



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104634847 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310581188. 9

(22) 申请日 2013. 11. 14

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫  
生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道 1 号

(72) 发明人 高志贤 彭媛 程超男 宁保安  
白家磊

(51) Int. Cl.

G01N 27/416(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于检测单增李斯特菌的电化学免疫传感方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测单增李斯特菌的方法,属于生物技术检测领域。本发明首先利用电化学活化金电极的表面,再浸入 1% 3- 巯基丙酸的乙醇溶液中自组装形成单分子膜,经活化后,将捕获抗体结合到电极表面,采用夹心法引入酶放大信号,通过酶催化电活性物质的氧化还原得到电流响应信号,建立了一种以三电极为体系的电化学免疫传感器检测单增李斯特菌的方法,该方法具有良好的灵敏度、特异性和稳定性。由于检测体系小,节省试剂,显著降低了检测成本,且由于不受样品浊度的影响,在应用与实际样品的检测中具有很大的潜力。

1. 一种在电化学传感器工作电极表面制备免疫传感器的方法,其特征由以下步骤组成:

(1) 将金电极在 2000 目、3000 目、5000 目砂纸上打磨,超纯水洗,然后依次用  $1.0\ \mu\text{m}$ 、 $0.3\ \mu\text{m}$ 、 $0.05\ \mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  粉末在麂皮上抛光,超纯水洗;

(2) 将洁净的金电极在  $0.1\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中进行循环伏安扫描(电压范围  $-0.2\text{V} \sim 1.2\text{V}$ ,扫描速率  $50\text{mV} / \text{s}$ )清洗,直至得到稳定的循环伏安图;然后在  $0.05\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中进行活化(电压范围  $-0.2\text{V} \sim 1.6\text{V}$ ,扫描速率  $50\text{mV} / \text{s}$ ),直至在  $0.94\text{V}$  左右得到一平滑的还原峰,超纯水洗,氮气吹干;

(3) 将处理好的金电极置于  $2\text{mL}$   $1\%$  3-巯基丙酸的乙醇溶液中自组装,室温过夜,乙醇洗,超纯水洗,氮气吹干;

(4) 将组装好的电极置于  $0.4\text{M}$  EDC- $0.1\text{M}$  NHS 的水溶液中室温活化  $30\text{min}$ ,超纯水洗,氮气吹干;

(5) 在活化好的电极表面滴加  $10\ \mu\text{L}$  单增李斯特菌单抗溶液, $37^\circ\text{C}$  孵育  $1\text{h}$ ,PBS 洗,氮气吹干;

(6) 将结合了单抗的电极置于  $1\text{mL}$   $1\%$  OVA 的 PBS 溶液, $37^\circ\text{C}$  封闭  $40\text{min}$ ,PBS 洗,氮气吹干;储于  $4^\circ\text{C}$  备用。

2. 一种基于自组装单分子膜的电化学免疫传感器检测单增李斯特菌的方法,其特征由以下步骤组成:

(1) 将制备的免疫传感器置于单增李斯特菌菌体抗原溶液中, $37^\circ\text{C}$  孵育  $1\text{h}$ ,PBS 洗;然后与辣根过氧化物酶标记的单增李斯特菌多抗反应, $37^\circ\text{C}$  孵育  $30\text{min}$ ,PBS 洗,氮气吹干;

(2) 配置  $10\text{mL}$  的底物溶液:含有  $0.24\text{mM}$  硫基溶液和  $6\text{mM}$  过氧化氢溶液的  $0.1\text{M}$  KCl 的 PBS 溶液 ( $0.01\text{M}$ ,  $\text{pH}7.0$ );氮吹  $5\text{min}$  除氧;

(3) 以 PBS 代替单增李斯特菌抗原溶液作为对照值,采用计时电流法检测电流信号的响应值,电压恒定在  $-0.3\text{V}$ ,持续时间  $200\text{s}$ 。用  $0.01\text{M}$  的甘氨酸-HCl ( $\text{pH}2.0$ ) 的水溶液再生  $5\text{min}$ ,除去结合的单增李斯特菌菌体抗原,以此循环进行不同浓度菌体的检测;

(4) 利用测得的电流信号与对应的单增李斯特菌浓度绘制标准曲线;对无菌牛奶样品进行加标实验,最终确定方法线性范围: $10^3$ - $10^6\text{CFU} / \text{ml}$ ,最低检测限: $10^2\text{CFU} / \text{ml}$ 。

## 一种用于检测单增李斯特菌的电化学免疫传感方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于夹心法电化学免疫传感采用计时电流法检测单增李斯特菌，属于生物技术检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 单增李斯特菌是一种重要的人畜共患病和食源性疾病的致病菌，能引起人、畜的李斯特菌病，感染后主要表现为脑膜炎、败血症、流产等，病死率高达 30%~70%，国际上已将此菌列为九十年代的食品四大致病菌之一。FDA、WHO 等组织都相继成立了相应的机构或规定相应的策略去预防和控制该菌的污染、传播。WHO 1988 年发表了“食源性李斯特菌病”劝告书，指导全世界各国如何预防 LM 污染和中毒，劝告公共卫生机构加强监测。近几年来，许多国家报道从多种食品中分离到李氏菌或因食品污染李氏菌而引起的食物中毒暴发事例。1999 年底，美国密歇根州发生了一起严重的李斯特菌感染食品引起的食物中毒事件，21 人因食用该菌污染的“热狗”和熟肉而死亡，另外 22 个州 97 人感染，6 名孕妇流产。2011 年 7 月，美国香瓜受李斯特菌污染事件，造成 30 人死亡，一名孕妇流产，共有 146 人染病，患者分布在 28 个州。2001 年 11 月以来，我国质检部门多次从美国、加拿大、法国、爱尔兰、比利时、丹麦等二十多家肉类加工厂进口的猪腰、猪肚、猪耳、小排等三十多批近千吨猪副产品中检出单增李斯特菌等致病菌。这些大量爆发和散发的流行病学案例表明，单增李斯特菌引起的食物中毒已是一个世界性的公共卫生问题。目前美国对于食品中的单增李斯特菌持零容忍态度，加拿大的标准为 100CFU / g 食物。因此，建立单增李斯特菌现场快速的检测技术在食品安全领域里意义重大。

[0003] 目前单增李斯特菌的检测方法主要是传统方法、酶联免疫吸附分析 (ELISA) 和聚合酶链式反应 (PCR) 等。在这些方法中，常规培养方法结果准确可靠，但是费时费力，得到结果常常需要 5-7 天；ELISA 方法操作简单，特异性强，反应灵敏度高，但是在分析前需要进行样品的前处理或富集；PCR 分析需要 DNA 提取和扩增等，步骤繁琐，且易出现假阳性。总之，这些方法都需要训练有素的专业人员和昂贵的花费以及较长的分析时间。最近几年，由于快速响应、简单灵敏、便宜和高特异性，电化学免疫传感器受到了人们的重视。电化学传感检测方法通过引入电活性物质的方法，将电极表面敏感元件对目标物的识别与吸附，转变成一种电信号，具有快速灵敏、对样品无损的优势。由于其对于样品的浊度无要求，故很容易应用与实际样品中的检测。电极上抗原抗体的固定方法对于检测信号的稳定性、重现性和灵敏度有着非常重要的影响。目前常用的固定方法有 LB 膜、聚合膜、蛋白 A 修饰、金纳米颗粒和自组装单分子层等。自组装单分子层制备简单、易形成超薄有序的单分子层。通过在电化学免疫传感器电极表面自组装单分子膜固定抗体，捕获目标物，引入酶催化电化学信号方法，其关键步骤是免疫传感器的制备和检测方法的确定。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种基于夹心法的电化学免疫传感方法用于检测单增李斯

特菌。

[0005] 本发明的技术方案概述如下：

[0006] 一种在电化学传感器的工作电极表面制备免疫传感器的方法，具体步骤如下：

[0007] (1) 将金电极通过打磨抛光处理后，再用硫酸溶液进行循环伏安清洗，然后在 0.05M $H_2SO_4$  溶液中进行活化（电压范围 -0.2V ~ 1.6V，扫描速率 50mV / s），直至在 0.94V 左右得到一平滑的还原峰，超纯水洗，氮气吹干；此为处理好的裸金电极。

[0008] (2) 将处理好的金电极置于 1% 3-巯基丙酸的乙醇溶液中自组装，室温过夜，乙醇洗，超纯水洗，氮气吹干；此为自组装电极。

[0009] (3) 将组装好的电极在室温活化 30min，超纯水洗，氮气吹干；此为活化电极。

[0010] (4) 在活化好的电极表面滴加单增李斯特菌单抗溶液，37℃ 孵育 1h，PBS 洗，氮气吹干；此为结合了单抗的电极。

[0011] (5) 将结合了单抗的电极 37℃ 封闭 40min，PBS 洗，氮气吹干；储于 4℃，悬于 PBS 上方，备用。此为制备好的免疫传感器。上述各步骤处理完成后都采用循环伏安法和电化学阻抗谱进行表征。

[0012] 表征溶液为 10mL 2.5mM  $Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}$  (1:1) 的含有 0.1M KCl 的 0.01M PBS 溶液。

[0013] 表征体系为三电极体系，金电极为工作电极，铂片电极为对电极，Ag / AgCl (3M KCl 溶液) 电极为参比电极。

[0014] 一种基于酶放大的夹心法电化学免疫传感器检测单增李斯特菌的方法，具体步骤如下：

[0015] (1) 配制系列浓度的单增李斯特菌溶液，分别与制备的免疫传感器在 37℃ 下孵育 1h，然后再与 HRP 标记的多抗进行反应，37℃ 孵育 30min，最后在电化学传感器上用计时电流法进行检测；以 PBS 为对照，在相同的条件下进行检测，得到的电流响应值即为阴性值，经计算得到电流响应的差值，绘制 LM 浓度与电流响应差值的标准曲线，计算方法线性范围及最低检测限。

[0016] (2) 用 0.1M 的甘氨酸-HCl (pH2.0) 的水溶液再生 5min，除去结合的单增李斯特菌菌体抗原，以此循环检测同一浓度的 LM 溶液，验证制备的免疫传感器的再生性能。

[0017] (3) 将电化学传感器得到的结果与平板计数的结果相比较，验证传感器的可靠性。

[0018] (4) 将此方法应用于检测牛奶样品加标实验，最终确定方法线性范围： $10^3-10^6$ CFU / ml，最低检测限： $10^2$ CFU / ml。

[0019] 底物溶液：10mL 含有 0.24mM 硫基溶液和 6mM 过氧化氢溶液的 0.1M KCl 的 PBS 溶液 (0.01M, pH7.0)；氮吹 5min 除氧。

[0020] 计时电流法参数设置：电压恒定在 -0.3V，电流持续时间 200S。

#### 附图说明

[0021] 图 1 电化学免疫传感器和检测系统示意图

[0022] 图 2 金电极活化图

[0023] 图 3 电化学免疫传感器循环伏安和电化学阻抗谱表征图

[0024] 图 4 电化学响应信号与单增李斯特菌浓度绘制的响应标准曲线

[0025] 图 5 电化学响应信号与牛奶中加标实验的曲线

### 具体实施方式

[0026] 实施方式一：电化学传感器电极表面制备免疫传感器

[0027] (1) 将金电极在 2000 目、3000 目、5000 目砂纸上画圈打磨或者在 Piranha 溶液 ( $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{SO}_4, 1:3, v/v$ ) 中浸泡 5min, 超纯水洗, 然后依次将  $1.0 \mu\text{m}$ 、 $0.3 \mu\text{m}$ 、 $0.05 \mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  粉末调成悬浮液在麂皮上抛光, 超纯水洗; 将洁净的金电极在  $0.1\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中进行循环伏安扫描 (电压范围  $-0.2\text{V} \sim 1.2\text{V}$ , 扫描速率  $50\text{mV}/\text{s}$ ) 清洗, 直至得到稳定的循环伏安图; 然后在  $0.05\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中进行活化 (电压范围  $-0.2\text{V} \sim 1.6\text{V}$ , 扫描速率  $50\text{mV}/\text{s}$ ), 直至在  $0.94\text{V}$  左右得到一平滑的还原峰, 超纯水洗, 氮气吹干;

[0028] (2) 将处理好的金电极置于  $2\text{mL}$   $1\%$  3-巯基丙酸的乙醇溶液中自组装, 室温过夜, 乙醇洗, 超纯水洗, 氮气吹干;

[0029] (3) 将组装好的电极置于  $2\text{mL}$   $0.4\text{M}$  EDC- $0.1\text{M}$  NHS 的水溶液中室温活化 30min, 超纯水洗, 氮气吹干;

[0030] (4) 在活化好的电极表面滴加  $10 \mu\text{L}$  稀释度为  $1:1000$  的单增李斯特菌单抗溶液,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h, PBS 洗, 氮气吹干;

[0031] (5) 将结合了单抗的电极置于  $1\text{mL}$   $1\%$  OVA 的 PBS 溶液,  $37^\circ\text{C}$  封闭 40min, PBS 洗, 氮气吹干; 储于  $4^\circ\text{C}$ , 悬于 PBS 上方, 备用。

[0032] 实施方式二：基于酶放大的夹心法电化学免疫传感器检测单增李斯特菌

[0033] (1) 将制备好的免疫传感器与空白溶液 PBS 在  $37^\circ\text{C}$  下反应, 然后再与 HRP 标记的多抗在  $37^\circ\text{C}$  下反应 30min, 最后在用计时电流法进行检测, 得到的值为阴性值;

[0034] (2) 配制系列浓度的单增李斯特菌溶液 ( $10^7\text{CFU}/\text{mL}$ 、 $10^6\text{CFU}/\text{mL}$ …… $10^1\text{CFU}/\text{mL}$ ), 分别与制备的免疫传感器在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 1h, 然后再与 HRP 标记的多抗进行反应,  $37^\circ\text{C}$  孵育 30min, 最后在电化学传感器上用计时电流法进行检测得到电流响应值, 用  $0.01\text{M}$  甘氨酸-HCl 溶液再生 5min, 除去结合的 LM, 以此循环对  $10^1\text{CFU}/\text{mL}$ - $10^7\text{CFU}/\text{mL}$  浓度范围内的 LM 进行检测。

[0035] (3) 经计算得到电流响应的差值, LM 浓度的对数值与电流响应差值的标准曲线:  $y=548.0x-727.2$ ,  $R^2=0.9883$ , 线性范围为  $10^2\text{CFU}/\text{mL}$ - $10^6\text{CFU}/\text{mL}$ 。

[0036] (4) 同时以同一浓度的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌和大肠杆菌为对照, 在相同条件下进行电化学检测, 结果显示制备的电化学免疫传感器具有较好的特异性。

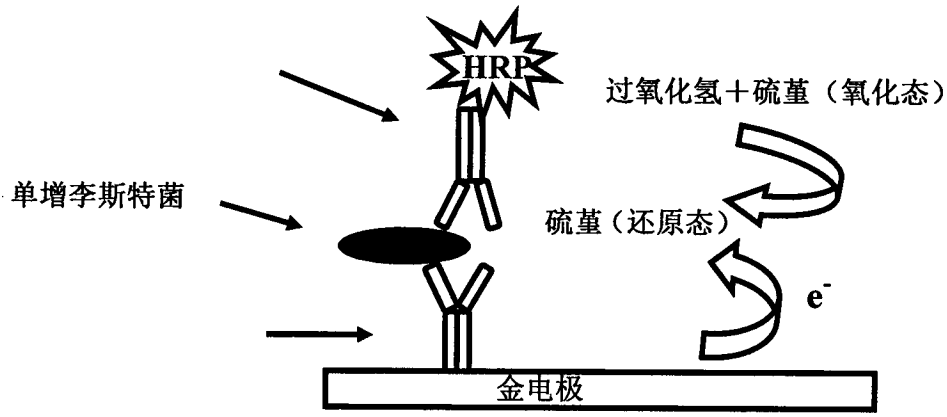


图 1

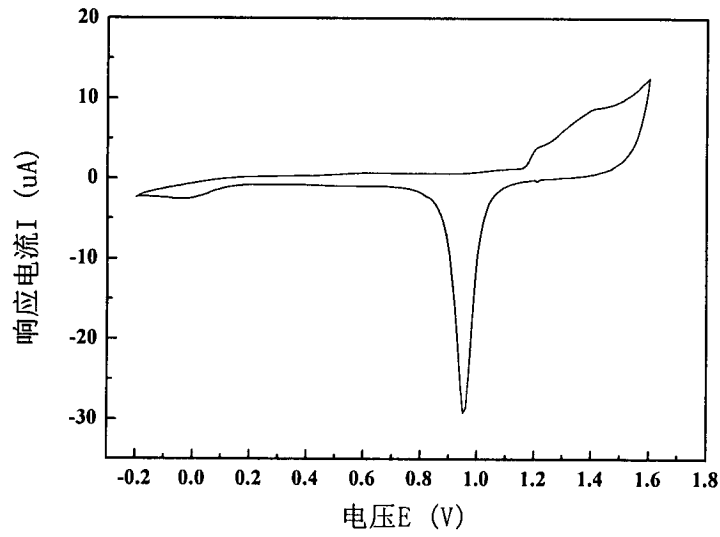


图 2

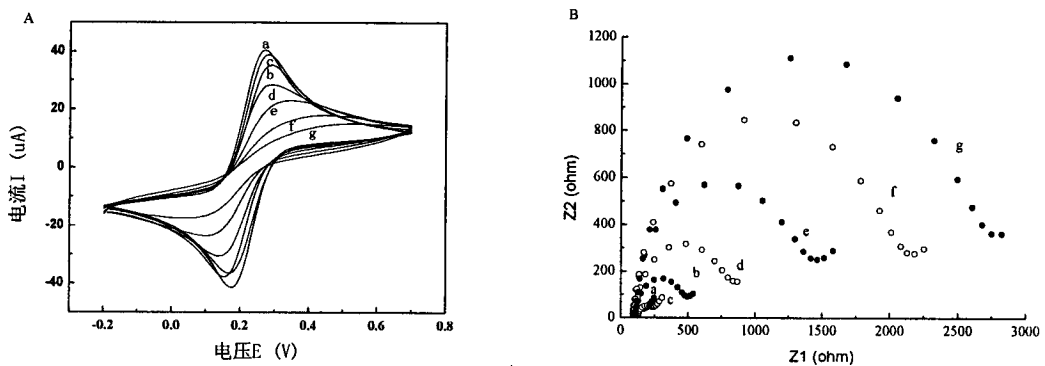


图 3

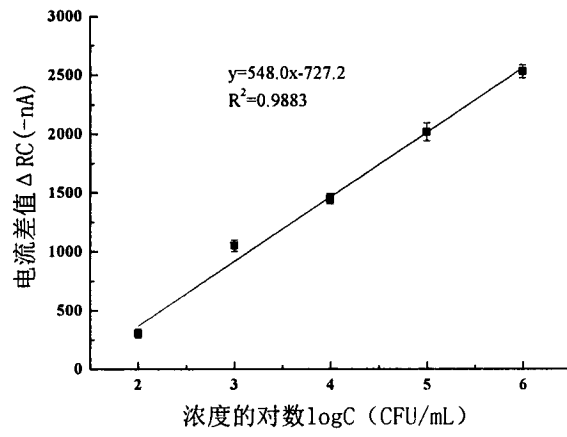


图 4

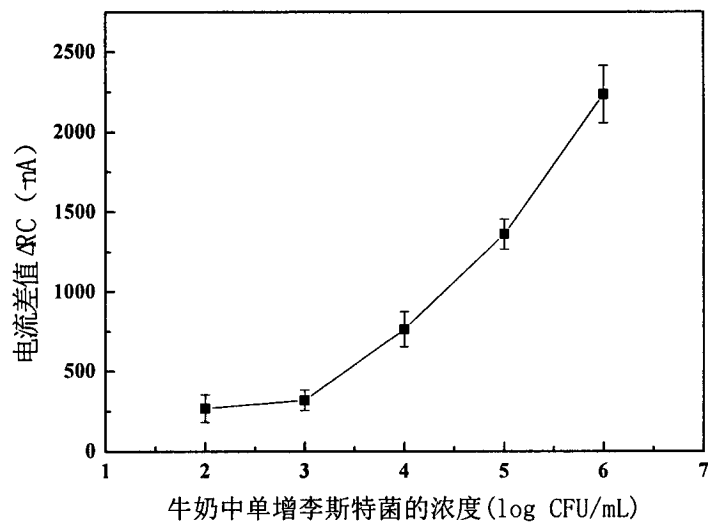


图 5

专利名称(译)	一种用于检测单增李斯特菌的电化学免疫传感方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104634847A</a>	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201310581188.9	申请日	2013-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	高志贤 彭媛 程超男 宁保安 白家磊		
发明人	高志贤 彭媛 程超男 宁保安 白家磊		
IPC分类号	G01N27/416 G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测单增李斯特菌的方法，属于生物技术检测领域。本发明首先利用电化学活化金电极的表面，再浸入1%3-巯基丙酸的乙醇溶液中自组装形成单分子膜，经活化后，将捕获抗体结合到电极表面，采用夹心法引入酶放大信号，通过酶催化电活性物质的氧化还原得到电流响应信号，建立了一种以三电极为体系的电化学免疫传感器检测单增李斯特菌的方法，该方法具有良好的灵敏度、特异性和稳定性。由于检测体系小，节省试剂，显著降低了检测成本，且由于不受样品浊度的影响，在应用与实际样品的检测中具有很大的潜力。

