

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02115040.0

[43] 公开日 2002 年 10 月 16 日

[11] 公开号 CN 1374526A

[22] 申请日 2002.4.5 [21] 申请号 02115040.0
[71] 申请人 中国科学院南海海洋研究所
地址 510260 广东省广州市新港西路 164 号
[72] 发明人 陈晓燕 胡超群 任春华

[74] 专利代理机构 广州科粤专利代理有限责任公司
代理人 赖汉光

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 细菌脂多糖的包被方法、检测特定脂多糖的试剂盒和检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种细菌脂多糖的包被方法,包括:(a) LPS 溶解于 pH9.6 含 0.02 - 2% 三氯乙酸的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液(包被液)中,并加到预先用杀菌紫外灯照射过的酶标测定孔中;(b)35 - 39℃ 温浴;(c)4℃ 放置;(d)甩干溶液,加入脱脂奶粉或白蛋白封闭液,35 - 39℃ 温浴封闭;(e)甩干溶液,洗涤液洗涤,置于 4℃ 中保存。进一步涉及使用这种方法提供的检测细菌特定脂多糖的试剂盒及使用这种试剂盒快速检测细菌特定 LPS 的方法。试剂盒包括(a)细菌 LPS 单克隆抗体;(b)酶标二抗;(c)标准 LPS;(d)稀释液;(e)已包被好 LPS 的酶标测定条。本发明的优点是 LPS 包埋方法和试剂盒简单,检测方便。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 一种细菌脂多糖的包被方法，其特征是包括下列步骤：

- (a) 0.2-2 μg LPS 溶解于 50-300 μl pH9.6 含 0.02-2%三氯乙酸的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（包被液）中，并加到预先用杀菌紫外灯照射过 10-60 分钟的酶标测定孔中；
- (b) 37°C 温浴 30 分钟-4 小时；
- (c) 4°C 放置 2-48 小时；
- (d) 甩干溶液，加入脱脂奶粉或白蛋白封闭液，35-39°C 温浴封闭；
- (e) 甩干溶液，洗涤液洗涤，置于 4°C 中保存。

2. 根据权利要求 1 中所述的细菌脂多糖的包被方法，其特征是 (a) 的优选条件为 0.5-1.2 μg LPS 溶解于 80-180 μl pH9.6 含 0.3-1%三氯乙酸的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（包被液）中，并加到预先用杀菌紫外灯照射过 20-50 分钟的酶标测定孔中。

3. 根据权利要求 1 中所述的细菌脂多糖的包被方法，其特征是 (b) 的优选方案为 35-39°C 温浴 1-2 小时。

4. 根据权利要求 1 中所述的细菌脂多糖的包被方法，其特征是 (c) 的优选条件为 4°C 放置 12-24 小时。

5. 使用权利要求 1 中所述的细菌脂多糖的包被方法提供的检测细菌特定脂多糖的试剂盒，其特征是溶剂和材料包括：

- (a) 保存于含 0.01-1%叠氮钠、30-80%甘油的磷酸氢二钠溶液中的细菌 LPS 单克隆抗体；
- (b) 过氧化物酶标记的抗 LPS 单克隆抗体的免疫球蛋白（酶标二抗）；
- (c) 溶解于 pH7.4 磷酸盐缓冲液中的标准 LPS；
- (d) 稀释液即含 0.05-0.5%明胶和 0.01-0.1%吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液；
- (e) 已包被好 LPS 的酶标测定条。

6. 根据权利要求 5 中所述的试剂盒，其特征是 (a) 中，叠氮钠和甘油优选含量分别为 0.05-0.3%和 45-60%。

7. 根据权利要求 5 中所述的试剂盒，其特征是 (d) 中明胶的优选含量为 0.1-0.3%。

8. 使用权利要求 5-7 中所述的的试剂盒及另配试剂快速检测细菌特定脂多糖的方法，其特征包括下列步骤：

- (a) 在每测定孔中加入细菌 LPS 单克隆抗体；
- (b) 将待检测样品用稀释液进行适当的稀释后加入酶标测定条中，使每孔加入溶液的体积为 100 μl ，对照孔加入细菌 LPS 单克隆抗体和稀释液使其体积为 100 μl ，充分混匀；
- (c) 35-39°C 温浴 1-2 小时；
- (d) 洗涤液洗涤；

- (e) 加入用稀释液适当稀释的酶标二抗 100 μ l;
- (f) 35-39 $^{\circ}$ C 温浴 1-2 小时;
- (g) 洗涤液洗涤;
- (h) 加入底物应用液 100 μ l, 避光显色 15-30 分钟;
- (I) 当对照孔出现明显颜色反应时, 加入终止液 50 μ l, 立即用酶标仪测定各孔的光吸收值即 OD 值;
- (j) 结果判断: 各测定孔显色的颜色深度与待测液中抗原的含量成反比, 若待测孔 OD 值比对照孔的小, 则可判定待测孔结果为阳性; 反之则阴性; 对检测样品进行定量时, 取梯度浓度的标准细菌 LPS 进行检测, 并根据检测结果, 按各测定孔 OD 值与对照孔 OD 值的比值绘制标准曲线, 根据测定比值查找待测样品的抗原含量。

细菌脂多糖的包被方法、检测特定脂多糖的试剂盒和检测方法

技术领域

本发明涉及一种细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的包被方法, 进一步涉及使用这种方法提供的检测细菌特定脂多糖的试剂盒及使用这种试剂盒快速检测细菌特定 LPS 的方法。

背景技术

脂多糖是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 作为内毒素, 又是病原菌的重要致病因子之一。LPS 对动物体有正反两方面的作用, 一方面, LPS 为受细菌感染的宿主带来热原反应等毒害作用, 并使病原菌躲避动物体补体的攻击, 使病原菌成功感染宿主, 另一方面, LPS 又是动物机体的免疫刺激剂, 可增强机体的免疫抵抗力。自二十世纪初发现内毒素以来, 关于内毒素的研究已有大量的报道, 在对内毒素的结构、活性、对机体作用的机理及致病机理的研究中, 常用到免疫学的研究方法, 而灵敏度高的 ELISA 检测方法是常用的一个方法, 但在 LPS 抗原或抗体的 ELISA 检测方法中, LPS 抗原的包埋困难, 不能用普通包埋蛋白质的方法直接包埋到酶标条中, 一般需采用一些较为复杂的化学交联或离心的方法, 因此 LPS 抗原的包埋麻烦、不稳定。

发明的内容

本发明的目的是为了克服因为 LPS 抗原包埋困难, 间接影响到其 ELISA 检测结果的稳定性的缺点, 提供一种简便、快速地包埋 LPS 抗原的方法, 进一步的目的是使用上述方法提供的快速检测细菌特定 LPS 的试剂盒和使用这种试剂盒快速检测细菌特定 LPS 的方法。

本发明的主要原理是: 细菌 LPS 单克隆抗体与细菌的 LPS 有特异的抗原抗体免疫结合反应, 用一定量的 LPS 包埋酶标反应孔, 加入要检测 LPS 的溶液和一定量的 LPS 单克隆抗体, 溶液中的 LPS 与包埋孔中固定化的 LPS 竞争结合 LPS 单克隆抗体, 使得与固定于酶标孔中的 LPS 结合的辣根过氧化物酶标记的 LPS 单克隆抗体的数量减少, 辣根过氧化物酶与底物反应显示的溶液颜色变浅直至无色, 由此可以定性或半定量检测 LPS。

本发明的一种细菌 LPS 的包被方法包括下列步骤:

- (a) 0.2-2 μ g LPS 溶解于 50-300 μ l pH9.6 含 0.02-2%三氯乙酸的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (包被液) 中, 并加到预先用杀菌紫外灯照射过 10-60 分钟的酶标测定孔中;
- (b) 35-39 $^{\circ}$ C 温浴 30 分钟-3 小时;
- (c) 4 $^{\circ}$ C 放置 2-48 小时;
- (d) 甩干溶液, 加入脱脂奶粉或白蛋白封闭液, 35-39 $^{\circ}$ C 温浴封闭;

(e) 甩干溶液, 洗涤液洗涤(三次), 置于 4℃ 中保存。

上述细菌 LPS 的包被方法中, (a) 的优选方案为: 0.5-1.2 μg LPS 溶解于 80-180 μl pH9.6 含 0.3-1% 三氯乙酸的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (包被液) 中, 并加到预先用杀菌紫外灯照射过 20-50 分钟的酶标测定孔中; (b) 的优选方案为 35-39℃ 温浴 1-2 小时; (c) 的优选条件为 4℃ 放置 12-24 小时。

使用上述方法提供的一种快速检测细菌特定 LPS 的试剂盒, 其溶剂和材料包括:

- (a) 保存于含 0.01-1% 叠氮钠、30-80% 甘油的磷酸氢二钠溶液中的细菌 LPS 单克隆抗体;
- (b) 过氧化物酶标记的抗 LPS 单克隆抗体的免疫球蛋白 (酶标二抗);
- (c) 溶解于 pH7.4 磷酸盐缓冲液中的标准 LPS;
- (d) 稀释液即含 0.05-0.5% 明胶和 0.01-0.1% 吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液;
- (e) 已包被好 LPS 的酶标测定条。

上面所述试剂盒的 (a) 中, 叠氮钠和甘油优选含量分别为 0.05-0.3% 和 45-60%。上面所述试剂盒的 (d) 中明胶的优选含量为 0.1-0.3%。

使用试剂盒时需另行配制的试剂包括:

- (1) 洗涤液 (pH7.4 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液-0.05% 吐温 20), 它含

| | |
|-------|---------|
| 磷酸二氢钾 | 0.2 克 |
| 磷酸氢二钠 | 2.9 克 |
| 氯化钠 | 8.0 克 |
| 吐温 20 | 0.5 克 |
| 加双蒸水至 | 1000 毫升 |

- (2) pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液

甲液: 柠檬酸 (无水) 19.2 克溶于 1000 毫升双蒸水中

乙液: 磷酸氢二钠 (12H₂O) 71.6 克溶于 1000 毫升双蒸水中

取甲液 24.3 毫升, 乙液 25.7 毫升, 双蒸水 50 毫升混合即成 pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液。

- (3) 底物应用液 (用时现配), 由下列三种试剂混合而成:

邻苯二胺 40 毫克

pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 100 毫升

30% 过氧化氢 0.15 毫升

- (4) 终止液

30 毫升浓硫酸加到 70 毫升双蒸水中混合而成。

使用上述快速检测细菌特定脂多糖的试剂盒及另配试剂快速检测细菌特定脂多糖的方

法包括：

- (a) 在每测定孔中加入细菌 LPS 单克隆抗体；
- (b) 将待检测样品用稀释液进行适当的稀释后加入酶标测定条中，使每孔加入溶液的体积为 100 μ l，对照孔加入细菌 LPS 单克隆抗体和稀释液使其体积为 100 μ l，充分混匀；
- (c) 35-39 $^{\circ}$ C 温浴 1-2 小时；
- (d) 洗涤液洗涤(3-4)次；
- (e) 加入用稀释液适当稀释的酶标二抗 100 μ l；
- (f) 35-39 $^{\circ}$ C 温浴 0.5-2 小时；
- (g) 洗涤液洗涤(3-4)次；
- (h) 加入底物应用液 100 μ l，避光显色 15-30 分钟；
- (I) 当对照孔出现明显颜色反应时，加入终止液 50 μ l，立即用酶标仪测定各孔的光吸收值即 OD 值；
- (j) 结果判断：各测定孔显色的颜色深度与待测液中抗原的含量成反比，若待测孔 OD 值比对照孔的小，则可判定待测孔结果为阳性；反之则阴性；对检测样品进行定量时，取梯度浓度的标准细菌 LPS 进行检测，并根据检测结果，按各测定孔 OD 值与对照孔 OD 值的比值绘制标准曲线，根据测定比值查找待测样品的抗原含量。

测定中可调整检测样品的浓度，使待测孔 OD 值与对照孔的 OD 值比值在 0.3-0.8 为宜。
本发明的优点和积极效果：

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁必需的成分，又是重要的致病因子，用免疫学方法对 LPS 展开研究和进行检测是一种很常用的方法，应用简便的方法将 LPS 包埋于酶标测定孔中，会给研究和检测带来很大的便利。而 LPS 检测试剂盒既可以用于有关 LPS 的科学研究中，又可以用于患病动物的检测中，还可以检测某些生物制品中，是否污染有特定细菌的 LPS。本试剂盒有一定的市场应用前景。

具体实施方式

下列结合实施例是对本发明作进一步说明，但不应该当作对本发明的限制。

细菌 LPS 的包被方法为

- (a) 0.8 μ g LPS 溶解于 100 μ l pH9.6 含 1%三氯乙酸的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（包被液）中，并加到预先用杀菌紫外灯照射过 30 分钟的酶标测定孔中；
- (b) 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 时；
- (c) 4 $^{\circ}$ C 放置 12 小时；
- (d) 甩干溶液，加入脱脂奶粉或白蛋白封闭液，37 $^{\circ}$ C 温浴封闭；
- (e) 甩干溶液，洗涤液洗涤三次，置于 4 $^{\circ}$ C 中保存。

试剂盒包括

- (a) 保存于含 0.1%叠氮钠、50%甘油的磷酸氢二钠溶液中的细菌 LPS 单克隆抗体;
- (b) 过氧化物酶标记的抗 LPS 单克隆抗体的免疫球蛋白 (酶标二抗);
- (c) 溶解于 pH7.4 磷酸盐缓冲液中的标准 LPS;
- (d) 稀释液即含 0.3%明胶和 0.05%吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液;
- (e) 已包被好 LPS 的酶标测定条。

另配试剂与技术内容中的一致。

应用本试剂盒研究溶藻弧菌在一定的培养条件下 LPS 是否分泌到细菌培养上清中,应用情况如下: 将溶藻弧菌接种于 2.5%NaCl 营养培养基中, 于 30℃振荡培养, 在 48 小时内每隔 4 小时取样, 离心分离细菌培养上清。取各时期的细菌培养上清 50 μ l, 加入溶藻弧菌 LPS 检测试剂盒提供的酶标条孔中, 每孔再加入 50 μ l 稀释液和 1 μ l 鼠抗溶藻弧菌 LPS 单克隆抗体, 充分混匀, 按试剂盒使用方法进行检测, 每个测定都作一个平行测定, 最后测定出细菌培养上清中没有可测出的 LPS, 表明溶藻弧菌在 2.5%NaCl 营养培养基培养条件下其 LPS 不分泌到细菌培养上清中。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 细菌脂多糖的包被方法、检测特定脂多糖的试剂盒和检测方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1374526A | 公开(公告)日 | 2002-10-16 |
| 申请号 | CN02115040.0 | 申请日 | 2002-04-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国科学院南海海洋研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国科学院南海海洋研究所 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国科学院南海海洋研究所 | | |
| [标]发明人 | 陈晓燕 胡超群 任春华 | | |
| 发明人 | 陈晓燕 胡超群 任春华 | | |
| IPC分类号 | C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/577 | | |
| 代理人(译) | 赖汉光 | | |
| 其他公开文献 | CN1141396C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种细菌脂多糖的包被方法,包括:(a)LPS溶解于pH9.6含0.02 - 2%三氯乙酸的0.1mol/L碳酸盐缓冲液(包被液)中,并加到预先用杀菌紫外灯照射过的酶标测定孔中;(b)35 - 39°C温浴;(c)4°C放置;(d)甩干溶液,加入脱脂奶粉或白蛋白封闭液,35 - 39°C温浴封闭;(e)甩干溶液,洗涤液洗涤,置于4°C中保存。进一步涉及使用这种方法提供的检测细菌特定脂多糖的试剂盒及使用这种试剂盒快速检测细菌特定LPS的方法。试剂盒包括(a)细菌LPS单克隆抗体;(b)酶标二抗;(c)标准LPS;(d)稀释液;(e)已包被好LPS的酶标测定条。本发明的优点是LPS包埋方法和试剂盒简单,检测方便。