



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107132353 A

(43)申请公布日 2017.09.05

(21)申请号 201710342836.3

(22)申请日 2017.05.16

(71)申请人 张子林

地址 519000 广东省珠海市香洲区狮山路
417号308室

(72)发明人 张子林 廖汉明 张羽

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 温旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

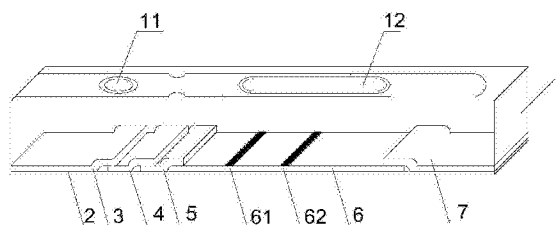
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法和检测方法,属于涉及微生物检测试剂盒技术领域。该试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸,检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在底板上的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸;第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体,第二结合物垫上含有生物素化兔抗B族链球菌抗体;包被膜上由左往右依次设置有平行排列的检测T线和质控C线,检测T线上包被有固相化链霉亲和素,质控C线上包被有固相化羊抗兔IgG抗体。本发明检测方便快捷,检测灵敏度高,特异性强,可重复性高,客观可靠,可定性和定量检测B族链球菌。



1. 一种B族链球菌的检测试剂盒,所述试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸,其特征在于:所述检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在所述底板上的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸;所述第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体,所述第二结合物垫上含有生物素化兔抗B族链球菌抗体;所述包被膜上由左往右依次设置有一条检测T线和一条质控C线,所述检测T线与质控C线平行排列,所述检测T线上包被有用于与生物素化兔抗B族链球菌抗体结合的固相化链霉亲和素,所述质控C线上包被有用于与Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体结合的固相化羊抗兔IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于:所述包被膜的两端分别与第二结合物垫和吸水纸相互交叠连接,所述第二结合物垫上压贴有第一结合物垫,所述第一结合物垫上压贴有样品垫。

3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于:所述样品垫为玻璃纤维垫或聚酯纤维垫。

4. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于:所述包被膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于:所述盒体上开设有向所述样品垫添加样品的加样孔和用于观察检测结果的观察窗口。

6. 一种如权利要求1~5中任一项所述的检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 样品垫制备:将样品垫置于样品垫处理液中浸泡或将样品垫处理液均匀喷涂在样品垫上,然后将含有样品垫处理液的样品垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;其中,样品垫处理液为含5%吐温-20、1%BSA的pH为8.5的0.15mol/L硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液;

2) 第一结合物垫制备:将Eu³⁺乳胶微球活化,向活化后的Eu³⁺乳胶微球加入兔抗B族链球菌抗体制成Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体,将Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体喷涂于第一结合物垫上,将含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体的第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;

3) 第二结合物垫制备:将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂与兔抗B族链球菌抗体混合反应制成生物素化兔抗B族链球菌抗体,将生物素化兔抗B族链球菌抗体喷涂于第二结合物垫上,将含有生物素化兔抗B族链球菌抗体的第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;

4) 包被膜制备:将链霉亲和素通过点膜机在包被膜上划好检测T线,将羊抗兔IgG抗体通过点膜机在包被膜上划好质控C线,将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h,备用;

5) 检测试纸组装:将制得的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸由左往右依次压贴在底板上制得检测试纸,将检测试纸安装在盒体内。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于:步骤2)中包括以下具体步骤:

a、活化Eu³⁺乳胶微球:用pH为4.5-7.5的MES缓冲液洗涤1%Eu³⁺乳胶微球,离心10~15min去上清,加入硼酸盐缓冲液超声重悬两次,使混合均匀,以上操作重复两次;向Eu³⁺乳胶微球混悬液中按1~1.5:1的比例加入EDC,室温下持续混匀15~20min,得到Eu³⁺乳胶微球

溶液；

b、结合兔抗B族链球菌抗体：向Eu³⁺乳胶微球溶液中加入兔抗B族链球菌抗体，使兔抗B族链球菌抗体的浓度为20~200ug/ml，18~26℃下持续混匀反应2~4h；反应完成后离心10~15min洗涤两次，用封闭液重悬，缓慢搅拌30min后离心清洗，得到Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体；再用结合物储存液重悬，4℃下储存备用；其中，封闭液为含30mmol/L甘氨酸、1%BSA的硼酸盐缓冲液，结合物储存液为含1%PEG、0.5%BSA、0.5%吐温-20的0.05mol/L硼酸盐缓冲液；

c、制备第一结合物垫：将Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体用第一稀释液稀释至20~80ug/ml，制成第一工作液，然后将第一工作液按3~5uI/cm²的喷涂量均匀喷涂于玻璃纤维垫或聚酯纤维垫上，制成第一结合物垫，将第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，第一稀释液为含1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、0.05~0.2%聚氧乙烯月桂醚、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于：步骤3) 中包括以下具体步骤：

A、制备生物素化兔抗B族链球菌抗体：用二甲基甲酰胺将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂溶解至1mg/ml，用pH为9.0的0.1mol/L NaHCO₃把兔抗B族链球菌抗体稀释至1mg/ml；然后将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂和兔抗B族链球菌抗体按质量比0.8~1:7混合，室温下搅拌反应3h，然后置于pH为7.2的0.05mol/L PBS中透析过夜，制得生物素化兔抗B族链球菌抗体，备用；

B、制备第二结合物垫：将生物素化兔抗B族链球菌抗体用第二稀释液稀释至20~80ug/ml，制成第二工作液，将第二工作液按20~50uI/cm²的喷涂量均匀喷涂在玻璃纤维垫上，制成第二结合物垫，将第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，第二稀释液为1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于：步骤4) 包括以下具体步骤：

a) 配制包被液：用包被液分别将链霉亲和素稀释至1.0~1.2mg/ml、将羊抗兔IgG抗体稀释至0.5~1mg/ml，制成亲和素工作液和羊抗兔IgG抗体工作液；其中，包被液为含2%甲醇、pH为7.2的0.01mol/L磷酸盐缓冲液；

b) 制备包被膜：将亲和素工作液通过点膜机按1~1.2uI/cm²的点模量在包被膜上划好检测T线，将羊抗兔IgG抗体工作液通过点膜机按1~1.2uI/cm²的点模量在包被膜上划好质控C线，将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h，备用。

10. 一种如权利要求1~5中任一项所述的检测试剂盒的检测方法，其特征在于：该方法依次包括以下步骤：

I、配制样本处理液：

A提取液：配制含有浓度为0.5%吐温-20的0.4mol/L醋酸缓冲液，备用；

B提取液：配制0.1mol/L亚硝酸钠溶液，备用；

II、采集样本：取女性直肠或阴道分泌物置于按A提取液：B提取液=1:1的体积比混合均匀的0.5ml混合液中，搅拌均匀后静置3~5min，制成样本提取液；

III、加样反应：用移液枪吸取静置后的样本提取液100uI，加入到盒体的加样孔内，反应10~15min，样本提取液通过吸水纸的吸水作用沿着样品垫依次向第一结合物垫、第二结

合物垫、包被膜移动；

IV:结果读取:

定性判读:采用紫外光照射检测试剂盒的观察窗口,观察检测T线及质控C线位置上是否有橙红色条带,如均有则为阳性;如检测T线无、质控C线有则为阴性;如质控C线无条带则表明试验失败需重新检测;

定量判读:

将反应完成后的检测试纸插入荧光免疫分析仪当中,设置激发光波长为360nm,检测区域发射出波长为610nm的可见光,荧光免疫分析仪读取检测T线和质控C线区域的荧光相对光强度,通过校准曲线读取样本中B族链球菌的浓度。

一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物检测试剂盒技术领域,具体涉及一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] B族链球菌(GBS)又称无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*),当机体免疫功能低下时,可引起皮肤感染、心内膜炎、产后感染、新生儿败血症和新生儿脑膜炎。孕妇直肠和阴道携带B族链球菌是引起新生儿侵袭性GBS感染的主要原因。GBS细菌可以从这些粘膜部位可上行进入子宫引起胎儿的宫内感染。同时,在分娩的过程中,新生儿经过母体GBS污染的产道,而获得感染。在新生儿,细菌可入侵血液引起肺炎、败血病、脑膜炎等严重侵袭性感染。具有发病率、病死率、致残率高的特点,严重危害妊娠妇女和新生儿健康。因此通过尽早鉴别诊断和治疗链球菌感染,可以显著减轻症状,减少风湿热、肾小球肾炎、风湿性心脏病等并发症的产生。并对预防孕妇围产期胎儿和新生儿的感染,降低新生儿死亡率有着重要的意义。

[0003] 现有的检测B族链球菌的技术方法主要有依靠细菌学鉴定方法以及分子生物学和利用B族链球菌特异性抗原检测的免疫学方法(主要以胶体金等有色微球的免疫层析方法)。这些技术方法具有各自的特点,因此其在临床应用中具有各自的优势和劣势。细菌微生物学鉴定方法主要依靠细菌的生理生化特性,从形态学和代谢生化反应作为判断依据,这种鉴定方法需要将样本经过合适条件培养24-48小时,再通过培养物是否具有相应的典型特征来辨别GBS,因此这种鉴定方法受到培养过程中各种非特异条件因素影响,尤其是很多健康人也携带GBS,而不适当的采集样本技术可以导致真正感染GBS的标本报告处阴性的结果。这种方法整体操作耗时,判断结果出现漏诊错诊几率高。在GBS的鉴定中还可以利用寡核苷酸探针来针对GBS特异性M蛋白基因的N端区域分型,提供一种高度特异性的分析方法。这种方法具有非常高的敏感性和特异性。但是其实验过程须在分子实验室进行,不利于临床和门诊快速应用。国内有采用胶体金免疫层析方法对GBS进行快速抗原检测。其检测不需要任何设备辅助,特异性较高,但是使用该种检测方法灵敏度不高,重复性差,检测范围狭窄,不可定量检测。而对于GBS微生物的临床检测,往往需要更高的检测灵敏度,才能满足临床筛查的需求。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法,本发明所述的试剂盒检测方便快捷,检测灵敏度高,特异性强,可重复性高,检测结果客观可靠,在B族链球菌体外诊断领域具有广阔的应用前景。

[0005] 为解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0006] 一种B族链球菌的检测试剂盒,该试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸,所述检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在所述底板上的样品垫、第一结合物

垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸；所述第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体，所述第二结合物垫上含有生物素化兔抗B族链球菌抗体；所述包被膜上由左往右依次设置有一条检测T线和一条质控C线，所述检测T线与质控C线平行排列，所述检测T线上包被有用于与生物素化兔抗B族链球菌抗体结合的固相化链霉亲和素，所述质控C线上包被有用于与Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体结合的固相化羊抗兔IgG抗体。

[0007] 作为本发明优选的实施方式，所述包被膜的两端分别与第二结合物垫和吸水纸相互交叠连接，所述第二结合物垫上压贴有第一结合物垫，所述第一结合物垫上压贴有样品垫。

[0008] 作为本发明优选的实施方式，所述样品垫为玻璃纤维垫或聚酯纤维垫。

[0009] 作为本发明优选的实施方式，所述包被膜为硝酸纤维素膜。

[0010] 作为本发明优选的实施方式，所述盒体上开设有向所述样品垫添加样品的加样孔和用于观察检测结果的观察窗口。

[0011] 本发明还提供了一种如上所述的检测试剂盒的制备方法，其包括以下步骤：

[0012] 1) 样品垫制备：将样品垫置于样品垫处理液中浸泡或将样品垫处理液均匀喷涂在样品垫上，然后将含有样品垫处理液的样品垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；其中，样品垫处理液为含5%吐温-20、1%BSA的pH为8.5的0.15mol/L硼酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲液；

[0013] 2) 第一结合物垫制备：将Eu³⁺乳胶微球活化，向活化后的Eu³⁺乳胶微球加入兔抗B族链球菌抗体制成Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体，将Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体喷涂于第一结合物垫上，将含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体的第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；

[0014] 3) 第二结合物垫制备：将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂与兔抗B族链球菌抗体混合反应制成生物素化兔抗B族链球菌抗体，将生物素化兔抗B族链球菌抗体喷涂于第二结合物垫上，将含有生物素化兔抗B族链球菌抗体的第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h，备用；

[0015] 4) 包被膜制备：将链霉亲和素通过点膜机在包被膜上划好检测T线，将羊抗兔IgG抗体通过点膜机在包被膜上划好质控C线，将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h，备用；

[0016] 5) 检测试纸组装：将制得的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸由左往右依次压贴在底板上制得检测试纸，将检测试纸安装在盒体内。

[0017] 具体地，步骤2)中包括以下具体步骤：

[0018] a、活化Eu³⁺乳胶微球：用pH为4.5~7.5的MES缓冲液洗涤1%Eu³⁺乳胶微球，离心10~15min去上清，加入硼酸盐缓冲液超声重悬两次，使混合均匀，以上操作重复两次；向Eu³⁺乳胶微球混悬液中按1~1.5:1的比例加入EDC，室温下持续混匀15~20min，得到Eu³⁺乳胶微球溶液；

[0019] b、结合兔抗B族链球菌抗体：向Eu³⁺乳胶微球溶液中加入兔抗B族链球菌抗体，使兔抗B族链球菌抗体的浓度为20~200ug/ml，18~26℃下持续混匀反应2~4h；反应完成后离心洗涤两次，用封闭液重悬，缓慢搅拌30min后离心清洗，得到Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体；再用结合物储存液重悬，4℃下储存备用；其中，封闭液为含30mmol/L甘氨酸、1%

BSA的硼酸盐缓冲液,结合物储存液为含1%PEG、0.5%BSA、0.5%吐温-20的0.05mol/L硼酸盐缓冲液;

[0020] c、制备第一结合物垫:将Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体用第一稀释液稀释至20~80ug/ml,制成第一工作液,然后将第一工作液按3~5uI/cm²的喷涂量均匀喷涂于玻璃纤维垫或聚酯纤维垫上,制成第一结合物垫,将第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;其中,第一稀释液为含1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、0.05~0.2%聚氧乙烯月桂醚、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

[0021] 具体地,步骤3)中包括以下具体步骤:

[0022] A、制备生物素化兔抗B族链球菌抗体:用二甲基甲酰胺将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂溶解至1mg/ml,用pH为9.0的0.1mol/L NaHCO₃把兔抗B族链球菌抗体稀释至1mg/ml;然后将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂和兔抗B族链球菌抗体按质量比0.8~1:7混合,室温下搅拌反应3h,然后置于pH为7.2的0.05mol/L PBS中透析过夜,制得生物素化兔抗B族链球菌抗体,备用;

[0023] B、制备第二结合物垫:将生物素化兔抗B族链球菌抗体用第二稀释液稀释至20~80ug/ml,制成第二工作液,将第二工作液按20~50uI/cm²的喷涂量均匀喷涂在玻璃纤维垫上,制成第二结合物垫,将第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3~5h,备用;其中,第二稀释液为1~3%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、0.5~1%吐温-20、5~15%蔗糖的0.1mol/L的硼酸盐缓冲液。

[0024] 具体地,步骤4)包括以下具体步骤:

[0025] a) 配制包被液:用包被液分别将链霉亲和素稀释至1.0~1.2mg/ml、将羊抗兔IgG抗体稀释至0.5~1mg/ml,制成亲和素工作液和羊抗兔IgG抗体工作液;其中,包被液为含2%甲醇、pH为7.2的0.01mol/L磷酸盐缓冲液;

[0026] b) 制备包被膜:将亲和素工作液通过点膜机按1~1.2uI/cm²的点模量在包被膜上划好检测T线,将羊抗兔IgG抗体工作液通过点膜机按1~1.2uI/cm²的点模量在包被膜上划好质控C线,将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2~3h,备用。

[0027] 本发明还提供了一种如上所述的检测试剂盒的检测方法,该方法依次包括以下步骤:

[0028] I、配制样本处理液:

[0029] A提取液:配制含有浓度为0.5%吐温-20的0.4mol/L醋酸缓冲液,备用;

[0030] B提取液:配制0.1mol/L亚硝酸钠溶液,备用;

[0031] II、采集样本:取女性直肠或阴道分泌物置于按A提取液:B提取液=1:1的体积比混合均匀的0.5ml混合液中,搅拌均匀后静置3~5min,制成样本提取液;

[0032] III、加样反应:用移液枪吸取静置后的样本提取液100uI,加入到盒体的加样孔内,反应10~15min,样本提取液通过吸水纸的吸水作用沿着样品垫依次向第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜移动;

[0033] IV:结果读取:

[0034] 定性判读:采用紫外光照射检测试剂盒的观察窗口,观察检测T线及质控C线位置

上是否有橙红色条带,如均有则为阳性;如检测T线无、质控C线有则为阴性;如质控C线无条带则表明试验失败需重新检测;

[0035] 定量判读:

[0036] 将反应完成后的检测试纸插入荧光免疫分析仪当中,设置激发光的波长为360nm,检测区域发射出波长为610nm的可见光,荧光免疫分析仪读取检测T线和质控C线区域的荧光相对光强度,通过校准曲线读取样本中B族链球菌的浓度。

[0037] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0038] 本发明所述的B族链球菌的检测试剂盒通过使用融合了镧系元素离子 Eu^{3+} 的乳胶微球进行标记,使得试剂盒的荧光强度大、荧光寿命长、荧光激发光谱和发射光谱的斯托克位移大,远小于其他荧光标记物的本底干扰;同时,本发明的试剂盒还采用了生物素-亲和素放大检测荧光信号,从而使检测结果达到更高的灵敏度和更宽的线性范围。本发明通过第一结合物垫和第二结合物垫相结合,能够通过紫外光源快速、准确地实现定性检测;另外,本发明还能够通过荧光分析仪进行荧光信号的测试得出定量检测结果,解决胶体金免疫层析方法无法定量检测的问题,能够给临床医生提供GBS病原浓度变化的信息,指导治疗用药。

[0039] 本发明的优点如下:

[0040] 1.方便快捷:本发明应用于检测样本时,只需加样后等待10-15min即可获得检测结果,操作简单;

[0041] 2.检测设备便宜:由于本发明采用了斯托克位移大的荧光材料,不需要对激发光源进行滤波,减少了昂贵的滤波片的投入;

[0042] 3.检测灵敏度高:本发明所采用的荧光材料荧光寿命长达1ms,因此如采用时间分辨检测设备,可以进一步降低背景荧光的影响,提高检测的灵敏度和特异性;采用生物素、亲和素分别偶联抗体和标记物,放大检测荧光信号,减少抗体用量,增加检测的灵敏度,使得本发明的检测灵敏度高达 $10^3\text{CFU}/\text{mI}$ 。

[0043] 4.特异性强:本发明对于B族链球菌的针对性强,对多数干扰微生物均无阳性结果。

附图说明

[0044] 图1为本发明所述的检测试剂盒的结构示意图;

[0045] 图2为本发明所述的检测试纸判读结果为阳性时的示意图;

[0046] 图3为本发明所述的检测试纸判读结果为阴性时的示意图;

[0047] 图1中,1、盒体;11、加样孔;12、观察窗口;2、底板;3、样品垫;4、第一结合物垫;5、第二结合物垫;6、包被膜;61、检测T线;62、质控C线;7、吸水纸。

[0048] 图2~3中,▲为B族链球菌,人形为 Eu^{3+} 乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体,⊔为生物素化兔抗B族链球菌抗体,⊕为链霉亲和素,⊕为羊抗兔IgG抗体。

具体实施方式

[0049] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0050] 需要说明的是,在本发明中,如未作特殊说明,溶剂与相关试剂的用量为反应的常规用量,本领域的技术人员根据现有技术即可确定;本发明使用的试剂为常规试剂,可通过市场购买得到,所用起始原料和反应物均可通过现有技术或公开的现有文献制备得到。除特殊说明外,本发明所述的百分比含量均为质量百分比;除特殊说明外,本发明所述“室温”均为18~26℃。

[0051] 如图1所示,为本发明所述的一种B族链球菌的检测试剂盒,该试剂盒包括箱体1和设置于箱体1内的检测试纸。具体地,箱体1上开设有用于添加样品的加样孔11和用于观察检测结果的观察窗口12。检测试纸包括底板2、以及由左往右依次连接并通过压敏胶设置在底板2上的样品垫3、第一结合物垫4、第二结合物垫5、包被膜6和吸水纸7。底板2优选为PVC底板2,样品垫3优选为玻璃纤维垫或聚酯纤维垫。第一结合物垫4上含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体,第二结合物垫5上含有生物素化兔抗B族链球菌抗体。包被膜6上由左往右依次设置有一条检测T线61和一条质控C线62,检测T线61与质控C线62平行排列,检测T线61上包被有用于与生物素化兔抗B族链球菌抗体结合的固相化链霉亲和素,质控C线62上包被有用于与Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体结合的固相化羊抗兔IgG抗体。优选地,包被膜6为硝酸纤维素膜。

[0052] 具体地,样品垫3的右端与第一结合物垫4的左端上相互交叠连接且样品垫3位于第一结合物垫4的上方,第一结合物垫4的右端与第二结合物垫5的左端上相互交叠连接且第一结合物垫4位于第二结合物垫5的上方,包被膜6的两端分别与第二结合物垫5和吸水纸7相互交叠连接。由于相邻的两个组件的首尾部分通过压贴形成较为紧密的重叠结构,使得样本能够从上游组件的尾部通过该重叠结构移动至下游组件上。在检测时,可以将液体状态的样本加样到样品垫3上,该液态状态的样品可以通过吸水纸7的吸水作用,沿着样品垫3向与之连接的第一结合物垫4移动,接触到第一结合物垫4后再沿着第一结合物垫4向与之连接的第二结合物垫5移动,接触到第二结合物垫5之后再沿着第二结合物垫5向与之连接的包被膜6移动,接触到包被膜6之后再沿着包被膜6向与之连接的吸水纸7移动。这样的移动通常称为层析作用,由此可知,进一步的,样品垫3与第一结合物垫4的交叠连接处在其延伸方向上与第一结合物垫4与第二结合物垫5的交叠连接处留有间距,第一结合物垫4与第二结合物垫5的交叠连接处在其延伸方向上与第二结合物垫5与包被膜6的交叠连接处留有间距,可以使得第一结合物垫4上Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体能够与样本中的待测抗原留有充分的结合时间,如待测样品中存在所要检测的特异性抗原,则可以在第一结合物垫4处形成抗原—Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体复合物;同样地,第二结合物垫5与包被膜6的交叠连接处与包被膜6与吸水纸7之间的交叠连接处之间留有间距,预留充分的结合时间。

[0053] 本发明的基本原理如下:

[0054] 本发明在免疫层析技术基础上应用了含有镧系元素离子Eu³⁺的乳胶微球作为高敏感性和特异性的标记物质,并采取生物素、亲和素放大检测荧光信号,能够快速、准确检测女性直肠、阴道分泌物中的B族链球菌。当样本加入到本发明的检测试剂盒中时,B族链球菌会先与Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体结合,接着会与生物素化兔抗B族链球菌抗体结合,形成夹心结构,该结构随着样本液体在固相的层析介质上流动,经过链霉亲和素固定的区域时,被捕获形成检测T线,再流经羊抗兔IgG抗体固定的区域时,被捕获形成质控C线,

其余不反应的抗体以及其他物质会随着层析作用流至吸水纸中,自行与参加反应的抗原抗体结合区域分离开来。反应后的检测试纸通过波长365nm的紫外灯激发检测区域,检测区域发射出610nm的可见发射光,该可见发射光的强度与样本中的B族链球菌抗原浓度呈正相关,可以通过CCD或荧光检测仪进行测量光强度,再拟合计算出样本中的B族链球菌浓度,实现定量检测;也可以直接通过目测检测T线区域荧光条带的有无,进行定性检测。

[0055] 实施例1:

[0056] 一、B族链球菌检测试剂盒的制备方法:

[0057] 步骤1) 样品垫制备:通过对玻璃纤维垫或聚酯纤维垫等多孔径介质进行处理,从而让加样到样品垫的理化性质达到免疫反应的最优条件,降低样本中干扰物质引起的偏差。

[0058] 所需材料:

[0059] 玻璃纤维垫,型号为AhIstrom8964;

[0060] 样品垫处理液:pH为8.5、含5%吐温-20、1%BSA的0.15mol/L硼酸盐缓冲液。

[0061] 处理方法:

[0062] 用裁纸刀将玻璃纤维裁切成30cm×10cm,放入样品垫处理液中,浸泡处理,也可以通过气泵喷头按40uI/cm²的喷涂量将处理液均匀的喷涂在样品垫上。将处理好的样品垫放入37℃、相对湿度小于20%的干燥环境中烘干4h,置于干燥环境保存待用。

[0063] 步骤2) 第一结合物垫制备:

[0064] 所需材料:

[0065] 玻璃纤维垫,型号为AhIstrom8964;

[0066] Eu³⁺乳胶微球,购自武汉华科微科科技有限公司;

[0067] 碳二亚胺盐酸盐(EDC);

[0068] 兔抗B族链球菌抗体,购自Meridian公司;

[0069] pH为6.0的0.1mol/L MES缓冲液;

[0070] pH为8.0的0.05mol/L硼酸盐缓冲液;

[0071] 封闭液:pH为8.0、含1%BSA、30mmol/L甘氨酸的0.05mol/L硼酸盐缓冲液;

[0072] 结合物储存液:pH为8.0、含1%PEG、0.5%BSA、0.5%吐温-20的0.05mol/L硼酸盐缓冲液;

[0073] 第一稀释液:pH为8.0、含1%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)、1%的吐温-20、0.1%聚氧乙烯月桂醚(Brij L23)、10%蔗糖的0.1mol/L硼酸盐缓冲液。

[0074] 处理方法:

[0075] a、活化Eu³⁺乳胶微球:

[0076] 吸取0.5mI 1%Eu³⁺乳胶微球,用0.5mI MES缓冲液洗涤两次,每次洗涤后,在转速13000g下离心15min,去上清,加入pH为8.0的0.05mol/L硼酸盐缓冲液超声(100w、1min、3s, 3s)重悬两次,使混合均匀。在洗涤后的混悬液中,加入100mg/mI的EDC溶液60uI(需现配现用)混合,室温下180r/min持续混匀15-20min,得到Eu³⁺乳胶微球溶液;

[0077] b、结合兔抗B族链球菌抗体:

[0078] 向活化后的2mI Eu³⁺乳胶微球溶液中立即加入240ug B族链球菌抗体,使兔抗B族链球菌抗体的浓度为120ug/mI,室温下180r/min持续混匀反应3h;反应完成后离心15min洗

涤两次,用封闭液重悬,室温下180r/min缓慢搅拌30min后离心,用结合物储存液清洗2次,得到Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体;然后加入0.5mI结合物储存液重悬,4℃下储存备用。

[0079] c、制备第一结合物垫:

[0080] 将得到的Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体用第一稀释液稀释至25ug/mI,制成第一工作液,用气泵喷头将第一工作液按5uI/cm²的喷涂量均匀连续喷涂在玻璃纤维垫(30cm×20cm)上,每条间隔距离8mm,制成第一结合物垫,将第一结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3h,置干燥环境保存备用。

[0081] 步骤3) 第二结合物垫制备:

[0082] 所需材料:

[0083] 玻璃纤维垫,型号为AhIstrom8964;

[0084] 生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂(BNHS),购自阿拉丁试剂有限公司,也可将生物素偶联抗体经过活化生成生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂,制备过程如下:将双环己基碳化二亚胺(DCCI)加入到含生物素和N-羟基琥珀酰亚胺的二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,各部分比例为4(W):5(W):3(W):60(V)(W为质量比、V为体积比)。室温下放置过夜,过滤沉淀物;滤液减压蒸干后,将残留物用乙醚反复洗涤,产物用异丙醇重结晶,可获得纯化的BNHS。

[0085] 二甲基甲酰胺(DMF);

[0086] 兔抗B族链球菌抗体(Meridian公司);

[0087] PBS透析液:pH为7.2的0.05moI/L PBS缓冲液;

[0088] 第二稀释液:pH为8.0的1%BSA、1%聚乙烯吡咯烷酮、1%吐温-20、5%蔗糖的0.1moI/L的0.1moI/L硼酸盐缓冲液;

[0089] 处理方法:

[0090] A、制备生物素化兔抗B族链球菌抗体:

[0091] 用二甲基甲酰胺将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂溶解至1mg/mI,用pH为9.0的0.1moI/L NaHCO₃把兔抗B族链球菌抗体稀释至1mg/mI;然后将生物素-N-羟基琥珀酰亚胺脂和兔抗B族链球菌抗体按质量比1:7混合,室温下搅拌反应3h,然后置于pH为7.2的0.05moI/L PBS中透析过夜,期间更换PBS透析液一次,制得生物素化兔抗B族链球菌抗体,备用;

[0092] B、制备第二结合物垫:

[0093] 将生物素化兔抗B族链球菌抗体用第二稀释液稀释至60ug/mI,制成第二工作液,将第二工作液按50uI/cm²的喷涂量均匀喷涂在玻璃纤维垫(30cm×20cm)上,制成第二结合物垫,将第二结合物垫置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干3h,置于干燥环境保存备用。

[0094] 步骤4) 包被膜制备:

[0095] 所需材料:

[0096] 链霉亲和素,购自Sigma-Aldrich公司;

[0097] 羊抗兔IgG抗体,购自菲鹏生物股份有限公司;

[0098] PVC底板;

[0099] 硝酸纤维素(NC)膜,型号为sartorius CN95,25mm;

- [0100] 包被缓冲液：含2%甲醇、pH为7.2的0.01mol/L磷酸盐缓冲液；
- [0101] 处理方法：
- [0102] a) 配制包被液：用包被液分别将链霉亲和素稀释至1.0mg/ml、将羊抗兔IgG抗体稀释至0.5mg/ml，制成亲和素工作液和羊抗兔IgG抗体工作液；
- [0103] b) 制备包被膜：
- [0104] 将NC膜粘贴到覆盖有压敏胶的PVC塑料薄底板上，底板宽度为80mm，NC膜位于底板中间，上端留18mm，下端留37mm。将底板置于专用的点膜机点膜平台上，调整好点膜机相关参数，将亲和素工作液通过点膜机按1uI/cm²的点模量在包被膜上划好检测T线，将羊抗兔IgG抗体工作液通过点膜机按1uI/cm²的点模量在包被膜上划好质控C线，将包被好的包被膜置于温度为37℃、相对湿度小于20%的环境中烘干2h，置于干燥环境保存备用。
- [0105] 步骤5) 检测试纸组装：
- [0106] 所需材料：
- [0107] 吸水纸，30cm*20cm；
- [0108] 步骤1)~4) 制得的半成品；
- [0109] 处理方法：
- [0110] 将步骤1) 的样品垫切割成30cm*2cm，步骤2) 的第一结合物垫切割成30cm*1cm，步骤3) 的第二结合物垫切割成30cm*1cm，将吸水纸切割成30cm*2cm。在步骤4) 的PVC底板上端贴附切割好的吸水纸，与NC膜交叠2mm；在PVC底板上依次贴附切割好的第二结合物垫、第一结合物垫、样品垫，两两之间各自交叠1mm；将贴附好的PVC板用切割机中切割成宽度3.5mm的检测试纸，将检测试纸安装到盒体上，加入干燥剂置于铝箔袋中封口。
- [0111] 检测例1：
- [0112] I、配制样本处理液：
- [0113] A提取液：配制含有浓度为0.5%吐温-20的0.4mol/L醋酸缓冲液，备用；
- [0114] B提取液：配制0.1mol/L亚硝酸钠溶液，备用；
- [0115] II、采集样本：用洁净棉签取女性直肠或阴道分泌物置于按A提取液：B提取液=1：1的体积比混合均匀的0.5ml混合液中，搅拌均匀后静置5min，制成样本提取液；
- [0116] III、加样反应：用移液枪吸取静置后的样本提取液100uI，加入到盒体的加样孔内，反应15min，样本提取液通过吸水纸的吸水作用沿着样品垫依次向第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜移动；
- [0117] IV、结果读取：
- [0118] 定性判读：采用紫外光照射检测试剂盒的观察窗口，观察检测T线及质控C线位置上是否有橙红色条带，如均有则为阳性，如图2所示；如检测T线无、质控C线有则为阴性，如图3所示；如质控C线无条带则表明试验失败需重新检测；
- [0119] 定量判读：
- [0120] 将反应完成后的检测试纸插入荧光免疫分析仪当中，设置激发光波长为360nm，检测区域发射出波长为610nm的可见光，荧光免疫分析仪读取检测T线和质控C线区域的荧光相对光强度，通过校准曲线读取样本中B族链球菌的浓度。
- [0121] 对比例1：性能评估试验
- [0122] 为了验证本发明的有益效果，以现有技术中的应用胶体金免疫层析方法制得的试

剂盒作为对比组,以本发明的检测试剂盒作为实验组,在相同的条件下进行灵敏度对比试验和特异性对比试验,具体实验过程和实验结果如下:

[0123] 一、灵敏度对比试验

[0124] 实验样本制备:首先利用比浊仪将B族链球菌(无乳链球菌)用生理盐水稀释至0.5MCF(1.5×10^8 CFU/ml);用样本处理液将以上0.5MCF(1.5×10^8 CFU/ml)的B族链球菌样本分别以10倍梯度稀释6个梯度进行测试,浓度分别为:1:10(1.5×10^7 CFU/ml)、1:100(1.5×10^6 CFU/ml)、1:1000(1.5×10^5 CFU/ml)、1:10000(1.5×10^4 CFU/ml)、1:100000(1.5×10^3 CFU/ml)、1:1000000(1.5×10^2 CFU/ml)。

[0125] 注:MCF为麦氏单位,是浊度的单位,0.5MCF的细菌浓度近似为 1.5×10^8 CFU/ml;CFU/ml:表示每毫升含菌落数量。

[0126] 质控要求:阳性质控品均为阳性。

[0127] 实验方法:用对比组和实验组的试剂盒分别对以上6个梯度浓度的B族链球菌样本进行检测,每个梯度浓度重复3次,检测结果见表1。

[0128] 表1灵敏度对比试验结果

[0129]

样本	对比组	实验组
1:10 (1.5×10^7 CFU/ml)	+	+
1:100 (1.5×10^6 CFU/ml)	+	+
1:1000 (1.5×10^5 CFU/ml)	+	+
1:10000 (1.5×10^4 CFU/ml)	-	+
1:100000 (1.5×10^3 CFU/ml)	-	+
1:1000000 (1.5×10^2 CFU/ml)	-	-

[0130] 注:“-”:表示阴性结果;“+”:表示阳性结果。

[0131] 由表1可知,本发明所述的检测试剂盒的灵敏度可以达到 1.5×10^3 CFU/ml,比传统的胶体金免疫层析方法提高了近100倍。

[0132] 二、特异性对比试验

[0133] 实验样本制备:将A族链球菌、G族链球菌、白色念珠菌、弯曲杆菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌用生理盐水稀释至1MCF(3×10^8 CFU/ml)。

[0134] 质控要求:阴性质控品均为阴性。

[0135] 实验方法:用对比组和实验组的试剂盒分别对以上7种实验样本,每种实验样本重复3次,检测结果见表2。

[0136] 表2特异性对比试验结果

[0137]

样本	对比组	实验组
A族链球菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	-	-
G族链球菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	-	-
白色念珠菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	-	-
弯曲杆菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	-	-
大肠杆菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	-	-

淋病奈瑟菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	-	-
金黄色葡萄球菌1MCF (3×10^8 CFU/ml)	+	-

[0138] 注：“-”：表示阴性结果；“+”：表示阳性结果。

[0139] 由表2可知，本发明的检测试剂盒特异性好，对多数干扰微生物均无阳性结果，而传统的应用胶体金免疫层析方法的试剂盒对于较高浓度的金黄色葡萄球菌会产生假阳性。

[0140] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式，不能以此来限定本发明保护的范围，本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范畴。

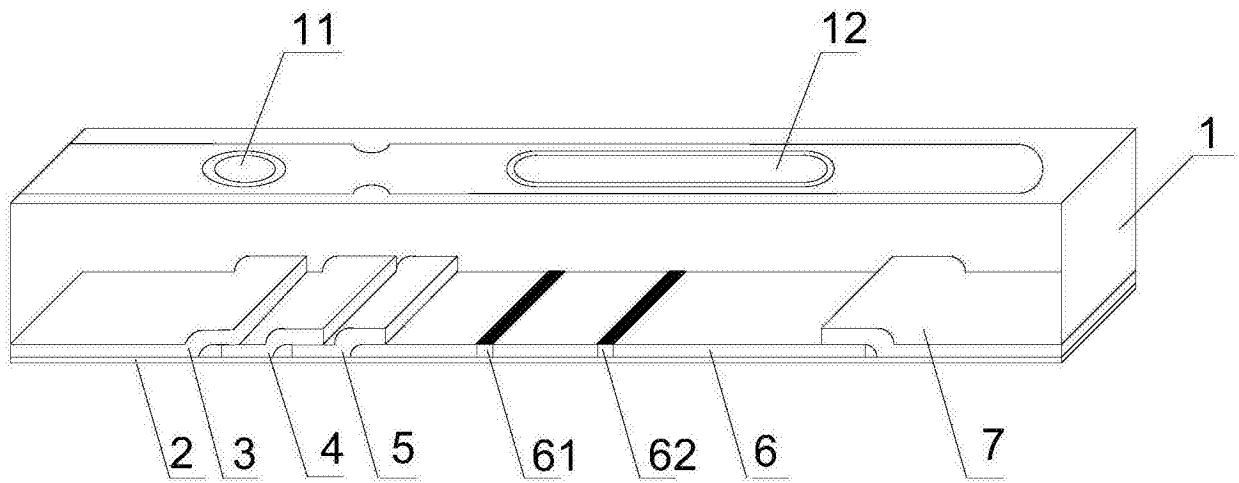


图1

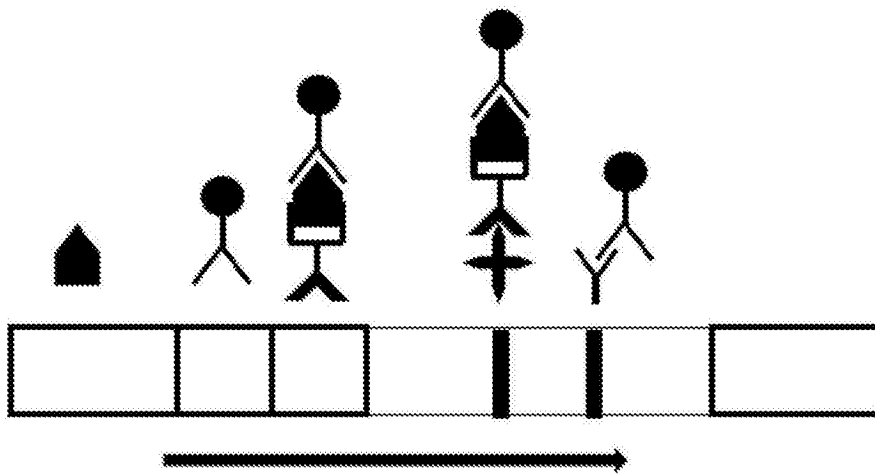


图2

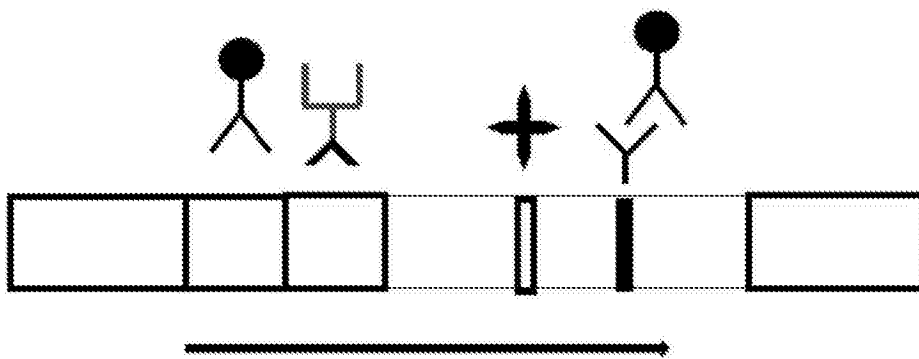


图3

专利名称(译)	一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107132353A	公开(公告)日	2017-09-05
申请号	CN201710342836.3	申请日	2017-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	张子林		
申请(专利权)人(译)	张子林		
当前申请(专利权)人(译)	张子林		
[标]发明人	张子林 廖汉明 张羽		
发明人	张子林 廖汉明 张羽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56944 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/585		
代理人(译)	温旭		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法和检测方法，属于涉及微生物检测试剂盒技术领域。该试剂盒包括盒体和设置于盒体内的检测试纸，检测试纸包括底板、以及由左往右依次连接并设置在底板上的样品垫、第一结合物垫、第二结合物垫、包被膜和吸水纸；第一结合物垫上含有Eu³⁺乳胶微球标记兔抗B族链球菌抗体，第二结合物垫上含有生物素化兔抗B族链球菌抗体；包被膜上由左往右依次设置有平行排列的检测T线和质控C线，检测T线上包被有固相化链霉亲和素，质控C线上包被有固相化羊抗兔IgG抗体。本发明检测方便快捷，检测灵敏度高，特异性强，可重复性高，客观可靠，可定性和定量检测B族链球菌。

