

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>  
G01N 33/569  
C07K 16/14



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808653.8

[43] 公开日 2004年9月1日

[11] 公开号 CN 1526073A

[22] 申请日 2002.2.21 [21] 申请号 02808653.8

[30] 优先权

[32] 2001.2.23 [33] GB [31] 0104566.5

[86] 国际申请 PCT/GB2002/000747 2002.2.21

[87] 国际公布 WO2002/068959 英 2002.9.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.10.22

[71] 申请人 克尼迪生物科学有限公司

地址 英国萨里郡

[72] 发明人 J·凯利

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公  
司

代理人 王旭

权利要求书1页 说明书8页

[54] 发明名称 液态烃燃料中微生物的检测

[57] 摘要

一种分析烃燃料中微生物的存在的方法，包含让一种水性稀释液与燃料样品以及一种能与微生物或微生物产生的代谢物、分解产物反应的抗体接触，以检测微生物的存在或不存在。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1 一种分析液态烃燃料中微生物存在的方法，该方法包括让燃料样品与水性稀释液以及一种与微生物或者与微生物的代谢物和分解产物反应的抗体接触，以检测所述微生物的存在或不存在。
- 5
- 2 按照权利要求 1 的方法，其中该方法包括在乳化剂的存在下让燃料和抗体接触。
- 3 按照权利要求 1 或 2 的方法，其中所述乳化剂是非离子洗涤剂。
- 4 按照前述任何一项权利要求的方法，其中所述乳化剂是聚氧乙
- 10 烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯。
- 5 按照权利要求 4 的方法，其中所述乳化剂的使用浓度为 0.01-10% 体积。
- 6 按照前述任何一项权利要求的方法，其中所述烃燃料是沸点低于 390℃的轻-中等馏分燃料。
- 15
- 7 按照前述任何一项权利要求的方法，其中所述微生物是 *Hormoconis resiniae*。
- 8 用于按照前述任何一项权利要求的方法的试剂盒，该试剂盒包括对能够在烃燃料中生长的微生物有特异性的抗原样品，对抗原反应的抗体；以及含有乳化剂的水性稀释液。
- 20
- 9 按照权利要求 1-8 任何一项的方法、试剂盒或用途，其中所述抗体是通过暴露于烃燃料中生长的微生物、抗原、所述微生物的代谢物或衍生物而制备的。
- 10 一种抗体，其是通过暴露于液态烃燃料中生长的微生物、抗原、所述微生物的代谢物或衍生物而制备的。

## 液态烃燃料中微生物的检测

5 本发明涉及一种分析烃燃料的方法。

众所周知，烃燃料会被微生物污染，这是不期望的。例如，*Hormoconis resiniae*（“喷气机燃料真菌”）能在航空煤油上生长而在航空器的机翼箱内产生腐蚀和堵塞问题。如果怀疑有污染，航班则要求将样品送至实验室检验。大多数实验室使用标准培养技术，这要花十天确认结果。市场上还有所谓的“快速”检验。然而所有这些都是基于培养技术，其需要七十二  
10 小时才能得出结果。

大多数航班甚至不能接受这种延误，自动使用生物杀灭剂：因此检测只是为了问题的回顾性确认。一种真正的快速检验方法将避免停工期的损失和实际上不需要的生物杀灭剂的费用。

15 目前还未有在烃燃料中检测微生物存在的快速检验方法。本发明开始解决这个问题。

首先，本发明涉及一种分析液态烃燃料中微生物的存在的方法，这种方法包含通过让燃料样品与一种能与微生物，或微生物产生的代谢物、分解产物反应的抗体接触，来检测微生物的存在或不存在。

20 这方法适宜地包含将烃燃料的样品和与感兴趣的微生物反应的抗体混合，接着检测微生物和抗体的结合的步骤。

已经发现，用针对微生物产生的抗体处理烃燃料提供了一个非常快速检测烃燃料中微生物的存在的方法。作为例子，已开发的检验航空燃料中 *Hormoconis resiniae* 的检测方法可以在九十分钟内得出结果。这样，本  
25 发明可以实现只在需要时才使用生物杀灭剂，这是令人满意的，因为生物杀灭剂在使用和处理起来是潜在的危险化合物。相反，Campos Lopes 和 Gaylarde 在 *Int. Biodeterioration & Biodegradation* (1996) 37-40 上公开了一种方法，在这种方法中燃料样品被过滤，接着将过滤垫堵住，干燥，用甲醛固定，洗涤三次，用特定的抗体温育后再洗涤三次。再加入抗体结合  
30 物进一步温育。洗三遍后，干燥滤器，观测结果，整个过程需四个小时以

上。

尽管是适合对轻-中等馏分燃料进行分析，使用本发明可以分析任何液态烃燃料的微生物污染。优选的是沸点低于 390°C 的液态燃料和燃料组分，如航空燃料和柴油机燃料或者有相同或相近组成的烃燃料。其它合适的烃燃料是在本领域所熟知的。汽油在本发明中是另外一种优选的燃料。

本发明涉及可能在烃燃料中存在的任何微生物的检测。例如，细菌，酵母和真菌都可用本发明的方法分析。可以在烃燃料中生存并优选的分析例子，细菌种类包括假单胞菌属和产碱菌属，酵母种类包括 *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*，尽管本发明不单局限于这些种类的分析。特别优选的是真菌 *Hormoconis resinae*，它也被认为是 *Cladosporium resinae*，在它的有性阶段称为 *Amorphotheca resinae*。其它的真菌包括 *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Paecilomyces viriotii* 和 *Pencillium sp.*

本文使用的术语“抗体”指的是与某特定微生物反应的任何合适的免疫试剂。术语“抗体”因而不仅仅限于天然存在的抗体，例如还包括整个抗体的片段和抗体衍生物。如果是使用抗体片段或衍生物，我们优选试剂能基本上保持与完整的天然抗体相比的对微生物抗原的活性，这样抗体就可以用来检测微生物。在本发明中单抗隆抗体和多克隆抗体都可以使用，这些抗体的制备在本领域是常规的。

在分子水平上，应当理解抗体的反应活性或特异性通常由微生物表达的或相关的抗原决定。因此在这里所有提到的对微生物的抗体反应活性通常是指这个抗体-抗原相互作用，这决定了抗体的目标及其特异性。

在烃燃料中微生物的存在也可以由感兴趣的微生物的代谢物或分解产物的存在来显示。针对这些代谢物和分解产物的抗体也可以检测烃燃料中的微生物，这种抗体的使用也被包括在本发明内。

优选地，抗体对感兴趣微生物是特异性的，或者是与感兴趣微生物特有的代谢物和/或分解产物反应。通过这种方式，某种特定种类的微生物就可以使用本发明鉴定。然而，在本发明中也可能使用一种能与许多种类所共同的抗原或衍生物反应的抗体。在这种情况下，抗体不是物种特异性的，而是还可以检测烃燃料中某一类微生物的存在。因此，本发明还

涉及检测烃燃料中一类微生物的检测方法，这个种类是由一个共同抗原定义的。

取决于所使用的化验和检测方法，本发明中使用的抗体可以任选地与其它蛋白质或化学标记物结合，这样便于检测抗体与抗原的结合。优选的是抗体与酶组分例如碱性磷酸酶、或者容易检测的基团例如胶体金，生物素和链亲和素结合。其它合适的结合试剂在本领域是熟知的。

任何合适的检测方法都可以用来在本发明中分析抗体的结合。优选的是结果能在光学或视觉上检测的方法，例如比色检测。在合适的情况下可以使用 ELISA 检验，例如夹层或双层检验，这些方法在本领域是常规的。优选的是一个竞争试验，附于如微量滴定盘的基质上的抗原和测试样品中的抗原竞争与抗体结合。

也可使用侧流装置，如量油计来检测抗体的结合，这些装置在本领域也是常规的。市场上供应的验孕试剂盒阐明了这个技术的一个简单实施方案。例如，一个测试抗原样品被加入到量油计中，量油计中包含一合适的芯和一能与抗原反应的固定化抗体。样品延芯运动，使得任何抗原都与固定化抗体接触。例如通过进一步与标记好的抗体反应，就可以被检测到结合的抗原。量油计技术和使用该技术的分析方法的其它实施方案在本领域是常规的。

尽管放射性检测系统较少地优选，然而包括放射性标记在内的一些方法（例如放射免疫试验和放射敏化吸收试验）在本发明抗原-抗体结合的检测中同样有效。

在发明的一个特别优选的实施方案中，分析方法包括在乳化剂的存在下让燃料和抗体接触。乳化剂的存在有利于抗体和燃料样品中抗原之间的相互作用。

任何合适的乳化剂都能在本发明中使用。优选的是强乳化剂和可将燃料样品中烷烃对抗体的任何变性效应最小化的乳化剂。乳化剂的稳定性可以很容易地通过例如比较在不同的乳化剂的存在下，污染的燃料样品中抗体和抗原的结合来衡量。

在本发明中非离子表面活性剂通常是优选的乳化剂，烷基乙氧基化物表面活性剂，如 Tritons，和聚氧乙烯山梨糖醇酐单酯，如聚氧乙烯山梨

糖醇酐单月桂酸酯（也称为吐温 20），是特别优选的乳化剂。在合适的情  
况下，乳化剂如吐温 20 可以在去离子水中制备，体积使用浓度为 0.01-10%  
体积，优选浓度为 1-5%体积，最优选浓度为 2.5%体积。然而，乳化剂的  
最优浓度很可能随着被分析的燃料变化，它可以很容易的由本领域的技术  
5 人员确定。

本发明中的方法不要求培养微生物，这样结果能够很快的得到。典型地，这个方法从燃料分析开始起，即从燃料样品以任何方式开始被处理的时候，在不到两个小时内提供结果。

发明进一步涉及本发明分析使用的试剂盒。优选地，本发明中使用的  
10 的试剂盒包括来源于能够在液态烃燃料中生长的微生物的抗原的标样，能够与  
该抗原反应的抗体，以及合适的乳化剂，如上所描述。

任选地，本发明的试剂盒包括选自下列的一个或多个附加组分：预先用抗原或抗体涂布的合适的基质（如微量滴定盘），合适的抗原标样，用来标记与微生物反应的抗体的标记试剂，能与第一个（微生物特异性的）  
15 抗体反应的另外的（检测）抗体，检测试剂如 ELISA 底物试剂，终止溶液和洗涤溶液。

本发明进一步涉及微生物以及本发明中使用的合适的抗原的制备方法，包括让微生物在液态烃燃料中温育至少生长过程的一个阶段的步骤。微生物和/或抗原随后适当地用标准技术从生长培养基中回收。这样，在  
20 微生物里面或者表面存在的抗原的结构和源于那里的代谢物和衍生物的结构很可能反映那些来源于烃燃料的样品中存在的微生物和抗原的结构。通过这种方式，在测试燃料样品中抗体和抗原的反应就可以被优化。

因此，本发明也涉及针对液态烃燃料中生长的微生物产生的抗体和针对燃料油中生长的微生物的代谢物或衍生物产生的抗体，这些抗体任选  
25 地包括一检测用的标记。本发明也还涉及使用这些抗体分析本文所描述的液态烃燃料的方法和试剂盒。

现在通过下列实施例举例说明本发明，但不是为了限制本发明的范围。

30 实施例 1 使用 ELISA 分析烃燃料中的 *H. Resinae*

## 材料

### 抗原/*Hormoconis resinae* 试剂

抗原试剂在微板的涂布和 ELISA 测试中使用的标样的生产中都有应用。

- 5           1 *H. resinae* 在麦芽浸出物琼脂上 25°C 下生长 7-10 天（乳脂糖(toffee) 大麦芽浸出物 20g, oxoid 3 号琼脂 20g, 1 升自来水, pH 6.5, 121°C 灭菌 15 分钟）

2 在 ‘ Bushnell Haas’ (Difco)液体培养基中制备孢子悬浮液。如下描述每 100ml 燃料制剂大约 3ml 悬浮液被用作接种物。

- 10           3 *H. resinae* 被接种至燃料培养基中，这种培养基是以大约 1:3 比例将可被灭菌的燃料漂浮在无菌的 Bushnell Haas 液体培养基上制备而成的。

4 培养基在 25°C 温育直至在容器中得到一块融合在一起的真菌团。

5 过滤培养基获得真菌团，在无菌蒸馏水中洗涤。

- 15           6 随后将真菌团在冰上的 Mickle 珠搅拌器中在无菌水中均一化 4 分钟。

7 得到的悬浮液在离心机里旋转（5mins@5000rpm），并在无菌蒸馏水中洗三次。

8 将最终的均匀混合物粒状沉淀冷冻干燥，产品被用作抗原。

- 20           平板涂布抗原

1 在 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中制备 2mg/ml 的均匀抗原溶液，并在 4°C 剧烈振荡过夜。

2 接着在 pH 为 8.5 的 TRIS（50mM Tris）缓冲液中制备 20µg/ml 的抗原悬浮液，以 100µl/孔涂布在微量滴定板的小孔上。

- 25           3 平板 4°C 温育过夜。

4 用封闭/glazing 缓冲液洗涤平板，这种缓冲液是含有 5%重量的乳糖，0.2%重量的鱼胶和 0.1%的叠氮化钠，在去离子水中制备（封闭由于鱼胶蛋白的存在，glazing 是由于乳糖的存在）。

- 30           5 在液体被抽吸之前将平板在室温下温育 1 小时，并让平板室温干燥过夜。

### 平板标样抗原

将 20%乙醇的 PBS 缓冲液加入到一体积的（已知浓度，例如 2mg/ml）  
抗原悬浮液中，得到适宜浓度的标样，例如在合适时，100 $\mu$ g/ml，30 $\mu$ g/ml，  
5 5 $\mu$ g/ml。

### 抗体

使用标准技术，从 *H. resinae*（上文）制备的抗原被用来在羊身上产  
生多克隆抗体。

10

### 结合试剂（示踪物）

结合到碱性磷酸酶偶联物的 Donkey 抗羊抗体在试验中被用作鉴定羊  
抗 *H. resinae* 的抗体的示踪物。也可以将碱性磷酸酶蛋白偶联至抗 *H.*  
*resinae* 的羊多克隆抗血清上，这样就能将它在试验中作为示踪物直接使  
15 用。

### 样品稀释剂

样品稀释剂是由 2.5%体积的吐温 20 在去离子水中制备而成。

20 ELISA 方法的分析试剂（可以作为一个试剂盒提供）

1 *Hormoconis resinae* 预先涂布了的 12 x 8 条纹的微型平板（以  
适宜的密封的袋子供应）

2 *Hormoconis resinae* 标样：标样浓度是 0-100 $\mu$ g/ml。每个小瓶都  
标有浓度。

25

3 在含有惰性蓝色染料（15mg/升的甲苯基兰），蛋白稳定剂（BSA  
1% w/v）和 0.1%w/v 叠氮化钠的 Tris 缓冲液中的 *Hormoconis resinae*  
抗体

4 Donkey 抗羊第二标记抗体试剂：含惰性蓝色染料和蛋白稳定剂  
（如上）和 0.1w/v 叠氮化钠的 Tris 缓冲液。

30

5 ELISA 底物试剂：包含 phenolphthalein 单磷酸盐（PMP，22.5g/2.5

升)和酶辅助因子 ( $\text{MgCl}_2$  1M/2.5 升)的二乙醇胺缓冲液 (262.5g/2.5 升, 在去离子水中配制)

6 ELISA 终止溶液: 包含氢氧化钠 (70g/升)和螯合试剂 (EDTA, 74.4g/升)的上述二乙醇胺缓冲液

- 5 7 ELISA 洗涤缓冲液的浓缩液 (10 倍浓度)。包含最终浓度为 0.1%w/v 的叠氮化钠和吐温 (最终浓度 0.5%v/v) 的磷酸盐缓冲液 (pH 为 7.4 的 PBS)。

### 材料和要求的设备

- 10 精密移液器和一次性枪头  
带有 550nm 过滤器的微量滴定板读数器  
微量滴定板洗涤器  
蒸馏水或去离子水  
微量滴定板振荡器

15

### 方法

#### 样品制备

- 1 彻底混合燃料样品
- 2 从容器中取等分的燃料样品, 加入等体积的样品稀释剂。可以对水相和/或者燃料相检测。
- 3 剧烈混合几秒进行乳化
- 4 取 100 $\mu\text{l}$  的混合物, 按照试验方案 (下面) 的指导加入

#### 试验方案

- 25 1 从密封袋中取出预先涂布过的平板, 并在 12 x 8 的模板片上标明样品和对照的位置。
- 2 吸取 100 $\mu\text{l}$  的标样和样品到合适的孔中。标样应加一式两份。每个样品也应加一式两份以取得最佳结果。
- 3 对每个孔分加 50 $\mu\text{l}$  的 *Hormoconis resinae* 抗体。覆盖平板, 使用平板混合器在室温 (20—25 $^{\circ}\text{C}$ ) 温育 30 分钟。
- 30

4 用上述的 ELISA 洗涤缓冲液 (300 $\mu$ l/孔) 洗涤平板 4 次, 倒转, 在吸水纸上用力敲打。确认孔完全干燥。

5 分加 100 $\mu$ l Donkey 抗羊碱性磷酸酶偶联抗体到每个孔。覆盖平板, 使用平板混合器在室温 (20–25 $^{\circ}$ C) 温育 30 分钟。

5 6 用上述的 ELISA 洗涤缓冲液 (300 $\mu$ l/孔) 洗涤平板 4 次, 倒转, 在吸水纸上用力敲打。确认孔完全干燥。

7 分加 100 $\mu$ l 上述 ELISA 底物试剂到每个孔。覆盖平板, 使用平板振荡器在室温 (20–25 $^{\circ}$ C) 下温育 30 分钟。

10 8 分加 50 $\mu$ l 上述 ELISA 终止溶液到每个孔中。轻微拍打平板边缘使之混合。

9 用软纸擦平板的下表面使之不会有凝聚。用微量滴定板读数器在 550nm 对平板读数。

#### 实施例 2 分析燃料样品

15 测试燃料样品由航班提供。通过传统的培养试验检测, 已知有 2 个样品有真菌污染。样品如实施例 1 所述进行处理。样品被乳化后在试验当天检测。结果如下所示。ELISA 试验证实了培养试验的结果, 样品 2082/32 和/36 真菌含量高。

20	鉴定样品	浓度 ug/ml	浓度 ug/100ml
	2082/32	> 200	>20000
	2082/33	1	100
	2082/34	0.30	30
	2082/35	0.34	34
25	2082/36	134	13400
	2082/37	1.8	180
	2082/38	0.4	40
	2082/39	0	0