



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102507934 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201110343097. 2

(22) 申请日 2011. 11. 02

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5060 2011. 07. 14

(73) 专利权人 集美大学

地址 361021 福建省厦门市集美区银江路
185 号

(72) 发明人 林鹏 冯建军 王艺磊 郭松林

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1414112 A, 2003. 04. 30,

CN 101699293 A, 2010. 04. 28,

CN 101665838 A, 2010. 03. 10,

DE 102006026952 A1, 2007. 12. 13,

WO 2009095840 A1, 2009. 08. 06,

US 2005130185 A1, 2005. 06. 16,

于兰等. 产酸克雷伯氏菌引起食物中毒 15 例
报告. 《武警医学》. 2003, (第 2 期),

G P Katsanis 等. Detection of
Klebsiella pneumoniae and Escherichia
coli strains producing extended-spectrum
beta-lactamases. 《Journal of Clinical
Microbiology》. 1994, 第 32 卷 (第 3 期),

J. Kamile Rasheed 等. Detection of the
Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Type 2
Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme in Clinical
Isolates of Citrobacter freundii and K.
oxytoca Carrying a Common Plasmid. 《Journal
of Clinical Microbiology》. 2008, 第 46 卷 (第
6 期),

唐毅等. 白鲢肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定. 《
西南大学学报(自然科学版)》. 2007, (第 6 期),

审查员 黄晓丽

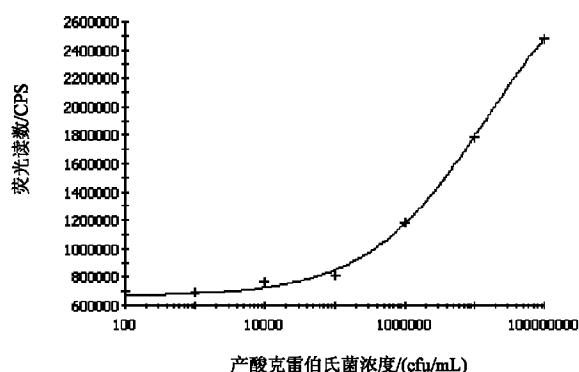
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法

(57) 摘要

产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法, 涉及一种病原菌的检测。提供一种灵敏度高、特异性强、简便快速的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法。产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定; 制备兔抗产酸克雷伯氏菌抗体; IgG 的 Eu³⁺ 标记及纯化; 建立产酸克雷伯氏菌 TRFIA 检测方法。灵敏度为 1.0×10^5 cfu/孔, 高于荧光抗体法。应用荧光抗体法进行病原菌全菌体检测, 需要显微镜目测观察荧光强度大小, 主观性大, 由于背景荧光的干扰, 检测灵敏度低, 且无法给出具体的灵敏度数值。通过 TRFIA 测定不同浓度的产酸克雷伯氏菌 CPS 值表明, 该法的范围宽, 能定量检测。



1. 产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于所述产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca* 已于 2011 年 07 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏中心登记入册编号为 CGMCC No. 5060;

所述检测法包括以下步骤:

- 1) 产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定;
- 2) 制备兔抗产酸克雷伯氏菌抗体;
- 3) IgG 的 Eu^{3+} 标记及纯化;
- 4) 建立产酸克雷伯氏菌 TRFIA 检测方法

将产酸克雷伯氏菌菌株首先用无菌生理盐水洗涤,4500r/min,离心 5min,弃上清;
 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液稀释,取 100 μL 加入到 96 孔微孔板中包被,用洗涤液冲洗,每孔加入 200 μL 1% 的 BSA,37°C 封闭 2h,洗涤,加入 Eu^{3+} -IgG 溶液 100 μL ,37°C 振荡孵育 1h,用洗涤液冲洗,每孔加入 200 μL 增强液,振荡,多标记分析仪上测量荧光读数 CPS;设碳酸盐包被液作阴性对照,以样品孔的 CPS 值与对照孔的 CPS 值之比大于 2 时判断为阳性。

2. 如权利要求 1 所述的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于在步骤 1) 中,所述产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定的具体方法是:采用 Biolog 自动生化鉴定系统进行鉴定。

3. 如权利要求 1 所述的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于在步骤 2) 中,所述制备兔抗产酸克雷伯氏菌抗体的具体方法包括以下步骤:

(1) 将产酸克雷伯氏菌菌株接种于 0.5%NaCl 的牛肉膏蛋白胨培养液中,27°C 培养 24h,用甲醛及加热两种方法灭活,离心,再加入无菌生理盐水洗涤,调整细菌浓度至 $6 \times 10^8 \text{cfu/mL}$ 备用;

(2) 选择 2 只健康的 2 ~ 3kg 的新西兰大白兔,背部两侧皮下多点注射免疫,分 4 次免疫,免疫间隔期为 2 周,第 1 次免疫时与弗氏完全佐剂 1 : 1 混合、乳化,第 2 次免疫时与弗氏不完全佐剂 1 : 1 混合乳化,第 3、4 次免疫采用菌液注射,每次每只注射剂量为 1mL;

(3) 最后一次免疫 10 天后,耳静脉采血,分离血清,用试管凝集法测定抗血清效价,效价达到 1 : 1280 以上方可使用;

(4) 采用 SPA 亲和层析法从血清中纯化抗体,然后脱盐和冷冻干燥。

4. 如权利要求 3 所述的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于在步骤(1) 中,所述离心的条件采用 4500r/min,5min。

5. 如权利要求 1 所述的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于在步骤 3) 中,所述 IgG 的 Eu^{3+} 标记及纯化的具体方法包括以下步骤:

1mg 的 IgG 抗体溶于 250 μL $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液中,与 0.2mg 的 Eu^{3+} 标记试剂充分混匀,4°C 磁力搅拌 12h,在 pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液 4°C 透析 24h,其间换透析液两次;通过蛋白纯化系统用 Sephadex G-50 柱层析,洗脱液仍为 Tris-HCl 缓冲液,监测 280nm 处吸光度并合并收集蛋白峰,计算合并液中 Eu^{3+} 和 IgG 的浓度,得到纯化的 IgG 标记复合物 Eu^{3+} -IgG,复合物溶液中 Eu^{3+} 和 IgG 浓度分别为 $4.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 和 $1.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$,标记比为 3。

6. 如权利要求 1 所述的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于在步骤 4) 中,所述 Eu^{3+} -IgG 溶液的工作浓度分别采用 1 : 80、1 : 320、1 : 1280、1 : 5120、

1 : 20480 和 1 : 81920 稀释,选择荧光读数 CPS 接近 10^6 且 P/N 值最大的稀释度为最佳稀释度。

7. 如权利要求 1 所述的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法,其特征在于所述包被的条件分别采用 4℃、37℃ 和 60℃ 的包被温度,12h、18h 和 24h 的包被时间,固定 Eu^{3+} -IgG 及菌株浓度,观察 P/N 值,选择最高 P/N 所对应的包被温度和包被时间。

产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种病原菌的检测,尤其是涉及一种产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法。

背景技术

[0002] 产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)是重要的条件致病菌,可导致人畜患病,引起食物中毒等疾病(董捷,等. 产酸克雷伯菌引起的食物中毒临床分析. 中华传染病杂志. 2002, 20 :315-316)。建立灵敏、特异、快速的检测技术,对产酸克雷伯氏菌进行监测,对疾病的早期预防能起到积极的指导作用。

[0003] 由于产酸克雷伯氏菌具有不同的血清型,传统的细菌形态和生理生化特性检测方法并不能满足疾病防治的需要。分子生物学手段如定量 PCR 检测已开始病原菌检测中得到应用,但是检测之前需要提取病原菌核酸,选取内标基因,设计和合成基因引物,样品的前处理复杂,过程控制严格,实验室依赖程度高,限制了其在实际中的应用。免疫检测技术方法简单、特异性强,在国内外病原菌检测中应用更为广泛,其中又以酶联免疫吸附法(ELISA)和荧光抗体法最为常用。ELISA 是以酶为标记物,但酶为生物大分子,容易失活,不易保存,大分子的酶易对免疫反应造成空间位阻效应,同时该法必须通过显色进行信号测定。荧光抗体法是以荧光物质为标记物,这种标记物分子量小,稳定,标记到抗原或抗体后对免疫反应影响小,可以直接测量荧光信号,不需要显色,弥补了 ELISA 法的不足,但由于测量时的背景荧光波长与标记物相近,干扰样品测定,导致测定灵敏度不高。时间分辨荧光免疫检测(TRFIA)是用稀土离子螯合物作为标记物,该螯合物是一种长寿命的荧光物质,通过具有时间分辨功能的荧光仪可与短寿命的背景荧光分开,有效消除背景荧光的干扰,该法已在化学、医学、食品和环境等领域(Wu F B, et al. Synthesis of a highly fluorescent beta-diketone-europium chelate and its utility in time-resolved fluoroimmunoassay of serum total thyroxine. Anal Chem, 2002, 74:5882-5889)得到广泛关注,但对产酸克雷伯氏菌的检测从未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种灵敏度高、特异性强、简便快速的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法。

[0005] 所述产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca* 已于 2011 年 07 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮政编码 100101,保藏中心登记入册编号为 CGMCC No. 5060。

[0006] 本发明利用时间分辨荧光免疫检测(TRFIA)法进行产酸克雷伯氏菌的检测。

[0007] 本发明包括以下步骤:

[0008] 1) 产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定;

[0009] 2) 制备兔抗产酸克雷伯氏菌抗体(IgG);

[0010] 3) IgG 的 Eu^{3+} 标记及纯化；

[0011] 4) 建立产酸克雷伯氏菌 TRFIA 检测方法

[0012] 将产酸克雷伯氏菌菌株首先用无菌生理盐水洗涤, 4500r/min, 离心 5min, 弃上清; Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液稀释, 取 100 μL 加入到 96 孔微孔板中包被, 用洗涤液冲洗, 每孔加入 200 μL 1% 的 BSA, 37°C 封闭 2h, 洗涤, 加入 1 : 320 稀释的 Eu^{3+} -IgG 溶液 100 μL , 37°C 振动孵育 1h, 用洗涤液冲洗, 每孔加入 200 μL 增强液, 振荡, 多标记分析仪上测量荧光读数 CPS; 设碳酸盐包被液作阴性对照, 以样品孔的 CPS 值(P) 与对照孔的 CPS 值(N) 之比大于 2 (即 $P/N > 2$) 时判断为阳性。

[0013] 在步骤 1) 中, 所述产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定的具体方法是: 可采用 Biolog 自动生化鉴定系统(Gene III) 进行鉴定。

[0014] 在步骤 2) 中, 所述制备兔抗产酸克雷伯氏菌抗体(IgG) 的具体方法可包括以下步骤:

[0015] (1) 将产酸克雷伯氏菌菌株接种于 0.5%NaCl 的牛肉膏蛋白胨培养液中, 27°C 培养 24h, 用甲醛及加热两种方法灭活, 离心, 再加入无菌生理盐水洗涤, 调整细菌浓度至 $6 \times 10^8 \text{cfu/mL}$ 备用;

[0016] (2) 选择 2 只健康的 2 ~ 3kg 的新西兰大白兔, 背部两侧皮下多点注射免疫, 分 4 次免疫, 免疫间隔期为 2 周, 第 1 次免疫时与弗氏完全佐剂 1 : 1 混合、乳化, 第 2 次免疫时与弗氏不完全佐剂 1 : 1 混合乳化, 第 3、4 次免疫采用菌液注射, 每次每只注射剂量为 1mL;

[0017] (3) 最后一次免疫 10 天后, 耳静脉采血, 分离血清, 用试管凝集法测定抗血清效价, 效价达到 1 : 1280 以上方可使用;

[0018] (4) 采用 SPA 亲和层析法从血清中纯化抗体 (IgG), 然后脱盐和冷冻干燥。

[0019] 在步骤(1) 中, 所述离心的条件可采用 4500r/min, 5min。

[0020] 在步骤 3) 中, 所述 IgG 的 Eu^{3+} 标记及纯化的具体方法可包括以下步骤:

[0021] 1mg 的 IgG 抗体溶于 250 μL Na_2CO_3 - NaHCO_3 (0.1mol/L, pH9.1) 缓冲溶液中, 与 0.2mg 的 Eu^{3+} 标记试剂充分混匀, 4°C 磁力搅拌 12h, 在 pH7.8 的 Tris-HCl (0.05mol/L, 0.9%NaCl) 缓冲液 4°C 透析 24h, 其间换透析液两次。通过蛋白纯化系统用 Sephadex G-50 柱层析(1×20cm), 洗脱液仍为 Tris-HCl 缓冲液, 监测 280nm 处吸光度(A_{280}) 并合并收集蛋白峰, 计算合并液中 Eu^{3+} 和 IgG 的浓度, 得到纯化的 IgG 标记复合物 Eu^{3+} -IgG, 复合物溶液中 Eu^{3+} 和 IgG 浓度分别为 $4.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 和 $1.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 标记比为 3。

[0022] 在步骤 4) 中, 所述 Eu^{3+} -IgG 溶液的工作浓度可分别采用 1 : 80、1 : 320、1 : 1280、1 : 5120、1 : 20480 和 1 : 81920 稀释, 选择荧光读数 CPS 接近 10^6 且 P/N 值最大的稀释度为最佳稀释度;

[0023] 所述包被的条件可分别采用 4°C、37°C 和 60°C 的包被温度, 12h、18h 和 24h 的包被时间, 固定 Eu^{3+} -IgG 及菌株浓度, 观察 P/N 值, 选择最高 P/N 所对应的包被温度和包被时间。

[0024] 以下给出敏感性试验的方法:

[0025] 将产酸克雷伯氏菌($1.0 \times 10^8 \text{cfu/mL}$) 用包被液作 10 倍倍比连续稀释, 观察 $P/N > 2$ 所对应的最高稀释倍数, 其对应浓度为检测灵敏度。

[0026] 以下给出重复性实验的方法:

[0027] 重复性通过板内变异系数和板间变异系数反映。固定细菌浓度和 Eu^{3+} -IgG 浓度,

在同一块微孔板上进行 TRFIA 测定,由每个微孔中的 CPS 值计算出平均值与标准差,进而计算出板内变异系数 = 板内标准差 / 平均值 $\times 100\%$;用同样浓度的细菌和 Eu^{3+} -IgG,在 5 块板上进行 TRFIA 测定,根据 CPS 值计算板间变异系数。

[0028] 结果:建立了产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法, Eu^{3+} -IgG 的最佳工作浓度为 1 : 320,最佳包被温度 60°C ,最佳包被时间 24h。而对于包被液是否烘干影响不大,检测灵敏度为 $1.0 \times 10^5 \text{cfu/孔}$,板内变异系数为 5.60%,板间变异系数为 10.08%。

[0029] 本发明具有以下突出优点:

[0030] 1) TRFIA 用于产酸克雷伯氏菌的检测在国内外未见报道。

[0031] 2)灵敏度为 $1.0 \times 10^5 \text{cfu/孔}$,高于荧光抗体法。应用荧光抗体法进行病原菌全菌体检测,需要显微镜目测观察荧光强度大小,主观性大,由于背景荧光的干扰,检测灵敏度低,且无法给出具体的灵敏度数值(参见文献:夏春. 间接荧光抗体法快速检测中国淡水鱼主要病原菌. 中国兽医学报. 1998, 18:466-468)。

[0032] 3)通过 TRFIA 测定不同浓度的产酸克雷伯氏菌 CPS 值表明,该法的范围宽,能定量检测。

附图说明

[0033] 图 1 为 TRFIA 的标准曲线。在图 1 中,横坐标为产酸克雷伯氏菌浓度 /(cfu/mL),纵坐标为荧光读数 /CPS。

具体实施方式

[0034] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0035] 本发明的具体步骤是:

[0036] 1、产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定

[0037] 材料及器具:Biolog 自动生化鉴定系统(Gene III),菌株(由本实验室分离于日本鳗鲡)。

[0038] 方法:采用自动生化鉴定系统进行鉴定。

[0039] 结果:表 1 为全自动细菌生化鉴定特性表,其中 + 为阳性,- 为阴性,鉴定结果为产酸克雷伯氏菌, id% 为 92.1%。

[0040] 表 1

[0041]

鉴定指标中文	鉴定指标英文	
阴性对照	Negative Control	-
糊精	Dextrin	+
D-麦芽糖	D-Maltose	+
D-海藻糖	D-Trehalose	+
D-纤维二糖	D-Cellobiose	+
龙胆	Gentiobiose	+
蔗糖	Sucrose	+
D- Turanose	D-Turanose	+
水苏糖	Stachyose	+
阳性对照	Positive Control	+
pH 值为 6	pH 6	+
pH 值 5	pH 5	+
D-棉籽糖	D-Raffinose	+

[0042]

α -D-乳糖	α -D-Lactose	+
D-蜜二糖	D-Melibiose	+
β -甲基-D-葡萄糖苷	β -Methyl-D-Glucoside	+
D-水杨甙	D-Salicin	+
N-乙酰-D-氨基葡萄糖	N-Acetyl-D-Glucosamine	+
N-乙酰- β -D-氨基甘露醇	N-Acetyl- β -DMannosamine	+
N-乙酰-D-半乳糖胺	N-Acetyl-DGalactosamine	+
N-乙酰神经氨酸	N-Acetyl Neuraminic Acid	-
1%氯化钠	1% NaCl	+
4%氯化钠	4% NaCl	+
8%氯化钠	8% NaCl	(+)
α -D-葡萄糖	α -D-Glucose	+
D-甘露糖	D-Mannose	+
D-果糖	D-Fructose	+
D-半乳糖	D-Galactose	+
3-甲基葡萄糖	3-Methyl Glucose	+
D-岩藻糖	D-Fucose	+
L-岩藻	L-Fucose	+
L-鼠李糖	L-Rhamnose	+
肌苷	Inosine	+
1%乳酸钠	1% Sodium Lactate	+
夫西地酸	Fusidic Acid	+
D-丝氨酸	D-Serine	+
山梨醇	D-Sorbitol	+
D-甘露醇	D-Mannitol	+
D-阿拉伯糖醇	D-Arabitol	+
肌醇	myo-Inositol	+
甘油	Glycerol	+
D-葡萄糖-6-磷酸	D-Glucose-6-PO4	+
D-果糖-6-磷酸	D-Fructose-6-PO4	+

[0043]

D-天冬氨酸	D-Aspartic Acid	-
D-丝氨酸	D-Serine	+
Troleandomycin	Troleandomycin	+
利福霉素 SV	Rifamycin SV	+
米诺环素	Minocycline	+
明胶	Gelatin	+
甘氨酸-L-脯氨酸	Glycyl-L-Proline	+
L-丙氨酸	L-Alanine	+
L-精氨酸	L-Arginine	+
L-天冬氨酸	L-Aspartic Acid	+
L-谷氨酸	L-Glutamic Acid	+
L-组氨酸	L-Histidine	+
L-焦谷氨酸	L-Pyroglutamic Acid	-
L-丝氨酸	L-Serine	+
林可霉素	Lincomycin	+
盐酸胍	Guanidine HCl	+
Niaproof 4	Niaproof 4	+
果胶	Pectin	+
D-半乳糖醛酸	D-Galacturonic Acid	+
L-Galactonic 酸内酯	L-Galactonic Acid Lactone	+
D-葡萄糖酸	D-Gluconic Acid	+
D-葡萄糖醛酸	D-Glucuronic Acid	+
Glucuronamide	Glucuronamide	+
粘酸	Mucic Acid	+
奎尼酸	Quinic Acid	+
D-Saccharic 酸	D-Saccharic Acid	+
万古霉素	Vancomycin	+
四氮唑紫	Tetrazolium Violet	+
四氮唑蓝	Tetrazolium Blue	+
对羟基苯乙酸	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	+

	甲基丙酮酸	Methyl Pyruvate	-
	D-乳酸甲酯	D-Lactic Acid Methyl Ester	-
	L-乳酸	L-Lactic Acid	+
	柠檬酸	Citric Acid	+
	α -酮戊二酸	α -Keto-Glutaric Acid	-
	D-苹果酸	D-Malic Acid	+
	L-苹果酸	L-Malic Acid	+
	溴丁二酸	Bromo-Succinic Acid	+
	萘啶酸	Nalidixic Acid	-
	氯化锂	Lithium Chloride	+
	钾酸盐	Potassium Tellurite	-
[0044]	吐温 40	Tween 40	-
	γ -氨基 Butyric 酸	γ -Amino-Butyric Acid	-
	α -羟基丁酸	α -Hydroxy-Butyric Acid	-
	β -羟基- D,L Butyric 酸	β -Hydroxy-D,LButyric Acid	+
	α -酮丁酸	α -Keto-Butyric Acid	-
	乙酰乙酸	Acetoacetic Acid	-
	丙酸	Propionic Acid	-
	醋酸	Acetic Acid	+
	甲酸	Formic Acid	-
	氮曲南	Aztreonam	+
	丁酸钠	Sodium Butyrate	+
	溴酸钠	Sodium Bromate	-

[0045] 2、制备兔抗产酸克雷伯氏菌抗体(IgG)

[0046] 材料及器具：产酸克雷伯氏菌菌株，新西兰大白兔，牛肉膏蛋白胨培养液，甲醛，弗氏完全佐剂，弗氏不完全佐剂，无菌生理盐水，TG16-W 高速台式离心机，YXQ-SG46-280S 压力蒸汽灭菌锅，SPA 亲和层析柱，AKTA Purifier100 蛋白纯化系统，LGJ-10 冷冻干燥机。

[0047] 方法：将产酸克雷伯氏菌菌株接种于 0.5%NaCl 的牛肉膏蛋白胨培养液中，27℃ 培养 24h，用甲醛及加热两种方法灭活，离心(4500r/min, 5min)，再加入无菌生理盐水洗涤，调整细菌浓度至 6×10^8 cfu/mL 备用。选择 2 只健康的 2-3kg 的新西兰大白兔，背部两侧皮下多点注射免疫，分 4 次免疫，免疫间隔期为 2 周，第 1 次免疫时与弗氏完全佐剂 1 : 1 混合、乳化，第 2 次免疫时与弗氏不完全佐剂 1 : 1 混合乳化，第 3、4 次免疫采用菌液注射，每

次每只注射剂量为 1mL。最后一次免疫 10 天后,耳静脉采血,分离血清,用试管凝集法测定抗血清效价,效价达到 1 : 1280 以上方可使用。采用 SPA 亲和层析法纯化抗血清,然后脱盐和冷冻干燥。

[0048] 结果:抗血清效价为 1 : 1280,亲和层析法纯化后得到白色的 IgG 抗体粉末。

[0049] 3、IgG 的 Eu^{3+} 标记及纯化

[0050] 材料及器具: IgG 纯化抗体, Eu^{3+} 标记试剂盒(1244-302, Perkins-Elmer 公司), $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (0.1mol/L, pH9.1)缓冲溶液, Tris-HCl (0.05mol/L, 0.9%NaCl, pH7.8)缓冲溶液,透析膜,磁力搅拌器, Sephadex G-50 层析柱(GE Healthcare 公司), AKTA Purifier100 蛋白纯化系统。

[0051] 方法:1mg 的 IgG 抗体溶于 250 μL $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液中,与 0.2mg 的 Eu^{3+} 标记试剂充分混匀,4℃磁力搅拌 12h,在 Tris-HCl 缓冲液 4℃透析 24h,其间换透析液两次。通过蛋白纯化系统用 Sephadex G-50 柱层析(1×20cm),洗脱液仍为 Tris-HCl 缓冲液,监测 280nm 处吸光度(A_{280})并合并收集蛋白峰,计算合并液中 Eu^{3+} 和 IgG 的浓度。

[0052] 结果:得到了纯化的 IgG 标记复合物 $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$,复合物溶液中 Eu^{3+} 和 IgG 浓度分别为 $4.5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 和 $1.5 \times 10^{-6}\text{mol/L}$,标记比约为 3。

[0053] 4、建立产酸克雷伯氏菌 TRFIA 检测方法

[0054] 材料及器具:产酸克雷伯氏菌菌株, $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$ 标记复合物, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (0.05mol/L, pH9.6)缓冲溶液, PBS (0.01mol/L, pH7.4)缓冲溶液,牛血清白蛋白(BSA),增强液、洗涤液(Perkins-Elmer 公司),96 孔白色微孔板, SHA-C 恒温振荡器, TG16-W 高速台式离心机,具有时间分辨功能的 PerkinElmer VICTOR X4 多标记分析仪(Perkins-Elmer 公司)。

[0055] 方法:将产酸克雷伯氏菌菌株首先用无菌生理盐水洗涤,4500r/min 离心 5min,弃上清。用 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液稀释菌株,取 100 μL 加入到 96 孔微孔板中,在 60℃包被 12h,用洗涤液冲洗 2 次,每孔加入 200 μL 的 1%BSA,37℃封闭 2h,洗涤 2 次,加入 1 : 320 稀释的 $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$ 溶液 100 μL ,37℃振动孵育 1h,用洗涤液冲洗 6 次,每孔加入 200 μL 增强液,室温振荡 10min,多标记分析仪上测量荧光读数 CPS。设碳酸盐包被液作阴性对照,以样品孔的 CPS 值(P)与对照孔的 CPS 值(N)之比大于 2 (即 $P/N > 2$) 时判断为阳性。

[0056] 1) $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$ 的最佳工作浓度的优选

[0057] 在上述步骤 4 中,所述 $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$ 的工作浓度分别采用 1 : 80、1 : 320、1 : 1280、1 : 5120、1 : 20480 和 1 : 81920 稀释,选择 CPS 接近 10^6 且 P/N 值最大的稀释度为最佳稀释度。

[0058] 2) 包被时间和包被温度的优选

[0059] 在上述步骤 4 中,分别采用 4℃、37℃和 60℃的包被温度,12h、18h 和 24h 的包被时间,固定 $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$ 及菌株浓度,按照上述工作程序进行试验,观察 P/N 值,选择最高 P/N 所对应的包被温度和包被时间。

[0060] 3) 敏感性试验

[0061] 将产酸克雷伯氏菌($1.0 \times 10^8\text{cfu/mL}$)用包被液作 10 倍倍比连续稀释,观察 $P/N > 2$ 所对应的最高稀释倍数,其对应浓度为检测灵敏度。

[0062] 4) 重复性实验

[0063] 重复性通过板内变异系数和板间变异系数反映。固定细菌浓度和 $\text{Eu}^{3+}\text{-IgG}$ 浓度,

在同一块微孔板上进行 TRFIA 测定,由每个微孔中的 CPS 值计算出平均值与标准差,进而计算出板内变异系数 = 板内标准差 / 平均值 $\times 100\%$ 。用同样浓度的细菌和 Eu^{3+} -IgG,在 5 块板上进行 TRFIA 测定,根据 CPS 值计算板间变异系数。

[0064] 结果:建立了产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法, Eu^{3+} -IgG 的最佳工作浓度为 1 : 320,最佳包被温度 60°C ,最佳包被时间 24h。而对于包被液是否烘干影响不大,检测灵敏度为 $1.0 \times 10^5 \text{cfu/孔}$,板内变异系数为 5.60%,板间变异系数为 10.08%。

[0065] 通过 TRFIA 测定不同浓度的产酸克雷伯氏菌 CPS 值表明,以 CPS 为纵坐标,不同浓度的细菌为横坐标,绘制标准曲线,结果见图 1,由图 1 可以看出,该法的范围宽,能定量检测。

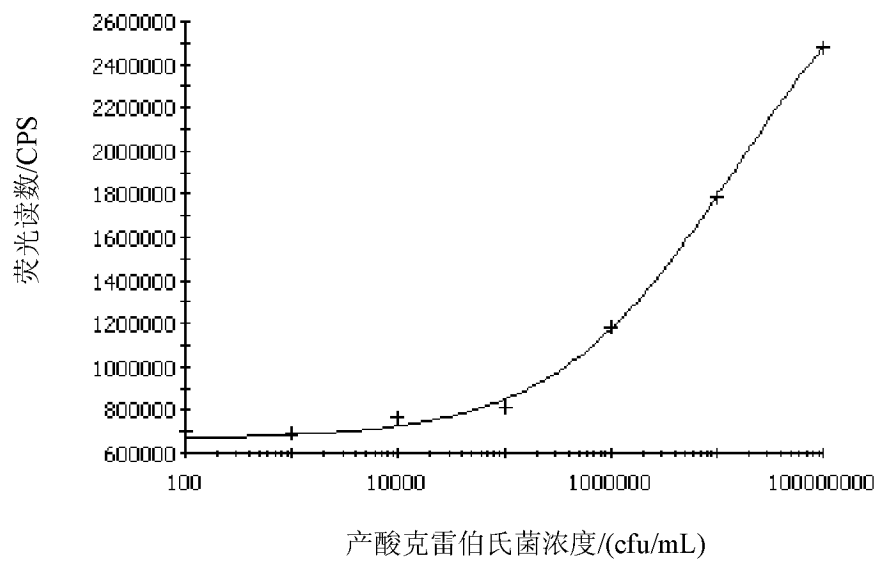


图 1

专利名称(译)	产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法		
公开(公告)号	CN102507934B	公开(公告)日	2014-02-26
申请号	CN201110343097.2	申请日	2011-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	集美大学		
申请(专利权)人(译)	集美大学		
当前申请(专利权)人(译)	集美大学		
[标]发明人	林鹏 冯建军 王艺磊 郭松林		
发明人	林鹏 冯建军 王艺磊 郭松林		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N21/64		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102507934A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法，涉及一种病原菌的检测。提供一种灵敏度高、特异性强、简便快速的产酸克雷伯氏菌的时间分辨荧光免疫检测法。产酸克雷伯氏菌菌株的微生物学鉴定；制备免抗产酸克雷伯氏菌抗体；IgG的Eu3+标记及纯化；建立产酸克雷伯氏菌TRFIA检测方法。灵敏度为 1.0×10^5 cfu/孔，高于荧光抗体法。应用荧光抗体法进行病原菌全菌体检测，需要显微镜目测观察荧光强度大小，主观性大，由于背景荧光的干扰，检测灵敏度低，且无法给出具体的灵敏度数值。通过TRFIA测定不同浓度的产酸克雷伯氏菌CPS值表明，该法的范围宽，能定量检测。

