

水环境中大肠杆菌多特征抗原及抗体的制备研究

王娜, 何苗*, 施汉昌

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 为了建立用于水环境中大肠杆菌的酶联免疫快速检测方法, 针对水中大肠杆菌属多种血清型的特征, 制备了水环境样品中大肠杆菌的多特征抗原, 包括全菌体抗原、破碎全菌体抗原、菌体抗原、鞭毛抗原和菌毛抗原; 采用这 5 种大肠杆菌抗原分别免疫新西兰大白兔, 获得了 5 种大肠杆菌多克隆抗体, 抗体效价高、纯度好, 具有较强且稳定的特异性结合抗原的功能; 间接 ELISA 方法表明, 全菌体抗体和破碎全菌体抗体的效价均大于 1×10^5 , 性能优良。基于上述抗体, 建立了水中大肠杆菌间接 ELISA 检测方法, 实际水样的检测结果表明, 检测限可达 10^4 个/L。

关键词: 大肠杆菌; 多特征抗原; 多克隆抗体; 水环境; 免疫检测

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)05-1142-05

Preparation of *E. coli* Antigens with Multi-characters and Antibodies in Water Environment

WANG Na, HE Miao, SHI Han-chang

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In order to establish enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect *E. coli* in water environment, *E. coli* multi-characters antigens in water environment were prepared according to the characters of kinds of *E. coli* serotypes, including antigen of whole cell, antigen of disrupted whole cell, somatic antigen, flagellar antigen and fimbrial antigen. *E. coli* polyclonal antibodies were obtained from the New Zealand rabbits immunized with these five antigens, respectively. Antibodies generated in this research are with high titers and good purity, can conjugate with antigens, specifically, stably and strongly. Indirect ELISA shows the titers of antibody of whole cell and antibody of disrupted whole cell are both more than 1×10^5 , and the antibodies are of good quality. Based on these antibodies, we established indirect ELISA method to detect *E. coli* in water environment. The result shows that the detection limitation could be 10^4 /L.

Key words: *E. coli*; multi-characters antigen; polyclonal antibody; water environment; immunoassay

大肠杆菌是环境水质监测和食品安全中重要的指示微生物, 世界各国及国际组织都将大肠杆菌作为重要环境卫生学指标, 并对其提出了严格的限制^[1]。目前国际上公认的大肠菌群标准检测方法以多管发酵法和滤膜法为主, 但是其检测周期长, 操作繁琐, 难以适应污染源快速诊断的需要。近年来, 酶联免疫吸附检测技术 (ELISA) 开始用于大肠杆菌的快速检测, 免疫检测技术以其特异性高、检测灵敏、操作简单等特点^[2,3], 呈现出了较好的应用前景, 受到国内外研究人员的广泛关注。

ELISA 是以免疫学反应为基础, 将抗原-抗体的特异性反应与酶-底物的高效催化作用相结合的检测技术, 抗原与抗体基于 2 种分子间的结构互补性和亲和性而产生特异性结合。Vandekerckhove 等^[4]运用多克隆抗体 ELISA 方法检测致病性大肠杆菌 (EPEC)。Padhyen^[5]采用单克隆抗体 ELISA 检测大肠杆菌 O157:H7。Park 等^[6]采用多克隆抗体的 ELISA 试剂盒来检测粪便中的大肠杆菌 O157, 并与传统的

麦康凯培养基法进行对比。Abuknesha 等^[7]利用 ELISA 检测方法在 2 h 内检测到大肠杆菌 O157 ($10 \sim 10^8$ CFU/mL)。Yao 等^[8]利用间接酶联免疫吸附方法检测活的非可培养状态的大肠杆菌 O157:H7, 最小检测浓度为 10^5 CFU/mL。Sun 等^[9]应用酶联免疫吸附试验检测 O157:H7, 并与常规培养法进行比较, 得到的结果检出率较高, 敏感性较强。

可见, 目前国内外有关大肠杆菌的快速检测研究大多针对强致病性大肠杆菌 O157:H7, 对于总大肠杆菌快速检测技术的研究较少。而环境样品中大肠杆菌包含的血清类型较多, 在开发针对大肠杆菌总量指标的酶联免疫吸附检测技术的研究中, 大肠杆菌的多特征抗原的合成、基于多种抗原的大肠杆菌广谱抗体 (broad spectrum antibody) 的制备是关键

收稿日期: 2006-07-12; 修订日期: 2006-10-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA649160)

作者简介: 王娜 (1981 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境污染物的免疫检测技术, E-mail: wangnake@163.com

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@mail. tsinghua. edu. cn

的技术环节,因为在此基础上方能建立可识别响应环境样品中各种类型大肠杆菌的免疫检测技术。

大肠杆菌的抗原类型主要包括菌体(O)抗原、表面(K)抗原和鞭毛(H)抗原等。目前 O 抗原 173 种, H 抗原 60 种, K 抗原 100 种以上。这些抗原均具有良好的免疫原性,免疫动物可以获得高效价的相应抗血清。但是,这些抗原除了 O 抗原外并不一定在同一菌株上全部表达,有的菌株具有 O、K、H 3 种抗原,而有的菌株则仅有 O 抗原、K 抗原或 O 抗原、H 抗原。此外,即使是同种抗原,由于化学组成及其结构等方面的差异,也会导致在免疫学方面表现出不同的抗原特异性。

鉴于此,本研究从生活污水中提取制备了大肠杆菌多种抗原,包括全菌体抗原、破碎全菌体抗原、菌毛抗原、菌体抗原及鞭毛抗原,通过免疫动物试验获得 5 种类型的多克隆抗体,从中筛选能够特异性识别水中大肠杆菌的广谱抗体,以期对环境样品中大肠杆菌酶联免疫快速准确检测技术的建立奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料

健康雌性新西兰大白兔 10 只,体重 2.5 kg 左右,购自北京大学医学部试验动物中心。

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂(Pierce 公司)。

牛血清白蛋白 BSA 组分 V(Sigma 公司);HRP 酶标羊抗兔抗抗体(Sigma 公司);0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)缓冲液;PBST 由 1 L PBS 中加入 0.5 mL Tween 20 配制;在以下实验中,若未特殊说明,稀释或配制溶液时均使用 PBS 缓冲液,清洗酶标板时均使用 PBST 冲洗;四甲基联苯胺(TMB);过氧化氢;终止液(2 mol/L H_2SO_4)。

1.1.2 主要仪器设备

分光光度计 NanoDrop[®] WD-1000 Spectrophotometer,离心机(上海安亭科学仪器公司, TGL-16B),Mettler-toled 电子感量天平(AL104),Bio-Rad 酶标仪(Model 550),Bio-Rad 洗板机(Model 1575Immunowash),Greiner 96 孔酶标板,HiTrap rProtein A FF 1 mL 柱,垂直板状电泳仪(Bio-RAD Mini-PROTEIN 3 CELL),DY-1 型电泳仪,微量进样器等。

1.2 方法

1.2.1 水样的采集

本研究以城镇生活污水为检测目标,水样分别取自北京市的 4 种生活污水(清河污水处理厂、肖家河污水处理厂、北小河污水处理厂的进水口处,以及清华大学校内生活污水)。共取水样 16 个,每厂 4 个。采样用塑料样品瓶进行^[10]。取回的水样于 4 ℃ 冰箱存放,在采样后 6 h 内完成接种,并进行培养得到大肠杆菌菌株,用以制备大肠杆菌各抗原。

1.2.2 大肠杆菌多特征抗原制备

本研究制备了大肠杆菌的 5 种抗原,包括大肠杆菌全菌体抗原(Q)、破碎全菌体抗原(psQ)、菌体抗原(O)、鞭毛抗原(H)和菌毛抗原(JM)。各抗原的制备方法如下:

全菌体抗原的制备:取大肠菌群菌株接种到牛肉膏蛋白胨培养基上,37 ℃ 孵育箱培养 15 ~ 18 h。用生理盐水洗下菌苔,做成浓菌悬液,配成 1 mL 含有约 1×10^8 个细菌的菌悬液,并用 Mc Farland 比浊管测定菌数。加入福尔马林液使其成为 0.4%,置于 60 水浴 1 h 将菌杀死,作为全菌体抗原。

破碎全菌体抗原的制备:将全菌体抗原 1 mL 用 200 W 超声波细胞破碎仪破碎 3 min,5 s 工作,5 s 间歇,使大肠杆菌细胞壁破碎,抗原位点充分暴露,作为破碎全菌体抗原。

菌体抗原、鞭毛抗原和菌毛抗原的制备方法见参考文献[11]。

1.2.3 大肠杆菌多克隆抗体和酶标抗体的制备及纯化

采用上述制备的 5 种大肠杆菌免疫原对 10 只成年雌性新西兰大白兔进行免疫。免疫途径采用背部 6 点皮下注射法。免疫模型为:免疫剂量采用 1 mL 抗原,每隔 7 d 免疫 1 次,共免疫 5 次。首次免疫采用 1 mL 完全福氏佐剂,加强免疫则采用 1 mL 不完全福氏佐剂。大量取血后将血清置室温中凝固约 2 h,然后置高速离心机以 11 000 r/min 离心 10 min,取上清分装于 -20 ℃ 冷冻或分装于 4 ℃ 冷藏。

将获得的大肠杆菌抗体分别采用饱和硫酸铵盐析沉淀法及 HiTrap rProtein A FF 1 mL 柱免疫亲和层析法进行纯化。取上柱纯化后的样品测定蛋白含量,同时采用 SDS-PAGE 电泳^[12]检测大肠杆菌抗体的纯度。

将大肠杆菌全菌体抗体和破碎全菌体抗体分别制备成酶标抗体,并采用克分子比值对酶标抗体进行鉴定^[13,14]。

1.2.4 大肠杆菌抗体效价的测定

本研究采用间接 ELISA 方法进行试验^[15,16],每孔包被量为 100 μ L,底物采用 TMB.

首先,确定测定大肠杆菌抗体效价的 ELISA 方法的工作条件,包括最佳包被抗原浓度及酶标抗抗体最佳稀释度.以最佳包被抗原浓度进行包被,采用酶标抗抗体最佳稀释度检测自行制备的大肠杆菌多克隆抗体效价.

1.2.5 实际水样的测定

采用国标法^[17]和间接 ELISA 方法对实际水样进行检测.

采用间接 ELISA 方法的具体步骤为:首先对水样进行预处理,抽滤 100 mL 污水,将杂质去除,采用微孔滤膜进行过滤,将1 000 mL 浓缩至 1 mL(包被液)^[18].然后包被预处理后的原污水,根据间接 ELISA 方法步骤进行检测.

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌多特征抗原和抗体的制备及纯化结果

本研究制备了大肠杆菌的 5 种抗原,包括大肠杆菌全菌体抗原(Q)、破碎全菌体抗原(psQ)、菌体抗原(O)、鞭毛抗原(H)和菌毛抗原(JM).

采用本研究制备的大肠杆菌多特征抗原首次免疫新西兰白兔 2 周后即产生特异性抗体,加强免疫后各抗体的含量明显增高,当抗体含量达到最高时获得 5 种抗血清.

抗血清经过纯化之后,需要对其进行定量分析.使用分光光度计测定本研究所制备的大肠杆菌多克隆抗体的蛋白质含量分别为:鞭毛抗体为 2.0 mg/mL,菌毛抗体 3.1 mg/mL,菌体抗体 2.1 mg/mL,破碎全菌体抗体 2.4 mg/mL,全菌体抗体 1.9 mg/mL.本研究获得了蛋白质含量较高的大肠杆菌多克隆抗体.

在测定大肠杆菌多克隆抗体蛋白质含量的基础上,对各种抗体进行 SDS-PAGE 电泳分析.图 1 为各种大肠杆菌多克隆抗体 SDS-PAGE 电泳结果.图 1 中显示,本研究所得 5 种抗体条带清晰,杂蛋白含量少,所制备的各种大肠杆菌多克隆抗体纯度良好.

大肠杆菌抗体是由 4 条对称的多肽链用二硫键以共价和非共价键联结而成^[19].由电泳图可知,本研究所得大肠杆菌抗体轻链和重链清晰,抗体结构完整.由于抗原结合位点的功能依赖于抗体的 2 条链共同形成的特定空间结构,这是抗原特异性结合

的构造基础,它保证了抗原结合位点基本结构的稳定性,因此本研究所制备的 5 种抗体具有较强且稳定的特异性结合抗原的功能.

由图 1 可知,本研究制备的大肠杆菌多克隆抗体重链明显,但轻链较为弥散.产生这种现象的可能原因有:多克隆抗体在进行 SDS-PAGE 电泳时,双链解开,大小不一,因而出现弥散状;针对不同表位产生的轻链大小不一,即使是针对同一表位产生的抗体其轻链大小也不一的,即针对同一表位产生抗体的不同 B 细胞其抗体基因的重排不同,因而大小也不相同,所以呈现弥散状.因此,电泳图中虽然抗体的轻链弥散,但是它不会影响本研究所获得抗体的性能.

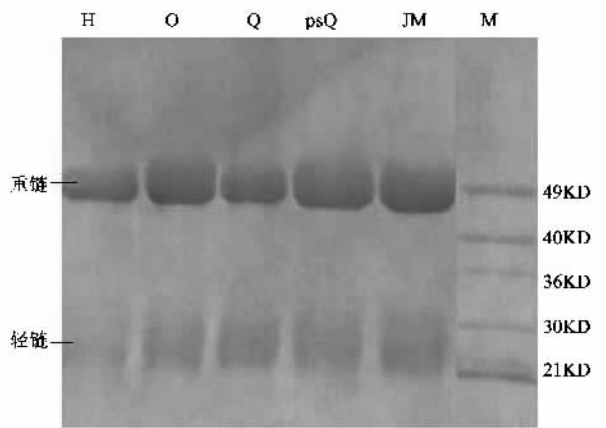


图 1 大肠杆菌抗体电泳图
Fig.1 Electrophoresis of *E. coli* antibody

2.2 确定大肠杆菌抗体效价的 ELISA 方法最佳工作条件

2.2.1 最佳包被抗原浓度的确定

将大肠杆菌全菌体抗原 2 倍系列稀释进行包被,在 100 ~ 12 800 倍稀释范围内,其包被量的变化对光密度值有明显的影响(见图 2).按照包被抗原应选择光密度值 ≥ 1.0 ,阴性(Neg)光密度值 < 0.1 ~

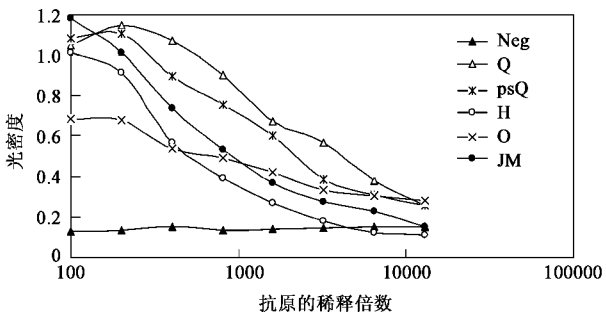


图 2 包被抗原最佳浓度的测定
Fig.2 Determination of best concentration of coating antigen

0.2 的抗原稀释度作为最适包被浓度的原则,本研究统一确定以 200 倍稀释的各抗原作为最佳包被浓度.

2.2.2 酶标抗抗体最佳稀释度的选择

以全菌体抗体作为代表选择酶标抗抗体的最佳稀释度.以 200 倍抗原稀释度进行包被,加入 100 ~ 409 600 倍稀释的抗体,将酶标抗抗体稀释 20 000, 40 000, 60 000, 80 000 倍,测定其最佳稀释度.由图 3 可见,当酶标抗抗体 20 000 倍稀释时,曲线形状良好,且最高光密度值约为 1.1,能够较好地反映抗体性质.因此,本研究确定 20 000 倍稀释的酶标抗抗体的稀释度为最佳稀释度.

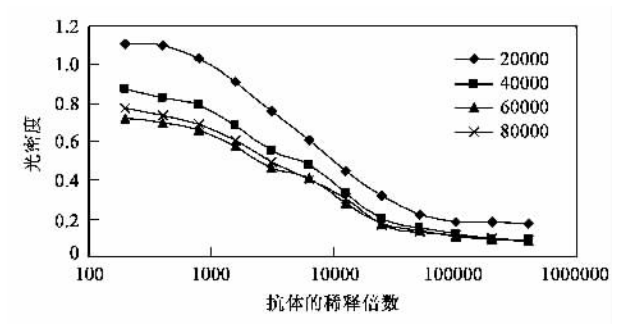


图 3 酶标抗抗体最佳稀释度的测定
Fig.3 Determination of best dilution of enzyme conjugated secondary antibody

2.3 大肠杆菌酶标抗体的鉴定结果

采用分光光度计对大肠杆菌酶标抗体在 403 nm 和 280 nm 下分别进行扫描,分别计算酶标全菌体抗体和酶标破碎全菌体抗体的酶量、抗体量及克分子比值,所得结果见表 1.

表 1 酶标抗体鉴定结果

Table 1 Identification result of enzyme conjugated antibody		
项目	酶标全菌体抗体	酶标破碎全菌体抗体
D_{403}	0.056 8	0.297 9
D_{280}	0.155 6	0.739 6
酶量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.022 72	0.119 16
抗体量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.085 907	0.403 143
克分子比值	1.057 886	1.182 311

一般认为酶标抗体的克分子比值在 1.0 ~ 2.0 范围内比较理想,本研究合成的大肠杆菌全菌体及破碎全菌体酶标抗体经分光光度计测定,计算得克分子比值分别为 1.057 886 和 1.182 311,结果符合该标准.

2.4 大肠杆菌多克隆抗体效价的测定结果

抗体的效价(titer, 又称滴度)是评价抗体性能的一个重要指标,是常用于表达抗血清中特异性抗体

相对含量的一个半定量指标^[20].

为了提高效价测定结果的灵敏度,以最佳包被稀释度为 200 倍稀释的大肠杆菌全菌体抗原作为包被抗原,用间接 ELISA 方法测定大肠杆菌各多克隆抗体,实验中使用最佳稀释度为 20 000 倍的酶标抗抗体,以阴性血清(Neg)作为对照,判断多克隆抗体的效价.大肠杆菌多克隆抗体的效价测定曲线如图 4 所示.

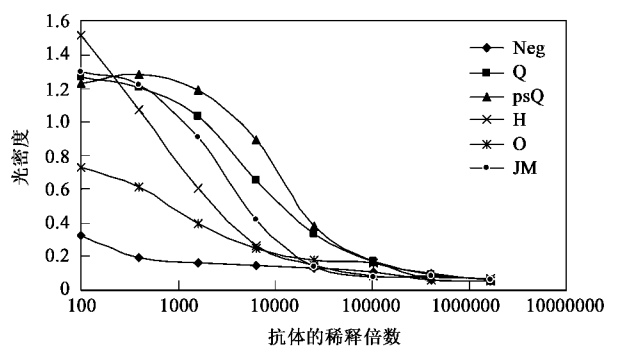


图 4 大肠杆菌多克隆抗体效价的测定
Fig.4 Determination of titers of *E. coli* antibody

由图 4 可知,本研究所制备的 5 种大肠杆菌多特征抗原免疫新西兰白兔均产生了较强的免疫反应,获得的大肠杆菌多克隆抗体对包被的大肠杆菌全菌体抗原具有较高的吸收值,抗体能够与抗原进行特异性反应,具有较强的反应性;由图 4 可知,全菌体抗体和破碎全菌体抗体的效价均大于 1×10^5 ,鞭毛抗体的效价大于 25 600,菌体抗体和菌毛抗体的效价均大于 6 400,可见本研究所制备的 5 种抗体均具有较高的效价;在 5 种抗体中, S 型曲线最好、光密度值最高的为破碎全菌体抗体,这正是上述分析中所提及的破碎全菌体抗原细胞壁的破碎使得各种抗原位点充分暴露,从而产生优良免疫效能的结果.

2.5 实际水样的测定

选取大肠杆菌最优抗体(大肠杆菌全菌体抗体和大肠杆菌破碎全菌体抗体)进行实际水样的测定(见图 5).

经预处理后水样浓缩 1000 倍.将 ELISA 检测结果同国标法结果进行对比可知,ELISA 检测限可达 10^4 个/L.能够满足中华人民共和国国家标准城镇污水处理厂污染物排放标准(GB 18918-2002)一级 B 标准及二级标准、中华人民共和国城镇建设行业标准生活饮用水水源水质标准(CJ 3020-93)二级标准和中华人民共和国国家标准地表水环境质量标准(GB 3838-2002)Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ类标准、中华人民共和国

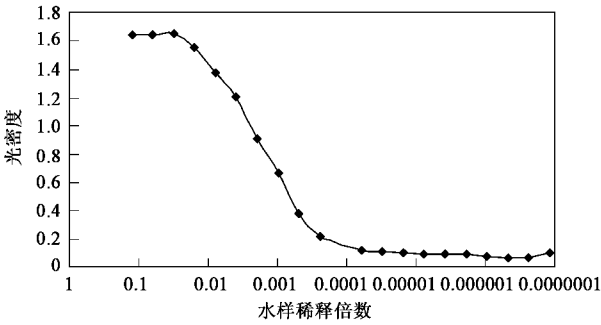


图 5 实际水样的测定结果

Fig.5 Determination of water sample

国家标准海水水质标准(GB 3097-1997)中大肠杆菌的检测要求。

3 结论

本研究制备了水环境样品中大肠杆菌的多特征抗原,包括全菌体抗原、破碎全菌体抗原、菌体抗原、鞭毛抗原和菌毛抗原;分别免疫新西兰大白兔,获得了效价较高、纯度较好的 5 种大肠杆菌多克隆抗体,所得大肠杆菌抗体轻链和重链清晰,抗体结构完整,具有较强且稳定的特异性结合抗原的功能;间接 ELISA 方法表明全菌体抗体和破碎全菌体抗体的效价均大于 1×10^5 ,鞭毛抗体的效价大于 25 600,菌体抗体和菌毛抗体的效价均大于 6 400,其中全菌体抗体及破碎全菌体抗体的性能最好。本研究采用间接 ELISA 测定实际水样中的大肠杆菌,检测限可达 10^4 个/L,表明运用本研究所获得的抗体进行间接 ELISA 方法,能够满足对中华人民共和国国家标准城镇污水处理厂污染物排放标准(GB 18918-2002)一级 B 标准及二级标准、中华人民共和国城镇建设行业标准生活饮用水水源水质标准(CJ 3020-93)二级标准和中华人民共和国国家标准地表水环境质量标准(GB 3838-2002)Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ类标准、中华人民共和国国家标准海水水质标准(GB 3097-1997)中大肠杆菌的检测要求。

参考文献:

[1] 高廷耀,周群英. 环境工程微生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000. 309 ~ 315.

[2] James Sherry. Environmental immunoassays and other bioanalytical methods: overview and update[J]. Chemosphere, 1997, **34**: 1011 ~ 1025.

[3] Andreotti P E, Ludwig G V, Peruski A H, et al. Immunoassay of infectious agents[J]. Biotechniques, 2003, **35**: 850 ~ 859.

[4] Vandekerchove D G F, Kerr P G, Callebaut A P, et al. Development of a capture ELISA for the detection of antibodies to Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) in rabbit flocks using intimin-specific monoclonal antibodies[J]. Veterinary Microbiology, 2002, **88**(4): 351 ~ 366.

[5] Padhyen V, Doyle M P. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for Enterohemorrhagic Escherichia coli of serotypes O157 : H7 and O26 : 11 [J]. Clinical Microbiology, 1991, **29**: 99 ~ 103.

[6] Park C H, Vandel N M, Hixon D L. Rapid immunoassay for detection of Escherichia coli O157 directly from stool specimens[J]. Clinical Microbiology, 1996, **34**: 988 ~ 990.

[7] Abuknesha R A, Darwish F. Coupling of enzymatic and immunoassay steps to detect E. coli: a new, highly sensitive tandem technique for the analysis of low levels of bacteria[J]. Talanta, 2005, **65**(2): 343 ~ 348.

[8] Yao Fei, Sha Sha, Chen Gang, et al. Indirect enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of viable but nonculturable Escherichia coli O157 : H7 [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, **31**(2): 211 ~ 214.

[9] Sun Ke-jiang, Guo Hong, Zhang Dong-fa, et al. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting O157 : H7 [J]. Disease Surveillance, 2001, **16**(9): 353 ~ 355.

[10] 孙成. 环境监测实验[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 195 ~ 200.

[11] 房海. 大肠埃希氏菌[M]. 石家庄: 河北科技出版社, 1997. 106 ~ 113.

[12] Scopes R K. Protein purification: principles and practice[M]. New York: Sping-verlag, 1994. 243 ~ 265.

[13] Masatoshi Nakano. Localization of renal and intestinal trehalase with immunofluorescence- and enzyme-labeled antibody techniques[J]. Histochemistry and Cytochemistry, 1982, **30**(12): 1243 ~ 1248.

[14] Zeck A, Eikenberg A, Weller M G, et al. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, **441**(1): 1 ~ 13.

[15] Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, et al. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity[J]. Nature Toxins, 1995, **3**(2): 78 ~ 86.

[16] Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, et al. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex for med by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody[J]. Nature Toxins, 1999, **7**(2): 49 ~ 55.

[17] 美国食品与药品管理局编,甄宏太,俞平译. 细菌学分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1982. 472 ~ 492.

[18] Straub T M, Chandler D P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens[J]. Microbiological Methods, 2003, **53**: 185 ~ 197.

[19] 于善谦,王洪海,朱乃硕,等. 免疫学导论[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 42 ~ 49.

[20] 张素雅. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 47 ~ 58.