



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 208580106 U

(45)授权公告日 2019.03.05

(21)申请号 201820007728.0

(22)申请日 2018.01.03

(73)专利权人 北京市理化分析测试中心

地址 100089 北京市海淀区西三环北路27号

专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

(72)发明人 李静雯 杜美红 刘清琚 赵瑞雪
万宇平 吴小胜 冯月君

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

代理人 严政 刘依云

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

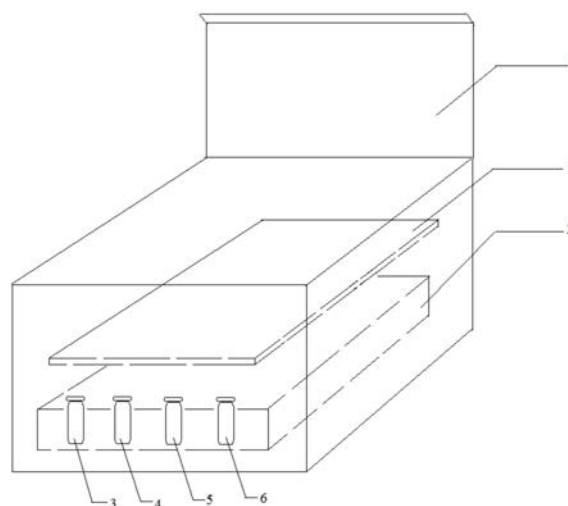
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)实用新型名称

克罗诺杆菌快速检测用系统

(57)摘要

本实用新型涉及微生物检测领域,公开了一种克罗诺杆菌快速检测系统,该系统包括试剂盒和磁力分离设备,其中磁力分离设备包括微孔板用磁力架和/或离心管用磁力架,试剂盒包括盒体和固定板。所述固定板固定于盒体底部,且设置有至少7个容器孔;各容器孔内分别放置有免疫捕获剂容器、检测抗体容器、化学发光A液容器、化学发光B液容器、样品前处理液容器、洗涤液容器和增菌液容器;所述容器孔的大小与各容器的大小相匹配,所述盒体的形状为长方体。使用本实用新型的试剂盒和系统对食品、药品或环境样品中的克罗诺杆菌进行检测时,可以在10小时内准确检测出食品、药品、环境等样品中 10^{-1} CFU/g(或mL)的克罗诺杆菌。



1. 一种克罗诺杆菌快速检测用系统,其特征在于,该系统包括试剂盒和磁力分离设备(8),所述磁力分离设备(8)包括微孔板用磁力架和/或离心管用磁力架;其中,所述试剂盒包括盒体(1)和固定板(2);所述固定板(2)固定于所述盒体(1)的底部,且所述固定板(2)上设置有至少7个容器孔;各容器孔内分别放置有免疫捕获剂容器(3)、检测抗体容器(4)、化学发光A液容器(5)、化学发光B液容器(6)、样品前处理液容器(9)、洗涤液容器(10)和增菌液容器(11);所述容器孔的大小与各容器的大小相匹配,所述盒体(1)的形状为长方体。

2. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述免疫捕获剂容器(3)的容积为1-3mL且装有免疫捕获剂,所述免疫捕获剂含有免疫磁珠和保存液,所述免疫磁珠偶联有能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体。

3. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述检测抗体容器(4)为容积为1-3mL的避光容器且装有检测抗体,所述检测抗体为辣根过氧化物酶标记的能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体。

4. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述化学发光A液容器(5)为容积为5-10mL的避光容器且装有化学发光A液,所述化学发光A液含有鲁米诺和对咪唑基苯酚。

5. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述化学发光B液容器(6)的容积为5-10mL且装有化学发光B液,所述化学发光B液含有过氧化脲、四硼酸钠和柠檬酸。

6. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述样品前处理液容器(9)的容积为25-50mL且装有样品前处理液,所述样品前处理液含有磷酸盐、营养物质和表面活性剂。

7. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述洗涤液容器(10)的容积为25-50mL且装有洗涤液,所述洗涤液为含有吐温的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述增菌液容器(11)为容积为15-80mL的无菌密封容器且装有增菌液,所述增菌液为mLST-Vm肉汤和/或BPW液体培养基。

9. 根据权利要求1-8中任意一项所述的系统,其特征在于,所述试剂盒还包括微孔板(7)、说明书、离心管和密封袋中的至少一种。

克罗诺杆菌快速检测用系统

技术领域

[0001] 本实用新型涉及微生物检测领域,具体地,涉及一种克罗诺杆菌 (*Cronobacter*) 快速检测用系统。

背景技术

[0002] 克罗诺杆菌属是一类条件致病菌,包括阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*)、苏黎世克罗诺杆菌、都柏林克罗诺杆菌、穆汀斯克克罗诺杆菌、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌等五种,可引起感染婴幼儿,特别是早产儿、免疫力低下者,引起败血症、脑膜炎、坏死性小肠结肠炎等疾病。特别是脑膜炎可引发脑梗塞、脑脓肿和脑室脑炎等并发症,患者常遗留有严重的神经系统后遗症。婴幼儿、老年人或免疫低下人群感染克罗诺杆菌属引发的疾病而招致的死亡率可达40-80%。所以我们国家标准对克罗诺杆菌属采取零容忍态度,规定了婴幼儿配方食品、乳和乳制品均需对该菌进行检测。

[0003] 目前,我国国家标准中克罗诺杆菌属的检测需要经过前增菌、选择性增菌、分离培养、平板鉴定、生化鉴定等步骤,虽然结果较为准确,成本较低,但检测过程繁琐,一般需要5-7天的时间获得结果,不适合用于克罗诺杆菌的快速筛查与污染控制。以PCR为代表的分子生物学技术和以酶联免疫为代表的免疫学检测技术是公认的致病菌快速检测的发展方向。分子生物学技术以检测微生物的核酸为特点,灵敏度高、特异性好,但对检测体系、检测环境要求严格,要求检测人员有较高的专业背景,容易形成气溶胶导致假阳性检测结果;而且检测仪器昂贵,限制了其在基层部门微生物快速检测中的应用。免疫分析技术以抗体特异性识别微生物细胞表面的抗原决定簇为特点,成本低廉、特异性好。但是上述方法仍存在灵敏度较低、可检测范围窄、检测结果不稳定易被干扰等问题。

[0004] 食品中克罗诺杆菌的数量一般较少(小于10CFU/g)且占样品中全部微生物的比例较小(一般小于1%,国家标准允许 10^3 - 10^5 CFU/g的非致病微生物存在于食品中),所以不适合直接进行检测。因此,目前急需研发一种能够快速检测克罗诺杆菌且检出限较低的克罗诺杆菌检测用试剂盒。

实用新型内容

[0005] 本实用新型的目的是为了克服现有技术存在的上述缺陷,提供一种克罗诺杆菌(特别是阪崎克罗诺杆菌)快速检测用系统。使用本实用新型提供的试剂盒和系统对食品或环境样品中的克罗诺杆菌进行检测时,可以快速且准确地检测出样品的克罗诺杆菌,同时检出限较低。

[0006] 为了实现上述目的,一方面,本实用新型提供了一种克罗诺杆菌快速检测用试剂盒,该试剂盒包括盒体和固定板;所述固定板固定于所述盒体的底部,且所述固定板上设置有至少7个容器孔;各容器孔内分别放置有免疫捕获剂容器、检测抗体容器、化学发光A液容器、化学发光B液容器、样品前处理液容器、洗涤液容器和增菌液容器;所述容器孔的大小与各容器的大小相匹配。

[0007] 优选地,所述免疫捕获剂容器的容积为1-3mL且装有免疫捕获剂,所述免疫捕获剂

含有免疫磁珠和保存液,所述免疫磁珠偶联有能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体。

[0008] 优选地,所述检测抗体容器为容积为1-3mL的避光容器且装有检测抗体,所述检测抗体为辣根过氧化物酶标记的能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体。

[0009] 优选地,所述化学发光A液容器为容积为5-10mL的避光容器且装有化学发光A液,所述化学发光A液含有鲁米诺和对咪唑基苯酚。

[0010] 优选地,所述化学发光B液容器的容积为5-10mL且装有化学发光B液,所述化学发光B液含有过氧化脲、四硼酸钠和柠檬酸。

[0011] 优选地,所述样品前处理液容器的容积为25-50mL且装有样品前处理液,所述样品前处理液含有磷酸盐、营养物质和表面活性剂。

[0012] 优选地,所述洗涤液容器的容积为25-50mL且装有洗涤液,所述洗涤液为含有吐温的磷酸盐缓冲液。

[0013] 优选地,所述增菌液容器为容积为15-80mL的无菌密封容器且装有增菌液,所述增菌液为LB1液体培养基和/或LB2液体培养基。

[0014] 优选地,所述试剂盒还包括微孔板、说明书、离心管和密封袋中的至少一种。

[0015] 另一方面,本实用新型还提供了一种克罗诺杆菌快速检测用系统,该系统包括上述试剂盒和磁力分离设备,所述磁力分离设备包括微孔板用磁力架和/或离心管用磁力架。

[0016] 本实用新型的试剂盒包括样品前处理容器、免疫捕获剂容器、洗涤液容器、增菌液容器、检测抗体容器、化学发光A液容器和化学发光B液容器,将克罗诺杆菌的免疫捕获过程与化学发光过程结合,实现了对食品或环境样品中的克罗诺杆菌进行快速检测的目的,本实用新型的试剂盒可以准确地在 10小时内检测出食品、药品、环境等样品中低至 10^{-1} CFU/g (或mL)的克罗诺杆菌,避免假阴性和假阳性结果。

附图说明

[0017] 图1是本实用新型的克罗诺杆菌快速检测用试剂盒的结构示意图;

[0018] 图2是本实用新型的克罗诺杆菌快速检测用系统的结构示意图;

[0019] 图3是本实用新型的克罗诺杆菌快速检测用试剂盒的俯视图;

[0020] 图4是实施例1中使用本实用新型的试剂盒进行克罗诺杆菌检测的结果图。

[0021] 附图标记说明

- | | | |
|--------|----|----------|
| [0022] | 1 | 箱体 |
| [0023] | 2 | 固定板 |
| [0024] | 3 | 免疫捕获剂容器 |
| [0025] | 4 | 检测抗体容器 |
| [0026] | 5 | 化学发光A液容器 |
| [0027] | 6 | 化学发光B液容器 |
| [0028] | 7 | 微孔板 |
| [0029] | 8 | 磁力分离设备 |
| [0030] | 9 | 样品前处理液容器 |
| [0031] | 10 | 洗涤液容器 |
| [0032] | 11 | 增菌液容器 |

具体实施方式

[0033] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0034] 如图1所示,本实用新型提供了一种克罗诺杆菌检测用试剂盒,该试剂盒包括箱体1和固定板2;所述固定板2固定于所述箱体1的底部,且所述固定板2上设置有至少7个容器孔(优选为9-14个容器孔,容器孔排列的俯视图如图3所示);各容器孔内分别放置有免疫捕获剂容器3、检测抗体容器4、化学发光A液容器5、化学发光B液容器6、样品前处理液容器9、洗涤液容器10和增菌液容器11;所述容器孔的大小与各容器的大小相匹配(以利于各容器的固定)。

[0035] 在本实用新型中,对所述箱体1的形状没有特别的限定,只要可以容纳以上各容器即可,在优选的情况下,所述箱体1的形状为长方体。

[0036] 在本实用新型中,所述固定板2的大小与所述箱体1的底部大小相匹配;优选地,所述固定板2距离所述箱体1的底部的高度为0-5cm。

[0037] 根据本实用新型,所述免疫捕获剂容器3的容积优选为1-3mL。

[0038] 在本实用新型中,所述免疫捕获剂容器3装有免疫捕获剂;优选地,所述免疫捕获剂含有免疫磁珠和保存液;更优选地,所述免疫磁珠偶联有能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体,也即所述免疫磁珠是通过将能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体偶联在磁珠上制备得到的。所述免疫磁珠的粒径可以为180-2800nm,优选为180-700nm(如190nm、200nm、250nm、300nm、500nm、600nm、700nm或其间的任意值),所述免疫磁珠的粒径以磁珠的粒径计。所述磁珠可以为通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化的表面修饰有羧基的超顺磁性 Fe_3O_4 微球(购自北京维百奥生物技术有限公司,粒径为300nm,表面修饰有羧基官能团)。

[0039] 在本实用新型的一种优选的实施方式中,所述免疫磁珠在使用时需要与磁力分离设备(更优选为磁力架)配套使用,所述磁力分离设备可以为常规的磁分离设备。

[0040] 在本实用新型中,对所述能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体的种类没有特别的限定,可以为本领域的常规选择,只要能够特异性捕获克罗诺杆菌即可。优选地,所述能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体为编号ES-Pab的多克隆抗体(从上海慧耘生物科技有限公司商购得到)和/或编号为1010015的多克隆抗体(从北京翰谱医药生物研究所商购得到)。制备方法可简述为:以新西兰大白兔作为免疫动物,以灭活的克罗诺杆菌作为免疫原,按照3 mg/kg/次进行免疫。将免疫原和佐剂混合经超声充分乳化后,颈背部皮下多点注射。第一次免疫将免疫原与弗氏完全佐剂,每间隔3周进行第二和第三次免疫,佐剂改为弗氏不完全佐剂。第三次免疫10天后采血,检测抗体效价,并采用Protein A亲和层析柱纯化抗体。

[0041] 在优选的情况下,所述免疫磁珠可以通过商购手段获得,也可以按照以下所述的常规方法进行制备获得,具体地,将通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化的表面修饰有羧基的超顺磁性 Fe_3O_4 微球作为磁球使用,取6mg磁球,分散在600 μL PBS缓冲液中,加入10 μL 多克隆抗体(浓度为20mg/mL),在室温下振荡(200r/min) 3h,然后通过磁分离进行清洗,去除未偶联到磁球表面的特异性抗体。接着用

浓度为10mg/L的牛血清白蛋白溶液(溶于磷酸盐缓冲液),在37℃下封闭30min,然后通过磁分离进行清洗,洗去多余的牛血清白蛋白溶液,即得到免疫磁球。

[0042] 在本实用新型中,对所述保存液的种类没有特别的限定,只要可以用于保存所述免疫磁珠即可,例如,所述保存液可以为各种常规的用于免疫磁珠保存的保存液,或者,可以通过实验室制备获得。优选地,所述保存液含有 10mg/L的牛血清白蛋白(BSA)、10mmol/L的磷酸盐缓冲液(PBS)和0.2g/L 的叠氮化钠。

[0043] 根据本实用新型,所述检测抗体容器4优选为避光容器且容积为1-3mL;更优选地,所述检测抗体容器4为容积为1-2mL的棕色玻璃瓶和/或塑料管。

[0044] 在本实用新型中,所述检测抗体容器4装有检测抗体;优选地,所述检测抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记的能够特异地与克罗诺杆菌结合的抗体;更优选地,所述检测抗体为HRP标记的编号为ES-Mab-02的单克隆抗体(从上海慧耘生物科技有限公司商购得到)。

[0045] 根据本实用新型,所述化学发光A液容器5优选为避光容器且容积为 5-10mL;更优选地,所述化学发光A液为容积为5-8mL的棕色玻璃瓶和/ 或塑料管。

[0046] 在本实用新型中,所述化学发光A液容器5装有化学发光A液。本实用新型对所述化学发光A液的组成没有特别的限定,可以为常规的化学发光底物A(如鲁米诺);优选地,所述化学发光A液含有鲁米诺和对咪唑基苯酚,所述化学发光A液的溶剂为去离子水。

[0047] 根据本实用新型,所述化学发光B液容器6的容积优选为5-10mL。

[0048] 在本实用新型中,所述化学发光B液容器6装有化学发光B液。本实用新型对所述化学发光B液的组成没有特别的限定,可以为常规的与上述化学发光底物A(如鲁米诺)配合使用的化学发光底物B(如过氧化物);优选地,所述化学发光B液含有过氧化脲、四硼酸钠和柠檬酸,所述化学发光 B液的溶剂为去离子水。

[0049] 在优选的情况下,所述化学发光A液与所述化学发光B在使用时现混现用;更优选地,所述化学发光A液(溶剂为水)含有1-10mmol/L的鲁米诺和0.5-5mmol/L的对咪唑基苯酚;更优选地,所述化学发光B液(溶剂为水)含有0.05-0.5mmol/L的过氧化脲、0.01-0.3mmol/L的四硼酸钠和 2-20mmol/L的柠檬酸。

[0050] 根据本实用新型,所述样品前处理液容器9的容积优选为25-50mL。

[0051] 在本实用新型中,所述样品前处理液容器9装有样品前处理液。本实用新型对所述样品前处理液的组成没有特别的限定,只要可以用于调节样品的 pH值(优选为6.4-7.4,更优选为6.8-7.4)和/或提供克罗诺杆菌生长所需的营养物质即可,例如,可以为常规的各种pH缓冲液和营养物质;优选地,所述样品前处理液含有磷酸盐、营养物质和表面活性剂;更优选地,所述样品前处理液的组成包括:3g/L的磷酸二氢钾、18g/L的磷酸氢二钠、80g/L 的氯化钠、5mL/L的吐温20和10g/L的蛋白胨(使用去离子水配制)。

[0052] 在优选的情况下,当待测样品为固体时,所述样品前处理液在使用时需要用去离子水稀释至少10倍。

[0053] 根据本实用新型,所述洗涤液容器10的容积为25-50mL。

[0054] 在本实用新型中,所述洗涤液容器10装有洗涤液(10×)。本实用新型对所述洗涤液的组成没有特别的限定,只要可以用于样品的洗涤即可,例如,可以为常规的各种洗涤液;优选地,所述洗涤液为含有吐温的磷酸盐缓冲液;更优选地,所述洗涤液的组成包括:80g/L的氯化钠、2g/L的氯化钾、14.4g/L的磷酸氢二钠、2.4g/L的磷酸二氢钾和5mL/L的吐

温20。

[0055] 在优选的情况下,所述洗涤液在使用时经去离子水稀释至少10倍后使用。

[0056] 根据本实用新型,所述增菌液容器11优选为无菌密封容器且容积为 15-80mL。

[0057] 在本实用新型的另一种实施方式中,在所述试剂盒中设置有3-8个所述增菌液容器11,且各个所述增菌液容器11为无菌密封容器且容积为5-10mL。

[0058] 在本实用新型中,所述增菌液容器11装有增菌液。优选地,所述增菌液为能够用于克罗诺杆菌生长和增殖的培养基;更优选地,所述增菌液为 mLST-Vm肉汤和/或BPW液体培养基。

[0059] 根据本实用新型,所述试剂盒优选还包括微孔板7、说明书、离心管和密封袋中的至少一种。优选地,所述微孔板7优选为底部和侧壁为白色不透明的96孔微孔板;所述密封袋为无菌密封袋,且所述密封袋内装有滤网。

[0060] 如图2所示,本实用新型还提供了一种克罗诺杆菌快速检测用系统,该系统包括上述试剂盒和磁力分离设备8,所述磁力分离设备8包括微孔板用磁力架和/或离心管用磁力架。在本实用新型中,所述磁力架、所述微孔板和所述密封袋均可以通过常规的手段获得。另外,所述系统还可以包括化学发光检测仪。所述化学发光检测仪通常包括电源电路、反应杯存储装置、样品存储装置、样品臂、试剂存储装置、试剂臂、运动式冷藏装置、清洗装置、自动注射泵和微光检测器,同时还可以配置有计算机与控制软件,可进行资料录入、结果汇总、质量控制、结果存储和结果查询等功能,可完成多种分析模式的编程,定量或定性报告结果,自动生成并储存和更新功能,两点自动修正标准曲线。

[0061] 以下将通过实施例对本实用新型进行详细描述。

[0062] 实施例1

[0063] 本实施例用于说明本实用新型提供的克罗诺杆菌快速检测用试剂盒。

[0064] (1) 试剂盒

[0065] 如图1所示,该试剂盒包括盒体1和固定于盒体1底部的固定板2,固定板2上设置有7个容器孔,这7个容器孔内分别放置:免疫捕获剂容器3 (容积为1mL的玻璃瓶)、检测抗体容器4 (容积为1mL的棕色塑料管)、化学发光A液容器5 (容积为5mL的棕色塑料管)、化学发光B液容器6 (容积为5mL的透明塑料管)、样品前处理液容器9 (容积为50mL的透明塑料瓶)、洗涤液容器10 (容积为50mL的透明塑料瓶) 和增菌液容器11 (容积为30mL的透明密封玻璃管),容器孔的大小与各容器的大小相匹配,以利用各容器的固定。

[0066] 其中,各容器内分别装有以下内容物:

[0067] 免疫捕获剂容器3:将6mg免疫磁珠(将通过1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 活化的表面修饰有羧基的超顺磁性 Fe_3O_4 微球作为磁球使用,取6mg磁球,分散在600 μL PBS缓冲液中,加入10 μL ES-Pab多克隆抗体(浓度为20mg/mL),在室温下振荡 (200r/min) 3h,然后通过磁分离进行清洗,去除未偶联到磁球表面的特异性抗体。接着用浓度为10mg/L的牛血清白蛋白溶液(溶于磷酸盐缓冲液),在37℃下封闭30min,然后通过磁分离进行清洗,洗去多余的牛血清白蛋白溶液,即得到免疫磁球) 加入至600 μL 保存液(将10mg牛血清白蛋白、200mg 叠氮化钠与10mmol/L的磷酸盐缓冲液混合,pH为6.8-7.4);

[0068] 检测抗体容器4:HRP标记的ES-Mab-02单克隆抗体600 μL ;

[0069] 化学发光A液容器5:5mL化学发光A液(鲁米诺10mmol/L,对咪唑基苯酚3mmol/L);

[0070] 化学发光B液容器6:5mL化学发光B液(过氧化脲0.5mmol/L,四硼酸钠0.3mmol/L,柠檬酸20mmol/L);

[0071] 样品前处理液容器9:40mL前处理液(3g/L的磷酸二氢钾、18g/L的磷酸氢二钠、80g/L的氯化钠、5mL/L的吐温20和10g/L的蛋白胨,使用去离子水配制),使用时用去离子水稀释10倍;

[0072] 洗涤液容器10:40mL洗涤液(80g/L的氯化钠、2g/L的氯化钾、14.4g/L的磷酸氢二钠、2.4g/L的磷酸二氢钾和5mL/L的吐温20),使用时用去离子水稀释10倍;

[0073] 增菌液容器11:25mL的mLST-Vm肉汤(购自陆桥公司,货号 CM1519A-02)。

[0074] (2) 婴儿营养米粉中克罗诺杆菌的检测

[0075] 20例市售婴儿营养米粉样品,均为阴性样品,随机选择10例加入 10^{-1} CFU/mL阪崎克罗诺杆菌(购自ATCC,货号为29544),得到待测样品。

[0076] 样品前处理:取待测样品100g,加入250mL上述试剂盒中用去离子水稀释15倍的样品前处理液,混匀,在36℃下振荡培养3h,用无菌密封袋中的滤网将沉淀滤去,得到培养液。取过滤后的培养液25mL,加入30μL上述试剂盒中的免疫捕获剂,在36℃下温和振荡1h,放置在磁力架上进行磁分离30min,弃上清,得到免疫磁珠-克罗诺杆菌复合物。

[0077] 待测样品制备:将上述复合物加入1mL上述试剂盒中的增菌液于44℃下增菌4h,放置在磁力架上进行磁分离5min后,用上述试剂盒中用去离子水稀释10倍后的洗涤液清洗两次,磁分离后,用800μL上述试剂盒中稀释10倍后的洗涤液重悬复合物,得到重悬液。

[0078] 检测:将80μL重悬液加入微孔板的小孔中,共加入2个孔(2个平行),加入上述试剂盒中的检测抗体10μL,25℃孵育30min,放置在磁力架上进行磁分离,用上述试剂盒中用去离子水稀释10倍后的洗液清洗5次(20min),再次磁分离弃上清后,将上述试剂盒中的化学发光A液与化学发光B液按照1:1的体积混合。加入100μL混合液,振荡3min后,用化学发光检测仪测定发光强度。

[0079] 按照GB 4789.40-2016的国标方法进行克罗诺杆菌检测。结果如表1所示。

[0080] 表1

[0081]

检测方法	阳性结果数	阴性结果数	检测时间	阳性检出率
实施例1	10	10	10h	100%
国标方法	10	10	5d	100%

[0082] 实施例2

[0083] 本实施例用于说明本实用新型提供的克罗诺杆菌快速检测用试剂盒。

[0084] (1) 试剂盒

[0085] 使用与实施例1相同的试剂盒。

[0086] (2) 婴幼儿配方乳粉中克罗诺杆菌的检测

[0087] 50例市售疑似感染克罗诺杆菌的婴幼儿配方乳粉。

[0088] 样品前处理:取样品100g,加入250mL上述试剂盒中用去离子水稀释15倍的样品前处理液,混匀,在36℃下振荡培养3h,得到培养液。取培养液25mL,加入30μL上述试剂盒中的免疫捕获剂,在36℃下温和振荡1h,放置在磁力架上进行磁分离30min,弃上清,得到免疫磁

珠-克罗诺杆菌复合物。

[0089] 待测样品制备:将上述复合物加入1mL上述试剂盒中的增菌液于44℃下增菌4h,放置在磁力架上进行磁分离5min后,将上述试剂盒中用去离子水稀释10倍后的洗涤液清洗两次,磁分离后,用800μL上述试剂盒中稀释 10倍后的洗涤液重悬复合物,得到重悬液。

[0090] 检测:分别按照实施例1中步骤(2)的检测方法和按照GB 4789.40-2016 的国标方法进行克罗诺杆菌检测。结果如表2所示。

[0091] 表2

[0092]

检测方法	阳性结果数	阴性结果数	检测时间	阳性检出率	国标符合率
实施例2	1	49	10h	2%	100%
国标方法	1	49	5d	2%	-

[0093] 实施例3

[0094] 本实施例用于说明本实用新型提供的克罗诺杆菌快速检测用试剂盒的灵敏度。

[0095] (1) 试剂盒

[0096] 使用与实施例1相同的试剂盒。

[0097] (2) 克罗诺杆菌检测

[0098] 待测样品制备:将 10^8 CFU/mL阪崎克罗诺杆菌(同实施例1) 10倍梯度稀释至 10^0 - 10^5 CFU/mL,每个浓度梯度取1mL分别加入14mL阴性牛奶样品中。

[0099] 样品前处理:将每个样品中加入1mL样品前处理液,加入15μL免疫捕获剂,在36℃下温和振荡1h,放置在磁力架上进行磁分离30min,弃上清,得到免疫磁珠-克罗诺杆菌复合物。然后用400μL上述试剂盒中稀释10倍后的洗涤液重悬复合物,得到重悬液。

[0100] 检测:按照实施例1中步骤(2)的检测方法。

[0101] 结果如图4所示,通过图4可以看出,当使用上述试剂盒进行牛奶样品中阪崎克罗诺杆菌的相对定量检测时,检出限为 6×10^2 CFU/mL。

[0102] 通过以上实施例1-3的结果可以看出,使用本实用新型提供的试剂盒对食品或环境样品中的克罗诺杆菌进行检测时,可以准确地在10小时内检测出食品、药品、环境等样品中低至 10^{-1} CFU/g (或mL)的阪崎克罗诺杆菌。

[0103] 以上详细描述了本实用新型的优选实施方式,但是,本实用新型并不限于此。在本实用新型的技术构思范围内,可以对本实用新型的技术方案进行多种简单变型,包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合,这些简单变型和组合同样应当视为本实用新型所公开的内容,均属于本实用新型的保护范围。

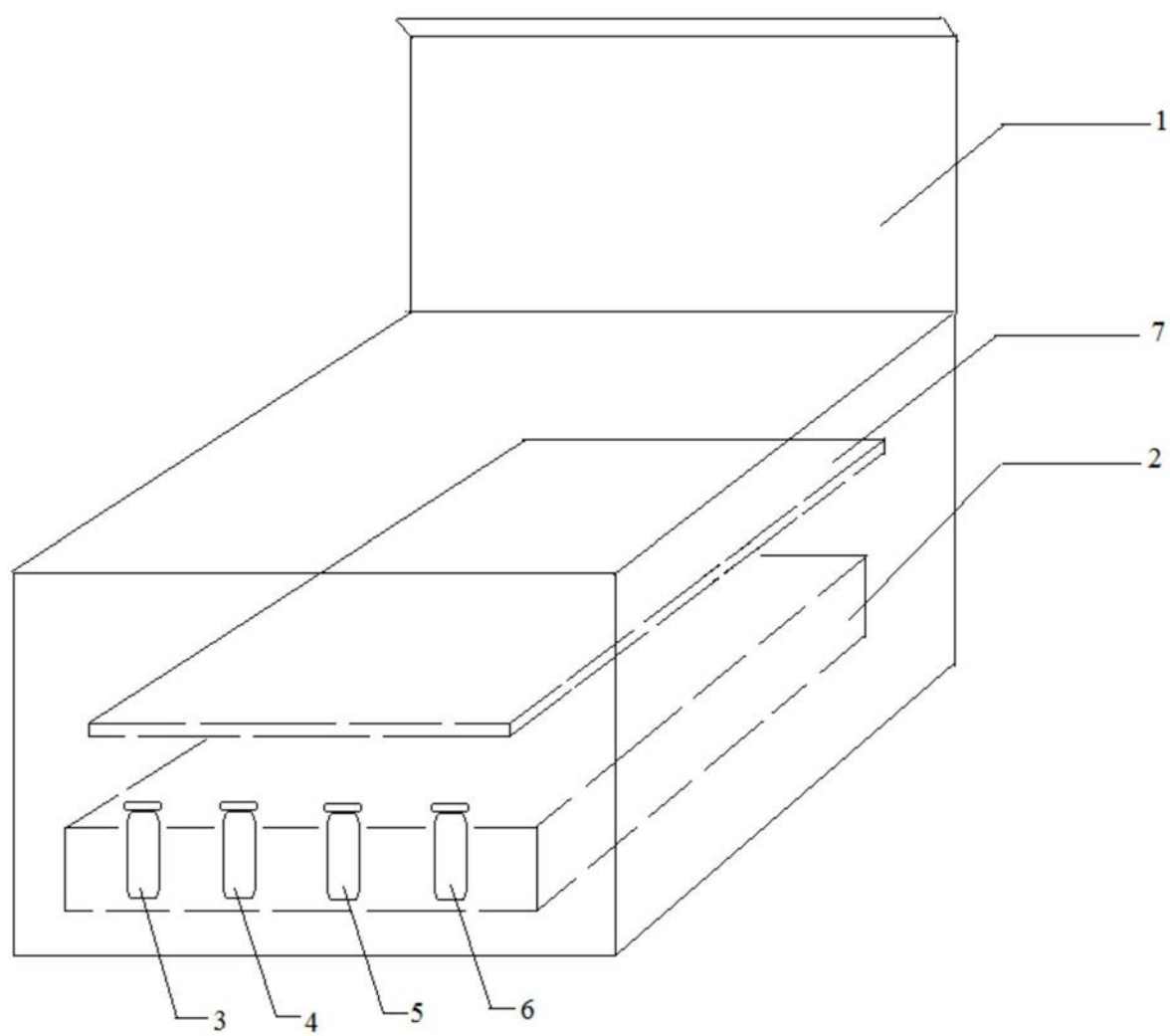


图1

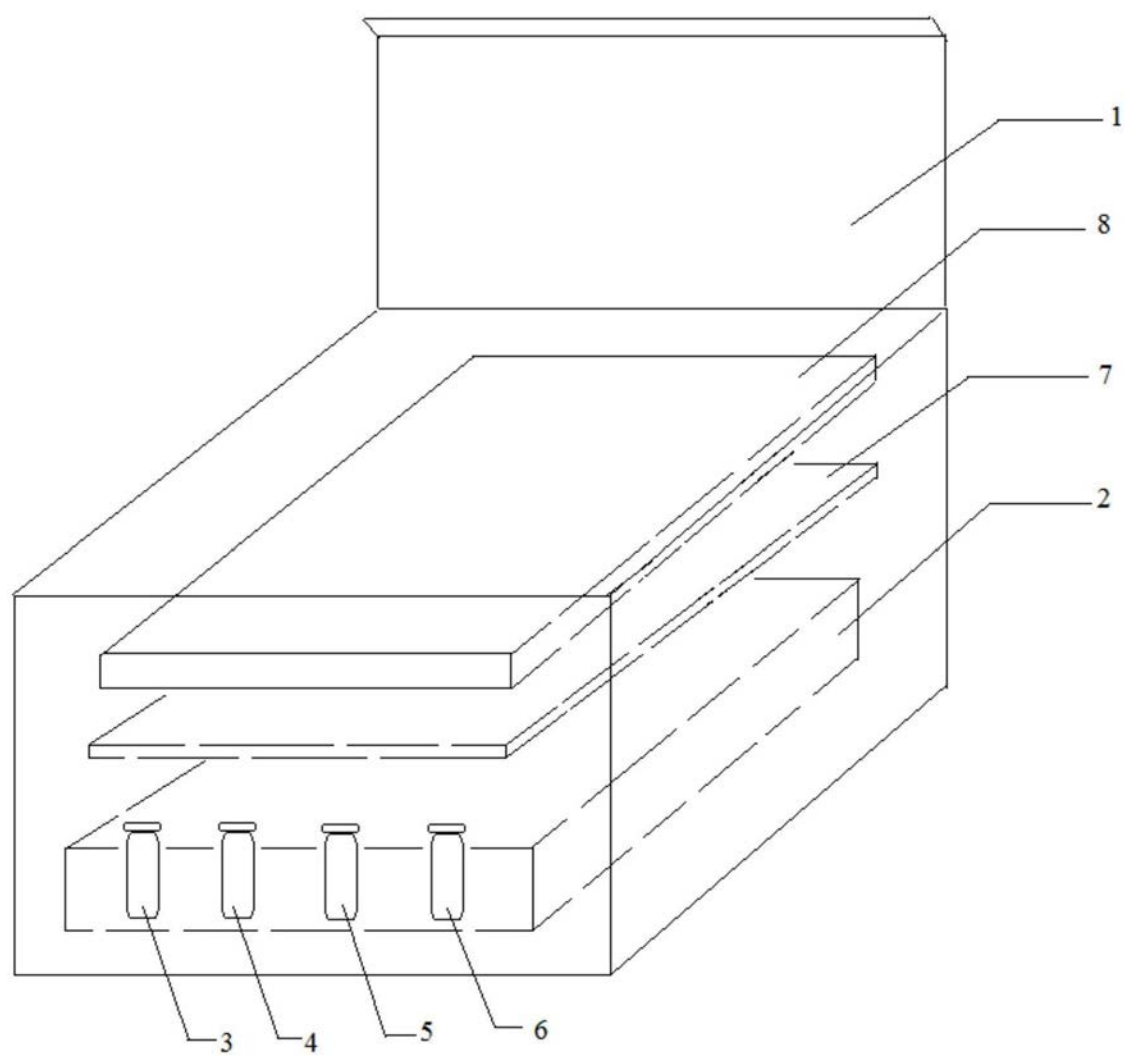


图2

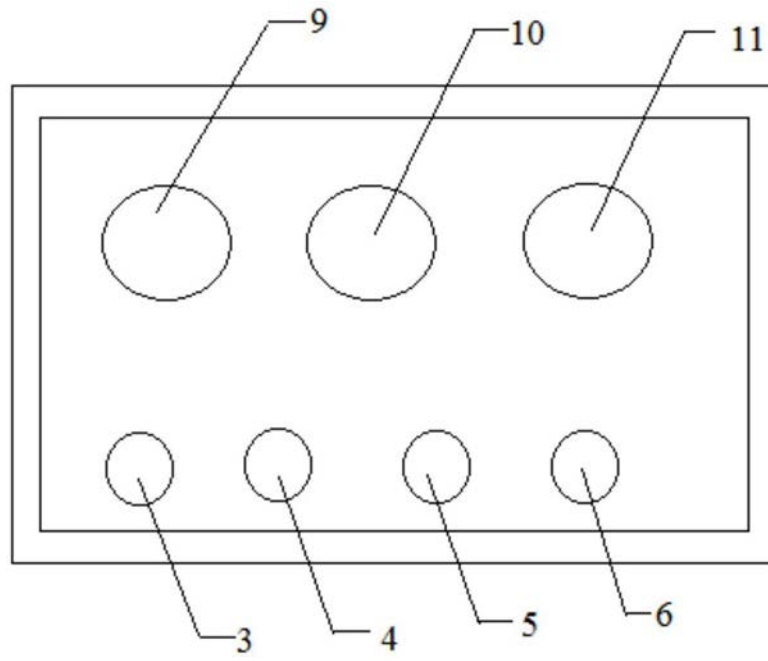


图3

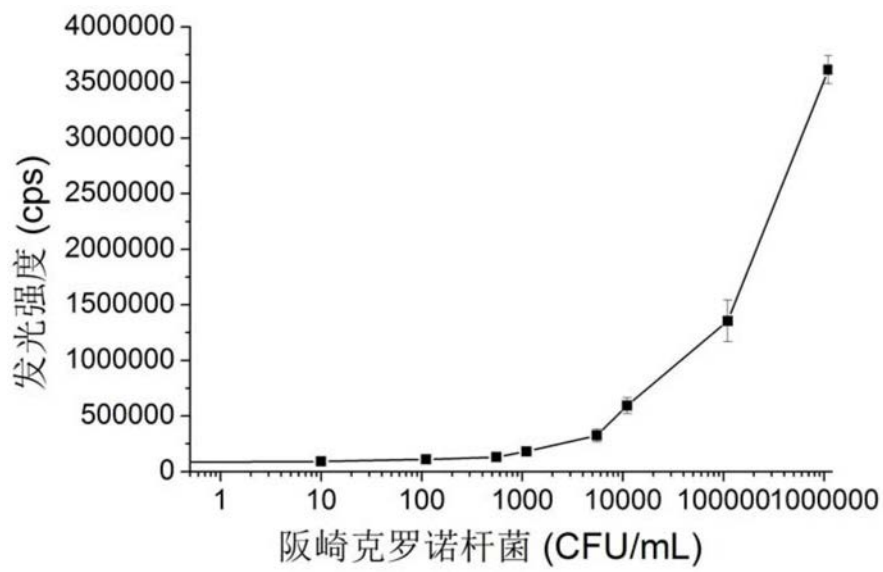


图4

专利名称(译)	克罗诺杆菌快速检测用系统		
公开(公告)号	CN208580106U	公开(公告)日	2019-03-05
申请号	CN201820007728.0	申请日	2018-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京市理化分析测试中心 北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京市理化分析测试中心 北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京市理化分析测试中心 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	李静雯 杜美红 刘清璐 赵瑞雪 万宇平 吴小胜 冯月君		
发明人	李静雯 杜美红 刘清璐 赵瑞雪 万宇平 吴小胜 冯月君		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	严政		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及微生物检测领域，公开了一种克罗诺杆菌快速检测系统，该系统包括试剂盒和磁力分离设备，其中磁力分离设备包括微孔板用磁力架和/或离心管用磁力架，试剂盒包括盒体和固定板。所述固定板固定于盒体底部，且设置有至少7个容器孔；各容器孔内分别放置有免疫捕获剂容器、检测抗体容器、化学发光A液容器、化学发光B液容器、样品前处理液容器、洗涤液容器和增菌液容器；所述容器孔的大小与各容器的大小相匹配，所述盒体的形状为长方体。使用本实用新型的试剂盒和系统对食品、药品或环境样品中的克罗诺杆菌进行检测时，可以在10小时内准确检测出食品、药品、环境等样品中10-1CFU/g(或mL)的克罗诺杆菌。

