



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105319359 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410405212. 8

(22) 申请日 2014. 08. 18

(71) 申请人 董俊

地址 432800 湖北省孝感市大悟县城关镇长
征路 8 号湖北华龙生物制药有限公司

(72) 发明人 胡征 杨波 董俊

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 余晓雪 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

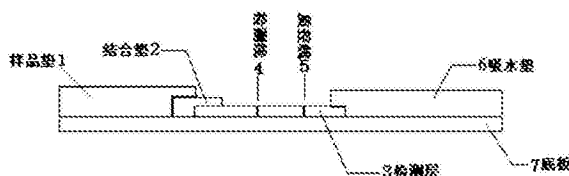
权利要求书4页 说明书15页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法
和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用,该检测卡包括底板、样品垫、吸水垫、结合垫和检测层;结合垫包被有量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针;检测层是由带有一条检测线以及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;检测线包被有鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体;质控线包被有抗兔 IgG;检测层粘贴在底板上;结合垫和吸水垫分别设置在检测层两端部上方且与检测层部分重叠后分别与检测层和底板粘贴;样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴。本发明具有操作简便、检测快速、可定量及高灵敏度等优点。



1. 一种人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡包括底板、样品垫、结合垫、检测层以及吸水垫;所述结合垫包被有量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针;所述检测层是由带有一条检测线及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;所述检测线包被有鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体;所述质控线包被有抗兔 IgG;所述检测层粘贴在底板上;所述结合垫以及吸水垫分别设置在检测层两端部的上方且与检测层部分重叠后分别与检测层以及底板粘贴在一起;所述样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴在一起。

2. 根据权利要求 1 所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述抗兔 IgG 包括但不限于羊抗兔 IgG。

4. 根据权利要求 3 所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述检测层长 2cm,所述检测层粘贴在长度是 6.6-7.7cm 的底板表面中间段;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 2.5-3cm 的吸水垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 0.5-0.8cm 的结合垫重叠 0.2-0.4cm;所述结合垫与粘贴在结合垫以及底板上的长度是 2.5cm 的样品垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测线与质控线的间距是 0.5-0.8cm;所述底板的宽度是 0.3-0.5cm。

5. 根据权利要求 4 所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述吸水垫是吸水滤纸;所述底板是 PVC 板。

6. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

1) 结合垫的制备:

1.1) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1) 对人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白进行生物信息学分析,分别获取人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的基因序列;

1.1.2) 在步骤 1.1.1) 中所得到的基因序列的 5' 端及 3' 端分别引入酶切位点并分别化学合成全基因序列,同时标记记为 PspA1、PspA2;

1.1.3) 将步骤 1.1.2) 中所得到的 PspA1、PspA2 按分子生物学方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后转入大肠杆菌中表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白;所述重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白均以可溶性表达形式存在于基因工程菌体中;

1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.3) 所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,再以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整二种蛋白浓度均为 0.2mg/mL 后备用;

1.2) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

1.2.1) 以步骤 1.1.4) 中所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清;所述兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗重组人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清

的间接 ELISA 效价均大于 1×10^5 ;

1. 2. 2) 采用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清中的多克隆抗体 IgG ;

1. 2. 3) 用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定步骤 1. 2. 2) 所得到的四种多克隆抗体 IgG 的浓度, 将其蛋白浓度均调整为 3mg/mL 后备用 ;

1. 3) 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备与纯化 :

1. 3. 1) 向微量离心管中依次加入 4nmol 量子点、600nmol N- 羟基琥珀酰亚胺和 600nmol 碳二亚胺, 以磷酸盐缓冲液定容为 2ml, 于旋转混合仪中, 以 15rpm/min, 37°C 反应 30min 后, 透析去除过量的 N- 羟基琥珀酰亚胺以及碳二亚胺 ; 所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为 : 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠 ; 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7. 3 ;

1. 3. 2) 在活化的量子点中, 加入 4-16nmol 的步骤 1. 2) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG, 避光反应 2h, 加入端氨基化聚乙二醇至终浓度为 1. 5%, 封闭未反应的活化羧基位点, 继续避光反应 1h ; 用 0. 2 μ m PES 滤器过滤除去抗体聚集物, 然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min, 除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物 ; 收集超滤管滤膜上层量子点 - 抗体偶联物溶液, 溶于 2ml 磷酸盐洗涤液中, 再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min, 收集超滤管滤膜上层量子点 - 抗体偶联物溶液, 溶于 1ml 磷酸盐保存液中, 至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG ;

所述磷酸盐洗涤液中各组分含量分别为 : 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、5ml/L 吐温 -20 以及 1g/L 叠氮钠 ; 所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7. 3 ; 所述磷酸盐保存液中各组分含量分别为 : 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、10g/L BSA 以及 1g/L 叠氮钠 ; 所述磷酸盐保存液的 pH = 7. 3 ;

1. 3. 3) 按照与步骤 1. 3. 1) 以及步骤 1. 3. 2) 相同的方法, 利用步骤 1. 2) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG ;

1. 3. 4) 将上述含量量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液与含量量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液按体积比 1 : 1 混合, 即制得量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针, 备用 ;

1. 4) 量子点标记抗体的负载 :

将聚酯纤维膜浸入步骤 1. 3. 4) 所得到的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针溶液中 1h, 取出, 25°C 干燥后 4°C 密封保存备用, 至此制得结合垫 ;

2) 样品垫的制备 :

取玻璃纤维素膜一张, 将玻璃纤维素膜在样品垫处理液中浸泡至少 3h 以上, 再置于生物安全柜内 37°C 通风干燥后, 25°C 密封干燥保存 ; 至此制得样品垫 ;

所述样品垫处理液中各组分含量分别为 : 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、20g/L 牛血清白蛋白、10ml/L 吐温 -20、20g/L 蔗糖以及 5g/L 聚乙烯吡咯烷酮 ; 所述样品垫处理液的 pH = 7. 3 ;

3) 检测层的制备 :

3.1) 将步骤 1.2.3) 中制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液与鼠抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液按体积比 1:1 混合, 制得鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体后备用;

3.2) 将步骤 3.1) 制备的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液均调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL 后备用; 所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为: 2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠, 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.3;

3.3) 将稀释好的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上, 形成检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5 μ l/cm 的量按照与检测线 0.5-0.8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线;

3.4) 将喷有检测线以及质控线的硝酸纤维素膜在 37°C 干燥 2h, 4°C 密封干燥保存; 至此制得检测层;

4) 底板的制备

将 PVC 材质的底板按实际要求裁剪后备用;

5) 吸水垫的制备

将吸水滤纸按实际要求裁剪后备用;

6) 人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的组装:

6.1) 将步骤 4) 所制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉;

6.2) 将步骤 3) 所制备得到的检测层粘贴到底板的中部区域, 并抹平膜面;

6.3) 将步骤 5) 所制备得到的吸水垫组装到底板上, 使吸水垫的左边与检测层有部分重叠, 同时将其右边缘与底板的右边缘对齐粘好并抹平;

6.4) 将步骤 1) 所制备得到的结合垫按部分重叠的方式重叠于硝酸纤维素膜的左边缘处, 同时将结合垫粘于底板上;

6.5) 将步骤 2) 所制备得到样品垫则按部分重叠的方式重叠于结合垫的左边缘处, 另一边与底板的左边缘对齐, 粘于底板上并抹平;

6.6) 将组装好的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡进行裁剪, 4°C 密封干燥避光保存;

所述步骤 6.1) 至步骤 6.6) 均是在生物安全柜内进行操作。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于: 所述步骤 1.3.2) 中加入 12nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG;

所述步骤 3.2) 中将步骤 3.1) 制备的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为 1.5-2.0mg/mL 以及 0.5-1.5mg/mL;

所述步骤 3.3) 中, 将稀释好的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 1.0-2.0 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上, 形成检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 1.0-2.0 μ l/cm 的量按照与检测线 0.5-0.8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线。

8. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡作为非诊断性检测人肺炎链球菌的应用。

9. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的非诊断性检测方法,其特征在于:所述检测方法包括以下步骤:

1) 将待检样品用 500 μ l 的样品处理液充分溶解后,取出 120 μ l 滴于检测卡的样品垫上,15 分钟后于紫外灯下观察检测结果;所述样品处理液中各组分含量分别为:磷酸氢二钠 2.9g/L、磷酸二氢钠 0.295g/L、Triton x-100 10mL/L 以及氯化钠 2g/L,所述样品处理液的 pH = 7.3;

2) 若待检样品中含有人肺炎链球菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线;

若待检样品中无人肺炎链球菌抗原,则仅出现一条荧光质控线;若荧光质控线未出现,则该检测卡失效。

10. 根据权利要求 9 所述的非诊断性检测方法,其特征在于:所述待检样品是包括但不限于咽拭子。

人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,具体为一种人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 人肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp) 是儿童呼吸道感染的重要病原体。主要经飞沫传播而进入呼吸道,从而寄生于人体的鼻咽部,或侵入人体不易清除的部位引起一系列的疾病,如大叶性肺炎,脑膜炎,支气管炎,中耳炎等。它是全球所有年龄组高发病率和病死率的主要病原菌。其中,在发展中国家,婴幼儿、老年人及免疫缺陷人群中尤为严重。肺炎链球菌于 1881 年首次由巴斯德 (Louis Pasteur) 及 G. M. Sternberg 分别在法国及美国从患者痰液中分离出。其为革兰氏染色阳性,菌体似矛头状,成双或成短链状排列的双球菌,有毒株菌体外有化学成分为多糖的荚膜。其荚膜具有抗原性,是肺炎链球菌分型的依据。根据荚膜多糖抗原性的不同将肺炎球菌分为 91 个血清型。其菌体抗原主要为 C 多糖,其存在于肺炎链球菌细胞壁中,具有种特异性,为各型菌株所共有。C 多糖可被血清中 C- 反应蛋白沉淀。在钙离子存在时,C 多糖可与正常人血清中称为 C- 反应蛋白 (C reactive protein, CRP) 的 β 球蛋白结合,发生沉淀。目前针对人肺炎链球菌抗原的检测亦主要是针对此抗原,而该抗原非肺炎链球菌独有,如缓和链球菌亦含有该抗原。在肺炎链球菌表面还有一种与毒力相关的重要抗原,为肺炎链球菌表面蛋白 A (PspA),其存在于所有肺炎链球菌血清型中,是肺炎链球菌的特异性抗原。但是 PspA 分子结构高度变异,具有抗原多样性,其富含脯氨酸的结构域上游被称为 CDR 域,具有多样性。根据 CDR 域的不同将 PspA 分为 3 个家族 6 亚类:Clade1, Clade2, Clade3, Clade4, Clade5, Clade6。其中 Clade1, Clade2 属于 Fam1 家族;Clade3, Clade4, Clade5 属于 Fam2 家族, Clade6 属于 Fam3 家族。具有 Fam1 或 Fam2 家族 PspA 蛋白的人肺炎链球菌占到了临床分离的人肺炎链球菌种类的 99% 以上。研究表明同一家族亚类间 PspA 蛋白间存在广泛的抗原抗体交叉反应,而异家族亚类间则无此交叉反应。

[0003] 临床病人由于不同的呼吸道病原体(如肺炎支原体、流感嗜血杆菌、流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒等)感染引起疾病症状可以十分相似,这导致了流行诊断比较困难,确诊往往依赖于实验室诊断。快速有效的诊断方法应该是在疾病的发病初期就可以得到明确的诊断,便于实施针对性的治疗,阻止病情的发展迁延。

[0004] 尽管肺炎链球菌在全球范围内传播,婴幼儿的感染尤其普遍,但可用于实验室诊断的标准化商品试剂的种类极少。目前,肺炎链球菌的检测主要有以下几种方法:

[0005] 一、常规实验室检测

[0006] 1、细菌分离

[0007] 实验室诊断肺炎链球菌的金标准是分离人肺炎链球菌毒株。采用鼻咽分泌物作为病原体分离的标本,可以用血培养的方法分离病原体。但是该法有严重的缺陷,因为肺炎链球菌是苛养菌,营养要求高,培养所需时间长,阳性率低,更重要的是,若采样前患者使用过

抗菌药物,会造成培养结果的假阳性。这样在临床方面对病人的治疗就有一定的局限性。

[0008] 2、血清学检测

[0009] 即采用酶联免疫法、放免法、微量免疫荧光法等,检测被检者血清中肺炎链球菌抗体水平,可间接提示肺炎链球菌感染的存在。然而,血清学试验只能提供一种回顾性的诊断,它需要同时检测患者急性期和恢复期的双份血清,如果恢复期中抗人肺炎链球菌抗体效价比急性期高 4 倍或 4 倍以上才有诊断意义。另外,抗体出现的时机不易掌握,且因为菌体血清型种类过多,导致其诱生的抗荚膜多糖抗体种类过多,对抗体的检测造成了很大的困难,故现有血清学方法的检测质量受到一定限制。

[0010] 二、快速诊断

[0011] 直接检查人肺炎链球菌蛋白抗原和菌体核酸可达到快速诊断的目的,目前主要有免疫荧光法、免疫酶法和 PCR 法等。免疫荧光法和免疫酶法均不能进行一步检测,均存在操作步骤复杂,需要专业人员操作,检测时间长(2h 以上),成本较高等缺点。PCR 方法快速、灵敏、特异,是目前研究肺炎链球菌感染的重要手段,但由于 PCR 对实验设备以及操作要求较高,且易出现假阳性,在我国还不能作为常用的临床诊断方法。目前,检测人肺炎链球菌抗原的方法主要为胶体金法检测其 C 多糖抗原,但是胶体金法敏感度较低,对待检样品材料质量要求较高,同时还存在与其他链球菌如缓和链球菌存在交叉反应等缺陷。因此,建立具备高灵敏度的人肺炎链球菌特异性抗原快速诊断法十分必要。

发明内容

[0012] 本发明针对背景技术中现存的几种人肺炎链球菌在检测方式中遇到的技术瓶颈,提出了一种具有操作简便、检测快速、可定量及高灵敏度等优点的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

[0013] 本发明的目的是通过以下技术手段来实现的:

[0014] 一种人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡包括底板、样品垫、结合垫、检测层以及吸水垫;所述结合垫包被有量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针;所述检测层是由带有一条检测线及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;所述检测线包被有鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体;所述质控线包被有抗兔 IgG;所述检测层粘贴在底板上;所述结合垫以及吸水垫分别设置在检测层两端部的上方且与检测层部分重叠后分别与检测层以及底板粘贴在一起;所述样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴在一起。

[0015] 作为优选,本发明所采用的量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点。

[0016] 作为优选,本发明所采用的抗兔 IgG 包括但不限于羊抗兔 IgG。

[0017] 作为优选,本发明所采用的检测层长 2cm,所述检测层粘贴在长度是 6.6-7.7cm 的底板表面中间段;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 2.5-3cm 的吸水垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 0.5-0.8cm 的结合垫重叠 0.2-0.4cm;所述结合垫与粘贴在结合垫以及底板上的长度是 2.5cm 的样品垫重叠 0.2-0.4cm;所述检测线与质控线的间距是 0.5-0.8cm;所述底板的宽度是 0.3-0.5cm。

[0018] 作为优选,本发明所采用的吸水垫是吸水滤纸;所述底板是 PVC 板。

[0019] 一种基于上述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

[0020] 1) 结合垫的制备:

[0021] 1.1) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化:

[0022] 1.1.1) 对人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白进行生物信息学分析,分别获取人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的基因序列;

[0023] 1.1.2) 在步骤 1.1.1) 中所得到的基因序列的 5' 端及 3' 端分别引入酶切位点并分别化学合成全基因序列,同时标记记为 PspA1、PspA2;其序列参见序列表;

[0024] 1.1.3) 将步骤 1.1.2) 中所得到的 PspA1、PspA2 按分子生物学方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后转入大肠杆菌中表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白;所述重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白均以可溶性表达形式存在于基因工程菌体中;

[0025] 1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.3) 所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,再以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整二种蛋白浓度均为 0.2mg/mL 后备用;

[0026] 1.2) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

[0027] 1.2.1) 以步骤 1.1.4) 中所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清;所述兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗重组人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清的间接 ELISA 效价均大于 1×10^5 ;

[0028] 1.2.2) 采用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清中的多克隆抗体 IgG;

[0029] 1.2.3) 用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定步骤 1.2.2) 所得到的四种多克隆抗体 IgG 的浓度,将其蛋白浓度均调整为 3mg/mL 后备用;

[0030] 1.3) 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备与纯化:

[0031] 1.3.1) 向微量离心管中依次加入 4nmol 量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺和 600nmol 碳二亚胺,以磷酸盐缓冲液定容为 2ml,于旋转混合仪中,以 15rpm/min,37°C 反应 30min 后,透析去除过量的 N-羟基琥珀酰亚胺以及碳二亚胺;所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为:2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠;所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.3;

[0032] 1.3.2) 在活化的量子点中,加入 4-16nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG,避光反应 2h,加入端氨基化聚乙二醇至终浓度为 1.5%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应 1h;用 0.2 μ m PES 过滤器过滤除去抗体聚集物,然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min,除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物;收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 2ml 磷酸盐洗涤液中,再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min,收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 1ml 磷酸盐保存液中,至

此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG；

[0033] 所述磷酸盐洗涤液中各组分含量分别为：2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、5ml/L 吐温-20 以及 1g/L 叠氮钠；所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7.3；所述磷酸盐保存液中各组分含量分别为：2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、10g/L BSA 以及 1g/L 叠氮钠；所述磷酸盐保存液的 pH = 7.3；

[0034] 1.3.3) 按照与步骤 1.3.1) 以及步骤 1.3.2) 相同的方法,利用步骤 1.2) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG；

[0035] 1.3.4) 将上述含量量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液与含量量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液按体积比 1:1 混合,即制得量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针,备用；

[0036] 1.4) 量子点标记抗体的负载：

[0037] 将聚酯纤维膜浸入步骤 1.3.4) 所得到的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针溶液中 1h,取出,25℃干燥后 4℃密封保存备用,至此制得结合垫；

[0038] 2) 样品垫的制备：

[0039] 取玻璃纤维素膜一张,将玻璃纤维素膜在样品垫处理液中浸泡至少 3h 以上,再置于生物安全柜内 37℃通风干燥后,25℃密封干燥保存；至此制得样品垫；

[0040] 所述样品垫处理液中各组分含量分别为：2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠、2g/L 氯化钠、20g/L 牛血清白蛋白 (BSA)、10ml/L 吐温-20、20g/L 蔗糖以及 5g/L 聚乙烯吡咯烷酮；所述样品垫处理液的 pH = 7.3；

[0041] 3) 检测层的制备：

[0042] 3.1) 将步骤 1.2.3) 中制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液与鼠抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液按体积比 1:1 混合,制得鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体后备用；

[0043] 3.2) 将步骤 3.1) 制备的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体与抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液均调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL 后备用；所述磷酸盐缓冲液中各组分含量分别为：2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠,所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.3；

[0044] 3.3) 将稀释好的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 0.8-2.5 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线；将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 0.8-2.5 μ l/cm 的量按照与检测线 0.5-0.8cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线；

[0045] 3.4) 将喷有检测线以及质控线的硝酸纤维素膜在 37℃干燥 2h,4℃密封干燥保存；至此制得检测层；

[0046] 4) 底板的制备

[0047] 将 PVC 材质的底板按实际要求裁剪后备用；

[0048] 5) 吸水垫的制备

[0049] 将吸水滤纸按实际要求裁剪后备用；

[0050] 6) 人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的组装：

- [0051] 6.1) 将步骤4)所制备得到的底板上的粘性保护膜揭掉；
- [0052] 6.2) 将步骤3)所制备得到的检测层粘贴到底板的中部区域,并抹平膜面；
- [0053] 6.3) 将步骤5)所制备得到的吸水垫组装到底板上,使吸水垫的左边与检测层有部分重叠,同时将其右边缘与底板的右边缘对齐粘好并抹平；
- [0054] 6.4) 将步骤1)所制备得到的结合垫按部分重叠的方式重叠于硝酸纤维素膜的左边缘处,同时将结合垫粘于底板上；
- [0055] 6.5) 将步骤2)所制备得到样品垫则按部分重叠的方式重叠于结合垫的左边缘处,另一边与底板的左边缘对齐,粘于底板上并抹平；
- [0056] 6.6) 将组装好的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡进行裁剪,4℃密封干燥避光保存；
- [0057] 所述步骤6.1)至步骤6.6)均是在生物安全柜内进行操作。
- [0058] 作为优选,本发明所采用的步骤1.3.2)中加入12nmol的步骤1.2)所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG；
- [0059] 作为优选,本发明所采用的步骤3.2)中将步骤3.1)制备的鼠抗人肺炎链球菌PspA蛋白多克隆抗体与抗兔IgG用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别为1.5-2.0mg/mL以及0.5-1.5mg/mL；
- [0060] 作为优选,本发明所采用的步骤3.3)中,将稀释好的鼠抗人肺炎链球菌PspA蛋白多克隆抗体装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0-2.0 μ l/cm的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔IgG装入BIODOT划膜仪喷头中,设置1.0-2.0 μ l/cm的量按照与检测线0.5-0.8cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上作为质控线。
- [0061] 一种基于上述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡作为非诊断性检测人肺炎链球菌的应用。
- [0062] 一种基于上述的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的非诊断性检测方法,其特征在于:所述检测方法包括以下步骤:
- [0063] 1) 将待检样品用500 μ l的样品处理液充分溶解后,取出120 μ l滴于检测卡的样品垫上,15分钟后于紫外灯下观察检测结果;所述样品处理液中各组分含量分别为:磷酸氢二钠2.9g/L、磷酸二氢钠0.295g/L、Triton x-100 10mL/L以及氯化钠2g/L,所述样品处理液的pH = 7.3；
- [0064] 2) 若待检样品中含有人肺炎链球菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎链球菌PspA蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔IgG结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线；
- [0065] 若待检样品中无人肺炎链球菌抗原,则仅出现一条荧光质控线;若荧光质控线未出现,则该检测卡失效。
- [0066] 作为优选,本发明所采用的待检样品是包括但不限于咽拭子。
- [0067] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:
- [0068] 1、本发明的检测人肺炎链球菌抗原的方法是将免疫层析与量子点标记技术综合起来,利用本发明制备的高效价、高特异性多克隆抗体,通过激发荧光来对样品进行检测,

具有灵敏度高的特点（如其对人肺炎链球菌临床流行耐药株 Sp6B、Sp19F、Sp23F 的检测底线分别为 2×10^4 CFU/ml, 1×10^4 CFU/ml 及 3×10^4 CFU/ml）。

[0069] 2、本发明所用的抗体均是识别人肺炎链球菌特异性 PspA 抗原胞外保守区的多克隆抗体，其特异性高，同时其较目前最广泛使用的单克隆抗体而言制备成本低廉，因此，本发明检测成本较低。

[0070] 3、本发明检测方法简单，检测快速，易于判定，结果判定在 20 分钟内完成，既可以用紫外检测仪进行定性检测，亦可结合 CCD 扫描等技术进行定量检测，检测成本低廉，克服了现有技术（如 ELISA）检测成本高、操作复杂繁琐、耗时长、且必需专业人员才能操作的不足。

[0071] 4、由于检测卡检测的是人肺炎链球菌抗原而非抗体（抗体的出现需要感染几天至几周以后），故该方法在人肺炎链球菌的早期临床诊断和防治、病原体亚型鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

[0072] 5、本发明检测方法所用的临床样本为呼吸道分泌物如痰液等，而非血液，可免除婴幼儿患者抽血检查的痛苦与家长的心理负担，故较易于推广。

附图说明

[0073] 图 1 是本发明所提供检测卡的纵向剖面结构示意图；

[0074] 图 2 是本发明所提供检测卡的在完成组装后的结构示意图；

[0075] 其中：

[0076] 1- 样品垫；2- 结合垫；3- 检测层；4- 检测线；5- 质控线；6- 吸水垫；7- 底板。

具体实施方式

[0077] 本发明的工作原理是：本发明是在免疫层析测定法（双抗体夹心）的前提下，以多克隆抗体为基础，采用量子点标记探针技术，通过量子点标记技术研制检测人肺炎链球菌抗原的量子点免疫层析检测卡。首先是兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体和鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体的制备、纯化以及量子点标记，其次为喷膜，然后将检测卡各组成成分进行组装，最后制备人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡。本发明所提供的检测卡具有敏感、快速和特异性好等特点，并且可定量检测，能进行样品的高通量筛查，具有较好的市场应用前景。

[0078] 如附图 1 所示，本发明所提供了一种人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡，包括样品垫 1、结合垫 2、检测层 3、吸水垫 6 及底板 7 组成。结合垫 2 上包被有量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针；检测层 3 是喷有检测线 4 以及质控线 5 的固相硝酸纤维素膜简称 NC 膜；检测线 4 包被有鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体；质控线 5 包被有抗兔 IgG；量子点为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点；吸水垫 6 材质为吸水滤纸；底板 7 材质为 PVC。

[0079] 其具体结构是：检测层长 2cm，检测层粘贴在长度是 6.6-7.7cm 的底板表面中间段；检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 2.5-3cm 的吸水垫重叠 0.2-0.4cm；检测层与粘贴在检测层以及底板上的且长度是 0.5-0.8cm 的结合垫重叠 0.2-0.4cm；结合垫与粘贴在结合垫以及底板上的长度是 2.5cm 的样品垫重叠 0.2-0.4cm；检测线与质控线间距

是 0.5-0.8cm ;底板的宽度是 0.3-0.5cm。

[0080] 其中,上述参数优选方案是:检测层 3 长 2cm,粘贴在底板 7 长 7.3cm 表面中间段,此检测层右端与粘贴在底板 7 右末端的吸水垫 6 长 3cm 重叠 0.2cm,其另一端与结合垫 2 长 0.6cm 重叠 0.3cm ;结合垫 2 则与粘贴在底板 7 左端的样品垫 (1) 长 2.5cm 重叠 0.3cm ;检测层 3 上的检测线 4 及质控线 5 间距 0.7cm。整条检测卡的宽度为 0.4cm。

[0081] 制备上述人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的方法,其主要步骤包括:

[0082] 一、结合垫的制备

[0083] (1) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化:

[0084] 对人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白进行生物信息学分析,分别获取人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的基因序列;在此二基因序列的 5' 端及 3' 端分别引入酶切位点并分别化学合成全基因序列,同时标记记为 PspA1、PspA2。其基因序列分别参见序列列表。将该两段基因序列按常规方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白。此二融合蛋白均以可溶性表达形式存在于基因工程菌体中。用镍柱分别纯化基因工程菌体中的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,再以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整二种蛋白浓度均为 0.2mg/mL 后备用;

[0085] (2) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

[0086] 以纯化的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白为完全抗原,按常规方法免疫新西兰大白兔及豚鼠,分别制备兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白抗血清。该四种抗血清的间接 ELISA 效价均大于 1×10^5 ,用 Protein G 亲和层析柱分别纯化四种抗血清中的多克隆抗体 IgG,用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并均调整为 3mg/mL 后备用。其中兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 用作量子点标记试验;鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 用作检测线的包被。

[0087] (3) 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备与纯化

[0088] 其操作步骤如下:向微量离心管中依次加入 4nmol 量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和 600nmol 碳二亚胺 (EDC),以磷酸盐缓冲液 (2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,pH 7.3) 定容为 2ml,于旋转混合仪中,以 15rpm/min,37°C 反应 30min 后,透析去除过量的活化剂 (sulfo-NHS 与 EDC)。在活化的量子点中,加入 4-16nmol (优选为 12nmol) 的步骤 (2) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG,避光反应 2h,加入端氨基化聚乙二醇 (PEG2000-NH₂) 至终浓度为 1.5%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应 1h。用 0.2 μm PES 滤器过滤除去抗体聚集物,然后将滤液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min,除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物。收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 2ml 磷酸盐洗涤液 (2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,5ml/L 吐温-20,1g/L 叠氮钠,pH 7.3) 中,再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中,以 8000g 离心力在 4°C 下离心 15min,收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于 1ml 磷酸盐保存液 (2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,10g/L BSA,1g/L 叠氮钠,pH 7.3) 中,制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。

[0089] 按照上述相同方法,用步骤(2)所制备的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。将上述二种量子点标记的多克隆抗体 IgG 按体积比 1:1 混合,即制得量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针,备用。

[0090] (4) 量子点标记抗体的负载

[0091] 将聚酯纤维膜浸入步骤(3)所得到的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针溶液中 1h,取出,25℃干燥后裁成 4cm*0.6cm 的规格后 4℃密封保存备用,至此制得结合垫。

[0092] 二、样品垫的制备

[0093] 取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,20g/L 牛血清白蛋白(BSA),10ml/L 吐温-20,20g/L 蔗糖,5g/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10),pH 7.3)中浸泡至少 3h 以上,再置于生物安全柜内 37℃通风干燥后,剪裁成 4cm*2.5cm 的规格,25℃密封干燥保存。至此制得样品垫。经试验证实玻璃纤维素膜经该方法处理后,显著地提高了量子点标记抗体的释放率。

[0094] 三、检测层的制备

[0095] 检测层的制备,是通过分别将由步骤一中所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用专用的喷膜机在硝酸纤维素膜上形成检测线和控制线;其具体制备方法包括如下步骤:

[0096] 将步骤一中制备的含鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液与含鼠抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液按体积比 1:1 混合,制得鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 后备用;分别将上述鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,2g/L 氯化钠,pH 7.3)均调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL,其中鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 优选的稀释终浓度为 1.5-2.0mg/mL,抗兔 IgG 优选的稀释终浓度为 0.5-1.5mg/mL。将稀释好的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 0.8-2.5 μ l/cm,优选为 1.0-2.0 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线;将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 0.8-2.5 μ l/cm,优选为 1.0-2.0 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,其与检测线间距为 0.7cm。将喷好的硝酸纤维素膜 37℃干燥 2h,剪裁成 4cm*4cm 的规格,4℃密封干燥保存。至此制得检测层。

[0097] 四、底板的加工

[0098] 将 PVC 材质的底板裁剪成 4cm*7.3cm 的规格后备用。

[0099] 五、吸水垫的制备

[0100] 将吸水滤纸裁剪成 4cm*3cm 的规格,即制成吸水垫,备用。

[0101] 六、检测卡的组装

[0102] 组装工作于生物安全柜内操作,首先将步骤四所述的底板上的粘性保护膜揭掉,将上文步骤三所述的检测层(即带有 1 条质控线和 1 条检测线的硝酸纤维素膜)粘贴到底板的中部区域,并小心抹平膜面。其次,将上文步骤五所述的吸水垫组装到底板上,使其左边与检测层有 0.2cm 的重叠,同时将其右边缘与底板的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将上文步骤一所述的结合垫按 0.3cm 重叠于硝酸纤维素膜的左边缘处,0.3cm 粘于底板上。最后将上文步骤二所述的样品垫则按一边 0.3cm 重叠于结合垫的左边缘处,另一边与底板的

左边缘对齐,粘于底板上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下载成 4.0mm 宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。至此制得人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡。

[0103] 上述人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的使用方法,步骤如下:

[0104] 将待检样品(如咽拭子等)用 500 μ l 的样品处理液(2.9g/L 磷酸氢二钠,0.295g/L 磷酸二氢钠,10mL/L Triton x-100,2g/L 氯化钠,pH 7.3)充分溶解后,取出 120 μ l 滴于检测卡的样品垫上,15 分钟后于紫外灯下观察检测结果。若待检样品中含有人肺炎链球菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若待检样品中无相关抗原,则仅出现一条荧光质控线。如果荧光质控线未出现,则该检测卡失效。

[0105] 本发明所需的羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点可到例如武汉珈源量子点技术开发有限公司等专业性公司购买;所需的 PVC 材质底板、吸水滤纸、硝酸纤维素膜、聚酯纤维膜、玻璃纤维素膜等可到 Millipore 及上海金标生物科技有限公司等专业性公司购买,所需的其他常规仪器、设备、生化药品均有市售。

[0106] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0107] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0108] 1、样品垫处理液:称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,2g 牛血清白蛋白(BSA),1ml 吐温-20,2g 蔗糖,0.5g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10),溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0109] 2、磷酸盐洗涤液:称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,0.5ml 吐温-20,0.1g 叠氮化钠,溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0110] 3、磷酸盐保存液:称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,1g 牛血清白蛋白(BSA),0.1g NaN_3 ,溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0111] 4、磷酸盐缓冲液(PBS):称取 0.29g 磷酸氢二钠,0.0295g 磷酸二氢钠,0.2g 氯化钠,溶解于 90ml 的去离子水中,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.3 后用去离子水定容至 100ml。

[0112] 5、兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG:为本发明自制,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 3mg/ml。

[0113] 6、兔抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG:为本发明自制,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 3mg/ml。

[0114] 7、鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG:为本发明自制,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 3mg/ml。

[0115] 8、鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG:为本发明自制,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 3mg/ml。

[0116] 9、羊抗兔 IgG:为博士德公司产品,用 PBS 稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体浓度为 1mg/ml。

[0117] 10、量子点:本发明中所用量子点为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量

子点,其发射波长为 565nm,购买自武汉珈源量子点技术开发有限公司,产品名称为羧基水溶性量子点-565。

[0118] 11、玻璃纤维素膜:厚度为 0.4mm,吸水量为 42mg/cm²,玻璃纤维直径为 0.6-3 μm,具有良好的亲水性,购买于上海金标生物科技有限公司(型号为 BT40)。

[0119] 12、聚酯纤维膜:厚度为 0.48mm,吸水速度为 18s/4cm,具有极好的亲水性,用于结合垫的制备,购买于上海金标生物科技有限公司(型号为 DL42)。

[0120] 13、硝酸纤维素膜:型号为 Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于 Millipore 公司。

[0121] 14、吸水滤纸:厚度为 0.95mm,吸水速度为 60s/4cm,吸水量为 700mg/cm²,具有良好的吸水性,作为制作吸水垫的材料。购买于上海金标生物科技有限公司(型号为 CH37K)。

[0122] 15、底板:为高白度 PVC 材质,表面涂布单层高聚合物压敏胶 SM31,购买于上海金标生物科技有限公司。

[0123] 16、人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC 700670。

[0124] 17、人肺炎链球菌亚型菌株 Sp19F:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC 49619。

[0125] 18、人肺炎链球菌亚型菌株 Sp23F:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC 700669。

[0126] 19、本发明所用到的微生物样品均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0127] 下面结合实施例对本发明所提供的技术方案进行详细说明:

[0128] 实施例 1(制备实施例)

[0129] 结合垫的制备

[0130] (一) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化

[0131] 1. 相关基因的克隆

[0132] 对人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白(其 NCBI 蛋白质数据库中的 accession number 分别为 AAF27703、AAF27712)进行生物信息学分析,分别获取其胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的 DNA 编码序列,同时在其 5' 引入酶切位点 NdeI、3' 端引入终止信号 TAA 和酶切位点 XhoI 后分别化学合成全基因序列(全序列合成交由金斯瑞生物科技有限公司完成,交货时人工合成的基因片段均分别连于载体 pUC57 上),记为 PspA1、PspA2。其基因全序列如列表所示。其中,PspA1 基因编码的蛋白质序列为人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白(accession number:AAF27703)的 29-406aa。PspA2 基因编码的蛋白质序列为人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白(accession number:AAF27712)的 26-427aa。将分别含有该两段人工合成的 DNA 片段的载体 pUC57 分别用 NdeI 及 XhoI 进行双酶切后按常规方法分别回收目的片段,备用。同时采用 NdeI 及 XhoI 对载体 pET-28a(+) 进行双酶切,并按常规方法分别将经双酶切后获得的 PspA1、PspA2 连入 pET-28a(+) 载体中,并转化大肠杆菌 TOP10,构建 pET-PspA1、pET-PspA2 表达载体。经酶切和序列测定证实表达载体构建无误。该载体分别表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白。

[0133] 2. 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的表达与纯化

[0134] 将鉴定正确的阳性克隆菌培养后提取质粒,按常规技术转入感受态

*E. coli*BL21 (DE3) 中,转化完成后将菌液涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上,按常规方法筛选表达菌株。分别挑取 pET-PspA1、pET-PspA2 转化的具有外源蛋白表达能力的单个菌落并分别接种入 100mL LB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。分别取出菌液后,按 1:100 分别接种于 100mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} = 0.6$ 时,加入 1mol/L IPTG 至终浓度为 1mmol/L,于 37 $^{\circ}$ C 摇菌培养,诱导融合蛋白表达。诱导 4h 后分别于 8000r/min 下离心 10min 收集菌体。将此两份菌体分别用 20mL 磷酸盐缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH = 7.4) 洗涤 3 次并分别用 10mL 上样缓冲液 (20mM Na_3PO_4 , 0.5M NaCl; 30mM 咪唑, pH7.4) 重悬后进行超声破碎,操作条件为:50HZ, 200W, 超声 3S, 间歇 5S, 工作 100 次。超声完成后,12000g 离心 15min 分别收集沉淀和上清后进行电泳检测。发现重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白均以可溶性表达方式存在于菌体中。收集此两份细胞破碎的上清液,分别用 His Trap affinity columns (GE healthcare 公司产品),按照说明书用同样的方法进行纯化。具体方法如下:

[0135] 1) 用 5mL 注射器吸满蒸馏水,拧开柱的塞子,用提供的接头将柱和注射器连接上,以 1mL/min 流速洗柱。

[0136] 2) 用 10mL 上样缓冲液平衡,1mL/min 流速。

[0137] 3) 将融合蛋白上样,1mL/min 流速。

[0138] 4) 用 10mL 上样缓冲液,以 1mL/min 流速洗柱。

[0139] 5) 用 10mL 洗脱缓冲液 (20mM Na_3PO_4 , 0.5M NaCl, 300mM 咪唑, pH7.4), 以 1mL/min 流速洗脱,分管收集,每管 1ml, 12% SDS-PAGE 检测,合并洗脱组分中含有目的蛋白的样品。经 Bradford 试剂盒进行蛋白质浓度测定后,调整浓度为 0.2mg/mL。

[0140] (二) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0141] 1. 兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0142] 用步骤 (一) 纯化的重组 PspA1-His 融合蛋白按照 200 μ g (1mL) 与 1mL 弗氏完全佐剂混匀乳化后免疫雄性新西兰大白兔 (由湖北省疾病预防控制中心提供), 于背部皮下多点注射, 间隔 7d 后再免疫一次, 再过 14d 后用上述纯化的重组 P1-His 融合蛋白按照 200 μ g (1mL) 与 1mL 弗氏不完全佐剂混匀乳化后进行加强免疫, 加强免疫 7d 后再按上述同样方法再加强免疫一次。7d 后取血分析抗体滴度。若不满意, 可重复进行一到两次加强免疫, 至抗体滴度满意 (用 ELISA 法测定抗体效价大于 1×10^5)。若满意则心脏采血, 分离血清, 以 Protein G 亲和层析柱 (GE healthcare 公司产品), 严格按照操作说明书纯化多克隆抗体 IgG, 用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH = 7.4) 调整为 3mg/mL, -20 $^{\circ}$ C 保藏备用, 至此制得兔抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。以步骤 (一) 纯化的重组 PspA2-His 融合蛋白作为抗原按照上述同样方法制得兔抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。Western blot 试验表明, 此二种多克隆抗体 IgG 均能对应性的特异性识别人肺炎链球菌全长 PspA 蛋白。

[0143] 2. 鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0144] 用步骤 (一) 纯化的重组 PspA1-His 融合蛋白作为完全抗原免疫豚鼠 (由湖北省疾病预防控制中心提供), 肩胛下注射抗原 200 μ g/只。基础免疫为等体积的抗原与弗氏完全佐剂进行乳化, 每隔 2 周进行一次加强免疫, 加强免疫用等体积抗原与等体积弗氏不

完全佐剂进行乳化,总共免疫4次。末次免疫10d后取血分析抗体滴度。若不满意,可重复进行一到两次加强免疫,至抗体滴度满意(用ELISA法测定抗体效价大于 1×10^5)。若满意则处死豚鼠取血清,以Protein G亲和层析柱(GE healthcare公司产品),严格按照操作说明书纯化多克隆抗体IgG,用凯基Braford蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH = 7.4)调整为3mg/mL, -20°C 保藏备用,至此制得鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG。以步骤(一)纯化的重组PspA2-His融合蛋白作为抗原按照上述同样方法制得鼠抗人肺炎链球菌Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG。Western blot试验表明,此二种多克隆抗体IgG均能对应性的特异性识别人肺炎链球菌全长PspA蛋白。

[0145] (三)量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备

[0146] 1. 纳米羧基量子点标记兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG反应条件的优化:

[0147] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记pH的确定

[0148] 将标记反应中磷酸盐缓冲液pH分别设为5,6,7,8,9,对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定,观察不同pH值对偶联反应的影响,确定了量子点标记多抗反应的最佳pH为7.0-8.0。本实验选择pH7.4。

[0149] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0150] 将量子点摩尔浓度与多抗浓度之比分别设置为1:1,1:2,1:3及1:4,进行标记反应后,对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定,观察二者不同浓度比对偶联反应的影响,确定量子点标记兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG反应的最佳摩尔浓度比为量子点与抗体摩尔比为1:3。本实验选择该最优浓度比来确定标记量。

[0151] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0152] 以乙醇胺、Tris、PEG2000-NH₂或者BSA作为封闭剂,按步骤1.1及1.2确定的条件进行标记反应后,对标记产物利用全光谱仪进行荧光强度测定,观察不同的封闭剂对于标记反应的影响,结果发现,PEG2000-NH₂为最佳封闭剂,其可显著提高标记复合物的胶体稳定性及免疫活性。

[0153] 纳米羧基量子点标记兔抗人肺炎链球菌Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG反应的条件优化结果与步骤1.1-1.3描述的纳米羧基量子点标记兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG反应相关条件的优化结果均完全一致。

[0154] 2. 标记过程:

[0155] 向微量离心管中依次加入4nmol羧基水溶性量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)和600nmol碳二亚胺(EDC),以磷酸盐缓冲液(2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,4g/L氯化钠,pH 7.4)定容为2ml,不停地混合溶液,37℃反应30min后,透析去除过量的作为活化剂的sulfo-NHS与EDC。在活化的量子点中,加入12nmol的步骤(二)制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h,加入单端氨基化聚乙二醇(PEG2000-NH₂)至终浓度为1%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h。用0.2μm PES过滤器过滤除去抗体聚集物,然后将滤液转移到50000MW超滤离心管中,以8000g离心力在4℃下离心15min,除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物。收集超滤管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于2ml磷酸盐洗涤液(2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L

L 磷酸二氢钠, 4g/L 氯化钠, 5ml/L 吐温 -20, 0.3g/L 叠氮钠, pH 7.4) 中, 再将此溶液转移到 50000MW 超滤离心管中, 以 8000g 离心力在 4℃ 下离心 15min, 收集超滤管滤膜上层量子点 - 抗体偶联物溶液, 溶于 1ml 磷酸盐保存液 (2.9g/L 磷酸氢二钠, 0.295g/L 磷酸二氢钠, 2g/L 氯化钠, 10g/L BSA, 0.3g/L 叠氮钠, pH 7.4) 中, 至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针, 置于 4℃ 保存备用。

[0156] 按上述相同方法利用步骤 (二) 制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白纳米探针。将上述两种量子点标记的纳米探针溶液按体积比 1:1 混合, 即制得量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针。

[0157] (四) 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的负载

[0158] 将聚酯纤维膜浸入步骤 (三) 所得到的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针溶液中 1h, 取出, 25℃ 干燥后裁成后规格为 4cm*0.6cm/ 条后, 4℃ 密封保存备用, 至此制得结合垫。

[0159] 实施例 2 (制备实施例)

[0160] 样品垫的制备

[0161] 配制不同配方的样品垫处理液, 观察量子点标记抗体的释放效果, 通过多次正交试验优化, 得到最优的样品垫处理液配方 (即本发明所述)。取玻璃纤维素膜一张, 将其在样品垫处理液中浸泡至少 3h, 再置于生物安全柜内 37℃ 通风干燥后, 剪裁成规格为 4cm*2.5cm/ 条后, 即制得样品垫, 25℃ 密封干燥保存。经试验证实该样品垫的使用, 大大提高了结合垫上量子点标记抗体的释放率, 达到了较好的应用效果。

[0162] 实施例 3 (制备实施例)

[0163] 检测层的制备

[0164] 将硝酸纤维素膜剪成 4cm*4cm 大小。将实施例 1 中制备的含鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液与含鼠抗人肺炎链球菌 Fam2 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的溶液按体积比 1:1 混合, 制得鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 后备用; 分别将上述鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度为 2.0mg/mL 及 1.0mg/mL。将稀释好的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头 2 中, 设置 1.0 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上, 形成检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中 1, 设置 1.0 μ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线, 其与检测线间距为 0.7cm。将喷好的硝酸纤维素膜 37℃ 干燥 2h, 剪裁成 4cm*4cm 的规格, 4℃ 密封干燥保存。至此制得检测层。

[0165] 实施例 4 (制备实施例)

[0166] 检测卡的组装

[0167] 下面结合附图 1 及附图 2 对检测卡的组作进一步说明。

[0168] 将底板裁剪成 4cm*7.3cm 大小, 备用。

[0169] 将吸水滤纸裁剪成 4cm*3cm 大小, 作为吸水垫, 备用。

[0170] 组装工作于生物安全柜内操作, 首先将底板 7 上的粘性保护膜揭掉, 将实施例 3 所述的检测层 3 即带有质控线 5 和检测线 4 的硝酸纤维素膜粘贴到底板 7 上附图 1 所指的具体区域, 并小心抹平膜面。其次, 将事先裁好的吸水垫 6 组装到底板 7 上, 使其左边与检测层右末端有 0.2cm 的重叠, 其右边缘则与底板 7 的右边缘对齐粘好并小心抹平。再将实施

例 1 所描述的结合垫 2 按 0.3cm 重叠于检测层 3 的左边缘处,0.3cm 粘于底板 7 上。最后将实施例 2 所描述的样品垫 1 则按一边 0.3cm 重叠于结合垫 2 的左边缘处,另一边与底板 7 的左边缘对齐,粘于底板 7 上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下裁成 4.0mm 宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。

[0171] 实施例 5(应用实施例)

[0172] 检测卡的使用方法

[0173] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有 500 μl 的添加了 1% Tritonx-100(体积百分比)的磷酸盐缓冲液(PBST)的软质塑料管中,挤压塑料管壁,使拭子上的样品充分溶解后,取出 120 μL 滴于检测卡的样品垫上,15 分钟后于紫外分析仪下(型号为 WD-9403A,北京六一仪器厂生产,紫外激发波长 365nm)观察检测结果。若咽拭子中含有人肺炎链球菌抗原,则与结合垫中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的量子点标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若待检咽拭子中无相关抗原,则仅出现一条荧光质控线。如果荧光质控线未出现,则该检测卡失效。

[0174] 实施例 6(应用实施例)

[0175] 本发明的应用效果举例

[0176] 本实施例中所指的人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡的使用方法参照实施例 5 所述的操作步骤。

[0177] 1) 特异性试验

[0178] 用呼吸道常见病原体如人呼吸道合胞病毒(Long 株,ATCC 编号 VR26)、人肺炎支原体(ATCC 编号 15531)、人肺炎衣原体(AR-39 株,ATCC 编号 53592)、人腺病毒 3 型(GB 株,ATCC 编号 VR-3)、人腺病毒 7 型(Gomen 株,ATCC 编号 VR-7)、人甲型流感病毒(H1N1,ATCC 编号 VR-1743)、人乙型流感病毒(ATCC 编号 VR-790)、流感嗜血杆菌(ATCC 编号 53781)、卡他莫拉菌(ATCC 编号 25238)等代替人肺炎链球菌进行检测,检测卡检测含这些微生物的 PBST 稀释液都为阴性。

[0179] 2) 敏感性试验

[0180] 通过测定肺炎链球菌培养物稀释液来做敏感性研究,确定实施例 4 所述的检测卡检测人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B 的检测下限为 2×10^4 CFU/ml,而来自生产商 Binax 的名为 Binax NOW Streptococcus pneumoniae test(胶体金法)的试剂盒的检测限为 5×10^5 CFU/ml,本发明试剂盒之检测下限较其明显降低。另外,对临床较为常见的分别具有 Fam1 PspA 及 Fam2 PspA 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp19F 及 Sp23F 的检测结果表明,实施例 4 所述检测卡对该两亚型菌株的检测下限分别为 1×10^4 CFU/ml 及 3×10^4 CFU/ml。

[0181] 3) 临床测试例

[0182] 以肺炎链球菌标准检测法-痰培养法作为参照,取 150 例呼吸科下呼吸道感染者的肺泡灌洗液标本用实施例 4 所述的检测卡进行检测,培养法阳性率为 12% (18/150),本检测卡为 12.7% (19/150),2 种方法的符合率为 98% (147/150)。两种方法检测结果差异无显著性。具体结果如表 1 所示。

[0183] 表 1 临床标本的检测结果

[0184]

本检测卡			
痰培养法	阳性	阴性	总计
阳性	17	1	18
阴性	2	130	132
总计	19	131	150

[0185] 需要指出的是,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明精神和原则之内所做的任何修改、等同替换等均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

序 列 表

PspA1 基因序列

CATATGGTAAAGAGCAGAAGAATCTCCCGTAGCCAGTCAGTCTAAAGCTGAGAAAGACTATGATGC

NdeI

AGCAGTGAAAAATGCTACAGCTGCAAAAAAGCAGCAGAAGACGCTCAAAGAGCTTTAGATGAAGCAA
AAGCTGCGCAGAAAAATATGACGAGGATCAAAAGAAAAGCTGAGGAGAAAGCGAAAGAAGTAAAAAA
AGCTTCGGAAGAAGAACAAGCTGCAAATCTGAAATATCAACAAGAGTTGGTTAAATATATTTAAATATA
CACGTGAAAATAATTCAACAAAAAGAACTGAAGCTGAGAAAGTAATGACTGCAGCTAAGAAAGAGCAT
GAGAAAAACAAACAGAAGCTTGTAAAAGTTCTCGCAAAGGTAATTCCTAGCGCGGAAGAAATTAGAAAA
TACTAGACAAAAAGCAGAGAAAGCTAAAGAAAAAGAACCAGAGCTTACTAAAAAACTAGAAGAAGCTA
AAGCAAAATCAGAAGAAGCTGAGAAAAAGCTACTGAAGCCAAACAAAAAGTGGATGCAGAACATGCT
GAAGAAGTCGTTCCCTCAAGCTAAAATCGCTGAGTTGGAAAATGAAGTTCAGAACTAGAAAAAGATCT
CAAAGAGATTGATGAATCTGACTCAGAAGATTATGTTAAAGAAGGTCTCCGTGCTCCTCTTCAATCTG
AATTGGATGCCAAACAAGCTAAACTATCAAACTTGAAGAGTTGAGTGATAAGATTGATGAGTTAGAC
GCTGAAATTGCAAACTTGAAAAAATGTAGAAGATTTCAAACTCAAACGGTGAGCAAGCTGAACA
ATACCGTGCTGCAGCTGGAGAAGACTTAGCTGCTAAACAAGCTGAATTAGAAAAAACTGAAGCTGACC
TTAAGAAAGCAGTTAATGAGCCAGAAAAACCAGCTCCAGCTCCAGAACTCCAGCCCCAGAACACCA
GCTGAACAACCAAAACCAGCGCCGGCTCCTCAACCAGCTCCCGCACCCAAACCAGAGAAGCCAGCTGA
ACAACCCAAAGCAGAAAAACCAGCTGATCAACAAGCTGAAGAAGACTATGATCGTAGATCAGAAGAAG
AATATAACCGCTTGACCCAACAGCAACCGCCAAAAGCAGAAAAACCAGCTCCTGCATAACTCGA

XhoI

G

PspA1 蛋白质序列

VRAEESPVASQSKAEKDYDAAVKNATAAKKAAEDAQRALDEAKAAQKKYDEDQKKTEEKAKEVKKASEE
EQAANLKYQQELVKYIKYTRENNSTKRTEAEKVMTAAKKEHEKKQTELAKVLAKVIPSAAELENTRQKA
EKAKEKEPELTKKLEEAkakSEEAekKATEAKQKVDAEHAEVVPQAKIAELENEVQKLEKDLKEIDES
DSEDYVKEGLRAPLQSELDAKQAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEKNVEDFKNSNGEQAEQYRAAAGE
DLAAKQAELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQPAPAPKPEKPAEQPKAEKPA
DQQAEEDYDRRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPA

[0002]

***PspA2* 基因序列**

CATATGCCTACTTTTGTAAAGAGCAGAAGAATCTCCACAAGTTGTCGAAAAATCTTCATTAGAGAAGA

NdeI

AATATGAGGAAGCAAAAAGCAAAAAGCTGATACTGCCAAGAAAGATTACGAAACGGCTAAAAAGAAAGCAG
 AAGACGCTCAGAAAAAGTATGAAGATGATCAGAAGAGAACTGAGGAGAAAGCTCGAAAAGAAGCAGAAG
 CATCTCAAAAATTGAATGATGTGGCGCTTGTGTTTCAAAAATGCATATAAAGAGTACCGAGAAGTTCAA
 ATCAACGTAGTAAATATAAATCTGACGCTGAATATCAGAAAAAATTAACAGAGGTGACTCTAAAATAG
 AGAAGGCTAGGAAAGAGCAACAGGACTTGCAAAAATAAATTTAATGAAGTAAGAGCAGTTGTAGTTCCTG
 AACCAATGCGTTGGCTGAGACTAAGAAAAAAGCAGAAGAAGCTAAAGCAGAAGAAAAAGTAGCTAAGA
 GAAAAATATGATTATGCAACTCTAAAGGTAGCACTAGCGAAGAAAGAAGTAGAGGCTAAGGAACCTGAAA
 TTGAAAAACTTCAATATGAAATTTCTACTTTGGAACAAGAAGTTGCTACTGCTCAACATCAAGTAGATA
 ATTTGAAAAAACTTCTTGCTGGTGCGGATCCTGATGATGGCACAGAAGTTATAGAAGCTAAATTA
 AAGGAGAAGCTGAGCTAAACGCTAAACAAGCTGAGTTAGCAAAAAAACAACAGAACCTTGAAAACTTC
 TTGACAGCCTTGATCCTGAAGGTAAGACTCAGGATGAATTAGATAAAGAAGCAGAAGAAGCTGAGTTGG
 AAAAAAAGCTGATGAACCTCAAAAATAAAGTTGCTGATTTAGAAAAAGAAATTAGTAACCTTGAAATAT
 TACTTGGAGGGGCTGATCCTGAAGATGATACTGCTGCTCTTCAAAAATAAATTAGCTGCTAAAAAAGCTG
 AGTTAGCAAAAAAACAACAGAACCTTGAAAACTTCTTGACAGCCTTGATCCTGAAGGTAAGACTCAGG
 ATGAATTAGATAAAGAAGCAGAAGAAGCTGAGTTGGATAAAAAAGCTGATGAACCTTCAAAAATAAAGTTG
 CTGATTTAGAAAAAGAAATTAGTAACCTTGAAATATTACTTGGAGGGGCTGATTTCTGAAGATGATACTG
 CTGCTCTTCAAAAATAAATTAGCTACTAAAAAAGCTGAATTG**TA****ACTCGAG**

XhoI

***PspA2* 蛋白质序列**

PTFVRAEESPQVVEKSSLEKKYEEAKAKADTAKKDYETAKKKAEDAQKKYEDDQKRTEEKARKEAESQ
 KLNDVALVVQNAYKEYREVQNQRSKYKSDAEYQKKLTEVDSKIEKARKEQQDLQNKFNRAVVVPEPN
 ALAETKKKAEBAKAEKVAKRKYDYATLKVALAKKEVEAKELEIEKLOYEISTLEQEVATAQHQVDNLK
 KLLAGADPDDGTEVIEAKLKKGEAELNAKQAE LAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDEL DKEAEEAELDKK
 ADELQNKVADLEKEISNLEILLGGADPEDDTAALQNKLAAKKAE LAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDEL
 DKEAEEAELDKKAE LQNKVADLEKEISNLEILLGGADSEDDTAALQNKLATKKAEL

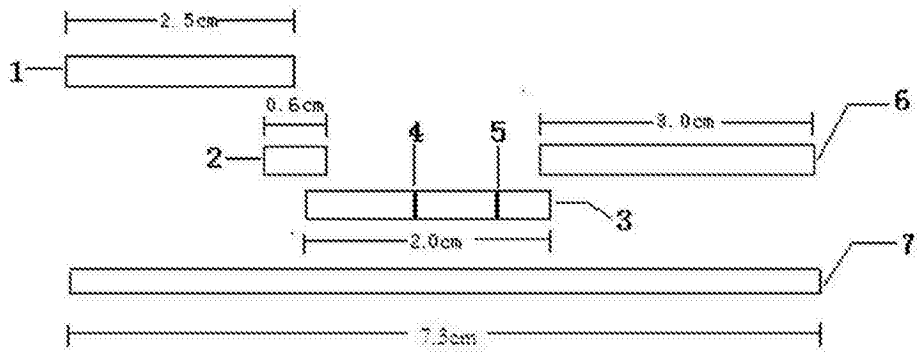


图 1

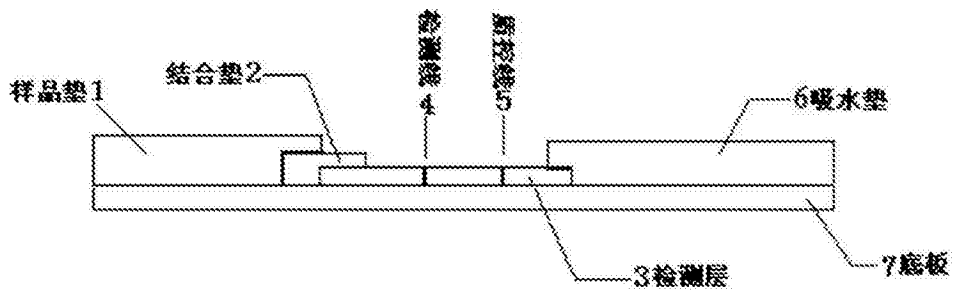


图 2

专利名称(译)	人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105319359A	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410405212.8	申请日	2014-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	董俊		
申请(专利权)人(译)	董俊		
当前申请(专利权)人(译)	董俊		
[标]发明人	胡征 杨波 董俊		
发明人	胡征 杨波 董俊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN105319359B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人肺炎链球菌量子点免疫层析检测卡及其制备方法和应用，该检测卡包括底板、样品垫、吸水垫、结合垫和检测层；结合垫包被有量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针；检测层是由带有一条检测线以及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成；检测线包被有鼠抗人肺炎链球菌PspA蛋白多克隆抗体；质控线包被有抗兔IgG；检测层粘贴在底板上；结合垫和吸水垫分别设置在检测层两端部上方且与检测层部分重叠后分别与检测层和底板粘贴；样品垫设置在结合垫上方且与结合垫部分重合后分别与结合垫及底板粘贴。本发明具有操作简便、检测快速、可定量及高灵敏度等优点。

