

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810046935.8

[43] 公开日 2008年9月24日

[11] 公开号 CN 101271110A

[22] 申请日 2008.2.27

[21] 申请号 200810046935.8

[71] 申请人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道
3688 号

共同申请人 深圳市疾病预防控制中心

[72] 发明人 胡章立 张仁利 甄茵

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 王敏锋

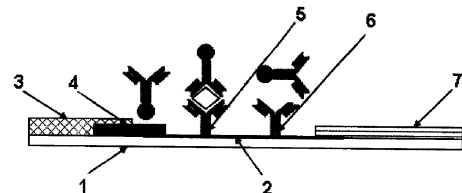
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种检测金葡菌肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条及制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测金葡菌肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条及制备方法，包括一种表达重组 SEA 蛋白的工程菌的构建，SEA 蛋白的分离纯化，抗 SEA 特异性抗体的制备，SEA 胶体金检测试纸条的制备。该试纸条由样品垫、涂覆金标标记抗 SEA 抗体的金标垫、在检测线和质控线包被有抗 SEA 抗体的和抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜构成，依次按样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜，吸水垫粘附在 PVC 底板上。该试纸条操作简便、快速、准确，全过程只需 10 分钟，不受环境条件的干扰，特异性好，且检测灵敏度高，最低检测限为 1ng/ml。本发明适用于海关、医院、检验检疫单位等，可实现食品或临床标本中金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的快速检测。



1、一种检测金葡萄肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条，它包括样品垫 (3)、检测线 (5) 和质控线 (6)，其特征在于：在 PVC 底板 (1) 的两端分别设有样品垫 (3) 和吸水垫 (7)，在 PVC 底板 (1) 中部设有硝酸纤维膜检测层 (2)，在硝酸纤维膜检测层 (2) 与样品垫 (3) 交界处设有包被金标标记抗 SEA 抗体的金标垫 (4)，在金标垫 (4) 一端设置样品垫 (3)，另一端设置在硝酸纤维膜检测层 (2) 上，在与金标垫 (4) 延续的硝酸纤维膜检测层 (2) 上设有检测线 (5) 和质控线 (6)，在检测线 (5) 和质控线 (6) 上分别包被有抗 SEA 抗体和羊抗鼠 IgG。

2、一种用于实现权利要求 1 所述的一种检测金葡萄肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条的制备方法，它包括下列步骤：

A、SEA 的制备：

通过 PCR 法筛选出产肠毒素 A 金黄色葡萄球菌，提取产肠毒素 A 金葡菌标准株的基因组 DNA，以其为模板进行 PCR 扩增产物，PCR 产物经纯化后，与 pGEM-T Easy 克隆载体进行连接、转化、测序，含 SEA 正确序列的重组质粒经 *NheI* 和 *EcoRI* 双酶切，与经同样双酶切的 pET28a 表达载体进行连接和转化，重组质粒 pET-SED 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，30℃ 0.5mM IPTG 诱导过夜，离心收集菌体，在冰水上进行超声波破菌，离心，分别收集上清液和沉淀，进行电泳分析，安装 XK26 柱子，进行清洗、装镍、平衡程序，上清液经过 0.45μm 滤器过滤后开始上样，用含 40mM 咪唑的 Washing buffer 清洗 Ni 离子层析柱，用 250mM 咪唑的 Elution buffer 洗脱目的蛋白，收集洗脱液，测定蛋白浓度，冰冻干燥呈干粉保存；

B、抗 SEA 特异性抗体的制备：

通过 Protein G 亲和层析法纯化抗 SEA 抗体，首先是将抗血清置于 Protein G 亲和层析柱柱吸附琼脂的表面；其次是用 10 倍柱体积的 1×Washing - Binding Buffer 洗吸附柱；第三是用 4 倍柱体积的 1×Elution Buffer 洗脱，得到 SEA 特异性抗体；

C、金黄色葡萄球菌肠毒素 A 胶体金检测试纸条的制备：

a、空白胶体金的制备：

采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒，在烧瓶加入 1000ml 双蒸水和 10ml 1% 氯金酸，加热至沸腾，加入 20ml 1% 柠檬酸钠，继续煮沸约 10-20 分钟，直到液体呈亮红色，将烧

杯置于室温，水浴中冷却，冷藏保存；

b、胶体金标记抗体的制备：

取空白胶体金，用 0.1M K_2CO_3 将 pH 值调至 7.4，在磁力搅拌下滴入稀释好的抗体，每 ml 胶体金加入 20 μ g 抗体，继续搅拌 30 分钟，离心，吸除上清，用金标抗体保存液重悬松散的胶体金沉淀；

c、金标垫的制备：

调试二维喷动仪，将标记好胶体金的抗 SEA 抗体均匀地喷在玻璃纤维膜上，喷液量为 0.6 微升/厘米，37 $^{\circ}$ C 烘干过夜，封袋备用；

d、包被膜的制备：

调试二维喷动仪，将稀释好的抗 SEA 抗体均匀地喷在硝酸纤维膜上，得到检测线；将稀释好的羊抗鼠二抗均匀地喷在硝酸纤维膜上，得到质控线，喷液量均为 0.6 微升/厘米，37 $^{\circ}$ C 烘干过夜，封袋备用。

一种检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条及制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条，同时还涉及免疫胶体金试纸条的制备方法，可实现金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的快速诊断，适用于大量样品的现场检测、食物中毒和院内感染的快速诊断和应急处理。

背景技术

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，简称金葡菌，是常见的食物中毒和医院污染的主要病原菌之一，广泛分布于皮肤、粘膜，特别是鸟及哺乳动物的鼻咽部。当动物机体的抵抗力下降或皮肤粘膜破损时，病菌便可乘虚而入，引起畜禽各种化脓性疾病。近年来，金葡菌感染在畜牧业中流行严重，造成极大的经济损失。

金葡菌在水分、蛋白质和淀粉较多的食品中极易繁殖并分泌多种体外毒性蛋白，其中金黄色葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcal enterotoxins, SEs) 是引起细菌性食物中毒及肠胃炎的重要致病因子，也是生物战剂中的主要毒素。人体如果食入被肠毒素污染的食物，很快 (2~6 小时) 就会出现恶心、呕吐、腹部疼痛、腹泻等典型的食物中毒症状，重者，尤其是年老患者会发生休克样症状乃至死亡。

金黄色葡萄球菌肠毒素是一组分子量小 (26kD~30kD)、结构相似、血清型不同的可溶性蛋白质，对热稳定，在 100℃、30min 的情况下不能被灭活。根据血清型已鉴定的 SEs 有 SEA~SEE，由它们引起的食物中毒占金黄色葡萄球菌食物中毒的 95%，其中又以 SEA 居多 (77.8%)，D 型次之 (37.5%)。近年来，许多新的肠毒素血清型 SEG~SER 也相继被分离。

由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒一直是世界性的卫生问题，据美国疾病预防控制中心统计，该事件居细菌性食物中毒的第二位，占 33%。加拿大占 45%，匈牙利、芬兰等欧洲国家占 50% 以上，我国每年发生的此类中毒事件也非常多，全国各地均有报道。在目前条件下，要完全避免肠毒素对食品及饲料的污染非常困难。除了在粮食收获、储存、加工各个环节科学作业、注意防霉去毒外，唯一有效的办法是加强对食品及饲料等的监控检测，

及时发现污染的食品和饲料,并立即剔除,防止肠毒素超标污染的食品进入人类的食物链。

自上世纪 60 年代利用免疫学方法作为金葡菌肠毒素中毒的诊断手段以来,免疫血清学技术这方面的应用发展迅速,现行金葡菌肠毒素的检测方法主要依靠免疫学技术,例如反向间接血凝法(RPHA)、反向被动乳胶凝集实验(RPLA)及酶联免疫吸附试验(ELISA)。

RPHA 是将各型肠毒素抗血清吸附或偶联于绵羊、鸡和人红血球表面,再加入被检的含有相应肠毒素的标本,出现血细胞凝集即为阳性。该试验简单、快速,检出灵敏度高,可达 1ng/ml,1~3 小时即可判定结果。RPLA 方法的原理同 RPHA,不同之处是将抗体吸附于乳胶颗粒上。RPHA 和 RPLA 敏感性较高,但操作较复杂,需要细菌纯培养和制备肠毒素,实验周期长,从培养到诊断结果需要一个星期,因此不能实现快速诊断,且非特异性反应和假阳性较多。

近十几年来,ELISA 开始广泛用于肠毒素的检测。此法是利用酶反应测定抗体抗原特异性反应方法,敏感、快速、简便,应用较广。ELISA 的缺陷是:(1)需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用;(2)操作人员需要经过专门培训;(3)操作过程相对较为复杂,检测所需时间比较长;(4)检测过程局限在实验室内,不适合应用于现场样品的分析。随着经济的发展,尤其是中国加入 WTO 后,农副产品进出口贸易的扩大,发展并推广简便、快速、灵敏、适用于样品实地检测的方法势在必行。

发明内容

本发明的目的是在于提供了一种检测金葡菌肠毒素 A 的免疫胶体金试纸条,结构简单,操作方便,检测快速,灵敏度高,成本低廉,安全简便。

本发明的另一个目的是在于提供了一种免疫胶体金试纸条的制备方法,它包括 SEA、抗 SEA 特异性抗体的制备、SEA 免疫胶体金检测试纸条的制备。该试纸条操作简便、快速、准确,全过程只需 10 分钟,不受环境条件的干扰,特异性好,且检测灵敏度高,最低检测限为 1ng/ml。本发明适用于海关、医院、检验检疫单位等,可实现食品或临床标本中金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的快速检测。

胶体金免疫层析技术是近年来继三大标记技术(荧光素、放射性同位素和酶)后发展迅速的一种简便、快速的免疫学检测方法,它解决了目前肠毒素检测方法的弊端,使得检测方法的方便和快速两个优点得以同时实现,顺应了快速检测的发展方向。该技术利用胶体金本身的显色特点结合免疫层析技术诊断特异性的待测物。其基本原理是以微孔滤膜为载

体, 包被已知抗原或抗体, 加入待测样品后, 经微孔膜的毛细管虹吸作用或渗滤作用, 使样品中的抗原或抗体与膜上包被的抗体或抗原结合, 再用胶体金结合物标记而达到检测目的。目前常用的是胶体金快速免疫层析法 (colloidal gold enhanced immunochromatography assay) 和快速斑点免疫金渗滤法 (Dot - immunogold filtration assay)。

本发明的检测 SEA 免疫胶体金试纸条由样品垫、涂覆胶体金标记的抗 SEA 抗体的金标垫、在检测线和质控线包被有抗 SEA 抗体的和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜、吸水垫依次构成 (见图 1)。在该 PVC 底板 1 的两端, 分别设有样品垫 3 和吸收垫 7; 在该 PVC 底板 1 中部设有硝酸纤维素膜检测层 2, 在硝酸纤维素膜检测层 2 与样品垫 3 交界处, 设有包被金标标记抗 SEA 抗体的金标垫 4, 在金标垫 4 一端部分设置在样品垫 3 之下, 其另一端部分设置在检测层 2 之上; 在与样品垫 3 延续的检测层 2 上设有检测线 5 和质控线 6, 在该检测线 5 和质控线 6 上分别包被有抗 SEA 抗体和羊抗鼠 IgG。

一种制备检测 SEA 免疫胶体金试纸条, 其步骤是:

1. SEA 的制备:

通过 PCR 法筛选出产肠毒素 A 金黄色葡萄球菌, 提取产肠毒素 A 金葡菌标准株的基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增产物, PCR 产物经纯化后, 与 pGEM-T Easy (Promega 公司购置) 克隆载体进行连接、转化、测序, 含 SEA 正确序列的重组质粒经 *NheI* 和 *EcoRI* 双酶切, 与经同样双酶切的 pET28a (Novagen 公司购置) 表达载体进行连接和转化, 重组质粒 pET-SED 转化大肠杆菌 *BL21 (DE3)* (Novagen 公司购置), 30°C 0.5mM IPTG 诱导过夜, 离心收集菌体。按菌体重 1 (g): 10 (ml) 的量加入 50mM pH8.0 Tris-HCl buffer。在冰水上进行超声波破菌。4°C, 5 000rpm, 离心 10min, 分别收集上清液和沉淀, 进行 12%SDS-PAGE 电泳分析。安装 XK26 柱子 (Pharmacia Biotech), 进行清洗、装镍、平衡程序, 上清液经过 0.45 μ m 滤器过滤后开始上样, 用含 40mM 咪唑的 Washing buffer 清洗 Ni 离子层析柱, 用 250mM 咪唑的 Elution buffer 洗脱目的蛋白, 收集洗脱液, 即为纯化的 SEA, 4°C PBS 透析过夜, 以 BCA 法测定蛋白浓度, 2mg/ml 分装, 冰冻干燥呈干粉保存。12%SDS-PAGE 电泳检测纯化的 SEA。

2. 抗 SEA 特异性抗体的制备:

选用 6~8w 的雌性 BalB/c 小鼠。初次免疫将 SEA 与弗氏完全佐剂 (Sigma) 混合, 乳化完全, 皮下多点注射, 50 μ g/只。每隔 2 周, 用相同剂量的 SEA 与弗氏不完全佐剂

(Sigma) 进行加强免疫, 共加强免疫 2 次。最后一次免疫后 8~10 天小鼠尾部取血, 通过间接 ELISA 测抗血清效价, 如效价理想, 则摘小鼠眼球放血。

通过 Protein G 亲和层析法纯化抗 SEA 抗体, 具体步骤如下: 轻轻将抗血清置于 Protein G 亲和层析柱 (KPL) 柱吸附琼脂的表面, 用 10 倍柱体积的 1×Washing/Binding Buffer (0.1M 磷酸钠缓冲液, 0.15M NaCl, pH7.4) 洗吸附柱, 用 4 倍柱体积的 1×Elution Buffer (0.2M 甘氨酸, pH2.85) 洗脱, 得到 SEA 特异性抗体。

3. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 胶体金检测试纸条的制备:

3.1 空白胶体金的制备

采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒, 在烧瓶加入 1000ml 双蒸水和 10ml 1% 氯金酸, 加热至沸腾 (约 100℃), 加入 20ml 1% 柠檬酸钠, 继续煮沸约 10~20 分钟, 直到液体呈亮红色即停止加热。将烧杯置于室温 (20~25℃, 以下相同) 水浴中冷却。4℃ 冷藏保存, 注意避免污染及强光照射。在标记前, 1500rpm 离心去沉淀。

3.2 胶体金标记抗体的制备:

取空白胶体金, 用 0.1M K_2CO_3 将 pH 值调至 7.4。在磁力搅拌下缓慢滴入稀释好的抗体, 每 ml 胶体金加入 20 μ g 抗体, 继续搅拌 30 分钟。4℃, 10000rpm 高速离心 40 分钟, 轻轻吸除上清, 用金标抗体保存液重悬松散的胶体金沉淀。

3.3 金标垫的制备:

调试二维喷动仪 (BIODOT), 将标记好胶体金的抗 SEA 抗体均匀地喷在玻璃纤维膜上, 喷液量为 0.6 微升/厘米, 37℃ 烘干过夜, 封袋备用。

3.4 包被膜的制备

调试二维喷动仪 (BIODOT), 将稀释好的抗 SEA 抗体 (1.5mg/ml) 均匀地喷在硝酸纤维膜上, 得到检测线 (T 线); 将稀释好的羊抗鼠二抗 (2mg/ml) 均匀地喷在硝酸纤维膜上, 得到质控线 (C 线), 喷液量均为 0.6 微升/厘米, 37℃ 烘干过夜, 封袋备用。

本发明试剂的工作原理: 采用胶体金免疫层析技术, 选用 SEA 特异性抗体作为固相物, 利用双抗夹心法原理检测样品中是否含有 SEA。当待检标本中含有 SEA 时, 抗原先和胶体金标记的抗 SEA 抗体结合, 由于层析作用复合物沿包被膜向前移动, 当遇到检测线上的抗 SEA 抗体时, 形成抗体-抗原-金标抗体复合物, 在检测线上富集, 形成红色沉淀线。

免疫胶体金快速检测技术之所以能在检测工业中迅速崛起, 主要是因为与其他检测方

法比较具有以下独特的优点：（1）迅速，在 15 分钟之内可出结果，这是目前其它快速检测方法所无法达到的，ELISA 法出结果要 1~2h，以灵敏度高见长的 PCR 也步骤繁琐，耗时甚长。这与胶体金本身显色特点有关，也与免疫层析法和斑点免疫渗滤的“免疫浓缩”（Immuno Concentration, ICON）有关；（2）灵敏度高，达到和 ELISA 相似的灵敏度，如果加入增敏试剂，多用银加强剂，可超过 ELISA 1~2 个数量级。此外，由于胶体金标记蛋白质是一物理结合过程，结合牢固，很少引起蛋白质活性改变，所以试剂非常稳定，不受温度等外界因素影响，可在办公室、家中甚至野外进行检测，实验结果也可长期保存；（3）成本低廉，所需试剂和样本量少。因为“免疫浓缩”，所需试剂和样本量都非常少，样本量可低至 1~2 μ l；再加上无需任何仪器和设备，并且可单份标本检测，使成本大幅下降；（4）安全简便，不需任何仪器和设备，只需制备好的试纸条或试剂盒即可。更由于胶体金本身具有颜色，比 ELISA 省略了加显示剂和终止液的步骤，大大简化了操作，更适合于野外或床边的现场应用。因为没有诸如放射性同位素、邻苯二胺等有害物质参与，所以也不会污染环境，具有放射性同位素或酶标等检测方法所无法比拟的安全性。

本发明与现有技术相比具有如下优点：（1）检测速度快，全过程只需 10 分钟，可以实现单个样品或大量样本的检测；（2）灵敏度高，最低检测限为 1ng/ml；（3）操作简便，操作人员无需经过专业培训，按说明书即可完成操作，易于推广使用；（4）不需要任何仪器，特别适合现场检测；（5）不需要细菌的纯培养和制备肠毒素，检测样本无需浓缩，所需试剂和样本量少，样本量可低至 1~2 μ l。

在食物中毒的应急处理过程中，快速检测是控制食物中毒的主要手段和措施。检测水平的滞后将会导致食物中毒和院内感染无法得到快速的检测和应急处理，是一个重大的公共卫生问题，严重影响人民身体健康和经济建设。通过该方法可满足以下需求：（1）疾病控制方面：适用于流行病学调查，可实现在食物中毒的应急处理过程中的快速检测，从而及早预防疫情的扩散；（2）卫生检验方面：特别适合大量样品的现场检测，为进出口食品卫生质量的有效监控提供技术支持，保证食品安全，维护人类健康；（3）临床检验方面：为食物中毒的病人实现快速、准确的病情检测。

因此，本发明具有非常广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为一种金葡萄菌肠毒素 A 免疫胶体金试纸条的结构示意图；

1 - PVC 底板; 2 - 硝酸纤维膜检测层; 3 - 样品垫; 4 - 金标垫; 5 - 检测线; 6 - 质控线; 7 - 吸水垫。

图 2 是金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的 SDS-PAGE 分析, M 为蛋白 Marker (Fermentas), 泳道 1 为纯化前的 SEA, 泳道 2 为纯化后的 SEA;

图 3 是金黄色葡萄球菌肠毒素 A 胶体金快速检测试纸条的阳性结果, 样品液为金黄色葡萄球菌肠毒素 A;

图 4 是金黄色葡萄球菌肠毒素 A 胶体金快速检测试纸条的阴性结果, 样品液为 PBS 缓冲液。

具体实施方式

实施例 1: 金葡菌肠毒素 A 免疫胶体金试纸条的连接关系是:

根据图 1 可知, 它包括样品垫 3, 涂覆胶体金标记的抗 SEA 抗体的金标垫 4、在检测线 5 和质控线 6 包被有抗 SEA 抗体的和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜、吸水垫 7, 一种金黄色葡萄球菌肠毒素 A 免疫胶体金试纸条其连接关系是: 适当尺寸的 PVC 底板 1; 在该 PVC 底板 1 的两端, 分别设有样品垫 3 和吸收垫 7; 在该 PVC 底板 1 中部设有硝酸纤维膜检测层 2, 在硝酸纤维膜检测层 2 与样品垫 3 交界处, 设有包被金标标记抗 SEA 抗体的金标垫 4, 在金标垫 4 一端部分设置在样品垫 3 之下, 其另一端部分设置在检测层 2 之上; 在与金标垫 4 延续的检测层 2 上设有检测线 5 和质控线 6, 该检测线 5 和质控线 6 上分别包被有抗 SEA 抗体和羊抗鼠 IgG。检测样品依次由样品垫 3 到金标垫 4, 再经过检测线 5 和质控线 7, 完成整个检测过程。

实施例 2: 产 SEA 金葡菌标准株的分离

本实施例选用金黄色葡萄球菌 (张文利, 等 不同培养方法对金黄色葡萄球菌肠毒素结果得影响. 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (1): 108) 作为筛选菌株。根据已知金黄色葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 的基因序列 (GenBank 登陆号: M28521), 利用 Primer5.0 设计上游引物 sea F: 5' GCC GCT AGC ATG AAA AAA ACA GCA TTT ACA TTA C 3', (下划线为 *Nhe*I 酶切位点); 下游引物 sea R: 5' CGC CGT CGA CTT AAC TTG TAT ATAAAT ATA TAT CAA 3', (下划线为 *Sal*I 酶切位点)。

接种金葡菌 (张文利, 等 不同培养方法对金黄色葡萄球菌肠毒素结果得影响. 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (1): 108) 于 7.5% 氯化钠肉汤, 37°C 振荡培养 24h, 采用金黄色葡萄

球菌检测试剂盒(购自华美生物工程公司)提取金黄色葡萄球菌核酸,具体操作为:取 1.5ml 菌液, 4℃ 13000 rpm 离心 2 min, 弃上清。沉淀加入 200 μ l EDTA 和 50 μ l Elution 充分混匀, 13000 rpm 离心 1min, 去上清。加入 450 μ l 生理盐水和 50 μ l 样品裂解液I, 离心 1 min, 去上清。加入 1ml 生理盐水洗涤, 离心 1 min, 去上清。加入 50 μ l 样品裂解液II, 55℃反应 30min。95℃灭活 15 min, 13000 rpm 离心 5 min, 取上清作为模板, sea F、sea R 为引物进行 PCR 扩增, 程序为: 94℃预变性 3min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min 循环 25 次; 72℃延伸 10min。凝胶电泳分析显示, 从野生型金黄色葡萄球菌中得到大小约 773bp 的扩增产物, 与 SEA 基因预期大小一致(金黄色葡萄球菌检测试剂盒, 华美生物工程公司)。

实施例 3: SEA 的制备:

提取产肠毒素 A 金黄色葡萄球菌标准株的基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增产物, PCR 产物经 DNA Extraction Kit(Fermentas 公司)纯化后, 与 pGEM-T Easy 克隆载体(Promega 公司)进行连接、转化、测序, 含 SEA 正确序列的重组质粒经 *Nhe*I 和 *Sal* I 双酶切, 与经同样双酶切的 pET28a (Novagen 公司) 表达载体进行连接和转化, 重组质粒 pET-SEA 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 37℃ 1mM IPTG 诱导 6h, 离心收集菌体。按菌体重 1 (g): 10 (ml) 的量加入 50mM pH8.0 Tris-HCl buffer, 在冰水上进行超声波破菌。4℃, 5 000rpm, 离心 10min, 分别收集上清液和沉淀, 进行 12%SDS-PAGE 电泳分析。

利用表达载体 pET28a (Novagen 公司) 上带有的组氨酸标签纯化重组 SEA 蛋白, 具体步骤如下: 安装 XK26 柱子 (Pharmacia Biotech 公司), 进行清洗、装镍、平衡程序, 用含 150mM 咪唑的 Washing buffer 清洗 Ni 离子层析柱, 用 500mM 咪唑的 Elution buffer 洗脱目的蛋白, 收集洗脱液, 即为纯化的 SEA。将收集的目的蛋白缓慢稀释到复性缓冲液 (2 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 20mmol/L β -ME, pH7.4) 中, 4℃搅拌 3 h, 透析过夜 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4), 离心后收集上清, 以 BCA 法测定蛋白浓度, 冰冻干燥呈干粉保存。12%SDS-PAGE 电泳检测纯化的 SEA 为一条带, 为电泳纯 (见图 2)。SEA 纯化蛋白的免疫印迹结果显示, 复性后的 SEA 蛋白能与兔抗 SEA 多克隆抗体 (DENKASEIKEN 公司) 特异性结合, 在相对分子质量 31000 处有一棕色条带, 与 SEA 蛋白的预期大小一致, 说明通过基因工程技术制备的 SEA 蛋白具有良好的免疫原性, 得到 SEA 抗原。

实施例 4: 抗 SEA 特异性抗体的制备:

抗 SEA 多克隆抗体的制备选用 6~8w 的雌性 BalB/c 小鼠。初次免疫将 SEA 与弗氏完全佐剂 (Sigma) 混合, 乳化完全, 皮下多点注射, 50 μ g/只。每隔 2 周, 用相同剂量的 SEA 与弗氏不完全佐剂 (Sigma) 进行加强免疫, 共加强免疫 2 次。最后一次免疫后 8~10 天小鼠尾部取血, 通过间接 ELISA 测抗血清效价, 如效价理想, 则摘小鼠眼球放血, 分离血清。

抗 SEA 单克隆抗体的制备选用 6~8w 的雌性 BalB/c 小鼠, 免疫程序同多克隆抗体制备, 最后一次免疫后 8~10 天小鼠尾部取血, 通过间接 ELISA 测抗血清效价, 如果效价理想 (至少达到 10^4), 则取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, 以生成杂交瘤母克隆细胞, 并对母克隆上清液进行 ELISA 检测。通过有限稀释法对阳性母克隆进行亚克隆, 并对亚克隆上清液进行 ELISA 检测。

通过 Protein G 亲和层析法纯化抗 SEA 多克隆抗体/单克隆抗体, 具体步骤如下: 轻轻将抗血清/腹水置于 Protein G 亲和层析柱 (KPL) 柱吸附琼脂的表面, 用 10 倍柱体积的 1 \times Washing/Binding Buffer (0.1M 磷酸钠缓冲液, 0.15M NaCl, pH7.4) 洗吸附柱, 用 4 倍柱体积的 1 \times Elution Buffer (0.2M 甘氨酸, pH2.85) 洗脱, 得到 SEA 特异性抗体。

实施例 5: SEA 胶体金检测试纸条的制备:

1. 40nm 空白胶体金的制备

(1) 1%氯金酸的配制: 用 1000ml 双蒸水溶解 10g 氯金酸, 0.22 μ m 滤膜过滤, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。

(2) 1%柠檬酸钠的配制: 用 1000ml 双蒸水溶解 10g 柠檬酸钠, 0.22 μ m 滤膜过滤, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。

(3) 方法: 采用柠檬酸盐还原法, 在烧瓶加入 1000ml 双蒸水和 10ml 1%氯金酸, 加热到沸腾 (约 100 $^{\circ}$ C)。加入 1%柠檬酸钠 20ml, 继续煮沸 10~20 分钟, 直到液体呈亮红色即停止加热。将烧杯置于室温 (20~25 $^{\circ}$ C, 以下相同) 水浴中冷却 (20~25 $^{\circ}$ C), 制成颗粒直径为 40nm 的胶体金颗粒。4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 注意避免污染及强光照射。在标记前, 1500rpm 离心去沉淀, 得到 40nm 空白胶体金。

2. 胶体金标记抗体的制备

(1) 0.1M 碳酸钾的配制: 用 1000ml 双蒸水溶解 13.8g 碳酸钾, 0.22 μ m 滤膜过滤, 置 4

℃备用。

(2) 标记洗涤液的配制: 10%BSA, 0.01M pH7.4 PB 溶液, 0.2 g/L NaN₃, 0.22μm 滤膜过滤, 置 4℃备用。1000ml 标记洗涤液的配方: 100g BSA, 0.2gNaN₃, 1000ml PB 溶液。

(3) 金标抗体保存液的配制: 1%BSA, 0.01M pH7.4 PB 溶液, 0.2 g/L NaN₃, 0.22μm 滤膜过滤, 置 4℃备用。1000ml 标记洗涤液的配方: 10g BSA, 0.2gNaN₃, 1000ml PB 溶液。

(4) 方法: 取空白胶体金, 用 0.1M K₂CO₃ 将 pH 值调至 7.4。在磁力搅拌下缓慢滴入稀释好的抗 SEA 抗体, 每 ml 胶体金加入 20μg 抗体, 继续搅拌 30 分钟。4℃, 10000rpm 高速离心 40 分钟, 轻轻吸除上清, 用标记洗涤液洗涤一次, 离心, 去上清, 用金标抗体保存液重悬松散的胶体金沉淀, 4℃冷藏保存, 得到胶体金标记的抗 SEA 抗体。

3. 金标垫的制备:

调试 BIODOT 二维喷动仪, 将标记好胶体金的抗 SEA 抗体均匀地喷在玻璃纤维膜上, 喷液量为 0.6 微升/厘米, 37℃烘干过夜, 得到金标垫, 封袋备用。

4. 包被膜的制备:

用 0.01M pH7.2 PB 缓冲液将抗 SEA 抗体的浓度稀释为 1.5mg/ml, 将羊抗鼠二抗的浓度稀释为 2mg/ml。调试 BIODOT 公司的二维喷动仪, 将稀释好的抗 SEA 抗体均匀地喷在硝酸纤维膜上, 得到检测线 (T 线); 将稀释好的羊抗鼠二抗均匀地喷在硝酸纤维膜上, 得到质控线 (C 线)。喷液量为 0.6 微升/厘米, 37℃烘干过夜, 得到包被膜, 封袋备用。

5. SEA 胶体金快速检测试纸条的组装与包装:

将样品垫、金标垫、包被膜、吸水纸粘贴在 PVC 底板上, 用切条机将试纸裁剪成 6cm × 4cm 规格, 将试纸条装入外壳内。组装车间温度控制在 25℃, 湿度 20% ~ 30%。将试纸条与干燥剂封装在铝箔塑料袋内, 于 4 ~ 30℃避光保存, 不得冻存。铝箔打开后应尽快使用试纸条, 受潮后试纸条将失效, 保质期一年。

6. SEA 胶体金快速检测试纸条的使用:

在检测前先将样本和试纸条在室温条件下放置, 使其平衡至室温。取出检测试纸条, 平放于操作台上, 在加样孔内加入 2 滴 (或 100μl) 待检样品, 10 分钟内可判定结果, 超过 30 分钟的结果无效。结果判断: 1. 阳性: 在观察孔内, 检测线 (T) 及质控线 (C) 出现紫红色线 (图 3)。肠毒素浓度越高, 检测线 (T) 颜色越深。2. 弱阳性: 在观察孔内,

检测线 (T) 及质控线 (C) 出现紫红色线, 但检测线 (T) 出现的颜色很浅。3. 阴性: 在观察孔内, 只有质控线 (C) 出现一条紫红色线 (图 4)。4. 失效: 在观察孔内, 质控线 (C) 和检测线 (T) 都不出现色线; 或仅检测线 (T) 出现色线。

实施例 6: SEA 胶体金快速检测试纸条灵敏度与稳定性的检测

特异性试验: 选用 SEA、SEB、SED 蛋白作为样品, 采用实施例 5 制备的 SEA 免疫胶体金检测试纸条进行测试, 结果 SEA 样品在检测线 (T) 及质控线 (C) 均出现紫红色线, 显阳性; SEB 和 SED 样品只在质控线 (C) 出现一条紫红色线, 显阴性。

稳定性试验: 将实施例 5 制备的 SEA 免疫胶体金检测试纸条分别放置于 4℃ 室温 (20~25℃) 30 天, 取出后分别用 SEA 样品进行检测, 测试的结果与特异性测试结果一致。

灵敏度试验: 将实施例 5 制备的 SEA 免疫胶体金检测试纸条, 加入用样品稀释液倍比稀释的 SEA 100μl, 平放于操作台上, 10 分钟判定结果, SEA 免疫胶体金检测试纸条可检测出浓度低至 1ng/ml 的 SEA, 显示出较高的敏感性, 见表 1。

表 1 SEA 胶体金检测试纸条敏感性的测定结果

SEA 浓度	1ng/ml	2ng/ml	4ng/ml	8ng/ml	16ng/ml
检测结果	+	+	+	+	+

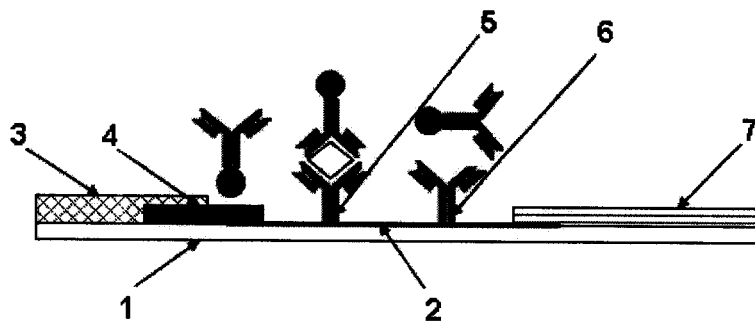


图 1

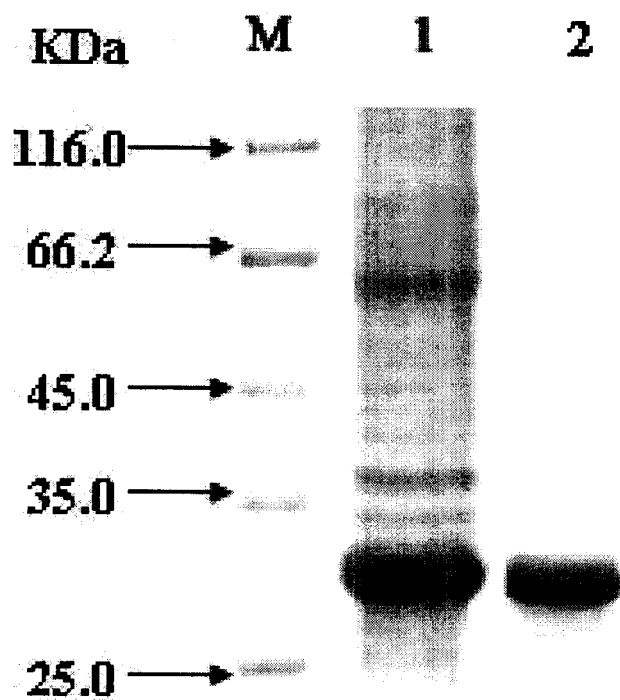


图 2

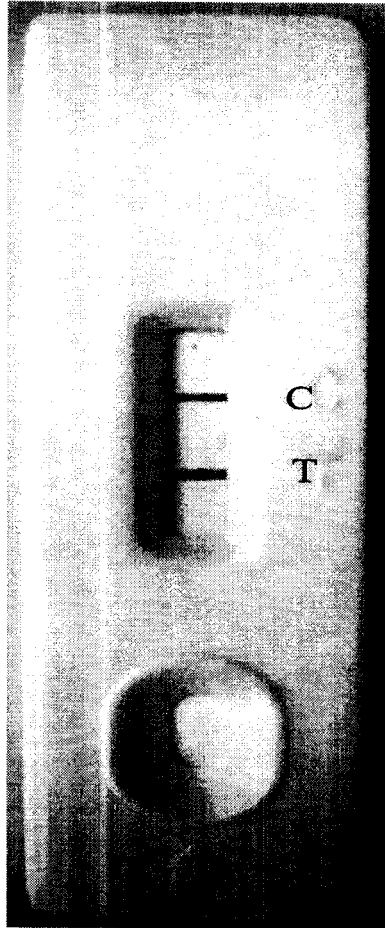


图 3

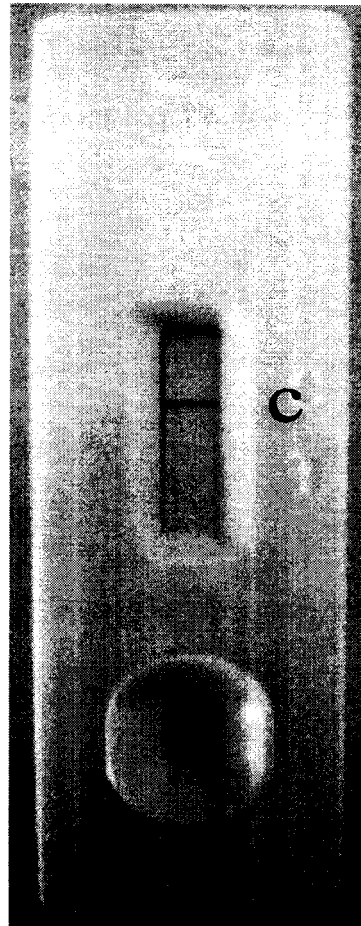


图 4

专利名称(译)	一种检测金黄色葡萄球菌肠毒素A的免疫胶体金试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN101271110A	公开(公告)日	2008-09-24
申请号	CN200810046935.8	申请日	2008-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	深圳大学 深圳市疾病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	深圳大学 深圳市疾病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	深圳大学 深圳市疾病预防控制中心		
[标]发明人	胡章立 张仁利 甄茵		
发明人	胡章立 张仁利 甄茵		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	王敏锋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测金黄色葡萄球菌肠毒素A的免疫胶体金试纸条及制备方法，包括一种表达重组SEA蛋白的工程菌的构建，SEA蛋白的分离纯化，抗SEA特异性抗体的制备，SEA胶体金检测试纸条的制备。该试纸条由样品垫、涂覆金标标记抗SEA抗体的金标垫、在检测线和质控线包被有抗SEA抗体的和抗鼠IgG的硝酸纤维素膜构成，依次按样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜，吸水垫粘附在PVC底板上。该试纸条操作简便、快速、准确，全过程只需10分钟，不受环境条件的干扰，特异性好，且检测灵敏度高，最低检测限为1ng/ml。本发明适用于海关、医院、检验检疫单位等，可实现食品或临床标本中金黄色葡萄球菌肠毒素A的快速检测。

