

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/20 C12Q 1/02

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01133584. X

[43] 公开日 2002 年 4 月 3 日

[11] 公开号 CN 1342903A

[22] 申请日 2001. 10. 25 [21] 申请号 01133584. X

[71] 申请人 中国科学院武汉病毒研究所

地址 430071 湖北省武汉市武昌小洪山

[72] 发明人 汤显春

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 黄金矿藏勘探的微生物检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种黄金矿藏勘探的微生物检测方法,该方法先将蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)孢子免疫注射家兔 5 次,制成第一抗体;用第一抗体免疫注射雄性山羊 5 次,制成第二抗体;然后将第二抗体作为检测黄金矿物样品的主要指示物,检测矿物样品是否含有黄金及含金的品位。可在野外同时对多份矿物样品进行定性、定量及快速、方便地检测,对人畜无害,且不污染环境。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权利要求书

1、黄金矿藏勘探微生物检测方法，其特征在于，该方法先将蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）孢子免疫注射家兔 5 次，制成第一抗体；用第一抗体免疫注射雄性山羊 5 次，制成第二抗体；然后将第二抗体作为检测黄金矿物样品的主要指示物，检测矿物样品是否含有黄金及含金的品位；

上述方法按下列步骤顺序进行：

a、将蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）孢子在肉汤培养基中培养 96 小时，离心、去上清，用生理盐水洗沉淀，去上清，如此反复 2~3 次，沉淀的蜡状芽孢杆菌孢子用超声波破碎器处理，用生理盐水稀释成 40mg/ml，按 1：1 加福氏完全佐剂；

b、用上述物质免疫注射 3~5 斤的家兔，第一次用量 0.5 毫升/只，以后每隔三天注射，用量 1 毫升/只，5 次后，从兔耳静脉抽血，检测抗体效价为 1：320~640 时，取兔血，分离抗血清；

c、用 50%硫酸铵洗脱一次，取抗血清沉淀，加等量生理盐水，再加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，离心、去上清；

d、再用 40%硫酸铵洗，用 c 的同样方法，将提取的球蛋白洗脱二次；

e、加入 30 毫升盐水，再加入 20 毫升饱和硫酸铵至成 40%饱和

度，4°C 放置 30 分钟，离心、去上清，此过程重复一次；

f、将球蛋白装入处理过的透析袋中，放置盐水中透析，直到盐水用奈氏佐剂测不出 NH_4^+ 为止（第一抗体）；

g、从透析袋中取第一抗体按 1: 1 加入福氏完全佐剂免疫注射雄性山羊，第一次用量 1 毫升，每隔三天注射一次，每次用量 1.5 毫升/只，在第五次注射 48 小时后，从心脏取血检测抗体效价，当抗体效价为 1: 320~640 时，从山羊的颈动脉取血，4°C 无菌保存 8~12 小时，离心、去沉淀；

h、取 200 毫升上清液血清加等量生理盐水，再加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，离心，去上清，取羊血清球蛋白加生理盐水，再加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，离心、去上清，用 40%硫酸铵洗脱二次；

I、将提取的羊球蛋白加 30 毫升盐水，再加入 20 毫升饱和硫酸铵至成 40%饱和度，在 4°C 放置 30 分钟，离心、去上清，此过程重复一次；

j、将提取的羊球蛋白装入处理过的透析袋中，放置盐水中透析，使硫酸铵逐渐向膜处渗出，直到盐水用奈氏佐剂测不出 NH_4^+ 为止；

k、将透析过的羊球蛋白过柱层析，洗脱收集峰样；

l、将收集的羊球蛋白装在透析袋中，用蒸馏水透析 8~12 小时，取出透析袋，在袋外加 100%固体蔗糖，待蔗糖浸湿后去掉，再加 100%固体蔗糖，反复 4~10 次，即为纯化的羊球蛋白（第二抗体）；

m、用酶联免疫吸附法检测，用酶联检测仪在 492nm 波长测定

各反应孔的 OD 值，凡检测抗体 P/N 值小于 1.5 的为阴性，超过 1.5 的为阳性，如果检测结果是阳性的，证明样品含黄金，若前 n 个孔的结果为阳性，则黄金品位的数量级为 10^{-3+n} 克 Au/吨样品。

说明书

黄金矿藏勘探的微生物检测方法

技术领域：

本发明涉及用生物方法进行地质矿藏勘探，尤其涉及用生物方法进行金属矿藏的勘探，更具体涉及黄金矿藏勘探的微生物检测方法。

背景技术：

目前，黄金矿藏的勘探方法主要是从野外采集大量的岩石、土壤等标本，回实验室后，经过一系列的化学和物理方法处理，再进行检测分析。因采集的标本无法在野外现场进行处理、检测、判断，所以，带回实验室的标本中有不少是无效的，这大大地增加了地质勘探工作者的无效劳动，造成人力、物力和财力的浪费，且用化学方法进行处理将造成一定程度的环境污染。

发明内容：

本发明的目的是提供黄金矿藏勘探的微生物检测方法，该方法可在野外同时对多份矿物样品进行定性、定量及快速、方便地检测，对人畜无害，且不污染环境。

为了实现上述目的，本发明先将蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）孢子免疫注射家兔 5 次，制成第一抗体；用第一抗体免疫注射雄性山羊 5 次，制成第二抗体；然后将第二抗体作为检测黄金矿物样品

的主要指示物，检测矿物样品是否含有黄金及含金的品位。

黄金矿藏勘探微生物检测方法按下列步骤顺序进行：

a、将蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）孢子在肉汤培养基中培养 96 小时，离心、去上清，用生理盐水洗沉淀，去上清，如此反复 2~3 次，沉淀的蜡状芽孢杆菌孢子用超声波破碎器处理，用生理盐水稀释成 40mg/ml，按 1: 1 加福氏完全佐剂；

b、用上述物质免疫注射 3~5 斤的家兔，第一次用量 0.5 毫升/只，以后每隔三天注射，用量 1 毫升/只，5 次后，从兔耳静脉抽血，检测抗体效价为 1: 320~640 时，取兔血，分离抗血清；

c、用 50%硫酸铵洗脱一次，取抗血清沉淀，加等量生理盐水，再加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，离心、去上清；

d、再用 40%硫酸铵洗，用 c 的同样方法，将提取的球蛋白洗脱二次；

e、加入 30 毫升盐水，再加入 20 毫升饱和硫酸铵至成 40%饱和度，4°C 放置 30 分钟，离心、去上清，此过程重复一次；

f、将球蛋白装入处理过的透析袋中，放置盐水中透析，直到盐水用奈氏佐剂测不出 NH_4^+ 为止（第一抗体）；

g、从透析袋中取第一抗体按 1: 1 加入福氏完全佐剂免疫注射雄性山羊，第一次用量 1 毫升，每隔三天注射一次，每次用量 1.5 毫升/只，在第五次注射 48 小时后，从心脏取血检测抗体效价，当抗体效价为 1: 320~640 时，从山羊的颈动脉取血，4°C 无菌保存 8~12 小时，离心、去沉淀；

h、取 200 毫升上清液血清加等量生理盐水，再加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，离心，去上清，取羊血清球蛋白加生理盐水，再加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，离心、去上清，用 40%硫酸铵洗脱二次；

I、将提取的羊球蛋白加 30 毫升盐水，再加入 20 毫升饱和硫酸铵至成 40%饱和度，在 4°C 放置 30 分钟，离心、去上清，此过程重复一次；

j、将提取的羊球蛋白装入处理过的透析袋中，放置盐水中透析，使硫酸铵逐渐向膜处渗出，直到盐水用奈氏佐剂测不出 NH_4^+ 为止；

k、将透析过的羊球蛋白过柱层析，洗脱收集峰样；

l、将收集的羊球蛋白装在透析袋中，用蒸馏水透析 8~12 小时，取出透析袋，在袋外加 100%固体蔗糖，待蔗糖浸湿后去掉，再加 100%固体蔗糖，反复 4~10 次，即为纯化的羊球蛋白（第二抗体）；

m、用酶联免疫吸附法检测，用酶联检测仪在 492nm 波长测定各反应孔的 OD 值，凡检测抗体 P/N 值小于 1.5 的为阴性，超过 1.5 的为阳性，如果检测结果是阳性的，证明样品含黄金，若前 n 个孔的结果为阳性，则黄金品位的数量级为 10^{-3+n} 克 Au/吨样品。

与现有的矿物样品检测方法相比：本发明的方法具有安全，灵敏、准确、并可定性，定量，具有较高的实用价值。用本发明的方法检测 116 份样品，阳性反应有 107 份，1 份为灰色区，7 份为阴性，检测结果与物化方法的检测结果完全吻合。

具体实施方式：

首先将蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 孢子在肉汤 (LB) 培养基中, 30°C 培养 96 小时, 离心去上清。用生理盐水洗沉淀, 去上清, 如此反复 2~3 次, 沉淀的蜡状芽孢杆菌孢子用超声波破碎器处理, 用生理盐水稀释成 40mg/ml, 按 1: 1 加福氏完全佐剂, 注射大耳白家兔, 家兔重量 4 斤, 第一次免疫注射 0.5 毫升, 以后每隔三天注射, 每次 1 毫升, 免疫注射 5 次后, 从兔耳静脉抽血, 用双扩散实验检测抗体效价为 1: 640 时, 取兔血分离抗血清。然后用 50% 硫酸铵洗脱一次, 取 100 毫升抗血清沉淀, 加等量生理盐水, 再缓慢加入 200 毫升饱和的硫酸铵, 4°C 下放置 30 分钟, 每分钟 10000 转离心 10 分钟, 去上清。用上述同样方法, 将提取的球蛋白沉淀用 40%硫酸铵洗脱二次。将提取的球蛋白沉淀加 30 毫升盐水, 再边搅拌、缓慢加入 20 毫升饱和硫酸铵至成 40%饱和度, 4°C 放置 30 分钟, 每分钟 10000 转离心 10 分钟, 去上清; 此过程重复一次。提取的球蛋白沉淀装入处理过的透析袋中, 两端扎紧后放置盐水中透析。使硫酸铵逐渐向膜处渗出, 3 小时换盐水一次, 直到盐水用奈氏佐剂测不出 NH_4^+ 为止 (第一抗体)。从透析袋中取出球蛋白沉淀按 1: 1 的比例加福氏完全佐剂免疫雄性山羊, 雄性山羊体重在 14 公斤, 第一次注射 1 毫升, 每隔三天注射一次, 每次注射 1.5 毫升/只, 在第五次注射 48 小时, 从心脏取血检测抗体效价, 当抗体效价为 1: 640 时, 从山羊的颈动脉取血。4°C 无菌保存 10 小时, 4°C 下每分钟 2000 转离心 20 分钟, 去溶血沉淀。取 200 毫升上清液血清加等量生理盐水, 再缓慢加入 200 毫升饱和的硫酸铵, 4°C 下放置 30 分

钟，每分钟 10000 转离心 10 分钟，去上清，取羊血清球蛋白沉淀再加 200 毫升生理盐水，再缓慢加入 200 毫升饱和的硫酸铵，4°C 下放置 30 分钟，每分钟 10000 转离心 10 分钟，去上清，羊球蛋白沉淀用 40%硫酸铵洗脱二次。将提取的羊球蛋白沉淀加 30 毫升盐水，再边搅拌、缓慢加入 20 毫升饱和硫酸铵至成 40%饱和度，在 4°C 放置 30 分钟，每分钟 10000 转离心 10 分钟，去上清，此过程重复一次。提取的羊球蛋白沉淀装入处理过的透析袋中，两端扎紧后放置盐水中透析，使硫酸铵逐渐向膜处渗出，3 小时换盐水一次，直到盐水用奈氏佐剂测不出 NH_4^+ 为止（即为无色透明状）。然后将透析过的羊球蛋白过柱层析，将纤维素（DEAE—Celinlose DE₃₂）用 0.1NHCL 浸泡 30 分钟，用蒸馏水洗至中性；然后用 0.1NNaOH 浸泡 30 分钟，用蒸馏水洗至中性；如此轮流、反复 6 次，装柱。用 0.005MOL，pH8.0 的 PB 缓冲液以每分钟 20 滴速度不间断经柱床再从柱下口流出，直到柱内流出液体与下口瓶内 PB 缓冲液至 pH 完全一致可加羊球蛋白过柱。用毛吸管加入提纯过的羊球蛋白，量为柱床体积 8%。以每分钟 20 滴的流速开始洗脱收集峰样，将收集的羊球蛋白装在透析袋中，用蒸馏水透析 10 小时，取出透析袋，在袋外加 100%固体蔗糖，待蔗糖浸湿后去掉，再加 100%固体蔗糖，反复 6 次，即为纯化的羊球蛋白（第二抗体），保存在 -70°C 下。此第二抗体是本发明用于检测黄金矿物样品的主要指示物。

第二抗体用于检测黄金矿物样品的方法：以微量滴定板作为载体，每个样品用 8 个孔，用 pH9.6NaCO₃—NaHCO₃ 包被缓冲液将待

测蜡状芽孢杆菌孢子抗原倍比稀释，每个孔按倍比稀释加入 100 微升。阴性对照孔加生理盐水，4°C 孵育 10 小时。用 pH 值 7.4 的 PBST—20，反复洗涤 3 次，每次 3 分钟，沥干后加 1%BSA 封闭液 37°C 封闭 1 小时，再洗脱 3 次，用保温液（BSA 封闭液 0.1g；0.05%PBST—20，100ul）稀释的 1：100 第二抗体，每孔加入 0.1 毫升，37°C 保温 2 小时，反复洗涤 3 次。加入 1：20 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG0.1 毫升，室温下保存 4 小时，反复洗涤 3 次，再加入 0.1 毫升邻苯二胺，置暗处显色 30 分钟，在酶的催化作用下，样品颜色由蓝绿色变成黄色，表明该样品含黄金。每孔加入 2MOL 的 H₂SO₄ 终止液 50 微升，静置 5 分钟，用酶联检测仪在 492nm 波长测定各反应孔的 OD 值。检测抗体 P/N 值为 2.1，检测结果为阳性，证明该样品含黄金，前 4 个孔的结果为阳性，则表明黄金品位的数量级为 10 克 Au/吨样品。

专利名称(译)	黄金矿藏勘探的微生物检测方法		
公开(公告)号	CN1342903A	公开(公告)日	2002-04-03
申请号	CN01133584.X	申请日	2001-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院武汉病毒研究所		
[标]发明人	汤显春		
发明人	汤显春		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/06 G01N33/20 G01N33/53 G01N33/569		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN1140802C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种黄金矿藏勘探的微生物检测方法,该方法先将蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)孢子免疫注射家兔5次,制成第一抗体;用第一抗体免疫注射雄性山羊5次,制成第二抗体;然后将第二抗体作为检测黄金矿物样品的主要指示物,检测矿物样品是否含有黄金及含金的品位。可在野外同时对多份矿物样品进行定性、定量及快速、方便地检测,对人畜无害,且不污染环境。