



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109709319 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201811648712.9

(22)申请日 2018.12.30

(71)申请人 广东环凯微生物科技有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区广州开发区科学城神舟路788号

申请人 广东粤微食用菌技术有限公司
广东环凯生物科技有限公司

(72)发明人 曲晓莹 蔡芷荷 卢勉飞 万强
徐环 吴清平 李艳嫦

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 许飞

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法,通过优化磁珠活化体系,与常用的EDC/NHS体系活化操作相比,更加简单高效。通过使用两种不同捕获性能的抗体以特定的比例混合,显著降低了免疫磁珠的漏检率。通过将制得的免疫磁珠保存在特定组成的保存液中,使免疫磁珠可以在4~8℃保存条件下一年内维持较高的活性,确保了免疫磁珠在保存与使用过程中性能的稳定,为免疫磁珠在实际检测中的应用提供了保障。

1. 一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法,包括如下步骤:

- 1) 将羧基磁珠清洗干净,分散于超纯水中;
- 2) 在分散有羧基磁珠的超纯水中加入MIX&GO活化剂,混合均匀,活化磁珠;
- 3) 使用MEST缓冲液洗涤活化后的磁珠后,将清洗后活化磁珠分散于MES缓冲液中;
- 4) 向MES缓冲液中加入两种抗沙门氏菌抗体,使其反应偶联在磁珠上;
- 5) 将偶联后的磁珠用TBST缓冲液洗涤,加入封闭液进行封闭处理;
- 6) 封闭完成后,使用TBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到沙门氏菌免疫磁珠。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:其制备方法包括如下步骤:

1) 取1mg羧基磁珠放入EP管中,加入1ml超纯水中超声30s,离心去掉上清,清洗干净,最后重悬于100 μ L超纯水中;

- 2) 缓慢加入MIX&GO活化剂100 μ L,置于混匀仪上室温活化1h;
- 3) 活化后加入1ml MEST缓冲液洗涤2遍,重悬于100 μ LMES缓冲液中;
- 4) 缓慢加入抗沙门氏菌抗体,置于混匀仪上室温偶联2h;
- 5) 用TBST缓冲液洗涤磁珠,加入1ml封闭液,置于混匀仪上封闭2h;
- 6) 封闭完成后,用TBST缓冲液洗涤磁珠,得到沙门氏菌免疫磁珠。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:MEST缓冲液的盐浓度为25mM, pH6.0。

4. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:封闭液的组成为:0.1wt%BSA, 0.05wt%Tween-20,0.1M TBS缓冲液,pH8.2。

5. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:TBST缓冲液的组成为:0.05wt% Tween-20,0.1M TBS缓冲液,pH8.2。

6. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:抗沙门氏菌抗体为KPL单克隆抗体和上海慧耘单克隆抗体。

7. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:KPL单克隆抗体的用量为70~80 μ g,上海慧耘单克隆抗体的用量为30~35 μ g。

8. 根据权利要求1、2或7所述的制备方法,其特征在于:羧基磁珠的粒径为100~800nm,优选为300nm。

9. 根据权利要求1、2或7所述的制备方法,其特征在于:将沙门氏菌免疫磁珠分散于免疫磁珠保存液中保存,免疫磁珠保存液的组分包括:3~5wt%BSA、3~4wt%酪蛋白钠、1~3wt%甘油、5~7wt%蔗糖、6~8wt%海藻糖、0.3~0.5wt%PVP、10~15wt%商品化蛋白酶稳定剂,适量防腐剂,缓冲液。

10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于:免疫磁珠保存液中的防腐剂为0.1~0.15wt%终浓度的Proclin。

一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种沙门氏菌免疫磁珠制备方法。

背景技术

[0002] 沙门氏菌(Salmonella)是最常见的人畜共患致病菌之一,在动物性产品中广泛存在,如肉制品、蛋、奶类等,这些食物广泛分布,因而沙门氏菌引起的食源性疾病爆发时很难溯源。食品中极少数的沙门氏菌即可引发食用者患病,目前全球包括我国国家标准对食品中沙门氏菌的限制都是禁止检出。

[0003] 传统的生化鉴定方法操作较为复杂,耗时长。与传统生化鉴定方法相比,分子学检测方法具有快速、检测限低、准确度高等优势。但分子学检测方法应用的前提是获得不含基因片段扩增抑制因素的高质量DNA模板。通常情况下,实际样本中背景菌的含量远高于目标菌的含量,加之食品基质多样且复杂,给目标菌的分离带来了很大的难度。

[0004] 目前用于食品样本中目标菌分离和富集的方法包括过滤和免疫吸附技术。过滤的方法最大的应用限制是滤膜会被样本基质中的颗粒堵塞,过滤的样本量有限,且样本也会损失从而无法准确定量。免疫吸附技术如免疫磁珠是从复杂的基质如食品、临床、环境样本中分离并富集到目标菌的行之有效的办法。

[0005] 免疫磁珠是对具有超顺磁性的微粒表面进行化学修饰,使之与特异性抗体牢固结合,成为能捕获特异性抗原的磁珠。将免疫磁珠与待测溶液混合,如有相应抗原存在,免疫磁珠就会将其捕获,形成抗原-免疫磁珠复合物,并在适当的磁场条件下分离出来,达到富集目标抗原的目的。

[0006] 磁珠表面修饰的配基一般为-COOH、-NH₂、甲苯磺酰基、链霉亲和素等。免疫磁珠的制备方法根据磁珠上修饰配基的不同而有所差别。不同抗体分子在具有负电荷的表面如-COOH基团,比在正电荷的表面有更倾向于Fc区域朝下的取向,即Fab区域更多的暴露在表面的最外面,可以自由的与抗原相结合。虽然通过调节表面带电荷的方法能够在一定比例上改善抗体分子在表面的取向结构,但是这种方法基于的结合力是分子间作用力如氢键,静电力等,并不是特异性的结合力,所以抗体最终在界面呈混合取向状态,造成最终偶联效率低的情况。

[0007] 一般情况下,制备免疫磁珠基本采用单株抗体。但是沙门菌血清型繁多,已确认的高达2523个,我国已发现的也有292个,使用单株抗体检测时容易出现漏检的情况,限制了免疫磁珠的使用。理论上,在磁珠上偶联两种或更多种抗体有望降低甚至消除漏检的情况,但是目前商品化的沙门氏菌抗体种类较少,并且还需要有效果的筛选平台(如沙门氏菌优势血清型菌种库)才能对抗体进行有意义的筛选。对筛选到的性能互补的抗体进行合理配比是改善免疫磁珠漏检现象的有效方式。

[0008] 另外,免疫磁珠因偶联有抗体,活性容易在使用及保存过程中损失。因冷冻保存会造成磁珠的聚集结团从而使性能下降,所以也不能像抗体一样进行冷冻保存。免疫磁珠较为适合的保存温度是4~8℃,市场上鲜有免疫磁珠商品化保存液出售,因此需要开发一种

适用于免疫磁珠4~8℃保存液。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的在于克服现有的技术的不足,提供一种漏检率低,检测效果好的沙门氏菌免疫磁珠的制备方法。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种长期保存上述沙门氏菌免疫磁珠的方法。

[0011] 本发明所采取的技术方案是:

[0012] 一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法,包括如下步骤:

[0013] 1) 将羧基磁珠清洗干净,分散于超纯水中;

[0014] 2) 在分散有羧基磁珠的超纯水中加入MIX&GO活化剂,混合均匀,活化磁珠;

[0015] 3) 使用MEST缓冲液洗涤活化后的磁珠后,将清洗后活化磁珠分散于MES缓冲液中;

[0016] 4) 向MES缓冲液中加入两种抗沙门氏菌抗体,使其反应偶联在磁珠上;

[0017] 5) 将偶联后的磁珠用TBST缓冲液洗涤,加入封闭液进行封闭处理;

[0018] 6) 封闭完成后,使用TBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到沙门氏菌免疫磁珠。

[0019] 作为上述制备方法的进一步改进,其制备方法包括如下步骤:

[0020] 1) 取1mg羧基磁珠放入EP管中,加入1ml超纯水中超声30s,离心去掉上清,清洗干净,最后重悬于100 μ L超纯水中;

[0021] 2) 缓慢加入MIX&GO活化剂100 μ L,置于混匀仪上室温活化1h;

[0022] 3) 活化后加入1ml MEST缓冲液洗涤2遍,重悬于100 μ L MES缓冲液中;

[0023] 4) 缓慢加入抗沙门氏菌抗体,置于混匀仪上室温偶联2h;

[0024] 5) 用TBST缓冲液洗涤磁珠,加入1ml封闭液,置于混匀仪上封闭2h;

[0025] 6) 封闭完成后,用TBST缓冲液洗涤磁珠,得到沙门氏菌免疫磁珠。

[0026] 作为上述制备方法的进一步改进,MEST缓冲液的盐浓度为25mM,pH6.0。

[0027] 作为上述制备方法的进一步改进,封闭液的组成为:0.1wt%BSA,0.05wt%Tween-20,0.1M TBS缓冲液,pH8.2。

[0028] 作为上述制备方法的进一步改进,TBST缓冲液的组成为:0.05wt%Tween-20,0.1M TBS缓冲液,pH8.2。

[0029] 作为上述制备方法的进一步改进,抗沙门氏菌抗体为KPL单克隆抗体和上海慧耘单克隆抗体。

[0030] 作为上述制备方法的进一步改进,KPL单克隆抗体的用量为70~80 μ g,上海慧耘单克隆抗体的用量为30~35 μ g。

[0031] 作为上述制备方法的进一步改进,羧基磁珠的粒径为100~800nm,优选为300nm。

[0032] 作为上述制备方法的进一步改进,将沙门氏菌免疫磁珠分散于免疫磁珠保存液中保存,免疫磁珠保存液的组分包括:3~5wt%BSA、3~4wt%酪蛋白钠、1~3wt%甘油、5~7wt%蔗糖、6~8wt%海藻糖、0.3~0.5wt%PVP、10~15wt%商品化蛋白酶稳定剂,适量防腐剂,缓冲液。

[0033] 作为上述制备方法的进一步改进,免疫磁珠保存液中的防腐剂为0.1~0.15wt%终浓度的Proclin。

[0034] 本发明的有益效果是:

[0035] 本发明的制备方法,与常用的EDC/NHS体系活化操作相比,更加简单高效。

[0036] 本发明的制备方法,使用两种不同捕获性能的抗体以特定的比例混合,显著降低了免疫磁珠的漏检率。

[0037] 本发明的制备方法,通过将制得的免疫磁珠保存在特定组成的保存液中,使免疫磁珠可以在4~8℃保存条件下一年内维持较高的活性,确保了免疫磁珠在保存与使用过程中性能的稳定,为免疫磁珠在实际检测中的应用提供了保障。

附图说明

[0038] 图1是磁珠粒径及制备方法对免疫磁珠捕获率的影响结果;

[0039] 图2是不同抗体复配后免疫磁珠捕获效果比较。

具体实施方式

[0040] 一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法,包括如下步骤:

[0041] 1) 将羧基磁珠清洗干净,分散于超纯水中;

[0042] 2) 在分散有羧基磁珠的超纯水中加入MIX&GO活化剂,混合均匀,活化磁珠;

[0043] 3) 使用MEST缓冲液洗涤活化后的磁珠后,将清洗后活化磁珠分散于MES缓冲液中;

[0044] 4) 向MES缓冲液中加入两种抗沙门氏菌抗体,使其反应偶联在磁珠上;

[0045] 5) 将偶联后的磁珠用TBST缓冲液洗涤,加入封闭液进行封闭处理;

[0046] 6) 封闭完成后,使用TBST缓冲液洗涤封闭后的磁珠,得到沙门氏菌免疫磁珠。

[0047] 作为上述制备方法的进一步改进,其制备方法包括如下步骤:

[0048] 1) 取1mg羧基磁珠放入EP管中,加入1ml超纯水中超声30s,离心去掉上清,清洗干净,最后重悬于100μL超纯水中;

[0049] 2) 缓慢加入MIX&GO活化剂100μL,置于混匀仪上室温活化1h;

[0050] 3) 活化后加入1ml MEST缓冲液洗涤2遍,重悬于100μL MES缓冲液中;

[0051] 4) 缓慢加入抗沙门氏菌抗体,置于混匀仪上室温偶联2h;

[0052] 5) 用TBST缓冲液洗涤磁珠,加入1ml封闭液,置于混匀仪上封闭2h;

[0053] 6) 封闭完成后,用TBST缓冲液洗涤磁珠,得到沙门氏菌免疫磁珠。

[0054] 作为上述制备方法的进一步改进,MEST缓冲液的盐浓度为25mM,pH6.0。

[0055] 作为上述制备方法的进一步改进,封闭液的组成为:0.1wt%BSA,0.05wt%Tween-20,0.1M TBS缓冲液,pH8.2。

[0056] 作为上述制备方法的进一步改进,TBST缓冲液的组成为:0.05wt%Tween-20,0.1M TBS缓冲液,pH8.2。

[0057] 作为上述制备方法的进一步改进,抗沙门氏菌抗体为KPL单克隆抗体和上海慧耘单克隆抗体。

[0058] 作为上述制备方法的进一步改进,KPL单克隆抗体的用量为70~80μg,上海慧耘单克隆抗体的用量为30~35μg。

[0059] 作为上述制备方法的进一步改进,羧基磁珠的粒径为100~800nm,优选为300nm。

[0060] 作为上述制备方法的进一步改进,将沙门氏菌免疫磁珠分散于免疫磁珠保存液中保存,免疫磁珠保存液的组分包括:3~5wt%BSA、3~4wt%酪蛋白钠、1~3wt%甘油、5~

7wt%蔗糖、6~8wt%海藻糖、0.3~0.5wt%PVP、10~15wt%商品化蛋白酶稳定剂,适量防腐剂,缓冲液。

[0061] 防腐剂可以是常用的对抗体活性无影响的防腐剂,其量可以根据实际防腐的需要和防腐剂的防腐能力进行相应的调整,其终浓度一般不超过0.5wt%。进一步的,防腐剂为安全性更好的Proclin300,当然,也可以使用其他防腐剂如叠氮化钠等。更进一步的,免疫磁珠保存液中的防腐剂为0.1~0.15wt%终浓度的Proclin。

[0062] 免疫磁珠保存液中,缓冲液的作用在于维持保存液的pH稳定,只要不影响抗体的活性即可。优选的,缓冲液为常用且具有良好安全性的PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液。

[0063] 下面对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。

[0064] 下述实施例及对比例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0065] 下述实施例及对比例中所用的抗沙门氏菌单克隆抗体分别购于KPL、上海慧耘生物科技有限公司;一水吗啉乙磺酸(4-morpholineethanesulfonic acid monohydrate, MES)购自美国Sigma公司;生物素、链霉亲和素、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidehydrochloride, EDC]和N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt, NHS)为美国Thermo公司产品;MIX&GO,购自于Anteo Diagnostics公司。其他材料、试剂等,如无特殊说明,均为商业途径购得。

[0066] 沙门氏菌免疫磁珠的制备方法的比较

[0067] 选取粒径分别为100nm、300nm、700nm、1 μ m、2 μ m,分别采取下列三种方法制备免疫磁珠:

[0068] 制备方法一:采用MIX&GO活化剂进行免疫磁珠的制备,过程如下:

[0069] 1) 取1mg羧基磁珠加100 μ L超纯水洗涤3遍,重悬于100 μ L超纯水中;

[0070] 2) 磁珠悬液缓慢加入100 μ Lmix&GO活化剂中,涡旋10s,超声5min,置于混匀仪上室温活化1h;

[0071] 3) 取300 μ L抗体(0.5mg/ml)进行超滤,除去PBS、叠氮化钠等试剂,备用;

[0072] 4) 将磁珠用MEST溶液(25mM, pH 6.0)洗涤2遍,重悬于100 μ L MEST溶液中,缓慢加入抗体,最后用MES补充到500 μ L,放在混匀仪上偶联2h;

[0073] 5) 用TBST洗涤磁珠2遍,加入1ml封闭液,置于混匀仪上封闭2h;用TBST洗涤磁珠2遍,重悬于1ml免疫磁珠保存液中,置于4 $^{\circ}$ C环境下保存。

[0074] 制备方法二:基于EDC-NHS羧基磁珠活化的免疫磁珠制备法

[0075] 1) 取1mg磁珠加入2mL低蛋白吸附管中,加入1mL MEST洗液(25mM, pH 6.0)洗涤涡旋或超声2~3min,显微镜镜检其单分散性;

[0076] 2) 在12000rpm转速下离心10min后,去上清;重复洗涤3次重悬于1mL MEST溶液,涡旋或超声2~3min,保证单分散性;

[0077] 3) 向1mL洗涤后的磁珠中迅速加入24 μ L 200mM EDC溶液,240 μ L 200mM sulfo-NHS;室温涡旋2min,放在旋转混合仪中混合30min;

[0078] 4) 离心10min,去上清;加入1mL MES溶液重悬,涡旋或超声2min,离心去上清;重复洗涤两次;按照表1重悬于一定体积的MEST中,涡旋或超声2min,保证单分散性;

[0079] 5) 加入一定量抗沙门氏菌抗体;在适宜温度下旋转混合一定时间,离心去上清;加入1mL封闭缓冲液PBST-BSA,涡旋2min,离心去上清,重复此操作2~3次;重悬于1mL封闭缓冲液中,室温封闭3h;

[0080] 6) 离心去上清,加入1mL保存液洗涤2~3次,最后保存在1mL磁珠保存液中,放在4℃保存。

[0081] 制备方法三:基于生物素-链霉亲和素的免疫磁珠制备方法

[0082] 1) 取100μg抗沙门氏菌单克隆抗体,1mg生物素加入500μL PBS (0.01M, pH 7.4) 溶液中,在28℃反应4h;

[0083] 2) 取1mg羧基磁珠按照上述基于EDC-NHS羧基磁珠活化的免疫磁珠制备法介绍的EDC-NHS方法活化后,加入0.08mg链霉亲和素,28℃反应2h;

[0084] 3) 取1mg SA-磁珠用PBS洗涤2次,加入100μg生物素标记的抗体,28℃反应30min;用封闭液洗涤2次,28℃,封闭2h;

[0085] 4) 保存液洗涤2次后,重悬于1mL保存液中。

[0086] 免疫磁珠捕获率检测

[0087] 无菌生理盐水稀释菌液至 10^3 cfu/mL并用螺旋接种仪计数,取1mL稀释好的菌液置于1.5m离心管中,加20μL免疫磁珠样品,旋转混合吸附10min,放在磁力架上进行磁力分离,移去残液并将其进行TSA平板涂布计数,避免吸到磁珠,用PBST洗液洗涤三次,最后加入100μLPBST溶液重悬磁珠,把全部磁珠悬液转移到显色培养基涂板均匀后放在37℃培养18h,平板进行菌落计数并按照以下公式(1)计算得到捕获率(capture efficiency,CE):

$$[0088] \quad CE = \frac{N_1}{N_1 + N_2} \times 100\% \quad \text{—————(1)}$$

[0089] 其中, N_1 表示为磁珠吸附到的菌落数; N_2 表示残液中的菌落计数。

[0090] 比较结果如图1所示,在三种免疫磁珠制备方法中,生物素-链霉亲和素系统的引入能够有效地提高免疫磁珠的捕获率,Mix&GO方法优于直接偶联的方法。对于不同粒径的磁珠,300nm粒径的磁珠具有更好的捕获效果。

[0091] 抗沙门氏菌单克隆抗体复配及检测

[0092] 首先根据制备方法一的操作,按照表1比例制备免疫磁珠,并对沙门氏菌优势血清型菌株进行捕获率检测,菌株如下:FSCC 21501435、FSCC 21501487、FSCC 21501636、FSCC 21501401、FSCC 21501425、FSCC 21501485、FSCC 21501500、FSCC 21501434、FSCC 21501487、FSCC 21501458、FSCC 21501442、FSCC 21501498、FSCC 21501727、FSCC 21501528、FSCC 21501620、FSCC 21501478依次编号为1至16。

[0093] 表1、用于制备免疫磁珠的抗体配比

[0094]

	配方1	配方2	配方3	配方4
单抗1 (KPL)	70μg	60μg	50μg	30μg
单抗2 (上海慧耘)	30μg	40μg	50μg	70μg

[0095] 结果如图2所示,单株KPL抗体、上海慧耘抗体都存在漏检或对某些菌株捕获率过低的现象,经过两者配比后显著改善了免疫磁珠的产品性能,其中最佳的抗体配比为KPL抗体70μg、上海慧耘抗体30μg。

[0096] 沙门氏菌免疫磁珠特异性检测

[0097] 14株非沙门氏球菌标准株：大肠杆菌0157:H7NCTC12900，铜绿假单胞菌ATCC27853、CMCC(B) 10104，创伤弧菌ATCC27562，金黄色葡萄球菌ATCC6538、CMCC(B) 26003，福氏志贺氏菌CMCC(B) 51572，宋内志贺氏菌CMCC(B) 51592，大肠埃希氏菌ATCC25922、CMCC(B) 44102，弗氏柠檬酸杆菌ATCC43864，阪崎肠杆菌ATCC29544，单核细胞增生李斯特菌ATCC19115，英诺克李斯特氏菌ATCC33090，均以10倍稀释梯度制备成 10^3 cfu/ml的菌悬液，各取1ml菌悬液，加入20 μ l制备好的沙门氏菌免疫磁珠进行非目标菌捕获，计算捕获率，评价磁珠的特异性。结果对铜绿假单胞菌ATCC27853、CMCC(B) 10104具有一定捕获率，分别为27.7%和24.5%，对其它株捕获率均为0。

[0098] 将磁珠对其有捕获率的非目标菌与目标菌制备成混合菌液，各细菌菌液浓度均为 10^3 cfu/ml，用磁珠分别对混合菌液以及纯菌液进行细菌捕获，评价非特异性吸附的非目标菌对磁珠捕获目标菌效率的影响。结果如表2所示，非目标菌的混入对目标菌的捕获效率无显著影响，不影响磁珠的实际应用。

[0099] 表2、干扰实验中磁珠对不同菌液体系各菌株的捕获率

菌株	混合菌液			
	ATCC14028	ATCC27853	CMCC(B) 10104	ATCC14028+ATCC 27853+CMCC(B)1 0104
[0100]				
ATCC14028	78.7%	/	/	80.6%
ATCC27853	/	21.6%	/	19.3%
CMCC(B)10104	/	/	12.7%	14.8%

[0101] 沙门氏菌免疫磁珠保存液的效果

[0102] 沙门氏菌免疫磁珠保存液按照表3进行配制，并进行稳定性检测，结果如表4所示。

[0103] 表3、沙门氏菌免疫磁珠保存液配方

[0104]

组分	不同保存液配方								
	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5	配方 6	配方 7	配方 8	配方 9
BSA	0.5%	1%	2%	3%	4%	5%	3%	3%	/
酪蛋白钠	1%	/	2%	3%	4%	4%	5%	4%	4%
甘油	/	0.5%	1%	1%	2%	3%	3%	3%	3%
蔗糖	2%	3%	4%	5%	6%	7%	/	7%	10%
海藻糖	2%	4%	6%	6%	7%	8%	8%	/	8%
PVP	0.1%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.8%	1%	3%
蛋白酶稳定剂	/	5%	7%	10%	13%	15%	20%	15%	15%
Proclin	0.1%	0.1%	0.15%	0.15%	0.15%	0.15%	0.2%	0.3%	0.4%

[0105] 注：表中的百分比，如无特别说明，均指质量百分比；溶剂为PBS缓冲液或Tris-HCl

缓冲液。

[0106] 表4、免疫磁珠保存稳定性检测

[0107]

月份	免疫磁珠捕获率 (%)								
	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5	配方 6	配方 7	配方 8	配方 9
0	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2
2	91.3	90.4	92.6	92.9	92.8	92.5	90.7	88.4	87.5
4	80.2	82.5	80.7	88.4	87.3	89.1	84.5	79.9	79.3
6	65.4	68.6	76.8	85.2	86.5	88.3	80.3	72.9	75.4
8	50.8	54.2	72.4	82.1	85.2	86.6	77.3	66.5	73.1
10	42.5	47.6	67.3	80.8	85.9	84.8	74.5	64.4	68.6
12	33.5	40.6	61.5	78.9	80.5	83.4	72.3	59.6	53.3

[0108] 从表4中的数据可知,配方4、配方5、配方6在12个月内对沙门氏菌免疫磁珠都具有较好的保存效果,免疫磁珠捕获率损失在15%以内,满足实际检测中对免疫磁珠捕获率的要求。

[0109] 沙门氏菌免疫磁珠在实际样品检测中的应用

[0110] 分别采用四种方式免疫磁珠(IMBS)-LAMP联用、IMBS-国标GB4789.4生化鉴定法、直接LAMP法和国标GB4789.4传统生化鉴定法如表5所示,对48份生猪肉样品的检测中,沙门氏菌免疫磁珠分离-LAMP(IMBS-LAMP)方法检出29例阳性,检出率为60.4%;免疫磁珠(IMBS)-生化鉴定方法阳性结果21例,检出率为43.8%;直接对样品行LAMP方法检测检出17例阳性,检出率为35.4%;传统生化鉴定出12例阳性,检出率为25%。经磁珠富集后在显色平板上划线分离,平板上杂菌依然较多,但总体阳性率更高。沙门氏菌免疫磁珠-LAMP方法的建立可以大大地提高对目标菌的检出率,相比传统生化鉴定方法,用时更短,效率更高。

[0111] 表5、生猪肉样品中不同检测方法得到的结果

[0112]

样品编号	IMBS-LAMP	IMBS-生化鉴定	LAMP	传统生化鉴定
1	+	+	-	-
2	+	-	+	+
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	+	+	-	-
6	+	-	+	-
7	+	+	+	+
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	+	+	-	-
11	+	+	+	+
12	+	-	-	-
13	-	-	-	-
14	+	+	+	-
15	+	-	+	+
16	+	+	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	+	+	+	+
21	+	-	+	-
22	+	+	-	-
23	+	+	+	+
24	+	+	-	-
25	+	+	+	-

[0113]

样品编号	IMBS-LAMP	IMBS-生化鉴定	LAMP	传统生化鉴定
26	+	-	-	-
27	+	+	+	+
28	+	+	+	+
29	-	-	-	-
30	+	+	-	-
31	-	-	-	-
32	+	+	+	-
33	-	-	-	-
34	+	+	+	+
35	+	-	-	-
36	+	+	+	+
37	+	+	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	+	+	+	+
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	+	-	-	-
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-
48	-	-	-	-
检出率	60.4%	43.8%	35.4%	25%

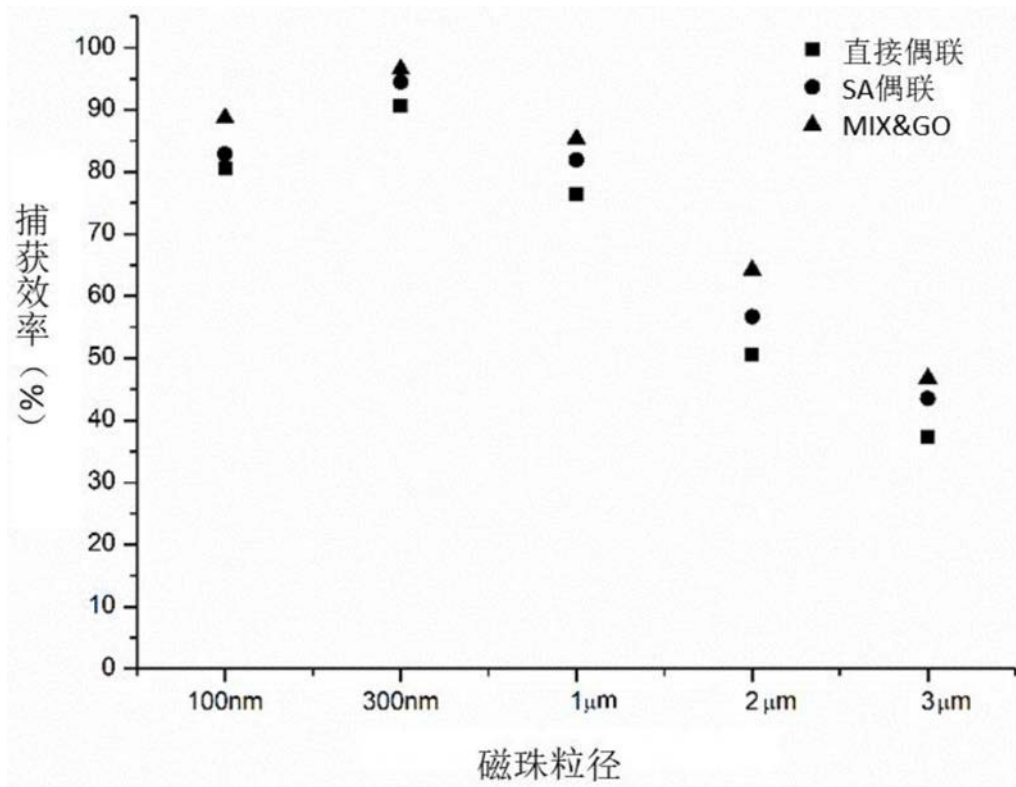


图1

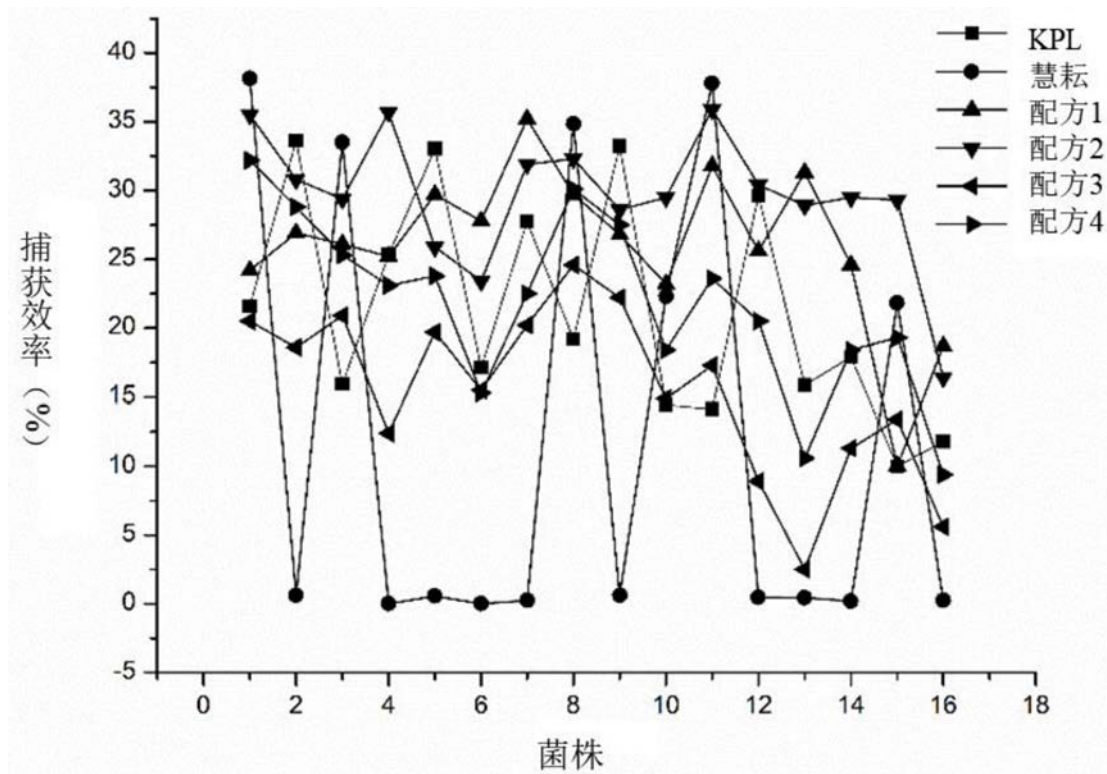


图2

专利名称(译)	一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法		
公开(公告)号	CN109709319A	公开(公告)日	2019-05-03
申请号	CN201811648712.9	申请日	2018-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	广东环凯微生物科技有限公司 广东粤微食用菌技术有限公司 广东环凯生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东环凯微生物科技有限公司 广东粤微食用菌技术有限公司 广东环凯生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东环凯微生物科技有限公司 广东粤微食用菌技术有限公司 广东环凯生物科技有限公司		
[标]发明人	曲晓莹 蔡芷荷 卢勉飞 万强 徐环 吴清平 李艳嫦		
发明人	曲晓莹 蔡芷荷 卢勉飞 万强 徐环 吴清平 李艳嫦		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	许飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种沙门氏菌免疫磁珠的制备方法，通过优化磁珠活化体系，与常用的EDC/NHS体系活化操作相比，更加简单高效。通过使用两种不同捕获性能的抗体以特定的比例混合，显著降低了免疫磁珠的漏检率。通过将制得的免疫磁珠保存在特定组成的保存液中，使免疫磁珠可以在4~8°C保存条件下一年内维持较高的活性，确保了免疫磁珠在保存与使用过程中性能的稳定，为免疫磁珠在实际检测中的应用提供了保障。

$$CE = \frac{N_1}{N_1 + N_2} \times 100\% \quad (1)$$