



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102053151 A

(43) 申请公布日 2011.05.11

(21) 申请号 201010522624.1

C09K 11/88(2006.01)

(22) 申请日 2010.10.26

C09K 11/56(2006.01)

(71) 申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381 号

(72) 发明人 王小慧 李栋 孙润仓

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 裘晖

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

C09K 11/89(2006.01)

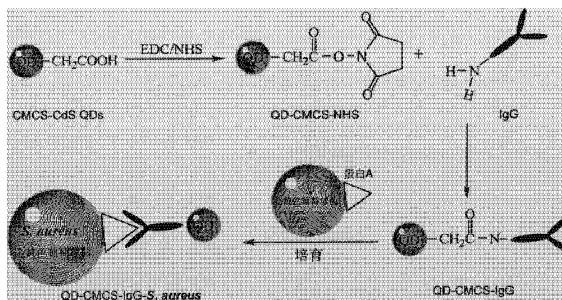
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种荧光探针和用该探针快速检测金黄色葡萄球菌的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种荧光探针,用下述方法制备:首先将在羧甲基壳聚糖模板中合成的荧光量子点纯化,通过碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺的耦合作用与人 IgG 抗体连接;然后使用葡聚糖凝胶柱分离纯化获得免疫修饰的羧甲基壳聚糖量子点荧光探针。本发明还公开了用上述荧光探针检测金黄色葡萄球菌的方法,具体为:将该荧光探针与待测菌共培养 30min,通过多次离心洗涤除去非特异性吸附的荧光探针,最后将荧光探针标识的细菌悬浮于磷酸缓冲液中,采用荧光光谱和紫外可见吸收光谱测定菌悬液的荧光和吸收强度,根据荧光强度与菌悬液浓度的线性关系实现对金黄色葡萄球菌的定量测定。该方法清洁、简单、快速,适合应用于紧急情况下的快速检测。



1. 一种荧光探针,其特征在于,采用如下方法制备:

(1) 制备以羧甲基壳聚糖为模板的 CMCS/QDs 量子点水溶液,将该量子点水溶液置于透过分子量为 10,000 道尔顿的透析袋中对蒸馏水透析 3 天;

(2) 碳二亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺分别溶解在蒸馏水中配成 500mM ~ 2 μ M 的 EDC 溶液和 500mM ~ 2 μ M 的 NHS 溶液,免疫球蛋白人 IgG 溶解在蒸馏水中配成 0.5 ~ 5mg/ml 的人 IgG 抗体溶液;

(3) 取纯化的 CMCS/QDs 量子点溶液 3ml 加入 0.45ml 的 EDC 溶液和 0.12ml 的 NHS 溶液的混合溶液中室温活化 3 ~ 6h,向混合溶液中加入 0.1ml 人 IgG 抗体溶液,室温避光反应 8 ~ 12h;

(4) 将反应后的产物在葡聚糖凝胶柱上分离,用蒸馏水透析 3 ~ 5 天,在小于 40°C 的温度下浓缩,即得到 CMCS-QDs-IgG 荧光探针。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光探针,其特征在于,所述量子点为 CdS、ZnS、HgS、CdSe、ZnSe 或 HgSe。

3. 根据权利要求 1 所述的荧光探针,其特征在于,所述量子点的粒径为 2 ~ 7nm。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的荧光探针,其特征在于,所述 CMCS/QDs 量子点水溶液的制备方法为:将羧甲基壳聚糖在室温下溶解于蒸馏水配置浓度为 2.5 ~ 10mg/ml 溶液,搅拌条件下向其中加入 5×10^{-4} - 10^{-2} mol/l 金属前驱物溶液,并搅拌 8 ~ 12h 获得羧甲基壳聚糖金属络合物;向金属络合物溶液中通氮气保护,在 > 1000r/m 的高速搅拌下迅速加入新鲜配置的硫族前驱物水溶液,使得金属和硫的摩尔比为 1 : 3 ~ 3 : 1 之间,然后继续在氮气保护下将体系升温至 80-100 度回流 2-3h,即获得羧甲基壳聚糖 / 量子点复合溶液;将上述产物在 pH = 7.5 的磷酸缓冲液中透析 2 天,凝胶过滤色谱柱纯化,浓缩得到 CMCS/QDs 量子点水溶液;所述金属前驱物溶液为醋酸镉溶液、醋酸锌溶液或醋酸汞溶液,所述硫族前驱物水溶液为硒化钠或硫化钠水溶液。

5. 一种用权利要求 1 ~ 4 任意一项制备的荧光探针快速检测金黄色葡萄球菌的方法,其特征在于,具体步骤如下:

(1) 接种单菌落待测细菌于 5ml 生理盐水中,制备三个平行样品;

(2) 取 900 微升菌液加入 100 微升 CMCS-QDs-IgG 荧光探针,混和后 37°C 孵育 30min; 500rpm 离心 5 ~ 10min,去除上清后重悬于 5ml、pH = 7.4 的磷酸缓冲液,重复离心、洗涤,直至除去非特异性吸附的 CMCS-QDs-IgG 荧光探针;

(3) 最后将细菌悬浮于 5ml 磷酸缓冲液中,测定菌悬液的 OD500 数值和 450 ~ 650nm 处的荧光强度。

6. 根据权利要求 5 所述快速检测金黄色葡萄球菌的方法,其特征在于,所述测定菌悬液的荧光强度所用的荧光波长为量子点的特征发射波长。

一种荧光探针和用该探针快速检测金黄色葡萄球菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用免疫修饰的羧甲基壳聚糖 / 量子点对金黄色葡萄球菌进行特异性快速检测识别的方法,属再生资源化学生物学领域与环境卫生领域。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种常见的人体致病菌,容易在人的鼻腔、皮肤和粘膜内繁殖,导致各种化脓性感染,如静脉炎、骨髓炎、心内膜炎,泌尿系统感染,医疗器械、手术感染,以及食物中毒和中毒性休克症。常规的金黄色葡萄球菌检测识别方法主要基于细菌培养与菌落计数,需要一周左右的时间才能完成。而在面临食品安全和环境安全的突发事件时,往往要求在现场或短时间内即完成对致病菌的识别检测。一些仪器的使用能够有效降低金黄色葡萄球菌的检测时间实现对金黄色葡萄球菌的快速特异性识别,如酶联免疫法 (PCR)、RNA 探针、飞行质谱,但所需仪器价格昂贵,对技术操作要求高,不利于普及。

发明内容

[0003] 针对上述现有技术中存在的问题,本发明提供一种荧光探针,以及用该探针快速检测识别金黄色葡萄球菌的方法,该方法对在生物多糖基质中合成的水溶性荧光量子点进行免疫修饰,构建对金黄色葡萄球菌具有特异性识别能力的荧光探针,通过该荧光探针与细菌悬液的共培养和菌悬液荧光强度的测量来定量检测环境中的金黄色葡萄球菌。

[0004] 本发明通过以下技术方案实现:

[0005] 一种荧光探针,采用如下步骤制备:

[0006] (1) 制备以羧甲基壳聚糖 (CMCS) 为模板的 CMCS/QDs 量子点水溶液,将该量子点水溶液置于透过分子量为 10,000 道尔顿的透析袋中对蒸馏水透析 3 天;

[0007] (2) 碳二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 分别溶解在蒸馏水中配成 500mM ~ 2 μ M (1M = 1mol/L) 的 EDC 溶液和 500mM ~ 2 μ M 的 NHS 溶液,免疫球蛋白人 IgG 溶解在蒸馏水中配成 0.5 ~ 5mg/ml 的人 IgG 抗体溶液;

[0008] (3) 取纯化的 CMCS/QDs 量子点溶液 3ml 加入 0.45ml 的 EDC 溶液和 0.12ml 的 NHS 溶液的混合溶液中室温活化 3 ~ 6h,向混合溶液中加入 0.1ml 人 IgG 抗体溶液,室温避光反应 8 ~ 12h;

[0009] (4) 将反应后的产物在葡聚糖凝胶柱上分离,用蒸馏水透析 3 ~ 5 天,在小于 40℃ 的温度下浓缩,即得到 CMCS-QDs-IgG 荧光探针。

[0010] 优选地,所述量子点 (QDs, 半导体纳米微晶) 为 CdS、ZnS、HgS、CdSe、ZnSe 或 HgSe。

[0011] 优选地,所述量子点 (QDs) 的粒径为 2 ~ 7nm。

[0012] 优选地,所述 CMCS/QDs 量子点水溶液的制备方法为:将羧甲基壳聚糖在室温下溶解于蒸馏水配置浓度为 2.5 ~ 10mg/ml 溶液,搅拌条件下向其中加入 $5 \times 10^{-4} \sim 10^{-2}$ mol/l 金属前驱物溶液 (醋酸镉、醋酸锌、醋酸汞),并搅拌 8-12h 获得羧甲基壳聚糖金属络合物。

向络合物溶液中通氮气保护,在 $> 1000\text{r/m}$ 的高速搅拌下迅速加入新鲜配置的硫族前驱物水溶液(硒化钠或硫化钠水溶液),使得金属和硫的摩尔比为 $1 : 3 \sim 3 : 1$ 之间,然后继续在氮气保护下将体系升温至 $80\text{--}100$ 度回流 $2\text{--}3\text{h}$,即获得高质量的羧甲基壳聚糖/量子点复合溶液;将上述产物在 $\text{pH} = 7.5$ 的磷酸缓冲液中透析2天,凝胶过滤色谱柱纯化(柱填料为 Sephadex G100),浓缩得到的量子点水溶液。

[0013] 一种用上述制备的荧光探针快速检测金黄色葡萄球菌的方法,具体步骤如下:

[0014] (1) 接种单菌落待测细菌于 5mL 生理盐水中,制备三个平行样品;

[0015] (2) 取 900 微升菌液加入 100 微升 CMCS-QDs-IgG 荧光探针,混和后 37°C 孵育 30min ; 500rpm 离心 $5 \sim 10\text{min}$,去除上清后重悬于 5mL 、 $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸缓冲液,重复离心、洗涤,直至除去非特异性吸附的 CMCS-QDs-IgG 荧光探针;

[0016] (3) 最后将细菌悬浮于 5mL 磷酸缓冲液中,测定菌悬液的 OD_{500} 数值和 $450 \sim 650\text{nm}$ 处的荧光强度。

[0017] 优选地,所述测定菌悬液的荧光强度所用的荧光波长为量子点的特征发射波长。所述 CdS 量子点的特征发射波长为 500nm , ZnS 量子点的特征发射波长为 450nm , CdSe 量子点的特征发射波长为 600nm 。

[0018] 本发明中,荧光探针对金黄色葡萄球菌的特异性识别主要是基于人 IgG 的免疫修饰。存在于金黄色葡萄球菌中的蛋白 A (SPA, 也称 A 抗原) 具有和人与多种哺乳动物如豚鼠、猪、小鼠、猴等血清中的 IgG 的 Fc 段特异性结合的能力,每个 SPA 分子可以同时结合两个 IgG 分子。并且 SPA 仅存在于致病金黄色葡萄球菌株中,而不存在于其他细菌中,为致病金黄色葡萄球菌的特异性检测提供了可能。图 1 示意 CdS QDs 生物荧光探针的构建及其如何识别金黄色葡萄球菌。NHS 用来活化量子点表面的羧基,EDC 偶联量子点活化后的羧基和免疫球蛋白的氨基形成酰胺键的稳定结构。

[0019] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0020] (1) 本发明所用的量子点以自然界广泛存在的生物质为基质制备,清洁廉价,具有稳定可控的荧光特性。由于其表面有丰富活性基团,易于与生物分子(如抗体)结合,制备荧光生物探针的工艺简单。

[0021] (2) 本发明所提供的致病菌的检测方法以免疫修饰的生物质基量子点为基础,所使用的仪器为实验室常规的紫外可见及荧光光谱仪,整个检测过程操作简单,能够在3个小时之内完成,因此可以替代费时费力的传统检测手段,在临床微生物检测、食品检验和环境检测中发挥作用。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明荧光探针的制备及其对金黄色葡萄球菌的识别过程示意图。

[0023] 图 2 是实施例 1 中不同浓度的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 分别与 QD-CMCS-IgG 荧光探针培养 30min 后,样品的荧光强度与浓度的关系图;当金黄色葡萄球菌浓度高于 $9.0 \times 10^2\text{CFU/ml}$ 时,荧光强度与菌液浓度呈线性关系,误差线表示 $n = 3$ 时的标准偏差。

[0024] 图 3 为实施例 1 中荧光探针专一性检测的效果图;细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌)浓度为 $3.6 \times 10^3\text{CFU/ml}$,误差线表示 $n = 3$ 时的标准偏差。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例对本发明作进一步具体详细描述,但本发明的实施方式不限于此,对于未特别注明的工艺参数,可参经常规技术进行。

[0026] 实施例 1

[0027] 将羧甲基壳聚糖在室温下溶解于蒸馏水配置浓度为 5mg/ml 溶液,搅拌条件下向其中加入 5×10^{-3} mol/l 醋酸镉溶液,并搅拌 8h 获得羧甲基壳聚糖镉络合物。将络合物溶液置于三口烧瓶,通氮气保护,在 2000r/m 的高速搅拌下迅速加入新鲜配置的硫化钠水溶液,使得 Cd : S 的摩尔比为 1 : 2,然后继续在氮气保护下将体系升温至 80-100 度回流 2h,即获得羧甲基壳聚糖 /CdS 量子点复合溶液。将上述产物在 pH = 7.5 的磷酸缓冲液中透析 2 天,凝胶过滤色谱柱纯化(柱填料为 Sephadex G100),浓缩得到纯化的量子点水溶液。将碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)分别溶解在蒸馏水中配成 500mM 的溶液,免疫球蛋白 IgG 溶解在蒸馏水中配成 1mg/ml 的溶液。取纯化的 CMCS/CdS 量子点溶液 3ml 加入 0.45ml 的 EDC 溶液和 0.12ml 的 NHS 溶液组成的混合溶液中室温活化 4h,向上述混合溶液中加入 0.1ml 人 IgG 抗体溶液,室温避光反应 8h。将产物在葡聚糖凝胶柱上分离,对蒸馏水透析 3-5 天,于 40 度浓缩,即得到免疫标识的羧甲基壳聚糖量子点 (CMCS-CdS QDs-IgG) 荧光探针。接种单菌落待测细菌于 5mL 生理盐水中,取 900 微升菌液加入 100 微升 CMCS-CdS QDs-IgG 荧光探针,混和后 37°C 孵育 30min ;5,00rpm 离心 5min,去除上清后重悬于 pH = 7.4 磷酸缓冲液,再次离心,如此洗涤 2-3 次除去非特异性吸附的 CMCS-QDs-IgG。最后将细菌悬浮于 5ml 磷酸缓冲液中,测定菌悬液在 600nm 处的吸收 (OD600) 和 500nm 处的荧光强度。

[0028] 实施例 2

[0029] 将羧甲基壳聚糖在室温下溶解于蒸馏水配置浓度为 5mg/ml 溶液,搅拌条件下向其中加入 1×10^{-2} mol/l 醋酸镉溶液,并搅拌 8h 获得羧甲基壳聚糖镉络合物。将络合物溶液置于三口烧瓶,通氮气保护,在 2000r/m 的高速搅拌下迅速加入新鲜配置的硒化钠水溶液,使得 Cd : Se 的摩尔比为 1 : 1,然后继续在氮气保护下将体系升温至 80-100 度回流 2h,即获得羧甲基壳聚糖 /CdSe 量子点复合溶液。将上述产物在 pH = 7.5 的磷酸缓冲液中透析 2 天,凝胶过滤色谱柱纯化(柱填料为 Sephadex G100),浓缩得到纯化的量子点水溶液。将碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)分别溶解在蒸馏水中配成 2 μ M 的溶液,免疫球蛋白 IgG 溶解在蒸馏水中配成 5mg/ml 的溶液。取纯化的 CMCS/CdSe 量子点溶液 3ml 加入 0.45ml 的 EDC 溶液和 0.12ml 的 NHS 溶液室温活化 6h,加入 0.1ml 人 IgG 抗体溶液,室温避光反应 12h。将产物在葡聚糖凝胶柱上分离,对蒸馏水透析 3-5 天,于 20°C 浓缩,即得到免疫标识的羧甲基壳聚糖量子点 (CMCS-CdSe QDs-IgG) 荧光探针。接种单菌落待测细菌于 5mL 生理盐水中,取 900 微升菌液加入 100 微升 CMCS-CdSe QDs-IgG 荧光探针,混和后 37°C 孵育 30min ;5,00rpm 离心 5min,去除上清后重悬于 pH = 7.4 磷酸缓冲液,再次离心,如此洗涤 2-3 次除去非特异性吸附的 CMCS-QDs-IgG。最后将细菌悬浮于 5ml 磷酸缓冲液中,测定菌悬液在 600nm 处的吸收 (OD600) 和 600nm 处的荧光强度。

[0030] 实施例 3

[0031] 将羧甲基壳聚糖在室温下溶解于蒸馏水配置浓度为 5mg/ml 溶液,搅拌条件下向其中加入 5×10^{-3} mol/l 醋酸锌溶液,并搅拌 8h 获得羧甲基壳聚糖锌络合物。将络合物溶液置于三口烧瓶,通氮气保护,在 2500r/m 的高速搅拌下迅速加入新鲜配置的硫化钠水溶液,

使得 Zn : S 的摩尔比为 1 : 1, 然后继续在氮气保护下将体系升温至 80-100 度回流 2h, 即获得羧甲基壳聚糖 /ZnS 量子点复合溶液。将上述产物在 pH = 7.5 的磷酸缓冲液中透析 2 天, 凝胶过滤色谱柱纯化 (柱填料为 Sephadex G100), 浓缩得到纯化的量子点水溶液。将碳二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 分别溶解在蒸馏水中配成 2 μ M 的溶液, 免疫球蛋白人 IgG 溶解在蒸馏水中配成 4mg/ml 的溶液。取纯化的 CMCS/ZnS 量子点溶液 3ml 加入 0.45ml 的 EDC 溶液和 0.12ml 的 NHS 溶液室温活化 6h, 加入 0.1ml 人 IgG 抗体溶液, 室温避光反应 12h。将产物在葡聚糖凝胶柱上分离, 对蒸馏水透析 3-5 天, 于 25℃ 浓缩, 即得到免疫标识的羧甲基壳聚糖量子点 (CMCS-ZnS QDs-IgG) 荧光探针。接种单菌落待测细菌于 5ml 生理盐水中, 取 900 微升菌液加入 100 微升 CMCS-ZnS QDs-IgG 荧光探针, 混和后 37℃ 孵育 30min ;5,00rpm 离心 5min, 去除上清后重悬于 pH = 7.4 磷酸缓冲液, 再次离心, 如此洗涤 2-3 次除去非特异性吸附的 CSS-QDs-IgG。最后将细菌悬浮于 5ml 磷酸缓冲液中, 测定菌悬液在 600nm 处的吸收 (OD600) 和 450nm 处的荧光强度。

[0032] 图 2 是实施例 1 中不同浓度的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 分别与 QD-CMCS-IgG 荧光探针培养 30min 后, 样品的荧光强度与浓度的关系。

[0033] 为了减少背景光的影响, 采用样品信号扣除阴性对照信号对不同浓度样品的荧光强度作图。结果发现, 当菌液浓度小于 9.0×10^2 CFU/ml 时, 样品的荧光强度比空白对照变化不大, 增加范围不超过噪声的三倍, 不能作为有效的检测信号。当菌液浓度大于 9.0×10^2 CFU/ml 时, 样品信号较之空白对照增加较为明显, 可以作为有效的检测信号, 并且荧光强度随菌液浓度的增加基本呈线性关系。可见, 使用 QD-CMCS-IgG 免疫荧光探针与荧光分光光度计结合可以作为环境中金黄色葡萄球菌检测的有效手段。

[0034] 对实施例 1 中荧光探针对金黄色葡萄球菌检测的特异性进行考察, 如图 3 所示, 相同的实验条件下 QD-CMCS-IgG 仅对金黄色葡萄球菌有信号, 而大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的信号和空白差不多。可见, 这种检测手段对金黄色葡萄球菌有良好的专一性。

[0035] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

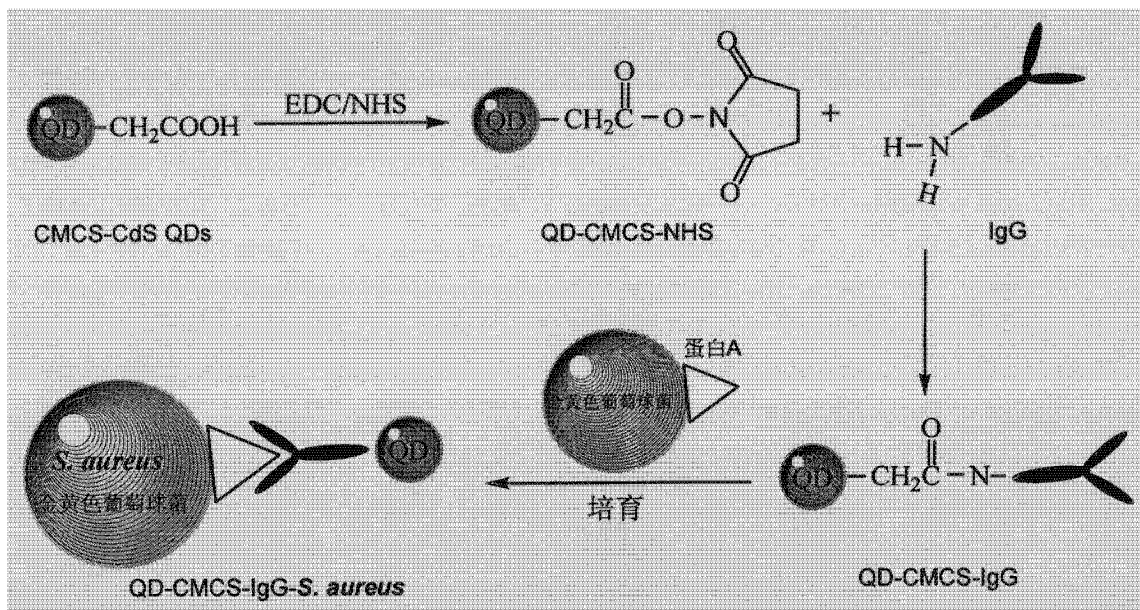


图 1

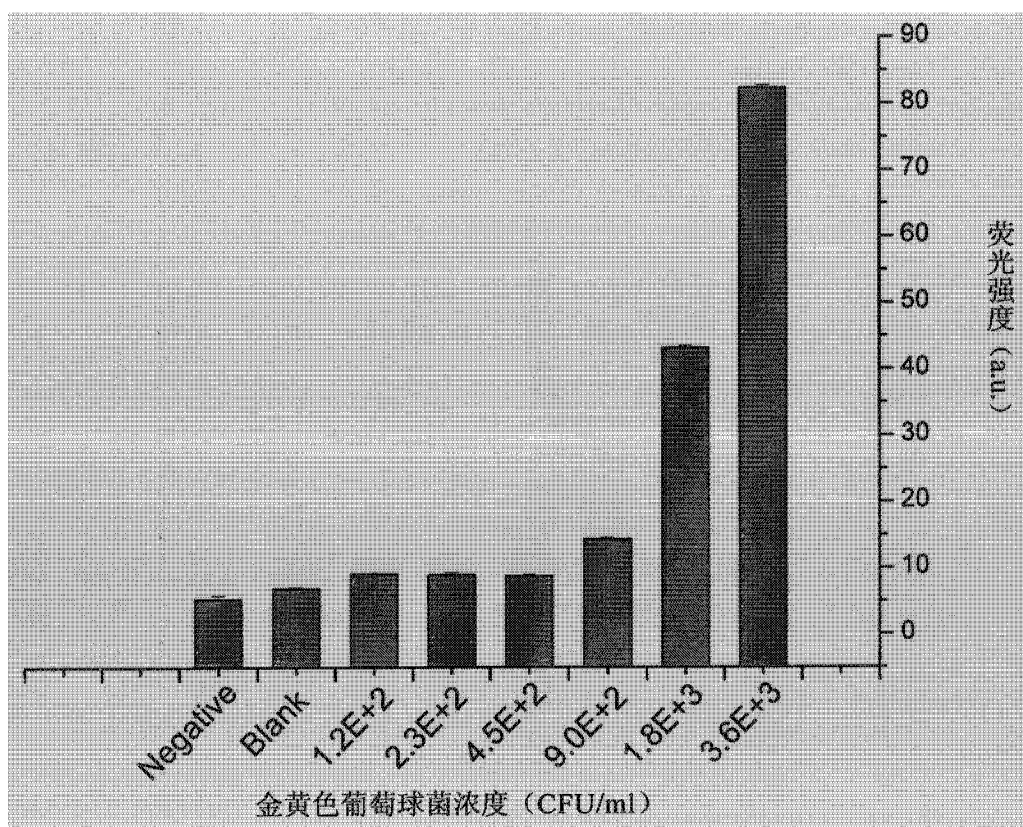


图 2

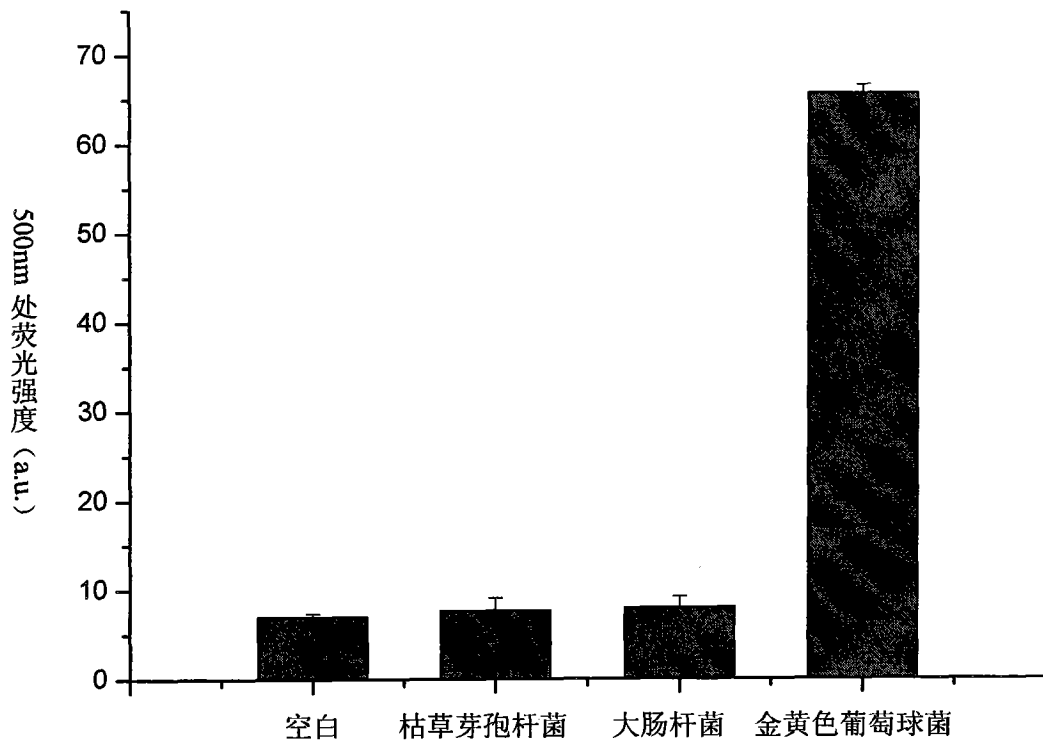


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种荧光探针和用该探针快速检测金黄色葡萄球菌的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN102053151A | 公开(公告)日 | 2011-05-11 |
| 申请号 | CN201010522624.1 | 申请日 | 2010-10-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 华南理工大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 华南理工大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 作者：南中国大学 | | |
| [标]发明人 | 王小慧 李栋 孙润仓 | | |
| 发明人 | 王小慧 李栋 孙润仓 | | |
| IPC分类号 | G01N33/533 G01N21/64 C09K11/89 C09K11/88 C09K11/56 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种荧光探针，用下述方法制备：首先将在羧甲基壳聚糖模板中合成的荧光量子点纯化，通过碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的耦合作用与人IgG抗体连接；然后使用葡聚糖凝胶柱分离纯化获得免疫修饰的羧甲基壳聚糖量子点荧光探针。本发明还公开了用上述荧光探针检测金黄色葡萄球菌的方法，具体为：将该荧光探针与待测菌共培养30min，通过多次离心洗涤除去非特异性吸附的荧光探针，最后将荧光探针标识的细菌悬浮于磷酸缓冲液中，采用荧光光谱和紫外可见吸收光谱测定菌悬液的荧光和吸收强度，根据荧光强度与菌悬液浓度的线性关系实现对金黄色葡萄球菌的定量测定。该方法清洁、简单、快速，适合应用于紧急情况下的快速检测。

