



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110308277 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910514060.8

(22)申请日 2019.06.14

(71)申请人 珠海市德灏生物科技有限公司

地址 519060 广东省珠海市南屏科技工业园屏西二路5号综合楼第4层401-406

(72)发明人 农高惠 何林声

(74)专利代理机构 重庆双马智翔专利代理事务所(普通合伙) 50241

代理人 顾晓玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

通用型病原微生物快速磁分离方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种通用型病原微生物快速磁分离方法:(1)制备通用桥连磁珠:a)制备磁珠-链霉亲和素交联物;b)制备生物素-Ab2交联物;c)制成通用桥连磁珠:将磁珠-链霉亲和素交联物与生物素-Ab2交联物混合孵育,制得通用桥连磁珠;(2)制备特异捕捉磁珠:将通用桥连磁珠与待测病原微生物的鼠源性Ab1混合,即可获得特异捕捉磁珠;(3)采用特异捕捉磁珠对待检测样品进行病原体捕捉分离纯化、初步鉴别。还公开了一种试剂盒,包括前述方法制备得到的特异捕捉磁珠。本发明实现了免疫磁珠制备的简易化、性能最优化、易实现自动化,通过分离操作即可获得单一目的菌,能够对样本中多种病原同步、自动化检测。

1. 一种通用型病原微生物快速磁分离方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 制备通用桥连磁珠:

a) 制备磁珠-链霉亲和素交联物:取粒径为10~50nm的羧基磁珠,活化后与链霉亲和素结合,并封闭残余活性基团;

b) 制备生物素-Ab2交联物:取生物素进行活化,再与Ab2偶联;或者,用商品化的水溶性生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯与Ab2直接偶联;

c) 制成通用桥连磁珠:将磁珠-链霉亲和素交联物与生物素-Ab2交联物混合孵育,制得通用桥连磁珠,洗涤去除游离的Ab2;

(2) 制备特异捕捉磁珠:将前面制备得到的通用桥连磁珠与待测病原微生物的鼠源性Ab1混合,即可获得特异捕捉磁珠,洗涤去除游离Ab1;

(3) 采用特异捕捉磁珠对待检测样品进行病原体捕捉分离纯化、初步鉴别。

2. 如权利要求1所述的通用型病原微生物快速磁分离方法,其特征在于:

所述羧基磁珠的活化方法为碳二亚胺法或者改良碳二亚胺法或者混合酸酐法。

3. 如权利要求1所述的通用型病原微生物快速磁分离方法,其特征在于:所述生物素为长链生物素,活化方法为碳二亚胺法或者改良碳二亚胺法或者混合酸酐法。

4. 如权利要求1所述的通用型病原微生物快速磁分离方法,其特征在于:所述Ab2为兔抗鼠IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体。

5. 如权利要求1所述的通用型病原微生物快速磁分离方法,其特征在于:所述磁珠的粒径为30nm。

6. 一种通用型病原微生物快速磁分离试剂盒,其特征在于:包括采用权利要求1至5任一项所述的方法制备得到的特异捕捉磁珠。

通用型病原微生物快速磁分离方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外生物检测诊断技术领域,具体涉及一种通用型病原微生物快速磁分离方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 病原微生物包括病毒、衣原体、立克次体、支原体、细菌、螺旋体、放线菌、真菌等八大类。病毒、衣原体、立克次体属寄生微生物,需在特定的活细胞内增殖;支原体、细菌、螺旋体、放线菌、真菌属独立生长微生物,可在无细胞培养基中繁殖,是微生物学检验的主要对象。

[0003] 微生物学检测是判定病原感染、卫生状态的确证性方法,检测结果关乎临床选药及卫生决策。检测过程主要包括病原分离、鉴别、药敏试验三大环节。其中病原分离是基础,是后续检测的前提;病原鉴别是关键,可避免选药的盲目性;药敏性测试是目的,利于个性化精准用药。目前,病原鉴别、药敏测试已基本实现快速化、自动化,而病原分离仍以传统的划线分离培养法为主。

[0004] 划线分离培养法是借助划线将标本中混杂的细菌在琼脂平皿表面分散开来,使单个菌能固定在某一点,经培养生长繁殖后形成单个菌落,以达到分离获得纯种菌的目的。本法耗时长(常需1-5天)、影响因素多,分离成功率低,分离菌株不代表目的菌总体。

[0005] 随着磁分离免疫技术的应用,近年人对病原菌的免疫磁珠分离方法进行的多种尝试,并得出以下结论:纳米级磁珠比微米级磁珠对病原菌的分离效果更好;可用病原特异的多克隆抗体或单克隆抗体偶联到磁珠表面制成免疫磁珠;可用直接法或用间接法将特异抗体与磁珠偶联;在生物素与抗体间增加长链物质,可解决抗体结合病原菌时的空间位阻问题。

[0006] 但直至目前,通过免疫磁珠法分离病原菌仍未获得认可和普及,主要原因为:1) 分离一种病原就需特制一种专用免疫磁珠,而免疫磁珠制备过程复杂、技术难度大、抗体活性在偶联过程中损失大、偶联抗体量不足,质量很难保证;2) 病原分离的纯度仅达到“富集”水平,为获得纯目的菌仍需划线分离培养,既不省时也不省力,反而增加了检测成本;3) 无法对样本进行多种病原的同步化、自动化分离。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对上述问题,提供一种通用型病原微生物快速磁分离方法及试剂盒。

[0008] 为了实现本发明目的本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种通用型病原微生物快速磁分离方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 制备通用桥连磁珠:

[0011] a) 制备磁珠-链霉亲和素交联物:取粒径为10~50nm的羧基磁珠,活化后与链霉亲和素结合,并封闭残余活性基团。

[0012] b) 制备生物素-Ab2交联物:取生物素进行活化,再与Ab2(二抗)偶联;或者,用商品化的水溶性生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯与Ab2直接偶联;Ab2如果选择使用抗血清,抗血清可先行辛酸-硫酸铵分离纯化并测定抗体蛋白含量。

[0013] c) 制成通用桥连磁珠:将磁珠-链霉亲和素交联物与生物素-Ab2交联物混合孵育,制得通用桥连磁珠,洗涤去除游离的Ab2;因1个亲和素分子可结合4个生物素分子,间接连接了4个Ab2分子,实现了四倍放大效应。

[0014] (2) 制备特异捕捉磁珠:将前面制备得到的通用桥连磁珠与待测病原微生物的鼠源性Ab1(一抗)混合,即可获得特异捕捉磁珠,洗涤去除游离Ab1。Ab1若为单抗腹水,需预先纯化并测定蛋白含量。

[0015] (3) 采用特异捕捉磁珠对待检测样品进行病原体捕捉、分离、纯化、初步鉴别:特异捕捉磁珠表面的Ab1与待检测样品中的特定病原菌结合,形成“磁珠包裹病原”;磁分离器分离“磁珠包裹病原”,进一步分离得到病原,进行纯化和鉴别。因Ab2将鼠源性Ab1视为抗原,两者属于生物性结合,结合后Ab1功能不变,不存在抗体活性损失;Ab2的长臂作用可避免Ab1结合病原时的位阻效应;因1个Ab2可结合2个Ab1,磁珠表面的Ab1量比直接偶联法多8倍,比亲和素-生物素介导的间接偶联法多2倍。

[0016] 病原体捕捉分离纯化可采用的方法是:

[0017] a) 病原体捕捉

[0018] i. 样本预处理:粘性样本(如痰等)应用胰酶消化液做均值化处理;组织细胞样本应做胞内病原释放处理;含抗体变性剂(如消毒剂、蛋白酶、重金属)样本应做中和化处理;必要时进行离心沉淀富集,在用生理盐水或PBS重悬;

[0019] ii. 加样:特制容器为双排无菌塑料双排微孔板,每种目的菌设2个平行孔,各孔均加预处理样本;

[0020] iii. 捕捉:在特定病原菌分离微孔中加入特异捕捉磁珠,孵育,磁珠通过Ab1将病原菌包裹,形成“磁珠包裹病原”;

[0021] b) 病原体分离:通过磁分离器将“磁珠包裹病原”分离;

[0022] c) 病原体纯化:通过反复洗涤、微孔滤膜过滤、分子筛层析、弱选择培养基接种等实现高度纯化。

[0023] 病原体培养可采用的方法是:

[0024] a) 原孔培养法:在分离纯化微孔中加注培养基后恒温培养,加注的培养基类型依目的菌种类而定。例如:酵母菌应加注沙保弱肉汤,沙门菌可加注伊红美兰培养基、麦康凯肉汤、SS肉汤等;

[0025] b) 转种培养法:将微孔中高度纯化的“磁珠包裹病原”转种到适合的液体培养管或固体培养板中培养,转种用的培养基依目的菌种类而定。例如:酵母菌应加注沙堡弱肉汤,沙门菌可加注伊红美兰培养基、麦康凯肉汤等。

[0026] 在上述技术方案中,所述羧基磁珠的活化方法为碳二亚胺法或者改良碳二亚胺法或者混合酸酐法。

[0027] 在上述技术方案中,所述生物素为长链生物素,活化方法为碳二亚胺法或者改良碳二亚胺法或者混合酸酐法。

[0028] 在上述技术方案中,所述Ab2为兔抗鼠IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体,其亲和力强、特

异性高、活性稳定。

[0029] 在上述技术方案中,所述磁珠的粒径为30nm。

[0030] 一种通用型病原微生物快速磁分离试剂盒,包括上述方法制备得到的特异捕捉磁珠。

[0031] 本发明的有益效果是:1)可解决病原菌的快速分离鉴别问题,利于临床现症感染的快速精准诊断,使临床医师能根据病原类型规范选药,最大程度避免盲目用药而延误治疗;2)可综合解决在病原捕捉磁珠制备中,特异抗体偶联技术复杂、偶联过程抗体活性受损、磁珠表面特异抗体密度低、抗体结合病原时出现位阻等技术问题,实现了病原菌快速分离用的免疫磁珠制备简易化、性能最优化、易实现自动化;3)本技术方案中,只要有特异抗体,就可轻易制备出特异捕捉磁珠,可促进磁珠免疫分析技术、磁微粒化学发光免疫分析技术的普及应用,促进相关试剂及设备的产业化发展;4)本技术方案可实现直接从标本中快速分离出单一目的菌,且纯度达到分离培养水平,使病原菌分离由耗时数日缩短为仅需数小时;5)可实现对样本中多种病原同步化、自动化检测,极大减轻了病原菌分离工作强度,提高分离工作质量和效率,并降低了检测成本。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,但并不因此而限制本发明。

[0033] 下述实施例中的实验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0034] 实施例1通用桥连磁珠的制备

[0035] 一、配制如下试剂

[0036] 反应缓冲液:0.05mol/L的MES, pH5.0;

[0037] 洗涤液:0.02mol/L的HEPES(羟乙基哌嗪乙磺酸), pH7.4;

[0038] 稀释液:0.01mol/L、pH8.0的PB(磷酸盐缓冲液,由Na₂HPO₄ • 2H₂O、Na₂HP0₄ • 12H₂O配制);

[0039] 封闭液:1mol/L的NH₄Cl;

[0040] EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)活化液:浓度为20mg/ml,用前述的反应缓冲液配制;

[0041] NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化液:浓度为20mg/ml,用前述的反应缓冲液配制;

[0042] 保存液:0.1%BSA(牛血清白蛋白)、0.02%叠氮钠、0.1%吐温-20,用0.02mol/L的HEPES配制;

[0043] 链霉亲和素液:浓度为0.35mg/ml,采用0.01mol/L、pH8.0的PB溶解链霉亲和素配制;

[0044] BNHS(N-羟基琥珀酰亚胺生物素酯)溶液:浓度为38mg/ml,采用二甲基甲酰胺(DMF)溶解;

[0045] Ab2液:浓度为6mg/ml,采用前述的稀释液稀释兔抗鼠IgG抗体或羊抗鼠IgG抗体配制。

[0046] 二、磁珠活化,按照如下步骤操作:

[0047] a)取10mg/ml、直径30nm的羧基磁珠0.5ml,加洗涤液9.5ml混匀,进行磁分离洗涤,重复3次;第4次加10ml的反应缓冲液洗涤;

- [0048] b) 加入EDC活化液290ul,NHS活化液325ul,混匀,活化1小时;
- [0049] c) 加洗涤液混匀,磁分离洗涤3次,用于下一步的磁珠链霉亲和素交联。
- [0050] 三、磁珠-链霉亲和素交联,按照如下步骤操作:
- [0051] a) 在前面活化后的磁珠中加链霉亲和素液1ml,37℃反应2小时;
- [0052] b) 乙醇胺溶液封闭2小时;
- [0053] c) 加洗涤液混匀,磁分离洗涤3次,按磁珠质量用稀释液稀释成1mg/ml,即得磁珠-链霉亲和素交联物;
- [0054] 四、生物素-Ab2交联,按照如下步骤操作:
- [0055] a) 取Ab2液5ml,加入BNHS溶液80ul,搅拌混匀,室温反应4小时;
- [0056] b) 加封闭液48ul,混匀,孵育10分钟;
- [0057] c) 洗涤液中4℃透析过夜,得到生物素-Ab2交联物。
- [0058] 五、偶联成通用桥连磁珠,按照如下步骤操作:
- [0059] a) 将上述制得的磁珠-链霉亲和素交联物与生物素-Ab2交联物按体积比1:0.5混合,37℃反应2小时;
- [0060] b) 洗涤液磁分离洗涤3次;
- [0061] c) 洗涤后用保存液调制成5mg/ml的溶液,即得通用桥连磁珠,-20℃保存。
- [0062] 实施例2特异捕捉磁珠对甲型副伤寒沙门菌的分离纯化
- [0063] 一、制备甲型副伤寒沙门菌特异捕捉磁珠,按照如下步骤操作:
- [0064] a) 取实施例1制备的通用桥连磁珠,用洗涤液稀释成2mg/ml;再取用洗涤液稀释成1mg/ml的鼠源甲型副伤寒沙门菌单克隆抗体1ml,与1ml的2mg/ml的通用桥连磁珠进行混合,37℃反应1小时;
- [0065] b) 步骤a)反应完毕后用洗涤液磁分离洗涤3次,然后用洗涤液稀释成1mg/ml,即得特异捕捉磁珠。
- [0066] 二、甲型副伤寒沙门菌捕捉试验
- [0067] 按照如下步骤操作:
- [0068] a) 取新扩增甲型副伤寒沙门菌(ATCC9150)用无菌洗涤液调整至 10^4 CFU/ml;
- [0069] b) 取1ml上述菌液,加1mg/ml的甲型副伤寒沙门菌特异捕捉磁珠10ul;室温孵育1小时;
- [0070] c) 磁分离洗涤3次,获得“磁珠包裹甲型副伤寒沙门菌”;
- [0071] d) 用洗涤液对“磁珠包裹甲型副伤寒沙门菌”进行梯度稀释;
- [0072] e) 接种麦康凯平板培养24小时,按以下公式计算俘获率:
- [0073] 俘获率(%) = $(A_1/A_0) * 100$
- [0074] 式中: A_1 :磁珠组的菌落数(CFU/ml)
- [0075] A_0 :对照组的菌落数(CFU/ml)
- [0076] f) 用普通大肠杆菌(ATCC2592)、变形杆菌(CMCC49027)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)菌株也采用甲型副伤寒沙门菌特异捕捉磁珠按以上方法进行试验,验证甲型副伤寒沙门菌特异捕捉磁珠的特异性。
- [0077] 结果如下表1所示:
- [0078] 表1甲型副伤寒沙门菌捕捉试验结果

[0079]

菌株	甲型副伤寒沙门菌	普通大肠杆菌	变形杆菌	金黄色葡萄球菌
俘获率	96%	0.01%	0.05%	0

[0080] 实施例3四种病原同步分离

[0081] 一、制备特异捕捉磁珠

[0082] a) 取经洗涤液稀释成2mg/ml的实施例1的通用桥连磁珠, 1ml/管, 共4管; 分别与1ml(浓度为均1mg/ml)的甲型副伤寒沙门菌单克隆抗体、痢疾志贺菌单克隆抗体、白色假丝酵母菌单克隆抗体、蜡样芽胞杆菌单克隆抗体混合, 37℃反应1小时;

[0083] b) 分别用洗涤液磁分离洗涤3次, 再稀释成1mg/ml, 制成特异捕捉磁珠。

[0084] 二、同步分离试验:

[0085] a) 混合试样制备: 用甲型副伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、白色假丝酵母菌、蜡样芽胞杆菌制备混合菌液, 用无菌洗涤液稀释, 使得混合菌液中的甲型副伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、白色假丝酵母菌、蜡样芽胞杆菌的浓度均为 10^4 CFU/ml, 将混合菌液按1ml/管分装成4管, 做为试样;

[0086] b) 在步骤a)的4管试样管中分别加入步骤一制备的甲型副伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、白色假丝酵母菌、蜡样芽胞杆菌特异捕捉磁珠10ul, 室温孵育1小时;

[0087] c) 分别用洗涤液进行磁分离洗涤3次, 分别获得“磁珠包裹甲型副伤寒沙门菌”、“磁珠包裹痢疾志贺菌”、“磁珠包裹白色假丝酵母菌”、“磁珠包裹蜡样芽胞杆菌”;

[0088] d) 用洗涤液对磁珠包裹病原菌进行梯度稀释;

[0089] e) 接种对应培养基, 培养24小时, 按下表计算俘获率:

[0090] 俘获率 (%) = $(A_1/A_0) * 100$

[0091] 式中: A_1 : 磁珠组的菌落数 (CFU/ml)

[0092] A_0 : 对照组的菌落数 (CFU/ml)

[0093] 三、结果如下表2所示

[0094] 表2四种病原同步分离结果

[0095]

菌株	甲型副伤寒沙门菌	痢疾志贺菌	白色假丝酵母菌	蜡样芽胞杆菌
培养基	麦康凯平板	麦康凯平板	沙堡弱琼脂平板	MYP平板
俘获率	96%	95%	98%	96%
杂菌	无	无	无	无

[0096] 实施例4

[0097] 按照实施例2的方法对其它病原菌进行了检测, 检测对象和结果如下表3所示:

[0098] 表3不同病原菌检测结果

[0099]

菌株	菌株编号	培养基	俘获率	计算单位
大肠杆菌 O157H7	NCTC12900	大肠杆菌 O157: H7 显色培养基平板	95.30%	CFU
副溶血弧菌	ATCC17802	3%NaCl 胰蛋白胨大豆琼脂平板	96%	CFU
空肠弯曲菌	ATCC33291	布氏血平板	97%	CFU
单核细胞增生李斯特菌	CMCC(B)54002	胰蛋白胨大豆酵母浸膏琼脂平板	93%	CFU
乙型溶血性链球菌	ATCC21059	哥伦比亚血琼脂平板	94.20%	CFU
肺炎克雷伯菌	ATCC13883	麦康凯平板	98%	CFU
流感嗜血杆菌	ATCC 49247	巧克力平板	92.30%	CFU
肺炎支原体	ATCC15531	改良 Hayflick 马血清肉汤	91%*	*CCU (颜色改变单位)

专利名称(译)	通用型病原微生物快速磁分离方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN110308277A	公开(公告)日	2019-10-08
申请号	CN201910514060.8	申请日	2019-06-14
[标]发明人	农高惠 何林声		
发明人	农高惠 何林声		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/56911		
代理人(译)	顾晓玲		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种通用型病原微生物快速磁分离方法：(1)制备通用桥连磁珠：a)制备磁珠-链霉亲和素交联物；b)制备生物素-Ab2交联物；c)制成通用桥连磁珠：将磁珠-链霉亲和素交联物与生物素-Ab2交联物混合孵育，制得通用桥连磁珠；(2)制备特异捕捉磁珠：将通用桥连磁珠与待测病原微生物的鼠源性Ab1混合，即可获得特异捕捉磁珠；(3)采用特异捕捉磁珠对待检测样品进行病原体捕捉分离纯化、初步鉴别。还公开了一种试剂盒，包括前述方法制备得到的特异捕捉磁珠。本发明实现了免疫磁珠制备的简易化、性能最优化、易实现自动化，通过分离操作即可获得单一目的菌，能够对样本中多种病原同步、自动化检测。

菌株	菌株编号	培养基	俘获率	计算单位
大肠杆菌 O157:H7	NCTC12900	大肠杆菌 O157: H7 显色培养基平板	95.30%	CFU
副溶血弧菌	ATCC17802	3%NaCl 胨蛋白胨大豆琼脂平板	96%	CFU
空肠弯曲菌	ATCC33291	布氏血平板	97%	CFU
单核细胞增生李斯蒂菌	CMCC(B)54002	胰蛋白胨大豆酵母浸膏琼脂平板	93%	CFU
乙型溶血性链球菌	ATCC21059	哥伦比亚血琼脂平板	94.20%	CFU
肺炎克雷伯菌	ATCC13883	麦康凯平板	98%	CFU
流感嗜血杆菌	ATCC 49247	巧克力平板	92.30%	CFU
肺炎支原体	ATCC15531	改良 Hayflick 马血清肉汤	91%*	*CCU(颜色改变单位)