



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110045105 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201811356197.7

(22)申请日 2018.11.09

(71)申请人 广州市妇女儿童医疗中心
地址 510180 广东省广州市人民中路318号

(72)发明人 王长兵 许甜甜 朱冰

(74)专利代理机构 广州新诺专利商标事务所有
限公司 44100

代理人 林玉芳 刘婉

(51)Int.Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

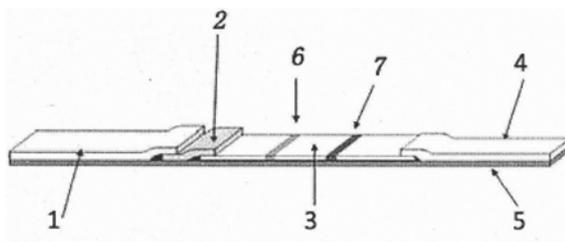
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条。本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条包括背板以及设置于背板上的样品垫、量子点颗粒标记垫、硝酸纤维素膜、吸水纸。本发明的试纸条利用量子点免疫荧光技术,并基于唾液标本中柯萨奇A16病毒IgA抗体作为检测靶位,能够高度灵敏、简单快速地对柯萨奇A16病毒早期感染进行诊断,有助于及时监控手足口病疫情,并防止疫情的蔓延。



1. 一种柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其包括背板以及依次置于所述背板上的样品垫、量子点颗粒标记垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述样品垫和所述量子点颗粒标记垫依次搭接在所述硝酸纤维素膜的一端上,所述吸水纸搭接在所述硝酸纤维素膜的另一端上,其特征在于:所述量子点颗粒标记垫吸附有抗人IgA抗体量子点微球标记物,所述硝酸纤维素膜上具有间隔开的检测线 and 对照线,所述检测线包被有柯萨奇A16病毒VP3蛋白多肽,所述对照线包被有人IgA抗体。

2. 根据权利要求1所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述柯萨奇A16病毒VP3蛋白多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 根据权利要求1所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述抗人IgA抗体量子点微球标记物包括抗人IgA抗体和量子点微球。

4. 根据权利要求3所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述量子点微球是CdTe/ZnSe量子点微球。

5. 根据权利要求3所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述抗人IgA抗体是羊抗人IgA多克隆抗体、鼠抗人IgA单克隆抗体、兔抗人IgA单克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体中的任意一种。

6. 根据权利要求1所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述量子点颗粒标记垫还包括吸附所述抗人IgA抗体量子点微球标记物的基底。

7. 根据权利要求1所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述柯萨奇A16病毒VP3蛋白多肽的包被浓度为0.2-2mg/ml。

8. 根据权利要求1所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其特征在于:所述人IgA抗体的包被浓度为0.5-3mg/ml。

9. 一种柯萨奇A16病毒IgA抗体检测试剂盒,其包括如权利要求1至8任一项所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条。

10. 根据权利要求9所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体检测试剂盒,其特征在于还包括紫外照射装置。

柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测领域,具体地公开了一种柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条。

背景技术

[0002] 柯萨奇A16病毒属于脊髓灰质炎病毒,与EV71病毒被称为引起手足口病的主要病原。柯萨奇A16病毒主要的症状包括发绕、食欲不振、咽喉痛、口腔溃疡、手部脚部水泡等,有时也会引发神经重症,部分会导致婴幼儿死亡。在中国,基本每年都流行柯萨奇A16病毒,流行发生率比EV71病毒还高。流行爆发时间主要是每年的5-6月,9-10月也会有流行的小高峰。发病人群主要是5岁以下的儿童,发病的场所主要是托儿所、幼儿园。目前柯萨奇A16病毒尚未有效的药物进行治疗,临床是采用对症治疗的方式进行救治。另外柯萨奇A16病毒的疫苗还处在临床研发阶段,真正进入市场使用还有很长的时间。因此目前预防控制柯萨奇A16病毒的关键是研发出一种高灵敏的早期诊断试剂,做到早确症,早救治,早隔离,防止柯萨奇A16病毒的疫情蔓延。

[0003] 柯萨奇A16病毒早期诊断的方法有RT-PCR方法、血清IgM抗体检测。RT-PCR方法是目前市场的主流方法,灵敏度高,特异性强。但也存在一些不足之处,RT-PCR荧光检测技术需要严格认证的实验室条件、昂贵的荧光检测仪、专业培训的技术员,因此比较难以在基层的医疗单位推广。另外由于病毒感染不同阶段,病毒所在的人体部位会有不同,有时在咽喉处,有时在肛门处,因此对单一的标本检测出阴性并不意味着柯萨奇病毒不存在。血清IgM抗体检测方法主要有两种方式,酶联免疫诊断方法和胶体金免疫层析方法。血清中IgM抗体存在的时间长,长达6个月,意味患者痊愈后血液中还可以检测出柯萨奇A16病毒IgM抗体。另外很多儿童对采集血液天生恐惧,在采血过程中产生抵触行为会干扰到医务人员的工作。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对以上要解决的技术问题,提供一种简单、快速、准确的柯萨奇A16病毒检测技术。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供了以下技术方案:

[0006] 一种柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其包括背板以及依次置于所述背板上的样品垫、量子点颗粒标记垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述样品垫和所述量子点颗粒标记垫依次搭接在所述硝酸纤维素膜的一端,所述吸水纸搭接在所述硝酸纤维素膜的另一端,其中所述量子点颗粒标记垫吸附有抗人IgA抗体-量子点微球标记物,所述硝酸纤维素膜上具有间隔开的检测线和对照线,所述检测线包被有柯萨奇A16病毒VP3蛋白多肽,所述对照线包被有人IgA抗体。

[0007] 根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其中所述柯萨奇A16病毒VP3蛋白多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。优选地,柯萨奇A16病毒VP3蛋白

多肽的包被浓度为0.2-2mg/ml,更优选为0.2-1mg/ml,最优选为0.5mg/ml。

[0008] 优选地,检测线和对照线之间的距离为0.5cm至1.5cm,更优选为至少1cm,最优选为1cm。其中,检测线靠近标记垫,对照线靠近吸水纸。

[0009] 根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其中所述抗人IgA抗体量子点微球标记物包括抗人IgA抗体和量子点微球。优选地,所述抗人IgA抗体量子点微球标记物通过EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)/NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)交联制备得到。

[0010] 更优选地,制备所述抗人IgA抗体量子点微球标记物的步骤如下:吸取将表面羧基修饰的水溶性CdTe/ZnSe核壳量子点离心后,加入PBS(磷酸缓冲盐溶液)溶解,得到量子点溶液,然后再加入N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐到量子点溶液中,再加入抗人IgA抗体溶液,室温搅拌,反应完全后,离心得到沉淀物,向沉淀物加入牛血清白蛋白溶液封闭处理,再离心得到沉淀物,向沉淀物加入PBS溶解,得到抗人IgA抗体-量子点微球标记物。

[0011] 根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其中所述量子点微球是CdTe/ZnSe量子点微球。

[0012] 根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条,其中所述抗人IgA抗体是羊抗人IgA多克隆抗体、鼠抗人IgA单克隆抗体、兔抗人IgA单克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体中的任意一种。更优选地,所述抗人IgA抗体是羊抗人IgA多克隆抗体。

[0013] 优选地,所述的人IgA抗体的包被浓度为0.5-3mg/ml,更优选为0.5-2mg/ml,最优选为1mg/ml。

[0014] 优选地,所述量子点颗粒标记垫还包括吸附所述抗人IgA抗体量子点微球标记物的基底。所述基底优选为玻璃纤维素膜。

[0015] 优选地,所述背板的材质为PVC(聚氯乙烯),特别是具有胶粘剂的粘性PVC。

[0016] 本发明还提供了一种柯萨奇A16病毒IgA抗体检测试剂盒,其包括如上文所述的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条。

[0017] 优选地,本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体检测试剂盒还包括紫外照射装置。

[0018] 更优选地,所述紫外照射装置为紫外线灯手电筒。紫外线的波长范围为200-400nm。

[0019] 本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的测试对象是受试者标本(血液、唾液、肛门拭子、尿液)中的IgA抗体,优选人唾液中的IgA抗体。

[0020] 应用本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条检测柯萨奇A16病毒的过程如下:

[0021] 将棉棒伸入受试者的口腔中,在腮帮、舌下收集唾液样品,采集后的棉棒放置到装有样品稀释液的样品管中充分挤压,得到样品溶液,吸取100-200 μ l样品溶液滴在本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的样品垫上,20-30分钟后用紫外线手电筒照射试纸条观察结果。

[0022] 如果检测线和质控线均具有荧光条带,则判断为柯萨奇A16病毒IgA抗体阳性;如果只有质控线有荧光条带,检测线无荧光条带,则判断为柯萨奇A16病毒IgA抗体阴性;如果质控线没有荧光条带,检测线有或者无荧光条带,则结果均为无效。

[0023] 棉棒的材料优选为聚酯棉、脱脂棉,更优选为聚酯棉。

[0024] 根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析检测试纸条利用量子捕获法原理技术,选取CdTe/ZnSe微球作为量子点标记物,检测的是人唾液中IgA抗体,灵敏度可以比常见的胶体金标记物高10倍以上,能够有效提高检测的灵敏度。此外,本发明是试纸条的检测对象是受试者的唾液标本,唾液中IgA抗体一般在病毒感染后2天就可以产生,因此检测的窗口期很短,最为早期诊断非常合适,IgA抗体存在的周期比较短,一般患者病毒感染痊愈后1周后病毒特异的IgA抗体就会消失,不会造成假阳性的结果。量子点标记物具有荧光强度高、荧光寿命长、激发波带宽肉眼可见等优势,作为检测的标记物具备先天性信号强的特点。本发明利用量子点优势可以有效提高柯萨奇A16病毒IgA抗体的检测灵敏度,为柯萨奇A16病毒的早期诊断技术提供有益的补充。此外,本发明的试纸条在采样方面更为方便简单,对操作人员来说简单易学不用专业培训便可容易掌握,特别适合托儿所、幼儿园等机构筛查柯萨奇A16病毒感染,及时隔离可疑的儿童患者,可以有效避免柯萨奇A16病毒疫情的蔓延传播。

附图说明

[0025] 图1为根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的结构示意图。

[0026] 图2为根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的检测过程示意图。

[0027] 图3为根据本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的结果判断示意图。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和具体实施例对本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条作进一步的详述,但本发明的保护范围并不受到其限制。

[0029] 如未特别指出,本发明所使用的试剂和处理手段均为本领域技术人员所知晓的。

[0030] 实施例1:制备柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条

[0031] 1、制备量子点颗粒标记垫

[0032] 吸取10-50 μ l水溶性CdTe/ZnSe核壳量子点(表面羧基修饰,北京中科物源生物技术有限公司,货号W-3006-570),6000rpm离心5-10min,加入100 μ l 10mM PBS(pH 7.2)溶解,得到量子点溶液。加入10-50 μ l的2%(质量浓度)N-羟基琥珀酰亚胺和2%(质量浓度)1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐到量子点溶液中,再加入100-1500 μ l的浓度为5mg/ml羊抗人IgA抗体(sigma公司,货号10884)溶液,室温搅拌1-6小时。反应完全后,6000rpm离心5-10min,得到沉淀物,向沉淀物加入1%(质量体积浓度)BSA(牛血清白蛋白)溶液封闭处理2小时。6000rpm离心5-10min,得到沉淀物,向沉淀物加入10mM PBS缓冲溶液(pH=7.2)溶解,得到抗人IgA抗体-量子点微球标记物,4 $^{\circ}$ C保存备用。将抗人IgA抗体-量子点微球标记物喷涂到基底玻璃纤维膜上,稀释参数为30cm²/ml,并在湿度15%、温度30 $^{\circ}$ C条件下干燥12小时以上,制备得到量子点颗粒标记垫2,密封备用。

[0033] 优选地,量子点颗粒标记垫2的基底玻璃纤维素膜在被喷涂之前经过质量浓度为

0.5%的Tween-20和浓度为10mM的PBS浸泡处理,其pH值为7.2。

[0034] 2、硝酸纤维素膜包被

[0035] 用包被液(50mM碳酸盐缓冲液,pH9.6)稀释人IgA抗体(sigma公司,货号14036)、柯萨奇A16病毒VP3抗原多肽(氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,由商业公司合成),其中人IgA抗体的浓度为1mg/ml,柯萨奇A16病毒VP3抗原多肽浓度为0.5mg/ml。将两者均匀喷涂到硝酸纤维素膜3上,其中将人IgA抗体浓度为1mg/ml喷涂到硝酸纤维素膜上的对照线7位置,将柯萨奇A16病毒VP3抗原多肽(浓度为0.5mg/ml)喷涂到硝酸纤维素膜3上检测线6位置。

[0036] 检测线6和对照线7以一定距离间隔开,优选两者之间的距离为1cm(可在0.5至1.5cm之间)。其中,检测线6靠近羊抗人IgA抗体量子点标记垫2,对照线7靠近吸水纸4。

[0037] 将喷涂好的硝酸纤维素膜3放置在湿度10-30%、温度20-35℃条件下烘干处理至少12小时,烘干好的硝酸纤维素膜3密封备用。

[0038] 3、组装、切条

[0039] 图1为本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的结构示意图。按照图1所示结构,将吸水纸4、硝酸纤维素膜3、量子颗粒标记垫2、样品垫1依次搭接粘附在PVC背板5上,其中样品垫1和量子颗粒标记垫2依次搭接在硝酸纤维素膜3的一端,吸水纸4搭接在硝酸纤维素膜3的另一端。然后调整切条机参数进行切条,切成宽3-4mm的试纸条(优选宽4mm)。试纸条的尺寸可以根据实际使用要求而改变。

[0040] 具体地,本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条包括背板5、背板5上表面的中间位置覆盖有硝酸纤维素膜3,背板5上表面还设置有吸水纸4,该吸水纸4的一端搭接在硝酸纤维素膜3的第一端上,吸水纸4的其余部分与背板5的上表面贴合,背板5上表面在与吸水纸4相对的一端依次设置有量子颗粒标记垫2和样品垫1,量子颗粒标记垫2的第一端搭接在硝酸纤维素膜3的第二端上,量子颗粒标记垫2的第二端与背板5的上表面贴合,样品垫1的一端搭接在量子颗粒标记垫2的第二端上,样品垫1的其余部分与背板5的上表面贴合。

[0041] 实施例2:标本测试及结果判断

[0042] 将棉棒伸入受试者的口腔中,在腮帮、舌下收集唾液,采集后的棉棒放置到装有样品稀释液的样品管中充分挤压,得到样品溶液8,吸取100-200 μ l样品溶液8沿方向A滴在本发明的免疫荧光层析试纸条的样品垫1上,样品溶液8沿层析方向B朝吸水纸移动。20-30分钟用紫外线手电筒9照射试纸条观察结果。紫外线的波长范围为200-400nm。

[0043] 样品稀释液的配方如下:

[0044] 质量分数为0.3%的明胶、质量分数为0.15%的酪蛋白、质量分数为0.1%的胰蛋白酶、体积分数为0.1%的ProClin300、浓度为10mM的PBS,pH值为7.2。

[0045] 图2示出了本发明柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条的检测过程示意图。

[0046] 如果检测线和质控线具有荧光条带,则判断为柯萨奇A16病毒IgA抗体阳性;如果只有质控线有荧光条带,检测线无荧光条带,则判断为柯萨奇A16病毒IgA抗体阴性;如果质控线没有荧光条带,检测线有或者无荧光条带,则结果均为无效。结果判定示意图参见图3。

[0047] 实施例3:本发明柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析试纸条与荧光PCR方法结果对比

[0048] 筛选临床手足口病患者100例,分别采集患者的唾液标本和咽拭子标本,分别用柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析试纸条诊断方法与柯萨奇A16病毒荧光PCR方法进行测试,结果如以下表1所示:

[0049] 表1:柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点检测试纸条诊断方法与荧光PCR方法比较结果

IgA抗体量子点方法	荧光PCR方法		合计
	阳性	阴性	
[0050] 阳性	35	5	40
阴性	2	58	60
合计	37	63	100

[0051] 由此可见,本发明柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析试纸条与荧光PCR方法比较,阳性率达到94.59%,特异性92.06%,可以符合临床检测的条件。

[0052] 实施例4:本发明柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析试纸条检测方法特异性研究

[0053] 临床上选择EV71病毒、呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、柯萨奇A6病毒、柯萨奇A10病毒感染患者唾液标本各3份,分别用本发明柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析试纸条进行测试,结果均显示阴性。由此说明本发明柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫层析试纸条与上述的病毒感染标本无交叉,特异性高,可用于特异性检测柯萨奇A16病毒。

[0054] 本发明并不局限于上述实施方式,如果对本发明的各种改动或变形不脱离本发明的精神和范围,倘若这些改动和变形属于本发明的权利要求和等同技术范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变形。

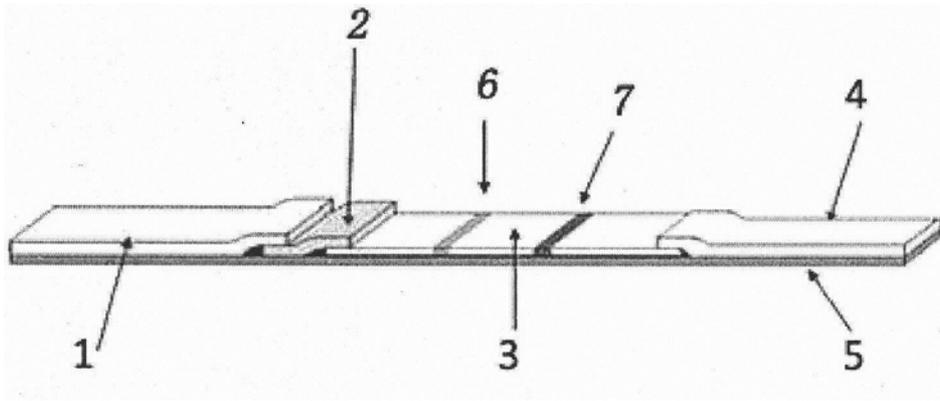


图1

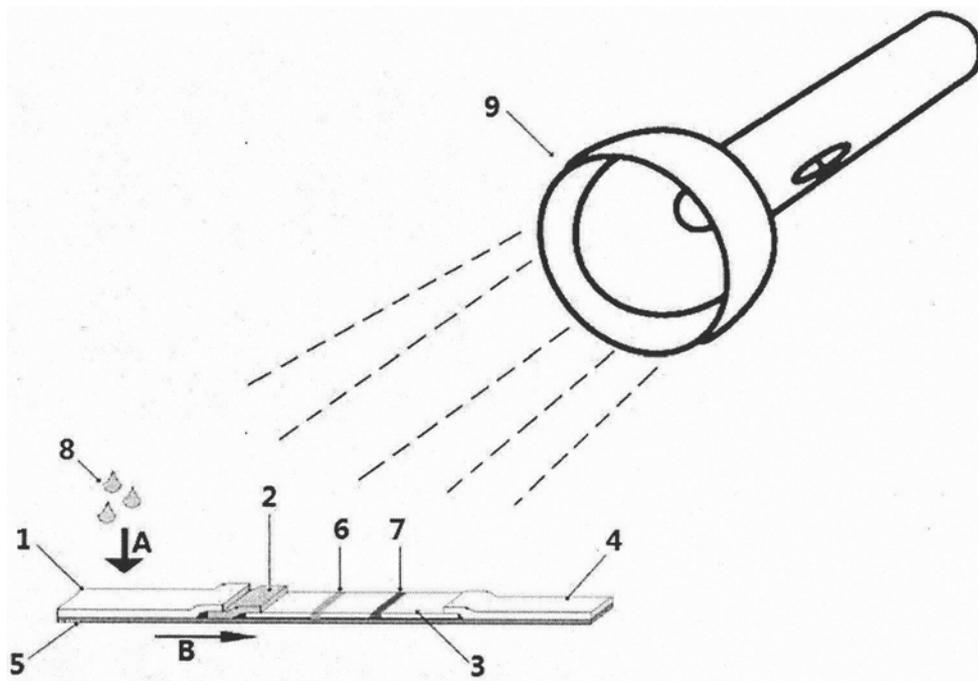


图2

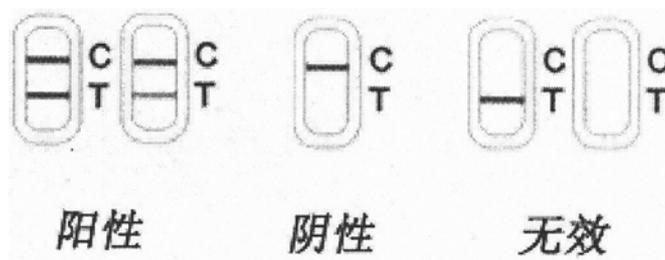


图3

专利名称(译)	柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条及试剂盒		
公开(公告)号	CN110045105A	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201811356197.7	申请日	2018-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	广州市妇女儿童医疗中心		
申请(专利权)人(译)	广州市妇女儿童医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	广州市妇女儿童医疗中心		
[标]发明人	王长兵 许甜甜 朱冰		
发明人	王长兵 许甜甜 朱冰		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/526 G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	林玉芳 刘婉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条。本发明的柯萨奇A16病毒IgA抗体量子点免疫荧光层析试纸条包括背板以及设置于背板上的样品垫、量子点颗粒标记垫、硝酸纤维素膜、吸水纸。本发明的试纸条利用量子点免疫荧光技术，并基于唾液标本中柯萨奇A16病毒IgA抗体作为检测靶位，能够高度灵敏、简单快速地对柯萨奇A16病毒早期感染进行诊断，有助于及时监控手足口病疫情，并防止疫情的蔓延。

