



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113758886 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 23

(21) 申请号 202110898312.9

G01N 33/543 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.05

G01N 33/53 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/569 (2006.01)

申请公布号 CN 113758886 A

审查员 朱滢滢

(43) 申请公布日 2021.12.07

(73) 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 陈翊平 周翠云 王知龙

(74) 专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所

42103

专利代理师 王玉芳

(51) Int. Cl.

G01N 21/33 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

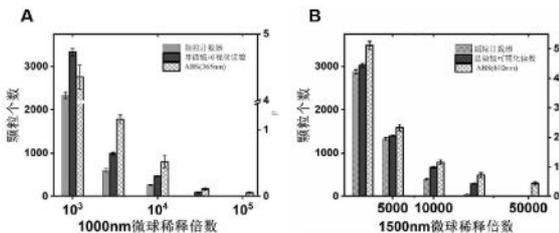
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法

(57) 摘要

本发明属于生化分析技术领域。具体涉及一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法。以纳米磁颗粒为磁分离载体，其表面偶联不同目标物的捕获抗体；以不同粒径的乳胶微球为信号探针，其表面偶联不同目标物的检测抗体或完全抗原，每一种粒径对应一种目标物；磁分离载体、信号探针与待测目标物进行免疫反应；磁分离后收集分离液中未参与反应的信号探针溶液；同时测定不同粒径信号探针的紫外吸收峰所对应的最大吸光度，依据吸光度的变化计算出对应的目标物含量。本发明可多目标物同时检测，大大缩短了检测时间，且紫外分光光度计操作简便，灵敏度高、稳定性好、成本低。



1. 一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 以纳米磁颗粒为磁分离载体,表面偶联不同目标物的捕获抗体或抗体;以不同粒径的乳胶微球为信号探针,表面偶联不同目标物的检测抗体或完全抗原,目标物为呕吐毒素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素同时检测时或金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和沙门氏菌同时检测时需要三种乳胶微球作为信号探针,所选乳胶微球为聚苯乙烯微球,粒径为200 nm、1000 nm、1500 nm,PS 乳胶微球的浓度比例为 200 nm:1000 nm:1500 nm=3:2:1;

2) 磁分离载体、信号探针与待测目标物进行充分的免疫反应,得到混合溶液;

3) 对上述步骤2)中混合溶液进行磁分离,磁分离载体被迅速吸附,取分离液,得到未参与反应的信号探针溶液;

4) 测定步骤3)得到的未参与反应的信号探针溶液中不同粒径信号探针的紫外吸收峰所对应最大吸光度,200 nm聚苯乙烯乳胶微球最大吸光度对应波长为228 nm,1000 nm聚苯乙烯乳胶微球最大吸光度对应波长为365 nm,1500 nm聚苯乙烯乳胶微球最大吸光度对应波长为610 nm,分别建立以待测物浓度与最大吸光度数值两者之间的数量关系,依据吸光度的变化计算出对应的目标物含量;

步骤1)中,乳胶微球的粒径为100 nm-5000 nm。

2. 根据权利要求1中所述的多目标物同时检测方法,其特征在于,所述步骤1)中,乳胶微球为聚苯乙烯乳胶微球或聚丁二烯乳胶微球、聚异戊二烯乳胶微球、聚丙烯酸乳胶微球中任一种。

3. 根据权利要求1中所述的多目标物同时检测方法,其特征在于,所述步骤1)中,纳米磁颗粒粒径为50 nm-5000 nm。

4. 根据权利要求1中所述的多目标物同时检测方法,其特征在于,所述步骤2)中,当进行夹心免疫反应时,混合溶液为“载体-目标物-信号探针”复合物和未参与反应的信号探针溶液;当进行竞争免疫反应时,混合溶液为载体-信号探针复合物、载体-目标物复合物和未参与反应的信号探针溶液。

5. 根据权利要求1中所述的多目标物同时检测方法,其特征在于,一种粒径乳胶微球对应检测一种目标物,选用多种粒径乳胶微球则可同时检测多种目标物。

6. 权利要求1-5任意一项所述的多目标物同时检测方法应用于各种目标物的同时定量检测,包括真菌毒素、致病微生物、抗生素、农兽药、疾病标志物或其他。

## 一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生化分析领域,涉及一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法。

### 背景技术

[0002] 快速检测方法具有简便、快速、准确的优点,在保障人类健康、保护生态环境中发挥了越来越重要的作用。根据信号读出方式的不同,快速检测方法主要分为光学方法、电化学方法和磁学方法。其中,基于光学的检测方法可与多种生化反应兼容,而且是一种非接触式的检测模式,在临床诊断、环境监测、食品安全等领域得到了广泛的应用。

[0003] 在基于光学的快速检测方法中,具有代表性且得到了广泛应用的是酶联免疫分析方法、胶体金免疫层析试纸条法和荧光光谱分析方法。酶联免疫分析方法和胶体金免疫层析试纸条法灵敏度较低,不适合分析痕量的目标物。荧光光谱分析可以满足痕量分析需求,但很少有物质自身发出荧光或形成荧光测量体系,经过化学衍生虽然可以使部分待测物形成荧光,但难度较高,极大地限制了其应用。基于荧光微球的免疫分析方法目前也得到了一定的应用,但荧光微球的价格较高,在使用中需要避光,限制了其进一步的应用。虽然上述方法在目标物的快速检测中发挥了重要作用,但是在复杂样品基质中的多目标物同时检测方面应用受限,检测效率低。

### 发明内容

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法,基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法,通过乳胶微球的特征紫外光谱实现了复杂基质中多目标物的同时检测。紫外分光光度法通过测定物质在190~1000nm波长范围内的吸光度,实现目标物的定性或定量分析。我们在试验中发现,一定粒径的乳胶微球(100nm-5000nm)在190~1000nm波长范围内具有较强的紫外吸收峰,且随着粒径变大,吸收峰会发生蓝移,即不同粒径的乳胶微球在不同波长处具有最强紫外吸收峰。进一步试验发现,乳胶微球浓度与其吸收峰强度在适宜范围内呈现明显的正相关,而且细微浓度的变化即可引起吸收峰强度改变,这种优异的相关性特别适合用于构建免疫分析方法。同时,由于不同粒径的乳胶微球具有不同的紫外吸收峰,可以作为多个信号探针,从而实现多个目标物的同时检测。

[0005] 本发明提供所采用的技术方案是:

[0006] 将纳米磁颗粒作为磁分离载体,将不同粒径的乳胶微球作为信号探针,在纳米磁颗粒表面分别修饰与目标物相对应的捕获抗体,在乳胶微球表面修饰对应的检测抗体或完全抗原。目标物的存在将诱导或抑制磁颗粒与乳胶微球的结合,致使溶液中未结合的自由分散状乳胶微球浓度发生相应改变,通过外加磁场,可以将未结合的乳胶微球从整个体系中分离,而未结合的乳胶微球含量与目标物含量相关,同时乳胶微球具有很强的紫外吸收峰,通过紫外分光光度计测定乳胶微球的信号强度即可获得目标物含量。该方法通过改变

乳胶微球的浓度,可以实现对目标物浓度的高灵敏快速检测。同时,根据待测物的种类,在不同粒径表面偶联相对应的生物识别分子,可实现多目标物的同时检测。

[0007] 一种基于乳胶微球浓度变化的多目标物同时检测方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 以纳米磁颗粒为磁分离载体,表面偶联不同目标物的捕获抗体或抗体;以不同粒径的乳胶微球为信号探针,其表面偶联不同目标物的检测抗体或完全抗原;

[0009] 2) 磁分离载体、信号探针与待测目标物进行充分的免疫反应,得到混合溶液;

[0010] 3) 对上述步骤2)中混合溶液进行磁分离,磁分离载体被迅速吸附,取分离液,得到未参与反应的信号探针溶液;

[0011] 4) 同时测定步骤3)得到的未反应的信号探针溶液中不同粒径信号探针的紫外吸收峰所对应最大吸光度,分别建立以待测物浓度与最大吸光度数值两者之间的数量关系,依据浓度的变化计算出对应的目标物含量。

[0012] 优选地,所述步骤1)中,乳胶微球是聚苯乙烯(PS)乳胶微球或聚丁二烯乳胶微球、聚异戊二烯乳胶微球、聚丙烯酸乳胶微球中任一种。

[0013] 优选地,所述步骤1)中,纳米磁颗粒粒径为50nm-5000nm。

[0014] 优选地,所述步骤1)中,乳胶微球的粒径为100nm-5000nm。

[0015] 优选地,所述步骤1)中,目标物为呕吐毒素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素同时检测时或金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌同时检测时,需要三种乳胶微球作为信号探针,所选乳胶微球为聚苯乙烯微球,粒径为200nm、1000nm、1500nm。

[0016] 进一步优选地,所述200nm聚苯乙烯乳胶微球最大吸光度对应波长为228nm,1000nm聚苯乙烯乳胶微球最大吸光度对应波长为365nm,1500nm聚苯乙烯乳胶微球最大吸光度对应波长为610nm。

[0017] 优选地,所述步骤2)中,当进行夹心免疫反应时,混合溶液为载体-目标物-信号探针复合物和未参与反应的信号探针溶液;当进行竞争免疫反应时,混合溶液为载体-信号探针复合物、载体-目标物复合物和未参与反应的信号探针溶液。

[0018] 优选地,一种粒径乳胶微球对应检测一种目标物,选用多种粒径乳胶微球则可同时检测多种目标物。

[0019] 所述的多目标物同时检测方法应用于各种目标物的同时定量检测,包括真菌毒素、致病微生物、抗生素、农兽药、疾病标志物或其他。

[0020] 现有的多目标物同时检测方法主要有基于小孔电阻颗粒计数读出和显微镜可视化多微球信号同时读出,上述这两种方法都是对微米级别的乳胶微球进行计数,不能实现对纳米级别的微球进行读出。本发明同时适用于纳米级别和微米级别的乳胶微球,颗粒计数器每进样一次都需要重新洗涤、重新除背景,显微镜拍照需要结合机器视觉识别处理数据,耗时久,效率低,而本专利中采用紫外分光光度计作为检测设备,只需要测量一次背景,可多样品同时进样检测,速度可达12s/样品,极大的提高了检测效率。更重要的是,本发明相比上述两种方法在灵敏度方面有所提升。如图1所示,对于200nm的乳胶微球,颗粒计数器和显微镜可视化读数都不适用;对于1000nm的乳胶微球,颗粒计数器最高只能检测到稀释了 $10^4$ 倍数的微球,显微镜可视化读数可以检测到稀释了 $5 \times 10^4$ 倍数的微球,紫外分光光度计最高可以检测到稀释了 $10^5$ 倍数的微球;对于1500nm的乳胶微球,颗粒计数器和显微镜可视化读数可以分析到稀释了 $2 \times 10^4$ 倍数的微球,紫外分光光度法最高可以达到稀释了 $5 \times$

10<sup>4</sup>倍数的微球,因此在一定程度上提高了灵敏度。用三种方法同时检测沙门氏菌时,效果如图2所示,颗粒计数器和显微镜可视化读数最高可以检测1000CFU/mL的沙门氏菌,紫外分光光度法最高可以达到100CFU/mL沙门氏菌。由图1-2说明本专利方法比颗粒计数器信号读出和显微镜可视化读出方法的灵敏度更高,与计数的方法相比,本发明方法不仅解决了多个目标物同时检测的难题,而且方法简便,灵敏度更高。

[0021] 本发明的有益效果是:

[0022] 1) 操作简单、检测快速:方法信号转化简便,采用一步法免疫反应,通过磁分离,短时间内即可实现乳胶微球的快速分离,紫外分光光度计相比于颗粒计数器和显微镜可视化读出方法,大大缩短了检测时间。

[0023] 2) 多目标物同时检测:不同粒径的乳胶微球有不同的最大紫外吸收峰,只需选用不同粒径(纳米级或微米级)乳胶微球作为信号探针即可实现对多目标物同时检测。

[0024] 3) 灵敏度高:吸光度对乳胶微球浓度的变化敏感,可以达到10微球/mL的响应度,因此可以实现高灵敏检测。

[0025] 4) 稳定性好:乳胶微球稳定性好,可在室温下保存6个月,不需要避光,保证了探针的稳定性。

[0026] 5) 成本低:方法信号转化简便,无需标记生物酶,荧光素酶等,而且乳胶微球性质稳定、粒径均一、制备工艺成熟,具有低成本的优势。

[0027] 6) 应用广泛:针对不同领域的检测需求,将免疫磁分离的快速前处理优势与乳胶微球的高效信号同时读出相结合,即可应用于不同领域。

## 附图说明

[0028] 图1为本发明与颗粒计数器和显微镜可视化读数两者计颗粒数的灵敏度对比图,其中图1A为1000nm乳胶微球下,三种方法检测灵敏度对比图,图1B为1500nm乳胶微球下,三种方法检测灵敏度对比图;

[0029] 图2为本发明与小孔电阻颗粒计数器和显微镜可视化读数检测沙门氏菌结果对比图,其中图2A为小孔电阻颗粒计数器检测结果图,图2B为显微镜检测结果图,图2C为本发明紫外分析检测结果图。

[0030] 图3为三种不同粒径PS (200nm、1000nm、1500nm) 乳胶微球对应紫外最大吸光度与浓度的线性关系

[0031] 图4为三种不同粒径PS (200nm、1000nm、1500nm) 乳胶微球按照不同比例混合时,各粒径所对应的最大吸光度数值对比图,其中图4A为200nm:1000nm:1500nm浓度比为1:1:1,图4B为2:2:1,图4C为3:1:1,图4D为3:2:1;

[0032] 图5为三种不同粒径PS (200nm、1000nm、1500nm) 乳胶微球按最佳比例混合时的紫外吸收峰;

[0033] 图6为本发明中同时检测三种真菌毒素的原理图;

[0034] 图7为本发明检测真菌毒素时,磁分离载体与信号探针浓度比例为1:1、1:2、1:3、2:1时真菌毒素浓度与对应最大吸光度的关系,其中图7A为呕吐毒素,图7B为黄曲霉毒素,图7C为赭曲霉毒素;

[0035] 图8为本发明同时检测三种真菌毒素的标准曲线;

[0036] 图9为本发明同时检测三种致病微生物的原理图；

[0037] 图10本发明同时检测三种致病微生物的标准曲线。

### 具体实施方式

[0038] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0039] 试验材料说明

[0040] 紫外可见分光光度计,购自ThermoFisher GENESYS150。

[0041] 微量石英比色皿,购自上海宽谱光学仪器有限公司。

[0042] 羧基化磁颗粒(MNP),粒径1000nm,10mg/mL,购自invitrogen。

[0043] 羧基化聚苯乙烯(PS)乳胶微球,粒径200nm(10mg/mL)、1000nm(100mg/mL)、1500nm(10mg/mL),购自Bangs Laboratories, Inc。

[0044] 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺活泼酯(sulfo-NHS):购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。Tween-20、牛血清白蛋白(BSA):购自Amresco公司。

[0045] PBS缓冲液(10mM, pH=7.4):取8.00g NaCl, 0.20g KCl, 0.20g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和2.90g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 于1000mL容量瓶中定容,摇匀。

[0046] MES缓冲液(0.1M, pH=6.0):取21.325g MES溶于去离子水中定容至1000mL,为A液;取4g NaOH溶于去离子水中定容至1000mL,为B液;取1000mL A液和400mL B液混合,摇匀。

[0047] PBST、MEST:在配制好的PBS或MES缓冲液中加入0.05% Tween-20。

[0048] 呕吐毒素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素及其对应的完全抗原和抗体:购自山东蓝都。

[0049] 金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌及其对应的捕获抗体和检测抗体:购自山东蓝都。

[0050] 为验证紫外光谱分析效果,分别测定粒径为200nm、1000nm、1500nm的PS乳胶微球的线性范围(尽量控制最大吸光度在0.1-0.8区间,读数最为准确),如图3所示,200nm PS乳胶微球在5-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内吸光值在0.14-0.82区间,标准曲线为 $Y=0.027X-0.001$ ,  $R^2=0.9997$ ;1000nm PS乳胶微球在2.5-36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内吸光值在0.13-0.79区间,标准曲线为 $Y=0.044X-0.025$ ,  $R^2=0.9956$ ;1500nm PS乳胶微球在1-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内吸光值在0.16-0.79区间,标准曲线为 $Y=0.105X-0.003$ ,  $R^2=0.9990$ 。

[0051] 在三种不同粒径的PS乳胶微球最佳线性范围内,按照不同浓度比例混合测试紫外吸收峰效果,包括200nm:1000nm:1500nm=1:1:1、2:2:1、3:1:1、3:2:1比例,如图4所示,为了获取最佳的读数结果,应取三种粒径的最大吸光度数值相近为宜,最终确定PS乳胶微球的浓度比例为200nm:1000nm:1500nm=3:2:1时效果最佳,紫外吸收峰效果如图5所示,200nm PS乳胶微球吸收峰的波长范围为190-270nm,1000nm PS乳胶微球吸收峰的波长范围为270-510nm,1500nm PS乳胶微球吸收峰的波长范围为510-1000nm,三种峰分布均匀,方便读数。则本发明分析多目标物时沿用此比例。

[0052] 实施例1呕吐毒素、黄曲霉毒素和赭曲霉毒素的多元定量检测

[0053] 采用竞争免疫法同时检测呕吐毒素、黄曲霉毒素和赭曲霉毒素,原理图如图6所

示,以粒径为1000nm的磁颗粒为磁分离载体,表面分别偶联与呕吐毒素、黄曲霉毒素和赭曲霉毒素对应的抗体;以200nm、1000nm、1500nm PS乳胶微球为信号探针,分别偶联与呕吐毒素、黄曲霉毒素和赭曲霉毒素对应的完全抗原,当目标物存在时,信号探针会与目标物共同竞争载体表面的抗体,形成信号探针-载体复合物或目标物-载体复合物。因此,目标物含量直接影响到形成的信号探针-载体复合物数量,磁分离去除载体后,分离液中只留存未结合的信号探针和目标物,目标物是小分子且微量,不影响紫外吸收峰,信号探针存留量与目标物浓度正相关,而且三种信号探针可以被紫外分光光度计同时检测(三种不同的吸收峰),即可实现对目标物的多元定量检测。

#### [0054] 试剂制备

[0055] 1) 磁颗粒偶联目标物抗体(磁分离载体)的制备,以呕吐毒素为例,具体过程如下:

[0056] 取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的磁颗粒于1.5mL离心管中,加入500 $\mu$ L MEST,磁颗粒分散均匀后经过磁分离除去上清液,如此反复洗涤3次,去除磁颗粒表面浮尘以及非特异性吸附,加入80 $\mu$ L EDC和40 $\mu$ L NHS,使用MES缓冲液定容到500 $\mu$ L,室温活化30min后使用MEST洗涤3次,去除多余的EDC和NHS,加入50 $\mu$ L呕吐毒素抗体,PBST定容到500 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C偶联3h,PBST洗涤3次去除多余的抗体,加入1000 $\mu$ L的含1%BSA的PBST封闭30min,PBST洗涤3次去除多余的封闭液,除去洗涤液所得的偶联抗体的磁颗粒用1000 $\mu$ L的PBST重悬,置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0057] 制备黄曲霉毒素、赭曲霉毒素的磁颗粒偶联物时,只需将呕吐毒素抗体换为相对应的抗体偶联即可。

[0058] 2) PS乳胶微球偶联目标物完全抗原(信号探针)的制备:

[0059] 与磁颗粒偶联过程类似,仅磁分离过程转变为离心,其中200nm PS乳胶微球离心条件为15000rpm,5min;1000nm PS乳胶微球离心条件为8000rpm,5min;1500nm PS乳胶微球离心条件为6000rpm,5min,偶联过程中与目标物相对应的抗体转变为完全抗原,制备成200nm PS乳胶微球-呕吐毒素完全抗原偶联物、1000nm PS乳胶微球-黄曲霉毒素完全抗原偶联物、1500nm PS乳胶微球-赭曲霉毒素完全抗原偶联物的保存液,偶联完成后置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

#### [0060] 免疫反应与分离

[0061] 将上述制备的三种磁分离载体、三种信号探针和一系列梯度对应的三种目标物等体积(各100 $\mu$ L)混合,置于37 $^{\circ}$ C孵育30min后,磁分离10s,收集分离液。

[0062] 为获得最佳的分析效果,对上述磁分离载体和信号探针的浓度比例分别进行了优化,图7为磁分离载体和信号探针浓度比例为1:1、1:2、1:3、2:1时各目标物的分析效果,显然,各目标物的磁分离载体与信号探针之间的浓度比例对结果影响显著,由于上述信号探针比例确定为200nm:1000nm:1500nm=3:2:1时效果最佳,最终确定呕吐毒素的载体与信号探针孵育浓度比例为1:3(50 $\mu$ g/mL:150 $\mu$ g/mL),黄曲霉毒素比为1:2(50 $\mu$ g/mL:100 $\mu$ g/mL),赭曲霉毒素比为1:1(50 $\mu$ g/mL:50 $\mu$ g/mL),线性最佳。

#### [0063] 紫外分光光度计测定分离液吸光值

[0064] 将上述步骤收集的分离液(未结合的信号探针溶液)混匀,加样200 $\mu$ L至微量比色皿中,放入样品池内比色池架上依此测量,记录三种PS乳胶微球分别对应的最大吸光度。以待测物浓度对数为横坐标,最大吸光度数值为纵坐标,得到两者之间线性关系。如图8所示,对于呕吐毒素,线性范围为1ng-1000ng/mL,回归方程为 $Y=0.185X-0.354$ , $R^2=0.9819$ ;对

于黄曲霉毒素,线性范围为0.1ng-300ng/mL,回归方程为 $Y=0.129X-0.144$ , $R^2=0.9910$ ;对于赭曲霉毒素,线性范围为0.05ng-100ng/mL,回归方程为 $Y=0.135X+0.069$ , $R^2=0.9926$ 。

[0065] 上述结果表明,该方法能够用于真菌毒素多目标物同时检测,具有高灵敏度和宽线性范围,且可适用于不同检出要求的待测物同时检测,200nm乳胶微球作为检测灵敏度要求较低的呕吐毒素的信号探针,1000nm乳胶微球作为检测黄曲霉毒素的信号探针,1500nm乳胶微球作为检测灵敏度要求最高的赭曲霉毒素的信号探针。

[0066] 实施例2金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌的多元定量检测

[0067] 采用夹心免疫法同时检测金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和沙门氏菌,原理图如9所示,以粒径为1000nm的磁颗粒为磁分离载体,表面分别偶联与金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和沙门氏菌对应的捕获抗体;以200nm、1000nm、1500nm PS乳胶微球为信号探针,分别偶联与金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和沙门氏菌对应的检测抗体,当目标物存在时,目标物会与载体和信号探针结合,形成载体-目标物-信号探针复合物,因此目标物数量直接影响到形成的夹心免疫复合物数量,磁分离去除载体后,分离液中只留存未结合的信号探针,存留量与目标物数量负相关,而且三种信号探针可以被紫外分光光度计同时检测(三种不同的吸收峰),即可实现对目标物的多元定量检测。

[0068] 试剂制备

[0069] 1) 磁颗粒偶联目标物捕获抗体(磁分离载体)的制备,以金黄色葡萄球菌为例,具体过程如下:

[0070] 取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的磁颗粒于1.5mL离心管中,加入500 $\mu$ L MEST,磁颗粒分散均匀后经过磁分离除去上清液,如此反复洗涤3次,去除磁颗粒表面浮尘以及非特异性吸附,加入80 $\mu$ L EDC和40 $\mu$ L NHS,使用MES缓冲液定容到500 $\mu$ L,室温活化30min后使用MEST洗涤3次,去除多余的EDC和NHS,加入50 $\mu$ L金黄色葡萄球菌菌捕获抗体,PBST定容到500 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C偶联3h,PBST洗涤3次去除多余的抗体,加入1000 $\mu$ L的含1%BSA的PBST封闭30min,PBST洗涤3次去除多余的封闭液,除去洗涤液所得的偶联抗体的磁颗粒用1000 $\mu$ L的PBST重悬,置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0071] 制备单增李斯特菌、沙门氏菌的磁颗粒偶联物时,只需将金黄色葡萄球菌捕获抗体换为相对应的捕获抗体偶联即可。

[0072] 2) PS乳胶微球偶联目标物检测抗体(信号探针)的制备:

[0073] 与磁颗粒偶联过程类似,仅磁分离过程转变为离心,其中200nm PS乳胶微球离心条件为15000rpm,5min,1000nm PS乳胶微球离心条件为8000rpm,5min,1500nm PS乳胶微球离心条件为6000rpm,5min,偶联过程中与目标物相对应的捕获抗体转变为检测抗体,制备成200nm PS乳胶微球-金黄色葡萄球菌检测抗体偶联物、1000nm PS乳胶微球-单增李斯特菌检测抗体偶联物、1500nm PS乳胶微球-沙门氏菌检测抗体偶联物的保存液,置于4 $^{\circ}$ C冰箱。

[0074] 免疫反应与分离

[0075] 将上述制备的三种载体、三种信号探针和一系列梯度对应的三种目标物等体积(各100 $\mu$ L)混合,置于37 $^{\circ}$ C孵育30min后,磁分离10s,收集分离液。

[0076] 为获得最佳的分析效果,对上述载体和信号探针的浓度比例分别进行了优化,由于上述信号探针比例确定为200nm:1000nm:1500nm=3:2:1时出峰效果最佳,参照真菌毒素

优化过程,最终确定金黄色葡萄球菌的载体与信号探针孵育浓度比例为2:3 (100 $\mu$ g/mL:150 $\mu$ g/mL),单增李斯特菌比为1:1 (100 $\mu$ g/mL:100 $\mu$ g/mL),沙门氏菌比为2:1 (100 $\mu$ g/mL:50 $\mu$ g/mL),线性最佳。

[0077] 紫外分光光度计测定分离液吸光值

[0078] 将上述步骤收集的分离液(未反应的信号探针溶液)混匀,进样200 $\mu$ L至微量比色皿中,放入样品池内比色池架上依此测量,分别记录在228nm、365nm、610nm波长处最大吸光度。以待测物浓度对数为横坐标,最大吸光度数值为纵坐标,得到两者之间线性关系。如图10所示,对于金黄色葡萄球菌,线性范围为 $10^3$ - $10^7$ CFU/mL,回归方程为 $Y = -0.085X + 0.763$ , $R^2 = 0.9998$ ,对于单增李斯特菌,线性范围为 $10^3$ - $10^7$ CFU/mL,回归方程为 $Y = -0.092X + 0.896$ , $R^2 = 0.9798$ ,对于沙门氏菌,线性范围为 $10^2$ - $10^6$ CFU/mL,回归方程为 $Y = -0.109X + 0.802$ , $R^2 = 0.9995$ 。

[0079] 上述结果表明,该方法能够用于致病微生物多目标物同时检测,具有高灵敏度和宽线性范围,且可适用于不同检出要求的待测物同时检测,200nm和1000nm乳胶微球作为检测金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的信号探针,1500nm乳胶微球作为检测灵敏度要求最高的沙门氏菌的信号探针。

[0080] 本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代,但并不会偏离本发明的精神或者超越所附权利要求书所定义的范围。

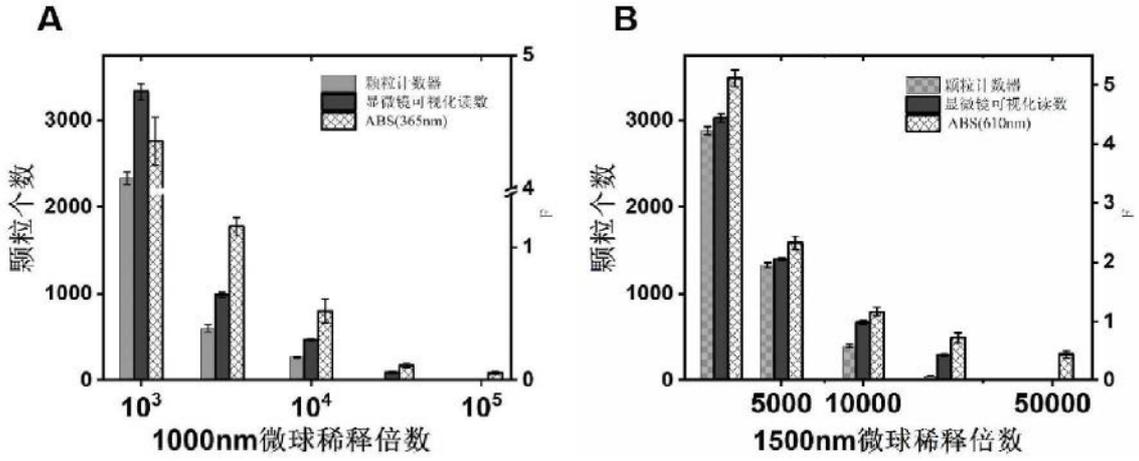


图1

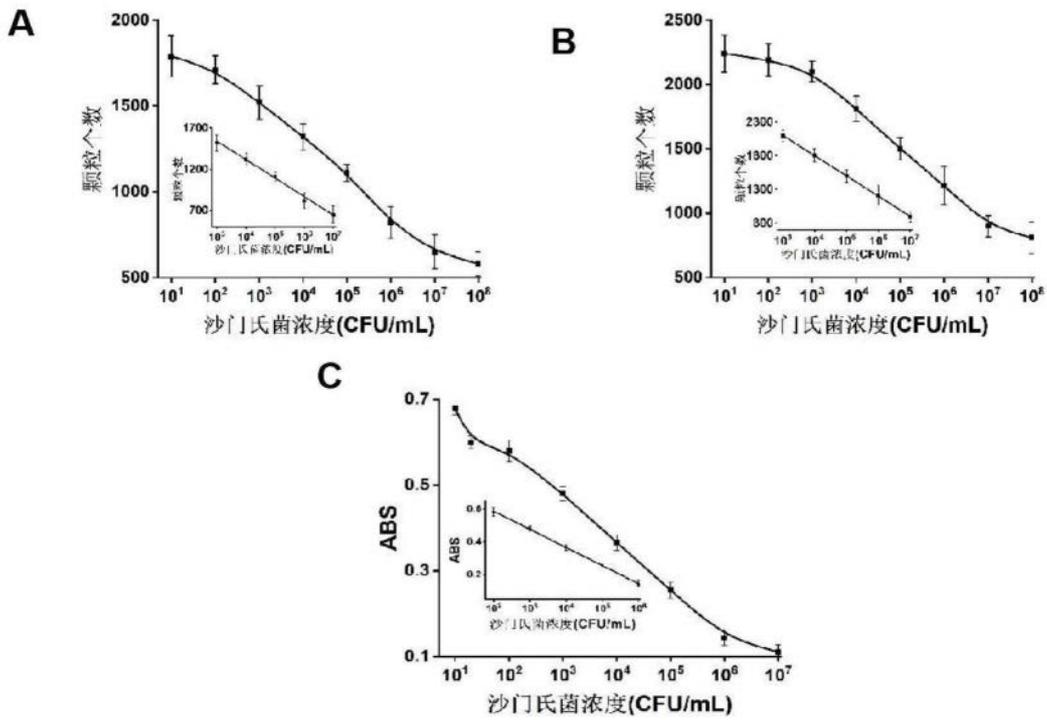


图2

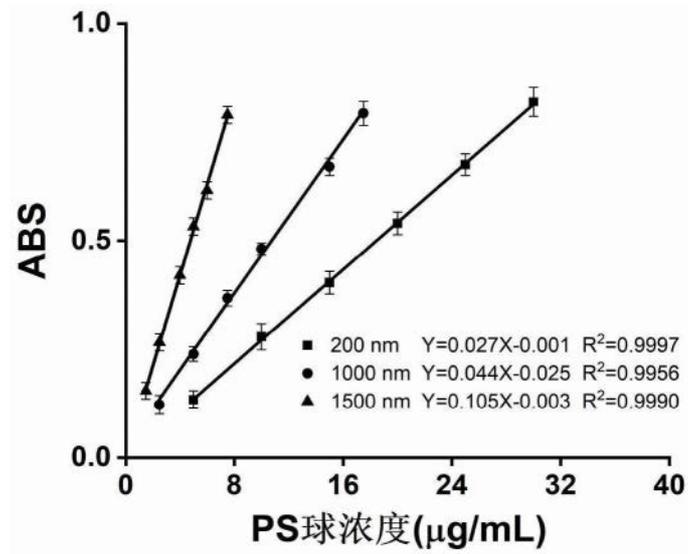


图3

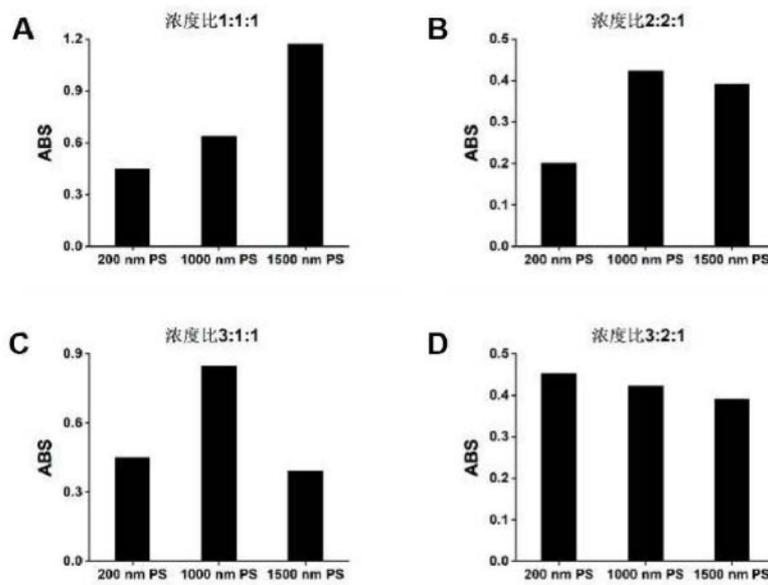


图4

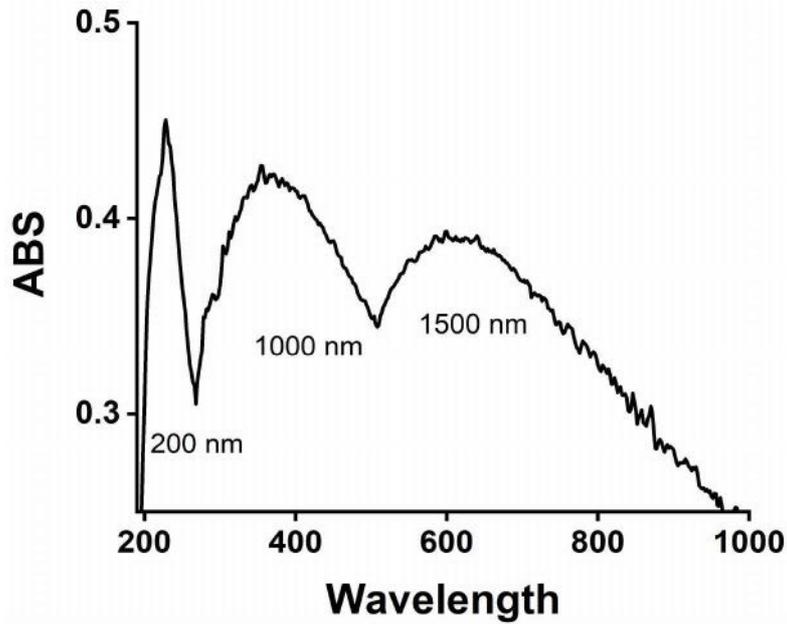


图5

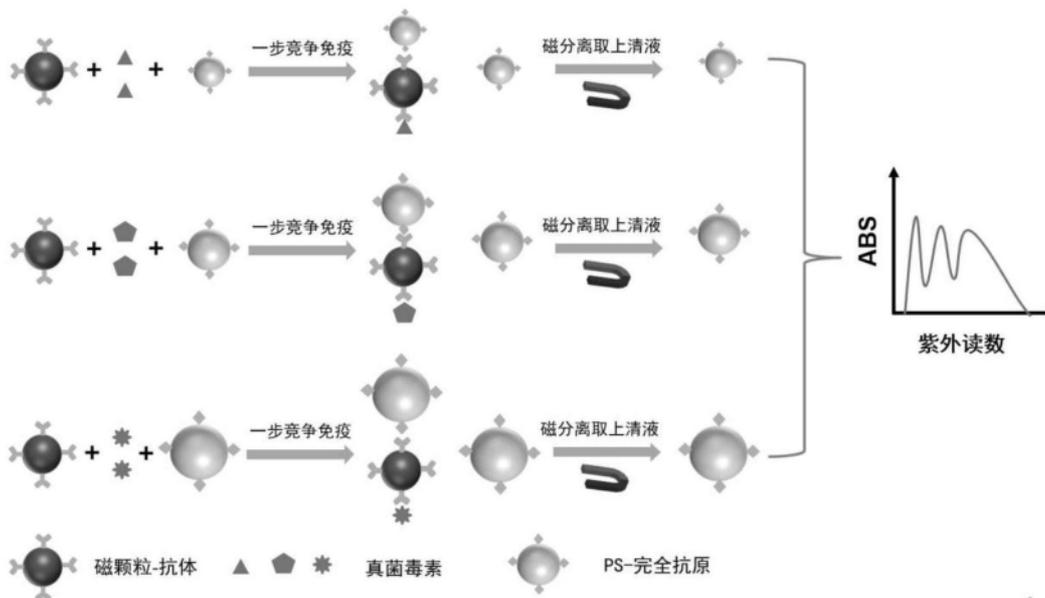


图6

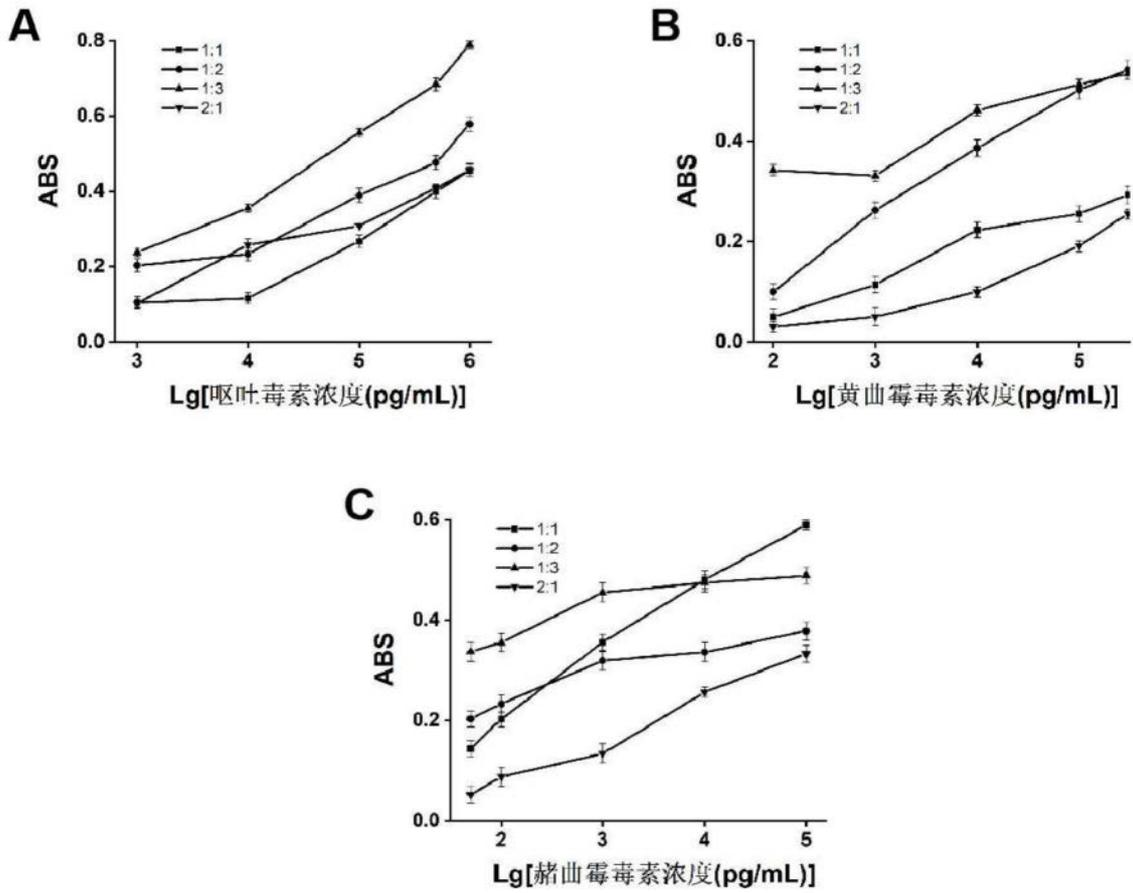


图7

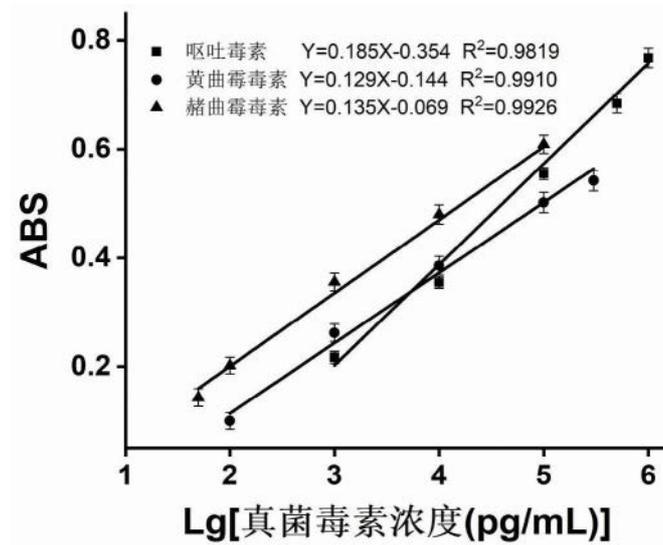
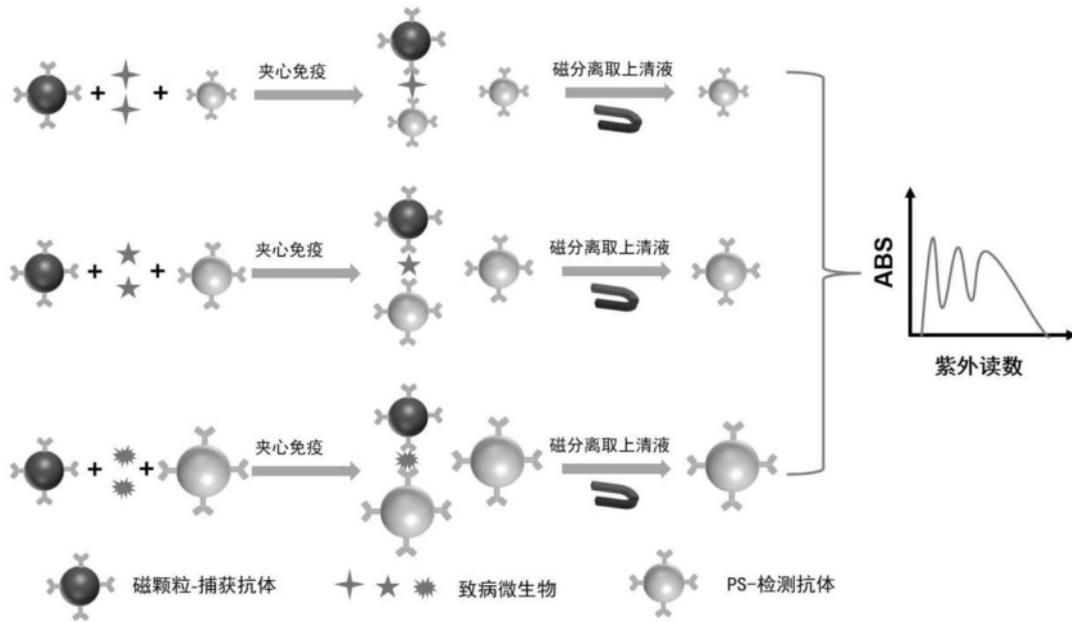


图8



2

图9

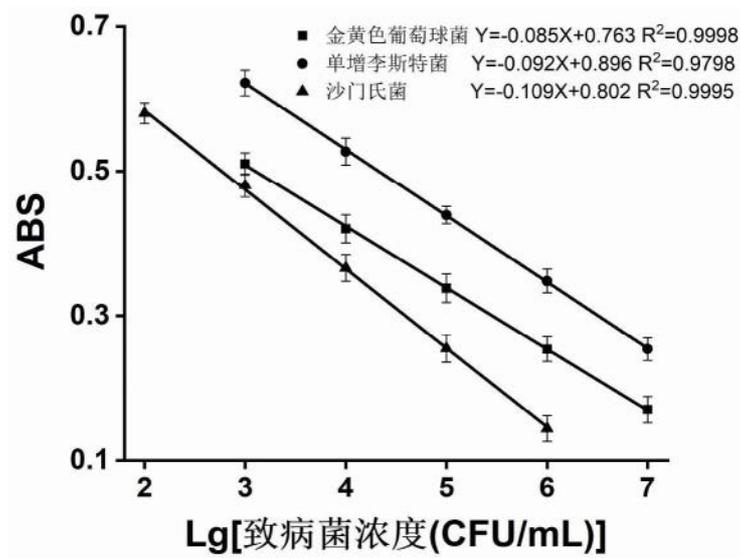


图10