(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103235126 B
(45)授权公告日 2014.09.24

(21)申请号 201310122480.4

(22)申请日 2013.04.09

(83)生物保藏信息
CGMCC No.7204 2013.01.23
CGMCC No.7205 2013.01.23

(73)专利权人 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

(72)发明人 胥传来 王文彬 匡华 宋珊珊 刘丽强 徐丽广 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 刘品超

(51)Int.Cl.
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件
US 2006/0292636 A1,2006.12.28, 全文.
CN 1935843 A,2007.03.28, 全文.
CN 101051050 A,2007.10.10, 全文.
范治国,等. 医药废水中大肠杆菌抗体制备及检测方法。.《净水技术》.2011, 第30卷(第2期), 第68-71页.
王娜,等. 水环境中大肠杆菌多特征抗原及抗体的制备研究.《环境科学》.2007, 第28卷(第5期), 第1142-1146页.
高明春,等. 大肠杆菌菌株ATCC25922碱性磷酸酶的原核表达、纯化及其活性研究。.《东北农业大学学报》.2010, 第41卷(第8期), 第48-53页.
郭艳峰,等. 食品和水中大肠杆菌快速检测方法的研究进展。.《畜牧与饲料科学》.2010, 第31卷(第9期), 第90-91页.

审查员 张绚

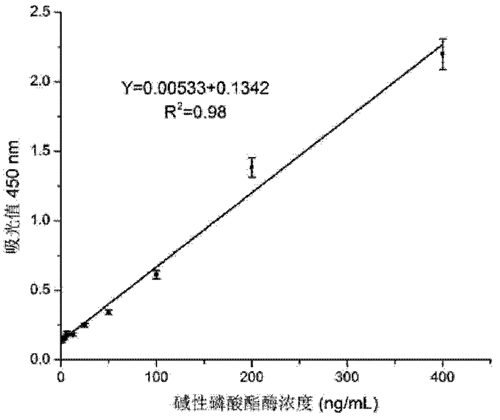
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

定量检测食品或自来水中大肠杆菌标志物β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法

(57)摘要

定量检测食品或自来水中大肠杆菌标志物β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法,属于免疫分析领域。本发明用β-碱性磷酸酯酶免疫8周龄的BALB/c小鼠,经正常的免疫、细胞融合、筛选后得13株β-碱性磷酸酯酶单抗。13株抗体分别标记辣根过氧化物酶并进行两两配对。确定以4号抗体CGMCC No.7204为包被抗体、5号抗体CGMCC No.7205为酶标抗体,以β-碱性磷酸酯酶为标准品建立了β-碱性磷酸酯酶的夹心ELISA法,LOD为0.8ng/mL,R^2=0.98,线性范围50-400ng/mL。本发明用β-碱性磷酸酯酶为免疫原,制备了理化性质高度均一、特异性好、可大量制备的β-碱性磷酸酯酶单抗,建立的夹心法为食品及自来水中E.coli菌属的检测提供了新颖、快速、高效的分析手段。



CN 103235126 B

1. 定量检测食品或自来水中大肠杆菌E.coli标志物β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法,其特征在于步骤为:

(1)β-碱性磷酸酯酶单克隆抗体的制备

以来源于大肠杆菌的β-碱性磷酸酯酶为免疫原,免疫8周龄的BALB/c小鼠,经融合、筛选,共筛选到13个细胞株;

(2)单克隆抗体的配对筛选

将纯化后的13株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶HRP,直接法鉴定标记成功后进行夹心法配对;配对参数如下:包被抗体5μg/mL;包被液为pH9.6、0.01M的碳酸盐缓冲液;标品浓度100ng/mL;标品稀释液pH7.2、0.01M的PBS;酶标抗体稀释500倍使用;在此条件下,实验成功得到了16对P/N值>5的配对;

(3)夹心法的建立

选择检测限最稳定的配对,即以4号抗体CGMCC No.7204为包被抗体,以5号抗体CGMCC No.7205为酶标抗体建立夹心法;具体参数如下:

抗体包被浓度:5μg/mL,

包被液:pH9.6、0.01M的碳酸盐缓冲液,

标品稀释液:pH7.2、0.01M的PBS,

酶标抗体浓度:4μg/mL,

反应时间:封闭:37℃ 2h;标准品:37℃ 1h;酶标抗体:37℃ 1h;显色12min;

优化后β-碱性磷酸酯酶夹心法,LOD:0.8ng/mL,检测限50ng/mL。

定量检测食品或自来水中大肠杆菌标志物 β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法

技术领域

[0001]　本发明涉及了一种定量检测食品或自来水中大肠杆菌 E.coli 标志物 β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法，属于免疫分析领域。

背景技术

[0002]　大肠杆菌（Escherichia coli，E.coli），1885 年由 Escherich 发现，分布在自然界，主要附生在人或动物的肠道里，为正常菌群，少数的大肠杆菌具有毒性，可引起疾病。

[0003]　E.coli 常随粪便散布在环境中，作为温血动物肠道细菌的代表，大肠杆菌常作为饮水和食物（或药物）的卫生学标准。若在水和食品中检出此菌，可认为是被粪便污染的指标，从而可能有肠道病原菌的存在。β-碱性磷酸酯酶是位于大肠杆菌胞质空间和表面的一种分子量为 50kDa，具有两个相同亚基的酶蛋白，在缺乏磷酸盐时大量合成。因此，β-碱性磷酸酯酶是 ELISA 检测大肠埃希氏菌 E.coli 的理想检测对象。

[0004]　目前，检测 E.coli 的方法有培养法、酶底物法、PCR 方法等。培养法是检测 E.coli 的国标方法，尽管权威可靠，但一般需要 10 天得到结果，且操作过程繁琐，不能适应快速检测的要求；酶底物法多利用 E.coli 属特异性的 β-碱性磷酸酯酶或者 β-D-葡萄糖苷酸酶的酶学活性催化底物产生荧光，从而在 24h 内实现对 E.coli 的检测，优点是检测时间短，操作简单，缺点是酶活性质易受温度、pH、离子强度的影响，所用酶的国外产品质量较为稳定，但相对比较昂贵；PCR 方法，检测 E.coli 属特异性的 DNA 片段，具有灵敏度高、检测时间短的特点，缺点是成本较高、需要较高的操作技术，且不能避免增菌过程。

[0005]　尽管食源性致病菌检测方法不断发展，ELISA 凭借其快速、灵敏、特异性好、高通量、不需要大型仪器，易于推广的特点成为目前检测微生物的常用方法。直接检测微生物的 ELISA 试剂盒检测抗原通常为菌体的表面抗原，检测抗体一般有多克隆抗体和单克隆抗体两种。由于单克隆抗体具有理化性质单一、特异性好、亲和力高并可以无限生产的特点，比多克隆抗体具有更大的应用价值。本发明首次通过制备单克隆抗体并建立起检测大肠杆菌分泌的 β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法来实现对大肠杆菌的检测，为食品和自来水中大肠埃希氏菌的快速检测提供了新方法。

发明内容

[0006]　（一）要解决的技术问题

[0007]　本发明的目的在于建立一种具有灵敏度高、特异性好、操作方法简单的基于单克隆抗体的大肠杆菌标志物 β-碱性磷酸酯酶双抗体夹心法，用于食品和自来水中大肠埃希氏菌的批量、快速检测。

[0008]　（二）技术方案

[0009]　为实现上述目的，本发明建立了一种大肠杆菌 β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心检测方法，该方法包括对检测方法的优化。

[0010]　其中，单克隆抗体是采用大肠杆菌 β-碱性磷酸酯酶(megazyme)经过特定免疫程序免疫 BALB/c 小鼠，经杂交瘤技术融合、筛选得到的。

[0011]　其中，用于配对的抗体是通过优化参数下夹心法配对，并通过多次试验筛选确定的，具有稳定性好、灵敏度高的特点。

[0012]　其中，建立的夹心法优化了包被抗体的浓度，包被液，封闭液，标准品稀释液，酶标抗体稀释液，酶标抗体稀释浓度。LOD 达到 0.8ng/mL，R^2 为 0.98，实际检测限为 50ng/mL。

[0013]　定量检测食品或自来水中大肠杆菌 E.coli 标志物 β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法：

[0014]　(1) β-碱性磷酸酯酶单克隆抗体的制备

[0015]　以 β-碱性磷酸酯酶(megazyme，来源于大肠杆菌，市售)为免疫原，免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠，免疫程序如下：第一周进行首免，100μg/只，弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射；第四周进行二免，100μg/只，弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射；第六周进行三免，50μg/只，弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射；第七周尾部采血测效价，选择效价最高的鼠；第八周进行冲刺免疫，20μg/只，生理盐水溶解，腹腔注射；冲刺免疫 3 天后眼眶采血后进行融合，筛选采用间接 ELISA 进行，共筛选到 13 个细胞株。

[0016]　(2) 单克隆抗体的配对筛选

[0017]　将纯化后的 13 株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶 HRP，直接法鉴定标记成功后进行夹心法配对；配对参数如下：包被抗体 5μg/mL；包被液为 pH9.6、0.01M 的碳酸盐缓冲液；标品浓度 100ng/mL；标品稀释液 pH7.2、0.01M 的 PBS；酶标抗体稀释 500 倍使用；在此条件下，实验成功得到了 16 对 P/N 值 >5 的配对；

[0018]　(3) 夹心法的建立

[0019]　选择检测限最稳定的配对，即以 11 号抗体 CGMCC No.7204 为包被抗体，以 1 号抗体 CGMCC No.7205 为酶标抗体建立夹心法；具体参数如下：

[0020]　抗体包被浓度：5μg/mL，

[0021]　包被液：pH9.6、0.01M 的碳酸盐缓冲液，

[0022]　标品稀释液：pH7.2、0.01M 的 PBS，

[0023]　检测抗体浓度：4μg/mL，

[0024]　反应时间：包被、封闭：37℃ 2h；标准品：37℃ 1h；检测抗体：37℃ 1h；显色 12min；

[0025]　优化后 β-碱性磷酸酯酶夹心法，LOD：0.8ng/mL，检测限 50ng/mL。

[0026]　本发明方法的检测分析原理是：

[0027]　酶标板上包被了捕获抗体 4 (CGMCC No.7204)，合适的浓度下可以最大限度捕获 β-碱性磷酸酯酶，37℃ 2h；洗板 3 次，洗去未结合的抗体，加入封闭液 220μL，37℃ 2h 封闭板孔上多余结合位点；洗板 3 次，加入样品及对照，37℃孵育 1h；洗板 3 次，加入酶标抗体 5-HRP(CGMCC No.7205-HRP)，37℃孵育 1h；洗板 4 次，加入显色液显色 12min。如果样品有 ≥50ng/mL 的 β-碱性磷酸酯酶，那么 β-碱性磷酸酯酶被捕获抗体 4 捕获并与酶标抗体 5-HRP (CGMCCNo.7205-HRP) 结合，并催化底物在 450nm 产生吸收值，并被判定为阳性；如果样品 β-碱性磷酸酯酶浓度＜50ng/mL 那么样品不被捕获或者捕获数量太小不足以引起足够的信号，被判定为阴性。

[0028]　(三) 有益效果

[0029] 本发明提供的大肠杆菌标志物β-碱性磷酸酯酶双抗体夹心检测方法，采用了理化性质高度均一、特异性好、可以大量制备的单克隆抗体，建立的夹心法灵敏度高，稳定性好、成本低，样品的前处理过程简单，能同时检测大量样品，适合食品行业和自来水中大肠杆菌的快速高通量检测，具有推广和应用价值。

[0030] 生物材料样品保藏：

[0031] 1、单克隆细胞株4号，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，保藏编号CGMCC No.7204，保藏日期2013年1月23日。

[0032] 2、单克隆细胞株5号，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，保藏编号CGMCC No.7205，保藏日期2013年1月23日。

附图说明

[0033] 图1大肠杆菌β-碱性磷酸酯酶双抗体夹心法的标准曲线。

具体实施方式

[0034] 实施例1

[0035] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0036] 一、仪器：

[0037] TGL－40B台式低速离心机，上海安亭科学仪器厂

[0038] KFLOW纯水机，凯佛隆公司

[0039] ZD-9556水平摇床，太仓科教器材厂

[0040] 96孔8×12可拆酶标板，厦门怡佳美实验器材有限公司

[0041] MuLtiska Mks酶标仪，Thermo Labsystems公司

[0042] 可调试移液器，Thermo Labsystems公司

[0043] 涡旋混合器，上海沪西仪器分析厂

[0044] 二、试剂：

[0045] 四甲基联苯胺(TMB)，上海晶纯实业有限公司

[0046] 其他试剂均为分析纯试剂

[0047] 三、步骤

[0048] 1. 单克隆抗体的制备

[0049] (1)实验动物：选5只8周龄的BALB/c小鼠进行免疫。

[0050] (2)抗原配置：将免疫原(β-碱性磷酸酯酶)用生理盐水稀释，配成1mg/mL的溶液。

[0051] (3)乳化：将上述溶液与等量完全或不完全福氏佐剂用混合搅拌法将其乳化，乳化完全后皮下多点注射小鼠。

[0052] 免疫方法：按照特定免疫流程免疫小鼠，3免后用间接竞争法测定效价，效价达到要求后，进行冲刺免疫；冲免3天后眼眶采血后进行融合。

[0053] (4)采血：第三次免疫后1周进行断尾采血，采用间接非竞争酶联免疫法测定抗血

清效价。

[0054]　(5)融合、筛选：采用杂交瘤技术进行融合，采用间接 ELISA 筛选阳性细胞孔，采用有限稀释法对阳性孔进行亚克隆。

[0055]　(6)抗体的纯化和保存：采用辛酸－饱和硫酸铵法纯化腹水，透析后得到单克隆抗体，采用微量紫外方法测定其浓度后分装后放入 -20℃保存。

[0056]　2、ELISA 反应过程：

[0057]　抗体效价测定步骤：

[0058]　(1)将包被原用包被缓冲液作系列稀释包被 96 孔酶标板，100μL/ 孔，于 4℃冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温，每孔注入 200μL PBST 溶液，摇床上振荡 3min，用力甩掉洗涤液，在吸水纸上拍干，继续洗涤 2 次。以下洗涤方法相同。

[0059]　(2)充分洗涤后，用封闭缓冲液封闭酶标板，200μL/ 孔，于 37℃温育箱内温育 2h 后取出烘干待用。

[0060]　(3)将阳性血清系列稀释对应加入到酶标板的前 7 行列，第 8 行加入阴性血清，100μL/ 孔，37℃孵育 1h 后洗涤、拍干。

[0061]　(4)每孔加入 100μL、1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG，37℃孵育 1h 后洗涤、拍干。

[0062]　(5)每孔加入 100μL 显色液 (TMB 与底物液比例为 1:5)，暗处 37℃反应 15min，取出后每孔加入 100μL 终止液 (2mol/L 的硫酸)，用酶标仪测定吸光值 A_{450}。

[0063]　大肠杆菌 β－碱性磷酸酯酶双抗体夹心法测定步骤：

[0064]　a、包被：用 6μg/mL 的 4 号抗体(CGMCC No.7204)包被酶标板，100μL/ 孔，4℃过夜。

[0065]　b、洗涤：用 PBST 洗涤反应板三次，每次 3min，200μL/ 孔，然后甩干反应板。

[0066]　c、封闭：含 0.2% 明胶的 CBS，200μL/ 孔，37℃封闭 2h。

[0067]　d、洗涤：同 b。

[0068]　e、样品：用 PBS 将大肠杆菌 β－碱性磷酸酯酶母液稀释成 6.25，12.5，25，50，100，200，400ng/mL 系列浓度，另设一个 PBS 空白对照。每孔加入 100μL 样品，于 37℃温育 1h。

[0069]　f、洗涤：同 b。

[0070]　g、加酶标抗体 (CGMCC No.7205-HRP，4μg/mL)，100μL/ 孔，37C 反应 1h。

[0071]　h、洗涤：同 b。

[0072]　i、显色：加底物 TMB100μL/ 孔，显色 15min。

[0073]　j、终止：加终止液 50μL/ 孔。

[0074]　k、测定：用酶标仪检测 OD_{450nm}

[0075]　试验结果如下：

[0076]　1、标准曲线：本发明所获得的抗原检测的线性范围为 50 ～ 400ng/mL，R^2=0.98，请见说明书附图。

[0077]　2、LOD：LOD 是空白的平均吸收值加 3 倍的标准偏差对应的抗原浓度，大肠杆菌标志物 β－碱性磷酸酯酶双抗体夹心法 LOD 为 0.8ng/mL。

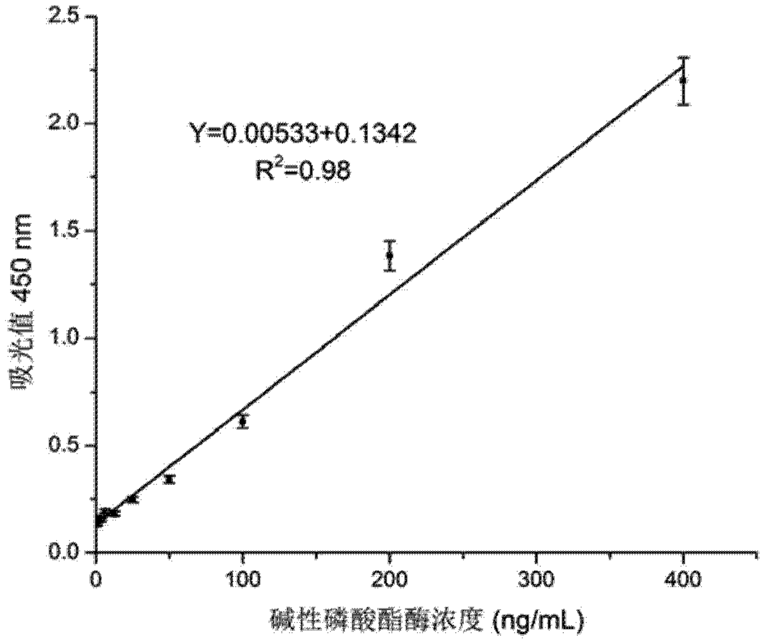
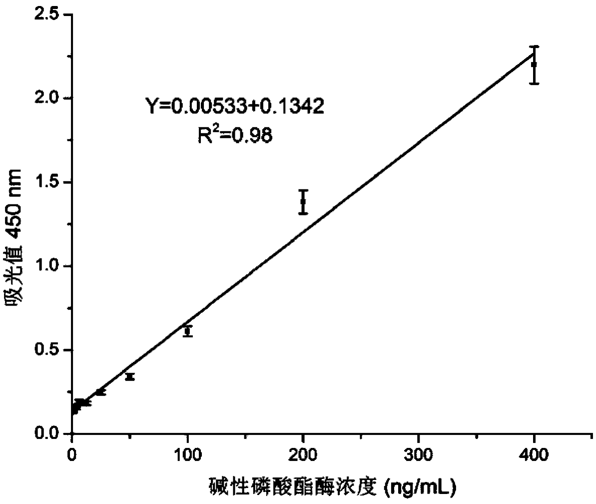

Y=0.00533+0.1342
R2=0.98
吸光值 450 nm
碱性磷酸酯酶浓度 (ng/mL)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
100
200
300
400

图 1

patsnap

专利名称(译)	定量检测食品或自来水中大肠杆菌标志物β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法		
公开(公告)号	CN103235126B	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	CN201310122480.4	申请日	2013-04-09
[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	胥传来 王文彬 匡华 宋珊珊 刘丽强 徐丽广 胡拥明		
发明人	胥传来 王文彬 匡华 宋珊珊 刘丽强 徐丽广 胡拥明		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN103235126A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

定量检测食品或自来水中大肠杆菌标志物β-碱性磷酸酯酶的双抗体夹心法，属于免疫分析领域。本发明用β-碱性磷酸酯酶免疫8周龄的BALB/c小鼠，经正常的免疫、细胞融合、筛选后得13株β-碱性磷酸酯酶单抗。13株抗体分别标记辣根过氧化物酶并进行两两配对。确定以4号抗体CGMCC No.7204为包被抗体、5号抗体CGMCC No.7205为酶标抗体，以β-碱性磷酸酯酶为标准品建立了β-碱性磷酸酯酶的夹心ELISA法，LOD为0.8ng/mL，R2=0.98，线性范围50-400ng/mL。本发明用β-碱性磷酸酯酶为免疫原，制备了理化性质高度均一、特异性好、可大量制备的β-碱性磷酸酯酶单抗，建立的夹心法为食品及自来水中E.coli菌属的检测提供了新颖、快速、高效的分析手段。