

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710043644.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007年12月5日

[11] 公开号 CN 101082624A

[22] 申请日 2007.7.10

[21] 申请号 200710043644.9

[71] 申请人 杨捷琳

地址 200135 上海市浦东新区民生路1208号  
2-812室

[72] 发明人 杨捷琳 顾鸣 黄应峰

[74] 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

代理人 翁若莹

权利要求书1页 说明书13页 附图1页

## [54] 发明名称

检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试方法及其中所用的抗体

## [57] 摘要

本发明涉及检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试(ELISA)的方法,其中运用抗阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体,其中所述 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列如Seq ID No: 2所示。另外,本发明还涉及ELISA方法中所用的抗体和制备该抗体所需的阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶及其编码核酸、载体等。上述抗体的ELISA应用以及包括了上述抗体的试剂盒。本发明的检测方法不但能够快速、高效地检测出阪崎肠杆菌,而且检测的灵敏度高、特异性强、结果可靠。

- 1、检测阪崎肠杆菌的方法，其特征在于，运用抗阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体进行酶联免疫吸附测试检测，其中所述 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列如 Seq ID No:2 所示。
- 2、权利要求 1 所述的方法，其中所述抗阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体是单克隆抗体，优选其是由杂交瘤细胞 CGMCC2084 产生的单克隆抗体。
- 3、一种阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶，其氨基酸序列如 Seq ID No:2 所示。
- 4、编码权利要求 3 的阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的核酸，优选所述核酸的核苷酸序列如 Seq ID No:1 所示。
- 5、一种载体，其含有权利要求 4 的核酸。
- 6、抗权利要求 3 的阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体。
- 7、权利要求 6 所述的抗体，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体，优选其是由杂交瘤细胞 CGMCC2084 产生的单克隆抗体。
- 8、权利要求 6 或 7 的抗体在制备检测阪崎肠杆菌的 ELISA 试剂盒中的用途。
- 9、一种检测阪崎肠杆菌的 ELISA 试剂盒，其包括装有权利要求 6 或 7 的抗体的容器。
- 10、杂交瘤细胞，其保藏号为 CGMCC2084，于 2007 年 6 月 13 日保藏于中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）。

## 检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试方法及其中所用的抗体

### 技术领域

本发明涉及检测细菌的酶联免疫吸附测试 (ELISA) 技术, 具体而言, 涉及了检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试方法。另外, 本发明还涉及 ELISA 方法中所用的抗体和制备该抗体所需的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶及其编码核酸、载体等。

### 背景技术

阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 是肠杆菌属的一种革兰氏阴性菌, 1980 年前被称为“黄色阴沟肠杆菌”。作为奶及奶制品加工过程及成品中的污染源, 阪崎肠杆菌能够引起的婴幼儿及成人疾病包括婴儿脑膜炎、脓血症、败血症和小肠结肠炎等, 并且可能引起神经功能紊乱, 造成严重的后遗症和死亡。例如, 1961 年到 2003 年报道的 76 个病例中 19 例死亡, 死亡率高达 50% 以上; 而 2002-2003 年美国某知名奶粉生产厂曾自发召回了含有阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉。FAO / WHO 于 2004 年 2 月 2~5 日在日内瓦召开的专家咨询会上将阪崎肠杆菌列入作为导致婴幼儿感染、疾病和死亡的主要原因的“A”类微生物范畴, 它严重威胁人们 (尤其是婴幼儿) 的健康, 并给食品 (尤其是奶及奶制品) 工业带来了重大经济损失。

为此, 各国对食品中的阪崎肠杆菌都有着严格的要求。美国 FDA 2002 年建立了阪崎肠杆菌的检测标准; 而我国自 2005 年 10 月起也对大部分进口的奶及奶制品都要求进行阪崎肠杆菌的检查, 并要求不得检出。因此, 阪崎肠杆菌的检测方法正日益引起人们的关注。

除了经典的常规细菌生理生化检验方法, 在美国专利申请 US2007/26482A、US2006/257967A 以及本发明人参与的工作 (参见: 食品科学, 2006, 27 (02): 208-212) 中, 分别公开了添加有 4-甲基伞形基- $\alpha$ -葡萄糖苷 (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -glucoside)、API20E 肠杆菌检测试剂等的细菌培养基, 用于菌落培养来检测阪崎肠杆菌。但是, 这种方法需要等待长时间的细菌生

长阶段，而且容易受具有相似生理生化性质的杂菌干扰。

除了已经建立的 SN 标准方法，在基因水平上对阪崎肠杆菌的改进检测方法也有报道，如中国专利申请 CN1664112A 和中国专利 CN1281763C、CN1280429C 等。它们主要利用了阪崎肠杆菌的 16S 和 23S rRNA 的编码基因序列，通过核酸探针杂交、PCR（如，荧光定量 PCR）等方式来进行检测。但是，检测基因的方法无法区分死细菌和活细菌，而且这类方法对杂交条件和扩增条件相当敏感，容易产生操作的轻微失误而导致较高的假阳性、假阴性结果。

针对现有技术的不足，本发明人开创性地提出了一种运用阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体进行酶联免疫吸附测试来检测阪崎肠杆菌的方法，其中开创性地应用了抗具有如 Seq ID No:2 所示氨基酸序列的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体，不但能够快速、高效地检测出阪崎肠杆菌，而且检测的灵敏度高、特异性强、结果可靠。另外，本发明人还得到了 ELISA 检测阪崎肠杆菌过程中所需的关键抗体以及制备该抗体所需的基因、蛋白质（酶）等。尽管该基因与 A. Lehner 等公开的序列（参见：Systematic and Applied Microbiology, 29:609-625 和 EMBL 核酸数据库中的 AM075208）相似，但是 A. Lehner 等的工作是为了研究阪崎肠杆菌代谢途径的，没有提示用其制备抗体用于 ELISA 检测中。

## 发明内容

本发明的目的在于提供酶联免疫吸附测试（ELISA）检测阪崎肠杆菌的方法，其不但能够快速、高效地检测出阪崎肠杆菌，而且检测的灵敏度高、特异性强、结果可靠。

本发明的目的之二还在于提供 ELISA 中关键的抗体和制备该抗体所需的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶及其编码核酸、载体等。

本发明的目的之三还有上述抗体的 ELISA 应用以及包括了上述抗体的试剂盒。

具体而言，在第一个方面，本发明提供了检测阪崎肠杆菌的方法，其特征在于，运用抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体进行酶联免疫吸附测试（ELISA）检测，其中所述  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列如 Seq ID No:2 所示。

在本文中，酶联免疫吸附测试本身是常用的免疫检测方法，其通过抗原和相应抗体的特异结合产生抗原-抗体复合物，其中抗原或相应抗体被直接或间接地

标记有酶，然后再与酶底物反应，产生可检测（如颜色或 pH、紫外吸光值发生变化）的产物，通过对该产物的检测即可定性或定量分析抗原或相应抗体。本发明第一个方面中的 ELISA 可以是直接 ELISA 方法，例如，固定待测菌体抗原，加入抗具有如 Seq ID No:2 所示氨基酸序列的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体，而且所述抗体标记有酶，洗去未与菌体抗原特异结合的抗体，加入酶底物，然后进行检测。如果固定的菌体抗原与抗体形成了抗原-抗体复合物，抗体上标记的酶可以产生可检测的产物，检测该产物就能判断是否存在阪崎肠杆菌了。本发明第一个方面中的 ELISA 优选是间接 ELISA 方法，例如，固定待测菌体抗原，加入抗具有如 Seq ID No:2 所示氨基酸序列的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体，洗去未与菌体抗原特异结合的抗  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体，再加入酶标记的抗抗体(又称二抗)，洗去未与抗  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体特异结合的抗抗体，加入酶底物，然后进行检测。如果能检测到酶底物经标记的酶催化产生的产物，则表示存在阪崎肠杆菌。本发明第一个方面中的 ELISA 还可以是双抗体夹心 ELISA 方法、竞争 ELISA 方法，其中抗具有如 Seq ID No:2 所示氨基酸序列的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体可以作为包被在固相载体的固定的抗体而运用其中。另外，本发明第一个方面中的 ELISA 还有捕获法测 IgM 抗体、ABS-ELISA 法以及 PCR-ELISA 法和斑点免疫酶结合试验等检测方法。上述 ELISA 方法本身对所属领域技术人员来说是熟悉的，也可参见李玉珍等的综述（中国食品添加剂，2006，03：108-112），其中酶标记抗体的方法、相应的酶、酶底物也是所属领域技术人员所熟知的，例如可以通过戊二醛将抗体与酶交联在一起，酶的具体例子有碱性过氧化物酶、辣根过氧化物酶等，至于酶标记的抗抗体，有许多已经商品化了。

在本文中，抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。可利用常规方式制备多克隆抗体，即从接触了所选抗原的动物或人血清中得到。例如，通过用所选择的抗原用常规方法刺激所选择的动物或人的免疫系统，使免疫系统产生天然抗体，然后从动物或人血或其他生物液体中收集这些抗体来制备多克隆抗体。对于单克隆抗体，可利用常规的杂交瘤技术制备。G.Kohler 和 C.Milstein, Nature, 256: 495-497(1975)中记载了制备单克隆抗体的方法，目前也有许多公知的改良方法。另外，本领域的技术人员采用公知技术操作动物或人抗体的互补决定区，即可制备出嵌合或人源化的抗体，这也可用作本发明的抗体。目前有些抗体已经商品化了，本发明中也包括使用通过商业途径购买的抗体。在本发明的第一方面中，抗

阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体是能特异结合阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体，其中所述  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列如 Seq ID No:2 所示。该抗体优选是单克隆抗体，尤其优选是由杂交瘤细胞 CGMCC2084 产生的单克隆抗体。如果本发明的第一方面中的 ELISA 方法中使用了抗抗体，则抗抗体是能特异结合抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体的抗体，通常是特异结合抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体所属的动物物种的抗体。例如，如果抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体是鼠抗体，则抗抗体可以是兔抗鼠抗体或羊抗鼠抗体等。这样的抗抗体或酶标记的抗抗体已经有商品化的产品可供购买。

在第二个方面，本发明提供了一种阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶，其氨基酸序列如 Seq ID No:2 所示。在本文中，“阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶”指的是来自阪崎肠杆菌的具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的蛋白质。本发明第二个方面的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶可以作为抗原而用于制备本发明第一方面中的抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体。

在第三个方面，本发明提供了编码本发明第二个方面的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的核酸。在本文中，“多核苷酸”、“核酸”、“核酸分子”、“核苷酸序列”可以相互替换使用，均指一个含意。本发明的多核苷酸，可以是 DNA 形式，也可以是 RNA 形式，优选 DNA 形式。DNA 形式包括天然 cDNA 和人工合成的 cDNA，DNA 可以是编码链或模板链。通过常规技术，如 PCR 方法、重组法或人工合成的方法，本领域技术人员可以很容易获得本发明的编码融合蛋白的核苷酸序列或其片段。这些序列一旦获得，就可以将其克隆入载体，再转化或转染入相应的细胞，然后通过常规的宿主细胞进行增殖，从中分离得到大量的核苷酸序列。优选本发明的核酸分子的核苷酸序列如 SEQ ID No: 1 所示。

在第四个方面，本发明提供了一种载体，其含有本发明第三个方面的核酸。载体在本文中是指本领域中常用的细菌质粒、粘粒、噬菌粒、酵母质粒、植物细胞病毒、动物病毒及其它各种病毒载体。本发明中适用的载体包括但不限于：在细菌中表达用的载体（原核表达载体）、在酵母中表达用的载体（如毕赤酵母载体、汉逊酵母载体等）、在昆虫细胞中表达的杆状病毒载体、在哺乳动物细胞中表达用的载体（痘苗病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴病毒载体等）、在植物中表达用的植物病毒载体以及在哺乳动物乳腺中表达用的各种载体。总之，只要能在宿主细胞中稳定复制，任何质粒和载体都可使用。优选表达载体包含选择标记基因，如细菌的氨苄青霉素抗性基因、四环素抗性基因、卡那霉素抗

性基因、链霉素抗性基因、氯霉素抗性基因；酵母菌的新霉素抗性基因、Zeocin 抗性基因、酵母菌的缺陷选择标志，如 His、Leu、Trp 等；真核细胞的新霉素抗性基因、Zeocin 抗性基因、二氢叶酸还原酶基因及荧光蛋白标记基因等。本领域技术人员可利用 DNA 重组技术等一系列技术，构建含本发明所述编码融合蛋白的 DNA 序列、合适的转录和翻译调控序列、启动子及选择性标记基因等特定元件的表达载体。上述载体可用来转化、转染合适的宿主细胞，以便获得本发明第二个方面的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶。

在第五个方面，本发明提供了一种细胞，其含有本发明第四个方面的载体，或其经本发明第四个方面的载体转染或转化而得。细胞可以是原核细胞，也可以是真核细胞，如，细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞等。宿主细胞在转化或转染含本发明所述编码融合蛋白的基因序列后，即构成工程化细胞或细胞株，可用于生产所需融合蛋白，或将该能提供相应融合蛋白的细胞直接用于给药。本领域技术人员能够恰当地选择适当的载体、宿主细胞，并熟知如何将载体高效地转化或转染入宿主细胞中，所用方法包括但不限于：氯化钙法、电穿孔法用于细菌细胞，电穿孔法和原生质体融合法用于酵母细胞，脂质体包裹、磷酸钙共沉淀、电融合法以及显微注射法用于哺乳动物细胞等真核细胞。

在第六个方面，本发明提供了制备本发明第二个方面的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的方法，其包括以下步骤：用本发明第五个方面的宿主细胞表达出本发明第二个方面的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶，并分离所述阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶。获得的工程细胞可以通过常规方法培养、诱导来表达所需要的融合蛋白，包括发酵过程和纯化工艺。上述表达的蛋白可在细胞内、细胞膜上或分泌到细胞周质、细胞外。根据需要，可利用融合蛋白的物理的、化学的以及其它生物学特性，进行分离纯化。方法包括但不限于：裂菌（超声波裂菌、渗透压裂菌），离心，盐析，分子筛色谱，离子交换色谱，吸附色谱（亲和层析、金属螯合层析），反向色谱，高效液相色谱，毛细管电泳，制备性等电聚焦以及常规的变性、复性处理等，这些方法本身均是本领域技术人员所熟知的。

在第七个方面，本发明提供了抗本发明第二个方面的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体。抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体，优选是单克隆抗体，更优选是由杂交瘤细胞 CGMCC2084 产生的单克隆抗体，其具有特异性好、灵敏度高的优点。在已经获得抗原的情况下，可利用现有技术制备相应抗体。本发明第

七个方面的抗体可运用在本发明的第一方面的检测方法中。

在第八个方面，本发明提供了本发明第七个方面的抗体在制备检测阪崎肠杆菌的 ELISA 试剂盒中的用途。ELISA 试剂盒是一种常见的检测产品，其包括进行 ELISA 所需的试剂。例如，常见的间接 ELISA 试剂盒可以包括固定抗原或抗体的固相介质、与抗原特异结合的抗体、标记酶的抗抗体以及酶底物、洗涤液等。其中，为了避免在测试前就混合各种试剂，故而通常用不同的容器装不同的试剂，再将这些容器装于一个包装容器中，由此构成 ELISA 试剂盒。本发明第七个方面的抗体可以作为与抗原特异结合的抗体而包括在 ELISA 试剂盒中，成为检测阪崎肠杆菌的 ELISA 试剂盒的必要组成部分，继而可制备出检测阪崎肠杆菌的 ELISA 试剂盒，用于实施本发明第一个方面的方法。

在第九个方面，本发明提供了一种检测阪崎肠杆菌的 ELISA 试剂盒，其包括装有本发明第七个方面的抗体的容器。在本文中，容器可以是瓶、盒、注射器等能容纳抗体等试剂的常用容器。该 ELISA 试剂盒还可以包括装有进行 ELISA 所需的其它试剂的容器，例如，分别标记酶的抗抗体、酶底物、洗涤液等的容器。通常，ELISA 试剂盒还包括有说明书。说明书可以贴在试剂盒上，或者直接打印到试剂盒上，也可以以独立的形式存在，如作为单独的纸质说明书而装在试剂盒中。说明书可以指示检测阪崎肠杆菌的方法，如本发明第一方面的方法，其中可以包括使用试剂盒中试剂的次序、时间、量和方式等内容。根据需要，如方便运输、存放，多个 ELISA 试剂盒可以进一步包装进更大的包装中，这也在本发明的范围内。

在第十个方面，本发明提供了杂交瘤细胞，其保藏号为 CGMCC2084。该杂交瘤细胞提交中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC，中国科学院微生物研究所，北京）保藏，保藏号为 CGMCC2084，保藏日期为 2007 年 6 月 13 日。该杂交瘤细胞可用于生产本发明的抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体，所产生的抗体具有特异性好、灵敏度高的优点。因此在另一个方面，本发明提供了一种制备抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体的方法，其包括，用本发明第十个方面的杂交瘤细胞分泌出所述抗体并收集、纯化所述抗体。

为了便于理解，以下将通过具体的附图、实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是，这些描述仅仅是示例性的描述，并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述，本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都

是显而易见的。另外，本发明引用了公开文献，这些文献是为了更清楚地描述本发明，它们的全文内容均纳入本文进行参考。

#### 附图说明

图 1 是 SDS-PAGE 电泳图，显示了阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的在表达载体中的表达情况。其中，泳道 M 是分子量标记；泳道 0 是诱导前的表达情况；泳道 1 是诱导后的表达情况。

图 2 是用抗阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体的 ELISA 检测照片。图 2A 和图 2B 中的泳道 1 是阪崎肠杆菌，泳道 2 是肠炎沙门氏菌，泳道 3 是阴沟肠杆菌，泳道 4 是克雷伯氏菌，泳道 5 是大肠杆菌 ATCC 51813，泳道 6 是大肠杆菌 ATCC25922。

#### 具体实施方式

以下本文将通过具体的实施例来描述发明。如未特别指明之处，可根据本领域技术人员所熟悉的《分子克隆实验指南》（第三版）（科学出版社，北京，2002 年）、《细胞实验指南》（科学出版社，北京，2001 年）、《RNA 实验技术手册》（科学出版社，北京，2004 年）、《免疫检测技术》（科学出版社，北京，中国，1991 年）、《生物合成药物学》（化学工业出版社，北京，2000 年）等实验手册、教科书以及本文所列的参考文献和所用仪器、试剂的厂商说明书来实施。

#### 实施例 1 阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因的克隆

取阪崎肠杆菌 ATCC29544 菌株（可购自美国典型培养物保藏中心（ATCC））接种于 LB 肉汤，以 37°C200rpm 震荡培养过夜，收集菌体抽提基因组 DNA 作为 PCR 模板，以如下克隆引物对进行 PCR 扩增：5'AGGAGGGGTAATGAGTGAAG3'，5'TTGATACCTCACGACGTCAG3'。PCR 条件：94°C5 分钟，30 个循环（94°C30 秒，56°C90 秒，72°C60 秒），72°C5 分钟。

琼脂糖电泳回收约 1677bp 大小的 PCR 产物，然后以该 PCR 产物为模板，以如下表达引物对进行 PCR 扩增，分别引入 BamHI 和 XhoI 酶切位点：5'ACTGCggatccgATGAGTGAAGCACCGACGCAG3'，5'TCAGTGCcctcgagCGACGTCAGTTTATAAACC3'。用 BamHI 和 XhoI 分别酶切作为表达载体的 pET22b（+）质粒（可购自 Invitrogen 公司）和上述 PCR 产物，

用连接酶连接酶切产物，转化大肠杆菌 BL21(DE3)（可购自 Invitrogen 公司）。挑取阳性转化子克隆，抽取质粒，酶切鉴定正确后，委托上海生工公司测序，阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因序列如 Seq ID No:1 所示。

### 实施例 2 阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的表达与纯化

挑取经实施例 1 验证的转化子克隆，活化过夜，以 1% 接种于 LB 肉汤中，以 0.5mM/L 的比例加入 IPTG，37°C 诱导 3 小时，离心（8000 rpm，5 分钟），弃上清，收集菌体细胞，于 -20°C 冻存。用 40ml 结合缓冲液（含 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH 8.0）重悬细胞，超声波破碎细胞。然后，4°C 以 13000 rpm 离心 30 分钟，取上清液，上样于 SDS-PAGE 观察诱导表达情况。结果如图 1 所示，明显有约 65kD（即，阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的大小）的蛋白质表达了。

取 Ni-NTA 柱（可购自美国 PE 公司），用超过 10 倍柱体积的结合缓冲液（含 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH 8.0）平衡。将上述破碎细胞后得到的上清液上样于 Ni-NTA 柱，然后，用结合缓冲液洗柱至 OD280 值恒定不变，再分别用洗脱缓冲液 1（含 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 20mM 咪唑, pH 8.0）和洗脱缓冲液 2（含 20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 500mM 咪唑, pH 8.0）依次各洗脱 10 倍柱体积，同时用 OD280 检测，收集洗脱液。用 SDS-PAGE 检测洗脱液成分。在咪唑浓度为 20mM 时大量杂蛋白被洗脱；而在咪唑浓度为 500mM 时，约 65kD（即，阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的大小）的蛋白质被洗脱，由此得以纯化。将纯化的约 65kD 的蛋白质加入含 4-硝基苯基- $\alpha$ -D-呋喃型葡萄糖的阪崎肠杆菌显色培养基（购自 Oxoid 公司），发现其能使该培养基显色。因此，该纯化的蛋白质具有能分解 4-硝基苯基- $\alpha$ -D-呋喃型葡萄糖的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性，是阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶。

### 实施例 3 阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体的制备

采用如 G. Kohler 和 C. Milstein (Nature, 256: 495-497 (1975)) 所述的杂交瘤技术，所不同的是用本发明的抗原（即表达、纯化得到的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶）通过昆明系小鼠来制备杂交瘤细胞，挑选到了 24 个杂交瘤细胞株。

先向小鼠腹腔内注射液体石蜡（每只小鼠 0.5ml）。7 天后，将杂交瘤细胞株分别接种于注射了液体石蜡的小鼠腹腔内，每只小鼠腹腔注射  $1\sim 5 \times 10^6$  个杂交

瘤细胞。10~14 天后收集腹水，经 10000g 离心 5 分钟，取上清，用等体积 pH7.0 的磷酸缓冲液稀释。稀释后，缓慢加入同稀释液等体积的饱和硫酸铵溶液，于 4 °C 静置 2 小时，以 8000 rpm 离心 30 分钟，弃去上清，沉淀用 pH7.0 的磷酸缓冲液溶解，用 0.45um 滤膜过滤。滤出液上样于用 pH7.0 的磷酸缓冲液平衡好的 Agarose-protein G 柱（可购自 Pharmacia Biotech 公司）。用 10 倍柱体积的 pH7.0 的磷酸缓冲液洗柱，洗脱杂蛋白。然后用 5~10 倍体积 0.1 M 甘氨酸-HCl (pH2.5) 缓冲液洗脱结合于柱上的抗体，洗脱液立即用 0.1mL 1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液中和，由此得到各个杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体。

通过 ELISA 法，将以上得到的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶（抗原）分别和各个杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体配对测定，选择灵敏度最高的抗体，并将相应的杂交瘤细胞株提交中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC，中国科学院微生物研究所，北京）保藏，保藏号为 CGMCC2084，保藏日期为 2007 年 6 月 13 日。

#### 实施例 4 用阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体的 **ELISA** 检测阪崎肠杆菌

采用间接 ELISA 法用本发明的抗体检测阪崎肠杆菌。选择易于与阪崎肠杆菌混淆的杂菌以及阪崎肠杆菌，分别取各种菌的菌液与 2×Loading Buffer（可购自大连宝生物工程有限公司）等体积混合均匀后煮沸 10 分钟，然后进行 SDS-PAGE，其中每孔上样量为 12ul（上样量约为 20ug 全菌蛋白）。SDS-PAGE 完成后，将胶取下，以 300mA 转膜 1 小时。然后，用 5%脱脂奶粉封闭过夜。加入实施例 3 得到的单克隆抗体，室温振荡孵育 1 小时。然后加 PBS-T 漂洗 2 遍，再振荡洗涤 3 次，每次 5 分钟。加入酶标羊抗鼠抗体（可购自美国 IDS 公司），室温振荡孵育 30 分钟。然后加 PBS-T 漂洗 2 遍，再振荡洗涤 3 次，每次 10 分钟。用 ECL-PLUS 试剂盒（购自 Amersham 公司）曝光，结果如图 2 所示。

图 2 的两次结果都仅仅在阪崎肠杆菌的泳道中出现检测条带，而且条带位置显示其分子量为约 65kD。这显示，本发明的阪崎肠杆菌  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抗体具有很强的专一性和可靠的重复性，利用它进行的 ELISA 能够清楚、可靠地鉴定、区分出阪崎肠杆菌。

## 序列表

&lt;110&gt; 杨捷琳

&lt;120&gt; 检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试方法及其中所用的抗体

&lt;130&gt; 杨捷琳

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1680

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 阪崎肠杆菌(Enterobacter sakazakii)

&lt;400&gt; 1

```

atgagtgaag caccgacgca ggtaaaaggc cgctggtgga aagaggcaac ggcctaccag      60
atttatccgc gcagctttaa agacagcaac ggcgacggca ttggcgatct caacgggatt      120
atcgaaaagc tcgattacct gaaagattta ggtatcgatc ttatctggat ctgcccgatg      180
taccgctgcg ccaacgacga taacggttat gacatcagcg actatcaggg gatcatggcg      240
gaatttgca  cgatggccga ttcgaccgg ctgctggaag gcgtgcatca gcgcggcatg      300
cggctgatcc tggacctggt ggtgaaccac acgtccgacg aacatccgtg gtttctgaa      360
tcgcgtcct  caaaggataa ccccaaacgc gactgtgata tctggcgcga cggcaaaaac      420
ggggcggagc cgaataactg ggaatcgatt ttcagcggct cggcctggaa gcgggatgac      480
gtgaccggcc agtatttcat gcacctgttc agcagccgtc agcccgatct caactgggaa      540
aatcatgaga tgcgcgccgc cgtctacgac atgatgcgct ggtggcttga taagggcatt      600
gacgggttfc gcatcgacgc cattgcgcat atgaaaaagg agccgacgtt aagcgacgtg      660
ccgaaccccg aaaaactgcc ctacgcgccg tcgatggtgt cgcaccttaa ttacgacggc      720
ctgctcgact atgtggacga catctgccgc aacgtcttta accattacga catcgtcag      780
gtggcggaga tgaacgggct ggacgctgcc cacgcggaag agtgggtggg cgaaaaccgc      840
gggcggctga atatggtgtt tcagtttgag catgtccggc tctgggagcc gcaggcgggc      900
ctgcgccgca cgcccggcgt gctgcgcaac atttcaccg cctggcagca ggcgctggaa      960

```

ggcaaaggct ggaatgcgct ctatgtggaa aaccatgacg tgacgcgctg ggtctcgcgc 1020  
 tggggcgata ccgagcatca ctggcgcgaa agcgcgacct gcatcgcggc gatgtatttt 1080  
 ctcatgcagg gcacgccgtt tatctatcag ggccaggaga tcggcatgac caatacgcgc 1140  
 tttgcgagcc tggacgattt tgacgacgtc tcggcccata acaaagcgcg cgatttgcgg 1200  
 gatcagggga tgcgcgagga ggagattgtc gaattctga cgcgaccgg gcgcgataac 1260  
 tccgcacgc cgatgcagtg ggacgcgtcg ccgatgcgg gcttcagcac ccatgaacce 1320  
 tggctgaagg tgaaccgaa ttacgagatg atcaacgtcg aaagccagca gcacgatccg 1380  
 cattcgggtgc tcaatttta ccggcggatg atccacctgc gaaaacgca gccggcgtg 1440  
 atttacgggc gctacgagac ggtgcttaac gatcagcagc agatctacgc ctaccgccgc 1500  
 gtgctgggcg atgaacaact ggtggtgttg tgtaattct ccggcaaggc ggcggagtgg 1560  
 gacgccaggc cgttgcgct caacggcgcg ttctgcgtgc tggcgaacct tgacgagacg 1620  
 caggagccgc accggttacg cgctggggag acacgggtt ataaactgac gtcgctcgag 1680

<210> 2

<211> 560

<212> PRT

<213> 阪崎肠杆菌(Enterobacter sakazakii)

<400> 2

Met Ser Glu Ala Pro Thr Gln Val Lys Gly Arg Trp Trp Lys Glu Ala  
 1 5 10 15

Thr Ala Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Ser Asn Gly Asp  
 20 25 30

Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys  
 35 40 45

Asp Leu Gly Ile Asp Leu Ile Trp Ile Cys Pro Met Tyr Pro Ser Pro  
 50 55 60

Asn Asp Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr Gln Gly Ile Met Ala  
 65 70 75 80

Glu Phe Gly Thr Met Ala Asp Phe Asp Arg Leu Leu Glu Gly Val His  
 85 90 95

Gln Arg Gly Met Arg Leu Ile Leu Asp Leu Val Val Asn His Thr Ser  
 100 105 110

Asp Glu His Pro Trp Phe Leu Glu Ser Arg Ser Ser Lys Asp Asn Pro  
 115 120 125

Lys Arg Asp Trp Tyr Ile Trp Arg Asp Gly Lys Asn Gly Ala Glu Pro  
 130 135 140

Asn Asn Trp Glu Ser Ile Phe Ser Gly Ser Ala Trp Lys Arg Asp Asp  
 145 150 155 160

Val Thr Gly Gln Tyr Phe Met His Leu Phe Ser Ser Arg Gln Pro Asp  
 165 170 175

Leu Asn Trp Glu Asn His Glu Met Arg Ala Ala Val Tyr Asp Met Met  
 180 185 190

Arg Trp Trp Leu Asp Lys Gly Ile Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ile  
 195 200 205

Ala His Met Lys Lys Glu Pro Thr Leu Ser Asp Val Pro Asn Pro Glu  
 210 215 220

Lys Leu Pro Tyr Ala Pro Ser Met Val Ser His Leu Asn Tyr Asp Gly  
 225 230 235 240

Leu Leu Asp Tyr Val Asp Asp Ile Cys Arg Asn Val Phe Asn His Tyr  
 245 250 255

Asp Ile Val Thr Val Gly Glu Met Asn Gly Leu Asp Ala Ala His Ala  
 260 265 270

Glu Glu Trp Val Gly Glu Asn Arg Gly Arg Leu Asn Met Val Phe Gln  
 275 280 285

Phe Glu His Val Arg Leu Trp Glu Pro Gln Ala Gly Leu Arg Pro Thr  
 290 295 300

Pro Ala Val Leu Arg Asn Ile Phe Thr Ala Trp Gln Gln Ala Leu Glu  
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Trp Asn Ala Leu Tyr Val Glu Asn His Asp Val Thr Arg  
 325 330 335

Val Val Ser Arg Trp Gly Asp Thr Glu His His Trp Arg Glu Ser Ala  
 340 345 350

Thr Cys Ile Ala Ala Met Tyr Phe Leu Met Gln Gly Thr Pro Phe Ile  
 355 360 365

---

Tyr Gln Gly Gln Glu Ile Gly Met Thr Asn Thr Arg Phe Ala Ser Leu  
 370 375 380

Asp Asp Phe Asp Asp Val Ser Ala His Asn Lys Ala Arg Asp Leu Arg  
 385 390 395 400

Asp Gln Gly Met Arg Glu Glu Glu Ile Val Glu Phe Leu Thr Arg Thr  
 405 410 415

Gly Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Met Gln Trp Asp Ala Ser Pro Tyr  
 420 425 430

Ala Gly Phe Ser Thr His Glu Pro Trp Leu Lys Val Asn Pro Asn Tyr  
 435 440 445

Glu Met Ile Asn Val Glu Ser Gln Gln His Asp Pro His Ser Val Leu  
 450 455 460

Asn Phe Tyr Arg Arg Met Ile His Leu Arg Lys Arg Glu Pro Ala Leu  
 465 470 475 480

Ile Tyr Gly Arg Tyr Glu Thr Val Leu Asn Asp His Glu Gln Ile Tyr  
 485 490 495

Ala Tyr Arg Arg Val Leu Gly Asp Glu Gln Leu Val Val Leu Cys Asn  
 500 505 510

Phe Ser Gly Lys Ala Ala Glu Trp Asp Ala Arg Ala Leu Ser Leu Asn  
 515 520 525

Gly Ala Phe Cys Val Leu Ala Asn Leu Asp Glu Thr Gln Glu Pro His  
 530 535 540

Arg Leu Arg Ala Trp Glu Thr Arg Val Tyr Lys Leu Thr Ser Leu Glu  
 545 550 555 560

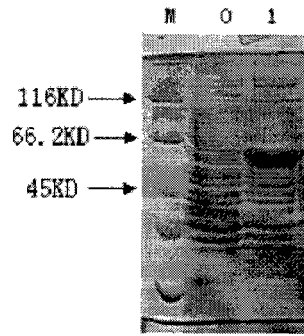


图 1

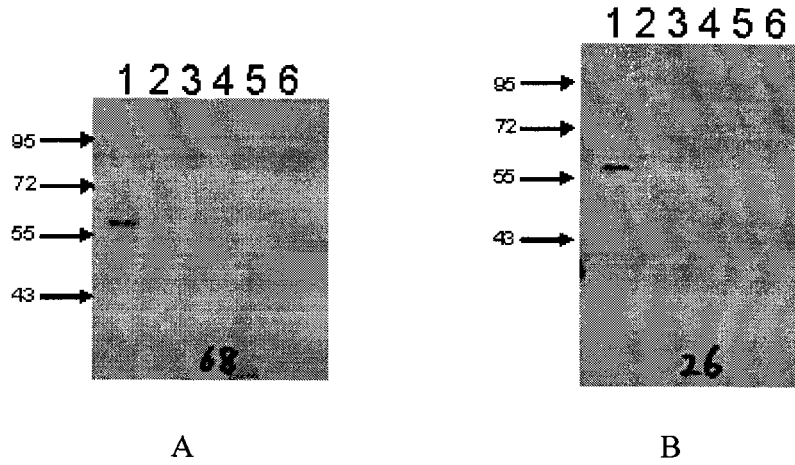


图 2

专利名称(译)	检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试方法及其中所用的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101082624A</a>	公开(公告)日	2007-12-05
申请号	CN200710043644.9	申请日	2007-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	杨捷琳		
申请(专利权)人(译)	杨捷琳		
当前申请(专利权)人(译)	杨捷琳		
[标]发明人	杨捷琳 顾鸣 黄应峰		
发明人	杨捷琳 顾鸣 黄应峰		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/10 G01N33/577 C12Q1/68 C12N5/12		
CPC分类号	Y02A50/451		
其他公开文献	CN101082624B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及检测阪崎肠杆菌的酶联免疫吸附测试(ELISA)的方法,其中运用抗阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抗体,其中所述 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列如Seq ID No: 2所示。另外,本发明还涉及ELISA方法中所用的抗体和制备该抗体所需的阪崎肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶及其编码核酸、载体等。上述抗体的ELISA应用以及包括了上述抗体的试剂盒。本发明的检测方法不但能够快速、高效地检测出阪崎肠杆菌,而且检测的灵敏度高、特异性强、结果可靠。

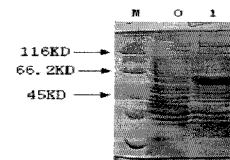


图 1

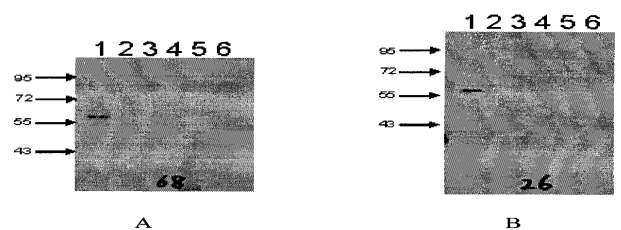


图 2