



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105784984 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610116309.6

(22)申请日 2016.03.01

(71)申请人 南京财经大学

地址 210023 江苏省南京市鼓楼区铁路北
街128号

(72)发明人 鞠兴荣 都立辉 吴学友 袁建
何荣 陈正行

(74)专利代理机构 南京汇盛专利商标事务所
(普通合伙) 32238

代理人 袁静

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

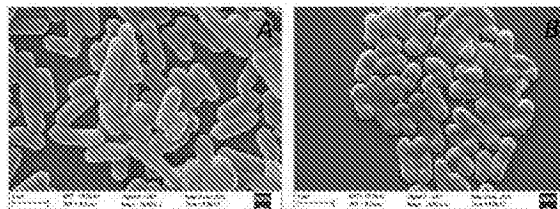
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

革兰氏阳性菌菌影的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明提供革兰氏阳性菌菌影的制备方法及其应用,属于微生物学和免疫学领域。所述菌影的制备方法,包括:在革兰氏阳性菌悬液中加入NaOH、SDS和CaCO₃,在30-40℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液A;在所述重悬液A中加入H₂O₂,在30-40℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液B;将重悬液B在20-30℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤,得到革兰氏阳性菌菌影。本发明利用简单化学试剂就可以快速、高效制备革兰氏阳性菌菌影,显著降低了生产成本。由于单增李斯特菌菌影保留了细菌结构的完整性,免疫后能够产生针对单增李斯特菌的抗体,从而筛选到能够高效、快速检测该细菌的抗体。



1. 革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1)在革兰氏阳性菌悬液中加入NaOH、SDS和CaCO₃,在30-40℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液A;

(2)在所述重悬液A中加入H₂O₂,在30-40℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液B;

(3)将重悬液B在20-30℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤,得到革兰氏阳性菌菌影。

2. 根据权利要求1所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于步骤(1)中革兰氏阳性菌悬液中加入的NaOH的终浓度为20-40mmol/L,加入的SDS的终浓度为0.1-0.3mmol/L,每升革兰氏阳性菌悬液中CaCO₃的加入量为9-11mmol;步骤(1)中,悬液孵育时在80-120r/min条件下振摇,孵育时间为40-60min。

3. 根据权利要求2所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于步骤(2)中所述重悬液A中加入的H₂O₂的最终质量百分浓度为0.02-0.05%;步骤(2)中,悬液孵育时在80-120r/min条件下振摇,孵育时间为20-40min。

4. 根据权利要求3所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于步骤(3)中,所述重悬液B孵育时在30-50r/min条件下振摇,孵育时间为20-40min。

5. 根据权利要求1-4之一所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于采用生理盐水进行洗涤。

6. 根据权利要求5所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于步骤(2)中重悬液B是将所述沉淀重悬于55-65%的乙醇水溶液中所得到。

7. 根据权利要求6所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于所述重悬液A是将所述沉淀重悬于水后所得。

8. 根据权利要求1-7之一所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于所述革兰氏阳性菌为单增李斯特菌。

9. 根据权利要求8所述革兰氏阳性菌菌影的制备方法,其特征在于所述革兰氏阳性菌悬液的OD₆₀₀为0.3~0.5。

10. 权利要求1-9之一方法制备的菌影在制备用于检测所述革兰氏阳性菌的抗体方面的应用。

革兰氏阳性菌菌影的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物学和免疫学领域,具体涉及革兰氏阳性菌菌影的制备方法。

背景技术

[0002] 细菌菌影(Bacterial Ghost)是一种没有细胞浆和核酸的空细菌体,它保留了细菌结构的完整性,保留了原菌体表面抗原决定簇,因此可以用于免疫动物后筛选针对该细菌的抗体,以开发能够高效、快速检测该细菌的抗体。目前,国内外在细菌菌影的研究方面,大多采用基于噬菌体 Φ X174裂解基因E的裂解系统的生物技术手段,而且针对的是革兰氏阴性细菌,如:大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、流感嗜血杆菌、胸膜肺炎放线杆菌、幽门螺旋杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、溶血巴氏杆菌、多杀巴氏杆菌、霍乱弧菌、绿脓杆菌、恶臭假单胞菌等。然而,该方法对于革兰氏阳性菌菌影的制备并不适用。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种利用简单化学试剂就可以快速、高效制备革兰氏阳性菌菌影的方法。

[0004] 革兰氏阳性菌菌影的制备方法,包括如下步骤:

[0005] (1)在革兰氏阳性菌悬液中加入NaOH、SDS和CaCO₃,在30-40℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液A;

[0006] (2)在所述重悬液A中加入H₂O₂,在30-40℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液B;

[0007] (3)将重悬液B在20-30℃条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤,得到革兰氏阳性菌菌影。

[0008] 优选的技术方案中,步骤(1)中革兰氏阳性菌悬液中加入的NaOH的终浓度为20-40mmol/L,加入的SDS的终浓度为0.1-0.3mmol/L,每升革兰氏阳性菌悬液中CaCO₃的加入量为9-11mmol;步骤(1)中,悬液孵育时在80-120r/min条件下振摇,孵育时间为40-60min。

[0009] 优选的技术方案中,,步骤(2)中所述重悬液A中加入的H₂O₂的最终质量浓度为0.02-0.05%;步骤(2)中,悬液孵育时在80-120r/min条件下振摇,孵育时间为20-40min。

[0010] 优选的技术方案中,步骤(3)中,所述重悬液B孵育时在30-50r/min条件下振摇,孵育时间为20-40min。

[0011] 优选的技术方案中,采用生理盐水进行洗涤。

[0012] 优选的技术方案中,步骤(2)中重悬液B是将所述沉淀重悬于55-65%的乙醇水溶液中所得到。

[0013] 优选的技术方案中,所述重悬液A是将所述沉淀重悬于水后所得。

[0014] 优选的技术方案中,所述革兰氏阳性菌为单增李斯特菌。

[0015] 优选的技术方案中,所述革兰氏阳性菌悬液的OD₆₀₀为0.3~0.5。

[0016] 本发明还提供上述方法制备的菌影在制备用于检测所述革兰氏阳性菌的抗体方

面的应用。

[0017] 本发明利用简单化学试剂就可以快速、高效制备革兰氏阳性菌菌影,显著降低了生产成本。单核细胞增生李斯特菌(缩写为单增李斯特菌,*Listeria monocytogenes*)是一种危险性严重的病原菌,可以导致严重的人畜共患传染病,如脑膜炎、败血症、流产和单核细胞增多等症状,由它引起的李斯特菌病致死率超过25%。由于单增李斯特菌菌影保留了细菌结构的完整性,尤其是保留了原菌体表面抗原决定簇,免疫后能够产生针对单增李斯特菌的抗体,从而筛选到能够高效、快速检测该细菌的抗体。

附图说明

[0018] 图1单增李斯特菌菌影的SEM观察结果,图A中观察对象为单增李斯特菌活细胞,图B中观察对象为单增李斯特菌菌影。

[0019] 图2单增李斯特菌菌影的TEM观察结果,图A中观察对象为单增李斯特菌活细胞,图B中观察对象为单增李斯特菌菌影。

[0020] 图3单增李斯特菌菌影免疫小鼠产生的抗体效价。

具体实施方式

[0021] 下面结合实施例对本发明做进一步说明,应该理解的是,这些实施例仅用于例证的目的,绝不限制本发明的保护范围。在该部分选取食源性革兰氏阳性菌单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)作为实施例进行具体说明。

[0022] 实施例1制备单增李斯特菌菌影

[0023] 1. 菌体培养与收集

[0024] 以1%(v/v)接种量将单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)CMCC54004(购自中国工业微生物菌种保藏中心)种子液接入经121℃高压蒸汽灭菌的BHI培养基(购自北京陆桥技术股份有限公司),于37℃、150r/min条件下过夜培养。将培养后的菌液于1500r/min条件下离心20min,弃去上清,用无菌生理盐水(0.9%NaCl,分析纯,试剂购自南京化学试剂有限公司)洗涤菌体沉淀。洗涤的具体方法:用无菌生理盐水重悬菌体,于1500r/min条件下离心20min,弃去上清。洗涤步骤重复3次。

[0025] 2. 菌影细胞制备

[0026] (1)取步骤1中洗涤后的菌体,用无菌水制备成OD₆₀₀为0.3~0.4的初始菌悬液,加入终浓度为27.500mmol/L的NaOH、终浓度为0.234mmol/L的SDS(十二烷基硫酸钠),每升初始菌悬液中加入10.490mmol的粉末状CaCO₃,在37℃摇床内、振摇状态下孵育50min,摇床转速为100r/min。然后于1500r/min条件下离心20min,弃去上清,收集沉淀,按照步骤1中方法采用无菌生理盐水洗涤3次,用无菌水重悬,得到重悬液A。重悬液A体积与初始菌悬液体积相等。NaOH、SDS分别以水溶液的形式添加至初始菌悬液中。NaOH水溶液的浓度为137.5mmol/L,SDS水溶液的浓度为1.170mmol/L。OD₆₀₀是指溶液在600nm波长处的吸光值。

[0027] (2)在重悬液A中加入终浓度为0.035%(质量百分浓度)的H₂O₂,于37℃摇床内、振摇状态下孵育30min,摇床转速为100r/min。然后于1500r/min条件下离心20min,弃去上清,收集沉淀,按照步骤1中方法采用无菌生理盐水洗涤沉淀3次,然后重悬于60%(v/v)(体积百分浓度)乙醇水溶液中,得到重悬液B。H₂O₂以水溶液的形式添加至重悬液A中,H₂O₂水溶液

的质量百分浓度为0.175%。

[0028] (3)将重悬液B于25℃摇床内、振摇状态下孵育30min,摇床转速为40r/min。然后于1500r/min条件下离心20min,弃去上清,收集沉淀,按照步骤1中方法采用无菌生理盐水洗涤3次,即获得单增李斯特菌菌影。

[0029] 实施例2单增李斯特菌菌影的制备效果

[0030] 检测实施例1中方法制备的单增李斯特菌菌影的存活率,同时进行扫描电镜(Scanning Electron Microscope,SEM)、透射电镜(Transmission Electron Microscope,TEM)观察。

[0031] (1)存活率

[0032] 在MSC-Advantage™二级生物安全柜(购自Thermo Scientific)中,将上述制备的菌影细胞用无菌水进行梯度稀释,稀释倍数分别为100倍、 10^1 倍和 10^2 倍,然后涂布于BH1固体培养基上(购自北京陆桥技术股份有限公司),于37℃的EYELA恒温培养箱(购自上海爱郎仪器有限公司)中培养5d,每天观察平板上的菌落生长情况。重复三次。结果见表1,从表1可以看出实施例1制备的单增李斯特菌菌影在培养5d后存活率为0%,即无活菌存在。

[0033] 表1单增李斯特菌菌影存活率

培养天数 (d)	存活率 (%)			
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	
[0034]	1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	2	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[0035] 注:表中数据为均值±标准差。

[0036] (2)SEM观察

[0037] 单增李斯特菌菌影SEM(扫描电子显微镜)观察结果如图1。可以看出因细胞浆和核酸排出,在外在形态上单增李斯特菌菌影细胞与单增李斯特菌活细胞是有所不同的。

[0038] (3)TEM观察

[0039] 单增李斯特菌菌影的TEM(透射电子显微镜)观察结果如图2所示,可以看到单增李斯特菌菌影内已经没有细胞浆。

[0040] 上述结果说明,实施例1成功制备了单增李斯特菌菌影。

[0041] 实施例3单增李斯特菌菌影的免疫效果检验

[0042] 采用实施例1中方法制备的单增李斯特菌菌影免疫小鼠,以考察该菌影免疫后是否能够产生单增李斯特菌抗体。

[0043] 采用生理盐水调整单增李斯特菌菌影的细胞浓度至 1×10^8 cfu/mL,得到免疫试剂。取10只6周龄Balb/c小鼠,每只皮下多点注射2mL免疫试剂。免疫结束后,测定免疫小鼠血液中抗体效价。检测结果如图3所示,可以看出,实施例1中方法制备的单增李斯特菌菌影免疫小鼠后能够产生抗体,免疫4周后,小鼠血液中抗体效价可达10000,效果良好。

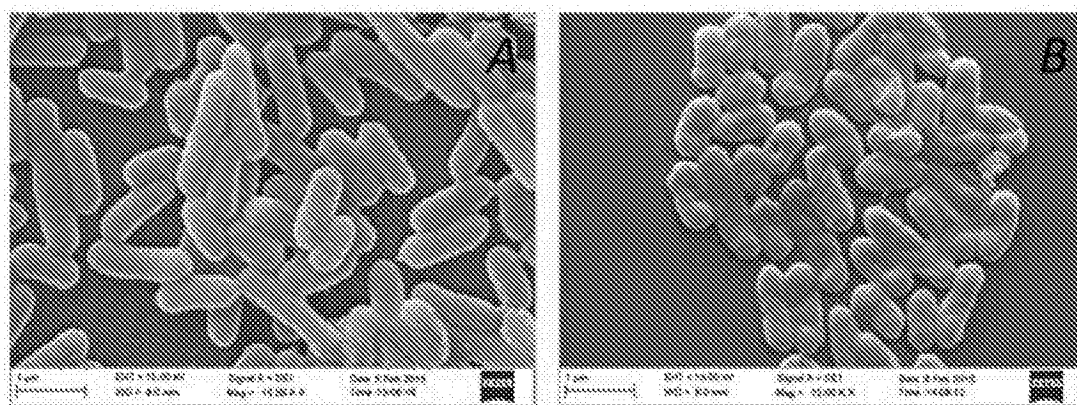


图1

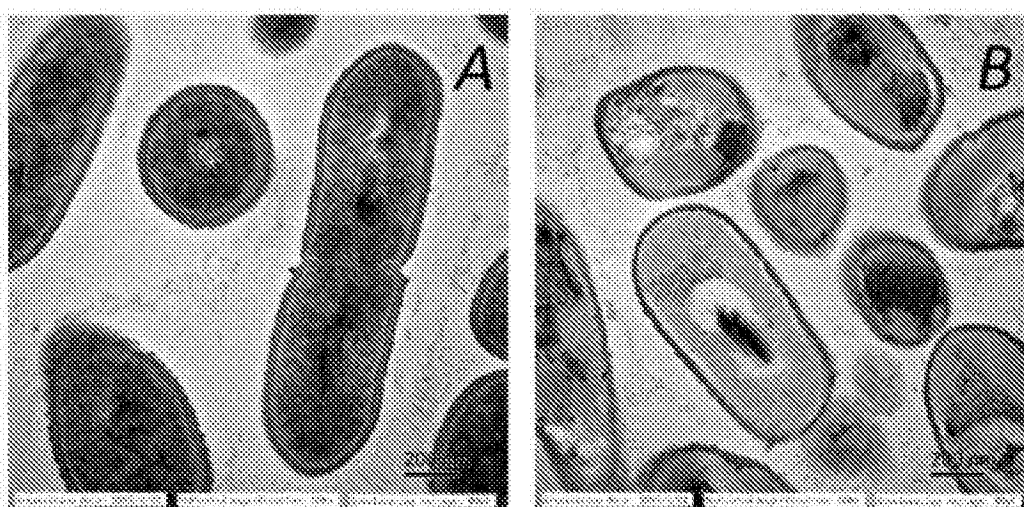


图2

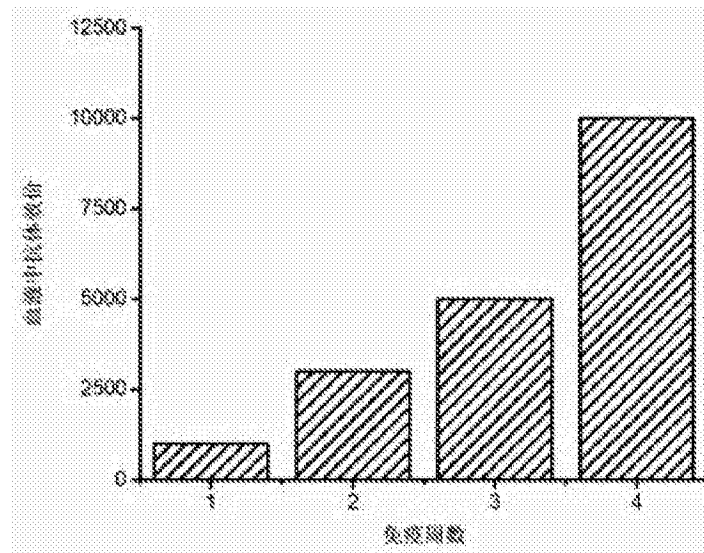


图3

专利名称(译)	革兰氏阳性菌菌影的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN105784984A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610116309.6	申请日	2016-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	南京财经大学		
申请(专利权)人(译)	南京财经大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京财经大学		
[标]发明人	鞠兴荣 都立辉 吴学友 袁建 何荣 陈正行		
发明人	鞠兴荣 都立辉 吴学友 袁建 何荣 陈正行		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/56911		
代理人(译)	袁静		
其他公开文献	CN105784984B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供革兰氏阳性菌菌影的制备方法及其应用,属于微生物学和免疫学领域。所述菌影的制备方法,包括:在革兰氏阳性菌悬液中加入NaOH、SDS和CaCO₃,在30-40°C条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液A;在所述重悬液A中加入H₂O₂,在30-40°C条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤后制成重悬液B;将重悬液B在20-30°C条件下孵育,离心,收集沉淀,洗涤,得到革兰氏阳性菌菌影。本发明利用简单化学试剂就可以快速、高效制备革兰氏阳性菌菌影,显著降低了生产成本。由于单增李斯特菌菌影保留了细菌结构的完整性,免疫后能够产生针对单增李斯特菌的抗体,从而筛选到能够高效、快速检测该细菌的抗体。

