

90. 3. 14修正
年 月 日
補元

公告本

申請日期	
案 號	86105975
類 別	

A4
C4

514640

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書 (90 年 3 月 修 正)		
一、發明 新 型 名 稱	中 文	李斯特單胞菌之鑑定及檢測方法
	英 文	Methods for identification and detection of <i>Listeria monocytogenes</i>
二、發明 創 作 人	姓 名	陳淑卿、陳秀雯、戴金華、張長泉
	國 籍	中 華 民 國
	住、居所	台中市南屯區東興東街122號7樓 新竹市食品路331號 新竹市食品路331號 桃園縣楊梅鎮大同里21鄰自立街93巷5號
三、申請人	姓 名 (名稱)	食品工業發展研究所
	國 籍	中 華 民 國
	住、居所 (事務所)	新竹市食品路331號
	代 表 人 姓 名	劉廷英

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

本發明尚未向其他國家申請

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

本發明之相關菌株均已公開於菌種目錄，無須寄存。

細菌	來源
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCRC 14845-14848, 15327-15355, 15386-15388, 15397-15403, CIP 55143, 7832, 7835, 7836, 8147, NCTC 10887, 10890, 11994, ATCC 19115
<i>L. grayi</i>	CCRC 14842, 15356
<i>L. innocua</i>	CCRC 14843, 15357-15358, 15384-15385, 15404
<i>L. ivanovii</i>	CCRC 14844, 15383, NCTC 11007
<i>L. murrayi</i>	CCRC 14849, 15359-15360, 15394
<i>L. seeligeri</i>	CCRC 15361, 15395
<i>L. welshimeri</i>	CCRC 14851, 15362-15364, 15396, ATCC 43550, 43551, 49591
<i>Bacillus cereus</i>	CCRC 10250
<i>Bacillus megaterium</i>	CCRC 10252
<i>Bacillus subtilis</i>	CCRC 10029
<i>Brevibacterium acetyllicum</i>	CCRC 10378

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

<i>Citrobactor freundii</i>	CCRC 12291
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCRC 12313
<i>Escherichia hermannii</i>	CCRC 13892
<i>Escherichia intermedia</i>	CCRC 10032
<i>Jonesia denitrificans</i>	ATCC 14870
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCRC 10692
<i>Micrococcus candidus</i>	CCRC 11273
<i>Micrococcus leteus</i>	CCRC 11271
<i>Micrococcus varians</i>	CCRC 11272
<i>Proteus vulgaris</i>	CCRC 10486
<i>Pseudomonas mendocina</i>	CCRC 10485
<i>Salmonella typhimurium</i>	CCRC 10241
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCRC 10783

CCRC, Culture Collection and Research Center, 食品工業發展研究所菌種保存及研究中心
ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, 美國
Collection of the Institute Pasteur (CIP, Paris, 法國)及 National Collection of Type Cultures (NCTC, London, 英國)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

五、發明說明 (1)

本發明係一種快速鑑定及檢測李斯特單胞菌 (*Listeria monocytogenes*) 的方法，更特定言之，係一種使用抗此菌表面蛋白質之抗體或抗血清，鑑定及檢測李斯特單胞菌之免疫分析方法 (immunoassay)。

李斯特單胞菌是一株重要的食品中毒細菌，廣泛分佈於自然界，和多數病原菌不同的是李斯特單胞菌具有能低溫生長、耐高溫及耐高鹽濃度的特性 (Gahan and Collins, 1991)。近年來，歐美國家李斯特菌症 (listeriosis) 的病例報告逐年增加，且有高達 23% 致死率的報告 (Farber and Peterkin, 1991)。由於其能藉由食物感染人及牲畜，使李斯特單胞菌在食品中的污染受到廣泛的注意及研究。

傳統檢測李斯特單胞菌的方法 (FDA 及 USDA 建議方法) 須經預先增殖、選擇性培養及一系列的生化、溶血、病原性及血清試驗，整個鑑定過程至少需 7 天以上 (Lovett *et al.*, 1987)。近年來利用放射性 DNA 探針 (probe) 法、酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay)、免疫螢光顯微鏡法 (immunofluorescence microscopy)、去氧核糖核酸雜交法 (DNA hybridization) 或聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction) 快速測定李斯特菌的研究相當多，且已有商品化套組問世，如 Gene-Trak (Framingham, MA, USA)、Listertest (VICAM, Watertown, MA, USA) 及 Listeria-Tek (Organon Technika Corp., Durham, NC, USA)，但這些方法只能檢測李斯特菌屬 (*Listeria spp.*) 的細菌，而無法鑑定李斯特單胞菌 (*L. monocytogenes*) (Eley, 1990; Johnson and Lattuada, 1993)。因此，若能發展出一快速、簡便且正確性高的鑑定及檢測方法，對於食品衛生與安全的管制，將有所幫助。

本發明即是提供一種具有種 (species) 的特異性的李斯特單胞菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

表面蛋白質，其分子量為 68,000 道爾吞(dalton)，並以之作為抗原，免疫動物，利用抗血清或純化之抗體，配合免疫分析方法之技術，建立快速鑑定及檢測李斯特單胞菌之方法。

本發明亦提供一種快速鑑定李斯特單胞菌之方法及檢測待測樣品中是否含有李斯特單胞菌之方法。本發明之方法極簡單、經濟且快速，可在 24 小時內完成可疑菌落是否為李斯特單胞菌之鑑定，且具有高靈敏度(sensitivity)及專一性(specificity)。

本發明之方法係對李斯特單胞菌之 68,000 道爾吞大小之細胞表面蛋白質進行免疫分析反應。係以一具有種(species)特異性的李斯特單胞菌之分子量 68,000 道爾吞的表面蛋白質，作為抗原，免疫動物，以產生抗血清並製備純化其抗體，並將該抗體利用於免疫分析方法。並可配合李斯特單胞菌之選擇性培養基之使用。亦可配合簡單生化測試(如溶血素、磷酸環己六醇磷酸脂解酵素、或芳基胺分解酵素之活性)將可能引起交叉反應之 *L. innocua* 及 *L. welshimeri* 和李斯特單胞菌加以區分。

本發明之部份內容因實驗研究目的，已於 1996 年 11 月公開發表於 Journal of Food Protection, Vol.59, No.11, 1996, pages 1176-1181。

本發明之標的、技術內容及特點係以下列圖式、敘述及實例作較詳細之說明。

發明之詳細說明

本發明係提供一種具有種(species)特異性的李斯特單胞菌表面蛋白質，其分子量為 68,000 道爾吞，以之作為抗原，免疫動物，利用抗血清或純化之抗體，配合免疫分析方法之技術，可建立快速

五、發明說明 (3)

鑑定及檢測李斯特單胞菌之方法。本發明亦提供可辨識李斯特單胞菌之抗體。該抗體是以李斯特單胞菌之表面蛋白質作為抗原，免疫動物而得。

已知革蘭氏陰性菌之外膜，含有一些具有種專一性(species specific)、高抗原性的蛋白質(Kabir, 1980; Kabir, 1986)。依本發明李斯特單胞菌表面蛋白質經電泳分析後，發現為革蘭氏陽性菌之李斯特單胞菌也有具此特性之主要蛋白質，分子量為 68,000 道爾吞。雖然此蛋白質之特性尚未十分了解，但可知此是李斯特單胞菌之相當特殊表面蛋白質（參見圖 1 及圖 2 第 1 行及第 7 行）。

李斯特單胞菌之表面蛋白質可由習知程序純化得，如 Koga 氏和 Kawata 氏所述之方法（Koga and Kawata, 1983）。本發明之一較佳具體實施例，係利用硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠片電泳(SDS-PAGE)分離，而直接由該 SDS-PAGE 膠片上切下分子量為 68,000 道爾吞之蛋白質帶。此方法對於以免疫為目的，欲得高純度蛋白質而言，是為一種方便可行的方法。

本發明所使用之抗血清或抗體，可由一般熟知之標準程序製備及純化。本發明中使用表面蛋白質作為抗原，係直接由該電泳膠片上切下含有該表面蛋白質之膠帶，磨碎成非常細顆粒，再與 Freund's 不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)乳化，然後免疫動物。

本發明亦提供一種快速鑑定李斯特單胞菌之方法及檢測待測樣品中是否含有李斯特單胞菌之方法。係對李斯特單胞菌之 68,000 道爾吞大小之細胞表面蛋白質進行免疫分析反應。以該抗體利用於免疫分析方法。

五、發明說明(4)

本發明之方法可利用任何習知免疫分析方法之技術完成。例如，聯結酵素免疫分析法(ELISA)、乳膠凝聚反應法(latex agglutination test)等，但不限於此。本發明方法所使用之免疫分析方法可依本技藝所熟知之方法完成。

本發明之聯結酵素免疫分析法可適用於任何固相(solid phase)，如微滴定盤(microtiter plate)之槽洞(well)內，但不限於此。即先將抗體吸附、固定在微滴定盤槽洞內，作為捕捉抗體；並製備抗體與酵素之耦合體(IgG-peroxidase conjugate) (Hudson and Hay, 1989)，作為測試抗體。以此二者對經處理之待測菌落增殖液進行三明治式聯結酵素免疫分析法之測試。

聯結酵素免疫分析法可包括下列步驟：

- (1)在固相上被覆上述蛋白質之抗體；
- (2)將待鑑定菌株之細胞表面蛋白質與該固相上被覆之該抗體反應，使在該固相上形成抗體-68,000 道爾吞細胞表面蛋白質之複合體；
- (3)加入標幟有酵素之該抗體（抗體酵素耦合體），使在該固相上形成抗體-68,000 道爾吞細胞表面蛋白質-抗體酵素耦合體之複合體；
- (4)加入該酵素之基質以觀察該聯結酵素免疫分析法之反應結果。

聯結酵素免疫分析法亦可包括下列步驟：

- (1)在固相上被覆上述蛋白質之抗體；
- (2)將該待鑑定菌株之細胞表面蛋白質與該固相上被覆之該抗體

五、發明說明(5)

反應，使在該固相上形成抗體-68,000 道爾吞細胞表面蛋白質之複合體；

(3)加入該 68,000 道爾吞細胞表面蛋白質之二次抗體及標幟有酵素之該二次抗體之抗體(抗二次抗體之抗體酵素耦合體)，使在該固相上形成抗體-68,000 道爾吞細胞表面蛋白質-二次抗體-抗二次抗體之抗體酵素耦合體之複合體；

(4)加入該酵素之基質以觀察該聯結酵素免疫分析法之反應結果。

所使用之酵素可為過氧化酵素(peroxidase)；待鑑定菌株之細胞表面蛋白質可以界面活性劑抽取，如 Teepol 或硫酸十二酯鈉(sodium dodecyl sulfate)。

本發明一具體實施例中測試步驟包含下列程序：先將抗體吸附、固定在微滴定盤槽洞內，以含有填塞(blocking)蛋白質(如牛血清蛋白，bovine serum albumin，BSA)之緩衝液填塞槽洞內任何剩餘可吸附蛋白質之部位。加入經處理之待測菌落增殖液反應，以含牛血清蛋白之緩衝液洗之，加入抗體與酵素之耦合體以進行測試，最後加入酵素基質(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; kpl, Gaitherburg, MD,美國)以進行呈色反應。適當呈色後，加入 1 M 之磷酸(H_3PO_4)終止反應，於微滴盤光度計中測 450 nm 吸光值。負對照試驗(negative control)是以含 2%牛血清蛋白之無菌培養液取代增殖菌液，以同樣方式進行聯結酵素免疫分析法。

本發明之乳膠凝聚法可選擇任何適合觀察凝聚反應之顏色的乳膠微粒。該乳膠微粒先以抗體被覆，即將含有適當濃度之抗李斯特單胞菌表面蛋白質之抗體與該乳膠微粒反應而完成。抗體之使用濃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

度取決於抗體力價及製造者之需求，熟諳本技藝之人士可輕易地決定此溶液之適當濃度。如本發明一具體實施例中係使用 70 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度。抗體被覆步驟包含下列程序：先以緩衝液清洗乳膠微粒（如磷酸鹽緩衝液），接著將溶於緩衝液中之抗體與乳膠微粒混合，使抗體吸附在乳膠微粒上，再藉離心將多餘抗體除去，並以含有填塞蛋白質（如牛血清蛋白）之緩衝液洗之。依此製得被覆有抗體之乳膠微粒，即可作為凝聚反應測試之試劑。

本發明方法亦可在一載玻片上完成。如以蠟筆在載玻片上畫出兩個圓圈，並以無菌牙籤挑出一至二個菌落移至載玻片上圓圈內。其中一個圓圈加入一滴(25 μl)之對照乳膠微粒試劑，另一圓圈加入一滴以抗體被覆之乳膠微粒試劑，以牙籤均勻塗開及輕微來回搖晃4分鐘，觀察是否發生凝聚反應並記錄。若在添加被覆抗體之乳膠微粒試劑之圓圈中發現凝聚反應，但對照組仍保持乳白均勻狀，記錄為陽性反應；若載玻片上兩個圓圈內均未發生凝聚反應，則記錄為陰性反應。偶爾會發現兩個圓圈內均發生凝聚反應，則顯示其發生自體凝聚反應(auto-agglutination)，此時試驗無效，應以傳統方法鑑定。

本發明並可配合李斯特單胞菌之選擇性培養基之使用，或以選擇性培養基篩選出待測定樣品中之可疑菌落進行鑑定。利用本發明方法檢測之試樣，可先在具選擇性瓊脂培養基中分離得可疑菌落。依習知技術（Lovett *et al.*, 1987），試樣通常可在（0.01% 蛋白水，peptone water）培養液增生，再接種至選擇性瓊脂培養基（如Oxford medium 或 lithium chloride-phenylethanol-moxalactam）上培

五、發明說明 (7)

養，篩出可疑菌落。

本發明亦可配合簡單生化測試（如溶血素、磷酸環己六醇磷酸脂解酵素、或芳基胺分解酵素之活性）將可能引起交叉反應之 *L. innocua* 及 *L. welshimeri* 和李斯特單胞菌加以區分。磷酸環己六醇磷酸脂解酵素 (PI-PLC) 活性分析方法 (Notermans, et al., 1991) 可以如下方式進行：將待鑑定菌株接種於 TY 平板上 (1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl, 1 % agar)，於 37°C 下培養 24-48 小時；於平板上加 4 毫升、55°C、含有 L- α -phosphatidylinositol (10 mg/mL) 之洋菜膠 (0.7 % 於 20 mM Tris-HCl, pH 7.0)，繼續培養、觀察；菌落周圍產生不透明環者為 (+) 菌株（即有 PI-PLC 活性）。溶血素分析方法 (Notermans, et al., 1991) 可以如下方式進行：將來自於 TSYAE 平板上之菌落穿刺接種於 5 % sheep blood agar (或 horse blood agar)，於 35°C 下培養 48 小時；於強光下觀察菌落周圍是否出現溶血斑。芳基胺分解酵素之活性分析方法 (Bille, et al., 1992) 可以如下方式進行：使用市售檢測試劑 API Listeria (BioMerieux, France)（其中之 DIM test）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

90年3月4日 修正
補充

五、發明說明 (7-1)

本發明之三明治式聯結酵素免疫分析法可得 98%之靈敏度 (sensitivity)，偽陰性比率甚低(1.96%)。雖然在本發明之一具體實施例中，6株 *L. innocua* 及 3株 *L. welshimeri* 產生偽陽性，但此交叉反應可藉簡單生化測試，如溶血素之產生、磷酸環己六醇磷酸脂解酵素(phosphoinositol-specific phospholipase C, PI-PLC)活性或芳基胺分解酵素(arylamidase)活性之有無，將會引起交叉反應之 *L. innocua* 及 *L. welshimeri* 和李斯特單胞菌加以區分。Notermans 等人 (Notermans *et al.*, 1991) 測試 468 株李斯特菌屬細菌，發現僅有李斯特單胞菌及 *L. ivanovii* 具有磷酸環己六醇磷酸脂解酵素活性，此酵素作用於基質 L- α -phosphatidylinositol，產生不溶性的 diacylglycerol，在菌體周圍產生不透明環 (Leimeister-Wächter *et al.*, 1991)。又 99.4 % *L. innocua* 能產生芳基胺分解酵素，而 97.7 % 的李斯特單胞菌不具有此酵素活性 (Bille *et al.*, 1992)，芳基胺分解酵素能水解酵素基質 amino acid β -naphthylamide，產生之 β -naphthylamine 可與呈色劑 Fast Violet BB 作用，而發生橘紅色反應，由此即可區分李斯特單胞菌和 *L. innocua*。因此，磷酸環己六醇磷酸脂解酵素或芳基胺分解酵素酵素活性試驗，可將李斯特單胞菌(磷酸環己六醇磷酸脂解酵素正反應，芳基胺分解酵素酵素負反應)與產生偽陽性之其它李斯特菌屬細菌區別。與傳統生化反應需要 4 天以上才能鑑定李斯特單胞菌相比較，本發明方法以酵素免疫分析法

五、發明說明 (8)

配合磷酸環己六醇磷酸脂解酵素或芳基胺分解酵素活性試驗，可在 24 小時內完成可疑李斯特單胞菌的鑑定；可見本發明方法為一鑑定李斯特單胞菌有效且可靠之方法。

下列實施例進一步例示說明本發明之特質，但絕非限制其範圍，本發明之範圍僅受所附之申請專利範圍所限。

實施例

實施例 1：實驗用菌株及培養基

測試菌株共 93 株，包括 51 株李斯特單胞菌，25 株李斯特菌屬細菌及 17 株非李斯特菌屬菌株（表 1）。所測試的 51 株李斯特單胞菌中，已知血清型的有 28 株，包括 serogroups 1 至 4 的 12 種 serovar；其餘 23 株血清型未知。這些李斯特單胞菌來自食品工業發展研究所菌種保存及研究中心（Culture Collection and Research Center, CCRC），American Type Culture Collection（ATCC, Rockville, MD, 美國），Collection of the Institute Pasteur（CIP, Paris, 法國）及 National Collection of Type Cultures（NCTC, London, 英國）。除了 *Jonesia denitrificans*，所有非李斯特菌屬細菌皆來自食品工業發展研究所菌種保存及研究中心。李斯特菌屬菌株皆保存於含 0.6 % 酵母抽出物 (yeast extract, YE) 之胰化蛋酪白大豆瓊脂培養基 (trypticase soy agar, TSA；Difco Laboratories, Detroit, MI, 美國)。非李斯特菌屬細菌則保存在胰化蛋酪白大豆瓊脂培養基上。欲以聯結酵素免疫分析法 (ELISA) 分析之菌株先在含 0.6 % 酵母抽出物之胰化蛋酪白大豆肉羹 (tryptic soy broth, TSB) 上活化 20 - 24 小時。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

表 1：實驗用菌株

細菌	總數	來源
<i>Listeria monocytogenes</i>	51	CCRC 14845-14848, 15327-15355, 15386-15388, 15397-15403, CIP 55143, 7832, 7835, 7836, 8147, NCTC 10887, 10890, 11994, ATCC 19115
<i>L. grayi</i>	2	CCRC 14842, 15356
<i>L. innocua</i>	6	CCRC 14843, 15357-15358, 15384-15385, 15404
<i>L. ivanovii</i>	3	CCRC 14844, 15383, NCTC 11007
<i>L. murrayi</i>	4	CCRC 14849, 15359-15360, 15394
<i>L. seeligeri</i>	2	CCRC 15361, 15395
<i>L. welshimeri</i>	8	CCRC 14851, 15362-15364, 15396, ATCC 43550, 43551, 49591
<i>Bacillus cereus</i>	1	CCRC 10250
<i>Bacillus megaterium</i>	1	CCRC 10252
<i>Bacillus subtilis</i>	1	CCRC 10029
<i>Brevibacterium acetylicum</i>	1	CCRC 10378
<i>Citrobactor freundii</i>	1	CCRC 12291
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	CCRC 12313
<i>Escherichia hermannii</i>	1	CCRC 13892
<i>Escherichia intermedia</i>	1	CCRC 10032
<i>Jonesia denitrificans</i>	1	ATCC 14870
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	CCRC 10692

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

<i>Micrococcus</i>	1	CCRC 11273
<i>candidus</i>		
<i>Micrococcus leteus</i>	1	CCRC 11271
<i>Micrococcus varians</i>	1	CCRC 11272
<i>Proteus vulgaris</i>	1	CCRC 10486
<i>Pseudomonas</i>	1	CCRC 10485
<i>mendocina</i>		
<i>Salmonella</i>	1	CCRC 10241
<i>typhimurium</i>		
<i>Staphylococcus</i>	1	CCRC 10783
<i>epidermidis</i>		

CCRC, Culture Collection and Research Center, 食品工業發展研究所菌種保存及研究中心

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, 美國

實施例 2：表面蛋白質之純化

表面蛋白質之純化係依據 Koga 氏及 Kawata 氏所述方法(Koga and Kawata, 1983)並加以修改而成。

首先將李斯特單胞菌(*Listeria monocytogenes* CCRC 14845)於含 0.6%酵母抽出物之 500 ml TSB 培養 20-24 小時(35-37°C)後，離心 (3,000 x g, 15 分鐘)收集菌體，以 0.1 M 之 Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8)洗，再次離心，將菌體懸浮於 10 毫升之 1% (w/v) 硫酸十二酯鈉 (SDS)溶液中，於 70°C 熱水浴中加熱 2 小時，以 11,300 x g 離心 20 分鐘取上清液，此即為李斯特菌細胞表面蛋白質。將之以 70 mM 之磷酸緩衝液(pH 6.3)透析，冷凍保存備用。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (11)

實施例 3：電泳分析

將李斯特單胞菌 ATCC19115, CCRC 14842-14849, 14851 利用實施例 2 之方法所得之表面蛋白質以硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠片電泳(SDS-PAGE)進行分析，膠片厚度為 0.75 mm，濃度為 12.5%。電泳完畢後以 Commassie brilliant blue 染色。

如圖 1 所示，除第 5 行李斯特單胞菌 CCRC 14848 (ATCC 19114)外，其餘 6 株李斯特單胞菌之表面蛋白質圖譜十分接近，皆具有一分子量 68,000 道爾吞之蛋白質。由圖 2 可知，其它李斯特菌屬細菌之表面蛋白質（第 2-6 行）則具有較不同之電泳圖譜。

實施例 4：抗原之製備

為進行製備性 SDS-PAGE，每片 3 mm 厚之膠片上施以 2.8 毫克之總表面蛋白質，經電泳分離(80 V, 18 小時)後，將膠片浸於 4 M 鈉溶液中(Higgins and Dahmus, 1979)，室溫下振盪 10-15 分鐘。俟蛋白質帶呈透明狀，直接由膠片上切下分子量為 68,000 道爾吞之蛋白質帶，作為免疫白兔之用。

實施例 5：抗血清之製備

由實施例 4 所得含有分子量為 68,000 道爾吞之蛋白質之膠片，壓成細碎後，以同體積之 Freund's 不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)乳化，以皮下多點注射至白兔，每隻注射 2 毫升乳化抗原。每 3 週以相同方式追加注射，共追加 4 次。最後一次注射後 10 天由兔耳採血，血液於 37°C 放置 1 小時，4°C 隔夜後離心取血清。血清於 56°C 水浴中加熱 30 分鐘以破壞補體(complements)，並以二乙基胺乙基(DEAE)離子交換分析法純化抗體，其方法可參考 Linn 氏等

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

之文獻 (Linn *et al.*, 1973) 。

抗體力價以聯結酵素免疫分析法測知。以 5 $\mu\text{g/ml}$ 之總表面蛋白質吸附在微滴定盤上，加入不同稀釋倍數之抗血清後，以蛋白質 A - 山葵過氧化酵素(horseradish peroxidase)作為二次抗體，進行酵素免疫分析，經測試抗體力價約為 1×10^7 。

實施例 6：抗體之親和性純化

取 8 ml 之 EAH-Sepharose 4B 膠體 (Code No.17-0569-01, Pharmacia, Uppasalla, 瑞典) 先以約 400 ml 之 0.5 M NaCl 膨潤及洗滌，將 80 mg 利用實施例 2 之方法獲得之李斯特單胞菌或 *L. innocua* 總表面蛋白質 (10 mg/ml) 及 80 mg 之 N-ethyl-N'(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC; Code No.E-6383, Sigma, St. Louis, 美國) 溶於去離子水(pH 值預先調整在 4 左右) 中，再和膠體混合均勻，於室溫下旋轉反應隔夜，而溶液 pH 值在反應期間需調整在 4.5-6 之間(以 0.1N HCl 調整)。反應完畢後，膠體經 0.1 M 醋酸緩衝液(acetate buffer, pH 4.0) 清洗，充填成 $0.7 \times 18 \text{ cm}$ 之管柱，再以 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、0.1 M Glycine-HCl 緩衝液(pH 2.5)及 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8)交互沖洗，最後以磷酸生理緩衝液 (phosphate-buffered saline, pH 7.2; PBS)平衡後備用。把實施例 5 中經 DEAE 純化之抗體，通入含李斯特單胞菌表面蛋白質之親和性管柱中，先以 PBS 沖洗出未結合之蛋白質，再以 0.1 M glycine-HCl 緩衝液(pH 3.0)將抗分子量 68,000 道爾吞表面蛋白質之抗體流洗出來，以 PBS 進行透析。此純化之抗體以 polyethylene glycol 10,000 濃縮後，通入含 *L. innocua* 總表面蛋白質之親和性管柱中，並以 PBS 進行流洗，流洗至 280 nm

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

吸光值為零，抗體置於-20°C 保存。

實施例 7：抗體與山葵過氧化酵素耦合體之製備

取 4 mg 山葵過氧化酵素溶於 1 ml 去離子水中，加入 200 μ l 新鮮配製的 sodium periodate，室溫下作用 20 分鐘後，以 1 mM sodium acetate 緩衝液(pH 4.4)於 4°C 隔夜透析。透析後之山葵過氧化酵素加入 8 mg 實施例 5 中經 DEAE 管柱純化之抗體(預先以 0.1 M sodium acetate 緩衝液，pH 9.5 透析)，於室溫下反應 2 小時，最後加入 100 μ l 新鮮配製的 sodium borohydride (4 mg/ml)，4°C 下反應 2 小時，以 0.1 M borate 緩衝液(pH 7.4)透析，加入等體積含 0.4% 牛血清蛋白、60% 甘油之 0.1 M borate 緩衝液(pH 7.4)，置於-20°C 下保存。

實施例 8：待測定菌株增殖菌液之前處理

將表一所列菌株於 TSB-YE 隔夜增殖，並各取 1 ml 增殖之菌液加入 10 % 之 Teepol (primary alkyl (C₉-C₁₃) sodium sulfates, Sigma, St. Louis, 美國)，使其最終濃度為 0.1 %。煮沸 3 分鐘後，離心，上清液加入等體積之 2 % 牛血清蛋白，混合均勻。

實施例 9：聯結酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

將實施例 5 經 DEAE 管柱純化之抗體溶在 PBS 中，使其濃度為 10 μ g/ml，取 0.1 ml 加至 96 孔微滴定盤之槽洞內，於 37°C 反應 1 小時，使抗體被覆在槽洞內。以 PBST (PBS 含 0.05% 之 Tween 20) 洗 5 次，每一槽洞再加入 0.15 ml 之 1% BSA，於 4°C 下放置隔夜。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

微滴定盤以 PBST 沖洗 5 次後，加入 0.1 ml 處理過之增殖菌液，於 37°C 反應 1 小時後，以 PBST 沖洗。抗體與山葵過氧化酵素之耦合體以含 0.1 % Tween 20 、 1 % BSA 之 PBS 稀釋 5,000 倍，取 0.1 ml 加入每個槽洞內，於 37°C 反應 1 小時，以 PBST 沖洗，再加入 0.1 ml 酵素基質 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) : H₂O₂ (v : v = 1 : 1, Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, 美國) 反應數分鐘，進行呈色反應 (藍色) 。適當呈色後，加入 0.1 ml 之 1 M 磷酸終止反應，此時反應溶液呈黃色，可以微滴定盤光度計 (Bio-Tek, Model EL 309, Winooski, Vermont, 美國) 測 450 nm 吸光值判讀結果。

各種不同李斯特菌屬細菌及其它細菌菌株，利用本方法測試之結果如表 2 所示。

表 2：各種不同細菌以聯結酵素免疫分析法測試之結果

細菌	菌株數目		
	總數	陽性反應	陰性反應
<i>L. monocytogenes</i> (李斯特單胞菌)	51	50	1
<i>L. grayi</i>	2	0	2
<i>L. innocua</i>	6	6	0
<i>L. ivanovii</i>	3	0	3
<i>L. seeligeri</i>	2	0	2
<i>L. welshimeri</i>	8	3	5
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	0	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	1
<i>Brevibacterium acetylicum</i>	1	0	1

A7
B7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

<i>Citrobactor freundii</i>	1	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	1
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	1
<i>Escherichia intermedia</i>	1	0	1
<i>Jonesia denitrificans</i>	1	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1
<i>Micrococcus candidus</i>	1	0	1
<i>Micrococcus leteus</i>	1	0	1
<i>Micrococcus varians</i>	1	0	1
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	1
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	0	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	0	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	1

根據 McClure 氏 (McClure, 1990) 所敘述方法計算靈敏度、專一性、偽陽性及偽陰性比率。

靈敏度係以李斯特單胞菌中陽性反應 (真陽性) 除以受測之所有李斯特單胞菌菌株數而得。專一性係以非李斯特菌中陰性反應株數 (真陰性) 除以所測之所有非李斯特菌菌株數而得。偽陽性比率為非李斯特菌中陽性反應株數除以所有呈陽性反應株數 (假陽性反應加上真陽性反應之數目) 之百分比。偽陰性比率為李斯特菌中陰性反應株數除以所有呈陰性反應株數 (假陰性反應加上真陰性反應之數目) 之百分比。

結果歸納在表 3。

表 3

細菌	菌株數目			靈敏度	專一性
	總數	陽性反應	陰性反應	%	%

五、發明說明 (16)

李 斯 特 單 胞 菌	51	50	1	98
李 斯 特 菌 屬 細 菌	21	9	12	57.1
其 它 細 菌	17	0	17	100.0

所測試之 51 株李斯特單胞菌，50 株呈陽性反應，只有 1 株為陰性反應，靈敏性為 98%，偽陰性反應比率為 1.96% (1/51)。對李斯特菌屬之其它細菌，偽陽性比率為 15.25% (9/59)。對非李斯特菌屬之其它細菌而言，靈敏性及專一性皆為 100%。

實施例 10：乳膠凝聚反應法(latex agglutination test)

A.乳膠微粒之被覆處理

取 1.09 μm 大小之乳膠微粒(Japan Synthetic Rubber，東京，日本)1 毫升以 PBS (pH 7.2)洗兩次，再懸浮於 10 毫升之 PBS 中。加入同體積經親和性管柱純化之抗體(70 μg/ml)，於室溫下反應 2 小時，以 PBS 清洗兩次，在懸浮於 10 毫升含有 0.5% 牛血清蛋白及 0.05% 疊氮化鈉(NaN₃)之 PBS 中，乳膠微粒最終濃度為 0.05% (w/v)。對照乳膠係以正常兔子血清純化得免疫球蛋白 G (IgG)，以相同方法被覆於乳膠微粒上。

B.乳膠凝聚反應法(latex agglutination test)

以蠟筆在載玻片上畫出兩個直徑 1.5 公分的圓圈，並以無菌牙籤挑出一至二個菌落移至載玻片上圓圈內。其中一個圓圈加入一滴(25 μl)之對照乳膠微粒試劑，另一圓圈加入一滴以抗體被覆之乳膠微粒試劑，以牙籤塗開及輕微來回搖晃 4 分鐘，觀察是否發生凝聚反應並記錄。若在添加被覆抗體之乳膠微粒試劑之圓圈中發現凝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

聚反應，但對照組仍保持乳白均勻狀，記錄為陽性反應；若載玻片上兩個圓圈內均未發生凝聚反應，則記錄為陰性反應。偶爾會發現兩個圓圈內均發生凝聚反應，此為自體凝聚反應 (auto-agglutination)，表示結果不可解釋。

各種不同李斯特菌屬細菌利用本方法測試之結果如表 4。

表 4：各種李斯特菌屬細菌以乳膠凝聚反應測試之結果

細菌	菌株數目		
	總數	陽性反應	陰性反應
<i>L. monocytogenes</i>	45	40	5
<i>L. welshimeri</i>	3	3	0
<i>L. innocua</i>	5	0	5
<i>L. ivanovii</i>	4	2	2
<i>L. seeligeri</i>	2	1	1
<i>L. murrayi</i>	4	1	3
<i>L. grayi</i>	1	0	1

參考文獻

Bille, J., B. Catimel, E. Bannernan, C. Jacquet, M. N. Yersin, I. Caniaus, D. Monget, and J. Rocourt. 1992. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 58:1857-1860.

Eley, A. 1990. New rapid detection methods for *Salmonella* and *Listeria*. British Food 92:28-31.

Farber, J. M. and P. I, Petekin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55:476-511.

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (18)

Gahan, C. G. M. and J. K. Collins. 1991. Listeriosis: biology and implications for the food industry. Trends in Food Science & Technology. 2:89-93.

Higgins, R. C. and M. E. Dahmus. 1979. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 93:257-260.

Hudson, L. and F. C. Hay. 1989. Affinity techniques for molecules and cells, p. 322-329. In Practical immunology. 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, London.

Johson, J. L. and C. P. Lattuada. 1993. Comparison of nucleic acid hybridization assays and biochemical characterization tests for the confirmation of *L. monocytogenes*. J. Food Prot. 56:834-840.

Kabir, S. 1980. Composition and immunological properties of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 144:382-389.

Kabir, S. 1986. Composition and immunological properties of the cell surface proteins of *Vibrio cholerae*. J. Gen. Microbiol. 132:2235-2242.

Koga, T. and T. Kawata. 1983. Isolation and characterization of the outer membrane proteins from *Vibrio parahaemolyticus*. J. Gen. Microbiol. 129:3185-3196.

Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty. 1991. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 5:361-366.

Linn, T. G., A. L. Greenleaf, R. G. Shorestein, and R. Losick. 1973. Loss of the sigma activity of RNA polymerase of *Bacillus subtilis* during sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 1865-1869.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

Lovett, J., D. W. Francis, and J. M. Hunt. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. J. Food Prot. 50:188-192.

McClure, F. D. 1990. Design and analysis of quantitative collaborative studies: minimum collaborative program. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73:953-960.

Notermans, S. H. W., J. Dufrenne, M. Leimeister-Wächter, E. Domann, and T. Chakraborty. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. Appl. Environ. Microbiol. 57:2666-2670.

圖式說明

圖 1：李斯特單胞菌種中不同菌株之表面蛋白質之電泳圖譜

係由八株李斯特單胞菌所抽取之表面蛋白質，經硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺膠片電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)圖譜。其中未編號之一行為已知分子量之蛋白質，第 1 及 2 行為李斯特單胞菌 CCRC 14845 (ATCC 19111)、第 3 及 4 行為李斯特單胞菌 CCRC 14847 (ATCC 19113)、第 5 行為李斯特單胞菌 CCRC 14848 (ATCC 19114)、第 6 行為李斯特單胞菌 ATCC 19115、第 7 及 8 行為李斯特單胞菌 CCRC 14846 (ATCC 19112)。左列數字為分子量 (kDa)，箭頭代表共同蛋白質。

圖 2：李斯特菌屬中不同菌種之表面蛋白質之電泳圖譜

係由兩株李斯特菌及五株其它李斯特菌屬細菌所抽取之表面蛋白質，經硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺膠片電泳圖譜。其中未編號之一行為已知分子量之蛋白質，第 1 及 7 行分別為李斯特單胞菌 ATCC

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

A7
B7

五、發明說明 (20)

19111 及 ATCC 19115 ；第 2 行為 *L. grayi* CCRC 14842 ；第 3 行為 *L. innocua* CCRC 14843 ；第 4 行為 *L. ivanovii* CCRC 14844；第 5 行為 *L. murrayi* CCRC 14849；第 6 行為 *L. welshimeri* CCRC 14851 。
左列數字為分子量 (kDa) ，箭頭代表共同蛋白質 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

90年3月14日 修正
補充

A5
B5

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 李斯特單胞菌之鑑定及檢測方法)

李斯特單胞菌(*Listeria monocytogenes*)廣泛存在自然界，可經由食物感染人及牲畜，且有高達 23% 的致死率，是一株重要的食品中毒細菌。傳統檢測李斯特單胞菌的鑑定過程中之生化反應至少需 4 天以上之時間，對於食品衛生的管制及稽查，緩不濟急。本發明係利用分子量為 68,000 道爾吞(dalton)之李斯特單胞菌細胞表面蛋白質，免疫動物產生抗體；並將該抗體利用於免疫分析方法(如聯結酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)或乳膠凝聚反應法(latex agglutination test))。利用簡單的生化試驗，如溶血素之產生、磷酸環己六醇磷酸脂解酵素(phosphoinositol-specific phospholipase C, PI-PLC)或芳基胺分解酵素(arylamidase)活性之有無，可將可能引起交叉反應之 *L. innocua* 及 *L. welshimeri* 和李斯特單胞菌加以區分。若配合李斯

英文發明摘要 (發明之名稱： Methods for Identification and detection of *Listeria monocytogenes*)

Listeria monocytogenes is a G(+), facultatively anaerobic, non-spore forming rod which can grow over a wide range of temperature. The wide growth temperature range of *L.monocytogenes*, coupled with its pathogenicity, makes this microorganism a potential hazard in food products. Conventional procedures for the identification of *L.monocytogenes* are tedious and time-consuming. Immunoassays such as ELISA and latex agglutination for rapid detection and identification of *L.monocytogenes* by antibodies specifically against *L.monocytogenes* 68-kDa surface protein were disclosed.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

補充

修正
90年3月14日
補充

四、中文發明摘要 (發明之名稱：

李斯特單胞菌之鑑定及檢測方法)

特菌之選擇性培養基 (如 Oxford medium 或 lithium chloride-phenylehtanol-moxalactam) 之使用，可在 24 小時內將分離自選擇性培養基之可疑李斯特單胞菌落有效鑑定及檢測出來。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

英文發明摘要 (發明之名稱：

)

六、申請專利範圍

第 86105625 號「李斯特單胞菌之鑑定及檢測方法」專利申請案
(91 年 4 月修正)

1. 一種多株抗體，係以 68k 道爾吞之李斯特單胞菌(*Listeria monocytogens*)
細胞表面蛋白質為抗原所製得，該抗原係以下列方法製得：

- (1) 萃取李斯特單胞菌之細胞表面蛋白質；
- (2) 將該細胞表面蛋白質進行電泳分析；
- (3) 取大小為 68k 道爾吞之蛋白質。

2. 一種鑑定李斯特單胞菌之方法，包括下列步驟：

- (1) 將待鑑定菌株培養於李斯特單胞菌之選擇性培養基；
- (2) 利用 68k 道爾吞之李斯特單胞菌(*Listeria monocytogens*)細胞表面
蛋白質為抗原所製得之抗體對待鑑定菌株進行免疫分析反應，該抗原係
以下列方法製得：

- a. 萃取李斯特單胞菌之細胞表面蛋白質；
- b. 將該細胞表面蛋白質進行電泳分析；
- c. 取大小為 68k 道爾吞之蛋白質；

(3) 利用生化測試方法測試待鑑定菌株，該生化測試方法已知對李斯
特單胞菌與 *L. innocua* 及 *L. welshimeri* 可產生不同之測試結果，用
以區分李斯特單胞菌與 *L. innocua* 及 *L. welshimeri*；

(4) 若待鑑定菌株於該李斯特單胞菌之選擇性培養基上呈現李斯特
單胞菌之典型菌落特徵，且經該免疫分析反應結果呈現正反應，且
經該生化測試方法結果顯示與已知李斯特單胞菌應呈現之結果相
同，則該待鑑定菌株為李斯特單胞菌。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該李斯特單胞菌之選擇性培養基
係 Oxford medium 或 lithium chloride-phenylethanol-moxalactam。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

4.如申請專利範圍第2項之方法，其中該免疫分析反應係聯結酵素免疫分析法或乳膠凝聚反應法。

5.如申請專利範圍第4項之方法，其中該聯結酵素免疫分析法包括下列步驟：

- (1)在固相上被覆該抗體；
- (2)將待鑑定菌株之細胞表面蛋白質與該固相上被覆之該抗體反應，使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質之複合體；
- (3)加入標幟有酵素之該抗體（抗體酵素耦合體），使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質-抗體酵素耦合體之複合體；
- (4)加入該酵素之基質以觀察該聯結酵素免疫分析法之反應結果。

6.如申請專利範圍第4項之方法，其中該聯結酵素免疫分析法包括下列步驟：

- (1)在固相上被覆該抗體；
- (2)將該待鑑定菌株之細胞表面蛋白質與該固相上被覆之該抗體反應，使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質之複合體；
- (3)加入該 68k 道爾吞細胞表面蛋白質之二次抗體及標幟有酵素之該二次抗體之抗體（抗二次抗體之抗體酵素耦合體），使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質-二次抗體-抗二次抗體之抗體酵素耦合體之複合體；
- (4)加入該酵素之基質以觀察該聯結酵素免疫分析法之反應結果。

7.如申請專利範圍第4或5項之方法，其中該酵素係過氧化酵素。

8.如申請專利範圍第4或5項之方法，其中該待鑑定菌株之細胞表面蛋白質以界面活性劑抽取。

9.如申請專利範圍第8項之方法，其中該界面活性劑係 Teepol 或硫酸十

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

六、申請專利範圍

二酯鈉。

10.如申請專利範圍第2項之方法，其中該生化測試方法係測試磷酸環己六醇磷酸脂解酵素(phosphoinositol-specific phospholipase C, PI-PLC)、芳基胺分解酵素(arylamidase)活性或溶血素之產生，且該已知李斯特單胞菌應呈現之結果分別為具PI-PLC活性、不具芳基胺分解酵素活性、產生溶血素。

11.一種測定樣品中是否含有李斯特單胞菌之方法，包括下列步驟：

(1)將待測定樣品增殖後塗佈於李斯特單胞菌之選擇性培養基篩選出可疑菌落；

(2)利用68k道爾吞之李斯特單胞菌(*Listeria monocytogens*)細胞表面蛋白質為抗原所製得之抗體對該可疑菌落進行免疫分析反應，該抗原係以下列方法製得：

a.萃取李斯特單胞菌之細胞表面蛋白質；

b.將該細胞表面蛋白質進行電泳分析；

c.取大小為68k道爾吞之蛋白質；

(3)利用生化測試方法測試該可疑菌落，該生化測試方法已知對李斯特單胞菌與 *L. innocua* 及 *L. welshimeri* 可產生不同之測試結果，用以區分李斯特單胞菌與 *L. innocua* 及 *L. welshimeri*；

(4)若該可疑菌落經該免疫分析反應上呈現李斯特單胞菌之典型菌落特徵結果呈現正反應，且經該生化測試方法結果顯示與已知李斯特單胞菌應呈現之結果相同，則該可疑菌落為李斯特單胞菌，亦即該待測定樣品中含有李斯特單胞菌。

12.如申請專利範圍第11項之方法，其中該李斯特單胞菌之選擇性培養基係Oxford medium或lithium chloride-phenylethanol-moxalactam。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

13.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該免疫分析反應係聯結酵素免疫分析法或乳膠凝聚反應法。

14.如申請專利範圍第 13 項之方法，其中該聯結酵素免疫分析法包括下列步驟：

- (1)在固相上被覆該抗體；
- (2)將該可疑菌落之細胞表面蛋白質與該固相上被覆之該抗體反應，使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質之複合體；
- (3)加入標幟有酵素之該抗體（抗體酵素耦合體），使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質-抗體酵素耦合體之複合體；
- (4)加入該酵素之基質以觀察該聯結酵素免疫分析法之反應結果。

15.如申請專利範圍第 13 項之方法，其中該聯結酵素免疫分析法包括下列步驟：

- (1)在固相上被覆該抗體；
- (2)將該可疑菌落之細胞表面蛋白質與該固相上被覆之該抗體反應，使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質之複合體；
- (3)加入該 68k 道爾吞細胞表面蛋白質之二次抗體及標幟有酵素之該二次抗體之抗體（抗二次抗體之抗體酵素耦合體），使在該固相上形成抗體-68k 道爾吞細胞表面蛋白質-二次抗體-抗二次抗體之抗體酵素耦合體之複合體；
- (4)加入該酵素之基質以觀察該聯結酵素免疫分析法之反應結果。

16.如申請專利範圍第 14 或 15 項之方法，其中該酵素係過氧化酵素。

17.如申請專利範圍第 14 或 15 項之方法，其中該可疑菌落之細胞表面蛋白質以界面活性劑抽取。

18.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該界面活性劑係 Teepol 或硫酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

六、申請專利範圍

十二酯鈉 (sodium dodecyl sulfate)。

19.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該生化測試方法係測試磷酸環己六醇磷酸脂解酵素(PI-PLC)、芳基胺分解酵素活性或溶血素之產生，且該已知李斯特單胞菌應呈現之結果分別為具 PI-PLC 活性、不具芳基胺分解酵素活性、產生溶血素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

A9
B9
C9
D9

86105P-5

圖式

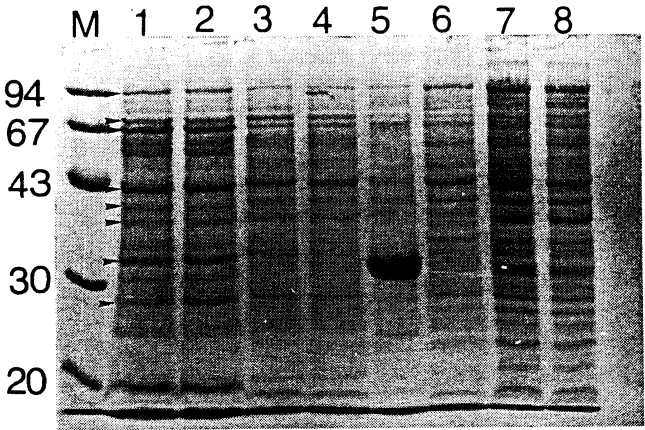


圖 一

(請先閱讀背面之注意事項再行繪製)

裝

訂

紉

A9
B9
C9
D9

圖式

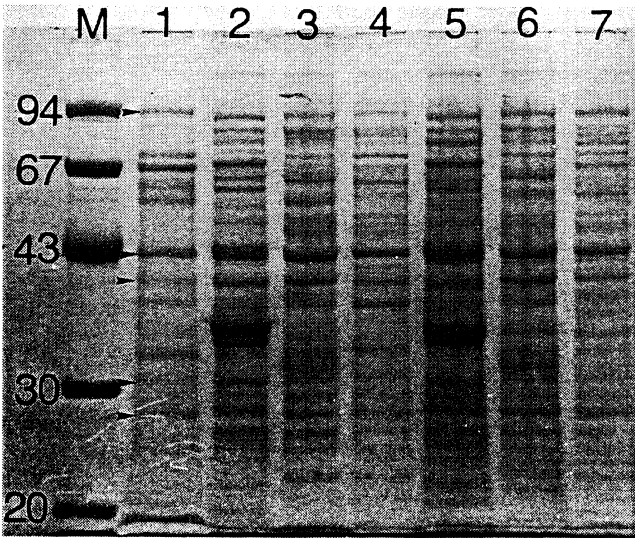


圖 二

(請先閱讀背面之注意事項再行繪製)

裝

訂