



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103383394 B

(45) 授权公告日 2014.09.10

(21) 申请号 201310254147.9

(22) 申请日 2013.06.24

(73) 专利权人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠城路3号

(72) 发明人 岳田利 王周利 袁亚宏 蔡瑞  
牛晨 郭彩霞

(74) 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务所 61216

代理人 史玫

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102768276 A, 2013.11.07,

Kang 等. Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody. 《Journal of Chromatography A》. 2007, 第 1161 卷

Liu 等. Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic

silica nanospheres. 《Journal of Magnetism and Magnetic Materials》. 2004, 第 270 卷

Wang 等. Development of Polyclonal Antibody-Based Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Alicyclobacillus Strains in Apple Juice. 《Journal of Food Science》. 2012, 第 77 卷

Wang 等. Development and evaluation of an immunomagnetic separation - ELISA for the detection of Alicyclobacillus spp. in apple juice. 《International Journal of Food Microbiology》. 2013, 第 166 卷

Wang 等. Development and evaluation of an immunomagnetic separation - ELISA for the detection of Alicyclobacillus spp. in apple juice. 《International Journal of Food Microbiology》. 2013, 第 166 卷

Li 等. Detection of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay. 《Food Control》. 2003, 第 30 卷

审查员 孙春梅

权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法

(57) 摘要

本发明公开了果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法,方法包括:利用脂环酸芽孢杆菌免疫磁微球对果汁样品中的脂环酸芽孢杆菌进行分离富集得到待检测富集样品;利用 ELISA 检测方法检测待检测富集样品中是否存在脂环酸芽孢杆菌;所用的脂环酸芽孢杆菌的免疫磁性微球是用胺基化磁性微球包被氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体而得到的。本发明通过抗原-抗体的特异性识别,将脂环酸芽孢杆菌吸附到免疫磁性微球表面,在磁场的作用下分离富集获得脂环酸芽孢杆菌样品,通过 ELISA 检测体系,对目标菌体进行识别。相对于现有的 ELISA 检测

方法,该方法具有检测限低、时效性和准确性更可靠的特点。

1. 果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法,其特征在于,方法包括:

将脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球加入果汁样品中对脂环酸芽孢杆菌进行吸附分离,所述果汁样品的可溶性固形物含量小于等于 15° Brix;

将吸附有脂环酸芽孢杆菌的脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球用浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液悬浮得待检测富集样品,且每 5mg 脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球的 PBS 缓冲液用量为 100-250  $\mu$  L;

利用 ELISA 检测方法检测待检测富集样品中是否存在脂环酸芽孢杆菌;

所述的脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球是用胺基化磁性微球包被氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体而得到的;

所述的胺基化磁性微球的制备方法包括:

(1) 80-90°C 条件下,  $Fe_3O_4$  磁核在硅酸钠溶液中进行硅烷化反应制备硅烷化磁性微球;所述硅酸钠溶液的质量浓度为 4% -5%、PH 大于 11;所述的  $Fe_3O_4$  磁核的粒径为 15-25nm、磁性的饱和磁化强度为 (40-80emu)/g;

(2) 调节硅烷化磁性微球的 PH 呈中性;

(3) 80-90°C 条件下,将 PH 呈中性的硅烷化磁性微球、甲醇、3- 氨丙基三乙氧基硅烷、去离子水和甘油混合反应制备胺基化磁性微球;所述硅烷化磁性微球、甲醇、3- 氨丙基三乙氧基硅烷、去离子水和甘油的用量为:

硅烷化磁性微球: (1-2g) /毫升

甲醇: 150 体积,

3-氨丙基三乙氧基硅烷: 10 体积,

去离子水: 1 体积,

甘油: 150-161 体积;

所述氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的制备方法包括:利用含高碘酸钠的 PBS 缓冲液对脂环酸芽孢杆菌特异性抗体进行氧化处理,之后采用 Sephadex G-25 层析柱收集获得氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体;

所述含高碘酸钠的 PBS 缓冲液中高碘酸钠浓度为 10mg/mL, PBS 缓冲液的浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4;

所述脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 (1-3mg)/mL;所述含高碘酸钠的 PBS 缓冲液与脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的体积比为 (1-3):1;

所述的氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 (1-2mg)/ 毫升,且每毫升氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体用 20mg 的胺基化磁性微球包被;

利用封闭液封闭所述的脂环酸芽孢杆菌的免疫磁性微球,所述封闭液的组分为:每 100ml 浓度为 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液中含有 1-10 克 BSA 和 0.05ml Tween-20。

2. 如权利要求 1 所述的果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法,所述果汁样品的可溶性固形物含量为 10-15° Brix。

## 果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品微生物检测的检测技术领域,具体涉及果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法。

### 背景技术

[0002] 现有的果汁中脂环酸芽孢杆菌的 ELISA 检测方法主要有:

[0003] 文献1:Zhouli Wang, Tianli Yue, Yahong Yuan, et al. Development of Polyclonal Antibody-Based Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Alicyclobacillus Strains in Apple Juice. Journal of food science, 2012, 77:M643-M649 公开的果汁中脂环酸芽孢杆菌的 ELISA 检测;以及

[0004] 文献2:Jianke Li, Kai Xia, Chaozhou Yu. Detection of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay. Food control, 2013, 30:251-254. 中公开的脂环酸芽孢杆菌的 ELISA 检测。

[0005] 上述文献公开的 ELISA 检测方法的检测限为  $10^5$ CFU/mL,在实际果汁样品的检测中,需要经过富集培养才可以实现对低浓度脂环酸芽孢杆菌的检测,在时效性方面不能满足快速检测的要求,并且因直接用果汁样品检测,果汁样品复杂的背景环境及其他菌体的存在,也会对 ELISA 检测产生一定的负面影响。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种检测限相对较低且检测速度快而准确的果汁中脂环酸芽孢杆菌的 ELISA 检测方法,以解决现有技术存在的检测限相对较高、时效性和可靠性相对较差的问题。

[0007] 为此,本发明提供的果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法包括:

[0008] 利用脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球对果汁样品中的脂环酸芽孢杆菌进行分离富集得到待检测富集样品;

[0009] 利用 ELISA 检测方法检测待检测富集样品中是否存在脂环酸芽孢杆菌;

[0010] 所述的脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球是用胺基化磁性微球包被氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体而得到的;

[0011] 所述氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的制备方法包括:利用含高碘酸钠的 PBS 缓冲液对脂环酸芽孢杆菌特异性抗体进行氧化处理,之后收集获得氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体。

[0012] 所述的果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法包括:

[0013] 将脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球加入果汁样品中对脂环酸芽孢杆菌进行吸附分离,所述果汁样品的可溶性固形物含量小于等于  $15^{\circ}$  Brix;

[0014] 将吸附有脂环酸芽孢杆菌的脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球用浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液悬浮得待检测富集样品,且每 5mg 脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球的

PBS 缓冲液用量为 100-250  $\mu$  L ;

[0015] 利用 ELISA 检测方法检测待检测富集样品中是否存在脂环酸芽孢杆菌。

[0016] 所述果汁样品的可溶性固形物含量为 10-15° Brix。

[0017] 进一步,采用 Sephadex G-25 层析柱收集获得氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体。

[0018] 所述的氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体制备方法还包括:

[0019] 所述含高碘酸钠的 PBS 缓冲液中高碘酸钠浓度为 10mg/mL, PBS 缓冲液的浓度为 0.1mol/L、pH 值为 7.4 ;

[0020] 所述脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 (1-3mg)/mL ;所述含高碘酸钠的 PBS 缓冲液与脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的体积比为 (1-3) :1。

[0021] 所述的胺基化磁性微球的制备方法包括:

[0022] (1) 80-90°C 条件下,  $Fe_3O_4$  磁核在硅酸钠溶液中进行硅烷化反应制备硅烷化磁性微球 ;所述硅酸钠溶液的质量浓度为 4% -5%、PH 大于 11 ;

[0023] (2) 调节硅烷化磁性微球的 PH 呈中性 ;

[0024] (3) 80-90°C 条件下, 将 PH 呈中性的硅烷化磁性微球、甲醇、3- 氨丙基三乙氧基硅烷、去离子水和甘油混合反应制备胺基化磁性微球 ;所述硅烷化磁性微球、甲醇、3- 氨丙基三乙氧基硅烷、去离子水和甘油的用量为 :

[0025]

硅烷化磁性微球: (1-2g) /毫升

甲醇: 150 体积,

3-氨丙基三乙氧基硅烷: 10 体积,

去离子水: 1 体积,

甘油: 150-161 体积。

[0026] 所述的  $Fe_3O_4$  磁核的粒径为 15-25nm、磁性的饱和磁化强度为 (40-80emu)/g。

[0027] 所述的氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 (1-2mg)/ 毫升, 且每毫升氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体用 20mg 的胺基化磁性微球包被。

[0028] 进一步, 利用封闭液封闭所述的脂环酸芽孢杆菌的免疫磁性微球, 所述封闭液的组分为: 每 100ml 浓度为 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液中含有 1-10 克 BSA 和 0.05ml Tween-20。

[0029] 与现有技术相比, 本发明的优点在于:

[0030] (1) 本发明通过抗原 - 抗体的特异性识别, 将脂环酸芽孢杆菌吸附到免疫磁性微球表面, 在磁场的作用下分离富集获得脂环酸芽孢杆菌样品, 通过 ELISA 检测体系, 对目标菌体进行识别。

[0031] (2) 本发明获得的免疫磁分离 -ELISA 检测方法, 速度快、成本低, 无需特殊试剂和样品前处理即可实现检测样品中目标菌体的分离、富集与即时检测, 且样品用量少, 操作方便无破坏性, 不会影响苹果汁的品质, 为生产实践和现场检验提供了更加有效、快速的方法。

[0032] (3) 本发明提供的检测方法的检测限为  $10^3$ CFU/mL。

[0033] (4) 本发明中的胺基化磁性微球具有特异性结合位点,可以实现对抗体的高效及特异性固定化,有效保留了抗体-抗原反应结合位点。

[0034] (5) 本发明的脂环酸芽孢杆菌特异性抗体氧化处理方法中抗体的 Fc 区域的糖链羟基部分被氧化为醛基,且保留了抗体的识别位点;处理后的抗体可与磁性微球的胺基部分高效结合,并保留了抗体的 Fab 活性区域,保证对目标菌体的有效识别和分离。

[0035] (6) 本发明的制备方法中抗体有效结合到磁性微球表面,并保留了对脂环酸芽孢杆菌高度特异性分离和富集特性。尤其是经封闭处理后的免疫磁性微球可实现脂环酸芽孢杆菌的有效分离。

[0036] (7) 采用本发明的胺基化磁性微球的制备方法制备的胺基化磁性微球的粒径为 45-55nm、磁性的饱和磁化强为 (40-60emu)/g。

### 附图说明

[0037] 图 1 为磁性微球的 APTES 胺基化改性及制备图;

[0038] 图 2 为免疫磁性微球的制备流程图;

[0039] 图 3 为不同浓度 BSA 封闭对免疫磁性微球特异性吸附影响(以  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核吸附抗体获得的免疫磁珠为对照),该图的横坐标为:封闭液中 BSA 的质量浓度,纵坐标为菌体分离率;

[0040] 图 4 为不同浓度脂环酸芽孢杆菌标准菌株免疫磁分离效果图,该图的横坐标为菌体浓度,纵坐标为菌体分离率。

### 具体实施方式

[0041] 免疫磁性微球作为一种材料化学与免疫学技术相结合发展形成的高新技术,通过磁性微球与抗体的表面化学基因或者表面吸附力实现磁性微球与抗体的有效结合。在免疫磁性分离过程中,利用抗原-抗体的高度特异性识别作用,使细胞表面抗原或者某种蛋白与连接有磁性微球的特异性抗体结合,形成固相抗体-抗原的复合物。在外磁场的作用下,利用磁性微球在磁场中的超顺磁性,使磁性微球载抗原-抗体复合物与其他组分分离,从而达到目标菌体分离与富集的目的。由于免疫磁性微球代替其他固相载体用于目标菌体的分离,具有方法简单易行、特异性高、损失小,兼顾免疫分离与富集结合为一体,分离效率远高于常规分离方法。同时,免疫磁分离结合 PCR、ELISA 及其他检测手段进行微生物检测,具有灵敏度高、时间短等巨大优势。

[0042] 结合图 1 和图 2,本发明对脂环酸芽孢杆菌特异性抗体进行氧化处理,将抗体可结晶段(Fc 区域)糖链部分转化成醛基,并以 APTES 胺基化处理的磁性微球为载体,实现了脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的定向固定化。通过这种方式,可以使抗体与磁性微球的结合位点远离抗原结合区,从而最大程度保留了抗体的活性位点。

[0043] 本发明的果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA 检测方法是先利用相应地脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球对果汁中的脂环酸芽孢杆菌进行分离富集,然后采用常规的 ELSIA 检测方法对富集样品中的脂环酸芽孢杆菌进行检测。且 ELSIA 检测的样品是以 PBS 缓冲液悬浮的其上吸附有脂环酸芽孢杆菌的免疫磁性微球的悬浮液。

[0044] 适用本发明的 ELSIA 检测方法为常规的 ELSIA 检测方法,如文献 1 和文献 2 公开

的果汁中脂环酸芽孢杆菌的 ELISA 检测方法。在样品的 ELISA 检测过程中, 每一步操作之间均有充分洗涤的步骤。如果待测样品中不含有脂环酸芽孢杆菌, 在检测过程中样品体系、酶标抗体被冲洗掉, 底物显色液没有颜色反应, 检测结果显示为阴性。当待测样品中含有目标具体且达到 ELISA 检测浓度, 则 ELISA 检测过程中底物显色并呈阳性结果。

[0045] 本发明使用的脂环酸芽孢杆菌特异性抗体为文献 Zhouli Wang, Tianli Yue, Yahong Yuan, et al. Development of Polyclonal Antibody-Based Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Alicyclobacillus Strains in Apple Juice. Journal of food science, 2012, 77:M643-M649 中公开的脂环酸芽孢杆菌特异性抗体。具体是将脂环酸芽孢杆菌标准菌株活化, 摇瓶培养, 取培养 18 ~ 24h 的新鲜菌液, 充分、离心后倒掉上清液, 加入适量生理盐水, 使菌体重新悬浮, 最后调整菌液浓度为  $10^8$ CFU/mL- $10^9$ CFU/mL, 灭活, 得到免疫原。对免疫原乳化后按照多点注射法对兔子进行免疫, 以 7 天为周期, 采血, 用 ELISA 测定获得血清的效价。待抗体效价达到要求后, 采血、纯化、分装, 最终获得脂环酸芽孢杆菌特异性抗体。

[0046] 以下是发明人提供的实施例及相关效果试验, 以对本发明的技术方案作进一步解释说明。

[0047] 以下实施例中所用的菌株及试剂:

[0048] Alicyclobacillus acidoterrestris (DSM3922)、Alicyclobacillus acidoterrestris (DSM2498)、Alicyclobacillus pomorum (DSM14955)、Alicyclobacillus fastidiosus (DSM17978) 和 Alicyclobacillus acidiphilus (DSM14558) 购于德国微生物菌种保藏中心; Saccharomyces cerevisiae (CICC-1027)、Bacillus subtilis (CICC10034)、Enterobacter cloacae (CICC10017) 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0049] 质量浓度为 36.5% 的盐酸。

[0050] 以下实施例中所用主要试剂配制方法:

[0051] ①磷酸缓冲液 1:(0.1mol/L PBS, pH9.6)

[0052] NaCl :8.0g ; $\text{KH}_2\text{PO}_4$  :0.24g ;KCl :0.2g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  :1.44g ;用蒸馏水溶解, 定容至 100mL, 调节至所需 pH。

[0053] ②磷酸缓冲液 2(0.01mol/L PBS, pH7.4)

[0054] 准确称取试剂, 溶解方式同试剂磷酸缓冲液 1, 定容至 1L, 调节至所需 pH。

[0055] ③包被缓冲液 (0.05M、pH9.6 碳酸盐缓冲液)

[0056]  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  :1.59g ; $\text{NaHCO}_3$  :2.93g 蒸馏水溶解, 定容至 1L, 调节 pH 至 9.6。

[0057] ④封闭混合液

[0058] 称取 0.5g BSA, 用 0.01M PBS (pH7.4) 溶解并定容至 100mL。

[0059] ⑤洗涤液 (PBS-T)

[0060] 称取药品同试剂磷酸缓冲液 1, 用蒸馏水溶解后, 加入 0.5mL Tween-20, 并定容至 1L, 调节 pH 至 7.4。

[0061] ⑥抗体稀释液

[0062] 称取 0.1g BSA, 用 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液溶解并定容至 100mL。

[0063] ⑦底物缓冲液

[0064] A 液 (0.1mol/L): 称取 20.141g 柠檬酸, 用蒸馏水溶解并定容至 1L。使用前一天

配制, 4℃保存。

[0065] B液 (0.2mol/L) :称取 28.4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  用蒸馏水溶解并定容至 1L。

[0066] 取 A液 24.3mL, B液 25.7mL 混合后, 加蒸馏水定容至 100mL, 调节 pH 至 5.0。

[0067] ⑧显色液

[0068] 10mg TMB 溶于 4mL 乙醇, 制备成 TMB 储存液, 4℃保存。使用时, 取 0.4mL TMB 储存液, 底物缓冲液 10mL 和 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu\text{l}$  混合均匀。

[0069] ⑨终止液 (2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液)

[0070] 移取 22.2mL 浓硫酸, 用蒸馏水稀释, 待冷却后定容至 200mL。

[0071] 以下实施例中采用投射电镜扫描检测  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核或胺基化磁性微球的粒径; 采用振动试样磁力计测定  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核或胺基化磁性微球的磁性的饱和磁化强度。

[0072] 实施例 1 :

[0073] (1) 磁性微球的硅烷化反应

[0074] 将 9.5g 硅酸钠溶解于 200mL 去离子水中并用盐酸调整 pH 值为 12-13, 向硅酸钠溶液中加入 5g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核超声处理 30min, 在 80-90℃水浴条件下用盐酸调整反应体系 pH 值为 6-7, 磁性分离获得微球并水洗得 pH 呈中性的硅烷化磁性微球;

[0075] (2) 磁性微球的胺基化改性

[0076] 2 克硅烷化磁性微球悬浮液、1mL 去离子水和 10mL APTES 加入 150mL 甲醇中, 超声处理 30min 后加入 150mL 甘油, 85-90℃充分反应 3h, 磁性分离获得微球, 并用甲醇和去离子水分别洗涤三次, 冷冻干燥, 获得胺基化磁性微球, 并且经检测得该胺基化磁性微球的粒径为 45-55nm、磁性的饱和磁化强为 46.82emu/g;

[0077] (3) 脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的氧化处理

[0078] 将 1mL 浓度为 2mg/mL 的脂环酸芽孢杆菌特异性抗体溶液加入 2ml 含有 20mg 高碘酸钠的 PBS 缓冲液中 (PBS 的浓度为 0.1mol/L, pH 值 7.4), 37℃条件下反应 30min; 氧化反应结束后, 采用 Sephadex G-25 层析柱过滤、除盐并分离得到氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体, 液体流速为 0.5mL/min;

[0079] (4) 脂环酸芽孢杆菌的免疫磁性微球的制备:

[0080] 将制备获得的 2mg 胺基化磁性微球与 100  $\mu\text{L}$  浓度为 2mg/mL 的氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体于 37℃条件下 120-180rpm 搅拌反应 30min, 磁性分离并洗涤, 得到包被抗体的免疫磁性微球。

[0081] 实施例 2 :

[0082] 该实施例与实施例 1 不同之处在于, 该实施例中所用的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核是采用下述方法制备的:

[0083] 将 3.4g 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  与 1.2g 的  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  加入到 800mL 去离子水中, 并加入 4g PEG-4000, 在氮气保护下充分搅拌溶解, 逐滴加入氨水溶液使反应体系 pH 大于 10; 之后反应体系在 75-85℃水浴中充分熟化 20-40min, 磁性分离获得微球并水洗获得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核; 经检测得该  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核粒径为 15-25nm、磁性的饱和磁化强度为 72.18emu/g。

[0084] 实施例 3 :

[0085] 该实施例与实施例 1 不同之处在于: 该实施例的免疫磁性微球经封闭液封闭处理; 以每 100ml PBS (0.01M、pH7.4) 缓冲液中含有 5g BSA 和 0.05ml Tween-20 的混合体系为

封闭液,加入吸附抗体的免疫磁性微球于 37℃ 条件下作用 60min,然后磁性分离并充分洗涤后得到封闭处理后的免疫磁性微球。

[0086] 一、利用实施例 3 制备的免疫磁性微球对脂环酸芽孢杆菌进行分离：

[0087] 具体操作步骤为：配制表 1 中所示的浓度梯度样品各 10mL,每个样品中加入 20mg 免疫磁性微球进行目标菌体的分离去除：120-180rpm、反应吸附时间 60min；磁性分离吸附菌体的免疫磁性微珠,无菌水洗涤免疫磁性微珠并悬浮于 200 μ L PBS 缓冲液中,采用涂布法计算分离前后菌体浓度变化,评价菌体分离效果。结果如表 1 所示：

[0088] 表 1

[0089]

菌体浓度 (CFU/mL)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
菌体分离率 (%)	98.98	96.81	81.37	68.79	35.38

[0090] 试验结果：结合图 4,当细菌的浓度小于 10<sup>4</sup>CFU/mL 时,微球对细菌的吸附率大于 95%；当脂环酸芽孢杆菌的浓度为 10<sup>4</sup>CFU/mL,微球对细菌的吸附率大于 80%；继续增大细菌浓度（超过 10<sup>4</sup>CFU/mL）时,吸附率呈现下降趋势。

[0091] 二、利用实施例 3 中制备的免疫磁性微球分离不同来源细菌,研究免疫磁性微球对菌体分离的特异性：

[0092] 具体操作步骤为：将脂环酸芽孢杆菌标准菌株 (DSM3922、DSM2498、DSM14955、DSM17978、DSM14558) 与非脂环酸芽孢杆菌标准菌株 (CICC1027、CICC10034、CICC10017) 培养液分别加入到稀释后的苹果汁样品中 (15° Brix),最终样品中菌体浓度约为 10<sup>4</sup>CFU/mL。将 5mg 的免疫磁性微球加入到 2mL 果汁样品中,吸附反应 60min,然后进行菌体分离,洗涤。将吸附菌体的微球重新悬浮于 200 μ L PBS 缓冲液中,采用涂布法计算分离前后菌体浓度变化,评价菌体分离效果。结果如表 2 所示：

[0093] 表 2

[0094]

菌株编号	DSM 3922	DSM 2498	DSM 14955	DSM 17978	DSM 14558	CICC 1027	CICC 10034	CICC 10017
菌体分离率 (%)	82.39	87.63	85.42	80.79	85.58	9.76	6.08	8.35

[0095] 表 2 所示结果表明,获得的免疫磁性微球对脂环酸芽孢杆菌有非常好的特异性,对脂环酸芽孢杆菌的分离率达到 80% 以上；而对其余三个菌株培养液 (CICC-1027、CICC-10034、CICC-10017) 分离效果较差,菌体分离率不足 10%,说明该实施例制备的免疫磁性微球对脂环酸芽孢杆菌有好的特异性。

[0096] 三、利用实施例 3 中制备的免疫磁性微球对不同可溶性固形物浓度的苹果果汁样品中菌体进行免疫分离：

[0097] 具体操作步骤为：将浓缩苹果汁 (68° Brix) 梯度稀释,可溶性固形物分别为 5° Brix,10° Brix,15° Brix,20° Brix,并加入一定量培养好的脂环酸芽孢杆菌标准菌株培养液,最终样品中菌体浓度约为 10<sup>4</sup>CFU/mL。然后将免疫磁性微球加入到各加标果汁样品中 (2.5g/L),按照前述条件进行菌体分离,洗涤。将吸附菌体的微球重新悬浮于 200 μ L

PBS 缓冲液中,采用涂布法计算分离前后菌体浓度变化。结果如表 3 所示:

[0098] 表 3

[0099]

可溶性固形物含量 (° Brix)	5	10	15	20
菌体分离率 (%)	85.43	87.86	83.17	不能分离

[0100] 表 3 所示结果表明,当果汁的可溶性固形物  $\leq 15^{\circ}$  Brix 时,免疫磁性微球对菌体分离效果好,没有显著影响;当可溶性固形物含量为  $20^{\circ}$  Brix 时,由于果汁黏度太多,磁性微球在果汁体系中不能有效分离,因而对菌体分离效果差。

[0101] 实施例 4:

[0102] 该实施例与实施例 3 不同之处在于,以每 100ml PBS 中含有 1g BSA 和 0.05ml Tween-20 的混合体系为封闭液。

[0103] 实施例 5:

[0104] 该实施例与实施例 3 不同之处在于,以每 100ml PBS 中含有 10g BSA 和 0.05ml Tween-20 的混合体系为封闭液。

[0105] 以下是发明人提供的关于磁性微球胺基化、脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的氧化处理、封闭处理对脂环酸芽孢杆菌免疫磁性微球吸附性能的影响试验研究。

[0106] 试验方法:

[0107] (1) 以氧化处理前后的抗体分别与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核、胺基化磁性微球反应,制备获得不同试验样品,分别为:

[0108] 氧化前抗体与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核反应制备的试验样品标记为 IMPs1;

[0109] 氧化前抗体与胺基化磁性微球反应制备的试验样品标记为 IMPs2;

[0110] 氧化后抗体与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核反应制备的试验样品标记为 IMPs3;

[0111] 氧化后抗体与胺基化微球反应制备的免疫磁性微球标记为 IMPs4;

[0112] 利用 IMPs1、IMPs2、IMPs3、IMPs4 各试验样品对菌体浓度为  $10^4\text{CFU/mL}$  脂环酸芽孢杆菌 (DSM3922) 培养液中的脂环酸芽孢杆菌进行吸附分离,之后采用涂布法计算各样品分离前后菌体浓度变化,并计算各试验样品对脂环酸芽孢杆菌的吸附率。试验结果如表 1 所示。

[0113] 该实验中所用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核为实施例 2 制备的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核;胺基化磁性微球和氧化抗体为实施例 1 制备。

[0114] (2) 利用实施例 1、3、4、5 制备的免疫磁性微球对菌体浓度为  $10^4\text{CFU/mL}$  脂环酸芽孢杆菌 (DSM3922) 培养液中的脂环酸芽孢杆菌进行吸附分离,之后采用涂布法计算各样品分离前后菌体浓度变化,并计算各试验样品对脂环酸芽孢杆菌的吸附率。试验结果如表 1 所示。

[0115] (3) 利用实施例 3 中所用封闭液,对 IMPs1、IMPs2、IMPs3、IMPs4 各试验样品进行封闭处理,得到相应的试验样品,之后进行菌体 (DSM3922) 分离处理并计算各试验样品对脂环酸芽孢杆菌的吸附率。试验结果如表 4 所示。

[0116] 表 4

[0117]

微球类型	IMPs1	IMPs2	IMPs3	IMPs4
封闭前菌体吸附率	32.96%	51.62%	47.18%	86.38%
封闭后菌体吸附率	18.92%	37.29%	23.61%	80.07%
非特异性吸附率	14.04%	14.33%	23.57%	6.31%

[0118] 表 4 中的非特异性吸附率指的是相应磁性微球封闭处理前对菌体的吸附率与封闭后菌体吸附率的差值。

[0119] 试验结果：研究表明，抗体氧化处理后与胺基化磁性微球反应，制备的免疫磁性微球对菌体的吸附率最高；封闭液中 BSA 含量对菌体的非特异性吸附有显著影响。

[0120] (1) 抗体氧化前后与胺基化磁性微球反应，制备的免疫磁性微球对菌体的有效吸附率分别为 37.29% 和 80.07%，说明抗体氧化对菌体吸附有重要影响。氧化后抗体与胺基化磁性微球反应过程中，保留了抗体的活性位点，因此有利用菌体的吸附。

[0121] (2)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核与氧化后抗体反应制备的免疫磁性微球对菌体的有效吸附率为 23.61%，而胺基化磁性微球与氧化后抗体反应制备的免疫磁性微球对菌体的有效吸附率为 80.07%。

[0122] (3) 当封闭液中 BSA 浓度由 1% 增大到 5% 时，免疫磁性微球对菌体的非特异性吸附明显减小。封闭液中 BSA 质量浓度为 5% 时， $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁核和胺基化微球制备的免疫微球的非特异性吸附率为 6.31% 和 23.57%；参考图 3，随着 BSA 浓度继续增大到 10% 时，封闭效果变化不明显。

[0123] 实施例 6：

[0124] 该实施例与实施例 2 不同之处在于：将 5mg 胺基化磁性微球与 250  $\mu\text{L}$  浓度为 0.4mg/mL 的氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下搅拌反应 60min(150rpm)，磁性分离并洗涤，得到包被抗体的免疫磁性微球。

[0125] 实施例 7：

[0126] 该实施例与实施例 6 不同之处在于：氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 0.8mg/mL。

[0127] 实施例 8：

[0128] 该实施例与实施例 6 不同之处在于：氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 1.2mg/mL。

[0129] 实施例 9：

[0130] 该实施例与实施例 6 不同之处在于：氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 1.6mg/mL。

[0131] 实施例 10：

[0132] 该实施例与实施例 6 不同之处在于：氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体的浓度为 2.0mg/mL。

[0133] 分别采用 BCA 试剂盒法测定实施例 6 至 10 固定化前后抗体浓度。结果如表 5 所示：

[0134] 表 5

[0135]

实施例	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10
抗体初始浓度 (mg/mL)	0.4	0.8	1.2	1.6	2
抗体固定化量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	19.48	38.76	58.65	71.86	75.6

[0136] 表 5 所示结果表明:随着抗体初始浓度的增大,胺基化磁性微球对抗体固定化量增加。在初始浓度为 2.0mg/mL 时,吸附率为 75.6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

[0137] 实施例 11:

[0138] 该实施例的被检测样品为:

[0139] 对脂环酸芽孢杆菌标准菌株 (DSM-3922) 培养液离心 (6000rpm, 10min)、洗涤三次, 去掉培养基, 并用无菌水调整浓度约  $10^8\text{CFU}/\text{mL}$ ; 用无菌水稀释获得不同浓度梯度的菌体悬浮液 ( $10^1\text{CFU}/\text{mL}$ - $10^7\text{CFU}/\text{mL}$ )。

[0140] 5mg 实施例 5 制备的免疫磁性微球分别加入 2mL 不同浓度的不同浓度梯度的菌体悬浮液中,  $37^\circ\text{C}$  条件下反应吸附 30min (150rpm)。

[0141] 磁性分离各浓度梯度菌体悬浮液中吸附菌体的免疫磁性微珠, 分别用无菌水洗涤各浓度梯度对应的免疫磁性微珠并悬浮于相应的 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液 (PBS 的浓度为 0.1mol/L, pH 值 7.4) 中, 富集获得各浓度梯度对应的待检测富集样品, 分别进行如下的 ELSIA 检测:

[0142] ①多克隆抗体包被: 将稀释后的多克隆抗体加入到 96 孔酶标板中 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 用保鲜膜将板面封住放入湿盒内,  $37^\circ\text{C}$  下振荡孵育 1h (60rpm); 倒出孔内液体, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  洗涤液 PBS-T, 振荡洗涤 3 次, 每次 3min, 拍干;

[0143] ②酶标板封闭: 每孔加入封闭混合液 200  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 2h, 倒出孔内液体, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  洗涤液 PBS-T, 振荡洗涤 3 次, 每次 3min, 拍干, 酶标板保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中, 备用;

[0144] ③样品检测: 将待检测富集样品加入封闭好的酶标板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 1h; PBS-T 洗涤三次, 拍干;

[0145] ④加入酶标二抗: 将稀释后的酶标二抗 (1:2000 稀释) 加入酶标板中, 每孔 150  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 1h, 洗涤 3 次, 每次 3min, 拍干;

[0146] ⑤加入显色液: 将显色液加入样品检测体系中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  条件下温育显色 10-20min;

[0147] ⑥加入终止液: 每孔加入终止液 50  $\mu\text{L}$ ;

[0148] ⑦结果判读: 采用 450nm 及 630nm 双波长测定反应吸光度, 每孔的 OD 值为  $\text{OD}_{450} - \text{OD}_{630}$ 。

[0149]  $\text{P/N 值} = (\text{待测孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}) / (\text{阴性对照孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值})$

[0150]  $\text{P/N} \geq 2.1$  为阳性,  $1.5 < \text{P/N} \leq 2.1$  为可疑,  $1.5 < \text{P/N}$  为阴性。

[0151] 该实施例的结果如表 7 所示。

[0152] 表 7

[0153]

菌体浓度 (CFU/mL)	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
IMS-ELSIA 检测 OD 值	0.568	0.736	1.109	1.538	1.865	2.089	2.112

[0154] 表 7 所示结果显示,检测限为 10<sup>3</sup>CFU/mL。

[0155] 实施例 12 :

[0156] 该实施例与实施例 11 的被检测样品相同。

[0157] 该实施例中不对样品进行富集处理,直接对不同浓度梯度的菌体样品进行 ELSIA 检测。结果见表 8。

[0158] 表 8

[0159]

菌体浓度 (CFU/mL)	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
ELISA 检测 OD 值	0.492	0.566	0.643	0.731	1.158	1.584	1.682

[0160] 表 8 所示结果表明,该实施例 ELISA 的检测限为 10<sup>5</sup>CFU/mL。

[0161] 对比实施例 11 与实施例 12 的结果说明免疫磁性微球富集可以显著提高 ELISA 检测限。

[0162] 实施例 13 :

[0163] 该实施例与实施例 11 不同之处在于 :

[0164] 该实施例的检测样品为 :

[0165] 用可溶性固形物含量为 15° Brix 的苹果汁样品配置表 9 所示脂环酸芽孢杆菌菌体浓度的待检测苹果汁样品。各待检测苹果汁样品取 2mL,并分别加入 5mg 的实施例 5 制备的免疫磁性微球,进行富集和检测。

[0166] 该实施例的 ELSIA 检测结果如表 9 所示 :

[0167] 表 9

[0168]

菌体浓度 (CFU/mL)	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
IMS-ELISA 检测 OD 值	0.568	0.896	1.189	1.638	1.965	2.298	2.312

[0169] 表 9 所示结果表明,在苹果汁样品中本发明的检测方法对脂环酸芽孢杆菌检测限为 10<sup>3</sup>CFU/mL。

[0170] 实施例 14 :

[0171] 该实施例与实施例 13 不同之处在于 :该实施例中不对样品进行富集处理,对样品直接进行 ELSIA 检测。结果如表 10 所示 :

[0172] 表 10

[0173]

菌体浓度 (CFU/mL)	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
ELSIA 检测 OD 值	0.458	0.637	0.796	0.928	1.155	1.298	1.331

[0174] 表 10 所示结果表明,在苹果汁样品中 ELISA 对脂环酸芽孢杆菌检测限为  $10^5$ CFU/mL。

[0175] 对比实施例 13 与实施例 14 的检测结果说明,采用免疫磁性微球对果汁样品进行富集处理可提高 ELSIA 检测的检测限。

[0176] 实施例 15 :

[0177] 该实施例与实施例 13 不同之处在于 ELSIA 检测中的操作步骤①和步骤③调换操作程序。

[0178] 检测结果如表 11 所示 :

[0179] 表 11

[0180]

菌体浓度(CFU/mL)	10	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$
实施例 15 IMS-ELISA 检测 OD 值	0.539	0.692	1.201	1.332	1.631	1.808	1.869

[0181] 表 11 所示结果表明,改变操作程序后本发明的检测方法对脂环酸芽孢杆菌培养液的检测限为  $10^3$ CFU/mL ;同时对高浓度菌体检测过程中 OD 值降低,说明多次洗涤过程中部分菌体被洗脱,对结果有一定的负面影响 ;实施例 11 中目标菌体的富集和酶标板的包被、封闭可以同时进行,甚至可以先准备好包被抗体的酶标板,直接用于免疫富集菌体的检测,因此检测时间减小到 3-4h。而实施例 15 中检测时间为 6-7h,检测时间长。

[0182] 以下是发明人提供的关于“对果汁生产体系中可能威胁果汁品质脂环酸芽孢杆菌及非脂环酸芽孢杆菌标准菌株进行 IMS-ELISA 检测评价”的试验。

[0183] 试验方法 :用可溶性固形物含量为  $15^\circ$  Brix 的苹果汁样品配置表 12 所示菌株菌体浓度为  $10^4$ CFU/mL 的待检测苹果汁样品。各待检测苹果汁样品取 2mL,并分别加入 5mg 的实施例 3 制备的免疫磁性微球,进行富集和检测。

[0184] 表 12

[0185]

菌株编号	菌株类别	OD value	菌株编号	菌株类别	OD value
446	<i>A. acidocaldarius</i> <sup>a</sup>	1.822	17978	<i>A. fastidiosus</i> <sup>a</sup>	1.987
448	<i>A. acidocaldarius</i> <sup>a</sup>	1.961	10	<i>B. subtilis</i> <sup>a</sup>	0.686
449	<i>A. acidocaldarius</i> <sup>a</sup>	1.893	30	<i>B. brevis</i> <sup>a</sup>	0.713
451	<i>A. acidocaldarius</i> <sup>a</sup>	1.654	32	<i>B. megaterium</i> <sup>a</sup>	0.598
2498	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>a</sup>	2.191	18134	<i>B. ginsengihumi</i> <sup>a</sup>	0.654
3922	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>a</sup>	1.972	13	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>b</sup>	1.942
3923	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>a</sup>	2.102	95	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>b</sup>	2.286
3924	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>a</sup>	2.369	96	<i>A. acidoterrestris</i> <sup>b</sup>	2.176
4006	<i>A. cycloheptanicus</i> <sup>a</sup>	1.859	1027	<i>S. cerevisiae</i> <sup>d</sup>	0.672
12489	<i>A. hesperidum</i> <sup>a</sup>	2.087	10034	<i>B. subtilis</i> <sup>d</sup>	0.489
13609	<i>A. herbarius</i> <sup>a</sup>	1.756	6169	<i>B. bifidum</i> <sup>d</sup>	0.517
14558	<i>A. acidiphilus</i> <sup>a</sup>	1.869	20420	<i>E. faecium</i> <sup>d</sup>	0.708
14955	<i>A. pomorum</i> <sup>a</sup>	1.817	20975	<i>L. rhamnosus</i> <sup>d</sup>	0.612
17614	<i>A. sendaiensis</i> <sup>a</sup>	1.926	23139	<i>L. rhamnosus</i> <sup>d</sup>	0.598
17975	<i>A. contaminans</i> <sup>a</sup>	2.136	1605	<i>S. cerevisiae</i> <sup>e</sup>	0.705

[0186] 表 12 中各上标字母分别代表相应菌株的来源信息：

[0187] 上标字母 a 代表相应菌株来源于德国微生物菌种保藏中心；

[0188] 上标字母 b 代表相应菌株购自日本东京三井诺有限公司食品研究实验室；

[0189] 上标字母 d 代表相应菌株来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心；

[0190] 上标字母 e 代表相应的菌株购自中国科学院微生物研究所。

[0191] 表 12 所示结果表明本发明的检测方法对脂环酸芽孢杆菌的检测具有较好的特异性。

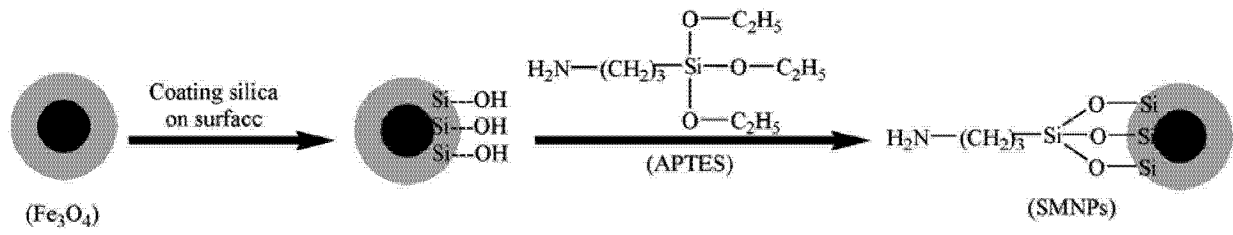


图 1

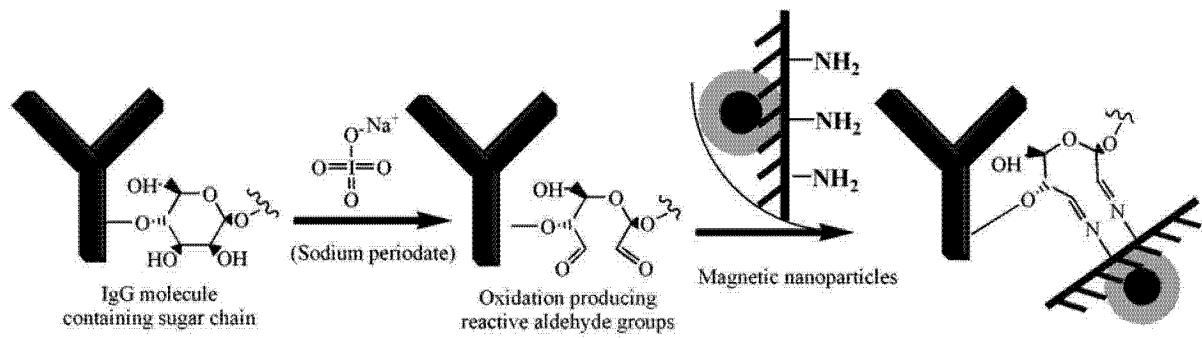


图 2

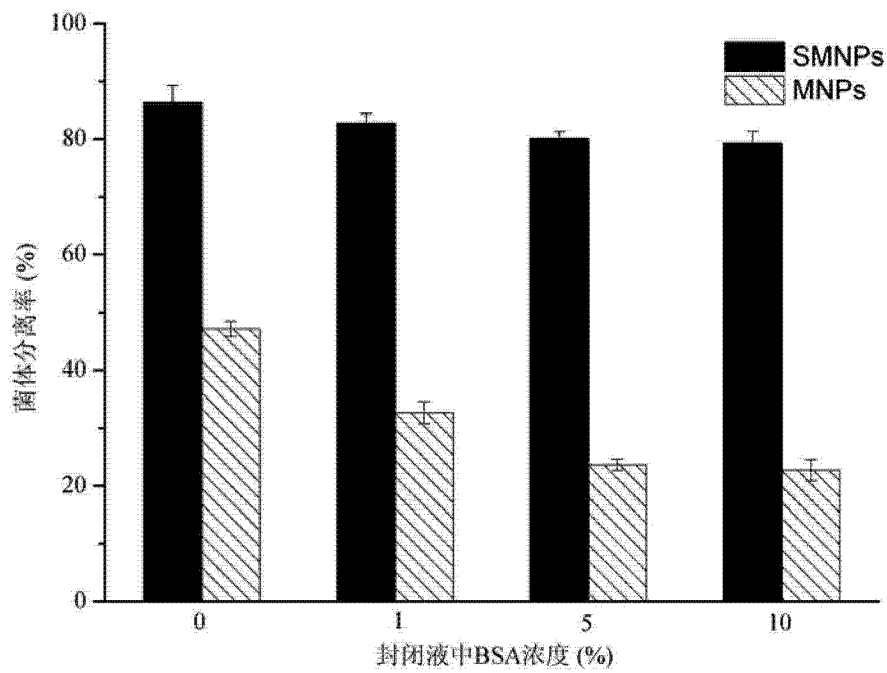


图 3

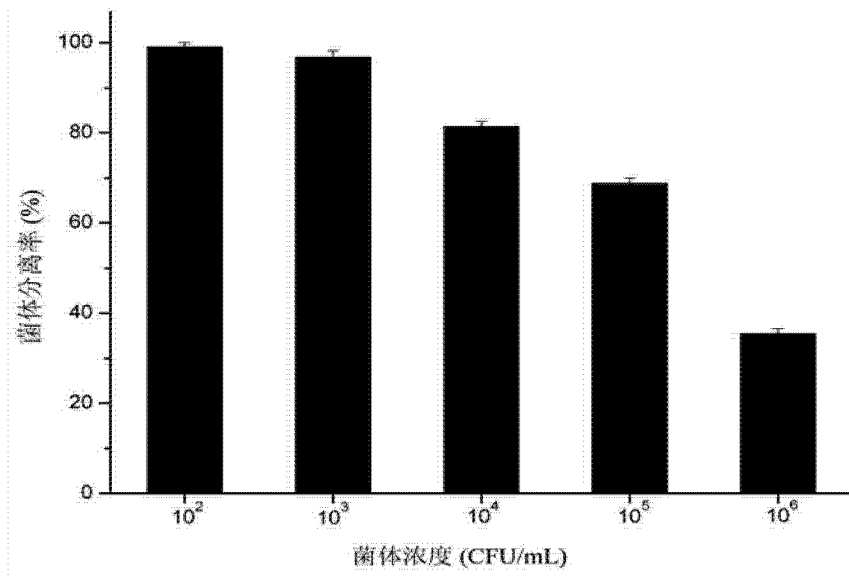


图 4

专利名称(译)	果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103383394B</a>	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201310254147.9	申请日	2013-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学		
申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学		
[标]发明人	岳田利 王周利 袁亚宏 蔡瑞 牛晨 郭彩霞		
发明人	岳田利 王周利 袁亚宏 蔡瑞 牛晨 郭彩霞		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
审查员(译)	孙春梅		
其他公开文献	CN103383394A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了果汁中脂环酸芽孢杆菌的免疫磁分离-ELISA检测方法，方法包括：利用脂环酸芽孢杆菌免疫磁微球对果汁样品中的脂环酸芽孢杆菌进行分离富集得到待检测富集样品；利用ELISA检测方法检测待检测富集样品中是否存在脂环酸芽孢杆菌；所用的脂环酸芽孢杆菌的免疫磁性微球是用胺基化磁性微球包被氧化脂环酸芽孢杆菌特异性抗体而得到的。本发明通过抗原-抗体的特异性识别，将脂环酸芽孢杆菌吸附到免疫磁性微球表面，在磁场的作用下分离富集获得脂环酸芽孢杆菌样品，通过ELISA检测体系，对目标菌体进行识别。相对于现有的ELISA检测方法，该方法具有检测限低、时效性和准确性更可靠的特点。

硅烷化磁性微球： (1-2g) /毫升

甲醇： 150 体积，

3-氨丙基三乙氧基硅烷： 10 体积，