



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102012384 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 201010550114. 5

(22) 申请日 2010. 11. 18

(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一号

(72) 发明人 湛志强 李君文 王景峰 邱志刚 金敏 王新为 陈照立

(74) 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有限公司 12107

代理人 闫俊芬

(51) Int. Cl.

G01N 27/00 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01H 11/08 (2006. 01)

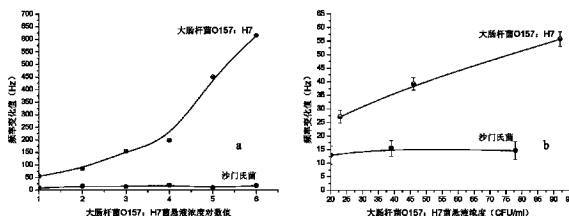
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种基于压电传感器检测致病菌的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种基于压电传感器检测致病菌的方法,通过抗原抗体反应(信标免疫磁颗粒)、生物素-亲和素系统(金标亲和素)和金的自生长技术(金生长液),对压电免疫传感器的检测信号进行了多级放大,使得本发明的检测灵敏度得到了最大限度提高,其检测大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度达到了 23CFU/ml,该方法具有灵敏度高,特异性强、操作简便快速等特点,而且只要更换检测过程中涉及的抗体就可以检测不同的微生物,在微生物的检测领域具有广阔的应用前景。



1. 一种基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：具体步骤为：

- (1) 制备信标免疫纳米磁颗粒；
- (2) 制备亲和素标记胶体金；
- (3) 制备金生长液，确定亲和素标记胶体金在金生长液中的生长时间；
- (4) 压电传感器的检测

取信标免疫纳米磁颗粒加入到进行梯度稀释的致病菌的菌悬液中，通过超强磁的吸引去除非目标菌；将制备好的亲和素标记胶体金加入，通过生物素-亲和素系统将胶体金结合到信标免疫纳米磁颗粒上；将连接有信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金的致病菌加入金生长液中，按照步骤(3)确定的生长时间使胶体金得到生长放大，收集该液体滴加至固定有 SPA 和致病菌鼠单克隆抗体并用牛血清白蛋白封闭非特异性位点的压电传感器的石英晶振上，观察压电传感器频率的变化确定待检测样本中致病菌的浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：具体步骤为：

- (1) 制备信标免疫纳米磁颗粒

采用化学共沉淀法制备粒径为 10nm ~ 200nm 的纳米磁颗粒，将采用 SPA 亲和纯化的致病菌兔多克隆抗体和相同浓度的生物素标记的兔 IgG 按体积比为 1 : 60 混匀后，取混合抗体连接到纳米磁颗粒上制成信标免疫纳米磁颗粒；

- (2) 制备亲和素标记胶体金

胶体金采用柠檬酸钠还原法制备粒径为 10nm-20nm 的胶体金，将浓度为 0.2mg/mL-1.0mg/mL 的亲和素连接至胶体金上，即为亲和素标记胶体金；

- (3) 制备金生长液，确定亲和素标记胶体金在金生长液中的生长时间

取氯金酸溶液加入十六烷基三甲基溴化胺溶液中混匀，然后置于 100℃ 水浴锅中加热 10min，颜色变为清亮的黄色，室温下冷却备用；加入抗坏血酸溶液轻轻混匀至金生长液颜色消失；取不同浓度的亲和素标记胶体金溶液于金生长液中进行自生长，利用紫外分光光度计进行波长扫描确定胶体金在金生长液中的生长时间；

- (4) 压电传感器的检测

①石英晶振用 piranha 液进行洗涤，取 SPA 溶液固定于压电传感器的石英晶振，检测频率变化，确定 SPA 的固定浓度和时间后，取致病菌鼠单克隆抗体溶液固定于压电传感器的石英晶振，检测频率变化，确定致病菌鼠单克隆抗体的固定浓度和时间；

②取信标免疫纳米磁颗粒加入到进行梯度稀释的致病菌的菌悬液中，通过超强磁的吸引去除非目标菌；再借助膜将多余的信标免疫纳米磁颗粒离心去除；将步骤(2)中制备好的亲和素标记胶体金加入，通过生物素-亲和素系统将胶体金结合到信标免疫纳米磁颗粒上，然后借助超强磁将未结合的亲和素标记胶体金去除；最后将连接有信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金的致病菌加入金生长液中，按照步骤(3)确定的生长时间使胶体金得到生长放大，继续用超强磁将多余的金生长液去除；

③按上述步骤(4)①的固定浓度和固定时间分别将 SPA 和致病菌鼠单克隆抗体固定于压电传感器的石英晶振上，并用牛血清白蛋白封闭石英晶振上非特异性位点，将步骤(4)②中最后收集到的液体滴加至石英晶振上，观察压电传感器频率的变化确定待检测样本中致病菌的浓度。

3. 根据权利要求 2 所述的基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：所述致病菌为大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌或嗜肺军团菌。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：所述致病菌为大肠杆菌 O157:H7。

5. 根据权利要求 4 所述的基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：具体检测方法为：

(1) 制备信标免疫纳米磁颗粒

采用化学共沉淀法制备粒径为 10nm ~ 200nm 的纳米磁颗粒，将采用 SPA 亲和纯化的浓度为 0.5mg/mL 大肠杆菌 O157:H7 兔多克隆抗体和相同浓度的生物素标记的兔 IgG 按体积比为 1 : 60 混匀后，取每 0.3mL 混合抗体连接到 1mL 纳米磁颗粒上制成信标免疫纳米磁颗粒；

(2) 制备亲和素标记胶体金

胶体金采用柠檬酸钠还原法制备，制备粒径为 18nm 的胶体金，将浓度为 0.5mg/mL 的亲和素连接至胶体金上，即为亲和素标记胶体金；

(3) 制备金生长液，确定胶体金在金生长液中的生长时间

取 52 μ l 0.024M 氯金酸溶液加入 5ml 0.1M 十六烷基三甲基苄溴化胺 (CTAB) 溶液中混匀，然后置于 100°C 的水浴锅中加热 10min，颜色变为清亮的黄色，室温下冷却备用；加入 50 μ l 11M 抗坏血酸溶液轻轻混匀至金生长液颜色消失；取每 100 μ l 的亲和素标记胶体金溶液于 900 μ l 金生长液中进行自生长，其中亲和素标记胶体金溶液的浓度为对步骤 (2) 中亲和素标记胶体金溶液进行对倍稀释，利用紫外分光光度计进行波长扫描观察胶体金在金生长液中的生长时间为 15min；

(4) 压电传感器的检测

① 石英晶振用 pi ranha 液进行洗涤，取浓度为 0.2mg/mL ~ 2.0mg/mL 的 SPA 溶液 10 μ l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min，取浓度为 0.1mg/mL ~ 1.8mg/mL 的大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体溶液 10 μ l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min；

② 取信标免疫纳米磁颗粒加入到进行梯度稀释的大肠杆菌 O157:H7 的菌悬液中，通过超强磁的吸引去除非目标菌；再通过 0.45 μ m 的膜将多余的信标免疫纳米磁颗粒离心去除；将制备好的亲和素标记胶体金溶液加入，通过生物素 - 亲和素系统将胶体金结合到信标免疫纳米磁颗粒上，然后借助超强磁将未结合的亲和素标记胶体金去除；最后将连接有信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金的大肠杆菌 O157:H7 加入金生长液中，按照步骤 (3) 确定的生长时间使胶体金得到生长放大，继续用超强磁将多余的金生长液去除；

③ 按上述步骤 (4) ① 的固定浓度和固定时间分别将 SPA 和大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体固定于压电传感器的石英晶振上，并用 1% 牛血清白蛋白封闭石英晶振上非特异性位点；将步骤 (4) ② 中最后收集到的液体滴加至石英晶振上，观察压电传感器频率的变化确定待检测样本中大肠杆菌 O157:H7 的浓度。

6. 根据权利要求 5 所述的基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：所述步骤 (1) 中的纳米磁颗粒粒径约为 50nm，连接的大肠杆菌 O157:H7 兔多克隆抗体的浓度为 0.5mg/mL；步骤 (2) 中亲和素的连接量为 14 μ g/ml。

7. 根据权利要求 5 所述的基于压电传感器检测致病菌的方法，其特征在于：所述步骤 (4) 中 SPA 的固定浓度和时间为 1.2mg/ml、40min；大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体的固定浓度和时间为 1.0mg/ml、60min。

一种基于压电传感器检测致病菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测致病菌的方法，尤其是一种基于压电传感器检测致病菌的方法。

背景技术

[0002] 1982 年大肠杆菌 O157:H7 (Enterohemorrhagic Escherichiacoli, EHEC) 首次在美国分离并确认为一种新型的肠道致病菌。它是肠出血性大肠杆菌的一个主要菌型，可引起人类腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒综合征 (uremic syndrome hemolytic, HUS) 和血栓形成性血小板减少性紫癜 (thrombocytopenic purpura, TTP)，个别患者可因急性或慢性肾功能衰竭而死亡，病死率高达 30% 以上，是全球关注的世界性公共卫生问题。由该菌引起的食物中毒已在世界范围内多次出现，1996 年日本发生了世界上规模最大、涉及上万人的由出血性大肠杆菌 O157:H7 引起的食物中毒。我国自 1986 年在徐州发现感染病人，已在全国其它城市分离到了大肠杆菌 O157:H7，而且据报道食入不足 10 个大肠杆菌 O157:H7 即可引起致病。

[0003] 传统的大肠杆菌 O157:H7 等致病菌的检测方法主要包括山梨醇麦康凯琼脂分离培养法，生化方法等，这些方法大多操作步骤繁琐，且耗时较长。随着科学技术的发展，出现了一些新兴检测方法，如 PCR 法，ELISA 法，免疫磁珠分离法，流式细胞仪法及基因芯片法等，这些方法同样也存在着仪器昂贵，操作复杂，费时等缺点。

[0004] 随着科技的发展，生物传感器以其灵敏度高、分析速度快、成本低等优点开始广泛用于大肠杆菌 O157:H7 等致病菌的检测研究。压电传感器作为生物传感器的一个重要分支，在大肠杆菌 O157:H7 等致病菌的检测方法中也开展了广泛的研究。压电传感器 (Piezoelectric biosensor) 是 20 世纪 60 年代建立起来的一种新型测量技术，其检测的理论基础是固载在晶体表面的沉积物质量与晶体频率变化存在着一定的比例关系，即 Sauerbrey 方程：

[0005] $\Delta F = -2.26 \times 10^{-6} F^2 \Delta m / A$ ，式中，F 为石英晶体天然谐振频率 (Hz)； Δm 为沉积在晶体表面的质量变化 (g)； ΔF 为晶体频率的变化 (Hz)；A 为参与晶振的面积 (cm^2)；负号表示质量的增加导致频率的下降。但是目前单纯利用压电传感器进行大肠杆菌 O157:H7 的检测，其灵敏度一般为 10^5cfu/ml 。学者为了提高压电传感器的检测灵敏度，分别借助纳米等技术对压电传感器的检测信号进行放大，使得灵敏度提高到了 10^2cfu/ml 。然而这还是不能达到对大肠杆菌 O157:H7 的检测要求。

[0006] 其他致病菌亦是如此，通过有效的检测方法，提高灵敏度，达到并优化致病菌的检测要求，具有非常重要的实践意义。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种基于压电传感器检测致病菌的方法。。

[0008] 为解决上述技术问题，本发明的技术方案是：

[0009] 本发明通过借助信标免疫纳米磁颗粒和金生长技术对压电传感器的检测信号进行多级放大，从而达到对致病菌的超灵敏检测。所述信标免疫纳米磁颗粒是指纳米磁颗粒上同时连接能够捕获目标菌的抗体（目标抗体）和用于对检测信号进行放大的抗体（信标抗体）。

[0010] 具体实现方法如下：

[0011] 一种基于压电传感器检测致病菌的方法，具体步骤为：

[0012] (1) 制备信标免疫纳米磁颗粒；

[0013] (2) 制备亲和素标记胶体金；

[0014] (3) 制备金生长液，确定亲和素标记胶体金在金生长液中的生长时间；

[0015] (4) 压电传感器的检测

[0016] 取信标免疫纳米磁颗粒加入到进行梯度稀释的致病菌的菌悬液中，通过超强磁的吸引去除非目标菌；将制备好的亲和素标记胶体金加入，通过生物素-亲和素系统将胶体金结合到信标免疫纳米磁颗粒上；将连接有信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金的致病菌加入金生长液中，按照步骤(3)确定的生长时间使胶体金得到生长放大，收集该液体滴加至固定有 SPA 和致病菌鼠单克隆抗体并用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭非特异性位点的压电传感器的石英晶振上，观察压电传感器频率的变化确定待检测样本中致病菌的浓度。

[0017] 优选的，上述基于压电传感器检测致病菌的方法，具体步骤为：

[0018] (1) 制备信标免疫纳米磁颗粒

[0019] 采用化学共沉淀法制备粒径为 10nm ~ 200nm 的纳米磁颗粒，将采用 SPA 亲和纯化的致病菌兔多克隆抗体（目标抗体）和相同浓度的生物素标记的兔 IgG（信标抗体）按体积比为 1 : 60 混匀后，取混合抗体连接到纳米磁颗粒上制成信标免疫纳米磁颗粒；

[0020] (2) 制备亲和素标记胶体金

[0021] 胶体金采用柠檬酸钠还原法制备粒径为 10nm-20nm 的胶体金，将浓度为 0.2mg/mL-1.0mg/mL 的亲和素连接至胶体金上，即为亲和素标记胶体金；

[0022] (3) 制备金生长液，确定亲和素标记胶体金在金生长液中的生长时间

[0023] 取氯金酸溶液加入十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 溶液中混匀，然后置于 100℃ 水浴锅中加热 10min，颜色变为清亮的黄色，室温下冷却备用；在加入亲和素标记胶体金溶液之前加入抗坏血酸 (AA) 溶液轻轻混匀，金生长液颜色即消失；取不同浓度的亲和素标记胶体金溶液于金生长液中进行自生长，利用紫外分光光度计进行波长扫描确定胶体金在金生长液中的生长时间；

[0024] (4) 压电传感器的检测

[0025] ①石英晶振用 piranha 液进行洗涤，取 SPA 溶液固定于压电传感器的石英晶振，取致病菌鼠单克隆抗体溶液固定于压电传感器的石英晶振，检测频率变化，确定致病菌鼠单克隆抗体的固定浓度和时间；

[0026] ②取信标免疫纳米磁颗粒加入到进行梯度稀释的致病菌的菌悬液中，通过超强磁的吸引去除非目标菌；再借助膜将多余的信标免疫纳米磁颗粒离心去除；将步骤(2)中制备好的亲和素标记胶体金加入，通过生物素-亲和素系统将胶体金结合到信标免疫

纳米磁颗粒上，然后借助超强磁将未结合的亲和素标记胶体金去除；最后将连接有信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金的致病菌加入金生长液中，按照步骤(3)确定的生长时间使胶体金得到生长放大，继续用超强磁将多余的金生长液去除；

[0027] ③按上述步骤(4)①确定的固定浓度和固定时间分别将 SPA 和致病菌鼠单克隆抗体固定于压电传感器的石英晶振上，并用牛血清白蛋白(BSA)封闭石英晶振上非特异性位点，将步骤(4)②中最后收集到的液体滴加至石英晶振上，观察压电传感器频率的变化确定待检测样本中致病菌的浓度。

[0028] 在检测致病菌的过程中，只需更换目标抗体和固定在压电传感器电极上的抗体即可。

[0029] 优选的，上述基于压电传感器检测致病菌的方法，所述致病菌所述致病菌为大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌或嗜肺军团菌等。

[0030] 优选的，上述基于压电传感器检测致病菌的方法，所述致病菌为大肠杆菌 O157:H7。

[0031] 优选的，上述基于压电传感器检测致病菌的方法，当致病菌为大肠杆菌 O157:H7 时，具体检测方法为：

[0032] (1) 制备信标免疫纳米磁颗粒

[0033] 采用化学共沉淀法制备粒径为 10nm ~ 200nm 的纳米磁颗粒，将采用 SPA 亲和纯化的浓度为 0.5mg/mL 大肠杆菌 O157:H7 兔多克隆抗体(目标抗体)和相同浓度的生物素标记的兔 IgG(信标抗体)按体积比为 1 : 60 混匀后，取每 0.3mL 混合抗体连接到 1mL 纳米磁颗粒上制成信标免疫纳米磁颗粒；

[0034] (2) 制备亲和素标记胶体金

[0035] 胶体金采用柠檬酸钠还原法制备，制备粒径为 18nm 的胶体金，将浓度为 0.5mg/mL 的亲和素连接至胶体金上，即为亲和素标记胶体金；

[0036] (3) 制备金生长液，确定亲和素标记胶体金在金生长液中的生长时间

[0037] 取 52 μ l 0.024M 氯金酸溶液加入 5ml 0.1M 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)溶液中混匀，然后置于 100°C 的水浴锅中加热 10min，颜色变为清亮的黄色，室温下冷却备用；在加入亲和素标记胶体金溶液之前加入 50 μ l 1M 抗坏血酸(AA)溶液轻轻混匀，金生长液颜色即消失；取 100 μ l 的亲和素标记胶体金溶液于 900 μ l 金生长液中进行自生长，即待生长的亲和素标记胶体金溶液与金生长液的体积比为 1 : 9，其中亲和素标记胶体金溶液的浓度为对步骤(2)中亲和素标记胶体金进行对倍稀释，即 1/2、1/4 和 1/8 的浓度，利用紫外分光光度计进行波长扫描观察胶体金在金生长液中的生长时间为 15min；

[0038] (4) 压电传感器的检测

[0039] ①石英晶振用 piranha 液进行洗涤，取浓度为 0.2mg/mL ~ 2.0mg/mL 的 SPA 溶液 10 μ l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min，取浓度为 0.1mg/mL ~ 1.8mg/mL 的大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体溶液 10 μ l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min；

[0040] ②取信标免疫纳米磁颗粒加入到进行梯度稀释的大肠杆菌 O157:H7 的菌悬液中，通过超强磁的吸引去除非目标菌；再通过 0.45 μ m 的膜将多余的信标免疫纳米磁颗粒离心去除；将制备好的亲和素标记胶体金溶液加入，通过生物素 - 亲和素系统将胶体金结合到信标免疫纳米磁颗粒上，然后借助超强磁将未结合的亲和素标记胶体金去除；

最后将连接有信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金的大肠杆菌 O157:H7 加入金生长液中，按照步骤 (3) 确定的生长时间使胶体金得到生长放大，继续用超强磁将多余的金生长液去除；

[0041] ③按上述步骤 (4) ①的固定浓度和固定时间分别将 SPA 和大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体固定于压电传感器的石英晶振上，并用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭石英晶振上非特异性位点；将步骤 (4) ②中最后收集到的液体滴加至石英晶振上，观察压电传感器频率的变化确定待检测样本中大肠杆菌 O157:H7 的浓度。

[0042] 优选的，上述基于压电传感器检测致病菌的方法，所述步骤 (1) 中的纳米磁颗粒粒径约为 50nm，连接的大肠杆菌 O157:H7 兔多克隆抗体的浓度为 0.5mg/mL；步骤 (2) 中亲和素的连接量为 14 μ g/ml。

[0043] 优选的，上述基于压电传感器检测致病菌的方法，所述步骤 (4) 中 SPA 的固定浓度和时间为 1.2mg/ml、40min；大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体的固定浓度和时间为 1.0mg/ml、60min。

[0044] 本发明的有益效果是：

[0045] 上述基于压电传感器检测致病菌的方法，通过抗原抗体反应（信标免疫纳米磁颗粒）、生物素 - 亲和素系统（亲和素标记胶体金）和金的自生长技术（金生长液），对压电免疫传感器的检测信号进行了多级放大，使得本发明的检测灵敏度得到了最大限度提高，其检测大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度达到了 23CFU/ml，该方法具有灵敏度高，特异性强、操作简便快速等特点，而且只要更换检测过程中涉及的抗体就可以检测不同的微生物，在微生物的检测领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0046] 图 1 为不同体积比的大肠杆菌 O157:H7 信标免疫纳米磁颗粒回收率的测定图谱；

[0047] 图 2 为 SPA 对传感器频率变化的影响图谱，其中 a 浓度、b 时间；

[0048] 图 3 为大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体对传感器频率变化的影响图谱，其中 a 浓度、b 时间；

[0049] 图 4 为大肠杆菌 O157:H7 菌悬液浓度与频率变化关系图谱，其中 a 高浓度、b 低浓度；

[0050] 图 5 为本发明所述检测方法检测大肠杆菌 O157:H7 的流程图。

具体实施方式

[0051] 为了使本领域的技术人员更好的理解本发明的技术方案，下面结合具体实施方式对本发明所述技术方案作进一步的详细说明。

[0052] 实施例 1

[0053] 大肠杆菌 O157:H7 纯菌悬液的检测

[0054] (1) 信标免疫纳米磁颗粒

[0055] ①纳米磁颗粒的制备：将 0.7mol/L 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 16mL 与 1.6mol/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 4mL 混合，在氮气条件下，加入 10g 葡聚糖 T-40，混匀，60℃，

水浴 20min, 在 2000rpm 的搅拌下, 20min 内, 向混合液中滴加 5mol/L 的氨水 40mL, 温度保持 60℃, 并始终通氮气, 制成悬液; 然后用去离子水透析 24h, 离心管离心, 2100rpm, 15min, 保留上清(阻氧避光保存), 所制备的纳米磁颗粒粒径约为 50nm;

[0056] ②信标免疫纳米磁颗粒的制备: 游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离, 洗脱平衡液为 pH 为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液, 收集的颗粒冷冻干燥, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 8mg/mL; 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 1.0mL, 加入 20mmol/L NaIO₄ 水溶液 0.25mL, 150 转 / 分钟避光阻氧震荡 6h 后, 加入 2mol/L 乙二醇的水溶液 0.21mL 终止氧化, pH 为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 4℃透析 24h, 去除过量的 NaIO₄, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5.5mg/mL; 取 SPA 亲和纯化的大肠杆菌 O157:H7 兔多克隆抗体(中国公共卫生, 2005; 21(6): 705-6) 和生物素化兔 IgG(BBI 生物公司购买) 分别按体积比为 1 : 0、1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 60、1 : 80 和 1 : 100 的比例混合, 抗体混合溶液的总体积为 0.3ml, 两种抗体的浓度均为 0.5mg/mL, 将混合好的抗体溶液加入到步骤(1) ②中的 1mL 纳米磁颗粒中, 混匀后, 放入 4℃冰箱过夜(避光), 次日, 在上述溶液中加入 BSA(终浓度为 1%) 进行封闭, 过夜, 置 4℃冰箱备用;

[0057] ③信标免疫纳米磁颗粒回收率的测定: 分别取 20 μl 步骤(1) ②中制备的不同体积比的大肠杆菌 O157:H7 信标免疫纳米磁颗粒加入浓度为 8.1×10²CFU/ml 的大肠杆菌 O157:H7 菌悬液中, 于室温下孵育 15min, 借助超强磁将溶液浓缩至 100 μl; 将此 100 μl 溶液转移至远藤平板(BD 公司产品) 均匀涂布后于 37℃下培养 24h 后计数, 并将此计数结果除以大肠杆菌 O157:H7 菌液的原始浓度即为信标免疫纳米磁颗粒的回收率, 如图 1 所示, 综合考虑信标免疫纳米磁颗粒的回收率及信标抗体的后期信号放大作用, 确定信标免疫纳米磁颗粒的目标抗体与信标抗体的最佳比例为体积比 1 : 60, 且此信标免疫纳米磁颗粒在保存 1 年后, 其回收率基本不变。

[0058] (2) 亲和素标记胶体金

[0059] 取 2.0mL 的 1% 氯金酸加入 198mL 超纯水, 于沸水浴中加热 10min; 然后迅速加入 5mL 的 1% 柠檬酸三钠溶液, 继续加热 15min; 当胶体金颜色变为葡萄酒红色时, 继续加热 10min, 冷却后用透射电镜观察其粒径大小约为 18nm。用 0.2% K₂CO₃ 调 pH 值为 6.5。利用分光光度计法测得稳定胶体金最适亲和素量为 14 μg/mL。取调好 pH 值的胶体金 25ml, 加入浓度为 0.5mg/mL 的亲和素 0.7ml, 缓慢搅拌 10min, 加入牛血清白蛋白(BSA), 使其终浓度为 1%, 继续搅拌 10min 以上。将上述初步制得的胶体金探针以 4000rpm 离心 20min, 收集上清以 10000rpm 4℃离心 60min; 丢弃上清, 留下管底为暗红色疏松状沉淀, 沉淀用 0.005mol/L pH 为 7.6 的 PB 缓冲液(含 1% BSA, 0.02% NaN₃) 重新悬浮, 再同前离心洗涤一次。最后将沉淀用同前的 pH 为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液悬浮, 置 4℃冰箱保存备用;

[0060] (3) 金生长液

[0061] 取 52 μl 0.024M 氯金酸溶液加入 5ml 0.1M 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB) 溶液中混匀, 然后置于 100℃下的水浴锅中加热 10min, 颜色变为清亮的黄色, 室温下冷却备用; 在加入胶体金溶液之前加入 50 μl 1M 抗坏血酸(AA) 溶液轻轻混匀, 金生长液颜色即消失, 此即为金生长液。

[0062] (4) 压电传感器的检测

[0063] ①先将石英晶振用 piranha 液 (浓 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3/1, 现用现配) 进行洗涤, 再用无水乙醇和超纯水洗涤, 每次 5min, 重复 3 次; 石英晶振在固定物质之前在气相中进行基础频率检测, 固定物质之后进行洗涤, 氮气吹干 10min 后在气相中进行频率检测, 频率变化稳定在 $\pm 1\text{Hz}$ 间时计数; 取 0.2–2.0mg/ml 的 SPA 溶液 10 μl 滴加于石英晶振上, 常温下固定 10–90min, 按上述步骤进行洗涤后取 0.2–2.0mg/ml 的大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体溶液 (专利申请号 200810053955.8) 10 μl 滴加于石英晶振上, 37°C 下固定 10–90min, 洗涤后用 1% BSA 封闭, 用压电传感器检测频率做为基频, 根据图 2 和图 3 可确定 SPA 的最佳固定浓度与时间为 1.2mg/ml 和 40min, 大肠杆菌 O157:H7 鼠单克隆抗体的最佳固定浓度与时间为 1.0mg/ml 和 60min;

[0064] ②取 20 μl 信标免疫纳米磁颗粒加入 1ml 梯度稀释后的大肠杆菌 O157:H7 菌悬液 (9.2×10^1 – 9.2×10^6 CFU/ml) 和沙门氏菌的菌悬液 (7.8×10^1 – 7.8×10^6 CFU/ml) 中, 轻轻混匀后, 于室温下孵育 15min, 借助超强磁将溶液浓缩至 100 μl ; 利用带 0.45 μm 滤膜的离心管 (ultrafree-MC microcentrifuge filters, Sigma 公司) 1500rpm 离心 10min 将多余的信标免疫纳米磁颗粒去除; 加入 10 μl 亲和素标记胶体金, 37°C 下孵育 20min, 用超强磁去除未结合的亲和素标记胶体金, 并将溶液定容到 100 μl ; 将上述 100 μl 溶液加入到 900 μl 的金生长液中反应 15min; 再借助超强磁将多余的金生长液去除, 最后将溶液定容到 10 μl ;

[0065] ③将步骤 (4) ②中最后得到的 10 μl 溶液滴加到步骤 (4) ①中已修饰好的石英晶振上, 并将石英晶振于 37°C 下反应 60min 后, 洗涤后进行频率的测定, 其检测结果见图 4, 可知压电免疫传感器经过信标免疫纳米磁颗粒和亲和素标记胶体金对检测信号进行了多级放大, 大肠杆菌 O157:H7 菌检测限达到了 23CFU/ml, 整个检测过程控制在 4h 之内。

[0066] 实施例 2

[0067] 大肠杆菌 O157:H7 纯菌悬液的检测

[0068] (1) 信标免疫纳米磁颗粒

[0069] ①纳米磁颗粒的制备: 将 0.7mol/L 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 16mL 与 1.6mol/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 4mL 混合, 在氮气条件下, 加入 4g 葡聚糖 T-40, 混匀, 60°C, 水浴 20min, 在 2000rpm 的搅拌下, 20min 内, 向混合液中滴加 5mol/L 的氨水 40mL, 温度保持 60°C, 并始终通氮气, 制成悬液; 然后用去离子水透析 24h, 离心管离心, 2100rpm, 15min, 保留上清 (阻氧避光保存), 所制备的纳米磁颗粒粒径约为 200nm, 按此方法制备的纳米磁颗粒较易产生聚集, 保存时间约 1 个月左右。

[0070] ②③同实施例 1, 制备的信标免疫纳米磁颗粒的回收率最高为 52%。

[0071] (2) (3) (4) 同实施例 1, 最后检测大肠杆菌 O157:H7 菌灵敏度为 172CFU/ml。

[0072] 实施例 3

[0073] 大肠杆菌 O157:H7 纯菌悬液的检测

[0074] (1) 信标免疫纳米磁颗粒

[0075] ①纳米磁颗粒的制备: 将 0.7mol/L 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 16mL 与 1.6mol/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 4mL 混合, 在氮气条件下, 加入 4g 葡聚糖 T-40, 混匀, 60°C, 水

浴 20min, 在 500rpm 的搅拌下, 20min 内, 向混合液中滴加 5mol/L 的氨水 40mL, 温度保持 60℃, 并始终通氮气, 制成悬液; 然后用去离子水透析 24h, 离心管离心, 2100rpm, 15min, 保留上清(阻氧避光保存), 所制备的纳米磁颗粒粒径约为 10nm。

[0076] ②③同实施例 1, 制备的信标免疫纳米磁颗粒的回收率最高为 63%。

[0077] (2)(3)(4) 同实施例 1, 最后检测大肠杆菌 O157:H7 菌灵敏度为 120CFU/ml。

[0078] 实施例 4

[0079] (1) 沙门氏菌纯菌悬液的检测

[0080] ①游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离, 洗脱平衡液为 pH 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液, 收集的颗粒冷冻干燥, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 8mg/mL; 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 1.0mL, 加入 20mmol/L NaIO₄ 水溶液 0.25mL, 150 转/分钟避光阻氧震荡 6h 后, 加入 2mol/L 乙二醇的水溶液 0.21mL 终止氧化, pH 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 4℃透析 24h, 去除过量的 NaIO₄, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5.5mg/mL;

[0081] ②取 SPA 亲和纯化的沙门氏菌兔多克隆抗体(中国公共卫生, 2005; 21(6): 705-6) 和生物素化兔 IgG(BBI 生物公司购买) 按体积比为 1:60 比例混合, 抗体混合溶液的总容积为 0.3ml, 两种抗体的浓度均为 0.5mg/mL, 将混合好的抗体溶液加入到步骤(1)①中的 1mL 纳米磁颗粒中, 混匀后, 放入 4℃冰箱过夜(避光), 次日, 在上述溶液中加入 BSA(终浓度为 1%) 进行封闭, 过夜, 置 4℃冰箱备用。

[0082] 其余步骤同实施例 1。

[0083] (4) 压电传感器的检测

[0084] ①先将石英晶振用 piranha 液(浓 H₂SO₄/H₂O₂3/1, 现用现配) 进行洗涤, 再用无水乙醇和超纯水洗涤, 每次 5min, 重复 3 次; 石英晶振在固定物质之前在气相中进行基础频率检测, 固定物质之后进行洗涤, 氮气吹干 10min 后在气相中进行频率检测, 频率变化稳定在 ±1Hz 间时计数; 取 1.2mg/ml 的 SPA 溶液 10 μl 滴加于石英晶振上, 常温下固定 40min; 按上述步骤进行洗涤后取 1.0mg/ml 的沙门氏菌鼠单克隆抗体溶液(AB 公司沙门氏菌鼠单克隆抗体, 货号为 ab13628) 10 μl 滴加于石英晶振上, 37℃下固定 60min, 洗涤后用 1% BSA 封闭, 用压电传感器检测频率做为基频;

[0085] ②取 20 μl 信标免疫纳米磁颗粒加入 1ml 梯度稀释后的沙门氏菌悬液(8.6×10¹-8.6×10⁶CFU/ml) 和肠球菌的菌悬液(4.2×10¹-4.2×10⁶CFU/ml) 中, 轻轻混匀后, 于室温下孵育 15min, 借助超强磁将溶液浓缩至 100 μl; 利用带 0.45 μm 滤膜的离心管(ultrafree-MC microcentrifuge filters, Sigma 公司) 1500rpm 离心 10min 将多余的信标免疫纳米磁颗粒去除; 加入 10 μl 亲和素标记胶体金 37℃下孵育 20min, 用超强磁去除未结合的亲和素标记胶体金, 并将溶液定容到 100 μl; 将上述 100 μl 溶液加入到 900 μl 的金生长液中反应 15min; 再借助超强磁将多余的金生长液去除, 最后将溶液定容到 10 μl;

[0086] ③将步骤(4)②中最后得到的 10 μl 溶液滴加到步骤(4)①中已修饰好的石英晶振上, 并将石英晶振于 37℃下反应 60min 后, 洗涤后进行频率的测定, 最后检测结果为 35CFU/ml。

[0087] 实施例 5

[0088] 嗜肺军团菌纯菌悬液的检测

[0089] (1) 信标免疫纳米磁颗粒的制备

[0090] ①游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离, 洗脱平衡液为 pH 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液, 收集的颗粒冷冻干燥, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 8mg/mL; 取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 1.0mL, 加入 20mmol/L NaIO₄ 水溶液 0.25mL, 150 转 / 分钟避光阻氧震荡 6h 后, 加入 2mol/L 乙二醇的水溶液 0.21mL 终止氧化, pH 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 4℃透析 24h, 去除过量的 NaIO₄, 使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5.5mg/mL;

[0091] ②取 SPA 亲和纯化的嗜肺军团菌兔多克隆抗体 (中国公共卫生, 2005; 21(6): 705-6) 和生物素化兔 IgG (BBI 生物公司购买) 按体积比为 1 : 60 比例混合, 抗体混合溶液的总容积为 0.3ml, 两种抗体的浓度均为 0.5mg/mL, 将混合好的抗体溶液加入到步骤 (1) ①中的 1mL 纳米磁颗粒中, 混匀后, 放入 4℃冰箱过夜 (避光), 次日, 在上述溶液中加入 BSA (终浓度为 1%) 进行封闭, 过夜, 置 4℃冰箱备用。

[0092] 其余步骤同实施例 1。

[0093] (4) 压电传感器的检测

[0094] ①先将石英晶振用 piranha 液 (浓 H₂SO₄/H₂O₂3/1, 现用现配) 进行洗涤, 再用无水乙醇和超纯水洗涤, 每次 5min, 重复 3 次; 石英晶振在固定物质之前在气相中进行基础频率检测, 固定物质之后进行洗涤, 氮气吹干 10min 后在气相中进行频率检测, 频率变化稳定在 ±1Hz 间时计数; 取 1.2mg/ml 的 SPA 溶液 10 μl 滴加于石英晶振上, 常温下固定 40min; 按上述步骤进行洗涤后取 1.0mg/ml 的嗜肺军团鼠单克隆抗体溶液 (AB 公司嗜肺军团鼠单克隆抗体, 货号为 ab8263) 10 μl 滴加于石英晶振上, 37℃下固定 60min, 洗涤后用 1% BSA 封闭, 用压电传感器检测频率做为基频;

[0095] ②取 20 μl 信标免疫纳米磁颗粒加入 1ml 梯度稀释后的嗜肺军团菌悬液 ($5.7 \times 10^1 - 5.7 \times 10^6$ CFU/ml) 和大肠杆菌的菌悬液 ($9.3 \times 10^1 - 9.3 \times 10^6$ CFU/ml) 中, 轻轻混匀后, 于室温下孵育 15min, 借助超强磁将溶液浓缩至 100 μl; 利用带 0.45 μm 滤膜的离心管 (ultrafree-MC microcentrifuge filters, Sigma 公司) 1500rpm 离心 10min 将多余的信标免疫纳米磁颗粒去除; 加入 10 μl 亲和素标记胶体金 37℃下孵育 20min, 用超强磁去除未结合的亲和素标记胶体金, 并将溶液定容到 100 μl; 将上述 100 μl 溶液加入到 900 μl 的金生长液中反应 15min; 再借助超强磁将多余的金生长液去除, 最后将溶液定容到 10 μl;

[0096] ③将步骤 (4) ②中最后得到的 10 μl 溶液滴加到步骤 (4) ①中已修饰好的石英晶振上, 并将石英晶振于 37℃下反应 60min 后, 洗涤后进行频率的测定, 最后检测结果为 57CFU/ml。

[0097] 实施例 6

[0098] 食品样本加标大肠杆菌 O157:H7 的检测

[0099] (1) 从天津某菜场购买熟牛肉作为本次实验的样本, 在无菌操作下分别称取 25g 样本分成 2 份进行检测, 其中一份按照 GB/T4789.36-2008 进行大肠杆菌 O157:H7 的检测; 另外一份样本中加入 225ml 灭菌生理盐水进行均质后, 取 2.5ml 已知浓度 (2.2×10^9 CFU/ml) 的大肠杆菌 O157:H7 的菌悬液加入, 分别在加入大肠杆菌 O157:H7 之

前与之后各取 1ml 样本液体利用压电免疫传感器进行大肠杆菌 O157:H7 的检测；

[0100] (2) 样本利用压电免疫传感器进行大肠杆菌 O157:H7 检测的方法同实施例 1 中的步骤 (1)-(4)，检测结果为：未加标的样本中未检测出大肠杆菌 O157:H7，加标样本中大肠杆菌 O157:H7 最低检测限为 55CFU/ml。

[0101] 可见，上述基于压电传感器检测致病菌的方法在其他检测条件不变的情况下，仅需更换目标抗体和固定在压电传感器电极上的抗体即可对各类致病菌进行检测，是可以普遍应用于各类致病菌的检测方法。

[0102] 上述参照具体实施方式对该一种基于压电传感器检测致病菌的方法进行的详细描述，是说明性的而不是限定性的，可按照所限定范围列举出若干个实施例，因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改，应属本发明的保护范围之内。

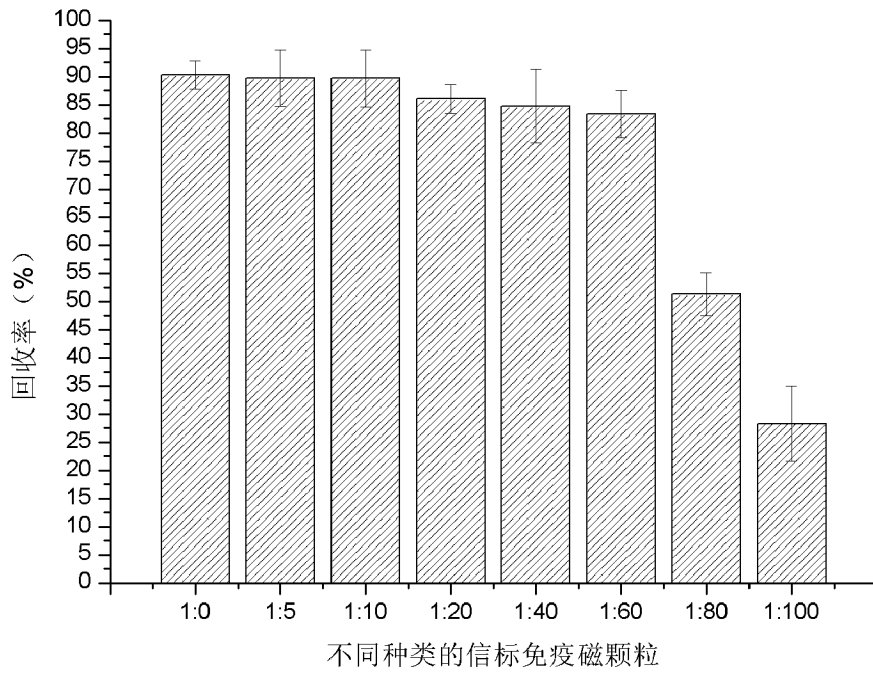


图 1

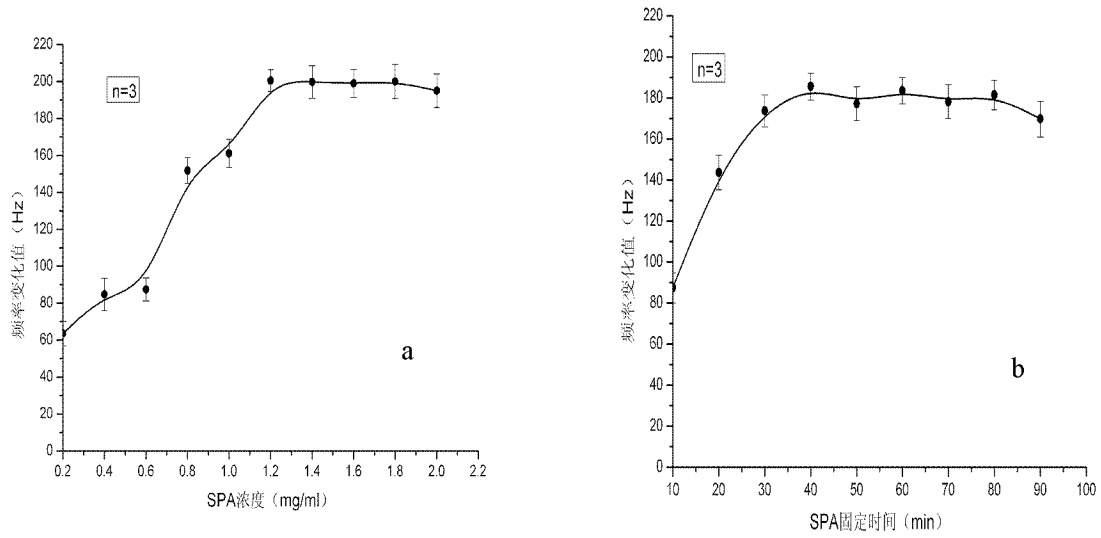


图 2

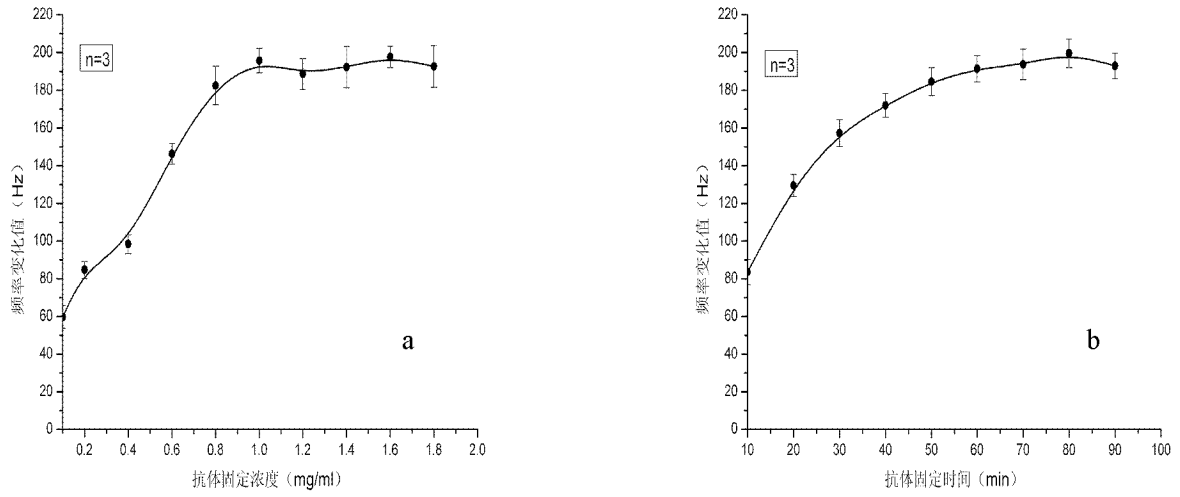


图 3

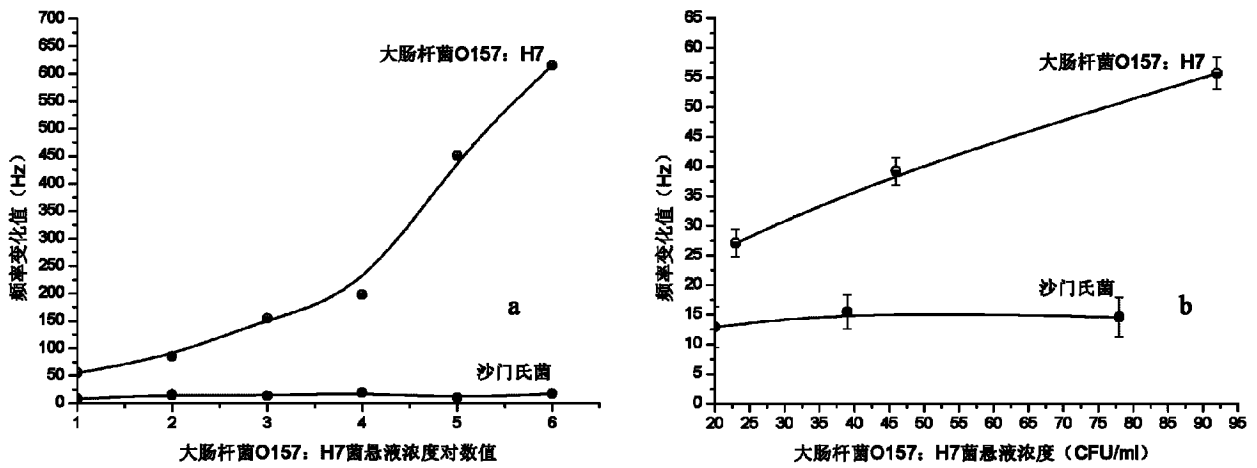


图 4

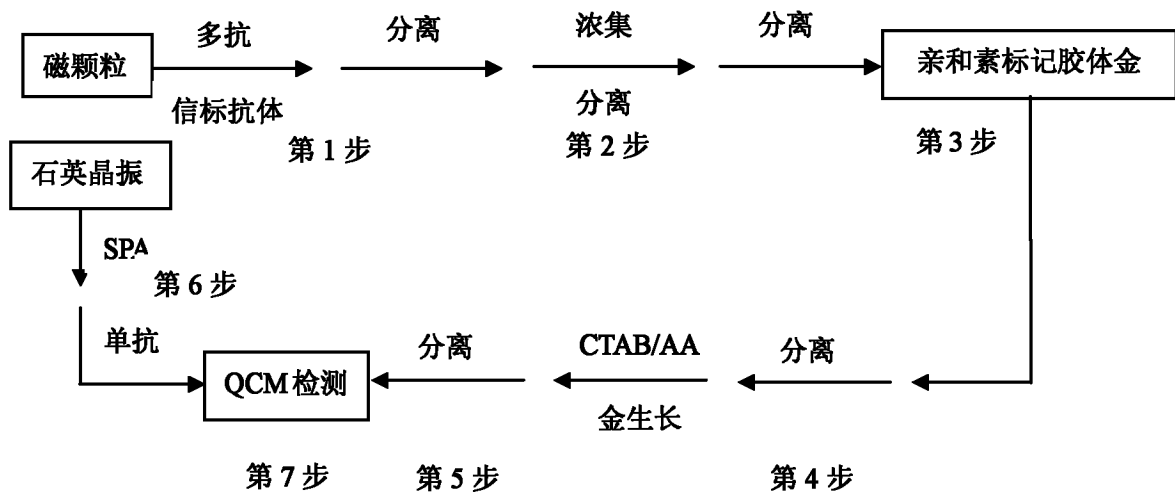


图 5

专利名称(译)	一种基于压电传感器检测致病菌的方法		
公开(公告)号	CN102012384A	公开(公告)日	2011-04-13
申请号	CN201010550114.5	申请日	2010-11-18
[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	谌志强 李君文 王景峰 邱志刚 金敏 王新为 陈照立		
发明人	谌志强 李君文 王景峰 邱志刚 金敏 王新为 陈照立		
IPC分类号	G01N27/00 G01N33/532 G01H11/08		
其他公开文献	CN102012384B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于压电传感器检测致病菌的方法，通过抗原抗体反应(信标免疫磁颗粒)、生物素-亲和素系统(金标亲和素)和金的自生长技术(金生长液)，对压电免疫传感器的检测信号进行了多级放大，使得本发明的检测灵敏度得到了最大限度提高，其检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度达到了23CFU/ml，该方法具有灵敏度高，特异性强、操作简便快速等特点，而且只要更换检测过程中涉及的抗体就可以检测不同的微生物，在微生物的检测领域具有广阔的应用前景。

