



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103320503 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201210078055. 5

审查员 吴希哲

(22) 申请日 2012. 03. 22

(73) 专利权人 上海市肺科医院

地址 200433 上海市杨浦区政民路 507 号

(72) 发明人 杨华 胡忠义 秦莲花 刘忠华
马慧

(74) 专利代理机构 上海申新律师事务所 31272
代理人 刘懿

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 15/10(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

C12R 1/32(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

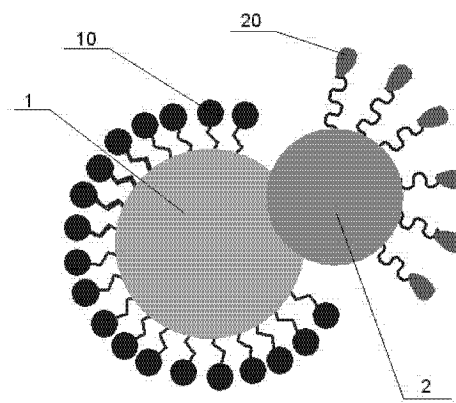
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

检测结核杆菌的纳米材料探针系统及检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测结核杆菌的纳米探针系统,以及所述纳米探针系统的制备方法,并在此基础上,提出了一种检测结核杆菌的方法。所述纳米探针系统包括集成纳米材料探针和免疫磁珠,集成纳米材料探针和免疫磁珠通过特异性配体与结核杆菌菌体结合形成三元复合体,利用磁场作用快速、准确分离及浓缩结核杆菌和纳米集成探针,然后检测集成探针上的荧光信号,通过磁富集和集成纳米探针上多肽位点与荧光量子点间的数量差可显著放大检测信号,实现结核杆菌的准确、高灵敏、特异检测。



1. 一种用于检测结核杆菌的纳米探针的制备方法,其特征在于,步骤包括:

步骤 1,制备氧化硅粒子;

步骤 2,提供水 / 油两相体系,将氧化硅粒子稳定在水 / 油两相界面处;

步骤 3,油相中溶解硅烷偶联剂,加碱催化,将硅烷偶联剂修饰在氧化硅的表面,得到改性氧化硅粒子;

步骤 4,在所述改性氧化硅粒子存在条件下,进行烯烃聚合,并诱导聚烯烃在改性氧化硅粒子表面成核、生长,在聚合过程中原位引入羧基到聚合物表面;步骤 5,改性氧化硅粒子表面上,没有聚合物成核生长的部分结合荧光染料,得到集成纳米材料;

步骤 6,将所述集成纳米材料中聚合物颗粒的部分表面基团进行活化,然后与结核杆菌特异性结合多肽或核酸通过偶联反应连接。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述聚烯烃是乙烯、苯乙烯、丙烯其中的一种或任意多种在所述改性氧化硅粒子存在条件下,进行聚合得到的聚烯烃。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述水 / 油两相体系中,所述油相为不溶于水的有机溶剂。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述荧光染料为 FITC 和 / 或 TRITC。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述结核杆菌特异性结合多肽序列为 WHSGTPH,其中,W 为色氨酸、H 为组氨酸、S 为丝氨酸、G 为甘氨酸、T 为苏氨酸、P 为脯氨酸。

6. 一种如权利要求 1 所述方法制备的用于检测结核杆菌的纳米探针,其特征在于,包括集成纳米材料,所述集成纳米材料为氧化硅颗粒和聚合物颗粒组成的二元复合体系,聚合物颗粒表面与特异性结合多肽或核酸相结合,氧化硅的表面结合荧光物质。

7. 一种用于检测结核杆菌的纳米探针系统的制备方法,其特征在于,步骤包括:如权利要求 1 所述方法制备纳米探针,制备免疫磁珠,其中,制备免疫磁珠的方法包括:

高温高压条件下,用还原剂将三价铁离子还原,制备得到磁性微球,然后用氧化硅作为壳层,包被所述磁性微球,用带有氨基的硅烷偶联剂与氧化硅表面的羟基进行缩聚,将氨基修饰到微球表面,然后用酸酐与氨基反应,得到表面带有羧基的磁性微球;将所述纳米微球的羧基用 EDC 和 NHS 活化,活化后的羧基与特异性针对结核杆菌的多抗上的氨基进行反应,将所述多抗偶联于磁性纳米微球表面。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,还原三价铁离子的反应条件为:温度 160 ~ 350℃,压力 1 ~ 5 个大气压

9. 一种用于检测结核杆菌的纳米探针系统,其特征在于,包括权利要求 1 中所述方法制备的纳米探针,以及免疫磁珠,所述免疫磁珠包括磁性纳米微球,所述磁性纳米微球包括铁磁性核,以及包被在外部的氧化硅壳层,氧化硅外层通过羧基与多抗偶联。

10. 一种检测结核杆菌的方法,其特征在于,步骤包括:

步骤 1,提供权利要求 9 中所述的免疫磁珠和集成纳米探针,并分别处理得到免疫磁珠悬液和集成纳米探针悬液,将检测标本处理成为细菌悬液;

步骤 2,将所述免疫磁珠悬液和集成纳米探针悬液与细菌悬液混合;

步骤 3,磁力架吸附,将三元复合物沉淀,然后进行荧光显微镜观察、和 / 或分光光度计计数;如果显微镜下观察到荧光量子点信号,则检测标本为结核杆菌或含有结核杆菌,否则

不是结核杆菌或没有结核杆菌。

检测结核杆菌的纳米材料探针系统及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种纳米材料,尤其涉及一种用于检测结核杆菌的磁性纳米微球、纳米材料、及其制备方法、以及基于磁性纳米微球和集成纳米材料检测结核杆菌的方法。

背景技术

[0002] 结核病是严重危害人类健康的传染病,也是全球关注的公共卫生问题和社会问题。早期诊断对于结核病的发现和治疗十分重要,目前结核病实验室诊断方法主要有三大类,即细菌学检查、分子生物学检查和免疫学检查,其中细菌学检查(包括涂片法和培养法)是结核病诊断的“金标准”。

[0003] 然而现有的涂片检查,包括直接涂片法、集菌法、萋-尼抗酸染色或荧光染色,虽然简便、快速,但灵敏度低,细菌量 > 5000 条/ml才能检出;培养法虽灵敏度高于涂片法,但需时过长(1~2个月),且阳性率也只有30~40%,快速培养仪检测系统虽可将培养时间缩短至3~4周,但需特殊仪器设备和试剂,费用昂贵,且检测时间仍然较长。

[0004] 由于“金标准”检测方法灵敏度低,或耗时长,大量活动性结核病人未能被及时发现,加剧了结核病在人群中的传播。因此,结核病实验室诊断新技术的研究,尤其是快速简便的细菌学检测新技术的开发,一直是结核病研究的热点之一,对降低结核病疫情、有效控制其流行与传播具有重要意义。

[0005] 从上世纪70年代科学家提出纳米科技的构想至今,纳米技术在近几十年间得到飞速发展,已经成为世界各国发展科技的重点研究内容之一。纳米技术在生物医学领域的应用,已然成为21世纪未来发展的必然。各种功能化纳米材料在肿瘤诊断、组织工程、生物标记、生物传感、药物载体等方面已显示出巨大的优势。同时,在感染性疾病方面,纳米材料也已用于病原菌的快速痕量检测、捕获和分离。其中最直接和常用的方法就是将针对某一待检测目标的特异性标志物分子连接到纳米材料表面形成纳米尺度的靶向探针;通过探针与靶标物的抗体-抗原或者配体-受体的特异性作用来实现探针对于靶标物的识别和结合,然后利用纳米粒子的各种光、电、磁、声特性来进行高效的检测。

[0006] 磁性纳米材料包括磁性纳米颗粒(常见如 Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)或/和磁性颗粒与其它材料形成的复合材料。各种生物分子(如:蛋白质、DNA或多肽)均可固定在磁性纳米材料表面,获得功能化磁性纳米材料,广泛用于生物检测与生物分离中,其优势在于:(1)在检测步骤中,以外磁场分离取代色谱、离心或过滤等分离操作,既节省了时间,又可避免使用价格昂贵的仪器设备;(2)可以对目标菌进行浓缩、富集,提高目标菌的检测样品浓度。Duan HL等将修饰了抗体的磁性葡聚糖纳米颗粒用于大肠杆菌0157:H7的检测,在15min之内就能检测到低至 10cells/ml 的目标菌,在含有 10^8cells/ml 非目标菌的混合菌样中,仍可获得 $10\sim 100\text{cells/ml}$ 的灵敏度,而且具有很好的选择性。

[0007] 虽然纳米技术在生物医学领域已经得到了广泛的应用,但是其在结核病检测方面的研究报道并不多。2008年, Lee等(Lee H, Sun E, Ham D, Weissleder R., Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells, *Nat. Med.*, 2008, 14(8) :

869 - 874) 构建了一种基于磁性纳米颗粒的核磁共振生物传感器,可用于快速、定量检测生物靶分子,包括结核杆菌。当磁性纳米颗粒与生物靶分子结合,作为近距离的传感器,可以利用纳米粒子的聚集,来改变核磁共振的检测信号,从而实现对目标分子的快速、灵敏检测。

[0008] 国内,有研究者(Qin D、He X、Wang K、Tan W, Using uorescent nanoparticles and SYBR Green I based two-color ow cytometry to determine Mycobacterium tuberculosis avoiding false positives, *Biosensors and Bioelectronic*, 2008, 24(4) : 626 - 631) 将基于硅壳荧光纳米颗粒的免疫荧光分析法与流式细胞术相结合,发展了一种改良双色流式细胞术用于结核杆菌的检测。采用 RuBpy 硅壳纳米颗粒标记的抗体对样品中目标结核杆菌进行免疫荧光染色后,以核酸染料 SYBR Green I 对样品中细菌的核酸进行染色,从而将细菌与样品中的碎片杂质区分,通过多参数流式细胞术对样品中双染色的结核杆菌进行测定与分析。该方法结合了免疫荧光技术快速、高特异性的特点和荧光纳米标记技术信号放大的作用,比基于 FITC 标记的传统流式细胞术具有更高的灵敏度。还有研究者以结核杆菌基因组 DNA 为靶分子,应用 DNA 电化学传感器和双标记的金颗粒,形成三明治状复合物来进行检测,与 PCR 分析结果一致。

[0009] 最近, Liandris E 等(Liandris E、Gazouli M、Andreadou M、Sechi LA、Rosu V、Ikonomopoulos J, Detection of Pathogenic Mycobacteria Based on Functionalized Quantum Dots Coupled with Immunomagnetic Separation, *PLoS one*, 2011, 5(6) : e20026) 应用功能化的荧光量子点和纳米磁珠进行分枝杆菌的检测。检测时,首先利用耦联分枝杆菌属特异性抗体的磁珠与细菌结合,通过外磁场除去未结合的细菌后,加入抗分枝杆菌肝磷脂结合红细胞凝集素单抗,与细菌结合后,再引入生物素化二抗与单抗结合,最后加入链亲和素化的量子点与二抗结合,通过检测量子点的荧光信号达到检测结核杆菌的目的。结果表明,该方法的检测下限为 10^4 cells/ml,如果用荧光分光光度计检测荧光信号,检测下限为 10^3 cells/ml。然而,虽然该研究利用生物素亲和素的放大作用,试图提高检测灵敏度,但即使用仪器来检测荧光信号,其检测下限也仅达到 1000 条菌,略高于涂片的检测下限,却并未达到培养的检测效果,而且需要加入 4 种不同的结合分子,影响因素较多,操作步骤繁琐,并未将纳米技术的优势充分体现出来。

发明内容

[0010] 为了将纳米技术更好的应用于结核杆菌的检测,本发明提供了一种用于检测结核杆菌的磁性纳米微球、纳米材料、及其应用和制备方法,以及一种基于磁性纳米微球和集成纳米材料的结核杆菌检测方法。

[0011] 本发明的第一个方面是提供一种磁性纳米微球的制备方法,步骤包括:高温高压条件下,用还原剂将三价铁离子还原,制备得到磁性微球,然后用氧化硅作为壳层,包被所述磁性微球,用带有氨基的硅烷偶联剂与氧化硅表面的羟基进行缩聚,将氨基修饰到微球表面,然后用酸酐与氨基反应,得到表面带有羧基的磁性微球(功能化的纳米微球)。

[0012] 其中,所述三价铁离子来自三价铁离子的无机酸盐、有机羧酸盐、或其氧化物,无机酸盐如氯化铁、硫酸铁、硝酸铁、磷酸铁、溴化铁等。

[0013] 其中,所述还原剂优选为乙二醇、丙三醇、异丙醇等,既可以作为还原剂,同时又作

为溶剂。

[0014] 其中,在还原三价铁离子的过程中,根据需要还可以加入稳定剂,所述稳定剂如柠檬酸钠、柠檬酸钾、柠檬酸或者丁二酸、丁二酸钠、丁二酸钾等。

[0015] 其中,还原三价铁离子的反应条件优选为:温度 160~350℃,压力 1~5 个大气压,更优选为:温度 160~250℃,如 200℃、220℃、240℃、180℃,压力 1~3 个大气压。

[0016] 氧化硅包被磁性微球的方法可以是本领域技术人员已知的任一方法,本发明优选为溶胶-凝胶法。

[0017] 本发明的第二个方面是提供一种上述方法制备的磁性纳米微球,包括铁磁性核,以及包被在外部的氧化硅壳层,氧化硅外层带有羧基。

[0018] 本发明的第三个方面是提供一种由上述磁性纳米微球制备免疫磁珠的方法,步骤包括,将所述纳米微球的羧基用 EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和 NHS (N-羟基琥珀酰亚胺酯)活化,活化后的羧基与特异性针对结核杆菌的多抗上的氨基进行反应,将所述多抗偶联于磁性纳米微球表面。

[0019] 本发明的第四个方面是提供一种上述方法制备的免疫磁珠,包括磁性纳米微球,所述磁性纳米微球包括铁磁性核,以及包被在外部的氧化硅壳层,氧化硅外层通过羧基与多抗偶联。

[0020] 本发明的第五个方面是提供一种集成纳米材料的制备方法,步骤包括:

[0021] 步骤 1,制备氧化硅粒子;

[0022] 步骤 2,提供水/油两相体系,将氧化硅粒子稳定在水/油两相界面处;

[0023] 步骤 3,油相中溶解硅烷偶联剂,加碱催化,将硅烷偶联剂修饰在氧化硅的表面,得到改性氧化硅粒子;

[0024] 步骤 4,在所述改性氧化硅粒子存在条件下,进行烯烃聚合,并诱导聚烯烃在改性氧化硅粒子表面成核、生长,在聚合过程中原位引入羧基到聚合物表面。

[0025] 本发明第五个方面所述的方法中,还可以包括:

[0026] 步骤 5,改性氧化硅粒子表面上,没有聚合物成核生长的部分结合荧光染料。

[0027] 本发明的第六个方面是提高一种上述方法制备的集成纳米材料,所述集成纳米材料为氧化硅颗粒和聚合物颗粒组成的二元复合体系,聚合物颗粒表面连接有羧基,其中,氧化硅颗粒表面还可以结合有荧光染料。

[0028] 氧化硅和聚合物是一个稳定的复合体,且各自具有独立的表面和表面化学基团,避免了基团间的相互干扰,同时发挥两种表面基团的功能。集成系统中聚合物部分表面基团与结核杆菌特异性结合多肽或核酸结合,而氧化硅部分表面固定了大量的荧光物质,从而建立基于集成纳米系统的探针,同时具有多位点靶向待检测的结核杆菌和信号放大的作用。

[0029] 其中,所述烯烃可以是乙烯、苯乙烯、丙烯等,可以是其中的一种或任意多种;相应地,所述聚烯烃或聚合物为聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯等。

[0030] 其中,所述荧光染料优选为 FITC 和 / 或 TRITC。

[0031] 所述集成纳米材料中,荧光染料优选为通过氨基与氧化硅粒子表面结合;相应地,其制备方法为:改性氧化硅粒子表面上,没有聚合物成核生长的部分进行氨基修饰,然后将荧光染料通过氨基结合在粒子表面。

[0032] 其中,所述水/油两相体系中,所述油相为不溶于水的有机溶剂,并优选为芳香烃有机溶剂,如苯、甲苯、二甲苯、氯苯、溴苯等;但也可以是脂肪烃溶剂,如二氯甲烷、氯仿、二氯乙烷等。

[0033] 本发明的第七个方面是提供一种由上述集成纳米制备集成纳米探针的方法,步骤包括,将本发明第五个方面中所述方法制备的集成纳米材料中聚合物颗粒的部分表面基团进行活化,然后与结核杆菌特异性结合多肽或核酸通过偶联反应进行连接。

[0034] 本发明的第八个方面是提供一种由上述集成纳米制备集成纳米探针,包括上述的集成纳米材料,所述集成纳米材料为氧化硅颗粒和聚合物颗粒组成的二元复合体系,聚合物颗粒表面与结核杆菌特异性结合多肽相结合,氧化硅的表面结合荧光物质。

[0035] 本发明的第九个方面是提供一种用于检测结核杆菌的纳米探针系统,包括上述的免疫磁珠和集成纳米探针。

[0036] 本发明上述内容中,所述结核杆菌特异性结合多肽已在申请人公开的专利(申请号 200910195820.X)中进行了描述,并优选为如下序列的结核杆菌特异性结合多肽(本申请中简称为 H8):

[0037] WHSGTPH (即 Trp His Ser Gly Thr Pro His)

[0038] 其中,W 为色氨酸、H 为组氨酸、S 为丝氨酸、G 为甘氨酸、T 为苏氨酸、P 为脯氨酸。

[0039] 本发明的第十个方面是提供一种所述用于检测结核杆菌的纳米探针系统的制备方法。通过本发明上述第一、第三、第五、第七和第九方面的方法分别制备免疫磁珠和集成纳米探针。

[0040] 本发明的第十一个方面是提供一种检测结核杆菌的方法,步骤包括:

[0041] 步骤 1,提供上述的免疫磁珠和集成纳米探针,并分别处理得到免疫磁珠悬液和集成纳米探针悬液,将检测标本处理成为细菌悬液;

[0042] 步骤 2,将所述免疫磁珠悬液和集成纳米探针悬液与细菌悬液混合;

[0043] 步骤 3,磁力架吸附,将三元复合物沉淀,然后进行荧光显微镜观察、和/或分光光度计计数;如果显微镜下观察到荧光量子点信号,则检测标本为结核杆菌或含有结核杆菌,否则不是结核杆菌或没有结核杆菌。

[0044] 本发明将特异性针对结核杆菌的多抗及通过噬菌体展示技术筛选获得特异性结合结核杆菌菌体的多肽配体分子,通过化学偶联方法分别连接到纳米磁珠和具有信号放大作用的集成纳米材料上得到两种免疫探针,两种探针通过特异性配体与结核杆菌菌体结合形成三元复合体,利用磁场作用快速、准确分离及浓缩结核杆菌和纳米集成探针,然后检测集成探针上的荧光信号,通过磁富集和集成纳米探针上多肽位点与荧光染料间的数量差可显著放大检测信号,实现痕量结核杆菌的准确、高灵敏检测。

[0045] 本发明上述的检测结核杆菌的纳米探针系统以及检测结核杆菌的方法,不受其它常见呼吸道病菌的干扰,可准确灵敏的对结核杆菌进行鉴定和检测,为结核感染的检测、结核药物的筛选、结核杆菌耐药性的检测、结核杆菌的鉴定等领域提供了一种新的检测产品和方法。

附图说明

[0046] 图 1 为本发明集成纳米材料氧化硅和聚合物粒子示意图;

- [0047] 图 2 为本发明集成纳米探针结构示意图；
- [0048] 图 3 为采用本发明集成纳米探针和免疫磁珠进行结核杆菌检测的流程图；
- [0049] 图 4 为本发明检测结核杆菌显微镜观察结果。

具体实施方式

[0050] 本发明提供了一种用于检测结核杆菌的纳米探针系统,以及所述纳米探针系统的制备方法,并在此基础上,提出了一种检测结核杆菌的方法。

[0051] 所述纳米探针系统包括集成纳米材料探针和免疫磁珠,集成纳米材料探针和免疫磁珠通过特异性配体与结核杆菌菌体结合形成三元复合体,利用磁场作用快速、准确分离及浓缩结核杆菌和纳米集成探针,然后检测集成探针上的荧光信号,通过磁富集和集成纳米探针上多肽位点与荧光量子点间的数量差可显著放大检测信号,实现结核杆菌的准确、高灵敏检测。

[0052] 所述特异性针对结核杆菌的多抗已有商业化产品,如:结核杆菌多克隆抗体 PA1-7260 (Thermo Scientific 公司),PA1-7231 (Thermo Scientific 公司),ab905 (Abcam 公司)。

[0053] 本发明中,可用的结核杆菌特异性结合多肽已在申请人公开的专利(申请号 200910195820.X)中进行了描述。

[0054] 下面通过具体实施例对本发明进行详细的介绍和描述,以使更好的理解本发明内容,但是应当理解的是,下述实施例并不限制本发明的范围。

[0055] 实施例 1

[0056] 步骤 1,制备功能化纳米磁珠

[0057] 在柠檬酸钠存在条件下,用乙二醇将三价铁离子还原,并在 200℃和 2 个大气压下反应制备得到磁性微球。

[0058] 采用溶胶-凝胶法制备氧化硅壳层,将所述磁性微球包被,然后利用氧化硅表面的羟基,与带有氨基的硅烷偶联剂羧基,将氨基修饰到磁性微球表面。

[0059] 再用酸酐与氨基反应,得到表面羧基化的磁性微球。

[0060] 步骤 2,制备集成纳米材料

[0061] 先采用溶胶-凝胶法合成氧化硅粒子,冻干得到粉末,氧化硅粒子通过搅拌作用稳定在水/甲苯两相界面处,然后在甲苯相中溶解硅烷偶联剂,通过加碱催化,将硅烷偶联剂修饰在氧化硅的部分表面上,然后在有改性的氧化硅粒子存在下进行苯乙烯的乳液聚合,诱导聚合物在改性过的氧化硅表面成核、增长,聚合过程中原位引入羧基到聚合物表面。再对氧化硅剩余表面进行氨基化修饰,再通过氨基,将大量荧光染料如红色荧光物质 FITC、TRITC 等结合在纳米系统上,就得到了可以与多肽连接,并且具有显著荧光信号的材料。

[0062] 得到的集成纳米材料如图 1 所示,包括氧化硅粒子 1 和 PS(聚苯乙烯)乳胶粒 2 组成的二元复合体系,氧化硅粒子 1 与 PS 乳胶粒 2 数量可以是 1:1,但并不限定为 1:1。

[0063] PS 乳胶粒 2 的表面带有大量羧基,而氧化硅粒子 1 的表面带有大量的红色荧光物质 10。

[0064] 步骤 3,制备集成纳米材料探针和免疫磁珠

[0065] 用 EDC 和 NHS 活化步骤 1 中的功能化纳米微球表面的羧基,活化后的羧基与特异性针对结核杆菌的多抗上氨基进行反应,从而将多抗偶联于磁珠表面,获得免疫磁珠。

[0066] 将集成纳米材料中 PS 乳胶粒表面羧基活化后,通过化学耦联方式,与结核杆菌特异性结合多肽 H8 连接,获得集成纳米材料探针。

[0067] 所制备的集成纳米材料探针如图 2 所示,包括氧化硅粒子 1 和 PS 乳胶粒 2,氧化硅粒子 1 的部分表面连接有红色荧光物质(荧光量子点 10),PS 乳胶粒表面通过羧基连接结核杆菌特异性结合多肽 H8 分子 20。

[0068] 步骤 4,进行结核杆菌检测

[0069] 参照图 3,步骤 3 中得到的免疫磁珠、集成纳米材料探针通过超声分散分别得到免疫磁珠悬液、集成纳米材料探针悬液,将检测标本处理制备细菌悬液。

[0070] 将上述免疫磁珠悬液、集成纳米材料探针悬液、细菌悬液混匀,室温条件下振荡 2h,通过磁力架吸附得到三元复合物沉淀。

[0071] PBS 将沉淀洗涤 2 次,然后进行 PBS 重悬沉淀,然后通过荧光显微镜观察,如果观察到红色荧光信号,则表示待测标本为结核杆菌。

[0072] 如果不是结核杆菌,则没有红色荧光信号。

[0073] 实施例 2

[0074] 步骤 1,制备功能化纳米磁珠

[0075] 在丁二酸存在条件下,用丙三醇将三价铁离子还原,并在 200℃ 和 2.7 个大气压下反应制备得到磁性微球。

[0076] 采用溶胶-凝胶法制备氧化硅壳层,将所述磁性微球包被,然后利用氧化硅表面的羟基,与带有氨基的硅烷偶联剂羧基,将氨基修饰到磁性微球表面。

[0077] 再用酸酐与氨基反应,得到表面羧基化的磁性微球。

[0078] 步骤 2,制备集成纳米材料

[0079] 先采用溶胶-凝胶法合成氧化硅粒子,冻干得到粉末,氧化硅粒子通过搅拌作用稳定在水/氯苯两相界面处,然后在氯苯相中溶解硅烷偶联剂,通过加碱催化,将硅烷偶联剂修饰在氧化硅的部分表面上,然后在有改性的氧化硅粒子存在下进行苯乙烯的乳液聚合,诱导聚合物在改性过的氧化硅表面成核、增长,聚合过程中原位引入羧基到聚合物表面。再对氧化硅剩余表面进行氨基化修饰,再通过氨基,将大量荧光染料如红色荧光物质 FITC、TRITC 等结合在纳米系统上,就得到了可以与多肽连接,并且具有显著荧光信号的材料。

[0080] 步骤 3,制备集成纳米材料探针和免疫磁珠

[0081] 用 EDC 和 NHS 活化步骤 1 中的功能化纳米微球表面的羧基,活化后的羧基与特异性针对结核杆菌的多抗上氨基进行反应,从而将多抗偶联于磁珠表面,获得免疫磁珠。

[0082] 将集成纳米材料中 PS 乳胶粒表面羧基活化后,通过化学耦联方式,与结核杆菌特异性结合多肽 H8 连接,获得集成纳米材料探针。

[0083] 步骤 4,进行结核杆菌检测

[0084] 参照图 3,步骤 3 中得到的免疫磁珠、集成纳米材料探针通过超声分散分别得到免疫磁珠悬液、集成纳米材料探针悬液,将检测标本处理制备细菌悬液。

[0085] 将上述免疫磁珠悬液、集成纳米材料探针悬液、细菌悬液混匀,室温条件下振荡

2h,通过磁力架吸附得到三元复合物沉淀。

[0086] PBS将沉淀洗涤2次,然后进行PBS重悬沉淀,然后通过荧光显微镜观察,如果观察到红色荧光信号,则表示待测标本为结核杆菌。

[0087] 如果不是结核杆菌,则没有红色荧光信号。

[0088] 实施例3

[0089] 步骤1,制备功能化纳米磁珠

[0090] 在柠檬酸钠存在条件下,用异丙醇将三价铁离子还原,并在200℃和1.2个大气压下反应制备得到磁性微球。

[0091] 采用溶胶-凝胶法制备氧化硅壳层,将所述磁性微球包被,然后利用氧化硅表面的羟基,与带有氨基的硅烷偶联剂羧基,将氨基修饰到磁性微球表面。

[0092] 再用酸酐与氨基反应,得到表面羧基化的磁性微球。

[0093] 步骤2,制备集成纳米材料

[0094] 先采用溶胶-凝胶法合成氧化硅粒子,冻干得到粉末,氧化硅粒子通过搅拌作用稳定在水/二甲苯两相界面处,然后在二甲苯相中溶解硅烷偶联剂,通过加碱催化,将硅烷偶联剂修饰在氧化硅的部分表面上,然后在有改性的氧化硅粒子存在下进行苯乙烯的乳液聚合,诱导聚合物在改性过的氧化硅表面成核、增长,聚合过程中原位引入羧基到聚合物表面。再对氧化硅剩余表面进行氨基化修饰,再通过氨基,将大量荧光染料如红色荧光物质FITC、TRITC等结合在纳米系统上,就得到了可以与多肽连接,并且具有显著荧光信号的材料。

[0095] 步骤3,制备集成纳米材料探针和免疫磁珠

[0096] 用EDC和NHS活化步骤1中的功能化纳米微球表面的羧基,活化后的羧基与特异性针对结核杆菌的多抗上氨基进行反应,从而将多抗偶联于磁珠表面,获得免疫磁珠。

[0097] 将集成纳米材料中PS乳胶粒表面羧基活化后,通过化学偶联方式,与结核杆菌特异性结合多肽H8连接,获得集成纳米材料探针。

[0098] 步骤4,进行结核杆菌检测

[0099] 参照图3,步骤3中得到的免疫磁珠、集成纳米材料探针通过超声分散分别得到免疫磁珠悬液、集成纳米材料探针悬液,将检测标本处理制备细菌悬液。

[0100] 将上述免疫磁珠悬液、集成纳米材料探针悬液、细菌悬液混匀,室温条件下振荡2h,通过磁力架吸附得到三元复合物沉淀。

[0101] PBS将沉淀洗涤2次,然后进行PBS重悬沉淀,然后通过荧光显微镜观察,如果观察到红色荧光信号,则表示待测标本为结核杆菌。

[0102] 如果不是结核杆菌,则没有红色荧光信号。

[0103] 上述实施例1~3中检测结核杆菌方法如下:

[0104] 取结核杆菌培养菌液,磨菌、比浊至 10^6 CFU/ml,PBS十倍稀释至 $10^5 \sim 10^4$ CFU/ml菌悬液,分别取不同稀释度的菌悬液100 μ l,与两种纳米材料各100 μ l混匀后,按上述实施例中的步骤4进行检测。

[0105] 结果,两种纳米材料可有效捕获低至 10^2 CFU/ml浓度的结核杆菌,通过磁富集和集成纳米探针上量子点的荧光信号,实现结核杆菌的直接镜下观察,荧光显微镜40倍放大可以明显看到红色荧光(图4中的灰色或黑色斑点)。

[0106] 同时,取常见呼吸道致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌按照上述方法进行检测,荧光显微镜下未见红色荧光量子点的信号,说明两种纳米材料与上述三种非结核杆菌均不结合。

[0107] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 检测结核杆菌的纳米材料探针系统及检测方法

<120> 上海市肺科医院

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> 结核杆菌特异性结合多肽

<400> 1

Trp His Ser Gly Thr Pro His

1

5

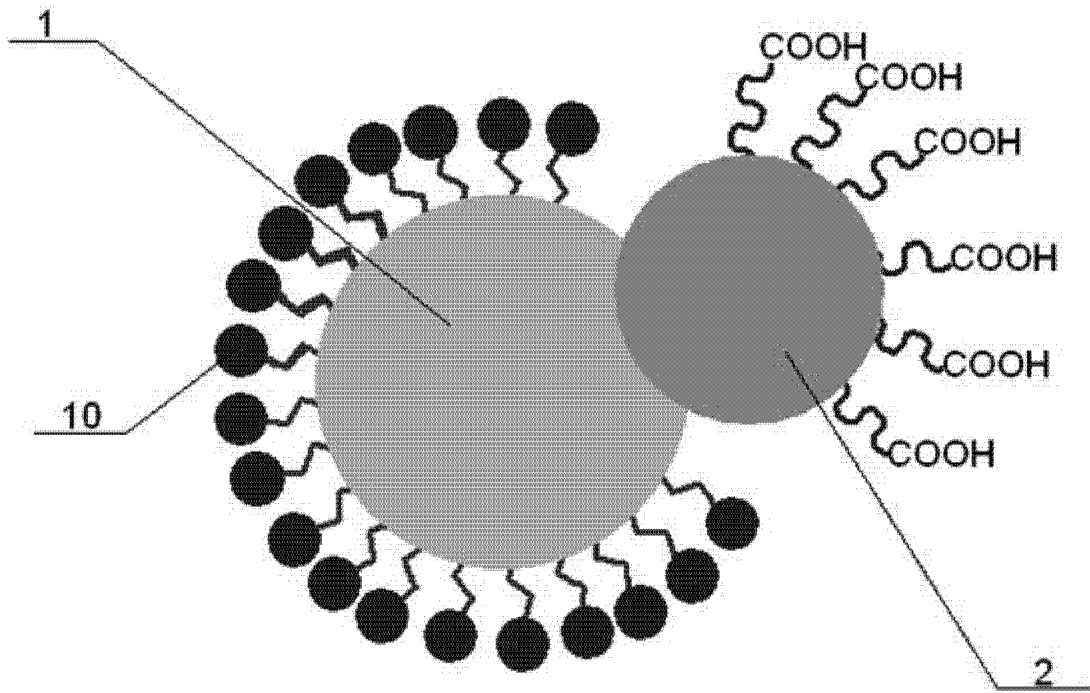


图 1

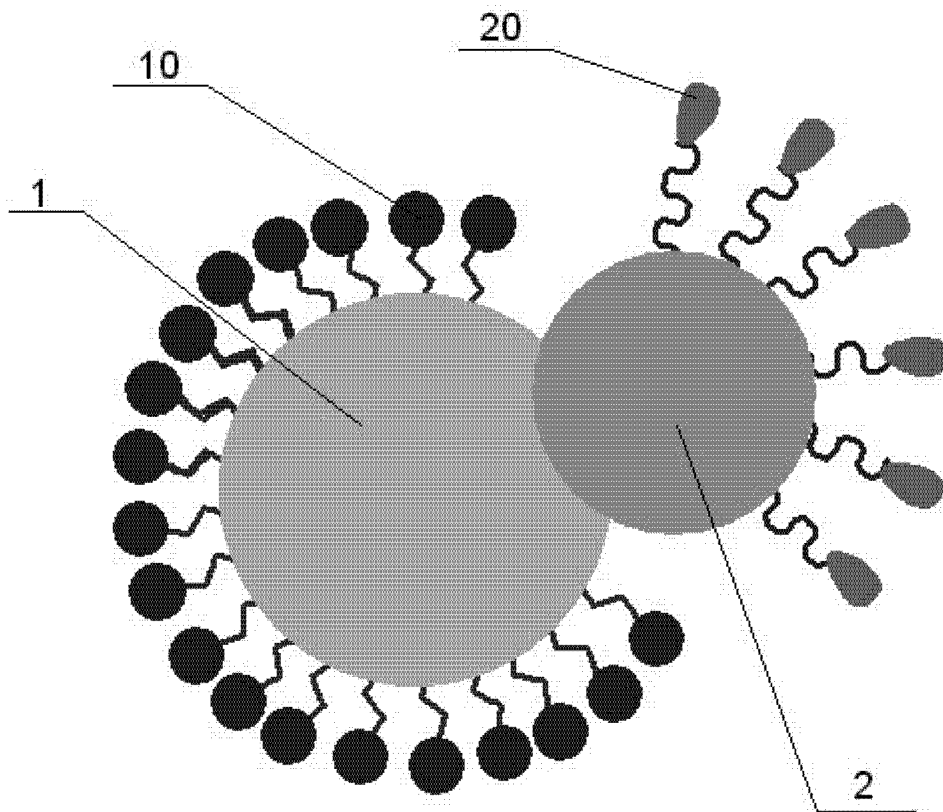


图 2

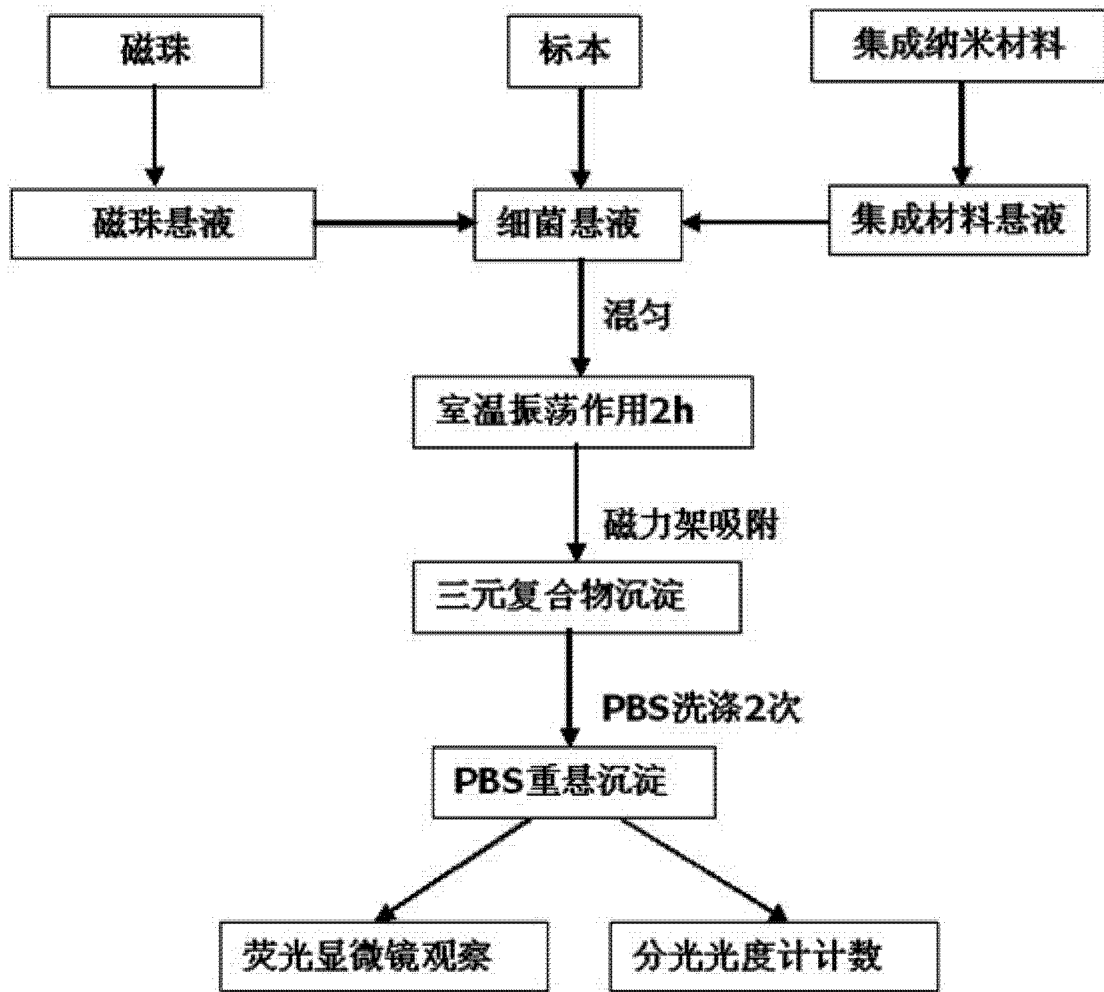


图 3

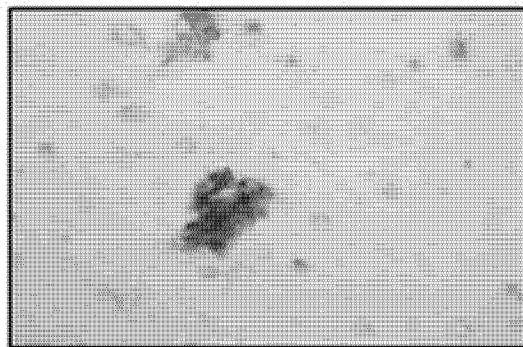


图 4

专利名称(译)	检测结核杆菌的纳米材料探针系统及检测方法		
公开(公告)号	CN103320503B	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201210078055.5	申请日	2012-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海市肺科医院		
申请(专利权)人(译)	上海市肺科医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市肺科医院		
[标]发明人	杨华 胡忠义 秦莲花 刘忠华 马慧		
发明人	杨华 胡忠义 秦莲花 刘忠华 马慧		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/11 C12N15/10 G01N33/68 G01N33/533 C12R1/32		
代理人(译)	刘懿		
审查员(译)	吴希哲		
其他公开文献	CN103320503A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测结核杆菌的纳米探针系统，以及所述纳米探针系统的制备方法，并在此基础上，提出了一种检测结核杆菌的方法。所述纳米探针系统包括集成纳米材料探针和免疫磁珠，集成纳米材料探针和免疫磁珠通过特异性配体与结核杆菌菌体结合形成三元复合体，利用磁场作用快速、准确分离及浓缩结核杆菌和纳米集成探针，然后检测集成探针上的荧光信号，通过磁富集和集成纳米探针上多肽位点与荧光量子点间的数量差可显著放大检测信号，实现结核杆菌的准确、高灵敏、特异检测。

