



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277713 A

(43) 申请公布日 2016.01.27

(21) 申请号 201410405100.2

(22) 申请日 2014.08.18

(71) 申请人 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)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书5页 说明书14页
序列表2页

(54) 发明名称

基于磁性分离和量子点标记的人肺炎链球菌
快速检测方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的快速检测方法及其试剂盒,其中,该试剂盒由具有富集人肺炎链球菌功能的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠、量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针、质控品以及 PBST 缓冲液所组成;质控品包括阳性质控品以及阴性质控品;阳性质控品由灭活的人肺炎链球菌干燥结合到拭子上而成;阴性质控品是经临床确定为人肺炎链球菌阴性的人群的咽拭子。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链球菌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。

1. 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

1) 兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体的制备;

2) 鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体的制备;

3) 将步骤 1) 制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体分别与纳米磁珠通过共价偶联,分别制备抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠及抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠,将抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠及抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠等量混合即制得抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠;

4) 将步骤 2) 制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体分别与纳米量子点通过共价偶联,分别制备量子点标记的人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针以及量子点标记的人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针,将量子点标记的人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针以及量子点标记的人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针等量混合即制得量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针;

5) 取人呼吸道分泌物样本,用 PBST 缓冲液溶解后,加入步骤 3) 制备得到的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠,充分混合,反应 15-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 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链球菌纳米探针,反应 25-45min 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 PBST 缓冲液中各组分含量分别为 8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.5ml/L Tween-20, 所述 PBST 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

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链球菌阴性的人群的呼吸道分泌物样品,读取荧光值;所述人肺炎链球菌阴性的人群的呼吸道分泌物样品简称人肺炎链球菌阴性对照样品;所述四份人肺炎链球菌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链球菌抗原为阳性;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链球菌抗原为阴性。

2. 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的试剂盒,其特征在于:所述基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的试剂盒由具有富集人肺炎链球菌功能的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠、量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针、质控品以及 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链球菌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链球菌阴性的人群的咽拭子。

3. 一种用于制备如权利要求 2 所述的基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌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:

1) 抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠的制备:

1.1) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

1.1.1) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1.1) 对人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白进行生物信息学分析,分别获取人

肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的基因序列;

1. 1. 1. 2) 在步骤 1. 1. 1. 1) 中所得到的基因序列的 5' 端及 3' 端分别引入酶切位点并分别化学合成全基因序列,同时标记记为 PspA1、PspA2;

1. 1. 1. 3) 将步骤 1. 1. 1. 2) 中所得到的 PspA1、PspA2 按分子生物学方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后转入大肠杆菌中表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白;所述重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白均以可溶性表达形式存在于基因工程菌体中;

1. 1. 1. 4) 用镍柱纯化步骤 1. 1. 1. 3) 所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白, SDS-PAGE 检测其纯度后,再以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整二种蛋白浓度均为 0. 2mg/mL 后备用;

1. 1. 2) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 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 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清;所述兔抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清的间接 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重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合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) 所得到的四种多克隆抗体 IgG 的浓度,将其蛋白浓度均调整为 1mg/mL 后备用,此四种多克隆抗体 IgG 即分别为兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG;

1. 2) 免疫纳米磁珠的包被:

1. 2. 1) 取 5mg 磁珠,用 1ml 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 180nm 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/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 6-10mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0. 5ml,以 10-40rpm/min 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;

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/ml 的由步骤 1. 1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液各 1ml,室温下以 15rpm/min 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 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液,室温下以 15rpm/min 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 1ml 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 ,0.5ml/L Tween-20,所述洗涤缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

1. 2. 5) 向各个离心管中分别加入 1ml 保存缓冲液重悬磁珠,置于 4°C 保存备用;至此制得抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠;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 $\text{pH} = 7.4$;

1. 2. 6) 按与步骤 1. 2. 1)-1. 2. 5) 相同的方法利用由步骤 1. 1) 所制备的免抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠;将上述两种免疫纳米磁珠悬液按体积比 1:1 混合,即制得抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠;

2) 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备:

其具体制备方法包括:

2. 1) 向微量离心管中依次加入 4nmol 羧基水溶性量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 以及 600nmol 碳二亚胺 EDC,以磷酸盐缓冲液定容为 5ml,混合溶液,37°C 反应 30min 后,透析去除过量的作为活化剂的 sulfo-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 $\text{pH} = 7.4$;

2. 2) 在步骤 2. 1) 所得到的活化的量子点中,加入 8-16nmol 的步骤 1. 1) 中所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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 0.2 μm 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°C 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 2ml 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°C 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 1ml 磷酸盐保存液中,置于 4°C 保存备用,至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针;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,5ml/L 吐温-20,0.3g/L 叠氮钠,所述磷酸盐洗涤液的 $\text{pH} = 7.4$;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 $\text{pH} = 7.4$;

2. 5) 按与步骤 2. 1)-2. 4) 相同的方法利用由步骤 1. 1) 所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针;将上述两种量子点标记的纳米探针溶液按体积比 1:1 混合,即制得抗人肺炎链球菌纳米探针;

3) PBST 缓冲液的配制:

其具体配制方法包括:

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

4) 质控品的制备：

4.1 阳性质控品：阳性质控品由灭活的人肺炎链球菌干燥结合到拭子上而成；

4.2 阴性质控品：阴性质控品即经临床确定为人肺炎链球菌阴性的人群的咽拭子。

4. 根据权利要求3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/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8mg/ml的sulfo-NHS溶液各0.5ml，以15rpm/min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；

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链球菌Fam1PspA蛋白多克隆抗体IgG溶液各1ml，室温下以15rpm/min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；

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12nmol的步骤1.1)中所制备的鼠抗人肺炎链球菌Fam1PspA蛋白多克隆抗体IgG，避光反应2h。

5. 根据权利要求4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。

6. 根据权利要求5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180nm的羧基磁珠。

7. 一种基于如权利要求2所述的基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌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：

1) 将待检样本用0.5ml PBST缓冲液溶解后将溶解液转入1.5ml普通离心管中；所述PBST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, 0.3g/L NaN₃, 0.5ml/L Tween-20；所述PBST缓冲液的pH = 7.4；

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链球菌抗原的试剂盒中的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠60-200 μ l，室温下以10rpm/min于旋转混合仪上反应15-45min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；

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1ml PBS缓冲液重悬磁珠，制得免疫纳米磁珠-链球菌抗原复合物；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；

4) 取100 μ l步骤3)得到的免疫纳米磁珠-链球菌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链球菌抗原的试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针，室温下以15rpm/min于旋转混合仪上反应25-45min，通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的链球菌抗原的免疫结合，量子点被标记到链球菌抗原表面，形成磁珠-链球菌抗原-量子点“三明治”复合物；

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链球菌纳米探针，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；

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链球菌抗原为阳性,反之则判断为待检样本中人肺炎链球菌抗原为阴性;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。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述步骤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链球菌抗原的试剂盒中的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠160 μ l,室温下以10rpm/min于旋转混合仪上反应30min后取下,将离心管插入磁力架分离3min,用移液器吸出上清;

所述步骤4)中,取100 μ l步骤3)多得到的免疫纳米磁珠-链球菌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链球菌抗原的试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针,室温下以15rpm/min于旋转混合仪上反应30min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的人肺炎链球菌抗原的免疫结合,量子点被标记到人肺炎链球菌抗原表面,形成磁珠-链球菌抗原-量子点“三明治”复合物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述待检样本包括但不限于咽拭子。

基于磁性分离和量子点标记的人肺炎链球菌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链球菌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] 人肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp) 是儿童呼吸道感染的重要病原体。主要经飞沫传播而进入呼吸道,从而寄生于人体的鼻咽部,或侵入人体不易清除的部位引起一系列的疾病,如大叶性肺炎,脑膜炎,支气管炎,中耳炎等。它是全球所有年龄组高发病率和病死率的主要病原菌。其中,在发展中国家,婴幼儿、老年人及免疫缺陷人群中尤为严重。肺炎链球菌于 1881 年首次由巴斯德 (Louis Pasteur) 及 G. M. Sternberg 分别在法国及美国从患者痰液中分离出。其为革兰氏染色阳性,菌体似矛头状,成双或成短链状排列的双球菌,有毒株菌体外有化学成分为多糖的荚膜。其荚膜具有抗原性,是肺炎链球菌分型的依据。根据荚膜多糖抗原性的不同将肺炎球菌分为 91 个血清型。肺炎链球菌菌体抗原主要为 C 多糖,其存在于肺炎链球菌细胞壁中,具有种特异性,为各型菌株所共有。C 多糖可被血清中 C- 反应蛋白沉淀。在钙离子存在时, C 多糖可与正常人血清中称为 C- 反应蛋白 (C reactive protein, CRP) 的 β 球蛋白结合,发生沉淀。目前针对人肺炎链球菌抗原的检测亦主要是针对此抗原,而该抗原非肺炎链球菌独有,如缓和链球菌亦含有该抗原。在肺炎链球菌表面还有一种与毒力相关的重要抗原,为肺炎链球菌表面蛋白 A (PspA),其存在于肺炎链球菌所有血清型中,是肺炎链球菌的特异性抗原。但是 PspA 分子结构高度变异,具有抗原多样性,其富含脯氨酸的结构域上游被称为 CDR 域,具有多样性。根据 CDR 域的不同将 PspA 分为 3 个家族 6 亚类: Clade1, Clade2, Clade3, Clade4, Clade5, Clade6。其中 Clade1, Clade2 属于 Fam1 家族; Clade3, Clade4, Clade5 属于 Fam2 家族, Clade6 属于 Fam3 家族。具有 Fam1 或 Fam2 家族 PspA 蛋白的人肺炎链球菌占到了临床分离的人肺炎链球菌种类的 99% 以上。我国目前还未见具有 fam3 家族 PspA 蛋白的肺炎链球菌的临床分离报道。研究表明同一家族亚类间 PspA 蛋白间存在广泛的抗原抗体交叉反应,而异家族亚类间则无此交叉反应。

[0003] 临床病人由于不同的呼吸道病原体 (如副流感病毒、流感嗜血杆菌、流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒等) 感染引起疾病症状可以十分相似,这导致了流行诊断比较困难,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。

[0004] 尽管肺炎链球菌在全球范围内传播,婴幼儿的感染尤其普遍,但可用于实验室诊断的标准化商品试剂的种类极少。目前,肺炎链球菌的检测主要有以下几种方法:

[0005] 一、常规实验室检测

[0006] 1、细菌分离

[0007] 实验室诊断肺炎链球菌的金标准是分离人肺炎链球菌毒株。采用鼻咽分泌物作为

病原体分离的标本,可以用血培养的方法分离病原体。但是该法有严重的缺陷,因为肺炎链球菌是苛养菌,营养要求高,培养所需时间长,阳性率低,更重要的是,若采样前患者使用过抗菌药物,会造成培养结果的假阳性。这样在临床方面对病人的治疗就有一定的局限性。

[0008] 2、血清学检测

[0009] 即采用酶联免疫法、放免法、微量免疫荧光法等,检测被检者血清中肺炎链球菌抗体水平,可间接提示肺炎链球菌感染的存在。然而,血清学试验只能提供一种回顾性的诊断,它需要同时检测患者急性期和恢复期的双份血清,如果恢复期中抗人肺炎链球菌抗体效价比急性期高4倍或4倍以上才有诊断意义。另外,抗体出现的时机不易掌握,且因为菌体血清型种类过多,导致其诱生的抗荚膜多糖抗体种类过多,对抗体的检测造成了很大的困难,故现有血清学方法的检测质量受到一定限制。

[0010] 二、快速诊断

[0011] 直接检查人肺炎链球菌蛋白抗原和菌体核酸可达到快速诊断的目的,目前主要有胶体金免疫层析法、免疫荧光法、免疫酶法和PCR法等。免疫荧光法和免疫酶法均存在操作步骤复杂,需要专业人员操作,检测时间长(2h以上),成本较高等缺点。PCR方法快速、灵敏、特异,是目前研究肺炎链球菌感染的重要手段,但由于PCR对实验设备以及操作要求较高,且易出现假阳性,在我国还不能作为常用的临床诊断方法。胶体金免疫层析法的检测目标抗原为C多糖抗原,但是胶体金法敏感度较低,对样品材料质量要求较高,同时还存在与其他链球菌如缓和链球菌存在交叉反应等缺陷。因此,建立具备高灵敏度的人肺炎链球菌特异性抗原快速诊断法十分必要。

发明内容

[0012] 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链球菌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。

[0013] 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0014] 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的方法,其特征在于:所述该方法包括以下步骤:

[0015] 1) 兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体的制备;

[0016] 2) 鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体的制备;

[0017] 3) 将步骤1) 制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体分别与纳米磁珠通过共价偶联,分别制备抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠及抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠,将抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠及抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠等量混合即制得抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠;

[0018] 4) 将步骤2) 制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体分别与纳米量子点通过共价偶联,分别制备量子点标记的人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针以及量子点标记的人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针,将量子点标记的人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针以及量子点标记的人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针等量混合即制得量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针;

[0019] 5) 取人呼吸道分泌物样本(包括但不限于咽拭子),用 PBST 缓冲液溶解后,加入步骤 3) 制备得到的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠,充分混合,反应 15-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 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链球菌纳米探针,反应 25-45min 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 PBST 缓冲液中各组分含量分别为 8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,0.5ml/L Tween-20,所述 PBST 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

[0020] 6) 根据步骤 1)-步骤 5) 的方法分别检测四份经临床确定为肺炎链球菌阴性的人群的呼吸道分泌物样品,读取荧光值;所述肺炎链球菌阴性的人群的呼吸道分泌物样品简称肺炎链球菌阴性对照样品;所述四份肺炎链球菌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肺炎链球菌抗原为阳性;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肺炎链球菌抗原为阴性。

[0021] 一种基于磁性分离和量子点标记的检测肺炎链球菌抗原的试剂盒,其特征在于:所述基于磁性分离和量子点标记的检测肺炎链球菌抗原的试剂盒由具有富集肺炎链球菌功能的抗肺炎链球菌免疫纳米磁珠、量子点标记的抗肺炎链球菌纳米探针、质控品以及 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肺炎链球菌干燥结合到拭子上而成;所述阴性质控品是经临床确定为肺炎链球菌阴性的人群的咽拭子。

[0022] 一种用于制备基于磁性分离和量子点标记的检测肺炎链球菌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:

[0023] 1) 抗肺炎链球菌免疫纳米磁珠的制备:

[0024] 1.1) 兔及鼠抗肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0025] 1.1.1) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化:

[0026] 1.1.1.1) 对肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白进行生物信息学分析,分别获取肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段,找到其对应的基因序列;

[0027] 1.1.1.2) 在步骤 1.1.1.1) 中所得到的基因序列的 5' 端及 3' 端分别引入酶切位点并分别化学合成全基因序列,同时标记记为 PspA1、PspA2;其序列参见序列表;

[0028] 1.1.1.3) 将步骤 1.1.1.2) 中所得到的 PspA1、PspA2 按分子生物学方法分别克隆入表达载体 pET-28a(+) 后转入大肠杆菌中表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白;所述重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白均以可溶性表达形式存在于基因工程菌体中;

[0029] 1.1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.1.3) 所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,再以 Bradford 法测定蛋白质浓度,调整二种蛋白浓度均为 0.2mg/mL 后备用;

[0030] 1.1.2) 兔及鼠抗肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备:

[0031] 1.1.2.1) 以步骤 1.1.1.4) 中所得到的重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白为完全抗原,分别免疫新西兰大白兔及豚鼠;分别制备兔抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清;所述兔抗重组 PspA1-His、

PspA2-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清的间接 ELISA 效价均大于 1×10^5 ；

[0032] 1.1.2.2) 采用用 Protein G 亲和层析柱分别纯化兔抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清及鼠抗重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白抗血清中的多克隆抗体 IgG；

[0033] 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) 所得到的四种多克隆抗体 IgG 的浓度,将其蛋白浓度均调整为 1mg/mL 后备用,此四种多克隆抗体 IgG 即分别为兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG；

[0034] 1.2) 免疫纳米磁珠的包被：

[0035] 1.2.1) 取 5mg 磁珠,用 1ml 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 180nm 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；

[0036] 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/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 6-10mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml,以 10-40rpm/min 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；

[0037] 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/ml 的由步骤 1.1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液各 1ml,室温下以 15rpm/min 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 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液,室温下以 15rpm/min 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；

[0038] 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 1ml 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 ,0.5ml/L Tween-20,所述洗涤缓冲液的 pH = 7.4；

[0039] 1.2.5) 向各个离心管中分别加入 1ml 保存缓冲液重悬磁珠,置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用；至此制得抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠；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；

[0040] 1.2.6) 按与步骤 1.2.1)-1.2.5) 相同的方法利用由步骤 1.1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠。将上述两种免疫纳米磁珠悬液按体积比 1:1 混合,即制得抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠；

[0041] 2) 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备：

[0042] 其具体制备方法包括：

[0043] 2.1) 向微量离心管中依次加入 4nmol 羧基水溶性量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 以及 600nmol 碳二亚胺 EDC, 以磷酸盐缓冲液定容为 5ml, 混合溶液, 37°C 反应 30min 后, 透析去除过量的作为活化剂的 sulfo-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;

[0044] 2.2) 在步骤 2.1) 所得到的活化的量子点中, 加入 8-16nmol 的步骤 1.1) 中所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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;

[0045] 2.3) 用 0.2 μm 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°C 下离心 15min, 除去未发生偶联反应的抗体和反应中的副产物;

[0046] 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 2ml 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°C 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 1ml 磷酸盐保存液中, 置于 4°C 保存备用, 至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针; 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, 5ml/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;

[0047] 2.5) 按与步骤 2.1)-2.4) 相同的方法利用由步骤 1.1) 所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针。将上述两种量子点标记的纳米探针溶液按体积比 1:1 混合, 即制得抗人肺炎链球菌纳米探针;

[0048] 3) PBST 缓冲液的配制:

[0049] 其具体配制方法包括:

[0050] 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24KH₂PO₄, 1.44g Na₂HPO₄, 0.3g NaN₃, 0.5ml Tween-20 溶解于 800ml 蒸馏水中, 用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4, 再定容至 1000ml;

[0051] 4) 质控品的制备:

[0052] 4.1 阳性质控品: 阳性质控品由灭活的人肺炎链球菌干燥结合到拭子上而成;

[0053] 4.2 阴性质控品: 阴性质控品即经临床确定为人肺炎链球菌阴性的人群的咽拭子。

[0054] 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 8mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml, 以 15rpm/min 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;

[0055] 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 μg/ml 的由步骤 1.1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液各 1ml, 室温下以 15rpm/min 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;

[0056] 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 12nmol 的步骤 1. 1) 中所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG, 避光反应 2h。

[0057] 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。

[0058] 作为优选, 本发明所采用的磁珠是以超顺磁性 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 180nm 的羧基磁珠。

[0059] 一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌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:

[0060] 1) 将待检样本用 0. 5ml PBST 缓冲液溶解后将溶解液转入 1. 5ml 普通离心管中; 所述 PBST 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 , 0. 5ml/L Tween-20; 所述 PBST 缓冲液的 pH = 7. 4;

[0061] 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链球菌抗原的试剂盒中的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠 60-200 μl , 室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 15-45min 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;

[0062] 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 1ml PBS 缓冲液重悬磁珠, 制得免疫纳米磁珠 - 链球菌抗原复合物; 所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下: 8g/L NaCl, 0. 2g/L KCl, 0. 24g/L KH_2PO_4 , 1. 44g/L Na_2HPO_4 ; 所述 PBS 缓冲液的 pH = 7. 4;

[0063] 4) 取 100 μl 步骤 3) 得到的免疫纳米磁珠 - 链球菌抗原复合物于另一离心管中, 再加入 100 μl 基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针, 室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 25-45min, 通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的链球菌抗原的免疫结合, 量子点被标记到链球菌抗原表面, 形成磁珠 - 链球菌抗原 - 量子点“三明治”复合物;

[0064] 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链球菌纳米探针, 用试剂盒中的 PBST 缓冲液清洗 2 遍, 复合物重新分散在 100 μl 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 KH_2PO_4 , 1. 44g/L Na_2HPO_4 ; 所述 PBS 缓冲液的 pH = 7. 4;

[0065] 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链球菌抗原为阳性, 反之则判断为待检样本中人肺炎链球菌抗原为阴性; 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。

[0066] 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链球菌抗原的试剂盒中的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠 160 μl , 室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 30min 后取下, 将离心管插入磁力架分离 3min, 用移液器吸出上清;

[0067] 所述步骤 4) 中, 取 100 μl 步骤 3) 多得到的免疫纳米磁珠 - 链球菌抗原复合物于另一离心管中, 再加入 100 μl 基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的试

剂盒中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 30min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的人肺炎链球菌抗原的免疫结合,量子点被标记到人肺炎链球菌抗原表面,形成磁珠-链球菌抗原-量子点“三明治”复合物。

[0068] 作为优选,本发明所提供的待检样本包括但不限于咽拭子。

[0069] 本发明所需的羧基水溶性纳米量子点、180nm 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。

[0070] 本发明相比现有技术具有如下优点:

[0071] 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(如其对人肺炎链球菌临床流行耐药株 Sp6B、Sp19F、Sp23F 的检测底线分别为 2×10^3 CFU/ml, 1×10^3 CFU/ml 及 5×10^3 CFU/ml)。

[0072] 2、本发明所用的抗体是识别人肺炎链球菌特异性 PspA 抗原胞外保守区的多克隆抗体,其特异性高,与常见的呼吸道病原体无交叉反应,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。

[0073] 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。

[0074] 4、由于检测试剂盒检测的是人肺炎链球菌抗原而非抗体(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。该方法在人肺炎链球菌的临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

[0075] 5、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

[0076] 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人肺炎链球菌的新方法,具有广阔的市场应用前景。

[0077] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0078] 各种试剂的配制及所需材料的说明

[0079] 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。

[0080] 2. 兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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。

[0081] 3. 兔抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 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。

[0082] 4. 鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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。

[0083] 5. 鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 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。

[0084] 6. 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 585nm,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-585。

[0085] 7. 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 μm 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。

[0086] 8、人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC 700670。

[0087] 9、人肺炎链球菌亚型菌株 Sp19F:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC 49619。

[0088] 10、人肺炎链球菌亚型菌株 Sp23F:购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),编号为 ATCC 700669。

[0089] 11. 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)。

[0090] 实施例 1 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0091] (一) 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的制备、纯化

[0092] 1. 相关基因的克隆

[0093] 对人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白(其 NCBI 蛋白质数据库中的 accession number 分别为 AAF27703、AAF27712)进行生物信息学分析,分别获取其胞外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,同时在其 5' 引入酶切位点 NdeI、3' 端引入终止信号 TAA 和酶切位点 XhoI 后分别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均分别连于载体 pUC57 上),记为 PspA1、PspA2。其基因全序列如列表所示。其中,PspA1 基因编码的蛋白质序列为人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白(accession number:AAF27703)的 29-406aa。PspA2 基因编码的蛋白质序列为人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白(accession number:AAF27712)的 26-427aa。将分别含有该两段人工合成的 DNA 片段的载体 pUC57 分别用 NdeI 及 XhoI 进行双酶切后按常规方法分别回收目的片段,备用。同时采用 NdeI 及 XhoI 对载体 pET-28a(+) 进行双酶切,并按常规方法分别将经双酶切后获得的 PspA1、PspA2 连入 pET-28a(+) 载体中,并转化大肠杆菌 TOP10,构建 pET-PspA1、pET-PspA2 表达载体。经酶切和序列测定证实表达载体构建无误。该载体分别表达重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白。

[0094] 2. 重组 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白的表达与纯化

[0095] 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. coli* BL21(DE3) 中,转化完成后将菌液涂布于含 50 $\mu g/mL$ 卡那霉素的 LB 平板上,按常规方法筛选表达菌株。分别挑取 pET-PspA1、pET-PspA2 转化的具有外源蛋白表达能力的单个菌落并分别接种入 100mL LB 培养基中,于 37 $^{\circ}C$ 培养过夜。分别取出菌液后,按 1:100 分别接种于 100mL 含有 50 $\mu g/mL$ 卡那霉素的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}C$ 培养至 $OD_{600} = 0.6$ 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 后分别于 8000r/min 下离心 10min 收集菌体。将此两份菌体分别用 20mL 磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,pH = 7.4)洗涤 3 次并分别用 10mL 上样缓冲液(20mM Na_3PO_4 ,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 PspA1-His、PspA2-His 融合蛋白均以可溶性表达方式存在于菌体中。收集此两份细胞破碎的上清液, 分别用 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:

[0096] 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。

[0097] 2) 用 10mL 上样缓冲液平衡, 1mL/min 流速。

[0098] 3) 将融合蛋白上样, 1mL/min 流速。

[0099] 4) 用 10mL 上样缓冲液, 以 1mL/min 流速洗柱。

[0100] 5) 用 10mL 洗脱缓冲液 (20mM Na_3PO_4 , 0.5M NaCl, 300mM 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。

[0101] (二) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0102] 1. 兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0103] 用步骤 (一) 纯化的重组 PspA1-His 融合蛋白按照 200 μg (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 P1-His 融合蛋白按照 200 μg (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 Bradford 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 KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH = 7.4) 调整为 1mg/mL, -20°C 保藏备用, 至此制得兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。以步骤 (一) 纯化的重组 PspA2-His 融合蛋白作为抗原按照上述同样方法制得兔抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。Western blot 试验表明, 此二种多克隆抗体 IgG 均能对应性的特异性识别人肺炎链球菌全长 PspA 蛋白。

[0104] 2. 鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA、Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的制备

[0105] 用步骤 (一) 纯化的重组 PspA1-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 200 μg / 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 Bradford 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 KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH = 7.4) 调整为 1mg/mL, -20°C 保藏备用, 至此制得鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。以步骤 (一) 纯化的重组 PspA2-His 融合蛋白作为抗原按照上述同样方法制得鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG。Western blot 试验表明, 此二种多克隆抗体 IgG 均能对

应性的特异性识别肺炎链球菌全长 PspA 蛋白。

[0106] 实施例 2 抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠的制备

[0107] 1. 抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体偶联磁珠反应条件的优化：

[0108] 以偶联了兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的磁珠作为固相载体，量子点标记的鼠抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体作为检测抗体，通过双抗夹心法原理检测肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B 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。

[0109] 1.1 磁珠粒径的选择

[0110] 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，分别与兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体进行偶联反应。分别将制备好的免疫纳米磁珠检测 10^4 CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B，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 180nm 的磁珠最符合本发明的要求，确定最适磁性微球粒径为 180nm。

[0111] 1.2 EDC/NHS 活化剂浓度的选择

[0112] 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 180nm 的羧基磁珠。将制备好的免疫纳米磁珠分别检测 10^4 CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B，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 4mg/ml 时偶联效果最好。

[0113] 1.3 偶联抗体浓度的选择

[0114] 将 20 μ g、40 μ g、60 μ g、80 μ g、100 μ g、120 μ g、140 μ g 的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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 180nm 的磁珠进行偶联。将制备好的免疫纳米磁珠分别检测 10^4 CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B，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链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的偶联量为 100 μ g/mg。

[0115] 1.4 偶联时间的选择

[0116] 确定磁珠的粒径、EDC/NHS 活化剂浓度及抗体偶联量后，将兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 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分别检测 10^4 CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B，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，确定兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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。

[0117] 1.5 封闭剂的选择

[0118] 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分别检测 10^4 CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B，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。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。

[0119] 抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 偶联磁珠反应条件的优化结果与上述步骤 1.1-1.5 描述的抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体与磁珠偶联反应相关反应条件的优化结果完全一致。

[0120] 2. 偶联过程:

[0121] 取 5mg 磁珠(以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为 180nm 的羧基磁珠)于 1.5ml 普通离心管中,用 1ml 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 8mg/ml 的 sulfo-NHS 溶液各 0.5ml,以 15rpm/min 于旋转混合仪中活化 1hr,磁分离后移除上清,用 1ml 上述的 MES 缓冲液重悬;取 5 个离心管,每个离心管中加入 200 μL 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 KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , pH7.4)稀释的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的实施例 1 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 溶液各 1ml,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪中反应 3h,磁分离移除上清后,各加入 1ml 含 1mg/ml 乙醇胺的上述 PBS 缓冲液,室温下以 15rpm/min 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 1ml 洗涤缓冲液(8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.5ml/L Tween-20, pH7.4)洗涤三遍,最后各用 1ml 保存缓冲液(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 BSA, pH7.4)重悬磁珠,置于 4 $^\circ\text{C}$ 保存备用,至此制得抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白免疫纳米磁珠。

[0122] 按上述步骤用相同的方法利用由实施例 1 所制备的兔抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白免疫纳米磁珠。将上述两种免疫纳米磁珠悬液按体积比 1:1 混合,即制得抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠。

[0123] 实施例 3 量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针的制备

[0124] 1. 纳米羧基量子点标记鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 反应条件的优化:

[0125] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记 pH 的确定

[0126] 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。

[0127] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0128] 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链球菌 Fam1PspA 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。

[0129] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0130] 以乙醇胺、Tris、PEG2000- NH_2 或者 BSA 作为封闭剂,按步骤 1.1 及 1.2 确定的条件进行标记反应后,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- NH_2 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。

[0131] 纳米羧基量子点标记鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 反应的条件优化结果与步骤 1.1-1.3 描述的纳米羧基量子点标记鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 反应相关条件的优化结果均完全一致。

[0132] 2. 标记过程：

[0133] 向微量离心管中依次加入 4nmol 羧基水溶性量子点、600nmol N-羟基琥珀酰亚胺 (sulfo-NHS) 和 600nmol 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 2ml, 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 sulfo-NHS 与 EDC。在活化的量子点中, 加入 12nmol 的实施例 1 所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 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 0.2 μm PES 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子点-抗体偶联物溶液, 溶于 2ml 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, 5ml/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 1ml 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, 至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白纳米探针, 置于 4℃ 保存备用。

[0134] 按上述相同方法利用由实施例 1 所制备的鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 制得量子点标记的抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白纳米探针。将上述两种量子点标记的纳米探针溶液按体积比 1:1 混合, 即制得抗人肺炎链球菌纳米探针。

[0135] 实施例 4 免疫纳米磁珠对人肺炎链球菌抗原进行免疫捕获条件的优化

[0136] 以偶联了人肺炎链球菌 Fam1PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的磁珠作为固相载体, 量子点标记的抗人肺炎链球菌 PspA 蛋白多克隆抗体作为检测抗体, 通过双抗夹心法原理, 建立人肺炎链球菌抗原的检测体系。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。

[0137] 实验 1. 免疫纳米磁珠加入量的选择

[0138] 将 20 μl、40 μl、60 μl、80 μl、100 μl、120 μl、140 μl、160 μl、200 μl 的由实施例 2 所制备好的免疫纳米磁珠分别加入到 0.5ml 含 10⁴CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B 的 PBS 悬浮液中, 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 160 μl 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。故本实验选择 160 μl 作为免疫纳米磁珠的最佳加入量。

[0139] 实验 2. 免疫捕获时间的选择

[0140] 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 10⁴CFU/mL 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B 进行 15min、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 30min 时表现出最大值, 随着时间的延长, 数值有所下降。故本实验选择

30min 作为免疫捕获的最佳时间。

[0141] 同时,分别以偶联了兔抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 的免疫纳米磁珠作为固相载体,对应的量子点标记的鼠抗人肺炎链球菌 Fam2PspA 蛋白多克隆抗体 IgG 作为检测抗体,通过双抗夹心法原理,建立人肺炎链球菌抗原的检测体系,对相应的检测体系中的捕获条件进行优化。结果发现,上述检测体系中的最佳捕获条件均与上述实验 1 及实验 2 所给出的结果完全一致。

[0142] 实施例 5 PBST 缓冲液的配制

[0143] 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 0.24g KH_2PO_4 , 1.44g Na_2HPO_4 , 0.3g NaN_3 , 0.5ml Tween-20 溶解于 800ml 蒸馏水中,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml。

[0144] 实施例 6 质控品的制备

[0145] 1. 阳性质控品:将用 1% 甲醛灭活的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp6B (0.5 μg) 干燥结合到拭子上,即为阳性质控品。

[0146] 2. 阴性质控品:阴性质控品即经临床确定为人肺炎链球菌阴性的人群的咽拭子样品。

[0147] 实施例 7 试剂盒的制备

[0148] 由实施例 2 所描述的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠、实施例 3 所描述的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针、实施例 5 所描述的 PBST 缓冲液、实施例 6 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链球菌抗原的试剂盒。

[0149] 实施例 8 试剂盒的使用方法

[0150] 按常规临床手段获得人咽拭子,用 0.5ml 试剂盒中的 PBST 缓冲液 (8g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.24g/L KH_2PO_4 , 1.44g/L Na_2HPO_4 , 0.5ml/L Tween-20, pH7.4) 溶解咽拭子上的临床样本后,将溶解液转入 1.5ml 普通离心管中,向该离心管中加入试剂盒中的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠 160 μl ,室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 30min 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 1ml 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 μl 上述的免疫纳米磁珠-链球菌抗原复合物于另一离心管中,再加入 100 μl 试剂盒中的量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针,室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 30min,通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的人肺炎链球菌抗原的免疫结合,量子点被标记到肺炎链球菌表面,形成磁珠-肺炎链球菌抗原-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 μl PBS 缓冲液中,使用荧光酶标仪 ($E_x = 405\text{nm}$, $E_m = 585\text{nm}$) 对其荧光值进行检测。

[0151] 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链球菌抗原为阳性,反之则判断为此份临床人咽拭子样本中人肺炎链球菌抗原为阴性;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。

[0152] 实施例 9 试剂盒的检测敏感性和特异性试验

[0153] 通过测定肺炎链球菌培养物稀释液来做敏感性研究,确定实施例 7 所描述的基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的试剂盒检测人肺炎链球菌亚型菌株

Sp6B 的检测下限为 2×10^3 CFU/ml, 而来自生产商 Binax 的名为 Binax NOW Streptococcus pneumoniae test(胶体金法)的试剂盒的检测限为 5×10^5 CFU/ml, 本发明试剂盒之检测下限较其明显降低。另外, 对临床较为常见的分别具有 Fam1PspA 及 Fam2PspA 的人肺炎链球菌亚型菌株 Sp19F 及 Sp23F 的检测结果表明, 实施例 7 所述试剂盒对该两亚型菌株的检测下限分别为 1×10^3 CFU/ml 及 5×10^3 CFU/ml。

[0154] 用呼吸道常见病原体如人呼吸道合胞病毒(Long 株, ATCC 编号 VR26)、人肺炎支原体(ATCC 编号 15531)、人肺炎衣原体(AR-39 株, ATCC 编号 53592)、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)等代替人肺炎链球菌进行检测, 试剂盒检测含这些微生物的 PBST 缓冲液都为阴性。

[0155] 实施例 10 临床测试例

[0156] 以肺炎链球菌标准检测法-痰培养法作为参照, 取 150 例呼吸科下呼吸道感染者的肺泡灌洗液标本用实施例 7 所描述的试剂盒进行检测, 培养法阳性率为 12% (18/150), 本试剂盒为 13.3% (20/150), 2 种方法的符合率为 97.3% (146/150)。两种方法检测结果差异无显著性。具体结果如表 1 所示。

[0157] 表 1 临床标本的检测结果

[0158]

痰培养法	本试剂盒		总计
	阳性	阴性	
阳性	17	1	18
阴性	3	129	132
总计	20	130	150

[0159] 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]

PspA1 基因序列

CATATGGTAAGAGCAGAAGAATCTCCCGTAGCCAGTCAGTCTAAAGCTGAGAAAGACTATGATGC

NdeI

AGCAGTGAAAAATGCTACAGCTGCAAAAAAGCAGCAGAAGACGCTCAAAGAGCTTTAGATGAAGCAA
AAGCTGCGCAGAAAAATATGACGAGGATCAAAAGAAAACTGAGGAGAAAGCGAAAGAAGTAAAAA
AGCTTCGGAAGAACAAGCTGCAAATCTGAAATATCAACAAGAGTTGGTTAAATATATTAATATA
CACGTGAAAAATAATTCAACAAAAAGAACTGAAGCTGAGAAAGTAATGACTGCAGCTAAGAAAGAGCAT
GAGAAAAAACAAACAGAACTTGCTAAAGTTCTCGCAAAGGTAATTCCTAGCGCGGAAGATTAGAAAA
TACTAGACAAAAAGCAGAGAAAGCTAAAGAAAAAGAACCAGAGCTTACTAAAAAACTAGAAGAAGCTA
AAGCAAAATCAGAAGAAGCTGAGAAAAAGCTACTGAAGCCAAACAAAAAGTGGATGCAGAACATGCT
GAAGAAGTCGTTCCCTCAAGCTAAAATCGCTGAGTTGGAAAATGAAGTTCAGAAACTAGAAAAAGATCT
CAAAGAGATTGATGAATCTGACTCAGAAGATTATGTTAAAGAAGGTCTCCGTGCTCCTCTTCAATCTG
AATTGGATGCCAAACAAGCTAAACTATCAAACTTGAAGAGTTGAGTGATAAGATTGATGAGTTAGAC
GCTGAAATTGCAAACTTGAAAAAATGTAGAAGATTTCAAACTCAAACGGTGAGCAAGCTGAACA
ATACCGTGCTGCAGCTGGAGAAGACTTAGCTGCTAAACAAGCTGAATTAGAAAAAACTGAAGCTGACC
TTAAGAAAGCAGTTAATGAGCCAGAAAAACCAGCTCCAGCTCCAGAACTCCAGCCCAGAACCA
GCTGAACAACCAAAACCAGCGCCGGCTCCTCAACCAGCTCCCGCACCCAAACCAGAGAAGCCAGCTGA
ACAACCCAAAGCAGAAAAACCAGCTGATCAACAAGCTGAAGAAGACTATGATCGTAGATCAGAAGAAG
AATATAACCGCTTGACCCAACAGCAACCGCCAAAAGCAGAAAAACCAGCTCCTGCATAACTCGA

XhoI

G

PspA1 蛋白质序列

VRAESFVASQSKAEKDYDAAVKNATAAKKAAEDAQRALDEAKAAQKKYDEDQKKTEEKAKEVKKASEE
EQAANLKYQQELVKYIKYTRENNSTKRTAEKVMATAAKKEHENKQTELAQVLAKVTPSAELENTRQKA
EKAKEKEPELTKKLEEAQAKSEBAEKKATEAKQKVDASHAEVVPQAKTAELENEVQKLEKDLKEIDES
DSEDYVKEGLRAPLQSELDKQAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEKNVEDFKNSNGEQAEQYRAAAGE
DLAAKQAELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKFAPAPQFAPAPKPEKPAEQPKAEKFA
DQQAEEEDYDRRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPAFA

[0002]

PspA2 基因序列

CATATGCCTACTTTTGTAAAGAGCAGAAGAATCTCCACAAGTTGTGCGAAAAATCTTCATTAGAGAAGA

NdeI

AATATGAGGAAGCAAAAAGCAAAAAGCTGATACTGCCAAGAAAAGATTACGAAAACGGCTAAAAAGAAAAGCAG
AAGAAGCTCAGAAAAAGTATGAAGATGATCAGAAGAGAACTGAGGAGAAAAGCTCGAAAAAGAAAGCAGAAG
CATCTCAAAAATTGAATGATGTGGCGCTTGTTGTTCAAAAATGCATATAAAGAGTACCGAGAAGTTTCAA
ATCAACGTAGTAAATATAAATCTGACCGCTGAATATCAGAAAAAATTAACAGAGGTGCACTCTAAAATAG
AGAAGGCTAGGAAAAGAGCAACAGGACTTGCAAAAATAAATTTAATGAAGTAAGAGCAGTTGTAGTTCCTG
AACCAAATGCSTTTGGCTGAGACTAAGAAAAAAGCAGGAGAAAGCTAAAGCAGAAAGAAAAAGTAGCTAAGA
GAAAATATGATTATGCAACTCTAAAGGTAGCACTAGCGAAGAAAGAAAGTAGAGGCTAAGGAACTTGAAA
TTGAAAAACTTCAATATGAAAATTTCTACTTTTGGAAACAAGAAGTTGCTACTGCTCAACATCAAGTAGATA
ATTTGAAAAAAGCTTCTTGGCTGGTGGGATCCCTGATGATGGCACAGAAATTATAGAAAGCTAAATTTAAAA
AAGGAGAAGCTGAGCTAAAACGCTAAAACAAGCTGAGTTAGCAAAAAAACAAACAGAACTTGAAAACTTC
TTGACAGCCTTGATCCTGAAGCTAAGACTCAGGATGAATTAGATAAAGAAGCAGAAGAAGCTGAGTTGG
ATAAAAAAGCTGATGAACTTCAAAAATAAAGTTGCTGATTTAGAAAAAGAAATTAGTAACCTTGAAATAT
TACTTGGAGGGCTGATCCTGAAGATGAACTGCTGCTCTTCAAAAATAAATTTAGCTGCTAAAAAAGCTG
AGTTAGCAAAAAAACAAACAGAACTTGAAAAACTTCTTGGACAGCCTTGATCCTGAAAGGTAAGACTCAGG
ATGAATTAGATAAAGAAGCAGAAGAAGCTGAGTTGGATAAAAAAGCTGATGAACTTCAAAAATAAAGTTG
CTGATTTAGAAAAAGAAATTAGTAACCTTGAATATTTACTTGGAGGGGCTGATTTCTGAAGATGATACTG
CTGCTCTTCAAAAATAAATTAGCTACTAAAAAAGCTGAATTT**TAACTCGAG**

XhoI

PspA2 蛋白质序列

PTFVRAEESPOVVEKSSLEKKYEEAKAKADTAKKDYETANKKAEDAQRKYEDDQKRTEEKARKEAESQ
KLNDVALVVQNAYKEYREVQNQRSKYKSDAEYQKKLTEVDSKIEKARKEQQDLQNKFNVRVVVPEPN
ALAETKKKAEEBAKAEKVAKRKYDYATLKVALLAKREVEAKELEIEKLQYEISTLEQEVATAQHQVENLK
KLLAGADPDDGTEVIEAKLKKGEAELNAKQAEI LAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDEL DKEAEEAELDKK
ADELQNKVADLEKEISNLEILLGGADPEDDTAALQNKLAAKKAEI LAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDEL
DKEAEEAELDKKAEDELQNKVADLEKEISNLEILLGGADSEDDTAALQNKLATKKAEL

专利名称(译)	基于磁性分离和量子点标记的人肺炎链球菌快速检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN105277713A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410405100.2	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	CN105277713B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于磁性分离和量子点标记的检测人肺炎链球菌抗原的快速检测方法及试剂盒，其中，该试剂盒由具有富集人肺炎链球菌功能的抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠、量子点标记的抗人肺炎链球菌纳米探针、质控品以及PBST缓冲液所组成；质控品包括阳性质控品以及阴性质控品；阳性质控品由灭活的人肺炎链球菌干燥结合到拭子上而成；阴性质控品是经临床确定为人肺炎链球菌阴性的人群的咽拭子。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链球菌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。

痰培养法	本试剂盒		
	阳性	阴性	总计
阳性	17	1	18
阴性	3	129	132
总计	20	130	150