

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910022897.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月28日

[11] 公开号 CN 101566632A

[22] 申请日 2009.6.10

[21] 申请号 200910022897.7

[71] 申请人 陕西师范大学

地址 710062 陕西省西安市长安南路199号  
(食品工程与营养科学学院)

[72] 发明人 李建科 王峰 余朝舟

[74] 专利代理机构 西安集思得知识产权代理有限公司

代理人 张晋吉

权利要求书4页 说明书6页

[54] 发明名称

耐热菌的 ELISA 快速检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种耐热菌的 ELISA 快速检测方法，目前采用的细菌平皿培养记数法，检测周期长，PCR 及 QC-PCR 检测方法步骤较繁琐。本发明解决了目前耐热菌检测方法存在的缺陷。操作步骤为：耐热菌捕集→预增菌→包被酶标板→封闭酶标板→加耐热菌多克隆抗体→加酶标抗体→加底物工作液→酶标仪测定。由于每步均有冲洗步骤，因此若样品中不含耐热菌，则耐热菌多克隆抗体、酶标抗体被洗掉；若样品中含有耐热菌，经过预增菌可达到所需检测浓度，最终使底物显色而呈阳性反应。本发明简便易行，检测限达国际标准，可满足苹果浓缩汁中耐热菌不超过 1 个/10mL 的检测标准，操作过程可在 24 小时内完成，达到快速检测的效果。

1. 耐热菌的 ELISA 快速检测方法，其特征是按以下步骤进行：

耐热菌的捕集；

耐热菌预增菌；

耐热菌包被酶标板；

封闭酶标板；

加耐热菌多克隆抗体；

加酶标抗体；

加底物工作液；

酶标仪测定。

2. 根据权利要求 1 所述的耐热菌的 ELISA 快速检测方法，其特征是按以下具体操作步骤进行：

2. a 耐热菌的捕集

2. a.1 取 10-20g 待检苹果浓缩汁，以无菌水适度稀释，

2. a.2 用溶剂过滤器过滤捕集耐热菌，滤膜孔径 0.45 $\mu$ m，

2. a.3 耐热菌被截留于滤膜表面；

2. b 耐热菌预增菌

2. b.1 采用 402 培养基预增菌 14-15h，使培养液中耐热菌浓度达到  $5 \times 10^4$  个/mL 以上，

2. b.2 将增菌后的培养液以 10000-12000 rpm/min，离心 10-15min；

2. c 耐热菌包被酶标板

2. c.1 用 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸缓冲液制成菌悬液作为包被液，

2. c.2 将包被液均匀加到酶标板中，每孔 100-150 $\mu$ L，
2. c.3 酶标板在 55-60 $^{\circ}$ C 烘箱中 2-3 h 烘干，
2. c.4 用 0.01mol/L，pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板，
2. c.5 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次，
2. c.6 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；
2. d 封闭酶标板
  2. d.1 封闭液为 5% - 8%的脱脂奶粉，
  2. d.2 将封闭液均匀的加到酶标板各孔中，每孔 200-300 $\mu$ L，
  2. d.3 在 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 2-3 h，
  2. d.4 洗板
    2. d.4.1 用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板
    2. d.4.2 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次
    2. d.4.3 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；
2. e 加耐热菌多克隆抗体
  2. e.1 耐热菌多克隆抗体为免疫大白兔得到的多克隆抗体，
  2. e.2 免疫程序为：
    2. e.2.1 给大白兔耳静脉注射耐热菌，注射的耐热菌浓度为  $1 \times 10^8$  -  $1 \times 10^9$  个/mL，每隔 4 天注射一次，共注射 6 次，第一次注射量为 0.5 mL，以后每次注射量比上一次增加 0.5 mL
    2. e.2.2 免疫注射 6 次后，于第 22-25 天取血，分离血清即为耐热菌多克隆抗血清
    2. e.2.3 将耐热菌多克隆抗血清经过盐析、DEAE-纤维素层析纯化即得耐热菌多克隆抗体，
  2. e.3 耐热菌多克隆抗体与 PBS-吐温 20 的稀释比例为 1 : 1600，

2. e.4 将稀释的耐热菌多克隆抗体加到酶标板各孔中，每孔100-150 $\mu$ L，
2. e.5 在 37 $^{\circ}$ C温箱中孵育 1-2 h，
2. e.6 洗板
  2. e.6.1 用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板
  2. e.6.2 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次
  2. e.6.3 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；
2. f 加酶标抗体
  2. f.1 酶标抗体为酶标山羊抗兔抗体，
  2. f.2 酶标抗体与 PBS-吐温 20 的稀释比例为 1 : 20000，
  2. f.3 将稀释的酶标抗体加到酶标板各孔中，每孔加 100-150 $\mu$ L，
  2. f.4 37 $^{\circ}$ C温箱中孵育 1-2 h，
  2. f.5 洗板
    2. f.5.1 用 0.01mol/L，pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板
    2. f.5.2 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次
    2. f.5.3 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；
2. g 加底物工作液
  2. g.1 底物工作液配方如下：
    2. g.1.1 取 25.7mL 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HP0}_4$  和 24.3mL 0.1mol/L 柠檬酸液放入 100mL 容量瓶，用蒸馏水定容至刻度即为底物缓冲液
    2. g.1.2 精确称取 0.02g 3,3',5,5'-四甲基联苯胺粉末，溶于 20mL 无水乙醇，即为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺母液
    2. g.1.3 底物缓冲液与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺母液按 1:1 的比例混合，每毫升混合液再加入 2 $\mu$ L 30% $\text{H}_2\text{O}_2$  即为底物工作液，

2. g.2 将底物工作液加到酶标板各孔中，每孔加 100-150 $\mu$ L，
2. g.3 反应 15-20 min，
2. g.4 加终止液终止反应
  2. g.4.1 终止液为 2mol/L 的硫酸
  2. g.4.2 酶标板每孔各加 50-75 $\mu$ L；
2. h 酶标仪测定
  2. h.1 将终止反应的酶标板放入酶标仪，
  2. h.2 在波长为 450nm 处测定 OD 值，
  2. h.3 以样品孔 OD 值 - 阴性孔 OD 值/阴性孔 OD 值 $\geq$ 2.1 为阳性判断标准
    2. h.3.1 样品孔为加经捕集并经预增菌处理的样品液，以及耐热菌多克隆抗体、酶标抗体、底物工作液及终止液的酶标孔
    2. h.3.2 阳性样为加耐热菌抗原，以及耐热菌多克隆抗体、酶标抗体、底物工作液及终止液的酶标孔
    2. h.3.3 阴性孔为不加耐热菌抗原，而加耐热菌多克隆抗体、酶标抗体、底物工作液及终止液的酶标孔。

## 耐热菌的 ELISA 快速检测方法

### 技术领域

本发明涉及一种耐热菌的检测方法，具体是耐热菌的 ELISA 快速检测方法，属于食品微生物检测领域。

### 背景技术

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 为酶联免疫分析技术的缩写，该方法是以免疫学反应为基础，将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的分析技术。其基本原理是：①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面，并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体，这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性，又保留酶的活性。在测定时，被检样品（含有受检的抗体或抗原）和酶标抗原或抗体与固相载体表面的抗原或抗体结合。通过洗涤除去未结合的游离反应物，最后，结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与样品中受检物质的量直接相关，使用酶标仪即可定性或定量分析。

酸土环脂芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)，是环状脂肪酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*) 的一员，是一种耐热、嗜酸的细菌，俗称耐热菌。苹果浓缩汁中的耐热菌芽孢能经受酸性条件下的巴氏杀菌过程而存活，在适宜条件下，在果汁中大量繁殖时，产生不良气味化合物，同时使果汁产生轻微沉淀或雾状浑浊，对果汁感官品质有很大影响。尽管耐热菌并不致病，也不产生毒素，但其引起的果汁感官性状劣变，甚

至引起果汁腐败，完全破坏了果汁的食用性和商品价值。所以，国际贸易中对耐热菌含量要求很严，是苹果浓缩汁产品的必检项目，常常成为苹果浓缩汁贸易中的技术壁垒，从而为苹果浓缩汁的生产、贸易和商检提出了新的挑战。

我国鲜苹果出口量和出口额分别位居世界第一位和第五位,苹果浓缩汁出口量居世界第一位，占60%的国际市场份额。然而耐热菌的超标是苹果浓缩汁质量安全的一个常见问题，解决这一问题的关键之一是要有快速、特异、灵敏的检测技术手段，以便及时反馈到生产线，实施有效的控制，以保证产品质量与安全。

目前，国内外对苹果浓缩汁中耐热菌检测的通用方法是细菌平皿培养记数法，检测周期为4-5天，不能及时有效控制产品质量安全。关于耐热菌快速检测方法，有日本学者建立的RT-PCR检测方法，国内有陕西师范大学食品工程与营养科学学院建立的PCR及QC-PCR检测方法。基于PCR的耐热菌检测方法，虽达到了快速、特异，但对设备和实验条件要求高，步骤较繁琐，推广应用较困难。

### 发明内容

本发明的目的是公开一种耐热菌的ELISA快速检测方法，解决目前耐热菌检测方法存在的缺陷。

本发明的操作步骤如下：

耐热菌的捕集→耐热菌预增菌→耐热菌包被酶标板→封闭酶标板→加耐热菌多克隆抗体→加酶标抗体→加底物工作液→酶标仪测定。

本发明将样品中捕集到的耐热菌抗原包被在固相载体上，形成固相抗原，加入封闭液，封闭没有包被到的酶标板空隙部分，从而降低非特异性吸附。加入耐热菌多克隆抗体，其中抗体与固相抗原形成抗原-抗体

复合物，再加入酶标抗体，与上述复合物结合，此时加入底物工作液，复合物上的酶则催化底物而显色，由于每步之间均有冲洗步骤，因此，若样品中不含耐热菌，则耐热菌多克隆抗体、酶标抗体将被洗掉，底物不显色而呈阴性反应；若样品中含有耐热菌，经过预增菌则可以达到所需检测浓度，最终使底物显色而呈阳性反应。本发明简便、易行，适合于现场检测，检测限可达国际标准，可满足苹果浓缩汁中耐热菌不得超过 1 个/10mL 的检测标准要求，整个操作过程可以在 24 小时内完成，可成功用于果汁中耐热菌的快速检测。

### 具体实施方式

本发明按以下具体步骤进行：

#### a. 耐热菌的捕集

- a.1 取 10-20g 待检苹果浓缩汁，以无菌水适度稀释，
- a.2 用溶剂过滤器过滤捕集耐热菌，滤膜孔径 0.45 $\mu$ m，
- a.3 耐热菌被截留于滤膜表面；

#### b. 耐热菌预增菌

b.1 采用 402 培养基预增菌 14-15h，使培养液中耐热菌浓度达到  $5 \times 10^4$  个/mL 以上，

b.2 将增菌后的培养液以 10000-12000 rpm/min，离心 10-15min；

#### c. 耐热菌包被酶标板

- c.1 用 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸缓冲液制成菌悬液作为包被液，
- c.2 将包被液均匀加到酶标板中，每孔 100-150 $\mu$ L，
- c.3 酶标板在 55-60 $^{\circ}$ C 烘箱中 2-3 h 烘干，
- c.4 用 0.01mol/L，pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板，
- c.5 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次，

- c.6 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；
- d. 封闭酶标板
  - d.1 封闭液为 5% - 8%的脱脂奶粉，
  - d.2 将封闭液均匀的加到酶标板各孔中，每孔 200-300 $\mu$ L，
  - d.3 在 37 $^{\circ}$ C温箱中孵育 2-3 h，
  - d.4 洗板
    - d.4.1 用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板
    - d.4.2 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次
    - d.4.3 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；
- e. 加耐热菌多克隆抗体
  - e.1 耐热菌多克隆抗体为免疫大白兔得到的多克隆抗体，
  - e.2 免疫程序为：
    - e.2.1 给大白兔耳静脉注射耐热菌，注射的耐热菌浓度为  $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  个/mL，每隔 4 天注射一次，共注射 6 次，第一次注射量为 0.5 mL，以后每次注射量比上一次增加 0.5 mL
    - e.2.2 免疫注射 6 次后，于第 22-25 天取血，分离血清即为耐热菌多克隆抗血清
    - e.2.3 将耐热菌多克隆抗血清经过盐析、DEAE-纤维素层析纯化即得耐热菌多克隆抗体，
  - e.3 耐热菌多克隆抗体与 PBS-吐温 20 的稀释比例为 1 : 1600，
  - e.4 将稀释的耐热菌多克隆抗体加到酶标板各孔中，每孔 100-150 $\mu$ L，
  - e.5 在 37 $^{\circ}$ C温箱中孵育 1-2 h，
  - e.6 洗板

e.6.1 用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板

e.6.2 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次

e.6.3 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；

f. 加酶标抗体

f.1 酶标抗体为酶标山羊抗兔抗体，

f.2 酶标抗体与 PBS-吐温 20 的稀释比例为 1 : 20000，

f.3 将稀释的酶标抗体加到酶标板各孔中，每孔加 100-150 $\mu$ L，

f.4 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 1-2 h，

f.5 洗板

f.5.1 用 0.01mol/L，pH7.4 的 PBS-吐温 20 洗板

f.5.2 每隔 1 分钟洗板一次，共洗板 5-6 次

f.5.3 洗完之后，倒扣酶标板，轻轻拍掉悬浮液珠；

g. 加底物工作液

g.1 底物工作液配方如下：

g.1.1 取 25.7mL 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HP0}_4$  和 24.3mL 0.1mol/L 柠檬酸液放入 100mL 容量瓶，用蒸馏水定容至刻度即为底物缓冲液

g.1.2 精确称取 0.02g 3,3',5,5'-四甲基联苯胺粉末，溶于 20mL 无水乙醇，即为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺母液

g.1.3 底物缓冲液与 3,3',5,5'-四甲基联苯胺母液按 1:1 的比例混合，每毫升混合液再加入 2 $\mu$ L 30% $\text{H}_2\text{O}_2$  即为底物工作液，

g.2 将底物工作液加到酶标板各孔中，每孔加 100-150 $\mu$ L，

g.3 反应 15-20 min，

g.4 加终止液终止反应

g.4.1 终止液为 2mol/L 的硫酸

g.4.2 酶标板每孔各加 50-75 $\mu$ L;

h. 酶标仪测定

h.1 将终止反应的酶标板放入酶标仪,

h.2 在波长为 450nm 处测定 OD 值,

h.3 以样品孔 OD 值 - 阴性孔 OD 值/阴性孔 OD 值 $\geq$ 2.1 为阳性判断标准

h.3.1 样品孔为加经捕集并经预增菌处理的样品液, 以及耐热菌多克隆抗体、酶标抗体、底物工作液及终止液的酶标孔

h.3.2 阳性样为加耐热菌抗原, 以及耐热菌多克隆抗体、酶标抗体、底物工作液及终止液的酶标孔

h.3.3 阴性孔为不加耐热菌抗原, 而加耐热菌多克隆抗体、酶标抗体、底物工作液及终止液的酶标孔。

专利名称(译)	耐热菌的ELISA快速检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101566632A</a>	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200910022897.7	申请日	2009-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
[标]发明人	李建科 王峰 余朝舟		
发明人	李建科 王峰 余朝舟		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/31		
其他公开文献	CN101566632B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种耐热菌的ELISA快速检测方法，目前采用的细菌平皿培养记数法，检测周期长，PCR及QC - PCR检测方法步骤较繁琐。本发明解决了目前耐热菌检测方法存在的缺陷。操作步骤为：耐热菌捕集→预增菌→包被酶标板→封闭酶标板→加耐热菌多克隆抗体→加酶标抗体→加底物工作液→酶标仪测定。由于每步均有冲洗步骤，因此若样品中不含耐热菌，则耐热菌多克隆抗体、酶标抗体被洗掉；若样品中含有耐热菌，经过预增菌可达到所需检测浓度，最终使底物显色而呈阳性反应。本发明简便易行，检测限达国际标准，可满足苹果浓缩汁中耐热菌不超过1个/10mL的检测标准，操作过程可在24小时内完成，达到快速检测的效果。