



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103558388 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201310506513. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 24

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 7206 2013. 01. 23

(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 胥传来 王文彬 匡华 徐丽广

马伟 刘丽强

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

32104

代理人 时旭丹 刘品超

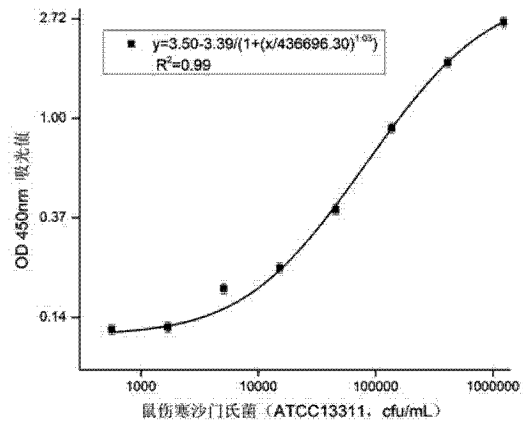
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法

(57) 摘要

一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法,属于免疫分析技术领域。本发明应用鼠伤寒沙门氏菌 ATCC13311 和光滑型的鼠伤寒沙门氏菌 LPS 混合免疫 7 周龄 BALB/c 小鼠,经免疫、融合、筛选得 10 株 LPS 单克隆抗体,分别标记 HRP,并以鼠伤寒沙门氏菌进行两两配对。以 6E2CGMCCNo. 7206 单抗作为包被抗体和酶标抗体,以鼠伤寒沙门氏菌为标准品建立了夹心 ELISA 方法,LOD 为 500cfu/mL。用理化性质高度均一、特异性好、可大量制备的单克隆抗体建立的夹心法灵敏度高,成本低,与肠炎沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、E. coli、E. coli0157:H7、阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应,为食品中鼠伤寒沙门氏菌检测提供了快速高效的分析手段。



1. 一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法,其特征在于步骤为:

(1) 鼠伤寒沙门氏菌 LPS 单克隆抗体的制备

以混合后的鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311 菌体和光滑型的鼠伤寒沙门氏菌 LPS 为免疫原,免疫 7 周龄的 BALB/c 小鼠,经免疫、融合、筛选,得 10 株 LPS 单克隆抗体;

(2) 单克隆抗体的配对筛选

将纯化后的 10 株 LPS 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 $5 \mu\text{g/mL}$;包被液为 pH9.6、0.01M 的碳酸盐缓冲液;标品浓度 10^7cfu/mL ;标品稀释液 pH7.2、0.01M 的 PBS;酶标抗体稀释 1000 倍使用;在此条件下,实验成功得到了 40 对 P/N 值 >5 的配对;

(3) 夹心法的建立

选择检测限稳定、灵敏的配对,以 6E2 抗体即 CGMCC No. 7206 分别为包被抗体和酶标抗体建立夹心法;具体参数如下:

抗体包被浓度: $5 \mu\text{g/mL}$,

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+0.1%Tween,

检测抗体浓度: $1.6 \mu\text{g/mL}$,

反应时间:包被、封闭: 37°C 、2h;标准品: 37°C 、1h;检测抗体: 37°C 、1h;显色 10min;

优化后鼠伤寒沙门氏菌夹心法 LOD: 500cfu/mL 。

一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法

技术领域

[0001] 本发明涉及了一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法,属于免疫分析技术领域。

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过程。

[0004] 目前检测沙门氏菌的方法主要有培养法、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 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] 免疫学检测方法主要有酶联免疫反应(ELISA)、免疫层析试纸条(Immuno chromatographic test strip)。ELISA 凭借其灵敏、快速、特异性好、易于推广的特点成为食源性致病菌的常规检测方法。抗体的亲和力、交叉反应、稳定性对于 ELISA 方法的灵敏度和特异性有着关键性的决定作用。虽然胶体金试纸条具有操作简单、稳定性高、不需要借助专门仪器、适合现场快速检测的优点,但一般而言,ELISA 比胶体金试纸条具有更好的灵敏度,而且更适合高通量检测,因此 ELISA 也具有相当广泛的应用空间。

[0006] 作为食品安全事件中常见的致病血清型,鼠伤寒沙门氏菌的检测也是非常重要的。本发明首次采用 LPS 和菌体混合免疫的方法,成功制备了高灵敏的鼠伤寒沙门氏菌 LPS 的单克隆抗体并应用一株单克隆抗体就实现了鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法检测。成功制备抗体与采用的免疫原是密不可分的,单纯的通过菌体免疫制备沙门氏菌的单克隆抗体是比较困难的。作为沙门氏菌的主要抗原,LPS 是有潜力的检测抗原,但 LPS 的免疫原性较

弱,在小鼠体内很难引起足够的免疫应答。而沙门氏菌菌体表面均匀分布着大量的 LPS,因此我们将鼠伤寒沙门氏菌 LPS 和鼠伤寒沙门氏菌菌体混合免疫取得了较好的效果。应用一个单克隆抗体即可实现高灵敏的双抗体夹心法检测这是与抗体较高的亲和力以及沙门氏菌表面分布大量 LPS 所决定的。

发明内容

[0007] (一) 要解决的技术问题

本发明的目的在于建立一种具有高灵敏度、高特异性、高准确度、高精度度、操作方法简单的酶联免疫吸附检测方法,用于食品中鼠伤寒沙门氏菌的批量、快速检测。

[0008] (二) 技术方案

为实现上述目的,本发明的技术方案:一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法,步骤为:

(1) 鼠伤寒沙门氏菌 LPS 单克隆抗体的制备

以混合后的鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311 菌体和光滑型的鼠伤寒沙门氏菌 LPS 为免疫原,免疫 7 周龄的 BALB/c 小鼠,免疫程序如下:第一周进行首免,(10^8 cfu 鼠伤寒沙门氏菌菌体 +100 μ g 鼠伤寒沙门氏菌 LPS) / 只,弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射;第四周进行二免,(10^8 cfu 鼠伤寒沙门氏菌菌体 +100 μ g 鼠伤寒沙门氏菌 LPS) / 只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;第六周进行三免,(10^7 cfu 鼠伤寒沙门氏菌菌体 +50 μ g 鼠伤寒沙门氏菌 LPS) / 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,挑选对鼠伤寒沙门氏菌 LPS 效价最高的老鼠;第九周进行冲刺免疫,30 μ g 鼠伤寒沙门氏菌 LPS / 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,共筛选得 10 株 LPS 单克隆抗体;

我们购买的菌株是 CICC 10420 (CICC 为中国工业微生物菌种保藏中心),菌株对应的 ATCC 编号为 ATCC 13311,该沙门氏菌为 ATCC 13311. 从网站信息可见所购菌株为 salmonella typhimurium 即专利中的鼠伤寒沙门氏菌。

[0009] LPS 购于 sigma 公司,货号为 L6511. 详细信息可见公司网站:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l6511?lang=zh®ion=CN>

(2) 单克隆抗体的配对筛选

将纯化后的 10 株 LPS 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 5 μ g/mL;包被液为 pH9.6、0.01M 的碳酸盐缓冲液;标品浓度 10^7 cfu/mL;标品稀释液 pH7.2、0.01M 的 PBS;酶标抗体稀释 1000 倍使用;在此条件下,实验成功得到了 40 对 P/N 值 >5 的配对;

(3) 夹心法的建立

选择检测限稳定、灵敏的配对,以 6E2 抗体即 CGMCC No. 7206 分别为包被抗体和酶标抗体建立夹心法;具体参数如下:

抗体包被浓度:5 μ g/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+0.1%Tween,

检测抗体浓度:1.6 μ g/mL,

反应时间:包被、封闭:37℃、2h;标准品:37℃、1h;检测抗体:37℃、1h;显色 10min;
优化后鼠伤寒沙门氏菌夹心法 LOD:500cfu/mL。

[0010] 建立了一种食品中鼠伤寒沙门氏菌 LPS 的双抗体夹心检测方法,该方法包括对检测方法的优化。

[0011] 其中,单克隆抗体是采用鼠伤寒沙门氏菌 LPS 与鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 13311)菌体混合,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。

[0012] 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。

[0013] 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 500cfu/mL, R^2 为 0.99。

[0014] 本发明方法的检测分析原理是:

酶标板上包被了捕获抗体 6E2,合适的浓度下可以最大限度捕获鼠伤寒沙门氏菌;洗板 3 次,洗去未结合的抗体,加入封闭液 220 μ L 封闭板孔上多余结合位点;洗板 3 次,加入样品或对照,37℃ 孵育 1h;洗板 3 次,加入酶标抗体 6E2-HRP,37℃ 孵育 1h;洗板 4 次,加入显色液显色 12min。如果样品有足够的鼠伤寒沙门氏菌,那么鼠伤寒沙门氏菌被捕获抗体捕获并与酶标抗体 6E2-HRP 结合,并催化底物在 450nm 产生吸收值($P/N \geq 2.1$),并被判定为阳性;如果样品鼠伤寒沙门氏菌浓度太低($P/N < 2.1$)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。

[0015] (三) 有益效果

本发明提供的鼠伤寒沙门氏菌双抗体夹心检测方法采用了理化性质高度均一、特异性好、可以大量制备的鼠伤寒沙门氏菌 LPS 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,适合食品行业大规模、高通量、快速、灵敏的检测要求,具有推广和应用价值。

[0016] 生物材料样品保藏:

单克隆细胞株 6 号,即 6E2,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. 7206,保藏日期 2013 年 1 月 23 日。

附图说明

[0017] 图 1 鼠伤寒沙门氏菌双抗体夹心法的标准曲线。

具体实施方案

[0018] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0019] 一、仪器:

TGL - 40B 台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂

KFLOW 纯水机,凯佛隆公司

ZD - 9556 水平摇床,太仓科教器材厂

96 孔 8×12 可拆酶标板,厦门怡佳美实验器材有限公司

MuLtiska Mks 酶标仪,Thermo Labsystems 公司

可调试移液器, Thermo Labsystems 公司

涡旋混合器, 上海沪西仪器分析厂

二、试剂:

四甲基联苯胺 (TMB), 上海晶纯实业有限公司

其他试剂均为分析纯试剂

三、步骤

1. 单克隆抗体的制备

(1) 实验动物: 选 5 只 7 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫。

[0020] (2) 抗原配置: 将免疫原(混合后的鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311 菌体和光滑型的鼠伤寒沙门氏菌 LPS) 用生理盐水稀释, 涡旋混合均匀。

[0021] (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。

[0022] 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。

[0023] (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。

[0024] (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。

[0025] (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°C 保存。

[0026] 2、ELISA 反应过程:

抗体效价测定步骤:

(1) 将包被原用包被缓冲液作系列稀释包被 96 孔酶标板, $100\ \mu\text{L}$ /孔, 于 4°C 冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温, 每孔注入 $200\ \mu\text{L}$ PBST 溶液, 摇床上振荡 3 min, 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。

[0027] (2) 充分洗涤后, 用封闭缓冲液封闭酶标板, $200\ \mu\text{L}$ /孔, 于 37°C 温育箱内温育 2 h 后取出烘干待用。

[0028] (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, $100\ \mu\text{L}$ /孔, 37°C 孵育 1 h 后洗涤、拍干。

[0029] (4) 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 、1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 孵育 1 h 后洗涤、拍干。

[0030] (5) 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 显色液(TMB 与底物液比例为 1:5), 暗处 37°C 反应 15 min, 取出后每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 终止液(2 mol/L 的硫酸), 用酶标仪测定吸光值 A_{450} 。

[0031] 鼠伤寒沙门氏菌双抗体夹心法测定步骤:

a、包被: 用 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 6E2 包被酶标板, $100\ \mu\text{L}$ /孔, 4°C 过夜。

[0032] b、洗涤: 用 PBST 洗涤反应板三次, 每次 3min, $200\ \mu\text{L}$ /孔, 然后甩干反应板。

[0033] c、封闭: 含 0.2% 明胶的 CBS, $200\ \mu\text{L}$ /孔, 37°C 封闭 2h。

[0034] d、洗涤: 同 b。

[0035] e、样品: 用 PBST 将鼠伤寒沙门氏菌稀释成 3.70×10^6 、 1.23×10^6 、 4.11×10^5 、

1. 3.7×10^5 、 4.57×10^4 、 1.52×10^4 、 5.08×10^3 、 1.69×10^3 、 5.64×10^2 cfu/mL 系列浓度,另设一个 PBST 空白对照。每孔加入 100 μ L 样品,于 37°C 温育 1h。

[0036] f、洗涤:同 b。

[0037] g、加酶标抗体(6E2-HRP, 2 μ g/mL), 100 μ L / 孔, 37 C 反应 1h。

[0038] h、洗涤:同 b。

[0039] i、显色:加底物 TMB100 μ L / 孔,显色 10min。

[0040] j、终止:加终止液 50 μ L / 孔。

[0041] k、测定:用酶标仪检测 OD_{450nm}

3、交叉率的测定

将肠炎沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、E. coli、E. coli 0157:H7、阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌精确稀释成 10^8 cfu/mL、 10^7 cfu/mL、 10^6 cfu/mL、 10^5 cfu/mL, 在建立的鼠伤寒沙门氏菌双抗体夹心法体系中检测吸光值,并设空白孔和鼠伤寒沙门氏菌阳性对照,每个浓度做 6 次测定平均值,做 3 次重复实验。

[0042] 试验结果如下:

1、标准曲线:本发明所获得的抗原检测的检测范围为 $10^4 \sim 10^6$ cfu/mL, $R^2=0.99$ 具体请见说明书附图。

[0043] 2、LOD:LOD 是空白的平均吸收值加 3 倍的空白吸收值的标准偏差对应的抗原浓度,鼠伤寒沙门氏菌双抗体夹心法 LOD 为 500cfu/mL。

[0044] 3、交叉反应率(CR%)

结果:鼠伤寒沙门氏菌正常显色,而 10^8 cfu/mL 及以下浓度的其它测试菌株均不显色(OD < 0.15)。说明建立的鼠伤寒沙门氏菌夹心法与肠炎沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、E. coli、E. coli 0157:H7、阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应,特异性良好。

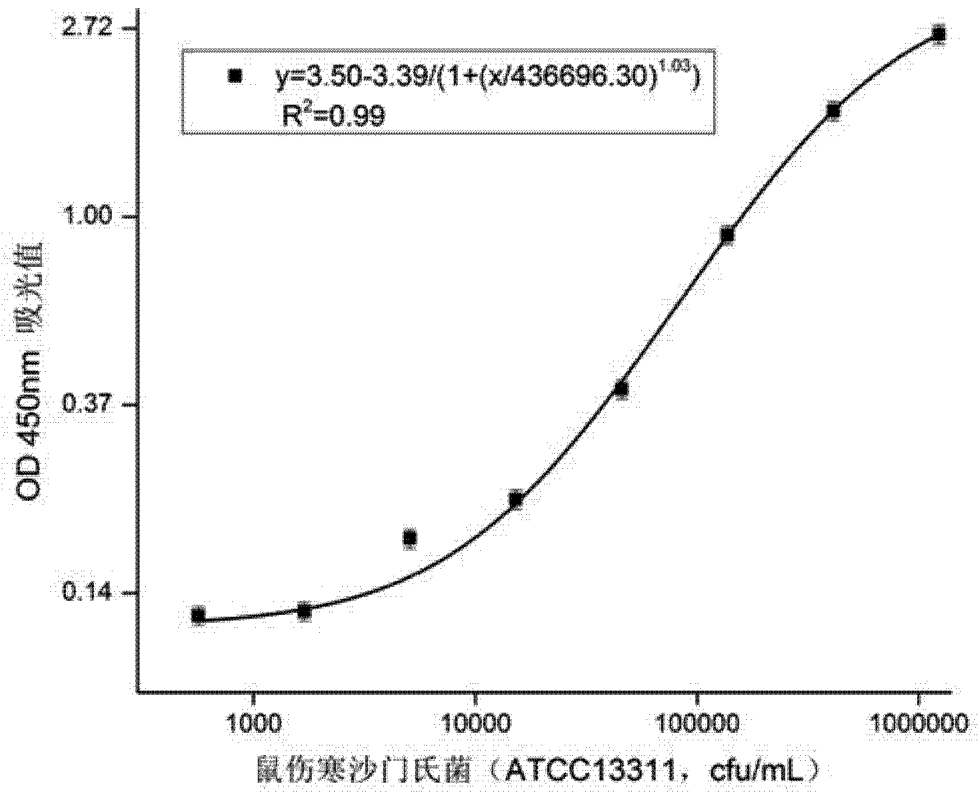


图 1

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103558388A | 公开(公告)日 | 2014-02-05 |
| 申请号 | CN201310506513.5 | 申请日 | 2013-10-24 |
| [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 徐丽广 马伟 刘丽强 | | |
| 发明人 | 胥传来 王文彬 匡华 徐丽广 马伟 刘丽强 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | G01N33/531 G01N33/56916 G01N33/577 | | |
| 其他公开文献 | CN103558388B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种基于单克隆抗体的检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的双抗体夹心法，属于免疫分析技术领域。本发明应用鼠伤寒沙门氏菌ATCC13311和光滑型的鼠伤寒沙门氏菌LPS混合免疫7周龄BALB/c小鼠，经免疫、融合、筛选得10株LPS单克隆抗体，分别标记HRP，并以鼠伤寒沙门氏菌进行两两配对。以6E2CGMCCNo.7206单抗作为包被抗体和酶标抗体，以鼠伤寒沙门氏菌为标准品建立了夹心ELISA方法，LOD为500cfu/mL。用理化性质高度均一、特异性好、可大量制备的单克隆抗体建立的夹心法灵敏度高，成本低，与肠炎沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、E.coli、E.coliO157:H7、阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应，为食品中鼠伤寒沙门氏菌检测提供了快速高效的分析手段。

