

ELISA 法快速检测水产品中副溶血性弧菌

窦勇¹, 胡佩红²

(1. 江苏财经职业技术学院, 江苏 淮安 223003) (2. 淮安正昌饲料有限公司, 江苏 淮安 223005)

摘要: 以副溶血性弧菌抗原免疫新西兰大白兔获得特异性抗体, 利用此抗体, 进行间接竞争 ELISA 法实验, 确定了抗原抗体最佳反应浓度和一抗稀释度分别为 10^7 cfu/mL 和 1:4000, 酶标二抗 IgG-HRP 最佳工作稀释度为 1:1000。以此方法分别对人工染菌水产品与实际水产品进行检测, 检测下限为 10^4 cfu/mL, 检测时间为 8 h; 而经 8 h 增菌后, 其检测下限为 10^3 cfu/mL。此法与常规方法检测结果完全一致, 具有很高的实际应用价值。

关键词: ELISA; 副溶血性弧菌; 快速检测; 水产品; OD_{492} 值

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0598-05

Application of Indirect ELISA Method for Rapid Detection of *Vibrio*

parahaemolyticus

DOU Yong¹, HU Pei-hong²

(1. Jiangsu Vocational and Technical College of Finance & Economics, Huai'an 223003, China)

(2. HuaiAn Zhengchang Feed Co., Ltd., Huai'an 223005, China)

Abstract: The specific antibody was achieved by immune New Zealand white rabbit with *V. parahaemolyticus* antigen. Using this antibody, an indirect ELISA method for the detection of *V. parahaemolyticus* was developed with the best concentrations of the antibody, antigen and second antibody marked with HRP being of 10^7 cfu/mL, 1:4000, and 1:1000, respectively. The method can be used for the detection of *V. parahaemolyticus* in seafood with the detection limit and time of 10^4 cfu/mL and 8 h, respectively. However, the detection limit increased to 10^3 cfu/mL after an 8 h of bacteria multiplication. This rapid method had similar results with the conventional method, showing high practical application value.

Key words: ELISA; *V. parahaemolyticus*; polyclonal antibody; OD_{492} value

目前食品中副溶血性弧菌的检测方法主要以国家标准及行业标准为依据, 该类标准主要是传统的培养和生化鉴定方法, 检测周期需要 5~7 d 左右, 检验周期长、工作量大, 不能满足食品卫生快速反应体系的需求^[1]。近年来, 随着免疫学和生物技术的发展, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 技术已经逐步运用于食品微生物检验中来, 但由于微生物抗原的特殊性, ELISA 在食品微生物检测中应用还不很广泛, 特别是对水产品中的副溶血性弧菌检验应用更为少见, 本研究目的为建立水产品中副溶血性弧菌的 ELISA 快速检测法, 为今后副溶血性弧菌 ELISA 检测试剂盒的研制提供理论基础和实验依据, 也为食品安全微生物检验提供快速、准确、灵敏度高的检测方法。

1 材料与方

1.1 材料

收稿日期: 2008-02-22

1.1.1 试验菌株

副溶血性弧菌 1.2164 (简称 VP1.2164)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 1.72)、志贺氏菌 (*Shigella* 51387)、沙门氏菌 (*Salmonella* 50041) 均购于中科院微生物研究所; 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 由本实验室保存。

1.1.2 试验兔

试验用新西兰大白兔购于复旦大学医学院动物实验部。

1.1.3 主要试剂和仪器

山羊抗兔 IgG-HRP (上海华美生物工程公司), APW、TCBS 培养基 (上海高信化玻仪器有限公司), 邻苯二胺 (国药集团上海化学试剂有限公司); 全自动酶标仪 Stat Fax3200 (美国 Awareness Technology Inc.), 微量移液枪 Nichpet EX (日本 NICHIRYO 公司), 紫外可见光分光光度计 UV2300 (上海天美科学仪器有限公司), 加拿大 JET 96 孔高结合力可拆卸酶标板 (上

海天呈医流科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 多克隆抗体的制备

选购3只健康雄性新西兰大白兔,体重2~2.5 kg,饲养观察1周,确定无异样后,从耳静脉采血2 mL制备阴性血清,同时与VP1.2164抗原做试管凝集试验,出现凝集反应的淘汰。

家兔免疫步骤为:用0.05% (V/V) 甲醛、30℃将副溶血性弧菌灭活4 h,无菌生理盐水洗涤、离心,重复3次,制备免疫抗原,注射浓度为 1×10^9 cfu/mL,分多次、剂量递增进行耳静脉注射,当效价达到要求时,耳动脉大量采血,制备的多克隆抗体,分装于无色聚丙烯冷冻管中,-20℃冰箱保藏备用^[2]。

1.2.2 间接ELISA法评价酶标板质量

取1份已知阳性血清,按1:4000的比例稀释,进行间接ELISA实验,由测得的 OD_{492} 值计算出平均值与标准差(SD),进而计算出每份血清的板内变异系数(CV), $CV(\%) = SD / \text{平均 } OD_{492} \text{ 值} \times 100$,重复3次。用同样的血清在5块板上作实验,进行ELISA实验计算板间差异系数^[3]。

1.2.3 间接竞争ELISA法检测流程

根据文献及预备实验^[4,5],基本操作流程如下:

(1) 100 μ L的副溶血性弧菌抗原60℃烘干包被。

(2) 用5%的小牛血清作为封闭液封闭1.5 h。

(3) 加入以PBS(0.01 mol/L, pH 7.4的柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液)稀释4000倍的兔抗血清90 μ L,同时加入不同浓度的副溶血性弧菌抗原10 μ L,使副溶血性弧菌反应终浓度分别为: 10^8 cfu/mL、 10^7 cfu/mL、 10^6 cfu/mL、 10^5 cfu/mL、 10^4 cfu/mL、 10^3 cfu/mL,混匀,同时设置阳性对照和空白对照(以PBST代替抗体),恒温恒湿孵育95 min。

(4) 每孔加稀释了1000倍的100 μ L山羊抗兔IgG-HRP,恒温恒湿孵育1 h。

(5) 每孔加反应底物(40 mg的OPD溶于100 mL pH 5.0的磷酸盐-柠檬酸缓冲液,临用前加入150 μ L,30%的 H_2O_2)100 μ L,30℃保温并避光反应15 min;每孔加入50 μ L、2 mol/L的 H_2SO_4 ,轻轻摇匀;酶标仪测量波长设置为492 nm,参比波长为630 nm,以空白对照孔调零,测定其 OD_{492} 值。

(6) 制作竞争抑制曲线,以间接竞争ELISA反应抑制率(竞争抗原孔 OD_{492} 值/阳性对照孔 OD_{492} 值)达到50%时所对应的毒素浓度为灵敏度(I_{50})。

1.2.4 间接竞争ELISA法测定副溶血性弧菌多克隆

抗体特异性

抗原包被浓度为 10^7 cfu/mL,分别加入10 μ L倍比稀释的副溶血性弧菌、沙门氏菌、鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌作为竞争抗原,同时加入倍比稀释的抗血清90 μ L,进行间接竞争ELISA实验,操作过程按照1.2.3进行。设置空白对照和阳性对照,空白对照以100 μ L的PBST代替90 μ L抗血清+10 μ L的竞争抗原;阳性对照为100 μ L抗血清溶液,不加竞争抗原^[5]。

1.2.5 间接ELISA法最适反应条件的筛选^[4]

1.2.5.1 抗原包被浓度的筛选

操作步骤同1.2.3,其它操作参数不变,将抗原包被浓度设置为 10^5 cfu/mL、 10^6 cfu/mL、 10^7 cfu/mL、 10^8 cfu/mL、 10^9 cfu/mL,60℃烘干包被,测定不同抗原包被浓度对竞争抑制曲线的影响。

1.2.5.2 抗体稀释度的影响

将抗体稀释度设置为1:2000,1:4000,1:8000,1:16000,抗原包被浓度采用1.2.5.1所确定最适包被浓度,其它操作参数不变,操作步骤同1.2.3,测定不同抗体稀释度对竞争抑制曲线的影响。

1.2.5.3 酶标二抗稀释度的影响

将酶标二抗稀释度设置为1:500,1:1000,1:2000,1:4000,抗原最佳包被浓度和抗体最佳稀释度采用1.2.5.1和1.2.5.2结果,其它操作参数不变,操作步骤同1.2.3,测定不同抗体稀释度对竞争抑制曲线的影响。

1.2.6 模拟水产品定量染菌检测实验

将在TCBS平板上培养的纯菌,用APW洗脱并稀释成浓度为 10^2 cfu/mL、 10^3 cfu/mL、 10^4 cfu/mL、 10^5 cfu/mL、 10^6 cfu/mL的菌悬液。取已知副溶血性弧菌阴性的大黄鱼、对虾、河蟹、鲈鱼各10 g。分别分成A、B两组,每组4种样品。每种样品按染菌梯度分成5份,分别取1 mL各浓度的菌悬液加入样本中无菌研磨成糜状,使其充分染菌。每组同时设空白样品对照两份。将已染菌的样品置于冰箱0℃放置3 d(模拟冷冻水产品保藏),取出放室温。A、B两组分别加入90 mL APW,混匀。A组样品经低速离心,取上清液进行间接ELISA检测。B组放37℃培养8 h后,再进行间接ELISA检测,检测步骤按照1.2.6,以产生的P/N值 ≥ 2.1 (阳性对照 OD_{492} 值-空白对照 OD_{492} 值/阴性对照 OD_{492} 值-空白对照 OD_{492} 值)判为阳性,测定模拟染菌最低检测浓度^[1]。

1.2.7 水产品中副溶血性弧菌ELISA检测

1.2.7.1 水产品前处理

以无菌操作称取 25 g 样品，放入装有 225 mL 包被液的灭菌均质杯中，于 8000 r/min，均质 1~2 min，制成样品均液。将样品均液用绢纱过滤，再低速离心后，取上清液进行 ELISA 检测。

1.2.7.2 间接 ELISA 检测

每孔加入 100 μ L 处理后的水产品均液，60 $^{\circ}$ C 烘干包被；PBST 洗涤，重复 3 次，每次 5 min，拍干；每孔加入 100 μ L，5% 的小牛血清封闭抗原，板封口，37 $^{\circ}$ C 封闭 2.5 h；取出酶标板，恢复至室温，弃去封闭液，按上述方法用 PBST 洗涤 3 次，每次 5 min，拍干，每孔分别加入 100 μ L 用 PBS 稀释的抗血清和阴性血清，同时以 PBST 代替血清设置空白对照，37 $^{\circ}$ C 孵育 75 min；取出酶标板，恢复至室温，弃去封闭液，同样用 PBST 洗涤 3 次，每次 5 min，拍干，每孔加入 100 μ L 稀释度 1:1000 的 IgG-HRP，37 $^{\circ}$ C 孵育 75 min；取出酶标板，恢复至室温，弃去封闭液，同样 PBST

洗涤，拍干，每孔加入 100 μ L 底物溶液（40 mg 的 OPD 溶于 100 mL pH 5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液，临用前加入 150 μ L，30% 的 H_2O_2 ），30 $^{\circ}$ C 保温并避光反应 15 min；每孔加入 50 μ L，2 mol/L 的 H_2SO_4 ，轻轻摇匀；酶标仪测量波长设置为 492 nm，参比波长为 630 nm，以空白对照孔调零，测定其 OD_{492} 值^[5-8]。

1.2.7.3 实际样品检测实验

取用包被液稀释的样品上清液 100 μ L，60 $^{\circ}$ C 烘干包被；加入 100 μ L 稀释度为 1:4000 的抗体，操作步骤同 1.2.6.2，其它操作参数不变，进行间接 ELISA 检测试验，同时以常规方法进行检测，方法按照 GB4789.7-94 进行。

2 结果与讨论

2.1 间接 ELISA 法分析酶标板质量

表 1 酶标板质量分析

Table 1 Quality analysis of microplate

酶标板编号	OD_{492}								平均值	标准差	变异系数/%
1	0.116	0.123	0.115	0.109	0.113	0.116	0.116	0.117	0.116	0.00395	3.405
2	0.118	0.123	0.116	0.121	0.114	0.115	0.118	0.121	0.118	0.00321	2.720
3	0.128	0.126	0.115	0.106	0.109	0.118	0.118	0.117	0.117	0.00749	6.401
4	0.116	0.126	0.111	0.122	0.113	0.117	0.117	0.114	0.117	0.00489	4.179
5	0.122	0.121	0.117	0.1253	0.118	0.121	0.114	0.116	0.119	0.00363	3.050
板间平均数									0.1174		
板间标准差										0.00105	
板间平均变异系数											8.943

表 1 结果显示，此酶标板板内变异系数均在 10% 以下，板间变异系数 CV=8.943% 也小于 10%，说明此酶标板很好，具有稳定的吸附性能。

2.2 副溶血性弧菌多克隆抗体特异性实验结果

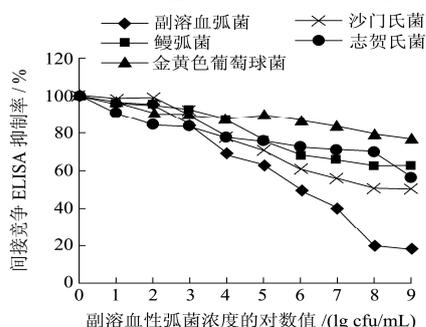


图 1 间接竞争 ELISA 测定抗体特异性

Fig.1 Specificity determination of the polyclone antibody with indirect competitive ELISA

图 1 为间接竞争抑制 ELISA 实验测定副溶血性弧

菌多克隆抗体特异性实验，由图可知本株副溶血性弧菌与鳃弧菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌及志贺氏菌等几种常见食品致病菌株无交叉反应，说明此多克隆抗体的特异性较强，因此可为 ELISA 检测提供良好的特异性抗体。

2.3 单因素分析

2.3.1 抗原包被浓度对 ELISA 灵敏度的影响

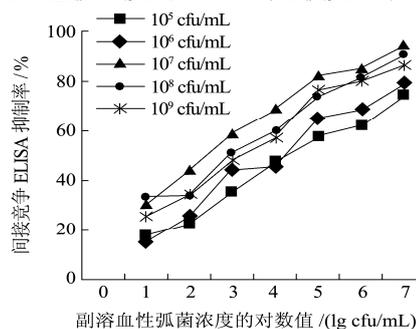


图 2 抗原包被浓度对间接竞争 ELISA 抑制曲线的影响

Fig.2 Effects of antigen concentration on inhibition rate of indirect competitive ELISA

图2显示抗原包被浓度为 10^7 cfu/mL时,检测灵敏度最高,而其它包被浓度的检测灵敏度相比较差,这说明 10^7 cfu/mL为单因素分析的最佳包被浓度。

2.3.2 抗体稀释度对ELISA灵敏度的影响

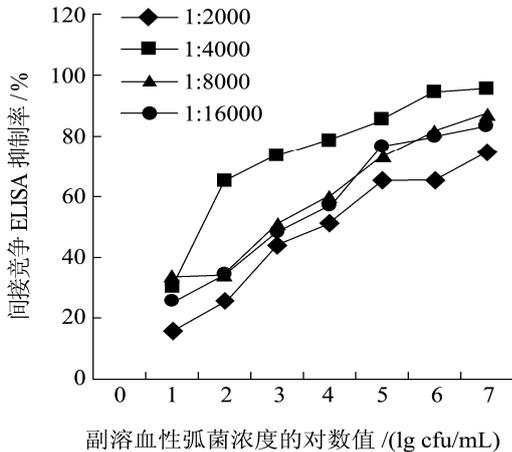


图3 抗体稀释度对间接竞争ELISA抑制曲线的影响

Fig.3 Effects of antibody dilution on inhibition rate of indirect competitive ELISA curve

图3显示抗体稀释度为1:4000时,检测灵敏度最高,而其它包被浓度的检测灵敏度相比较差,这说明1:4000为单因素分析的最佳抗体稀释度。

2.3.3 酶标二抗稀释度对ELISA灵敏度的影响

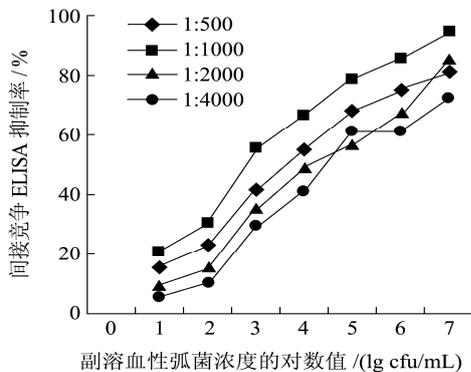


图4 酶标二抗稀释度对间接竞争ELISA抑制曲线的影响

Fig.4 Effects of IgG-HRP dilution on inhibition rate of indirect competitive ELISA curve

图4显示酶标二抗稀释度为1:1000时,检测灵敏度最高,而其它包被浓度的检测灵敏度相比较差,这说明1:1000为单因素分析的最佳酶标二抗稀释度。

2.4 模拟水产品定量染菌检测结果

图5~8结果均显示:四种染菌样品在增菌前,运

用间接ELISA对副溶血性弧菌的最小检测浓度为 10^4 cfu/mL,而经过8h增菌后其检测最小浓度为 10^3 cfu/mL,这说明对样品进行增菌,有助于提高间接ELISA检测副溶血性弧菌的最低浓度。

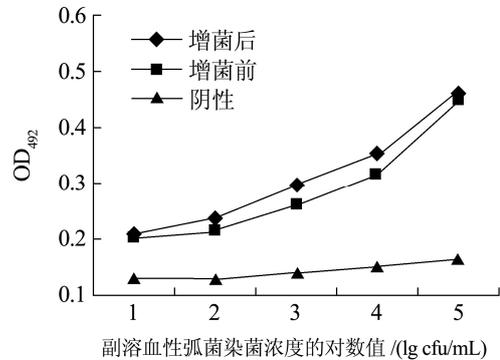


图5 大黄鱼模拟染菌实验结果

Fig.5 The simulation test result of microbiological contamination of *Pseudosciaena crocea*

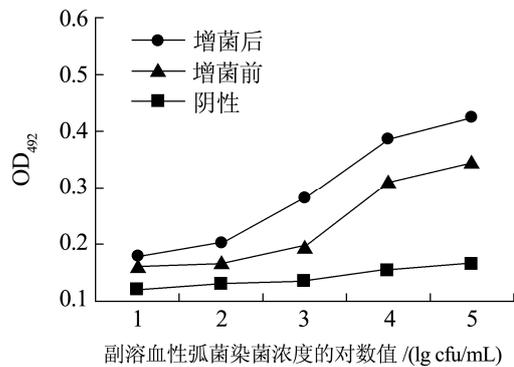


图6 对虾模拟染菌实验结果

Fig.6 The simulation test result of microbiological contamination of shrimps

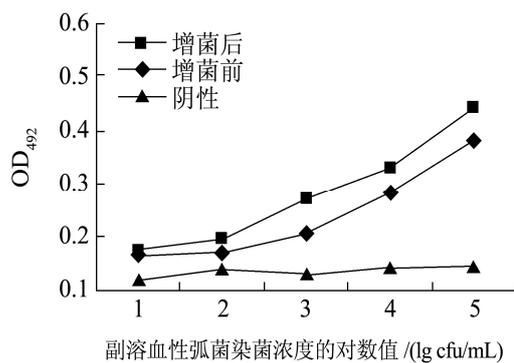


图7 鲈非鱼模拟染菌实验结果

Fig.7 The simulation test result of microbiological contamination of weever

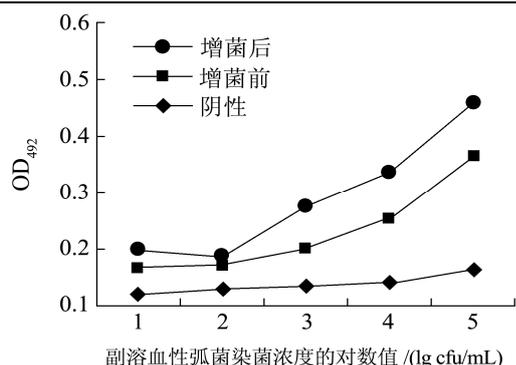


图 8 河蟹模拟染菌实验结果

Fig.8 The simulation test result of microbiological contamination of mitted crabs

2.5 实际样品检测结果

分别运用间接 ELISA 法和常规国标检测法对购回的水产品样品进行检测，其检测结果符合率基本为 100%，在对对虾样品检测中，常规法有一个样品未检出，原因可能是水产品中一些死亡的或者未可培养状态菌，常规生化培养无法检测出，而 ELISA 却可以将其检测出。说明本实验 ELISA 检测法准确、可靠。

表 2 实际样品检测结果

Table 2 Results of PCR detection for some seafood

样品名称	样品数	ELISA 检测	常规法检	检测符合率/%
		阳性数	测阳性数	
对虾	100	10	9	99
河蟹	80	2	2	100
大黄鱼	80	5	5	100
鲈非鱼	80	2	2	100
鳕鱼	60	1	1	100

3 结论

本实验所制备的副溶血性弧菌多克隆抗体，具有很高效价及特异性，与其它菌株菌无交叉反应，因此本实验的抗体制备方法具有一定的实际意义。

本实验所建立的间接 ELISA 法，其检测参数为：

60 °C 烘干包被；抗原包被浓度为 10⁷ cfu/mL；封闭时间为 2.5 h；一抗工作稀释度为 1:4000；抗原、一抗孵育时间为 75 min；酶标二抗工作稀释度为 1:1000；一抗与酶标二抗孵育时间为 60 min；酶与底物反应温度为 30 °C，时间为 15 min；菌悬液检测阈为 10⁴ cfu/mL；孵育温度为 37 °C；样品检测最小浓度为 10⁴ cfu/mL，增菌后检测最小浓度为 10³ cfu/mL；检测时间为 6 h，如加上增菌时间则检测时间为 14 h。此法具有检测速度快、精确性高的优点，可为今后副溶血性弧菌 ELISA 检测试剂盒的研制提供理论基础和实验依据。因此，本实验具有较高的应用价值。

参考文献

- [1] 焦红,王方金,程钢,等.用 FQ-PCR 方法快速检测水产品中副溶血性弧菌[J].检验检疫科学,2004,14(6):40-42
- [2] 王军,鄢庆彬,苏永全,马梁,等.养殖大黄鱼副溶血性弧菌的酶联免疫吸附法研究[J].台湾海峡,2001,20(3):346- 350
- [3] 樊景凤,梁玉波,等.凡纳滨对虾红体病原菌间接 ELISA 快速检测方法的研究[J].水产学报,2006,30(1):113- 117
- [4] 熊勇华,陈雪岚,许杨.检测赭曲霉毒素 A (OTA) 的酶联免疫吸附法 (ELISA) 体系的建立[J].食品科学,2006,27(5):30-35
- [5] 陈福生,高志贤,王建华主编.食品安全检测与现代生物技术[M].北京:化学工业出版社,2004
- [6] 张晓华,Peter Robertson,Brain Austin,等.检测海洋弧菌的酶联免疫吸附试验研究[J].青岛海洋大学学报, 1997,27(3): 326-331
- [7] Hiroshi Miyakawa1 , et al. High sensitivity of a novel ELISA for anti-M2 in primary biliary cirrhosis[J]. Journal of Gastroenterology, 2001(36):33-38
- [8] S.Mayfield, A.L.Lopata ,G. M.Branch . Limitation and failure of immunological technique (ELISA) in resolving the diet of the South African rock lobster[J].*Jasus lalandii*.Marine Biology, 2000,137:595-604