



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103499685 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 08

(21) 申请号 201310481151. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 15

G01N 33/53 (2006. 01)

(71) 申请人 牛远杰

G01N 33/532 (2006. 01)

地址 300211 天津市河西区平江道 23 号

G01N 33/577 (2006. 01)

申请人 陈家童

G01N 21/64 (2006. 01)

蒋宁

尚芝群

喻其林

刘越

(72) 发明人 牛远杰 陈家童 蒋宁 尚芝群

喻其林 刘越

(74) 专利代理机构 天津市宗欣专利商标代理有限公司 12103

代理人 董光仁

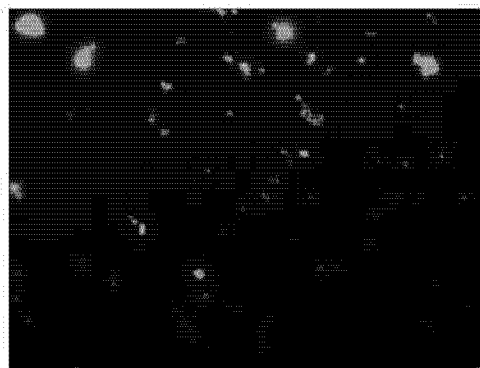
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法,属于带有荧光标记的免疫化学试剂。其是以泌尿系统感染的致病原菌株,制备单克隆抗体或多克隆抗体,然后将抗体与荧光纳米量子点材料经酰胺脱水缩合,连接为荧光纳米量子点抗体复合物,可直接用于对载体材料上已包被了未知抗原如待测患者标本样品检测,或预先包被在载体材料上对抗原检测,这样设计的本发明,具有对不同病原菌感染泌尿系统疾病检测特异性强、性质稳定;操作使用便捷,检测快速、准确、检测时间短等特点。有效的指导临床医生准确用药,减少抗生素滥用,降低患者的诊断检测及治疗费用。从而产生良好的经济效益和社会效益。



1. 一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂,其特征在于:以引发人泌尿系统感染的致病菌为抗原,制备单克隆抗体或多克隆抗体,该抗体与粒径 0.1- 1.0 微米的荧光纳米量子点材料经缩合连接为荧光纳米量子点抗体复合物,直接用于对未知抗原的检测,或包被在载体材料上,荧光纳米量子点材料激发光波长为 200nm - 700nm。

2. 根据权利要求 1 所述人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂,其特征在于:所述的载体材料是高分子材料制备的微孔滤膜材,或片材,或棒材;或 PVC 材料制备的 24 孔板,或 96 孔板,或平皿,或反应碟。

3. 根据权利要求 2 所述人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂,其特征在于:所述高分子材料制备的微孔滤膜材孔径 0.22 - 0.45 微米。

4. 如权利要求 1 所述一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的制备方法,其特征在于:

①. 制备抗体

取人泌尿系统感染患者病样标本,分离病原菌抗原标准株,确定其菌属性;

扩大病原菌的培养,制备可溶性抗原;并以该抗原为致敏源,免疫动物,制备特异性多克隆抗体,或利用体外培养细胞融合技术制备特异性单克隆抗体;

②荧光纳米量子点材料和抗体的酰胺脱水缩合

a. 将粒径 0.1- 1.0 微米的荧光纳米量子点材料 1mg 溶于无离子水 500ul 内,制成荧光纳米量子点溶液;

b. 另将 1mg EDC /1ml 无离子水浓度的 EDC 溶液 200ul 与上述荧光纳米量子点溶液混合后,于 4℃摇床反应 15-20 分钟,再加入 0.5mg NHS/1ml 无离子水浓度的 NHS 溶液 200ul 反应 30 分钟;

c. 然后按 1mg/ml 的浓度加入纯化后的上述①抗体 100-150ul 反应,置于 4℃摇床过夜,即得到酰胺脱水缩合后的荧光纳米量子点抗体复合物溶液,直接用于对未知抗原的检测,或包被于载体材料。

5. 根据权利要求 4 所述人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的制备方法,其特征在于:荧光纳米量子点材料是非金属量子点荧光材料,或金属量子点荧光材料,或贵金属纳米团簇荧光材料,荧光纳米量子点的粒径:0.1- 1.0 微米。

6. 根据权利要求 4 所述人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的制备方法,其特征在于:荧光纳米量子点材料的激发光波长为 200nm - 700nm 波长范围内的自发荧光物质或人工合成的荧光物质。

7. 根据权利要求 4 所述人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的制备方法,其特征在于:荧光纳米量子点材料的荧光发光色为蓝色,或绿色,或橙色,或红色。

8. 根据权利要求 4 所述人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的制备方法,其特征在于:所述的病原菌是细菌、真菌、霉菌中的任意一种。

9. 一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的应用方法,其特征在于:

a. 过滤包被:用 2ml 注射器吸取 1ml 待测尿液样品,经直径 1cm 且内置 0.22 微米滤膜的组装式滤器过滤,取出滤膜,置载玻片上,风干 30 分钟,使菌体固定在膜片上;

b. 在膜片上滴加 200ul 荧光纳米量子点抗体复合物溶液,37℃,孵育 1h;

- c. 洗涤 :每次用 2ml PBS 洗涤,洗 3 次,洗去未结合多抗抗体 ;
- d. 观察 :将膜片置于荧光显微镜下,或荧光检测仪,或激发不同波长的便携式激发光源仪器,如紫外显示器,以相关波长观察荧光发光的留存结果。

人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及带有荧光标记的免疫化学试剂。具体是人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法。

背景技术

[0002] 泌尿系感染是由致病原,包括致病细菌、霉菌、真菌、病毒、病原虫等,而以致病菌感染为主要感染源。可引发肾盂肾炎、膀胱炎、尿道炎等病的总称。近年来,随着环境条件、免疫抑制剂使用、激素及介入技术等医疗手段的广泛应用,导致泌尿系感染的发病率日益上升,据报道,泌尿系感染发病率仅次于呼吸道感染。病原菌常由于患者免疫功能下降而侵入泌尿系统引起原发和继发性尿路感染。其典型的临床表现为发热,尿频、尿急、尿痛、排尿困难等膀胱刺激症状和耻骨上压痛等,严重者可发生菌血症和急、慢性肾功能不全甚至威胁患者生命。所以一旦病人发生了泌尿系感染,就有必要尽可能快速和准确地确定该致病菌的种类、性质和药敏检测结果,以便临床医师选择最有效的治疗方案进行治疗。

[0003] 病原微生物检测技术诞生已愈百年,但至今临床上的主流检测方法仍是基于细菌培养的菌种鉴定,这种传统方法虽具有灵敏度好,准确度高的优点,但是缺点也很明显,就是存在方法步骤多,检测所需时间长等问题。一般的大肠杆菌培养结果需要3天时间才能有明确的结果。但是临床上有很多感染患者迫切者需要快速、明确其致病菌的种类,以便临床医师尽快地选用敏感的抗生素进行对症治疗。尤其是那些因某些较为罕见的高耐药性病原菌所引发的凶险感染,正是由于无法迅速的明确致病菌,从而导致医师仅能使用一些广谱的抗生素进行治疗,这种疗效往往不尽如人意。所以,研制致病原快速、高效、准确的检测方法,具有广泛的重要意义。

[0004] 近些年以来,由于生命科学的迅猛发展,各种各样的检测方法层出不穷。如基因探针检测法,聚合酶链反应法,电阻电导检测法,微量热法,免疫磁性微球法等一系列理化和免疫学方法。但是,在实际检测中也还存在着不少问题使这些方法都未得到临床的大规模应用,主要问题有:操作复杂、对仪器要求高、测试时间相对较长、费用较高等等。因此,开发新型的快速、高效、准确的检测方法的意义就不言而喻了。

发明内容

[0005] 本发明就是为了解决现有技术中,操作复杂、对仪器要求高、测试时间相对较长、费用较高等问题,而提供一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法。

[0006] 一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂,其是以引发人泌尿系统感染的致病菌为抗原,制备单克隆抗体或多克隆抗体,该抗体与粒径0.1-1.0微米的荧光纳米材料经缩合连接连接为荧光纳米量子点抗体复合物,直接用于对未知抗原的检测,

或包被在载体材料上,荧光纳米量子点材料激发光波长为 200nm - 700nm。

[0007] 一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的制备方法,其步骤为:

①. 制备抗体

取人泌尿系统感染患者病样标本,分离病原菌抗原标准株,确定其菌属性;

扩大病原菌的培养,制备可溶性抗原;并以该抗原为致敏源,免疫动物,制备特异性多克隆抗体,或利用体外培养细胞融合技术制备特异性单克隆抗体;

②荧光纳米材料和抗体的酰胺脱水缩合

a. 将粒径 0.1- 1.0 微米的荧光纳米量子点材料 1mg 溶于无离子水 500ul 内,制成荧光纳米量子点溶液;

b. 另将 1-3- 二甲氨基丙基 -3- 乙基碳二亚胺(EDC) 与无离子水按 1mg/1ml 浓度比的溶液 200ul 与上述荧光纳米量子点溶液混合后,于 4℃ 摇床反应 15-20 分钟,再加入 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS) 与 0.5mg NHS/1ml 无离子水浓度比的溶液 200ul 反应 30 分钟;

c. 然后按 1mg/ml 的浓度比加入纯化后的上述抗体 100-150ul 反应,置于 4℃ 摇床过夜,即得到酰胺脱水缩合后的荧光纳米量子点抗体复合物溶液,直接用于对未知抗原的检测,或包被于载体材料。

[0008] 一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂的应用方法,

a. 过滤包被:用 2ml 注射器吸取 1ml 待测尿液样品,经直径 1cm 且内置 0.22 微米滤膜的组装式滤器过滤,取出滤膜,置载玻片上,风干 30 分钟,使菌体固定在膜片上;

b. 在膜片上滴加 200ul 荧光纳米量子点抗体复合物溶液,37℃,孵育 1h;

c. 洗涤:每次用 2ml PBS 洗涤,洗 3 次,洗去未结合多抗体;

d. 观察:将膜片置于荧光显微镜下,或荧光检测仪,或激发不同波长的便携式激发光源仪器,如紫外显示器,以相关波长观察荧光发光的留存结果。

[0009] 这样设计的本发明,具有对不同病原菌感染泌尿系统疾病检测特异性强、性质稳定;操作使用便捷,检测快速、准确、检测时间短等特点。有效的指导临床医生准确用药,减少抗生素滥用,降低患者的诊断检测及治疗费用。从而产生良好的经济效益和社会效益。

附图说明

[0010] 图 1 是假生殖道棒杆菌菌株 16S rDNA 的系统发育树示意图;

图 2 是临床标本假生殖道棒杆菌免疫荧光诊断检测图;

图 3 是金黄葡萄球菌菌株 16S rDNA 的系统发育树示意图;

图 4 是临床标本金黄葡萄球菌免疫荧光诊断检测图。

具体实施方式

[0011] 下面结合附图及实施例对本发明进行详细的说明。

[0012] 实施例一:假生殖道棒杆菌免疫荧光诊断试剂的制备

1)菌株分离:为检验科经泌尿系感染患者尿液中采集病原菌标本。经细菌血培养基平板划线培养 24h 获得标准菌株。经检验科细菌检测仪检测初步证实为致病菌株。(原初始检测为大肠杆菌)

2) 菌株鉴定:形态学及生理生化指标鉴定,主要测定项目包括:细胞形态,芽孢,革兰氏染色,触酶,运动性, M. R., 脲酶, 丙二酸利用, 碳源利用(木糖, 蔗糖, 甘露醇, 山梨醇, 海藻糖), 葡萄糖产酸产气等。测定结果见表 1:

表 1 假生殖道棒杆菌菌株的形态学及生理生化特征

性质	待检测菌	大肠杆菌	假生殖道棒杆菌
细胞形状	杆状, 尖头	杆状	杆状, 尖头, V 行
孢子	-	-	-
革兰氏染色	+/-	-	+
活动性	-	+	-
过氧化氢酶	+	+	+
尿素酶实验	-	-	-
M. R. test	+	+	+
丙二酸实验	+	-	+
碳实验	木糖	+	+
	蔗糖	+	+
	海藻糖	+	+
	D-甘露醇糖	+	+
	D-山梨糖醇	+	+
葡萄糖产酸	+	+	+
葡萄糖产气	-	+	-

3) 菌株分子生物学鉴定:

采用 Protease K 裂解-氯仿异戊醇抽提法, 提取菌株的基因组; 采用细菌 16S rDNA 通用扩增引物 16SF (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

及 16SR (5' -TACGGTTACCTGTACACTT-3'), 从菌株基因组上扩增 16S rDNA 序列。将所扩增序列克隆至 pMD19-T simple vector (Takara), PCR 检测转化子。挑取正确转化子, 采用 M13F-47 (5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')

及 M13-48 (5' -GAGCGGATAACAATTTTCACAC AGG-3'), 对插入片段进行双向测序。采用 DNAMAN 软件对双向序列进行拼接, 得到菌株的 16S rDNA 序列。通过 NCBI 在线 BLAST 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 对菌株的 16S rDNA 进行 BLASTN 分析。采用 Clustal 1.8 软件及 MAGA 2 软件, 通过 N-J 算法构建菌株的系统发育树。

[0013] 通过 NCBI 在线 BLASTN 软件对菌株的 16S rDNA 序列进行分析, 发现其与假生殖道棒杆菌 (*Corynebacterium pseudogenitalium*) 菌株 CIP106714 的 16S rDNA 具有极高的序列相似性, 相似度达到 99% 以上。结合菌株的 16S rDNA 序列与形态学及生理生化特征, 确定菌株为假生殖道棒杆菌 (*Corynebacterium pseudogenitalium*)。

[0014] 采用 N-J 算法构建假生殖道棒杆菌菌株 16S rDNA 的系统发育树, 结果见图 1。

[0015] 4) 抗原制备:

4.1. 将平皿内培养成的细菌菌落用生理盐水或 PBS 缓冲液洗脱下来, 平均每盘皿可洗脱 1.5ml 菌悬液。

[0016] 4.2. 加入菌悬液 0.4% 体积的福尔马林溶液, 60 度水浴 1 小时灭活

4.3. 将灭活全菌体抗原, 使用超声波细胞破碎仪使细胞壁破碎, 抗原位点充分暴露,

作为破碎全菌体抗原,破碎时在冰浴中进行,破碎 3min,强度 70%,采用破碎 5s,暂停 5s,来防止温度过高以及大量泡沫的产生。

[0017] 4.4. 得到的破碎菌体抗原 4℃、12000 转 / 分 离心,取上清得到可溶性菌体抗原, -20℃ 保存,得到的可溶性抗原浓度为 :假生殖道棒杆菌抗原 2.6mg/ml 。

[0018] 5) 动物免疫和抗体制备

5.1. 动物选择 :

选用新西兰大耳白兔作为抗原免疫动物,使用 1.5 公斤左右的健壮、无感染性疾病的新西兰种大耳白兔。免疫前,抽取每只兔的耳缘静脉血 10ml,4℃ 冰箱过夜,吸取血清,无菌离心 4℃、10000 转 / 分,15 分钟。得正常兔血清作为阴性对照血清。

[0019] 5.2. 抗原乳剂制备 :

将制备的可溶性抗原液 1.0ml 吸入一支 2ml 无菌注射器中,取另一只 2ml 注射器吸取 1.0ml 的完全弗氏佐剂(或弗式不完全佐剂),两支注射器以无菌软管连接并反复对抽 10min,直到充分乳化后,滴一滴到冷水中不扩散,即为达到油包水的完全乳化程度,用于免疫。

[0020] 5.3. 动物免疫 :

采用多点法注射于兔子背部、腋下、腹股沟及颈部皮下。每周免疫一次,抗原剂量相同,并以福氏佐剂乳化,乳化方法同前。

[0021] 动物免疫日历 :

Day1 :第一次免疫 可溶性抗原 + 完全弗氏佐剂 ;

Day8 :第二次免疫 可溶性抗原 + 不完全弗氏佐剂 ;

Day15 :第三次免疫 可溶性抗原 + 不完全弗氏佐剂 ;耳静脉取血测抗体效价。

[0022] Day22 :第四次免疫 可溶性抗原 + 不完全弗氏佐剂 ;耳静脉取血测抗体效价。

[0023] Day29 :第五次免疫 可溶性抗原 + 不完全弗氏佐剂 ;耳静脉取血测抗体效价。

[0024] Day31 :加强免疫 可溶性抗原 + 完全弗氏佐剂 ;耳静脉取血测抗体效价。

[0025] Day37 :二次加强免疫 耳静脉注射可溶性抗原 1mg / ml,1ml / 只 ;二次加强免疫后 72 小时,杀兔取血,分离血清。

[0026] 5.4. 抗血清分离及保存 :

将收集免疫全血的离心管 4℃ 冰箱过夜。吸取血清,无菌 4℃、10000 转 / 分钟离心 20 分钟,得到无菌抗血清,最终得抗血清 16ml,ELISA 法测定其效价后,用 1.5ml 离心管分装,保存于 -20℃ 冰箱内备用。

[0027] 5.5. 血清抗体效价测定 :

自动物第三次免疫开始从耳静脉取血,分离血清,进行血清特异性抗体效价测定。采用酶联免疫吸附测定(ELISA 法)进行抗体效价测定,确定抗体效价滴度。以动物免疫前所取正常血清为阴性对照。加强免疫后抗体效价已达 1 :50000。

[0028] 5.6. 抗体纯化 :

将免疫、取血,得到的分离抗血清,通过原可溶性抗原进行抗血清亲和纯化。获得假生殖道棒杆菌特异性抗体(0.35mg/ml) 4.5 ml。

[0029] 6) 假生殖道棒杆菌免疫荧光诊断试剂的制备 :

6.1. 荧光纳米材料的制备 :

非金属量子点荧光材料 ;选用碳元素为合成母体,碳元素以其无毒无害,成本低廉,可

作为常见的非金属量子点原料。收集燃烧的蜡烛产生的炭黑,称取 0.1~1 g 炭黑到 50 mL 烧杯中,加入 1~10 mL 丙酮,超声清洗 5 min,重复两次,净化炭黑,置于室温下干燥。

[0030] 将干燥好的炭黑研细,移入三口瓶,加 100 mL、1~10 mol/L HNO_3 ,加热搅拌回流 72 h。反应完成后,将三口瓶中溶液转移到透析袋中,夹好,放入盛有蒸馏水的大烧杯中,至 HNO_3 洗净,收集,备用。

[0031] 称取制备好的纯净碳量子点 0.1~1 g, PEI 1~10 g,放入 50 mL 烧杯中,加入 1~50 mL 蒸馏水,超声溶解 5 min 后,将溶液转至三口瓶中,加热回流 1~6 h。将反应液转移出,透析纯化 72 h,冷冻干燥,收集功能化碳纳米量子点。

[0032] 材料特点:可激发 450~560 nm 的蓝光到绿光。量子点的粒径:0.1~1.0 微米。

[0033] 6.2. 荧光纳米量子点(FNP)材料和抗体的酰胺脱水缩合:

先将 1mg 荧光纳米量子点材料溶于 500uL 无离子水内,将 200mg 的 EDC (1-3-二甲氨基丙基-3-乙基碳二亚胺)溶于 200uL 无离子水内,再称量 100mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)溶于 200uL 无离子水内。将 EDC 溶液与荧光纳米量子点材料溶液混合后,于 4℃ 摇床反应 15~20 分钟,再加入 NHS 溶液反应 30 分钟,加入 100uL 1mg/mL 浓度的经纯化后的抗假生殖道棒杆菌抗体,将此 1mL 的反应体系置于 4℃ 摇床过夜,即得到酰胺脱水缩合后的荧光纳米量子点(FNP)抗体复合物溶液。

[0034] 本反应体系适用于各类动物抗体与荧光纳米量子点的缩合反应。

EDC 通过与羧基反应形成 O-酰基异硫脲中间体,然而,该中间体在水溶液中很不稳定,并易于水解。O-酰基异硫脲中间体在 NHS 存在的情况下,可以转变为氨基反应活性的 NHS-活性酯,这种 NHS-活性酯中间体非常稳定。

[0035] 7) 假生殖道棒杆菌荧光免疫诊断试剂的应用

7.1. 过滤包被:用 2mL 注射器吸取 1mL 待测尿液样品,经直径 1cm 组装式滤器(内装有 0.22 微米滤膜一片)过滤。取出滤膜,置载玻片上,风干 30 分钟。使菌体固定在膜片上。组装式滤器内置等径的 0.22 微米滤膜,可经乳胶管与注射器连通。

[0036] 7.2. 加荧光抗体试剂:在膜片上滴加 200uL 荧光诊断试剂(FNP-抗体),37℃,孵育 1h。

[0037] 7.3. 洗涤:每次用 2mL PBS 洗涤,洗 3 次,洗去未结合多抗体。

[0038] 7.4. 观察:将膜片置于荧光显微镜下以相关波长观察荧光发光的留存结果。如图 2 所示(本测试以蓝光激发,发绿色荧光)。也可应用荧光检测仪,以及可激发不同波长的便携式激发光源仪器,如紫外显示器等。

[0039] 7.5. 结论:结果证实样品为阳性。(患者为假生殖道棒杆菌感染)

8) 临床检测结果见表 3:

实施例二:金黄葡萄球菌免疫荧光诊断试剂的制备

1) 菌株分离:为检验科经泌尿系感染患者尿液中采集病原菌标本。经细菌血培养基平板划线培养 24h 获得标准菌株。经检验科细菌检测仪检测初步证实为致病菌株。(金黄葡萄球菌)

2) 菌株鉴定:形态学及生理生化指标鉴定,主要测定项目包括:细胞形态,芽孢,革兰氏染色,触酶,运动性,MR,脲酶,丙二酸利用,碳源利用(木糖,蔗糖,甘露醇,山梨醇,海藻糖),葡萄糖产酸产气等。测定结果见表 2:

表 2：金黄葡萄球菌菌株的形态学及生理生化特征

性质		待检测菌	金黄葡萄球菌
细胞形状		球状，集群	球状，集群
孢子		—	—
革兰氏染色		+	+
活动性		—	—
过氧化氢酶		+	+
尿素酶实验		+	+
M. R. test		+	+
丙二酸实验		+	+
碳实验	木糖	—	—
	蔗糖	—	—
	海藻糖	—	—
	D-甘露醇糖	—	—
	D-山梨糖醇	—	—
葡萄糖产酸		—	—
葡萄糖产气		—	—

3) 金黄葡萄球菌菌株分子生物学鉴定：

3.1. 金黄葡萄球菌菌株 16S rDNA 克隆：

采用细菌 16S rDNA 通用扩增引物 16SF 及 16SR, 以 STA01 菌株基因组为模板, 扩增 STA01 的 16S rDNA 序列, 同样得到约为 1.6 kb 的条带。将该片段与 pMD19-T simple vector 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。采用 M13F-47 及 M13-48 对转化子进行 PCR 检测, 预期可扩增得到约 1.6 kb 条带。各转化子的 PCR 检测结果符合预期。

[0040] 3.2. 金黄葡萄球菌菌株 16S rDNA 测序：

采用测序引物 M13F-47 及 M13-48 对正确转化子进行双向测序。采用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接, 获得金黄葡萄球菌菌株 16S rDNA 测序结果。

[0041] 3.3. 金黄葡萄球菌菌株系统发育树的构建：

通过 NCBI 在线 BLASTN 软件对金黄葡萄球菌菌株的 16S rDNA 序列进行分析, 发现其与金黄色葡萄球菌菌株 JH1 的 16S rDNA 具有极高的序列相似性, 相似度达到 99% 以上。结合金黄葡萄球菌的 16S rDNA 序列与形态学及生理生化特征, 确定菌株为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

[0042] 采用 N-J 算法构建金黄葡萄球菌 16S rDNA 的系统发育树, 结果见图 3：

4) 方法与实例 1: 中 4) 相同。

[0043] 5) 方法与实例 1: 中 5) 相同。

[0044] 6) 金黄葡萄球菌免疫荧光诊断试剂的制备：

6.1. 荧光纳米量子点材料的制备：

金属量子点荧光材料；IIB-VIA 族结构的金属量子点应用较广且材料广泛。

[0045] 实例选用 Na_2S 。称取 0.01~1 mol 的 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, 0.01~1 mol 的 Na_2S 和 0.01~1 mol 的半胱氨酸配成约 300 mL 水溶液, 以 0.1~1 mol L^{-1} NaOH 溶液调节 pH 至 7~11, 通氮气 30~60 分钟除氧气, 100℃回流反应 1~10 小时, 得到荧光纳米量子点母液。用无水乙醇沉淀,

12000 rpm 转速下离心 20 min, 上清液吸出除去, 并洗涤。反复 3 次, 真空干燥 24h。

[0046] 材料特点: 可激发 510 nm 的蓝绿光。量子点的粒径: 0.1-1.0 微米。

[0047] 6.2. 荧光纳米量子点材料和抗体的酰胺脱水缩合:

先将 1mg 荧光量子点材料溶于 500ul 无离子水内, 将 300mg 的 EDC (1-3-二甲氨基丙基-3-乙基碳二亚胺) 溶于 300ul 无离子水内, 再称量 150mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶于 300ul 无离子水内。将 EDC 溶液与荧光纳米材料溶液混合后, 于 4℃ 摇床反应 15-20 分钟, 再加入 NHS 溶液反应 30 分钟, 加入 150ul 1mg/ml 浓度的经纯化后的抗金黄葡萄球菌抗体, 将此 1.7ml 的反应体系置于 4℃ 摇床过夜, 即得到酰胺脱水缩合后的 FNP 抗体复合物溶液。

[0048] 本反应体系适用于各类动物抗体与荧光纳米量子点的缩合反应。

[0049] 7) 金黄葡萄球菌荧光免疫诊断试剂的应用

7.1. 过滤包被: 用 2ml 注射器吸取 1ml 待测尿液样品, 经直径 1cm 组装式滤器 (内装有 0.22 微米滤膜一片) 过滤。取出滤膜, 置载玻片上, 风干 30 分钟。使菌体固定在膜片上。

[0050] 7.2. 加荧光免疫诊断试剂: 在膜片上滴加 200ul 荧光免疫诊断试剂 (FNP-抗体), 37℃, 孵育 1h。

[0051] 7.3. 洗涤: 每次用 1ml PBS 洗涤, 洗 3 次, 洗去未结合多抗体。

[0052] 7.4. 观察: 将膜片置于荧光显微镜下以相关波长观察荧光发光的留存情况如下图 (本样品蓝光激发, 发绿色荧光)。也可应用荧光检测仪, 以及可激发不同波长的便携式激发光源仪器, 如紫外显示器等。

[0053] 7.5. 结论: 结果证实样品为阳性。(患者为假生殖道棒杆菌感染)

8) 临床检测结果见表 3:

此外, 在过滤包被过程中, 对待测尿液样品进行过滤, 可有效将待测样品 (尿液) 中致病菌浓缩, 避免假阴性结果。同时病原体可直接在膜片固定 (相当于抗原包被), 利用制备的特异性免疫荧光诊断试剂进行诊断鉴定。

[0054] 微孔滤膜过滤所使用的过滤装置, 为微型组装式正压滤器; 即采用 2ml 医用注射器, 吸取待测患者尿液标本 1.0ml, 注射器乳头连接组装式滤器, 过滤尿液。滤膜直径与滤器内径相同。在过滤尿液后, 将滤膜取出, 便于病原菌固定 (抗原包被)、抗原-免疫荧光诊断试剂反应、水冲洗、检测。

[0055] 表 3: 细菌培养和免疫荧光诊断试剂对临床标本检测结果

姓名	性别	年龄	住院号	大肠杆菌检测		金黄葡萄球菌检测		假生殖道棒杆菌检测		备注
				菌培	荧光检测	菌培	荧光检测	菌培	荧光检测	
刘明辉	男	61	1756	+	-	-	-	-	+	
赵宇	男	63	1763	+	+	-	-	-	-	
王冬梅	女	76	1767	+	+	-	-	-	-	
李凤春	女	67	1761	-	-	+	+	-	-	
张玉兰	女	88	1754	+	+	-	-	-	-	
刘再	女	82	1755	+	+	-	-	-	-	
冯冬	女	72	1642	-	-	+	+	-	-	
王建国	男	69	1659	+	-	-	-	-	+	

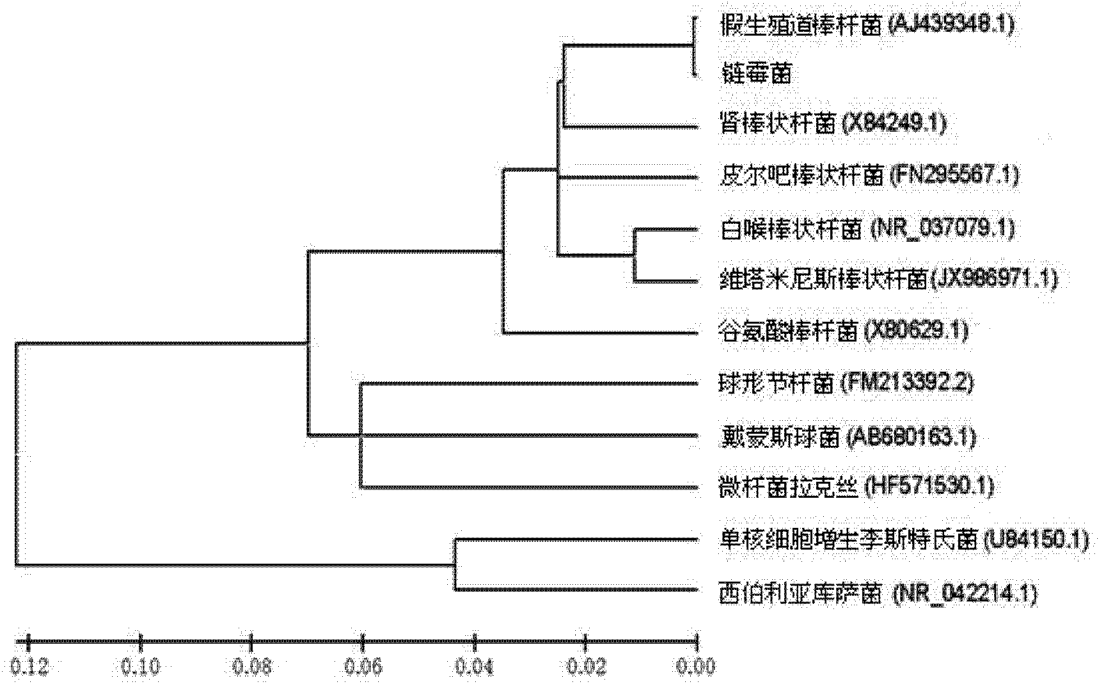


图 1

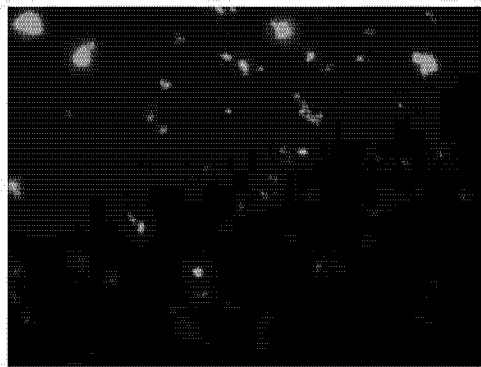


图 2

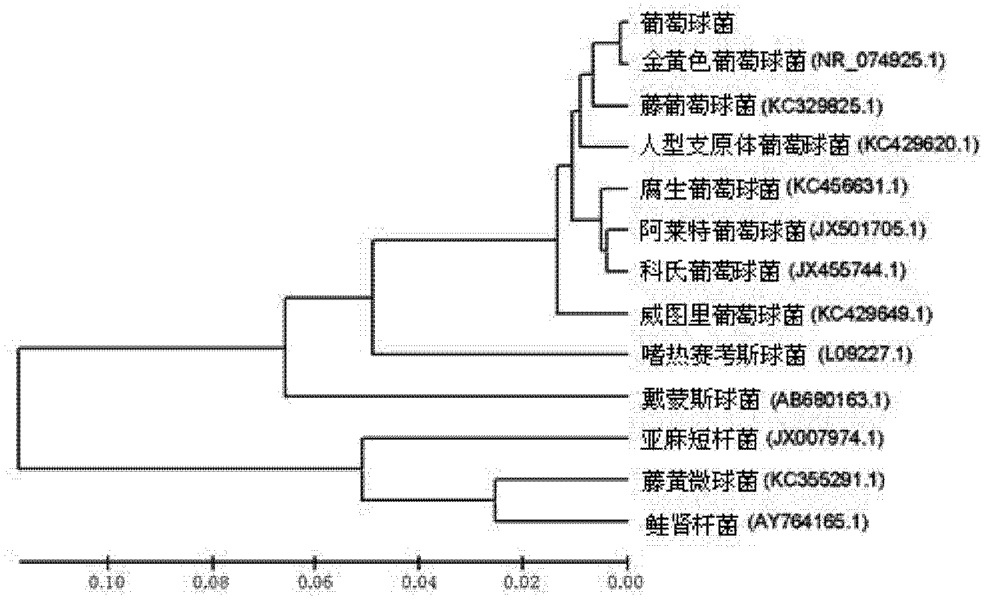


图 3

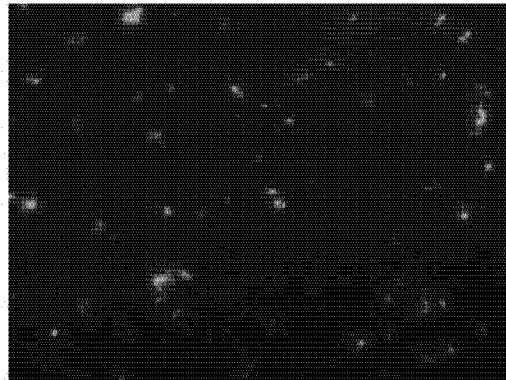


图 4

专利名称(译)	人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法		
公开(公告)号	CN103499685A	公开(公告)日	2014-01-08
申请号	CN201310481151.9	申请日	2013-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	牛远杰 陈家童 蒋宁 喻其林 刘越		
申请(专利权)人(译)	牛远杰 陈家童 喻其林 刘越		
当前申请(专利权)人(译)	牛远杰 陈家童 喻其林 刘越		
[标]发明人	牛远杰 陈家童 蒋宁 尚芝群 喻其林 刘越		
发明人	牛远杰 陈家童 蒋宁 尚芝群 喻其林 刘越		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/577 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/569 G01N2800/348		
其他公开文献	CN103499685B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人泌尿系统病原菌感染临床诊断的免疫荧光诊断试剂及其制备和应用方法，属于带有荧光标记的免疫化学试剂。其是以泌尿系统感染的致病原菌株，制备单克隆抗体或多克隆抗体，然后将抗体与荧光纳米量子点材料经酰胺脱水缩合，连接为荧光纳米量子点抗体复合物，可直接用于对载体材料上已包被了未知抗原如待测患者标本样品检测，或预先包被在载体材料上对抗原检测，这样设计的本发明，具有对不同病原菌感染泌尿系统疾病检测特异性强、性质稳定；操作使用便捷，检测快速、准确、检测时间短等特点。有效的指导临床医生准确用药，减少抗生素滥用，降低患者的诊断检测及治疗费用。从而产生良好的经济效益和社会效益。

