



(21)申请号 201910965480.8

(22)申请日 2019.10.12

(71)申请人 南京黎明生物制品有限公司

地址 210042 江苏省南京市玄武区蒋王庙
116-1号

(72)发明人 刘光明 张树文 黄翔 孙雯燕

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书4页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及微生物检测技术领域,特别涉及基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,包括GNP1复合物和GNP2复合物;GNP1复合物由Cas蛋白与HPV-6型的gRNA1复合而成,gRNA1的基因序列由引物序列1和基因E1 replication protein MK313768.1 2399-2421构成;GNP2复合物由Cas蛋白与HPV-11型的gRNA2复合而成,gRNA2的基因序列由引物序列2和基因E2 regulatory protein MK313768.1 3414-3436构成。本发明的免疫检测试剂盒具有较高的敏感性、特异性和准确性。

1. 一种基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,包括GNP1复合物和GNP2复合物;

所述GNP1复合物由Cas蛋白与HPV-6型的gRNA1复合而成,所述gRNA1的基因序列由如SEQ ID NO:1所示的引物序列1和基因E1 replication protein MK313768.1 2399-2421构成;

所述GNP2复合物由Cas蛋白与HPV-11型的gRNA2复合而成,所述gRNA2的基因序列由如SEQ ID NO:2所示的引物序列2和基因E2 regulatory protein MK313768.1 3414-3436构成;

SEQ ID NO:1为:5'-ATGATGCCACACAACCATGTTGG-3',

SEQ ID NO:2为:5'-ACGGCGTGTCTGGCGCCGCTAGG-3'。

2. 根据权利要求1所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,所述Cas蛋白为Cas9蛋白和Cas13蛋白中的一种。

3. 根据权利要求1所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,所述免疫检测试剂盒为HPV酶联免疫试剂盒、HPV免疫层析试剂盒和HPV化学发光免疫试剂盒中的一种。

4. 根据权利要求3所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,所述HPV酶联免疫试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

- ①、利用电脑软件设计并体外合成针对HPV特异性的gRNA1和gRNA2;
- ②、将Cas蛋白分别与gRNA1和gRNA2混合,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物;
- ③、将GNP1复合物包被于酶标板上;
- ④、用HRP标记GNP2复合物,作为HRP标记品;
- ⑤、配制底物显色A液、底物显色B液、清洗液和终止液;
- ⑥、将步骤③、④、⑤中得到的半成品分别单独包装后进行装盒,得到最终的酶联免疫试剂盒;

或

- ①、利用电脑软件设计针对HPV特异性的gRNA1和gRNA2;
- ②、将Cas蛋白分别与gRNA1和gRNA2混合,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物;
- ③、将GNP2复合物包被于酶标板上;
- ④、用HRP标记GNP1复合物,作为HRP标记品;
- ⑤、配制底物显色A液、底物显色B液、清洗液和终止液;
- ⑥、将步骤③、④、⑤中得到的半成品分别单独包装后进行装盒,得到最终的酶联免疫试剂盒。

5. 根据权利要求4所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,步骤②中,将1mL 1mg/mL的所述Cas蛋白与10D的gRNA1或gRNA2混合,37℃反应30min,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物;步骤③中,所述GNP1复合物或GNP2复合物在包被于酶标板上时,稀释成2μg/mL,包被量为100μL/孔,包被6h后,用15wt%的FCS于4℃封闭过夜。

6. 根据权利要求4所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,步骤④中,所述HRP标记GNP1复合物或GNP2复合物,包括以下步

骤:

- 4-1、称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,得到HRP溶液;
- 4-2、于HRP溶液中加入0.2mL新配的0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20min,得到HRP- NaIO_4 溶液;
- 4-3、将HRP- NaIO_4 溶液装入透析袋中,用1mM pH=4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,得到醛化程RP;
- 4-4、加20μL 0.2M pH=9.5的碳酸盐缓冲液,使所述醛化程RP的pH升高到至9.0-9.5,然后立即加入10mg GNP1复合物或GNP2复合物,室温避光轻轻搅拌2h;
- 4-5、加0.1mL新配的4mg/mL NaBH_4 溶液,混匀,置4℃温度下2h,得到HRP混合液;
- 4-6、将HRP混合液装入透析袋中,用0.15M pH=7.4的PBS透析,4℃过夜;
- 4-7、在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃温度下1h,转移至离心管,得到离心液;
- 4-8、将离心液置于离心机中,4℃、3000rpm离心30min,弃上清,收获沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤二次,最后将沉淀物溶于少量0.15M pH=7.4的PBS中,得到HRP标记液;
- 4-9、将HRP标记液装入透析袋中,用0.15M pH=7.4的PBS透析,去除铵离子后,于4℃、10,000rpm离心30min,收获上清液即为HRP标记的GNP1复合物或HRP标记的GNP2复合物,分装后于-20℃冰冻保存。

7. 根据权利要求4所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,步骤⑤中,所述底物显色A液按如下配比配制而成:在500mL蒸馏水中添加醋酸钠13.6g、柠檬酸1.6g和30wt%的双氧水0.3mL,

所述底物显色B液按如下配比配制而成:在500mL蒸馏水中添加乙二胺四乙酸二钠0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL、溶有0.15g TMB的DMSO溶液3mL;

所述清洗液为0.01M PBST;

所述终止液为2N H_2SO_4 。

8. 根据权利要求4所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,所述HPV酶联免疫试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

- A、试剂平衡:取制作好的酶标板、样品稀释液、质控品/待测品平衡至室温;
- B、稀释:将质控品/待测品用样品稀释液稀释至特定浓度;
- C、加样:将质控品/待测品以100μL/孔加至相应酶标板内;
- D、温育:酶标板置于37℃温育60min,于自动洗板机用清洗液洗板5次;
- E、加酶:将HRP标记品以100μL/孔加至相应的酶标板内;
- F、温育:酶标板置于37℃温育60min,于自动洗板机用洗涤液洗板5次;
- G、显色:将显色剂A液与显色剂B液等体积混匀,以100μL/孔加至酶标板内,置电热恒温培养箱37℃温育30min;
- H、终止:以50μL/孔加入终止液终止反应;

I、读板:用酶标仪在波长450nm处测定吸光度,参比波长为620nm或630nm。

9. 根据权利要求3所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,所述HPV免疫层析试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 蓝色乳胶颗粒标记生物素

用0.01M pH=7.4的PBS把蓝色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度,加入生物素使其终浓度为0.1mg/mL,4℃反应过夜;加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h,于4℃、10,000rpm离心20min,去上清,沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶,得到生物素乳胶液,置于4℃备用;

(2) 红色乳胶颗粒标记GNP1

用0.01M pH=7.4的PBS把红色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度,加入GNP1使其终浓度为0.1mg/mL,4℃反应过夜;加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h,4℃、10,000rpm离心20min,去上清,沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶,得到GNP1乳胶液,置于4℃备用;

(3) 点膜

用0.01M pH=7.4的PBS分别将抗生物素抗体和GNP2稀释至合适的浓度,用点膜机分别将抗生物素抗体稀释液和GNP2稀释液点在硝酸纤维素膜上的质控区和测试区,于37℃烘干2h,密封后置于室温备用;

(4) 点乳胶

用含0.1wt%BSA的0.01M pH=7.4的PBS将步骤(1)、(2)中标记好的生物素乳胶液和GNP1乳胶液稀释至合适浓度,用机器喷点在聚酯膜上,于37℃烘干2小时,密封好置于室温备用;

(5) 组装

将点好的硝酸纤维素膜和聚酯膜粘贴于试纸条的PVC片材上,所述聚酯膜与玻纤加料区粘接,所述硝酸纤维素膜的两端分别与聚酯膜和吸水区粘接,切成相应宽度装入塑料卡,得到最终的免疫层析试剂盒;

或

(1) 蓝色乳胶颗粒标记生物素

用0.01M pH=7.4的PBS把蓝色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度,加入生物素使其终浓度为0.1mg/mL,4℃反应过夜;加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h,于4℃、10,000rpm离心20min,去上清,沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶,得到生物素乳胶液,置于4℃备用;

(2) 红色乳胶颗粒标记GNP2

用0.01M pH=7.4的PBS把红色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度,加入GNP2使其终浓度为0.1mg/mL,4℃反应过夜;加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h,4℃、10,000rpm离心20min,去上清,沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶,得到GNP2乳胶液,置于4℃备用;

(3) 点膜

用0.01M pH=7.4的PBS分别将抗生物素抗体和GNP1稀释至合适的浓度,用点膜机分别将抗生物素抗体稀释液和GNP1稀释液点在硝酸纤维素膜上的质控区和测试区,于37℃烘干2h,密封后置于室温备用;

(4) 点乳胶

用含0.1wt%BSA的0.01M pH=7.4的PBS将步骤(1)、(2)中标记好的生物素乳胶液和GNP2乳胶液稀释至合适浓度,用机器喷点在聚酯膜上,于37℃烘干2小时,密封好置于室温备用;

(5) 组装

将点好的硝酸纤维素膜和聚酯膜粘贴于试纸条的PVC片材上,所述聚酯膜与玻纤加料区粘接,所述硝酸纤维素膜的两端分别与聚酯膜和吸水区粘接,切成相应宽度装入塑料卡,得到最终的免疫层析试剂盒。

10. 根据权利要求9所述的基于CAS蛋白及GRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其特征在于,HPV免疫层析试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

- a、试剂平衡:取制作好的免疫层析试剂、样品稀释液、质控品/待测品平衡至室温;
- b、稀释:将质控品/待测品用样品稀释液稀释至特定浓度;
- c、加样:将质控品/待测品以100 μ L/孔加至试纸条的加料区中;
- d、结果判读:加样后15min判读结果,检测线出现一条红线为阳性,否则为阴性。

基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物检测技术领域,特别涉及基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 尖锐湿疣是由人乳头瘤病毒(HPV)感染所致的以肛门生殖器部位增生性损害为主要表现的性传播疾病,大多发生于18~50岁的中青年。大约经过半个月至8个月,平均为3个月的潜伏期后发病,此病较为常见,主要通过性接触传播。HPV有不同的亚型,最常引起尖锐湿疣的HPV有6型和11型。

[0003] 目前,临床上诊断尖锐湿疣主要有以下几种方法:

1.醋酸白实验:用3%~5%醋酸液局部外涂或湿敷5~10分钟可在HPV感染区域发白,即所谓“醋酸白现象”。但特异性不高,有些慢性炎症,如念珠菌性外阴炎、生殖器部位外伤和非特异性炎症均可出现假阳性。

[0004] 2.细胞学检查:用阴道或宫颈疣组织涂片,巴氏染色,可见到两种细胞,即空泡化细胞及角化不良细胞同时存在,对尖锐湿疣有诊断价值。

[0005] 3.组织病理检查:如在棘层上方及颗粒层出现空泡化细胞,是诊断HPV感染的重要证据。

[0006] 4.免疫学试验:采用抗HPV蛋白的抗体检测病变组织中的HPV抗原,该方法敏感性不高,检出率只有50%左右。

[0007] 5.核酸杂交试验:是检测HPV感染的重要手段,包括斑点印迹法(dot blot hybridization)、组织原位杂交法、核酸印记法(Southern blot hybridization)。这些方法的特异度和敏感性均较高,是诊断HPV感染的敏感而可靠的方法。但技术操作繁琐,临床上没有普遍开展。

[0008] 6.聚合酶链反应(PCR):是目前检出HPV感染的最敏感的方法,又可做型特异度分析,具有敏感性高、方法简便迅速的特点。

[0009] 上述六种检测方法中,PCR检测是在三甲级别的大医院使用最广泛的方法,但是PCR使用需要经过专门培训的人员和验收合格的场地,且设备比较昂贵,在二级及以下医院没办法开展。

[0010] 相对的,免疫学检测利用抗体抗原的特异性结合,准确性高且成本低于PCR检测,因此用于检测HPV抗原具有重要意义。但是,免疫学检测能实现的前提是找到针对HPV的抗体,由于HPV无法体外培养,因此无法提取天然的HPV病毒用于免疫动物得到针对HPV的抗体,体外合成的HPV多肽不具有天然构象,免疫得到的抗体不能与天然的HPV病毒反应,因此利用现有的方法无法开发出HPV免疫检测试剂盒。

[0011] 为解决现有技术中无法制备得到HPV抗体或抗体活性很弱时,无法开发出相应免疫检测试剂盒的难题,本申请的发明人研制出人工合成的GNP复合物(guide RNA-Protein)

作为替代抗体,用于开发HPV免疫检测试剂盒。

发明内容

[0012] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,其将HPV特有的gRNA与Cas蛋白相连,组成一种特异性针对HPV的GNP复合物替代HPV抗体,以此开发出的HPV免疫检测试剂盒,具有较高的敏感性、特异性和准确性。

[0013] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

一种基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒,包括GNP1复合物和GNP2复合物;

所述GNP1复合物由Cas蛋白与HPV-6型的gRNA1复合而成,所述gRNA1的基因序列由如SEQ ID NO:1所示的引物序列1和基因E1 replication protein MK313768.1 2399-2421构成;所述GNP2复合物由Cas蛋白与HPV-11型的gRNA2复合而成,所述gRNA2的基因序列由如SEQ ID NO:2所示的引物序列2和基因E2 regulatory protein MK313768.1 3414-3436构成;SEQ ID NO:1为:5'-ATGATGCCACACAACCATGTTGG-3',

SEQ ID NO:2为:5'-ACGGCGTGTCGGCGCCGCTAGG-3'。

[0014] 进一步地,所述Cas蛋白为Cas9蛋白和Cas13蛋白中的一种。

[0015] 进一步地,所述免疫检测试剂盒为HPV酶联免疫试剂盒、HPV免疫层析试剂盒和HPV化学发光免疫试剂盒中的一种。

[0016] 进一步地,所述HPV酶联免疫试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

- ①、利用电脑软件设计并体外合成针对HPV特异性的gRNA1和gRNA2;
- ②、将Cas蛋白分别与gRNA1和gRNA2混合,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物;
- ③、将GNP1复合物包被于酶标板上;
- ④、用HRP标记GNP2复合物,作为HRP标记品;
- ⑤、配制底物显色A液、底物显色B液、清洗液和终止液;
- ⑥、将步骤③、④、⑤中得到的半成品分别单独包装后进行装盒,得到最终的酶联免疫试剂盒;

或

- ①、利用电脑软件设计针对HPV特异性的gRNA1和gRNA2;
- ②、将Cas蛋白分别与gRNA1和gRNA2混合,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物;
- ③、将GNP2复合物包被于酶标板上;
- ④、用HRP标记GNP1复合物,作为HRP标记品;
- ⑤、配制底物显色A液、底物显色B液、清洗液和终止液;
- ⑥、将步骤③、④、⑤中得到的半成品分别单独包装后进行装盒,得到最终的酶联免疫试剂盒。

[0017] 进一步地,步骤②中,将1mL 1mg/mL的所述Cas蛋白与10D的gRNA1或gRNA2混合,37℃反应30min,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物。

[0018] 进一步地,步骤③中,所述GNP1复合物或GNP2复合物在包被于酶标板上时,稀释成2μg/mL,包被量为100μL/孔,包被6h后,用15wt%的FCS于4℃封闭过夜。

[0019] 进一步地,步骤④中,所述HRP标记GNP1复合物或GNP2复合物,包括以下步骤:4-1、称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,得到HRP溶液;

4-2、于HRP溶液中加入0.2mL新配的0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20min,得到HRP- NaIO_4 溶液;

4-3、将HRP- NaIO_4 溶液装入透析袋中,用1mM $\text{pH}=4.4$ 的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,得到醛化程RP;

4-4、加20 μL 0.2M $\text{pH}=9.5$ 的碳酸盐缓冲液,使所述醛化程RP的 pH 升高到至9.0-9.5,然后立即加入10mg GNP1复合物或GNP2复合物,室温避光轻轻搅拌2h;

4-5、加0.1mL新配的4mg/mL NaBH_4 溶液,混匀,置4℃温度下2h,得到HRP混合液;

4-6、将HRP混合液装入透析袋中,用0.15M $\text{pH}=7.4$ 的PBS透析,4℃过夜;

4-7、在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃温度下1h,转移至离心管,得到离心液;

4-8、将离心液置于离心机中,4℃、3000rpm离心30min,弃上清,收获沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤二次,最后将沉淀物溶于少量0.15M $\text{pH}=7.4$ 的PBS中,得到HRP标记液;

4-9、将HRP标记液装入透析袋中,用0.15M $\text{pH}=7.4$ 的PBS透析,去除铵离子后,于4℃、10,000rpm离心30min,收获上清液即为HRP标记的GNP1复合物或HRP标记的GNP2复合物,分装后于-20℃冰冻保存。

[0020] 进一步地,步骤⑤中,所述底物显色A液按如下配比配制而成:在500mL蒸馏水中添加醋酸钠13.6g、柠檬酸1.6g和30wt%的双氧水0.3mL,

所述底物显色B液按如下配比配制而成:在500mL蒸馏水中添加乙二胺四乙酸二钠0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL、溶有0.15g TMB的DMSO溶液3mL;

所述清洗液为0.01M PBST;

所述终止液为2N H_2SO_4 。

[0021] 进一步地,所述HPV酶联免疫试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

A、试剂平衡:取制作好的酶标板、样品稀释液、质控品/待测品平衡至室温;

B、稀释:将质控品/待测品用样品稀释液稀释至特定浓度;

C、加样:将质控品/待测品以100 μL /孔加至相应酶标板内;

D、温育:酶标板置于37℃温育60min,于自动洗板机用清洗液洗板5次;

E、加酶:将HRP标记品以100 μL /孔加至相应的酶标板内;

F、温育:酶标板置于37℃温育60min,于自动洗板机用洗涤液洗板5次;

G、显色:将显色剂A液与显色剂B液等体积混匀,以100 μL /孔加至酶标板内,置电热恒温培养箱37℃温育30min;

H、终止:以50 μL /孔加入终止液终止反应;

I、读板:用酶标仪在波长450nm处测定吸光度,参比波长为620nm或630nm。

[0022] 进一步地,所述HPV免疫层析试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

(1) 蓝色乳胶颗粒标记生物素

用0.01M $\text{pH}=7.4$ 的PBS把蓝色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度,加入生物素使其终浓度为0.1mg/mL,4℃反应过夜;加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h,于4℃、10,000rpm离心20min,去上清,沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M $\text{pH}=7.4$ 的PBS复溶,得到生物素乳胶液,置

于4℃备用；

(2) 红色乳胶颗粒标记GNP1

用0.01M pH=7.4的PBS把红色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度，加入GNP1使其终浓度为0.1mg/mL，4℃反应过夜；加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h，4℃、10,000rpm离心20min，去上清，沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶，得到GNP1乳胶液，置于4℃备用；

(3) 点膜

用0.01M pH=7.4的PBS分别将抗生物素抗体和GNP2稀释至合适的浓度，用点膜机分别将抗生物素抗体稀释液和GNP2稀释液点在硝酸纤维素膜上的质控区和测试区，于37℃烘干2h，密封后置于室温备用；

(4) 点乳胶

用含0.1wt%BSA的0.01M pH=7.4的PBS将步骤(1)、(2)中标记好的生物素乳胶液和GNP1乳胶液稀释至合适浓度，用机器喷点在聚酯膜上，于37℃烘干2小时，密封好置于室温备用；

(5) 组装

将点好的硝酸纤维素膜和聚酯膜粘贴于试纸条的PVC片材上，所述聚酯膜与玻纤加料区粘接，所述硝酸纤维素膜的两端分别与聚酯膜和吸水区粘接，切成相应宽度装入塑料卡，得到最终的免疫层析试剂盒；

或

(1) 蓝色乳胶颗粒标记生物素

用0.01M pH=7.4的PBS把蓝色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度，加入生物素使其终浓度为0.1mg/mL，4℃反应过夜；加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h，于4℃、10,000rpm离心20min，去上清，沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶，得到生物素乳胶液，置于4℃备用；

(2) 红色乳胶颗粒标记GNP2

用0.01M pH=7.4的PBS把红色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度，加入GNP2使其终浓度为0.1mg/mL，4℃反应过夜；加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h，4℃、10,000rpm离心20min，去上清，沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶，得到GNP2乳胶液，置于4℃备用；

(3) 点膜

用0.01M pH=7.4的PBS分别将抗生物素抗体和GNP1稀释至合适的浓度，用点膜机分别将抗生物素抗体稀释液和GNP1稀释液点在硝酸纤维素膜上的质控区和测试区，于37℃烘干2h，密封后置于室温备用；

(4) 点乳胶

用含0.1wt%BSA的0.01M pH=7.4的PBS将步骤(1)、(2)中标记好的生物素乳胶液和GNP2乳胶液稀释至合适浓度，用机器喷点在聚酯膜上，于37℃烘干2小时，密封好置于室温备用；

(5) 组装

将点好的硝酸纤维素膜和聚酯膜粘贴于试纸条的PVC片材上，所述聚酯膜与玻纤加料区粘接，所述硝酸纤维素膜的两端分别与聚酯膜和吸水区粘接，切成相应宽度装入塑料卡，得到最终的免疫层析试剂盒。

[0023] 进一步地, HPV免疫层析试剂盒的使用方法, 包括以下步骤:

- a、试剂平衡: 取制作好的免疫层析试剂、样品稀释液、质控品/待测品平衡至室温;
- b、稀释: 将质控品/待测品用样品稀释液稀释至特定浓度;
- c、加样: 将质控品/待测品以100 μ L/孔加至试纸条的加料区中;
- d、结果判读: 加样后15min判读结果, 检测线出现一条红线为阳性, 否则为阴性。

[0024] 综上所述, 本发明具有以下有益效果:

1、本申请研发的HPV免疫检测试剂盒, 利用本申请设计合成的HPV GNP复合物代替了HPV抗体, 既能与天然的HPV病毒结合, 又能与免疫试剂盒的载体结合, 具有较高的敏感性、特异性和准确性;

2、本申请采用免疫检测法, 相对于PCR检测法, 能够有效降低HPV的检测成本, 可供基层适用。

附图说明

[0025] 图1为HPV免疫层析试剂盒的试纸条;

图2为HPV酶联免疫试剂盒临床标本测试结果图。

[0026] 图中, 1、PVC片材; 2、加料区; 3、聚酯膜; 4、硝酸纤维素膜; 5、测试区; 6、质控区; 7、吸水区。

具体实施方式

[0027] 以下结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0028] 1、材料及试剂

1.1、Cas蛋白

需要说明的是, 本申请的GNP1复合物和GNP2复合物中, 可用Cas蛋白家族中的任一种蛋白, 其中使用Cas9蛋白和Cas13蛋白制得的GNP复合物具有更高的检测敏感性、特异性和准确性。本申请具体以Cas9蛋白(购自sigma)为例进行说明。

[0029] 1.2、HPV-6型的gRNA1和HPV-11型的gRNA2

本申请利用电脑设计出HPV特异性的gRNA1和gRNA2的基因序列, 随后使用PCR技术体外合成, 其合成方法为本领域常规手段, 在此不再赘述。

[0030] 1.3、样品稀释液

本申请使用磷酸盐吐温缓冲液, 具体配比为0.01M PBS+0.5%吐温20。

[0031] 另外, 本申请的其他材料及试剂均为市售产品, 试剂均采用优级纯。

[0032] 2、实施例

2.1、实施例1

一种基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒, 包括GNP1复合物和GNP2复合物。

[0033] GNP1复合物由Cas蛋白与HPV-6型的gRNA1复合而成, gRNA1的基因序列由如SEQ ID NO:1所示的引物序列1和基因E1 replication protein MK313768.1 2399-2421构成。

[0034] GNP2复合物由Cas蛋白与HPV-11型的gRNA2复合而成, gRNA2的基因序列由如SEQ ID NO:2所示的引物序列2和基因E2 regulatory protein MK313768.1 3414-3436构成;

其中,SEQ ID NO:1为:5'-ATGATGCCACACAACCATGTTGG-3',SEQ ID NO:2为:5'-ACGGCGTGTCGGCGCCGCTAGG-3'。

[0035] 上述免疫检测试剂盒为HPV酶联免疫试剂盒,其制备方法包括以下步骤:

①、利用电脑软件设计并体外合成针对HPV特异性的gRNA1和gRNA2。

[0036] ②、将1mL 1mg/mL的Cas9蛋白分别与10D的gRNA1和gRNA2混合,于37℃反应30min,对应形成GNP1复合物和GNP2复合物。

[0037] ③、将GNP1复合物包被于酶标板上,GNP1复合物稀释成2μg/mL,包被量为100μL/孔,包被6h后,用15wt%的FCS于4℃封闭过夜。

④、用HRP(辣根过氧化物酶)标记GNP2复合物,作为HRP标记品,其标记步骤包括如下:

4-1、称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中,得到HRP溶液;

4-2、于HRP溶液中加入0.2mL新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20min,得到HRP-NaIO₄溶液;

4-3、将HRP-NaIO₄溶液装入透析袋中,用1mM pH=4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,得到醛化程RP;

4-4、加20μL 0.2M pH=9.5的碳酸盐缓冲液,使所述醛化程RP的pH升高到至9.0-9.5,然后立即加入10mg GNP1复合物或GNP2复合物,室温避光轻轻搅拌2h;

4-5、加0.1mL新配的4mg/mL NaBH₄溶液,混匀,置4℃温度下2h,得到HRP混合液;

4-6、将HRP混合液装入透析袋中,用0.15M pH=7.4的PBS透析,4℃过夜;

4-7、在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃温度下1h,转移至离心管,得到离心液;

4-8、将离心液置于离心机中,4℃、3000rpm离心30min,弃上清,收获沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤二次,最后将沉淀物溶于少量0.15M pH=7.4的PBS中,得到HRP标记液;

4-9、将HRP标记液装入透析袋中,用0.15M pH=7.4的PBS透析,去除铵离子后,于4℃、10,000rpm离心30min,收获上清液即为HRP标记的GNP1复合物或HRP标记的GNP2复合物,分装后于-20℃冰冻保存。

[0038] ⑤、配制底物显色A液、底物显色B液、清洗液和终止液;

底物显色A液按如下配比配制而成:在500mL蒸馏水中添加醋酸钠13.6g、柠檬酸1.6g和30wt%的双氧水0.3mL;

底物显色B液按如下配比配制而成:在500mL蒸馏水中添加乙二胺四乙酸二钠0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mL、溶有0.15g TMB的DMSO溶液3mL;

清洗液为0.01M PBST;

终止液为2N H₂SO₄。

[0039] ⑥、将步骤③、④、⑤中得到的半成品分别单独包装后进行装盒,得到最终的酶联免疫试剂盒。

[0040] 上述HPV酶联免疫试剂盒,以质控品为样品来验证本试剂盒的检测效果,其质控品的品种类和浓度参见下表一,其使用方法包括以下步骤:

A、试剂平衡:取制作好的酶标板、样品稀释液、质控品平衡至室温;

B、稀释:将质控品用样品稀释液稀释至特定浓度;

C、加样:将质控品以100μL/孔加至相应酶标板内;

D、温育：酶标板置于37℃温育60min，于自动洗板机用清洗液洗板5次；

E、加酶：将HRP标记品以100μL/孔加至相应的酶标板内；

F、温育：酶标板置于37℃温育60min，于自动洗板机用洗涤液洗板5次；

G、显色：将显色剂A液与显色剂B液等体积混匀，以100μL/孔加至酶标板内，置电热恒温培养箱37℃温育30min；

H、终止：以50μL/孔加入终止液终止反应；

I、读板：用酶标仪在波长450nm处测定吸光度，参比波长为620nm或630nm。

[0041] 2.2、实施例2

实施例2在实施例1的方法基础上，将GNP1复合物包被于酶标板上，用HRP标记GNP1复合物。其对应的检测结果与实施例1一致，因此GNP1复合物与GNP2复合物的顺序可以互换，对免疫检测试剂盒的敏感性、特异性和准确性影响可以忽略不计。

[0042] 2.3、实施例3

实施例3的免疫检测试剂盒为HPV免疫层析试剂盒，其采用实施例1的GNP1复合物和GNP2复合物，制备方法包括以下步骤：

(1) 蓝色乳胶颗粒标记生物素

用0.01M pH=7.4的PBS（磷酸缓冲盐溶液）把蓝色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度，加入生物素使其终浓度为0.1mg/mL，4℃反应过夜；加入终浓度为1wt%的BSA（牛血清白蛋白）封闭1h，于4℃、10,000rpm离心20min，去上清，沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶，得到生物素乳胶液，置于4℃备用；

(2) 红色乳胶颗粒标记GNP1

用0.01M pH=7.4的PBS把红色乳胶颗粒稀释成1wt%的终浓度，加入GNP1使其终浓度为0.1mg/mL，4℃反应过夜；加入终浓度为1wt%的BSA封闭1h，4℃、10,000rpm离心20min，去上清，沉淀用含0.1wt%的BSA的0.01M pH=7.4的PBS复溶，得到GNP1乳胶液，置于4℃备用；

(3) 点膜

用0.01M pH=7.4的PBS分别将抗生物素抗体和GNP2稀释至合适的浓度，用点膜机分别将抗生物素抗体稀释液和GNP2稀释液点在硝酸纤维素膜上的质控区和测试区，于37℃烘干2h，密封后置于室温备用；

(4) 点乳胶

用含0.1wt%BSA的0.01M pH=7.4的PBS将步骤(1)、(2)中标记好的生物素乳胶液和GNP1乳胶液稀释至合适浓度，用机器喷点在聚酯膜上，于37℃烘干2小时，密封好置于室温备用；

(5) 组装

将点好的硝酸纤维素膜和聚酯膜粘贴于试纸条的PVC片材上，所述聚酯膜与玻纤加料区粘接，所述硝酸纤维素膜的两端分别与聚酯膜和吸水区粘接，切成相应宽度，制成参见图1所示的试纸条，装入塑料卡，得到最终的免疫层析试剂盒。

[0043] 上述HPV免疫层析试剂盒的使用方法，以质控品为样品来验证本试剂盒的检测效果，其质控品的品种类和浓度参见下表一，其使用方法包括以下步骤：

a、试剂平衡：取制作好的免疫层析试剂、样品稀释液、质控品平衡至室温；

b、稀释：将质控品用样品稀释液稀释至特定浓度；

c、加样：将质控品以100 μ L/孔加至试纸条的加料区中；

d、结果判读：加样后15min判读结果，检测线出现一条红线为阳性，否则为阴性。

[0044] 2.4、实施例4

实施例4在实施例3的方法基础上，红色乳胶颗粒标记GNP2。其对应的检测结果与实施例3一致，因此GNP1复合物与GNP2复合物的顺序可以互换，对免疫检测试剂盒的敏感性、特异性和准确性影响可以忽略不计。

[0045] 其中，化学发光免疫试剂盒的原理与酶联免疫试剂盒相似，因此本申请的GNP1复合物与GNP2复合物同时适用于化学发光免疫试剂盒。但酶联免疫试剂盒的检测结果显示化学发光免疫，因此优选酶联免疫试剂盒为例进行展开。

[0046] 3、性能检测

分别使用实施例1和实施例3的免疫检测试剂盒，对HPV 6型和HPV 11型进行敏感性和准确性检测，检测结果参见下表一和表二。

[0047] 3.1、敏感性

表一实施例1和实施例3的敏感性检测结果

检测项目	浓度/copies/mL	酶联免疫结果	免疫层析结果
HPV 6型	1×10^8	阳性	阳性
HPV 6型	1×10^7	阳性	阳性
HPV 6型	1×10^6	阳性	阳性
HPV 6型	1×10^5	阳性	阴性
HPV 6型	1×10^4	阴性	阴性
HPV 11型	1×10^8	阳性	阳性
HPV 11型	1×10^7	阳性	阳性
HPV 11型	1×10^6	阳性	阳性
HPV 11型	1×10^5	阳性	阴性
HPV 11型	1×10^4	阴性	阴性

从表一的结果可以看出，HPV酶联免疫试剂盒对HPV 6型和11型的检测敏感性为 1×10^5 copies/ml；免疫层析试剂盒对HPV 6型和11型的检测敏感性为 1×10^6 copies/ml，均具有较高的敏感性。

[0048] 3.2、特异性

表二实施例1和实施例3的特异性检测结果

检测项目	浓度/copies/mL	酶联免疫结果	免疫层析结果
HPV 16型	1×10^8	阴性	阴性
HPV 18型	1×10^8	阴性	阴性
沙眼衣原体	1×10^8	阴性	阴性
淋病奈瑟氏菌	1×10^8	阴性	阴性
解脲支原体	1×10^8	阴性	阴性
人型支原体	1×10^8	阴性	阴性
金黄色葡萄球菌	1×10^8	阴性	阴性
大肠杆菌	1×10^8	阴性	阴性

从表二的结果可以看出,HPV酶联免疫试剂盒和免疫层析试剂盒对以上微生物在浓度为 1×10^8 copies/mL时均无交叉反应,具有优良的特异性。

[0049] 3.3、HPV免疫检测试剂盒临床标本的检测

取48份疑似尖锐湿疣患者的标本,用PCR检测作为基准,同时用PCR检测、HPV酶联免疫试剂盒(实施例1)和HPV免疫层析试剂盒(实施例3)进行检测,HPV酶联免疫试剂盒临床标本测试结果参见图2,检测结果参见下表三。

表三PCR法、酶联免疫法以及免疫层析法对临床标本的检测结果

	PCR法	酶联免疫法	免疫层析法
阳性	17	15	14
阴性	31	33	34
敏感性/%	100.00	88.24	82.35
特异性/%	100.00	100.00	100.00
准确性/%	100.00	95.83	93.75

[0050] 从表三的结果可以看出,本申请的HPV酶联免疫试剂盒和HPV免疫层析试剂盒的特异性均能达到100%,其中HPV酶联免疫试剂盒和HPV免疫层析试剂盒的敏感性均大于82%,准确性均大于93%,能够满足基层的HPV检测所需,相对于PCR检测能够有效降低HPV的检测成本,便于被推广使用。其中,HPV酶联免疫试剂盒的检测结果更优,因此以实施例1为优选实施例。

[0051] 本具体实施例仅仅是对本发明的解释,其并不是对本发明的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本发明的权利要求范围内都受到专利法的保护。

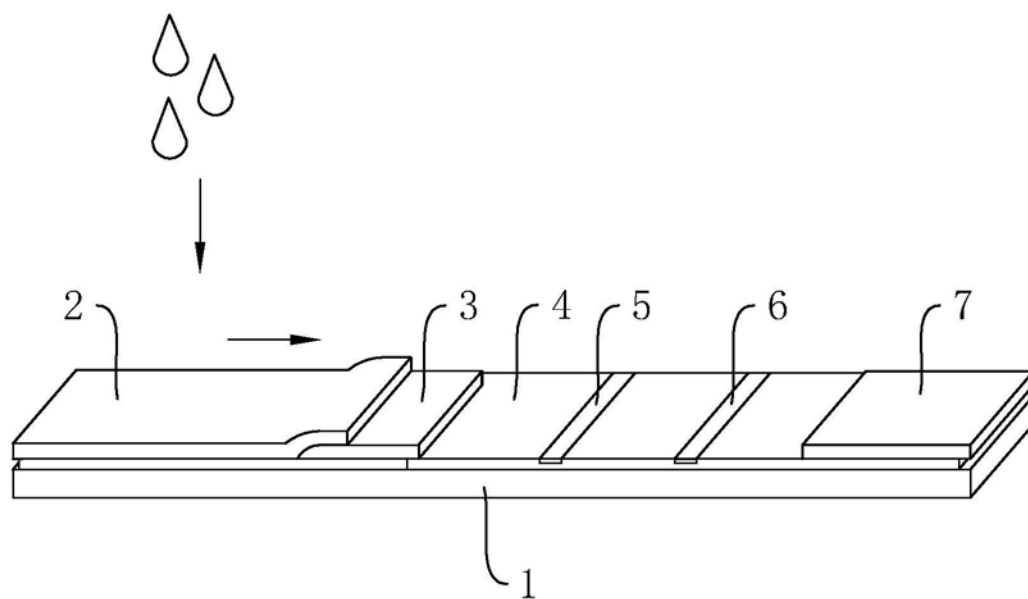


图1

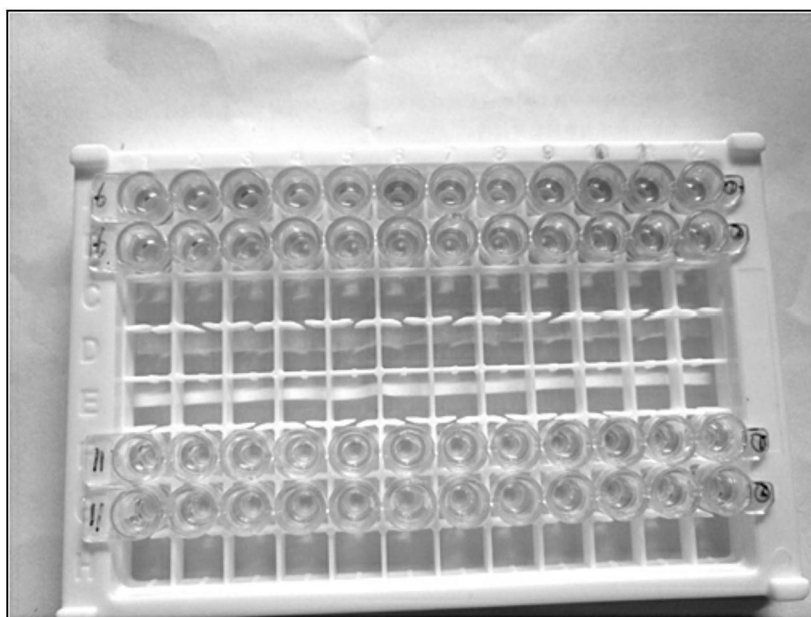


图2

专利名称(译)	基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110596384A	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN201910965480.8	申请日	2019-10-12
[标]发明人	刘光明 张树文 黄翔		
发明人	刘光明 张树文 黄翔 孙雯燕		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及微生物检测技术领域，特别涉及基于Cas蛋白及gRNA复合物制备的人乳头瘤病毒6型和11型免疫检测试剂盒，包括GNP1复合物和GNP2复合物；GNP1复合物由Cas蛋白与HPV-6型的gRNA1复合而成，gRNA1的基因序列由引物序列1和基因E1 replication protein MK313768.1 2399-2421构成；GNP2复合物由Cas蛋白与HPV-11型的gRNA2复合而成，gRNA2的基因序列由引物序列2和基因E2 regulatory protein MK313768.1 3414-3436构成。本发明的免疫检测试剂盒具有较高的敏感性、特异性和准确性。

