



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103941004 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201410036188. 5

(22) 申请日 2014. 01. 25

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8770 2014. 01. 14

(73) 专利权人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街 61 号

(72) 发明人 王海荣 孙佳芝 柴同杰 李课

陈勇 逢伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

审查员 黄晓丽

权利要求书2页 说明书8页

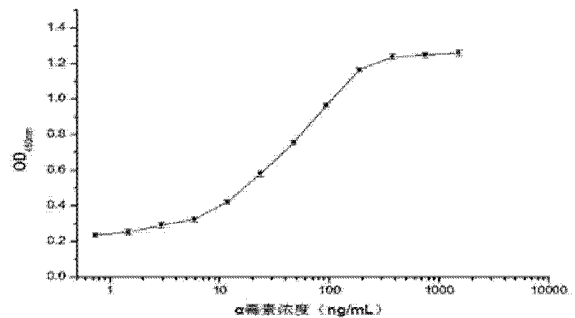
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双单抗夹心 ELISA 检测方法, 该检测方法是采用原核表达的  $\alpha$  毒素蛋白为免疫原, 利用杂交瘤技术制备单克隆抗体作为检测抗体和捕获抗体, 通过试验优化反应条件, 以系列含量的  $\alpha$  毒素蛋白作为标准制作标准曲线, 建立了双单抗夹心 ELISA 方法, 并对该方法各项指标进行验证。具体包括以下步骤: (1)  $\alpha$  毒素原核表达; (2) 抗  $\alpha$  毒素单克隆抗体的制备; (3) 双单抗夹心 ELISA 方法的建立; (4) 标准曲线的建立; (5) 对该双单抗夹心 ELISA 方法进行性能评价。该方法特异性好、灵敏度高、稳定性好, 快速、简便, 且能有效地定量检测 A ~ E 型产气荚膜梭菌培养上清中  $\alpha$  毒素, 为  $\alpha$  毒素提供了高效的检测工具。



1. 一种用于非疾病诊断目的的产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法, 其特征在于包括以下步骤:

1) 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素的原核表达, 得到纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白;

2) 抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素单克隆抗体的制备:

选择与骨髓瘤细胞 Sp 2/0 同源的纯系雌性 BALB/c 小鼠作为免疫动物; 首免为步骤 1) 中得到的纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白与等体积弗式完全佐剂完全乳化后, 100  $\mu$ g/ 只腹腔注射; 二免、三免分别于首免后二周和五周将重组  $\alpha$  毒素蛋白与等体积弗式不完全佐剂完全乳化后, 100  $\mu$ g/ 只腹腔注射; 三免后三周腹腔注射不加佐剂的重组  $\alpha$  毒素蛋白 50 ~ 100  $\mu$ g/ 只, 注射后 3-5 天取效价最高小鼠脾细胞用于细胞融合;

取生长状态良好的骨髓瘤细胞 SP2/0 与效价最高小鼠脾细胞利用 PEG1500 进行化学法融合, 运用间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞, 并采用有限稀释法进行 3 ~ 5 次亚克隆, 得到保藏号为 CGMCC8770 的抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素杂交瘤细胞株 CP f12; 利用 CP f12 制备单克隆抗体 F12;

3) 抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素多克隆抗体的制备:

选取新西兰大白兔作为免疫动物, 首免为纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白与等体积弗式完全佐剂完全乳化后背部皮下多点注射 1mg/ 只; 首免后将弗式不完全佐剂与等体积纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白完全乳化每间隔两周免疫一次, 三免后两周用不加佐剂的步骤 1) 得到的纯化的重组  $\alpha$  毒素加强免, 15d 后采集兔血清, 利用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体, 得到多克隆抗体;

4) 双抗体夹心 ELISA 定量检测方法 & 标准曲线的建立

(1) 用抗原包被液将多克隆抗体即包被抗体稀释至 3  $\mu$ g/mL; 100  $\mu$ L/ 孔包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 所述的抗原包被液组分为 0.1M 碳酸盐缓冲液, 其 pH 9.6;

(2) 用 PBST 溶液洗涤 3 次, 加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液作为封闭液 200  $\mu$ L/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜; 所述 PBST 溶液组分为: 含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液: NaCl 8g/L、KCl 0.2g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 3.58g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27g/L, pH 7.4;

(3) 用 PBST 溶液洗涤 3 次后加入待检样品, 100  $\mu$ L/ 孔, 同时设置阴阳性和空白对照, 阳性对照为步骤 1) 得到的纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白, 阴性对照分别为按常规方法制备的大肠杆菌培养上清和 PBS 缓冲液, 所述 PBS 缓冲液组分为: 含 NaCl 8g/L、KCl 0.2g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 3.58g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27g/L; 空白对照为不加任何样品, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

(4) 3 次 PBST 溶液洗涤后, 将杂交瘤细胞株 CP f12 制备的单克隆抗体 F12 用 PBS 缓冲液稀释至 0.2  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h;

(5) 用 PBST 溶液洗涤 3 次, 加入用 PBS 缓冲液 1:10000 体积比稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 溶液洗涤 3 次;

(6) 最后加入可溶性 TMB 底物显色液 100  $\mu$ L/ 孔, 室温条件避光反应 15min, 用 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液终止反应, 450nm 处读取吸光值;

(7) 以  $\alpha$  毒素蛋白稀释浓度为横坐标, OD<sub>450nm</sub> 值为纵坐标绘制曲线图; 根据曲线图, 选择最佳线性范围, 以浓度的自然对数 LN(x) 为横坐标, OD<sub>450nm</sub> 值为纵坐标绘制标准曲线, 通过标准曲线计算待测样品中  $\alpha$  毒素浓度;

5) 结果判定标准的确定

计算阴性样品平均值 ( $\bar{X}$ ) 与标准差 (SD), 求得  $\bar{X}+3SD$  为阳性临界值,  $\bar{X}+2SD$  为阴性临界值; 运用建立的 DAS-ELISA 测定  $OD_{450nm}$ ,  $OD_{450nm} > \bar{X}+3SD$  为阳性,  $OD_{450nm} < \bar{X}+2SD$  为阴性,  $\bar{X}+2SD < OD_{450nm} < \bar{X}+3SD$  为可疑样品。

## 产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法。

### (二) 发明背景

[0002] 产气荚膜梭菌能引起羔羊痢疾和羔羊、牛犊、仔猪、家兔、雏鸡等的坏死性肠炎、肠毒血症等疾病,发病急、死亡率高,是严重危害养殖业的重要疾病,给各国畜牧业发展带来巨大经济损失。各型产气荚膜梭菌均产生  $\alpha$  毒素 (CPA),因此  $\alpha$  毒素是诊断魏氏梭菌病的重要依据,亦是判定食品安全的重要指标。

[0003] 检测  $\alpha$  毒素的经典方法包括动物试验、毒素中和试验、卵磷脂分解试验等,但操作繁琐、敏感性较低。近年随着生物技术的发展,国内外对  $\alpha$  毒素的检测方法已有很大进展,Naylor 等建立了多抗基础上的 ELISA 方法,Hale 等建立了捕获抗体 ELISA,McCourt 等用双夹心 ELISA 检测  $\alpha$  毒素。但是这些方法灵敏度不是特别高,且在国内可操作性欠缺,而国外可购买的检测试剂盒价格昂贵亦无法定量和大批量检测,难以在国内推广,因此为了弥补此方法在国内  $\alpha$  毒素检测中的空白,急切需要建立快速、灵敏、特异并能定量和大批量检测的 ELISA 方法,本方法的建立也为产气荚膜梭菌病早期诊断、后续研究提供有效工具。

### (三) 发明内容

[0004] 本发明建立了特异性好、灵敏度高、稳定性好,快速、简便,高效检测  $\alpha$  毒素的双抗体夹心 ELISA 方法。该方法检测速度快、操作简单、可定量检测和大批量检测,能大大缩短检测周期,为  $\alpha$  毒素的早期检测和魏氏梭菌的传播预防提供有效检测工具。

[0005] 为达到上述目的,本发明的技术方案为:

[0006] 一种产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法,具体操作步骤是:

[0007] 1 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素的原核表达,得到纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白;

[0008] 2 抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素单克隆抗体的制备:

[0009] 选择与骨髓瘤细胞 Sp2/0 同源的纯系雌性 BALB/c 小鼠 (4-6 周龄)作为免疫动物,免疫方案:首免为纯化后的重组  $\alpha$  毒素蛋白(步骤 1 中得到)与等体积弗式完全佐剂完全乳化后,100  $\mu$ g/ 只腹腔注射;二免、三免分别于首免后二周和五周将重组  $\alpha$  毒素蛋白与等体积弗式不完全佐剂完全乳化后,100  $\mu$ g/ 只腹腔注射;三免后三周腹腔注射不加佐剂的重组  $\alpha$  毒素蛋白 50 ~ 100  $\mu$ g/ 只,注射后 3-5 天取效价最高小鼠脾细胞用于细胞融合。

[0010] 取生长状态良好的骨髓瘤细胞 SP2/0 与上述 ELISA 检测效价最高小鼠脾细胞利用 PEG1500 进行化学法融合,运用间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞,并采用有限稀释法进行 3 ~ 5 次亚克隆,得到抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素杂交瘤细胞株 CP f12;利用 CP f12 制备单克隆抗体 F12。

[0011] 3 抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素多克隆抗体的制备:

[0012] 选取新西兰大白兔作为免疫动物,首免为纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白与等体积弗式

完全佐剂完全乳化后背部皮下多点注射 1mg/ 只,首免后弗式不完全佐剂与等体积纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白完全乳化,间隔两周免疫一次,三免后两周用不加佐剂的纯化的重组  $\alpha$  毒素蛋白加强免,15d 后兔心脏采血获得血清,利用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体,得到多克隆抗体。

[0013] 4 双抗体夹心 ELISA 定量检测方法 & 标准曲线的建立

[0014] (1) 用抗原包被液(0.1M 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 将多克隆抗体(包被抗体) 稀释至  $3 \mu\text{g/mL}$ 。100  $\mu\text{L}$ / 孔包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜;

[0015] (2) 用 PBST 溶液(含 0.05%Tween-20 的 PBS 溶液:NaCl8g/L、KCL0.2g/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.27g/L, pH7.4) 洗涤 3 次,加入含 5%脱脂奶粉的 PBST 溶液作为封闭液 200  $\mu\text{L}$ / 孔,4 $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜;

[0016] (3) 用 PBST 溶液洗涤 3 次后加入待检样品,100  $\mu\text{L}$ / 孔,同时设置阴阳性和空白对照,阳性对照为步骤 1 得到的纯化重组  $\alpha$  毒素蛋白,阴性对照分别为按常规方法制备的大肠杆菌培养上清和 PBS 缓冲液(含 NaCl8g/L、KCL0.2g/L、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.27g/L),空白对照为不加任何样品,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1h;

[0017] (4) 3 次 PBST 溶液洗涤后,将杂交瘤细胞株 CP f12 制备的单克隆抗体 F12 用 PBS 缓冲液稀释至 0.2  $\mu\text{g/mL}$ ,100  $\mu\text{L}$ / 孔,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h

[0018] (5) 用 PBST 溶液洗涤 3 次,加入用 PBS 缓冲液 1:10000 体积比稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1h, PBST 溶液洗涤 3 次;

[0019] (6) 最后加入可溶性 TMB 底物显色液 100  $\mu\text{L}$ / 孔,室温条件避光反应 15min,用 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液终止反应,450nm 处读取吸光值。

[0020] (7) 以  $\alpha$  毒素蛋白稀释浓度为横坐标,  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  值为纵坐标绘制曲线图;根据曲线图,选择最佳线性范围,以浓度的自然对数  $\text{LN}(x)$  为横坐标,  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  值为纵坐标绘制标准曲线,通过标准曲线计算待测样品中  $\alpha$  毒素浓度。

[0021] 4 结果判定标准的确定

[0022] 计算阴性样品平均值( $\bar{X}$ ) 与标准差(SD),求得  $\bar{X}+3\text{SD}$  为阳性临界值,  $\bar{X}+2\text{SD}$  为阴性临界值。运用建立的 DAS-ELISA 测定  $\text{OD}_{450\text{nm}}$ ,  $\text{OD}_{450\text{nm}} > \bar{X}+3\text{SD}$  为阳性,  $\text{OD}_{450\text{nm}} < \bar{X}+2\text{SD}$  为阴性,  $\bar{X}+2\text{SD} < \text{OD}_{450\text{nm}} < \bar{X}+3\text{SD}$  为可疑样品。

[0023] 本发明制备得到的抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素杂交瘤细胞株,命名为 CP f12,分类命名:抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素杂交瘤细胞株;已于 2014 年 1 月 14 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院中科院微生物研究所,保藏号:CGMCC8770。

[0024] 本发明的有益效果主要体现在:

[0025] (1) 特异性强:与重组  $\alpha$  毒素蛋白(步骤 1 中原核表达蛋白)和天然  $\alpha$  毒素有较强的反应性,  $\beta$  毒素、大肠杆菌培养上清、其他无关蛋白等为抗原进行 ELISA 检测,表明无交叉反应。

[0026] (2) 灵敏度高:通过试验和标准曲线得知,线性范围 5.86 ~ 375ng/mL 即为该方法的有效检测范围;平均值与 2 倍标准差之和( $\text{OD}_{450\text{nm}}$ ),在标准曲线中对应的浓度为 4.57ng/mL,即为此方法最低检测线。

[0027] (3) 重复性好:在线性范围内选择 375、93.75、11.72ng/mL 3 个浓度点,在一次试验中每个浓度测 10 孔,计算批内变异次数;连续测 10 个批次,计算批间变异系数。该方法批内变异系数为 2.59%~5.02%,批间变异系数为 2.67%~5.86%,两者均小于 10%,说明同一样品在同批和不同批试验中变异程度很小,表明该方法具有较好的精密度。

[0028] (4) 回收率测定:在 10 次试验中,对 3 个浓度点的蛋白样品测量得到的回收率在 97.22%~102.85% 范围内,证明该方法准确性较高。

#### (四) 说明书附图

[0029] 图 1 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法曲线图。由图得知,以  $\alpha$  毒素蛋白稀释浓度为横坐标,OD<sub>450nm</sub> 值为纵坐标绘制成曲线图,可知  $\alpha$  毒素蛋白在 5.86~375ng/mL 浓度范围内具有良好的线性关系。

[0030] 图 2 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法标准曲线。浓度的自然对数 LN(x) 与 OD<sub>450nm</sub> 值呈显著线性关系,回归方程为  $y=0.2533x-0.2047$ , 相关系数  $R^2=0.9935$ 。

#### (五) 具体实施方式

[0031] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0032] 实施例中所用的试剂及其来源:表达载体 pET28a 购自德国 Novagen 公司;pMD18-T 购自大连宝生物公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;PCR 产物回收试剂盒购自美国 OMEGA Bio-Tek 公司;限制性内切酶 Bam HI 和 Hind III 购自 Fermentas 公司;High Affinity Ni-IDA Resin 购自南京金斯瑞公司;弗式完全佐剂与弗式不完全佐剂、IPTG、Tween20 均购自美国 Sigma 公司;anti-His Tag 兔多抗、羊抗兔 IgG-HRP 和羊抗小鼠 IgG-HRP 均购自杭州华安生物技术有限公司;96 孔酶标板购自 Solarbio 公司;厌氧肉肝汤、液体硫乙醇酸盐培养基购自青岛海博生物;融合剂 PEG1500 购自德国 Roche 公司;BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金公司;Sp2/0 骨髓瘤细胞株购自中国典型培养物保藏中心(武汉);可溶性 TMB 底物显色液购自天根生化科技有限公司;其他所用化学试剂均为分析纯。

[0033] 实施例 1 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素的原核表达

[0034] 根据 primer5 软件设计特异性的引物:

[0035] 上游引物:5'-GCGGAATTCATGAAAAGAAAGATTTGT-3', 如 SEQ No. 1 所示;

[0036] 下游引物:5'-GCGGCGAAGCTTTTATTTTATATTATAAGTT-3', 如 SEQ No. 2 所示;

[0037] 选取标准菌种 NCTC528 增菌后,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后,利用 PCR 扩增产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素基因片段,扩增条件:94℃ 5min、94℃ 1min、54℃ 1min、72℃ 70s,共进行 32 个循环,72℃ 延伸 7min。将经 DNA 纯化回收试剂盒纯化的目的产物与 pMD18-T 连接,测序。测序正确的重组质粒与载体 pET-28a 分别用 EcoR I 和 Xho I 双酶切处理,连接后转入表达感受态细胞 BL21 中,将菌液涂布于固体 LB 培养基(NaCl 1g, 蛋白胨 1g, 酵母提取物 0.5g, 琼脂粉 1.5g, 用 100mL 去离子水溶解后高压灭菌),挑取单菌落接种于含有卡那霉素的液体 LB 培养基中(卡那霉素终浓度为 100  $\mu$ g/mL),37℃ 培养 3h 至 OD<sub>600nm</sub> 为 0.4~0.6 时,加入 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷,终浓度 1mmol/L) 诱导表达 6h, 菌体超声

破碎后,经High Affinity Ni-changed Resin纯化制备的 $\alpha$ 毒素重组蛋白;利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹法(Western-blot)验证纯化后的 $\alpha$ 毒素重组蛋白的纯度和免疫原性,用于后续动物免疫实验和检测实验。

[0038] 实施例2 抗产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素单克隆抗体的制备

[0039] 选择与骨髓瘤细胞 Sp2/0 同源的纯系雌性 BALB/c 小鼠(4-6 周龄)作为免疫动物,免疫方案:首免为步骤1中制备的重组 $\alpha$ 毒素蛋白与等体积弗式完全佐剂完全乳化后,100  $\mu$ g/只腹腔注射;二免、三免分别于首免后二周和五周将重组 $\alpha$ 毒素蛋白与等体积弗式不完全佐剂完全乳化后,100  $\mu$ g/只腹腔注射;三免后三周腹腔注射不加佐剂的重组 $\alpha$ 毒素蛋白 50 ~ 100  $\mu$ g/只,注射后 3-5 天取效价最高小鼠脾细胞用于下步细胞融合。期间每次免疫后第 7d 采血通过间接 ELISA 检测抗体水平,以便时刻检测抗体水平,选择效价最优的小鼠用于后续试验。

[0040] 取生长状态良好的骨髓瘤细胞 SP2/0 与上述 ELISA 检测效价最高小鼠脾细胞利用 PEG1500 进行化学法融合,运用间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞,并采用有限稀释法进行 3 ~ 5 次亚克隆后,得到 2 株抗产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素的杂交瘤细胞株 CP f12(已提交中国微生物菌种保藏中心保藏)、CP b12。选择 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 20 只,分为 2 组,腹腔注射弗式不完全佐剂 0.5mL/只致敏,一周后第一组注射阳性杂交瘤细胞株 CP f12,第二组注射阳性杂交瘤细胞株 CP b12,0.5-1 $\times 10^6$ 个/只,7-10 天后分别收集 2 组小鼠腹水,分别得到大量单克隆抗体 F12、B12,经间接 ELISA 方法检测腹水效价。腹水经正辛酸-硫酸铵方法纯化后,SDS-PAGE 检测纯化效果;蛋白质印迹法(Western-blot)用于单抗特性鉴定;验证单克隆抗体的特异性、鉴定单抗与 $\alpha$ 毒素的反应性。

[0041] 实施例3 抗产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素多克隆抗体的制备:

[0042] 选取 5 只 2-3Kg 新西兰大白兔,首免为纯化的重组 $\alpha$ 毒素与等体积弗式完全佐剂完全乳化后背部皮下多点注射 1mg/只,以后弗式不完全佐剂与等体积纯化的重组 $\alpha$ 毒素完全乳化,间隔 2 周免疫一次,3 免后 2 周用不加佐剂的纯化的重组 $\alpha$ 毒素加强免,15d 后兔心脏采血获得血清。利用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体,得到抗产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素多克隆抗体,通过间接 ELISA 法检测抗体效价,SDS-PAGE 电泳检测纯度。

[0043] 实施例4 双抗夹心 ELISA 定量检测方法的建立

[0044] 通过方阵滴定实验确定包被抗体及检测抗体(单克隆抗体 F12、B12)的最佳配对,以及包被抗体的最佳包被浓度和检测抗体的最佳稀释浓度,并对 ELISA 条件进行摸索和优化,最终确定如下体系:

[0045] (1) 对抗体的选择及最佳浓度确定

[0046] 初步选择实施例3制备的抗产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素多克隆抗体作为捕获抗体,由杂交瘤细胞株 CP f12、CP b12 制备的单克隆抗体 F12、B12 分别作为检测抗体,通过方阵实验进行最佳抗体配对的选择。将捕获抗体用抗原包被液按体积比 1:100 稀释加入 96 孔酶标板第一行,并用抗原包被液向下 1:2 倍比稀释至第八行,100  $\mu$ L / 孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,PBST 洗涤 3 次,每次 3min,拍干。每孔加封闭液 200  $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,PBST 洗涤 3 次,每次 3min,拍干。每孔加入重组 $\alpha$ 毒素蛋白 100  $\mu$ L / 孔(用 PBS 稀释毒素蛋白浓度至 4  $\mu$ g / mL),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗涤 3 次,每次 3min,拍干。将检测抗体用 PBS 缓冲液按体积比 1:100 稀释加入 96 孔酶标板第一列、第二列,并用 PBS 缓冲液做 1、3、5、7、9、11 列 1:2 倍比稀释,

2、4、6、8、10、12 列同理做 1:2 倍比稀释, 100  $\mu$ L / 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 溶液洗涤 3 次, 每次 3min, 拍干。加入可溶性 TMB 底物显色液, 避光显色 15min, 每孔加入 50  $\mu$ L 2M  $H_2SO_4$  终止反应, 在 450nm 处用酶标仪测定每孔 OD 值。以 P / N 值作为选择最佳配对抗体和最佳稀释浓度的依据。

[0047] 最终确定捕获抗体为抗产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素多克隆抗体, 最佳工作浓度为 3  $\mu$ g/mL; 检测抗体为杂交瘤细胞株 CP f12 制备的单克隆抗体 F12, 最佳工作浓度为 0.2  $\mu$ g/mL。

[0048] (2) 最佳包被条件的确定

[0049] 96 孔酶标板第一、二列用 0.01mol/L 碳酸盐缓冲液包被捕获抗体, 第三、四列用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液包被捕获抗, 第五、六列用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液包被捕获抗体, 第一、二行包被时间为 37 $^{\circ}$ C 2h, 第三、四行包被时间 4 $^{\circ}$ C 12h, 第五、六行包被时间为 37 $^{\circ}$ C 1h+4 $^{\circ}$ C 12h, 进行方阵滴定实验, 根据 P/N 值确定最佳包被条件。

[0050] 最终确定最佳包被条件为 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液包被捕获抗体, 4 $^{\circ}$ C 12h 条件最佳。

[0051] (3) 最佳封闭条件的确定

[0052] 以捕获抗体最佳包被浓度包被 96 孔酶标板, 以最佳工作浓度稀释检测抗体, 分别用 5% 脱脂奶粉、5% 胎牛血清、1%BSA 作为封闭液, 选取 5 份重组  $\alpha$  毒素蛋白抗原, 5 份阴性抗原, 测定其在 450nm 处的 OD 值, 根据 P / N 值确定合适的封闭液。

[0053] 最终确定的最佳封闭条件为 5% 脱脂奶粉。

[0054] (4) 检测抗体最佳作用时间的确定

[0055] 最佳包被条件下, 加入重组  $\alpha$  毒素蛋白和阴性样品各 10 份, 以检测抗体最佳工作浓度 0.2  $\mu$ g/mL 稀释检测抗体, 置 37 $^{\circ}$ C 分别反应 30min、60min、90min、120min, 进行 ELISA 试验, 根据 P/N 值确定检测抗体的最佳作用时间。

[0056] 最终确定检测抗体的最佳作用时间为 1h。

[0057] (5) 利用方阵滴定实验对 ELISA 检测条件进行优化, 最终确定如下反应体系:

[0058] ①用抗原包被液(0.1M 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 将作为捕获抗体的多克隆抗体稀释至 2  $\mu$ g/mL。100  $\mu$ L/ 孔包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0059] ②用 PBST 溶液(含 0.05%Tween-20 的 PBS 溶液:NaCl8g/L、KCL0.2g/L、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58g/L、 $KH_2PO_4$ 0.27g/L, pH7.4) 洗涤 3 次, 加入含 5%脱脂奶粉的 PBST 溶液作为封闭液 200  $\mu$ L/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;

[0060] ③用 PBST 溶液洗涤 3 次后, 前 5 行加入待检样品, 第 6 行加纯化重组  $\alpha$  毒素蛋白作为阳性对照, 第 7 行加入按常规方法制备的大肠杆菌培养上清, 第 8 行加入 PBS 缓冲液(含 NaCl8g/L、KCL0.2g/L、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58g/L、 $KH_2PO_4$ 0.27g/L), 第 7 行和第 8 行作为阴性对照, 100  $\mu$ L/ 孔; 空白对照为不加任何样品, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

[0061] ④3 次 PBST 溶液洗涤后, 将杂交瘤细胞株 CP f12 制备的单克隆抗体 F12 用 PBS 缓冲液稀释至 0.2  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h;

[0062] ⑤用 PBST 溶液洗涤 3 次, 加入用 PBS 缓冲液 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 洗涤液洗涤 3 次;

[0063] ⑥最后加入可溶性 TMB 底物显色液 100  $\mu$ L/ 孔, 室温条件避光反应 15min, 用 2M  $H_2SO_4$  终止反应, 450nm 处读取吸光值。

[0064] 实施例 5 :双抗体夹心 ELISA 方法标准曲线的建立

[0065] 根据已建立好的双单抗夹心 ELISA 定量检测方法操作程序,对重组的  $\alpha$  毒素蛋白标准品从 1500ng/mL 起两倍系列稀释至 0.73ng/mL、阴性样品和空白孔分别进行检测,反应完毕后测定 OD<sub>450nm</sub> 值。以  $\alpha$  毒素蛋白稀释浓度为横坐标, OD<sub>450nm</sub> 值为纵坐标绘制曲线图;根据曲线图,选择最佳线性范围,以浓度的自然对数 LN(x) 为横坐标, OD<sub>450nm</sub> 值为纵坐标绘制标准曲线。该曲线线性范围较理想,可根据标准曲线计算待测样品中  $\alpha$  毒素浓度。

[0066] 实施例 6 :双抗体夹心 ELISA 方法性能评价

[0067] (1) 特异性试验运用建立好的双抗体夹心 ELISA 方法,检测产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素阳性样品 30 份,大肠杆菌培养上清等阴性样品 20 份,其他无关蛋白 10 份,并设置空白对照。结果显示除与重组  $\alpha$  毒素蛋白和  $\alpha$  毒素反应呈阳性外,其他均为阴性,表明无交叉反应。

[0068] (2) 灵敏度分析根据上述试验中得到的  $\bar{X}+2SD$  的值,从标准曲线中找出对应浓度,即为此方法的检测限。根据标准曲线的线性范围确定有效检测范围。

[0069] (3) 精密度分析在线性范围内选择 375、93.75、11.72ng/mL 3 个浓度点,在一次试验中每个浓度测 10 个孔,计算批内变异系数;连续测 10 个批次,计算批间变异系数。该方法批内变异系数为 2.59%~5.02%,批间变异系数为 2.67%~5.86%,两者均小于 10%,说明同一样品在同批和不同批试验中变异程度很小,表明该方法具有较好的精密度。

[0070] (4) 回收率测定在空白检测基质中加入不同浓度(375、93.75、11.72ng/mL)重组  $\alpha$  毒素蛋白,按标准检测程序测定,根据实测值/理论值\*100%求得平均回收率。在 10 次试验中,对 3 个浓度点的蛋白样品测量得到的回收率在 97.22%~102.85% 范围内,证明该方法准确性较高。

[0071] 实施例 7 :以表达的重组  $\alpha$  毒素蛋白和提取的天然  $\alpha$  毒素为检测材料

[0072] (1) 重组  $\alpha$  毒素蛋白和提取的天然  $\alpha$  毒素的制备

[0073] ①  $\alpha$  毒素原核表达方法制备重组  $\alpha$  毒素蛋白

[0074] 根据 primer5 软件设计特异性的引物:

[0075] 上游引物:5'-GCGGAATTCATGAAAAGAAAGATTTGT-3',如 SEQ No. 1 所示;

[0076] 下游引物:5'-GCGGCGAAGCTTTTATTTTATATTATAAGTT-3',如 SEQ No. 2 所示;

[0077] 选取标准菌种 NCTC528 增菌后,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后,利用 PCR 扩增产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素基因片段,扩增条件:94℃ 5min、94℃ 1min、54℃ 1min、72℃ 70s,共进行 32 个循环,72℃ 延伸 7min。将经 DNA 纯化回收试剂盒纯化的目的产物与 pMD18-T 连接,测序。测序正确的重组质粒与载体 pET-28a 分别用 EcoR I 和 Xho I 双酶切处理,连接后转入表达感受态细胞 BL21 中,涂布于固体 LB 培养基(NaCl 1g, 蛋白胨 1g, 酵母提取物 0.5g, 琼脂粉 1.5g, 用 100mL 去离子水溶解后高压灭菌),挑取单菌落接种于含有卡那霉素的液体 LB 培养基中(卡那霉素终浓度为 100  $\mu$ g/mL),37℃ 培养 3h 至 OD<sub>600nm</sub> 为 0.4-0.6 时,加入 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷,终浓度 1mmol/L) 诱导表达 6h,菌体超声破碎后,经 High Affinity Ni-changed Resin 纯化制备的  $\alpha$  毒素重组蛋白;利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹法(Western-blot)验证纯化后的  $\alpha$  毒素重组蛋白的纯度和免疫原性,用于后续动物免疫实验和检测实验。

[0078] ②将 A 型产气荚膜梭菌标准菌株(NCTC756)接种血平板培养基厌氧培养 36-48h

后,接入液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG) 增菌培养后,接种厌氧肉肝汤 40℃ 厌氧震荡培养 6h ;

[0079] ③ 8000r, 15min 离心取上清 ;

[0080] ④ 上清经饱和硫酸铵法纯化, 得到天然  $\alpha$  毒素 ; 大肠杆菌 (ATCC11775) 培养上清及未接种厌氧肉肝汤均作为阴性对照

[0081] 2、双抗体夹心 ELISA 方法检测

[0082] ① 用抗原包被液 (0.1M 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 通过方阵试验确定作为捕获抗体的多克隆抗体稀释至  $3 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{L}$ /孔包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜。

[0083] ② 用 PBST 溶液 (0.05% Tween20, pH7.4 PBST) 洗涤 3 次, 加入封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液)  $200 \mu\text{L}$ /孔, 4℃ 封闭过夜 ;

[0084] ③ 用 PBST 溶液洗涤 3 次后前 3 行加入上述制备好的重组  $\alpha$  毒素蛋白, 第 4-6 行加入制备的天然  $\alpha$  毒素,  $100 \mu\text{L}$ /孔, 第 7、8 行分别加入阴性对照 (PBS、大肠杆菌 (ATCC11775) 培养上清及未接种菌的厌氧肉肝汤均) 和空白对照 (不加样品) ; 37℃ 孵育 1h ;

[0085] ④ 3 次 PBST 溶液洗涤后, 加入制备的作为检测抗体的单克隆抗体 F12 (用 PBS 缓冲液稀释至  $0.2 \mu\text{g/mL}$ ),  $100 \mu\text{L}$ /孔, 37℃ 反应 1h ;

[0086] ⑤ 用 PBST 洗涤 3 次, 加入用 PBS 缓冲液按体积比 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37℃ 孵育 1h ;

[0087] ⑥ 最后加入可溶性 TMB 底物显色液  $100 \mu\text{L}$ /孔, 室温条件避光反应 15min, 用  $2\text{M H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 450nm 处读取吸光值。

[0088] 3、结果

[0089] 由图 1 得知, 本实施例标准品的浓度与可检测到吸光度呈显著的线性关系, 其相关系数  $R^2=0.9935$ , 线性方程为  $y=0.2533x-0.2047$ , 线性范围  $5.86 \sim 375\text{ng/mL}$ , 此方法最低检测线为  $4.57\text{ng/mL}$ 。本实施例测得的回收率在  $97.22\% \sim 102.85\%$  范围内, 满足要求。结果说明本方法能有效地检测  $\alpha$  毒素。

[0090] 实施例 8 : 以 A ~ E 型产气荚膜梭菌培养上清为检测材料

[0091] 1、A-E 型产气荚膜梭菌培养上清的制备

[0092] ① 相同培养条件下, 将标准菌种 A 型 (NCTC756)、B 型 (NCTC8533)、C 型 (NCTC3180)、D 型 (NCTC8504)、E 型 (NCTC6719) 接种血平板培养基厌氧培养 36-48h 后, 接入液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG) 增菌培养后 ;

[0093] ② 接种厌氧肉肝汤 40℃ 厌氧震荡培养 6h ;

[0094] ③ 8000r, 15min 离心取上清, 大肠杆菌 (ATCC11775) 培养上清及未接种的厌氧肉肝汤作均为阴性对照。

[0095] 2、双抗体夹心 ELISA 方法检测

[0096] ① 用抗原包被液 (0.1M 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 将通过方阵试验确定作为捕获抗体的多克隆抗体稀释至  $3 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{L}$ /孔包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜。

[0097] ② 用 PBST 溶液 (含 0.05% Tween20, pH7.4 的 PBS) 洗涤 96 孔酶标板 3 次, 拍干后加入封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液)  $200 \mu\text{L}$ /孔, 4℃ 封闭过夜 ;

[0098] ③ 用 PBST 溶液洗涤 96 孔酶标板板 3 次后, 前 5 行分别加入上述制备的各型产气荚膜梭菌的培养上清, 第 6 行加入阳性对照重组  $\alpha$  毒素蛋白、第 7、8 行分别加入阴性对照

(常规方法制备的大肠杆菌培养上清、未接种菌的厌氧肉肝汤、PBS 缓冲液), 100  $\mu$  L/ 孔, 以及空白对照(不加样品), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

[0099] ④ 3 次 PBST 溶液洗涤后, 加入制备的作为检测抗体的单克隆抗体 F12(用 PBS 缓冲液稀释至 0.2  $\mu$  g/mL), 100  $\mu$  L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h;

[0100] ⑤用 PBST 溶液洗涤 3 次, 加入用 PBS 缓冲液按体积比 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

[0101] ⑥最后加入可溶性 TMB 底物显色液 100  $\mu$  L/ 孔, 室温条件避光反应 15min, 用 2M  $H_2SO_4$  终止反应, 450nm 处读取吸光值。

[0102] 3、结果

[0103] 经过样品、阳性和阴性对照的多次平行测定, 得到 A ~ E 型产气荚膜梭菌培养上清中  $\alpha$  毒素检测值均为阳性, 且根据 450nm 处吸光值运用回归方程计算出其在标准曲线对应浓度, 得到 A ~ E 型产气荚膜梭菌标准菌株产生的  $\alpha$  毒素量的平均值和标准差分别为 103.29 $\pm$ 4.13ng/mL、29.20 $\pm$ 1.21ng/mL、16.15 $\pm$ 0.97ng/mL、10.46 $\pm$ 0.58ng/mL、7.05 $\pm$ 0.47ng/mL, 符合产气荚膜梭菌各型中均有  $\alpha$  毒素的理论, 且能有效地定量检测 A ~ E 型产气荚膜梭菌培养上清中  $\alpha$  毒素。

[0104] 结果说明本方法在制备单克隆抗体基础上建立的双抗体夹心 ELISA, 可用于大批量样品检测、 $\alpha$  毒素的初步定量检测和早期结果的获得, 为预防畜禽产气荚膜梭菌的传播及研究提供了更快速、有效的工具, 并为疫苗质量和食品安全监测的研究奠定了坚实的基础。

[0001]

<110>山东农业大学

<120>产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素双抗体夹心 ELISA 定量检测方法

<160>2

<210>1

<211>27

<212>DNA

<213>人工序列（上游引物）

<400>1

gcggaattca tgaaaagaaa gatttgt 27

<210>2

<211>31

<212>DNA

<213>人工序列（下游引物）

<400>2

gcggcgaagc ttttatttta tattataagt t 31

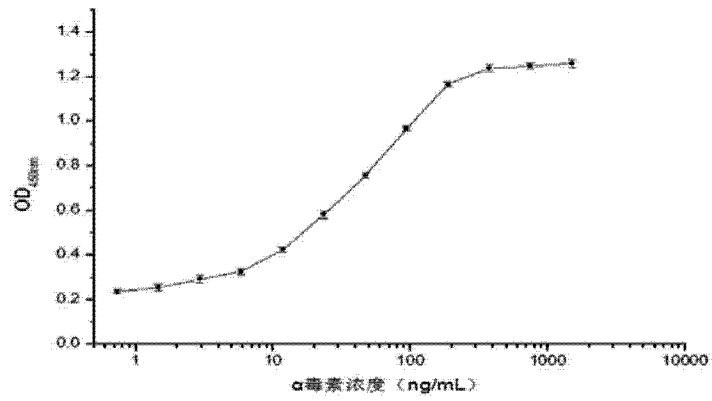


图 1

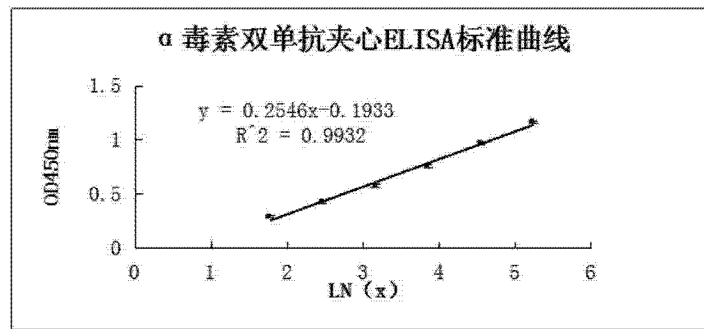


图 2

专利名称(译)	产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素双抗体夹心ELISA定量检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103941004B</a>	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201410036188.5	申请日	2014-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	王海荣 孙佳芝 柴同杰 李课 陈勇 逢伟		
发明人	王海荣 孙佳芝 柴同杰 李课 陈勇 逢伟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/577		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN103941004A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素双单抗夹心ELISA检测方法，该检测方法是采用原核表达的 $\alpha$ 毒素蛋白为免疫原，利用杂交瘤技术制备单克隆抗体作为检测抗体和捕获抗体，通过试验优化反应条件，以系列含量的 $\alpha$ 毒素蛋白作为标准制作标准曲线，建立了双单抗夹心ELISA方法，并对该方法各项指标进行验证。具体包括以下步骤：(1)  $\alpha$ 毒素原核表达；(2) 抗 $\alpha$ 毒素单克隆抗体的制备；(3) 双单抗夹心ELISA方法的建立；(4) 标准曲线的建立；(5) 对该双单抗夹心ELISA方法进行性能评价。该方法特异性好、灵敏度高、稳定性好，快速、简便，且能有效地定量检测A~E型产气荚膜梭菌培养上清中 $\alpha$ 毒素，为 $\alpha$ 毒素提供了高效的检测工具。

