



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102565389 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201110315673. 2

(22) 申请日 2011. 10. 09

(71) 申请人 温州医学院

地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区温州医学院

(72) 发明人 吕建新 吴文鹤 张杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

G01N 21/33 (2006. 01)

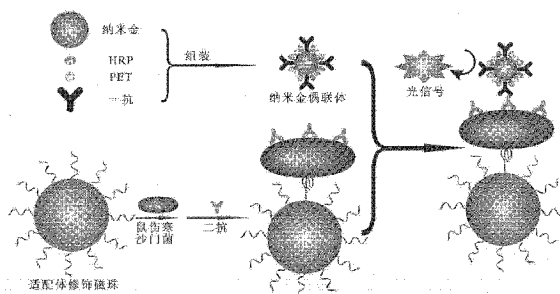
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种用于沙门菌快速检测的 Nano/ALISA 方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及利用适配体代替抗体进行沙门菌捕获和以纳米金偶联体作为信号报告基团, 建立的一种基于纳米 / 适配体联合免疫吸附法的新型沙门菌快速检测方法... (1) 将沙门菌的特异适配体修饰到磁性颗粒表面; (2) 加入标本进行反应; (3) 加入沙门菌的特异一抗进行反应; (4) 加入二抗-纳米金-报告基团的偶联体进行反应; (5) 加入特异性底物进行反应, 或直接记录此时的光信号。试剂盒中含有: (1) 特异适配体修饰的磁性颗粒; (2) 沙门菌的特异一抗; (3) 二抗-纳米金-报告基团的偶联体; (4) 封闭液; (5) 洗涤液; (6) 底物; (7) 阳性对照菌液和阴性对照菌液等。



1. 一种基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测方法,其特征在于,依次包括以下步骤:

- (1) 将沙门菌的特异适配体修饰到磁性颗粒表面;
- (2) 加入标本进行反应;
- (3) 加入沙门菌的特异一抗进行反应;
- (4) 加入二抗-纳米金-报告基团的偶联体进行反应;
- (5) 加入特异性底物进行反应,或直接记录此时的光信号。

2. 根据权利要求 1 所述的基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测方法,其特征在于,首次提出了以适配体、病原菌和纳米金构成三明治结构以用于特异性检测病原菌的新型免疫学方法。

3. 根据权利要求 1 所述的基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测方法,其特征在于,步骤 (4) 所述纳米金的粒径为 15 ~ 20nm。

4. 根据权利要求 1 所述的基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测方法,其特征在于,步骤 (4) 所述报告基团为能催化底物生成具有颜色或荧光信号的酶,或具有自发光性能的荧光蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测方法,其特征在于,步骤 (4) 所述二抗-纳米金-报告基团的偶联体的制备方法包括下列步骤:

(1) 将二抗和报告基团按一定比例混合,加入到纳米金溶液中,调节 pH 值,37℃振荡孵育 10min,4℃静置过夜;

- (2) 加入封闭液封闭纳米金表面的空余的结合位点;
- (3) 离心洗涤去除未结合物质;
- (4) 加储存液混匀,置于 4℃保存。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是步骤 (1) 所述的二抗和报告基团的摩尔数分别为纳米金的 50 ~ 100 倍和 200 ~ 400 倍,pH 值为 8.0 ~ 9.0。

7. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是步骤 (3) 所述的离心条件为 12000rpm 离心 20min。

8. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是步骤 (3) 和 (4) 所述的洗涤液和储存液组成为 0.5% 牛血清白蛋白 2.5% 蔗糖,0.1% PEG,10mM PBS(pH7.4)。

9. 一种基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测试剂盒,其特征在于,试剂盒中含有:

- (1) 特异适配体修饰的磁性颗粒,其粒径约 1 ~ 1.5 μm ,浓度约为 5mg ml^{-1} ;
- (2) 沙门菌的特异一抗,最适浓度 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$;
- (3) 二抗-纳米金-报告基团的偶联体,最佳稀释度为 1 : 10;
- (4) 封闭液,其组分为含有 1% BSA 的 10mM PBS(pH 7.4) 溶液;
- (5) 洗涤液,其组分为含有 0.05% Tween 20 的 10mM PBS(pH 7.4) 溶液;
- (6) 底物,纳米金偶联体中报告基团相对应的底物,如 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (3,3',5,5' - tetramethylbenzidine, TMB) 等;
- (7) 阳性对照菌液和阴性对照菌液;
- (8) 说明书。

一种用于沙门菌快速检测的 Nano/ALISA 方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,涉及利用适配体代替抗体进行沙门菌捕获和以纳米金偶联体作为信号报告基团,特别涉及应用该技术建立的一种基于纳米/适配体联合免疫吸附法(nano/aptamer-linked immobilized sorbent assay, Nano/ALISA)的新型沙门菌快速检测方法及用于沙门菌快速检测的试剂盒。

背景技术

[0002] 沙门菌(Salmonella)为常见的人畜共患病原菌,广泛存在于各类动物的肠道内,以及被动物粪便污染的水和土壤中,可导致肠炎、肠热症甚至败血症等。它的感染发病占细菌性食物中毒的主要地位,由其引起的伤寒病已被我国《传染病防治法》列入乙类传染病之一,在发展中国家和发达国家都仍然是严重的公共卫生问题。美国每年报道的沙门菌感染约有四万例,但由于许多感染者没有就医和报告,实际感染者数是这个数字的20倍以上。2008年9月美国发生了由鼠伤寒沙门菌导致的“花生酱中毒事件”,这是美国10年来最严重的沙门菌病疫情,导致了美国历史上最大的食品召回事件,并迫使奥巴马政府对现行的食品安全法进行修正。在我国,特别是广大农村基层,因沙门菌引起的感染时有发生,其传播速度快、波及面广,一旦发生,很容易引起扩散流行。张肃等对1985年~2000年我国食物中毒情况重点分析,在微生物性食物中毒的发病人数中,沙门菌最为严重;王世杰等对1994年~2003年我国766起细菌性食物中毒的分析结果显示,沙门菌居第二位。沙门菌对人类的健康构成威胁,而且也给国家带来沉重的经济负担,故对沙门菌暴发的预防,以及对第一例病例的快速确诊并对可疑病员进行排查,作到早发现、早治疗、早隔离、快速查找传染源、切断传播途径等对控制本病极为重要。

[0003] 目前沙门菌的实验室检测仍以检出病原菌为主要依据,其检测程序包括标本采集接种、分离培养、生化鉴定,血清学分型等多个环节,最快也要四到八天才能作出最终检验诊断。近年来,世界各地学者针对沙门菌的快速检测技术展开了大量研究工作,利用特异的生物识别元件来进行快速诊断,如分子生物学和免疫学检测技术等。通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)可以把痕量的遗传物质迅速扩增百万倍,使原本无法进行的各种分析检测项目得以实施。但PCR往往需要先提取沙门菌的DNA或RNA,利用已报道的特异引物进行扩增,根据扩增结果可以进行定性或定量检测,可以检测<100CFU的沙门菌。虽然PCR具有快速、灵敏、特异等优点,但是在检测沙门菌方面仍有缺陷,如需要专业人员操作,所用的试剂和仪器昂贵,检测结果假阳性高等,都是研究者们面临的难题。免疫学检测技术则利用抗原和抗体之间的特异性反应实现沙门菌的快速检测,最常用的为酶联免疫吸附技术(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),已报道的检测灵敏度为 10^5CFU ml^{-1} 。ELISA技术自20世纪70年代出现以来,就因其特异性高、敏感性高、简单快速,不需要昂贵仪器设备,特别适合于对大量样本的筛检工作等优点而备受关注。此外,免疫磁分离(immunomagnetic separation)技术能在各种样品中捕获特异菌体,起到浓缩的作用,往往与ELISA技术联用。但是ELISA技术的灵敏度和特异性往往依赖于抗体和抗原之间亲

和力的大小,且抗体具有制备困难、标记繁琐、容易变性等缺点,这都是我们需要改进的关键;另外,ELISA检测的目标难以像核酸一样直接通过PCR进行扩增,所以信号放大效率受到了很大限制,而沙门菌在实际样本中往往浓度较低。因此,迫切需要发展新的简便、快速、灵敏的方法来满足对沙门菌的检测。

[0004] 适配体 (aptamer) 是一类具有高度亲和力和能够高度特异性识别结合目标分子的寡核苷酸序列,其目标分子范围广,从小分子,如药物和染料;到复杂的生物大分子,如酶分子,多肽以及蛋白质,甚至完整的细胞。这种人工受体是通过一种新的体外筛选技术—指数富集配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX),从随机单链寡核苷酸文库中筛选得到的。由于适配体具有与抗体相同或优于抗体的选择性和亲和力,所以能够取代抗体作为一种新型分子识别元件。另外,与抗体相比,适配体还具有几个优点,如热稳定性增加、耐广泛的 pH 值和盐浓度以及合成、修饰和固化方法简便。因此,适配体与 ELISA 方法的结合成为了一个新的发展趋势。2006 年,Vivekananda 等首次在文章中提出适配体联合免疫吸附法 (aptamer-linked immobilized sorbent assay, ALISA) 这个概念,并成功地检测了土拉热弗朗西丝菌。

[0005] 纳米材料 (nanomaterials) 是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围 (1 ~ 100nm) 或由它们作为基本单元构成的具有特殊性能的材料。由于纳米材料的小尺寸以及特殊的表面状态,使其表现出许多既不同于微观粒子又不同于宏观物体的特性,例如量子尺寸效应、表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等。纳米技术的快速发展为生物检测的信号放大方式提供了新的选择,两者的结合已成为新的发展趋势。在生物检测领域,利用纳米材料极大的比表面积,研究者们可以更加方便地构建多种生物分子的偶联体,可在装载目标识别分子 (如寡核苷酸探针、抗体等) 的同时携带大量信号分子 (如可以产生显色或荧光信号的蛋白质) 用于信号增强,这就为发展高灵敏度的生物学检测方法提供了可能。

[0006] 其中,纳米金 (gold nanoparticles, AuNPs) 因其具有优异的光学性质、电学性质、化学活性、生物兼容性,使其在生物领域的应用最为广泛,最早可以追溯到上世纪七十年代免疫金在生物成像中的应用。纳米金还具有独特的生物兼容性,能广泛地应用于 DNA、抗体、抗原和酶等物质的标记。近年来,国内外的研究机构相继报道了利用纳米金为载体偶联多个生物分子进行信号放大的生物学检测策略。2003 年以来,Mirkin 研究组报道了一系列基于“抗体-纳米金-条码 DNA”偶联结构的高灵敏度蛋白检测策略,利用纳米金表面装载的大量作为信号分子的条码 DNA,使检测信号大大增强。2009 年,Chun-Ping Jia 等将 p53 抗体和亲和素化 HRP 共组装在纳米金粒子表面,制备成 p53 抗体-纳米金-亲和素化 HRP 复合纳米结构,2h 内即可检测 5pg ml^{-1} 的 p53,比传统 ELISA 的最低检测限降低了 25 倍。

发明内容

[0007] 本发明要解决的第一个技术问题是提供用于捕获沙门菌的特异适配体标记磁性颗粒。

[0008] 免疫磁分离技术能在各种样品中捕获特异菌体,起到浓缩的作用;适配体可通过自动化的固相合成大规模制备,不依赖于活体动物或活细胞,批间误差小,重复性好,成本低廉,且稳定性好,变性可逆,易于进行生物化学修饰。因此,本发明通过化学或生物学方法

将沙门菌特异适配体与磁性颗粒偶联。此步骤中为使磁性颗粒表面的适配体尽量保持竖立而不是倒伏在磁性颗粒表面,以利于其捕获沙门菌,选用间隔 DNA(spacer DNA) 来封闭磁性颗粒的空余位点,通常为 20 个 T 或 A;相应地在适配体标记端也设计连续的不同碱基,提高适配体捕获沙门菌的效率。本发明中具有特异性识别沙门菌功能的适配体并不局限于一种具体的适配体,而包括所有能够通过合适的方法修饰到磁性颗粒表面沙门菌的特异适配体。修饰方法如戊二醛交联法、碳化二亚胺法、亲和素-生物素法等。

[0009] 本发明要解决的第二个技术问题是提供用于沙门菌检测的纳米金偶联体。由于纳米金极大的比表面积和良好的生物相容性,我们可以方便地构建多种生物分子的偶联体,可在装载目标识别分子(如沙门菌的特异适配体、抗体等)的同时携带大量信号分子(如过氧化物酶、碱性磷酸酶等)用于信号增强。因此本发明的纳米金偶联体可以作为一种信号放大试剂,通过催化剂催化的底物反应或自身反应起到信号放大的作用。

[0010] 根据本发明,纳米金与目标识别分子、信号分子的偶联连接同现有的方法。其中,适配体序列修饰有巯基,与纳米金通过金硫键连接。通常将原纳米金溶液离心浓缩得到大约 10nM 的纳米金溶液,放置在 4℃ 下备用;将巯基化适配体加入纳米金溶液混合过夜(16h),然后加盐老化,室温放置 40h,接着离心洗涤 3 次,最后以实验中用的反应液悬浮,4℃ 保存。而蛋白质可以很容易地通过金硫键、静电力等多种作用力与纳米金粒子偶联。通常调节纳米金溶液的 pH 值略高于蛋白质等电点,加入蛋白质溶液 37℃ 振荡孵育 10 分钟,4℃ 静置过夜;加 5% PEG 至终浓度 0.5%,混匀,4℃ 放置 1 小时;离心洗涤 3 次,最后以储存溶液重悬。所述的储备液优选含有 0.5% BSA,2.5% 蔗糖,0.1% PEG,pH 7.4 的 PBS 缓冲液。另外,需要提高纳米金的 pH 值时可用 0.1M K_2CO_3 ,需要降低纳米金的 pH 值时可用 0.1M HCl。

[0011] 本发明的第一个目的是公开一种新型的免疫学检测技术(Nano/ALISA),以及利用此技术进行快速检测沙门菌的方法。这种新方法可包括以下步骤:

[0012] 1. 用沙门菌特异适配体捕获沙门菌,通过磁性颗粒进行分离富集沙门菌;

[0013] 2. 加入沙门菌的特异一抗进行反应;

[0014] 3. 加入上述本发明的纳米金偶联体,获得适用于高灵敏度免疫检测“三明治”结构;

[0015] 4. 通过纳米金偶联体上的可以产生显色或荧光信号的蛋白质催化底物生成一定颜色或荧光并进行检测。

[0016] 本发明的第二个目的是提供一种基于 Nano/ALISA 技术的沙门菌快速检测试剂盒,它含有:

[0017] 1. 特异适配体修饰的磁性颗粒,其粒径约 1 ~ 1.5 μm ,浓度约为 5mg ml^{-1} ;

[0018] 2. 沙门菌的特异一抗,最适浓度 2 $\mu g ml^{-1}$;

[0019] 3. 二抗-纳米金-报告基团的偶联体,最佳稀释度为 1 : 10;

[0020] 4. 封闭液,其组分为含有 1% BSA 的 10mM PBS(pH 7.4) 溶液;

[0021] 5. 洗涤液,其组分为含有 0.05% Tween 20 的 10mM PBS(pH 7.4) 溶液;

[0022] 6. 底物,纳米金偶联体中报告基团相对应的底物,如 3,3',5,5' -四甲基联苯胺(3,3',5,5' -tetramethylbenzidine, TMB) 等;

[0023] 7. 阳性对照菌液和阴性对照菌液;

[0024] 8. 说明书。

[0025] 用于本发明的封闭液、洗涤液没有特别限制,可以采用本领域相对应的封闭液、洗涤液。此外,试剂盒中的封闭液和洗涤液可以是浓缩或稀释液。

[0026] 相对于现有技术,本发明提供了一种成本低廉、操作简单、灵敏度高、特异性强的快速检测沙门菌的新型免疫学方法和试剂盒;并首次提出了以适配体、病原菌和纳米金构成三明治结构以用于特异性检测病原菌的新型免疫学方法,为病原菌的检测提供了一种新的思路。与传统的 ELISA 方法相比,本发明以 Nano/ALISA 技术作为一种新型的多级信号放大手段,有望在仅需类似于 ELISA 技术的操作和设备条件下实现对各种物质快速、灵敏地检测。这种便利性有利于该技术的应用和推广,特别适合疫区病原菌的现场检测。

附图说明

[0027] 下面结合附图对本发明做进一步说明。

[0028] 图 1(a) 为纳米金的 AFM 图;(b) 为纳米金的 TEM 图;

[0029] 图 2 为纳米金的紫外-可见光吸收光谱图;

[0030] 图 3(a) 为二抗的最适稳定量;(b) 为 HRP 的最适稳定量;

[0031] 图 4 为纳米金偶联体上修饰的二抗和 HRP 比值优化结果;

[0032] 图 5 为一抗浓度优化结果;

[0033] 图 6 为基于 Nano/ALISA 技术的鼠伤寒沙门菌快速检测方法的工作示意图;

[0034] 图 7 为对本发明检测方法的特异性进行研究的结果;

[0035] 图 8 为对本发明检测方法的灵敏度进行分析的结果。

具体实施方式

[0036] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0037] 以下是部分本发明实施例中所用的仪器和设备,其他未注明的实验条件按照常规或以其制造厂商所建议的条件。

[0038] 纳米金溶液进行 400nm ~ 800nm 波长范围的扫描所用仪器为紫外可见分光光度计(U-3010, Hitachi),用石英黑体微量比色皿进行测量,样品体积 100 μ l,室温,参数设置:波段扫描,400nm ~ 800nm, Scan Speed 1200nm/min, Sampling Interval 2nm, Slit Width 0.5nm, Lamp Change 339nm。紫外可见光波长范围内吸光度检测所用仪器为酶标仪(Genios, TECAN),用 96 孔板或 384 孔板进行测量,室温。纳米金的粒径和形状进行表征所用仪器为透射电子显微镜(JEM-2011, JEOL)和原子力显微镜(NanoScope IIIa, Veeco)。

[0039] 15nm 纳米金采用柠檬酸三钠法制备:将 100ml 的 0.01% 的氯金酸水溶液加入 250ml 圆底烧瓶,加热至剧烈沸腾后,剧烈搅拌下快速加入 3.5ml 的 1% 柠檬酸三钠水溶液,继续加热搅拌 15min 后,停止加热,继续搅拌 30min 后静置,室温自然冷却。用 0.22 μ m 滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C 保存。根据此法制备所得的纳米金利用原子力显微镜和透射电镜对其粒径和形状进行表征,如图 1 所示,粒径比较均一,大约在 15 ~ 20nm 之间;采用紫外-可见光光谱分光光度计表征样品对应的特征吸收峰(如图 2 所示)。金纳米粒子对应的消光系数 ϵ_{520} 值取 $3.64 \times 10^8 \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$,根据朗伯-比尔定律以及溶胶在 520nm 处的吸光度,可以计算出金

溶胶的浓度为 2.2nM。

[0040] 所用各种溶液成分如表 1 所示。

[0041] 表 1 溶液成分表

[0042]

溶液名称	溶液组成
10 mM PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4, 高压蒸汽灭菌 121 °C, 20 min
洗涤液	10 mM PBS (pH 7.4), 0.05 % Tween 20
终止液	0.5 M H ₂ SO ₄
1%BSA-PBS	100 ml PBS (10 mM , pH 7.4) , 1 g BSA
[0043]	
0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6)	Na ₂ CO ₃ 1.59 g, NaHCO ₃ 2.93 g, 加双蒸水 800 ml 溶解, 调 pH9.6 后加水定容至 1000 ml
纳米金偶联体储存液	0.5 % BSA, 2.5%蔗糖, 0.1 % PEG6000, 10 mM PBS (pH 7.4)

[0044] 实施例 1 磁性颗粒的适配体修饰

[0045] 5'端氨基化修饰的鼠伤寒沙门菌等特异性适配体均由生工生物工程(上海)有限公司负责合成并完成氨基修饰。利用 Maldi-Tof 质谱分析进行质量控制。适配体均用灭菌水溶解,分装,-20°C 保存。使用之前,95°C 变性 5min、4°C 10min 预处理。

[0046] 氨基磁性颗粒结合试剂盒购于 Bangs Laboratories 公司,颗粒直径约 1 ~ 1.5 μm,固含量为 50mg ml⁻¹。按产品说明书,取 100 μl 氨基磁性颗粒至 1.5ml EP 管内;加 0.8ml 吡啶洗液(Pyridine Wash Buffer,PWB),混匀,磁分离,重复洗涤 3 遍;加 0.4ml 5% 戊二醛至上述磁性颗粒中,混匀;室温混合 3 小时;磁分离,弃上清,重复洗涤 4 遍;加入用 PWB 稀释的氨基化适配体 10 μM 800 μl,漩涡振荡混匀后至恒温振荡仪 25°C,16 ~ 24h;磁分离,加入 800 μl PWB 重悬;加 400 μl 猝灭缓冲液(1M 甘氨酸,pH 8.0)漩涡振荡混匀后至恒温振荡仪 25°C,30min;加入 800 μl 洗液(10mM PBS,0.1% BSA,0.1mM EDTA,pH 7.4)漩涡振荡混匀,磁分离弃上清,重复 3 次;加入 1ml 洗液重悬,此时磁性颗粒浓度约为 5mg ml⁻¹,2°C ~ 8°C 保存。

[0047] 实施例 2 纳米金偶联体的制备

[0048] 1. 待标记蛋白质最适稳定量的测定

[0049] 制备一系列不同浓度的等体积蛋白质溶液(2 μl),分别加入 100 μl (pH 调至 8.0-8.5) 纳米金中,迅速混匀,然后各加入 20 μl 10% NaCl 溶液,摇匀,静置 5min 后测各管。根据纳米金颗粒的大小,测定 520nm 处的吸光度值,以吸光度值为纵坐标,蛋白质用量为横坐标作一曲线,取曲线最先达到平衡点处的蛋白质用量为最适稳定量。

[0050] 图 3 中所示,15nm 的纳米金溶液中二抗(羊抗鼠 IgG,购于 Fitzgerald 公司)和辣根过氧化物酶(HRP,购于 SIGMA 公司)的最适稳定量分别为 $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ 和 $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 。

[0051] 2. 二抗和 HRP 比值以及纳米金偶联体稀释倍数的优化

[0052] 将 10mg ml^{-1} 羊抗鼠 IgG 和 HRP 按不同比例(9 : 1,4 : 1,1 : 1,1 : 4,9 : 1)混合,各取 $5 \mu\text{l}$ 分别加入 1ml (pH 调至 8.0 ~ 9.0) 纳米金中, 37°C 振荡孵育 10min, 4°C 静置过夜。加 5% PEG6000 至终浓度 0.5%,混匀, 4°C 放置 1 小时。 12000rpm 离心 20min,去上清,加储存缓冲液 1ml ,重悬。重复此离心洗涤步骤,3 次。最后以 $200 \mu\text{l}$ 储存缓冲液混匀,置于 4°C 保存。

[0053] 将 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ 鼠伤寒沙门菌的特异一抗(0.05M 碳酸盐缓冲液稀释) $20 \mu\text{l}$ 分装于 ELISA 板 384 微孔中, 4°C 包被过夜;弃去孔内溶液,用碳酸盐缓冲液洗板 3 次;将上述不同比例羊抗鼠 IgG 和 HRP 制备的纳米金偶联体按一定比例稀释(1、2.5、5、10、20 倍),加入上述相对应微孔中, 37°C 孵育 1h,同时做空白对照;弃去孔内溶液,用洗涤液洗板 3 次;加 TMB $20 \mu\text{l}$,室温 10min;加终止液 $20 \mu\text{l}$,室温 5min;于 450nm 波长下读取 A 值。图 4 所示,二抗和 HRP 最适比例为 1 : 1,即二抗和 HRP 的摩尔数分别为纳米金的 76 倍和 258 倍;而纳米金偶联体的最佳稀释倍数为 10 倍。

[0054] 实施例 3 一抗浓度的优化

[0055] 1. 吸取 $2 \mu\text{l}$ 适配体修饰磁性颗粒,磁分离弃上清;

[0056] 2. 加封闭液 1% BSA-PBS $20 \mu\text{l}$, 37°C ,650rpm,0.5h,震荡混匀;

[0057] 3. 加入以灭菌 PBS 稀释的菌液 $200 \mu\text{l}$,650rpm, 37°C 孵育 1h,弃去反应液,用 $200 \mu\text{l}$ 洗涤液洗涤 3 次;

[0058] 4. 加入用封闭液稀释的不同浓度一抗(0.1 、 0.5 、 2 、 10 、 $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) $10 \mu\text{l}$,650rpm, 37°C 孵育 1h;

[0059] 5. 弃去反应液,用洗涤液洗涤 3 次;

[0060] 6. 加入 10 倍稀释的纳米金偶联体 $10 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 1h;

[0061] 7. 弃去反应液,用洗涤液洗涤 5 次;

[0062] 8. 加 $100 \mu\text{l}$ TMB,室温振荡 10 分钟,用酶标仪读 595nm 吸光值。

[0063] 如图 5 所示,一抗浓度为 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ 时,信噪比(signal-to-noise ratio, S/N) 最高,为 2.68 ± 0.24 ,即 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ 为最适一抗浓度。

[0064] 实施例 4 用 Nano/ALISA 法快速检测鼠伤寒沙门菌

[0065] 本发明快速检测鼠伤寒沙门菌的示意图如图 6,具体步骤包括:

[0066] (1) 吸取 $2 \mu\text{l}$ 鼠伤寒沙门菌特异适配体修饰磁性颗粒,磁分离弃上清;

[0067] (2) 加封闭液 1% BSA-PBS $20 \mu\text{l}$, 37°C ,650rpm,0.5h 震荡混匀;

[0068] (3) 加入以灭菌 PBS 稀释的菌液 $200 \mu\text{l}$,650rpm, 37°C 孵育 1h,弃去反应液,用 $200 \mu\text{l}$ 洗涤液洗涤 3 次;

[0069] (4) 加入用封闭液稀释的 $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ 不同浓度一抗 $10 \mu\text{l}$,650rpm, 37°C 孵育 1h;

[0070] (5) 其余步骤同实施例 3 的 5 ~ 7。

[0071] 1. 细菌的培养与计数:

[0072] 挑取单个菌落至 5ml LB 液体培养基中, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 200rpm/min 培养 16h ~ 18h,使其达到实验所需的浓度要求。然后用灭菌 PBS 洗涤 2 次后再用 5ml PBS 水充分重悬。将洗

涂好的菌体溶液依次稀释成 8 个 10 倍系列稀释样本匀液,分别装入 8 个无菌小瓶,从 10^1 到 10^8 ,每瓶 1ml,分别标号 1 ~ 8。细胞计数使用传统的平板计数方法,每个稀释度分别取 $100 \mu\text{l}$,均匀涂布在三个普通琼脂平板表面,于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 24h 后,肉眼计数在平板上可读区域的菌落数。选取菌落数在 30CFU ~ 300CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数,算出同一稀释度三个平板上的菌落平均数,并按下列公式进行计算:

[0073] 浓度 (CFU/ml) = 同一稀释度三次重复的平均菌落数 \times 稀释倍数 $\times 10$

[0074] 同时分别取 $50 \mu\text{l}$ 灭菌 PBS 均匀涂布在三个普通琼脂平板上做空白对照。培养物计数完成后,装有活菌的小瓶于 4°C 冰箱保存。

[0075] 2. 特异性实验

[0076] 选择革兰阴性菌 (伤寒沙门 CMCC 50071, *S. typhi*; 甲型副伤寒沙门菌 CMCC50001, *S. paratyphi* A; 宋内氏志贺菌, *S. sonnei*; 福氏志贺菌 CMCC 51571, *S. flexneri*; 大肠杆菌 0157 CICC 21530, *E. coli* 0157; 大肠杆菌 0111 CMCC 44151, *E. coli* 0111; 大肠杆菌 ATCC 25922, *E. coli* ATCC 25922) 和革兰阳性菌 (金黄色葡萄球菌 ATCC25923, *S. aureus*) 对本发明的特异性进行研究。过夜培养后,分别将上述细菌和鼠伤寒沙门菌 (CMCC 50115, *S. typhimurium*) 的菌液浓度调整到 10^8CFU ml^{-1} ,按上述方法进行检测,用酶标仪读 595nm 吸光值,并计算与鼠伤寒沙门菌检测结果的比值。如图 7 所示,使用本发明设计的鼠伤寒沙门菌特异检测的试剂盒对伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、宋内氏志贺菌、福氏志贺菌等进行检测,仅鼠伤寒沙门菌呈阳性反应,其余细菌均为阴性,A 值都小于 $A_{S. typhimurium}$ 的 11%,均不会发生交叉反应或非特异性反应。

[0077] 3. 灵敏度实验

[0078] 将不同浓度的鼠伤寒沙门菌 (PBS 稀释) 使用本发明试剂盒进行检测,结果如图 8 所示。随着鼠伤寒沙门菌浓度的增加,A 值逐渐增加,检测限为 10^3CFU ml^{-1} ($S/N > 3$)。

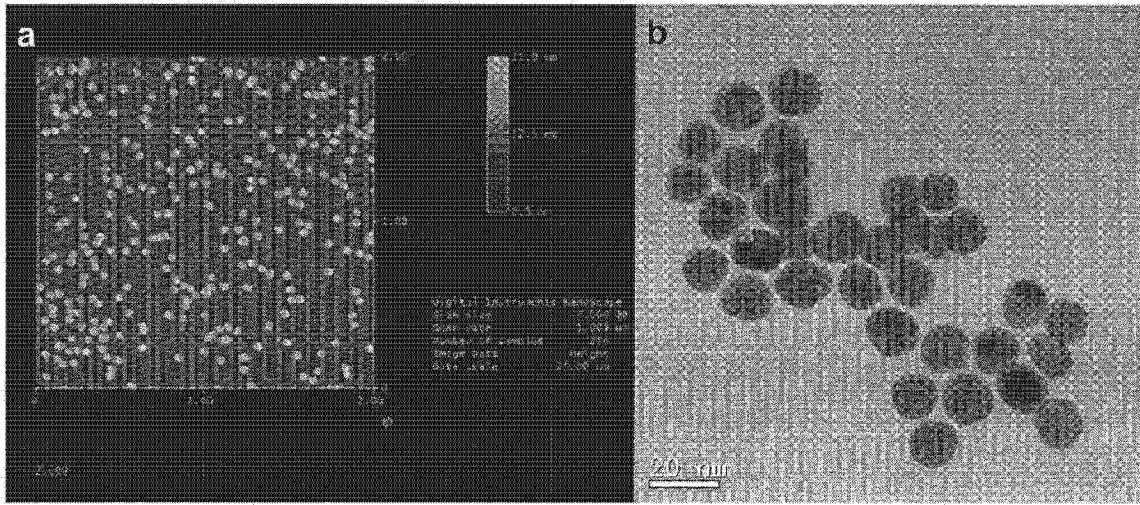


图 1

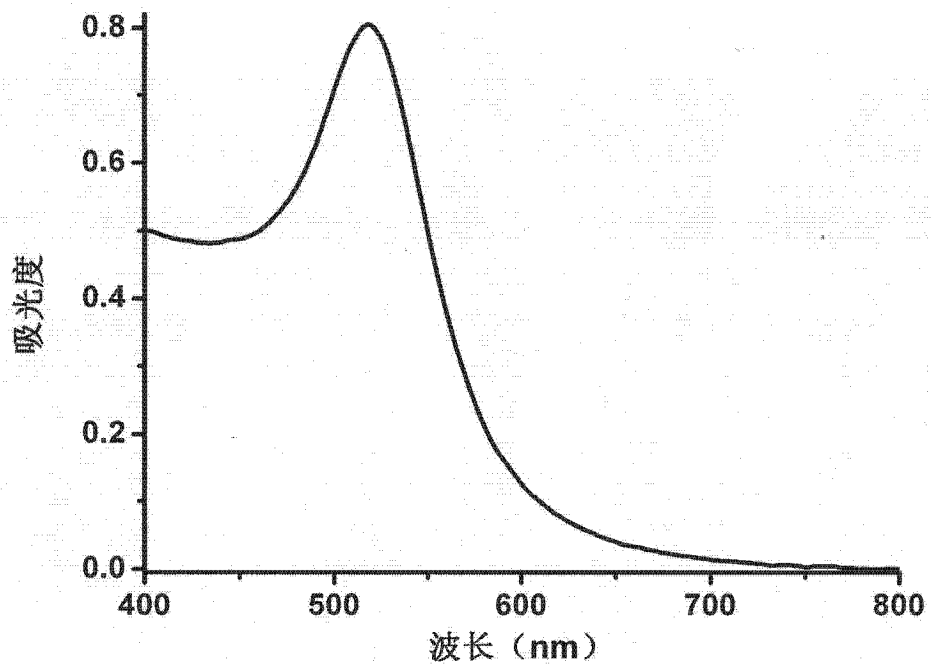


图 2

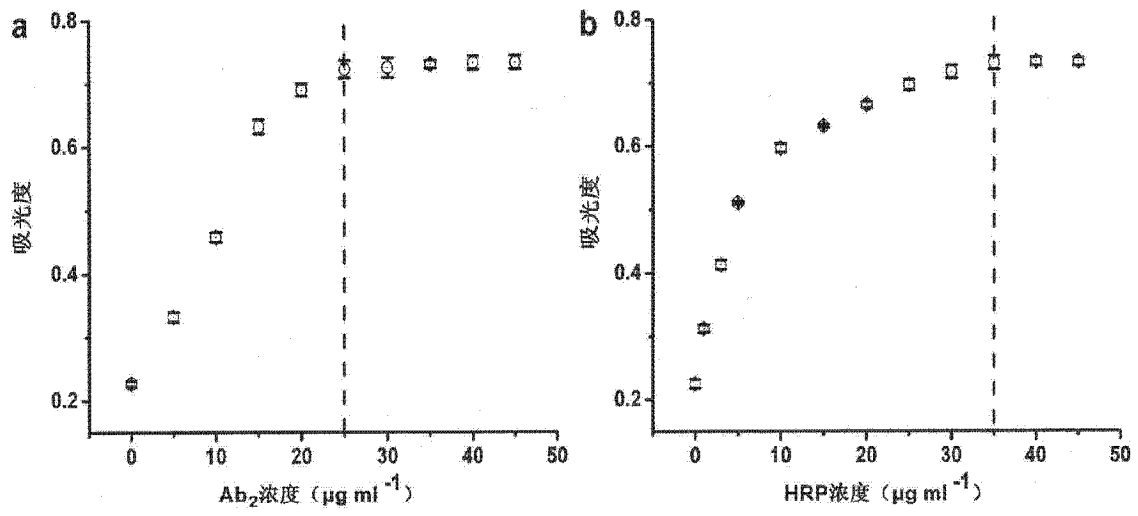


图 3

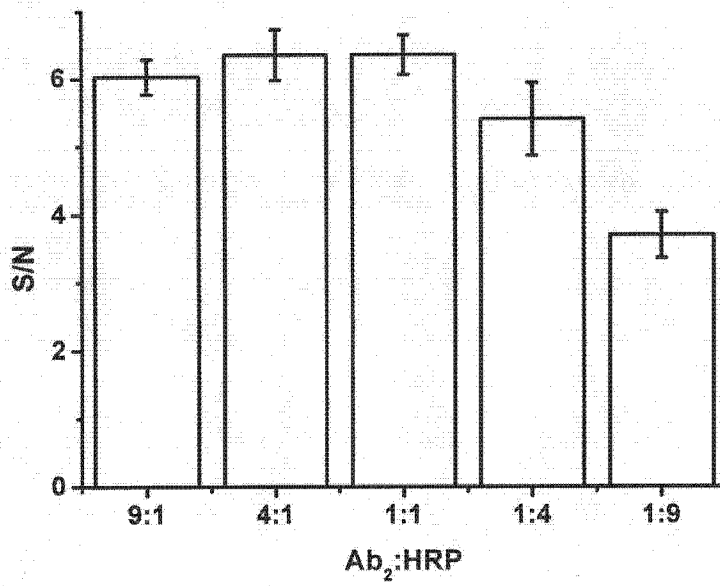


图 4

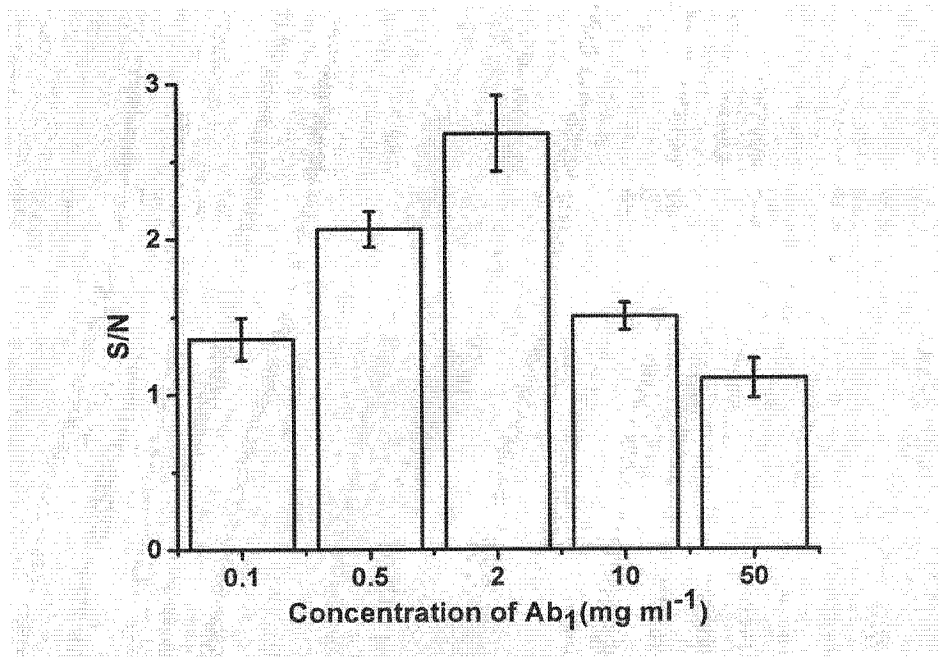


图 5

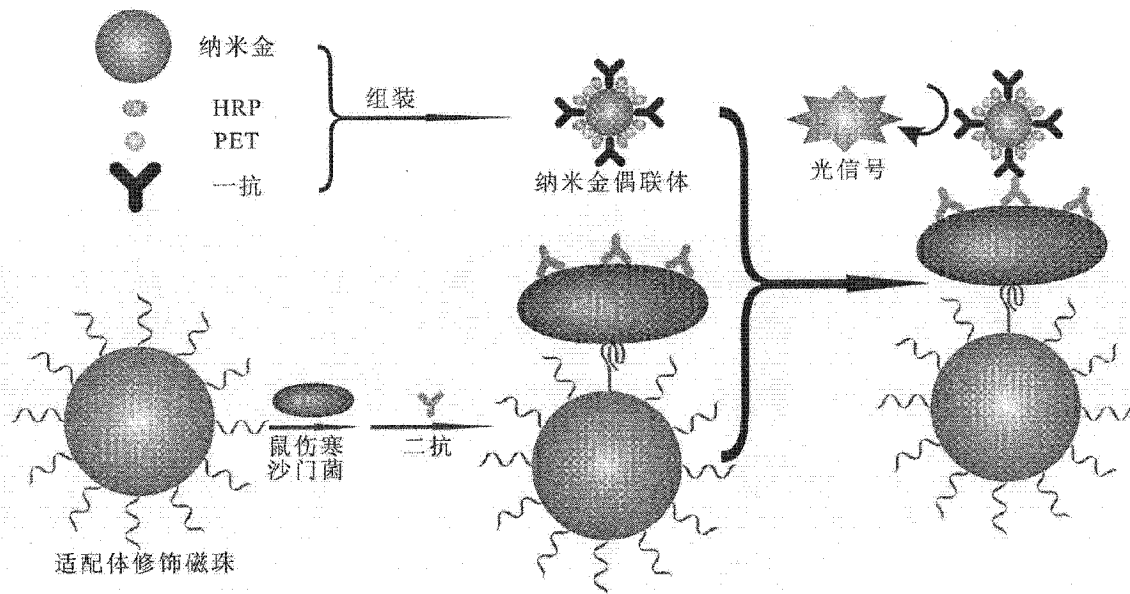


图 6

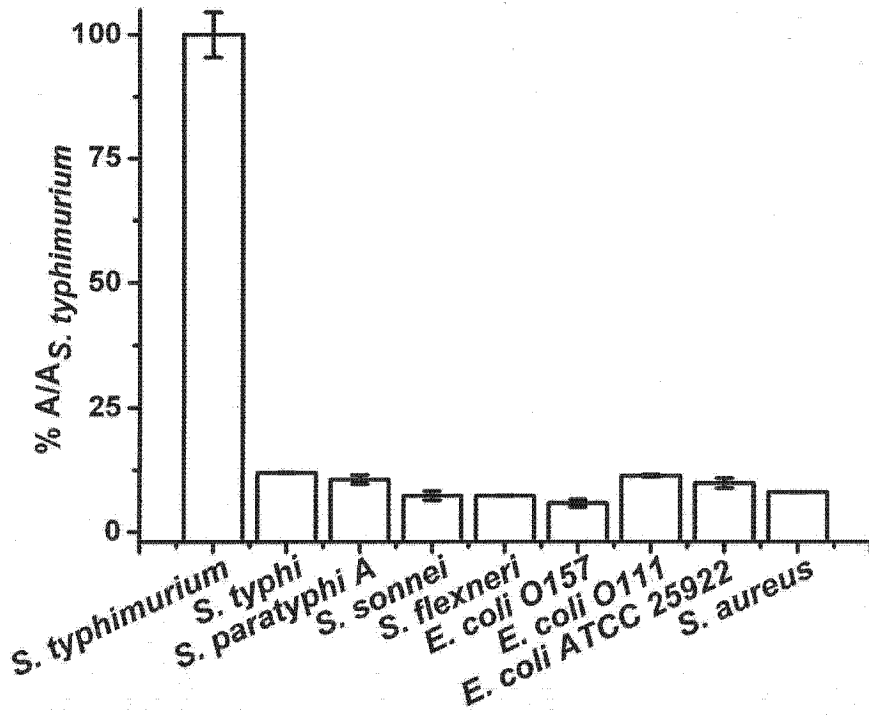


图 7

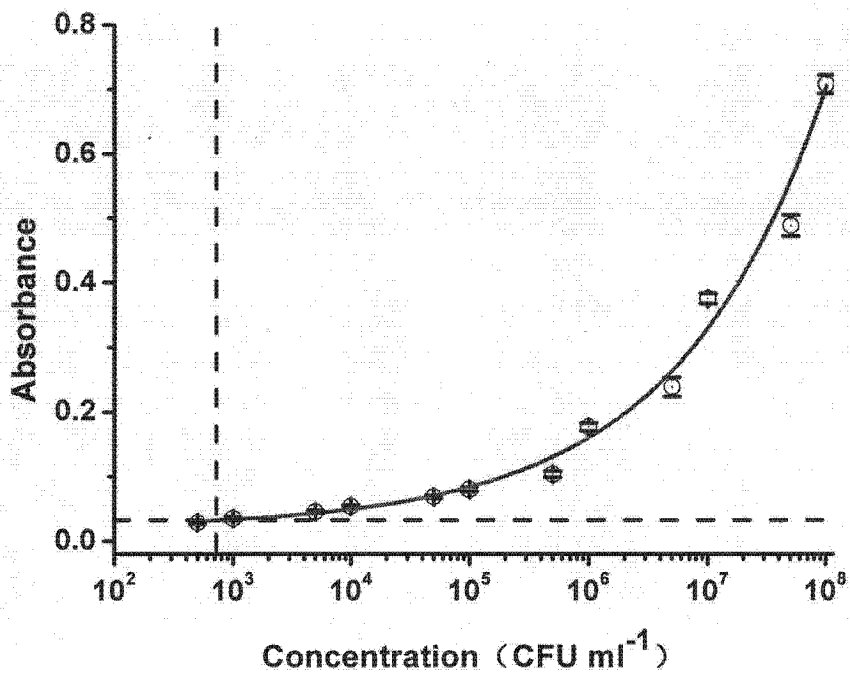


图 8

专利名称(译)	一种用于沙门菌快速检测的Nano/ALISA方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN102565389A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201110315673.2	申请日	2011-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	温州医科大学		
申请(专利权)人(译)	温州医学院		
当前申请(专利权)人(译)	温州医学院		
[标]发明人	吕建新 吴文鹤 张杰		
发明人	吕建新 吴文鹤 张杰		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N21/31 G01N21/33		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及利用适配体代替抗体进行沙门菌捕获和以纳米金偶联体作为信号报告基团，建立的一种基于纳米/适配体联合免疫吸附法的新颖沙门菌快速检测方法用于沙门菌快速检测的试剂盒。包括以下步骤：(1)将沙门菌的特异适配体修饰到磁性颗粒表面；(2)加入标本进行反应；(3)加入沙门菌的特异一抗进行反应；(4)加入二抗-纳米金-报告基团的偶联体进行反应；(5)加入特异性底物进行反应，或直接记录此时的光信号。试剂盒中含有：(1)特异适配体修饰的磁性颗粒；(2)沙门菌的特异一抗；(3)二抗-纳米金-报告基团的偶联体；(4)封闭液；(5)洗涤液；(6)底物；(7)阳性对照菌液和阴性对照菌液等。

