

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200610113827.9

[51] Int. Cl.
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 9 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100535009C

[22] 申请日 2006.10.18

[21] 申请号 200610113827.9

[73] 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

[72] 发明人 何 苗 王 娜 施汉昌 蔡 强

[56] 参考文献

WO9214487 A1 1992.9.3

Immunoprotective oral whole cell vaccine for enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea prepared by in situ destruction of chromosomal and plasmid DNA with colicin E2. Doyle J. Evans, Jr., et al. FEMS Microbiology Immunology, Vol. 47 . 1988

Vaccination with a formalin – killed P – fimbriated E. coli whole – cell vaccine prevents renal scarring from pyelonephritis in the non – human primate. J. A. Roberts, et al. Vaccine, Vol. 13 No.1. 1995

审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称

大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法与应用。该制备方法包括以下步骤：1) 分离大肠杆菌；2) 将大肠杆菌置于含无菌玻璃珠和/或钢珠的生理盐水中，摇动，在 80 – 120℃ 下孵育 1.5 – 3 小时，离心，弃上清，用 PBS 重悬后对其进行灭菌，得到大肠杆菌菌体抗原；3) 将大肠杆菌菌体抗原免疫动物；4) 从经免疫的动物中分离、纯化抗血清，得到大肠杆菌菌体多克隆抗体。用本发明方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体具有特异性高，纯度及效价高 (大于 6400) ，可长期保存的优点，将其用于环境及食品检测领域中大肠杆菌的免疫检测中，将具有精确性、灵敏度高和检测步骤少的优势，应用前景广阔。

1、一种制备大肠杆菌菌体抗原的方法，包括以下步骤：

1) 自生活污水中分离大肠杆菌：先将生活污水样品接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上在 36-38℃下培养 12-36 小时，再将在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基长出的菌落涂布于品红亚硫酸钠培养基上在 36-38℃下培养 24-48 小时，接着挑取在品红亚硫酸钠培养基上长出的紫红色带金属光泽的单菌落，再次接种于品红亚硫酸钠培养基上在 36-38℃下培养 24-48 小时，然后挑取紫红色带金属光泽的单菌落，接种于添加了质量百分浓度为 1.4-1.8% 溴甲酚紫的乳糖蛋白胨培养基中在 36-38℃下培养 12-36 小时，待乳糖蛋白胨培养基中的紫色褪去，将菌液接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上，对长出的菌落进行革兰氏染色，观察细菌形态，将鉴定为大肠杆菌的菌落再接种于伊红美蓝培养基上在 36-38℃下培养 12-36 小时，菌落呈黑紫色的为大肠杆菌；

2) 将大肠杆菌培养后置于含无菌玻璃珠和/或钢珠的生理盐水中，摇动，然后在 80-120℃下孵育 1.5-3 小时，离心，弃上清，洗涤，再离心，弃上清，将菌体沉淀用 PBS 重悬后对其进行灭菌，得到大肠杆菌菌体抗原。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，用于培养大肠杆菌的培养基为牛肉膏蛋白胨琼脂培养基，培养条件为在 36-38℃下培养 12-36 小时。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，对菌体沉淀进行灭菌的条件为在 120℃下加热 15-25min。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤 2) 中，孵育温度为 100℃，孵育时间为 2-2.5 小时；离心条件均为在 4000-6000rpm 下离心 8-12min；用无菌生理盐水洗涤。

大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及抗体及其制备方法与应用，特别是涉及环境检测领域中的一种大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法与其在检测大肠杆菌中的应用。

背景技术

大肠杆菌是环境水质监测和食品安全中一种重要的指示微生物。目前，世界各国及国际组织都将大肠菌群数作为重要的环境卫生学指标，并对其在水中的浓度提出了严格的限制。世界卫生组织《饮用水水质标准》(第二版)中规定，所有饮用水中的大肠杆菌或耐热大肠菌在任意 100mL 水样中不得检出；现行美国饮用水水质标准国家一级饮用水标准规定总大肠杆菌(包括粪型及艾氏大肠菌)为 0mg/L；中华人民共和国国家标准《生活饮用水水质卫生规范》中规定总大肠菌群及粪大肠菌群在任意 100mL 水样中不得检出。

目前，国际上公认的大肠菌群标准检测方法以多管发酵法和滤膜法为主。我国在水和食品卫生检验标准中规定的大肠菌群数的检测方法也是多管发酵法和滤膜法。但是这两种检测方法都存在检测周期长，操作繁琐的缺点，因而难以实现对污染源的快速诊断。近年来，世界各国针对水环境和食品中大肠杆菌的快速检测进行了大量的研究工作，其中基于免疫技术原理的 ELISA 检测方法呈现出了良好的应用前景。

免疫检测技术是利用抗原和抗体间的特异性反应，通过检测标记在反应物上的示踪物，对抗原或抗体进行定性或定量测定的快速检测技术。根据标记物质的不同，目前用于检测环境污染物的免疫检测方法主要有酶免疫分析技术、荧光免疫测定技术、化学发光免疫分析技术、免疫胶体金标记技术、免疫磁珠技术等。其中，酶免疫分析技术(Enzyme immunoassay, EIA)在环境领域中的应用较为广泛，该类技术中的酶联免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)又是最常用的测定方法。该方法具有操作简单，特异性强，迅速灵敏的优点，在大肠杆菌的快速检测中具有优势。

Vandekerchove 等运用多克隆抗体 ELISA 方法检测了致病性大肠杆菌(EPEC)，在单个检测水平上(individual level)，该法试验得到的敏感度及特异性分别为 80.0%和 98.4%，而在多个检测水平上(rabbit flock level)的敏感度及特异性则降低为 79.2%和 85.2% (VANDEKERCHOVE D G F, KERR P G, CALLEBAUT A P, et. al.

Development of a capture ELISA for the detection of antibodies to enteropathogenic *Escherichia coli*(EPEC) in rabbit flocks using intimin-specific monoclonal antibodies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002. 12, 88(4):351-366.). Padhye 采用单克隆抗体 ELISA 法检测了大肠杆菌 0157:H7 (PADHYE N V, DOYLE M P. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes 0157:H7 and 026:11[J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29:99-103). Park 等采用多克隆抗体 ELISA 试剂盒检测了粪便中的大肠杆菌 0157, 与传统的麦康凯培养基法相比, 该试剂盒的灵敏度及特异性分别为 91.2%和 99.5%, 而传统检测方法的灵敏度及特异性仅为 82.4%和 100% (PARK C H, VANDEL N M, HIXON D L. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* 0157 directly from stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34:988-90). Ramadan 等利用 ELISA 检测方法在 2 小时内检测到了大肠杆菌 0157(10^{-10} CFU/mL)(ABUKNESHA R A, DARWISH F. Coupling of enzymatic and immunoassay steps to detect *E. coli*: a new, highly sensitive tandem technique for the analysis of low levels of bacteria[J]. *Talanta*, 2005. 1, 65(2):343-348). 我国姚斐等利用间接酶联免疫吸附方法检测了活的非可培养状态的大肠杆菌 0157:H7, 最小检测浓度为 10^5 CFU/mL (YAO Fei(姚斐), SHA Sha(沙莎), CHEN Gang(陈刚), et al. Indirect enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of viable but nonculturable *Escherichia coli* 0157:H7[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*(青岛海洋大学学报), 2001, 31(2):211-214.). 孙克江等应用酶联免疫吸附法检测了大肠杆菌 0157:H7, 与常规的培养等方法相比, 检出率及敏感性均得到大幅提高 (SUN Kejiang(孙克江), GUO Hong(郭宏), ZHANG Dongfa(张东发), et al. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting 0157:H7[J]. *Disease Surveillance*(疾病监测), 2001, 16(9):353-355). 虽然 ELISA 检测方法操作简单, 灵敏度高, 但是若用该法检测所有血清型的大肠杆菌则需要广谱抗体(Broad spectrum antibody), 此外, 上述试剂盒要想实现商品化仍需对其可靠性做进一步检验, 而且目前检测标准尚不统一, 因此, 商品化受到极大限制。

美国食品与药物管理局已认可使用商品化的出血性大肠杆菌 0157:H7 的免疫检测试剂盒。我国仅中国兽药监察所分别针对大肠埃希氏菌 K88、K99 和 987P 抗原开发出了 ELISA 检测试剂盒, 用于控制幼畜大肠杆菌病(China Institute of Veterinary Drug Control(没有具体作者)). Research and application of enzyme linked immunosorbent assay for detecting *E. coli* kit. *Bulletin of Agricultural Science*

and Technology(农业科技通讯), 1997, 8无卷期页码)。由以上诸多文章中可见, 目前国内外的研究和应用多针对致病性的大肠杆菌 0157:H7, 还未有针对总大肠杆菌开发的 ELISA 检测试剂盒, 而环境检测标准中所要求检测的均为总大肠杆菌。同时, 各研究结果显示, 针对于大肠杆菌所开发的各技术的检测限均难以满足环境检测的要求。因此, 迫切需要一种环境检测领域中用于检测总大肠杆菌的 ELISA 试剂盒。

发明内容

本发明的目的是提供一种简便易行的大肠杆菌菌体多克隆抗体的制备方法。

为实现上述目的, 本发明采取以下设计方案: 一种大肠杆菌菌体多克隆抗体的制备方法, 包括以下步骤:

1) 分离出大肠杆菌, 具体方法为: 先将样品接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上在 36-38℃下培养 12-36 小时, 再将在牛肉膏蛋白胨固体培养基长出的菌落涂布于品红亚硫酸钠培养基上在 36-38℃下培养 24-48 小时, 接着挑取在品红亚硫酸钠培养基上长出的紫红色带金属光泽的单菌落, 再次接种于品红亚硫酸钠培养基上在 36-38℃下培养 24-48 小时, 然后挑取紫红色带金属光泽的单菌落, 接种于添加了质量百分浓度为 1.4-1.8% 溴甲酚紫的乳糖蛋白胨培养基中在 36-38℃下培养 12-36 小时, 待乳糖蛋白胨培养基中的紫色褪去, 将菌液接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面上, 对长出的菌落进行革兰氏染色, 观察细菌形态, 将鉴定为大肠杆菌的菌落再接种于伊红美蓝培养基上在 36-38℃下培养 12-36 小时, 菌落呈黑紫色的为大肠杆菌;

2) 将大肠杆菌培养后置于含无菌玻璃珠和/或钢珠的生理盐水中, 摇动, 然后在 80-120℃下孵育 1.5-3 小时, 离心, 弃上清, 洗涤, 再离心, 弃上清, 将菌体沉淀用 PBS 重悬后对其进行灭菌, 得到大肠杆菌菌体抗原;

3) 将大肠杆菌菌体抗原免疫动物;

4) 从经免疫的动物中分离、纯化抗血清, 得到大肠杆菌菌体多克隆抗体。

自然环境, 特别是生活污水中存在多种大肠杆菌, 因而在上述制备方法的步骤 1) 中, 首先需要分离出存在于待测样品中的多种大肠杆菌, 以使制备的多克隆抗体具有广谱性。

步骤 2) 中用于培养大肠杆菌的培养基的选择是多种多样的, 如牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、LB 培养基等, 优选为牛肉膏蛋白胨琼脂培养基, 培养条件可为在 36-38℃下培养 12-36 小时; 玻璃珠和钢珠的大小和数量可视容器大小和液体量而定, 无特别要求; 孵育温度优选为 100℃, 孵育时间优选为 2-2.5 小时; 离心条件均优选为在 4000-6000rpm 下离心 8-12min; 用无菌生理盐水洗涤; 对菌体抗原进行灭菌的条件可为在 120℃下加热 15-25min。

步骤3)中免疫方法的选择是多种多样的,如背部皮下多点注射法、腹腔注射法等,免疫剂量可为0.3-2.0mL/只(浓度为 10^8 - 10^{10} cfu/mL),此外,用于制备大肠杆菌菌体多克隆抗体的免疫动物可为兔、鸡、鼠、羊或马等常用的免疫动物。

步骤4)中为获得较好的检测效果,还应每隔7-10天测定免疫动物抗血清的抗体效价,当抗体效价达到最大值时,可从经免疫的动物中分离、纯化抗血清;所述对抗血清进行纯化的方法可为饱和硫酸铵盐析沉淀法和亲和层析等方法。

用上述方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体是本发明需要保护的。

本发明的大肠杆菌菌体多克隆抗体可用于大肠杆菌的免疫检测中。

所述大肠杆菌的免疫学检测方法可采用酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫胶体金标记技术、化学发光免疫测定技术或荧光免疫测定技术等。

本领域技术人员知晓,对于固相反应而言,可以将本发明的多克隆抗体固定于固相载体,也可以将待测样品固定于固相载体上。反应通常在室温下进行,检测过程中需要洗涤不与本发明多克隆抗体结合的样品的步骤。

对于液相反应而言,通常可以向处在特定缓冲体系中的待测样品中直接加入本发明的多克隆抗体,然后在适于抗原抗体发生相互作用的温度下(如室温)进行反应。

本领域技术人员知晓如何根据多克隆抗体的来源选择相应的第二抗体。所述第二抗体可以是放射性同位素标记的,包括但不限于使用选自: ^{32}P 、 ^{125}I 、S、 ^3H 等;也可以是非放射性同位素标记的,包括但不限于使用选自:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、生物素、链霉亲和素等标记。本发明所述检测方法中使用的检测试剂取决于检测过程使用的第二抗体的标记物,本领域技术人员知晓如何选择合适的检测试剂。

所述大肠杆菌的ELISA检测法,可包括如下步骤:

- 1) 用待测样品包被酶联板,洗板;
- 2) 封闭经包被的酶联板,洗板;
- 3) 加大肠杆菌菌体多克隆抗体,洗板;
- 4) 加酶标二抗,洗板;
- 5) 加底物显色;
- 6) 终止反应;
- 7) 测定 OD_{450} 值。

上述检测方法中的反应条件及试剂均可按照常规方法进行选择。

步骤4)中的二抗可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的抗兔抗抗体。

本发明还提供了一种检测大肠杆菌的ELISA试剂盒。

本发明所提供的检测大肠杆菌的ELISA试剂盒,可包括上述大肠杆菌菌体多克隆

抗体。

所述试剂盒还可包括所述大肠杆菌菌体多克隆抗体的酶标二抗。

所述酶标二抗可为羊抗兔 IgG 等。

所述用于标记二抗的酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶等标记酶，优选为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体上。

试剂盒中还可包括由显色液 A 和显色液 B 组成的显色液，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲溶液，所述显色液 B 液为邻苯二胺或 3',3',5',5'-四甲基联苯胺溶液。

为方便使用，所述试剂盒还可包括检测用的洗涤液，如 PBST 等常规的洗涤试剂；封闭液，如 1 %BSA 等；包被液，如 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 等。

本发明提供了一种大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法。在本发明的制备方法中，大肠杆菌分离自自然环境，特别是生活污水中，因而是环境中大肠杆菌的代表性菌群类型，基于此得到的多克隆抗体可特异性识别环境中的大肠杆菌，具有广谱性；此外，该制备方法还具有简单，成本低廉的优点。实验证明，用本发明方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体具有特异性高，纯度及效价高（大于 6400），可长期保存的优点，将其用于环境及食品检测领域中大肠杆菌的免疫检测中，将具有精确性、灵敏度高等优势，应用前景广阔。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

图 1 为大肠杆菌菌体多克隆抗体的 SDS-PAGE 检测结果

图 2 为大肠杆菌菌体多克隆抗体的效价测定结果

具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。所有培养基均用蒸馏水配制，分装包装好后灭菌备用，灭菌条件为在 115℃ 下灭菌 20-30min。

实施例 1、大肠杆菌菌体多克隆抗体的制备及其效价测定

一、制备大肠杆菌菌体多克隆抗体

现用本发明的方法制备大肠杆菌菌体多克隆抗体，包括以下步骤：

1、从生活污水中分离出大肠杆菌

1) 采集水样：分别从北京市的 4 个生活污水处理厂(清河污水处理厂、肖家河污水处理厂、北小河污水处理厂的进水口处和清华大学校内生活污水水样)采集水样，共取水样 16 点，每厂 4 点。采样用塑料样品瓶，取水时尽量减少与空气接触时间，用手握住样品瓶底部，将瓶迅速浸入水面下，然后将瓶口转向水流方向，待水样充满

至瓶体积 2/3 时，在水中塞上瓶盖，取出水面。将取回的水样保存于 4℃ 冰箱中，保存时间不应超过 6 个小时。

2) 大肠杆菌的分离和鉴定

采用选择性培养方法从步骤 1) 采集的水样中分离出大肠杆菌，具体方法包括以下步骤：

A. 将水样划线接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（牛肉膏 2.5g，蛋白胨 5.0g，NaCl 2.5g，琼脂 10g，水 500mL，pH 7.2）上 37℃ 培养 24 小时（复壮）；

B. 将在牛肉膏蛋白胨固体培养基长出的菌落涂布于品红亚硫酸钠培养基（蛋白胨 10g，酵母浸膏 5g，牛肉膏 5g，乳糖 10g，琼脂 20g，磷酸氢二钾 3.5g，无水亚硫酸钠 5g，5% 碱性品红乙醇溶液 20mL，水 1000mL，pH 至 7.2-7.4）上在 37℃ 下培养 24-48 小时进行分离；

C. 挑取在品红亚硫酸钠培养基上长出的紫红色带金属光泽单菌落，再划线接种于品红亚硫酸钠培养基上在 37℃ 下培养 36 小时进行分离；

D. 挑取步骤 C 分离出的紫红色带金属光泽单菌落，接种于添加了溴甲酚紫的乳糖蛋白胨培养基（蛋白胨 5g，牛肉膏 1.5g，乳糖 2.5g，氯化钠 2.5g，0.5mL 1.6% 溴甲酚紫乙醇溶液，水 500mL，pH 7.2）中在 37℃ 下培养约 24 小时；

E. 待步骤 D 中乳糖蛋白胨培养基中的紫色褪去，挑取培养基中的菌液，将其接种在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面上；

F. 对在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基斜面上长出的菌落进行革兰氏染色，在光学显微镜下观察细菌形态，将鉴定为大肠杆菌的菌落再涂布接种于伊红美蓝培养基（半乳糖 5g，胰蛋白胨 2.5g，NaCl 2.5g，K₂HPO₄ 1g，伊红 Y 0.2g，美蓝 0.05g，琼脂 7.5g，水 500mL，pH 7.2）上，在 37℃ 下培养约 24h 观察颜色形态，菌落呈黑紫色，有光泽或无光泽的为大肠杆菌，低温保存、备用（一般可以储存约 6 个月）。

用上述方法获得的大肠杆菌包括了水环境中代表性的大肠杆菌，能够用以表征水环境中的总大肠杆菌。

2、大肠杆菌菌体抗原的制备

将步骤 1 分离的大肠杆菌制成浓度为 10^8 - 10^{10} cfu/mL 的菌悬液接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基（牛肉膏 2.5g，蛋白胨 5.0g，NaCl 2.5g，琼脂 10g，水 500mL，pH 7.2）上，在 37℃ 下培养 12-24 小时，从培养皿中刮下菌苔，置于含有的无菌玻璃珠和 20mL 生理盐水的 150mL 角烧瓶中，充分摇动和混匀菌体，然后在 100℃ 下孵育 2-2.5 小时后，把菌液移入 2 个 10mL 离心管中，5000rpm 离心 10min，弃上清，再用无菌生理盐水洗涤，然后 5000rpm 离心 10min，弃上清，将菌体沉淀用 PBS 重悬，将菌液倒入灭

菌的烧瓶内在 120℃下加热 20min 进行灭菌，得到大肠杆菌菌体抗原。

3、免疫动物

将步骤 2 获得的大肠杆菌菌体抗原对 10 只成年雌性新西兰大白兔采用背部 6 点皮下注射法(靠近淋巴结的腋下、背部、腹股沟各两侧)进行免疫，免疫前 1 周取家兔耳缘静脉血，分离血清作为阴性对照 (Neg)，免疫剂量为 1.0mL/次，每次免疫时加注 1.0mL 福氏佐剂 (购自 sigma 公司) 作为免疫佐剂，分别于初次免疫后第 7、14、21 和 28 天再加强免疫一次 (免疫方案见表 1)。

表 1 免疫方案

免疫时间 (d)	免疫剂量 (mL)	佐剂添加量 (mL)
1	1.0	1.0 完全佐剂
7	1.0	1.0 不完全佐剂
14	1.0	1.0 不完全佐剂
21	1.0	1.0 不完全佐剂
28	1.0	1.0 不完全佐剂

4、大肠杆菌菌体多克隆抗体的获得

1) 效价测定

免疫过程中，定期 (初期免疫后每隔 7 天，待免疫五次后每天检测) 从免疫兔子的耳缘静脉采血，采血量为 1mL/只，分离血清，用间接 ELISA 法检测血清中的抗体效价 (抗体的效价 (titer) (又称滴度) 是评价抗体性能的一个重要指标，是常用于表达抗血清中特异性抗体相对含量的一个半定量指标。效价是指在一定条件下，抗血清经过一系列稀释与定量的抗原反应，当阳性抗血清吸光值大于 2.1 倍阴性血清的对照吸光值时抗血清的稀释倍数。) 以考察免疫效果，具体步骤如下：

a. 包被：用 0.05M pH 9.6 碳酸氢钠缓冲溶液 (Na_2CO_3 0.159g, NaHCO_3 0.294g, ddH₂O 100mL) 将大肠杆菌菌体抗原包被 96 孔板，每孔包被量为 100 μL , 37℃温育 2h;

b. 封闭：用 PBST 洗涤液 (内含 0.05% Tween-20 的 0.01M pH7.4 磷酸盐-NaCl 缓冲液 (PBS)，配方为：NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, Tween-20 0.5mL，用水定容至 1L) 清洗酶标板 3 次，每次 3min，再每孔添加质量百分浓度为 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液 100 μL , 37℃温育 2h;

c. 加抗体：以 PBST 洗涤液清洗酶标板 3 次，每次 3min，再加入上述分离自免疫兔子的抗血清 100 μL , 37℃温育 1h;

d. 加酶标抗抗体：以 PBST 洗涤液清洗酶标板 3 次，每次 3min，再加入辣根过氧

化物酶标记的羊抗兔抗抗体（购自 Sigma）100 μ L，37℃温育 1h；

e. 加底物显色：以 PBST 洗涤液清洗酶标板 3 次，每次 3min，再加 3',3',5',5'-四甲基联苯胺（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB）溶液（ Na_2HPO_4 142mg，柠檬酸 105mg，TMB 2mg，30% H_2O_2 7.5 μ l，蒸馏水 5mL）100 μ L，反应 5min；

f. 终止反应及 OD₄₅₀ 值测定：加 H_2SO_4 终止液（ H_2SO_4 28mL，ddH₂O 500mL）终止反应后，取出放入酶标仪中，读取 450nm 下的吸光度。

2) 分离抗血清

当免疫兔子抗体的效价达到最高时，用颈动脉放血的方法大量采血（注意：大量采血前，先将家兔禁食 24h 以防血脂过高），取血后在室温下放置约 2h 使其凝固，然后用高速离心机 11000rpm 离心 10min，取上清分装，于-20℃冷冻保藏（或于 4℃冷藏）。

3) 抗血清的纯化

A. 用饱和硫酸铵盐析沉淀法进行纯化

首先用饱和硫酸铵盐析沉淀法对步骤 2) 分离的抗血清进行初步纯化，具体方法包括以下步骤：

(1) 取抗血清样品 20mL，加入等量 PBS（ NaCl 8.0g， KH_2PO_4 0.2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g， KCl 0.2g，用水定容至 1L，pH 5.0），于冰上用玻璃棒轻轻搅拌，缓慢、逐滴加入 4℃预冷的 SAS（饱和硫酸铵溶液）40mL，于 4℃冰箱中静置 12-24h（注：加入等体积的 SAS 后终浓度变为原浓度的 50%）；

(2) 4℃、12000rpm 离心 10min，弃上清，将沉淀物用 12mL PBS 溶解，缓慢、逐滴加入 4℃预冷的 8mL SAS，4℃静置 1h；

(3) 重复步骤(2)离心，用 13.4mL PBS 溶解沉淀，滴加 6.6mL SAS，4℃静置 1h；

(4) 重复步骤(2)离心，将沉淀用 PBS 溶解，装入透析袋；

(5) 于 4℃冰箱中，用 25 倍体积的 PBS 进行透析，期间每 3h 换液一次，共换液 3 次，直至用 BaCl_2 检测透析液无白色沉淀为止。

B. 用亲和层析法进行纯化

对步骤 A 中用饱和硫酸铵盐析沉淀法进行初步纯化的抗血清用购自 Amersham Biosciences 公司的蛋白 A 亲和层析柱（HiTrap rProtein A FF）做进一步纯化，具体方法包括以下步骤：

(1) 准备收集管，向待收集部分加入 120 μ l 1M Tris $\cdot$ HCl（pH 9.0）/mL；

(2) 用起始缓冲液（HiTrap rProtein A FF 层析柱的绑定产品）填充注射器，以

至少5倍柱体积的蒸馏水洗涤酒精防腐剂；

(3)以5倍柱体积的洗脱缓冲液(HiTrap rProtein A FF层析柱的绑定产品)洗柱使柱再生；

(4)用5-10倍柱体积的偶联缓冲液(HiTrap rProtein A FF层析柱的绑定产品)平衡柱子；

(5)样品过柱，用注射器将样品注入柱子上端接口；

(6)用5-10倍柱体积的偶联缓冲液洗柱(注意：避免过度洗涤)；

(7)用2-5倍柱体积的洗脱缓冲液洗脱，得到大肠杆菌菌体多克隆抗体。

二、大肠杆菌菌体多克隆抗体的检测

1、蛋白质含量测定

使用分光光度计在280nm下测定步骤一中用本发明方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体的蛋白质含量，结果菌体抗体2.1mg/mL，表明获得了蛋白质含量较高的大肠杆菌菌体多克隆抗体。

2、SDS-PAGE电泳检测

再对步骤一制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体进行SDS-PAGE电泳检测，具体检测步骤为：先后用洗洁精、自来水、蒸馏水、无水乙醇清洗玻板，再用吸水纸擦干；配胶：配置10mL 15%的Tris·甘氨酸SDS-PAGE分离胶溶液和4mL 5%的Tris·甘氨酸SDS-PAGE浓缩胶溶液，样品处理液(1g SDS, 5mL甘油, 0.5mg BPB, 2.5mL巯基乙醇, 10mL pH6.8的Tris·HCl缓冲液，加水至50mL)；分离胶溶液充分混匀后，平稳地将其从一侧加入4.5mL，然后在液面上注入一层水，以隔绝空气，促使聚合并消除凝胶弯月面的形成，使凝胶表面平坦；于37℃孵箱中放置40min后将水倒掉，用滤纸吸干，注入浓缩胶液至玻板顶端，然后立即小心插入梳子，37℃孵箱中放置30min；拔梳子时先往电泳内槽灌满电泳缓冲液，以免有气泡进入梳孔使梳孔变形，同时去掉凝胶密封框，30min后即可上样；样品处理时，用2×样品处理液与样品1:1混合，将其同标准蛋白Marker一起在100℃下煮10min，冷却至室温，离心(去除样品中一些不溶性的物质)；上样时，上样量为10μg/孔；将浓缩胶和分离胶分别在80V和160V下进行电泳；当溴酚蓝前沿到达玻璃板底部时停止电泳；取胶时，撬去玻板，将浓缩胶轻轻刮去，避免把分离胶刮破，将分离胶卸下，左上切角，用纯水冲洗；染色与脱色时，将分离胶经微波加热1-2min后倒掉染色液，再用微波加热脱色3min×2(平皿里放大量海绵)，摇床振荡冷却；凝胶脱色干净后，脱色液经活性炭回收，凝胶泡清水后即可进行扫描，结果如图1所示(泳道0为大肠杆菌菌体多克隆抗体，泳道M为蛋白标准分子量)，可以看出所得大肠杆菌菌体多克隆抗体的重链及轻链清晰，杂蛋

白含量少,表明用本发明方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体具有较高的纯度。

3、效价测定

用与步骤一中相同的间接 ELISA 法测定用本发明方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体的效价,除步骤 c 中的抗体变为大肠杆菌菌体多克隆抗体外,其余步骤均相同。效价测定结果如图 2 所示(Neg 为阴性对照,0 为大肠杆菌菌体多克隆抗体),用大肠杆菌菌体抗原免疫新西兰白兔产生了较强的免疫反应,获得的大肠杆菌菌体多克隆抗体对包被的大肠杆菌菌体抗原具有较高的吸收值,表明抗体能够与抗原具有较强的特异反应性,所获得的大肠杆菌菌体多克隆抗体效价较高,大于 6400。

实施例 2、用含有大肠杆菌菌体多克隆抗体的 ELISA 试剂盒检测大肠杆菌

一、含有大肠杆菌菌体多克隆抗体的 ELISA 试剂盒的制备

将实施例 1 制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体与作为第二抗体的经过辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,显色 A 液: 30% H_2O_2 1mL,显色 B 液: 质量百分浓度为 1%的 3',3',5',5'-四甲基联苯胺(TMB)液 1mL(将 TMB 溶于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)(或二甲基甲酰胺(Dimethyl formamide, DMF))得到),洗涤及稀释液 PBST 50mL,封闭液 1%BSA 10mL,包被液 0.05M pH 9.6 碳酸氢钠 50mL, H_2SO_4 终止液 10mL 共同包装,得到检测大肠杆菌的 ELISA 试剂盒。

二、大肠杆菌的检测

以清华大学校内生活污水为例,用步骤一制备的试剂盒对环境中的大肠杆菌进行测定,具体方法包括以下步骤:

(1) 包被酶联板: 用 0.05M pH 9.6 碳酸氢钠缓冲溶液将污水水样包被在 96 孔板中,每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时,然后用 10mM PBS-0.05% Tween 20 (pH7.4) 洗三遍;

(2) 封闭已包被的酶联板: 用 1%的 BSA 封闭包被的酶联板, 100 μ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟;

(3) 在酶联板上加实施例 1 制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体(经 200 倍稀释)100 μ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时,然后用 10mM PBS-0.05%Tween 20 (pH7.4) 洗三遍。

(4) 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 100 μ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟,然后用 10mM PBS-0.05%Tween 20 (pH7.4) 洗三遍;

(5) 加辣根过氧化物酶底物溶液(9.8mL pH5.0 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中加入 0.2 mL TMB 溶液,再加入 20 μ l 30% H_2O_2 , 摇匀), 50 μ l/孔, 室温显色 5 分钟;

(6) 加 2N H_2SO_4 50 μ l/孔终止反应;

(7) 测定 OD_{450} 值。

结果 OD_{450} 值为 0.6，对照用已知浓度的大肠杆菌菌液绘制的标准曲线，样品中的大肠杆菌量约为 $10^4/\text{mL}$ ，表明本发明的大肠杆菌菌体多克隆抗体及含有该抗体的试剂盒可用于大肠杆菌的免疫检测中。

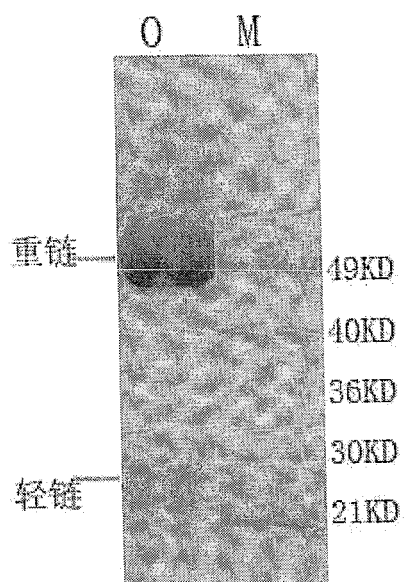
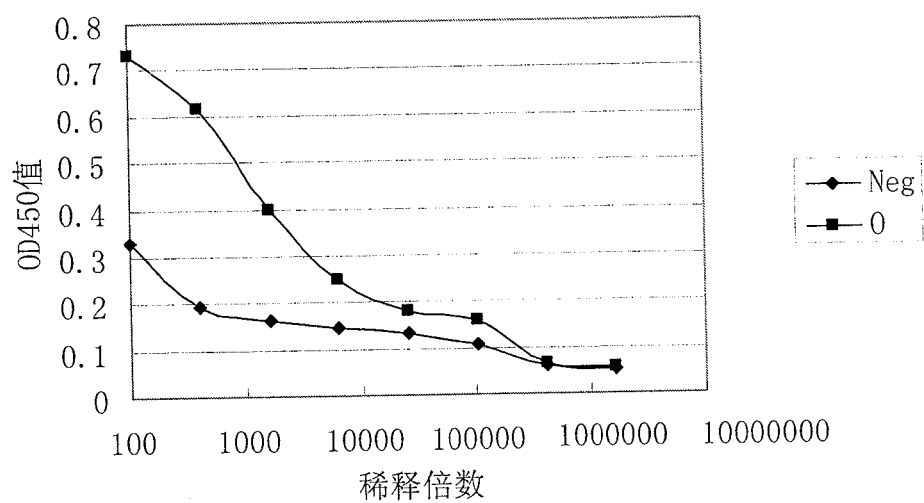


图 1



专利名称(译)	大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN100535009C	公开(公告)日	2009-09-02
申请号	CN200610113827.9	申请日	2006-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	何苗 王娜 施汉昌 蔡强		
发明人	何苗 王娜 施汉昌 蔡强		
IPC分类号	C07K16/12 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	徐莉		
其他公开文献	CN1935843A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种大肠杆菌菌体多克隆抗体及其制备方法与应用。该制备方法包括以下步骤：1)分离大肠杆菌；2)将大肠杆菌置于含无菌玻璃珠和/或钢珠的生理盐水中，摇动，在80-120℃下孵育1.5-3小时，离心，弃上清，用PBS重悬后对其进行灭菌，得到大肠杆菌菌体抗原；3)将大肠杆菌菌体抗原免疫动物；4)从经免疫的动物中分离、纯化抗血清，得到大肠杆菌菌体多克隆抗体。用本发明方法制备的大肠杆菌菌体多克隆抗体具有特异性高，纯度及效价高(大于6400)，可长期保存的优点，将其用于环境及食品检测领域中大肠杆菌的免疫检测中，将具有精确性、灵敏度高和检测步骤少的优势，应用前景广阔。

免疫时间(d)	免疫剂量(mL)	佐剂添加量(mL)
1	1.0	1.0 完全佐剂
7	1.0	1.0 不完全佐剂
14	1.0	1.0 不完全佐剂
21	1.0	1.0 不完全佐剂
28	1.0	1.0 不完全佐剂