



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113670907 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 09

(21) 申请号 202110932714.6

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2021.08.13

G01N 21/78 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113670907 A

审查员 任华

(43) 申请公布日 2021.11.19

(73) 专利权人 广东海洋大学
地址 524088 广东省湛江市麻章区海大路1号

专利权人 广东海洋大学深圳研究院

(72) 发明人 陈志宝 马丽 姚秋成 葛叶
陈进军 徐春厚

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102
专利代理师 刘瑶云 陈伟斌

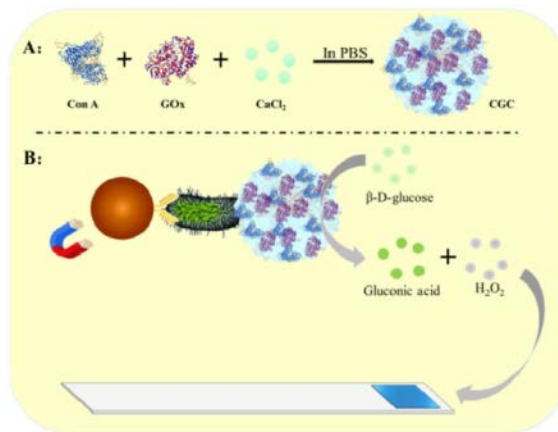
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种CGC杂化纳米复合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种CGC杂化纳米复合物及其制备方法和应用,所述CGC杂化纳米复合物即Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃。在此复合物的基础上,本发明设计了一种大肠杆菌O157:H7的杂化纳米复合物比色检测体系及方法,实现了大肠杆菌O157:H7的可视化检测,且操作简便,检测特异性强,灵敏度高,其最低检测限为10CFU·mL⁻¹。在实际样品的检测中,所述检测方法的检测回收率也在93~102%之间,具有较高的准确性,不仅适于大肠杆菌O157:H7的现场快速检测,在其他病原菌或临床诊断的检测中也具有巨大应用潜力。



1. 一种Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物,其特征在于,所述纳米复合物是将伴刀豆球蛋白A、葡萄糖氧化酶及Ca²⁺离子溶于PBS缓冲溶液后通过一锅法合成;其制备方法包含以下步骤:

S1.将500~1500 μL 10 mM PBS缓冲溶液、50~200 μL 0.1 mg/mL 伴刀豆球蛋白A、50~200 μL 0.1 mg/mL葡萄糖氧化酶及10~100 μL 100~500 mM CaCl₂溶液混匀,室温下静置16~24 h,至产生白色絮状沉淀物;

S2.将混合溶液在室温下,8000~12 000 rpm离心3~5 min后,去除上清液,加入1~5 mL 0.1~10 mM PBS缓冲溶液洗涤、离心,即得。

2. 一种检测大肠杆菌O157: H7的方法,其特征在于,包含以下步骤:

S1.将大肠杆菌O157: H7抗体磁珠用PBS缓冲液洗涤后悬浮备用;

S2.将步骤S1所得抗体磁珠悬浮液、待测样品以及权利要求1所述的Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物混合孵育,形成“磁珠-靶标-CGC”结合的三明治夹心结构,用PBS缓冲液洗涤备用;所述抗体磁珠、大肠杆菌O157: H7及纳米复合物CGC的孵育温度为25℃~55℃,孵育时间为20~60 min;所述PBS缓冲液的pH值为4.5~8.5;

S3.取适量β-D-葡萄糖溶液加入S2所述夹心结构中混匀反应,反应后将磁珠吸附,吸取上清液滴加在H₂O₂试纸条上,反应10~60 s后进行结果判别。

3. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤S2中抗体磁珠悬浮液的用量为1~6 μL,待测样品的用量为10~100 μL,Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的用量为1~10 μL。

4. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤S3中,β-D-葡萄糖溶液的浓度为10~60 mM。

一种CGC杂化纳米复合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食源性病原菌检测技术领域。更具体地,涉及一种Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃(CGC)杂化纳米复合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 大肠杆菌0157:H7作为最常见的食源性致病菌之一,广泛存在于肉、蛋和蔬菜中,其能导致人体出现严重的出血性腹泻、溶血性尿毒症、新生儿败血症或急性肾衰竭,甚至死亡。若能对大肠杆菌0157:H7进行及时准确的检测,则可以有效的减少其所带来的危害。因此,构建一种简单、快速、准确的检测大肠杆菌0157:H7的方法具有重要意义。

[0003] 在食源性致病菌的检测方法中,比色生物传感器由于具有简单性和肉眼可识别性,常用于病原微生物的快速检测。而试纸条作为常见的比色传感器输出方式之一,被广泛应用于生物检测领域,与其他比色传感器信号输出方式相比,试纸条具有体积小、操作简单、易读取以及成本低等优点。Ge等人发现蛋白质等有机物质和磷酸盐能形成一种多孔花状、大比表面积的有机-无机纳米复合物。当酶或抗体作为有机-无机纳米复合物的有机成份时,与自由酶相比,具有优异的稳定性和酶活性,与自由抗体相比,具有优异的捕获能力。近年来,基于此类有机-无机纳米复合物的生物传感器在疾病诊断和检测中得到应用。中国专利CN108300758A公开了一种Hemin杂化纳米花及其制备方法和应用,但使用该方法检测大肠杆菌0157:H7时,需使用紫外分光光度计等测反应溶液的吸光度,仍不够便携,不适于现场快速检测。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有上述技术的缺陷和不足,提供一种具有特异性的Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物及其制备方法和应用。所述Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物能够与H₂O₂试纸条结合,通过发生显色反应,实现对食源性致病菌一大肠杆菌0157:H7的可视化快速检测。

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物。

[0006] 本发明的第二个目的是提供一种Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的制备方法。

[0007] 本发明的第三个目的是提供一种用于检测大肠杆菌0157:H7的杂化纳米复合物比色检测体系。

[0008] 本发明的第四个目的是提供一种利用所述杂化纳米复合物比色检测体系检测大肠杆菌0157:H7的方法。

[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0010] 本发明首先提供了一种Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物,是将伴刀豆球蛋白A(Con A)、葡萄糖氧化酶(GOx)及Ca²⁺离子溶于磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)后,通过一锅法合成得到。

[0011] 本发明所述Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物(简称CGC)中的Ca₃(PO₄)₂作为无机骨架固定Con A和GOx,同时,Ca²⁺与GOx共存产生协同增效作用,可以增强酶催化活性,使CGC具有更好的适应性及活性,对外界条件敏感度低,稳定性强。

[0012] 本发明还提供所述Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的制备方法,包含以下步骤:

[0013] S1.在离心管中依次加入500~1500μL 10mM PBS缓冲溶液、50~200μL 0.1~1mg/mL Con A、50~200μL 0.1~1mg/mL葡萄糖氧化酶及10~100μL 100~500mM CaCl₂溶液,立即振荡混匀,室温下静置16~24h,至产生白色絮状沉淀物;

[0014] S2.将混合溶液在室温下,8000~12 000rpm离心3~5min后,去除上清液,加入1~5mL 0.1~10mM PBS缓冲溶液洗涤、离心两次,弃上清后加入100~500μL 0.1~10mM PBS缓冲液悬浮,4℃保存。

[0015] 本发明利用上述Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物(CGIC)对大肠杆菌0157:H7进行可视化定量检测的原理是:CGC中的Con A可与大肠杆菌0157:H7结合,同时通过带有大肠杆菌0157:H7特异性抗体的磁珠对大肠杆菌0157:H7进行识别并富集。在靶标大肠杆菌0157:H7存在的情况下,三者形成“磁珠-靶标-CGC”三明治夹心结构,并通过PBS缓冲液漂洗去除反应中多余的CGC杂化纳米复合物。此外,CGC纳米复合物中的葡萄糖氧化酶可将β-D-葡萄糖催化为H₂O₂及葡萄糖酸。因此,在三明治夹心结构中添加β-D-葡萄糖溶液可使催化产生H₂O₂,即可通过直接使用H₂O₂试纸条实现大肠杆菌0157:H7的可视化定量检测及分析,用于现场的快速检测。

[0016] 因此,本发明在所述Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的基础上,还提供了一种用于检测大肠杆菌0157:H7的杂化纳米复合物比色检测体系,其包含大肠杆菌0157:H7抗体磁珠、Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物以及H₂O₂试纸条。

[0017] 优选地,还包含β-D-葡萄糖溶液。

[0018] 本发明还提供了一种利用所述Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物比色检测体系检测大肠杆菌0157:H7的方法,包含以下步骤:

[0019] S1.将大肠杆菌0157:H7抗体磁珠用PBS缓冲液洗涤后悬浮备用;

[0020] S2.将步骤S1所得抗体磁珠悬浮液、大肠杆菌0157:H7以及Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物混合孵育,形成“磁珠-靶标-CGC”结合的三明治夹心结构,用PBS缓冲液洗涤备用;

[0021] S3.取适量β-D-葡萄糖溶液加入S2所述夹心结构中混匀,用磁珠分离器将磁珠吸附,吸取上清液滴加在H₂O₂试纸条上,反应10~60s后立即用拍摄设备拍摄信号。

[0022] 上述检测方法的原理为:Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物中的Con A作为一种生物识别元件,对大肠杆菌0157:H7表面的O⁻抗原具有很高的亲和力,可结合大肠杆菌0157:H7;而葡萄糖氧化酶作为信号输出元件,可以将β-D-葡萄糖催化为H₂O₂及葡萄糖酸。当靶标大肠杆菌0157:H7存在时,加入带有大肠杆菌0157:H7特异性抗体的磁珠和CGC,三者可形成“磁珠-靶标-CGC”三明治夹心结构复合物;当孵育结束后,通过PBS缓冲液洗去多余的CGC,再加入β-D-葡萄糖,使β-D-葡萄糖被葡萄糖氧化酶催化为H₂O₂和葡萄糖酸,H₂O₂试纸条对H₂O₂进行显色,从而实现大肠杆菌0157:H7的可视化检测;进一步利用摄像设备,如智能手机等即可记录显色结果,还可利用Image J软件对H₂O₂试纸条显色结果分析。反之当没有大

肠杆菌0157:H7靶标存在时,无法形成夹心结构,没有葡萄糖氧化酶, β -D-葡萄糖就不能酶解生成 H_2O_2 , H_2O_2 试纸条无颜色变化。

[0023] 本发明通过大肠杆菌0157:H7浓度变化与 H_2O_2 试纸条颜色变化的相关性,可对大肠杆菌0157:H7的浓度进行定量分析。

[0024] 优选地,步骤S2中抗体磁珠悬浮液的用量为1~6 μ L,大肠杆菌0157:H7的用量为10~100 μ L,Con A-GOx- $Ca_2(PO_4)_3$ 杂化纳米复合物的用量为1~10 μ L,见实施例5。

[0025] 优选地,步骤S2中抗体磁珠、大肠杆菌0157:H7及纳米复合物CGC的孵育温度为25 $^{\circ}C$ ~55 $^{\circ}C$,见实施例5。

[0026] 优选地,步骤S2中,抗体磁珠、大肠杆菌0157:H7及纳米复合物CGC的孵育时间为20~60min,见实施例5。

[0027] 更优选地,步骤S2中,抗体磁珠、大肠杆菌0157:H7及纳米复合物CGC的孵育时间为40~60min,见实施例5。

[0028] 优选地,步骤S2中,PBS缓冲液的pH值为4.5~8.5,见实施例5。

[0029] 更优选地,步骤S2中,PBS缓冲液的pH值为5.5~7.5,见实施例5。

[0030] 优选地,步骤S3中, β -D-葡萄糖溶液的浓度为10~60mM,见实施例5。

[0031] 更优选地,步骤S3中, β -D-葡萄糖溶液的浓度为40~60mM,见实施例5。

[0032] 本发明具有以下有益效果:

[0033] 本发明基于Con A-GOx- $Ca_2(PO_4)_3$ 杂化纳米复合物信号放大技术来测定食源性致病菌大肠杆菌0157:H7,Con A-GOx- $Ca_2(PO_4)_3$ 杂化纳米复合物具有葡萄糖氧化酶活性,其具有以下优点:

[0034] (1) 本发明通过“一锅法”合成的Con A-GOx- $Ca_2(PO_4)_3$ 杂化纳米复合物中的 $Ca_3(PO_4)_2$ 作为无机骨架固定Con A和GOx,同时, Ca^{2+} 与GOx共存产生协同增效作用,可以增强酶催化活性,具有更好的适应性及活性,对外界条件敏感度低,稳定性强,制备方法的操作简单;

[0035] (2) 本发明通过一步法使“磁珠-靶标-CGC”形成三明治夹心结构复合物,其中,ConA作为识别元件与大肠杆菌0157:H7细胞膜识别结合,纳米复合物中的葡萄糖氧化酶由于 Ca^{2+} 离子的作用,增强了催化活性和稳定性,催化 β -D-葡萄糖转化为葡萄糖酸及 H_2O_2 ,而 H_2O_2 试纸条的比色度变化强度作为信号输出端检测结果,实现了大肠杆菌0157:H7的可视化检测;

[0036] (3) 本发明所述基于CGC和 H_2O_2 试纸条对食源性病原菌大肠杆菌0157:H7检测的特异性强,灵敏度高,其最低检测限为10CFU \cdot mL $^{-1}$,检测的线性范围为10~10 6 CFU \cdot mL $^{-1}$ 。

[0037] (4) 本发明所述检测方法在实际样品的检测中,检测回收率在93~102%之间,具有较高的准确性。

[0038] (5) 本发明所述检测方法的操作简便,适于致病菌大肠杆菌0157:H7的现场检测,在其他病原菌或临床诊断的检测中具有巨大应用潜力。

附图说明

[0039] 图1为Con A-GOx- $Ca_2(PO_4)_3$ 杂化纳米复合物的扫描电子显微图像,其中图A的放大倍数为10000 \times ,图B的放大倍数为25000 \times 。

[0040] 图2为Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物结合H₂O₂试纸条对大肠杆菌0157:H7可视化检测原理图。

[0041] 图3为检测条件优化结果,其中图A对应磁珠-靶标-CGC的孵育时间,图B对应磁珠-靶标-CGC的孵育温度,图C对应PBS缓冲溶液的pH,图D对应β-D-葡萄糖的浓度。

[0042] 图4为大肠杆菌0157:H7可视化检测的灵敏度分析结果,其中图A为H₂O₂试纸条对不同浓度的大肠杆菌0157:H7的检测结果,图B为不同浓度的大肠杆菌0157:H7的比色度变化强度,图C为H₂O₂试纸条的Δintensity%与大肠杆菌0157:H7浓度的线性关系。

[0043] 图5为可视化检测的特异性分析结果,其中图A为H₂O₂试纸条对不同菌种的检测显色结果,图B为不同菌种的Δintensity%统计结果。

具体实施方式

[0044] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0045] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0046] 本发明中所涉及的食源性致病菌菌株,包括大肠杆菌0157:H7(CICC 21530)、大肠杆菌(CICC 10389)、鼠伤寒沙门氏菌(CICC 21482)、金黄色葡萄球菌(CICC 21600)、单核细胞增生李斯特菌(CICC 21529)和副溶血性弧菌(CICC 21617)均由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。H₂O₂试纸条购自德国Merck有限公司。

[0047] 大肠杆菌0157:H7抗体磁珠购自美国Thermo Fisher Scientific有限公司;伴刀豆蛋白A(Con A)购自Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;葡萄糖氧化酶(GOx)购自Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。

[0048] 实施例1 Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的合成与分析

[0049] Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的合成

[0050] (1) 在1.5mL离心管中依次加入780μL浓度为10mM的PBS缓冲液、100μL浓度为0.1mg/mL的伴刀豆球蛋白(Con A)、100μL浓度为0.1mg/mL的葡萄糖氧化酶(GOx)以及20μL浓度为200mM的CaCl₂溶液,立即振荡混匀,并静置于室温下16h,产生白色絮状沉淀物;

[0051] (2) 将步骤(1)中所得混合溶液于室温,10000rpm离心5min后,去除上清液,加入1mL浓度为1mM的PBS缓冲液洗涤、离心两次,最后加入100μL浓度为1mM的PBS缓冲液制成Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃有机-无机纳米复合物(CGC)的悬浮液,取适量CGC用扫描电镜显示所合成的纳米复合物的外貌特征,其余保存于4℃冰箱待用。

[0052] Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的扫描电子显微图像如图1所示,其中图A的放大倍数为10000×,图B的放大倍数为25000×。如图1A所示,CGC是大约6μm的花状纳米结构。进一步对其结构进行分析,从图1B中可以看出CGC具有纳米级分层的花瓣结构,这使得CGC具有较高的比表面积,有助于增大识别蛋白的靶标捕获和增强酶催化的活性。

[0053] 实施例2 Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的合成与分析

[0054] Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的合成

[0055] (1) 在1.5mL离心管中依次加入500μL浓度为10mM的PBS缓冲液、50μL浓度为1mg/mL的伴刀豆球蛋白(Con A)、50μL浓度为1mg/mL的葡萄糖氧化酶(GOx)以及10μL浓度为500mM

的CaCl₂溶液,立即振荡混匀,并静置于室温下20h,产生白色絮状沉淀物;

[0056] (2) 将步骤(1)中所得混合溶液于室温,12000rpm离心3min后,去除上清液,加入5mL浓度为0.1mM的PBS缓冲液洗涤、离心两次,最后加入500μL浓度为0.5mM的PBS缓冲液制成Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃有机-无机纳米复合物(CGC)的悬浮液,取适量CGC用扫描电镜显示所合成的纳米复合物的外貌特征,其余保存于4℃冰箱待用。

[0057] 此实施例制备所得的Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的扫描电子显微图像与图1类似,具有纳米级分层的花瓣结构。

[0058] 实施例3 Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的合成与分析

[0059] Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的合成

[0060] (1) 在1.5mL离心管中依次加入1500μL浓度为10mM的PBS缓冲液、200μL浓度为0.1mg/mL的伴刀豆球蛋白(Con A)、200μL浓度为0.1mg/mL的葡萄糖氧化酶(GOx)以及100μL浓度为300mM的CaCl₂溶液,立即振荡混匀,并静置于室温下24h,产生白色絮状沉淀物;

[0061] (2) 将步骤(1)中所得混合溶液于室温,8000rpm离心5min后,去除上清液,加入1mL浓度为10mM的PBS缓冲液洗涤、离心两次,最后加入100μL浓度为10mM的PBS缓冲液制成Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃有机-无机纳米复合物(CGC)的悬浮液,取适量CGC用扫描电镜显示所合成的纳米复合物的外貌特征,其余保存于4℃冰箱待用。

[0062] 此实施例制备所得的Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物的扫描电子显微图像与图1类似,具有纳米级分层的花瓣结构。

[0063] 实施例4大肠杆菌O157:H7的可视化检测

[0064] 本发明基于CGC纳米复合物及H₂O₂试纸条对大肠杆菌O157:H7进行比色法检测的原理如图2所示。本发明在室温条件下,通过“一锅法”将伴刀豆蛋白A(Con A)、葡萄糖氧化酶(GOx)和Ca²⁺离子合成了Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃有机-无机纳米复合物(CGC)。其中, Ca₂(PO₄)₃作为无机骨架固定Con A和GOx,同时Ca²⁺离子可以与GOx共存,产生协同增效作用,增强酶的催化活性。Con A作为一种生物识别元件,对大肠杆菌O157:H7表面的O-抗原具有很高的亲和力,葡萄糖氧化酶作为信号输出元件,可以将β-D-葡萄糖催化为H₂O₂及葡萄糖酸。当靶标大肠杆菌O157:H7存在时,抗体磁珠、靶标和CGC纳米复合物可以形成“磁珠-靶标-CGC”三明治夹心结构,使β-D-葡萄糖被催化为H₂O₂和葡萄糖酸,H₂O₂使H₂O₂试纸条变色,表明所测样品中含有大肠杆菌O157:H7,可使用拍摄设备记录显色结果,此外还可使用ImageJ软件对H₂O₂试纸条的显色结果进行定量分析。反之,当没有靶标存在时,不能形成夹心结构,没有葡萄糖氧化酶,β-D-葡萄糖也就不能酶解生成H₂O₂,H₂O₂试纸条无颜色变化。

[0065] Con A-GOx-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物结合H₂O₂试纸条对大肠杆菌O157:H7进行可视化检测的步骤如下:

[0066] (1) 大肠杆菌O157:H7抗体磁珠的预处理: 试验前将抗体磁珠用等体积的1mM的PBS缓冲液洗涤2~5次,再用等体积的PBS缓冲液悬浮备用;

[0067] (2) 取3μL处理后的抗体磁珠、50μL靶标(大肠杆菌O157:H7)以及6μL的CGC杂化纳米复合物加入离心管中,于25℃条件下孵育40min,形成“磁珠-靶标-CGC”结合的三明治夹心结构,用50μL浓度为1mM的PBS缓冲液洗涤三次,备用;

[0068] (3) 取10μL浓度为40mM的β-D-葡萄糖加入到步骤(2)所得夹心结构中,用移液枪混匀后,利用磁珠分离器将RCR管中的磁珠吸附,吸取上清反应溶液滴加在H₂O₂试纸条上,反应

30s后立即用拍摄设备拍摄反应信号,通过试纸条的颜色变化判断是否存在大肠杆菌O157:H7,也可以用ImageJ软件进行定量分析。

[0069] 结果发现H₂O₂试纸条变色,表明成功构建了大肠杆菌O157:H7的快速可视化检测方法。

[0070] 实施例5检测条件的优化

[0071] 本发明进一步研究发现,“磁珠-靶标-CGC”夹心结构复合物的孵育时间、孵育温度以及洗涤缓冲溶液的pH值对复合物体系中三者结合的效率有很大影响。 β -D-葡萄糖的量会影响复合物中葡萄糖氧化酶将其催化为葡萄糖酸的量,对试纸条的显色信号具有影响。故本发明根据葡萄糖诱导H₂O₂试纸条的比色度变化强度对检测条件进行了优化。H₂O₂试纸条的比色度变化强度(Δ intensity%)计算如下:
$$\Delta \text{ intensity\%} = \left[\frac{(\text{In}_{\text{阳性}} - \text{In}_{\text{阴性}})}{\text{In}_{\text{阳性}}} \right] \times 100\%$$
,结果数据均进行3次重复。检测条件的优化结果如图3所示,其中图A对应磁珠-靶标-CGC的孵育时间,图B对应磁珠-靶标-CGC的孵育温度,图C对应PBS缓冲溶液的pH,图D对应 β -D-葡萄糖的浓度。

[0072] 1、“磁珠-靶标-CGC”夹心结构复合物孵育时间的优化

[0073] 采用与实施例4相同的比色检测步骤,将孵育时间分别设置为20、30、40、50和60min。孵育时间的优化结果如图3A所示,由图3A可知,随着孵育时间的增加,H₂O₂试纸条的 Δ intensity%也随之增加。孵育时间为20~60min时,均可实现检测目的,但当孵育时间为50min时, Δ intensity%达到最大值且趋于稳定。

[0074] 2、“磁珠-靶标-CGC”夹心结构复合物孵育温度的优化

[0075] 采用与实施例4相同的比色检测步骤,将孵育温度分别设置为4℃、25℃、37℃和55℃。孵育温度的优化结果如图3B所示,由图3B可知,随着孵育温度的升高,H₂O₂试纸条的 Δ intensity%先增大后减小,当孵育温度达到37℃时,H₂O₂试纸条的 Δ intensity%达到最大值,从结果可以看出,孵育温度过高或过低都会影响“磁珠-靶标-CGC”三者的结合效率,对 Δ intensity%有影响,25~55℃范围内较为理想。

[0076] 3、PBS洗涤缓冲液pH值的优化

[0077] PBS洗涤缓冲液的pH值分别选择4.5、5.5、6.5、7.5和8.5。PBS洗涤缓冲液pH值的优化结果如图3C所示,由图3C可知,随着PBS洗涤缓冲液pH值的增加,H₂O₂试纸条的 Δ intensity%先增加后减小,当洗涤缓冲溶液的pH值达到7.5时, Δ intensity%达到最大值。从结果可以看出,PBS洗涤缓冲液的pH值过高或过低都会影响“磁珠-靶标-CGC”的结合效率,对 Δ intensity%值有影响。

[0078] 4、 β -D-葡萄糖溶液浓度的优化

[0079] 分别选择浓度为10、20、30、40、50和60mM的 β -D-葡萄糖溶液进行优化实验。 β -D-葡萄糖溶液浓度的优化结果如图3D所示,由图3D可知,随着 β -D-葡萄糖浓度的增加,H₂O₂试纸条的 Δ intensity%也随之增加。 β -D-葡萄糖的浓度为10~60mM时,均可实现检测目的,但当 β -D-葡萄糖的浓度达到40mM时, Δ intensity%达到最大值且趋于稳定。

[0080] 若想达到最佳的检测效果,则可选择将“磁珠-靶标-CGC”夹心结构复合物在37℃条件下孵育50min,使用pH值为7.5的PBS洗涤缓冲液进行洗涤,使用浓度为40mM的 β -D-葡萄糖进行检测。

[0081] 对上述条件进行优化的同时,本发明同时对抗体磁珠悬浮液、大肠杆菌O157:H7、

Con A-GO_x-Ca₂(PO₄)₃杂化纳米复合物以及β-D-葡萄糖的使用量进行了优化。结果发现,处理后的大肠杆菌0157:H7抗体磁珠的用量为1~6μL,大肠杆菌0157:H7的用量为10~100μL,CGC杂化纳米复合物的用量为1~10μL,β-D-葡萄糖的用量为10~50μL时,均能实现对大肠杆菌0157:H7的可视化检测,不是对检测效果的关键影响因素。

[0082] 实施例6检测灵敏度和特异性分析

[0083] 1、灵敏度分析

[0084] 本发明所述大肠杆菌0157:H7的可视化检测的灵敏度分析在实施例4所述最佳反应条件下进行,对检测方法的灵敏度进行分析,确定线性方程及检测范围,检出靶标最低检测限,结果数据均进行3次及以上重复。用核酸蛋白分析仪计算菌液浓度,以10倍梯度稀释法依次稀释到10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷CFU·mL⁻¹,待用。

[0085] 灵敏度分析结果如图4所示,其中图A为H₂O₂试纸条对不同浓度的大肠杆菌0157:H7的检测结果,图B为不同浓度的大肠杆菌0157:H7的比色度变化强度,图C为H₂O₂试纸条的Δintensity%与大肠杆菌0157:H7浓度的线性关系。由图4A可知,随着大肠杆菌0157:H7浓度的增加,H₂O₂试纸条的颜色逐渐加深。而从图4B中可以看出,H₂O₂试纸条的Δintensity%随大肠杆菌0157:H7浓度的增加而增大。由图4C可知,H₂O₂试纸条的Δintensity%与大肠杆菌0157:H7的浓度在10~10⁶CFU·mL⁻¹范围内具有良好的线性关系,线性方程为Y=11.22X+20.69(其中Y代表比色度变化强度,X代表大肠杆菌0157:H7浓度的对数),相关系数R²可达0.9878,最低检测限为10CFU·mL⁻¹。

[0086] 2、特异性分析

[0087] 检测方法的特异性分析同样在最佳实验条件下进行,基于“磁珠-靶标-CGC”形成的三明治夹心结构,分别使用浓度为10⁷CFU·mL⁻¹的大肠杆菌0157:H7(E.coli 0157:H7)、大肠杆菌(E.coli)、鼠伤寒沙门氏菌(Sal.t)、金黄色葡萄球菌(S.aur)、单核细胞增生李斯特菌(List.m)和副溶血性弧菌(Vibiro.p)探究可视化检测的特异性,结果数据均进行3次及以上重复。可视化检测的特异性分析结果如图5所示,其中图A为H₂O₂试纸条对不同菌种的检测显色结果,图B为不同菌种的Δintensity%统计结果。由图可知,H₂O₂试纸条仅在检测大肠杆菌0157:H7时才显色,且对照菌株E.coli、Sal.t、S.aur、List.m及Vibiro.p的H₂O₂试纸条的Δintensity%值低于20%,低于靶标菌的最低检测限,而靶标大肠杆菌0157:H7引发了较强的H₂O₂试纸条Δintensity%,可以看出,本发明所述基于CGC纳米复合物及H₂O₂试纸条对大肠杆菌0157:H7的可视化检测的特异性强。

[0088] 实施例7实际样品的检测

[0089] 为了评估本发明所述基于CGC杂化纳米复合物及H₂O₂试纸条的大肠杆菌0157:H7可视化检测方法对实际样品检测的适用性,本发明使用脱脂奶粉样品进行了回收试验。基于“抗体-靶标-CGC”结合的三明治夹心结构,在灭菌脱脂奶粉中分别加入大肠杆菌0157:H7,使浓度达到10⁴、10⁵和10⁶CFU·mL⁻¹,以探究本检测方法的回收率和准确性,结果数据均进行3次及以上重复。

[0090] 结果如表1所示,实际检测的回收率从93±0.71%到102±1.32%,回收结果表明该检测方法可为初步的实际应用提供可行和可靠的病原细菌测量,检测结果准确可靠。

[0091] 表1脱脂奶粉样品中大肠杆菌0157:H7的检测

	初始值 (CFU·mL ⁻¹)	添加值 (CFU·mL ⁻¹)	检测值 (CFU·mL ⁻¹)	回收率±RSD (%)
[0092]	0	1×10 ⁴	1.02×10 ⁴	102±1.32
	0	1×10 ⁵	0.93×10 ⁵	93.0±0.71
	0	1×10 ⁶	1.01×10 ⁶	101±1.42

[0093] 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。

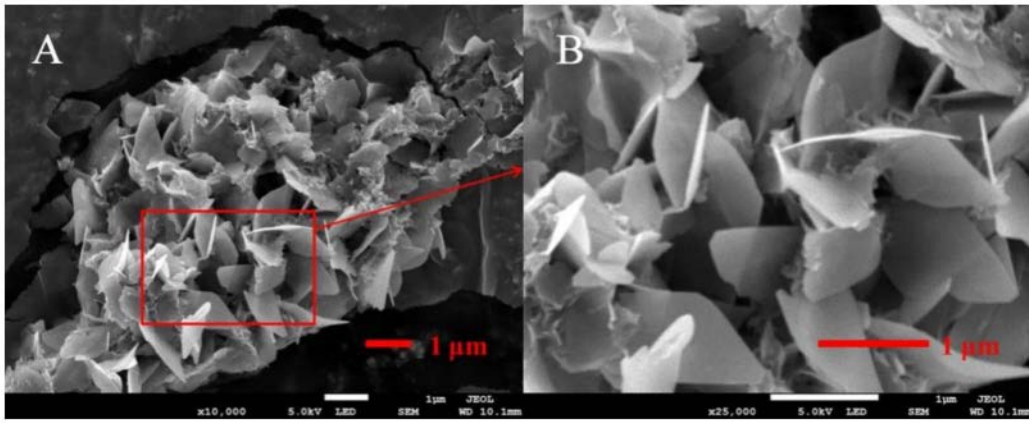


图1

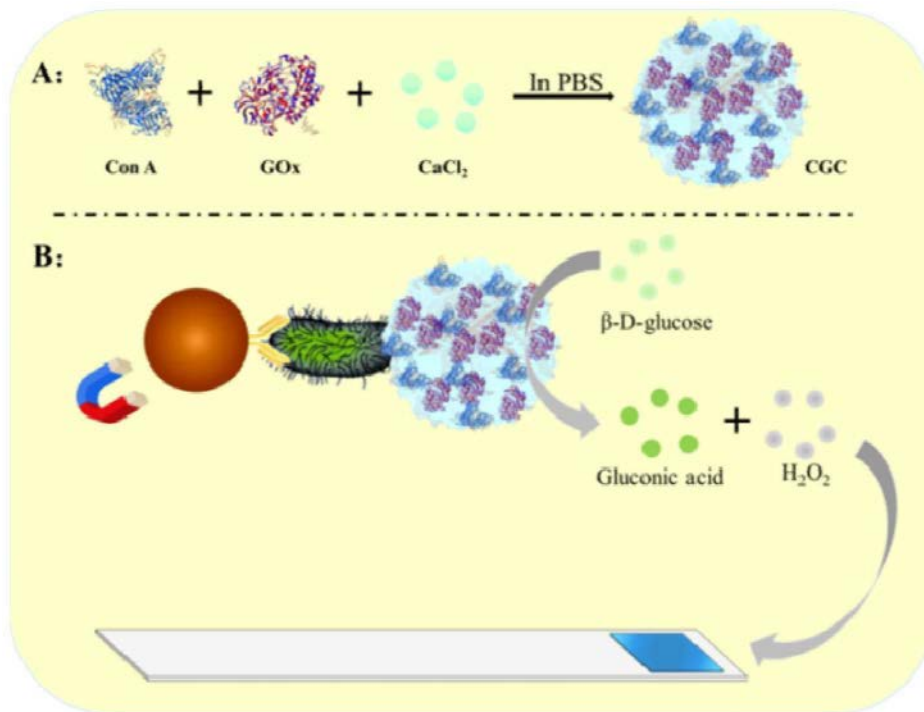


图2

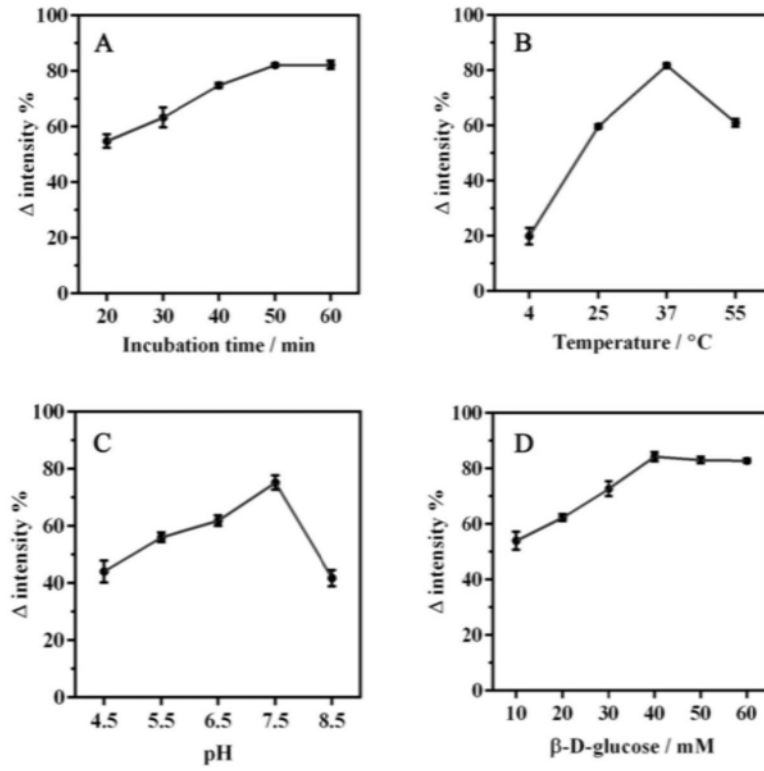


图3

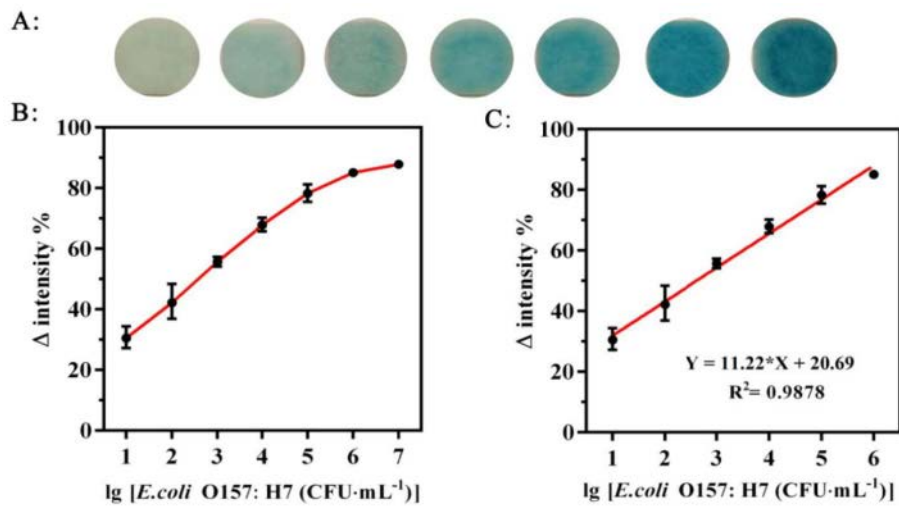


图4

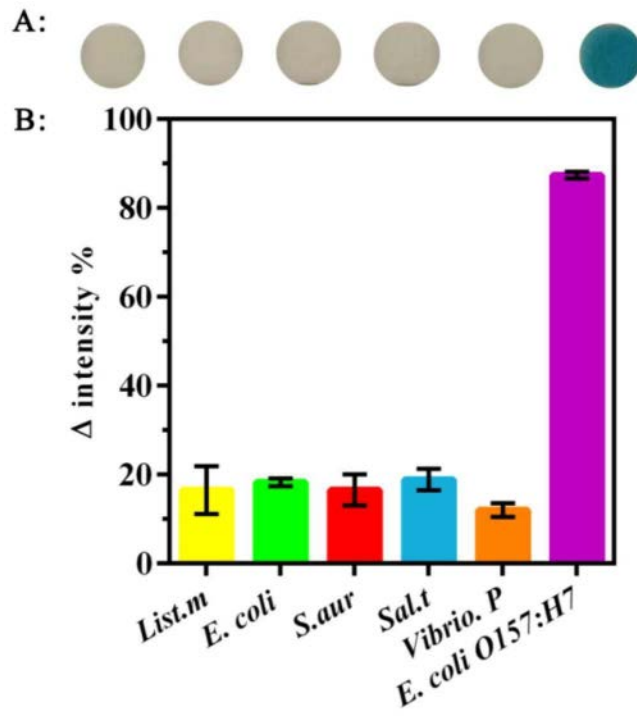


图5