



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101776610 B

(45) 授权公告日 2011. 09. 07

(21) 申请号 201010107576. X

(22) 申请日 2010. 02. 09

(73) 专利权人 中国人民解放军第三军医大学
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30 号

(72) 发明人 张惠静 管潇 毕颖楠 张莉
郝敦玲

(74) 专利代理机构 重庆志合专利事务所 50210
代理人 胡荣瑛

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

审查员 关元

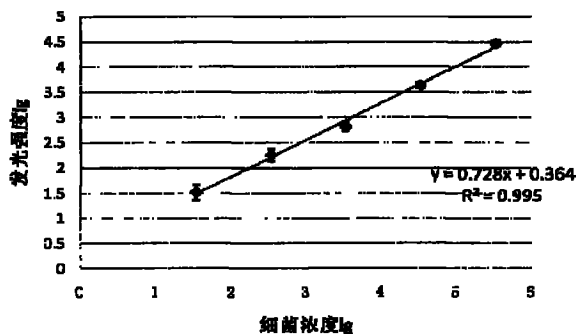
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种病原微生物分析检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种病原微生物分析检测方法,其包含步骤:1) 将经抗体修饰的免疫微珠装填于免疫识别/富集腔中;2) 将待测样品溶液引入免疫识别/富集腔,被免疫微珠识别、捕获和富集;3) 将裂解剂、生物发光试剂分别传输至免疫识别/富集腔中,与富集的病原微生物发生裂解反应和生物发光反应,生成发光复合物;4) 用缓冲溶液洗脱步骤3) 产生的发光复合物,通过发光检测,分析待测样品中的病原微生物。该方法在同一微流控芯片上实现了病原微生物的分选/富集、内涵物裂解、生物发光反应和定量检测,不仅减少了样品和试剂的消耗量,而且避免了多个分析步骤或过程导致的操作繁琐、分析时间过长和样品损失,提高了分析速度、检测准确度和灵敏度。



1. 一种病原微生物分析检测方法,其特征在于,包含步骤:

1) 取用于病原微生物检测的微流控芯片进行检测,所述微流控芯片包括盖片和基片,盖片和基片封接贴合,盖片上设置有两条流体传输通道、六边形免疫识别/富集腔、生物发光检测单元和两个储液池,免疫识别/富集腔的两端分别与第一、第二流体传输通道连通,第一储液池与第一流体传输通道连接,第二储液池与第二流体传输通道连接,第一、二储液池分别位于芯片的两端,储液池与外部传输装置相连,生物发光检测单元位于第二流体传输通道的末端或第二储液池,第二流体传输通道与免疫识别/富集腔间为台阶状,其中所述第二流体传输通道深度小于免疫识别/富集腔深度;

2) 将经抗体修饰的免疫微珠装填于步骤 1) 所述的微流控芯片中的免疫识别/富集腔中;

3) 将待测样品溶液通过第一储液池和第一流体传输通道引入免疫识别/富集腔中,被免疫微珠识别、捕获和富集,所述待测样品中被分析的病原微生物浓度为 $10^1 \sim 10^5 \text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,待测样品的用量为 $1-10 \mu\text{L}$ /次;

4) 将裂解剂、生物发光试剂分别传输至免疫识别/富集腔中,与富集的病原微生物发生裂解反应和生物发光反应,生成发光复合物;

5) 用缓冲溶液洗脱步骤 4) 产生的发光复合物,通过发光检测,定量分析待测样品中的病原微生物,所述发光检测按步骤 1) 所述的生物发光检测单元中完成。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 2) 所述的微珠材质可是玻璃或聚苯乙烯。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗体的浓度为 $50 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 3) 所述待测样品溶液的进样流速为 $1-5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,缓冲溶液的冲洗流速为 $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,冲洗时间为 5-20min。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 4) 所述生物发光试剂用量 $\geq 5 \mu\text{L}$,发光试剂的传输流速为 $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,发光检测时间为 5-30min。

一种病原微生物分析检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于微全分析技术在生物分析领域的应用,尤其涉及一种基于微流控芯片技术的病原微生物分析检测方法。

背景技术

[0002] 强致病性病原微生物往往致病力强,如肠出血性大肠杆菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) 的最低感染剂量可少于 10 个病原菌。因此,发展对环境、食品和临床标本中病原微生物的快速、灵敏、特异的分析检测方法是人类社会预防传染性疾病扩散,确保人类健康的迫切需要。目前,常规的病原微生物检测方法主要有培养法、免疫学检测法和分子生物学法,且都因其自身研究手段的局限性而存在许多不足:传统的细菌培养法和生化鉴定法特异性低、耗时费力、对培养环境和操作人员要求严格,不适宜病原菌的快速检测。免疫学检测方法,如酶联免疫吸附试验 (ELISA)、生物发光免疫分析法、免疫胶体金技术等一般需要提供数量较多的纯化细菌,或需对样品进行浓缩富集,同样难以在短时间内获得检测结果。PCR 及其相关技术虽具有高度的特异性和灵敏度,但由于方法过度敏感,在检测过程中,因为样本污染、RNA 非法转录、靶 RNA 低水平表达、引物设计不合理以及实验条件未优化、取材的局限等常常出现假阳性或假阴性结果。

[0003] 相对于现有检测技术的缺陷,20 世纪 90 年代初期出现的微流控芯片技术以其高度的集成化、微型化、分析手段的多样化、分析速度快、准确度高等特点,在技术上呈现出独特的优势,适合病原微生物快速检测的多项要求:首先,微流控芯片系统具有多种操作单元灵活组合、整体可控和规模集成的特点,可将整个病原微生物的样品处理和检测分析过程整合在一块芯片上;第二,通过 MEMS 加工,可以很容易的在芯片上刻蚀密集的分析通道阵列,大大增加了分析通量,并且芯片每一通道之间均相互独立,避免了样本的交叉干扰,分离分析过程完全在一个相对密闭的通道中进行,降低了操作者被感染的危险性。第三,鉴于芯片微通道的结构(微升级或纳升级),微尺度下的高比表面积,流体传质、传热快,有效地降低了样品和试剂的消耗量,大大缩短整个分析时间,达到快速分析的目的。因此,利用微流控芯片技术进行微生物研究越来越受到人们的重视。

[0004] 目前,经过十多年的发展,各种基于微流控技术开展的病原微生物预处理 (Inami H, et al. *Biosens Bioelectron.* 2009,24(11):3299-3305;Kulinski MD, et al. *Biomed Microdevices.* 2009,11(3):671-678.)、富集/分选 (Bao N, et al. *J Chromatogr A*, 2008, 1181(1-2):153-158;Qiu J, et al. *Talanta.* 2009,79(3):787-795.) 以及分离检测 (Lee SJ, et al. *Sensors and Actuators B*, 2008,132(2):443-448;Zordan MD, et al. *Cytometry A.* 2009,75(2):155-162.) 的新方法不断涌现。但现有的技术和方法主要是针对病原微生物分析检测中的某一单元或步骤,如富集/分选、预处理或分离检测展开的,即通常检测需要分几次完成,有大量的操作误差积累,且存在分析时间过长和样品损失大,有检测误差大、时间长、检测时消耗的药品和试剂量大等缺点。

[0005] 因此,在同一微流控芯片上实现病原微生物的分选/富集、内涵物裂解、生物发光

反应和检测一步完成的检测方法,是目前亟待即将的问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种病原微生物分析检测方法,简化现有技术中病原微生物的分析检测过程,降低样品用量和试剂耗量,避免多个分析步骤或过程导致的操作繁琐、分析时间过长和样品损失,提高检测准确度和灵敏度。

[0007] 本发明所述的病原微生物分析检测方法主要包含步骤:

[0008] 1) 取用于病原微生物检测的微流控芯片进行检测,所述微流控芯片包括盖片和基片,盖片和基片封接贴合,盖片上设置有两条流体传输通道、六边形免疫识别/富集腔、生物发光检测单元和两个储液池,免疫识别/富集腔的两端分别与第一、第二流体传输通道连通,第一储液池与第一流体传输通道连接、第二储液池与第二流体传输通道连接,第一、二储液池分别位于芯片的两端,储液池与外部传输装置相连,生物发光检测单元位于第二流体传输通道的末端或第二储液池,第二流体传输通道与免疫富集腔间为“台阶”状;

[0009] 2) 将经抗体修饰的免疫微珠装填于步骤 1) 所述的微流控芯片中的免疫识别/富集腔中;

[0010] 3) 将待测样品溶液通过流体传输单元引入免疫识别/富集腔中,被免疫微珠识别、捕获和富集,所述待测样品中被分析的病原微生物浓度为 $10^1-10^5 \text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,待测样品的用量为 $1-10 \mu\text{L}$ /次;

[0011] 4) 将裂解剂、生物发光试剂分别传输至免疫识别/富集腔中,与富集的病原微生物发生裂解反应和生物发光反应,生成发光复合物;

[0012] 5) 用缓冲溶液洗脱步骤 4) 产生的发光复合物,通过发光检测,定量分析待测样品中的病原微生物,所述发光检测按 1) 所述的生物发光检测单元中完成。

[0013] 步骤 2) 所述的微珠材质可是玻璃或聚苯乙烯等聚合物,所述抗体的适宜浓度为 $50-200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0014] 步骤 3) 所述待测样品溶液的进样流速为 $1-5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,缓冲溶液的最佳冲洗流速为 $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,冲洗时间为 5-20min。

[0015] 步骤 4) 所述生物发光试剂用量不低于 $5 \mu\text{L}$,发光试剂的传输流速为 $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,发光检测时间 5-30min。

[0016] 本发明的优选实施例中,所用冲洗液均为 $\text{pH} = 7.20$ 的 $0.01 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液。

[0017] 由于微流控芯片的网络结构和微珠的微米级尺寸,以及生物发光检测的高灵敏特性,可以使病原微生物样品的进样,分选/富集、加试剂、混合、反应和内涵物的高灵敏检测在一块微流控芯片上实现。因此本发明采用微流控芯片进行病原微生物分析检测,其优点是:

[0018] 1. 利用微流控独特的网络结构和流体控制技术,将病原微生物样品的进样,分选/富集、加试剂、混合、反应和内涵物的高灵敏检测等功能集成在微芯片上,可大大简化分析流程,降低样品和试剂的消耗量,减少复杂操作程序所引入的操作误差,避免样品转移所产生的样品损失,从而提高方法的分析速度、检测准确度和灵敏度。

[0019] 2. 以抗体为识别分子,可增强检测特异性,利用共价修饰可便利地将相应抗体固载于微珠表面。微珠价格低廉,可根据样本的需要控制微珠的数量,保证检测灵敏度和检测

范围。同时,利用微流控技术,可便利地将微珠导入 / 导出微芯片,芯片可反复多次使用而无污染,有利于保证测定的准确度。

[0020] 3. 微米级或纳米级微珠具有较大的比表面积,可增加抗原 / 抗体的结合几率,有利于加快免疫反应,缩短分析时间,提高病原微生物的检出速度。

[0021] 4. 将样品预处理(包括识别 / 富集、内涵物裂解)、生物发光反应和检测等功能集成至单一微流控芯片上,可使微流控芯片装置构造更为紧凑,利于发展微型化、便携化的病原微生物检测系统。

[0022] 为了让本发明的上述和其它目的、特征和优点能更明显易懂,下文特举较佳实施例,并配合附图,作详细说明如下。

附图说明

[0023] 图 1 为本实用新型芯片的结构简图;

[0024] 图 2 为本实用新型芯片的侧视图。

[0025] 在图 1、2 中,1 为第一流体传输通道,2 为免疫识别 / 富集腔,3 为第二流体传输通道,4 为免疫微珠,5 为第一储液池,6 为第二储液池。

[0026] 图 3 为实施例 1 中本发明芯片对不同浓度 *E. coli* 0157:H7 样品的捕获率。

[0027] 图 4 为实施例 2 中用本发明芯片对 *E. coli* 0157:H7 进行生物发光检测所得典型发光曲线。

[0028] 图 5 为实施例 2 中细菌浓度 - 发光强度标准曲线,其相关系数 r^2 为 0.995。

[0029] 图 6 为实施例 2 中用本发明芯片对实验菌株 *E. coli* 0157:H7 以及对照菌株 *E. coli* 25922 和伤寒沙门氏菌进行生物发光检测所得发光强度。

具体实施方式

[0030] 本发明的技术方案可以通过下述操作步骤完成:将含有病原微生物的样品通过进样储液池,在泵压驱动下通过流体传输通道进入免疫识别 / 富集腔中;腔内填充有经抗体修饰的微珠,该抗体是具有靶向各类病原微生物有机体的抗体,通过特异性的免疫识别反应,样品中的病原微生物被识别、捕获,并被富集于微珠表面;反应结束后,驱动裂解剂和生物发光试剂经进样储液池、流体传输通道进入微腔,富集的病原微生物被其中的裂解剂裂解后,释放出内涵物并生成发光复合物,通过运行缓冲溶液将生成的发光复合物洗脱至生物发光检测单元,进而实现高灵敏的生物发光定量检测。病原微生物的定量分析方法采用标准曲线法,结果以细菌浓度 $\text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 表征。

[0031] 运用模塑法(孟斐等. 高等学校化学学报. 2002, 23(7):1264-1268;刘长春等,微细加工技术,2004,1:58-61)制作出如图 1 所示微结构的 PDMS 盖片,经紫外光化学处理后,将此盖片与玻璃基片封接即可得到完整的微流控芯片。参见图 1 和图 2,该芯片由流体传输通道 1、3、免疫识别 / 富集腔 2、微珠 4 和第一、第二储液池 5、6 组成。盖片上设置有第一、第二流体传输通道 1、3、六边形识别 / 富集腔 2 和第一、第二储液池 5、6,填充有抗体修饰的微珠 4 的识别 / 富集 2 腔的两端分别与第一、第二流体传输通道 1、3 连通。识别 / 富集腔内的微珠呈单层排列。第一流体传输通道为入口通道,第二流体传输通道为出口通道;第一流体传输通道宽 $200 \mu\text{m}$,深 $70 \mu\text{m}$,长 1cm ;第二流体传输通道宽 $200 \mu\text{m}$,深 $30 \mu\text{m}$,长

1.8cm。第一储液池和第二储液池的直径分别为 1.5mm 和 3mm。第一储液池 5 与第一流体传输通道 1 连接、第二储液池 6 与第二流体传输通道 3 连接,第一、二储液池分别位于芯片的两端。所述识别 / 富集腔腔体长 7mm、宽 3mm,深 $70\ \mu\text{m}$ 。识别 / 富集与通道相连的两斜边之间的夹角 α 为 60° ,其腔体深度为大于微珠直径的 1 倍并小于微珠直径的 2 倍。采用这种结构的六边形微腔,使其具有较大的有效腔体面积,可拥有较高的微珠填充率;六边形的稳定结构,可使装填的微珠排列为稳定的六边形晶格聚集模式,不易受到液流剪切的影响而保持其排列的稳定性;而且六边形腔体结构较相同体积的圆形、方形、菱形等几何形状具有更大的径向长度,液流进 / 出腔体时,流体的线速度沿腔体径向呈线性改变,减少了流速较大时腔体内产生死体积的可能性。腔内填充有经抗体修饰的微珠,微珠粒径为微米级,略小于腔体深度,使其在微腔内呈单层排列。微珠采用玻璃或聚苯乙烯材料。微珠表面固载的抗体为具有靶向各类病原微生物有机体的抗体,所述盖片材料为聚合物聚二甲基硅氧烷。储液池与外部传输装置相连,生物发光检测单元位于第二流体传输通道 3 的末端或第二储液池 6,本实施例的发光检测位点位于出口储液池 6 中。第二流体传输通道深度小于富集腔深度,使第二流体传输通道 3 与免疫富集腔 2 为台阶状,防止微珠流入出口通道。

[0032] 微珠表面固载抗体的方法如下:

[0033] 准确称取 10mg 直径 $50\ \mu\text{m}$ 玻璃微珠于离心管中,用 Piranha 溶液 ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$) 浸泡过夜后,再用无菌超纯水洗涤 5 次,然后置于 70°C 干燥 30min。在离心管中加入 2% APTES 丙酮溶液反应 1min,依次用丙酮和无菌超纯水清洗 5 次。在 $10\ \mu\text{L}$ $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗体工作液中加入 $50\ \mu\text{L}$ MES 缓冲液、 $8\ \mu\text{L}$ $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ EDC ($-2\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 $12\ \mu\text{L}$ $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NHS ($-2\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$),室温反应 15min 后,加入 $120\ \mu\text{L}$ $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液终止 NHS- 抗体活化酯形成反应,即得到抗体浓度为 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的反应液。将反应液加入上述装有玻珠的离心管中,室温反应 2h。反应完毕后用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 清洗 3 次,得到经抗 E. coli 0157:H7 多克隆抗体修饰的免疫微珠,置于 4°C 备用。

[0034] 将芯片依次用 75% 酒精、无菌超纯水清洗后,用 1% 小牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 30min,再用 $\text{pH} = 7.20$ 的 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液清洗。将经抗体修饰后的微珠加入已注满 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 的芯片微通道入口储液池内,利用注射泵以 $10\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速正压驱动填充入免疫微腔内。该芯片免疫富集腔内的微珠易于导入和导出,在富集腔内成单层紧密排列。

[0035] 针对不同的病原微生物检测需求,采用不同抗体,如鼠抗单核细胞增生李斯特菌单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA),鼠抗霍乱弧菌单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA)、鼠抗金黄色葡萄球菌单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) 或鼠抗鼠伤寒沙门氏菌单克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) 等,按照上述方法及反应条件,以 $50\text{--}200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度对微珠进行修饰,可以得到不同抗体修饰的微珠。将抗体修饰后的微珠填充入免疫富集腔后,采用本发明所述的检测方法,可分别对单核细胞增生李斯特菌、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌或鼠伤寒沙门氏菌等病原菌进行微流控芯片的免疫捕获 / 富集和生物发光分析检测。

[0036] 本实施例采用标准菌株 E. coli 0157:H7 和经抗 E. coli 0157:H7 多克隆抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, USA) 修饰的微珠进行微流控芯片的分析检测。

[0037] 下面通过具体实施例来进一步说明本发明,但并不局限于下述实施例。

[0038] **实施例 1**:用图 1 所示芯片进行 E. coli 0157:H7 捕获 / 富集研究

[0039] 将 LB 培养基 37℃ 增菌 8h 的 E. coli 0157:H7 菌液用 pH = 7.20 的 0.01mol · L⁻¹PBS 按 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ 倍梯度稀释, 充分混悬后, 分别取上述细菌悬液 1 μL (其菌液浓度如表 1 所示) 加入至入口储液池中, 以 5 μL · min⁻¹ 流速正压驱动至芯片微通道内, 再用 pH = 7.20 的 0.01mol · L⁻¹PBS 以 10 μL · min⁻¹ 流速对微通道冲洗 5min。整个研究以填充有抗体修饰的微珠芯片为实验组、填充有用 BSA 封闭的微珠芯片为对照组。利用平板计数法, 分别对细菌样品进样液和在出口储液池中收集的冲洗液进行培养计数, 根据公式:

[0040]

$$\text{捕获率} = \frac{\text{进样细菌数} - \text{冲洗液细菌数}}{\text{进样细菌数}} \times 100\%$$

[0041] 计算实验组芯片和对照组芯片对细菌的捕获率和吸附率, 再以实验组捕获率和对照组吸附率的差值作为本发明芯片的实际捕获率, 其结果如表 1 和图 2 所示。

[0042] 表 1 芯片对不同浓度细菌的捕获率($\bar{x} \pm s$, n=5)

[0043]

细菌浓度/ cfu · μL ⁻¹	捕获率/%		
	对照组	实验组	实际捕获率
3.2 × 10 ⁵	4.38 ± 0.34	96.12 ± 2.77 ^a	91.75 ± 2.84 ^a
3.2 × 10 ⁴	3.44 ± 0.41	95.81 ± 3.28 ^a	92.38 ± 3.70 ^a
3.2 × 10 ³	3.12 ± 0.23	96.38 ± 2.36 ^a	93.62 ± 2.52 ^a
3.2 × 10 ²	2.50 ± 0.21	98.12 ± 1.56 ^a	95.62 ± 2.16 ^a
3.2 × 10 ¹	6.25 ± 0.48	97.44 ± 1.68 ^a	93.75 ± 1.89 ^a

[0044] a :P < 0.01, 与对照组比较 ;b :P < 0.05, 与对照组比较

[0045] 结果表明, 在菌液浓度 3.2 × 10¹ - 3.2 × 10⁵ cfu · μL⁻¹ 范围内, 本发明芯片对 E. coli 0157:H7 细菌的实际捕获率可达 91.75% ~ 95.62%。由此可见, 在一定的冲洗流速和冲洗时间条件下, 可降低或清除芯片壁、微珠间隙产生的非特异性吸附或残留, 本发明芯片针对靶向抗原的免疫识别 / 富集具有较高的捕获率。

[0046] **实施例 2**:标准菌株 E. coli 0157:H7 的生物发光检测

[0047] 将 LB 培养基 37℃ 增菌 8h 的 E. coli 0157:H7 菌液用 pH = 7.20 的 0.01mol · L⁻¹PBS 缓冲液稀释 10 倍, 菌液浓度为 10⁵ cfu · μL⁻¹。取此细菌悬液 1 μL 加入至芯片入口储液池中, 以 5 μL · min⁻¹ 流速正压驱动至芯片内, 再用 pH = 7.20 的 0.01mol · L⁻¹PBS 缓冲液以 10 μL · min⁻¹ 流速冲洗 5min, 以降低或消除芯片壁、微珠间隙产生的非特异性吸附或残留。将生物发光试剂 (BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay, Promega, USA) 以 1 μL · min⁻¹ 流速正压传输至芯片中, 于芯片出口储液池为发光检测点检测发光强度, 以 PMT 光信号探测器采集信号, 得典型发光曲线如图 3 所示。

[0048] 按上述检测方法,以 5min 内平均每秒所得光子数的对数 $\lg(\text{Count} \cdot \text{s}^{-1})$ 为纵坐标,细菌浓度的对数值 $\lg(\text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ 为横坐标,进行回归分析,本分析方法在 10^1 - $10^5 \text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,其回归方程为 $y = 0.728x + 0.364$,相关系数 (R^2) 为 0.995,如图 4 所示;方法的相对标准偏差 (RSD) 为 10.74%;以平板计数法为对照,本方法的方法回收率为 81.33%;此外,经与 *E. coli* 25922 菌株和伤寒沙门氏菌比较,*E. coli* 0157:H7 所得发光强度较对照菌株 *E. coli*25922 和伤寒沙门氏菌所得发光强度高出 2-3 个数量级,如表 2 和图 5 所示。结果表明,利用本发明方法进行 *E. coli* 0157:H7 的分析检测具有较高的重现性、准确度和特异性,且 20min 内即可完成整个分析流程,大大提高了病原微生物的检测速度。

[0049] 表 2 不同种类细菌的发光强度($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

[0050]

细菌种类	进样浓度/ $\text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	发光强度
<i>E. coli</i> 25922	1.34×10^5	55.70667 ± 12.38
伤寒沙门氏菌	1.2×10^5	165.5667 ± 26.92
<i>E. coli</i> 0157:H7	3.2×10^5	30601.47 ± 3826.68

[0051] 实施例 3:食品样品中 *E. coli* 0157:H7 的生物发光检测

[0052] 取两份洁净猪肉,每份 5g,分别在无菌环境中切成体积为 1mm^3 左右的碎块。将两份猪肉分别加至两支灭菌的离心管中,再加入经过 8h 增殖的 *E. coli*0157:H7 $1000 \mu\text{L}$ 和稀释 10^3 倍的 *E. coli* 0157:H7 $1000 \mu\text{L}$ 各一份,以及 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 4mL 各一份。将上述两组含不同浓度细菌悬液的猪肉样本涡旋混匀后,于 1000rpm 离心 5min,然后各取 $1 \mu\text{L}$ 上清液(其进样菌液浓度见表 3)加入至芯片入口储液池中,以 $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速正压驱动至芯片内,再用 $\text{pH} = 7.20$ 的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液以 $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速冲洗 5min。将生物发光试剂以 $1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速正压传输至芯片中,于芯片出口储液池为发光检测点检测发光强度,以 PMT 光信号探测器采集信号,结果如表 3 所示。

[0053] 表 3 食品样品的发光强度($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

[0054]

进样浓度/ $\text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	样品发光强度	测得细菌浓度/ $\text{cfu} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	回收率/%
3.5×10^5	22897.7 ± 2429.55	3.08×10^5	88.00
3.0×10^2	207.4433 ± 22.34	2.57×10^2	85.67

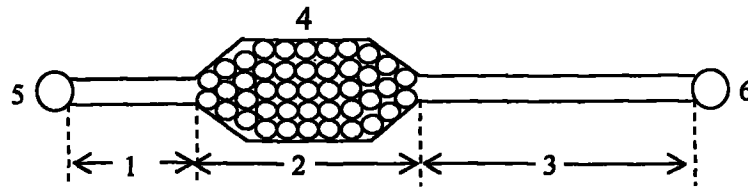


图 1

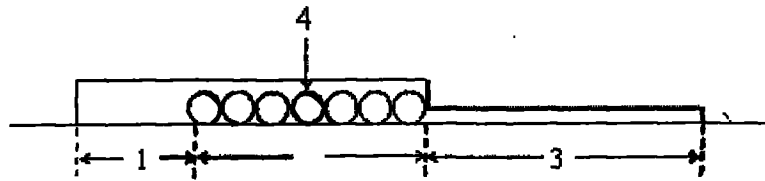


图 2

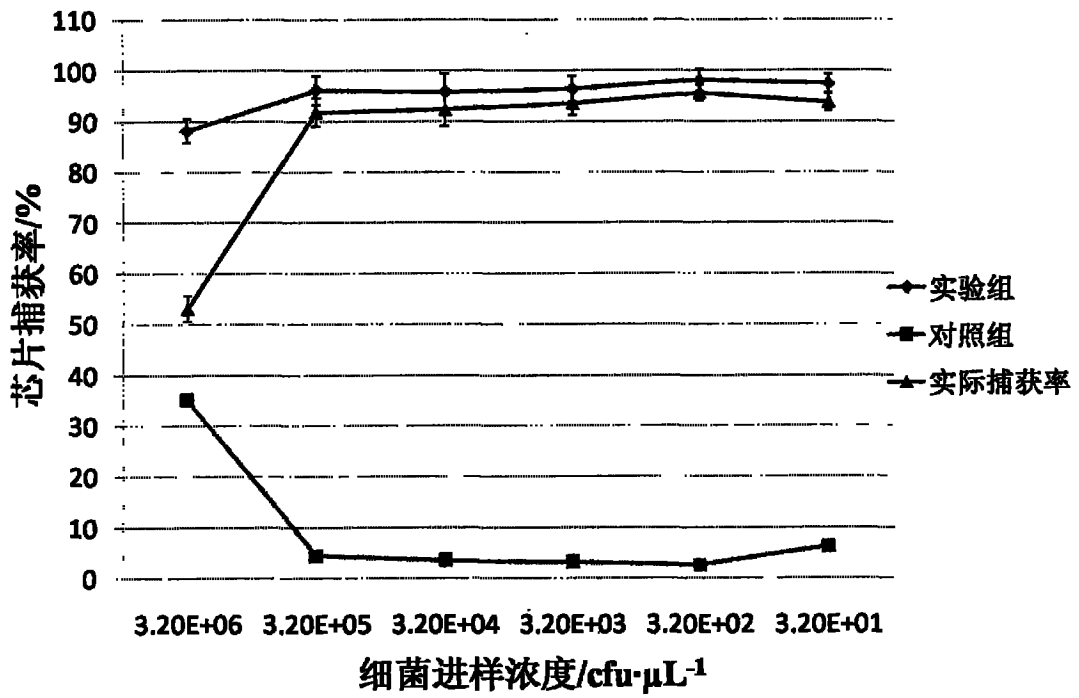


图 3

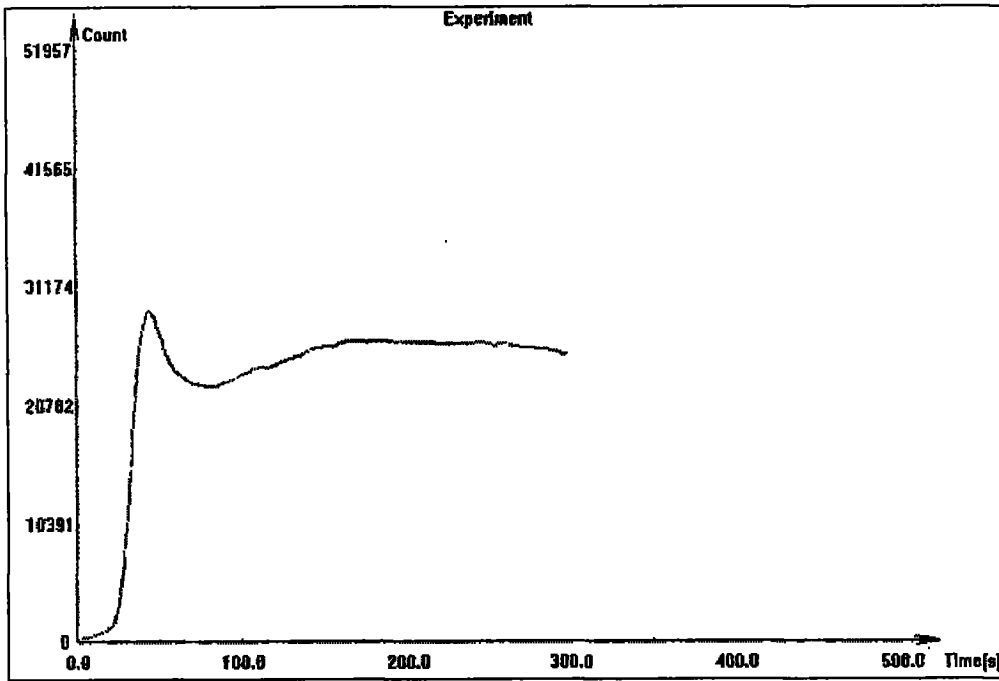


图 4

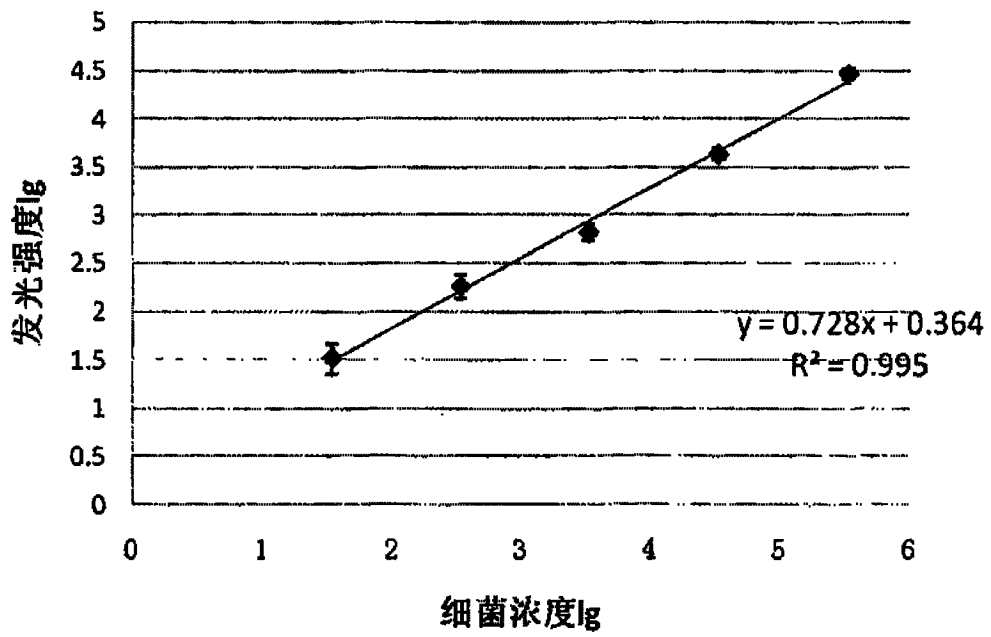


图 5

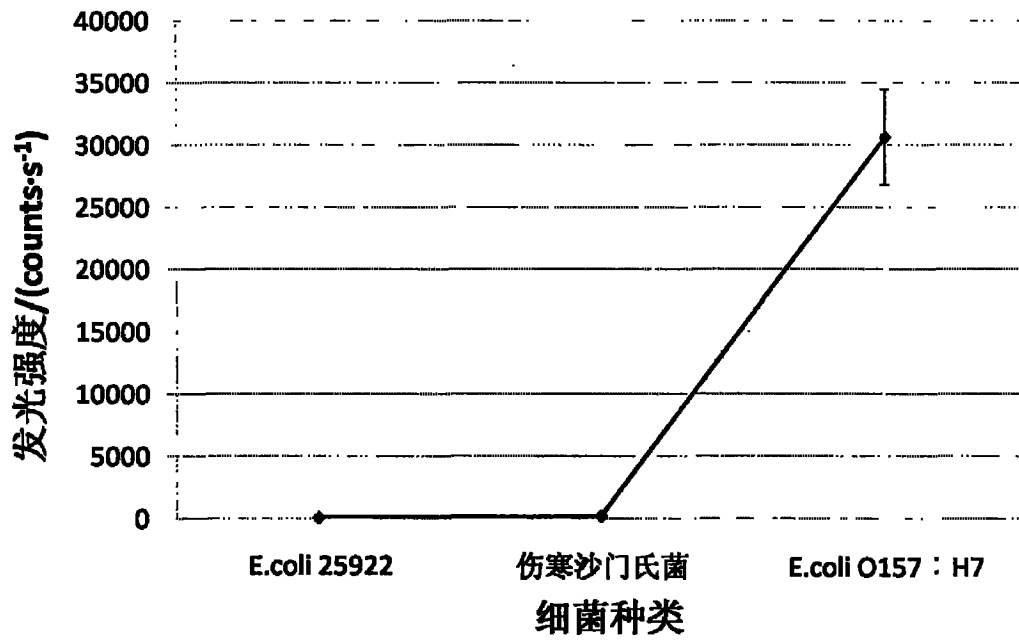


图 6

专利名称(译)	一种病原微生物分析检测方法		
公开(公告)号	CN101776610B	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201010107576.X	申请日	2010-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	张惠静 管潇 毕颖楠 张莉 郝敦玲		
发明人	张惠静 管潇 毕颖楠 张莉 郝敦玲		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
审查员(译)	关元		
其他公开文献	CN101776610A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种病原微生物分析检测方法，其包含步骤：1)将经抗体修饰的免疫微珠装填于免疫识别/富集腔中；2)将待测样品溶液引入免疫识别/富集腔，被免疫微珠识别、捕获和富集；3)将裂解剂、生物发光试剂分别传输至免疫识别/富集腔中，与富集的病原微生物发生裂解反应和生物发光反应，生成发光复合物；4)用缓冲溶液洗脱步骤3)产生的发光复合物，通过发光检测，分析待测样品中的病原微生物。该方法在同一微流控芯片上实现了病原微生物的分选/富集、内涵物裂解、生物发光反应和定量检测，不仅减少了样品和试剂的消耗量，而且避免了多个分析步骤或过程导致的操作繁琐、分析时间过长和样品损失，提高了分析速度、检测准确度和灵敏度。

