



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102841198 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201210345823. 9

(22) 申请日 2012. 09. 18

(73) 专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山武汉大学

(72) 发明人 庞代文 温聪颖 胡军 张志凌 孙自镛

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 汪俊锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

审查员 黄晓丽

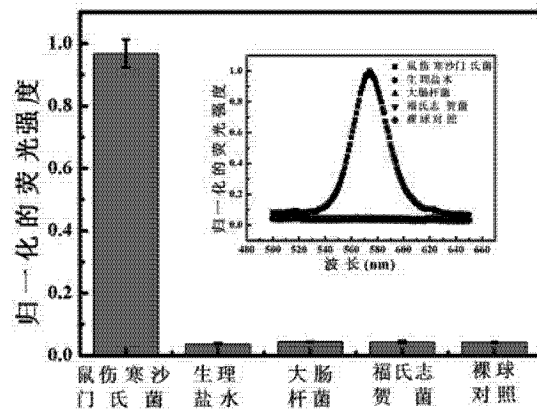
权利要求书1页 说明书5页 附图6页

(54) 发明名称

一种灵敏简便检测细菌的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种细菌的检测方法,包括步骤:利用磁性纳米球和荧光纳米球偶联上鼠伤寒沙门氏菌抗体从而得到对鼠伤寒沙门氏菌靶向的免疫磁球和免疫荧光球,然后把它们同时投入到检测体系中,从而同时实现了对鼠伤寒沙门氏菌的磁捕获和荧光标记。通过荧光显微镜观察,可以检测到约 10CFU/mL 的鼠伤寒沙门氏菌;通过荧光光谱仪检测,得到很好的定量关系,线性范围为 10⁵~10⁷CFU/mL, R²=0. 9994。整个检测过程非常简单,灵敏度高,特异性强,可以在 1. 5h 内完成检测。



1. 一种检测细菌的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将目标细菌的抗体连接到磁性纳米球和荧光纳米球表面,并用牛血清白蛋白对偶联了抗体的磁性纳米球和荧光纳米球进行封闭,得到免疫磁球和免疫荧光球;

2) 将免疫磁球和免疫荧光球加入到待测溶液中,孵育使免疫磁球、免疫荧光球和目标细菌充分结合,然后磁分离并洗涤,最后加入生理盐水并重悬均匀,得到磁球-细菌-荧光球复合物;

3) 利用荧光显微镜或者荧光光谱仪对磁球-细菌-荧光球复合物进行检测。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,其中步骤 1 中,将目标细菌的抗体连接到磁性纳米球和荧光纳米球表面,具体为:通过 EDC/NHS 活化法先将 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 偶联到纳米球表面作为桥梁,再通过 EDC/NHS 活化法和目标细菌的抗体连接。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述磁性纳米球表面带有 $-\text{COOH}$,是将油溶性的 $\text{nano-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 包埋到苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球中制备得到。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述荧光纳米球,表面带有 $-\text{COOH}$,是将油溶性的 CdSe/ZnS 量子点包埋到苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球中制备得到。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述目标细菌是鼠伤寒沙门氏菌。

一种灵敏简便检测细菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测细菌的方法,属于微生物学及化学生物学领域。

背景技术

[0002] 食源性病原菌严重威胁到人类的健康和生命,每年有很多人因此生病、住院甚至死亡,而且由于很多致病菌的感染剂量非常低(例如肠出血性大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌的感染剂量低至 10 个细胞),所以简单、快速、灵敏、可靠地检测细菌对人类的生命健康至关重要。然而传统的检测方法,例如培养的方法、酶联免疫吸附法(ELISA)具有耗时长、灵敏度低等缺点,而 PCR 的方法灵敏度虽然高,但是通常需要进行样品前处理而且需要专业人员操作且步骤较繁琐从而限制了其应用。

[0003] 近年来,随着纳米科技的快速发展,越来越多的纳米材料应用于细菌检测,并显现出巨大的优势,例如磁性纳米材料作为一种分离工具被广泛地应用于从复杂样品中快速捕获和富集目标细菌,其具有以下优势:磁性纳米材料具有超顺磁性,通过一块磁铁就可以对其进行操纵;比表面积大,可以偶联丰富的功能分子(抗体、适配体、亲和素、凝集素等);而且相对于 ELISA 的界面反应,具有较快的反应动力学特征;易于实现和各种检测手段连用,如与传统的培养、PCR 的方法,电化学方法,光学检测方法等连用,极大的降低了检测时间和检测限。然而在这些检测方法中,大部分都将捕获和标记分开进行,步骤较多,检测过程也较为繁琐。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种快速灵敏简便检测细菌的方法。

[0005] 本发明将磁性纳米球和荧光纳米球偶联上目标细菌的抗体,从而得到对目标细菌靶向的免疫磁球和免疫荧光球,然后把它们同时投入到待检体系中,从而同时实现了对目标细菌的磁捕获和荧光标记,通过检测磁球-细菌-荧光球复合物的荧光信号检测细菌。

[0006] 具体的技术方案是:

[0007] 1、将目标细菌的抗体连接到磁性纳米球和荧光纳米球表面,并用牛血清白蛋白(BSA)对偶联了抗体的磁性纳米球和荧光纳米球进行封闭,得到免疫磁球和免疫荧光球;

[0008] 2、将免疫磁球和免疫荧光球加入到待测溶液中,孵育使免疫磁球、免疫荧光球和目标细菌充分结合,磁分离并洗涤,最后加入生理盐水并重悬均匀,得到磁球-细菌-荧光球复合物;

[0009] 3、利用荧光显微镜或者荧光光谱仪对磁球-细菌-荧光球复合物进行检测。

[0010] 其中步骤 1 中,将目标细菌的抗体连接到磁性纳米球和荧光纳米球表面,具体为:通过 EDC(1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)/NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化法将 NH_2 -PEG-COOH 偶联到磁性纳米球和荧光纳米球表面作为 spacer(桥梁),再通过 EDC/NHS 活化法和目标细菌的抗体连接。。

[0011] 所述磁性纳米球,表面带有 -COOH,是将油溶性的 nano- γ - Fe_2O_3 包埋到苯乙烯-丙

烯酰胺共聚纳米球中制备得到。

[0012] 所述荧光纳米球,表面带有-COOH,是将油溶性的 CdSe/ZnS 量子点(QDs)包埋到苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球中制备得到。

[0013] 所述目标细菌一般指食源性致病菌,如沙门氏菌、大肠杆菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌等。

[0014] 基于上述方法,本发明利用偶联有 *S. typhimurium* 的单克隆抗体的免疫磁球捕获 *S. typhimurium*,并利用偶联有 *S. typhimurium* 的单克隆抗体的免疫荧光球识别 *S. typhimurium*,实现捕获与标记的同时进行,通过荧光显微镜或者荧光光谱仪对磁球-细菌-荧光球复合物进行检测。

[0015] 本发明方法利用免疫磁球和免疫荧光球实现对目标细菌的同时捕获和标记,通过检测磁球-细菌-荧光球复合物的荧光信号来检测细菌,步骤非常简单,无需对样品进行预处理或预富集,而且灵敏度高,特异性好。通过荧光显微镜观察,可以检测到约 10 CFU/mL 的鼠伤寒沙门氏菌;通过荧光光谱仪检测,得到很好的定量关系,线性范围 $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL, $R^2 = 0.9994$ 。整个检测过程非常简单,灵敏度高,特异性强,可以在 1.5 h 内完成检测。

附图说明

[0016] 图 1 为磁性纳米球的透射电镜图 (A) 和磁滞回线表征 (B)。

[0017] 图 2 为荧光纳米球的透射电镜图 (A)、荧光显微镜图 (B) 和荧光光谱图 (C,虚线是量子点的荧光光谱图,实线是荧光球的光谱图) 以及其荧光强度与其浓度的关系图 (D,内部插图为荧光球低浓度情况的线性拟合)。

[0018] 图 3 检测鼠伤寒沙门氏菌的原理图。

[0019] 图 4 为检测鼠伤寒沙门氏菌的荧光显微镜图片:从 A~E 菌的浓度分别为 0、10、50、100、1000、10000 CFU/mL, F 为对一个被免疫磁球捕获和免疫荧光球标记的典型的细菌的空放大图。

[0020] 图 5 为检测鼠伤寒沙门氏菌的荧光光谱图 (A) 和及其荧光强度与细菌浓度的线性拟合 (B)。

[0021] 图 6 为检测 10^7 CFU/mL 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和生理盐水即空白对照、大肠杆菌 (*E. coli*)、福氏志贺菌 (*S. flexneri*) 以及用未偶联抗体的裸球 MNS 和 FNS 与鼠伤寒沙门氏菌作用的荧光强度柱状图。

[0022] 图 7 为检测鼠伤寒沙门氏菌 (A)、生理盐水 (B)、大肠杆菌 (C)、福氏志贺菌 (D) 以及未偶联抗体的裸球 MNS/FNS 与鼠伤寒沙门氏菌作用 (E) 的激光共聚焦显微镜图片,依次为明场;Hoechst 33342;激发:405 nm,发射:447±30 nm;FNS:激发:488 nm,发射:565±10 nm;叠加:两个荧光通道的叠加。各组细菌在检测前均用 Hoechst 33342 染色。

[0023] 图 8 为模拟样本检测的结果:图的上部分为在生理盐水、牛奶、胎牛血清、尿液中检测的荧光显微镜图;图 A 为对应的荧光光谱图,图 B 为在牛奶中检测的荧光强度与细菌浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0024] 以下实施例仅用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制。

[0025] 实施例 1 鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* 的检测

[0026] 下面以鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* 为例,对本发明方法进行详细的说明。

[0027] 一、方法

[0028] 1. 免疫磁球和免疫荧光球的制备

[0029] 磁性纳米球 (MNS) 和荧光纳米球 (FNS) 的制备是在本实验室制备荧光磁性双功能纳米球的基础上进行的。即用超声溶胀的方法,利用疏水相互作用,将油溶性的磁性纳米颗粒 γ -Fe₂O₃ 或者量子点 (CdSe/ZnS QDs) 包埋到表面羧基化的苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球 (Pst-AAm-COOH) 的疏水空腔内部,从而得到了 MNS 和 FNS。纳米球的直径约为 250nm。在纳米球表面连接抗体前,先利用共价偶联引入 NH₂-PEG-COOH (MW 3400) 作为桥梁 (spacer):取大约 5 mg MNS 或者 FNS,分散到 0.01 M pH 6.8 PBS 中,并加入 EDC/NHS 使其最终浓度为 100 mM,活化 0.5 h,用 0.01 M pH 7.2 PBS 洗涤三次 (MNS 通过磁分选,FNS 通过离心洗涤),然后分散到 1 mL 0.01 M pH 7.2 PBS 中,加入约 2 mg NH₂-PEG-COOH (MW 3400) 反应四小时,然后用 0.01 M pH 7.2 PBS 洗涤五次除去未反应的 PEG。抗体的引入也是通过 EDC/NHS 活化法进行的,步骤与偶联 PEG 相同,只是将 2 mg 的 PEG 换成了约 50 μ g 的鼠伤寒沙门氏菌的抗体。即得到了对鼠伤寒沙门氏菌靶向的免疫磁球 (IMNS) 和免疫荧光球 (IFNS),用 1% BSA 封闭后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中待用。

[0030] 2. 鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* 的检测

[0031] 将 0.32 mg IMNS,2.61 mg IFNS 同时加入到细菌悬液中(通过梯度稀释的方法,得到各个稀释度的细菌悬液。),置于摇床上,37 $^{\circ}$ C、120 rpm 孵育 60min,检测体系用 0.1% Skim Milk (脱脂奶粉) -0.05% Tween 20 (吐温-20) 封闭。然后免疫复合物通过磁分离,用 0.1% Skim Milk -0.05% Tween 20-0.9% NaCl 洗涤四次,0.9%NaCl 洗涤一次,最后分散到 300 μ L 0.9% NaCl 用荧光光谱仪检测,或者分散到 20 μ L 0.9% NaCl 富集到 PDMS 小槽底 (直径 ~3 mm) 用荧光显微镜检测。

[0032] 3. 特异性实验

[0033] 采用生理盐水、大肠杆菌 (*E. coli*)、福氏志贺菌 (*S. flexneri*) 作为对照组,另外,没有偶联抗体的 MNS 和 FNS 也用于和 *S. typhimurium* 作用作为对照。分别按照步骤 2 进行实验。对于荧光显微镜检测,细菌事先用 Hoechst 33342 进行染色 (细菌浓度为 10⁷CFU/mL, Hoechst 33342 浓度为 30 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C,30 min),用 PBS 洗涤 3 次分散到 0.1% Skim Milk-0.05% Tween 20-0.9% NaCl,然后将 IMNS 和 IFNS 加入检测体系捕获和标记细菌。磁分离并洗涤后,将免疫复合物滴到玻片上用共聚焦显微镜观察。

[0034] 4. 重复性实验

[0035] 将浓度为 1 \times 10⁶ CFU/mL 的细菌悬液,用同一批按步骤 1 制备的 IMNS 和 IFNS 进行检测,按照步骤 2 重复实验 5 次,记录每次检测结果的荧光值,计算批次内相对标准偏差 Intra-assay CV。同时,用 5 种不同批次制备的 IMNS 和 IFNS 对上述样品进行检测,记录检测结果的荧光值,计算批次间相对标准偏差 Inter-assay CV。

[0036] 5. 人工模拟样本检测

[0037] 将细菌悬液加入到牛奶、胎牛血清、尿液等复杂介质中,按照步骤 2 对其进行检测,并用没有加细菌的样品作为对照,和理想的检测体系(生理盐水)比较检测结果。

[0038] 二、结果

[0039] 1. 磁性纳米球和荧光纳米球的表征

[0040] 苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球是在水相中通过无乳聚合合成的,具有亲水的表面和疏水空腔。油溶性的 γ - Fe_2O_3 或者 QDs 可以在正丁醇、氯仿 (体积比:95:5) 混合溶剂中通过疏水相互作用进入纳米球的疏水空腔中, MNS (图 1 A) 和 FNS (图 2 A) 的透射电镜图表明 γ - Fe_2O_3 或者 QDs 很好的分散在纳米球里。通过 MNS 的磁滞回线 (图 1 B) 可以看出 MNS 的矫顽力和剩磁几乎为零,表明 MNS 在室温下呈现较好的超顺磁性。FNS 的荧光显微镜图 (图 2 B) 和荧光光谱图 (图 2 C) 表明 FNS 分散性很好而且具有优良的荧光性质。而 FNS 的荧光强度与其浓度的关系图 (图 2D) 表明 FNS 的荧光强度与其浓度 (0.004 mg/mL ~ 0.875 mg/mL) 线性相关 ($R^2=0.996$),这也从另一方面说明包埋法合成的 FNS 有较好的均一性,并为定量检测提供了可能性。

[0041] 2. 鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* 的检测

[0042] 检测鼠伤寒沙门氏菌原理见图 3, IMNS 和 IFNS 同时投入检测体系,同时实现了对鼠伤寒沙门氏菌的磁捕获和荧光标记,然后产物用荧光光谱仪和荧光显微镜检测。为了实现较大的富集效果,我们将免疫复合物分散在 20 μL 的生理盐水中,然后滴入直径约 3 mm 的 PDMS 小槽 (将 PDMS 键合到盖玻片上得到) 里,把磁铁放到小槽底部,从而将免疫复合物吸引至槽底,然后用荧光倒置显微镜观察,直径 3 mm 的小槽在 100 \times 物镜下约有 200 个视野,我们即在这 200 个视野中寻找目标物——标记有荧光球的细菌,我们发现该法可以检测到大约 10 CFU/mL 的鼠伤寒沙门氏菌,见图 4。当免疫复合物用荧光光谱仪检测时 (图 5),发现阳性样品呈现明显的 FNS 发射峰,而阴性样品没有明显的 FNS 荧光信号,而且其荧光强度与细菌浓度在 $10^5\sim 10^7$ CFU/mL 呈现很好的定量关系 ($R^2=0.9994$)。

[0043] 3. 特异性

[0044] 一个方法的可靠性需要用其特异性和选择性来评价,因此一系列对照实验是非常必要的。IMNS 和 IFNS 分别与生理盐水、大肠杆菌 (*E. coli*)、福氏志贺菌 (*S. flexneri*) 相互作用, MNS 和 FNS 与鼠伤寒沙门氏菌作用作为对照实验来检验这个方法的特异性与选择性。图 6 是用荧光光谱法检测 10^7 CFU/mL 鼠伤寒沙门氏菌和生理盐水即空白对照、大肠杆菌 (*E. coli*)、福氏志贺菌 (*S. flexneri*),以及用 MNS 和 FNS 与鼠伤寒沙门氏菌作用所得到的荧光强度柱状图,发现阴阳性对比明显。图 7 是用激光共聚焦显微镜观察的结果。各组细菌均用 Hoechst 33342 染色,然后用 IMNS/IFNS 检测,发现只有阳性组捕获到了细菌,并且细菌周围结合有荧光球,而且有一定程度的凝集现象,而阴性组的磁球分散性很好,均未发现被捕获的细菌。通过光谱图和显微镜图片证明 IMNS/IFNS 可以特异性捕获和检测鼠伤寒沙门氏菌。

[0045] 4. 重复性

[0046] 为了评价该方法的重现性,测定了该方法的批内相对标准偏差 (Intra-assay CV) 和批间相对标准偏差 (Inter-assay CV),计算 Intra-assay CV 是使用同一批次的 IMNS 和 IFNS 进行检测,重复实验 5 次后计算其相对标准偏差。计算 Inter-assay CV 是用五种不同批次的 IMNS 和 IFNS 对样品进行检测记录荧光强度,计算其相对标准偏差,计算得到 Intra-assay CV 和 Inter-assay CV 分别为 5.2% 和 7.2%,表明该法重现性较好,方法可靠。

[0047] 5. 人工模拟样本检测

[0048] 在实际检测中,样品环境通常比较复杂,为了考察该检测方法在复杂体系中的应

用,我们设计人工模拟样本,将细菌悬液与牛奶、胎牛血清、尿液等复杂样品混合,然后用该法进行检测,检测结果如图 8,说明该法有望应用于复杂实际样品。

[0049] 通过以上各项检测,证明本发明方法可以应用于鼠伤寒沙门氏菌的检测,操作简单快速、只需一步即完成对目标细菌的捕获和标记;灵敏度高、检测限可达到约 10 CFU/mL;重复性好而且具有很好的选择性和特异性,常见的大肠杆菌、福氏志贺菌不干扰检测。

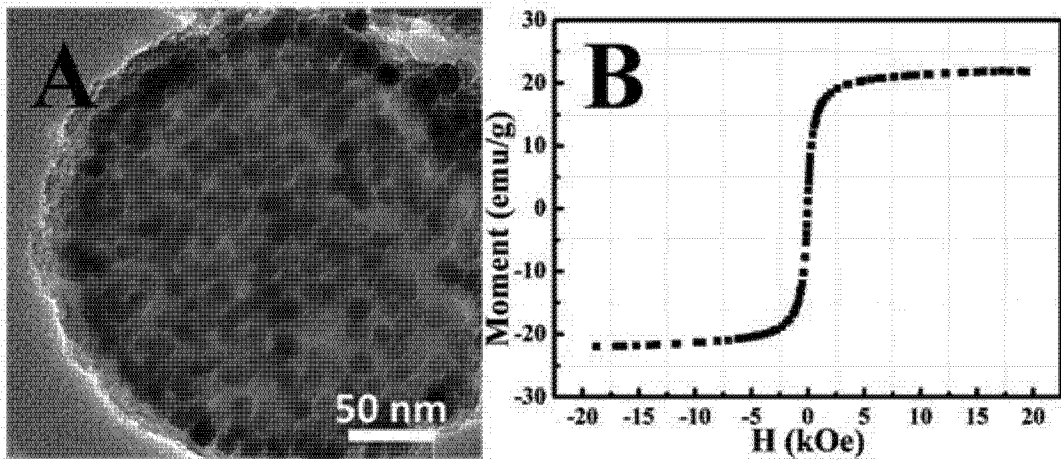


图 1

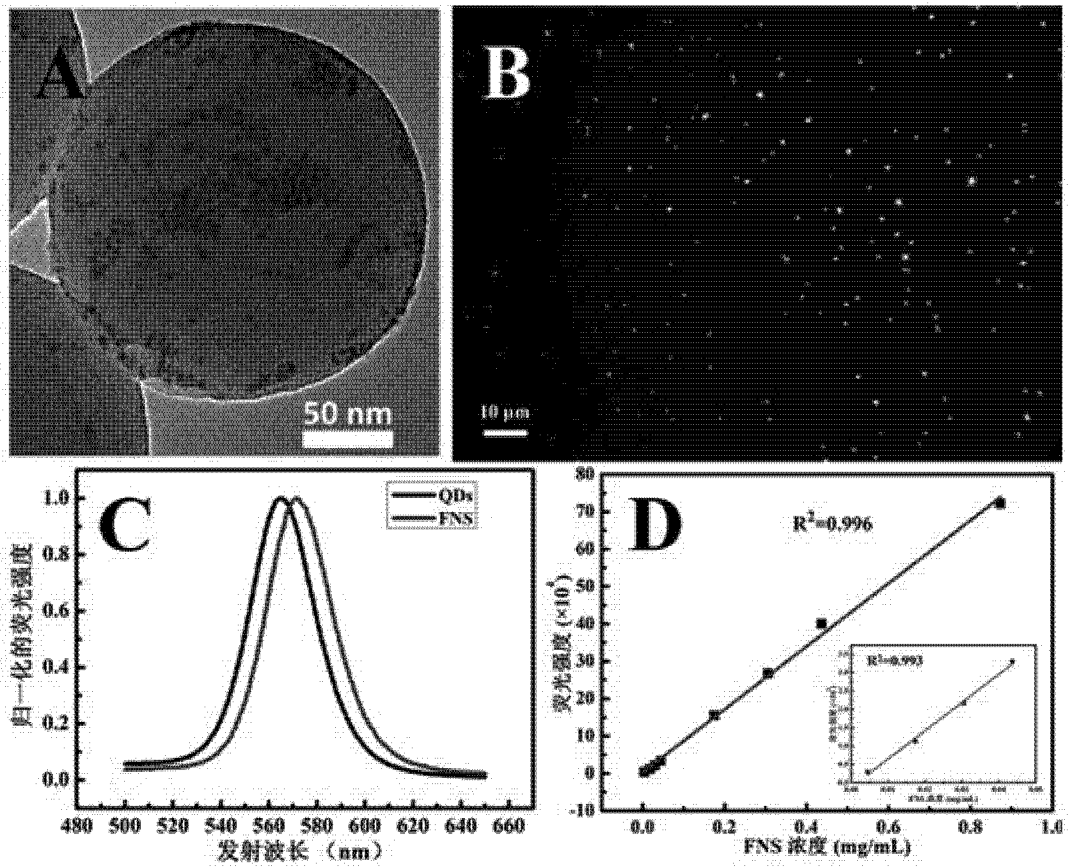


图 2

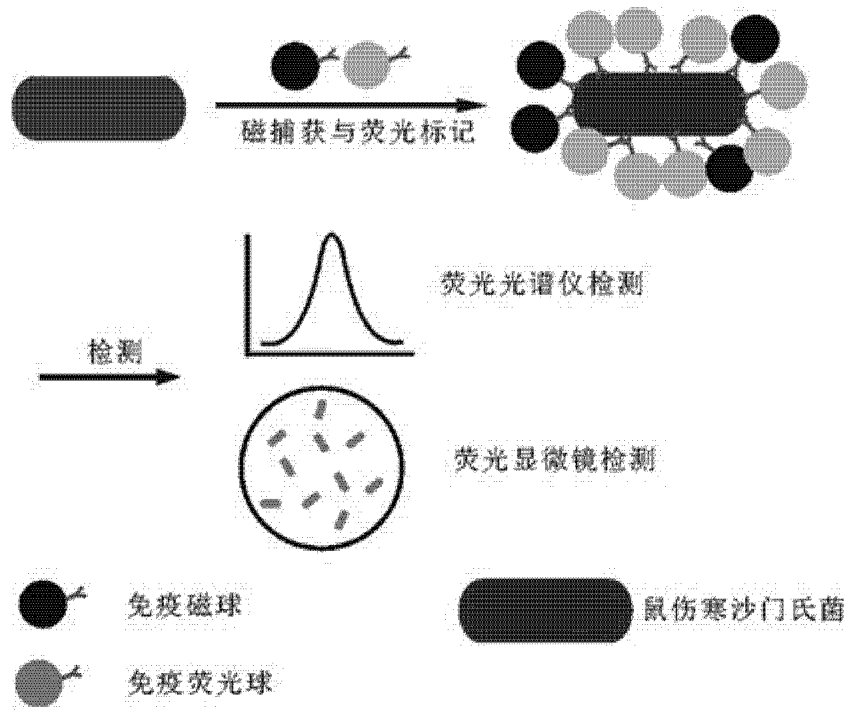


图 3

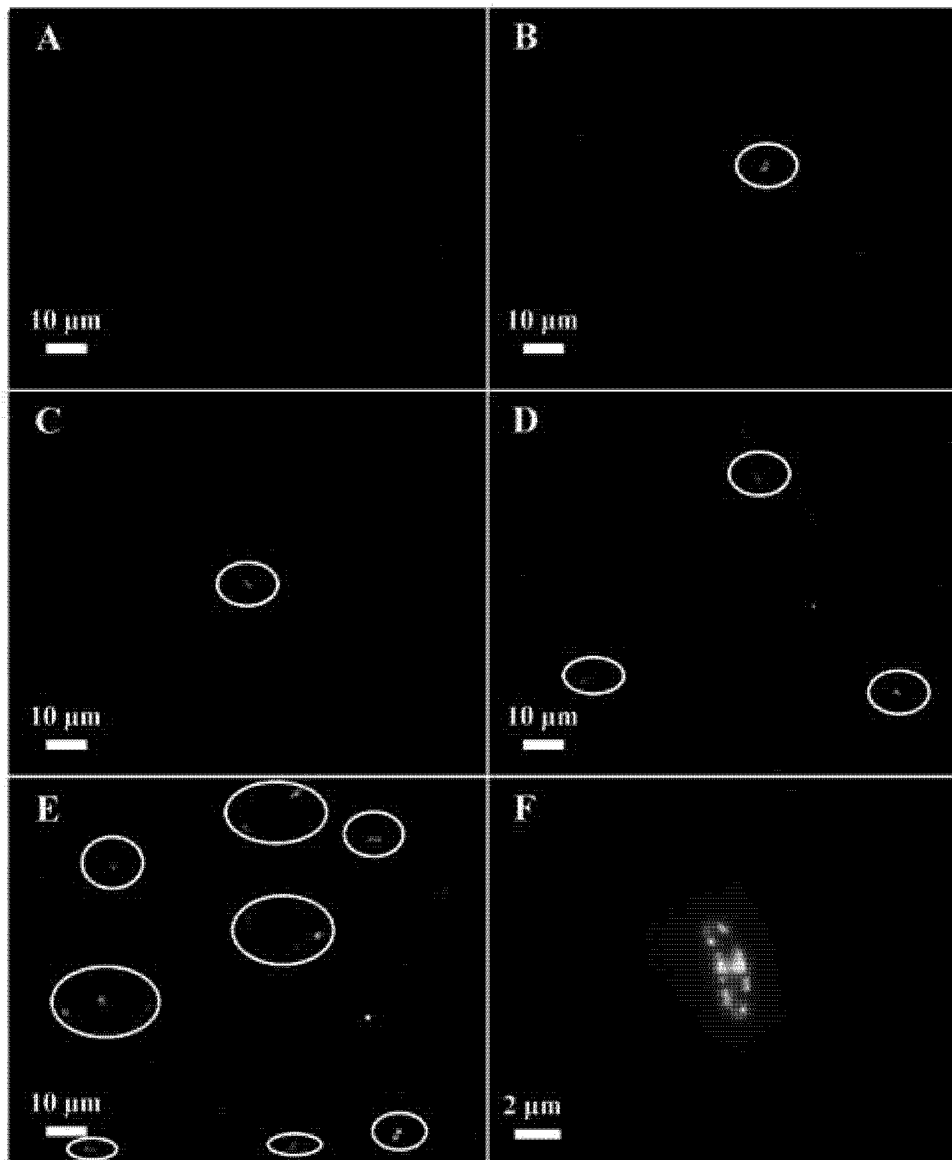


图 4

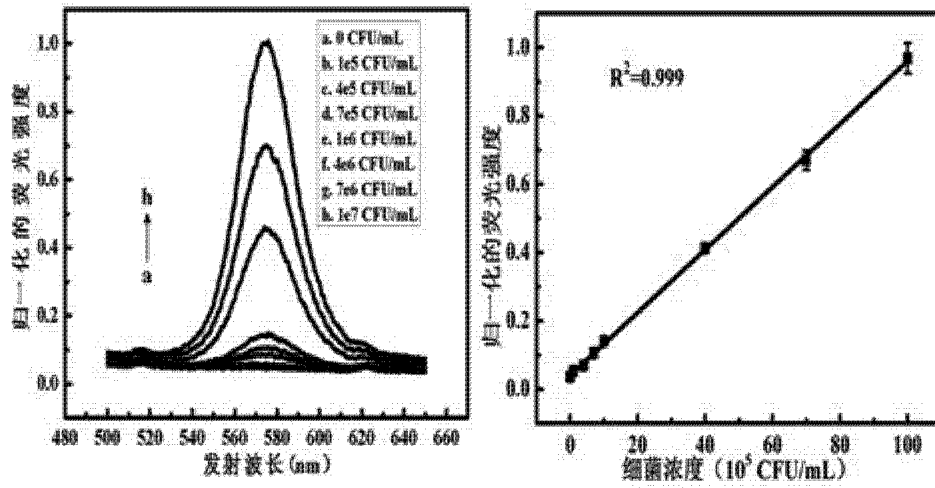


图 5

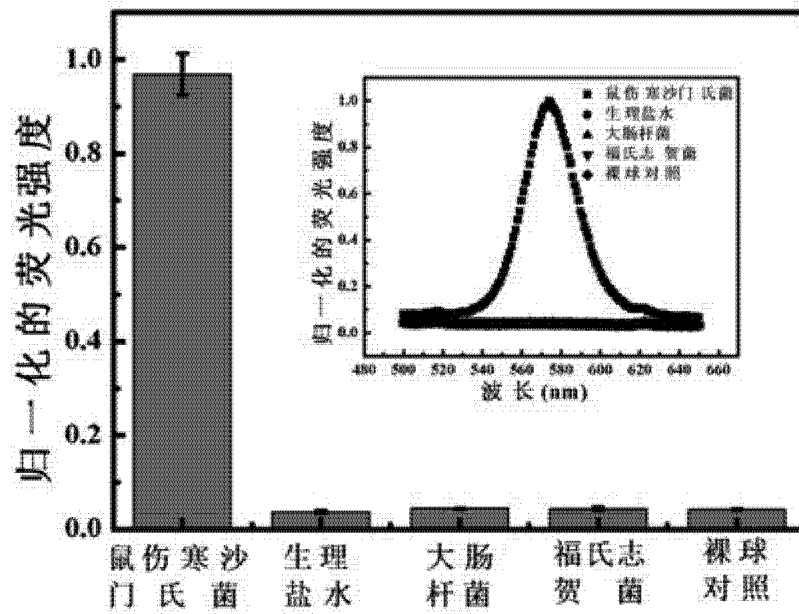


图 6

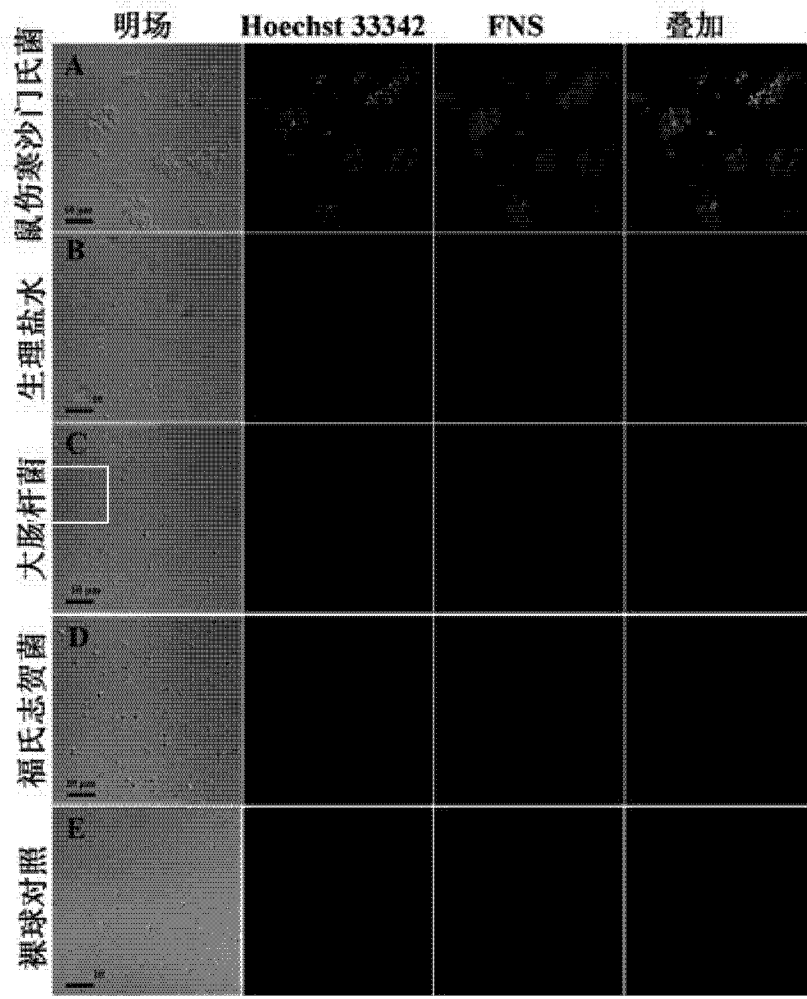


图 7

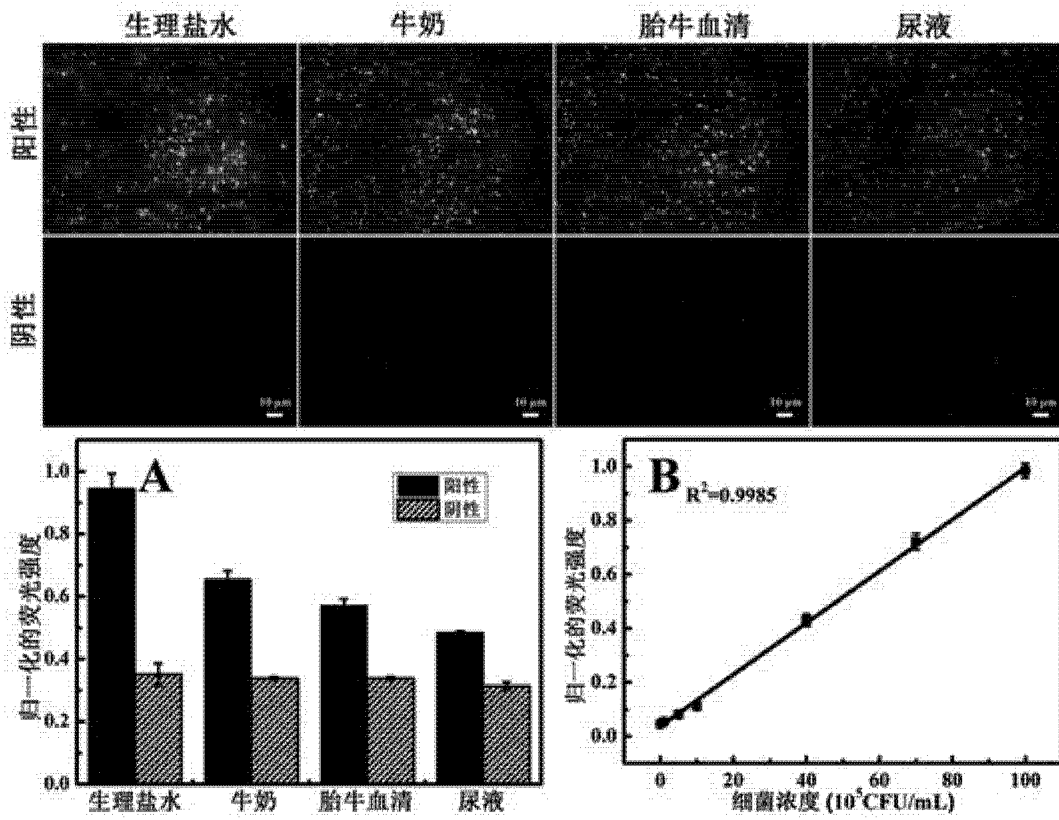


图 8

专利名称(译)	一种灵敏简便检测细菌的方法		
公开(公告)号	CN102841198B	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201210345823.9	申请日	2012-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	庞代文 温聪颖 胡军 张志凌 孙自镛		
发明人	庞代文 温聪颖 胡军 张志凌 孙自镛		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	汪俊锋		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102841198A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种细菌的检测方法，包括步骤：利用磁性纳米球和荧光纳米球偶联上鼠伤寒沙门氏菌抗体从而得到对鼠伤寒沙门氏菌靶向的免疫磁球和免疫荧光球，然后把它们同时投入到检测体系中，从而同时实现了对鼠伤寒沙门氏菌的磁捕获和荧光标记。通过荧光显微镜观察，可以检测到约10CFU/mL的鼠伤寒沙门氏菌；通过荧光光谱仪检测，得到很好的定量关系，线性范围为105~107CFU/mL，R2=0.9994。整个检测过程非常简单，灵敏度高，特异性强，可以在1.5h内完成检测。

