



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107677817 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201710756436.7

(22)申请日 2017.08.29

(71)申请人 山东师范大学

地址 250014 山东省济南市文化东路88号

(72)发明人 张鸿雁 张震 罗钰

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 王志坤

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

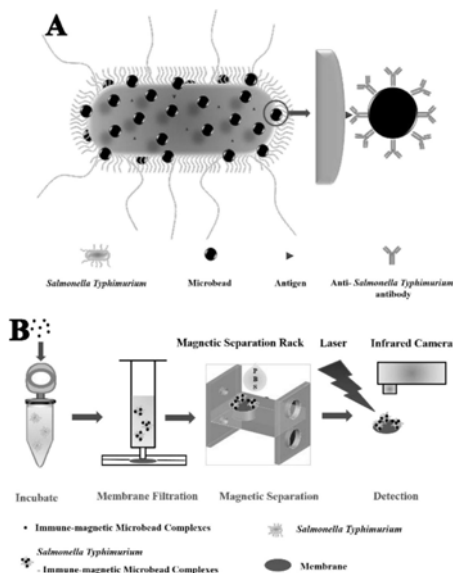
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54)发明名称

一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法

(57)摘要

本发明建立了一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法,利用免疫磁性纳米材料的光热效应建立了温度升高值与鼠伤寒沙门氏菌数目间的标准曲线,可将样品产生的温度升高值带入标准曲线得到样品中的细菌数目。同时,利用免疫磁性纳米材料的磁性与光热效应,实现了富集分离-检测-试样灭活三个环节的有效整合,本方法灵敏、安全、快速、便携、成本低,经实验验证,基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌方法最低检测限为300个细菌,且温度升高值 ΔT 与细菌数目在300~1000范围内成线性相关关系,因此本发明具有良好的实际应用前景,可应用于对鼠伤寒沙门氏菌的实际快速检测。



1. 免疫磁性纳米材料在鼠伤寒沙门氏菌快速检测中的应用。
2. 如权利要求1所述应用,其特征在於,所述免疫磁性纳米材料的制备方法为:
 - 1) 取羧基磁珠,超声,磁分离,用双蒸水清洗;向其中加入EDC/NHS溶液,在室温条件下活化,再进行磁分离,用PBS溶液反复清洗后得活化后磁珠;
 - 2) 向活化后的磁珠中加入抗鼠伤寒沙门氏菌抗体,室温条件下反应一段时间,磁分离,然后用PBS溶液反复清洗,得免疫磁性纳米材料。
3. 如权利要求2所述应用,其特征在於,所述羧基磁珠的粒径为10~300nm(优选为200~300nm)。
4. 一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法,其特征在於,包括:
 - S1. 将羧基磁珠与抗鼠伤寒沙门氏菌抗体偶联得免疫磁性纳米材料;
 - S2. 将步骤S1.制备得到的免疫磁性纳米材料添加至鼠伤寒沙门氏菌中,孵育,膜过滤,并用磁分离技术进一步纯化,得鼠伤寒沙门氏菌-免疫磁性纳米材料复合物;
 - S3. 用激光对截留在膜上的鼠伤寒沙门氏菌-免疫磁性纳米材料复合物照射,产生温度变化,根据温度升高值和细菌数目建立标准曲线;同时基于免疫磁性纳米材料的光热效应,同步对鼠伤寒沙门氏菌进行灭活。
5. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在於,步骤S1.免疫磁性纳米材料具体制备方法为:
 - S1.1取羧基磁珠,超声,磁分离,用双蒸水清洗;向其中加入EDC/NHS溶液,在室温条件下活化,再进行磁分离,用PBS溶液反复清洗后得活化后磁珠;
 - S1.2向活化后的磁珠中加入抗鼠伤寒沙门氏菌抗体,室温条件下反应一段时间,磁分离,然后用PBS溶液反复清洗,得免疫磁性纳米材料。
6. 如权利要求5所述的检测方法,其特征在於,步骤S1.1中所述羧基磁珠的粒径为10~300nm(优选为200~300nm)。
7. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在於,步骤S2.中免疫磁性纳米材料的添加量为9~10 μ g/1000个鼠伤寒沙门氏菌(优选为10 μ g/1000个鼠伤寒沙门氏菌)。
8. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在於,所述步骤S3.中激光功率为2.5~2.8W \cdot cm⁻²(优选2.5W \cdot cm⁻²),波长为808nm,照射时间为2~5分钟(优选为2分钟)。
9. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在於,所述步骤S3.中根据温度升高值和细菌数目建立标准曲线具体使用公式如下:
$$\Delta T = \Delta T_1 - \Delta T_0$$
其中, ΔT 为温度升高值; ΔT_0 为空白(未添加鼠伤寒沙门氏菌)样品激光照射前后的温度升高值; ΔT_1 为添加样品后激光照射前后的温度升高值。
10. 权利要求4-9任一项所述检测方法在快速检测鼠伤寒沙门氏菌中的应用,优选的,所述应用方式为对饮用水中鼠伤寒沙门氏菌进行快速检测。

一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,特别涉及一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法。

背景技术

[0002] 由食源性致病菌引起的食品安全问题一直是世界卫生组织及各国政府高度重视的全球性问题,也是食品安全管理与控制的核心与难点之一。沙门氏菌病是重要的人畜共患病之一,其病原沙门氏菌属肠道细菌科,可引起食物中毒。

[0003] 当前沙门氏菌的检测方法一般均需增殖步骤,以增加病原的可检出率,费时费力,需4~7天才能完成,无法及时、快速评价食品中沙门氏菌的含量。目前利用菌体或鞭毛抗原特异性抗体的免疫学方法是快速检测方法的主要研究方向。已经建立的沙门氏菌免疫学检测方法有酶联免疫法、荧光免疫法、放射免疫法、免疫传感器等,此类方法可以酶标板、试纸条、膜或电极等作为固定载体。其中,基于试纸条或膜的方法最为简单快速,无需大型仪器,适用于定性或半定量分析。由于多数待测样本为阴性,对于大样本量的快速定性或半定量筛查能大大提高检测效率,因此,此类快速检测方法非常适用于大样本量快速筛查。但由于此类方法大多采用目视或简易检测设备,灵敏度仍然相对较低,只有提高灵敏度,再配以用于富集净化的前处理步骤才能适用于复杂基质的食品样品中沙门氏菌的快速筛查。

[0004] 由上述分析可知,目前绝大部分致病菌检测方法是将富集分离-检测-试验灭活分为三个环节进行,步骤多,耗时长,且目前多数关于分析时间的报道只涉及检测这一环节,而从样品处理至试样灭活整个分析过程所需时间不少于2h,若需增菌环节将不少于10 h,且现有致病菌检测方法的检测灵敏度仍有待提高。有鉴于此,亟需提供一种对沙门氏菌灵敏、安全、快速、便携、低成本的检测方法。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术的不足,发明人提供一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法,该方法采用免疫磁性纳米材料同时实现对鼠伤寒沙门氏菌捕获、检测及灭活,同时利用激光照射免疫磁性纳米材料产生的温度变化,建立温度升高值与鼠伤寒沙门氏菌数目的标准曲线,实现对鼠伤寒沙门氏菌的定量检测。

[0006] 具体的,本发明涉及以下技术方案:

[0007] 本发明的第一个方面,公开了免疫磁性纳米材料在鼠伤寒沙门氏菌快速检测中的应用。将所述免疫磁性纳米材料添加到鼠伤寒沙门氏菌中,具体的,通过在羧基磁珠上标记抗鼠伤寒沙门氏菌抗体从而制得免疫磁性纳米材料,进而与鼠伤寒沙门氏菌进行偶联,实现对鼠伤寒沙门氏菌捕获。

[0008] 其中,所述免疫磁性纳米材料的制备方法为:

[0009] 1) 取羧基磁珠, 超声, 磁分离, 用双蒸水清洗; 向其中加入EDC/NHS溶液, 在 室温条件下活化, 再进行磁分离, 用PBS溶液反复清洗后得活化后磁珠;

[0010] 2) 向活化后的磁珠中加入抗鼠伤寒沙门氏菌抗体, 室温条件下反应一段时间, 磁分离, 然后用PBS溶液反复清洗, 得免疫磁性纳米材料。

[0011] 其中, 所述羧基磁珠的粒径为10~300nm (优选为200~300nm); 该粒径下获得的免疫磁性纳米材料光热效应最佳, 同时磁分离时间短, 且对细菌的非特异吸附低。

[0012] 本发明的第二个方面, 公开了一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法, 其具体步骤包括:

[0013] S1. 将羧基磁珠与抗鼠伤寒沙门氏菌抗体偶联得免疫磁性纳米材料;

[0014] S2. 将步骤S1. 制备得到的免疫磁性纳米材料添加至鼠伤寒沙门氏菌中, 孵育, 膜过滤, 并用磁分离技术进一步纯化, 得鼠伤寒沙门氏菌-免疫磁性纳米材料复合物;

[0015] S3. 用激光对截留在膜上的鼠伤寒沙门氏菌-免疫磁性纳米材料复合物照射, 产生温度变化, 根据温度升高值和细菌数目建立标准曲线; 同时基于免疫磁性纳米材料的光热效应, 同步对鼠伤寒沙门氏菌进行灭活。

[0016] 其中, 步骤S1. 免疫磁性纳米材料具体制备方法为:

[0017] S1.1 取羧基磁珠, 超声, 磁分离, 用双蒸水清洗; 向其中加入EDC/NHS溶液, 在 室温条件下活化, 再进行磁分离, 用PBS溶液反复清洗后得活化后磁珠;

[0018] S1.2 向活化后的磁珠中加入抗鼠伤寒沙门氏菌抗体, 室温条件下反应一段时间, 磁分离, 然后用PBS溶液反复清洗, 得免疫磁性纳米材料。

[0019] 其中, 步骤S1.1中所述羧基磁珠的粒径为10~300nm (优选为200~300nm); 该粒径下获得的免疫磁性纳米材料光热效应最佳, 同时磁分离时间短, 且对细菌的非特异吸附低;

[0020] 步骤S2. 中免疫磁性纳米材料的添加量为9~10 μ g/1000个鼠伤寒沙门氏菌 (优选为 10 μ g/1000个鼠伤寒沙门氏菌), 免疫磁性纳米材料添加量过低或过高, 均会导致光热效应较低, 影响实验结果;

[0021] 所述步骤S3. 中激光功率为2.5~2.8W \cdot cm⁻² (优选2.5W \cdot cm⁻²), 波长为808nm, 照射时间为2~5分钟 (优选为2分钟); 照射功率过低, 则免疫磁性纳米材料升温缓慢, 延长检测时间和灭活时间; 照射功率过高, 则免疫磁性纳米材料升温过高会对滤膜产生破坏;

[0022] 所述步骤S3. 中根据温度升高值和细菌数目建立标准曲线具体使用公式如下:

[0023] $\Delta T = \Delta T1 - \Delta T0$

[0024] 其中, ΔT 为温度升高值

[0025] $\Delta T0$ 为空白 (未添加鼠伤寒沙门氏菌) 样品激光照射前后的温度升高值。

[0026] $\Delta T1$ 为添加样品后激光照射前后的温度升高值。

[0027] 为了消除截留在滤膜上多余免疫磁性纳米材料的影响, 故应将空白 (未添加鼠伤寒沙门氏菌) 样品激光照射前后的温度升高值 ($\Delta T0$) 从添加样品后激光照射前后的温度升高值 ($\Delta T1$) 中扣除;

[0028] 本发明还公开了上述检测方法在快速检测鼠伤寒沙门氏菌中的应用, 具体的, 所述应用方式为对饮用水中鼠伤寒沙门氏菌进行快速检测。

[0029] 本发明的有益效果:

[0030] 本发明建立了一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法,利用免疫磁性纳米材料的光热效应建立了温度升高值与鼠伤寒沙门氏菌数目间的标准曲线,可将样品产生的温度升高值带入标准曲线得到样品中的细菌数目。同时,利用免疫磁性纳米材料的磁性与光热效应,实现了富集分离-检测-试样灭活三个环节的有效整合,即利用一种纳米材料同时实现致病菌的磁富集、光热检测及试样的光热灭活三种功能,将总分析时间缩短至1.5h以内;

[0031] 本方法灵敏、安全、快速、便携、成本低,经实验验证,基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌方法最低检测限为300个细菌,且温度升高值 ΔT 与细菌数目在300~1000范围内成线性相关关系,因此本发明具有良好的实际应用前景,可应用于对鼠伤寒沙门氏菌的实际快速检测。

附图说明

[0032] 图1A为免疫磁性纳米材料识别鼠伤寒沙门氏菌示意图;图1B为基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌捕获及光热效应检测过程示意图;

[0033] 图2为不同粒径羧基磁珠在不同浓度下的光热效应图;

[0034] 图3为不同粒径羧基磁珠磁分离时间的比较图;

[0035] 图4为不同粒径羧基磁珠对鼠伤寒沙门氏菌非特异性吸附图;

[0036] 图5为鼠伤寒沙门氏菌偶联免疫磁性纳米材料透射电子显微镜图;

[0037] 图6为荧光染色鼠伤寒沙门氏菌偶联荧光免疫磁性纳米材料荧光图;

[0038] 图7(A)为不同激光照射功率与羧基磁珠升温关系图,图7(B)不同激光照射时间与羧基磁珠升温关系图;

[0039] 图8为免疫磁性纳米材料添加量与其光热效应关系图;

[0040] 图9(A)为PBS与饮用水中 ΔT 与沙门氏菌数目的标准曲线图,图9(B)为饮用水中沙门氏菌的检测结果图;图9(C)为本发明的方法特异性考察图,分别针对沙门氏菌,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行考察。

[0041] 图10为孵育羧基磁珠经激光不同辐照时间后对鼠伤寒沙门氏菌的杀菌效果图。

具体实施方式

[0042] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0043] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0044] 正如背景技术中所介绍的,绝大部分致病菌检测方法是富集分离-检测-试验灭活分为三个环节进行,步骤多,耗时长。

[0045] 有鉴于此,本发明的一种具体实施方式中,提供一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法,其具体步骤包括:

- [0046] S1.将羧基磁珠与抗鼠伤寒沙门氏菌抗体偶联得免疫磁性纳米材料;
- [0047] S2.将步骤S1.制备得到的免疫磁性纳米材料添加至鼠伤寒沙门氏菌中,孵育,膜过滤,并用磁分离技术进一步纯化,得鼠伤寒沙门氏菌-免疫磁性纳米材料复合物;
- [0048] S3.用激光对截留在膜上的鼠伤寒沙门氏菌-免疫磁性纳米材料复合物照射,产生温度变化,根据温度升高值和细菌数目建立标准曲线;同时基于免疫磁性纳米材料的光热效应,同步对鼠伤寒沙门氏菌进行灭活。
- [0049] 其中,步骤S1.免疫磁性纳米材料具体制备方法为:
- [0050] S1.1取羧基磁珠,超声,磁分离,用双蒸水清洗;向其中加入EDC/NHS溶液,在室温条件下活化,再进行磁分离,用PBS溶液反复清洗后得活化后磁珠;
- [0051] S1.2向活化后的磁珠中加入抗鼠伤寒沙门氏菌抗体,室温条件下反应一段时间,磁分离,然后用PBS溶液反复清洗,得免疫磁性纳米材料。
- [0052] 其中,步骤S1.1中所述羧基磁珠的粒径为10~300nm(优选为200~300nm);该粒径下获得的免疫磁性纳米材料光热效应最佳,同时磁分离时间短,且对细菌的非特异吸附低;
- [0053] 步骤S2.中免疫磁性纳米材料的添加量为9~10 μ g/1000个鼠伤寒沙门氏菌(优选为10 μ g/1000个鼠伤寒沙门氏菌),免疫磁性纳米材料添加量过低或过高,均会导致光热效应较低,影响实验结果;
- [0054] 所述步骤S3.中激光功率为2.5~2.8W \cdot cm⁻²(优选2.5W \cdot cm⁻²),波长为808nm,照射时间为2~5分钟(优选为2分钟);照射功率过低,则免疫磁性纳米材料升温缓慢,延长检测时间和灭活时间;照射功率过高,则免疫磁性纳米材料升温过高会对滤膜产生破坏;
- [0055] 所述步骤S3.中根据温度升高值和细菌数目建立标准曲线具体使用公式如下:
- [0056] $\Delta T = \Delta T_1 - \Delta T_0$
- [0057] 其中, ΔT 为温度升高值
- [0058] ΔT_0 为空白(未添加鼠伤寒沙门氏菌)样品激光照射前后的温度升高值。
- [0059] ΔT_1 为添加样品后激光照射前后的温度升高值。
- [0060] 为了消除截留在滤膜上多余免疫磁性纳米材料的影响,故应将空白(未添加鼠伤寒沙门氏菌)样品激光照射前后的温度升高值(ΔT_0)从添加样品后激光照射前后的温度升高值(ΔT_1)中扣除。
- [0061] 以下通过实施例的方式对本发明做进一步阐述。
- [0062] 实施例
- [0063] 1. 试验材料及设备
- [0064] 1.1 主要材料与试剂
- [0065] 表1试剂及药品
- [0066]

汉语名称	英语名称及缩写	购买公司
------	---------	------

[0067]

Chinese Name	English Name and Abbreviation	Company
鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella Typhimurium</i>	中国医学菌种保藏中心
大肠杆菌	<i>Escherichia Coli</i>	中国医学菌种保藏中心
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus Aureus</i>	中国医学菌种保藏中心
抗鼠伤寒沙门氏菌抗体	Anti- <i>Salmonella Typhimurium</i> Antibody	北京博奥森生物技术有限公司
抗鼠伤寒沙门氏菌抗体 -Cy5	Anti- <i>Salmonella Typhimurium</i> -Cy5 Antibody	北京博奥森生物技术有限公司
SYBR Green I	SYBR Green I	百泰克生物技术有限公司
1-乙基-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亚胺盐酸盐， EDC·HCl	1-(3-Dimethylaminopropyl)- 3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC·HCl N-Hydroxysuccinimide;	上海绿源生物科技有限公司
N-羟基丁二酰亚胺，NHS	1-hydroxypyrrolidine-2,5-dio , NHS	上海绿源生物科技有限公司
羧基聚苯乙烯磁珠 (200 ~300 nm)	COOH-magneticPolystyrene Microbeads(200 ~300 nm)	美国阿拉丁工业公司
羧基聚苯乙烯磁珠 (100 ~200 nm)	COOH-magneticPolystyrene Microbeads(100 ~200 nm)	美国阿拉丁工业公司
羧基聚苯乙烯磁珠 (10 nm)	COOH-magneticPolystyrene Microbeads(10 nm)	美国阿拉丁工业公司

[0068]

羧基化石墨烯	Carboxyl Graphene	美国阿拉丁工业公司
纳米金	Gold Nanoparticles	美国阿拉丁工业公司
聚碳酸酯膜 (0.4 μm)	Nuclepore Track-etch Membrane (0.4 μm)	上海富雪生物科技有限公司
磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄	济南昆腾生物有限公司
磷酸二氢钠	NaH ₂ PO ₄	济南昆腾生物有限公司
碳酸钾	K ₂ CO ₃	济南昆腾生物有限公司
牛血清白蛋白	BSA	济南昆腾生物有限公司
氯化钠	NaCl	济南昆腾生物有限公司
乙二胺四乙酸二钠	EDTA-2Na	济南昆腾生物有限公司
二甲基亚砷	Dimethyl sulfoxide, DMSO	济南昆腾生物有限公司
胰蛋白胨	Tryptone	北京奥博星生物技术有限公司
酵母浸粉	Yeast Extract Powder	北京奥博星生物技术有限公司
牛肉膏	Beef Extract	北京奥博星生物技术有限公司
蛋白胨	Peptone	北京奥博星生物技术有限公司
琼脂粉	Agar Powder	北京奥博星生物技术有限公司

[0069] 1.2主要仪器与设备

[0070] 表3-2仪器及器材

[0071] Table 3-2Equipments and Instruments

[0072]

名称	型号及购买公司
Name	Model No.and Company
磁分离架	天津市倍思乐色谱技术开发中心

[0073]

细菌培养箱	HZQ-X100, 哈尔滨市东联有限公司
超净工作台	BBS-V1800, 山东博科生物产业有限公司
电子天平	AR1530, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司
近红外激光灯 (808 nm)	ADR-1860, 上海熙隆光电科技有限公司
透射电子显微镜	JEM-100CX II, 日本电子株式会社
流式细胞仪	ImageStreamx Mark II, 上海斯信生物科技有限公司
IRS 红外热像仪	S6, 上海热像机电科技股份有限公司

[0074] 2相关溶液配制

[0075] EDC/NHS溶液配制:分别称取EDC 9.6mg、NHS 9.6mg溶于3mL二次水中。

[0076] $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液配制:分别称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 13.76g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.79g、NaCl 9.00g,加去离子水定容至1000mL。[0077] SYBR GreenI标准使用液配制:用DMSO将SYBR GreenI原液稀释100倍, -20°C 保存。

[0078] EDTA-2Na使用液配制:称取EDTA-2Na 18.61g,加灭菌蒸馏水定容至100mL。

[0079] LB液体培养基配制:分别称取胰蛋白胨10g、酵母浸粉5g、NaCl 10g,用去离子水定容至1000mL,调节pH至7.0。

[0080] 牛肉膏蛋白胨培养基配制:分别称取牛肉膏3g、蛋白胨10g、NaCl 5g,用去离子水定容至1000mL,加入20g琼脂。

[0081] 3鼠伤寒沙门氏菌的培养、制备及荧光染色方法

[0082] 3.1鼠伤寒沙门氏菌的培养

[0083] 用接种环从斜面上挑取鼠伤寒沙门氏菌单菌落置于LB液体培养基中, 37°C 振荡培养8h后收集菌液。

[0084] 3.2鼠伤寒沙门氏菌的制备

[0085] 取收集的菌液1mL进行梯度稀释 (10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6),分别取各稀释度菌液25 μL 均匀涂布到牛肉膏蛋白胨培养基表面, 37°C 培养箱中培养16h后计数。[0086] 分别取各稀释度菌液1mL, 4°C 3000r \cdot min $^{-1}$ 离心5min,弃上清(除去培养基及其他

杂质), PBS复溶后再离心。重复上述离心操作, 弃上清, 10 μ L PBS复溶沉淀待用。

[0087] 3.3鼠伤寒沙门氏菌的荧光染色方法

[0088] 取1mL菌液于聚苯乙烯样品管中, 于37 $^{\circ}$ C水浴中预热5min, 加入10 μ L EDTA-2Na 使用液, 混匀后迅速加入10 μ L SYBR GreenI标准使用液, 37 $^{\circ}$ C避光孵育10min, 4 $^{\circ}$ C 3000r \cdot min $^{-1}$ 离心5min, 弃上清(除去培养基及其他杂质), PBS复溶后再离心。重复上述离心操作, 弃上清, 10 μ L PBS复溶沉淀待用。

[0089] 4. 免疫磁性纳米材料的制备

[0090] 取200 μ L羧基磁珠(羧基磁珠浓度为1mg/mL), 超声30s, 磁分离, 用双蒸水清洗一次。加入250 μ L EDC/NHS溶液, 在室温条件下活化30min, 磁分离, 用PBS溶液反复清洗3次, 即得活化后磁珠。

[0091] 于活化后磁珠中加入150 μ L抗鼠伤寒沙门氏菌抗体(稀释至10 μ g \cdot mL $^{-1}$), 室温条件下反应6h, 磁分离, 用0.01mol \cdot L $^{-1}$ PBS溶液反复清洗3次, 得免疫磁性纳米材料。

[0092] 5. 鼠伤寒沙门氏菌的捕获及检测

[0093] 将免疫磁性纳米材料添加到有鼠伤寒沙门氏菌的培养基中, 室温孵育1h, 被捕获的鼠伤寒沙门氏菌通过膜过滤操作被截留到滤膜上, 把滤膜放到磁分离架上用PBS溶液清洗进一步去除截留到滤膜上的杂质。用激光照射经过上述过程后的滤膜, 照射前后的温度变化利用热像仪进行记录。利用温度升高值(ΔT)与细胞数目建立标准曲线, 计算公式如下:

$$[0094] \quad \Delta T = \Delta T_1 - \Delta T_0$$

[0095] ΔT , 温度升高值;

[0096] ΔT_0 , 空白(未添加细胞)样品激光照射前后的温度升高值;

[0097] ΔT_1 , 添加样品后激光照射前后的温度升高值。

[0098] 为了消除截留在滤膜上多余免疫磁性纳米材料的影响, 应将空白(未添加鼠伤寒沙门氏菌)样品激光照射前后的温度升高值(ΔT_0)从添加样品后激光照射前后的温度升高值(ΔT_1)中扣除。

[0099] 结果与讨论

[0100] 1. 羧基磁珠的优化

[0101] 为了选择最优羧基磁珠参数, 用激光照射不同浓度不同粒径的羧基磁珠和G0s并记录其温度变化情况, 比较其光热效应; 利用磁分离架对相同浓度不同粒径的羧基磁珠进行磁分离, 比较其磁分离时间; 以及用相同浓度不同粒径的羧基磁珠与鼠伤寒沙门氏菌孵育, 比较其对细菌的非特异性吸附能力, 综合以上三点对羧基磁珠进行选择。如图2所示, 粒径为100~200nm及200~300nm羧基磁珠的光热效应与G0s几乎相当, 粒径为10nm的羧基磁珠光热效应相对较弱。由于在检测过程中磁分离的操作时间会对最终总操作时间产生影响, 从图3中可知, 粒径为100~200nm及200~300nm羧基磁珠可在5s内完成磁分离, 而粒径为10nm的羧基磁珠5min内仍无法完成磁分离。如图4所示, 粒径为10nm及100~200nm羧基磁珠对细菌的非特异吸附较高, 粒径为200~300nm羧基磁珠对细菌的非特异吸附较低。综上所述, 选择粒径为200~300nm羧基磁珠用于最终检测方法的建立。

[0102] 2. 免疫磁性纳米材料识别鼠伤寒沙门氏菌的表征

[0103] 利用TEM及流式细胞仪对免疫磁性纳米材料识别鼠伤寒沙门氏菌进行表征。如图5

所示,大圈中部分为鼠伤寒沙门氏菌,小圈中部分为粒径为200~300nm免疫磁性纳米材料,从图中可以看出免疫磁性纳米材料成功偶联到鼠伤寒沙门氏菌表面。本申请进一步用流式细胞仪对免疫磁性纳米材料识别鼠伤寒沙门氏菌进行了表征,利用带有绿色荧光的SYBR GreenI对鼠伤寒沙门氏菌进行染色,利用Cy5标记的抗鼠伤寒沙门氏菌抗体与免疫磁性纳米材料进行孵育。如图6所示,可知发红色荧光和绿色荧光分别与明场中的细菌对应一致,将红色荧光与绿色荧光进行合并后也对应一致,进一步证明偶联有Cy5标记的抗鼠伤寒沙门氏菌抗体的羧基磁珠成功与SYBR GreenI染色的鼠伤寒沙门氏菌偶联。

[0104] 3. 激光功率及照射时间的优化

[0105] 用不同功率的808nm激光照射5 μ L羧基磁珠2min,利用热像仪记录照射前后羧基磁珠的温度变化情况。当照射功率低于 $2.5\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时,随照射功率的增加,羧基磁珠的温度升高值有明显的增加,当照射功率在 $2.5\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\sim 2.8\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 时,羧基磁珠的温度升高值并无显著增加(图7A)。若照射功率大于 $2.8\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$,羧基磁珠升温过高则会 对滤膜产生破坏。因此,激光照射功率选择为 $2.5\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。为了实现快速检测,照射时间应当尽量缩短,因此对照射时间进行了优化。用照射功率为 $2.5\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的808nm激光照射5 μ L的羧基磁珠,利用热像仪记录照射前后羧基磁珠的温度变化情况。如图7B 所示,羧基磁珠在激光照射的前2min迅速升温,从2min~5min升温缓慢。因此,照射时间选择为2min。

[0106] 4. 免疫纳米材料添加量的优化

[0107] 为了优化免疫纳米材料的添加量,固定细菌数目(1000个)与不同数目的免疫纳米材料孵育,经膜过滤、磁分离后,用激光进行照射(808nm, $2.5\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$)。图8表明,当免疫纳米材料添加量在5~10 μ g时,随免疫纳米材料添加量增加,光热效应随之增加,在添加量为10 μ g时达到最大值,复合物添加量继续增加(10~12 μ g),光热效应急剧降低,这可能是由于免疫磁性纳米材料在滤膜上发生团聚造成的。因此,免疫纳米材料添加量选择为10 μ g/1000个细菌。

[0108] 5. PBS溶液中鼠伤寒沙门氏菌的检测

[0109] 由于PBS基质对检测结果影响较小,因此检测首先在PBS中进行。用激光照射滤膜上经过过滤部分,利用热像仪记录温度变化情况,利用羧基磁珠的光热效应建立 ΔT 与细菌数目间的标准曲线。

[0110] 按照3倍噪音值为最低检测限。在相同条件下,用激光照射10个滤膜2min,10个滤膜照射前后温度差的SD为 0.44°C ,即为检测方法的噪音值。因此,对应标准曲线中鼠伤寒沙门氏菌最低检测限的 ΔT 应为 1.32°C 。由图9A可知,基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌方法最低检测限为300个细菌,且温度升高值 ΔT 与细菌数目在300~1000范围内成线性相关关系。

[0111] 6. 饮用水中鼠伤寒沙门氏菌的检测

[0112] 为了考察建立的基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌方法在实际样品中的可行性,将鼠伤寒沙门氏菌添加到饮用水中,并用建立方法进行检测。将不同数目的鼠伤寒沙门氏菌添加到1mL饮用水中,样品经过孵育、膜过滤、磁分离后,激光照射,根据光热效应进行检测,根据温度升高值 ΔT 与鼠伤寒沙门氏菌数目建立标准曲线。图9A表明,在饮用水中建立的标准曲线与在PBS中建立的标准曲线基本一致,证明饮用水基质对检测方法影响较小,温度升高值 ΔT 与细菌数目在300~1000范围内也成线性相关关系。样

品添加回收实验表明,回收率为96.2%~106.4%(图9B),可满足检测要求。300个孵育有免疫磁性纳米材料的鼠伤寒沙门氏菌在饮用水中经激光照射产生的温度升高值为1.17℃,回收率为96.2%,与在PBS中检测结果基本一致,符合检测要求(图9C)。

[0113] 7. 方法特异性考察

[0114] 为了考察所建立方法的特异性和选择性,选取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌对方法进行考察。如图9C所示,在PBS中进行了以下实验,在PBS中仅添加鼠伤寒沙门氏菌,仅添加大肠杆菌,仅添加金黄色葡萄球菌。从图中可看出,仅添加添加大肠杆菌和金黄色葡萄球菌组经激光照射产生的 ΔT 要低于另外两组实验。以上实验证明本发明建立的基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌方法具有高特异性和选择性。

[0115] 8. 方法杀菌效果考察

[0116] 为了考察方法的杀菌效果,样品经过孵育、膜过滤、磁分离后,分别使用808nm激光照射0s、30s、60s、120s,用100 μ L PBS对滤膜进行反复冲洗,将冲洗用的100 μ L PBS均匀的涂布到牛肉膏蛋白胨培养基上,由图10可知,当用激光照射120s后滤膜上的鼠伤寒沙门氏菌已被完全杀死,证明该方法杀菌效果良好,可在检测的同时实现对样品的灭活。

[0117] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

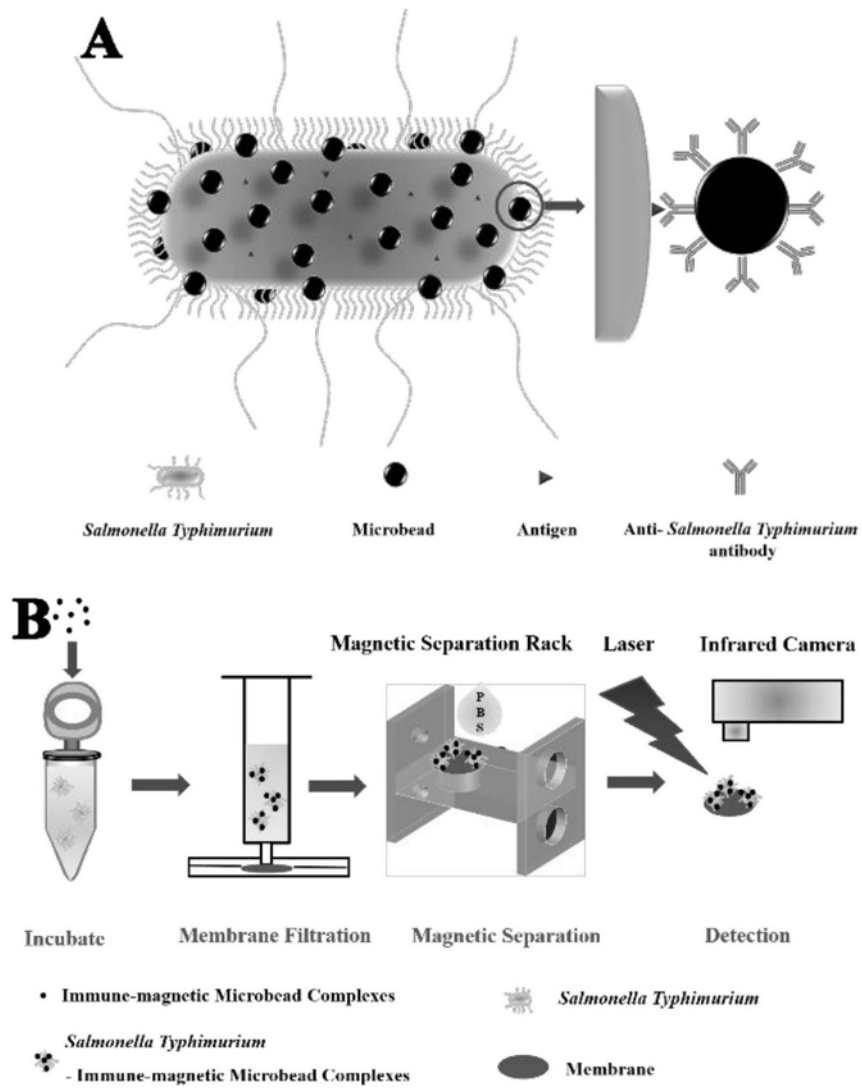


图1

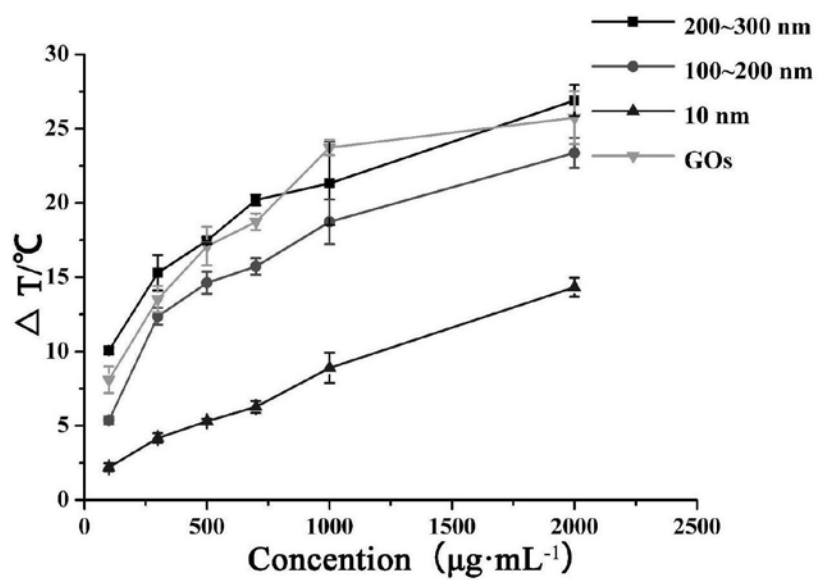


图2

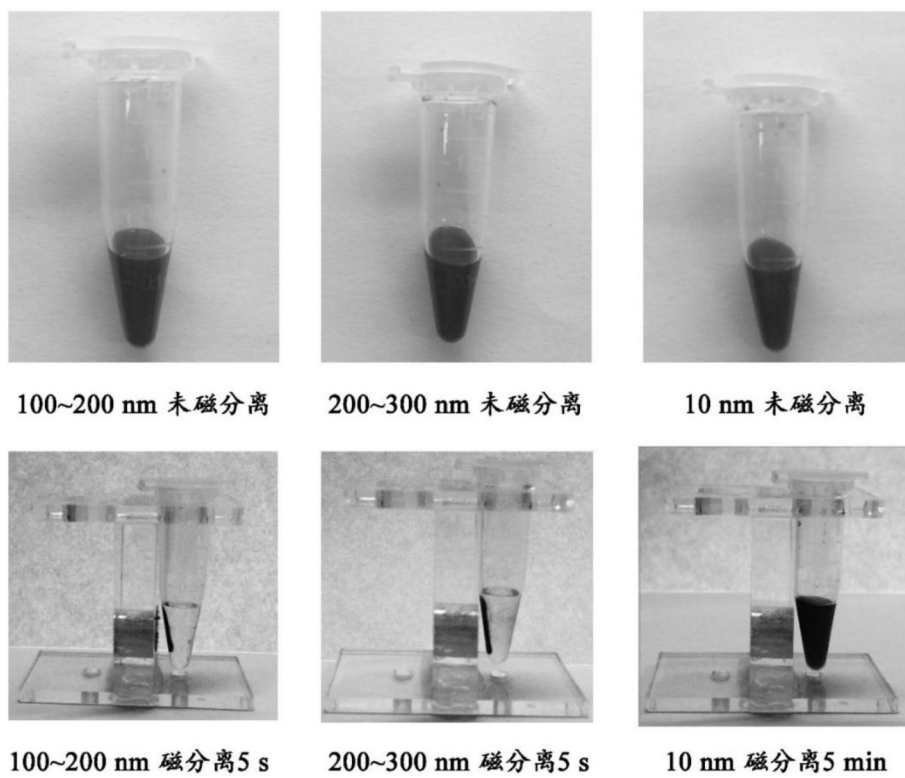


图3

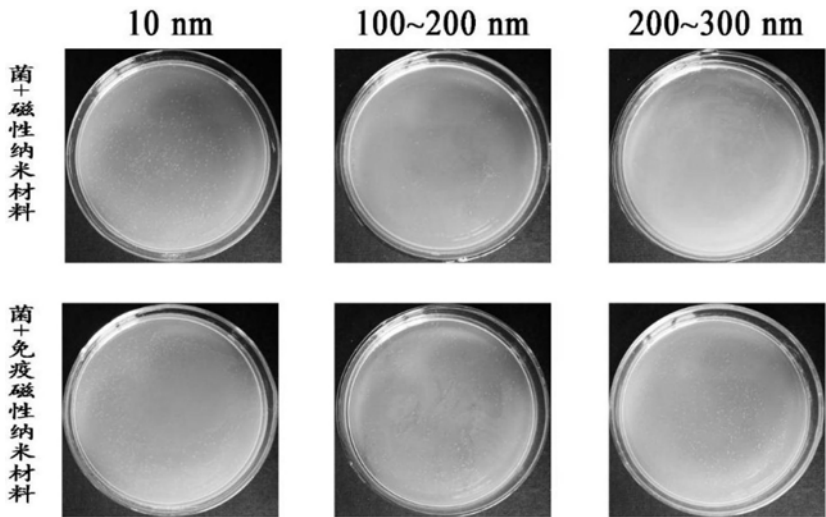


图4

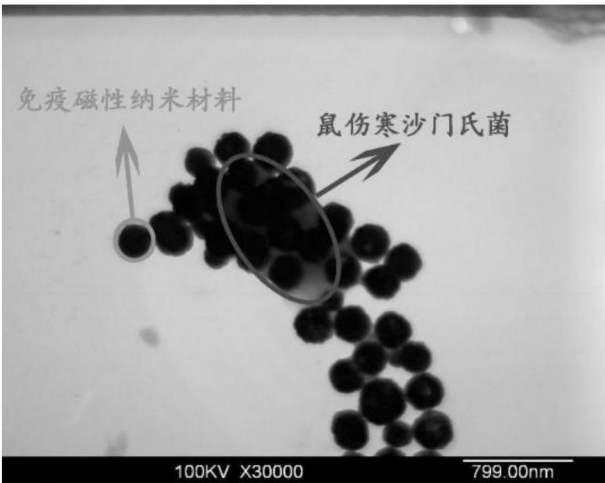


图5

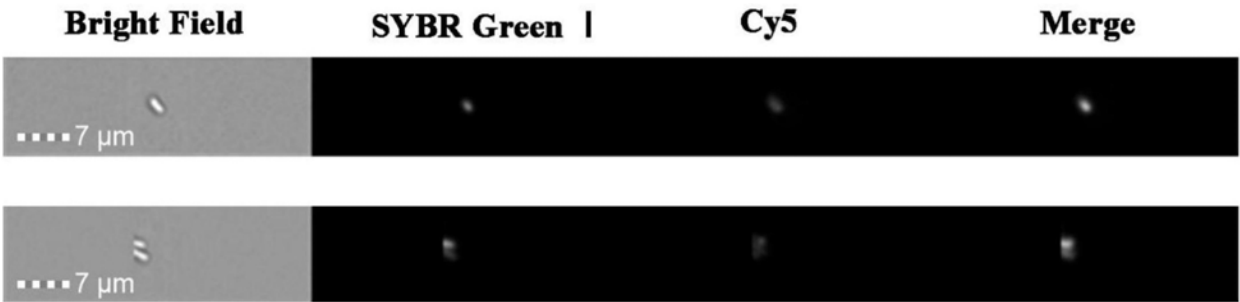


图6

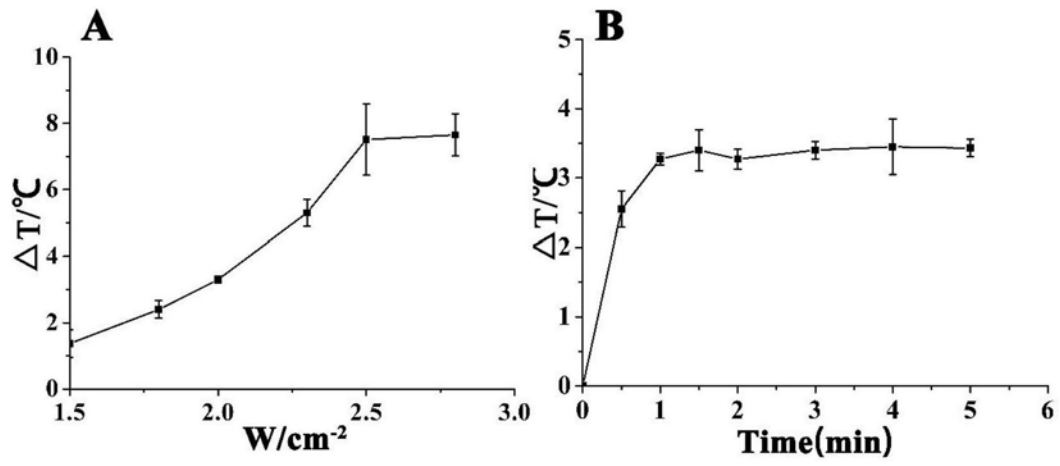


图7

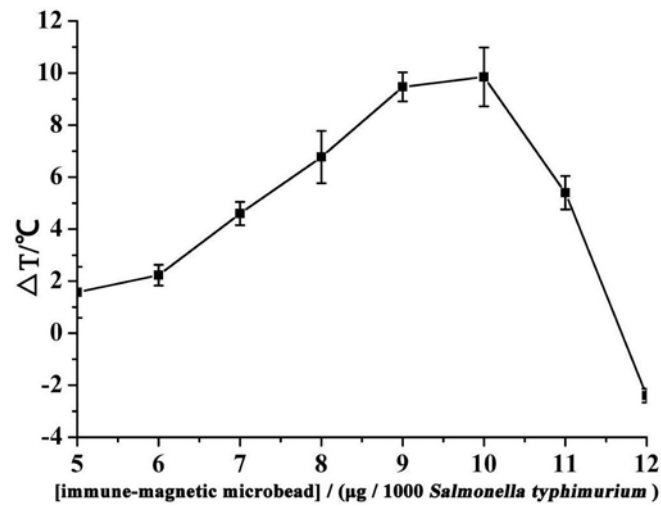


图8

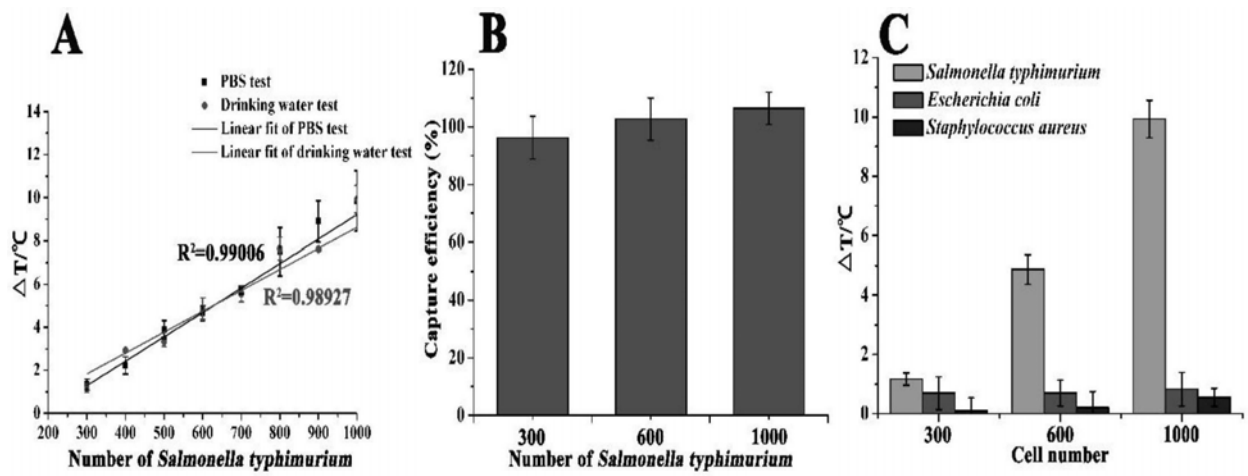
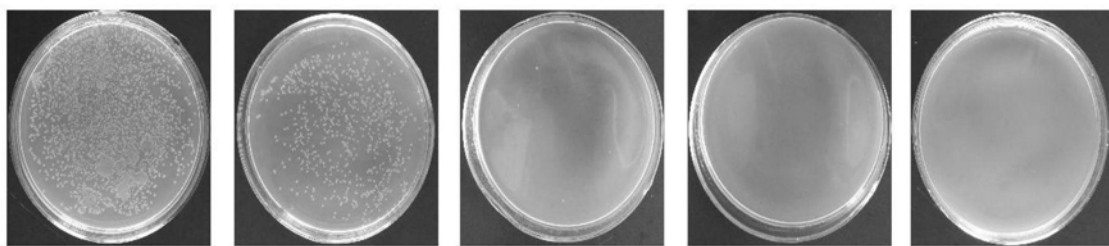


图9



未孵育磁球照射0 s 孵育磁球照射0 s 孵育磁球照射30 s 孵育磁球照射60 s 孵育磁球照射120 s

图10

专利名称(译)	一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法		
公开(公告)号	CN107677817A	公开(公告)日	2018-02-09
申请号	CN2017110756436.7	申请日	2017-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	山东师范大学		
申请(专利权)人(译)	山东师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东师范大学		
[标]发明人	张鸿雁 张震 罗钰		
发明人	张鸿雁 张震 罗钰		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N33/56916 G01N2333/255 G01N2446/90		
代理人(译)	王志坤		
其他公开文献	CN107677817B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明建立了一种基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌快速检测方法，利用免疫磁性纳米材料的光热效应建立了温度升高值与鼠伤寒沙门氏菌数目的标准曲线，可将样品产生的温度升高值带入标准曲线得到样品中的细菌数目。同时，利用免疫磁性纳米材料的磁性与光热效应，实现了富集分离-检测-试样灭活三个环节的有效整合，本方法灵敏、安全、快速、便携、成本低，经实验验证，基于免疫磁性纳米材料光热效应的鼠伤寒沙门氏菌方法最低检测限为300个细菌，且温度升高值 ΔT 与细菌数目在300~1000范围内成线性相关关系，因此本发明具有良好的实际应用前景，可应用于对鼠伤寒沙门氏菌的实际快速检测。

