



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277693 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201410405742. 2

(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 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书4页 说明书16页

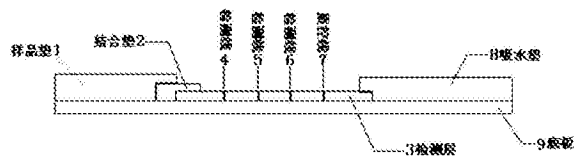
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种人副流感病毒量子点免疫层析分型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分别标记的兔抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白多克隆抗体的混合物;检测层是由带有三条检测线以及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成;三条检测线分别包被有鼠抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒多克隆抗体;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. 一种人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡,其特征在于:所述人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡包括底板、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分别标记的兔抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白多克隆抗体的混合物;所述检测层是由带有第一检测线、第二检测线、第三检测线以及质控线的固相硝酸纤维素膜构成;所述第一检测线、第二检测线以及第三检测线分别包被有鼠抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒多克隆抗体;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 所述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡,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 所述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡,其特征在于:所述检测层长 4cm,所述检测层粘贴在长度是 8.6-9.5cm 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;所述第一检测线、第二检测线、第三检测线以及质控线中相邻两线之间的间距均是 0.5-0.8cm;所述底板的宽度是 0.3-0.5cm。

4. 根据权利要求 3 所述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡,其特征在于:所述吸水垫是吸水滤纸;所述底板是 PVC 板。

5. 根据权利要求 4 所述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡,其特征在于:所述抗兔 IgG 包括但不限于羊抗兔 IgG。

6. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡的制备方法,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 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白的制备、纯化以及复性:

1.1.1) 对 I、II 以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白进行生物信息学分析,分别获取 I、II 以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白的胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段;

1.1.2) 找到步骤 1.1.1) 中所得肽段对应的基因编码序列,根据大肠杆菌中密码子的偏好性,对步骤 1.1.1) 中所得基因编码序列进行密码子优化;

1.1.3) 在步骤 1.1.2) 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 hn1、hn2 以及 hn3;

1.1.4) 将步骤 1.1.3) 中所得到的 hn1、hn2 以及 hn3 按分子生物学方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后表达重组融合蛋白 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His;所述重组融合蛋白 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 均以包涵体形式存在于基因工程菌体内;

1.1.5) 用镍柱分别纯化步骤 1.1.4) 所得到的包涵体蛋白,再分别对包涵体蛋白进行复性即得到所需重组蛋白;

1.2) 重组 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

1.2.1) 以步骤 1.1.5) 中所得到的复性的重组 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋

白为完全抗原,免疫新西兰大白兔及豚鼠,分别制备兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清;所述兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清的间接 ELISA 效价均大于  $1 \times 10^5$ ;

1.2.2) 采用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合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) 所得到的抗体浓度,同时将该浓度调整至 3mg/mL 后备用;

1.3) 量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备与纯化:

1.3.1) 向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺和 300nmol 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磷酸氢二钠 2.9g/L、磷酸二氢钠 0.295g/L 以及氯化钠 2g/L,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 4-8nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 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  $\mu$ 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;

所述磷酸盐洗涤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、氯化钠 2g/L、吐温 -205ml/L 以及叠氮钠 1g/L,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磷酸氢二钠 2.9g/L、磷酸二氢钠 0.295g/L、氯化钠 2g/L、BSA 10g/L 以及叠氮钠 1g/L,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,分别利用步骤 1.2) 所制备的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别制得量子点标记的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG;

1.3.4) 将量子点标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 按体积比 1:1:1 混合后备用;

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) 所得到的量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 混合液中 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磷酸氢二钠 2.9g/L、磷酸二氢钠 0.295g/L、氯化钠 2g/L、牛血清白蛋白 20g/L、吐温-20 10mL/L、蔗糖 20g/L 以及聚乙烯吡咯烷酮 5g/L, 所述样品垫处理液的 pH = 7.3;

### 3) 检测层的制备:

3.1) 将步骤 1.2.2) 中制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL, 所述磷酸盐缓冲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 以及氯化钠 2g/L, 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.3;

3.2) 将稀释好的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5  $\mu$ l/cm 的量按照一定间隔依次喷于硝酸纤维素膜上, 形成第一检测线、第二检测线以及第三检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5  $\mu$ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线;

3.3) 将喷有第一检测线、第二检测线、第三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) 人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡的组装:

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) 将组装好的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡进行裁剪, 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 6nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG;

所述步骤 3.1) 中将步骤 1) 中制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别是 0.5-1.0mg/mL 以及 0.5-1.5mg/mL;

所述步骤 3.2) 中, 将稀释好的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 1.0-2.0  $\mu$ l/cm 的量按照一定间隔依次喷于硝酸纤维素膜上, 形成第一检测线、第二检测线以及第三检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入

BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0-2.0  $\mu$  l/cm 的量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副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡作为非诊断性检测人副流感病毒的应用。

9. 一种基于如权利要求 1-5 任一权利要求所述的人副流感病毒量子点免疫层析分型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  $\mu$  l 的样品处理液充分溶解后,取出 120  $\mu$  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 I 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在第一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;

若待检样品中有 II 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在第二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;

若待检样品中有 III 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在第三检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的荧光标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合形成肉眼可见的第二条荧光质控线;

若待检样品中无 I 型人副流感病毒抗原、II 型人副流感病毒抗原以及 III 型人副流感病毒抗原,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。

## 人副流感病毒量子点免疫层析分型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,具体为一种人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 人副流感病毒 (human parainfluenza virus, HPIV) 是儿童急性呼吸道感染的重要病原体,主要经飞沫传染,亦可通过眼、口或鼻的粘膜接触进行传播,发病率以婴幼儿最高。HPIV 感染呈全球性分布,是常见的社区获得性呼吸道感染的病原,HPIV 感染在小儿儿童急性呼吸道感染的发生率高达 30-40%,其是导致小儿下呼吸道严重感染的、仅次于呼吸道合胞病毒的病原体。该病原体首先发现于上世纪 50 年代末,原名仙台病毒,最初从日本仙台市一例死于肺炎的患儿肺液中分离出来。根据遗传学和血清学人副流感病毒可分为 4 型,其中 1-3 型在临床中最为常见,每种亚型主要的结构和生物学特征相似,但流行病学和所引发疾病的临床特征有差异。人副流感病毒 1 型以及 2 型所导致的相关疾病主要有义膜性喉炎、上呼吸道和下呼吸道感染;人副流感病毒 3 型主要导致细支气管炎及肺炎;人副流感病毒 4 型在临床上不多见,一般仅导致轻微感染。

[0003] 临床病人由于不同的呼吸道病原体(如人副流感病毒、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。快速及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] 尽管人副流感病毒在全球范围内传播,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,人副流感病毒的检测主要有以下几种方法:

[0005] 1、常规实验室检测

[0006] 1.1) 病毒分离

[0007] 实验室诊断人副流感病毒的金标准是分离人副流感病毒毒株。采用鼻咽分泌物作为病毒分离的标本,可以用 LCC-MK2 细胞培养的方法分离病毒。但是该方法费时费力,通常需要一周才能得到最终结果,在临床方面对病人的治疗就有一定的局限性。

[0008] 1.2) 血清学检测

[0009] 即采用酶联免疫法、胶体金免疫法、微量免疫荧光法和间接血凝试验等,检测被检者血清中 HPIV 抗体水平,可间接提示 HPIV 感染的存在。然而,血清学试验只能提供一种回顾性的诊断,需要同时检测患者急性期和恢复期的双份血清,如果恢复期中抗人副流感病毒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,儿童、青少年与成人之间又存在 HPIV 特异性抗体的差异,并且,据报道患儿 IgM 的检出率大约只有 50%,故现有血清学方法的检测质量受到一定限制。

[0010] 2、快速诊断

[0011] 直接检查人副流感病毒蛋白抗原和病毒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 法具有快速、灵敏以及特异的优点,是目前研究 HPIV 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。因此,建立“一步法”HPIV 特异性抗原快速分型诊断法十分必要。

## 发明内容

[0012] 本发明针对背景技术中现存的几种人副流感病毒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副流感病毒量子点免疫层析分型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] 一种人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡,其特征在于:所述人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡包括底板、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分别标记的兔抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白多克隆抗体的混合物;所述检测层是由带有第一检测线、第二检测线、第三检测线以及质控线的固相硝酸纤维素膜构成;所述第一检测线、第二检测线以及第三检测线分别包被有鼠抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒多克隆抗体;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,本发明所采用的所述检测层长 4cm,所述检测层粘贴在长度是 8.6-9.5cm 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;所述第一检测线、第二检测线、第三检测线以及质控线中相邻两线之间的间距均是 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] 一种基于上述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡的制备方法,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 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白的制备、纯化以及复性:

[0022] 1.1.1) 对 I、II 以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白进行生物信息学分析,分别获取 I、II 以及 III 型人副流感病毒 HN 蛋白的胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段;

[0023] 1.1.2) 找到步骤 1.1.1) 中所得肽段对应的基因编码序列,根据大肠杆菌中密码子的偏好性,对步骤 1.1.1) 中所得基因编码序列进行密码子优化;

[0024] 1.1.3) 在步骤 1.1.2) 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 hn1、hn2 以及 hn3 ;其基因序列如序列表所示 ;

[0025] 1. 1. 4) 将步骤 1. 1. 3) 中所得到的 hn1、hn2 以及 hn3 按分子生物学方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后表达重组融合蛋白 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His ;所述重组融合蛋白 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 均以包涵体形式存在于基因工程菌体内 ;

[0026] 1. 1. 5) 用镍柱分别纯化步骤 1. 1. 4) 所得到的包涵体蛋白,再分别对包涵体蛋白进行复性即得到所需重组蛋白 ;

[0027] 1. 2) 重组 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备 :

[0028] 1. 2. 1) 以步骤 1. 1. 5) 中所得到的复性的重组 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白为完全抗原,免疫新西兰大白兔及豚鼠,分别制备兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清 ;所述兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清的间接 ELISA 效价均大于  $1 \times 10^5$  ;

[0029] 1. 2. 2) 采用用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清中的多克隆抗体 IgG ;

[0030] 1. 2. 3) 用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定步骤 1. 2. 2) 所得到的抗体浓度,同时将该浓度调整至 2mg/mL 后备用 ;

[0031] 1. 3) 量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备与纯化 :

[0032] 1. 3. 1) 向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N- 羟基琥珀酰亚胺和 300nmol 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℃ 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 ;所述磷酸盐缓冲液是由 2. 9g/L 磷酸氢二钠、0. 295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠配置而成,所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7. 3 ;

[0033] 1. 3. 2) 在活化的量子点中,加入 4-8nmol 的步骤 1. 2) 所制备的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 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  $\mu$ 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℃ 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℃ 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 ;

[0034] 所述磷酸盐洗涤液是由 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 叠氮钠配置而成 ;所述磷酸盐洗涤液的 pH = 7. 3 ;所述磷酸盐保存液是由 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 叠氮钠配置而成 ;所述磷酸盐保存液的 pH = 7. 3 ;

[0035] 1. 3. 3) 按照与步骤 1. 3. 1) 以及步骤 1. 3. 2) 相同的方法,分别利用步骤 1. 2) 所制备的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别制得量子点标记的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG ;

[0036] 1. 3. 4) 将量子点标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆

抗体 IgG 按体积比 1 :1 :1 混合后备用；

[0037] 1.4) 量子点标记抗体的负载：

[0038] 将聚酯纤维膜浸入步骤 1.3.4) 所得到的量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His 以及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 混合液中 1h, 取出, 25℃干燥后 4℃密封保存备用, 至此制得结合垫；

[0039] 2) 样品垫的制备：

[0040] 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；

[0041] 所述样品垫处理液是由 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 聚乙烯吡咯烷酮配置而成, 所述样品垫处理液的 pH = 7.3；

[0042] 3) 检测层的制备：

[0043] 3.1) 将步骤 1) 中制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL, 所述磷酸盐缓冲液是由 2.9g/L 磷酸氢二钠、0.295g/L 磷酸二氢钠以及 2g/L 氯化钠配置而成, 所述磷酸盐缓冲液的 pH = 7.3；

[0044] 3.2) 将稀释好的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5  $\mu$ l/cm 的量按照一定间隔依次喷于硝酸纤维素膜上, 形成第一检测线、第二检测线以及第三检测线；将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5  $\mu$ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线；

[0045] 3.3) 将喷有第一检测线、第二检测线、第三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) 人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡的组装：

[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) 将组装好的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡进行裁剪, 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 6nmol 的步骤 1.2) 所制备的兔抗

重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG；

[0059] 作为优选,本发明所采用的步骤 3.1) 中将步骤 1) 中制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 和抗兔 IgG 用磷酸盐缓冲液调整至终浓度分别是 0.5-1.0mg/mL 以及 0.5-1.5mg/mL；

[0060] 作为优选,本发明所采用的步骤 3.2) 中,将稀释好的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0-2.0  $\mu$  l/cm 的量按照一定间隔依次喷于硝酸纤维素膜上,形成第一检测线、第二检测线以及第三检测线;将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置 1.0-2.0  $\mu$  l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线。

[0061] 一种基于上述的人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡作为非诊断性检测人副流感病毒的应用。

[0062] 一种基于上述的人副流感病毒量子点免疫层析分型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  $\mu$  l 的样品处理液充分溶解后,取出 120  $\mu$  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 I 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在第一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] 若待检样品中有 II 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在第二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;

[0066] 若待检样品中有 III 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下在第三检测线处会形成肉眼可见的一条荧光检测线,未结合完的荧光标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合形成肉眼可见的第二条荧光质控线;

[0067] 若待检样品中无 I 型人副流感病毒抗原、II 型人副流感病毒抗原以及 III 型人副流感病毒抗原,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。

[0068] 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。

[0069] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0070] 1、本发明的检测人副流感病毒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,其对 I、II、III 型人副流感病毒的检测底线分别为 5ng/mL, 5ng/mL 及

3ng/mL。

[0071] 2、本发明所用的抗体均是识别人副流感病毒 HN 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。

[0072] 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。

[0073] 4、由于检测卡检测的是人副流感病毒抗原而非抗体（抗体的出现需要感染几天至几周以后），且本检测卡可以三型病毒共检，故该方法在人副流感病毒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。

[0074] 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

[0075] 图 1 是本发明所提供检测卡的纵向剖面结构示意图；

[0076] 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；

[0077] 其中：

[0078] 1- 样品垫；2- 结合垫；3- 检测层；4- 检测线；5- 检测线；6- 检测线；7- 质控线；8- 吸水垫；9- 底板。

#### 具体实施方式

[0079] 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分型检测人副流感病毒抗原的量子点免疫层析检测卡。首先是兔抗 I、II、III 型人副流感病毒 HN 蛋白多克隆抗体和鼠抗 I、II、III 型人副流感病毒 HN 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，最后制备分型检测人副流感病毒的检测卡。本发明所提供的检测卡具有敏感、快速和特异性好等特点，并且可定量分型检测，能进行样品的高通量筛查，具有较好的市场应用前景。

[0080] 如附图 1 所示，本发明所提供了一种人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡，包括样品垫 1、结合垫 2、检测层 3、吸水垫 8 及底板 9 组成。结合垫 2 上包被有量子点分别标记的兔抗 I、II、III 型人副流感病毒 HN 蛋白多克隆抗体的混合物；检测层 3 是喷有检测线 4、检测线 5、检测线 6 以及质控线 7 的固相硝酸纤维素膜简称 NC 膜；检测线 4、检测线 5 以及检测线 6 分别包被有鼠抗 I 型、II 型以及 III 型人副流感病毒多克隆抗体；质控线 7 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 8 材质为吸水滤纸；底板 9 材质为 PVC。

[0081] 其具体结构是：检测层长 4cm，检测层粘贴在长度是 8.6-9.5cm 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 4、检测线 5、检测线 6 以及质控线 7 间距均是 0.5-0.8cm；底板的宽度是 0.3-0.5cm。

[0082] 其中,上述参数优选方案是:检测层 3 长 4cm,粘贴在底板 9 长 9.3cm 表面中间段,此检测层右端与粘贴在底板 9 右末端的吸水垫 8 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 9 左端的样品垫 (1) 长 2.5cm 重叠 0.3cm;检测层 3 上的检测线 4、5、6 及质控线 7 间距 0.7cm。整条检测卡的宽度为 0.4cm。

[0083] 制备上述分型检测人副流感病毒抗原的量子点免疫层析检测卡的方法,其主要步骤包括:

[0084] 一、结合垫的制备

[0085] (1) 重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白的制备、纯化与复性

[0086] 对 I、II、III 型人副流感病毒 HN 蛋白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,找到其对应的基因编码序列,再根据大肠杆菌中密码子的偏好性,对其进行密码子优化后,在其序列 5' 及 3' 端分别引入酶切位点后分别化学合成全基因序列,记为 hn1, hn2, hn3。其基因序列分别参见序列表。将该三段基因序列按常规方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后表达重组融合蛋白 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His。此三种重组蛋白在大肠杆菌中均以包涵体形式存在。用镍柱分别纯化包涵体蛋白,再分别对包涵体蛋白进行复性即得到所需重组蛋白。

[0087] (2) 重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0088] 以复性的重组蛋白为完全抗原,按常规方法免疫新西兰大白兔及豚鼠,分别制备兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白抗血清。该六种抗血清的间接 ELISA 效价均大于  $1 \times 10^5$ ,用 Protein G 亲和层析柱分别纯化六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。其中兔抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 用作量子点标记试验;鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 用作检测线的包被。

[0089] (3) 量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备与纯化

[0090] 其操作步骤如下:向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N-羧基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和 300nmol 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 4-8nmol (优选为 6nmol) 的步骤 (2) 所制备的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG,避光反应 2h,加入端氨基化聚乙二醇 (PEG2000-NH<sub>2</sub>) 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。

[0091] 按照上述相同方法, 分别用步骤 (2) 所制备的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG。将三种量子点标记的抗体按体积比 1:1:1 混合后备用。

[0092] (4) 量子点标记抗体的负载

[0093] 将聚酯纤维膜浸入步骤 (3) 所得到的量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 混合液中 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。

[0094] 二、样品垫的制备

[0095] 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种方法处理后, 显著地提高了量子点标记抗体的释放率。

[0096] 三、检测层的制备

[0097] 检测层的制备, 是通过分别将由步骤一中所制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 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:

[0098] 分别将上述步骤一中制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 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) 调整至终浓度为 0.5-2.5mg/mL, 其中鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 优选的稀释终浓度为 0.5-1.0mg/mL, 抗兔 IgG 优选的稀释终浓度为 0.5-1.5mg/mL。将稀释好的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5 $\mu$ l/cm, 优选为 1.0-2.0 $\mu$ l/cm 的量按照 0.7cm 的间隔依次喷于硝酸纤维素膜上, 形成三条检测线; 将稀释好的抗兔 IgG 装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 0.8-2.5 $\mu$ l/cm, 优选为 1.0-2.0 $\mu$ l/cm 的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线, 其与最近的一条检测线间距亦为 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。

[0099] 四、底板的加工

[0100] 将 PVC 材质的底板裁剪成 4cm\*9.3cm 的规格后备用。

[0101] 五、吸水垫的制备

[0102] 将吸水滤纸裁剪成 4cm\*3cm 的规格, 即制成吸水垫, 备用。

[0103] 六、检测卡的组装

[0104] 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 3 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裁成 4.0mm 宽的检测卡,4℃密封干燥避光保存。至此制得能分型检测人副流感病毒抗原的量子点免疫层析检测卡。

[0105] 上述分型检测人副流感病毒抗原的量子点免疫层析检测卡的使用方法,步骤如下:

[0106] 将待检样品(如咽拭子等)用 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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。若样品中含有 I 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的荧光检测线 1,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;若样品中有 II 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的相应的量子点标记抗体结合后,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的荧光检测线 2,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;若样品中有 III 型人副流感病毒抗原,则亦与结合垫中相应的量子点标记抗体结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的荧光检测线 3,未结合完的荧光标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若样品中无相关抗原,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。

[0107] 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。

[0108] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0109] 本发明使用或采用的各种材料的来源及相关试剂的配制

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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  $\text{NaN}_3$ ,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。

[0113] 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。

[0114] 5、兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 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 2mg/ml。

[0115] 6、兔抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体 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 2mg/ml。

[0116] 7、兔抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 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 2mg/ml。

[0117] 8、鼠抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 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 1mg/ml。

[0118] 9、鼠抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体 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 1mg/ml。

[0119] 10、鼠抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 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 1mg/ml。

[0120] 11、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。

[0121] 12、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。

[0122] 13、玻璃纤维素膜 :厚度为 0.4mm,吸水量为 42mg/cm<sup>2</sup>,玻璃纤维直径为 0.6-3 μ m,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)。

[0123] 14、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)。

[0124] 15、硝酸纤维素膜 :型号为 Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于 Millipore 公司。

[0125] 16、吸水滤纸 :厚度为 0.95mm,吸水速度为 60s/4cm,吸水量为 700mg/cm<sup>2</sup>,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)。

[0126] 17、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。

[0127] 18、I 型人副流感病毒 :为 ATCC 标准株 C35,购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC),编号为 ATCC VR-94。

[0128] 19、II 型人副流感病毒 :为 ATCC 标准株 Greer,购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC),编号为 ATCC VR-92。

[0129] 20、III 型人副流感病毒 :为 ATCC 标准株 C243,购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC),编号为 ATCC VR-93。

[0130] 21、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)。

[0131] 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 :

[0132] 实施例 1 (制备实施例)

[0133] 结合垫的制备

[0134] (一) 重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白的制备、纯化与复性

[0135] (1) 相关基因的克隆

[0136] 对 I、II、III 型人副流感病毒 HN 蛋白 (其 NCBI 蛋白质数据库中的 accession number 分别为 AAC23946.1、BAA00739.1 及 ACF28540.1) 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,再根据大肠杆菌密码子偏好性,对其进行密码子优化,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 hn1, hn2, hn3。其基因全序列如列表所示。其中, hn1 基因编码的蛋白质序列为天然 I 型人副流感病毒 HN 蛋白(accession number:AAC23946.1)的 214-508aa。hn2 基因编码的蛋白质序列为天然 II 型人副流感病毒 HN 蛋白(accession number:BAA00739.1)的 312-552aa。hn3 基因编码的蛋白质序列为天然 III 型人副流感病毒 HN 蛋白(accession number:ACF28540.1)的 243-512aa。将分别含有该三段人工合成的 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 hn1, hn2 及 hn3 基因连入 pET-28a(+) 载体中,并转化大肠杆菌 TOP10,构建 pET-HN1、pET-HN2、pET-HN3 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 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白。

[0137] (2)HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白的表达与纯化

[0138] 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  $\mu$ 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-HN1、pET-HN2、pET-HN3 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  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> = 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。将此三份菌体分别用 20mL 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次并再次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,即为包涵体。分别将此三份包涵体用洗涤缓冲液(20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,0.5M NaCl;3M 尿素,30mM 咪唑,pH7.4)洗涤两次后,12000g 离心 15min 收集沉淀。将三份沉淀分别用 Binding buffer(20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,0.5M NaCl;8M 尿素,30mM 咪唑,pH7.4)于室温下溶解后,12000g 离心 15min,上清用 0.45  $\mu$ m 的滤膜进行过滤。此三份溶解液均用 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:

[0139] 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。

[0140] 2) 用 10mL Binding buffer 平衡,1mL/min 流速。

[0141] 3) 将融合蛋白上样,1mL/min 流速。

[0142] 4) 用 10mL Binding buffer,以 1mL/min 流速洗柱。

[0143] 5) 用 10mL Elution buffer(20mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,0.5M NaCl;8M 尿素,500mM 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。

[0144] (3)HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白的复性

[0145] 将上述经 His Trap affinity columns 纯化的重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白,先各分别用含 4mol/L 尿素的磷酸盐缓冲液透析过夜,然后再各分别用含 2、1、0.6、

0.2mol/L 尿素的磷酸盐缓冲液梯度透析各 4h, 最后用磷酸盐缓冲液透析 4h。将透析液各用 12000rpm 离心 15min, 各上清即为复性的重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白。经 Bradford 试剂盒进行蛋白质浓度测定后, 调整其浓度均为 0.2mg/mL。

[0146] (二) 重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0147] (1) 兔抗重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0148] 用上述纯化的重组 HN1-His 融合蛋白按照 200  $\mu$ 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 HN1-His 融合蛋白按照 200  $\mu$ 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(用间接 ELISA 法测定抗体效价大于  $1 \times 10^5$ )。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调整为 2mg/mL,  $-20^\circ\text{C}$  保藏备用, 至此制得兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG。

[0149] 用上述同样的方法, 分别用上述纯化的重组 HN2-His、HN3-His 融合蛋白分别制备兔抗重组 HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG。此三种抗体作为量子点标记用。Western blot 试验表明, 此三种多克隆抗体 IgG 均能对应性的特异性识别 I、II、III 型人副流感病毒全长 HN 蛋白。

[0150] (2) 鼠抗重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0151] 用上述纯化的重组 HN1-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  $\mu$ 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  $1 \times 10^5$ )。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 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液调整为 1mg/mL, 备用, 至此制得鼠抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG。

[0152] 用上述同样的方法, 分别用上述纯化的重组 HN2-His、HN3-His 融合蛋白分别制备鼠抗重组 HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG。此三种抗体作为包被检测线用。Western blot 试验表明, 此三种多克隆抗体 IgG 均能对应性的特异性识别 I、II、III 型人副流感病毒全长 HN 蛋白。

[0153] (三) 量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的制备与纯化

[0154] a. 量子点标记抗人副流感病毒多克隆抗体反应条件的优化:

[0155] 1) 量子点标记抗体探针最佳标记 pH 的确定

[0156] 将标记反应中磷酸缓冲液 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 pH7.3。

[0157] 2) 量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0158] 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, 确定量子点标记多抗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。

[0159] 3) 量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确

[0160] 以乙醇胺、Tris、PEG2000-NH<sub>2</sub> 或者 BSA 作为封闭剂, 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-NH<sub>2</sub> 为最佳封闭剂, 其可显著提高复合物的胶体稳定性及免疫活性。

[0161] b. 标记过程:

[0162] 向微量离心管中依次加入 2nmol 量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和 300nmol 碳二亚胺 (EDC), 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, 透析去除过量的活化剂 (sulfo-NHS 与 EDC)。在活化的量子点中, 加入 6nmol 的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG, 避光反应 2h, 加入端氨基化聚乙二醇 (PEG2000-NH<sub>2</sub>) 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。

[0163] 按照上述相同方法, 分别利用兔抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 及兔抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别制得量子点标记的兔抗重组 HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG。将三种量子点标记的抗体按 1:1:1 的体积比混合后备用。

[0164] (四) 量子点分别标记的兔抗重组 HN1-His、HN2-His、HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 的负载

[0165] 将聚酯纤维膜浸入步骤(三)所得到的量子点标记的多抗 IgG 混合液中 1h, 取出, 25°C 干燥后裁成后规格为 4cm\*0.6cm/条后, 4°C 密封保存备用, 至此制得结合垫。

[0166] 实施例 2(制备实施例)

[0167] 样品垫的制备

[0168] 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°C 通风干燥后, 剪裁成规格为 4cm\*2.5cm/条后, 即制得样品垫, 25°C 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。

[0169] 实施例 3(制备实施例)

[0170] 检测层的制备

[0171] 将硝酸纤维素膜剪成 4cm\*4cm 大小。将实施例 1 中所制备的鼠抗重组 HN1-His、HN2-His 及 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 分别装入 BIODOT 划膜仪喷头中, 设置 1 μl/cm 的喷速依次喷于硝酸纤维素膜上, 作为三条检测线, 检测线间距 0.7cm。同样, 将羊抗兔 IgG

装入 BIODOT 划膜仪喷头中,设置  $1\ \mu\text{l}/\text{cm}$  的喷速喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,其与最近的一条检测线间距亦为  $0.7\text{cm}$ 。将喷好的硝酸纤维素膜  $37^\circ\text{C}$  干燥  $2\text{h}$ ,  $4^\circ\text{C}$  密封干燥保存。

[0172] 实施例 4(制备实施例)

[0173] 检测卡的组装

[0174] 下面结合附图 1 及附图 2 对检测卡的组作进一步说明。

[0175] 将底板裁剪成  $4\text{cm}\times 9.3\text{cm}$  大小,备用。

[0176] 将吸水滤纸裁剪成  $4\text{cm}\times 3\text{cm}$  大小,作为吸水垫,备用。

[0177] 组装工作于生物安全柜内操作,首先将底板 9 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 7 和检测线 4、5、6 的硝酸纤维素膜粘贴到底板 9 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 8 组装到底板 9 上,使其左边与检测层右末端有  $0.2\text{cm}$  的重叠,其右边缘则与底板 9 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  $0.3\text{cm}$  重叠于检测层 3 的左边缘处,  $0.3\text{cm}$  粘于底板 9 上。最后将实施例 2 所描述的样品垫 1 则按一边  $0.3\text{cm}$  重叠于结合垫 2 的左边缘处,另一边与底板 9 的左边缘对齐,粘于底板 9 上并小心抹平。将组装好的检测板于切条机下载成  $4.0\text{mm}$  宽的检测卡,  $4^\circ\text{C}$  密封干燥避光保存。

[0178] 实施例 5(应用实施例)

[0179] 检测卡的使用方法

[0180] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有  $500\ \mu\text{l}$  的添加了  $1\%$  Triton x-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  $120\ \mu\text{L}$  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  $365\text{nm}$ )观察检测结果。若样品中含有 I 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的量子点标记的兔抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体 IgG 结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN1-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的荧光检测线 1,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;若样品中有 II 型人副流感病毒抗原,则与结合垫中的相应的量子点标记抗体结合后,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN2-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的荧光检测线 2,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;若样品中有 III 型人副流感病毒抗原,则亦与结合垫中相应的量子点标记抗体结合,通过层析作用先与硝酸纤维素膜上的鼠抗重组 HN3-His 融合蛋白多克隆抗体结合后在紫外线激发下形成肉眼可见的荧光检测线 3,未结合完的荧光标记抗体继续层析与抗兔 IgG 结合形成肉眼可见的第二条荧光质控线;若样品中无相关抗原,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。

[0181] 实施例 6(应用实施例)

[0182] 本发明的应用效果举例

[0183] 本实施例中所指的分型检测人副流感病毒的量子点标记免疫层析检测卡的检测方法参照实施例 5 所述的操作步骤。

[0184] 1) 特异性试验

[0185] 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)、肺炎链球菌 (ATCC 编号 49619)、流感嗜血杆菌 (ATCC 编号 53781)、卡他莫拉菌 (ATCC 编号 25238)、等代替人副流感病毒进行检测,检测卡检测含这些微生物的 PBST 稀释液都为阴性。同时,检测 I、II、III 型人副流感病毒样品时,亦未发现三种病毒之间的交叉反应。

#### [0186] 2) 敏感性试验

[0187] 将 I 型人副流感病毒抗原用磷酸盐缓冲液调整为浓度分别为 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.003, 0.001  $\mu\text{g/mL}$  的浓度后,取出 120  $\mu\text{L}$  滴于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,紫外波长 365nm) 观察检测结果。在对照线出现荧光的前提下,若相应的检测线上有肉眼可见的荧光,则判断为阳性,否则为阴性。结果表明,该检测卡检测 I 型人副流感病毒的检测下限为 0.005  $\mu\text{g/mL}$ ,即 5ng/mL。按同样的方法对 II、III 型人副流感病毒进行检测,确定其检测下限分别为 5ng/mL 及 3ng/mL。

#### [0188] 3) 重复性试验

##### [0189] 3.1) 检测卡的批内重复性测试

[0190] 选取在 4 $^{\circ}\text{C}$  保存的同一批组装好好的检测卡,每天检测一次三个不同浓度含 I 型人副流感病毒的样品。通过观察检测卡上相应检测线上的荧光强度变化来确定检测卡的重复性。实验结果显示,批内重复的变异系数为 2.3%。以同样方法用同一批检测卡对含有 II 型人副流感病毒、III 型人副流感病毒的样品进行检测,发现批内重复的变异系数分别为 2.6% 和 2.4%。

##### [0191] 3.2) 检测卡的批间重复性测定

[0192] 选取在 4 $^{\circ}\text{C}$  保存的 3 个不同批次组装好好的检测卡,选定在相一时间,测定同一含 I 型人副流感病毒的样品。通过观察检测卡上相应检测线上的荧光强度变化来确定检测卡的重复性。实验结果显示,批间重复的变异系数为 4.3%。以同样方法用同一批检测卡对含有 II 型人副流感病毒、III 型人副流感病毒的样品进行检测,发现批内重复的变异系数分别为 3.5% 和 3.8%。

##### [0193] 3.3) 再现性试验

[0194] 将同一批次的检测卡由不同的人员在同一实验室和同一人员在不同的实验室进行操作,通过检测卡检测线上的荧光效果来确定检测卡的再现性,结果显示,该检测卡对 I, II, III 型人副流感病毒的检测结果均具有再现性。

##### [0195] 3.4) 稳定性试验

[0196] 将同一批次的检测卡分别用塑料袋及铝箔密封,加干燥剂于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、室温保存和在 37 $^{\circ}\text{C}$  做加速破坏试验,在不同的保存期与新制备的检测卡时对分别含有 I 型人副流感病毒的样品 (10ng/mL 的病毒) 进行测定,通过检测卡检测线上荧光强度的变化来确定检测卡的稳定性。

[0197] 实验结果显示,同一批次的检测卡于 4 $^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月的期间,每周测定的结果表明,荧光条带均清晰可见,强度未见明显变化,说明检测卡在 4 $^{\circ}\text{C}$  可保存 6 个月以上,还在继续检测;同一批次的检测卡于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月的期间,分别每半个月检测一次,迄今为

止检测卡还没出现荧光强度有所下降的变化,还在继续检测;同一批次的检测卡于 37℃破坏试验期间,每天都进行检测,在第 12 天时检测卡的荧光强度有所降低。对 II、III 型人副流感病毒的实验结果与上述 II 型人副流感病毒的实验结果相同。说明检测卡在 37℃可保存 11 天半,相当于 2 ~ 8℃存放 17 个月左右,稳定性符合国家所规定的指标。

[0198] 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

**hn1 基因序列****CATATG**CAGGGTTGCGCTGACATCGGTAATCTTACCAGGTTCTGCAGCTGGGTTACATCTCTCT*NdeI*

GAACTCTGACATGTACCCGGACCTGAACCCGGTTATCTCTCACACCTACGACATCAACGACAACCGTA  
 AATCTTGCTCTGTTATCGCTGCTGGTACCCGTGGTTACCAGCTGTGCTCTCTGCCGACCGTTAACGAA  
 ACCACCGACTACTCTTCTGAAGGTATCGAAGACCTGGTTTTCGACATCCTGGACCTGAAAGGTA  
 CAAATCTCACCGTTACAAAAACGAAGACATCACCTTCGACCACCCGTTCTCTGCTATGTACCCGTCTGT  
 TGGTTCTGGTATCAAAATCGAAAACACCCTGATCTTCCTGGGTTACGGTGGTCTGACCACCCCGCTGC  
 AGGGTGACACCAAATGCGTTATCAACCGTTGCACCAACGTTAACCAGTCTGTTTGAACGACGCTCTG  
 AAAATCACCTGGCTGAAAAACGTCAGGTTGTTAACGTTCTGATCCGTATCAACAACACTACCTGTCTGA  
 CCGTCCGAAAATCGTTGTTGAAACCATCCCGATCACCCAGAACTACCTGGGTGCTGAAGGTCGTCTGC  
 TGAAACTGGGTAAAAAATCTACATCTACACCCGTTCTTCTGGTTGGCACTCTAACCTGCAGATCGGT  
 TCTCTGGACATCAACAACCCGATGACCATCAAATGGGCTCCGCACGAAGTTCTGTCTCGTCCGGGTAA  
 CCAGGACTGCAACTGGTACAACCGTTGCCCGCTGAATGCATATCGGGTGTCTACACCGACGCGTAC  
 CCGCTGTCTCCGGACGCTGTTAACGTTGCTACCACCACCTGTACGCTAACACCTCTCGTGTTAACCC  
 GACCATCATG**TA****ACTCGAG**

*XhoI***HN1 蛋白质序列**

QGCADIGKSYQVLQQLGYISLNSDMYPDLNPVISHTYDINDNRKSCSVIAAGTRGYQLCSLPTVNETDY  
 SSEGIEDLVFDIILDLKGTKSHRYKNEDITFDHPFSAMYPSVSGIKIENTLIFLGYGGLTTPLOGDTK  
 CVINRCTNVNQSVCDALKITWLKKRQVVNVLIRINNYLSDRPKIVVETIPITQNYLGAEGRLLKLGKK  
 IYIYTRSSGWHSNLQIGSLDINNPMTIKWAPHEVLSRPGNQDCNWNRCPRECISGVYTDAYPLSPDAV  
 NVATTTLYANTSRVNPTIM

[0002]

**hn2 基因序列**

**CATATG**GGTGGTCTGATCAAAGGTACCCCGTCTTACAACAAACAGTCTTCTCGTTACTTCATCCCG

*NdeI*

AAACACCCGAACATCACCTGCGCTGGTAAATCTTCTGAACAGGCTGCTGCTGCTCGTTCTTCTTACGT  
 TATCCGTTACCACTCTAACCGTCTGCTGCAGTCTGCTGTTCTGATCTGCCCGCTGTCTGACATGCACA  
 CCGCTCGTTGCAACCTGGTTATGTTCAACAACCTCTCAGGTTATGATGGGTGCTGAAGGTCGTCTGTA  
 CGTTATCGACAACAACCTGTACTACTACCAGCGTTCTTCTTCTTGGTGGTCTGCTTCTCTGTTCTACC  
 GTATCAACACCGACTTCTC TAAAGGTATCCCGCCGATCATCGAAGCTCAGTGGGTTCCGCTTACCA  
 GGTCCCGCTCCGGGTGTTATGCCGTGCAACGCTACCTCTTCTGCCCGGCTAACTGCATAACTGGG  
 GTATACGCCGACGTGTGGCCGCTGAACGACCCGGAACCGACCTCTCAGAACGCTCTGAACCCGAACT  
 ACCGTTTCGCTGGTGCTTTCCTGCGTAACGAATCTAACCGTACCAACCCGACCTTCTACACCGCTTCT  
 GCTTCTGCTCTGCTGAACACCACCGGTTTCAACAACACCAACCACAAAGCTGCTTACACCTCTTCTACC  
 TGCTTCAAAAACACCGGTACCCAGAAAATCTACTGCCTGATCATCATCGAAATG **TAACTCGAG**

*XhoI*

**HN2 蛋白质序列**

GGLIKGTPSYNKQSSRYFIPKHPNITCAGKSSEQAAAARSSYVIRYHSNRLQLQSAVLICPLSDMHTARC  
 NLVMFNNSQVMMGAEGRLYVIDNNLYYYQRSSSWWSASLFYRINTDFSKGIPPIIEAQWVPSYQVPRPG  
 VMPCNATSFPCANCITGVYADVWPLNDPEPTSQNALNPNYRFAGAFLRNESNRNTPFTYASASALLNT  
 TGFNNTNHKAAYTSSSTCFKNTGTQKIYCLIIEM

[0003]

**hn3 基因序列****CATATG**ATCTCTCACACCTTCAACATCAACGACAACCGTAAATCTTGCTCTCTGGCTCTGCTGAACA*NdeI*

CCGACGTTTACCAGCTGTGCTCTACCCCGAAAGTTGACGAACGTTCTGACTACGCTTCTTCTGGTATCG  
 AAGACATCGTTCTGGACATCGTTAACTACGACGGTTCTATCTCTACCACCCGTTTCAAAAACAACA  
 TCTCTTTTCGACCAGCCGTACGCTGCTCTGTACCCGTCTGTTGGTCCGGGTATCTACTACAAAGGTAAAA  
 TCATCTTCTCTGGGTTACGGTGGTCTGGAACACCCGATCAACGAAAACGCTATCTGCAACACCACCGGTT  
 GCCCGGGTAAAACCCAGCGTGACTGCAACCAGGCTTCTCTGTCTCCGTGGTTCTCTGACCGTCGTATGG  
 TTAATCTATCATCGTTGTTGACAAAGGTCTGAACTCTGTTCCGAAACTGAAAGTTTGGACCATCTCTA  
 TGCGTCAGAACTACTGGGGTTCTGAAGGTCGTCTGCTGTCTGGGTAACAAAATCTACATCTACACCC  
 GTTCTACCTCTTGGCACTCTAAACTGCAGCTGGGTATCATCGACATCACCGACTACTCTGACATCCGTA  
 TCAAATGGACCTGGCACAACGTTCTGTCTCGTCCGGGTAACAACGAATGCCCGTGGGGTCACTCTTGCC  
 CGGACGGTTGCATAACTGGTGTCTACACCGACGCGTACCCGCTGAACCCGACCGGCTCGATCGTGAGCT  
 CTGTTATCCTGGACTCTCAGAAATCTCGTGTAAACCCGGTTATCACCTACTCTACCGCT**TA****ACTCG**

*XhoI***AG****HN3 蛋白质序列**

ISHTFNINDNRKSCSLALLNTDVYQLCSTPKVDERSDYASSGIEDIVLDIVNYDGSISTTRFKNNNISE  
 DQPYAALYPSVGPFIYYKGIIFLGYGGLEHPINENAINNTGCPGKTQRDCNQASLSPWFSDRRMVNS  
 IIVVDKGLNSVPKLKVWTISMRQNYWGSEGRLLLLGNKIYIYTRSTSWHSLQLGIIDITDYSDIRIKW  
 TWHNVLSRPGNNECPWGHSCPDCITGVYTDAYPLNPTGSIVSSVILDSQKSRVNPVITYSTA

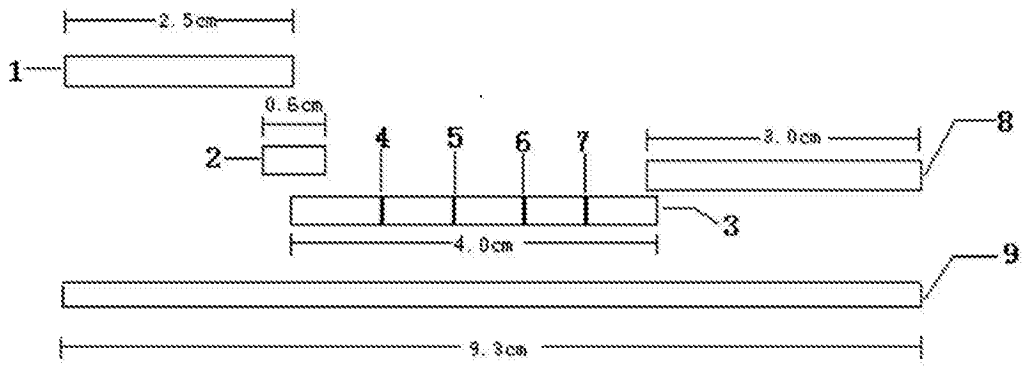


图 1

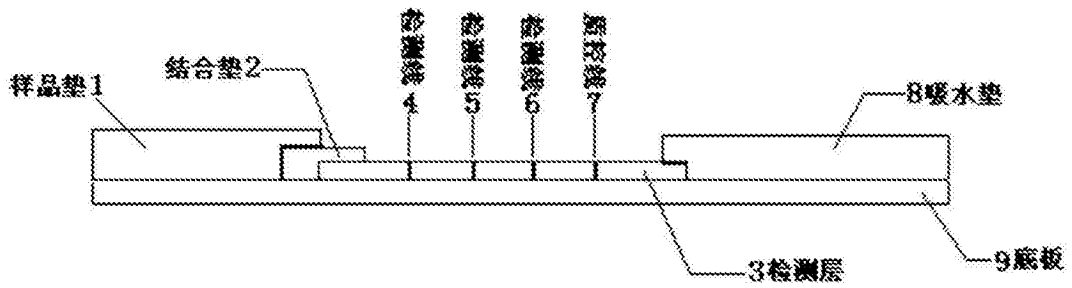


图 2

专利名称(译)	人副流感病毒量子点免疫层析分型检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105277693A</a>	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410405742.2	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 G01N33/531 G01N33/533		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN105277693B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种人副流感病毒量子点免疫层析分型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分别标记的兔抗I型、II型以及III型人副流感病毒HN蛋白多克隆抗体的混合物；检测层是由带有三条检测线以及一条质控线的固相硝酸纤维素膜构成；三条检测线分别包被有鼠抗I型、II型以及III型人副流感病毒多克隆抗体；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。

