



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107561267 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201710559638.2

(22)申请日 2017.07.11

(71)申请人 广东省湛江市质量计量监督检测所

地址 524094 广东省湛江市麻章区瑞云南
路8号

(72)发明人 刘阳 孔冬伟 吴移山 邱妹
王媚 薛雨

(74)专利代理机构 深圳市兴科达知识产权代理
有限公司 44260

代理人 杨小东

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备
方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于NHS基团修饰的免疫磁珠制备方法,具体涉及用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法及应用,该方法以磁流体为载体,偶联副溶血性弧菌抗体,制备成能够富集目标菌株的副溶血性弧菌免疫磁珠,应用所述NHS免疫磁珠制备方法,由传统制备工艺时间26h缩短至2-3h,提高制备效率;经过实验对照,与传统制备的副溶血弧菌免疫磁珠相比,富集目标菌群准确率提高,提高6.7%;提高了副溶血性弧菌免疫磁珠的灵敏性,同时凭借其免疫磁珠自身的快速方便、无需大型检测仪器、价格低廉的特点可以运用于食品、饲料、医疗环境和自然环境中副溶血性弧菌的分离与富集,高效快速检测副溶血性弧菌。

1. 用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法,其特征在于,该方法以磁流体为载体,偶联副溶血性弧菌抗体,制备成能够富集目标菌株的副溶血性弧菌免疫磁珠;

具体方法:

(1) 洗涤:取NHS磁珠加入EP管中,加入洗涤缓冲液反复洗涤若干次,每次间隔3-5分钟,放置于磁分离器,去除上清液;

(2) 偶联:取副溶血性弧菌抗体稀释液至EP管中,加入偶联缓冲液调节体积,将混合液在室温下震荡反应后,放置于磁分离器,取上清液检测偶联率;

(3) 封阻:加入封阻缓冲液,进行涡旋操作,将离心管放置室温震荡反应,反应时间1-2小时;

(4) 保存:洗涤后将制备好的免疫磁珠,即IMB_{VP},将所述IMB_{VP}放于保存缓冲液,低温保存待用;

上述各步骤中所述:

洗涤缓冲液为PBST:0.1M PBS溶液含0.05%吐温20,pH7.4;

偶联缓冲液为MEST:15mM MES含0.05%吐温20,pH6.0;

封阻缓冲液为PBST:含2%BSA;

保存缓冲液为PBST:含0.02%NaN₃、1%BSA。

2. 如权利要求1所述用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法,其特征在于,

所述步骤(1)的NHS磁珠与洗涤缓冲液溶液体积之比1:4-6;

所述步骤(2)加入偶联缓冲液调节体积为0.3-0.6mL;

所述步骤(3)的涡旋操作时间为20-30s;

所述步骤(4)保存温度为4℃。

3. 如权利要求1所述用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法,其特征在于,所述检测计算偶联率方法具体包括:

a. 在步骤(3)获得的上清液在洗涤缓冲液洗涤3次,放置于磁分离器,去除上清;

b. 用考马斯亮蓝测蛋白法测定上清液蛋白质含量,计算血清与磁珠偶联率。

4. 如权利要求3所述用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法,其特征在于,计算血清与磁珠偶联率的公式为:

$$\text{偶联率}(\%) = \frac{\text{血清蛋白加入量} - \text{上清液蛋白剩余量}}{\text{血清蛋白加入量}} \times 100。$$

5. 用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠的应用方法,其特征在于,上述权利要求1-4任意之一制备的NHS免疫磁珠用于分离致病性微生物副溶血性弧菌;

具体应用方法:

(1) 将装有IMB_{VP}离线管放置于磁分离器,去除上清液;

(2) 取0.1mL副溶血性弧菌菌悬液加入到IMB_{VP}中,加入0.3mL洗涤缓冲液,混合液在37℃下,进行震荡反应操作后,放置于磁分离器,取0.1mL上清液涂布弧菌显色培养基,去除其他上清液;

(3) 取0.5mL洗涤缓冲液洗涤IMB_{VP},洗涤3次,放置于磁分离器,去除上清液;

(4) 加入0.3mL PBST混匀后,各取0.1mL混合液涂布3个弧菌显色培养基,在37℃下培养

18h-24h计数；

计算原液菌落数和IMB_{VP}捕获菌落数，计算捕获率。

6.如权利要求5所述用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠的应用方法，其特征在于，用IMB_{VP}溶液捕获目标菌落为实验组，用空白磁珠溶液捕获目标菌落为阴性对照组。

7.如权利要求5所述用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠的应用方法，其特征在于，所述步骤(4)计算捕获率的公式为：

$$\text{捕获率 (\%)} = \frac{\text{富集到的菌落数 (CFU/0.1mL)}}{\text{原始菌落数 (CFU/0.1mL)}} \times 100。$$

用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于NHS基团修饰的免疫磁珠制备方法,具体涉及用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法及应用,该制备方法用于分离致病性微生物副溶血性弧菌,属于病原菌分离技术领域。

背景技术

[0002] 在现有技术中,已有学者对副溶血性弧菌免疫磁珠的制备方法进行了研究,但存在三个问题:一、采用国外磁珠Dynabeads效果较好,但是国外磁珠价格昂贵,超出国内磁珠价格的10倍;二、磁珠类型为羧基磁珠或氨基磁珠,这两类磁珠虽然价格便宜,但是在连接抗体前需要对磁珠进行活化,并且磁珠与抗体偶联的时间较长,一般需要过夜,大大影响了免疫磁珠制备的效率;三、现有研究主要是对1mL样品进行富集,没有体现免疫磁珠的应用优势。

[0003] 本申请公开的技术方案在这些研究的基础上改进了免疫磁珠的制备工艺,从而提高了副溶血性弧菌免疫磁珠的灵敏性,同时凭借其免疫磁珠自身的快速方便、不需要大型检测仪器、价格低廉的特点可以运用于食品,饲料、医疗环境和自然环境中副溶血性弧菌的分离与富集,为高效快速检测副溶血性弧菌提供了可能。

发明内容

[0004] 为了有效解决上述问题,本发明提供用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法及应用。

[0005] 本发明的具体技术方案如下:用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法,该方法以磁流体为载体,偶联副溶血性弧菌抗体,制备成能够富集目标菌株的副溶血性弧菌免疫磁珠;

[0006] 具体方法:

[0007] (1) 洗涤:取NHS磁珠加入EP管中,加入洗涤缓冲液反复洗涤3次,每次间隔3-5分钟,放置于磁分离器,去除上清液;

[0008] (2) 偶联:取副溶血性弧菌抗体稀释液至EP管中,加入偶联缓冲液调节体积,将混合液在室温下震荡反应后,放置于磁分离器,取上清液检测偶联率;

[0009] (3) 封阻:加入封阻缓冲液,进行涡旋操作,将离心管放置室温震荡反应,反应时间1-2小时;

[0010] (4) 保存:洗涤后将制备好的免疫磁珠,即IMB_{VP},将所述IMB_{VP}放于保存缓冲液,低温保存待用;

[0011] 上述各步骤中所述:

[0012] 洗涤缓冲液为PBST:0.1M PBS溶液含0.05%吐温20,pH7.4;

[0013] 偶联缓冲液为MEST:15mM MES含0.05%吐温20,pH6.0;

[0014] 封阻缓冲液为PBST:含2%BSA;

- [0015] 保存缓冲液为PBST:含0.02%NaN₃、1%BSA。
- [0016] 进一步地,所述步骤(1)的NHS磁珠与洗涤缓冲液溶液体积之比1:4-6;
- [0017] 所述步骤(2)加入偶联缓冲液调节体积为0.3-0.6mL;
- [0018] 所述步骤(3)的涡旋操作时间为20-30s;
- [0019] 所述步骤(4)保存温度为4℃。
- [0020] 进一步地,所述检测计算偶联率方法具体包括:
- [0021] a.在步骤(3)获得的上清液在洗涤缓冲液洗涤3次,放置于磁分离器,去除上清;
- [0022] b.用考马斯亮蓝测蛋白法测定上清液蛋白质含量,计算血清与磁珠偶联率。
- [0023] 进一步地,计算血清与磁珠偶联率的公式为:
- [0024]
$$\text{偶联率}(\%) = \frac{\text{血清蛋白加入量} - \text{上清液蛋白剩余量}}{\text{血清蛋白加入量}} \times 100$$
。
- [0025] 进一步地,上述制备的NHS免疫磁珠用于分离致病性微生物副溶血性弧菌;
- [0026] 具体应用方法:
- [0027] (1)将装有IMB_{VP}离线管放置于磁分离器,去除上清液;
- [0028] (2)取0.1mL副溶血性弧菌菌悬液加入到IMB_{VP}中,加入0.3mL偶联缓冲液,混合液在37℃下,进行震荡反应操作后,放置于磁分离器,取0.1mL上清液涂布弧菌显色培养基,去除其他上清液;
- [0029] (3)取0.5mL洗涤缓冲液洗涤IMB_{VP},洗涤3次,放置于磁分离器,去除上清液;
- [0030] (4)加入0.3mL PBST混匀后,各取0.1mL混合液涂布3个弧菌显色培养基,在37℃下培养18h-24h计数;
- [0031] 计算原液菌落数和IMB_{VP}捕获菌落数,计算捕获率。
- [0032] 进一步地,用IMB_{VP}溶液捕获目标菌落为实验组,用空白磁珠溶液捕获目标菌落为阴性对照组。
- [0033] 进一步地,所述步骤(4)计算捕获率的公式为:
- [0034]
$$\text{捕获率}(\%) = \frac{\text{富集到的菌落数}(CFU/0.1mL)}{\text{原始菌落数}(CFU/0.1mL)} \times 100$$
- [0035] 本发明的有益之处:应用所述NHS免疫磁珠制备方法,与传统的氨基、羧基磁珠相比,NHS基团修饰的磁珠无需采用EDC/NHS或戊二醛进行活化,一步偶联生物分子,室温条件下1-3小时完成偶联,时间短,效率高,生物相容性好,非特异性吸附少。这种磁珠大大提高了制备的效率,减少了免疫磁珠制备的程序。
- [0036] 因此本方法将制备工艺时间由传统制备工艺时间26h缩短至2-3h,提高制备效率;经过实验对照,与传统制备的副溶血弧菌免疫磁珠相比,富集目标菌群准确率提高,提高6.7%;提高了副溶血性弧菌免疫磁珠的灵敏性,同时凭借其免疫磁珠自身的快速方便、不需要大型检测仪器、价格低廉的特点可以运用于食品,饲料、医疗环境和自然环境中副溶血性弧菌的分离与富集,为高效快速检测副溶血性弧菌提供了可能。

具体实施方式

- [0037] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细描述。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本发明,并不用于

限定本发明。

[0038] 相反,本发明涵盖任何由权利要求定义的在本发明的精髓和范围上做的替代、修改、等效方法以及方案。进一步,为了使公众对本发明有更好的了解,在下文对本发明的细节描述中,详尽描述了一些特定的细节部分。对本领域技术人员来说没有这些细节部分的描述也可以完全理解本发明。

[0039] 用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法,根据所述NHS免疫磁珠制备方法制备的NHS免疫磁珠与副溶血性弧菌的抗体偶联制备进行捕获实验,从而捕获目标菌落。

[0040] 所述NHS免疫磁珠制备方法,以磁流体为载体,偶联副溶血性弧菌抗体,制备成能够富集目标菌株的副溶血性弧菌免疫磁珠;

[0041] 具体方法:

[0042] (1) 洗涤:取0.1mL NHS磁珠加入EP管中,加入0.5mL洗涤缓冲液,洗涤缓冲液为PBST:0.1M PBS溶液含0.05%吐温20,pH7.4,反复洗涤3次,每次间隔5分钟,放置于磁分离器,去除上清液;

[0043] (2) 偶联:取副溶血性弧菌抗体稀释液至EP管中,加入偶联缓冲液调节体积至0.4mL,偶联缓冲液为MEST:15mM MES,含0.05%吐温20,pH6.0,将混合液在室温下震荡反应后,放置于磁分离器,取上清液检测偶联率;

[0044] (3) 封阻:加入封阻缓冲液,封阻缓冲液为PBST:含2%BSA,进行涡旋操作,涡旋30s,将离心管放置室温震荡反应,反应时间1-2小时;

[0045] (4) 保存:洗涤后将制备好的免疫磁珠,即IMB_{VP},将所述IMB_{VP}放于保存缓冲液,保存缓冲液为PBST:含0.02%NaN₃、1%BSA,低温保存待用,保存温度为4℃;优选的,所述检测计算偶联率方法具体包括:

[0046] a.在步骤(3)获得的上清液在洗涤缓冲液洗涤3次,放置于磁分离器,去除上清;

[0047] b.用考马斯亮蓝测蛋白法测定上清液蛋白质含量,计算血清与磁珠偶联率。

[0048] 计算血清与磁珠偶联率的公式为:

$$[0049] \quad \text{偶联率}(\%) = \frac{\text{血清蛋白加入量} - \text{上清液蛋白剩余量}}{\text{血清蛋白加入量}} \times 100。$$

[0050] 用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠的应用方法,用于分离致病性微生物副溶血性弧菌;

[0051] 具体应用方法:

[0052] (1) 将装有IMB_{VP}离线管放置于磁分离器,去除上清液;

[0053] (2) 取0.1mL副溶血性弧菌菌悬液加入到IMB_{VP}中,加入0.3mL偶联缓冲液,混合液在37℃下,进行震荡反应操作后,放置于磁分离器,取0.1mL上清液涂布弧菌显色培养基,去除其他上清液;

[0054] (3) 取0.5mL洗涤缓冲液洗涤IMB_{VP},洗涤3次,放置于磁分离器,去除上清液;

[0055] (4) 加入0.3mL PBST混匀后,各取0.1mL混合液涂布3个弧菌显色培养基,在37℃下培养18h-24h计数;

[0056] 计算原液菌落数和IMB_{VP}捕获菌落数,计算捕获率。

[0057] 优选的,用IMB_{VP}溶液捕获目标菌落为实验组,用空白磁珠溶液捕获目标菌落为阴性对照组。

[0058] 优选的,所述步骤(4)计算捕获率的公式为:

$$[0059] \quad \text{捕获率}(\%) = \frac{\text{富集到的菌落数} (CFU/0.1mL)}{\text{原始菌落数} (CFU/0.1mL)} \times 100$$

[0060] 应用所述NHS免疫磁珠制备方法,与传统的氨基、羧基磁珠相比,NHS基团修饰的磁珠无需采用EDC/NHS或戊二醛进行活化,一步偶联生物分子,室温条件下1-3小时完成偶联,时间短,效率高,生物相容性好,非特异性吸附少。这种磁珠大大提高了制备的效率,减少了免疫磁珠制备的程序。

[0061] 因此本方法将制备工艺时间由传统制备工艺时间26h缩短至2-3h,提高制备效率;经过实验对照,与传统制备的副溶血弧菌免疫磁珠相比,富集目标菌群准确率提高,提高6.7%;提高了副溶血性弧菌免疫磁珠的灵敏性,同时凭借其免疫磁珠自身的快速方便、不需要大型检测仪器、价格低廉的特点可以运用于食品,饲料、医疗环境和自然环境中副溶血性弧菌的分离与富集,为高效快速检测副溶血性弧菌提供了可能。

[0062] 对于本领域的普通技术人员而言,根据本发明的教导,在不脱离本发明的原理与精神的情况下,对实施方式所进行的改变、修改、替换和变形仍落入本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法及应用		
公开(公告)号	CN107561267A	公开(公告)日	2018-01-09
申请号	CN201710559638.2	申请日	2017-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	广东省湛江市质量计量监督检测所		
申请(专利权)人(译)	广东省湛江市质量计量监督检测所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省湛江市质量计量监督检测所		
[标]发明人	刘阳 孔冬伟 吴移山 邱妹 王媚 薛雨		
发明人	刘阳 孔冬伟 吴移山 邱妹 王媚 薛雨		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	杨小东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于NHS基团修饰的免疫磁珠制备方法，具体涉及用于捕获副溶血性弧菌的NHS免疫磁珠制备方法及应用，该方法以磁流体为载体，偶联副溶血性弧菌抗体，制备成能够富集目标菌株的副溶血性弧菌免疫磁珠，应用所述NHS免疫磁珠制备方法，由传统制备工艺时间26h缩短至2-3h，提高制备效率；经过实验对照，与传统制备的副溶血弧菌免疫磁珠相比，富集目标菌群准确率提高，提高6.7%；提高了副溶血性弧菌免疫磁珠的灵敏性，同时凭借其免疫磁珠自身的快速方便、无需大型检测仪器、价格低廉的特点可以运用于食品，饲料、医疗环境和自然环境中副溶血性弧菌的分离与富集，高效快速检测副溶血性弧菌。

$$\text{偶联率}(\%) = \frac{\text{血清蛋白加入量} - \text{上清液蛋白剩余量}}{\text{血清蛋白加入量}} \times 100$$