



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108949146 B

(45) 授权公告日 2021.03.26

(21) 申请号 201810592529.5

(22) 申请日 2018.06.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108949146 A

(43) 申请公布日 2018.12.07

(73) 专利权人 北京热景生物技术股份有限公司
地址 102600 北京市大兴区大兴生物医药
产业基地天富街9号9幢

专利权人 华南生物医药研究院
热景(廊坊)生物技术有限公司

(72) 发明人 杨瑞馥 赵勇 曲松楠 林长青
李艳召

(74) 专利代理机构 北京科石知识产权代理有限
公司 11595

代理人 高元吉

(51) Int.Cl.

G09K 11/06 (2006.01)

G09K 11/65 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

审查员 张璐

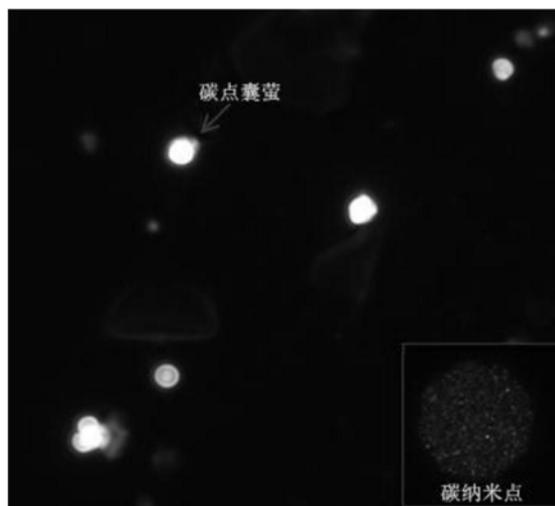
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种以微生物载体的新型示踪标记物材料、
制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种以微生物为载体的新型示踪标记物材料及其制备方法与应用。新型示踪标记物材料是基于碳基纳米材料可进入微生物体内并稳定结合的特性制备而成；其发光强度可达到单个碳基纳米材料发光强度的2000倍以上，具有发光强度高、粒径均一、制备工艺简单、易于批量制备等特点。新型示踪标记物材料可替代目前化学发光材料或有机发光染料，广泛应用于各种生物检测技术中，实现生物学超敏检测。



1. 一种基于微生物为载体的示踪标记物材料,其特征在于,所述示踪标记物材料包括碳基纳米材料和微生物载体,且所述碳基纳米材料位于所述微生物载体的内部;

所述示踪标记物材料的制备包括以微生物为载体,通过将微生物体内装载入碳基纳米材料,并进一步经固化稳定处理从而增强碳基纳米材料的发光强度。

2. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,单个基于微生物为载体的示踪标记物材料发光强度大于单个碳基纳米材料发光强度的2000倍。

3. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述碳基纳米材料包括能够对微生物进行发光成像的碳基纳米材料。

4. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述碳基纳米材料为固态发光碳基纳米材料和/或液态发光碳基纳米材料。

5. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述碳基纳米材料的发光光谱表现为全谱段发光。

6. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述碳基纳米材料的表面官能基团包括选自自由羟基、羧基和氨基组成的组中的至少一种。

7. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述碳基纳米材料粒径不大于10nm。

8. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述微生物载体包括选自自由细菌、病毒、真菌和动植物细胞组成的组中的至少一种。

9. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述微生物载体为选自自由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和芽孢杆菌组成的组中的至少一种。

10. 根据权利要求1所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述微生物载体包括通过基因工程手段进行微生物表面处理和修饰的微生物载体。

11. 根据权利要求10所述的示踪标记物材料,其特征在于,所述微生物载体表达选自自由亲和素、生物素和葡萄球菌A蛋白组成的组中的至少一种蛋白。

12. 根据权利要求1-11任一项所述的基于微生物为载体的示踪标记物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

取微生物载体悬液加入碳基纳米材料的生理盐水缓冲溶液中,混合后,室温孵育;

离心分离微生物悬液,用生理盐水缓冲溶液洗涤,重新用生理盐水缓冲溶液配置成微生物悬液;

加入固定液处理,离心分离,用生理盐水缓冲溶液洗涤并重悬,得到基于微生物为载体的示踪标记物材料。

13. 根据权利要求1-11任一项所述的以微生物为载体的示踪标记物的应用,其特征在于,包括使所述示踪标记物与生物分子结合的步骤。

14. 根据权利要求13所述的应用,其特征在于,所述生物分子包括选自自由亲和素、生物素、SPA蛋白、抗原、抗体、多肽、适配体和核酸组成的组中的至少一种。

15. 根据权利要求13所述的应用,其特征在于,所述应用包括标记示踪和/或检测。

16. 根据权利要求15所述的应用,其特征在于,所述应用包括选自自由化学发光法检测、免疫层析法检测、免疫渗滤法检测、原位杂交检测、凝集法检测和荧光成像组成的组中的至少一种。

一种以微生物载体的新型示踪标记物材料、制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种通过将碳基纳米材料和微生物载体相结合所形成的新型碳基纳米材料发光标记物及其制备和应用,属于纳米材料和生物技术交叉领域。

背景技术

[0002] 在当前生物检测技术中,光学标记物是一类重要的生物标记物,也是影响多数生物检测技术检测性能的一个关键因素。传统的光学标记物主要为化学发光底物和发光素。其中,化学发光底物主要有鲁米诺或其衍生物类,碱性磷酸酶底物AMPPD,吖啶酯及吖啶酰胺类,三联吡啶钌 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 等;常见的发光素主要有吖啶橙(AO)、异硫氰酸发光素(FITC)以及目前应用较为广泛的SYTO₉和碘化丙啶(PI)等;上述化学发光底物和发光素均属于有机发光材料,不仅具有潜在的致畸和致癌风险,对人体健康存在不可估量的危害,而且发光性质不稳定,对生物检测结果稳定性也有一定的影响。

[0003] 随着纳米技术的发展,纳米发光材料因其优越的光学性质越来越多的被应用于各种生物检测应用中,例如胶体金、半导体量子点和稀土上转换发光颗粒等。然而这些纳米材料大多含有重金属元素或镧系金属元素,不仅制备困难,而且具有潜在的细胞毒性和环境危害作用,因而在实际推广应用中也受到了一定限制。

[0004] 碳基纳米材料(Carbon nanodots,CDs)是近年来新发展的一种粒径在10nm以内的碳纳米材料,不仅具有良好的光学稳定性、耐光漂白性,而且具有细胞毒性低、生物相容性好和易于功能化修饰等特点,被广泛认为是一种新型环境友好型发光纳米材料。过去几年间,研究人员开发出多种经济、环保、简单的碳基纳米材料的制备方法,并积极探索了碳基纳米材料在生物学领域中的应用。基于这个特性,碳基纳米材料在细胞标记和生物成像领域得到了广泛的认可和应用。然而,对于生物检测技术而言,单个碳基纳米材料作为发光标记物,其发光强度虽然可达到或优于其它纳米发光材料,但发光强度仍然有限,对生物检测检测灵敏度并无明显的提升作用。

[0005] 因而,现阶段生物检测技术的发展迫切需要一种兼具光学性质稳定、发光强度高、制备工艺简单、成本低等特点的新型环境友好型发光标记物,从而进一步提高检测技术性能,并实现超敏生物检测,甚至达到单病原体或单分子水平检测。

发明内容

[0006] 本发明发现,碳基纳米材料可进入微生物体内,通过固化处理等手段稳定结合,基于该特性,本发明提供了一种可用于生物学超敏检测的新型示踪标记物,即以微生物为载体、通过将微生物体内装载入适量的碳基纳米材料,从而获得一种可成倍放大光学信号强度的生物标记物。受启发于典故“囊萤夜读”,本发明将这种以微生物为载体的碳基纳米材料发光材料命名为“基于微生物载体的示踪标记物”、“以微生物为载体的示踪标记物”、“碳点囊萤”或“囊萤技术”。至少部分地基于上述发现完成了本发明。具体地,本发明包括以下内容。

[0007] 本发明的第一方面,提供基于微生物载体的新型示踪标记物,其中所述新型示踪标记物包括碳基纳米材料和微生物载体。其中所述“微生物载体”是指源自微生物的作为载体用途的材料,并非具有生物活性的微生物本身。另外,本发明的“微生物”是指难以用肉眼观察的一切微小生物的总称。其包括原核微生物和真核微生物。作为原核微生物的实例包括但不限于细菌、病毒、支原体。例如,真细菌、放线菌、蓝细菌、粘细菌、立克次氏体、支原体、衣原体和螺旋体等。作为真核微生物实例包括但不限于真菌、微小藻类和动植物细胞等。本发明的碳基纳米材位于微生物载体的内部或表面。本发明的碳基纳米材通常位于微生物载体的内部,但不可避免地,可能部分碳基纳米材位于微生物载体的表面。

[0008] 在本发明的某些实施方案中,本发明的碳基纳米材料和微生物载体相结合。其中结合方式包括通常各种化学或物理方式的连接方式。优选通过化学方式将碳基纳米材料和微生物载体相结合。此时优选在碳基纳米材料的表面上具有官能基团,所述官能基团的实例包括选自羟基、羧基和氨基中的至少一种。

[0009] 在本发明的某些更进一步的实施方案中,所述基于微生物载体的新型示踪标记物由碳基纳米材料通过微生物载体表面通道进入微生物载体内部,并进一步固化微生物载体制备形成。

[0010] 在本发明的某些实施方案中,所述以微生物为载体的新型示踪标记物材料能够显著增强碳基纳米材料发光强度,单个以微生物为载体的新型示踪标记物材料的发光强度可达到单个碳基纳米材料的1000倍以上,优选1500倍以上,更优选2000倍以上,同时其光学稳定性和耐光漂白性也均优于现有化学发光底物、显色底物和发光素等,因而能够大幅提高现有生物检测技术的检测灵敏度。

[0011] 在本发明的某些实施方案中,所述碳基纳米材料为固态发光碳基纳米材料和液态发光碳基纳米材料的任意一种。

[0012] 在本发明的某些更进一步的实施方案中,所述碳基纳米材料的粒径为10nm以下,并可对微生物进行发光成像。

[0013] 在本发明的某些实施方案中,通过精准调控碳基纳米材料的粒径大小、表面官能团、碳基骨架的不同,新型示踪标记物材料的发光光谱可表现为全谱段发光。

[0014] 在本发明的某些实施方案中,所述微生物载体为细菌、病毒和真菌中的至少一种。

[0015] 在本发明的某些更进一步的实施方案中,所述微生物载体为细菌中的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和芽孢杆菌中的至少一种。

[0016] 在本发明的某些更进一步的实施方案中,所述微生物载体可通过基因工程手段进行微生物表面处理和修饰;优选微生物载体表面修饰表达有亲和素、生物素和葡萄球菌A蛋白(SPA)中的任意一种。

[0017] 本发明第二方面,提供以微生物为载体的新型示踪标记物的制备方法,其包括:(1)取微生物的悬液加入碳基纳米材料的生理盐水缓冲溶液中,混合后孵育;(2)离心分离微生物,用生理盐水缓冲溶液洗涤,重新用生理盐水缓冲溶液配置成微生物悬液;(3)向再次得到的微生物悬液加入固定液进行处理,离心分离,用生理盐水缓冲溶液洗涤并重悬,得到基于微生物为载体的示踪标记物材料

[0018] 在某些实施方案中,本发明制备方法包括以下步骤:

[0019] 取浓度为 10^7 - 10^9 cfu/ml浓度的微生物悬液,按照体积比1:10-1:100的比例加入

10-100mg/ml的碳基纳米材料材料的生理盐水缓冲溶液中,混合均匀,室温孵育不超过24h;
[0020] 离心分离微生物悬液,用生理盐水缓冲溶液洗涤2-5次,重新用生理盐水缓冲溶液配置成 10^7 - 10^9 cfu/ml浓度的微生物悬液;加入甲醛溶液至终浓度为0.1%-5%,室温处理不超过6h;

[0021] 离心分离甲醛处理后的微生物悬液,用生理盐水缓冲溶液洗涤2-5次,适当缓冲液重悬,即得新型示踪标记物材料发光标记物。

[0022] 本发明的第三方面,提供以微生物为载体的示踪标记物的应用,其包括使所述示踪标记物与生物分子结合的步骤。本发明的生物分子为来自生物体的任何部分或来自生物体的大分子成分。优选地,本发明的生物分子包括选自由亲和素、生物素、SPA蛋白、抗原、抗体、多肽、适配体和核酸组成的组中的至少一种。

[0023] 在某些实施方案中,本发明的应用包括标记示踪和/或检测。优选地,包括选自由化学发光法检测、免疫层析法检测、免疫渗滤法检测、原位杂交检测、凝集法检测和荧光成像组成的组中的至少一种。例如,通过亲和素-生物素相互作用系统、SPA-抗体相互作用系统或其他物理化学方法实现新型示踪标记物材料与抗原、抗体、多肽、适配体或核酸等生物体、生物活性分子的标记示踪、检测的应用,并可以代替现有化学发光底物、显色底物、示踪颗粒等进行生物学检测。本发明克服现有技术的不足和缺点,其有益效果包括以下三个方面:

[0024] 1. 本发明的以微生物为载体的新型示踪标记物材料能够显著增强碳基纳米材料发光强度,单个以微生物为载体的新型示踪标记物材料的发光强度可达到单个碳基纳米材料的2000倍以上,同时其光学稳定性和耐光漂白性也均优于现有化学发光底物、显色底物和发光素等,因而能够大幅提高现有生物检测技术的检测灵敏度。

[0025] 2. 本发明新型示踪标记物材料以微生物为载体,而微生物载体表面具有、或通过基因工程手段可具有丰富的活性基团和功能蛋白,相较于传统的纳米粒子或发光微球,更容易与抗体、适配体或DNA等靶向功能分子稳定结合,因而更适宜用于生物检测。

[0026] 3. 本发明新型示踪标记物材料具有良好的环境友好性、且易于批量制备。碳基纳米材料不含有重金属元素被认为是一种绿色环保型纳米材料,而微生物载体经严格灭活处理后亦可作为生物学诊断试剂,对人体和环境几乎不存在危害;另外,微生物载体通过常规培养方法可大量获得,相较于其他微球类标记物更易于批量制备,而且成本低廉,因此具有很好的应用前景。

附图说明

[0027] 图1:以微生物为载体的新型示踪标记物的发光光谱测量结果图。

[0028] 图2:以微生物为载体的新型示踪标记物在发光显微镜下的发光成像图。图中的白色部分为绿色荧光亮点。

[0029] 图3:单个以微生物为载体的新型示踪标记物和单个碳基纳米材料发光强度对比图。图示中以微生物为载体的新型示踪标记物材料简称碳点囊萤;碳基纳米材料简称碳纳米点。

[0030] 图4:以微生物为载体的新型示踪标记物发光稳定性测试结果图。

具体实施方式

[0031] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0032] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为具体公开了该范围的上限和下限以及它们之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0033] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与本发明所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0034] 实施例1:以微生物为载体的新型示踪标记物的制备

[0035] 1. 碳基纳米材料的制备

[0036] 参考已有专利技术或公知技术进行制备,或选自商品化的碳基纳米材料。为更优的解释本发明,本发明实施例所用碳基纳米材料由中国科学院长春光学精密机械与物理研究所合成,其合成方法可参考为中国科学院长春光学精密机械与物理研究所申请的发明名称为“多色发光碳基纳米材料及其制备方法与应用”,公布号为CN 103396793A的专利申请;发明名称为“一种生物基碳基纳米材料发光粉及其制备方法与应用”,公布号为,CN 104263364A的专利申请文献。

[0037] 为更优的解释本发明,本发明实施例的碳基纳米材料的粒径在2-10nm的固态发光碳基纳米材料,碳基纳米材料粒子表面含有氨基(N-H)、羟基(O-H)、羰基(C=O),无其他重金属杂质。通过检测,碳基纳米材料的最佳激发中心波长(λ_{ex})为360nm,最佳发射光中心波长(λ_{em})为460nm,不同波长的激发光获得的碳基纳米材料发射光谱不同,表现出明显的激发光依赖性,固态发光量子效率为30-40%。

[0038] 2. 微生物载体的制备

[0039] 新型示踪标记物材料的载体可选用细菌、病毒和真菌中的任意一种,优选细菌中广泛应用的、处理后无毒害作用的大肠杆菌基因工程菌、金黄色葡萄球菌和芽孢杆菌中的任意一种。所述微生物载体可通过基因工程手段进行微生物表面处理和修饰;优选通过表面修饰以表达亲和素、生物素和葡萄球菌A蛋白(SPA)中的任意一种。

[0040] 为更优的解释本发明,本发明实施例优选公认富含SPA蛋白的金黄色葡萄球菌(ATCC 12598)为新型示踪标记物材料的微生物载体,微生物载体的制备与普通微生物的培养相同:将金黄色葡萄球菌接种于5ml的Luria-Bertani (LB) 液体培养基(10g·L⁻¹胰蛋白胨、10g·L⁻¹NaCl、5g·L⁻¹酵母粉;固体LB培养基另加15g·L⁻¹琼脂粉),37℃培养至对数中期,然后分别取800 μ l的上述液体培养物,转接20ml的LB液体培养基进行扩大培养,培养至对数中期后,5000rpm离心5min,离心收集金黄色葡萄球菌,生理盐水洗涤2次,平板计数确定细菌浓度,然后用生理盐水配置成10⁷-10⁹cfu/ml金黄色葡萄球菌溶液备用,即得新型示踪标记物材料的微生物载体。

[0041] 3.根据选择的碳基纳米材料和微生物载体原料,在如下条件下进行以微生物为载体的新型示踪标记物材料的制备条件优化:

[0042] 取浓度为 10^7 - 10^9 cfu/ml浓度的微生物悬液,按照体积比1:10-1:100的比例加入10-100mg/ml的碳基纳米材料材料的生理盐水溶液中,混合均匀,室温孵育1min-24h;

[0043] 离心分离微生物悬液,用生理盐水洗涤2-5次,重新用生理盐水配置成 10^7 - 10^9 cfu/ml浓度的微生物悬液;加入甲醛溶液至终浓度为0.1%-5%,室温处理1-6h;

[0044] 离心分离甲醛处理后的微生物悬液,用生理盐水洗涤2-5次,适当缓冲液重悬,即得新型示踪标记物材料发光标记物。

[0045] 实施例2:以微生物为载体的新型示踪标记物材料的光学性质测量及发光稳定性评价

[0046] 1.以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光光谱测量

[0047] 配制浓度 10^8 cfu/ml的新型示踪标记物材料水溶液,采用日立F-7000发光光谱仪检测新型示踪标记物材料溶液的最佳激发波长(λ_{ex})和最佳发射波长(λ_{em})。图1示出了新型示踪标记物材料的发光光谱测量结果图,如图1所示,本发明实施例1中优选制备得到的新型示踪标记物材料的 λ_{ex} 和 λ_{em} 分别为400nm和470nm。

[0048] 2.以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光强度检测

[0049] 分别取5 μ l浓度为 10^7 cfu/ml的新型示踪标记物材料溶液和1mg/ml的碳基纳米材料溶液滴于载玻片的中央,用无菌接种环均匀涂开形成直径约为2.5-3.0cm的薄层,自然干燥后,在酒精灯火焰上进行过火固定;

[0050] 用激光共聚焦发光显微镜观察涂片中新型示踪标记物材料的发光成像(图2:新型示踪标记物材料在发光显微镜下的发光成像图),并用配备有EMCCD的发光共聚焦显微镜对单个新型示踪标记物材料和单个碳基纳米材料的发光强度进行相对定量分析(图3:单个新型示踪标记物材料和单个碳基纳米材料发光强度对比图),结果显示单个新型示踪标记物材料的平均发光强度可以达到单个碳基纳米材料平均发光强度的2000倍以上。

[0051] 3.以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光保存稳定性研究

[0052] 取浓度约为 10^8 cfu/ml的新型示踪标记物材料生理盐水溶液,避光保存,分别在室温和37 $^{\circ}$ C条件下放置1天、3天、5天、7天、9天,同时设置一组在2-8 $^{\circ}$ C条件下保存3个月,均以第0天保存的新型示踪标记物材料溶液作为对照,采用F-7000发光光谱仪对各个时间点的新型示踪标记物材料发光强度进行定量分析,每次测量取固定量的新型示踪标记物材料,并统一仪器参数,激发波长和发射波长分别为400nm和470nm。结果显示新型示踪标记物材料溶液在37 $^{\circ}$ C和室温条件下均可保存至少9天,在2-8 $^{\circ}$ C下可保存至少3个月,不同保存条件下的发光强度最大降低幅度百分比分别为9.79%,7.65%,5.57%,发光强度较为稳定,没有发生明显的淬灭现象(图4:新型示踪标记物材料发光稳定性测试结果图)。根据加速热稳定性实验相关经验值估算,新型示踪标记物材料溶液在2-8 $^{\circ}$ C避光保存条件下至少可稳定存放1年。

[0053] 实施例3:以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光标记物检测致病菌大肠杆菌0157:H7

[0054] 以微生物为载体的新型示踪标记物材料作为一种新型示踪发光材料可替代现有化学发光底物、显色底物、示踪颗粒等发光材料广泛应用于各种生物检测技术中;包括但不

限于化学发光法、免疫层析法、免疫渗滤法、原位杂交法、凝集法等生物检测技术。为更优的解释本发明,本发明实施例优选生物检测中具有代表性的化学发光法进行说明,代表性检测方法的选择应当理解为对发明更优的解释,而非对本发明的限制条件。

[0055] 为更优的解释本发明,本发明实施例以常见的致病菌大肠杆菌0157:H7为检测目标物,以碱性磷酸酶化学发光底物AMPPD发光检测法为对照,用以评价基于新型示踪标记物材料发光进行生物检测的可行性及方法性能。

[0056] 1. 化学发光底物AMPPD发光法试剂准备

[0057] 化学发光底物AMPPD发光法检测试剂,包括大肠杆菌0157分离试剂、大肠杆菌0157检测试剂(AMPPD发光)、大肠杆菌0157清洗液、大肠杆菌0157定标液等,均由北京热景生物技术股份有限公司保存提供,并按照工艺规程或说明书要求分装至相应大小的试剂瓶内,或条装试剂的试剂条的相应孔位,然后密封。分装后的试剂与定标液、耗材反应槽、一次性取样头等组成大肠杆菌0157化学发光法检测试剂,所述试剂适配MQ60系列自动免疫分析仪(北京热景生物技术股份有限公司)使用。

[0058] 2. 以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光法检测试剂准备

[0059] 取本发明实施例1中所述新型示踪标记物材料溶液,以转速8000rpm/min,离心5min,去上清,按照大肠杆菌0157单抗与以微生物为载体的新型示踪标记物材料材料质量比为1/4-1/1的比例,将以微生物为载体的新型示踪标记物材料加入大肠杆菌0157单抗保存液中(由北京热景生物技术股份有限公司提供),混匀,37℃震荡反应1h;

[0060] 将反应物离心,用生理盐水清洗2-3次,适当生理盐水重悬使以微生物为载体的新型示踪标记物材料悬液浓度 $\geq 10^8$ cfu/ml,即得以微生物为载体的新型示踪标记物材料-大肠杆菌0157单抗复合物,置于2-8℃避光保存。

[0061] 以微生物为载体的新型示踪标记物材料-大肠杆菌0157单抗复合物可作为大肠杆菌0157检测试剂(新型示踪标记物材料发光),用来代替上述大肠杆菌0157检测试剂(AMPPD发光)。其他所需试剂包括大肠杆菌0157分离试剂、大肠杆菌0157清洗液、大肠杆菌0157定标液等均与酶促化学发光底物AMPPD发光法相同,由北京热景生物技术股份有限公司保存提供,并按照工艺规程或说明书要求分装至相应大小的试剂瓶内,或条装试剂的试剂条的相应孔位,然后密封。分装后的试剂与定标液、耗材反应槽、一次性取样头等组成大肠杆菌0157磁微粒化学发光法检测试剂,所述试剂适配MQ60系列自动免疫分析仪(北京热景生物技术股份有限公司)使用。

[0062] 3. 以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光法检测大肠杆菌0157:H7及结果分析

[0063] 取大肠杆菌0157:H7菌种分离株(军事科学院军事医学研究院保存)接种于5ml的LB液体培养基,37℃培养至对数中期,分别取800 μ l的上述液体培养物,转接20ml的LB液体培养基扩大培养,5000rpm离心5min,离心收集菌体,生理盐水洗涤2次,平板计数确定大肠杆菌0157浓度,然后配置成 10^8 cfu/ml大肠杆菌0157生理盐水溶液,用生理盐水溶液梯度稀释成 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^4 cfu/ml, 10^3 cfu/ml, 10^2 cfu/ml, 10^1 cfu/ml,0cfu/ml共计9个稀释梯度备用。

[0064] 每个浓度梯度各取100 μ l用于检测,即每个浓度梯度的平均测试浓度为: 10^7 cfu/test、 10^6 cfu/test、 10^5 cfu/test、 10^4 cfu/test、 10^3 cfu/test、 10^2 cfu/test、 10^1 cfu/test、

100cfu/test、0cfu/test。

[0065] 按照MQ60系列自动免疫分析仪仪器操作规程,分别用上述酶促化学发光底物AMPPD发光检测试剂和以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光检测试剂,检测系列浓度大肠杆菌0157菌液,每个浓度梯度均检测5次,取平均值进行统计分析。

[0066] 检测结果见下表:

[0067] 表1:大肠杆菌0157:H7检测结果平均值(单位:cfu/test)

理论浓度	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	0
[0068] AMPPD 发光法	8.8×10^6	8.5×10^5	2.6×10^5	9.1×10^3	0	0	0	0	0
囊萤技术	1.8×10^7	2.2×10^6	1.3×10^5	2.6×10^4	9.1×10^2	8.5×10^1	1.2×10^1	0	0

[0069] 根据检测结果分析,AMPPD发光法的检测灵敏度约为 9.1×10^3 cfu/test;

[0070] 以微生物为载体的新型示踪标记物材料发光法的检测灵敏度约为12cfu/test;

[0071] 结果显示,同等实验条件下,本发明提供的以微生物为载体的新型示踪标记物材料作为发光标记物,其检测灵敏度是碳点发光标记的发光法的检测灵敏度目前常用发光底物检测灵敏度的1000倍以上,基本可以达到单病原体检测水平。因此以微生物为载体的新型示踪标记物材料作为一种新型的发光标记物,可广泛适用于各种发光法生物检测,对于超敏生物检测检测、甚至是单分子或单病原体检测,都有着重要的应用价值和应用前景。

[0072] 上述实施例描述了本发明的优选实施例,如前所述,应当理解为对本发明的解释,而非局限于本发明实施例披露的形式,不应看做是对其他实施例的排除,而可以用于各种其他形式的组合、修改,并能够在本发明的构思范围内改动。本领域人员所进行的改动和变化在本发明构思及范围内的,都应在本发明所附权利要求保护范围内。

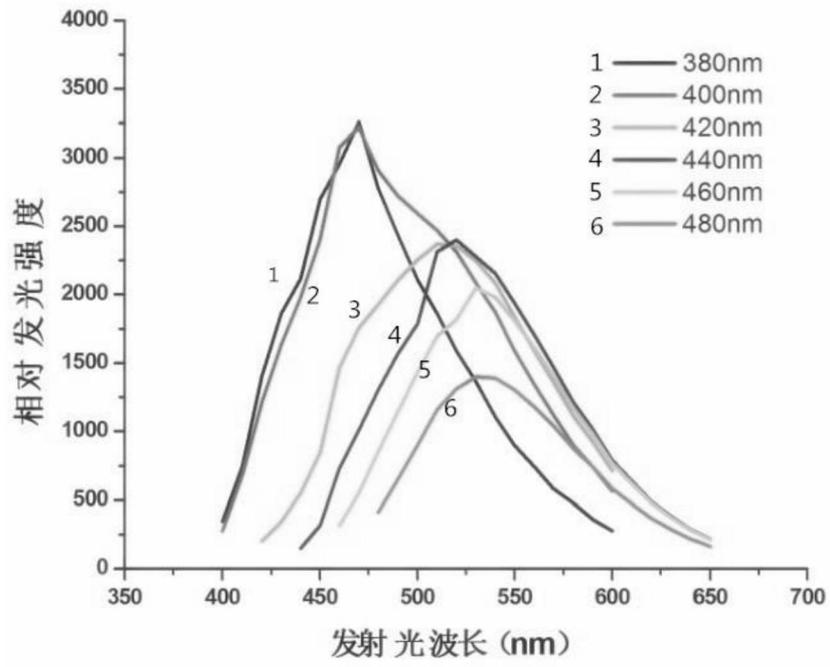


图1

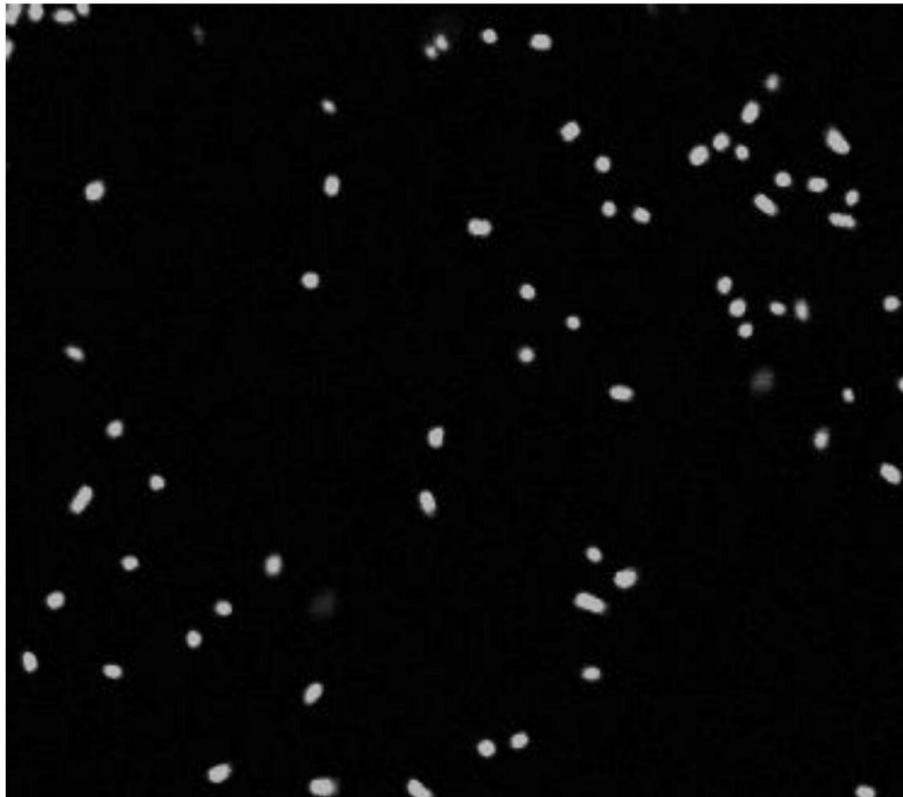


图2

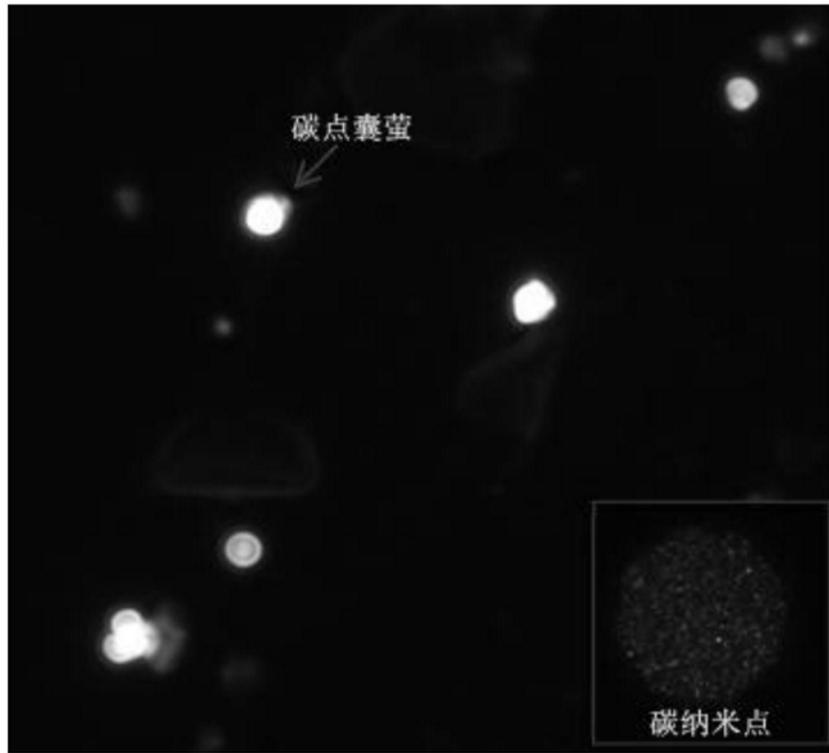


图3

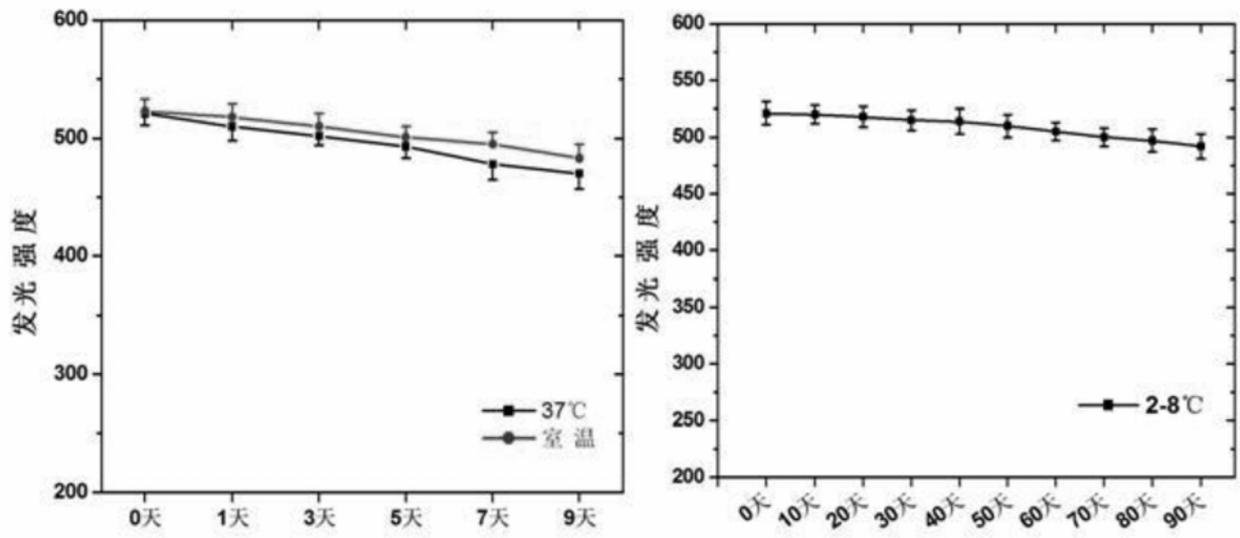


图4