



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104142396 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201310170561. 1

(22) 申请日 2013. 05. 10

(71) 申请人 北京东方冷翠国际技术有限公司
地址 100043 北京市石景山区古城西街 21
号 C 座 8212#

(72) 发明人 裴胜 涂维国 庞东

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

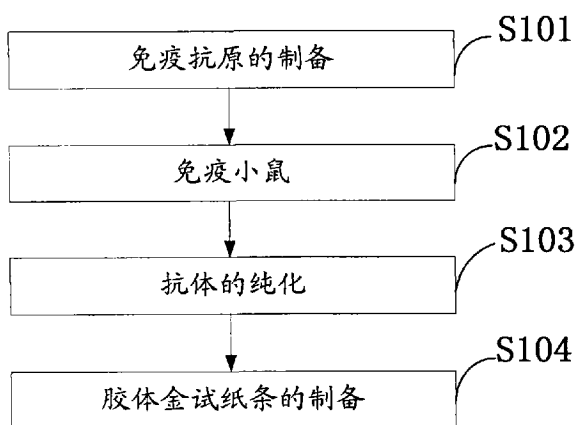
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法,该方法包括以下步骤:免疫抗原的制备,免疫小鼠,抗体的纯化,胶体金试纸条的制备。本发明提供了一种简单快捷的肠出血性大肠杆菌检测方法,旨在制备出高灵敏度肠出血性大肠杆菌胶体金试纸条,直接检测样品中的肠出血性大肠杆菌,解决了长期存在的肠出血性大肠杆菌检测周期长,检测操作复杂的难题;此外,本发明采用的免疫胶体金层析分析法,纳米胶体金技术结合免疫原理,检测方法操作简单、方便快捷、准确灵敏,适合现场的快速检测,利于检测部门的监控。



1. 一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:
免疫抗原的制备;免疫小鼠;抗体的纯化;胶体金试纸条的制备。
2. 如权利要求1所述的肠出血性大肠杆菌快速检测方法,其特征在于,免疫抗原的制备是将二代肠出血性大肠杆菌菌株制备成菌悬液。
3. 如权利要求1所述的肠出血性大肠杆菌快速检测方法,其特征在于,免疫小鼠的方法为:选用6-8周的BalB/c小鼠,初次免疫菌悬液与弗氏完全佐剂混合,乳化完全,皮下多点注射,1ml/每只,每隔两周,用相同剂量的菌悬液与弗氏不完全佐剂进行加强免疫,共加强免疫两次,最后一次免疫后8-10天小鼠尾部取血,通过间接ELISA测抗体血清效价,则进行小鼠眼部取血。
4. 如权利要求1所述的肠出血性大肠杆菌快速检测方法,其特征在于,抗体纯化的方法为:将血清置于Protein G亲和层析柱(KPL)柱吸附琼脂的表面,用10倍柱体积1×Washing/Binding Buffer洗吸附柱,用4倍柱体积的1×Elution Buffer洗脱,得到肠出血性大肠杆菌特异性抗体。
5. 如权利要求4所述的肠出血性大肠杆菌快速检测方法,其特征在于,1×Washing/Binding Buffer为0.1M磷酸钠缓冲液,0.15MNaCl, pH7.4洗吸附柱;1×Elution Buffer为0.2M甘氨酸, pH2.5。
6. 如权利要求1所述的肠出血性大肠杆菌快速检测方法,其特征在于,胶体金试纸条制备的具体步骤为:
步骤一,胶体金的制备:利用冷凝回流装置将50mL质量分数为0.01%的氯金酸溶液加热至沸腾后迅速加入质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液1.2mL,待颜色稳定后继续煮沸10min,冷却,4℃保存备用,利用投射电镜和紫外光谱扫描仪分析胶体金的性状;
步骤二,标记条件的选择:在酶标板孔中分别加入胶体金100μL,而后依次从少到多加入0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5μg的肠出血性大肠杆菌特异性抗体,混匀10min后各加入10% NaCl溶液20μL,于10min后肉眼观察反应结果,第一个保持不变颜色的孔的抗PBP2a单克隆抗体加入量即为最少稳定量,最少稳定量增加10%左右为实际标记量,取三支1.5mL离心管各装胶体金1mL,用0.1mol/L HCl和K₂CO₃分别调pH为7.2、8.2、9.2,加入最佳标记抗体量,对比标记效果;
步骤三,免疫胶体金制备:取10mL胶体金于三角瓶中,用K₂CO₃调pH为最佳标记条件,加入最佳标记抗体量,RT搅拌反应30min,得免疫胶体金,8000rpm离心30min,用1mLPBS复溶免疫胶体金备用,将制备好的免疫胶体金喷涂在玻璃纤维膜上制成胶体金垫;
步骤四,层析NC膜的制备:将羊抗鼠二抗C线和肠出血性大肠杆菌多克隆抗体T线分别划在NC膜上,制成层析NC膜;
步骤五,纸条的组装:取一张PVC底板,在离上方18mm处贴上20mm宽的硝酸纤维膜,上方贴上19mm宽的吸水纸,压上硝酸纤维膜1mm,硝酸纤维膜下方贴上结合垫,结合垫压硝酸纤维膜1mm,胶体金垫下面贴上玻璃纤维膜,压上胶体金垫3mm,下端与底板对齐。

一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测领域,尤其涉及一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法。

背景技术

[0002] 大肠杆菌是一种革兰氏阴性短杆菌,长约 $2 \times 10^{-3} \text{cm}$,宽约 $0.5 \times 10^{-3} \text{cm}$,体积约为 $0.6-0.7 \times 10^{-6} \text{cm}$ 周身鞭毛大约每个菌细胞有 4—6 根鞭毛能运动无芽孢。大肠杆菌合成代谢能力强,在含无机盐、钱盐、葡萄糖的普通培养基上生长大肠杆菌的卫生标准大肠杆菌大量存在于人及其他恒温动物体内的肠道内,常随人及动物粪便一块排出,广泛传播于自然环境中,对水源造成污染。若在水和食品中检出,可认为是被粪便污染的指标。大肠杆菌对热的抵抗力较其他肠道杆菌强, 55°C 经 60 分钟或 60°C 加热 15 分钟仍有部分细菌存活。在自然界的水中可存活数周至数月,在温度较低的粪便中存活更久,这些特性使他们可以作为一个理想的生物测试环境样品的粪便污染指示物,因此,大肠杆菌的检测已成为环境微生物学中重要的检测项目之一。目前,世界各国及国际组织都将大肠菌群数作为重要环境卫生学指标,并对其提出了严格的限制。世界卫生组织《饮用水水质标准》(第二版)中规定,所有用于饮用的水中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菌群为 cfu/ml;中华人民共和国国家标准《生活饮用水水质卫生规范》规定,总大肠菌群及粪大肠菌群每 100mL 水样中不得检出。

[0003] 大肠杆菌的最适生长温度为 37°C ,在 42°C 并 4°C 条件下也可生长,有些实验室菌株在高达 49°C 下仍能繁殖。大肠杆菌兼性厌氧,其最适生长的 pH 值范围为 6.8—8.0。在酸性发酵的厌氧条件下,大肠杆菌可以产生乳酸,琥珀酸,乙醇,乙酸和二氧化碳等。

[0004] 检测大肠杆菌的传统方法包括多管发酵法和滤膜法。

[0005] 多管发酵法适用于各种样品,但操作复杂,检测时间较长;滤膜法主要用于检测杂质较少的水样,操作比多管发酵法更为简单。但是这两种方法都具有检测周期长,程序繁琐的缺点,难以适应污染源快速诊断的需要。

[0006] 多管发酵法:

[0007] 食品中大肠菌群数常以每 100ml (g) 检测样品内大肠菌群最近似数 (MPN) 来表示。大肠菌群的测定,一般应包括发酵试验(在单料或双料乳糖胆盐发酵管内进行)、分离培养试验(利用伊红美蓝平皿分离)、复发酵试验(在乳糖发酵管中进行)、革兰氏染色、芽孢染色、显微镜观察等试验操作。

[0008] 大肠杆菌多管发酵法是指多管发酵法大肠菌群阳性,在含有荧光底物的培养基上 44.5°C 培养 24h,能产生 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)分解荧光底物释放出荧光产物,使培养基在紫外光下产生特征性荧光,以此来检测水中大肠杆菌的方法。多管发酵法是对样品中活菌浓度的一种估计值。

[0009] 当混匀的样品通过一系列稀释和等量分配成为小样品时,有些小样品中最后喊样品量少,以至其中不再含有需检验的细菌。在一定的小样品中存在或不存在细菌,可被用来对原样品的菌数作统计学估计。多管发酵法就是这样一种将样品“多次(管)稀释至无菌”

的计数方法。在此方法中,将 3 个稀释梯度的检样稀释液接种于 9 支或巧支试管培养基中,每个稀释度接种 3 支或 5 支。经培养后,根据结果查阅 MPN 检索表,就可得到原样品中微生物的估计数量。

[0010] 多管发酵法尤其适用于带菌量极少、其他方法不能检测的食品。比如水、乳制品及其他食品中大肠菌群的计数测定。在对一个产气肠杆菌纯培养物作计数时,应采用选择性平板计数法而不要用多管发酵法。如果待检测的样品是以其他细菌为主的河水,就应选用多管发酵法。

[0011] 食物上细菌的分布有可能是完全均匀的,也有可能存在于固态食物的表面上,或者有可能分布在食物的特定的污染点,或是在全部食物中随机分布的定位的污染点上。MPN 表中所列的值是假定所检验的细菌在样品或检样稀释液中呈均匀分布而计算出来的。而食物中的脂肪和不溶性食物颗粒妨碍了均一性,由于这个原因,由食物样品中所得到的 MPN 值,比之由水样中所得到的 MPN 值的精确度和可重复性就要差一些。

[0012] 滤膜法:

[0013] 针对大肠菌群的滤膜法是指用孔径为 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤水样,将滤膜贴在添加乳糖的选择性培养基上 37℃ 培养 24h,能形成特征性菌落的需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽胞杆菌以检测水中大肠菌群的方法。采用滤膜过滤器过滤水样,将水中含有的细菌截留在滤膜上,然后将滤膜放在品红硫酸钠培养基上进行培养,因大肠菌群可以发酵乳糖,在滤膜上出现紫红色具有金属光泽的菌落。直接计数滤膜上生长的典型大肠菌群菌落,可计算出每升水样中含大肠菌群数。如果有必要,对可疑菌落应进行涂片染色镜检,并再接种乳糖发酵管进一步鉴定。

[0014] 大肠杆菌滤膜法是指用滤膜法检测水样后,将大肠菌群阳性的滤膜在含有荧光底物的培养基上培养,能产生 p-葡萄糖醛酸酶分解荧光底物释放出荧光产物,使菌落能够在紫外光下产生特征性荧光,以此来检测水中大肠杆菌的方法。

[0015] 滤膜法具有高度的再现性,可用于检验体积较大的水样,能比多管发酵技术更快地获得肯定的结果。不过在检验浑浊度高、非大肠杆菌类的细菌密度大的水样时,有其局限性。

[0016] 多管发酵法和滤膜法的结果作统计学比较,可显示后者较为精密。虽然这两种技术所得到的数据都提供了基本相同的样品质量情报,但检验结果的数值不同。在做水源的检验时,可以预期约有 80% 的滤膜实验的数据落在多管发酵实验数据 95% 的置信界限内。

[0017] 目前,国内外研究人员已经发展了一些新方法进行大肠杆菌的快速检测,主要包括酶底物法、聚合酶链反应技术、免疫分析法、电化学方法、荧光法等。

[0018] 酶底物法:

[0019] 在国家标准 GB 5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法中介绍了大肠菌群和大肠杆菌酶底物法。大肠菌群酶底物法是指在选择性培养基上能产生 β -半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase) 的细菌群组,该细菌群组能分解色原底物释放出无色原体使培养基呈现颜色变化,以此技术来检测水中总大肠菌群的方法。大肠杆菌酶底物法是指在选择性培养基上能产生 p-半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase) 分解色原底物释放出无色原体使培养基呈现颜色变化,并能产生压葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase) 分解荧光底物释放出荧光产物,使菌落能够在紫外光下产生特征性荧光,以此技术来检测大肠埃希氏菌的方法为

大肠埃希氏菌酶底物法。

[0020] 酶底物法之所以可以入选国家标准,是由于根据相关研究报道,几乎所有的大肠菌群都有 β -D-半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase) 活性,94%—97%的大肠杆菌具有 β -D-葡萄糖醛酸糖苷酶 (β -D-glucuronidase) 活性,而且水体和食品中都缺少这两种酶。因此,基于这两种酶的水体和食品中大肠菌群和大肠杆菌的检测方法得到了迅速的发展。最近报道的一种安培生物传感器应用对氨基酚 β -D-吡喃半乳糖苷 (PAPG) 作为底物,能够在 60—7min 内检测 1000cfu/ml 的大肠杆菌,采用预培养步骤可将灵敏度提高约一百倍。

[0021] 聚合酶链反应技术:

[0022] 聚合酶链反应技术 (PCR, Polymerase Chain Reaction) 是利用从耐热菌中分离的 DNA 聚合酶,加入适量寡聚核苷酸引物,以四种脱氧核苷酸材料模拟天然 DNA 复制过程,在实验室条件下特异性扩增 DNA (或 RNA) 片段的一种新技术。PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成:1. 模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后,使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便与引物结合,为下轮反应作准备;2. 模板 DNA 与引物的退火 (复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55℃ 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;3. 引物的延伸:DNA 模板—引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基互补配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链重复循环变性—退火—延伸三过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2—4 分钟,2-3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

[0023] PCR 技术经过近 20 年的发展已经相当标准和成熟,与电化学传感器、酶联免疫分析以及表面等离子共振传感器等检测方法结合已被广泛应用于细菌的检测成为微生物检测技术中常见而重要的最基础的分析手段之一。其中,应用于大肠杆菌快速检测的 PCR 技术也到了长足的发展。Fricke 等建立了基于 PCR 的大肠杆菌检测方法,可在 24h 内完成 99 种不同的环境水样检测,检测结果与标准方法 100% 吻合。Fortin 等将套式 PCR 技术和荧光探针相结合,可检测出牛奶和果汁中大于 100cfu/mL 的大肠杆菌,如果对细菌进行增菌处理,则可在 6 小时内检测到低至 1cfu/mL 的大肠杆菌。但是,PCR 技术检测大肠杆菌有三点局限:一是难以精确定量;二是由于灵敏度高,操作不慎易交叉污染,产生假阳性,三是操作复杂,仪器昂贵,不利与大规模应用。

[0024] 免疫检测技术:

[0025] 免疫检测技术是基于抗体与抗原或半抗原之间的高选择性反应而建立起来的一种生物化学分析法,分为放射免疫分析、荧光免疫分析、化学发光免疫分析、酶免疫分析、酶联免疫分析及电化学免疫分析等非均相免疫分析和均相免疫分析。免疫检测技术具有许多优点:第一,高选择性。抗体的特异性很高,在免疫分析中一般样品不需要预处理,这一点决定了分析结果的可靠性,同时可以省略预分离的过程。第二,高亲和性。保证分析数据的精密度和分析结果的准确性,这也是达到高灵敏分析的基础。事实上,抗体与抗原复合物的稳定常数一般为 10^9 ,有些可达 10^{14} — 10^{15} ,有较高的稳定性。第三,高灵敏性。抗体与其复合物间应有较大的信号反差,试剂空白低,从而结果准确而灵敏。免疫检测技术还具有检测时间短、样品通量大、检测成本低等优势。因此,在水体和食品中大肠杆菌的检测领域得到

了诸多应用。

[0026] 化学发光法：

[0027] 化学发光法是利用物质在进行化学反应过程中伴随的光辐射现象的一种化学分析方法。化学发光法在培养时间足够长的情况下可以检测到非常低的细浓度，最低可以准确检测到样品中的几个大肠杆菌。由于对细菌的渗透可以减胞内酶的扩散障碍，加速基底向酶的传递，科学工作者经常利用此来提高检测号。同样，荧光分析法也可以在充足的培养时间下检测到样品中几个大肠杆菌。例如 Mathew 等发展了一种化学发光检测大肠杆菌的方法。大肠杆菌在特定的培养过程中能够产生半乳糖普酶，此酶能与 Lumi-Gal ⑧ 530 发生反应产生化学发光，发光强度与大肠杆菌在 1×10^3 – 1×10^6 cfu/mL 的范围内成线性关系。Van 等使用了改进的荧光物质和化学发光物质作为 p-葡萄糖普酸酶的底物，提高了底物与细胞之间的输送速度，显著改善了细菌的检测灵敏度，缩短了检测时间。

[0028] 除了上述的方法外，还有许多快速检测方法，如纳米装置、荧光分析结合免疫技术等方法，商品化的快速检测方法包括特异性检验的培养基、检测试纸片等。一般是利用大肠杆菌特异性酶检测鉴定大肠杆菌，大约 96%~98% 的大肠杆菌产生 β -D-葡萄糖苷酸酶 (β -D-Gud)，而绝大部分沙门氏菌、志贺氏菌和耶尔森氏菌不能产生该酶，因此可利用 Gud 酶底物有效检测大肠杆菌。

[0029] 以上的快速检测方法很少是单独使用的，更多情况下是多个方法复合使用，以提高检测的准确性，缩短检测时间。但是这些方法还有许多方面需要改进，其各自的不足限制了检测方法的推广和运用；而且随着对大肠杆菌的检测速度和精确度要求的不断提高，需要更有效的方法的建立，为人们的生活环境及安全提供有力的保障。

发明内容

[0030] 本发明实施例的目的在于提供一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法，旨在通过采用免疫胶体金层析分析法，纳米胶体金技术结合免疫原理，制备高灵敏度肠出血性大肠杆菌胶体金试纸条，直接检测样品中的肠出血性大肠杆菌，解决了长期存在的肠出血性大肠杆菌检测周期长，检测操作复杂的问题。

[0031] 本发明实施例是这样实现的，一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法，该方法包括以下步骤：

[0032] 免疫抗原的制备；

[0033] 免疫小鼠；

[0034] 抗体的纯化；

[0035] 胶体金试纸条的制备。

[0036] 进一步，免疫抗原的制备：将二代肠出血性大肠杆菌菌株制备成菌悬液。

[0037] 进一步，免疫小鼠：选用 6–8 周的 BalB/c 小鼠，初次免疫菌悬液与弗氏完全佐剂混合，乳化完全，皮下多点注射，1ml 每只，每隔两周，用相同剂量的菌悬液与弗氏不完全佐剂进行加强免疫。共加强免疫两次，最后一次免疫后 8–10 天小鼠尾部取血，通过间接 ELISA 测抗体血清效价，则进行小鼠眼部取血。

[0038] 进一步，抗体的纯化：轻轻将血清置于 Protein G 亲和层析柱 (KPL) 柱吸附琼脂的表面，用 10 倍柱体积 $1 \times$ Washing/Binding Buffer (0.1M 磷酸钠缓冲液，0.15M NaCl, pH7.4)

洗吸附柱,用 4 倍柱体积的 1×Elution Buffer(0.2M 甘氨酸, pH2.5) 洗脱,得到肠出血性大肠杆菌特异性抗体。

[0039] 进一步,胶体金试纸条的制备,具体步骤为:

[0040] (1)、胶体金的制备

[0041] 利用柠檬酸三钠法制备 40nm 胶体金,具体方法如下:利用冷凝回流装置将 50mL 质量分数为 0.01% 的氯金酸溶液加热至沸腾后迅速加入质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液 1.2mL,待颜色稳定后继续煮沸 10min,冷却,4℃ 保存备用。利用投射电镜和紫外光谱扫描仪分析胶体金的性状。

[0042] (2)、标记条件的选择

[0043] 利用 Mey 氏稳定性实验确定最佳标记量以及最佳标记 pH 值,具体方法如下:在酶标板孔中分别加入胶体金 100 μL,而后依次从少到多加入 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 μg 的肠出血性大肠杆菌特异性抗体,混匀 10min 后各加入 10% NaCl 溶液 20 μL,于 10min 后肉眼观察反应结果,第一个保持不变颜色的孔的抗 PBP2a 单克隆抗体加入量即为最少稳定量,最少稳定量增加 10% 左右为实际标记量;取三支 1.5mL 离心管各装胶体金 1mL,用 0.1mol/L HCl 和 K₂CO₃ 分别调 pH 为 7.2、8.2、9.2,加入最佳标记抗体量,对比标记效果。

[0044] (3)、免疫胶体金制备

[0045] 取 10mL 胶体金于三角瓶中,用 K₂CO₃ 调 pH 为最佳标记条件,加入最佳标记抗体量,RT 搅拌反应 30min,得免疫胶体金,8000rpm 离心 30min,用 1mLPBS 复溶免疫胶体金备用。将制备好的免疫胶体金喷涂在玻璃纤维膜上制成胶体金垫。

[0046] (4)、层析 NC 膜的制备

[0047] 将羊抗鼠二抗(C 线)和肠出血性大肠杆菌多克隆抗体(T 线)分别划在 NC 膜上,制成层析 NC 膜。

[0048] (5)、纸条的组装

[0049] 取一张 PVC 底板,在离上方 18mm 处贴上 20mm 宽的硝酸纤维膜,上方贴上 19mm 宽的吸水纸,压上硝酸纤维膜 1mm,硝酸纤维膜下方贴上结合垫,结合垫压硝酸纤维膜 1mm,胶体金垫下面贴上样品垫(玻璃纤维膜),压上胶体金垫 3mm,下端与底板对齐。

[0050] 本发明提供的肠出血性大肠杆菌快速检测方法,提供了一种简单快捷的本发明的肠出血性大肠杆菌检测方法,目的旨在制备出高灵敏度肠出血性大肠杆菌胶体金试纸条,直接检测样品中的肠出血性大肠杆菌。解决了长期存在的肠出血性大肠杆菌检测周期长,检测操作复杂的难题。

附图说明

[0051] 图 1 是本发明实施例提供肠出血性大肠杆菌快速检测方法流程图。

[0052] 图 2 是本发明实施例提供的双抗夹心法 GICA 原理示意图。

[0053] 图中:1、样品垫;2、待检样品;3、结合垫;4、质控线;5、吸水纸;6、底板;7、检测线;8、硝酸纤维膜。

具体实施方式

[0054] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明

进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0055] 图1示出了本发明实施例提供的肠出血性大肠杆菌快速检测方法的流程。为了便于说明,仅仅示出了与本发明相关的部分。

[0056] 如图1所示,本发明实施例提供的肠出血性大肠杆菌快速检测方法包括以下步骤:

[0057] S101:免疫抗原的制备;

[0058] S102:免疫小鼠;

[0059] S103:抗体的纯化;

[0060] S104:胶体金试纸条的制备。

[0061] 本发明实施例提供的的具体实施步骤为:

[0062] 第一步、免疫抗原的制备:将二代肠出血性大肠杆菌菌株制备成菌悬液;

[0063] 第二步、免疫小鼠:选用6-8周的BalB/c小鼠,初次免疫菌悬液与弗氏完全佐剂混合,乳化完全,皮下多点注射,1ml/每只,每隔两周,用相同剂量的菌悬液与弗氏不完全佐剂进行加强免疫。共加强免疫两次,最后一次免疫后8-10天小鼠尾部取血,通过间接ELISA测抗体血清效价,则进行小鼠眼部取血;

[0064] 第三步、抗体的纯化:轻轻将血清置于Protein G亲和层析柱(KPL)柱吸附琼脂的表面,用10倍柱体积1×Washing/Binding Buffer(0.1M磷酸钠缓冲液,0.15MNaCl, pH7.4)洗吸附柱,用4倍柱体积的1×Elution Buffer(0.2M甘氨酸, pH2.5)洗脱,得到肠出血性大肠杆菌特异性抗体;

[0065] 第五步、胶体金试纸条的制备,具体方法为:

[0066] 步骤一,胶体金的制备

[0067] 利用柠檬酸三钠法制备40nm胶体金,具体方法如下:利用冷凝回流装置将50mL质量分数为0.01%的氯金酸溶液加热至沸腾后迅速加入质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液1.2mL,待颜色稳定后继续煮沸10min,冷却,4℃保存备用。

[0068] 步骤二,标记条件的选择:

[0069] 利用Mey氏稳定性实验确定最佳标记量以及最佳标记pH值,具体方法如下:在酶标板孔中分别加入胶体金100μL,而后依次从少到多加入0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5μg的肠出血性大肠杆菌特异性抗体,混匀10min后各加入10%NaCl溶液20μL,于10min后肉眼观察反应结果,第一个保持不变颜色的孔的抗PBP2a单克隆抗体加入量即为最少稳定量,最少稳定量增加10%左右为实际标记量;取三支1.5mL离心管各装胶体金1mL,用0.1mol/LHCl和K₂CO₃分别调pH为7.2、8.2、9.2,加入最佳标记抗体量,对比标记效果

[0070] 步骤三,免疫胶体金制备:

[0071] 取10mL胶体金于三角瓶中,用0.2M摩尔浓度K₂CO₃调pH为8.2,加入35μg抗体量,RT搅拌反应30min,得免疫胶体金,8000rpm离心30min,用1mLPBS复溶免疫胶体金备用,将制备好的免疫胶体金喷涂在聚酯纤维膜上制备成胶体金垫。聚酯纤维膜、玻璃纤维膜处理方法:用pH7.4的PB缓冲液浸泡1分钟。

[0072] 步骤四,层析NC膜的制备:

[0073] 将羊抗鼠二抗(C线)和肠出血性大肠杆菌多克隆抗体(T线)分别划在硝酸纤维

膜上,制成层析硝酸纤维膜。

[0074] 步骤五,纸条的组装:

[0075] 如图 2 所示,取一张 PVC 底板 6,在离上方 18mm 处贴上 20mm 宽的硝酸纤维膜 8,上方贴上 19mm 宽的吸水纸 5,压上硝酸纤维膜 1mm,硝酸纤维膜 8 下方贴上结合垫即胶体金垫 3,胶体金垫 3 压硝酸纤维膜 1mm,胶体金垫 3 下面贴上样品垫 1(玻璃纤维膜),压上胶体金垫 3mm,下端与底板 6 对齐。

[0076] 检测肠出血性大肠杆菌时只需把制备好的纸条水平放置,将待检测样品滴在样品垫 1 上即可。

[0077] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

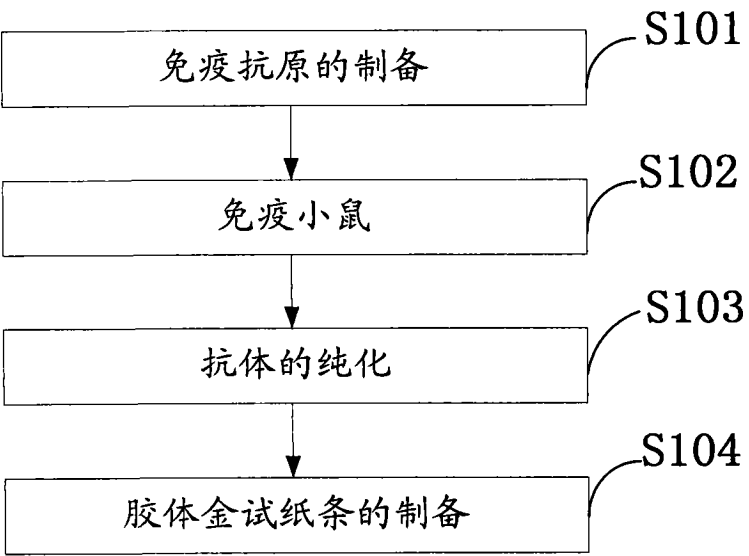


图 1

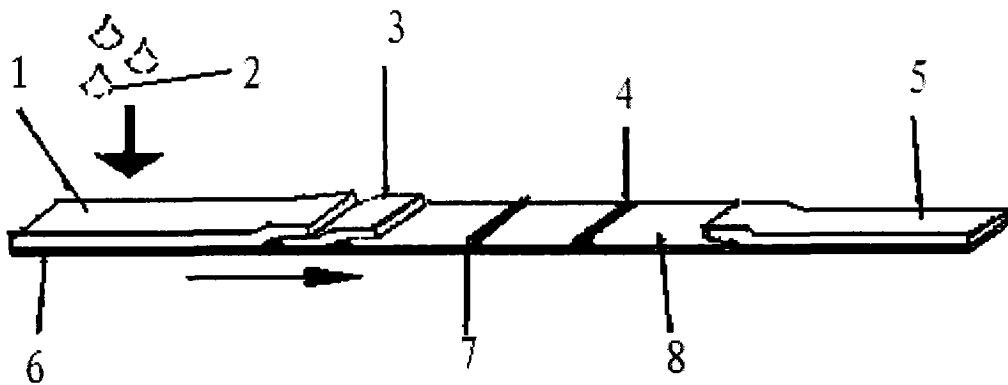


图 2

专利名称(译)	一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法		
公开(公告)号	CN104142396A	公开(公告)日	2014-11-12
申请号	CN201310170561.1	申请日	2013-05-10
[标]发明人	裴胜 涂维国 庞东		
发明人	裴胜 涂维国 庞东		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56916 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肠出血性大肠杆菌快速检测方法，该方法包括以下步骤：免疫抗原的制备，免疫小鼠，抗体的纯化，胶体金试纸条的制备。本发明提供了一种简单快捷的肠出血性大肠杆菌检测方法，旨在制备出高灵敏度肠出血性大肠杆菌胶体金试纸条，直接检测样品中的肠出血性大肠杆菌，解决了长期存在的肠出血性大肠杆菌检测周期长，检测操作复杂的难题；此外，本发明采用的免疫胶体金层析分析法，纳米胶体金技术结合免疫原理，检测方法操作简单、方便快捷、准确灵敏，适合现场的快速检测，利于检测部门的监控。

