



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102087283 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 24

(21) 申请号 200910273095. 3

(22) 申请日 2009. 12. 08

(73) 专利权人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037 号

(72) 发明人 徐顺清 夏纬 李媛媛 许冰

(74) 专利代理机构 华中科技大学专利中心
42201

代理人 夏惠忠

(56) 对比文件

CN 1563969 A, 2005. 01. 12,

CN 101225122 A, 2008. 07. 23,

US 2009024019 A1, 2009. 01. 22,

王存嫦等. 纳米金自组装膜的 tgm 压电免疫传感器的研究. 《化学学报》. 2003, 第 61 卷 (第 4 期),

审查员 黄晓丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 33/04(2006. 01)

C12N 1/20(2006. 01)

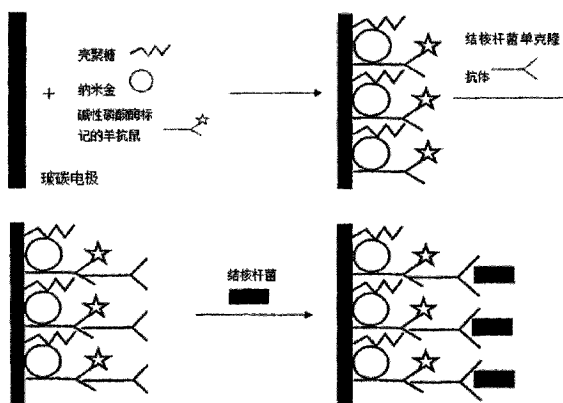
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器及其应用

(57) 摘要

本发明是一种基于壳聚糖和纳米金的酶免疫传感器,利用结核分支杆菌细胞壁的单克隆抗体能特异的结合结核杆菌,可用于快速检测牛奶中结核杆菌。其特点是用壳聚糖凝胶、纳米金溶液和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体混合溶液经电化学沉积法来修饰玻碳电极表面,再利用抗原抗体特异性反应将结核杆菌单克隆鼠抗体固定在碱性磷酸酶标记的羊抗鼠-壳聚糖-纳米金膜修饰的玻碳电极表面,制备用于检测结核杆菌的酶免疫传感器。通过差分脉冲伏安法测定修饰好的电极与结核杆菌孵育反应前后引起的电信号改变进行定量分析。该传感器制备方法简单,具有灵敏度高、检测时间短,操作简单等优点,是一种可快速检测结核杆菌的方法。



1. 一种检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器,其特征在于,它由玻碳电极、位于该玻碳电极表面的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG- 壳聚糖 - 纳米金修饰膜和固定在该修饰膜表面的结核杆菌单克隆鼠抗体构成。

2. 一种检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

步骤一:取玻碳电极用 $0.3\mu\text{m}$ 、 $0.05\mu\text{m}$ 的氧化铝粉抛光成镜面,超声波清洗 3min 后三蒸水冲洗,在 $30\%\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4=3:7$ 的 piranha 溶液中浸泡 10min,然后分别用三蒸水和乙醇超声波清洗三次;

步骤二:将经抛光清洁处理过的玻碳电极插入 0.1mg/mL 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体(羊抗鼠 IgG-ALP)、 0.5% 壳聚糖溶液和 0.8nM 纳米金混合溶液中,于三电极系统下给予电压恒压 $+3.0\text{V}$ 下电沉积修饰 5 分钟,电极取出后分别用 2mL 的高纯水冲洗三次,即制得碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的玻碳电极;

步骤三:将步骤二制得的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的玻碳电极插入含有 0.1mg/mL 的结核杆菌单克隆鼠抗体磷酸缓冲溶液中,于 4°C 浸泡 10 小时,取出后用 2mL PH 为 7.4 浓度为 0.01M 磷酸盐缓冲液冲洗电极表面三次,即得到本发明提供的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器, 4°C 储存备用。

3. 根据权利要求 2 所述的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤一中所述的玻碳电极为 $\phi=3\text{mm}$ 的玻碳电极。

4. 根据权利要求 2 所述的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤二中所述的纳米金为粒径 15nm 的纳米金。

5. 一种检测牛奶中结核杆菌的方法,包括以下步骤:

步骤一:按以下步骤(a)或(b)对待检测牛奶样本进行前处理:

(a)取 10ml 待检测牛奶样品 1900g 离心 20min,弃上清液,加入 PH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 液 5ml 混匀, 1900g 离心 10min,弃上清液,往沉淀物中加入 0.5ml PBS, 混匀备用;

(b)对牛奶样本进行增菌培养,具体步骤为:10ml 牛奶样品 1900g 离心 20min, 弃上清液,加入 10ml Middledbrook7H9 培养液, 37°C ,厌氧条件下培养 1-2 天。然后 1900g 离心 20min,弃上清液,加入 PH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 液 5ml, 混匀, 1900g 离心 10min,弃上清液,往沉淀物中加入 0.5ml PBS, 混匀备用;

步骤二:按权利要求 2 所述方法制备本发明提供的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器;

步骤三:标准结核杆菌液的制备:选用具有免疫原性减毒活牛分支杆菌制备而来的卡介苗,经 Middledbrook7H9 培养液, 37°C ,厌氧条件下培养,充分混匀以 0.01M 磷酸盐缓冲液 PBS 为稀释液进行 1 : 10 的倍比稀释,再接种于罗氏斜面培养基,计算出菌落数,调整 PBS 对 Middledbrook7H9 培养液中 BCG 菌稀释度,分别配制从 $10^2 \sim 10^7\text{cfu/mL}$ 之间不同浓度的结核杆菌 BCG 的 PBS 混悬液;

步骤四:测试本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器的初始电流值 I_0 ;

步骤五:将本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器分别与前述步骤制备的不同浓度结核杆菌 BCG 的 PBS 悬浮液和待测样品的 PBS 悬浮液在 37°C 培育 30 分钟,然后,测试孵育后的电极的电流值 I_p ;

步骤六:用 I_0 减去 I_p 获得电流改变差值 ΔI ,以不同浓度结核杆菌 BCG 的 PBS 悬浮液与本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器反应前和反应后引起的电流值改变 ΔI 绘制标准曲线,依标准曲线及待测样品的 PBS 悬浮液 ΔI 即得出待测样本中结核杆菌的浓度。

6. 根据权利要求 5 所述的检测牛奶中结核杆菌的方法,其特征在于,步骤四所述的测试本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器的初始电流值 I_0 的具体方法是:以本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝为辅助电极构成的三电极系统,5mM α -萘磷酸的 PH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液为测试工作液,用差分脉冲法扫描测定电流,扫描条件为起始电压 0V、终止电压 0.6V、幅度 0.05V;记录在 +300mv 左右产生的氧化峰,以此氧化峰的电流值为本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器的初始电流值 I_0 。

7. 根据权利要求 5 所述的检测牛奶中结核杆菌的方法,其特征在于,步骤五所述的测试孵育后的电极的电流值 I_p 的具体方法是:以孵育后的电极为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝为辅助电极构成的三电极系统,5mM α -萘磷酸的 PH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液为测试工作液,用差分脉冲伏安法扫描测定电流,记录在 +300mv 左右产生的氧化峰,此氧化峰的电流值即为孵育后的电极的电流值 I_p 。

8. 权利要求 1 所述的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器用于检测牛奶中的结核杆菌。

检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器及其应用

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种牛奶样品中检测结核杆菌的方法，具体涉及一种针对结核杆菌进行快速、准确的纳米结构的酶免疫传感器电化学检测的方法。

背景技术：

[0002] 牛奶是人类主要蛋白质和其它营养素的重要来源，但是它们在生产、运输和加工过程中易受到病原菌的污染，尤其是结核分枝杆菌。有研究发现分别从尼泊尔、西班牙和巴西的市售牛奶、生牛奶、牛肺组织和某些起淋巴结组织中检测出牛型结核分枝杆菌等多种分枝杆菌。参见 Vijay 等, J Vet Med Sci., 69, 819 (2007) ;Gutiérrez 等, Vet Herit., 29, 41 (2006) ;Clarice 等, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro., 98, 319 (2003)。还有文献表明，一般的巴氏消毒和瞬间高温消毒不能彻底杀灭结核分枝杆菌。参见 Cvetnic Z 等, Int J Tuberc Lung Dis., 11, 652 (2007)。人类食用这些被结核杆菌污染的牛奶可导致肺外结核，临床上的大部分肺外结核患者是因为食用或饮用被结核杆菌污染的牛奶或其它食物 [2]。近年来，由于耐药菌株的出现，结核病人的临床治疗效果下降。所以，针对这类疾病的预防除了接种疫苗外，更重要的是切断传染源，减少病原菌的接触机会，故必需加强结核杆菌的检测，特别是加强对牛奶这类易被结核杆菌污染的食物的检测。这对于食品安全具有非常重要的卫生学意义。

[0003] 传统检测结核杆菌的方法是涂片镜检和细菌培养。涂片镜检简单，但是检出率很低；另外，虽然结核杆菌培养是结核杆菌检验的标准方法，但是由于结核杆菌生长缓慢，生长一代需要 10-20 小时，所以细菌培养检测需要 1-2 个月，这种培养耗时、费力。随着分子生物学技术的发展，目前用于结核杆菌检测的方法还有基因芯片技术、PCR 技术等。虽然这些方法提高了结核杆菌检测的灵敏度和准确度，而且检测时间缩短了，由原来的 1-2 个月缩短到现在的数天或数小时。但是，这些方法需要一个纯培养样本，而且在测检过程要使用到难保存的 Taq 聚合酶或其它 DNA 聚合酶，并且技术难度大，操作者需要经过专门培训，大规模推广很困难。因此，急需开发灵敏度和准确度高、操作简单、能快速检测结核杆菌的新方法。

[0004] 纳米结构的生物免疫传感器是近年发展起来的一门前沿性、交叉性的新兴技术。传感技术与特异性免疫反应结合起来在检测蛋白质和核酸方面有着非常高的灵敏度。纳米材料的引入使得传感技术的灵敏度进一步提高。生物传感器将生物样品固定在电极表面，将生物的相互作用转化为电信号达到检测生物活动的目的。壳聚糖作为一种多聚体，有很好的成膜特性，对水高通透性，无毒性、生物相容性，是很好的固定抗体、酶等蛋白在电极表面的材料。纳米金掺入到修饰电极表面的成膜材料中，不但有利于电子通过起到提高灵敏度的作用，还有助于保持电极表面蛋白质的生物活性而延长电极的保存时间。

发明内容

[0005] 本发明的任务是提供一种检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器，使其具

有快速、简单、准确检测结核杆菌的特点,以克服现有结核杆菌检测方法需时太长、准确型低、操作步骤繁琐的不足。

[0006] 实现本发明的技术方案是:

[0007] 本发明提供的这种检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器,由玻碳电极、位于该玻碳电极表面的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠-壳聚糖-纳米金修饰膜和固定在该修饰膜表面的结核杆菌单克隆鼠抗体构成。

[0008] 本发明提供的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 步骤一:取玻碳电极($\Phi = 3\text{mm}$)用 $0.3\ \mu\text{m}$ 、 $0.05\ \mu\text{m}$ 的氧化铝粉抛光成镜面,超声波清洗 3min 后三蒸水冲洗,在 piranha 溶液 ($30\% \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{SO}_4 = 3 : 7$) 中浸泡 10min,然后分别用三蒸水和乙醇超声波清洗三次;

[0010] 步骤二:将经抛光清洁处理过的玻碳电极插入 0.1mg/mL 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体(羊抗鼠 IgG-ALP)、 0.5% 壳聚糖溶液和 0.8nM 纳米金(粒径 15nm) 混合溶液中,于三电极系统下给予电压恒压 $+3.0\text{V}$ 下电沉积修饰 5 分钟,电极取出后分别用 2mL 的高纯水冲洗三次,即制得碱性磷酸酶标记的羊抗鼠-壳聚糖-纳米金膜修饰的玻碳电极(羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC);

[0011] 步骤三:将步骤二制得的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠-壳聚糖-纳米金膜修饰的玻碳电极插入含有 0.1mg/mL 的结核杆菌单克隆鼠抗体磷酸缓冲溶液中,于 4°C 浸泡 10 小时,取出后用 2mL PH 为 7.4 浓度为 0.01M 磷酸盐缓冲液冲洗电极表面三次,即得到本发明提供的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器(TB 鼠抗/羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC), 4°C 储存备用。

[0012] 应用本发明提供的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器检测牛奶中结核杆菌的方法包括以下步骤:

[0013] 步骤一:按以下步骤(a)或(b)对待检测牛奶样本进行前处理:

[0014] (a) 取 10ml 待检测牛奶样品 1900g 离心 20min ,弃上清液,加入 PH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 液 5ml 混匀, 1900g 离心 10min ,弃上清液,往沉淀物中加入 0.5ml PBS,混匀备;或

[0015] (b) 对牛奶样本进行增菌培养,具体步骤为: 10ml 牛奶样品 1900g 离心 20min ,弃上清液,加入 10ml Middledbrook7H9 培养液, 37°C ,厌氧条件下培养 1-2 天。然后 1900g 离心 20min ,弃上清液,加入 PH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 液 5ml ,混匀, 1900g 离心 10min ,弃上清液,往沉淀物中加入 0.5ml PBS,混匀备用;

[0016] 步骤二:按权利要求 2 所述方法制备本发明提供的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器;

[0017] 步骤三:标准结核杆菌液的制备:选用具有免疫原性减毒活牛分支杆菌制备而来的卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin, BCG)经 Middledbrook7H9 培养液, 37°C ,厌氧条件下培养,充分混匀以 0.01M 磷酸盐缓冲液 PBS ($\text{pH} = 7.4$) 为稀释液进行 1:10 的倍比稀释,再接种于罗氏斜面培养基,计算出菌落数,调整 PBS 对 Middledbrook7H9 培养液中 BCG 菌稀释度,分别配制从 $10^2 \sim 10^7\text{cfu/mL}$ 之间不同浓度的结核杆菌 BCG 的 PBS 混悬液;

[0018] 步骤四:测试本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器(TB 鼠

抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) 的初始电流值 I_0 ;

[0019] 步骤五 : 将本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器 (TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) 分别与前述步骤制备的不同浓度结核杆菌 BCG 的 PBS 悬浮液和待测样品的 PBS 悬浮液在 37°C 培育 30 分钟 ; 然后, 测试孵育后的电极的电流值 I_p ;

[0020] 步骤六 : 用 I_0 减去 I_p 获得电流改变差值 ΔI , 以不同浓度结核杆菌 BCG 的 PBS 悬浮液与本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器反应前和反应后引起的电流值改变 ΔI 绘制标准曲线, 依标准曲线及待测样品的 PBS 悬浮液 ΔI 即得出待测样本中结核杆菌的浓度。

[0021] 以上步骤四所述的测试本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器 (TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) 的初始电流值 I_0 的具体方法是 : 以本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝为辅助电极构成的三电极系统, 5mM α - 萘磷酸的 PH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液为测试工作液, 用差分脉冲法扫描测定电流, 扫描条件为起始电压 0V、终止电压 0.6V、幅度 0.05V ; 记录在 +300mv 左右产生的氧化峰, 以此氧化峰的电流值为本发明制备的检测结核杆菌的壳聚糖 - 纳米金酶免疫传感器的初始电流值 I_0 。

[0022] 以上步骤五所述的测试孵育后的电极的电流值 I_p 的具体方法是 : 将孵育后的电极在与上述相同的测试工作液和测试条件下, 差分脉冲伏安法扫描, 记录在 +300mv 左右产生的氧化峰电流值 I_p 。

[0023] 本发明用壳聚糖凝胶、纳米金溶液和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠混合溶液经电化学沉积的方法修饰玻碳电极表面而形成纳米结构的敏感膜, 再利用抗原抗体特异性反应将结核杆菌单克隆鼠抗体固定在碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的玻碳电极表面, 制备成本发明用于检测结核杆菌的酶免疫传感器。通过差分脉冲伏安法测定修饰好的电极 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 与不同浓度结核杆菌悬浮液孵育反应前和后, 电极插入含碱性磷酸酶的底物萘磷酸的测试工作液中, 电极表面纳米敏感膜中的碱性磷酸酶即可催化底物 α - 萘磷酸, 其产生的水解产物在差分脉冲伏安法扫描下氧化峰电流改变量的大小与结核杆菌浓度相关, 采用结核杆菌减毒株卡介苗 (BCG) 绘制标准曲线, 从而可实现对被测物样品中结核杆菌的快速、准确检测。整个检测过程可在 1 小时之内完成。

[0024] 本发明制备的壳聚糖 - 纳米金的酶免疫传感器制备方法简单, 利用壳聚糖作为载体承载酶标抗体来固定结核杆菌抗体保持了抗体的生物活性 ; 结核杆菌单克隆抗体特异性的识别结核杆菌保证了检测的特异性 ; 电极修饰过程中纳米金的掺入增强了保持抗体活性的持久性, 并且在电化学方法的检测中纳米金有利于电子的传导而获得很高的灵敏度。

[0025] 该方法结合了免疫反应的高特异性、快速的特点和纳米结构敏感膜对电信号放大作用 (即高敏感性), 简化了检测步骤、缩短了检测时间、提高了方法的敏感度。与抗酸染色法相比, 本法结合了纳米结构膜的高敏感性和结核杆菌抗体的高特异性, 可以提高检测方法的敏感性以及减小假阳性现象 ; 本法不需要对待测牛奶样品进行特殊处理, 极大的缩短了检测的时间, 与聚合酶链反应 (PCR) 等方法相比, 操作更简单、步骤更少、耗时更省, 检测快速、准确。

附图说明 :

[0026] 图 1 为壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极的修饰过程和对结核杆菌的识别的原理示意图。

[0027] 图 2 为壳聚糖 - 纳米金 - 酶免疫电极 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 分别与不同浓度的结核杆菌 BCG 37℃ 培育 30min 后在含有 5mM α -萘磷酸的 pH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液工作液中的差分脉冲伏安法图 :0cfu/mL (曲线 a)、 10^3 cfu/mL (曲线 b)、 5×10^3 cfu/mL (曲线 c)、 10^4 cfu/mL (曲线 d)、 5×10^4 cfu/mL (曲线 e)、 10^5 cfu/mL (曲线 f)。嵌入图为壳聚糖 - 纳米金 - 酶免疫电极对结核杆菌 BCG 不同浓度响应值的对数校正曲线。

具体实施方式

[0028] 实施例 1

[0029] 利用壳聚糖 - 纳米金 - 酶免疫传感器来快速、准确的检测牛奶中结核杆菌

[0030] 1、牛奶样本前处理研究

[0031] 本法对牛奶样本勿需特殊处理,操作简单,10ml 牛奶样品 1,900g 离心 20min,弃上清液,加入 pH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 液 5ml 混匀,1,900g 离心 10min,弃上清液,往沉淀物中加入 0.5ml PBS,混匀备用即可。

[0032] 如为提高检出率,可对牛奶样本进行增菌培养,具体步骤为 :10ml 牛奶样品 1,900g 离心 20min,弃上清液,加入 10ml Middelbrook7H9 培养液,37℃,厌氧条件下培养 1-2 天。然后,1,900g 离心 20min,弃上清液,加入 pH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 液 5ml,混匀,1,900g 离心 10min,弃上清液,往沉淀物中加入 0.5ml PBS,混匀备用。

[0033] 2、壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极的制备

[0034] (1) 玻碳电极的预处理 :玻碳电极 ($\Phi = 3\text{mm}$) 在修饰前经 $0.3\ \mu\text{m}$ 、 $0.05\ \mu\text{m}$ 的氧化铝粉抛光成镜面,超声波清洗 3min 后三蒸水冲洗,在 piranha 溶液 (30% H_2O_2 : $\text{H}_2\text{SO}_4 = 3 : 7$) 中浸泡 10min,然后分别用三蒸水和乙醇超声波清洗三次。

[0035] (2) 制备碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的玻碳电极 (羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) :将处理好清洁的玻碳电极插入 5ml 含 0.2mg/mL 羊抗鼠 IgG-ALP、和 0.8nM 纳米金 (粒径 15nm) 的 0.5% 壳聚糖溶液中。以该电极为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝电极为辅助电极构成的三电极系统下,利用电化学工作站的恒压法给予电压 +3.0V 下电沉积修饰 5 分钟,此步修饰好后的玻碳电极为羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC,取出后用 2ml 高纯水冲洗 3 次。

[0036] (3) 固定结核杆菌单克隆鼠抗体在碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的电极上 (TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) :将 5 μL 浓度为 0.1mg/mL 的结核杆菌单克隆鼠抗体溶液 (用 pH 为 7.4 浓度为 0.01M 磷酸盐缓冲液稀释) 滴加于电极羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 表面,置 37℃ 湿盒 1h,取出后用 2ml pH 为 7.4 浓度为 0.01M 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,以冲掉结合不稳定的抗体,4℃ 储存备用。

[0037] 3、标准结核杆菌液的制备

[0038] 选用具有免疫原性减毒活牛分支杆菌制备而来的卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 经 Middelbrook7H9 培养液,37℃,厌氧条件下培养,充分混匀以 0.01M 磷酸盐缓冲液 PBS (pH = 7.4) 为稀释液进行 1 : 10 的倍比稀释,再接种于罗氏斜面培养基,计算出菌落数。调整 PBS 对 Middelbrook7H9 培养液中 BCG 菌稀释度,分

别配制从 $10^2 \sim 10^7$ cfu/mL 之间不同浓度的结核杆菌 BCG 的 PBS 混悬液。

[0039] 4、测试方法

[0040] (1) 测试壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极 (TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) 初始电流值 I_0 : 以 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝为辅助电极构成的三电极系统, 5mM α -萘磷酸的 PH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液为测试工作液, 用差分脉冲法扫描测定电流, 扫描条件为起始电压 0V、终止电压 0.6V、幅度 0.05V。TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 上的碱性磷酸酶 (ALP) 可以催化测试工作液中的 α -萘磷酸产生的水解产物在 +300mv 左右产生氧化峰, 记录下此氧化峰的电流为测定结核杆菌前的初始电流值 I_0 。

[0041] (2) TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 对结核杆菌的识别: 利用以结核杆菌细胞壁抗原为免疫原的结核杆菌抗体对结核杆菌具有高特异性的识别能力这一特性, 将 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 分别与不同浓度结核杆菌 BCG 的 PBS 悬浮液和待测样品的 PBS 悬浮液在 37°C 培育 30 分钟, 孵育后的电极为 TB/TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC。

[0042] (3) 测试壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极与结核杆菌孵育后 TB/TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 的电流值 I_p : TB/TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 在上述测试工作液和测试条件下, 差分脉冲伏安法扫描测得 I_p 值。由于结核杆菌即与结核杆菌抗体结合, 使得电极表面膜的厚度增加, 阻碍电子通过达到电极表面, 电极纳米结构膜中的碱性磷酸酶催化底物 α -萘磷酸产生的水解产物在 +300mv 左右产生氧化峰电流减小。

[0043] (4) 计算壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极与结核杆菌反应前和后电流值的改变, 并绘制标准曲线获得待检样品结核杆菌浓度: 用 I_0 减去 I_p 获得电流改变差值 ΔI , ΔI 改变的大小与结核杆菌浓度相关, 由此以不同浓度的结核杆菌 BCG 与 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 反应前和后引起的电流值改变 ΔI 绘制标准曲线, 从而可计算得出待测样本中结核杆菌的浓度。

[0044] 实施例 2

[0045] 利用壳聚糖 - 纳米金 - 酶免疫传感器来快速、准确的检测混合细菌体系 (同时含有大肠杆菌和结核杆菌) 中的结核杆菌:

[0046] 1、含混合细菌的牛奶样本的制备: 取 10mL 灭菌消毒处理过的牛奶样品, 1,900g 离心 20min, 弃上清液, 然后加入含浓度为 10^3 cfu/mL 结核杆菌和 10^7 cfu/mL 大肠杆菌 PH 为 7.4 浓度为 0.01M 的 PBS 悬浮液 5mL 混匀, 1,900g 离心 10min, 弃上清液, 往沉淀物中加入 0.5mL PBS, 混匀备用即可。

[0047] 2、壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极的制备

[0048] (1) 玻碳电极的预处理: 玻碳电极 ($\phi = 3$ mm) 在修饰前经 $0.3 \mu\text{m}$ 、 $0.05 \mu\text{m}$ 的氧化铝粉抛光成镜面, 超声波清洗 3min 后三蒸水冲洗, 在 piranha 溶液 (30% H_2O_2 : $\text{H}_2\text{SO}_4 = 3 : 7$) 中浸泡 10min, 然后分别用三蒸水和乙醇超声波清洗三次。

[0049] (2) 制备碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的玻碳电极 (羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC): 将处理好清洁的玻碳电极插入 5mL 含 0.2mg/mL 羊抗鼠 IgG-ALP、和 0.8nM 纳米金 (粒径 15nm) 的 0.5% 壳聚糖溶液中。以该电极为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝电极为辅助电极构成的三电极系统下, 利用电化学工作站的恒压法给予电压 +3.0V 下电沉积修饰 5 分钟, 此步修饰好后的玻碳电极为羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC, 取出

后用 2ml 高纯水冲洗 3 次。

[0050] (3) 固定结核杆菌单克隆鼠抗体在碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 - 壳聚糖 - 纳米金膜修饰的电极上 (TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) : 将 5 μ L 浓度为 0.1mg/mL 的结核杆菌单克隆鼠抗体溶液 (用 PH 为 7.4 浓度为 0.01M 磷酸盐缓冲液稀释) 滴加于电极羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 表面, 置 37 $^{\circ}$ C 湿盒 1h, 取出后用 2mL PH 为 7.4 浓度为 0.01M 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 以冲掉结合不稳定的抗体, 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0051] 3、标准结核杆菌液的制备

[0052] 选用具有免疫原性减毒活牛分支杆菌制备而来的卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 经 Middledbrook 7H9 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 厌氧条件下培养, 充分混匀以 0.01M 磷酸盐缓冲液 PBS (pH = 7.4) 为稀释液进行 1 : 10 的倍比稀释, 再接种于罗氏斜面培养基, 计算出菌落数。调整 PBS 对 Middledbrook 7H9 培养液中 BCG 菌稀释度, 分别配制从 $10^2 \sim 10^7$ cfu/mL 之间不同浓度的菌液。

[0053] 4、测试方法

[0054] (1) 测试壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极 (TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC) 初始电流值 I_0 : 以 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极和铂丝为辅助电极构成的三电极系统, 5mM α - 萘磷酸的 PH 为 8 的 Tris-HCl 缓冲液为测试工作液, 用差分脉冲法扫描测定电流, 扫描条件为起始电压 0V、终止电压 0.6V、幅度 0.05V。TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 上的碱性磷酸酶 (ALP) 可以催化测试工作液中的 α - 萘磷酸产生的水解产物在 +300mv 左右产生氧化峰, 记录下此氧化峰的电流为测定结核杆菌前的初始电流值 I_0 。

[0055] (2) TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 对结核杆菌的识别 : 利用以结核杆菌细胞壁抗原为免疫原的结核杆菌抗体对结核杆菌具有高特异性的识别能力这一特性, 将 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 分别与不同浓度结核杆菌 BCG 的 PBS 悬浮液和待测样品的 PBS 悬浮液在 37 $^{\circ}$ C 培育 30 分钟, 孵育后的电极为 TB/TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC。

[0056] (3) 测试壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极与结核杆菌孵育后 TB/TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 的电流值 I_p : TB/TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 在上述测试工作液和测试条件下, 差分脉冲伏安法扫描测得 I_p 值。由于结核杆菌即与结核杆菌抗体结合, 使得电极表面膜的厚度增加, 阻碍电子通过达到电极表面, 电极纳米结构膜中的碱性磷酸酶催化底物 α - 萘磷酸产生的水解产物在 +300mv 左右产生氧化峰电流减小。

[0057] (4) 计算壳聚糖 - 纳米金的酶免疫电极与结核杆菌反应前和后电流值的改变, 并绘制标准曲线获得待检样品结核杆菌浓度 : 用 I_0 减去 I_p 获得电流改变差值 ΔI , ΔI 改变的大小与结核杆菌浓度相关, 由此以不同浓度的结核杆菌 BCG 与 TB 鼠抗 / 羊抗鼠 IgG-ALP/Ch/Au/GC 反应前和后引起的电流值改变 ΔI 绘制标准曲线, 从而可计算得出待测样本中结核杆菌的浓度。

[0058] 结果表明在有大肠杆菌的干扰下, 仍然可以准确的检出结核杆菌的浓度, 说明此方法对结核杆菌的识别是高特异的。

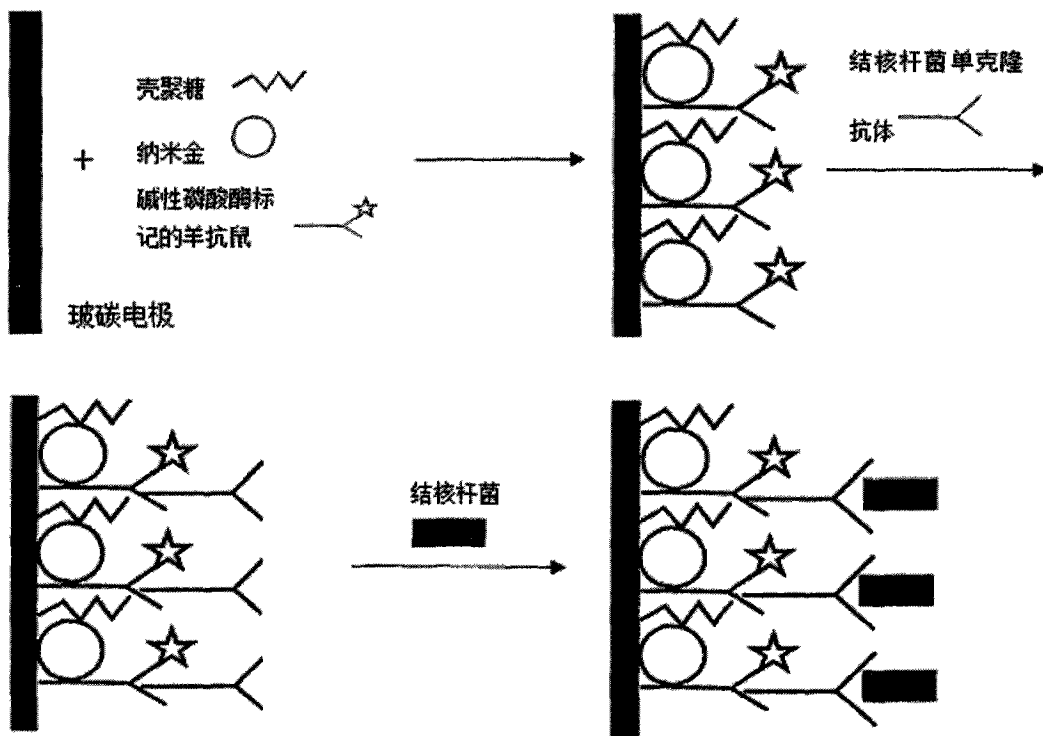


图 1

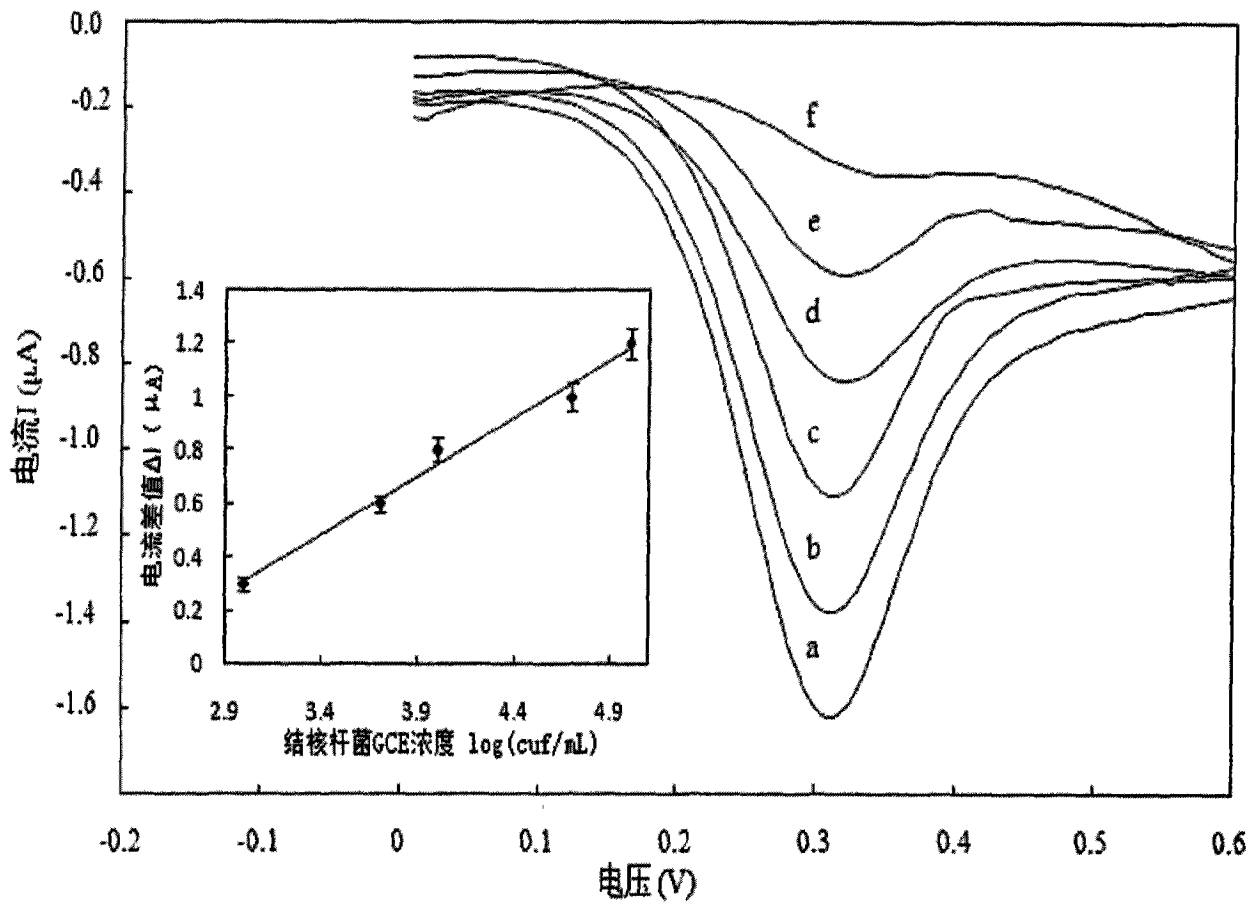


图 2

专利名称(译)	检测结核杆菌的壳聚糖-纳米金酶免疫传感器及其应用		
公开(公告)号	CN102087283B	公开(公告)日	2013-07-24
申请号	CN200910273095.3	申请日	2009-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
[标]发明人	徐顺清 夏纬 李媛媛 许冰		
发明人	徐顺清 夏纬 李媛媛 许冰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N27/327 G01N33/04 C12N1/20		
代理人(译)	夏惠忠		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102087283A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种基于壳聚糖和纳米金的酶免疫传感器，利用结核分支杆菌细胞壁的单克隆抗体能特异的结合结核杆菌，可用于快速检测牛奶中结核杆菌。其特点是用壳聚糖凝胶、纳米金溶液和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体混合溶液经电化学沉积法来修饰玻碳电极表面，再利用抗原抗体特异性反应将结核杆菌单克隆鼠抗体固定在碱性磷酸酶标记的羊抗鼠-壳聚糖-纳米金膜修饰的玻碳电极表面，制备用于检测结核杆菌的酶免疫传感器。通过差分脉冲伏安法测定修饰好的电极与结核杆菌孵育反应前后引起的电信号改变进行定量分析。该传感器制备方法简单，具有灵敏度高、检测时间短，操作简单等优点，是一种可快速检测结核杆菌的方法。

