



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105242037 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201510567026. 9

(22) 申请日 2015. 09. 09

(71) 申请人 上海市疾病预防控制中心

地址 200336 上海市徐汇区中山西路 1380 号

(72) 发明人 张红芝 陈敏 张曦 朱颖莹

(74) 专利代理机构 上海浦东良风专利代理有限公司 31113

代理人 张劲风

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

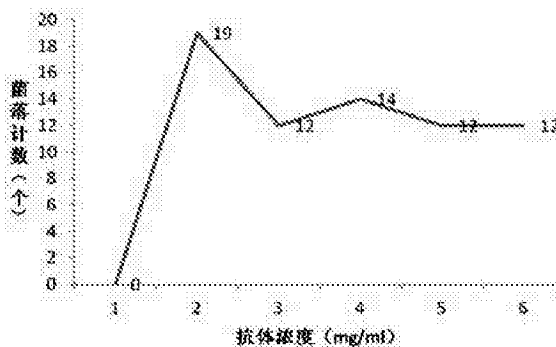
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种病原菌免疫磁珠的制备和应用,特别涉及富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法及应用。主要解决目前检测方法只能对其进行定性分析,不能做到分离致病性副溶血性弧菌的技术问题。本发明的技术方案是通过表达纯化副溶血性弧菌中毒力因子 TDH,将其免疫大白兔,获得多克隆抗体,然后将多克隆抗体偶联在磁珠上,获得结合标记二抗的免疫磁珠,然后直接捕获食品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌。本发明适用于出入境检验检疫、水产养殖业、食品卫生和疾病预防控制及相关实验室开展的针对产耐热直接溶血素副溶血性弧菌的检测分离工作。



1. 一种富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法,其特征是包括以下步骤,通过表达纯化副溶血性弧菌中毒力因子 TDH,将其免疫大白兔,获得多克隆抗体,然后将多克隆抗体偶联在磁珠上,获得结合标记二抗的免疫磁珠。

2. 根据权利要求 1 所述的富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法,其特征是所述毒力因子 TDH 表达纯化:根据网上公布的副溶血性弧菌 RIMD2210633 菌株的全基因组序列,利用软件 Oligo6.0 设计毒力因子 TDH 的表达用引物,并根据需要加入克隆所需要的酶切位点和保护碱基;引物为:FP-CGGGATCCATGAAGTACCGATATTTTGC;RP-CCCAAGCTTTTTATTGTTGATGTTTAC;经 PCR 扩增,克隆入表达质粒 pET-30a,建立重组质粒,将其转入表达菌 BL21 中,经诱导表达后超生离心,上清用融合标签蛋白纯化试剂盒纯化重组蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法,其特征是所述多克隆抗体的获取:用获得的重组蛋白皮下多点注射成年新西兰兔,第一次剂量为 1mg/只;第 14 天,进行第二次免疫,剂量为 0.5mg/只;第 28 天,进行第三次免疫,剂量为 0.5mg/只;第 35 天进行第四次免疫,剂量为 0.5mg/只,之后再每隔一周免疫一次,共免疫 7 次;免疫完后,进行兔血的纯化;将纯化好的兔血分装,于 -20℃ 冻存备用。

4. 根据权利要求 1 所述的富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法,其特征是所述免疫磁珠的获取:取 100 μ l 磁珠悬浮液至离心管内,将离心管放于磁力架上,待上层液体变澄清后,保留底部的磁珠,弃掉上清,加 1ml 磁珠偶联缓冲液,重悬磁珠后,磁力条件下将磁珠沉淀;先后加入 100 μ l 磁珠偶联缓冲液和 2 μ l 抗体混匀,孵育 30min,磁力将磁珠沉淀,弃上清;加入 1ml 洗液,磁力将磁珠沉淀;重复此步骤 3 次;最后加入 100 μ l 洗液,重选磁珠,放于 4℃ 冰箱备用。

5. 一种权利要求 1 所述富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠的应用方法,其特征是包括以下步骤无菌操作取检样至 225ml 碱性蛋白胨水中,轻缓振荡 30min;取检样上清液于 3000rpm 离心 2min,上清液再次于 5000rpm 离心 2min,弃液体,沉淀悬于 1ml 洗液中;取检样悬液于装有 100 μ l 免疫磁珠悬液的小管中,室温轻缓旋转振荡 30min;将小管置于磁力架上 1min,小心移出管中液体;加入 1ml 洗液混匀,置于磁力架上 2min,移出洗液,重复清洗 3-5 次,加入 100 μ l 洗液使吸附副溶血性弧菌产毒株的磁珠重悬其中,涂布显色平板 TCBS。

富集 TDH致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种病原菌免疫磁珠的制备和应用,特别涉及用于富集产耐热直接溶血素(TDH)的致病性副溶血性弧菌的免疫磁珠的制备方法及应用,它是以磁珠为载体,免疫兔子制备的多克隆抗体为中间识别体,经过偶联-洗涤的过程制备出免疫磁珠,在合适的条件下可以高效捕获产 TDH 的致病性副溶血性弧菌,可广泛应用于环境及进出口食品检验中致病性副溶血性弧菌的富集分离与检测。

背景技术

[0002] 副溶血性弧菌是引起世界上很多国家尤其是沿海地区食源性疾病的重要病原菌,其广泛存在于近海岸的海水、海底沉积物和鱼虾类、贝类。其引起的食物中毒症状主要是以腹痛、腹泻、恶心、呕吐、发热等为主的急性胃肠炎。目前,由副溶血性弧菌引起的临床病例已在数量上超过沙门氏菌引起的临床病例,成为我国首要的食源性病原菌,特别是一些沿海城市,由该菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒的比例高达 60% 以上。

[0003] 研究显示只有携带毒力因子的菌株才具有致病性。但是大量研究表明,几乎所有从海水和水产品中分离的副溶血性弧菌是不产毒的菌株,虽然此类菌株也有引起食物中毒的报道,但绝大部分是不致病的。而且随着检测技术的发展和证实,致病性副溶血性弧菌的确在环境及食品中的含量较低,致病性菌株和非致病性菌株差异悬殊的混合分布于沿岸海水、海河交界处及海产品中,致病性菌株仅占 1/100-1/1000。利用传统的平板分离方法从环境及食品中分离的副溶血弧菌大多数为非致病性菌株,很难分离到致病性菌株。但是临床病人中分离的副溶血性弧菌超过 90% 都是致病性菌株。

[0004] 不针对致病性副溶血性弧菌的监测就不能有效预警和控制食物中毒的发生。1997 年在美国的太平洋西北岸以及 1998 年在美国的牡蛎海湾都发生了因食用牡蛎所致的副溶血性弧菌暴发病例,流行病学调查表明食用的样品中检测到的副溶血性弧菌总数小于 200cfu/g,按照 FDA 标准这个结果远远低于 1×10^4 cfu/g,属于“正常的合格样品”。Kara-Kudo 等人的研究也证实海产品中总的副溶血性弧菌的量并不能正确反映致病性副溶血性弧菌的情况,致病性副溶血性弧菌的量与较高的总的副溶血性弧菌的量之间并没有直接关系,因为在检测到的 TDH 阳性的样品中,其总的副溶血性弧菌的量小于 1×10^4 cfu/g,这提示,总的副溶血性弧菌并不是预测致病性副溶血性弧菌的一个可靠的指标^[5]。因此,建立针对致病性副溶血性弧菌的检测方法对于预防和控制食源性疾病有重要的意义。

[0005] 分子流行病学研究发现,致病性副溶血性弧菌中主要毒力因子是耐热直接溶血素(TDH),超过 90% 的致病性菌株携带 TDH,只有很少致病性菌株携带耐热直接溶血素相关溶血素(TRH),因此通常将 TDH 作为鉴定致病性副溶血性弧菌的标记。目前,用于致病性副溶血性弧菌检测的方法主要是分子检测,比较常见的有常规 PCR,实时荧光 PCR 以及基因芯片,这些检测方法具有高灵敏度,操作简单,高特异性和高通量等优点,但是这些方法只能对其进行定性分析,不能做到分离致病性副溶血性弧菌,不利于对其的深入研究。

[0006] 本研究即在此基础上,表达纯化毒力因子 TDH,制备多克隆抗体,免疫磁珠,富集携

带 TDH 的副溶血性弧菌。

发明内容

[0007] 本发明旨在提供一种富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法及应用。主要解决目前检测方法只能对其进行定性分析,不能做到分离致病性副溶血性弧菌的技术问题。本发明的思路是:利用产耐热直接溶血素副溶血性弧菌中毒力因子 TDH 作为抗原制备多克隆抗体,后者结合免疫磁珠对食品目的菌进行富集,然后利用弧菌显色平板进行分离,从而达到有针对性的检测食品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌的目的。

[0008] 实现本发明的技术方案是:一种富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法,包括以下步骤:通过表达纯化副溶血性弧菌中毒力因子 TDH,将其免疫大白兔,获得多克隆抗体,然后将多克隆抗体偶联在磁珠上,获得结合标记二抗的免疫磁珠,然后直接捕获食品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌。

[0009] 具体步骤如下:

①毒力因子 TDH 的表达纯化:

根据网上公布的副溶血性弧菌 RIMD2210633 菌株的全基因组序列,利用软件 Oligo6.0 设计毒力因子 TDH 的表达用引物,并根据需要加入克隆所需要的酶切位点和保护碱基。引物为:FP-CGGGATCCATGAAGTACCGATATTTTGC;RP-CCCAAGCTTTTATTGTTGATGTTTAC。经 PCR 扩增,克隆入表达质粒 pET-30a,建立重组质粒,将其转入表达菌 BL21 中,经诱导表达后超生离心,上清用 His Bind Purification Kit (Novagen 公司)纯化重组蛋白。

[0010] ②多克隆抗体的制备:

用获得的重组蛋白皮下多点注射成年新西兰兔,第一次剂量为 1mg/只。第 14 天,进行第二次免疫,剂量为 0.5mg/只。第 28 天,进行第三次免疫,剂量为 0.5mg/只。第 35 天进行第四次免疫,剂量为 0.5mg/只,之后再每隔一周免疫一次,共免疫 7 次。免疫完后,进行兔血的纯化。将纯化好的兔血分装,于 -20℃冻存备用。

[0011] ③免疫磁珠的制备:

免疫磁珠的制备按照磁珠说明书进行。取 100 μ l 磁珠悬浮液(含磁珠约 1mg)至离心管内,将离心管放于磁力架上,待上层液体变澄清后,保留底部的磁珠,弃掉上清,加 1ml 磁珠偶联缓冲液,重悬磁珠后,磁力条件下将磁珠沉淀;先后加入 100 μ l 磁珠偶联缓冲液和 2 μ l 抗体(含抗体约 7 μ g)混匀,孵育 30min,磁力将磁珠沉淀,弃上清;加入 1ml 洗液,磁力将磁珠沉淀;重复此步骤 3 次;最后加入 100 μ l 洗液,重选磁珠,放于 4℃冰箱备用。

[0012] 本发明优点是:1 表达纯化副溶血性弧菌中主要的毒力因子 TDH,将其作为抗原,制备多克隆抗体,保证分离的高度特异性,这是常规培养分离方法所不及的;2 利用免疫磁珠捕获技术可快速收集,浓缩环境及食品中的目的菌,操作简便,快速。

附图说明

[0013] 图 1 为免疫磁珠捕获产耐热直接溶血素副溶血性弧菌实验中抗原抗体优化组合实验结果。

[0014] 图 2 为免疫磁珠捕获产耐热直接溶血素副溶血性弧菌的特异性实验结果。

[0015] 图 3 为未经免疫磁珠捕获水产品样品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌实验结

果。

[0016] 图 4 为经免疫磁珠捕获水产品样品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌实验结果。

具体实施方式

[0017] 富集 TDH 致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法,包括以下步骤:

①毒力因子 TDH 的表达纯化:

根据网上公布的副溶血性弧菌 RIMD2210633 菌株的全基因组序列,利用软件 Oligo6.0 设计毒力因子 TDH 的表达用引物,并根据需要加入克隆所需要的酶切位点和保护碱基。引物为:FP-CGGGATCCATGAAGTACCGATATTTTGC;RP-CCCAAGCTTTTATTGTTGATGTTTAC。经 PCR 扩增,克隆入表达质粒 pET-30a,建立重组质粒,将其转入表达菌 BL21 中,经诱导表达后超生离心,上清用 His Bind Purification Kit (融合标签蛋白纯化试剂盒,Novagen 公司)纯化重组蛋白。

[0018] ②多克隆抗体的制备:

用获得的重组蛋白皮下多点注射成年新西兰兔,第一次剂量为 1mg/只。第 14 天,进行第二次免疫,剂量为 0.5mg/只。第 28 天,进行第三次免疫,剂量为 0.5mg/只。第 35 天进行第四次免疫,剂量为 0.5mg/只,之后再每隔一周免疫一次,共免疫 7 次。免疫完后,进行兔血的纯化。将纯化好的兔血分装,于 -20℃ 冻存备用。

[0019] ③免疫磁珠的制备:

免疫磁珠的制备按照磁珠说明书进行。取 100 μ l 磁珠悬浮液(Dynal 公司生产的 Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG,含磁珠约 1mg)至离心管内,将离心管放于磁力架上,待上层液体变澄清后,保留底部的磁珠,弃掉上清,加 1ml 磁珠偶联缓冲液,重悬磁珠后,磁力条件下将磁珠沉淀;先后加入 100 μ l 磁珠偶联缓冲液和 2 μ l 抗体(含抗体约 7 μ g)混匀,孵育 30min,磁力将磁珠沉淀,弃上清;加入 1ml 洗液,磁力将磁珠沉淀;重复此步骤 3 次;最后加入 100 μ l 洗液,重选磁珠,放于 4℃ 冰箱备用。

[0020] ④免疫磁珠的应用:

无菌操作取检样至 225ml 碱性蛋白胨水中,轻缓振荡 30min;取检样上清液于 3000rpm 离心 2min,上清液再次于 5000rpm 离心 2min,弃液体,沉淀悬于 1ml 洗液中。取检样悬液于装有 100 μ l 免疫磁珠悬液的小管中,室温轻缓旋转振荡 30min;将小管置于磁力架上 1min,小心移出管中液体;加入 1ml 洗液混匀,置于磁力架上 2min,移出洗液,重复清洗 3-5 次,加入 100 μ l 洗液使吸附副溶血性弧菌产毒株的磁珠重悬其中,涂布显色平板 TCBS。免疫磁珠捕获产耐热直接溶血素副溶血性弧菌得到敏感性结果见表 1。

[0021] 表 1 免疫磁珠捕获产耐热直接溶血素副溶血性弧菌得到敏感性结果

不同菌液浓度	细菌的生长状态 CFU/50 μ l
4.3×10^4	113/ 平板
4.3×10^3	43/ 平板
4.3×10^2	5/ 平板
4.3×10^1	1/ 平板

其余试验结果见图 1-4,由图 1 可知,并非抗体的浓度越大越好,当 2 μ l 抗体,即 6.34 μ g 抗体,与 50 μ l 免疫磁珠结合,此时的捕获效率最高。由图 2 可知,沙门氏菌、大肠杆菌、创伤弧菌、金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌共 5 种食源性病原菌,稀释到

一定浓度添加到携带 TDH 毒力因子的 ATCC33847 的菌液中,免疫磁珠能够特异性的富集到 ATCC33847。免疫磁珠洗涤的最后一次上清液于 TCBS 平板上菌落数低于 10 或没有生长,说明免疫磁珠缓冲液已将非特异性目标洗干净。富集后的免疫磁珠在 TCBS 平板上均有绿色菌落出现,经鉴定为携带 TDH 的产耐热直接溶血素副溶血性弧菌。由图 3 可知,未经免疫磁珠富集的检测结果,没有副溶血性弧菌检出。由图 4 可知,经免疫磁珠富集后,平板上检出 4 株副溶血性弧菌,经 PCR 鉴定为产耐热直接溶血素副溶血性弧菌。

[0022] 本发明利用抗致病性副溶血性弧菌毒力因子 TDH 免疫磁珠直接捕获检样中的目的菌,再利用显色平板将其副溶血性弧菌进行分离。本方法采用的磁珠捕获结合显色平板技术,提高了食品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌的检出率和灵敏度,解决了食品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌的检测难题,达到了准确,快速,灵敏的要求。

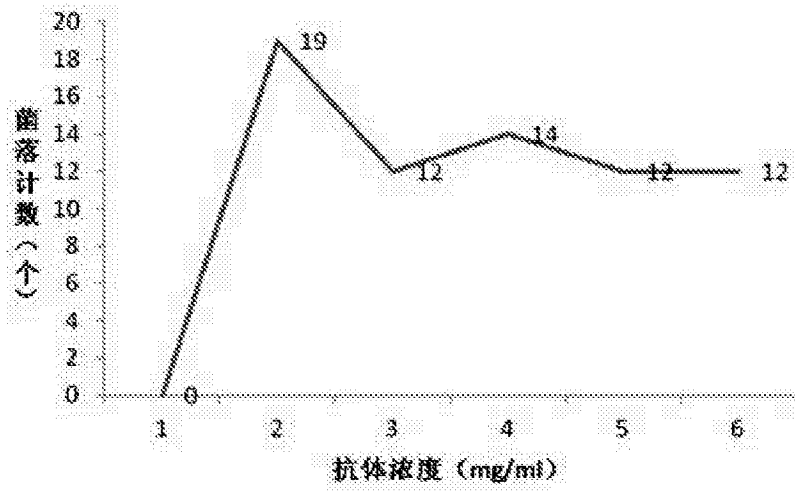


图 1

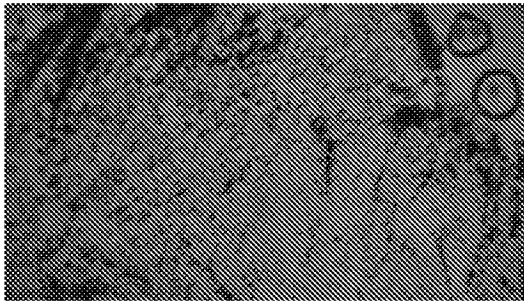


图 2

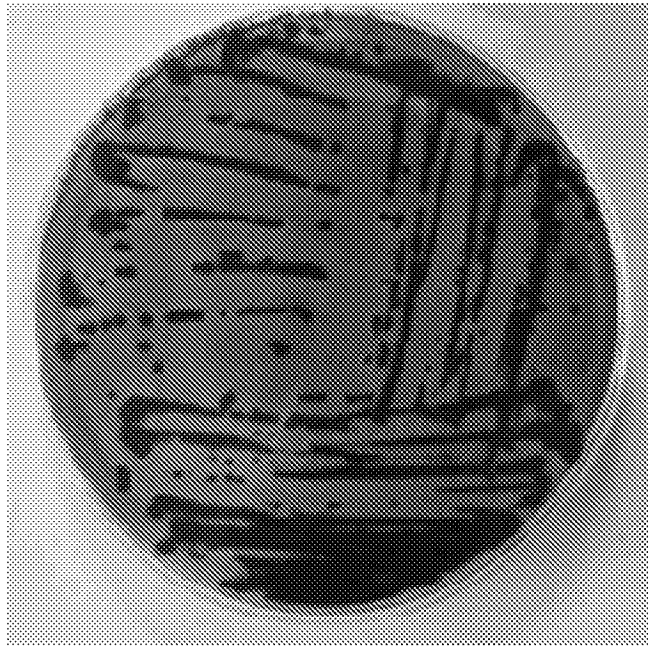


图 3

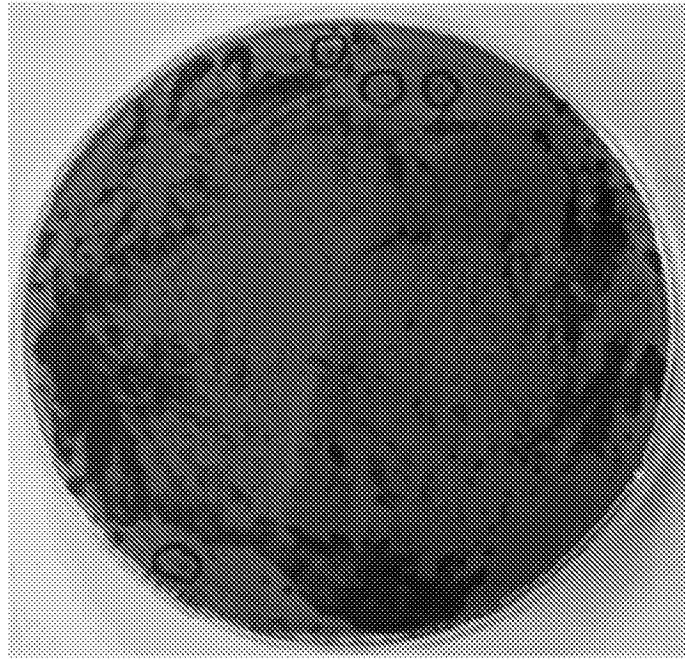


图 4

专利名称(译)	富集TDH致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105242037A	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201510567026.9	申请日	2015-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	上海市疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	上海市疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	上海市疾病预防控制中心		
[标]发明人	张红芝 陈敏 张曦 朱颖莹		
发明人	张红芝 陈敏 张曦 朱颖莹		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种病原菌免疫磁珠的制备和应用，特别涉及富集TDH致病性副溶血性弧菌免疫磁珠制备方法及应用。主要解决目前检测方法只能对其进行定性分析，不能做到分离致病性副溶血性弧菌的技术问题。本发明的技术方案是通过表达纯化副溶血性弧菌中毒力因子TDH，将其免疫大白兔，获得多克隆抗体，然后将多克隆抗体偶联在磁珠上，获得结合标记二抗的免疫磁珠，然后直接捕获食品中产耐热直接溶血素副溶血性弧菌。本发明适用于出入境检验检疫、水产养殖业、食品卫生和疾病预防控制及相关实验室开展的针对产耐热直接溶血素副溶血性弧菌的检测分离工作。

