



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102053156 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 11

(21) 申请号 200910236712. 2

(22) 申请日 2009. 10. 28

(71) 申请人 中国科学院电子学研究所

地址 100080 北京市海淀区北四环西路 19 号

(72) 发明人 刘晓红 蔡新霞 罗金平 田青
刘春秀 刘军涛

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 周长兴

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

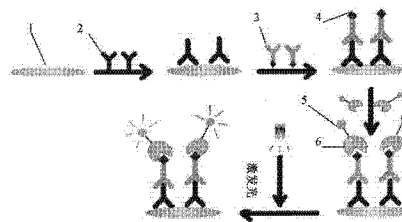
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,是先通过抗原抗体反应来特异性捕获样品中的待测菌,再利用生物素与亲和素之间的结合力,将荧光量子点标记到待测菌上形成荧光免疫复合物,然后在激发光的作用下检测荧光信号,通过建立标准曲线,实现炭疽芽孢杆菌的定量检测。该方法克服了传统和现代方法中的不足,具有灵敏度高、特异性好、操作简便的优点,能在 2 小时内完成对炭疽芽孢杆菌的快速检测。



1. 一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,其主要步骤为:

- 1) 先将炭疽芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌抗体进行抗原抗体特异性反应;
- 2) 在步骤 1 中加入生物素化的抗抗体进行反应;
- 3) 在步骤 2 中加入亲和素化的荧光量子点进行反应,形成荧光免疫复合物;
- 4) 对荧光免疫复合物激发,检测荧光强度。

2. 如权利要求 1 所述基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,其中,步骤 1、2、3 中的反应时间均为 10 ~ 30 分钟,且每步反应之后离心洗涤 2 ~ 3 次。

3. 如权利要求 2 所述基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,其中,步骤 1、2、3 均采用冷冻离心机进行离心,用缓冲液洗涤。

4. 如权利要求 1 所述基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,其中,步骤 1 中的炭疽芽孢杆菌抗体是炭疽杆菌单克隆抗体或者多克隆抗体。

5. 如权利要求 1 所述基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,其中,步骤 2 中的抗抗体是能与炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体特异性结合的抗体。

6. 如权利要求 1 所述基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,其中,步骤 3 中的荧光量子点是由 II-VI 族元素组成的纳米颗粒。

一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,具体涉及一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法。

背景技术

[0002] 炭疽是由炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 引起的一种人兽共患传染病,是牧区食草动物的一种常见疾病。炭疽芽孢杆菌属于蜡样芽孢杆菌属,主要可通过消化道、呼吸道及皮肤接触感染人和动物,具有高度致病性,特定条件下炭疽芽孢杆菌可以形成芽孢,抵抗力强,在外环境中可存活数十年,此外由于炭疽芽孢杆菌易大批量生产、易施放、易扩散,在军事上一直被列为头号生物战剂。因此开发一种快速、准确的检测技术,对于监控炭疽的发生和生物恐怖袭击均有重大意义。

[0003] 炭疽芽孢杆菌诊断根据实验室检查进行,主要是靠涂片显微镜检查、培养性状、噬菌体试验等。目前国内外均在研究开发一些更加快速和灵敏的检测方法,主要有直接免疫荧光法 (DFA) 和聚合酶链反应 (PCR)。但这些方法步骤比较繁琐,都需要特殊的仪器和试剂,且操作人员需要具备相应的技术素质。

[0004] 免疫标记技术是生物医学领域中的新方法之一,而荧光免疫技术是其中发展最早的一种,随着荧光抗体标记方法及荧光材料的改进,荧光免疫技术在生物物种的超灵敏检测等方面得到了广泛的应用。但是传统的荧光染料如异硫氰酸荧光素 (FITC)、罗丹明等,由于其激发光谱和发射光谱常有部分重叠,互相干扰严重,且对光不稳定等缺点,从而限制了其应用范围。荧光量子点是近年来出现的新型荧光标记材料,因其特有的量子尺寸效应和表面效应,具有光稳定、激发光谱范围宽、发射光谱范围窄而对称、stokes 位移大、背景噪声小等特性,灵敏度和分辨率显著提高,成为生物标记方面的研究热点,在微生物检测等方面有着诱人的应用前景。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,以克服公知技术中的缺陷。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供的基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法,是以荧光量子点作为标记物,通过抗原抗体特异性反应及生物素与亲和素之间的结合作用,形成荧光免疫复合物,即炭疽芽孢杆菌-炭疽芽孢杆菌抗体-生物素化的抗抗体-亲和素化的荧光量子点,最后采用激发光激发待测样品,通过检测荧光信号建立标准曲线,实现炭疽芽孢杆菌的定量检测。

[0007] 其主要步骤为:

[0008] 1) 先将炭疽芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌抗体进行抗原抗体特异性反应;

[0009] 2) 加入生物素化的抗抗体进行反应;

[0010] 3) 加入亲和素化的荧光量子点进行反应,形成荧光免疫复合物;

[0011] 4) 对荧光免疫复合物进行检测。

[0012] 上述步骤 1、2、3 中的反应时间均为 10 ~ 30 分钟,且每步反应之后离心洗涤 2 ~ 3 次。

[0013] 上述步骤 1、2、3 均采用冷冻离心机进行离心,用缓冲液洗涤,主要是用在于去除未参加反应的炭疽芽孢杆菌抗体、生物素化的抗抗体或亲和素化的荧光量子点。

[0014] 上述步骤 1 中的炭疽芽孢杆菌抗体是炭疽杆菌单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0015] 上述步骤 2 中的抗抗体是能与炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体特异性结合的抗体。

[0016] 本发明提供的检测炭疽芽孢杆菌的方法,无需对活菌进行培养,具有操作简便,特异性好等优点,在公共安全,防化反恐等领域具有重要实际意义。本发明方法不仅仅局限于炭疽芽孢杆菌的检测,也可应用于其他细菌的特异性定量检测。

附图说明

[0017] 图 1 为基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的原理示意图;图中:

[0018] 1- 炭疽芽孢杆菌,2- 炭疽芽孢杆菌抗体,3- 抗抗体,4- 生物素,5- 荧光量子点,6- 亲和素

[0019] 图 2 为炭疽芽孢杆菌经荧光量子点标记后的荧光显微镜观察图;图中:A- 明场;B- 荧光。

[0020] 图 3 为结合 F4500 荧光光度计对不同浓度炭疽芽孢杆菌的检测结果。

具体实施方式

[0021] 本发明结合荧光量子点光稳定、激发光谱范围宽、发射光谱范围窄而对称、stokes 位移大、背景噪声小等特性,提供一种基于荧光量子点检测炭疽芽孢杆菌的方法(请参阅图 1 所示),以荧光量子点作为标记物,通过抗原抗体特异性反应及生物素与亲和素之间的结合作用,形成荧光免疫复合物,即炭疽芽孢杆菌-炭疽芽孢杆菌抗体-生物素化的抗抗体-亲和素化的荧光量子点,最后采用激发光激发待测样品,通过检测荧光信号建立标准曲线,实现炭疽芽孢杆菌的定量检测。

[0022] 本发明检测炭疽芽孢杆菌的方法是:

[0023] 一、先将炭疽芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌抗抗体反应一定时间;

[0024] 二、再加入生物素化的抗体反应一定时间;

[0025] 三、最后加入亲和素化的荧光量子点反应一定时间,经过上述三步反应形成最终的荧光免疫复合物。

[0026] 上述的三步反应中,每步反应时间为 10 ~ 30 分钟,每步反应之后离心洗涤 2 ~ 3 次。

[0027] 所述的离心洗涤,是通过冷冻离心机对样品离心,然后使用缓冲液洗涤,作用在于去除未参加反应的炭疽芽孢杆菌抗体、生物素化的抗抗体或亲和素化的荧光量子点。

[0028] 所述的炭疽芽孢杆菌抗体,是炭疽杆菌单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0029] 所述的抗抗体,是能与炭疽芽孢杆菌单克隆抗体或多克隆抗体特异性结合的抗体。

[0030] 本发明提供的方法,是通过抗原抗体特异性反应及生物素与亲和素之间的结合作用,形成荧光免疫复合物,将荧光量子点标记在炭疽芽孢杆菌上,经离心去除未连接的炭疽芽孢杆菌抗体、生物素化的抗抗体或亲和素化的荧光量子点,最后通过激发光激发荧光量子点检测荧光信号,建立标准曲线,便可定量检测炭疽芽孢杆菌。

[0031] 下面以高压灭活的炭疽芽孢杆菌为具体实施例对本发明进一步描述。

[0032] 实施例 1:荧光量子点标记炭疽杆菌方法和荧光显微观察

[0033] 1) 取高压灭活的炭疽芽孢杆菌待测样品 100 μ L ;

[0034] 2) 向待测样品中加入 5 μ L 浓度为 1mg/mL 的炭疽芽孢杆菌抗体溶液,37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30min 后,离心洗涤 2 次 ;

[0035] 3) 向上述溶液中加入 5 μ L 稀释比例为 1 : 50 的生物素化的抗抗体,37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30min 后,离心洗涤 2 次 ;

[0036] 4) 向上述溶液中加入 5 μ L 浓度为 20nmol/L 的亲和素化的荧光量子点,37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30min 后,离心洗涤 2 次 ;

[0037] 5) 在显微镜下使用紫外光激发样品,观察拍摄荧光图像,进行分析处理。图 2 为拍摄到的炭疽芽孢杆菌在显微镜下的明场和暗场对比图。

[0038] 如图 2 所示,荧光图像清晰明亮,可以清晰地分辨经荧光量子点标记的炭疽芽孢杆菌,从而实现对炭疽芽孢杆菌的检测。

[0039] 实施例 2:利用 F4500 荧光分光光度计对炭疽杆菌进行定量检测

[0040] 1) 取高压灭活的炭疽芽孢杆菌待测样品 100 μ L ;

[0041] 2) 向待测样品中加入 5 μ L 浓度为 0.1mg/mL 的炭疽芽孢杆菌抗体溶液,37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30min 后,离心洗涤 2 次 ;

[0042] 3) 向上述溶液中加入 5 μ L 稀释比例为 1 : 20 的生物素化的抗抗体,37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30min 后,离心洗涤 2 次 ;

[0043] 4) 向上述溶液中加入 5 μ L 浓度为 40nmol/L 的亲和素化的荧光量子点,37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30min 后,离心洗涤 2 次 ;

[0044] 5) 取 100 μ L 待测样品加入荧光比色皿中,利用 F4500 荧光分光光度计对样品进行激发,检测荧光信号。图 3 为利用 F4500 检测结果建立的标准曲线,可以看出, F4500 检测到的荧光信号与炭疽芽孢杆菌浓度之间呈现良好的线性关系。

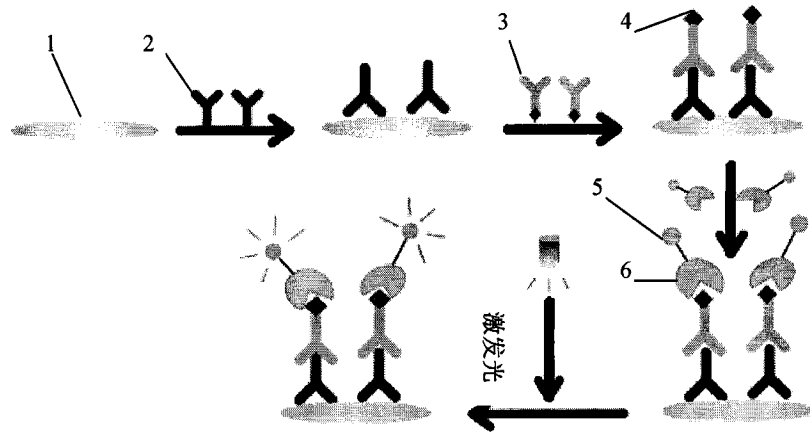


图 1

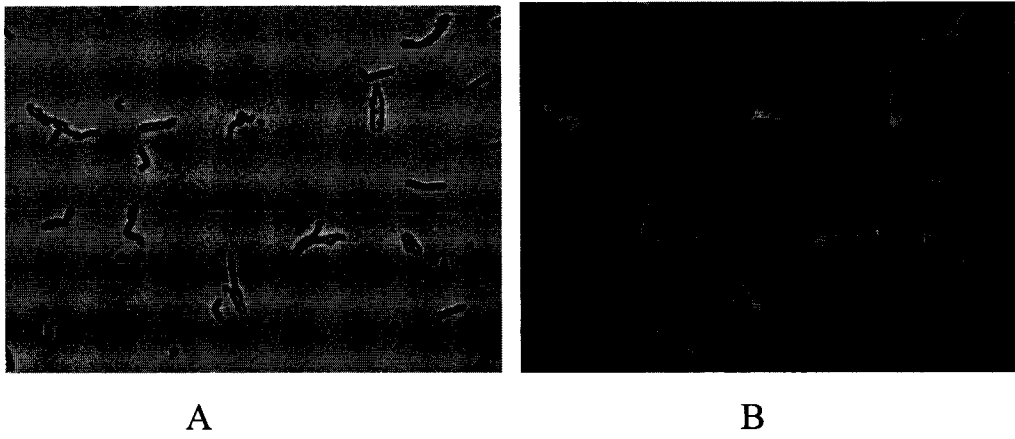


图 2

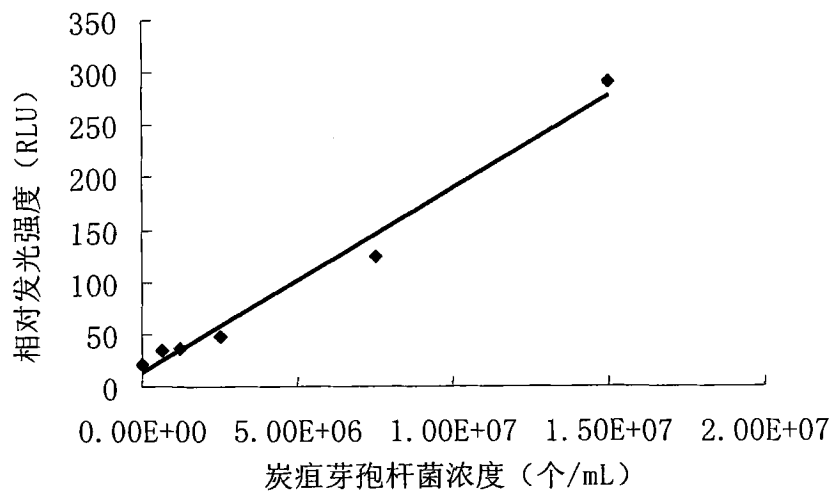


图 3

