



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102928590 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 13

(21) 申请号 201210480081. 0

(22) 申请日 2012. 11. 22

(71) 申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 赵渝 姚玉婷 李先富 赵琨

陶珊珊

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有

限公司 31227

代理人 吴瑾瑜

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

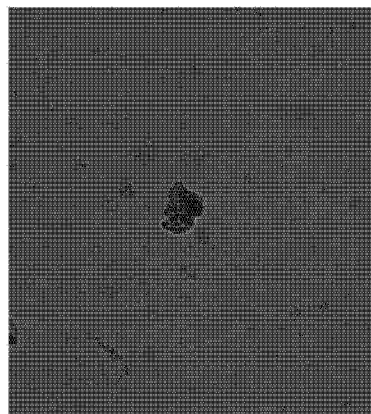
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒,本发明的试剂盒通过免疫功能化超顺磁性纳米粒子与沙门氏菌发生特异性结合,实现沙门氏菌的分离;通过免疫功能化的荧光量子点对沙门氏菌进行特异性可视化标记,实现快速识别目标菌。本发明中使用的磁珠、量子点和其它试剂均可事先制备,大大降低了检测时间。



1. 一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒,其特征在于,包括沙门氏菌分离试剂、沙门氏菌检测试剂、Buffer 1、Buffer 2;

所述沙门氏菌分离试剂为分散有免疫功能化磁珠的磷酸盐缓冲液,所述免疫功能化磁珠以 Fe_3O_4 核心,外层包裹二氧化硅的超顺磁性纳米磁珠颗粒,表面偶联兔抗沙门氏菌多克隆抗体;

所述沙门氏菌检测试剂为分散有免疫功能化荧光量子点的磷酸盐缓冲液,所述免疫功能化量子点为粒径为 5-10nm,发射峰为 530nm 的 CdTe 量子点颗粒表面偶联兔抗沙门氏菌多克隆抗体;

所述 Buffer 1 含有 pH=6.0, 0.01M 磷酸盐缓冲液;

所述 Buffer 2 含有 pH=7.2, 0.01M 磷酸盐缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的沙门氏菌分离试剂的制备方法包括如下步骤:

(1) 氨基化磁珠的制备:将 Fe_3O_4 纳米粒子分散于 TritonX-100、环己烷和正己醇的混合体系中,用氨水调整体系的 pH 至 8-10,滴加 TEOS 进行水解,得表面包裹二氧化硅的磁性纳米粒子,然后分散于甲醇和丙三醇的混合溶液(V 甲醇 :V 丙三醇 =3:1)中,再加入 AEAPS 反应 5-6h,得表面修饰氨基的纳米粒子,即氨基化磁珠;

(2) 连接抗体:将氨基化磁珠分散到磷酸缓冲液(0.01mol/mL, pH=7.4)中,加入终浓度为 1% 的戊二醛,室温搅拌反应 3-4h 后,用上述磷酸缓冲液洗去多余的戊二醛,加入沙门氏菌抗体继续反应 3-4h 后再加入 4°C 预冷的封闭液至终浓度为 1mg/mL, 4°C 反应 2h,固液分离,洗净多余抗体,得到的免疫化功能磁珠,将得到的免疫化功能磁珠重新分散于上述缓冲溶液中,4°C 保存备用;所述封闭液为含 10mg/mL 牛血清白蛋白的缓冲液。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的沙门氏菌检测试剂的制备方法包括如下步骤:

将表面修饰有羧基的 CdTe 量子点加入磷酸盐缓冲液和交联剂的混合溶液中,室温下涡旋 5-10min,再反应 15-20min 以活化量子点上的自由羧基;

加入保护剂,室温涡旋 15-20min,反应 60-70min;与兔抗沙门氏菌多克隆抗体上的末端氨基交联反应生成酰胺键,得到免疫化的量子点,分散于磷酸盐缓冲液(0.01mol/mL, pH=7.2)中,0~4°C 保存;

兔抗沙门氏菌多克隆抗体与量子点的摩尔比为 1:10 至 1:30;交联剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐;保护剂为 N-羟基丁二酰亚胺。

4. 权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,交联剂在混合溶液中的浓度为 10mg/mL 至 50mg/mL。

5. 权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,保护剂在混合溶液中的浓度为 5mg/mL 至 20mg/mL。

6. 一种使用权利要求 1-5 任意一项所述试剂盒快速检测沙门氏菌的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取沙门氏菌分离试剂加入到根据中国国家标准 GB4789.40-2010《食品微生物学检验》增菌处理后的样品中,35-37°C 振荡 2-3h,用 Buffer1 洗脱 2-3 次;

(2) 将经步骤(1)处理后的反应液与免疫功能化量子点混合,35-37°C 振荡 2-3h,再用

Buffer2 洗脱 3-4 次；

(3) 按上海地方标准 DB31/T455-2009 《食品中沙门氏菌、志贺氏菌量子点抗体快速筛选法》对步骤(2)所得产物进行检测。

一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物食源性致病菌检测领域,具体地说是一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒。

背景技术

[0002] 近年来食品安全事故频频发生。国家食品卫生监督局的一项统计显示,在1994年至2003年间,由微生物细菌引起的食源性致病菌感染占食品中毒的37%到52%之间,其中沙门氏菌、大肠杆菌、志贺氏菌引起的食源性致病菌感染分别约占22%、6%、2%,而其中的鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌0157、福氏志贺氏菌是食源性致病菌中传播最为广泛的3种致病菌。

[0003] 许多食源性疾病大多都是由食源性致病菌引起的。而在细菌性食物中毒中发病率最高的是由沙门氏菌引起的食物中毒。沙门氏菌属是肠杆菌科中重要的病原菌属,是最常见的人畜共患疾病之一。沙门氏菌为革兰氏阴性,其菌体大小为 $(0.6 \sim 0.9) \times (1 \sim 3)$ 微米,无芽胞,一般没有荚膜,除鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌之外,通常具有周身鞭毛。潜伏期由数小时到1-2周,引起畏寒,发热,恶心、呕吐,腹痛和腹泻等症状。

[0004] 常规的检测方法,如经典的微生物方法需要先对样品进行预处理,再选择性增菌,而后分离培养,最后进行生理生化鉴定和血清分型。由于操作烦琐、灵敏度低、特异性差,且传统的沙门氏菌检测方法从采样到鉴定要4-7d,才能得出明确的诊断结果。显然,这并不能满足人们对有效的监测、预防作用的期望。

[0005] 现在,沙门氏菌的检测方法趋于多样化,并不局限于微生物方法。通过物理、化学、生物等学科的结合,许多新型的检测方法陆续诞生。如分子生物学方法,这是对病原微生物中的核酸物质进行特征鉴定。其中包括扩增片段长度多态性技术(AFLP)、聚合酶链反应技术(PCR)、核酸探针、基因芯片技术、噬菌体裂解试验;免疫学方法,这是以抗原和抗体的特异性结合反应为基础,再辅以免疫放大技术来鉴别细菌,通过病原体刺激机体产生免疫球蛋白(抗体)的方法。其中包括酶联免疫吸附、斑点酶联免疫吸附、免疫磁性分离技术、免疫荧光标记、自动酶标免疫检测仪、自动酶标免疫检测仪;电阻抗法,它的检出率和可靠性都非常高。这些方法具有操作简便、快速、灵敏度高和特异性强等特点。虽然提高了检测的灵敏度,大大缩短了检测时间,但是都存在一定的缺陷。例如ELISA对试剂的选择性高,很难同时分析多种成分;对结构类似的化合物有一定程度的交叉反应;分析分子量很小的化合物或很不稳定的化合物有一定的困难。在致病菌的分子生物学检测方法方面,由于检样中存在死的致病菌、特异性DNA或RNA片段存在同源性和检样中存在不可培养微生物的情况等问题,常常造成PCR检测结果与常规方法相比,阳性率变高的现象,除存在不可培养微生物的情况外,均属于假阳性范畴。

[0006] 免疫磁性分离技术是将特异性抗体偶联在磁性颗粒表面,与样品中被检致病菌发生特异性的结合,载有致病菌的磁性颗粒在外加磁场的作用下,向磁极方向聚集,弃去检样混合液,使致病菌不断得到分离、浓缩。免疫磁性分离技术代替了常规的选择性增菌培养过

程,可特异有效地将目的微生物从样品中快速的分离出来。因此,可用来建立一种致病性沙门氏菌快速分离检验的体系。

[0007] 荧光半导体量子点有较长时间的荧光效应和较宽的激发光谱,能被任何短于发射峰的波长有效激发,发出稳定、均匀、狭窄的光谱。在同一波长光照下,不同尺寸的量子点有不同的发射峰。因其优良的光化学稳定性和光谱特性,免疫功能量子点能对样品中的目标致病菌进行特异性可视化标记,并在荧光条件下进行检测。

[0008] 为了食品安全,为了寻求更简便、快速、灵敏检测食源性致病菌沙门氏菌,研发了一种快速检测筛选沙门氏菌的方法。

发明内容

[0009] 本发明在于针对现有技术的不足,提出一种以免疫功能超顺磁性纳米粒子和免疫功能化的荧光量子点免疫识别目标微生物,实现特异性检测食源性致病菌沙门氏菌的快速检测沙门氏菌的方法。

[0010] 本发明的技术方案如下:

[0011] 一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒,其特征在于,包括沙门氏菌分离试剂、沙门氏菌检测试剂、Buffer 1、Buffer 2;

[0012] 所述沙门氏菌分离试剂为分散有免疫功能磁珠的磷酸盐缓冲液,所述免疫功能磁珠以 Fe_3O_4 核心,外层包裹二氧化硅的超顺磁性纳米磁珠颗粒,表面偶联兔抗沙门氏菌多克隆抗体;

[0013] 所述沙门氏菌检测试剂为分散有免疫功能荧光量子点的磷酸盐缓冲液,所述免疫功能量子点为粒径为 5-10nm,发射峰为 530nm 的 CdTe 量子点颗粒表面偶联兔抗沙门氏菌多克隆抗体;

[0014] 所述 Buffer 1 含有 pH=6.0,0.01M 磷酸盐缓冲液;

[0015] 所述 Buffer 2 含有 pH=7.2,0.01M 磷酸盐缓冲液。

[0016] 所述沙门氏菌分离试剂的制备方法包括如下步骤:

[0017] (1) 氨基化磁珠的制备:将 Fe_3O_4 纳米粒子分散于 TritonX-100、环己烷和正己醇的混合体系中,用氨水调整体系的 pH 至 8-10,滴加 TEOS 进行水解,得表面包裹二氧化硅的磁性纳米粒子,然后分散于甲醇和丙三醇的混合溶液(V 甲醇 :V 丙三醇 =3:1)中,再加入 AEAPS 反应 5-6h,得表面修饰氨基的纳米粒子,即氨基化磁珠;

[0018] (2) 连接抗体:将氨基化磁珠分散到磷酸缓冲液(0.01mol/mL,pH=7.4)中,加入终浓度为 1% 的戊二醛,室温搅拌反应 3-4h 后,用上述磷酸缓冲液洗去多余的戊二醛,加入沙门氏菌抗体继续反应 3-4h 后再加入 4℃ 预冷的封闭液至终浓度为 1mg/mL,4℃ 反应 2h,固液分离,洗净多余抗体,得到的免疫化功能磁珠,将得到的免疫化功能磁珠重新分散于上述缓冲溶液中,4℃ 保存备用;所述封闭液为含 10mg/mL 牛血清白蛋白的缓冲液。

[0019] 所述沙门氏菌检测试剂的制备方法包括如下步骤:

[0020] 将表面修饰有羧基的 CdTe 量子点加入磷酸盐缓冲液和交联剂的混合溶液中,室温下涡旋 5-10min,再反应 15-20min 以活化量子点上的自由羧基;

[0021] 加入保护剂,室温涡旋 15-20min,反应 60-70min;与兔抗沙门氏菌多克隆抗体上的末端氨基交联反应生成酰胺键,得到免疫化的量子点,分散于磷酸盐缓冲液(0.01mol/

mL, pH=7.2) 中, 0 ~ 4°C 保存;

[0022] 兔抗沙门氏菌多克隆抗体与量子点的摩尔比为 1:10 至 1:30; 交联剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐; 保护剂为 N-羟基丁二酰亚胺。

[0023] 所述交联剂在混合溶液中的浓度为 10mg/mL 至 50mg/mL; 所述保护剂在混合溶液中的浓度为 5mg/mL 至 20mg/mL。

[0024] 本发明还提供使用上述试剂盒快速检测沙门氏菌的方法, 包括如下步骤:

[0025] (1) 取沙门氏菌分离试剂加入到根据中国国家标准 GB4789.40-2010《食品微生物学检验》增菌处理后的样品中, 35-37°C 振荡 2-3h, 用 Buffer1 洗脱 2-3 次;

[0026] (2) 将经步骤(1)处理后的反应液与免疫功能化量子点混合, 35-37°C 振荡 2-3h, 再用 Buffer2 洗脱 3-4 次;

[0027] (3) 按上海地方标准 DB31/T455-2009《食品中沙门氏菌、志贺氏菌量子点抗体快速筛选法》对步骤(2)所得产物进行检测。

[0028] 本发明的方法通过免疫功能化超顺磁性纳米粒子与沙门氏菌发生特异性结合, 实现沙门氏菌的分离; 通过免疫功能化的荧光量子点对沙门氏菌进行特异性可视化标记, 实现快速识别目标菌。本发明方法中使用的磁珠、量子点和其它试剂均可事先制备, 大大降低了检测时间。

附图说明

[0029] 图 1 为氨基化磁珠与抗体的连接示意图。

[0030] 图 2 为免疫量子点-沙门氏菌-免疫磁珠在可见光下的镜检图。

[0031] 图 3 为免疫量子点-沙门氏菌-免疫磁珠在紫外光激发下的镜检图。

[0032] 图 4 为空白对照组在可见光下的镜检图。

[0033] 图 5 为空白对照组在紫外光激发下的镜检图。

具体实施方式

[0034] 下面结合实施例对本发明做进一步详细、完整地说明:

[0035] 实施例 1

[0036] 免疫功能化磁珠(沙门氏菌分离试剂)的制备

[0037] 1) 氨基化超顺磁性纳米磁珠的制备

[0038] 将 TritonX-100、环己烷、正己醇先按 4:1:1 比例混合, 搅拌均匀, 用超声使其形成透明稳定的反相微乳液体系。加入 2.5g 的 Fe_3O_4 粒子, 再次用超声使其分散均匀。将 30mL 浓氨水滴加到不断搅拌的微乳液体系中, 待浓氨水在体系中分散均匀之后, 继续向不断搅拌的体系中缓慢滴加 1.5mL TEOS, 整个加样时间持续 10h, 静置过夜。磁性分离后, 用乙醇来洗涤纳米粒子, 收集表面包裹二氧化硅的磁性纳米粒子 ($\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNPs)。随后将制备得到的 $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNPs 分散于甲醇/丙三醇(V 甲醇:V 丙三醇=3:1)混合溶液中。然后向搅拌体系加入 5mL AEAPS, 反应 5h 后进行离心分离, 用乙醇和蒸馏水洗涤 3~4 次, 得到了表面修饰氨基的纳米粒子 ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNPs)。

[0039] 2) 氨基化磁珠和兔抗沙门氏菌多克隆抗体的连接

[0040] 将 0.5mL 氨基化纳米磁珠分散到磷酸缓冲液中 (0.01mol/mL, pH=7.4), 加入终浓

度为 1% 的戊二醛, 室温搅拌反应 3h 后, 用上述磷酸缓冲液洗去多余的戊二醛。加入 1mg 的沙门氏菌抗体继续反应 3h 后再加入 4℃ 预冷的封闭液(含 10mg/mL 牛血清白蛋白的缓冲液)至终浓度为 1mg/mL, 4℃ 反应 2h。通过磁性分离洗净多余的抗体, 并将得到的免疫磁珠重新分散于缓冲溶液中 (0.01mol/mL, pH=7.4), 4℃ 保存备用。

[0041] 免疫功能化量子点(沙门氏菌检测试剂)的制备:

[0042] 将 60 μ L (2.6 $\times 10^{-5}$ mol) 的 CdTe 量子点(QDs) 加入到磷酸缓冲溶液 PBS (0.01mol/L, pH 7.2) 和 6mg EDC·HCL (最终浓度为 20mg/mL) 的混合液中, 混合液室温下涡旋 5min, 再反应 15-20min 以便让 QDs 上的自由羧基完全活化;

[0043] 将 1.5mg NHS (最终浓度为 5mg/mL) 加入到上面的混合液中, 室温涡旋 15min, 反应 60min; 在这步中, QDs 上的自由羧基和 NHS 上的羟基酯化反应生成半稳定的具有胺活性的 NHS (羟基丁二酰胺)-酯;

[0044] 接下来 120 μ L 抗体(2mg/mL) 加到体系中, 涡旋至少 2h, 没反应的抗体分子最后通过超滤浓缩离心管去除掉, QDs 和抗体通过强烈的共价键结合在一起, 最后收集产品, 0~4℃ 保存。

[0045] 实施例 2 用试剂盒对脱脂奶粉中的致病性沙门氏菌进行检测

[0046] Buffer 1

[0047] NaCl 8.00g/L, Na₂HPO₄ 1.44g/L, KCl 0.2g/L, KH₂PO₄ 0.24g/L, pH 值为 6.0。

[0048] Buffer 2

[0049] NaCl 8.00g/L, Na₂HPO₄ 1.44g/L, KCl 0.2g/L, KH₂PO₄ 0.24g/L, pH 值为 7.2。

[0050] 本实例包括以下步骤:

[0051] (1) 根据中国国家标准的食品卫生微生物检验(GB4789.40-2010), 首先取 100g 奶粉到 900mL 的缓冲蛋白胨水中, 分成两份, 一份作为实验组, 加入预先培养好的沙门氏菌, 另一份作为空白对照, 不作处理。

[0052] (2) 分别取 100 μ L 免疫功能化磁珠加入到两份 2mL 处理后的样品中, 于磁力架上 35-37℃ 振荡 2-3h, 用 Buffer1 洗脱 2-3 次,

[0053] (3) 将(1)中 200 μ L 处理后的反应液与 50 μ L 免疫功能化量子点混合, 于磁力架上 35-37℃ 振荡 2-3h, 用 Buffer2 洗脱 3-4 次,

[0054] (4) 按上海地方标准 DB31/T455-2009, 将(3)中的最终产物, 置于荧光显微镜下, 先用低倍物镜扫视整个标本, 再换较高倍物镜继续观察, 选择盖玻片上、中、下均匀分布的 3 个视野, 记录样本中出现的绿色荧光亮度与菌量等情况。

[0055] 菌体量子点标记情况表示如下:

[0056] + : 任一视野中可见绿色闪亮荧光, 且菌体周围及中心轮廓清晰。

[0057] + / (-) : 任一视野中绿色较弱荧光, 且菌型尚可见;

[0058] - : 3 个或以上视野无荧光, 且菌型模糊;

[0059] 阳性及可疑阳性结果: 菌体绿色荧光亮度为+, 菌体形态特征符合沙门菌, 且任一视野中均能检出有绿色荧光标记的菌体;

[0060] 阴性结果: 3 个或以上视野无红色与绿色荧光, 且菌形模糊为阴性。绿色-。表示样本中不含沙门氏菌。

[0061] (5) 对阳性及可疑阳性进行纯(化)分离、生化学实验和血清学实验。

[0062] (6) 报告结果。

[0063] 结果报告：

[0064] 在加入沙门氏菌的实验组中，检测结果为阳性，即菌体绿色荧光亮度为+，菌体形态特征符合沙门菌。从图 2、图 3 中可以看出，被免疫磁珠分离出的沙门氏菌可被免疫量子点特异性结合。从图 4、图 5 中可以看出，在未加入沙门氏菌的空白对照样品中，检测结果为阴性，即 3 个或以上视野无红色与绿色荧光。绿色-。表示样本中不含沙门氏菌。

[0065] 以上所述为本发明的较佳实施例而已，但本发明不应该局限于该实施例所公开的内容。所以凡是不脱离本发明所公开的精神下完成的等效或修改，都落入本发明保护的范围内。

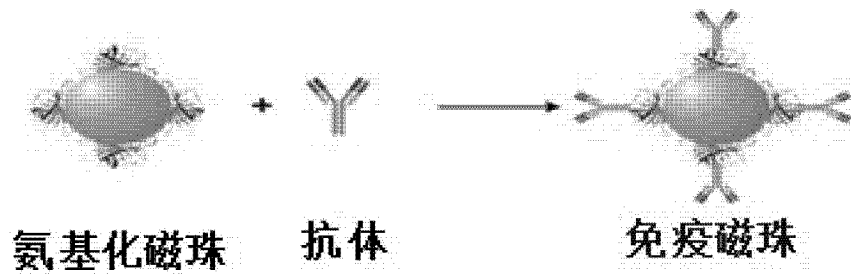


图 1

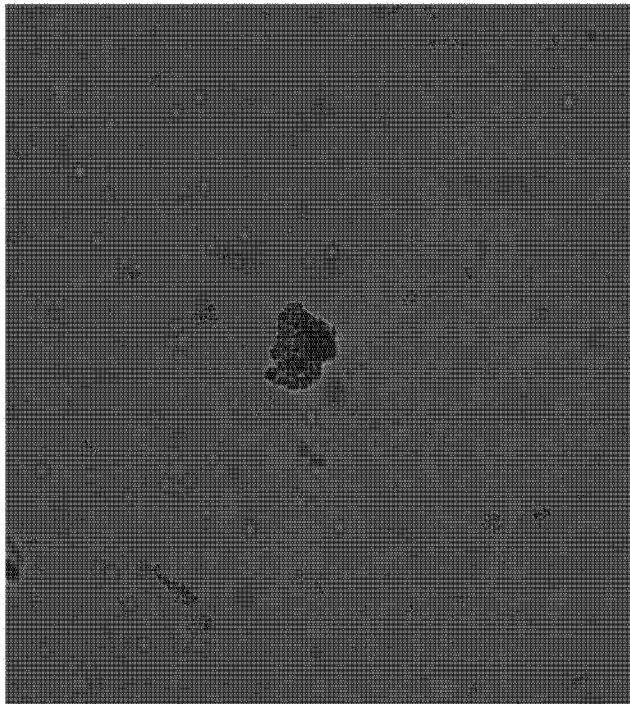


图 2

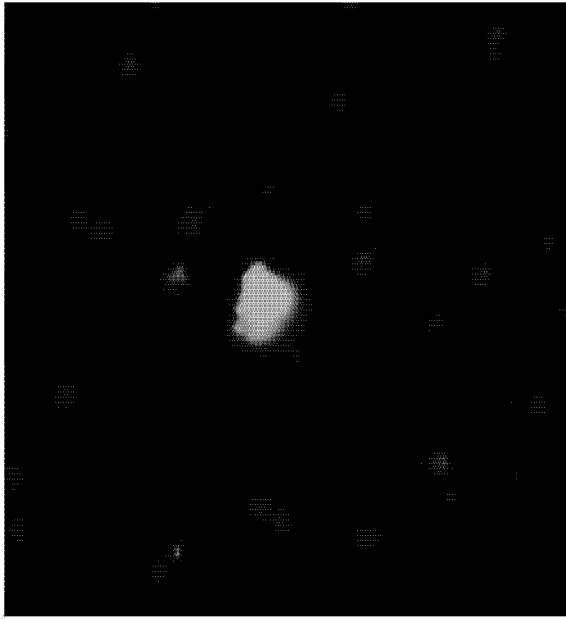


图 3

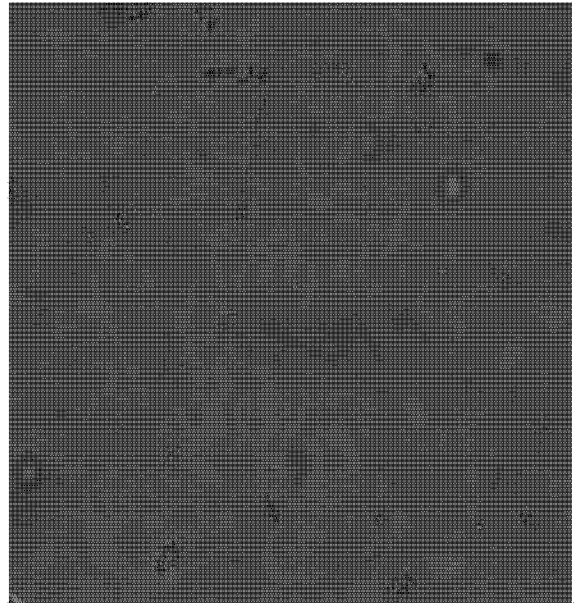


图 4



图 5

专利名称(译)	一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102928590A	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201210480081.0	申请日	2012-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	赵渝 姚玉婷 李先富 赵琨 陶珊珊		
发明人	赵渝 姚玉婷 李先富 赵琨 陶珊珊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测沙门氏菌的荧光量子点筛选分离检测试剂盒，本发明的试剂盒通过免疫功能化超顺磁性纳米粒子与沙门氏菌发生特异性结合，实现沙门氏菌的分离；通过免疫功能化的荧光量子点对沙门氏菌进行特异性可视化标记，实现快速识别目标菌。本发明中使用的磁珠、量子点和其它试剂均可事先制备，大大降低了检测时间。

