

副溶血弧菌高灵敏免疫层析检测法的建立

赵芳¹, 葛丽雅¹, 赵现锋¹, 张恒¹, 黄欣迪¹, 曾静², 吕敬章^{1*}

(1. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳 518045; 2. 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026)

摘要: **目的** 建立一种简便、准确、高灵敏的检测副溶血弧菌的免疫层析方法。**方法** 采用免疫层析结合纳米颗粒信号放大技术, 利用间接法进行示踪标记: 试纸条由粘贴在底板上的样品垫、含有副溶血弧菌检测抗体的结合垫 2、含有荧光颗粒标记羊抗鼠 IgG 的结合垫 1、含有检测线(捕获抗体)和质控线(羊抗鼠 IgG)的硝酸纤维素膜和吸水纸组成。**结果** 结合增菌培养, 该方法的检测灵敏性为 10^3 CFU/g, 与大肠杆菌、霍乱弧菌、河弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、拟态弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等无交叉反应。**结论** 本研究所建立的检测方法具有高灵敏、特异、简便、快速等优势, 具有潜在的实际应用价值。

关键词: 副溶血弧菌; 免疫层析; 信号放大; 荧光颗粒

Establishment of a highly sensitive lateral-flow test method for the determination of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHAO Fang¹, GE Li-Ya¹, ZHAO Xian-Feng¹, ZHANG Heng¹, HUANG Xin-Di¹, ZENG Jing², LV Jing-Zhang^{1*}

(1. Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China; 2. Inspection and Quarantine Center, Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simple, accurate and highly sensitive method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* by lateral-flow test. **Methods** A signal amplification system was combined with lateral-flow test in order to improve the sensitivity, and the tracing mark was conducted by indirect method. The lateral-flow strip was constructed from a sample pad, 2 conjugated pads (one was coated with detection antibody, and the other was coated with fluorescence nanoparticle-anti-mouse IgG conjugation), a nitrocellulose membrane [containing detection line (capture antibody) and quality control line (sheep anti-rat IgG)] and an absorbent pad. **Results** The test strip had high sensitivity combined with pre-cultivation, and the sensitivity of this method was 10^3 CFU/g. This method had no cross reaction with *E.coli*, *V.cholerae*, *V. flurialis*, *V.vulnificus*, *V.alginolyticus*, *V.mimicus*, *Salmonella spp.* and *Staphylococcus aureus*. **Conclusion** This method is high sensitive, specific, simple, rapid, and has the potential application value in the rapid detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in food.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; lateral-flow test; signal-amplified; fluorescence nanoparticle

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科技项目(SZ2015207)

Fund: Supported by Shenzhen CIQ Science & Technology Program (SZ2015207)

*通讯作者: 吕敬章, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

*Corresponding author: LV Jing-Zhang, Master, Professor, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

1 引言

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要的食源性致病菌,主要存在于海产品中,可引起恶心、呕吐、腹痛、腹泻及水样便等,对人体健康产生危害^[1,2]。建立简便、准确的检测方法是防止副溶血弧菌传播的关键,对于预防由副溶血弧菌引发的公共卫生事件具有重要意义。目前检测副溶血弧菌的常用方法有分离培养^[3]、核酸检测^[3-7]、免疫层析^[8,9]等方法。其中,分离培养方法准确可靠,是法定的仲裁依据,但是费时费力,满足不了食品检测快速的要求;核酸检测具有高灵敏性、快速等特点,但是对专业化检测设施和人员要求高,不便于推广应用;免疫层析技术是一种在纸上进行免疫反应的快速检测方法,具有检测时间短、成本低廉、易于操作等特点,自20世纪90年代以来快速发展,在临床、食品安全、法医、环境监测等诸多领域得到广泛应用。免疫层析技术的缺陷是检测灵敏性不够高,特别是在细菌检测领域,免疫层析试纸条的灵敏性多在 10^6 CFU/mL甚至更高浓度,这显然满足不了实际检测需求。因此,提高免疫层析技术的检测信号强度是提高该技术灵敏性的重要内容,而利用纳米颗粒形成树枝状结构来提高检测的信号强度也是其中的一个重要研究方向^[10-14]。

本研究采用免疫层析结合纳米颗粒信号放大技术,建立一种高灵敏的副溶血弧菌检测方法,希望能为水产品中副溶血弧菌污染的检测提供一种简便、快速的方法。

2 材料与方 法

2.1 材料及试剂

副溶血弧菌(ATCC17082)、创伤弧菌(ATCC27562)、肠炎沙门氏菌(分离株:200918567)、甲型副伤寒沙门氏菌(ATCC9150)、大肠杆菌(ATCC11775)、金黄色葡萄球菌(ATCC33862)、O1型霍乱弧菌(小川)、O139型霍乱弧菌(MO45)、河弧菌(ATCC33809、ATCC33812)、溶藻弧菌(CC016-02、ATCC17749)、弗氏弧菌(ATCC 11218)、拟态弧菌(ATCC33653)均为本实验室保存。

CN140硝酸纤维素膜(德国赛多利斯公司);8964样品垫(芬兰奥斯龙公司);吸水纸、PVC底板(上海杰一生物技术有限公司);牛血清白蛋白(BSA,北京鼎国生物技术有限公司);羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG,北京博尔西生物科技有限公司);副溶血弧菌单克隆抗体、副溶血弧菌多克隆抗体(张掖市誉诚医药生物科技有限公司);荧光纳米颗粒(激发光:360 nm,发射光:613 nm,粒径:300 nm,厦门鑫海东方生物科技有限公司);吗啉乙磺酸(MES)(苏州亚科科技股份有限公司);1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)(美国 Thermo

Fisher 公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris,生工生物工程(上海)股份有限公司);蔗糖(生工生物工程(上海)股份有限公司);盐酸(分析纯,广州化学试剂厂);3%氯化钠碱性蛋白胨水(北京陆桥技术股份有限公司)。

2.2 实验仪器

HM3030划膜仪、ZQ4200切条机(上海金标生物科技有限公司);Beta 2-8 LD冻干机(德国 Christ 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 荧光纳米颗粒标记羊抗鼠 IgG 的制备

取100 μ L 荧光颗粒,13000 r/min 离心10 min,弃掉上清。加入1 mL 50 mmol/L 吗啉乙磺酸(MES, pH 6.0),超声重悬颗粒。13000 r/min 离心10 min,弃掉上清。加入1 mL 50 mmol/L MES(pH 6.0),超声重悬颗粒。加入5 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和1 mg N-羧基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应15 min。4 $^{\circ}$ C、13000 r/min 离心10 min,弃掉上清。加入1 mL 50 mmol/L MES(pH 6.0),超声重悬颗粒。加入100 μ g 羊抗鼠 IgG,室温反应2 h。加入BSA使之终浓度为1%,室温继续反应2 h。4 $^{\circ}$ C、13000 r/min 离心10 min,弃掉上清。加入1 mL 10 mmol/L Tris-HCl、5%蔗糖、2%BSA, pH 为8.0,于4 $^{\circ}$ C干燥保存。

2.3.2 结合垫1的制备

将荧光纳米颗粒标记羊抗鼠 IgG 按照2 μ L/cm 喷到玻璃纤维素膜上,置于55 $^{\circ}$ C干燥,于4 $^{\circ}$ C干燥保存。

2.3.3 结合垫2的制备

将副溶血弧菌单克隆抗体用稀释液(10 mmol/L Tris-HCl, 1%BSA, 5%蔗糖)稀释至0.5 mg/mL。按照1 μ L/cm 喷到玻璃纤维素膜上,置于55 $^{\circ}$ C干燥,于4 $^{\circ}$ C干燥保存。

2.3.4 层析膜的制备

按照1 μ L/cm 将2 mg/mL 副溶血弧菌多克隆抗体划在硝酸纤维素膜检测线处,按照1 μ L/cm 将0.08 mg/mL 的羊抗鼠 IgG 划在硝酸纤维素膜质控线处,置于37 $^{\circ}$ C烘干2 h。

2.3.5 样品垫的处理

将样品垫浸泡于处理液(100 mmol/L Tris-HCl, 1% BSA, 0.5% Tween 20, pH 8.5)中10 min。置于55 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中干燥,于4 $^{\circ}$ C干燥保存。

2.3.6 免疫层析试纸条的组装

将层析膜、结合垫1、结合垫2、样品垫,以及吸水纸依次搭接粘贴在底板上,裁成3 mm 宽的试纸条,于干燥条件下保存。

2.3.7 免疫层析试纸条对副溶血弧菌的检测

(1) 细菌培养

参照 GB 4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[15]中的方法:无菌取样25 g,加入3%氯化钠碱性蛋白胨水225 mL,于36 $^{\circ}$ C培养过夜。

(2) 副溶血弧菌的检测

取 1 mL 菌液, 1200 r/min 离心 1 min, 吸弃上清, 加入 200 μ L 生理盐水, 重悬菌体。吸取 80 μ L 到试纸条样品垫上, 15 min 后观察结果。

3 结果与分析

3.1 方法灵敏性

挑取副溶血弧菌单菌落, 制成 0.5 麦氏单位的生理盐水菌液, 用生理盐水梯度稀释, 将稀释好的菌液添加到罗非鱼肉糜中, 按照 GB 4789.7-2013^[15]中的方法进行培养, 采用荧光试纸条对培养后的菌液进行检测。检测过程中, 样品中的副溶血弧菌首先与结合垫 2 上的单克隆抗体结合, 然后与结合垫 1 上的荧光纳米颗粒标记的羊抗鼠 IgG 结合, 形成荧光纳米颗粒-羊抗鼠 IgG-单克隆抗体-副溶血弧菌复合物。由于荧光纳米颗粒表面有多个羊抗鼠 IgG 分子, 2 个颗粒上的羊抗鼠 IgG 都可能会结合同一个单克隆抗体分子而发生桥联, 进而形成树枝状复合物。随着层析的进行, 这种树枝状的复合物会越变越大, 当这些复合物达到检测线处时, 检测线上的捕获抗体将结合树枝状免疫复合物表面的副溶血弧菌分子; 到达质控线处时, 质控线上的羊抗鼠 IgG 同样与树枝状的复合物表面的单克隆抗体结合形成夹心结构, 形成质控线。结果表明, 该试纸条可以稳定检测出加标浓度在 10^3 CFU/g 以上的副溶血弧菌样品(见表 1)。

表 1 方法的灵敏性
Table 1 Sensitivity results of the method

加标浓度(CFU/g)	检测结果
10^6	5/5
10^5	5/5
10^4	5/5
10^3	5/5
10^2	4/5
10^1	1/5
10^0	0/5
0	0/5

注: 4/5 表示加标检测 5 次, 其中 4 次为阳性反应, 其余同理。

3.2 方法特异性

挑取营养琼脂上的单菌落, 制成 0.5 麦氏单位的生理盐水菌悬液, 接种 1 mL 菌悬液到 24 g 罗非鱼肉糜中, 加入 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。用免疫层析法对培养液进行检测, 结果显示, 该试纸条与副溶血弧菌(ATCC17082)、创伤弧菌(ATCC27562)、肠炎沙门氏菌(分离株: 200918567)、甲型副伤寒沙门氏菌

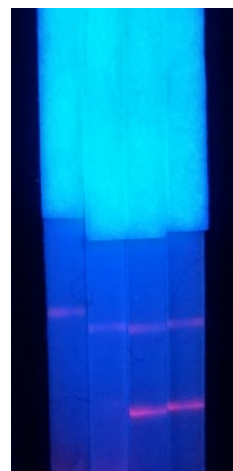
(ATCC9150)、大肠杆菌(ATCC11775)、金黄色葡萄球菌(ATCC33862)、O1 型霍乱弧菌(小川)、O139 型霍乱弧菌(MO45)、河弧菌(ATCC33809、ATCC33812)、溶藻弧菌(CC 016-02、ATCC17749)、弗氏弧菌(ATCC 11218)、拟态弧菌(ATCC33653)均没有交叉反应, 结果如表 2 和图 1 所示, 3%氯化钠碱性蛋白胨水选择性培养和抗体的特异性识别保证了检测的特异性。

3.3 方法稳定性

将制备好的试纸条置于 37 $^{\circ}$ C 条件下 7 d 取出, 检测不

表 2 方法的特异性
Table 2 Specific results of the method

细菌	编号/型别	结果
副溶血弧菌	ATCC17082	阳性
创伤弧菌	ATCC27562	阴性
肠炎沙门氏菌	分离株: 200918567	阴性
甲型副伤寒沙门氏菌	ATCC9150	阴性
大肠杆菌	ATCC11775	阴性
金黄色葡萄球菌	ATCC33862	阴性
O1 型霍乱弧菌	小川	阴性
O139 型霍乱弧菌	MO45	阴性
河弧菌	ATCC33812	阴性
河弧菌	ATCC33809	阴性
溶藻弧菌	CC 016-02	阴性
溶藻弧菌	ATCC17749	阴性
弗氏弧菌	ATCC 11218	阴性
拟态弧菌	ATCC33653	阴性



注: 左二为创伤弧菌, 右二为副溶血弧菌。

图 1 典型实验结果

Fig. 1 Typical experimental results

表3 放置7 d后方法的灵敏性
Table 3 Sensitivity results of the method after 7 d

加标浓度(CFU/g)	结果
10^6	5/5
10^5	5/5
10^4	5/5
10^3	5/5
10^2	3/5
10^1	2/5
10^0	0/5
0	0/5

注: 3/5 表示加标检测 5 次, 其中 3 次为阳性反应, 其余同理。

同浓度加标样品, 评估其稳定性。检测结果如表 3 所示, 说明灵敏性没有变化。

4 结论

本研究所建立的免疫层析法在保留免疫层析技术简便、快捷特点的基础上, 融合了树枝状信号放大技术, 对检测信号进行了信号放大, 提高了检测的灵敏性。同时, 结合增菌培养, 检测灵敏性达到 10^3 CFU/g, 且与大肠杆菌、霍乱弧菌、河弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、拟态弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等无交叉反应。高灵敏的检测方法结合增菌操作, 保证了检测的灵敏性, 具有高灵敏、特异、简便、快速等优势, 具有潜在的实际应用价值。

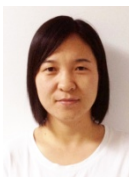
参考文献

- [1] Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety [J]. Food Microbiol, 2007, 24(6): 549–558.
- [2] Yeung PS, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections [J]. Foodborne Pathog Dis, 2004, 1(2): 74–88.
- [3] Zeng J, Wei H, Zhang L, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification [J]. Int J Food Microbiol, 2014, 174: 123–128.
- [4] Li Y, Li Y, Zheng B, et al. Determination of foodborne pathogenic bacteria by multiplex PCR-microchip capillary electrophoresis with genetic algorithm-support vector regression optimization [J]. Anal Chim Acta, 2009, 643(1-2): 100–107.
- [5] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh [J]. J Microbiol Meth. 1999, 36(3): 215–225.

- [6] Pang B, Ding X, Wang G, et al. Rapid and quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* by the mixed-dye-based loop-mediated isothermal amplification assay on a self-priming compartmentalization microfluidic chip [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(51): 11312–11319.
- [7] Yin JF, Wang MY, Chen YJ, et al. Direct detection of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from clinical and environmental samples by a multiplex touchdown polymerase chain reaction assay [J]. Surg Infect, 2017, 19(1): 48–53.
- [8] Sakata J, Kawatsu K, Iwasaki T, et al. Development of a rapid and simple immunochromatographic assay to identify *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Microbiol Meth, 2015, 116: 23–29.
- [9] Liu Y, Zhang Z, Wang Y, et al. A highly sensitive and flexible magnetic nanoprobe labeled immunochromatographic assay platform for pathogen *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 211: 109–116.
- [10] Choi DH, Lee SK, Oh YK, et al. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(8): 1999–2002.
- [11] Chen M, Yu Z, Liu D, et al. Dual gold nanoparticle lateflow immunoassay for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Anal Chim Acta, 2015, 876: 71–76.
- [12] Mei Z, Qu W, Deng Y, et al. One-step signal amplified lateral flow strip biosensor for ultrasensitive and on-site detection of bisphenol A (BPA) in aqueous samples [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 49: 457–461.
- [13] Zhu M, Wang Y, Deng Y, et al. Ultrasensitive detection of mercury with a novel one-step signal amplified lateral flow strip based on gold nanoparticle-labeled ssDNA recognition and enhancement probes [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61: 14–20.
- [14] Chevaliez S, Challine D, Najja H, et al. Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations [J]. J Clin Virol, 2014, 59(2): 89–93.
- [15] GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].
GB 4789.7-2013 National food safety standards-Microbiological examination of food-*Vibrio parahaemolyticus* test [S].

(责任编辑: 王婷婷)

作者简介



赵芳, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: zf_ff@163.com



吕敬章, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn