



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107942053 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201610497713.2

(22)申请日 2016.06.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107942053 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(73)专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 胡涌刚 夏苗苗 李政

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 104928275 A, 2015.09.23, 说明书第6-33、73-74段, 实施例1-3.

CN 101675164 A, 2010.03.17, 权利要求1-3、21-26, 说明书7-9页, 实施例1.

CN 102760543 A, 2012.10.31, 全文.

杨文霞. 基于新型信号检测技术的蛋白激酶活性分析方法研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 基础科学辑》.2015,

审查员 刘彦宁

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

芽胞@Zr⁴⁺作为功能微球的制备及其在免疫检测中的应用

(57)摘要

本发明属于生物材料制备领域,具体涉及芽胞@Zr⁴⁺作为功能微球的制备及其在免疫检测中的应用。利用生物化学方法处理芽胞,制备成稳定性高、分散性好的悬浮微球,然后通过Zr⁴⁺离子吸附在芽胞表面,并将其应用于免疫检测领域。发明特征在于,收集培养7天的细菌芽胞,经离心洗涤和超声处理,用胰蛋白酶液和去芽胞衣处理液处理,得到除去孢外壁和芽胞衣的表面光滑的细菌芽胞微球,用该微球吸附Zr⁴⁺离子制备成芽胞@Zr⁴⁺功能微球。本发明的功能微球具有较好的机械强度,粒径均一,比重大小合适,制备工艺简单,成本低,适合高通量检测,对环境友好。本发明还公开了芽胞@Zr⁴⁺微球在牛分枝杆菌感染免疫检测中的应用。

1. 一种芽孢@Zr⁴⁺功能微球在制备免疫诊断试剂中的应用,其特征在于,所述的应用方法包括:

(1) 芽孢杆菌的培养及芽孢的收集:分别取用50%甘油保存在-20℃的解淀粉芽孢杆菌或巨大芽孢杆菌菌种200μL,加入灭菌的5mL LB液体培养基中,置37℃控温摇床中于180rpm培养过夜,使菌种活化;当OD₆₀₀=0.6时,吸取200μL加入到已冷却的LB固体培养基平板上,用玻璃棒涂布均匀后,收集培养7天的芽孢,用去离子水洗涤并离心,重复4-5次;

(2) 芽孢处理:将收集到的解淀粉芽孢杆菌的芽孢、巨大芽孢杆菌的芽孢用双蒸水重悬后,在冰浴条件下,用超声波破碎仪每次超声5min,超声间隔5min使芽孢液冷却,超声输出强度为7-8,频率为20%-30%,超声20min后离心洗涤3-4次;收集沉淀下来的芽孢,用15-20mL的1%胰蛋白酶溶液重悬,在37℃摇床中于80rpm振荡过夜;离心去除胰蛋白酶溶液,加入15-20mL的去衣被剂(Decoating Buffer),在70℃的条件下磁力搅拌反应2h;将处理好的芽孢离心去除上清液,用双蒸水清洗芽孢5次,再将芽孢重悬后,取少量用于芽孢计数,剩余的在121℃高压灭活30min,使芽孢失去活性,即为芽孢储备液,置4℃下保存备用;

(3) 芽孢吸附锆离子:取1mL处理好的芽孢储备液置于EP管中,12000rpm离心2min,弃掉上清,加入1mL 0.5mol/L的Zr⁴⁺离子溶液将芽孢重悬,吹打均匀使芽孢充分分散,将EP管放入摇床中于100rpm振荡1h,离心去上清,用双蒸水洗涤三次,保存在4℃冰箱中备用;

其中:

步骤(2)中所述的去衣被剂(Decoating Buffer)的配方如下:分别称取0.40g的氢氧化钠,5.84×10⁻¹g的氯化钠,1.00g的十二烷基硫酸钠,1.54g的二硫代苏糖醇,加超纯水定容至100mL;

1%胰蛋白酶溶液的配方如下:称取1g胰蛋白酶,溶于100mL pH7.4的PBS缓冲液中;

步骤(3)中所述的0.5mol/L的Zr⁴⁺溶液配制方法:称取8.056g的八水氧氯化锆溶于50mL去离子水中;

步骤(2)中所述的芽孢杆菌是保藏编号为CCTCC AB 92052的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和保藏编号为CCTCC AB 2013062的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*);

所述的Zr⁴⁺离子来源于八水氧氯化锆(ZrOCl₂·8H₂O),分子量为322.25。

芽胞@Zr⁴⁺作为功能微球的制备及其在免疫检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析材料制备领域,具体涉及一种芽胞@Zr⁴⁺功能微球的制备方法与在免疫检测中的应用。

背景技术

[0002] 免疫分析技术是一种基于抗原抗体特异反应的分析方法。由于具有高特异性、高灵敏度、低成本等优点,该技术目前已成为一种重要的用于分析特定蛋白或其他物质的技术。然而传统的免疫检测方法却仍存在某些缺陷。

[0003] 以酶联免疫吸附法(ELISA)为例,该方法成本高、劳动强度大,同时在检测动态范围及检测敏感度上明显受限。免疫微球检测技术作为一种新的免疫检测方法,它突破了传统方法固有的局限性并迅速发展起来¹⁻⁸。与传统的免疫技术相比,基于微球的免疫分析方法的优点有:(1)比表面积大。相对于二维的平面结构来说,微球的比表面积大大增加,更有利于受体与微球表面的结合;(2)结合速率更快。基于微球的免疫分析方法在悬浮的液相中进行,克服了固相载体在大分子检测时表面张力、空间效应等对反应动力学的影响,加速了反应的进行;(3)操作简单。基于微球的免疫分析其分离可以直接通过离心或磁分等方法进行,分离洗涤更加方便快速。(4)低成本,免疫检测样品用量少。微球更容易大批量、低成本的生产同时用于免疫检测时只需微量的样品体积;(5)高通量的检测。免疫微球可同时对一份标本中的多种不同目的分子进行定性定量分析。(6)在样品分析以及数据处理上具有较大的灵活性。据相关研究表明,理想的用于免疫分析的微球具有粒径均一、密度稍大于水,同时应具备反应快速和易分离、易洗涤等特点⁹。然而先前报道的许多微球用于免疫分析存在粒径过大或是密度过大的缺点,难以较好的运用在免疫分析中。例如当前商业化的微球,由于其多为多聚物合成,在与样品反应的过程中往往发生聚沉的微球而不是悬浮在上清中,从而降低微粒的扩散效率并进而影响检测效率^{9,10}。近年来,本申请人的研究团队利用芽胞杆菌的芽胞发展了一种新颖的生物方法制备表面带有多种功能基团(氨基、羧基和羟基)的高度单分散的微球,并证明其在特定的领域具有显著的应用潜力¹¹⁻¹³。这种基于芽胞的微球具有良好的理化性质,如较好的机械强度,粒径均一,比重大小合适等,这恰好符合微球用于免疫分析的理想条件⁹。同时与传统微球相比,该生物微球还具有制备简单,成本低,适合高通量检测以及环境友好等优点。其中最大的优点在于可以通过工业化的细菌发酵的方式大量制备,这是一种低成本,环境友好的制备方式。这种基于芽胞的微球具备的以上优点为其应用于其他更广阔的领域方面成为可能。

[0004] 对于免疫分析,现有的制备免疫微球的方法一般是将抗原或抗体通过传统的偶联试剂(N-羟基琥珀酰亚胺酯、可溶于水的碳二亚胺)偶联到功能化的微球上¹⁴。然而这种偶联过程复杂,成本高,耗时长,不适合微量蛋白,且需要专业技术培训。因此,寻找一种操作简单、高性能、低成本的装配捕获蛋白方法已成为迫切需要。在过去的几十年里,金属离子功能化的微球由于在生物分子(多肽或蛋白)富集¹⁵,酶固定化¹⁶以及环境污染治理¹⁷等方面报道的应用而逐渐引起人们的关注。通常,商业化的微球在合成过程中都会预先修饰一些

功能基团如氨基、羧基和磷酸基团在其表面作为螯合剂用来固定金属离子¹⁸⁻²⁰；然而，化学修饰过程通常较为复杂、耗时且对环境存在危害。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷，提供一种新的简单快速制备高度单分散的功能微球的方法。

[0006] 本申请人首次以 Zr^{4+} 作为模型构建金属离子功能化的材料用于免疫分析。本发明提出了一个创新的方法即利用芽胞杆菌的芽胞制备高度单分散的生物功能微球并应用于牛结核病的诊断中。在本发明提出的策略中，金属离子（如 Zr^{4+} ）能直接结合在芽胞表面而无需额外的修饰过程。这是因为该发明制备的芽胞生物微球表面存在一些固有的功能基团（如羧基和氨基）。显而易见的，将金属离子固定在基于芽胞的功能微球上形成芽胞@ Zr^{4+} 较传统方法制备用于免疫分析的微球相比更加的简便、快速和安全。据此，金属离子被用来作为固定捕获蛋白的连接媒介，其具有的优势是容易操作、环境友好、低成本。制备的芽胞@ Zr^{4+} 微球采取两种免疫分析策略对牛分枝杆菌感染进行检测：(1) 捕获抗原蛋白MPB83通过 Zr^{4+} 固定在芽胞 @ Zr^{4+} 微球上，接着被牛分枝杆菌感染的血清被添加与免疫微球反应，DyLight™ 649-羊抗牛 IgG随后被添加参与二级免疫反应，最后牛分枝杆菌感染血清中抗体的量采用流式细胞术进行分析。(2) 在第二种策略中，申请人证明抗体同样能被固定在芽胞@ Zr^{4+} 微球的表面用来检测由牛分枝杆菌感染引起的外周血单核细胞释放的牛IFN- γ 。经过双抗夹心免疫反应后，采用辣根过氧化物酶（HRP）- H_2O_2 -Amplex Red荧光反应体系^{21,22}对牛IFN- γ 进行免疫分析。最后这些分析被用于牛分枝杆菌感染的临床诊断。本发明克服了传统制备功能微球操作繁琐复杂，高能耗，环境不友好以及密度和粒径不均一等缺点。本发明将金属锆离子固定在处理后的芽胞表面，形成芽胞@ Zr^{4+} 微球并将其应用于免疫检测。

[0007] 为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

[0008] 将培养7天的细菌芽胞收集起来，经过离心洗涤后以及超声处理，再用胰蛋白酶液处理和去芽胞衣缓冲液（Decoating buffer）处理，最后得到表面光滑，分散性和疏水性都更强的芽胞微球，然后将此微球吸附锆离子构建芽胞@ Zr^{4+} 微球用于牛分枝杆菌感染血清中抗体的检测及牛IFN- γ 荧光免疫分析。

[0009] 具体地，本发明的技术方案如下所述：

[0010] 一种利用细菌芽胞制备芽胞@ Zr^{4+} 功能微球的方法，包括下列步骤：

[0011] (1) 芽胞杆菌的培养及芽胞的收集：分别取用50%甘油保存在-20℃的解淀粉芽胞杆菌或巨大芽胞杆菌菌种200 μ L，加入已灭菌的5mL LB液体培养基中，置37℃控温摇床中180 rpm培养过夜，使菌种活化；当OD₆₀₀=0.6时，吸取200 μ L加入到已冷却的LB固体培养基平板上，用玻璃棒涂布均匀后，收集培养7天的芽胞，用去离子水洗涤并离心，重复4-5次；

[0012] (2) 芽胞处理：将收集得到的解淀粉芽胞杆菌的芽胞、巨大芽胞杆菌的芽胞用双蒸水重悬后，在冰浴条件下，用超声波破碎仪每次超声5min，超声间隔5min使芽胞液冷却，超声输出强度为7-8，频率为20%-30%，超声时间为20min后离心洗涤3-4次；收集沉淀下来的芽胞，用15-20mL的1%胰蛋白酶溶液重悬，在37℃摇床中80rpm振荡过夜；离心去除胰蛋白酶溶液，加入15-20mL的去衣被剂（Decoating Buffer），在70℃的条件下磁力搅拌反应2h；将处理好的芽胞离心去除上清液，用双蒸水清洗芽胞5次，再将芽胞重悬后，取少量用于

芽胞计数,剩余的在121℃高压灭活30min,使芽胞失去活性,即为芽胞储备液,置4℃下保存备用;

[0013] (3) 芽胞吸附锆离子:取1mL处理好的芽胞储备液置于EP管中,12000rpm离心2分钟,弃掉上清,加入1mL 0.5mol/L的 Zr^{4+} 离子溶液将芽胞重悬,吹打均匀使芽胞充分分散,将EP管放入摇床中于100rpm振荡1h,离心去上清,用双蒸水洗涤三次,保存在4℃冰箱中备用;

[0014] 其中:

[0015] 所述的所述的芽孢杆菌是巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 为中国典型培养物保藏中心公开发放的菌株,其保藏编号为CCTCC AB 92052,解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 为中国典型培养物保藏中心公开发放的菌株,其保藏编号为CCTCC AB 2013062。

[0016] 申请人提供了一种利用细菌芽胞制备的功能微球的应用方法,所述的应用包括下列两个方向::

[0017] 1. 本发明制备的芽胞@ Zr^{4+} 微球在牛分支杆菌感染血清抗体检测中的应用:具体步骤是:

[0018] (1) 取100 μ L 1.2×10^{10} particles mL^{-1} 的芽胞@ Zr^{4+} 微球与10 μ g mL^{-1} 的MPB83抗原蛋白37℃反应20min,使MPB83抗原蛋白偶联在芽胞@ Zr^{4+} 微球表面上;

[0019] (2) 取出反应离心管,离心后向每管加入500 μ L PBST对免疫微球进行洗脱,混合均匀后静置3min,离心去除洗脱液,重复洗涤3次;

[0020] (3) 用15%的羊血清溶液作为封闭剂,对偶联有MPB83抗原蛋白的芽胞@ Zr^{4+} 微球进行封闭;

[0021] (4) 取出反应离心管,重复步骤(2);

[0022] (5) 加入200 μ L待检测血清,使血清中的抗体与抗原蛋白发生特异性免疫反应,形成芽胞 @ Zr^{4+} 微球-抗原-抗体复合物;

[0023] (6) 取出反应离心管,重复步骤(2);

[0024] (7) 加入200 μ L浓度为0.25 μ g mL^{-1} Dylight™649标记的羊抗牛IgG进行第二次免疫反应,反应完成后进行充分的洗涤,以使未结合到微球表面的Dylight™649-IgG被充分洗脱下来;

[0025] (8) 洗脱完成后,将免疫反应完成后的微球用PBS缓冲液重悬,利用流式细胞仪检测标记到微球表面的Dylight™649的荧光信号强度。

[0026] 2. 本发明制备的芽胞@ Zr^{4+} 微球在牛IFN- γ 荧光免疫分析中的应用,具体步骤是:

[0027] (1) 取1mL浓度为 3.30×10^9 particles/mL的芽胞@ Zr^{4+} 微球离心去上清后,加入5 μ g/mL的抗牛IFN- γ 单克隆抗体混匀,放入台式恒温摇床中37℃、160r/min条件下振荡孵育1h;

[0028] (2) 将反应管取出后,离心去除上清,用1mL PBST洗涤3次后,用1mL含5%牛血清白蛋白(BSA)和5%脱脂牛奶(skim milk)的混合封闭剂进行封闭反应2h;

[0029] (3) 封闭后用1mL的PBST洗涤微球3次,加入1mL含0.1%BSA的PBS缓冲液重悬;

[0030] (4) 取 6.60×10^7 个免疫芽胞微球加入2mL离心管中,用500 μ L的PBST洗涤3次,离心去上清;加入100 μ L的不同浓度梯度的标准品或待检测血浆样品并振荡均匀,于台式恒温摇床中37℃、180r/min条件下反应30min;

[0031] (5) 取出反应离心管,离心后向每管加入500 μ L PBST对免疫微球进行洗脱,混合均匀后静置3min,离心去除洗脱液,重复洗涤3次;

[0032] (6) 向每管加入100 μ L浓度为0.50 μ g mL⁻¹的抗牛IFN- γ 多克隆抗体并振荡均匀,于台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应30min;

[0033] (7) 取出反应离心管,重复步骤(2);

[0034] (8) 向每管中加入100 μ L浓度为2.50 μ g/mL的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG并振荡混匀,与台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应30min;

[0035] (9) 取出反应离心管,重复步骤(2),获得免疫芽胞微球;

[0036] (10) 分别将50 μ L的0.20mmol/L H₂O₂和0.10mmol/L Amplex Red与步骤(9)获得的免疫芽胞微球混匀,同时以直接向离心管中添加50 μ L的0.20mmol/L H₂O₂和0.10mmol/L Amplex Red作为空白对照。将上述离心管避光置于台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应20min 后离心,吸取上清50 μ L用荧光和化学发光检测仪检测各样品的荧光信号;

[0037] (11) 标准曲线的绘制:以标准品浓度作为横坐标,检测荧光强度值作纵坐标,手工绘制或用软件绘制标准曲线。通过待检标本的荧光强度值可在标准曲线上查出其浓度;

[0038] (12) 牛结核病诊断的结果判定。计算每头动物采用该方法检测禽PPD和牛PPD刺激血浆读取的平均荧光信号强度;

[0039] 计算公式如下:

[0040] 阳性=牛PPD刺激血浆检测的荧光信号强度/禽PPD刺激血浆检测的荧光信号强度 ≥ 1.71 ;

[0041] 阴性=牛型提纯的结核菌素的荧光信号强度/禽型提纯的结合菌素的荧光信号强度 < 1.71 ;其中:

[0042] 所述的芽胞杆菌是为中国典型培养物保藏中心公开发放的菌株巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*),其保藏编号为CCTCC AB 92052,解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)为中国典型培养物保藏中心公开发放的菌株,其保藏编号为 CCTCC AB 2013062。

附图说明

[0043] 图1:处理后芽胞及芽胞@Zr⁴⁺微球表征。图1中的A图和图1中的B图分别为处理后解淀粉芽胞杆菌和巨大芽胞杆菌的芽胞透射电镜图;图1中的C图为芽胞吸附Zr⁴⁺离子前后的FTIR光谱图。附图标记说明:黑线代表芽胞吸附Zr⁴⁺离子前的FTIR光谱图,红线表示芽胞吸附Zr⁴⁺后的FTIR光谱图;图1中的D图为处理后的芽胞的XPS能谱图;E图为芽胞@Zr⁴⁺的XPS能谱图;F图为E图中Zr⁴⁺元素的XPS分峰图。

[0044] 图2:芽胞@Zr⁴⁺功能微球作为悬浮载体在抗体免疫检测中的应用。图2中的A图是阴性血清的检测信号强度;图2中的B图是阳性血清的检测信号强度;图2中的C图是标准阳性血清在1:1000-20000倍稀释范围内的检测线性图;图2中的D图是对牛结核阳性血清、牛传染性鼻气管炎阳性血清、牛巴贝斯虫病阳性血清、口蹄疫阳性血清、布氏杆菌阳性血清、牛附红细胞体阳性血清五种阳性血清和牛结核阴性血清对照的检测结果图。

[0045] 图3:芽胞@Zr⁴⁺功能微球作为悬浮载体在抗原免疫检测中的应用。图3中的A图为阳性样品、阴性样品光谱图,插图展示的是阳性和阴性样品的比色结果;图3中的B图是牛IFN-

γ 标准品在 0.1 ng mL^{-1} 到 20 ng mL^{-1} 浓度范围内的检测线性图;图3中C图是基于芽胞@Zr⁴⁺对牛IFN- γ 免疫分析方法的特异性研究。图3中C图标记的说明:横坐标从左至右依次代表 3.0 ng mL^{-1} 牛IFN- γ , 3.0 ng mL^{-1} 牛IFN- γ + 1.0 ng mL^{-1} 牛IFN- α , 3.0 ng mL^{-1} 牛IFN- γ + 5.0 ng mL^{-1} 牛IFN- α , 3.0 ng mL^{-1} 牛IFN- γ + 1.0 ng mL^{-1} 牛IFN- β , 3.0 ng mL^{-1} 牛IFN- γ + 5.0 ng mL^{-1} 牛IFN- β , Control (-), 1.0 ng mL^{-1} 牛IFN- α , 5.0 ng mL^{-1} 牛IFN- α , 1.0 ng mL^{-1} 牛IFN- β , 5.0 ng mL^{-1} 牛IFN- β 。

具体实施方式

[0046] 实施例1(制备实施例)

[0047] 本实施例以解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 是中国典型培养物保藏中心公开发放的菌株,其保藏编号为CCTCC AB 2013062) 和中国典型培养物保藏中心公开发放的菌株巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*),其保藏编号为CCTCC AB 92052) 的芽胞作为制备功能微球的起始材料。

[0048] 具体步骤如下:

[0049] (1) 芽胞杆菌的培养及芽胞的收集:分别取用50%甘油保存在-20℃的解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 或巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) 菌种200 μ L,加入已灭菌的5mL LB液体培养基中,置37℃控温摇床中180rpm培养过夜,使菌种活化;当OD₆₀₀=0.6 时,吸取200 μ L加入到已冷却的LB固体培养基平板上,用玻璃棒涂布均匀后,收集培养7天的芽胞,用去离子水洗涤并离心,重复4-5次;

[0050] (2) 芽胞处理:将收集到的解淀粉芽胞杆菌的芽胞、巨大芽胞杆菌的芽胞用双蒸水重悬后,在冰浴条件下,用超声波破碎仪每次超声5min,超声间隔5min使芽胞液冷却,超声输出强度为7-8,频率为20%-30%,超声20min后离心洗涤3-4次。收集沉淀下来的芽胞,用15-20 mL的1%胰蛋白酶溶液重悬,在37℃摇床中80rpm振荡过夜;离心去除胰蛋白酶溶液,加入15-20mL的去衣被剂(Decoating Buffer),在70℃的条件下磁力搅拌反应2h;将处理好的芽胞离心去除上清液,用双蒸水清洗芽胞5次,再将芽胞重悬后,取少量用于芽胞计数,剩余的在121℃高压灭活30min,使芽胞失去活性,即为芽胞储备液,置4℃下保存备用;

[0051] (3) 芽胞吸附锆离子:取1mL处理好的芽胞储备液置于EP管中,12000rpm离心2分钟,弃掉上清,加入1mL 0.5mol/L的Zr⁴⁺离子溶液将芽胞重悬,吹打均匀使芽胞充分分散,将EP管放入摇床中于100rpm振荡1h,离心去上清,用双蒸水洗涤三次,保存在4℃冰箱中备用;

[0052] (4) 对处理后芽胞及芽胞@Zr⁴⁺微球进行表征:将实施例1中所述的处理后的芽胞用透射电子显微镜(TEM)表征,对处理后的芽胞和芽胞@Zr⁴⁺微球进行傅里叶变换红外光谱(FTIR)、X射线电子能谱分析(XPS)表征。

[0053] 本实施例的结果如图1所示,巨大芽胞杆菌 (*B. Megaterium*) 和解淀粉芽胞杆菌 (*B. Amyloliquefaciens*) 芽胞的透射电子显微镜图(见图1中的A图,图1中的B图)揭示处理后的芽胞表面非常的光滑、呈椭圆形。解淀粉芽胞杆菌 (*B. Amyloliquefaciens*) 芽胞和基于解淀粉芽胞杆菌芽胞的芽胞@Zr⁴⁺功能微球进一步通过FTIR和XPS进行分析,由FTIR分析可知,单分散芽胞微球表面(见图1中的C图中的黑线指示)带有羧基功能基团(RCOOH;1654, 1541, 1241 and 1067cm⁻¹)、肽键(CO-NH-;1654, and 1541cm⁻¹)以及氨基基团(-NH₂, and -NH; 3282, 1557, 669cm⁻¹);而芽胞@Zr⁴⁺微球的FTIR表征结果表面位于3282和1654cm⁻¹处的吸收峰在结

合 Zr^{4+} 离子后分别红移至3288和1652 cm^{-1} 处。处理后的单分散芽胞微球(请按照附图新的图号编辑,见图1中的D图)和芽胞@ Zr^{4+} 功能微球(图1中的E图和F图)分别采用XPS进行分析。由图1中的E图,图1中的F图可见182.22eV处有Zr3d的特征峰,其比位于184.71eV处的 $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ 结合能要略低一点。同时O1s和N1s的结合能在芽胞吸附 Zr^{4+} 后分别升高了约0.53eV和1.25eV,这是由于O1s和N1s电子密度的损失造成。由FTIR 和XPS的表征结果证明处理后的芽胞微球通过其表面的氨基、羧基与 Zr^{4+} 离子间以化学吸附或配位作用结合。

[0054] 实施例2(应用实施例1)

[0055] 本发明制备的芽胞@ Zr^{4+} 微球在牛分支杆菌感染血清抗体检测中的应用

[0056] 具体步骤如下:

[0057] (1)取100 μL 1.2×10^{10} particles mL^{-1} 的芽胞@ Zr^{4+} 微球与10 μg mL^{-1} 的MPB83抗原蛋白37 $^{\circ}C$ 反应20min,使MPB83抗原蛋白偶联在芽胞@ Zr^{4+} 微球表面上;

[0058] (2)取出反应离心管,离心后向每管加入500 μL PBST对免疫微球进行洗脱,混合均匀后静置3min,离心去除洗脱液,重复洗涤3次;

[0059] (3)用15%的羊血清溶液作为封闭剂,对偶联有MPB83抗原蛋白的芽胞@ Zr^{4+} 微球进行封闭;

[0060] (4)取出反应离心管,重复步骤(2)。

[0061] (5)加入200 μL 待检测血清,使血清中的抗体与抗原蛋白发生特异性免疫反应,形成芽胞@ Zr^{4+} 微球-抗原-抗体复合物;

[0062] (6)取出反应离心管,重复步骤(2);

[0063] (7)加入200 μL 浓度为0.25 μg mL^{-1} DylightTM649标记的羊抗牛IgG进行第二次免疫反应,反应完成后进行充分的洗涤,以使未结合到微球表面的DylightTM649-IgG被充分洗脱下来;

[0064] (8)洗脱完成后,将免疫反应完成后的微球用PBS缓冲液重悬,利用流式细胞仪检测标记到微球表面的DylightTM649的荧光信号强度。

[0065] 利用本发明制备的免疫微球分别检测牛结核病的标准阴、阳性血清,并测试了不同稀释倍数的标准阳性血清的线性范围和对其它致病因子之间的交叉感染,结果如图2所示。图2 中的A图和图2中的B图分别为阴性和阳性血清的检测信号强度,可见阳性血清检测信号强度明显高于阴性血清,有很好的区分性。通过相关条件的优化后,用本发明制备的芽胞@ Zr^{4+} 微球在检测牛结核病中具有良好的线性、重复性和特异性。在500-20000倍稀释的标准阳性血清中 $R^2=0.997$ (结果见图2中的C图),11组重复实验的相对标准偏差为2.33%,检测限为32000倍稀释的标准阳性血清,远远低于传统的ELISA方法($S/N=3$)。同时,本实施例对牛传染性鼻气管炎阳性血清、牛巴贝斯虫病阳性血清、口蹄疫阳性血清、布氏杆菌阳性血清、牛附红细胞体阳性血清、五种阳性血清进行检测分析(结果见图2中的D图)。由图可知这五种感染的血清的荧光信号强度和牛结核阴性对照血清荧光值相近,并远低于牛结核阳性对照血清信号值,表明芽胞吸附 Zr^{4+} 离子在检测牛结核感染血清时与其它致病原菌不会发生交叉反应,说明本发明方法的特异性良好。用本发明与商用牛结核抗体ELISA检测试剂盒同时对69份临床牛血清进行检测,结果见图1,由图1的结果可知本发明的敏感度为71.43%,符合率为86.95%,特异性为97.50%。

[0066] 表1 芽胞@ Zr^{4+} 复合微球和Ap_xIVA-ELISA检测猪临床血清结果的比较

		流式细胞术			表现		
		阳性	阴性	合计	符合率	敏感度	特异性
[0067]	阳性	20	8	28			
	ELISA 阴性	1	40	41	86.95%	71.43%	97.50%
	合计	21	48	69			

[0068] 由此表明,本发明构建的芽胞@Zr⁴⁺微球在悬浮芯片用于血清中抗体检测方面巨大潜力和应用前景。

[0069] 实施例3(应用实施例2)

[0070] 芽胞@Zr⁴⁺微球在牛IFN- γ 荧光免疫分析中的应用

[0071] 1.全血的培养

[0072] 从湖北省黄冈市奶牛场采集54份奶牛血样,加入肝素抗凝。室温下运至实验室并在采血后30h内进行培养。将抗凝血加入24孔组织培养板,每头奶牛加2管各1.5mL抗凝血,之后向2管中分别加入100 μ L禽PPD、牛PPD至相应的孔,置于37 $^{\circ}$ C湿温培养箱中孵育16-24 h。用移液器小心吸取约400 μ L的上层血浆用于后续检测。

[0073] 2.牛IFN- γ 荧光免疫分析步骤

[0074] (1)取1mL浓度为 3.30×10^9 particles/mL的芽胞@Zr⁴⁺微球离心去上清后,加入5ug/mL的抗牛IFN- γ 单克隆抗体混匀,放入台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C、160r/min条件下振荡孵育1h;

[0075] (2)将反应管取出后,离心去除上清,用1mL PBST洗涤3次后,用1mL含5%牛血清白蛋白(BSA)和5%脱脂牛奶(skim milk)的混合封闭剂进行封闭反应2h;

[0076] (3)封闭后用1mL的PBST洗涤微球3次,加入1ml含0.1%BSA的PBS缓冲液重悬;

[0077] (4)取 6.60×10^7 个免疫芽胞微球加入2mL离心管中,用500 μ L的PBST洗涤3次,离心去上清。加入100 μ L的不同浓度标准品或待检测血浆样品并振荡均匀,于台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应30min;

[0078] (5)取出反应离心管,离心后向每管加入500 μ L PBST对免疫微球进行洗脱,混合均匀后静置3min,离心去除洗脱液,重复洗涤3次;

[0079] (6)向每管加入100 μ L浓度为0.50 μ g mL⁻¹的抗牛IFN- γ 多克隆抗体并振荡均匀,于台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应30min;

[0080] (7)取出反应离心管,重复步骤(2);

[0081] (8)向每管中加入100 μ L浓度为2.50 μ g/mL的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG并振荡混匀,与台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应30min;

[0082] (9)取出反应离心管,重复步骤(2);

[0083] (10)分别将50 μ L的0.20mmol/L H₂O₂和0.10mmol/L Amplex Red与上一步获得的免疫芽胞微球混匀,同时以直接向离心管中添加50 μ L的0.20mmol/L H₂O₂和0.10mmol/L Amplex Red作为空白对照。将上述离心管避光置于台式恒温摇床中37 $^{\circ}$ C,180r/min条件下反应20min 后离心,吸取上清50 μ L用荧光和化学发光检测仪检测各样品的荧光信号。

[0084] (11)标准曲线的绘制。以标准品浓度作为横坐标,检测荧光强度值作纵坐标,手工

绘制或用软件绘制标准曲线。通过待检标本的荧光强度值可在标准曲线上查出其浓度。

[0085] (12) 牛结核病诊断的结果判定。计算每头动物采用该方法检测禽PPD和牛PPD刺激血浆读取的平均荧光信号强度。计算公式：

[0086] 阳性 = 牛PPD刺激血浆检测的荧光信号强度 / 禽PPD刺激血浆检测的荧光信号强度 ≥ 1.71

[0087] 阴性 = 牛型提纯的结核菌素的荧光信号强度 / 禽型提纯的结合菌素的荧光信号强度 < 1.71

[0088] 基于HRP可以催化 H_2O_2 氧化Amplex Red产生具有强荧光性质的试卤灵，建立了一种基于芽孢@Zr⁴⁺的新型荧光免疫传感技术，并将其成功用于牛IFN- γ 的免疫测定和牛结核病的早期诊断中。图3中的A图为阳性样品与阴性样品的荧光光谱图，从该图中可以看出阳性样品的荧光强度远远高于阴性样品。图3中的B图结果表明：在 $0.1ng\ mL^{-1}$ – $20.0ng\ mL^{-1}$ 范围内牛 IFN- γ 的浓度与荧光信号强度值呈良好的线性关系 ($R^2=0.998$)；检测限为 $40pg\ mL^{-1}$ ($S/N=3$) (图3中B图)。采用本发明对浓度为 $1.5ng\ mL^{-1}$ 的牛IFN- γ 进行了重复测定，计算相对标准偏差为4.2%，结果显示传感方法具有良好的重复性和用于牛IFN- γ 检测的潜力。牛IFN- α 、IFN- β 被用来评估诊断特异性。结果如图3中的C图所示，检测牛IFN- α ，牛IFN- β 的荧光信号值和阴性对照接近，而牛IFN- α 和牛IFN- γ 混合后检测的荧光信号值以及牛IFN- β 和牛IFN- γ 混合后检测的荧光信号值与单独检测相同浓度的牛IFN- γ 产生相近的荧光信号强度，说明本方法对牛IFN- γ 检测具有特异性。为了调查本发明用于牛结核病诊断的应用前景，对54份经牛PPD和禽PPD分别刺激后的血浆样品做检测并与商业Bovigam™试剂盒作比较，结果见表2，符合率达87.0%，敏感度为82.6%，特异性为90.3%。

[0089] 表2 Bovigam™试剂盒与本方法诊断牛结核病结果的比较

			本发明			表现	
			阳性	阴性	总计	符合率	敏感度 特异性
[0090]	Bovigam™ 试剂盒	阳性	19	4	23	87.0%	82.6% 90.3%
		阴性	3	28	31		
		总计	22	32	54		

[0091] 以上结果表明本发明构建的芽孢@Zr⁴⁺微球能成功对牛IFN- γ 进行荧光免疫分析进而实现对牛结核病的早期诊断，同时芽孢@Zr⁴⁺微球在双抗夹心免疫分析中具有良好的商业应用前景。

[0092] 备注：实施例中所用到的生物材料、试剂和仪器相关信息如下所述：

[0093] 细菌芽胞：来自于培养7天的芽胞杆菌，包括取自：巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) CCTCC AB 92052，解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) CCTCC AB 2013062)，这两种菌株均保存于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，属于公开发放的生物材料，但是实施本发明不限于上述生物材料。

[0094] 相关试剂：原核重组表达牛IFN- γ ，鼠抗牛IFN- γ 单克隆抗体，兔抗牛IFN- γ 多克隆抗体及血浆样品均由华中农业大学微生物国家重点实验室郭爱珍教授课题组提供 (制备方法见该课题组发表论文Li C, Tan YD, Hu QY, Chen YY, Ma Y, Zhang GR, et al. Chin J Biomed Eng 2007; 23: 40-45)，原核重组表达牛分枝杆菌特异抗原蛋白MPB83购买于ABClonal生物技术有限公司；试验用水均为超纯水；胰蛋白胨和酵母浸粉购买于英国Oxoid

公司;胰蛋白酶、Amplex Red购买于美国Sigma-Aldrich公司;十二烷基硫酸钠、八水氧氯化锆、30% H₂O₂溶液、甘油购买于国药化学试剂有限公司;1,4-二硫代苏糖醇购买于合肥博美生物科技有限责任公司;HRP标记的山羊抗兔IgG购买于美国Abbkine公司;考马斯亮蓝G250购买于天津威一化工科技有限公司;脱脂牛奶购买于碧迪医疗器械有限公司(上海);牛血清白蛋白(BSA)、吐温-20购买于德国罗氏公司;BovigamTM牛结核分枝杆菌 γ -干扰素检测试剂盒购买于PrioniesAG公司;牛PPD与禽PPD购买于中国兽医药品监察所。

[0095] 主要溶液的配制:

[0096] (1) 1%胰蛋白酶溶液:称取1.00g胰蛋白酶,用pH 7.4的0.01mol/L的磷酸盐缓冲液即 PBS溶液(常用缓冲液)溶解,加超纯水定容至100mL。

[0097] (2) 去衣被剂(Decoating buffer):分别称取0.40g氢氧化钠, 5.84×10^{-1} g氯化钠, 1.00g 十二烷基硫酸钠, 1.54g二硫代苏糖醇,加超纯水定容至100mL。

[0098] 0.50mol/L Zr⁴⁺溶液:称取16.10g八水氧氯化锆溶于100mL水中。

[0099] (3) PBS配制方法:8.00g氯化钠,0.20g氯化钾,3.63g十二水合磷酸氢二钠,0.24g磷酸二氢钾,加超纯水定容至1L超纯水中。

[0100] (4) PBST洗脱液配制方法:取1L PBS溶液,加入500 μ L吐温-20。

[0101] (5) Bradford工作液配制方法:称取100mg考马斯亮蓝G250溶于50mL95%乙醇,向其中加入100mL 85%磷酸,用超纯水稀释定容至1L,用棕色瓶保存备用,使用前先用滤纸过滤。

[0102] 相关仪器生产厂商及型号(实际使用时按厂商提供的说明书操作):

[0103] pH计:PB-10,美国奥利龙公司;

[0104] 纯水仪:CASCADA IX MK2,美国颇尔公司;

[0105] 透射电子显微镜:JEM-100CX II,日本电子株式会社;

[0106] 傅里叶变换红外光谱仪:330FTIR,美国赛默飞世尔科技有限公司;

[0107] 高速冷冻离心机:Sigma 3K15,德国西格玛公司;

[0108] 粒度及电位分析仪:NanoZS90,英国马尔文公司;

[0109] 等离子光谱仪:IRIS II,美国热电元素公司;

[0110] X射线光电子能谱仪:VG Multilab 2000,美国赛默飞世尔科技公司;

[0111] 超声波破碎仪:450D,美国Branson公司;

[0112] 荧光和化学发光检测仪:Fluoroskan Ascent FL,美国赛默飞世尔科技有限公司;

[0113] 流式细胞仪:FACSCalibur,美国BD公司。

[0114] 主要参考文献

[0115] 1.C.N.LaFratta and D.R.Walt,Chemical Reviews,2008,108,614-637.

[0116] 2.J.P.Nolan and L.A.Sklar,Trends in Biotechnology,2002,20,9-12.

[0117] 3.M.Han,X.Gao,J.Z.Su and S.Nie,Nature Biotechnology,2001,19,631-635.

[0118] 4.T.Song,Q.Zhang,C.L.Lu,X.Q.Gong,Q.H.Yang,Y.H.Li,J.Q.Liu and J.Chang, Journal of Materials Chemistry,2011,21,2169-2177.

[0119] 5.G.Wang,Y.K.Leng,H.J.Dou,L.Wang,W.W.Li,X.B.Wang,K.Sun,L.S.Shen, X.L.Yuan,J.Y.Li,K.Sun,J. S.Han,H.S.Xiao and Y.Li,Acs Nano,2013,7,471-481.

[0120] 6.H.Zhang,L.Liu,X.Fu and Z.J.Zhu,Biosensors&Bioelectronics,2013,42,

23-30.

[0121] 7.J.Raez,D.R.Blais,Y.Zhang,R.A.Alvarez-Puebla,J.P.Bravo-Vasquez,J.P.Pezacki and H.Fenniri,Langmuir, 2007,23,6482-6485.

[0122] 8.R.Liu,P.Wu,L.Yang,X.D.Hou and Y.Lv,Mass Spectrometry Reviews,2014,33,373-393.

[0123] 9.R.Wilson,A.R.Cossins and D.G.Spiller,Angewandte Chemie-International Edition,2006,45,6104-6117.

[0124] 10.L.R.Shang,F.F.Fu,Y.Cheng,H.Wang,Y.X.Liu,Y.J.Zhao and Z.Z.Gu,Journal of the American Chemical Society,2015,137,15533-15539.

[0125] 11.X.Y.Zhang,Q.Zhou,Z.F.Shen,Z.Li,R.H.Fei,E.H.Ji,S.Hu and Y.G.Hu,Biosensors&Bioelectronics,2015, 74,575-580.

[0126] 12.X.Y.Zhang,Z.Li,T.Zhou,Q.Zhou,Z.M.Zeng,X.D.Xu and Y.G.Hu,Talanta,2016,150,184-189.

[0127] 13.Z.M.Zeng,Y.Zhong,H.C.Yang,R.H.Fei,R.Zhou,R.Luque and Y.G.Hu,Green Chemistry,2016,18,186-196.

[0128] 14.S.K.Vashist,E.Lam,S.Hrapovic,K.B.Male and J.H.T.Luong,Chemical Reviews,2014,114,11083-11130.

[0129] 15.M.Zhao,C.Deng and X.M.Zhang,Acs Applied Materials&Interfaces,2013,5,13104-13112.

[0130] 16.S.F.Motevalizadeh,M.Khoobi,A.Sadighi,M.Khalilvand-Sedagheh,M.Pazhouhandeh,A.Ramazani,M.A. Faramarzi and A.Shafiee,Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic,2015,120,75-83.

[0131] 17.V.Kuroki,G.E.Bosco,P.S.Fadini,A.A.Mozeto,A.R.Cestari and W.A.Carvalho,Journal of Hazardous Materials,2014,274,124-131.

[0132] 18.E.K.M.Ueda,P.W.Gout and L.Morganti,Journal of Chromatography A,2003,988,1-23.

[0133] 19.D.W.Qi,Y.Mao,J.Lu,C.H.Deng and X.M.Zhang,Journal of Chromatography A,2010,1217,2606-2617.

[0134] 20.C.Y.Shi and C.H.Deng,Talanta,2015,143,464-468.

[0135] 21.V.Mishin,J.P.Gray,D.E.Heck,D.L.Laskin and J.D.Laskin,Free Radical Biology and Medicine,2010,48, 1485-1491.

[0136] 22.J.V.Rodrigues and C.M.Gomes,Free Radical Biology and Medicine,2010,49,61-66.

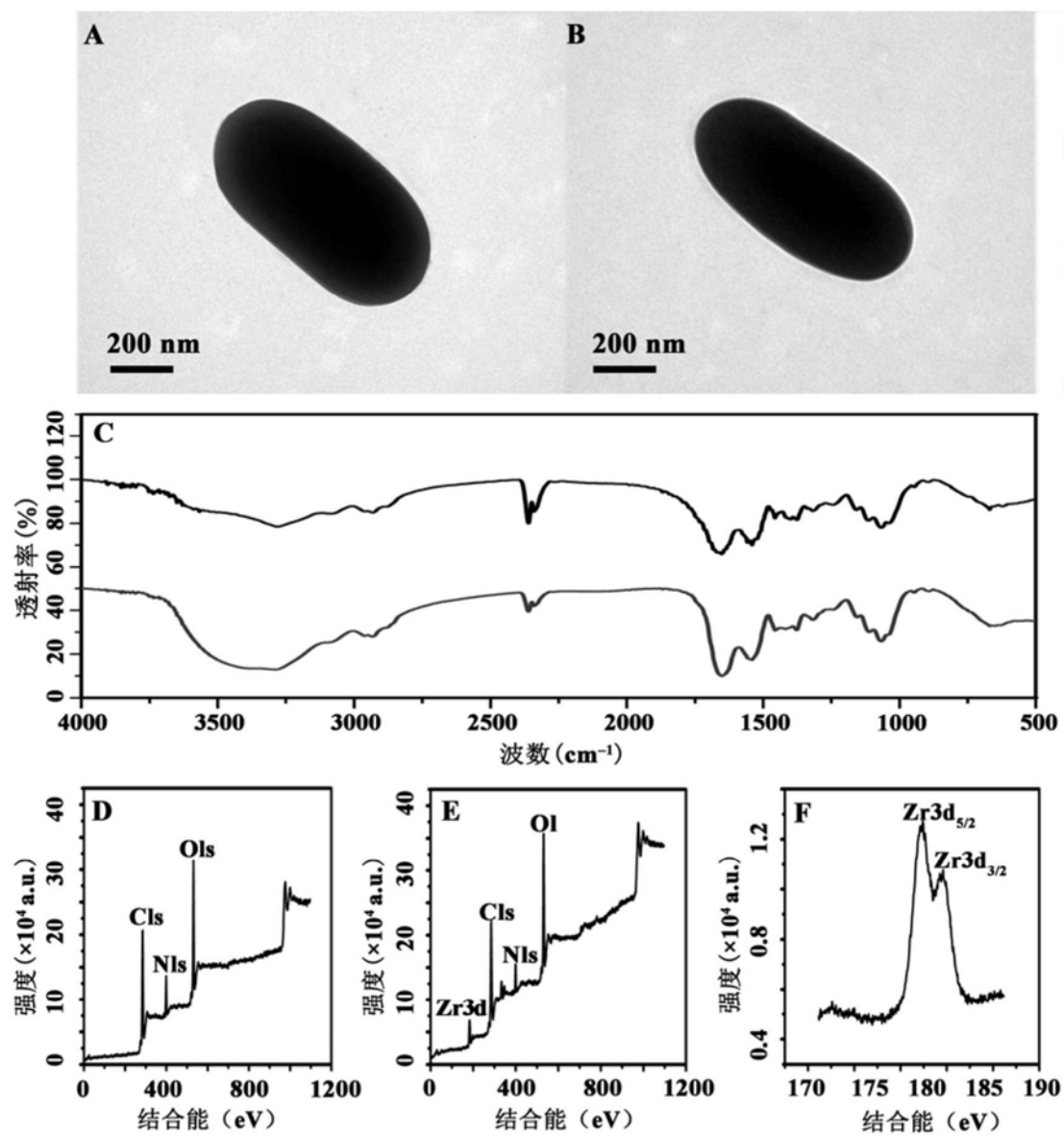


图1

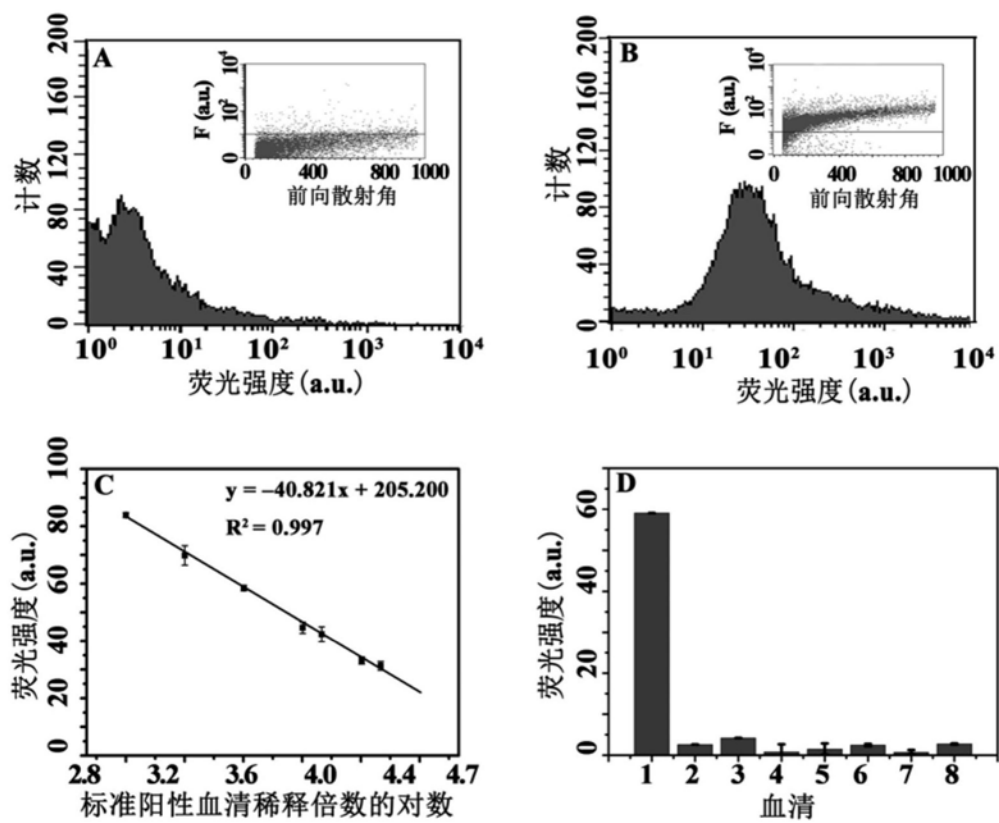


图2

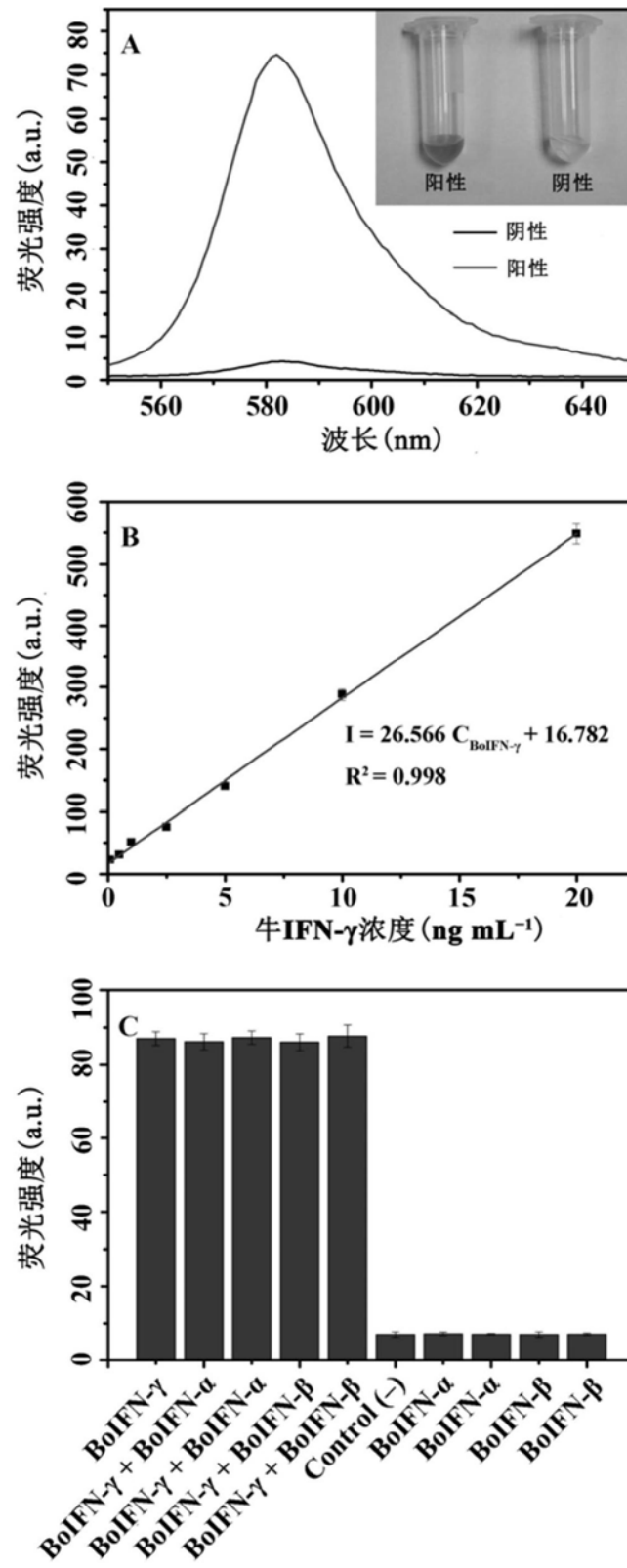


图3

专利名称(译)	芽孢@Zr4+作为功能微球的制备及其在免疫检测中的应用		
公开(公告)号	CN107942053B	公开(公告)日	2020-06-09
申请号	CN201610497713.2	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	胡涌刚 夏苗苗 李政		
发明人	胡涌刚 夏苗苗 李政		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/54353 G01N33/5695		
代理人(译)	张红兵		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN107942053A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物材料制备领域，具体涉及芽孢@Zr4+作为功能微球的制备及其在免疫检测中的应用。利用生物化学方法处理芽孢，制备成稳定性高、分散性好的悬浮微球，然后通过Zr4+离子吸附在芽孢表面，并将其应用于免疫检测领域。发明特征在于，收集培养7天的细菌芽孢，经离心洗涤和超声处理，用胰蛋白酶液和去芽孢衣处理液处理，得到除去孢外壁和芽孢衣的表面光滑的细菌芽孢微球，用该微球吸附Zr4+离子制备成芽孢@Zr4+功能微球。本发明的功能微球具有较好的机械强度，粒径均一，比重大小合适，制备工艺简单，成本低，适合高通量检测，对环境友好。本发明还公开了芽孢@Zr4+微球在牛分枝杆菌感染免疫检测中的应用。

