



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107918011 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201610882326.0

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.10.09

(71)申请人 徐新平

地址 210042 江苏省南京市江宁区江宁科
学园芝兰路18号

申请人 赵静

(72)发明人 徐新平 赵静

(74)专利代理机构 合肥市上嘉专利代理事务所
(普通合伙) 34125

代理人 王伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

(54)发明名称

真菌的检测方法及检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种病原真菌的快速检测方法,该方法包括:该方法包括:用标记物标记1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体二者中任意一个,先将未做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体结合到固相载体上,然后将待检样品加入到固相载体上,再加入已做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体,通过检测标记物方法来检测待检样品中是否存在真菌。以及基于此方法的真菌检测试剂盒。该真菌检测方法及试剂盒,可以快速、简便进行真菌感染的检测与诊断,降低检测成本,提高检测精度,满足临床使用的需求。

1. 一种真菌检测方法,其特征在于,该方法包括:用标记物标记1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体二者中任意一个,先将未做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体结合到固相载体上,然后将待检样品加入到固相载体上,再加入已做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体,通过检测标记物方法来检测待检样品中是否存在真菌。

2. 根据权利要求1中所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的1,3- β -D-葡聚糖的多肽,应至少含有以下的氨基酸序列:

Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn,

其中,Xaa表示任意的氨基酸。

3. 根据权利要求2所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的1,3- β -D-葡聚糖的多肽,其N末端的氨基酸序列如下:

Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn,

其中,Xaa表示任意的氨基酸。

4. 根据权利要求2或3所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的Xaa为Gly或Lys。

5. 根据权利要求2或3所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的1,3- β -D-葡聚糖的多肽偶联有大分子物质。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的固相载体为至少一种以下的载体:乳胶颗粒、硝酸纤维素膜、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜、微孔板或磁性颗粒。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的1,3- β -D-葡聚糖多肽或其抗体可用至少一种以下的标记物标记:胶乳颗粒、胶体金、荧光、地高辛、生物素、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、吖啶酯、吖啶酯衍生物、鲁米诺或其衍生物或三联吡啶钌。

8. 根据权利要求1-5中任一项所述的真菌检测方法,其特征在于,所述的检测标记物检测方法为免疫层析法、免疫比浊法、ELISA法、蛋白免疫印迹法、微流控法或化学发光法中的一种或几种。

9. 一种真菌检测试剂盒,应用了权利要求1-8中任一项所述的方法来检测真菌。

真菌的检测方法及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术领域,具体涉及生物检测技术领域,特别涉及一种真菌的快速检测方法及检测试剂盒。

背景技术

[0002] 真菌性感染主要是外源性感染,浅部真菌有亲嗜表皮角质特性,侵犯皮肤、指甲及须发等组织,顽强繁殖,发生机械刺激损害,同时产生酶及酸等代谢产物,引起炎症反应和细胞病变。深部真菌,可侵犯皮下,内脏及脑膜等处,引起慢性肉芽肿及坏死。条件性真菌感染主要是内源性感染(如白色念珠菌),亦有外源性感染(如曲霉菌),此类感染与机体抵抗力,免疫力降低及菌落失调有关,常发生于长期应用抗生素、激素、免疫抑制剂、化疗和放疗的患者。近年来,原发性和继发性侵袭性真菌感染(invasive fungal infections,IFI)的患病率持续上升。IFI作为院内感染在恶性肿瘤患者、接受化疗的血液病患者、AIDS患者、器官移植患者和接受抑制免疫力治疗的患者中十分常见,致使越来越多的患者产生严重的并发症甚至死亡。过敏性真菌病系在各种过敏性或变态反应性疾病中,由真菌性过敏原(如孢子抗原)引起过敏症,如哮喘,变态反应性肺泡炎和癣菌疹等。目前临床上针对真菌感染的检测手段主要有一下几种:

[0003] (一) 直接检查

[0004] 是最简单而重要方法,浅部感染真菌的病变标本如毛发、皮屑、甲屑置玻片上,滴加10%KOH,覆盖玻片微热熔化角质层,再将玻片压紧,用吸水纸吸去周围多余碱液,在显微镜下观察,见皮屑甲屑中有菌丝,或毛发内部或外部有成串孢子,即可初步诊断为癣菌感染,但不能确定菌种。深部感染真菌标本如痰,脑脊液亦可做涂片用革兰氏染色(白色念珠菌)或墨汁负染色(隐球菌)观察形态特征。

[0005] (二) 培养检查

[0006] 本法可确定菌种,辅助直接检查不足,通常用沙保氏培养基(22~28℃),深部真菌可用血琼脂或脑心葡萄糖血琼脂37℃培养,或根据不同菌种运用不同培养基,如孢子丝菌可用胱氨酸血液葡萄糖琼脂,必要时运用鉴别培养基和生化反应,同化试验等进行鉴定。

[0007] (三) 免疫学试验

[0008] 近年来有许多方法用于检测深部感染真菌的抗体,作辅助诊断荚膜组织胞浆菌、念珠菌、曲霉菌。但系统性感染患者常因免疫功能降低不出现抗体;而且许多真菌间抗原性有交叉反应;有的产生抗体后维持时间较长,正常人群中有一定比例的阳性率,则必须结合临床情况分析结果才能作出恰当的诊断。

[0009] (四) 动物试验

[0010] 某些真菌对实验动物有致病性,如皮炎芽生菌,球孢子菌可在小白鼠,豚鼠体内生长,白色念珠接种家兔小白鼠可发生肾脏脓肿致死。

[0011] (五) G试验

[0012] G试验检测的是真菌的细胞壁成分——1,3-β-D-葡聚糖,人体的吞噬细胞吞噬真

菌后,能持续释放该物质,使血液及体液中含量增高(浅部真菌感染无类似现象)。1-3- β -D-葡聚糖可特异性激活鲎(Limulus)变形细胞裂解物中的G因子,引起裂解物凝固,故称G试验。

[0013] G试验是目前真菌检测的金标准;但是G试验依赖国家二级保护动物——鲎的血清,并且,操作繁琐,人为干扰因素较多,大规模应用存在缺陷。

[0014] 综上所述,上述这些方法总是存在一些问题,有的是因为检测时间过长,不利于及时诊断和治疗;有的则是因为敏感度不高,假阴性率高,错过了真菌感染及早发现及早治疗的时机。

[0015] 目前针对1,3- β -D-葡聚糖的检测是新兴的灵敏度较高特异性较好的检测真菌感染的方法。1,3- β -D-葡聚糖是酵母和丝状真菌细胞壁的多聚糖成分,而原核生物、病毒和人体细胞都不存在这种多聚糖,当真菌进入人体血液或深部组织后,经中性粒细胞及吞噬细胞的处理,1,3- β -D-葡聚糖可从真菌细胞壁释放出来进入血液及其他体液中,在浅部真菌感染中,1,3- β -D-葡聚糖未被释放出来,故在体液中的量不增高。因此,1,3- β -D-葡聚糖在血液及无菌体液中的含量成为侵袭性真菌感染诊断标准。当前市场上有几例针对1,3- β -D-葡聚糖的检测的试剂盒,灵敏度不错,但是因为是基于凝胶法、比浊法等原理,导致整个检测过程比价漫长,检测费用也比较高。

发明内容

[0016] 为了解决上述问题,本发明提供一种真菌的检测方法,种真菌检测方法,该方法包括:用标记物标记1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体二者中任意一个,先将未做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体结合到固相载体上,然后将待检样品加入到固相载体上,再加入已做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽或其抗体,通过检测标记物方法来检测待检样品中是否存在真菌。

[0017] 应当说明的是:此方法中,可以用标记物标记1,3- β -D-葡聚糖多肽,而将其抗体结合到固相载体上,然后将待检样品加入到固相载体上,再加入已做标记的1,3- β -D-葡聚糖的多肽,通过检测标记物方法来检测待检样品中是否存在真菌;同样地,也可以用标记物标记1,3- β -D-葡聚糖抗体,而将其多肽结合到固相载体上,然后将待检样品加入到固相载体上,再加入已做标记的1,3- β -D-葡聚糖的抗体,通过检测标记物方法来检测待检样品中是否存在真菌。

[0018] 较优地,所述真菌检测方法中,1,3- β -D-葡聚糖的多肽,应至少含有以下的氨基酸序列:

[0019] Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn,

[0020] 其中,Xaa表示任意的氨基酸;

[0021] 如果用氨基酸的单字母缩写表示,则为:

[0022] K-S-G-F-I-L-T-A-P-K-S-L-T-L-G-R-N-N-R-L-N-L-H-L-F-D-I-N-T-N-G-F-X-R-I-G-V-K-D-Q-N-D-F-N,

[0023] 其中,X表示任意的氨基酸。

[0024] 较优地,所述真菌检测方法中,所述的1,3- β -D-葡聚糖的多肽,其N末端的氨基酸序列如下:

[0025] Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn,

[0026] 其中,Xaa表示任意的氨基酸;

[0027] 更优地,所述真菌检测方法中,所述的Xaa为Gly或Lys。

[0028] 可想而知的,上述的多1,3- β -D-葡聚糖的多肽偶联有大分子物质,以增强标记效果或是免疫效果。

[0029] 本领域的普通技术人员应当知道,Xaa表示任意的氨基酸可以选自以下各种氨基酸;所述氨基酸可以用三字母或是单字母表示,氨基酸与三字母和单字母的一一对应关系为:

[0030] 丙氨酸(alanine)-Ala-A,精氨酸(arginine)-Arg-R,天冬酰胺(asparagine)-Asn-N,天冬氨酸(aspartic acid)-Asp-D,亮氨酸(leucine)-Leu-L,赖氨酸(lysine)-Lys-K,甲硫氨酸(methionine)-Met-M,苯丙氨酸(phenylalanine)-Phe-F,半胱氨酸(cysteine)-Cys-C,脯氨酸(proline)-Pro-P,谷氨酰胺(glutamine)-Gln-Q,丝氨酸(serine)-Ser-S,谷氨酸(glutamic acid)-Glu-E,苏氨酸(threonine)-Thr-T,甘氨酸(Glycine)-Gly-G,色氨酸(tryptophan)-Trp-W,组氨酸(histidine)-His-H,酪氨酸(tyrosine)-Tyr-Y,异亮氨酸(isoleucine)-Ile-I,缬氨酸(valine)-Val-V,等。

[0031] 较优地,所述的固相载体为至少一种以下的载体:乳胶颗粒、硝酸纤维素膜、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜、微孔板或磁性颗粒。

[0032] 较优地,所述的1,3- β -D-葡聚糖多肽或其抗体可用至少一种以下的标记物标记:胶乳颗粒、胶体金、荧光、地高辛、生物素、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、吖啶酯、吖啶酯衍生物、鲁米诺或其衍生物或三联吡啶钌。

[0033] 较优地,所述的检测标记物检测方法为免疫层析法、免疫比浊法、ELISA法、蛋白免疫印迹法、微流控法或化学发光法中的一种或几种。

[0034] 本发明还提供一种真菌检测试剂盒,该试剂盒应用了上述方法来检测真菌。

[0035] 本发明的有益效果主要有:

[0036] (1) 本发明专利的多肽可采用基因工程表达或者化学合成获得,无需像传统方法(G试验),依赖天然的动物血清,不受原料的限制;另外,生产工艺更易标准化;

[0037] (2) 成本可进一步降低;传统技术依赖鲎血清,鲎是国家二级保护动物,种群规模逐年降低,并且已经严禁滥捕滥杀,鲎血清的价格逐年升高;本发明采用基因工程技术或化学合成获得原料,成本较低;

[0038] (3) 检测更方便:传统的G试验,一般采用凝胶法或动态比浊法,检测时需要人工值守和观察,并且检测通量较低;而本发明采用夹心免疫技术,将真菌的检测可采用临床检验最常用的免疫层析、免疫比浊、ELISA或化学发光等,自动化程度高,操作简便,检测成本低。

具体实施方式

[0039] 为了能够更清楚地理解本发明专利的技术内容,特举以下实施例详细说明。

[0040] 本发明专利的真菌检测的方法的检测试纸条的制备过程简述如下,应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆技术实验室操作手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2005)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0041] 实施例1 多肽合成

[0042] 特异性结合真菌特有的1,3- β -D-葡聚糖多肽,其氨基酸序列如下:

[0043] Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Xaa-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn。

[0044] 委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行合成以下三条多肽,其中,Xaa分别是: Gly、Lys、Thr;具体如下:

[0045] (1) 多肽1 (Xaa为Gly),氨基酸序列如下:

[0046] Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Gly-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn;

[0047] (2) 多肽2 (Xaa为Lys),氨基酸序列如下:

[0048] Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Lys-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn;

[0049] (3) 多肽3 (Xaa为Thr且增加10个氨基酸),氨基酸序列如下:

[0050] Leu-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala-Lys-Ser-Gly-Phe-Ile-Leu-Thr-Ala-Pro-Lys-Ser-Leu-Thr-Leu-Gly-Arg-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Leu-His-Leu-Phe-Asp-Ile-Asn-Thr-Asn-Gly-Phe-Thr-Arg-Ile-Gly-Val-Lys-Asp-Gln-Asn-Asp-Phe-Asn;其中,前10个氨基酸(Leu-Val-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Ala-Leu-Ala)来自于BSA(牛血清白蛋白);

[0051] 将真菌1,3- β -D-葡聚糖多肽包被在微孔板,采用ELISA方法进行亲和力与特异性测试,上述三个多肽在性能上无显著差异。

[0052] 实施例2 荧光标记多肽1

[0053] 清洗:取荧光微球(2014年购自Bangs Lab,货号:11233)至离心管中,加0.1M MES (2-吗啉代乙磺酸) (pH 5.0) 缓冲液混匀,并以13000rpm,15min,4℃条件离心,弃上清,用0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液重悬待用。活化并清洗:将活化剂EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和荧光微球按照质量比比2:1:2的量进行活化,具体操作如下:

[0054] 称取EDC、NHS加入0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液中溶解,迅速取适量至4.3.3.1清洗完毕的荧光微球中,用封口膜封好放置在200rpm摇床上室温摇匀30min,取出后13000rpm,30min,4℃离心除去上清,用等量0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液重悬超声混匀并清洗,重复一次以上操作即清洗两次。离心完成后弃掉上清待用。

[0055] 标记:将活化后的胶乳重悬至0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液中,迅速分别加入特异性结合1,3- β -D-葡聚糖的多肽(实施例1中的多小肽1),混匀,放置室温,200rpm摇床上摇匀4

小时。

[0056] 封闭:取上述标记好的微球于13000rpm,30min,4℃离心除去上清,立即向微球中加入等量封闭液,超声重悬后再放置室温,200rpm摇床上摇匀1小时。反应完成后13000rpm,20min,4℃离心,取上清待检。

[0057]

检测内容	质量标准	检测方法
包被量	包被量 $\geq 40\mu\text{g}$ 多肽/mg微球	BCA蛋白浓度测定法

[0058] 清洗&重悬:加入重悬液,超声吹打重悬,用高速冷冻离心机13000rpm,20min,4℃离心,弃掉上清;加入重悬液,超声吹打重悬。

[0059] 重悬好的微球溶液做好标记,备用。

[0060] 实施例3 荧光标记多肽2

[0061] 清洗:取荧光微球(2014年购自Bangs Lab,货号:11233)至离心管中,加0.1M MES (2-吗啉代乙磺酸) (pH 5.0) 缓冲液混匀,并以13000rpm,15min,4℃条件离心,弃上清,用0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液重悬待用。活化并清洗:将活化剂EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和荧光微球按照质量比比2:1:2的量进行活化,具体操作如下:

[0062] 称取EDC、NHS加入0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液中溶解,迅速取适量至4.3.3.1清洗完毕的荧光微球中,用封口膜封好放置在200rpm摇床上室温摇匀30min,取出后13000rpm,30min,4℃离心除去上清,用等量0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液重悬超声混匀并清洗,重复一次以上操作即清洗两次。离心完成后弃掉上清待用。

[0063] 标记:将活化后的胶乳重悬至0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液中,迅速分别加入特异性结合1,3- β -D-葡聚糖的多肽(实施例1中的多肽2),混匀,放置室温,200rpm摇床上摇匀4小时。

[0064] 封闭:取上述标记好的微球于13000rpm,30min,4℃离心除去上清,立即向微球中加入等量封闭液,超声重悬后再放置室温,200rpm摇床上摇匀1小时。反应完成后13000rpm,20min,4℃离心,取上清待检。

[0065]

检测内容	质量标准	检测方法
包被量	包被量 $\geq 40\mu\text{g}$ 多肽/mg微球	BCA蛋白浓度测定法

[0066] 清洗&重悬:加入重悬液,超声吹打重悬,用高速冷冻离心机13000rpm,20min,4℃离心,弃掉上清;加入重悬液,超声吹打重悬。

[0067] 重悬好的微球溶液做好标记,备用。

[0068] 实施例4 荧光标记多肽3

[0069] 清洗:取荧光微球(2014年购自Bangs Lab,货号:11233)至离心管中,加0.1M MES (2-吗啉代乙磺酸) (pH 5.0) 缓冲液混匀,并以13000rpm,15min,4℃条件离心,弃上清,用0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液重悬待用。活化并清洗:将活化剂EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和荧光微球按照质量比比2:1:2的量进行活化,具体操作如下:

[0070] 称取EDC、NHS加入0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液中溶解,迅速取适量至4.3.3.1清洗完

毕的荧光微球中,用封口膜封好放置在200rpm摇床上室温摇匀30min,取出后13000rpm,30min,4℃离心除去上清,用等量0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液重悬超声混匀并清洗,重复一次以上操作即清洗两次。离心完成后弃掉上清待用。

[0071] 标记:将活化后的胶乳重悬至0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液中,迅速分别加入特异性结合1,3-β-D-葡聚糖的多肽(实施例1中的多肽3),混匀,放置室温,200rpm摇床上摇匀4小时。

[0072] 封闭:取上述标记好的微球于13000rpm,30min,4℃离心除去上清,立即向微球中加入等量封闭液,超声重悬后再放置室温,200rpm摇床上摇匀1小时。反应完成后13000rpm,20min,4℃离心,取上清待检。

[0073]

检测内容	质量标准	检测方法
包被量	包被量 $\geq 40\mu\text{g}$ 多肽/mg微球	BCA蛋白浓度测定法

[0074] 清洗&重悬:加入重悬液,超声吹打重悬,用高速冷冻离心机13000rpm,20min,4℃离心,弃掉上清;加入重悬液,超声吹打重悬。

[0075] 重悬好的微球溶液做好标记,备用。

[0076] 实施例5 荧光标记特异性抗体

[0077] 清洗:取荧光微球(2014年购自Bangs Lab,货号:11233)至离心管中,加0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液混匀,并以13000rpm,15min,4℃条件离心,弃上清,用0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液重悬待用。活化并清洗:将活化剂EDC、NHS和荧光微球按照质量比比2:1:2的量进行活化,具体操作如下:

[0078] 称取EDC、NHS加入0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液中溶解,迅速取适量至4.3.3.1清洗完毕的荧光微球中,用封口膜封好放置在200rpm摇床上室温摇匀30min,取出后13000rpm,30min,4℃离心除去上清,用等量0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液重悬超声混匀并清洗,重复一次以上操作即清洗两次。离心完成后弃掉上清待用。

[0079] 标记:将活化后的胶乳重悬至0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液中,迅速分别加入特异性结合1,3-β-D-葡聚糖的抗体(羊多抗,2014年购自United States Biological,货号:168214,2ml),混匀,放置室温,200rpm摇床上摇匀4小时。

[0080] 封闭:取上述标记好的微球于10000rpm,30min,4℃离心除去上清,立即向微球中加入等量封闭液,超声重悬后再放置室温,200rpm摇床上摇匀1小时。反应完成后10000rpm,20min,4℃离心,取上清待检。

[0081]

检测内容	质量标准	检测方法
包被量	包被量 $\geq 200\mu\text{g}$ 抗体/mg微球	BCA蛋白浓度测定法

[0082] 清洗&重悬:加入重悬液,超声吹打重悬,用高速冷冻离心机10000rpm,20min,4℃离心,弃掉上清;加入重悬液,超声吹打重悬。

[0083] 重悬好的微球溶液做好标记,备用。

[0084] 实施例6 荧光标记羊抗兔IgG

[0085] 清洗:取荧光微球(2014年购自Bangs Lab,货号:11233)至离心管中,加0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液混匀,并以13000rpm,15min,4℃条件离心,弃上清,用0.1M MES (pH 5.0) 缓

冲液重悬待用。活化并清洗:将活化剂EDC、NHS和荧光微球按照质量比比2:1:2的量进行活化,具体操作如下:

[0086] 称取EDC、NHS加入0.1M MES (pH 5.0) 缓冲液中溶解,迅速取适量至4.3.3.1清洗完毕的荧光微球中,用封口膜封好放置在200rpm摇床上室温摇匀30min,取出后13000rpm, 30min,4℃离心除去上清,用等量0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液重悬超声混匀并清洗,重复一次以上操作即清洗两次。离心完成后弃掉上清待用。

[0087] 标记:将活化后的胶乳重悬至0.1M MES (pH 6.5) 缓冲液中,迅速分别加入羊抗兔1gG (2012年购自成都双龙生化,货号:J0711-6,1mg),混匀,放置室温,200rpm摇床上摇匀4小时。

[0088] 封闭:取上述标记好的微球于10000rpm,30min,4℃离心除去上清,立即向微球中加入等量封闭液,超声重悬后再放置室温,200rpm摇床上摇匀1小时。反应完成后10000rpm, 20min,4℃离心,取上清待检。

[0089]

检测内容	质量标准	检测方法
包被量	包被量 $\geq 200\mu\text{g}$ 抗体/mg微球	BCA蛋白浓度测定法

[0090] 清洗&重悬:加入重悬液,超声吹打重悬,用高速冷冻离心机10000rpm,20min,4℃离心,弃掉上清;加入重悬液,超声吹打重悬。

[0091] 重悬好的微球溶液做好标记,备用。

[0092] 实施例7 结合垫的喷点

[0093] 特异性结合1,3- β -D-葡聚糖的多肽结合垫的喷点方法如下:荧光标记溶液稀释:用荧光标记重悬液将上述制备的荧光标记多肽结合物(来自实施例2或实施例3或实施例4)以及荧光标记羊抗兔1gG结合物(来自实施例6)混合后稀释2倍;设定点膜仪,开启点膜仪的电源,设定喷点程序,喷点量为8 $\mu\text{l}/\text{cm}$;1号管道为喷点通道;点膜仪初始化:将1号管道置于荧光标记重悬溶液中,选择初始化程序,初始化6个循环;喷点:将结合垫按固定位置平放在点膜仪上,按控制面板上“GO”键开始喷点,点完后取下,检查喷点好的结合垫,喷点的荧光标记多肽条带均匀、连续和贯通整个结合垫的直线为合格喷点品,两条直线中出现断点为不合格喷点品;每放一片结合垫,按一次控制面板上的“GO”键为喷点一次(一片);喷点结束,将喷点的结合垫置于室温中自然干燥1小时,膜上应看不到喷点痕迹。

[0094] 实施例8 结合垫的喷点

[0095] 抗1,3- β -D-葡聚糖的抗体结合垫的喷点方法如下:荧光标记溶液稀释:用荧光标记重悬液将上述制备的荧光标记抗体结合物(来自实施例5)稀释4倍;设定点膜仪,开启点膜仪的电源,设定喷点程序,喷点量为8 $\mu\text{l}/\text{cm}$;1号管道为喷点通道;点膜仪初始化:将1号管道置于荧光标记重悬溶液中,选择初始化程序,初始化6个循环;喷点:将结合垫按固定位置平放在点膜仪上,按控制面板上“GO”键开始喷点,点完后取下,检查喷点好的结合垫,喷点的荧光标记多肽条带均匀、连续和贯通整个结合垫的直线为合格喷点品,两条直线中出现断点为不合格喷点品;每放一片结合垫,按一次控制面板上的“GO”键为喷点一次(一片);喷点结束,将喷点的结合垫置于室温中自然干燥1小时,膜上应看不到喷点痕迹。

[0096] 实施例9 硝酸纤维素膜的制备(特异性抗体)

[0097] 1,3- β -D-葡聚糖的抗体(羊多抗,2014年购自United States Biological,货号:

168214-2ml) 硝酸纤维素膜制备方法如下:取羊抗1,3- β -D-葡聚糖的多克隆抗体500ug,加到5ml刻度离心管中,抗体稀释液至1ml,容器标记T标志。取鼠抗羊IgG抗体(2013年购自Santa Cruz,货号:sc-53799,规格:0.4mg/ml) 25ul,加到5ml刻度离心管中,抗体稀释液至1ml,容器标记C标志。设定点膜仪,开启点膜仪的电源,设定喷点程序,喷点量为1ul/cm;1号管道为检测带喷点通道,2号管道为对照带喷点通道;点膜仪初始化:将1号管道置于检测带溶液中,将2号管道置于对照带溶液中,选择初始化程序,初始化6个循环;喷点:将硝酸纤维素膜按固定位置平放在点膜仪上,按控制面板上“GO”键开始喷点,点完后取下,检查喷点好的硝酸纤维素膜,检测带和对照带为两条均匀、连续和贯通整个硝酸纤维素膜的直线为合格喷点品,两条直线中出现断点为不合格喷点品;每放一片硝酸纤维素膜,按一次控制面板上的“GO”键为喷点一次(一片);喷点结束,将喷点的硝酸纤维素膜置于室温中自然干燥1小时,膜上应看不到喷点痕迹。

[0098] 实施例10 硝酸纤维素膜的制备(特异性多肽)

[0099] 特异性结合1,3- β -D-葡聚糖的多肽硝酸纤维素膜制备方法如下:取特异性结合1,3- β -D-葡聚糖的多肽200ug(实施例1中的小肽1或小肽2或小肽3),加到5ml刻度离心管中,稀释至1ml,容器标记T标志。取鼠抗羊IgG抗体(2013年购自Santa Cruz,货号:sc-53799,规格:0.4mg/ml) 25ul,加到5ml刻度离心管中,抗体稀释液至1ml,容器标记C标志。设定点膜仪,开启点膜仪的电源,设定喷点程序,喷点量为1ul/cm;1号管道为检测带喷点通道,2号管道为对照带喷点通道;点膜仪初始化:将1号管道置于检测带溶液中,将2号管道置于对照带溶液中,选择初始化程序,初始化6个循环;喷点:将硝酸纤维素膜按固定位置平放在点膜仪上,按控制面板上“GO”键开始喷点,点完后取下,检查喷点好的硝酸纤维素膜,检测带和对照带为两条均匀、连续和贯通整个硝酸纤维素膜的直线为合格喷点品,两条直线中出现断点为不合格喷点品;每放一片硝酸纤维素膜,按一次控制面板上的“GO”键为喷点一次(一片);喷点结束,将喷点的硝酸纤维素膜置于室温中自然干燥1小时,膜上应看不到喷点痕迹。

[0100] 实施例11 组装

[0101] 将底板上较宽部分的保护纸除去,沿上面保护纸的下边缘,将划好线的硝酸纤维素膜(来自实施例9),以C线在上方的方式贴到底板板上;将结合垫(来自实施例7)贴在T线下方,与NC膜少许接触;将样品垫贴在结合垫下方,与结合垫少许接触;接着除去上方保护纸,将吸水纸贴在NC膜的上方,与NC膜少许接触;将保护纸及指示带纸逐一贴在组装好的试纸条外面,组装成大卡。

[0102] 实施例12 组装

[0103] 将底板上较宽部分的保护纸除去,沿上面保护纸的下边缘,将划好线的硝酸纤维素膜(来自实施例10),以C线在上方的方式贴到底板板上;将结合垫(来自实施例8)贴在T线下方,与NC膜少许接触;将样品垫贴在结合垫下方,与结合垫少许接触;接着除去上方保护纸,将吸水纸贴在NC膜的上方,与NC膜少许接触;将保护纸及指示带纸逐一贴在组装好的试纸条外面,组装成大卡。

[0104] 实施例13 切条

[0105] 接通切割机电源,设定切膜程序,设定切割宽度为4mm;将大卡(来自实施例11或实施例12)平放入切割机平台轨道中,正面朝上,按操作面板上“GO”键,开始切割;每放一片大

卡合格品,按操作面板上“GO”键一次,直至切割完所有大卡合格品;切割完成后,将试纸条并列黏贴于底板上,组成检测试纸条。

[0106] 实施例14 试剂盒组装

[0107] 将上述的试纸条(来自实施例13)装入卡盒中,形成检测卡。

[0108] 取铝箔袋和干燥剂;打开热封机,预热;将待装袋的检测卡、1袋干燥剂装入铝箔袋中;按照规定的长度切断装有检测卡和干燥剂的铝箔袋;用热封机封好铝箔袋;贴上标签。

[0109] 实施例15 HRP标记特异性抗体

[0110] 将5mg HRP(2013年购自罗氏,货号:1464325,规格:25mg/瓶)溶于0.5ml 0.1M NaHCO₃溶液中;加0.5ml 10mM NaIO₄溶液,混匀,盖紧瓶塞,室温避光作用2小时;加0.75ml 0.1M Na₂CO₃混匀;加入0.75ml抗体(羊多抗,2014年购自United States Biological,货号:168214,2ml),混匀。

[0111] HRP抗体结合物的保存:加入等量甘油后,小量分装-20℃存放,防止反复冻融。

[0112] 实施例16 HRP标记特异性多肽1

[0113] 将5mg HRP(2013年购自罗氏,货号:1464325,规格:25mg/瓶)溶于0.5ml 0.1M NaHCO₃溶液中;加0.5ml 10mM NaIO₄溶液,混匀,盖紧瓶塞,室温避光作用2小时;加0.75ml 0.1M Na₂CO₃混匀;加入0.75ml特异性多肽(实施例1中的多肽1),混匀。

[0114] HRP标记多肽结合物的保存:加入等量甘油后,小量分装-20℃存放,防止反复冻融。

[0115] 实施例17 HRP标记特异性多肽2

[0116] 将5mg HRP(2013年购自罗氏,货号:1464325,规格:25mg/瓶)溶于0.5ml 0.1M NaHCO₃溶液中;加0.5ml 10mM NaIO₄溶液,混匀,盖紧瓶塞,室温避光作用2小时;加0.75ml 0.1M Na₂CO₃混匀;加入0.75ml特异性多肽(实施例1中多肽2),混匀。

[0117] HRP标记多肽结合物的保存:加入等量甘油后,小量分装-20℃存放,防止反复冻融。

[0118] 实施例18 HRP标记特异性多肽3

[0119] 将5mg HRP(2013年购自罗氏,货号:1464325,规格:25mg/瓶)溶于0.5ml 0.1M NaHCO₃溶液中;加0.5ml 10mM NaIO₄溶液,混匀,盖紧瓶塞,室温避光作用2小时;加0.75ml 0.1M Na₂CO₃混匀;加入0.75ml特异性多肽(实施例1中多肽3),混匀。

[0120] HRP标记多肽结合物的保存:加入等量甘油后,小量分装-20℃存放,防止反复冻融。

[0121] 实施例19 特异性抗体包被

[0122] 采用0.01M, pH 10的CBS(碳酸盐缓冲液)将特异性抗体(羊多抗,2014年购自United States Biological,货号:168214,2ml)稀释至1μg/ml;取96孔微孔板,每孔加入100ul上述包被抗体;37℃温育1h;甩掉包被液,加入200ul的封闭缓冲液(2%牛血清白蛋白, pH7.4),37℃温育1h,甩掉封闭液;于室温自然干燥12h,放入干燥剂,封入铝箔袋,2~8℃备用。

[0123] 实施例20 多肽1包被

[0124] 采用0.01M, pH 10的CBS(碳酸盐缓冲液)将特异性多肽1(来自实施例1中多肽1)稀释至0.2μg/ml;取96孔微孔板,每孔加入100ul上述包被多肽;37℃温育1h;甩掉包被液,加

入200u1的封闭缓冲液(2%牛血清白蛋白,pH7.4),37℃温育1h,甩掉封闭液;于室温自然干燥12h,放入干燥剂,封入铝箔袋,2~8℃备用。

[0125] 实施例21 多肽2包被

[0126] 采用0.01M,pH 10的CBS(碳酸盐缓冲液)将特异性多肽2(来自实施例1中多肽2)稀释至0.2μg/ml;取96孔微孔板,每孔加入100u1上述包被多肽;37℃温育1h;甩掉包被液,加入200u1的封闭缓冲液(2%牛血清白蛋白,pH7.4),37℃温育1h,甩掉封闭液;于室温自然干燥12h,放入干燥剂,封入铝箔袋,2~8℃备用。

[0127] 实施例22 多肽3包被

[0128] 采用0.01M,pH 10的CBS(碳酸盐缓冲液)将特异性多肽3(来自实施例1中多肽3)稀释至0.2μg/ml;取96孔微孔板,每孔加入100u1上述包被多肽;37℃温育1h;甩掉包被液,加入200u1的封闭缓冲液(2%牛血清白蛋白,pH7.4),37℃温育1h,甩掉封闭液;于室温自然干燥12h,放入干燥剂,封入铝箔袋,2~8℃备用。

[0129] 实施例23 ELISA试剂盒组装

[0130] 将HRP标记抗体(来自实施例15)与特异性多肽包被板(来自实施例20或实施例21或实施例22),组装成真菌检测的ELISA试剂盒。

[0131] 实施例24 ELISA试剂盒组装

[0132] 将HRP标记特异性多肽(来自实施例16或实施例17或实施例18)与抗体包被板(来自实施例19),组装成真菌检测的ELISA试剂盒。

[0133] 实施例25 试剂盒检测真菌

[0134] 将上述的检测卡(来自实施例14),用临床样本进行验证。

[0135] 将待测样本滴加到检测卡的样本孔中,然后置于荧光检测仪中进行读数。

[0136] 检测结果与真菌检测的金标准(G试验)如下:

[0137]

	G试验阳性	G试验阴性	合计
检测卡检测阳性	132	3	135
检测卡检测阴性	0	83	83
合计	132	86	218

[0138] 根据上表可得:

[0139] 该试纸条的检测灵敏度为: $(132+0)/(132+0) \times 100\% = 100\%$;

[0140] 该试纸条的检测特异性为: $(83+0)/(83+3) = 96.5\%$ 。

[0141] 实施例26 试剂盒检测真菌

[0142] 将上述的检测卡(来自实施例23),用临床样本进行验证。

[0143] 将待测样本滴加到检测卡的样本孔中,然后置于荧光检测仪中进行读数。

[0144] 检测结果与真菌检测的金标准(G试验)如下:

[0145]

	G试验阳性	G试验阴性	合计
检测卡检测阳性	132	5	137
检测卡检测阴性	0	81	81
合计	132	86	218

[0146] 根据上表可得：

[0147] 该试纸条的检测灵敏度为： $(132+0)/(132+0) \times 100\% = 100\%$ ；

[0148] 该试纸条的检测特异性为： $(81+0)/(81+5) = 94.2\%$ 。

[0149] 实施例27 试剂盒检测真菌

[0150] 将上述的检测卡(来自实施例24)，用临床样本进行验证。

[0151] 将待测样本滴加到检测卡的样本孔中，然后置于荧光检测仪中进行读数。

[0152] 检测结果与真菌检测的金标准(G试验)如下：

[0153]

	G试验阳性	G试验阴性	合计
检测卡检测阳性	129	2	131
检测卡检测阴性	3	84	87
合计	132	86	218

[0154] 根据上表可得：

[0155] 该试纸条的检测灵敏度为： $(131+0)/(131+1) \times 100\% = 97.7\%$ ；

[0156] 该试纸条的检测特异性为： $(84+0)/(84+2) = 97.7\%$ 。

[0157] 上述实施例结果表明，本检测试剂盒检测真菌的准确率非常高，能够满足临床应用的要求。

[0158] 应当说明的是，以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用于限制本发明的范围，凡在本发明的精神和原则之内所作出的任何修改、等同的替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 徐新平 赵静

<120> 真菌的检测方法及检测试剂盒

<130> 2016

[0159] <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 1

Lys Ser Gly Phe Ile Leu Thr Ala Pro Lys Ser Leu Thr Leu Gly Arg
1 5 10 15

Asn Asn Arg Leu Asn Leu His Leu Phe Asp Ile Asn Thr Asn Gly Phe
20 25 30

Xaa Arg Ile Gly Val Lys Asp Gln Asn Asp Phe Asn
35 40

<210> 2
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

[0160]

<400> 2

Lys Ser Gly Phe Ile Leu Thr Ala Pro Lys Ser Leu Thr Leu Gly Arg
1 5 10 15

Asn Asn Arg Leu Asn Leu His Leu Phe Asp Ile Asn Thr Asn Gly Phe
20 25 30

Gly Arg Ile Gly Val Lys Asp Gln Asn Asp Phe Asn
35 40

<210> 3
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 3

Lys Ser Gly Phe Ile Leu Thr Ala Pro Lys Ser Leu Thr Leu Gly Arg

1 5 10 15

Asn Asn Arg Leu Asn Leu His Leu Phe Asp Ile Asn Thr Asn Gly Phe
20 25 30

Lys Arg Ile Gly Val Lys Asp Gln Asn Asp Phe Asn
35 40

<210> 4

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

[0161]

<400> 4

Leu Val Val Ser Thr Gln Thr Ala Leu Ala Lys Ser Gly Phe Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ala Pro Lys Ser Leu Thr Leu Gly Arg Asn Asn Arg Leu Asn Leu
20 25 30

His Leu Phe Asp Ile Asn Thr Asn Gly Phe Thr Arg Ile Gly Val Lys
35 40 45

Asp Gln Asn Asp Phe Asn
50

专利名称(译)	真菌的检测方法及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN107918011A	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN201610882326.0	申请日	2016-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	徐新平 赵静		
申请(专利权)人(译)	徐新平 赵静		
当前申请(专利权)人(译)	徐新平 赵静		
[标]发明人	徐新平 赵静		
发明人	徐新平 赵静		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/56961 G01N33/68 G01N33/6854		
代理人(译)	王伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

序列表

本发明涉及一种病原真菌的快速检测方法，该方法包括：该方法包括：用标记物标记1，3-β-D-葡聚糖的多肽或其抗体二者中任意一个，先将未做标记的1，3-β-D-葡聚糖的多肽或其抗体结合到固相载体上，然后将待检样品加入到固相载体上，再加入已做标记的1，3-β-D-葡聚糖的多肽或其抗体，通过检测标记物方法来检测待检样品中是否存在真菌。以及基于此方法的真菌检测试剂盒。该真菌检测方法及试剂盒，可以快速、简便进行真菌感染的检测与诊断，降低检测成本，提高检测精度，满足临床使用的需求。

<110> 徐新平 赵静

<120> 真菌的检测方法及检测试剂盒

<130> 2016

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列