



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253193 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201010178657. 9

(22) 申请日 2010. 05. 20

(71) 申请人 上海医脉赛科技有限公司

地址 201201 上海市浦东新区张江东区瑞庆路 526 号 4 幢 304 室

(72) 发明人 李莉 杨武利 府寿宽 府宇雷

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司 31224

代理人 陈学雯

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

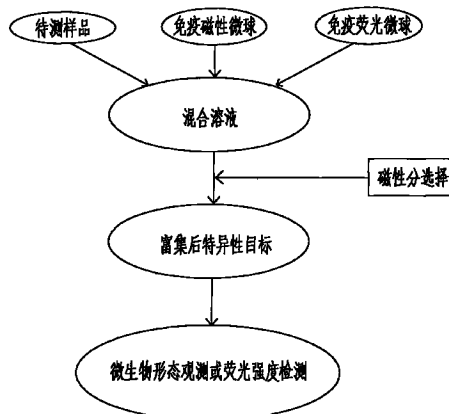
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒及其制备方法和使用方法。该试剂盒包括两个组成成分：1) 与待测微生物特异性结合的免疫磁性微球；2) 与待测微生物特异性结合的免疫荧光微球。制备方法包括如下步骤：(1) 免疫磁性微球的制备，(2) 免疫荧光微球的制备。使用方法：(1) 将待测样品、免疫磁性微球冻干粉及免疫荧光微球加入缓冲溶液中；(2) 所鉴定微生物表面具有同时与免疫磁性微球及免疫荧光微球相结合表面抗原决定簇；(3) 通过磁性分离免疫磁性微球富集与之结合的微生物；(4) 通过测定与所分离、富集的微生物相结合的免疫荧光微球的荧光强度对微生物作出定性及定量的判断。本发明具有快速、定量、适用范围广的优点。



1. 一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒,包括以下组成成分:
 - 1) 与待测微生物特异性结合的免疫磁性微球;
 - 2) 与待测微生物特异性结合的免疫荧光微球。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球为具有磁响应性的纳米微球,其粒径为20-150nm,磁响应时间小于30min。
3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球的磁响应性时间小于10min。
4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球的磁响应性时间小于3min。
5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球为超顺磁性纳米微球,磁性材料为铁、钴、镍及其合金纳米粒子,包括 Fe_3O_4 , Fe_2O_4 , Fe_xPt_y , Co_xPt_y , MnFe_xO_y , CoFe_xO_y , NiFe_xO_y , CuFe_xO_y , ZnFe_xO_y , and CdFe_xO_y ,其中x和y为1-6。
6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球具有核壳结构的磁性聚合物复合微球,聚合物材料包括聚苯乙烯、二氧化硅。
7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球为具有表面功能化核壳结构的磁性二氧化硅复合微球。
8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫磁性微球为功能化亲水性磁性微球,表面结合与微生物特异性结合的单克隆抗体或多克隆抗体。
9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球为能发射荧光的纳米微球,其粒径为5-150nm。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球粒径为5-50nm。
11. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球包括无机荧光材料、有机荧光材料及量子点发光材料。
12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述荧光材料包括荧光素类、罗丹明类、邻苯二甲醛类化合物。
13. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球采用荧光材料与纳米微球共价结合。
14. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球采用荧光材料包埋于纳米微球内部。
15. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球含荧光材料的聚合物复合微球,聚合物材料包括聚苯乙烯、二氧化硅。
16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫荧光微球为具有表面功能化二氧化硅复合微球。
17. 一种如权利要求1所述的一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 免疫磁性微球的制备:

通过双功能偶联试剂将磁性纳米微球与微生物抗原特异性抗体偶联,磁分离,充分洗涤后,冷冻干燥后制得偶联抗体的磁性纳米微球;
 - (2) 免疫荧光微球的制备:

通过双功能偶联试剂将荧光纳米微球与微生物抗原特异性抗体偶联,离心或超滤透析分离未结合的抗体,冷冻干燥后制得偶联抗体的荧光纳米微球。

18. 一种如权利要求 1 所述的一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒的使用方法,该试剂盒将对微生物信号的检测转化为对荧光强度的检测,其操作步骤为:

- (1) 将待测样品、免疫磁性微球及免疫荧光微球加入缓冲溶液中;
- (2) 所鉴定微生物表面具有同时与免疫磁性微球及免疫荧光微球相结合表面抗原决定簇;
- (3) 通过磁性分离免疫磁性微球富集与之结合的微生物及结合于微生物上的免疫荧光微球;
- (4) 通过测定与所分离、富集的微生物相结合的免疫荧光微球的荧光强度对微生物作出定性及定量的判断。

19. 根据权利要求 17 所述的使用方法,其特征在于,免疫磁性微球和免疫荧光微球的比例为 1 ~ 2 : 1 ~ 2。

一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒及其制备方法和使用方法,具体涉及一种具有富集作用、可特异性、快速定量检测导致感染性疾病的微生物的磁性荧光试剂盒组成、制备及使用方法。

背景技术

[0002] 微生物的快速检测方法是应用微生物学中一个迅速发展的领域,无论是对感染性疾病的控制和治疗,还是食品安全的监测和管理,都迫切需要快速的致病菌检测方法。

[0003] 目前对致病菌快速检测主要采用微生物学、化学、生物化学、分子生物学、免疫学的方法对致病菌进行分离、检测、鉴定和计数。目前这些致病菌检测方法仍存在局限性,到目前为止,还没有一种方法能简便地从多种生物样本中分离富集致病菌;进而,适时的回答出以下两个问题:1、有没有特定的致病菌,如威胁食品安全的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等,及严重威胁人类生命质量的结核分枝杆菌、肺炎链球菌(定性的检查);2、如果有,有多少?(定量的检测)这对于确定致病菌及采用相应治疗方法至关重要。

[0004] 免疫磁性分离方法,是将特异性抗体偶联在磁性颗粒表面,与样品中被检致病微生物发生特异性结合,载有致病微生物的磁性颗粒在外加磁场的作用下,向磁极方向聚集,并聚集在容器的内壁,稍后将标本液体移出,撒去磁场,收集磁性微球,可以将微生物从磁性微球上解离下来,这种方法可使致病微生物不但得以从多种样品,如土壤样品、食物样品、临床样本中得到分离,而且也得到浓缩富集。

[0005] 免疫磁性分离技术从乳及乳制品、肉类和蔬菜中分离出沙门氏菌,其检测限为每克 1×10^2 个细菌。Seo 等将荧光免疫分析(FIA)与免疫磁性分离结合,测定接种于牛肉、苹果汁和生牛奶中的低浓度大肠杆菌,每克牛肉中仅有4个大肠杆菌即可被检出。可见将免疫磁性分离技术和其它检验方法,如酶联免疫吸附分析(ELISA),多聚酶链式反应(PCR),荧光免疫分析(FIA),电子化学发光(ECL)相结合,可以数倍地提高分离效率和检测极限。而目前在微生物检测中,所有与免疫磁性分离相结合的鉴定和检测方法均包括后续生物化学、分子生物学、免疫学的检查方法,操作繁琐,设备条件要求高,应用前景不容乐观。

[0006] 荧光微球是一种载有荧光分子的功能性微球,由于其在单个微球中富集了能够发射荧光的分子,在许多领域具有广泛的应用前景。目前结合特异性抗体的荧光微球已用于标记和识别各种抗原,包括多糖、蛋白质、细胞等。所检测的荧光强度则与待测物浓度线性相关,从而实现待测抗原的定性及定量检测。该方法最突出的优点是可以在同一体系中同时进行多靶分析,特异性强,可实现快速诊断。

[0007] 因此利用磁性纳米微球的富集作用和荧光微球的定性定量等现代纳米技术,结合现代生物检测方法寻找一种简单有效的方法快速富集各种微生物,并特异性、快速定性、定量检测微生物是本发明需要解决的主要内容。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒,以解决现有微生物检测试剂盒所存在的诸多不足之处。该发明适用于医院诊断,食品卫生部门检验,或者科研机构研究使用。

[0009] 本发明需要解决的技术问题之一是公开一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒。

[0010] 本发明需要解决的技术问题之二是提供该磁性荧光试剂盒的制备方法。

[0011] 本发明需要解决的技术问题之三是提供该磁性荧光试剂盒的使用方法。

[0012] 本发明的原理,参见图 1:

[0013] 荧光微球由于微球的表面标有荧光物质或微球体内结构含有荧光物质的微球,受到外界能量刺激能激发出荧光。近年来,人们已经能够制备各种各样的粒径从纳米级到亚微米级的荧光微球。免疫荧光微球有比较稳定的形态结构及发光行为,受溶剂、热、电、磁等外界条件的影响比纯荧光化合物小很多。将荧光分子或发光材料通过高分子层或二氧化硅壳材料包裹或连接,表面再偶联靶向生物分子,则可形成具有靶向性的荧光纳米粒子;制备了荧光染料染色的纳米微球,通过特定的化学修饰,形成免疫磁性微球,可以使数千个荧光纳米粒子与一个微生物的表面抗原结合,这种放大效应的检测可实现对微生物的超高灵敏检测。

[0014] 免疫磁性微球在磁场中具有顺磁性和高分子粒子的特性。免疫磁性微球的顺磁性使固液分离更加简便,可省去过滤等繁杂的传统操作;而且免疫磁性微球颗粒小,比表面积大,与其它物质偶联容量大,悬浮稳定性好,有利于抗原抗体偶联反应顺利地进行。将待测样品和免疫磁性微球和免疫荧光微球混合时,待测样品中微生物可同时与包被有微生物特异性抗体的免疫磁性微球和免疫荧光微球结合形成新的复合物。通过磁场时,进行磁性分选,该复合物可被滞留,与其它组分相分离,对经过富集后复合物可通过荧光检测进行微生物形态观测或荧光强度测定,其荧光点数量及荧光强度与样品中微生物的数量相关。免疫磁性分离简便易行,免疫磁珠分离技术用在微生物检测方面能准确快速分离出样品中的微生物。

[0015] 本发明通过免疫磁性微球对样本的富集作用,结合免疫荧光微球灵敏的定量的检测效果,可同时高效的分离出样品中的微生物及与微生物特异性结合的免疫荧光微球,通过检测荧光强度,快速对微生物进行定性、定量分析。这对于食品卫生、疾病预防和治疗的具有重要的意义。

[0016] 本发明所需要解决的技术问题,可以通过以下技术方案来实现:

[0017] 作为本发明的第一方面,一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒,包括以下组成成分:

[0018] 1) 与待测微生物特异性结合的免疫磁性微球;

[0019] 2) 与待测微生物特异性结合的免疫荧光微球。

[0020] 进一步,所述免疫磁性微球为具有磁响应性的纳米微球,其粒径为 20-150nm,磁响应时间小于 30min。

[0021] 所述免疫磁性微球的优选磁响应性时间小于 10min。

[0022] 所述免疫磁性微球的优选磁响应性时间小于 3min。

[0023] 进一步,所述免疫磁性微球为超顺磁性纳米微球,磁性材料为铁、钴、镍及其合金

纳米粒子,包括 Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , Fe_xPt_y , Co_xPt_y , MnFe_xO_y , CoFe_xO_y , NiFe_xO_y , CuFe_xO_y , ZnFe_xO_y , and CdFe_xO_y , 其中 x 和 y 为 1-6。

[0024] 所述免疫磁性微球具有核壳结构的磁性聚合物复合微球, 聚合物材料包括聚苯乙烯、二氧化硅等。

[0025] 所述免疫磁性微球优选为具有表面功能化核壳结构的磁性二氧化硅复合微球。

[0026] 所述免疫磁性微球优选为功能化亲水性磁性微球, 表面结合与微生物特异性结合的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0027] 进一步, 所述免疫荧光微球为能发射荧光的纳米微球, 其粒径为 10-150nm。

[0028] 进一步, 所述的免疫荧光微球的优选微球粒径为 5-50nm。

[0029] 所述免疫荧光微球包括无机荧光材料、有机荧光材料及量子点发光材料。

[0030] 所述荧光材料包括荧光素类、罗丹明类、邻苯二甲醛类等化合物, 如异硫氰酸荧光素 (FITC)、罗丹明等。

[0031] 所述免疫荧光微球采用荧光材料与纳米微球共价结合。

[0032] 所述免疫荧光微球采用荧光材料包埋于纳米微球内部。

[0033] 所述免疫荧光微球为含荧光物质的聚合物复合微球, 聚合物材料包括聚苯乙烯、二氧化硅。

[0034] 所述免疫荧光微球优选为具有表面功能化二氧化硅复合微球。

[0035] 作为本发明的第二方面, 一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

[0036] (1) 免疫磁性微球的制备:

[0037] 通过双功能偶联试剂将磁性纳米微球与微生物抗原特异性抗体偶联, 磁分离, 充分洗涤后, 加入含保护剂及分散剂的缓冲溶液, 冷冻干燥后制得偶联抗体的磁性纳米微球;

[0038] (2) 免疫荧光微球的制备:

[0039] 通过双功能偶联试剂将荧光纳米微球与微生物抗原特异性抗体偶联, 离心或超滤透析分离未结合的抗体, 加入含保护剂及分散剂的缓冲溶液, 冷冻干燥后制得偶联抗体的荧光纳米微球。

[0040] 作为本发明的第三方面, 一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒的使用方法, 该试剂盒将对微生物信号的检测转化为对荧光强度的检测, 其操作步骤为:

[0041] (1) 将待测样品、免疫磁性微球冻干粉及免疫荧光微球加入缓冲溶液中;

[0042] (2) 所鉴定微生物表面具有同时与免疫磁性微球及免疫荧光微球相结合表面抗原决定簇; 故微生物表面均匀分布免疫磁性微球和免疫荧光微球;

[0043] (3) 通过磁性分离免疫磁性微球富集与之结合的微生物;

[0044] (4) 通过测定与所分离、富集的微生物相结合的免疫荧光微球的荧光强度对微生物作出定性及定量的判断。

[0045] 进一步, 免疫磁性微球和免疫荧光微球比例为 1 ~ 2 : 1 ~ 2。

[0046] 本发明的有益效果:

[0047] 与目前常规的致病菌检测方法相比, 如细菌培养、免疫 ELISA 法及 PCR 扩增方法, 相比较, 该方法具有快速富集微生物、使用方便、准确度高、敏感度高、假阳性低、设备要求

低等特点,可广泛应用于传染病检测、疾病预防及治疗、食品安全等领域。

附图说明

[0048] 以下结合附图和具体实施方式来进一步说明本发明。

[0049] 图 1 为本发明的原理示意图。

具体实施方式

[0050] 为了使本发明的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体图示,进一步阐述本发明。

[0051] 实施例 1 含氨基基团的纳米磁性微球的制备

[0052] 免疫磁性微球具有核壳结构的磁性聚合物复合微球,聚合物材料包括聚苯乙烯、二氧化硅,优选为具有表面功能化核壳结构的磁性二氧化硅复合微球。

[0053] 在 500ml 三颈瓶中,加入 5.0g 经过去离子水洗涤过的四氧化三铁粉末,加入 200ml 的去离子水,在 600rpm 转速下搅拌分散后,加入 100ml 硝酸溶液 (3.0M),室温下搅拌 10 分钟。然后用磁铁分离并用去离子水洗涤 3-5 次。将洗涤后的四氧化三铁泥浆搅拌分散在 400ml 的柠檬酸钠溶液中 (0.2M),接着用磁铁分离并用去离子水洗涤 3-5 次,最后所得到的四氧化三铁分散在 200ml 去离子水中,制备固含量约为 2.0wt% 的磁流体。

[0054] 在一个 500ml 的三颈瓶中,加入 5.0g 事先制备好的磁流体,并用 40ml 去离子水和 200ml 无水乙醇稀释,然后在高速搅拌下加入 5ml 的浓氨水,加入 4ml 的正硅酸乙酯,维持搅拌 6h 后,再向此体系中加入 0.5ml 的三乙氧基氨丙基硅烷 (APS),继续反应 12h。反应结束后离心洗涤,所制备的免疫磁性微球的粒径为 80-90nm,磁饱和强度为 8.0emu/g,免疫磁性微球的磁响应性时间小于 3min。

[0055] 实施例 2 含氨基基团的纳米荧光微球的制备

[0056] 免疫荧光微球采用荧光材料与纳米微球共价结合。通常免疫荧光微球采用荧光材料包埋于纳米微球内部。免疫荧光微球为含荧光材料的聚合物复合微球,聚合物材料包括聚苯乙烯、二氧化硅,优选为具有表面功能化二氧化硅复合微球。

[0057] 在一个 25ml 的单颈圆底烧瓶中,用 10ml 的无水乙醇溶解 0.0356g 的荧光素 FITC,然后加入 0.0183g 的三乙氧基氨丙基硅烷 (APS),避光搅拌反应 48h,制得键合荧光分子 FITC 的硅烷偶联剂。

[0058] 在一个 500ml 的三颈瓶中,加入 5ml 去离子水和 250ml 无水乙醇,然后在高速搅拌下加入 8.5ml 的浓氨水,加入 7.5ml 的正硅酸乙酯,维持搅拌 4h 后,加入 2ml 上述制备的键合荧光分子异硫氰酸荧光素 (FITC) 的硅烷偶联剂,同时再向此体系中加入 5ml 的正硅酸乙酯,反应 12h 后再向此体系中加入 0.5ml 的三乙氧基氨丙基硅烷 (APS),继续搅拌反应 12h。反应结束后离心洗涤,所制备的荧光微球的粒径为 60-70nm。

[0059] 实施例 3 抗沙门氏菌表面脂多糖的免疫磁性微球的制备

[0060] 1、取大约 25mg 的上述制备的氨基磁性微球于 5ml 含 5% 戊二醛的磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中,混合振荡,室温反应 3h。

[0061] 2、磁分离微球,用磷酸盐缓冲液溶液充分洗涤,磁分离后,弃上清液,除去未反应的戊二醛。

[0062] 3、将活化后氨基磁性微球置于 4ml 磷酸盐缓冲液中,加入 2ml 含抗沙门氏菌表面脂多糖抗体 (10mg/ml) 的磷酸盐缓冲液溶液,振荡,37℃反应 6h。

[0063] 4、磁分离微球,用磷酸盐缓冲液溶液充分洗涤,磁分离后,弃上清液,除去未反应的偶联的抗体,制得抗体偶联的抗沙门氏菌-免疫磁性微球。

[0064] 实施例 4 抗沙门氏菌表面脂多糖免疫荧光微球的制备

[0065] 1、取大约 25mg 的上述制备的氨基荧光微球于 5ml 含 5% 戊二醛的磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中,混合振荡,室温反应 3h。

[0066] 2、离心分离微球,用磷酸盐缓冲液溶液充分洗涤,离心后,弃上清液。

[0067] 3、将活化后氨基荧光微球置于 4ml 磷酸盐缓冲液中,加入 2ml 含抗沙门氏菌表面脂多糖抗体 (10mg/ml) 的磷酸盐缓冲液溶液,振荡,37℃反应 6h。

[0068] 4、离心分离免疫荧光微球,用磷酸盐缓冲液溶液充分洗涤,离心,弃上清液,

[0069] 制得抗体偶联的抗沙门氏菌-免疫荧光微球。

[0070] 实施例 5 荧光显微镜检测沙门氏菌

[0071] 1、将沙门氏菌接种于培养基中,37℃振荡过夜,细菌计数。

[0072] 2、取 10^3 个沙门氏菌、10mg 免疫磁性微球冻干粉及 10mg 免疫荧光微球冻干粉加入 10ml 孵育缓冲液 (10mM 的磷酸盐缓冲液, pH 值 7.4, 0.05% 吐温 20), 室温温和摇荡 5min。

[0073] 3、磁性分离磁性微球,弃上清液。

[0074] 4、用 5ml 孵育缓冲液洗涤三次,磁分离,去除所有未结合的抗沙门氏菌-免疫荧光微球。

[0075] 5、撤去磁场,将所得样品悬于少量孵育缓冲液中。

[0076] 6、通过荧光显微镜观察沙门氏菌表面吸附的荧光微球所形成的荧光点,并进行细菌计数。

[0077] 实施例 6 荧光强度定量检测沙门氏菌

[0078] 1、将沙门氏菌接种于培养基中,37℃振荡过夜,细菌计数。

[0079] 2、取不同细菌数的沙门氏菌、加入 10ml 含抗沙门氏菌表面脂多糖的免疫磁性微球和免疫荧光微球的孵育缓冲液 (10mM 的磷酸盐缓冲液, pH 值 7.4, 0.05% 吐温 20), 室温温和摇荡 5min。

[0080] 3、磁性分离磁性微球,弃上清液。

[0081] 4、用 5ml 孵育缓冲液洗涤三次,磁分离,去除所有未结合的抗沙门氏菌-免疫荧光微球。

[0082] 5、撤去磁场,加入 1ml 8M 脲溶液变性蛋白,使免疫荧光微球和免疫磁性微球分离。

[0083] 6、磁性分离免疫磁性微球,收集上清液。

[0084] 7、通过荧光计测定上清液荧光强度,并绘制标准曲线。

[0085] 8、将待测样品所产生的荧光强度与标准曲线比较,即得待测样品沙门氏菌含量。

[0086] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

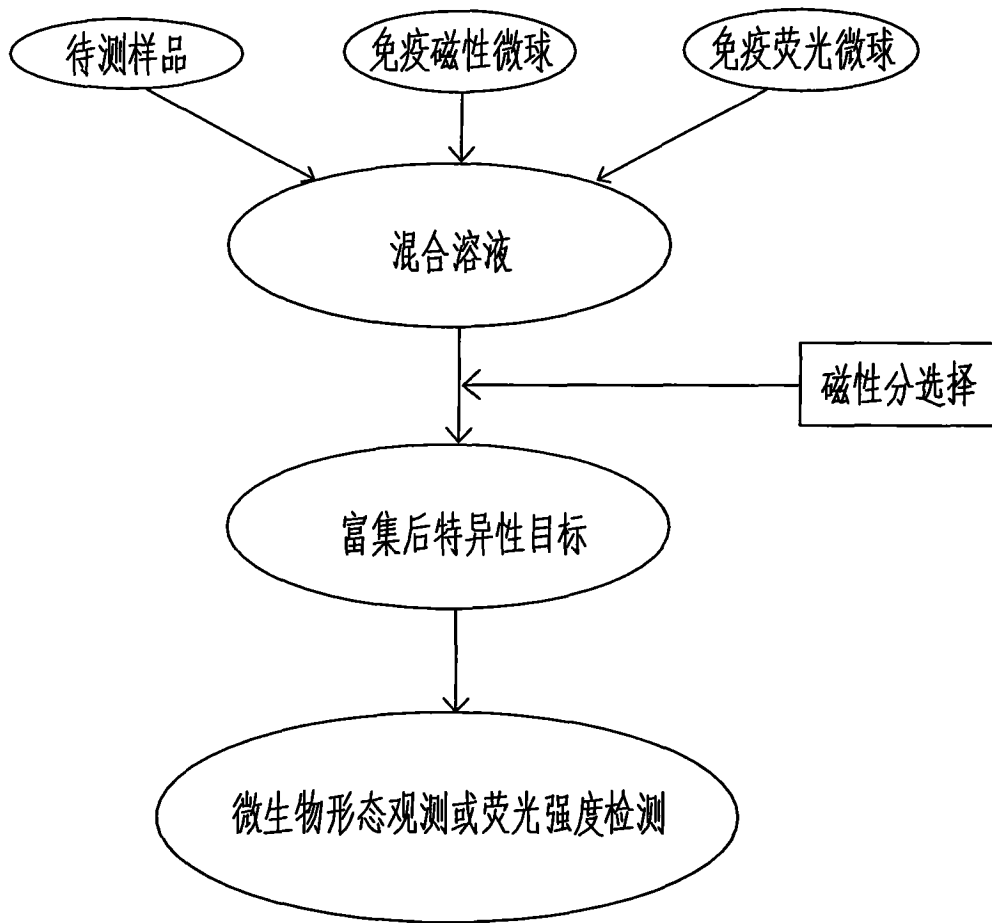


图 1

专利名称(译)	一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN102253193A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201010178657.9	申请日	2010-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海医脉赛科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海医脉赛科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海医脉赛科技有限公司		
[标]发明人	李莉 杨武利 府寿宽 府宇雷		
发明人	李莉 杨武利 府寿宽 府宇雷		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/531 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/569 G01N33/54326 G01N33/582		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测微生物的磁性荧光试剂盒及其制备方法和使用方法。该试剂盒包括两个组成成分：1)与待测微生物特异性结合的免疫磁性微球；2)与待测微生物特异性结合的免疫荧光微球。制备方法包括如下步骤：(1)免疫磁性微球的制备，(2)免疫荧光微球的制备。使用方法：(1)将待测样品、免疫磁性微球冻干粉及免疫荧光微球加入缓冲溶液中；(2)所鉴定微生物表面具有同时与免疫磁性微球及免疫荧光微球相结合表面抗原决定簇；(3)通过磁性分离免疫磁性微球富集与之结合的微生物；(4)通过测定与所分离、富集的微生物相结合的免疫荧光微球的荧光强度对微生物作出定性及定量的判断。本发明具有快速、定量、适用范围广的优点。

