



(10) 申请公布号 CN 103543268 A

(21) 申请号 201310484909.4

(22) 申请日 2013.10.16

(71) 申请人 北京华卫骥生物医药有限公司

地址 100054 北京市西城区白纸坊东街 10
号泰然居 B 座 11 层

(72)发明人 文德敏 申有长 于晓永

(74) 专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有限公司 11335

代理人 吳甘棠

(51) Int. Cl.

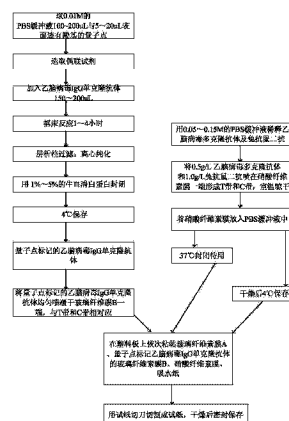
G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

检测乙脑病毒的方法及量子点标记免疫层析试纸及其制备方法

本发明涉及医学免疫检测方法,特别是涉及使用量子点标记免疫层析试纸,以免疫学的方法检测乙脑病毒的方法。一种量子点标记免疫层析试纸,在塑料板上从下到上依次粘贴有玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;其中,所述硝酸纤维素膜一端有乙脑病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗,以此形成检测带 T 和质控带 C;所述量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的另一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于进样点一端。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种检测方法的检测灵敏度高 1000 倍左右。



1. 一种量子点标记免疫层析试纸,其特征在于,设有塑料板、硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、吸水纸;

其中,所述塑料板上从下到上依次粘贴有玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

其中,所述硝酸纤维素膜一端有乙脑病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗,以此形成检测带 T 和质控带 C;

其中,所述量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于进样点一端。

2. 如权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸,其特征在于,所述量子点为 CdTe/ZnSe 核壳量子点。

3. 如权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸,其特征在于,所述塑料板为粘性 PVC 底板。

4. 如权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸,其特征在于,所述乙脑病毒多克隆抗体的浓度为 0.5g/L。

5. 如权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸,其特征在于,所述兔抗鼠二抗的浓度为 1.0g/L。

6. 如权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸,其特征在于,所述检测带 T 和质控带 C 间距不少于 5mm。

7. 如上任意一项权利要求所述的量子点标记免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 量子点与乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的偶联:

取 0.01M 的 PBS 缓冲液 100 ~ 200uL 与 5 ~ 20uL 表面连有羧基的量子点;

选取偶联试剂;

加入乙脑病毒 IgG 单克隆抗体 150 ~ 200uL;

摇床反应 1 ~ 4 小时;

层析柱过滤,离心纯化;

用 1% ~ 5% 的牛血清白蛋白封闭;

4℃保存;

(2) 试纸的制备:

用 0.05 ~ 0.15M 的 PBS 缓冲液稀释乙脑病毒多克隆抗体及兔抗鼠二抗,将 0.5g/L 乙脑病毒多克隆抗体和 1.0g/L 兔抗鼠二抗喷在硝酸纤维素膜一端,形成检测带 T 和质控带 C, T 带和 C 带间隔 5mm,室温晾干,将硝酸纤维素膜放入 PBS 缓冲液中,37℃封闭待用,或者干燥后 4℃保存;

将量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体均匀喷覆于玻璃纤维膜 B 一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于进样点一端,室温干燥,4℃保存;

在塑料板上依次粘帖玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

用试纸切刀切割成试纸,干燥后密封保存。

8. 如权利要求 7 所述的量子点标记免疫层析试纸的制备方法,其特征在于,步骤(1)中的偶联试剂选自羟基硫代琥珀酸亚胺、1-(3-二甲基氨丙基)-3-乙基碳二胺盐酸盐。

9. 用权利要求 1-6 任意一项所述的试纸检测乙脑病毒,其特征在于,包括如下步骤:将样品点样在组装好的试纸上接近乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的一端,反应 5min 后,在紫外分析仪中观察结果。

检测乙脑病毒的方法及量子点标记免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫检测方法,特别是涉及使用量子点标记免疫层析试纸,以免疫学的方法检测乙脑病毒的方法。

背景技术

[0002] 乙脑病毒于 1935 年首先在日本患者脑组织中分离获得,因此又称日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus,JEV),为球形单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科黄病毒属,直径 20 ~ 30nm,内有衣壳蛋白与核酸构成的核心,外披以含脂质的囊膜,表面有囊膜糖蛋白刺突,即病毒血凝素,囊膜内尚有内膜蛋白,参与病毒的装配,乙脑病毒基因组全长 11kb,自 5' 至 3' 端依次编码结构蛋白 C、M、E 以及非结构蛋白 NS1—NS5。当人体被带病毒的蚊虫叮咬后,病毒即进入血液循环中。发病与否,一方面取决于病毒的毒力与数量,另一方面取决于机体的反应性及防御机能。如果已经接种过乙脑疫苗,体内存在一定数量的抗体,此时人体抗体能力较强,病毒即被消灭,不发病或不表现临床症状。当人体抵抗力较弱,而感染病毒量大,毒力强时,病毒经血循环即可突破血脑屏障侵入中枢神经系统,并在神经细胞内复制增殖,导致中枢神经系统广泛病变。不同的神经细胞对病毒感受不同,以及脑组织在高度炎症时引起的缺氧、缺血、营养障碍等,造成中枢病变部位不平衡,如脑膜病变较轻,脑实质病变较重;间脑、中脑病变重,脊髓病变轻。

[0003] 目前,常用的检测方法为胶体金法,此法虽然检测快速简便,容易操作,但是准确率较低,灵敏度也较低。因此寻求一种价格便宜、操作简便、灵敏度和特异性都较高的检测方法是迫切需要解决的问题。

发明内容

[0004] 针对上述技术的不足之处,本发明提供一种价格便宜、操作简便、灵敏度和特异性都较高的检测试纸以及用该试纸检测乙脑病毒的方法。

[0005] 一种量子点标记免疫层析试纸,设有塑料板、硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、吸水纸;

[0006] 其中,所述塑料板上依次粘贴有玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

[0007] 其中,所述硝酸纤维素膜一端有乙脑病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗,以此形成检测带 T 和质控带 C;

[0008] 其中,所述量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于进样点一端。

[0009] 优选的,所述量子点为 CdTe/ZnSe 核壳量子点。

[0010] 优选的,所述塑料板为粘性 PVC 底板。

[0011] 优选的,所述乙脑病毒多克隆抗体的浓度为 0.5g/L。

- [0012] 优选的,所述兔抗鼠二抗的浓度为 1.0g/L。
- [0013] 优选的,所述检测带 T 和质控带 C 间距不少于 5mm。
- [0014] 如上所述的试纸的制备方法,包括如下步骤:
- [0015] (1) 量子点与乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的偶联:
- [0016] 取 0.01M 的 PBS 缓冲液 100 ~ 200uL 与 5 ~ 20uL 表面连有羧基的量子点;
- [0017] 选取偶联试剂,偶联试剂选自羟基琥珀酸亚胺、1-(3-二甲基氨丙基)-3 乙基碳二胺盐酸盐;
- [0018] 加入乙脑病毒 IgG 单克隆抗体 150 ~ 200uL;
- [0019] 摇床反应 1 ~ 4 小时;
- [0020] 层析柱过滤,离心纯化;
- [0021] 用 1% ~ 5% 的牛血清白蛋白封闭;
- [0022] 4℃保存;
- [0023] (2) 试纸的制备:
- [0024] 用 0.05 ~ 0.15M 的 PBS 缓冲液稀释乙脑病毒多克隆抗体及兔抗鼠二抗,将 0.5g/L 乙脑病毒多克隆抗体和 1.0g/L 兔抗鼠二抗喷在硝酸纤维素膜一端,形成检测带 T 和质控带 C,T 带和 C 带间隔 5mm,室温晾干,将硝酸纤维素膜放入 PBS 缓冲液中,37℃封闭待用,或者干燥后 4℃保存;
- [0025] 将量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体均匀喷覆于玻璃纤维膜 B 一端,与形成的 T 带和 C 带相对应,室温干燥,4℃保存;
- [0026] 在塑料板上依次粘帖玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;
- [0027] 用试纸切刀切割成试纸,干燥后密封保存。
- [0028] 用所述的试纸检测乙脑病毒,包括如下步骤:将样品点样在组装好的试纸上接近乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的一端,反应 5min 后,在紫外分析仪中观察结果。
- [0029] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:由于在所制备的试纸中加入了核壳量子点,特别是采用了 CdTe/ZnSe 水溶性核壳量子点,将水溶性的量子点与特异性的通过共价偶联,然后利用双抗夹心原理结合量子点的荧光性质检测样品中是否含有目标物。在紫外灯的照射下,通过观察免疫层析试纸条上检测带和质控带的荧光线,判断检测结果。本发明将免疫反应的高特异性和量子点的荧光特性相结合,利用量子点多波长激发,高强度荧光发射,发射峰窄,峰形对称,发光稳定性好的荧光特性,建立了快速,特异,简便,灵敏的免疫层析检测方法。通过观察荧光信号达到了定量检测的目的。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种快速检测方法-胶体金的检测灵敏度高约 1000 倍左右。

附图说明

- [0030] 图 1 为试纸制备的工艺流程图。

具体实施方式

- [0031] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明。
- [0032] 实施例 1:一种量子点标记免疫层析试纸,设有塑料板、硝酸纤维素膜、玻璃纤维

素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、吸水纸,所述玻璃纤维素膜 A 为没有点样的市场上购买的玻璃纤维素膜;

[0033] 其中,所述塑料板上依次粘贴有玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

[0034] 其中,所述硝酸纤维素膜一端有乙脑病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗,以此形成检测带 T 和质控带 C;

[0035] 其中,所述量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于玻璃纤维素膜 B 的一端,与检测带 T 和质控带 C 相对应,并且量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体位于进样点一端。

[0036] 优选的,所述量子点为 CdTe/ZnSe 核壳量子点。

[0037] 优选的,所述塑料板为粘性 PVC 底板。

[0038] 优选的,所述乙脑病毒多克隆抗体的浓度为 0.5g/L。

[0039] 优选的,所述兔抗鼠二抗的浓度为 1.0g/L。

[0040] 优选的,所述检测带 T 和质控带 C 间距不少于 5mm。

[0041] 实施例 2:如上所述的试纸的制备方法,如图 1 所示,包括如下步骤:

[0042] (1) 量子点与乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的偶联:

[0043] 取 0.01M 的 PBS 缓冲液 100 ~ 200uL 与 5 ~ 20uL 表面连有羧基的量子点;

[0044] 选取偶联试剂,偶联试剂选自羟基硫代琥珀酸亚胺、1-(3-二甲基氨丙基)-3 乙基碳二胺盐酸盐;

[0045] 加入乙脑病毒 IgG 单克隆抗体 150 ~ 200uL;

[0046] 摇床反应 1 ~ 4 小时;

[0047] 层析柱过滤,离心纯化;

[0048] 用 1% ~ 5% 的牛血清白蛋白封闭;

[0049] 4℃ 保存;

[0050] (2) 试纸的制备:

[0051] 用 0.05 ~ 0.15M 的 PBS 缓冲液稀释乙脑病毒多克隆抗体及兔抗鼠二抗,将 0.5g/L 乙脑病毒多克隆抗体和 1.0g/L 兔抗鼠二抗喷在硝酸纤维素膜一端,形成检测带 T 和质控带 C,T 带和 C 带间隔 5mm,室温晾干,将硝酸纤维素膜放入 PBS 缓冲液中,37℃ 封闭待用,或者干燥后 4℃ 保存;

[0052] 将量子点标记的乙脑病毒 IgG 单克隆抗体均匀喷覆于玻璃纤维膜 B 一端,与 T 带和 C 带相对应,室温干燥,4℃ 保存;

[0053] 在塑料板上依次粘帖玻璃纤维素膜 A、量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的玻璃纤维素膜 B、硝酸纤维素膜、吸水纸;

[0054] 用试纸切刀切割成试纸,干燥后密封保存。

[0055] 其中,步骤(1)中偶联效果的检测方法如下:

[0056] 凝胶电泳法:采用 0.8 琼脂糖凝胶,电压为 80V,电泳 15min 后,在紫外分析仪中观察电泳结果。

[0057] 斑点印迹法:将 0.3g/L 乙脑病毒 -BSA 液点在硝酸纤维素膜上,晾干后浸泡于含 5%BSA 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,10nmol/L,PH=7.4,含 NaCl8.5g/L)中,封闭膜上剩余的蛋白结合位点,于 37℃ 孵育 1h,封闭后取出,PBS 洗涤。制备三个完全相同的乙脑病毒

印迹膜,晾干后分别放入量子点标记乙脑病毒 IgG 单克隆抗体,量子点-BSA 及量子点溶液,于 37℃摇床反应 30min,PBS 洗涤。紫外分析仪中观察结果。

[0058] 实施例 3:用所述的试纸检测乙脑病毒 IgG 单克隆抗体,包括如下步骤:将样品点在组装好的试纸上接近乙脑病毒 IgG 单克隆抗体的一端,反应 5min 后,在紫外分析仪中观察结果。用 PBS 缓冲液及正常人的血液设为空白对照。

[0059] 结果判定:在 C 带显现红色荧光带的前提下,目视 T 带的荧光带强度,与空白对照,荧光越弱,代表待测液中含被检物的浓度越低。

[0060] 实施例 4:试纸检测有效性验证,配制四种浓度的乙脑病毒溶液,浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0ug/L。利用检测试纸和化学发光试纸盒对样本进行检测,每个浓度检测 6 次,测定试纸检出结果的有效性。如表一所示,结果表明用本发明制备的试纸检测出来的呈现阳性,并且溶液浓度越大荧光强度越大。

[0061] 表一:各种浓度乙脑病毒的试纸条检测结果

[0062]

	对照组		实验组乙脑病毒 IgG 溶液 (ug/L)			
	水	PBS 溶液	0.5	1.0	2.0	5.0
1	C+ , T—	C+ , T—	C+ , T+	C+ , T++	C+ , T+++	C+ , T++++
2	C+ , T—	C+ , T—	C+ , T+	C+ , T++	C+ , T+++	C+ , T++++
3	C+ , T—	C+ , T—	C+ , T+	C+ , T++	C+ , T+++	C+ , T++++
4	C+ , T—	C+ , T—	C+ , T+	C+ , T++	C+ , T+++	C+ , T++++
5	C+ , T—	C+ , T—	C+ , T+	C+ , T++	C+ , T+++	C+ , T++++
6	C+ , T—	C+ , T—	C+ , T+	C+ , T++	C+ , T+++	C+ , T++++
Note: — 表示隐形, +表示阳性, +越多, 荧光强度越大						

[0063] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,举凡熟悉此项技艺的专业人士在了解本发明的技术手段之后,自然能依据实际的需要在本发明的教导下加以变化。因此凡依本发明申请专利范围所作的同等变化与修饰,曾应仍属本发明专利涵盖的范围内。

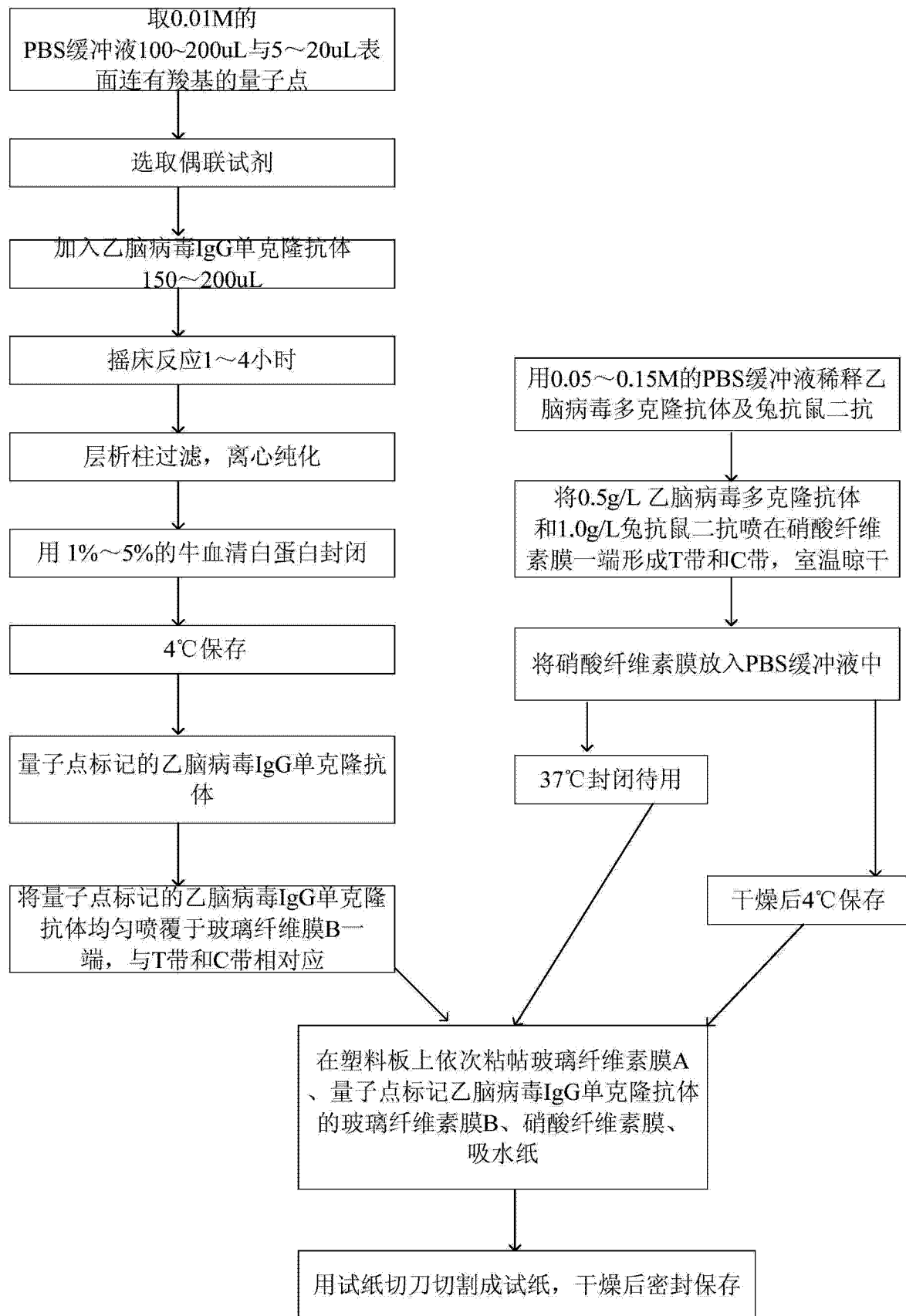


图 1

专利名称(译)	检测乙脑病毒的方法及量子点标记免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN103543268A	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201310484909.4	申请日	2013-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京华卫骥生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华卫骥生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京华卫骥生物医药有限公司		
[标]发明人	文德敏 申有长 于晓永		
发明人	文德敏 申有长 于晓永		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/577 G01N33/588 G01N2333/185		
其他公开文献	CN103543268B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学免疫检测方法，特别是涉及使用量子点标记免疫层析试纸，以免疫学的方法检测乙脑病毒的方法。一种量子点标记免疫层析试纸，在塑料板上从下到上依次粘贴有玻璃纤维素膜A、量子点标记乙脑病毒IgG单克隆抗体的玻璃纤维素膜B、硝酸纤维素膜、吸水纸；其中，所述硝酸纤维素膜一端有乙脑病毒多克隆抗体和兔抗鼠二抗，以此形成检测带T和质控带C；所述量子点标记的乙脑病毒IgG单克隆抗体位于玻璃纤维素膜B的另一端，与检测带T和质控带C相对应，并且量子点标记的乙脑病毒IgG单克隆抗体位于进样点一端。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种检测方法的检测灵敏度高1000倍左右。

