



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103852580 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201410057836. 5

(22) 申请日 2014. 02. 18

(73) 专利权人 温州市康泰生物科技有限公司
地址 325102 浙江省永嘉县瓯北镇西岸工业
区

(72) 发明人 李超 吴玲智 诸葛锐军 林磊
许天鸿

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102901810 A, 2013. 01. 30,

CN 103073642 A, 2013. 05. 01,

CN 102695718 A, 2012. 09. 26,

CN 102662061 A, 2012. 09. 12,

CN 102944679 A, 2013. 02. 27,

CN 103344763 A, 2013. 10. 09, 全文.

US 2005153370 A1, 2005. 07. 14, 全文.

CN 1603348 A, 2005. 04. 06, 全文.

CN 101775386 A, 2010. 07. 14, 全文.

WO 2009039854 A2, 2009. 04. 02, 全文.

王崇义等. 单克隆抗体标志乳胶凝集试验快速检测金黄色葡萄球菌及其耐药性. 《中华医院感染学杂志》. 2006, 第 16 卷 (第 2 期),

审查员 刘彦宁

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒及其制备方法,包括检测试剂 R1 和阴性对照试剂 R2,阴性对照试剂 R2 为聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,其特征是检测试剂 R1 采用免疫聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,免疫聚苯乙烯微球采用羟基功能化聚苯乙烯微球与至少两种特异蛋白偶联而成。羟基功能化聚苯乙烯微球制备方法,采用烷基化壳聚糖与聚苯乙烯微球进行反应,利用羟基功能化聚苯乙烯微球表面分布的高密度羟基,提高羟基功能化聚苯乙烯微球与特异蛋白的偶联效率,使得免疫聚苯乙烯微球表面偶联上的特异蛋白或抗体物质大大提高,具有检测灵敏度高、准确度高,漏检率少等优点。

1. 一种金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒,包括检测试剂 R_1 和阴性对照试剂 R_2 ,阴性对照试剂 R_2 为聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,其特征是检测试剂 R_1 采用免疫聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,免疫聚苯乙烯微球采用羟基功能化聚苯乙烯微球与至少两种特异蛋白偶联而成;

上述金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒的制备方法:

1)、检测试剂 R_1 的制备方法:在每 100ml 微球缓冲液中,加入 0.5g 免疫聚苯乙烯微球;

2)、阴性对照试剂 R_2 的制备方法:在每 100ml 微球缓冲液中,加入 0.5g 聚苯乙烯微球;

其中微球缓冲液的制备方法为:

①. 配制浓度为 0.1 ~ 1M, PH 值为 6.0 ~ 9.0 的磷酸盐缓冲液、tris 缓冲液、碳酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液;

②. 取上述一种缓冲液,加入曲拉通系列和吐温系列中的一种或多种化合物,使配制后的化合物浓度为 0.5 ~ 2%;

③. 向步骤②中配制好的缓冲液中加入 PEG2000、酪蛋白、明胶、脱脂牛奶中的一种或多种成份物质,使配制后的各成份物质浓度为 1 ~ 5%;

④. 将步骤③配制好的微球缓冲液搅拌均匀,置于 2 ~ 8°C 的温度环境保存;

其特征是:

免疫聚苯乙烯微球的制备方法为:

①. 将羟基功能化聚苯乙烯微球分散于水溶液中,使其浓度为 2 ~ 5%;

②. 取上述的溶液 10ml,加入 1 ~ 2ml 新配的浓度为 0.1 ~ 0.5mol/L 的 NaIO_4 溶液,混匀,4°C 温度环境静置 20 分钟;

③. 在步骤②溶液中加入 1 ~ 2ml,0.16M 的乙二醇水溶液,混匀,室温避光静置 30 ~ 60 分钟;

④. 在步骤③取得的溶液中,加入特异蛋白溶液,混匀,装入透析袋,用 0.05mol/LPH7.0 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌,在 4°C 温度环境中透析 16 ~ 20 小时,中途更换二次透析液,混合后特异蛋白浓度为 1 ~ 10mg/ml;所述特异蛋白溶液为人或动物的血浆、人或动物的 IgG 免疫球蛋白、抗 SPA 单克隆抗体或多克隆抗体、抗金黄色葡萄球菌荚膜多糖抗原单克隆抗体或多克隆抗体、抗金黄色葡萄球菌单克隆抗体或多克隆抗体;

⑤. 在步骤④取得的溶液中,加入新鲜配制的浓度为 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 2 ~ 5ml,混匀,在 4°C 温度环境中反应 2 小时后,装入透析袋,用 0.1mol/LPH7.0 磷酸盐缓冲液缓缓搅拌,4°C 温度环境中透析 16 ~ 20 小时,中途更换二次透析液;

⑥. 取出透析好的反应液,用 0.1mol/LPH7.0PBS 加至 20ml,置于 2 ~ 8°C 的温度环境保存。

2. 根据权利要求 1 所述的金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒的制备方法,其特征是羟基功能化聚苯乙烯微球的制备方法为:

①. 烷基化壳聚糖:将壳聚糖、KOH、异丙醇混合置于三颈烧瓶中,匀速搅拌,升温至 40°C 保持 1 小时,使壳聚糖碱化后升温至 60°C,并滴加卤代烃,恒温搅拌反应 2 ~ 12 小时;其中每毫升异丙醇加 0.05 ~ 0.1g 壳聚糖和 0.1 ~ 0.2gKOH;每毫升反应液含 0.10 ~ 0.30ml 卤代烃;

②. 将经过步骤①的反应物用丙酮和蒸馏水交替洗涤,直至洗出的蒸馏水中不再有卤

离子,烘干后得到烷基化壳聚糖;

③. 将步骤②取得的烷基化壳聚糖,溶于浓度为1~5%醋酸溶液中,静置16~20小时,使其充分溶解分散,溶解后烷基化壳聚糖的浓度为1~5%;

④. 取经过步骤③的烷基化壳聚糖溶液,滴加到聚苯乙烯微球溶液中,室温下匀速搅拌1~10小时,呈均匀分散的胶状溶液后,离心分离得到羟基功能化聚苯乙烯微球;在羟基功能化聚苯乙烯微球溶液中,烷基化壳聚糖的浓度为0.01~0.5%,聚苯乙烯微球的浓度为0.1~1%。

金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术及微生物检测领域,涉及一种基于免疫聚苯乙烯微球凝集反应的金黄色葡萄球菌快速鉴定试剂盒。本发明适用于临床微生物或食品微生物样本中的金黄色葡萄球菌快速检测。

技术背景

[0002] 葡萄球菌是在人类皮肤及粘膜上栖生的常见菌株。其中金黄色葡萄球菌可引起包括表皮化脓在内的大范围化脓性感染,食物中毒和中毒性休克,及其它各种疾病。因此金黄色葡萄球菌为实验室经常遇到的最常见的致病菌之一,由于金黄色葡萄球菌感染发生频率高并且严重,而且金黄色葡萄球菌对众多常规抗生素有耐药性,因此迫切需要快速而准确的诊断,以便对病人采取有效的治疗措施。另外在食品制造中发现葡萄球菌是较好的微生物总体污染水平的指示菌,因此对感染严重的样品需要一种高度特异性的金黄色葡萄球菌快速鉴定方法。

[0003] 乳胶凝集法是近年来出现的一种较为常用的快速检测方法。该方法利用金黄色葡萄球菌表面特有的血浆凝固酶,能与血浆纤维蛋白物质发生特异凝集反应的原理,将血浆纤维蛋白物质与乳胶颗粒共价偶联制备成致敏的乳胶颗粒,该交联后的致敏微球能够与上述金黄色葡萄球菌表面的血浆凝固酶发生反应,产生微球凝集现象,从而达到快速鉴定金黄色葡萄球菌的目的。该方法具有较高的特异性,检测时间短,检测效率高。但是,对呈现血浆凝固酶阴性的少数金黄色葡萄球菌菌株会有漏检现象,造成假阴性的结果,检测准确度较差。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种检测速度快、检测灵敏度高、检测准确度好的金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒的技术方案包括检测试剂 R1 和阴性对照试剂 R2,阴性对照试剂 R2 为聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,其特征是检测试剂 R1 采用免疫聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,免疫聚苯乙烯微球采用羟基功能化聚苯乙烯微球与至少两种特异蛋白偶联而成。

[0006] 本发明的制备方法为:

[0007] 1、检测试剂 R1 的制备方法:在每 100ml 微球缓冲液中,加入 0.5g 免疫聚苯乙烯微球;

[0008] 2、阴性对照试剂 R2 的制备方法:在每 100ml 微球缓冲液中,加入 0.5g 聚苯乙烯微球;

[0009] 其中微球缓冲液的制备方法为:

[0010] ①. 配制浓度为 0.1 ~ 1M, PH 值为 6.0 ~ 9.0 的磷酸盐缓冲液、tris 缓冲液、碳酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液;

[0011] ②. 取上述一种缓冲液,加入曲拉通系列和吐温系列中的一种或多种化合物,使配制后的化合物浓度为 0.5 ~ 2% ;

[0012] ③. 向步骤②中配制好的缓冲液中加入 PEG2000、酪蛋白、明胶、脱脂牛奶中的一种或多种成份物质,使配制后的各成份物质浓度为 1 ~ 5% ;

[0013] ④. 将步骤③配制好的微球缓冲液搅拌均匀,置于 2 ~ 8℃ 的温度环境保存 ;

[0014] 其特征是 :

[0015] 免疫聚苯乙烯微球的制备方法为 :

[0016] ①. 将羟基功能化聚苯乙烯微球分散于水溶液中,使其浓度为 2 ~ 5% ;

[0017] ②. 取上述的溶液 10ml,加入 1 ~ 2ml 新配浓度为 0.1 ~ 0.5mol/L 的 NaIO_4 溶液,混匀,4℃ 温度环境静置 20 分钟 ;

[0018] ③. 在步骤②溶液中加入 1 ~ 2ml,0.16M 的乙二醇水溶液,混匀,室温避光静置 30 ~ 60 分钟 ;

[0019] ④. 在步骤③取得的溶液中,加入特异蛋白溶液,混匀,装入透析袋,用 0.05mol/L PH7.0 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌,在 4℃ 温度环境中透析 16 ~ 20 小时,中途更换二次透析液,混合后特异蛋白浓度为 1 ~ 10mg/ml ;

[0020] ⑤. 在步骤④取得的溶液中,加入新鲜配制的浓度为 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 2 ~ 5ml,混匀,在 4℃ 温度环境中反应 2 小时后,装入透析袋,用 0.1mol/L PH7.0 磷酸盐缓冲液缓缓搅拌,4℃ 温度环境中透析 16 ~ 20 小时,中途更换二次透析液 ;

[0021] ⑥. 取出透析好的反应液,用 0.1mol/L PH7.0 PBS 加至 20ml,置于 2 ~ 8℃ 的温度环境保存。

[0022] 最好是,羟基功能化聚苯乙烯微球的制备方法为 :

[0023] ①. 烷基化壳聚糖 :将壳聚糖、KOH、异丙醇混合置于三颈烧瓶中,匀速搅拌,升温至 40℃ 保持 1 小时,使壳聚糖碱化后升温至 60℃,并滴加卤代烃,恒温搅拌反应 2 ~ 12 小时 ;其中每毫升异丙醇加 0.05 ~ 0.1g 壳聚糖和 0.1 ~ 0.2g KOH ;每毫升反应液含 0.10 ~ 0.30ml 卤代烃 ;

[0024] ②. 将经过步骤①的反应物用丙酮和蒸馏水交替洗涤,直至洗出的蒸馏水中不再有卤离子,烘干后得到烷基化壳聚糖 ;

[0025] ③. 将步骤②取得的烷基化壳聚糖,溶于浓度为 1 ~ 5% 醋酸溶液中,静置 16 ~ 20 小时,使其充分溶解分散,溶解后烷基化壳聚糖的浓度为 1 ~ 5% ;

[0026] ④. 取经过步骤③的烷基化壳聚糖溶液,滴加到聚苯乙烯微球溶液中,室温下匀速搅拌 1 ~ 10 小时,呈均匀分散的胶状溶液后,离心分离得到羟基功能化聚苯乙烯微球 ;在羟基功能化聚苯乙烯微球溶液中,烷基化壳聚糖的浓度为 0.01 ~ 0.5%,聚苯乙烯微球的浓度为 0.1 ~ 1%。

[0027] 本发明的优点之一在于 :提供一种新的基于免疫聚苯乙烯微球凝集反应的金黄色葡萄球菌快速鉴定方法,该方法采用多重检测机制,同时识别金黄色葡萄球菌表面的血浆凝固酶、SPA、多糖抗原、荚膜抗原等,提高了检测试剂的特异性和准确度,减少漏检率 ;

[0028] 本发明的优点之二在于 :提供一种羟基功能化聚苯乙烯微球制备方法,采用烷基化壳聚糖与聚苯乙烯微球进行反应,制备成一种表面分布有高密度羟基基团的功能化聚苯乙烯微球,采用羟基功能化聚苯乙烯微球与抗体物质偶联制备成免疫聚苯乙烯微球,利用

羟基功能化聚苯乙烯微球表面分布的高密度羟基,提高羟基功能化聚苯乙烯微球与特异蛋白的偶联效率,使得免疫聚苯乙烯微球表面偶联上的特异蛋白或抗体物质大大提高,提高试剂的检测灵敏度。

具体实施方式

[0029] 本发明的金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒,包括检测试剂 R1 和阴性对照试剂 R2,阴性对照试剂 R2 为聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,检测试剂 R1 为免疫聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物,免疫聚苯乙烯微球采用羟基功能化聚苯乙烯微球与至少两种特异蛋白偶联而成。所述特异蛋白可以为人或动物的血浆、人或动物的 IgG 免疫球蛋白、抗 SPA 单克隆抗体或多克隆抗体、抗金黄色葡萄球菌荚膜多糖抗原单克隆抗体或多克隆抗体、抗金黄色葡萄球菌单克隆抗体或多克隆抗体。

[0030] 本发明金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒的配制方法:

[0031] 1、检测试剂 R1 的制备方法:在每 100ml 微球缓冲液中,加入 0.5g 免疫聚苯乙烯微球;

[0032] 2、阴性对照试剂 R2 的制备方法:在每 100ml 微球缓冲液中,加入 0.5g 聚苯乙烯微球;

[0033] 其中微球缓冲液的制备方法为:

[0034] ①. 配制浓度为 0.1 ~ 1M, PH 值为 6.0 ~ 9.0 的磷酸盐缓冲液、tris 缓冲液、碳酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液;

[0035] ②. 取上述一种缓冲液,加入曲拉通系列和吐温系列中的一种或多种化合物,使配制后的化合物浓度为 0.5 ~ 2%;

[0036] ③. 向步骤②中配制好的缓冲液中加入 PEG2000、酪蛋白、明胶、脱脂牛奶中的一种或多种成份物质,使配制后的各成份物质浓度为 1 ~ 5%;

[0037] ④. 将步骤②和步骤③配制好的微球缓冲液搅拌均匀,置于 2 ~ 8°C 的温度环境保存;

[0038] 免疫聚苯乙烯微球的制备方法为:

[0039] ①. 将羟基功能化聚苯乙烯微球分散于水溶液中,使其浓度为 2 ~ 5%;

[0040] ②. 取上述的溶液 10ml,加入 1 ~ 2ml 新配的浓度为 0.1 ~ 0.5mol/L 的 NaIO_4 溶液,混匀,4°C 温度环境静置 20 分钟;

[0041] ③. 在步骤②溶液中加入 1 ~ 2ml,0.16M 的乙二醇水溶液,混匀,室温避光静置 30 ~ 60 分钟;

[0042] ④. 在步骤③取得的溶液中,加入特异蛋白溶液,混匀,装入透析袋,用 0.05mol/LPH7.0 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌,在 4°C 温度环境中透析 16 ~ 20 小时,中途更换二次透析液,混合后特异蛋白浓度为 1 ~ 10mg/ml;

[0043] ⑤. 在步骤④取得的溶液中,加入新鲜配制的浓度为 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 2 ~ 5ml,混匀,在 4°C 温度环境中反应 2 小时后,装入透析袋,用 0.1mol/LPH7.0 磷酸盐缓冲液缓缓搅拌,4°C 温度环境中透析 16 ~ 20 小时,中途更换二次透析液;

[0044] ⑥. 取出透析好的反应液,用 0.1mol/LPH7.0PBS 加至 20ml,置于 2 ~ 8°C 的温度环境保存。

[0045] 羟基功能化聚苯乙烯微球的制备方法为：

[0046] ①. 烷基化壳聚糖：将壳聚糖、KOH、异丙醇混合置于三颈烧瓶中，匀速搅拌，升温至 40℃保持 1 小时，使壳聚糖碱化后升温至 60℃，并滴加卤代烃，恒温搅拌反应 2 ~ 12 小时；其中每毫升异丙醇加 0.05 ~ 0.1g 壳聚糖和 0.1 ~ 0.2g KOH；每毫升反应液含 0.10 ~ 0.30ml 卤代烃；

[0047] ②. 将经过步骤①的反应物用丙酮和蒸馏水交替洗涤，直至洗出的蒸馏水中不再有卤离子，烘干后得到烷基化壳聚糖；

[0048] ③. 将步骤②取得的烷基化壳聚糖，溶于浓度为 1 ~ 5%醋酸溶液中，静置 16 ~ 20 小时，使其充分溶解分散，溶解后烷基化壳聚糖的浓度为 1 ~ 5%；

[0049] ④. 取经过步骤③的烷基化壳聚糖溶液，滴加到聚苯乙烯微球溶液中，室温下匀速搅拌 1 ~ 10 小时，呈均匀分散的胶状溶液后，离心分离得到羟基功能化聚苯乙烯微球；在羟基功能化聚苯乙烯微球溶液中，烷基化壳聚糖的浓度为 0.01 ~ 0.5%，聚苯乙烯微球的浓度为 0.1 ~ 1%。

[0050] 羟基功能化聚苯乙烯微球制备的优选方案为：

[0051] ①. 壳聚糖的烷基化：将 5g 壳聚糖、10g KOH 与 100ml 异丙醇混合置于三颈烧瓶中，匀速搅拌，升温至 40℃保持 1 小时，使壳聚糖碱化后升温至 60℃，并滴加 20ml 卤代烃，恒温搅拌反应 8 小时；卤代烃采用氯代十二烷，制备成的烷基化壳聚糖为十二烷基壳聚糖；

[0052] ②. 将经过步骤①的反应物用丙酮和蒸馏水交替洗涤，直至洗出的蒸馏水中不再有卤离子，烘干后得到烷基化壳聚糖；

[0053] ③. 将烷基化壳聚糖，溶于浓度为 2%的醋酸溶液中，静置 12 小时，使其充分溶解分散，溶解后烷基化壳聚糖的浓度为 1%；

[0054] ④. 取经过步骤③的烷基化壳聚糖溶液，滴加到聚苯乙烯微球溶液中，使烷基化壳聚糖的浓度为 0.01%，聚苯乙烯微球的浓度为 0.5%，室温下匀速搅拌 5 小时，呈均匀分散的胶状溶液后，离心分离得到羟基功能化的聚苯乙烯微球。

[0055] 微球缓冲液制备的优选方案为：

[0056] ①. 配制浓度为 1M, PH 值为 6.0 的磷酸盐缓冲液；

[0057] ②. 在上述磷酸盐缓冲液中加入 1%的曲拉通和 0.5%的吐温 10，搅拌均匀；

[0058] ③. 向步骤②中配制好的缓冲液中加入 1%的 PEG2000、2%的酪蛋白，搅拌均匀；

[0059] ④. 将步骤②和步骤③配制好的混合缓冲液搅拌均匀，并将制成微球缓冲液置于 4℃的温度环境保存。

[0060] 免疫聚苯乙烯微球制备的优选方案为：

[0061] ①. 将羟基功能化聚苯乙烯微球分散于水溶液中，使其终浓度为 3%；

[0062] ②. 取上述的溶液 10ml，加入 2ml 新配的浓度为 0.5mol/L 的 NaIO₄溶液，混匀，4℃温度环境静置 20 分钟；

[0063] ③. 在步骤②溶液中加入加入 2ml、0.16M 的乙二醇水溶液，混匀，室温避光静置 30 分钟；

[0064] ④. 在步骤③取得的溶液中，加入人血浆、抗 SPA 单克隆抗体、抗金黄色葡萄球菌荚膜多糖单克隆抗体特异蛋白溶液，使各种特异蛋白的浓度为 2mg/ml，混匀后装入透析袋，用 0.05mol/LPH7.0 碳酸盐缓冲液缓缓搅拌，4℃温度环境中透析 12 小时，中途更换二次透

析液；

[0065] ⑤. 在步骤④取得的溶液中,加入新鲜配制的浓度为 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 2ml, 混匀, 在 4℃ 温度环境中反应 2 小时后, 装入透析袋, 用 0.1mol/LPH7.0 磷酸盐缓冲液缓缓搅拌, 4℃ 温度环境中透析 12 小时, 中途更换二次透析液；

[0066] ⑥. 取出透析好的反应液, 用 0.1mol/LPH7.0PBS 加至 20ml, 置 4℃ 的温度环境保存。

专利名称(译)	金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103852580B	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201410057836.5	申请日	2014-02-18
[标]发明人	李超 吴玲智 诸葛锐军 林磊 许天鸿		
发明人	李超 吴玲智 诸葛锐军 林磊 许天鸿		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/545 G01N33/56911 G01N2333/31		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN103852580A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种金黄色葡萄球菌鉴定试剂盒及其制备方法，包括检测试剂R1和阴性对照试剂R2，阴性对照试剂R2为聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物，其特征是检测试剂R1采用免疫聚苯乙烯微球与微球缓冲液的混合物，免疫聚苯乙烯微球采用羟基功能化聚苯乙烯微球与至少两种特异蛋白偶联而成。羟基功能化聚苯乙烯微球制备方法，采用烷基化壳聚糖与聚苯乙烯微球进行反应，利用羟基功能化聚苯乙烯微球表面分布的高密度羟基，提高羟基功能化聚苯乙烯微球与特异蛋白的偶联效率，使得免疫聚苯乙烯微球表面偶联上的特异蛋白或抗体物质大大提高，具有检测灵敏度高、准确度高，漏检率少等优点。