



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103439495 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201310350228. 9

(22) 申请日 2013. 08. 13

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府
大道 999 号

(72) 发明人 赖卫华 山珊

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

单核增生李斯特氏菌富集和快速检测方法

(57) 摘要

本发明应用双功能纳米金磁微粒, 提供一种集成免疫磁珠捕获技术和免疫层析技术, 快速检测单核增生李斯特氏菌的检测方法。将免疫磁分离和免疫层析有机整合, 免去了将单核增生李斯特氏菌从免疫磁珠中洗脱下来的步骤, 提高了捕获效率; 免去了将胶体金喷在结合垫上的步骤, 免疫学反应更加均一, 定量检测时变异系数小; 减少了工作量和杂菌污染概率。该检测方法基本思路是探索纳米金磁微粒和抗体有效结合的方式, 优化其富集单核增生李斯特氏菌的条件, 以免疫层析技术为载体, 以双抗夹心为检测原理, 进行快速定量检测。

1. 单核增生李斯特氏菌富集和快速检测方法,其特征在于包括以下步骤:1)制备偶联单抗的金磁微粒;取抗单核增生李斯特氏菌单抗与纳米金磁微粒混合;在温度 37℃时,放在转速为 10-15rpm 的旋转仪上,偶联时间 30~60min,磁分离 3~5min,弃上清;用清洗缓冲液清洗 3 遍之后,用 1mL 封闭剂与磁珠混合封闭 1h;2)使用偶联单抗的金磁微粒捕获菌:培养单核增生李斯特氏菌,将菌液浓度调整为 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL,各取 1 mL 备用;取待测样品溶液 1 mL、各浓度菌液 1 mL,分别与步骤 1)所得偶联单抗的金磁微粒 100~150 μ g,温度 37℃,转速 10-15rpm 混合孵育 30~60min,;孵育后磁分离 3~5min 后,弃上清,用 PBS 缓冲液清洗后,复溶于 PBS 中;3)制作免疫层析试纸条;将单核增生李斯特氏菌兔多抗和兔抗鼠二抗喷到硝酸纤维膜上分别作为检测线 T 线和质控线 C 线,浓度均为 1.0~2.0mg/mL,喷量均为 0.5~1.0 μ L/cm,37℃真空干燥过夜,将样本垫、硝酸纤维膜、吸水纸、滤纸依次粘贴在 PVC 底板上,贴好后将其切成 4mm 宽的条子,装卡;将制备好的试纸条置于锡箔袋中加干燥剂密封,置于干燥缸保存备用;4)利用双抗夹心法对样品进行测定;将捕获到菌的金磁微粒稀释到浓度 50 ~150 μ g /mL,取 100 μ L 滴加到试纸条加样孔中,10min 后用免疫层析分析仪读取,记录 T 线吸光度、C 线吸光度和 T/C 的值;5)定性分析:用肉眼观察结果进行定性分析,T 线显色则说明样品中有单核增生李斯特氏菌,T 线不显色则说明样品中没有单核增生李斯特氏菌或是含有单核增生李斯特氏菌的量低于最低检测下限 10^4 CFU/mL;6)定量分析:使用免疫层析分析仪测量 T 线、C 线的吸光度,T 线和 C 线的吸光度的比值记为 T/C 值,以不同菌的浓度为横坐标,T/C 值为纵坐标绘制标准曲线;参考所做的标准曲线图,确定普通样品中的单核增生李斯特氏菌数量。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述步骤 1) 纳米金磁微粒粒径为 50nm;步骤 1) 抗单核增生李斯特氏菌单抗的量 200~300 μ g 对应 50nm 的纳米金磁微粒的量为 0.5~1.0mg。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:步骤 3)所述免疫层析试纸条是在粘性底板上依次粘贴样本垫、硝酸纤维膜、吸水纸、滤纸组成,没有结合垫。

单核增生李斯特氏菌富集和快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物检测领域,具体采用双功能纳米金磁微粒集成免疫磁珠捕获技术和免疫层析快速检测单核增生李斯特氏菌。

技术背景

[0002] 单核细胞增生李斯特氏菌简称单增李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM), 是李斯特菌属中最重要的食源性病原菌。肉、蛋、海产品、乳制品、蔬菜等食品均是 LM 的主要污染源,人被 LM 感染后死亡率可达 30%,在新生婴幼儿和免疫力低下的人群中死亡率则高达 70%。该菌在 4℃ 冰箱保存的食物中仍能生长繁殖,使其成为冷藏食品中主要的病原菌之一。按照我国国标法规定的检测方法,完成 LM 初筛过程需 72~96h。如此长的检测周期给企业、国家相关部门对日常产品质量监测及 LM 中毒事件进行快速反馈带来了一定困难。

[0003] 免疫学检测是实现 LM 快速筛查的有效手段之一。比较经典的流程包括前期增菌、免疫磁珠高效富集及胶体金免疫层析试纸条或 ELISA 检测等步骤。其中提高免疫磁珠富集效率对缩短 LM 检出时间具有较大的贡献。免疫磁分离是基于抗原、抗体免疫学反应,利用超顺磁粒子在磁场存在时能迅速磁化并聚集、磁场消失后可重新分散于溶液的特性的一种磁分离方法。一些研究把免疫磁捕获和实时荧光 PCR 技术结合起来,检测食品中的单核增生李斯特氏菌。PCR 方法和生物传感器方法都具有较高的检测灵敏度,一般可将检测时间减少至 24-48 小时(依据不同检测项目而言),但是该方法要求具有较高素质的操作人员、较好的检测仪器以及检测条件,因此较难在基层以及企业大面积推广使用,同时检测时间仍很难满足企业对出厂前产品质量安全进行快速反应的实际需求,且该方法无法分辨死/活致病菌以及 DNA 片段的同源性,易造成假阳性偏高的结果;而在检测很多食品基质时,又会因为一些物质的存在而抑制了 DNA 聚合酶的活性,从而造成假阴性。免疫学尤其是免疫层析方法,不需复杂仪器设备,检测时间快(一般 15 min 即可获得结果),易操作,但目前该类方法总体检测灵敏度偏低(需要细菌浓度需达到 10^{5-6} CFU/mL),因此针对食品样品检测,往往需要较长的增菌时间。目前单核增生李斯特氏菌免疫学方法,采用胶体金免疫层析技术检测,从增菌到检测需要至少 24 小时才能实现 25 g 样品中单菌的检测。

[0004] 由于微生物的生长具有其特定的生理周期,通过优化培养条件缩短时间效果不明显;因此多采用免疫磁珠分离技术富集。依赖于特异性抗体的免疫磁珠分离技术可有效地提高待测微生物的检测灵敏度,已逐渐成为食源性致病菌特异性分离和浓缩的最有效手段之一,并广泛应用于单核增生李斯特氏菌等食源性致病菌的富集,大大缩短了食源性致病菌整体检测时间。

[0005] 以膜为固相载体的胶体金免疫层析法是 20 世纪 80 年代在单克隆抗体技术、胶体金免疫技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型检测方法。由于其快速、便捷、不需特殊设备、结果判断直观、可以现场进行检测的特点,近年来越来越受到人们的重视,其技术发展迅速,在的检测领域得到了广泛应用。但是对于某些抗原或抗体含量极低的样本,标记

物的颜色很淡几乎用肉眼难以判断结果,虽然目前市场上有针对胶体金等标记的免疫层析试纸条判读的仪器,但是这种仪器仅能对在固相载体表面的标记物颜色检测,而对固相载体内部的标记物很难检测到,因此检测的灵敏度受到很大限制。同时检测的生物样本中可能含有颜色物质会严重影响检测的结果和灵敏度。

发明内容

[0006] 本发明目的在于提供一种快速、灵敏、简便的单核增生李斯特氏菌定性、定量检测技术。

[0007] 本发明具体方案如下:

单核增生李斯特氏菌富集和快速检测方法,包括以下步骤:1) 制备偶联单抗的金磁微粒;取抗单核增生李斯特氏菌单抗与纳米金磁微粒混合;在温度 37℃ 时,放在转速为 10-15rpm 的旋转仪上,偶联时间 30~60min,磁分离 3~5min,弃上清;用清洗缓冲液清洗 3 遍之后,用 1mL 封闭剂与磁珠混合封闭 1h;2) 使用偶联单抗的金磁微粒捕获菌:培养单核增生李斯特氏菌,将菌液浓度调整为 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL,各取 1 mL 备用;取待测样品溶液 1 mL、各浓度菌液 1 mL,分别与步骤 1) 所得偶联单抗的金磁微粒 100~150 μ g,温度 37℃,转速 10-15rpm 混合孵育 30~60min,;孵育后磁分离 3~5min 后,弃上清,用 PBS 缓冲液清洗后,复溶于 PBS 中;3) 制作免疫层析试纸条;将单核增生李斯特氏菌兔多抗和兔抗鼠二抗喷到硝酸纤维膜上分别作为检测线 T 线和质控线 C 线,浓度均为 1.0~2.0mg/mL,喷量均为 0.5~1.0 μ L/cm,37℃ 真空干燥过夜,将样本垫、硝酸纤维膜、吸水纸、滤纸依次粘贴在 PVC 底板上,贴好后将其切成 4mm 宽的条子,装卡;将制备好的试纸条置于锡箔袋中加干燥剂密封,置于干燥缸保存备用;4) 利用双抗夹心法对样品进行测定;将捕获到菌的金磁微粒稀释到浓度 50~150 μ g/mL,取 100 μ L 滴加到试纸条加样孔中,10min 后用免疫层析分析仪读取,记录 T 线吸光度、C 线吸光度和 T/C 的值;5) 定性分析:用肉眼观察结果进行定性分析,T 线显色则说明样品中有单核增生李斯特氏菌,T 线不显色则说明样品中没有单核增生李斯特氏菌或是含有单核增生李斯特氏菌的量低于 10^4 CFU/mL;6) 定量分析:使用免疫层析分析仪测量 T 线、C 线的吸光度,T 线和 C 线的吸光度的比值记为 T/C 值,以不同菌的浓度为横坐标,T/C 值为纵坐标绘制标准曲线;参考所做的标准曲线图,确定普通样品中的单核增生李斯特氏菌数量。

[0008] 步骤 1) 纳米金磁微粒粒径为 50nm;步骤 1) 抗单核增生李斯特氏菌单抗的量 200~300 μ g 对应 50nm 的纳米金磁微粒的量为 0.5~1.0mg。

[0009] 步骤 3) 所述免疫层析试纸条是在粘性底板上依次粘贴样本垫、硝酸纤维膜、吸水纸、滤纸组成,没有结合垫。

[0010] 使用单核增生李斯特氏菌胶体金试纸条,同时使用免疫层析分析仪定量检测的方法,其特征在于:配制已知系列浓度的单核增生李斯特氏菌溶液,用免疫层析分析仪测出其对应的光密度的数值,根据这一系列数值与对应浓度建立标准曲线,然后将检测样品的试纸条放入免疫层析分析仪中,根据免疫层析分析仪输出的数值,查标准曲线图即可得出样本中单核增生李斯特氏菌的含量。

[0011] 本发明有以下优点:

1) 本发明采用的纳米金磁微粒,兼有磁性纳米粒子的超顺磁性以及胶体金表面高效偶

联抗体的性能。由于纳米金磁微粒可以借助其表面的静电作用、疏水作用及 Au-SH 作用等非共价键作用,物理性的吸附抗体等蛋白质,偶联率高,偶联效果稳定、而且在偶联过程中能够保证抗体的活性不受影响。

[0012] 2) 本发明将免疫磁分离和免疫层析有机整合,免去了将单核增生李斯特氏菌从免疫磁珠中洗脱下来的步骤,提高了捕获效率;免去了将胶体金喷在结合垫上的步骤,免疫学反应更加均一,定量检测时变异系数小;减少了工作量和杂菌污染概率。

[0013] 3) 能同时对目标物单核增生李斯特氏菌进行定性定量检测。

附图说明

[0014] 图 1 是纳米金磁微粒偶联抗体的结构图

图 2 是纳米金磁微粒免疫磁分离单核增生李斯特氏菌的流程图

图 3 是使用免疫层析试纸条检测阴性样本的示意图

图 4 是使用免疫层析试纸条检测阳性样本的示意图。

具体实施方式

[0015] 本发明利用纳米金磁微粒的磁学性质、特征颜色和易于偶联抗体的特性,将纳米金磁微粒标记抗单核增生李斯特氏菌抗体,用然后将此标记物加入到样品中,同时,将单核增生李斯特氏菌兔多抗包被在硝酸纤维膜上形成检测线,兔抗鼠二抗包被在硝酸纤维膜上作为质控线,再将处理过的样品垫、硝酸纤维膜、吸水纸和滤纸依次粘贴在支撑板上,利用双抗体夹心法检测样品中是否含有单核增生李斯特氏菌和定量检测单核增生李斯特氏菌。当待测样品中含有一定浓度的单核增生李斯特氏菌时,单核增生李斯特氏菌先与金磁微粒标记抗体结合,将其滴加在试纸条加样孔中,由于层析作用反应形成抗原(单核增生李斯特氏菌)—抗体—纳米金磁微粒抗体复合物而富集在检测带上,多余的纳米金磁微粒标记物继续移动到控制带位置,由于二抗与纳米金磁微粒标记的抗体发生免疫反应,又富集在控制带上,1~10 分钟后,取出试纸条,用肉眼在检测带和质控带上观察结果,也可以通过免疫层析分析仪进行结果的定量判读。如果质控线处都没有颜色或者没有明显信号,说明试纸条有质量问题,测试无效。

[0016] 以下结合本发明的技术方案提供实施例。以下实施例对本发明的方案以具体实验操作的形式示例,其中的实验条件和设定参数不应视为对本发明基本技术方案的局限。并且本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0017] 纳米金磁颗粒购于西安金磁纳米生物技术有限公司,纳米金磁微粒粒径为 50nm。

[0018] SkanFlexi 免疫层析分析仪购于常州思康立生物科技有限公司。

[0019] 偶联缓冲液配制方法如下:将 3mL 浓度为 19.07g/mL 的硼砂与 7mL 浓度为 12.37g/mL 的硼酸混合后,稀释 10 倍。

[0020] 清洗缓冲液配制方法如下:称取 0.43gMES 溶于 200mL 的无菌蒸馏水中,调 pH 为 5.5~6.0。

[0021] 封闭剂配制方法如下:取 50mg 脱脂奶粉加入 1mLPBS 溶液配成封闭剂。

[0022] 实施例一:使用纳米金磁微粒对牛奶中单核增生李斯特氏菌的检测

1. 制备偶联单抗的金磁微粒:

1.1 纳米金磁微粒的处理:取 200~400 μL 的偶联缓冲液于 2mL 离心管中,取 0.5~1.0mg 的 50nm 纳米金磁微粒与之混合,磁分离 3~5min 后,弃上清。

[0023] 1.2 偶联反应:取制备好的抗单核增生李斯特氏菌单抗 200~300 μg ,与 50nm 的纳米金磁微粒 0.5~1.0mg 混合,置于 1mL 偶联缓冲液中。在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 时,放在转速为 10~15rpm 的旋转仪上,偶联时间 30~60min,磁分离 3~5min 弃上清。用 1mL 清洗缓冲液清洗 3 遍。

[0024] 1.3 封闭:清洗后,用封闭剂 1mL 与磁珠混合封闭 1h。

[0025] 2. 使用偶联单抗的纳米金磁微粒捕获牛奶中的单核增生李斯特氏菌

取 25mL 的灭菌后牛奶加入到 225mL 培养基中,接种一定浓度的单核增生李斯特氏菌,温度在 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,时间为 8~18h 震荡培养。将菌液浓度调整为 10⁷CFU/mL、10⁶ CFU/mL、10⁵CFU/mL、10⁴CFU/mL。

[0026] 取 1mL 各个浓度的菌液、取 1mL 待测牛奶样品,加封闭后的免疫纳米金磁微粒 100~150 μg ,混合孵育 30~60min,温度 37 $^{\circ}\text{C}$,转速 10~15rpm。孵育后磁分离 3~5min 后,弃上清,用 PBS 清洗后,复溶于 PBS 中。

[0027] 3. 制作单核增生李斯特氏菌免疫层析试纸条

将单核增生李斯特氏菌兔多抗和兔抗鼠二抗喷到硝酸纤维膜上分别作为检测线和质控线,浓度均为 1.0~2.0mg/mL,喷量均为 0.5~1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥过夜,将样本垫、硝酸纤维膜、吸水纸依次粘贴在 PVC 底板上,贴好后将其切成 4mm 宽的条子,装卡。将制备好的试纸条置于锡箔袋中加干燥剂密封,置于干燥缸保存备用。

[0028] 4. 利用双抗夹心法对样品进行目测和使用仪器测定结果

将捕获到菌的金磁微粒稀释到浓度 50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,取 100 μL 滴加到试纸条加样孔中,10min 后用免疫层析分析仪读取,记录 T 线吸光度、C 线吸光度和 T/C 的值,以不同菌的浓度为横坐标,分别以 T 线吸光度、T/C 值为纵坐标绘制标准曲线。用肉眼观察结果进行定性分析,T 线显色则说明样品中有单核增生李斯特氏菌,T 线不显色则说明样品中没有单核增生李斯特氏菌或是含有单核增生李斯特氏菌的量低于 10⁴CFU/mL。

[0029] 参考所做的标准曲线图,确定样品中单核增生李斯特氏菌的数量。定量检验菌浓度的范围在 10⁴~10⁷CFU/mL。

[0030] 实施例二:使用纳米金磁微粒对牛肉中单核增生李斯特氏菌的检测

1. 制备偶联单抗的金磁微粒:

1.1 纳米金磁微粒的处理:取 200~400 μL 的偶联缓冲液于 2mL 离心管中,取 0.5~1.0mg 的 50nm 纳米金磁微粒与之混合,磁分离 3~5min 后,弃上清。

[0031] 1.2 偶联反应:取制备好的抗单核增生李斯特氏菌单抗 200~300 μg ,与 50nm 的纳米金磁微粒 0.5~1.0mg 混合,置于 1mL 偶联缓冲液中。在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 时,放在转速为 10~15rpm 的旋转仪上,偶联时间 30~60min,磁分离 3~5min 弃上清。用清洗缓冲液清洗 3 遍。

[0032] 1.3 封闭:清洗后,用封闭剂 1mL 与磁珠混合封闭 1h。

[0033] 2. 使用偶联单抗的纳米金磁微粒捕获牛奶中的单核增生李斯特氏菌

取 25mg 的牛肉肉糜加入到 225mL 培养基中,混匀。接种一定浓度的单核增生李斯特氏菌,温度在 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,时间为 8~18h 震荡培养。

[0034] 将菌液浓度调整为 10⁷CFU/mL、10⁶ CFU/mL、10⁵CFU/mL、10⁴CFU/mL。

[0035] 取 1mL 各个浓度的菌液、取 1mL 待测肉糜样品溶液,加封闭后的免疫纳米金磁微粒

100~150 μ g, 混合孵育 30~60min, 温度 37 $^{\circ}$ C, 转速 10~15rpm。孵育后磁分离 3~5min 后, 弃上清, 用 PBS 清洗后, 复溶于 PBS 中。

[0036] 3. 制作单核增生李斯特氏菌免疫层析试纸条

将单核增生李斯特氏菌兔多抗和兔抗鼠二抗喷到硝酸纤维膜上分别作为检测线和质控线, 浓度均为 1.0~2.0mg/mL, 喷量均为 0.5~1.0 μ L/cm, 37 $^{\circ}$ C 真空干燥过夜, 将样本垫、硝酸纤维膜、吸水纸依次粘贴在 PVC 底板上, 贴好后将其切成 4mm 宽的条子, 装卡。将制备好的试纸条置于锡箔袋中加干燥剂密封。

[0037] 4. 利用双抗夹心法对样品进行目测和使用仪器测定结果

将捕获到菌的纳米金磁微粒稀释到浓度 50~150 μ g/mL, 取 100 μ L 滴加到试纸条加样孔中, 10min 用免疫层析分析仪读取, 记录 T 线吸光度、C 线吸光度和 T/C 的值, 以不同菌的浓度为横坐标, 分别以 T 线吸光度、T/C 值为纵坐标绘制标准曲线。同时用肉眼观察结果进行定性分析, T 线若有颜色则说明样品中有菌, 检测限约为 10⁴CFU/mL., T 线不显色则说明样品中没有单核增生李斯特氏菌或是含有单核增生李斯特氏菌的量低于 10⁴CFU/mL。

[0038] 参考所做的标准曲线图, 确定样品中单核增生李斯特氏菌的数量。定量检验菌浓度的范围在 10⁴~10⁷CFU/mL。

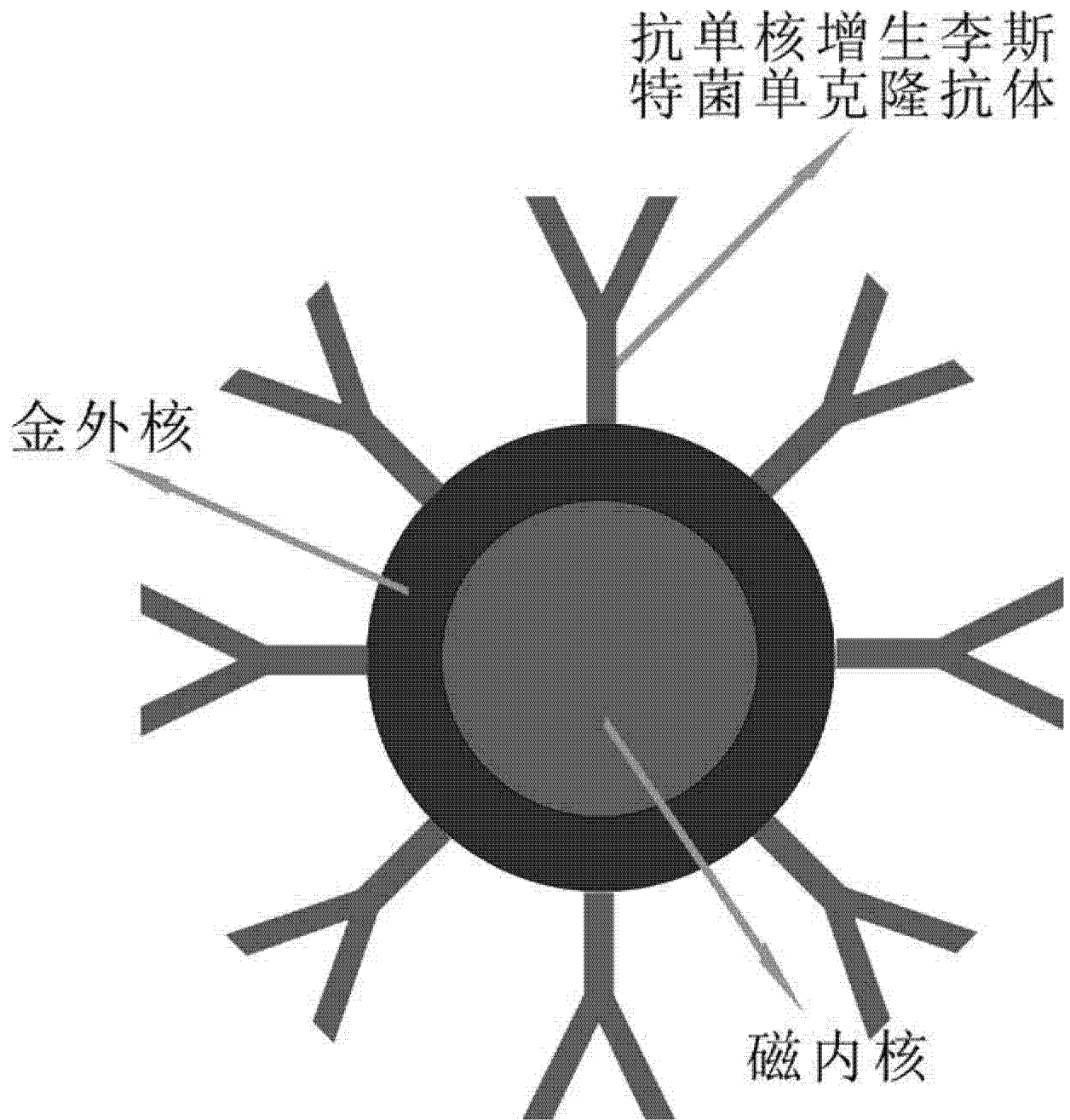


图 1

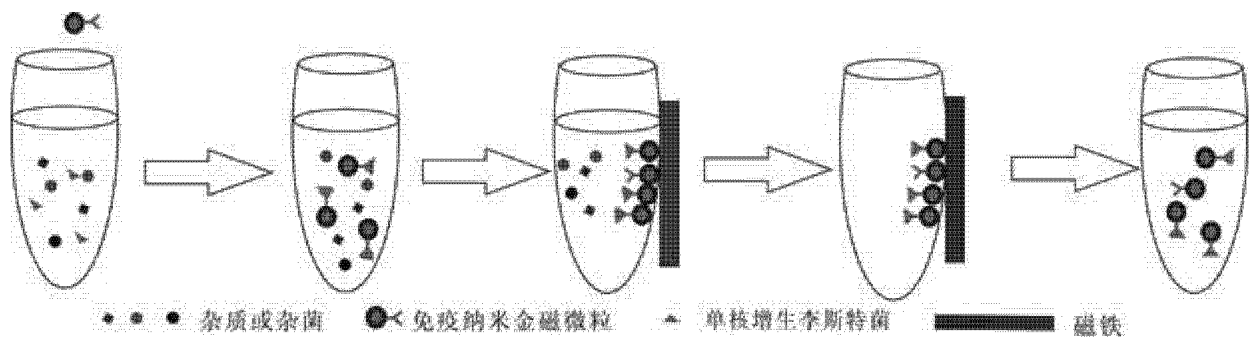


图 2

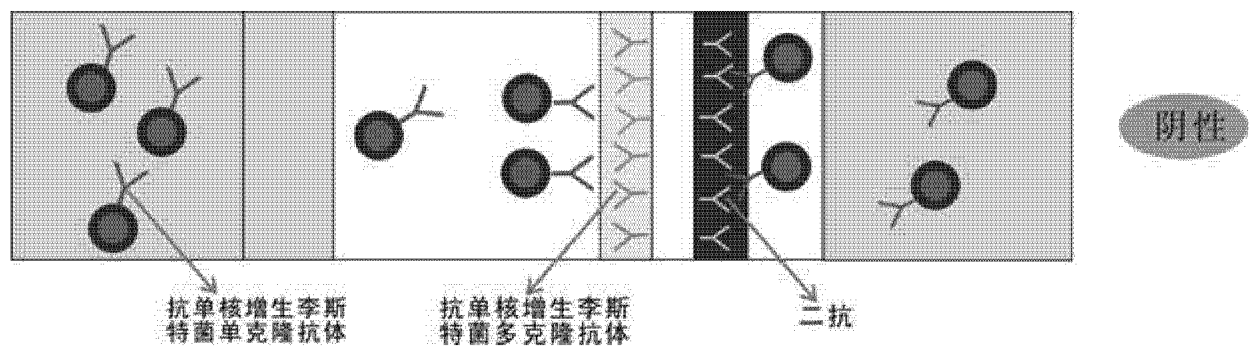


图 3

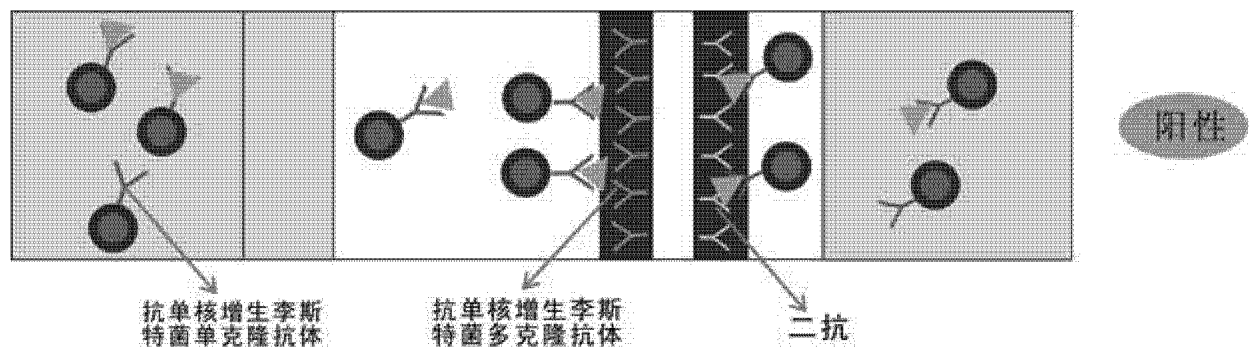


图 4

专利名称(译)	单核增生李斯特氏菌富集和快速检测方法		
公开(公告)号	CN103439495A	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	CN201310350228.9	申请日	2013-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	赖卫华 山珊		
发明人	赖卫华 山珊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
其他公开文献	CN103439495B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明应用双功能纳米金磁微粒，提供一种集成免疫磁珠捕获技术和免疫层析技术，快速检测单核增生李斯特氏菌的检测方法。将免疫磁分离和免疫层析有机整合，免去了将单核增生李斯特氏菌从免疫磁珠中洗脱下来的步骤，提高了捕获效率；免去了将胶体金喷在结合垫上的步骤，免疫学反应更加均一，定量检测时变异系数小；减少了工作量和杂菌污染概率。该检测方法基本思路是探索纳米金磁微粒和抗体有效结合的方式，优化其富集单核增生李斯特氏菌的条件，以免疫层析技术为载体，以双抗夹心为检测原理，进行快速定量检测。

