

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810239674.1

[43] 公开日 2009年5月13日

[11] 公开号 CN 101430331A

[22] 申请日 2008.12.15

[21] 申请号 200810239674.1

[71] 申请人 中华人民共和国北京出入境检验检疫局

地址 100026 北京市朝阳区甜水园街6号

[72] 发明人 赖平安 王孔江 辛亮 高志强
周琦 柏亚铎 汪琳 张伟

[74] 专利代理机构 北京正理专利代理有限公司

代理人 李超

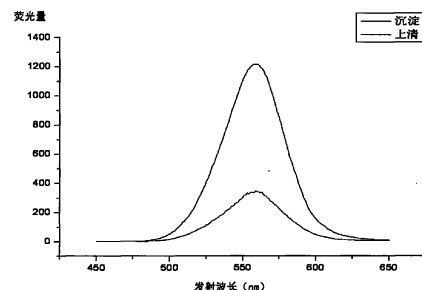
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

[54] 发明名称

布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，属于检验检疫领域。一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，包括如下步骤：(1)将量子点、布氏杆菌多克隆抗体和偶联剂混合，室温作用2小时，得到含有偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点的溶液；(2)纯化偶联产物，去除未反应的布氏杆菌抗体和量子点；(3)偶联产物和涂布在载波片上的待测样品反应，冲洗掉游离的偶联产物后，进行荧光检测，有荧光表示待测样品中含有相应抗原。本发明的优点是：本发明提供的方法具有极低的检测限，该方法灵敏度高、特异性强，同时检测多种布氏杆菌抗原成分，快速、简便，而且设备简单、成本低廉；快速，可用于布氏杆菌的现场快速检测。



1. 一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，包括如下步骤：

(1) 将量子点、布氏杆菌多克隆抗体和偶联剂混合，室温作用 2 小时，得到含有偶联有布氏杆菌抗体的量子点的溶液；

(2) 纯化偶联产物，去除未反应的布氏杆菌多克隆抗体和量子点；

(3) 偶联产物和涂布在载波片上的待测样品反应，冲洗掉游离的偶联产物后，进行荧光检测，有荧光表示待测样品中含有相应抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述步骤 (1) 将量子点、布氏杆菌多克隆抗体和偶联剂混合，得到含有偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点的溶液，是指将量子点、偶联剂和布氏杆菌多克隆抗体按 $1\mu\text{mol}: 1-6\text{ mg}: 0.91\text{mg}$ 的比例混合。

3. 根据权利要求 1 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述的量子点是水溶性量子点。

4. 根据权利要求 3 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述的水溶性量子点是 CdTe 水溶性量子点。

5. 根据权利要求 1 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述偶联剂为乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐或 N-羟基琥珀酰亚胺或二者混合。

6. 根据权利要求 5 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述偶联剂为乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐。

7. 根据权利要求 1 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述步骤 (2) 纯化偶联产物的方法为分子筛法纯化，分子筛为 sephadex G100。

8. 根据权利要求 1 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述步骤 (2) 纯化偶联产物的方法为离心法纯化，离心条件为 4°C ，6000-12000r/min，离心 10-20min，所得沉淀即为纯化的偶联有布氏杆菌抗体的量子点。

9. 根据权利要求 1 所述的布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，其特征在于：所述布氏杆菌多克隆抗体为布氏杆菌可溶性抗原于哺乳动物皮下注射，进行免疫后，收集被免疫动物的血清并经纯化得到的布氏杆菌可溶性特异抗体。

布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法

技术领域

本发明涉及布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，更具体地说是采用纳米生物技术制备和纯化偶联布氏杆菌特异性抗体的量子点的方法，尤指一种水溶性半导体荧光量子点与布氏杆菌特异性抗体偶联和纯化的方法，获得的偶联抗体适用于布氏杆菌的现场快速检测，属于检验检疫领域。

背景技术

纳米技术是目前国际上基础研究和高新技术发展中最具有前瞻性、带动性的重点领域之一。纳米材料因具有独特的物理化学性质，其巨大的比表面积，特异的反应活性和纳米效应，使其大异于传统材料，在发展快速、高灵敏度、高准确性检测技术和传感手段方面具有极大的潜力。我国在纳米生物材料的设计、研发、表征和潜在应用领域成果层出不穷。研究并利用新型纳米生物材料的特性，结合现有的检测技术，实现口岸快速、高特异、高敏感检验目的，开发具有我国自主知识产权的病原富集、纳米与生物活性物质标记及检测技术，对占领纳米材料应用性研究领域的制高点具有重要的战略意义。

在严重危害人畜健康的病原微生物检测方面，利用带有荧光的无机纳米颗粒与生物细胞或蛋白质的偶联，开展生物检测具有重大应用前景。但在目前，纳米材料与蛋白质偶联是一个世界性难题。主要难点包括纳米材料水溶性的问题；纳米材料表面基团的活化；抗体分子和纳米材料的共价结合；偶联条件必须能保证纳米材料和抗体活性不能受损；之外还要求偶联后能有效去除未偶联的抗体分子。

发明内容

本发明要解决的第一个技术问题是：提供一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法。通过反应条件优化，实现特异性抗体与量子点的偶联。并对产物纯化方法进行研究，从而建立量子点与抗体偶联与纯化的方法。

本发明要解决的另一个技术问题是：将纯化的量子点偶联抗体用于布氏杆菌等病原微生物的快速检测，建立一种新的病原微生物检测技术。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，包括如下步骤：

(1) 将量子点、布氏杆菌多克隆抗体和偶联剂混合，室温反应 2 小时，得到含有偶联有布氏杆菌抗体的量子点的溶液；

(2) 纯化偶联产物，去除未反应的布氏杆菌多克隆抗体和量子点；

(3) 偶联产物和涂布在载波片上的待测样品反应，冲洗掉游离的偶联产物后，进行荧光检测，有荧光表示待测样品中含有相应抗原。

所述步骤(1)将量子点、布氏杆菌多克隆抗体和偶联剂混合，得到含有偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点的溶液，是指将量子点、偶联剂和布氏杆菌多克隆抗体按 $1\mu\text{mol}: 1-6\text{ mg}: 0.91\text{mg}$ 的比例混合。

所述的量子点 (quantumdots, QD) 是指半导体纳米粒子，也可称为半导体纳米晶 (nanocrystals, NC)，是一种由 II-IV 族元素组成的纳米颗粒。本发明使用的量子点是水溶性量子点，优选水溶性量子点 CdTe。

所述“偶联剂”是指可以使抗体和量子点进行共价结合的试剂。由于抗体的结构特征和量子点被修饰羧基的原因，选择的偶联剂应符合下列条件的一种：能活化羧基，使活化的羧基与抗体上的氨基反应，形成肽键。本发明使用的偶联剂为乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC) 或 N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS)，也可将二者混合进行偶联。优选为单独使用 EDC。

所述步骤(2)纯化偶联产物的方法一为分子筛法纯化，分子筛为 sephadex G100。

所述步骤(2)纯化偶联产物的方法二为离心法纯化，离心条件为 4°C ，6000-12000r/min，离心 10-20min，所得沉淀即为纯化的偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点。

所述的“布氏杆菌多克隆抗体”是指通过布氏杆菌可溶性抗原于哺乳动物皮下注射，进行多次免疫，收集被免疫动物的血清，经纯化得到布氏杆菌可溶性特异抗体。

本发明通过对荧光量子点和布氏杆菌特异性抗体分子特性的研究，通过对各种偶联条件进行优化，选择合适的偶联剂品种和浓度，可以将水溶性的量子点与特异性的抗体进行共价偶联，得到功能化的量子点，这种生物功能化量子点与涂布在载波片上的布氏杆菌通过免疫特异性结合，来定性和定量地检测布氏杆菌，实现了布氏杆菌的现场快速检测。

本发明的优点是：

1) 本发明提供的方法具有极低的检测限。

- 2) 本发明提供的方法灵敏度高、特异性强。
- 3) 本发明提供的方法可同时检测多种布氏杆菌抗原成分。
- 4) 本发明提供的方法快速、简便,而且设备简单、成本低廉。
- 5) 快速,可用于布氏杆菌的现场快速检测。

附图说明

图1为用 Sephadex G100 分离偶联反应产物, 280 nm 紫外检测结果。

图2为离心分离产物的荧光检测结果。

图3为偶联特异性抗体的量子点对布氏杆菌的检测结果。

具体实施方式

实施例 1: 量子点和布氏杆菌多克隆抗体的偶联、纯化和检测

1. 材料

pH8.0 的硼酸缓冲液: 0.05 M 硼砂 30% (V/V), 0.2 M 硼酸 70% (V/V), pH 值为 8.0。

CdTe 水溶性量子点 (购自深圳中鼎盛投资有限公司), 乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC), N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS), 乙醇胺, 1 M 甘氨酸, 0.02 M NaH_2PO_4 , 0.1 M NaCl, 1%叠氮钠 (质量积百分比), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液, Sephadex G100(购自 BIO-RAD 公司), DEAE Sepharose Fast Flow 填料(购自 Pharmacia 公司)。

布氏杆菌可溶性抗原 (购自北京市生物制品检定所), 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 (购自北京市生物制品检定所)。

2. 方法

(1) 布氏杆菌多克隆抗体 (9.1mg/ml) 的制备: 分 4 次免疫新西兰大白兔, 第 1 次免疫: 取 2.0mL (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 布氏杆菌可溶性抗原与等体积弗氏完全佐剂, 充分研磨至完全乳化, 兔颈背部皮下多点注射; 间隔 3 周后进行第 2 次免疫: 取 2.0mL (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 布氏杆菌可溶性抗原与等体积弗氏不完全佐剂, 充分研磨至完全乳化, 兔颈背部皮下多点注射; 间隔 3 周后进行第 3 次免疫: 取 2.0mL (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 布氏杆菌可溶性抗原, 兔耳静脉注射。20 天后, 颈动脉放血收获抗血清。

取 20ml 上述血清, 加生理盐水 20ml, 再逐滴加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液 10ml, 使成 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 边加边搅拌, 充分混合后, 静置 30min。4°C, 3000r/min 离心 20min, 弃去沉淀, 以除去纤维蛋白。在上清液中再加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液 30ml,

使成 50% (NH₄)₂SO₄ 溶液, 充分混合, 静置 30min。4℃, 3000r/min 离心 20min, 弃上清。于沉淀中加 20ml 生理盐水, 使之溶解, 再加 (NH₄)₂SO₄ 饱和溶液 10ml, 使成 33% (NH₄)₂SO₄ 溶液, 充分混合后, 静置 30min。4℃, 3000r/min 离心 20min, 弃上清, 以除去白蛋白。用 10ml 生理盐水溶解沉淀, 装入透析袋。透析除盐, 4℃, 在常水中透析过夜, 再在生理盐水中于 4℃透析 24h, 中间换液 5 次。4℃, 3000r/min 离心 10min 去沉淀, 上清液即为粗提布氏杆菌多克隆抗体。

粗提布氏杆菌多克隆抗体的离子交换树脂纯化:

1)取体积分数为 20%酒精浸泡的 DEAE Sepharose Fast Flow 填料 20mL 装填柱子(112 cm×20 cm Millipore, 购自 BIO-RAD 公司), 先用 200 mL 纯水以 1.5 mL/min 洗柱, 再用 100 mL 的 Buffer A(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 以 1.5 mL/min 平衡柱子。

2)将粗提后所得的布氏杆菌多克隆抗体样品利用透析袋更换成 Buffer A 缓冲液, 以 1.0 mL/min 流速上样, 同时开启紫外检测仪, 开始记录。

3)上样完毕后,首先用 Buffer A 洗脱,洗脱速度为 1.0 mL/min,并收集洗脱峰后,随后用含有 0.1 mol/L NaCl Buffer A 溶液进行等梯度洗脱,收集洗脱峰,为一个洗脱峰,标记为 P1, P1 样品即为纯化的布氏杆菌多克隆抗体,于 4℃冰箱保存。

(2)量子点和布氏杆菌多克隆抗体的偶联: 0.01 M 100 μL 量子点加硼酸缓冲液补至 800 μL, 加入 EDC 2mg 和 Sulfo-NHS 4 mg, 室温反应 15 分钟。然后加入 10 μL 乙醇胺淬灭 EDC。加 100 μL 布氏杆菌多克隆抗体 (9.1 mg/ml), 室温反应 2 小时。加 100 μL 1 M 甘氨酸, 封闭量子点上的未反应的羧基。最后加入 10 μl 1%叠氮钠, 放到 2℃冰箱中保存。

(3)分离未偶联的量子点和布氏杆菌多克隆抗体: 取 10 g Sephadex G100 干粉, 加入适量 0.1 M NaCl, 100℃加热 3 小时, 冷却至室温后, 装入层析柱中。调整好流速后, 用 200 ml NaH₂PO₄ 洗脱。使用紫外检测器检测洗脱液的 280 nm 吸收值。收集各个组分, 最前面的组分应为所需量子点和布氏杆菌多克隆抗体的偶联产物。

(4)检测偶联产物的荧光效率: 使用荧光分光光度计。用 260 nm 或 295 nm 激发光, 扫描 400-650 nm 的发射波谱。结果显示偶联反应未改变量子点的发射波长的荧光效率。

(5)偶联产物检测布氏杆菌:

①抗原固定: 将正常小鼠的肝脏研磨, 用 pH7.2 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 制成 20%的组织悬液, 分装为 2 管, 每管 1 ml, 分别加入布氏杆菌可溶性抗原 50 μl(8

mg/ml)或 PBS 50 μ l, 充分混匀后, 分别滴加 100 μ l 于两张载玻片上, 用-20 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮室温固定 15 分钟, 再用 pH7.2 的 0.01 M PBS 冲洗 3 次, 自然干燥。

②抗原抗体反应: 滴加 1:20 稀释的偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点(0.001 M), 于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中作用 3 小时, 用 pH7.2 的 0.01 M PBS 洗涤 3 次, 自然干燥。

③检测荧光强度: 用 295nm 激发光, 检测 560 nm 发射光强度。

3. 结果

图 1 用 Sephadex G100 分离偶联反应产物(原液, 未作稀释), 280 nm 紫外检测结果。1 # 峰为偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点, 2 # 峰为未反应的布氏杆菌多克隆抗体、量子点以及水解后的偶联剂。

表 1: Sephadex G100 方法分离的组分的 ELISA 抗体活性检测结果

稀释倍数	分离峰 1 #	分离峰 2 #	对照 (未标记抗体)
1: 50	1.398	0.121	2.043
1: 500	0.729	0.107	1.360
1: 1000	0.385	0.109	0.783
1: 2000	0.272	0.115	0.465
1: 4000	0.175	0.099	0.265
1: 8000	0.133	0.097	0.160
1: 16000	0.110	0.095	0.116
1: 32000	0.103	0.097	0.097

实施例 2: 量子点和布氏杆菌抗体的偶联、纯化和检测

1. 材料

pH8.0 的硼酸缓冲液: 0.05 M 硼砂 30% (V/V), 0.2 M 硼酸 70% (V/V), pH 值为 8.0。

CdTe 水溶性量子点 (购自深圳中鼎盛投资有限公司), 乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC), N-羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS), 乙醇胺, 1 M 甘氨酸, 0.02 M NaH_2PO_4 , 0.1 M NaCl, 1%叠氮钠 (质量百分比), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液, Sephadex G100(购自 BIO-RAD 公司), DEAE Sepharose Fast Flow 填料(购自 Pharmacia 公司)。

布氏杆菌可溶性抗原 (购自北京市生物制品检定所), 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐

剂（购自北京市生物制品检定所）。

2. 方法

（1）布氏杆菌多克隆抗体（9.1 mg/ml）的制备：同实施例 1 中所述的制备方法。

（2）量子点和布氏杆菌多克隆抗体的偶联：0.01 M 100 μ L 量子点和 100 μ L 布氏杆菌多克隆抗体（9.1 mg/ml）加硼酸缓冲液补至 900 μ L，加入 EDC 2mg 室温反应 2 小时。加 100 μ l 1 M 甘氨酸，封闭量子点上的未反应的羧基。最后加入 10 μ l 1%叠氮钠，放到 2 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

（3）分离未偶联的量子点和布氏杆菌多克隆抗体：将偶联反应所得产物进行离心，所得沉淀即为纯化的偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点。离心条件为 4 $^{\circ}$ C 条件下，6000-12000 r/min 离心 10-20min，均可以得到纯化的偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点。

（4）检测偶联产物的荧光效率：使用荧光分光光度计。用 260 nm 或 295 nm 激发光，扫描 400-650 nm 的发射波谱。结果显示偶联反应未改变量子点的发射波长的荧光效率。

（5）偶联产物检测布氏杆菌：

①抗原固定：将正常小鼠的肝脏研磨，用 pH7.2 的 0.01 M 磷酸盐缓冲液（PBS）制成 20%的组织悬液，分装为 2 管，每管 1 ml，分别加入布氏杆菌可溶性抗原 50 μ l(8 mg/ml)或 PBS 50 μ l，充分混匀后，分别滴加 100 μ l 于两张载玻片上，用-20 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮室温固定 15 分钟，再用 pH7.2 的 0.01 M PBS 冲洗 3 次，自然干燥。

②抗原抗体反应：滴加 1:20 稀释的偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点(0.001 M)，于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中作用 3 小时，用 pH7.2 的 0.01 M PBS 洗涤 3 次，自然干燥。

③检测荧光强度：用 295nm 激发光，检测 560 nm 发射光强度。

有荧光表示待测样品中含有布氏杆菌抗原。

3. 结果

图 2 为离心分离产物的荧光检测结果，仪器为 Hitachi F-4500 FL Spectrophotometer，激发波长 395.0 nm。

表 2: 离心方法分离的组分的 ELISA 抗体活性检测结果

稀释倍数	上清	沉淀	对照 (未标记抗体)
1: 500	0.104	0.533	0.663
1: 1000	0.075	0.333	0.364
1: 2000	0.058	0.197	0.222
1: 4000	0.073	0.122	0.176
1: 8000	0.055	0.088	0.131
1: 16000	0.050	0.069	0.109
1: 32000	0.045	0.059	0.101
1: 64000	0.045	0.051	0.101

图 3 为偶联特异性抗体的量子点对布氏杆菌的检测结果, 激发波长 395.0 nm。

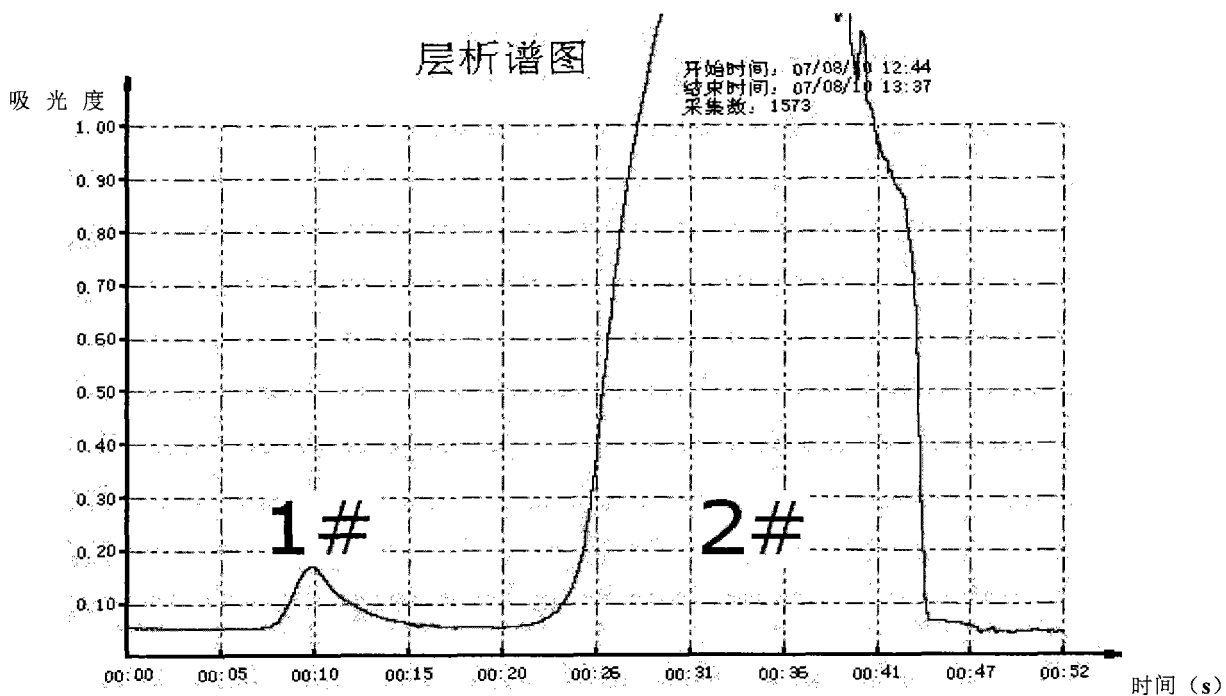


图 1

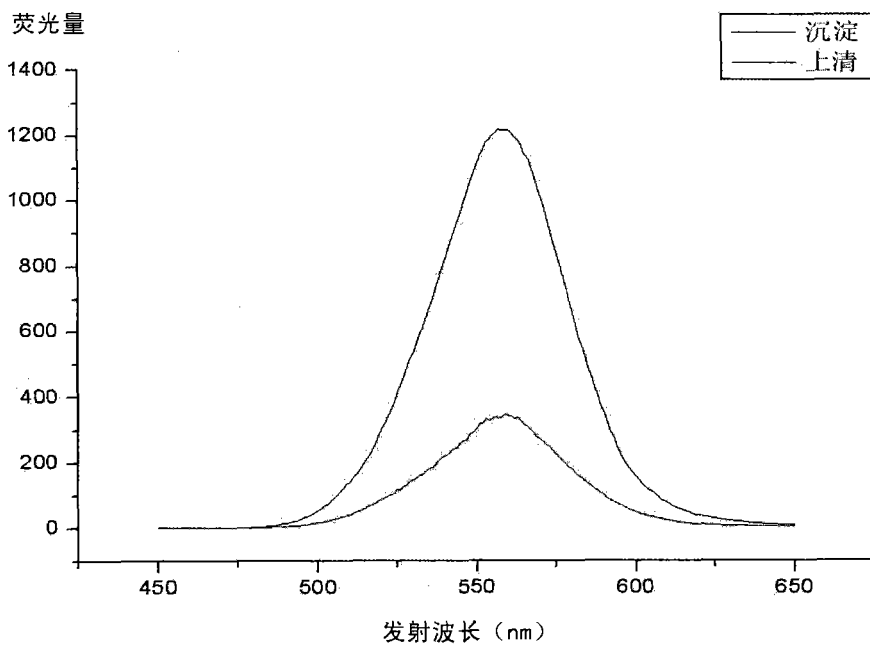


图 2

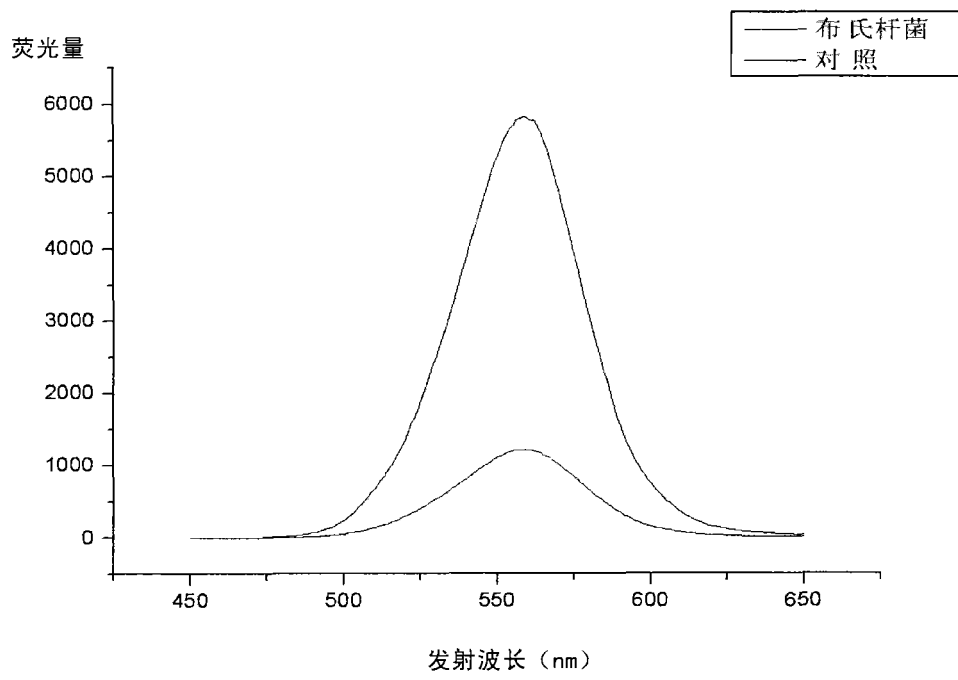


图 3

专利名称(译)	布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法		
公开(公告)号	CN101430331A	公开(公告)日	2009-05-13
申请号	CN200810239674.1	申请日	2008-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国北京出入境检验检疫局		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国北京出入境检验检疫局		
当前申请(专利权)人(译)	中华人民共和国北京出入境检验检疫局		
[标]发明人	赖平安 王孔江 辛亮 高志强 周琦 柏亚铎 汪琳 张伟		
发明人	赖平安 王孔江 辛亮 高志强 周琦 柏亚铎 汪琳 张伟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
代理人(译)	李超		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，属于检验检疫领域。一种布氏杆菌荧光量子点偶联抗体检测方法，包括如下步骤：
 (1)将量子点、布氏杆菌多克隆抗体和偶联剂混合，室温作用2小时，得到含有偶联有布氏杆菌多克隆抗体的量子点的溶液；
 (2)纯化偶联产物，去除未反应的布氏杆菌抗体和量子点；
 (3)偶联产物和涂布在载波片上的待测样品反应，冲洗掉游离的偶联产物后，进行荧光检测，有荧光表示待测样品中含有相应抗原。本发明的优点是：本发明提供的方法具有极低的检测限，该方法灵敏度高、特异性强，同时检测多种布氏杆菌抗原成分，快速、简便，而且设备简单、成本低廉；快速，可用于布氏杆菌的现场快速检测。

