



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103954750 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201410133860. 2

WO 2009105192 A2, 2009. 08. 27,

(22) 申请日 2014. 04. 03

JunLin Wen et al. Colorimetric

(73) 专利权人 广东省生态环境与土壤研究所
地址 510650 广东省广州市天河区天源路
808

detection of *Shewanella oneidensis* based on immunomagnetic capture and bacterial intrinsic peroxidase activity. 《Science Reports》. 2014, 第 4 卷 5191.

(72) 发明人 温俊林 周顺桂 陈俊华

JunLin Wen et al. Graphene oxide as nanogold carrier for ultrasensitive electrochemical immunoassay of *Shewanella oneidensis* with silver enhancement strategy. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2014, 第 52 卷 44-49.

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

YouPeng Chen et al. An innovative miniature microbial fuel cell fabricated using photolithography. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2011, 第 26 卷 (第 6 期), 2841-2846.

代理人 郑莹

审查员 李进进

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101696973 A, 2010. 04. 21,

CN 104458607 A, 2015. 03. 25,

CN 103380213 A, 2013. 10. 30,

CN 102382888 A, 2012. 03. 21,

WO 2014186901 A1, 2014. 11. 27,

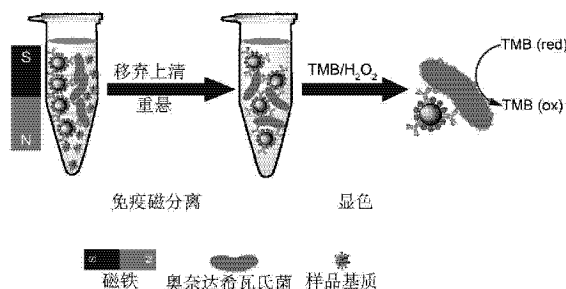
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法。免疫磁珠的制备为将奥奈达希瓦氏菌特异性抗体与活化的羧基化聚苯乙烯磁性微球进行孵育即可获得。快速检测方法为将免疫磁珠放入样品溶液中,使免疫磁珠上的抗体与奥奈达希瓦氏菌体抗原充分结合;去除样品基质得到免疫磁珠-奥奈达希瓦氏菌免疫复合物,洗涤干净,加显色液发生显色反应,再加入硫酸溶液终止显色反应,检测其 OD_{450nm} 值,若 OD_{450nm} 值 0.029 以上,说明样品中含有奥奈达希瓦氏菌。本发明方法具有较高的灵敏度,检测限为 5.0×10³ cfu/ml,操作方便、迅速,可用于实地现场检测;且具有很好的特异性,检测结果几乎不受其他常见微生物的影响。



CN 103954750 B

1. 一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:包括以下步骤:

1)将免疫磁珠加入待测样品溶液中,在 18 ~ 27℃ 下振荡反应,使免疫磁珠上的抗体与奥奈达希瓦氏菌体抗原充分结合;

2)步骤 1)中结合反应完成后,用磁铁将免疫磁珠与样品基质分开,去样品基质,得到免疫磁珠-奥奈达希瓦氏菌免疫复合体;

3)将 2)中得到的免疫磁珠-奥奈达希瓦氏菌免疫复合体洗涤干净,加入显色液,发生显色反应,使蓝色产物生成完全;

4)向蓝色产物中加入硫酸溶液终止显色反应,蓝色产物转化为黄色产物,检测其在 450 纳米处 OD 值,若 OD 值在 0.029 以上,说明此样品中含有奥奈达希瓦氏菌。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:步骤 1)中免疫磁珠与样品溶液体积比为(1 ~ 5):50。

3. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:步骤 1)中所述振荡反应的时间为 10 ~ 70min。

4. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:步骤 3)中所述洗涤的具体过程为先用含 4 ~ 6% (v/v) 吐温 20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 ~ 4 次,再用纯水洗涤干净。

5. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:步骤 3)中所述显色液的体积与样品溶液体积的比为(0.8 ~ 1.2):5。

6. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:步骤 3)中所述显色液含有的 0.1 ~ 5mM 过氧化氢,90 ~ 110mM 柠檬酸钠,190 ~ 210mM 磷酸氢二钠,0.3 ~ 0.35mM 四甲基联苯胺, pH 值为 4 ~ 5。

7. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:步骤 3)中所述显色反应时间为 5 ~ 60min。

8. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,其特征在於:所述免疫磁珠的制备方法包括以下步骤:

1)制备奥奈达希瓦氏菌特异性抗体;

2)将羧基化聚苯乙烯磁性微球活化,洗涤干净,然后与步骤 1)中制备的奥奈达希瓦氏菌特异性抗体进行振荡孵育,使抗体与磁珠充分结合;

3)将孵育的磁珠洗涤干净,然后封闭,清洗干净,4℃ 保存,即可获得免疫磁珠。

一种免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测领域,涉及一种免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法。

背景技术

[0002] 奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis* MR-1, *S. oneidensis*)属于 γ -变形菌纲的革兰氏阴性兼性厌氧菌,广泛存在于海水,海洋沉积物和淡水环境。在厌氧条件下,奥奈达希瓦氏菌能够在降解有机物的同时还原重金属离子。它在环境污染修复领域具有广泛的应用前景,例如它直接能够将水溶性的U(VI)还原成U(IV)。此外它还能还原硫代硫酸盐产生硫离子,继而与重金属离子结合形成硫化物沉淀。鉴于奥奈达希瓦氏菌在环境领域的应用前景,开发低成本的快速检测方法具有重要意义。目前,针对奥奈达希瓦氏菌的检测方法,有表面增强拉曼光谱法和微阵列杂交法。然而,这些方法不但操作复杂而且检测灵敏度较低。

[0003] 免疫磁分离技术是免疫学和磁性载体技术相结合而发展起来的一种新型富集分离技术。该技术采用的磁性微球包被有特异性抗体,可与相应的靶物质特异性结合形成免疫磁珠抗原复合物,通过外加磁场作用,免疫磁珠抗原复合物和溶液快速分离。因此,具有检测时间短、灵敏度较高和不受样品基质影响等优点。近年来,采用免疫磁分离技术与现代信号放大系统相结合的原理,开发了众多新型检测方法。例如,免疫磁珠分离技术与PCR、流式细胞术和ELISA等相结合。但是,这些方法具有检测时间长、成本高和需要复杂的仪器等。已有研究表明,奥奈达希瓦氏菌80%的膜结合的c型细胞色素位于细胞外膜,而且这些C型细胞色素与辣根过氧化物(HRP)具有相似的过氧化氢酶活性。对现有的技术检索发现,目前还没有针对奥奈达希瓦氏菌的免疫磁分离检测方法。因此,利用奥奈达希瓦氏菌细胞外膜过氧化氢酶活性,结合免疫磁珠分离技术,可以开发出一种新型的奥奈达希瓦氏菌的快速检测方法。

发明内容

[0004] 为了解决上述存在的问题,本发明能过研究,将基于奥奈达希瓦氏菌胞外过氧化氢酶活性的信号放大作用与免疫磁珠分离技术相结合进行创造性地结合,构建快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法,该方法具有特异性高,操作简单,检测迅速。

[0005] 本发明的目的在于提供一种免疫磁珠。

[0006] 本发明的另一目的在于提供快一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法。

[0007] 本发明所采取的技术方案是:

[0008] 一种免疫磁珠,其制备方法包括以下步骤:

[0009] 1) 制备奥奈达希瓦氏菌特异性抗体;

[0010] 2) 将羧基化聚苯乙烯磁性微球活化,洗涤干净,然后与步骤1)中制备的奥奈达希瓦氏菌特异性抗体进行振荡孵育,使抗体与磁珠充分结合;

[0011] 3) 将孵育的磁珠洗涤干净, 然后封闭, 清洗干净, 4℃保存, 即可获得免疫磁珠。

[0012] 一种快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法, 包括以下步骤:

[0013] 1) 将上述免疫磁珠加入待测样品溶液中, 在 18 ~ 27℃下振荡反应, 使免疫磁珠上的抗体与奥奈达希瓦氏菌体抗原充分结合;

[0014] 2) 步骤 1) 中结合反应完成后, 用磁铁将免疫磁珠与样品基质分开, 去样品基质, 得到免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体;

[0015] 3) 将 2) 中得到的免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体洗涤干净, 加入显色液, 发生显色反应, 使蓝色产物生成完全;

[0016] 4) 向蓝色产物中加入硫酸溶液终止显色反应, 蓝色产物转化为黄色产物, 检测其在 450 纳米处 OD 值, 若 OD 值在 0.029 以上, 说明此样品中含有奥奈达希瓦氏菌。

[0017] 进一步的, 步骤 1) 中免疫磁珠与样品溶液体积比为 (1 ~ 5):50。

[0018] 进一步的, 步骤 1) 中所述振荡反应的时间为 10 ~ 70min。

[0019] 进一步的, 步骤 3) 中所述洗涤的具体过程为先用含 4 ~ 6% (v/v) 吐温 20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 ~ 4 次, 再用纯水洗涤干净。

[0020] 进一步的, 步骤 3) 中所述显色液的体积与样品溶液体积的比为 (0.8 ~ 1.2):5。

[0021] 进一步的, 步骤 3) 中所述显色液含有的 0.1 ~ 5mM 过氧化氢, 90 ~ 110mM 柠檬酸钠, 190 ~ 210mM 磷酸氢二钠, 0.3 ~ 0.35mM 四甲基联苯胺, pH 值为 4 ~ 5。

[0022] 进一步的, 步骤 3) 中所述显色反应时间为 5 ~ 60min。

[0023] 本发明的有益效果是:

[0024] (1) 本发明所述的免疫磁珠具有完全超顺磁性, 单分散性, 悬浮性好;

[0025] (2) 奥奈达希瓦氏菌具有胞外过氧化氢酶活性, 在过氧化氢存在下能够催化氧化四甲基联苯胺, 产生蓝色反应产物, 达到快速检测的目的;

[0026] (3) 本发明所述的奥奈达希瓦氏菌的检测方法具有较高的灵敏度, 对奥奈达希瓦氏菌的检测限为 5.0×10^3 cfu/ml, 检测过程方便、迅速, 可用于实地现场检测;

[0027] (4) 本发明所述的奥奈达希瓦氏菌检测方法具有很好的特异性, 常见的其他微生物对检测几乎不产生影响。

附图说明

[0028] 图 1 为免疫磁珠制备示意图;

[0029] 图 2 为快速检测奥奈达希瓦氏菌的示意图;

[0030] 图 3 为奥奈达希瓦氏菌和免疫磁珠复合体的光学显微镜头和扫描电镜图;

[0031] 图 4 为奥奈达希瓦氏菌和免疫磁珠的类过氧化物酶活性检测;

[0032] 图 5 为快速检测奥奈达希瓦氏菌的工作条件的优化;

[0033] 图 6 为奥奈达希瓦氏菌检测的回归曲线;

[0034] 图 7 为特异性实验结果图;

[0035] 图 8 为样品基质成分对本发明检测方法的影响。

具体实施方式

[0036] 免疫磁珠的制备

[0037] (1) 制备免疫抗原:所述免疫抗原采用 1% 福尔马林灭活奥奈达希瓦氏菌液而制成;

[0038] (2) 制备奥奈达希瓦氏菌特异性抗体:所述奥奈达希瓦氏菌特异性抗体采用灭活免疫抗原免疫新西兰白兔方法得到抗血清,并且采用两步硫酸铵盐析法纯化抗血清,获得奥奈达希瓦氏菌特异性抗体;

[0039] (3) 制备免疫磁珠:所述免疫磁珠采用纯化的奥奈达希瓦氏菌特异性抗体与活化的羧基化聚苯乙烯磁性微球振荡孵育偶联制备而成;

[0040] 快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法

[0041] 1) 将上述制备的免疫磁珠加到待测样品液中,室温(18 ~ 27℃)振荡反应 10 ~ 70min,使免疫磁珠上的抗体与奥奈达希瓦氏菌体抗原充分结合;其中免疫磁珠与样品溶液体积比为(1 ~ 5):50;

[0042] 2) 用磁铁将免疫磁珠与样品基质分开,去样品基质,得到免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体;

[0043] 3) 将 2) 中得到的免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体洗涤干净,加入显色液,显色液的体积与样品溶液体积的比为(0.8 ~ 1.2):5,发生显色反应 5 ~ 60min,使蓝色产物生成完全;

[0044] 4) 向蓝色产物中加入硫酸溶液终止显色反应,蓝色产物转化为黄色产物,检测其在 450 纳米处 OD 值,若 OD 值在 0.029 以上,说明此样品中含有奥奈达希瓦氏菌。

[0045] 优选的,步骤 1) 中免疫磁珠与样品溶液体积比为 4:50。

[0046] 优选的,步骤 1) 中所述振荡反应的时间为 50min。

[0047] 优选的,步骤 3) 中所述显色液的体积与样品溶液体积的比为 1:5

[0048] 优选的,步骤 3) 中所述洗涤的具体过程为先用含 4 ~ 6% (v/v) 吐温 20 的 PBS 缓冲液洗涤 3 ~ 4 次,再用纯水洗涤干净。

[0049] 优选的,步骤 3) 中所述显色液含有的 0.1 ~ 5mM 过氧化氢,90 ~ 110mM 柠檬酸钠,190 ~ 210mM 磷酸氢二钠,0.3 ~ 0.35mM 四甲基联苯胺,pH 值为 4 ~ 5。

[0050] 最优选的,步骤 3) 中所述显色液含有 2mM 过氧化氢,100mM 柠檬酸钠,200mM 磷酸氢二钠,0.32mM 四甲基联苯胺,pH 为 4.3。

[0051] 优选的,步骤 3) 中所述显色反应时间为 30min。

[0052] 下面简要介绍一下本发明方法的技术原理:

[0053] 在有奥奈达希瓦氏菌存在下,免疫磁珠与奥奈达希瓦氏菌发生抗原抗体结合形成免疫复合体;在外磁场作用下,免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体与样品基质分离,以移液器吸取样品基质,得到免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体;用含有 1%BSA 的 PBST 洗涤洗去非特异性结合的奥奈达希瓦氏菌;在有过氧化氢存在时,奥奈达希瓦氏菌外膜 c 型细胞色素催化氧化四甲基联苯胺(TMB),产生了蓝色反应产物;该蓝色产物与硫酸反应转化成黄色,可用酶标仪于 450 纳米处检测 OD 值。检测得到 OD 值与奥奈达希瓦氏菌数量在一定范围正相关。

[0054] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0055] 实施例 1:免疫磁珠的制备

[0056] (1) 奥奈达希瓦氏菌特异性抗体制备

[0057] 将奥奈达希瓦氏菌甘油保存液以 1:100 比例接种于 500ml 三角瓶中,在温度为 30℃,转速 160rpm 的恒温摇床中振荡培养 16h。将培养菌液以 5000g 离心 20min,收集沉淀,以 PBS 洗涤 3 遍后,以 PBS 将菌液浓度调至 10^9 cfu/mL。以 1% 福尔马林灭活菌悬液 24h 后,再以 PBS 洗涤 3 遍,将菌液浓度调至 10^8 cfu/mL,并且与弗氏佐剂按照 1:1 (V/V) 充分乳化制得免疫抗原。将制备抗原免疫新西兰白兔,首次免疫 30 天后,每隔 10 天免疫一次,总共免疫 4 次。在最后一次免疫后 10 天,收集耳朵静脉血,分离得到奥奈达希瓦氏菌特异性抗血清。制备的抗血清以 50%、33% 饱和度硫酸铵各盐析一次,然后以 PBS 透析 72h,将透析液以聚乙二醇 20000 浓缩后,分装保存于 -20℃。

[0058] (2) 免疫磁珠制备

[0059] 如图 1 所示,取 1ml 直径为 1-2 μ m 的羧基化聚苯乙烯磁性微球,以 2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液(MES) (0.05 M, pH 5.5) 洗涤 3 次,分别加入 200 微升 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 溶液(100mg/ml)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 溶液(100mg/ml) 和 600 微升 MES,室温振荡 30min。将活化的免疫磁珠以 MES 洗涤 3 次后,加入 1.4mg/ml 纯化奥奈达希瓦氏菌抗体,室温振荡 3h 后以 PBS 洗涤 3 遍,重悬于 1% 牛血清白蛋白溶液(W/V) 进行封闭,4℃ 保存,即可。

[0060] 实施例 2:快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法

[0061] 1) 在 1.5ml 离心管中加入 10 ~ 50 实施例 1 中制备的免疫磁珠和 500 μ L 待测样品,室温(18 ~ 27℃) 振荡 50 ~ 60min;

[0062] 2) 将离心管置于磁铁上 5min,使得磁珠与溶液完全分开,用移液器从离心管底部吸去样品基质,得到免疫磁珠-奥奈达希瓦氏菌免疫复合物;

[0063] 3) 将 2) 中得到的复合物用含 4 ~ 6% (v/v) 吐温 20 的 PBS 洗涤液洗涤 3 次,用纯水洗涤 1 次后转移至 96 孔板,在 96 孔板中加入 100 μ L 显色液(0.1 ~ 5mM 过氧化氢,90 ~ 110mM 柠檬酸钠,190 ~ 210mM 磷酸氢二钠,0.3 ~ 0.35mM 四甲基联苯胺, pH 为 4 ~ 5),室温(18 ~ 27℃) 显色反应 5 ~ 60min;

[0064] 4) 加入 50 μ L 2M 硫酸溶液终止反应,通过磁分离,取上清液,用酶标仪检测其在 450nm 处 OD 值,若 OD 值在 0.029 以上,说明此样品中含有奥奈达希瓦氏菌。

[0065] 实施例 3:快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法

[0066] 快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法的示意图如图 2 所示,具体操作步骤为:

[0067] 1) 在 1.5ml 离心管中加入 40 μ L 实施例 1 中制备的免疫磁珠和 500 μ L 5.0×10^6 CFU 的奥奈达希瓦氏菌液,室温(18 ~ 27℃) 振荡 60min;

[0068] 2) 将离心管置于磁铁上 5min,使得磁珠与溶液完全分开,用移液器从离心管底部吸去样品基质,得到免疫磁珠-奥奈达希瓦氏菌免疫复合物;

[0069] 3) 将 2) 中得到的复合物用含 5% (v/v) 吐温 20 的 PBS 洗涤液洗涤 3 次,用纯水洗涤 1 次后转移至 96 孔板,在 96 孔板中加入 100 μ L 显色液(100mM 柠檬酸钠,200mM 磷酸氢二钠,0.32mM 四甲基联苯胺和 2mM 过氧化氢, pH 4.3),室温(18 ~ 27℃) 显色反应 30min;

[0070] 4) 加入 50 μ L 2M 硫酸溶液终止反应,通过磁分离,取上清液,用酶标仪检测其在 450nm 处 OD 值(OD 值为 0.60),即可。

[0071] 为了进一步确认免疫磁珠与 *S. oneidensis* (奥奈达希瓦氏菌) 的结合是否与免疫磁珠表面的抗体有关,分别用磁珠和免疫磁珠去捕获 *S. oneidensis*,对捕获结果进行检

测,结果显示磁珠未能捕获到 *S. oneidensis*,如图 3a 所示,其中光学显微镜图和扫描电镜图中均无杆状的菌体,而在免疫磁珠捕获图中(如图 3b 所示),其光学显微镜图和扫描电镜图中均可看到那杆状的 *S. oneidensis*菌体,说明本发明的免疫磁珠是通过其表面的抗体与 *S. oneidensis*菌体表面抗原的特异性识别而进行结合的。

[0072] 另外,有些研究报道一些磁珠本身具有类似于过氧化物酶的活性(Wei, H. & Wang, E. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Anal. Chem.* 80, 2250–2254 (2008).),为了进一步确认在本发明快速检测方法中所采用磁珠是否也具有类似于过氧化物酶的活性? 其中的显色反应是否受所采用的磁珠的影响? 分别将 *S. oneidensis*、细胞色素 c(阳性对照)、*S. oneidensis*和免疫磁珠的复合体、免疫磁珠加入含 H₂O₂和 TMB 的溶液中,进行显色反应,且扫描反应液的紫外—可见光光谱,结果如图 4 所示,其中 *S. oneidensis*(图 4a)、细胞色素 c(图 4b)、*S. oneidensis*和免疫磁珠的复合体(图 4c)均能产生蓝色反应产物,且在 650nm 处具有明显的吸光峰,而免疫磁珠组(图 4d)和仅含 H₂O₂和 TMB 的阴性对照组(图 4e)中均无蓝色产物,还未出现相应的吸光峰,说明本发明选用的磁珠不具有类似于过氧化物酶的活性,对本发明的检测方法不存在干扰。

[0073] 实施例 4:快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法

[0074] 为了获得最佳的检测效果,本实施例进一步对影响检测效果的参数(免疫磁珠体积浓度、H₂O₂浓度、免疫反应时间、显色反应时间)作进一步的优化。

[0075] 免疫磁珠体积浓度优化:实验操作过程同实施例 2,在奥奈达希瓦氏菌液浓度为 5.0×10^6 cfu/mL,体积为 500 μ L, H₂O₂浓度为 3mM、免疫反应时间 60 min、显色反应时间 30min 的条件下研究最佳的免疫磁珠浓度,免疫磁珠加入的体积分别选取为 10、20、30、40、50 μ L,最后检测加入不同体积免疫磁珠的反应液在 450nm 处的 OD 值,检测结果如图 5a 所示,从中可以看出当免疫磁珠加入的体积为 40 μ L 时,最终反应液在 450nm 处的 OD 值最高,检测效果最灵敏,故最佳的免疫磁珠体积浓度为 8% (40 μ L / 500 μ L)。

[0076] H₂O₂浓度优化:本发明的快速检测方法依赖于奥奈达希瓦氏菌本身的过氧化物酶活性,而过氧化物酶活性的灵敏度应该会受到 H₂O₂浓度的影响,故有必要探研本发明方法中最佳的 H₂O₂浓度。

[0077] 在奥奈达希瓦氏菌液浓度为 5.0×10^6 cfu/mL,体积为 500 μ L,免疫磁珠体积浓度为 8%、免疫反应时间 60 min、显色反应时间 30min 的条件下研究最佳的 H₂O₂浓度, H₂O₂浓度的体积分别选取为 0.1、1、2、3、4、5 mM,最后检测加入不同浓度 H₂O₂的反应液在 450nm 处的 OD 值,检测结果如图 5b 所示,从中可以看出当 H₂O₂浓度为 2mM 时,最终反应液在 450nm 处的 OD 值最高,检测效果最灵敏,故最佳的 H₂O₂浓度为 2mM。

[0078] 免疫反应时间优化:在奥奈达希瓦氏菌液浓度为 5.0×10^6 cfu/mL,体积为 500 μ L,免疫磁珠体积浓度为 8%、H₂O₂浓度为 2mM、显色反应时间 30min 的条件下研究最佳免疫反应时间,免疫反应时间分别选为 10、20、30、40、50、60 min,最后检测加入不同免疫反应时间后的反应液在 450nm 处的 OD 值,检测结果如图 5c 所示,从中可以看出当免疫反应时间为 10 ~ 50min 时,OD 值随免疫反应时间的增长而增大,当免疫反应时间为 50 ~ 60min 时,OD 值趋于平缓,几乎不再增大,所以最优的免疫反应时间为 50min。

[0079] 显色反应时间优化:在奥奈达希瓦氏菌液浓度为 5.0×10^6 cfu/mL,体积为

500 μL , 免疫磁珠体积浓度为 8%、免疫反应时间 50 min、 H_2O_2 浓度为 2mM 的条件下研究最佳的显色反应时间, 显色反应时间分别选为 5、10、20、30、40 min, 最后检测不同显色反应时间后的反应液在 450nm 处的 OD 值, 检测结果如图 5d 所示, 从中可以看出当显色反应时间为 30min 时, 最终反应液在 450nm 处的 OD 值最高, 检测效果最灵敏, 故最佳的显色反应时间为 30min。

[0080] 根据上述对各参数的优化, 可获得最优的快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法, 包括以下操作步骤:

[0081] 1) 在 1.5ml 离心管中加入 40 μL 实施例 1 中制备的免疫磁珠和 500 μL 菌液样品, 室温 (18 ~ 27 $^{\circ}\text{C}$) 振荡 50min;

[0082] 2) 将离心管置于磁铁上 5min, 使得磁珠与溶液完全分开, 用移液器从离心管底部吸去样品基质, 得到免疫磁珠 - 奥奈达希瓦氏菌免疫复合体;

[0083] 3) 将 2) 中得到的复合体用含 5% (v/v) 吐温 20 的 PBS 洗涤液洗涤 3 次, 用纯水洗涤 1 次后转移至 96 孔板, 在 96 孔板中加入 100 μL 显色液 (100mM 柠檬酸钠, 200mM 磷酸氢二钠, 0.32mM 四甲基联苯胺和 2mM 过氧化氢, pH 4.3), 室温 (18 ~ 27 $^{\circ}\text{C}$) 显色反应 30min;

[0084] 4) 加入 50 μL 2M 硫酸溶液终止反应, 通过磁分离, 取上清液, 用酶标仪检测其在 450nm 处 OD 值, OD 值在 0.029 以上, 即可说明此样品中含有奥奈达希瓦氏菌。

[0085] 下面对本明的免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法作进一步的效果评估。

[0086] 一、灵敏性

[0087] 将 10^8cfu/mL 奥奈达希瓦氏菌悬液依次稀释为浓度分别为 5.0×10^7 、 5.0×10^6 、 2.5×10^6 、 1.25×10^6 、 6.3×10^5 、 3.2×10^5 、 1.6×10^5 、 8.0×10^4 、 4.0×10^4 、 2.0×10^4 、 1.0×10^4 、 $5.0 \times 10^3\text{cfu/mL}$ 的菌悬液, 以实施例 4 所建立的最优检测方法检测这些不同浓度的奥奈达希瓦氏菌液, 以菌体浓度为横坐标, OD 值作为纵坐标, 绘制曲线, 见图 6, 分析该曲线可知, 其回归方程为 $Y=1.133^{-7}X + 0.027$, ($R^2=0.9988$), 根据信号噪音比等于 3 判断本发明方法可检测致浓度为 $5.0 \times 10^3\text{cfu/mL}$, 线性检测范围为 $5.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^6\text{cfu/mL}$ 。

[0088] 二、特异性

[0089] 分别配制浓度为 $5.0 \times 10^6\text{cfu/ml}$ 的奥奈达希瓦氏菌菌液、大肠杆菌菌液和枯草芽孢杆菌菌液, 以及空白对照, 采用实施例 4 中确定的最优检测方法检测这些不同菌种的菌液, 其 OD 值如图 7 所示, 从中可以看出, 本发明的免疫磁珠及其快速检测方法只对奥奈达希瓦氏菌具有检测效果。说明本发明方法具有很好的特异性和准确性。

[0090] 为了进一步确定本发明方法适用于真实的检测过程, 采集真正的河水分别配制浓度为 $5.0 \times 10^6\text{cfu/ml}$ 的奥奈达希瓦氏菌菌液 (River water + *S. oneidensis*)、大肠杆菌菌液 (River water + *E. coli*) 和枯草芽孢杆菌菌液 (River water + *B. subtilis*), 以及同时含有该三种菌的混合菌液 (Mixture, 每种菌的浓度均为 $5.0 \times 10^6\text{cfu/ml}$), 以河水 (River water) 作为对照 (如图 8 所示), 检测结果显示, 只有奥奈达希瓦氏菌菌液和混合菌液出现很强的吸光值, 且二者的吸光值无显著差异 (如图 8 所示), 这说明河水中的成份及其他菌类不影响本发明免疫磁珠及其快速检测方法对奥奈达希瓦氏菌的特异性检测, 本发明免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法具有很好的特异性, 并适用于环境中对此菌的检测。

[0091] 三、可重复性

[0092] 对浓度为 5.0×10^6 cfu/ml 的奥奈达希瓦氏菌菌液进行 5 次生物学重复检测, 检测结果均显示出类似的吸光值, 相对准备差为 5.41%, 说明本发明方法具有很好的可重复性。

[0093] 四、与其奥奈达希瓦氏菌检测方法的比较

[0094] 与文献报道的其它奥奈达希瓦氏菌检测方法, 如表面增强拉曼光谱法(Yang, X., Gu, C., Qian, F., Li, Y. & Zhang, J. Z. Highly sensitive detection of proteins and bacteria in aqueous solution using surface-enhanced Raman scattering and optical fibers. Anal. Chem. 83, 5888-5894 (2011).)和微阵列杂交法(Wu, L. et al. Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. Environ. Sci. Technol. 38, 6775-6782 (2004).), 其最低检测限分别为 10^6 cells/mL 和 2.5×10^5 cells/mL 相比较, 本发明方法(最低检测限为 5.0×10^3 cells/mL) 具有更好的检测性能。此外, 根据文献报道, 生物修复位点的低生物量水样的细菌浓度高达 3×10^6 cells/mL, 因此, 本发明方法能够满足生物修复过程功能微生物数量的监测。

[0095] 综上所述, 本发明的免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法具有较高的灵敏度, 对奥奈达希瓦氏菌的检测限为 5.0×10^3 cfu/ml, 检测过程方便、迅速, 可用于奥奈达希瓦氏菌的实地现场检测; 此外, 本发明的检测方法具有很好的特异性, 常见的其他微生物及环境成分对检测不产生干扰。

[0096] 以上实施例仅为介绍本发明的优选案例, 对于本领域技术人员来说, 在不背离本发明精神的范围内所进行的任何显而易见的变化和改进, 都应被视为本发明的一部分。

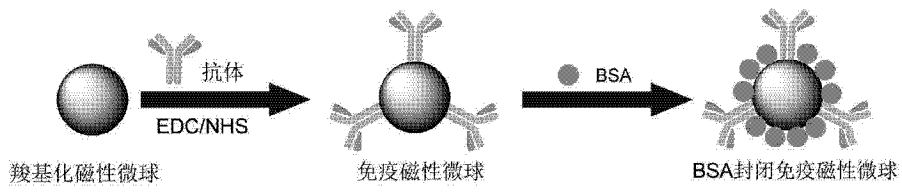


图 1

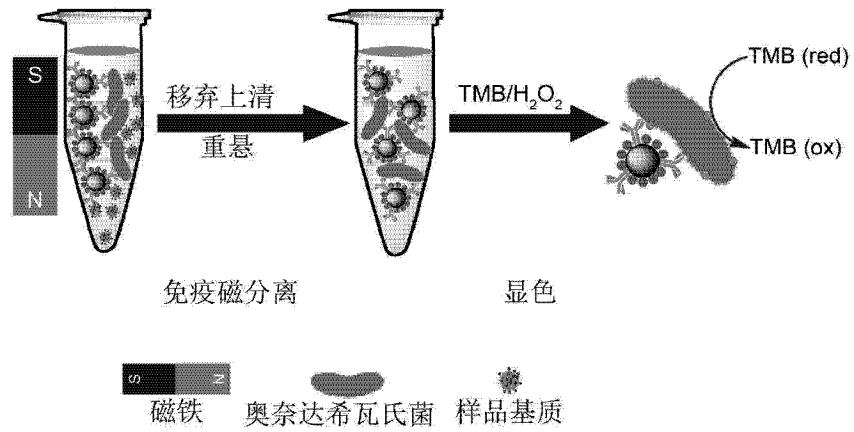


图 2

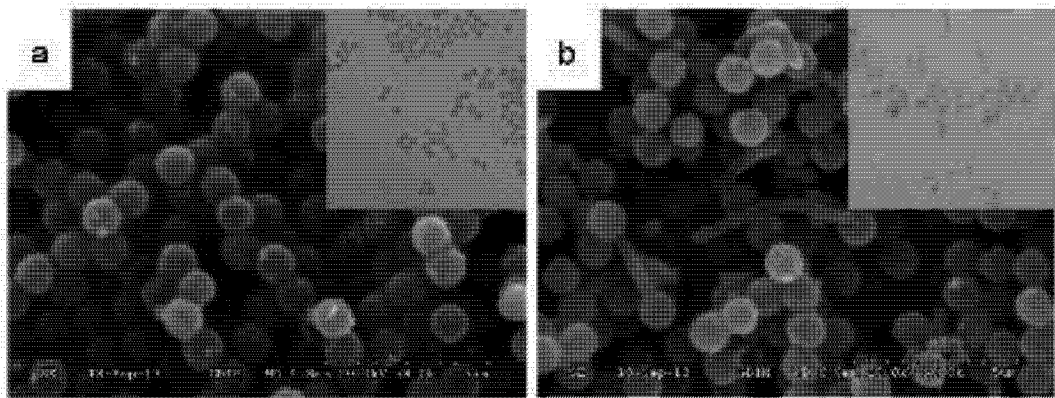


图 3

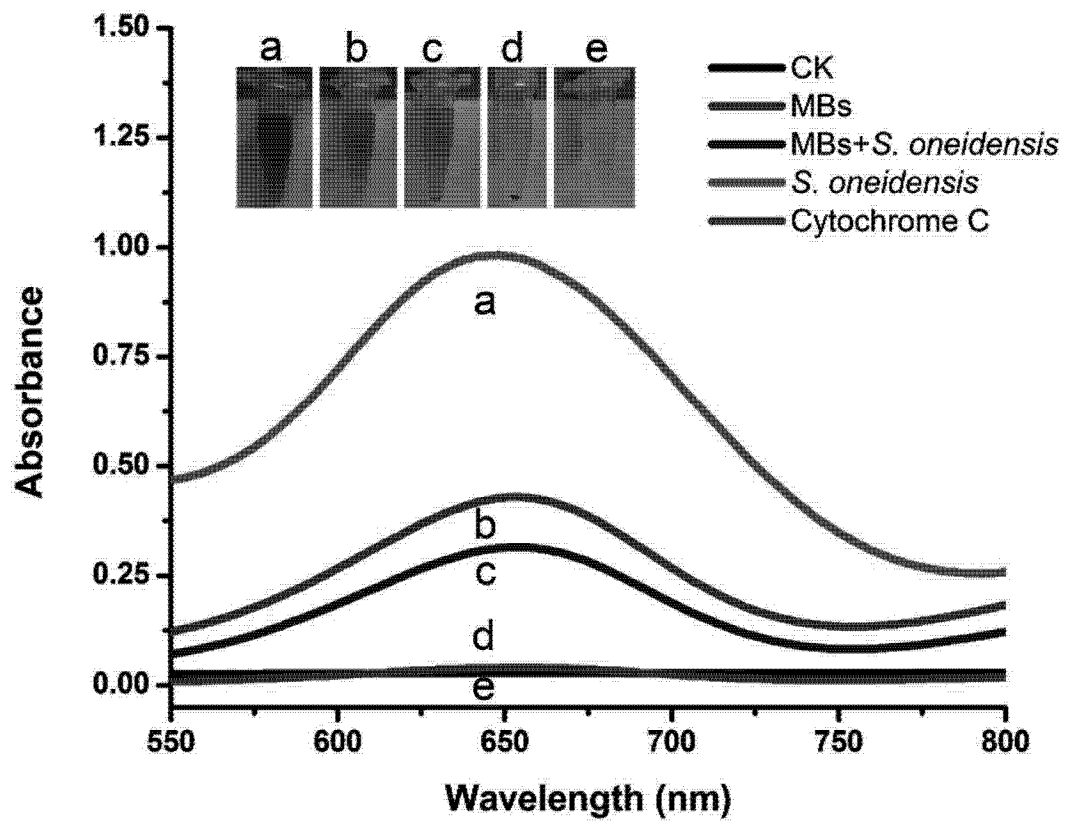


图 4

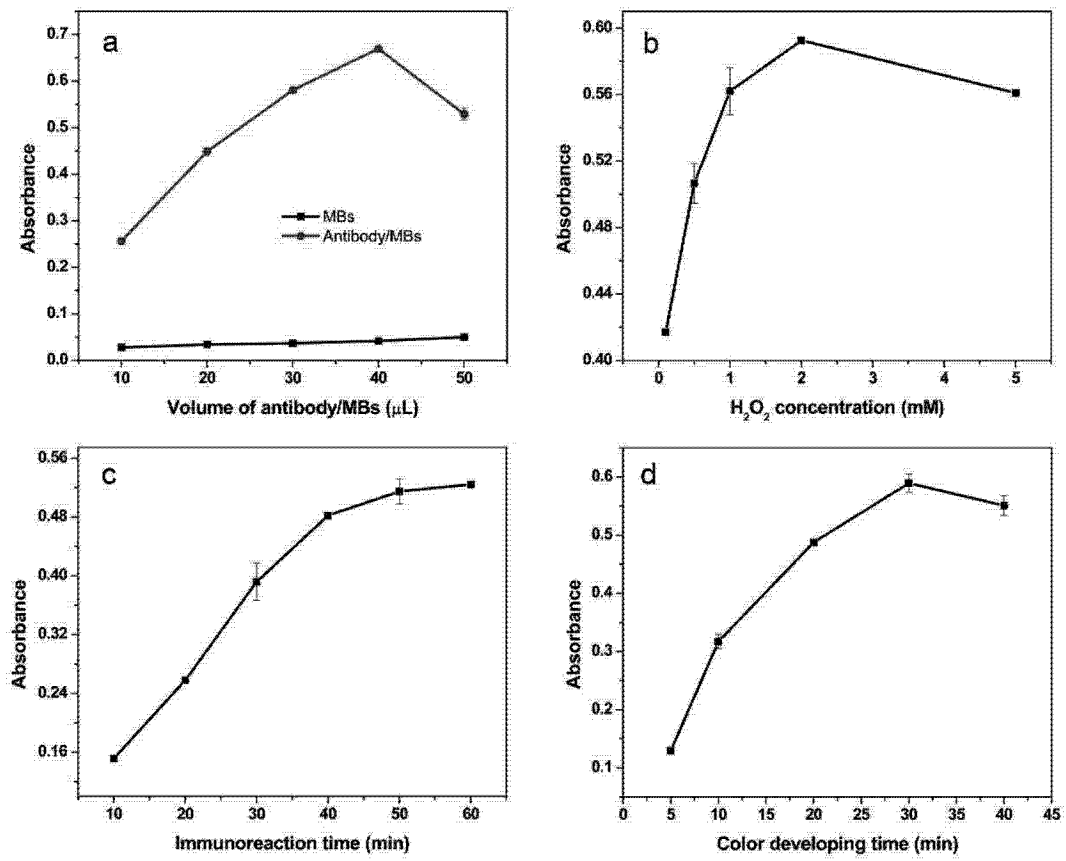


图 5

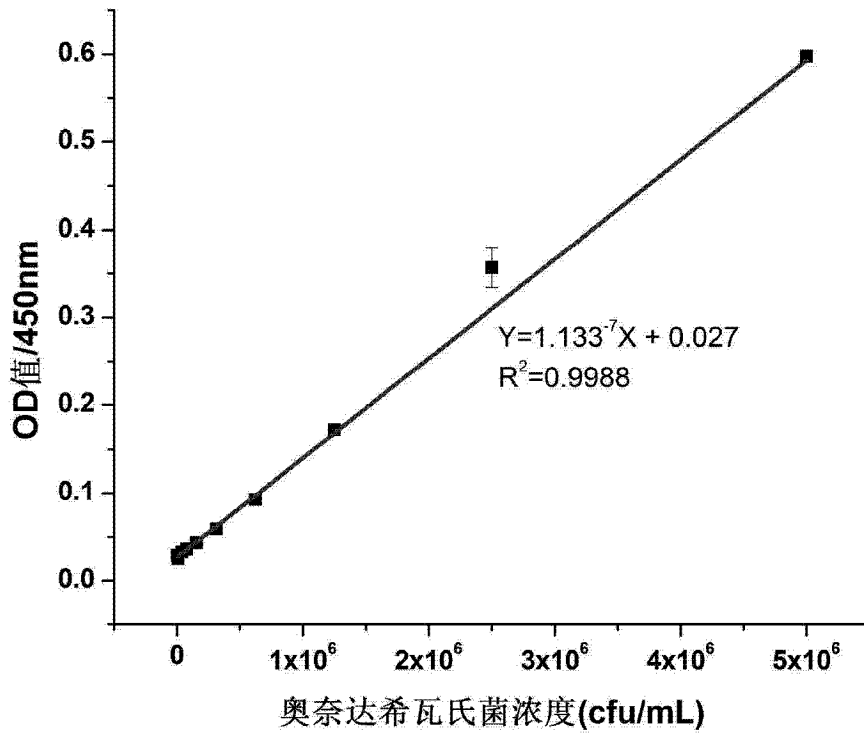


图 6

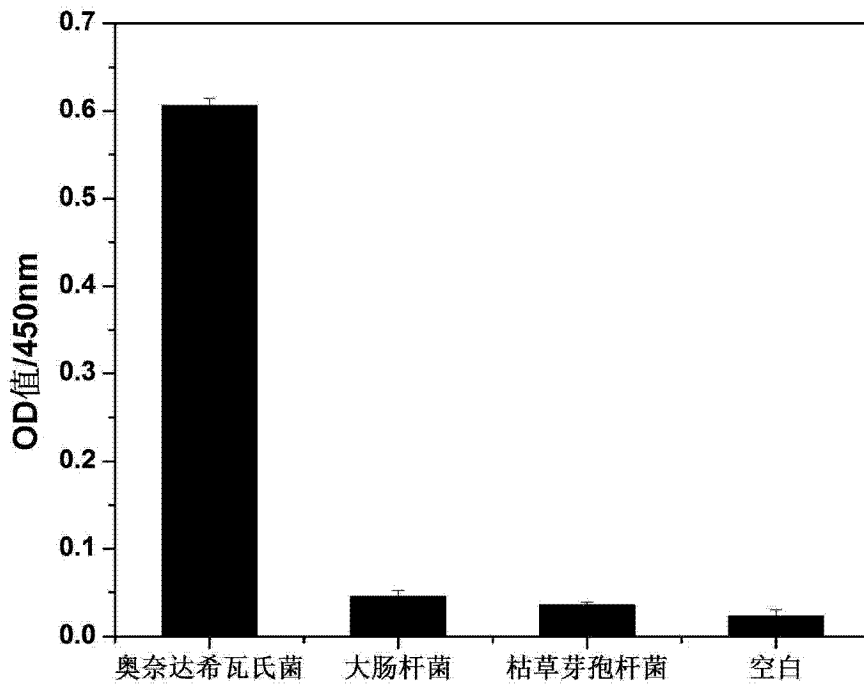


图 7

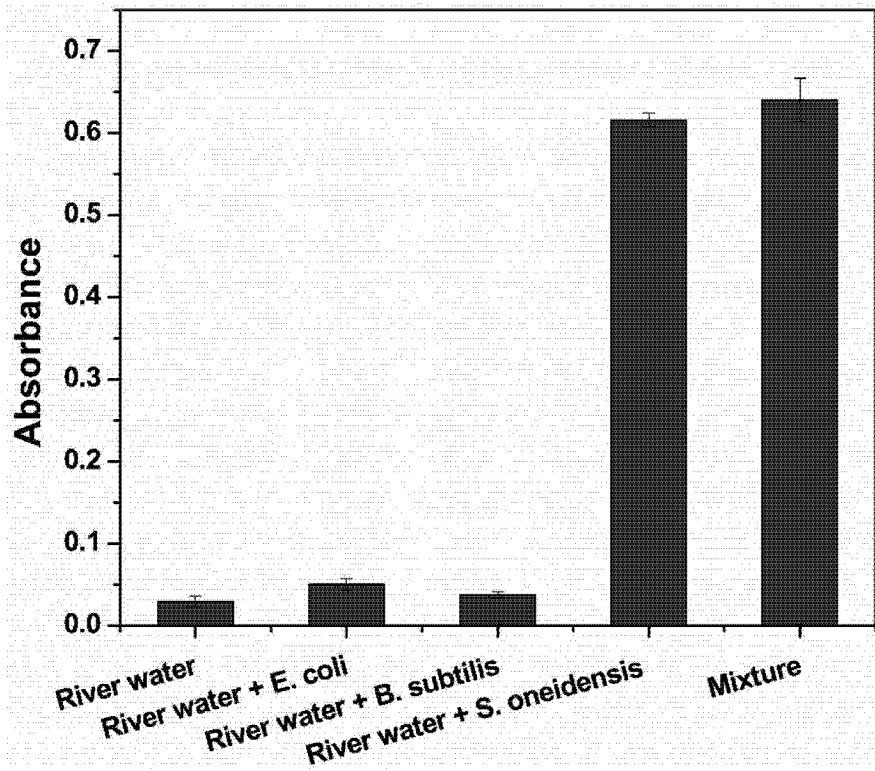


图 8

专利名称(译)	一种免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法		
公开(公告)号	CN103954750B	公开(公告)日	2015-09-30
申请号	CN201410133860.2	申请日	2014-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	广东省生态环境与土壤研究所		
申请(专利权)人(译)	广东省生态环境与土壤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省生态环境与土壤研究所		
[标]发明人	温俊林 周顺桂 陈俊华		
发明人	温俊林 周顺桂 陈俊华		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/56911 G01N2446/80		
代理人(译)	郑莹		
审查员(译)	李进进		
其他公开文献	CN103954750A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫磁珠及其快速检测奥奈达希瓦氏菌的方法。免疫磁珠的制备为将奥奈达希瓦氏菌特异性抗体与活化的羧基化聚苯乙烯磁性微球进行孵育即可获得。快速检测方法为将免疫磁珠放入样品溶液中，使免疫磁珠上的抗体与奥奈达希瓦氏菌体抗原充分结合；去除样品基质得到免疫磁珠-奥奈达希瓦氏菌免疫复合物，洗涤干净，加显色液发生显色反应，再加入硫酸溶液终止显色反应，检测其OD450nm值，若OD450nm值0.029以上，说明样品中含有奥奈达希瓦氏菌。本发明方法具有较高的灵敏度，检测限为 5.0×10^3 cfu/ml，操作方便、迅速，可用于实地现场检测；且具有很好的特异性，检测结果几乎不受其他常见微生物的影响。

