



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105759032 B

(45)授权公告日 2017. 11. 28

(21)申请号 201610156913.1

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.03.18

审查员 周洋

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105759032 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(73)专利权人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 许恒毅 熊勇华 黄小林 赖卫华

陈锐 湛胜楠

(74)专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有

限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

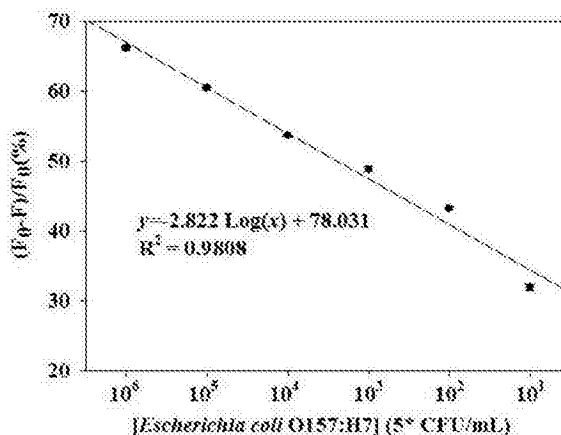
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种针对大肠杆菌O157:H7的检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种针对大肠杆菌O157:H7的检测方法,该方法先将大肠杆菌O157:H7与包被的多克隆抗体结合,接着连接生物素化的单克隆抗体,再连接链霉亲和素标记的触酶C100,通过触酶催化双氧水分解,降低对巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的荧光淬灭,根据荧光强度的高低来判断样品中大肠杆菌O157:H7的浓度。该方法基于双抗夹心酶联免疫技术,并采用了生物素-亲和素系统用于反应的放大。更为重要的是,由于本发明采用了新的抗体标记酶(触酶C100)和更为灵敏的荧光底物(碲化镉量子点),并匹配了有效的反应条件,使得检测灵敏性得到显著提升,同时降低成本、提升检测效率,因此具有良好的推广前景。



1. 一种针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,该方法属于双抗夹心酶联免疫法,该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测,该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100,该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

2. 根据权利要求1所述的针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 包被大肠杆菌0157:H7抗体;

2) 取步骤1) 包被后的抗体,与待测样品混合后于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

3) 而后加入生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体混合,于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

4) 而后加入链霉亲和素标记的触酶C100混合,于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

5) 而后加入浓度为8~12 $\mu\text{mol/L}$ 的双氧水溶液混合,于35~39℃避光环境中反应20~40min;

6) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于室温避光环境中反应10~20min;

7) 检测步骤6) 产物的荧光强度。

3. 根据权利要求2所述的针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于步骤1) 具体包括以下操作:

A) 在酶标板上以0.04~0.06 mol/L 、pH9.4~9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释大肠杆菌0157:H7多克隆抗体至9~11 $\mu\text{g/mL}$;

B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于35~39℃封闭1~3h,而后弃去封闭液。

4. 根据权利要求3所述的针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于步骤A) 中包被液的加入量为80~120 $\mu\text{L/孔}$,稀释后静置8~12h再执行步骤B)。

5. 根据权利要求2所述的针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于步骤3) 所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体是通过以下方法制备的:配制含有1~3 mg/mL 大肠杆菌0157:H7单克隆抗体、0.07~0.08 mg/mL 生物素的PBS溶液,于避光条件下反应30~60min,所述PBS溶液的浓度为0.005~0.02 mol/L ,而后透析去除生物素,即得到所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体。

6. 根据权利要求2所述的针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于步骤4) 所述链霉亲和素标记的触酶C100是通过以下方法制备的:配制含有0.5~2 mg/mL 链霉亲和素的PBS溶液,所述PBS溶液的浓度为0.005~0.02 mol/L ,而后加入SM(PEG)₂₄反应30~60min,而后凝胶柱纯化,收集滤液向其中加入触酶C100至终浓度1~3 mg/mL ,即得到所述链霉亲和素标记的触酶C100。

7. 根据权利要求2所述的针对大肠杆菌0157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于步骤6) 所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有8~12 mmol/L 硝酸镉、20~28 mmol/L 巯基丙酸、3~7 mmol/L 碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11~11.5,将所述前体溶液水浴加热至93~97℃,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

8. 根据权利要求2所述的针对大肠杆菌O157:H7的非诊断目的的检测方法,其特征在于步骤7)中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

一种针对大肠杆菌O157:H7的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物检测技术领域,进一步涉及基于ELISA的抗原检测技术,具体涉及一种针对大肠杆菌O157:H7的检测方法。

背景技术

[0002] 大肠杆菌O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7) 属于肠杆菌科埃希氏菌属,是肠出血性大肠杆菌的主要血清型;牛是其主要宿主,通过食物传播能引起人的出血性肠炎、腹泻、溶血性尿毒症等症状,其显著特征是产生大量的类志贺氏毒素(Shiga-Like Toxin, SLT),引起体内的微血管变化;有研究发现该菌致病剂量极低,只需10个活菌即可。大肠杆菌O157:H7菌培养容易、繁殖迅速、感染力强、感染途径广泛,因此,建立灵敏、快速的检测方法是有效防治大肠杆菌O157:H7的重要技术前提。

[0003] 现有技术中,检测大肠杆菌O157:H7常用方法包括传统分离培养法、分子生物学方法以及免疫学方法三大类。常用传统分离培养法有山梨醇麦康凯琼脂(SMAC)方法、MUG试验和CHROMagar琼脂平板法等。该类方法虽操作简单,但耗时长,且容易出现漏检情况;分子生物学方法包括限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性DNA(RAPD)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、随机片段长度多态性(AFLP)、多位点可变数衔接重复序列分析(MLVA)、基因芯片(Gene Chip)、聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR)等,尽管该类方法具有灵敏度高等特点,但需依赖于昂贵的仪器设备和熟练的操作人员,且需复杂的样品前处理,因此无法满足基层及现场实地监控的需要。免疫学方法主要包括直接免疫荧光(IFA)法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫磁性分离(IMS)、乳胶凝集试验等,该类方法基于免疫学的快速筛查,具有通量高、检测快速、价格便宜等优势,近年来得到了大量的推广和应用。特别是,酶联免疫吸附法(ELISA)方法因具有快速、灵敏、特异、准确、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备,且对样品纯度要求不高,特别适用于大批量样品的检测等优点,已成为大肠杆菌O157:H7快速筛查检测的主要方法。然而,现有技术中检测大肠杆菌O157:H7的ELISA方法普遍基于辣根过氧化物酶标记的抗体或抗原催化双氧水生成羟自由基,进而氧化无色的化学显色底物四甲基联苯二胺(TMB)形成蓝色产物,然后使用终止液(2M H₂SO₄)终止反应形成黄色溶液于450nm处记录吸光度值。该类方法因其显色强度较低,因此检测灵敏度相对较低,当待测样品中目标物含量较低时易出现假阴性结果,从而无法满足实际应用的要求。

[0004] 近年来,一些新型的信号传导机制被报道用于替代传统ELISA的信号传导机制用于提高ELISA的灵敏度,如放射免疫分析底物、化学发光底物、荧光底物以及共振胶体金溶液等。然而,发光体系的构建需要充分考虑被检测对象的分子生物学性质,例如在方法层面,抗体的包被及其与抗原的结合性能,选用何种标记物酶及其与抗体的偶联方法,显色底物的选择以及具体发光方法;在效果层面,既要保证显色反应的灵敏性,又应满足显色强度与目标物含量的线性关系。因此,针对大肠杆菌O157:H7的ELISA检测方法,尤其以提升其检测灵敏性为目的的方法改进,具有突出的技术难度。

发明内容

[0005] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法,以解决现有技术的大肠杆菌0157:H7ELISA检测方法精度较低。

[0006] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术用于大肠杆菌0157:H7抗原检测的ELISA方法中,标记抗体的酶灵敏性较低。

[0007] 本发明要解决的再一技术问题是现有技术用于大肠杆菌0157:H7抗原检测的ELISA方法中,显色系统灵敏性较低。

[0008] 本发明要解决的又一技术问题是当采用触酶C100作为抗体标记酶对大肠杆菌0157:H7抗原执行ELISA检测时,具体工艺方法并不明确。

[0009] 本发明要解决的又一技术问题是当采用触酶C100作为抗体标记酶、采用双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点作为底物对大肠杆菌0157:H7抗原执行ELISA检测时,检测结果与抗原浓度的线性关系不佳。

[0010] 本发明要解决的又一技术问题是当采用触酶C100作为抗体标记酶、采用双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点作为底物对大肠杆菌0157:H7抗原执行ELISA检测时,过程中洗涤效果不佳。

[0011] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0012] 一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法,该方法属于双抗夹心酶联免疫法,该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测,该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100。

[0013] 作为优选,该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。其中双氧水作为碲化镉量子点荧光淬灭剂,反应过程中,双氧水在触酶作用下分解,从而降低荧光淬灭作用,实现发光。

[0014] 作为优选,该方法包括以下步骤:

[0015] 1) 包被大肠杆菌0157:H7抗体;

[0016] 2) 取步骤1)包被后的抗体,与待测样品混合后于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

[0017] 3) 而后加入生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体混合,于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

[0018] 4) 而后加入链霉亲和素标记的触酶C100混合,于35~39℃避光环境中反应40~80min,洗涤;

[0019] 5) 而后加入浓度为8~12 $\mu\text{mol/L}$ 的双氧水溶液混合,于35~39℃避光环境中反应20~40min;

[0020] 6) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于室温避光环境中反应10~20min;

[0021] 7) 检测步骤6)产物的荧光强度。

[0022] 该荧光强度即用于反应待测样品中大肠杆菌0157:H7含量,实际操作中可利用已知浓度且呈梯度分布的多组大肠杆菌0157:H7标准液通过以上方法绘制荧光强度-菌浓度标准曲线,再利用待测样品的荧光强度从标准曲线中计算待测样品的大肠杆菌0157:H7含量。具体操作方法可以依据本技术领域的一般技术常识任一选择。上述梯度分布的多组大

大肠杆菌O157:H7标准液,可以分别选择 10^1 CFU/mL、 10^2 CFU/mL、 10^3 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL。

[0023] 该优选技术方案中,步骤2)用于获得固相的抗原抗体复合物;步骤3)实现生物素化的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体与固相的抗原抗体复合物之间的连接;步骤4)利用生物素-链霉亲和素系统实现与触酶C100的连接;步骤5)酶催化双氧水分解;步骤6)实现显色反应。在该优选技术方案中:各试剂在使用前可以先于室温平衡30min以上再使用;步骤2)中待测样品的加入量优选为80~120 μ L/孔,更优的是100 μ L/孔;步骤3)中生物素化的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体的加入量优选为80~120 μ L/孔,更优的是100 μ L/孔;步骤4)中链霉亲和素标记的触酶C100的加入量优选为80~120 μ L/孔,更优的是100 μ L/孔;步骤5)中双氧水溶液的加入量优选为80~120 μ L/孔,更优的是100 μ L/孔;步骤6)中巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的加入量优选为30~70 μ L/孔,更优的是50 μ L/孔。

[0024] 作为优选,步骤1)具体包括以下操作:

[0025] A)在酶标板上以0.04~0.06mol/L、pH9.4~9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释大肠杆菌O157:H7多克隆抗体至9~11 μ g/mL;

[0026] B)去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于35~39 $^{\circ}$ C封闭1~3h,而后弃去封闭液。

[0027] 进一步可以执行以下优选:所述牛血清白蛋白的浓度为0.3~0.7%,更优的是0.5%;封闭液的加入量为320~360 μ L/孔,更优的是340 μ L/孔;弃去封闭液后的酶标板于室温下干燥,而后于2~6 $^{\circ}$ C保存。

[0028] 作为优选,步骤A)中包被液的加入量为80~120 μ g/孔,稀释后静置8~12h再执行步骤B)。

[0029] 作为优选,步骤3)所述生物素化的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体是通过以下方法制备的:配制含有1~3mg/mL大肠杆菌O157:H7单克隆抗体、0.07~0.08mg/mL生物素的PBS溶液,于避光条件下反应30~60min,所述PBS溶液的浓度为0.005~0.02mol/L,而后透析去除生物素,即得到所述生物素化的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体。进一步可以执行以下优选:所述生物素是活泼酯化生物素;所述透析的时间为66~78h,更优的是72h。

[0030] 作为优选,步骤4)所述链霉亲和素标记的触酶C100是通过以下方法制备的:配制含有0.5~2mg/mL链霉亲和素的PBS溶液,所述PBS溶液的浓度为0.005~0.02mol/L,而后加入SM(PEG)₂₄反应30~60min,而后凝胶柱纯化,收集滤液向其中加入触酶C100至终浓度1~3mg/mL,即得到所述链霉亲和素标记的触酶C100。在该优选技术方案中:凝胶柱纯化环节用于去除多余的交联剂;收集得到的滤液可以先检测其中蛋白含量、并将含有蛋白的溶液混合后再加入触酶C100。

[0031] 作为优选,步骤6)所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有8~12mmol/L硝酸镉、20~28mmol/L巯基丙酸、3~7mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11~11.5,将所述前体溶液水浴加热至93~97 $^{\circ}$ C,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0032] 作为优选,步骤7)中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

[0033] 在以上任一技术方案基础上优选的,所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡,所述洗

洗涤液是含有0.3~0.7% (v/v) 吐温-20的PBST溶液,所述PBST溶液的浓度为0.005~0.02mol/L,所述PBST溶液的pH为7.0~7.5。

[0034] 在以上技术方案中,触酶(Catalase)又称为过氧化氢酶,本发明中所使用的触酶C100专指由美国Sigma-Aldrich公司出品的、型号为cat.No.C100的触酶。所述生物素化的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体,是指将生物素共价连接到大肠杆菌O157:H7单克隆抗体分子后得到的复合物。所述链霉亲和素标记的触酶C100,是指将链霉亲和素与触酶C100进行共价结合所得的复合物。

[0035] 以上技术方案中,酶标板可以选用96孔黑色荧光酶标板。96孔黑色荧光酶标板,生物素,抗大肠杆菌O157:H7单克隆抗体,抗大肠杆菌O157:H7多克隆抗体,链霉亲和素,触酶C100均可于市面购得。

[0036] 作为优选,所述洗涤是向酶标孔中加入320~360 μ L/孔的洗涤液,洗涤3~4次,每次间隔10~30s。

[0037] 作为优选,所述待测样品可以是蔬菜,当待测样品是蔬菜时,先执行以下操作再进行检测:(1)将买来的蔬菜称取1mg放于无菌试管中,在超净台中灭菌1h,再捣碎;(2)加入9mL PBS (pH 7.4,0.01mol/L) 和1mL的菌液,剧烈震荡30分钟;(3)取上清再加入免疫磁珠浓缩富集为1mL备用。

[0038] 本发明采用酶联免疫吸附试验方法来检测。用于检测大肠杆菌O157:H7的新型荧光ELISA检测方法的原理是:将大肠杆菌O157:H7与包被的多克隆抗体结合,接着加上生物素化的单克隆抗体,再加上SA@CAT (链霉亲和素标记的触酶C100,下同),通过触酶催化双氧水分解,降低对巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的荧光淬灭,根据荧光强度的高低来判断样品中大肠杆菌O157:H7的浓度。如果样品中的大肠杆菌O157:H7浓度高,荧光强度高;反之,则荧光强度低。即荧光强度的高低与样品中的菌的浓度成正相关。该方法可直接用于检测生菜中的大肠杆菌O157:H7。本发明的检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的检测。

[0039] 采用本发明技术方案具有如下有益效果:

[0040] 1、本发明方法使用更为灵敏的新型的触酶取代传统ELISA方法中的辣根过氧化物酶,可以大大节约了成本。

[0041] 2、本发明方法使用更为灵敏的新型的荧光底物(巯基丙酸修饰的碲化镉量子点)取代传统ELISA方法中的化学显色底物,可以大大提高其检测灵敏度,相对于传统ELISA至少提高了2-3数量级。

附图说明

[0042] 图1是本发明检测方法与常规以辣根过氧化物酶作为抗体标记物酶的检测方法的原理对比图。

[0043] 图2是本发明实施例1中百分荧光率-菌浓度标准曲线图。

[0044] 图3是本发明实施例2中百分吸光率-菌浓度标准曲线图。

具体实施方式

[0045] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在

以下实施例中对于属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0046] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0047] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解的含义。

[0048] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0049] 以下实施例中,抗生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体和多克隆抗体购买于无锡中德伯尔生物技术有限公司;所述的生物素(Cat.No.B5161)、链霉亲和素(Cat.No.S4762)、触酶(cat.No.C100)和底物液A双氧水(35%,cat.No.349887)均购买于美国Sigma-Aldrich公司。所述的触酶C100即指触酶(cat.No.C100)。

[0050] 实施例1(本发明检测大肠杆菌0157:H7的新型荧光ELISA检测方法在检测生菜中的大肠杆菌0157:H7含量中的应用)

[0051] 本发明新型荧光ELISA检测方法用于检测生菜中的大肠杆菌0157:H7含量时,通过以下步骤实施:样品前处理、用本发明检测方法进行检测、分析结果。

[0052] (1) 样品前处理

[0053] 取处理好的生菜样品1g,加入到9ml无菌PBS中,再加入1ml菌液,剧烈震荡30分钟;取上清再加入免疫磁珠进行富集浓缩为1mL液体,取出备用。

[0054] (2) 用本发明检测方法进行检测上述样品中大肠杆菌0157:H7含量

[0055] 取包被有抗大肠杆菌0157:H7含量多克隆抗体的酶标板,加标准品/样本100 μ L/孔到对应的微孔中;取包被有抗大肠杆菌0157:H7多克隆抗体的酶标板,加样本100 μ L/孔到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后放置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应60min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液340 μ L/孔,充分洗涤4次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破),再加入生物素化大肠杆菌0157:H7单克隆抗体100 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后放置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应60min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液340 μ L/孔,充分洗涤3次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破),加入SA@CAT,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后放置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应60min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液340 μ L/孔,充分洗涤3次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。加入底物液A双氧水(10 μ mol/L)稀释液,100 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min;加入荧光底物液B巯基丙酸修饰的碲化镉量子点底物液50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应15min,设定荧光酶标仪(美国Thermo Varioskan Flash全波长多功能酶标仪)于激发波长为310nm,发射波长为590nm处检测,测定每孔荧光值(请在5min内读完数据);以标准品测试的荧光值与标

准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中大肠杆菌0157:H7的含量。

[0056] 所述抗大肠杆菌0157:H7多克隆抗体包被的96孔黑色荧光酶标板的制备是用0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将大肠杆菌0157:H7多克隆抗体(购买于无锡中德伯尔生物技术有限公司)释成10 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C放置过夜,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液340 μ L/孔,洗板次,30s/次;然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA,购买于美国Sigma-Aldrich公司,cat.No.A4737)封闭,340 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置4 $^{\circ}$ C下保存。所述的大肠杆菌0157:H7适当浓度梯度分别为10⁰CFU/mL、10¹CFU/mL、10²CFU/mL、10³CFU/mL、10⁴CFU/mL、10⁵CFU/mL。

[0057] 所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体通过以下方式获得:将1mg大肠杆菌0157:H7单克隆抗体用PBS(pH 8.6,0.01mol/L)稀释,加入50 μ L活泼酯化生物素(0.76mg/mL)使抗体的终浓度为2mg/mL,室温避光反应45min。反应产物在0.01mol/L的PBS溶液中透析72h,去除游离的生物素;透析结束后,将样品冷冻干燥得到生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体,分装,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0058] 所述SA@CAT通过以下方式获得:将SA用PBS(pH 8.6,0.01mol/L)溶解为1mg/mL,再加入10 μ L SM(PEG)₂₄(Thermo;22104,82.8mg/mL)反应45min,反应结束后用凝胶柱(Thermo:43230)分离纯化,出去多余的交联剂;收集的液体用Nanodrop测定,将有蛋白的用溶液混合,再加入到5mg触酶溶液中(终浓度2mg/mL)。将获得的样品冷冻干燥,分装,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0059] 所述生物素化大肠杆菌0157:H7单克隆抗体工作液的制备:采用活泼酯化生物素与大肠杆菌0157:H7单克隆抗体偶联得到的,用PBS(0.01M,pH7.4)稀释成1:230。

[0060] 所述SA@CAT工作液的制备:采用链霉亲和素和触酶偶联得到的,用PBS(0.01M,pH7.4)稀释成1:300。

[0061] 所述底物液A双氧水的制备:用PBS(0.01mol/L,pH7.4)稀释至10 μ mol/L。所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点荧光底物液的制备:方法,用PBS(0.01mol/L,pH7.4)稀释成1:400。

[0062] 所述浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,其包含0.5%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

[0063] (3) 分析结果

[0064] 用上述制备的6个大肠杆菌0157:H7不同浓度的菌液10¹CFU/mL、10²CFU/mL、10³CFU/mL、10⁴CFU/mL、10⁵CFU/mL、10⁶CFU/mL。在激发波长为310nm,发射波长为590nm处检测荧光强度。

[0065] 淬灭百分荧光率的计算,标准品或样本的淬灭百分荧光率等于第一个标准(0标准)的荧光强度值减去标准品或样本的荧光强度值的平均值(双孔),再除以第一个标准(0标准),即百分荧光率(%) = $(F_0 - F) / F_0 \times 100\%$,其中F₀为第一个标准(0标准)的荧光强度值,F为标准品或样本的荧光强度值的平均值(双孔)。

[0066] 以淬灭百分荧光率为纵坐标,以大肠杆菌0157:H7菌浓度(CFU/mL)横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。标准曲线为 $y = -2.822 \log(x) + 78.031$, $R^2 = 0.9808$,见附图2。该方法的最低检测限被定义为0CFU/mL的荧光值加上三个标准差。通过该标准曲线计算得最低检测线为 5×10^1 CFU/mL。当进行实际样本检测时,将样本的荧光值 $((F_0 - F) / F_0 \times 100\%)$ 值代

入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应样本的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中大肠杆菌0157:H7的实际浓度。

[0067] 实施例2(以辣根过氧化物酶为抗体标记酶、以TMB作为显色底物的大肠杆菌0157:H7ELISA检测方法)

[0068] 传统ELISA检测方法用于检测生菜和牛肉产品中的大肠杆菌0157:H7含量时,通过以下步骤实施:样品前处理、用传统ELISA检测方法进行检测、分析结果。

[0069] (1) 样品前处理

[0070] 取处理好的生菜样品1g,加入到9ml无菌PBS中,再加入1ml菌液,剧烈震荡30分钟;取上清再加入免疫磁珠进行富集浓缩为1mL液体,取出备用。

[0071] (2) 用传统ELISA检测方法进行检测上述样品中大肠杆菌0157:H7含量

[0072] 取包被有抗大肠杆菌0157:H7含量多克隆抗体的酶标板,加标准品/样本100 μ L/孔到对应的微孔中;取包被有抗大肠杆菌0157:H7多克隆抗体的酶标板,加样本100 μ L/孔到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后放置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应60min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液340 μ L/孔,充分洗涤4次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破),再加入生物素化大肠杆菌0157:H7单克隆抗体100 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后放置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应60min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液340 μ L/孔,充分洗涤3次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破),加入SA@HRP,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后放置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应60min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液340 μ L/孔,充分洗涤3次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);加入TMB显色液,100 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置37 $^{\circ}$ C避光环境中反应15min;加入终止液50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处或双波长450nm处检测,测定每孔吸光度值(请在5min内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中的大肠杆菌0157:H7的残留量。

[0073] (3) 分析结果

[0074] 用上述制备的6个大肠杆菌0157:H7不同浓度的菌液 10^1 CFU/mL、 10^2 CFU/mL、 10^3 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL。百分吸光率的计算,标准品或样本的吸光百分率等于标准品或样本的吸光强度平均值(双孔)减去第一个标准(0标准)的吸光强度值,再除于标准品或样本的吸光强度平均值(双孔),即百分吸光率(%) = $(B - B_0) / B \times 100\%$,其中B为标准品或样本的吸光强度平均值(双孔), B_0 为第一个标准(0标准)的吸光强度值。

[0075] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以大肠杆菌0157:H7浓度(CFU/mL)为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。标准曲线为 $y = 9.9009 \log(x) - 115.74$, $R^2 = 0.9738$,见附图3。该方法的最低检测线被定义为百分吸光率大于0CFU/mL的吸光率加上三个标准偏差。通过该标准曲线计算得最低检测限为 5×10^5 CFU/mL。当进行实际样本检测时,将样本的百分吸光率 $(B - B_0) / B \times 100\%$ 值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应样本的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中大肠杆菌0157:H7的实际浓度。

[0076] 由实施例1与实施例2的对比可以发现,本发明的新型ELISA方法灵敏度可达经典ELISA方法的10000倍,同时也证明本发明的新型ELISA方法可适用于以高灵敏度检测任何传统ELISA方法可以检测的物质。

[0077] 实施例3

[0078] 一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法,该方法属于双抗夹心酶联免疫法,该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测,该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100。

[0079] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0080] 该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0081] 具体检测方法包括以下步骤:

[0082] 1) 包被大肠杆菌0157:H7抗体;

[0083] 2) 取步骤1)包被后的抗体,与待测样品混合后于35℃避光环境中反应40min,洗涤;

[0084] 3) 而后加入生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体混合,于35℃避光环境中反应40min,洗涤;

[0085] 4) 而后加入链霉亲和素标记的触酶C100混合,于35℃避光环境中反应40min,洗涤;

[0086] 5) 而后加入浓度为8 μ mol/L的双氧水溶液混合,于35℃避光环境中反应20min;

[0087] 6) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于35℃避光环境中反应10min;

[0088] 7) 检测步骤6)产物的荧光强度。

[0089] 其中步骤1)具体包括以下操作:

[0090] A) 在酶标板上以0.04mol/L、pH9.4的碳酸盐缓冲液作为包被液,稀释大肠杆菌0157:H7多克隆抗体至9 μ g/mL,包被液的加入量为80 μ g/孔,稀释后静置8h;

[0091] B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板,再加入牛血清白蛋白封闭液,于35℃封闭1h,而后弃去封闭液。

[0092] 步骤3)所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体是通过以下方法制备的:配制含有1mg/mL大肠杆菌0157:H7单克隆抗体、0.07mg/mL生物素的PBS溶液,于避光条件下反应30min,所述PBS溶液的浓度为0.005mol/L,而后透析去除生物素,即得到所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体。

[0093] 步骤4)所述链霉亲和素标记的触酶C100是通过以下方法制备的:配制含有0.5mg/mL链霉亲和素的PBS溶液,所述PBS溶液的浓度为0.005mol/L,而后加入SM(PEG)₂₄反应30min,而后凝胶柱纯化,收集滤液向其中加入触酶C100至终浓度1mg/mL,即得到所述链霉亲和素标记的触酶C100。

[0094] 步骤6)所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的:配制含有8mmol/L硝酸镉、20mmol/L巯基丙酸、3mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液,所述前体溶液的pH为11,将所述前体溶液水浴加热至93℃,即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0095] 步骤7)中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的,激发波长为310nm,发射波长为590nm。

[0096] 所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡,所述洗涤液是含有0.3%(v/v)吐温-20的PBST溶液,所述PBST溶液的浓度为0.005mol/L,所述PBST溶液的pH为7.0。实施例4

[0097] 一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法,该方法属于双抗夹心酶联免疫法,该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测,该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100。

[0098] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

- [0099] 该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。
- [0100] 具体检测方法包括以下步骤：
- [0101] 1) 包被大肠杆菌0157:H7抗体；
- [0102] 2) 取步骤1) 包被后的抗体，与待测样品混合后于39℃避光环境中反应80min，洗涤；
- [0103] 3) 而后加入生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体混合，于39℃避光环境中反应80min，洗涤；
- [0104] 4) 而后加入链霉亲和素标记的触酶C100混合，于39℃避光环境中反应80min，洗涤；
- [0105] 5) 而后加入浓度为12 μ mol/L的双氧水溶液混合，于39℃避光环境中反应40min；
- [0106] 6) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合，于39℃避光环境中反应20min；
- [0107] 7) 检测步骤6) 产物的荧光强度。
- [0108] 其中步骤1) 具体包括以下操作：
- [0109] A) 在酶标板上以0.06mol/L、pH9.8的碳酸盐缓冲液作为包被液，稀释大肠杆菌0157:H7多克隆抗体至11 μ g/mL，包被液的加入量为120 μ g/孔，稀释后静置12h；
- [0110] B) 去除酶标板上的液体后利用洗涤液洗涤酶标板，再加入牛血清白蛋白封闭液，于39℃封闭3h，而后弃去封闭液。
- [0111] 步骤3) 所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体是通过以下方法制备的：配制含有3mg/mL大肠杆菌0157:H7单克隆抗体、0.08mg/mL生物素的PBS溶液，于避光条件下反应60min，所述PBS溶液的浓度为0.02mol/L，而后透析去除生物素，即得到所述生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体。
- [0112] 步骤4) 所述链霉亲和素标记的触酶C100是通过以下方法制备的：配制含有2mg/mL链霉亲和素的PBS溶液，所述PBS溶液的浓度为0.02mol/L，而后加入SM(PEG)₂₄反应60min，而后凝胶柱纯化，收集滤液向其中加入触酶C100至终浓度3mg/mL，即得到所述链霉亲和素标记的触酶C100。
- [0113] 步骤6) 所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点是通过以下方法制备的：配制含有12mmol/L硝酸镉、28mmol/L巯基丙酸、7mmol/L碲氢化钠的溶液即为前体溶液，所述前体溶液的pH为11.5，将所述前体溶液水浴加热至97℃，即得到所述巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。
- [0114] 步骤7) 中荧光强度的检测是利用酶标仪实现的，激发波长为310nm，发射波长为590nm。
- [0115] 所述洗涤是利用洗涤液冲洗或浸泡，所述洗涤液是含有0.7% (v/v) 吐温-20的PBST溶液，所述PBST溶液的浓度为0.02mol/L，所述PBST溶液的pH为7.5。
- [0116] 实施例5
- [0117] 一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法，该方法属于双抗夹心酶联免疫法，该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测，该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100。
- [0118] 在以上技术方案的基础上，满足以下条件：
- [0119] 该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。
- [0120] 具体检测方法包括以下步骤：

- [0121] 1) 包被大肠杆菌0157:H7抗体;
- [0122] 2) 取步骤1) 包被后的抗体,与待测样品混合后于37℃避光环境中反应60min,洗涤;
- [0123] 3) 而后加入生物素化的大肠杆菌0157:H7单克隆抗体混合,于37℃避光环境中反应60min,洗涤;
- [0124] 4) 而后加入链霉亲和素标记的触酶C100混合,于37℃避光环境中反应60min,洗涤;
- [0125] 5) 而后加入浓度为10 μ mol/L的双氧水溶液混合,于37℃避光环境中反应30min;
- [0126] 6) 而后加入巯基丙酸修饰的碲化镉量子点混合,于37℃避光环境中反应15min;
- [0127] 7) 检测步骤6) 产物的荧光强度。

[0128] 实施例6

[0129] 一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法,该方法属于双抗夹心酶联免疫法,该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测,该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100,该方法中底物包括双氧水和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。

[0130] 实施例7

[0131] 一种针对大肠杆菌0157:H7的检测方法,该方法属于双抗夹心酶联免疫法,该方法是针对大肠杆菌0157:H7抗原的检测,该方法中用于标记抗体的酶是触酶C100。

[0132] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

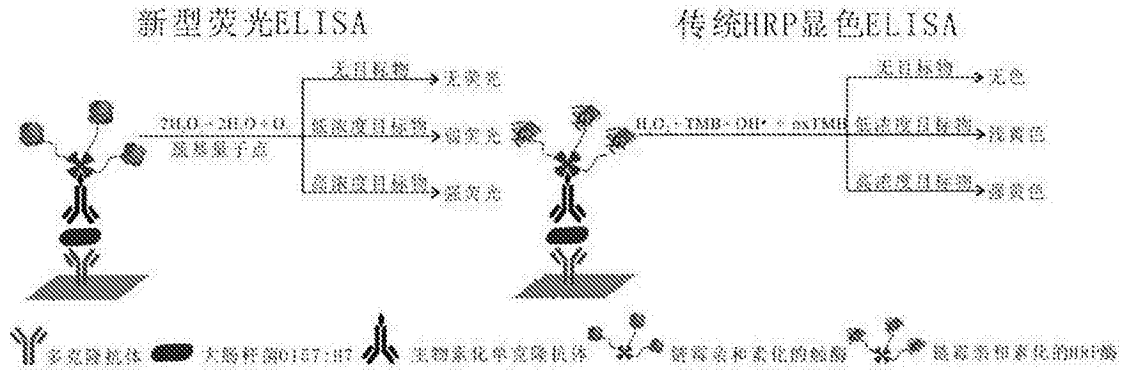


图1

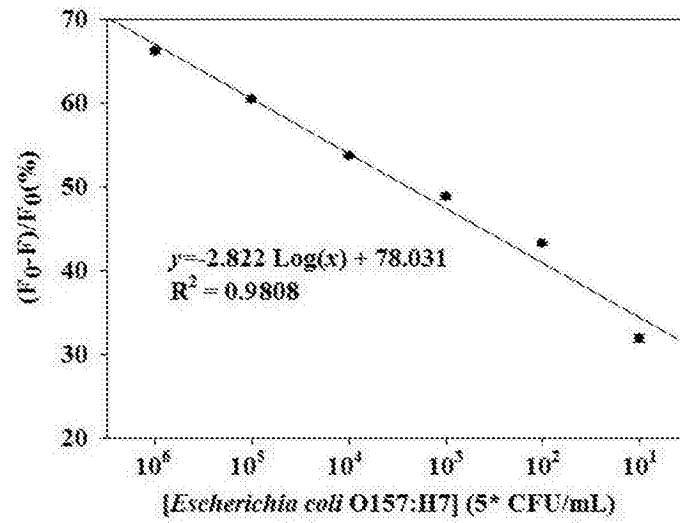


图2

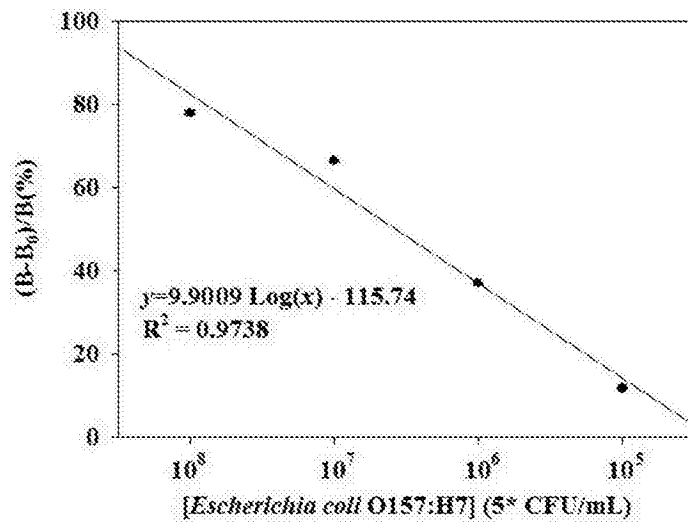


图3

专利名称(译)	一种针对大肠杆菌O157:H7的检测方法		
公开(公告)号	CN105759032B	公开(公告)日	2017-11-28
申请号	CN201610156913.1	申请日	2016-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	许恒毅 熊勇华 黄小林 赖卫华 陈锐 湛胜楠		
发明人	许恒毅 熊勇华 黄小林 赖卫华 陈锐 湛胜楠		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56916 G01N2333/245		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN105759032A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种针对大肠杆菌O157:H7的检测方法，该方法先将大肠杆菌O157:H7与包被的多克隆抗体结合，接着连接生物素化的单克隆抗体，再连接链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶C100，通过辣根过氧化物酶催化双氧水分解，降低对巯基丙酸修饰的碲化镉量子点的荧光淬灭，根据荧光强度的高低来判断样品中大肠杆菌O157:H7的浓度。该方法基于双抗夹心酶联免疫技术，并采用了生物素-亲和素系统用于反应的放大。更为重要的是，由于本发明采用了新的抗体标记酶(辣根过氧化物酶C100)和更为灵敏的荧光底物(碲化镉量子点)，并匹配了有效的反应条件，使得检测灵敏性得到显著提升，同时降低成本、提升检测效率，因此具有良好的推广前景。

