(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104698167 A
(43)申请公布日 2015.06.10

(21)申请号 201510125306.4

(22)申请日 2015.03.20

(71)申请人 黑龙江大学
地址 150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路74号

(72)发明人 孟利 刘峰 李梦洋 李冲伟 任洪波 金海涛

(74)专利代理机构 哈尔滨市文洋专利代理事务所（普通合伙）23210
代理人 何强

(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

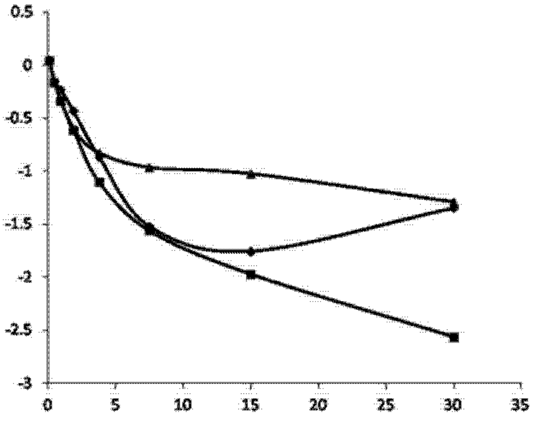
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种阪崎肠杆菌检测试剂及其制备方法

(57)摘要

一种阪崎肠杆菌检测试剂及其制备方法，涉及一种细菌检测试剂及其制备方法。本发明是为了解决现有的检测阪崎肠杆菌的胶体金试纸条无法定量检测的问题。该检测试剂由试剂A和试剂B组成，试剂A包括缓冲液、促凝剂、BSA和防腐剂；试剂B包括标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒、稳定剂、缓冲液和防腐剂。方法：一、将促凝剂、BSA和防腐剂加入到缓冲液中，制得试剂A；二、将稳定剂、防腐剂和缓冲液混合得混合液，然后将混合液与标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒混合，制得试剂B；三、将试剂A和试剂B混合即得抗阪崎肠杆菌检测试剂。本发明检测线性范围大，可定量检测，分析灵敏度高，使用方便。用于检测牛奶或奶粉中阪崎肠杆菌。



CN 104698167 A

1.一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于该检测试剂由试剂A和试剂B组成,其中所述试剂A包括缓冲液、促凝剂、BSA和防腐剂;所述试剂B包括标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒、稳定剂、缓冲液和防腐剂;试剂A中缓冲液的浓度为20～50mmol/L,促凝剂的浓度为2%(w/v),BSA的浓度为2%(w/v),防腐剂的浓度为0.1%～0.5%(w/v);试剂B中缓冲液的浓度为20～50mmol/L,标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为0.08mg～0.8mg/mL,稳定剂的浓度为2%～5%(w/v),防腐剂的浓度为0.1%～0.5%(w/v),所述试剂A和试剂B的体积比为5:1。

2.根据权利要求1所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于试剂A和试剂B中的缓冲液均为含有0.5%～5.0%(w/v)BSA的Tris-HCl缓冲液、HEPES缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或几种按任意比组成的混合物。

3.根据权利要求1或2所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于试剂A中的促凝剂为PEG6000或Brij-35。

4.根据权利要求3所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于试剂A和试剂B中的防腐剂均为叠氮化钠。

5.根据权利要求4所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于试剂B中的稳定剂为蔗糖或海藻糖。

6.根据权利要求5所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的直径为60nm～90nm。

7.根据权利要求6所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于所述试剂A和试剂B的pH值均为7.0～9.0。

8.根据权利要求7所述的一种阪崎肠杆菌检测试剂,其特征在于所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体为具有不同免疫活性位点多克隆株抗体的混合物。

9.如权利要求1所述的阪崎肠杆菌检测试剂的制备方法,其特征在于该方法包括如下步骤:

一、将促凝剂、BSA和防腐剂加入到缓冲液中,制得试剂A;

二、将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比1:1加热煮沸制得胶体金溶液;将抗阪崎肠杆菌多克隆抗体加入到胶体金溶液中,超滤,得到标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒,将稳定剂、防腐剂和缓冲液混合得混合液,然后将混合液与标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒混合,制得试剂B;

三、将试剂A和试剂B按照5:1的体积比混合,即得抗阪崎肠杆菌检测试剂。

10.根据权利要求9所述的阪崎肠杆菌检测试剂的制备方法,其特征在于步骤二所述胶体金溶液中抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的浓度为20～25μg/mL。

一种阪崎肠杆菌检测试剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细菌检测试剂及其制备方法，具体涉及一种用于检测奶粉或牛奶中阪崎肠杆菌的试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 阪崎肠杆菌(Cronobacter sakazakii)是革兰氏阴性菌，能运动，无芽孢且兼性厌氧。以前一直被认为是黄色阴沟肠杆菌(Enterobacter cloacae)到1980年才更名为“阪崎肠杆菌”。2008年又将阪崎肠杆菌定义为肠杆菌的一个新属—克罗诺杆菌属(Cronobacter spp)。

[0003] C.sakazakii是一种能够在动物和人体内寄生的致病菌，能够引起严重的新生儿脑膜炎、坏死性小肠结肠炎及菌血症，并能引起神经系统后遗症甚至死亡。该菌感染引起的死亡率高达50%以。近年来，对C.sakazakii在食品、饮品、加工原辅料、生态环境等多方面的研究发现其在自然界中分布广泛。现阶段还不能确定其具体的宿主和感染源，但发现婴儿配方奶粉是它的主要感染渠道。

[0004] 1961年Urmenyi和Franklin首次发现两例由C.sakazakii引起的新生儿脑膜炎以后从感染病人的感染部位、创伤部位和排泄物等中分离到C.sakazakii。第一个将C.sakazakii与婴幼儿配方奶粉联系起来的是Muytjens，他们在研究荷兰的八例新生儿髓膜炎和败血症时，从冲调奶粉的器具中分离出阪崎肠杆菌。之后，世界各地也多次发现C.sakazakii污染的事件。冰岛报道了三例婴幼儿奶粉引起感染C.sakazakii的案例。2001年田纳西州的一个新生儿加护中心发生了十例C.sakazakii感染引起的脑膜炎，从同品牌的同一批次婴幼儿配方奶粉产品中培养到了C.sakazakii，生产该奶粉的公司召回了这批产品。2004年，我国安徽阜阳发生劣质奶粉引发的“大头娃娃”事件，从87分阜阳劣质奶粉样品中检测到十一例阪崎肠杆菌阳性样品。这些研究表明，奶粉中C.sakazakii是危害生命安全和健康的重要生物因素之一。

[0005] 2011年4月出台的《食品安全国家标准婴儿配方食品》(GB 10765-2010)将C.sakazakii纳入检测范围。婴儿配方奶粉生产线上阪崎肠杆菌的有效检出对其风险控制有着重要意义。因此，目前对简便、快捷、特异性好、低成本的阪崎肠杆菌检测方法的需求越来越迫切。

发明内容

[0006] 本发明是为了解决现有的检测阪崎肠杆菌的胶体金试纸条无法定量检测的问题，提供一种阪崎肠杆菌检测试剂及其制备方法。

[0007] 本发明阪崎肠杆菌检测试剂由试剂A和试剂B组成，其中所述试剂A包括缓冲液、促凝剂、BSA和防腐剂；所述试剂B包括标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒、稳定剂、缓冲液和防腐剂；试剂A中缓冲液的浓度为20～50mmol/L，促凝剂的浓度为2%(w/v)，BSA的浓度为2%(w/v)，防腐剂的浓度为0.1%～0.5%(w/v)；试剂B中缓冲液的浓

度为 20 ～ 50mmol/L，标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为 0.08mg ～ 0.8mg/mL，稳定剂的浓度为 2％～ 5％ (w/v)，防腐剂的浓度为 0.1％～ 0.5％ (w/v)，所述试剂 A 和试剂 B 的体积比为 5:1。

[0008] 上述阪崎肠杆菌检测试剂的制备方法，包括如下步骤：

[0009] 一、将促凝剂、BSA 和防腐剂加入到缓冲液中，制得试剂 A；

[0010] 二、将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比 1:1 加热煮沸制得胶体金溶液；将抗阪崎肠杆菌多克隆抗体加入到胶体金溶液中，超滤，得到标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒，将稳定剂、防腐剂和缓冲液混合得混合液，然后将混合液与标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒混合，制得试剂 B；

[0011] 三、将试剂 A 和试剂 B 按照 5:1 的体积比混合，即得抗阪崎肠杆菌检测试剂。

[0012] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0013] 1、本发明利用胶体金匀相颗粒特性，将特定的抗阪崎肠杆菌多克隆抗体标记于胶体金颗粒表面，当检测系统或检测环境中存在阪崎肠杆菌时，胶体金颗粒表面的抗体即将与之对应的抗原捕获，并形成抗原 - 抗体复合物，进而造成局部胶体金颗粒的聚合或堆积，使胶体金匀相试剂透光光谱由红色向蓝色光谱移动，这种移动主要反应为 540nm 处吸光度的降低和 660nm 处吸光度的升高，从而达到定量检测检体中阪崎肠杆菌的目的，同时避免了同类检测项目乳胶增强免疫比浊法试剂在反应后产生胶乳微球交联物吸附比色杯不易清洗的缺点。

[0014] 2、本发明检测试剂中标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒为纳米金，颗粒直径为 60nm ～ 90nm，可以做到定量检测。

[0015] 3、本发明可用于检测乳粉或牛奶中阪崎肠杆菌含量，适用于乳品检测过程中使用的分光光度计、半自动生化分析仪和全自动生化分析仪等仪器。

[0016] 4、本发明检测线性范围大，可达 1×10^{2}～ 1×10^{6}cfu/mL，具有高分析灵敏度，高特异性，使用方便且检测快速等特点。

附图说明

[0017] 图 1 为实施例六中胶体金颗粒大小与其它不同颗粒大小的胶体金分析能力比较；图 2 为国标方法和本发明试剂检测结果的比较。

具体实施方式

[0018] 本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式，还包括各具体实施方式间的任意组合。本发明中涉及的重量体积比记为“w/v”，单位为“g/mL”。

[0019] 具体实施方式一：本实施方式阪崎肠杆菌检测试剂由试剂A和试剂B组成，其中所述试剂 A 包括缓冲液、促凝剂、BSA 和防腐剂；所述试剂 B 包括标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒、稳定剂、缓冲液和防腐剂；试剂 A 中缓冲液的浓度为 20 ～ 50mmol/L，促凝剂的浓度为 2％ (w/v)，BSA 的浓度为 2％ (w/v)，防腐剂的浓度为 0.1％～ 0.5％ (w/v)；试剂 B 中缓冲液的浓度为 20 ～ 50mmol/L，标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为 0.08mg ～ 0.8mg/mL，稳定剂的浓度为 2％～ 5％ (w/v)，防腐剂的浓度为 0.1％～ 0.5％ (w/v)，所述试剂 A 和试剂 B 的体积比为 5:1。

[0020] 具体实施方式二：本实施方式与具体实施方式一不同的是：试剂 A 和试剂 B 中的缓冲液均为含有 0.5%～5.0%(w/v)BSA 的 Tris-HCl 缓冲液、HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或几种按任意比组成的混合物。其它与具体实施方式一相同。

[0021] 具体实施方式三：本实施方式与具体实施方式一或二不同的是：试剂 A 中的促凝剂为 PEG6000 或 Brij-35。其它与具体实施方式一或二相同。

[0022] 具体实施方式四：本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是：试剂 A 和试剂 B 中的防腐剂均为叠氮化钠。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0023] 具体实施方式五：本实施方式与具体实施方式一至四之一不同的是：试剂 B 中的稳定剂为蔗糖或海藻糖。其它与具体实施方式一至四之一相同。

[0024] 具体实施方式六：本实施方式与具体实施方式一至五之一不同的是：所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的直径为 60nm～90nm，颗粒含量为 0.08～0.8mg/mL。其它与具体实施方式一至五之一相同。

[0025] 具体实施方式七：本实施方式与具体实施方式一至五之一不同的是：所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的直径为 75nm～85nm。其它与具体实施方式一至五之一相同。

[0026] 具体实施方式八：本实施方式与具体实施方式一至七之一不同的是：所述试剂 A 和试剂 B 的 pH 值均为 7.0～9.0。其它与具体实施方式一至七之一相同。

[0027] 具体实施方式九：本实施方式与具体实施方式一至七之一不同的是：所述试剂 A 和试剂 B 的 pH 值均为 7.8～8.2。其它与具体实施方式一至七之一相同。

[0028] 具体实施方式十：本实施方式与具体实施方式一至九之一不同的是：所述标记有抗阪崎肠杆菌抗体为多克隆抗体。其它与具体实施方式一至九之一相同。

[0029] 具体实施方式十一：本实施方式阪崎肠杆菌检测试剂的制备方法，包括如下步骤：

[0030] 一、将促凝剂、BSA 和防腐剂加入到缓冲液中，制得试剂 A；

[0031] 二、将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比 1:1 加热煮沸制得胶体金溶液；将抗阪崎肠杆菌多克隆抗体加入到胶体金溶液中，超滤，得到标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒，将稳定剂、防腐剂和缓冲液混合得混合液，然后将混合液与标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒混合，制得试剂 B；

[0032] 三、将试剂 A 和试剂 B 按照 5:1 的体积比混合，即得抗阪崎肠杆菌检测试剂。

[0033] 具体实施方式十二：本实施方式与具体实施方式十一不同的是：试剂 A 中缓冲液的浓度为 20～50mmol/L，促凝剂的浓度为 2%(w/v)，BSA 的浓度为 2%(w/v)，防腐剂的浓度为 0.1%～0.5%(w/v)。其它与具体实施方式十一相同。

[0034] 具体实施方式十三：本实施方式与具体实施方式十一或十二不同的是：试剂 B 中缓冲液的浓度为 20～50mmol/L，标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为 0.08～0.8mg/mL。稳定剂的浓度为 2%～5%(w/v)，防腐剂的浓度为 0.1%～0.5%(w/v)。其它与具体实施方式十一或十二相同。

[0035] 具体实施方式十四：本实施方式与具体实施方式十一至十三之一不同的是：步骤二所述胶体金溶液中抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的浓度为 20～25μg/mL。其它与具体实施方式十一至十三之一相同。

[0036] 具体实施方式十五：本实施方式与具体实施方式十一至十四之一不同的是：步骤二所述胶体金溶液中抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的浓度为 21 ～ 24μg/mL。其它与具体实施方式十一至十四之一相同。

[0037] 具体实施方式十六：本实施方式与具体实施方式十一至十五之一不同的是：试剂 A 和试剂 B 中的缓冲液均为含有 0.5%～ 5.0% (w/v)BSA 的 Tris-HCl 缓冲液、HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或几种按任意比组成的混合物。其它与具体实施方式十一至十五之一相同。

[0038] 具体实施方式十七：本实施方式与具体实施方式十一至十六之一不同的是：试剂 A 中的促凝剂为 PEG6000 或 Brij-35。其它与具体实施方式十一至十六之一相同。

[0039] 具体实施方式十八：本实施方式与具体实施方式十一至十七之一不同的是：试剂 A 和试剂 B 中的防腐剂均为叠氮化钠。其它与具体实施方式十一至十七之一相同。

[0040] 具体实施方式十九：本实施方式与具体实施方式十一至十八之一不同的是：试剂 B 中的稳定剂为蔗糖或海藻糖。其它与具体实施方式十一至十八之一相同。

[0041] 具体实施方式二十：本实施方式与具体实施方式十一至十九之一不同的是：所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的直径为 60nm ～ 90nm。其它与具体实施方式十一至十九之一相同。

[0042] 具体实施方式二十一：本实施方式与具体实施方式十一至十九之一不同的是：所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的直径为 75nm ～ 85nm。其它与具体实施方式十一至十九之一相同。

[0043] 具体实施方式二十二：本实施方式与具体实施方式十一至二十一之一不同的是：所述试剂 A 和试剂 B 的 pH 值均为 7.0 ～ 9.0。其它与具体实施方式十一至二十一之一相同。

[0044] 具体实施方式二十三：本实施方式与具体实施方式十一至二十一之一不同的是：所述试剂 A 和试剂 B 的 pH 值均为 7.8 ～ 8.2。其它与具体实施方式十一至二十一之一相同。

[0045] 具体实施方式二十四：本实施方式与具体实施方式十一至二十三之一不同的是：所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体为具有不同免疫活性位点多克隆株抗体的混合物。其它与具体实施方式十一至二十三之一相同。

[0046] 具体实施方式二十五：本实施方式与具体实施方式十一至二十四之一不同的是：配制氯金酸与柠檬酸三钠溶液时，使用 0.2μm 滤膜过滤。其它与具体实施方式十一至二十四之一相同。

[0047] 具体实施方式二十六：本实施方式与具体实施方式十一至二十五之一不同的是：标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为 0.4mg/mL。其它与具体实施方式十一至二十五之一相同。

[0048] 为验证本发明的有益效果，进行以下实验：

[0049] 实施例一、胶体金颗粒的制备（以下所有操作需在高洁净度无尘空间内完成）

[0050] 1) 准备工作：所有用到的玻璃容器先用洗洁剂洗涤并用流水冲洗干净，然后用硅化试剂浸泡过夜，对所以制金器皿的内表面做硅化处理，再用蒸馏水冲洗干净，备用；

[0051] 2) 配制 1% (w/v) 氯金酸和 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液，使用 0.2μm 滤膜过滤；

[0052]　3) 在清洗干净的 1000ml 圆底烧瓶中放入磁力搅拌子 1 枚，加入 1000ml 超纯水；

[0053]　4) 加入一定体积浓度为 1％ (w/v) 氯金酸，600rpm 左右高速搅拌，并加热至溶液沸腾，然后迅速将一定体积浓度为 1％柠檬酸钠溶液快速加入到烧瓶中，保持加热和剧烈搅拌 10min，溶液颜色先变黑色，然后逐渐变紫红色；

[0054]　5) 冷却：关闭加热开关并继续搅拌 10min，然后停止搅拌冷却至室温，用超纯水恢复到原体积，即得到胶体金溶液；

[0055]　6) 不同粒径的胶体金颗粒可根据加入氯金酸和柠檬酸钠的比例进行控制，最终以电子粒度仪检测 10mL 胶体金溶液，以粒度仪显示结果为金颗粒的粒径结果使用。

[0056]　实施例二、试剂 A 的制备

[0057]　试剂 A 的配方如下：Tris-Hcl 缓冲液、0.9％ NaCl(w/v)、2％ BSA(w/v)、0.1％ NaN_3(w/v)、0.05％ Tween20(w/v)，可根据 Tris 的质量控制缓冲液的浓度，根据 HCl 的使用量来调整缓冲液的 pH 值。

[0058]　实施例三、标记物的制备：

[0059]　1) 取 1 毫升制备好的胶体金溶液加入到 1.5 毫升的离心管内；

[0060]　2) 用 10％的碳酸钾溶液将离心管内的胶体金溶液调至 pH 值为 8.0 ～ 10.0；

[0061]　3) 将一定量抗体加入到离心管中，震荡 30 分钟；

[0062]　4) 再加入 100μL10％的 NaCl 溶液，混匀，静置 2h 后观察各管是否有颜色改变或者沉淀析出，当无颜色改变和无沉淀析出表明加入的抗体分子小于蛋白最大需求量；

[0063]　5) 将 500mL 胶体金溶液加入三角瓶中，边搅拌边用 10％的碳酸钾调整溶液的 pH 值至 8.0 ～ 10.0，并用精密 pH 试纸检测调整过程；

[0064]　按所述的方法将确定的抗体用量加入到上述溶液中，继续搅拌 30 分钟，超滤收集标记物。

[0065]　实施例四、试剂 B 的制备：

[0066]　试剂 B 中溶解的生物大分子和化学物质为 Tris-Hcl 缓冲液、0.9％ (w/v)NaCl、2％ (w/v)BSA、0.1％ (w/v)NaN_3、0.05％ (w/v)Tween20，5％ (w/v) 蔗糖或海藻糖，2％ (w/v) 甘氨酸，2％ (w/v)PEG6000。

[0067]　将配制好的试剂 B 同超滤收集得到的标记物相混合，最终控制标记物金颗粒浓度为 0.4mg/mL 即可。

[0068]　实施例五、校准品的制备：

[0069]　活化后的阪崎肠杆菌标准菌株 C.sakazakii ATCC 29544 用 2％ (w/v)BSA 溶液溶解或稀释，制得 1×10^6cfu/mL 菌悬液，使用时根据所需要浓度梯度用 0.9％ (w/v)NaCl 稀释即可。

[0070]　实施例六、不同颗粒度胶体金颗粒的选择：

[0071]　根据以上实施例中胶体金颗粒的制备不同粒径的胶体金颗粒完成标记制得试剂 B，选择同一缓冲液浓度和 pH 进行实验。

[0072]　实验方法：

[0073]　将校准品、试剂 A 和试剂 B 按照体积比为 3:250:50 依次混合，37℃下充分反应。

[0074]　在 7180 全自动生化分析仪上记录 540±10nm 处吸光度值。

[0075]　比较不同颗粒大小胶体金标记物校准曲线最终确定最佳颗粒大小。

[0076] 根据校准曲线判断选择 75nm-85nm 范围的金颗粒较为合适，大颗粒分析灵敏度较好但是易产生 HOOK 效应不利于检测，而小颗粒在高值区的分析能力却明显不如 75nm-85nm 颗粒。

[0077] 图 1 为本发明胶体金颗粒大小与其它不同颗粒大小的胶体金分析能力比较，图 1 中—◆—表示颗粒粒径 85nm 以上，—■—表示颗粒粒径 75nm-85nm，—▲—表示颗粒粒径 75nm 以下。

[0078] 试验方法：以含菌 1×10^6cfu/mL 的乳菌悬液为例，将其倍比稀释如下梯度，分别用对照试剂和本发明试剂检测，并拟合其线性，结果如图 2 和表 1 所示，表 2 中—◆—表示国标方法，—✳—表示本发明试剂检测。

[0079] 表 1 线性数据结果

[0080]

浓度梯度倍数	稀释目标浓度（cfu/mL）	国标法计数（cfu/mL）	本发明试剂检测结果（cfu/mL）
1	1×10^6	1.3×10^6	1.1×10^6
100	1×10^5	1.4×10^5	1.2×10^5
1000	1×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4
10000	1×10^3	1.1×10^3	1.2×10^3
1×10^5	1×10^2	0.9×10^2	1.1×10^2

[0081] 从相关数据统计可以看出，本发明试剂线性结果可达到国标方法准确程度。

[0082] 实施例七、干扰试验

[0083] 在正常人血清中各自添加一定量的大肠杆菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌和嗜酸乳杆菌，先测定样本初始值，之后根据下表干扰物质浓度添加干扰物质在样本中，每次只添加一种干扰物，使其达下表中所示的浓度，同时根据测量结果和体积变化反算稀释倍数计算测量后的结果，结果见表 2。

[0084] 表 2 抗干扰检测结果

[0085]

干扰物种类及浓度	测量值	理论值	抗干扰程度（%）
大肠杆菌	225	234	-3.85%
志贺氏菌	215	234	-8.12%
金黄色葡萄球菌	243	234	3.85%
嗜酸乳杆菌	237	234	1.28%

[0086] 根据以上数据表明，本发明试剂在此干扰物存在范围内满足食品安全检测要求，说明本发明试剂具有良好的抗干扰性能。

[0087] 实施例八、

[0088] 本实施例阪崎肠杆菌检测试剂由试剂 A 和试剂 B 组成，其中所述试剂 A 包括

Tris-HCl 缓冲液、PEG6000、BSA 和叠氮化钠;所述试剂 B 包括标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒、海藻糖、Tris-HCl 缓冲液和叠氮化钠;试剂 A 中 Tris-HCl 缓冲液的浓度为 35mmol/L,PEG6000 的浓度为 2% (w/v),BSA 的浓度为 2% (w/v),叠氮化钠的浓度为 0.3% (w/v);试剂 B 中 Tris-HCl 缓冲液的浓度为 35mmol/L,标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为 3% (w/v),海藻糖的浓度为 4% (w/v),叠氮化钠的浓度为 0.3% (w/v),所述试剂 A 和试剂 B 的体积比为 5:1。

[0089] 本实施例阪崎肠杆菌检测试剂的制备方法,包括如下步骤:

[0090] 一、将 PEG6000、BSA 和叠氮化钠加入到 Tris-HCl 缓冲液中,制得试剂 A;试剂 A 中 Tris-HCl 缓冲液的浓度为 35mmol/L,PEG6000 的浓度为 2% (w/v),BSA 的浓度为 2% (w/v),叠氮化钠的浓度为 0.3% (w/v);

[0091] 二、将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比 1:1 加热煮沸制得胶体金溶液;将抗阪崎肠杆菌多克隆抗体加入到胶体金溶液中,超滤,得到标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒,将海藻糖、叠氮化钠和 Tris-HCl 缓冲液混合得混合液,然后将混合液与标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒混合,制得试剂 B;试剂 B 中 Tris-HCl 缓冲液的浓度为 35mmol/L,标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的浓度为 3% (w/v),海藻糖的浓度为 4% (w/v),叠氮化钠的浓度为 0.3% (w/v),所述试剂 A 和试剂 B 的体积比为 5:1;

[0092] 三、将试剂 A 和试剂 B 按照 5:1 的体积比混合,即得抗阪崎肠杆菌检测试剂。

[0093] 步骤二所述胶体金溶液中抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的浓度为 22μg/mL

[0094] 所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒的直径为 75nm ~ 85nm

[0095] 所述试剂 A 和试剂 B 的 pH 值均为 8.0。

[0096] 所述标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体为具有不同免疫活性位点多克隆株抗体的混合物。

[0097] 步骤二中氯金酸与柠檬酸三钠溶液配置时,使用 0.2um 滤膜过滤。

[0098] 分别用本实施例试剂与国标 GB 4789.40-2010 检测乳粉中阪崎肠杆菌,将样品、试剂 A 和试剂 B 按照体积比 3:250:50 混合,37℃下充分反应。在 7180 全自动生化分析仪上记录 540±10nm 处吸光度值。检测结果如表 3 所示。

[0099] 表 3 本实施例试剂与国标 GB 4789.40-2010 检测乳粉中阪崎肠杆菌

[0100]

样品	理论值	GB 4789.40-2010	本实施例试剂
样品 1	1×10^3	1.3×10^3	1.2×10^3
样品 2	1×10^3	1.1×10^3	1.4×10^3
样品 3	1×10^3	1.5×10^3	1.1×10^3
样品 4	1×10^3	1.1×10^3	1.3×10^3

[0101] 从相关数据统计可以看出,本实施例试剂可达到国标方法准确程度。

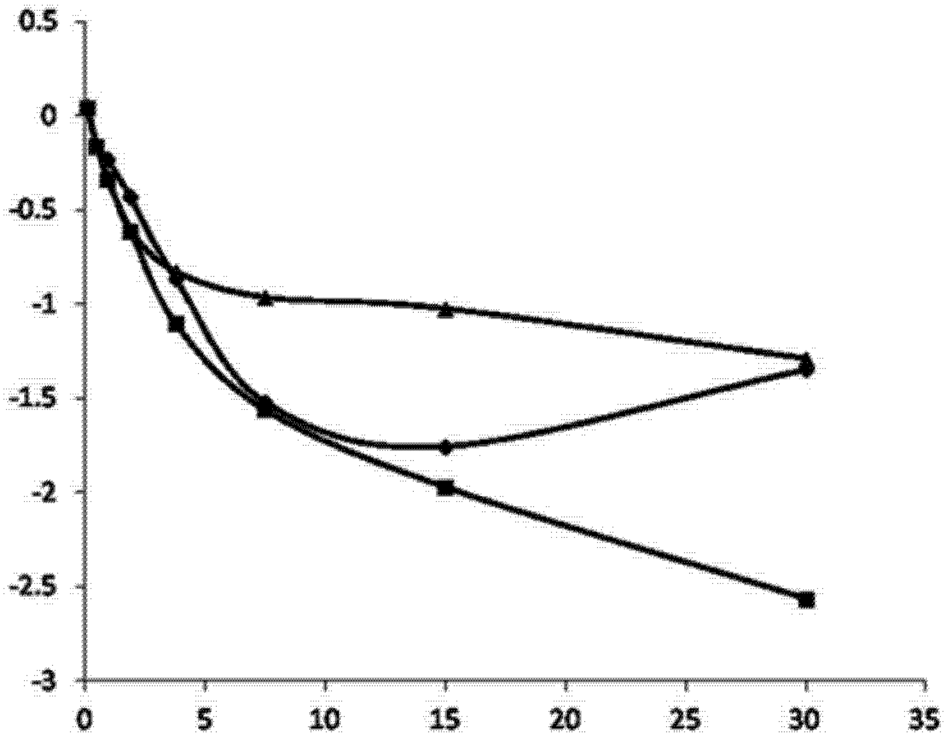

0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
-3
0
5
10
15
20
25
30
35

图 1

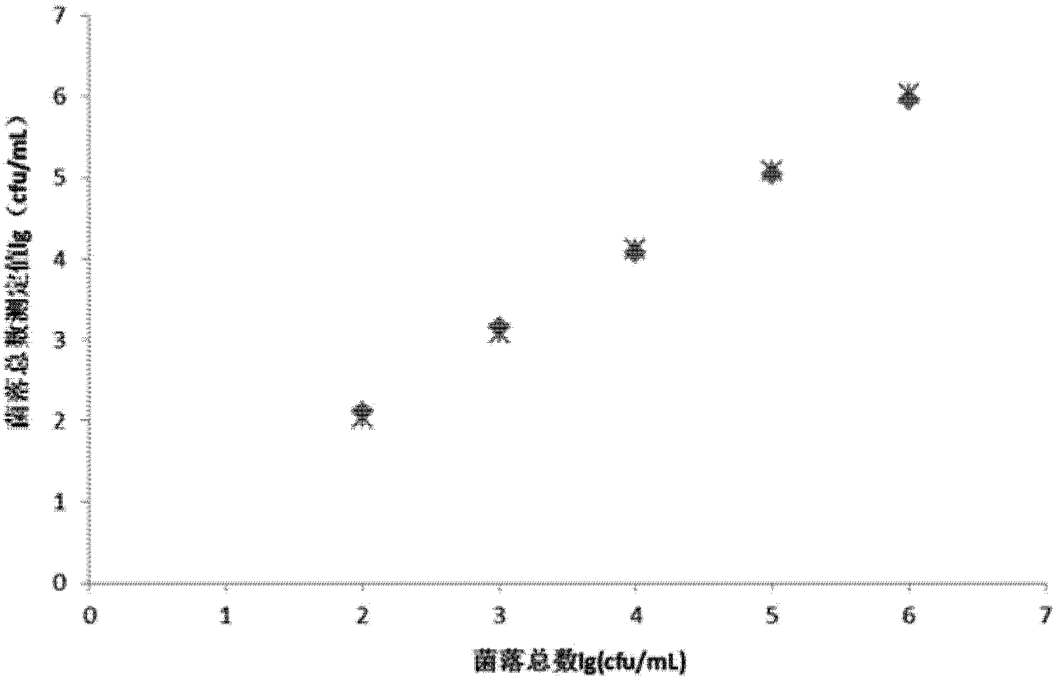
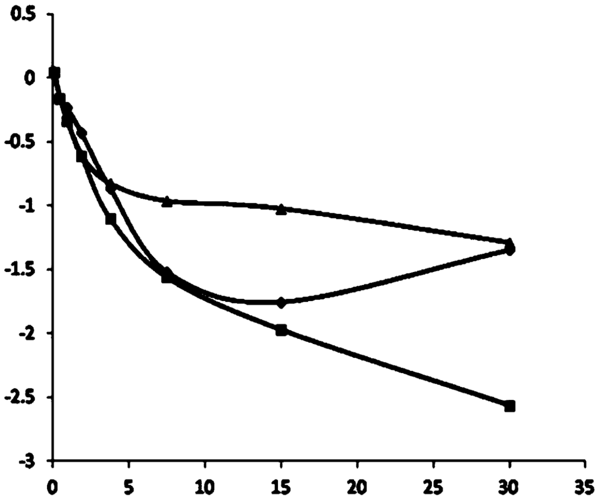

菌落总数测定值lg（cfu/mL）
菌落总数lg(cfu/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7

图 2

专利名称(译)	一种阪崎肠杆菌检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN104698167A	公开(公告)日	2015-06-10
申请号	CN201510125306.4	申请日	2015-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	黑龙江大学		
申请(专利权)人(译)	黑龙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	黑龙江大学		
[标]发明人	孟利 刘峰 李梦洋 李冲伟 任洪波 金海涛		
发明人	孟利 刘峰 李梦洋 李冲伟 任洪波 金海涛		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56916 G01N33/531 G01N2333/265		
代理人(译)	何强		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种阪崎肠杆菌检测试剂及其制备方法，涉及一种细菌检测试剂及其制备方法。本发明是为了解决现有的检测阪崎肠杆菌的胶体金试纸条无法定量检测的问题。该检测试剂由试剂A和试剂B组成，试剂A包括缓冲液、促凝剂、BSA和防腐剂；试剂B包括标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒、稳定剂、缓冲液和防腐剂。方法：一、将促凝剂、BSA和防腐剂加入到缓冲液中，制得试剂A；二、将稳定剂、防腐剂和缓冲液混合得混合液，然后将混合液与标记有抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的胶体金颗粒混合，制得试剂B；三、将试剂A和试剂B混合即得抗阪崎肠杆菌检测试剂。本发明检测线性范围大，可定量检测，分析灵敏度高，使用方便。用于检测牛奶或奶粉中阪崎肠杆菌。