



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024943 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911325247.X

(22)申请日 2019.12.20

(71)申请人 吉林农业大学

地址 130118 吉林省长春市新城大街2888号

(72)发明人 陈萍 崔雯雯 王秀娟 董娜
孟祥慧 王思琪 王平

(74)专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任公司 22201

代理人 刘世纯 王恩远

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

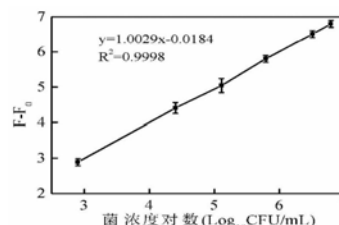
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种用于沙门氏菌快速检测的关开型复合荧光纳米探针及其制备方法

(57)摘要

一种用于沙门氏菌快速检测的关开型复合荧光纳米探针及其制备方法,属于食品安全技术领域。本发明基于量子点与金纳米粒子之间的荧光共振能量转移效应,将化学修饰后的功能化磁珠、抗体和量子点进行组装,构建了具有集磁性富集分离和检测结果快速呈现功能于一体的“磁珠-抗体-量子点”关开型复合荧光纳米探针。加入目标菌后,目标菌通过抗原抗体反应与荧光探针结合,荧光探针与金纳米粒子之间的距离增大,荧光共振能量转移效应被削弱,因荧光共振能量转移而淬灭的荧光信号恢复。本发明所述荧光纳米探针受背景基质干扰低,具有选择性高、快速、灵敏的优点,为沙门氏菌的快速检测提供了一种准确有效的方法。



1. 一种用于沙门氏菌快速检测的开关型复合荧光纳米探针的制备方法,其步骤如下:

(1) 免疫磁珠的制备

称取4~5g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2~3g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在150~300mL超纯水中,在通 N_2 的条件下搅拌至溶解;加入3~3.5g的 NaOH ,在80~90℃水浴条件下持续搅拌0.5~2.0h制得 Fe_3O_4 纳米磁珠;通过磁吸倾注法用乙醇和超纯水多次洗涤 Fe_3O_4 纳米磁珠至中性,再于50~70℃真空干燥得到裸磁珠;将0.3~0.8g裸磁珠与4~8mL正硅酸乙酯一同加入至200~300mL乙醇与水体积比为1:1的分散体系中,超声分散15~30min,50~70℃持续搅拌反应2~4h后用外磁场分离,再用超纯水充分清洗后得到硅烷化磁珠,即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$,于55~65℃真空下干燥;取0.1~0.5g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 加入至15~25mL无水乙醇中,超声使其分散均匀,向其中加入1~5mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷,用氨水调节pH至11,在55~65℃水浴中搅拌反应过夜,用超纯水多次洗涤除掉未偶联上的3-氨丙基三乙氧基硅烷,于55~65℃真空干燥得到化学修饰后的功能化磁珠,即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$;

将30~60mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ 用3~5mL、pH=7.0的PBS缓冲液分散,超声20~40min;加入2~3mL、质量分数25%的戊二醛溶液,室温振荡反应2~4h后保存在pH=5.0、0.2M的PBS缓冲液中,取0.8~1.3mL上述磁珠溶液加入5~8mL用PBS缓冲液按1:500体积比例稀释的沙门氏菌特异性抗体溶液,室温震荡反应1~3h得到免疫磁珠溶液;

(2) 量子点的制备

取30~60mL、0.024mol/L的 Na_2S 溶液和30~60mL、0.032mol/L的 ZnCl_2 溶液,在快速搅拌并通氮气条件下逐滴交替滴加到30~60mL、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的MPA-CdTe QDs溶液中,在55~65℃条件下密闭搅拌反应0.8~1.5h,得到MPA-CdTe@ZnS QDs溶液,静置后将该MPA-CdTe@ZnS QDs溶液与丙酮按1:1体积比例混匀,振荡3~8min,8000~15000r/min条件下离心3~8min,然后用超纯水离心洗涤沉淀,再用超纯水悬浮,得到纯化后的MPA-CdTe@ZnS QDs溶液,4℃保存;

(3) 将免疫磁珠和量子点共同进行偶联反应,得到复合荧光纳米探针

取80~120 μL 步骤(2)中得到的量子点溶液中加入20~30 μL 、33.4mmol/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐水溶液和20~30 μL 、70.9mmol/L的N-羟基琥珀酰亚胺溶液,充分混匀并在20~30℃恒温振荡器上振荡反应10~20min,得到活化后的量子点溶液;取40~50 μL 步骤(1)制备的免疫磁珠溶液加入到活化后的量子点溶液中,恒温避光轻微振荡1.5~3.0h后磁分离,用PBS溶液重复洗涤2~4次制得复合荧光纳米探针;

(4) 金纳米的制备,构建开关型复合荧光纳米探针

将400~700 μL 、0.213mol/L的半胱胺盐酸盐和40~60mL、1.4mmol/L的四氯金酸混合,在室温避光搅拌15~30min后,迅速加入10~15 μL 、10mmol/L新制备的硼氢化钠溶液,继续剧烈搅拌20~40min,制得酒红色溶液,用0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,制得巯基乙胺修饰的金纳米溶液,即CS-AuNPs;用5~20 μL 、0.2mol/L的 K_2CO_3 将CS-AuNPs调节pH至8,取0.8~1.2mL、15倍比稀释、pH=8的CS-AuNPs于离心管中,加入80~120 μL 步骤(3)制得的复合荧光纳米探针,混匀后静置反应10~20min,即得到被淬灭后的开关型复合荧光纳米探针。

2. 一种用于沙门氏菌快速检测的开关型复合荧光纳米探针,其特征在于:是由权利要求1所述的方法制备得到。

一种用于沙门氏菌快速检测的关开型复合荧光纳米探针及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全技术领域,具体涉及一种用于沙门氏菌快速检测的关开型复合荧光纳米探针及其制备方法。

背景技术

[0002] 沙门氏菌(Salmonella)为肠杆菌科的革兰阴性短小杆菌,据报道共有2600多个血清型,是引起食源性疾病暴发的重要人畜共患病原菌之一,通常通过受污染的食物传播,在世界范围内成为主要的公共卫生威胁,可以引起肠胃炎、伤寒、败血症等多种疾病,严重时可导致休克及意识障碍。在中国,近几年每年由沙门氏菌引起的食物中毒事件占到全部食物中毒事件的10%~20%,沙门氏菌成为导致食源性疾病暴发的主要病原菌之一。

[0003] 近年来,沙门氏菌的主要快速检测方法有聚合酶链反应(PCR)、核酸探针技术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、表面等离子体共振(SPR)等。虽然这些方法在检测速度、灵敏度以及特异性等方面较传统方法有了明显提高,但由于大部分检测方法需要精密仪器以及繁琐的样品前处理等缺点,使得其应用在现场快速检测方面受到了很大程度上的限制。因此有必要研究灵敏简便、易于操作、选择性高的快速检测的方法。

[0004] 随着现代新型纳米技术的发展,纳米材料因其优异的性能获得了广泛的关注,国内外的研究学者先后将采用纳米材料与荧光技术相结合的方法用于微生物的快速检测。量子点又称半导体量子点(quantum dots,QDs)或半导体纳米微晶体,是一种新型的半导体纳米材料,具有优良的光谱特性和光化学特性,作为一种新型的标记材料与传统的荧光染料相比,具有稳定性好、激发光谱宽且连续、发射光谱窄而对称及荧光强度高特点,常被用作荧光探针,在分子识别探针和生物传感器技术方面有着卓越的检测性能,已被广泛应用于食品药品检测领域。

发明内容

[0005] 本发明利用沙门氏菌抗体的特异性识别和荧光共振能量转移效应的优势,提供一种高选择性与灵敏度的关开型复合荧光纳米探针及其制备方法。

[0006] 本发明基于QDs与金纳米粒子(AuNPs)之间的荧光共振能量转移效应(Fluorescence resonance energy transfer,FRET),将氨基化磁珠、抗体和量子点进行组装,构建了具有集磁性富集分离和检测结果快速呈现功能于一体的“磁珠-抗体-量子点”关开型复合荧光纳米探针。此荧光探针中经巯基丙酸修饰后的量子点含有羧基(-COOH),带负电荷;经巯基乙胺修饰后的金纳米粒子溶液(CS-AuNPs)含有氨基(-NH₂),带正电荷;两种纳米材料由于静电作用拉近了彼此间的距离,且AuNPs的吸收光谱与QDs的发射光谱有很好的重叠,可发生有效的荧光共振能量转移,荧光探针的荧光被显著淬灭。加入目标菌后,目标菌通过抗原抗体反应与荧光探针结合,荧光探针与CS-AuNPs之间的距离增大,FRET效应被削弱,因FRET而淬灭的荧光信号恢复。本发明基于QDs和AuNPs间的FRET效应构建荧光“关-

开”体系,建立了用于沙门氏菌快速检测的开关型复合荧光纳米探针及其制备和使用方法。此方法受背景基质干扰低,具有选择性高、快速、灵敏的优点,为沙门氏菌的快速检测提供了一种准确有效的方法。

[0007] 本发明所述的一种用于沙门氏菌快速检测的开关型复合荧光纳米探针的制备方法,其步骤如下:

[0008] (1) 免疫磁珠的制备

[0009] 称取4~5g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2~3g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在150~300mL超纯水中,在通 N_2 的条件下搅拌至溶解;加入3~3.5g的 NaOH ,溶液立即变为黑色,在80~90℃水浴条件下持续搅拌0.5~2.0h制得 Fe_3O_4 纳米磁珠;通过磁吸倾注法用乙醇和超纯水多次洗涤 Fe_3O_4 纳米磁珠至中性,再于50~70℃真空干燥得到裸磁珠;将0.3~0.8g裸磁珠与4~8mL正硅酸乙酯(TEOS)一同加入至200~300mL乙醇与水体积比为1:1的分散体系中,超声分散15~30min,50~70℃持续搅拌反应2~4h后用外磁场分离,再用超纯水充分清洗后得到硅烷化磁珠($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$),于55~65℃真空下干燥;取0.1~0.5g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 加入至15~25mL无水乙醇中,超声使其分散均匀,向其中加入1~5mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),用氨水调节pH至11,在55~65℃水浴中搅拌反应过夜,用超纯水多次洗涤除掉未偶联上的 APTES ,于55~65℃真空干燥得到化学修饰后的功能化磁珠,即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ 。

[0010] 将30~60mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ 用3~5mL、pH=7.0的PBS缓冲液分散,超声20~40min;加入2~3mL、质量分数25%的戊二醛溶液,室温振荡反应2~4h后保存在pH=5.0、0.2M的PBS缓冲液中,取0.8~1.3mL上述磁珠溶液加入5~8mL沙门氏菌特异性抗体(将沙门氏菌特异性抗体用PBS缓冲液按1:500的体积比例进行稀释),室温震荡反应1~3h得到免疫磁珠溶液;

[0011] (2) 量子点的制备

[0012] 取30~60mL、0.024mol/L的 Na_2S 溶液和30~60mL、0.032mol/L的 ZnCl_2 溶液,在快速搅拌并通氮气条件下逐滴交替滴加到购买的30~60mL、0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的MPA-CdTe QDs溶液中,在55~65℃条件下密闭搅拌反应0.8~1.5h,得到MPA-CdTe@ZnS QDs溶液,静置后将该MPA-CdTe@ZnS QDs溶液与丙酮按1:1的体积比例混匀,振荡3~8min,8000~15000r/min条件下离心3~8min,然后用超纯水离心洗涤沉淀,再用超纯水悬浮,得到纯化后的MPA-CdTe@ZnS QDs溶液,4℃保存备用;

[0013] (3) 将免疫磁珠和量子点共同进行偶联反应,得到复合荧光纳米探针

[0014] 选用EDC/NHS来活化步骤(2)中量子点表面的羧基基团。取80~120 μL 步骤(2)中得到的量子点溶液中加入20~30 μL 、33.4mmol/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐水溶液(EDC)和20~30 μL 、70.9mmol/L的N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS),充分混匀并在20~30℃恒温振荡器上振荡反应10~20min,得到活化后的量子点溶液;取40~50 μL 步骤(1)制备的免疫磁珠溶液加入到活化后的量子点溶液中,20~30℃恒温避光轻微振荡1.5~3.0h后磁分离,用PBS溶液重复洗涤2~4次制得复合荧光纳米探针;

[0015] (4) 金纳米的制备,构建开关型复合荧光纳米探针

[0016] 将400~700 μL 、0.213mol/L的半胱胺盐酸盐和40~60mL、1.4mmol/L的四氯金酸混合,在室温避光搅拌15~30min后,迅速加入10~15 μL 、10mmol/L新制备的硼氢化钠溶液,继续剧烈搅拌20~40min,制得酒红色溶液,用0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,制得巯基乙胺修饰

的金纳米溶液,即CS-AuNPs;用5~20 μ L、0.2mol/L的 K_2CO_3 将CS-AuNPs调节pH至8,取0.8~1.2mL、15倍比稀释、pH=8的CS-AuNPs于离心管中,加入80~120 μ L步骤(3)制得的复合荧光纳米探针,混匀后静置反应10~20min,即得到被淬灭后的关开型复合荧光纳米探针。

[0017] 使用本发明制备的关开型复合荧光纳米探针检测沙门氏菌的方法,其步骤如下:

[0018] (1) 将待检沙门氏菌菌液加入到淬灭后的关开型复合荧光纳米探针中,与之结合进行反应;

[0019] (2) 在365nm激发波长下用荧光光谱仪对加入沙门氏菌菌液前后该探针的荧光值进行检测,检测结果分别记为F、 F_0 ,用 $F-F_0$ 表示该探针加入沙门氏菌菌液后的荧光恢复程度,对不同浓度沙门氏菌加入后的荧光恢复程度进行对比分析发现,加入沙门氏菌菌液浓度的对数(x)与荧光恢复程度(用y表示 $F-F_0$)呈良好的线性关系,该线性方程为 $y=103.5x+121.4$ ($R^2=0.9956$)。从而根据测定的加入菌液前后的荧光差值代入上述线性方程即可定量的计算出沙门氏菌的浓度。本发明相对于现有技术,具备以下优点:

[0020] (1) 本发明首次采用经巯基乙胺修饰的金纳米作为淬灭剂,修饰了巯基乙胺的金纳米溶液中含有氨基($-NH_2$),带正电荷,而复合荧光纳米探针中的量子点经MPA修饰后含有羧基($-COOH$),带负电荷,由于静电自组装作用,相比于未经修饰的金纳米与量子点结合地更紧密,增强了探针中纳米材料间连接的牢固性,从而提高了探针的灵敏度。

[0021] (2) 本发明利用沙门氏菌抗体的特异性识别和荧光共振能量转移效应的优势,将功能化磁珠、抗体和量子点(QDs)进行有序组装,构建了具有集磁性富集分离和检测结果快速呈现功能于一体的“磁珠-抗体-量子点”复合荧光纳米探针,检测效率更快;

[0022] (3) 本发明的检测操作简便,该方法只需将样品与荧光探针混合,然后测定其荧光强度即可得知相应的沙门氏菌浓度,且具有特异性强灵敏度高的特点,其检测限可达到 10^2 CFU/mL;

附图说明

[0023] 图1: Fe_3O_4 (a) 和 $Fe_3O_4@SiO_2@NH_2$ (b) 的近红外光谱;

[0024] 图2: 复合荧光纳米探针淬灭前(a)后(b)荧光光谱图;

[0025] 图3: CS-AuNPs的紫外吸收图谱;

[0026] 图4: CS-AuNPs的Zeta电位值;

[0027] 图5: MPA-CdTe@ZnS QDs的Zeta电位值;

[0028] 图6: 关开型复合荧光纳米探针对不同浓度沙门氏菌的检测结果显示图;

[0029] 图7: 关开型复合荧光纳米探针荧光恢复程度随沙门氏菌菌液浓度变化的关系曲线图;

[0030] 图8: 特异性检测结果示意图;目标菌:沙门氏菌;非目标菌:志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌;

[0031] 图9: 沙门氏菌和非目标混合菌与该荧光探针结合后荧光显微成像图;

具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不限定发明。

[0033] 本发明提供一种复合荧光纳米探针。该用于沙门氏菌快速检测的荧光复合纳米探针,由沙门氏菌抗体、功能化磁珠、量子点组成。所述抗体与所述功能化磁珠和所述量子点反应形成偶联体系构建荧光复合纳米探针;所述探针与金纳米发生荧光共振能量转移得到被淬灭后的关开型复合荧光纳米探针;基于淬灭后的复合荧光纳米探针检测沙门氏菌;对该检测探针进行检测性能评价。

[0034] 实施例1:用于沙门氏菌快速检测的复合荧光纳米探针的制备,包括以下步骤:

[0035] (1) 免疫磁珠的制备

[0036] 称取4.78g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2.78g $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在200mL超纯水中,在通 N_2 的条件下搅拌至溶解。加入3.2gNaOH,85℃温度下持续搅拌1h制得 Fe_3O_4 纳米磁珠。多次洗涤磁珠至中性,于60℃真空干燥得裸磁珠,取裸磁珠0.5g与6mL的正硅酸乙酯(TEOS)一同加入至250mL乙醇:水=1:1的分散体系中,超声分散20min,于60℃持续搅拌反应3h后磁分离,用超纯水充分清洗后得到硅烷化磁珠 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$,于60℃真空干燥备用。取0.3g上述磁珠加入至20mL无水乙醇中,超声分散均匀后加入3mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),用氨水调节pH至11,于60℃水浴中搅拌反应过夜,用超纯水多次洗涤除掉未偶联上的APTES,于60℃真空干燥得到功能化磁珠,备用。

[0037] 取上述功能化磁珠50mg,用4mL pH7.0的PBS缓冲液分散,超声30min,加入2.5mL、25%戊二醛,室温振荡反应3h后保存在pH 5.0 0.2M的PBS缓冲液中。取1mL(约10mg)上述磁珠,加入6mL沙门氏菌特异性抗体(1:500稀释),室温震荡反应2h得免疫磁珠。将裸磁珠(Fe_3O_4)与修饰了氨基后的硅烷化免疫磁珠($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$)真空干燥后于近红外光谱仪中对其具有特征峰的官能团进行表征。如图1所示,在 574cm^{-1} 出现了一个较强的吸收峰,为处于氧四面体位和氧八面体位的Fe-O伸缩振动峰。通常 Fe_3O_4 的吸收峰在 580cm^{-1} 处,其微小差距可能由于纳米颗粒的尺寸效应,基团频率发生位移,由此证明样品的物相是 Fe_3O_4 。在图2b中,在 3402cm^{-1} 处的强吸收峰归属于羧基中的O-H键的伸缩振动,表明修饰后的磁珠表面引入了-OH。 1080cm^{-1} 处较强的吸收峰是Si-O-Si键的伸缩振动峰, 800cm^{-1} 处为Si-O的伸缩振动峰,表明 SiO_2 成功包裹在 Fe_3O_4 磁珠表面。在 3402cm^{-1} 处出现 -NH_2 的特征吸收峰,在 1633cm^{-1} 处出现N-H键的弯曲振动峰,表明氨基已成功修饰在 Fe_3O_4 磁珠表面。综上近红外光谱结果表明,该免疫化磁珠已经成功被 SiO_2 包被,并且经过化学修饰成功修饰上氨基。

[0038] (2) 制备量子点,与免疫磁珠连接共同构建复合荧光纳米探针

[0039] 取50mL 0.024mol/L Na_2S 溶液和50mL 0.032mol/L ZnCl_2 溶液,在快速搅拌并通氮气条件下逐滴交替滴加到巯基丙酸(MPA)修饰的CdTe QDs溶液中,在60℃条件下密闭搅拌反应1h,得到MPA-CdTe@ZnS QDs溶液。将溶液转移到干净干燥的玻璃瓶中,密封室温静置。将制备好的QDs溶液与等体积的丙酮混匀,振荡5min,10000r/min离心5min,用超纯水离心洗涤沉淀,用再用超纯水悬浮,备用。向100 μL 量子点溶液中其中加入28.75 μL 的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(33.4mmol/L,使用前现配)和27 μL 的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(70.9mmol/L)。充分混匀并在25℃恒温振荡器上振荡反应15min。取45 μL (1)中合成的免疫磁珠加入到活化后的量子点溶液中。20~30℃恒温避光振荡2h,磁分离,用PBS溶液重复洗涤3次制得复合荧光纳米探针。

[0040] (3) 制备金纳米,将其作为淬灭剂对复合荧光纳米探针进行荧光淬灭,得到关开型复合荧光纳米探针

[0041] 将500 μ L 0.213mol/L半胱胺盐酸盐和50mL 1.4mmol/L四氯金酸混合,在室温避光搅拌20min后,迅速加入12.5 μ L 10mmol/L新制备的硼氢化钠溶液,继续剧烈搅拌30min,制得的酒红色溶液用0.45 μ m的微孔滤膜过滤后,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0042] 取1mL 15倍比稀释后pH为8的CS-AuNPs于离心管中,加入复合荧光纳米探针100 μ L,混匀后在室温下放置15min,即得被淬灭后的复合荧光纳米探针。如图2可知,该探针的荧光发射峰位于516nm左右处,加入CS-AuNPs后,CS-AuNPs对复合荧光纳米进行了有效淬灭,淬灭后的该探针荧光强度明显降低。如图3的CS-AuNPs的紫外光谱可知,CS-AuNPs最大吸收峰位于524nm处,光谱呈现出不对称分布状态。这与该探针的荧光峰值的波长基本吻合。当淬灭剂的紫外吸收峰的波长与荧光物质的荧光峰的波长基本重合时,淬灭剂才能对荧光物质做到很好的淬灭,所以胶体金作为荧光淬灭剂能够满足对量子点荧光淬灭的需要。由图4的CS-AuNPs的Zeta电位值和图5的MPA-CdTe@ZnS QDs的Zeta电位值可知体系中CS-AuNPs与MPA-CdTe@ZnS QDs Zeta电位分别为-35.7和15.4mV,进一步证明由于静电引力,修饰了巯基乙胺的金纳米与修饰了MPA的量子点紧密结合发生了有效的荧光共振能量转移。

[0043] 实施例2:用于沙门氏菌快速检测的复合荧光纳米探针的使用方法,包括以下步骤:

[0044] (1) 将实施例1步骤(3)中被金纳米淬灭后的关开型复合荧光纳米探针分散于PBS缓冲液中,备用;

[0045] (2) 将菌液浓度为 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 CFU/mL的沙门氏菌菌液分别加入到上述反应体系中,置于摇床中37 $^{\circ}$ C振荡反应1h,用荧光光谱仪测定反应体系加入沙门氏菌菌液前后的荧光信号值变化情况,如图6可知,加入沙门氏菌后被淬灭的反应体系荧光明显恢复;

[0046] (3) 其荧光差值 $F-F_0$ 记为荧光恢复程度y,沙门氏菌菌液浓度对数用x表示,由图6可作出线性方程为 $y=103.5x+121.4$ ($R^2=0.9956$),即如图7所示。用上述关开型复合荧光纳米探针检测未知浓度的沙门氏菌时,只需将测得的加入沙门氏菌前后的荧光差值得到的荧光恢复程度y,代入上述线性方程即可定量的计算出沙门氏菌的浓度对数x,从而得知沙门氏菌浓度。

[0047] 实施例3:用于沙门氏菌快速检测的复合荧光纳米探针的检测性能评价,包括以下步骤:

[0048] (1) 对不同浓度沙门氏菌的检测效果如图7所示,由图中数据可知,沙门氏菌浓度小于 10^2 CFU/mL时检测结果呈阴性,浓度高于 10^2 CFU/mL时,检测结果呈阳性,由此确定沙门氏菌的检出限为 10^2 CFU/mL;

[0049] (2) 为了检测该体系对沙门氏菌的特异性,对不同的食源性致病菌做了分析。研究了非目标菌(志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)对化学发光的响应,如图8所示,随着沙门氏菌浓度增加,复合荧光纳米探针溶液的荧光强度逐渐增大,而非目标菌的加入,未引起体系荧光强度明显改变。图9图分别是加入目标菌和非目标混合菌后的荧光显微镜下图片(a,b分别为目标菌在荧光显微镜下的明场与暗场图,c,d分别为非目标混合菌在荧光显微镜下的明场与暗场图)。通过明视场与暗视场间的对比可知,图9-b中的目标菌体发出橙色荧光,说明被淬灭的荧光得到恢复;图9-d几乎观察不到荧光,说明非目标菌没有使淬灭的荧光恢复。上述结果表明,本方法对沙门氏菌的检测具有良好的特异性。

[0050] (3) 为了进一步说明本发明所提供的基于荧光共振能量转移效应用于沙门氏菌的快速检测方法的检测性能,对存在于人工污染牛奶样品中的沙门氏菌进行检测。如表1,分别随机取不同浓度的沙门氏菌菌悬液加入到新鲜的牛奶样品中,于37℃恒温培养箱中培养18h得到人工污染的牛奶样品。与国家标准(GB/T4789.4—2016食品微生物学检验沙门氏菌检验)检测结果对比,分析数据可知两种方法得出的数值基本一致,相关系数R的平方达到0.9998,说明该检测方法不仅可以检测分析实验室条件下的沙门氏菌,还能够分析存在于牛奶中的沙门氏菌。

[0051] 表1:人工模拟污染牛奶样品的检测结果

No	国标方法菌浓度检测结果	复合荧光探针法菌浓度检测结果
	National standard method (CFU/mL)	Compound fluorescent probe method (CFU/mL)
1	8.0×10^2	7.9×10^2
2	2.5×10^4	2.6×10^4
3	1.3×10^5	1.1×10^5
4	6.2×10^5	6.3×10^5
5	3.2×10^6	3.2×10^6
6	6.3×10^6	6.3×10^6

[0053] 以上实施例仅作为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所做的任何修改、等同替换或者改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

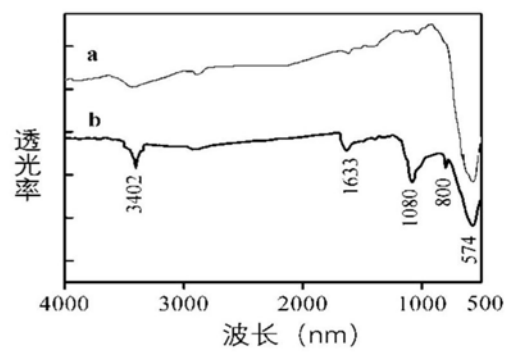


图1

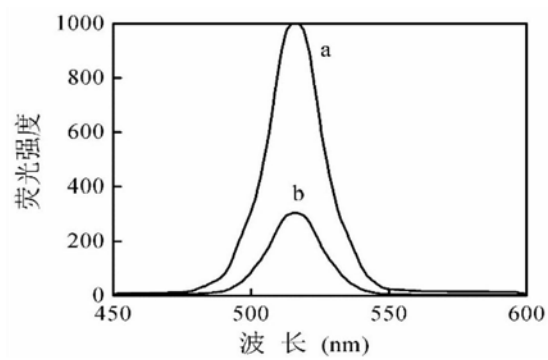


图2

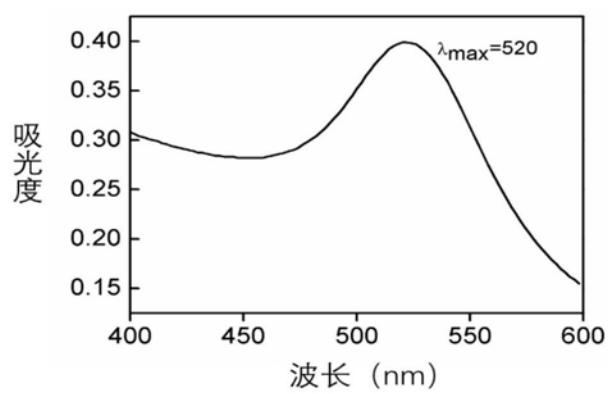


图3

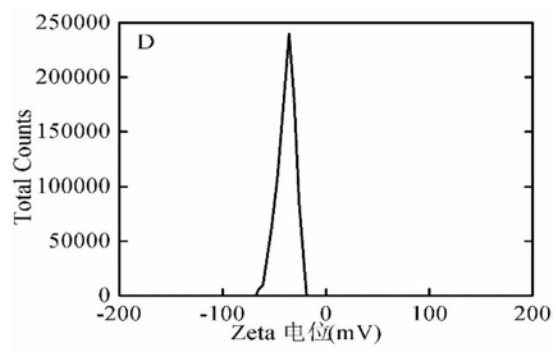


图4

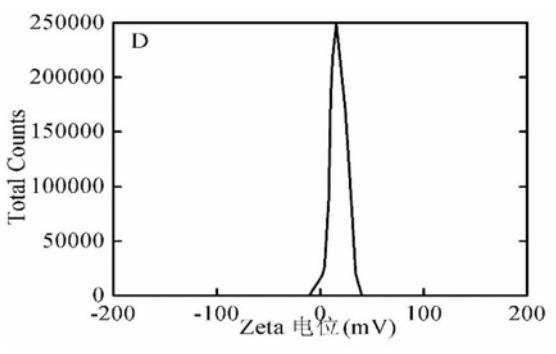


图5

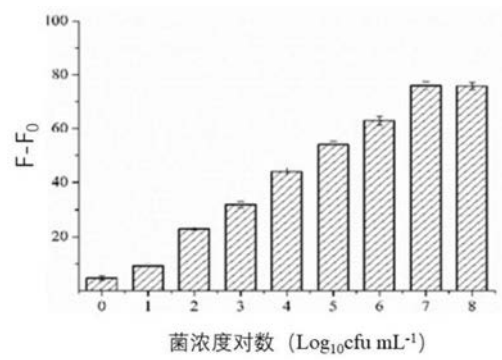


图6

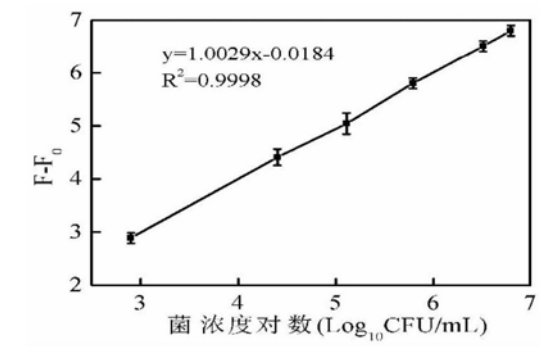


图7

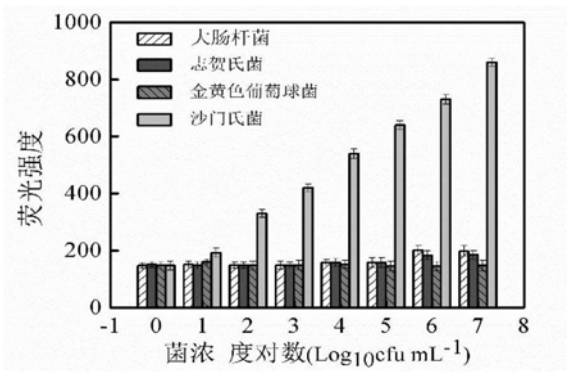


图8

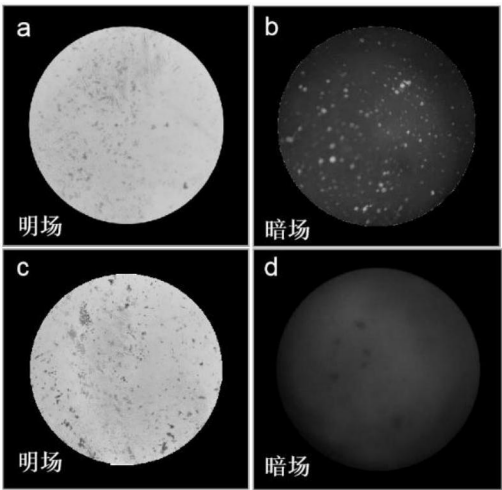


图9

专利名称(译)	一种用于沙门氏菌快速检测的开关型复合荧光纳米探针及其制备方法		
公开(公告)号	CN111024943A	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN201911325247.X	申请日	2019-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
[标]发明人	陈萍 崔雯雯 王秀娟 董娜 孟祥慧 王思琪 王平		
发明人	陈萍 崔雯雯 王秀娟 董娜 孟祥慧 王思琪 王平		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/56916 G01N2333/255		
代理人(译)	刘世纯 王恩远		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于沙门氏菌快速检测的开关型复合荧光纳米探针及其制备方法，属于食品安全技术领域。本发明基于量子点与金纳米粒子之间的荧光共振能量转移效应，将化学修饰后的功能化磁珠、抗体和量子点进行组装，构建了具有集磁性富集分离和检测结果快速呈现功能于一体的“磁珠-抗体-量子点”开关型复合荧光纳米探针。加入目标菌后，目标菌通过抗原抗体反应与荧光探针结合，荧光探针与金纳米粒子之间的距离增大，荧光共振能量转移效应被削弱，因荧光共振能量转移而淬灭的荧光信号恢复。本发明所述荧光纳米探针受背景基质干扰低，具有选择性强、快速、灵敏的优点，为沙门氏菌的快速检测提供了一种准确有效的方法。

