



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198710 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410405739. 0

(22) 申请日 2014. 08. 18

(71) 申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市武昌南湖李家墩
一村一号

(72) 发明人 杨波 胡征

(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 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书5页 说明书14页
序列表1页

(54) 发明名称

基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检的方法和试剂盒,该试剂盒由具有富集抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体功能的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠、多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 抗体纳米探针、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;阳性质控品为人肺炎衣原体感染者的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体分别为阳性的血清;阴性质控品是抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 均为阴性的人血清。本发明具有简便、快速、高灵敏度的优点,可实现对抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体的同步检测。

1. 一种基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

1) 重组人肺炎衣原体 98KD 膜蛋白抗原的制备;

2) 将步骤 1) 制备得到的重组人肺炎衣原体 98KD 膜蛋白抗原与纳米磁珠通过共价偶联,制得抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠;

3) 将鼠抗人 IgM 单克隆抗体与发射波长为 520nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人 IgM 纳米探针;将鼠抗人 IgG 单克隆抗体与发射波长为 600nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人 IgG 纳米探针;将量子点标记的抗人 IgM 纳米探针与量子点标记的抗人 IgG 纳米探针等量混合即制得多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针;

4) 取人血清样本,用 PBSA 缓冲液适当稀释后,分别向血清稀释液中加入步骤 2) 制备得到的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠以及步骤 3) 制备得到的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针,充分混合,反应 5-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 2 遍后,使用荧光酶标仪,在发射波长分别为 520nm 及 600nm 下分别读取荧光值;所述 PBSA 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 ,5g/L BSA,所述 PBSA 缓冲液的 pH = 7.4;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 ,5g/L BSA,0.3g/L NaN_3 ,0.5ml/L Tween-20,所述 PBST 缓冲液的 pH = 7.4;

5) 根据步骤 4) 的方法检测至少 30 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本,分别读取发射波长分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;所述抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本简称人肺炎衣原体抗体阴性对照样品;所述人肺炎衣原体抗体阴性对照样品在发射波长为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;所述人肺炎衣原体抗体阴性对照样品在发射波长为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;

若步骤 4) 中人血清样本在发射波长为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性;

若步骤 4) 中人血清样本在发射波长为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阴性;

若步骤 4) 中人血清样本在发射波长为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性;

若步骤 4) 中人血清样本在发射波长为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阴性。

2. 一种基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒,其特征在于:所述基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒由具有富集抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体功能的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠、多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 抗体纳米探针、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;所述阳性质控品由两份人肺炎衣原体感染者的抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性的血清及两份抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性的血清组成;所述阴性质控品是四份抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清。

3. 一种用于制备如权利要求 2 所述的基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

1) 抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠的制备:

1.1) 重组 M98-His 融合蛋白的制备、纯化:

1.1.1) 对人肺炎衣原体 98KD 外膜蛋白进行生物信息学分析,获取人肺炎衣原体 98KD 膜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;

1.1.2) 在步骤 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化学合成全基因序列,同时标记记为 M98;

1.1.3) 将步骤 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形式存在于基因工程菌体中;

1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.3) 所得到的重组 M98-His 融合蛋白, SDS-PAGE 检测其纯度后,再对重组 M98-His 融合蛋白进行复性,经 Bradford 试剂盒进行蛋白质浓度测定后,用 PBS 缓冲液调整浓度为 0.2mg/mL;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) 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 1150nm 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 μL 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的由步骤 1.1.4) 所制备的重组 M98-His 融合蛋白溶液各 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 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;至此制得抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠;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 BSA,所述保存缓冲液的 pH = 7.4;

2) 多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 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 2nmol 羧基水溶性量子点、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 以及 300nmol 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;所述羧基水溶性量子点的发射波长是 520nm;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 2-12nmol 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体,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 IgM 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;

2.5) 按与步骤 2.1)-2.4) 相同的方法利用鼠抗人 IgG 单克隆抗体与发射波长为 600nm 的羧基水溶性量子点制得量子点标记的抗人 IgG 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,即制得多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 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,0.24KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄,5g BSA,0.3g NaN₃,0.5ml Tween-20 溶解于 900ml 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:

4.1.1) 抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性质控品:由 0.5ml 人肺炎衣原体感染者的已确定抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性的血清构成;

4.1.2) 抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性质控品:由 0.5ml 人肺炎衣原体感染者的已确定抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性的血清构成;

4.2) 阴性质控品:由 0.5ml 抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清构成。

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 $150 \mu\text{g/ml}$ 的由步骤 1. 1. 4) 所制备的重组 M98-His 融合蛋白溶液各 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 6nmol 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体, 避光反应 2h 。

5. 根据权利要求 3 或 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 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 1150nm 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多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒的使用方法, 其特征在于: 所述使用方法包括以下步骤:

1) 取待检血清样本 $5 \mu\text{l}$ 用 $995 \mu\text{l}$ PBSA 缓冲液稀释后将稀释液转入 1.5ml 普通离心管中; 所述 PBSA 缓冲液中各成分含量如下: 8g/L NaCl , 0.2g/L KCl , $0.24\text{g/L KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4$, 5g/L BSA ; 所述 PBSA 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

2) 向步骤 1) 中的离心管中依次加入基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠 $10-100 \mu\text{l}$ 及基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针 $50 \mu\text{l}$, 室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 $5-25\text{min}$ 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) 添加基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的 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 0.2ml PBS 缓冲液重悬磁珠, 制得纳米磁珠 - 人肺炎衣原体抗体 - 量子点“三明治”复合物; 所述 PBS 缓冲液中各成分含量如下: 8g/L NaCl , 0.2g/L KCl , $0.24\text{g/L KH}_2\text{PO}_4$, $1.44\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4$; 所述 PBS 缓冲液的 $\text{pH} = 7.4$;

4) 将步骤 3) 得到的纳米磁珠 - 人肺炎衣原体抗体 - 量子点复合物载于酶标板中, 使用荧光酶标仪在激发波长同为 365nm , 发射波长分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别对其荧光值进行分别读数;

5) 按上述同样的方法检测至少 30 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本, 分别读取发射波长分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;

所述经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本在发射波长为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值; 所述经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本在发射波长为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值; 同时检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样品及四份阳性质控品样品, 分别读取发射波长分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值; 四份阴性质控品样品在发射波长为 520nm 的荧光值的平均值记为 NCX1; 四份阴性质控品样品在发射波长为 600nm 的荧光值的平均值记为 NCX2 值; 两份抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性质控品样品在发射波长为 520nm 的荧光平均值为 PCX1; 两份抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性质控品样品在发射波长为及 600nm 下的荧光值记为 PCX2;

若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值且 $PCX1/NCX1 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性;

若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值且 $PCX1/NCX1 \geq 2.1$, 则判断为人待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阴性;

若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值且 $PCX2/NCX2 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性;

若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值且 $PCX2/NCX2 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阴性;

若 $PCX1/NCX1 < 2.1$ 或 $PCX2/NCX2 < 2.1$, 均表明试剂盒失效。

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) 中的离心管中依次加入基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠 $20 \mu l$ 及基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针 $50 \mu l$, 室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min 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。

基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检的方法和试剂盒

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多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检的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] 在人肺炎衣原体感染的实验室诊断上,被检者血清中抗人肺炎衣原体抗体指标则是诊断结果的重要依据之一。

[0004] 免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 和免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 是人体内最重要的两种抗体。当人肺炎衣原体进入机体后,最早出现的免疫球蛋白是 IgM 抗体,之后出现 IgG,通过检测体内特异性 IgM、IgG 抗体的存在,可诊断人体对人肺炎衣原体的免疫反应状态。若检测出特异性 IgM 抗体,表明有近期感染的发生,但 IgM 抗体半衰期较短,IgM 的检测阴性并不能证明机体未受感染,还需要检测半衰期较长,含量最高的 IgG 抗体,以明确诊断。

[0005] 目前,血清中特异性 IgM 及 IgG 抗体的检测方法主要有冷凝集实验、明胶颗粒凝集实验、酶联免疫吸附实验、金标免疫斑点法及金标免疫层析法。冷凝集实验的特异度和敏感度均为最低,因此其临床诊断价值不大;金标免疫斑点法及金标免疫层析法虽操作简便快捷,但敏感度略低,对抗体水平较低的患者有漏诊的可能;明胶凝集实验试剂准备与操作过程较为繁琐,且需要专业操作人员。酶联免疫吸附法具有特异、敏感等优点,已用于检查各种抗体或抗原,但此方法存在以下问题:(1) 每一批试验从加样、温浴、洗版等步骤较多,操作繁琐,时间较长(总共需要 2-4 小时);(2) 检测中需分别加入显色成分 A 液与 B 液,且还要在规定时间内完成读数,一定程度上增加了劳动强度和操作失误的可能性;(3) 该法无法做到对 IgM 及 IgG 两种抗体的同时检测。虽然单独检测 IgM 和 IgG 抗体后,再综合分析检测结果对疾病的诊断并无影响,但操作过程繁琐,检测不够方便快捷,检测成本较共检亦

会增加。

[0006] 因此,建立具备高灵敏度的能对抗人肺炎衣原体的特异性 IgM、IgG 抗体进行快速同步共检的检测方法显得十分必要。

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多色量子点标记的能简便、快速、高灵敏度的同步共检抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体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多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

[0010] 1) 重组人肺炎衣原体 98KD 膜蛋白抗原的制备;

[0011] 2) 将步骤 1) 制备得到的重组人肺炎衣原体 98KD 膜蛋白抗原与纳米磁珠通过共价偶联,制得抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠;

[0012] 3) 将鼠抗人 IgM 单克隆抗体与发射波长为 520nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人 IgM 纳米探针;将鼠抗人 IgG 单克隆抗体与发射波长为 600nm 的纳米量子点通过共价偶联,制备量子点标记的抗人 IgG 纳米探针;将量子点标记的抗人 IgM 纳米探针与量子点标记的抗人 IgG 纳米探针等量混合即制得多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针;

[0013] 4) 取人血清样本,用 PBSA 缓冲液适当稀释后,分别向血清稀释液中加入步骤 2) 制备得到的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠以及步骤 3) 制备得到的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针,充分混合,反应 5-45min 后进行磁分离,以 PBST 缓冲液洗涤 2 遍后,使用荧光酶标仪,在发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 下分别读取荧光值;所述 PBSA 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 , 5g/L BSA(牛血清白蛋白),所述 PBSA 缓冲液的 pH = 7.4;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 , 5g/L BSA(牛血清白蛋白), 0.3g/L NaN_3 , 0.5ml/L Tween-20, 所述 PBST 缓冲液的 pH = 7.4;

[0014] 5) 根据步骤 4) 的方法检测至少 30 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本,分别读取发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;所述抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本简称人肺炎衣原体抗体阴性对照样品;所述人肺炎衣原体抗体阴性对照样品在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;所述人肺炎衣原体抗体阴性对照样品在发射波长 (Em) 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;若步骤 4) 中人血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性;若步骤 4) 中人血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阴性;若步骤 4) 中人血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性;若步骤 4) 中人血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值,则判断为人血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为

阴性。

[0015] 一种基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒,其特征在於:所述基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒由具有富集抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体功能的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠、多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 抗体纳米探针、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;所述阳性质控品由两份人肺炎衣原体感染者的抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性的血清及两份抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性的血清组成;所述阴性质控品是四份抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清。

[0016] 一种用于制备基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒的方法,其特征在於:所述方法包括以下步骤:

[0017] 1) 抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠的制备:

[0018] 1.1) 重组 M98-His 融合蛋白的制备、纯化:

[0019] 1.1.1) 对人肺炎衣原体 98KD 外膜蛋白进行生物信息学分析,获取人肺炎衣原体 98KD 膜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;

[0020] 1.1.2) 在步骤 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化学合成全基因序列,同时标记记为 M98;其序列参见序列列表;

[0021] 1.1.3) 将步骤 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形式存在于基因工程菌体中;

[0022] 1.1.4) 用镍柱纯化步骤 1.1.3) 所得到的重组 M98-His 融合蛋白,SDS-PAGE 检测其纯度后,再对重组 M98-His 融合蛋白进行复性,经 Bradford 试剂盒进行蛋白质浓度测定后,用 PBS 缓冲液调整浓度为 0.2mg/mL;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;

[0023] 1.2) 纳米磁珠的包被:

[0024] 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 1150nm 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;

[0025] 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;

[0026] 1.2.3) 取 5 个离心管,在每个离心管中加入 200 μL 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的由步骤 1.1.4) 所制备的重组 M98-His 融合蛋白溶液各 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;

[0027] 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;

[0028] 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℃ 保存备用;至此制得抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠;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;

[0029] 2) 多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针的制备:

[0030] 其具体制备方法包括:

[0031] 2.1) 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 sulfo-NHS 以及 300nmol 碳二亚胺 EDC,以磷酸盐缓冲液定容为 5ml,混合溶液,37℃ 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;所述羧基水溶性量子点的发射波长是 520nm;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;

[0032] 2.2) 在步骤 2.1) 所得到的活化的量子点中,加入 2-12nmol 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体,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;

[0033] 2.3) 用 0.2 μm PES 过滤器过滤除去步骤 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;

[0034] 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℃ 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℃ 保存备用,至此制得量子点标记的抗人 IgM 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;

[0035] 2.5) 按与步骤 2.1)-2.4) 相同的方法利用鼠抗人 IgG 单克隆抗体与发射波长为 600nm 的羧基水溶性量子点制得量子点标记的抗人 IgG 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,即制得多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针;

[0036] 3) PBST 缓冲液的配制:

[0037] 其具体配制方法包括:

[0038] 取 8g NaCl,0.2g KCl,0.24g KH_2PO_4 ,1.44g Na_2HPO_4 ,5g BSA,0.3g NaN_3 ,0.5ml Tween-20 溶解于 900ml 蒸馏水中,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml;

[0039] 4) 质控品的制备:

[0040] 4.1) 阳性质控品:

[0041] 4.1.1) 抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性质控品 : 由 0.5ml 人肺炎衣原体感染者的已确定抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性的血清构成 ;

[0042] 4.1.2) 抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性质控品 : 由 0.5ml 人肺炎衣原体感染者的已确定抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性的血清构成 ;

[0043] 4.2) 阴性质控品 : 由 0.5ml 抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清构成。

[0044] 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 ;

[0045] 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 150 μ g/ml 的由步骤 1.1.4) 所制备的重组 M98-His 融合蛋白溶液各 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 ;

[0046] 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 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体, 避光反应 2h。

[0047] 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。

[0048] 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 1150nm 的羧基磁珠。

[0049] 一种基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒的使用方法, 其特征在于 : 所述使用方法包括以下步骤 :

[0050] 1) 取待检血清样本 5 μ l 用 995 μ l PBSA 缓冲液稀释后将稀释液转入 1.5ml 普通离心管中 ; 所述 PBSA 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 , 5g/L BSA ; 所述 PBSA 缓冲液的 pH = 7.4 ;

[0051] 2) 向步骤 1) 中的离心管中依次加入基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠 10-100 μ l 及基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针 50 μ l, 室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 5-25min 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 ;

[0052] 3) 添加基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的 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 0.2ml PBS 缓冲液重悬磁珠, 制得纳米磁珠 - 人肺炎衣原体抗体 - 量子点“三明治”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 ;

[0053] 4) 将步骤 3) 得到的纳米磁珠 - 人肺炎衣原体抗体 - 量子点复合物载于酶标板中, 使用荧光酶标仪在激发波长 (Ex) 同为 365nm, 发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别对其荧光值进行分别读数 ;

[0054] 5) 按上述同样的方法检测至少 30 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体

IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本,分别读取发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;所述经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF1 值;所述经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的荧光值的平均值与 3 倍标准差之和记为 CUT-OFF2 值;同时检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样品及四份阳性质控品样品,分别读取发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;四份阴性质控品样品在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光值的平均值记为 NCX1;四份阴性质控品样品在发射波长 (Em) 为 600nm 的荧光值的平均值记为 NCX2 值;两份抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性质控品样品在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光平均值为 PCX1;两份抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性质控品样品在发射波长 (Em) 为及 600nm 下的荧光值记为 PCX2;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值且 $PCX1/NCX1 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值且 $PCX1/NCX1 \geq 2.1$, 则判断为人待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阴性;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值且 $PCX2/NCX2 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值且 $PCX2/NCX2 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阴性;若 $PCX1/NCX1 < 2.1$ 或 $PCX2/NCX2 < 2.1$, 均表明试剂盒失效。

[0055] 作为优选,本发明所提出的步骤 2) 中,向步骤 1) 中的离心管中依次加入基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠 20 μ l 及基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针 50 μ l, 室温下以 10rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min 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。

[0056] 本发明所需的羧基水溶性纳米量子点、1150nm 羧基磁珠,鼠抗人 IgM 单克隆抗体、鼠抗人 IgG 单克隆抗体等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。

[0057] 本发明相比现有技术具有如下优点:

[0058] 1、本发明利用了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与准确度。

[0059] 2、本发明所用的捕获抗原是包含有人肺炎衣原体特异性 98KD 膜蛋白抗原胞外区富含抗原表位的重组抗原,病人血清中针对其产生的抗体水平高,因此捕获效果好。

[0060] 3、本发明所用的捕获抗原为人肺炎衣原体所特有的表面抗原,其特异性高,与其他常见的呼吸道病原体(如鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体、甲、乙型人流感病毒、人流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、人肺炎支原体、人流感嗜血杆菌等)的抗体之间无抗原抗体交叉反应。

[0061] 4、本发明所用抗原为基因工程重组抗原,蛋白质表达量高,蛋白复性方法简单,故较为廉价易得。

[0062] 5、本发明检测方法简单,检测快速(30min之内),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、临床应用不便的不足。

[0063] 6、本发明可实现抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体的同步检测,解决了分项检测所带来的操作过程繁琐,检测不够方便快捷,检测成本较高等问题,而目前市面上还未曾见到抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体同步共检测的产品或者相关科学报道的出现。

具体实施方式

[0064] 本发明是根据免疫学中的抗体抗原反应原理,利用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同步检测抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体的新方法,具有广阔的市场应用前景。

[0065] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0066] 各种试剂的配制及所需材料的说明

[0067] 1. PBSA 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,5g 牛血清白蛋白溶解于 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。

[0068] 2. 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。

[0069] 3. 重组 M98-His 融合蛋白:为本发明自制,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中重组蛋白的重量百分比浓度为 0.2mg/ml。

[0070] 4. 鼠抗人 IgM 单克隆抗体:为 Abcam 公司产品,货号 ab99741,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中单克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/ml。

[0071] 5. 鼠抗人 IgG 单克隆抗体:为 Abcam 公司产品,货号 ab99757,用 PBS 缓冲液稀释,摇匀,使溶液中单克隆抗体重量百分比浓度为 1mg/ml。

[0072] 6. 量子点:本发明中所用的两种量子点均为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性 CdSe/ZnS 量子点,其发射波长分别为 520nm 及 600nm,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-520 及羧基水溶性量子点-600。

[0073] 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。

[0074] 实施例 1 重组 M98-His 融合蛋白的表达、纯化与复性

[0075] 1. 相关基因的克隆

[0076] 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。

[0077] 2. 重组 M98-His 融合蛋白的表达与纯化

[0078] 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 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 Na₂HPO₄ pH = 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。

[0079] 重组 M98-His 融合蛋白的纯化步骤如下 :

[0080] 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 0.45 μ m 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 :

[0081] 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。

[0082] 2) 用 10mL Binding buffer 平衡, 1mL/min 流速。

[0083] 3) 将融合蛋白上样, 1mL/min 流速。

[0084] 4) 用 10mL Binding buffer, 以 1mL/min 流速洗柱。

[0085] 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 0.5mg/mL。

[0086] 3. 重组 M98-His 融合蛋白的复性

[0087] 将上述经 His Trap affinity columns 纯化的重组 M98-His 融合蛋白, 先用含 4mol/L 尿素的 PBS 缓冲液透析过夜, 然后再各分别用含 2、1、0.6、0.2mol/L 尿素的 PBS 缓冲液梯度透析各 4h, 最后用 PBS 缓冲液透析 4h。将透析液各用 12000rpm 离心 15min, 上清即为复性的重组 M98-His 融合蛋白。经 Bradford 试剂盒进行蛋白质浓度测定后, 用 PBS 缓冲液调整其浓度均为 0.2mg/mL, 供纳米磁珠的包被用。

[0088] 实施例 2 抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠的制备

[0089] 1. 重组 M98-His 融合蛋白偶联磁珠反应条件的优化 :

[0090] 以偶联了重组 M98-His 融合蛋白的磁珠作为固相载体, 量子点标记的鼠抗人 IgM

单克隆抗体作为检测抗体,检测抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清,观察磁珠与重组蛋白的偶联情况。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。

[0091] 1.1 磁珠粒径的选择

[0092] 选择粒径为 50nm、180nm、350nm、1150nm、3 μ m 的羧基纳米磁珠,均加入含 4mg/ml EDC 及 4mg/ml NHS 的 PBS 缓冲液进行活化反应后,分别与重组 M98-His 融合蛋白偶联反应。分别将制备好的羧基纳米磁珠检测抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清,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 1150nm 的磁珠最符合本发明的要求,确定最适羧基磁珠粒径为 1150nm。

[0093] 1.2 EDC/NHS 活化剂浓度的选择

[0094] 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 1150nm 的羧基纳米磁珠。将制备好的羧基纳米磁珠检测抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清,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。

[0095] 1.3 偶联抗原浓度的选择

[0096] 将 10 μ g、50 μ g、100 μ g、120 μ g、150 μ g、200 μ g、250 μ g、300 μ g 的重组 M98-His 融合蛋白分别与 1mg 按上述最优方法活化的粒径为 1150nm 的磁珠进行偶联。将制备好的羧基纳米磁珠分别检测抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清,结果发现,当重组蛋白的投放量小于 150 μ g/mg 时,荧光强度随着抗体的浓度增加而增加,而当重组蛋白的投放量大于 150 μ g/mg 时,荧光强度基本不变甚至略有减小,因此本实施例选择重组 M98-His 重组蛋白的偶联量为 150 μ g/mg。

[0097] 1.4 偶联时间的选择

[0098] 确定磁珠的粒径、EDC/NHS 活化剂浓度及抗体偶联量后,将重组 M98-His 融合蛋白与磁珠的偶联反应时间分别设为 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h。将制备好的羧基纳米磁珠分别检测抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清,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,确定重组 M98-His 融合蛋白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。

[0099] 1.5 封闭剂的选择

[0100] 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纳米磁珠封闭剂,制得成品羧基纳米磁珠。将制备好的纳米磁珠分别检测抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清,结果发现,采用乙醇胺作为封闭剂的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。

[0101] 同时,以偶联了重组 M98-His 融合蛋白的羧基纳米磁珠作为固相载体,对应的量子点标记的鼠抗人 IgG 单克隆抗体作为检测抗体,建立抗人肺炎衣原体 IgG 抗体的检测体系,对相应的检测体系中的重组蛋白偶联磁珠的反应条件进行优化。结果发现,该检测体系中的最佳偶联条件均与上述步骤 1.1-1.5 所给出的结果完全一致。

[0102] 2. 偶联过程:

[0103] 取 5mg 磁珠（以超顺磁性 Fe_3O_4 为内核、粒径为 1150nm 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 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的实施例 1 所制备的重组 M98-His 融合蛋白溶液各 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℃ 保存备用，至此制得抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠。

[0104] 实施例 3 多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针的制备

[0105] 1. 纳米羧基量子点标记鼠抗人 IgM 单克隆抗体反应条件的优化：

[0106] 1.1、羧基量子点标记抗体探针最佳标记 pH 的确定

[0107] 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，确定了量子点标记单抗反应的最佳 pH 为 7.0-8.0。本实验选择 pH7.4。

[0108] 1.2、羧基量子点标记抗体探针最佳标记量的确定

[0109] 将量子点摩尔浓度与单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 IgM 单克隆抗体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。

[0110] 1.3、羧基量子点标记抗体探针最佳封闭剂种类的确定

[0111] 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。

[0112] 纳米羧基量子点标记鼠抗人 IgG 单克隆抗体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 IgM 单克隆抗体反应相关条件的优化结果均完全一致。

[0113] 2. 标记过程：

[0114] 向微量离心管中依次加入 2nmol 羧基水溶性量子点（发射波长 520nm）、300nmol N-羟基琥珀酰亚胺（sulfo-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 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 6nmol 的鼠抗人 IgM 单克隆抗体，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 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 IgM 纳米探针,置于 4℃ 保存备用。

[0115] 按上述相同方法利用鼠抗人 IgG 单克隆抗体与发射波长为 600nm 的羧基水溶性量子点制得量子点标记的抗人 IgG 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,即制得多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针;

[0116] 实施例 4 羧基纳米磁珠对人肺炎衣原体抗原进行免疫捕获条件的优化

[0117] 以偶联了重组 M98-His 融合蛋白的磁珠作为固相载体,多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针作为检测抗体,建立人肺炎衣原体抗体的检测体系。分别对检测体系中羧基纳米磁珠的用量,捕获时间等条件进行了一系列的优化选择。

[0118] 实验 1. 羧基纳米磁珠加入量的选择

[0119] 将 5 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、30 μ l、50 μ l、70 μ l 的由实施例 2 所制备好的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠分别加入到 0.5ml 含抗人肺炎衣原体 IgG 抗体的人血清稀释液中,进行免疫捕获,再由实施例 3 所描述的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针进行检测,记录荧光值。结果发现,随着羧基纳米磁珠加入量的增加,荧光值逐渐增大,当羧基纳米磁珠加入量达到 20 μ l 时,荧光值达到最大。再继续增加羧基纳米磁珠的量,荧光值反而降低。故本实验选择 20 μ l 作为纳米磁珠的最佳加入量。

[0120] 实验 2. 免疫捕获时间的选择

[0121] 确定磁珠的加入量后,取四份实施例 2 所制备好的纳米磁珠,在室温下以 10r/min,对抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清进行 5min、10min、15min、20min、30min 及 40min 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 时表现出最大值,随着时间的延长,数值基本不变。故本实验选择 15min 作为免疫捕获的最佳时间。

[0122] 同时,以偶联了重组 M98-His 融合蛋白的羧基纳米磁珠作为固相载体,对应的量子点标记的鼠抗人 IgG 单克隆抗体作为检测抗体,建立抗人肺炎衣原体 IgG 抗体的检测体系,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。

[0123] 实施例 5 PBST 缓冲液的配制

[0124] 取 8g NaCl,0.2g KCl,0.24KH₂PO₄,1.44g Na₂HPO₄,5g BSA,0.3g NaN₃,0.5ml Tween-20 溶解于 900ml 蒸馏水中,用 5M NaOH 调整 pH 至 7.4,再定容至 1000ml。

[0125] 实施例 6 质控品的制备

[0126] 6.1) 阳性质控品:

[0127] 6.1.1) 抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性质控品:由 0.5ml 人肺炎衣原体感染者的已确定抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性的血清构成;

[0128] 6.1.2) 抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性质控品:由 0.5ml 人肺炎衣原体感染者的已

确定抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性的血清构成；

[0129] 6.2) 阴性质控品：由 0.5ml 抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清构成。

[0130] 实施例 7 试剂盒的制备

[0131] 由实施例 2 所描述的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠 2ml、实施例 3 所描述的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针 5ml、实施例 5 所描述的 PBST 缓冲液 200ml、实施例 6 所描述的质控品一套共同组成基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒。

[0132] 实施例 8 待检血清稀释度的确定

[0133] 用临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM 抗体分别为阴性及阳性的人血清样本各 20 份，用 PBSA 缓冲液分别进行 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 倍稀释，选择阳性血清与阴性血清的检测荧光数值之比 >3 的最高稀释度作为待检血清的最适工作浓度。结果发现，200 倍稀释的效果最佳。

[0134] 同样，用临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgG 抗体分别为阴性及阳性的人血清样本各 20 份，用 PBSA 缓冲液分别进行 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 倍稀释，选择阳性血清与阴性血清的检测荧光数值之比 >3 的最高稀释度作为待检血清的最适工作浓度。结果亦发现，200 倍稀释的效果最佳。

[0135] 实施例 9 试剂盒的使用方法

[0136] 1) 取待检血清样本 5 μ l 用 995 μ l PBSA 缓冲液稀释 (200 倍稀释) 后将稀释液转入 1.5ml 普通离心管中；

[0137] 2) 向步骤 1) 中的离心管中依次加入基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠 20 μ l 及基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的多色量子点分别标记的抗人 IgM、IgG 纳米探针 50 μ l，室温下以 15rpm/min 于旋转混合仪上反应 15min 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；

[0138] 3) 添加基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒中的 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 0.2ml PBS 缓冲液重悬磁珠，制得纳米磁珠-人肺炎衣原体抗体-量子点“三明治”复合物；

[0139] 4) 将步骤 3) 得到的 0.2ml 纳米磁珠-人肺炎衣原体抗体-量子点复合物载于酶标板中，使用荧光酶标仪在激发波长 (Ex) 同为 365nm，发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 的参数下分别对其荧光值进行分别读数；

[0140] 5) CUT-OFF 值的确定：按与上述步骤 1)-4) 同样的方法检测 100 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本，分别读取发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值；所述 100 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光值的平均值 (42.5) 与 3 倍标准差 (9.76) 之和记为 CUT-OFF1 值 (71.78)；所述 100 份经临床各种方法均确定为抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体均为阴性的人血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的荧光值的平均值 (57.3) 与 3 倍标准差 (13.54) 之和记为 CUT-OFF2 值 (97.92)；

[0141] 6) 按与上述步骤 1)-4) 相同的方法同时检测试剂盒中提供的四份阴性质控品样

品及四份阳性质控品样品,分别读取发射波长 (Em) 分别为 520nm 及 600nm 下的荧光值;四份阴性质控品样品在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光值的平均值记为 NCX1;四份阴性质控品样品在发射波长 (Em) 为 600nm 的荧光值的平均值记为 NCX2 值;两份抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性质控品样品在发射波长 (Em) 为 520nm 的荧光平均值为 PCX1;两份抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性质控品样品在发射波长 (Em) 为及 600nm 下的荧光值记为 PCX2;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF1 值 (71.78) 且 $PCX1/NCX1 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阳性;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 520nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF1 值 (71.78) 且 $PCX1/NCX1 \geq 2.1$, 则判断为人待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgM 抗体为阴性;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的检测荧光值大于 CUT-OFF2 值 (97.92) 且 $PCX2/NCX2 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阳性;若步骤 4) 中待检血清样本在发射波长 (Em) 为 600nm 的检测荧光值小于 CUT-OFF2 值 (97.92) 且 $PCX2/NCX2 \geq 2.1$, 则判断为待检血清样本中抗人肺炎衣原体 IgG 抗体为阴性;若 $PCX1/NCX1 < 2.1$ 或 $PCX2/NCX2 < 2.1$, 均表明试剂盒失效。

[0142] 实施例 10 试剂盒的特异性试验

[0143] 用呼吸道常见病原体如人呼吸道合胞病毒、人肺炎支原体、鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体、人腺病毒 3 型、人腺病毒 7 型、人甲型流感病毒、人乙型流感病毒、人流感嗜血杆菌、人肺炎链球菌感染者的相应病原体抗体呈阳性的血清来代替人肺炎衣原体抗体阳性血清用实施例 7 所述的试剂盒按实施例 9 所述的方法进行检测,发现检测结果均为阴性。

[0144] 实施例 11 临床测试例

[0145] 应用本发明制备的基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒对临床诊断明确的抗人肺炎衣原体 IgM 抗体阳性血清样本 120 份和阴性血清样本 70 份进行了检测,检测结果如表 1。

[0146] 表 1 抗人肺炎衣原体 IgM 抗体临床血清检验结果

[0147]

| | 检测结果 | 阳性病例 | 阴性病例 |
|------|------|------|------|
| 本试剂盒 | + | 119 | 0 |
| | - | 1 | 70 |

[0148] 应用本发明制备的基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体 IgM、IgG 抗体快速共检试剂盒对临床诊断明确的抗人肺炎衣原体 IgG 抗体阳性血清样本 70 份和阴性血清样本 50 份进行了检测,检测结果如表 2。

[0149] 表 2 抗人肺炎衣原体 IgG 抗体临床血清检验结果

[0150]

| | 检测结果 | 阳性病例 | 阴性病例 |
|------|------|------|------|
| 本试剂盒 | + | 69 | 0 |
| | - | 1 | 50 |

[0151] 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]

序 列 表

***M98* 基因序列**

CATATGACAACGGTTACTACAGGTCAGGGAACGCTTTCCTCAGCAGGAGGCGTAAATTTAGAAAATAT

NdeI

TCGTAAACTTGTAGTTGCTGGGAATTTTCTACTGCAGATGGTGGAGCTATCAAAGGAGCGTCTTTCCT
TTTAACTGGCACTTCTGGAGATGCTCTTTTATAGTAACAACCTCTTCATCAACAAAGGGAGGAGCAATTGC
TACTACAGCAGGCGCTCGCATAGCAAATAACACAGGTTATGTTAGATTCCCTATCTAACATAGCGTCTAC
GTCAGGAGGCGCTATCGATGATGAAGGCACGTCGATACTATCGAACAAACAAATTTCTATATTTTGAAGG
GAATGCAGCGAAAATACTACTGGCGGTGCGATCTGCAACACCAAGGCGAGTGGATCTCCTGAACTGATAAT
CTCTAACAAATAAGACTCTGATCTTTGCTTCAAACGTAGCAGAAACAAGCGGTGGCGCCATCCATGCTAA
AAAGCTAGCCCTTTCCTCTGGAGGCTTTACAGAGTTTCTACGAAATAATGTC**TAACCTCGAG**

XhoI

M98 蛋白质序列

TTVTTGQGTLSAGGVNLENIRKLVVAGNFSTADGGAIKGASFLLTGTSGDALFSNNSSTKGGAIATT
AGARIANNTGYVRFLSNIASSTSGGAIDDEGTSILSNKFLYFEGNAAKTGGGAICNPKASGSPELIISN
NKTLIFASNVAETSGGAIHAKKLALSSGGFTEFLRNNV

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体IgM、IgG抗体快速共检的方法和试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN104198710A | 公开(公告)日 | 2014-12-10 |
| 申请号 | CN201410405739.0 | 申请日 | 2014-08-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 湖北工业大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 湖北工业大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 湖北工业大学 | | |
| [标]发明人 | 杨波 胡征 | | |
| 发明人 | 杨波 胡征 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/533 | | |
| CPC分类号 | G01N33/533 G01N33/56927 G01N33/577 | | |
| 代理人(译) | 王敏锋 | | |
| 其他公开文献 | CN104198710B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种基于磁性分离和多色量子点标记的抗人肺炎衣原体IgM、IgG抗体快速共检的方法和试剂盒，该试剂盒由具有富集抗人肺炎衣原体IgM、IgG抗体功能的抗人肺炎衣原体抗体捕获纳米磁珠、多色量子点分别标记的抗人IgM、IgG抗体纳米探针、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；阳性质控品为人肺炎衣原体感染者的抗人肺炎衣原体IgM、IgG抗体分别为阳性的血清；阴性质控品是抗人肺炎衣原体IgM、IgG均为阴性的人血清。本发明具有简便、快速、高灵敏度的优点，可实现对抗人肺炎衣原体IgM、IgG抗体的同步检测。

| | | | |
|--------------|--------------|--------------|-----|
| | 抗人肺炎衣原体IgM抗体 | 抗人肺炎衣原体IgG抗体 | 质控品 |
| 抗人肺炎衣原体IgM抗体 | + | + | + |
| 抗人肺炎衣原体IgG抗体 | + | + | + |