



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655842 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510063433. 6

(22) 申请日 2015. 02. 08

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路  
238 号

(72) 发明人 李贇 苏真真 潘鲁青

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有  
限公司 37201

代理人 张中南 邱岳

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

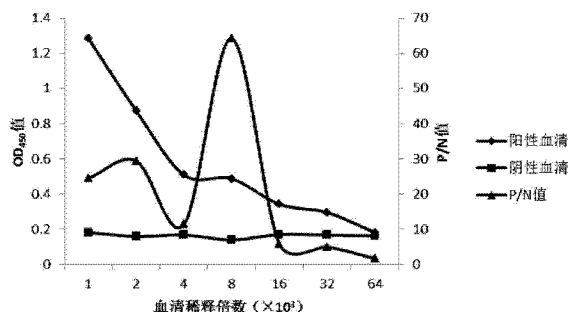
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法

(57) 摘要

一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法, 包括 1) 盐单胞菌 O 抗原的制备 ;2) 盐单胞菌多克隆抗体的制备 : 以盐单胞菌 O 抗原为免疫抗原, 免疫新西兰大白兔并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得盐单胞菌多克隆抗体 ;3) 间接 ELISA 操作方法 : 将抗原包被酶标板, 4℃ 过夜 ;洗板, 加封闭液 ;洗板, 加抗体 ;洗板, 加二抗 ;洗板, 进行显色反应 ;用酶标仪测定 450nm 波长下的吸光值即 OD<sub>450</sub>。本发明建立了一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法, 其操作流程简便, 易于操作, 检测灵敏度能够达到 10<sup>5</sup>cfu/mL, 抗血清与其他细菌无交叉反应, 是一种快速、高效、灵敏性高、特异性强的检测方法为有益菌在水产上的应用起到推动作用, 具有一定的实际应用意义。



1. 一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,其特征包括以下步骤:

1) 盐单胞菌 O 抗原的制备:首先将盐单胞菌接至 2216E 液体培养基作增殖培养;然后将所述的盐单胞菌制备成菌体 O 抗原;

2) 盐单胞菌多克隆抗体的制备:

以盐单胞菌 O 抗原为免疫抗原,免疫新西兰大白兔并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得盐单胞菌多克隆抗体,该抗体可与盐单胞菌特异性结合。

3) 间接 ELISA 操作方法

3.1) 以碳酸盐 (CBS) 缓冲液稀释步骤 1 得到的抗原至  $10^7$ cfu/mL,将稀释后的包被抗原加入酶标板中,每孔  $100\ \mu\text{L}$ ,置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱内孵育过夜;将孵育过夜后的酶标板甩干液体,然后每孔加入  $300\ \mu\text{L}$  洗涤液洗涤 3 次后,加入封闭液, $37^\circ\text{C}$  封闭 60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

3.2) 用抗体稀释液以 1:500 的比例稀释步骤 2 得到的多克隆抗体,再加入到上述酶标板中,每孔  $100\ \mu\text{L}$ ;  $37^\circ\text{C}$  孵育 30min 后以 PBST 洗涤 3 次;

3.3) 以 PBST 1:1000 的比例稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP,然后加入到上述酶标板中,每孔  $100\ \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

3.4) 将四甲基联苯胺显色液 A 液和 B 液 1:1 混合后加入到上述酶标板中,每孔  $100\ \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  显色 20min;将 2M 硫酸溶液加入到上述酶标板中终止反应,每孔  $50\ \mu\text{L}$ ;用酶标仪在 450nm 波长下测吸光值  $OD_{450}$ ,得到盐单胞菌标准品溶液的标准曲线,以及待测样品的吸光值,将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比可计算出待测样品的盐单胞菌含量。

2. 如权利要求 1 所述的盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,其特征包括上述步骤 1) 盐单胞菌 O 抗原的制备具体如下:将盐单胞菌接种于 2216E 液体培养基,放入摇床 ( $25^\circ\text{C}$ ,  $200\text{r}/\text{min}$ ) 活化增菌培养,24h 后,离心 ( $8000\text{r}/\text{min}$ , 15min) 收集菌体,将沉淀悬浮于 0.5% 石碳酸生理盐水,再加入等量的无水酒精混合,放入冰箱过夜后用生理盐水稀释至  $10^8$ cfu/mL,放入  $4^\circ\text{C}$  或  $-20^\circ\text{C}$  备用,即得到盐单胞菌 O 抗原。

3. 如权利要求 1 所述的盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,其特征包括上述步骤 2) 盐单胞菌多克隆抗体的制备具体如下:选取 6 个月以上,体重在 2-3kg 的雄性新西兰大白兔作为实验动物,实验前暂养一周;将用生理盐水稀释至  $10^8$ cfu/mL 的盐单胞菌 O 抗原作为免疫原,然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化;初次免疫将乳化好的抗原溶液于兔子背部皮下多点注射,每只注射 1.2mL,两周后进行第一次加强免疫,用不完全弗氏佐剂乳化,注射部位和剂量与初次免疫相同,一周后进行第二次加强免疫,注射 0.3mL 稀释后的抗原溶液进行免疫,免疫部位为耳静脉,一周后进行最后一次加强免疫,操作与第二次加强免疫相同,从耳缘静脉采血,采用直接 ELISA 法测定抗体效价,确定抗体效价可用后采用耳动脉取血获得抗血清,收集于灭菌离心管中;将此抗血清高速离心并过滤纯化后于  $-20^\circ\text{C}$  保存,即得到盐单胞菌多克隆抗体。

4. 如权利要求 3 所述的盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,其特征包括上述采用直接 ELISA 法测定抗体效价具体如下:

1) 将盐单胞菌 O 抗原用 CBS 稀释至  $10^8$ cfu/mL,  $100\ \mu\text{L}$ /孔加入酶标孔中,置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱内过夜,次日取出酶标板,将孵育后的酶标板中的液体扣掉,每孔加入 PBST 洗涤液  $300\ \mu\text{L}$ ,洗涤 3min,甩去洗涤液,在吸水纸上拍干,重复此洗涤过程 3 次;以下洗涤方法相同;

2) 加封闭缓冲液  $200\ \mu\text{L}$ /孔封闭酶标板,  $37^\circ\text{C}$  孵育 60min;

- 3) 将封闭缓冲液扣掉,洗涤 3 次;
- 4) 将抗血清稀释液、阴性血清、阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 60min 后洗涤 3 次;
- 5) 每孔加入 100  $\mu$ L 1:3000 稀释的酶标羊抗兔 IgG-HRP,37 $^{\circ}$ C 孵育 60min 后洗涤 3 次;
- 6) 加入 100  $\mu$ L TMB 显色液 (A 液 :B 液的混合比例为 1:1),暗处静置显色反应 20min 后每孔加入 50  $\mu$ L 2M 浓硫酸终止反应,用酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ );以 P/N 值 (阳性血清  $OD_{450}$ 值 - 空白对照  $OD_{450}$  / 阴性血清  $OD_{450}$  - 空白对照  $OD_{450}$ ) 大于 2.1 对应的最大的抗血清稀释度为抗血清效价。

## 一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种盐单胞菌含量的检测方法,更具体的说是一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,属于免疫检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 在应用益生菌改善水质的过程中,为了判断不同浓度有益菌对水质改善的情况,以及了解益生菌在水体中数量的变动情况,常常需要对其定量检测。因而建立准确的定量检测技术非常必要。

[0003] 盐单胞菌(Halomonas)对温度、盐度和氧气的适应范围广,具有很强的适应能力,在水产养殖水体净化、污水处理与生物修复方面具有重要的应用价值。目前盐单胞菌的检测主要通过传统的检测技术,如平板计数法、显微镜直接计数法,其缺点是随机性大、耗时长,费时又费力,难以用于大量的样品检测。

### 发明内容

[0004] 本发明目的是提供一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,以克服现有技术的不足。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 1) 抗原的制备:首先将盐单胞菌接至 2216E 液体培养基作增殖培养;然后将所述的盐单胞菌制备成菌体 O 抗原;

[0007] 2) 盐单胞菌多克隆抗体的制备:

[0008] 以盐单胞菌 O 抗原为免疫抗原,免疫新西兰大白兔并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得盐单胞菌多克隆抗体,该抗体可与盐单胞菌特异性结合;

[0009] 3) 间接 ELISA 操作方法

[0010] 利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体工作浓度进行筛选,选择包被抗原浓度为  $10^7$  cfu/mL,多克隆抗体稀释度为 1:500,酶标二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(RAM-HRP))稀释度为 1:1000;优化抗原抗体最佳反应时间和二抗最佳反应时间分别为 30min、60min。

[0011] 3.1) 以碳酸盐(CBS)缓冲液稀释步骤 1 得到的抗原至  $10^7$  cfu/mL,将稀释后的包被抗原加入酶标板中,每孔 100  $\mu$ L,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜;将孵育过夜后的酶标板甩干液体,然后每孔加入 300  $\mu$ L 洗涤液洗涤 3 次后,加入封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

[0012] 3.2) 用抗体稀释液以 1:500 的比例稀释步骤 2 得到的多克隆抗体,再加入到上述酶标板中,每孔 100  $\mu$ L;37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后以 PBST 洗涤 3 次;

[0013] 3.3) 以 PBST 1:1000 的比例稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP,然后加入到上述酶标板中,每孔 100  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 60min 后以 PBST 洗涤 3 次;

[0014] 3.4) 将四甲基联苯胺显色液 A 液和 B 液 1:1 混合后加入到上述酶标板中,每孔

100  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 显色 20min; 将 2M 硫酸溶液加入到上述酶标板中终止反应, 每孔 50  $\mu$  L; 用酶标仪在 450nm 波长下测吸光值  $OD_{450}$ , 得到盐单胞菌标准品溶液的标准曲线, 以及待测样品的吸光值, 将所得的待测样品的吸光值与所做标准曲线对比可计算出待测样品的盐单胞菌含量。

[0015] 上述步骤 1) 盐单胞菌 O 抗原的制备具体如下: 将盐单胞菌接种于 2216E 液体培养基, 放入摇床 (25 $^{\circ}$ C, 200r/min) 活化增菌培养, 24h 后, 离心 (8000r/min, 15min) 收集菌体, 将沉淀悬浮于 0.5% 石碳酸生理盐水, 再加入等量的无水酒精混合, 放入冰箱过夜后用生理盐水稀释至  $10^8$ cfu/mL, 放入 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 备用, 即得到盐单胞菌 O 抗原。

[0016] 上述步骤 2) 盐单胞菌多克隆抗体的制备具体如下: 选取 6 个月以上, 体重在 2-3kg 的雄性新西兰大白兔作为实验动物, 实验前暂养一周; 将用生理盐水稀释至  $10^8$ cfu/mL 的盐单胞菌 O 抗原作为免疫原, 然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化; 初次免疫将乳化好的抗原溶液于兔子背部皮下多点注射, 每只注射 1.2mL, 两周后进行第一次加强免疫, 用不完全弗氏佐剂乳化, 注射部位和剂量与初次免疫相同, 一周后进行第二次加强免疫, 注射 0.3mL 稀释后的抗原溶液进行免疫, 免疫部位为耳静脉, 一周后进行最后一次加强免疫, 操作与第二次加强免疫相同, 从耳缘静脉采血, 采用间接 ELISA 法测定抗体效价, 确定抗体效价可用后采用耳动脉取血获得抗血清, 收集于灭菌离心管中; 将此抗血清高速离心并过滤纯化后于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 即得到盐单胞菌多克隆抗体。

[0017] 上述采用直接 ELISA 法测定抗体效价具体如下:

[0018] 1) 将盐单胞菌 O 抗原用 CBS 稀释至  $10^8$ cfu/mL, 100  $\mu$  L/ 孔加入酶标孔中, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜, 次日取出酶标板, 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 每孔加入 PBST 洗涤液 300  $\mu$  L, 洗涤 3min, 甩去洗涤液, 在吸水纸上拍干, 重复此洗涤过程 3 次; 以下洗涤方法相同;

[0019] 2) 加封闭缓冲液 200  $\mu$  L/ 孔封闭酶标板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min;

[0020] 3) 将封闭缓冲液扣掉, 洗涤 3 次;

[0021] 4) 将抗血清稀释液、阴性血清、阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔, 100  $\mu$  L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min 后洗涤 3 次;

[0022] 5) 每孔加入 100  $\mu$  L 1:3000 稀释的酶标羊抗兔 IgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min 后洗涤 3 次;

[0023] 6) 加入 100  $\mu$  L TMB 显色液 (A 液 :B 液的混合比例为 1:1), 暗处静置显色反应 20min 后每孔加入 50  $\mu$  L 2M 浓硫酸终止反应, 用酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ ); 以 P/N 值 (阳性血清  $OD_{450}$  值 - 空白对照  $OD_{450}$  / 阴性血清  $OD_{450}$  - 空白对照  $OD_{450}$ ) 大于 2.1 对应的最大的抗血清稀释度为抗血清效价。

[0024] 所需的试剂为:

[0025] 1) 配制 0.01M 磷酸盐 (PBS) 缓冲液 (pH = 7.4)

[0026]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.62g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2g
$\text{NaCl}$	0.2g
$\text{KCl}$	8.0g

[0027] 加超纯水定容至 1000mL ;

[0028] 2) 配制 0.05M 碳酸盐 (CBS) 缓冲液 (pH = 9.6)

[0029]  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g

[0030]  $\text{NaHCO}_3$  2.93g

[0031] 加超纯水定容至 1000mL

[0032] 3) 配制 PBST 洗涤液 : 含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液 ;

[0033] 4) 配制封闭液 : 含 0.5% 脱脂奶粉的 PBS 溶液 ;

[0034] 5) 配制抗体稀释液 : 含 1% 脱脂奶粉的 PBS 溶液 ;

[0035] 6) 四甲基联苯胺显色液购自北京翰谱医药生物研究所 ;

[0036] A 液为过氧化脲, B 液为四甲基联苯胺 (TMB), 使用前将 A 液和 B 液等体积混合 ;

[0037] 7) 终止液 : 2M 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 。

[0038] 发明优点

[0039] 本发明涉及的盐单胞菌菌株具有很强的亚硝酸盐降解能力 ; 在改善养殖水体水质方面具有潜在的应用价值 ; 因此本发明建立的盐单胞菌株定量检测技术可为单位水体盐单胞菌株的数量在改善水质的应用效果进行准确评估, 从而为优化该益生菌的应用方案提供必要的检测手段。本发明建立的盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法, 其操作流程简便, 易于操作, 检测灵敏度能够达到  $10^5$  cfu/mL, 该检测方法与溶藻弧菌、假交替单胞菌、鞘氨醇单胞菌及海杆菌的交叉反应均呈阴性, 是一种快速、高效、灵敏性高、特异性强的检测方法。本研究可以为养殖水体中盐单胞菌的定量检测提供快速准确的检测方法, 为该有益菌在水产上的应用起到推动作用, 具有一定的实际应用意义。

## 附图说明

[0040] 图 1 盐单胞菌抗血清效价的测定。

[0041] 图 2 盐单胞菌的检测的标准曲线。

## 具体实施方式

[0042] 以下通过实施例进一步说明本发明

[0043] 一、实验动物 :

[0044] 5 只健壮雄性家兔 (6 个月以上, 体重在 2-3kg, 饲喂颗粒混合饲料, 温度 16-28°C, 暂养一周)

[0045] 二、主要仪器 :

[0046] R015 型纯水机, 上海力申科学仪器有限公司

[0047] Neofuge 15R 型台式离心机, 上海力申科学仪器有限公司

[0048] TS-1 型摇床, 江苏海门市麒麟医用仪器厂

[0049] SPECTRA MAX 190 型酶标仪, Molecular Devices 公司

[0050] 可调式移液器, Effendorf 公司

[0051] 三、试剂

[0052] 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP, 北京翰谱医药生物研究所

[0053] 四苯基联苯氨 (TMB) 显色液, 北京翰谱医药生物研究所

[0054] 其他试剂均为分析纯试剂

[0055] 四、步骤:

[0056] 1、盐单胞菌 O 抗原的制备: 将盐单胞菌接种于 2216E 液体培养基, 放入摇床 (25°C, 200r/min) 活化增菌培养, 24h 后, 离心 (8000r/min, 15min) 收集菌体, 将沉淀悬浮于 0.5% 石碳酸生理盐水, 再加入等量的无水酒精混合, 放入冰箱过夜后用生理盐水稀释至  $10^8$ cfu/mL, 放入 4°C 或 -20°C 备用。

[0057] 2、盐单胞菌多克隆抗体的制备: 选取 6 个月以上, 体重在 2-3kg 的雄性新西兰大白兔作为实验动物, 实验前暂养一周。将用生理盐水稀释至  $10^8$ cfu/mL 的盐单胞菌 O 抗原作为免疫原, 然后与等量的弗氏佐剂混合用搅拌法使其乳化。初次免疫将乳化好的抗原溶液于兔子背部皮下多点注射, 每只注射 1.2mL。两周后进行第一次加强免疫, 用不完全弗氏佐剂乳化, 注射部位和剂量与初次免疫相同。一周后进行第二次加强免疫, 注射 0.3mL 稀释后的抗原溶液进行免疫, 免疫部位为耳静脉。一周后进行最后一次加强免疫, 操作与第二次加强免疫相同。从耳缘静脉采血, 采用直接 ELISA 法测定抗体效价, 确定抗体效价可用后采用耳动脉取血获得抗血清, 收集于灭菌离心管中。将此抗血清高速离心并过滤纯化后于 -20°C 保存。

[0058] 3、抗体效价的测定步骤:

[0059] 1) 将盐单胞菌 O 抗原用 CBS 稀释至  $10^8$ cfu/mL, 100  $\mu$ L/孔加入酶标孔中, 置于 4°C 冰箱内过夜。次日取出酶标板, 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 每孔加入 PBST 洗涤液 300  $\mu$ L, 洗涤 3min, 甩去洗涤液, 在吸水纸上拍干, 重复此洗涤过程 3 次; 以下洗涤方法相同;

[0060] 2) 加封闭缓冲液 200  $\mu$ L/孔封闭酶标板, 37°C 孵育 60min;

[0061] 3) 将封闭缓冲液扣掉, 洗涤 3 次;

[0062] 4) 将抗体稀释液、阴性血清、阳性血清稀释成系列浓度加入酶标孔, 100  $\mu$ L/孔, 37°C 孵育 60min 后洗涤 3 次;

[0063] 5) 每孔加入 100  $\mu$ L 1:3000 稀释的酶标羊抗兔 IgG-HRP, 37°C 孵育 60min 后洗涤 3 次;

[0064] 6) 加入 100  $\mu$ L TMB 显色液 (A 液:B 液的混合比例为 1:1), 暗处静置显色反应 20min 后每孔加入 50  $\mu$ L 2M 浓硫酸终止反应, 用酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ ), 反应曲线如图 1; 以 P/N 值 (阳性血清  $OD_{450}$  值 - 空白对照  $OD_{450}$  / 阴性血清  $OD_{450}$  - 空白对照  $OD_{450}$ ) 大于 2.1 对应的最大的抗血清稀释度为抗血清效价, 本发明中制备的抗血清效价为 1:32000, 满足实验要求。

[0065] 4、抗原最适包被浓度和抗血清最佳稀释比的确定

[0066] 1) 利用棋盘滴定法对包被抗原和抗体工作浓度进行筛选。

[0067] 2) 包被: 将盐单胞菌 O 抗原用 CBS 倍比稀释为  $10^8$ cfu/mL、 $10^7$ cfu/mL、 $10^6$ cfu/mL、

$10^5$ cfu/mL, 100  $\mu$ L/ 孔加入酶标孔中, 置于 4℃冰箱内孵育过夜;

[0068] 3) 洗板: 将酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0069] 4) 封闭: 加入封闭缓冲液, 200  $\mu$ L/ 孔, 37℃封闭 60min;

[0070] 5) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0071] 6) 加抗体: 分别加入 100  $\mu$ L 抗体稀释液、阴性血清至酶标板, 以抗体稀释液按不同稀释度 1:50、1:500、1:1000、1:5000、1:10000 稀释阳性血清, 分别加入酶标板, 每孔 100  $\mu$ L, 充分混匀后 37℃孵育 60min;

[0072] 7) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0073] 8) 加二抗: 加入 HRP 标记的二抗 100  $\mu$ L/ 孔, 37℃孵育 60min;

[0074] 9) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0075] 10) 显色: 加入 TMB 显色液 100  $\mu$ L/ 孔, 避光静置显色反应 20min, 然后加入 2M 的浓硫酸 50  $\mu$ L/ 孔终止反应;

[0076] 11) 测定: 酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ ), 结果见表 1。当  $OD_{450}$  值在 1.0 左右时, 抗血清稀释比为 1:500, 抗原的最佳浓度为  $10^7$ cfu/mL。

[0077] 表 1 抗原最适包被浓度和抗血清最佳稀释比的确定

[0078]

抗血清稀释度	不同抗原浓度 (cfu/mL) 的 $OD_{450}$			
	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$
1:50	1.3448	1.219	0.4502	0.1553
1:500	0.7073	0.9022	0.2585	0.119
1:1000	0.5037	0.5449	0.2086	0.1179
1:5000	0.2382	0.265	0.1381	0.1033
1:10000	0.1821	0.2019	0.1206	0.1011
阴性对照	0.0842	0.1109	0.0981	0.0937
空白	0.0771	0.1061	0.0958	0.0926

[0079]

[0080] 5、酶标二抗最佳稀释度的确定

[0081] 1) 选择包被抗原浓度为  $10^7$ cfu/mL, 多克隆抗体稀释度为 1:500。

[0082] 2) 包被: 将盐单胞菌 O 抗原用 CBS 稀释至  $10^7$ cfu/mL, 100  $\mu$ L/ 孔加入酶标孔中,

置于 4℃ 冰箱内孵育过夜；

[0083] 3) 洗板：将酶标板中的液体扣掉，洗涤 3 次；

[0084] 4) 封闭：加入封闭缓冲液，200 μL/孔，37℃ 封闭 60min；

[0085] 5) 洗板：将孵育后的酶标板中的液体扣掉，洗涤 3 次；

[0086] 6) 加抗体：加入 100 μL 抗体稀释液、阴性血清、抗体稀释液以 1:500 比例稀释的阳性血清至酶标板，充分混匀后，分别在 37℃ 孵育 60min；

[0087] 7) 洗板：将孵育后的酶标板中的液体扣掉，洗涤 3 次；

[0088] 8) 加二抗：加入不同稀释度 1:1000、1:3000、1:6000、1:10000、1:20000 的 HRP 标记的二抗 100 μL/孔，37℃ 孵育 60min；

[0089] 9) 洗板：将孵育后的酶标板中的液体扣掉，洗涤 3 次；

[0090] 10) 显色：加入 TMB 显色液 100 μL/孔，避光静置显色反应 20min，然后加入 2M 的浓硫酸 50 μL/孔终止反应；

[0091] 11) 测定：酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ )，结果见表 2。在本发明中， $OD_{450}$  值在 1.0 左右，且 P/N 值最大的二抗稀释度为 1:1000，故本发明采用稀释度为 1:1000 的二抗。

[0092] 表 2 酶标二抗最佳稀释度的确定

[0093]

二抗稀释倍数	OD <sub>450</sub> 值			P/N
	阳性血清	阴性对照	空白	
1:1000	1.1949	0.1077	0.0977	109.72
1:3000	0.4680	0.0942	0.0840	37.64
1:6000	0.2678	0.0773	0.0636	14.94
1:10000	0.2619	0.0810	0.0642	11.77
1:20000	0.1416	0.0824	0.0614	3.82

[0094] 6、抗原抗体最适反应时间

[0095] 1) 选择包被抗原浓度为  $10^7$  cfu/mL，多克隆抗体稀释度为 1:500，酶标二抗稀释度为 1:1000。

[0096] 2) 包被：将 4 块酶标板包被抗原即用 CBS 稀释至  $10^7$  cfu/mL 的盐单胞菌 O 抗原，100 μL/孔加入酶标孔中，置于 4℃ 冰箱内孵育过夜；

[0097] 3) 洗板：将酶标板中的液体扣掉，每孔加入 PBST 洗涤液 200 μL，洗涤 3 次；

[0098] 4) 封闭：加入封闭缓冲液，200 μL/孔，37℃ 封闭 60min；

[0099] 5) 洗板：将孵育后的酶标板中的液体扣掉，洗涤 3 次；

[0100] 6) 加抗体：加入 100 μL 抗体稀释液、阴性血清、抗体稀释液以 1:500 比例稀释的阳性血清至酶标板，充分混匀后，分别在 37℃ 孵育 15min、30min、60min、90min；

- [0101] 7) 洗板 :将孵育后的酶标板中的液体扣掉,洗涤 3 次 ;
- [0102] 8) 加二抗 :加入以 1:1000 比例稀释的 HRP 标记二抗 100  $\mu$  L/ 孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 60min ;
- [0103] 9) 洗板 :将孵育后的酶标板中的液体扣掉,洗涤 3 次 ;
- [0104] 10) 显色 :加入 TMB 显色液 100  $\mu$  L/ 孔,避光静置显色反应 20min,然后加入 2M 的浓硫酸 50  $\mu$  L/ 孔终止反应 ;
- [0105] 11) 测定 :酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ ),结果见表 3。在本发明中,加入抗体孵育 30min 的  $OD_{450}$  值在 1.0 左右,故本发明采用 37 $^{\circ}$ C,30min 作为抗原抗体最适反应时间。
- [0106] 表 3 抗原抗体最适反应时间的测定
- [0107]

OD <sub>450</sub> 值	抗原抗体反应时间			
	15min	30min	60min	90min
阳性血清	1.2013	1.0658	0.8269	0.7890
阴性血清	0.1081	0.1073	0.2579	0.1034
空白	0.1009	0.0961	0.2436	0.0992

- [0108] 7、二抗最适反应时间
- [0109] 1) 选择包被抗原浓度为  $10^7$  cfu/mL,多克隆抗体稀释度为 1:500,酶标二抗稀释度为 1:1000,抗原抗体最适反应时间 30min。
- [0110] 2) 包被 :将 4 块酶标板包被抗原即用 CBS 稀释至  $10^7$  cfu/mL 的盐单胞菌 O 抗原,100  $\mu$  L/ 孔加入酶标孔中,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜 ;
- [0111] 3) 洗板 :将酶标板中的液体扣掉,洗涤 3 次 ;
- [0112] 4) 封闭 :加入封闭缓冲液,200  $\mu$  L/ 孔,37 $^{\circ}$ C 封闭 60min ;
- [0113] 5) 洗板 :将孵育后的酶标板中的液体扣掉,洗涤 3 次 ;
- [0114] 6) 加抗体 :分别加入 100  $\mu$  L 抗体稀释液、阴性血清、抗体稀释液以 1:500 比例稀释的阳性血清至酶标板,充分混匀后,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min ;
- [0115] 7) 洗板 :将孵育后的酶标板中的液体扣掉,洗涤 3 次 ;
- [0116] 8) 加二抗 :加入以 1:1000 比例稀释的 HRP 标记二抗 100  $\mu$  L/ 孔,分别在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min、30min、60min、90min ;
- [0117] 9) 洗板 :即将孵育后的酶标板中的液体扣掉,洗涤 3 次 ;
- [0118] 10) 显色 :加入 TMB 显色液 100  $\mu$  L/ 孔,避光静置显色反应 20min,然后加入 2M 的浓硫酸 50  $\mu$  L/ 孔终止反应 ;
- [0119] 11) 测定 :酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ ),结果见表 4。在本发明中,加入抗体孵育 60min 的  $OD_{450}$  值在 1.0 左右,故本发明采用 37 $^{\circ}$ C,60min 作为二抗最适反应时间。
- [0120] 表 4 二抗最适反应时间的测定
- [0121]

OD <sub>450</sub> 值	二抗反应时间			
	15min	30min	60min	90min
阳性血清	0.5845	0.6767	0.9772	0.8959
阴性血清	0.1439	0.1306	0.1327	0.1494
空白	0.1251	0.1326	0.1280	0.1463

[0122] 8、间接 ELISA 反应过程

[0123] 1) 选择包被抗原浓度为  $10^7$ cfu/mL, 多克隆抗体稀释度为 1:500, 酶标二抗稀释度为 1:1000, 抗原抗体最适反应时间 30min, 二抗最适反应时间 60min。

[0124] 2) 包被: 将盐单胞菌 O 抗原用 CBS 稀释至  $10^7$ cfu/mL, 100  $\mu$ L/ 孔加入酶标孔中, 置于 4℃ 冰箱内孵育过夜;

[0125] 3) 洗板: 将酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0126] 4) 封闭: 加入封闭缓冲液, 200  $\mu$ L/ 孔, 37℃ 封闭 60min;

[0127] 5) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0128] 6) 加抗体: 分别加入 100  $\mu$ L 抗体稀释液、阴性血清、抗体稀释液以 1:500 比例稀释的阳性血清至酶标板, 充分混匀后 37℃ 孵育 30min;

[0129] 7) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0130] 8) 加二抗: 加入以 1:1000 比例稀释的 HRP 标记二抗 100  $\mu$ L/ 孔, 37℃ 孵育 60min;

[0131] 9) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0132] 10) 显色: 加入 TMB 显色液 100  $\mu$ L/ 孔, 避光静置显色反应 20min, 然后加入 2M 的浓硫酸 50  $\mu$ L/ 孔终止反应;

[0133] 11) 测定: 酶标仪测定 450nm 的吸光值 (OD<sub>450</sub>)。根据标准品 OD<sub>450</sub> 和标准品浓度制作标准曲线 (见图 2, 图中 1-9 分别表示  $10^9$ cfu/mL、 $10^8$ cfu/mL、 $10^7$ cfu/mL、 $10^6$ cfu/mL、 $10^5$ cfu/mL、 $10^4$ cfu/mL、 $10^3$ cfu/mL、 $10^2$ cfu/mL、10cfu/mL), 以标准曲线对待测样品进行定量分析。标准曲线见图 2。从图 2 可见本实验所获得的抗体的线性检测范围为  $10^5$ - $10^8$ cfu/mL。

[0134] 9、交叉反应过程

[0135] 1) 选择包被抗原浓度为  $10^7$ cfu/mL, 多克隆抗体稀释度为 1:500, 酶标二抗稀释度为 1:1000, 抗原抗体最适反应时间 30min, 二抗最适反应时间 60min。

[0136] 2) 包被: 将盐单胞菌、溶藻弧菌、假交替单胞菌、鞘氨醇单胞菌、海杆菌的 O 抗原用 CBS 稀释至  $10^7$ cfu/mL, 100  $\mu$ L/ 孔加入酶标孔中, 置于 4℃ 冰箱内孵育过夜;

[0137] 3) 洗板: 将酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0138] 4) 封闭: 加入封闭缓冲液, 200  $\mu$ L/ 孔, 37℃ 封闭 60min;

[0139] 5) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0140] 6) 加抗体: 分别加入 100  $\mu$ L 抗体稀释液、阴性血清、抗体稀释液以 1:500 比例稀释的阳性血清至酶标板, 充分混匀后 37℃ 孵育 30min;

[0141] 7) 洗板: 将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0142] 8) 加二抗:加入以 1:1000 比例稀释的 HRP 标记二抗 100  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min;

[0143] 9) 洗板:将孵育后的酶标板中的液体扣掉, 洗涤 3 次;

[0144] 10) 显色:加入 TMB 显色液 100  $\mu$ L/孔, 避光静置显色反应 20min, 然后加入 2M 的浓硫酸 50  $\mu$ L/孔终止反应;

[0145] 11) 测定:酶标仪测定 450nm 的吸光值 ( $OD_{450}$ )。结果见表 5。本发明建立的盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法与溶藻弧菌、假交替单胞菌、鞘氨醇单胞菌及海杆菌的交叉反应均不显著, 结果表明该间接酶联免疫检测方法有较高的特异性。

[0146] 表 5 免疫血清交叉实验测定

[0147]

不同菌种	$OD_{450}$
盐单胞菌	1.6815
溶藻弧菌	0.126
假交替单胞菌	0.0829
鞘氨醇单胞菌	0.1396
海杆菌	0.0924

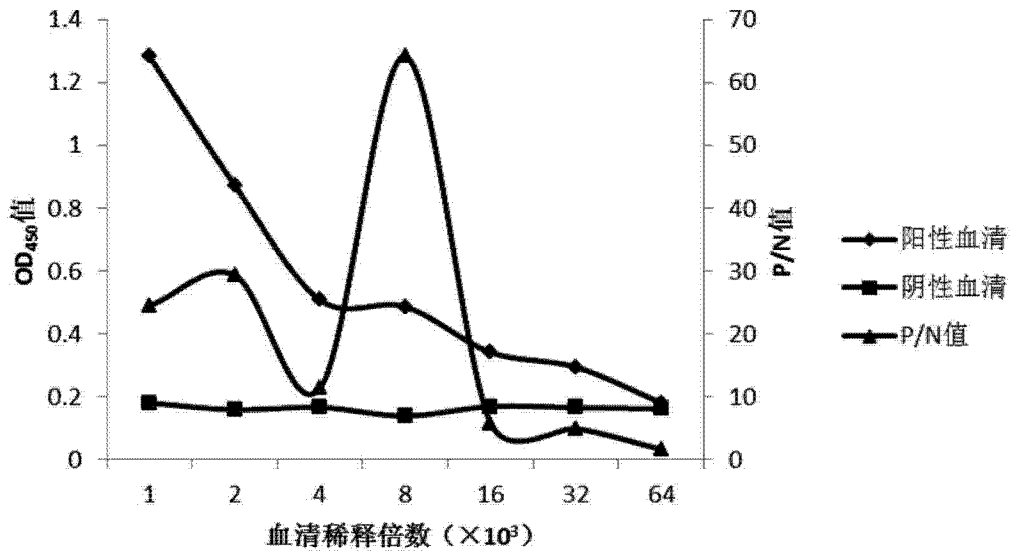


图 1

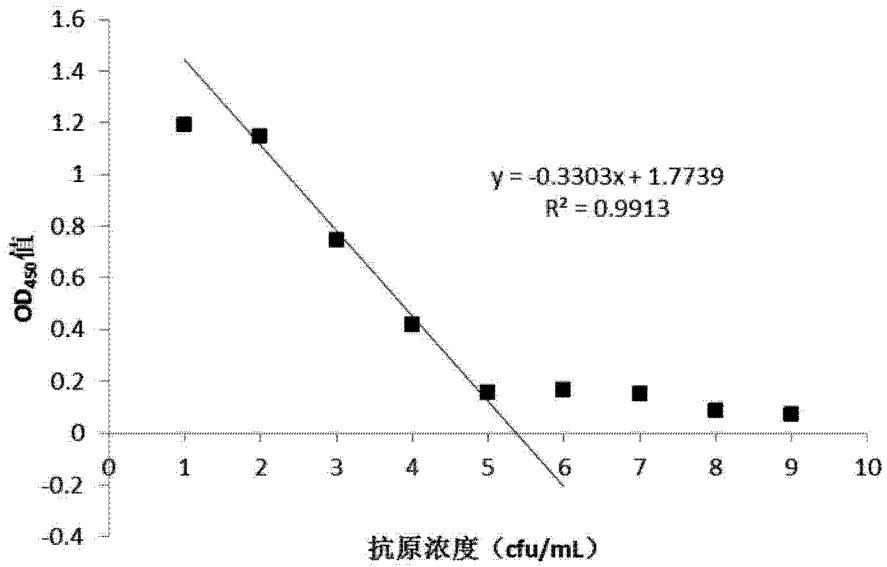


图 2

专利名称(译)	一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104655842A</a>	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201510063433.6	申请日	2015-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	李贇 苏真真 潘鲁青		
发明人	李贇 苏真真 潘鲁青		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56911		
代理人(译)	张中南 邱岳		
其他公开文献	CN104655842B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,包括1)盐单胞菌O抗原的制备;2)盐单胞菌多克隆抗体的制备:以盐单胞菌O抗原为免疫抗原,免疫新西兰大白兔并利用现有的多克隆抗体制备与纯化技术获得盐单胞菌多克隆抗体;3)间接ELISA操作方法:将抗原包被酶标板,4°C过夜;洗板,加封闭液;洗板,加抗体;洗板,加二抗;洗板,进行显色反应;用酶标仪测定450nm波长下的吸光值即OD<sub>450</sub>。本发明建立了一种盐单胞菌菌株的间接酶联免疫定量检测方法,其操作流程简便,易于操作,检测灵敏度能够达到105cfu/mL,抗血清与其他细菌无交叉反应,是一种快速、高效、灵敏性高、特异性强的检测方法为有益菌在水产上的应用起到推动作用,具有一定的实际应用意义。

