



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105203769 B

(45)授权公告日 2017.02.15

(21)申请号 201410406411.0

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2014.08.18

审查员 舒霏霏

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105203769 A

(43)申请公布日 2015.12.30

(73)专利权人 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 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书3页 说明书13页
序列表1页

(54)发明名称

基于磁性分离和量子点标记的人肺炎衣原体快速检测方法和试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的方法,该方法包括(1)制备抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠;(2)制备量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针;(3)将待检样品用样品处理液溶解后,向溶解液中加入抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠,充分混合及反应后进行磁分离,以PBST缓冲液洗涤,向得到的沉淀物中加入量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针,反应后磁分离,以PBST缓冲液洗涤后,使用荧光酶标仪检测荧光值。本发明建立了一套准确、快速、高灵敏度的检测人肺炎衣原体的方法,其在人肺炎衣原体的临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

1. 一种用于制备基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒的方法,其特征在於:所述制备方法包括以下步骤:

1) 抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠的制备:

1.1) 兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

1.1.1) 重组M98-His融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1.1) 对人肺炎衣原体98KD膜蛋白进行生物信息学分析,获取其胞外保守结构域中抗原表位最为丰富的肽段;

1.1.1.2) 找到步骤1.1.1.1) 中所得肽段对应的基因编码序列,在上述基因序列的5'端及3'端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记记为m98;

1.1.1.3) 将步骤1.1.1.2) 中所得到的m98按分子生物学方法克隆入表达载体pET-28a(+)后转入大肠杆菌中表达重组M98-His融合蛋白;所述重组M98-His融合蛋白以包涵体表达方式存在于菌体中;

1.1.1.4) 用镍柱纯化步骤1.1.1.3) 所得到的重组蛋白,SDS-PAGE检测其纯度后,以Bradford法测定蛋白质浓度,调整蛋白浓度为0.2mg/mL后备用;

1.1.2) 兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备:

1.1.2.1) 以步骤1.1.1.4) 中所得到的重组M98-His融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清;所述兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清的间接ELISA效价均大于 1×10^5 ;

1.1.2.2) 采用Protein G亲和层析柱分别纯化兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清中的多克隆抗体IgG;

1.1.2.3) 用凯基Bradford蛋白含量检测试剂盒测定步骤1.1.2.2) 所得到的两种多克隆抗体IgG的浓度,将其蛋白浓度均调整为1mg/mL后备用;

1.2) 免疫纳米磁珠的包被:

1.2.1) 取5mg磁珠,用1mI MES缓冲液洗涤三次,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清;所述磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为350nm的羧基磁珠;所述MES缓冲液是质量浓度是2g/L的2-(N-吗啉代)乙磺酸;所述MES缓冲液的pH=6.0;所述纳米磁分离器的磁性强度是0.4T;

1.2.2) 依次加入用步骤1.2.1) 中的MES缓冲液配制的浓度是8-12mg/mI的EDC溶液以及用步骤1.2.1) 中的MES缓冲液配制的浓度是6-12mg/mI的sulfo-NHS溶液各0.5mI,以10-40rpm于旋转混合仪中活化1hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用1mI步骤1.2.1) 中的MES缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

1.2.3) 取5个离心管,在每个离心管中加入200 μ L步骤1.2.2) 所得到的活化后的磁珠,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,向各离心管中加入用PBS缓冲液稀释的浓度为50-200 μ g/mI的由步骤1.1) 所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG溶液各1mI,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应2-6h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入1mI含1mg/mI乙醇胺的上述PBS缓冲液,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应2h以封闭磁珠上未与抗体反应的羧基;所述PBS缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 所述PBS缓冲液的pH=7.4;

1.2.4) 封闭反应完成后,将该5个离心管置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,各用1mI洗涤缓冲液洗涤三遍;所述洗涤缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.5mI/L Tween-20,所述洗涤缓冲液的pH=7.4;

1.2.5) 向各个离心管中分别加入1mI保存缓冲液重悬磁珠,置于4℃保存备用;所述保存缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,5g/L牛血清白蛋白,所述保存缓冲液的pH=7.4;

2) 量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的制备:

其具体制备方法包括:

2.1) 向微量离心管中依次加入2nmI羧基水溶性量子点、300nmI N-羟基琥珀酰亚胺suIf_o-NHS以及300nmI碳二亚胺EDC,以磷酸盐缓冲液定容为2mI,混合溶液,37℃反应30min后,透析去除过量的作为活化剂的suIf_o-NHS及EDC,得到活化后的量子点;所述磷酸盐缓冲液中各成分含量如下:2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,4g/L氯化钠;所述磷酸盐缓冲液的pH=7.4;

2.2) 在步骤2.1) 所得到的活化的量子点中,加入4-12nmI的步骤1.1) 中所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h,加入单端氨基化聚乙二醇PEG2000-NH₂至终浓度为1%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h;

2.3) 用0.2μm PES滤器过滤除去步骤2.2) 中的抗体聚集物,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;

2.4) 收集步骤2.3) 中超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于2mI磷酸盐洗涤液中,再将此溶液转移到一个新的50000MW超滤离心管中,以8000g离心力在4℃下离心15min,收集超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于1mI磷酸盐保存液中,置于4℃保存备用;所述磷酸盐洗涤液中各成分含量如下:2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,4g/L氯化钠,5mI/L吐温-20,0.3g/L叠氮钠,所述磷酸盐洗涤液的pH=7.4;所述磷酸盐保存液中各成分含量如下:2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,2g/L氯化钠,10g/L牛血清白蛋白,0.3g/L叠氮钠;所述磷酸盐保存液的pH=7.4;

3) PBST缓冲液的配制:

其具体配制方法包括:

取8g NaCl,0.2g KCl,0.24 KH_2PO_4 ,1.44g Na_2HPO_4 ,0.3g NaN_3 ,0.5mI Tween-20溶解于800mI蒸馏水中,用5M NaOH调整pH至7.4,再定容至1000mI;

4) 样品处理液的配制:

取8g NaCl,0.2g KCl,0.24 KH_2PO_4 ,1.44g Na_2HPO_4 ,0.3g NaN_3 ,10mI Nonidet P-40,1mI SDS,用5M NaOH调整pH至7.4,再定容至1000mI;

5) 质控品的制备:

5.1) 阳性质控品:阳性质控品由灭活的人肺炎衣原体干燥结合到拭子上而成;

5.2) 阴性质控品:阴性质控品即经临床确定为人肺炎衣原体阴性的人群的咽拭子。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤1.2.2) 中,依次加入用步骤1.2.1) 中的MES缓冲液配制的浓度是10mg/mI的EDC溶液以及用步骤1.2.1) 中的MES缓冲液配制的浓度是10mg/mI的suIf_o-NHS溶液各0.5mI,以15rpm于旋转混合仪中活化1hr,置于纳

米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用1mI步骤1.2.1)中的MES缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

所述步骤1.2.3)中,向各离心管中加入用PBS缓冲液稀释的浓度为100 μ g/mI的由步骤1.1)所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG溶液各1mI,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应3h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入1mI含1mg/mI乙醇胺的上述PBS缓冲液;

所述步骤2.2)中,在步骤2.1)所得到的活化的量子点中,加入6nmol的步骤1.1)中所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,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。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述磁珠是以超顺磁性Fe₃O₄为内核、壳材料为聚苯乙烯、表面官能团为羧基、粒径为350nm的羧基磁珠。

基于磁性分离和量子点标记的人肺炎衣原体快速检测方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,具体为一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*,Cpn)抗原的快速检测方法及检测试剂盒,以及该检测试剂盒的制备及使用方法。

背景技术

[0002] 肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*,Cpn)作为衣原体属的一种重要的呼吸道病原微生物,自从上个世纪80年代中期由Grayston等人正式命名,在随后的时间里被研究者们广泛研究。现仅知人是该病原体的宿主,感染方式可能为人与人之间通过呼吸道分泌物传播。5岁以下儿童极少受染,8岁以上儿童及青年易被感染,尤其是人群聚集处,如家庭、学校、军营中易流行,经血清流行病学调查,证实成人中至少有40%已受到该衣原体感染,大部分为亚临床型。肺炎衣原体是专性细胞内寄生的微生物,寄居于人呼吸道和咽喉等处,在儿童和成人中产生上呼吸道和呼吸道感染,常引起肺炎和支气管炎等呼吸道疾病。目前研究表明,其还与动脉粥样硬化综合症、老年痴呆症、心肌炎、哮喘等疾病有关。临床上由于其与其他呼吸道病原体引起的感染症状类似,因此常难以根据临床表现、x-射线检查等得出结论,确诊往往依赖于实验室诊断。快速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。

[0003] 尽管肺炎衣原体在全球范围内传播,但可用于实验室诊断的标准化商品试剂的种类极少。目前,肺炎衣原体感染的诊断方法有血清学检测法,核酸检测法和病原体直接检测法。检测血清中肺炎衣原体IgG、IgA、IgM抗体常用的有5种方法:微量免疫荧光抗体检测(MIF),补体结合试验(CF),重组酶免疫测定(rEIA),血清补体结合一酶免疫测定试验(SeroCF—EIA),OY酶免疫试剂盒(LoY—EIA)。这5种方法要求肺炎衣原体不同成分做为抗原,而且肺炎衣原体抗体的检出只能说明该个体感染过肺炎衣原体,却不能反映体内是否仍有肺炎衣原体活菌存在,并且血清学特异性抗体检测常需要根据IgM抗体的动态结果进行判断,需要较长的时间。同时,这些技术均存在灵敏度低、操作步骤复杂、需要专业人员操作、重复性差、检测时间长、检测特异性差、成本较高等缺陷,因而难以满足临床的实际需要。

[0004] 核酸检测包括核酸杂交和聚合酶链式反应(PCR),核酸杂交检测肺炎衣原体的特异性强,但敏感性不高,主要用于PCR结果的检测、判定,尚未直接用于临床标本的检测;PCR具有较高的敏感性,应用肺炎衣原体外膜蛋白基因片段的一对特异性引物对临床咽拭子进行PCR测定,其结果与血清学检测具有较好的一致性。但PCR实验对实验室有特殊要求,标本处理、扩增和检测要求严格,且易出现假阳性,在我国还不能作为常用的临床诊断方法。

[0005] 抗原检测方法有鸡胚卵黄囊分离培养和细胞培养法(常用HL和Hep-2两种细胞),然后采用荧光标记或酶标记抗体检测标本中的衣原体,但该方法存在操作步骤复杂,细胞培养时间长等明显缺陷,并不适合临床应用。近年也尝试直接应用于临床标本的检验,其敏感

性与标本采集有关:痰液和咽拭子涂片后用EIA可检测肺炎衣原体抗原的存在,其敏感性、特异性和可重复性不理想,且仅限于急性呼吸道感染;酶联免疫吸附试验(ELISA)也可以直接检出病原体,主要检测肺炎衣原体外膜蛋白-2,所用抗体为抗衣原体属特异性抗体,不能直接识别肺炎衣原体,与“金标准”(MIF)相比,虽然很灵敏,特异性却不高。

[0006] 因此,目前建立具有高灵敏度、高特异性的人肺炎衣原体抗原快速检测法以满足临床的检测需求就显得非常必要了。

发明内容

[0007] 针对背景技术中存在的这些技术问题,本发明提供了一种基于磁性分离和量子点标记的能简便、快速、高灵敏度的检测人肺炎衣原体抗原的检测方法和试剂盒,以及该试剂盒的制备及使用方法。

[0008] 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0009] 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

[0010] 1) 兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体的制备;

[0011] 2) 鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体的制备;

[0012] 3) 将步骤1) 制备得到的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体与纳米磁珠通过共价偶联,制备抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠;

[0013] 4) 将步骤2) 制备得到的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体与纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针;

[0014] 5) 取人呼吸道分泌物样本(包括但不限于咽拭子),用样品处理液溶解后,加入步骤3) 制备得到的抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠,充分混合,反应10-45min后进行磁分离,以PBST缓冲液2遍后,向磁分离得到的沉淀物中加入步骤4) 制备得到的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针,反应10-45min后进行磁分离,以PBST缓冲液洗涤2遍后,使用荧光酶标仪读取荧光值;所述样品处理液中各组分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,10ml/L Nonidet P-40,1ml/L SDS;所述样品处理液pH=7.4;所述PBST缓冲液中各组分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.3g/L NaN_3 ,0.5ml/L Tween-20;所述PBST缓冲液pH=7.4;

[0015] 6) 根据步骤1)-步骤5) 的方法分别检测四份经临床确定为人肺炎衣原体阴性的人群的呼吸道分泌物样品,读取荧光值;所述人肺炎衣原体阴性的人群的呼吸道分泌物样品简称人肺炎衣原体阴性对样品;所述四份人肺炎衣原体阴性对照样品的荧光值的平均值与3倍标准差之和即为CUT-OFF值;若步骤5) 中人呼吸道分泌物样本的检测荧光值大于CUT-OFF值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人肺炎衣原体抗原为阳性;若步骤5) 中人呼吸道分泌物样本的检测荧光值小于CUT-OFF值,则判断为人呼吸道分泌物样本中人肺炎衣原体抗原为阴性。

[0016] 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由具有富集人肺炎衣原体抗原功能的抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠、量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针、质控品、样品处理液以及PBST缓冲液所组成;所述质控品包括阳性质控品以及阴性质控品;所述阳性质控品由灭活的人肺炎衣原体干燥结合到拭

子上而成;所述阴性质控品是经临床确定为人肺炎衣原体阴性的人群的咽拭子。

[0017] 一种用于制备基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒的方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

[0018] 1) 抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠的制备:

[0019] 1.1) 兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0020] 1.1.1) 重组M98-His融合蛋白的制备、纯化:

[0021] 1.1.1.1) 对人肺炎衣原体98KD膜蛋白进行生物信息学分析,获取其胞外保守结构域中抗原表位最为丰富的肽段;

[0022] 1.1.1.2) 找到步骤1.1.1.1) 中所得肽段对应的基因编码序列,在上述基因序列的5' 端及3' 端引入酶切位点并化学合成全基因序列,同时标记记为m98;其基因序列参见序列表;

[0023] 1.1.1.3) 将步骤1.1.1.2) 中所得到的m98按分子生物学方法克隆入表达载体pET-28a (+) 后转入大肠杆菌中表达重组M98-His融合蛋白;所述重组M98-His融合蛋白以包涵体表达方式存在于菌体中;

[0024] 1.1.1.4) 用镍柱纯化步骤1.1.1.3) 所得到的重组蛋白,SDS-PAGE检测其纯度后,以Bradford法测定蛋白质浓度,调整蛋白浓度为0.2mg/mL后备用;

[0025] 1.1.2) 兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备:

[0026] 1.1.2.1) 以步骤1.1.1.4) 中所得到的重组M98-His融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清;所述兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清的间接ELISA效价均大于 1×10^5 ;

[0027] 1.1.2.2) 采用Protein G亲和层析柱分别纯化兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白抗血清中的多克隆抗体IgG;

[0028] 1.1.2.3) 用凯基Braford蛋白含量检测试剂盒测定步骤1.1.2.2) 所得到的二种多克隆抗体IgG的浓度,将其蛋白浓度均调整为1mg/mL后备用;

[0029] 1.2) 免疫纳米磁珠的包被:

[0030] 1.2.1) 取5mg磁珠,用1mI MES缓冲液洗涤三次,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清;所述磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为350nm的羧基磁珠;所述MES缓冲液是质量浓度是2g/L的2-(N-吗啉代) 乙磺酸;所述MES缓冲液的pH=6.0;所述纳米磁分离器的磁性强度是0.4T;

[0031] 1.2.2) 依次加入用步骤1.2.1) 中的MES缓冲液配制的浓度是8-12mg/mI的EDC溶液以及用步骤1.2.1) 中的MES缓冲液配制的浓度是6-12mg/mI的sulfo-NHS溶液各0.5mI,以10-40rpm于旋转混合仪中活化1hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用1mI步骤1.2.1) 中的MES缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

[0032] 1.2.3) 取5个离心管,在每个离心管中加入200 μ L步骤1.2.2) 所得到的活化后的磁珠,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,向各离心管中加入用PBS缓冲液稀释的浓度为50-200 μ g/mI的由步骤1.1) 所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG溶液各1mI,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应2-6h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入1mI含1mg/mI乙醇胺的上述PBS缓冲液,室温下以15rpm于旋转混合仪中反

应2h以封闭磁珠上未与抗体反应的羧基;所述PBS缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 所述PBS缓冲液的pH=7.4;

[0033] 1.2.4) 封闭反应完成后,将该5个离心管置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,各用1mI洗涤缓冲液洗涤三遍;所述洗涤缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.5mI/L Tween-20, 所述洗涤缓冲液的pH=7.4;

[0034] 1.2.5) 向各个离心管中分别加入1mI保存缓冲液重悬磁珠,置于4℃保存备用;所述保存缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.3g/L NaN_3 , 5g/L牛血清白蛋白(BSA), 所述保存缓冲液的pH=7.4;

[0035] 2) 量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的制备:

[0036] 其具体制备方法包括:

[0037] 2.1) 向微量离心管中依次加入2nmI羧基水溶性量子点、300nmI N-羟基琥珀酰亚胺suIf_o-NHS以及300nmI碳二亚胺EDC,以磷酸盐缓冲液定容为2mI,混合溶液,37℃反应30min后,透析去除过量的作为活化剂的suIf_o-NHS及EDC,得到活化后的量子点;所述磷酸盐缓冲液中各成分含量如下:2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,4g/L氯化钠;所述磷酸盐缓冲液的pH=7.4;

[0038] 2.2) 在步骤2.1)所得到的活化的量子点中,加入4-12nmI的步骤1.1)中所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h,加入单端氨基化聚乙二醇PEG2000-NH₂至终浓度为1%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h;

[0039] 2.3) 用0.2μm PES滤器过滤除去步骤2.2)中的抗体聚集物,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;

[0040] 2.4) 收集步骤2.3)中超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于2mI磷酸盐洗涤液中,再将此溶液转移到一个新的50000MW超滤离心管中,以8000g离心力在4℃下离心15min,收集超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于1mI磷酸盐保存液中,置于4℃保存备用;所述磷酸盐洗涤液中各成分含量如下:2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,4g/L氯化钠,5mI/L吐温-20,0.3g/L叠氮钠,所述磷酸盐洗涤液的pH=7.4;所述磷酸盐保存液中各成分含量如下:2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,2g/L氯化钠,10g/L牛血清白蛋白,0.3g/L叠氮钠;所述磷酸盐保存液的pH=7.4;

[0041] 3) PBST缓冲液的配制:

[0042] 其具体配制方法包括:

[0043] 取8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24 KH_2PO_4 , 1.44g Na_2HPO_4 , 0.3g NaN_3 , 0.5mI Tween-20溶解于800mI蒸馏水中,用5M NaOH调整pH至7.4,再定容至1000mI;

[0044] 4) 样品处理液的配制:

[0045] 取8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24 KH_2PO_4 , 1.44g Na_2HPO_4 , 0.3g NaN_3 , 10mI Nonidet P-40, 1mI SDS, 用5M NaOH调整pH至7.4,再定容至1000mI;

[0046] 5) 质控品的制备:

[0047] 5.1阳性质控品:阳性质控品由灭活的人肺炎衣原体干燥结合到拭子上而成;

[0048] 5.2阴性质控品:阴性质控品即经临床确定为人肺炎衣原体阴性的人群的咽拭子。

[0049] 作为优选,本发明在步骤1.2.2)中,依次加入用步骤1.2.1)中的MES缓冲液配制的

浓度是10mg/ml的EDC溶液以及用步骤1.2.1)中的MES缓冲液配制的浓度是10mg/ml的sulfo-NHS溶液各0.5ml,以15rpm于旋转混合仪中活化1hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用1ml步骤1.2.1)中的MES缓冲液重悬,得到活化后的磁珠;

[0050] 所述步骤1.2.3)中,向各离心管中加入用PBS缓冲液稀释的浓度为100 μ g/ml的由步骤1.1)所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG溶液各1ml,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应3h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入1ml含1mg/ml乙醇胺的上述PBS缓冲液;

[0051] 所述步骤2.2)中,在步骤2.1)所得到的活化的量子点中,加入6nmol的步骤1.1)中所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h。

[0052] 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。

[0053] 作为优选,本发明所采用的磁珠是以超顺磁性Fe₃O₄为内核、壳材料为聚苯乙烯、表面官能团为羧基、粒径为350nm的羧基磁珠。

[0054] 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒的使用方法,其特征在于:所述使用方法包括以下步骤:

[0055] 1)将待检样本用0.5ml样本处理液溶解后将溶解液转入1.5ml普通离心管中;所述样本处理液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,0.3g/L NaN₃,10ml/L Nonidet P-40,1ml/L SDS;所述样本处理液的pH=7.4;

[0056] 2)向步骤1)中的离心管中加入基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒中的抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠50-150 μ l,室温下以10rpm于旋转混合仪上反应10-45min后取下,将离心管插入纳米磁分离器磁分离3min,用移液器吸出上清;

[0057] 3)添加试剂盒中的PBST缓冲液1ml洗涤两遍,采用纳米磁分离器磁分离后吸出洗涤液,最后用1mlPBS缓冲液重悬磁珠,制得免疫纳米磁珠-衣原体抗原复合物;所述PBS缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄;所述PBS缓冲液的pH=7.4;

[0058] 4)取100 μ l步骤3)得到的免疫纳米磁珠-衣原体抗原复合物于另一离心管中,再加入100 μ l基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针,室温下以15rpm于旋转混合仪上反应10-45min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的衣原体抗原的免疫结合,量子点被标记到衣原体抗原表面,形成磁珠-衣原体抗原-量子点“三明治”复合物;

[0059] 5)反应完成后,采用纳米磁分离器磁分离3min,除去多余的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针,用试剂盒中的PBST缓冲液清洗2遍,复合物重新分散在100 μ l PBS缓冲液中,使用荧光酶标仪对其荧光值进行检测;所述PBS缓冲液中各成分含量如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄;所述PBS缓冲液的pH=7.4;

[0060] 6)按上述同样的方法检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样品及一份阳性质控品样品,分别读取荧光值;四份阴性质控品样品的荧光读数的平均值与3倍标准差之和即为CUT-OFF值;若步骤5)中待检样本的检测荧光值若大于CUT-OFF值即判断为待检样本中人肺炎衣原体抗原为阳性,反之则判断为待检样本中人肺炎衣原体抗原为阴性;若阳性质控品样品的荧光值小于CUT-OFF值,则表明试剂盒失效。

[0061] 作为优选,本发明所提出的步骤2)中,向步骤1)中的离心管中加入基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒中的抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠100 μ I,室温下以10rpm于旋转混合仪上反应15min后取下,将离心管插入磁力架分离3min,用移液器吸出上清;

[0062] 所述步骤4)中,取100 μ I步骤3)得到的免疫纳米磁珠-衣原体抗原复合物于另一离心管中,再加入100 μ I基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针,室温下以15rpm于旋转混合仪上反应15min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的衣原体抗原的免疫结合,量子点被标记到衣原体抗原表面,形成磁珠-衣原体抗原-量子点“三明治”复合物。

[0063] 作为优选,本发明所提供的待检样本包括但不限于咽拭子。

[0064] 本发明所需的羧基水溶性纳米量子点、350nm羧基磁珠,可到相关专业的研究单位、公司购买或定制;所需的仪器、设备、药品均有市售。

[0065] 本发明相比现有技术具有如下优点:

[0066] 1、本发明利用了免疫纳米磁珠对样品的可富集性、分离的速度快、效率高等优点,同时结合量子点光化学稳定性高、荧光强度高特性,使得检测体系具备多重信号协同放大的效果,从而具有超高的检测灵敏度(其对肺炎衣原体的检测底线为0.1ng/ml,低于目前任何一种已报道的检测方法,用其对临床样品的检测结果与目前对该病原体的检测“金标准”-MIF法的相比无统计学差异。

[0067] 2、本发明所用的抗体是识别人肺炎衣原体特异性98KD表面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。

[0068] 3、本发明检测方法简单,检测快速,易于判定,检测成本低廉,克服了现有技术检测阳性率低、成本高、操作复杂繁琐、耗时长、无法进行临床应用的不足。

[0069] 4、由于检测试剂盒检测的是肺炎衣原体抗原而非抗体(抗体的出现需要感染几周以后),故而可进行早期诊断和防治,临床诊断符合率高。该方法在肺炎衣原体的临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

[0070] 5、本发明首次以肺炎衣原体所独有的98KD表面膜蛋白作为目标抗原,其检测特异性高,不与其他任何衣原体起交叉反应。而传统ELISA法的检测标为Cpn外膜蛋白-2(OMP-2),所用抗体为抗衣原体属特异性抗体,不能直接识别Cpn,其存在与鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体等起交叉反应的缺点。

[0071] 6、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。

具体实施方式

[0072] 本发明是根据免疫学中的双抗夹心原理,利用免疫纳米磁珠对样品的可富集性、分离的速度快、效率高等优点,结合量子点光化学稳定性高、荧光强度高特性,建立的一套具备多重信号协同放大、具有超高灵敏度及高度特异性的快速检测肺炎衣原体的新方法,具有广阔的市场应用前景。

[0073] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0074] 各种试剂的配制及所需材料的说明

[0075] 1. PBS缓冲液:称取1.44g磷酸氢二钠,0.24g磷酸二氢钾,8g氯化钠,0.2g氯化钾,溶解于900mL的去离子水中,用1mol/L NaOH调pH至7.4后用去离子水定容至1000mL。

[0076] 2. 兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG:为本发明自制,用PBS缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为1mg/mL。

[0077] 3. 鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG:为本发明自制,用PBS缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为1mg/mL。

[0078] 4. 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,自武汉珈源量子点技术开发有限公司购买,产品名称为羧基水溶性量子点-565。

[0079] 5. 磁珠:本发明中所用磁珠是以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、壳材料为聚苯乙烯、表面官能团为羧基、粒径为分别为50nm、180nm、350nm、1150nm、3 μ m的羧基磁珠,可从陕西北美基因股份有限公司、上海奥润微纳新材料科技有限公司购买。

[0080] 6. 人肺炎衣原体:AR-39株,购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为ATCC 53592。

[0081] 7. 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)。

[0082] 实施例1兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0083] (一) 重组M98-His融合蛋白的制备、纯化

[0084] 1. 相关基因的克隆

[0085] 对人肺炎衣原体98KD膜蛋白(其NCBI蛋白质数据库中的accession number为CAA04672)进行生物信息学分析,获取其胞外保守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,同时在序列5' 引入酶切位点NdeI、3' 端引入终止信号TAA和酶切位点XhoI后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连于载体pUC57上),记为m98。其基因全序列如序列列表所示。具体的说,m98基因编码的蛋白质序列为天然人肺炎衣原体98KD膜蛋白(accession number:CAA04672)的130-305aa。将含有该段人工合成的DNA片段的载体pUC57用NdeI及XhoI进行双酶切后按常规方法回收目的片段,备用。同时采用NdeI及XhoI对载体pET-28a(+)进行双酶切,并按常规方法将经双酶切后获得的m98基因连入pET-28a(+)载体中,并转化大肠杆菌TOP10,构建pET-M98表达载体。经酶切和序列测定证实表达载体构建无误。该载体表达重组M98-His融合蛋白。

[0086] 2. 重组M98-His融合蛋白的表达与纯化

[0087] 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.coIi BL21(DE3)中,转化完成后将菌液涂布于含50 μ g/mL卡那霉素的LB平板上,按常规方法筛选表达菌株。挑取pET-M98转化的具有外源蛋白表达能力的单个菌落并接种入100mL LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C培养过夜。取出菌液后,按1:100接种于100mL含有50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀=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后于8000r/min下离心10min收集菌体。将此菌体用20mL磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄pH=7.4)洗涤3次并用10mL上样缓冲液(20mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;30mM咪唑,pH7.4)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分别收集沉淀和上清后进行电泳检测。发现重组M98-His融合蛋白以包涵体方式存在于菌体中。

[0088] 重组M98-His融合蛋白的纯化步骤如下:

[0089] 将上述沉淀组分用洗涤缓冲液(20mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;3M尿素,30mM咪唑,pH7.4)洗涤两次后,12000g离心15min收集沉淀。将沉淀用Binding buffer(20mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;8M尿素,30mM咪唑,pH7.4)于室温下溶解后,12000g离心15min,上清用0.45μm的滤膜进行过滤。溶解液中的重组蛋白用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:

[0090] 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。

[0091] 2)用10mL Binding buffer平衡,1mL/min流速。

[0092] 3)将融合蛋白上样,1mL/min流速。

[0093] 4)用10mL Binding buffer,以1mL/min流速洗柱。

[0094] 5)用10mL Elution buffer(20mM Na₃PO₄,0.5M 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。经bradford试剂盒进行蛋白质浓度测定后,调整浓度为0.2mg/mL。

[0095] (二)兔及鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0096] 1.兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0097] 用步骤(一)纯化的重组M98-His融合蛋白按照200μg(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M98-His融合蛋白按照200μg(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ELISA法测定抗体效价大于 1×10^5)。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Braford蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄pH=7.4)调整为1mg/mL,-20℃保藏备用,至此制得兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG。Westen blot试验表明,此多克隆抗体IgG能特异性识别人肺炎衣原体全长98KD膜蛋白。

[0098] 2.鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0099] 用步骤(一)纯化的重组M98-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200μg/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 1×10^5)。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Braford蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄pH=7.4)调整为1mg/mL,备用,至此制得鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG。Westen blot试验表明,此多克隆抗体IgG

能特异性识别人肺炎衣原体全长98KD膜蛋白。

[0100] 实施例2抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠的制备

[0101] 1. 抗人肺炎衣原体多克隆抗体偶联磁珠反应条件的优化:

[0102] 以偶联了抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体的磁珠作为固相载体,量子点标记的抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体作为检测抗体,通过双抗夹心法原理检测人肺炎衣原体抗原,观察磁珠与多抗的偶联情况。分别对磁珠的粒径,以及EDC/NHS活化剂浓度、偶联抗体浓度、偶联时间、封闭剂种类等偶联条件进行了一系列的优化选择。

[0103] 1.1磁珠粒径的选择

[0104] 选择粒径为50nm、180nm、350nm、1150nm、3 μ m的羧基磁珠,均加入含4mg/ml EDC及4mg/ml NHS的PBS缓冲液进行活化反应后,分别与实施例1所描述的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG进行偶联反应。分别将制备好的免疫纳米磁珠检测10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592),荧光显微镜下观察结果,选择荧光强度大,背景荧光干扰少,以及在磁场作用下分离速度较快者为最适磁珠粒径。结果表明粒径350nm的磁珠最符合本发明的要求,确定最适磁性微球粒径为350nm。

[0105] 1.2EDC/NHS活化剂浓度的选择

[0106] 将反应体系中EDC和NHS浓度各自设为1~10mg/ml后进行浓度梯度组合,分别活化粒径350nm的羧基磁珠。将制备好的免疫纳米磁珠检测10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592),选择荧光最强者为EDC和NHS溶液的最适活化浓度。结果表明当EDC浓度为5mg/ml、NHS浓度为5mg/ml时偶联效果最好。

[0107] 1.3偶联抗体浓度的选择

[0108] 将20 μ g、40 μ g、60 μ g、80 μ g、100 μ g、120 μ g、140 μ g的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG分别与1mg按上述最优方法活化的粒径为350nm的磁珠进行偶联。将制备好的免疫纳米磁珠检测10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592),结果发现,当抗体的投放量小于100 μ g/mg时,荧光强度随着抗体的浓度增加而增加,而当抗体的质量浓度大于100 μ g/mg时,荧光强度基本不变甚至略有减小,因此本实施例选择兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的偶联量为100 μ g/mg。

[0109] 1.4偶联时间的选择

[0110] 确定磁珠的粒径、EDC/NHS活化剂浓度及抗体偶联量后,将抗体与磁珠的偶联反应时间分别设为0.5h、1h、2h、3h、4h、5h,将制备好的免疫纳米磁珠检测10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592)。结果发现,当偶联时间>3h时,荧光强度趋于稳定,此后再延长偶联时间,荧光不再增强。因此,确定兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG与磁珠的最适偶联反应时间为3h。偶联时间远少于传统ELISA法的24h。

[0111] 1.5封闭剂的选择

[0112] 按照上述确定的最优条件选择磁珠的粒径、EDC/NHS活化剂浓度、抗体偶联量及偶联时间后进行偶联反应。偶联结束后,选择BSA,乙醇胺,Tris和D-氨基葡萄糖盐酸盐作为免疫纳米磁珠封闭剂,制得成品免疫纳米磁珠。将制备好的免疫纳米磁珠检测10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592)。结果发现,采用乙醇胺作为封闭剂的免疫纳米磁珠的检测荧光值最高。我们推测由于乙醇胺的分子较小,可以较好的消耗由于空间位阻未与抗体结合的表面羧基,使封闭更为完全,并且有效减少空间位阻效应对已连接抗体的结构影响。

[0113] 2. 偶联过程:

[0114] 取5mg磁珠(以超顺磁性Fe₃O₄为内核、粒径为350nm的羧基磁珠)于1.5mI普通离心管中,用1mI MES缓冲液(2g/L MES,pH6.0)洗涤三次,置于纳米磁分离器中进行磁分离(0.4T)后移除上清,依次加入用上述MES缓冲液配制的浓度为10mg/ml的EDC溶液及用上述MES缓冲液配制的浓度为10mg/ml的suIf_o-NHS溶液各0.5mI,以15rpm于旋转混合仪中活化1hr,磁分离后移除上清,用1mI上述的MES缓冲液重悬;取5个离心管,每个离心管中加入200μL上述活化的磁珠,磁分离后吸出上清,向各管中加入用PBS缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,pH7.4)稀释的浓度为100μg/ml的实施例1所制备的兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG溶液各1mI,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应3h,磁分离移除上清后,各加入1mI含1mg/ml乙醇胺的上述PBS缓冲液,室温下以15rpm于旋转混合仪中反应2h以封闭磁珠上未与抗体反应的羧基。磁分离后移除各管上清,各用1mI洗涤缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,0.5mI/L Tween-20,pH7.4)洗涤三遍,最后各用1mI保存缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,0.3g/L NaN₃,5g/L BSA,pH7.4)重悬磁珠,置于4℃保存备用。

[0115] 实施例3量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针的制备

[0116] 1. 纳米羧基量子点标记鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG反应条件的优化:

[0117] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记pH的确定

[0118] 将标记反应中磷酸盐缓冲液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pH7.4。

[0119] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0120] 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,确定量子点标记鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG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。

[0121] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0122] 以乙醇胺、Tris、PEG2000-NH₂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-NH₂为最佳封闭剂,其可显著提高标记复合物的胶体稳定性及免疫活性。

[0123] 2. 标记过程:

[0124] 向微量离心管中依次加入2nmol羧基水溶性量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺(suIf_o-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,4g/L氯化钠,pH 7.4)定容为2mI,不停地混合溶液,37℃反应30min后,透析去除过量的作为活化剂的suIf_o-NHS与EDC。在活化的量子点中,加入6nmol的实施例1所制备的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2h,加入单端氨基化聚乙二醇(PEG2000-NH₂)至终浓度为1%,封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应1h。用0.2μm PES过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

量子点-抗体偶联物溶液,溶于2mI磷酸盐洗涤液(2.9g/L磷酸氢二钠,0.295g/L磷酸二氢钠,4g/L氯化钠,5mI/L吐温-20,0.3g/L叠氮钠,pH 7.4)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1mI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,0.3g/L叠氮钠,pH 7.4)中,置于4℃保存备用。

[0125] 实施例4免疫纳米磁珠对人肺炎衣原体抗原进行免疫捕获条件的优化

[0126] 以偶联了兔抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体IgG的免疫纳米磁珠作为固相载体,量子点标记的鼠抗人肺炎衣原体98KD膜蛋白多克隆抗体作为检测抗体,通过双抗夹心法原理,建立人肺炎衣原体抗原的检测体系。分别对检测体系中免疫纳米磁珠的用量,捕获时间等条件进行了一系列的优化选择。

[0127] 1. 免疫纳米磁珠加入量的选择

[0128] 将20 μ I、40 μ I、60 μ I、80 μ I、100 μ I、120 μ I、140 μ I的由实施例2所制备好的免疫纳米磁珠分别加入到0.5mI含10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592)的样品处理液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,0.3g/L NaN₃,10mI/L Nonidet P-40,1mI/L SDS,pH7.4)中,进行免疫捕获,再由实施例3所描述的量子点标记探针进行检测,记录荧光值。结果发现,随着免疫纳米磁珠加入量的增加,荧光值逐渐增大,当免疫纳米磁珠加入量达到100 μ I时,荧光值达到最大。再继续增加免疫纳米磁珠的量,荧光值反而降低。这可能是由于免疫纳米磁珠过多,磁分离时对菌体造成损伤,从而导致捕获率下降。故本实验选择100 μ I作为免疫纳米磁珠的最佳加入量。

[0129] 2. 免疫捕获时间的选择

[0130] 确定磁珠的加入量后,取四份实施例2所制备好的免疫纳米磁珠,在室温下以10r/min,对10ng/mL的人肺炎衣原体(ATCC编号53592)进行10min、15min、20min、30min、45min及60min的免疫捕获,再由实施例3所描述的量子点标记探针进行检测,记录荧光值。结果发现,荧光值在免疫捕获15min时即达到最大值,故本实验选择15min作为免疫捕获的最佳时间。

[0131] 实施例5PBST缓冲液的配制

[0132] 取8g NaCl,0.2g KCl,0.24KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄,0.3g NaN₃,0.5mI Tween-20溶解于800mI蒸馏水中,用5M NaOH调整pH至7.4,再定容至1000mI。

[0133] 实施例6样品处理液的配制

[0134] 取8g NaCl,0.2g KCl,0.24KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄,0.3g NaN₃,10mI Nonidet P-40,1mI SDS,用5M NaOH调整pH至7.4,再定容至1000mI。

[0135] 实施例7质控品的制备

[0136] 1. 阳性质控品:将用1%甲醛灭活的人肺炎衣原体(0.5 μ g)干燥结合到拭子上,即为阳性质控品。

[0137] 2. 阴性质控品:阴性质控品即经临床确定为人肺炎衣原体阴性的人群的咽拭子样品。

[0138] 实施例8试剂盒的制备

[0139] 由实施例2所描述的抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠、实施例3所描述的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针、实施例5所描述的PBST缓冲液、实施例6所描述的样品处理液、

实施例7所描述的质控品共同组成基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的试剂盒。

[0140] 实施例9试剂盒的使用方法

[0141] 按常规临床手段获得人咽拭子,用0.5mI试剂盒中的样品处理液溶解咽拭子上的临床样本后,将溶解液转入1.5mI普通离心管中,向该离心管中加入试剂盒中的抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠100 μ I,室温下以10rpm于旋转混合仪上反应15min后取下,将离心管插入磁力架分离3min,用移液器吸出上清。添加试剂盒中的PBST缓冲液1mI洗涤两遍,磁分离后吸出洗涤液,最后用1mL PBS缓冲液重悬磁珠。取100 μ I上述的免疫纳米磁珠-衣原体抗原复合物于另一离心管中,再加入100 μ I试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针,室温下以15rpm于旋转混合仪上反应15min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的衣原体抗原的免疫结合,量子点被标记到衣原体抗原表面,形成磁珠-衣原体抗原-量子点“三明治”复合物。反应完成后,磁分离3min,除去多余的量子点标记探针,并用PBST缓冲液清洗2遍,复合物重新分散在100 μ I PBS缓冲液中,使用荧光酶标仪 ($E_x = 405\text{nm}$, $E_m = 565\text{nm}$) 对其荧光值进行检测。

[0142] 按上述同样的方法检测试剂盒中提供的四份阴性质控品及一份阳性质控品样品,分别读取荧光值;四份阴性质控品样品的荧光读数的平均值与3倍标准差之和即为CUT-OFF值;若上述临床人咽拭子样本的检测荧光值若大于CUT-OFF值即判断为此份临床咽拭子中人肺炎衣原体抗原为阳性,反之则判断为此份临床人咽拭子样本中人肺炎衣原体抗原为阴性;若阳性质控品样品的荧光值小于CUT-OFF值,则表明试剂盒失效。

[0143] 实施例10试剂盒的检测敏感性和特异性试验

[0144] 将人肺炎衣原体AR-39株样品用样品处理液进行系列稀释后,用实施例8所述试剂盒进行检测,结果表明其检测底限为0.3ng/mI。同时,用解脲支原体(ATCC编号27618)、人型支原体(ATCC编号23114)、肺炎支原体(ATCC编号15531)、肺炎链球菌(ATCC编号49619)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)、流感嗜血杆菌(ATCC编号53781)、卡他莫拉菌(ATCC编号25238)等进行检测,试剂盒检测含这些微生物的样品处理液都为阴性。

[0145] 实施例11临床测试例

[0146] 以肺炎衣原体检测金标准-MIF法作为参照,取68例呼吸科下呼吸道感染者的肺泡灌洗液标本用实施例8所描述的试剂盒进行检测,培养法阳性率为27.9% (19/68),本试剂盒为29.4% (20/68),2种方法的符合率为95.6% (65/68)。

[0147] 表1临床标本的检测结果

	本试剂盒			
	MIF法	阳性	阴性	总计
[0148]	阳性	18	1	19
	阴性	2	47	49
	总计	20	48	68

[0149] 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]

m98 基因序列

CATATGACAACGGTTACTACAGGTCAGGGAACGCTTTCCTCAGCAGGAGGCGTAAATTTAGAAAATAT

NdeI

TCGTAAACTTGTAGTTGCTGGGAATTTTCTACTGCAGATGGTGGAGCTATCAAAGGAGCGTCTTTCCT
TTTAACTGGCACTTCTGGAGATGCTCTTTTITAGTAACAACTCTTCATCAACAAAAGGGAGGAGCAATTGC
TACTACAGCAGGCGCTCGCATAGCAAATAACACAGGTTATGTTAGATTCCATCTAACATAGCGTCTAC
GTCAGGAGGCGCTATCGATGATGAAGGCACGTCGATACTATCGAACAACAAATTTCTATATTTTGAAGG
GAATGCAGCGAAAACTACTGGCGGTGCGATCTGCAACACCAAGGCGAGTGGATCTCCTGAACTGATAAT
CTCTAACAAATAAGACTCTGATCTTTGCTTCAAACGTAGCAGAAACAAGCGGTGGCGCCATCCATGCTAA
AAAGCTAGCCCTTTCCTCTGGAGGCTTTACAGAGTTTCTACGAAATAATGTC**TAACCTCGAG**

XhoI

M98 蛋白质序列

TTVTTGQGTLSAGGVNLENIRKLVVAGNFSADGGAIKGASFLLTGTSGDALFSNNSSTKGGAIATT
AGARIANNTGYVRELSNIASTSGGAIDDEGTSILSNKFLYFEGNAAKTEGGAICNTRKASGSPELIISN
NKTLIFASNVAETSGGAIHAKKLALSSGGFTEFLRNNV

专利名称(译)	基于磁性分离和量子点标记的人肺炎衣原体快速检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN105203769B	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201410406411.0	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	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/533		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN105203769A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎衣原体抗原的方法，该方法包括（1）制备抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠；（2）制备量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针；（3）将待检样品用样品处理液溶解后，向溶液中加入抗人肺炎衣原体免疫纳米磁珠，充分混合及反应后进行磁分离，以PBST缓冲液洗涤，向得到的沉淀物中加入量子点标记的抗人肺炎衣原体纳米探针，反应后磁分离，以PBST缓冲液洗涤后，使用荧光酶标仪检测荧光值。本发明建立了一套准确、快速、高灵敏度的检测人肺炎衣原体的方法，其在人肺炎衣原体的临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

MIF法	本试剂盒		
	阳性	阴性	总计
阳性	18	1	19
阴性	2	47	49
总计	20	48	68