

单核细胞增生李斯特菌液相芯片检测方法的建立

赵丽¹, 蔡阳², 黄伟¹, 邱杨¹

(1. 东莞出入境检验检疫局, 广东东莞 523072) (2. 吉林出入境检验检疫局, 吉林长春 130000)

摘要: 建立单核细胞增生李斯特菌液相芯片检测方法。本研究将单核细胞增生李斯特菌单克隆抗体 (mAb930) 与聚苯乙烯微球偶联, 结合双抗体夹心技术建立单核细胞增生李斯特菌液相芯片检测方法。测定不同浓度的抗体与微球偶联率。通过 $L_{25}(5^6)$ 正交设计试验优化方法的反应条件, 并进行灵敏度和特异性试验。应用建立的方法及国家标准检测方法同时检测 200 份食品样品, 比较检测结果。结果显示, 较优实验条件即多抗工作浓度为 1:100、生物素标记的羊抗兔 IgG 工作浓度为 1:500、SA-PE 的工作浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、生物素标记的抗体与 SA-PE 反应时间为 30 min。该方法灵敏度可达 10^3 CFU/mL; 与其他常见食源性致病菌无交叉反应。与国家标准方法检测单核细胞增生李斯特菌的结果基本相符, 液相芯片法检测各种样品的假阳性率低于 0.77%。该方法灵敏度高、特异性强、重复性好, 可快速检测食品中的单核细胞增生李斯特菌, 能够应用于实际样品的检测。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; 双抗体夹心免疫学检测; 液相芯片检测

文章编号: 1673-9078(2014)4-296-300

Establishment of a Liquidchip Method for *Listeria Monocytogenes* Detection

ZHAO Li¹, CAI Yang², HUANG Wei¹, QIU Yang¹

(1. Dongguan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Dongguan 523072, China)

(2. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Changchun 130000, China)

Abstract: *Listeria monocytogenes* liquidchip detection method was established by coupling *Listeria monocytogenes* monoclonal antibody (mAb930) and polystyrene microspheres, and combining with double antibody sandwich technique. The ratios of different concentration of antibody to the microsphere coupling were detected. $L_{25}(5^6)$ orthogonal test was used to optimize the reaction conditions, and verification of the sensitivity and specificity were detected by the developed method. 200 food samples were tested by the method, with comparison of the national standard method. The optimal concentrations of polyclonal antibody, the antibody biotin labeled Goat anti rabbit IgG and SA-PE antibody were 1:100, 1:500 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. And the best reaction time of biotin labeled and SA-PE was, 30 min. The sensitivity of this method reached 10^3 CFU/mL. No cross reaction with other common food borne pathogenic bacteria occurred. In addition, the results were consistent with the national standard method. The false positive rate of liquid chip assay for the detection of various samples was less than 0.77%. The method has high sensitivity, strong specificity, good reproducibility, and can be used for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food.

Key words: *Listeria monocytogenes*; double antibody sandwich immunoassay; liquid phase chip detection

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L. m*), 是一种人畜共患病的病原菌。人、畜感染后主要表现为败血症、脑膜炎、胃肠炎、孕妇流产等症状。婴幼儿、老年人及免疫耐受病人临床死亡率为 30% 左右^[1]。该菌广泛存在于自然界中, 具有低温生长的特性, 生长温度为 1~45 $^{\circ}\text{C}$, 对不利环境具有比较强的耐受能力, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中也可生长繁殖, 在 pH 5.0

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技计划项目 (2013GDK02)

作者简介: 赵丽 (1980-), 女, 研究生, 兽医师, 主要从事动物检疫、动物源性食品检验检测

通讯作者: 蔡阳, 高级兽医师

~9.0 的环境中, 1 年后仍可检出。这使其危害性更进一步增大。该菌在冷藏的食品中容易达到感染致病所需的菌量, 是冷藏食品和即食食品污染的重要致病菌之一。世界卫生组织 (WHO) 也将其列为食品安全工作计划中重点检测的食源性病菌之一^[2]。因此, 建立快速而有效的单增李斯特菌的检测方法一直以来是食品安全的研究热点之一。

当前食源性病原菌的检测已经有多种方法, 如传统的生化检测方法、免疫学检测方法、PCR 技术及核酸探针等。虽然食品中单增李斯特菌的传统检测方法实验设备要求不高, 可操作性强, 但检验周期长, 需 6~7 d, 无法实现快速检测^[3]。目前国内外许多学者致力于

该菌的快速检测方法的研究工作,在常规分离鉴定检测方法的基础上不断探索免疫学和分子生物学的快速检测方法。基因芯片是在多种微生物基因组序列被确定之后出现的一种新兴检测技术^[4]。作为生物信息学先进的操作平台,基因芯片在临床诊断、兽医传染病诊断、食品微生物检测等领域具有广阔的应用前景。

近几年,利用基因芯片技术对食源性致病菌检测的研究逐渐增多,但利用基因芯片技术对多种食源性致病菌的检出率差距较大,仍然存在许多不足^[5-6]。但与其它几种检测方法相比,该方法检测样品数量和检测项目数量双向高通量、灵活性好、灵敏度高、信噪比好、操作简便、标准曲线范围宽和应用范围广等方面^[7]。

本研究将单核细胞增生李斯特菌单克隆抗体(mAb930)与聚苯乙烯微球偶联,结合双抗体夹心免疫学检测模式,建立了单核细胞增生李斯特菌液相芯片检测方法并进行初步应用,为今后的研究及检测工作提供参考。

1 实验材料

1.1 供试菌株

单核细胞增生性李斯特氏菌(ATCC33090)、产气荚膜梭菌(ATCC13124)、肠炎沙门氏菌(50041-14)、金黄色葡萄球菌(26001-25)、绵羊李斯特氏菌(ATCC19111)、伤寒沙门氏菌(50071-7)、英诺克李斯特氏菌(ATCC19119)、大肠埃希菌(44102-20)、蜡样芽胞杆菌(63301-14)、大肠杆菌O157(54144172)、空肠弯曲杆菌(33560)由吉林出入境检验检疫局技术中心生物室提供。

1.2 试剂与耗材

牛血清白蛋白(BSA)购自北京鼎国生物有限公司;1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐(EDC)购于北京晶美有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购于北京晶美有限公司;链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE)购于北京晶美有限公司;活化缓冲液:0.1 M的磷酸盐缓冲液(pH6.2),0.2 μL滤器过滤;偶联缓冲液:50 mmol/L、pH6.2的2-(N-吗啡啉)乙磺酸[2-(N-Momphdino)ethanesulfonicacid, MES],0.2 μL滤器过滤;封闭终止液:磷酸盐缓冲液(pH 7.4)Tween-20(0.05% V/V),0.2 μL滤器过滤。鞘液:美国QIAGEN公司。聚苯乙烯荧光微球,编号为25,内标荧光素,直径5.5 μm,购自美国luminex公司。

1.3 仪器设备

液相芯片仪(QIAGEN, Luminex 100 IS),悬浮芯片检测仪,酶标仪平台,超声波清洗器,漩涡振荡器,离心机,恒温培养箱,纯水机等。

2 方法

2.1 微球的活化

取微球室温恢复30 min,超声波作用3 min,然后用漩涡振荡器震荡微球悬液20 s,使微球混合均匀;取微球原液(1.25×10^7 个)100 μL,约 1.25×10^6 个微球,转移到1.5 mL离心管中,14000 g离心5 min,沉淀羧基微球;弃去上清,加入80 μL活化缓冲液,用漩涡振荡器振荡20 s,再加入10 μL 50 g/L NHS,和10 μL 50 g/L EDC,用漩涡振荡器轻轻振荡;室温避光振荡孵育20 min;14000 g离心5 min,沉淀活化的羧基微球。移走上清,用500 μL偶联缓冲液重悬活化好的微球。

2.2 微球的偶联

按照50 μL的体积分到10个1.5 mL离心管中,分别加入50 μL不同浓度的单克隆抗体,最终的抗体浓度分别为25 μg/mL、50 μg/mL、75 μg/mL、100 μg/mL、125 μg/mL、150 μg/mL、175 μg/mL、200 μg/mL、225 μg/mL和250 μg/mL。漩涡振荡20 s混匀;室温避光振荡反应2 h,14000 g离心2 min,弃去上清;加入100 μL封闭终止液中,漩涡振荡混匀,即得到捕获抗体与微球的偶联体。计数偶联的微球,用PBS-TBN稀释到 1.25×10^5 个微球/mL。

2.3 包被微球的质控

用漩涡振荡器充分振荡包被好的微球(避光储存在4 °C)。

吸取适量微球,用储存缓冲液稀释至5000个/50 μL。

按1:250稀释生物素标记的羊抗兔IgG。

各吸取5000个标记和未标记微球(空白)分别与50 μL稀释后生物素标记抗体充分振荡混匀,室温作用30 min。

均加入50 μL用检测缓冲液1:100稀释的SA-PE,室温作用30 min。

用QIAGEN液相芯片系统读取荧光强度MFI数值并分析数据。

结果判定:空白对照FMI低于100,包被微球FMI

大于2000的可使用；若包被微球FMI小于2000，则说明包被不成功。

2.4 检测条件的优化

表1 $L_{25}(5^4)$ 因素位级表
Table 1 $L_{25}(5^4)$ factor level meter

水平	因素			
	A (多抗稀 释度)	B (Bio 标记二 抗的稀释度)	C [SA-PE 终 浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)]	D (反应的时 间/min)
实验 1	100	500	1	30
实验 2	100	1000	2	40
实验 3	100	2000	4	50
实验 4	100	4000	8	60
实验 5	100	5000	10	90
实验 6	1K	1000	1	50
实验 7	1K	2000	2	60
实验 8	1K	4000	4	90
实验 9	1K	5000	8	30
实验 10	1K	500	10	40
实验 11	10K	2000	1	90
实验 12	10K	4000	2	30
实验 13	10K	5000	4	40
实验 14	10K	500	8	50
实验 15	10K	1000	10	60
实验 16	100K	4000	1	40
实验 17	100K	5000	2	50
实验 18	100K	500	4	60
实验 19	100K	1000	8	90
实验 20	100K	2000	10	30
实验 21	1000K	5000	1	60
实验 22	1000K	500	2	90
实验 23	1000K	1000	4	30
实验 24	1000K	2000	8	40
实验 25	1000K	4000	10	50

采用双抗体夹心免疫学检测模式，检测过程中全部反应均在96孔滤板上进行。向96孔板中加入2000个偶联微球，再依照表1正交表优化反应条件，每个试验做3个平行，同时做Pab和SA-PE空白对照。上机检测100个微球的MFI值，30 min可以完成96个样品的检测。样品MFI值同空白MFI值比大于3判定为阳性。操作步骤如下：每孔加入50 μL 含相应编码微球的工作溶液；加入50 μL 检测样品，混匀后室温避光震荡30 min，洗液洗涤并抽滤三次；加入50 μL 适当浓度的用抗体稀释液稀释后的生物素化抗体，混匀后室温避光震荡30

min，洗液洗涤并真空泵抽滤3次；加入50 μL 的SA-PE，混匀后室温避光震荡10 min，洗液洗涤并真空泵抽滤三次；加入125 μL 的检测缓冲液，经旋涡振荡器重悬混匀；用QIAGEN悬浮芯片系统读取FMI数值并分析数据。

2.5 灵敏度试验

将纯培养的目标菌用PBS缓冲液配成浓度为 10^8 CFU/mL、 10^7 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL、 10^3 CFU/mL、 10^2 CFU/mL，分别取50 μL ；置于离心管中；取1 μL （1000个）偶联好的微球加入离心管中，漩涡震荡20 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应1 h；加入100 μL 洗液洗涤，漩涡震荡20 s，14000 g离心2 min，弃去上清；加入过量的LM单克隆抗体50 μL ，漩涡震荡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应30 min；重复上步洗涤，加入过量的biotin-羊抗鼠荧光二抗50 μL 、SA-PE20 μL ，漩涡震荡20 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应30 min；重复上步洗涤，弃上清，再加入100 μL 洗液，漩涡震荡混匀，上机检测，重复实验3次。

2.6 特异性试验

用建立的液相芯片检测单核细胞增生性李斯特氏菌的方法对已知的产气荚膜梭菌（ATCC13124）、肠炎沙门氏菌（50041-14）、金黄色葡萄球菌（26001-25）、绵阳李斯特氏菌（ATCC19111）、伤寒沙门氏菌（50071-7）、英诺克李斯特氏菌（ATCC19119）、大肠埃希菌（44102-20）、蜡样芽胞杆菌（63301-14）、大肠杆菌O157（54144172）、空肠弯曲杆菌（33560）等细菌进行特异性交叉试验，同时设阳性对照、空白对照。

2.7 实际样品的检测

取吉林出入境检验检疫局收集到的食品样品 200份（50份兔肉，130份鸡肉，20份牛肉）应用已建立的液相芯片方法进行检测，同时应用GB 4789.10-2010进行验证。

3 结果与讨论

3.1 不同浓度的抗体与微球偶联率测定结果

按照抗体微球偶联的方法将LM单克隆抗体按25~250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度梯度和微球偶联。由图1可知，偶联率随蛋白浓度的增大而提高，在100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时达到最大值，随后逐渐下降，这说明当蛋白浓度达到100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时，处于饱和状态，随后未偶联上的蛋白逐渐增多，所以偶联率下降。空白对照值很低，说明这6种浓度对

偶联效率影响均不大。因此在保证偶联率较高又不浪费抗体的情况下，选择100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度作为偶联蛋白的浓度，用于LM多克隆抗体与微球的偶联。

在实验过程中我们发现微球的偶联率至关重要，微球的数量，菌液与检测抗体及生物素抗体的反应时间对实验结果也有很大影响，因为液相芯片仪只能检测到微球上的SA-PE的荧光强度。只有检测抗体结合到微球上，生物素标记的二抗才能结合到微球上，SA-PE才能通过生物素标记的二抗结合到微球上。

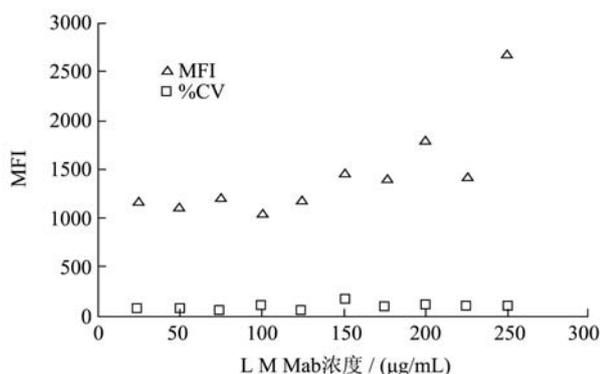


图1 L m Mab偶联优化结果图

Fig.1 L m Mab Results figure coupling optimization

3.2 反应条件优化结果

根据正交实验的设计，对25次实验的结果进行分析。根据表2结果可知实验条件A₁B₁C₅D₅为较优实验条件，即多抗工作浓度为1:100，生物素标记的羊抗兔IgG工作浓度为1:500，SA-PE的工作浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，生物素标记的抗体与SA-PE反应时间为30 min。直接观察法：对所确定的4个因素5个位级的正交实验结果可以看出，实验5即A₂B₂C₃D₁所测得的平均荧光强度是最高的，因而认为实验5的条件是最优反应条件。计算法：对于每列MFI越高越好，所以3次重复试验中平均值高的位级较好。A列II高，所以A₂较好；B列II高，所以B₂较好；C列III高，所以C₃较好；D列I高，所以D₁较好。经过计算验证，A₂B₂C₃D₁即试验5的条件是反应最优条件。

3.3 灵敏度试验结果

将纯培养的菌液用PBS缓冲液稀释成10²~10⁸ CFU/mL的浓度梯度，与1 μL 微球（蛋白浓度为100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）、过量LM单抗、biotin-羊抗鼠荧光抗体及SA-PE作用，确定LM的最少用量。如图2可知，细菌浓度达到10³时，荧光值趋稳定。由此推断，该试验灵敏度为10³ CFU/mL。

3.4 特异性试验结果

用建立的液相芯片检测单核细胞增生性李斯特氏菌的方法与其他细菌进行交叉试验，结果见图3。

表2 正交试验优化结果表

Table 2 The optimization results of orthogonal test

实验号	因素				结果(MFI)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1713
2	1	2	2	2	2352
3	1	3	3	3	2093
4	1	4	4	4	2125
5	1	5	5	5	1567
6	2	1	2	3	2163
7	2	2	3	4	1789
8	2	3	4	5	1654
9	2	4	5	1	1765
10	2	5	1	2	1342
11	3	1	3	5	1785
12	3	2	4	1	1542
13	3	3	5	2	1459
14	3	4	1	3	1612
15	3	5	2	4	1412
16	4	1	4	2	1897
17	4	2	5	3	1763
18	4	3	1	4	1659
19	4	4	2	5	1670
20	4	5	3	1	1342
21	5	1	5	4	1872
22	5	2	1	5	1546
23	5	3	2	1	1543
24	5	4	3	2	827
25	5	5	4	3	459
均值1	1630.8	1728.2	1619.8	1876.4	
均值2	2539.4	2396.6	1523	1573.6	
均值3	1562	1598.8	1984.4	1532	
均值4	1666.2	1499.8	1535.4	1571.4	
均值5	1549.4	1424.4	1682.5	1644.4	

注：A：pAb 的浓度，B：Bio-AAb 的浓度，C：SA-PE 的浓度，D：Bio-AAb 与 SA-PE 反应时间。

可见，单核细胞增生性李斯特氏菌检测到的荧光值为12000多，为阳性反应。而其他细菌的荧光值均不超过2000，其中的李斯特菌属的绵阳李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌的荧光值较其他菌的荧光值高，但都与空白对照荧光值差别不大。说明该方法的特异性很高，与其他菌无交叉性反应。

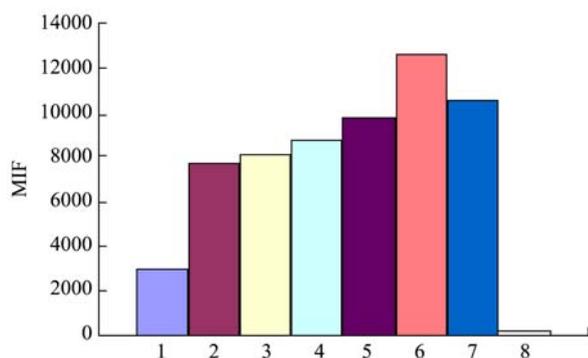


图2 单核细胞增生性李斯特氏菌灵敏度检测结果

Fig.2 Mononuclear cell proliferative List S bacteria sensitivity test results

注: 1~7号菌浓度为 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL, 8号为空白。

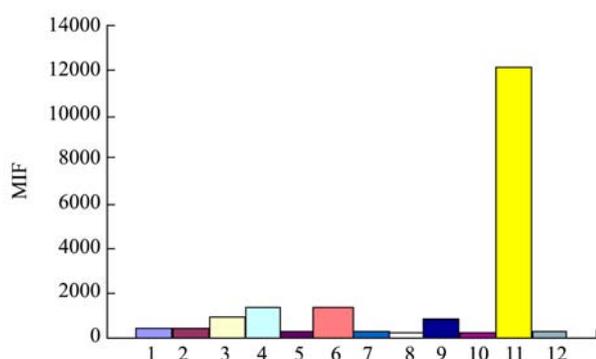


图3 液相芯片检测LM与其他细菌交叉试验结果

Fig.3 Liquid phase chip for detection of LM and other bacterial cross test results

注: 1~12号依次为产气荚膜梭菌、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、绵阳李斯特氏菌、伤寒沙门氏菌、英诺克李斯特氏菌、大肠埃希菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌O157、空肠弯曲杆菌、空白对照。

3.5 实际样品检测结果

表4 液相芯片方法与GB标准方法对样品实测结果

Table4 Liquid phase chip method and the standard method of GB on the measured results of sample

样品	液相芯片法检测结果		GB 法检测结果		液相芯片法假阳性率%
	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	
鸡肉 /130 份	13	10.00	13	10.00	0
牛肉 /20 份	3	15.00	3	15.00	0
兔肉 /50 份	0	0	0	0	0

应用已建立的液相芯片方法和 GB 方法检测 200 份实际样品, 检测结果如表 4, 两种方法检测结果基

本相符, 液相芯片法检测各种样品的假阳性率低于 0.77%, 说明所建立的方法检测结果准确。

4 结论

4.1 本研究以单核细胞增生性李斯特氏菌为检测对象, 对单核细胞增生性李斯特氏菌液相芯片的检测条件进行了优化。结果显示: 采用1000个微球, 检测抗体稀释度为1:2000, SA-PE的浓度为8 $\mu\text{g/mL}$, 菌液与检测抗体反应60 min, 与生物素二抗反应30 min, 反应条件最佳。运用优化的反应体条件进行特异性试验, 单核细胞增生性李斯特氏菌的荧光值高达12000, 而其他细菌的荧光值则不足2000, 说明其特异性强, 能很好的避免交叉性反应。液相芯片仪每次使用50 μL 菌液, 检测最低限为 10^3 CFU/mL。与VIDAS检测仪最低限 10^7 CFU/mL相比, 液相芯片仪检测的线性范围更大, 为大量检测食品中的病原菌打下坚实的基础。

4.2 本研究对单核细胞增生性李斯特氏菌液相芯片的制备条件进行了优化, 获得了与目前常用的常规检测方法相同的检测结果, 且检测范围更广。综上所述本研究方法灵敏度高、特异性强、重复性好, 可快速检测食品中的单核细胞增生李斯特菌, 能够应用于实际样品的检测。与此同时, 本研究为进一步开发其他食源性病原菌的液相芯片提供了实验依据。

参考文献

- [1] Marija Z, Konrad J D, Wolfgang K. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments [J]. Food Science and Technology, 2011, 44(2): 351-362
- [2] Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise [J]. Interdisciplinary perspect infect on infectious diseases, 2010, 11(5): 142-168
- [3] 刘海泉,沈潇,吴启华.单核细胞增生性李斯特氏菌快速检测技术研究进展[J].湖南农业科学,2011,1:1-3,6
- [4] LIU Hai-quan, SHEN Xiao, WU Qi-hua, et al. Progresses of Rapid Detection Technique for *Listeria monocytogenes* [J]. Hunan Agricultural Science, 2011, 1: 1-3, 6
- [5] Bang J, Beuchat L R, Song H. Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 161(2): 134-141
- [5] Biao Suo, Yiping He, George Paoli. Development of an

- oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens [J]. Mol. Cell Probes., 2010, 24(2): 77-86
- [6] 郭桂萍,葛红梅,王匀,等.单增李斯特菌检测技术研究进展[J].中国食物与营养,2011,17(3):12-15
GUO Gui-ping, GE Hong-mei, WANG Jun, etc. Research progress in detection of *Listeria bacteria* Lester [J]. Food and Nutrition in China, 2011, 17(3): 12-15
- [7] 李斌,朱晓光,张仁舟,等.基因芯片技术在微生物学研究中的作用[J].中国病原生物学杂志,2011,6(9):704-706
LI Bin, ZHU Xiao-guang, ZHANG Ren-dan, et al. Effect of gene chip technology in microbiological study [J]. Chinese Journal of biotechnology, 2011, 6(9): 704-706

现代食品科技