



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110412261 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201910395518.2

(22)申请日 2019.05.13

(71)申请人 广东工业大学

地址 510006 广东省广州市越秀区东风东路729号

(72)发明人 赵肃清 陈莉莉 肖益热 邹同达 王甜甜

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈嘉毅

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

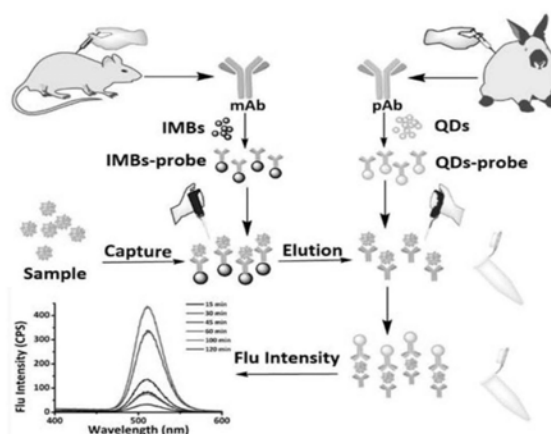
权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒,该试剂盒包括抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠和抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针。本发明利用了免疫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、荧光强度高等特性,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;本发明检测方法简单,检测快速,易于判定,检测成本低廉;可进行早期诊断和防治,临床诊断符合率高;在临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值,易于推广。



1. 一种基于磁分离与量子点标记快速检测幽门螺杆菌的试剂盒,其特征在于,包括抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠和抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针;

其中,抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠为单克隆抗体与纳米免疫磁珠亲和偶联制备得到,所述单克隆抗体为氨基酸序列为CHHLDKSIKEDVQFADSRI的肽段偶联血蓝蛋白作为抗原免疫得到的;

抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针为外膜蛋白多克隆抗体与荧光量子点通过共价偶联制备得到,所述外膜蛋白多克隆抗体是由幽门螺杆菌外膜蛋白作为抗原免疫得到。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,外膜蛋白多克隆抗体是由幽门螺杆菌外膜蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔得到。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠的制备过程包括以下步骤:

S11. 取磁珠悬液,洗涤,磁性分离,重悬,重复一次;

S12. 步骤S11的产物进行磁性分离,弃上清液,加入单克隆抗体,混合,进行磁珠的抗体吸附,磁性分离,收集上清液;

S13. 用结合缓冲液洗涤,然后进行磁性分离,弃上清液,重复一次;

其中,纳米磁珠用量不少于50 μ g,单克隆抗体的用量是不少于25 μ g,偶联反应时间不少于60min。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针的制备过程包括以下步骤:

S21. 活化羧基水溶性量子点的羧基位点:羧基水溶性量子点、N-羟基琥珀酰亚胺、碳二亚胺和PBS缓冲混合,37 $^{\circ}$ C反应,PBST溶液洗涤;

S22. 亲和偶联:步骤S21的产物与多克隆抗体混合,避光反应,PBST溶液洗涤;

S23. 封闭未反应的活化羧基位点:步骤S22的产物与BSA混合,避光反应,PBST溶液洗涤;

其中,量子点用量不少于200 μ g,多克隆抗体的用量是不少于75 μ g,偶联反应时间不少于60min。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,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1所述的试剂盒,其特征在于,纳米磁珠是以超顺磁性Fe₂O₃为内核、壳材料为介孔二氧化硅、表面官能团为蛋白A/G、粒径为2 μ m的磁珠。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,还包括阳性质控品和阴性质控品。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,阳性质控品为灭活的幽门螺杆菌干燥结合到人体健康粪便上。

9. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,阴性质控品为经临床诊断为幽门螺杆菌阴性的人体粪便。

10. 权利要求1到9任一所述试剂盒在检测幽门螺杆菌中的应用。

一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及幽门螺杆菌检测技术领域,更具体地,涉及一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌(H.pylori)是一种螺旋状革兰氏阴性细菌,是一种挑剔的、微嗜气的人类病原体。一般来说,幽门螺杆菌感染在儿童早期是一种后验性疾病,在没有抗生素治疗的情况下,他们的一生都会受到感染。目前,发展中国家约有20%的人口受到影响,发展中国家也有90%以上的人口受到影响。

[0003] 将感染幽门螺杆菌且无症状的儿童和年轻人都进行流行病学分析或进行上消化道内窥镜检查是不现实的。此外,由于年龄较小的儿童敏感性较低,不适合进行血清抗体检测。¹³C-尿素呼吸试验(UBT)虽然可以在年龄较大的儿童中进行,但不适用于幼儿。粪便样品基质复杂,预处理时间长,传统检测技术的酶联免疫吸附法(ELISA)不能满足粪便抗原检测的要求。

[0004] 因此,幽门螺杆菌粪便抗原检测需要一些新的技术以克服以上问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,提供一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种基于磁分离与量子点标记快速检测幽门螺杆菌的试剂盒。

[0007] 本发明的另一个目的是提供所述试剂盒在检测幽门螺杆菌中的应用。

[0008] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

[0009] 磁性纳米颗粒(Magnetic Nanoparticles,MNPs)技术具有强磁性,超顺磁性效应,具有良好的可操作性,无需离心即可快速富集复杂基质中的靶点,广泛应用于漆酶固定化、药物递送、抗体、蛋白质和核酸的提取或纯化。量子点(quantum dots,QDs)技术具有发射峰窄、吸收谱宽、抗光漂白、量子产率高等优点。QDs由于其突出的特性,越来越多地应用于荧光生物技术研究,包括致病菌免疫测定或IgG;DNA或染色体的荧光原位杂交;膜蛋白、核抗原及细胞免疫染色;组织和细胞的免疫荧光标记。通过抗体-抗原特异性结合行为信号转导探针与MNPs的功能化QDs信号转导探针被用于免疫组织的构建和作为信号转导探针的靶分子的检测。通过MNPs与QD的结合,有效实现目标分子的分离和发光检测。

[0010] 因此本发明要求保护以下内容:

[0011] 一种基于磁分离与量子点标记快速检测幽门螺杆菌的试剂盒,其特征在于,包括抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠和抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针;

[0012] 其中,抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠为单克隆抗体与纳米免疫磁珠亲和偶联

制备得到,所述单克隆抗体为氨基酸序列为CHHLDKSIKEDVQFADSRI的肽段偶联血蓝蛋白作为抗原免疫得到的;

[0013] 抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针为外膜蛋白多克隆抗体与荧光量子点通过共价偶联制备得到,所述外膜蛋白多克隆抗体是由幽门螺杆菌外膜蛋白作为抗原免疫得到。

[0014] 氨基酸序列为CHHLDKSIKEDVQFADSRI的肽段为幽门螺杆菌的脲酶B中的一段。

[0015] 利用本试剂盒进行幽门杆菌的检测,用免疫磁珠偶联抗体,然后捕获幽门螺杆菌,经过洗脱,形成的抗体-抗原复合物,与量子点结合的抗体进行特异性结合,得到免疫磁珠-抗体-抗原三明治复合物,再经过洗脱液,将免疫磁珠洗脱下来,形成抗体-抗原复合物,用量子点荧光作为检测信号,本发明技术路线图见图1。

[0016] 优选地,外膜蛋白多克隆抗体是由幽门螺杆菌外膜蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔得到。

[0017] 更优选地,兔抗血清用饱和硫酸铵法进行粗提,然后用葡聚糖凝胶G25过柱提纯,得到多克隆抗体。

[0018] 优选地,抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠的制备过程包括以下步骤:

[0019] S11.取磁珠悬液,洗涤,磁性分离,重悬,重复一次;

[0020] S12.步骤S11的产物进行磁性分离,弃上清液,加入单克隆抗体,混合,进行磁珠的抗体吸附,磁性分离,收集上清液;

[0021] S13.用结合缓冲液洗涤,然后进行磁性分离,弃上清液,重复一次;

[0022] 其中,纳米磁珠用量不少于50 μ g,单克隆抗体的用量是不少于25 μ g,偶联反应时间不少于60min。

[0023] 更优选地,纳米磁珠用量50 μ g,单克隆抗体的用量25 μ g,偶联反应时间60min。

[0024] 优选地,抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针的制备过程包括以下步骤:

[0025] S21.活化羧基水溶性量子点的羧基位点:羧基水溶性量子点、N-羟基琥珀酰亚胺、碳二亚胺和PBS缓冲混合,37 $^{\circ}$ C反应,PBST溶液洗涤;

[0026] S22.亲和偶联:步骤S21的产物与多克隆抗体混合,避光反应,PBST溶液洗涤;

[0027] S23.封闭未反应的活化羧基位点:步骤S22的产物与BSA混合,避光反应,PBST溶液洗涤;

[0028] 其中,量子点用量不少于200 μ g,多克隆抗体的用量是不少于75 μ g,偶联反应时间不少于60min。

[0029] 更优选地,量子点用量200 μ g,多克隆抗体的用量75 μ g,偶联反应时间60min。

[0030] 优选地,量子点是羧基化两亲聚合物修饰的水溶性CdSe/Zns量子点。

[0031] 优选地,纳米磁珠是以超顺磁性Fe₂O₃为内核、壳材料为介孔二氧化硅、表面官能团为蛋白A/G、粒径为2 μ m的磁珠。

[0032] 优选地,还包括阳性质控品和阴性质控品

[0033] 更优选地,阳性质控品为灭活的幽门螺杆菌干燥结合到人体健康粪便上。

[0034] 更优选地,阴性质控品为经临床诊断为幽门螺杆菌阴性的人体粪便

[0035] 以上任一所述试剂盒在检测幽门螺杆菌中的应用,也属于本发明的保护范围。

[0036] 优选地,所述样本为消化道排泄物。

[0037] 所述试剂盒的使用方法为：

[0038] 用PBST缓冲液溶待检样本，加入抗幽门螺杆菌的免疫纳米磁珠50 μ L，室温下以10rpm于旋转混合仪上反应60min，磁分离3min，用移液器吸出上清，用PBST缓冲液500 μ L洗涤两遍，磁分离后吸出洗涤液，最后用500 μ L PBS缓冲液重悬免疫纳米磁珠。

[0039] 取100 μ L上述重悬的免疫纳米磁珠与100 μ L量子点标记的抗幽门螺杆菌的纳米探针混合，室温下以15rpm于旋转混合仪上反应60min，通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的菌体抗原的免疫结合，量子点被标记到菌体抗原表面，形成磁珠-菌体抗原-量子点“三明治”复合物。

[0040] 反应完成后，磁分离3min，除去多余的量子点标记探针，并用PBST缓冲液清洗2遍，复合物重新分散在100 μ LPBS缓冲液中，使用荧光光谱仪对其荧光值进行检测。

[0041] 按上述同样的方法检测试剂盒中提供的阴性质控品及阳性质控品样品，分别读取荧光值；阴性质控品样品的荧光读数的平均值与3倍标准差之和即为CUT-OFF值；若上述临床人体粪便样本的检测荧光值若大于CUT-OFF值即判断为此份临床人体粪便中幽门螺杆菌抗原为阳性，反之则判断为此份临床人体粪便子样本中幽门螺杆菌抗原为阴性；若阳性质控品样品的荧光值小于CUT-OFF值，则表明试剂盒失效。

[0042] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0043] 1、本发明利用了免疫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、荧光强度高等特性，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

[0044] 2、本发明检测方法简单，检测快速，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、无法进行临床应用的不足。

[0045] 3、由于检测试剂盒检测的是幽门螺杆菌抗原而非抗体抗体的出现需要感染几周以后)，故而可进行早期诊断和防治，临床诊断符合率高。该方法在幽门螺杆菌感染的临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值。

[0046] 4、本发明检测方法所用的临床样本为胃肠道排泄物等，而非血液，可免除婴幼儿患者抽血检查的痛苦与家长的心理负担，故较易于推广。

附图说明

[0047] 图1为本发明技术路线图，用IMBs探针分离幽门螺杆菌，洗脱后形成抗原-抗体复合物，然后用QDs探针作为荧光标记探针检测复合物的荧光强度，确定是否存在幽门螺杆菌。

[0048] 图2为本发明的SDS—PAGE电泳图；(A) 线M：标准蛋白170kD，线1：OMPs，线2：幽门螺杆菌；pAb纯度评价；(B) 线M，标准蛋白170kD，线3：pAb；线4：兔血清，可以看出兔血清蛋白条带比pAb多，因此本文采用的纯化方法是有效的；(C) 线M，标准蛋白170kD，线5：mAb，线5：小鼠腹水，可以看出单抗纯化后的蛋白纯度较高，结果令人满意。mAb的分子量为75kD，重链在40~55kD，轻链在20~25kd。

[0049] 图3为本发明的倒置荧光显微镜下的pAb图像；A和B表示幽门螺杆菌pAb和PBS的亮场图像；C和D表示暗场的pAb和PBS图像；其中A、B、C、D图的放大倍数是400 $\times$ ，基准尺=4 μ m；结果表明，pAb与幽门螺杆菌能特异性结合，在此过程中无非特异性结合。

[0050] 图4为本发明的免疫磁珠的用量优化图,在优化IMBs用量时,随着IMBs用量的增加,复合物的OD₄₅₀值增大,IMBs用量超过50 μ g时,OD₄₅₀值达到了最高水平,保持饱和。

[0051] 图5为本发明的技术路线检测过程中的优化图;A,优化mAb结合IMBs探针的用量,mAb用量为25 μ g为最佳;B,优化mAb结合IMBs探针的时间,偶联时间为60min为最佳;C,优化QDs探头的用量,QDs的用量为200 μ g为最佳;D,优化pAb结合QDs探针的时间,偶联时间为60min为最佳;E,优化pAb结合QDs探针的用量,pAb用量为75 μ g为最佳。

[0052] 图6为本发明的幽门螺杆菌检测方法的灵敏度结果;A,P/N>2.1为阳性,检测范围为10~10⁶CFU/mL;B,幽门螺杆菌检测标准曲线;C,检测方法检测的特异性。

[0053] 图7为本发明的测定人体粪便中幽门螺杆菌的校准曲线。

具体实施方式

[0054] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0055] 各种试剂的配制及所需材料的说明

[0056] (1) 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。

[0057] (2) PBST缓冲液中各成分为:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.24g/L KH₂PO₄,1.44g/L Na₂HPO₄,0.3g/L NaN₃,0.5mL/L Tween-20,pH=7.4。

[0058] (3) 兔抗幽门螺杆菌多克隆抗体:为本发明自制,用PBS缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量浓度为1mg/mL。

[0059] (4) 单克隆抗体:为本发明自制用PBS缓冲液稀释,摇匀,使溶液中多克隆抗体重量浓度为1mg/mL。

[0060] (5) 量子点:本发明中所用量子点为羧基化两亲聚合物修饰的水溶性CdSe/ZnS量子点,其发射波长为515nm,自星紫新材料技术开发有限公司购买,产品名称为羧基水溶性量子点,5mg/mL。

[0061] (6) 磁珠:本发明中所用磁珠是以超顺磁性Fe₃O₄为内核,壳材料为介孔二氧化硅、表面官能团为蛋白A/G,粒径为2 μ m的蛋白A/G磁珠,从海狸生物医药有限公司购买,1mg/mL。

[0062] (7) 幽门螺杆菌:南方医科大学惠赠,悉尼菌株ss1。

[0063] (8) 本发明所用到的微生物样品均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0064] 实施例1兔抗幽门螺杆菌外膜蛋白多克隆抗体的制备

[0065] 一、兔抗幽门螺杆菌外膜蛋白(OMPs)蛋白抗原的制备

[0066] (一) 实验方法

[0067] 1、幽门螺杆菌(H.P)的培养

[0068] H.P为螺旋形、弯曲或直的不分枝杆菌,0.3~1.0 $\times$ 1.5~5 μ m,顶端钝圆,革兰氏阴性,微需氧,由两端的4~8根鞭毛进行快速螺旋状运动。用哥伦比亚血琼脂培养基(添加脱纤维羊血5~10%)平板上培养菌落无明显色素、半透明,呈针尖状细小菌落,放入培养箱,调节培养条件,气体条件为含5%O₂、10%CO₂和85%N₂(或H₂)的气体环境,温度为37 $^{\circ}$ C,高湿

度环境下生长三天左右,收集细菌。

[0069] 2、OMPs蛋白的提取

[0070] 将收集到的湿菌体,按照外膜蛋白提取试剂盒厂家说明书进行提取,最后得到的外膜蛋白进行透析三天,SDS-PAEG检测蛋白条带,用BCA试剂盒测定蛋白质浓度,调整蛋白浓度为1mg/mL备用。

[0071] (二) 实验结果

[0072] SDS-PAEG检测结果如图2A所示,纯化方法是有效的,成功得到OMPs蛋白。

[0073] 二、OMPs蛋白多克隆抗体的制备

[0074] (一) 实验方法

[0075] 用上面得到的OMPs蛋白(1mL)与1mL弗氏完全佐剂混匀乳化后免疫雌性新西兰大白兔(由广东省医学动物中心提供),于背部皮下多点注射间隔7d后再免疫一次,再过14d后用上述纯化的OMPs蛋白按照1mg(1mL)与1mL弗氏不完全佐剂混匀乳化后进行加强免疫,加强免疫7d后再按上述同样方法再加强免疫一次。7d后取血分析抗体滴度。若不满意,可重复进行一到两次加强免疫,至抗体滴度满意(用ELISA法测定抗体效价大于 1×10^5),若满意则心脏采血,分离血清,以Protein G亲和层析柱(GE healthcare公司产品),严格按照操作说明书纯化多克隆抗体,用BCA蛋白含量检测试剂盒测定抗体浓度并用磷酸盐缓冲液(8g/L NaCl、0.2g/L KCl、0.24g/L KH_2PO_4 、1.44g/L Na_2HPO_4 pH=7.4)调整为1mg/mL, -20°C 保藏备用。至此制得兔抗幽门螺杆菌OMPs多克隆抗体。Western blot试验表明,此多克隆抗体能特异性识别幽门螺杆菌,稀释至1mg/mL备用。

[0076] (二) 实验结果

[0077] SDS-PAEG检测结果如图2B所示,纯化方法是有效的,成功得到OMPs蛋白多克隆抗体。

[0078] 实施例2用幽门螺杆菌的脲酶B肽段的单克隆抗体的制备

[0079] 一、实验方法

[0080] 具体制备过程参考申请号为201810229091.4的专利《杂交瘤细胞株及基于杂交瘤细胞株的甘胆酸单克隆抗体和检测试剂盒》的方法,使用《Identification of an Antigenic Epitope in Helicobacter pylori Urease That Induces Neutralizing Antibody Production》中提供的幽门螺杆菌的脲酶B肽段CHHLDKSIKEDVQFADSRI进行单克隆抗体的制备。

[0081] 具体方法如下:

[0082] (1) 动物免疫

[0083] 免疫原为肽段CHHLDKSIKEDVQFADSRI偶联血蓝蛋白,直接用PBS溶解,配成浓度1mg/mL。取上述溶液0.5mL与等体积的弗氏完全佐剂乳化,注射到Balb/C小鼠(5只6周龄的Balb/C雌性小鼠,18~22g),0.5mL/只,采取皮下多点注射和腹腔注射。初次免疫选用免疫抗原和弗氏完全佐剂乳化,随后用不完全弗氏不完全佐剂进行乳化,每次免疫时间间隔15天。第15日、29日进行加强免疫,免疫剂量同初次免疫。在融合前三天,最后一次进行冲击免疫,使用的是不加佐剂的抗原。在第三次免疫后,小鼠尾部静脉采血,分离的到血清,采用抗原包被的间接ELISA法检测血清的抗体效价。制备单克隆抗体的小鼠是选择最后一次免疫后,取抗体效价最高的Balb/C小鼠。

[0084] (2) 瘤细胞的制备

[0085] SP2/0细胞的复苏和培养:融合前两周将SP2/0细胞复苏。从-80℃的冰箱取出骨髓瘤细胞(SP2/0)冻存管,使其在40℃水浴中2min内快速解冻,1000rpm,离心5min,室温。弃去上清液,用RPMI1640培养基(含10%胎牛血清+1%双抗)将细胞轻轻吹散,再将细胞吸入到细胞培养瓶中,补充适量RPMI1640培养基(含10%胎牛血清+1%双抗),放入37℃5%CO₂细胞培养箱培养。根据观察细胞的生长状态,更换培养基。为确保所用的SP2/0细胞对HAT选择培养基的敏感性,可在培养液中加入1%8-杂氮鸟嘌呤(100*)。融合前一天将一瓶细胞传代至两瓶,继续培养,使细胞处于对数生长期,活力最好。融合时,倒掉完全培养基,用适量RPMI1640吹散,计数,细胞总数约为 $1 \times 1.2 \times 10^7$ 个,并转移至50mL离心管中;1000rpm,5min,离心洗涤2-3次,重悬后备用。

[0086] 饲养细胞的制备:采取小鼠腹腔的巨噬细胞作为饲养层细胞。细胞融合前一天,取8-10周的Balb/C小鼠,脱颈致死,浸泡在75%酒精中5min,固定于超净工作台的无菌泡沫板上,用无菌剪刀剪开腹部皮肤,暴露腹膜,小心剪开腹膜,用无菌滴管吸取少量RPMI1640培养液吹打小鼠腹腔,另腹腔细胞充分进入培养液,反复吹吸到50mL无菌离心管中,直至吹吸的颜色与RPMI1640颜色一致。将吹吸起来的细胞液离心,1000rpm,5min。弃去上清液,用HAT培养液重悬,细胞计数,调整至 1×10^5 个/mL,加入到无菌的96孔板中,每孔100μL,置于37℃,5%CO₂细胞培养箱中培养备用。

[0087] 免疫脾细胞的制备:将效价最高的小鼠冲击免疫三天后,摘除眼球取血,收集血清作为检测抗体时的阳性对照。按住小鼠头部,拉尾处死,浸泡在75%酒精中5min,将小鼠偏向左侧固定在无菌操作台的无菌泡沫板上,用无菌剪刀剪开小鼠的腹部皮肤,沿着切口上下撕开皮肤,可以看到脾脏所在的位置;换另外的无菌剪刀和镊子,剪开腹膜,使小鼠脾脏充分暴露出来,用无菌钉固定皮肤;换剪刀和镊子,镊子轻轻夹住脾脏,用剪刀小心的分离脾脏,尽量的把脾脏周围的结缔组织剔除干净,用8~10mL RPMI1640培养基将脾细胞在无菌培养皿中洗干净,再将脾脏放入另外一个无菌培养皿中,用1mL的无菌注射器针头戳几下,用2mL无菌注射器吸取8-10mL RPMI1640培养基冲洗小鼠脾脏,使脾细胞充分从脾脏中冲洗出来,制成脾细胞悬液,将液体移到另外一个50mL离心管中。计数,大约 1×10^8 /小鼠。至超净工作台备用。

[0088] 骨髓瘤细胞的制备:与SP2/0细胞的复苏和培养过程条件一致,骨髓瘤细胞置于超净工作台备用。

[0089] 细胞融合:将 1×10^8 个脾细胞和 1×10^7 个SP2/0细胞混于一支50mL离心管中,补加不完全培养基RPMI1640培养基至20mL,充分混匀,离心,1000rpm,5min。取离心好的脾细胞和SP2/0细胞,去上清(注意保持这个姿势)用滤纸条轻轻粘去管壁上的培养液(保证PEG1450不被稀释)。轻轻敲打,充分混匀。将离心管放到40℃水浴中(用一小烧杯制作水浴)(PEG1450预热),45秒加入预热至40℃的1mL 50%PEG1450(边加边轻轻混匀,大约3秒一滴),轻轻混匀30秒,静止1min。将一吸管预热的无血清培养液缓慢加入细胞中终止融合,动作尽量轻柔,边加边搅拌(现在细胞在PEG1450的作用下已经发生形状改变以及皱缩,若滴加溶液太快或者动作过粗则会引起细胞破裂而死亡。)。具体加液方法是以先慢后快的原则滴加,用无菌滴管在第一分钟内缓慢滴加1mL预热的RPMI1640培养基,第二分钟滴加2mL,第三分钟内则可以快速滴加8mL,最后补RPMI1640培养基至20mL,将溶液放置37℃水浴中静置

10min,然后离心1000rpm,5min,弃上清。加入100mL含有20%胎牛血清的HAT培养基,轻轻吹吸沉淀细胞,使其悬浮并混匀,加到已有饲养细胞的96孔板中,每孔100μL,将细胞放置与37℃,5%CO₂细胞培养箱培养。

[0090] (3) 杂交瘤细胞筛选及其亚克隆

[0091] 融合后的每三天换一下HAT培养基半液100μL,切勿吹打。10天后用HT培养基换出全部的HAT培养基,每间隔3天换一下HT全液。培养20天左右,换为一般的完全培养基。

[0092] 每天观察细胞生长,大约在第10天细胞长满培养孔的1/2,取上清液进行间接ELISA测定,检测是否产生抗体。

[0093] 制备杂交瘤细胞悬液:轻轻吹散ELISA检测为阳性孔中的杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞用移液器吸入到10mL的离心管中,计数,计算,将细胞浓度以完全培养基稀释到200个/mL,取出2mL加入到2mL含有饲养细胞的完全培养基中,杂交瘤细胞的浓度则变为100个/mL;

[0094] 有限稀释:将上述杂交瘤细胞悬液以每孔100μL加入到96孔细胞培养板的第1、2两行,这两行的杂交瘤细胞的浓度为每孔10个。在剩余细胞悬液中加入等体积的饲养细胞悬液,混匀后加入到第3、4两行,则这两行的杂交瘤细胞的浓度为每孔5个,重复上述步骤,则第5、6两行的浓度为每孔2.5个,第7、8两行的浓度为每孔1.25个。培养3天后,在导倒置显微镜下观察细胞生长状况,并小心吸取培养板上100μL的培养液,再添加完全培养基100μL。利用间接ELISA对孔中上清进行检测,选择效价高的细胞培养孔进行再次克隆化,并尽可能选取单克隆孔。直到连续两次克隆化的单克隆孔检测全为阳性为止。

[0095] 从抗体的阳性孔中,选择抗体效价高、特异性强、且细胞状态良好的细胞孔,继续进行再克隆,获得单克隆抗体细胞株,大量培养后,分装小管冻存于-80℃冰箱中。

[0096] (4) 腹水诱生和抗体纯化

[0097] 腹水的诱生:取Balb/C小鼠5只,在接种杂交瘤细胞前十天左右,每只小鼠腹腔内注射0.5mL弗氏不完全佐剂。同时将单克隆抗体分泌细胞株置于细胞培养瓶中培养至对数期,1000rpm离心5min,取沉淀用1640基础培养基重悬,调整细胞数为 1×10^6 个细胞/mL,在上述小鼠腹腔内注射0.5mL杂交瘤细胞,待小鼠腹部明显肿大,行动迟缓,约10-13天后。用酒精棉球消毒腹部皮肤,用5mL注射器抽取腹水,将腹水4℃、1000rpm离心10min,取上清,分装后冻存-20℃冰箱保存备用。

[0098] 单克隆抗体的纯化:辛酸硫酸铵法纯化小鼠腹水抗体。从冰箱取出小鼠腹水,室温融化,双层滤纸过滤;缓慢加入2倍血清体积的0.06mol/L的NaAC (pH4.5) 溶液;缓慢滴加正辛酸,沉淀杂蛋白(变性沉淀),在家的过程中就会发现血清中慢慢有白色物质产生。上清中的单克隆抗体在加入正辛酸沉淀完全后含量能够达到90%以上。不同物质加入正辛酸的量也不同:1mL鼠血清加入40μL正辛酸,1mL小鼠腹水中加入33μL正辛酸。滴加完成后,4℃作用1-2小时后,然后4℃下8000-10000rpm离心15min,弃去沉淀,取上清。沉淀加1M的10×PBS,体积为上清的1/10。用1M NaOH快速将pH调回中性,减少对抗体的伤害;4℃下加入1倍体积的饱和硫酸铵(pH=7.5),体积为前面的总体积。加完后硫酸铵的浓度为50%。加的过程要慢,不能让局部的盐浓度过高边加边搅拌,冰浴。加到一定程度溶液变浑浊,单克隆抗体开始沉淀。加完后在磁力搅拌器上搅拌6h或4℃静置过夜;4℃8000~10000rpm离心15min,弃去上清液,取沉淀溶解于与原腹水体积相同的PBS(0.01M,pH=7.4)或生理盐水中,加入1/2体积饱和的硫酸铵溶液使得硫酸铵的浓度为33%,放置4℃3h;4℃8000~10000rpm离心

15min,弃去上清液,沉淀用PBS (0.01M,pH=7.4) 重悬至原体积;然后置于0.01M PBS中透析,4℃透析2天,期间换水4次以上。透析过的溶液,8000rpm离心30min,除去不溶性沉渣,分装小管1mL-80℃冻存备用。

[0099] (二) 实验结果

[0100] SDS-PAEG检测结果如图2C所示,单抗纯化后的蛋白纯度较高,结果令人满意。mAb的分子量为75kD,重链40~55kD,轻链20~25kD。

[0101] 实施例3pAb与细菌结合的间接免疫荧光

[0102] 一、实验方法

[0103] (1) 固定:将细菌转移至1.5mL离心管中(尖头),离心去除上清液,加入500μL冰冷的4%多聚甲醛,室温孵育20min,固定后可在PBS中4℃保存1周;

[0104] (2) 通透:离心去上清,加入250μL通透液,4℃孵育10min;

[0105] (3) 甘氨酸漂洗:离心、吸除通透液,用甘氨酸溶液室温漂洗3遍;

[0106] (4) 封闭:离心、吸除甘氨酸溶液后,加入250μL封闭液,常温孵育1.5h;

[0107] (5) 一抗pAb孵育:离心、吸除封闭液后,加入250μL实施例1的pAb,常温孵育4h~过夜;

[0108] (6) PBST洗涤3~5遍;

[0109] (7) 二抗孵育:吸除缓冲液后,加入250μL荧光二抗FITC-goat anti-rabbit antibodies,常温孵育2h;

[0110] (8) PBST洗涤3~5遍;

[0111] (9) 离心,加入少量PBS,吹打均匀后转移到载玻片上,避光干燥后,加入一滴抗荧光淬灭封片剂,盖上盖玻片,干燥后在荧光显微镜下观察。

[0112] (10) 图像采集:在荧光倒置显微镜下用Image Pro软件进行图像采集。

[0113] (二) 实验结果

[0114] 结果发现(图3),pAb与幽门螺杆菌能特异性结合,在此过程中无非特异性结合。

[0115] 实施例4抗幽门螺杆菌单克隆抗体偶联磁珠反应条件的优化

[0116] 以实施例2制备的偶联幽门螺杆菌的脲酶B肽段的单克隆抗体的磁珠作为固相载体,以量子点标记的实施例1制备的偶联了OMP_s蛋白多克隆抗体为检测抗体,通过双抗夹心法原理检测幽门螺杆菌抗原,观察磁珠与多抗的偶联情况。

[0117] 一、磁珠的用量

[0118] (一) 实验方法

[0119] 选择免疫磁珠(1mg/mL)的体积为15μL、35μL、45μL、50μL、60μL的羧基磁珠(1mg/mL),加入200μL结合缓冲液洗涤,进行磁性分离(将EP管放置于磁性分离器上,使磁珠被吸附在管壁至溶液澄清;该操作描述以下省略),弃上清液,从磁性分离器上取下EP管,重复洗涤一次。最后加入200μL结合缓冲液重悬磁珠以备用。与实施例1制备的OMP_s蛋白多克隆抗体进行偶联反应。分别将制备好的免疫纳米磁珠检测10⁶CFU/mL的幽门螺杆菌,按照间接酶联免疫分析方法,在光度450nm下观察结果。

[0120] (二) 实验结果

[0121] 结果发现(图4),当磁珠的投放量小于50μg时,光强随着磁珠的量增加而增加,而当磁珠的量大于50μg时,光强基本不变。结果表明用量为50μg的磁珠体积最符合本发明的

要求,确定最适免疫磁珠用量为50 μ g。

[0122] 二、单克隆抗体体积的选择

[0123] (一)实验方法

[0124] 将10 μ L、25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、150 μ L的单克隆抗体分别与50 μ g按上述最优方法活化的粒径为2 μ m的磁珠进行偶联。将制备好的免疫纳米磁珠检测10⁶CFU/mL的幽门螺杆菌。

[0125] (二)实验结果

[0126] 结果发现(图5A),当单克隆抗体的投放量小于25 μ g时,荧光强度随着单克隆抗体的浓度增加而增加,而当单克隆抗体的用量大于25 μ g时,荧光强度基本不变甚至略有减小,因此本实施例4选择单克隆抗体的偶联量为25 μ g。

[0127] 三、单抗偶联磁珠的时间的选择

[0128] (一)实验方法

[0129] 确定磁珠的体积用量、单克隆抗体体积后,将单克隆抗体与磁珠的偶联反应时间分别设为15min、30min、45min、60min、80min、100min、120min,将制备好的免疫纳米磁珠检测10⁶CFU/mL的幽门螺杆菌。

[0130] (二)实验结果

[0131] 结果发现(图5B),当偶联时间>60min时,荧光强度趋于稳定,此后再延长偶联时间,荧光不再增强甚至减小。因此,确定OMP_s蛋白多克隆抗体与磁珠的最适偶联反应时间为60min。偶联时间远少于传统ELISA法的24h。

[0132] 实施例5抗幽门螺杆菌免疫纳米磁珠的制备

[0133] 一、磁珠预处理

[0134] 取50 μ g磁珠,按照说明书进行操作。将免疫沉淀磁珠漩涡振荡1min,使磁珠充分振荡重悬;取50 μ L磁珠悬液置于1.5mL EP管中。加入200 μ L结合缓冲液洗涤,进行磁性分离(将EP管放置于磁性分离器上,使磁珠被吸附在管壁至溶液澄清;该操作描述以下省略),弃上清液,从磁性分离器上取下EP管,重复洗涤一次。最后加入200 μ L结合缓冲液重悬磁珠以备用。

[0135] 二、抗体吸附

[0136] 将预处理的磁珠悬液进行磁性分离,弃上清液;加入25 μ L抗体工作液,迅速重悬后在室温下置于翻转混合仪或者手工轻轻翻转EP管,60min后进行磁性分离,收集上清液置于冰上以备后续检测。

[0137] 三、洗涤

[0138] 向EP管中加入200 μ L结合缓冲液洗涤,用移液器轻轻吹打使磁珠-抗体复合物均匀分散,然后进行磁性分离,弃上清液,从磁性分离器上取下EP管。重复以上洗涤操作一次,得到免疫磁珠。

[0139] 实施例6抗幽门螺杆菌免疫量子点探针的制备条件的优化

[0140] 确定磁珠的体积用量、单克隆抗体体积、单抗偶联磁珠的时间后,量子点的用量、多克隆抗体偶联量子点的时间、多克隆抗体体积等偶联条件进行了一系列的优化选择。

[0141] 一、量子点的用量的选择

[0142] (一)实验方法

[0143] 向微量离心管中依次加入10 μ L、50 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L羧基水溶性量子点(5mg/mL)、200 μ L(10mg/mL, g/v, PBS缓冲液)N-羟基琥珀酰亚胺sulfo-NHS以及200 μ L碳二亚胺EDC(10mg/mL, g/v, PBS缓冲液),混合溶液,37 $^{\circ}$ C反应30min后,用PBST溶液洗涤三次,得到活化后的量子点,加入一定量的实施例1制备得到的多克隆进行偶联,将制备好的免疫纳米磁珠检测10⁶CFU/mL的幽门螺杆菌。

[0144] (二)实验结果

[0145] 结果发现(图5C),当量子点的投放量小于200 μ g时,荧光光度随着量子点的量增加而增加,而当量子点的量大于200 μ g时,荧光光度基本不变甚至降低。结果表明用量为200 μ g的量子点体积最符合本发明的要求,确定最适量子点用量为200 μ g。

[0146] 二、多克隆抗体偶联量子点的时间的选择

[0147] (一)实验方法

[0148] 将多克隆抗体偶联量子点的偶联反应时间分别设为15min、30min、45min、60min、100min、120min,将制备好的免疫纳米磁珠检测10⁶CFU/mL的幽门螺杆菌。

[0149] (二)实验结果

[0150] 结果发现(图5D),当偶联时间>60min时,荧光强度趋于稳定,此后再延长偶联时间,荧光不再增强甚至减小。因此,确定OMPs蛋白多克隆抗体与量子点的最适偶联反应时间为60min。偶联时间远少于传统ELISA法的24h。

[0151] 三、多克隆抗体体积的选择

[0152] (一)实验方法

[0153] 在活化的量子点中,加入不同浓度体积所制备的OMPs蛋白多克隆抗体10 μ L、25 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、150 μ L(1mg/mL),避光反应60min,然后用PBST溶液洗涤三次后,用1%的500 μ L的BSA封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应60min;将制备好的免疫纳米磁珠检测10⁶CFU/mL的幽门螺杆菌。

[0154] (二)实验结果

[0155] 结果发现(图5E),当抗体的投放量小于75 μ g时,荧光强度随着抗体的浓度增加而增加,而当抗体的用量大于75 μ g时,荧光强度基本不变甚至略有减小,因此本实施例选择多克隆抗体的偶联量为75 μ g。

[0156] 实施例7抗幽门螺杆菌免疫量子点探针的制备

[0157] 向微量离心管中依次加入200 μ L羧基水溶性量子点(5mg/mL)、200 μ L(10mg/mL, g/v, PBS缓冲液)N-羟基琥珀酰亚胺sulfo-NHS以及200 μ L碳二亚胺EDC(10mg/mL, g/v, PBS缓冲液),混合溶液,37 $^{\circ}$ C反应30min后,用PBST溶液洗涤三次,得到活化后的量子点在所得到的活化的量子点中,加入75 μ L体积所制备的OMPs蛋白多克隆抗体,避光反应60min,然后用PBST溶液洗涤三次后,用1%的500 μ L的BSA封闭未反应的活化羧基位点,继续避光反应30min;在洗涤步骤之后,加入500 μ L的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C备用。

[0158] 实施例8一种基于磁性分离和量子点标记的检测人幽门螺杆菌抗原的试剂盒

[0159] 以实施例2制备的偶联幽门螺杆菌的脲酶B肽段的单克隆抗体的磁珠作为固相载体,以量子点标记的实施例1制备的偶联了OMPs蛋白多克隆抗体为检测抗体,通过双抗夹心法原理检测幽门螺杆菌抗原。

[0160] 一、组成

[0161] 试剂盒包括：实施例4制备得到抗幽门螺杆菌的纳米免疫磁珠、实施例6制备得到量子点标记的抗幽门螺杆菌的纳米探针、质控品以及PBST缓冲液所组成。

[0162] 其中，PBST缓冲液的配制方法为：取8g NaCl、0.2g KCl、0.24KH₂PO₄、1.44g Na₂HPO₄、0.3g NaN₃、0.5mL Tween-20溶解于800mL蒸馏水中，用5M NaOH调整pH至7.4，再定容至1000mL；

[0163] 阳性质控品的制备：阳性质控品由灭活的幽门螺杆菌干燥结合到人体健康粪便上；

[0164] 阴性质控品的制备：阳性质控品即经临床诊断为幽门螺杆菌阴性的人体粪便。

[0165] 二、使用方法

[0166] 按常规临床手段获得人体粪便，用0.5mL试剂盒中的PBST缓冲液溶解人体粪便上的临床样本后，将溶解液转入1.5mL普通离心管中，向该离心管中加入试剂盒中的抗幽门螺杆菌的免疫纳米磁珠50μL，室温下以10rpm于旋转混合仪上反应60min后取下，将离心管插入磁力架分离3min，用移液器吸出上清。添加试剂盒中的PBST缓冲液500μL洗涤两遍，磁分离后吸出洗涤液，最后用500μL PBS缓冲液重悬免疫纳米磁珠。

[0167] 取100μL上述重悬的免疫纳米磁珠于另一离心管中，再加入100μL试剂盒中的量子点标记的抗幽门螺杆菌的纳米探针，室温下以15rpm于旋转混合仪上反应60min，通过量子点上的抗体与免疫纳米磁珠上的菌体抗原的免疫结合，量子点被标记到菌体抗原表面，形成磁珠-菌体抗原-量子点“三明治”复合物。

[0168] 反应完成后，磁分离3min，除去多余的量子点标记探针，并用PBST缓冲液清洗2遍，复合物重新分散在100μLPBS缓冲液中，使用荧光光谱仪对其荧光值进行检测。

[0169] 按上述同样的方法检测试剂盒中提供的四份阴性质控品及一份阳性质控品样品，分别读取荧光值；四份阴性质控品样品的荧光读数的平均值与3倍标准差之和即为CUT-OFF值；若上述临床人体粪便样本的检测荧光值若大于CUT-OFF值即判断为此份临床人体粪便中幽门螺杆菌抗原为阳性，反之则判断为此份临床人体粪便子样本中幽门螺杆菌抗原为阴性；若阳性质控品样品的荧光值小于CUT-OFF值，则表明试剂盒失效。

[0170] 实施例9试剂盒的检测敏感性和特异性试验

[0171] 一、敏感性

[0172] (一) 实验方法

[0173] 将幽门螺杆菌样品用PBST缓冲液进行系列稀释后，稀释至10CFU/mL、10²CFU/mL、10³CFU/mL、10⁴CFU/mL、10⁵CFU/mL、10⁶CFU/mL，用实施例8的试剂盒进行检测。

[0174] (二) 实验结果

[0175] 结果表明(图6)，本试剂盒检测底限为1×10CFU/mL。

[0176] 二、特异性

[0177] (一) 实验方法

[0178] 用枯草芽孢杆菌(ACCC 10719)、金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、副溶血性弧菌(ATCC 17802)、嗜水气单胞菌(ATCC 35654)、诺卡氏菌(ATCC 40100)、大肠杆菌(ATCC 43888)、伴放线放线杆菌(ATCC700685)、屎肠球菌(ATCC 19434)、粪肠球菌(ATCC 29212)等作为检测对象，使用实施例6的试剂盒进行检测。

[0179] (二) 实验结果

[0180] 实施例8的试剂盒检测结果(图6C)显示含这些微生物的PBST缓冲液都为阴性。

[0181] 实施例10人类粪便样本分析

[0182] 一、实验方法

[0183] 为了评价所建立的方法对复杂生物基质的适用性,介绍了人胃肠道排泄物。健康个体的粪便没有任何预处理,在人粪便中加入不同浓度的幽门螺杆菌后,使用实施例8的试剂盒进行检测。

[0184] 为了进一步证明,该方法不受基体效应的影响人类粪便复杂样品,采用50mg健康的人类粪便作为模型矩阵和恢复进行了测试。

[0185] 二、实验结果

[0186] 结果(图7)表明其荧光强度明显的由低到高。则说明幽门螺旋杆菌荧光强度仍然表现为线性浓度范围的 $10 \sim 10^6$ CFU/mL,在真实样品中该方法以及检测试剂盒仍然适用。

[0187] 结果如表1所示,回收率在93.0%~109.3%之间,相对标准偏差值在1.1%~6.7%之间。因此,该方法及该方法制备检测试剂盒适用于实际样品中幽门螺杆菌的测定。

[0188] 表1人体粪便中幽门螺杆菌的回收率

Sample number	Added	Found	Recovery	RSD (%)
	(CFU/mg)	(CFU/mg)	(%)	(n=3)
1	10^2	$10^{1.97}$	93.3	2.3
2	10^3	$10^{2.99}$	97.7	2.2
3	10^4	$10^{4.03}$	107.2	1.6
4	10^5	$10^{4.95}$	89.1	3.6
5	10^6	$10^{6.02}$	104.7	2.1

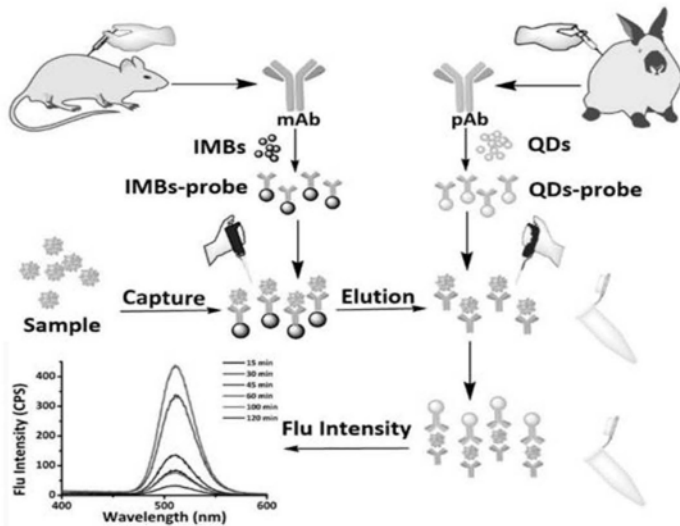


图1

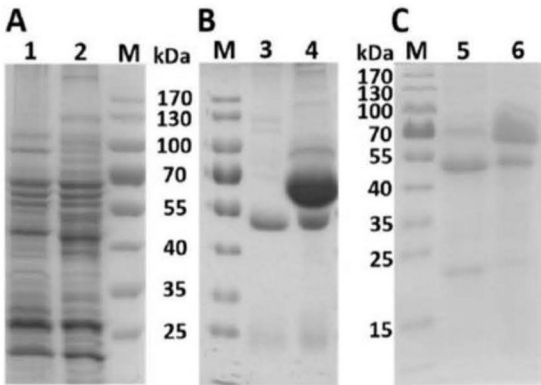


图2

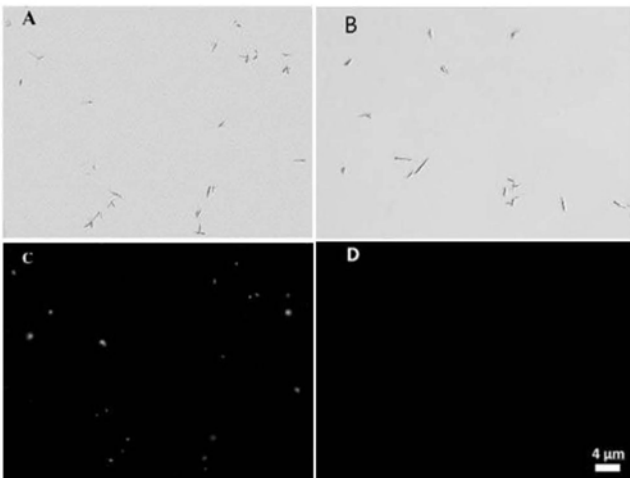


图3

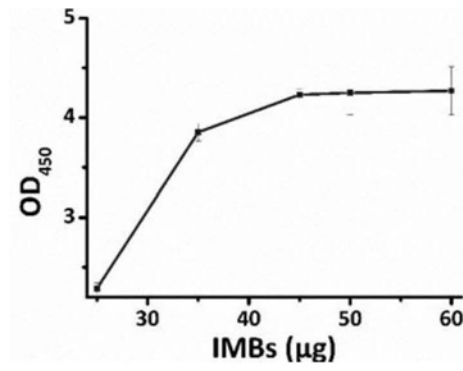


图4

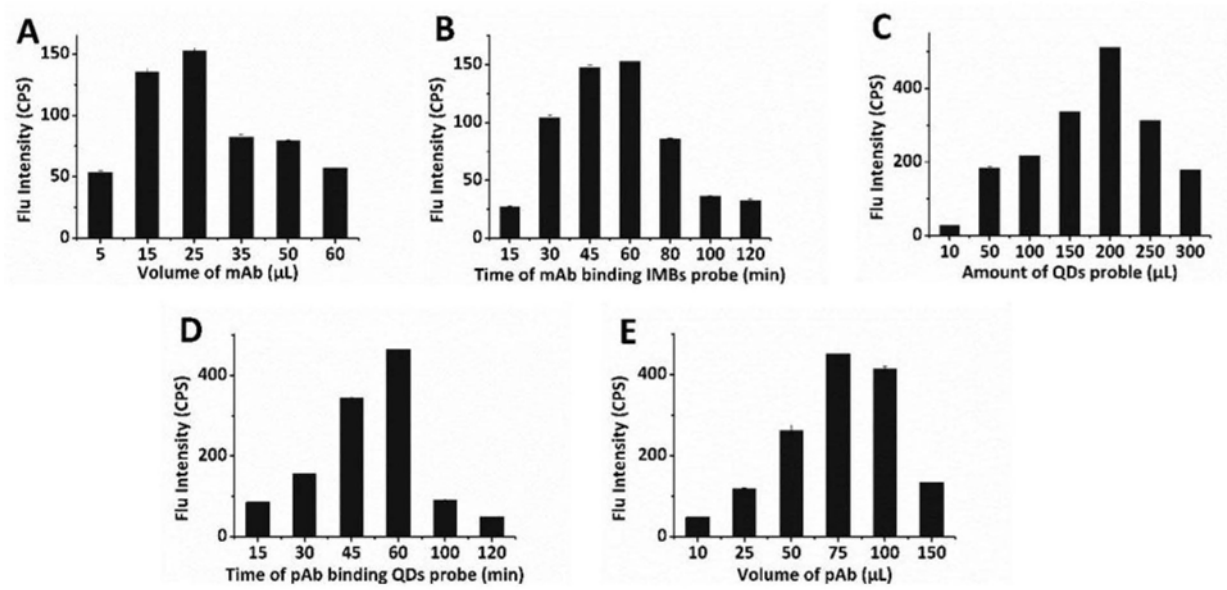


图5

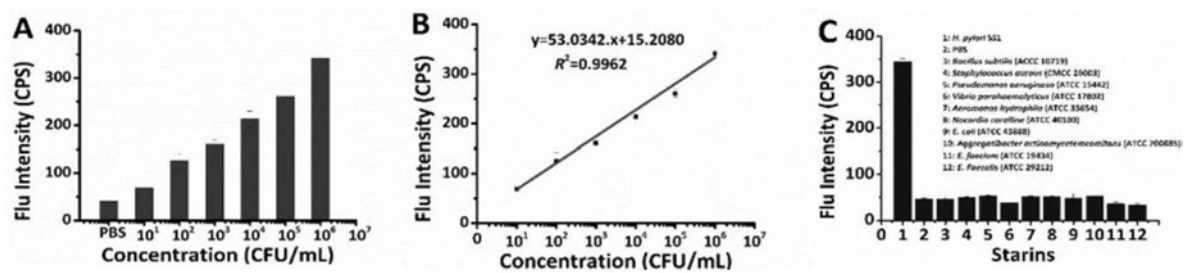


图6

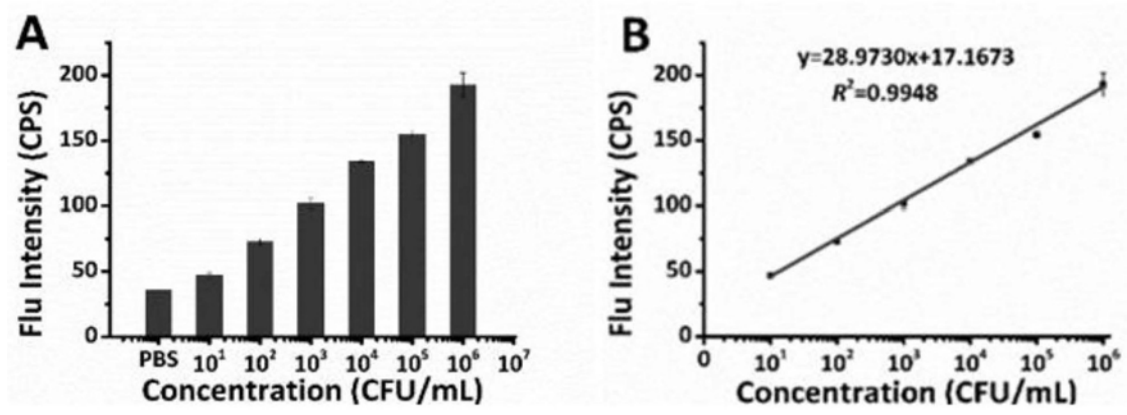


图7

专利名称(译)	一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN110412261A	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201910395518.2	申请日	2019-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	赵肃清 陈莉莉 肖益热 王甜甜		
发明人	赵肃清 陈莉莉 肖益热 邹同达 王甜甜		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/56916		
代理人(译)	陈嘉毅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于磁分离与量子点标记幽门螺杆菌快速检测方法和试剂盒，该试剂盒包括抗幽门螺杆菌的免疫磁珠纳米磁珠和抗幽门螺杆菌的量子点标记的纳米探针。本发明利用了免疫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；本发明检测方法简单，检测快速，易于判定，检测成本低廉；可进行早期诊断和防治，临床诊断符合率高；在临床诊断、病原学鉴别、流行病学调查等方面具有很高的实用价值，易于推广。

