



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308679 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310219430. 8

(22) 申请日 2013. 06. 03

(71) 申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市学府路 301 号

(72) 发明人 夏圣 章佳英 邵启祥 陈敏

张元 姜德立 杜凤仪

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

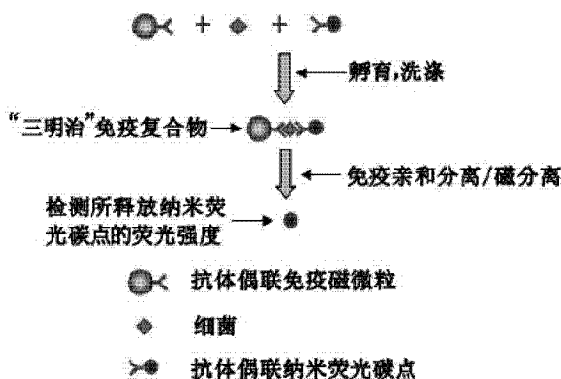
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

用纳米荧光碳点免疫标记检测细菌的方法

(57) 摘要

一种利用纳米荧光碳点快速检测细菌的方法。它是利用抗体分别偶联磁微粒、纳米荧光碳点,利用抗体与细菌抗原的特异性结合,形成“磁微粒-细菌-纳米荧光碳点”的“三明治”免疫复合物。通过磁场快速分离该细菌免疫复合物后,再利用抗原抗体免疫亲和分离液解离出纳米荧光碳点,然后检测分离液中的荧光信号,从而对待测样本中细菌进行定性或定量分析。



1. 纳米荧光碳点在免疫标记检测细菌中的用途。
2. 一种用纳米荧光碳点免疫标记检测细菌的方法,其特征在于包括以下步骤:
 - (1)制备抗体标记的磁微粒:利用以氧化铁为核心制备的、外周包绕有机大分子的核壳型磁微粒为载体,利用其表面修饰的羧基或氨基与抗体在化学偶联剂存在条件下进行化学偶联反应,制备抗体标记的磁微粒;偶联剂采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀亚胺偶联体系;
 - (2)制备抗体标记的免疫纳米荧光碳点:利用纳米荧光碳点上的羧基,与抗体的氨基在化学偶联剂存在条件下进行共价偶联,制备抗体标记的免疫纳米荧光碳点;偶联剂采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺/N-羟基琥珀亚胺偶联体系;
 - (3)利用抗体标记的磁微粒对样本中的细菌进行捕获,形成“磁微粒-细菌”;并在磁场作用条件下,对样本中的细菌进行富集与快速分离;
 - (4)在步骤(3)样本中加入抗体标记的免疫纳米荧光碳点,使其与步骤(3)得到的“磁微粒-细菌”进行再结合,形成“磁微粒-细菌-碳点”的复合物;再利用磁场进行快速分离;
 - (5)采用免疫亲和分离液通过解离抗原与抗体间的结合,将纳米荧光碳点从细菌免疫复合物中释放出来;
 - (6)用荧光光度计测定免疫亲和分离液中纳米荧光碳点的荧光强度,从而推算出测试样品中细菌数量。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)偶联过程中的反应pH为7.2;抗体浓度为4 g/L;偶联时间为120分钟。
4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(2)偶联过程中的反应pH为7.2;抗体浓度为8g/L;偶联时间为60分钟。
5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述的免疫亲和分离液成分为pH7.0磷酸缓冲液,含8M尿素,1%SDS,0.1%BSA。

用纳米荧光碳点免疫标记检测细菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用纳米荧光碳点(Fluorescent carbon, CDs)材料进行抗体免疫标记后建立的细菌检测方法。

背景技术

[0002] 细菌的快速检测技术是指应用相应的技术手段在尽量短的时间内对样本中细菌的数与量做出准确的定性或定量检测。该技术在临床病原学诊断,以及食品、环境、海关的细菌学检测等领域有着广泛的应用需求。从近年来的情况来看,我国在经济高速发展的同时,食品问题与环境问题日益加重,其中微生物(包括细菌)的污染是其面临的主要问题之一。与此同时,随着国门打开,全球国际化进程加速,我国对外交流日益增多,海关也面临大量商品的细菌快速现场检测问题。因此,建立有效的快速细菌检测技术对于我国社会有着现实的需求,及潜在的巨大社会与经济效益。

[0003] 目前,伴随分子生物学与免疫学技术的快速发展,已经建立了许多快速、敏感的微生物学检测方法。这些方法与传统的培养方法相比,其检测速度明显加快,显著提高了监测水平,尤其是现场检测能力,但它们各自仍有相应的不足之处。

[0004] 通常,利用分子生物学技术建立的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的检测速度虽然快,检测灵敏度较高。但此法只是对待检微生物的核酸进行检测,不能反映微生物的活性状态。因此,该法在检测过程中的假阳性率比较高。而利用免疫抗体建立的传统 ELISA 检测法,其检测敏感性较差,检测时间较长;免疫金标记法能做到现场的检测应用,利用该标记物建立的免疫渗滤检测法与免疫层析检测法,已用于多种免疫原,包括一些细菌的快速检测中。但该法最大的问题是检测敏感性较低,对于低丰度的细菌抗原不能有效检出。免疫荧光标记技术也是建立微生物快速检测的方法之一,但传统的免疫荧光方法中因使用的传统有机荧光染料的激发光谱窄、荧光不稳定等因素影响了其在现场快速检测中的应用。

[0005] 随着材料科学的发展,新型的纳米标记材料不断出现,并应用于生物医学领域。其中,纳米荧光碳点(CDs)即是一类新型纳米荧光材料。与传统的免疫荧光标记物相比,CDs具有以下特点:(1)激发波长宽,即可以使用小于其发射波长的任意波长的激发光进行激发;(2)发射峰窄而对称,无拖尾现象,激发波长与发射波长相隔较远,几乎无重叠;(3)发射波长可以通过控制CDs的大小和组成来调整,在一定范围内,可以任意合成所需波长的碳点,而粒径均一的量子点的谱峰为对称高斯分布;(4)因不含重金属离子,对生物体的危害小,生物相容性较好,经过各种化学修饰的碳点,其表面可含羧基(-COOH),易与抗体蛋白进行有效偶联,制备抗体标记的CDs。(5)荧光稳定性好,抗光漂白性强,几乎没有光褪色现象,因此可以对所标记的物体进行长时间观察;(6)该材料可用青草为碳源,通过一步法合成制备,生产成本较低。

[0006] 因此,利用新的荧光标记材料CDs建立的快速、高效、敏感的细菌检测方法有其独特的方法学优势。

发明内容

[0007] 本发明主要是利用纳米荧光碳点作为标记物,建立一种快速免疫荧光检测细菌的方法。其原理图见图1。即将抗体偶联免疫磁微粒与待检测细菌、抗体偶联纳米荧光碳点混合孵育后,洗涤,对抗体偶联免疫磁微粒/细菌/抗体偶联纳米荧光碳结合形成的“三明治”免疫复合物进行免疫亲和分离及磁分离,再用解离液将纳米荧光碳点从该免疫复合物上解离,检测所释放纳米荧光碳点的荧光强度,从而对样本中待检测细菌进行定量。为解决该技术问题,本案所采用的技术方案包括:

[0008] (1)制备抗体标记的磁微粒:利用以氧化铁为核心制备的、外周包绕有机大分子的核壳型磁微粒为载体,利用其表面修饰的羧基或氨基与抗体在化学偶联剂存在条件下进行化学偶联反应,制备抗体标记的磁微粒;偶联剂采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀亚胺(NHS)偶联体系;

[0009] (2)制备抗体标记的免疫纳米荧光碳点:利用纳米荧光碳点上的羧基,与抗体的氨基在化学偶联剂存在条件下进行共价偶联,制备抗体标记的免疫纳米荧光碳点;偶联剂采用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀亚胺(NHS)偶联体系;

[0010] (3)利用抗体标记的磁微粒对样本中的细菌进行捕获,形成“磁微粒-细菌”;并在磁场作用条件下,对样本中的细菌进行富集与快速分离;

[0011] (4)在步骤(3)样本中加入抗体标记的免疫纳米荧光碳点,使其与步骤(3)得到的“磁微粒-细菌”进行再结合,形成“磁微粒-细菌-碳点”的复合物;再利用磁场进行快速分离;

[0012] (5)采用免疫亲和分离液通过解离抗原与抗体间的结合,将纳米荧光碳点从细菌免疫复合物中释放出来;

[0013] (6)用荧光光度计测定免疫亲和分离液中纳米荧光碳点的荧光强度,从而推算出测试样品中细菌数量。

[0014] 步骤(1)偶联过程中的反应pH为7.2;抗体浓度为4g/L;偶联时间为120分钟。

[0015] 步骤(2)偶联过程中的反应pH为7.2;抗体浓度为8g/L;偶联时间为60分钟。

[0016] 本发明中的待检测细菌不限于伤寒沙门氏菌属,应包括大肠埃希氏菌属、志贺氏菌属、假单胞菌属、弯曲杆菌属、弧菌属、葡萄球菌属、克雷伯杆菌属、变形杆菌属、链球菌属、分枝杆菌属等所有细菌。

[0017] 本发明的有益效果是:可以从低丰度的细菌样本中,做到对待检测细菌的特异性快速分离与免疫荧光检测。

附图说明

[0018] 下面结合附图和实施例对本发明进行进一步说明。

[0019] 图1是本发明的技术原理图。

[0020] 图2是本发明所用磁微粒的透射电子显微镜图。图中标尺为1 μ m。

[0021] 图3是本发明中磁微粒偶联抗体的最适条件图。A:最适pH条件;B:最适蛋白浓度(g/L);C:最适时间(min)。

[0022] 图 4 是本发明所用纳米荧光碳点的透射电子显微镜图。图中标尺为 20nm。

[0023] 图 5 是本发明中纳米荧光碳点偶联检测抗体的最适条件图。A : 最适 pH 条件 ; B : 最适蛋白浓度 (g/L) ; C : 最适时间 (min)。

[0024] 图 6 是本发明中免疫磁微粒中抗体功能鉴定图, 图 6A : 不含抗体的对照图, 无乙型副伤寒沙门氏菌与磁微粒结合 ; 图 6B : 抗体结合的免疫磁微粒, 磁微粒结合有乙型副伤寒沙门氏菌 (革兰染色)。MMP : 磁微粒 ; SPB : 乙型副伤寒沙门氏菌。

[0025] 图 7 是本发明中抗体标记的纳米荧光碳点免疫功能的鉴定图。采用玻片凝集法对结合在纳米荧光碳点的抗体的功能进行快速鉴定。图 7A : 乙型副伤寒沙门氏菌与抗体偶联的纳米荧光碳点进行凝集反应 ; 图 7B : 乙型副伤寒沙门氏菌与对照生理盐水进行反应。

[0026] 图 8 是本发明中抗乙型副伤寒沙门氏菌 (*S. para*) 抗体标记的纳米荧光碳点对不同浓度乙型副伤寒沙门氏菌检测的荧光值和大肠埃希菌 (*E. coli*) 对本实验的干扰试验图。

具体实施方式

[0027] 为使本领域内的技术人员能更好地理解本发明的技术过程, 下面将结合实施方案与附图, 对本技术的具体实施方式进行详细说明。

[0028] 实施例 1 :

[0029] (1) 磁微粒偶联捕获抗体的过程及条件的优化 (见图 3)

[0030] 磁微粒的透射电子显微镜图如图 2, 取磁微粒 (10mg/ml) 200 μ l 至 1.5ml 的离心管中, 用 500 μ l 无菌双蒸水洗涤两次, 磁分离后去除上清液。用 500 μ l MEST (pH6.0, 10mmol/L MES (4-morpholine ethyl sulfonic acid, 4-吗啉乙磺酸), 含 0.05% 吐温 -20) 洗涤两次, 磁分离后去除上清液。配制 5mg/ml 的 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethyl ammonium propyl)-carbide imine, 1-乙基-(2-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺) 溶液, 用 4 $^{\circ}$ C 保存的 10mmol/L MES (pH6.0, 10mmol/L MES) 水溶液制备。配制 5mg/ml 的 NHS (N-hydroxy succinimide, N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液, 用 4 $^{\circ}$ C 保存的 10mmol/L MES 水溶液制备。在装有磁微粒的离心管中, 分别加入上述新鲜配制的 EDC (5mg/ml) 溶液 200 μ l 和 NHS (5mg/ml) 溶液 200 μ l, 涡旋混匀, 使磁微粒充分悬浮, 37 $^{\circ}$ C 活化 30 分钟, 制备得活化的磁微粒 (这期间必须保持磁微粒的悬浮状态)。将上述离心管放在磁分离架上进行磁分离, 去除上清液, 加入 MEST 500 μ l, 充分混匀, 再把磁微粒转移到新的无菌离心管中。将上述离心管放在磁分离架上进行磁分离, 去除上清液, 磁微粒再用 MEST 500 μ l 洗涤两次, 磁分离, 去除上清液。取 0.8mg (终浓度 4g/L) 的沙门氏菌 *O*₄ 因子血清抗体加入上述离心管中, 用 PBS 调整总体积至 500 μ l, 轻轻混匀磁微粒和抗体, 37 $^{\circ}$ C 偶联不得少于 2 个小时, 这期间必须保持磁微粒的混悬状态。将上述离心管放在磁分离架上进行磁分离, 去除上清液, 加入 1.0ml PBST (pH7.4, 0.01mol/L, 含 1%BSA 和 0.05% 吐温 -20), 重悬磁微粒。将上述离心管放在磁分离架上进行磁分离, 去除上清液, 磁微粒用 500 μ l PBST 洗涤四次。将上述离心管放在磁分离架上进行磁分离, 去除上清液, 磁微粒用 200 μ l PBST (pH7.4, 0.01mol/L, 含 0.5%BSA 和 0.02%NaN₃) 重悬, 此即为抗体标记的磁性微粒。

[0031] (2) 磁微粒偶联捕获抗体的 pH 选择

[0032] 取活化后的磁微粒各 10 μ l (10mg/ml), 分别加到 100 μ l 不同 pH 值 (6.0 ~ 8.0)

的 PBS 中,然后再加入沙门氏菌 O₄ 因子血清抗体 0.44mg,后续操作按(1)进行。结果如图 3A。选择偶联效率最高时的 pH 值 7.2 作为偶联捕获抗体的最适 pH。

[0033] (3) 磁微粒偶联捕获抗体的抗体浓度选择

[0034] 取活化后的磁微粒各 10 μ l (10mg/ml, pH7.2), 分别加入不同体积的沙门氏菌 O₄ 因子血清抗体, 后续操作按(1)进行。结果如图 3B。选择偶联效率最高时的抗体浓度 4g/L 作为偶联捕获抗体的最适抗体浓度。

[0035] (4) 磁微粒偶联捕获抗体所需时间的选择

[0036] 采用磁微粒偶联捕获抗体的最适 pH 和最适抗体偶联浓度, 观察不同偶联时间对偶联效率的影响。以 30min、60min、90min、120min、150min 和 180min 为时间点。结果如图 3C。选择偶联效率最高时的偶联时间 120min 作为磁微粒偶联捕获抗体的最适时间。

[0037] 实施例 2: 免疫磁微粒抗体功能的鉴定(见图 6)。

[0038] 取免疫磁微粒 1 滴加在载玻片上, 与乙型副伤寒沙门氏菌混匀, 洗去游离的细菌, 晾干, 用革兰染色, 借助 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜观察免疫磁微粒富集细菌的能力。对照用没有偶联捕获抗体的磁微粒代替, 其余均同测定。由图 6A 可知, 无抗体结合的磁微粒不能结合乙型副伤寒沙门氏菌, 而图 6B 中的免疫磁微粒 (MMP) 可通过抗体结合乙型副伤寒沙门氏菌 (S. para)。

[0039] 实施例 3: 纳米荧光碳点偶联检测抗体条件的优化(见图 5)

[0040] (1) 纳米荧光碳点偶联检测抗体的步骤

[0041] 纳米荧光碳点的透射电子显微镜图如图 4, 取羧基化的 CDs 200 μ l (CDs : 1mg/ml), 加入 PBS (pH7.2, 0.01mol/L) 400 μ l, 再加入 EDC20mg, 溶解, 混匀, 室温, 涡流 5 分钟, 用 15 ~ 20 分钟去完全活化游离 CDs 上的羧基。然后, 加入 NHS5mg, 溶解, 混匀, 室温, 涡流 15 分钟, 再加入沙门氏菌 Ha 因子血清抗体 0.8mg (终浓度 8g/L), 混匀, 室温涡流至少 1 个小时。将上述溶液离心 (12000rpm, 4℃, 20 分钟), 移除上清液, 加入 PBS100 μ l, 洗涤两次, 再加入 PBS100 μ l, 彻底混匀, 即为免疫 CDs, 新鲜使用。

[0042] (2) 纳米荧光碳点偶联检测抗体的 pH 选择

[0043] 取活化后的 CDs 各 10 μ l (1mg/ml), 分别加到 100 μ l 不同 pH 值 (6.0 ~ 8.0) 的 PBS 中, 然后再加入沙门氏菌 Ha 因子血清抗体 0.88mg, 后续操作按(1)进行。结果如图 5A。选择荧光强度最高时的 pH 值 7.2 作为偶联检测抗体的最适 pH。

[0044] (3) 纳米荧光碳点偶联检测抗体的抗体浓度选择

[0045] 取活化后的 CDs 各 10 μ l (1mg/ml, pH7.2), 分别加入不同量的沙门氏菌 Ha 因子血清抗体, 后续操作按(1)进行。结果如图 5B。选择荧光强度最高时的抗体浓度 8g/L 作为偶联检测抗体的最适抗体浓度。

[0046] (4) 纳米荧光碳点偶联检测抗体的偶联时间选择

[0047] 用 CDs 偶联检测抗体的最适 pH 和最适抗体偶联浓度, 观察不同偶联时间对 CDs 荧光强度的影响。以 30min、60min、90min、120min、150min 和 180min 为时间点, 结果如图 5C。选择荧光强度最强时的偶联时间 60min, 作为 CDs 偶联检测抗体的最适时间。

[0048] 实施例 4: 抗体结合的纳米荧光碳点的抗体功能鉴定(见图 7)

[0049] 取免疫 CDs 1 滴加在载玻片上, 与乙型副伤寒沙门氏菌混匀, 数分钟后观察凝集结果, 出现颗粒凝集者为阳性反应。对照用不连抗体的 CDs 代替, 余同测定。此试验为定性试

验,用于鉴定连接在 CDs 上的抗体与抗原(细菌)结合的能力。由图 7A 可知,免疫 CDs 可凝集细菌,而对照的图 7B 为阴性对照结果,不发生细菌的凝集。

[0050] 实施例 5:抗体结合的纳米荧光碳点检测细菌方法的建立(以乙型副伤寒沙门氏菌为例)(图 8)

[0051] 取制备好的免疫磁微粒 480 μ l,加入 12ml 乙型副伤寒沙门氏菌(*S. para*)菌液($10^1 \sim 10^7$ cfu/ml),混匀,室温旋转 30 分钟,用磁分离器分离,去除上清液,加入 PBS(pH7.4, 0.01mol/L)1.0ml,磁分离,去除上清液,再加入 PBS1.0ml,共洗涤 3 次,然后加入免疫 CDs480 μ l,混匀,室温旋转 30 分钟,磁分离,用 PBS1.0ml 洗涤 3 次,加免疫亲和分离液(pH7.0PBS,含 8M 尿素,1%SDS,0.1%BSA)2400 μ l 重悬。除去磁微粒,用荧光光度计测定免疫亲和分离液中 CDs 的荧光强度(Ex :408nm)。阴性对照管用 3ml 生理盐水代替菌液,其余均同测定管。从图 8 的结果中可以得知:检测样本中的 CDs 荧光强度随着样本中乙型副伤寒沙门氏菌的菌量增加而增强。在本案中本法对乙型副伤寒沙门氏菌的最低检测限为 10^4 cfu/ml。同时,检测中以待测样本中最为常见的大肠埃希菌(*E. coli*)作为干扰菌,以检测其对结果的影响。结果表明,大肠埃希菌对本法检测乙型副伤寒沙门氏菌基本无干扰。

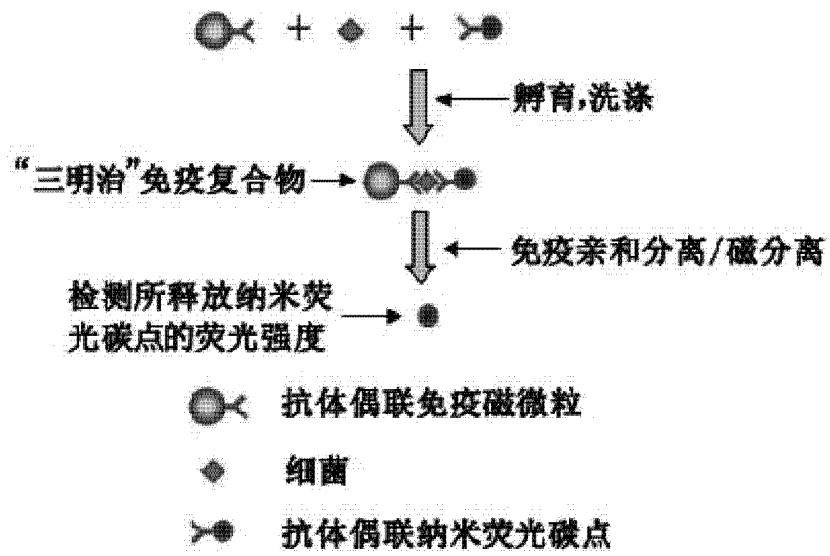


图 1

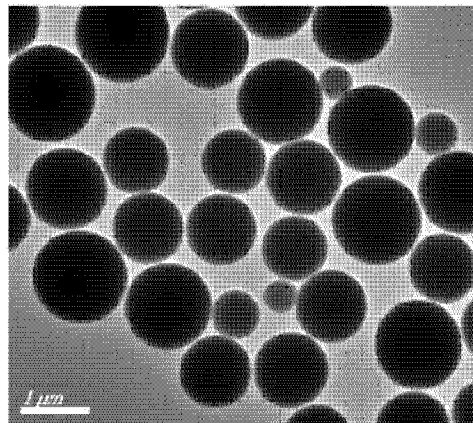


图 2

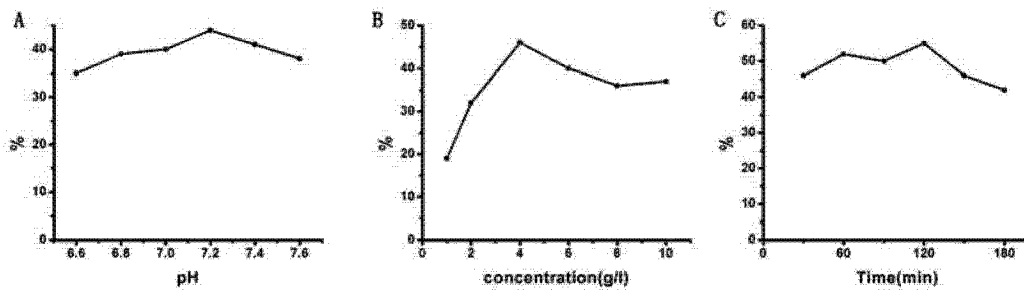


图 3

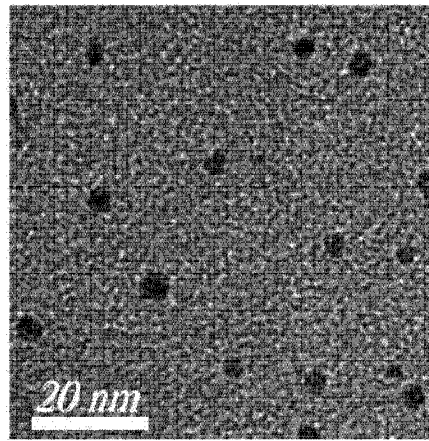


图 4

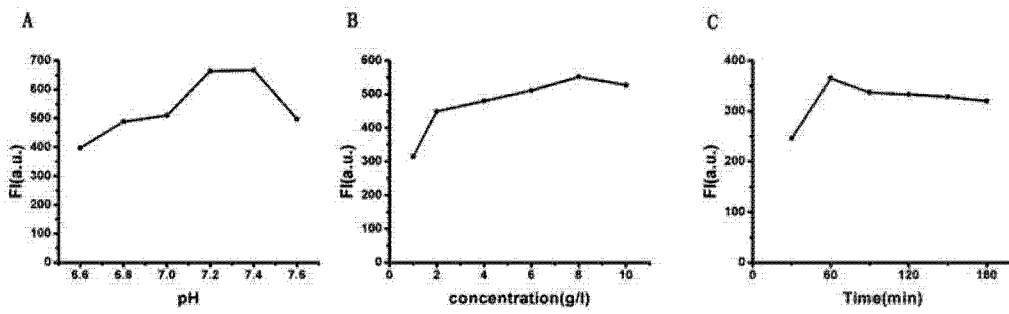


图 5

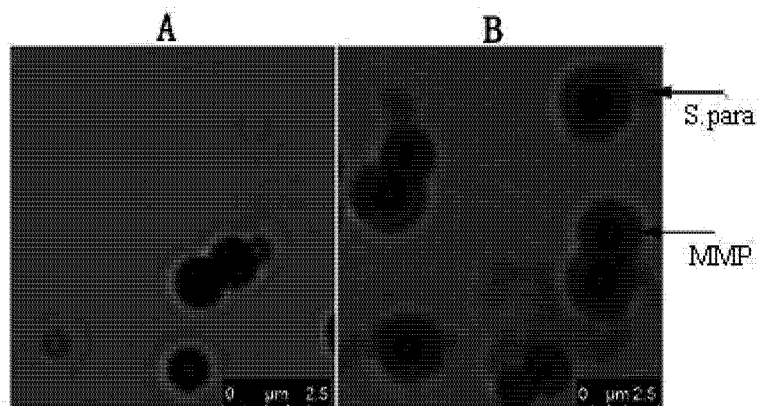


图 6

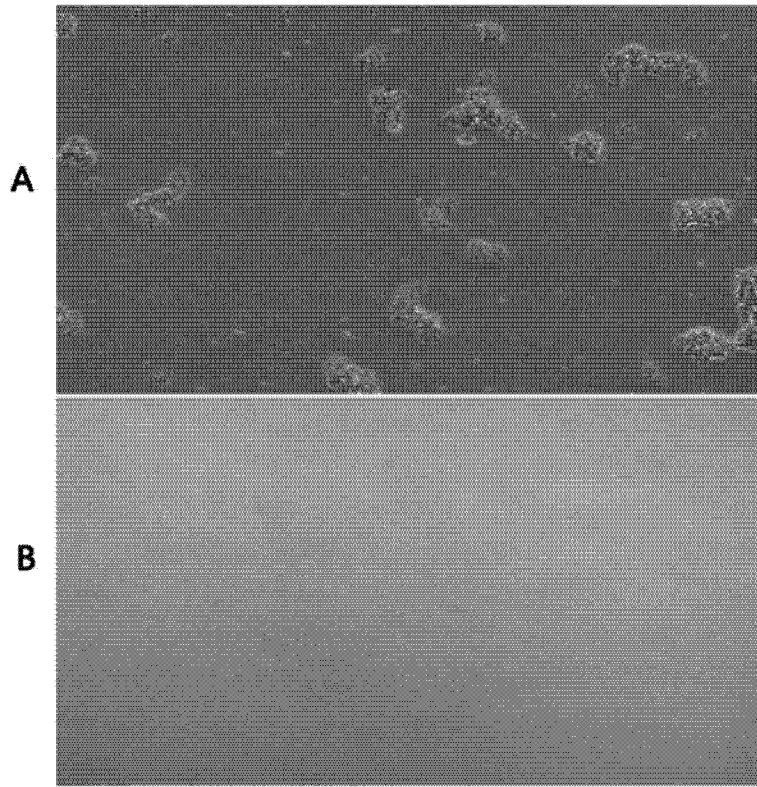


图 7

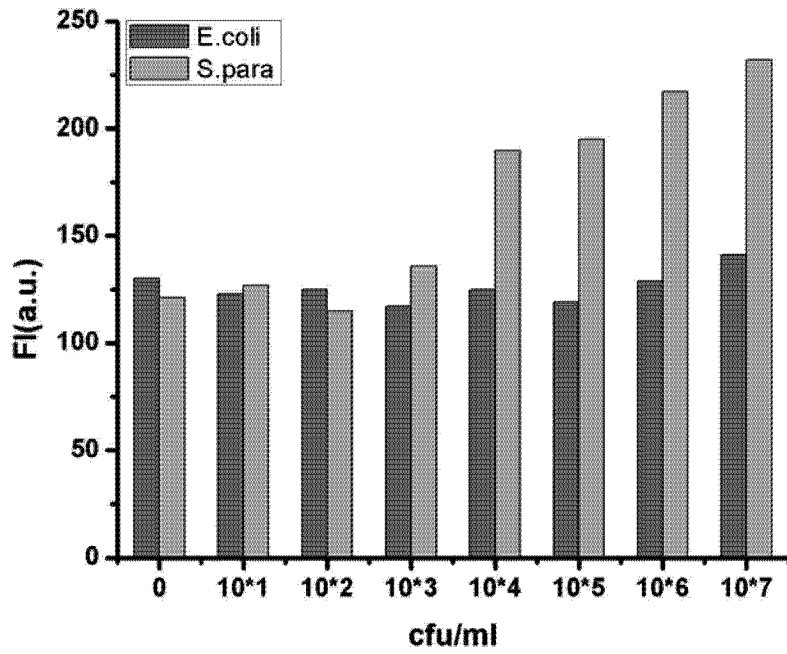


图 8

专利名称(译)	用纳米荧光碳点免疫标记检测细菌的方法		
公开(公告)号	CN103308679A	公开(公告)日	2013-09-18
申请号	CN201310219430.8	申请日	2013-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	夏圣 章佳英 邵启祥 陈敏 张元 姜德立 杜凤仪		
发明人	夏圣 章佳英 邵启祥 陈敏 张元 姜德立 杜凤仪		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	卢亚丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种利用纳米荧光碳点快速检测细菌的方法。它是利用抗体分别偶联磁微粒、纳米荧光碳点，利用抗体与细菌抗原的特异性结合，形成“磁微粒-细菌-纳米荧光碳点”的“三明治”免疫复合物。通过磁场快速分离该细菌免疫复合物后，再利用抗原抗体免疫亲和分离液解离出纳米荧光碳点，然后检测分离液中的荧光信号，从而对待测样本中细菌进行定性或定量分析。

