



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103412122 B

(45) 授权公告日 2015.06.24

(21) 申请号 201310347757.3

(22) 申请日 2013.08.09

(73) 专利权人 安徽农业大学

地址 230036 安徽省合肥市蜀山区长江西路130号

(72) 发明人 李槿年 梁明燕 刘雪兰 张婷婷 李冠青

(74) 专利代理机构 合肥和瑞知识产权代理事务所(普通合伙) 34118

代理人 王挺

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

US 4818688, 1989.04.04,

CN 101235090 A, 2008.08.06,

CN 102481352 A, 2012.05.30,

CN 102928599 A, 2013.02.13,

CN 103172752 A, 2013.06.26,

CN 101747416 A, 2010.06.23,

王艳华等. 抗原表位预测方法的研究进展. 《中国兽医科学》. 2009, 第39卷(第10期), 第938-940.

梁明燕等. 金黄色葡萄球菌 SEG 蛋白 B 细胞线性表位的预测与验证. 《安徽农业大学学报》. 2013, 第40卷(第3期),

孙茂忠等. 乳源性金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的间接 ELISA 检测方法建立. 《食品工业》. 2012, 第33卷(第8期),

李冠青. 乳源金葡菌主要肠毒素基因的检测、表达及其抗体制备. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库(医药卫生科技辑)》. 2013, (第7期),

审查员 刘迎鸣

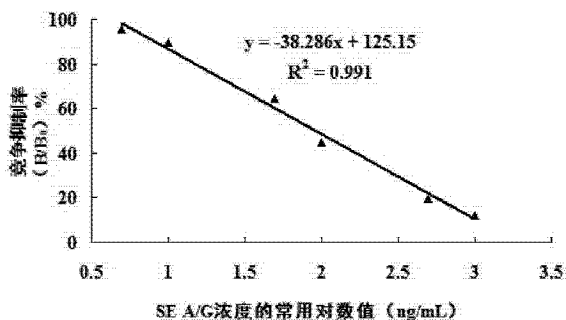
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法

(57) 摘要

本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法。本发明的方法主要包括 A 型和 G 型肠毒素多表位串联肽 SE A/G (包被抗原)的制备、兔抗 SE A/G 抗体的制备、样品前处理和基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 检测方法的建立。该间接竞争 ELISA 检测方法由以下步骤组成:1) 包被;2) 洗板;3) 封闭;4) 洗板;5) 依次加入标准品、待测样品和特异性抗体;6) 洗板;7) 加入酶标二抗;8) 洗板;9) 显色和终止反应。本发明方法具有特异性强、灵敏度高、重复性好的特点,适合于乳与乳制品等食品中金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的快速和同步定量检测。



1. 一种同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法,其特征包括如下步骤:

步骤 1)、制备金葡菌 A 型肠毒素和 G 型肠毒素 B 细胞多表位串联肽 SE A/G;并制备获得兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体;

步骤 2)、将所述多表位串联肽 SE A/G 作为检测抗原包被在酶标板的孔中,且酶标板的孔分成如下三类:空白对照孔、标准品阳性对照孔和样品孔;

将蒸馏水加入已包被有所述检测抗原的空白对照孔中,

将稀释成系列浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液加入到已包被有所述检测抗原的标准品阳性对照孔中,所述系列浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液包括浓度为零的多表位串联肽 SE A/G 标准液,

将经过前处理的含有金葡菌 A 型和 / 或 G 型肠毒素的待测样品加入已包被有所述检测抗原的样品孔中;

除空白对照孔外,向上述其余二类孔中均依次加入兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体工作液、酶标二抗进行酶活性的放大作用,最后三类孔中均加入底物显色后终止反应,分别测定三类孔中液体的光密度 (OD) 值即吸光度值;

步骤 3)、以空白对照孔中液体测得的光密度 (OD) 值调零,在 492nm 处测定标准品阳性对照孔和样品孔中液体的光密度 (OD) 值;

以系列浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液的吸光度值 B 除以 0 标准即 0ng/mL 的多表位串联肽 SE A/G 标准液的吸光度值 B_0 ,再乘以 100%,即可得到竞争抑制率;以多表位串联肽 SE A/G 标准液浓度的对数为横坐标,竞争抑制率为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得出标准曲线的回归方程;同样的,测定待测样品的竞争抑制率,根据每个待测样品的竞争抑制率就可从标准曲线上读出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为待测样品中金葡菌 A 型和 / 或 G 型肠毒素的实际含量;

所述 B 细胞多表位串联肽 SE A/G 的制备过程如下:

(1)、多表位串联肽 SE A/G 的设计和基因合成

设计金葡菌 A 型和 G 型肠毒素 B 细胞表位串联肽 SE A/G 基因,即采用核苷酸序列 SEQIDNO:8 将 SE A 的 4 个 B 细胞线性表位区域和 SE G 的 3 个优势 B 细胞线性表位的核苷酸序列按 SEQIDNO:1、SEQIDNO:8、SEQIDNO:2、SEQIDNO:8、SEQIDNO:3、SEQIDNO:8、SEQIDNO:4、SEQIDNO:8、SEQIDNO:5、SEQIDNO:8、SEQIDNO:6、SEQIDNO:8、SEQIDNO:7 顺序串联成多表位串联肽 SE A/G 基因,其核苷酸序列如 SEQIDNO:9 所示;在所述多表位串联肽 SE A/G 基因的序列两端分别添加 BamHI、HindIII 酶切位点以及终止密码子 TAA,全基因合成;

(2)、多表位串联肽 SE A/G 的克隆、表达与纯化重组蛋白

将所述多表位串联肽 SE A/G 基因克隆入 pUC57 载体构建成 pUC57-SEA/G,以 pUC57 - SE A/G 为模板,设计合成 PCR 引物如下:

P1 :5' -CAGATGGATCCCATGATAATAATCGTTTGACCGAAGAG-3', 下划线部分为 BamHI 酶切位点;

P2 :5' -GTGTCAAGCTTTTATTTATCGCGTTCATTTTCAGAACTATTTAAA-3', 下划线部分为 HindIII 酶切位点;

经 PCR 反应扩增所述多表位串联肽 SE A/G 基因,PCR 产物经 DNAExtraction Kit 纯化和

BamHI 与 HindIII 双酶切后,与经同样双酶切的 pET-32a 表达载体进行连接和转化得到重组质粒 pET-32a-SE A/G;所述重组质粒 pET-32a-SE A/G 转化 *E. coli* Rosetta, 30°C 1mmol/L IPTG 诱导 4h,离心收集菌体,SDS-PAGE 分析表达产物,所述表达产物为重组蛋白 His-SE A/G,且重组蛋白 His-SE A/G 的相对分子量为 31kDa,并使用 Ni-Charged Resin 亲和层析柱纯化重组蛋白 His-SE A/G。

2. 根据权利要求 1 所述的同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法,其特征在于所述兔抗多表位串联肽 SEA/G 的特异性抗体的制备过程如下:

(1)、兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的获得

选择 2.5Kg/ 只的雄性新西兰大白兔作为实验兔,将纯化的多表位串联肽 SE A/G 与司本白油佐剂混合,乳化完全,皮下多点注射,免疫剂量 1mg/ 只;免疫后第 15 天加强免疫一次,免疫剂量及免疫途径同第一次免疫;于第一次免疫后第 28 天从实验兔心脏穿刺采血,分离血清备用;

(2)、兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的提纯

使用饱和硫酸铵分级沉淀结合 Protein G 亲和层析法纯化所述血清,得到兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法,其特征在于步骤 2) 中所述含有金葡菌 A 型和 / 或 G 型肠毒素的待测样品的前处理方式如下:

(1) 液体待测样品

将液体待测样品混合均匀后取 10mL 置离心管中,10000rpm 离心 15min,取上清 100 μ L,用磷酸盐缓冲液 PBS 以 1:10 稀释后即可;

(2) 固体待测样品

取 10g 固体待测样品加入 100mL 磷酸盐缓冲液 PBS 中均质后,45°C 水浴剧烈摇动 1h,10000rpm 离心 15min,上清液用滤纸过滤后即可。

4. 根据权利要求 1 所述的同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法,其特征在于本方法中的包被抗原工作液和特异性抗体工作液按如下方式配制:

(1) 包被抗原工作液

取纯化后的浓度为 1mg/mL 的多表位串联肽 SE A/G,用稀释液稀释成 0.75 μ g/mL;

(2) 特异性抗体工作液

用稀释液将纯化后的兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体稀释成 1:256000。

同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的 间接竞争 ELISA 方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,涉及乳与乳制品等食品中金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的快速、特异、灵敏和同步检测方法,具体为一种基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称金葡菌)是一种重要的食源性病原菌,该菌广泛存在于空气、水、尘埃以及人和动物的排泄物中。金葡菌在含水分、蛋白质和淀粉较多的食品,尤其是乳及乳制品中,极易生长繁殖并产生分泌肠毒素(*Staphylococcal Enterotoxin, SE*)。由于 SE 具有很强的热稳定性和毒性,被金黄色葡萄球菌污染的食物经过加热处理后,虽然细菌可被杀死,但其已产生的 SE 仍具有致病性,SE 微量污染食品即可导致严重的人类食物中毒,危害人类健康。因此,SE 被列为食品卫生检验中的法定检测项目。

[0003] 自 1940 年 Verwry 等首先分离到第一种金葡菌肠毒素以来,越来越多的 SE 被发现。根据抗原性不同,目前已有 20 种不同血清型的 SE 蛋白,其中 SEA、SEB、SEC、SED 和 SEE 为经典肠毒素,其余为新型肠毒素。20 世纪 80 年代初的研究表明由经典肠毒素和新型肠毒素引起的食物中毒发生率分别为 95% 和 5%。近年来研究发现新型肠毒素引起食物中毒的机率比经典肠毒素大,并且同一株金黄色葡萄球菌可产生 2 种或 2 种以上不同血清型肠毒素,不同血清型肠毒素的检出率与菌株的分离地域和食品来源有关。研究发现乳及乳制品中的金葡菌肠毒素的血清型主要为 SEA 和 SEG。

[0004] 食品中 SE 检测方法有动物实验法、PCR 法、生物传感器检测法和免疫检测法。各类方法均存在一些不足之处。例如,动物实验法灵敏度低、存在个体差异;PCR 方法只能检测 SE 基因,不能真实反映食物的安全性;生物传感器检测法灵敏度低且易被污染。现行针对 SE 抗原检测的免疫学方法主要包括反向间接血凝法(RPHA)、反向被动乳胶凝集实验(RPLA)、免疫琼脂扩散法、免疫芯片法及酶联免疫吸附试验(ELISA)。前三种免疫检测法的缺点是费时、灵敏度低;免疫芯片法则存在价格昂贵、操作人员需要经过专业培训、影响分析的干扰因素较多等不足。酶联免疫吸附试验(ELISA)以其快速、方便、特异、可定量等优点,在 SE 检测中受到广泛应用。国外已研制出高质量 ELISA 试剂盒,用于牛奶、肉制品等食品中的 SE 检测,但其价格昂贵。2010 年我国也将间接 ELISA 方法定为检测经典 SE 的国标方法,但检测范围有限,只能检测经典肠毒素,对新型肠毒素的检测存在盲区,检测特异性和灵敏性也不能令人满意,往往出现假阳性现象。目前,国内申报的有关 SE 抗原检测方法也只能检测经典肠毒素,检测试剂的质量有待于进一步提高。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有 SE 检测方法的不足,通过制备金葡菌 A 型和 G 型肠毒素

多表位串联肽 SE A/G 及其特异性抗体,并利用该多表位串联肽及其特异性抗体,建立一种快速、特异、灵敏和可同时检测食品中 SEA (经典肠毒素)和 SEG (新型肠毒素)的间接竞争 ELISA 方法。

[0006] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 一种同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法,其包括如下步骤:

[0008] 步骤 1)、制备金葡菌 A 型肠毒素和 G 型肠毒素 B 细胞多表位串联肽 SEA/G;并制备获得兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体;

[0009] 步骤 2)、将所述多表位串联肽 SE A/G 作为检测抗原包被在酶标孔中,且酶标板的孔分成如下三类:空白对照孔、标准品阳性对照孔和样品孔;

[0010] 将蒸馏水加入已包被有所述检测抗原的空白对照孔中,

[0011] 将稀释成系列浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液加入到已包被有所述检测抗原的标准品阳性对照孔中,所述系列浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液包括浓度为零的多表位串联肽 SE A/G 标准液,

[0012] 将经过前处理的含有金葡菌 A 型和 / 或 G 型肠毒素的待测样品加入已包被有所述检测抗原的样品孔中;

[0013] 除空白对照孔外,向上述其余二类孔中均依次加入兔抗多表位串联肽 SEA/G 特异性抗体工作液、酶标二抗进行酶活性的放大作用,最后三类孔中均加入底物显色后终止反应,分别测定三类孔中液体的光密度(OD)值即吸光度值;

[0014] 步骤 3)、以空白对照孔中液体测得的光密度(OD)值调零,在 492nm 处测定标准品阳性对照孔和样品孔中液体的光密度(OD)值;

[0015] 以系列浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液的吸光度值 B 除以 0 标准即 0ng/mL 的多表位串联肽 SE A/G 标准液的吸光度值 B_0 ,再乘以 100%,即可得到竞争抑制率;以多表位串联肽 SE A/G 标准液浓度的对数为横坐标,竞争抑制率为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得出标准曲线的回归方程;同样的,测定样品的竞争抑制率,根据每个样品的竞争抑制率就可从标准曲线上读出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样品中金葡菌 A 型和 / 或 G 型肠毒素的实际含量。

[0016] 所述 B 细胞多表位串联肽 SE A/G 的制备过程如下:

[0017] (1)、多表位串联肽 SE A/G 的设计和基因合成

[0018] 设计金葡菌 A 型和 G 型肠毒素 B 细胞表位串联肽 SE A/G 基因,即采用核苷酸序列 SEQIDNO:8 将 SE A 的 4 个 B 细胞线性表位区域和 SE G 的 3 个优势 B 细胞线性表位的核苷酸序列按 SEQIDNO:1、SEQIDNO:8、SEQIDNO:2、SEQIDNO:8、SEQIDNO:3、SEQIDNO:8、SEQIDNO:4、SEQIDNO:8、SEQIDNO:5、SEQIDNO:8、SEQIDNO:6、SEQIDNO:8、SEQIDNO:7 顺序串联成多表位串联肽 SE A/G 基因,其核苷酸序列如 SEQIDNO:9 所示;在所述多表位串联肽 SE A/G 基因的序列两端分别添加 BamHI、HindIII 酶切位点以及终止密码子 TAA,全基因合成;

[0019] (2)、多表位串联肽 SE A/G 的克隆、表达与纯化重组蛋白

[0020] 将所述多表位串联肽 SE A/G 基因克隆入 pUC57 载体构建成 pUC57-SE A/G,以 pUC57-SE A/G 为模板,设计合成所述 PCR 引物如下:

[0021] P1:5' -CAGATGGATCCCATGATAATAATCGTTTGACCGAAGAG-3', 下划线部分为 BamHI 酶

切位点；

[0022] P2 :5'-GTGTCAAGCTTTTATTTATCGCGTTCATTTTCAGAACTATTTAAA-3'，下划线部分为 HindIII 酶切位点；

[0023] 经 PCR 反应扩增所述多表位串联肽 SE A/G 基因，PCR 产物经 DNA Extraetion Kit 纯化和 BamHI 与 HindIII 双酶切后，与经同样双酶切的 pET-32a 表达载体进行连接和转化得到重组质粒 pET-32a-SE A/G；所述重组质粒 pET-32a-SE A/G 转化 E. coli Rosetta，30℃ 1mmol/L IPTG 诱导 4h，离心收集菌体，SDS-PAGE 分析表达产物，并使用 Ni-Charged Resin 亲和层析柱纯化重组蛋白 His-SE A/G。

[0024] 所述兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的制备与提纯过程如下：

[0025] (1)、兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的制备

[0026] 选择 2.5Kg/ 只的雄性新西兰大白兔作为实验兔，将纯化的多表位串联肽 SE A/G 与司本白油佐剂混合，乳化完全，皮下多点注射，免疫剂量 1mg/ 只；免疫后第 15 天加强免疫一次，免疫剂量及免疫途径同第一次免疫；于第一次免疫后第 28 天从实验兔心脏穿刺采血，分离血清备用；

[0027] (2)、兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的提纯

[0028] 使用饱和硫酸铵分级沉淀结合 Protein G 亲和层析法提纯所述免疫血清，得到兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体。

[0029] 步骤 2) 中所述含有金葡菌 A 型和 / 或 G 型肠毒素的待测样品的前处理方式如下：

[0030] (1) 液体待测样品

[0031] 将液体待测样品混合均匀后取 10mL 置离心管中，10000rpm/min 离心 15min，取上清 100 μ L，用磷酸盐缓冲液 PBS 以 1:10 稀释后即可；

[0032] (2) 固体待测样品

[0033] 取 10g 固体待测样品加入 100mL 磷酸盐缓冲液 PBS 中均质后，45℃ 水浴剧烈摇动 1h，10000rpm/min 离心 15min，上清液用滤纸过滤后即可。

[0034] 本方法中的包被抗原工作液和特异性抗体工作液按如下方式配制：

[0035] (1) 包被抗原工作液

[0036] 取纯化后的浓度为 1mg/mL 的多表位串联肽 SE A/G，用稀释液稀释成 0.75 μ g/mL；

[0037] (2) 特异性抗体工作液

[0038] 用稀释液将纯化后的兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体稀释成 1:256000。

[0039] 本发明与现有技术相比，具有如下优点和有益效果：

[0040] (1) 本发明方法是基于金葡菌 A 型和 G 型肠毒素多表位串联肽 SE A/G 而建立，排除了整个抗原分子中免疫非相关成分或免疫抑制成分。SE A/G 特异性抗体只与 SEA 和 / 或 SEG 发生特异性结合反应，不与其他血清型 SE 和其他肠毒素发生交叉反应。因此，本发明较现有间接竞争 ELISA 方法的特异性强。

[0041] (2) 灵敏度高，本发明对抗原浓度的最低检测限为 5.068ng/mL。

[0042] (3) 对待测样品的前处理要求低，前处理过程简单，不需要细菌的纯培养和制备肠毒素。

[0043] (4) 操作简便快速，能在 5 小时左右定性或定量检测样品，且可实现样品中 SEA 和 SEG 两种肠毒素的同时检测。

[0044] (5) 结果判定简单、准确,以显色反应的深浅定性显示检测结果,即检测孔出现桔黄色,终止后呈黄色或棕色为阴性,无色和较浅色为阳性。采用酶标仪机读定量结果,减少主观性,准确可靠。

[0045] (6) 对仪器设备要求低、试剂保存时间长、成本低,可批量检测,在动物源性食品,尤其是乳及乳制品 SE 检测中,能够发挥重要作用。

附图说明

[0046] 图 1 为金葡菌肠毒素多表位串联肽 SE A/G 的 SDS-PAGE 分析, M 为蛋白 Marker,泳道 1 为纯化前的 SE A/G (31kDa),泳道 2 为纯化后的 SE A/G (31kDa)。

[0047] 图 2 为基于多表位串联肽 SE A/G 的间接竞争 ELISA 法同步检测 SEA 和 SEG 的标准曲线。

具体实施方式

[0048] 下面通过实施例对本发明做进一步说明,但不限制本发明。

[0049] 下述实施例中的实验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0050] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0051] 下述实施例中的比例,如无特别说明,均为体积比例。

[0052] 1. 金葡菌 A 型和 G 型肠毒素多表位串联肽 SE A/G 的制备

[0053] 1.1 多表位串联肽 SE A/G 的设计与基因合成

[0054] 设计金葡菌 A 型和 G 型肠毒素多表位串联肽 SE A/G 基因,即使用 AAY(丙氨酸-丙氨酸-酪氨酸)的核苷酸序列(SEQIDNO:8)将 SE A 的 4 个 B 细胞线性表位区域和 SE G 的 3 个优势 B 细胞线性表位的核苷酸序列按如下方式顺序串联成多表位串联肽 SE A/G 基因:

[0055] SEAepitope1 (SEQIDNO:1)-AAY (SEQIDNO:8)-SEAepitope2 (SEQIDNO:2)-AAY (SEQIDNO:8)-SEAepitope3 (SEQIDNO:3)-AAY (SEQIDNO:8)-EAepitope4 (SEQIDNO:4)-AAY (SEQIDNO:8)-SEGepitope5 (SEQIDNO:5)-AAY (SEQIDNO:8)-SEGepitope6 (SEQIDNO:6)-AAY (SEQIDNO:8)-SEGepitope7 (SEQIDNO:7)

[0056] 所述多表位串联肽 SE A/G 基因的核苷酸和氨基酸序列如 SEQIDNO:9 (282bp, 94aa) 所示。

[0057] 在所述多表位串联肽 SE A/G 基因序列 (282bp) 两端分别添加 BamHI、HindIII 酶切位点以及终止密码子 TAA,最后形成一个长度为 297bp 的多表位串联肽 SE A/G 基因。委托上海生工生物工程技术有限公司合成多表位串联肽 SE A/G 基因并克隆入 pUC57 载体构建成 pUC57-SE A/G。

[0058] 1.2 多表位串联肽 SE A/G 的克隆、表达与纯化

[0059] 以 pUC57 - SE A/G 为模板,设计合成所述 PCR 引物如下:

[0060] P1 :5' -CAGATGGATCCCATGATAATAATCGTTTGACCGAAGAG-3',下划线部分为 BamHI 酶切位点;

[0061] P2 :5' -GTGTCAAG CTTTATTTATCGGTTTCATTTTCAGAACTATTTAA-3',下划线部分为 HindIII 酶切位点;

[0062] 经 PCR 反应扩增所述多表位串联肽 SE A/G 基因,PCR 产物经 DNA Extraetion Kit

(Fermentas 公司)纯化和 BamHI 与 HindIII 双酶切后,与经同样双酶切的 pET-32a(Novagen 公司)表达载体进行连接和转化得到重组质粒 pET-32a-SE A/G。重组质粒 pET-32a-SE A/G 转化 E. coli Rosetta, 30°C 1mmol/L IPTG 诱导 4h,离心收集菌体, SDS-PAGE 分析表达产物,并使用 Ni-Charged Resin 亲和层析柱纯化重组蛋白 His-SE A/G。12%SDS-PAGE 显示纯化后重组 SE A/G 为一条带 (31kDa),为电泳纯(见图 2 所示)。以 BCA 法测定纯化后 SE A/G 蛋白浓度约为 1.7mg/mL,冷冻干燥呈干粉状保存。Western-blot 分析结果显示纯化后重组 SE A/G 能与兔抗 SEA 多克隆抗体和兔抗 SEG 多克隆抗体发生特异性结合反应,说明通过基因重组技术制备的多表位串联肽 SE A/G 仍保留天然蛋白的抗原性,其浓度和纯度满足检测抗原的要求。

[0063] 2. 兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的制备与提纯

[0064] 2.1 兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的制备

[0065] 选用 2.5Kg/ 只的雄性新西兰大白兔制备多克隆抗体。将纯化的 SE A/G 与司本白油佐剂混合,乳化完全,皮下多点注射,免疫剂量 1mg/ 只。免疫后第 15 天加强免疫一次,免疫剂量及免疫途径同第一次免疫。分别于免疫前(阴性血清对照)和免疫后第 28 天从实验兔心脏采血分离血清,采用间接 ELISA 法测定抗体效价为 1:327680。

[0066] 2.2 兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体的提纯

[0067] 使用饱和硫酸铵分级沉淀结合 Protein G 亲和层析法纯化免疫血清,用考马斯亮法测定其含量,采用 SDS-PAGE 分析其纯度,采用间接 ELISA 测定其效价。结果显示纯化后兔抗重组蛋白抗体的浓度为 1mg/mL、纯度达到 95%、ELISA 效价为 1:819200,满足检测抗体的要求。

[0068] 3. 基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法的建立

[0069] 3.1 抗原抗体最佳工作浓度的确定

[0070] 采用方阵滴定法对抗原和抗体的最佳工作浓度进行优化。用包被液将多表位串联肽 SE A/G 稀释为 1.5、1.25、1.0、0.75、0.5、0.25 μ g/mL 6 个浓度,每横行包被 1 个稀释度,100 μ L/ 孔,4°C 包被过夜。兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体做 1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000、1:256000、1:512000 和 1:1024000 共 8 个梯度稀释,每纵行 1 个稀释度,100 μ L/ 孔,按照间接 ELISA 的操作步骤,测定各孔 OD₄₉₂ 值,选择 OD₄₉₂ 值在 1.0 左右且抗原和抗体浓度均为最低的组合时为其最佳工作浓度。结果由表 1 可见,抗原的最佳包被浓度为 0.75 μ g/mL,抗体的最佳稀释度为 1:256000。

[0071] 表 1 最佳抗原和抗体工作浓度的筛选

[0072]

SE A/G 包被浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗体稀释度								空白对照
	8×10^3	16×10^3	32×10^3	64×10^3	128×10^3	256×10^3	512×10^3	1024×10^3	
1.5	2.844	2.328	1.959	1.398	1.131	0.861	0.721	0.404	0.066
1.25	2.844	2.47	2.116	1.519	1.133	0.955	0.727	0.41	0.07
1.0	2.754	2.42	2.095	1.579	1.226	0.886	0.64	0.448	0.058
0.75	2.847	2.494	2.047	1.731	1.31	1	0.576	0.421	0.059
0.5	2.702	2.34	1.901	1.478	1.173	0.934	0.683	0.44	0.068

[0073] 3.2 标准曲线的绘制和最低检测线

[0074] (1) 标准曲线绘制

[0075] 以最佳抗原浓度 ($0.75 \mu\text{g/mL}$) 包被酶标板, 4°C 过夜。弃去包被液, 用 pH7.4 PBST 振荡洗涤 3 次, 1min/次, 纸上拍干。用含 5% 脱脂奶粉的 pH7.4 PBS 溶液 ($200 \mu\text{L/孔}$), 37°C 封闭 2h, 洗涤。将多表位串联肽 SE A/G 标准品用稀释液稀释成 1000、500、100、50、10、5、0、0ng/mL 系列浓度, 每个浓度重复 3 孔, $50 \mu\text{L/孔}$, 每孔再加 $50 \mu\text{L}$ 1:128000 稀释的兔抗多表位串联肽 SE A/G 抗体, 振荡混匀, 置 37°C 孵育 2h, 洗涤。加 1:5000 稀释羊抗兔 HRP-IgG, $100 \mu\text{L/孔}$, 37°C 作用 1h, 洗涤。加底物液作用 10-15min, 酶标仪检测各孔 OD_{492} 值, 重复测定 3 次。

[0076] 以系列浓度的标准液的吸光度值 (B) 除以 0 标准 (0ng/mL 的标准液) 的吸光度值 (B_0), 再乘以 100%, 即可得到竞争抑制率 (B/B_0)%。以标准液浓度的对数为横坐标, 竞争抑制率为纵坐标绘制标准曲线, 进行线性回归, 得出标准曲线的回归方程; 如图 2 所示, 标准曲线的线性回归方程为 $y = -38.286x + 125.15$, $R^2 = 0.991$, 在 5-1000ng/mL 围内, 竞争抑制率与多表位串联肽 SE A/G 浓度的对数相关系数达 0.991, 因此本方法的检测范围较宽。

[0077] (2) 标准曲线最低检测限

[0078] 制作标准曲线, 测定 10 个 0ng/mL 标准溶液, 计算 OD 值的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD), 根据最低检测限公式 $B = \bar{x}_i - 3SD$ 计算抑制率 Y 为 98.164%。将 Y 值代入线性回归方程, 计算出在标准曲线上对应的抗原浓度常用对数为 0.7049, 抗原浓度为 5.068ng/mL, 即本方法的最低检测限为 5.068ng/mL。

[0079] 3.3 特异性检测

[0080] 采用间接竞争 ELISA 方法进行检测, 测定各竞争物的 IC₅₀ 值, 计算交叉反应率 (CR%), 以交叉反应率为指标判定方法的特异性。结果由表 2 可见, 兔抗多表位串联肽 SE A/G 抗体对 SE A/G、SEA 和 SEG 的交叉反应率分别为 100%、90.95% 和 89.54%, 与其他肠毒素的交叉反应率很低 ($< 0.01-4.23$), 说明该方法能够特异性检测 SEA 和 / 或 SEG。

[0081] 表 2 间接竞争 ELISA 方法的特异性检测结果

[0082]

竞争物	交叉反应率 /%	竞争物	交叉反应率 /%
SE A/G	100	SEB	4.23
SEA	90.95	大肠杆菌不耐热肠毒素	< 0.01
SEG	89.54	痢疾志贺氏菌肠毒素	< 0.01

[0083] 3.4 重复稳定性检测

[0084] 做标准曲线时,每一个竞争抗原浓度设3个重复孔,进行间接竞争ELISA,测定各孔的OD₄₉₂值,重复操作一次。计算每次每浓度的平均值OD₄₉₂值和标准偏差SD,隔天重复实验,连续测定3天。以其批内变异系数(CV=(SD均值/OD₄₉₂平均值)×100%)表示批内误差。以其批间变异系数表示批间误差,先求出各浓度的板间变异系数,再求其平均值即为批间变异系数。由表3可见,批内CV为2.34%~8.59%,批间CV为2.40%~11.68%,均小于15%,说明该方法具有良好的重复稳定性。

[0085] 表3 间接竞争ELISA方法的批内和批间重复性结果

[0086]

SE A/G 浓度 (ng/mL)	重复数	批内变异试验			批间变异试验		
		Means	SD	CV%	Means	SD	CV%
1000	3	0.152	0.0035	2.34	0.143	0.0060	4.21
500	3	0.214	0.018	8.59	0.245	0.029	11.68
100	3	0.439	0.024	5.47	0.578	0.0355	5.99
50	3	0.847	0.042	4.93	0.930	0.036	3.91
10	3	1.17	0.037	3.14	1.18	0.028	2.40

[0087] 3.5 人工污染样品的回收率检测

[0088] 分别将不同浓度的多表位串联肽SE A/G添加到灭菌乳中搅拌均匀,使其终浓度为800、400、200、100、50、25、12.5ng/mL,然后进行样品预处理,采用间接竞争ELISA方法测定样品中多表位串联肽SE A/G浓度,每个添加浓度做4个平行,根据公式计算各添加样品的平均回收率(测量浓度/实际浓度×100%)。结果由表4可见,灭菌乳中多表位串联肽SE A/G的添加平均回收率为91.19%~157.5%,CV%为6.8%~11.4%,符合分析要求。

[0089] 表4 人工污染样品的回收率

[0090]

SE A/G 添加浓度 (ng/mL)	回收率(%, $\bar{x} \pm s$)	变异系数(CV%, n=4)
12.5	157.5±17.9	11.4
25	106.7±11.2	10.5
50	91.19±9.0	9.9
100	94.05±8.4	8.9
200	99.85±8.3	8.3
400	101.5±8.0	7.9

[0091]

800	96.66±6.6	6.8
-----	-----------	-----

[0092] 4. 样品处理方法

[0093] 4.1 液体样品(如,原料乳、消毒乳):样品混合均匀后取 10mL 置离心管中,10000rpm/min 离心 15min,取上清 100 μ L,用 PBS1:10 稀释后用于检测。

[0094] 4.2 固体样品(如,乳粉):取 10g 样品加入 100mL PBS 中均质后,45 $^{\circ}$ C 水浴剧烈摇动 1h,10,000rpm/min 离心 15min,上清液用滤纸过滤后用于检测。

[0095] 5. 间接竞争 ELISA 的检测程序

[0096] 5.1 工作液配制

[0097] (1) 磷酸盐缓冲液(0.01mol/L PBS)

[0098] NaCl8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl0.2g, 加蒸馏水定容至 1000mL, 调 pH7.4。

[0099] (2) 洗涤液(PBST)

[0100] 1000mL、0.01mol/L pH7.4PBS 中加入 0.5mL Tween-20, 混匀即可。

[0101] (3) 封闭液

[0102] 将 5g 脱脂奶粉溶于 100mL、0.01mol/L pH7.4PBS 溶液中, 混匀即可。

[0103] (4) 稀释液

[0104] 1000mL、0.01mol/L pH7.4PBS 中加入 1mL Tween-20, 1g 明胶, 稍加热溶解。

[0105] (5) 包被缓冲液

[0106] Na_2CO_3 1.5g, NaHCO_3 2.9g, 加去离子水至 1000mL, 调 pH9.6。

[0107] (6) 底物液(现配现用, 避光保存):

[0108] A 液:柠檬酸 9.6g, 加去离子水至 500mL;

[0109] B 液: $\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.85g, 加去离子水定容至 500mL;

[0110] A 液 48.6mL 与 B 液 51.4mL 混合, 加入邻苯二胺 40mg, 待充分溶解后加入 30% (V/V) H_2O_2 50 μ L, 即成底物液。

[0111] (7) 终止液:2mol/L H_2SO_4 溶液。

[0112] (8) 多表位串联肽 SE A/G 系列浓度标准溶液

[0113] 取纯化后的多表位串联肽 SE A/G (1mg/mL) 用稀释液稀释成 1000、500、100、50、10、5.0、1.0ng/mL 系列浓度溶液。

[0114] (9) 包被抗原工作液

[0115] 取纯化后的多表位串联肽 SE A/G (1mg/mL) 用稀释液稀释成 0.75 μ g/mL。

[0116] (10) 特异性抗体工作液

[0117] 用稀释液将纯化后的兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体稀释成 1:256000。

[0118] (11) 酶标二抗工作液:用稀释液将羊抗兔 HRP-IgG 做 1:5000 稀释。

[0119] 5.2 器材

[0120] (1) 乳白色聚苯乙烯 96 孔酶联免疫板

[0121] (2) 酶标仪

[0122] 5.3 间接竞争 ELISA 的操作步骤

[0123] (1) 包被:用包被缓冲溶液将多表位串联肽 SE A/G 稀释至工作浓度 0.75 μ g/mL, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 作用过夜。

[0124] (2) 洗板:以 PBST 为洗涤液, 300 μ L/孔, 在洗板机上洗涤 3 次, 1min/次, 拍干。

[0125] (3) 封闭:以含 5% 脱脂奶粉的 pH7.4PBS 溶液为封闭液, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h。

[0126] (4) 洗板 :同(2),拍干。

[0127] (5) 竞争 :将 50 μ L 前处理过的待测样品和 50 μ L 系列浓度(1000、500、100、50、10、5.0、1.0、0ng/mL)的多表位串联肽 SE A/G 标准液(用于绘制标准曲线)分别加到抗原预包被条的微孔中,然后再加入 1:128000 稀释的兔抗多表位串联肽 SE A/G 特异性抗体,50 μ L/孔,混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。空白对照孔加蒸馏水。

[0128] (6) 洗板 :同(2),拍干。

[0129] (7)加酶标二抗 :每孔加 100 μ L 1:5000 稀释的羊抗兔 HRP-IgG,混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ;空白对照孔加蒸馏水。

[0130] (8) 洗板 :同(2),拍干。

[0131] (9) 显色 :将底物液加入到酶标板中,100 μ L/孔,常温下显色 10-15min,然后每孔加入 50 μ L 2mol/L H₂SO₄溶液终止反应。

[0132] (10)结果测定 :在 492nm 处测量标准品阳性对照孔和样品孔中液体的光密度(OD)值。以系列浓度(1000、500、100、50、10、5.0、1.0ng/mL)的多表位串联肽 SE A/G 标准液的吸光度值 B 除以 0 标准(0ng/mL 的多表位串联肽 SE A/G 标准液)的吸光度值 B₀,再乘以 100%,即可得到竞争抑制率(B/B₀)%。以多表位串联肽 SE A/G 标准液浓度的对数为横坐标,竞争抑制率为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得出标准曲线的回归方程为 $y = -38.286x + 125.15$ 。

[0133] 也即,竞争抑制率(%)=(各个浓度的多表位串联肽 SE A/G 标准液的吸光度值 B/零标准时的吸光值 B₀) \times 100%;所述零标准时的吸光值 B₀为多表位串联肽 SE A/G 标准液浓度为 0ng/mL 时的吸光值。

[0134] 按照同样的步骤,测定待测样品的竞争抑制率,根据待测样品的竞争抑制率就可从标准曲线上读出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样品中金葡菌 A 型和/或 G 型肠毒素的实际含量。

[0135]

SEQUENCE LISTING

- <110> 安徽农业大学
- <120> 同步检测金葡菌 A 型和 G 型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争 ELISA 方法
- <130> 说明书,权利要求书
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 54
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(54)
- <223>
- <400> 1

cat gat aat aat cga ttg acc gaa gag aaa aaa gtg ccg atc aat tta tgg cta

54

His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn Leu Trp Leu

[0136]

1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (45)
 <223>
 <400> 2

caa aat aca gta cct ttg gaa acg gtt aaa acg aat aag aaa aat 45

Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys Thr Asn Lys Lys Asn

1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (24)
 <223>
 <400> 3

cat act tet aca gaa cct tcg gtt 24

His Thr Ser Thr Glu Pro Ser Val

1 5
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (24)
 <223>
 <400> 4

tat aga gat aat aaa acg att aac 24

Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn

1 5
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0137]

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (30)

<223>

<400> 5

gta agt gat tat aaa agt aat aag gga act

30

Val Ser Asp Tyr Lys Ser Asn Lys Gly Thr

1 5 10

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (24)

<223>

<400> 6

aaa tct gaa ccg gat ata aac caa

24

Lys Ser Glu Pro Asp Ile Asn Gln

1 5

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (27)

<223>

<400> 7

aat agt tct gaa aat gaa aga gat aaa

27

Asn Ser Ser Glu Asn Glu Arg Asp Lys

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (9)

<223>

[0138]

<400> 8
 gcc gcc tac 9
 Ala Ala Tyr
 1
 <210> 9
 <211> 282
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (282)
 <223>
 <400> 9
 cat gat aat aat cga ttg acc gaa gag aaa aaa gtg ccg atc aat tta tgg cta 54
 His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn Leu Trp Leu
 1 5 10 15
 gcc gcc tac caa aat aca gta cct ttg gaa acg gtt aaa acg aat aag aaa aat 108
 Ala Ala Tyr Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys Thr Asn Lys Lys Asn
 20 25 30 35
 gcc gcc tac cat act tet aca gaa cct teg gtt gcc gcc tac tat aga gat aat 162
 Ala Ala Tyr His Thr Ser Thr Glu Pro Ser Val Ala Ala Tyr Tyr Arg Asp Asn
 40 45 50
 aaa acg att aac gcc gcc tac gta agt gat tat aaa agt aat aag gga act gcc 216
 Lys Thr Ile Asn Ala Ala Tyr Val Ser Asp Tyr Lys Ser Asn Lys Gly Thr Ala
 55 60 65 70
 gcc tac aaa tet gaa ccg gat ata aac caa gcc gcc tac aat agt tet gaa aat 270
 Ala Tyr Lys Ser Glu Pro Asp Ile Asn Gln Ala Ala Tyr Asn Ser Ser Glu Asn
 75 80 85 90
 gaa aga gat aaa 282
 Glu Arg Asp Lys
 。

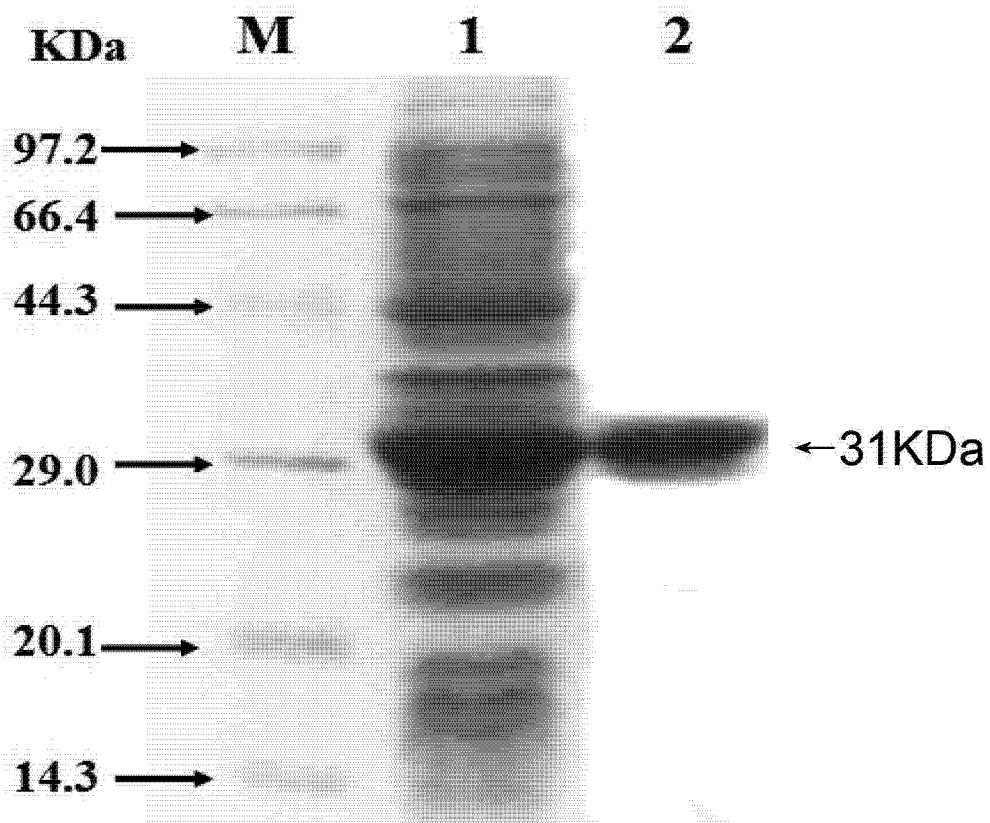


图 1

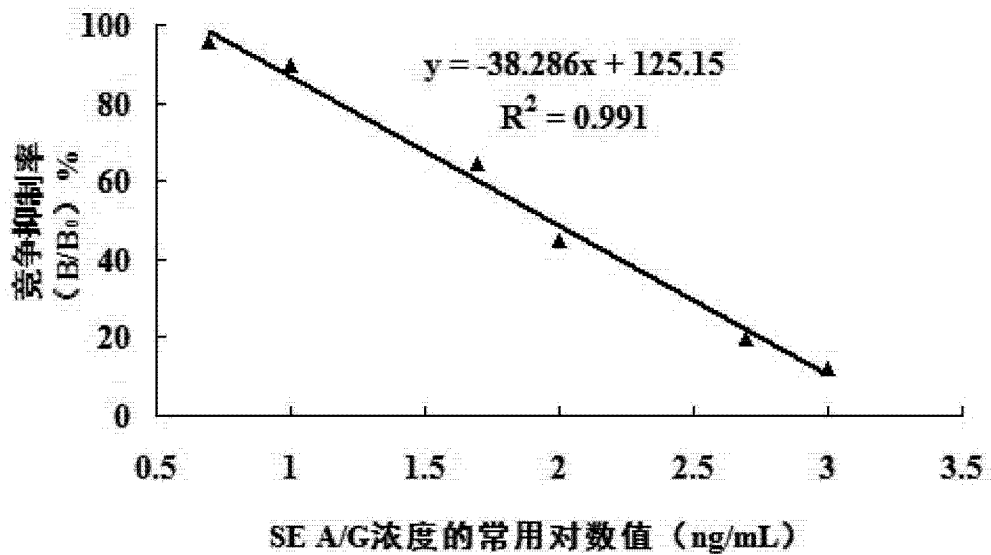


图 2

专利名称(译)	同步检测金葡菌A型和G型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争ELISA方法		
公开(公告)号	CN103412122B	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201310347757.3	申请日	2013-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	安徽农业大学		
申请(专利权)人(译)	安徽农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽农业大学		
[标]发明人	李權年 梁明燕 刘雪兰 张婷婷 李冠青		
发明人	李權年 梁明燕 刘雪兰 张婷婷 李冠青		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	王挺		
其他公开文献	CN103412122A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析技术领域，具体涉及一种同步检测金葡菌A型和G型肠毒素的基于多表位串联肽的间接竞争ELISA方法。本发明的方法主要包括A型和G型肠毒素多表位串联肽SE A/G（包被抗原）的制备、免抗SE A/G抗体的制备、样品前处理和基于多表位串联肽的间接竞争ELISA检测方法的建立。该间接竞争ELISA检测方法由以下步骤组成：1）包被；2）洗板；3）封闭；4）洗板；5）依次加入标准品、待测样品和特异性抗体；6）洗板；7）加入酶标二抗；8）洗板；9）显色和终止反应。本发明方法具有特异性强、灵敏度高、重复性好的特点，适合于乳与乳制品等食品中金葡菌A型和G型肠毒素的快速和同步定量检测。

