



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105277713 B

(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 201410405100.2

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2014.08.18

审查员 贾静

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105277713 A

(43)申请公布日 2016.01.27

(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. 一种用于制备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Fam1 PspA、Fam2 PspA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Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白进行生物信息学分析,分别获取人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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0.2 mg/mL后备用;

1.1.2) 兔及鼠抗人肺炎链球菌 Fam1 PspA、Fam2 PspA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Braford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1 mg/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Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG及鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG;

1.2) 免疫纳米磁珠的包被:

1.2.1) 取5 mg磁珠,用1 mL 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180 nm的羧基磁珠;所述MES缓冲液是质量浓度是2 g/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8-12 mg/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6-10 mg/mL的sulfo-NHS溶液各0.5 mL,以10-40 rpm于旋转混合仪中活化1 hr,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清,用1 mL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 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的由步骤1.1)所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG溶液各1 mI,室温下以15 rpm于旋转混合仪中反应2-6 h,置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后,各加入1 mI含1 mg/mI乙醇胺的上述PBS缓冲液,室温下以15 rpm于旋转混合仪中反应2 h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:8 g/L NaCl,0.2 g/L KCl,0.24 g/L KH_2PO_4 ,1.44 g/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1 mI洗涤缓冲液洗涤三遍;所述洗涤缓冲液中各成分含量如下:8 g/L NaCl,0.2 g/L KCl,0.24 g/L KH_2PO_4 ,1.44 g/L Na_2HPO_4 ,0.5 mI/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1 mI 保存缓冲液重悬磁珠,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;至此制得抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白免疫纳米磁珠;所述保存缓冲液中各成分含量如下:8 g/L NaCl,0.2 g/L KCl,0.24 g/L KH_2PO_4 ,1.44 g/L Na_2HPO_4 ,0.3 g/L NaN_3 ,5 g/L 牛血清白蛋白,所述保存缓冲液的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)所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG制得抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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4 nmoI 羧基水溶性量子点、600 nmoI N-羟基琥珀酰亚胺suIf_o-NHS以及600 nmoI 碳二亚胺EDC,以磷酸盐缓冲液定容为5 mI,混合溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min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:2.9 g/L磷酸氢二钠,0.295 g/L磷酸二氢钠,4 g/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8-16 nmoI的步骤1.1)中所制备的鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG,避光反应2 h,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1 h;

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 50000 MW超滤离心管中,以8000 g离心力在4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心15 min,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2 mI磷酸盐洗涤液中,再将此溶液转移到一个新的 50000 MW超滤离心管中,以8000 g离心力在4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心15 min,收集超滤离心管滤膜上层量子点-抗体偶联物溶液,溶于1 mI磷酸盐保存液中,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白纳米探针;所述磷酸盐洗涤液中各成分含量如下:2.9 g/L磷酸氢二钠,0.295 g/L磷酸二氢钠,4 g/L氯化钠,5 mI/L 吐温-20,0.3 g/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:2.9 g/L磷酸氢二钠,0.295 g/L磷酸二氢钠,2 g/L氯化钠,10 g/L 牛血清白蛋白,0.3 g/L 叠氮钠;所述磷酸盐保存液的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Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG制得量子点标记的抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.24 KH₂PO₄, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.3 g NaN₃, 0.5 ml Tween-20 溶解于800 ml蒸馏水中, 用5 M NaOH调整pH至7.4, 再定容至1000 ml;

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。

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10 mg/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8 mg/ml的sulfo-NHS溶液各0.5 ml, 以15 rpm于旋转混合仪中活化1 hr, 置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清, 用1 ml 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 μg/ml的由步骤1.1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG溶液各1 ml, 室温下以15 rpm于旋转混合仪中反应3 h, 置于纳米磁分离器中进行磁分离后移除上清后, 各加入1 ml 含1 mg/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12 nmoI的步骤1.1) 中所制备的鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白多克隆抗体IgG, 避光反应2 h。

3. 根据权利要求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180 nm的羧基磁珠。

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:CIade1, CIade2, CIade3, CIade4, CIade5, CIade6。其中CIade1, CIade2属于Fam1家族; CIade3, CIade4, CIade5属于Fam2家族, CIade6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Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白多克隆抗体的制备;

[0016] 2) 鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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Fam1 PspA、Fam2 PspA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Fam1 PspA蛋白免疫纳米磁珠及抗人肺炎链球菌Fam2 PspA蛋白免疫纳米磁珠,将抗人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白免疫纳米磁珠及抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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Fam1 PspA、Fam2 PspA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Fam1 PspA蛋白纳米探针以及量子点标记的人肺炎链球菌Fam2 PspA蛋白纳米探针,将量子点标记的人肺炎链球菌Fam1 PspA蛋白纳米探针以及量子点标记的人肺炎链球菌Fam2 PspA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。

[0021] 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。

[0022] 一种用于制备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:

[0023] 1) 抗人肺炎链球菌免疫纳米磁珠的制备:

[0024] 1.1) 兔及鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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) 对人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白进行生物信息学分析,分别获取人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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) 兔及鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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B 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Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG及鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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/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6-10mg/mI的suIfo-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;

[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/mI的由步骤1.1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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;

[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;

[0039] 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 $^{\circ}$ C保存备用;至此制得抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG制得抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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4nmI羧基水溶性量子点、600nmI N-羟基琥珀酰亚胺suIfo-NHS以及600nmI碳二亚胺EDC,以磷酸盐缓冲液定容为5mI,混合溶液,37 $^{\circ}$ C反应30min后,透析去除过量的作为活化剂的suIfo-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Fam1 PspA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0.2μm 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;

[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, 至此制得量子点标记的抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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, 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;

[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Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG制得量子点标记的抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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, 0.5mI Tween-20溶解于800mI蒸馏水中, 用5M NaOH调整pH至7.4, 再定容至1000mI;

[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/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8mg/mI的suIfon-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;

[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100μg/mI的由步骤1.1) 所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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;

[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Fam1 PspA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0.5mI PBST缓冲液溶解后将溶解液转入1.5mI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 ,0.5mI/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 μI ,室温下以10rpm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1mI洗涤两遍,采用纳米磁分离器磁分离后吸出洗涤液,最后用1mI 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 μI 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 μI 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缓冲液液清洗2遍,复合物重新分散在100 μI 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 μI ,室温下以10rpm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 μI 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 μI 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Fam1 PspA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Fam2 PspA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Fam1 PspA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Fam2 PspA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 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。

[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Fam1 PspA、Fam2 PspA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Fam1 PspA、Fam2 PspA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Fam1 PspA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Fam2 PspA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.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。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 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1mM IPTG至终浓度为1mM,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 KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄pH=7.4)洗涤3次并分别用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 Na₃PO₄,0.5M 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Fam1 PspA、Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG的制备

[0102] 1. 兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA、Fam2 PspA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 μ g (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 μ g (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 $^{\circ}$ C保藏备用,至此制得兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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Fam2 PspA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Fam1 PspA、Fam2 PspA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 μ g/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,-20 $^{\circ}$ C保藏备用,至此制得鼠抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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Fam2 PspA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。

[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Fam1 PspA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Fam1 PspA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人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Fam1 PspA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Fam1 PspA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Fam1 PspA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Fam1 PspA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Fam1 PspA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Fam2 PspA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Fam1 PspA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1.5mI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/mI的EDC溶液及用上述MES缓冲液配制的浓度为8mg/mI的sulfo-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200 μ L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 μ g/mI的实施例1所制备的兔抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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/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。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 KH_2PO_4 ,1.44g/L Na_2HPO_4 ,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 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 $^{\circ}C$ 保存备用,至此制得抗人肺炎链球菌Fam1 PspA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Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG制得抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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Fam1 PspA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Fam1 PspA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-NH₂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-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。

[0131] 纳米羧基量子点标记鼠抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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Fam1 PspA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(suIf_o-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suIf_o-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Fam1 PspA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Fam1 PspA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Fam2 PspA蛋白多克隆抗体IgG制得量子点标记的抗人肺炎链球菌Fam2 PspA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Fam1 PspA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20μL、40μL、60μL、80μL、100μL、120μL、140μL、160μL、200μL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160μL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160μL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Fam2 PspA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Fam2 PspA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,0.24KH₂PO₄,1.44g 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。

[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(0.5μg)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 KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,0.5ml/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160μl,室温下以10rpm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100μl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100μl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100μl PBS缓冲液中,使用荧光酶标仪(Ex=405nm,Em=585nm)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Fam1 PspA及Fam2 PspA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

	本试剂盒			总计
	痰培养法	阳性	阴性	
[0158] 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*

AGCAGTGAAAAATGCTACAGCTGCAAAAAAGCAGCAGAAAGACGCTCAAAGAGCTTTAGATGAAGCAA
 AAGCTGCGCAGAAAAATATGACGAGGATCAAAAGAAAAGCTGAGGAGAAAGCGAAAGAAGTAAAAAA
 AGCTTCGGAAGAAGAACAAGCTGCAAATCTGAAATATCAACAAGAGTTGGTTAAATATATTAATATA
 CACGTGAAAATAATTCAACAAAAGAAGCTGAAGCTGAGAAAGTAATGACTGCAGCTAAGAAAGAGCAT
 GAGAAAAACAAACAGAAC TTGCTAAAGTTCTCGCAAAGGTAATTCCTAGCGCGGAAGAATTAGAAAA
 TACTAGACAAAAAGCAGAGAAAGCTAAAGAAAAAGAACCAGAGCTTACTAAAAAACTAGAAGAAGCTA
 AAGCAAAATCAGAAGAAGCTGAGAAAAAGCTACTGAAGCCAAACAAAAGTGGATGCAGAACATGCT
 GAAGAAGTCGTTCTCAAGCTAAAATCGCTGAGTTGGAAAATGAAGTTCAGAACTAGAAAAAGATCT
 CAAAGAGATTGATGAATCTGACTCAGAAGATTATGTTAAAGAAGGTCTCCGTGCTCCTCTTCAATCTG
 AATTGGATGCCAAACAAGCTAAACTATCAAACTTGAAGAGTTGAGTGATAAGATTGATGAGTTAGAC
 GCTGAAATTGCAAACTTGAAAAAATGTAGAAGATTTCAAAAAGCTCAAACGGTGAGCAAGCTGAACA
 ATACCGTGCTGCAGCTGGAGAAGACTTAGCTGCTAAACAAGCTGAATTAGAAAAAACTGAAGCTGACC
 TTAAGAAAGCAGTTAATGAGCCAGAAAAACCAGCTCCAGCTCCAGAACTCCAGCCCAGAAAGCACCA
 GCTGAACAACCAAAACCAGCGCCGGCTCCTCAACCAGCTCCCGCACCCAAACCAGAGAAGCCAGCTGA
 ACAACCCAAAGCAGAAAAACCAGCTGATCAACAAGCTGAAGAAGACTATGATCGTAGATCAGAAGAAG
 AATATAACCGCTTGACCCAACAGCAACCGCCAAAAGCAGAAAAACCAGCTCCTGCATAACTCGA

*XhoI*G*PspA1* 蛋白质序列

VRAEESPVASQSKAEKDYDAAVKNATAAKKAAEDAQRALDEAKAAQKKYDEDQKKTEEKAKEVKKASEE
 EQAANLKYQQELVKYIKYTRENNSTKRTEAEKVMTAAKKEHEKKQTELAQVLAKVIPSAEELNTRQKA
 EKAKEKEPELTKKLEEKAKSEEAEEKATEAKQKVDAEHAEVVPQAKIAELENEVQKLEKDLKEIDES
 DSEDYVKEGLRAPLQSELDKQAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEKNVEDFKNSNGEQAEQYRAAAGE
 DLAAKQAELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQAPAPAPKPEKPAEQPKAEKPA
 DQQAEEDYDRRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPAPA

[0002]

PspA2 基因序列

CATATGCCTACTTTTGTAAGAGCAGAAGAATCTCCACAAGTTGTCGAAAAATCTTCATTAGAGAAGA
NdeI

AATATGAGGAAGCAAAAGCAAAAGCTGATACTGCCAAGAAAAGATTACGAAACGGCTAAAAAGAAAGCAG
 AAGACGCTCAGAAAAAGTATGAAGATGATCAGAAGAGAACTGAGGAGAAAGCTCGAAAAGAAGCAGAAG
 CATCTCAAAAATTGAATGATGTGGCGCTTGTGTTCAAAAATGCATATAAAGAGTACCGAGAAGTTCAAA
 ATCAACGTAGTAAATATAAATCTGACGCTGAATATCAGAAAAAATTAACAGAGGTCGACTCTAAAATAG
 AGAAGGCTAGGAAAGAGCAACAGGACTTGCAAAAATAAATTTAATGAAGTAAGAGCAGTTGTAGTTCCTG
 AACCAAATGCGTTGGCTGAGACTAAGAAAAAAGCAGAAAGCTAAAGCAGAAGAAAAAGTAGCTAAGA
 GAAAAATATGATTATGCAACTCTAAAGGTAGCACTAGCGAAGAAAGAGTAGAGGCTAAGGAACTTGAAA
 TTGAAAAACTTCAATATGAAATTTCTACTTTGGAACAAGAAGTTGCTACTGCTCAACATCAAGTAGATA
 ATTTGAAAAAAGCTTCTTGCTGGTGCGGATCCTGATGATGGCACAGAAGTTATAGAAGCTAAATTAAGAA
 AAGGAGAAGCTGAGCTAAACGCTAAACAAGCTGAGTTAGCAAAAAAACAAACAGAAGCTTGAAAAAGCTC
 TTGACAGCCTTGATCCTGAAGGTAAGACTCAGGATGAATTAGATAAAGAAGCAGAAGAAGCTGAGTTGG
 ATAAAAAAGCTGATGAAGTTCAAAAATAAAGTTGCTGATTTAGAAAAAGAAATTAGTAACCTTGAAATAT
 TACTTGGAGGGGCTGATCCTGAAGATGATACTGCTGCTCTTCAAAAATAAATTAGCTGCTAAAAAAGCTG
 AGTTAGCAAAAAAACAAACAGAAGCTTGAAAAAGCTTCTTGACAGCCTTGATCCTGAAGGTAAGACTCAGG
 ATGAATTAGATAAAGAAGCAGAAGAAGCTGAGTTGGATAAAAAAGCTGATGAAGCTTCAAAAATAAAGTTG
 CTGATTTAGAAAAAGAAATTAGTAACCTTGAAATATTACTTGGAGGGGCTGATTTCTGAAGATGATACTG
 CTGCTCTTCAAAAATAAATTAGCTACTAAAAAAGCTGAATTG**TAAGCTCGAG**

*XhoI***PspA2 蛋白质序列**

PTFVRAEESPOVVEKSSLEKKYEEAKAKADTAKKDYETAKKKAEDAQKKYEDDQKRTEEKARKEAEASQ
 KLNDVALVVQNAYKEYREVQNQRSKYKSDAEYQKKLTEVDSKIEKARKEQQDLQNKFNVRVAVVPEPN
 ALAETKKKAEEAKAEKVAKRKYDYATLKVALAKKEVEAKELEIEKLYEISTLEQEVATAQHQVDNLK
 KLLAGADPDDGTEVIEAKLKKGEAELNAKQAEELAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDELKEAEAEELDKK
 ADELQNKVADLEKEISNLEILLGGADPEDDTAALQNKLAAKKAEELAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDEL
 DKEAEAEELDKKADELQNKVADLEKEISNLEILLGGADSEDDTAALQNKLATKKAEL

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	CN105277713B	公开(公告)日	2017-03-22
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		
[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		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN105277713A		
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		总计
	阳性	阴性	
阳性	17	1	18
阴性	3	129	132
总计	20	130	150