

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910037189.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101482563A

[22] 申请日 2009.2.13

[21] 申请号 200910037189.0

[71] 申请人 广东省微生物研究所

地址 510070 广东省广州市先烈中路100号

[72] 发明人 吴清平 周艳红 徐晓可 张菊梅

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司

代理人 莫瑶江 万志香

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

一种富集阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种富集阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法，该试剂包括包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠。该试剂可以直接从样品中或前增菌培养液中富集目标微生物，起到浓缩作用，解决了样品前处理的瓶颈问题，提高了检测灵敏度和检出率。

1. 一种富集阪崎肠杆菌的试剂，其特征是，包括包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠。

2. 根据权利要求1所述的富集阪崎肠杆菌的试剂，其特征是，包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠是由90—110 μ l的效价为1:49000—51000的含阪崎肠杆菌多克隆抗体的兔免疫血清包被于浓度为10mg/ml的17—23 μ l Sheep anti-Rabbit IgG免疫磁珠中制备的。

3. 一种制备权利要求1所述的富集阪崎肠杆菌的试剂的方法，包括以下步骤：

(1) 取浓度为10mg/ml的17—23 μ l Sheep anti-Rabbit IgG免疫磁珠于1.0ml洗涤缓冲液中，混匀，置于磁力架上 4 ± 2 min，弃液体；重复洗涤2—5次后，加20 μ l洗涤缓冲液使磁珠重悬其中，得磁珠重悬液；

(2) 在步骤(1)所述的磁珠重悬液中加入90—110 μ l的效价为1:49000—51000的含有阪崎肠杆菌多克隆抗体的兔免疫血清，室温混匀；用洗涤缓冲液洗涤，再以洗涤缓冲液定容至20 μ l，即得所述包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠。

4. 根据权利要求3所述的制备方法，其特征是，步骤(1)中所述Sheep anti-Rabbit IgG免疫磁珠的量为20 μ l；步骤(2)中所述含有阪崎肠杆菌多克隆抗体的兔免疫血清量为100 μ l。

一种富集阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法

技术领域

本发明属于食品微生物安全监测领域，具体地是涉及一种富集阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法。

背景技术

阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是奶粉中近几年引起广泛关注的一种致病菌。阪崎肠杆菌原称黄色阴沟肠杆菌，直到 1980 年才被认为是一个新的菌种，并以日本微生物学家——Riichi Sakazakii 的名字命名，即阪崎肠杆菌。2008 年，食品卫生法典委员会同意考虑创建一个新属 *Cronobacter*，*Cronobacter* 包括阪崎肠杆菌和相关种。阪崎肠杆菌是人和动物肠道内寄生的一种革兰氏阴性致病菌，其周生鞭毛、能运动、无芽孢和兼性厌氧。

阪崎肠杆菌在自然界的污染源仍然不清楚 (Friedemann 等, 2007; Lin 等, 2007)，在多次暴发事件中发现，阪崎肠杆菌的感染与婴幼儿配方奶粉密切相关 (Iversen 等, 2004)。从大多数病例看，婴幼儿 (主要是 1 岁以下) 特别是出生 28 天以内、早产儿、低体重儿或免疫缺陷的婴幼儿更容易被阪崎肠杆菌感染，虽然有抗生素的治疗，但总体死亡率高达 80%。不仅如此，阪崎肠杆菌也能引起成人的骨髓炎、菌血症和恶性肿瘤。2002 年国际食品微生物标准化委员会 (ICMSF) 把阪崎肠杆菌列为“严重危害特定人群，危害生命或慢性实质性后遗症或长期影响”的一种致病菌。FAO/WHO 把阪崎肠杆菌列为婴儿配方奶粉中的 A 类致病菌。

自从阪崎肠杆菌造成的危害得到频频报道后，食品中特别是婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的检测就显得非常重要。目前大部分实验室都参考美国食品及药品管理局 (FDA) 于 2002 年制定的阪崎肠杆菌分离和计数方法，这是国际上颁布的第一个官方方法。2006 年，ISO 和

国际乳品联盟（IDF）联合公布了“乳和乳制品中阪崎肠杆菌的检测”方法即 ISO / TS 22964 1 IDF / RM210。近年来国内外还发展了针对阪崎肠杆菌的分子生物学检测方法（李兆辉等，2006；Hassan et al, 2007）。由于阪崎肠杆菌在奶粉中的污染水平很低（0.36-66 CFU/100g），而且奶粉不是无菌产品，可能会存在各种杂菌的污染，从而在检测阪崎肠杆菌时候会有其他菌的干扰或者竞争，影响检出率。因此，迫切需要建立新的样品前处理方法，用于富集奶粉中的阪崎肠杆菌，提高检出率。

免疫磁珠是由直径 3~5 微米，有一定磁性，且分散度良好的微珠经不同单克隆抗体包被而成的颗粒，而免疫磁珠分离方法（immuno magnetic separation, IMS）是于 70 年代中期发展起来的一项免疫学技术。IMS 用于食源性致病菌检测领域的原理是：用特异性抗体包被在磁珠表面来捕获检样（或增菌液）中的目标致病菌，然后在磁场的作用下被吸附沉淀，使目标致病菌与影响和干扰检测灵敏度的检样残渣和其他杂菌分离开，起到浓缩作用，从而提高检测的灵敏度和检出率。如在李斯特氏菌检测中，采用免疫磁珠技术的检出率显著高于标准培养法，后者检出率仅为前者的 36%。

IMS 方法操作简便，只在检测样品或者增菌液中加入免疫磁珠，室温振荡混匀一定的时间后，在磁场作用下反复用缓冲液洗涤即可，捕获目标菌的免疫磁珠不用与目标菌分离，直接进行后续实验。由于 IMS 方法具有许多优点：1、分离速度快，效率高、可重复性好；2、操作简单，不需要昂贵的仪器设备；3、不影响被分离细胞或其它生物材料的生物学性状和功能等，因此在微生物检测方面具有很大的优势。目前，用 IMS 检测食品中常见的沙门氏菌（Salehi et al, 2007）、单增李斯特菌（Uyttendaele et al, 2000；Yang et al, 2007）和大肠杆菌 O157（Jenkins et al, 2003；Lee J II et al, 2006）等已渐渐成熟，并且已得

到越来越多的应用。而且 IMS 也已成功用于从实际样品中检测志贺氏菌 (Islam et al, 1992)、副溶血性弧菌、蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、粪链球菌、白色念珠菌、空肠弯曲菌以及白色葡萄球菌, 但尚未有阪崎肠杆菌的免疫磁珠富集方法报道。

发明内容

本发明需要解决的技术问题是提供一种富集阪崎肠杆菌的试剂, 该试剂可以直接从样品中或前增菌培养液中富集目标微生物, 起到浓缩作用, 解决了样品前处理的瓶颈问题, 提高了检测灵敏度和检出率。

解决上述技术问题的技术方案如下:

一种富集阪崎肠杆菌的试剂, 包括包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠。优选地, 效价为 1: 49000-51000 的 90-110 μ l 含阪崎肠杆菌多克隆抗体的兔免疫血清包被于浓度为 10mg/ml 的 17-23 μ l 的 Sheep anti Rabbit IgG 免疫磁珠中制备得到。

本发明的另一需要解决的技术问题是提供上述富集阪崎肠杆菌的试剂的制备方法。

解决上述技术问题的技术方案如下:

一种制备上述富集阪崎肠杆菌的试剂的方法, 包括以下步骤:

(1) 取浓度为 10mg/ml 的 17-23 μ l Sheep anti-Rabbit IgG 免疫磁珠于 1.0 ml 洗涤缓冲液中, 混匀, 置于磁力架上 4 ± 2 min, 弃液体; 重复洗涤 2-5 次后, 加 20 μ l 洗涤缓冲液使磁珠重悬其中, 得磁珠重悬液;

(2) 在步骤 (1) 所述的磁珠重悬液中加入 90-110 μ l (效价为 1: 49000-51000) 含阪崎肠杆菌多克隆抗体的兔免疫血清, 室温混匀; 用洗涤缓冲液洗涤, 再以洗涤缓冲液定

容至 20 μ l 即得所述包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠。

优选地，步骤（1）中，Sheep anti Rabbit IgG 免疫磁珠的量为 20 μ l；步骤（2）中含有阪崎肠杆菌多克隆抗体的兔免疫血清量为 100 μ l。

本发明首次建立了阪崎肠杆菌免疫磁珠分离方法。首先，制备阪崎肠杆菌兔免疫血清，获得多克隆抗体；然后利用多克隆抗体包被免疫磁珠制备阪崎肠杆菌免疫磁珠；最后，对免疫磁珠的特异性和敏感性进行验证，建立起的高效的样本前处理技术——阪崎肠杆菌免疫磁珠富集方法，可与传统检测方法、分子检测方法和特异性生化显色检测方法等相结合对阪崎肠杆菌进行检测，能大大提高检测的灵敏度和检出率，具有更广泛的应用前景。本发明所述的试剂用于富集阪崎肠杆菌，分离简单、有效、省时和省力，为微生物快速检测样品前处理提供了新的途径。

附图说明：

图 1 为阪崎肠杆菌标准株纯菌验证富集阪崎肠杆菌免疫磁珠敏感性的示意图。

具体实施方式

实施例 1：制备富集阪崎肠杆菌的试剂

1、阪崎肠杆菌免疫血清的制备：

按常规方法制备含阪崎肠杆菌多克隆抗体的阪崎肠杆菌免疫血清。纯化的阪崎肠杆菌分别以 0.2%、0.3% 的甲醛灭活 12 h、24 h，在固定时间各取 1 ml 倾注 TSA 平板 37℃ 培养 24 h，观察菌的灭活情况。

取完全灭活的阪崎肠杆菌，调整浓度至 10^8 CFU/ml，取 0.1 ml 与等体积的福氏完全佐剂乳化均匀，皮下多点注射新西兰兔（为了保证成功率，以 3 只兔子同时做实验），每隔 2 周重复注射一次。最后一次免疫后一周（血清效价达 1: 50000）给兔子放血取血清，20℃ 保存备用。

免疫血清特异性的验证

分别取阪崎肠杆菌免疫血清未稀释、2 倍稀释及生理盐水各 20 μ l 置无菌平板不同区域。实验菌株划线接种 NA 平板，取单菌落加于各个区域，用无菌牙签不停混合，2 min 左右观察凝集现象。

取未稀释及 1: 2 稀释（稀释液：无菌生理盐水）的多克隆免疫血清 20 μ l，对下列实验室保存菌株做玻片凝集实验，每种菌设阳性对照（阪崎肠杆菌 ATCC 51329）和阴性对照（生理盐水），玻片凝集实验证明该血清对阪崎肠杆菌两个标准株（ATCC 51329 和 ATCC 29544）和 15 个实验室分离株产生强凝集反应；赫氏肠杆菌和阴沟肠杆菌的分离株产生弱凝集反应；大肠杆菌（ATCC 25922）、大肠杆菌 0157 : H7（NCTC 12900）、鼠伤寒沙门氏菌（CMCC 50115）和宋内氏志贺氏菌（CMCC 51592）没有凝集。结果如表 1。

表 1 阪崎肠杆菌免疫血清玻片凝集实验

菌株	来源	血清稀释度	
		未稀释	1:2
阪崎肠杆菌	ATCC 51329	++	++
阪崎肠杆菌	ATCC 29544	++	++
阪崎肠杆菌	分离株 (15 株)	++	++
阴沟肠杆菌	分离株	+	+
赫氏肠杆菌	分离株	+	+

大肠杆菌	ATCC 25922	-	-
伤寒沙门氏菌	CMCC 50115	-	-
大肠杆菌 0157 : H7	NCTC 12900	-	-
宋内氏志贺氏菌	CMCC 51592	-	-

*+, 强凝集; +, 弱凝集; -, 未凝集

2、富集阪崎肠杆菌的免疫磁珠的制备:

取 20 μ l Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG 磁珠液 (10mg/ml) 于 1.0 ml 洗涤缓冲液中, 混匀, 置于磁力架上 4 min, 弃液体; 重复洗涤 3 次后, 加 20 μ l 洗涤缓冲液使磁珠重悬其中。加入 100 μ l (效价 1: 50000) 阪崎肠杆菌兔免疫血清, 室温轻缓水平振荡 30 min; 用 1.0 ml 洗涤缓冲液清洗 3 次, 4 min/次, 以洗涤缓冲液定容至 20 μ l, 得到包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠, 即富集阪崎肠杆菌的免疫磁珠, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

富集阪崎肠杆菌免疫磁珠纯菌敏感性验证:

阪崎肠杆菌标准株 ATCC 51329 和 ATCC 29544 过夜培养, 按 10 倍梯度稀释, 取 10^0 - 10^5 CFU/ml 菌做阪崎肠杆菌免疫磁珠分离实验, 分别计数上清中的菌数。免疫磁珠捕获百分比计算 (%): (各稀释度菌数 - 上清中菌数) / 各稀释度菌数。独立样品 t 检验显示: 两标准株间无统计学意义上的显著差异 (t=0.100, sig=0.922>0.05)。分离实验后涂显色培养基, 免疫磁珠最低捕获限为 10 CFU/ml。结果如图 1。

其他杂菌对富集阪崎肠杆菌免疫磁珠敏感性的影响:

阪崎肠杆菌标准株 ATCC 51329 过夜培养, 按 10 倍梯度稀释, 取 10^1 - 10^6 CFU/ml 菌做竞争菌抑制实验, 竞争菌选择沙门氏菌和阴沟肠杆菌 (各 10^6 CFU/ml)。阪崎肠杆菌免疫磁珠吸附后定容至 100 μ l, 稀释或者不稀释, 涂显色培养基平板, 37 $^{\circ}$ C 培养后计数典型蓝绿色菌

落数。结果如表 2。由表 2 可见：在干扰菌沙门氏菌和阴沟肠杆菌存在条件下，阪崎肠杆菌吸附率下降，但最低吸附限仍为 10 CFU/ml，没有影响富集阪崎肠杆菌免疫磁珠的最低吸附限。

表 2 竞争菌对免疫磁珠吸附阪崎肠杆菌的影响

阪崎肠杆菌接种量 (CFU/ml)	阪崎肠杆菌吸附率	
	悬液菌数 (CFU/ml)	吸附率 (%)
3.5×10^8	1.34×10^6	38
3.5×10^6	1.73×10^5	49
3.5×10^4	2.8×10^4	80
3.5×10^3	2×10^3	57
3.5×10^2	200	57
3.5×10^1	20	57

实施例 2

1、奶粉样品增菌后采用免疫磁珠富集阪崎肠杆菌

采用实施例 1 所述的富集阪崎肠杆菌的试剂（阪崎肠杆菌免疫磁珠）富集奶粉样品增菌液后取 100 μ l，稀释或者不稀释，涂显色培养基平板，37℃培养后观察典型蓝绿色菌落。在显色培养基上，可见菌落清晰，分散，易于观察及分离纯化后鉴定。

2、富集阪崎肠杆菌免疫磁珠与显色培养基法联用检测奶粉中阪崎肠杆菌

对 37 份疑似阳性奶粉样品增菌后，利用所建立的免疫磁珠进行富集，取悬浮液涂布阪崎肠杆菌显色培养基平板，结果有 11 份样品为阳性，并经 API 20E 系统鉴定获得确证；而直接用显色培养基检测的阳性样品仅为 9 份。因此，应用免疫磁珠富集方法可以提高奶粉中阪崎肠杆菌的检出率，2 种检测方法的结果比较见表 3。

表 3 2 种检测方法结果比较

序列号	疑似阳性样品编号 ^a	免疫磁珠+	显色培养基
		显色培养基	
1	133	+	-
2	167	-	+
3	285	+	+
4	289	+	-
5	290	+	+
6	292	+	+
7	298	+	+
8	302	+	+
9	304	+	+
10	6	+	-
11	11	+	-
12	8	-	-
13	18		-
14	88	-	-
15	217	-	-
16	255	-	-
17	259	-	-
18	262		-
19	264	-	-
20	265	-	-
21	272	-	-
22	275		-
23	278	-	-
24	279	-	-
25	284	-	-
26	286	-	-
27	287		-
28	291	-	-

29	293	-	
30	296	-	-
31	297		-
32	299	-	
33	300	-	-
34	301	-	-
35	303	-	-
36	305		
37	327	-	-

* 婴幼儿奶粉样品号码;

^h+: 阳性结果; -: 阴性结果。

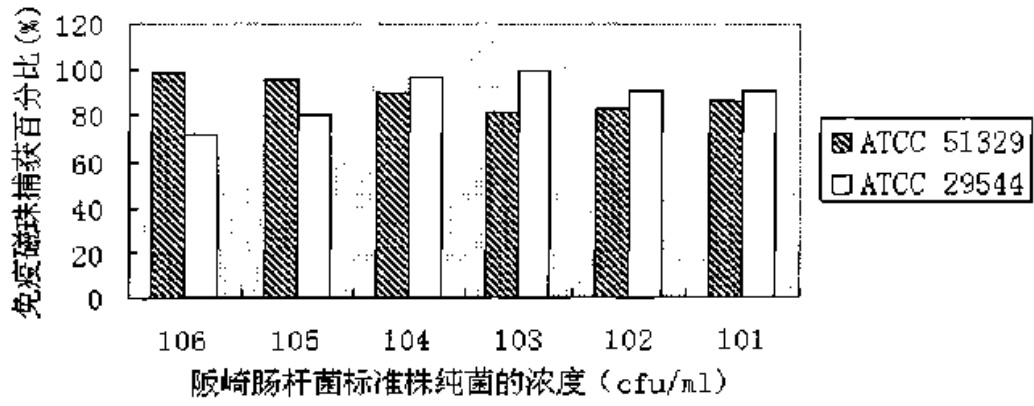


图1

专利名称(译)	一种富集阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN101482563A	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN200910037189.0	申请日	2009-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	广东省微生物研究所		
申请(专利权)人(译)	广东省微生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省微生物研究所		
[标]发明人	吴清平 周艳红 徐晓可 张菊梅		
发明人	吴清平 周艳红 徐晓可 张菊梅		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种富集阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法，该试剂包括包被有阪崎肠杆菌多克隆抗体的免疫磁珠。该试剂可以直接从样品中或前增菌培养液中富集目标微生物，起到浓缩作用，解决了样品前处理的瓶颈问题，提高了检测灵敏度和检出率。

菌株	来源	血清稀程度	
		未稀释	1:2
阪崎肠杆菌	ATCC 51329	++ ^a	++
阪崎肠杆菌	ATCC 29544	++	++
阪崎肠杆菌	分离株 (15 株)	++	++
阴沟肠杆菌	分离株	+	+
赫氏肠杆菌	分离株	+	+