



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239334 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811048834.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2018.09.10

G01N 33/558(2006.01)

(71)申请人 吉林大学

G01N 33/533(2006.01)

地址 130012 吉林省长春市人民大街5988
号

申请人 长春恒晓生物科技有限责任公司

(72)发明人 刘斌 李宝民 关恒 张蕾 刘戈
赵青 史永丰 刘宁 李添伟
隋宝珍 张金玲 仇淑园 孙净
黄景林 高敏 孙晓婷 林林
朱道林 孙玉峰 王贺

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 白冬冬

权利要求书1页 说明书16页 附图9页

(54)发明名称

建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂

盒

(57)摘要

一种建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA
试剂盒，属于基因重组及蛋白制备技术领域。本
发明的目的是用SF9细胞表达Flag-MxA，纯化出
MxA蛋白，作为校准品。制备时间分辨荧光免疫层
析法检测MxA试纸卡，用时间分辨荧光免疫法分
析仪测定试纸卡荧光强度，进一步获得样品中
MxA浓度的建立时间分辨荧光免疫层析法检测
MxA试剂盒。本发明包括试纸卡和低渗溶液；在底
板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有
MxA抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质
控线的硝酸纤维素膜和吸水垫，组装后形成试纸
板，然后切割成3-5mm宽的试纸条，将试纸条装入
塑料外壳形成试纸卡。本发明采用昆虫细胞系统
表达MxA，昆虫细胞近似于人体细胞，但产量高，
成本低，能大量生产。

A
CN 109239334 A

CN

1. 一种建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：包括试纸卡和低渗溶液；在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MxA抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫，组装后形成试纸板，然后切割成3-5mm宽的试纸条，将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

2. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：硝酸纤维素膜上包被有MxA抗体形成检测线和抗IgG抗体形成质控线。

3. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：荧光微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种，直径为100-500nm；根据权利要求1所述的荧光微球标记镧系元素螯合物，包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)螯合物中一种；进一步优选为铕螯合物(Europium Chelate)，激发波长是420nm，发射波长是615nm。

4. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：低渗溶液是Tris，磷酸盐，碳酸盐缓冲液，盐浓度低于10mm，含0.1-0.5%NP-40，用于裂解细胞，释放出细胞内的蛋白。

5. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：所用时间分辨荧光免疫层析(TRFIA)分析仪，波长350-430nm激发光作用后，延时100-400uS，再测定波长600-650nm荧光强度。

6. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：MxA抗体-荧光微球，选用镧系元素螯合物荧光标记羧基修饰微球，用碳二亚胺(EDC)和N-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)处理羧基修饰荧光微球后，MxA抗体偶联到上述荧光微球上，MxA抗体与荧光微球重量比为1:50-1:5，用喷膜仪将MxA抗体-荧光微球喷涂于结合垫上，干燥后，封存备用。

7. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：制备MxA校准品：用PCR从pCS6-MX1扩增出MxA DNA(核酸序列1-1989)，构建pFastBac-Flag-MxA载体，转导到HD10Bac 细菌中，产生重组Flag-MxA AcNPV(昆虫病毒)质粒；再转导此质粒进到昆虫细胞(SF9细胞)，产生重组Flag-MxA AcNPV；此病毒感染SF9细胞后，表达出Flag-MxA蛋白；用Anti-Flag 抗体亲和层析法纯化出Flag-MxA蛋白，此纯化Flag-MxA蛋白作为校准品。

8. 根据权利要求1所述的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，其特征在于：Flag-MxA为校准品，用TRFIA分析仪测定不同浓度MxA校准品试纸卡检测线上呈现荧光强度，制备MxA浓度标准曲线，建立MxA浓度标准卡，输入到TRFIA分析仪，建立TRFIA分析仪自动显示样品中MxA浓度检测系统。

建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于基因重组及蛋白制备技术领域。

背景技术

[0002] 感染性疾病是指由致病微生物(细菌、病毒、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体、真菌等)通过不同方式引起人体发生感染并出现临床症状的疾病,其中最常见是细菌和病毒感染,需要快速诊断细菌或病毒感染,指导临床治疗方向。临幊上常用检测血清中降钙素原(Procalcitonin ,PCT)指标,来快速诊断细菌感染发生,指导抗细菌感染治疗。目前,还没有一个血液学指标能诊断病毒感染发生,需要寻找判定病毒感染血液指标,而血液中单核细胞产生粘病毒抗性基因蛋白A (Myxovirus resistance protein A,MxA)有潜力作为病毒感染指标,用于早期诊断病毒感染发生。

[0003] MxA是血液单核细胞质中蛋白,MxA基因位于21 号染色体长臂远端 (21q22) , 经 IFN- α /β处理细胞,诱导产生78KDa MxA蛋白,MxA属于大GTP酶的动态蛋白 (dynamin) 超家族成员,MxA的特征是相对高分子量,自我聚合倾向,相对比较低GTP亲和力和高GTP水解速率,不同种群MxA蛋白间的同源性很高。

[0004] MxA蛋白主要由3个区域组成: (1) N端GTPase结构域,由约300个氨基酸组成,是GTP 酶活性区,包含3个 GTP结合基序,1个自我组装区; (2) 中央相互作用结构域:约含有150个氨基酸; (3) C端GTPase效应结构域,约含有100个氨基酸,其中含2个亮氨酸拉链结构, 形成分子双螺旋结构。

发明内容

[0005] 本发明的目的是用SF9细胞表达Flag-MxA,纯化出MxA蛋白,作为校准品。制备时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试纸卡,用时间分辨荧光免疫法分析仪测定试纸卡荧光强度,进一步获得样品中MxA浓度的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒。

[0006] 本发明包括试纸卡和低渗溶液;在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MxA抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后形成试纸板,然后切割成3-5mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

[0007] 本发明硝酸纤维素膜上包被有MxA抗体形成检测线和抗IgG抗体形成质控线。

[0008] 本发明荧光微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种,直径为100-500nm;根据权利要求1所述的荧光微球标记镧系元素螯合物,包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)螯合物中一种;进一步优选为铕螯合物(Europium Chelate),激发波长是420nm,发射波长是615nm。

[0009] 本发明低渗溶液是Tris,磷酸盐,碳酸盐缓冲液,盐浓度低于10mm,含0.1-0.5%NP-40, 用于裂解细胞,释放出细胞内的蛋白。

[0010] 本发明所用时间分辨荧光免疫层析(TRFIA)分析仪,波长350-430nm激发光作用后,延时100-400uS,再测定波长600-650nm荧光强度。

[0011] 本发明MxA抗体-荧光微球,选用镧系元素螯合物荧光标记羧基修饰微球,用碳二亚胺(EDC)和N-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)处理羧基修饰荧光微球后,MxA抗体偶联到上述荧光微球上,MxA抗体与荧光微球重量比为1:50-1:5,用喷膜仪将MxA抗体-荧光微球喷涂于结合垫上,干燥后,封存备用。

[0012] 本发明制备MxA校准品:用PCR从pCS6-MX1扩增出MxA DNA(核酸序列1-1989),构建pFastBac-Flag-MxA载体,转导到HD10Bac 细菌中,产生重组Flag-MxA AcNPV(昆虫病毒)质粒;再转导此质粒进到昆虫细胞(SF9细胞),产生重组Flag-MxA AcNPV;此病毒感染SF9细胞后,表达出Flag-MxA蛋白;用Anti-Flag 抗体亲和层析法纯化出Flag-MxA蛋白,此纯化Flag-MxA蛋白作为校准品。

[0013] 本发明Flag-MxA为校准品,用TRFIA分析仪测定不同浓度MxA校准品试纸卡检测线上呈现荧光强度,制备MxA浓度标准曲线,建立MxA浓度标准卡,输入到TRFIA分析仪,建立TRFIA分析仪自动显示样品中MxA浓度检测系统。

[0014] 本发明采用昆虫细胞系统表达MxA,昆虫细胞近似于人体细胞,但产量高,成本低,能大量生产,纯化出MxA具有蛋白自然结构和抗原性,能作为TRFIA检测MxA浓度试剂盒的校准品。

附图说明

[0015] 图1是侧向免疫层析法试纸条侧面图;

图2是包装外壳后侧向免疫层析法试纸卡示意图;图1和图2中1是底板,2是样品垫,3是结合垫,4是硝酸纤维素膜,5是检测线,6是质控线,7是吸水垫,8是样品窗口,9是检测窗口,10是塑料外壳;

图3是侧向免疫层析法试纸条长度示意图;

图4是PCR产物;

图5是Sal1/Xhol切割pFastBac-MxA质粒DNA;

图6是Flag-MxA AcNPV重组质粒PCR产物;

图7是银染法测定Flag-MxA纯度;

图8是MxA抗体的免疫印迹分析;

图9是BSA浓度标准曲线;

图10是MxA浓度标准曲线;

图11是MxA浓度敏感度曲线;

图12是MxA蛋白结构示意图。

具体实施方式

[0016] 本发明是用纯化的重组MxA蛋白为校准品,建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒过程,是表达和纯化出Flag-MxA,及用时间分辨荧光免疫层析法定量检测MxA过程。

[0017] 研究发现,病毒感染人体后,诱导人体细胞分泌的一种具有调节机体免疫功能、抗病毒、抗肿瘤等多种生物活性的宿主特异性糖蛋白,称为干扰素(Interferon, IFN),是机体防御系统的重要组成部分,由于IFN在血液中寿命很短,不适合作为检测指标。I 型INF(α/β)进一步诱导人外周血单核细胞,巨噬细胞产生MxA,又称INF诱导蛋白P78(Interferon-Inducible Protein P78, IFI78),MxA分布于细胞质中的蛋白质,具有广谱的抗病毒活性,

对多种RNA病毒和部分DNA病毒均有抑制作用，并且MxA水平是代表病毒诱导机体产生IFN状态指标。

[0018] 试验表明，人单核细胞在受到人免疫缺陷病毒(HIV)感染后6小时可产生MxA，14天达高峰，MxA表达可不依赖IFN的存在。腺病毒3型可诱导MxA蛋白产生，MxA对病毒反应非常敏感，高度稀释腺病毒3型可以诱导MxA产生。

[0019] 单核细胞中MxA基础浓度很低，但I型IFN(α/β)及多种病毒诱导后，人外周血单个核细胞中产生大量MxA，尤以人单核白细胞对INF敏感性高，合成大量MxA，可占细胞质蛋白总量0.5%；MxA半衰期较长，达2.5天。MxA表现出基础值低，正常人群中MxA值低于100ng/ml，而病毒感染人群MxA值可高达1000ng/ml以上，适合作为病毒感染早期诊断血液学指标。另外，其它细胞因子，如IL-1或TNFα，不诱导MxA水平增高；细菌、真菌、寄生虫及其它微生物感染，不能诱导细胞MxA表达，表明MxA是病毒感染特异性指标。

[0020] 许多病毒种类，包括呼吸道合胞病毒、腺病毒、轮状病毒、流感病毒、疱疹病毒、EB病毒等，可诱导细胞表达MxA增高，表明MxA不是鉴定病毒感染类型的指标。

[0021] 急性感染病人，儿科病人，重症病人，ICU病人，大创伤及休克病人都需要简单，快速鉴别细菌感染或病毒感染，指导药物治疗，并监测病性进展。本发明采用侧向免疫层析法(Lateral flow immunoassay, LFIA)测定外周血单核细胞裂解液中MxA，15分钟内出结果，用时间分辨荧光免疫法(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)定量检测MxA浓度，快速，准确地检测出样品中MxA浓度，用于诊断急性病毒感染发生。

[0022] 一. 制备MxA校准品

本发明采用昆虫细胞系统表达MxA，昆虫细胞近似于人体细胞，但产量高，成本低，能大量生产，纯化出MxA具有蛋白自然结构和抗原性，能作为TRFIA检测MxA浓度试剂盒的校准品。

[0023] 用PCR从pCS6-MX1扩增出MxA DNA(核酸序列1-1989)。选用昆虫细胞表达载体pFastBac-Flag，含Polyhedrin启动子，在昆虫细胞中表达外源性蛋白；此载体插入8个氨基酸残基(DYKDDDDK)短肽(Flag)DNA序列，用于表达Flag融合蛋白；此载体带有部分AcNPV DNA序列，用于在HD10Bac细菌中产生基因重组昆虫病毒(AcNPV)质粒。用内切酶NdeI/SalI切割MxA DNA，NdeI/XhoI切割pFastBac-Flag，将MxA DNA连接到pFastBac-Flag NdeI/XhoI部位，构建pFastBac-Flag-MxA载体，转导到HD10Bac细菌中，产生重组Flag-MxA AcNPV质粒；再转导此质粒进到SF9细胞，产生重组Flag-MxA AcNPV；此病毒感染SF9细胞后，表达出Flag-MxA蛋白。

[0024] 本发明表达全长MxA(1-662氨基酸残基)，N-端带有Flag标记短肽，用Anti-Flag M2 affinity agarose亲合层析法分离和纯化出Flag-MxA。

[0025] 纯化Flag-MxA进行SDS-PAGE电泳，再做银染法，测定Flag-MxA纯度达到98%以上；Western blot法进一步证实，抗MxA抗体结合Flag-MxA蛋白。用纯化Flag-MxA作为校准品，-80℃冻存。

[0026] 二. 制备时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试纸卡

本发明所述的时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，由试纸卡和低渗溶液组成。

[0027] 所述试纸卡，是在底板上顺次相互搭接预处理样品垫、吸附有MxA抗体-荧光微球结合垫、喷涂有检测线和质控线硝酸纤维素膜和吸水垫，组装成试纸板，然后切割成3-5mm宽试纸条，将试纸条装入塑料外壳中形成试纸卡。

[0028] 所述结合垫上吸附的荧光微球,直径范围100–500nm,进一步优选,所选用荧光微球直径是300nm。

[0029] 所述荧光微球标记有镧系元素螯合物,包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)螯合物中的任意一种或几种。进一步优选,为铕螯合物(Europium Chelate),在420nm激发光源作用下,发射出波长615nm荧光。

[0030] 所述与荧光微球偶联抗体为羊抗MxA抗体;所述检测线包被为MxA单克隆抗体;所述质控线包被抗体为抗羊IgG抗体。

[0031] 所述的低渗溶液是Tris,磷酸盐,碳酸盐缓冲液,盐浓度低于10mm,含0.1–0.5%NP-40。

[0032] 所述TRFIA分析仪,在350–430nm波长激发光作用后,延时100–400uS,测定600–650nm波长荧光强度。对MxA检测范围为0.1–100ng/mL。

[0033] 1. 制备MxA抗体-荧光微球

(1) 加MxA抗体到抗体净化和浓缩离心柱中(Innova Biosciences),按说明书步骤,净化和浓缩MxA抗体,用磷酸盐缓冲液调节MxA抗体浓度到0.5–2.0mg/ml;

(2) 用25mmol MES缓冲液(pH6.0)洗涤铕螯合物荧光标记羧基修饰微球,加入5–20mmol碳二亚胺(EDC)和10–40mmol N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),室温下,反应10–30分钟。

[0034] (3) 用上述MES缓冲液洗涤荧光微球,用50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)复溶微球后,加入净化后MxA抗体,使MxA抗体与荧光微球的质量比为1:50–1:10,室温下,反应2小时。

[0035] (4) 用200mM Tris(pH7.5)终止反应,0.2% BSA,0.01% Tween-20,50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)洗涤荧光微球,再复溶MxA抗体-荧光微球。

[0036] 2. 制备吸附MxA抗体-荧光微球结合垫

用10mM 磷酸盐缓冲液(pH8.0),0.1% BSA,10% Sucrose,0.1% PEG,0.1% PVP,0.02% Tween20,0.01% NaN3复溶AMH抗体-荧光微球至需要浓度。本发明选用玻璃纤维结合垫,预处理后,上述玻璃纤维膜放在Bio-DotXYZ3060三维喷点平台上,用非接触式微量喷头,5ul–15ul/cm速度,将MxA抗体-荧光微球喷到玻璃纤维膜上,37°C烘干2–5小时,干燥封存,备用。

[0037] 3. 制备包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜

用5mM 磷酸盐缓冲液(pH8.0)含10% Sucrose,0.01% Tween20,0.01% NaN3溶解MxA抗体和抗IgG 抗体至需要浓度,将硝酸纤维素膜放在Bio-DotXYZ3060三维喷点平台上,用非接触式微量喷头,0.8–1.5ul/cm速度,将AMH抗体和抗鼠IgG 抗体喷到硝酸纤维素膜上,两线间隔4–6mm, 37°C烘干2–5小时,干燥封存,备用。

[0038] 4. 组装TRFIA免疫层析法检测MxA试纸卡

在底板上依次粘贴预理样品垫、吸附MxA抗体-荧光微球结合垫、包被有检测线和质控线硝酸纤维素膜和吸水垫,形成试纸板,再切割成4mm宽试纸条,将试纸条装入塑料外壳中形成试纸卡。

[0039] 三.TRFIA分析仪检测MxA浓度程序设定

本发明用铕螯合物为荧光物,铕螯合物峰值激发波长420nm,峰值发射波长是615nm,Stocks位移较大,可有效排除普通非特异性荧光对检测荧光的干扰。铕螯合物的荧光寿命较长,可达到数百微秒(uS),而普通荧光团的荧光衰变时间只有1~100μS,样品中的一些蛋白质荧光衰变时间更短,仅为1~10μS。用TRFIA分析仪测定铕螯合物荧光强度,延时100–

400μS后，待背景荧光和蛋白质荧光完全衰减后，再测定铕螯合物荧光信号。

[0040] 本发明使用TRFIA分析仪，激发波长350-430nm，接收波长600-650nm，延时100-400μS后，测定试纸卡检测线及质控线上荧光强度。

[0041] 四.建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA浓度方法

用低渗溶液稀释纯化Flag-MxA浓度到 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000ng/ml, 作为MxA校准品，加5ul MxA校准品到试纸卡的样品窗口部位，再加150ul低渗液样品窗口部位，进行膜层析反应，10-15分钟后，用TRFIA分析仪检测线试纸卡检测线和质控线的荧光强度。以MxA校准品浓度为纵坐标，校准品荧光强度为横坐标，制备MxA校准品浓度标准曲线，再获得MxA浓度标准卡，输入TRFIA分析仪，建立TRFIA分析仪自动显示MxA浓度系统。进一步测定5μl全血中MxA浓度。

[0042] 本发明包括试纸卡和低渗溶液；在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MxA抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫，组装后形成试纸板，然后切割成3-5mm宽的试纸条，将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。

[0043] 本发明硝酸纤维素膜上包被有MxA抗体形成检测线和抗IgG抗体形成质控线。

[0044] 本发明荧光微球表面修饰官能团为羧基、羟基或环氧基的一种，直径为100-500nm；根据权利要求1所述的荧光微球标记镧系元素螯合物，包括铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)螯合物中一种；进一步优选为铕螯合物(Europium Chelate)，激发波长是420nm，发射波长是615nm。

[0045] 本发明低渗溶液是Tris, 磷酸盐, 碳酸盐缓冲液，盐浓度低于10mm，含0.1-0.5%NP-40，用于裂解细胞，释放出细胞内的蛋白。

[0046] 本发明所用时间分辨荧光免疫层析(TRFIA)分析仪，波长350-430nm激发光作用后，延时100-400uS，再测定波长600-650nm荧光强度。

[0047] 本发明MxA抗体-荧光微球，选用镧系元素螯合物荧光标记羧基修饰微球，用碳二亚胺(EDC)和N-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)处理羧基修饰荧光微球后，MxA抗体偶联到上述荧光微球上，MxA抗体与荧光微球重量比为1:50-1:5，用喷膜仪将MxA抗体-荧光微球喷涂于结合垫上，干燥后，封存备用。

[0048] 本发明制备MxA校准品：用PCR从pCS6-MX1扩增出MxA DNA(核酸序列1-1989)，构建pFastBac-Flag-MxA载体，转导到HD10Bac 细菌中，产生重组Flag-MxA AcNPV(昆虫病毒)质粒；再转导此质粒进到昆虫细胞(SF9细胞)，产生重组Flag-MxA AcNPV；此病毒感染SF9细胞后，表达出Flag-MxA蛋白；用Anti-Flag 抗体亲和层析法纯化出Flag-MxA蛋白，此纯化Flag-MxA蛋白作为校准品。

[0049] 本发明Flag-MxA为校准品，用TRFIA分析仪测定不同浓度MxA校准品试纸卡检测线上呈现荧光强度，制备MxA浓度标准曲线，建立MxA浓度标准卡，输入到TRFIA分析仪，建立TRFIA分析仪自动显示样品中MxA浓度检测系统。

[0050] 结合具体实验，对本发明原理和结果作进一步说明，以下列出本发明多步实验过程：

一. 制备Flag-MxA蛋白

(一) PCR扩增MxA DNA

1. 合成MxA引物，引物-1：ttttcatatgggttccgaagtggacatc；

引物-2：ttttctcgagtaaccgggaactggcaagcc

2. 进行PCR

5x Reaction buffer 10ul

5x High GC enhancer 10ul

10mM dNTP 1ul

25pm/u1引物-11ul

25pm/u1引物-21ul

pCS6-MX1 DNA10ng

Q5 HF-DNA Polymerase 0.5ul

H₂O 到50ul

3. PCR条件如下：

A. 95 °C 2分钟

B. 95 °C 1分钟

C. 56 °C 1分钟

D. 72 °C 1.5分钟

重复B-D 步骤30次

E. 95 °C 1分钟30秒

F. 56 °C 1分钟30秒

G. 72 °C 7分钟

冷却到25 °C, 完成PCR

4. 吸取5ul PCR 产物, 加2ul 5X DNA loading buffer

5. 放在1% Agarose/TBE 凝胶电泳孔中, 进行电泳

6. 用 EB 进行DNA 染色, 紫外线下观察2.0kbDNA条带(图4孔1 ,2)

7. 其余PCR 产物, 加100ul H₂O, 再加150ul 芳酚/氯仿/异戊醇(25/24/1), 混合

8. 离心, 13000rpm, 5分钟

9. 收取上清液, 加15ul 5M NaCl, 800ul 乙醇, 混合, -20 °C, 过夜

10. 4°C条件下, 离心, 13000rpm, 20分钟

11. 去除上清液, 加800ul 70%乙醇, 4°C条件下, 离心, 13000rpm, 10分钟

去除上清液, 干燥微量离心管底部DNA, 加50ul H₂O 溶解DNA。

[0051] (三) 构建FastBac-Flag-MxA质粒

1. 用NdeI/XhoI内切酶(New England Biolabs)切割DNA

PCR DNA产物	48ul
-----------	------

Cutsmart buffer	6ul
-----------------	-----

NdeI	3ul
------	-----

XhoI3ul

pFastBac-Flag 载体DNA	3ul (3ug)
---------------------	-----------

Cutsmart buffer	6ul
-----------------	-----

NdeI	3ul
------	-----

XhoI	3ul
------	-----

H ₂ O	45ul
------------------	------

混均,37℃反应2 小时,

2. 放在1% Agarose/TBE 胶电泳孔中,进行电泳

3. EB 进行DNA 染色,紫外线下观察2.0kb (PCR 产物) 和4.6kb(载体) DNA条带,分别切割下DNA条带,分别放到1.5ml微量离心管中

4. 用QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) , 提取Agarose 条带中DNA,按说明书步骤操作,用Nanodrop Spectrophotometer 测定提取DNA浓度

5. 用T4DNA ligase (New England Biolabs.) ,连接PCR DNA片段pFastBac-Flag载体中,

在1.5ml 微量离心管中加入以下物质

PCR DNA (NdeI/XhoI)	60ng
载体 DNA (NdeI/XhoI)	30ng
10X T4 DNA Ligase Buffer	1.0 ul
T4 DNA Ligase	0.5ul
H ₂ O	到10ul

混均,25 ℃,反应4小时,

6. 放微量离心管在冰块上,加100ul感受态细菌 (XL10 Gold细菌株),轻轻混合,冰块上放置30分钟

7. 放微量离心管在42 ℃水浴条件下,50秒,再放到冰块上3分钟

8. 加700ul LB 培养液,37 ℃,摇动1小时

9. 离心, 10000g, 5分钟,去除上清液,收集微量离心管底部细菌

10. 涂种在100ug/ml Ampicillin LB-琼脂板上,37 ℃, 培养过夜

11. 挑选单个菌落,接种到3ml100ug/ml Ampicillin LB培养液中,37 ℃,摇动,过夜

12. 提取细菌质粒DNA,用PureLink Quick Plasmid Miniprep Kits (Life Technologies Inc.),按说明书步骤操作,用Nanodrop Spectrophotometer 测定提取DNA浓度

13. 限制性内切酶(New England Biolabs),切割pFastBac-Flag-MxA DNA

DNA	1.0ug
-----	-------

Cutsmart buffer	2.0ul
-----------------	-------

BamHI	1.0ul
-------	-------

XhoI	1.0ul
------	-------

H₂O到20ul

混均,37 ℃,反应2 小时,

14. 放在1% Agarose/TBE 胶电泳孔中,进行电泳

15.EB 进行DNA 染色,紫外线下观察形成DNA条带

16.选出900bp,6.0kbDNA条带质粒(图5孔1,2)为FastBac-Flag-MxA阳性质粒

17.用MxA DNA测序引物,引物-1: ttttcatatgggtttccgaagtggacatc;

引物-2: ttttctcgagtaaccgggaactggcaagcc进行DNA序列测定

18.选择出正确MxA DNA 序列的pFastBac-Flag-MxA质粒DNA。

[0052] MxA DNA 序列(1-1989bp)

atggttgt ttccgaagt gacatgc aa gactgatcc
 agctgctgca tcccaccctc tattactgaa tggagatgct actgtggccc agaaaaatcc
 aggctcggtg gctgagaaca acctgtgcag ccagtatgag gagaagggtgc gcccctgcat
 cgacccatt gactccctgc gggctctagg tgtggagcag gacccctggccc tgccaggccat
 cgccgtcatc ggggaccaga gctcggcaa gagctccgtg ttggaggcac tgtcaggagt
 tgcccttccc agaggcagcg ggatcgtgac cagatgccc ctggtgctga aactgaagaa
 acttgtgaac gaagataagt ggagaggcaa ggtcagttac caggactacg agattgagat
 ttcggatgct tcagaggttag aaaaggaaat taataaagcc cagaatgcca tcgcccggga
 aggaatggga atcagtcatg agctaatac cctggagatc agctcccgag atgtcccgga
 tctgactcta atagaccttc ctggcataac cagagtggct gtggcaatc agcctgctga
 cattgggtat aagatcaaga cactcatcaa gaagtacatc cagaggcagg agacaatcag
 cctggtggtg gtccccagta atgtggacat cgccaccaca gaggctctca gcatggccca
 ggagggtggac cccgagggag acaggaccat cggaaatctt acgaagcctg atctggtgga
 caaaggaaact gaagacaagg ttgtggacgt ggtgcggaa ctcgtgttcc acctgaagaa
 gggttacatg attgtcaagt gccggggcca gcaggagatc caggaccagc tgagcctgtc
 cgaaggccctg cagagagaga agatcttcc tgagaaccac ccatatttca gggatctgct
 ggaggaagga aaggccacgg ttccctgcct ggcagaaaaaa cttaccagcg agctcatcac
 acatatctgt aaatctctgc ccctgttaga aaatcaaatac aaggagactc accagagaat
 aacagaggag ctacaaaagt atgggtgcga cataccgaa gacgaaaatg aaaaaatgtt
 cttcctgata gataaagtta atgcctta tcaggacatc actgctctca tgcaaggaga
 gggaaactgta ggggaggaag acattcgct gtttaccaga ctccgacacg agttccacaa
 atggagtaca ataattgaaa acaatttca agaaggccat aaaatttga gtagaaaaat
 ccagaaattt gaaaatcagt atcgtggtag agagctgcca ggctttgtga attacaggac
 atttgagaca atcgtgaaac agcaaataa ggcactggaa gagccggctg tggatatgct
 acacaccgtg acggatatgg tccggcttgc tttcacagat gtttcgataa aaaatttga
 agagttttt aacccacaca gaaccgcaa gtccaaaatt gaagacatta gagcagaaca
 agagagagaa ggtgagaagc tgatccgcct ccacttccag atgaaacaga ttgtctactg
 ccaggaccag gtatacaggg gtgcattgca gaaggtcaga gagaaggagc tggaagaaga
 aaagaagaag aaatcctggg attttgggc tttccagtcc agctcgccaa cagactcttc
 catggaggag atcttcagc acctgtatggc ctatcaccag gaggccagca agcgcacatc
 cagccacatc ccttgcata tccagttttt catgctccag acgtacggcc agcagctca
 gaaggccatg ctgcagctcc tgcaggacaa ggacacccatc agctggctcc tgaaggagcg
 gagcgcacacc agcgcacaagc ggaagttcct gaaggagcgg cttgcacggc tgacgcaggc
 tcggcgccgg ctggcccgat tccccggta a

[0053] (四)制备重组Flag-MxAcNPV质粒

1. 取50ng, pFastBac-Flag-MxA DNA 放入微量离心管中,再放在冰块上,加100ul感受态HD10Bac细菌,轻轻混合,冰块上,放置30分钟
2. 放微量离心管在42 °C水浴条件下,50秒,再放到冰块上3分钟
3. 加700ul LB 培养液,37 °C摇动4小时培养细菌

4. 取20ul 细菌液, 涂种在50ug/ml Kanamycin, 7ug/ml Gentamicin, 10ug/ml Tetracycline, 100ug/ml X-gal, 40ug/ml IPTG LB-琼脂板上, 37 °C, 培养过夜

5. 挑选单个白色菌落, 接种到3ml 50ug/ml Kanamycin, 7ug/ml Gentamicin, 10ug/ml TetracyclineLB培养液中, 37 °C, 摆动, 培养过夜

6. 提取细菌质粒DNA

a. 加1.5ml 细菌液到微量离心管中, 离心, 13000rpm 3分钟, 去除上清液,

b. 加300ul BufferI (15mM Tris, pH8.0, 10mM EDTA, 100ug/ml RNaseA) 到微量离心管中, 均匀悬浮细菌

c. 加300ul BufferII (0.2N NaOH, 1%SDS) 到微量离心管中, 上下倒置微量离心管8次, 放置室温下, 5分钟

d. 加300ul Buffer III (KCH₃COO, pH5.5) 到微量离心管中, 上下倒置微量离心管8次, 放置微量离心管在冰块中, 10分钟

e. 离心, 13000rpm, 10分钟

f. 转移700ul离心上清液到微量离心管中, 加700ul Isopropanol到微量离心管中, 混均, 放置-20°C条件下, 过夜

g. 离心, 14000g, 20分钟, 去除上清液,

h. 加1.0ml 70% Ethanol到微量离心管中, 洗涤, 14000g, 10分钟, 去除上清液

i. 干燥微量离心管底部DNA

j. 加40ul TE buffer 到微量离心管中, 溶解DNA

7. 用MxA引物-1, 引物-2进行PCR

5x Reaction buffer 10ul

5x High GC enhancer 10ul

10mM dNTP 1ul

25pm/u1引物-1 1ul

25pm/u1引物-2 1ul

重组Flag-MxAcNPV 质粒DNA 1ul

Q5 HF-DNA Polymerase 0.5ul

H₂O 到50ul

8. PCR条件如下:

A. 95 °C 2分钟

B. 95 °C 1分钟

C. 56 °C 1分钟

D. 72 °C 1.5分钟

重复B-D 步骤30次

E. 95 °C 1分钟30秒

F. 56 °C 1分钟30秒

G. 72 °C 7分钟

冷却到25 °C, 完成PCR

9. 吸取10ul PCR 产物, 加3ul 5X DNA loading buffer

10. 放在1% Agarose/TBE 凝胶电泳孔中,进行电泳
11. 用 EB 进行DNA 染色,紫外线下观察2.0kpDNA条带(图6孔1-4) 质粒为阳性Flag-MxA AcNPV 重组质粒。

[0054] (五) 制备Flag-MxA AcNPV

1. 溶液A: 6ul 重组Flag-MxA AcNPV DNA + 100ul TNM-FH 液 (No FBS, No antibiotics)
 2. 溶液B: 6ul Cellfectin (Invitrogen) + 100ul TNM-FH 液 (No FBS, No antibiotics)
 3. 混合溶液A和溶液B,用微量移液器轻轻吹吸3次,室温下,放置 30分钟后,加800ul TNM-FH 液,混匀,成为质粒DNA细胞转染液
 4. 吸出6孔培养皿中SF9 细胞TNM-FH 培养液,加2ml TNM-FH 液,洗涤SF9细胞一次
 5. 加质粒DNA细胞转染液到SF9 细胞培养皿中,放在摇床上缓慢摇动,室温下,5 小时
 6. 从SF9 细胞培养皿吸出质粒DNA细胞转染液,加2.0ml含有10%FBS TNM-FH 培养液, 28 °C, 培养3天
 7. 吸取细胞培养液到离心管中,3000rpm, 离心10分钟,收集上清液,做为Flag-MxA AcNPV液
 8. 加 2×10^6 SF9细胞到100mm细胞培养皿中,加5ml含10%FBS的TNM-FH 培养液, 28 °C, 放置4小时
 9. 吸出旧TNM-FH 培养液, 加5ml含10%FBS的TNM-FH 培养液,加100ul Flag-MxAAcNPV 液到SF9细胞培养皿中
 10. 室温下,轻轻摇动SF9细胞培养皿,1小时
 11. 加5ml含10%FBS的TNM-FH 培养液到SF9细胞培养皿中,28 °C, 培养3天
 12. 吸取细胞培养液到离心管中,3000rpm, 离心10分钟,收集上清液,为扩增Flag-MxA AcNPV液。
- (六) 制备Flag-MxA蛋白
1. 加 8×10^6 SF9细胞到150mm细胞培养皿中,加20ml含10%FBS TNM-FH 培养液, 28 °C, 放置4小时
 2. 吸出旧TNM-FH 培养液, 加10ml含10%FBS的TNM-FH 培养液,加300ul Flag-MxA AcNPV到SF9细胞培养皿中
 3. 室温下,轻轻摇动SF9细胞培养皿,1小时
 4. 加20ml含10%FBS TNM-FH 培养液到SF9细胞培养皿中,28 °C, 培养3天
 5. 收集SF9细胞到50ml离心管中,离心,3000rpm, 5分钟
 6. 去除上清液,加20ml PBS到离心管中,离心,3000rpm, 5分钟,
 7. 加1ml PBS到离心管中,转移SF9细胞到1.5ml 微量离心管中
 8. 离心,3000rpm, 5分钟,去除上清液
 9. 加1.0ml 细胞溶解溶液 (10mM Hepes pH7.5, 100mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10ug/ml leupeptine, 10ug/ml Aprotinin) 到微量离心管中,用微量移液器轻轻吹吸,混均,放置在冰块中15分钟
 10. 在4 °C条件下,离心,5000rpm, 5分钟,转移上清液到新1.5ml 微量离心管中

11. 在4 °C条件下,离心,13000rpm, 20分钟
12. 转移上清液(SF9细胞溶解液)到新1.5ml 微量离心管中
13. 取50ul Anti-Flag M2 affinity agarose (Sigma-Aldrich)放到1.5ml 微量离心管中
14. 加1.2ml 洗涤液(40mM Tris pH8.0, 300mM NaCl, 5% Glycerol, 0.01% NP-40, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10ug/ml Leupetine, 10ug/ml Aprotinin) 到Anti-Flag M2 affinity agarose微量离心管中,
15. 在4 °C条件下,离心,3000g, 1分钟,吸出上清,重复洗涤2次
16. 加SF9细胞溶解液到Anti-Flag M2 affinity agarose微量离心管中
17. 在4 °C条件下,摇动微量离心管,1.5小时
18. 在4 °C条件下,离心,3000rpm, 1分钟,吸除上清液
19. 加1.2ml 洗涤液到Anti-Flag M2 affinity agarose微量离心管中,在4 °C条件下,摇动微量离心管,20分钟
20. 在4 °C条件下,离心,3000rpm, 1分钟,吸除洗涤液, 相同条件,重复洗涤3次
21. 加50ul 洗脱液(0.1M Glycine-HCl, pH2.5)到Anti-Flag M2 affinity agarose微量离心管中, 用微量移液器轻轻吹吸,放置在冰块中2分钟
22. 在4 °C条件下,离心,6000rpm, 30秒,吸取上清液,到新微量离心管中,含2ul中和液(2M Tris, pH8.0, 3M NaCl), 混均,相同条件,重复洗脱4次,
23. 结合4次洗脱液,转入到透析袋 (Spectra/Pro) 中,放在透析液(20mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl, 5% Glycerol, 1mM DTT, 1mM EDTA) 中,在4 °C条件下,缓慢搅动,过夜
24. 收集透析袋中蛋白液体移到微量离心管中,在4 °C条件下,离心,13000rpm, 10分钟,
25. 分装蛋白液到不同微量离心管中,4 °C短期保存,-20 °C或-80°C长期保存。

[0055] (七) 测定纯化Flag-MxA

- A. 银染法测定Flag-MxA纯度
1. 冻存10ul蛋白液放到37°C水浴中,快速溶化,放到冰块中,
 2. 加4ul 4X 蛋白加样液(50 mMTris, pH 6.8, 2% SDS, 20% Glycerol, 1% β-mercaptoethanol, 12.5mM EDTA, 0.02% Bromophenol blue), 100 °C,3分钟
 3. 加10ul处理后蛋白液样本到10% SDS-PAGE 凝胶的孔中,进行电泳
 4. 完成电泳后,获取SDS-PAGE 凝胶,进行银染色,步骤如下:
 - a. 加100ml 50% Methanol 到SDS-PAGE凝胶的容器中,室温下,缓慢摇动,15分钟,去除Methanol液体
 - b. 加100ml 5% Methanol 到SDS-PAGE凝胶容器中,室温下,缓慢摇动,10分钟,去除Methanol液体,用水洗涤SDS-PAGE凝胶1次
 - c. 加10ul DTT 到SDS-PAGE胶容器中,有200ml水,室温下,缓慢摇动,10分钟,去除DTT液体,用水洗涤SDS-PAGE凝胶1次
 - d. 加100ml 0.1% AgNO₃ 到SDS-PAGE凝胶容器中,室温下,缓慢摇动,15分钟,去除AgNO₃液体,用水洗涤SDS-PAGE凝胶2次

e. 加100ml 3% Na₂CO₃& 0.05% Formaldehyde 到SDS-PAGE凝胶容器中,室温下反应,看到清晰蛋白条带为止

f. 加Critic Acid到SDS-PAGE凝胶容器中,终止反应

g. 用水清洗SDS-PAGE胶后,干躁SDS-PAGE凝胶,判断Flag-MxA纯度
Flag-MxA纯度达98%以上。

[0056] 测定纯化Flag-MxA

1. 冻存Flag-MxA蛋白液放到37℃ 水浴中,快速溶化,放到冰块中,用PBS 1:20 稀释蛋白液

2. 20ul 稀释BSA蛋白液(5ug/ml) 和20ul稀释Flag-MxA蛋白液,分别加8ul 4X 蛋白加样液,100℃,3分钟

3. 10ul处理后蛋白液样本加到10% SDS-PAGE 凝胶的孔中,进行电泳,100V, 2小时

4. 完成电泳后,获取SDS-PAGE凝胶

5. 转移SDS-PAGE凝胶上蛋白到硝基纤维素膜上用蛋白转移缓冲液,30V,3小时

6. 用5%脱脂牛奶粉在TBS Buffer (20mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20),封闭硝基纤维素膜,室温,2小时,用TBS Buffer 洗涤硝基纤维素膜一次,

7. 加1:3000稀释羊抗MxA多克隆抗体(R & D systems)在1% 脱脂牛奶粉-TBS Buffer 到硝基纤维素膜容器中,在6 ℃条件下,缓慢摇动,过夜

8. 吸出抗体液,用TBS Buffer 洗涤硝基纤维素膜4次,每次10分钟

9. 加1:4000稀释抗羊IgG抗体-HRP(Promega)在1% 脱脂牛奶粉-TBS Buffer 到硝基纤维素膜容器中,室温下,缓慢摇动,1.5小时

10. 吸出抗体液,用TBS Buffer 洗涤硝基纤维素膜4次,每次10分钟

11. 加ECL Western blotting底物(Pierce)液到硝基纤维素膜上,反应2分钟

12. 用ImageReader LAS-4000 (FUJIFILM) 测定Westernblot结果。

[0057] C. Bradford法测定Flag-MxA浓度

1. 取2ml浓缩染料试剂(Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate)与6ml H₂O混合均匀

2. 用PBS稀释BSA标准液, 浓度分别为0,25,50,100,200ug/ml

3. 加80ul PBS 到微量滴定板孔中,加5ul不同浓度BSA标准液,5ul纯化Flag-MxA到微量滴定板孔中,每个样本加3个孔

4. 加80ul稀释染料试剂到微量滴定板孔中,反应5分钟

5. 放微量滴定板到Victor3V 1420MultilabelCounter,选用波长495nm,测定OD值

6. 根据BSA浓度标准曲线,计算出Flag-MxA 浓度为98ug/ml

BSA ug/ml	0	25	50	100	200	Flag-MxA
	0.334	0.445	0.516	0.658	0.924	0.636
	0.328	0.438	0.527	0.641	0.938	0.655
	0.338	0.452	0.522	0.652	0.943	0.642
Average	0.333333	0.445	0.521667	0.650333	0.935	0.644333

[0058] 二. 制备测定MxA时间分辨免疫层析试纸条

(一) MxA侧向免疫层析试纸条组成

本发明实施例中,测定MxA侧向免疫层析试纸条(图1)包括底板(1)以及沿所述底板长度方向顺次粘覆于底板上样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)、吸水纸(7);其中,硝酸纤维素膜粘覆于底板中间部位,其上有相间隔的由MxA单克隆抗体涂层形成的检测线(5)和由兔抗羊IgG抗体涂层形成的质控线(6),检测线位于结合垫一侧,质控线靠近吸水纸一侧;结合垫喷涂羊抗MxA抗体-铕螯合物荧光微球;样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)、吸水纸(7)之间,依次与相邻部位接触且部分重叠。

[0059] 本发明实施例中,检测线(5)与质控线(6)平行设置,检测线与质控线之间的距离为5mm(图1)。

[0060] 吸水纸(7)位于硝酸纤维素膜(4)靠近质控线(6)一端,且吸水纸一端与硝酸纤维素膜有部分重叠,其重叠部分长度为2mm;吸水纸重叠在硝酸纤维素膜上方(图1)。

[0061] 结合垫(3)位于硝酸纤维素膜(4)靠近检测线(5)一端;且结合垫一端与硝酸纤维素膜部分重叠,其重叠部分长度为2mm;结合垫重叠在硝酸纤维素膜上方(图1)。

[0062] 样品垫(2)位于结合垫(3)的外侧,并与结合垫部分重叠,其重叠部分长度为5mm;样品垫重叠在结合垫上方。

[0063] 本发明实施例中,所有测定MxA时间分辨免疫层析试纸条宽度为4mm。

[0064] 将上述结构试纸条装入塑料外壳里,外壳包括底座和卡盖(10),看图2,卡盖上设置有加样窗口(8)检测窗口(9),露出试纸条局部区域;加样窗口开口于样品垫(2)上部,露出部分样品垫区域;观察窗口开口于硝酸纤维素膜(4)上部,以露出全部检测线(5)和质控线(6)。

[0065] 本发明选用玻璃纤维样品垫(EMD Millipore),浸泡在样品垫处理液(0.1% NP-40, 0.1% NaN₃, 20磷酸盐缓冲液pH7.4),室温下,1小时,再37°C,烘干4小时,干燥封闭保持。

[0066] 本发明选用聚酯膜结合垫组(EMD Millipore),浸泡在结合垫处理液(0.1% NP-40, 0.1% NaN₃, 20磷酸盐缓冲液pH7.4),室温下,1小时,再37°C,烘干4小时,干燥封闭保持。

[0067] (二) MxA抗体化学偶联到铕螯合物(Europium Chelate)荧光标记羧基修饰微粒上

本发明实施例中,选用铕螯合物(Europium Chelate)荧光标记羧基修饰微粒(Carboxylated Fluorescent Microspheres),购于Ocean NanoTech, 可选用铕螯合物(Europium Chelate)荧光标记羧基修饰微粒直径为100–500nm。

[0068] 本发明实施例中,选用羊抗MxA多克隆抗体(R & D Systems),用InnovaBiosciences公司抗体浓缩和净化离心柱(AbSelect™ Antibody Concentration and Clean-Up Kit)预处理羊抗MxA多克隆抗体,步骤如下:

1. 加500ul羊抗MxA多克隆抗体到抗体浓缩和净化离心柱中,
2. 离心,15000g 1–3分钟, 减少MxA抗体液到100ul
3. 去除收集管中液体,加400ul50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)到抗体浓缩和净化离心柱中
4. 离心,15000g 1–3分钟, 减少离心柱中液体积到100ul
5. 重复3–4步骤,5次以上
6. 吸出抗体浓缩和净化离心柱中约100ulMxA抗体

测定MxA抗体浓度,50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)稀释MxA抗体浓度到1.0mg/ml。

[0069] 本发明实施例中,用碳二亚胺(EDC)和N-羟基硫代琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)化学试剂,购于Thermo Scientific,把羊抗MxA抗体偶联到铕螯合物荧光标记羧基修饰微粒(直径300nm)上,步骤如下:

1. 取0.4ml铕螯合物荧光标记羧基修饰微粒(10mg/ml),直径300nm,加入1.5ml离心管中,再加入1.0 ml 50mmolMES缓冲液(pH6.0)到离心管中
2. 离心,10000rpm,6分钟,去除上清液
3. 加入1.0ml 50mmolMES缓冲液(pH6.0)到离心管中
4. 离心,10000rpm,6分钟,去除上清液
5. 新鲜制备50mmolMES缓冲液(pH6.0)含有10mmol碳二亚胺(EDC)和20mmol N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),立即加0.4ml上述液体到离心管中,混均,
25°C, 反应30分钟
6. 离心,10000rpm,6分钟,去除反应液
7. 加入1.0ml 50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)到离心管中
8. 离心,10000rpm,6分钟,去除上清液,重复7-8步骤1次
9. 加入0.4ml净化理过羊抗MxA抗体(0.25mg/ml)加入到上述离心管中,
25°C, 反应2小时
10. 加入0.1ml0.2M Tris pH7.5, 25°C, 反应30分钟
11. 离心,10000rpm,6分钟,去除上清液,
12. 加入1.2ml 0.2% BSA,0.1% tween20,50mmol磷酸盐缓冲液(pH7.5)到离心管中
13. 离心,10000rpm,6分钟,去除上清液,重复12-13步骤3次
14. 加入0.4ml抗体稀释液(0.2% BSA,10% Sucrose,0.02% Tween-20, 0.01% NaN3, 50mmol磷酸盐缓冲液pH8.0)到离心管中,4°C储存备用。

[0070] (三).喷涂MxA抗体到结合垫和硝酸纤维素膜上

1. 将上述制备完成MxA抗体-铕螯合物荧光微粒液体,用喷膜仪(BioDot XYZ3050)以10ul/cm速度,喷涂在聚酯膜结合垫上,37°C,烘干2小时,加入干燥剂封存备用。

[0071] 2. 用抗体浓缩和净化离心柱预处理MxA单克隆抗体及兔抗羊IgG抗体后,用包被液(5% Sucrose,, 0.01% Tween-20, 0.01% NaN3, 10mmol磷酸盐缓冲液pH8.0)把MxA单克隆抗体浓度调到2.0mg/ml,兔抗羊IgG抗体浓度调到0.2mg/ml,喷膜仪(BioDot XYZ3050),1.0ul/cm速度,将两抗体以5mm间隔喷涂于硝酸纤维素膜上,37°C,烘干2小时,加入干燥剂封存备用。

[0072] (四).组装检测MxA侧向免疫层析试纸条

组装操作在湿度小于30%,稳定25-30°C的房间进行,在层合机(BioDot LM5000)上,底板中间先铺放硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素膜质控线相临近一侧铺放吸水纸,使吸水纸与硝酸纤维素膜部分重叠(2mm),吸水纸在硝酸纤维素膜上方;然后在硝酸纤维素膜检测线相临近一端铺放结合垫,使硝酸纤维素膜与结合垫一端部分重叠(2mm),结合垫在硝酸纤维素膜上方;随后,结合垫另一端铺设样品垫,使结合垫与样品垫一端部分重叠(5mm),样品垫在结合垫上方;最后用切割机,切割成宽度为4mm试纸条。

[0073] 将上述宽度4mm试纸条装入外壳内,形成试纸卡。其中外壳包括底座和卡盖。看图

2, 卡盖上设置有加样窗(8)和观察窗口(9), 露出试纸条局部区域; 加样窗口开口在述样品垫上部, 露出部分样品垫区域; 检测窗口开口在硝酸纤维素膜上部, 露出全部检测线和质控线, 用于测定检测线和质控线发出荧光信号。

[0074] (五). 测定MxA时间分辨免疫层析试纸条操作过程

用时间分辨免疫层析试纸条测定MxA时, 在样品垫窗口上加入样品液, 在毛细现象作用下, 样品液向吸水纸方向泳动, 当样品液中含有MxA移动到结合垫时, MxA蛋白与MxA抗体-铕螯合物微粒结合, 形成MxA-MxA抗体-铕螯合物微粒复合物, 随着层析作用, 复合物向前移动, 到达硝酸纤维素膜检测线处, 此处MxA抗体进一步结合, 形成MxA抗体-MxA-MxA抗体-铕螯合物微粒夹心复合物, 聚集在检测线上; 而未结合MxA的MxA抗体-铕螯合物微粒继续前移, 到达质控线时, 此处兔抗羊IgG抗体与MxA抗体-铕螯合物微粒结合, 在质控线处出现兔抗羊IgG抗体-MxA抗体-铕螯合物微粒复合物聚集。检测线和质控线都会产生相应的荧光信号, 使用TRFIA分析仪, 激发波长350-430nm, 检测波长600-650nm, 在延时100-400μS后, 再测定试纸条的检测线及质控线上铕螯合物发出荧光强度, 并计算出样品中MxA含量。整个反应在10-15分钟内完成。

[0075] (六). 建立时间分辨免疫层析试纸条定量检测MxA程序

1. 建立MxA浓度标准曲线

用PBS稀释纯化Flag-MxA, 制成不同浓度MxA校准品(0, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000ng/ml), 加5ulMxA校准品到样品窗口部位, 再加150ul低渗液到样品窗口部位, 进行膜层析反应, 15分钟后,

使用TRFIA分析仪, 选定激发波长420nm, 检测波长615nm, 在延时200μS后, 测定试纸条的检测线及质控线上荧光强度。

[0076] 以Flag-MxA校准品浓度为纵坐标, 校准品荧光强度单位为横坐标, 建立MxA校准品浓度标准曲线, 得到方程式, $y=26X-302.47$, $R^2=0.8537$, 看图4, 通过此标准曲线得到MxA浓度标准卡, 作为对样品中所含MxA浓度进行定量分析的基础。输入上述参数到TRFIA分析仪, 建立自动运行系统, TRFIA分析仪通过相应的分析软件自动计算出待测样品中的MxA浓度。

MxA ng/ml	0	10	50	200	500	1000	2000
荧光强度	0.35	8.8	18.4	30.12	43.28	56.54	72.16
X100000	0.42	7.54	16.5	28.78	40.34	54.12	73.11
	0.38	7.32	15.2	32.18	42.58	58.58	71.35
Average	0.383333	7.886667	16.7	30.36	42.06667	56.41333	72.20667

[0078] 2. 时间分辨免疫层析试纸卡检测MxA的灵敏度

用PBS制成低浓度MxA校准品(0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10ng/ml), 加5ulMxA校准品到MxA时间分辨免疫层析试纸卡加样窗口部位, 再加150ul低渗液到样品窗口部位, 进行膜层析反应, 15分钟后, 使用TRFIA 分析仪, 测定试纸卡检测线及质控线的荧光强度。

[0079] 测定0-10ng/mlMxA校准品荧光强度, 1-10ng/ml之间有线性关系, TRFIA分析仪测定1ng/mlMxA 校准品荧光强度(2.64)与0ng/ml 校准品荧光强度(0.45)相差5倍以上, 确定此试剂盒TRFIA测定MxA敏感度为1.0 ng/ml

MxA ng/ml	0	0.2	0.5	1	2	5	10
荧光强度	0.48	0.84	1.81	2.2	4.15	6.38	9.28
X100000	0.37	0.63	1.51	2.28	3.84	6.64	8.74
	0.52	0.58	1.25	2.64	3.94	7.02	9.28
Average	0.456667	0.683333	1.523333	2.373333	3.976667	6.68	9.1

[0080] 3. 时间分辨免疫层析试纸卡检测血液中MxA的浓度

加5ul血液到MxA时间分辨免疫层析试纸卡加样窗口部位,再加150ul低渗液到样品窗口部位,进行膜层析反应,15分钟后,使用TRFIA 分析仪,测定试纸卡检测线及质控线的荧光强度,用多段线性法得到血液中MxA 浓度

血液样品	1	2	3	4	5	6
荧光强度	9.87	21.34	8.83	17.6	10.52	45.11 X100000
MxA	13.9	110	4.8	81.2	19.5	320.5 ng/ml

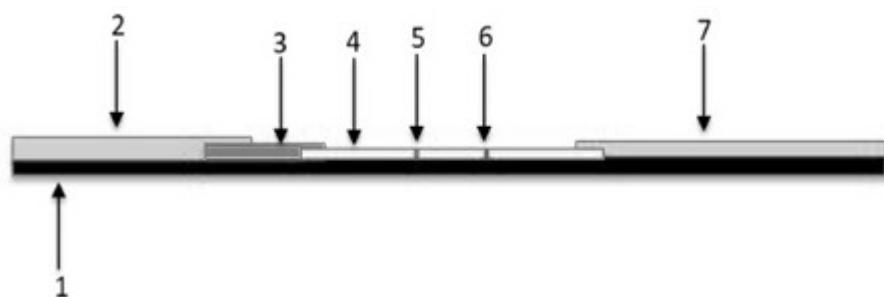


图1

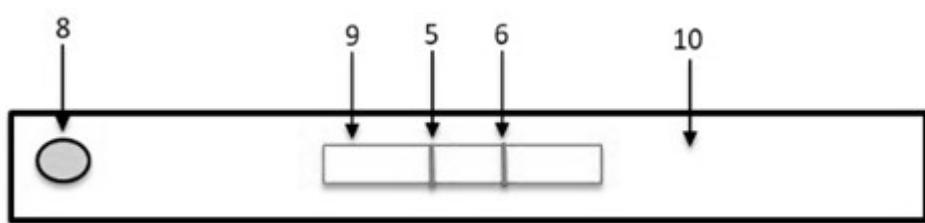


图2

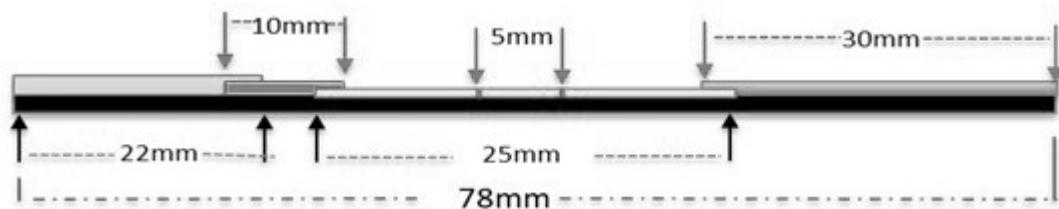


图3

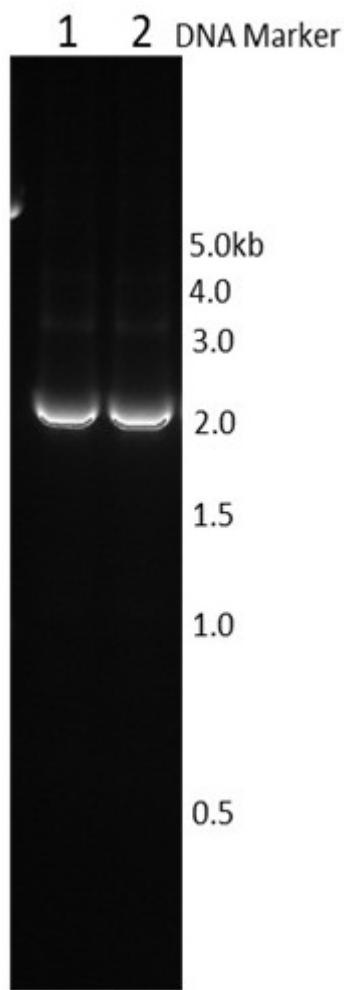


图4

1 2 DNA Marker

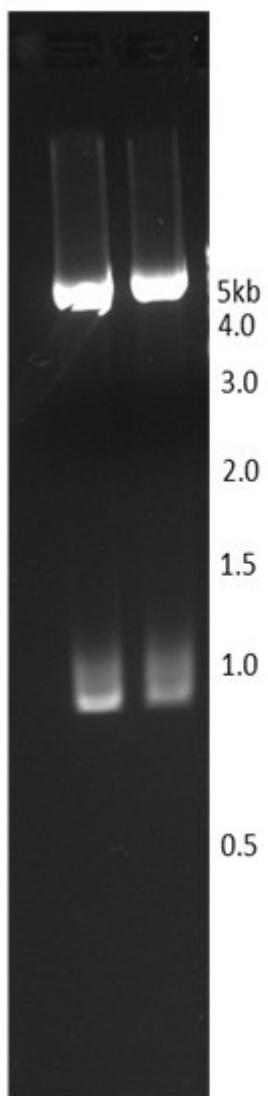


图5

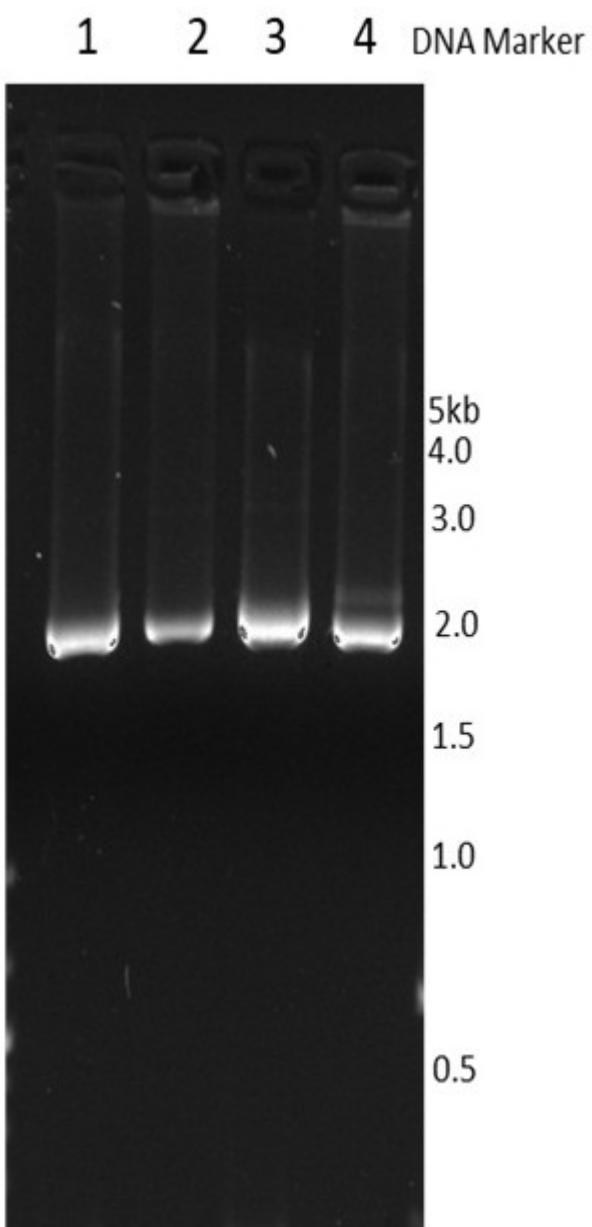


图6

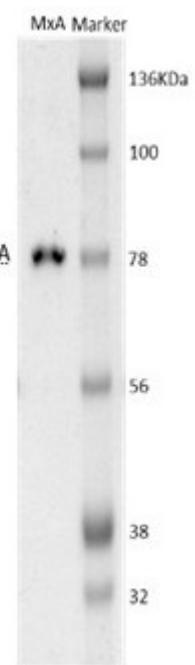


图7

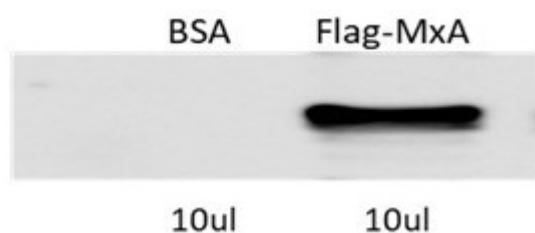


图8

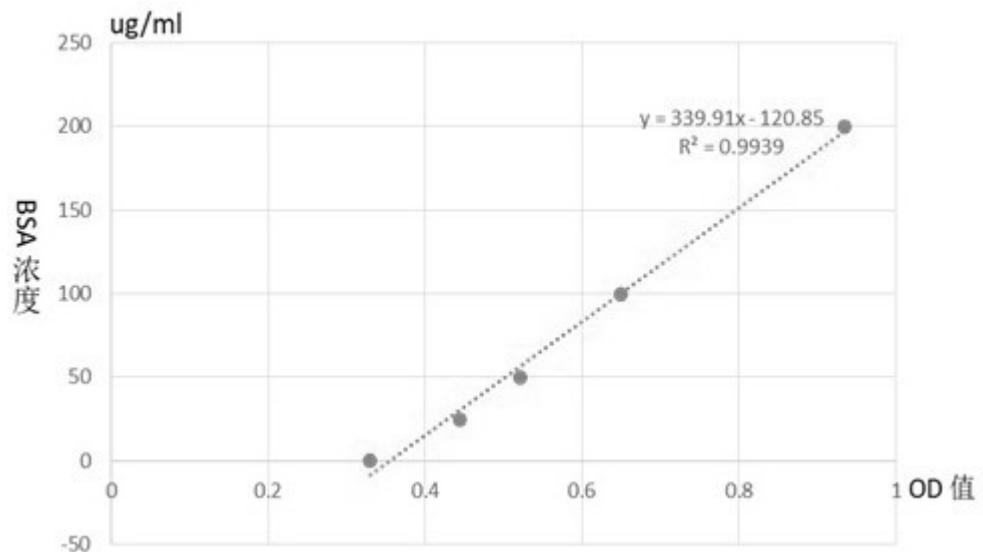


图9

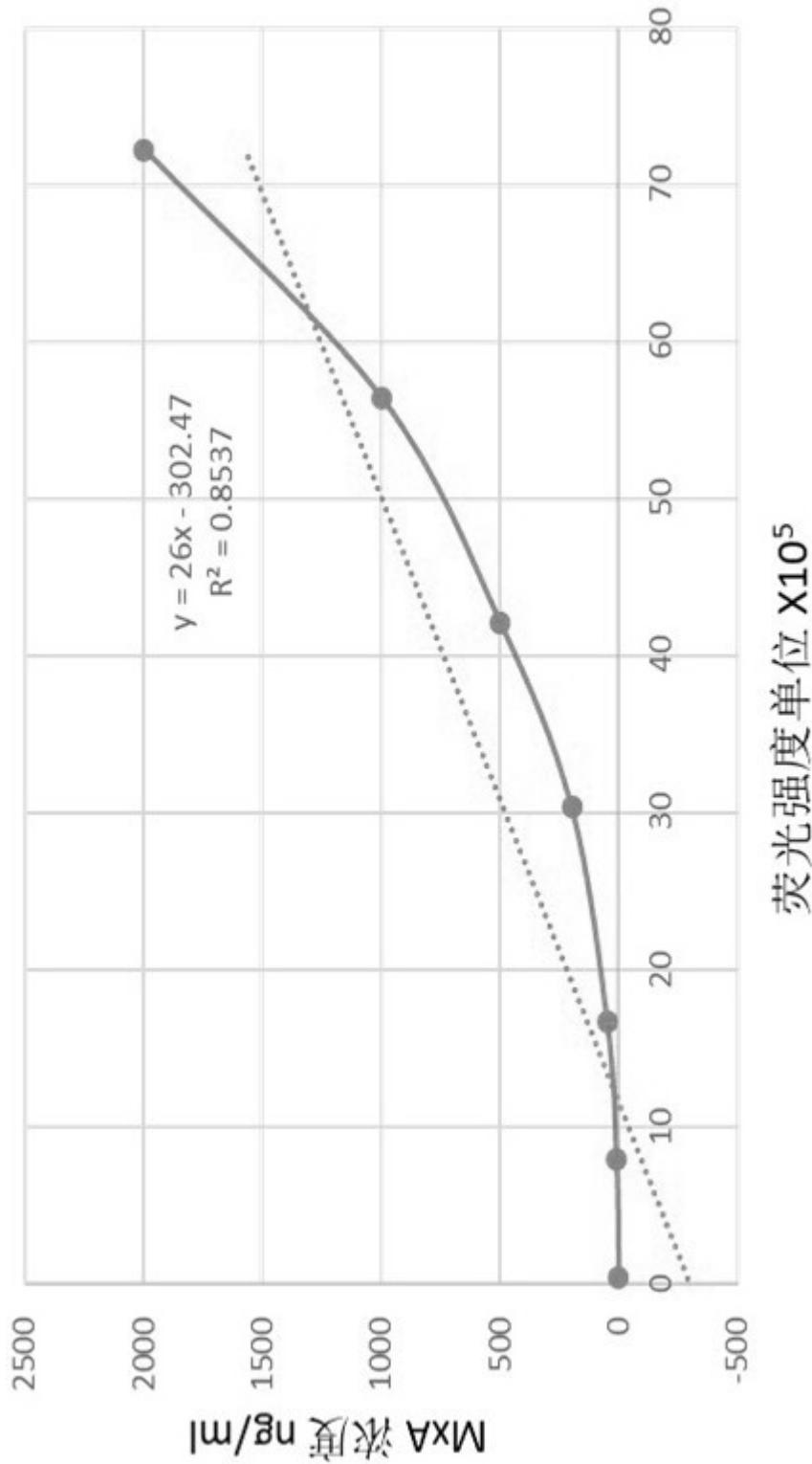


图10

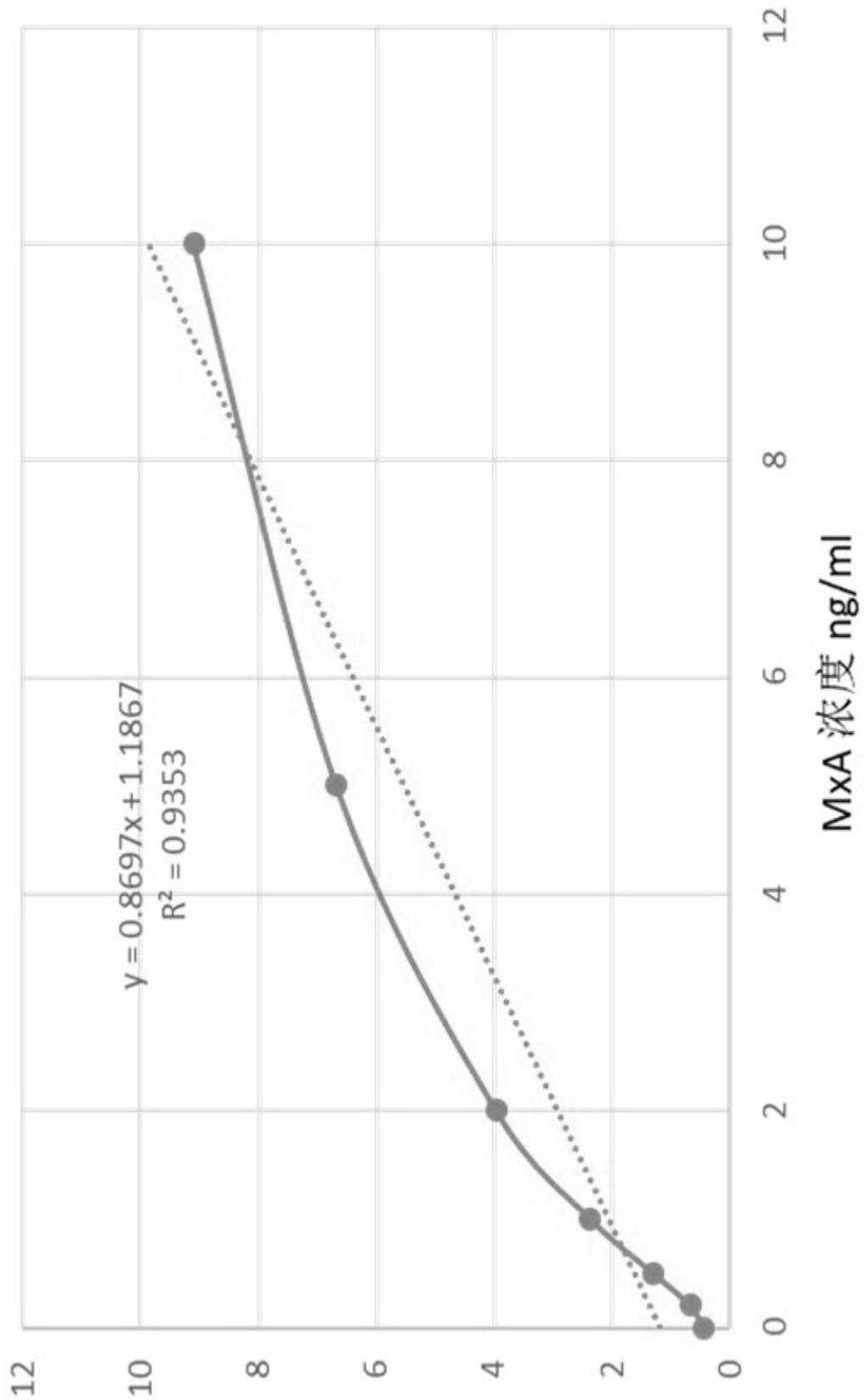


图11

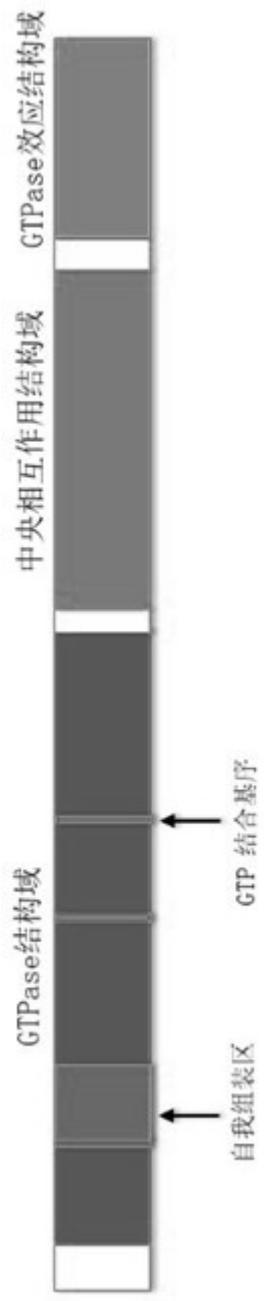


图12

专利名称(译)	建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒		
公开(公告)号	CN109239334A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811048834.4	申请日	2018-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学 长春恒晓生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	吉林大学 长春恒晓生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学 长春恒晓生物科技有限责任公司		
[标]发明人	刘斌 李宝民 关恒 张蕾 刘戈 赵青 史永丰 刘宁 李添伟 隋宝珍 张金玲 仇淑园 孙净 黄景林 高敏 孙晓婷 林林 朱道林 孙玉峰 王贺		
发明人	刘斌 李宝民 关恒 张蕾 刘戈 赵青 史永丰 刘宁 李添伟 隋宝珍 张金玲 仇淑园 孙净 黄景林 高敏 孙晓婷 林林 朱道林 孙玉峰		

IPC分类号 G01N33/558 G01N33/533

CPC分类号 G01N33/558 G01N33/533

外部链接 [Espacenet](#) [SIPPO](#)

摘要(译)

一种建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒，属于基因重组及蛋白制备技术领域。本发明的目的是用SF9细胞表达Flag-MxA，纯化出MxA蛋白，作为校准品。制备时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试纸卡，用时间分辨荧光免疫法分析仪测定试纸卡荧光强度，进一步获得样品中MxA浓度的建立时间分辨荧光免疫层析法检测MxA试剂盒。本发明包括试纸卡和低渗溶液；在底板上顺次相互搭接经过处理的样品垫、吸附有MxA抗体-荧光微球的结合垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫，组装后形成试纸板，然后切割成3-5mm宽的试纸条，将试纸条装入塑料外壳形成试纸卡。本发明采用昆虫细胞系统表达MxA，昆虫细胞近似于人体细胞，但产量高，成本低，能大量生产。

