



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106872423 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201611265827.0

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 锦州医科大学

地址 121001 辽宁省锦州市凌河区松坡路
三段40号

(72)发明人 王冠男 梅晰凡 金丽 陈书睿
高巍

(74)专利代理机构 北京太兆天元知识产权代理
有限责任公司 11108

代理人 张洪年

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及采用荧光免疫层析试纸检测唾液中人幽门螺旋杆菌的方法及该试纸的制备方法。该方法通过制备量子点;制备人幽门螺旋杆菌cagA抗体量子点偶联标记物;组装荧光免疫层析试纸完成。该方法制备得到的试纸具有检测人幽门螺旋杆菌高特异性,高灵敏度,快速,方便的特点。

1. 一种检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法包括如下步骤:

- (1) 制备量子点;
- (2) 制备人幽门螺旋杆菌cagA抗体量子点偶联标记物;
- (3) 组装荧光免疫层析试纸。

2. 如权利要求1所述的一种检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法包括如下步骤:

(1) 在剧烈搅拌下,将甲基镉 $[(CH_3)_2Cd]$ 和TOPSe(三辛基磷硒)迅速注射到300–400℃的三辛基氧磷(TOP0)中;然后迅速降温至200–280℃,而后缓慢升温到380–320℃;加入过量甲醇,通过离心分离得到CdSe纳米颗粒;以硬脂酸锌,六甲基二硅硫烷 $[(TMS)_2S]Zn$ 作为前体,加入CdSe纳米颗粒,在TOP0中合成CdSe/ZnS量子点;

(2) 将聚(叔丁基丙烯酸酯-乙基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)三嵌段共聚物与辛胺混合溶解在二甲亚砜中,加入碳化二亚胺反应后纯化,得到高分子溶液;将制备得到的CdSe/ZnS量子点和高分子溶液共同充分溶解在氯仿中,在超声过程中加入到乳化剂Lipoid E-80和蒸馏水中,并继续超声,然后再室温下对获得的乳液进行磁力搅拌,直到氯仿完全挥发,即得到水溶性量子点;

(3) 将适量PBS缓冲液和水溶性量子点加入反应器中搅拌均匀后,加入人幽门螺旋杆菌cagA抗体,继续搅拌至混合均匀;加入碳二亚胺(EDC)溶液,室温反应2–4h,然后在35–40℃条件下,180r/min振动反应2–5h,后置于4℃冰箱中过夜,用20000r/min超速离心,去上清液,将沉淀用BSA溶液重悬,得到人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物;

(4) 免疫层析试纸由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸和底板构成;样品垫和结合垫采用BSA溶液浸泡后洗涤干燥;将人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物加入结合垫中,干燥;层析膜检测带和质控带为羊抗鼠Ig G划线;将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于底板上,切成4mm的试纸条,置于4℃冰箱中储存,即得。

3. 如权利要求1所述的一种检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法包括如下步骤:

(1) 将10mg甲基镉 $[(CH_3)_2Cd]$ 和10mg TOPSe(三辛基磷硒)迅速注射到剧烈搅拌的350℃的三辛基氧磷(TOP0)中;然后迅速降温至250℃,而后缓慢升温到280℃;加入过量甲醇,通过离心分离得到CdSe纳米颗粒;在TOP0中加入8mg硬脂酸锌,12mg六甲基二硅硫烷 $[(TMS)_2S]Zn$ 和CdSe纳米颗粒,加入微波炉高温加热,待溶液自然冷却后,用中速滤纸过滤去除不溶性黑色沉淀,离心除去大颗粒,收集上清液注入透析袋内进行透析;将透析后的产物进行真空旋转蒸发至固体状,获得CdSe/ZnS量子点;

(2) 将10mL聚(叔丁基丙烯酸酯-乙基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)三嵌段共聚物与10mL辛胺混合溶解在二甲亚砜中,加入碳化二亚胺反应6h后纯化,得到高分子溶液;将制备得到的CdSe/ZnS量子点和高分子溶液共同充分溶解在氯仿中,在超声过程中加入到乳化剂Lipoid E-80和蒸馏水中,并继续超声,然后再室温下对获得的乳液进行磁力搅拌,直到氯仿完全挥发,即得到水溶性量子点;

(3) 将5mL PBS缓冲液和10 μ g水溶性量子点加入反应器中,搅拌,加入10 μ L人幽门螺旋杆菌cagA抗体,继续搅拌至混合均匀;缓慢搅拌5min后,加入1.2mL碳二亚胺(EDC)溶液,继续室温反应2h,反应结束后,在37℃条件下,150r/min振动反应2h,后置于冰箱中4℃过夜,

用40000r/min超速离心,去上清液,将沉淀用BSA溶液重悬,相同条件下离心两次,重悬得到人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物;

(4) 免疫层析试纸由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸和底板构成;样品垫和结合垫采用BSA溶液浸泡后洗涤干燥,以减少实际检测时的蛋白吸附;将人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物加入结合垫中,干燥;层析膜检测带和质控带为羊抗鼠Ig G划线。将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于底板上,切成4mm的试纸条,置于4℃冰箱中储存,即得检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸。

检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种唾液中人幽门螺旋杆菌的方法,具体涉及采用荧光免疫层析试纸检测唾液中人幽门螺旋杆菌的方法及该试纸的制备方法。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是上世纪八十年代发展起来的一种快速免疫分析技术。免疫层析技术的基本原理是,被检测的样品通过毛细作用,在条状纤维(如硝酸纤维素膜、玻璃纤维等)制成的膜上移动,其中的待测物与膜上一定区域的配体(一般为抗原、抗体、核酸等物质)结合,然后通过酶促显色反应或直接使用着色标记物,短时间内便可得到直观的结果。以原理来划分,免疫层析可以分为两类,一种是以酶促反应显色为基础,根据显色亮度来定量;另外一种是通过着色标记物(如量子点、胶体金等)标记,纤维膜上的显色深浅表征了其上所偶联的配体含量。

[0003] 抗原和对应抗体在一定条件下特异结合形成可逆性的抗原-抗体复合物的过程被称为抗原-抗体生物学反应,亦称免疫反应。抗体都是蛋白质,抗原多数也是蛋白质,也有一些抗原是多糖、类脂和核酸等物质。抗原和抗体反应具有高度的特异性,该反应是分子表面的结合,反应产物相当比较稳定,但因抗体和抗原本身并未受到破坏,它们依旧可以分离。抗原抗体反应主要可以分为两个阶段。首先是抗原和抗体的特异性结合阶段,该阶段使亲水系统变更为疏水系统,反应一般较快,一般耗时数秒钟到数分钟,无可见反应。第二阶段为免疫反应的可见阶段,一般会出现沉淀和凝集等宏观现象,该反应时间一般为几分钟到几十分钟,易受电解质、温度和酸碱度等外界因素的影响。

[0004] 荧光免疫层析技术是将免疫荧光技术和传统免疫层析技术相结合的一种新型检测技术。该技术在保留免疫层析技术的操作简便、检测快速和便携性强的优点外,还可以实现检测结果的定量化。因为检测方便、精确度较高,荧光免疫层析技术即时检验(POCT)技术领域的发展趋势。荧光免疫技术是指将不影响抗体抗原活性的荧光材料标记在抗原或者抗体上,制成荧光探针,在与其相对应的抗体或者抗原反应后,形成含有标记荧光染料抗原抗体复合物,然后利用外界光诱导,测定复合物中的荧光强度,进而推算出被测物质的浓度。

[0005] 量子点又称为荧光半导体纳米颗粒,量子点受激发光照射后可以发射荧光,且可以与生物大分子结合,具有极强的生物相容性。与传统的荧光染料相比,量子点有可调谐的发射波长,可以通过调整其粒径来获得具备不同发射光谱的量子点。同时,量子点具有较大的斯托克斯位移和对称型的荧光光谱,可以有效减弱激发光对发射光的影响,进而降低系统复杂度。

[0006] 幽门螺旋杆菌感染与慢性萎缩性胃炎、十二指肠溃疡、胃腺癌和胃黏膜相关性淋巴瘤组织淋巴瘤的发生有关,世界卫生组织已经将其定为胃癌的一类致癌原。目前诊断幽门螺旋杆菌感染的方法很多,分为侵入性及非侵入性两大类。我们结合量子点的优良荧光性质和抗原抗体反应的特异性,应用双抗体夹心量子点免疫层析法检测唾液中人幽门螺旋杆

菌的方法及该试纸的制备方法,旨在寻求敏感度及特异度高、快速简便的唾液中幽门螺旋杆菌检测方法,进而促进幽门螺旋杆菌感染的早期诊断及治疗。

发明内容

[0007] 我们提供了一种检测唾液中幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸及其制备方法,步骤如下:

[0008] 一种检测唾液中幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法包括如下步骤:

[0009] (1) 制备量子点;

[0010] (2) 制备人幽门螺旋杆菌cagA抗体量子点偶联标记物;

[0011] (3) 组装荧光免疫层析试纸。

[0012] 进一步的,一种检测唾液中幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法包括如下步骤:

[0013] (1) 在剧烈搅拌下,将甲基镉 $[(CH_3)_2Cd]$ 和TOPSe(三辛基磷硒)迅速注射到300-400℃的三辛基氧磷(TOP0)中;然后迅速降温至200-280℃,而后缓慢升温到380-320℃;加入过量甲醇,通过离心分离得到CdSe纳米颗粒;以硬脂酸锌,六甲基二硅硫烷 $[(TMS)_2S]Zn$ 作为前体,加入CdSe纳米颗粒,在TOP0中合成CdSe/ZnS量子点;

[0014] (2) 将聚(叔丁基丙烯酸酯-乙基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)三嵌段共聚物与辛胺混合溶解在二甲亚砜中,加入碳化二亚胺反应后纯化,得到高分子溶液;将制备得到的CdSe/ZnS量子点和高分子溶液共同充分溶解在氯仿中,在超声过程中加入到乳化剂Lipoid E-80和蒸馏水中,并继续超声,然后再室温下对获得的乳液进行磁力搅拌,直到氯仿完全挥发,即得到水溶性量子点;

[0015] (3) 将适量PBS缓冲液和水溶性量子点加入反应器中搅拌均匀后,加入人幽门螺旋杆菌cagA抗体,继续搅拌至混合均匀;加入碳二亚胺(EDC)溶液,室温反应2-4h,然后在35-40℃条件下,180r/min振动反应2-5h,后置于4℃冰箱中过夜,用20000r/min超速离心,去上清液,将沉淀用BSA溶液重悬,得到人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物;

[0016] (4) 免疫层析试纸由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸和底板构成;样品垫和结合垫采用BSA溶液浸泡后洗涤干燥;将人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物加入结合垫中,干燥;层析膜检测带和质控带为羊抗鼠Ig G划线;将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于底板上,切成4mm的试纸条,置于4℃冰箱中储存,即得。

[0017] 进一步的,一种检测唾液中幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法包括如下步骤:

[0018] (1) 将10mg甲基镉 $[(CH_3)_2Cd]$ 和10mg TOPSe(三辛基磷硒)迅速注射到剧烈搅拌的350℃的三辛基氧磷(TOP0)中;然后迅速降温至250℃,而后缓慢升温到280℃;加入过量甲醇,通过离心分离得到CdSe纳米颗粒;在TOP0中加入8mg硬脂酸锌,12mg六甲基二硅硫烷 $[(TMS)_2S]Zn$ 和CdSe纳米颗粒,加入微波炉高温加热,待溶液自然冷却后,用中速滤纸过滤去除不溶性黑色沉淀,离心除去大颗粒,收集上清液注入透析袋内进行透析;将透析后的产物进行真空旋转蒸发至固体状,获得CdSe/ZnS量子点;

[0019] (2) 将10mL聚(叔丁基丙烯酸酯-乙基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)三嵌段共聚物与10mL

辛酸混合溶解在二甲亚砜中,加入碳化二亚胺反应6h后纯化,得到高分子溶液;将制备得到的CdSe/ZnS量子点和高分子溶液共同充分溶解在氯仿中,在超声过程中加入到乳化剂Lipoid E-80和蒸馏水中,并继续超声,然后再室温下对获得的乳液进行磁力搅拌,直到氯仿完全挥发,即得到水溶性量子点;

[0020] (3) 将5mL PBS缓冲液和10 μ g水溶性量子点加入反应器中,搅拌,加入10 μ L人幽门螺旋杆菌cagA抗体,继续搅拌至混合均匀;缓慢搅拌5min后,加入1.2mL碳二亚胺(EDC)溶液,继续室温反应2h,反应结束后,在37 $^{\circ}$ C条件下,150r/min振动反应2h,后置于冰箱中4 $^{\circ}$ C过夜,用40000r/min超速离心,去上清液,将沉淀用BSA溶液重悬,相同条件下离心两次,重悬得到人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物;

[0021] (4) 免疫层析试纸由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸和底板构成;样品垫和结合垫采用BSA溶液浸泡后洗涤干燥,以减少实际检测时的蛋白吸附;将人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物加入结合垫中,干燥;层析膜检测带和质控带为羊抗鼠Ig G划线。将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于底板上,切成4mm的试纸条,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中储存,即得检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸。

[0022] 相比于现有技术,本发明优势在于:

[0023] 1、选择了采用乳化法将疏水化改性后的高分子材料直接包裹脂溶性量子点,这样的改造不仅保持了原量子点的特性,还能够在保证产品稳定性的同时提供了良好的水溶性,保证与蛋白分子的偶联。并且荧光量子产率大幅提高,因而增强了量子点的发光强度,提高了检测灵敏度。

[0024] 2、采用氨基和羧基共价结合的标记技术,利用交联剂使得活化量子点上的羧基活化进而得以与蛋白质上的氨基进行缩合反应。相比另外一种常用的偶联方法“静电吸附”耗时更短。

[0025] 3、应用双抗体夹心量子点免疫层析法检测唾液中人幽门螺旋杆菌抗原,其原理是,首先将适量的待测液被滴加在样品垫上,然后待测液在渗透和虹吸的作用下,迁移到结合垫上,液体迅速浸透结合垫。结合垫上固定有量子点抗体的复合物,即人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物,其被待测液迅速溶解,将随着待测液一起,沿着硝化纤维膜向前运动。在这个过程中,如果待测液中存在幽门螺旋杆菌cagA抗原,就会与被溶解的幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物发生特异性免疫反应,它们形成的复合物以及过量未与抗原发生反应的量子点偶联物继续在硝化纤维膜毛细管力的作用下沿着膜向前运动。当运动到试纸条带上的检测线时,检测线上的人幽门螺旋杆菌抗体会将标记量子点的人幽门螺旋杆菌捕获,形成检测带,未标记人幽门螺旋杆菌的量子点抗体偶联物继续移动至质控线被Ig G捕获形成质控线。

具体实施方式

[0026] 实施例1一种检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸,其制备方法为:

[0027] (1) 将10mg甲基镉[(CH₃)₂Cd]和10mg TOPSe(三辛基磷硒)迅速注射到剧烈搅拌的350 $^{\circ}$ C的三辛基氧膦(TOP)中;然后迅速降温至250 $^{\circ}$ C,而后缓慢升温到280 $^{\circ}$ C;加入过量甲醇,通过离心分离得到CdSe纳米颗粒;在TOP中加入8mg硬脂酸锌,12mg六甲基二硅硫烷[(TMS)₂S]Zn和CdSe纳米颗粒,加入微波炉高温加热,待溶液自然冷却后,用中速滤纸过滤

去除不溶性黑色沉淀,离心除去大颗粒,收集上清液注入透析袋内进行透析;将透析后的产物进行真空旋转蒸发至固体状,获得CdSe/ZnS量子点;

[0028] (2) 将10mL聚(叔丁基丙烯酸酯-乙基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)三嵌段共聚物与10mL辛胺混合溶解在二甲亚砜中,加入碳化二亚胺反应6h后纯化,得到高分子溶液;将制备得到的CdSe/ZnS量子点和高分子溶液共同充分溶解在氯仿中,在超声过程中加入到乳化剂Lipoid E-80和蒸馏水中,并继续超声,然后再室温下对获得的乳液进行磁力搅拌,直到氯仿完全挥发,即得到水溶性量子点;

[0029] (3) 将5mL PBS缓冲液和10 μ g水溶性量子点加入反应器中,搅拌,加入10 μ L人幽门螺旋杆菌cagA抗体,继续搅拌至混合均匀;缓慢搅拌5min后,加入1.2mL碳二亚胺(EDC)溶液,继续室温反应2h,反应结束后,在37 $^{\circ}$ C条件下,150r/min振动反应2h,后置于冰箱中4 $^{\circ}$ C过夜,用40000r/min超速离心,去上清液,将沉淀用BSA溶液重悬,相同条件下离心两次,重悬得到人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物;

[0030] (4) 免疫层析试纸由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸和底板构成;样品垫和结合垫采用BSA溶液浸泡后洗涤干燥,以减少实际检测时的蛋白吸附;将人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物加入结合垫中,干燥;层析膜检测带和质控带为羊抗鼠Ig G划线。将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于底板上,切成4mm的试纸条,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中储存,即得检测唾液中人幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸。

[0031] 实施例2量子点偶联测定

[0032] 采用酶联免疫分析法测定:在固化有幽门螺旋杆菌抗原的微孔板利用偶联混合物与该抗原反应,如果量子点与抗体有效偶联,则经过偶联的抗体就会与固化在微孔板上的经过量子点标记的抗原反应,在洗板后未与微孔板上抗原反应的量子点抗体偶联物就会被洗脱。将实施例1步骤(3)制备的人幽门螺旋杆菌量子点荧光偶联物经过上述步骤,在酶标仪下观察,结果观测到了荧光现象。因此,表明本发明制备的量子点和抗体之间是发生了有效偶联的。

[0033] 实施例3灵敏度评价

[0034] 将唾液中人幽门螺旋杆菌样品进行按照10倍梯度稀释,通过倾注平板法测得其浓度分别约为1 $\times 10^{-1}$, 1 $\times 10$, 1 $\times 10^2$ CFU/mL。分别取100 μ L不同浓度的菌悬液用本发明制备的量子点荧光免疫层析试纸条检测,结果如表1显示。

[0035] 表1量子点荧光免疫层析试纸适用性测试

[0036]

样品浓度CFU/mL	本发明试纸	胶体金试纸
1 $\times 10^{-1}$	+	-
1 $\times 10$	+	+
1 $\times 10^2$	+	+

[0037] 可见,本发明制备的量子点荧光免疫层析试纸灵敏度高于市售的胶体金试纸。本发明制备得到的试纸具有检测人幽门螺旋杆菌高特异性,高灵敏度,快速,方便的特点。

专利名称(译)	检测唾液中幽门螺旋杆菌的荧光免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN106872423A	公开(公告)日	2017-06-20
申请号	CN201611265827.0	申请日	2016-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	锦州医科大学		
申请(专利权)人(译)	锦州医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	锦州医科大学		
[标]发明人	王冠男 梅晰凡 金丽 陈书睿 高巍		
发明人	王冠男 梅晰凡 金丽 陈书睿 高巍		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及采用荧光免疫层析试纸检测唾液中幽门螺旋杆菌的方法及该试纸的制备方法。该方法通过制备量子点；制备幽门螺旋杆菌cagA抗体量子点偶联标记物；组装荧光免疫层析试纸完成。该方法制备得到的试纸具有检测幽门螺旋杆菌高特异性，高灵敏度，快速，方便的特点。

↓ 品文儿无及后作以取承世獨，相本相依1並/小。

[0035] 表1量子点荧光免疫层析试纸适用性测试

[0036]

样品浓度CFU/mL	本发明试纸	胶体金试纸
1×10^{-1}	+	-
1×10^0	+	+
1×10^2	+	+

[0037] 可见，本发明制备的量子点荧光免疫层析试纸灵敏度高于市售的胶体金试纸。本发明制备得到的试纸具有检测幽门螺旋杆菌高特异性，高灵敏度，快速，方便的特点。