



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105527441 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201610039900.6

(22)申请日 2016.01.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105527441 A

(43)申请公布日 2016.04.27

(83)生物保藏信息
CGMCC No.10875 2015.05.19
CGMCC No.10876 2015.05.19

(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)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C07K 16/12(2006.01)

(56)对比文件

CN 103940995 A,2014.07.23,

CN 104316688 A,2015.01.28,

CN 104792991 A,2015.07.22,

CN 104237519 A,2014.12.24,

CN 104178458 A,2014.12.03,

KR 20040088597 A,2004.10.20,

US 2006078951 A1,2006.04.13,

审查员 黄晓丽

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

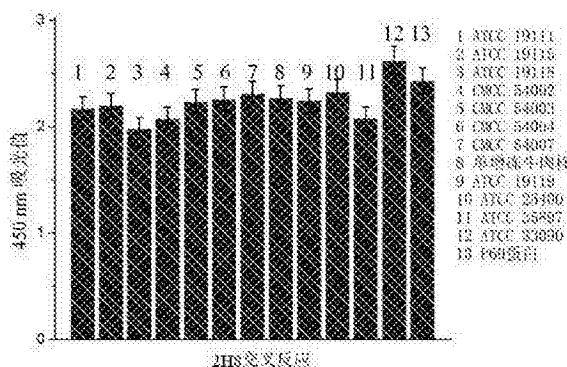
(54)发明名称

一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法

(57)摘要

一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法,属于免疫分析技术领域。本发明用原核表达的单增李斯特菌P60蛋白免疫8周龄BALB/c小鼠,经免疫、融合、多重筛选得到15株李斯特菌属特异性单克隆抗体,分别标记辣根过氧化物酶HRP,并以单增李斯特菌CMCC54003为目标物进行两两配对。经筛选不同配对的交叉反应,以2G7为包被抗体、2H8-HRP为酶标抗体建立夹心ELISA方法对包括单增李斯特菌在内的李斯特菌属均有交叉反应。对测试的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌0157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌没有交叉反应。本发明制备了李斯特菌属特异性的单克隆抗体并建立了双抗体夹心ELISA法,为食品中李斯特菌属的特异性快速检测提供了技术

手段。



1. 一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法,其特征在于酶标板上包被了包被抗体2G7,可特异性捕获李斯特菌属内的李斯特菌,2H8-HRP为酶标抗体,包被抗体2G7与李斯特菌结合后催化底物在450nm产生吸收值, $P/N \geq 2.1$ 时被判定为阳性,反之, $P/N < 2.1$ 则判定为阴性;

抗体2G7,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,保藏编号:CGMCC No.10875;

酶标抗体2H8,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,保藏编号:CGMCC No.10876;

步骤为:

(1) 李斯特菌属单克隆抗体的制备

以原核表达的单增李斯特菌P60蛋白为免疫原,免疫8周龄BALB/c小鼠,经常规免疫、融合后用单增李斯特菌CMCC 54003菌体包被检测阳性,得到的阳性孔用ATCC 19111、ATCC 19115、ATCC 19118、CMCC 54002、CMCC 54004、CMCC 54007、冻牛肉分离株以及李斯特菌属的ATCC 19119、ATCC 33090、ATCC 35897、ATCC 25400包被的板检测细胞株的交叉反应,挑选对李斯特菌属均有交叉反应的强阳性孔进行亚克隆;随后3次亚克隆后第7天均采用同样的方案检测阳性孔的交叉反应并选孔进行亚克隆;多重筛选得到15株李斯特菌属特异性单克隆抗体,分别标记辣根过氧化物酶HRP,并以单增李斯特菌CMCC54003为目标物进行两两配对;

配对参数如下:包被抗体2G7 4 μ g/mL;包被液为pH 9.6、0.01M的碳酸盐缓冲液;标品CMCC 54003浓度 5×10^7 CFU/mL;标品稀释液含0.1% Tween 20的pH 7.2、0.01M的PBS;酶标抗体2H8-HRP稀释1000倍使用,在此条件下,实验成功得到了18对 $P/N > 5$ 的配对;

(2) 李斯特菌属特异性ELISA方法的建立

配对后,比较不同配对的检测限和交叉反应;在此基础上,用包被抗体2G7和酶标抗体2H8-HRP建立了李斯特菌属特异性的夹心ELISA分析方法;

具体参数如下:

包被抗体2G7包被浓度:4 μ g/mL,

包被液:pH 9.6、0.01M碳酸盐缓冲液,

标品稀释液:含0.1% Tween 20的pH 7.2、0.01M的PBS溶液,

酶标抗体2H8-HRP浓度:2 μ g/mL,

反应时间:包被、封闭:37 $^{\circ}$ C,2h;标准品:37 $^{\circ}$ C,1h;酶标抗体37 $^{\circ}$ C,1h;显色10min;

本方法对包括单增李斯特菌在内的李斯特菌属的快速,高灵敏检测;对单增李斯特菌ATCC 19111、ATCC 19115、ATCC 19118、CMCC 54002、CMCC 54003、CMCC 54004、CMCC 54007、冻牛肉分离株以及李斯特菌属的ATCC 19119、ATCC 33090、ATCC 35897、ATCC 25400的实际检测限 $P/N \geq 2.1$ 分别为 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.22×10^6 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 4.53×10^4 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL;同时对P60蛋白的实际检测限达到了0.137 ng/mL,线性范围为0.13-11.1ng/mL;对测试的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌0157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌没有交叉反应。

一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA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李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法,属于免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 单增李斯特菌是一种兼性厌氧性革兰氏阳性细菌,属于李斯特菌属。它主要以食物为传染媒介,是全球范围内的最致命的食源性病原体之一。李斯特菌在环境中分布广泛,肉类、蛋类、禽类、乳制品、蔬菜等均已被证实是李斯特菌的感染源。感染李斯特菌后会引起肌肉疼痛、恶心、腹泻等症状,严重的可引起血液和脑组织感染,而且由于该菌在4℃冷藏温度下仍可生长繁殖,被污染的冷藏食品对人类健康具有很大威胁。因此很多国家都已经采取措施来控制食品中的李斯特菌,并制定了相应的标准。

[0003] 李斯特菌属共分为10个种,包括单增李斯特菌 (*L.monocytogenes*)、绵羊李斯特菌 (*L.ivanii*)、英诺克李斯特菌 (*L.innocua*)、威尔李斯特菌 (*L.welshimeri*)等。其中单增李斯特菌是引起人类致病的主要原因。然而,作为食品卫生学的指标,李斯特菌常常被要求专门进行检测。检测李斯特菌属的方法目前主要有平板培养法、聚合酶链式反应法(PCR)、酶联免疫方法(ELISA)。

[0004] ELISA作为检测微生物的常用方法具有快速、灵敏、特异性好、高通量、不需要大型仪器,易于推广的特点。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,检测抗体一般为多克隆抗体或单克隆抗体。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高的应用价值。本发明制备了李斯特菌属特异性单克隆抗体并建立起李斯特菌属特异性的双抗体夹心ELISA方法,为食品中李斯特菌属的监测与控制提供了分析手段。

发明内容

[0005] (一)要解决的技术问题

[0006] 李斯特菌属包括10个种,其中的单增李斯特菌又分为13种亚型,种类较为繁多。如何实现对李斯特菌属的均一性、特异性检测是目前ELISA方法仍需要解决的问题。本发明的目的在于建立一种具有较高灵敏度、均一、特异性好、操作简单的ELISA方法用于检测食品中的李斯特菌属的。

[0007] (二)技术方案

[0008] 为实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0009] 一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法,酶标板上包被了包被抗体2G7,可特异性捕获李斯特菌属内的李斯特菌,2H8-HRP为酶标抗体,包被抗体2G7与李斯特菌结合后催化底物在450nm产生吸收值, $P/N \geq 2.1$ 时被判定为阳性,反之, $P/N < 2.1$ 则判定为阴性;

[0010] 抗体2G7,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,保藏编号:CGMCC No.10875;

[0011] 酶标抗体2H8,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,保藏编号:CGMCC No.10876;

[0012] 步骤为:

[0013] (1)李斯特菌属单克隆抗体的制备

[0014] 以原核表达的单增李斯特菌P60蛋白(*Listeria monocytogenes* J0161, GenBank: AE0 02672.1)为免疫原,免疫8周龄BALB/c小鼠并通过杂交瘤技术融合小鼠脾脏。免疫程序如下:第一周进行首免,80 μ g/只,弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射;第四周进行二免,80 μ g/只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;第六周进行三免,40 μ g/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,检测小鼠血清对李斯特菌属及其它杂菌的交叉反应;第九周进行四免,40 μ g/只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;第十周检测小鼠血清对李斯特菌属及其它杂菌的交叉反应,筛选对李斯特菌属效价高,交叉均一并且对其它杂菌没有交叉的小鼠;第十二周进行冲刺免疫,20 μ g /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用常规杂交瘤技术融合小鼠脾脏。

[0015] (2)采用多重筛选得到具有李斯特菌属特异性的细胞株。经常规免疫融合后用单增李斯特菌CMCC 54003菌体包被检测阳性,得到的阳性孔用ATCC 19111(1/2a)、ATCC 19115(4b)、ATCC 19118(4e)、CMCC 54002(1/2c)、CMCC 54004、CMCC 54007、冻牛肉分离株(北京良润生物技术有限公司提供)以及李斯特菌属的ATCC 19119(*Listeria ivanovii*)、ATCC 33090(*Listeria innocua*, 6a)、ATCC 35897(*Listeria welshimeri*, 6b)、ATCC 25400(*Listeria grayi*)包被的板检测细胞株的交叉反应,(以上ATCC菌体见American Type Culture Collection,美国模式培养物保藏中心 简称ATCC;以上CMCC菌株见国家微生物资源平台 中国医学细菌保藏管理中心 简称CMCC)挑选对李斯特菌属均有交叉反应的强阳性孔进行亚克隆;随后3次亚克隆后第7天均采用同样的方案检测阳性孔的交叉反应并选孔进行亚克隆;多重筛选得到15株李斯特菌属特异性单克隆抗体,分别标记辣根过氧化物酶HRP,并以单增李斯特菌CMCC54003为目标物进行两两配对;

[0016] (3)单克隆抗体的配对筛选

[0017] 15株李斯特菌属特异性单克隆抗体纯化后分别标记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2G7 4 μ g/mL;包被液为pH 9.6、0.01M的碳酸盐缓冲液;标品CMCC 54003浓度 5×10^7 CFU/mL;标品稀释液含0.1% Tween 20 的pH7.2、0.01M的PBS;酶标抗体2H8-HRP稀释1000倍使用,实验成功得到了18对P/N值>5的配对;

[0018] (4)李斯特菌属特异性ELISA方法的建立

[0019] 配对后,比较不同配对的检测限和交叉反应,在此基础上,用包被抗体2G7和酶标抗体2H8-HRP建立了李斯特菌属特异性的夹心ELISA分析方法;具体参数如下:

[0020] 包被抗体2G7包被浓度:4 μ g/mL,

[0021] 包被液:pH9.6、0.01M碳酸盐缓冲液,

[0022] 样品稀释液:含0.1% Tween 20 的pH 7.2、0.01M的PBS溶液,

[0023] 酶标抗体2H8-HRP浓度:2 μ g/mL,

[0024] 反应时间:包被、封闭:37 $^{\circ}$ C,2h;标准品:37 $^{\circ}$ C,1h;酶标抗体37 $^{\circ}$ C,1h;显色10min;

[0025] 本方法对包括单增李斯特菌在内的李斯特菌属的快速,高灵敏检测;对单增李斯特菌ATCC 19111(1/2a)、ATCC 19115 (4b)、ATCC 19118(4e)、CMCC 54002(1/2c)、CMCC 54003、CMCC 54004、CMCC 54007、冻牛肉分离株以及李斯特菌属的ATCC 19119(*Listeria ivanovii*)、ATCC 33090(*Listeria innocua*, 6a)、ATCC 35897 (*Listeria welshimeri*, 6b)、ATCC 25400(*Listeria grayi*)的实际检测限($P/N \geq 2.1$)分别为 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.22×10^6 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 4.53×10^4 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL;同时对P60蛋白的实际检测限达到了0.137 ng/mL,线性范围为0.13-11.1ng/mL;对测试的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌0157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌没有交叉反应。

[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2G7,合适的浓度下可以最大限度捕获李斯特菌属;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,加入样品和对照,37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板3次,加入酶标抗体2H8-HRP,37 $^{\circ}$ C孵育1h;洗板4次,加入显色液显色12min。如果样品有足够的李斯特菌,被捕获抗体捕获后与酶标抗体2H8-HRP结合并催化底物在450nm产生吸收值($P/N \geq 2.1$),被判定为阳性;如果样品没有李斯特菌或浓度太低($P/N < 2.1$)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。

[0028] (三)有益效果

[0029] 本发明制备了李斯特菌属特异性单克隆抗体并建立了李斯特菌属双抗体夹心ELISA法,该方法对包括单增李斯特菌在内的李斯特菌属均有交叉反应。该方法对单增李斯特菌及李斯特菌属的实际检测限($P/N \geq 2.1$)在 4.53×10^4 CFU/mL到 1.22×10^6 CFU/mL之间。同时对P60蛋白的实际检测限为0.137 ng/mL,线性范围为0.13-11.1ng/mL。对测试的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌0157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌没有交叉反应。

[0030] 生物材料样品保藏:

[0031] 单克隆细胞株2G7,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2015年5月19日,保藏编号:CGMCC No.10875。

[0032] 单克隆细胞株2H8,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2015年5月19日,保藏编号:CGMCC No.10876。

附图说明

[0033] 图1 单克隆抗体2H8与李斯特菌属的交叉反应。

[0034] 图2 单克隆抗体2G7与李斯特菌属的交叉反应。

[0035] 图3 李斯特菌双抗体夹心ELISA法检测P60蛋白标准曲线。

[0036] 图4 李斯特菌双抗体夹心ELISA法检测李斯特菌属标准曲线。

具体实施方案

- [0037] 以下通过实施例进一步说明本发明。
- [0038] 一、仪器：
- [0039] TGL-40B台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂
- [0040] KFLOW纯水机,凯佛隆公司
- [0041] ZD-9556水平摇床,太仓科教器材厂
- [0042] 96孔8×12可拆酶标板,厦门怡佳美实验器材有限公司
- [0043] MuLtiska Mks酶标仪,Thermo Labsystems公司
- [0044] 可调试移液器,Thermo Labsystems公司
- [0045] 涡旋混合器,上海沪西仪器分析厂
- [0046] 二、试剂：
- [0047] 四甲基联苯胺(TMB),上海晶纯实业有限公司
- [0048] 其他试剂均为分析纯试剂
- [0049] 三、步骤
- [0050] 1.单克隆抗体的制备
- [0051] (1)实验动物:选5只8周龄的BALB/c小鼠进行免疫;
- [0052] (2)抗原配置:将单增李斯特菌P60蛋白用生理盐水稀释,涡旋混合均匀;
- [0053] (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;
- [0054] 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;
- [0055] (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;
- [0056] (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;
- [0057] (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。
- [0058] 2、ELISA反应过程:
- [0059] 抗体效价测定步骤:
- [0060] (1)将包被原用包被缓冲液作系列稀释包被96孔酶标板,100 μL/孔,于4℃冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温,每孔注入200 μL 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;
- [0061] (2)充分洗涤后,用封闭缓冲液封闭酶标板,200 μL/孔,于37℃温育箱内温育2 h后取出烘干待用;
- [0062] (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 μL/孔,37℃孵育1 h后洗涤、拍干;
- [0063] (4)每孔加入100 μL、1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG,37℃孵育1 h后洗涤、拍干;
- [0064] (5)每孔加入100 μL显色液(TMB与底物液比例为1:5),暗处37℃反应15 min,取出后每孔加入100 μL终止液(2 moI/L的硫酸),用酶标仪测定吸光值A₄₅₀。

- [0065] 李斯特菌属双抗体夹心ELISA法测定步骤:
- [0066] A 包被:用4 μ g/mL的2G7包被酶标板,100 μ L /孔,4 $^{\circ}$ C过夜;
- [0067] B 洗涤:用PBST洗涤反应板三次,每次3min,200 μ L/孔,然后甩干反应板;
- [0068] C 封闭:含0.2%明胶的CBS,200 μ L /孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h;
- [0069] D 洗涤:同B;
- [0070] E 样品:用PBST将李斯特菌属稀释成 10^8 、 3.3×10^7 、 1.1×10^7 、 3.7×10^6 、 1.23×10^6 、 4.12×10^5 、 1.37×10^5 、 4.57×10^4 CFU /mL系列浓度,另设4个PBST空白对照。每孔加入100 μ L样品,于37 $^{\circ}$ C温育1h;
- [0071] F、洗涤:同B;
- [0072] G、加酶标抗体(2H8-HRP,2 μ g/mL),100 μ L /孔,37 $^{\circ}$ C反应1h;
- [0073] H、洗涤:同B;
- [0074] I、显色:加底物TMB 100 μ L /孔,显色10min;
- [0075] J、终止:加终止液50 μ L /孔;
- [0076] K、测定:用酶标仪检测OD_{450nm}
- [0077] 3、交叉率的测定
- [0078] 将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌O157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌精确稀释成 10^8 CFU/mL、 10^7 CFU/mL并在建立的单增李斯特菌双抗体夹心ELISA法体系中检测吸光值,并设空白孔和单增李斯特菌阳性对照,每个浓度做6次测定平均值,做3次重复实验。
- [0079] 试验结果如下:
- [0080] 1、标准曲线:本方法对李斯特菌检测范围在 1.37×10^5 — 3.3×10^7 CFU/mL,对单增李斯特菌ATCC19118(4e)检测范围在 1.26×10^6 — 10^8 CFU/mL,对P60蛋白的检测范围在0.13-11.1ng/mL,具体请见说明书附图。
- [0081] 2、实际检测限:空白的平均吸收值的2.1倍的吸收值对应的菌体浓度。对单增李斯特菌ATCC 19111(1/2a)、ATCC 19115 (4b) 、ATCC 19118(4e)、CMCC 54002(1/2c)、CMCC 54003、CMCC 54004、CMCC 54007、冻牛肉分离株以及李斯特菌属的ATCC 19119(*Listeria ivanovii*)、ATCC 33090(*Listeria innocua*, 6a)、ATCC 35897 (*Listeria welshimeri*, 6b)、ATCC 25400(*Listeria grayi*)的实际检测限(P/N \geq 2.1)分别为 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.22×10^6 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 4.53×10^4 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL、 1.36×10^5 CFU/mL。同时对P60蛋白的实际检测限达为0.137 ng/mL,线性范围为0.13-11.1ng/mL。
- [0082] 3、交叉反应率(CR%)
- [0083] 结果:李斯特菌正常显色,而 10^8 CFU/mL及以下浓度的其它测试菌株均不显色(OD< 0.15)。说明建立的李斯特菌属夹心法与金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌O157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌无交叉反应,特异性良好。

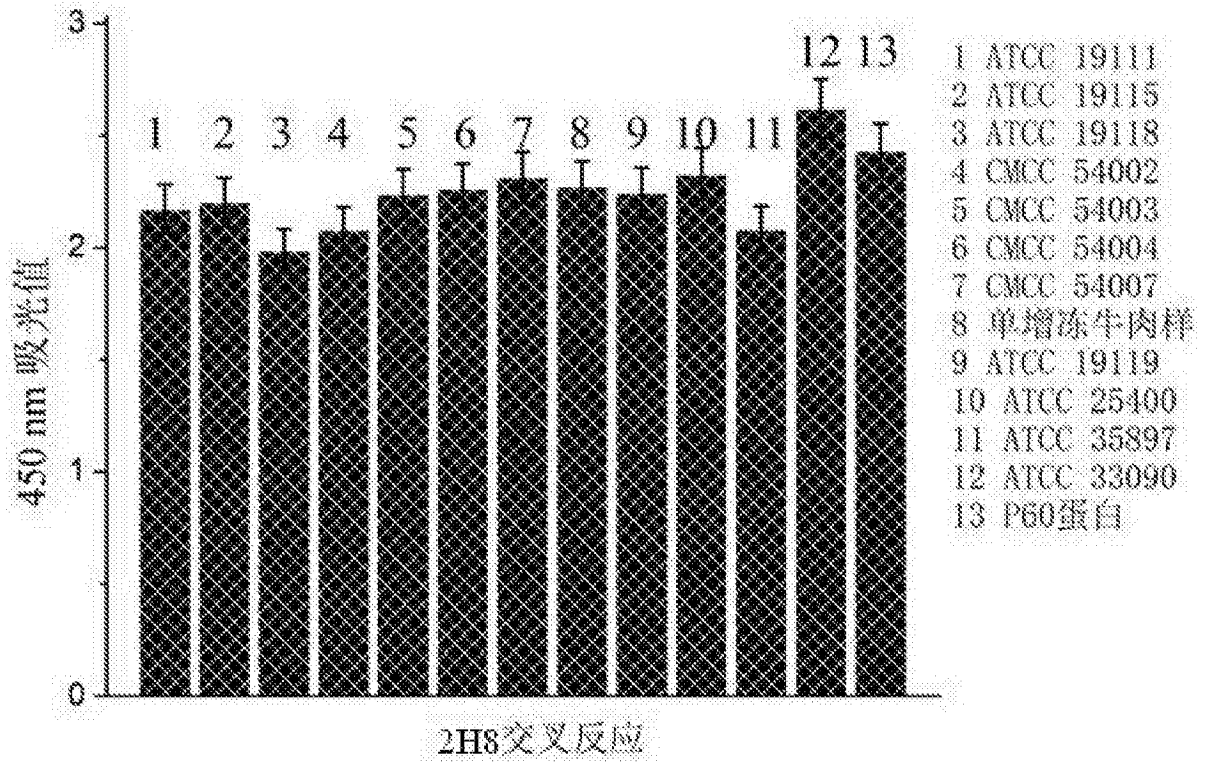


图1

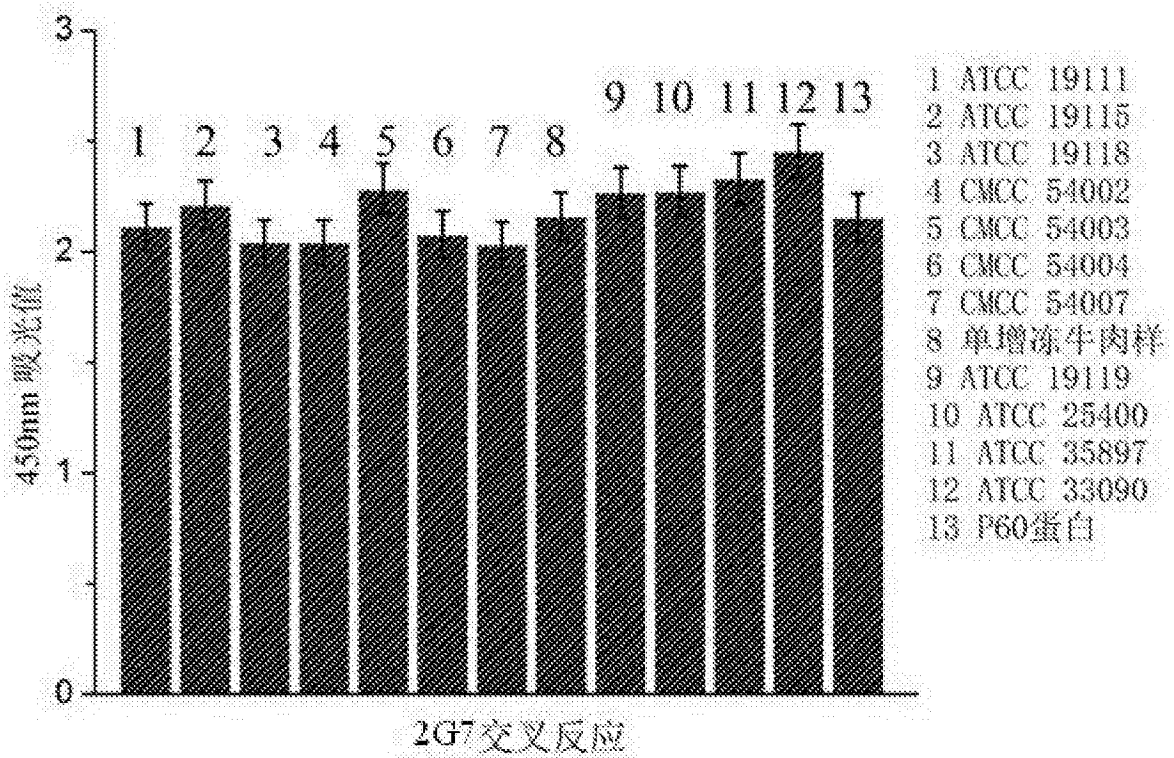


图2

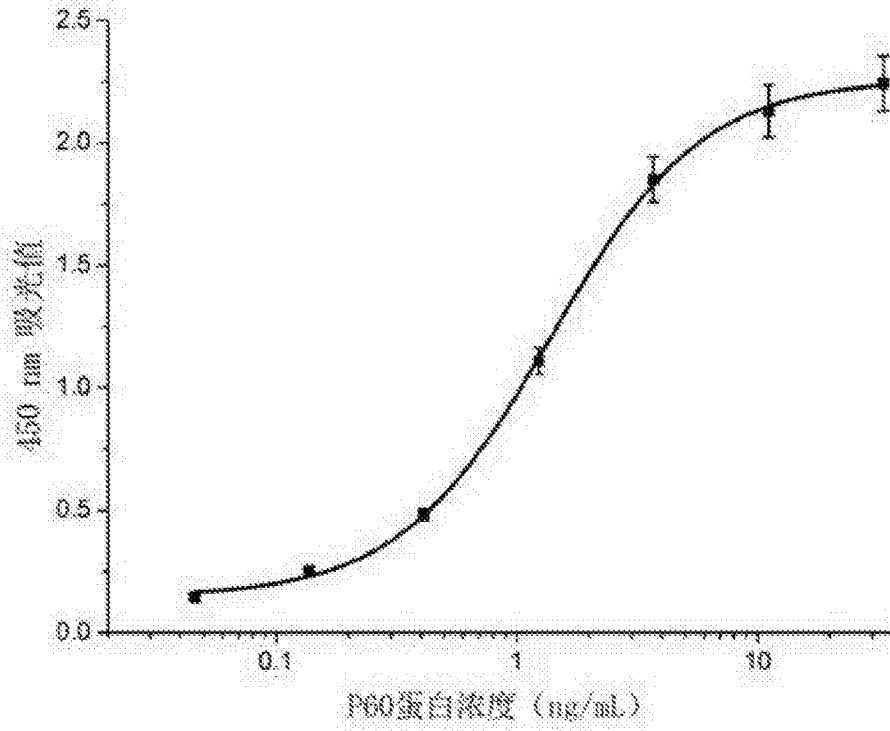


图3

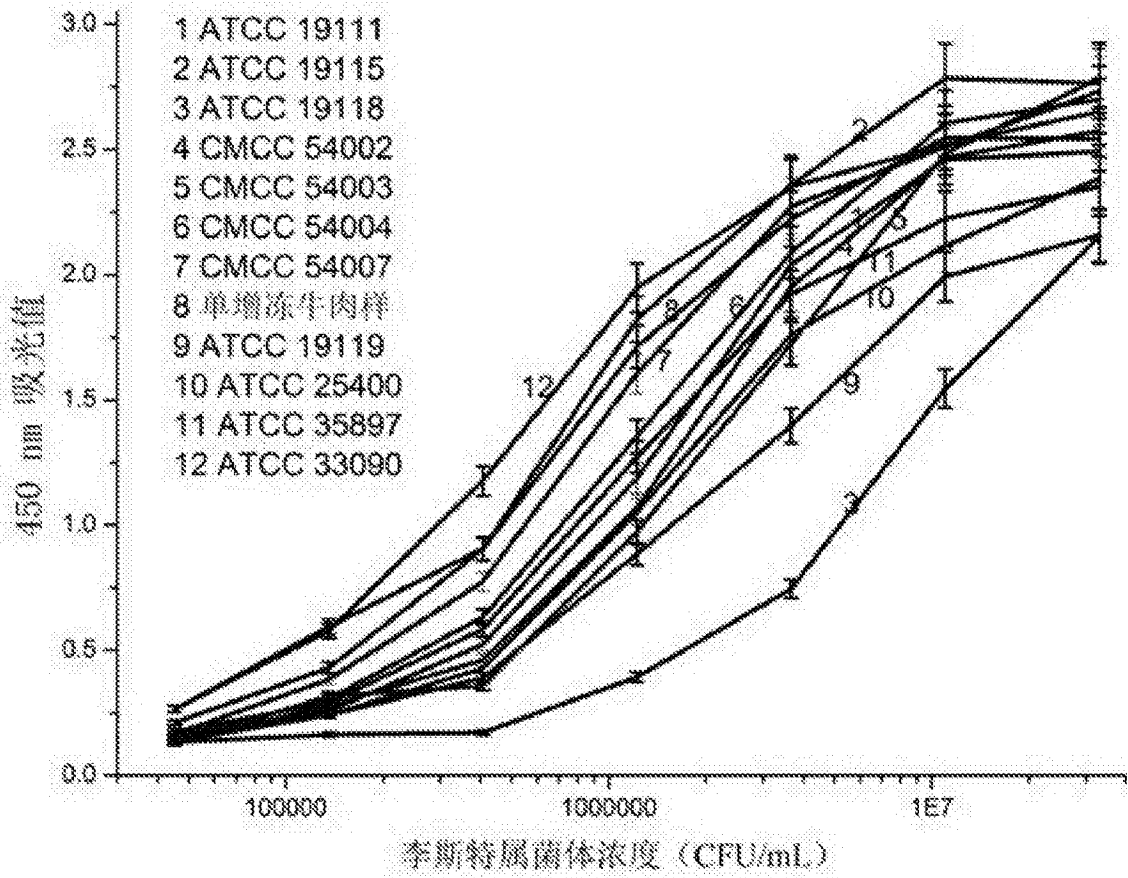


图4

专利名称(译)	一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法		
公开(公告)号	CN105527441B	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201610039900.6	申请日	2016-01-21
[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 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535 C07K16/12		
CPC分类号	C07K16/1296 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56911 G01N33/577		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN105527441A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于单克隆抗体的检测食品中李斯特菌属的双抗体夹心ELISA法，属于免疫分析技术领域。本发明用原核表达的单增李斯特菌P60蛋白免疫8周龄BALB/c小鼠，经免疫、融合、多重筛选得到15株李斯特菌属特异性单克隆抗体，分别标记辣根过氧化物酶HRP，并以单增李斯特菌CMCC54003为目标物进行两两配对。经筛选不同配对的交叉反应，以2G7为包被抗体、2H8-HRP为酶标抗体建立夹心ELISA方法对包括单增李斯特菌在内的李斯特菌属均有交叉反应。对测试的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、大肠杆菌O157、沙门氏菌、阪崎肠杆菌、空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌没有交叉反应。本发明制备了李斯特菌属特异性的单克隆抗体并建立了双抗体夹心ELISA法，为食品中李斯特菌属的特异性快速检测提供了技术手段。

