



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106706907 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201611156471.7

(22)申请日 2016.12.14

(71)申请人 武汉市农业科学技术研究院农业环境安全检测研究所(武汉市农业科学技术研究院中心实验室)

地址 430065 湖北省武汉市洪山区青菱乡张家湾特1号

(72)发明人 王利华 曾令文 韩艳云 杨保国

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条

(57)摘要

本发明设计了一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条。所述的量子点微球为聚合物包裹多个量子点形成的微球。所述的抗生素与金黄色葡萄球菌细胞壁有一定的结合作用。所述快速层析试纸条为多孔膜材质,膜上固定有抗生素-BSA偶联物,其能与金黄色葡萄球菌以及抗体修饰的量子点微球形成夹心结构,借助便携式量子点荧光检测仪实现检测。利用低成本的小分子抗生素以及稳定性好、信号强的量子点微球,不仅实现了单个细菌的多位点结合,提高了检测灵敏度,同时省去另外一个抗体的使用,极大地降低了检测成本。本试纸条的构建过程和检测过程不需要昂贵的仪器和试剂,操作简单,灵敏度很高。

1. 一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,其特征在于,包括如下的步骤:

- 1) 抗生素-BSA偶联物的制备;
- 2) 量子点微球的制备;
- 3) 免疫荧光微球的制备;
- 4) 试纸条的设计和组装;
- 5) 样品检测。

2. 基于权利要求1所述方法的一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,其特征在于,包括如下的步骤:

1) 抗生素-BSA偶联物的制备:采用EDC/NHS化学反应方法,将抗生素与BSA偶联,偶联蛋白用AKTA prime TM protein purification system纯化,用于制备检测线;

2) 量子点微球的制备:以聚(苯乙烯/丙烯酰胺)纳米球为载体,通过在有机溶剂中溶胀和超声处理将CdSe/ZnS量子点包埋在纳米球上;

3) 免疫荧光微球的制备:将制备好的量子点微球调节pH值后,与金黄色葡萄球菌的抗体通过EDC/NHS反应偶联;

4) 试纸条的设计和组装:试纸条包括三个部分:样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜上预先包被抗生素-BSA偶联物和羊抗鼠二抗,分别形成检测线T线和质控线C线;

5) 样品检测:金黄色葡萄球菌样品与免疫荧光微球混匀、孵育一段时间后,取一定体积溶液滴加到试纸条样品垫上,反应一段时间后,借助便携式量子点荧光检测仪完成样品的检测。

3. 如权利要求2所述的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,其特征在于:所述步骤1) 抗生素与BSA的质量比为1:4。

4. 如权利要求2所述的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,其特征在于:步骤2) 所述的量子点微球粒径为80nm。

5. 如权利要求2所述的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,其特征在于,包括如下的步骤:

1) 抗生素-BSA偶联物制备:将50mg抗生素和200mg BSA加入500 μ L PBS (10mM, pH 7.0) 中完全溶解后继续加入200mg EDC与NHS的混合物,室温反应2h;加入200mg甘氨酸,孵育30min,进行封闭处理;接着用20KD透析袋在PBS中透析3天,最后用PEG 20000浓缩,制得抗生素-BSA偶联物;

2) 量子点微球的制备:将2mL肼处理过的聚(苯乙烯/丙烯酰胺)纳米球溶液和3mg CdSe/ZnS量子点加入体积比为5:95的氯仿/丁醇溶剂中混匀、溶胀,超声处理60min后,用丁醇和10mM、pH 7.0的PBS,2790g离心洗涤5次,最后重悬在2mL PBS中,制得羧基化的量子点微球;

3) 免疫荧光微球制备:将500 μ L步骤2) 制得的羧基化量子点微球加入500 μ L溶有50mM EDC和50mM NHS的PBS溶液中活化处理30min后,用PBS离心洗涤2次等体积重悬;接着,继续加入1mg金黄色葡萄球菌单抗,室温轻微振荡反应4h后,用含1%BSA的PBS离心洗涤两次,重悬在500 μ L PBS中,最后4度保存;

4) 试纸条的设计和组装:T线用抗生素-BSA偶联物划线,浓度为0.5mg/mL,C线用羊抗鼠

二抗划线,浓度为0.3mg/mL,划线速度均为1 μ L/cm,37度烘干2小时后干燥保存;

5) 样品检测:将50 μ L金黄色葡萄球菌样品、50 μ L免疫荧光微球加入10mM、pH 7.0的PBS 400 μ L中,室温孵育30min后,取60 μ L滴加到试纸条上,5min后用荧光读卡仪读数。

6. 如权利要求2所述的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建,其特征在于:步骤1)所述抗生素为能与金黄色葡萄球菌细胞壁特异性结合的抗生素,包括万古霉素、去甲万古霉素、环丙沙星及其改构体、青霉素及其改构体。

7. 如权利要求2所述的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建,其特征在于:步骤3)所述荧光微球为量子点微球,其上面的标记物为金黄色葡萄球菌单抗。

8. 如权利要求2所述的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建,其特征在于:步骤4)所述试纸条上T线固定的是抗生素-BSA偶联物。

一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学检测领域,涉及一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是人类的一种重要病原菌,隶属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 是革兰氏阳性菌的代表,有“嗜肉菌”的别称,可引起局部化脓感染,也可引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等,甚至败血症、脓毒症等全身感染。金黄色葡萄球菌在自然界中无处不在,空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中都可找到。因此,食品受到污染的机会很多。美国疾病控制中心报告,由金黄色葡萄球菌引起的感染占第二位,仅次于大肠杆菌。金黄色葡萄球菌肠毒素是个世界性卫生难题,在美国由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒,占整个细菌性食物中毒的33%,加拿大则更多,占到45%。中国金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件也时有发生,比如2001年4月12日,无锡市锡山区所辖小学、幼儿园因课间加餐饮用袋装牛奶饮料导致食物中毒事件。

[0003] 传统金黄色葡萄球菌等病原微生物的检测方法为琼脂培养法,其主要是依据病原微生物的形态特征和生理性状,进行分离、培养及一系列生化反应,整个过程通常需要两到三天,且需要专业的操作人员,程序繁琐。这对货架寿命较短的食品在产品卫生状况方面的评估作用不大,难以满足食品生产厂家特别是出口厂家的检测期较短的需求。近年来,不断发展的免疫荧光技术、酶联免疫技术、放射免疫技术等免疫学方法已逐步应用于金黄色葡萄球菌等病原微生物的检测,但仍存在操作繁琐,敏感性偏低等问题。且相比传统方法所需仪器设备要求高,在很大程度上限制了这些方法的应用和推广,大大降低了其实用价值。快速检测试纸条因成本低、操作简单、检测时间短等明显优势,近年来备受关注。它是金黄色葡萄球菌等病原微生物快速检测技术的重要研究方向,对有效预防和控制病原微生物类食品安全事件的暴发,减轻病原微生物对人类造成的危害将发挥重要的作用。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条及其构建方法,以解决现有技术灵敏度低,操作复杂,设备要求高等问题。

[0005] 本发明通过以下的技术方案来实现:

[0006] 一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条,其构建方法如下:

[0007] 1) 抗生素-BSA偶联物的制备;

[0008] 2) 量子点微球的制备;

[0009] 3) 免疫荧光微球的制备;

[0010] 4) 试纸条的设计和组装;

[0011] 5) 样品检测。

[0012] 进一步的,步骤1)所述抗生素可以为万古霉素、环丙沙星中的一种。

[0013] 优选的,本发明所述基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条,其构建方法如下:

[0014] 1) 抗生素-BSA偶联物的制备:采用经典EDC/NHS化学反应方法,将抗生素与BSA偶联,偶联蛋白用AKTAprime™ protein purification system纯化,用于制备检测线;

[0015] 2) 量子点微球的制备:以聚(苯乙烯/丙烯酰胺)纳米球为载体,通过在有机溶剂中溶胀和超声处理将CdSe/ZnS量子点包埋在纳米球上;

[0016] 3) 免疫荧光微球的制备:将制备好的量子点微球调节pH值后,与金黄色葡萄球菌的抗体通过EDC/NHS反应偶联;

[0017] 4) 试纸条的设计和组装:

[0018] 试纸条包括三个部分:样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜上预先包被抗生素-BSA偶联物和羊抗鼠二抗,分别形成检测线(T线)和质控线(C线);

[0019] 5) 样品检测:

[0020] 金黄色葡萄球菌样品与免疫荧光微球混合、孵育一段时间后,取一定体积溶液滴加到试纸条上,反应一段时间后,借助荧光读卡仪完成样品的检测。

[0021] 进一步的,步骤3)所述荧光微球为量子点微球,其上面的标记物为金黄色葡萄球菌单抗。

[0022] 进一步的,步骤4)所述试纸条上T线固定的是抗生素-BSA偶联物。

[0023] 优选的,具体包括如下的步骤:

[0024] 1) 抗生素-BSA偶联物制备:将50mg抗生素和200mg BSA加入500μL PBS(10mM,pH 7.0)中溶解后继续加入200mg EDC和NHS的混合物,室温反应2h;加入200mg甘氨酸,孵育30min,进行封闭处理;接着用20KD透析袋在PBS中透析3天,最后用PEG 20000浓缩,制得抗生素-BSA偶联物;

[0025] 2) 量子点微球的制备:将2mL肼处理过的聚(苯乙烯/丙烯酰胺)溶液和3mg CdSe/ZnS量子点加入体积比为5:95的氯仿/丁醇溶剂中混匀、溶胀,超声处理60min后,用丁醇和PBS(10mM,pH 7.0)离心洗涤5次(2790g,5min),最后重悬在2mL PBS中,制得羧基化的量子点微球;

[0026] 3) 免疫荧光微球制备:将500μL步骤2)制得的羧基化量子点微球加入500μL溶有50mM EDC和50mM NHS的PBS溶液中活化处理30min后,用PBS离心洗涤2次等体积重悬;接着,继续加入1mg金黄色葡萄球菌单抗,室温轻微振荡反应4h后,用含1%BSA的PBS离心洗涤两次,重悬在500μL PBS中,最后4度保存;

[0027] 4) 试纸条的设计与组装:T线用抗生素-BSA偶联物划线,浓度为0.5mg/mL,C线用羊抗鼠二抗划线,浓度为0.3mg/mL,划线速度均为1μL/cm,37度烘干2小时后干燥保存;

[0028] 5) 样品检测:将50μL金黄色葡萄球菌样品、50μL免疫量子点荧光微球加入400μL PBS(10mM,pH 7.0)中,室温混合反应30min后,取60μL滴加到试纸条上,5min后用便携式量子点荧光检测仪读数。

[0029] 优选的,步骤1)与BSA偶联时,抗生素与BSA的质量比为1:4,具体的质量分别为50和200mg。

[0030] 优选的,步骤2)所述合成量子点微球的纳米载体为聚(苯乙烯/丙烯酰胺)纳米球,合成的量子点微球粒径为80nm。

[0031] 优选的,步骤3)制备免疫量子点荧光微球的金黄色葡萄球菌单抗质量为1mg。

[0032] 优选的,步骤4)所述试纸条上,T线抗生素-BSA偶联物浓度为0.5mg/mL,C线羊抗鼠二抗划线浓度为0.3mg/mL,划线速度均为1 μ L/cm。

[0033] 优选的,所述用于检测的样品体积为60 μ L。

[0034] 进一步的,本发明所述方法不局限于金黄色葡萄球菌的检测,可根据待检测微生物的不同,调整抗生素与抗体种类。

[0035] 其中,量子点微球表面修饰有抗体,其和抗生素均能与金黄色葡萄球菌结合,形成夹心结构实现检测。本发明中由于采用抗生素捕获金黄色葡萄球菌,因此检测只需一个单抗,这在一定程度大大降低了检测成本(常规抗生素价格远低于抗体)。此外,由于采用量子点微球,一个球体含有很多个量子点,不仅抗体的标记效率有所提高、成本有所降低,而且灵敏度比常规单个量子点的荧光强很多倍。

[0036] 本发明旨在利用量子点微球稳定性好、荧光信号强、抗体标记效率高等优势,以及低成本小分子抗生素与金黄色葡萄球菌的结合作用,构建一种可以现场、简单、快速、高灵敏检测金黄色葡萄球菌的夹心快速层析试纸条,其检测限可低至100CFU mL⁻¹;该夹心法利用细菌表面两个完全不同的结合位点,可大大提高检测的特异性,同时,小分子抗生素的使用只需采用一种抗体,检测成本可以大幅度降低;量子点微球的使用,不仅因为聚合物包裹材料稳定性提高,而且一个微球由很多个量子点组成,可以实现荧光信号的指数级放大,大幅度提高检测灵敏度;通过将样品与抗体溶液室温孵育30min即可借助便携式量子点荧光检测仪进行检测,整个检测时间短,约为40min。本发明中提供的检测方法具有操作简单、成本低、灵敏度高、通用等特点;同时试纸条的构建过程和使用过程不需要依赖大型仪器以及专业的操作人员,可广泛用于资源匮乏的农村以及发展中国家的现场定量检测。

具体实施方式

[0037] 下面通过具体的实施例对本发明的技术方案进行详细的说明,但是本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0038] 实施例1

[0039] 一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,包括如下的步骤:

[0040] 1) 万古霉素-BSA偶联物制备:将50mg万古霉素和200mg BSA加入500 μ L PBS (10mM, pH 7.0)中溶解后继续加入200mg EDC和NHS的混合物,室温反应2h;加入200mg甘氨酸,孵育30min,进行封闭处理;接着用20KD透析袋在PBS中透析3天,最后用PEG 20000浓缩,制得万古霉素-BSA偶联物;

[0041] 2) 量子点微球的制备:将2mL肼处理过的聚(苯乙烯/丙烯酰胺)溶液和3mg CdSe/ZnS量子点加入体积比为5:95的氯仿/丁醇溶剂中混匀、溶胀,超声处理60min后,用丁醇和PBS (10mM, pH 7.0)离心洗涤5次(2790g, 5min),最后重悬在2mL PBS中,制得羧基化的量子点微球;

[0042] 3) 免疫荧光微球制备:将500 μ L步骤(2)制得的羧基化量子点微球加入500 μ L溶有

50mM EDC和50mM NHS的PBS溶液中活化处理30min后,用PBS离心洗涤2次等体积重悬;接着,继续加入1mg金黄色葡萄球菌单抗,室温轻微振荡反应4h后,用含1%BSA的PBS离心洗涤两次,重悬在500 μ L PBS中,最后4度保存;

[0043] 4) 试纸条的设计与组装:T线用万古霉素-BSA偶联物划线,浓度为0.5mg/mL,C线用羊抗鼠二抗划线,浓度为0.3mg/mL,划线速度均为1 μ L/cm,37度烘干2小时后干燥保存;

[0044] 5) 样品检测:将50 μ L金黄色葡萄球菌标准品样品、50 μ L免疫量子点荧光微球加入400 μ L PBS (10mM,pH 7.0) 中,室温混合反应30min后,取60 μ L滴加到试纸条上,5min后用便携式量子点荧光检测仪读数。

[0045] 实施例2

[0046] 一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条的构建方法,包括如下的步骤:

[0047] 1) 环丙沙星-BSA偶联物制备:将50mg环丙沙星和200mg BSA加入500 μ L PBS (10mM,pH 7.0) 中溶解后继续加入200mg EDC和NHS的混合物,室温反应2h;加入200mg甘氨酸,孵育30min,进行封闭处理;接着用20KD透析袋在PBS中透析3天,最后用PEG 20000浓缩,制得环丙沙星-BSA偶联物;

[0048] 2) 量子点微球的制备:将2mL肼处理过的聚(苯乙烯/丙烯酰胺)溶液和3mg CdSe/ZnS量子点加入体积比为5:95的氯仿/丁醇溶剂中混匀、溶胀,超声处理60min后,用丁醇和PBS (10mM,pH 7.0) 离心洗涤5次(2790g,5min),最后重悬在2mL PBS中,制得羧基化的量子点微球;

[0049] 3) 免疫荧光微球制备:将500 μ L步骤(2)制得的羧基化量子点微球加入500 μ L溶有50mM EDC和50mM NHS的PBS溶液中活化处理30min后,用PBS离心洗涤2次等体积重悬;接着,继续加入1mg金黄色葡萄球菌单抗,室温轻微振荡反应4h后,用含1%BSA的PBS离心洗涤两次,重悬在500 μ L PBS中,最后4度保存;

[0050] 4) 试纸条的设计与组装:T线用环丙沙星-BSA偶联物划线,浓度为0.5mg/mL,C线用羊抗鼠二抗划线,浓度为0.3mg/mL,划线速度均为1 μ L/cm,37度烘干2小时后干燥保存;

[0051] 5) 样品检测:将50 μ L金黄色葡萄球菌标准品样品、50 μ L免疫量子点荧光微球加入400 μ L PBS (10mM,pH 7.0) 中,室温混合反应30min后,取60 μ L滴加到试纸条上,5min后用便携式量子点荧光检测仪读数。

[0052] 需要指出的是,以上的实施例只是对本发明的解释,并非是对发明的限定,在不违背本发明的精神的情况下,本发明可以作任何形式的修改,例如抗生素和抗体种类的变化、荧光微球纳米材料种类以及其表面抗体修饰方法的变化都应在本发明技术方案保护范围之内。

专利名称(译)	一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条		
公开(公告)号	CN106706907A	公开(公告)日	2017-05-24
申请号	CN201611156471.7	申请日	2016-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	武汉市农业科学技术研究院农业环境安全检测研究所武汉市农业科学技术研究院中心实验室		
申请(专利权)人(译)	武汉市农业科学技术研究院农业环境安全检测研究所(武汉市农业科学技术研究院中心实验室)		
当前申请(专利权)人(译)	武汉市农业科学技术研究院农业环境安全检测研究所(武汉市农业科学技术研究院中心实验室)		
[标]发明人	王利华 曾令文 韩艳云 杨保国		
发明人	王利华 曾令文 韩艳云 杨保国		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56938 G01N33/533 G01N2333/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明设计了一种基于量子点微球和抗生素的金黄色葡萄球菌快速层析试纸条。所述的量子点微球为聚合物包裹多个量子点形成的微球。所述的抗生素与金黄色葡萄球菌细胞壁有一定的结合作用。所述快速层析试纸条为多孔膜材质，膜上固定有抗生素-BSA偶联物，其能与金黄色葡萄球菌以及抗体修饰的量子点微球形成夹心结构，借助便携式量子点荧光检测仪实现检测。利用低成本的小分子抗生素以及稳定性好、信号强的量子点微球，不仅实现了单个细菌的多位点结合，提高了检测灵敏度，同时省去另外一个抗体的使用，极大地降低了检测成本。本试纸条的构建过程和检测过程不需要昂贵的仪器和试剂，操作简单，灵敏度很高。