



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102426229 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201110288372. 5

JP 2009075100 A, 2009. 04. 09,

(22) 申请日 2011. 09. 26

WO 2009026251 A1, 2009. 02. 26,

(73) 专利权人 广东海洋大学

KR 20110039046 A, 2011. 04. 15,

地址 524000 广东省湛江市麻章区湖光岩东
广东海洋大学

陈伶俐等. 金黄色葡萄球菌及 SPA 快速分离
检验新技术的研究. 《中华微生物学和免疫学杂
志》. 2004, 第 24 卷 (第 4 期),

(72) 发明人 孙力军 王雅玲 刘阳 徐德峰
聂芳红 刘唤明

王延昭. “利用免疫磁珠技术富集肠炎沙门
氏菌和金黄色葡萄球菌”. 《中国优秀硕士学位论
文全文数据库农业科技辑》. 2011,

(74) 专利代理机构 广州市南锋专利事务有限
公司 44228

Lingli Chen 等. Immunomagnetic
separation and MS/SPR end-detection
combined procedure for rapid detection
of Staphylococcus aureus and protein
A. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2007,

代理人 刘广生

审查员 黄晓丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 1/40 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101892196 A, 2010. 11. 24,

CN 102043055 A, 2011. 05. 04,

CN 101092614 A, 2007. 12. 26,

CN 1975423 A, 2007. 06. 06,

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫
磁珠的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于富集金黄色葡萄球菌
的人 IgG 免疫磁珠的制备方法及应用, 它是
以磁珠为载体, 人 IgG 为识别中间体, 经
过活化-偶联-洗涤-封阻的过程制备出人
IgG 免疫磁珠, 在合适的缓冲液中于一定
条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样
本中的金黄色葡萄球菌; 该方法特异性强,
高效快速, 操作简单, 价格低廉, 不需
要大型仪器和特殊培训的专业操作人员,
样品不需要特殊前处理, 可广泛应用于食
品、饲料、化妆品、环境和临床中金黄
色葡萄球菌的富集分离与检测。

CN 102426229 B

1. 一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法,其特征在于:该方法以磁珠为载体,偶联人 IgG,制备成能够富集金黄色葡萄球菌的免疫磁珠;

具体方法是:

(1)活化:取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠,反复三次,每次间隔 3~5 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)各 200 μ L,混匀,将磁珠于 22~25°C 条件下震荡孵育 30~60 分钟,将磁珠活化;

(2)偶联:用偶联缓冲液洗涤磁珠,反复三次,每次间隔 3~5 分钟,加入人 IgG,混匀,于 22~25°C 条件下震荡孵育 24 小时,制成人 IgG 免疫磁珠;

(3)封阻:人 IgG 免疫磁珠经洗涤缓冲液洗涤,反复三次,每次间隔 3~5 分钟,加入封阻缓冲液于 22~25°C 条件下作用 1~2 小时,存放于保存缓冲液中,4°C 保存待用;

上述各步骤中所述:

活化缓冲液:0.1M MES 和 0.05% 吐温 -20, pH6.0-6.5;

偶联缓冲液:0.1M MES 和 0.05% 吐温 -20, pH7.0-7.4;

洗涤缓冲液:0.1M MES,0.1%BSA,0.05% 吐温 -20;

封阻缓冲液:0.2M pH8.5 Tris 溶液,0.1%BSA,0.05% 吐温 -20

保存缓冲液:0.1M MES, pH7.4;

活化剂:EDC 和 NHS,浓度均为 1-5mg/mL,用活化缓冲液溶解,先加入 EDC,混匀后加入 NHS,震荡均匀;上述的百分比为重量百分比。

2. 根据权利要求 1 所述的一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的应用,其特征在于:通过将免疫磁珠添加到待检样品中,在一定条件下达到分离或富集并检测金黄色葡萄球菌的目的,并以人 IgG 免疫磁珠分离效果为依据进行产品标注和宣传,具体应用为:

1) 按照金黄色葡萄球菌检验国标方法中的样品前处理办法处理样品,免疫磁珠与样品在偶联缓冲液中于 37°C 充分震荡孵育 1 小时,对样品中金黄色葡萄球菌进行富集;

2) 在 37°C 条件下,将富集的金黄色葡萄球菌在 7.5%NaCl 营养琼脂培养基中培养 18~24 小时后计数。

3. 根据权利要求 2 所述的一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的应用,其特征在于:利用制备的人 IgG 免疫磁珠对食品、饲料、化妆品、公共场所工具和临床样本中的金黄色葡萄球菌进行富集和检验。

一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫磁珠的制备方法及应用,具体涉及一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法及应用,该制备方法用于分离致病性金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),包括金黄色葡萄球菌免疫磁珠的制备方法和应用方法,属于病原菌分离技术领域。

背景技术

[0002] 免疫磁珠分离技术(Immunomagnetic bead-based separation, IMS)是近年来发展起来的一项新的免疫学技术。包裹有一定复合有机材料的微小磁珠在一定条件下既可结合蛋白质抗体成为抗体-磁珠二联体,将其加入经过前处理的样品中,磁珠上的特异性抗体可以和相应的抗原结合从而形成抗原-抗体-磁珠复合物(免疫磁珠, Immunomagnetic bead, IMB),这种复合物在磁力作用下,发生力学移动,使之与样品中的其它物质分离,而达到分离特定抗原的目的。免疫磁珠(IMB)是一个平台,凡是利用抗原抗体结合原理进行工作的领域都可以应用,并且已在医学和生物学的骨髓移植、分离干细胞、细胞器、癌细胞、激素、病原菌等方面取得了显著成绩。近年来 IMB 以其高度的敏感性和特异性被广泛应用于食品、水、生物样品、环境等标本中病原微生物的分离和检测工作中,显示出良好的开发应用前景。

[0003] 在分离致病性微生物方面,IMB 可有效地收集、浓缩大量样品中的少量病原微生物。IMB 对目的菌的富集具有高分离率、高特异性、高稳定性、无污染、无毒性、操作简便的特点。使用该方法样品用量少且不会伤及细菌,较之常规检验法相比,更高效、更敏感。该方法省去了常规方法中的预富集培养步骤,直接对致病菌进行分离,在 2-6h 内即可完成。此外,由于 IMB 特异性高,且能够识别性质极为相近的菌株,可以有效的区分致病性与非致病性菌株,从而减少漏检,显著地提高了分离准确率,减少了假阳性的出现。

[0004] 近年来,免疫磁珠技术对食源性致病菌分离的研究集中于沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、副溶血弧菌等。根据常规免疫磁珠的制备原理,对于上述致病菌的免疫磁珠制备较繁琐,首先要制备这些菌种的单克隆抗体或多克隆抗体,然后将抗体与磁珠偶联,从而对菌株进行分离。因此,免疫磁珠的分离效果(准确度和灵敏度)直接受到抗体纯度的影响。本发明提及的人 IgG 免疫磁珠制备的原理是金黄色葡萄球菌细胞表面一种特有的蛋白质——金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA),它具有与人 IgG 的 Fc 片段特异性结合的能力,每个 SPA 分子可以同时结合 2 个人 IgG 分子,将人 IgG 与磁珠偶联制成免疫磁珠,便可以用于分离金黄色葡萄球菌。人 IgG 分子的制备及纯化的技术现已成熟,市场上可以买到低价位,高纯度的人 IgG 标准品,为高质量低成本的人 IgG 免疫磁珠制备提供了条件。

[0005] 目前,利用 SPA 分子与人 IgG 特异性结合的原理分离人 IgG 的方法已相对成熟,而利用人 IgG 免疫磁珠分离金黄色葡萄球菌的研究仅处于初步阶段,对磁珠的制备和用于金葡菌的分离等条件的优化没有进行详细的研究,磁珠的稳定性和富集能力还不高。本发明

利用此原理对用于金黄色葡萄球菌富集的人 IgG 免疫磁珠的制备工艺及富集应用条件进行了优化,大大提高了对金黄色葡萄球菌的富集能力和检测灵敏度,同时凭借其免疫磁珠自身的快速方便、不需要大型检测仪器、价格低廉的特点运用于食品、饲料、医疗环境和自然环境中金黄色葡萄球菌的分离与富集,可以进一步提高快速检测金黄色葡萄球菌效率。

发明内容

[0006] 本发明的目的是为了弥补现有金葡菌检测技术存在的不足,提供一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法及应用。磁珠经过适量活化剂(EDC-NHS 组合)处理后与人 IgG 在合适的条件下进行偶联,制成人 IgG 免疫磁珠,将人 IgG 免疫磁珠加入待测经过前处理的样品中,在一定的条件下捕获金黄色葡萄球菌。

[0007] 为实现上述发明目的,本发明采取的技术方案是:该用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法是:以磁珠为载体,偶联人 IgG,制备成能够富集金黄色葡萄球菌的免疫磁珠;

[0008] 一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法,该方法以磁珠为载体,偶联人 IgG,制备成能够富集金黄色葡萄球菌的免疫磁珠;

[0009] 具体方法是:

[0010] (1) 活化:取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠,反复三次,每次间隔 3~5 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 200 μ L,混匀,将磁珠于 22~25 $^{\circ}$ C 条件下震荡孵育 30~60 分钟,将磁珠进行活化;

[0011] (2) 偶联:用偶联缓冲液洗涤磁珠,反复三次,每次间隔 3~5 分钟,加入人 IgG,混匀,于 22~25 $^{\circ}$ C 条件下震荡孵育 24 小时,制成人 IgG 免疫磁珠;

[0012] (3) 封阻:人 IgG 免疫磁珠经洗涤缓冲液洗涤,反复三次,每次间隔 3~5 分钟,加入封阻缓冲液于 22~25 $^{\circ}$ C 条件下作用 1~2 小时,存放于保存缓冲液中,4 $^{\circ}$ C 保存待用;

[0013] 上述各步骤中所述:

[0014] 活化缓冲液:0.1M MES 和 0.05% 吐温 -20, pH6.0-6.5;

[0015] 偶联缓冲液:0.1M MES 和 0.05% 吐温 -20, pH7.0-7.4;

[0016] 洗涤缓冲液:0.1M MES,0.1%BSA,0.05% 吐温 -20;

[0017] 封阻缓冲液:0.2M pH8.5 Tris 溶液,0.1%BSA,0.05% 吐温 -20;

[0018] 保存缓冲液:0.1M MES, pH7.4;

[0019] 活化剂:EDC 和 NHS,浓度均为 1-5mg/mL,用活化缓冲液溶解,先加入 EDC,混匀后加入 NHS,震荡均匀;

[0020] 上述的百分比为重量百分比。

[0021] 一种用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的应用方法,是通过将人 IgG 免疫磁珠添加到各种待检样品中,在一定条件下达到分离或富集并检测金黄色葡萄球菌的目的。

[0022] 1) 按照国标法的样品前处理方法处理样品,免疫磁珠与样品在偶联缓冲液中于 37 $^{\circ}$ C 充分震荡孵育 1 小时,对金黄色葡萄球菌富集;

[0023] 2) 经富集后的金黄色葡萄球菌在 7.5%NaCl 营养琼脂培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 18-24 小时培养,计数,获得样品中金黄色葡萄球菌的数量。

[0024] 该金黄色葡萄球菌免疫磁珠产品应用于食品、饲料、化妆品、公共场所工具和临床样本检验中。

[0025] 本发明的有益效果是：

[0026] 本发明首次将活化剂(EDC 和 NHS) 活化后的磁珠应用于金黄色葡萄球菌免疫磁珠的制备,根据金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA) 分子与人 IgG 特异性结合的原理富集金黄色葡萄球菌,特异性强,高效快速。目前人 IgG 产品在国内已商品化,和金黄色葡萄球菌免疫血清相比,纯度高,性能稳定,成本低廉;制备出的免疫磁珠稳定性好,分离效率高,价格低。本发明利用上述原理经磁珠类型及活化剂的选择、抗体-磁珠偶联和 IMB-菌体捕获等条件优化,建立了利用人 IgG 免疫磁珠对样品中的金黄色葡萄球菌进行富集的方法,较先前相关研究大大提高了检测灵敏度(由 100CFU/ml 提高到 2.6CFU/ml),与国标法 GB/T 4789.10-2010 相比,也显著地提高了检测下限,缩短了检测时间(由 55 小时缩减到 26.5 小时)。本发明用于富集金黄色葡萄球菌的人 IgG 免疫磁珠的制备方法操作简单,不需要大型仪器和特殊培训的专业人员,样品不需要特殊前处理,可广泛应用于食品、饲料、化妆品、环境和临床中金黄色葡萄球菌的分离与检测。

具体实施方式

[0027] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0028] 一、人 IgG 免疫磁珠的制备：

[0029] 1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂 EDC 和 NHS 各 200 μ L,混匀,于 24 $^{\circ}$ C 震荡孵育 30 分钟,进行磁珠活化；

[0030] 2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔 3 分钟,加入人 IgG,混匀,于 24 $^{\circ}$ C 震荡孵育 24h,制备成人 IgG 免疫磁珠；

[0031] 3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔 3 分钟,用封阻缓冲液于 24 $^{\circ}$ C 震荡孵育 1 ~ 2 小时,置于保存缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 保存待用；

[0032] 4. 按照国标法的样品前处理方法处理样品,取人 IgG 免疫磁珠加入样品中,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 1 小时,使得免疫磁珠与样品充分接触,于磁力架上对金黄色葡萄球菌富集。

[0033] 二、人 IgG 免疫磁珠对样品中金黄色葡萄球菌富集的应用：

[0034] 实施例 1

[0035] 以无菌吸管吸取 25mL 液体类食品样品至盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶中,充分混匀,制成 1:10 的样品匀液。将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37 $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0036] 实施例 2

[0037] 称取 25g 半固体类食品待测样品至 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000r/min ~ 10 000r/min 均质 1 ~ 2 分钟,制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上

清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0038] 实施例 3

[0039] 称取 25g 固体类食品待测样品至 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000r/min ~ 10 000r/min 均质 1 ~ 2 分钟,制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0040] 实施例 4

[0041] 以无菌吸管吸取 25mL 液体类饲料样品至盛有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌锥形瓶中,充分混匀,制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0042] 实施例 5

[0043] 称取 25g 半固体类饲料待测样品至 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000r/min ~ 10 000r/min 均质 1 ~ 2 分钟,制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0044] 实施例 6

[0045] 称取 25g 固体类饲料待测样品至 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,8 000r/min ~ 10 000r/min 均质 1 ~ 2 分钟,制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0046] 实施例 7

[0047] 将待检化妆品类样品制成 1:10 的样品匀液,将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0048] 实施例 8

[0049] 将待测公共场所空气样本加入至含有 225mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌袋中,制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0050] 实施例 9

[0051] 将公共场所用具(宾馆、理发、美容、游泳场、饭店等场所用具)用涂抹法取样,待测样品制成 1:10 的样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

[0052] 实施例 10

[0053] 将各种临床标本(门诊及住院患者血、痰、尿、咽拭子、切口分泌物、穿刺液、便及骨髓等)制成 1:10 待测样品匀液。将人 IgG 免疫磁珠加入经处理的样品中,充分混匀后于 37℃ 孵育 1 小时。置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,以无菌水适度稀释,倾注法于 7.5% 氯化钠营养琼脂平板 37℃ 培养 18 ~ 24 小时后计数。

专利名称(译)	一种用于富集金黄色葡萄球菌的人IgG免疫磁珠的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN102426229B	公开(公告)日	2014-03-05
申请号	CN201110288372.5	申请日	2011-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东海洋大学		
[标]发明人	孙力军 王雅玲 刘阳 徐德峰 聂芳红 刘唤明		
发明人	孙力军 王雅玲 刘阳 徐德峰 聂芳红 刘唤明		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569 G01N1/40		
代理人(译)	刘广生		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102426229A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于富集金黄色葡萄球菌的人IgG免疫磁珠的制备方法及应用，它是以磁珠为载体，人IgG为识别中间体，经过活化-偶联-洗涤-封阻的过程制备出人IgG免疫磁珠，在合适的缓冲液中于一定条件下孵育可以高效捕捉、富集检测样本中的金黄色葡萄球菌；该方法特异性强，高效快速，操作简单，价格低廉，不需要大型仪器和特殊培训的专业操作人员，样品不需要特殊前处理，可广泛应用于食品、饲料、化妆品、环境和临床中金黄色葡萄球菌的富集分离与检测。