



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105891473 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201610211155.9

(22)申请日 2016.04.06

(71)申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号

(72)发明人 宋信信 郭智勇 苏秀榕 胡宇芳
俞欣辰 郭富米

(74)专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 何仲

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

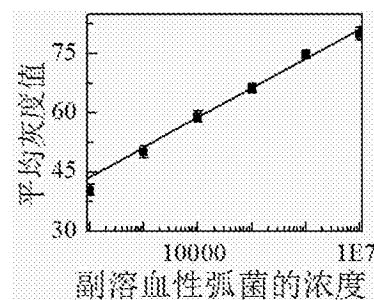
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用,特点是包括载玻片的硅烷化步骤;将氮化碳材料羧基化后与胶体金溶液搅拌混合得到多功能化氮化碳溶液的步骤;将多功能化氮化碳溶液结合食源性致病菌一抗得到食源性致病菌一抗探针的步骤;在硅烷化载玻片上依次滴上偶联试剂,食源性致病菌二抗、食源性致病菌抗原和食源性致病菌一抗探针,即得到基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器,通过添加银染试剂进行定量检测分析,优点是特异性好、灵敏度高、结果准确可靠、成本低、简单快速。



1. 一种基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)载玻片的硅烷化

将载玻片置于piranha洗液中,于90~100 °C加热20~40 min后取出,用蒸馏水洗涤三次,置于N₂氛中干燥后,浸入硅烷化试剂中室温下硅烷化处理2~6 h,再用乙醇洗净后,于110~130 °C真空干燥1~3 h后,得到硅烷化载玻片;

(2)多功能化氮化碳材料的制备方法

a. 将三聚氰胺在500~600 °C下加热3~5 h,真空干燥后,得到氮化碳粉末;取0.8~1.5 g 氮化碳粉末加入到80~120 mL 4~6 mol/L HNO₃溶液中,于120~150 °C下回流24~48 h后,自然冷却至室温,水洗涤至pH=7,离心,将沉淀在35~40 °C下真空干燥12~20 h,得到羧基化的g-C₃N₄;

b. 将80~120 mL 蒸馏水和1~3 mL 1 wt%氯金酸溶液加入到烧杯中,在磁力搅拌下加热至沸腾,迅速加入3~5 mL的1 wt%柠檬酸钠水溶液,继续煮沸直至溶液颜色变成深红色,沸腾状态下继续加热搅拌20 min,得到胶体金溶液,4 °C密封保存;

c. 将30~70 mg 羧基化的g-C₃N₄加入到 30~70 mL 胶体金溶液中,室温下搅拌16~24 h,然后离心去除固体颗粒,所得溶液即为多功能化氮化碳溶液;

(3)抗体探针的制备

取步骤(2)制备的多功能化氮化碳溶液200 µL置于玻璃瓶中,加入80~120 µL 10⁻³~10⁻⁵ mg/mL 食源性致病菌一抗后孵育3~5 h,然后加入80~100 µL 2wt %牛血清白蛋白溶液孵育1~2 h,用蒸馏水清洗离心去除剩余的牛血清白蛋白溶液,即得食源性致病菌一抗探针;

(4)食源性致病菌免疫传感器的制备

在硅烷化载玻片上滴上4~6 µL 的偶联试剂, 30~50 min后滴上食源性致病菌二抗,孵育30~50 min,然后置于2wt%牛血清白蛋白溶液中孵育20~30 min,然后加入待测食源性致病菌溶液,反应30~50 min后,滴入步骤(3)得到的食源性致病菌一抗探针,反应30~50 min,用超纯水清洗除去残余的探针,即得到基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法,其特征在于:所述的piranha洗液为98%的浓硫酸和30%双氧水以7 : 3的体积比例混合得到;所述的硅烷化试剂为4wt%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷溶液;所述的偶联试剂为2.5 wt%的戊二醛溶液。

3. 根据权利要求1所述的基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法,其特征在于:所述的食源性致病菌为副溶血性弧菌、大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌或者沙门氏菌。

4. 利用权利要求1-3中任一项所述的基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器检测食源性致病菌的方法,该检测方法不是以疾病诊断为目的,其特征在于:将食源性致病菌免疫传感器的试样点上滴加3~5 µL银染试剂,室温避光反应10~15 min,通过超纯水洗去多余的银染试剂,然后置于空气中干燥,将干燥后载玻片上的金标银染试样点扫描成图片获得待测样品溶液的金标银染信号及其灰度平均值,根据金标银染信号灰度平均

值与食源性致病菌溶液浓度之间的定量关系,计算得到待测样品溶液中食源性致病菌的准确浓度。

基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种食源性致病菌检测技术,尤其是涉及一种基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 食源性疾病是指通过摄食了食物中的致病因子而引起的疾病。食源性疾病主要包括:食物中毒、经食物而感染的肠道疾病、食源性寄生虫病、以及食物中有毒、有害污染物所引起的中毒性疾病。食源性疾病中的主要病原物有细菌及其毒素,食源性致病菌是指引起细菌性食物中毒的致病菌,如大肠杆菌、副溶血性弧菌、葡萄球菌、沙门氏菌、变形杆菌等。这些致病菌引起的疾病大多是在夏秋季发生,这与细菌的生活习性相一致,并且动物性食品是引起细菌性食物中毒的主要食品。根据2001年WHO数据报告分析显示,约有220万人因感染食源性疾病而丧生,在我国每年因食源性致病菌造成的重大经济损失达170亿美元。食源性疾病已经成为困扰发达和发展中国家的公共问题,其威胁不容忽视。目前,常见的食源性致病菌检测方法有传统生化法和经典PCR方法。传统生化法有较好的选择性和可靠性,但是用时长且程序繁琐;尽管PCR方法有检测限低和时间短等优势,但易出现假阳性结果且需要专业人员操作。因此,开发灵敏、准确、快速、简便的食源性致病菌检测手段势在必行。

[0003] 金标银染技术最早是被用在核酸分子杂交领域的一种可视化检测技术。其原理是金纳米颗粒(AuNPs)被标记在靶DNA末端,靶DNA与目标DNA杂交,之后再用银染试剂,附着在核酸分子上的纳米金颗粒作为还原剂还原银染试剂中的银离子,单质银被还原显现出黑色的银染信号。在此之后,科研工作者建立一种“夹心式”金标银染的模式,具体做法是:用纳米金标记的抗体制备特异性探针,这种探针能识别其特定的抗原。第一抗体连接在固相支持物上,随后加入待检测物质,最后加入该特异性探针去识别抗原,目标检测物的多少可以根据银染信号的大小来判定。

[0004] 免疫传感器是利用抗体与抗原之间的特异性识别与结合而研制成的一类生物传感器,基于金标银染信号放大技术的免疫传感器是将AuNPs和免疫传感器相结合的产物。其中将AuNPs标记的抗体作为第二抗体去识别相应的抗原,该传感器具备免疫传感器的快速、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、步骤简单等特点,同时,通过金标银染技术实现了对目标检测物的可视化检测。

[0005] 石墨相氮化碳(g-C₃N₄)是一种二维网状材料,具有硬度高、耐磨、化学惰性和良好的生物相容性等特点,被广泛运用于光电子学、生物传感器、环境监测等。目前,有把g-C₃N₄作为发光基团来检测铜离子和芦丁的报道。由于g-C₃N₄带正电,可以通过静电作用结合带负电的AuNPs,形成一张带有大量AuNPs的网状g-C₃N₄,称为多功能化氮化碳材料(Au@g-C₃N₄)。目前未见基于金标银染技术与多功能化氮化碳材料结合的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种特异性好、灵敏度高、结果准确可靠、成本低、快速的基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为：一种基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法，包括以下步骤：

(1)载玻片的硅烷化

将载玻片置于piranha洗液中，于90~100 °C加热20~40 min后取出，用蒸馏水洗涤三次，置于N₂氛中干燥后，浸入硅烷化试剂中室温下硅烷化处理2~6 h，再用乙醇洗净后，于110~130 °C真空干燥1~3 h后，得到硅烷化载玻片；

(2)多功能化氮化碳材料(Au@g-C₃N₄)的制备方法

a. 将三聚氰胺在500~600 °C下加热3~5 h，真空干燥后，得到氮化碳(g-C₃N₄)粉末；取0.8~1.5 g 氮化碳粉末加入到80~120 mL 4~6 mol/L HNO₃溶液中，于120~150 °C下回流24~48 h后，自然冷却至室温，水洗涤至pH=7，离心，将沉淀在35~40 °C下真空干燥12~20 h，得到羧基化的g-C₃N₄；

b. 将80~120 mL 蒸馏水和1~3 mL 1 wt%氯金酸溶液加入到烧杯中，在磁力搅拌下加热至沸腾，迅速加入3~5 mL的1 wt%柠檬酸钠水溶液，继续煮沸直至溶液颜色变成深红色(溶液很快发生颜色变化黑-蓝-深红)，沸腾状态下继续加热搅拌20 min，得到胶体金溶液，4 °C密封保存；

c. 将30~70 mg 羧基化的g-C₃N₄加入到 30~70 mL 胶体金溶液中，室温下搅拌16~24 h，然后离心去除固体颗粒(没有连接上的胶体金)，所得溶液即为多功能化氮化碳溶液(Au@g-C₃N₄)；

(3)抗体探针的制备(anti-VP-Au@g-C₃N₄)

取步骤(2)制备的多功能化氮化碳溶液200 μL置于玻璃瓶中，加入80~120 μL 10⁻³~10⁻⁵ mg/mL 食源性致病菌一抗后孵育3~5 h，然后加入80~100 μL 2wt %牛血清白蛋白(BSA)溶液孵育1~2 h(封闭非特异性吸附位点)，用蒸馏水清洗离心去除剩余的牛血清白蛋白溶液，即得食源性致病菌一抗探针(anti-VP-Au@g-C₃N₄)；

(4)食源性致病菌免疫传感器的制备

在硅烷化载玻片上滴上4~6 μL 的偶联试剂，30~50 min后滴上食源性致病菌二抗，孵育30~50 min，然后置于2wt%牛血清白蛋白(BSA)溶液中孵育20~30 min，然后加入待测食源性致病菌溶液，反应30~50 min后，滴入步骤(3)得到的食源性致病菌一抗探针，反应30~50 min，用超纯水清洗除去残余的探针，即得到基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器。

[0008] 所述的piranha洗液为98%的浓硫酸和30%双氧水以7 : 3的体积比例混合得到；所述的硅烷化试剂为4wt%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)溶液；所述的偶联试剂为2.5 wt%的戊二醛溶液。

[0009] 所述的食源性致病菌为副溶血性弧菌(VP)、大肠杆菌O157:H7(E.coli)、金黄色葡萄球菌(SA)或者沙门氏菌(SE)。

[0010] 上述基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器检测食源性致病菌

的方法,该检测方法不是以疾病诊断为目的,将食源性致病菌免疫传感器的试样点上滴加3~5 uL银染试剂,室温避光反应10~15 min,通过超纯水洗去多余的银染试剂,然后置于空气中干燥,将干燥后载玻片上的金标银染试样点扫描成图片获得待测样品溶液的金标银染信号及其灰度平均值,根据金标银染信号灰度平均值与食源性致病菌溶液浓度之间的定量关系,计算得到待测样品溶液中食源性致病菌的准确浓度。

[0011] 发明原理:本发明是一种夹心式的免疫传感器,利用抗原和抗体特异性结合作用,结合了g-C₃N₄片层网状纳米结构材料和AuNPs,制备了一种“免疫夹心”式的生物传感器用来检测细菌,该方法具有普适性。多功能化氮化碳材料是一层二维网状结构,具有巨大的表面积、丰富的表面基团和良好的生物相容性,其表面能吸附大量的AuNPs。AuNPs和g-C₃N₄靠正负电荷的吸引牢牢结合,经过处理的AuNPs表面带有负电荷能与抗体的正电荷基团静电吸附,AuNPs牢牢地附着在抗体表面,且不会使抗体变性。此刻,g-C₃N₄就像一张巨大的渔网一样能负载大量的AuNPs,这相对于传统的AuNPs直接吸附抗体的做法来说,大大增加了负载的AuNPs的数量,使得银染信号放大,从而增加检测灵敏度。

[0012] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明构建了基于金标银染信号放大技术的免疫夹心式传感器,利用抗原-抗体的高度特异性结合原理。首先,用强氧化剂piranha洗液氧化玻璃板,使得玻璃板上带入丰富的羟基,经过硅烷化试剂处理的玻璃板上含有大量氨基,这些氨基能够与戊二醛的一端发生缩合反应形成席夫碱。其次,加入第二抗体,抗体中的氨基能与戊二醛的另一端也发生缩合反应,使得第二抗体被牢牢地固定在玻璃板上。随后加入需要检测的细菌,让其反应一定的时间,最后加入带有第一抗体的Au@g-C₃N₄探针,充分反应。这样就建立了一个“抗体-抗原-抗体”的夹心式模型。用超纯水洗去表面多余的探针,通过银染试剂进行信号放大,银染完成后产生相应的银染信号即灰度值。显然,抗原浓度越大,所接上的探针越多,对应的灰度值也越大。实验结果表明,显示灰度值的大小与细菌浓度的对数值呈线性关系,实现样品中抗原浓度的检测。其优点在于:

(1)高灵敏度。本发明的检测灵敏度大约是现有方法的10倍以上,原因在于:传统的金标银染法是将AuNPs直接吸附在抗体上,抗体上AuNPs的数量是有限的。而本发明是将大量的AuNPs绑定在g-C₃N₄上形成Au@g-C₃N₄复合材料,再把这个材料和抗体绑定在一起,这样用g-C₃N₄构建了一个信号放大的网络桥梁,一个抗原不再是对应一个AuNPs,而是对应数个乃至数十个。g-C₃N₄上的AuNPs都能参与银染反应,使得银染后灰度值大大增加,提高检测灵敏度。

[0013] (2)高特异性。其他常见的细菌对本检测体系均无干扰,原因在于:本发明是基于细菌和其相对应的抗体之间特异性识别与结合而构建的“夹心式”免疫传感器,干扰物质不是特定抗体的目标物,因此待测物中的干扰物质并不能与特定抗体结合,故对本检测体系无干扰。

[0014] (3)结果准确。回收率均在90%~110%之间。

[0015] (4)制备与检测方法试剂用量少、检测速度快、不需要专业检测人员和设备。使用本发明只需消耗少量材料和试剂就可实现对食源性致病菌的高灵敏检测,且两个2小时便能完成检测,不需要配备专门的检测人员和检测设备。

[0016] 综上所述,本发明是基于上述多功能化氮化碳材料,通过标记抗体作为探针,根据“抗体-抗原-抗体”的原理构建了一种基于金标银染信号放大技术的检测食源性致病菌的

“夹心式”免疫传感器,兼具免疫分析的高选择性和金标银染技术的信号可视化,具有灵敏度高、选择性好、操作简单、分析快速、易于操作等优点,可以实现对超低浓度细菌的检测,具有良好的应用前景。

附图说明

[0017] 图1为不同浓度副溶血性弧菌金标银染信号灰度平均值与副溶血性弧菌浓度的对数的线性关系图;

图2为不同浓度沙门氏菌金标银染信号灰度平均值与沙门氏菌浓度的对数的线性关系图;

图3为不同浓度大肠杆菌金标银染信号灰度平均值与大肠杆菌浓度的对数的线性关系图;

图4为不同浓度金黄色葡萄球菌金标银染信号灰度平均值与金黄色葡萄球菌浓度的对数的线性关系图。

具体实施方式

[0018] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0019] 具体实施例一

一种基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法,具体包括以下步骤:

(1)载玻片的硅烷化

将载玻片置于piranha洗液中,于90~100 °C加热20~40 min后取出,用蒸馏水洗涤三次,置于N₂氛中干燥后,浸入硅烷化试剂中室温下硅烷化处理2~6 h,再用乙醇洗净后,于110~130 °C真空干燥1~3 h后,得到硅烷化载玻片;

(2)多功能化氮化碳材料(Au@g-C₃N₄)的制备方法

a. 将三聚氰胺在500~600 °C下加热3~5 h,真空干燥后,得到氮化碳(g-C₃N₄)粉末;取0.8~1.5 g 氮化碳粉末加入到80~120 mL 4~6 mol/L HNO₃溶液中,于120~150 °C下回流24~48 h后,自然冷却至室温,水洗涤至pH=7,离心,将沉淀在35~40 °C下真空干燥12~20 h,得到羧基化的g-C₃N₄;

b. 将80~120 mL 蒸馏水和1~3 mL 1 wt%氯金酸溶液加入到烧杯中,在磁力搅拌下加热至沸腾,迅速加入3~5 mL的1 wt%柠檬酸钠水溶液,继续煮沸直至溶液颜色变成深红色(溶液很快发生颜色变化黑-蓝-深红),沸腾状态下继续加热搅拌20 min,得到胶体金溶液,4 °C密封保存;

c. 将30~70 mg 羧基化的g-C₃N₄加入到 30~70 mL 胶体金溶液中,室温下搅拌16~24 h,然后离心去除固体颗粒(没有连接上的胶体金),所得溶液即为多功能化氮化碳溶液(Au@g-C₃N₄);

(3)抗体探针的制备(anti-VP-Au@g-C₃N₄)

取步骤(2)制备的多功能化氮化碳溶液200 μL置于玻璃瓶中,加入80~120 μL 10⁻³~10⁻⁵ mg/mL 食源性致病菌一抗后孵育3~5 h,然后加入80~100 μL 2wt %牛血清白蛋白(BSA)溶液孵育1~2 h(封闭非特异性吸附位点),用蒸馏水清洗离心去除剩余的牛血清白

蛋白溶液,即得食源性致病菌一抗探针(anti-VP-Au@g-C₃N₄);

(4)食源性致病菌免疫传感器的制备

在硅烷化载玻片上滴上4~6 μL 的偶联试剂,30~50 min后滴上食源性致病菌二抗,孵育30~50 min,然后置于2wt%牛血清白蛋白(BSA)溶液中孵育20~30 min,然后加入待测食源性致病菌溶液,反应30~50 min后,滴入步骤(3)得到的食源性致病菌一抗探针,反应30~50 min,用超纯水清洗除去残余的探针,即得到基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器。

[0020] 上述piranha洗液为98%的浓硫酸和30%双氧水以7 : 3的体积比例混合得到;硅烷化试剂为4wt%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)溶液;偶联试剂为2.5 wt%的戊二醛溶液。上述食源性致病菌为副溶血性弧菌(VP)、大肠杆菌0157:H7(E.coli)、金黄色葡萄球菌(SA)或者沙门氏菌(SE)。

[0021] 具体实施例二

利用上述具体实施例一制备的基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器检测食源性致病菌的方法,将上述食源性致病菌免疫传感器的试样点上滴加3~5 μL 银染试剂,室温避光反应10~15 min,通过超纯水洗去多余的银染试剂,然后置于空气中干燥,将干燥后载玻片上的金标银染试样点扫描成图片获得待测样品溶液的金标银染信号及其灰度平均值,根据金标银染信号灰度平均值与食源性致病菌溶液浓度之间的定量关系,计算得到待测样品溶液中食源性致病菌的准确浓度。

[0022] 具体实施例三

基于金标银染信号放大技术的副溶血性弧菌免疫传感器的制备及其检测应用,具体包括以下步骤:

(1)载玻片的硅烷化

将载玻片置于piranha洗液(为98%的浓硫酸和30%双氧水以7 : 3的体积比例混合得到)中,于95 $^{\circ}\text{C}$ 加热30 min后取出,用蒸馏水洗涤三次,置于N₂氛中干燥后,浸入硅烷化试剂中室温下硅烷化处理2~6h,再用乙醇洗净后,于120 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥2 h后,得到硅烷化载玻片;

(2)多功能化氮化碳材料的制备方法

a. 将三聚氰胺在550 $^{\circ}\text{C}$ 下加热4 h,真空干燥后,得到氮化碳粉末;取1.2 g 氮化碳粉末加入到100 mL 5 mol/L HNO₃溶液中,于135 $^{\circ}\text{C}$ 下回流36 h后,自然冷却至室温,水洗涤至pH=7,离心,将沉淀在38 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥16 h,得到羧基化的g-C₃N₄;

b. 将100 mL 蒸馏水和2 mL 1 wt%氯金酸溶液加入到烧杯中,在磁力搅拌下加热至沸腾,迅速加入4 mL的1 wt%柠檬酸钠水溶液,继续煮沸直至溶液颜色变成深红色,沸腾状态下继续加热搅拌20 min,得到胶体金溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存;

c. 将50 mg 羧基化的g-C₃N₄加入到 50 mL 胶体金溶液中,室温下搅拌20 h,然后离心去除固体颗粒,所得溶液即为多功能化氮化碳溶液;

(3)抗体探针的制备

取步骤(2)制备的多功能化氮化碳溶液200 μL 置于玻璃瓶中,加入100 μL 10⁻⁴ mg/mL副溶血性弧菌一抗后孵育4 h,然后加入90 μL 2wt %牛血清白蛋白溶液孵育1.5 h,用蒸馏水清洗离心去除剩余的牛血清白蛋白溶液,即得副溶血性弧菌一抗探针;

(4) 副溶血性弧菌免疫传感器的制备

在硅烷化载玻片上滴上5 μL 的2.5wt%的戊二醛溶液, 40 min后滴上副溶血性弧菌二抗, 孵育40 min, 然后置于2wt%牛血清白蛋白溶液中孵育25 min, 然后在各硅烷化载玻片上分别加入不同浓度的副溶血性弧菌溶液, 反应40 min后, 滴入步骤(3)得到的副溶血性弧菌一抗探针, 反应40 min, 用超纯水清洗除去残余的探针, 即得到基于金标银染信号放大技术的副溶血性弧菌免疫传感器;

(5) 副溶血性弧菌定量分析

将上述副溶血性弧菌免疫传感器的试样点上滴加3~5 μL 银染试剂, 室温避光反应12 min, 通过超纯水洗去多余的银染试剂, 然后置于空气中干燥, 将干燥后载玻片上的金标银染试样点扫描成图片获得一系列不同浓度的副溶血性弧菌溶液对应的灰度值, 建立金标银染信号灰度平均值与副溶血性弧菌溶液浓度之间的定量关系, 以灰度值(y)为纵坐标, 副溶血性弧菌浓度(x, nM)为横坐标作图, 如图1所示, 金标银染信号灰度平均值与副溶血性弧菌浓度的对数之间呈现线性关系, 线性方程为: $y = 7.43 \cdot \log x + 29.0$, 相关系数 $R^2 = 0.9906$, 线性范围为 $10^2 \sim 10^7 \text{ CFU/mL}$, 检测限为100 CFU/mL。线性良好, 可以用于未知样品检测。

[0023] 具体实施例四

基于金标银染信号放大技术的沙门氏菌免疫传感器的制备及其检测应用, 具体包括以下步骤:

(1) 载玻片的硅烷化

将载玻片置于piranha洗液中, 于90 $^{\circ}\text{C}$ 加热40 min后取出, 用蒸馏水洗涤三次, 置于 N_2 氛中干燥后, 浸入硅烷化试剂中室温下硅烷化处理2 h, 再用乙醇洗净后, 于110 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥3 h后, 得到硅烷化载玻片;

(2) 多功能化氮化碳材料的制备方法

a. 将三聚氰胺在500 $^{\circ}\text{C}$ 下加热5 h, 真空干燥后, 得到氮化碳粉末; 取0.8 g 氮化碳粉末加入到80 mL 6 mol/L HNO_3 溶液中, 于120 $^{\circ}\text{C}$ 下回流48 h后, 自然冷却至室温, 水洗涤至pH=7, 离心, 将沉淀在35 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥20 h, 得到羧基化的g- C_3N_4 ;

b. 将80 mL 蒸馏水和1 mL 1 wt%氯金酸溶液加入到烧杯中, 在磁力搅拌下加热至沸腾, 迅速加入3 mL的1 wt%柠檬酸钠水溶液, 继续煮沸直至溶液颜色变成深红色, 沸腾状态下继续加热搅拌20 min, 得到胶体金溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存;

c. 将30 mg 羧基化的g- C_3N_4 加入到 30 mL 胶体金溶液中, 室温下搅拌16 h, 然后离心去除固体颗粒, 所得溶液即为多功能化氮化碳溶液;

(3) 抗体探针的制备

取步骤(2)制备的多功能化氮化碳溶液200 μL 置于玻璃瓶中, 加入80 μL 10^{-3} mg/mL 沙门氏菌一抗后孵育3 h, 然后加入80 μL 2wt %牛血清白蛋白溶液孵育1 h, 用蒸馏水清洗离心去除剩余的牛血清白蛋白溶液, 即得沙门氏菌一抗探针;

(4) 沙门氏菌免疫传感器的制备

在硅烷化载玻片上滴上4 μL 的2.5wt%的戊二醛溶液, 30 min后滴上沙门氏菌二抗, 孵育30 min, 然后置于2wt%牛血清白蛋白溶液中孵育20 min, 然后在各硅烷化载玻片上分别加入不同浓度的沙门氏菌溶液, 反应30 min后, 滴入步骤(3)得到的沙门氏菌一抗探针, 反应30 min, 用超纯水清洗除去残余的探针, 即得到基于金标银染信号放大技术的沙门氏

菌免疫传感器；

(5)沙门氏菌定量分析

将上述沙门氏菌免疫传感器的试样点上滴加3~5 μL 银染试剂,室温避光反应10 min,通过超纯水洗去多余的银染试剂,然后置于空气中干燥,将干燥后载玻片上的金标银染试样点扫描成图片获得一系列不同浓度的沙门氏菌溶液对应的灰度值,建立金标银染信号灰度平均值与沙门氏菌溶液浓度之间的定量关系,以灰度值(y)为纵坐标,沙门氏菌浓度(x, nM)为横坐标作图,如图2所示,金标银染信号灰度平均值与沙门氏菌浓度的对数之间呈现线性关系,线性方程为: $y=11*\log x+9.75$,相关系数 $R^2=0.9877$,线性范围为 $5*10^3\sim 10^5\text{CFU/mL}$,检测限为5000 CFU/mL。线性良好,可以用于未知样品检测。

[0024] 具体实施例五

基于金标银染信号放大技术的大肠杆菌免疫传感器的制备及其检测应用,具体包括以下步骤:

(1)载玻片的硅烷化

将载玻片置于piranha洗液中,于100 $^{\circ}\text{C}$ 加热20 min后取出,用蒸馏水洗涤三次,置于 N_2 氛中干燥后,浸入硅烷化试剂中室温下硅烷化处理6 h,再用乙醇洗净后,于130 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥1 h后,得到硅烷化载玻片;

(2)多功能化氮化碳材料的制备方法

a. 将三聚氰胺在600 $^{\circ}\text{C}$ 下加热3 h,真空干燥后,得到氮化碳粉末;取1.5 g 氮化碳粉末加入到120 mL 4 mol/L HNO_3 溶液中,于150 $^{\circ}\text{C}$ 下回流24 h后,自然冷却至室温,水洗涤至pH=7,离心,将沉淀在40 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥12 h,得到羧基化的g- C_3N_4 ;

b. 将120 mL 蒸馏水和3 mL 1 wt%氯金酸溶液加入到烧杯中,在磁力搅拌下加热至沸腾,迅速加入5 mL的1 wt%柠檬酸钠水溶液,继续煮沸直至溶液颜色变成深红色,沸腾状态下继续加热搅拌20 min,得到胶体金溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存;

c. 将70 mg 羧基化的g- C_3N_4 加入到 70 mL 胶体金溶液中,室温下搅拌24 h,然后离心去除固体颗粒,所得溶液即为多功能化氮化碳溶液;

(3)抗体探针的制备(anti-VP-Au@g- C_3N_4)

取步骤(2)制备的多功能化氮化碳溶液200 μL 置于玻璃瓶中,加入120 μL 10^{-5} mg/mL 大肠杆菌一抗后孵育5 h,然后加入100 μL 2wt %牛血清白蛋白(BSA)溶液孵育2 h,用蒸馏水清洗离心去除剩余的牛血清白蛋白溶液,即得大肠杆菌一抗探针;

(4)大肠杆菌免疫传感器的制备

在硅烷化载玻片上滴上6 μL 的2.5wt%的戊二醛溶液, 50 min后滴上大肠杆菌二抗,孵育50 min,然后置于2wt%牛血清白蛋白溶液中孵育30 min,然后在各硅烷化载玻片上分别加入不同浓度的大肠杆菌溶液,反应50 min后,滴入步骤(3)得到的大肠杆菌一抗探针,反应50 min,用超纯水清洗除去残余的探针,即得到基于金标银染信号放大技术的大肠杆菌免疫传感器;

(5)大肠杆菌定量分析

将上述大肠杆菌免疫传感器的试样点上滴加3~5 μL 银染试剂,室温避光反应15 min,通过超纯水洗去多余的银染试剂,然后置于空气中干燥,将干燥后载玻片上的金标银染试样点扫描成图片获得一系列不同浓度的大肠杆菌溶液对应的灰度值,建立金标银染信号灰

度平均值与大肠杆菌溶液浓度之间的定量关系,以灰度值(y)为纵坐标,大肠杆菌浓度(x, nM)为横坐标作图,如图3所示,金标银染信号灰度平均值与大肠杆菌浓度的对数之间呈现线性关系,线性方程为: $y=7.82*\log x+18.6$,相关系数 $R^2=0.9978$,线性范围为 $10^3\sim 10^7$ CFU/mL,检测限为1000 CFU/mL。线性良好,可以用于未知样品检测。

[0025] 具体实施例六

同上述具体实施例一,其区别在于:食源性致病菌为金黄色葡萄球菌,以灰度值(y)为纵坐标,金黄色葡萄球菌 (x, nM)为横坐标作图,如图4所示,金标银染信号灰度平均值与金黄色葡萄球菌浓度的对数之间呈现线性关系,线性方程为: $y=10.1*\log x+10.2$ 。相关系数 $R^2=0.9912$,线性范围为 $10^3\sim 10^6$ CFU/mL,检测限为1000 CFU/mL。线性良好,可以用于未知样品检测。

[0026] 具体实施例七

为了考察该方法的准确性与实际应用价值,采用加标回收法,在自来水中加入相同浓度的不同种致病菌,使得浓度为 10^4 CFU/mL,结果见表1。使用本发明方法检测结果可知,相对标准偏差(RSD)小于7.4%,回收率为91.6~105.7%,结果令人满意。表明本发明对于水样中多种食源性致病菌的检测精密度高,结果准确可靠。

[0027] 表1自来水中多种食源性致病菌的检测结果(n = 5)

食源性致病菌	加入量(CFU/mL)	结果		
		回收值(CFU/mL)	RSD (%)	回收率%
SE	10^4	$(1.06 \pm 0.052)*10^4$	4.9	105.7
E.coli	10^4	$(0.957 \pm 0.059)*10^4$	6.5	95.7
SA	10^4	$(1.03 \pm 0.057)*10^4$	5.5	103.4
VP	10^4	$(0.916 \pm 0.068)*10^4$	7.4	91.6

以上结果说明,本发明构建金标银染免疫传感器,能够高灵敏高选择性地检测食源性致病菌,操作简单,结果准确可靠。通过改变本免疫传感器中的抗体,即可实现不同致病菌的高灵敏度、高特异性检测。

[0028] 当然,上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

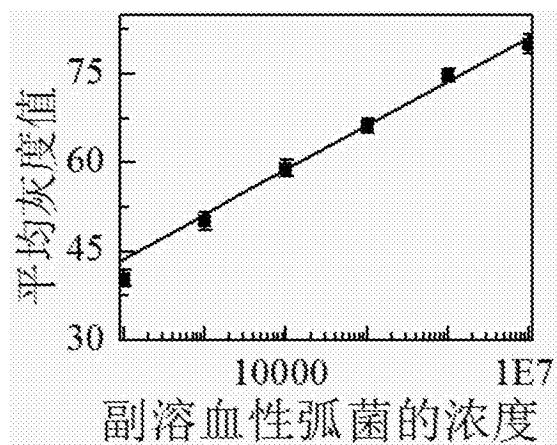


图1

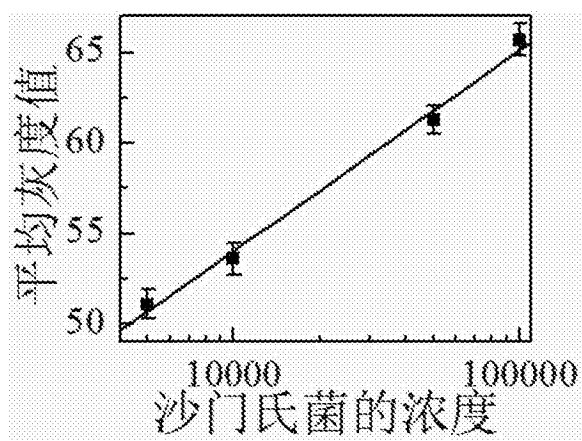


图2

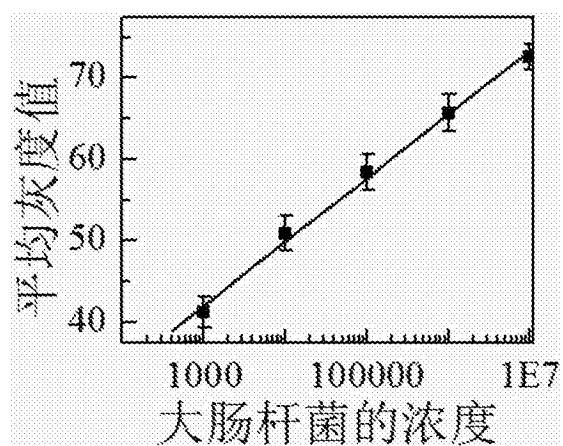


图3

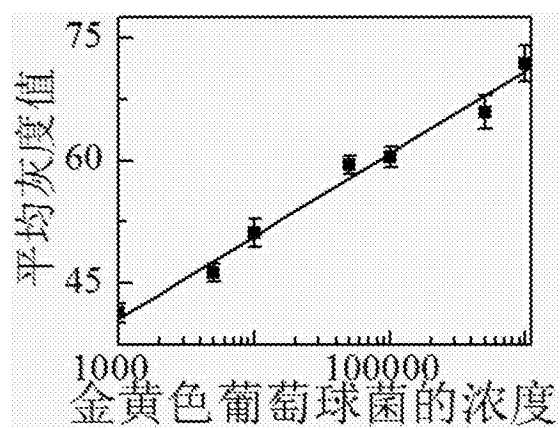


图4

专利名称(译)	基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN105891473A	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201610211155.9	申请日	2016-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	宋信信 郭智勇 苏秀榕 胡宇芳 俞欣辰 郭富米		
发明人	宋信信 郭智勇 苏秀榕 胡宇芳 俞欣辰 郭富米		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/56911 G01N33/56916 G01N33/56938		
代理人(译)	何仲		
其他公开文献	CN105891473B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器的制备方法及其应用，特点是包括载玻片的硅烷化步骤；将氮化碳材料羧基化后与胶体金溶液搅拌混合得到多功能化氮化碳溶液的步骤；将多功能化氮化碳溶液结合食源性致病菌一抗得到食源性致病菌一抗探针的步骤；在硅烷化载玻片上依次滴上偶联试剂，食源性致病菌二抗、食源性致病菌抗原和食源性致病菌一抗探针，即得到基于金标银染信号放大技术的食源性致病菌免疫传感器，通过添加银染试剂进行定量检测分析，优点是特异性好、灵敏度高、结果准确可靠、成本低、简单快速。

