



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752562 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201810562853.2

(22)申请日 2018.06.04

(71)申请人 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所

地址 130122 吉林省长春市净月开发区柳莺西路666号

(72)发明人 万家余 王奎宇 卜胜君 刘文森

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理有限公司 22214

代理人 于晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/76(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

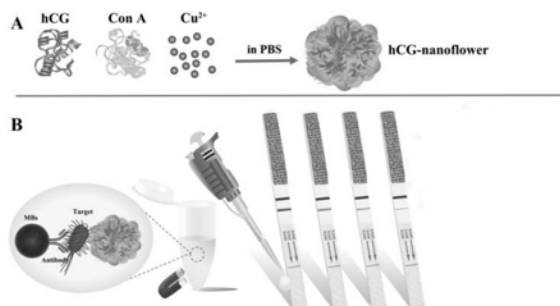
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用

(57)摘要

一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用,属于食源性致病菌快速检测领域。本发明的一种靶标食源性病菌的检测方法采用hCG-纳米花传感器体系实现,将修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体固定在标记链霉亲和素SA的磁珠上;加入待测样品37℃恒温孵育2h,用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后吸干;加入hCG-纳米花,在靶标食源性病原菌存在时磁珠上的靶标抗体与hCG-纳米花之间形成三明治夹心免疫复合物;采用商用一次性早孕试纸条作为信号读取方式,手机拍摄图片并利用Image J软件对其检测线颜色的强弱进行计算实现靶标食源性病菌浓度的测定。本发明操作简单、成本低廉、灵敏度高、特异性好。



1. 一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花, 其特征在于, 其组成成分为: 人体绒毛膜促性腺激素hCG、刀豆蛋白ConA、CuSO₄和磷酸盐缓冲液PBS。

2. 制备权利要求1所述的一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

取1.5mL离心管, 依次加入10~100μL、5~15μg/mLhCG、0.1~0.5mg刀豆蛋白ConA悬浮于800~1500μL、10mM的磷酸盐缓冲液PBS中, 所述磷酸盐缓冲液PBS中含有20μL、120mM的CuSO₄, 经震荡混匀、常温静置孵育12~24h后, 10000rpm离心3~5min, 弃上清后加入100μL、0.1mM的磷酸盐缓冲液PBS悬浮, 4℃保存备用。

3. 含有权利要求1所述的一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花的人体绒毛膜促性腺激素纳米花传感器体系。

4. 根据权利要求3所述的人体绒毛膜促性腺激素纳米花传感器体系, 其特征在于, 该体系包括修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体、链霉亲和素SA标记的磁珠、人体绒毛膜促性腺激素-纳米花, 用于检测靶标食源性病菌。

5. 采用权利要求3或4所述的人体绒毛膜促性腺激素纳米花传感器体系检测靶标食源性病菌的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、制备修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体;

步骤二、将修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体固定在链霉亲和素SA标记的磁珠上;

步骤三、加入待测样品, 37℃恒温孵育2h进行磁性分离, 用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后吸干;

步骤四、加入人体绒毛膜促性腺激素-纳米花, 在靶标食源性病原菌存在时, 磁珠上的食源性病原菌抗体与人体绒毛膜促性腺激素-纳米花之间形成三明治夹心免疫复合物;

步骤五、通过商用一次性早孕检测试纸条作为信号输出平台对靶标食源性病菌进行检测, 并利用其检测线颜色深浅计算实现靶标食源性病菌浓度的测定。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 步骤二的具体过程为:

将1~10μL链霉亲和素SA标记的磁珠原液置于离心管中, 用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后, 加入5~15μL、0.1mg/mL的修饰生物素Biotin的靶标病原菌抗体, 37℃孵育1~2h, 然后用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次, 置于磷酸盐缓冲液PBS中混合均匀, 得到终产物, 4℃保存备用。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 步骤四的具体过程为:

加入2~10μLhCG-纳米花, 37℃恒温孵育1h进行磁性分离, 用0.1mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次, 使其悬浮于10μL磷酸盐缓冲液PBS中, 得到三明治夹心免疫复合物。

8. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 所述链霉亲和素SA标记的磁珠粒径为2.8μm, 浓度为10mg/mL。

9. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 所述磷酸盐缓冲液PBS的pH为7.4, 其组成成分为: 0.1mMNa₂HPO₄和0.1mMNaH₂PO₄。

一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食源性致病菌快速检测技术领域,具体涉及一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 近几年,食品安全问题得到了愈加广泛的关注,在所有食源性疾病致病因素包括微生物因素、化学物理以及有毒动植物因素中,微生物因素是最重要的致病因素,高居第一位。食源性病原菌作为一种常见微生物,分布极为广泛,是影响食品安全的最重要的因素之一。因此,开展食源性致病菌的快速检测研究势在必行。

[0003] 目前用于检测鉴定食源性致病菌的方法主要包括传统的分离鉴定检测方法,免疫学方法及分子生物学检测方法。传统培养方法如平板划线法,由于操作繁琐、所需时间长、低灵敏度等原因,已经无法满足现代检测工作中对快速便捷检测的要求。酶联免疫法(ELISA)方法容易污染,检测灵敏度受抗原-抗体结合能力影响,且需要制备高效抗体。常用的聚合酶链式反应技术(PCR),具有较好的灵敏性,但是PCR技术需要反复的变温加热,所需仪器复杂,对操作人员技术要求较高。随着现代食品卫生及检测速度的发展要求,对食源性致病菌的检测手段要求操作简便、灵敏快速、适应性强,显然上述方法已不能满足这些要求。

[0004] 自纳米技术问世以来,因其具有制备简单、价格低廉、使用寿命长及对环境要求低等优点,通常可以结合不同生物技术,提高生物传感器的灵敏度,是影响最深远的重大科技进展之一。在食品监测以及人类环境生活等领域中显示了独特的优势并得到了广泛的应用。

[0005] 2012年Ge等首次发现蛋白质与无机金属盐类可以自组装形成花状的有机无机杂化纳米结构,称为纳米花。研究发现与纳米花杂化的酶同游离酶相比,杂化纳米花在酶的活性与稳定性方面表现出更加稳定优越的性能,同时作者对其形成机理做了初步探究。杂化纳米花结构一经发现,便引起了研究人员的高度关注。目前纳米花已经成功运用于多种领域,如生物传感器、生物分析、生物医药、污水处理等,但其应用范围及对象有待进一步开拓创新。因此,开发新型纳米花,在生物监测应用等领域具有广阔的应用前景。

发明内容

[0006] 为了解决传统检测食源性致病菌传感器存在的成本高、设计复杂的问题,本发明提供一种操作简单、成本低廉、实用性强、灵敏度高、特异性好的一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用。

[0007] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0008] 本发明的一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花,其组成成分为:人体绒毛膜促性腺激素hCG、刀豆蛋白ConA、CuSO₄和磷酸盐缓冲液PBS。

[0009] 本发明还提供了一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 取1.5mL离心管,依次加入10~100μL、5~15μg/mLhCG、0.1~0.5mg刀豆蛋白ConA

悬浮于800~1500 μ L、10mM的磷酸盐缓冲液PBS中,所述磷酸盐缓冲液PBS中含有20 μ L、120mM的CuSO₄,经震荡混匀、常温静置孵育12~24h后,10000rpm离心3~5min,弃上清后加入100 μ L、0.1mM的磷酸盐缓冲液PBS悬浮,4℃保存备用。

[0011] 本发明还提供了一种含有人体绒毛膜促性腺激素-纳米花的人体绒毛膜促性腺激素纳米花传感器体系。

[0012] 作为优选的实施方式,该人体绒毛膜促性腺激素纳米花传感器体系包括修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体、链霉亲和素SA标记的磁珠、人体绒毛膜促性腺激素-纳米花,用于检测靶标食源性病菌。

[0013] 本发明还提供了一种采用人体绒毛膜促性腺激素纳米花传感器体系检测靶标食源性病菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0014] 步骤一、制备修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体;

[0015] 步骤二、将修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体固定在链霉亲和素SA标记的磁珠上;

[0016] 步骤三、加入待测样品,37℃恒温孵育2h进行磁性分离,用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后吸干;

[0017] 步骤四、加入人体绒毛膜促性腺激素-纳米花,在靶标食源性病原菌存在时,磁珠上的食源性病原菌抗体与人体绒毛膜促性腺激素-纳米花之间形成三明治夹心免疫复合物;

[0018] 步骤五、通过一次性早孕检测试纸条作为信号输出平台对靶标食源性病菌进行检测,并利用其检测线颜色深浅计算实现靶标食源性病菌浓度的测定。

[0019] 作为优选的实施方式,步骤二的具体过程为:

[0020] 将1~10 μ L链霉亲和素SA标记的磁珠原液置于离心管中,用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后,加入5~15 μ L、0.1mg/ml的修饰生物素Biotin的靶标病原菌抗体,37℃孵育1~2h,然后用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次,置于磷酸盐缓冲液PBS中混合均匀,得到终产物,4℃保存备用。

[0021] 作为优选的实施方式,步骤四的具体过程为:

[0022] 加入2~10 μ L人体绒毛膜促性腺激素-纳米花,37℃恒温孵育1h进行磁性分离,用0.1mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次,使其悬浮于10 μ L磷酸盐缓冲液PBS中,得到三明治夹心免疫复合物。

[0023] 作为优选的实施方式,所述链霉亲和素SA标记的磁珠粒径为2.8 μ m,浓度为10mg/mL。

[0024] 作为优选的实施方式,所述磷酸盐缓冲液PBS的pH为7.4,其组成成分为:0.1mM Na₂HPO₄和0.1mM NaH₂PO₄。

[0025] 发明原理:如图1所示,本发明利用刀豆蛋白(ConA)和人体绒毛膜促性腺激素(hCG)通过一步法合成hCG-纳米花。ConA作为一种凝集素,具有识别细菌表面糖蛋白功能,可与靶标细菌细胞膜糖蛋白专一结合,利用这种特性,可成功识别分离食源性致病菌靶标。hCG可结合家用一次性早孕试纸条,将其合成一种可识别致病菌特性的纳米聚合物:hCG-纳米花,可以有效与家用一次性早孕试纸条结合,且对外界条件敏感度低。利用本发明的hCG-纳米花作为信号输出平台,并结合一次性家用早孕试纸条作为信号读取方式,用于食源性致病菌大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的灵敏检测,最低检测限分别可达4.30cfu/mL及3.32cfu/

mL。

[0026] 本发明的有益效果是：本发明基于商用一次性早孕试纸条结合hCG-纳米花传感器技术来测定食源性致病菌：大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌，具有以下优点：

[0027] (1) 利用家庭医用常见一次性早孕试纸条作为信号输出平台，其检测线颜色深浅对靶标病原菌进行定量及定性检测，具有检测灵敏度高、成本低廉、实用性强等优势，可实现快速低浓度食源性致病菌：大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的检测分析。

[0028] (2) 通过一步法合成hCG-纳米花，操作简便，具有良好的稳定性及实用性，抗外界条件能力强，敏感度低。

[0029] (3) 通过磁珠的分离作用，有效消除了复杂环境的干扰，可以成功运用于实际样品牛奶中大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的检测，无需任何前期处理过程。

[0030] (4) 本发明用于食源性致病菌大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的检测方法具有较好的重现性及准确度，且特异性良好，并可以实现在牛奶等复杂环境中对大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的检测。

[0031] (5) 本发明的商用一次性早孕试纸条结合hCG-纳米花传感器对食源性病原菌的检测具有操作简便，快速，灵敏特异等优势，为今后病原菌快检提供了新的潜能。在此基础上，研究新型杂化纳米花在食源性致病菌快速检测领域的应用，并充分发挥其优势，规避传统检测方法弊端，在人类生物医学领域中具有重大的意义。

附图说明

[0032] 图1为商用一次性早孕试纸条结合hCG-纳米花对食源性病原菌可视化检测原理图。

[0033] 图2为本发明的hCG-纳米花扫描电镜 (SEM) 电镜图。

[0034] 图3为本发明商用一次性早孕试纸条结合hCG-纳米花检测方法对大肠杆菌0157:H7灵敏性分析结果图。其中，图3A为不同大肠杆菌浓度 (0cfu/mL至 10^5 cfu/mL) 对本发明检测体系的线性分析图。内置小图为不同大肠杆菌0157:H7浓度对试纸条检测线颜色的影响图。图3B不同沙门氏菌浓度 (0cfu/mL至 10^5 cfu/mL) 对本发明检测体系的线性分析图。内置小图为不同沙门氏菌浓度对试纸条检测线颜色的影响图。

[0035] 图4为本发明的检测方法特异性分析结果图。其中，图4A为对大肠杆菌0157:H7的特异性分析。图4B为对沙门氏菌的特异性分析。

具体实施方式

[0036] 以下结合实施例对本发明作进一步详细说明。下述实施例中，未进行详尽描述的试剂、方法均为常规试剂及方法。其中，所有使用的化学用品都是化学纯，所有的溶液都用超纯水配制。大肠杆菌抗体及沙门氏菌抗体从英国的艾比康生物公司购买。刀豆蛋白ConA及硫酸铜从美国奥尔德里奇公司购买、hCG购于上海医药制药有限公司，一次性早孕试纸条由北京紫竹医药有限公司购买。标记SA磁珠从美国赛默飞世尔科技公司购买。

[0037] 实施例1hCG-纳米花的制备

[0038] 取1.5mL离心管，依次加入10~100 μ L、5~15 μ g/mLhCG、0.1~0.5mg刀豆蛋白ConA悬浮于800~1500 μ L、10mM的磷酸盐缓冲液PBS中，所述磷酸盐缓冲液PBS中含有20 μ L、120mM

的CuSO₄,经震荡混匀、常温静置孵育12~24h后,10000rpm离心3~5min,弃上清后加入100μL、0.1mM的磷酸盐缓冲液PBS悬浮,4℃保存备用。

[0039] 实施例2hCG-纳米花的扫描电镜分析

[0040] 对实施例1中所获得的hCG-纳米花进行扫描电镜分析,观察其微观形态表征,结果如图2(图2A和图2B)所示,从电镜图片中可以清晰地看到hCG-纳米花的大小约为5μm,形状大多为花状球形结构,由此可以证明本发明所制备的hCG-纳米花成花形态特征明显。

[0041] 实施例3制备修饰Biotin的大肠杆菌抗体的磁珠

[0042] 将1~10μL链霉亲和素SA标记的磁珠原液置于离心管中,用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后,加入5~15μL、0.1mg/ml的修饰生物素Biotin的靶标病原菌抗体,37℃孵育1~2h,然后用0.1~0.5mM PBS缓冲液清洗3次,悬浮后,得到终产物,4℃保存备用。

[0043] 实施例5食源性致病菌-大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的制备

[0044] 利用LB培养基培养大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌。分别准确称取各成分:蛋白胨0.5g、酵母提取物0.25g、氯化钠0.5g、蒸馏水50mL;在恒温摇床37℃、180转/分振摇过夜,超净台内分装菌液,最终分别置于4℃保存备用。

[0045] 实施例6灵敏度分析

[0046] 向待检液加入在hCG-纳米花混匀常温孵育20~60min,利用商用一次性早孕试纸条检测线输出图片,手机拍照并利用电脑软件Image J对图片进行分析,利用照片中检测线颜色的深浅强弱分别对待检液进行定量测定。

[0047] 如图3A所示,验证了本发明的检测方法测定大肠杆菌0157:H7灵敏度及线性定量分析范围特性。在最佳反应条件下,靶标大肠杆菌0157:H7的浓度在10~10⁵cfu/mL范围内的线性方程为: $Y=0.04063 \times X+0.1322$ ($R^2=0.9882$);其中,Y表示检测线信号值,X表示大肠杆菌0157:H7浓度,单位为cfu/mL。该线性方程的线性范围是10¹到10⁵cfu/mL之间,根据上述所测得的吸光值以及线性方程计算含有大肠杆菌0157:H7的待检液中大肠杆菌的浓度,最低检测限可达4.3cfu/mL。图3B验证了本发明的检测方法测定沙门氏菌灵敏度及线性定量分析范围特性。在最佳反应条件下,靶标沙门氏菌的浓度在10~10⁵cfu/mL范围内的线性方程为: $Y=0.04944 \times X+0.1368$ ($R^2=0.9912$);其中,Y表示产检测线信号值,X表示沙门氏菌浓度,单位为cfu/mL。该线性方程的线性范围是10¹到10⁵cfu/mL之间,根据上述所测得的吸光值以及线性方程计算含有沙门氏菌的待检液中大肠杆菌的浓度,最低检测限可达3.32cfu/mL。

[0048] 实施例7特异性试验

[0049] 为了验证本发明的检测方法的特异性,如图4A和图4B所示,分别选择大肠杆菌(E.coli)金黄色葡萄球菌(Sta)、李斯特菌(Lis)、沙门氏菌(Sal)以及缓冲液PBS作为对照组进行显色分析,根据试验结果,在相同的试验条件下,只有靶标大肠杆菌及沙门氏菌可产生明显的信号值,由此证明本发明的检测方法具有很好地选择性,不会与非靶标产生特异性反应。

[0050] 实施例8牛奶样品中的大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌检测

[0051] 运用本发明的检测方法对牛奶样品中的大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌浓度(10~10⁴cfu/mL)进行测定。具体检测过程如下:

[0052] 步骤一、制备修饰生物素Biotin的大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌抗体。

[0053] 步骤二、将修饰生物素Biotin的大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌抗体固定在链霉亲和素SA标记的磁珠上:将1-10 μ L链霉亲和素SA标记的磁珠原液置于离心管中,用0.1-0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后,加入5-15 μ L、0.1mg/ml的修饰生物素Biotin的靶标病原菌抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1-2h,然后用0.1-0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次,置于磷酸盐缓冲液PBS中混合均匀,得到终产物,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0054] 步骤三、加入待测样品,37 $^{\circ}$ C恒温孵育2h进行磁性分离,用0.1-0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后吸干。

[0055] 步骤四、加入5~15 μ LhCG-纳米花,37 $^{\circ}$ C恒温孵育1h进行磁性分离,用0.1mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次,使其悬浮于10 μ L磷酸盐缓冲液PBS中,得到三明治夹心免疫复合物。

[0056] 步骤五、取最终得到的三明治夹心免疫复合物5-10 μ L,滴在商用一次性早孕试纸条的样品垫上,反应3min后,利用其检测线颜色的深浅(即对应的线性方程中的Y值,表示检测线颜色信号值)进行计算实现靶标食源性病菌浓度的测定。结合家用一次性怀孕试纸条作为读取信号方式,利用手机拍照并结合ImageJ软件进行分析,实现了食源性致病菌大肠杆菌0157:H7及沙门氏菌的可视化快速检测。

[0057] 利用实施例6得到线性方程进行测定并计算。结果如表1、2所示。通过回收率对本发明的检测方法准确性及精密度进行分析,大肠杆菌0157:H7在90.3%到141.7%之间;沙门氏菌回收率在80.7%到124.9%之间。

[0058] 表1:大肠杆菌0157:H7回收率测定

	初始含量 (CFU/mL)	标准加入量 (CFU/mL)	测得值 (±相对标准偏差, CFU/mL)	回收率 (%)
[0059]	0	1 $\times 10^1$	(0.903 \pm 0.112) $\times 10^1$	90.3 \pm 11.2
	0	1 $\times 10^2$	(0.904 \pm 0.169) $\times 10^2$	90.4 \pm 16.9
	0	1 $\times 10^3$	(1.261 \pm 0.109) $\times 10^3$	126.1 \pm 10.9
	0	1 $\times 10^4$	(1.417 \pm 0.129) $\times 10^4$	141.7 \pm 12.9

[0060] 表2:沙门氏菌回收率测定

[0061]

	初始含量 (CFU/mL)	标准加入量 (CFU/mL)	测得值 (±相对标准偏差, CFU/mL)	回收率 (%)
[0062]				
	0	1 $\times 10^1$	(0.855 \pm 0.145) $\times 10^1$	85.5 \pm 14.5
	0	1 $\times 10^2$	(0.807 \pm 0.131) $\times 10^2$	80.7 \pm 13.1
	0	1 $\times 10^3$	(1.249 \pm 0.042) $\times 10^3$	124.9 \pm 4.2
	0	1 $\times 10^4$	(1.018 \pm 0.381) $\times 10^4$	101.8 \pm 38.1

[0063] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人

员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

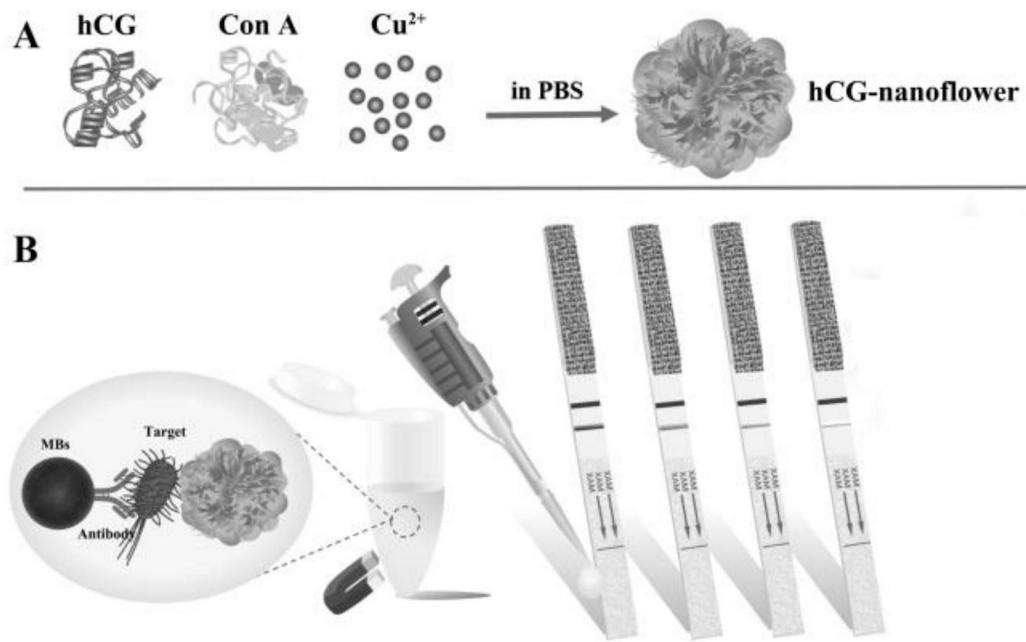


图1

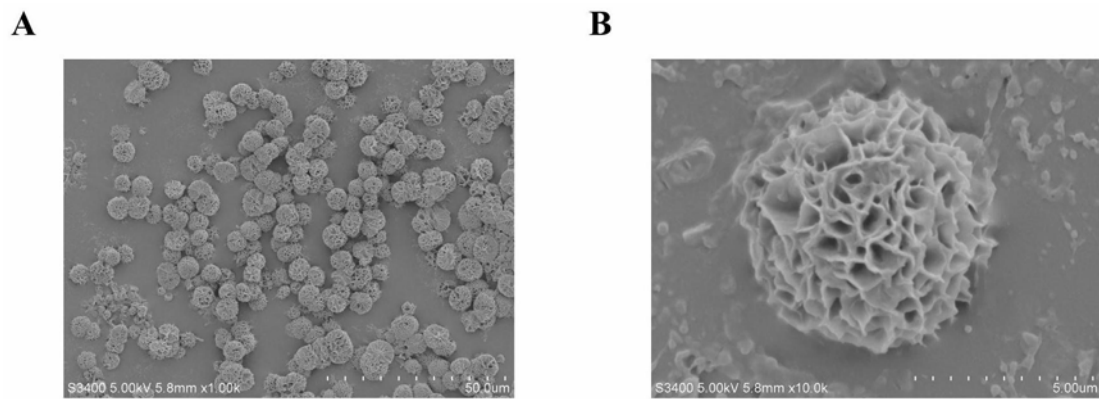


图2

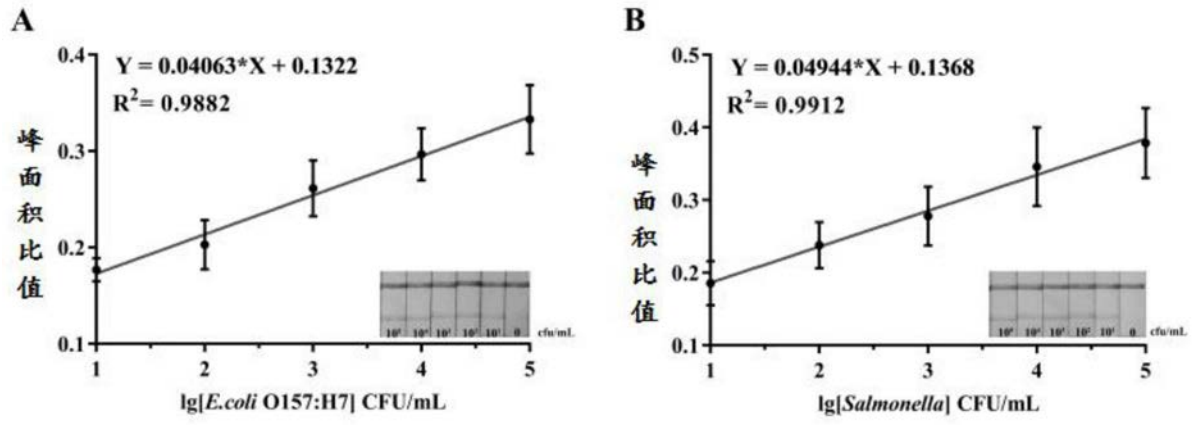


图3

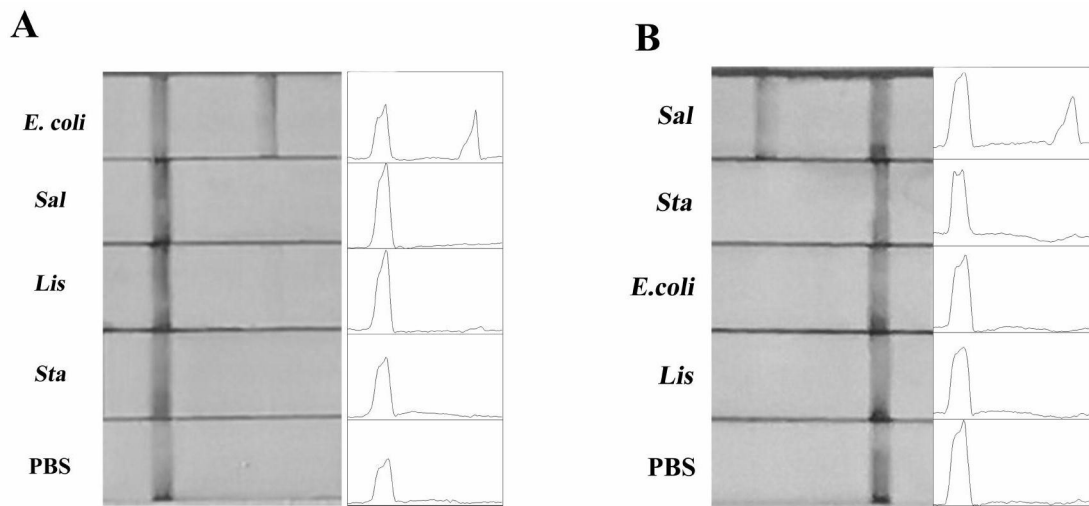


图4

专利名称(译)	一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109752562A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN201810562853.2	申请日	2018-06-04
[标]发明人	万家余 王奎宇 卜胜君 刘文森		
发明人	万家余 王奎宇 卜胜君 刘文森		
IPC分类号	G01N33/76 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	于晓庆		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种人体绒毛膜促性腺激素-纳米花及其制备方法和应用，属于食源性致病菌快速检测领域。本发明的一种靶标食源性病菌的检测方法采用hCG-纳米花传感器体系实现，将修饰生物素Biotin的食源性病原菌抗体固定在标记链霉亲和素SA的磁珠上；加入待测样品37℃恒温孵育2h，用0.1~0.5mM磷酸盐缓冲液PBS清洗3次后吸干；加入hCG-纳米花，在靶标食源性病原菌存在时磁珠上的靶标抗体与hCG-纳米花之间形成三明治夹心免疫复合物；采用商用一次性早孕试纸条作为信号读取方式，手机拍摄图片并利用Image J软件对其检测线颜色的强弱进行计算实现靶标食源性病菌浓度的测定。本发明操作简单、成本低廉、灵敏度高、特异性好。

