



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198737 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410462482. 2

(22) 申请日 2014. 09. 11

(71) 申请人 中国科学院武汉病毒研究所
地址 430071 湖北省武汉市武昌小洪山中区
44 号

(72) 发明人 危宏平 胡伟 杨航 余军平

(74) 专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所 (普通合伙) 11371
代理人 吴开磊

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006. 01)
G01N 33/531 (2006. 01)

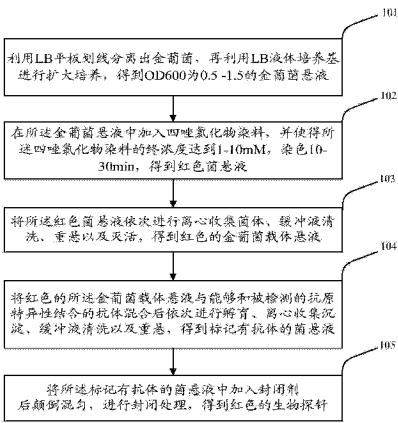
权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称

基于金黄色葡萄球菌的生物探针、制备方法
及其应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物病原检测技术领域,具体而言,涉及一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针、制备方法及其应用。该基于金黄色葡萄球菌的生物探针,包括:金葡菌载体以及标记在所述金葡菌载体的表面 A 蛋白上,且能够与被检测抗原特异性结合的抗体;其中,所述金葡菌载体被四唑氯化物染料染至红色。本发明提供的这种基于金黄色葡萄球菌的生物探针,兼具乳胶微球和红细胞优点,颗粒均一、稳定,与抗原结合能力以及凝集性能强,颜色鲜明,使得凝集结果非常易于判定。与现有技术相比,该体系的凝集反应的分辨率、灵敏度和特异性都得到了很大的提高,因此,可有效地应用到免疫学检测中。



1. 一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针,其特征在于,包括:
金葡菌载体以及标记在所述金葡菌载体的表面 A 蛋白上,且能够与被检测抗原特异性结合的抗体;
其中,所述金葡菌载体被四唑氯化物染料染至红色。
2. 根据权利要求 1 所述的生物探针,其特征在于,所述四唑氯化物染料具体为 5- 氰基 -2,3- 二 (4- 甲基苯基) 四唑氯化物。
3. 一种根据权利要求 2 所述的生物探针的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - 1)、利用 LB 平板划线分离出金葡菌,再利用 LB 液体培养基进行扩大培养,得到 OD600 为 0.5-1.5 的金葡菌悬液;
 - 2)、在所述金葡菌悬液中加入四唑氯化物染料,并使得所述四唑氯化物染料的终浓度达到 1-10mM,染色 10-30min,得到红色菌悬液;
 - 3)、将所述红色菌悬液依次进行离心收集菌体、缓冲液清洗、重悬以及灭活,得到红色的金葡菌载体悬液;
 - 4)、将红色的所述金葡菌载体悬液与能够和被检测的抗原特异性结合的抗体混合后依次进行孵育、离心收集沉淀、缓冲液清洗以及重悬,得到标记有抗体的菌悬液;
 - 5)、将所述标记有抗体的菌悬液中加入封闭剂后颠倒混匀,进行封闭处理,得到红色的生物探针。
4. 根据权利要求 3 所述的生物探针的制备方法,其特征在于,在步骤 4) 中,所述抗体包括单克隆抗体或多克隆抗体;
在步骤 5) 中,所述封闭剂包括脱脂奶粉或牛血清蛋白。
5. 根据权利要求 4 所述的生物探针的制备方法,其特征在于,在步骤 1) 中:所述扩大培养的温度为 35-39℃,转速为 160-200rpm。
6. 根据权利要求 5 所述的生物探针的制备方法,其特征在于,在步骤 3) 中:
所述离心的转速为 3800-4200rpm,时间为 3-7min;
所述清洗以及重悬均采用浓度为 0.1M、pH 为 8.0 的 Tris-HCl,且所述清洗的次数为 2-3 次。
7. 根据权利要求 6 所述的生物探针的制备方法,其特征在于,在步骤 3) 中:
所述灭活具体包括:在将所述重悬处理后的红色菌悬液中加入终浓度为 1% 的甲醛处理 10-30min;
或,将所述重悬处理后的红色菌悬液在 60-75℃温育 15-50min。
8. 根据权利要求 3-7 任一项所述的生物探针的制备方法,其特征在于,在步骤 4) 中:
能够和被检测的抗原特异性结合所述抗体的浓度为 0.1-5mg/ml,且所述金葡菌载体悬液与所述抗体的体积比为 1:50-500;
所述孵育的温度为 37℃,时间为 30min,转速为 180rpm;
所述离心收集沉淀中,离心的温度为 4℃,转速为 4000rpm,时间为 5min;
所述清洗以及重悬均采用浓度为 0.1M, pH 为 8.0 的 Tris-HCl。
9. 根据权利要求 8 所述的生物探针的制备方法,其特征在于,在步骤 5) 中:
每 100 毫升的所述标记有抗体的菌悬液加入的封闭剂的质量为 0.1-5 克。
10. 权利要求 3-7 任一项所述制备方法获得的生物探针在肠出血性大肠杆菌 O157:H7

检测中的应用。

基于金黄色葡萄球菌的生物探针、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物病原检测技术领域,具体而言,涉及一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 典型的金葡菌(金黄色葡萄球菌)为球型,直径 $0.8\mu\text{m}$ 左右,显微镜下排列成葡萄串状。金葡菌无芽胞、鞭毛,大多数无荚膜,革兰氏染色阳性。金黄色葡萄球菌A蛋白(Staphylococcal Protein A, SPA),或简称表面A蛋白,占整个细胞壁蛋白成分的6.7%,通过胞壁肽聚糖以共价键与之结合。

[0003] 多数表面A蛋白呈一侧面稍凹的椭球形结构,结构稳定、均一,长约为 $40.88\pm 1.58\text{nm}$,宽约为 $20.82\pm 0.68\text{nm}$,高约为 $10.51\pm 0.28\text{nm}$ 。

[0004] 表面A蛋白由亮、缬、脯、丙、苏、甘、丝、谷丙、天门冬及赖氨酸等十种氨基酸组成。由于其不含有胱氨酸及半胱氨酸,所以无二硫键。紫外光谱和吸收系数为 $A_{275\text{nm}}\% = 1.65$,等电点为pH5.1。表面A蛋白十分稳定,用4mol/L尿素、硫氰酸盐、6mol/L的盐酸胍和pH2.5的酸性条件,以及加热煮沸均不影响其活性。

[0005] 表面A蛋白能与人及多种哺乳动物血清IgG分子中的Fc片段结合,结合的亲和性次序依次是猪、狗、兔、人、猴、鼠、小鼠及牛;对大白鼠、绵羊的亲和力差;对马、犍牛、山羊等无亲和力;对所有的鱼类、两栖类、爬行类、鸟类(除少数例外)均不能与之结合。基于金黄色葡萄球菌A蛋白的免疫学性质,预示着其可以作为载体并与已知的标准血清进行修饰吸附,进而获得吸附有抗体的载体,通过进行协同凝集反应并应用到检测相应的未知抗原中。虽然,上述的方式其检测未知抗原的特异性和敏感性均较好,但是,相关技术中,由于对金黄色葡萄球菌没有进行特定的处理,因此,在鉴定其协同凝集后的凝集产物时,其分辨率差(常需要借助大型的仪器进行分析辨别),因此,不易判定其凝集结果,进而严重影响了其在免疫学检测中的应用。

[0006] 综上,提供一种便于观测凝集结果的金黄色葡萄球菌的生物探针并应用到抗原检测中是本领域亟待解决的一个技术问题。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针;以解决上述的问题。本发明的另外一个目的在于提供一种上述生物探针的制备方法,并实现其应用。

[0008] 在本发明的实施例中提供了一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针,包括:金葡菌载体以及标记在所述金葡菌载体的表面A蛋白上,且能够与被检测抗原特异性结合的抗体;其中,所述金葡菌载体被四唑氯化物染料染至红色。

[0009] 本发明提供的这种基于金黄色葡萄球菌的生物探针,金黄色葡萄球菌作为基本的结构组成,由于其细胞壁上含有一定量结构稳定的表面A蛋白,而该表面A蛋白则可以和多种动物血清中的IgG分子中的Fc片段结合,即其表面A蛋白可以和标记有被检测抗原特

异性结合的抗体,通过抗体与未知抗原的特异性结合以及发生的协同凝集反应进而实现抗原的检测。更为重要的,由于金葡菌载体是被四唑氯化物染料染至红色的,具体的,四唑氯化物染料可被金葡菌内部所含的各类氧化还原酶作用,生成红色的不溶物(在细菌内部发生),进而使得整个金葡菌显现出红色,即得到红色的金葡菌载体。因此,该红色的载体与相应的抗体标记之后(生物探针),其与特定的抗原发生协同凝集反应时,生物探针兼具乳胶微球和红细胞优点,颗粒均一、稳定,与抗原结合能力以及凝集性能强,颜色鲜明,使得凝集结果非常易于判定。与现有技术相比,该体系的凝集反应的分辨率、灵敏度和特异性都得到了很大的提高,因此,可有效地应用到免疫学检测中。

[0010] 可选的,四唑氯化物染料具体为 5- 氰基 -2,3- 二(4- 甲基苯基)四唑氯化物。

[0011] 一种上述的生物探针的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 1)、利用 LB 平板划线分离出金葡菌,再利用 LB 液体培养基进行扩大培养,得到 OD600 为 0.5-1.5 的金葡菌悬液;

[0013] 2)、在所述金葡菌悬液中加入四唑氯化物染料,并使得所述四唑氯化物染料的终浓度达到 1-10mM,染色 10-30min,得到红色菌悬液;

[0014] 3)、将所述红色菌悬液依次进行离心收集菌体、缓冲液清洗、重悬以及灭活,得到红色的金葡菌载体悬液;

[0015] 4)、将红色的所述金葡菌载体悬液与能够和被检测的抗原特异性结合的抗体混合后依次进行孵育、离心收集沉淀、缓冲液清洗以及重悬,得到标记有抗体的菌悬液;

[0016] 5)、将所述标记有抗体的菌悬液中加入封闭剂后颠倒混匀,进行封闭处理,得到红色的生物探针。

[0017] 可选的,在步骤 4) 中,所述抗体包括单克隆抗体或多克隆抗体;在步骤 5) 中,所述封闭剂包括脱脂奶粉或牛血清蛋白。

[0018] 可选的,在步骤 1) 中:所述扩大培养的温度为 35-39℃,转速为 160-200rpm。

[0019] 可选的,在步骤 3) 中:所述离心的转速为 3800-4200rpm,时间为 3-7min;所述清洗以及重悬均采用浓度为 0.1M、pH 为 8.0 的 Tris-HCl,且所述清洗的次数为 2-3 次。

[0020] 可选的,在步骤 3) 中:所述灭活具体包括:在将所述重悬处理后的红色菌悬液中加入终浓度为 1% 的甲醛处理 10-30min;或,将所述重悬处理后的红色菌悬液在 60-75℃ 温育 15-50min。

[0021] 可选的,在步骤 4) 中:能够和被检测的抗原特异性结合所述抗体的浓度为 0.1-5mg/ml,且所述金葡菌载体悬液与所述抗体的体积比为 1:50-500;所述孵育的温度为 37℃,时间为 30min,转速为 180rpm;所述离心收集沉淀中,离心的温度为 4℃,转速为 4000rpm,时间为 5min;所述清洗以及重悬均采用浓度为 0.1M, pH 为 8.0 的 Tris-HCl。

[0022] 可选的,在步骤 5) 中:每 100 毫升的所述标记有抗体的菌悬液加入的封闭剂的质量为 0.1-5 克。

[0023] 上述制备方法获得的生物探针在肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测中的应用。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的

附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0025] 图 1 为本发明实施例二提供的红色生物探针的制备流程图;

[0026] 图 2 为本发明实施例二中未染色的金葡菌悬液和染色后的红色菌悬液对比图;

[0027] 图 3 为本发明实施例二中红色的金葡菌载体悬液未灭活/灭活后 72 小时培养结果对比图;

[0028] 图 4 为本发明实施例二中灭活前的金葡菌载体悬液和灭活后的金葡菌载体悬液负染透射电镜结果图;

[0029] 图 5 为本发明实施例二中以金葡菌为基础的生物探针凝集试验灵敏度评价图;

[0030] 图 6 为本发明实施例二中金葡菌为基础红色生物探针与 0157:H7 凝集反应产物负染透射电镜观察图;

[0031] 图 7 为现有技术中未染色探针凝集试验灵敏度评价图;

[0032] 图 8 为本发明实施例二中 3 次以金葡菌为基础红色生物探针重复试验结果图;

[0033] 图 9 为本发明实施例二中以金葡菌为基础的 0157:H7 生物探针特异性评价图;

[0034] 图 10 为本发明实施例二中红色生物探针检测 0157:H7 稳定性试验结果图;

[0035] 图 11 示出了本发明实施例二制备红色生物探针凝集检测大肠杆菌 0157:H7 的示意图。

具体实施方式

[0036] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明的技术方案进行清楚、完整的描述,基于本发明中的具体实施方式,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所得到的所有其它实施方式,都属于本发明所保护的范围。

[0037] 实施例一

[0038] 本实施例提供了一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针,包括:金葡菌载体以及标记在所述金葡菌载体的表面 A 蛋白上,且能够与被检测抗原特异性结合的抗体;其中,所述金葡菌载体被四唑氯化物染料染至红色;具体的,四唑氯化物染料具体为 5-氰基-2,3-二(4-甲基苯基)四唑氯化物;5-氰基-2,3-二(4-甲基苯基)四唑氯化物(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC)是一种氧化还原型染料,一定浓度的该染料可以被细菌或者细胞内部的氧化还原酶还原成不溶物质,从而将细菌和细胞染色。由于反应在细胞内部进行,因此,该染色的过程不影响金葡菌表面 A 蛋白的活性,表面 A 蛋白与抗体(包括单克隆抗体或多克隆抗体)的结合不受影响;另外,该染色反应时间快,操作简单。

[0039] 本发明提供的这种基于金黄色葡萄球菌的生物探针,四唑氯化物染料可被金葡菌内部所含的各类氧化还原酶作用,生成红色的不溶物(在细菌内部发生),进而使得整个金葡菌显现出红色,即得到红色的金葡菌载体。因此,该红色的载体与相应的抗体标记之后(生物探针),其与特定的抗原发生协同凝集反应时,生物探针兼具乳胶微球和红细胞优点,颗粒均一、稳定,与抗原结合能力以及凝集性能强,颜色鲜明,使得凝集结果非常易于判定。与现有技术相比,该体系的凝集反应的分辨率、灵敏度和特异性都得到了很大的提高,因此,可有效的应用到免疫学检测中。

[0040] 为了使得本发明实施例一的金葡菌生物探针得到更好的应用,更加有效应用到微生物学、生物材料和生化检测技术领域,本发明还在上述实施例一的基础之上提供了实施例二,实施例二为根据实施例一所举的生物探针给出了具体的制备方法,请参考图 1- 图 11 :

[0041] 实施例二

[0042] 请参考图 1,本实施例提供的这种生物探针的制备方法,具体包括以下步骤:

[0043] 步骤 101 :利用 LB 平板划线分离出金葡菌,再利用 LB 液体培养基进行扩大培养,得到 OD600 为 0.5-1.5 的金葡菌悬液;

[0044] 具体的,在该步骤中,利用 LB 平板划线分离出金葡菌(优选金葡菌 N315),然后再挑选单克隆至 LB 液体培养基进行扩大培养,优选的,扩大培养的条件为:温度为 35-39℃,转速为 160-200rpm(具体操作时,参数取中间值,即温度为 37℃,转速为 180rpm),进而获得 OD600 为 0.5-1.5 的金葡菌悬液(平板计数结果推算菌浓度为 1×10^8 CFU/ml- 2×10^9 CFU/ml)。

[0045] 步骤 102 :在所述金葡菌悬液中加入四唑氯化物染料,并使得所述四唑氯化物染料的终浓度达到 1-10mM,染色 10-30min,得到红色菌悬液;

[0046] 通过在金葡菌悬液中加入既定终浓度的四唑氯化物染料,染料具体为 5- 氰基 -2,3- 二 (4- 甲基苯基) 四唑氯化物;其在染色的过程中需要将四唑氯化物染料的终浓度控制在 1-10mM,染色时间控制在 10-30min,这样即可保证该染料在金葡菌内的氧化还原酶的作用下生成红色颗粒物,进而保证在较短的时间内实现较好的染色效果。

[0047] 在本实施例中,对于染料的选取是非常关键的,能够明显地将金葡菌染色是首先需要考虑的因素,其次,还要保证该染料不能影响金葡菌的生物活性,尤其是不能影响其表面 A 蛋白与相应的抗体结合的性能,另外,还需要综合考虑染色时间以及操作步骤是否繁琐等因素。在染料选取的过程中,通过对比姬姆萨染色以及多种染料的染色效果,才获得了能够满足上述染色需求的四唑氯化物染料,具体为 5- 氰基 -2,3- 二 (4- 甲基苯基) 四唑氯化物,其染色鲜明,费时短,而且操作简单,更为重要的,其不影响金葡菌表面 A 蛋白与不同来源 IgG(猪、狗、兔、人、猴、鼠、小鼠及牛等)的 Fc 片段的结合,为实现该红色生物探针的制备奠定了基础。

[0048] 如图 2 所示,染色前 (A) 和染色后 (B) 的金葡菌悬液。制备后的载体悬液呈红色。进一步的,得到的红色菌悬液需要进行离心、清洗、重悬等操作进而实现金葡菌载体的制备。

[0049] 步骤 103 :将所述红色菌悬液依次进行离心收集菌体、缓冲液清洗、重悬以及灭活,得到红色的金葡菌载体悬液;

[0050] 在该步骤 103 中,为了实现菌体的收集效果,优选的,所述离心的转速为 3800-4200rpm、时间为 3-7min(更优选的,转速为 4000rpm,时间为 5min);所述清洗以及重悬均采用浓度为 0.1M、pH 为 8.0 的 Tris-HCl,且所述清洗的次数为 2-3 次。

[0051] 另外,如图 3 所示,为了分析此种载体(金葡菌载体)的生物安全性,对该载体在灭活前和灭活后的菌体进行平板划线,监测显示,此种载体的生物安全型是满足要求的。在图 3 中,A 为未灭活红色金葡平板划线 72h 结果,B 为灭活红色金葡平板划线 72h 结果。

[0052] 如图 4 所示,将此生物载体制备前和制备后在溶液里的状态进行了透射电镜表

征,结果显示制备后的新型载体分散性好,颗粒均匀。其中,在图 4 中,A 为金葡菌灭活前负染透射电镜结果。B 为所制备的以金葡为基础红色生物探针灭活后负染透射电镜结果。

[0053] 通过图 3 和图 4 可知,灭活前,染色后的菌保持了很好的活性,在平板上长出许多菌落。而经过甲醛或温育灭活后的金葡菌都没有生长。进而提示所制备的红色生物载体虽然是由金葡菌制备而来,但是灭活后不能生长,保证了红色载体的生物安全性。电镜图片显示(图 4),灭活后的载体呈单颗粒,且大小均一,而未灭活的菌为葡萄球菌的典型葡萄串分布,聚集在一起。

[0054] 另外,在灭活处理的过程中,为了实现便于操作的同时,尽可能的不减少操作对金葡菌载体特异结合抗体的能力,优选的,所述灭活过程具体包括:在将所述重悬处理后的红色菌悬液中加入终浓度为 0.1-5% (优选 1%) 的甲醛处理 10-30min;或,将所述重悬处理后的红色菌悬液在 60-75℃温育 15-50min。

[0055] 步骤 104:将红色的所述金葡菌载体悬液与能够和被检测的抗原特异性结合的抗体混合后依次进行孵育、离心收集沉淀、缓冲液清洗以及重悬,得到标记有抗体的菌悬液;

[0056] 在该步骤中,抗体的选择是多样的,只要满足其能够与被检测抗原特异结合的条件即可。常用的,其可以是单/多克隆抗体,但是,优选的,在本实施例中,采用单克隆抗体。

[0057] 金葡菌载体悬液制备完成后,以大肠杆菌 0157:H7 的检测为例,利用金葡菌表面 A 蛋白的免疫学性质,将 0157:H7 的 H 抗原的鼠源 IgG 单克隆抗体标记在红色灭活的金葡菌载体上。

[0058] 具体步骤如下:

[0059] 取红色的金葡菌载体悬液,按体积比 1:50-1:500 加入 H 抗原的鼠源 IgG 单克隆抗体 (1mg/ml),37℃、180rpm 孵育 30min 后,4℃,4000rpm,5min 收集沉淀,上清可回收再利用。用相同体积 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗 3 遍后,相同体积 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 重悬,得到标记有单克隆抗体的菌悬液。

[0060] 步骤 105:将所述标记有抗体的菌悬液中加入封闭剂后颠倒混匀,进行封闭处理,得到红色的生物探针。

[0061] 得到标记有单克隆抗体的菌悬液后,为了保证该生物探针在检测抗原时,生物探针上的抗体能够特异性地与抗原的相应部位结合,以防止发生非特异性吸附,优选的,需要将获得的标记有单克隆抗体的菌悬液加入封闭剂后进行封闭处理,具体的,每 100 毫升的所述标记有单克隆抗体的菌悬液加入的封闭剂的质量为 0.1-5 克,然后颠倒溶解,实现封闭处理的效果,即可得到能够检测 0157:H7 红色生物探针。优选的,为了得到较好的封闭效果,在本实施例中,选用脱脂奶粉或者牛血清蛋白 (BSA) 作为封闭剂。

[0062] 0157:H7 是肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic E. coli, EHEC) 的一个主要菌型,其致病力强,对人类健康构成重大威胁。0157:H7 是革兰氏阴性两端钝圆的短杆菌,大小 $0.5 \times 1 \sim 3$ 微米。周身鞭毛,能运动,无芽孢。目前对 0157:H7 的检测方法包括生化反应、免疫学、分子生物学、血清学以及毒素等多个方面的检测。其中免疫学方法中的乳胶凝集试验是本发明的基础之一,该方法比较成熟,市场上已有诊断试剂盒可供选择,但特异性及灵敏度均有待提高。因此,在本发明的应用中,主要以 0157:H7 检测为例,通过获得易于判定凝集效果的红色生物探针,进而提高该致病菌的检测灵敏度。

[0063] 另外,请参考图 11,在图 11 中,示出了本发明实施例的这种红色生物探针凝集检

测大肠杆菌 0157:H7 的示意图。

[0064] 需要指出的是,在本实施例中,获得了红色生物探针之后,为了检测其是否满足应用需求,还对其灵敏度进行了评价,具体的,包括以下步骤:

[0065] S1:LB 平板划线分离 0157:H7 后,挑取单克隆至 LB 液体培养基,在培养箱以 37℃,180rpm 条件将菌液扩大培养后,利用平板计数确定菌浓度。取 1×10^8 CFU/ml $500 \mu\text{l}$,于 10000rpm,2min 收集菌液, $1 \times \text{PBS}$ 洗 3 遍后,用 $500 \mu\text{l}$ 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液重悬菌液。

[0066] S2:用 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液 10 倍梯度稀释 1×10^8 CFU/ml 菌 0157:H7。

[0067] S3: 取 1×10^8 、 1×10^7 、 5×10^6 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 CFU/ml 的 0157:H7 以及空白对照 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 各 $10 \mu\text{l}$ 滴在洁净载玻片上后,取 $20 \mu\text{l}$ 2×10^7 – 2×10^{10} 个 /ml 的新型生物探针悬液与其混合,5 ~ 15min 后肉眼观察结果。结果如图 5 所示,其中每个反应的大肠杆菌 0157:H7 含量为 (CFU) A. 10^6 、B. 10^5 、C. 5×10^4 、D. 10^4 、E. 10^3 、F. 10^2 、G. 10^1 、H. 10^0 、I. 空白对照。

[0068] 为了方便判读凝集结果,制定了阳性标准,即出现明显红色凝集块和絮状沉淀,溶液变透明为强阳性。结合这一标准,图 4 的灵敏度可达到 5×10^4 CFU/ 反应。另外,将上述产生的明显凝集溶液轻柔重悬后,利用透射电镜进行了表征。图 6 示出了以金葡菌为基础红色生物探针与 0157:H7 凝集反应产物负染透射电镜观察图,进一步证实了凝集反应的结果。

[0069] 在本实施例中,还将这种新型生物探针与未染色的生物探针进行了比较。未染色的基于金葡菌的生物探针没有用染料染色,其他制备方法和凝集试验与该新型生物探针相同; 2×10^8 个 /ml 的无色生物探针 $20 \mu\text{l}$ 与 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 CFU/ml 的 0157:H7 以及空白对照 0.1M Tris-HCl (pH8.0) 各 $10 \mu\text{l}$ 的凝集试验结果如图 7 所示。结果显示传统的基于金葡菌的协同凝集反应结果,肉眼判定非常不明确,各不同浓度的差异不明显,所以,凝集反应的结果很难判断。在图 6 中,每个反应的 0157:H7 含量为 (CFU). A. 10^6 、B. 10^5 、C. 10^4 、D. 10^3 、E. 10^2 、F. 10^1 、G. 10^0 、H. Blank。

[0070] 另外,如图 8 所示,按照本实施例提供的方法重复制备 3 次基于金葡菌的红色生物探针并和 1×10^5 CFU/ml 的 0157:H7 单克隆凝集试验结果一致,说明该凝集试验体系可重复性强,可以应用到 0157:H7 的检测中。

[0071] 为了检测本发明实施例提供的这种红色生物探针与被检测抗原是否能够特异性结合。在本发明中,还对这种新型生物探针检测 0157:H7 的特异性进行了评价,具体的操作步骤如下:

[0072] 1)、将大肠杆菌 0157、091、097、0100、0149、BL21 (DE3)、肠炎沙门以及猪链球菌分别接种至 LB 液体培养基,将铜绿假单胞菌接种至 BHI+5% 小牛血清液体培养基后,37℃、180rpm 过夜扩大培养。

[0073] 2)、通过平板计数确定 0157:H7 浓度后,将上述菌各取 $500 \mu\text{l}$, $1 \times \text{PBS}$ 洗 3 遍, $500 \mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}$ 重悬菌液。将 0157:H7 两倍梯度稀释至 5 个梯度,各取 $100 \mu\text{l}$ 上述菌悬液测量 OD600,通过 0157:H7, 的 5 个梯度的方程大致测算其他菌液浓度。

[0074] 3)、各取 $10 \mu\text{l}$ 1×10^7 CFU/ml 大肠杆菌 0157、091、097、0100、0149、BL21 (DE3)、肠炎沙门、猪链球菌、铜绿假单胞菌以及 $10 \mu\text{l}$ 1×10^7 CFU/ml 0157:h7 与 $10 \mu\text{l}$ 1×10^7

CFU/ml 大肠杆菌 0100、肠炎沙门、猪链球菌、铜绿假单胞菌的混悬液滴于洁净载玻片上。再取 $20\ \mu\text{l}$ 2×10^{10} 个 /ml 的新型生物探针悬液与其混合,5—15min 后肉眼观察结果。结果如图 9,其中,A. 091、B. 097、C. 0100、D. 0149、E. BL21、F. 肠炎沙门、G. 猪链球菌、H. 铜绿假单胞菌、I. 0157、J. 0 157+0100、K. 0157+ 肠炎沙门、L. 0157+ 猪链球菌、M. 0157+ 铜绿假单胞菌、N. Blank。

[0075] 结果显示,这种新型生物探针在应用于 0157:H7 的凝集反应检测时,特异性较好。

[0076] 最后,基于本发明实施例所提供的这种红色生物探针,公开其对检测 0157:H7 的稳定性检测试验的步骤:

[0077] 1)、取 2 份所制备的红色生物探针各 $200\ \mu\text{l}$ 置于 1.5ml EP 管。

[0078] 2)、一份放置于 4°C ,一份放置于室温,一个月后,进行凝集试验,挑取 LB 平板分离的 0157:H7 单克隆 2 个,并分别与 $20\ \mu\text{l}$ 步骤 1) 中所给出的生物探针悬液混合,5~15min 后,结果如图 10 所示,其中,A 为 4°C 放置一个月稳定性结果,B 为室温放置一个月稳定性结果。通过图 10 显示,两者的凝集现象明显,证明该生物探针稳定性较好。

[0079] 综上,本发明实施例所制备的金葡菌生物探针实现了在 0157:H7 协同凝集检测上的应用。通过将所制备的金葡菌红色载体与 0157:H7 鞭毛抗原(H Antigen)的鼠源 IgG 单抗共孵育,将抗体标记到红色灭活金葡菌表面,经脱脂奶粉等封闭后,得到能检测 0157:H7 的生物探针。而且,使用该生物探针的凝集试验对 0157:H7 的检测限达到 5×10^4 CFU/ 反应,凝集结果肉眼易于观察,整个过程不需要大型仪器且一般操作人员容易掌握。基于上述的启示,该生物探针可以通过标记不同种类的单抗或者多克隆抗体,进而实现与其特异性结合的抗原的检测,为免疫学检测病原提供了有效的帮助。

[0080] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

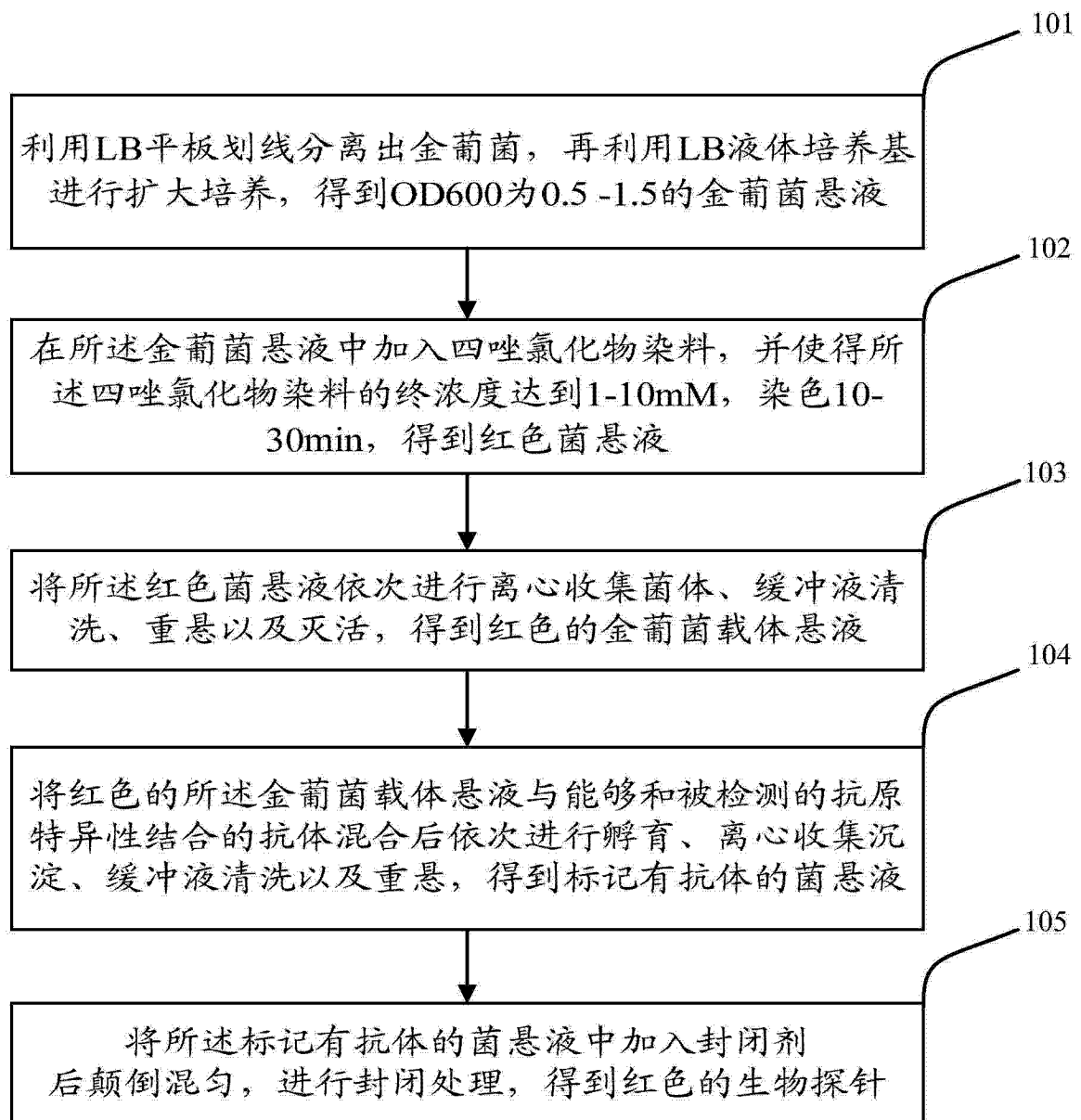


图 1

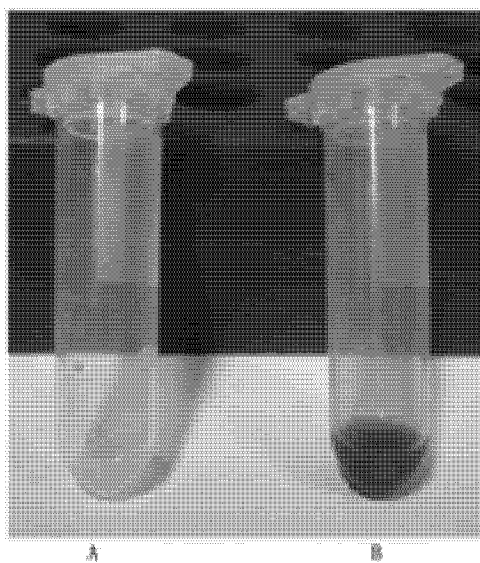


图 2

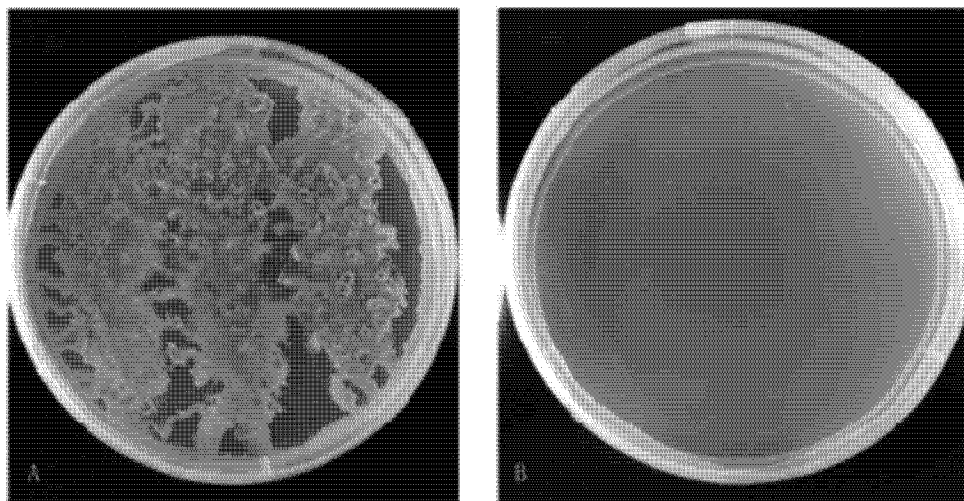


图 3

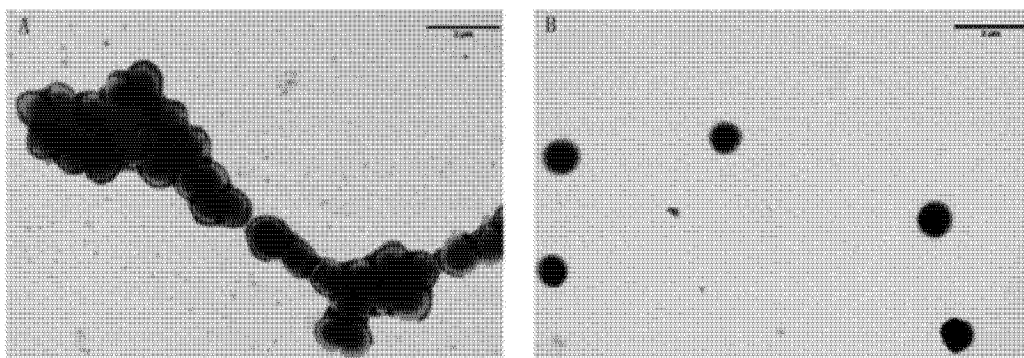


图 4

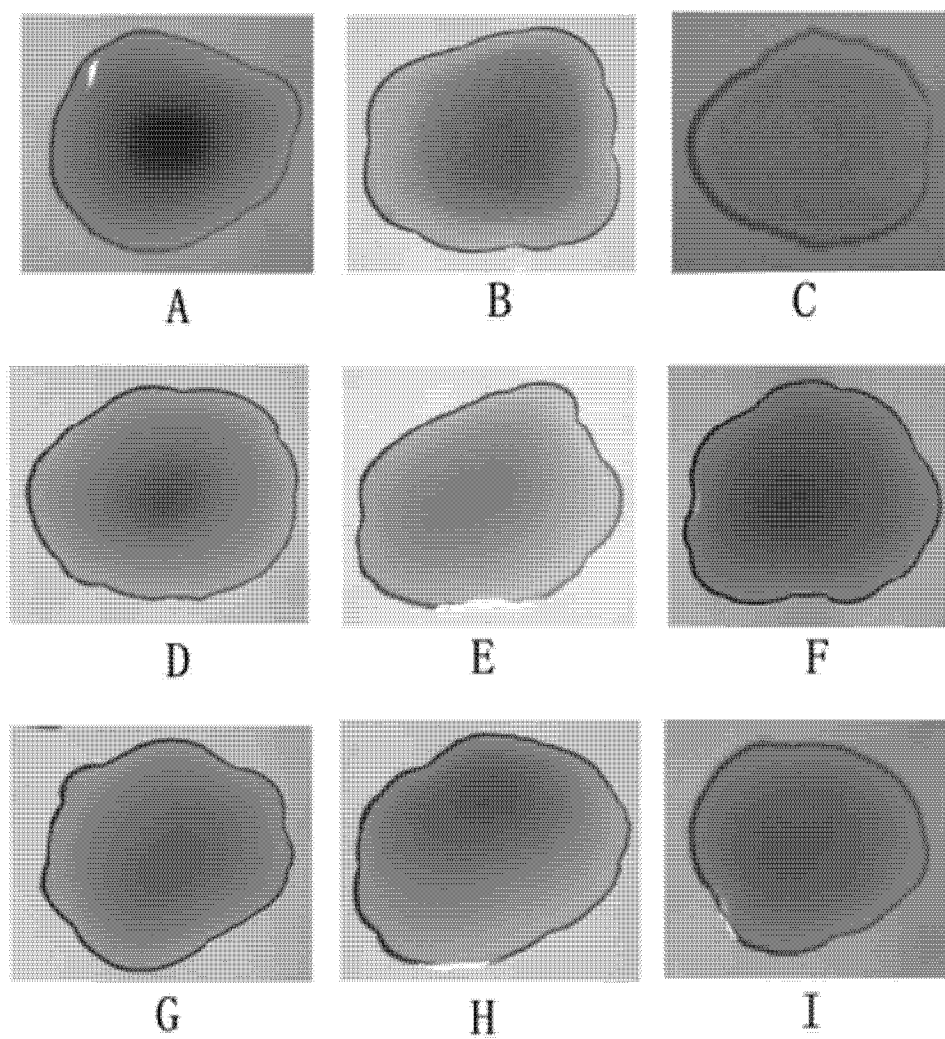


图 5

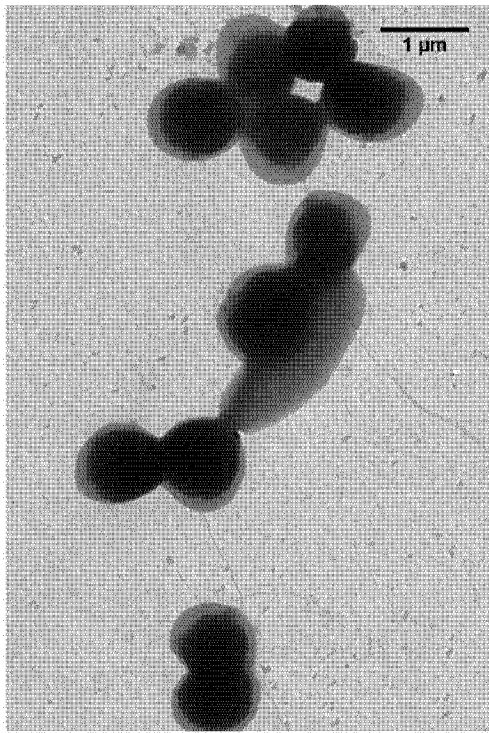


图 6

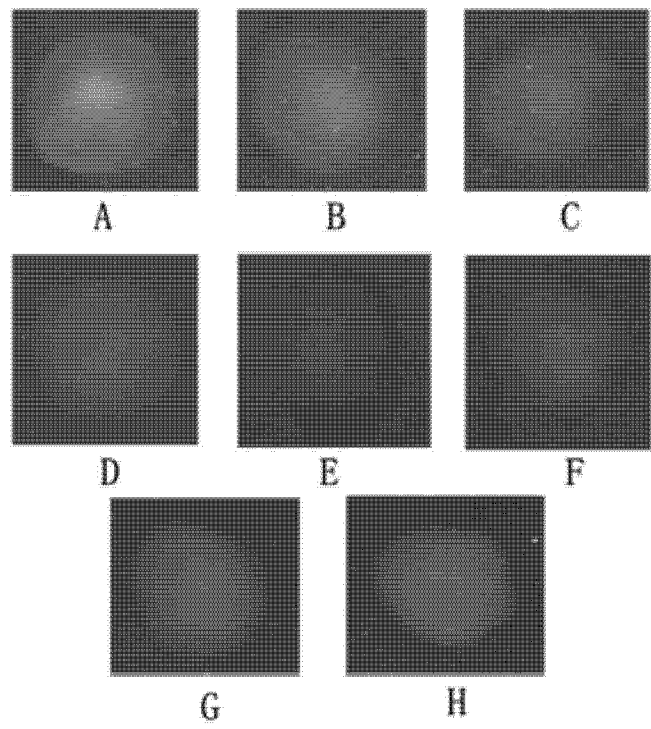


图 7

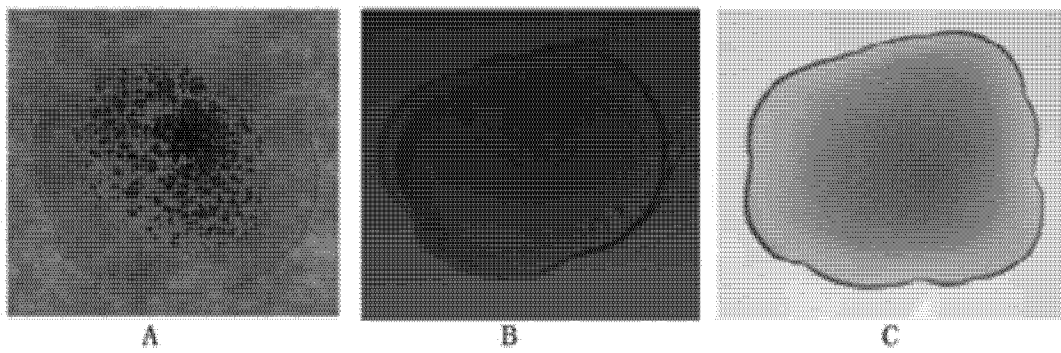


图 8

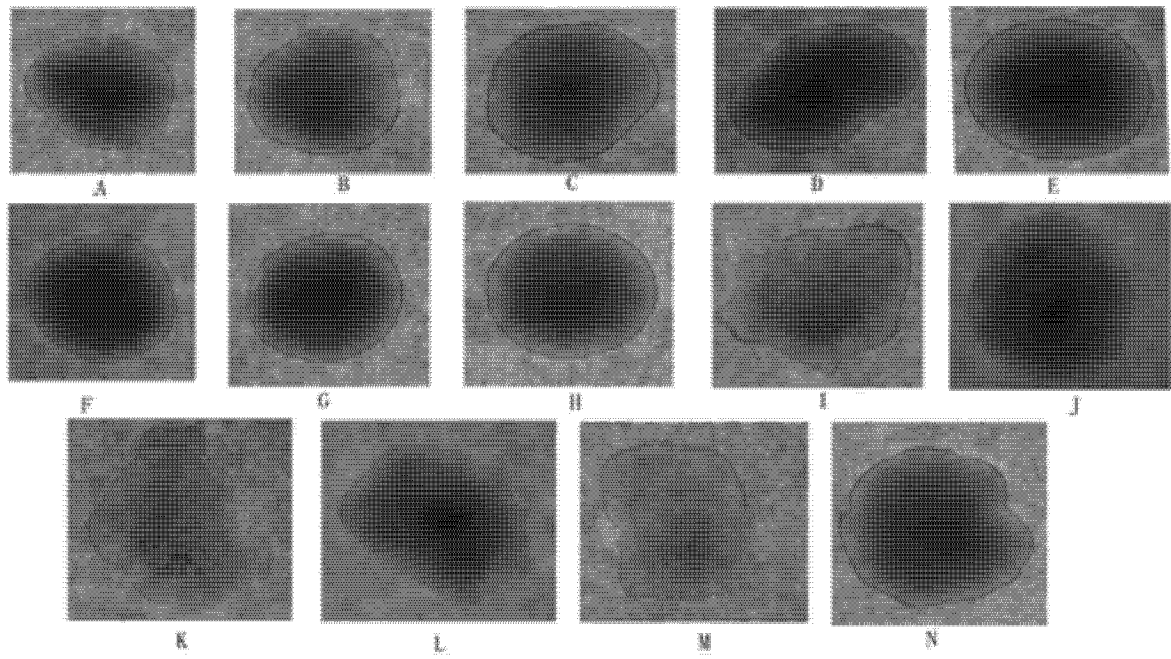


图 9

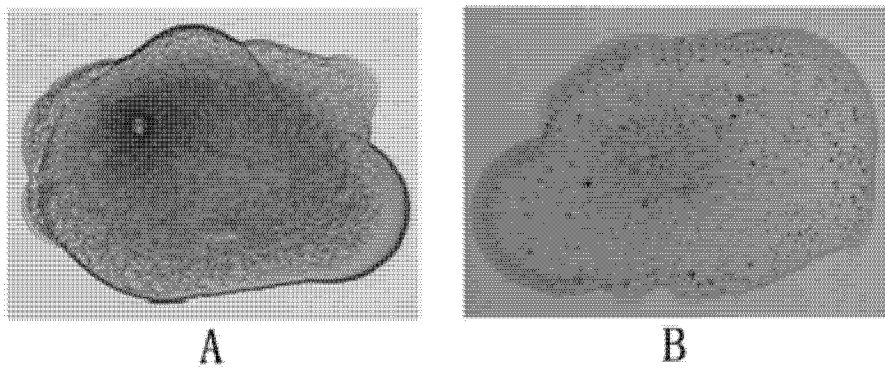


图 10

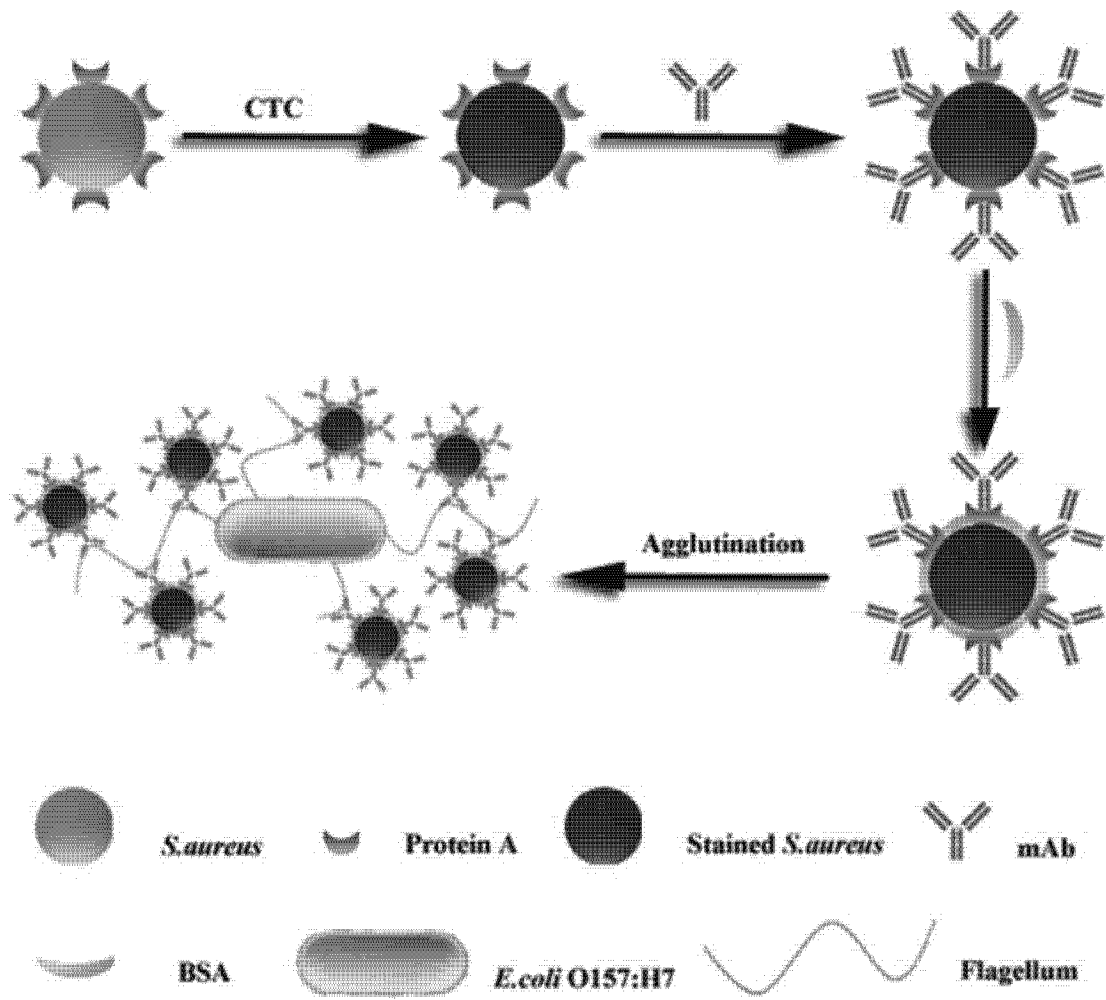


图 11

专利名称(译)	基于金黄色葡萄球菌的生物探针、制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN104198737A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410462482.2	申请日	2014-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
[标]发明人	危宏平 胡伟 杨航 余军平		
发明人	危宏平 胡伟 杨航 余军平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56916 G01N33/56938		
代理人(译)	吴开磊		
其他公开文献	CN104198737B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及微生物病原检测技术领域，具体而言，涉及一种基于金黄色葡萄球菌的生物探针、制备方法及其应用。该基于金黄色葡萄球菌的生物探针，包括：金葡菌载体以及标记在所述金葡菌载体的表面A蛋白上，且能够与被检测抗原特异性结合的抗体；其中，所述金葡菌载体被四唑氯化物染料染至红色。本发明提供的这种基于金黄色葡萄球菌的生物探针，兼具乳胶微球和红细胞优点，颗粒均一、稳定，与抗原结合能力以及凝集性能强，颜色鲜明，使得凝集结果非常易于判定。与现有技术相比，该体系的凝集反应的分辨率、灵敏度和特异性都得到了很大的提高，因此，可有效地应用到免疫学检测中。

