



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102539770 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201110449180. 8

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 29

(71) 申请人 何鑫

地址 130033 吉林省长春市仙台大街 126 号
中日联谊医院检验科

申请人 贾芙蓉

黄胜起

赵丽纯

何成彦

(72) 发明人 何鑫 贾芙蓉 黄胜起 赵丽纯

何成彦

(74) 专利代理机构 长春众益专利商标事务所

(普通合伙) 22211

代理人 纪尚

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 13 页

序列表 2 页 附图 1 页

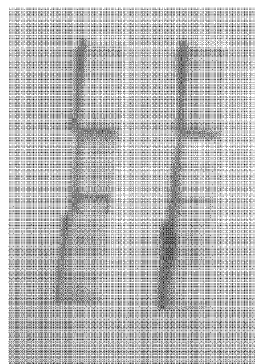
(54) 发明名称

胶体金标记 Hly 基因单克隆抗体测定单核细胞增生性李斯特菌试剂盒

(57) 摘要

一种胶体金标记 Hly 基因单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒,属于卫生学检验及医学检验技术领域,其特征是:1 引物设计、2PCR 扩增、3 琼脂糖凝胶电泳的反应条件、4 切下目的 DNA 片段、5 应用热休克转化法、6SDS 裂解法纯化试剂盒制备质粒、7 蛋白的诱导表达、8SDS-PAGE 电泳、9 从 SDS-PAGE 电泳凝胶中切下所需条带、10 胶体金的制备。有益效果是:改进了过去针对单一菌属单一抗原测定的局限性。抗体纯、效价高,提高了敏感度和准确度。对单增李斯特菌进行检测,同 ELISA 法和 PCR 法比较,免疫胶体金层析对李斯特菌的检测具有快速、便捷的优点。

1 2



T

C

1. 一种胶体金标记 Hly 基因单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒,其特征是:

a、引物设计

L. monocytogenes Hly 蛋白基因序列

```

AAATGT CGACGG AGAGTG AAACCC ATGAAA AAAATA ATGCTA GTTATT ACACTT ATA 60
TTAGTT AGTCTA CCAATT GCGCAA CAACT GAAGCA AAGGAT GCATCT GCATTC AATAAA 120
GAAAAT TTAATT TCATCC ATGGCA CCACCA GCATCT CCGGCT GCAAGT CCTAAG ACGCCA 180
ATGGAA AAGAAA CACGCG GATGAA ATCGAT AAGTAT ATACAA GGATTC GATTAC AATAAA 240
ACAAT GTATTA GTATAG CACCGA GATGCA GTGACA AATGTG CCGCCA AGAAAA GGTTAT 300
AAAGAT GGAAAT GAATAT ATCGTT GTGGAG AAAAAG AAGAAA TCGATG AATCAA AATAAT 360
GCAGAT ATCCAA GTTGTG AATGCA ATTCG AGCCTA AGATAT CCAGGT GCTCTC GTGAAA 420
GCGAAT TCGGAA TTAGTA GAAAAT CAACCC GATGTT GTTCTT GTCAAA CGTGAT TCATTA 480
ACACTT AGCATT GATTTG CCAGGA ATGACT AATCAA GACAAT AAAATT GTTGTA AAAAAAT 540
GCTACT AAATCG AACGTT AACAAC GCAGTA AATACA TTAGTG GAAAGA TGGAAT GAAAAA 600
TATGCT CAAGCT TATCCA AATGTA AGTGCA AAAATT GATTAT GATGAC GAAATG GCTTAC 660
AGTGAA TCACAA TTAATT GCAAAA TTTGGT ACGGCA TTAAAA GCTGTA AATAAT AGCTTG 720
AATGTA AACTTC GGCGCA ATCAGT GAAGGG AAAATG CAAGAA GAAGTC ATTAGT TTTAAA 780
CAAAT TACTAT AACGTG AATGTT AATGAA CCTACA AGACCT TCCAGA TTTTTC GGCAAA 840
GCTGTT ACTAAA GAGCAG TTGCAA GCGCTT GCAGTG AATGCA GAAAAT CCTCCT GCATAT 900
ATCTCA AGTGTG GCATAT GGCCGT CAAGTT TATTTG AAATTA TCAACT AATTCC CATAGT 960
ACGAAA GTAAAA GCTGCT TTTGAG GCTGCG GTAAGT GGGAAA TCTGTC TCAGGT GATGTA 1020
CAACTG ACAAAT ATCATC AAAAAAT TCTTCC TTCAA GCGGTA ATTTAC GGTGGC TCCCCA 1080
AAAGAT GAAGTT CAAATC ATCGAC GGTAAC CTCGGA GACTTA CGAGAT ATTTTG AAAAAA 1140
GGTGCT ACTTTT AAGCGG GAAACA CCAGCA GTTCCG ATTGCC TATACA ACAAAC TTCTTA 1200
AAAGAC AATGAA TTAGCT GTTATT AAAAAC AACTCA GAATAT ATTGAA ACAAAC TCAAAA 1260
GCTTAT ACAGAT CGAAAA ATCAAC ATCGAT CACTCT GGAGGA TACGTT GCTCAA TTCAAC 1320
ATCTCT TGGCAT GAAATA AATTAT GATCCT GAACGT AACGAA ATTGTT CAACAT AAAAAAC 1380
TCGAGC GAAAAC AATAAA AGTAAG CTAGCT CATTTC ACATCG TCCATC TATTTG CCACGT 1440
AACGCA AGAAAT ATTAAT GTTTAC GCTAAA GAATGC ACTGGT TTAGCT TGGGAA TGGTGG 1500
AGAACG GTAATT GATGAC CGGAAC CTACCG CTTGTG AAAAAAT AGAAAT ATCTCC ATCTGG 1560
GGCACT ACACTT TATCCG AAATAT AGTAAT AGTGTA GATAAT GCAATC GAATAA TTTTAA 1620
AAATTA AAAAAA AAATCT AGAATA AA 1646

```

根据 GenBank 中的 L. monocytogenes Hly 蛋白基因序列,应用 Primer Premier 5.0, DNA Club 和 Oligo 6.0 设计特异性引物 P1 和 P2,预期扩增长度为 1434bp;在 NCBI GENE BANK 中找到基因序列后,看选择的酶切位点,在所要进行 PCR 的基因序列中是否存在;用 Primer primer 5 把序列反向互补;在应用 Oligo 6.0 引物设计时,上下游引物全长输入;上游引物位点的确定为 5' 端模板第一个碱基前面的所有碱基的负数值 +1 下游引物位点的确定为下游引物 - 酶切位点 - 保护性碱基 = A,序列全长 -A+1 = 下游引物位点;

上游引物

5' - 'AAGAggatccAGAGTGAAACCCATG - 3';

下游引物

5' - 'GGACctcgagAATTATTCGATTGGATT - 3';

为下一步克隆需要,分别在上、下游引物中引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点

b、PCR 扩增

PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 53℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 扩增 32 个循环; 预期片段大小 1 600bp;

c、琼脂糖凝胶电泳的反应条件

用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 电压 100V, 电泳 30min;

d、切下目的 DNA 片段, 用凝胶快速纯化回收试剂盒回收; 将回收纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 进行连接, 并 pMD18-T 载体 16℃ 12 小时以上连接; 制备感受态细胞, 应用 CaCl₂ 致敏法制备大肠杆菌感受态, 接种 JM109 菌种, 37℃, 225rpm 12 小时振荡培养后, 菌液在 LB 固体培养基上划线, 37℃ 孵箱过夜培养, 筛选单克隆; 选一单菌落接种于 5mLLB 培养基中, 12 小时以上培养, 培养物按 1/100 接种于 LB 培养基中, 培养至 A₆₀₀ 达 0.45-0.55, 用 CaCl₂ 致敏大肠杆菌;

e、应用热休克转化法, 将连接反应液加入 100 μL 感受状态的细胞中, 再加 3 μL DMSO 以增加转化效率, 冰浴 30min 后, 42℃ 休克 45s, 然后迅速冰浴 5min, 再将转化产物加入 LB 液体培养基中复苏 30min 后, 离心收集菌体, 将其铺于含筛选抗生素的 LB 固体培养基上, 37℃ 恒温孵箱放置 16h 后观察转化效果;

f、SDS 裂解法纯化试剂盒制备质粒; 用 BamH I 和 Xho I 进行酶切鉴定及 PCR 鉴定, 筛选出阳性重组质粒, 命名为 pGEX-6P-1-Hly; 用 BamH I 和 Xho I 进行亚克隆, 表达载体 pGEX-6P-1 和重组克隆载体 pGEX-6P-1-Hly 用 BamH I 和 Xho I 切处理, 琼脂糖凝胶电泳, 线性表达载体用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收, 亚克隆片段用挤胶法回收, 亚克隆载体与片段用 T4DNA 连接酶连接, 连接产物转化 JM109 感受态, 提取质粒, 鉴定阳性克隆;

g、蛋白的诱导表达

用 pGEX-6P-1 重组质粒转化 BL21 受体菌, 选择单克隆接种到 5mL LB 培养液里, 按传统方式诱导表达, 即 37℃, 225rpm 振荡培养至 A₆₀₀ 达 0.6-0.8, 加 IPTG 至 1mmol/L, 对照组不加 IPTG, 3h 后收集细菌; 同时接种诱导菌种, 提取质粒, BamH I 和 Xho I 酶切验证确含目的片段后, 进行测序, 测序正确后进行重组蛋白的后续实验;

h、SDS-PAGE 电泳

将诱导后菌液 30mL 11000rpm 离心 2min, 弃上清, 收集菌体, 向菌体沉淀中加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液 1000 μL, 煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳;

i、从 SDS-PAGE 电泳凝胶中切下所需条带, 大约用两天时间将其冻干, 并碾成粉末; 用考马斯亮蓝法进行蛋白浓度测定, 制作蛋白标准曲线; 595nm 处比色; 将抗原溶于生理盐水中, 配制浓度为 1 μg/μL; 免疫 BALB/c 小鼠; 4-6 周, 加强免疫;

小鼠腹水的诱导

取 10 周龄的健康 BALB/c 小鼠, 腹腔注射灭菌液体石蜡, 每只 0.5ml, 7-10 天后, 收集杂交瘤细胞, 离心, 去上清, 加入不含血清的培养基, 调节细胞密度为 3×10⁷ 个 /ml, 每只小鼠注射 1ml; 设阴性对照、盐水对照; 10 天后, 小鼠腹部增大, 开始收集腹水; 用 12 号针头扎入腹部, 挤压, 使腹水流出, 收集至离心管, 并使劲晃动离心管防止腹水凝结; 1000 转离心 5 分钟, 吸取上清, 注意去掉上面一层脂肪; 分装, -20℃ 冻存;

j、胶体金的制备采用柠檬酸三钠还原法并稍作改进制备胶体金; 胶体金制备, 取 1% 氯金酸溶液 2.5ml 加入到 250ml 容量瓶中, 加双蒸水至标定刻度线, 使氯金酸溶液的浓度为

1%，沸水浴 10min，加入 1% 柠檬酸三钠溶液 6.65ml；快速搅拌直至颜色彻底变为紫红色，继续沸水 10min，取出；凉至室温后，用双蒸水恢复至原体积；置 4℃ 冰箱保存备用；

测定胶体金在 515nm 波长具有最大吸收峰，确定胶体金直径大小为 10nm；

胶体金探针制备，取新鲜制备的胶体金溶液 50ml，加入 0.2mol/L K_2CO_3 ，调 pH 至 8.2，置磁力搅拌器上调适量转速，然后加入适量的已纯化好的抗体；

使抗体浓度恰好在稳定蛋白质的最小量上；缓慢搅拌 10min，加入牛血清白蛋白 BSA，使 BSA 的终浓度为 1%，继续搅拌 10min。将上述胶体金—抗体—BSA 液进行 4000r/min 离心 20min，收集上清；将收集的上清进行 4℃、10000r/min 离心 60min；弃上清，沉淀用含 1% BSA 的 0.01mol/L pH7.4PBS 悬浮；同上 4℃、10000r/min 离心 60min 两次，最后将沉淀用 5ml PBS-T 溶解；4℃ 冰箱保存备用；

层析试纸条组装试纸条由吸水纤维、硝酸纤维膜、玻璃纤维和 PVC 板组成；硝酸纤维膜处理，中段相隔 5mm 分别用羊抗鼠 IgG 对照线和单核李斯特菌抗体检测线划线，形成两条宽约 1mm 的线段，干燥后用含 1% BSA 的 PBS 封闭过夜，37℃ 干燥；

试纸条组装，取洁净 PVC 板，将处理好的硝酸纤维膜粘在 PVC 板中部合适位置；将 2cm 吸水纤维粘在 PVC 板上端并部分压在硝酸纤维膜上，0.8cm 玻璃纤维粘在 PVC 板下端并部分压在硝酸纤维膜上，切成宽 5mm 的条带，即为层析试纸条；干燥剂密封冷冻保存。

胶体金标记 Hly 基因单克隆抗体测定单核细胞增生性李斯特菌试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于卫生学检验及医学检验技术领域。

背景技术

[0002] 李斯特菌属 *Listeria* 分为 2 个群, 7 个种。第 1 群包括单核细胞增生性李斯特菌 *L. monocytogenes* (简称单增李斯特菌)、伊氏李斯特菌 *L. ivanovii*、无害李斯特菌 *L. innocua*、韦氏李斯特菌 *L. welshmei* 及塞氏李斯特菌 *L. seeligeri*; 第 2 群为较少见的格氏李斯特菌 *L. grayi* 和莫氏李斯特菌 *L. murrayi*。其中单增李斯特菌被认为是引起动物和人类李斯特菌病的主要致病菌。单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, Lm) 是一种短小的革兰阳性无芽胞杆菌, 是一种人畜共患病的致病菌, 可使人 and 动物患李斯特菌病。研究发现单增李斯特菌包括致病性、弱致病性和非致病性 3 种类型。单增李斯特菌能使人畜致病, 造成猪、鸡等多种畜禽死亡。人感染后则主要表现为脑膜炎、败血症和单核细胞增多。婴幼儿、怀孕妇女和免疫耐受病人的感染死亡率可高达 20%~30%。单增李斯特菌广泛存在于自然界中, 人们食用的肉、奶、蛋、水产品、蔬菜以及冷冻食品等均有不同程度的污染, 世界卫生组织 (WHO) 在关于单增李斯特菌食物中毒的报告中指出: 4%~8% 的水产品、5%~10% 的奶及奶制品、15% 以上的家禽、30% 以上的肉制品及冷冻制品, 均被该菌污染。食品中存在的单增李斯特菌对人类的食品安全存在较大威胁, 是冷冻食品中威胁人类健康的主要病原菌之一。在美国李斯特菌被列为 7 种主要的食源性致死病菌之一, 已经被 WHO 食品安全工作计划列为重点检测的食源性病菌之一。

[0003] 单增李斯特菌是典型的胞内寄生菌, 可在巨噬细胞和许多非吞噬细胞 (如内皮细胞、上皮细胞和肝细胞) 内增殖。单增李斯特菌的致病性涉及多个毒力因子, 如溶血素 (*Listeriolysin O*, 简称 LLO)、内化素、p60 蛋白等。LLO 是该菌侵染力的重要组成成分, 是 LM 的主要毒力因子。LLO 是一种能结合胆固醇、可被巯基活化的细胞溶解素, 由 hly 基因编码的 529 个氨基酸组成, 其中有 25 个氨基酸构成的信号肽序列。LLO 能溶解宿主细胞吞噬泡膜, 逃离噬菌体, 进入胞浆, 逃避吞噬体中杀菌物质的杀灭; 此外还能在感染细胞内诱导信号传导和定向免疫应答中发挥重要作用。由于 LLO 所具有的独特生物学特性, 已被用于构建各种减毒疫苗或核酸疫苗, 且促进 MHC-I 类分子限制性免疫应答, 增强了保护性抗原的免疫作用。

[0004] 单增李斯特菌为需氧或兼性厌氧菌, 生长温度为 1~45℃, 对不利环境具有比较强的耐受能力, 在 4℃ 冰箱中也可生长繁殖, 在 pH5.0~9.0 的环境中, 1 年后仍可检出。这使其危害性更进一步增大。另外, 单增李斯特菌病原体是定居在细胞内的, 因此应用抗生素治疗李斯特菌病的效果不太理想。由李斯特菌引起的疾病及其食源性感染日益引起世界各国的重视, 对该病原进行快速、灵敏、准确的检测是有效防治本病和保证食品卫生安全的重要手段。

[0005] 本研究旨在克隆和表达单增李斯特菌的 hly 基因, 研制基于溶血素的诊断用单克

隆抗体,以对单增李斯特菌进行检验分析及制备基因工程疫苗奠定基础。国内的赵松波等人已经原核表达出溶血素 (LLO),也建立了 LLO 的间接 ELISA 检测方法,但是该方法在检测动物血清时容易出现假阴性。赵松波提出利用 LLO 单抗建立夹心 ELISA 可提高检测灵敏度,但相关工作未见报道。董慧和罗正等人已经制备了 LLO 单抗,但均未用于实际样品检测。早在 1991 年就有国外的学者用 LM 培养上清中纯化的蛋白免疫小鼠制备单抗,获得 3 株能抑制 LLO 溶血的单抗、1 株能抑制 LLO 与红细胞膜结合的单抗以及 2 株能抑制与其他细胞膜结合的单抗。1999 年 Erdenlig 等人同样得到了具有抑制 LLO 溶血作用的单克隆抗体,并用于鉴定所分离的李斯特菌是否为致病菌株。

[0006] 经典的李斯特菌分离培养和鉴定技术需要 1-2 周时间,人力、物力花费大,不适应实际检验工作的需要。目前,对产单核李斯特菌快速检测方法的研究,绝大部分尚停留在实验室的研究阶段,很大程度局限于 ELISA 法和 PCR 法,而免疫胶体金层析为李斯特菌的检测具有快速、便捷的优点,可广泛应用于医院、商检、卫生、安检,也可用于家庭进行简易的检测。其良好的特异性,较高的灵敏度,可靠的重现性和稳定性,为产单核李斯特菌检测提供了一个更为理想的检测方法和思路。罗利新等所用抗体为产单核李斯特菌抗体 (O 链抗原 I / II),实验只针对单一血清型李斯特菌进行了研究,而产单核李斯特菌根据菌体 (O) 抗原和鞭毛 (H) 抗原分成 13 个血清型,所以实验针对李斯特全菌属不够完备。

[0007] 综合以上的国内外研究资料可发现,单增李斯特菌的检测方法仍不够完备,现有的检测技术方法仍存在如下两个方面的不足:

[0008] 1 标本仍需 48h 的增菌培养。

[0009] 2 本方法仍只可对单增李斯特菌感染的标本进行阴性筛查,阳性标本的确定试验仍为细菌培养及生化反应的鉴定。

发明内容

[0010] 本发明的目的是:提供一种胶体金标记 Hly 基因单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒,它将标记 Hly 基因单克隆抗体的免疫胶体金层析法用于快速检测单增李斯特菌,使用方便、操作简单、结果可靠。

[0011] 本发明的技术方案是:

[0012] 1 引物设计:

[0013] L. monocytogenes Hly 蛋白基因序列:

[0014]

```

AAATGT CGACGG AGAGTG AAACCC ATGAAA AAAATA ATGCTA GTTATT ACACTT ATA 60
TTAGTT AGTCTA CCAATT GCGCAA CAAACT GAAGCA AAGGAT GCATCT GCATTC AATAAA 120
GAAAAT TTAATT TCATCC ATGGCA CCACCA GCATCT CCGGCT GCAAGT CCTAAG ACGCCA 180
ATGGAA AAGAAA CACGCG GATGAA ATCGAT AAGTAT ATACAA GGATTC GATTAC AATAAA 240
AACAAAT GTATTA GTATAG CACCGA GATGCA GTGACA AATGTG CCGCCA AGAAAA GGTTAT 300
AAAGAT GGAAAT GAATAT ATCGTT GTGGAG AAAAAG AAGAAA TCGATG AATCAA AATAAT 360
GCAGAT ATCCAA GTTGTG AATGCA ATTTTC AGCCTA AGATAT CCAGGT GCTCTC GTGAAA 420
GCGAAT TCGGAA TTAGTA GAAAAT CAACCC GATGTT GTTCTT GTCAAA CGTGAT TCATTA 480
ACACTT AGCATT GATTTC CCAGGA ATGACT AATCAA GACAAT AAAATT GTTGTA AAAAAAT 540
GCTACT AAATCG AACGTT AACAAAC GCAGTA AATACA TTAGTG GAAAGA TGGAAAT GAAAAA 600
TATGCT CAAGCT TATCCA AATGTA AGTGCA AAAATT GATTAT GATGAC GAAATG GCTTAC 660
AGTGAA TCACAA TTAATT GCAAAA TTTGGT ACGGCA TTAAAA GCTGTA AATAAT AGCTTG 720
AATGTA AACTTC GCGCA ATCAGT GAAGGG AAAATG CAAGAA GAAGTC ATTAGT TTTAAA 780
CAAATT TACTAT AACGTG AATGTT AATGAA CCTACA AGACCT TCCAGA TTTTTC GGCAAA 840
GCTGTT ACTAAA GAGCAG TTGCAA GCGCTT GCAGTG AATGCA GAAAAT CCTCCT GCATAT 900
ATCTCA AGTGTG GCATAT GGCCGT CAAGTT TATTTG AAATTA TCAACT AATTCC CATAGT 960
ACGAAA GTAAAA GCTGCT TTTGAG GCTGCG GTAAGT GGGAAA TCTGTC TCAGGT GATGTA 1020
CAACTG ACAAAT ATCATC AAAAAAT TCTTCC TTCAAA GCGGTA ATTTAC GGTGGC TCCCCA 1080
AAAGAT GAAGTT CAAATC ATCGAC GGTAAC CTCGGA GACTTA CGAGAT ATTTTG AAAAAA 1140
GGTGCT ACTTTT AAGCGG GAAACA CCAGCA GTTCCG ATTGCC TATACA ACAAAC TTCTTA 1200
AAAGAC AATGAA TTAGCT GTTATT AAAAAC AACTCA GAATAT ATTGAA ACAACT TCAAAA 1260
GCTTAT ACAGAT CGAAAA ATCAAC ATCGAT CACTCT GGAGGA TACGTT GCTCAA TTCAAC 1320
ATCTCT TGGCAT GAAATA AATTAT GATCCT GAACGT AACGAA ATTGTT CAACAT AAAAAC 1380
TCGAGC GAAAAC AATAAA AGTAAG CTAGCT CATTTC ACATCG TCCATC TATTTG CCACGT 1440
AACGCA AGAAAT ATTAAT GTTTAC GCTAAA GAATGC ACTGGT TTAGCT TGGGAA TGGTGG 1500
AGAACG GTAATT GATGAC CGGAAC CTACCG CTTGTG AAAAAT AGAAAT ATCTCC ATCTGG 1560
GGCACT ACACTT TATCCG AAATAT AGTAAT AGTGTA GATAAT GCAATC GAATAA TTTTAA 1620
AAATTA AAAAAA AAATCT AGAATA AA 1646

```

[0015] 根据 GenBank 中的 *L.monocytogenes* Hly 蛋白基因序列,应用 Primer Premier5.0,DNA Club 和 Oligo 6.0 设计特异性引物 P1 和 P2,预期扩增长度为 1434bp。在 NCBI GENE BANK 中找到基因序列后,看选择的酶切位点,在所要进行 PCR 的基因序列中是否存在;用 Primer primer5 把序列反向互补;在应用 Oligo 6.0 引物设计时,上下游引物全长输入;上游引物位点的确定为 5' 端模板第一个碱基前面的所有碱基(包括酶切位点+保护碱基)的负数值+1 下游引物位点的确定为下游引物-酶切位点-保护性碱基=A,序列全长 -A+1 = 下游引物位点。

[0016] 上游引物:

[0017] 5' - 'AAGAggatccAGAGTGAAACCCATG - 3' ;

[0018] 下游引物:

[0019] 5' - 'GGACctcgagAATTATTCGATTGGATT - 3'。

[0020] 为下一步克隆需要,分别在上、下游引物中引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点

[0021] 2PCR 扩增:

[0022] 参照 TaKaRa 公司的 TaqTM PCR 试剂盒。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 1min,53℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,扩增 32 个循环。预期片段大小 1 600bp 左右。

[0023] 3 琼脂糖凝胶电泳的反应条件：

[0024] 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物，电压 100V，电泳 30min。

[0025] 4 切下目的 DNA 片段，用凝胶快速纯化回收试剂盒回收。将回收纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 进行连接，并 pMD18-T 载体 16℃ 12 小时以上连接。制备感受态细胞：应用 CaCl₂ 致敏法制备大肠杆菌感受态，接种 JM109 菌种，37℃，225rpm 12 小时振荡培养后，菌液在 LB 固体培养基上划线，37℃ 孵箱过夜培养，筛选单克隆。选一单菌落接种于 5mLLB 培养基中，12 小时以上培养，培养物按 1/100 接种于 LB 培养基中，培养至 A₆₀₀ 达 0.45-0.55，用 CaCl₂ 致敏大肠杆菌。具体如下：将菌液冰浴 10min 后，4℃，4000rpm 离心 20min，收集菌体，再加入冰冷的 0.1M CaCl₂ 致敏液，悬浮菌体，冰浴 10min，重新收集菌体后，加冰冷的 0.1M CaCl₂，重悬菌体，加甘油至终浓度为 15%，100 μL/管分装，-70℃ 保存，用于转化。

[0026] 5 应用热休克转化法，将连接反应液加入 100 μL 感受状态的细胞中，再加 3 μL DMSO 以增加转化效率，冰浴 30min 后，42℃ 休克 45s，然后迅速冰浴 5min，再将转化产物加入 LB 液体培养基中复苏 30min 后，离心收集菌体，将其铺于含筛选抗生素的 LB 固体培养基上，37℃ 恒温孵箱放置 16h 后观察转化效果。

[0027] 6 SDS 裂解法纯化试剂盒制备质粒。用 BamH I 和 Xho I 进行酶切鉴定及 PCR 鉴定，筛选出阳性重组质粒，命名为 pGEX-6P-1-Hly。用 BamH I 和 Xho I 进行亚克隆，表达载体 pGEX-6P-1 和重组克隆载体 pGEX-6P-1-Hly 用 BamH I 和 Xho I 切处理，琼脂糖凝胶电泳，线性表达载体用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收，亚克隆片段用挤胶法回收，亚克隆载体与片段用 T4 DNA 连接酶连接，连接产物转化 JM109 感受态，提取质粒，鉴定阳性克隆。

[0028] 7 蛋白的诱导表达

[0029] 用 pGEX-6P-1 重组质粒转化 BL21 受体菌，选择单克隆接种到 5mL LB 培养液里，按传统方式诱导表达，即 37℃，225rpm 振荡培养至 A₆₀₀ 达 0.6-0.8，加 IPTG 至 1mmol/L，对照组不加 IPTG，3h 后收集细菌。同时接种诱导菌种，提取质粒，BamH I 和 Xho I 酶切验证确实含目的片段后，进行测序，测序正确后进行重组蛋白的后续实验。

[0030] 8 SDS-PAGE 电泳

[0031] 将诱导后菌液 30mL 11000rpm 离心 2min，弃上清，收集菌体，向菌体沉淀中加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液 1000 μL，煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳，操作过程如下：

[0032] 12% 的分离胶 15mL：水 4.9mL、30% 丙烯酰胺 6.0mL、1.5mol/L Tris-HCl 其 pH 8.8 的 3.8mL、10% SDS 150mL、10% 过硫酸铵 150mL、TEMED 6mL，迅速灌注于两层玻璃板的间隙，在胶上小心覆盖一层蒸馏水，凝胶垂直置于室温，聚合完全后，倒出覆盖的水，用滤纸将水吸净。制备 8mL 积层胶：水 5.5mL、30% 丙烯酰胺 1.3mL、1.0mol/L Tris-HCl 其 pH 6.8 的 1.0mL、10% SDS 80mL、10% 过硫酸铵 80mL、TEMED 8mL，直接注于分离胶上层，立即在积层胶中插入干净的 Teflon 梳子，小心避免形成气泡。积层胶聚合完全后，小心移出 Teflon 梳子，将凝胶固定于电泳装置上，加入 Tris-甘氨酸电泳缓冲液 25mmol/L Tris，250mmol/L 甘氨酸，0.1% SDS，上电泳样品及蛋白质 Marker，电压 200v 电泳 45min，电泳结束后凝胶加入考马斯亮蓝染色，脱色液脱色后，将凝胶浸泡于水中，拍照记录。

[0033] 9 从 SDS-PAGE 电泳凝胶中切下所需条带，大约用两天时间将其冻干，并碾成粉末。用考马斯亮蓝法进行蛋白浓度测定，制作蛋白标准曲线。595nm 处比色。将抗原溶于生理盐水中，配制浓度为 1 μg/μl。免疫 BALB/c 小鼠。4-6 周，加强免疫。

[0034] 小鼠腹水的诱导：

[0035] 取 10 周龄的健康 BALB/c 小鼠，腹腔注射灭菌液体石蜡，每只 0.5ml，7-10 天后，收集杂交瘤细胞，离心，去上清，加入不含血清的培养基，调节细胞密度为 3×10^7 个 /ml，每只小鼠注射 1ml。设阴性对照、盐水对照。约 10 天后，小鼠腹部增大，开始收集腹水。用 12 号针头扎入腹部，挤压，使腹水流出，收集至离心管，并使劲晃动离心管防止腹水凝结。1000 转离心 5 分钟，吸取上清，注意去掉上面一层脂肪。分装，-20℃ 冻存。

[0036] 10 胶体金的制备采用柠檬酸三钠还原法并稍作改进制备胶体金。胶体金制备：取 1% 氯金酸溶液 2.5ml 加入到 250ml 容量瓶中，加双蒸水至标定刻度线，使氯金酸溶液的浓度为 1%，沸水浴 10min，加入 1% 柠檬酸三钠溶液 6.65ml。快速搅拌直至颜色彻底变为紫红色，继续沸水 10min，取出。凉至室温后，用双蒸水恢复至原体积。置 4℃ 冰箱保存备用。

[0037] 测定胶体金在 515nm 波长具有最大吸收峰，确定胶体金直径大小为 10nm。

[0038] 胶体金探针制备：取新鲜制备的胶体金溶液 50ml，加入 0.2mol/L K_2CO_3 ，调 pH 至 8.2，置磁力搅拌器上调适量转速，然后加入适量的已纯化好的抗体。

[0039] 使抗体浓度恰好在稳定蛋白质的最小量上。缓慢搅拌 10min，加入牛血清白蛋白 BSA，使 BSA 的终浓度为 1%，继续搅拌 10min。将上述胶体金-抗体-BSA 液进行 4000r/min 离心 20min，收集上清。将收集的上清进行 4℃、10000r/min 离心 60min。弃上清，沉淀用含 1% BSA 的 0.01mol/L pH7.4 PBS 悬浮。同上 4℃、10000r/min 离心 60min 两次，最后将沉淀用 5ml PBS-T 溶解。并加入少量的 Na_3N ，4℃ 冰箱保存备用。

[0040] 层析试纸条组装试纸条由吸水纤维、硝酸纤维膜、玻璃纤维和 PVC 板组成。

[0041] 硝酸纤维膜处理：中段相隔 5mm 分别用羊抗鼠 IgG 对照线和单核李斯特菌抗体检测线划线，形成两条宽约 1mm 的线段，干燥后用含 1% BSA 的 PBS 封闭过夜，37℃ 干燥。

[0042] 试纸条组装：取洁净 PVC 板，将处理好的硝酸纤维膜粘在 PVC 板中部合适位置；将 2cm 吸水纤维粘在 PVC 板上端并部分压在硝酸纤维膜上，0.8cm 玻璃纤维粘在 PVC 板下端并部分压在硝酸纤维膜上，切成宽 5mm 的条带，即为层析试纸条；干燥剂密封冷冻保存。

[0043] 本发明的有益效果是：1 根据 GeneBank 中已发表的 *L. monocytogenes* Hly 蛋白基因序列，应用 Primer Premier5.0, DNA Club 和 Oligo 6.0 自行设计出引物。

[0044] 2 LL0 是该菌侵染力的重要组成成分，是 LM 的主要毒力因子，由 Hly 基因编码，对单核细胞增多性李氏杆菌 Hly 基因进行克隆和原核表达，改进了过去针对单一菌属单一抗原测定的局限性。3 表达产物可溶性重组蛋白免疫动物 BALB/c 小鼠，制备杂交瘤细胞株，制备腹水抗体。抗体纯、效价高，同过去的方法比较，提高了敏感度和准确度。4 胶体金标记单增李斯特菌抗体制备免疫层析检测试剂板，对单增李斯特菌进行检测，同 ELISA 法和 PCR 法比较，免疫胶体金层析对李斯特菌的检测具有快速、便捷的优点。

附图说明

[0045] 图 1 Hly 基因 PCR 产物电泳图

[0046] M : DNA marker DL2000

[0047] 图 2 pGEX-6P-1-Hly 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳

[0048] M : 蛋白质相对分子质量标准；

[0049] 1 : pGEX-6P-1-Hly 重组质粒在 BL21 (DE3) pLysS 中经 IPTG 诱导 6h

- [0050] 图 3 重组蛋白的 Westernblotting 免疫蛋白印迹分析
- [0051] M:蛋白质相对分子质量标准;
- [0052] 1:重组蛋白的 Westernblotting 免疫蛋白印迹分析表达的相对分子量大约 72ku。
- [0053] 图 4 胶体金方法检测单增李斯特菌阴、阳性结果照片。
- [0054] 1 胶体金方法检测单增李斯特菌阴性结果
- [0055] 2 胶体金方法检测单增李斯特菌阳性结果
- [0056] C:阳性对照线 T:检测线

具体实施方式

- [0057] 实施例 1:
- [0058] 工艺条件:
- [0059] 第一步骤对单核细胞增多性李氏杆菌基因进行克隆和原核表达。
- [0060] 主要器材:
- [0061] 药品与试剂:菌种及质粒单增李斯特菌菌种(C54002株)、pMD18-T、pGEX-6P 载体质粒为 TAKARA 公司产品。感受态细胞大肠杆菌 JM109、BL21 受体菌为 Promega 公司产品。酶及相关试剂 Ex Taq 聚合酶,限制性内切酶 BamH I、Xho I 及 IPTG 为大连宝生物工程有 限公司产品。T4 DNA ligase 为 Promega 公司产品。DNA 快速纯化回收试剂盒、凝胶快速纯 化回收试剂盒为大连宝生物工程有 限公司产品。
- [0062] 实验方法:
- [0063] 一. 基因组 DNA 的制备
- [0064] 按常规方法培养单核细胞增多性李氏杆菌, DNA 快速纯化回收试剂盒
- [0065] 二. 含 *L. monocytogenes* Hly 蛋白基因克隆载体的构建
- [0066] 2.1 引物设计:
- [0067] 根据 GenBank 中已发表的 *L. monocytogenes* Hly 蛋白基因序列,应用 Primer Premier5.0, DNAClub 和 Oligo 6.0 设计特异性引物 P1 和 P2,预期扩增长度为 1434bp。上 海生工生物工程技术有限公司制备。
- [0068] NCBI GENE BANK 中找到基因序列后,看选择的酶切位点,在所要进行 PCR 的基因序 列中是否存在;用 Primer primer5 把序列反向互补;在应用 Oligo 6.0 引物设计时,上下 游引物全长输入;上游引物位点的确定为:5' 端模板第一个碱基前面的所有碱基(包括酶 切位点+保护碱基)的负数值+1 下游引物位点的确定为:下游引物-酶切位点-保护性碱 基=A,序列全长-A+1=下游引物位点。引物设计时候要考虑到序列的起始碱基和末尾碱 基中是否包含起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA),如果有,要考虑是否需要删除或者保 留。引物长度的选择要考虑到 CG 比例,酶切位点的选择要兼顾廉价,常用,而且要兼顾其加 入后引物的 GC 比例变化;还要考虑到酶切位点的序列是否在 PCR 的全序列中出现,如果 出现要选择其它酶切位点。前面适当加碱基调节 GC 比例,5' 端照抄;3' 端反向互补;保护性 碱基和酶切位点加在引物前面。自身互补,二聚体(两个引物之间)<6,负数值越大能量 越大,退火温度越高,错配几率越小。
- [0069] 上游引物:
- [0070] 5'-AAGAggatccAGAGTGAAACCCATG-3';

- [0071] 下游引物：
- [0072] 5 - ‘GGACctcgagAATTATTCGATTGGATT - 3’。
- [0073] 为下一步克隆需要,分别在上、下游引物中引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点
- [0074] 2. 2PCR 扩增：
- [0075] 参照 TaKaRa 公司的 TaqTM PCR 试剂盒。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 53℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 扩增 32 个循环。预期片段大小 1 600bp 左右。
- [0076] 2. 3 琼脂糖凝胶电泳：
- [0077] 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 电压 100V, 电泳 30min。
- [0078] 2. 4PCR 产物回收：
- [0079] 切下目的 DNA 片段, 用凝胶快速纯化回收试剂盒回收。
- [0080] 2. 5PCR 产物的克隆：
- [0081] 将回收纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 进行连接, 并 pMD18-T 载体 16℃ 过夜连接。
- [0082] 2. 6 制备感受态细胞：
- [0083] 应用 CaCl₂ 致敏法制备大肠杆菌感受态, 接种 JM109 菌种, 37℃, 225rpm 过夜振荡培养后, 菌液在 LB 固体培养基上划线, 37℃ 孵箱过夜培养, 筛选单克隆。选一单菌落接种于 5mLLB 培养基中, 过夜培养, 培养物按 1/100 接种于 LB 培养基中, 培养至 A₆₀₀ 达 0. 45-0. 55, 用 CaCl₂ 致敏大肠杆菌。具体如下: 将菌液冰浴 10min 后, 4℃, 4000rpm 离心 20min, 收集菌体, 再加入冰冷的 0. 1M CaCl₂ 致敏液, 悬浮菌体, 冰浴 10min, 重新收集菌体后, 加冰冷的 0. 1M CaCl₂, 重悬菌体, 加甘油至终浓度为 15%, 100 μ L/ 管分装, -70℃ 保存, 用于转化。
- [0084] 2. 7 转化：
- [0085] 应用热休克转化法, 将连接反应液加入 100 μ L 感受状态的细胞中, 再加 3 μ l DMSO 以增加转化效率, 冰浴 30min 后, 42℃ 休克 45s, 然后迅速冰浴 5min, 再将转化产物加入 LB 液体培养基中复苏 30min 后, 离心收集菌体, 将其铺于含筛选抗生素的 LB 固体培养基上, 37℃ 恒温孵箱放置 12 ~ 16h 后观察转化效果。
- [0086] 2. 8 质粒 DNA SDS 裂解法纯化试剂盒制备质粒。
- [0087] 2. 9 鉴定：
- [0088] 用 BamH I 和 Xho I 进行酶切鉴定及 PCR 鉴定, 筛选出阳性重组质粒, 命名为 pMD18-T-Hly。
- [0089] 2. 10pMD18-T-Hly 的序列测定：
- [0090] 将阳性重组质粒 pMD18-T-Hly 送至上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定, 并进行同源性比较。
- [0091] 三. 原核表达载体 pGEX-6P-Hly 的构建与重组蛋白的表达和检测
- [0092] 3. 1 亚克隆：
- [0093] 用 BamH I 和 Xho I 进行亚克隆, 表达载体 pGEX-6P 和重组克隆载体 pGEX-6P-Hly 用 BamH I 和 Xho I 切处理, 琼脂糖凝胶电泳, 线性表达载体用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收, 亚克隆片段用挤胶法回收, 亚克隆载体与片段用 T4DNA 连接酶连接, 连接产物转化 JM109 感受态, 提取质粒, 鉴定阳性克隆。
- [0094] 3. 2 蛋白的诱导表达
- [0095] 用 pGEX-6P-Hly 重组质粒转化 BL21 受体菌, 选择单克隆接种到 5mL LB 培养液里,

按传统方式诱导表达,即 37℃,225rpm 振荡培养至 A600 达 0.6-0.8,加 IPTG 至 1mmol/L,对照组不加 IPTG,3h 后收集细菌。同时接种诱导菌种,提取质粒,BamH I 和 Xho I 酶切验证确含目的片段后,上海生工测序,测序正确后进行重组蛋白的后续实验。

[0096] 3.3 重组蛋白的鉴定

[0097] 3.3.1 SDS-PAGE 电泳

[0098] 将诱导后菌液 2mL 11000rpm 离心 2min,弃上清,收集菌体,向菌体沉淀中加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液 200 μ l,煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳,操作过程如下:

[0099] 12% 的分离胶 15mL:水 4.9mL、30% 丙烯酰胺 6.0mL、1.5mol/L Tris-HCl (pH 8.8) 3.8mL、10% SDS 150mL、10% 过硫酸铵 150mL、TEMED 6mL,迅速灌注于两层玻璃板的间隙,在胶上小心覆盖一层蒸馏水,凝胶垂直置于室温,聚合完全后,倒出覆盖的水,用滤纸将水吸净。制备 8mL 积层胶:水 5.5mL、30% 丙烯酰胺 1.3mL、1.0mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 1.0mL、10% SDS 80mL、10% 过硫酸铵 80mL、TEMED 8mL,直接注于分离胶上层,立即在积层胶中插入干净的 Teflon 梳子,小心避免形成气泡。积层胶聚合完全后,小心移出 Teflon 梳子,将凝胶固定于电泳装置上,加入 Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (25mmol/L Tris, 250mmol/L 甘氨酸,0.1% SDS),上电泳样品及蛋白质 Marker,电压 200v 电泳 45min,电泳结束后凝胶加入考马斯亮蓝染色,脱色液脱色后,将凝胶浸泡于水中,拍照记录。见图 2。

[0100] 3.3.2 Western blot 12% SDS-PAGE 电泳 marker 两侧对称上样,一半凝胶染色、脱色,另一办用于 western blot。戴手套剪 6 张 Whatman 3MM 滤纸和 1 张硝酸纤维素滤膜 (Millipore HAWP),大小略小于凝胶,切去滤膜一角作为标记。把硝酸纤维素滤膜浸入超纯水中 5min 以上,6 张 3MM 滤纸浸于转移缓冲液,用蒸馏水淋洗石墨板,用滤纸揩干石墨板上的液滴,在阳极依次放 3 张 3MM 滤纸、硝酸纤维素滤膜、凝胶、3 张 3MM 滤纸,各层精确对齐并不留气泡,正确安装电泳装置,根据凝胶面积按 0.6mA/cm² 接通电流,转膜 2h 后,凝胶染色、脱色观察转膜是否成功,硝酸纤维素滤膜 4℃ 封闭过夜 (封闭液为含 5% [W/V] 脱脂奶粉的 PBS,按膜面积 0.1mL/cm² 的量加入),然后向封闭液中按 0.1mL/cm² 的量加入第一抗体,室温缓慢摇动孵育 2h,硝酸纤维素滤膜经 250mL PBS 洗涤 3 次后 (每次 5min),转移到辣根过氧化物酶标记的二抗中,室温平缓摇动 2h,同上洗涤后,移至显色液中 (10mL 的 PBS 中 DAB 6mg,30% H₂O₂ 10mL),室温观察反应过程,蛋白带的颜色深度达到要求后即用清水略为漂洗,然后拍照。见图 3。第二步骤单核细胞增多性李斯特菌的杂交瘤细胞制备和单克隆抗体生产和纯化

[0101] 1.1.1 从 SDS-PAGE 电泳凝胶中切下所需条带,大约用两天时间将其冻干,并碾成粉末。

[0102] 1.1.2 蛋白浓度测定 (考马斯亮蓝法)

[0103] 制作蛋白标准曲线。595nm 处比色,得吸光度,查标准曲线,得到蛋白浓度。

[0104] 1.2 将抗原溶于生理盐水中,配制浓度为 1 μ g/μ l。免疫 BALB/c 小鼠。4-6 周,加强免疫。

[0105] 2 融合实验

[0106] 2.1 培养骨髓瘤细胞 NS-1

[0107] 2.2 制备饲养细胞:

[0108] 取塑料管备用。拉颈处死小鼠,浸泡于 75% 酒精 2-3 分钟。将小鼠移入超净工作

台上,以仰卧位固定在解剖板上,用眼科剪剪开胸部皮肤,用两手纵向拉开皮肤,暴露腹部,并用酒精棉球消毒腹膜。用滴管吸取 HAT 培养液注入腹腔,冲洗,吸出,注入预先准备好的塑料管中,反复做几次,取一定量小鼠腹腔巨噬细胞。将巨噬细胞接种于 96 孔板。置 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

[0109] 2.3 脾细胞制备:

[0110] 拉颈处死免疫小鼠,用 75% 酒精浸泡消毒小鼠体表。在超净工作台内,无菌暴露腹腔,摘取脾脏,去除脂肪和结缔组织,用血清培养液冲洗。将脾脏移入盛有无血清培养液的匀浆器研磨。用无血清培养液冲洗,收集细胞悬液,以 1000 转离心 5 分钟,弃去上清液,悬浮于不完全培养液中,并记共多少毫升脾细胞。脾细胞计数,取 1 毫升脾细胞悬液,加 1% 冰醋酸(破碎红细胞)。

[0111] 2.4 细胞融合实验:

[0112] 将骨髓瘤细胞与脾细胞 1 : 10 的比例混合在一起,在 50 毫升塑料离心管内用不完全培养液洗一次,1100 转,离心 5 分钟。弃去上清液,用食指轻弹离心管底部,使细胞沉淀团块稍松散。一手均匀转动离心管,另一手用吸管边滴边加轻轻搅动,同时加入 0.5ml-1ml,50% PEG 作用,控制 1 分钟内加完。加预热的不完全培养液,终止 PEG 作用,每隔 2 分钟,分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 10ml。离心,1000 转,5 分钟。弃上清,用含有小牛血清的培养液轻轻混悬,切记不能吹打,以免融合细胞散开。根据 96 孔板培养板数量,补加培养液。将融合细胞悬液加入含饲养细胞的 96 孔板,100u1/孔,37℃,5% CO₂ 孵箱培养。

[0113] 3 酶联免疫吸附试验(ELISA):

[0114] 3.1 包被:

[0115] 蛋白抗原按比例加包被液,每孔 100u1,加 96 孔板,4℃ 放置过夜。PBS 洗 4 次。(2 毫升吐温 /1LPBS 水)。封闭:1% BSA(0.01g+100mlPBS)1 小时。加阴性对照、阳性标本,每孔 100u1。

[0116] 3.2PBS 250u1/孔,洗三次。封闭:10% 封闭液(1ml 小牛血清 +9mlPBS),250u1/每孔,封闭 1 小时,-20℃ 保存备用。弃上清,PBS 洗三次。一抗加阴性对照、阳性对照及需检测克隆上清标本,编号放置 1 小时,弃上清,PBS 洗四次。二抗酶标抗体,2u1+5ml 封闭液,放置 1 小时。PBS 洗六次。底物溶液每孔 100u1,避光放置 30min。加终止液观察,酶标液读数。

[0117] 4 有限稀释法克隆杂交瘤细胞

[0118] 4.1 在已检测过的 96 孔培养板内将待克隆的孔作好标记。用吸管吹打孔内的细胞使其散开,从孔内吸出 0.1ml 细胞悬液到 1ml 杂交细胞培养液中计数。初次克隆时用 HT 培养液调整杂交瘤细胞密度到 3-10 个 /ml。每块 96 孔培养板为 10ml(第二次或第三次克隆可改用杂交细胞培养液)。将调好预定密度的细胞加到含饲养细胞的 96 孔培养板,每个孔加 0.1ml。将 96 孔培养板置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。第四天用新培养液置换孔内 1/2 上清液。第七天至第九天,当孔底细胞集落在 1-2mm 大小时,吸出杂交瘤细胞生长孔的上清液。按抗体筛选方法检测上清液中的抗体。计算杂交瘤细胞的阳性孔比率。将抗体阳性的孔内细胞移到 24 孔培养板扩大培养 2-4d。按以上步骤,将扩大培养后的阳性细胞再重复克隆 2-4 次,直到杂交瘤细胞的阳性孔率达到 100% 为止。孔内的细胞即为克隆化后的杂交瘤细胞。将克隆化的杂交瘤细胞扩大培养后,以 1000r/min 离心 5min。收集上

清液做单克隆抗体鉴定,冻存沉淀的细胞备用。

[0119] 5 小鼠腹水的诱导 :

[0120] 取 10 周龄的健康 BALB/c 小鼠,腹腔注射灭菌液体石蜡,每只 0.5ml. 7-10 天后,收集杂交瘤细胞,离心,去上清,加入不含血清的培养基,调节细胞密度为 3×10^7 个 /ml,每只小鼠注射 1ml. 设阴性对照、盐水对照。约 10 天后,小鼠腹部增大,开始收集腹水。用 12 号针头扎入腹部,挤压,使腹水流出,收集至离心管,并使劲晃动离心管防止腹水凝结。1000 转离心 5 分钟,吸取上清,注意去掉上面一层脂肪。分装, -20°C 冻存。

[0121] 6 小鼠腹水单抗间接 ELISA 亚型分型实验

[0122] 1 离心处理样品,用 PBS 按照 1000 : 1 比例稀释腹水样品与阴性对照样品 (未免疫 BALB/C 小鼠腹水)。取 100ul 稀释腹水样品和阴性对照分别包被到 ELISA 板中,每种样品一列,每列 6 个孔,取 PBS 为空白对照 ;

[0123] 2 将 ELISA 板置于 37°C 孵育一小时 ;

[0124] 3 用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板三次 ;

[0125] 4 用 PBS 按照 10 : 1 比例稀释 6 个抗体亚型 (分别为 IgA, M, G1, 2a, 2b 和 G3) (SIGMA 公司,货号为 ISO-2),将每种亚型抗体分别加入到空白孔,阴性对照孔和腹水样品孔中,每孔 100ul ;

[0126] 5 室温放置 30 分钟 ;

[0127] 6 用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板三次 ;

[0128] 7 用含 0.02% TWEEN-20 的 PBS 按照 500 : 1 的比例稀释 HRP 标记的马抗羊二抗 (北京鼎国生物技术责任公司,货号 :HD004-1),并将其加入到 18 个孔中,每孔 100ul ;

[0129] 8 室温放置 15 分钟 ;

[0130] 9 用 PBST 洗涤液洗涤 ELISA 板三次 ;

[0131] 10 加入显色底物缓冲液每孔 100 微升 (采用 OPD 显色系统,光吸收值为 490nm) ;

[0132] 11 室温避光放置 10 分钟 ;

[0133] 12 加终止液 50ul ;

[0134] 13 拍照,用酶标仪在 490nm 处读数记录。

[0135] 实验结果讨论 :

[0136] 1 : 10000 稀释后的样品在 490nm 处有仍有吸收,而且样品与阴性比较差别明显的是 IgM 和 IgG3。

[0137] 7 单克隆抗体的纯化 :

[0138] 小鼠腹水可通过亲和层析方法获得所需的纯化单克隆抗体。

[0139] 第三步骤胶体金及胶体金探针的制备

[0140] 1 材料与方法

[0141] 1.1 试剂与仪器

[0142] 氯金酸分析纯,1g 装 (国药集团化学试剂有限公司);产单核李斯特菌抗体 (O 链抗原 I / II) 14 ms/ml \times 2ml 装 (购于日本生研公司);检测标准产单核李斯特菌 (34922) 样品;硝酸纤维膜层析条带 4cm \times 200cm (购于德国赛多利斯公司);吸水纤维、玻璃纤维和 PVC 板 (购于上海良信科技有限公司)。

[0143] 1.2 胶体金的制备采用柠檬酸三钠还原法并稍作改进制备胶体金。18 ~ 20nm 胶

体金制备：取 1% 氯金酸溶液 2.5ml 加入到 250ml 容量瓶中，加双蒸水至标定刻度线，使氯金酸溶液的浓度为 1%，沸水浴 10min，加入 1% 柠檬酸三钠溶液 6.65ml。快速搅拌直至颜色彻底变为紫红色，继续沸水 10min，取出，凉至室温后，用双蒸水恢复至原体积。置 4℃ 冰箱保存备用。

[0144] 10nm 直径大小的胶体金，在 515nm 波长具有最大吸收峰，通过比较各法制备的胶体金的可见光吸光度，分析其金颗粒大小和分布。

[0145] 胶体金探针制备：取新鲜制备的胶体金溶液 50ml，加入 0.2mol/L K_2CO_3 ，调 pH 至 8.2，置磁力搅拌器上调适量转速，然后加入适量的已纯化好的抗体。

[0146] 使抗体浓度恰好在稳定蛋白质的最小量上。缓慢搅拌 10min，加入牛血清白蛋白 (BSA)，使 BSA 的终浓度为 1%，继续搅拌 10min。将上述胶体金—抗体—BSA 液进行 4000r/min 离心 20min，收集上清。将收集的上清进行 4℃、10000r/min 离心 60min。弃上清，沉淀用含 1% BSA 的 0.01mol/L pH7.4 PBS 悬浮。同上 4℃、10000r/min 离心 60min 两次，最后将沉淀用 5ml PBS-T 溶解。并加入少量的 Na_3N ，4℃ 冰箱保存备用。

[0147] 层析试纸条组装试纸条由吸水纤维、硝酸纤维膜、玻璃纤维和 PVC 板组成。硝酸纤维膜处理：中段相隔 5mm 分别用羊抗鼠 IgG (对照线) 和单核李斯特菌抗体 (检测线) 划线，形成两条宽约 1mm 的线段，干燥后用含 1% BSA 的 PBS 封闭过夜，37℃ 干燥。

[0148] 试纸条组装：取洁净 PVC 板，将处理好的硝酸纤维膜粘在 PVC 板中部合适位置；将 2cm 吸水纤维粘在 PVC 板上端并部分压在硝酸纤维膜上，0.8cm 玻璃纤维粘在 PVC 板下端并部分压在硝酸纤维膜上，切成宽 5mm 的条带，即为层析试纸条；干燥剂密封冷冻保存。

[0149] 1.5 检测

[0150] 取待检样品培养 48h，取 0.1ml 加入免疫胶体金离心管混合振荡 10min，将层析试纸条插入离心管，可见混合液沿试纸条向上移，移行过程中与固定在硝酸纤维膜上的单核李斯特菌抗体和羊抗鼠 IgG 发生抗原抗体反应，并产生肉眼可见的红色条带，试验过程需 10-20min。测定结果判断：阴性，仅对照线出现红色；阳性，对照线和检测线均出现红色。

[0151] 本发明的试验效果评价：

[0152]

[0153] 2.1 胶体金制备方法和条件

[0154] 2.1 检测灵敏度，并进行了 10 倍系列稀释。数据均低于食物中毒所需的菌种浓度。由此可见，对于常见的由于单增李斯特菌引起的中毒，可以通过此方法检测出来。

[0155] 2.2 特异性用自制的胶体金探针分别与沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌、非产肠毒素金葡菌以及其它菌共 10 株等进行检测，单增李斯特菌胶体金探针具有很大的特异性，基本上不与其它菌产生非特异的交叉反应。

[0156] 表 1 胶体金试剂盒特异性的观察

[0157]

菌种	株数	阳性株数	阴性株数	阳性率
金黄色葡萄球菌	19	0	19	0/19 (0.0)
大肠杆菌	13	0	13	0/13 (0.0)
沙门氏、志贺氏菌	7	0	7	0/7 (0.0)
链球菌、腐生菌等	8	0	8	0/8 (0.0)

[0158] 2.3 本发明的效果：

[0159] 2.3.1 检测结果见表 1。阳性待检样品中，均为两条红色线。阴性待检样品中，均为显示红色单一对照线。不确定样中，未发现有产单核李斯特菌的存在，均为显示红色单一对照线。

[0160] 2.3.2 灵敏度阳性待检样品每样 3 次进行检测，在不同稀释度的标样以及感染食物中，共检测 24 次，灵敏度达 96%；稀释检测不明显时，需其它辅助方法检测予以确定。

[0161] 表 2 结果：

[0162]

待检品	检测次数		
	1次	2次	3次
感染冷冻猪肉	+	+	+
感染牛奶	+	+	+
感染冰激凌	+	+	+
标准样品 10^{-1}	+	+	+
标准样品 10^{-2}	+	+	+
标准样品 10^{-3}	+	+	+
标准样品 10^{-4}	-	+	+
标准样品 10^{-5}	-	-	+
标准样品 10^{-6}	-	-	-
标准样品 10^{-7}	-	-	-
自来水	-	-	-
未感染冷冻猪肉	-	-	-
未感染牛奶	-	-	-
未感染冰激凌	-	-	-
湖水	-	-	-
生活污水	-	-	-
动物粪便	-	-	-

[0163] + 检测阳性；- 检测阴性

[0164] 2.3.3 重现性不同批次生产的免疫胶体金具有良好的检测重现性，检测上无大的波动。

[0165] 2,3.4 稳定性将测试条 3 个月 4℃保藏，与新制测试条进行检测对照，结果无显著

性差异。

[0166] 检测使用例 1

[0167] 检测分析结果选用阳性待检标准样为产单核李斯特菌,感染冷冻猪肉、牛奶、冰激凌,增菌器增菌培养 2-4h,以及标准样各稀释度的标样;阴性对照样为自来水,不确定样为湖水,生活污水,动物粪便。

[0168] 使用方法:

[0169] 取待检样品 0.1ml 加入免疫胶体金离心管混合振荡 10min,将层析试纸条插入离心管,可见混合液沿试纸条向上移,移行过程中与固定在硝酸纤维膜上的单核李斯特菌抗体和羊抗鼠 IgG 发生抗原抗体反应,并产生肉眼可见的红色条带,全部试验过程仅需 10-20min。

[0170] 测定结果判断:阴性,仅对照线出现红色;阳性,对照线和检测线均出现红色。

[0171] 检测使用例 2

[0172] 检测分析结果选用阳性待检标准样为产单核李斯特菌感染血、脑脊液及其它标本增菌器增菌培养 2-4h,阴性对照样为盐水。

[0173] 使用方法:

[0174] 取待检样品 0.1ml 加入免疫胶体金离心管混合振荡 10min,将层析试纸条插入离心管,可见混合液沿试纸条向上移,移行过程中与固定在硝酸纤维膜上的单核李斯特菌抗体和羊抗鼠 IgG 发生抗原抗体反应,并产生肉眼可见的红色条带,试验过程需 10-20min。

[0175] 测定结果判断:阴性,仅对照线出现红色;阳性,对照线和检测线均出现红色。

[0176] 检测使用例 3

[0177] 检测分析结果选用阳性待检标准样为产单核李斯特菌,以盐水以不同稀释度进行稀释,阴性对照样为盐水。

[0178] 使用方法:

[0179] 取待检样品 0.1ml 加入免疫胶体金离心管混合振荡 10min,将层析试纸条插入离心管,可见混合液沿试纸条向上移,移行过程中与固定在硝酸纤维膜上的单核李斯特菌抗体和羊抗鼠 IgG 发生抗原抗体反应,并产生肉眼可见的红色条带,试验过程需 10-20min。

[0180] 测定结果判断:阴性,仅对照线出现红色;阳性,对照线和检测线均出现红色。

[0001]

<110>何鑫 贾芙蓉 黄胜起 赵丽纯 何成彦

<120> 胶体金标记 Hly 基因单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒

<160> 1

<210> 1

<211> 1646

<212> DNA

<213> 单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*)

<220>

<221> prim_bind

<222> (1)···(24)

<223> 为克隆需要, 在上游引物中引入 BamH I 切位点。

<400> 1

```

AAATGT CGACGG AGAGTG AAACCC ATGAAA AAAATA ATGCTA GTTATT ACACTT ATA 60
TTAGTT AGTCTA CCAATT GCGCAA CAACT GAAGCA AAGGAT GCATCT GCATTC AATAAA 120
GAAAAT TTAATT TCATCC ATGGCA CCACCA GCATCT CCGGCT GCAAGT CCTAAG ACGCCA 180
ATGGAA AAGAAA CACGCG GATGAA ATCGAT AAGTAT ATACAA GGATTC GATTAC AATAAA 240
AACAAAT GTATTA GTATAG CACCGA GATGCA GTGACA AATGTG CCGCCA AGAAAA GGTTAT 300
AAAGAT GGAAAT GAATAT ATCGTT GTGGAG AAAAAG AAGAAA TCGATG AATCAA AATAAT 360
GCAGAT ATCCAA GTTGTG AATGCA ATTTCT AGCCTA AGATAT CCAGGT GCTCTC GTGAAA 420
GCGAAT TCGGAA TTAGTA GAAAAT CAACCC GATGTT GTTCTT GTCAAA CGTGAT TCATTA 480
ACACTT AGCATT GATTTG CCAGGA ATGACT AATCAA GACAAT AAAATT GTTGTA AAAAAT 540
GCTACT AAATCG AACGTT AACAAC GCAGTA AATACA TTAGTG GAAAGA TGGAAT GAAAAA 600
TATGCT CAAGCT TATCCA AATGTA AGTGCA AAAATT GATTAT GATGAC GAAATG GCTTAC 660
AGTGAA TCACAA TTAATT GCAAAA TTTGGT ACGGCA TTAAA GCTGTA AATAAT AGCTTG 720
AATGTA AACTTC GGCGCA ATCAGT GAAGGG AAAATG CAAGAA GAAGTC ATTAGT TTAAA 780
CAAAT TACTAT AACGTG AATGTT AATGAA CCTACA AGACCT TCCAGA TTTTTC GGCAAA 840
GCTGTT ACTAAA GAGCAG TTGCAA GCGCTT GCAGTG AATGCA GAAAAT CCTCCT GCATAT 900
ATCTCA AGTGTG GCATAT GGCCGT CAAGTT TATTTG AAATTA TCAACT AATTCC CATAGT 960
ACGAAA GTAAAA GCTGCT TTTGAG GCTGCG GTAAGT GGGAAA TCTGTC TCAGGT GATGTA 1020
CAACTG ACAAAT ATCATC AAAAAT TCTTCC TTCAA GCGGTA ATTTAC GGTGGC TCCCA 1080
AAAGAT GAAGTT CAAATC ATCGAC GGTAAC CTCGGA GACTTA CGAGAT ATTTTG AAAAAA 1140
GGTGCT ACTTTT AAGCGG GAAACA CCAGCA GTTCCG ATTGCC TATACA ACAAAC TTCTTA 1200
AAAGAC AATGAA TTAGCT GTTATT AAAAAC AACTCA GAATAT ATTGAA ACAACT TCAAAA 1260
GCTTAT ACAGAT CGAAAA ATCAAC ATCGAT CACTCT GGAGGA TACGTT GCTCAA TTCAAC 1320
ATCTCT TGGCAT GAAATA AATTAT GATCCT GAACGT AACGAA ATTGTT CAACAT AAAAAA 1380
TCGAGC GAAAAA AATAAA AGTAAG CTAGCT CATTTC ACATCG TCCATC TATTTG CCACGT 1440
AACGCA AGAAAT ATTAAT GTTTAC GCTAAA GAATGC ACTGGT TTAGCT TGGGAA TGGTGG 1500
AGAACG GTAATT GATGAC CGGAAC CTACCG CTTGTG AAAAAA AGAAAT ATCTCC ATCTGG 1560
GGCACT ACACTT TATCCG AAATAT AGTAAT AGTGTA GATAAT GCAATC GAATAA TTTTAA 1620
AATAA AAAAAA AATCT AGAATA AA
1646

```

<210> 1

[0002]

- <211> 1646
<212> DNA
<213> 单核细胞增生性李斯特菌 (*L. monocytogenes*)
<220>
<221> prim_bind
<222> (1620)···(1646)
<223>为克隆需要，在下游引物中引入 Xho I 酶切位点。
<400> 1

```
AAATGT CGACGG AGAGTG AAACCC ATGAAA AAAATA ATGCTA GTTATT ACACTT ATA 60
TTAGTT AGTCTA CCAATT GCGCAA CAACT GAAGCA AAGGAT GCATCT GCATTC AATAAA 120
GAAAAT TTAATT TCATCC ATGGCA CCACCA GCATCT CCGGCT GCAAGT CCTAAG ACGCCA 180
ATGGAA AAGAAA CACGCG GATGAA ATCGAT AAGTAT ATACAA GGATTC GATTAC AATAAA 240
AACAAAT GTATTA GTATAG CACCGA GATGCA GTGACA AATGTG CCGCCA AGAAAA GGTTAT 300
AAAGAT GGAAAT GAATAT ATCGTT GTGGAG AAAAAG AAGAAA TCGATG AATCAA AATAAT 360
GCAGAT ATCCAA GTTGTG AATGCA ATTTTC AGCCTA AGATAT CCAGGT GCTCTC GTGAAA 420
GCGAAT TCGGAA TTAGTA GAAAAT CAACCC GATGTT GTTCTT GTCAAA CGTGAT TCATTA 480
ACACTT AGCATT GATTTG CCAGGA ATGACT AATCAA GACAAT AAAATT GTTGTG AAAAAAT 540
GCTACT AAATCG AACGTT AACAAAC GCAGTA AATACA TTAGTG GAAAGA TGGAAT GAAAAA 600
TATGCT CAAGCT TATCCA AATGTA AGTGCA AAAAAT GATTAT GATGAC GAAATG GCTTAC 660
AGTGAA TCACAA TTAATT GCAAAA TTTGGT ACGGCA TTTAAA GCTGTA AATAAT AGCTTG 720
AATGTA AACTTC GGCGCA ATCAGT GAAGGG AAAATG CAAGAA GAAGTC ATTAGT TTTAAA 780
CAAATT TACTAT AACGTG AATGTT AATGAA CCTACA AGACCT TCCAGA TTTTTC GGCAAA 840
GCTGTT ACTAAA GAGCAG TTGCAA GCGCTT GCAGTG AATGCA GAAAAT CCTCCT GCATAT 900
ATCTCA AGTGTG GCATAT GGCCGT CAAGTT TATTTG AAATTA TCAACT AATTCC CATAGT 960
ACGAAA GTAAAA GCTGCT TTTGAG GCTGCG GTAAGT GGGAAA TCTGTC TCAGGT GATGTA 1020
CAACTG ACAAAT ATCATC AAAAAT TCTTCC TTCAAA GCGGTA ATTTAC GGTGGC TCCCCA 1080
AAAGAT GAAGTT CAAATC ATCGAC GGTAAC CTCGGA GACTTA CGAGAT ATTTTG AAAAAA 1140
GGTGCT ACTTTT AAGCGG GAAACA CCAGCA GTTCCG ATTGCC TATACA ACAAAC TTCTTA 1200
AAAGAC AATGAA TTAGCT GTTATT AAAAAAC AACTCA GAATAT ATTGAA ACAACT TCAAAA 1260
GCTTAT ACAGAT CGAAAA ATCAAC ATCGAT CACTCT GGAGGA TACGTT GCTCAA TTCAAC 1320
ATCTCT TGGCAT GAAATA AATTAT GATCCT GAACGT AACGAA ATTGTT CAACAT AAAAAAC 1380
TCGAGC GAAAAAC AATAAA AGTAAG CTAGCT CATTTC ACATCG TCCATC TATTTG CCACGT 1440
AACGCA AGAAAT ATTAAT GTTTAC GCTAAA GAATGC ACTGGT TTAGCT TGGGAA TGGTGG 1500
AGAACG GTAATT GATGAC CGGAAC CTACCG CTTGTG AAAAAAT AGAAAT ATCTCC ATCTGG 1560
GGCACT ACACTT TATCCG AAATAT AGTAAT AGTGTA GATAAT GCAATC GAATAA TTTTAA 1620
AAATTA ATAAAA AAATCT AGAATA AA
1646
```

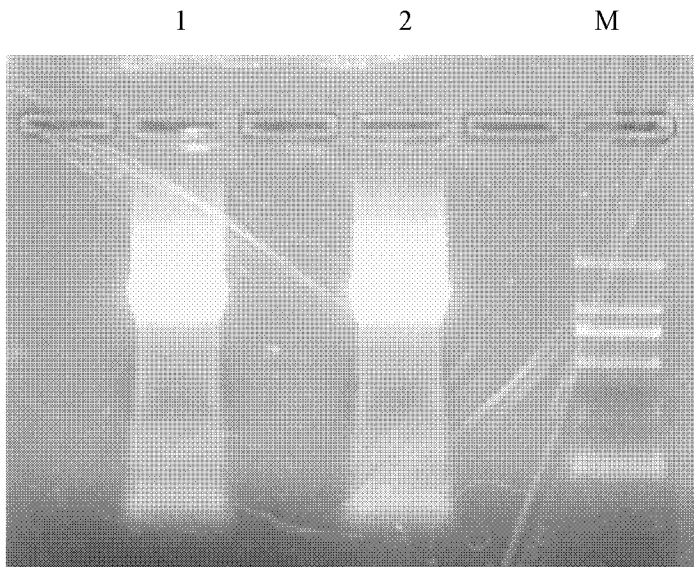


图 1

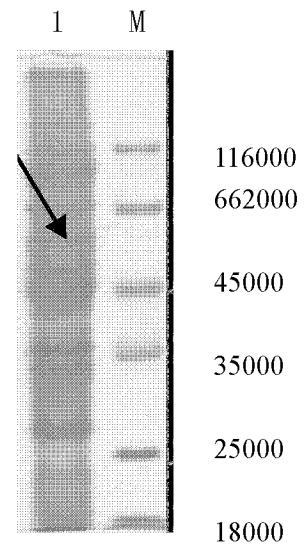


图 2

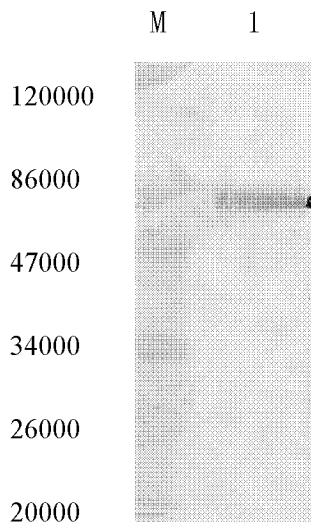


图 3

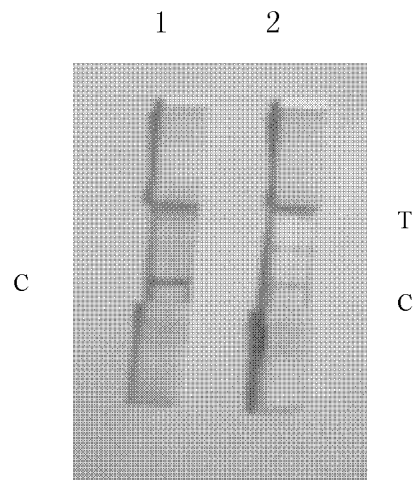


图 4

专利名称(译)	胶体金标记Hly基因单克隆抗体测定单核细胞增生性李斯特菌试剂盒		
公开(公告)号	CN102539770A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201110449180.8	申请日	2011-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	何鑫 黄胜起		
申请(专利权)人(译)	何鑫 黄胜起		
当前申请(专利权)人(译)	何鑫 黄胜起		
[标]发明人	何鑫 贾芙蓉 黄胜起 赵丽纯 何成彦		
发明人	何鑫 贾芙蓉 黄胜起 赵丽纯 何成彦		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种胶体金标记Hly基因单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒，属于卫生学检验及医学检验技术领域，其特征是：1引物设计、2PCR扩增、3琼脂糖凝胶电泳的反应条件、4切下目的DNA片段、5应用热休克转化法、6SDS裂解法纯化试剂盒制备质粒、7蛋白的诱导表达、8SDS-PAGE电泳、9从SDS-PAGE电泳凝胶中切下所需条带、10胶体金的制备。有益效果是：改进了过去针对单一菌属单一抗原测定的局限性。抗体纯、效价高，提高了敏感度和准确度。对单增李斯特菌进行检测，同ELISA法和PCR法比较，免疫胶体金层析对李斯特菌的检测具有快速、便捷的优点。

