



分类号 _____

学校代码 10136

ICS号 _____

学 号 202100687

内蒙古民族大学

ᠮᠤᠩᠭᠣᠯᠠ ᠮᠢᠨᠵᠤ ᠤᠨᠢᠯᠤᠰ

硕士学位论文

牛乳腺炎致病性粪肠球菌 *esp* 表面蛋白抗原性分析及单克隆抗

体胶体金标记免疫层析试剂盒研究

Analysis of Antigenicity of Surface Protein of Bovine

Mastitis-causing *Enterococcus faecalis esp* and Study of

Monoclonal Antibody Colloidal Gold Labeling

Immunochromatographic Kit

作 者：石竞楠

学科专业：生物学

研究方向：微生物学

学位类别：学术学位

指导教师：布日额 教授

论文提交日期：二〇二四年六月

国家自然科学基金项目（No. 31760725, 32060798）；内蒙古自治区科技厅关键技术攻关项目（No.2021GG0001）；内蒙古自然科学基金项目（No. 2021MS03084）支持。

摘 要

奶牛乳腺炎是目前全球奶业最常见、最流行的疾病之一。它在全国各地都有不同程度的发生和蔓延，给农业造成了严重的经济损失，尤其是在气候寒冷干燥的内蒙古地区，其发病率更高。近年来，粪肠球菌已成为导致奶牛乳腺炎的主要病原体。伴随着抗生素应用广泛，并且粪肠球菌具有耐药性的特点。耐药性粪肠球菌菌株逐年增加，导致粪肠球菌的耐药性问题日渐严重，成为目前乳源安全、牛乳腺炎临床病例诊治、医院感染及食品公共卫生安全方面的现实风险和需要解决的问题。从全球有效防控各类生物危害事件中获得的经验看，早诊断、早预防是防治关键技术，但是目前尚无相关现地快速检测技术产品和商品化疫苗，且抗生素治疗效果有限，反倒增加耐药菌新增的风险。实验室常用的普通 PCR、荧光定量 PCR、ELISA 抗体检测等已用于粪肠球菌 *esp* 致病因子的诊断，但便携式快速现地检测方法才能真正满足应激性诊断的需求。由于奶牛乳腺炎粪肠球菌 *esp* 致病因子的检测难度较大且常规的检测技术比较落后，检测结果不准确，胶体金法是一种简单、迅速、独特且灵敏的方法，有稳定以及结果评估直观等优点，可应用于现地临床快速检测需求，成为该实验开展研究，攻关破解关键技术的科学问题。

本实验主要开展以下研究：

1) 依据 Genbank 发布的粪肠球菌 *esp* 基因 CP045045.1 的 DNA 序号，构建了独特的引物对。*esp* 基因被成功克隆，pET-30a-*esp* 载体得以重组并利用 Western blotting 印迹技术确定了该蛋白的抗原表达。在此基础上，利用 DNA Star 生物信息学软件，探索了表达蛋白的空间布局和其物理化学属性、跨膜区域和抗原性，并进行了预测和分析。结果表明，二级结构主要是不规则的复杂结构，表面有较多连续的抗原表位，可推测该蛋白具有跨膜特性，抗原可及性较为集中。

2) 把重组的 pET-30a-*esp* 转化到大肠杆菌 BL21 细胞中，IPTG 成功地诱导重组 pET-30a-*esp* 蛋白，并有着高度表达。随后，对 pET-30a-*esp* 重组蛋白用 Ni-NTA 进行纯化，并通过 Western 免疫印记技术确认了其反应原性。研究发现，在 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 180 rpm 37℃ 的条件下，5 h 内 pET-30a-*esp* 重组蛋白可以诱导表达，而且蛋白的表达量也处于较高的水平；利用 Elution Buffer 对 pET-30a-*esp* 重组蛋白进行洗脱，成功生成了单一的目标条带，其分子量大约为 37KDa；Western-blotting 结果得出，经纯化后的 pET-30a-*esp* 重组蛋白能够被相应抗体所识别。

3) 用纯化重组的 pET-30a-*esp* 蛋白免疫 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，小鼠即可产杂交瘤 *esp* 单克隆抗体。随后，杂交瘤细胞的阳性克隆被间接 ELISA 方法筛选出来，两次亚克隆的操作，通过一系列培养扩增，小鼠被腹腔注射，辛酸-硫酸铵纯化出单克隆抗体。间接 ELISA 测试抗体的效价，Western-blotting 来鉴定其特殊反应性能。经过筛选，确定了两种具有较高特异性的杂交瘤细胞株，其能将抗体稳定分泌，并被命名为 1A7 和 6F6，抗体效价均可达到 1:128000。

4) 使用纯化的兔抗粪肠球菌全菌体多克隆抗体作为 T 线（1:200）和纯化的小鼠 1A7 单克隆抗体（12 μ g/mL pH 8.0）作为胶体金标记抗体，C 线使用羊抗鼠 IgG（1 mg/mL），组成胶体金检测试纸条。该抗原胶体金免疫层析试纸条在检测金黄色葡萄球菌，无乳链球菌，枯草芽孢杆菌，猪链球菌，鸭疫里默氏杆菌，沙门氏菌菌液中均不产生反应线，证明此试纸条特异性良好。检测粪肠球菌的细菌量可达 10^5 CFU/ml。在 36 份的粪肠球菌阳性乳样样品和 14 份阴性乳样样品中的检测，使用本次研究中制备的胶体金试纸条和传统的 PCR 两种技术进行了测试。测试结果的符合率高达 96.7%，显示出较高的准确性。经过多次实验验证，这种试纸条具有良好的重复性和稳定性，能够在 15 min 内完成对样本的快速检测。在本次研究中，成功地制备胶体金标记的牛乳腺炎致病性粪肠球菌 *esp* 单克隆抗体的免疫层析试剂盒，可以实现快速、特异地检测临床样本中的 *esp* 致病因子，可初步应用于牛乳腺炎粪肠球菌 *esp* 致病因子的临床检测，对早期诊断、预防和控制奶牛乳腺炎具有重要的应用价值。

关键词：牛乳腺炎；粪肠球菌；*esp*；单克隆抗体；胶体金试纸条

Abstract

Mastitis in dairy cows is currently one of the most common and prevalent diseases in the global dairy industry. It occurs and spreads to varying degrees throughout the country, causing serious economic losses to agriculture, especially in the cold and dry climate of Inner Mongolia, where its incidence is higher. In recent years, *Enterococcus faecalis* has emerged as a major pathogen causing mastitis in dairy cows. This is accompanied by the widespread use of antibiotics and the fact that *Enterococcus faecalis* is characterized by drug resistance. Drug-resistant *Enterococcus faecalis* strains have been increasing year by year, leading to the growing problem of drug resistance of *E. faecalis*, which has become a real risk and a problem that needs to be solved in terms of the safety of the milk supply, the diagnosis and treatment of clinical cases of bovine mastitis, hospital infections, and the safety of public health of foodstuffs. From the experience gained in the effective prevention and control of various types of biohazardous events around the world, early diagnosis and prevention are the key technologies for prevention and control, but there are currently no relevant in situ rapid detection technology products and commercialized vaccines, and antibiotics have limited therapeutic effects, which in turn increase the risk of the emergence of new drug-resistant bacteria. Commonly used laboratory general PCR, fluorescence quantitative PCR, ELISA antibody assays have been used for the diagnosis of *Enterococcus faecalis esp* pathogenicity factors, but portable rapid in situ assays can truly meet the needs of stress diagnosis. Due to the dairy cow mastitis *Enterococcus faecalis esp* pathogenic factor detection difficulty and conventional detection technology is relatively outdated, the test results are inaccurate, colloidal gold method is a simple, rapid, unique and sensitive method, there are stable as well as the results of the assessment of the advantages of intuitive, etc., can be applied to the current clinical needs of rapid detection, become the experiments to carry out research, the attack on the cracking of the key technical scientific issues.

This experiment focuses on the following studies:

- 1) A unique primer pair was constructed based on the DNA sequence number of the *Enterococcus faecalis esp* gene CP045045.1 released by Genbank. The *esp* gene was successfully cloned and the pET-30a-*esp* vector was recombined and antigenic expression of the protein was determined using Western blotting. On this

basis, the spatial layout of the expressed proteins and their physicochemical properties, transmembrane regions and antigenicity were explored, predicted and analyzed using DNA Star bioinformatics software. The results show that the secondary structure is mainly irregular and complex with more continuous antigenic epitopes on the surface, which can be speculated that the protein has transmembrane properties and more concentrated antigenic accessibility.

2) The recombinant pET-30a-*esp* was transformed into *E. coli* BL21 cells, and IPTG successfully induced the recombinant pET-30a-*esp* protein with high expression. Subsequently, the pET-30a-*esp* recombinant protein was purified with Ni-NTA and its reactogenicity was confirmed by Western immunoblotting. It was found that the expression of pET-30a-*esp* recombinant protein could be induced within 5 h at an IPTG concentration of 0.4 mmol/L 180 rpm 37° C, and the protein expression was also at a high level; Elution of pET-30a-*esp* recombinant protein using Elution Buffer successfully generated a single target band with a molecular weight of approximately 37 KDa; Western-blotting results yielded that the purified pET-30a-*esp* recombinant protein was able to be recognized by the corresponding antibody.

3) Immunization of 6-week-old female BALB/c mice with purified recombinant pET-30a-*esp* protein results in the production of hybridoma *esp* monoclonal antibodies in the mice. Subsequently, positive clones of hybridoma cells were screened by an indirect ELISA method, twice subcloned for manipulation, expanded through a series of cultures, and the mice were intraperitoneally injected with octanoic acid-ammonium sulfate to purify the monoclonal antibody. Indirect ELISA to test the potency of the antibody and Western-blotting to characterize its specific reactivity. After screening, two hybridoma cell lines with high specificity for stable antibody secretion were identified and named 1A7 and 6F6, both with antibody potency up to 1:128,000.

4) Colloidal gold detection test strips were composed using purified rabbit anti-*E. faecalis* whole bacterial polyclonal antibody as the T-line (1:200) and purified mouse 1A7 monoclonal antibody (12 μg/mL pH 8.0) as the colloidal gold-labeled antibody, and goat anti-mouse IgG (1 mg/mL) for the C-line. The antigenic colloidal gold immunochromatographic test strips did not produce reaction lines in the detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus porcineus*, *Rimerella duckii*, and *Salmonella bacterial fluids*,

which proved that the test strips had good specificity. Detects *Enterococcus faecalis* bacteria up to 10^5 CFU/ml. Detection of *E. faecalis* in 36 positive and 14 negative milk samples was tested using both colloidal gold test strips prepared in this study and conventional PCR. The compliance rate of the test results was as high as 96.7%, showing a high degree of accuracy. After many experiments, this test strip has good reproducibility and stability, and can complete the rapid detection of samples within 15 min. In this study, an immunochromatographic kit of colloidal gold-labeled monoclonal antibody against bovine mastitis pathogenic *Enterococcus faecalis esp* was successfully prepared, which can achieve rapid and specific detection of *esp* pathogenicity factor in clinical samples, and can be preliminarily applied to the clinical detection of bovine mastitis *Enterococcus faecalis esp* pathogenicity factor, which is of great application value for the early diagnosis, prevention and control of mastitis in dairy cows.

Key words: Bovine mastitis; *Enterococcus faecalis*; *esp*; Monoclonal antibody;
Colloidal gold test strip

目 录

摘 要	I
Abstract	III
目 录	VII
插图清单	XII
附表清单	XIV
缩略语表	1
1 引言	1
1.1 粪肠球菌研究进展	2
1.1.1 粪肠球菌的生物学特性	2
1.1.2 粪肠球菌流行病学及其致病性	3
1.1.3 粪肠球菌诊断方法研究	4
1.2 粪肠球菌毒力因子	4
1.2.1 聚集物质	4
1.2.2 心内膜炎抗原	5
1.2.3 胶原蛋白黏附素	5
1.2.4 细胞溶血素	5
1.2.5 丝氨酸蛋白酶	5
1.2.6 明胶酶	6
1.2.7 表面蛋白	6
1.3 单克隆抗体	6
1.3.1 单克隆抗体的免疫学原理	6
1.3.2 动物细胞融合技术	6
1.3.3 单克隆抗体的应用	7
1.4 胶体金技术研究进展	7
1.4.1 胶体金技术原理	7
1.4.2 胶体金技术在免疫学中的应用	8
1.4.3 胶体金技术的优点	8
1.4.4 胶体金技术发展现状	8
1.5 本研究的目的是及研究意义	9
2 材料与方法	10
2.1 材料	10
2.1.1 菌株, 细胞及实验动物	10

2.1.3	主要仪器设备	11
2.1.4	主要试剂配制	12
2.2	粪肠球菌的分离与鉴定	15
2.2.1	粪肠球菌的活化培养	15
2.2.2	革兰氏染色鉴定	15
2.2.3	糖发酵实验	16
2.2.4	药敏实验	16
2.3	牛乳腺炎粪肠球菌 <i>esp</i> 基因的克隆	16
2.3.1	引物的设计及合成	16
2.3.2	粪肠球菌基因组的提取	16
2.3.3	<i>esp</i> 基因的 PCR 扩增	16
2.3.4	PCR 产物的纯化和胶回收	17
2.3.5	<i>esp</i> 基因与 pMD18-T 载体的连接	17
2.3.7	重组克隆载体 pMD18-T- <i>esp</i> 的转化实验	18
2.3.8	重组质粒 pMD18-T- <i>esp</i> 的提取	18
2.3.9	重组质粒 pMD18-T- <i>esp</i> 的酶切及 PCR 鉴定	18
2.4	原核表达载体 pET-30a- <i>esp</i> 的构建	19
2.4.1	原核表达载体 pET-30a(+)的提取	19
2.4.2	<i>esp</i> 基因与质粒 pET-30a(+)连接	19
2.4.3	重组质粒 pET-30a- <i>esp</i> 的转化实验	20
2.4.4	重组质粒 pET-30a- <i>esp</i> 的双酶切鉴定	20
2.4.5	重组质粒 pET-30a- <i>esp</i> 的生物信息学分析	20
2.5	重组 ESP 蛋白初步表达及条件优化	20
2.5.1	ESP 重组蛋白初步表达	20
2.5.2	pET-30 a- <i>esp</i> 重组蛋白诱导表达时间的探究	20
2.6	pET-30 a- <i>esp</i> 重组蛋白纯化及表达	21
2.6.1	填料再生	21
2.6.2	pET-30 a- <i>esp</i> 重组蛋白的纯化	21
2.6.3	pET-30 a- <i>esp</i> 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳分析	22
2.6.4	小鼠抗 ESP 蛋白抗原血清的制备	22
2.6.5	表达的重组 ESP 蛋白抗原的 Western blot 鉴定	22
2.7	pET-30 a- <i>esp</i> 重组蛋白单克隆抗体的制备	23
2.7.1	免疫小鼠	23
2.7.2	检测小鼠血清免疫效价	23

2.7.3	骨髓瘤细胞的准备	23
2.7.4	脾细胞的准备	24
2.7.5	饲养细胞的制备	24
2.7.6	细胞融合与杂交瘤细胞的选择性培养	24
2.7.7	杂交瘤细胞的筛选	25
2.7.8	杂交瘤细胞的克隆化	25
2.7.9	杂交瘤细胞的冻存与复苏	25
2.7.10	小鼠腹水的制备	26
2.7.11	单克隆抗体的纯化	26
2.7.12	单克隆抗体的 Western blotting 鉴定	26
2.7.13	单克隆抗体效价测定	27
2.8	粪肠球菌全菌体多克隆抗体的制备	27
2.8.1	免疫原制备	27
2.8.2	动物免疫	27
2.8.3	间接 ELISA 检测多抗血清效价	27
2.8.4	兔抗多克隆抗体的产生进程	28
2.8.5	兔抗多克隆抗体的纯化及 SDS-PAGE 鉴定	28
2.9	胶体金试纸条的制备	28
2.9.1	玻璃器皿的硅化	28
2.9.2	胶体金溶液的制备	28
2.9.3	胶体金颗粒的鉴定	28
2.9.4	单克隆抗体与胶体金颗粒结合的最佳 pH 的确定	29
2.9.5	单克隆抗体与胶体金颗粒结合的最佳标记量的确定	29
2.9.6	金标抗体的制备	29
2.9.7	胶体金检测试纸条的组装	29
2.9.8	胶体金检测试纸条的性能评价	31
3	结果与分析	32
3.1	粪肠球菌菌株鉴定结果	32
3.1.1	粪肠球菌革兰氏染色结果	32
3.1.2	糖发酵试验结果	32
3.1.3	药敏试验结果	33
3.2	粪肠球菌 <i>esp</i> 基因的克隆	33
3.2.1	粪肠球菌表面蛋白 <i>esp</i> 基因扩增结果	33
3.3	重组表达载体 pET-30a(+)- <i>esp</i> 的构建及鉴定结果	35

3.4	表面蛋白 <i>esp</i> 基因序列生物信息学分析	36
3.4.1	表面蛋白 <i>esp</i> 基因序列的克隆及同源性分析	36
3.4.2	<i>esp</i> 基因编码蛋白的二维结构及三维结构预测	37
3.4.3	<i>esp</i> 基因编码蛋白的理化性质预测分析	38
3.4.4	跨膜领域分析	39
3.4.5	抗原性预测分析	40
3.5	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白的表达	40
3.5.1	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白的初步表达	40
3.5.2	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白诱导表达时间的探究	41
3.5.3	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析	42
3.5.4	ESP 重组蛋白的 Western blotting 分析	43
3.6	单克隆抗体的制备	43
3.6.1	小鼠血清免疫效价的测定	43
3.6.2	细胞融合	44
3.6.3	杂交瘤细胞筛选结果	44
3.6.4	杂交瘤细胞的克隆化结果	45
3.6.5	单克隆抗体的制备及腹水的纯化	45
3.6.6	ESP 蛋白单克隆抗体 1A7, 6F6 的纯化	46
3.6.7	单克隆抗体 1A7, 6F6 的 Western blotting 鉴定	47
3.6.8	单克隆抗体效价鉴定	47
3.7	粪肠球菌多克隆抗体的制备	47
3.7.1	兔抗多克隆抗体的产生进程	47
3.7.2	间接 ELISA 测多克隆抗体效价	48
3.7.3	多克隆抗体 SDS-PAGE 分析	48
3.8	胶体金免疫层析试纸条的制备	49
3.8.1	胶体金溶液的制备	49
3.8.2	胶体金与抗体最佳标记 pH 的确定	50
3.8.3	胶体金与抗体最佳标记量的确定	50
3.8.4	特异性实验结果	51
3.8.5	敏感性实验结果	51
3.8.6	重复性实验结果	52
3.8.7	稳定性实验结果	52
3.8.8	胶体金检测试纸条的初步应用结果	53
4	讨论	55

4.1 粪肠球菌表面蛋白 <i>esp</i> 基因的克隆及表达	55
4.2 pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白单克隆抗体的制备	56
4.3 粪肠球菌胶体金检测试纸条的制备	57
4.4 胶体金免疫层析检测技术与 PCR 技术的符合度测试	58
5 结论	59
参考文献	60
致 谢	68
作者简介	69

插图清单

图 1	胶体金检测试纸条的组装示意图	30
图 2	粪肠球菌革兰染色观察(20×100)	32
图 3	<i>esp</i> 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定	34
图 4	<i>esp</i> 基因菌液 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定	34
图 5	重组质粒 pMD18-T- <i>esp</i> PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定	35
图 6	重组质粒 pMD18-T- <i>esp</i> 双酶切鉴定	35
图 7	重组表达质粒 pET-30a- <i>esp</i> 双酶切鉴定	36
图 8	<i>esp</i> 基因克隆序列与序列(CP045045.1)BLAST 比对分析	37
图 9	粪肠球菌 <i>esp</i> 基因序列进化树	37
图 10	ESP 蛋白二级结构预测	38
图 11	ESP 蛋白三级结构预测	38
图 12	ESP 蛋白理化性质分析	39
图 13	ESP 蛋白序列跨膜领域分析	39
图 14	表面蛋白 ESP 基因抗原性分析	40
图 15	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白的初步表达	41
图 16	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白诱导表达时间	42
图 17	pET-30a- <i>esp</i> 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析	42
图 18	ESP 重组蛋白 Western blotting 鉴定	43
图 19	3 只小鼠血清抗体效价试验结果	44
图 20	融合杂交瘤细胞形态 (100×20)	44
图 21	杂交瘤细胞筛选结果	45
图 22	亚克隆杂交瘤细胞形态 (100×20)	45
图 23	接种杂交瘤细胞小鼠	46
图 24	单克隆抗体腹水的纯化	46
图 25	单克隆抗体 Western blotting 鉴定	47
图 26	兔抗多克隆抗体的产生进程	48
图 27	ELISA 测多克隆抗体效价	48
图 28	多克隆抗体 SDS-PAGE 分析	49
图 29	制备完成的胶体金溶液	49
图 30	胶体金溶液吸光度	50
图 31	胶体金与抗体最佳标记 pH	50
图 32	胶体金与抗体最佳标记量	51

图 33 特异性实验结果	51
图 34 敏感性实验结果	52
图 35 重复性实验结果	52
图 36 稳定性实验结果	53

附表清单

表 1	主要耗材及试剂	10
表 2	主要仪器设备	12
表 3	PCR 反应条件	17
表 4	PCR 反应体系	17
表 5	pMD18-T- <i>esp</i> 重组质粒连接体系	17
表 6	pMD18-T- <i>esp</i> 重组质粒双酶切体系	19
表 7	pET-30a(+) 双酶切体系	19
表 8	pET-30a- <i>esp</i> 重组质粒连接体系	20
表 9	实验菌株生化实验结果	33
表 10	药敏试验结果	33
表 11	ELISA 检测纯化后腹水 OD450 值	47
表 12	胶体金检测试纸条的初步应用结果	54

缩略语表

AS (Aggregation substance)	聚集物质
Ace (Adhesin of collagen)	胶原蛋白黏附素
BSA (B ov ine Serum Albumin)	牛血清蛋白
Cyl (Cytolysin)	溶血素
CYLA (Cytolysin activator)	溶血素激活蛋白
CYLB (ABC -type transporter)	溶血素转运蛋白
CYLM (Cytolysin subunit modifier)	溶血素修饰蛋白
CYLI (Cytolysin immunity protein)	溶血素免疫蛋白
Esp (enterococcal surface protein)	肠球菌表面蛋白
efaA (endocarditis antigen)	心内膜炎抗原
APM (Ampicillin)	氨苄青霉素
BSA (bovine serum albumin)	牛血清白蛋白
dNTP (Deoxy-ribonucleoside triphosphate)	脱氧核糖核苷三磷酸
E.coli BL2I (Escherichia coli BL21)	基因工程表达菌
E.coli DH5a (Escherichia coli DH5a)	基因工程克隆菌
FCA (Freund complete adjuvant)	弗氏完全佐剂
FIA (Freund incomplete adjuvant)	弗氏不完全佐剂
IPTG (Isopropylthio- β -D-thiogalactose)	异丙基_ β _D-硫代半乳糖苷
rpm(Rotateperminute)	每分钟转数
SDS (Sodium dodecyl sulfata)	十二烷基磺酸钠
HAT (Hypoxanthine Aminopterin, Thymidine)	筛选培养基
HT (Hypoxanthine, Thymidine)	HT 培养基

1 引言

奶牛乳腺炎（Bovine mastitis）是一种很普遍的疾病，主要症状是乳腺组织出现红肿、发热和疼痛，同时乳汁的性质也发生了变化，体细胞数量也有所增加，导致乳腺组织出现不同程度的炎症反应，其损害乳腺组织，导致奶牛的乳汁分泌能力下降，乳汁品质下降，最终使奶牛患病后被淘汰，产生很大的经济损失^[1,2]。乳腺炎疾病存在于全球大约三分之一的奶牛当中，国内外也一直在研究有效措施，奶牛乳腺炎防治工作取得了些许成效，但却不尽人意，其中以隐性乳房炎最为严重^[3,4]。据新闻报道，美国、日本等国家牛乳腺炎的发病率为 62.1%，我国为 73.9%。牛乳腺炎发现历史已有近 200 年，国内外学者也曾进行了近 100 年的研究，但至今仍未提出一个彻底解决的技术^[5,6]。牛乳腺炎在我国上海、江苏、安徽等地发病率高达 30% 以上，内蒙古地区的发病率在 70% 以上^[7,8]。奶牛乳腺炎是病原入侵、乳腺机械性损伤、营养不均衡造成的免疫功能低下、生活环境不佳等原因所致，而致病微生物所致的乳腺炎是最常见的^[9]。

复杂的病原菌种类分两种情况致使奶牛发病，一种是接触传染另一种是环境型，多个病原体使奶牛患上乳腺炎。按致病因素可将其分为两类：一是接触感染，二是环境感染^[10]。接触传染型病原菌是引起乳腺炎的重要病原体，它可以通过乳汁等途径在奶牛中传播^[11]。常见的病原菌有三种，分别是金黄色葡萄球菌、无乳链球菌及牛支原体^[12]。研究表明，做好产奶前、产奶后的药浴工作，以及产奶用具的定期清洗和消毒，都能有效地减少感染性病原在母牛间的传播^[13]。环境病原菌较多的分布在牛床上，包括能够产生排泄物的场所。当奶牛采奶或休息时，外界致病菌进入奶牛乳腺的可能性明显增加^[14]。常见的有粪肠球菌，大肠杆菌，肺炎克雷伯菌，凝固酶阴性葡萄球菌，乳腺链球菌等^[15]。针对环境致病菌，牧场要注意环境卫生，同时要优化挤奶方法，以避免奶牛乳腺受伤^[16]。

粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）也可称为粪链球菌，被分类为 D 群^[17]。它可以产生一种具有强烈致病性的外毒素，能够引起人类急性腹泻和败血症等病症，并且在粪便中还会分离出一些菌株。这种病原体是最近被识别出来的，与医院内的感染和牛奶有关。由于粪肠球菌可以引起人体多种器官或者系统的感染性炎症，所以在临床上很容易被忽视。主要为严重基础病症和重症的老年人、幼儿，以及免疫系统功能相对较弱的人群^[18]。在临床上还经常遇到一些其他原因导致了免疫力低下或者机体抵抗力下降的情况下发生的感染病例。如前所述，这一特定群体也是牛奶消费量相对较大的一部分，他们有可能患败血症、心内膜炎、盆腔感染、腹腔感染、尿路感染、牙根炎、动脉炎以及新生儿败血症^[18]。其中最常发生的是败血症，其次就是心内膜炎和子宫内膜炎等其他感染

性疾病，而婴儿腹泻则相对少见。这类细菌在人类和动物的肠道里是一个普遍存在的微生物群体，它们在人类和动物的居住环境、例如排泄的粪便，呼吸道和生殖道中^[19]。最新的研究报告揭示，在对 7 名中国儿童的粪便样本进行研究后，可查到具有毒性的毒力基因占 66.4%，均是导致机会性感染的病原体^[20]。粪肠球菌作为一种条件致病菌，可以引起食物中毒、呼吸道感染等疾病。近些年来，有关粪肠球菌引发的食源性和院内感染的研究报告逐渐增加。在美国，血液感染的三大诱因之一包括粪肠球菌感染在内，中国的各类相关的检测和研究也在进行中。粪肠球菌引起的疾病主要为脑膜炎，肺炎以及菌血症。因基因检测结果揭示了牛乳源粪肠球菌携带复杂的致病基因，小鼠在其注射 72 h 内可被致死^[21]。*esp* 基因与这种病原菌的附着、感染以及生物被膜生成之间存在明确的关联，生物被膜的生成将显著增强菌株对药物和药物的抗性^[22]。粪肠球菌的表面蛋白 *esp* 是一种能够黏附的表面蛋白，它在生物被膜生成的过程中发挥着至关重要的角色^[23]。粪肠球菌的生物被膜形成是受到多重因素影响的。*esp* 基因的存在可以增强细菌在无机表面和生物被膜中的黏附能力，使得生物膜变得更为稳固和强大。因此，*esp* 基因被视为致病性粪肠球菌的独特标志^[24,25]。

在我国奶牛养殖业中，对奶牛乳腺炎的治疗方法存在一定的误区和局限性^[26]。目前，中国奶牛乳腺炎的传统治疗方法主要依赖抗生素和激素治疗、在酶制剂的治疗和疫苗的预防措施中，抗生素治疗被认为是最常见且效果显著的方法^[27]。虽然短期内能缓解症状，但长期使用易导致致病细菌产生耐药性和机体的不良反应^[28]。进而导致肠道微生物群的多样性减少，耐药菌株群增加，并在奶牛体内形成抗生素残留。奶牛体内和牛奶中的抗生素残留物不仅会增加乳腺炎治疗的难度，而且还会增加传播耐药菌的风险^[29]。此外，传统的中医治疗方法在奶牛乳腺炎治疗中也有一定的局限性，如疗效较慢、个体差异较大等^[30]。创制快速检测奶牛乳源致病性粪肠球菌的试剂盒技术产品，为确保原料乳安全，防控乳源致病性粪肠球菌通过牛乳向人类转移，造成生物安全风险。研究新型关键技术产品，做到早发现、早治疗，保障内蒙古地区乳品产业的健康发展，为实现习近平总书记交给内蒙古自治区的“五大任务”提供乳源安全保障技术支撑，减少乳源生物危害具有重要意义。

1.1 粪肠球菌研究进展

1.1.1 粪肠球菌的生物学特性

粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 是球型的革兰氏阳性菌，其生理生化特性与大肠杆菌相似，但不具有荚膜，而是具有较厚的细胞壁，在细胞外环境中容易生长^[31]。菌体较大，直径 0.5-1.0 μm ，有 4 对菌毛，其中 2 对是短的，2 对是长的，细胞浆两端为空泡。广泛分布于自然界中，例如土壤和水源中，可

以在牛、羊等反刍动物的瘤胃和小肠内生长，且具有产生肠毒素、细菌素、生物被膜以及抵抗多种抗生素的能力，对环境适应性极强，且具有较强的抗逆性^[32]。据报道，粪肠球菌能生存于高盐、高酸、高渗透压等极端环境下，这使得它在多种生态环境中得以生存和繁殖。粪肠球菌具有多种生物学功能，当其数量过多时，可引发肠道菌群失衡，导致一系列疾病的发生^[33,34]。此外，粪肠球菌的生物被膜生成与其高度的黏附性有着紧密的联系^[35]。研究发现，粪肠球菌通过产生多糖黏附素，与肠道上皮细胞相互作用，从而增强其在肠道内的定植能力^[36]。这种生物被膜不仅有助于粪肠球菌在肠道内生存，还为其他共生细菌提供了一个保护屏障。此外，粪肠球菌还可以作为益生菌应用于食品和保健品开发，以调节肠道菌群、改善人体健康状况^[35]。

1.1.2 粪肠球菌流行病学及其致病性

粪肠球菌在人类及动物的肠道和生殖系统中有着广泛的分布、包括口腔等部位^[37]。据研究发现，粪肠球菌在健康人群中的携带率较高，与个体差异、生活环境、卫生习惯等因素密切相关^[38]。在某些特定条件下，粪肠球菌可能会引发一系列疾病，如免疫力低下、肠道菌群失衡、尿路感染、盆腔炎、化脓性腹部感染、败血症、心内膜炎、脑膜炎和呼吸道感染等^[39,40]。粪肠球菌能够产生多种毒素，如肠毒素、细胞毒素等，对人体细胞造成损伤^[41]。其具有很强的侵袭能力，可以借助黏附素等分子与宿主细胞结合，进一步损伤肠道黏膜。研究发现，粪肠球菌的致病性受到菌群相互作用、环境因素、还有宿主的免疫状况以及其他多个因素所带来的影响^[42]。

在奶牛主要引起奶牛乳腺炎，粪肠球菌可以通过多种途径感染乳腺组织，其中包括机械损伤和化学损伤两种途径^[43]。机械损伤主要是通过对乳腺组织造成物理性损伤而引起乳腺炎^[44]。化学损伤是指由粪肠球菌及其代谢产物所引发的微生物感染所造成的乳腺炎^[45]。此外，还有其他一些致病机制，如对机体免疫力的破坏等^[46]。在奶牛泌乳期间，粪肠球菌可以随着乳汁的分泌进入乳管，然后通过破损的乳头进入乳腺组织，从而导致乳腺感染^[47]。当奶牛在饲养管理过程中受到应激、外界环境温度过高或过低、奶牛的饮食、疾病等原因时，均可使粪肠球菌侵入乳腺组织，引发乳腺炎^[48]。目前研究表明，粪肠球菌可以通过多种方式传播^[35]。比如，可以通过污染饲料、饮水、饲养管理用品等方式进行传播，此外，还可以通过与其他致病菌共同感染引发乳腺炎^[49]。目前对粪肠球菌的检测多采用核酸检测的方法，但该方法需进行严格的基因分型和分离鉴定，费时费力且成本高^[50]。牛乳腺炎的发生是由于感染了致病性粪肠球菌引起，及时使用抗菌药物进行治疗，这样可以减少这种疾病给奶牛养殖带来的经济损失^[28]。随着畜牧业的不断发展，奶牛乳腺炎也逐渐成为一种常见疾病，给社会

和经济带来了很大损失^[51]。因此，我们有必要采取有效措施来控制该菌在奶牛乳腺炎中的感染率。

1.1.3 粪肠球菌诊断方法研究

1.1.3.1 传统微生物学方法

传统的微生物学检测方法涵盖了细菌细胞的涂片染色，显微观察和分离培养技术、生化试验和血清学分型等^[52]，在一定程度上确诊粪肠球菌感染，然而，该操作过程复杂、时间消耗大，并且容易受到实验环境的干扰。在最近的几年中，分子生物学技术取得了显著的进步，传统微生物学方法在粪肠球菌诊断中的应用逐渐被先进的方法所取代^[53]。

1.1.3.2 分子生物学方法

分子生物学的技术手段主要涵盖了聚合酶链反应（PCR）和实时荧光定量PCR（qPCR）两种方法、也包括基因测序^[54]。其优势是高灵敏度、高特异性、快速等特点，能够在短时间内准确诊断粪肠球菌感染^[55]，不足是需要完备的实验室场地及专用仪器设备，不具备现地检测能力。目前成为第三方动物疫病检验检疫实验室常用的方法。

1.1.3.3 生物传感器技术

生物传感器技术是一种将生物学识别元件与信号转换装置相结合的检测方法。近年来利用粪肠球菌的特异生物学特性，制备了多种生物传感器，实现了对粪肠球菌的快速、准确检测^[56,57]。尽管实时监测具有诸多优势，但在大规模的临床诊断实践中尚未得到广泛的应用^[58,59]。

1.1.3.4 免疫学方法

免疫学方法主要应用抗体与抗原的特异性联结反应，逐步开展起来的一种检测技术，是一种高度灵敏的诊断措施^[60]。此外，还存在几种基于免疫学原理设计的实验方法，这些技术手段适用于识别抗原、抗体、免疫细胞以及它们分泌的细胞因子^[61]。此外还可应用于肿瘤标志物的测定。由于免疫学方法具有高度的灵敏性、特异、快速和易于使用而发展迅速并得到广泛应用。

1.2 粪肠球菌毒力因子

1.2.1 聚集物质

聚集物质（aggregation substance As or asa）是一种存在于细菌表层的表面蛋白质，它是黏附素家族中的一员，形似菌毛，对细菌聚集和质粒转移有重要作用^[62,63]。科学研究揭示，在由信息素触发的供体细胞表面，*asa* 得到了表达，这种表达有助于供体与无质粒受体细胞建立稳固的连接，进而通过这种结合方

式提高质粒转移的效能^[64]。AS 蛋白主要由 pADI、pAM373、pPD1、pCF10 编码的 Asa1、Asa373、Asp1、Asc10 4 个蛋白组成^[65]。当 AS 的数量达到特定水平，它们会聚集在一处，形成结合体，由于抗体不能与特定抗原形成结合，这导致了细菌数量的急剧增加，进一步增加了心内膜炎和根尖周炎等疾病的风险^[66]。

1.2.2 心内膜炎抗原

粪肠球菌主要的表面脂蛋白抗原为抗原 A，其由 *efaAfs* 基因所编辑而成，并在生物被膜形成的过程中发挥了促进作用^[67,68]。该物质由 308 个氨基酸构成，该物质的相对分子量约为 37 KDa，并展现出鲜明的组织特性。此外，我们还发现，该分子可通过改变细胞膜脂双层结构来调控微生物对药物的吸附能力。它在生物膜的形成过程中起作用，并在血清中有所存在，这与细菌在生物细胞及非生物表面的附着行为密切相关^[69]。粪肠球菌引发的心内膜炎是导致心内膜炎的主要原因之一，对此类患者的血清中 *efaA* 进行了检测，可作为诊断依据^[70,71]。

1.2.3 胶原蛋白黏附素

胶原蛋白粘附素（adhesin of collagen from *Enterococcus faecalis* Ace）属于蛋白质中的一种，会包围菌体的表面^[50]。其由 721 个氨基酸组成，大小约为 71ku^[72]。当宿主的皮肤和粘膜受损时，Ace 会帮助粪肠球菌附着在皮肤和粘膜上，导致感染^{[73], [74]}。Ace 会感染宿主细胞表面的基质蛋白，当组织完整性受损时，基质蛋白就会被检测到，粪肠球菌就会利用 Ace 与之结合并导致感染，抑制 Ace 基因可显著降低粪肠球菌的粘附力，Ace 阴性菌株可降低粪肠球菌对牙本质的粘附力^[75]。

1.2.4 细胞溶血素

细胞溶血素（cytolysin *cy1*）是一种细菌产生的毒素，其具备造成毒性和损害的能力^[76]。大部分溶血素是由质粒 DNA 所编码的，而少数则是由染色体 DNA 所编码的^[77]。编辑的基因主要由六个基因片段组成：激活蛋白编码基因 *cylA*、结构蛋白编码基因 *cyls* 和 *cylL*、转运蛋白编码基因 *cylB*、免疫蛋白编码基因 *cylI* 以及修饰蛋白基因 *cylM*^[78]。它与许多病原微生物密切相关，引起组织器官功能损害，最严重的结果是导致死亡。激发炎症因子的生成，最终破坏目标细胞，实现其致病作用^[79]。

1.2.5 丝氨酸蛋白酶

丝氨酸蛋白酶（Serine protease *sprE*）是粪肠球菌保守基因的一类，由 284 个氨基酸组成，大小为 26 ku，属于粪肠球菌的分泌蛋白^[80]。*sprE* 基因与 *gelE* 基因共同协作参与生物膜的形成^[81]。*SprE* 可保护粪肠球菌免受 GelE 的蛋白质的水解。*gelE* 位于 *sprE* 上游 48bp 处，两基因共同转录^[82]。*sprE* 基因在粪肠球

菌抵抗宿主体内环境中发挥重要作用，保护粪肠球菌免受因环境造成的损伤，*sprE* 基因的敲除有助于降低粪肠球菌的感染风险。

1.2.6 明胶酶

明胶酶 (Gelatinase *gelE*) 属于细胞外锌离子内肽酶的一种，可参与炎症过程^{[25][83]}。肠道中和菌体表面均有存在。它的长度大约是 1530 个碱基，而其分子量大约是 31.5 ku^[84]。其表达由上游的调节因子和三个启动子共同调节^[85]。现代以来，分子生物学技术的高速发展和肠道微生物研究的高层次探索，越来越多的学者将目光集中于该领域，以期了解其与病原菌间的关系及其致病机制。在粪肠球菌体内，明胶酶 E 作为一种毒性因子，其主要功能是分解宿主组织，为粪肠球菌提供必要的营养，其次是参与生物膜的生成过程^[85]。

1.2.7 表面蛋白

Esp (enterococcal surface protein) 表面蛋白，其总长由 5622 个核苷酸组成，编码的蛋白质的分子质量大约是 202 ku^[86,87]。在粪肠球菌感染初期，粪肠球菌与宿主细胞的黏附靠大分子蛋白，小分子表面蛋白帮助粪肠球菌逃避宿主免疫系统的自动清洁功能^[88]。*esp* 的携带与其黏附、定植、逃避宿主免疫系统清除、抗生素抗性和生物膜形成之间均存在着相当紧密的联系^[89]。*esp* 生成的生物膜，使心脏瓣膜上的细菌逃脱免疫系统的监控，细菌感染会表现出慢性感染宿主的趋势导致心内膜炎感染持续存在^[90]。

1.3 单克隆抗体

1.3.1 单克隆抗体的免疫学原理

单克隆抗体技术最早属于杂交瘤技术的一种，B 淋巴细胞与肿瘤细胞相互融合，筛选出能产生单一抗体类型的杂交瘤细胞^[91]。其优势在于，突破了传统抗体制备过程中的种属限制，实现了异种间抗原的传递与识别。此外，单克隆抗体存在非常高的亲和性和特异性，能够识别抗原并与之结合^[92]。通过利用单克隆抗体的高度特异性，我们能够将药物精确地输送到受损区域，实现对肿瘤、自身免疫性疾病等疾病的治疗，在非霍奇金淋巴瘤的治疗中效果显著^[93,94]。开发多种诊断试剂盒，用于疾病诊断和监测。利用单克隆抗体检测病原体抗原、诸如肿瘤标志物之类的指标，可以有效地增强诊断的精确度和敏感性^[95,96]。通过基因工程技术制备具有特定功能的单克隆抗体，可以用于生物制药、生物材料等领域^[97]。如融合蛋白类药物、生物仿生材料等，均为单克隆抗体技术在生物工程领域的应用实例^[98]。

1.3.2 动物细胞融合技术

动物细胞融合技术是基于细胞膜的流动性原理,可以采用物理手段如振动、离心和电击,化学手段如聚乙二醇,或是生物方式如病毒灭活等,诱导两个或多个不同种类的细胞融合成为一个具有双亲遗传特性的单核细胞,称为杂交瘤,细胞融合过程中细胞膜的结构和功能发生变化^[99,100]。

这种方法可以产生大量稳定的单抗并可在体外培养扩增以获得较高浓度的抗体。通过将绵羊红细胞免疫诱导的小鼠骨髓瘤细胞与 B 淋巴细胞融合后,利用高效的方法获得杂交瘤细胞,单一抗原决定簇的单克隆抗体被成功制备^[101]。

1.3.3 单克隆抗体的应用

1.3.3.1 单克隆抗体在学术研究中的应用

制备成功的特殊单克隆抗体,使细胞表面分子、胞内抗原等进行特异性标记,为研究细胞信号通路、分子互作等提供工具^[102]。还可通过靶向结合目的基因产物,诱导内源性蛋白质降解。此外,单克隆抗体可用于药物筛选,通过对候选药物进行高通量筛选,筛选出具有特定靶点结合能力的药物^[103]。

1.3.3.2 单克隆抗体在临床诊疗中的应用

针对肿瘤相关抗原制备的单克隆抗体,该技术能够特定地识别并消除肿瘤细胞,进而达到对肿瘤进行诊断和治疗的目的^[102]。目前,像利妥昔单抗等多种针对肿瘤的单克隆抗体药物已获得批准,并成功上市^[104]。针对类风湿关节炎患者制备的抗 TNF- α 单克隆抗体已成功应用于临床,具有显著成效。

1.3.3.3 单克隆抗体在疫苗研发中的应用

单克隆抗体可用于筛选病原体保守抗原,为疫苗研发提供候选抗原^[98]。通过制备针对保守抗原的单克隆抗体,可以评估疫苗抗原的免疫原性和保护效果,通过检测疫苗接种后患者血清中针对病原体抗原的抗体水平,可以评估疫苗的保护效果^[105]。单克隆抗体技术还可以用于疫苗优化,通过筛选高亲和力的单克隆抗体,指导疫苗抗原的优化设计。

1.4 胶体金技术研究进展

1.4.1 胶体金技术原理

胶体金是一种纳米级别的金属颗粒,其主要的制备技术包括:电化学方法、化学还原技术以及生物还原技术等^[106]。制备过程中,通过控制反应条件,可实现对胶体金颗粒尺寸、形状和表面修饰的控制^[107]。其性质独特:颗粒尺寸在 1~100 nm 之间,处于纳米尺度,具有较大的比表面积,存在电荷、几何形状等特性,可与生物分子发生相互作用,颗粒表面存在等离子共振现象,使其在可

见光范围内具有特定的吸收峰，具有较高的生物相容性，可安全应用于生物医学领域^[108-110]。

1.4.2 胶体金技术在免疫学中的应用

胶体金技术可以用于检测多种肿瘤标志物，如 CEA、AFP、CA125 等，为肿瘤的早期发现和诊断提供依据^[111]。对病抗进行检测，可以帮助我们更好地鉴别感染性疾病。此外，自身抗体可被检测，从而为自身免疫性疾病的确证提供科学依据^[112]。胶体金技术用于 ELISA 中的酶标记物制备，提高检测灵敏度和特异性。通过胶体金纳米颗粒与目标分子的特异性结合，实现对目标分子的可视化检测^[113]。用于免疫比浊法和免疫磁珠法的标记物制备，实现对目标分子的快速、准确检测^[114]。

1.4.3 胶体金技术的优点

高灵敏度：能够检测到痕量抗原。利用抗原与抗体结合反应，通过胶体金的信号放大作用，实现对目标抗原的检测^[113]。在实际应用中，胶体金免疫层析技术可检测到 ng 级别的抗原，满足了大部分检测需求^[115]。

高特异性：仅与目标抗原发生反应，降低了由于非特异性结合产生的外部干扰。胶体金纳米颗粒表面的抗体分子与目标抗原的专一性结合，从而保证了检测结果的准确性^[96]。

操作简便：胶体金的免疫层析方法使用起来非常方便，无需专业设备，适用于现场快速检测^[116]。实验过程中，只需将待测样品与试剂盒中的抗体结合，通过层析柱分离出目标抗原，最后通过比色或荧光读数即可获得检测结果。

快速出结果：一般在 10~15 min 内即可获得检测结果，为应急情况下的现场检测提供了宝贵的时间，对于疾病诊断、食品安全等领域具有重要意义^[117]。

1.4.4 胶体金技术发展现状

胶体金纳米颗粒可作为荧光探针用于活细胞和组织的成像，具有高分辨率和高信噪比等优点^[118]。通过将胶体金与生物识别元件结合，可实现对目标分子的快速、灵敏、特异性检测^[119]。胶体金作为一种药物载体，具有高载药量和良好的生物相容性^[120]。将药物加载到胶体金纳米颗粒中，该方法能够实现药物的缓慢释放和目标导向传输，从而增强药物治疗的有效性。通过将光敏剂加载到胶体金纳米颗粒中，可实现对肿瘤高效、低毒的光热治疗^[121]。

随着研究的深入，生物医学领域的应用检测技术应用潜力价值越来越高^[122]。胶体金的功能被逐渐放大，实现对疾病的高效诊断和治疗^[123]。利用胶体金纳米颗粒作为疫苗载体，提高疫苗的安全性、有效性和免疫原性^[124]。将胶体金应用

于基因传递,实现对遗传性疾病的高效治疗。发展新型胶体金纳米颗粒探针,实现对疾病的高灵敏度、高分辨率成像。

1.5 本研究的目 的及研究意义

内蒙古地区不仅是中国畜牧业的主要产区,也是乳制品生产和消费的关键区域,因此,确保乳源的安全性对于维护人民的身体健康具有至关重要的作用^[18]。奶牛乳腺炎在奶牛养殖业中普遍存在,这种疾病的控制难度极高,是导致经济损失最为严重的几种疾病之一,在临床上难以预防和治疗^[125]。乳腺炎不但影响牧场产奶质量,给畜牧场造成较高经济损失,也给公共卫生安全带来潜在威胁^[126]。奶牛乳腺炎的快速诊断对奶牛乳腺炎的预防及早期治疗有较为重要的意义,也是防控乳腺炎最为有效的手段^[127]。如果不研究新型检测方法,解决实际奶牛乳源的质量问题是一项艰巨的任务,这将导致奶牛被淘汰和乳产量下降等经济损失,也将存在食品安全隐患。

奶牛乳腺炎粪肠球菌具有严重的人畜共患性及公共卫生隐患,作为新现病原菌,可通过原料乳转移到乳品中,引起人类感染多种复杂的疾病,且难治愈易复发,其中 *esp* 致病因子起到关键作用^[127]。在这项研究中,克隆 *esp* 基因,并制备了高效纯化的抗原,并通过杂交瘤细胞融合技术来筛选出具有高效反应能力和特异性的单克隆抗体,进而进行胶体金标记,以创制快速检测奶牛乳源致病性粪肠球菌试剂盒技术产品,为确保原料乳安全,造成生物安全风险提供新型关键技术产品。通过开发和推广方便快捷的牛乳源致病菌快速检测试剂盒,可以迅速而有效地诊断和治疗奶牛乳腺炎,从而减少抗生素的“滥用”,减少“抗奶”的出现,对于保障消费者的食乳安全具有现实的公共卫生意义。同时对于落实习近平总书记交给内蒙古自治区的“五大任务”之一“提升内蒙古农畜产品的生产和加工水平,满足国内市场需求”具有重要的战略意义。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌株, 细胞及实验动物

菌株: 实验用牛乳源粪肠球菌菌株、大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21 由“内蒙古自治区乳源致病菌防控工程技术研究中心”保存并提供。

细胞: 小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0) 由山东省滨州畜牧兽医研究院兽医生物技术重点实验室保存提供。

实验动物: SPF 级 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购济南朋悦实验动物繁育有限公司, 雌性日本大耳兔由山东绿都生物科技有限公司提供。

2.1.2 主要耗材及试剂

表 1 主要耗材及试剂
Table 1 Main consumables and reagents

耗材及试剂	生产厂家
胰蛋白胨	北京奥博兴生物技术有限公司
酵母浸粉	北京奥博兴生物技术有限公司
氯化钠	北京奥博兴生物技术有限公司
琼脂粉	北京奥博兴生物技术有限公司
2xTaq PCR MasterMix	北京索莱宝科技有限公司
溶菌酶	北京索莱宝科技有限公司
细菌 DNA 提取试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
质粒小量提取试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
DNAMarker	北京索莱宝科技有限公司
RNaseA 和蛋白酶 K	北京索莱宝科技有限公司
pMD-18-T	宝生物工程(大连)有限公司
限制性核酸内切酶 <i>Bam</i> H I 和	宝生物工程(大连)有限公司
T ₄ 连接酶	宝生物工程(大连)有限公司
pET-30a(+)	宝生物工程(大连)有限公司
甘氨酸	恒兴试剂
丙烯酰胺	恒兴试剂
溴酚蓝	恒兴试剂
考马斯亮蓝	恒兴试剂

续表 1

透析袋	北京索莱宝科技有限公司
咪唑	Sigma
BSA	Sigma
DAB 酶底物显色试剂盒	碧云天生物
Ni NTA Beads 6FF	天地人和生物有限公司
IPTG	赛默飞
胎牛血清	Cegrogen
酶标板	赛默飞
DMEM 培养基	赛默飞
单克隆抗体亚型鉴定试剂盒	赛默飞
HAT/HT 培养基	Sigma-Aldrich
弗氏完全佐剂/弗氏不完全佐剂	Sigma-Aldrich
细胞培养瓶 (25cm ² 、75cm ²)	贝兰伯生物
96/24/6 孔细胞培养板	贝兰伯生物
细胞冻存管	贝兰伯生物
聚乙二醇	Roche
细胞筛网	北京索莱宝科技有限公司
二甲基亚砜 (细胞培养级)	北京索莱宝科技有限公司
羊抗鼠 IgG-FITC	北京索莱宝科技有限公司
0.45 μm 滤膜	北京索莱宝科技有限公司
正辛酸	国药集团
甲醇	恒兴试剂
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	Millipore 公司
玻璃纤维素膜	Millipore 公司
样品垫	Millipore 公司
吸水垫	Millipore 公司
胶体金卡式套装	上海杰一生物技术有限公司

2.1.3 主要仪器设备

表 2 主要仪器设备
Table 2 Main instruments and equipment

仪器设备	生产厂家
超声破碎仪	SONIC
分光光度计	赛默飞
恒温培养箱	上海森信实验仪器有限公司
超净工作台 (DL-CJ)	北京东联哈尔仪器制造有限公司
蠕动泵	Longer Pump
恒温震荡培养箱	上海铂温仪器有限公司
蛋白电泳仪	ATTA
高压灭菌锅	Sanyo
- 80℃低温冰箱	赛默飞
pH 计	上海仪电科学仪器股份有限公司
高速离心机 (TGL-6C)	上海安亭科学仪器厂
高速冷冻离心机 (HC-2518R)	上海一恒科学仪器有限公司
核酸凝胶电泳电泳仪(DY Y-6 型)	北京六一仪器厂
PCR 仪 (MastercycLerep)	德国 Eppendorf 公司
佐剂乳化器	博奥龙
酶标仪	赛默飞
电子天平	上海精密
恒温水浴锅	赛默飞
荧光倒置显微镜	赛默飞
恒温细胞培养箱	冠森生物科技
电动移液器	Eppendorf
ZX1010 三维喷点平台	BioDot
可编程切条机	杭州峰航科技有限公司
酶标仪	美谷分子仪器有限公司
自动洗板机	上海巴玖实业有限公司
恒温培养箱	上海森信实验仪器有限公司
低温高速离心机	Sigma
旋转混合器	碧云天

2.1.4 主要试剂配制

0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS): 称取 NaCl 8 g; Na₂HPO₄ 2.93 g; KCl 0.20 g; KH₂PO₄ 0.20 g; 加 ddH₂O 溶解后, 调节 pH 至 7.4, 然后定容至 1 L, 室温保存备用。

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 相关溶液:

30%丙烯酰胺: 称取丙烯酰胺 58 g, N,N'-亚基双丙烯酰胺 2 g, 溶解于 160 mL ddH₂O 中, 混匀后定容至 200 mL, 避光保存备用。

1.5 mol/L Tris-HCL(pH8.8, 1L): 称取 Tris 粉末 181.8 g, 溶解于 800 mL ddH₂O, 用浓 HCL 调 pH 至 8.8, 定容至 1 L, 室温保存备用。

1.0 mol/L Tris-HCL(pH6.8, 1L): 称取 Tris 粉末 121.2 g, 溶解于 800 mL ddH₂O, 用浓 HCL 调 pH 至 6.8, 定容至 1 L, 室温保存备用。

10%过硫酸铵 (10%AP, 10mL): 称取过硫酸铵 1 g, 溶解于 10 mL ddH₂O, 4℃保存备用。

10% (W/V)SDS: 准确称取 10 g SDS 溶于 80 mL ddH₂O, 定容至 100 mL, 保存备用。

5x 电泳缓冲液 (1 L): 称取 Tris 15.1 g, 甘氨酸 94 g, 充分溶解于 800 mL ddH₂O 中, 加入 10% SDS 50 mL, 定容至 1 L, 室温保存备用。

5x 蛋白上样缓冲液: 准确称取溴酚蓝 (BPB) 0.25 g, SDS 5 g, 溶于 10 mL ddH₂O 中, 加入 1.0 mol/L Tris-HCL(pH6.8) 12.5 mL, 甘油 25 mL, 2-巯基乙醇 2.5 mL, ddH₂O 定容至 50 mL, 保存备用。

12% 分离胶: 量取 4 mL 30% 丙烯酰胺溶液, 2.5 mL 1.5 mol/L Tris-HCL(pH8.8), 0.1 mL 10% SDS, 0.1 mL 10%过硫酸铵, 0.004 mL TEMED, 3.3 mL ddH₂O, 混匀后倒入膜具室温静置晾干。

5% 浓缩胶: 量取 0.5 mL 30% 丙烯酰胺溶液, 0.38 mL 1.0 mol/L Tris-HCL(pH6.8), 0.02 mL 10% SDS, 0.02 mL 10%过硫酸铵, 0.002 mL TEMED, 1.4 mL ddH₂O, 混匀后倒入膜具, 插入梳子, 室温静置晾干可 4℃保存备用。

蛋白印迹(Western Blot, WB)相关溶液:

转膜缓冲液: 称取甘氨酸 2.9 g, Tris 5.8 g, SDS 0.37 g, 溶解于 ddH₂O, 定容至 800 mL, 最后加入 200 mL 甲醇溶液, 4℃保存备用。

20xTBST 缓冲液: 称取 NaCl 90 g, Na₂HPO₄·12H₂O 20.7 g, NaH₂PO₄·2H₂O 6.6 g, 溶于 900 mL ddH₂O, 加入 5 mL Tween-20, 混匀后加 ddH₂O 定容至 1 L, 室温保存备用。

封闭液: 称取 2.5 g 脱脂奶粉, 加 50 mL 1xTBST 充分溶解, 保存备用。

底物显色液：量取 9 mL 的 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 溶液，准确称量 6 mg 二氨基联苯胺(DAB)，加入 1 mL 0.3%的 NiCl_2 和 10 μL 30% H_2O_2 混匀后立即使用即可。

蛋白纯化相关溶液：

1 mmol/L EDTA：准确称取 EDTA 0.336 g，使其完全溶解于 800 mL ddH₂O，加碱助溶，定容至 1 L 保存备用。

Lysis Buffer：称取 3.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，8.77 g NaCl，0.34 g 咪唑，加 400 mL ddH₂O 使其完全溶解，使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，定容至 500 mL，0.45 μm 滤膜过滤除菌，4°C 保存备用。

Wash Buffer：称取 3.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，8.77 g NaCl，0.68 g 咪唑，加 400 mL ddH₂O 使其完全溶解，使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，定容至 500 mL，0.45 μm 滤膜过滤除菌，4°C 保存备用。

Elution Buffer：称取 3.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，8.77 g NaCl，8.5 g 咪唑，加 400 mL ddH₂O 使其完全溶解，使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0，定容至 500 mL，0.45 μm 滤膜过滤除菌，4°C 保存备用。

细胞培养相关溶液：

不完全 DMEM 培养基：取 DMEM 粉 1 袋，加入 990 mL ddH₂O 使其溶解，再加入 3.7 g NaHCO_3 ，搅拌 2 h，经 0.22 μm 过滤后，即配成 1 L 无血清 DMEM，4°C 保存备用。

完全 DMEM 培养基：100 mL DMEM 不完全培养基加入 10 % 胎牛血清，1 % L-谷氨酰胺液，4°C 保存备用。

HAT 选择培养液：取 98 mL 完全 DMEM 培养基加入 2 mL 50 倍 HAT 储存液，4°C 保存备用。

HT 培养液：取 99 mL 完全 DMEM 培养基，加入 1 mL 100 倍 HT 储存液，4°C 保存备用。

细胞冻存液（现用现配）：取 7 mL 不完全 DMEM 培养基，2 mL FBS，1 mL DMSO，混匀后，0.22 μm 过滤后，即配成细胞冻存液。

ELISA 相关溶液：

包被液：0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (Carbonate buffer solution, CBS)：称取 NaHCO_3 2.93 g； Na_2CO_3 1.59 g；溶于 ddH₂O，pH 调至 9.6，然后定容至 1 L 后 4°C 保存备用。

封闭液：3% BSA 溶于 1xPBST 后，4°C 保存备用。

终止液：取 H_2SO_4 22.2 mL，加入 178.8 mL ddH₂O，混匀后，室温保存备用。

单克隆抗体及多克隆抗体纯化相关溶液:

0.06 mol/L (pH4.8) 醋酸盐缓冲液: 称取无水醋酸钠 0.29 g, 量取冰醋酸 0.141 mL, ddH₂O 充分混匀, 定容至 100 mL, 室温保存备用。

2 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取 16 gNaOH 固体溶于 200 mL ddH₂O 中。

2 mol/L 盐酸溶液: 量取 33 mL 36.4%的浓 HCl, 定容 200 mL ddH₂O 中。

胶体金制备相关溶液:

20%BSA: 取 2g 的粉状 BSA 加入 10 mLddH₂O, 充分溶解后, 分装, -20°C 保存备用。

柠檬酸三钠: 取 1 g 粉状柠檬酸三钠, 溶解于 50 mL ddH₂O 中, 分装后-20°C 保存备用。

10%NaCl: 称取 1 gNaCl 加入 10 mL ddH₂O 中, 采用 0.22 μm 滤器过滤除菌。

0.1M K₂CO₃: 称取 2.77 g 粉状 K₂CO₃, 溶于 200 mL ddH₂O 中, 完全溶解后, 分装-20°C保存备用。

重悬液: 称取四硼酸钠 0.76 g, BSA 0.5g, 海藻糖 4 g, 加入 0.05 mLTween-20, ddH₂O 溶解后定容至 100 mL, 放置室温保存。

样品稀释液: 准确称取称取 2 g 粉状 BSA, 0.5 gPVP K30, 0.1mol/LPBS 定容至 100 mL, 4°C保存备用。

2.2 粪肠球菌的分离与鉴定

2.2.1 粪肠球菌的活化培养

从“内蒙古自治区乳源致病菌防控工程技术研究中心”获取的粪肠球菌菌株 100 μL, 在 10 mL LB 液体培养基中以 37°C 180 rpm 的温度培养 12~16 h。接着, 在 LB 固体培养基上划线传代。在 37°C 条件中的恒温培养箱中继续培养 12 h, 可挑选一定的白色单一菌落, 继续接种于液体培养基, 37°C, 180 rpm 培养 12 h, 最终可在 LB 液体培养基中得到活化好的粪肠球菌菌株, 用于下步实验。

2.2.2 革兰氏染色鉴定

取干净的载玻片, 用移液枪在其中央滴 20 μL ddH₂O, 蘸取待鉴定的菌液于 ddH₂O 中, 使用酒精灯将其烘干并固定, 在固定过程中, 只需用火焰加热 1~2 次, 避免过高的温度, 确保载玻片不会烫伤手。先初染, 用草酸铵结晶紫覆其表面约 1 min 左右后, 用 ddH₂O 轻轻冲洗。再媒染, 用碘液将其表面覆盖约 1 min 左右, 再用 ddH₂O 轻轻冲洗。接着脱色, 首先用吸水纸轻轻地将载玻片表面的水分吸干, 然后用 95%的酒精进行滴洗, 约 20~30 s 左右, 清水洗净。在最终

的复染过程中,使用番红染液进行了 2 min 的染色,用 ddH₂O 轻轻冲洗,吸干表面水分,待其干燥后,置于油镜下观察。

2.2.3 糖发酵实验

取生化发酵培养管半乳糖,山梨醇,麦芽糖,果糖,甘露醇,阿拉伯糖、蔗糖,和已经活化传代培养的粪肠球菌 10 株和粪肠球菌标准株菌液,以无菌操作分别接种少量菌液于相应的生化发酵培养管内,置 37°C 恒温箱下培养 24 h,即可观察管内细菌是否发酵和有无产气反应。

2.2.4 药敏实验

首先准备了氨苄西林、四环素、氯霉素、诺氟沙星、庆大霉素和链霉素这 6 种药敏片。在超净工作台中,使用移液枪取 200 μL 的粪肠球菌菌液进行活化培养,按规范要求铺在 LB 固体平板。药敏片按照说明轻贴,记录空白。在 37°C 的条件下,培养 24 h 后,测量了抑菌圈的直径,按国际标准进行测量。该环节实验旨在明确内蒙古地区分离临床菌株的耐药状况,为给当地养牛户提供防治技术提供依据,并非分离菌株分类鉴定项目。

2.3 牛乳腺炎粪肠球菌 *esp* 基因的克隆

2.3.1 引物的设计及合成

采用 Primer 5.0 生物信息学软件,并以 Genbank 发布的粪肠球菌 *esp* 基因 (CP045045.1) 作为参考模板,设计并合成了克隆引物。在这些引物的上游和下游序列中,分别加入了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性酶切位点。

上游引物 ESP-F: 5'-CGCGGATCCGATGTTACTCCTGGTGGT-3';

下游引物 ESP-R: 5'-CCGGAATTCAACTTGAGGTTTATTCGGC-3'(下划线部分为酶切位点)。扩增片段的长度大约是 776 bp,该引物是由哈尔滨博士生物科技有限公司进行合成的。

2.3.2 粪肠球菌基因组的提取

在提取粪肠球菌的基因组时,严格遵循了北京索莱宝科技有限公司提供的细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作指南完成。

2.3.3 *esp* 基因的 PCR 扩增

采用从粪肠球菌菌株中提取的总 DNA 作为参考模板,并使用引物 ESP-F/ESP-R 对 *esp* 基因进行 PCR 扩增。

表 3 PCR 反应条件
Table 3 PCR reaction conditions

阶段	程序
预变性	95 °C, 45 min
变性	95 °C, 30 s
退火	57 °C, 30 s
延伸	72 °C, 1 min
终止	72 °C, 10min
循环	30 次

表 4 PCR 反应体系
Table 4 PCR reaction systems

试剂	剂量
2xTaq PCR MasterMix	10 μ L
模版 DNA	2 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
ddH ₂ O	6 μ L
总体系	20 μ L

2.3.4 PCR 产物的纯化和胶回收

根据北京索莱宝科技有限公司提供的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, PCR 产物的回收操作是按照特定的步骤来进行的。

2.3.5 *esp* 基因与 pMD18-T 载体的连接

对 *esp* 基因的纯化和回收产物进行了处理, 并与 pMD18-T Vector 相连接, 在 4 °C 的温度下进行了过夜的静置反应。通过将 *esp* 基因片段与 pMD-18-T 载体进行连接, 成功构建了重组克隆载体 pMD18-T-*esp*。如表 5 所示的连接体系。

表 5 pMD18-T-*esp* 重组质粒连接体系
Table 5 pMD18-T-*esp* recombinant plasmid ligation system

试剂	剂量
PCR 纯化产物	4.5 μ L
pMD18-T Vector	0.5 μ L
Solution I	5 μ L
反应总体系	10 μ L

2.3.6 CaCl₂ 法制备 DH5 α 和 BL21 感受态细胞

1) 首先, 从 -80°C 的温度下保存大肠杆菌的菌种, 并将其放置在冰上。当菌体完全融解后, 标记好, 倒置在 37°C 恒温条件下, 经过 16 h 的培养, 直到菌落形成为止。

2) 从单菌落中取 10 mL 的液体 LB 培养基, 然后在 37°C 的温度下进行振荡培养一夜。

3) 将 1 mL 的菌液注入 50 mL 的 LB 培养基中, 180 rpm 37°C 振荡培养, 持续 2~3 h。

4) 将 50 mL 的离心管预冷, 测试菌液浓度 OD_{600} 大概在 0.5 前后时, 预冷离心管中加入转移来的菌液, 冰置 10 min, 接着在 4°C 的温度下进行 8000 rpm, 离心 10 min, 收集后清除, 管倒置在已灭菌的滤纸上, 以确保管内的培养液完全流尽。

5) 使用 10 mL 0.1 mol/L 的冰冷 CaCl_2 进行悬浮沉淀, 然后立刻在冰面上放置 30 min, 接着在 4°C 的温度下进行 8000 rpm 离心 10 min, 以收集菌体。

6) 将培养液丢弃, 然后加入 2 mL 的冰冷 CaCl_2 悬浮细胞, 将其放在冰面上, 这样就可以制得 DH5 α 感受态细胞, 并将其存放在 -80°C 的温度下。

2.3.7 重组克隆载体 pMD18-T-*esp* 的转化实验

1) 高压灭菌后的离心管中加入连接产物和 100 μL 的 DH5 α 感受态细胞, 冷冻 30 min。

2) 在 42°C 的恒温水浴锅里进行 45 s 的热击, 然后谨慎而迅速地把离心管放入冰块中持续 1 min。

3) 从离心管中取出后, 向其注入 890 μL 的 LB 液体培养基, 并在 37°C 的温度下进行 90 min 的振荡培养, 直到观察到烟雾般的效果。

4) 从含有 Ampicillin LB 的培养基中吸取 50 μL 的菌液, 然后将其涂抹上, 首先进行 30 min 的正置培养, 接着以 37°C 的倒置角度进行过夜培养。

2.3.8 重组质粒 pMD18-T-*esp* 的提取

按照北京索莱宝科技有限公司提供的试剂盒操作流程, 完整地提取了重组质粒。

2.3.9 重组质粒 pMD18-T-*esp* 的酶切及 PCR 鉴定

采用重组质粒 pMD18-T-*esp* 作为参考模板, 进行双酶切和 PCR 的鉴定, PCR 的体系和条件与表 3 和表 4 相同。PCR 反应产物与 3 μL 10x Buffer 混匀, 以 DL2000 DNA 3 μL 为参照, 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中进行了 30 min 的电泳, 电压设置为 140 v, 随后在紫外光照射下进行了观察。如表 6 所示, 双酶切体系

在琼脂糖凝胶电泳双酶切鉴定确认无误后，会将菌液送至哈尔滨博仕生物科技有限公司进行后续的测序工作。

表 6 pMD18-T-*esp* 重组质粒双酶切体系
Table 6 Double digestion system of pMD18-T-*esp* recombinant plasmid

试剂	剂量
重组质粒	4 μL
10×H Buffer	1 μL
<i>Bam</i> H I	0.5 μL
<i>Eco</i> R I	0.5 μL
ddH ₂ O	4 μL
总体系	10 μL

2.4 原核表达载体 pET-30a-*esp* 的构建

2.4.1 原核表达载体 pET-30a(+)的提取

根据质粒小提试剂盒的说明书（D1100）来执行质粒的提取操作。首先提取质粒 pET-30a（+），接着利用 *Eco*RI 和 *Bam*H I 内切酶进行双酶切处理，最后通过 1%琼脂糖凝胶电泳技术，完成胶回收工作，获得质粒 pET-30a(+)。双酶切反应体系如表 7。

表 7 pET-30a(+) 双酶切体系
Table 7 pET-30a(+) double digestion system

试剂	剂量
质粒 pET-30a(+)	4 μL
10×H Buffer	1 μL
<i>Bam</i> H I	0.5 μL
<i>Eco</i> R I	0.5 μL
ddH ₂ O	4 μL
总体系	10 μL

2.4.2 *esp* 基因与质粒 pET-30a(+)连接

对重组克隆载体 pMD18-T-*esp* 进行 *Bam* H I 和 *Eco* R I 的酶切处理后，纯化出的目标基因与经过相同酶处理的空载体 pET-30a（+）通过 T4 连接酶实现了 16°C 的夜间连接。该连接体系可以用于构建含有不同目的片段或表达水平的基因工程菌，并可将外源蛋白整合到宿主细胞中。如表 8 所示的连接体系。

表 8 pET-30a-*esp* 重组质粒连接体系
Table 8 pET-30a-*esp* recombinant plasmid ligation system

试剂	剂量
空载体 pET-30a(+)	1 μ L
目的片段 <i>esp</i> 基因	4 μ L
T ₄ DNA Ligase	0.5 μ L
10×T ₄ DNA Ligase Buffer	1 μ L
ddH ₂ O	3.5 μ L
总体系	10 μ L

2.4.3 重组质粒 pET-30a-*esp* 的转化实验

将已连接的重组质粒 pET-30a-*esp* 转化到对应的大肠杆菌 BL21 (DE3) 宿主的感受态细胞中, 转化处理方法步骤与 2.3.7 相同。

2.4.4 重组质粒 pET-30a-*esp* 的双酶切鉴定

使用质粒小提试剂盒 (D1100) 提取了重组质粒 pET-30a-*esp*, 并通过 *Bam*HI 和 *Eco*RI 的双酶切方法进行筛选, 可得到阳性的重组质粒, 并对其进行了序列分析。双酶切反应体系同表 7。

2.4.5 重组质粒 pET-30a-*esp* 的生物信息学分析

构建重组表达载体 pET-30a-*esp*, 双酶切鉴定正确后, 通过使用生物信息学软件对测序结果进行深入分析, 对表达蛋白的空间结构、物理和化学特性、跨膜区域以及抗原性等方面进行了预测性研究。

2.5 重组 ESP 蛋白初步表达及条件优化

2.5.1 ESP 重组蛋白初步表达

在 LB 液体培养基中, 接种了含有重组质粒 pET-30a-*esp* 的大肠杆菌 BL21 单菌落, 并在 37 °C 的温度下进行了过夜震荡培养。第二天, 将培养出的菌液按照 1:100 的比例转移到含有卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 然后在 37 °C 和 200 rpm 下进行振荡培养, 直到 OD₆₀₀ 的浓度约为 0.6, 取出少量全菌备用, 5 h 后, 添加 0.4 mmol/L IPTG, 在 37 °C 180 rpm 的温度下诱导表达, 并在一夜之后收集了菌液。用 0.5 mmol/L pH7.4 PBS Buffer 缓冲液重悬并进行超声破碎, 取诱导后全菌少量, 经过离心处理后, 分别收集了上清和沉淀样本, 并使用 12% 的 SDS-PAGE 电泳来分析它们的表达特性。

2.5.2 pET-30 a-*esp* 重组蛋白诱导表达时间的探究

在表达菌液中加入 0.4 mmol/L IPTG, 37 °C 180 rpm 震荡培养, 进行诱导时间探究实验, 在加入诱导剂后的 2 h, 3h, 4 h, 5 h, 按时间段取出少量菌液,

10000 rpm 10 min。弃去上清 LB 液体培养基，沉淀用 0.5 mmol/L pH7.4 PBS Buffer 重悬，超声破碎后，加入的 5×SDS-PAGE-Loading Buffer，离心，100 °C 加热 10 min，用 12%SDS-PAGE 分析其表达效果。

2.6 pET-30 a-esp 重组蛋白纯化及表达

2.6.1 填料再生

为使重组 ESP 蛋白纯化效果最佳，对镍耦合亲和层析柱已经完成了镍离子的剥离操作，并对镍离子进行了重新悬挂。在制备过程中，将活性炭颗粒与分散剂和催化剂一起放入反应容器里。首先，填料需要用 5 倍柱体积的去离子水进行清洁，接着用 5 倍柱体积 100 mM EDTA (pH 8.0) 来去除其中的镍离子。下一步，将继续使用去离子水来清洁柱体的 10 倍体积，并添加 0.5M NaOH 进行进一步的清洁。在完成清洗之后，使用 100 mM NiSO₄ 来洗净柱的 5 倍体积。最后，采用去离子水对柱体进行了 10 倍的清洗，完成了填料的再生，并在 20% 的乙醇中以 4°C 的温度悬浮，以备后用。

2.6.2 pET-30 a-esp 重组蛋白的纯化

使用亲和层析法进行纯化蛋白。具体的纯化步骤如下：

1) 首先，大量诱导 pET-30a-esp 蛋白，然后将含有重组质粒 pET-30 a-esp 的菌液以 1:100 的比例转接到含有卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 液体培养基中。在 37°C 200 rpm 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.65 后，再添加 0.4 mmol/L IPTG, 37°C, 180 rpm 诱导过夜，同时接种 pET-30a(+) 空载体细菌培养，为阴性对照。

2) 收集菌体，12000 rpm，离心 15 min，用 30 mL 蛋白缓冲液 Lysis buffer 收集菌体。

3) 将重悬菌体放入小烧杯中，置于盛有冰水混合物的大容器内，超声破碎处理菌体 (F3×65%，3s+2s，40min)，处理完成后，移液枪吸取少许菌液，菌液不再粘稠，可见清澈透明。

4) 超声裂解后，10000 rpm，4 °C，10 min，除杂质，取上清做样品，用 0.45 μm 滤器过滤。

5) 取出 4°C 保存的重新填好的 Ni-NAT 亲和层析柱，准备驱动泵，先用去离子水清洗 10 min，将乙醇的气味冲洗掉即可。再用 Lysis buffer 过柱 20 min 平衡填料。

6) 接着可过样品于层析柱，上样过程中以 1 mL/min 控制流速，接出流出的液体，可用于后续跑胶验证。

7) 上样后，Wash Buffer 过柱 15 min 进行洗杂，等待柱子中液体全部流完，加 Elution buffer 逐渐洗脱，随即接流出的液体，1 mL 一管，共洗脱 8 mL 即可。

8) 洗脱完毕后, 用去离子水水洗层析柱 10 min, 回收所用填料, 再用 20% 乙醇浸泡。

9) 所接样品可直接测量浓度, 再进行 12%SDS-PAGE 电泳分析。

2.6.3 pET-30 a-*esp* 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

进行样品处理, 可分别处理 BL21(DE3)/pET-30a(+)空载体诱导产物, BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导全菌体裂解产物, BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导菌体裂解上清, BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导全菌体裂解沉淀和 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 表达蛋白纯化产物, 取 30 μ L 样品加入 10 μ L 4 \times loading buffer, 在金属浴中保持 100 $^{\circ}$ C 的温度, 并加热 10 min, 以确保样品得到充分的变性。首先准备预制的 SDS-PAGE 凝胶 (包括分离胶和浓缩胶), 待其冷却至室温之后, 将蛋白样本直接放入 SDS-PAGE 胶的加样孔中进行上样。在使用上层胶的过程中, 采用了低电压 80v 的恒压电泳技术, 而当溴酚蓝进入下层胶时, 选择了高电压 120v 的恒压电泳方法。当溴酚蓝接近胶的底部时, 电泳就会停止。

2.6.4 小鼠抗 ESP 蛋白抗原血清的制备

将经过纯化的重组蛋白 ESP 与等量的完全弗氏佐剂 (FCA) 混合, 并采用电动搅拌器确保其充分乳化。在此条件下, 利用酶联免疫吸附法检测了所制备得到的疫苗抗体效价。接下来, 采用皮下多点注射的方法, 对 6 周大的雌性 BALB/c 小鼠进行了免疫处理, 并为每只小鼠设定了 50 μ g 的剂量。在给药结束后, 每天检测血清中抗体效价及补体活性。接下来, 每隔 14 天会提取等量的抗原和不完全体积的弗氏佐剂 (FIA), 并进行充分的乳化处理, 进行皮下多点注射以增强免疫反应两次。最终, 取下小鼠的眼球并进行放血处理, 然后将分离出的血清保存在 -20 $^{\circ}$ C 的温度下以备后用。

2.6.5 表达的重组 ESP 蛋白抗原的 Western blot 鉴定

样品处理: 将表达的重组 ESP 蛋白含量定量分析后分别稀释至 1:2、1:4、1:8、1:16, 按 2.5.2 的方法处理样品。

上样和电泳: 将经过稀释处理的样本直接放入 SDS-PAGE 胶的加样孔中, 采用预染的蛋白质分子量作为标准。在使用上层胶时, 采用低电压 80 v 的恒压电泳方法, 而在溴酚蓝进入下层胶时, 则使用高电压 120 v 的恒压电泳技术, 待 Maker 每个条带清晰可见时, 停止电泳, 然后对蛋白胶进行切割。

转膜: 需要裁剪两片适当大小的滤纸和 PVDF 膜, 然后将滤纸放入转膜缓冲液中浸泡。PVDF 膜应暂时放入去离子水中, 并注意标记正反两面, 以确保水中膜的光面朝上。将滤纸、PVDF 膜、蛋白胶和滤纸按顺序叠放, 然后轻轻

按压以排除气泡，在表面淋少许转膜缓冲液。设置电压为 PVDF 膜面积的 5 倍，时间为 20 min。

封闭：转膜完毕后，取出膜，首先使用 5.0% 的脱脂乳 37°C 进行 2 h 的封闭处理，然后取出并用 TBST Buffer 进行三次洗涤，每次持续 5 min。接着，在 37°C 的温度条件下，使用收集到的小鼠抗血清作为第一抗体，以及 HRP 标记羊抗鼠抗体作为第二抗体，孵化过程持续了 15 min。最终，使用 TBST Buffer 进行了三轮清洗，每次清洗持续 5 min，并使用底物显色液在避光条件下显色 1 min，结果显示 PVDF 膜上存在明显的条带，后用去离子水洗涤终止。

2.7 pET-30 a-esp 重组蛋白单克隆抗体的制备

2.7.1 免疫小鼠

取纯化后的重组 ESP 蛋白对 BALB/c 小鼠进行多次免疫，用磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 调整纯化后的 ESP 蛋白浓度，将蛋白浓度调整为 1 mg/mL 后，过滤除菌备用。首次对小鼠进行免疫的剂量是 150 μ g/只，然后加入等量的弗氏完全佐剂进行乳化，接着捏住小鼠的表皮，并在颈背部皮下进行多点 BALB/c 小鼠注射。在首次进行免疫之后，每隔两周要进行第二次和第三次免疫，并添加等体积的弗氏不完全佐剂以确保完全乳化，所需的免疫剂量是 150 μ g/只，这一免疫方式与首次免疫保持一致。

2.7.2 检测小鼠血清免疫效价

在完成第三次免疫后的第一周，对小鼠的尾静脉进行了采血，并采用 ESP 蛋白作为抗原的间接 ELISA 技术来测定免疫后小鼠的血清效价。使用纯净的 ESP 蛋白 (2 μ g/mL) 对 ELISA 板子进行了 4 °C 的夜间包被，封闭液 37 °C 封闭 1 h。检测小鼠血清效价，血清从 1:1000 倍开始 2 倍梯度稀释，样品稀释后加样，37 °C 孵育 30 min，洗液洗涤 3 次后加入 1:2000 稀释的羊抗鼠为二抗，在 37 °C 的温度下孵化 30 min，然后用洗液清洗三次以达到显色效果，显色所需时间为 10 min，温度设置为 37 °C，并在每个孔中加入 50 μ L 的终止液，最后测量吸光度。在空白对照组中，浓度为 0.1 mol PBS，而在阴性对照组中，稀释比例为 1:1000 倍，选择抗体效价较高的 1 只小鼠进行冲击免疫 100 μ g/只。

2.7.3 骨髓瘤细胞的准备

在进行融合之前的 36 h，需要在 100 mL 的细胞培养瓶中对骨髓瘤细胞进行扩大培养，并预备 2~3 瓶。在融合的那一天，使用弯头滴管轻轻地将细胞从瓶壁吹落，并将其收集到 50 mL 的离心管中。在进行 1000 rpm 的离心处理 5~10 min 后，将上层的清液丢弃。向其中加入 30 mL 的不完全培养基，并按照同样

的方法进行离心清洗。接下来,需要将细胞重新悬浮在 10 mL 的不完全培养基中,并确保混合均匀。

2.7.4 脾细胞的准备

选择已经进行了 3 天冲击免疫的 BALB/c 小鼠,摘除了其眼球进行采血,并从中分离出血清,作为抗体测试时的阳性参考血清。把颈脱位致死的小鼠浸泡在 75% 的酒精中 5 min,并在解剖台板上进行固定。随后,揭开其左侧腹部的皮肤,可以清晰地看到脾脏。接着,使用眼科剪镊,在超净台上进行无菌手术,剪开腹膜,取出脾脏,并将其放置在装有 10 mL 不完全培养基的平皿中,轻轻清洗并仔细剥离周围的结缔组织。把脾脏转移到一个装有 10 ml 不完全培养基的平皿里,然后用弯头镊子轻轻地挤压脾脏,这样脾细胞就可以进入平皿中的不完全培养基。通过多次用吸管吹打,成功地制作了单细胞悬液。在进行 1000 rpm 的离心 10 min 后,收集了脾细胞的悬液,并使用不完全培养基离心清洗了两次。接着,将这些细胞重新悬挂在 10 mL 的不完全培养基中并混合均匀,从而得到了上述的悬液,加台酚蓝染液,细胞计数,得到 2.1×10^8 个/ml 脾细胞。

2.7.5 饲养细胞的制备

通过采集小鼠脾细胞的方式,对小鼠进行了致死处理、体表消毒和固定,然后使用消毒剪镊从后腹部掀起腹部皮肤,使腹膜暴露出来。使用含酒精的棉球对腹膜进行清洁消毒。当使用注射器向腹腔内注入 10 mL 的不完全培养基时,务必小心不要将其插入肠道。使用右手来固定注射器,确保针头位于腹腔之内,而左手则持有酒精棉球,轻柔地按摩腹部约 1 min,接着吸取注射的培养液。以 1000 rpm 的速度进行离心,持续 10 min,然后丢弃上清。首先,使用 5 mL 的 HAT 培养基使沉淀的细胞处于悬浮状态。基于细胞的计数数据,进一步添加了 HAT 培养基,确保细胞浓度达到 2×10^5 /mL,并在细胞培养箱中进行储存以备后用。将上述的细胞悬液倒入 96 孔板中,每个孔滴入 2 滴,即 0.1 mL,然后将其放入 37 °C 6%CO₂ 的培养箱中进行培养。

2.7.6 细胞融合与杂交瘤细胞的选择性培养

在 50 mL 的离心管中,将 2.1×10^8 个脾细胞和 2×10^7 个骨髓瘤细胞 SP2/0 进行混合,然后添加不完全培养基至 30 mL,并确保充分混合。在进行 1000 rpm 的离心处理 10 min 后,应确保上清被完全吸收。轻轻地在手掌上敲击融合管的底部,确保沉淀的细胞分布均匀且松散,然后将其放入 40 °C 的水浴锅中进行预热。使用 1 mL 的吸管,在 1 min 内加入已经预热至 40 °C 的 50%PEG(PH 8.0) 1mL,并在加入的同时轻轻搅动。接下来,使用 10 mL 的吸管,在 90 s 内加入预热至 37 °C 的 25 mL 不完全培养基,然后在 37 °C 下静置 10 min,1000 rpm

后进行离心, 5 min 后丢弃上清。首先加入 5 mL 的 HAT 培养基, 然后轻轻地吹吸沉淀的细胞, 使其悬浮并均匀混合, 接着再添加含有腹腔巨噬细胞的 HAT 培养基至 100 mL。将其分装至 96 孔细胞培养板中, 每个孔的容量为 0.10~0.15mL, 接着把细胞培养板放入 37 °C 6%CO₂ 的培养箱中进行培养。5 d 之后, 使用 HAT 培养基替换为 1/2 的培养基; 10 d 之后, 用 HT 培养基替换为 HAT 培养基; 到了第 14 d, 可以选择使用普通的完全培养基。需要定期检查杂交瘤细胞的生长状况, 并在其增长到孔底面积的 1/10 或更大时, 取上清供抗体检测。

2.7.7 杂交瘤细胞的筛选

取 100 μL 上清, 利用 2 μg/mL 的 ESP 蛋白覆盖的酶标板, 采用间接 ELISA 技术对杂交瘤细胞进行了筛查。将细胞培养上清、SP2/0 培养上清作为阴性对照、1×PBS 作为空白对照、阳性血清 1:1000 倍稀释作为阳性对照, 然后在 37°C 下孵育 15 min, 洗液洗涤 3 次, 加入羊抗鼠二抗, 在 37 °C 的温度下孵育 30 min, 清洗三次后加入显色剂, 37 °C 孵育 10 min, 然后在每个孔中加入 50 μL 的终止液终止反应, 测吸光度值。

2.7.8 杂交瘤细胞的克隆化

使用有限稀释技术来克隆杂交瘤细胞。在制备饲养细胞的过程中, 首先需要准备待克隆的杂交瘤细胞悬液, 然后对计数后的杂交瘤细胞进行精确的系列稀释, 直到每毫升含有 10 个细胞。接着, 按照每孔接种 0.1 mL 的细胞悬液, 确保每个孔内含有 1 个细胞。37°C、6% CO₂ 细胞培养箱内培养 10 d, 在倒置显微镜的观察下, 标记仅有单一克隆生长的孔洞, 并从上清中提取样本进行抗体的检测。经过两次的亚克隆, 得到了具有稳定基因型和稳定分泌表型的细胞, 并从这些细胞中提取了用于检测阳性孔的抗体, 然后进行了扩大培养和冷冻保存。

2.7.9 杂交瘤细胞的冻存与复苏

2.7.9.1 杂交瘤细胞的冻存

对杂交瘤细胞进行 2000 rpm 的离心处理 5 min 后, 将其重新悬浮在预冷的冻存液中, 浓度设定为 10⁷/mL, 然后将其分装到每瓶 1 mL 的容器中, 封口后将其放置在冰面上, 并明确标注细胞的名称和冻存的日期。将其存放在 4 °C 的预冷细胞冷冻容器里, 然后在 -80 °C 的冰箱中过夜保存后, 转移到液氮中进行长时间的储存。

2.7.9.2 杂交瘤细胞的复苏

首先从液氮中提取安瓶，并迅速放入 37°C 的水中进行水浴使其融化。当最后一块冰块即将融化时，从水浴中取出并放在冰浴之上。首先使用 5 mL 的 HT 培养基进行稀释，然后以 1000 rpm 的速度离心 10 min，之后将上清丢弃，并将其悬浮在适量的 HT 培养基中，最后将其转移到培养瓶中，并放置 37°C，6% CO₂ 细胞培养箱中培养。

2.7.10 小鼠腹水的制备

对小鼠进行腹腔内液体石蜡的注射以增强其敏感性，每只小鼠在 0.3 mL 的剂量下，在 10 天后进行无血清培养基稀释的杂交瘤细胞的腹腔注射，每只小鼠的剂量为 $5 \times 10^5/0.2\text{mL}$ 。在相隔 5 天之后，每日都要检查小鼠腹水的生成状况，肉眼可见腹部明显膨大，当用手进行触摸时，如果皮肤感到紧绷，可以使用 16 号针头来收集腹水，通常可以连续采集 2~3 次，每只小鼠通常可以采集 5~10 mL 的腹水。对腹水进行 2000 rpm 的离心处理 5 min，去除其中的细胞和其他沉淀物，然后收集上层的清液，测量抗体的效价，并将其分装成 -80 °C 进行冷冻保存以备后用。

2.7.11 单克隆抗体的纯化

使用辛酸-硫酸铵技术来纯化腹水，并通过双层滤纸对腹水进行过滤，以初步去除其中的杂质、脂肪和细胞碎片。在 4 °C 的温度下，转速为 12000 rpm，经过 15 min 的离心处理后，收集上层的清液并丢弃沉淀物。为了精确地测量腹水的体积，需要将一个体积的腹水与三个体积的醋酸盐缓冲液混合，然后使用磁力搅拌器将其搅拌均匀，并加入 2 mol/L HCL 来调整 pH 值至 4.5。在搅拌的过程中，慢慢地加入正辛酸，33 μL/mL 腹水，加入后，在室温下搅拌大约半小时，然后放置在 4 °C 的位置静置 2 h。在静置完毕之后，以 4 °C 12000 rpm 进行离心处理 5 min，然后收集上层液体，使用双层滤纸进行过滤，并进一步收集得到的滤液。准确地测量滤液的体积，然后加入体积为 1/10 的 0.1M pH 值为 7.4 的 PBS，使用 2 mol/L NaOH 将 pH 值调整至 7.4，并记录下加入 NaOH 的体积。在加入硫酸铵固体至 0.277 g/mL 的过程中，持续搅拌并确保在 30 min 内完成，然后放置在 4 °C 的温度下过夜。处理速度为 12000 rpm，离心时间为 15 min，然后丢弃上清。采用特定体积的 0.01 mo/LPBS 进行溶解和沉淀，再用 0.01 mo/LPBS 透析过夜。收集透析液，12000 rpm，离心 15 min，取上清，置 -20°C 保存备用，再用 SDS-PAGE 电泳分析纯度。

2.7.12 单克隆抗体的 Western blotting 鉴定

采用纯化的重组蛋白 ESP 和含有空质粒的菌体蛋白来进行 SDS-PAGE 电泳，接着将其电转印到 PVDF 膜上。在 2.6.5 的封闭过程完成后，将膜浸泡在含有

0.1 $\mu\text{g/mL}$ 单克隆抗体的 TBST 溶液中, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下孵化 1 h, 并使用 TBST Buffer 进行了三次洗膜操作; 随后, 把膜放入含有 0.1 $\mu\text{g/mL}$ HRP 标记的羊抗单克隆 IgG 的 TBST 溶液中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下孵化一个小时。在使用 TBST Buffer 进行三次清洗后, 在避光的环境中使用底物显色液显色 1 min, 可以观察到 PVDF 膜上有明显的条纹, 此时可以使用去离子水进行清洗以终止反应。

2.7.13 单克隆抗体效价测定

经过纯化处理的腹水, 使用间接 ELISA 方法来测定其抗体的效价, 同方法 2.7.7, 所测单克隆抗体以第一孔为 1: 1000 稀释, 之后倍比稀释即可。

2.8 粪肠球菌全菌体多克隆抗体的制备

2.8.1 免疫原制备

复苏保存的粪肠球菌, 通过传代扩大培养的方法, 将活化后的粪肠球菌接种到 LB 液体培养基中, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 180 rpm 震荡培养一夜并进行计数。接着, 使用 0.1% 的甲醛溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下灭活 24 h。再次涂抹 LB 固体平板以检查是否存在活菌后, 用生理盐水清洗菌体两次, 每次洗涤 4000 rpm, 然后离心 5 min 以收集菌体。采用生理盐水来调节菌体的浓度, 设定为 1×10^9 CFU/mL, -20 $^{\circ}\text{C}$ 并将其储存以备后用。

2.8.2 动物免疫

取两只日本雌性日本大耳兔, 重量在 2 kg 左右, 选择在背部皮下进行多点的注射方式。首次对粪肠球菌进行免疫灭活, 并使用等量的弗氏完全佐剂, 漩涡混合器上充分混匀, 使其完全乳化, 于兔子脊柱两旁皮下分 5 点注射, 建议的免疫剂量是 1 mL/只。在首次免疫后, 每隔两周需要加强免疫程序, 确保免疫剂量与首次免疫保持一致, 并与弗氏不完全佐剂充分乳化。在第三次免疫后的第一周, 通过耳静脉采集血液进行效价测试。当效价达到 1:10000 时, 可以进行一次冲击免疫, 然后在 1 周后进行心脏采血, 以分离血清。

2.8.3 间接 ELISA 检测多抗血清效价

兔子的抗多抗血清使用间接 ELISA 技术进行检测, 并通过包被液将热灭活抗原稀释至 10^8 CFU/mL, 然后用酶标板包被 100 μL 每孔, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行夜间包被。第二天, 将预先包被好的酶标板用 PBST 清洗三遍, 然后将孔内的水拍干, 接着使用 10% 的小牛血清作为封闭液, 每个孔内加入 180 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 持续 1 小时。PBST 需要清洗三遍, 拍干孔内水分, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 5 min 即可用于检测。待测血清稀释度分六个梯度 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 在实验过程中, 正常兔的血清被用作阴性对照, 而 PBS 则作为空白

对照。每个稀释度点双孔，加到酶标板中的每个孔 100 μ L。正常兔的血清是 1:1000 稀释，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。然后，使用 PBST 洗液进行三次清洗，并将水分拍干。在处理二抗时，以 1:1000 的稀释比例稀释 PBS 羊抗兔 IgG-HRP，确保每个孔均覆盖，温度保持 37 $^{\circ}$ C，并孵化 30 min。PBST 需要再清洗三遍，然后加入显色液 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 进行避光反应，这个过程将持续 10 min。显色过程完成后，将 50 μ L 的终止液加入每个孔中，并利用酶联检测仪来测定 OD₄₅₀ 的数值。

2.8.4 兔抗多克隆抗体的产生进程

每次免疫前，都对兔子进行耳静脉采血，血样先在 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 后，再将血清放在 4 $^{\circ}$ C 的温度下夜间析出，然后在次日以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 的温度下进行离心，持续 5 min 以分离血清。接着，按照 1:100 的比例进行稀释，并用间接 ELISA 方法来测定多抗血清中的抗体滴度。

2.8.5 兔抗多克隆抗体的纯化及 SDS-PAGE 鉴定

使用辛酸—硫酸铵的技术来纯化多克隆抗体，这一方法与 2.7.11 的方法相同。经过纯化处理后，进行了 SDS-PAGE 电泳分析，配制浓缩胶为 5%，分离胶为 12%，纯化后的多抗 1:100 稀释，处理方式与上样同方法 2.6.3。

2.9 胶体金试纸条的制备

2.9.1 玻璃器皿的硅化

打开通风橱，将所用器皿圆底烧瓶、玻璃量筒、收集瓶、转子等清洗干净后，将其浸泡在含有 5% 二氯二甲基硅烷的氯仿溶液中，然后缓缓旋转容器，确保玻璃容器的四周都被硅化。几分钟后，用去离子水冲洗，确认硅化容器在用去离子水冲洗时，四周没有水滴，水面是水平的，没有凹痕，干燥后，用铝箔纸封口备用。

2.9.2 胶体金溶液的制备

采用柠檬酸三钠法制备胶体金。量筒量取 200 mL 过滤后的去离子水于圆底烧瓶中，放入酸化后的转子，在天平上称重并记录，将其放在正在加热的磁性搅拌器上进行混合和加热。在煮沸 2 min 之后，迅速加入 2 mL 的 1% 氯金酸溶液，然后继续搅拌加热 5 min，接着加入 4 mL 的柠檬酸三钠溶液，观察溶液的颜色，然后继续搅拌加热，待其从透明转至灰色，灰色转至深红色，最后转至不变清亮的酒红色时，持续煮沸 8 min 结束烧制，将超纯水添加到起始重量，然后放入棕色的瓶子中，保持 4 $^{\circ}$ C 的温度以备后用。

2.9.3 胶体金颗粒的鉴定

可用肉眼观察,胶体金颗粒制备完成后,置于 4°C 过夜,次日观察胶体金溶液的稳定性,色泽与烧制完成后无颜色差异,溶液对光可见均一透亮,瓶子底部无沉淀聚集和无浮游性杂质。接下来,使用紫外分光光度计来测定胶体金溶液在 400 nm 至 600 nm 范围内的吸收峰,在最高吸收峰处数值在 0.8~0.9 之间。

2.9.4 单克隆抗体与胶体金颗粒结合的最佳 pH 的确定

通过目视观察,可以大致评估单克隆抗体与胶体金颗粒结合时的理想 pH 值。先取 6 个 1.5 mL 灭菌 EP 管将上述制备的胶体金溶液加入 1 mL,然后取 4.5-10.0 的精密 pH 试纸,并使用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液进行测试,将胶体金溶液的 pH 分别调为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5。分别加入单抗 20 μ L 于 EP 管中,漩涡振荡器混匀 2 min,静置 10 min。每管中加入 10% 的 NaCl 溶液 100 μ L,振荡器混匀 2 min,经过 1 小时的静置观察后,选择与原始液体颜色相近的红色,这被认为是最理想的 pH 值。

2.9.5 单克隆抗体与胶体金颗粒结合的最佳标记量的确定

取 6 个灭菌后的 1.5 mL EP 管,向离心管中加入 1 mL 的胶体金溶液,并使用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液来调整胶体金溶液的理想 pH 值,依次加入 6 μ g、8 μ g、10 μ g、12 μ g、14 μ g、16 μ g 浓度为 1 mg/mL 的 ESP 单克隆抗体,颠倒数次,充分完全混匀,在室温条件下反应 30 min,观察溶液颜色。在胶体金溶液中加入 ESP 单克隆抗体后,由于蛋白浓度差异,可呈现不同的状态和颜色。标记的最佳量是标记最小量加上蛋白量的 20%。

2.9.6 金标抗体的制备

选择 10 个 1.5 mL 经过高压处理的 EP 管,并在每管中加入 1 mL 的胶体金溶液,使用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液来调整 PH 值是最理想的,再加入最佳标记量(12 μ L, 1mg/mL)的 ESP 单克隆抗体 1A7,确保充分混合后,让其在室温下静置 30 min,最终使用 20% 的 BSA 溶液进行密封,确保其最终浓度达到 1%,封闭时长为 30 min。接着,先用 1000 rpm 离心 5 min,去除溶液中的杂质,再用 12000 rpm,在 4°C 的温度下进行离心 15 min 后,将上层的清液丢弃,然后用 110 μ L 的胶体金重悬液对每一管中的沉淀物进行重悬,并在 4°C 的温度下进行保存以备后用。

2.9.7 胶体金检测试纸条的组装

2.9.7.1 金标垫的处理

将结合垫裁剪成 5 mm 宽的条带，用移液枪将金标抗体均匀浸涂于垫上，每 30 cm 结合垫均匀喷涂 1 mL 金标抗体，接着，把它放在 37°C 的恒温箱里进行烘干，每隔 5 min 翻转一次，直至完全干燥后，干燥袋中备用。

2.9.7.2 NC 膜抗体包被量的确定

质控线抗体包被量：羊抗鼠 IgG 二抗按照 1:10、1:20、1:100、1:200 稀释，在 NC 膜 C 线划线，37°C 恒温箱干燥 2 min。组装试纸条，用相同的抗原进行检测，以确定最适的抗体包被浓度。

检测线抗体包被量：粪肠球菌多克隆抗体按照 1:10、1:20、1:100、1:200 稀释，并分别在 NC 膜的 T 线划线，37°C 恒温箱干燥 2 min，组装试纸条，用相同的抗原进行检测，以确定检测线最适的抗体包被浓度。

T 线与 C 线间隔为 4 mm 最佳。

2.9.7.3 胶体金检测试纸条的组装

最下层为 PVC 底板，粘贴层朝上，撕去粘贴膜，先粘贴中间 NC 膜，再依次粘贴金标垫、样品垫、吸水垫，每个部分之间都要有 2 mm 重叠，抗体划到 NC 膜上，室温自然晾干，组装完成的试纸条排列整齐，没有褶皱，并使用切条机切成 38 mm 宽，裁切好后装入塑料卡槽板，放入干燥袋中，密封保存。

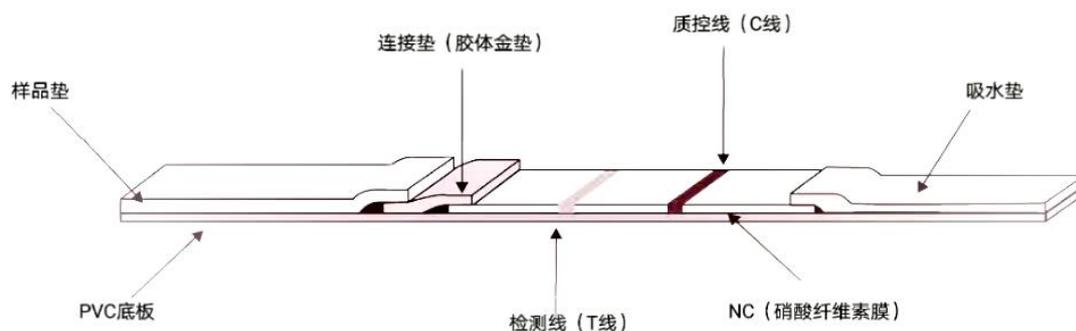


图 1 胶体金检测试纸条的组装示意图

Figure 1 Schematic diagram of the assembly of colloidal gold test strips

2.9.7.4 胶体金试纸条的检测方法和判定标准

将样品经样品稀释液处理后，在吸取了 80 μ L 进行稀释后，先将样品均匀地滴在样品垫上，接着借助试纸条上的毛细效应，使样品得以向前移动。当待测样本中存在 ESP 致病因子时，ESP 首先会与金标单抗结合，形成了一个被命名为"ESP-1A7-金颗粒"的复合材料。这种复合物是由一种特殊结构的纳米金球

和抗体结合而成。在层析的过程中,这种复合物会被固定在检测线(T线)上的多种抗体所捕获,进而生成一个名为"多抗-ESP-1A7-金颗粒"的复合体。当金粒子在检测线上聚集时,它们的颜色会变成红色。对于那些未与之结合的金标单抗,它们会继续向前泳动层析,并与固定在质控线(C线)上的羊抗鼠 IgG 二抗结合,从而形成"羊抗鼠 IgG-二抗-1A7-金颗粒"的复合物。通过分析检测到的荧光信号来判断该样品是否为阳性结果。另外,在质控线上,金颗粒的富集现象也会表现为红色。如果测试样本里没有 ESP 致病因子,并且检测线上没有任何反应,那么红色条带就不会出现。尽管如此,在质控线上还是会生成复合物,导致红色条带的形成。这说明该试验方法具有一定程度的假阳性结果。假如质控线并未显示,那么不论检测线是否已经显示,此试纸条都将被判定为无效。

2.9.8 胶体金检测试纸条的性能评价

2.9.8.1 胶体金检测试纸条的特异性分析

分别用制备的胶体金试纸条检测实验室保存的金黄色葡萄球菌,无乳链球菌,枯草芽孢杆菌,猪链球菌,鸭疫里默氏杆菌,沙门氏菌,观察是否出现交叉反应,同时用粪肠球菌样品为阳性对照,PBS 作为阴性对照,室温下反应 15 min,观察并记录反应结果。

2.9.8.2 胶体金检测试纸条的敏感性分析

准备组装好的试纸条,将含粪肠球菌细菌量分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/mL 菌液样品,用样稀稀释后,加于样品垫上,10 min 后观察结果。

2.9.8.3 胶体金检测试纸条的重复性分析

使用同一批次的试纸条对多个样本进行了测试,评估试纸条在不同批次中的重复性。接着,利用不同批次的试纸条对同一样本进行了测试,以此来判断试纸条在不同批次之间的重复性。

2.9.8.4 胶体金检测试纸条的稳定性分析

将组装并封存好的胶体金试纸条分别放置于 4°C 和室温(25°C) 环境中,分别取 15 d、30 d、90 d、180 d 进行稳定性检测。

2.9.8.5 胶体金检测试纸条的初步应用

对实验室保存的 36 份含有粪肠球菌的人工污染乳阳性乳样和 14 份阴性乳样分别利用胶体金试纸条和 PCR 进行检测,探究两者检测阳性的符合率。

3 结果与分析

3.1 粪肠球菌菌株鉴定结果

3.1.1 粪肠球菌革兰氏染色结果

通过对连续三代粪肠球菌的革兰氏染色和光学显微镜观察,可看到紫色球菌的存在,其菌体可以是圆形、椭圆形,或者是单一的或短链的形态。如图 2 所示。

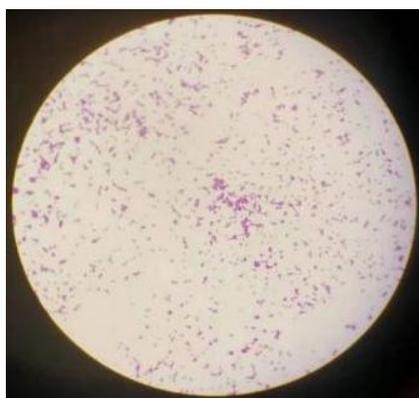


图 2 粪肠球菌革兰染色观察(20×100)
Figure 2 Gram staining of *E. faecalis* (20×100)

3.1.2 糖发酵试验结果

将活化培养的 10 株粪肠球菌进行糖发酵生化实验,与粪肠球菌标准株表现结果进行比对。实验结果显示,10 株粪肠球菌经过分离培养后接种的阿拉伯糖发酵管仍然颜色反应不变,并且其反应呈现为阴性,不产酸,其余 6 种生化发酵管均有颜色变化,表明其有产酸反应,其中有 4 株粪肠球菌对山梨醇、麦芽糖,甘露醇和蔗糖的反应缓慢。结果表明活化分离培养的粪肠球菌菌株与粪肠球菌标准株发酵情况相符。实验菌株反应结果,如表 9 所示。

表 9 实验菌株生化实验结果
Table 9 Biochemical experimental results of the experimental strains

菌株 糖种类	标准 株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”为阳性；“-”为阴性；“d”为反应缓慢。

3.1.3 药敏试验结果

结果显示,分离的临床粪肠球菌菌株对氨苄西林和诺氟沙星的敏感性最高,四环素的抗药性是最为显著的,而其他的庆大霉素、链霉素和氯霉素也展现出了不同的抗药水平。结果如表 10 所示。为向奶牛户提供临床技术服务提供可靠的检测依据。

表 10 药敏试验结果
Table 10 Drug sensitivity test results

抗生素名称	抑菌环直径 (mm)	敏感性
氨苄西林	22	S
四环素	5	R
氯霉素	17	I
诺氟沙星	25	S
庆大霉素	15	R
链霉素	19	I

注: 抑菌环直径<16mm 为耐药 (R); 16<直径<20mm 为中等敏感 (I); 直径>20mm 为高度敏感 (S)

3.2 粪肠球菌 *esp* 基因的克隆

3.2.1 粪肠球菌表面蛋白 *esp* 基因扩增结果

通过 PCR 技术扩增得到的 *esp* 基因片段的长度大约是 776 bp(位于泳道 1、2 的第 3 条带)，这与克隆基因预测的片段长度是一致的。如图 3 所示。

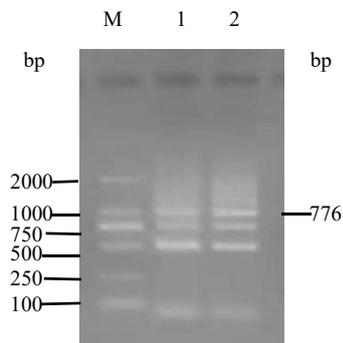


图 3 *esp* 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

Figure 3 Electrophoretic identification of PCR amplification products of *esp* Gene

注: M DNA 分子量标准(2000 bp) 1~2 *esp* 基因 PCR 产物(第 3 条为 776bp)

3.2.2 重组克隆载体 pMD18-T-*esp* 的构建与鉴定结果

esp 目的基因在与 pMD-18-T 克隆载体连接之后,被转移到大肠杆菌的 DH5 α 感受态细胞中进行增殖。从菌液中提取样本进行 PCR 鉴定(图 4),然后提取重组质粒进行 PCR 鉴定(图 5),并使用重组克隆载体 pMD18-T-*esp* 以及 *Bam* H I 和 *Eco* R I 进行酶切鉴定(图 6),电泳结果均出现约 776 bp 的特异性条带,表明重组质粒 pMD18-T-*esp* 构建正确。

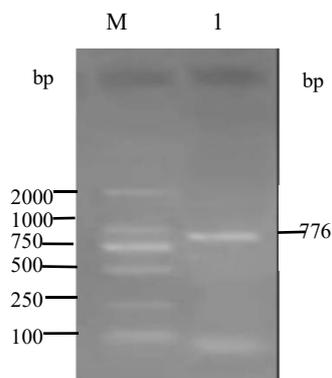


图 4 *esp* 基因菌液 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

Figure 4 Agarose Gel Electrophoresis Identification of PCR Amplified Products of *esp* Gene in Bacteria

注: M DNA 分子量标准(2000 bp) 1 菌液 PCR 产物

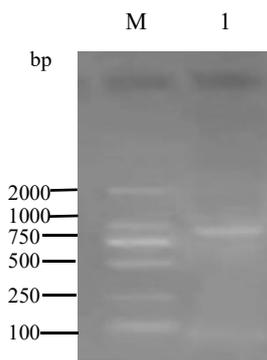


图 5 重组质粒 pMD18-T-*esp* PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

Figure 5 Recombinant plasmid pMD18-T-*esp* PCR product identification by agarose gel electrophoresis

注: M DNA 分子量标准(2000 bp) 1 重组质粒 PCR 产物

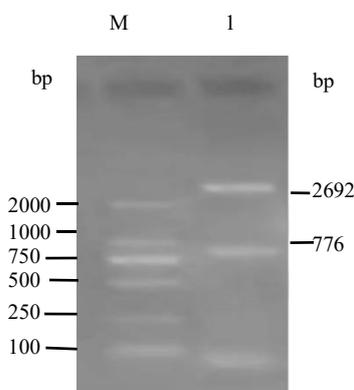


图 6 重组质粒 pMD18-T-*esp* 双酶切鉴定

Figure 6 Recombinant plasmid pMD18-T-*esp* double restriction digestion identification

注: M DNA 分子量标准(2000 bp) 1 重组质粒双酶切

3.3 重组表达载体 pET-30a(+)-*esp* 的构建及鉴定结果

经过酶切纯化的重组克隆载体的目标片段与质粒 pET-30a(+)进行了连接,并被转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞。在此基础上,筛选出了表达重组质粒 pET-30a-*esp*,并通过双酶切鉴定的电泳观察到了大约 776bp 的特异性条带。测序的结果证实成功地构建了重组表达载体 pET-30a-*esp*(图 7)。

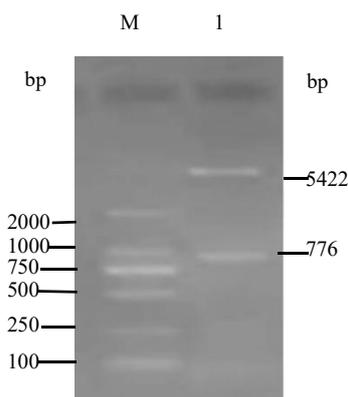


图7 重组表达质粒 pET-30a-*esp* 双酶切鉴定

Figure 7 Recombinant expression plasmid pET-30a-*esp* double restriction digestion identification

注: M DNA 分子量标准(2000 bp) 1 重组表达质粒 pET-30a-*esp* 的双酶切

3.4 表面蛋白 *esp* 基因序列生物信息学分析

3.4.1 表面蛋白 *esp* 基因序列的克隆及同源性分析

在对重组质粒进行测序后,与 CP045045.1 序列的对比结果表明,它们的同源性达到了 100% (图 8)。通过进化树的构建分析,发现表面蛋白 *esp* 目的基因序列与 CP040898.1 和 CP085291.1 具有 97.0% 的同源性,与 CP045045.1 的同源性达到了 100%。此外,它与粪肠球菌 CP045045.1 株的亲缘关系最为接近。通过使用 NCBI 对 CP045045.1 进行分析,确认分离出的粪肠球菌是乳源性的(图 9)。

```

Query 1 GGATCCGAAGGCACCAAGTATTGAAAGTGGCACCACCGTGTTCAGTTAAAGATGGTGTG 60
Sbjct 1 GGATCCGAAGGCACCAAGTATTGAAAGTGGCACCACCGTGTTCAGTTAAAGATGGTGTG 60
Query 61 AGCCTGCCGGAAGATAAACTGCCGGTGCTGAAAGCCAAGATGGTTATACCGATGCAAAA 120
Sbjct 61 AGCCTGCCGGAAGATAAACTGCCGGTGCTGAAAGCCAAGATGGTTATACCGATGCAAAA 120
Query 121 TGGCCGGGTGAAGCAACCAGCCGATTAAGGCCGATGATACCGAATTTGTTAGCAGTGCC 180
Sbjct 121 TGGCCGGGTGAAGCAACCAGCCGATTAAGGCCGATGATACCGAATTTGTTAGCAGTGCC 180
Query 181 ACCAACTGGATGATAAAAGTATGATGCCGATAAATATACCCCGAAGGTCAGAAAAGTTACC 240
Sbjct 181 ACCAACTGGATGATAAAAGTATGATGCCGATAAATATACCCCGAAGGTCAGAAAAGTTACC 240
Query 241 ACCGAACTGAATAAGGAAACCGGATGCCAGCGAAGGCATTAAGAATAAGAAAGATCTGCCG 300
Sbjct 241 ACCGAACTGAATAAGGAAACCGGATGCCAGCGAAGGCATTAAGAATAAGAAAGATCTGCCG 300
Query 301 AAAGATGCAAAAATATACCTGGAAAGAAAAGTTGATATCAGTACCGCCGGCAATAAGAAA 360
Sbjct 301 AAAGATGCAAAAATATACCTGGAAAGAAAAGTTGATATCAGTACCGCCGGCAATAAGAAA 360
Query 361 GGCACCGTGGTTGTGACCTATAGTGATGGCAGCAGTGAAGTTGAAGTGGATGTTACC 420
Sbjct 361 GGCACCGTGGTTGTGACCTATAGTGATGGCAGCAGTGAAGTTGAAGTGGATGTTACC 420
Query 421 GTTACCGATAATCGTAGCGATGCAGATAAATATGAACCGACCGTTGAAGGTGAAAAAGTT 480
Sbjct 421 GTTACCGATAATCGTAGCGATGCAGATAAATATGAACCGACCGTTGAAGGTGAAAAAGTT 480
Query 481 GAAATTGGCGGCAAGTGGATCTGACCGATAATGTTACCAATCTGCCGACCTGCCGACG 540
Sbjct 481 GAAATTGGCGGCAAGTGGATCTGACCGATAATGTTACCAATCTGCCGACCTGCCGACG 540
Query 541 GGCACCACCGTTACCGACGTGACCCCTGGTGGTACAATTGATACCAATACCCCTGGTAAT 600
Sbjct 541 GGCACCACCGTTACCGACGTGACCCCTGGTGGTACAATTGATACCAATACCCCTGGTAAT 600
Query 601 TATGAAGGCGTTATTGAAGTGACCTATCCGGATGGTACAAAAGATACCGTTAAAGTTCCG 660
Sbjct 601 TATGAAGGCGTTATTGAAGTGACCTATCCGGATGGTACAAAAGATACCGTTAAAGTTCCG 660
Query 661 GTTGAAGTGACCGATAATCGCAGTGATGCAGATAAGTATGAACCGACAGTTGAAGGTGAG 720
Sbjct 661 GTTGAAGTGACCGATAATCGCAGTGATGCAGATAAGTATGAACCGACAGTTGAAGGTGAG 720
Query 721 AAAGTGGAAATTGGTGGTAAAGTTGATCTGACCGACAATGTTACCAACGCGAATTC 776
Sbjct 721 AAAGTGGAAATTGGTGGTAAAGTTGATCTGACCGACAATGTTACCAACGCGAATTC 776
    
```

图 8 *esp* 基因克隆序列与序列(CP045045.1)BLAST 比对分析

Figure 8 Comparison of *esp* cloned sequence with BLAS with sequence (CP045045.1)

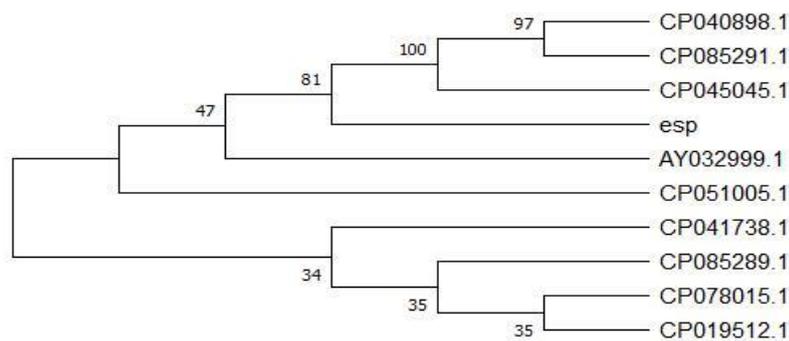


图 9 粪肠球菌 *esp* 基因序列进化树

Figure 9 Evolutionary tree of *Enterococcus faecalis esp* gene sequences

3.4.2 *esp* 基因编码蛋白的二维结构及三维结构预测

使用在线工具 SOPMA 来预测 *esp* 基因编码蛋白的二级结构，预测结果如图 10 所示。在这之中，C 代表的是不规则的卷曲，其比例为 68.6%；H 是 α 螺

而亲水性的总平均值为-0.818。该蛋白的不稳定系数达到了 14.90，这一较低的不稳定系数意味着其性质是稳定的（图 12）。

```

      10      20      30      40      50      60
GSEGTSIESG TTVFAVKDGV SLPEDKLPVL KAKDGYTDAK WPGEATQPIK ADDTEFVSSA

      70      80      90     100     110     120
TKLDDKSDAD KYTPEGQKVT TELNKEPDAS EGIKNKKDLP KDAKYTWKEK VDISTAGNKK

      130     140     150     160     170     180
GTVVVITYSDG SSDEVEVDVT VTDNRSADK YEPTVEGEKV EIGGKVDLTD NVTNLPTLPQ

      190     200     210     220     230     240
GTTVTDVTPG GTIDTNTPGN YEGVIEVTYP DGTKDVKVVP VEVTDNRSDA DKYEPTVEGE

      250
KVEIGGKVDL TDNVTNAN

```

图 12 ESP 蛋白理化性质分析

Figure 12 Physicochemical properties analysis of ESP protein

3.4.4 跨膜领域分析

通过在线生物信息学软件 TMHMM 对 ESP 蛋白的结构进行跨膜分析，我们发现 ESP 蛋白序列中的跨膜区域位于 6~25 位氨基酸之间，这暗示了该蛋白可能具有跨膜分泌的特性。（如图 13）。

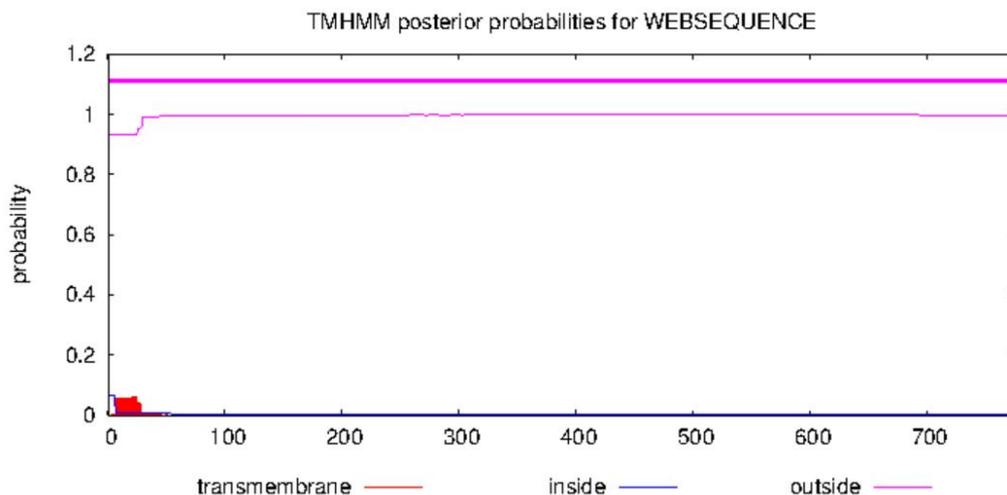


图 13 ESP 蛋白序列跨膜领域分析

Figure 13 Analysis of the transmembrane domain of ESP protein sequence

3.4.5 抗原性预测分析

通过使用 DNA Star 生物信息学软件,对 *esp* 基因编码的蛋白质进行了抗原表位的预测分析。分析结果揭示,在 14~55、59~170、186~197、206~255 的氨基酸范围内,抗原可及性表现得相当出色。特别是在 59~170 的范围内,抗原可及性更为集中,连续的波峰即为抗原表位区,这表明 *esp* 具有多个抗原表位,并且大多数位于 *esp* 的表面(图 14)。

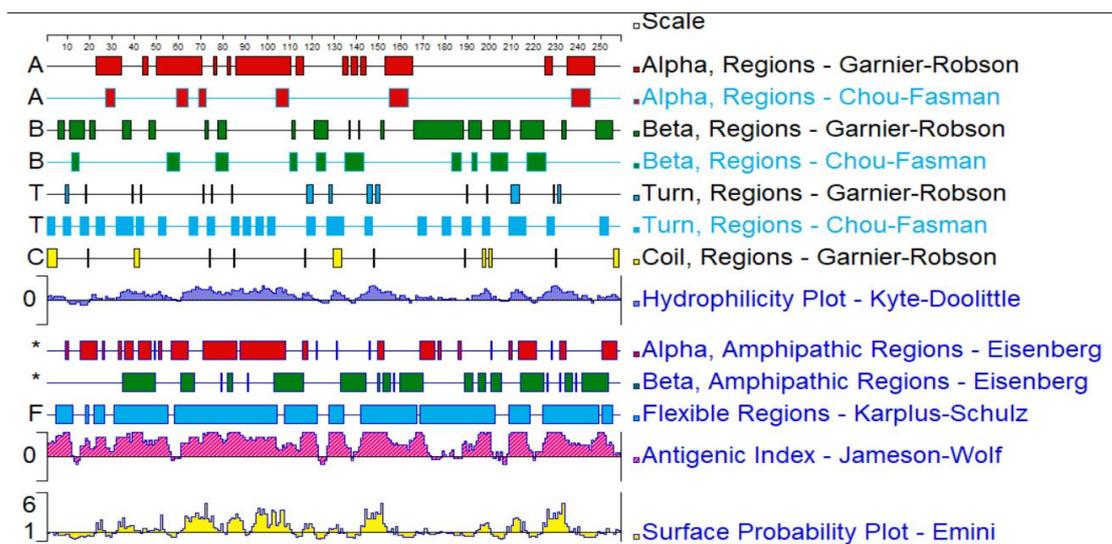


图 14 表面蛋白 ESP 基因抗原性分析

Figure 14 Antigenicity analysis of surface protein ESP gene

3.5 pET-30a-*esp* 重组蛋白的表达

3.5.1 pET-30a-*esp* 重组蛋白的初步表达

12% SDS-PAGE 电泳检测结果表明: pET-30a-*esp*/ BL21(DE3)重组菌在 37°C, IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 的环境中,诱导了 5 h 的表达,并通过 12%的 SDS-PAGE 电泳来观察其表达状况。如图 15 所示,只有诱导后 pET-30a-*esp* 在 37KDa 左右处出现目的条带,未诱导的 pET-30a-*esp* 在 37KDa 处未出现明显条带,上清和沉淀的中,都观察到了 pET-30a-*esp* 重组蛋白的表达,但在上清,表达较高,表明 pET-30a-*esp* 重组蛋白主要存于上清中,因此,在后续纯化过程中选择上清溶液进行纯化。

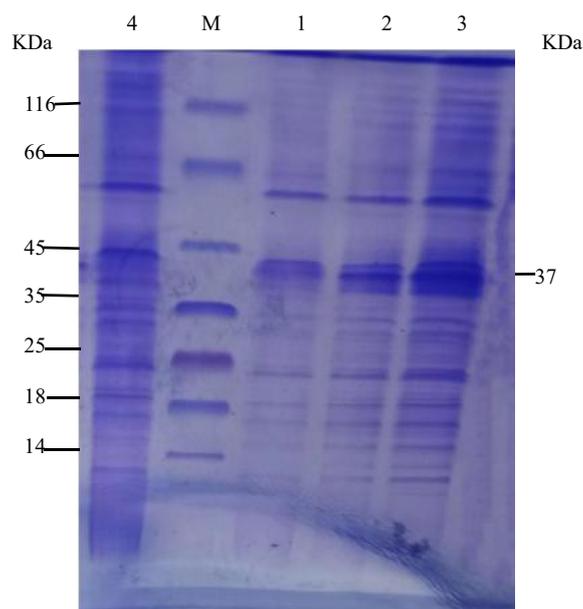


图 15 pET-30a-esp 重组蛋白的初步表达

Figure 15 Initial expression of pET-30a-esp recombinant protein

注：M 低分子量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 BL21(DE3)/pET-30a-esp 诱导后全菌体裂解产物
2 BL21(DE3)/pET-30a-esp 诱导菌体裂解上清 3 BL21(DE3)/pET-30a-esp 诱导全菌体裂解沉淀
4 BL21(DE3)/pET-30a-esp 诱导前全菌体产物

3.5.2 pET-30a-esp 重组蛋白诱导表达时间的探究

在 37°C 的环境中，为了评估重组目标蛋白在各种诱导时间下的表达差异，用 0.4 mmol/L IPTG 分别诱导表达菌体。如图 16 所示，在 37°C 200 rpm 条件下随着诱导时间增加，pET-30a-esp 重组蛋白表达量也随诱导时间增加，在第 5 h 后，pET-30a-esp 重组蛋白表达量稍高。因此，确定诱导表达 5 h 为 pET-30a-esp 重组蛋白最佳诱导时间。

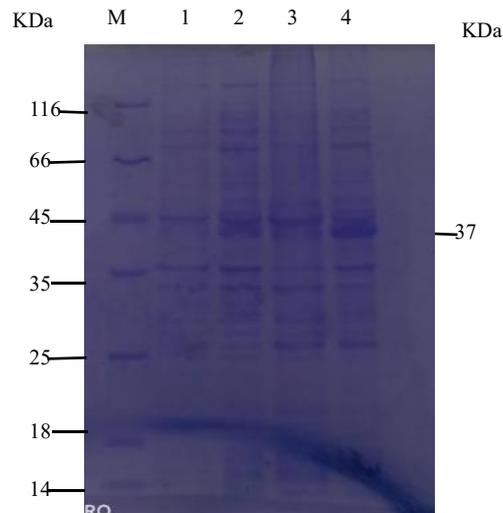


图 16 pET-30a-*esp* 重组蛋白诱导表达时间

Figure 16 Time of induced expression of pET-30a-*esp* recombinant protein

注: M 低分子质量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导表达 2h
2 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导表达 3h 3 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导表达 4h
4 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导表达 5h

3.5.3 pET-30a-*esp* 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

在使用 IPTG 进行诱导后,对含有重组表达质粒 pET-30a-*esp* 的 *E.coli* BL21 进行了菌体收集和超声裂解。裂解后的上清液经过纯化的层析柱处理,并使用 SDS-PAGE 技术进行了分析。此外,还采用了 0.25% 的考马斯亮蓝染色和甲醇脱色技术(图 17)。结果显示,诱导表达的目标蛋白的相对分子质量大约是 37×10^3 , 蛋白浓度为 $106 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 这与预期的大小是一致的。蛋白质主要是以可形式进行表达,但在 pET-30a (+) 未被诱导的细菌中,并没有观察到这种表达模式。

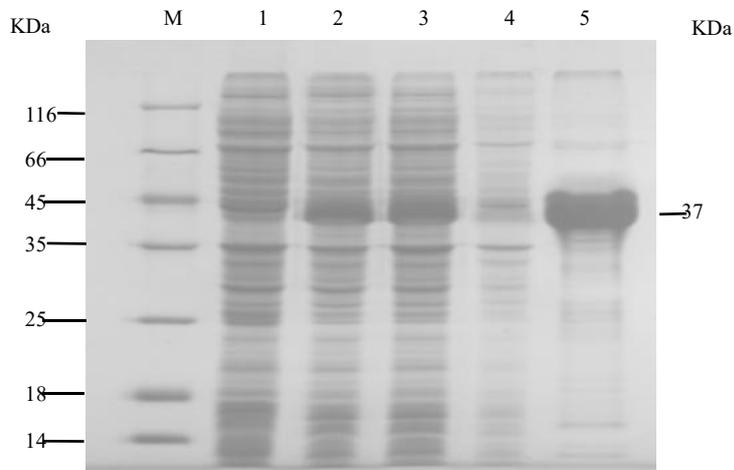


图 17 pET-30a-*esp* 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 17 SDS-PAGE analysis of pET-30a-*esp* recombinant protein

注: M 低分子质量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 BL21(DE3)/pET-30a(+)空载体诱导产物
 2 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导全菌体裂解产物 3 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导菌体裂解上清 4
 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 诱导全菌体裂解沉淀
 5 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 表达蛋白纯化产物

3.5.4 ESP 重组蛋白的 Western blotting 分析

采用纯化蛋白小鼠抗血清作为第一抗体, 第二抗体为 HRP 标记的羊抗鼠, Western-blotting 结果分析显示, ESP 重组蛋白与小鼠抗血清产生了特定的反应, 产生了明显的免疫印迹条纹, 在相对分子质量约 37 KDa 处出现特异性条带(图 18), 这意味着表达的蛋白可以被对应的抗体所辨识。

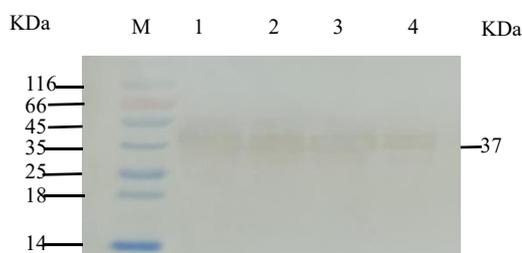


图 18 ESP 重组蛋白 Western blotting 鉴定

Figure 18 ESP identification of recombinant protein Western blotting

注: M 低分子质量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 纯化产物稀释 2 倍
 2 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 纯化产物稀释 4 倍 3 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 纯化产物稀释 8 倍 4
 BL21(DE3)/pET-30a-*esp* 纯化产物稀释 16 倍

3.6 单克隆抗体的制备

3.6.1 小鼠血清免疫效价的测定

第三次免疫后的第 7 d, 对小鼠的尾静脉进行了采血, 并采用 ESP 蛋白作为包被抗原, 间接 ELISA 技术来检测免疫小鼠的血清效价。从 1:1000 倍开始, 2 倍梯度稀释, 样品被稀释后加样, 3 只小鼠的血清效价均较高, 满足细胞融合的条件标准, 其中 3 号小鼠抗体血清效价最高, 如图 19, 这只小鼠可以选择将其脾脏取出, 并与 SP2/0 细胞进行融合反应, 用来制备单克隆抗体。

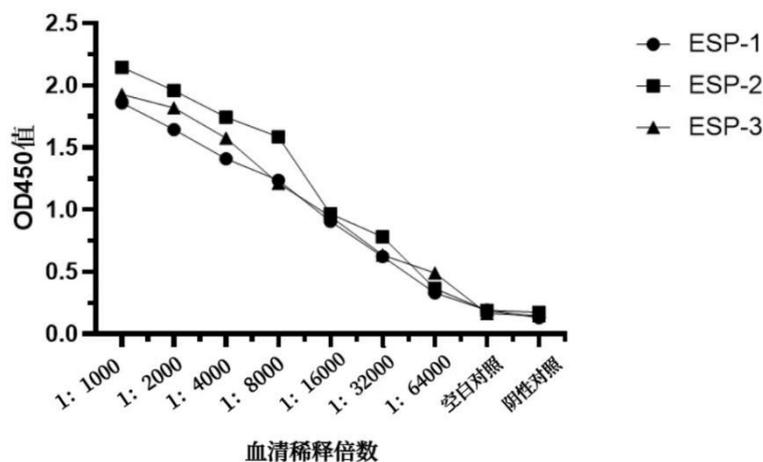


图 19 3 只小鼠血清抗体效价试验结果

Figure 19 Results of serum antibody titer test in 3 mice

3.6.2 细胞融合

在细胞融合后的第 5 d，未融合的 SP2/0 细胞、饲养细胞以及其他类型的细胞开始逐步死亡，仅有融合完成的杂交瘤细胞在生长，第 7 d 到第 9 d，杂交瘤细胞繁殖增多，生长状态良好，第 12 d，其生长状态处于最旺盛时期，显微镜下观察可见细胞几乎覆盖整个视野，则说明在 PEG 的介导下，两种细胞类型的融合取得成功，当它生长到孔底的面积超出正常范围时，会吸取上层来进行抗体的检测。如图 20 所示。

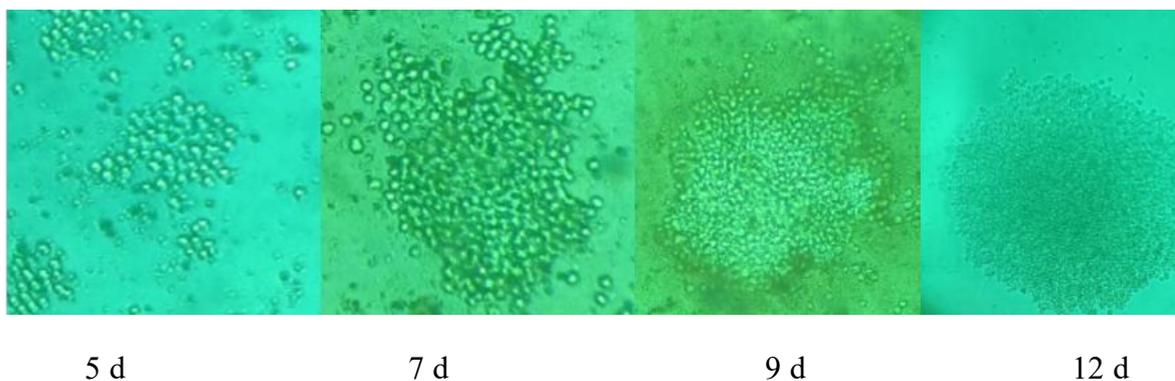


图 20 融合杂交瘤细胞形态 (100×20)

Figure 20 Fusion hybridoma cell morphology (100×20)

3.6.3 杂交瘤细胞筛选结果

杂交瘤细胞初筛，共筛出 12 株阳性单克隆细胞株，将 12 株细胞株传代培养，最后发现了两个能够稳定分泌抗 ESP 蛋白的杂交瘤细胞系，分别为 1A7，6F6。（如图 21）。

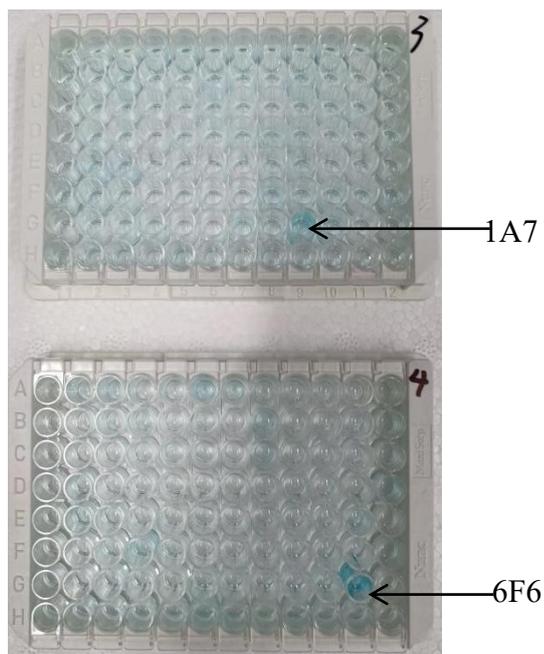


图 21 杂交瘤细胞筛选结果

Figure 21 Hybridoma cell screening results

3.6.4 杂交瘤细胞的克隆化结果

使用有限稀释技术来克隆杂交瘤细胞。两个阳性的杂交瘤细胞株，即 1A7 和 6F6，被分别克隆到两块具有 96 孔的细胞培养板上，并标记出仅有单一克隆生长的孔，然后取其上清样本进行抗体测试。如图 22。2 次亚克隆后，间接 ELISA 检测阳性率为 99%，即获得稳定基因型和稳定分泌表型的细胞，提取细胞并扩大培养，进行冷冻保存。

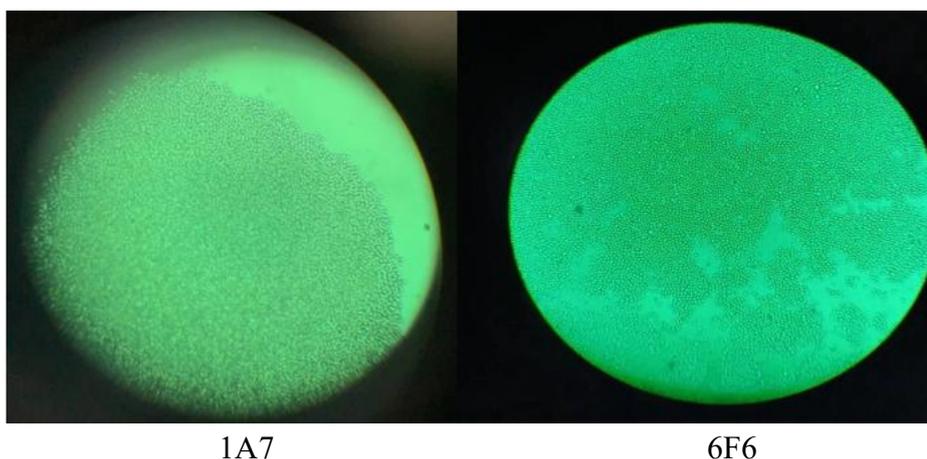


图 22 亚克隆杂交瘤细胞形态 (100×20)

Figure 22 Subclonal hybridoma cell morphology (100×20)

3.6.5 单克隆抗体的制备及腹水的纯化

杂交瘤细胞被注入到小鼠腹腔第 10 d 之后，可见其腹部明显膨胀，皮毛稀疏，当用手去触摸时，它们的皮肤会感到紧绷，且行动缓慢，此状态下即可用针头取其腹水。如图 23。

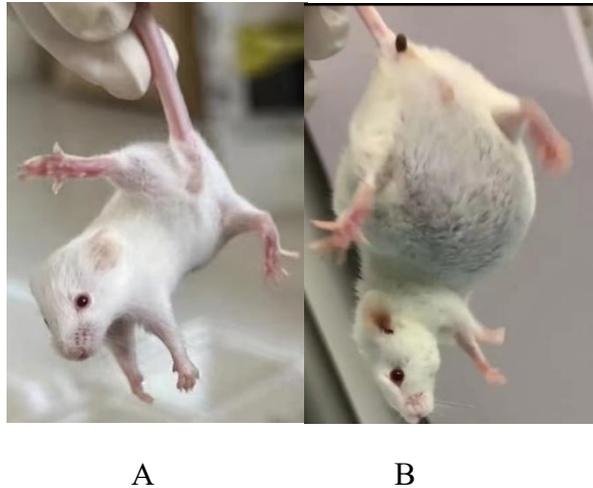


图 23 接种杂交瘤细胞小鼠

Figure 23 Mice inoculated with hybridoma cells

注：A 空白对照 B 接种杂交瘤细胞后第 10 天的小鼠

3.6.6 ESP 蛋白单克隆抗体 1A7, 6F6 的纯化

使用辛酸-硫酸铵技术来纯化腹水，并在磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L pH 7.4）透析一夜后进行 SDS-PAGE 分析，结果显示，单克隆抗体裂解为 55 KDa 左右的重链和 25 KDa 左右的轻链。如图 24。

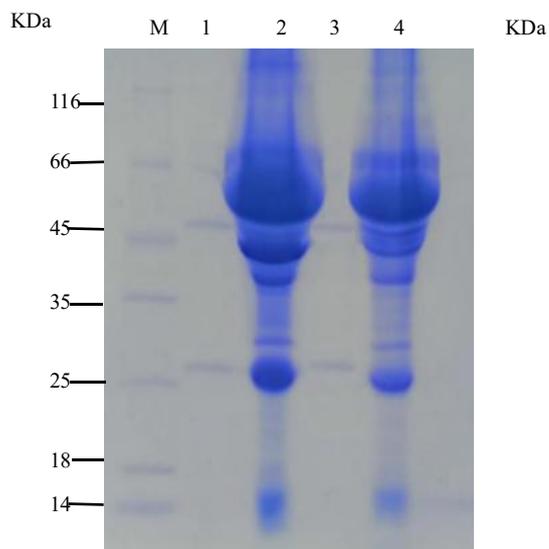


图 24 单克隆抗体腹水的纯化

Figure 24 Purification of monoclonal antibody ascites

注：M 低分子量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 1A7 纯化后的重链和轻链条带大小
2 1A7 未纯化前 3 6F6 纯化后的重链和轻链条带大小 4 6F6 未纯化前

3.6.7 单克隆抗体 1A7, 6F6 的 Western blotting 鉴定

通过使用 Western blotting 方法来检测 1A7, 6F6 和 ESP 蛋白的反应性, 研究结果表明, 这些蛋白都能被特异性地识别出来, 在大约 37KDa 的区域出现了特定的条带, 并且与 pET-30a 空质粒表达的菌体蛋白没有发生任何反应。如图 25。

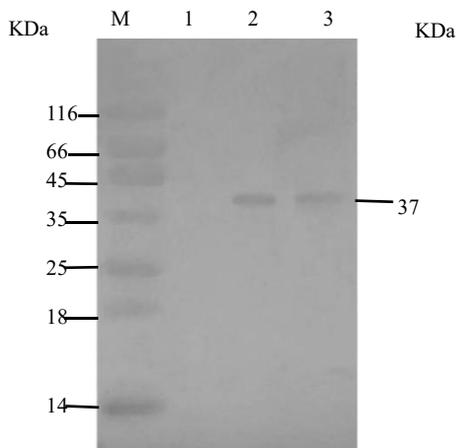


图 25 单克隆抗体 Western blotting 鉴定

Figure25 Western blotting analysis of monoclonal antibody

注: M 低分子量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 pET-30a 空载体质粒 2 单克隆抗体 1A7
3 单克隆抗体 6F6

3.6.8 单克隆抗体效价鉴定

间接 ELISA 检测纯化后小鼠腹水中单克隆抗体效价, 当单克隆抗体稀释至 1:256000 时所得样品 OD₄₅₀ 值小于 2.1 倍阴性对照 SP2/0 细胞培养上清液。如表 11。因此可知纯化后的单克隆抗体效价为 1:128000。

表 11 ELISA 检测纯化后腹水 OD₄₅₀ 值
Table 11 OD₄₅₀ values of purified ascites by ELISA

稀释度 名称	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000	1:256000
1A7	1.6532	1.6568	1.5032	1.2073	1.1075	0.9834	0.7220	0.5280	0.2126
6F6	1.5591	1.5320	1.4090	1.3297	1.2392	0.8739	0.6678	0.4938	0.2789
SP2/0	0.1429								

3.7 粪肠球菌多克隆抗体的制备

3.7.1 兔抗多克隆抗体的产生进程

实验动物从开始接受免疫到大量生成抗体的整个过程, 与免疫原的使用量、纯净度, 以及实验所用兔子的种类、大小、抗原注射路径和免疫间隔时间等其他外部环境因素有密切关系。以 1% 甲醛 37°C 灭活粪肠球菌菌体为免疫原免疫

日本大白兔。在每次注射前采血，获得血清，按 1:100 倍稀释，抗体的滴度可用间接 ELISA 来测定，并以吸光值作为纵向坐标，同时以采血间隔的天数作为横向坐标，从而绘制出抗体生成的进程曲线，结果见图 26，图示可表明免疫在前 60 d 左右，抗体滴度不断上升，在免疫 60d 效价达到最高，随后有所下降。

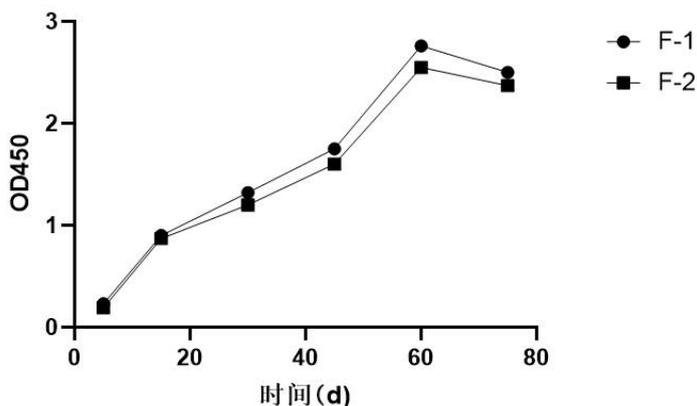


图 26 兔抗多克隆抗体的产生进程

Figure 26 The process of generating rabbit anti-polyclonal antibodies

3.7.2 间接 ELISA 测多克隆抗体效价

使用间接 ELISA 方法来测定兔子的抗血清效价，如图 27 所示，当吸光值 OD_{450} 的值 P (阳性)/N (阴性) 达到或超过 2.1 时，就被视为阳性。免疫兔子的抗体滴度达到 1:16000，在 ELISA 的测试中，只要效价超过 1000，就显示出了其实际应用的价值，这证明了得到效价相对较高的抗体。



图 27 ELISA 测多克隆抗体效价

Figure 27 ELISA for polyclonal antibody potency

注: A:1:1000 B:1:2000 C:1:4000 D: 1:8000 E: 1:16000 F: 1:32000 G: 阴性血清 H:空白对照

3.7.3 多克隆抗体 SDS-PAGE 分析

纯化处理后，兔血清 IgG 中的共价二硫键被还原并解离为亚基形态。IgG 的重链（H 链）和轻链（L 链）将被区分为两条明确的带状结构，重链分子量大约为 55 KDa，而轻链的分子量约为 25 KDa。如图 28。

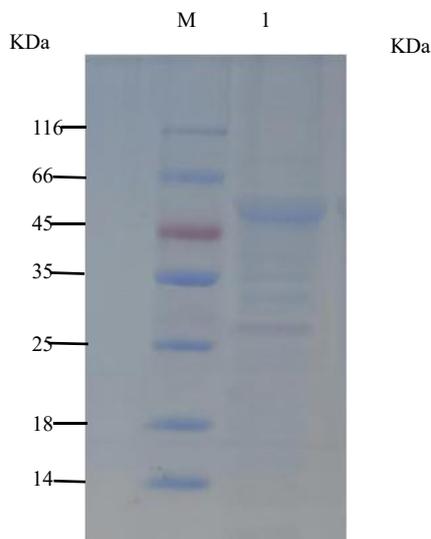


图 28 多克隆抗体 SDS-PAGE 分析

Figure 28 SDS-PAGE analysis of polyclonal antibodies

注：M 低分子质量蛋白 Marker(116~14KDa) 1 纯化后多克隆抗体

3.8 胶体金免疫层析试纸条的制备

3.8.1 胶体金溶液的制备

如图 29 所示，制备成功的胶体金溶液经 4°C 过夜放置后，颜色与烧制完成时无较大差异，肉眼可见呈溶液均一，透亮清澈，呈酒红色透明度较好，瓶身底部无沉淀出现，表面也没有浮游状杂质。用紫外分光光度计测定胶体金颗粒在 500 nm~550nm 处呈现最高峰。根据颜色及紫外吸收光谱峰值，颗粒大小约 20 nm，如图 30 所示。



图 29 制备完成的胶体金溶液

Figure 29 Prepared colloidal gold solution

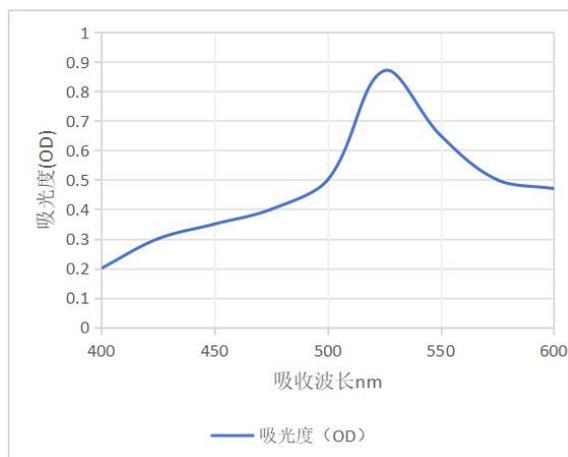


图 30 胶体金溶液吸光度

Figure 30 Absorbance of colloidal gold solution

3.8.2 胶体金与抗体最佳标记 pH 的确定

用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液调整胶体金溶液的 pH 值分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5。在加入单抗并混合均匀之后，接着加入 10% 的 NaCl 溶液，然后在室温下静置超过 1 小时进行观察。观察结果显示，在 pH 值为 8.0 的情况下，红色颜色保持不变，即最佳的 pH 值为 8.0。如图 31 所示。



图 31 胶体金与抗体最佳标记 pH

Figure 31 Colloidal gold with antibodies optimally labeled with pH

注：1-6: pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5

3.8.3 胶体金与抗体最佳标记量的确定

标记的抗体量不同会影响最佳标记的 pH 值。抗体浓度较低时，溶液颜色会变淡，少量的抗体无法被胶体金充分标记，过高或达到最小稳定量时，颜色保持不变，但抗体量较多时会存在浪费现象。如图 32 所示，用 $10 \mu\text{g/mL}$ 单克

隆抗体标记胶体金时，胶体金溶液维持在稳定状态，并具有良好的活性颜色，胶体金最佳标记量为 $12 \mu\text{g/mL}$ (标记的最佳量是标记的最小量加 20%的标记量)。

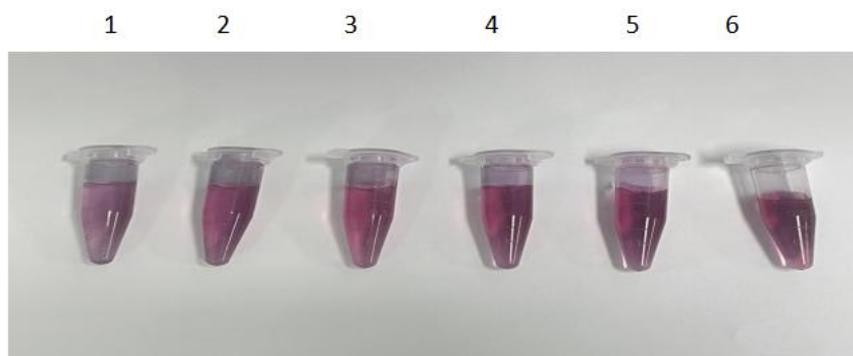


图 32 胶体金与抗体最佳标记量

Figure 32 Colloidal gold with optimal amount of antibody labeling

注：1-6：抗体标记量分别为 6、8、10、12、14、16 $\mu\text{g/mL}$

3.8.4 特异性实验结果

用本实验制备的试纸条分别对，金黄色葡萄球菌，无乳链球菌，枯草芽孢杆菌，猪链球菌，鸭疫里默氏杆菌，沙门氏菌菌液进行检测，同时用粪肠球菌样品为阳性对照，PBS 作为阴性对照，结果如图 33 所示。被检样本为粪肠球菌时出现检测线，阴性样本和其他细菌出现质控线，与其他细菌无特异性交叉反应。

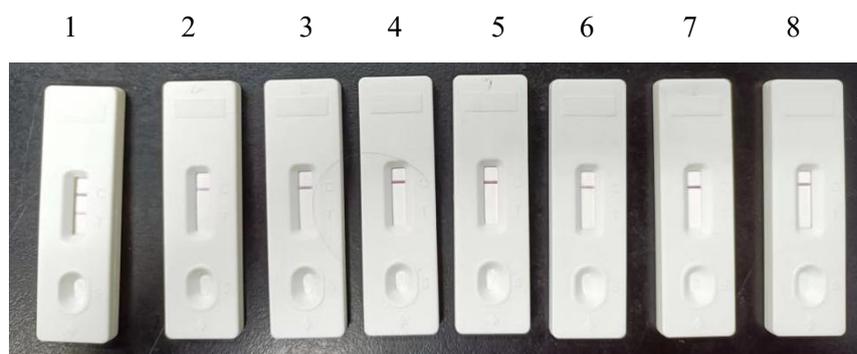


图 33 特异性实验结果

Figure 33 Results of specificity experiments

注：1-8：被检样本分别为粪肠球菌、PBS、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、枯草芽孢杆菌、猪链球菌、鸭疫里默氏杆菌、沙门氏菌

3.8.5 敏感性实验结果

敏感性测试结果表明，制备的胶体金试纸最低可以检测粪肠球菌细菌量为 10^5CFU/mL ，如图 34。



图 34 敏感性实验结果

Figure 34 Sensitivity test results

注：1-7：粪肠球菌菌液细菌量分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/mL

3.8.6 重复性实验结果

重复性测试结果表明，分别使用同一批次的试纸条对粪肠球菌菌液样品进行检测，评估试纸条批次内重复性，再对粪肠球菌菌液样品使用 4 个批次的试纸条进行检测，以此评估试纸条批次间重复性。批内检测和批间检测粪肠球菌菌液样品均能被检测出，无明显差异，说明该胶体金检测试纸条具有较好的重复性，如图 35 所示。

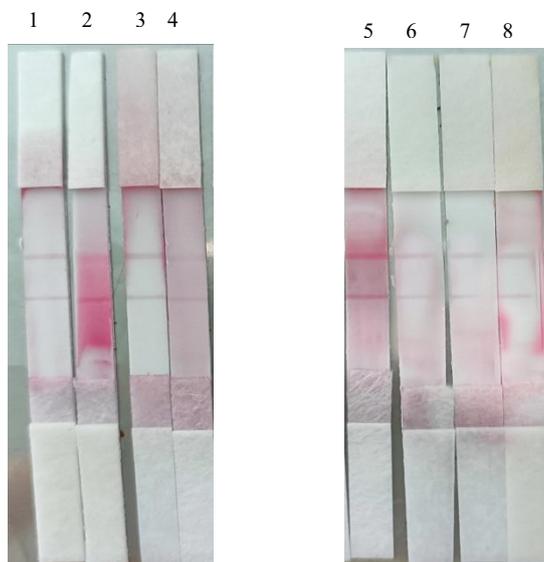


图 35 重复性实验结果

Figure 35 Repeatability experiment results

注：1-4：批内重复（试纸条批号 20230301） 5-8：批间重复（试纸条批号从左至右为 20230301, 20230315, 20230330, 20230415）

3.8.7 稳定性实验结果

对不同储存条件下胶体金检测试纸条进行稳定性检测,分别在 4°C和 25°C、下保存 15~180 d,然后用粪肠球菌菌液样品对试纸条进行比较检测,均能检测到样品中的 ESP 致病因子。如图 36 所示。但胶体金试纸条在 25°C的稳定性较高于 4°C,因此胶体金检测试纸条最佳存放环境为室温。

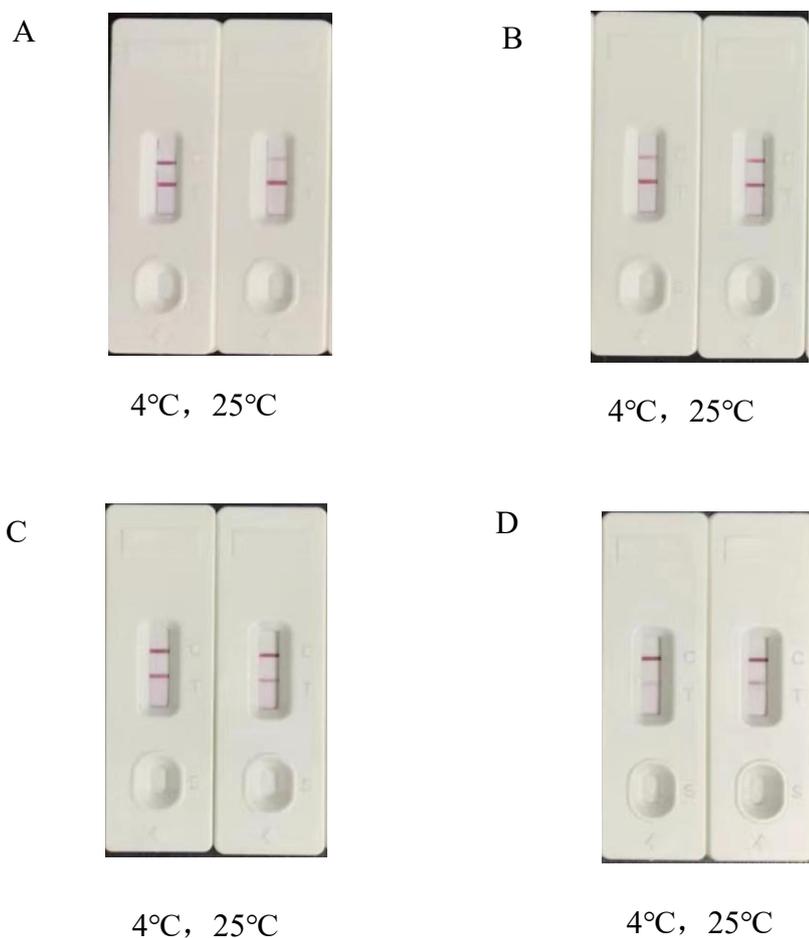


图 36 稳定性实验结果

Figure 36 Stability experiment results

注: A:试纸条存放 15 d B:试纸条存放 30 d C:试纸条存放 90 d D:试纸条存放 180 d

3.8.8 胶体金检测试纸条的初步应用结果

对山东滨州实验室收集的 36 个粪肠球菌阳性样本和 14 个阴性样本使用试纸条和 PCR 技术进行了检测。检测结果如表格所示,利用胶体金试纸条,阳性临床样本的检出数量达到了 31,PCR 检出数为 30,两者符合率为 96.7%。如表 12。

表 12 胶体金检测试纸条的初步应用结果
Table 12 Preliminary application results of colloidal gold test strips

样品类型	样品数	阳性数		阴性数		符合率
		胶体金试纸条	PCR	胶体金试纸条	PCR	
阳性合计	36	31	30	5	6	96.7%
阴性合计	14	0	0	14	14	

4 讨论

粪肠球菌属于条件性致病菌, 当其打破人体平衡时, 会引发其系统功能失调等反应, 迅速转变为致病菌, 并生成对人体有害的致病因子, 从而引发人类和动物的疾病^[128-130]。粪肠球菌的生物被膜形成受到多重因素的影响。细菌在无机表面和生物被膜中的黏附能力会随 *esp* 的表达加大, 进而使生物膜变得稳固和强大。因此, 可认为生物膜形成的关键因素之一是表面蛋白 *esp* 基因的作用。

4.1 粪肠球菌表面蛋白 *esp* 基因的克隆及表达

在成功地克隆和表达了表面蛋白 *esp* 基因之后, 本研究对编码这些基因的蛋白质的物理和化学性质, 以及其抗原性进行了详细的分析。在克隆 *esp* 基因的过程中, 可能会在生物信息软件上发现引物与模板之间存在某种程度的不匹配。因此, 在目标基因被放大之后, 会在目标片段之外出现两条相对较小的非特异性条带, 这一发现在克隆前已经得到了明确的确认, 由于选择的基因在克隆区域内序列比较特殊, 多次设计引物结果没有获得更好的引物序列, 所以只好利用设计、合成的引物进行克隆。在实验过程中, 将 776 bp 这一相对较大的片段作为目标片段进行了胶回收, 测序结果证实了该序列的准确性。结果表明, 经过克隆和表达的表面蛋白 *esp* 基因片段显示出相对稳定的特性以及抗原的可及性。

利用原核表达系统使用 IPTG 诱导表达了表面蛋白 *esp* 基因, 在上清和沉淀中均有 pET-30a-*esp* 重组蛋白表达, 沉淀中目的蛋白表达含量明显低于上清中, 上清中表达的蛋白活性更好, 因此选择上清中表达的目的蛋白进行纯化^[131], 周岩岩等纯化表达了小反刍兽疫病毒 N 蛋白, 在上清中表达了目的蛋白^[132]。

在本次研究中, 选择了高效的可溶表达载体 pET-30a, 通过对诱导表达条件的优化获得了 pET-30a-*esp* 的高效表达。选择使用 Ni-NTA 亲和层析技术来纯化目标蛋白, 可简化纯化工艺, Elution Buffer 洗脱下的蛋白条带单一且 SDS-PAGE 与预期大小相符, 以可溶性形式在 E.coli(BL21)中表达, 通过 Western blotting 的技术鉴定, 发现 pET-30a-*esp* 的重组蛋白能够与针对 His 的单克隆抗体产生特定的化学反应, 表明获得了 pET-30a-*esp* 纯化蛋白。

因经 Ni-NTA 亲和层析纯化后的目的蛋白中含有某些小分子物质, 如咪唑和 NaCl 等, 当直接为小鼠制备免疫原免疫时, 可能会导致小鼠出现副作用。在本次研究中, 使用磷酸缓冲液对纯化后的目标蛋白进行了透析处理, 以去除咪唑和其他小分子化合物。在透析的过程中, 透析液需要被多次替换, 使蛋白浓度有所降低, 可用 PEG20000 浓缩蛋白以制备高效纯化抗原。

4.2 pET-30a-*esp* 重组蛋白单克隆抗体的制备

鉴于广泛使用的骨髓瘤细胞主要源于小鼠 BALB/c 系列, 因此, 在本次研究中, 选择 BALB/c 系列的小鼠作为免疫相关的动物是最为适宜的。抗原纯度越高越有利于目的单克隆抗体的筛选。免疫小鼠的主要目标是使小鼠淋巴细胞发生分化和增长, 这有助于细胞之间的结合, 生成杂交细胞, 并增加产生特定抗体的杂交瘤的机会^[133]。目前已发现许多能诱导单克隆抗体分泌或促进其生成的因素, 但这些因素对不同类型肿瘤中单抗活性有明显影响, 因此研究这些因子与单抗反应性之间的关系是非常必要的。在对小鼠进行免疫处理时, 需要关注抗原的纯净度、抗原量以及免疫途径、频率和时间间隔, 以及佐剂和小鼠对该抗原的免疫反应等因素都应被纳入考虑范围内^[134]。将重组蛋白 pET-30a-*esp* 表达后, 可与弗氏佐剂完全乳化, 免疫小鼠, 并在正式开始操作前, 小鼠的血清 ELISA 检测结果显示效价超过了 10^5 , 同时脾脏也出现了明显的肿胀现象。

因 SP2/0 细胞, 具有容易培养、融合率高的特点, 本研究采用 SP2/0 细胞^[135]。细胞开始融合前, 要准备好已经培育完成的状态极佳的状态极佳的 SP2/0 细胞, 并在应用骨髓瘤细胞的操作过程中, 应优先选择那些在对数生长阶段表现出旺盛生长和良好形态的细胞进行融合。骨髓瘤细胞不应在培养液中长时间传代。为防止细胞变异和支原体感染的发生, 应密切关注细胞的冻存或在融合前进行重新复苏^[136]。选择 PEG 作为细胞的融合剂, 分子量随浓度的升高而变大, 其促进融合的能力也越强, 但与此同时, 其黏度和对细胞的毒性也会相应提高。在进行细胞融合的过程当中, 操作手法应当是温和的, 以便提升细胞融合的效能。PEG 在 40°C 的温度下工作, pH 值维持在 8.0, 持续时间为 1 min, 并且其工作浓度达到了 50%。饲养细胞在推动杂交细胞健康生长方面起到了至关重要的角色, 无论是在细胞融合还是亚克隆阶段, 都离不开饲养细胞的存在。在这项研究中, 选择小鼠的腹腔巨噬细胞作为饲养细胞。HAT 培养基具有抑制杂交瘤细胞增长的能力, 去除 HT 培养基后, 恢复正常, HT 培养基换为 HAT 培养基之后的第 14 d, 可使用常规的完全培养基。这种方法不仅可以选择性地培养杂交瘤细胞, 还能减少氨基嘌呤对杂交瘤细胞造成的损害。脾细胞的活跃性是决定细胞融合是否能够成功的核心要素。因此, 在进行脾细胞的制备过程中, 建议采用针刺、轻柔按摩和冲洗的组合方式, 以减少对脾细胞的潜在伤害^[137]。

在筛选杂交瘤细胞时, 间接 ELLSA 被认为是最简单且高效的方法, 能在非常短的时间内完成对所有杂交瘤细胞生长孔的全方位检测, 一次性能够筛选出大量样本, 从而减少了工作量^[138]。此外, 由于采用了快速定量和高效分离技术, 因此可实现从单个细胞系或单一抗原表位出发, 通过简单的步骤即可获得

多株具有特异性表达的单抗。在筛选阶段，附带加上阳性和阴性的对照孔，通过对照结果，可确保成功地筛选出目标单克隆抗体。

将成功筛选的阳性杂交细胞，亚克隆操作后，使杂交瘤细胞能够稳定分泌单一抗体。此外，在融合的早期阶段，杂交细胞的稳定性表现得相当不佳，容易导致染色体的缺失和变异，但经过克隆处理后，这些细胞逐渐变得更加稳定^[139]。在同时培养分泌抗体型细胞和不分泌抗体型细胞的情况下，由于生长过程中存在的竞争机制，不产生抗体型细胞可能会抑制抗体型杂交瘤细胞的分泌活性，但克隆技术能够及时筛选出具有分泌功能的抗体型细胞。在这种情况下，如何快速有效地从大量含有分泌抗体型细胞系中得到所需要的抗原成分就显得非常重要了。为了进行亚克隆，采用了有限稀释的方法，这种方法不依赖特定的设备，并且操作流程简洁，实验室实验中使用次数较多。本研究为了确保所获得单一细胞克隆，共进行 2 次亚克隆。亚克隆越早越好，需要每天细心观察，并及时检查和传代。在细胞培养的初始阶段就开始选择性培养，以确保细胞集落是由单一细胞分裂形成的，这样可以减少不稳定和假阳性细胞株的操作，从而提高工作效率。在进行亚克隆之前，需要对阳性孔进行冷冻保存以确保种子的保存。在进行每一轮的亚克隆筛查过程中，都应当迅速地对比阳性孔细胞进行冷冻保存，以确保种子的安全，并避免阳性细胞株的遗失^[140]。

当单克隆抗体被用于免疫检测时，由于小鼠腹水中存在大量的小转铁蛋白和白蛋白等成分，这些成分可能会影响单克隆抗体在检测过程中的特异性和敏感性，同时其内含的蛋白水解酶也会对单克隆抗体的生物活性产生影响。选择辛酸-硫酸铵法进行纯化是比较理想的方法，后续实验表明，采用这种方法纯化的单克隆抗体所建立的检测手段，表现出较高的特异性。

4.3 粪肠球菌胶体金检测试纸条的制备

在本次研究中，使用柠檬酸三钠还原法得到的胶体金颗粒显示出了出色的稳定性和高度的敏感性，其检测过程中的条带非常明显，并且得出的结果也相对容易评估。在制作胶体金的过程中，所用的玻璃容器必须接受彻底的清洁和硅化处理，否则可能会阻碍生物大分子与胶体金颗粒之间的有效结合。我们采用一种简单而又安全的方法来解决这个问题，即利用化学溶解法进行表面活性剂的去除。所有化学试剂均为分析纯试剂，而用于溶液制备的则是去离子水，并且在使用之前需要使用微孔滤膜进行过滤，以去除其中的杂质。氯金酸具有很好的吸湿性，并且在受热时容易分解，它对金属具有很强的腐蚀性，因此应该密封存放在通风良好的地方，并使用塑料药匙进行取用。为了避免单克隆抗体与胶体金颗粒发生聚合沉淀，可加入牛血清白蛋白（BSA）作为稳定剂。采用差速离心法去除溶液中可能存在的聚合物。选择硝酸纤维素膜，因其灵敏度

高、特异性好和稳定性强、价格方面有优势，此外，它与单克隆抗体具有很强的结合能力。使用玻璃纤维不仅具备高度的亲水特性，还能稳定地释放胶体金，价格低廉。

成功构建了一种针对粪肠球菌 ESP 蛋白的胶体金免疫层析检测技术。优化研究发现，胶体金免疫层析试纸条的 T 线检测抗原的工作浓度为 1:200 稀释、C 线羊抗鼠 IgG 的工作浓度为 1:100 稀释，开发了针对 ESP 蛋白的胶体金免疫层析试纸条。结果表明，在最佳反应条件下，胶体金免疫层析试纸条于 15 min 内可完成对 ESP 蛋白的检测，其具有良好的特异性和灵敏度。

4.4 胶体金免疫层析检测技术与 PCR 技术的符合度测试

本研究用研制出的牛乳腺炎致病性粪肠球菌 *esp* 胶体金免疫层析试纸条对实验室保存山东滨州乳样进行检测，所出结果并与 PCR 检测的吻合度进行比对，发现两者的一致性较高，这证实了这种试纸条在临床样本检测方面具有巨大的应用潜力。在进行实验的时候，需要特别留意，控制好要在 10~15 min 内获得检测结果，确保稀释后的样品用量在 80~100 μL ，这一结果有可能呈现为假阳性或者假阴性，因此，在面对不确定样本时，多次检测验证操作，以确定阴阳性。

5 结论

- 1) 通过构建杂交瘤细胞，获得了两株特异性好的单克隆抗体，分别是 1A7 和 6F6。
- 2) 以纯化的单克隆抗体 1A7 和粪肠球菌兔抗多克隆抗体建立了检测粪肠球菌 *esp* 致病因子的快速检测胶体金免疫层析方法，试纸条具有较高的敏感性和特异性，表现出优异的性能。在牛乳源粪肠球菌快速检测实践中具有巨大潜力和价值，这为未来进一步开发用于快速检测牛乳源粪肠球菌的试剂盒提供了稳固的研究基石。

参考文献

- [1]程彪.新疆昌吉地区奶牛乳房炎主要致病菌的分离、鉴定及多重PCR检测方法的建立[D].新疆农业大学,2021.
- [2]何挺.奶牛乳腺炎主要病原菌的调查[D].浙江大学,2010.
- [3]田猛.发酵复方中草药添加剂防治奶牛隐性乳腺炎的初步研究[D].吉林大学,2020.
- [4]杨丰利.南宁市郊奶牛乳腺炎相关研究及其对繁殖性能的影响[D].广西大学,2011.
- [5]高学虎.奶牛乳腺炎病因及预防措施[J].中国畜禽种业,2021,17(03):119-120.
- [6]闫先峰.不同饲养模式的奶牛乳腺炎发病情况及其主要病原菌的调查[D].山东农业大学,2009.
- [7]王赞嘉.奶牛乳腺炎粪肠球菌溶血素 *cy1A* 基因逃逸奶牛巨噬细胞完全吞噬功能的分子机制研究[D].内蒙古民族大学,2023.
- [8]布日额,吴金花,锡林高娃等.牛乳腺炎无乳链球菌 β 溶血素基因 *cy1E* 缺失突变株的构建[J].中国病原生物学杂志,2019,14(07):773-779.
- [9]赵龙.奶牛乳房炎的发病原因[J].现代畜牧科技,2019,(10):76+103.
- [10]徐越.奶牛隐性乳腺炎气球菌的分离鉴定及其致病性和耐药性分析研究[D].西北农林科技大学,2019.
- [11]李炎焱.瓜蒌水提物对小鼠金黄色葡萄球菌性乳腺炎的保护作用和机制研究[D].吉林大学,2020.
- [12]哈爱日.呼和浩特地区奶牛临床型乳房炎发病情况调查及其治疗方法的探究[D].内蒙古农业大学,2018.
- [13]Hristov S, Stanković B, Samolovac L, et al. Hygiene procedures before, during and after cow milking[J]. Arhiv veterinarske medicine, 2023, 16(1): 5-15.
- [14]胡建春.不同饲养环境下奶牛乳腺炎的发生率与综合防治[D].南京农业大学,2004.
- [15]李文杰.奶牛乳房炎凝固酶阴性葡萄球菌的分离鉴定与耐药性分析[D].西北农林科技大学,2017.
- [16]Zigo F, Vasil' M, Ondrašovičová S, et al. Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis[J]. Frontiers in veterinary science, 2021, 8: 607311.
- [17]牛天明.牛乳源粪肠球菌溶血素 *Cyla* 基因的克隆及其原核表达[D].内蒙古民族大学,2018.
- [18]包秀慧.牛乳源致病菌检测技术的发展及其对乳品安全的意义[J].中国病原生物学杂志,2020,15(07):854-858.
- [19]黄奕雯.粪肠球菌江西分离株对氟喹诺酮类药物的耐药性检测及分析[D].江西农业大学,2018.
- [20]兰彦芳,余刚,丁鹏等.武汉市马源肠球菌感染现状分析[J].湖北畜牧兽医,2019,40(08):5-8.

- [21]石竞楠,锡林高娃,吴金花等.内蒙古地区牛乳腺炎致病性粪肠球菌表面蛋白esp基因的克隆、表达及抗原性分析[J].中国病原生物学杂志,2023,18(01):23-29.
- [22]Popović N, Dinić M, Tolinački M, et al. New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates[J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 78.
- [23]王瞳.宁夏部分地区牛源肠球菌的分离鉴定与耐药性分析及相关基因的检测[D].宁夏大学,2019.
- [24]肖百言.半导体激光对粪肠球菌生物膜形成和粘附的影响[D].天津医科大学,2020.
- [25]郭秉娇.致羔羊脑炎粪肠球菌XJ05基因组精细图的绘制及四种重要基因的克隆与原核表达[D].石河子大学,2014.
- [26]周二顺.千金藤碱对LPS诱发的乳腺炎小鼠的保护效果及其机制的初步研究[D].吉林大学,2015.
- [27]Sharun K, Dhama K, Tiwari R, et al. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review[J]. *Veterinary Quarterly*, 2021, 41(1): 107-136.
- [28]张宇航.吉林地区奶牛隐性乳腺炎流行病学调查、多重PCR诊断方法建立及中草药复方治疗[D].吉林大学,2021.
- [29]Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle[J]. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2011, 16: 383-407.
- [30]张月.山东省临朐县奶牛隐性乳房炎流行病学调查及病原菌耐药分析[D].吉林农业大学,2018.
- [31]杨雨桐,杨晓波,王尚等.信息素调控质粒介导的粪肠球菌耐药基因接合转移机制研究进展[J].生态毒理学报,2021,16(05):160-167.
- [32]章婧,蔡萍,贺奕卓等.广东省养禽场肠球菌耐药性及毒力因子流行分布特征[J].畜牧兽医学报,2021,52(09):2650-2659.
- [33]何瑶.屎肠球菌WEFA23表面蛋白拮抗单核增生李斯特菌内化定植及其敲除株构建的研究[D].南昌大学,2020.
- [34]何志钧,宋怀宇.肠道菌群与肝硬化关系的研究进展[J].医学综述,2017,23(20):3984-3988.
- [35]姬晶晶.鸡粪肠球菌多位点序列分型及毒力分析[D].河北工程大学,2020.
- [36]吕娜.粪肠球菌TLME3株sprE基因的原核表达及抗原表位预测[D].内蒙古民族大学,2015.
- [37]Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, et al. The many faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1900.
- [38]Davis E, Hicks L, Ali I, et al. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* colonization in nursing facilities[C]//Open Forum Infectious Diseases. US:

- Oxford University Press, 2020, 7(1): ofz553.
- [39]胡秀花,孙芷馨,赵梦洋等.野生松鼠源屎肠球菌的致病性与耐药性分析[J].畜牧兽医学报,2023,54(07):3012-3021.
- [40]Minami M ,Nishiyama H ,Ikegami S , et al.Analysis of Pyelonephritis-Associated Beta Hemolytic Streptococcus in Japan[J].Journal of Biosciences and Medicines,2018,6(12):45-52.
- [41]Brosnahan A J, Merriman J A, Salgado-Pabón W, et al. Enterococcus faecalis inhibits superantigen toxic shock syndrome toxin-1-induced interleukin-8 from human vaginal epithelial cells through tetramic acids[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61255.
- [42]Fiore E, Van Tyne D, Gilmore M S. Pathogenicity of enterococci[J]. Microbiology spectrum, 2019, 7(4): 7.4. 9.
- [43]龚子桓.动物源粪肠球菌多重耐药菌株毒力基因的检测及相关性研究[D].石河子大学,2017.
- [44]Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control[J]. Journal of animal science, 2008, 86(suppl_13): 57-65.
- [45]Kibebew K. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view[J]. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2017, 7(2): 1-14.
- [46]李亚林,段晓琴,简子健,等.中草药对奶牛临床型乳腺炎病原菌的体外抑菌试验[J]. 2008.
- [47]韩书娟.山东某规模化奶牛场乳房炎流行病学调查[D].山东农业大学,2017.
- [48]Sharma C, Rokana N, Chandra M, et al. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals[J]. Frontiers in veterinary science, 2018, 4: 237.
- [49]王雯卿.吉林省白城市奶牛隐性乳腺炎流行病学调查及致病菌的耐药分析[D].吉林大学,2018.
- [50]邓云贵.鸡源主要肠球菌快速检测方法的建立[D].河北工程大学,2021.
- [51]姜佳奇.奶牛常见疾病的防治要点[J].畜禽业,2018,29(08):118.[1]王磊,刘海霞,王艳晓.免疫抗体检测技术在预防重大畜禽疫病中的问题和建议[J].畜禽业,2021,32(12):48-49.
- [52]瞿介明.病原学诊断新技术在肺部感染诊治中的价值及其应用[C]//2018年中华医学会呼吸病学年会呼吸与危重症医学2017-2018.中华医学会, 2018.
- [53]刘喜波.激素受体与HER2在乳腺癌不同制片技术中的表达水平比较及其临床意义研究[D].浙江大学,2010.
- [54]马玲玲.产气荚膜梭菌Beta1毒素单克隆抗体的制备及间接ELISA方法的建立[D].宁夏大学,2021.
- [55]Speers D J. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases[J]. Clinical Biochemist Reviews, 2006, 27(1): 39.
- [56]吴忧.齐墩果酸对粪肠球菌自溶及耐药基因的影响[D].西南医科大学,2018.

- [57]刘巨.基于滚环扩增的荧光及比色传感器在克罗诺杆菌检测中应用的研究[D].南昌大学,2021.
- [58]唱凯.I:LSAW生物传感器的构建及临床应用研究 II:两株罕见致病菌的鉴定[D].第三军医大学,2015.
- [59]易兵.猪肺炎支原体免疫胶体金快速诊断试纸的研制[D].四川农业大学,2010.
- [60]阿迪莱·卡哈曼.新疆南疆地区部分规模化羊场粪肠球菌生物学特性研究[D].塔里木大学,2021.
- [61]Gershwin L J. Clinical veterinary immunology[J]. Clinical biochemistry of domestic animals, 2008: 157-172.
- [62]沈晓霞.17%EDTA根管冲洗液对牙本质粪肠球菌黏附影响的研究[D].昆明医科大学,2018.
- [63]Todokoro D, Tomita H , Inoue T ,et al.Genetic Analysis of Bacteriocin 43 of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium[J].Applied and Environmental Microbiology, 2006.
- [64]Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi M R, et al. High-level aminoglycoside resistance in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium; as a serious threat in hospitals[J]. Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-InfectiousDisorders), 2020, 20(2): 223-228.
- [65]Christen P, Hofmann E, Wirth R. The sex pheromone system of Enterococcus faecalis:More than just a plasmid-collection mechanism?[J]. EJB Reviews 1994, 1995: 117-128.
- [66]张晓晨.基于乙型肝炎病毒两表位肽段组合的ELISA检测方法研究[D].吉林大学,2018.
- [67]黄奕雯.粪肠球菌江西分离株对氟喹诺酮类药物的耐药性检测及分析[D].江西农业大学,2018.
- [68]赵娣.共感染时常见细菌对粪肠球菌转录水平影响[D].河南农业大学,2018.
- [69]徐慧慧.基于主客体识别作用的电化学适体传感器的构建及其在凝血酶检测中的应用研究 [D].江西中医药大学,2021.
- [70]李岱霞.湖南部分养殖场猪、鸡源粪肠球菌毒力基因、耐药性及多位点序列分型研究[D].湖南农业大学,2019.
- [71]Low Y L , Jakubovics N S , Flatman J C ,et al.Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of Enterococcus faecalis[J].Journal of Medical Microbiology, 2003, 52(Pt 2):113-9.
- [72]郭珍珍,和春昊,李滨洲等.粪肠球菌Ace抗原表位预测及重组表位疫苗载体构建与表达[J].河南农业大学学报,2019,53(03):379-384.
- [73]Nallapareddy S R , Qin X , Weinstock G M ,et al.Enterococcus faecalis Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well as Collagen

- Type I[J].*Infection & Immunity*, 2000, 68(9):5218-5224.
- [74]Riley S P D , Serieys L E K , Moriarty J G .*Infectious Disease and Contaminants in Urban Wildlife: Unseen and Often Overlooked Threats*[J].Springer US[2023-12-28].
- [75]Alpdogan,Kantarci,Thomas,et al.Lipoxins in chronic inflammation.[J].*Critical Reviews in Oral Biology & Medicine An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 2003.
- [76]强华,林建银,蒋明森等.肠球菌溶血素与其致病力的关系[J].*中国人兽共患病杂志*,2001,(06):68-70.
- [77]幸文定.江西部分地区猪源粪肠球菌耐药性及毒力基因检测与分析[D].江西农业大学,2016.
- [78]狄婷婷,高原.粪肠球菌主要毒力因子研究进展[J].*中国病原生物学杂志*,2012,7(03):231-234.
- [79]高升杰.克雷伯杆菌质粒耐药性研究[D].温州医学院,2009.
- [80]贾宁,林茂虎,陈世平等.变形杆菌基因分型方法的评价[J].*中华医院感染学杂志*,2002,(09):15-17.
- [81]Thomas V C , Hiromasa Y , Harms N ,et al.A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*[J]. 2009, 72(4):1022-1036.
- [82]K,V,Singh,et al.Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model.[J].*Journal of Infectious Diseases*, 1998.
- [83]牛海英.内蒙古包头地区临床来源肠球菌耐药基因与致病基因的研究[D].内蒙古科技大学包头医学院,2015.
- [84]马贵军,韩素娟,剡根强等.肠球菌毒力因子研究进展[J].*动物医学进展*,2007,(06):66-69.
- [85]Mohamed J A , Huang D B .Biofilm formation by enterococci.[J].*Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56(12):1581-8.
- [86]兰彦芳,余刚,丁鹏等.武汉市马源肠球菌感染现状分析[J].*湖北畜牧兽医*,2019,40(08):5-8.
- [87]张留君.动物源性粪肠球菌 *ebp* 菌毛基因的保守性及其多克隆抗体的制备[D].河南农业大学,2015.
- [88]周霞.肠球菌性羔羊脑炎的发现及其病原特性和诊断方法研究[D].四川农业大学,2007.
- [89]Toledo-Arana,Alejandro,Valle,et al.The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation.[J].*Applied & Environmental Microbiology*, 2001.
- [90]卢星梅.肠球菌毒力因子检测及耐药特性研究[D].温州医学院,2012.
- [91]Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production[J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(3): 371-380.
- [92]王思权.抗沙门氏菌 *Peg* 菌毛单克隆抗体制备的一种简捷方法与初步应用[D].扬州大学,2021.

- [93]李洋.抗哈维弧菌单克隆抗体的制备、特性分析与应用[D].大连海洋大学,2014.
- [94]Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas[J]. Future oncology, 2015, 11(9): 1327-1342.
- [95]李瑜,张雯,袁昱,等.小鼠内源性逆转录病毒Gag抗原在胰岛的表达及单克隆抗体的制备[J].基础医学与临床, 2023, 43(1):59-67.
- [96]黄小林.提高免疫学检测灵敏度的新型信号传导系统研究[D].南昌大学,2018.
- [97]阚兵.抗人肺癌单克隆抗体的制备及其生物特性的研究[D].四川大学,2006.
- [98]官亚婷.抗棘球绦虫(Em PSC)单克隆抗体细胞株的建立[D].新疆农业大学,2018.
- [99]林楚雯,张春玉.肿瘤微环境中细胞融合机制的研究进展[J].国际遗传学杂志, 2020, 43(1):6.
- [100]方水琴,刘程,马俊飞等.小鼠杂交瘤单克隆抗体快速制备技术研究进展[J].生物工程学报,2021,37(07):2293-2306.
- [101]Khlér G , Milstein C .Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J].Nature, 1975, 256(5517):495-7.
- [102]颜露.呋喃它酮代谢物AMOZ单克隆抗体的制备及免疫学检测方法的研究[D].暨南大学,2011.
- [103]牟大超,周轶,白秀峰.单克隆抗体技术进展及上市药物分析[J].药物生物技术,2022,29(01):87-94.
- [104]冯丹阳.包含唾液酸化Lewisx四糖和CRM_(197)蛋白的肿瘤糖疫苗的合成和免疫学评价[D].山东大学,2016.
- [105]贾建桃.抗人肺鳞癌单克隆抗体的制备及其特性的鉴定[D].昆明医学院,2006.
- [106]靖乐.硼砂相应核酸适配体的筛选及其可视化检测法的研究[D].昆明理工大学,2019.
- [107]李洁.基于核酸适配体技术对食品中吊白块的胶体金试纸条研究[D].昆明理工大学,2018.
- [108]梁家杰.基于金、银纳米材料的新型免疫学检测技术的建立与评价[D].暨南大学,2015.
- [109]牛凯莉.基于胶体金免疫层析法的食源性致病菌检测技术的研究[D].上海师范大学,2013.
- [110]徐伊凡.生物相容性材料的3D打印应用研究[D].上海交通大学,2020.
- [111]蓝庆春.新型无标记电化学免疫传感器的构建及其在肿瘤标志物检测中的应用[D].扬州大学,2020.
- [112]杨沐凡.病原微生物实验室工作人员等职业人群疫苗接种意愿调查[D].中国疾病预防控制中心,2020.
- [113]王玲.基于新型表面等离子体共振的生物传感技术的研究[D].湖南大学,2005.
- [114]曾燕.基于碳和金纳米材料构建免疫传感器对两种肺癌标志物的检测研究[D].重庆大学,2018.
- [115]宋佳蕾.鱼类淋巴囊肿病毒(LCDV)胶体金免疫层析试纸条的研制[D].中国海洋大学,2011.
- [116]武玉东.量子点和金纳米颗粒的生物标志物体外检测方法的构建[D].天津大学,2017.

- [117]李艳宁,李光琪,王红霞等.抗人CD20纳米抗体的筛选、表达及特性分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2021,37(01):67-72.
- [118]张彩.人乳头瘤病毒(HPV)16型单克隆抗体的性质鉴定及其在疫苗质量分析中的应用[D].厦门大学,2018.
- [119]刘巨.基于滚环扩增的荧光及比色传感器在克罗诺杆菌检测中应用的研究[D].南昌大学,2021.
- [120]潘浣钰,李丰,何建雄.免疫层析技术及其在环境小分子污染物快速检测中的研究进展[J].广东化工,2019,46(06):129-131.
- [121]王守巨.金纳米颗粒介导的肿瘤光复合治疗[D].南京大学,2013.
- [122]娄豆豆.新型免疫层析法建立及其在心血管疾病检测中的应用研究[D].东南大学,2019.
- [123]姚倩.Rituxan-Ag纳米偶联体用于淋巴瘤细胞的拉曼检测和同步消融[D].北京工业大学,2017.
- [124]曹璐.高危型HPV(HPV16/18/52/58)重组病毒样颗粒疫苗抗原活性分析方法的建立及初步应用[D].厦门大学,2017.
- [125]吴俊强.乳酸链球菌菌素治疗奶牛隐性乳腺炎的研究[D].浙江大学,2010.
- [126]徐艳.石家庄汪洋沟地区抗生素、抗性细菌和抗性基因污染特征研究[D].山东农业大学,2014.
- [127]李亚林,段晓琴,简子健,等.中草药对奶牛临床型乳腺炎病原菌的体外抑菌试验[J].2008.
- [128]Prahara, I., S. Sistla, and C.P. Subhash, Virulence factors in clinical and commensal isolates of *Enterococcus* species. *Indian journal of pathology & microbiology*, 2013. 56(1)25-29.
- [129]Ahmadrajab R, Dalfardi MS, Farsinejad A, et al. Distribution of Ebp pili among clinical and fecal isolates of *Enterococcus faecalis* and evaluation for human platelet activation[J]. *APMIS*, 2018, 126(4): 314-319.
- [130]布日额,吴金花,锡林高娃,邢家辉,丹妮,刘凯.牛乳腺炎粪肠球菌溶血素CylA基因编码多肽的理化特性及抗原性分析[J].中国病原生物学杂志,2021,16(09):1020-1024.
- [131]栗宁,陈玉梅,周景明,等. HPV23 L1蛋白的表达、纯化及活性鉴定[J].郑州大学学报(理学版), 2022, 054(02):89-94
- [132]周岩岩,李玲霞,吴锦艳,等.小反刍兽疫病毒N蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J].中国兽医科学, 2019, 49(10):1277-1282.
- [133]Chesnut R W, Grey H M. Antigen presentation by B cells and its significance in TB interactions[J]. *Advances in immunology*, 1986, 39: 51-94.
- [134]Schunk M K, Macallum G E. Applications and optimization of immunization procedures[J]. *ILAR journal*, 2005, 46(3): 241-257.
- [135]Neunstoecklin B, Stettler M, Solacroup T, et al. Determination of the maximum operating range

- of hydrodynamic stress in mammalian cell culture[J]. *Journal of biotechnology*, 2015, 194: 100-109.
- [136]Galfre G, Milstein C. [1] Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures[J]. 1981.
- [137]World Health Organization. Basic laboratory methods in medical parasitology[M]. World Health Organization, 1991.
- [138]Cervino C, Weber E, Knopp D, et al. Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity hapten-specific monoclonal antibodies[J]. *Journal of immunological methods*, 2008, 329(1-2): 184-193.
- [139]Delespaul L, Merle C, Lesluyes T, et al. Fusion-mediated chromosomal instability promotes aneuploidy patterns that resemble human tumors[J]. *Oncogene*, 2019, 38(33): 6083-6094.
- [140]Lorge E, Moore M M, Clements J, et al. Standardized cell sources and recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2016, 809: 1-15.