



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109932513 A

(43)申请公布日 2019.06.25

(21)申请号 201910160836.0

(22)申请日 2019.03.04

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘
路866号

申请人 山东泰乐康健生物科技有限责任公
司

(72)发明人 陈瑜 王楠 郑书发 楼滨

(74)专利代理机构 山东众成清泰律师事务所
37257

代理人 丁修亭

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

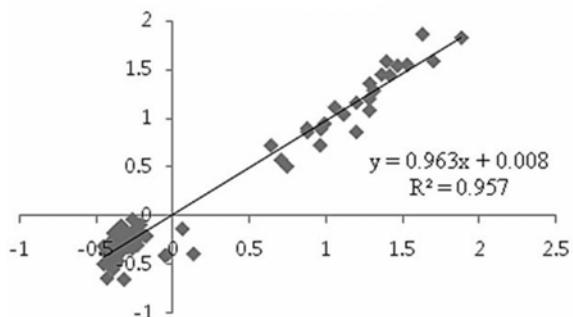
权利要求书2页 说明书9页 附图10页

(54)发明名称

呼吸道病原体检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种呼吸道病原体检测方法，包括以下步骤：1)对给定的呼吸道病原样本进行蛋白提取；2)以步骤1)提取到的蛋白为蛋白样本形成RPPA；3)对步骤2)获得的RPPA通过PWG进行微生物或病毒检测；其中，RPPA为Reverse Phase Protein Array，即反相蛋白阵列；PWG为Planar Wave Guide，即平面光导。依据本发明呼吸道病原体检测方法在样本中所含蛋白量相对较少时不容易产生漏检。



1. 一种呼吸道病原体检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 对给定的呼吸道病原样本进行蛋白提取;
- 2) 以步骤1)提取到的蛋白为蛋白样本形成RPPA;
- 3) 对步骤2)获得的RPPA通过PWG进行微生物或病毒检测;

其中,RPPA为Reverse Phase Protein Array ,即反相蛋白阵列;

PWG为Planar Wave Guide,即平面光导。

2. 根据权利要求1所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,蛋白提取的方法为:

针对痰液:

- t1) 将痰液样本震荡混匀;
- t2) 在痰液样本中加入裂解液,然后混合均匀,获得混合液;
- t3) 对步骤t2)获得的混合液进行温育;
- t4) 对温育后的混合液进行离心分离,取上清,即获得蛋白样本;

针对咽拭子,第一提取方法:

- y11) 取下咽拭子头,置于EP管内;
- y12) 加入裂解液,裂解液完全淹没咽拭子头部;
- y13) 对浸入裂解液的咽拭子头进行温育,促咽拭子头上的起始样本裂解;
- y14) 将温育后的EP管置于离心机进行离心分离,取出咽拭子头,保留上清液,即获得蛋白样本;

针对咽拭子,第二提取方法:

- y21) 取下咽拭子头,将咽拭子头浸入病毒培养液中,混匀;
- y22) 取新咽拭子,蘸取步骤y21)中的病毒培养液,新咽拭子头吸收饱和后取下,置于EP管内;
- y33) 向EP管内加入裂解液直至淹没新咽拭子头,温育裂解;
- y44) 将温育后的EP管置于离心机进行离心分离,取出咽拭子头,保留上清液,即获得蛋白样本。

3. 根据权利要求2所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,所述裂解液为AG4;

针对痰液样本,裂解液与痰液的体积比为1:1。

4. 根据权利要求2所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,还包括对抗体芯片的验证,对抗体芯片验证的方法为:

- k1) 对温育裂解后所获得的液体进行稀释;
- k2) 将稀释后的液体制备到第一多孔板中;
- k3) 将第一多孔板中的液体进一步制备到第二多孔板中,使第一多孔板中每一第一微孔适配于第二多孔板中的多个第二微孔,而在相应的多个第二微孔中制备出适配于第一微孔内液体的梯度稀释液体;
- k4) 将梯度稀释液体制备到PWG芯片上,然后进行芯片封闭;
- k5) 对芯片封闭后的PWG芯片进行温育;
- k6) 对温育后的PWG芯片进行洗涤,然后进行信号读取。

5. 根据权利要求4所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,步骤k1)中稀释所获得的液体的浓度为0.1~0.2微克/微升。

6. 根据权利要求4或5所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,每一第一微孔与四个第二微孔对应,相对应于的梯度稀释液体的四个梯度为:100%、75%、50%、25%。

7. 根据权利要求4所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,PWG芯片上的芯片单元具有多个小单元,每个小单元适配一种抗体。

8. 根据权利要求4或7所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,制备PWG芯片的方法是通过微量点阵仪将梯度稀释液体制备到PWG芯片上,在PWG芯片的制备过程中,应保持50%的湿度以及16摄氏度的温度。

9. 根据权利要求4所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,步骤k5)在进行温育前,对芯片封闭后的PWG芯片进行浸泡洗涤,洗涤次数不少于3次,且不多于5次;

其中,芯片封闭的时间不少于25分钟,且不多于35分钟。

10. 根据权利要求4所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,步骤k5)中,温育温度为37摄氏度,针对一抗温育时间为30分钟,针对二抗温育时间为30分钟。

11. 根据权利要求4所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,步骤k4)所适配抗体的稀释度为1:2500。

12. 根据权利要求1所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,在步骤2)前,还包括对步骤1)提取到的蛋白样本进行抗体适应性筛选的步骤。

13. 根据权利要求12所述的呼吸道病原体检测方法,其特征在于,抗体适应性筛选的方法为蛋白免疫印迹法。

呼吸道病原体检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种呼吸道病原体检测方法。

背景技术

[0002] 流行性感冒病毒 (Influenza Virus), 是正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) 的代表种, 简称流感病毒, 包括人流感病毒和动物流感病毒, 人流感病毒分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 三型, 是流行性感冒 (流感) 的病原体。其中甲型流感病毒抗原性易发生变异, 多次引起世界性大流行。例如1918~1919年的大流行中, 全世界至少有2000万~4000万人死于流感; 乙型流感病毒也对人类也较强的致病性, 可在局部地区爆发流行。

[0003] 甲型流感病毒颗粒呈多形性, 其中球形直径80~120nm, 有囊膜。基因组为分节段单股负链RNA。甲型流感病毒共有8个基因节段, 依据其外膜血凝素 (H) 和神经氨酸酶 (N) 蛋白抗原性不同, 目前从禽类已鉴定出16个H亚型 (H1~H16) 和9个N亚型 (N1~N9)。

[0004] 近一个世纪, 在人间流行的流感病毒主要是H1、H2、H3和N1、N2等几种抗原构成的亚型, 但流感病毒较易出现突变, 可产生新型的流感病毒, 造成局部地区爆发流行乃至全球大流行。2013年我国新发现人感染H7N9禽流感就在短期内蔓延至全国各地, 截止目前已累计报告确诊病例近2000例, 死亡率高达40%, 严重威胁人民生命健康安全。

[0005] 检测试剂是实现早发现、早诊断、早治疗和有效降低重大新发传染病病死率的关键技术手段。目前流感诊疗的实验室检查包括血常规、血生化、病原学及相关检测及胸部影像学检查等。病原学检测是流感病毒的筛查、确认至关重要的环节。

[0006] 作为病毒鉴定标准的传统病原分离检测方法对培养条件及技术要求较高, 且实验周期长(一般3-7天), 因此不适用于大规模快速临床诊断与筛查。流感病毒核酸检测具有较高的灵敏度及特异性, 作为目前较为普及的检测标准, 在医疗机构有着广泛的应用, 然而实时荧光定量PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应) 技术则需要较高的设备及实验室环境要求, 并存在其它一系列劣势, 如操作繁琐、较易污染, 操作人员要求高, 针对大样本的消耗大, 效率低等, 因此也较难普及并在基层开展。

[0007] 快速抗原检测法是对病原体抗原进行检测的一大类方法。这类方法以快速检测法 (Rapid Diagnostic Tests) 为主, 其中主要通过免疫法对抗原进行特异性识别鉴定, 包括胶体金法, 斑点ELISA法, 以及直接免疫荧光法 (DFA) 等。胶体金法和斑点ELISA法因操作简单而被广泛应用到基层医疗机构, 其操作简便性的优势得到很大的体现。然而直接免疫荧光法则对实验技术要求较高, 不易进行标准化, 而所有的抗原检测均存在一个技术瓶颈, 即灵敏度问题。

[0008] 在快速检测法应用中, 因抗原不可像核酸一样被复制, 且临床样本, 尤其是鼻/咽拭子等来源的样本所含的蛋白量的少, 回收率低, 因此其检测灵敏度完全依赖于检测方法本身, 很容易造成漏检, 并且不能实现进一步的流感亚型分型 (如甲流亚型分型), 更加适用于流感早期初筛, 而最终定型及分型还需要通过核酸检测来完成。

发明内容

[0009] 针对现有技术在面对样本中所含蛋白量相对较少而容易产生漏检的技术问题,本发明的目的在于提供一种在样本中所含蛋白量相对较少时不容易产生漏检的呼吸道病原体检测方法。

[0010] 依据本发明的实施例,提供一种呼吸道病原体检测方法,包括以下步骤:

- 1) 对给定的呼吸道病原样本进行蛋白提取;
- 2) 以步骤1) 提取到的蛋白为蛋白样本形成RPPA;
- 3) 对步骤2) 获得的RPPA通过PWG进行微生物或病毒检测;

其中,RPPA为Reverse Phase Protein Array ,即反相蛋白阵列;

PWG为Planar Wave Guide,即平面光导。

[0011] 上述呼吸道病原体检测方法,可选地,蛋白提取的方法为:

针对痰液:

- t1) 将痰液样本震荡混匀;
- t2) 在痰液样本中加入裂解液,然后混合均匀,获得混合液;
- t3) 对步骤t2) 获得的混合液进行温育;
- t4) 对温育后的混合液进行离心分离,取上清,即获得蛋白样本;

针对咽拭子,第一提取方法:

- y11) 取下咽拭子头,置于EP管内;
- y12) 加入裂解液,裂解液完全淹没咽拭子头部;
- y13) 对浸入裂解液的咽拭子头进行温育,促咽拭子头上的起始样本裂解;
- y14) 将温育后的EP管置于离心机进行离心分离,取出咽拭子头,保留上清液,即获得蛋白样本;

针对咽拭子,第二提取方法:

- y21) 取下咽拭子头,将咽拭子头浸入病毒培养液中,混匀;
- y22) 取新咽拭子,蘸取步骤y21) 中的病毒培养液,新咽拭子头吸收饱和后取下,置于EP管内;
- y33) 向EP管内加入裂解液直至淹没新咽拭子头,温育裂解;
- y44) 将温育后的EP管置于离心机进行离心分离,取出咽拭子头,保留上清液,即获得蛋白样本。

[0012] 可选地,所述裂解液为AG4;

针对痰液样本,裂解液与痰液的体积比为1:1。

[0013] 可选地,还包括对抗体芯片的验证,对抗体芯片验证的方法为:

- k1) 对温育裂解后所获得的液体进行稀释;
- k2) 将稀释后的液体制备到第一多孔板中;
- k3) 将第一多孔板中的液体进一步制备到第二多孔板中,使第一多孔板中每一第一微孔适配于第二多孔板中的多个第二微孔,而在相应的多个第二微孔中制备出适配于第一微孔内液体的梯度稀释液体;
- k4) 将梯度稀释液体制备到PWG芯片上,然后进行芯片封闭;
- k5) 对芯片封闭后的PWG芯片进行温育;

k6) 对温育后的PWG芯片进行洗涤,然后进行信号读取。

[0014] 可选地,步骤k1)中稀释所获得的液体的浓度为0.1~0.2微克/微升。

[0015] 可选地,每一第一微孔与四个第二微孔对应,相对应于的梯度稀释液体的四个梯度为:100%、75%、50%、25%。

[0016] 可选地,PWG芯片上的芯片单元具有多个小单元,每个小单元适配一种抗体。

[0017] 可选地,制备PWG芯片的方法是通过微量点阵仪将梯度稀释液体制备到PWG芯片上,在PWG芯片的制备过程中,应保持50%的湿度以及16摄氏度的温度。

[0018] 可选地,步骤k5)在进行温育前,对芯片封闭后的PWG芯片进行浸泡洗涤,洗涤次数不少与3次,且不多于5次;

其中,芯片封闭的时间不少于25分钟,且不多于35分钟。

[0019] 可选地,步骤k5)中,温育温度为37摄氏度,针对一抗温育时间为30分钟,针对二抗温育时间为30分钟。

[0020] 可选地,步骤k4)所适配抗体的稀释度为1:2500。

[0021] 可选地,在步骤2)前,还包括对步骤1)提取到的蛋白样本进行抗体适应性筛选的步骤。

[0022] 可选地,抗体适应性筛选的方法为蛋白免疫印迹法。

[0023] 依据本发明的实施例的呼吸道病原体检测方法,基于平面光导的反向蛋白阵列方法对蛋白样本的量要求相对较低。反相蛋白阵列通常应用于肿瘤中目的蛋白的检验,本发明将其应用于呼吸道病原体的检测,是其在呼吸道病原体检测领域中的首次应用。呼吸道病原体检测,无论初始样本是痰液还是咽拭子,所含有的蛋白样本量都非常低,容易产生误检或者漏检。而反相蛋白阵列恰好能够弥补这一缺陷,在蛋白样本量相对较少的情况下,不容易产生误检或者漏检。

附图说明

[0024] 图1为痰液及咽拭子蛋白提取法1提取到的蛋白浓度效果对比图。

[0025] 图2为咽拭子蛋白提取法2提取到的蛋白浓度效果对比图。

[0026] 图3-1为H1N1蛋白免疫印迹法抗体检验证效果图。

[0027] 图3-2为H3N2蛋白免疫印迹法抗体检验证效果图。

[0028] 图3-3为H7N9蛋白免疫印迹法抗体检验证效果图。

[0029] 图4为痰液及咽拭子样本H1抗体蛋白免疫印迹验证效果图。

[0030] 图5为读取的PWG(从左至右的三个芯片依次匹配的H1抗体、H3抗体、H7抗体)芯片信号图。

[0031] 图6-1为四个稀释梯度H1N1抗体特异性反应柱形图。

[0032] 图6-2为四个稀释梯度H3N2抗体特异性反应柱形图。

[0033] 图6-3为四个稀释梯度H7H9抗体特异性反应柱形图

图7-1为一抗(H1)浓度1:2500稀释度下的线性关系图。

[0034] 图7-2为一抗(H3)浓度1:2500稀释度下的线性关系图。

[0035] 图7-3为一抗(H7)浓度1:2500稀释度下的线性关系图。

[0036] 图8为芯片间线性相关性图。

- [0037] 图9为实验条件相关性对比图。
- [0038] 图10为 Trizol蛋白提取及芯片检测数据。
- [0039] 图11为20例临床咽拭子样本检验的原始图像示例,抗体浓度逐步稀释1:1000,1:4000,1:16000。
- [0040] 图12为28例临床咽拭子样本的AUC曲线。
- [0041] 图13为28例临床咽拭子样本的混淆矩阵(PCR与RPPA比较)。

具体实施方式

[0042] 基于平面波导(Planar Wave Guide,PWG)技术的生物芯片技术作为一种高灵敏度的检测技术在蛋白分子检测方面有着不可比拟的优势。其原理是通过在平面固相基质(如二氧化硅等)中刻入光栅结构,光从光密介质进入光疏介质表面时,当入射角度满足一定条件时,光会全部反射回光密介质内,即全反射现象。全反射现象会在光疏介质表面形成一个光场,该光场通常被定义为渐逝波,该渐逝波的高度为100纳米,而生物分子在固相表面的结合高度一般在几十纳米,因此通过荧光检测可捕获到与固相表面结合的分子,而在液相(如含有探针及目的蛋白的液体)中的大部分杂质分子将不会被激光激发,大大降低检测的背景噪音,并真实反映信号强度,不受环境干扰。

[0043] 基于PWG的芯片技术的一个主要应用场景是在反相蛋白阵列(Reverse Phase Protein Arrays,RPPA)技术领域。反相蛋白阵列技术在肿瘤组织分析领域有着广阔的应用,其主要优势是样本消耗量小,并且同时可以实现大样本的高通量多靶点检测,从而实现大量肿瘤组织的多维度蛋白组学分析。

[0044] 目前RPPA在微生物检测及其它病原体检测的应用几乎为空白,还未有文献报道相关研究。而得益于其在肿瘤检测中的应用优势,该方法则十分符合临床对多种呼吸道病原体同时进行高通量快速检测的实际需求,因此十分适合于开发新型的检测技术。除此之外,在RPPA样本处理的方法学研究中,目前还未有从痰液及鼻咽拭子中抽提蛋白并进行样本制备的方法学研究及报道,因此这类方法更加具有独创性和实际应用价值。

[0045] 例如痰液,正常人一般不咳痰,或者只有极少量的泡沫样痰或粘液样痰。当呼吸道有病变时,痰量会增加,但短时间内可被提取的痰量仍然不多。送检的痰液必须十分新鲜,要求送检样本在1小时内处理,以防止细胞自溶,因此,痰液样本本身对检测速度就有比较高的要求。目前针对痰液的检查方法主要是涂片检查和显微检查,后者误检率相对较高。涂片检查对痰液量要求比较高,因痰液样本量有限,只能做出非常少量的检查,不仅所检涉及病毒或者病原体数量少,而且容易产生误检。

[0046] 关于RPPA,即反相蛋白阵列,所对应的芯片即反相芯片,这种芯片是把样品固定在固体支持物上,将单个可溶的探针如抗体溶液与芯片孵育,用于分析检测在不同样品中目的蛋白的存在与否,这种技术在蛋白芯片技术领域中还是新兴技术,可用于大量组织样品、细胞样品或细胞样品碎片的不同种类参数的检测。

[0047] RPPA就像是一个非常高通量的ELISA,但其其中还包含有一种重要的优点——每个玻璃载体只需要纳克级的样品,爱丁堡大学的Neil Carragher认为这一RPPA只需少量样品,就能分析这些宝贵的临床活检样品,起始样本提取蛋白被稀释后分为200多个稀释液,还会有起始样本剩余。

[0048] RPPA有赖于蛋白提取,蛋白提取后就可以在提取到的蛋白中检定是否存在目的蛋白,从而用于确定相关病原体的存在。

[0049] 关于起始样本收集,对于呼吸道疾病,主要是痰液收集或者咽拭子上所粘附体液的收集。

[0050] 关于RPPA,在蛋白提取后,进一步的处理是对提出到的蛋白进行样本处理,然后进行样本定量、样本制备,最终形成芯片,即芯片制备。进一步通过芯片封闭、抗体孵育及洗脱,最后进行数据扫描,对结果进行判读。

[0051] 目前针对呼吸道疾病缺少必要的蛋白提取方法,在本发明的实施例中,根据样本来源不同,采用不同的蛋白提取方法,将生物样本(细胞)中的蛋白混合物进行相对高效的提取,并使之完全变性,将提取到的均一化的蛋白样本通过微量打印的方式制备在固相材质芯片表面(如玻璃载体以及硝酸纤维膜等),再通过一系列抗原抗体(适用于变性蛋白识别的抗体如蛋白免疫印迹WB适用抗体)反应以及信号放大捕获来检测待测样本中的目的蛋白并通过荧光信号或显色法反映出待测蛋白的含量。

[0052] 基于PWG平面波导的反相蛋白阵列在呼吸道病原体检测中的优势:

仅需少量起始样本(大约10-20微升甚至更少,对于呼吸道疾病而言,例如痰液或者咽拭子所取得的体液量都会非常少),在此条件下,仍然可同时检测多达几十种甚至上百种靶点(因每个样本每个指标检测点的样本含量仅需300-800皮升)。

[0053] 呼吸道传染病起始样本来源多为鼻咽拭子和痰液,尤其是鼻咽拭子样本,其所收集的蛋白含量少,因此对检测方法的灵敏度要求极高,而基于PWG检测原理的反相蛋白阵列技术刚好可以弥补这方面的不足。相对于以硝酸纤维膜及化学信号放大显色反应(如基于生物素亲和素的信号放大系统)为技术路径的反相蛋白阵列方法,基于PWG的RPPA的另一个优势在于通过PWG芯片技术可以将检测流程控制在1个小时内完成(在完全优化的情况下可在15分钟内完成检测)。这是由于最终的信号读取可在液相中检测,通过荧光直接标记一抗完成,而无需洗脱,二抗温育等步骤,而通过显色法进行反相蛋白阵列分析则引入了二抗反应,洗脱,显色等环节,使操作流程繁琐化,并引入更多质控流程,不易于临床实际应用。而基于PWG的芯片检测方法则十分符合临床检验的需求,易于进行流程控制,更加易于产品及服务的商业化开发,且速度更快,尤其是对流感等呼吸道传染病,因其药物治疗时间受诊断时间影响大(以神经氨酸抑制剂达菲为例),因此在症状早期如能得到准确诊断将会使得治疗效果达到最大化,降低并发症发生率29%-43%。而这个问题对于处在突发性流感最前沿的中小型医院恰恰是最明显的。

[0054] 下面对呼吸道病原体检测方法所涉及各个步骤详述如下:

首先是起始样本中蛋白样本的提取方法,以及蛋白样本的定量,如前所述,由于起始样本量少,目前通常只能用于单一检测,例如镜检或者涂片检测。

[0055] 针对不同的起始样本,采用不同的方法对咽拭子及痰液的样本进行处理,其操作流程如下:

痰液样本:

- t1) 将痰液样本震荡混匀;
- t2) 按1:1比例(体积比)加入裂解液AG4;
- t3) 对步骤t2)获得的混合物使用超声波匀浆,获得混合液;

t4) 对步骤t3) 所获得混合液在100度的条件下进行温育,温育时间为10分钟,以促充分裂解;

t5) 对步骤t4) 温育后的混合液在10000转/分钟的转速下离心5分钟,取上清,即获得蛋白样本。

[0056] 咽拭子蛋白提取法1:

y11) 取下咽拭子头,并将其置于EP管内

y12) 向EP管内加入50-100微升AG4裂解液,裂解液的量足以完全淹没咽拭子头;

y13) 对浸入裂解液的咽拭子头进行温育,促咽拭子头上的起始样本裂解,温度条件时100摄氏度,温育时间是10分钟;

y14) 将EP管置于离心机,离心机工作参数是10000转/分钟,离心5分钟,取出咽拭子,保留上清液,即获得蛋白样本。

[0057] EP管是一种小型的离心管,又称为EP(eppendorf)管。可以与微型离心机配套使用,用于微量试剂的分离 微量离心管离心。

[0058] 咽拭子蛋白提取法2:

y21) 取下咽拭子头,将咽拭子头浸入病毒培养液中(0.5-1毫升),并充分混匀;

y22) 用新咽拭子蘸取病毒培养液使之充分吸收,至饱和,进而取下新咽拭子头置于EP管内;

y23) 向EP管内加入50-100微升AG4裂解液,裂解液的量足以完全淹没咽拭子头;

y24) 对浸入裂解液的新咽拭子头进行温育,促咽拭子头上的蘸取的病毒培养液中的病毒裂解,温度条件时100摄氏度,温育时间是10分钟

y25) 将EP管置于离心机,离心机工作参数是10000转/分钟,离心5分钟,取出咽拭子,保留上清液,即获得蛋白样本。

[0059] 以上针对痰液样本和咽拭子提取获得的蛋白样本即待测样本,在以下的步骤中基于RPPA进行目的蛋白的检测。

[0060] 比对已知的DTT对咽拭子进行处理以及用PBS对痰液进行预处理的方法,所提取到的咽拭子蛋白浓度可达到1-2微克/微升,痰液蛋白浓度可达5微克/微升。并通过后续样本进行重验证,这两种方法虽可同时实现蛋白提取,但引入了额外的样本处理步骤,因此便捷性并不比AG4直接裂解方便有效,而AG4裂解液本身为含有高浓度的SDS的裂解液,可使样本充分裂解,蛋白充分变性,并适用于芯片样本制备以及下游应用。

[0061] 痰液及咽拭子蛋白提取法1的结果如图1所示,蛋白定量法为BCA法,样本按照1:15稀释,每样本重复三次,结果如图1,图中纵座标轴单位: $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

[0062] BCA法具体为BCA蛋白浓度检测法,是用于蛋白浓度检测的实验,是根据吸光值可以推算出蛋白浓度的方法,图1和图2中蛋白浓度的检测采用BCA法。

[0063] 图2为通过咽拭子蛋白提取法2提取到的蛋白浓度示意图,图中为通过20例样本进行咽拭子方法2蛋白采集的平均蛋白浓度为1.2微克/微升(纵坐标轴单位: $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

[0064] 下面对样本制备及抗体芯片验证进行说明:

因进行反相蛋白阵列实验对抗体特异性要求极高,必须通过严格的抗体适用性筛选才可以进行下游应用。下面选取了H1,H3,H7三种不同的抗体进行蛋白免疫印迹验证,确保使用抗体的特异性及适用性。一般而言,如抗体可以通过蛋白免疫印迹工作,则其在反相蛋白

阵列上所得到的结果应基本保持一致(因待测蛋白均为变性蛋白)。

[0065] 图3-1~图3-3是基于免疫印迹法对抗体特异性进行印迹验证的效果图,图中,纵坐标为通过TRIZOL提取液提取的病毒蛋白的分子量(单位是千道尔顿,KDa),右侧为病毒体外细胞侵染后细胞裂解液蛋白混合物。

[0066] 基于图3-1~图3-3分析三种抗体的特异性,其中H1N1抗体与H3,H9有少量的交叉反应,而因为灵敏度关系,这在低含量的Trizol蛋白提取物中几乎不可见,H3N2抗体因灵敏度关系,在Trizol提取物中几乎检测不到。但其抗体特异性在侵染细胞中得到验证。

[0067] H7N9抗体在Trizol蛋白提取样本和体外细胞侵染样本中均表现出了良好的特异性。图4(病毒蛋白的分子量,单位是千道尔顿,Kda)纵坐标为还从痰液及咽拭子中提取的样本通过H1蛋白免疫印迹进行验证,并比对各种提取方法的优劣性。痰69样本代表了AG4裂解液对应的样本。其表现出了良好的提取效率。虽然其它1预处理法的提取浓度较低,但并不代表其效率低,因每个样本均为单独样本,理论上不可平行比较。

[0068] 下面对样本制备及抗体芯片验证进行说明:

用于抗体芯片验证的验证样本制备流程如下:

k1.将AG4裂解后的混合样本通过AG4与CSBL1样本稀释液的1:9(体积比)配比进行稀释,使待测蛋白混合物最终浓度维持在0.1~0.2微克/微升。并将稀释后的混合样本(即含有待测蛋白混合物的稀释液)手工制备在96孔板中。

[0069] 在步骤k1中,如通过咽拭子样本方法2进行抽提蛋白,则将稀释配比调整为1:5。

[0070] 步骤k1中的稀释为第一次稀释,所对应多孔板记为第一多孔板,该第一多孔板上的微孔记为第一微孔。

[0071] k2.通过自动移液工作站(以TECAN为例),将第一多孔板上第一微孔中的混合样本进一步稀释,形成稀释样本,稀释形成四个梯度,即100%(未稀释)、75%,50%,25%,从而将稀释样本制备到第二多孔板中,按照1:4的比例,第二多孔板的孔数为384,第二多孔板上的微孔记为第二微孔。

[0072] 相应地,一份混合样本在第二多孔板中对应四个梯度,即对应四个稀释样本。

[0073] k3.通过微量点阵仪将制备好的384孔板中的稀释样本制备在PWG芯片上,每个芯片单元包含6个小单元,可同时进行6种不同抗体的免疫反应。在芯片制备过程中,应保持50%湿度以及16摄氏度的芯片温度以保证点样质量,防治挥发及气体冷凝液化。

[0074] k4.将制备好的PWG芯片通过气雾沉降法进行封闭,使用的封闭液为BB1。封闭时间为30分钟,室温。

[0075] k5.将封闭后的PWG芯片在超纯水中浸泡洗涤3次,并装入流体单元内进行抗体温育。

[0076] k6.温育条件为一抗30分钟,二抗30分钟。

[0077] 在荧光标记一抗的情形下,可直接进行第一步反应。

[0078] k7.洗涤一次或直接在芯片扫描仪上对PWG芯片进行信号读取。

[0079] 图5是对PWG芯片信号读取的结果的扫描原始数据图片,从左至右所适配的抗体是H1,H3,H7抗体,用于确定抗体特异性反应。根据软件分析结果,通过获取两次重复的梯度稀释中位值作为最终信号值作图(图6-1~图6-3,图中纵坐标为relative fluorescence intensity,RFI,即相对荧光强度)。从图6-1~图6-3中可以发现,在高浓度抗体下(1:500)抗

体特异性相对较低,随着抗体浓度降低,其特异性逐步提高,并在1:2500稀释度下表现出良好的特异性和线性梯度,参见说明书附图7-1~图7-3。

[0080] 图6-1~图6-3: 三种抗体的特异性评价。在不同样本浓度及抗体稀释度下的抗体特异性展示。由图中可以看出,随着抗体稀释度越大,抗体特异性越好。并且在1:2500左右内呈现出良好的线性关系R=0.90~0.99(图7-1~图7-3)。图7-1~图7-3纵坐标轴单位:RFI。

[0081] 图7-1~图7-3中,一抗浓度1:2500稀释度下的线性关系。三种抗体(H1,H3,H7)的线性关系分别在图内列出。三种抗体均能达到R²=0.9以上。

[0082] 下面就实验间条件重复与不同反应条件下的结果比对:

通过实验确定芯片间相关性的研究以及不同反应条件下的相关性研究,其结果如下图图8和图9。芯片间的相关性达到0.96。对比了37度温育30分钟与4度过夜温育的对比,其相关性达到0.83。

[0083] 下面针对临床样本Trizol试剂中蛋白提取及芯片检测进行说明:

图10 Trizol蛋白提取及芯片检测数据。H1,H3为对照样本,H7为阳性待检样本。

[0084] 在Trizol试剂制备的H1,H3,H7,IBV临床样本中分别进行蛋白提取,定量及芯片实验,可以看出,用H7抗体进行孵育时,在临床样本亚型鉴别实验中同样有着高度特异性及灵敏度(图10中黑框所示)。尤其是在低样本浓度的范围内(0.0001mg/ml~0.01mg/ml),虽然样本在高浓度下(0.1mg/ml)与H3和IBV出现一定程度的交叉反应,但仍然可以实现亚型进行鉴别。实验中抗体稀释度达到一百万倍,大大降低抗体消耗,超高灵敏度可实现低浓度微量样本的鉴别,同时完成大量样本(几百例至上千例)的平行分析,降低人工消耗,缩短检测周期。

[0085] 通过大量实验,发明人建立了一些列针对不同样本来源的(咽拭子及痰液)蛋白提取法,并通过大量验证确定了方法的稳定性和可重复性。在方法学建立的过程中,发明通过进一步优化实现了快速抽提蛋白的目的,可在15分钟内完成单一样本蛋白抽提,如进行多样本同时抽提,可在一小时内完成上百例样本的蛋白提取。此抽提方法效率高,简便,易操作,可进一步进行流程优化实现临床标准化。

[0086] 发明通过28例临床咽拭子样本的验证实验(14例H1阳性样本,14例阴性样本),证实了该方法的有效性(原始图像为图11)。通过反相蛋白微阵列法,我们可以将方法的灵敏度提升到92.9%,同时保证了78.6的特异性,AUC下面积可达到0.889(即诊断准确度为88.9%)(图12,图13),比目前现有的金标法及ELISA法的准确度(30~50%浮动)提高了20~40%。大大提升了流感分型蛋白诊断方法的优势。为临床诊断提供了新的技术路径和思路。该方法的另一个优势在于其极少的抗体消耗,因样本通过微量矩阵式排列,单位矩阵中的可检测样本可达到150~200个/芯片。大大节省了昂贵的抗体消耗,十分利于大规模筛查应用。

[0087] 图11为20例临床咽拭子样本检验的原始图像示例。抗体浓度逐步稀释1:1000,1:4000,1:16000。

[0088] 对于具体的患有呼吸道疾病的患者,具体的检测步骤是:

1. 起始样本收集与前处理。

[0089] 根据样本来源,按照3种不同方法进行蛋白提取,即前述的针对痰液、咽拭子共三种蛋白提取方式。

- [0090] 2. 蛋白定量,即确定蛋白样品的浓度,通过BCA法进行蛋白定量。
- [0091] 3. 样本制备,通过与点样液的配比进行步骤2所提取到的蛋白样本稀释,最终蛋白样本浓度保持在0.1-0.2微克/微升范围。
- [0092] 4. 样本转换,通过自动移液工作站将稀释后的蛋白样本从例如EP管内制备到384孔板中。
- [0093] 5. 芯片点样,将384孔板上的蛋白样本通过微量点阵仪打印到疏水PWG芯片表面。
- [0094] 6. 芯片封闭,通过气雾沉降的方式封闭芯片上未反应位点,以减小抗体与芯片的非特异性结合。
- [0095] 7. 抗体孵育,通过荧光标记的特异性一抗(或非标记的一抗)与芯片表面样本进行反应(如标记荧光二抗,则需进行二抗孵育)。
- [0096] 8. 信号读取,数据处理与结果判读。
- [0097] 表1

检测方法	灵敏度	亚型区分	检测周期	快速结果	样本通量	实验条件	成本
病毒分离	高	是	3-10 天	否	低	高	较低
免疫荧光	较高	否	2-4 小时	否	低	高	较高
核酸检测	高	是	2-4 小时	否	较高	高	高
快速抗原检测	较低	否	30 分钟	是	较低	低	低
新型芯片检测法 (本发明)	较高	是	30-60 分钟	是	高	较低	低

表1为各类流感检测方法的指标比对表。

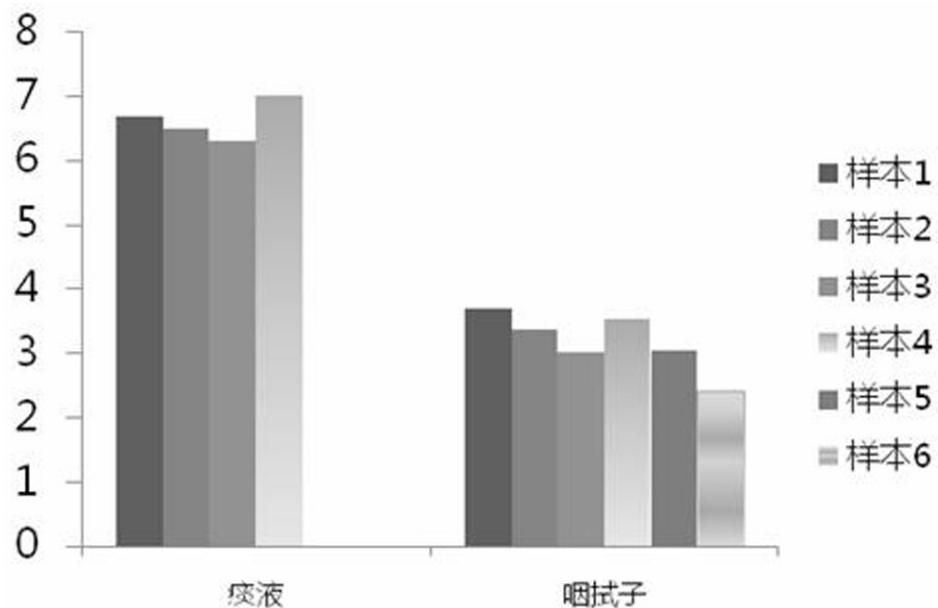


图1

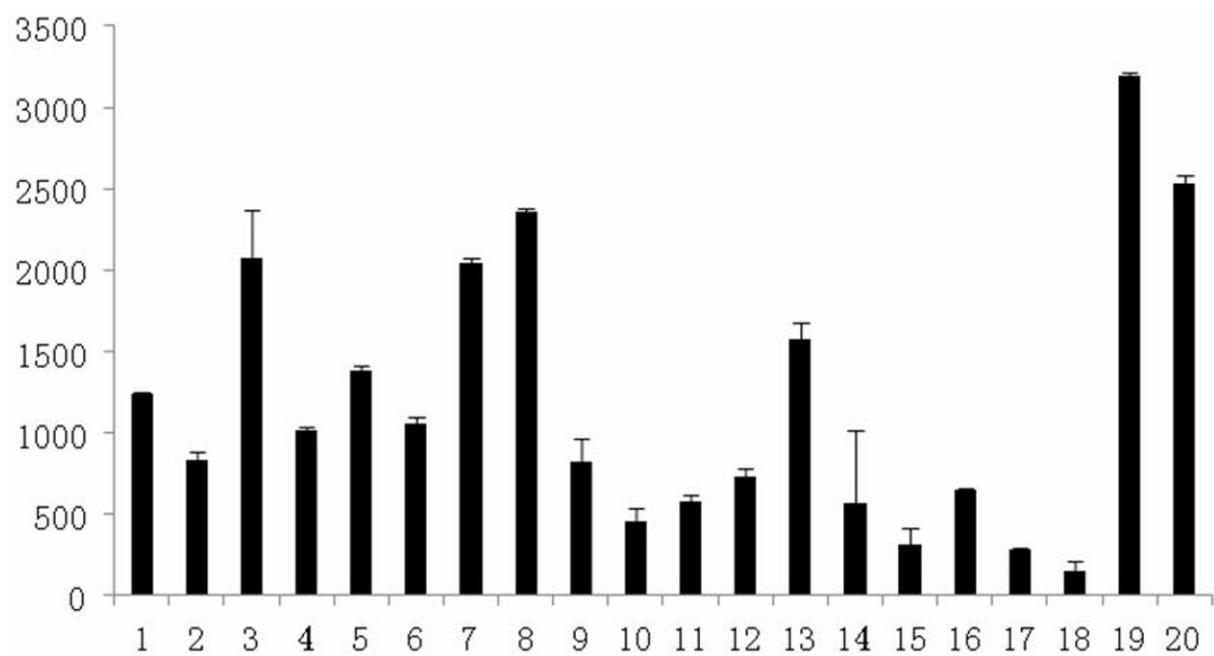


图2

H1N1 Trizol蛋白第二批 2018.3.12

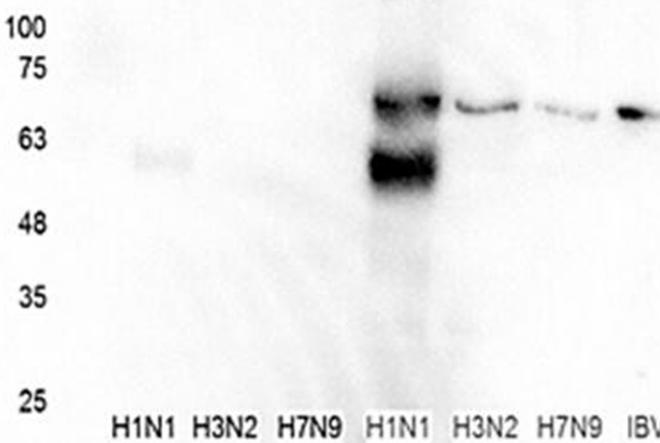


图3-1

H3N2 Trizol蛋白第二批 63KD 2018.3.12

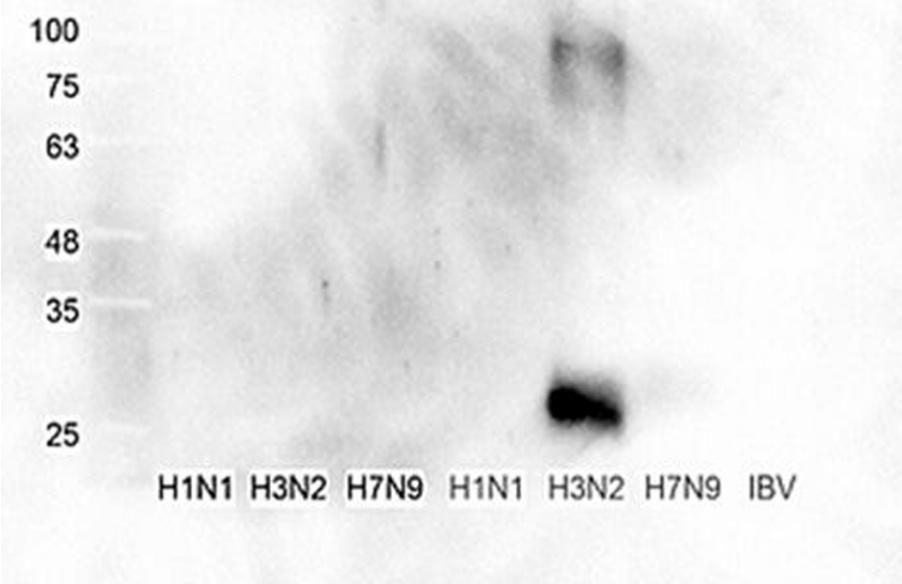


图3-2

H7N9 Trizol蛋白第二批 2018.3.12

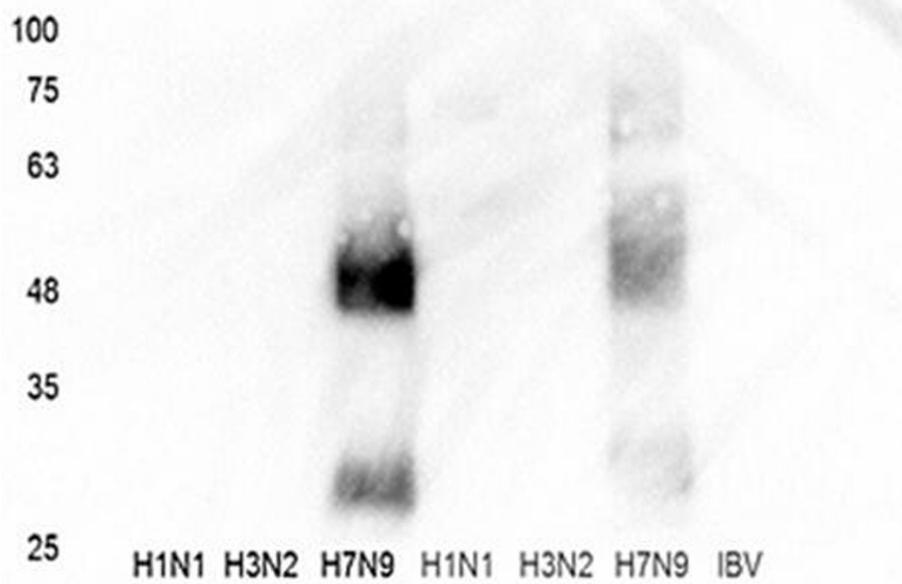


图3-3

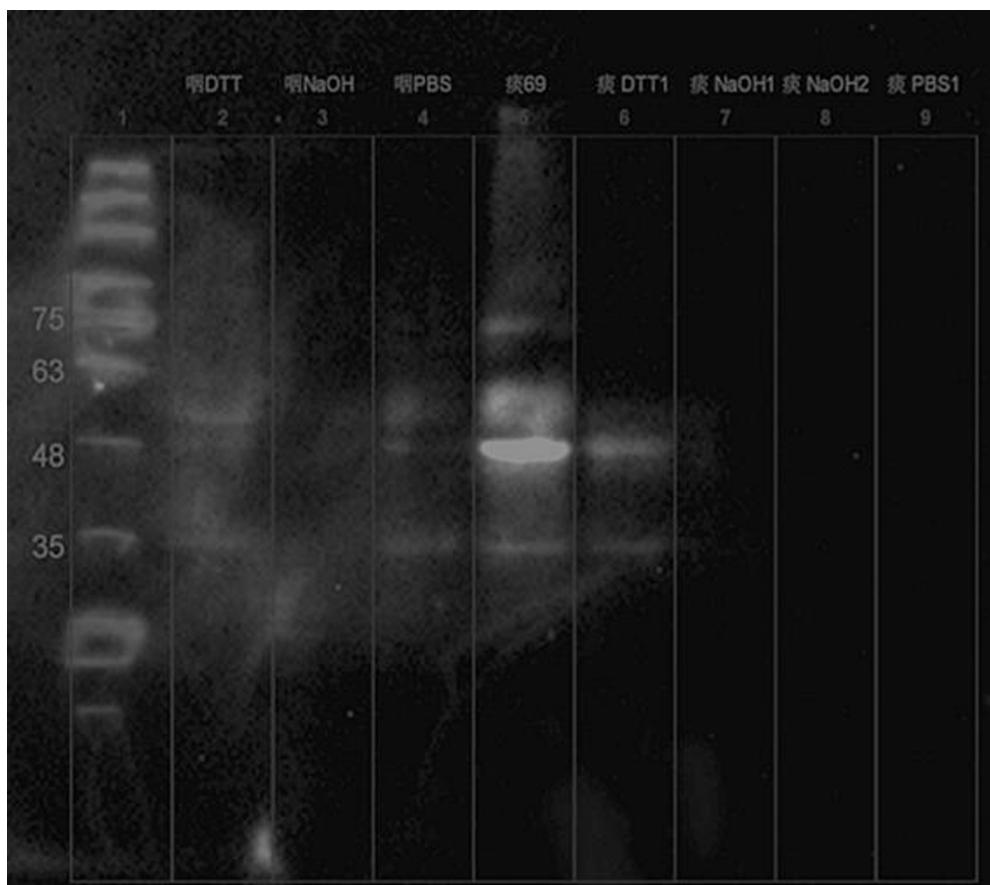


图4



图5

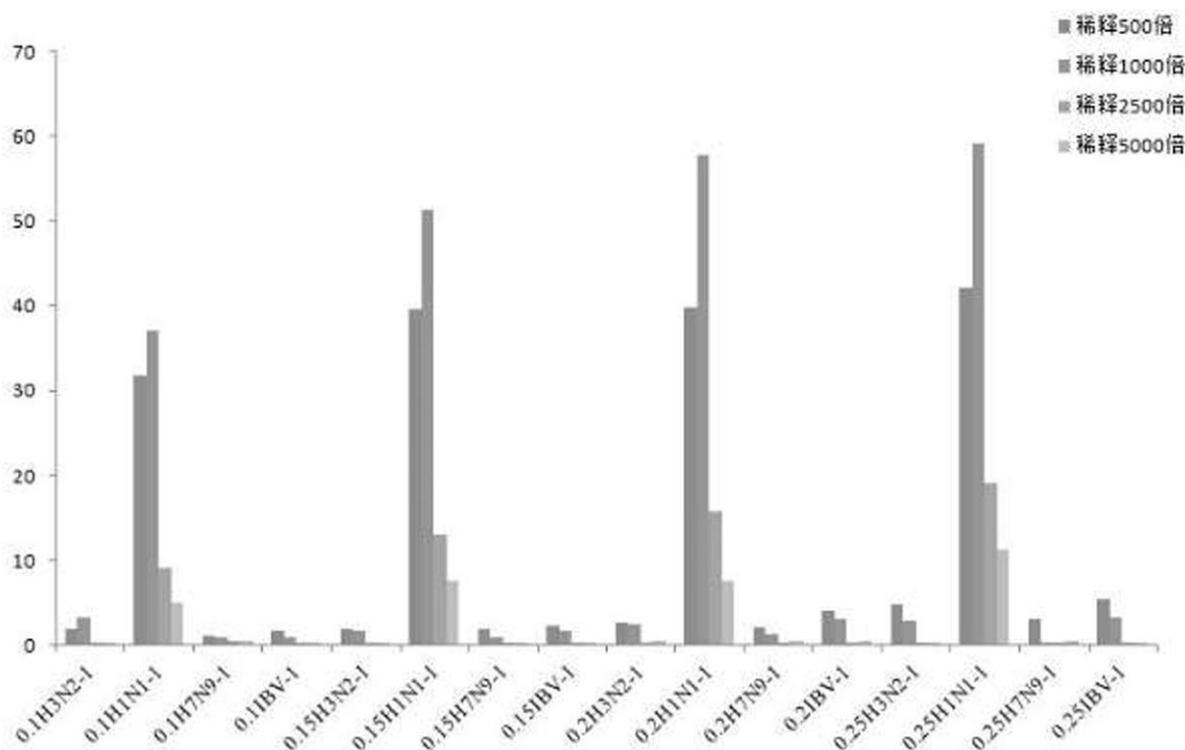


图6-1

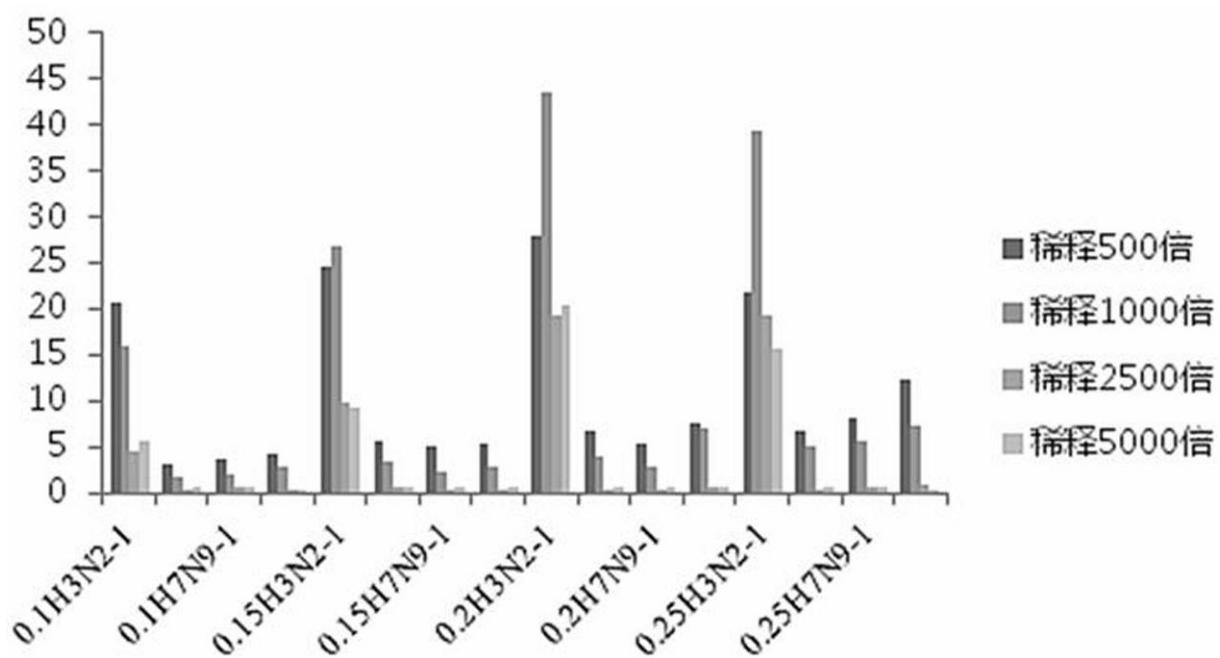


图6-2

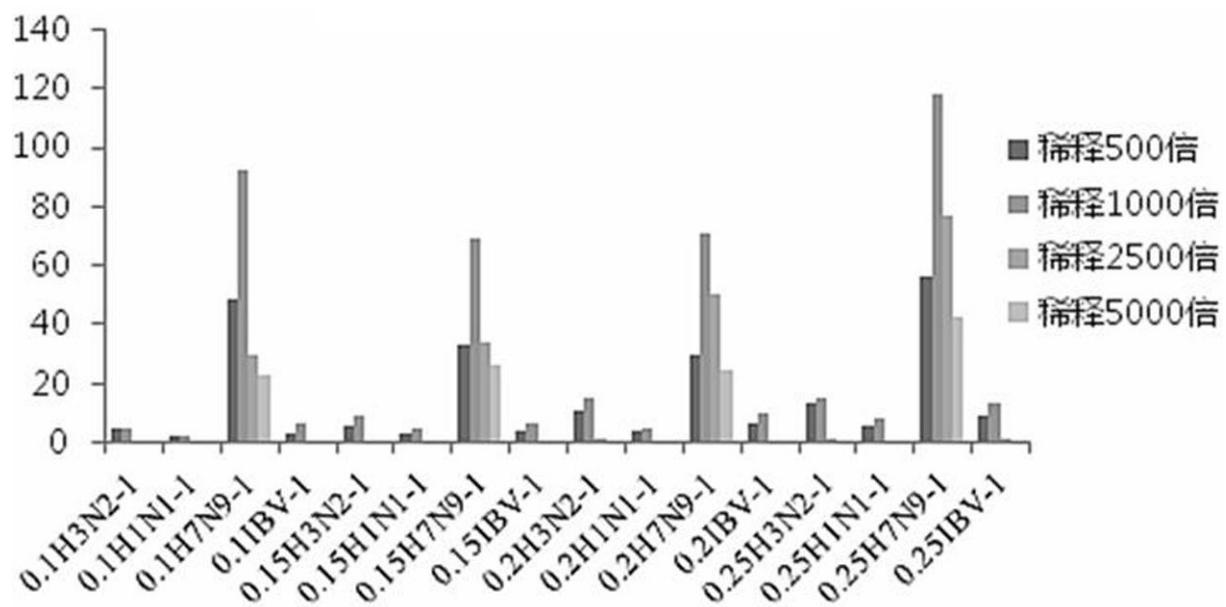


图6-3

$$y = 65.79x + 2.775$$

$$R^2 = 0.995$$

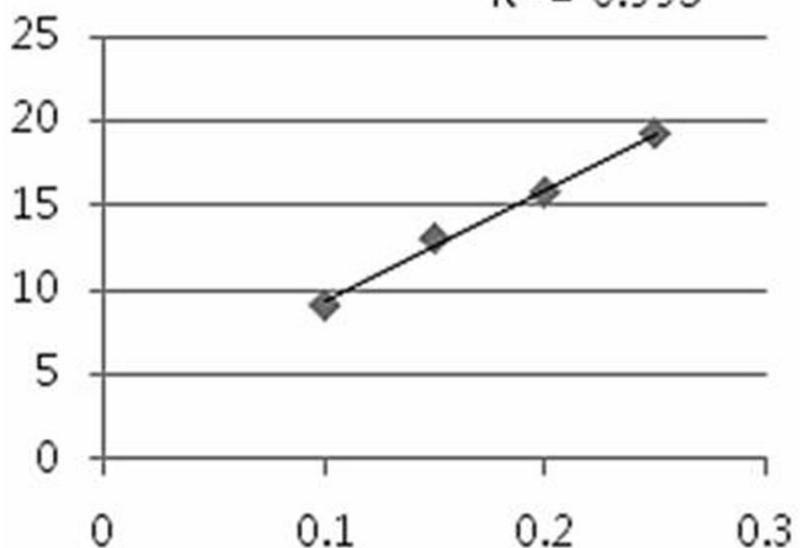


图7-1

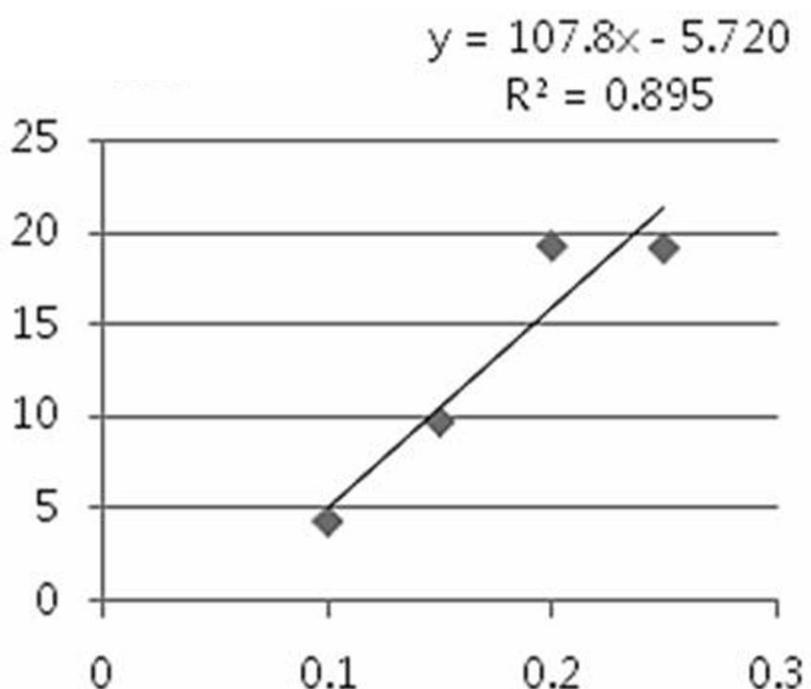


图7-2

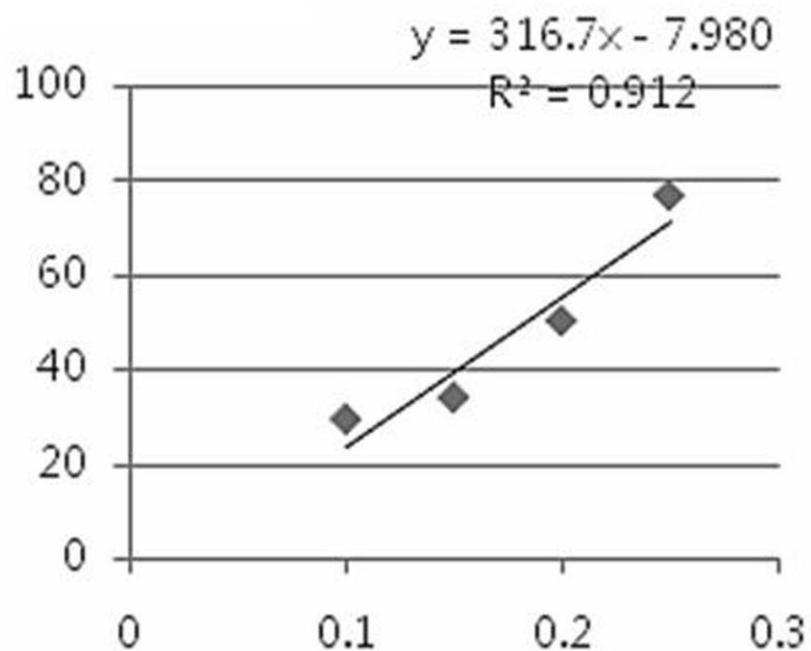


图7-3

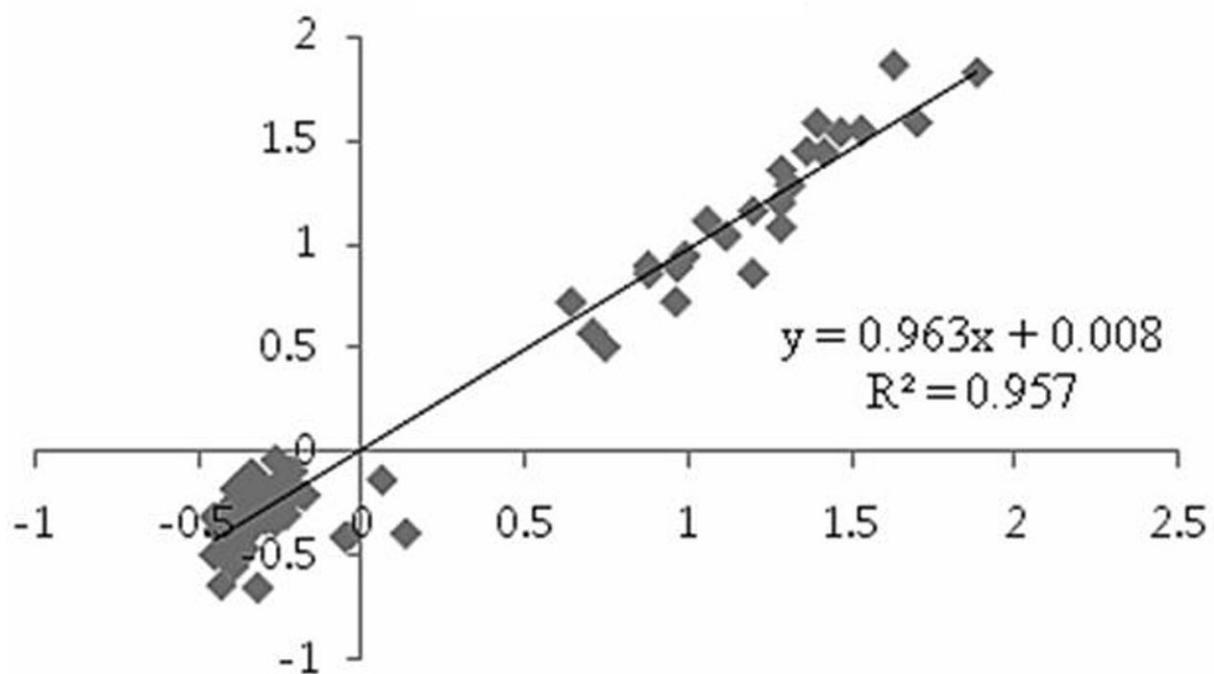


图8

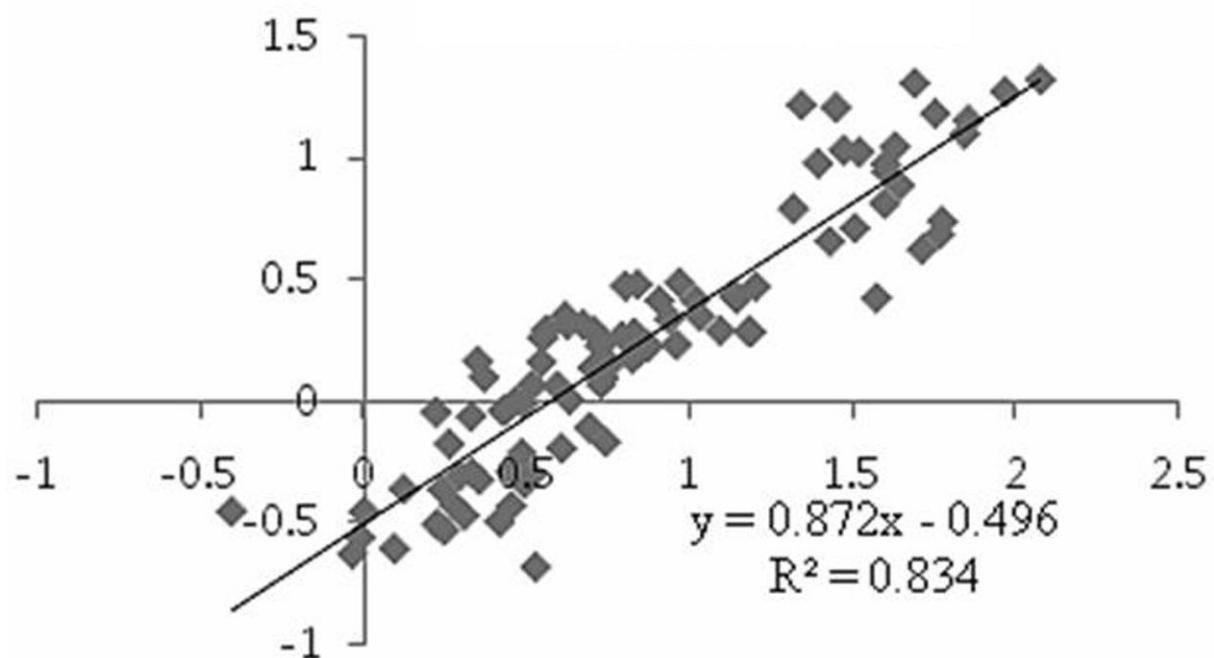


图9

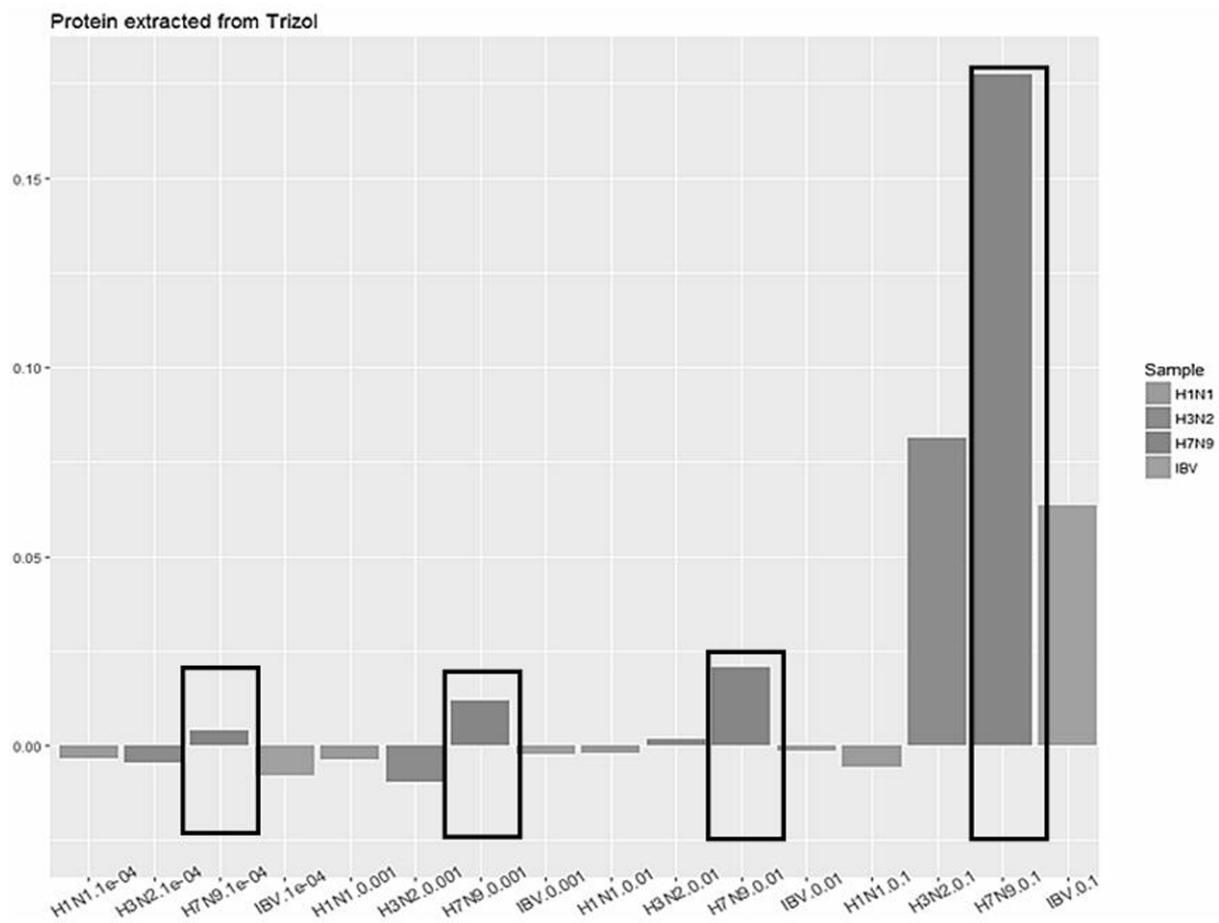


图10

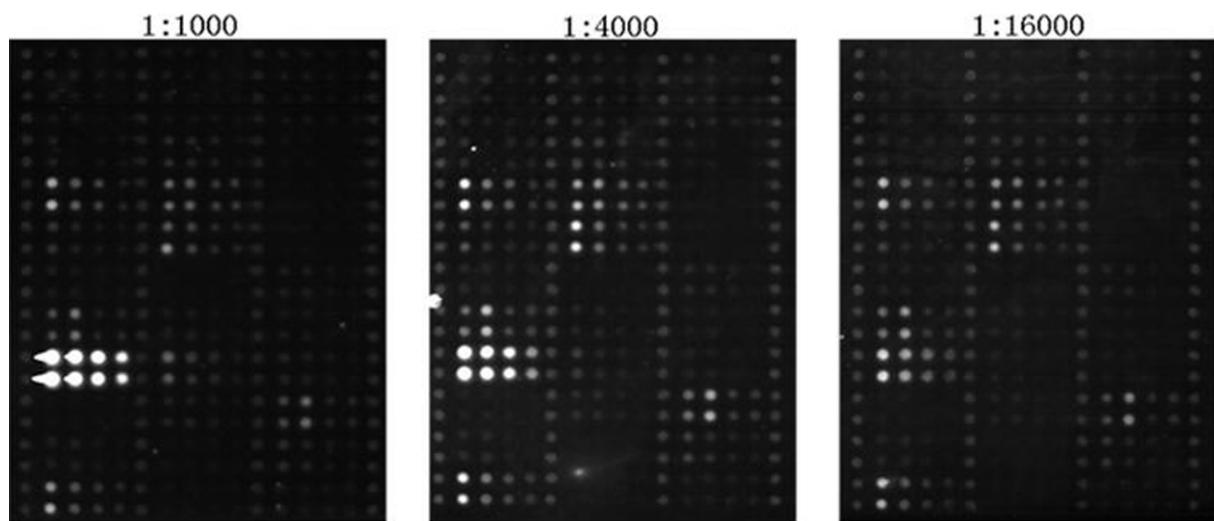


图11

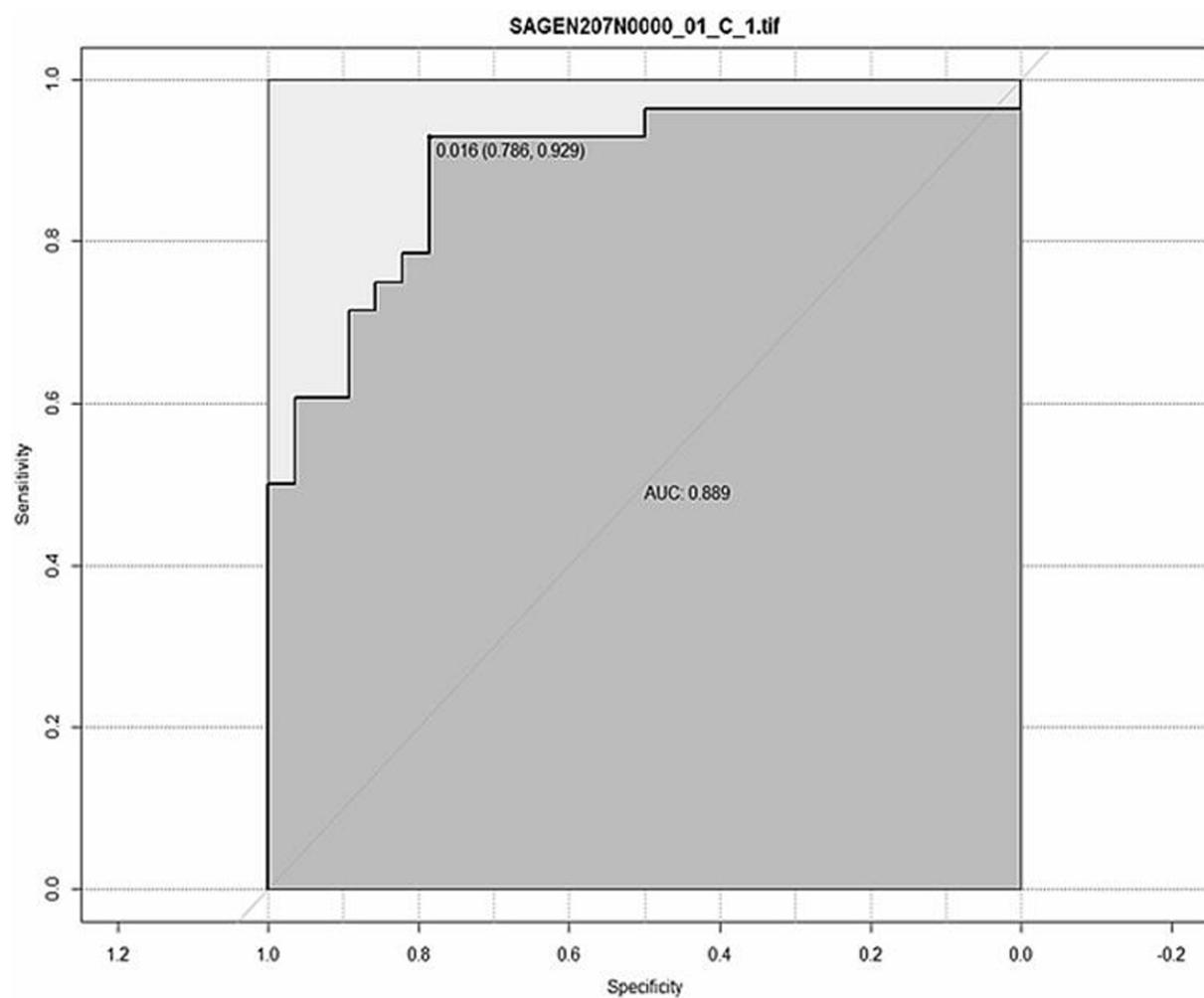


图12

	RPPA (N)	RPPA (P)
PCR (N)	26	2
PCR (P)	6	22

图13

专利名称(译)	呼吸道病原体检测方法		
公开(公告)号	CN109932513A	公开(公告)日	2019-06-25
申请号	CN201910160836.0	申请日	2019-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	陈瑜 王楠 郑书发 楼滨		
发明人	陈瑜 王楠 郑书发 楼滨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种呼吸道病原体检测方法，包括以下步骤：1) 对给定的呼吸道病原样本进行蛋白提取；2) 以步骤1) 提取到的蛋白为蛋白样本形成RPPA；3) 对步骤2) 获得的RPPA通过PWG进行微生物或病毒检测；其中，RPPA为Reverse Phase Protein Array，即反相蛋白阵列；PWG为Planar Wave Guide，即平面光导。依据本发明呼吸道病原体检方法在样本中所含蛋白量相对较少时不容易产生漏检。

