

分类号\_\_\_\_\_

密 级\_非密

UDC\_\_\_\_\_

单位代码\_10733

# 甘肃农业大学

# 硕士学位论文

金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗原单克隆抗体的制备与  
初步应用

**Preparation and application of Monoclonal Antibodies Against  
*Staphylococcus aureus* protein A**

彭洪江

指导教师姓名\_李克生 研究员 (甘肃医学科学研究所 兰州 730050)

伏小平 副教授 (甘肃农业大学 兰州 730070)

学科专业名称\_预防兽医学\_ 研究方向\_兽医微生物与免疫

论文答辩日期\_2012年 5月 29日\_ 学位授予日期\_ 年 月

答辩委员会主席\_柳纪省 研究员

评 阅 人\_付宝权 研究员

胡永浩 教授

2012年 5月 28 日

**Preparation and application of Monoclonal  
Antibodies Production Against *Staphylococcus aureus*  
protein A**

By

Peng Hong-Jiang

Supervisor: Prof. Li Ke-Sheng

A Dissertation

Submitted to Gansu Agricultural University

for

The Degree of Master

of Preventive Veterinary Medicine

Completed in May 2012

Commencement in June 2012

# 目 录

目 录 .....	I
缩略词表.....	IV
摘 要 .....	1
Summary .....	2
前言 .....	4
第一章 金黄色葡萄球菌快速检测方法的研究进展 .....	6
1 培养基法.....	6
2 免疫学方法.....	7
2.1 乳胶凝集试验.....	7
2.2 酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) .....	8
2.3 放射免疫分析法(Radioimmuno Assay, RIA) .....	9
3 分子生物学方法.....	9
3.1 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	10
3.2 实时荧光定量-聚合酶链反应(Real-Time Fluorescent Quantitative PCR, FQ-PCR) .....	10
3.4 基因芯片技术(gene chip, DNA chip) .....	11
4 其他检测方法.....	12
4.1 表面等离子共振技术.....	12
4.2 免疫传感器技术.....	13
5 金黄色葡萄球菌检测发展方向及其应用展望.....	13
第二章 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗原的提取及特异性鉴定 .....	15
1 材料及试剂.....	15
1.1 菌种.....	15
1.2 主要生化试剂.....	15
1.3 仪器设备.....	15
1.4 试剂配制.....	15
1.4.1 改良肉汤培养基.....	15
1.4.2 SDS-PAGE 电泳所需试剂.....	15
1.4.3 ELISA 检测所需试剂.....	16
2 方法.....	16
2.1 金黄色葡萄球菌的培养.....	16
2.3 SPA 粗提.....	17
2.4 纯化.....	17
2.4.1 分离纯化 SPA.....	17
2.4.2 选择收集 SPA.....	17
2.5 纯度及相对分子量检测.....	18
3 结果.....	18
3.1 金黄色葡萄球菌的培养.....	18
3.2 SPA 的提取和纯化.....	18
3.3 SPA 特异性检测.....	20
3.3.1 纯度及相对分子量检测.....	20
4 讨论.....	20
5 结论.....	22

第三章 金黄色葡萄球菌蛋白 A 单克隆抗体的制备.....	23
1 材料及试剂.....	23
1.1 菌株、筛选抗原、细胞及实验动物.....	23
1.2 主要仪器设备.....	23
1.3 主要试剂.....	23
1.4 试剂配制.....	23
1.4.1 细胞培养所需试剂.....	23
1.4.3 染色体计数所需试剂.....	24
2 方法.....	25
2.1 动物免疫.....	25
2.2 细胞融合与杂交瘤细胞筛选.....	25
2.2.1 饲养细胞的制备.....	25
2.2.2 脾细胞的制备.....	25
2.2.3 细胞融合.....	25
2.2.4 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆.....	26
2.2.5 杂交瘤细胞的扩大培养及冻存.....	26
2.2.6 单克隆抗体 Ig 亚类的鉴定.....	26
2.2.7 抗原位点分析.....	26
2.2.8 腹水的制备与单克隆抗体的纯化.....	27
2.2.9 单克隆抗体特异性鉴定.....	27
2.3 单克隆抗体的稳定性鉴定.....	27
2.3.1 细胞体外传代试验.....	27
2.3.2 连续冻存复苏试验.....	27
2.3.3 腹水连续传代试验.....	28
2.4 杂交瘤细胞染色体数目鉴定.....	28
3 结果.....	28
3.1 杂交瘤细胞株的建立与单抗 Ig 亚类鉴定.....	28
3.2 单克隆抗体抗原位点分析.....	29
3.3 单克隆抗体的纯化.....	29
3.4 单克隆抗体的稳定性测定.....	31
3.5 杂交瘤细胞染色体数目鉴定.....	32
4 讨论.....	33
5 结论.....	34
第四章 金黄色葡萄球菌双抗夹心 ELISA 检测方法的建立.....	35
1 材料及试剂.....	35
1.1 菌株、单克隆抗体.....	35
1.2 主要仪器设备.....	35
1.3 主要试剂及配制.....	35
2 方法.....	36
2.1 单克隆抗体的浓缩.....	36
2.2 酶标抗体的制备.....	36
2.3 ELISA 方法检测酶标抗体 3B11-HRP 活性.....	36
2.4 双抗夹心 ELISA 建立.....	37
2.5 捕获抗体包被浓度及酶标抗体工作浓度的确定.....	37
2.6 双抗体夹心 ELISA 检测方法特异性及灵敏度的测定.....	37
3 结果.....	37
3.1 酶标抗体 3B11-HRP 活性.....	37
3.2 抗体包被浓度及酶标抗体工作浓度的确定.....	38

---

3.3 双抗体夹心 ELISA 的特异性.....	39
4 讨论.....	39
5 结论.....	40
参考文献.....	41
致 谢 .....	48
作者简介.....	49
导师简介.....	50
原创性声明.....	51
学位论文版权认定和使用授权书.....	51

## 缩略词表

缩写	英文全称	中文全称
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CFU	Colony forming unite	菌落集成单位
DMEM	Dulbecco' s modified eagle' s medium	达尔伯克改良伊格尔 培养液
DMSO	Dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FCA	Freund' s complete adjuvant	弗氏完全佐剂
FIA	Freund' s incomplete adjuvant	弗氏不完全佐剂
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化酶
HAT	Hypoxanthine, aminopterin, thymidine	次黄嘌呤、氨基蝶呤、 胸腺嘧啶
HT	Hypoxanthine, thymidine	次黄嘌呤、胸腺嘧啶
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
McAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
OD	Optical density	光密度值
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
S-ELISA	Sandwich Enzyme linked	双夹心酶联免疫吸附

---

	immunosorbent assay	试验
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠聚丙
	polyacrylamide gel electrophoresis	烯酰胺凝胶电泳
SPA	<i>Staphylococcus aureus</i> protein A	金黄色葡萄球菌蛋白 A
TMB	3, 3, 5, 5-Tetramethy Ibenzidine	3, 3, 5, 5-四甲基联 苯氨

---

## 摘 要

金黄色葡萄球菌是一种严重危害人类健康的食源性病原菌，在环境中广泛分布。目前对于金黄色葡萄球菌所引发的食品中毒事件频发，因此针对该菌快速、简便、灵敏的检测方法是监控该菌关键。本研究制备了 SPA 及其单克隆抗体，对其生物学活性进行了分析鉴定，建立了检测金黄色葡萄球菌的双抗体夹心 ELISA 方法，为该菌的防控监测提供有用的检测手段。

应用热 PBS 浸出法提取 SPA, 通过离心，酸沉淀，乙醇沉淀粗提，将粗提的蛋白再经过 ÄKTA prime 蛋白纯化系统 SephadexS-200 凝胶层析纯化，以丙种球蛋白作为一抗检测 SPA；SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯度及分子量。使用 ÄKTA prime 蛋白纯化系统 SephadexS-200 凝胶层析出现 4 个洗脱峰，2 号收集管洗脱液和 3 号收集管洗脱液经间接 ELISA 试验检测 OD<sub>450</sub> 值最高；合并后蛋白浓度测定仪测得蛋白含量为 0.506mg/mL；SDS-PAGE 电泳显示在约 12KD 处有一条明显的电泳条带。制备的 SPA 纯度达到免疫纯，活性高，特异性强，是制备抗 SPA 单克隆抗体的理想材料。

为了获得稳定性好、特异性强、效价较高的抗金黄色葡萄球菌蛋白 A 单克隆抗体。用热灭活的金黄色葡萄球菌 w01-04 菌体抗原免疫 BALB/c 小鼠，取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）融合，以 SPA 为筛选抗原进行克隆筛选，并对各株单抗的生物学特性进行分析和鉴定。获得 6 株稳定分泌 SPA 单克隆抗体的杂交瘤细胞，6 株单抗与其他菌株没有交叉反应，其中单克隆抗体 3B11、4F7 为 SPA 表面抗原表位的单克隆抗体，与金黄色葡萄球菌 w01-04 菌体和 SPA 有较强的免疫反应性，免疫球蛋白亚类分别为 IgG1 和 IgG3，具有稳定性好、特异性强、效价较高等特点。

取单克隆抗体 3B11，采用改良过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶（HRP）酶标抗体得到 3B11-HRP 检测抗体。以单克隆抗体 4F7 为捕获抗体、3B11-HRP 为检测抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法。该方法对金黄色葡萄球菌具有特异性，与受试的非金黄色葡萄球菌菌株没有交叉反应，对金黄色葡萄球菌纯培养菌液检出限为  $1 \times 10^5$  CFU/mL。本研究建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法对金黄色葡萄球菌具有较高的特异性和灵敏度，该方法有望与其他方法相结合用于对金黄色葡萄球菌的检测。

**关键词：**金黄色葡萄球菌；金黄色葡萄球菌蛋白 A；单克隆抗体；双抗体夹心 ELISA



## Summary

*Staphylococcus aureus* has emerged as one of the important contemporary human food borne pathogens capable of inflicting various disease symptoms in humanbeing. It is widely distributed in environment. At present, the frequent incidents of food poisoning caused by *Staphylococcus aureus*. Therefore, accurate, rapid and simple detecting assay is of great significance to prevent and control *Staphylococcus aureus* infection. In this study SPA and monoclonal antibodies against SPA were prepared to establish a sandwich ELISA for the detection of the organism. The principal researchs are as the following.

Isolate and purify Staphylococcal protein A (SPA) and study it's specificity. The SPA was use heat PBS isolated and purified by SephadexS-200 Gel Chromatography. and protein contents of SPA was 0.506 mg/mL. SDS-PAGE showed single protein band with relative molecular mass of about 12Kd. A high purity, activity natural SPA was successfully acquired.

Produce Monoclonal antibodies (McAbs)directed against the SPA. Hybridoma cells were obtained by fusion of myeloma cells with lymphocytes from BALB/c mice immunized with heat-killed *Staphylococcus aureus* cells. Postive clones were selected using indirect ELISA with *Staphylococcus aureus* and SPA as antigens. Finally, nine McAbs specific for the SPA of *Staphylococcus aureus* were obtained. The six McAbs reacted with *Staphylococcus aureus* and SPA, no cross-reactivity was observed with other tested strains. Two of the McAbs 3B11 and 4F7 were proved to be specific for the , and agglutinated *Staphylococcus aureus* wol-04 cells well. They are of IgG1 and IgG3 subtype, and have high specificity stability and titer.

3B11 was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) by using an improved sodium periodate oxidation method. The sandwich ELISA format was developed to detect *Staphylococcus aureus* using 4F7 as the capture-antibody and 3B11-HRP as the detection antibody. This assay is specific for *Staphylococcus aureus* and showed no cross reaction with the tested non- *Staphylococcus aureus* strains. The detection limit is  $1 \times 10^5$ CFU/mL in pure culture of *Staphylococcus aureus*. The sandwich ELISA provides a reliable, sensitive and rapid assay for the detection of *Staphylococcus aureus*, and would be used to detect *Staphylococcus aureus* combined with other

assays.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* protein A ; Monoclonal antibody; sandwich ELISA

## 前言

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 简称“金葡菌”) 是一类极其常见的革兰氏阳性菌, 隶属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)。在自然界分布极其广泛, 空气中、水、土壤、灰尘及人和动物的排泄物中都不缺乏金葡菌的踪影<sup>[1]</sup>。金葡菌分泌的葡萄球菌肠毒素 (*Staphylococcal enterotoxin*, SE) 是引起食品中毒的致病因子<sup>[2]</sup>, 在食品受金葡菌污染的机率及高, 由金葡菌引发的食物中毒主要属于毒素型中毒, 是由进食金葡菌肠毒素污染的食物引起的; 金葡菌容易污染的食品包括奶、肉、蛋、鱼类及其制品<sup>[3]</sup>, 几乎包括了所有的食品, 如干酪、香肠等发酵食品<sup>[4]</sup>。在北美及欧洲等发达国家最为多见, 据相关数据统计每年由金葡菌引起的食物中毒病例是仅次于由沙门氏菌引起的食物中毒病例, 因而金葡菌肠毒素是一个严峻的世界性卫生问题<sup>[5]</sup>。据Martin 2004年的统计, 在美国由金葡菌分泌的肠毒素所引起的食物中毒事件占到整个细菌性食物中毒事件的33%, 在加拿大的统计中更是达到45%<sup>[6]</sup>。在我国每年金葡菌引起的食物中毒事件也屡有报道<sup>[7]</sup>, 金葡菌在细菌性食物中毒事件中仅次于沙门氏菌和副溶血弧菌引起的食物中毒的病原菌<sup>[8]</sup>。在临床医学上, 它是一种条件性致病菌, 常因皮肤伤口的感染而发病。寄居在人和动物的皮肤粘膜、鼻腔、咽喉及胃肠道等处。主要呈现皮肤软组织感染、肺炎、心包炎、脑膜炎、败血症及脓毒血症等, 因此金葡菌感染与艾滋病、肝炎称为世界三大难治传染性顽症<sup>[9]</sup>。

所以对消费食品、药品和日常用品中金葡菌的监控及检测以及临床金葡菌的准确诊断是确保人类健康的首要措施, 发达国家和大部分发展中国家对消费食品、医疗用品等的金葡菌检测指标都有严格规定。目前, 我国最新食品安全国家标准方法 (GB/T 4789.10-2010) 统一采用成品Baird-Parker 平板和血平板相结合的传统方法进行食品中金葡菌的检测。虽然国标法检测所需的实验器材要求

不高，容易推广，因而具有廉价，能够较准确的进行定性定量检测分析等优点，但是国标发的局限性也比较明显，国标报告检验结果需5d左右，加之检验方法步骤极其繁琐，费时费力，难于满足金葡菌的检测需要<sup>[10]</sup>。这就对金葡菌快速、准确、简便的各种检测方法提出了新的要求。

免疫学检测方法尤其是免疫层析法、酶联免疫吸附法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）和免疫传感器技术，由于其操作简单、准确、检测速度快，可用于现场快速检测，在食品卫生检验中得到了广泛的应用。因而制备针对金葡菌的具有高特异性、高亲和力的单克隆抗体是免疫学检测的基础。单克隆抗体是针对某一抗原位点的具有高度专一性的抗体，具有特异性强、生物活性专一、便于大量制备等优点，因此在免疫学检测中得到了广泛的应用推广。但是细菌表面抗原组成比较复杂，制备细菌特异性单抗的关键点和难点在于选取合适的细菌表面抗原，并制备针对细菌表面抗原的单克隆抗体。金黄色葡萄球菌蛋白A（*Staphylococcal protein A*，SPA）是金葡菌细胞壁的特异组成表面抗原<sup>[11]</sup>，因此，SPA是制备金葡菌特异性单抗的比较理想的筛选抗原。

基于以上背景，本实验旨在制备具有高纯度、强免疫反应性、可用于单克隆抗体筛选的SPA抗原，并将其作为筛选抗原，利用细胞融合技术制备鼠原针对金黄色葡萄球菌的特异性单克隆抗体，为金葡菌的快速检测和防治提供物质基础

## 第一章 金黄色葡萄球菌快速检测方法的研究进展

金黄色葡萄球菌的快速有效检测方法按照检测机理划分可以分为4类：一是培养基法；二是免疫学方法；三是以核酸为基础的分子生物学方法；四是非传统的新型检测方法。以下将对金葡菌的快速检测方法从检测特异性、检测速度、极限、简便性、检测成本、器材要求以及对被检样品的要求等几个方面着重对每种检测方法进行介绍。

### 1 培养基法

由于培养基法具有使用方便、操作容易、灵敏高、成本降低等优点，国内外科学家对传统培养基法进行改良，发明了金葡菌快速检测的成品显色培养基和鉴别培养基方法。

显色培养基鉴别培养基较传统培养基相比有巨大的优势。首先它具有较高的灵敏度，在培养之前不需要增菌；其次由于其特异性较高，假阳性机率比传统的培养基低，因而大大能减少确认试验的量，节省大量人力、财力和时间<sup>[12]</sup>。多个国际知名的培养基公司都积极致力于显色培养基的研发和优化。法国科玛嘉

(Chromagar)公司的 CHROMagar Staph aureus 是目前鉴别金葡菌比较成熟的显色鉴定培养基之一。CHROMagar Staph aureus 成品显色培养基经划线接种，37℃培养24h后仅需通过观察菌株颜色就可判定，即凡是紫红色、红色和粉红色菌落即可基本认定是金黄色葡萄球菌，如需进一步确认结果，可挑取菌落进行革兰氏染色镜检、血浆凝固酶试验。刘钰等对50份牛乳样品中金葡菌的检测，分别使用金葡菌标准检验方法和显色培养基进行检测，其中21份均检出阳性样品，结果金葡菌标准检验方法和显色培养基检测结果一致<sup>[13]</sup>。此外，BD公司的BBL

CHROMagar Staph aureus, 生物梅利埃公司的*Staph aureus* ID 和3M 公司的 Petrifilm Staph Express Count Plate等均是目前比较成熟常用的鉴别金葡萄菌的快速显色培养基。

## 2 免疫学方法

免疫学技术通过抗原和抗体的特异性结合反应,再辅以免疫放大技术来鉴别细菌。免疫性方法可分为传统免疫学方法和标记免疫学方法,传统免疫学方法有免疫琼脂扩散法、乳胶凝集试验、反向间接血凝试验(Reversed Passive Hemagglutination, RPHA)、反向被动乳胶凝集实验(Reversed Passive Latex Agglutination, RPLA)。标记免疫学方法有免疫荧光法(Immunofluorescence Assay, IFA)、放射免疫检测法(Radioimmuno Assay, RIA)、酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫印迹技术(Immunoblotting Technique, IBT)、免疫层析法(Immunochromatographic Test, ICT),最典型的是酶联免疫吸附试验(ELISA)。下面将从中选取几种常见的免疫学检测方法进行简要的介绍。

### 2.1 乳胶凝集试验

乳胶凝集试验检测金葡萄菌的基本原理是抗原结合抗体反应,有区别的是所用的抗体包被到了可吸附金葡萄菌特异性抗体的乳胶颗粒表面,使得抗原与抗体发生结合反应时产生快速明显的肉眼可观察的凝集反应。在乳胶凝集试验中,通常采用表面包被有抗体的有色乳胶颗粒或胶体颗粒检测金葡萄菌菌体细胞悬液。如果悬液中存在特异性的抗原,就可形成肉眼可观察的凝集现象或沉淀。虽然凝集反应非常简便快速,但灵敏度不高,检测前常常需要进行大量的增菌才能进行实验<sup>[14]</sup>,但是增菌培养通常不可避免的会被污染,从而也是的检测结果准确度降低。法国

生物梅里埃公司的Slidex Staph-kit 在对检测样品进行24h增菌后, 20 s即可判断出结果。Trisum公司的Aureus Tset™ 也是一种检测金葡菌的凝集试验材料从食品中分离金黄色葡萄球菌的快速检测鉴定方法, 对待测样品进行24h增菌后1 min内便可观察结果。孔海深等<sup>[15]</sup>以PCR检测方法为查考标准, 用乳胶凝集实验检测耐甲氧西林葡萄球菌的敏感性为100%, 特异性为98.8%。乳胶凝集实验虽然据有凝集反应迅速, 但是, 在检测前需要大量增菌, 增菌过程相当费时, 使得总检测时间较长, 除此, 增菌培养通常不可避免的会被污染, 从而也是的检测结果准确度降低。现今在快速检测金葡菌中极少有人应用。

## 2.2 酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是最早也是最普遍的用于检测食品中病原菌的抗体标记检测方法。ELISA将抗原抗体之间的特异性免疫反应与酶对底物的高度催化效应结合起来, 以酶促反应的放大作用来显示初级免疫反应。检测时将待检样品和酶标抗原或抗体与结合在固相载体上的抗原或抗体结合形成复合物, 然后加入底物显色, 根据颜色的深浅即可确定被测物含量。此法可直接检测溶液中的肠毒素, 在检测SE方面, 使用ELISA 方法的报道最多<sup>[16]</sup>。Kim E. Sapsford 等<sup>[17]</sup>使用ELISA 法检测SEB 时应用微型化96微孔酶标板, 并使用可携带的色度法检测器, 使得检测更加方便, 易于开展, 检测时每孔样品量低至5  $\mu$ L。商品化的ELISA试剂通常为“夹心法”, 即用包被在固相载体上的抗体捕捉增菌培养基中的抗原(细菌或毒素), 然后加入酶标记的另一种抗体, 从而形成“抗体-抗原-抗体”的夹心复合物。最后加入显色底物, 经酶解和终止反应后, 用肉眼或酶标仪判定结果<sup>[18]</sup>。王晶等<sup>[19]</sup>应用双抗体夹心法检测食品中SE, 其灵敏度达到1 ng/mL, 且检测不需要增菌培养, 检测速度大大提高, 4 h 就可以得出准确结果。龙军等<sup>[20]</sup>通过大量验证改进建立的双抗夹心ELISA, 采用生物素标记SEB 单克隆抗体作为检测抗体检测SEB, 灵敏度更是达到

0.078 ng /L。该方法充分利用SEB单克隆抗体和SEB反应的特异性和生物素—亲和素系统的放大原理使得检测灵敏度显著升高达到 ng 级别, 比普通的ELISA 灵敏度提高2 ~ 5倍。Poli Mark A等采用改良的色度法ELISA<sup>[21]</sup>检测SE时, 在检测缓冲液中灵敏度为0.5 ng /mL, 在实际样品人尿中的的检验中灵敏度为0.1 ng /mL。总的来说ELISA在检测方面具有特异性高、灵敏度高、可检测大批量的样品等优点。

### 2.3 放射免疫分析法(Radioimmuno Assay, RIA)

放射免疫分析法(Radioimmuno Assay, RIA)是利用同位素标记的与未标记的抗原同抗体发生竞争性抑制反应的放射性同位素体外微量分析方法, 又称竞争性饱和分析法<sup>[22]</sup>。1968年Miles和Hales建立了利用核素标记的抗体检测抗原的放射分析法。RIA法的优点是灵敏、特异、简便易行、用样量少等优点, RIA灵敏度达pg级别, Collins等用RIA 检测SEA, 结果显示检测限达到0.01  $\mu$ g /mL级别<sup>[23]</sup>。RIA虽然也是使用放射性物质进行标记检测, 但一般都是在检测样品时再加入标记的同位素示踪物, 此示踪物的放射性强度极低, 一般不会对实验者引起辐射损伤<sup>[24]</sup>。RIA虽然具有灵敏度高、特异性强、操作简单等优点, 但其缺点也比较突出如易出现交叉反应、假阳性结果, 组织样品的检测不够迅速需要处理, 不能灭活降解酶和盐及pH有时会影响结果等<sup>[25]</sup>。

## 3 分子生物学方法

20世纪以来随着分子生物学及分子遗传学的飞速发展, 使得科研工作者对微生物的研究探索逐渐从外部形态结构特征逐步转向内部基因型及其表达功能特征的研究, 对微生物的检测也相应的从传统生化反应、免疫方法转向基因分子水平的检测<sup>[26]</sup>。金葡菌的侵染致病能力强弱很大程度上取决于其分泌的毒素和侵袭



性酶类。而这些致病因子的基因的鉴定(包括耐药性相关基因、肠毒素基因、凝集酶基因及多种特异性性状基因)使得分子生物学检测方法成为近年来广泛应用于食品及各个领域致病微生物快速检测的高效方法<sup>[27]</sup>。

### 3.1 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction , PCR)

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction , PCR), 即 PCR 技术, 是一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法, 由高温变性、低温退火(复性)及适温延伸等几步反应组成一个周期, 经过大约 25 个循环, 使目的 DNA 片段得以迅速大量体外扩增<sup>[28]</sup>。目前用于设计特异性引物来检测金黄色葡萄球菌的基因有: 编码耐热核酸酶的 *nuc* 基因, 内毒素基因( *sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see* 等), 16S-23SrDNA, *tst* 基因, *eta* 和 *etb* 基因等均是金葡菌的特异基因。Michael 采用有机物提取 DNA 的方法进行实时 PCR 检测金葡菌<sup>[29]</sup> 全过程仅耗时 3 h; Thomas 采用实时 PCR 检测金葡菌 *mecA* 的基因灵敏度为 97%, 特异性为 100%<sup>[30]</sup>; 其后 Thomas 又采用实时 PCR 检测金葡菌 *nuc* 基因进行检测比较灵敏度为 98%, 特异性为 100%<sup>[31]</sup>。Chiang 经过 10 h 的样品富集处理后实时 PCR 灵敏度可达 1 cfu/mL<sup>[32]</sup>。Athanasia 采用多重单管 PCR 扩增金葡菌 *nuc* 基因, 多重单管 PCR 灵敏度达到了惊人的 100%, 特异性为 100%<sup>[33]</sup>; Fischer 应用 4 重 PCR 完成检测 18 种金黄色葡萄球菌肠毒素只需 3 h<sup>[34]</sup>。

### 3.2 实时荧光定量-聚合酶链反应(Real-Time Fluorescent Quantitative PCR, FQ-PCR)

目前, 在 PCR 定性技术基础上发展起来的核酸定量技术—实时荧光定量 PCR 技术(Real-Time Fluorescent Quantitative PCR, FQ-PCR) 是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准

曲线对未知模板进行定量分析的方法<sup>[35]</sup>。普通PCR检测金葡菌虽然有灵敏度高、特异性强的优点,但是在检测操作过程中容易受到污染,出现假阳性结果。荧光定量PCR相对于定性普通PCR具有定量与扩增同步进行、灵敏度高、特异性强、自动化程度高、受污染程度小、准确性高等特点。目前金黄色葡萄球菌FQ-PCR技术已应用于医学研究等领域。徐德顺等<sup>[36]</sup>通过实时荧光定量-聚合酶链反应检测食品中金黄色葡萄球菌,其最低检测极限可达44cfu/mL。Klotz用实时荧光定量-PCR分别检测葡萄球菌肠毒素A、B、C、D的基因sea、seb、sec、sed检测均达到较高的灵敏度和特异性<sup>[37]</sup>。苏明权通过实时荧光定量-PCR设计金黄色葡萄球菌femB基因引物和探针检测金葡菌,检测极限为 $10^2$  copy/mL,特异性为100%<sup>[38]</sup>。

### 3.4 基因芯片技术(gene chip , DNA chip)

基因芯片技术(gene chip , DNA chip)也称DNA芯片技术,实际上就是一种大规模集成的固相杂交,是指在固相支持物上原位合成寡核苷酸或者直接将大量预先制备的DNA探针以显微打印的方式有序地固化于支持物表面,然后与标记的样品杂交。通过对杂交信号的检测分析,得出样品的遗传信息(基因序列及表达的信息)。由于常用计算机硅芯片作为固相支持物,所以称为基因芯片<sup>[39]</sup>。基因芯片技术是利用碱基互补配对原理的检测技术。作为新一代基因诊断技术,DNA芯片的突出特点在于快速、高效、敏感、经济、平行化、自动化等,与传统基因诊断技术相比,基因芯片技术具有明显的优势<sup>[40]</sup>。唐晓敏<sup>[41]</sup>通过PCR扩增检测靶基因,采用基因芯片与扩增产物在一定条件下进行杂交,杂交结果通过Scan Array 3000芯片扫描仪读取并与标准杂交图谱比较,从而判定样品中细菌的种属。对分离的20株细菌进行了基因芯片的杂交检测,并用传统方法对这些菌株进行了鉴定,基因芯片检测结果与传统方法鉴定结果的一致性为95%。赵金毅等<sup>[42]</sup>利用特异性引物进行PCR扩增,并利用固定

于可视芯片的特异探针与扩增产物进行杂交反应加以鉴定。利用可视芯片技术可以准确的检出沙门氏菌属和金黄色葡萄球、小肠结核肠炎耶尔森氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌3种食品中常见致病菌,检测灵敏度可达 $8.5 \times 10^1$  cfu/ mL。何洋<sup>[43]</sup>采用基因芯片技术对食品中金黄色葡萄球菌进行检测,在检测16SrRNA扩增后用制备的基因芯片进行杂交反应,得到金黄色葡萄球菌特异性的杂交图谱。应用基因芯片对从食品中分离的金黄色葡萄球菌进行检测,基因芯片检测的灵敏度可达到6.6cfu/mL。邢建明等<sup>[44]</sup>建立的导流杂交芯片技术可以在3h内同时检测8种常见肠道致病菌。基因芯片技术因为是全封闭,避免了交叉感染;且通过控制分子杂交的严谨度,使基因诊断的假阳性率、假阴性率显著降低。

## 4 其他检测方法

### 4.1 表面等离子共振技术

表面等离子共振技术是近年来迅速发展起来的用于分析生物分子相互作用的一项技术,它利用全反射时入射光可以和金属表面的等离子发生共振的原理,探测生物分子之间是否发生作用以及反应的动力学参数。该技术目前已广泛应用于免疫学、蛋白质组学、药物筛选、蛋白质与核酸相互作用等各个领域,并获得了许多用其它方法无法得到的动力学数据<sup>[45]</sup>。Shankar Balasubramanian等<sup>[46]</sup>使用裂解性噬菌体作为特异性选择探针,以SPREETA™表面等离子共振传感器作为检测平台,检测金黄色葡萄球菌能达到 $10^4$ cfu/mL。此外,表面等离子共振技术相对免疫法和核酸技术不易受敌对的环境压力,如温度,pH值,离子强度,和交叉反应的影响且灵敏度高。

## 4.2 免疫传感器技术

免疫传感器是耦联含有抗原/抗体分子的生物敏感膜与信号转换器的一种新型生物传感器。免疫传感器的工作原理和传统的免疫测试法相似,都属于固相免疫测试法,其测定原理基于把抗原或抗体固定在固相支持物表面,来检测样品中的抗体或抗原并结合形成稳定的抗原抗体复合物,抗原与抗体发生反应后可导致多种信号发生改变如重量、光学、热学、电化学等方面,然后通过信号转换器转变为相应的数字化的电信号、光信号等,从而达到定量分析的目的<sup>[47]</sup>。免疫传感器具有灵敏度高、特异性强、使用简便、对抗原-抗体反应进行实时监测等优点,被列为迈向21世纪五大医学检验技术之一<sup>[48]</sup>。目前常用的有电化学免疫传感器、质量检测免疫传感器和光学免疫传感器。

Ho等<sup>[49]</sup>建立了基于流动注射微脂体免疫分析法的免疫传感器,这个系统用到了在弹性石英表面的夹心检测法,其二抗被涂有荧光染料的微脂体标记,反应后裂解微脂体进行荧光检测,此系统对经高温灭活的金黄色葡萄球菌的检出限是 $3.6 \times 10^2$  CFU/ml。刘岚等<sup>[50]</sup>应用双分子层脂质膜核酸生物传感器检测SEB,可在24 h内完成,检测SEB灵敏度为20 ng/mL。Mahmoud Labib等<sup>[51]</sup>采用金电极免疫传感器检测SE,检测SE最低检测限为0.3 pg/mL,1.5h内检测 $2.0 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^8$  CFU/ml的目标菌,并可重复再生使用,SE浓度在2.8 pg/mL ~ 2.8 ng/mL范围内获得较好的线性关系。

## 5 金黄色葡萄球菌检测发展方向及其应用展望

微生物检测工作将向着更快速、更简易、更准确的方向发展。微型化生化试剂盒因其自身具有的轻便、快速、简易的优势将成为未来微生物检测中较有前景的重要手段之一。PCR技术可以快速特异地扩增任何期望的DNA片断和目的基因,因而在食品检验领域有重要的实际应用价值。20世纪以来,在计算机技术快

速发展下，微生物检测方法开始向自动化、微量化、系列化的方向发展，一系列的检测仪器开始应用于微生物检测<sup>[52]</sup>。龙军等<sup>[53]</sup>结合PCR和ELISA 的联合检测方法，能检测3.0 fg金黄色葡萄球菌肠毒素A（SEA）的DNA。因而从目前研究情况来看，几种主流方法相结合的方法能大大提高金黄色葡萄球菌的灵敏度，是检测金黄色葡萄球菌的发展趋势。其检测方法也正朝着低检测限、高特异性、快速化、简便化、经济、自动化的方向不断发展。

## 第二章 金黄色葡萄球菌蛋白 A 抗原的提取及特异性鉴定

### 1 材料及试剂

#### 1.1 菌种

实验菌株:金黄色葡萄球菌标准株wo1-04株,由珠海出入境检验检疫局提供。

#### 1.2 主要生化试剂

牛肉膏、酵母抽提物(OXOID);牛血清白蛋白(BSA)(北京利科恒达科贸有限公司);十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris碱(华美);丙烯酰胺、双丙烯酰胺(Merck);羊抗人IgG-HRP(北京博奥森生物制品有限公司);底物(Promega);丙种球蛋白(Sigma);四甲基联苯胺(TMB)(Sigma);葡聚糖凝胶SephadexS-200(Amersham Biosciences)。

#### 1.3 仪器设备

电热恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司),酶标检测仪(Thermo Labsystems),洗板机(Thermo Labsystems),低温冷冻离心机(Beckman),高速离心机(Eppendorf),电泳仪、垂直板槽(bio-rad),蛋白浓度测定仪(Eppendorf),ÄKTA prime 蛋白纯化系统(Amersham Biosciences)。

#### 1.4 试剂配制

##### 1.4.1 改良肉汤培养基

10g牛肉膏,2.5酵母抽提物,30g胰蛋白胨,1g葡萄糖,2g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 43g NaCl,用超纯水溶解,用盐酸或氢氧化钠调pH值为7.8,定容至1L,0.11MPa高压下灭菌15min。固体培养基加2%的琼脂。

##### 1.4.2 SDS-PAGE 电泳所需试剂

(1) Tris-甘氨酸缓冲液:称取Tris 3.02g、甘氨酸 18.8g、SDS 1.0g,加入1000mL超纯水。

- (2) 30%丙烯酰胺储液：丙烯酰胺 30g、甲叉双丙烯酰胺 0.8g 溶于 70mL 超纯水中，避光保存。
- (3) 1.0mol/L Tris-HCl (PH6.8)：称取 Tris 12.114g，加入 80mL 超纯水中，浓盐酸调 pH 至 6.8，然后定容至 100mL。
- (4) 1.5mol/L Tris-HCl (PH8.8)：称取 Tris 18.171g，加入 80mL 超纯水中，浓盐酸调 pH 至 8.8，然后定容至 100mL。
- (5) SDS-PAGE 上样缓冲液：1.0mL 1.0mol/L Tris-HCl (PH6.8)、0.05mL 10%SDS、0.8mL 甘油、0.4mL 2-巯基乙醇、0.2mL 0.25%溴酚蓝、4mL 超纯水。
- (6) 5%浓缩胶：0.63mL 1.0mol/L Tris-HCl (PH6.8)、0.83mL 30%丙烯酰胺、0.05mL 10%SDS、0.05mL 10%过硫酸铵、0.005mL TEMED、3.4mL 超纯水。
- (7) 12%分离胶：2.5mL 1.5mol/L Tris-HCl (PH8.8)、3.8mL 30%丙烯酰胺、0.1mL 10%SDS、0.1mL 10%过硫酸铵、0.004mL TEMED、3.3mL 超纯水。
- (8) 染色液：配制 100mL 染色液：45mL 甲醇、45mL 超纯水、10mL 冰乙酸、0.25g 考马斯亮蓝。
- (9) 脱色液：配制 100mL 染色液：45mL 甲醇、45mL 超纯水、10mL 冰乙酸。

### 1.4.3 ELISA 检测所需试剂

- (1) 包被液：1.59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、2.93g  $\text{NaHCO}_3$  溶于 1000mL 超纯水。
- (2) 封闭液：0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 500mL，高压灭菌后加入 1.25 g BSA、1.25 g casein 以及 10g 蔗糖，37°C 溶解，-20°C 保存。
- (3) 洗涤液 (PBS-T 溶液)：称取 28.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、80g  $\text{NaCl}$ 、2g  $\text{KCl}$  溶于 500mL 去离子水中，加热融化，冷却后加入 5mL T-20，用前用去离子水 20 倍稀释。
- (4) 样品稀释液 (样稀)：洗涤缓冲液 100mL，加入 0.1g BSA，4°C 保存。
- (5) 酶稀释液 (酶稀)：洗涤缓冲液 100mL，加入 5mL 兔 (或羊) 血清，4°C 保存。
- (6) 终止液：2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50mL 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  加到 400mL 三蒸水中)。

## 2 方法

### 2.1 金黄色葡萄球菌的培养

取金黄色葡萄球菌标准株 w01-04 株一支复苏，在普通肉汤平板上划线接种，37°C 培养 16h，选取典型单菌落接种于营养肉汤培养基，在 37°C，200r/min 的摇床培养 12h，经 75°C 水浴 30min 灭活后，在高速冷冻离心机中 5500rps 离心

10min生盐洗菌3次。加pH5.9, 0.2M PB制成20%的菌悬液

## 2.3 SPA 粗提

将pH5.9, 0.2M PB制成20%的菌悬液, 置于沸水浴中1h, 冰浴冷却, 高速冷冻离心机12000rpm离心15min, 留上清用1N HCl调到pH3.0, 静置10min 12000r/min离心15min弃掉上清, 再加入等体积的0.01 mol/L的 PBS溶解沉淀, 加无水乙醇调到乙醇浓度为70%后静置10min再以12000r/min离心15min。收集到的蛋白沉淀用等体积的pH7.4, 0.01mol/L的PBS溶解制得粗SPA用于SephadexS-200凝胶层析。

## 2.4 纯化

### 2.4.1 分离纯化 SPA

先用0.2N NaOH 处理SephadexS-200凝胶 30min后用0.01mol/L pH7.2的PBS漂洗直到pH7.2时装入50cm×1.5cm有机玻璃柱。打开ÄKTA prime蛋白纯化系统, 设置洗脱液流速为1mL/min, 每管收集量10mL, 压力0.2MPa, 检测波长为280 nm。洗脱液用PBS (pH7.4, 0.01mol/L) 检测UV值, 平衡后(当UA值小于20mAu并恒定)上样, 上样量为柱体积的1/10左右。根据UV值选择峰段开始分管收集洗脱液, 测蛋白浓度。

### 2.4.2 选择收集 SPA

将各收集管含有蛋白的洗脱液用包被液稀释到相同的蛋白浓度后同丙种球蛋白作间接 ELISA 反应, 具体操作偶步骤如下:

(1) 包被: 各管洗脱液以蛋白浓度 1 μg/mL 包被聚苯乙烯板, 100ul/每孔 37°C水浴 2h, 4°C过夜。

(2) 封闭: 洗涤液洗涤三次后, 加入封闭液, 120ul/每孔, 37°C水浴 2h。

(3) 加丙种球蛋白: 取丙种球蛋白, 用样品稀释液 0.1μg/mL, 依次加入酶标板中, 100ul/每孔, 每个样设复孔, 37°C水浴 30min, PBST 洗涤 4 次。

(4) 加羊抗人 IgG-HRP: 加入酶稀释液稀释的(1:20000) HRP 标记的羊抗人 IgG, 50μl/每孔, 37°C水浴 30min, PBS-T 洗涤 5 次。



(5) 显色: 加入底物 TMB 100 $\mu$ L/每孔, 37 $^{\circ}$ C 水浴显色 10min。

(6) 终止: 加入 2M $H_2SO_4$  终止液, 50 $\mu$ l/每孔, 终止显色, 酶标检测仪测定 OD<sub>450</sub>。

根据上述步骤, 包被时以包被液、PBS 和 1  $\mu$ g/mL BSA 包被作为阴性对照孔, 灭活的金黄色葡萄球菌以  $1 \times 10^7$  包被作为阳性对照, 加丙种球蛋白时留一孔不加丙种球蛋白作为空白对照孔, 根据 OD<sub>450</sub> 值的高低可以判定反应的强弱收集值高的管。

## 2.5. 纯度及相对分子量检测

采用 SDS-PAGE 电泳 配制 12% 分离胶, 5% 的浓缩胶, 上样分别为 1  $\mu$ g、10  $\mu$ g, 80V 电压直至样品进入分离胶, 然后以 120V 电泳至溴酚蓝迁移到分离胶末端。考马斯亮蓝染色分析所提纯 SPA 的纯度和分子量。

## 3 结果

### 3.1 金黄色葡萄球菌的培养

复苏的菌种划线培养得到单个菌落, 500mL 的改良肉汤培养基摇床培养 12h 能收获 5g 菌 (湿重)。

### 3.2 SPA 的提取和纯化

粗提过的 SPA 经 ÄKTA prime 蛋白纯化系统, 洗脱液分离出峰见图 2-1, 蛋白浓度见表 2-1。与丙种球蛋白的反应强度经间接 ELISA 法检测, 2 号收集管和 3 号收集管与丙种球蛋白的反应最强, 各管在相同包被浓度下与丙种球蛋白的反应见图 2-2。合并 2 号收集管和 3 号收集管收集液测得蛋白含量为 0.506mg/mL 共 5.3mL, 经计算 5g 金葡菌共获得 2.682mg SPA。

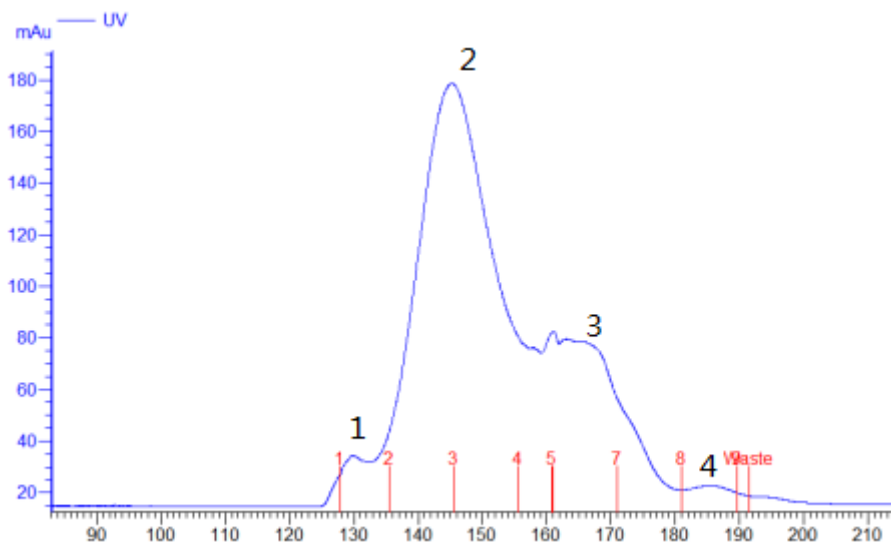


图2-1 葡聚糖凝胶SephadexS-200分离纯化SPA的洗脱曲线

Fig.2-1 The elutiou figure of the extract fraction by SephadexS-200 Ge Chromatography.

表 2-1各收集管蛋白浓度

Tab.2-1 Protein contents of each collection tubes

收集管编号								
1	2	3	4	5	6	7	8	
蛋白浓度 (mg/mL)	0.236	0.530	0.490	0.280	0.246	0.133	0.112	0.102

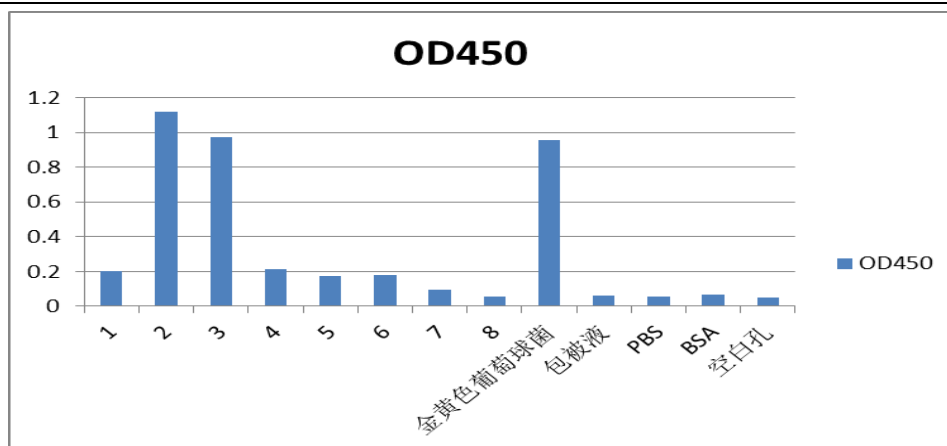


图 2-2 以各收集管为包被抗原间接 ELISA 反应结果

Tab. 2-2 Result of Indirect ELISA with different collection tubes as antigen

### 3.3 SPA 特异性检测

#### 3.3.1 纯度及相对分子量检测

经SDS-PAGE电泳考马斯亮蓝染色后在12KD处有明显的电泳条带。上样量的变化电泳条带的粗细也有不同见图2-3。

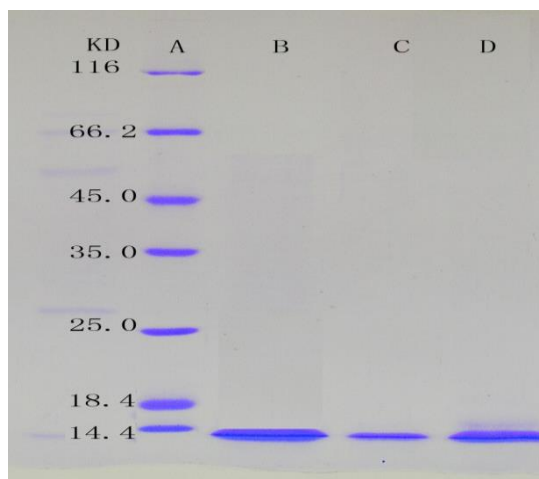


图2-3 SDS-PAGE电泳分析蛋白纯化情况

A: Marker; B: 上样量10  $\mu\text{g}$ ; C上样量1  $\mu\text{g}$ ; D上样量5  $\mu\text{g}$ 。

Fig.2-3 Analysis of purified proteins by SDS-PAGE

A: Protein molecular weight markers; B: Sample of 10  $\mu\text{g}$ ; C: Sample of 1  $\mu\text{g}$ ; D: Sample of 5  $\mu\text{g}$ .

## 4 讨论

黄色葡萄球菌是常见的引起细菌性食物中毒的主要病原菌之一，广泛分布存在于自然环境中<sup>[54]</sup>。SPA是细胞壁抗原的主要成分，大约90%以上的葡萄菌株均含有这种成分<sup>[55]</sup>，SPA能与人及某些哺乳动物血清中IgG的Fc段发生部分结合，基于SPA特有的这种生物学特性，近年来多数研究将SPA用于制备A蛋白亲和吸附凝胶用于纯化相关的免疫球蛋白和单克隆抗体，代替二抗用于人及相应的哺乳动物的各种疾病的抗体，以及用于检查细胞表面IgG等<sup>[56]</sup>。但是由于近年来原核表达

的兴起,多数SPA制品为原核表达,天然免疫活性的SPA的制备受到忽视,而对SPA研究及抗SPA单克隆抗体的制备等以天然SPA为最佳材料。因此本实验提取纯化获得高纯度SPA,并检测其特异性,用于制备抗SPA单克隆抗体的研究及各种免疫学实验研究。

SPA的分离主要有溶葡萄菌素消化分离SPA和热PB浸出提取SPA,本实验应有常见的热PB浸出提取SPA,纯化后的收率为0.506mg/g菌,比冯小黎<sup>[57]</sup>等报道的0.18~0.2mg/g略多。及可能是由于纯化条件的差异造成的,冯小黎用人工测定280吸光值绘制洗脱峰,人工操作会使收率有所偏低。而本实验用的是电脑一体自动化的 ÄKTA prime 蛋白纯化系,避免了人为因素所造成的偏差,因此在得率方面稍有提高。

SPA的相对分子质量由于提取方法和测定方法不同而有所差异,Sjoquist<sup>[58]</sup>等用脱氧核糖核酸酶消化细胞壁后超速离心或用加热抽提法,所测相对分子质量为12000~15000。用沉淀平衡分析和在6mol/L鸟嘌呤盐酸中凝胶过滤,测出相对分子质量为42000。本实验用热PB浸出提取SPA,经SDS-PAGE电泳,SPA分子量在12KD左右与前一种提取方法所测定的分子量范围相符。有学者<sup>[59]</sup>使用非还原SDS-PAGE相对分子质量约为160 000~180 000;以还原SDS-PAGE相对分子质量则是分别约为67 000和34 000。由电泳图片可以看出只有一条清楚的条带,可能还有一部分与之分子量相当的物质,但由于用热PB提取法,多数蛋白质经过100℃沸腾1h早已分解掉,即使残留下来的都很少,因此能用于后面的免疫试验。

免疫扩散法就是将抗原与抗体在琼脂或琼脂糖制备的凝胶中,抗原抗体进行自由扩散而相遇,从而形成抗原抗体的复合物,由于此抗原抗体复合物分子量逐渐增大并发生聚集,不再继续发生扩散从而形成肉眼可见的带状或线状沉淀环。SPA能与人及多种哺乳动物血清IgG分子中的Fc片段进行结合<sup>[60]</sup>,通过琼脂扩散实验当SPA和人血清比例合适时能出现沉淀环,出现共沉

反应的 SPA 与相应的 IgG 必须含有两个结合部位，它们分别在 Fc 和 Fab 段上，缺一不可，如果缺少其中的一段虽能与 SPA 结合，但并不会出现共沉淀反应，这种反应是 Fab 的参与的并非 SPA-抗体反应<sup>[61]</sup>。现已研究表明，IgG 与 SPA 的结合部位是 CH<sub>2</sub> 和 CH<sub>3</sub> 的交界处<sup>[62]</sup>。基于 SPA 的特殊免疫学特性其鉴定方法有，用抗体致敏绵羊红细胞的凝集反应；<sup>125</sup>I 标记的人骨髓瘤 IgG<sub>1</sub> 蛋白的结合试验；荧光标记正常人，兔或猪的 IgG 的结合试验；单向凝胶扩散法；双向凝胶扩散法<sup>[63]</sup>。其中单向凝胶扩散法和双向凝胶扩散法由于实验条件要求不高为常用的方法。本实验制备的 SPA 与人血清的琼脂双扩散校价为 1: 64，一方面初步鉴定了 SPA 的特异性，另一方面检测了 SPA 的活性。鉴定的对于 IgG 的选择普遍以人或动物血清，人或动物血清主要成分除了免疫球蛋白（IgG、IgA 等）。由于 SPA 的特殊免疫学性质，自 70 年代开始，国外应用 SPA 建立了许多敏感、特异性强、快速和简易的实验方法<sup>[66]</sup>，并在许多方面的应用中积累了实际应用的材料，现已广泛应用到免疫学及其相关科学如细胞学、细菌学和病毒学等<sup>[65]</sup>。

## 5 结论

SPA 是金黄色葡萄球菌细胞壁上的重要组成成分，也是金黄色葡萄球菌重要的表面抗原，由于 SPA 的生物学特性近年来有关 SPA 的研究备受关注。经鉴定制备的 SPA 分子量约为 12000，纯度达到免疫纯，活性高，特异性强，是制备抗 SPA 单克隆抗体的理想材料。

## 第三章 金黄色葡萄球菌蛋白 A 单克隆抗体的制备

### 1 材料及试剂

#### 1.1 菌株、筛选抗原、细胞及实验动物

菌株：金黄色葡萄球菌 w01-04、志贺氏杆菌、大肠杆菌 0157、大肠杆菌、婴儿沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、单核增生李斯特氏杆菌、阪崎肠杆菌菌种均由珠海出入境检验检疫局提供。

细胞：小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞由甘肃省医学科学研究院医学生物中心保存。

实验动物：8~12 周龄 BALB/c 小鼠购自兰州大学动物中心。

筛选抗原：SPA 由实验室制备。

#### 1.2 主要仪器设备

酶标检测仪 (Thermo Labsystems); 洗板机 (Thermo Labsystems); CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱 (ShellAB); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 高速冷冻离心机 (BECKMAN); 蛋白浓度检测仪 (Eppendorf); Sephacryl S-300 填料和全自动蛋白纯化仪 (Armashia); 倒置显微镜和光学显微镜 (Olympus); 电泳仪、垂直板槽 (bio-rad); Aquaplus 系列实验室超纯水机 (Aquapro)

#### 1.3 主要试剂

弗氏佐剂、HT 母液 (胸腺嘧啶核苷、次黄嘌呤)、A 母液 (氨基碟呤)、聚乙二醇 (PEG-1000)、鼠源单克隆抗体同型试剂盒 (Sigma)、新生胎牛血清 (兰州民海生物公司); DMEM 培养基干粉 (GIBICO); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (羊抗鼠 IgG-HRP) (北京博奥森生物制品有限公司); 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐/四唑硝基蓝 (BCIP/NBT) 底物 (Promega);

#### 1.4 试剂配制

##### 1.4.1 细胞培养所需试剂

(1) 0.1mol/L 丙酮酸钠溶液：称取 1.1g 丙酮酸钠溶于 100ml 超纯水，过滤除菌，

分装，-20℃保存备用。

- (2) 0.2mol/L 谷氨酰胺溶液：称取 2.9g 谷氨酰胺溶于 100ml 超纯水，过滤除菌，分装，-20℃保存备用。
- (3) 8-氮鸟嘌呤溶液：称取 20mg 8-氮鸟嘌呤，溶于 100ml 超纯水，过滤除菌，分装，-20℃保存备用。
- (4) 无血清 DMEM 培养基：10g DMEM 培养基粉末溶于 1L 超纯水中，搅拌并用  $\text{NaHCO}_2$  调 pH7.4，过滤分装，4℃保存备用。
- (5) 50% PEG：称取 PEG (1000) 5g，高压灭菌后，加入等量无血清培养液，混匀后超净工作台分装，-20℃保存。
- (6) 20% DMEM 完全培养液：78ml 不含血清的无菌 DMEM 培养液、20ml 新生胎牛血清、1ml 0.1mol/L 丙酮酸钠溶液、1ml 0.2mol/L 谷氨酰胺溶液 4℃保存。
- (7) HAT 选择培养液：76ml 不含血清的无菌 DMEM 培养液、20ml 新生胎牛血清、1ml 0.1mol/L 丙酮酸钠溶液、1ml 0.2mol/L 谷氨酰胺溶液、1ml HT 母液、1ml A 母液 4℃保存。
- (8) HT 培养液：77ml 不含血清的无菌 DMEM 培养液、20ml 新生胎牛血清、1ml 0.1mol/L 丙酮酸钠溶液、1ml 0.2mol/L 谷氨酰胺溶液、1ml HT 母液 4℃保存。
- (9) 细胞冻存液：1ml 二甲基亚砷加入到 9ml 新生胎牛血清，4℃保存。

#### 3.1.4.2 抗体亚类鉴定所需试剂

- (1) 终止液：3mol/mL NaOH 称 12g NaOH 溶于 100ml 三蒸水。
- (2) 底物：5ml 0.01MPBS (PH6.8) 中加入 5mg 5-对氨基水杨酸和 50u1 1% $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

#### 1.4.3 染色体计数所需试剂

- (1) 秋水仙素：10mg 秋水仙素溶于 100ml 生理盐水中，过滤除菌，分装，-20℃保存。
  - (2) Giemsa 染色液：取 0.1ml Giemsa 染色原液(37.5ml 甲醇、12.5ml 甘油、Giemsa 染料，三者充分混合溶解，2 周后使用)，加入 0.9ml 1/15mol/L 磷酸缓冲液 (PH6.8)，混匀后，室温保存。
  - (3) 固定液：30ml 甲醇、10ml 冰醋酸，临用前配制。
- ELISA 检测所需试剂参考第二章 1.4.3。

## 2 方法

### 2.1 动物免疫

参照文献<sup>[66]</sup>，选取 6-8 周龄、18~20g 雌性健康 BALB/c 小鼠腹股沟皮下注射卡介苗。一周后取热灭活（65℃，30min）的金黄色葡萄球菌菌体抗原与等量弗氏完全佐剂充分乳化，腹股沟皮下、背颈部皮下、足垫多点注射免疫，每只 0.2mL（菌量约  $10^8$ CFU），间隔 3 周后用弗氏不完全佐剂使用同样方法加强免疫 2 次，抗原浓度每次加倍。融合前三天取金黄色葡萄球菌菌体抗原（生理盐水稀释），腹腔加强免疫，每只 0.2mL（菌量约  $4 \times 10^8$ CFU）。以灭活金黄色葡萄球菌  $10^7$  包板，免疫后的小鼠尾尖采血通过间接 ELISA 测小鼠效价，当效价大于 5000 准备融合，3d 后处死小鼠取脾。

### 2.2 细胞融合与杂交瘤细胞筛选

#### 2.2.1 饲养细胞的制备

取雌性小鼠断颈处死，75%酒精中浸泡体表消毒。拨开皮，用 5mL 的注射器抽取培养皿中的培养液注入小鼠腹腔，反复冲洗几次吸出培养液，细胞计数，使其达到  $2 \times 10^5$  个细胞/mL。将饲养细胞接种于 96 孔培养板中（100  $\mu$  l/孔），置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱备用。

#### 2.2.2 脾细胞的制备

取加强免疫后小鼠，眼眶取血，收集血清为阳性血清，75%酒精中浸泡体表消毒。拔皮无菌取出脾脏，去除结缔组织，用 DMEM 培养基冲洗后放入 200 目灭菌铜丝网中，置小烧杯上，用眼科剪将脾脏充分剪碎后，用玻璃注射器针芯轻轻研磨脾脏，用 DMEM 培养液冲洗。收集脾细胞悬液，并转移到 10 mL 离心管中，1 000 r/m 离心 10min，弃上清，重悬于 5 mL DMEM 培养液中，计数后备用。

#### 2.2.3 细胞融合

选择状态良好且呈对数生长的 SP2/0 细胞，将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来并转移到离心管中，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 5 mL DMEM 悬浮，计数。按 1:5~1:10 的比例将 SP2/0 细胞和脾细胞悬液混匀，1 000 r/min 离心 10min，弃上清。轻轻振动使细胞沉淀松动，用滴管往玻璃管中缓慢加入 1 mL 37℃预热的 50%PEG（1 000），2min 内加完，静置 1~2min。2min 内加入 10mL 37℃预热



的 DMEM。混匀后 800r/min 离心 5min, 弃上清。用 HAT 培养液重悬细胞, 移入 HAT 培养液中, 轻轻混匀, 按 100  $\mu$  l/孔转入加有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

#### 2.2.4 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

融合后根据细胞数量和生长情况第 5 天或第 6 天用 HAT 培养液进行半量换液, 第 8 天, 待细胞长到孔底的 1/4~1/3 时取出细胞上清, 用热灭活的菌体抗原 ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) 结合 SPA (1  $\mu$  g/mL) 为包被抗原包被酶标板, 作间接 ELISA 检测, 以 P/N $\geq$ 3 作为阳性临界值, 用 SP2/0 细胞上清及正常小鼠血清作阴性对照。对检测为阳性的孔采用有限稀释法进行克隆化培养, 第一次亚克隆时换用 HT 培养液, 两周后换为普通完全培养液。

#### 2.2.5 杂交瘤细胞的扩大培养及冻存

单克隆细胞株经过几次单克隆后, 有细胞孔阳性率连续 3 次达到 100% 后开始扩大培养, 将细胞从 96 孔培养板转入 24 孔培养板中, 再由 24 孔板转入细胞培养瓶进行扩大培养。选择状态良好且呈对数生长的细胞, 收集细胞后计数, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用冻存液将细胞悬浮, 液氮罐冻存。

#### 2.2.6 单克隆抗体 Ig 亚类的鉴定

按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定同型试剂盒说明对每株单克隆抗体进行亚类测定。具体步骤如下:

将待测细胞培养上清加入已包被抗原的酶标板中, 100  $\mu$  l/孔, 室温下作用 2h, 洗板 3 次。同型特异试剂 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM 分别用 0.01 mol/L PBS 1 000 倍稀释后, 按 100  $\mu$  l/孔加样, 室温下作用 30min, 洗板 3 次。辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG, 用 0.01 mol/L PBS 4000 倍稀释后, 按 100  $\mu$  l/孔加样, 室温下作用 15min, 洗板 3 次。加入新配底物, 100  $\mu$  l/孔, 室温下作用 10~15min。用 3mol/L 的 NaOH 终止反应, 50  $\mu$  l/孔, 酶标仪读值。

#### 2.2.7 抗原位点分析

用间接 ELISA 法 (金黄色葡萄球菌菌体  $10^7$  cfu/mL 为包被抗原) 检测各单抗细胞上清, 做复孔, 取平均值。同时将各单抗细胞上清加入到已包被好抗原的酶标板中, 100  $\mu$  l/孔, 做复孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 30min, 洗板 4 次; 洗板后再加入另外一株细胞上清, 100  $\mu$  l/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 30min, 洗板 4 次; 羊抗鼠 IgG-HRP 40 000 倍稀释后, 按 50  $\mu$  l/孔加样, 37 $^{\circ}$ C 作用 30min, 洗板 5 次; 加入底物于 37 $^{\circ}$ C 下避

光显色 10 min, 用终止液终止反应, 50 $\mu$ l/孔; 用酶标检测仪测定 OD<sub>450</sub> 值。结果按公式  $AI\%=[2 \times A(1+2) \div (A1+A2)-1] \times 100\%$  计算叠加率。式中:A1 为单抗 1 的 OD<sub>450</sub>; A2 为单抗 2 的 OD<sub>450</sub> 值; A (1+2) 为单抗 1 叠加单抗 2 的 OD<sub>450</sub>。

## 2.2.8 腹水的制备与单克隆抗体的纯化

杂交瘤细胞腹腔注射经液体石蜡处理过的雌性 BALB/c 小鼠, 每只约  $2 \times 10^6$  个细胞, 1~2 周后收集腹水, 1000r/m 离心 10min 除去细胞及脂类取腹水上清。腹水分别经 50%、45%饱和硫酸铵盐析沉淀, Sephacryl S-300 凝胶柱纯化。紫外吸收法测定蛋白含量, 间接 ELISA 检测抗体, SDS-PAGE 电泳分析抗体纯度及抗体轻链和重链分子量。

## 2.2.9 单克隆抗体特异性鉴定

用热灭活法灭活的金黄色葡萄球菌 w01-04 标准株、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏杆菌、阪崎肠杆菌、肠炎沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、单核增生李斯特氏菌。按  $10^7$ CFU/mL 包被板, 检测各株杂单抗特异性。

## 2.3 单克隆抗体的稳定性鉴定

杂交瘤细胞进行体外传代实验, 选取单抗杂交瘤细胞 3B11 和 4F7 进行连续冻存复苏实验和腹水连续传代实验。

### 2.3.1 细胞体外传代试验

取稳定分泌抗体的细胞株在 96 孔培养板连续传代培养三个月, 每传 1 代即收集细胞培养上清, 间接 ELISA 法(金黄色葡萄球菌菌体为包被抗原)测定杂交瘤细胞培养上清的抗体效价, 对比传代前后效价变化情况以分析该细胞株的稳定性。

### 2.3.2 连续冻存复苏试验

3B11 和 4F7 两株杂交瘤细胞冻存一个月后复苏, 观察细胞生长状况, 待其培养传代稳定后用 ELISA 间接法(金黄色葡萄球菌菌体为包被抗原)测定其培养上清的抗体效价, 随后再冻存, 再隔 1 个月后取出复苏, 如此连续冻存复苏 5 次。对杂交瘤细胞培养上清的抗体效价测进行比较分析。

### 2.3.3 腹水连续传代试验

取 3B11 和 4F7 杂交瘤细胞, 采用体内诱生法生产腹水, 收集腹水后, 采集腹水细胞并计数, 按  $2 \times 10^6$  个/只接种于小鼠腹腔, 连续传代 6 次, 间接 ELISA 测定(金黄色葡萄球菌菌体为包被抗原)小鼠各代腹水的效价, 并将这些结果进行比较。

## 2.4 杂交瘤细胞染色体数目鉴定

- (1) 细胞接种: 对培养细胞进行传代, DMEM 完全培养液中培养 48h。
- (2) 秋水仙素处理: 对传代培养了 48h 的细胞进行秋水仙素处理, 使其终浓度为 0.4ug/mL, 继续培养 4-6h。
- (3) 收集细胞: 轻轻吹打已经用秋水仙素处理过的杂交瘤细胞, 1000rpm 离心 10min, 弃上清。
- (4) 低渗处理: 将上述细胞沉淀用 37℃温育的 0.075mol/L 的 KCl 溶液轻轻悬浮, 使终体积为 5mL, 吹打均匀后, 37℃温育 20-30min。
- (5) 预固定: 向管中缓缓加入 1mL 新鲜固定液, 吹打均匀, 1000rpm 离心 10min, 弃上清。
- (6) 固定: 将沉淀再用新鲜固定液慢慢悬浮, 使其终体积达到 8-10mL, 室温固定 15-20min, 1000rpm 离心 10min, 弃上清。
- (7) 再固定: 向管中缓缓加入 8-10mL 新鲜的固定液, 吹打均匀, 室温下固定 30min 后, 1000rpm 离心 10min, 吸取上清, 视细胞量留少量固定液, 悬浮细胞沉淀, 吹打均匀。
- (8) 制片: 载玻片事先用 95%的酒精浸泡, 用三蒸水冲洗干净后, 放入-20℃冰冻。取以上处理的细胞悬浮液, 距载玻片 15cm 高处滴加 1-2 滴, 置酒精灯烤干。
- (9) 染色: 用新鲜的 giemsa 染液染色 10-20min, 用流水缓缓从侧面冲洗, 晾干。
- (10) 镜检: 在油镜下观察, 选择染色体数目清晰, 分散良好的计数, 并拍照保存。

## 3 结果

### 3.1 杂交瘤细胞株的建立与单抗 Ig 亚类鉴定

以菌体结与 SPA 为包被板筛选阳性杂交瘤细胞, 并经过数次亚克隆, 本实验

最终得到 7 株分泌金黄色葡萄球菌和 SPA 单抗的杂瘤细胞，分别命名为：1B7、2G6、3B11、3H5、4F7、5F2、5H4。各单克隆抗体细胞培养上清的反应性与抗体亚类见表 3-1。

表 3-1 杂交瘤细胞上清反应性与单克隆抗体亚类

Tab. 3-1 Isotype of McAbs

McAbs	1B7	2G6	3B11	3H5	4F7	5F2	5H4
Isotype	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG3	IgG1	IgM

### 3.2 单克隆抗体抗原位点分析

采用 ELISA 叠加试验对 6 株杂交瘤细胞株进行配对分析，结果如表 3-2。5H4 Ig 亚类鉴定为 IgM 类单克隆抗体细胞株，由于 IgM 及其不稳定，将其舍去。其余 6 株单抗原不同包被抗原的间接 ELISA 进行检测，其中 3B11、4F7 与金黄色葡萄球菌菌体、SPA、都有较强反应配对率是 58%，4B2、5E6、6G3、7H10 只与 SPA 有较强反应，与菌体反应较弱或不反应。

表 3-2 叠加实验结果

Table 3-2 The result of superposable test

	1B7	2G6	3B11	3H5	4F7
5F2	-	-	-	-	-
2G6	-	-	-	-	-
3B11	-	-	-	-	-
3H5	-	-	-	-	-
4F7	-	-	58%	-	-

### 3.3 单克隆抗体的纯化

采用饱和硫酸铵沉淀法和 Sephacryl S-300 HR 层析法对 3B11 和 4F7 杂交瘤细胞经小鼠体内诱生法所采集到的腹水进行纯化，纯化结果见图 3-1 和图 3-2。

经 ELISA 检测和电泳分析，结果表明，2 号峰峰为单克隆抗体，其他峰均为杂蛋白，3B11 和 4F7 细胞上清和纯化腹水的效价的效价见表 3-3。单抗采用 SDS-PAGE 鉴定纯化后单抗的纯度及分子量分布，图 3-3 显示，纯化后单抗主要有两条蛋白区带，重链分子量为 50KD 左右，轻链分子量在 23-29KD 之间。

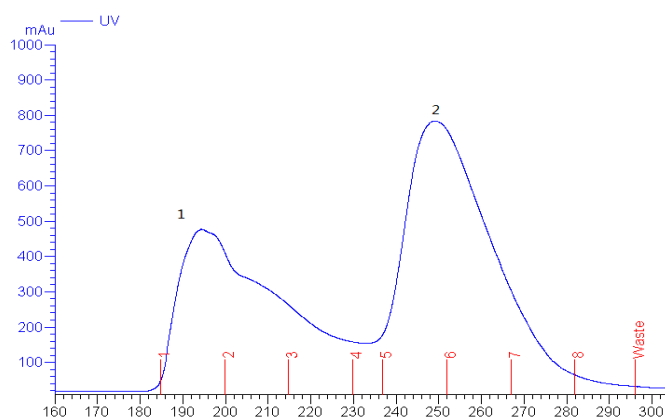


图 3-1 3B11 腹水纯化图

Fig.3-1 Purify ascitic fluid of 3B11

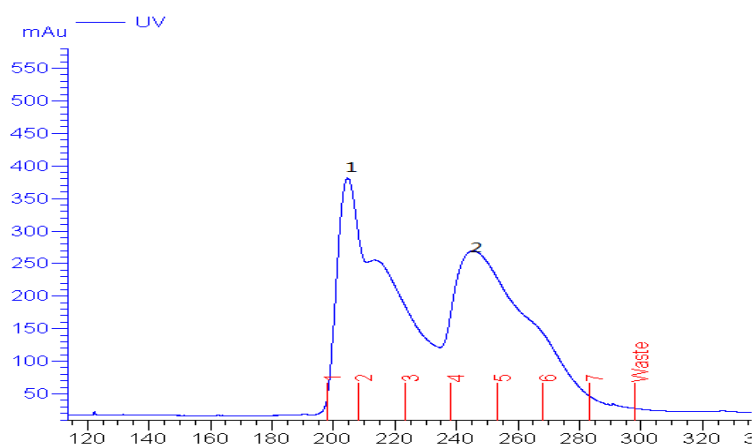


图 3-2 4F7 腹水纯化图

Fig. 3-2 Purify ascitic fluid of 4F7

表 3-3 mAbs 细胞上清和纯化腹水的效价测定结果

Table 3-3 The result of detecting titers of mAbs' cultuer supernatant and puiefied ascies

mAbs	以全菌作为包被抗原		以 SPA 作为包被抗原	
	细胞上清效价	纯化腹水效价	细胞上清效价	纯化腹水效价
3B11	1:1280	1: 32000	1:2560	1: 64000
4F7	1:640	1: 16000	1:1280	1: 32000

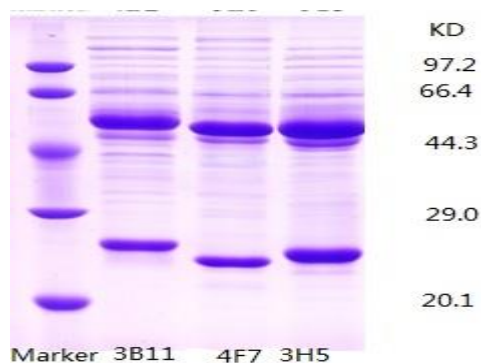


图 3-3 纯化后单克隆抗体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 3-3 SDS-PAGE analysis of purified ascitic fluid

### 3.4 单克隆抗体的稳定性测定

6 株单抗用 96 孔板体外连续传代培养 3 个月，结果见图 4，各株单抗体外传代后细胞上清抗体效价保持稳定。单克隆抗体 3B11 和 4F7 经连续冻存复苏实验，以金葡菌为包被抗原所测的细胞上清效价保持稳定分别为 1280 和 640（图 3-4，3-5）。单克隆抗体 3B11 和 4F7 经腹水连续传代实验，其腹水效价基本保持稳定，结果见图 3-6。

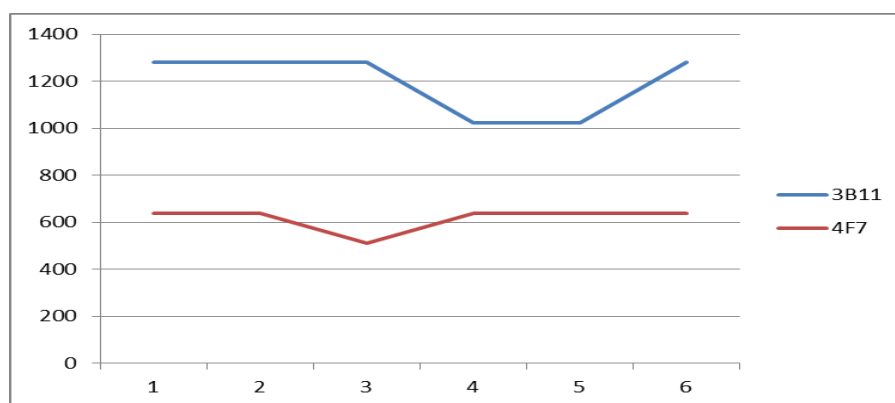


图 3-4 3B11 和 4F7 传代细胞上清效价

Fig.3-4 The titers of 3B11 and 4F7 in each generation

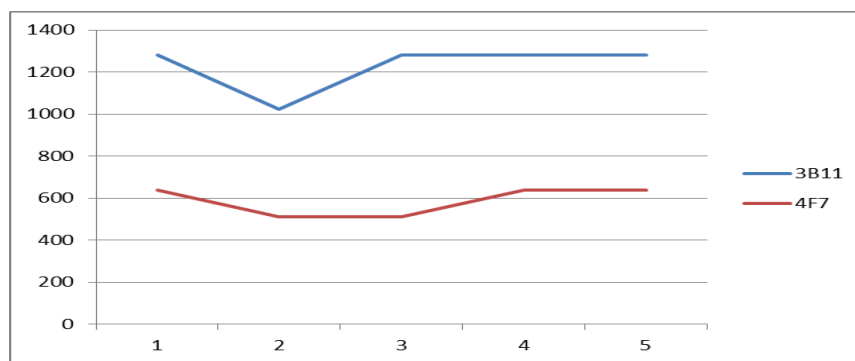


图 3-5 3B11 和 4F7 反复冻存后的细胞上清效价

Fig.3-5 The titers of 3B11 and 4F7 after revive

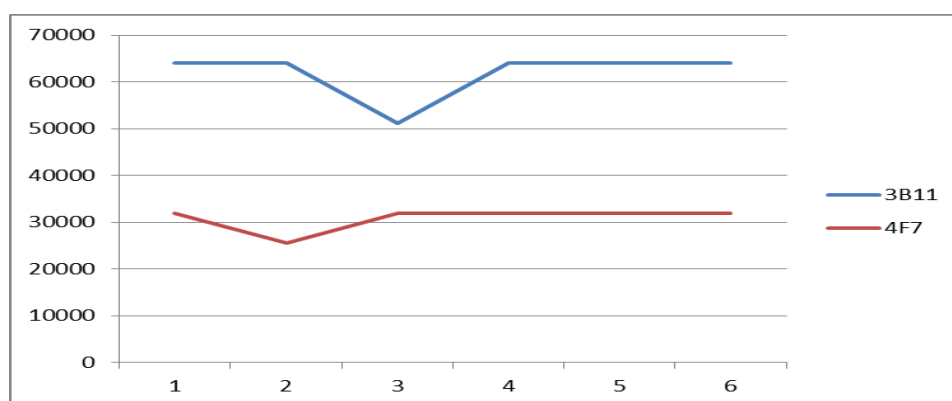


图 3-6 3B11 和 4F7 各代腹水效价

Fig.3-6 The ascites titers of 3B11 and 4F7 in each generation

### 3.5 杂交瘤细胞染色体数目鉴定

正常小鼠脾细胞的染色体数目为 40 条，sp2/0 染色体数目为 62~68 条，所得杂交瘤细胞的染色体数目处于 96~108 条之间。杂交瘤细胞及 SP2/0 细胞的染色体图如图 3-7，3-8 所示。

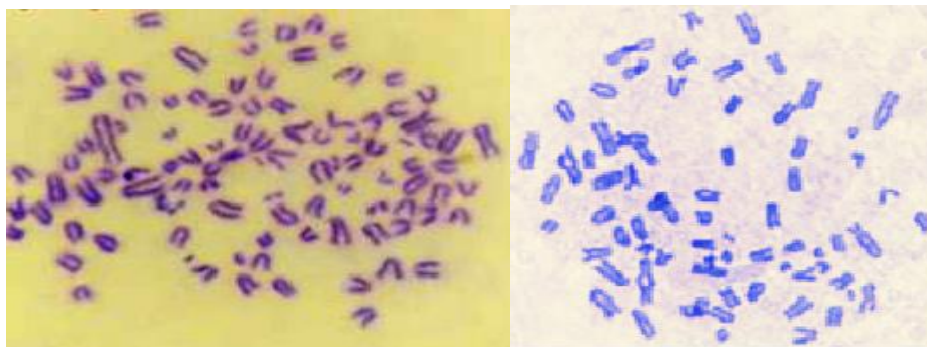


图 3-7 杂交瘤细胞株的染色体图

图 3-8 SP2/0 骨髓瘤细胞的染色体图

Fig 3-7 chromosomal maps of hybridoma cell      Fig 3-8 chromosomal maps of SP2/0 cell

## 4 讨论

金黄色葡萄球菌是一种常见的引起细菌性食物中毒的主要病原菌之一，广泛存在于自然环境中<sup>[67]</sup>。对食品污染极其常见，每年由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒病例仅次于沙门氏菌，金黄色葡萄球菌在食物中的检测监控是世界性卫生问题。金黄色葡萄球菌检测技术繁多，其中以免疫学方法最为常用，而制备针对金黄色葡萄球菌的单克隆抗体是各种免疫检测方法的基础<sup>[68]</sup>。SPA 是细胞壁抗原的主要成分，大约 90%以上的葡萄菌株均含有这种成分，且蛋白功能区高度保守<sup>[69]</sup>。因此制备高特异性的抗 SPA 的单克隆抗体，是诊断和检测食品中是否含有金黄色葡萄球菌的有效途径。本研究制备高特异性地鼠源 SPA 单克隆抗体，为食品中金黄色葡萄球的检测提供材料。

SPA 是金黄色葡萄球菌细胞壁表面蛋白的重要组成部分，也是是细胞壁特异性抗原的主要成分，大约 90%以上的葡萄菌株均含有这种成分且对应的编码基因



保守, 因此具有免疫优势。由于 SPA 具有较高的热稳定性<sup>[70]</sup>, 而热灭活的金黄色葡萄球菌有完整的细胞结构, 尤其是菌表明抗原物质得到完整的保留且毒性低<sup>[71]</sup>。所以本实验采用热灭活方法灭活金黄色葡萄球菌, 并以之作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠。经三次免疫后的小鼠尾血效价以金黄色葡萄球菌  $10^7$  包被间接 ELISA 检测效价为 6400~12000, 以 SPA 1mg/mL 包被间接 ELISA 检测效价能达 12000~48000。以菌体结合 SPA 作为筛选抗原, 得到 6 株阳性杂交瘤细胞, 经验证 6 株单抗全是针对 SPA 的单克隆抗体, 且与其它所有受试非金黄色葡萄球菌都无交叉反应, 其中两株 3B11 和 4F7 是针对在细胞壁表面的 SPA 抗原表位, 针对细胞壁表面的单抗是检测细菌的理想抗体。

根据文献研究<sup>[72]</sup>, 加强免疫 3~4 天取小鼠脾细胞做融合获得 IgG 类亚类单抗的机会高于 IgM。孙晓林等<sup>[73]</sup>的研究和本实验也证实了这一观点, 在得到的 7 株单抗除了 1 株为 IgM 外, 其他为 6 株 IgG 类抗体。

单克隆抗体的下游纯化技术多种多样, 主要有离子交换层析、亲和层析、凝胶过滤、辛酸-硫酸铵法和硫酸铵沉淀法<sup>[74]</sup>。本实验采用饱和硫酸铵沉淀和 Sephacryl S-300 HR 层析两种方法结合, 对含有单克隆抗体的腹水进行纯化。由 SDS-PAGE 电泳结果可以看出两种方法结合纯化腹水的效果比较理想。

根据与 SPA 的反应性可将 6 株 IgG 类单克隆抗体分为两类, 即: 识别 SPA 细胞壁表面抗原表位部分包括 3B11 和 4F7, 针对 SPA 镶嵌在细胞壁内的抗原表位, 包括 1B7、2G6、3H5 和 5F2。实验中还发现, 虽然单克隆抗体都与 SPA 较强的反应性, 但是与菌体的反应较弱。在一定抗体水平下这跟抗原浓度有关, 及有可能是包被在酶标板上的菌体其表面 SPA 的含量是有限的<sup>[75]</sup>, 而以  $1 \mu\text{g/mL}$  浓度的 SPA 包被其 SPA 包被数量高于以  $10^7\text{CFU/mL}$  菌体包被的 SPA 含量。

本实验利用杂交瘤细胞技术, 得到了 6 株稳定分泌 SPA 抗体的杂交瘤细胞株。其中单克隆抗体 3B11 和 4F7 为在金黄色葡萄球菌菌体表面的 SPA 表位单克隆抗, 属于 IgG 亚类, 对金黄色葡萄球菌菌体具有较强的反应性和较高的特异性。本实验为金黄色葡萄球菌免疫学检测方法的建立提供了抗体基础。

## 5 结论

获得 6 株稳定分泌 SPA 单克隆抗体的杂交瘤细胞, 6 株单抗与其他菌株没有交叉反应, 其中单克隆抗体 3B11、4F7 为 SPA 表面抗原表位的单克隆抗体, 与金黄色葡萄球菌 wo1-04 菌体和 SPA 有较强的免疫反应性, 免疫球蛋白亚类分别为 IgG1 和 IgG3, 具有稳定性好、特异性强、效价较高等特点。

## 第四章 金黄色葡萄球菌双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

### 1 材料及试剂

#### 1.1 菌株、单克隆抗体

菌株：金黄色葡萄球菌 w01-04、志贺氏杆菌、大肠杆菌 0157、大肠杆菌、婴儿沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、单核增生李斯特氏杆菌、阪崎肠杆菌菌种均由珠海出入境检验检疫局提供。

单克隆抗体：3B11、4F7 实验室制备。

#### 1.2 主要仪器设备

酶标检测仪 (Thermo Labsystems)

洗板机 (Thermo Labsystems)

蛋白浓缩过滤离心管 (Millipore)

透析袋 (W 8000-12000) ((spectrum Laboratories)

恒温磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表有限公司)

低温冷冻离心机 (Beckman)

#### 1.3 主要试剂及配制

(1) 辣根过氧化物酶 (HRP) (Sigma)。

(2) 0.06M 过碘酸钠溶液：称取 6.4mg  $\text{NaIO}_4$  溶于 0.5mL 水中，现用现配。

(3) 0.16M 乙二醇溶液：4.5  $\mu\text{l}$  乙二醇溶于 0.5mL 超纯水中。

(4) 5mg/mL 硼氢化钠溶液：称取 5mg 硼氢化钠，溶于 1mL 超纯水中，现用现配。

(5) 0.05M, pH9.6 碳酸盐缓冲液：称取 0.32g  $\text{NaCO}_3$ ，0.586g  $\text{NaHCO}_3$  溶于超纯水中，定容至 50m。

(6) 1mM pH4.4 醋酸钠缓冲液：. 称取 3.7ml 0.2M 醋酸钠 (1.361g/50ml) 和 6.3ml 0.2M 醋酸 (0.601ml/50ml) 加三蒸水到 2000ml。

(7) 0.2M (PH9.5) 碳酸盐缓冲液：称取 0.32g  $\text{NaCO}_3$ 、0.586g  $\text{NaHCO}_3$  加水

至 50ml。 .

(8) 0.1MNaIO<sub>4</sub>: 称取 24.1mg NaIO<sub>4</sub>溶于 10ml 水中, 现用现配。

(9) NaBH<sub>4</sub>(4mg/ml): 称取 4mg NaBH<sub>4</sub>溶于 10ml 水中, 现用现配。

ELISA 检测所需试剂参考 2.1.4.3。

## 2 方法

### 2.1 单克隆抗体的浓缩

取纯化后单抗 3B11 用蛋白浓缩过滤离心管浓缩至 5mg/mL, 1mL/支分装, -20℃保存备用。

### 2.2 酶标抗体的制备

- (1) 称取 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP), 溶于 0.5mL 去离子水中。
- (2) 加入 0.5mL 新鲜配制的 0.06M 过碘酸钠溶液, 混匀, 4℃, 避光氧化 30min。
- (3) 加入 0.5mL 的 0.16M 乙二醇溶液, 混匀, 4℃, 30min, 终止氧化。
- (4) 加入 0.5mL 3B11 单克隆抗体溶液(5mg/mL), 混匀后移入透析袋中, 置于 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 4℃透析过夜, 换液 4~5 次。
- (5) 收集透析后液体, 加入 1/10 体积的新鲜配制的硼氢化钠溶液, 4℃, 30min, 然后再加入 1/10 体积的新鲜配制的硼氢化钠溶液, 4℃, 1h。
- (6) 用 0.01M PBS (pH7.4) 充分透析后加入等体积饱和硫酸铵, 4℃静置 2h, 8000r/min, 4℃, 离心 30min, 收集沉淀用 50%饱和硫酸铵洗涤数次。
- (7) 将沉淀溶于少量 0.01M PBS 中, 加入等体积的甘油, -20℃保存备用。

### 2.3 ELISA 方法检测酶标抗体 3B11-HRP 活性

采用直接 ELISA 法初步确定酶标抗体 3B11-HRP 的工作浓度。用热灭活的金黄色葡萄球菌 ( $1 \times 10^7$ CFU/mL) 包被酶标板, 37℃孵育 2h, 4℃过夜; 弃包被液, PBS-T 洗 1min×3 次, 加入封闭液, 每孔 120 μl, 37℃, 封闭 2h; 弃封闭液, PBS-T 洗 1min×3 次, 加入稀释倍数分别为 100、200、400、800、1600、3200、6400、12000 的酶标抗体, 每孔 50 μl, 37℃孵育 30min; PBS-T 洗 1min×5 次, 加入 TMB 底物, 37℃显色 10min, 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应, 用酶标仪在 450nm 下测定 OD<sub>450</sub> 值。

## 2.4 双抗夹心 ELISA 建立

- (1) 纯化后单克隆抗体用包被液 (0.05mol/mL 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 以适当倍数稀释后包被酶标板, 每孔 100  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 2h, 然后 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- (2) 弃包被液, PBS-T 洗 1min $\times$ 3 次, 加入封闭液, 每孔 120  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 2h。
- (3) 弃封闭液, 加入待检菌液, 同时选择一孔只加入样品稀释液作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C, 1h。
- (4) PBS-T 洗 1min $\times$ 4 次, 加入一定浓度的 3B11-HRP, 37 $^{\circ}$ C, 30min。
- (5) PBS-T 洗 1min $\times$ 5 次, 加入 TMB 底物, 37 $^{\circ}$ C 显色 20min, 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 用酶标仪在 450nm 下测定各孔 OD 值。

## 2.5 捕获抗体包被浓度及酶标抗体工作浓度的确定

采用棋盘方阵滴定法, 同时确定包被抗体和酶标抗体的最适工作浓度, 具体方法如下: 用包被液将单克隆抗体 4F7 分别稀释为 20、10、4、2、1  $\mu$ g/mL, 包被酶标板, 将 3B11-HRP 分别作 400、600、1000 倍稀释, 按照 2.4 方法检测梯度稀释的金黄色葡萄球菌, 样品稀释液作为阴性对照。选择 P/N 值较大的组合, 从而确定捕获抗体包被浓度和酶标抗体工作浓度。

## 2.6 双抗体夹心 ELISA 检测方法特异性及灵敏度的测定

用 4.2.5 中所介绍的方法检测金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏杆菌、阪崎肠杆菌、肠炎沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、单核增生李斯特氏菌, 菌浓度均为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。同时将  $1 \times 10^6$  CFU/mL (约相当于  $2^{20}$  CFU/mL) 的金黄色葡萄球菌菌液倍比稀释后进行检测, 确定该检测方法的灵敏度。

# 3 结果

## 3.1 酶标抗体 3B11-HRP 活性

直接 ELISA 法检测酶标抗体 3B11-HRP 活性, 结果见表 4-1 根据直接 ELISA 检测结果, 初步确定酶标抗体 3B11-HRP 的工作浓度为 800~1600 倍稀释。

表 4-1 酶标抗体的直接 ELISA 检测结果

Tab.4-1 The result of direct ELISA

包被抗原 ( $1 \times 10^7$ CFU/mL)	3B11-HRP 酶标抗体稀释度							
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12000
金黄色葡萄球菌	1.779	1.572	1.572	1.314	0.815	0.435	0.306	0.163

### 3.2 抗体包被浓度及酶标抗体工作浓度的确定

采用棋盘方阵滴定法,同时确定包被抗体和酶标抗体的最适工作浓度,测定结果见表 4-3,当 4F7 的包被浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ , 3B11-HRP 稀释度为 1:1000 时,系统具有较高的灵敏度,由表 4-3 结果得出 4F7 最适包被浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ ,酶标抗体最适工作浓度为 1000 倍稀释。按双抗夹心 ELISA 操作步骤对系列稀释的金黄色葡萄球菌进行测定,本方法对纯培养的金黄色葡萄球菌的最小检测限  $1 \times 10^5$  CFU/mL 左右。

表 4-2 ELISA 确定 4F7 最适包被浓度和 HRP-PcAb 最适工作浓度

Tab.4-3 Experimental results for proper concentration of 4F7 and

3B11-HRP by ELISA

4F7 包 被浓 度( $\mu$ g/mL)	3B11-HRP 稀释度和检测抗原浓度 (CFU/mL)											
	500						1000					
	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	NC	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	NC
20	0.681	0.651	0.553	0.251	0.089	0.022	0.678	0.532	0.511	0.385	0.037	0.018
10	0.643	0.632	0.44	0.187	0.075	0.02	0.658	0.407	0.356	0.113	0.024	0.015
4	0.512	0.507	0.435	0.318	0.089	0.009	0.375	0.138	0.043	0.011	0.007	0.009
2	0.237	0.139	0.045	0.032	0.01	0.005	0.189	0.098	0.056	0.025	0.029	0.003
	2000						4000					
	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	NC	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	NC
20	0.383	0.304	0.244	0.146	0.089	0.003	0.198	0.109	0.055	0.007	0.024	0.005
10	0.436	0.348	0.44	0.187	0.075	0.018	0.207	0.098	0.016	0.003	0.009	0.003
4	0.194	0.115	0.013	0.018	0.057	0.013	0.007	0.013	0.018	0.017	0.007	0.007
2	0.043	0.009	0.006	0.091	0.01	0.007	0.011	0.011	1.009	0.002	0.029	0.001

### 3.3 双抗体夹心 ELISA 的特异性

选用 4F7 的包被浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$ , 3B11-HRP 稀释度为 1:1000, 即以改良过碘酸法 HRP 标记的 3B11 作为检测抗体, 以 4F7 作为捕获抗体, 初步建立夹心 ELISA 体系, 检测常见 15 种肠道菌 (肠炎沙门氏菌株、大肠杆菌 O157: H7、大肠杆菌 O157、大肠杆菌、宋内氏志贺杆菌、阪崎肠杆菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、单核增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌), 鉴定初步建立的夹心 ELISA (S-ELISA) 体系的特异性结果表明, 该体系只与金黄色葡萄球菌发生阳性反应, 与其他 14 种检测菌体均不发生反应, 特异性较高, 结果见图 4-1。

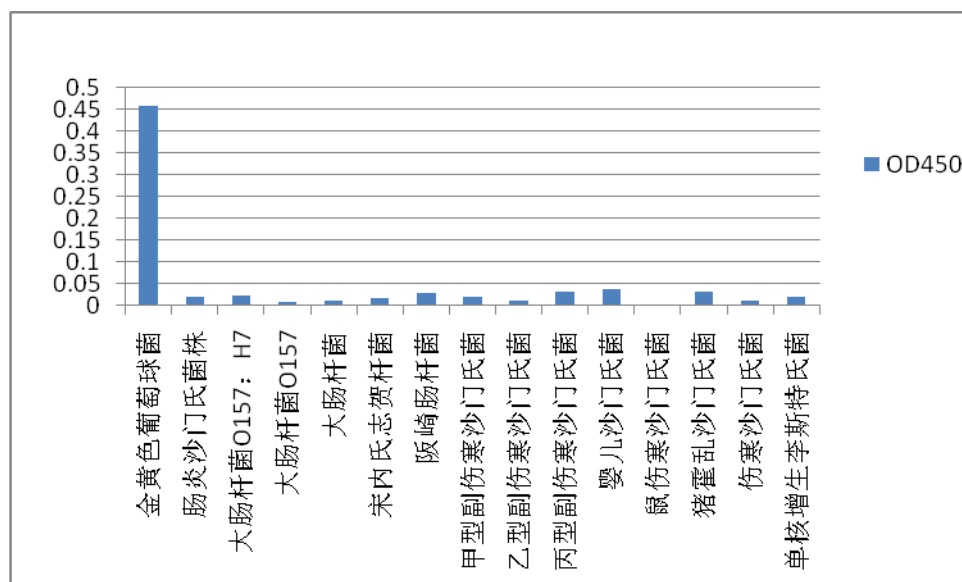


图 4-1 双抗体夹心 ELISA 特异性检测结果

## 4 讨论

单克隆抗体 3B11 为 SPA 克隆抗体, 具有效价高、特异性强等特点, 因此, 本实验选择 3B11 作为检测抗体, 采用改良过碘酸钠法<sup>[76]</sup>制备 3B11 辣根过氧化物酶标抗体。酶标抗体的质量对双抗体夹心 ELISA 检测的效果有着至关重要的影响。本实验利用硫酸铵沉淀法可有效地除去未标记的 HRP。

细菌的检测方法种类繁多, 主要有传统的细菌检测技术、分子生物学检测技术和免疫学检测技术。传统的细菌检测方法由于其检测程序复杂、效率低、灵敏度不高等原因, 不适合用于批量产品的检测。分子生物学检测技术虽然特异性强,

灵敏度高,但对技术和设备的要求比较高,也不适合广泛用与日常生活中食品的检测。而以血清学为基础的免疫学检测方法,由于其方便快捷、灵敏度高、特异性强等优点被广泛用于食品中细菌的检测,其中间接ELISA和夹心ELISA是最常用的两种免疫学检测方法<sup>[77]</sup>。Kim E. Sapsford 等<sup>[78]</sup>使用ELISA法检测SEB时应用微型化96微孔板,并使用可携带的色度法检测器,使得检测更加方便,易于开展,检测时每孔样品量低至5  $\mu$ L。本文选取效价高、特异性强的3B11采用改良过碘酸法进行HRP标记,作为检测抗体,以与3B11配对较好的4F7作为捕获抗体,初步建立夹心ELISA体系,用于检测金黄色葡萄球菌,结果表明该检测体系对金黄色葡萄球菌的检测 $10^5$ cfu/mL以上菌浓度时有较高的特异性和灵敏度。

由于金黄色葡萄球菌引食品中毒剂量极低,因此检测的灵敏度就显得非常重要,细菌表面抗原具有多样性,多克隆抗体可与细菌表面多种抗原表位结合,相对于单克隆抗体多克隆抗体具有更强的捕获能力,因此在对纯培养的金黄色葡萄球菌的检测中,用多克隆抗体作为捕获抗体灵敏度要高于单克隆抗体。然而在实际应用中,被检样品中往往含有大量的杂菌,由于细菌之间广泛地存在交叉抗原,因此某些杂菌可能会与金黄色葡萄球菌竞争结合多克隆抗体,这样势必会影响检测的灵敏度和特异性。

## 5 结论

本实验建立了金黄色葡萄球菌双抗体夹心 ELISA 检测方法,但是由于所用的捕获抗体 4F7 和检测抗体 3B11 都是针对 SPA 的,所以该方法与金黄色葡萄球菌反应,但与所受的常见肠道菌属及常见的菌株没有交叉反应,该方法可用于对金黄色葡萄球菌的检测,并有望与其他检测方法结合用于对金黄色葡萄球菌的检。

## 参考文献

- [1] Dinges Martin M, Orwin Paul M, Schlievert Patrick M. Exotoxins of staphylococcus aureus [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13 (1):16 -34.
- [2] 张严峻, 张俊彦, 梅玲玲, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因的分型和分布[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15 (6): 682-683.
- [3] 张雯霞, 陈敏, 席曼芳, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素实验分析[J]. 上海预防医学杂志, 2008, 20 (4): 186-188.
- [4] Han, Barbara, Rijkelt, *et al.* Behaviour of Staphylococcus aureus during sufu production at laboratory scale[J]. Food Control, 2005.
- [5] Silva, Caraviello, Rodrigues, *et al.* Evaluation of petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples[J]. J Dairy Sci, 2005, 88(8): 3000-3008.
- [6] Martin M C, Fueyo J M, Gonzalez, *et al.* Genetic procedures for indentification of enterotoxigenic strain of Staphylococcus aureus From three poisoning outbreaks [J]. Int J Food Microbiol. 2004, 94(3): 279-286.
- [7] Shu-Er Yang, Roch-Chui Yu, Cheng-Chun Chou. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 22(63):99-107.
- [8] 吴仲梁, 韩伟, 陶军, 等. 快速检测食品中金黄色葡萄球菌的检测方法[J]. 食品安全与检测, 2003(6): 56~57.
- [9] 黄晓蓉, 郑晶, 汤敏英, 等. 进口冷冻生鸡产品中金黄色葡萄球菌及其肠毒素的检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13 (6): 741-742.
- [10] Gailllot O, Wetsch M, Fortineau N, *et al.* Evaluation of CHROMagar *S. taphlaureus*, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (4) : 1587 - 1591.
- [11] 逢少堃, 梁浩, 宋淑亮, 王伟莉, 吉爱国. 葡萄球菌蛋白A活性机制与现代应用[J]. 生命的化学, 2008, 28 (6) : 778-751.



- [12] 黄汝添, 吴清平, 张菊梅, 等. 金黄色葡萄球菌显色培养基研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(6):1148-1150.
- [13] 刘钰, 刘军, 赵英杰. 金黄色葡萄球菌显色培养基在乳品检验中的应用[J]. 预防医学文献信息, 2004, 10(1):87.
- [14] 韩北忠, 张琳, 蓝泽, 等. 发酵食品中金黄色葡萄球菌快速检测方法研究进展[J]. 中国酿造, 2005, 152(11):1-4.
- [15] 孔海深, 徐根云, 姜慧芬, 等. 乳胶凝集试验快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 中华检测医学杂志, 2003, 26(11):695-696.
- [16] 黄岭芳, 赖卫华, 张莉莉. 食品中金黄色葡萄球菌快速检测方法的研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(6):181-185.
- [17] Kim E Sapsford, Jesse Francis, Steven Sun, et al. Miniaturized 96-well ELISA chips for staphylococcal enterotoxin B detection using portable colorimetric detector [J]. Anal. Bioanal Chem., 2009(394):499-505.
- [18] Paul T Charles, Freddie Velez, Carissa M Soto, et al. A galactosepolyacrylate-based hydrogel scaffold for the detection of cholera toxin and staphylococcal enterotoxin B in a sandwich immunoassay format [J]. Analytica Chimica Acta., 2006(578):2-10.
- [19] 王晶, 王林, 黄晓蓉. 食品安全快速检测技术 [M]. 北京:化学工业出版社, 2002, 115-119, 150-153.
- [20] 龙军, 陈清, 俞守义. 双抗夹心ELISA法检测葡萄球菌B型肠毒素 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21(2):154-155.
- [21] Poli Mark A, Rivera Victor R, Neal Dwayne. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for staphylococcus aureus enterotoxins A and B in urine and buffer [J]. Toxicon, 2002(40):1723-1726.
- [22] Rauzzino M J, Quinn C M, Fisher W S, et al. after Aneurysms Surgery: Indication for Selective Angiography [J]. Surg Neurol, 2005, 12(6):32-41.
- [23] William S Collins, Anna D. Johnson, Joseph F Metzger, et al. Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A [J]. App. Um. D Mic. Romo LoGy, 1973(30):774-777.
- [24] Joo SP, Kim TS, Kim YS, et al. Clinical utility of multislice computed tomographic angiography for detection of cerebral vasospasm in acute

- subarachnoid hemorrhage[J]. *Minim Invasive Neurosurg* 2006, 49 (5) :286-290.
- [25] Liu Nan, Gao Zhixian, Zhou HuanYing, et al. Detection of SEBgene by bilayer lipid membranes nucleic acid biosensor supported by modified patch-clamp pipette electrode [J] . *Biosensors and Bioelectronics*, 2007(22) : 2 371-2 376.
- [26] Labib Mahmoud, Hedström Martin, Magdy Amin, et al. A capacitive biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B [J] . *Anal. Bioanal Chem.* 2009(393) :1539 -1544.
- [27] 杜洪利, 张双双, 欧旭, 等. 金黄色葡萄球菌检测技术研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2009, 45 (5) : 13-15.
- [28] 高正琴, 李厚达, 贺争鸣. 金黄色葡萄球菌nuc 基因特异性核酸探针的制备及应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(5) :301 -303.
- [29] Hogg Graham Michael, McKenna James Patrick, Ong Grace. Rapid detection of methicillin-susceptible and methicillin-resistant staphylococcus aureus directly from positive BacT /Alert blood culture bottles using real-time polymerase chain reaction: evaluation and comparison of 4 DNA extraction methods [J] . *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 61(4) : 446 -452.
- [30] Thomas L C, Gidding H F, Ginn A N, et al. Development of a realtime staphylococcus aureus and MRSA ( SAM-) PCR for routine blood culture [J] . *Journal of Microbiological Methods*, 2007 (68 ) :296-302.
- [31] Thomas L C, Gidding H F, Ginn A N, et al. Development of a realtime staphylococcus aureus and MRSA ( SAM-) PCR for routine blood culture [J] . *Journal of Microbiological Methods*, 2007 (68 ) :296- 302.
- [32] Chiang Y C, Fan C M, Liao W W, et al. Real-time PCR detection of staphylococcus aureus in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene htrA sequence [J] . *Food Prot*, 2007, 70(12) : 2 855 -2 859.
- [33] 25 Athanasia Xirogianni, Georgina Tzanakaki, Eleni Karagianni, et al. Development of a single-tube polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Streptococcus spp. directly in clinical samples [J] . *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009(63) :121 ~ 126.

- [34] Adrien Fischer, Patrice Francois, Silva Holtfreter, et al. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in staphylococcus aureus [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009(77):184-190.
- [35] 钟江华, 张光萍, 柳小英. 实时荧光定量PCR技术的研究进展与应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2): 68-72.
- [36] 徐德顺, 韩健康, 吴晓芳. 实时荧光定量-聚合酶链反应检测食品中金黄色葡萄球菌方法的研究[J]. 疾病监测, 2007, 7.
- [37] Klotz M, Opper S, Heeg K, et al. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2003, 10(41): 4683-4687.
- [38] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 实施荧光定量PCR检测金黄色葡萄球菌方法的试验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 794-796.
- [39] 张阳德. 生物信息学(3): 生物芯片技术[J]. 外科理论与实践, 2006, 11(6): 13-17
- [40] 夏俊芳, 刘箐. 生物芯片应用概述[J]. 生物技术通报, 2010, 7(1): 73-77.
- [41] 唐晓敏, 高志贤. 基因芯片快速检测常见水中致病菌的初步应用研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2003, 21(2): 94-96.
- [42] 赵金毅, 白素兰, 黄文胜, 等. 应用可视芯片技术检测食品中常见致病菌的方法研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(8): 141-144.
- [43] 何洋, 周黎黎, 刘红露, 等. 应用基因芯片技术检测食品中金黄色葡萄球菌[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(6): 108-110.
- [44] 邢建明, 周丰宁, 张红河, 等. 导流杂交基因芯片技术在肠道致病菌检测中的应用研究[J]. 中华医药感染学杂志, 2008, 18(10): 1494-1497.
- [45] B Liedberg, et al. Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing Sensors. Actuators B, 1983, 4: 299-304.
- [46] Shankar Balasubramanian, Iryna B. Sorokulova, Vitaly J. Vodyanoy, et al. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of Staphylococcus aureus — A surface plasmon resonance spectroscopic study[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, (22): 948-955.
- [47] 温志立, 汪世平, 沈国励. 免疫传感器的发展概述. 生物医学工程学杂志, 2001, 18(4): 642-646.

- [48] 刘国艳, 柴春彦, 吴祖立等. 检测盐酸克伦特罗含量的免疫传感器载体膜部件的研制及效果评价. 上海交通大学学报, 2004, 22(4): 348-354.
- [49] Ho JA, Hsu HW, Huang MR. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of Escherichia coli O157:H7 [J]. Anal Biochem, 2004, 330: 342 - 349.
- [50] Liu Nan, Gao Zhixian, Zhou HuanYing, et al. Detection of SEB gene by bilayer lipid membranes nucleic acid biosensor supported by modified patch-clamp pipette electrode [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007(22): 2371-2376.
- [51] Labib Mahmoud, Hedstrom Martin, Magdy Amin, et al. A capacitive biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B [J]. Anal. Bioanal Chem. , 2009(393):1 539 - 1 544.
- [52] Xue Xiuheng, Pan Jian, Xie Huiming, et al. Fluorescence detection of total count of escherichia coli and staphylococcus aureus on watersoluble CdSe quantum dots coupled with bacteria [J]. Talanta, 2009(77):1 808 - 1 813.
- [53] 龙军, 陈清, 俞守义. PCR-ELISA 法检测葡萄球菌肠毒素A [J]. 中国公共卫生, 2004, 20(11):1 340 - 1 341.
- [54] Elizabete Rodrigues da Silva, Jorge Ubirajara Dias Boechat, Juliana Cristina Dias Martins, et al. Hemolysin production by Staphylococcus aureus species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds [J]. Small Ruminant Research. 2005, 56, (56) :271-275 .
- [55] Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, et al. Identification of clinical coagulase negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(16) :998-1004 .
- [56] 逢少堃, 梁浩, 宋淑亮, 王伟莉, 吉爱国. 葡萄球菌蛋白A活性机制与现代应用 [J]. 生命的化学, 2008, 28 (6) :778-751.
- [57] 冯小黎, 苏志国. 金黄色葡萄球菌的液相培养及A蛋白的提取 [J]. 应用与环境生物学报. 1996, 2 (2) :152-157.
- [58] Sjoquist J, Meloun B, Hjelm H. Protein A isolate from staphylococcus aureus after digestion with Lysostaphin [J]. Eur J Biochem, 1972, 29 (3) :572-578.
- [59] 何小曼, 张超, 杨文冲等. 葡萄球菌蛋白A的纯化新工艺. 中国生物制品学杂志, 2007, 7(7):20, 7.
- [60] Scroggle, D, Harris, MD, Abel, M. Vasculitis following treatment of rheumatoid

- arthritis with extracorporeal staphylococcal protein A immunoabsorption column (ProSORBA) [J]. *J Clin Rheumatol*, 2001, 7, (7) :238-241 .
- [61] Tsang LH, Daily ST, Weiss EC, et al. Mutation of traPinStaphylococcus aureus has no impact on expression of agr or biofilm formation [J]. *Infect Immun*, 2007, 75 (9) :4528-4533 .
- [62] Park H K, Woo S Y, Jung Y J, et al. Detection of virulence genes of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis isolated from supra-pubic urine from infants with fever [J]. *Journal of Bacteriology and Virology*, 2008, 38 (4) :189-196 .
- [63] S. Mehrotra, Manisha, WANG Ge-hua, et al. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant Staphylococcus aureus and glycopeptide-resistant Enterococcus species [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, (4) 6 :1577-1587 .
- [64] Tanya Das, Gaurisankar Sa, Sreya Chattopadhyay, Prasanta K. Ray. Protein A-induced apoptosis of cancer cells is effected by soluble immune mediators [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2002, 51, (7) : 376-80 .
- [65] Bekeredjian-Ding I, Inamura S, Giese T, et al. Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands [J]. *J Immunol*, 2007, 178, 178 (5) :2803-2812 .
- [66] Elizabete Rodrigues da Silva, Jorge Ubirajara Dias Boechat, Juliana Cristina Dias Martins, et al. Hemolysin production by Staphylococcus aureus species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds [J]. *Small Ruminant Research*. 2005, 56, (56) :271-275 .
- [67] Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, et al. Identification of clinical coagulase negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(16) :998-1004 .
- [68] Scroggle, D, Harris, MD, Abel, M. Vasculitis following treatment of rheumatoid arthritis with extracorporeal staphylococcal protein A immunoabsorption column (ProSORBA) [J]. *J Clin Rheumatol*, 2001, 7, (7) :238-241 .
- [69] Belkessam Y, Benali M, Moulessehouli S et al. Polyclonal antibodies production against Staphylococcus aureus protein A: ELISA technique optimization for milk quality control [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9 (5) :764-769.
- [70] Tsang LH, Daily ST, Weiss EC, et al. Mutation of traPinStaphylococcus aureus has

- no impact on expression of agr or biofilm formation[J]. *Infect Immun*, 2007, 75 (9) :4528-4533 .
- [71] Park H K, Woo S Y, Jung Y J, et al. Detection of virulence genes of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis isolated from supra-pubic urine from infants with fever[J]. *Journal of Bacteriology and Virology*, 2008, 38 (4) :189-196 .
- [72] S. Mehrotra, Manisha, WANG Ge-hua, et al. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant Staphylococcus aureus and glycopeptide-resistant Enterococcus species[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, (4)6 :1577-1587 .
- [73] 孙晓林, 景志忠, 王佩雅等. 猪带绦虫六钩蚴45W-4BX 抗原单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2008, 43(1): 7-13.
- [74] Tanya Das, Gaurisankar Sa, Sreya Chattopadhyay, Prasanta K. Ray. Protein A-induced apoptosis of cancer cells is effected by soluble immune mediators[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2002, 51, (7): 376-80 .
- al. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1[J]. *Nat Med*, 2004, 10 (8) :842-848 .
- [75] 沈泓, 易喻, 梅建凤, 等. 人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体的制备与分离纯化 [J]. *中国生化药物杂志* 2010 (31): 23-26.
- [76] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. *上海免疫学杂志*, 1983, 3(2): 97-100.
- [77] Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Food Control* 2008 (19): 1-8.
- [78] kumar S, Balakrishna K, Batra H. V. Enrichment-ELISA for detection of salmonella typhi from food and water samples [J]. *Blomedical and environmental sciences* 2008 (21):137-143.

## 致 谢

值此论文完成之际，我深深地感谢我的导师李克生研究员三年来对我的悉心教导，本文的字里行间无不凝结着导师的心血和智慧

同时感谢我的校内导师付小平副教授在这三年来给予我学习和生活上的热情关怀与支持，帮助我顺利完成学业。

同时也要感谢杜惠芬老师、刘洪亮师兄和鲁学萍师姐在实验上对我的指导和生活上对我的帮助。

感谢甘肃农业大学动物医学院和甘肃省医学科学研究院为我们提供的优越的学习条件和科研平台，在这里我度过了三年美好的时光。还要感谢所有帮助过我的老师们，老师你们辛苦了！

感谢我的实验搭档马卫静和杜丽娟同学，单克隆抗体的制备是一项需要团队协作的任务，我必将铭记那段与你并肩作战共同奋斗的美好的时光。还要感谢连晓雯师姐、袁明师姐、叶文华师姐，以及陈亚青、蔡靓同学对我的关心和帮助。

感谢父母多年来对我的养育之恩！感谢他们在我面对困难时给我的鼓励和爱心！

彭洪江  
2012年3月

---

## 作者简介

彭洪江，1986年4月23日生，贵州龙里县人。2005年9月至2009年7月于西北民族大学生命科学与工程学院生物技术专业学习，获理学学士学位。2009年9月至2012年7月在甘肃农业大学动物医学院预防兽医学专业攻读硕士学位。



---

## 导师简介

李克生，男，1963年11月出生，农工党党员，1989年7月毕业于甘肃农业大学传染病与预防兽医专业，获得硕士学位，同年分配于甘肃省医学科学院工作，现任医学生物技术研究中心主任，研究员，甘肃省生物检测工程中心副主任，于2009年毕业于甘肃农业大学预防兽医学专业，获得博士学位。2000年获得副研究员任职资格，2004年获得研究员任职资格，获得甘肃省“555创新人才工程”第二层次人选，甘肃省首届省属院科研院所学科带头人，甘肃省医疗卫生中青年学术技术带头人，兰州市“222工程”跨世纪学术技术带头人，甘肃省领军人才第二层次。现为兰州大学兼职教授，兰州大学、甘肃农业大学硕士生导师，中华医学会会员，甘肃省抗癌协会理事，中国临床微生物学寄生虫组专业委员会，副组长委员。

## 原创性声明

本人声明所提交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得甘肃农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

签字日期 年 月 日

## 学位论文版权认定和使用授权书

本人完全了解甘肃农业大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保存并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权甘肃农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，第一作者及通讯作者署名单位为甘肃农业大学。

保密的学位论文在解密后应遵守此规定。

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日