



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110161239 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201910379347.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.05.08

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C201976 2019.05.08

CCTCC NO:C201977 2019.05.08

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 张鑫宇 周花艳 刘潇羽 孙怀昌

朱国强

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司

公司 32224

代理人 薛海霞 董建林

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用,属于病原诊断技术领域,包括PVC底板,在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫。其中胶体金垫内有胶体金标记的抗葡萄球菌延长因子Tu(EFTu)抗原的单克隆抗体1F7F10;硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线,检测线为针对葡萄球菌EFTu另一表位的单克隆抗体2E5D3,质控线为羊抗小鼠IgG抗体。本发明建立的胶体金免疫层析试纸条具有方便、快速、特异等优点,可用于葡萄球菌的快速检测。



1. 一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸,其特征在于,所述的试纸由PVC底板以及在PVC底板上按顺序依次固定的样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫组成,其中胶体金垫内有胶体金标记抗葡萄球菌EFTu抗原的单克隆抗体1F7F10;分泌单克隆抗体1F7F10的杂交瘤细胞保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201976,分类命名为:杂交瘤细胞株1F7F10;硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线,检测线为针对葡萄球菌EFTu另一表位的单克隆抗体2E5D3;分泌单克隆抗体2E5D3的杂交瘤细胞保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201977,分类命名为:杂交瘤细胞株2E5D3;质控线为羊抗小鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸,其特征在于,单克隆抗体1F7F10针对的抗原表位均位于葡萄球菌EFTu特有的氨基酸序列NH₃-GTDADAASVREVFMKLGKVKLNNDL-COOH中;单克隆抗体1F7F10和2E5D3与不同种葡萄球菌EFTu均能发生抗原-抗体反应,单克隆抗体1F7F10、2E5D3分别针对葡萄球菌EFTu的不同表位。

3. 根据权利要求1或2所述的基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸的制备方法,其特征在于,在PVC底板上按顺序依次固定样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫,以制备基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸;其中制备胶体金垫的具体步骤为:将1F7F10单克隆抗体标记到直径40nm的胶体金颗粒上,标记时pH8.0,1F7F10标记浓度为10μg/mL;离心沉淀胶体金标记物,用复溶液溶解浓缩沉淀,复溶液浓缩比例为100μL/mL,最终胶体金复合物喷涂于胶体金垫内,喷涂量为15μL/cm;其中复溶液组成为:10%蔗糖,1%PVP,1%BSA,0.5%Tween-20,0.1M TrisCl,pH 8.5。

4. 根据权利要求3所述的基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸的制备方法,其特征在于,硝酸纤维素膜表面划有检测线T和质控线C,检测线为针对EFTu抗原另一表位的单克隆抗体2E5D3,质控线为羊抗小鼠IgG抗体,单克隆抗体2E5D3工作浓度为1.5mg/mL,羊抗鼠IgG抗体工作浓度为1.5mg/mL,单克隆抗体2E5D3、羊抗小鼠IgG抗体划膜时喷涂量均为1μL/cm,且检测线与质控线之间距离0.5cm。

5. 采用权利要求1或2所述的基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸检测葡萄球菌的方法,其特征在于,通过检测葡萄球菌EFTu抗原检测葡萄球菌是否存在,葡萄球菌EFTu抗原存在于所有葡萄球菌胞浆内。

6. 根据权利要求6所述的检测葡萄球菌的方法,其特征在于,检测葡萄球菌EFTu抗原时,先用增菌培养液培养待测样品,再用裂解酶裂解待测样品,当待测样品中存在葡萄球菌,裂解时从葡萄球菌释放出葡萄球菌的EFTu抗原,所述的增菌培养液为含10%新生牛血清的营养肉汤。

7. 权利要求1或2所述的基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸作为葡萄球菌检测试剂的用途。

8. 分泌单克隆抗体1F7F10的杂交瘤细胞,其特征在于,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201976,分类命名为:杂交瘤细胞株1F7F10。

9. 分泌单克隆抗体2E5D3的杂交瘤细胞,其特征在于,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201977,分类命名为:杂交瘤

细胞株2E5D3。

一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法 及应用

技术领域

[0001] 本发明属于细菌检测技术领域,具体涉及一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用。

背景技术

[0002] 葡萄球菌引起的奶牛乳房炎是常见的奶牛疾病之一,从临床病例中分离最多的是凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌,近些年发现不同种凝固酶阴性葡萄球菌所占的比重越来越高。对该类型疾病的诊断主要:①传统的细菌分离、培养、鉴定,该方法准确性较高,但耗时长;②鉴别培养基或显色培养基培养鉴定,该方法主要用于金黄色葡萄球菌的鉴定,易受操作人员影响。我们在前期诊断研究中曾建立葡萄球菌增菌培养结合刃天青还原反应的奶牛乳房炎葡萄球菌微孔显色的诊断方法,该方法操作简便,也有较高的检测灵敏度,但易受到乳汁中白细胞及上皮细胞裂解后释放出的酶影响;③免疫学方法检测,如凝集试验、免疫荧光光试验、ELISA等,此类方法目前仍然集中于金黄色葡萄球菌的诊断,而且对实验人员要求较高;④核酸检测,如PCR检测16S rRNA、Tuf、Coa、Nuc基因及序列测定等,该方法可有效鉴别所有的葡萄球菌,但存在检测技术要求高,确诊周期长等缺点,在一般的奶牛场难以开展;而基因芯片技术灵敏度高、特异性强,但主要检测对象是还是金黄色葡萄球菌,凝固酶阴性葡萄球菌的检测方法基本没有快速、高效、简便的方法。

[0003] 胶体金免疫层析技术因其简便、快捷、易操作的特点,在疾病的检测、诊断上使用越来越广泛。目前已有不少关于葡萄球菌检测胶体金试纸条报道,如检葡萄球菌的SPA抗原检测试纸条、检测肠毒素A的试纸条等,这些试纸条主要用于金黄色葡萄球菌的检测,由于SPA并非所有的金黄色葡萄球菌都能表达,从而造成漏检现象发生,而肠毒素的检测往往用于葡萄球菌造成的食物中毒检测,难以用于葡萄球菌引起奶牛乳房炎的诊断。结合引起奶牛乳房炎葡萄球菌的流行病学特点,筛选出葡萄球菌共同的、特异的、标志性抗原,在此基础上开发出胶体金检测试纸,有着重要的意义。

发明内容

[0004] 为了简便、快速、鉴定葡萄球菌性奶牛乳房炎,本发明提供一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:一种检测葡萄球菌的胶体金免疫层析试纸(即一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸),包括PVC底板,在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫。其中胶体金垫内有胶体金标记的抗葡萄球菌延长因子Tu (EFTu) 抗原的单克隆抗体1F7F10;硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线,检测线为针对葡萄球菌EFTu另一表位的单克隆抗体2E5D3,质控线为羊抗小鼠IgG抗体(浓度1.5mg/mL,羊抗小鼠IgG(H+L)抗体:购于杭州华安生物科技有限公司,Cat No.G006-1)。

[0006] 单克隆抗体1F7F10针对的抗原表位均位于葡萄球菌EFTu特有的氨基酸序列NH₃-GTDADAASVREVFMKLGKVKLNNDL-COOH中;单克隆抗体1F7F10和2E5D3与不同种葡萄球菌EFTu均能发生抗原-抗体反应,单克隆抗体1F7F10、2E5D3针对葡萄球菌EFTu不同表位。

[0007] 制备胶体金垫的具体步骤:将1F7F10单克隆抗体标记到直径40nm的胶体金颗粒上,标记时pH8.0,1F7F10标记浓度为10μg/mL;离心沉淀胶体金标记物(即1F7F10单克隆抗体-胶体金复合物),用复溶液溶解浓缩沉淀(即胶体金标记物),复溶液体积为原来标记时体积的1/10,最终胶体金复合物(即1F7F10单克隆抗体-胶体金复合物)喷涂于胶体金垫内,喷涂量为15μL/cm;其中复溶液组成为:10%蔗糖,1%PVP,1%BSA,0.5%Tween-20,0.1M TrisCl,pH 8.5。

[0008] 单克隆抗体2E5D3工作浓度为1.5mg/mL,羊抗鼠IgG抗体工作浓度为1.5mg/ml,单克隆抗体2E5D3、羊抗小鼠IgG抗体划膜时喷涂量均为1μL/cm,且检测线与质控线之间距离0.5cm。

[0009] 本发明还提供基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸检测葡萄球菌的方法,通过检测葡萄球菌EFTu抗原检测葡萄球菌是否存在,葡萄球菌EFTu抗原存在于所有葡萄球菌胞浆内。检测葡萄球菌EFTu抗原时,先用增菌培养液培养待测样品,再用裂解酶裂解待测样品;当待测样品中存在葡萄球菌,则裂解时释放出葡萄球菌的EFTu抗原,所述的增菌培养液为含10%新生牛血清的营养肉汤。

[0010] 本发明还提供基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸作为葡萄球菌检测试剂的用途。

[0011] 本发明涉及的分泌单克隆抗体1F7F10的杂交瘤细胞,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201976,分类命名为:杂交瘤细胞株1F7F10。

[0012] 本发明涉及的分泌单克隆抗体2E5D3的杂交瘤细胞,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201977,分类命名为:杂交瘤细胞株2E5D3。

[0013] 所述的一种胶体金免疫层析试纸制备方法包括以下步骤:

[0014] 1. 抗葡萄球菌EFTu单克隆抗体的制备

[0015] (1) 抗原的制备

[0016] ①根据报道基因序列(Genbank Accession No.LR134093.1)合成一对扩增葡萄球菌EFTu完整基因的引物:F 5'-CGAggtaccATGGCAAAGAAAAATTTGATCG-3'(SEQ ID No.1),R 5'-GAAGctcgagTTATTTAATGATTTTCAGTAACAACGCC-3'(SEQ ID No.2)。以金黄色葡萄球菌的基因组为模板,EcoR V和Xho I限制性内切酶酶切后,插入质粒pET30a(+)相应的酶切位点,构建重组质粒pET-EFTu,转化感受态大肠杆菌BLR(DE3)。按1:100体积比,将携带质粒pET-p30的重组大肠杆菌接种含50μg/mL卡那霉素的2×YT培养基,37℃培养至OD₆₀₀=0.8,加入IPTG至终浓度1mmol/L,37℃诱导4h;8000rpm离心2min,离心得到的菌体用0.01M PBS溶液洗涤2次,再次离心;再次离心得到的菌体用超声波仪裂解,超声波仪功率50W,10s/次,共5min;4℃、12000rpm离心20min,收集沉淀;采用Ni-NTA琼脂糖柱纯化EFTu重组蛋白。

[0017] ②根据Genbank中发表的不同种葡萄球菌以及链球菌、大肠杆菌的EFTu氨基酸序列,利用DNASTar7.1软件中的MegAlign进行比较分析,筛选出葡萄球菌EFTu特有的氨基酸序列NH₃-GTDADAASVREVFMKLGKVKLNNDL-COOH(SEQ ID No.3),委托南京淘普生物科技有限

公司合成,并在合成的多肽羧基端偶联上血蓝蛋白(KLH),作为免疫抗原。

[0018] (2) 抗EFTu单克隆抗体制备

[0019] 以纯化的EFTu重组蛋白以及偶联有KLH的人工合成多肽为抗原,分别免疫8周龄的BALB/c小鼠。首次免疫时,抗原与弗氏完全佐剂等体积乳化,腹腔接种小鼠,25 μ g抗原/只;7天后抗原与弗氏不完全佐剂等体积乳化,第二次腹腔接种途径免疫小鼠,25 μ g抗原/只;7天后第三次小鼠腹腔途径直接免疫,25 μ g/只;免疫后的第3天,取小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合,HAT选择性培养基培养;10天后以纯化的重组EFTu为抗原包被酶标板,间接ELISA检测细胞上清,筛选阳性杂交瘤细胞,并对筛选出的杂交瘤细胞进行亚克隆,获得纯净的杂交瘤细胞,收获含有单克隆抗体的细胞上清。

[0020] (3) 单克隆抗体生物学特性鉴定

[0021] ①单克隆抗体特异性的鉴定

[0022] i.以金黄色葡萄球菌、链球菌以及大肠杆菌菌体蛋白为抗原,Western-Blot检测制备的单克隆抗体与金黄色葡萄球菌反应的特异性。

[0023] ii.以大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌、金黄色葡萄球菌、志贺杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草杆菌、肠球菌菌体蛋白作为抗原,根据上述试验结果,筛选出的只与金黄色葡萄球菌EFTu反应的细胞上清作为一抗进行Western-Blot实验,检测该单克隆抗体是否与其他常见细菌能发生抗原抗体反应。

[0024] iii.根据上述实验结果,Western-Blot实验验证筛选出的单克隆抗体能否与其他种葡萄球菌发生抗原抗体反应。

[0025] ②单克隆抗体抗原表位鉴定

[0026] 为确定获得的单克隆抗体是否针对葡萄球菌EFTu不同抗原表位,用ELISA相加指数(AI)方法进行验证。具体操作步骤如下:用5 μ g/mL的重组蛋白EFTu包被96孔酶标板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C包被2h,弃去包被液;5%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭2h,弃去孔中的封闭液;分别加入5倍稀释的所需测定的两株不同的单克隆抗体,每个单克隆抗体加样100 μ L/孔,同时各取50 μ L 5倍稀释的上述单克隆抗体加入同一孔,相加孔最终体积为100 μ L,37 $^{\circ}$ C作用1h,PBST洗涤液(0.01M PBS,0.1%Tween20,pH7.4)洗涤3次,弃去液体;每孔加入100 μ L稀释成工作浓度的HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体,37 $^{\circ}$ C作用1h,PBST洗涤3次,弃去液体;每孔加入100 μ L TMB底物溶液,15min后加入2M H₂SO₄终止液,450nm波长下酶标仪读取结果。计算相加指数,其中A₁、A₂分别为两株不同单克隆抗体加样孔最终吸光值,A₁₊₂为混合单克隆抗体加样孔的吸光值,根据相加指数计算公式:AI = (A₁₊₂ - A₁) / A₂ × 100% 计算结果。如果AI大于10%显示两株单抗针对的抗原表位不同,具有相加效应;如果AI小于10%显示两株单抗的抗原表位邻近或相同,无相加效应。

[0027] (4) 单克隆抗体腹水制备

[0028] 8周龄的BALB/c小鼠腹腔注射无菌液体石蜡,0.5mL/只;1周后,小鼠腹腔分别接种获得的杂交瘤细胞,10⁶个细胞/只,6天后收集腹水,12000rpm离心去除细胞及脂肪。在腹水中分别加入3倍体积0.06M的CH₃COONa缓冲液(pH=5.0),然后再加入1M的盐酸,调节pH至4.5;逐滴滴加1/3体积的辛酸,边滴边搅拌,滴完后继续搅拌30min,4 $^{\circ}$ C静置1.5h;4 $^{\circ}$ C 10000rpm离心30min,吸出上清;上清中加入1M NaOH溶液调节pH至7.4,逐滴滴加等体积的饱和(NH₄)₂SO₄溶液,边滴边搅拌,滴完后4 $^{\circ}$ C静置过夜;第二天10000rpm离心30min,弃去上

清, 10mM PB (pH=7.4) 溶解沉淀, 装入透析袋, PB缓冲液中透析, 去除高浓度的盐离子。最终用PB缓冲液稀释至浓度1.5mg/mL, 用于胶体金试纸条的包被和标记。

[0029] 2. 检测EFTu抗原胶体金试纸制备及检测结果判定

[0030] (1) 单克隆抗体配对筛选

[0031] 将单克隆抗体, 分别标记40nm胶体金颗粒和包被硝酸纤维素膜。用纯化的重组蛋白EFTu (0.34mg/mL) 作为检测抗原, 观察胶体金试纸小样的检测效果, 选取最佳的标记及包被抗体。

[0032] (2) 胶体金试纸条的制备

[0033] 在上述结果基础上, 以硝酸纤维素膜作为固相载体, 三维喷点仪在硝酸纤维素膜上划上合适浓度的单抗作为检测线(T), 合适浓度的羊抗鼠IgG作为质控线(C), 检测线和质控线划膜量均为1 μ L/cm。标记好胶体金颗粒的单克隆抗体用喷点仪喷射至干燥的玻璃纤维膜上, 放入37 $^{\circ}$ C烘箱干燥1h, 干燥后即为胶体金垫。分别将硝酸纤维素膜、胶体金垫、吸水纸依次贴到PVC底板上, 切成4mm宽度的条后装卡备用。

[0034] (3) 检测结果判定

[0035] 吸取90 μ L稀释的待检样品, 滴加至水平放置的胶体金试纸加样孔中, 室温下静置5-10min, 肉眼观察并判定结果。如果质控线和检测线均出现红色条带, 待检样品中含有葡萄球菌EFTu, 结果为阳性; 如果质控线出现红色条带, 检测线处无红色条带, 待检样品中无葡萄球菌EFTu, 结果为阴性; 如果质控线无红色条带, 则该试纸检测结果无效。

[0036] 3. 胶体金试纸条的灵敏性检测

[0037] 用样本稀释液 (0.1M Tris+10%蔗糖+1%PVP+1%BSA+0.5%Tween-20, 盐酸调pH至8.5) 对纯化重组蛋白EFTu进行梯度稀释后, 滴入胶体金试纸的加样孔, 每孔加样90 μ L, 5-10min内观察结果, 确定该试纸条检测重组蛋白EFTu最低浓度。

[0038] 4. 葡萄球菌增菌培养基筛选

[0039] 将不同种葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌按1:100的比例分别接种1mL LB液体培养基、普通营养肉汤、含5%新生牛血清的营养肉汤以及含10%新生牛血清的营养肉汤, 置37 $^{\circ}$ C恒温摇床振荡培养, 分别于2h、3h取少量菌液分光光度计测定其OD₆₀₀值, 筛选最佳增菌培养基。

[0040] 5. 葡萄球菌裂解酶的制备

[0041] (1) 表达葡萄球菌裂解酶重组菌的构建

[0042] 合成裂解葡萄球菌噬菌体裂解酶基因:

[0043] CATatggcactgcctaaaacgggtaaaccaacggcaaaacaggtggttgactgggcaatcaatttaat
cggcagtggtgtcgatgttgatggttattatgggtcggaatgttgggatttacctaactatatttttaatagatac
tggaacttttaagacaccaggcaacgcaagagatatggcatggtatagatatcctgaagggtttaaagtgtttagaa
acacttctgatTTTTgtccctaaccaggtgatatagcagtggtgacaggtggttaattacaattggaacacttgggg
acacactggtattgtttaggtccatcaactaaaagttacttttatagtgtagatcagaattggaataactctaac
tcttacgttggttagtcctgcagcaagataaaaacatagttatttttggtgtaactcattttgttagaccgcataca
aagcagaaccgaaacctacaccaccaggtaccagatctgcatgcggtaaatctgcaagtaaaataacagttggaag
taaagcgccttataaccttaaatggtcaaaaggtgcttatttttaatgcgaaaatcgacggcttaggtgctacttca
gccactagatacgggtgataatcgtactaactatagattcgaatgttggtgacaggctgtatacgcgcctggaacattaa

tatatgtgtttgaaattatagatggttggtgtcgcatatttattggaacaatcataatgagtggatatggcatgagagattgattgtgaaagaagtgttttaaCTCGAGA (SEQ ID No.4), 将合成的基因克隆进原核表达载体 pET-30a (+) Nde I 和 Xho I, 转化大肠杆菌 BLR (DE3) 感受态细胞, 获得携带重组质粒的重组菌。

[0044] (2) 重组葡萄球菌裂解酶表达及粗提

[0045] 将获得的重组菌接种含卡那霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 摇床中 220rpm 培养, 12h 后转接种含卡那霉素 2×YT 液体培养基, 置于 37℃ 摇床 220rpm 培养 4h 左右, 使菌液 OD₆₀₀ 值到达 0.8, 加入 IPTG 诱导重组蛋白表达 4h, 同时设立不诱导对照。4000rpm 离心 10min, 收集重组菌, 高压破碎菌体后, 进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 电泳结束后考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2h, 甲醇-乙酸脱色液脱色至背景清晰, 蛋白凝胶成像系统观察结果, 判断重组菌是否表达重组裂解酶。

[0046] 根据上述试验结果, 转接种重组菌至 500mL 含卡那霉素 2×YT 液体培养基, IPTG 诱导重组蛋白表达, 诱导好的重组菌菌液 4000rpm 离心 10min, 用 3 倍体积的 PBS 进行洗涤离心, 最终菌体沉淀悬浮于 30mL 的 PBS 中, 高压破碎细菌获取蛋白, 10000rpm 离心 5min 后, 再用 0.22μm 细菌滤器过滤后, 滤液即为粗提的重组裂解酶, -20℃ 保存备用。

[0047] 6. 胶体金免疫层析试纸的初步应用

[0048] (1) 胶体金免疫层析试纸敏感性试验

[0049] 将分离自患乳房炎奶牛的不同种葡萄球菌按 1:100 的比例接种 1mL 增菌培养基, 置于 37℃ 恒温摇床振荡培养 3h 后 10000rpm 离心 1min, 用 1mL PBS 洗涤一次, 加入等体积粗提的裂解酶溶液, 在 37℃ 静置 30min, 10000rpm 离心 1min, 离心后的上清加入等体积的样本稀释液, 移液器吹匀后加入胶体金试纸的加样孔中, 加样体积为 90μL/孔, 5-10min 内观察并判定检测结果, 计算试纸条敏感性。

[0050] (2) 胶体金免疫层析试纸特异性试验

[0051] 将分离自患乳房炎奶牛大肠杆菌、链球菌以及自然界常见的沙门氏菌、链球菌、志贺杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草杆菌、肠球菌按 1:100 的比例接种 1mL 增菌培养基, 置于 37℃ 恒温摇床振荡培养 3h 后 10000rpm 离心 1min, 用 1mL PBS 洗涤一次, 加入等体积粗提的裂解酶溶液, 在 37℃ 静置 30min, 10000rpm 离心 1min, 离心后的上清加入等体积的样本稀释液, 移液器吹匀后加入胶体金试纸的加样孔中, 加样体积为 90μL/孔, 5-10min 内观察并判定检测结果, 计算试纸条特异性。

[0052] 申请人利用非标记差异蛋白质组相对定量方法 (Label-free), 对常见 12 种可导致奶牛乳房炎的葡萄球菌菌体蛋白进行质谱分析, 从不同种的葡萄球菌 1445 种蛋白中筛选出的蛋白延长因子 (Elongation Factor Tu, EFTu) 为葡萄球菌特有的、共同的、高丰度的蛋白, 可作为葡萄球菌诊断抗原。在此基础上, 制备针对不同种葡萄球菌 EFTu 的通用单克隆抗体, 建立双抗体夹心胶体金免疫层析方法; 通过对待检细菌的增菌培养、细菌裂解, 释放出胞浆内蛋白, 再用制备的胶体金试纸对裂解产物进行检测, 判断其中是否有葡萄球菌 EFTu 蛋白, 确定是否存在葡萄球菌, 从而实现简便、快速、鉴定葡萄球菌性奶牛乳房炎。

附图说明

[0053] 图 1 单克隆抗体 1F7F10 和 2E5D3 与金黄色葡萄球菌、链球菌及大肠杆菌裂解产物

Western-Blot结果:

[0054] M.蛋白分子质量标准,1-3.单克隆抗体1F7F10与金黄色葡萄球菌、链球菌及大肠杆菌裂解产物Western-Blot结果,4-6.单克隆抗体2E5D3与金黄色葡萄球菌、链球菌及大肠杆菌裂解产物Western-Blot结果。

[0055] 图2单克隆抗体1F7F10与常见不同细菌裂解产物Western-Blot结果:

[0056] M.蛋白分子质量标准,1.大肠杆菌TG1,2.大肠杆菌,3.沙门氏菌,4.金黄色葡萄球菌,5.链球菌,6.志贺杆菌,7.蜡样芽孢杆菌,8.枯草杆菌,9.肠球菌。

[0057] 图3单克隆抗体1F7F10和2E5D3与不同种葡萄球菌裂解产物Western-Blot结果:

[0058] A.单克隆抗体1F7F10 Western-Blot结果;B.单克隆抗体2E5D3Western-Blot结果。

[0059] M.预染蛋白Marker,1.模仿葡萄球菌,2.产色葡萄球菌,3.腐生葡萄球菌,4.沃氏葡萄球菌,5.溶血葡萄球菌,6.松鼠葡萄球菌,7-16.金黄色葡萄球菌,17.大肠杆菌。

[0060] 图4胶体金试纸条结果判定;

[0061] 图5胶体金试纸条灵敏度测定结果;

[0062] 图6不同培养基对不同种葡萄球菌增菌效果;

[0063] 分泌单克隆抗体1F7F10的杂交瘤细胞,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201976,分类命名为:杂交瘤细胞株1F7F10,保藏日期:2019.5.8。

[0064] 分泌单克隆抗体2E5D3的杂交瘤细胞,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C201977,分类命名为:杂交瘤细胞株2E5D3,保藏日期:2019.5.8。

具体实施方式

[0065] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步详细说明。

[0066] 主要生物材料来源:

[0067] 大肠杆菌表达载体pET-30a(+):购于Novogen公司(Cat No.69909.3);

[0068] 大肠杆菌BLR(DE3)感受态细胞:购于北京华越洋生物(Cat No.C345001);

[0069] 分离自患乳腺炎奶牛的不同种葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌,以及沙门氏菌、链球菌、志贺杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草杆菌、肠球菌:本实验室保存;

[0070] 羊抗鼠IgG、牛血清白蛋白(BSA)、硝酸纤维素膜(Sartorius CN140)、玻璃纤维纸、吸水滤纸、PVC底板、塑料卡壳以及直径约40nm的胶体金溶液:购于潍坊百诺迪生物科技有限公司;

[0071] Dylight-800标记的羊抗鼠IgG(H+L)抗体:购自KPL公司;

[0072] 营养肉汤:购于海博生物(Cat No.HB0108);

[0073] 新生牛血清:购于Gibco公司(Cat No.16010)。

[0074] 实施例1抗葡萄球菌EFTu单克隆抗体的制备

[0075] 1.抗原的制备

[0076] (1)根据报道基因序列(Genbank Accession No.LR134093.1)合成一对扩增葡萄球菌EFTu完整基因的引物:F 5'-CGaggtaccATGGCAAAGAAAAATTTGATCG-3'(SEQ ID No.1),

R 5'-GAAGctcgagTTATTTAATGATTTTCAGTAACAACGCC-3' (SEQ ID No.2)。以金黄色葡萄球菌的基因组为模板,EcoR V和XhoI限制性内切酶酶切后,插入质粒pET-30a(+)相应的酶切位点,构建重组质粒pET-EFTu,转化感受态细胞BLR(DE3)。按1:100体积比,将携带质粒pET-p30的重组菌接种含50 μ g/mL卡那霉素的2 \times YT培养基,37 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀=0.8,加入IPTG至终浓度1mmol/L,37 $^{\circ}$ C诱导4h;8000rpm离心2min,离心得到的菌体用0.01M PBS溶液洗涤2次,悬浮菌体,超声波仪裂解细菌,超声波仪功率50W,10s/次,共5min;4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心20min,收集沉淀;采用Ni-NTA琼脂糖柱纯化EFTu重组蛋白。

[0077] (2) 根据Genbank中发表的不同种葡萄球菌以及链球菌、大肠杆菌的EFTu氨基酸序列,利用DNASTar7.1软件中的MegAlign进行比较分析。筛选出葡萄球菌EFTu特有的氨基酸序列NH₃-GTDADAASVREVFMKLGKVKLNNDL-COOH (SEQ ID No.3),委托南京淘普生物科技有限公司合成,并在合成的多肽羧基端偶联上KLH,作为免疫抗原。

[0078] 2. 抗EFTu单克隆抗体制备

[0079] 用纯化的EFTu重组蛋白以及偶联有KLH的人工合成多肽为抗原,分别免疫8周龄的BALB/c小鼠。首次免疫时,抗原与弗氏完全佐剂等体积乳化,腹腔接种小鼠,25 μ g抗原/只;7天后抗原与弗氏不完全佐剂等体积乳化,第二次腹腔接种途径免疫小鼠,25 μ g抗原/只;7天后第三次小鼠腹腔途径直接免疫,25 μ g/只;免疫后的第3天,取小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合,HAT选择性培养基培;10天后以重组EFTu为包被抗原,间接ELISA检测细胞上清,筛选阳性杂交瘤细胞,并对筛选出的杂交瘤细胞进行亚克隆,获得纯净的杂交瘤细胞2E5D3和1F7F10,其中2E5D3来自于EFTu免疫的小鼠,1F7F10来自于合成多肽免疫的小鼠。

[0080] 3. 单克隆抗体生物学特性鉴定

[0081] (1) 单克隆抗体特异性的鉴定

[0082] ①以金黄色葡萄球菌、链球菌以及大肠杆菌菌体蛋白为抗原,Western-Blot检测制备的单克隆抗体与金黄色葡萄球菌反应的特异性。结果单克隆抗体2E5D3与金黄色葡萄球菌EFTu能发生抗原抗体反应,与链球菌不发生反应,但与大肠杆菌有一定的交叉反应;1F7F10只与金黄色葡萄球菌EFTu发生抗原抗体反应(图1)。

[0083] ②以大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌、金黄色葡萄球菌、志贺杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草杆菌、肠球菌菌体蛋白作为抗原,根据上述试验结果,筛选出的只与金黄色葡萄球菌EFTu反应的1F7F10作为一抗进行Western-Blot实验,检测该单克隆抗体是否与其他常见细菌能发生抗原抗体反应,结果显示,该单克隆抗体与其他常见细菌不反应(图2)。

[0084] ③根据上述实验结果,Western-Blot实验验证筛选出的单克隆抗体能否与其他种葡萄球菌发生抗原抗体反应,结果显示2E5D3和1F7F10均能与不同种的葡萄球菌裂解产物发生抗原抗体反应(图3)。

[0085] (2) 单克隆抗体抗原表位鉴定

[0086] 为确定获得的单克隆抗体2E5D3和1F7F10是否针对葡萄球菌EFTu不同抗原表位,用ELISA相加指数(AI)方法进行验证。具体操作步骤如下:用5 μ g/ml的重组蛋白EFTu包被96孔酶标板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C包被2h,弃去包被液;5%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭2h,弃去孔中的封闭液;分别加入5倍稀释的所需测定的两株不同的单克隆抗体,每个单克隆抗体加样100 μ L/孔,同时各取50 μ L 5倍稀释的上述单克隆抗体加入同一孔,相加孔最终体积为100 μ L,37 $^{\circ}$ C作用1h,PBST洗涤液(0.01M PBS,0.1%Tween20,pH7.4)洗涤3次,弃去液体;每孔加入100 μ L

HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体,37℃作用1h,PBST洗涤3次,弃去液体;每孔加入100μL TMB底物溶液,15min后加入2M H₂SO₄终止液,450nm波长下酶标仪读取结果。计算相加指数,其中A₁、A₂分别为两株不同单克隆抗体加样孔最终吸光值,A₁₊₂为混合单克隆抗体加样孔的吸光值,根据相加指数计算公式:AI=(A₁₊₂-A₁)/A₂×100%计算结果。如果AI大于10%显示两株单抗针对的抗原表位不同,具有相加效应;如果AI小于10%显示两株单抗的抗原表位邻近或相同无相加效应。结果AI=24%,表明2E5D3和1F7F10分别针对EFTu不同的抗原表位。

[0087] 4. 单克隆抗体腹水制备

[0088] 8周龄的BALB/c小鼠腹腔注射无菌液体石蜡,0.5mL/只;1周后,小鼠腹腔分别接种获得的杂交瘤细胞2E5D3和1F7F10,10⁶个细胞/只,6天后收集腹水,12000rpm离心去除细胞及脂肪。在腹水中分别加入3倍体积0.06M的CH₃COONa缓冲液(pH=5.0),然后再加入1M的盐酸,调节pH至4.5;逐滴滴加1/3体积的辛酸,边滴边搅拌,滴完后继续搅拌30min,4℃静置1.5h;4℃10000rpm离心30min,吸出上清;上清中加入1M NaOH溶液调节pH至7.4,逐滴滴加等体积的饱和(NH₄)₂SO₄溶液,边滴边搅拌,滴完后4℃静置过夜;第二天10000rpm离心30min,弃去上清,10mM PB(pH=7.4)溶解沉淀,装入透析袋,PB缓冲液中透析,去除高浓度的盐离子。最终用PB缓冲液稀释至浓度1.5mg/mL,用于胶体金试纸条的包被和标记。

[0089] 实施例2检测EFTu抗原胶体金试纸制备及检测结果判定

[0090] 1. 标记单克隆抗体1F7F10的胶体金垫制备

[0091] (1) 1F7F10标记胶体金最佳pH确定:1.5mL指形管中分装1mL直径40nm的胶体金溶液,共9管,加入0.2mol/L盐酸溶液或0.2mol/L K₂CO₃溶液,精密pH试纸测定胶体金溶液pH,使指形管中溶液pH值按顺序分别为pH5.0、pH5.5、pH6.0、pH6.5、pH7.0、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9.0;加入20μg的EFTu重组蛋白,混匀静置1h;再加入100μL 10%的NaCl,静置10min后观察结果,溶液的颜色没有变化的即为胶体金标记抗体的最适pH。经测定1F7F10标记胶体金最佳pH值为8.0。

[0092] (2) 1F7F10与胶体金最佳标记浓度确定:0.005mol/L NaCl溶液将1F7F10浓度调成200μg/mL,分别取10μL、20μL、30μL、40μL、50μL、60μL、70μL、80μL、90μL的重组蛋白溶液以及0.005mol/L NaCl溶液加入装有1mL胶体金的指形管中;根据上述结果,加入0.2mol/L K₂CO₃调至最佳pH值,混匀静置1h;再在上述各管内分别加入100μL 10%NaCl,静置10min后,观察胶体金溶液颜色的变化,如果颜色不变,此时加入的重组蛋白最小量能使胶体金稳定。经测定1F7F10与胶体金最佳标记浓度为10μg/mL。

[0093] (3) 1F7F10胶体金标记:用0.2mol/L K₂CO₃溶液调节胶体金溶液至pH8.0,加入适量的200μg/mL 1F7F10溶液至终浓度为10μg/mL,搅拌30min;缓慢加入适量的10%BSA,使其终浓度为1%,搅拌30min;然后将该溶液1000rpm 4℃离心15min,取上清;再将上清12000rpm 4℃离心30min,弃上清,沉淀用复溶液(10%蔗糖,1%PVP,1%BSA,0.5%Tween-20,0.1M TrisCl,pH 8.5)溶解浓缩沉淀,复溶液浓缩比例为125μL/mL。用Biodot XYZ3060喷金划膜一体机将浓缩后的胶体金复合物喷涂于胶体金垫内,喷涂量为15μL/cm,自然干燥。

[0094] 2. 硝酸纤维素膜检测线和质控线喷涂

[0095] 在硝酸纤维素膜表面用喷金划膜一体机喷涂检测线(T)和质控线(C),检测线为单克隆抗体2E5D3,质控线为羊抗小鼠IgG抗体;2E5D3工作浓度为1.5mg/mL,羊抗鼠IgG抗体工作浓度为1.5mg/mL,两者划膜时喷涂量均为1μL/cm,且检测线与质控线之间距离0.5cm。

[0096] 3. 胶体金免疫层析试纸组装

[0097] (1) 8cm宽的PVC底板粘面朝上,将2.5cm宽的固相硝酸纤维素膜黏附于中间;

[0098] (2) 0.5cm宽的胶体金垫粘附于硝酸纤维素膜前,与固相硝酸纤维素膜重叠0.2cm;

[0099] (3) 2.7cm宽的样品垫粘附于胶体金垫前,与胶体金垫重叠0.2cm;

[0100] (4) 3.2cm宽的吸水垫粘附于硝酸纤维素膜后,与固相硝酸纤维素膜重叠0.2cm;

[0101] (5) 微电脑自动斩切机切割成4mm宽的条带;

[0102] (6) 条带装上保护性塑料外壳。

[0103] 4. 胶体金试纸检测结果判定 (图4)

[0104] 吸取90 μ L稀释的待检样品,滴加至水平放置的胶体金试纸加样孔中,室温下静置5-10min,肉眼观察并判定结果。如果质控线和检测线均出现红色条带,待检样品中含有葡萄球菌EFTu,结果为阳性;如果质控线出现红色条带,检测线处无红色条带,待检样品中无葡萄球菌EFTu,结果为阴性;如果质控线无红色条带,则该试纸检测结果无效。

[0105] 实施例3胶体金试纸最低检测灵敏度测定

[0106] 将纯化的重组蛋白EFTu用样品稀释液稀释成3.4 μ g/mL、340ng/mL、68ng/mL、34ng/mL,分别吸取90 μ L的稀释液,加入试纸的加样孔中,5-10min内观察结果。结果显示样品浓度 \geq 68ng/mL时,质控线和检测线均能出现红色条带,而样品浓度为34ng/mL时检测线基本无颜色出现 (图5),表明该胶体金免疫层析试纸检测灵敏度为68ng/mL。

[0107] 实施例4葡萄球菌增菌培养基筛选

[0108] 将不同种葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌按1:100的比例分别接种1mL LB液体培养基、普通营养肉汤培养基、5%新生牛血清的营养肉汤培养基以及10%新生牛血清的营养肉汤培养基同时置于37 $^{\circ}$ C恒温摇床振荡培养,分别于2h、3h取出少量菌液,分光光度计测定其OD₆₀₀值,筛选最佳增菌培养基。结果显示,相同的培养时间10%新生牛血清的营养肉汤增菌效果最佳 (如图6),在短时间内就能达到预期的培养目的。

[0109] 实施例5葡萄球菌裂解酶的制备

[0110] 1. 表达葡萄球菌裂解酶重组菌的构建

[0111] 合成裂解葡萄球菌噬菌体裂解酶基因:

[0112] CATatggcactgcctaaaacgggtaaaccaacggcaaaacaggtggttgactgggcaatcaatttaatcggcagtggtgtcgatgttgatggttattatggtcggcaatgttggtgatttacctaactatatttttaatagatactggaacttttaagacaccaggcaacgcaagagatatggcatggtatagatatcctgaagggtttaaagtgtttagaaacacttctgattttgtccctaaccagggtgatatagcagtggtgacaggtggttaattacaattggaacacttggggacacactggtattgtttaggtccatcaactaaaagttacttttatagtgtagatcagaattggaataactctaactcttacgttggttagtcctgcagcaagataaaaacatagttatttttggtgtaactcattttgtagaccgcatacaaaagcagaaccgaaacctacaccaccaggtaccagatctgcatgcggtaaatctgcaagtaaaataacagttggaagtaaagcgccttataaccttaaatggtcaaaaggtgcttatttttaatgcgaaaatcgacggcttaggtgctacttgccactagatacgggtgataatcgtaactaactatagattcgatgttggacaggctgtatacgcgcctggaacatttaatatatgtgtttgaaattatagatggttggtgtcgcatttatttgaacaatcataatgagtggtatggcatgagagattgattgtgaaagaagtgttttaaCTCGAGA (SEQ ID No.4),将合成的基因克隆进原核表达载体pET-30a (+)Nde I和Xho I,转化大肠杆菌BLR (DE3)感受态细胞,获得携带重组质粒的大肠杆菌重组菌。

[0113] 2. 重组葡萄球菌裂解酶表达及粗提

[0114] 将获得的重组菌接种含卡那霉素的LB液体培养基, 37℃摇床中220rpm扩大培养, 12h后转接种含卡那霉素2×YT液体培养基, 置于37℃摇床220rpm培养4h左右, 使菌液OD₆₀₀值到达0.8, 加入IPTG诱导重组蛋白表达4h, 同时设立不诱导对照。4000rpm离心10min, 收集重组菌, 高压破碎菌体后, 进行SDS-PAGE蛋白凝胶电泳, 电泳结束后考马斯亮蓝R-250染色液室温染色2h, 甲醇-乙酸脱色液脱色直至背景清晰, 蛋白凝胶成像系统观察结果, 确定大肠杆菌工程菌BLR表达了重组裂解酶, 且该重组裂解酶以可溶性蛋白方式存在于胞浆内。

[0115] 根据上述试验结果, 转接种重组菌至500mL含卡那霉素2×YT液体培养基, IPTG诱导重组蛋白表达, 重组菌菌液4000rpm离心10min, 用3倍体积的PBS进行洗涤离心, 菌体沉淀悬浮于30mL的PBS中, 高压破碎细菌获取蛋白, 10000rpm离心5min后, 再用0.22μm细菌滤器过滤后, 滤液即为粗提的重组裂解酶, -20℃保存备用。

[0116] 实施例6胶体金免疫层析试纸的初步应用

[0117] 1. 胶体金免疫层析试纸敏感性试验

[0118] 将分离自患乳房炎奶牛的不同种葡萄球菌按1:100的比例接种1mL含10%新生牛血清的营养肉汤, 置于37℃恒温摇床振荡培养3h后10000rpm离心1min, 用1mL PBS洗涤一次, 加入等体积粗提的裂解酶溶液, 在37℃静置30min, 10000rpm离心1min, 离心后的上清加入等体积的样本稀释液, 移液器吹匀后加入胶体金试纸的加样孔中, 加样体积为90μL/孔, 5-10min内观察并判定检测结果, 计算试纸条敏感性。结果14株不同的葡萄球菌中13株能被有效检出, 试纸条敏感性为92.86% (表1)。

[0119] 表1胶体金试纸条敏感性试验结果

	菌 株	T 线显色深浅	检测结果
[0120]	金黄色葡萄球菌 1	++	正确
	模仿葡萄球菌	+	正确
	金黄色葡萄球菌 2	+	正确
	产色葡萄球菌	—	错误
	腐生葡萄球菌	++	正确
	木糖葡萄球菌 1	++	正确
	溶血葡萄球菌	++	正确
	金黄色葡萄球菌 3	++	正确
	金黄色葡萄球菌 4	++++	正确
	金黄色葡萄球菌 5	+++	正确
	金黄色葡萄球菌 6	++	正确
	金黄色葡萄球菌 7	++	正确
	木糖葡萄球菌 2	++	正确
	金黄色葡萄球菌 8	++++	正确

[0121] (2) 胶体金免疫层析试纸特异性试验

[0122] 将分离自患乳房炎奶牛大肠杆菌、链球菌以及自然界常见的沙门氏菌、志贺杆菌、蜡样芽孢杆菌、枯草杆菌、肠球菌接种1mL 10%血清的营养肉汤,37℃恒温摇床培养3h后离心洗涤菌体,按照前面的方法加入粗提的裂解酶溶液,37℃静置30min,离心除去菌体碎片,上清加入等体积的样本稀释液,胶体金试纸检测并判定结果。结果显示(表2),该试纸条特异性为100%。

[0123] 表2胶体金试纸条特异性试验结果

[0124]	菌 株	T 线显色深浅	检测结果
	大肠杆菌	—	正确
	链球菌	—	正确
	沙门氏菌	—	正确
	志贺杆菌	—	正确
	蜡样芽孢杆菌	—	正确
	枯草杆菌	—	正确
	肠球菌	—	正确

[0125] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征以及本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

序列表

<110> 扬州大学

<120> 一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用

<130> xhx2019050801

<141> 2019-05-08

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cgaggtacca tggcaaaaga aaaatttgat cg 32

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gaagctcgag ttatttaatg atttcagtaa caacgcc 37

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Gly Thr Asp Ala Asp Ala Ala Ser Val Arg Glu Val Phe Met Lys Leu

1 5 10 15

Gly Tyr Lys Val Lys Leu Asn Asn Asp Leu

20 25

<210> 4

<211> 784

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

catatggcac tgcctaaaac gggtaaacca acggcaaac aggtggttga ctgggcaatc 60
aatttaatcg gcagtgggtg cgatgttgat ggttattatg gtcggcaatg ttgggattta 120
cctaactata tttttaatag atactggaac tttaagacac caggcaacgc aagagatatg 180
gcatggtata gatatcctga agggtttaaa gtgttttagaa acacttctga ttttgtccct 240
aaaccagggtg atatagcagt gtggacaggt ggtaattaca attggaacac ttggggacac 300

actggtattg ttgtaggtcc atcaactaaa agttactttt atagtgtaga tcagaattgg 360
aataactcta actcttacgt tggtagtcct gcagcaaaga taaaacatag ttattttggt 420
gtaactcatt ttgttagacc cgcatacaaa gcagaaccga aacctacacc accaggtacc 480
agatctgcat gcggtaaadc tgcaagtaaa ataacagttg gaagtaaagc gccttataac 540
cttaaagtgt caaaaggtgc ttattttaat gcgaaaatcg acggcttagg tgctacttca 600
gccactagat acggtgataa tcgtactaac tatagattcg atgttggaca ggctgtatac 660
gcgcctggaa cattaatata tgtgtttgaa attatagatg gttggtgtcg cattttattgg 720
aacaatcata atgagtggat atggcatgag agattgattg tgaaagaagt gttttaactc 780
gaga 784

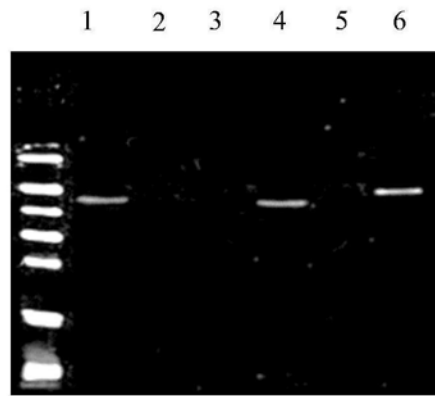


图1

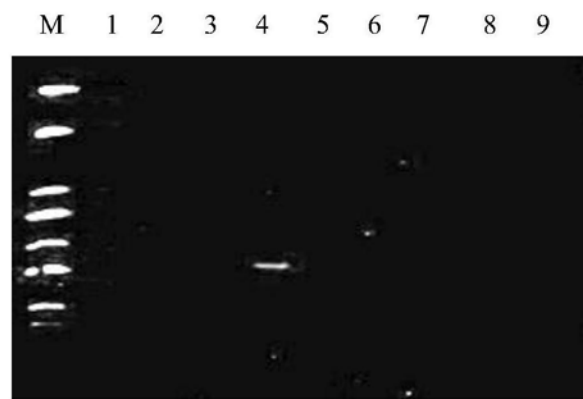
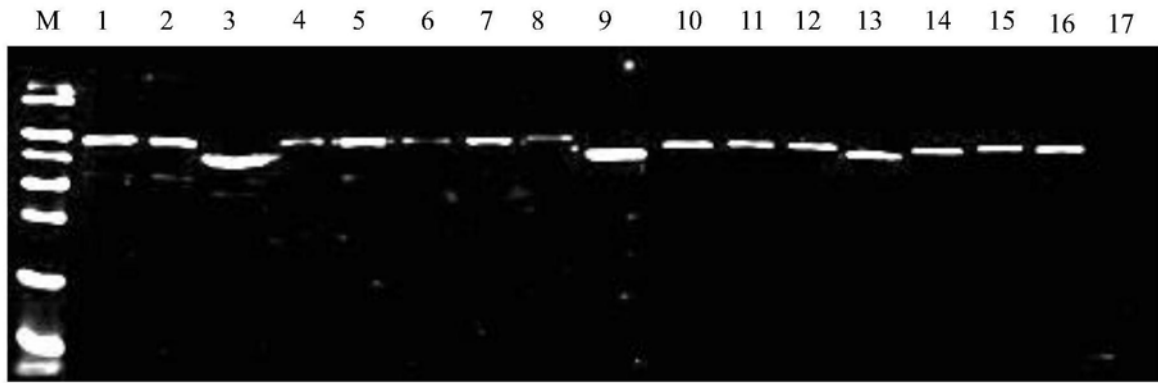
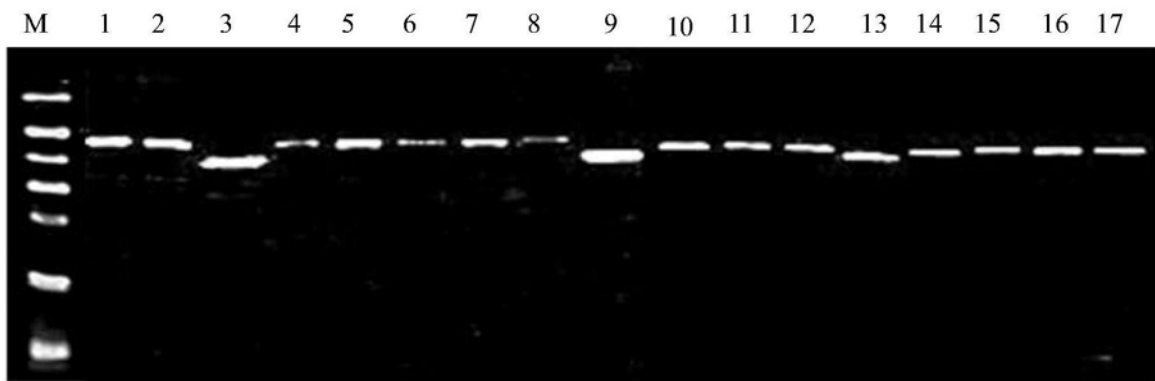


图2



A



B

图3

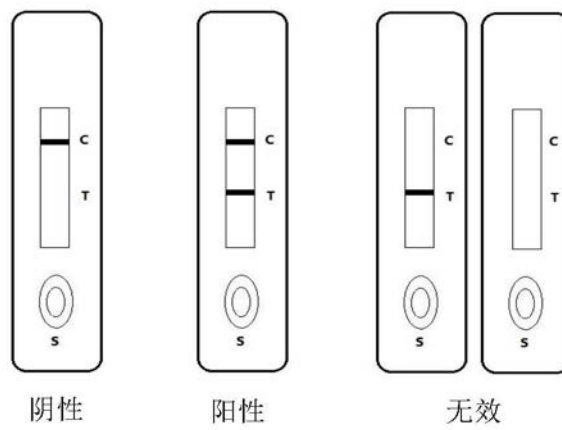


图4

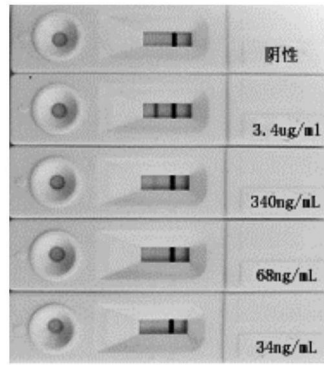


图5

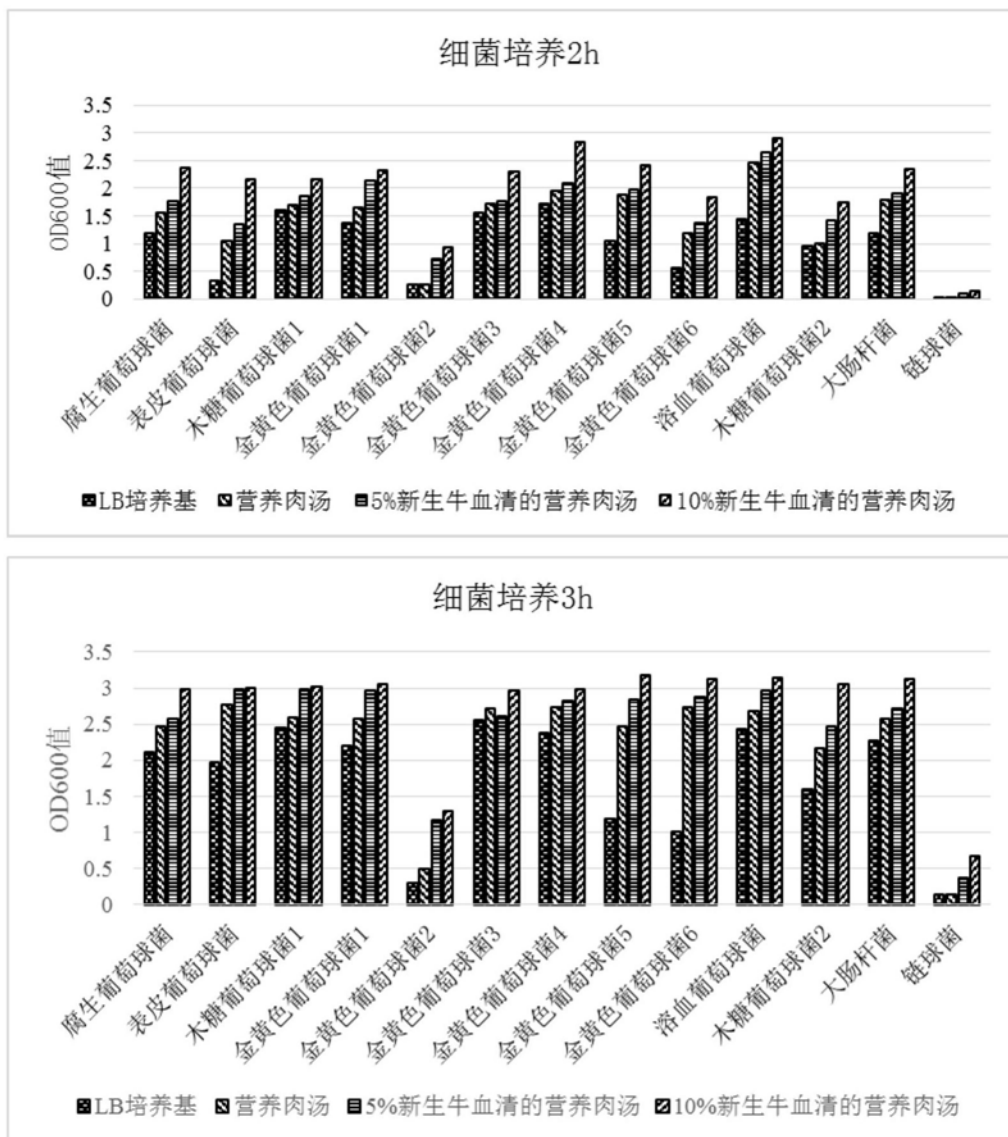


图6

专利名称(译)	一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用		
公开(公告)号	CN110161239A	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201910379347.4	申请日	2019-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	张鑫宇 周花艳 孙怀昌 朱国强		
发明人	张鑫宇 周花艳 刘潇羽 孙怀昌 朱国强		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/544 G01N33/558 G01N33/56938 G01N33/577		
代理人(译)	薛海霞 董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于EFTu的双抗体夹心胶体金试纸、葡萄球菌检测方法及应用，属于病原诊断技术领域，包括PVC底板，在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜以及吸水垫。其中胶体金垫内有胶体金标记的抗葡萄球菌延长因子Tu (EFTu) 抗原的单克隆抗体1F7F10；硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线，检测线为针对葡萄球菌EFTu另一表位的单克隆抗体2E5D3，质控线为羊抗小鼠IgG抗体。本发明建立的胶体金免疫层析试纸条具有方便、快速、特异等优点，可用于葡萄球菌的快速检测。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

