



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108342397 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201810122691.0

C12N 15/10(2006.01)

(22)申请日 2018.02.07

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(71)申请人 石河子大学

地址 832000 新疆维吾尔自治区石河子市
北四路221号石河子大学

(72)发明人 乔军 孟庆玲 孟丹 乔梦凡

伍晔晖 王学领 曹旭东 刘昱成
王国超 田振中 张星星 蔡扩军
赵春光

(74)专利代理机构 石河子恒智专利商标代理事
务所(普通合伙) 65102

代理人 李伯勤

(51)Int.Cl.

C12N 15/31(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

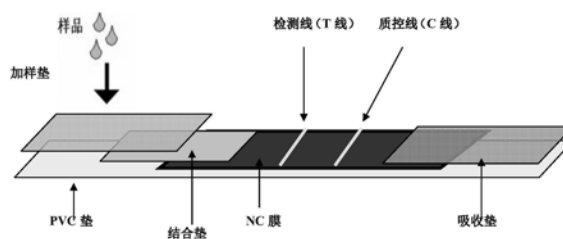
权利要求书2页 说明书9页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

检测SA肠毒素SEI的试剂及制备方法和试剂盒

(57)摘要

本发明公开了快速检测SA(金黄色葡萄球菌)肠毒素SEI的试剂及制备方法和所构成的试剂盒,通过基因工程技术制备了SA重组肠毒素SEI,并与抗SA肠毒素SEI单克隆抗体和羊抗鼠IgG配合组装成ICCGIC试纸条,实现针对液体奶中SA肠毒素SEI的快速、简便、准确的检测。



1. 一种检测SA肠毒素SEI的试剂的制备方法,其特征在于主要包含以下过程:

SA的培养及其基因组DNA的提取:将SA接种在LB液体培养基中培养,取对数生长期的SA培养液离心处理,收集菌体,弃上清,菌体用TE缓冲液悬浮后,用细菌基因组DNA提取试剂盒提取SA基因组DNA,待用;

SA肠毒素SEI基因扩增引物的设计:根据已有SA肠毒素SEI基因序列设计扩增SEI基因序列的特异性引物,在上游引物和下游引物5'端分别引入BamHI和HindIII限制性酶切位点,同时,设计扩增该基因的荧光定量RT-PCR引物,

SA肠毒素SEI基因的扩增与克隆:配制PCR反应体系,该反应体系包括:SA基因组DNA模板,10×PCR buffer,dNTPs,上游引物SEI FP1、下游引物SEI RP1,ddH₂O,Taq DNA聚合酶,将所有试剂加入PCR反应管中并充分混匀,在不同温度段下进行PCR反应,用1-2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,将扩增产物电泳后进行回收,与pMD19-T载体连接,转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α,经氨苄青霉素抗性平板筛选及菌液PCR验证后,获得重组质粒pT-SEI,

SA肠毒素SEI基因的表达:按照分子克隆的方法,将含有SEI基因片段的重组质粒重组质粒pT-SEI与原核表达pET-28a (+) 质粒分别用BamHI和HindIII限制性内切酶进行双酶切,然后分别回收目的片段和载体片段,用T4DNA连接酶进行过夜连接,并将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞DH5α中,在含有卡那霉素抗性的LB液体培养基中36-38℃振荡培养12-24小时,构建pET-SEI重组表达质粒,

按照分子克隆常规方法,将鉴定正确的pET-SEI重组表达质粒转化入大肠杆菌感受态细胞BL21中,用IPTG诱导培养6-8h,离心收集菌液并加入Lysis Buffer裂解菌体,液氮和40-45℃水浴反复冻融2-5次后进行超声破碎,每次8-12s,间歇8-12s,80-100次/周期,直至菌液清亮为止,得到SA重组肠毒素SEI,冷冻保存。

2. 根据权利要求1所述的检测SA肠毒素SEI的试剂的制备方法,其特征在于:

SA的培养及其基因组DNA的提取为:将SA接种在LB液体培养基中,36-38℃培养,取对数生长期的SA培养液在5500-6500r/min离心15min。

3. 根据权利要求2所述的检测SA肠毒素SEI的试剂的制备方法,其特征在于:

SA肠毒素SEI基因的扩增与克隆为:配制PCR反应体系,反应体系包括:SA基因组DNA模板、10×PCR buffer、dNTPs、上游引物SEI FP1、下游引物SEI RP1、ddH₂O和Taq DNA聚合酶,将所有试剂加入PCR反应管中,并充分混匀,在不同温度条件循环反应,得扩增产物,将扩增产物电泳后进行回收,与pMD19-T载体连接,转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α,经氨苄青霉素抗性平板筛选及菌液PCR验证后,获得重组质粒pT-SEI。

4. 一种检测SA肠毒素的试剂,其特征在于:根据权利要求1-3任一项所述的方法制备得到SA重组肠毒素SEI。

5. 一种检测SA肠毒素的试剂盒,其特征在于:包含免疫层析试纸条,所述的免疫层析试纸条包含加样垫、结合垫、NC膜,吸收垫和PVC塑料垫5个部分组成,在NC膜上设置检测线和质控线,

结合垫制作:取一片NC膜,在该NC膜上均匀滴加制备好的胶体金标记抗SA肠毒素SEI单克隆抗体IgG,在真空干燥箱中36-38℃干燥8-12min,作为结合垫,

在设有检测线和质控线的NC膜的检测线上包被经PBS缓冲液稀释至1-3mg/mL的SA重组肠毒素SEI,在质控线上包被1-3mg/mL的羊抗鼠IgG,常温下干燥25-35min,

组装的顺序依次为：在PVC板的中间区域贴上NC膜，结合垫贴在NC膜的前方区域；结合垫压NC膜1-3mm，再在结合垫的前方贴上样品垫，样品垫压结合垫1-3mm，最后将吸水垫在NC膜的后方，吸水垫压NC膜1-3mm，用试纸条切割刀切成条状，低温储存备用；

所述胶体金标记抗SA肠毒素SEI单克隆抗体IgG为：胶体金溶液与抗SA肠毒素SEI单克隆抗体之比为按体积比为1:4-1:6的溶液，所述胶体金溶液颗粒直径为20-100nm，与抗SA肠毒素SEI单克隆抗体混合后，在3-5℃恒温下缓慢振荡20-40min，12000-14000r/min离心3-50min，弃去上清液，沉淀物溶解于0.05-0.15mol/L、pH=7.9-8.1的Tris-HCL缓冲溶液中备用。

检测SA肠毒素SEI的试剂及制备方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测SA(金黄色葡萄球菌)肠毒素SEI的试剂及制备方法和所构成的试剂盒,特别是一种快速检测SA肠毒素SEI的试剂及制备方法和所构成的试剂盒,属生物技术领域。

背景技术

[0002] SA(金黄色葡萄球菌, *Staphylococcus aureus*,)是一种引起奶牛乳房炎(Bovine mastitis)最常见的病原微生物。

[0003] 近年来,随着我国奶牛养殖业的快速发展,奶牛乳房炎已经成为对奶牛场危害最大、投入药费最多、防治最难的疾病之一,它不仅严重影响奶牛的产乳量,而且患病牛产生的牛奶中含有大量的SA及其分泌肠毒素,可引起食物中毒,直接危害人类健康。

[0004] 肠毒素(Enterotoxins, SEs)是SA在生长繁殖过程中产生的一类能够引起急性胃肠炎的外毒素,在低浓度就能够产生致毒活性。SA肠毒素对热稳定,易溶于水和盐溶液。虽然在高温(100℃、30min)或低pH值环境条件下SA很容易就被杀灭,但是由SA产生的肠毒素仍然具有活性,并且肠毒素能够抵抗胃肠液中蛋白酶的水解作用,因此当人食入后污染SA的食物后引起中毒。目前,已经发现的SA肠毒素包括传统肠毒素[SEA、SEB、SEC(SEC1、SEC2、SEC3、SEC ovine、SEC bovine variants)、SED和SEE]、新型肠毒素(SEG、SEH、SEI、SER、SES、SET)和类肠毒素(SE1J、SE1K、SE1L、SE1M、SE1N、SE1O、SE1P、SE1Q、SE1U、SE1U2和SE1 V等)三个类型20余个不同的种型。

[0005] 在产肠毒素的SA菌株中,含有携带不同肠毒素基因的可移动基因元件及毒素基因,并在特定的条件下表达产生肠毒素引起食物中毒。SEA是目前最常见污染食品的肠毒素,也是被认为SA引起食物中毒最主要的肠毒素,它单独存在或与其他肠毒素基因共同存在。

[0006] 1969-1990年,在英国发生的359次中毒事件中,的SA菌株产生SEA。与荧光相似,法国、美国、韩国发生的食物中毒事件中,分别有79%、69.7%和90%的SA菌株产生SEA。与传统肠毒素相比,对新型肠毒素研究相对较少,但有许多研究报道编码新型肠毒素的基因在食源性SA分离株中具有高携带率,并且通过口服实验证实新型肠毒素SEG、SEH、SEI、SER、SES和SET同样具有严重催吐活性。

[0007] 由于SA不同分离菌株之间产生的肠毒素种类差异较大,同一株SA可以产生多种毒素,因此肠毒素的检测也越来越受到研究者的重视。

[0008] 目前,SA肠毒素的检测主要依赖于动物接种试验、免疫学试验和分子生物学方法。

[0009] 动物接种试验是较早被用于检测肠毒素的一种方法,常选用幼鼠和猿类为受试对象,喂食或腹腔注射含有肠毒素的SA菌株纯培养液,当动物发生感染后会产生明显的临床症状。然而,由于各种动物对肠毒素反应的灵敏性相差较大,因而易产生假阴性结果;加之时间和养殖成本较高,限制了该方法的推广应用。

[0010] 目前,检测SA肠毒素常用的免疫学方法主要包括反向被动胶乳凝集(RPLA)、酶联

免疫吸附试验 (ELISA) 和酶联免疫化学发光检测法 (CLIA) 法。RPLA法已经应用于SA肠毒素的检测,但PRLA由于价格昂贵,且所能检测的血清型有限(主要是SEA和SEB),限制了其广泛使用。

[0011] 与传统的动物接种试验相比,ELISA和CLIA法具有灵敏、简单、快速的优点,现已推出商品化的ELISA试剂盒。

[0012] 然而,由于SA不同的肠毒素之间同源性较高,同时内源性酶类、葡萄球菌A蛋白和基质蛋白等会干扰检测,极易引起假阳性反应的发生。

[0013] 目前,商业化的抗体仅用于检测5种传统肠毒素,新型肠毒素除了SEG和SEI可通过ELISA法进行检测外,没有商业化的试剂盒能够用于其他新型肠毒素免疫检测。近年来,利用分子生物学方法对SA毒素基因检测取得了较大进步。

[0014] 到目前为止,利用PCR或多重PCR方法已经检测到21种SA肠毒素基因,包括传统肠毒素和新型肠毒素。与动物接种试验或免疫学方法比较,PCR技术具有敏感性高、特异性强、重复性好等特点,可及时提供快速、准确的检测结果,且易自动化操作,可以克服传统食品检测方法的不足。然而,PCR方法易受到食品基质、培养基成分和死亡SA残留DNA的干扰,造成的假阳性结果。

[0015] 产肠毒素SA是引起奶牛乳房炎的重要病原菌之一。为了有效防控该病,奶牛养殖场长期或大量使用抗生素,导致近年来在奶牛上耐甲氧西林(MRSA)的菌株不断增多,由此引发的鲜奶和乳制品生物安全问题日益凸显,因此急需加强对原料奶SA肠毒素特别是新型肠毒素的检测技术研究。

[0016] 目前,新型的快速检测方法是通过酶促显色反应或直接使用着色标记物短时间获得直观的测试结果的试纸条检测方法,其具有快速、灵敏度高、特异性强、操作简便、结果可靠,适用于现场操作。

[0017] 间接竞争胶体金免疫层析技术(Indirect competitive colloidal gold immunochromatography, ICCGIC)是当将含有待测抗原的样品滴在加样区,待测样品中的抗原会与结合垫中胶体金标记的单克隆抗体结合,形成一种抗原-单克隆抗体-胶体金标记物。当达到检测区后,样品中的抗原与检测线的抗原竞争结合单克隆抗体胶体金标记物。当样品中含有抗原时,会与结合垫中胶体金标记的抗体结合,胶体金标记的抗体不能再与检测线上固定的抗原结合,因此在检测线(T线)不出现条带。当抗原-单克隆抗体-胶体金标记物继续向前层析,与固定在质控线(C线)二抗结合,形成胶体金沉积线。此方法在无需特殊仪器设备下可以实现检测结果的可视化,即可实现抗原分子的快速检测。

[0018] 宋农等通过使用胶体金标记的产肠毒素SA多克隆抗体,制成检测SA肠毒素SEB的免疫层析法检测试纸条,具有检测速度快、特异性好、灵敏度高等优点,但多克隆抗体不能区分出SEs的亚型。利用单克隆抗体(McAb)的高度特异性,制备免疫胶体金检测试纸条,价格低廉,不需要特殊设备和培训,适用于基层卫生单位和流行病学调查使用,因此具有广泛应用前景。

[0019] 本发明通过基因工程技术制备了SA重组肠毒素SEI,免疫小鼠后制备了抗SA肠毒素SEI单克隆抗体,并利用ICCGIC技术制备了一种检测SA肠毒素SEI胶体金试纸条,用于检测SA肠毒素SEI。首先,对SA肠毒素SEI基因进行了扩增,并在大肠杆菌中进行表达。将纯化的SA重组肠毒素SEI免疫BALB/c小鼠,制备了抗SA肠毒素SEI单克隆抗体,并用胶体金溶液

对抗SA肠毒素SEI单克隆抗体进行了标记,在此基础上,将胶体金标记的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体铺在结合垫上,在NC膜上检测线(T线)上包被重组肠毒素SEI,质控线(C线)上包被羊抗鼠IgG,配合加样垫和吸收垫组装成ICCGIC试纸条。将待检样品滴加于ICCGIC试纸条上样垫上,进行了SA肠毒素SEI的检测。利用制备的SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC试纸条分别对89株SA培养液和重组SEI溶液进行检测,证实本发明所制备的SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条具有很高的特异性和敏感性,因此,一种针对液体奶中SA肠毒素SEI的快速、简便、准确的检测试剂及其试剂盒就应运而生。

发明内容

[0020] 本发明的主要目的是制备SA肠毒素SEI单克隆抗体,利用ICCGIC技术制备了检测SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC试纸条,用于液体奶中SA肠毒素SEI的检测。通过对液体奶中SA肠毒素SEI的检测,证实制备的SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC试纸条具有很高的特异性和敏感性,为液体奶中SA肠毒素SEI的检测提供了一个快速、简便、准确的检测试剂。

[0021] 通过制备SA肠毒素SEI单克隆抗体,利用间接竞争胶体金免疫层析技术(ICCGIC)制备了可快速检测SA肠毒素SEI的胶体金ICCGIC试纸条。首先利用基因工程技术制备了SA重组肠毒素SEI,用制备的SA重组肠毒素SEI制备获得抗SA肠毒素SEI的单克隆抗体。用胶体金颗粒标记抗SA肠毒素SEI单克隆抗体得到金标抗体,将金标抗体用移液枪均匀滴加喷到玻璃纤维素膜上,作为结合垫。将重组肠毒素SEI和羊抗鼠IgG分别喷在NC膜上,作为检测线(T线)和质控线(C线)。

[0022] 当待检测的样品中含有SA肠毒素SEI时,样品中的SA肠毒素SEI可与结合垫上的胶体金标记抗SA肠毒素SEI的单克隆抗体结合,且当样品中的SA肠毒素SEI浓度越高时,结合的胶体金标记抗SA肠毒素SEI的单克隆抗体越多,而检测线(T线)上的重组肠毒素结合的抗SA肠毒素SEI的单克隆抗体越少,因此在NC膜的检测线(T线)上会出现的胶体金条带颜色越浅;随着胶体金标记的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体的迁移,会与羊抗鼠IgG结合,在质控线(C线)也会出现条带。

[0023] 当检测样品中不含有SA肠毒素SEI时,没有抗原与胶体金标记的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体结合,因此抗SA肠毒素SEI单克隆抗体结合会与检测线(T线)上的重组肠毒素SEI抗原结合,在NC膜的检测线(T线)上会出现胶体金条带;同时随着胶体金标记的抗SA肠毒素SEI的迁移,会与质控线(C线)上的羊抗鼠IgG结合,因此在NC膜的质控线(C线)上也会出现胶体金条带。

[0024] 本发明主要涉及以下几个方面的内容:

[0025] 1、SA的培养及其基因组DNA的提取。

[0026] 2、SA肠毒素SEI基因引物的设计。

[0027] 3、SA肠毒素SEI基因的扩增与克隆。

[0028] 4、SA肠毒素SEI基因的表达及重组肠毒素SEI的纯化。

[0029] 5、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条的制备。

[0030] 6、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条使用方法及结果判定。

[0031] 7、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条特异性评价。

[0032] 8、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条敏感性评价。

[0033] 9、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条重复性评价。

[0034] 具体过程如下：

[0035] 1、SA的培养及其基因组DNA的提取。

[0036] 将SA接种在LB液体培养基中，37℃培养，取对数生长期的SA培养液30mL于50mL离心管，6000r/min离心15min，收集菌体，弃上清，菌体用TE缓冲液悬浮后，用细菌基因组DNA提取试剂盒提取SA基因组DNA，采用紫外吸光度法测定提取DNA的浓度及纯度 (A_{260nm}/A_{280nm})，待用。

[0037] 2、SA肠毒素SEI基因扩增引物的设计。

[0038] 根据GenBank中登录的SA肠毒素SEI基因序列(AF285760.1)，采用Premier 5.0引物软件设计扩增SEI基因序列的特异性引物，在上游引物和下游引物5'端分别引入BamHI和HindIII限制性酶切位点，预期扩增SEI基因片段大小约为800bp。同时，设计扩增该基因的荧光定量RT-PCR引物(qRT-PCR FP2和qRT-PCR RP2) (表1)。

[0039] 3、SA肠毒素SEI基因的扩增与克隆。

[0040] 配制50μL的PCR反应体系，反应体系包括：SA基因组DNA模板2μL，10×PCR buffer 5μL，2.5mmol/L dNTPs 4μL，上游引物SEI FP1 (25mol/L)、下游引物SEI RP1 (25mol/L) 各1μL，ddH₂O 36.8μL，Taq DNA聚合酶 (5U/μL) 0.2μL。将所有试剂加入0.2mL PCR反应管中，并充分混匀。PCR反应条件：95℃ 5min；94℃ 40s，48℃ 40s，72℃ 60s，共35个循环；最后72℃延伸10min。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。将扩增产物电泳后进行回收，与pMD19-T载体连接，转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α，经氨苄青霉素 (Amp^r) 抗性平板筛选及菌液PCR验证后，获得重组质粒pT-SEI，进行测序验证。结果成功克隆得到了长度为729bp的SA肠毒素SEI基因。

[0041] 4、SA肠毒素SEI基因的表达及重组肠毒素SEI的纯化。

[0042] 4.1重组表达载体的构建。

[0043] 按照分子克隆的方法，将含有SEI基因片段的重组质粒重组质粒pT-SEI与原核表达pET-28a(+)质粒分别用BamHI和HindIII限制性内切酶进行双酶切，然后分别回收目的片段和载体片段，用T4DNA连接酶进行过夜连接，并将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞DH5α中，在含有卡那霉素 (Kan^r) 抗性的LB液体培养基中37℃过夜振荡培养，次日提取质粒进行PCR和双酶切鉴定。结果成功构建了pET-SEI重组表达质粒。

[0044] 4.2重组肠毒素SEI的诱导表达与鉴定。

[0045] 按照分子克隆常规方法，将鉴定正确的重组质粒pET-SEI转化入大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) 中，用IPTG诱导培养6-8h。对表达的重组蛋白进行SDS-PAGE电泳分析。同时，将凝胶中的重组蛋白转移至NC膜，用抗SEI阳性血清 (用重组蛋白SEI-GST免疫小鼠制备) 作为一抗，用HRP标记的兔抗鼠SEI抗体作为二抗进行Western blot分析，确定是否有可识别的特异性条带。

[0046] 4.5重组肠毒素SEI的纯化。

[0047] 离心收集200mL菌液，加5mL Lysis Buffer裂解菌体；液氮和42℃水浴反复冻融3次后进行超声破碎，每次10s，间歇10s，90次/周期，直至菌液清亮为止。按照Ni-NTA Purification System (Invitrogen, USA) 说明书的纯化步骤进行重组蛋白的纯化，得到重组肠毒素SEI。经蛋白浓度测定，Ni柱纯化的重组蛋白SEI浓度为20mg/mL。将SA重组肠毒素

SEI用冷冻干燥机进行冷冻干燥,保存在-20℃中。

[0048] 5、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条的制备。

[0049] 所述的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体可以自行制备,也可采用市售品。

[0050] 抗SA肠毒素SEI单克隆抗体的胶体金标记。

[0051] 采用柠檬酸三钠还原法制备颗粒直径为40nm的胶体金溶液。取10mL胶体金溶液,用0.2mol/L的K₂CO₃溶液调pH=8.2。精密吸取1mL胶体金溶液加入试管中,向其中加入5μg抗SA肠毒素SEI单克隆抗体IgG,恒温缓慢振荡30min。分别加入10%的BSA溶液(200μL)、1%的PEG-20000(200μL),继续振荡15min。4℃,13 000r/min,离心40min。缓慢弃去上清液,沉淀溶解于0.1mol/L的Tris-缓冲溶液中(pH=8.0,含有1%BSA,0.05%Na₃N),即得到胶体金标记的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体。将制备好的溶液4℃密封保存,备用。

[0052] 免疫层析试纸条的组装。

[0053] 所述的免疫层析试纸条包含加样垫、结合垫、NC膜(硝酸纤维素膜),吸收垫和PVC塑料垫5个部分组成,在NC膜上设置检测线(T线)和质控线(C线)。将制备的胶体金标记鼠SA抗肠毒素SEI单克隆抗体IgG用移液枪均匀滴加喷到NC膜上,迅速放在真空干燥箱中37℃干燥10min,取出,作为结合垫(金标垫)。在NC膜上,在检测线(T线)上包被经PBS(0.01mol/L, pH=7.4)缓冲液稀释至2mg/mL的SA重组肠毒素SEI,在质控线(C线)上包被2mg/mL的羊抗鼠IgG,室温下干燥30min。组装的顺序依次为:在PVC板的中间区域贴上NC膜,结合垫贴在NC膜的前方区域;为保证良好的接触,结合垫压NC膜2mm,再在结合垫的前方贴上样品垫,样品垫压结合垫2mm,最后将吸水垫在NC膜的后方,吸水垫压NC膜2mm。用试纸条切割刀切为4mm的试纸条。将制备好的试纸条置于放有干燥剂的锡箔袋内,4℃冰箱中储存备用。

[0054] 6、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条使用方法及结果判定。

[0055] 用微量移液器取100μL液体奶样,滴加于免疫层析试纸条加样垫上,将加样完毕的装置放入37℃孵育10min,取出ICCGIC试纸条,用肉眼观察结果。若质控线(C线)显色,检测线(T线)不显色,判为阳性结果。若质控线(C线)和检测线(T线)均显色,判为阴性结果。若质控线(C线)不显色,无论检测卡(T线)是否显色,判为试纸条失效。

[0056] 7、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条特异性评价。

[0057] 用LB培养液对89株奶牛源SA临床分离株进行过夜培养,用细菌基因组DNA提取试剂盒分别提取89株SA培养液的总RNA,分别以上述RNA为模板,用qRT-PCR FP2和qRT-PCR RP2引物进行荧光定量RT-PCR扩增,检测89株SA分离株SA肠毒素SEI基因的转录水平(mRNA)。同时,分别对上述SA菌株培养液用肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条进行检测,比较ICCGIC检测试纸条与荧光定量RT-PCR检测结果(表2)。检测结果证实,胶体金免疫层析检测结果的特异性为95.78%,符合率为96.52%,证实所制备的SA肠毒素SEI的胶体金ICCGIC检测试纸条具有良好的特异性。

[0058] 8、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条敏感性评价。

[0059] 用荧光定量RT-PCR检测为阴性的鲜奶将SA重组肠毒素SEI进行10倍倍比稀释,使其在鲜奶中的浓度在 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-6}$ mg/mL之间,并将其作为待检抗原样品。用微量移液器取100μL样品,用制备的SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条进行检测,确定该方法的最低检测浓度。检测结果发现,ICCGIC检测试纸条最低可以检测到奶样中 1×10^{-5} mg/mL(即10ng/mL)的重组肠毒素SEI,证实本发明所制备的SA肠毒素SEI的胶体金ICCGIC检测试纸条

具有良好的敏感性。

[0060] 9、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条重复性评价。

[0061] 将检测浓度为200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL和10ng/mL的SA重组肠毒素SEI标准溶液分别滴加到试纸条上,每个检测浓度分别重复操作5次,结果每个检测浓度的试纸条检测线上均未出现胶体金条带,且每个检测浓度试纸条质控线(C线)上条带颜色深浅完全一致,证实SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条具有良好的重复性。

[0062] 本发明具有如下优点:与ELISA方法相比,胶体金免疫层析方法快速、操作简便,可实现检测结果的可视化。与PCR方法相比,胶体金免疫层析方法,对仪器设备要求低,仅需要恒温培养箱即可完成反应。其次,检测速度快,反应时间约10min,比常规PCR反应时间要短。这些特点使得本发明制备的SA肠毒素SEI的胶体金ICCGIC检测试纸条可以用于乳制品生产企业液体奶中SA肠毒素SEI的快速检测。

附图说明

[0063] 图1为SA肠毒素SEI ICCGIC检测试纸条的组装示意图。

[0064] 图2为SA肠毒素SEI胶体ICCGIC试纸条的检测结果。

[0065] 图3为表1,为本发明实施例中所设计的SA SEI基因特异性引物。

[0066] 图4为表2,为间接竞争免疫层析法(ICCGIC)与荧光定量RT-PCR(qRT-PCR)方法对89株SA肠毒素SEI检测的对比试验。

具体实施方式

[0067] 1、SA的培养及其基因组DNA的提取。

[0068] 将SA接种在LB液体培养基中,37℃培养,取对数生长期的SA培养液30mL于50mL离心管,6000r/min离心15min,收集菌体,弃上清,菌体用TE缓冲液悬浮后,用细菌基因组DNA提取试剂盒提取SA基因组DNA,采用紫外吸光度法测定提取DNA的浓度及纯度(A_{260nm}/A_{280nm}),待用。

[0069] 2、SA肠毒素SEI基因扩增引物的设计。

[0070] 根据GenBank中登录的SA肠毒素SEI基因序列(AF285760.1),采用Premier 5.0引物软件设计扩增SEI基因序列的特异性引物,在上游引物和下游引物5'端分别引入BamHI和HindIII限制性酶切位点,预期扩增SEI基因片段大小约为800bp。同时,设计扩增该基因的荧光定量RT-PCR引物(qRT-PCR FP2和qRT-PCR RP2)(表1)。

[0071] 3、SA肠毒素SEI基因的扩增与克隆。

[0072] 配制50μL的PCR反应体系,反应体系包括:SA基因组DNA模板2μL,10×PCR buffer 5μL,2.5mmol/L dNTPs 4μL,上游引物SEI FP1(25mol/L)、下游引物SEI RP1(25mol/L)各1μL,ddH₂O 36.8μL,Taq DNA聚合酶(5U/μL)0.2μL。将所有试剂加入0.2mL PCR反应管中,并充分混匀。PCR反应条件:95℃5min;94℃40s,48℃40s,72℃60s,共35个循环;最后72℃延伸10min。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。将扩增产物电泳后进行回收,与pMD19-T载体连接,转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α,经氨苄青霉素(Amp^r)抗性平板筛选及菌液PCR验证后,获得重组质粒pT-SEI,进行测序验证。结果成功克隆得到了长度为729bp的SA肠毒素SEI基因(<210>1)。

[0073] 4、SA肠毒素SEI基因的表达及重组肠毒素SEI的纯化。

[0074] 4.1重组表达载体的构建。

[0075] 按照分子克隆的方法,将含有SEI基因片段的重组质粒重组质粒pT-SEI与原核表达pET-28a(+)质粒分别用BamHI和HindIII限制性内切酶进行双酶切,然后分别回收目的片段和载体片段,用T4DNA连接酶进行过夜连接,并将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞DH5 α 中,在含有卡那霉素(Kan^r)抗性的LB液体培养基中37℃过夜振荡培养,次日提取质粒进行PCR和双酶切鉴定。结果成功构建了pET-SEI重组表达质粒。

[0076] 4.2重组肠毒素SEI的诱导表达与鉴定。

[0077] 按照分子克隆常规方法,将鉴定正确的重组质粒pET-SEI转化入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中,用IPTG诱导培养6-8h。对表达的重组蛋白进行SDS-PAGE电泳分析。同时,将凝胶中的重组蛋白转移至NC膜,用抗SEI阳性血清(用重组蛋白SEI-GST免疫小鼠制备)作为一抗,用HRP标记的兔抗鼠SEI抗体作为二抗进行Western blot分析,确定是否有可识别的特异性条带。

[0078] 4.5重组肠毒素SEI的纯化。

[0079] 离心收集200mL菌液,加5mL Lysis Buffer裂解菌体;液氮和42℃水浴反复冻融3次后进行超声破碎,每次10s,间歇10s,90次/周期,直至菌液清亮为止。按照Ni-NTA Purification System(Invitrogen,USA)说明书的纯化步骤进行重组蛋白的纯化,得到重组肠毒素SEI。经蛋白浓度测定,Ni柱纯化的重组蛋白SEI浓度为20mg/mL。将SA重组肠毒素SEI用冷冻干燥机进行冷冻干燥,保存在-20℃中。

[0080] 5、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条的制备。

[0081] 本实施例使用鼠抗SA肠毒素SEI单克隆抗体。当然也可采用其它途径得到的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体或其它的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体。

[0082] 抗SA肠毒素SEI单克隆抗体的制备如下:

[0083] 小鼠免疫。

[0084] 用纯化的重组肠毒素SEI免疫6周龄健康的雌性BALB/c小鼠,按常规方法免疫。首免用0.2mL(20mg/mL)的重组肠毒素SEI与等量的弗氏完全佐剂混合,充分乳化后,每只小鼠腹腔注射0.2mL;首免2周后进行第2次免疫,用同样的病毒与等量弗氏不完全佐剂混合,充分乳化后,每只小鼠腹腔注射0.2mL;间隔2周后进行第3次免疫。

[0085] 免疫脾细胞悬液的制备。

[0086] 第3次免疫后10天,将免疫小鼠拉颈处死,用自来水冲洗后浸入75%酒精中,移入超净台无菌取脾,放入无菌平皿内,除去脂肪及结缔组织,用洗液(无血清无双抗的RPMI 1640培养基使用液)冲洗,用灭菌的注射器活塞碾磨,小心吸取细胞悬液,移入50mL灭菌塑料离心管中,用洗液洗涤细胞两次,10mL RPMI1640培养液重新悬浮细胞并计数。

[0087] 细胞融合。

[0088] 将已制备好的SP2/0骨髓瘤细胞及脾细胞混合于灭菌的50mL离心管内,两种细胞之比为1:10,缓慢加入37℃预热的50%PEG4000,作用完后缓慢加入洗液10mL,轻轻转动离心管2min将细胞悬起,1000rpm离心5min,同样的方法再洗涤两次,去除PEG。最后一次离心后弃上清,加入HT培养液5mL,37℃5%CO₂培养箱静止30min,然后加入HT培养液将细胞悬起,加入已准备好饲养细胞的96孔板中,每孔50 μ L,将融合细胞培养板放置37℃5%的CO₂培

养箱中培养。

[0089] 杂交瘤细胞的筛选。

[0090] 当杂交瘤细胞长至一个视野(100×)的1/2以上时,用间接ELISA方法检测抗体分泌情况,筛选阳性克隆。取细胞培养上清100μL加入包被好纯化抗原的酶标板中,细胞培养孔补加100μL培养液,其中两孔加入SP2/0培养上清作为阴性对照,两孔加入多抗血清作为阳性对照,被测孔OD_{490nm}值大于阴性4倍以上判定为阳性。

[0091] 杂交瘤细胞的克隆。

[0092] 先用健康BALB/c小鼠的腹腔巨噬细胞制备饲养细胞铺板,用含20%牛血清的RPMI1640培养基将阳性孔中的融合细胞吹打吸到无菌10ml塑料离心管中,细胞计数,稀释至每100μL中含有一个细胞。然后将稀释的细胞悬液滴入已铺有饲养细胞的培养板内,每孔100μL。待克隆细胞长至一个视野的1/2以上时,检测抗体,选择OD值高、细胞活力好的细胞再次克隆,直到所有的孔都为阳性。

[0093] 阳性杂交瘤细胞培养上清中单克隆抗体效价的测定。

[0094] 阳性杂交瘤细胞克隆株依次在24孔板中扩大培养,待细胞长满全瓶后停止换液,5%CO₂温箱放置2-3天,1400r/min离心5min,取上清,采用间接ELISA方法测定细胞培养上清中单克隆抗体效价。用大肠杆菌表达的重组蛋白SEI-GST包被酶标板,将细胞培养上清分别作1:10至1:100梯度稀释,同时以SP2/0细胞培养上清做同等稀释度作为对照,以平行稀释的单抗OD_{490nm}值/对照OD_{490nm}值比值大于2的最高稀释倍数为单克隆抗体的效价。

[0095] 抗SA肠毒素SEI单克隆抗体的胶体金标记。

[0096] 采用柠檬酸三钠还原法制备颗粒直径为40nm的胶体金溶液。取10mL胶体金溶液,用0.2mol/L的K₂CO₃溶液调pH=8.2。精密吸取1mL胶体金溶液加入试管中,向其中加入5μg抗SA肠毒素SEI单克隆抗体IgG,恒温缓慢振荡30min。分别加入10%的BSA溶液(200μL)、1%的PEG-20000(200μL),继续振荡15min。4℃,13 000r/min,离心40min。缓慢弃去上清液,沉淀溶解于0.1mol/L的Tris-缓冲溶液中(pH=8.0,含有1%BSA,0.05%Na₃N),即得到胶体金标记的抗SA肠毒素SEI单克隆抗体。将制备好的溶液4℃密封保存,备用。

[0097] 免疫层析试纸条的组装。

[0098] 所述的免疫层析试纸条包含加样垫、结合垫、NC膜(硝酸纤维素膜),吸收垫和PVC塑料垫5个部分组成,在NC膜上设置检测线(T线)和质控线(C线)(图1)。将制备的胶体金标记鼠SA抗肠毒素SEI单克隆抗体IgG用移液枪均匀滴加喷到NC膜上,迅速放在真空干燥箱中37℃干燥10min,取出,作为结合垫(金标垫)。在NC膜上,在检测线(T线)上包被经PBS(0.01mol/L,pH=7.4)缓冲液稀释至2mg/mL的SA重组肠毒素SEI,在质控线(C线)上包被2mg/mL的羊抗鼠IgG,室温下干燥30min。组装的顺序依次为:在PVC板的中间区域贴上NC膜,结合垫贴在NC膜的前方区域;为保证良好的接触,结合垫压NC膜2mm,再在结合垫的前方贴上样品垫,样品垫压结合垫2mm,最后将吸水垫在NC膜的后方,吸水垫压NC膜2mm。用试纸条切割刀切为4mm的试纸条。将制备好的试纸条置于放有干燥剂的锡箔袋内,4℃冰箱中储存备用。

[0099] 本实施例采用的二抗为羊抗鼠IgG,当然也可采用其它的二抗。

[0100] 6、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条使用方法及结果判定。

[0101] 用微量移液器取100μL液体奶样,滴加于免疫层析试纸条加样垫上,将加样完毕的

装置放入37℃孵育10min,取出ICCGIC试纸条,用肉眼观察结果。若质控线(C线)显色,检测线(T线)不显色,判为阳性结果。若质控线(C线)和检测线(T线)均显色,判为阴性结果。若质控线(C线)不显色,无论检测卡(T线)是否显色,判为试纸条失效。

[0102] 7、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条特异性评价。

[0103] 用LB培养液对89株奶牛源SA临床分离株进行过夜培养,用细菌基因组DNA提取试剂盒分别提取89株SA培养液的总RNA,分别以上述RNA为模板,用qRT-PCR FP2和qRT-PCR RP2引物进行荧光定量RT-PCR扩增,检测89株SA分离株SA肠毒素SEI基因的转录水平(mRNA)。同时,分别对上述SA菌株培养液用肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条进行检测,比较ICCGIC检测试纸条与荧光定量RT-PCR检测结果(表2)。检测结果证实,胶体金免疫层析检测结果的特异性为95.78%,符合率为96.52%,证实所制备的SA肠毒素SEI的胶体金ICCGIC检测试纸条具有良好的特异性。

[0104] 8、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条敏感性评价。

[0105] 用荧光定量RT-PCR检测为阴性的鲜奶将SA重组肠毒素SEI进行10倍倍比稀释,使其在鲜奶中的浓度在 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-6}$ mg/mL之间,并将其作为待检抗原样品。用微量移液器取100μL样品,用制备的SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条进行检测,确定该方法的最低检测浓度。检测结果发现,ICCGIC检测试纸条最低可以检测到奶样中 1×10^{-5} mg/mL(即10ng/mL)的重组肠毒素SEI,证实本发明所制备的SA肠毒素SEI的胶体金ICCGIC检测试纸条具有良好的敏感性。

[0106] 9、SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条重复性评价。

[0107] 将检测浓度为200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL和10ng/mL的SA重组肠毒素SEI标准溶液分别滴加到试纸条上,每个检测浓度分别重复操作5次,结果每个检测浓度的试纸条检测线上均未出现胶体金条带,且每个检测浓度试纸条质控线(C线)上条带颜色深浅完全一致,证实SA肠毒素SEI胶体金ICCGIC检测试纸条具有良好的重复性。

[0108] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

<110> 石河子大学

<120> 快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素SEI的试剂及制备方法和所构成的试剂盒

<141>

<160> 5

<210> 1

<211> 729

<212> DNA序列

<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus, SA)

<220>

<221> misc_feature

<223> 肠毒素SEI基因

<400> 1

```

1   ATGAAAAAAT TTAAATATAG TTTTATATTA GTTTTATAT TACTTTTAA CATTAAAGAT
61  CTTACGTATG CTCAAGGTGA TATTGGTGTA GGTAACCTAA GAAATTTCTA TACAAAACAT
121 GATTATATAG ATTTAAAAGG CGTCACAGAT AAAACCTAC CTATTGCAA TCAACTTGAA
181 TTTTCAACAG GTACCAATGA TTTGATCTCA GAATCTAATA ATTGGGACGA AATAAGTAAA
241 TTTAAAGGAA AGAAACTGGA TATTTTGGC ATTGATTATA ATGGTCCTTG TAAATCTAAA
301 TACATGTATG GAGGGGCCAC TTTATCAGGA CAATACTTAA ATTCTGCTAG AAAAATCCCT
361 ATTAATCTTT GGGTAAATGG CAAACATAAA ACAATTTCTA CTGACAAAAT AGCAACTAAT
421 AAAAACTAG TAACAGCTCA AGAAATTGAT GTTAAATTAA GAAGATATCT TCAAGAAGAA
481 TACAATATAT ATGGTCATAA TAACACTGGT AAAGGCAAAG AATATGGATA TAAATCTAAA
541 TTTTATTCAG GTTTTAATAA TGGGAAAGTT TTATTTTATT TAAATAATGA AAAATCATTT
601 TCATATGATT TGTTTATAC AGGAGATGGA CTGCCTGTAA GTTTTTTGAA AATTTATGAA
661 GATAATAAAA TAATAGAATC TGAAAAATTT CATCTTGATG TCGAAATATC ATATGTAGAT
721 AGTAACTAA

```

<210> 2

<211> 242

<212> 氨基酸序列

<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus, SA)

<220>

<221> misc_feature

<223> 肠毒素SEI基因编码的氨基酸序列

<400> 1

```

1   MKKFKYSFIL VFILLFNIKD LTYAQDIGV GNLRNFYTKH DYIDLKGVTD KNLPIANQLE
61  FSTGTNDLIS ESNWDEISK FKGKKLDIFG IDYNGPCKSK YMYGGATLSG QYLNSARKIP
121 INLWVNGKHK TISTDKIATN KKLVTAEID VKLRRYLQEE YNIYGHNTG KGKEYGYKSK
181 FYSGFNNGKV LFHLNNEKSF SYDLFYTDG LPVSFLKIYE DNKIIIESEKF HLDVEISYVD
241 SN

```

<210> 3
<211> 29
<212> DNA序列
<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus,SA)
<220>
<221> misc_feature
<223> SEI FP1引物
<400> 1
5'- AACGGATCCATGAAAAAATTTAAATATAG-3'
<210> 4
<211> 29
<212> DNA序列
<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus,SA)
<220>
<221> misc_feature
<223> SEI RP1引物
<400> 1
5'- ACCAAGCTTTTAGTTACTATCTACATATG-3'

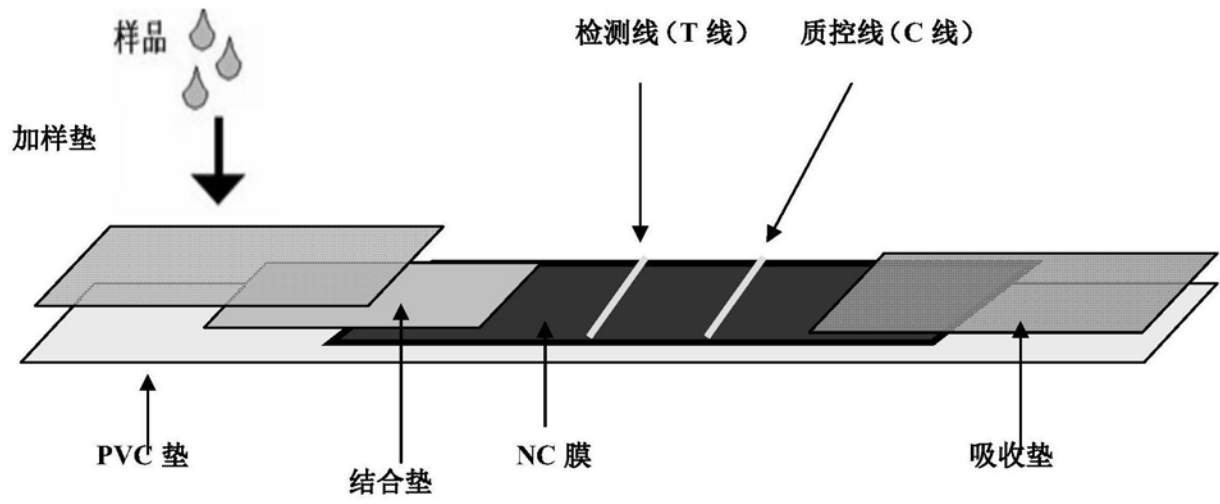


图1

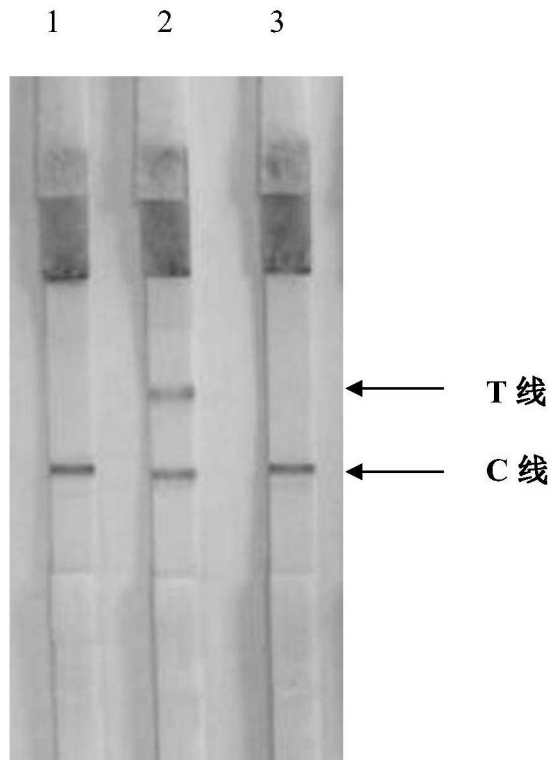


图2

表 1 本发明所设计的 SA SEI 基因特异性引物

引物名称	引物序列 (5'-3')	在 SEI 基因中的位置	扩增长度 (bp)
SEI FP1	AACGGATCCATGAAAAATTTAAATATAG	1-20	729
SEI RP1	ACCAAGCTTTTAGTTACTATCTACATATG	710-729	
qRT-PCR FP2	GTATGCTCAAGGTGATATTG	66-85	222
qRT-PCR RP2	GGACCATTATAATCAATGCC	268-287	

图3

表 2 间接竞争免疫层析法 (ICCGIC) 与荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR) 方法对 89 株 SA 肠毒素 SEI 检测的对比试验

		ICCGIC	qRT-PCR
ICCGIC qRT-PCR	N=89	阳性数	阴性数
	阳性数	29	1
	阴性数	1	58

图4

专利名称(译)	检测SA肠毒素SEI的试剂及制备方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN108342397A	公开(公告)日	2018-07-31
申请号	CN201810122691.0	申请日	2018-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	石河子大学		
申请(专利权)人(译)	石河子大学		
当前申请(专利权)人(译)	石河子大学		
[标]发明人	乔军 孟庆玲 孟丹 乔梦凡 伍晔晖 王学领 曹旭东 刘昱成 王国超 田振中 张星星 蔡扩军 赵春光		
发明人	乔军 孟庆玲 孟丹 乔梦凡 伍晔晖 王学领 曹旭东 刘昱成 王国超 田振中 张星星 蔡扩军 赵春光		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/70 C12N15/10 G01N33/532 G01N33/577		
代理人(译)	李伯勤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了快速检测SA(金黄色葡萄球菌)肠毒素SEI的试剂及制备方法和所构成的试剂盒，通过基因工程技术制备了SA重组肠毒素SEI，并与抗SA肠毒素SEI单克隆抗体和羊抗鼠IgG配合组装成ICCGIC试纸条，实现针对液体奶中SA肠毒素SEI的快速、简便、准确的检测。

