



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410065175.7

[43] 公开日 2005 年 4 月 6 日

[11] 公开号 CN 1603832A

[22] 申请日 2004.10.29

[21] 申请号 200410065175.7

[71] 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

[72] 发明人 唐祖明 陆祖宏 郁颖蕾 史智扬

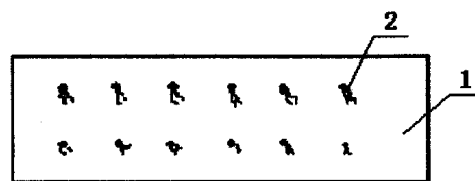
[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司
代理人 陆志斌

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称 致病性细菌免疫检测芯片及其制备方法

[57] 摘要

本发明所述产品是一种致病性细菌免疫检测芯片，包括：载体，在载体上通过设在其上的含氨基或醛基的化学基团固定互不相同的细菌抗体，且相同的细菌抗体按阵列排列在载体上。上述芯片的制备方法，先取载玻片并将其清洗，再将清洗好的载玻片浸入含有 0.1 - 10.0% 氨基丙基三甲氧基硅烷的 95% 丙酮/水的溶液 3 - 30 分钟，取出后，载玻片用丙酮洗 2 - 6 遍，每次 1 - 5 分钟，再用去离子蒸馏水冲洗 1 - 5 遍，每次 1 - 5 分钟，再在 60 - 180℃ 下烘干，使载玻片表面的硅烷化，然后，在载玻片表面修饰氨基或醛基，最后，将致病性细菌抗体按阵列设置在载玻片上，并将其置于 0℃ - 55℃ 潮湿环境中存放 0.1 - 72 小时后取出，用 pH4.0 - 10，离子浓度 0.00 - 0.75m/L 的缓冲液清洗 1 - 5 遍。



1. 一种致病性细菌免疫检测芯片, 包括: 载体 (1), 其特征在于: 在载体上通过设在其上的含氨基或醛基的化学基团固定互不相同的细菌抗体 (2), 且相同的细菌抗体按阵列排列在载体上。

2、一种用于制造权利要求 1 所述芯片的制备方法, 其特征在于先取载玻片并将其清洗, 再将清洗好的载玻片浸入含有 0.1—10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷的 95%丙酮/水的溶液 3—30 分钟, 取出后, 载玻片用丙酮洗 2—6 遍, 每次 1—5 分钟, 再用去离子蒸馏水冲洗 1—5 遍, 每次 1—5 分钟, 再在 60—180° C 下烘干, 使载玻片表面的硅烷化, 然后, 在载玻片表面修饰氨基或醛基, 最后, 将致病性细菌抗体按阵列设置在载玻片上, 并将其置于 0°C—55°C 潮湿环境中存放 0.1—72 小时后取出, 用 pH4.0—10, 离子浓度 0.00—0.75m/L 的缓冲液清洗 1—5 遍。

3、根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于载玻片的清洗是用水清洗干净, 放入由过氧化氢和浓硫酸体积比为 1: 2 组成的混合液中, 浸泡 0.5—3.0 小时。然后用去离子水或蒸馏水冲洗 2—6 遍, 再用去离子水或蒸馏水煮沸 2—30 分钟; 在氮 (或其它惰性气体) 气流下吹干。

4、根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于在载玻片上修饰醛基是将硅烷化后的载玻片放入含 1%—10%戊二醛的 PB 溶液 (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 中, 在室温下浸泡 0.1—10 小时, 取出后先用 PB (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 洗 2—6 次, 然后用去离子蒸馏水冲洗 3 遍, 用氮气吹干, 置于 4° C 保存备用。

5、根据权利要求 2 所述的制备方法, 其特征在于在载玻片上修饰氨基采用如下方法:

(1) 配置 0.5—3.0g 的琼脂糖加至 100ml 的双蒸水配成琼脂糖溶液, 完全混合微波炉煮沸 2—10 分钟;

(2) 将 1—5 ml 琼脂糖溶液覆盖在 60° C 左右预热的硅烷化后的载玻片上;

(3) 琼脂糖凝固后, 载玻片在 10—120° C 下过夜干燥。可室温干燥条件下保存;

(4) 在使用之前, 将含琼脂糖膜的载玻片浸入 0.1—100mM 的 NaIO₄ 溶液, 室温下放置 0.05—6.00 小时, 取出再用双蒸水彻底冲洗干净, 并用氮气流干燥, 于室温或低温干燥保存。

致病性细菌免疫检测芯片及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种用于检测粪便、土壤、水、食品、发酵材料等以及水、环境中致病性细菌的致病性细菌免疫检测芯片及其制备方法。

背景技术

致病性细菌尽管种类繁多但各种属间在形态结构等各有其特点，一般可经过不同染色方法和或通过显微镜可以得到鉴定。目前细菌检验有生化培养方法该方法优点是检测到的细菌结果可靠，缺点是检测所化时间很长，在细菌培养过程中可能会有些菌之间会发生抑制而影响检测结果可靠性，探针标记的免疫方法；检测结果可靠，缺点是探针标记较贵而且一种探针只能检测一种细菌，工作量大；pcr 基因扩增可以对一些特殊细菌有针对性检测但需设计引物，不但费时而且较贵同时还会出现假阳性。如肠道致病菌大肠杆菌 O157、O139 型霍乱、伤寒、痢疾等感染引发的传染性疾病。在我国不仅流行地域广、群体发病率高而且亦有较高的死亡率，严重影响人民群众的身心健康，每年为此类疾病的防治国家要投入大量人力、物力，所以对此疾病的防治受到社会各界的重视。目前国内外在分子水平上对肠道致病菌的检测方法是先培养筛选然后用基因扩增的方法经凝胶电泳分析进行快速检测。基因水平上通过检测目的基因如 rfbE、flicH7 等特异性序列来检测鉴定大肠杆菌 O157:H7；通过检测目的基因如 ctxA、Hly、TcpA 毒力基因等来检测 O139 型霍乱弧菌。其它的检测方法也有一些报道，比如通过检测不同微生物的特异性 16S rRNA 来鉴定这些不同的微生物，这些方法存在假阳性高、费时费力等技术缺陷。

发明内容

本发明在于提出一种快速、准确的用于对粪便、土壤、水、植物种子、食品、发酵材料中的致病性细菌进行检测的致病性细菌免疫检测芯片及其制备方法，本发明可实现高通量检测。

本发明采用如下技术方案：

本发明所述产品是一种致病性细菌免疫检测芯片，包括：载体，在载体上通过设在其上的含氨基或醛基的化学基团固定互不相同的细菌抗体，且相同的细菌抗体按阵列排列在载体上。

本发明所述方法是一种用于制造致病性细菌免疫检测芯片的制备方法，先

取载玻片并将其清洗，再将清洗好的载玻片浸入含有 0.1—10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷的 95%丙酮/水的溶液 3—30 分钟，取出后，载玻片用丙酮洗 2—6 遍，每次 1—5 分钟，再用去离子蒸馏水冲洗 1—5 遍，每次 1—5 分钟，再在 60—180° C 下烘干，使载玻片表面的硅烷化，然后，在载玻片表面修饰氨基或醛基，最后，将致病性细菌抗体按阵列设置在载玻片上，并将其置于 0℃—55℃ 潮湿环境中存放 0.1—72 小时后取出，用 pH4.0—10，离子浓度 0.00—0.75m/L 的缓冲液清洗 1—5 遍。

与现有技术相比，本发明具有如下优点：

本发明利用活细菌表面完整的抗原或受体，可以特异地与修饰在固相载体（使用的载体可以是聚苯乙烯，纤维膜，玻璃，微孔板，PVDF 膜中的一种，载体的表面经过化学修饰，可以用戊二醛修饰法，聚赖氨酸修饰法，多糖修饰法，BSA-NHS 修饰法，水凝胶修饰法其中的一种。）表面的抗体结合的原理，将对被检测的样本作出评价。对样品可直接检测，不需要进行预处理、分离、培养。同时检测一个样品中各种细菌，不需分别对每一种细菌分离，只需将样品上清液加到修饰有抗体的载体上，孵育 10—50 分钟，即可根据各点所对应的抗体上结合的细菌而判定细菌种类，对样品含细菌情况作出正确评价。本方法结果不仅可以检测样品中有无细菌而且还可以同时报告出样品中含有多少种细菌，不需要再进行菌种鉴定。结果可靠而且省时省力。

附图说明

图 1 是本发明结构示意图。

具体实施方式

实施例 1

1. 载玻处理

1) 载玻片清洗

取载玻片用水清洗干净，放入由 1/3 过氧化氢和 2/3 浓硫酸组成的溶液中，浸泡 0.5—3.0 小时。然后用去离子水或蒸馏水冲洗 2—6 遍，再用去离子水或蒸馏水煮沸 2—30 分钟；在氮气流下干燥，于干燥处保存备用。

(1) 载玻片表面的氨基硅烷化

清洗好的载玻片浸入含有 0.1—10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane) 的 95%丙酮/水的溶液 3—30 分钟，取出后，玻片用丙酮洗 2—6 遍，每次 1—5 分钟，再用去离子蒸馏水冲洗 1—5 遍，每次 1—5 分钟，最后在 60—180° C 下烘干，置于干燥处保存。

(2) 载玻片表面的醛基修饰

将硅烷化后的载玻片放入含 1%—10%戊二醛的 PB 溶液 (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 中，在室温下浸泡 0.1—10 小时，取出后先用 PB (0.001—0.150M

pH4.5—11.0)洗2—6次,然后用去离子蒸馏水冲洗3遍,用氮气吹干,置于4°C保存备用。

(3) 载. 玻片表面的氨基修饰

(1) 取0.5—3.0g的琼脂糖加至100ml的双蒸水配成琼脂糖溶液,完全混合微波炉煮沸2—10分钟;

(2) 将1—5 ml 琼脂糖溶液覆盖在60°C左右加在载玻片上;

(3) 琼脂糖凝固后,载玻片在10—120°C下过夜干燥。可室温干燥条件下保存;

(4) 在使用之前,将含琼脂糖膜的载玻片浸入0.1—100mM的NaIO₄溶液,室温下放置0.05—6.00小时,再用双蒸水彻底冲洗干净,并用氮气流干燥,于室温或低温干燥保存。

在以上修饰有化学基因的载体上用手工或用点样仪点上相应的抗体(球菌、杆菌等各种致病性细菌)。置于0°C—55°C潮湿环境中(将载体放在潮湿盒子内)内存放0.1—72小时后取出载体,用pH4.0—10,离子浓度0.00—0.75m/L的缓冲液清洗1—5遍。以除去载体上未结合的抗体。即可用各种致病细菌检测或吹干避光保存备用。

2、待检样品处理 取待检样品(粪便、土壤、植物种子、食品、发酵材料)1—5g粉碎加缓冲液1—50ml溶解混匀过滤或200—800转离心除去大颗粒,溶液备用,水、尿等样品可直接用于检测。

3、取出1置备好的载玻片,加上0.5—5ml样品液,在2°C—60°C放置潮湿环境中0.1—72小时,取出后用缓冲液冲洗,除去未结合的游离xj。然后在显微镜或CCD上观察或染色观察各点结合细菌情况以确定该样品中含哪些细菌。

实施例2

本发明所述产品是一种致病性细菌免疫检测芯片,包括:载体1,在载体上通过设在其上的含氨基或醛基的化学基团固定互不相同的细菌抗体2,且相同的细菌抗体按阵列排列在载体上。

实施例3

本发明所述方法是一种用于制造致病性细菌免疫检测芯片的制备方法,先取载玻片并将其清洗,再将清洗好的载玻片浸入含有0.1—10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷的95%丙酮/水的溶液3—30分钟,取出后,载玻片用丙酮洗2—6遍,每次1—5分钟,再用去离子蒸馏水冲洗1—5遍,每次1—5分钟,再在60—180°C下烘干,使载玻片表面的硅烷化,然后,在载玻片表面修饰氨基或醛基,最后,将致病性细菌抗体按阵列设置在载玻片上,并将其置于0°C—55°C潮湿环境中存放0.1—72小时后取出,用pH4.0—10,离子浓度0.00—0.75m/L的缓冲液清洗1—5遍,上述载玻片的清洗是用水清洗干净,放入由过氧化氢和浓硫

酸体积比为 1: 2 组成的混合液中, 浸泡 0.5—3.0 小时。然后用去离子水或蒸馏水冲洗 2—6 遍, 再用去离子水或蒸馏水煮沸 2—30 分钟; 在氮 (或其它惰性气体) 气流下吹干; 在载玻片上修饰醛基是将硅烷化后的载玻片放入含 1%—10% 戊二醛的 PB 溶液 (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 中, 在室温下浸泡 0.1—10 小时, 取出后先用 PB (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 洗 2—6 次, 然后用去离子蒸馏水冲洗 3 遍, 用氮气吹干, 置于 4° C 保存备用; 在载玻片上修饰氨基采用如下方法:

(1) 配置 0.5—3.0g 的琼脂糖加至 100ml 的双蒸水配成琼脂糖溶液, 完全混合微波炉煮沸 2—10 分钟;

(2) 将 1—5 ml 琼脂糖溶液覆盖在 60° C 左右预热的硅烷化后的载玻片上;

(3) 琼脂糖凝固后, 载玻片在 10—120° C 下过夜干燥。可室温干燥条件下保存;

(4) 在使用之前, 将含琼脂糖膜的载玻片浸入 0.1-100mM 的 NaIO₄ 溶液, 室温下放置 0.05-6.00 小时, 取出再用双蒸水彻底冲洗干净, 并用氮气流干燥, 于室温或低温干燥保存。

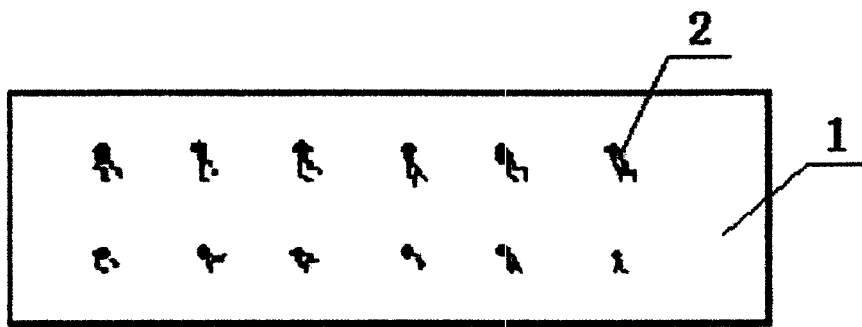


图 1

专利名称(译)	致病性细菌免疫检测芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN1603832A	公开(公告)日	2005-04-06
申请号	CN200410065175.7	申请日	2004-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	唐祖明 陆祖宏 郁颖蕾 史智扬		
发明人	唐祖明 陆祖宏 郁颖蕾 史智扬		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
代理人(译)	陆志斌		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明所述产品是一种致病性细菌免疫检测芯片，包括：载体，在载体上通过设在其上的含氨基或醛基的化学基团固定互不相同的细菌抗体，且相同的细菌抗体按阵列排列在载体上。上述芯片的制备方法，先取载玻片并将其清洗，再将清洗好的载玻片浸入含有0.1 - 10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷的95%丙酮/水的溶液3 - 30分钟，取出后，载玻片用丙酮洗2 - 6遍，每次1 - 5分钟，再用去离子蒸馏水冲洗1 - 5遍，每次1 - 5分钟，再在60 - 180°C下烘干，使载玻片表面的硅烷化，然后，在载玻片表面修饰氨基或醛基，最后，将致病性细菌抗体按阵列设置在载玻片上，并将其置于0°C - 55°C潮湿环境中存放0.1 - 72小时后取出，用pH4.0 - 10，离子浓度0.00 - 0.75m/L的缓冲液清洗1 - 5遍。

