

大肠杆菌 O157 LPS 单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立

刘红亮,李克生,陈学忠*,杜惠芬,连晓雯,鲁学萍,袁明

(甘肃省医学科学研究院,甘肃兰州 730050)

摘要: 以热灭活的大肠杆菌 O157:H7(*E. coli* O157:H7)菌体抗原为免疫原,*E. coli* O157:H7 菌体结合脂多糖(LPS)为筛选抗原,应用淋巴细胞杂交瘤技术制备 *E. coli* O157:H7 LPS 单克隆抗体。采用改良过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶(HRP)酶标抗体,并建立检测 *E. coli* O157:H7 的双抗体夹心 ELISA 方法。结果,成功制备了 9 株稳定分泌 *E. coli* O157:H7 LPS 单克隆抗体的杂交瘤细胞,其中 7F9 和 7G2 为 LPS O-特异性多糖(O-SP)单克隆抗体,与 *E. coli* O157:H7 菌体具有较好的反应性。此双抗体夹心 ELISA 方法对与受试的非 O157 菌株没有交叉反应,对 *E. coli* O157:H7 纯培养菌液的检出下限为 3×10^4 CFU/mL。结果表明,建立的 ELISA 检测方法对 *E. coli* O157 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 *E. coli* O157:H7 的检测。

关键词: 大肠杆菌 O157:H7;单克隆抗体;脂多糖;双抗体夹心 ELISA

Preparation of monoclonal antibodies for *E. coli* O157 LPS and development of a sandwich ELISA

LIU Hong-liang, LI Ke-sheng, CHEN Xue-zhong, DU Hui-fen, LIAN Xiao-wen,
LU Xue-ping, YUAN Ming

(Medical Academy of Gansu, Lanzhou 730050, China)

Abstract: This study was aimed to obtain monoclonal antibodies (MAbs) against *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) lipopolysaccharide (LPS) and establish ELISA method for the detection of *E. coli* O157:H7. Using heat-killed *E. coli* O157:H7 cells as antigen and by lymphocyte-hybridoma technique, MAbs for *E. coli* O157:H7 LPS were obtained. MAb7F9 was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) by using an improved sodium periodate oxidation method. A sandwich ELISA detecting method was developed to detect *E. coli* O157:H7. Nine hybridoma cell lines which stably secreted monoclonal antibodies against *E. coli* O157:H7 LPS were generated. Two of the MAbs 7F9 and 7G2 were proved to be specific for the O-specific polysaccharide (O-SP), and agglutinated *E. coli* O157:H7 cells as well. The assay established in the present study was specific for *E. coli* O157 detecting and showed no cross reaction with non-O157 strains. The detection limit was 3×10^4 CFU/mL in pure culture of *E. coli* O157:H7. The sandwich ELISA detecting method provides a reliable, sensitive and rapid assay approach for the detection of *E. coli* O157, which could be used for the detection of *E. coli* O157:H7 combined with other assays.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7; monoclonal antibody; lipopolysaccharide; sandwich ELISA

肠出血性大肠杆菌(EHEC)是一种严重危害人类健康的食源性病原菌,以 O157:H7 血清型为主。近年来我国多地都有从腹泻病人和家禽家畜粪便、食品及水中检测出 *E. coli* O157:H7 的报

收稿日期: 2011-06-14; 修回日期: 2011-08-29

作者简介: 刘红亮(1986—),男,河南南阳人,硕士生,研究方向为医学生物技术的开发。* 通讯作者, E-mail: chief.chenxuezhong@163.com

道^[1-2]。因此,该菌在国内外越来越受到人们的重视。*E. coli* O157:H7 引发感染的剂量极低,有报道称摄取 10 个活菌就有可能致病^[3],并且目前对于该菌的感染还没有特效的治疗方法,所以,建立具有高灵敏度和高特异性的检测方法用于食品检验、临床诊断、兽医服务以及疾病暴发调查等就显得尤为重要。基于单克隆抗体的免疫学检测方法因其具有操作简单、检测速度快、特异性强等特点而得到了广泛的应用,然而具有高特异性和亲和力的单克隆抗体是进行免疫学检测的基础。目前国内针对 *E. coli* O157:H7 的夹心 ELISA 检测方法多是基于多克隆抗体^[4],或是多克隆抗体结合单克隆抗体^[5],双单克隆抗体夹心 ELISA 检测方法尚未见有报道。脂多糖(LPS)是 *E. coli* O157:H7 细胞壁的重要组成部分,并且 *E. coli* O157:H7 特异性 O 抗原就位于 LPS 上。因此,本试验选用 *E. coli* O157:H7 LPS 作为筛选抗原,制备了 *E. coli* O157 LPS 特异性单克隆抗体,继而选用制备的单克隆抗体初步建立了检测 *E. coli* O157 的双单克隆抗体夹心 ELISA 检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株、LPS 抗原、细胞及实验动物

大肠杆菌 O157:H7(NCTC 12900)、大肠杆菌 O157、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种由珠海出入境检验检疫局提供;*E. coli* O157:H7 LPS 抗原和 LPS O-特异性多糖抗原(O-SP)以及 SP2/0 细胞由甘肃省医学科学院医学生物中心提供;BALB/c 小鼠购自兰州大学动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

弗氏佐剂、HT 母液(100×)、A 母液(100×)、聚乙二醇(PEG-1000)、小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG(羊抗鼠 IgG-AP)、辣根过氧化物酶(HRP)均为 Sigma 公司产品;新生胎牛血清为兰州民海生物公司产品;DMEM 培养基为 Gibco 公司产品;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为北京博奥森生物制品有限公司产品;Hybond c-Extra 硝酸纤维素为 Amersham Biosciences 公司产品;5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/四唑硝基蓝(BCIP/NBT)底物为 Promega 公司产品;其他试剂均为进口分装或国产分析纯化学试剂。酶标检测仪、洗板机由 Thermo LabSystems 公司生

产;电泳仪、垂直板槽由 Bio-rad 公司生产;Sephacryl S-300 填料和全自动蛋白纯化仪由 Armashia 公司生产。

1.3 单克隆抗体的制备

1.3.1 动物免疫 取 1×10^9 CFU/mL 热灭活(60℃,30 min)的 *E. coli* O157:H7 菌体抗原与等量弗氏完全佐剂充分乳化,经腋窝、腹股沟、背部、足垫多点注射免疫 6~8 周龄、18~20 g 雌性健康 BALB/c 小鼠,每只 0.2 mL(菌量约 1×10^8 CFU),间隔 3 周用弗氏不完全佐剂以同样方法加强免疫 2 次,抗原浓度每次加倍。第 3 次免疫后第 30 天取 2×10^9 CFU/mL *E. coli* O157:H7 菌体抗原(生理盐水稀释),腹腔加强免疫,每只 0.2 mL(菌量约 4×10^8 CFU),3 d 后处死小鼠取脾。

1.3.2 细胞融合与杂交瘤细胞的筛选 取免疫小鼠脾细胞与对数期的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 用聚乙二醇法融合细胞,使用 HAT 培养基筛选培养。以菌体结合 LPS 为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法筛选阳性孔,用有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至阳性率连续 3 次达到 100%,再分别对其进行扩大培养,冻存于液氮罐中备用。

1.3.3 腹水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 2×10^6 个细胞,1~2 周后收集腹水,2 000 r/min 离心 10 min 除去杂物,处理后的腹水分别经 500、450 g/L 饱和硫酸铵盐析出沉淀和 Sephacryl S-300 凝胶柱分离纯化。用紫外吸收法测定纯化后腹水总蛋白含量,并用 SDS-PAGE 电泳分析抗体纯度及抗体轻链和重链的分子质量。

1.4 单克隆抗体的鉴定

1.4.1 腹水效价及 Ig 亚类的测定 分别以 *E. coli* O157:H7 菌体、LPS 以及 O-SP 为包被抗原,采用间接 ELISA 法检测各单克隆抗体腹水效价。按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒说明对每株单克隆抗体进行亚类测定。

1.4.2 单克隆抗体特异性鉴定 采用间接 ELISA 法检测单克隆抗体特异性,检测菌包括 *E. coli* O157:H7、*E. coli* O157、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。均采用热灭活法灭活以上各菌,按 1×10^7 CFU/mL 包被酶标孔,检测各株杂交瘤细胞上清。

1.4.3 单克隆抗体结合位点的 Western-blot 检测 取 20 μg 的 *E. coli* O157:H7 LPS 进行 SDS-

PAGE 电泳,采用 4%的浓缩胶结合 12%的分离胶,60 V 电压直至样品进入分离胶,然后以 150 V 电泳至溴酚蓝迁移到分离胶末端。电泳结束后,取一部分泳道进行银染^[6],作为 Western-blot 结果的对照。将剩余泳道样品电转印至硝酸纤维素薄膜上(200 mA,电转印 60 min),电转移后将膜于含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST (20 mmol/L Tris-Cl, pH7.4,150 mmol/L NaCl,5 mL/L Tween-20)中室温封闭 1 h, TBST 洗 3 次(每次 5 min);将膜分别浸于各单克隆抗体腹水(1:200 稀释,稀释液为含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液),室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次(每次 5 min);加入二抗(1:2000 稀释的羊抗鼠 IgG-AP,稀释液为含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液),室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次(每次 5 min);加入 BCIP/NBT 显色液(用前现配),室温下避光显色,蒸馏水终止反应。

1.5 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

1.5.1 酶标单抗的制备 选取纯化的单抗 7F9 为标记抗体,采用改良过碘酸钠标记法^[7]并做适当改动,制备 7F9-HRP 酶标抗体复合物。取制备的 7F9-HRP 溶液加入等量的饱和硫酸铵,4 °C 静置 2 h,8 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,并用 500 g/L 饱和硫酸铵洗涤沉淀 2~3 次,然后将沉淀溶解于少量 0.01 mol/L PBS(pH7.4),过 Sephacryl S-300 凝胶柱进一步分离纯化。

1.5.2 双抗夹心 ELISA 检测条件的确定 将单抗 7G2 作为捕获抗体包被酶标板,7F9-HRP 为检测抗体,建立双抗夹心 ELISA 检测方法,采用方阵滴度法确定包被浓度、酶标抗体的工作浓度和底物的最佳反应时间。按照以下步骤进行检测:①纯化后单抗 7G2 用包被液(0.05 mol/mL 碳酸盐缓冲液,pH9.6)稀释至 1.6 μg/mL 后包被酶标板,每孔 100 μL,37 °C 2 h,然后 4 °C 过夜;②弃包被液,PBS-T 洗 1 min×3 次后,加入封闭液,每孔 120 μL,37 °C 2 h;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空白对照,每孔 100 μL,37 °C 1 h;④

PBS-T 洗 1 min×4 次后,加入 7F9-HRP(1:4 000 稀释),每孔 50 μL,37 °C 30 min;⑤ PBS-T 洗 1 min×5 次后,加入 TMB 底物,37 °C 显色 20 min,2 mol/mL H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪在 450 nm 下测定各孔吸光度值。

1.5.3 双抗夹心 ELISA 检测方法特异性及灵敏度的测定 用 1.5.2 的方法检测 *E. coli* O157:H7、*E. coli* O157、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 1×10⁷ CFU/mL。同时将 1×10⁶ CFU/mL(约相当于 1×10²⁰ CFU/mL)的 O157:H7 菌液系列稀释后进行检测,确定该检测方法的灵敏度。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立及单抗亚类的测定

以菌体结合 LPS 为包被抗原筛选阳性杂交瘤细胞,并经过数次亚克隆,本试验最终得到 9 株稳定分泌 *E. coli* O157:H7 LPS 单抗的杂交瘤细胞,分别命名为 2B9、4B2、5B2、5E6、5H2、6G3、7F9、7G2、7H10。各单克隆抗体细胞培养上清的反应性与抗体亚类见表 1。

2.2 单克隆抗体的腹水效价及特异性

3 株 IgM 类单克隆抗体细胞株得不到效价较高的单抗腹水,试验没有继续进行。其他各株单抗用不同包被抗原的间接 ELISA 进行检测,单抗腹水的反应性及效价见表 2(在 450 nm 波长下检测各孔吸光度值,每个样品设 2 个重复并计算其平均值,腹水做 1:100 稀释),其中 7F9、7G2 与 *E. coli* O157:H7 菌体、LPS、O-SP 都有较强反应,4B2、5E6、6G3、7H10 只与 LPS 有较强反应,与菌体反应较弱,与 O-SP 不发生反应。单克隆抗体特异性检测结果显示,各单抗除了与 *E. coli* O157:H7 和 *E. coli* O157 有较强反应外,与所有其他受试菌均不反应($D_{450\text{ nm}}$ 均小于 0.050)。

表 1 细胞上清反应性与单克隆抗体亚类

Table 1 Reactivity of hybridoma supernatant by indirect ELISA and isotype of MAbs

项目 Items	2B9	4B2	5B2	5E6	5H2	6G3	7F9	7G2	7H10
$D_{450\text{ nm}}$	1.173	1.219	1.075	1.022	1.261	1.271	1.125	1.104	1.287
亚类 Isotype	IgM	IgG2b	IgM	IgG1	IgM	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3

2.3 单克隆抗体的纯化

小鼠腹水分别用 500、450 g/L 饱和硫酸铵盐析

沉淀,再经 Sephacryl S-300 凝胶柱分离纯化,紫外吸收法测定纯化后腹水总蛋白含量均在 1~3

mg/mL。采用 SDS-PAGE 鉴定纯化后单抗的纯度及分子质量分布,结果(见图 1)显示,纯化后单抗主

要有 2 条蛋白区带,重链分子质量约为 50 ku,轻链分子质量在 23~29 ku 之间。

表 2 单抗腹水与不同抗原的反应性与效价

Table 2 Reaction and titer of ascitic fluid with different coating antigen by indirect ELISA

单抗 MAb	$D_{450\text{ nm}}$			腹水效价 Titer of ascitic fluid		
	<i>E. coli</i> O157 : H7	LPS	O-SP	<i>E. coli</i> O157 : H7	LPS	O-SP
7F9	0.912	1.04	1.110	1×10^5	8×10^5	8×10^5
7G2	0.830	0.988	0.856	2×10^4	2×10^5	1×10^5
4B2	0.239	1.162	0.052	6×10^3	2×10^5	
5E6	0.387	0.873	0.064	1×10^4	2×10^5	
6G3	0.212	1.087	0.035	1×10^4	4×10^5	
7H10	0.219	0.993	0.010	3×10^3	2×10^4	

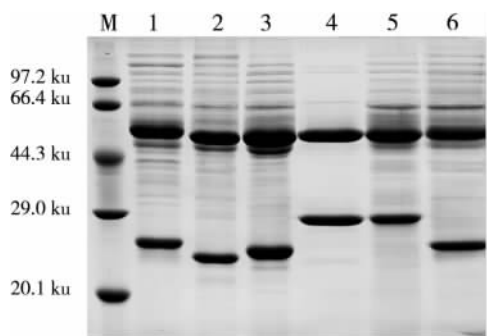


图 1 纯化后单克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified ascitic fluid

M:蛋白质分子质量标准;1~6:分别为单克隆抗体 4B2、5E6、6G3、7F9、7G2、7H10

M:Protein Marker;1-6:MAb4B2, MAb5E6, MAb6G3, MAb7F9, MAb7G2 and MAb7H10, respectively

2.4 Western-blot 分析

LPS 银染与 Western-blot 分析结果(见图 2)显示,*E. coli* O157 : H7 LPS 经 SDS-PAGE 电泳呈典型的阶梯状条带,在 10~60 ku 之间都有分布,主要包括 35~60 ku 的大分子区和 10~20 ku 的小分子区。4B2、5E6、6G3、7H10 与两部分都有反应,7F9、7G2 只与大分子质量的 LPS 有较强的反应。

2.5 双抗夹心 ELISA 最佳反应条件的确定

包被抗体 7G2 的最佳包被浓度为 1.6 $\mu\text{g/mL}$,酶标抗体 7F9-HRP 的最适工作浓度为 1 : 4 000 稀释,底物显色时间以 20 min 为最佳。

2.6 双抗夹心 ELISA 检测方法的特异性和灵敏度

E. coli O157 : H7 双抗体夹心 ELISA 法除了与 *E. coli* O157 : H7 和 *E. coli* O157 有很强的反应外,与其他受试菌株均无交叉反应 ($D_{450\text{ nm}} < 0.050$)。从图 3 可以看出,该方法的最小检测限为 1×10^{15} CFU/mL,约等于 3×10^4 CFU/mL。

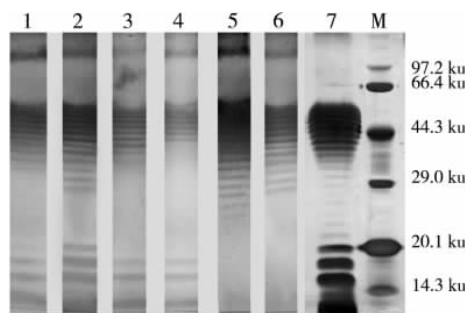


图 2 单克隆抗体与 *E. coli* O157 : H7 LPS 的免疫印迹反应及 *E. coli* O157 : H7 LPS 银染结果

Fig. 2 Western-blot of MAbs on *E. coli* O157 : H7 LPS and result of silver staining of *E. coli* O157 : H7 LPS

M:蛋白质分子质量标准;1~6:分别为单克隆抗体 4B2、5E6、6G3、7F9、7G2、7H10 与 *E. coli* O157 : H7 LPS 的免疫印迹结果;7:*E. coli* O157 : H7 LPS 银染结果

M:Result of silver staining of protein Marker;1-6:Western-blot of MAb 4B2, MAb 5E6, MAb 6G3, MAb 7F9, MAb 7G2 and MAb 7H10 on *E. coli* O157 : H7 LPS, respectively;7:Result of silver staining of *E. coli* O157 : H7 LPS

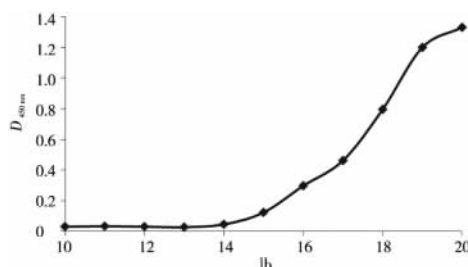


图 3 双抗体夹心 ELISA 检测 *E. coli* O157 : H7 的曲线

Fig. 3 Sandwich ELISA curve for *E. coli* O157 : H7

3 讨论

LPS 是 *E. coli* O157 : H7 细胞壁的重要组成部分,也是决定 *E. coli* O157 : H7 血清型的物质基

础之一,具有免疫优势。本试验用热灭活的 *E. coli* O157:H7 菌体作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠,菌体结合 LPS 作为筛选抗原,得到 9 株阳性杂交瘤细胞,经验证这 9 株单抗全是针对 *E. coli* O157:H7 LPS 的单克隆抗体,所有单抗包括 7F9 和 7G2 都与 *E. coli* O157 有交叉反应,与其他所有受试菌都无交叉反应。在国内外之前的研究中^[8-9],用类似免疫方法制备的 *E. coli* O157:H7 单克隆抗体大多也是针对 LPS 抗原的。另外 Padhye 等^[10]用变异的粗糙型 *E. coli* O157:H7(O 侧链缺失)作为免疫原,得到了 1 株 *E. coli* O157:H7 单克隆抗体,不与 O157:非 H7 或非 O157:H7 反应,但是该单抗与 *E. coli* O26:H11 有交叉反应。据文献^[11]报道,LPS 在 BABL/c 小鼠体内只能激活 Ly-1 B 淋巴细胞系,并且 Ly-1 B 淋巴细胞优先分泌 IgM 或 IgG3 类抗体,本试验得到的 9 株单抗除了 3 株为 IgG1 和 IgG2b 亚类以外,其他 6 株全是 IgM 和 IgG3。

根据与 O-SP 的反应性可将 6 株 IgG 类单克隆抗体分为两类,即:识别 LPS O-特异性多糖的 O-特异性多糖单克隆抗体,包括 7F9 和 7G2;识别 LPS 核心糖脂的核心抗原单克隆抗体,包括 4B2、5E6、6G3 和 7H10,Western-blot 结果也印证了这一点。由于 LPS 具有不均一性,是由核心糖脂(类脂 A 和核心多糖)和具有不同寡糖重复单位的 O-特异性链组成,所以其电泳图呈阶梯状分布。大分子质量的 LPS 分子不仅含有核心糖脂还具有较长的 O-特异性链,所以与 O-特异性多糖单克隆抗体和核心抗原单克隆抗体都有很好的反应性;而小分子质量的 LPS 分子不含 O-特异性链,所以不能与 O-特异性多糖单克隆抗体结合。本试验还发现,如表 2 所示,虽然核心抗原单克隆抗体都与 LPS 有较强的反应性,但是与菌体的反应很弱。在光滑型的革兰氏阴性菌中,O-特异性链位于细菌细胞壁的最外侧,核心糖脂位于 O-特异性链的内侧。因此 O-特异性链对核心糖脂的位阻作用有可能是导致核心糖脂单克隆抗体与菌体反应较弱的原因,而在游离的光滑型 LPS 分子中不存在这种位阻现象。

本试验选择效价较高的 O-特异性多糖单克隆抗体 7F9 作为检测抗体,将其与 HRP 结合制备酶标抗体,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。本试验利用改良过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶酶标抗体,并用 500 g/L 饱和硫酸铵处理 7F9-HRP,除去游离的 HRP,并且笔者在郭春祥等^[7]原方法的基础上进行了改

进,利用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱进一步除去了没有标记上 HRP 的抗体,否则这部分抗体会与酶标抗体复合物竞争结合抗原,从而影响 ELISA 检测的灵敏度。

由于 *E. coli* O157:H7 引发感染的剂量极低^[3],因此检测的灵敏度就显得非常重要,表 3 为本方法与国内外类似方法对纯培养的 *E. coli* O157:H7 检测灵敏度的对比。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 *E. coli* O157:H7 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 *E. coli* O157:H7 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。本方法用 O-特异性多糖单克隆抗体 7G2 作为捕获抗体,另外一株 O-特异性多糖单克隆抗体 7F9 作为检测抗体;结果表明,7G2 和 7F9 与 *E. coli* O157:H7 菌体有非常好的反应性,因此本方法也具有较高的灵敏度。本方法用 2 株不同的单克隆抗体进行检测,只有当菌体同时与 2 株单抗有交叉反应时才会产生阳性结果,说明本方法具有较高的特异性。

表 3 与其他 *E. coli* O157:H7 双抗体夹心 ELISA 检测方法的对比

Table 3 Comparison with other ELISA for detection of *E. coli* O157:H7

方法 Methods	捕获抗体 Capture-antibody	检测抗体 Detection antibody	最低检测限/ (CFU·mL ⁻¹) Detection limit
方法 1 ^[5] Method 1	Polyclonal antibody	MAB	1×10 ³ ~1×10 ⁴
方法 2 ^[12] Method 2	MAB	MAB-biotin	1×10 ⁵
本试验方法 The present method	MAB	MAB-HRP	3×10 ⁴

本试验制备了 *E. coli* O157:H7 LPS 单克隆抗体,并建立了双抗体夹心 ELISA 检测方法,虽然该方法与 *E. coli* O157:非 H7 菌株有交叉反应,但它与其他检测方法结合用于对 *E. coli* O157:H7 的检测。

参考文献(References)

- [1] 夏胜利,沈刚健,靳会娟. 河南省新发传染病 EHEC O157:H7 监测研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(23): 4691-4694.
XIA Sheng-li, SHEN Gang-jian, JIN Hui-juan, et al. Study on emerging infectious diseases of EHEC O157:H7 in Henan

- province[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2008, 35(23): 4691-4694. (in Chinese)
- [2] 李永红, 林玫, 王鸣柳. 广西肠出血性大肠埃希菌 O157 监测研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(10): 1027-1029.
LI Yong-hong, LIN Mei, WANG Ming-liu. Surveillance on the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Guangxi[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2009, 25(10): 1027-1029. (in Chinese)
- [3] BOLTON F J, CROZIER L, WILLIAMSON L K. Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 23(5): 317-321.
- [4] 宋宏新, 马冬, 薛海燕, 等. 双抗夹心 ELISA 法定量检测食品中大肠杆菌 O157 : H7 初探 [J]. 食品科学, 2008, 29(10): 528-530.
SONG Hong-xin, MA Dong, XUE Hai-yan, et al. Quantitative detection of *E. coli* O157 : H7 in foods by double antibody sandwich ELISA method[J]. *Food Science*, 2008, 29(10): 528-530. (in Chinese)
- [5] 赵志晶, 刘秀梅. 大肠杆菌 O157 多克隆抗体及食品中双抗 ELISA 测定方法的研究 [J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 606-609.
ZHAO Zhi-jing, LIU Xiu-mei. Studies on the polyclonal antibody and the double-antibody enzyme-linked immunosorbent assay against *E. coli* O157 in food[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2003, 32(6): 606-609. (in Chinese)
- [6] 徐先栋, 谢珍玉, 王世锋, 等. 脂多糖快速银染检测方法的改良 [J]. 生物技术通报, 2009, 25(3): 95-97.
XU Xian-dong, XIE Zhen-yu, WANG Shi-feng, et al. A modified silver-staining method for lipopolysaccharides detection [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 25(3): 95-97. (in Chinese)
- [7] 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 [J]. 上海免疫学杂志, 1983, 3(2): 97-100.
GUO Chun-xiang, GUO Xi-qiong. Introduce a simple, rapid and efficient sodium periodate oxidation method for producing horse-radish peroxidase labeled antibody [J]. *Current Immunology*, 1983, 3(2): 97-100. (in Chinese)
- [8] WESTERMAN R B, HE Y, KEEN J E, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157 [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(3): 679-684.
- [9] 孙洋, 冯书章, 祝令伟. 肠出血性大肠杆菌 O157 LPS 单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 971-973.
SUN Yang, FENG Shu-zhang, ZHU Ling-wei. Preparation and characterization of monoclonal antibody against LPS antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2007, 23(10): 971-973. (in Chinese)
- [10] PADHYE N V, DOYLE M P. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157 : H7 and O26: H11 [J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(1): 99-103.
- [11] RYAN J L, MORRISON D C. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides: Molecular Biochemistry and Cellular Biology* [M]. Ann Arbor: CRC Press, 1992: 359.
- [12] KERR P, CHART H, FINLAY D. Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157 strains [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90(4): 543-549.

(责任编辑 胡弘博)