



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102323408 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201110143730. 3

(22) 申请日 2011. 05. 31

(73) 专利权人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 赵渝 陈艳 黄慧心 郭鲁申

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 吴瑾瑜

Charalambos Kaittanis 等. One-Step, Nanoparticle-Mediated Bacterial Detection with Magnetic Relaxation. 《Nano Letters》. 2006, 第 7 卷 (第 2 期),

张晶晶. 部分超顺磁性纳米材料的合成及基于 MRI 的生物应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2010,

审查员 黄晓丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 24/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2003130823 A, 2003. 05. 08,

CN 101865919 A, 2010. 10. 20,

CN 101858964 A, 2010. 10. 13,

CN 101726535 A, 2010. 06. 09,

US 2007111330 A1, 2007. 05. 17,

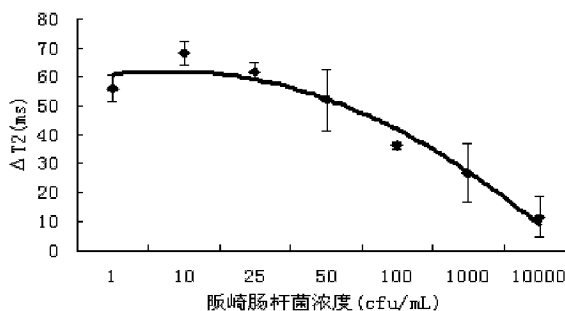
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

快速检测阪崎肠杆菌的方法

(57) 摘要

本发明涉及微生物检测领域,公开了一种快速检测阪崎肠杆菌的方法。将免疫化超顺磁性纳米磁珠加入到样品中,加入稳定剂,30~40℃孵育45~60min,磁珠特异性结合和富集到样品中被检微生物食源性致病菌阪崎肠杆菌上;测定自旋-自旋弛豫时间,以不含菌的样品为空白对照,计算ΔT<sub>2</sub>值。本方法对阪崎肠杆菌的检测具有高度特异性和灵敏性,而且快速,尤其适用于检测低浓度的阪崎肠杆菌,尤其是乳制品中的阪崎肠杆菌;操作方便、简单,可靠性好,对配套设备要求低。



1. 快速检测阪崎肠杆菌的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 向待测的样品中加入免疫化超顺磁性纳米磁珠和稳定剂,30 ~ 40℃ 孵育 45 ~ 60 分钟;

(2) 将步骤(1) 混合物加入核磁管中,测定自旋 - 自旋弛豫时间,以不含菌的样品为空白对照,计算  $\Delta T_2$  值;当  $\Delta T_2$  值大于或等于 20ms 时为阳性结果,可以确定有阪崎肠杆菌存在;当  $\Delta T_2$  值小于 20ms 时,结果为阪崎肠杆菌数大于 1000cfu/ml 或没有阪崎肠杆菌存在;

用核磁共振分析仪测定自旋 - 自旋弛豫时间,核磁管直径为 3cm 时参数设定 D1(us):100 ;D2(us):200 ;D0(ms):100 ;TD:20000 ;SW(kHz):75.0 ;DFW(kHz):30.0 ;RG:2 ;Ns:8 ;C1:2000 ;Ds:3 ;

所述的稳定剂为牛奶,在混合体系中质量含量为 1 ~ 3%;

所述免疫化超顺磁纳米磁珠的粒径为 80 ~ 120nm,用量为 0.5 ~ 0.1mg/ml ;

所述的免疫化超顺磁性纳米磁珠是以四氧化三铁纳米粒子为内核、以二氧化硅为外壳、表面偶联抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的磁性粒子,其制备方法包括如下步骤:

(A)包被二氧化硅和表面氨基化:将粒径 10 ~ 70nm 的四氧化三铁纳米磁核的环己烷溶液与正硅酸四乙酯和氨水混合,加入过硫酸铵,搅拌反应 48 ~ 96 小时;反应结束后加入丙酮,过滤洗涤;所述四氧化三铁纳米磁核、正硅酸四乙酯和过硫酸铵的质量比为 1 :0.018 ~ 0.02 :0.003 ~ 0.004 ;

所述四氧化三铁纳米磁核的制备方法为:在氮气保护和真空条件下,乙酰丙酮铁在油胺和苯醚体系中,依次在 110 ~ 120℃ 和 175 ~ 185℃ 保温 20 ~ 60 分钟;再升温至 300 ~ 305℃ 保温 1 ~ 2 小时;

(B) 连接抗体:特异性抗体活化后分散在 pH7.3 ~ 7.6 磷酸缓冲液中,加入步骤(A) 所得表面氨基化的纳米磁珠,2 ~ 8℃ 反应 8 ~ 12 小时;所述表面氨基化的纳米磁珠与特异性抗体重量比为 1 :0.1 ~ 0.2 ;

所述抗阪崎肠杆菌多克隆抗体用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺) 活化。

2. 权利要求 1 所述快速检测阪崎肠杆菌的方法,其特征在于,所述的抗阪崎肠杆菌多克隆抗体为兔抗阪崎肠杆菌多克隆抗体。

## 快速检测阪崎肠杆菌的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物检测领域,尤其是食源性微生物检测领域,公开了一种以核磁共振方法检测生物功能化超顺磁纳米粒子免疫识别目标微生物,实现高灵敏检测阪崎肠杆菌的方法。

### 背景技术

[0002] 许多食源性疾病大多都是由食源性致病菌引起的。食源性致病菌快速检测一直是研究关注的焦点。食源性致病菌快速检测是采用微生物学、化学、生物化学、生物物理、免疫学的方法对食品及其加工、贮藏等环境中的致病菌进行分离、检测、鉴定和计数。

[0003] 阪崎肠杆菌是乳制品中新发现的一种病原菌,已被世界卫生组织和许多国家确定为引起婴幼儿死亡的重要条件致病菌。阪崎肠杆菌(又称阪崎氏肠杆菌)是肠杆菌科的一种,1980年由黄色阴沟肠杆菌更名为阪崎肠杆菌。该菌引起的食源性疾病可导致婴儿(尤其是新生儿)的脑膜炎、小肠结肠炎和菌血症,报告病例的死亡率达20%~50%,幸存者常遗留严重的神经系统疾病。

[0004] 近年来对食品(奶粉、巧克力、谷类食品、马铃薯、意大利面等)加工厂原料、生产环境及家庭中阪崎肠杆菌污染率的研究发现,阪崎肠杆菌在自然界中分布广泛。在多起阪崎肠杆菌的暴发事件中发现,新生儿阪崎肠杆菌感染与婴儿配方粉(powdered infant formula, PIF)密切相关。2004年2月FAOPWHO在日内瓦召开的婴儿配方粉中阪崎肠杆菌专家研讨会上提出,婴儿配方粉中微量的阪崎肠杆菌污染( $< 3CFU/100g$ )也能导致感染的发生。即使是婴儿配方粉中大肠菌群污染水平符合相应的微生物学标准,也可能存在阪崎肠杆菌的污染。PIF中阪崎肠杆菌的污染已经引起国际社会的广泛关注。2002年国际食品微生物标准化委员会(ICMSF)把阪崎肠杆菌列为“严重危害特定人群,危害生命或慢性实质性后遗症或长期影响”的一种致病菌。

[0005] 从2005年开始我国陆续出台了阪崎肠杆菌检测的行业标准和国家标准。虽然标准规定的检测方法准确性和灵敏度较高,但存在操作繁琐、时间长等缺陷。分子技术比如PCR技术应用于阪崎肠杆菌的检测,用PCR技术检测有害微生物具有特异性强、灵敏度高和操作简便、省时等优点,但是PCR反应受样品情况的影响比较大,特别在食源性有害微生物检查中,食品中的成分(糖类、酸类,油脂等物质)会干扰反应的正常进行。而检测的环境,中间处理环节也会带来一些PCR反应抑制剂。从而使PCR反应呈现较高的假阳性和假阴性率。

[0006] 近年来,随着科技的发展,纳米技术和核磁共振技术的发展趋势与前景越来越广泛,应用范围也趋于多样化。在静磁场中,具有磁性的原子核存在不同能级。用一特定频率的电磁波(射频场)照射样品,当电磁波能量等于能级差时,原子核吸收电磁波发生能级跃迁,产生共振吸收信号,此即核磁共振。核磁共振(NMR)技术就是利用高磁场中原子核对射频辐射的吸收光谱来鉴定化合物结构的分析技术。

[0007] 核磁共振技术目前已经应用的有:细菌、酵母、丝状真菌、支原体等多种微生物的

代谢研究 ; 酒类样品的质量鉴定 ; 肉类样品的质量检验 ; 食品中污染物的分析 ; 核磁共振磷谱  $^{31}\text{P}$  NMR 与 HPLC 联用筛选高效有机磷降解细菌 ; 食品中农药残留物的分析测定等。核磁共振技术具有与其他方法相比较的独特优点 : (1) 对样品没有损伤性, 它并不破坏样品的结构和性质, 无辐射损伤 ; (2) 只需简单预处理 ( 不必进行提取分离 ) 就可以同时测定多种成分 ; (3) 定量测定不需标定 (4) 分析速度与精密度接近于高效液相色谱法 ; (5) 实验方法灵活多样。所以核磁共振技术在食品中的应用和发展也越来越趋于广泛。

[0008] 为了食品安全, 为了寻求更简便、快速、灵敏的食源性致病菌的检测方法, 为了替可能出现的食品安全问题提供应对方法, 需要对现有的检测方法进行改进。

## 发明内容

[0009] 本发明旨在提供一种快速检测阪崎肠杆菌的方法。

[0010] 这种快速检测阪崎肠杆菌的方法, 包括如下步骤 :

[0011] (1) 向待测的样品中加入免疫化超顺磁性纳米磁珠和稳定剂,  $30 \sim 40^\circ\text{C}$  孵育 45 ~ 60 分钟 ;

[0012] (2) 将步骤 (1) 混合物加入核磁管中, 测定自旋 - 自旋弛豫时间, 以不含菌的样品为空白对照, 计算  $\Delta T_2$  值 ;

[0013] 所述的稳定剂为牛奶, 在混合体系中质量含量为 1 ~ 3% ;

[0014] 所述的免疫化超顺磁性纳米磁珠是以四氧化三铁纳米粒子为内核、以二氧化硅为外壳、表面偶联抗阪崎肠杆菌多克隆抗体的磁性粒子。

[0015] 优选的, 抗阪崎肠杆菌多克隆抗体为兔抗阪崎肠杆菌多克隆抗体。

[0016] 免疫化超顺磁纳米磁珠的粒径为  $80 \sim 120\text{nm}$ , 用量为  $0.5 \sim 0.1\text{mg/ml}$ 。

[0017] 所述的免疫化超顺磁性纳米磁珠制备方法包括如下步骤 :

[0018] (1) 包被二氧化硅和表面氨基化 : 将粒径  $10 \sim 70\text{nm}$  的四氧化三铁纳米磁核的环己烷溶液与正硅酸四乙酯和氨水混合, 加入过硫酸铵, 搅拌反应 48 ~ 96 小时 ; 反应结束后加入丙酮, 过滤洗涤 ;

[0019] 四氧化三铁纳米磁核、正硅酸四乙酯和过硫酸铵的质量比为  $1 : 0.018 \sim 0.02 : 0.003 \sim 0.004$  ;

[0020] (2) 连接抗体 : 特异性抗体活化后分散在  $\text{pH } 7.3 \sim 7.6$  磷酸缓冲液中, 加入步骤 (1) 所得表面氨基化的纳米磁珠,  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  反应 8 ~ 12 小时 ; 表面氨基化的纳米磁珠与特异性抗体重量比为  $1 : 0.1 \sim 0.2$  ;

[0021] 所述抗阪崎肠杆菌多克隆抗体用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基丁二酰亚胺) 活化。

[0022] 用核磁共振分析仪测定自旋 - 自旋弛豫时间, 核磁管直径为 3cm 时参数设定  $D1(\text{us}) : 100 ; D2(\text{us}) : 200 ; D0(\text{ms}) : 100 ; TD : 20000 ; SW(\text{kHz}) : 75.0 ; DFW(\text{kHz}) : 30.0 ; RG : 2 ; Ns : 8 ; C1 : 2000 ; Ds : 3$ 。

[0023] 本方法首先制备四氧化三铁超顺磁性纳米磁珠, 纳米磁珠表面包被上二氧化硅, 使磁珠有更好的分散性和对生物大分子有更好的相容性。表面修饰以氨基, 使其能与抗体结合, 加入特异性抗体, 制成免疫化的超顺磁性纳米磁珠。然后将免疫化超顺磁性纳米磁珠加入到样品中, 加入稳定剂,  $30 \sim 40^\circ\text{C}$  孵育 45 ~ 60min, 磁珠特异性结合和富集到样品中被

检微生物食源性致病菌阪崎肠杆菌上。

[0024] 本方法中制备的磁珠粒径较小,容易发生团聚成簇的现象,所以加入稳定剂。稳定剂能使带磁珠的菌体悬浮在溶液中,并且使各个菌体之间保持一定的距离,这样可以避免磁珠过于聚集或者沉降。优化稳定剂得到最优的稳定剂为牛奶。

[0025] 处理好的样品加到核磁管中,设定参数,进行核磁共振检测。磁珠从分散状态到聚集状态的改变,伴随着溶液水质子的自旋-自旋弛豫时间( $T_2$ )的改变,核磁共振仪检测出 $T_2$ 值的改变以此判定样品中是否存在被检微生物食源性致病菌阪崎肠杆菌。样品中被检菌越少,有效的结合富集到被检菌表面的磁珠的比例就会增大,导致自旋-自旋弛豫时间( $T_2$ )有很大的改变,当样品中被检菌数目增多,被检菌更多的抗原决定簇就会去竞争有效的磁珠,导致结合到菌表面的磁珠呈现一种貌似分散的状态,自旋-自旋弛豫时间( $T_2$ )就会有很小的改变。

[0026] 本方法对阪崎肠杆菌的检测具有高度特异性和灵敏性,而且快速,尤其适用于检测低浓度的阪崎肠杆菌,尤其是乳制品中的阪崎肠杆菌。本方法能高灵敏度地检测出样品中的目标菌,尤其在低浓度的目标菌情况下极为灵敏。阪崎肠杆菌在乳制品中含量极少,本方法对样品处理简单,而且只需要少量的样品。整个检测过程仅需 1.5 小时,操作方便、简单,可靠性好,对配套设备要求低。

#### 附图说明

[0027] 图 1 为实施例 2 不同浓度阪崎肠杆菌的检测结果。

[0028] 图 2 为实施例 3 检测阪崎肠杆菌、大肠杆菌等其他对照菌和 5 种混合菌的检测结果。

#### 具体实施方式

[0029] 下面结合实施例对本发明做进一步详细、完整地说明:

[0030] 实施例 1 免疫化(生物功能化)超顺磁性纳米磁珠的制备

[0031] 1、四氧化三铁( $Fe_3O_4$ )的合成以及包被和氨基功能化

[0032] ①、20mM(3.25g)的三氯化铁、120mM(12.3mL)的乙酰丙酮、20mL 的蒸馏水混合搅拌 15min,加入 6mL 三乙胺,过滤,得红色粉末,溶于 30mL 无水乙醇和蒸馏水(V:V 7:3),加热至 80°C,冷却至室温重结晶,得乙酰丙酮合铁。

[0033] 1.06g 乙酰丙酮合铁加入到 15mL 苯醚、15mL 油胺的体系中,磁力搅拌,不断升温至 115°C(温度范围可以在 110~120°C),维持 30 分钟,抽真空,继续升温至 180°C(温度范围可以在 175~185°C),维持 30 分钟,继续升温至 300°C(温度范围可以在 300~305°C),维持 1 小时,冷却至室温(其间一直用氮气保护)。产品磁核  $Fe_3O_4$  用无水乙醇洗 4 次,溶解于正己烷中,4°C 保存。

[0034] ②、由于磁核  $Fe_3O_4$  的分散性不好,粒径也不均匀,且易于和其它物质发生反应,所以必须对磁核进行包裹,来得到化学性能稳定、分散性好的核壳型磁珠。将 2.0g IGEPAL CO-520 与 35mL 环己烷混合均匀,加入 10mg $Fe_3O_4$ ,分散均匀;混合液室温移至三口烧瓶中,连续搅拌,加入 0.35mL 质量浓度 25%~28%氨水,0.2mL 正硅酸四乙酯(TEOS,0.186~0.188mg),搅拌 2 个小时后,加入 35uLAPS(过硫酸铵,0.033mg),继续搅拌 3 天。当反应结

束后,立即加入丙酮,过滤,用无水乙醇洗 3 次。制得表面氨基化包被上二氧化硅的磁珠。

[0035] 2、氨基功能化磁珠和抗体的连接

[0036] 兔抗阪崎肠杆菌多克隆抗体 200uL(浓度 6.82mg/ml),用 200mgEDC.HCL(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和 250mgNHS(N-羟基丁二酰亚胺)活化,4℃孵育一夜,分散到 Ph 7.5 的 PBS 中。加入 10mg 氨基功能化的磁珠,4℃轻摇过夜。磁性分离后,将得到的粒子重新分散于缓冲溶液中,4℃保存备用。

[0037] 实施例 2

[0038] 将实施例 1 制得的免疫化的超顺磁性纳米磁珠分散在磷酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH = 7.2)中,浓度为 0.8mg/mL(实验优化过的数据)。

[0039] 取 225uL 的上述磁珠加入到 75uL 已经孵育 2h 的含不同浓度阪崎肠杆菌的(1cfu/ml、10cfu/ml、25cfu/ml、50cfu/ml、10<sup>2</sup>cfu/ml、10<sup>3</sup>cfu/ml、10<sup>4</sup>cfu/ml)乳制品样品中,加入 2.7mL 的稳定剂 2%的牛奶,37℃孵育 45min ~ 60min(实验优化的数据)。用不含菌的乳制品样品作为对照。

[0040] 将处理好的样品加入到直径 3cm 的核磁管中,将核磁管放入核磁共振分析仪内,调整参数, D1(us):100 ;D2(us):200 ;D0(ms):100 ;TD:20000 ;SW(kHz):75.0 ;DFW(kHz):30.0 ;RG:2 ;Ns:8 ;C1:2000 ;Ds:3,核磁共振分析仪 NM120-Analyst,测定自旋-自旋弛豫时间(T<sub>2</sub>),计算 ΔT<sub>2</sub> 值。结果如图 1 所示。

[0041] 实施例 3

[0042] 将实施例 1 制得的免疫化的超顺磁性纳米磁珠分散在磷酸盐缓冲液(0.01mol/L, pH = 7.2)中,浓度为 0.8mg/mL(实验优化过的数据)。

[0043] 取 225uL 的上述磁珠加入到 75uL 已经孵育 2h 的乳制品样品中(阪崎肠杆菌浓度 10<sup>2</sup>cfu/ml),加入 2.7mL 的稳定剂 2%的牛奶,37℃孵育 45min ~ 60min(实验优化的数据)。用不含菌的乳制品样品作为对照。

[0044] 将处理好的样品加入到直径 3cm 的核磁管中,将核磁管放入核磁共振分析仪内,调整参数, D1(us):100 ;D2(us):200 ;D0(ms):100 ;TD:20000 ;SW(kHz):75.0 ;DFW(kHz):30.0 ;RG:2 ;Ns:8 ;C1:2000 ;Ds:3,核磁共振分析仪 NM120-Analyst,测定自旋-自旋弛豫时间(T<sub>2</sub>),计算 ΔT<sub>2</sub> 值。

[0045] 并且用同样条件检测相同浓度(10<sup>2</sup>cfu/ml)的大肠杆菌 0157、志贺氏菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌以及混合菌(上述 5 种菌的混合物与阪崎肠杆菌混合而成,阪崎肠杆菌在总菌数中的比例为 50%,混合菌的总浓度 10<sup>2</sup>cfu/ml),用不含菌的样品为对照,结果如图 2 所示,说明本方法对阪崎肠杆菌的检测具有高度特异性。

[0046] 免疫化超顺磁性纳米磁珠磁珠从分散状态到聚集状态的改变,伴随着溶液水质子的自旋-自旋弛豫时间(T<sub>2</sub>)的改变,核磁共振仪检测出 T<sub>2</sub> 值的改变以此判定样品中是否存在被检微生物食源性致病菌阪崎肠杆菌。样品中被检菌越少,有效的结合富集到被检菌表面的磁珠的比例就会增大,导致自旋-自旋弛豫时间(T<sub>2</sub>)有很大的改变,当样品中被检菌数目增多,被检菌更多的抗原决定簇就会去竞争有效的磁珠,导致结合到菌表面的磁珠呈现一种貌似分散的状态,自旋-自旋弛豫时间(T<sub>2</sub>)就会有很小的改变。因此,本发明的方法对于阪崎肠杆菌有很高的灵敏性,尤其适用于检测低浓度的阪崎肠杆菌。

[0047] 根据实施例 2 和 3 特异性实验结果、目标微生物梯度稀释以及检测其它的对照菌,

核磁共振测得的自旋-自旋弛豫时间改变  $\Delta T_2$  值大于或等于 20 时为阳性结果,可以确定有阪崎肠杆菌存在,应按依照国家标准对阳性结果及可疑阳性结果进行培养法检查,并根据培养法检查结果做报告。

[0048]  $\Delta T_2$  值小于 20 时有两种可能:(1) 目标微生物(阪崎肠杆菌)数大于 1000cfu/ml ;或,(2) 空白对照(没有阪崎肠杆菌存在)中由于磁珠偶联抗体的自行聚合,造成  $\Delta T_2$  值变化小,此时需要进一步培养或用其他方法鉴定。

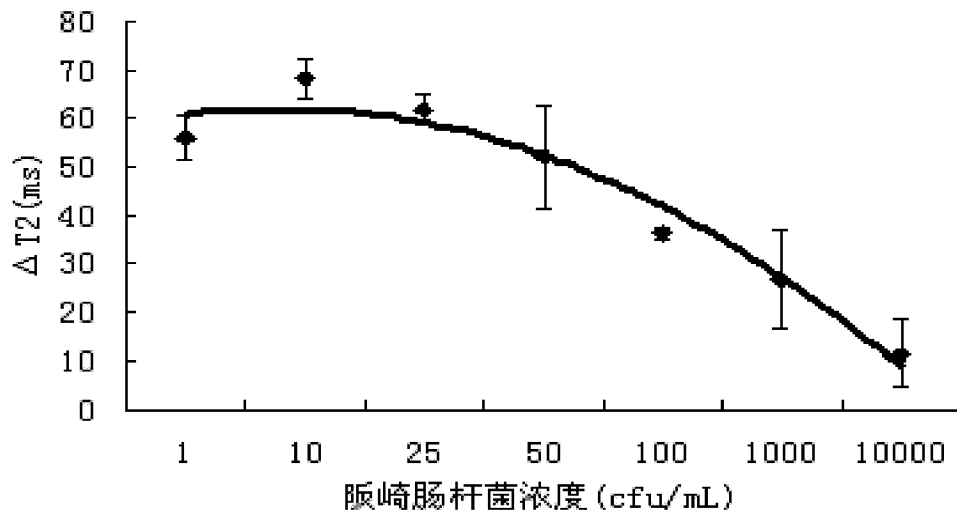


图 1

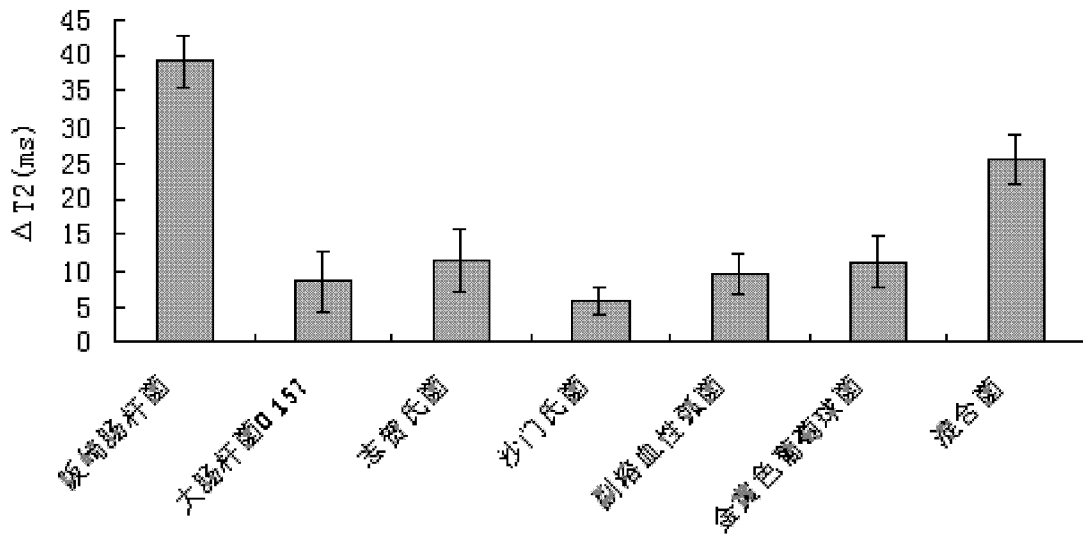


图 2

专利名称(译)	快速检测阪崎肠杆菌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102323408B</a>	公开(公告)日	2014-01-15
申请号	CN201110143730.3	申请日	2011-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	赵渝 陈艳 黄慧心 郭鲁申		
发明人	赵渝 陈艳 黄慧心 郭鲁申		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N24/08		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102323408A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及微生物检测领域，公开了一种快速检测阪崎肠杆菌的方法。将免疫化超顺磁性纳米磁珠加入到样品中，加入稳定剂，30~40°C 孵育 45~60min，磁珠特异性结合和富集到样品中被检微生物食源性致病菌阪崎肠杆菌上；测定自旋-自旋弛豫时间，以不含菌的样品为空白对照，计算 $\Delta T_2$ 值。本方法对阪崎肠杆菌的检测具有高度特异性和灵敏性，而且快速，尤其适用于检测低浓度的阪崎肠杆菌，尤其是乳制品中的阪崎肠杆菌；操作方便、简单，可靠性好，对配套设备要求低。

