



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102590513 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201110461038. 5

(22) 申请日 2011. 12. 29

(71) 申请人 北京市食品酿造研究所

地址 100050 北京市西城区禄长街头条 4 号

(72) 发明人 张金兰 赵燕 王夫杰 张建  
渠岩

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

### (54) 发明名称

检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其制备方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其制备方法,属于生物技术领域。本发明首先纯化了蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢,然后用纯化的蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢作为免疫原,制备多克隆抗体和单克隆抗体。用胶体金标记单克隆抗体作为示踪物,分别在检测线和指控线位置包被抗菌体、芽孢的多克隆抗体和兔抗鼠的多克隆抗体。可以根据检测线和质控线的显色与否判定阴阳性结果。本发明具有测定简便、特异性强、敏感性高等特点,可以方便、快捷、准确的在几分钟内检测蜡样芽孢杆菌菌体及芽孢,也可用在商品流通领域及生产过程中是否污染了蜡样芽孢杆菌。

1. 一种测定样品中蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸,包括样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸水纸及 PVC 底板,其特征在于:

1) 胶体金垫是由在玻璃纤维素膜上包被蜡样芽孢杆菌金标的单克隆抗体所构成,在硝酸纤维素膜上检测区包被蜡样芽孢杆菌的多克隆抗体;

2) 在硝酸纤维素膜上的质控区包被兔抗鼠 IgG 的多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的蜡样芽孢杆菌的金标单克隆抗体,其特征在于:应用纯化的蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢作为免疫原,免疫 BALB/c 小鼠。取免疫后小鼠的脾细胞和小鼠的骨髓瘤细胞 sp/20 进行细胞融合,经过亚克隆筛选后,采用间接非竞争性 ELISA 方法检测杂交瘤细胞上清液,获得分泌针对蜡样芽孢杆菌的单克隆抗体杂交瘤细胞。杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体特异性高、稳定性好。

3. 根据权利要求 1 所述的抗蜡样芽孢杆菌的多克隆抗体,其特征在于:将纯化的蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢分别免疫家兔后制备。

4. 根据权利要求 1 所述的抗蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸,其特征在于可以用于方便、快捷、准确的检测蜡样芽孢杆菌,可用于检测商品流通领域及生产过程中是否污染了蜡样芽孢杆菌。

## 检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其制备方法

[0001] 本发明所属的技术领域

[0002] 本发明涉及一种检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其检测方法,同时还涉及该试纸相关试剂的制备方法。

[0003] 发明的背景技术

[0004] 蜡状芽孢杆菌广泛存在于土壤、空气、水和尘埃中,因此无法避免地会污染到食品中。几乎所有种类的食品都曾被报道与蜡状芽孢杆菌引发的食物中毒有关,主要有:乳品、米、蒸煮的米饭和炒饭、调料、干制品(面粉、奶粉等)、豆类和豆芽、肉制品、焙烤食品等。

[0005] 所有芽孢杆菌种类能形成热稳定内生孢子,蜡样芽孢杆菌孢子是食源性疾病的一个重要因子。孢子的 D<sub>95</sub>°C 从低于 1min 到超过 30min,观察不到孢子的新陈代谢活动,但孢子可以在没有营养的条件下存活许多年。内生孢子是休眠、硬的和非再生结构。内生孢子最初的功能是确保细菌能承受环境压力。孢子高度耐热、干燥、有毒化学物质、UV 射线、γ 射线和其他不利的环境因素。芽孢杆菌孢子是最耐受灭活的生命形式

[0006] 蜡状芽孢杆菌是条件致病菌,偶尔能导致人的眼部感染,甚至是心内膜炎、脑膜炎和菌血症等疾病,但最常见的是导致两种不同类型的食物中毒:腹泻型和呕吐型。一般认为肠毒素在胃中会被破坏,所以腹泻型食物中毒是由残留下来的蜡状芽孢杆菌(芽孢或菌体)在小肠中生长、产肠毒素引起的,具体过程尚未完全明了。多数情况下,引起该类食物中毒的食品中蜡状芽孢杆菌的数量在 10<sup>5</sup> ~ 10<sup>8</sup>CFU/g,也有在数量较低的情况下(10<sup>3</sup> ~ 10<sup>4</sup>CFU/g)导致食物中毒的。其症状类似于产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)食物中毒:水样腹泻、腹部痉挛和疼痛,呕吐很少见。常因食用肉类、海鲜、乳品和蔬菜等食物引起,潜伏期一般为 6 ~ 15h,一般持续 24h;而致呕吐的毒素是该菌在食物中预先产生的,该毒素非常稳定,进入人体后在胃中与其受体 5-HT<sub>3</sub> 结合,导致呕吐。所以尽管有时食物中检出的蜡状芽孢杆菌数量很低(10<sup>2</sup>CFU/g),却仍能引发呕吐中毒。呕吐型食物中毒的潜伏期一般为 0.5 ~ 6h,一般限于富含淀粉质的食品,特别是炒饭和米饭。主要症状为恶心、呕吐,有时有腹泻、头晕、发烧和四肢无力等症状,与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)引发的食物中毒相似。从目前的报道看,由蜡状芽孢杆菌引起的食物中毒在亚洲以呕吐型比较常见,而在欧洲和北美地区则以腹泻型更常见。

[0007] 目前,食品中蜡样芽孢杆菌的检测主要采用传统的细菌分离及生化鉴定方法,该法费时费力,极大限制了在食品加工中对该菌污染的有效监控。为提高食品安全性,建立一种快速灵敏的检测方法十分必要。

[0008] 免疫层析法(Immunoehromatography)是 20 世纪 90 年代兴起的一种快速诊断技术,胶体金免疫层析技术(GICA)就是利用胶体金本身的显色特点结合免疫层析技术诊断特异性的待测物而发展起来的。在该技术基础上研制的胶体金免疫层析试纸条具有特异性强、灵敏度高、制作方便、价格低廉、容易操作、结果直观、无须仪器设备等优点,满足了现场快速检测及实时监测等方面的要求,具有广泛的应用价值。本发明所解决的问题

[0009] 本发明以蜡样芽孢杆菌作为检测对象,可以同时检测蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢,可以克服传统方法检测中无法区分蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢的缺点。结合胶体金免疫层析

技术使本发明的检测方法更加特异、快速、针对性强,实用和方便。

## 发明内容

[0010] 本发明提供了一种检测样品中蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其制备方法。该试纸条由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸水纸及 PVC 底板组成。PVC 背衬一端依次粘有样品垫、胶体金垫、中间部附有硝酸纤维素膜、另一端粘附有吸水纸。所述样品垫与所述胶体金垫之间有搭接;所述硝酸纤维素膜与胶体金垫之间有搭接;所述硝酸纤维素膜与吸水纸之间有搭接;所述胶体金垫是有吸附有胶体金标记的抗蜡样芽孢杆菌的单克隆抗体的玻璃纤维素膜构成,所述硝酸纤维素膜上分别包被有抗蜡样芽孢杆菌多克隆抗体构成的检测线和兔抗鼠的 IgG 构成的质控线。

[0011] 用于检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸条及其制备方法,填补了目前国内尚未有检测蜡样芽孢杆菌免疫胶体金试纸条的空白和检测蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢的快速检测方法的空白。本发明具有以下优点:

[0012] 1、本发明的检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸条,具有特异性强、灵敏度高、检测时间短的优点。

[0013] 2、本发明的检测试纸条不需要特殊仪器、设备,技术简单,检测成本低。

[0014] 该试纸的制备方法包括以下步骤:

[0015] 1) 抗原的制备

[0016] 将蜡样芽孢杆菌的菌体和芽孢通过化学物质的作用及离心方式分开。

[0017] 2) 单克隆抗体的制备

[0018] 将纯化的抗原,分三次免疫 BALB/c 小鼠,取免疫后小鼠的脾脏进行细胞融合,经过亚克隆筛选后,用间接 ELISA 检测效价,选取其中分别针对菌体和芽孢效价最高的杂交瘤细胞株进行后续试验。

[0019] 3) 单克隆抗体的大量制备及提纯

[0020] 采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体,将杂交瘤细胞株注射于已致敏的小鼠腹腔,12-15d 待小鼠腹腔明显隆起收集腹水,腹水经试剂盒纯化,经测定抗体纯度达到 95%。

[0021] 4) 抗蜡样芽孢杆菌多克隆抗体的制备

[0022] 将纯化的抗原,分 3 次免疫家兔后采取抗血清。多克隆抗体经试剂盒纯化,经测定抗体纯度达到 95%。

[0023] 5) 兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的制备

[0024] 将纯化的小鼠 IgG,分 3 次免疫家兔后采取抗血清。多克隆抗体经试剂盒纯化,经测定抗体纯度达到 95%。

[0025] 6) 胶体金探针的制备

[0026] 用柠檬酸三钠还原法制备直径为 20nm 的胶体金,之后以 0.9mg/ml 比例加入纯化的抗蜡样芽孢杆菌单克隆抗体,进行高速离心后用专用溶液保存。

[0027] 7) 胶体金垫的制备

[0028] 将胶体金探针均匀的涂布在玻璃纤维上,在室温下烘干,制成胶体金垫。

[0029] 8) 用专用的包被稀释液稀释好抗蜡样芽孢杆菌多克隆抗体、兔抗鼠二抗分别包被在硝酸纤维素膜上的检测区和质控区,喷涂之后室温干燥。

[0030] 9) 组装试纸条, PVC 底板上一次黏贴样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。将组装完的试纸条切成 3mm 的宽度。

### 具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不仅限于本发明。

[0032] 实施实例一: 抗原的制备

[0033] 芽孢抗原的获得

[0034] 将培养物于 30℃ 培养 10-12d。当孢子生成量最大时, 培养物用无菌水收集下来, 并洗涤两次, 然后用无菌水重悬。为了使芽孢从营养体细胞的碎片中游离出来, 需要进行进一步的处理。

[0035] 蜡样芽孢杆菌在硫柳汞 (1 : 20000) 的稀释液中, 于 37℃ 培养 4 天, 直至营养体细胞裂解彻底。

[0036] 用上述方法制得的芽孢, 在无菌水里洗 6 次, 重悬于生理盐水中, 剧烈震荡 10min, 慢速离心使大的孢子团沉淀。硬度平稳的悬浮物被稀释到浊度相同的等分, 至布朗浊度为 8 号, 并储存于 4℃。如果没有特别说明, 用于凝集或沉淀反应的芽孢悬浮物为未经加热的。用于抗血清制备的通常是 121℃ 20min。

[0037] 菌体抗原的获得

[0038] 培养物在营养肉汤中培养, 接种一环隔夜的培养物, 在 30℃ 下培养 12h, 轻微振荡。培养物离心, 细胞用 25ml 生理盐水复溶, 洗六次。最后一次离心后悬浮于生理盐水中, 剧烈震荡 10min, 轻微离心除去细胞聚集物。均匀的悬浮物上清用吸管吸出, 用无菌盐水稀释。菌体细胞在 100℃ 下加热 1h, 并保存于 4℃ 备用。

[0039] 实施实例二: 免疫胶体金试纸条的制备

[0040] 将 PVC 做背衬, 上面一端依次粘有吸水纸、样品垫、胶体金垫、中间部附有硝酸纤维素膜、另一端粘附有吸水纸。胶体金垫是有吸附有胶体金标记的抗蜡样芽孢杆菌的单克隆抗体的玻璃纤维素膜构成, 硝酸纤维素膜上分别包被有抗蜡样芽孢杆菌多克隆抗体构成的检测线和兔抗鼠的 1gG 构成的质控线。

[0041] 按以下步骤制备:

[0042] 1) 单克隆抗体的制备

[0043] 动物免疫

[0044] 取免疫原, 分别用 PBS (0.01mol/L, pH7.2) 稀释至 1mg/ml 左右备用。免疫小鼠时, 取免疫原与等量的弗氏佐剂, 制成乳化剂, 按照免疫程序免疫 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 5 只, 每只小鼠 100  $\mu$  l, 免疫间隔为 2 周。多次免疫时采血时间一样。

[0045] 血清测定

[0046] 三免后第 10 天, 小鼠尾部采血, 室温静置 1h, 4℃ 过夜, 10000rpm 离心 10min, 收集血清, 4℃ 保存。用间接非竞争 ELISA 法测定血清效价, 测定步骤如下:

[0047] (a) 包板: 用包被液将包被用抗原稀释至适当的工作浓度; 向微孔中每孔加 100  $\mu$  l, 37℃ 孵育 2 小时; 然后弃去孔内的液体。用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 1min (简称洗涤, 下同), 拍干;

- [0048] (b) 封闭 :将封闭液向微孔中加 150  $\mu$  l/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 湿盒 1h, 弃孔内液体, 吸水纸拍干;
- [0049] (c) 加样 :抗体用稀释液适当稀释后每孔按 100  $\mu$  l 顺序加入, 37 $^{\circ}$ C 温箱 30min;
- [0050] (d) 洗涤 :用洗液洗 5 遍, 250  $\mu$  l/ 孔, 每次间隔 1 分钟, 在吸水纸上拍干;
- [0051] (e) 加酶标二抗 :将酶标第二抗体稀释到适当的工作浓度, 每孔加 100  $\mu$  l, 置 37 $^{\circ}$ C 30min; 洗涤同 (d);
- [0052] (f) 显色 :每孔加入 100  $\mu$  l 底物使用液, 室温反应 5 分钟。
- [0053] (g) 终止 :每孔加终止液 50  $\mu$  l 终止反应。
- [0054] (h) 测定 :于 450nm/630nm 波长处测定吸光度值。
- [0055] 当血清效价达到要求即可进行细胞融合制备单克隆抗体。
- [0056] 小鼠骨髓瘤细胞准备
- [0057] 骨髓瘤细胞 (SP2/0) 培养在含 10%~15% 小牛血清的完全培养液中, 如细胞数低于  $10^4$  个 /ml 时, 细胞生长缓慢。一般在  $10^4 \sim 10^5$  个 /ml 时成对数生长, 此时细胞混圆、透亮、大小均一、排列整齐、呈半致密分布。当细胞密度超过  $10^6$  个 /ml 以上时, 细胞便停止分裂, 表现皱缩、发暗、细胞浆中出现颗粒。当细胞处于对数生长的中期时, 可按 1 : 3 ~ 1 : 10 的比例稀释传代。一般每 3 ~ 4 天进行 1 次传代或扩大培养, 然后选取处于生长旺盛, 形态良好的对数生长期细胞供融合用。融合前 24h 将 SP2/0 细胞扩大培养。
- [0058] 饲养细胞的准备
- [0059] (a) 将 BALB/c 小鼠 (8 ~ 12 周龄) 颈椎脱臼处死, 浸泡于 75% 酒精 5min, 移入超净工作台。
- [0060] (b) 用镊子提起小鼠腹部皮肤, 剪一小口, 撕开皮肤, 充分暴露腹膜。
- [0061] (c) 用剪刀剪腹膜一小口, 弯头滴管吸取不完全 DMEM 培养液 1 ~ 2ml 注入小鼠腹腔, 反复吹打, 把液体吸出于离心管中; 此步骤可重复 2 ~ 3 次。
- [0062] (d) 所得营养液 1000rpm 离心 10min, 弃上清液, 以 HAT 培养液重新悬浮, 显微镜下计数, 调节浓度为  $2 \times 10^5$  个 /ml, 分种于 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1ml。
- [0063] 收集骨髓瘤细胞
- [0064] 融合当天, 选择处于对数生长期的细胞, 用移液管将细胞吹下, 收集于 50ml 离心管中, 1000rpm 离心 10min, 然后用 DMEM 营养液重新悬浮, 显微镜下计数并计算细胞成活率, 大于 90% 者, 用于融合。
- [0065] 免疫脾细胞的制备
- [0066] (a) 将用于细胞融合的小鼠摘除眼球放血, 并分离阳性血清作对照。
- [0067] (b) 颈椎脱臼处死小鼠, 置 75% 酒精中浸泡 5min 后移入超净台, 打开腹腔, 无菌取出小鼠脾脏, 放入盛有 5 ~ 10ml DMEM 营养液的平皿中漂洗, 并细心剥除脾脏周围的脂肪和结缔组织。
- [0068] (c) 将脾脏移入另一盛有 5ml DMEM 不完全培养液的平皿中, 置于 200 目铜网上, 用注射器内芯挤压研磨脾脏, 并用平皿内的不完全培养液轻轻冲洗铜网, 使脾细胞全部通过网孔挤压到溶液中。
- [0069] (d) 将脾细胞悬液转移至 50ml 离心管中, 1000rpm 离心 5min, 弃上清液, 以 10ml DMEM 液悬浮, 显微镜下计数。

**[0070] 融合方法**

**[0071]** (a) 分别吸取含  $6 \times 10^7$  个脾细胞和含  $6 \times 10^6$  个 SP2/0 细胞的细胞悬液 (两种细胞数之比为 10 : 1), 合并置入 50ml 塑料离心管中, 800rpm 离心 5min, 弃上清液。

**[0072]** (b) 用手指轻弹管底, 使沉淀松散成糊状。

**[0073]** (c) 取 50% PEG1450 1ml, 左手匀速转动离心管, 右手持 1ml 移液管吸取 50% PEG 溶液 0.7ml, 沿转动的管壁 (尽量接近细胞处) 缓缓滴入, 并控制时间在 60s 内加完; 然后将细胞悬液缓缓吸入移液管内, 控制时间在 30s 内刚好吸完, 静置 30s 后, 再将细胞悬液缓缓吹回到离心管中, 时间控制在 30s 内。

**[0074]** (d) 立即在 5min 内加入 25ml DMEM 不完全培养液, 终止反应。加入速度为: 第 1min 内加 1ml, 第 2min 内加 4ml, 剩下的 20ml 在 3min 内加完。加液时应轻轻匀速转动离心管, 此时操作应轻柔。

**[0075]** (f) 800rpm 离心 7min, 弃上清液, 加入 20ml HAT 培养液, 轻轻吹吸使沉淀细胞悬浮。此时操作应轻柔, 切勿用力吹打。

**[0076]** (g) 将细胞悬液分别加入已铺有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中 (4 板), 0.1ml/孔, 置 37°C、饱和湿度、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

**[0077]** (h) 每天观察并记录细胞生长情况。融合后第 3 天每孔用 HAT 培养液半量换液, 融合后第 7、10 天改用 HT 培养液半量换液, 后改用含有 15% 胎牛血清的细胞生长培养液换液。

**[0078] 融合细胞的培养**

**[0079]** 根据所使用的骨髓瘤细胞等条件的不同, 融合后细胞生长的情况也会有些差别。用倒置显微镜观察, 一次成功地融合实验其细胞生长情况大致如下:

**[0080]** (a) 融合当天 (第 1 天): 可见瘤细胞透亮, 形态多样, 相互之间有粘连、重叠、并可见到巨细菌或哑铃状的细胞。

**[0081]** (b) 融合后第 2 ~ 3 天: 瘤细胞数锐减, 有大量的破碎细胞, 残留的瘤细胞折光性差, 或呈暗黑、皱缩; 可见少数形态良好, 透亮的细胞, 但不能判定他们是残留的瘤细胞还是早期的融合细胞。

**[0082]** (c) 融合后第 4 ~ 5 天: 瘤细胞几乎全部消失, 在巨噬细胞周围聚集着许多大小不等的细胞碎片, 可见形似骨髓瘤细胞, 浑圆透亮, 呈葡萄状分布的融合细胞小集落克隆, 细胞数多少不等, 而且细胞数增加很快。

**[0083]** (d) 融合后第 6 ~ 7 天: 细胞克隆继续长大, 如检测方法敏感, 这时即可取部分克隆的培养上清液检测相应的特异性抗体。

**[0084]** (e) 融合后第 8 ~ 9 天: 细胞克隆继续长大, 大者可达 1/3 ~ 1/2 培养孔的面积, 此时即可对所有有克隆生长孔的培养上清进行检测。

**[0085] 阳性细胞株的筛选**

**[0086]** 采用间接非竞争性 ELISA 方法检测杂交瘤细胞上清液。方法如下:

**[0087]** (a) 包板: 用包被液将包被用抗原 (芽孢和营养体) 分别稀释至适当的工作浓度; 向微孔中每孔加 100  $\mu$  l, 37°C 孵育 2 小时; 然后弃去孔内的液体。用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 1min (简称洗涤, 下同), 拍干;

**[0088]** (b) 封闭: 将封闭液向微孔中加 150  $\mu$  l/孔, 37°C 湿盒 1h, 弃孔内液体, 吸水纸拍

干；

[0089] (c) 加样：将待测培养上清液稀释不同的倍数后每孔按 100  $\mu$ l 顺序加入；每块板同时设空白对照、阴性对照和阳性对照各 2 孔。37℃温箱 30min；

[0090] (d) 洗涤：用洗液洗 5 遍，250  $\mu$ l/孔，每次间隔 1 分钟，在吸水纸上拍干；

[0091] (e) 加酶标二抗：将酶标第二抗体稀释到适当的工作浓度，每孔加 100  $\mu$ l，置 37℃ 30min；洗涤同 (d)；

[0092] (f) 显色：每孔加入 100  $\mu$ l 底物使用液，室温反应 5 分钟。

[0093] (g) 终止：每孔加终止液 50  $\mu$ l 终止反应。

[0094] 判定结果阴性对照孔 (SP2/0 上清和阴性血清) 应该无色或接近无色，阳性对照孔 (免疫小鼠血清) 应明显显色。测定 OD 值，若待测孔 OD 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍，即为阳性。

[0095] 待融合后的细胞克隆长至孔底面积的 1/4 ~ 1/3 时，即可用间接 ELISA 法对所有有克隆生长孔的培养上清进行抗体检测。选择阳性值较高、克隆数目较少的细胞克隆化，并扩大培养。阴性孔 2 ~ 4 天后再检测一次，如仍为阴性则弃去，若为阳性，处理方法同前。

[0096] 阳性细胞株的克隆化

[0097] 采用有限稀释法进行细胞克隆，具体步骤如下：

[0098] 克隆化的前一天制备饲养细胞 (也可以于当天制备)，方法如前述。

[0099] (a) 悬浮待克隆化的阳性孔中的细胞，吸出悬浮液至已含有 1ml HT 培养液 (或细胞生长培养基) 的无菌试管中。

[0100] (b) 取 0.1ml 细胞悬液计数。以 HT 培养液 (或细胞生长培养基) 稀释细胞至 100 个/ml。每个克隆细胞做 3 个稀释度 (100 个/ml、10 个/ml、5 个/ml)，分种于 96 孔细胞板中，每孔 0.1ml，即 10 个/孔、1 个/孔、0.5 个/孔，每个稀释度分别为 12 孔、27 孔和 8 孔。

[0101] (c) 培养板置 37℃、饱和湿度、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 7 ~ 10 天，中间换液一次。换液前倒置显微镜下观察记录单一克隆生长孔。克隆细胞长至孔底面积的 1/4 ~ 1/3 时，对其上清液进行间接 ELISA 检测。取强阳性 (0 孔 OD 值最高者) 克隆扩大培养，冻存，同时按上法继续克隆至阳性率达 100%。

[0102] (d) 将强阳性单克隆细胞扩大培养至 12 孔板，长满后扩至 10ml 细胞瓶，一部分准备冻存；一部分继续培养，以用于生产腹水，大量制备单克隆抗体。

[0103] 2) 单克隆抗体的大量制备及提纯

[0104] 采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体，具体步骤如下：

[0105] (a) 选择 8-10 周 BLAB/c 雌性小鼠 10 只，每只腹腔内注射无菌石蜡油 0.5ml。

[0106] (b) 10-14 天后，接种杂交瘤细胞。将培养的杂交瘤细胞吹打下来，1000rpm 离心 10min，弃去上清液，用无血培养液将其混匀，并将细胞数调至 1-4 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml，每只小鼠腹腔注射 0.5ml。

[0107] (c) 植入细胞后第 7 天起，每天观察小鼠腹部，待小鼠腹部明显膨大，用 9 号针头穿刺腹腔，收集腹水，5000rpm 离心 10min，收集上清液，分装，-20℃ 保存备用。

[0108] 3) 抗蜡样芽孢杆菌多克隆抗体的制备

[0109] 将纯化的抗原和佐剂等量混合乳化，初次免疫用弗氏完全佐剂乳化，每隔 7 天加强免疫一次，加强免疫用弗氏不完全佐剂乳化。接种方式选择皮下背部分六点接种。自免

疫后起每隔一周耳静脉采血一次,ELISA 检测抗体效价达到所需水平后,进行心脏采血。所采学液 37℃放置 1h,4℃放置过夜,第二天 4℃,3000r/min,离心 20min,取上清为多克隆抗血清。多克隆抗体经试剂盒纯化,经测定抗体纯度达到 95%。

#### [0110] 4) 兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的制备

[0111] 将提纯的单克隆抗体作为免疫原,和佐剂等量混合乳化,初次免疫用弗氏完全佐剂乳化,每隔 7 天加强免疫一次,加强免疫用弗氏不完全佐剂乳化。接种方式选择皮下背部分六点接种。自免疫后起每隔一周耳静脉采血一次,ELISA 检测抗体效价达到所需水平后,进行心脏采血。所采学液 37℃放置 1h,4℃放置过夜,第二天 4℃,3000r/min,离心 20min,取上清为多克隆抗血清。多克隆抗体经试剂盒纯化,经测定抗体纯度达到 95%。

#### [0112] 5) 胶体金探针的制备

[0113] 取制备好的胶体金(颗粒直径在 20nm)溶液,各分装 50ml 在两个干净的玻璃瓶中,用 0.2MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调 pH 至 8.2。在磁力搅拌器上边搅拌边分别缓慢加入蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢的单克隆抗体,加入抗体后继续搅拌 5min,然后加入 10mL20mMpH8.2 硼酸缓冲液,搅拌 70min,加入 10% BSA 至终浓度 1%,继续搅拌 50min。然后 4℃ 1500rpm 离心 20min,弃去沉淀,然后离心 9000rpm,30-40min,弃上清,沉淀用洗涤液重悬至原体积,重复以上步骤 2 次,最后沉淀重悬于 1/10 体积的保存液里,4℃ 保存备用。

#### [0114] 6) 硝酸纤维素膜的封闭

[0115] 把喷涂有抗蜡样芽孢杆菌的多克隆抗体和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体的 NC 膜,置于 3% BSA 的 0.01% 的 PBS-T,37℃ 封闭 30min,然后用 0.01% 的 PBS-T 洗涤 3 次,将洗涤后的 NC 膜自然晾干,置 4℃ 备用。

#### [0116] 7) 测试条的组装

[0117] 测试条是由白色塑料底板和吸水滤纸、玻璃纤维、喷涂有抗蜡样芽孢杆菌的多克隆抗体和兔抗鼠 IgG 多克隆抗体 NC 膜组成。将样品垫、结合垫、NC 膜、滤纸按左到右依次固定于白色塑料板上,多余部分裁减掉。

#### [0118] 8) 金标抗体的喷涂

[0119] 将金标抗体喷涂到的测试条的结合垫上,置 37℃ 烘箱烘干 20min,与干燥剂一起装入包装袋中,置 4℃ 备用。

[0120] 具体实施实例三:免疫层析胶体金层析板的特异性、敏感性、稳定性分析胶体金检测试纸条的敏感性试验

[0121] 将培养好的蜡样芽孢杆菌,4℃,8000rpm 离心 10min,再以 PBS 稀释成不同数量级的蜡样芽孢杆菌菌悬液,取用 PBS 缓冲液配成 10 倍系列稀释液涂布平板进行菌落记数。记完数的单增李斯特菌悬液灭菌后用 PBS 10 倍系列稀释后检测。不含菌 PBS 稀释液为空白对照,看试纸条的最低检测浓度,经检测其最低检测浓度为 10<sup>3</sup>cfu/ml。

#### [0122] 胶体金检测试纸条的特异性试验

[0123] 将培养好的相似菌或食品病原菌 8000rpm 离心 10min,去掉培养基,再用含 1% Tween20 的 PBS 样品稀释液制成菌悬液,以制备好的胶体金免疫层析试纸条检测,并同时检测空白对照样品。

[0124] 免疫胶体金测试条的特异性取决于测试条上的抗体能否与被检测菌的抗原特异性结合。因此,与其它杂菌的非特异性交叉反应越少,其特异性越高。以制备好的胶体金免

疫层析试纸条检测,并与同样菌数的蜡样芽孢杆菌样品对照,同时检测空白对照。

[0125] 用于实验的菌包括:蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、简单节杆菌、多粘芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、肠炎沙门氏菌、变形杆菌、柠檬酸杆菌、斯氏假单孢菌、小球菌、单核细胞增生李斯特氏菌。

[0126] 试验结果表明,在菌浓度为  $10^3$ cfu/ml 的水平上,该免疫胶体金试纸条与其他菌无交叉反应,该免疫胶体金试纸条特异性良好。

[0127] 胶体金检测试纸条的稳定性试验

[0128] 将胶体金免疫层析试纸条于  $4^{\circ}\text{C}$  和室温放置 3 个月,并接着在  $37^{\circ}\text{C}$  放置 15 天来评价其稳定性。

[0129] 取记完数后的蜡样芽孢杆菌菌悬液(浓度为  $10^3$ CFU/ml)、BSA 和金黄色葡萄球菌进行检测,并与同样的 PBS 溶液做为样品空白对照。

[0130] 试验结果表明,在菌浓度为  $10^3$ cfu/ml 的水平上, $4^{\circ}\text{C}$  和室温放置 3 个月测定结果与原来无显著性差异,接着在  $37^{\circ}\text{C}$  放置 15 天后测定结果与原来无显著性差异,表明该免疫胶体金试纸条稳定性良好。

专利名称(译)	检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102590513A</a>	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201110461038.5	申请日	2011-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京市食品酿造研究所		
申请(专利权)人(译)	北京市食品酿造研究所		
当前申请(专利权)人(译)	北京市食品酿造研究所		
[标]发明人	张金兰 赵燕 王夫杰 张建 渠岩		
发明人	张金兰 赵燕 王夫杰 张建 渠岩		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种检测蜡样芽孢杆菌的免疫胶体金试纸及其制备方法，属于生物技术领域。本发明首先纯化了蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢，然后用纯化的蜡样芽孢杆菌菌体和芽孢作为免疫原，制备多克隆抗体和单克隆抗体。用胶体金标记单克隆抗体作为示踪物，分别在检测线和指控线位置包被抗体、芽孢的多克隆抗体和兔抗鼠的多克隆抗体。可以根据检测线和质控线的显色与否判定阴阳性结果。本发明具有测定简便、特异性强、敏感性高等特点，可以方便、快捷、准确的在几分钟内检测蜡样芽孢杆菌菌体及芽孢，也可用在商品流通领域及生产过程中是否污染了蜡样芽孢杆菌。