



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093409 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201610396856.4

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2016.06.07

(83)生物保藏信息

CGMCC No.12019 2016.01.20

(71)申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号江南大学食品学院

(72)发明人 匡华 王文彬 胥传来 徐丽广

马伟 刘丽强 吴晓玲 宋珊珊

胡拥明

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

(51)Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

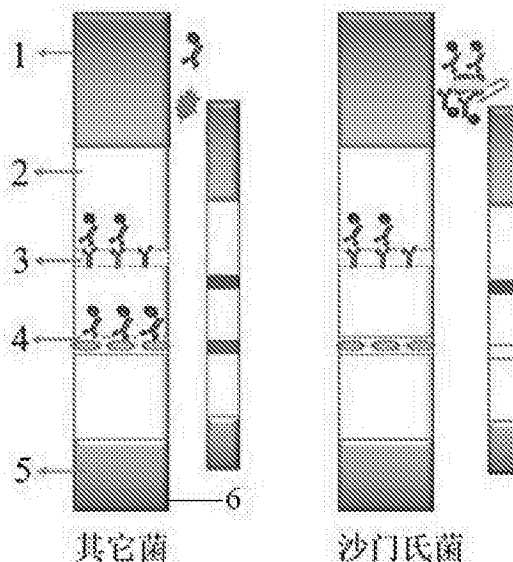
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的检测
食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法

(57)摘要

基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法,属于免疫分析领域。本发明以高碘酸钠法合成的鼠伤寒沙门氏菌脂多糖(LPS)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物作为胶体金试纸条测试线(T线)的包被原,以沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8作为金标抗体。本发明区别于常规致病菌胶体金试纸条夹心法的原理,该沙门氏菌胶体金试纸条方法采用间接竞争原理进行检测,并且沙门氏菌属核心多糖特异性单克隆抗体保证了方法对属内沙门氏菌均有交叉同时对属外细菌无交叉反应,为食品中沙门氏菌属的全面、简便、快速检测提供了分析手段。



1. 一株基于沙门氏菌核心多糖的单克隆细胞株SQX6D8, 已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 简称CGMCC, 保藏编号为CGMCC No.12019。

2. 基于沙门氏菌核心多糖的单克隆抗体SQX6D8, 其特征在于: 它由所述保藏编号为CGMCC No.12019的单克隆细胞株SQX6D8分泌产生。

3. 一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法, 其特征在于具体步骤为:

(1) 沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的制备: 采用保藏编号为CGMCC No.12019的菌株免疫得到单克隆抗体;

(2) T线包被原LPS-BSA偶联物的合成:

a、活化: 取突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS 10mg用超纯水溶解, 按照反应质量比 NaIO_4 :Ra-LPS 5:1滴加47 μL 浓度为200mM/L的 NaIO_4 溶液到突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS溶液中, 25℃反应2h; 然后取10 μL 1M/L的乙二醇溶液到反应液中, 25℃反应2h;

b、偶联: 按照反应摩尔比Ra-LPS:BSA为5:1的比例将步骤a活化后的突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS反应液滴加到BSA溶液中, 用0.01M、pH9.6的碳酸盐缓冲液CB调节反应液pH至8.5; 室温反应过夜, 透析后即得到合成的LPS-BSA偶联物;

(3) 金纳米粒子的合成: 采用柠檬酸还原法合成30nm的金纳米粒子, 在洗净的烧瓶中加入300mL质量浓度0.01%的氯金酸溶液, 在磁力搅拌下加热至完全沸腾, 向溶液中快速加入4.8mL质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液, 将溶液煮沸10min直至颜色变为透亮的酒红色, 将烧瓶置于室温冷却, 并在4℃保藏;

(4) 金标抗体的偶联: 用0.1M碳酸钾溶液将1mL胶体金溶液pH调至8; 加入10 μg 的沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8并在室温下反应2h; 加入50 μL 质量体积比10%的BSA溶液进行封闭, 室温反应2h; 4℃、6000g、20min条件下离心胶体金溶液, 去除未偶联的胶体金和单克隆抗体; 用含有0.2% Tween、0.2%蔗糖的 0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤金标抗体;

(5) 金标试纸条的制备: 将硝酸纤维素膜(2)固定于PVC底板上(6)上, 将吸水垫(1)粘附在硝酸纤维素膜(2)与PVC底板(6)靠近质控线(3)的一端, 将样品垫(5)粘附在硝酸纤维素膜(2)与PVC底板(6)的靠近测试线(4)的另一端; 质控线(3)与测试线(4)之间间隔6mm; 将LPS-BSA偶联物用喷膜机喷至测试线(4)处, 0.5mg/mL的羊抗鼠IgG二抗喷至质控线(3)处; 37℃烘干2h并切条备用, 得到基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条。

4. 根据权利要求3所述基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法, 其特征在于: 所述沙门氏菌包括12株, 依次为甲型副伤寒(A群)、阿贡那沙门(B群)、鼠伤寒沙门(B群)、乙型副伤寒(B群)、汤普逊沙门(C1群)、布洛克利沙门(C2群)、肯塔基沙门(C3群)、肠炎沙门(D群)、伤寒沙门(D群)、都柏林沙门(D群)、鸭沙门(E群)、亚利桑那沙门。

基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法,属于免疫分析领域。

背景技术

[0002] 沙门氏菌(*Salmonella*)是一种全球性的食源性致病菌。生物学上沙门氏菌是一类两端钝圆的革兰氏阴性菌,无芽孢,一般无荚膜,主要抗原有O抗原、H抗原、Vi抗原。动物性食品如禽肉、蛋类、乳品容易污染沙门氏菌。人体摄入含菌食物后会引发急性肠胃炎,伤寒,免疫力低下的儿童等人群中甚至出现败血症等症状。

[0003] 沙门氏菌有2000多种血清型,临床中常见的血清型主要是肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌等。良好规范的生产操作过程和危害分析与关键点控制(HACCP)等管理体系的应用可以很大程度上减少食源性致病菌的发生。然而对原料和生产过程、产品的质量监测也是保障食品生物安全的重要手段。

[0004] 目前检测沙门氏菌的方法主要有生化培养法、免疫学检测方法、分子检测方法。传统的生化培养法是检测沙门氏菌的国标方法,尽管权威可靠,但一般需要5-10天得到结果,且操作过程繁琐,不能适应快速检测的要求;分子检测方法是基于沙门氏菌脱氧核糖核酸(DNA)聚合酶链式反应(PCR)建立起来的。目前发展为传统PCR、实时荧光定量PCR(RT-PCR)、环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。与传统PCR相比,RT-PCR具有实现定量检测目标DNA、特异性更强、有效解决PCR污染问题、自动化程度高等特点。LAMP方法具有简单、快速、特异性强的特点。该技术在灵敏度、特异性和检测范围等方面不亚于常规PCR技术,不依赖专门的仪器设备,可以现场高通量快速检测,而且检测成本远低于实时荧光定量PCR。然而,有文献报道LAMP方法在检测牛乳中的沙门氏菌时,会出现假阴性的问题。这可能是与引物受到样品基质影响所引起的。同样常规PCR和实时荧光PCR也面临着检测成本高、对操作人员技术要求较高的问题。

[0005] 胶体金试纸条方法检测病原微生物具有简便、快速、成本低的优点。目前在菌属水平上检测沙门氏菌的胶体金试纸条未见报道,主要难点集中在交叉均一、亲和力高的单克隆抗体的制备,以及用于双抗体夹心的配对抗体的获得。在之前的专利中我们公开了交叉性免疫原的合成(专利申请号:201410314040.3)、交叉型双抗体夹心法ELISA方法的建立(201510183851.9)。然而用配对抗体建立胶体金试纸条方法时面临着T线不显色的问题,其中原因可能有:(1)筛选的单克隆抗体的亲和力满足ELISA但不足以满足胶体金试纸条要求;(2)核心多糖难以暴露在菌体表面,在胶体金试纸条方法反应时间很短(10 min)的情况下,固定在T线的抗体难以有效捕获样品中的沙门氏菌。因此,我们采用新制备的、具有更高亲和力的单克隆抗体SQX6D8,并合成异源LPS偶联物作为T线包被原,用竞争法原理进行检测,克服了T线上抗体难以捕获沙门氏菌的难题。该方法对测试的12株沙门氏菌的检测灵敏度为 $10^5 - 5 \times 10^6$ CFU/mL,交叉较为均一,同时对于其它测试菌如E.coli、E.coli 0157:

H7、阪崎肠杆菌、空肠弯曲菌、结肠弯曲杆菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应。

发明内容

[0006] 本发明的目的是建立一种在菌属水平上检测沙门氏菌属的胶体金试纸条,用于食品中沙门氏菌属的高特异性、高准确性快速检测。

[0007] 本发明的技术方案,为实现上述目的,本发明建立了一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的竞争法原理检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条方法,该方法还包括优化过程。

[0008] 其中,单克隆抗体SQX6D8是采用EDC法LPS-BSA人工抗原作为免疫原免疫8周龄的BALB/c小鼠并经杂交瘤技术融合、筛选得到的,具有亲和力高、抑制效果好的特点。

[0009] 其中,T线包被原采用NaIO₄法合成的LPS-BSA偶联物,相比同源的EDC法LPS-BSA抑制效果更好。

[0010] 本发明方法的检测分析原理:采用间接竞争原理进行检测,测试线(T线)喷有合成的LPS-BSA偶联物做包被原,沙门氏菌核心多糖特异性单克隆抗体SQX6D8与红色的金纳米粒子进行偶联作为金标抗体。检测时,样品中的沙门氏菌先与金标抗体结合从而抑制了金标抗体与T线上包被原的结合,T线的显色强度与样品中沙门氏菌的数量成反比。沙门氏菌属核心多糖特异性单克隆抗体保证了方法对属内沙门氏菌均有交叉同时对属外细菌无交叉反应。

[0011] 一株基于沙门氏菌核心多糖的单克隆细胞株SQX6D8,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称CGMCC,保藏编号为CGMCC No.12019。

[0012] 基于沙门氏菌核心多糖的单克隆抗体SQX6D8,它由所述保藏编号为CGMCC No.12019的单克隆细胞株SQX6D8分泌产生。

[0013] 一种基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法,具体步骤为:

(1)沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的制备:采用保藏编号为CGMCC No.12019的菌株免疫得到单克隆抗体;

(2)T线包被原LPS-BSA偶联物的合成:

a、活化:取突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS 10mg用超纯水溶解按照反应质量比NaIO₄:Ra-LPS 5:1滴加47 μL浓度为200mM/L的NaIO₄溶液到突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS溶液中,25℃反应2h;然后取10μL 1M/L的乙二醇溶液到反应液中,25℃反应2h;

b、偶联:按照反应摩尔比Ra-LPS:BSA为5:1的比例将步骤a活化后的突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS反应液滴加到BSA溶液中,用0.01M、pH9.6的碳酸盐缓冲液CB调节反应液pH至8.5;室温反应过夜,透析后即得到合成的LPS-BSA偶联物;

(3)金纳米粒子的合成:采用柠檬酸还原法合成30nm的金纳米粒子,在洗净的烧瓶中加入300mL质量浓度0.01%的氯金酸溶液,在磁力搅拌下加热至完全沸腾,向溶液中快速加入4.8mL质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液,将溶液煮沸10min直至颜色变为透亮的酒红色,将烧瓶置于室温冷却,并在4℃保藏;

(4)金标抗体的偶联:用0.1M碳酸钾溶液将1mL胶体金溶液pH调至8;加入10μg的沙门氏

菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8并在室温下反应2h;加入50 μ L 质量体积比10%的BSA溶液进行封闭,室温反应2h;4 $^{\circ}$ C、6000g、20min条件下离心胶体金溶液,去除未偶联的胶体金和单克隆抗体;用含有0.2% Tween、0.2%蔗糖的 0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤金标抗体;

(5)金标试纸条的制备:将硝酸纤维素膜固定于PVC底板上,将吸水垫粘附在硝酸纤维素膜与PVC底板靠近质控线的一端,将样品垫粘附在硝酸纤维素膜与PVC底板的靠近测试线的另一端;质控线与测试线之间间隔6mm;将LPS-BSA偶联物用喷膜机喷至测试线处,0.5mg/mL的羊抗鼠IgG二抗喷至质控线处;37 $^{\circ}$ C烘干2h并切条备用,得到基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条。

[0014] 所述沙门氏菌包括12株,依次为甲型副伤寒(A群)、阿贡那沙门(B群)、鼠伤寒沙门(B群)、乙型副伤寒(B群)、汤普逊沙门(C1群)、布洛克利沙门(C2群)、肯塔基沙门(C3群)、肠炎沙门(D群)、伤寒沙门(D群)、都柏林沙门(D群)、鸭沙门(E群)、亚利桑那沙门。

[0015] 本发明的有益效果:本发明提供的沙门氏菌属特异性胶体金试纸条不同于常规大分子胶体金试纸条双抗体夹心法的原理,而是采用了竞争法进行检测。

[0016] 沙门氏菌核心多糖特异性的单克隆抗体SQX6D8亲和力更高、交叉较均一,通过合成的LPS-BSA偶联物作为T线包被原与样品中沙门氏菌竞争SQX6D8偶联金纳米粒子的金标抗体,建立的胶体金试纸条可以在菌属水平上检测沙门氏菌,并与其它测试菌没有交叉反应。该方法操作简便快速、稳定性好、成本低的特点,具有推广和应用价值。

[0017] 生物材料样品保藏:单克隆细胞株SQX6D8,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏日期:2016年1月20日,保藏编号CGMCC No.12019。

附图说明

[0018] 图1 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条的原理示意图。

[0019] 图2 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条检测突变型脂多糖(RaLPS)。

[0020] 图3 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条检测沙门氏菌。

[0021] 图4 沙门氏菌属特异性胶体金试纸条交叉反应。

具体实施方式

[0022] 实施例1

该胶体金试纸条开发的具体步骤为:

(1)沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的制备:

采用专利申请号:201410314040.3中公开的免疫原合成方法,用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)法合成突变型沙门氏菌脂多糖(Ra-LPS)与匙孔血蓝蛋白(KLH)完全抗原,并作为免疫原免疫小鼠,通过常规细胞融合以及LPS、不同O抗原的沙门氏菌菌体作为包被原进行阳性细胞筛选,最终制备了对沙门氏菌属内亲和力高,交叉较均一的属特异性单克隆抗体SQX6D8。

[0023] (2)T线包被原LPS-BSA偶联物的合成:采用专利申请号:2014103140403中公开的合成方法合成偶联物,具体步骤如下:

a、活化:取突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS 10mg用超纯水溶解,按照反应质量比

NaIO₄:Ra-LPS 5:1滴加47 μL浓度为200mM/L的NaIO₄溶液到突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS溶液中,25℃反应2h;然后取10μL 1M/L的乙二醇溶液到反应液中,25℃反应2h;

b、偶联:按照反应摩尔比Ra-LPS:BSA为5:1的比例将活化后的突变型鼠伤寒沙门氏菌脂多糖Ra-LPS反应液滴加到BSA溶液中,用0.01M、pH9.6的碳酸盐缓冲液CB调节反应液pH至8.5;室温反应过夜,透析后即得到合成的LPS-BSA偶联物;

(3)金纳米粒子的合成:采用柠檬酸还原法合成30nm的金纳米粒子,在洗净的烧瓶中加入300mL质量浓度0.01%的氯金酸溶液,在磁力搅拌下加热至完全沸腾,向溶液中快速加入4.8mL质量浓度1%的柠檬酸三钠溶液,将溶液煮沸10min直至颜色变为透亮的酒红色,将烧瓶置于室温冷却,并在4℃保藏;

(4)金标抗体的偶联:用0.1M碳酸钾溶液将1mL胶体金溶液pH调至8;加入10 μg的沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8并在室温下反应2h;加入50 μL 10% (M/V)的BSA溶液进行封闭,室温反应2h。4℃、6000g、20min条件下离心胶体金溶液,去除未偶联的胶体金和单克隆抗体;用含有0.2% Tween、0.2%蔗糖的 0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤金标抗体;

(5)金标试纸条的制备:在聚氯乙烯PVC底板6和硝酸纤维素膜2上按图示位置固定吸水垫1和样品垫5,依次标记好测试线4和质控线3的位置,间隔6mm;将LPS-BSA偶联物和羊抗鼠IgG二抗(0.5mg/mL)用喷膜机BioJet Quanti3000分别喷至测试线4和质控线3处;37℃烘干2h并切条备用。

[0024] 实施例2 采用该胶体金试纸条检测沙门氏菌Ra LPS:

首先将Ra LPS(1mg/mL)用0.01M的磷酸盐缓冲液梯度稀释到100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL和5 ng/mL,空白0.01M的磷酸盐缓冲液作对照;

随后采用湿法检测Ra LPS, 取7 μL实施例1步骤(4)中制备的金标抗体与47 μL重悬液(0.1% Tween、0.2%蔗糖,1% BSA的 0.01M的磷酸盐缓冲液)到微孔板中,用移液枪混合。将不同浓度的Ra LPS 各取150 μL分别加入不同的微孔板中,用移液枪混合均匀,室温反应5分钟;将制备的胶体金试纸条插入微孔板中,室温反应10分钟后进行判读。判读依据:空白样品,质控线和测试线同时有颜色,且测试线显色较深,阳性样品。质控线有颜色,测试线显色与空白样品相比很浅或不显色,阴性样品。具体检测结果如图2所示。

[0025] 实施例3 采用该胶体金试纸条检测12株沙门氏菌:

12株菌株依次为甲型副伤寒(A群)CMCC 50093、阿贡那沙门(B群)CICC 21586、乙型副伤寒(B群)CMCC 50094、鼠伤寒沙门(B群)ATCC 13311、汤普逊沙门(C1群)CICC21480、布洛克利沙门(C2群)CICC 21489、肯塔基沙门(C3群)CICC 21488、肠炎沙门(D群)ATCC13076、伤寒沙门氏菌(D群)CMCC 50071、都柏林沙门(D群)CICC 21497、鸭沙门(E群)CICC21498、亚利桑那沙门ATCC 13314。

[0026] 具体检测过程为:将测试的沙门氏菌纯培养物用0.01M的磷酸盐缓冲液梯度稀释到 10^7 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^5 CFU/mL和 10^4 CFU/mL,用稀释液做空白对照,其它过程同实施例2。具体检测结果如图3所示。

[0027] 实施例4 测试沙门氏菌属特异性胶体金试纸条的交叉反应:

8株测试的其它细菌分别是:金黄色葡萄球菌,单增李斯特菌,大肠杆菌0157,普通大肠杆菌,克罗诺肠杆菌,副溶血性弧菌,空肠弯曲杆菌,结肠弯曲杆菌。测试浓度均为 5×10^8 CFU/mL,检测过程同实施例2,结果如图4所示。

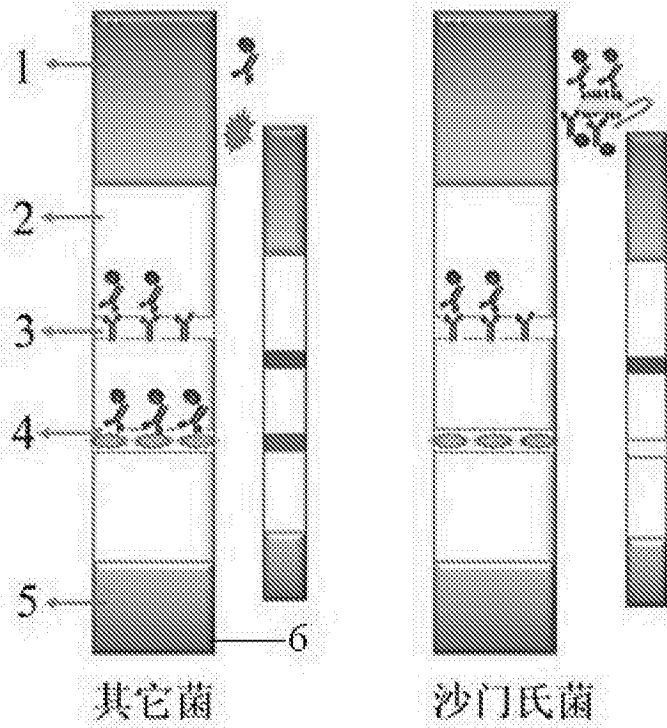


图1

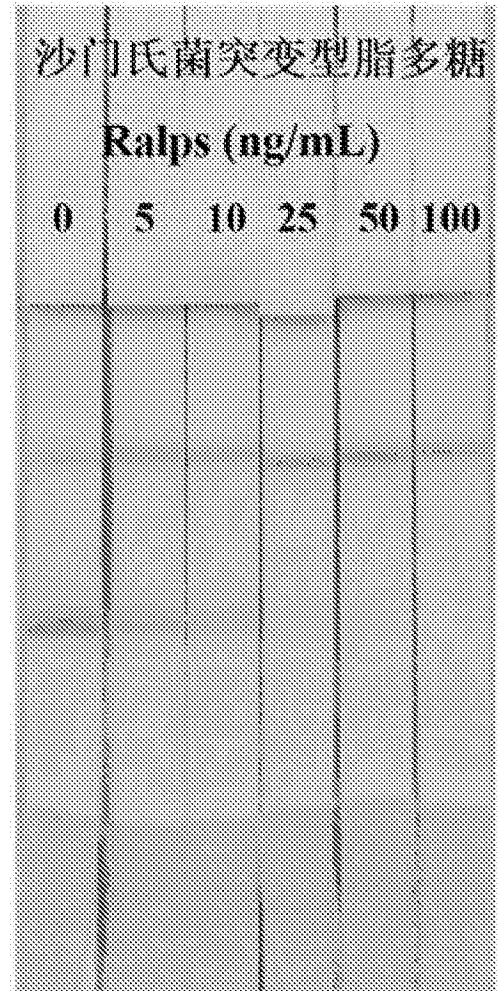


图2

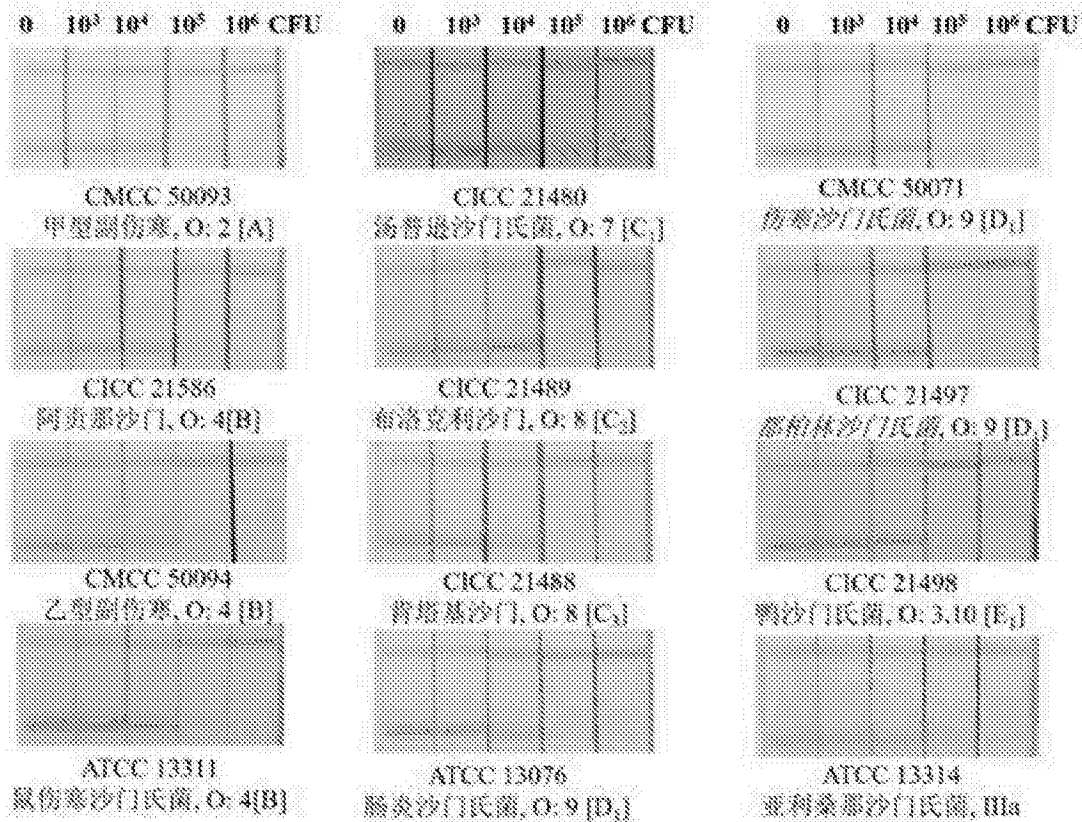


图3

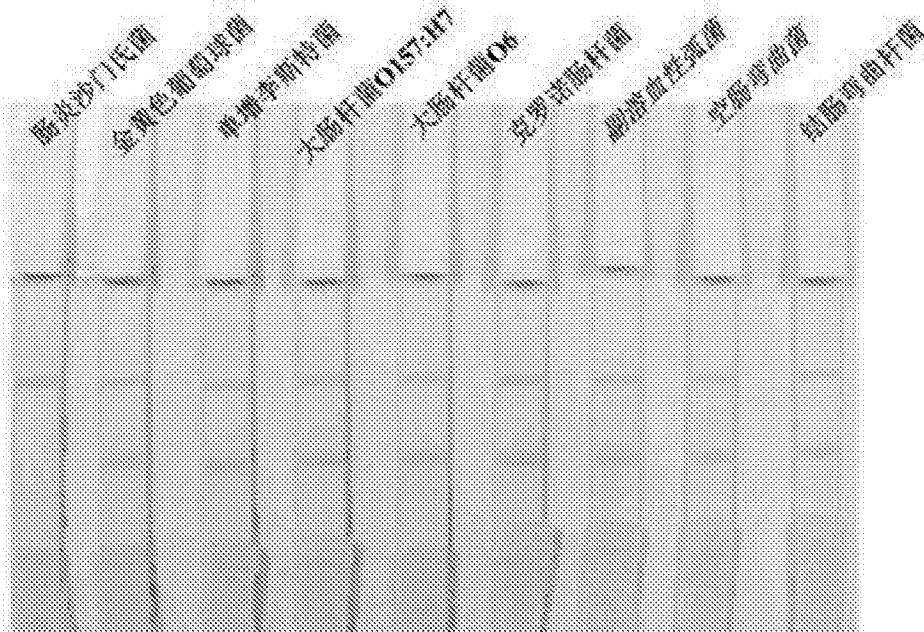


图4

专利名称(译)	基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN106093409A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610396856.4	申请日	2016-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	匡华 王文彬 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
发明人	匡华 王文彬 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 吴晓玲 宋珊珊 胡拥明		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N33/56916 G01N2333/255		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

基于沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8的检测食品中沙门氏菌属的胶体金试纸条的制备方法，属于免疫分析领域。本发明以高碘酸钠法合成的鼠伤寒沙门氏菌脂多糖（LPS）与牛血清白蛋白（BSA）的偶联物作为胶体金试纸条测试线（T线）的包被原，以沙门氏菌核心多糖单克隆抗体SQX6D8作为金标抗体。本发明区别于常规致病菌胶体金试纸条夹心法的原理，该沙门氏菌胶体金试纸条方法采用间接竞争原理进行检测，并且沙门氏菌核心多糖特异性单克隆抗体保证了方法对属内沙门氏菌均有交叉同时对属外细菌无交叉反应，为食品中沙门氏菌属的全面、简便、快速检测提供了分析手段。

