

金黄色葡萄球菌肠毒素 P 双抗夹心酶联免疫检测方法的建立

杜玄, 赵燕英, 刘骥, 龙虎, 王洪志, 田万帆, 唐俊妮

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

摘要: 本研究目的是建立一种快速检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEP 的双抗夹心酶联免疫方法。通过对单克隆抗体和抗血清质量浓度、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (IgG/HRP) 最佳稀释度、不同种类包被缓冲液、封闭时间、抗原包被时间、IgG/HRP 作用时间以及四甲基联苯胺 (TMB) 显色时间等条件进行优化; 并采用灵敏度、批内和批间变异和加标回收率等方法进行评价。结果表明: 该方法中抗 SEP 单克隆抗体的最佳稀释质量浓度为 3.28 $\mu\text{g/mL}$, 抗 SEI 兔血清的质量浓度为 3.14 $\mu\text{g/mL}$, 酶标二抗稀释度 1:3000, 1 \times 磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 为最佳包被缓冲液, 封闭时间为 1 h, 抗原孵育时间为 90 min, 酶标二抗反应时间为 30 min, TMB 显色时间 15 min。该方法回归方程为 $y=0.0313x+0.0262$, $R^2=0.9946$ 。灵敏度为 1.80 $\mu\text{g/mL}$, 精密批内变异低于 6%, 批间变异低于 15%, 对 LB 肉汤、牛肉糜和熟米饭回收率达 90% 以上。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 新型肠毒素 SEP; 双抗夹心酶联免疫吸附; 优化

文章编号: 1673-9078(2018)04-264-269

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.039

Development of a Double-Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin P

DU Xuan, ZHAO Yan-ying, LIU Ji, LONG Hu, WANG Hong-zhi, TIAN Wan-fan, TANG Jun-ni

(College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: A double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) method was developed for detection of a new staphylococcal enterotoxin P (SEP). The experimental conditions were evaluated through the index of sensitivity, intra-assay variation, inter-assay variation and spike recovery by optimizing the concentration of monoclonal antibody and antiserum, the horseradish peroxidase (HRP) labeled goat anti-rabbit IgG (IgG/HRP), different types of buffer, blocking time, antigen incubation time, IgG / HRP incubation time, and TMB chromogenic time. Our results were as follows: the optimal concentration of anti-SEP monoclonal antibody 3.28 $\mu\text{g/mL}$, the concentration of anti-SEI rabbit serum 3.14 $\mu\text{g/mL}$, the dilution of enzyme-labeled secondary antibody 1: 3000, the blocking time 1 h, the antigen incubation time 90 min, the secondary antibody incubation time 30 min and the TMB chromogenic time 15 min. And 1 \times phosphate buffer solution (pH 7.4) was shown as the best buffer. The regression equation of this method was $y=0.0313x+0.0262$ with R^2 of 0.9946. The sensitivity of the developed method was 1.80 $\mu\text{g/mL}$. The precision within the batch variation was less than 6%, and inter-assay variation was less than 15%. The recovery rates for LB broth, beef and cooked rice were more than 90%. Thus, this study successfully established a DAS-ELISA method for rapid detection of newly identified staphylococcal enterotoxin P.

Key words: *Staphylococcus aureus*; newly identified staphylococcal enterotoxin P; DAS-ELISA; optimization

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种重要的病原菌, 极易污染食品并引发食物中毒, 以及人或动物的组织感染、败血症和肺炎等^[1,2]。在我国,

收稿日期: 2017-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371781); 四川省应用基础项目 (2014JY0253); 西南民族大学研究生创新课题 (GX2017SZ070)

作者简介: 杜玄 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全

通讯作者: 唐俊妮 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物

由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒占有所有细菌性食物中毒的比例高达 20%~25%^[3]。金黄色葡萄球菌引发的食物中毒主要是由肠毒素引起的。目前已发现的金黄色葡萄球菌肠毒素有 22 种, 根据其被发现的先后顺序, 分别命名为传统肠毒素 SEA~SEE 和新型肠毒素 SEG~SET, SE/U, SE/U₂, SE/V^[4]。

对于新发现的肠毒素目前还缺乏检测方法。现有的检测金黄色葡萄球菌传统肠毒素和部分新型肠毒素的方法有分子生物学检测法、免疫学检测法和生物传

感器法等^[5], 其中, 大多是针对毒素基因水平的检测, 如 Letertre 等^[6]利用实时荧光 PCR (polymerase chain reaction) 成功检测出了 9 种肠毒素基因, 该检测技术快速, 但只能检测核酸水平而不能检测蛋白本身。

酶联免疫吸附法 (ELISA) 是依靠抗原决定簇与抗体结合位点之间特异性进行检测, 如 Rahimi 等^[7]用 ELISA 方法检测食品中的传统肠毒素 SEA-SED; Nagaraj 等^[8]利用双抗夹心 ELISA (double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) 的方法检测食品中的 SEG; 朱安妮等^[9]利用双抗夹心 ELISA 建立检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEI; Zhao 等^[10]利用双抗夹心 ELISA 检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEM。但目前还未见检测新型肠毒素 SEP 的 ELISA 方法报道。

新型肠毒素 *sep* 基因的核苷酸序列有 729 bp (NCBI 登录号: YP_009113107.1), 编码 286 个氨基酸残基的毒素蛋白 SEP, 分子量为 27.89 ku。Hait 等^[11]在发生食物中毒事件的面包店中, 检测出金黄色葡萄球菌新型肠毒素 *sep* 基因。Calderwood 等^[12]的研究发现携带 *sep* 基因的 MRSA 菌株会增加败血症的风险。因此, 研究肠毒素 SEP 的夹心 ELISA 检测方法具有必要性, 可为食品污染肠毒素 SEP 的风险识别提供技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

SEP 蛋白纯品 (1.8 mg/mL), SEP 单克隆抗体 (2.3 mg/mL), 抗 SEP 兔血清 (1.57 mg/mL), 以及 SEK、SEI 和 SEM 蛋白均为本实验室自制; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (IgG/HRP) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司; Tween-20 购自美国 Amresco 公司; 脱脂奶粉购自英国 Oxoid 公司; 96 孔聚苯乙烯酶标板购自中国 Costar 公司; Elx-808 型酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SEP 的 DAS-ELISA 工作流程

以适当稀释的 SEP 单克隆抗体包被酶标板, 每孔 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜; 倒出包被液, 每孔加入含有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST), 清洗 3 次; 随后, 每孔加入 200 μ L 的 5% 脱脂乳的磷酸盐缓冲液 (PBS), 37 $^{\circ}$ C 封闭 1~2 h, 洗板 3 次; 再加入 SEP 纯品蛋白 (20 μ g/mL), 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45~90 min; 加入抗

SEP 兔血清, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 以羊抗兔 IgG/HRP 为二抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30~60 min; 洗板 5 次, 加入 TMB 底物显色溶液, 每孔 100 μ L, 避光显色 10~20 min; 加入 2 mol/L 的硫酸溶液使反应停止。测定 450 nm 处的 OD 值, 并计算 P/N 值 (其中 P 为检测样品的 OD_{450 nm} 值; N 为阴性对照 OD_{450 nm} 值)。

1.2.2 最佳抗体质量浓度确定

保持其余工作条件不变, 采用 1.2.1 的流程分别对不同质量浓度下的抗 SEP 单克隆抗体 (1.64、3.28、6.56 μ g/mL)、不同稀释质量浓度的抗 SEP 兔血清 (1.57、3.14、6.28 μ g/mL) 和不同稀释度的 IgG/HRP (稀释度为 1:3000、1:6000) 进行检测。阳性孔用已知浓度的 SEP 蛋白纯品作对照, 阴性孔用 PBS 代替抗原, 反应结束, 测定 OD_{450 nm} 值, 并计算 P/N 值, 根据 P/N 大小确定最佳抗 SEP 单克隆抗体和抗 SEP 兔血清浓度以及 IgG/HRP 最佳稀释度。

1.2.3 最佳检测条件确定

参照朱安妮^[9]的方法, 按照 1.2.1 的流程, 在最佳抗体工作浓度的条件下, 分别对不同种类的缓冲液 (0.1 mol/L, pH 9.2 碳酸盐); 1 \times PBS (pH 7.4)、封闭时长 (1、1.5、2 h)、抗原孵育时间 (45、60、90 min)、羊抗兔 IgG/HRP 反应时间 (37 $^{\circ}$ C: 30、45、60 min)、TMB 底物显色时间 (10、15、20 min) 进行 ELISA 实验。检测阳性孔和阴性孔的 OD_{450 nm}, 计算并选择最大 P/N 值为最佳条件。

1.2.4 制备 DAS-ELISA 标准曲线

按照 ELISA 的工作程序, 用夹心 ELISA 法检测不同质量浓度 SEP 抗原 (0.63、1.25、2.5、5、10、20 μ g/mL), 测定 OD_{450 nm} 值, 并制作标准曲线。

1.2.5 灵敏度实验

利用 DAS-ELISA 法检测不同质量浓度的 SEP 蛋白 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4 μ g/mL), 测试 SEP 检测方法的灵敏度。判断标准: P/N>2.0 为阳性。

1.2.6 精密度实验^[9,13]

参考文献方法, 批内变异将阳性对照组 (20、10、5 μ g/mL), 阴性对照组分别作 5 个孔, 同时检测其 OD_{450 nm} 值; 批间变异将上述标本连续 5 次检测 OD_{450 nm} 值。变异系数的计算公式为 $CV=(SD/\bar{x})\times 100\%$

1.2.7 DAS-ELISA 方法的特异性分析

取实验室保存的 SEK、SEI 和 SEM 纯品 (10 μ g/mL) 作为样品检测。判断标准: P/N>2.0 为阳性结果。

1.2.8 测定人工污染样品中 SEP 回收率

SEP 人工污染基质采用 LB 肉汤、牛肉糜和熟米饭。通过添加,使基质中 SEP 的含量分别为 2.5、5、10 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 。利用所建立的 SEP 的 DAS-ELISA 方法,分别测定样品和阴性对照的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$,计算样品的回收率。

1.2.9 数据统计分析

每个检测样品做三次重复,数据采用 excel 软件进行分析,实验结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 最佳抗体质量浓度的确定

采用方阵滴定法来确定单克隆抗体和抗血清配对的最佳工作浓度,结果如表 1 所示。

当单克隆抗体的包被质量浓度为 3.28 $\mu\text{g/mL}$,抗 SEP 兔血清的质量浓度为 3.14 $\mu\text{g/mL}$ 的时候,P/N 值最大,达到 9.44。

因此确定抗体的最佳配对浓度为单克隆抗体 3.28 $\mu\text{g/mL}$,抗血清 3.14 mg/L 。

表 1 不同抗体浓度配对下的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值

Table 1 The $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ values under different antibody concentrations

抗血清质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	组别	单克隆抗体质量包被浓度/ $(\mu\text{g/mL})$					
		1.64		3.28		6.56	
		$\text{OD}_{450\text{ nm}}$	P/N	$\text{OD}_{450\text{ nm}}$	P/N	$\text{OD}_{450\text{ nm}}$	P/N
1.57	阳性	0.60 \pm 0.01	7.97	0.73 \pm 0.02	8.31	0.76 \pm 0.01	8.31
	阴性	0.08		0.09		0.09	
3.14	阳性	0.61 \pm 0.02	8.07	0.74 \pm 0.00	9.44	0.78 \pm 0.00	8.67
	阴性	0.08		0.08		0.09	
6.28	阳性	0.69 \pm 0.00	8.18	0.75 \pm 0.02	8.67	0.80 \pm 0.03	7.85
	阴性	0.08		0.09		0.10	

注:加粗字体为最佳抗体浓度条件。

2.2 最佳 IgG/HRP 稀释度的优化

表 2 不同羊抗兔 IgG/HRP 稀释度下的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值

Table 2 The $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ values of different goat anti-rabbit IgG/

组别	HRP dilutions			
	酶标抗体 IgG/HRP 稀释度			
	1:3000		1:6000	
	$\text{OD}_{450\text{ nm}}$	P/N	$\text{OD}_{450\text{ nm}}$	P/N
阳性	0.74 \pm 0.00	9.68	0.72 \pm 0.02	9.24
阴性	0.08		0.08	

注:加粗字体为酶标抗体的最佳稀释度。在最佳配对抗体浓度的条件下(即单克隆抗体质量浓度为 3.28 $\mu\text{g/mL}$,抗 SEP 兔血清质量浓度为 3.14 $\mu\text{g/mL}$),测定酶标抗体稀释度的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值。如表 2 所示,当酶标

抗体的稀释度为 1:3000 时,P/N 值是 9.68,因此,确定 1:3000 为最佳 IgG/HRP 稀释度。

2.3 DAS-ELISA 实验条件优化

根据 2.1 和 2.2 的实验结果,单克隆抗体的包被浓度为 3.28 $\mu\text{g/mL}$,抗 SEP 兔血清的浓度为 3.14 $\mu\text{g/mL}$,羊抗兔 IgG/HRP 的稀释度为 1:3000,在此体系下对包被缓冲液、封板时长、抗原孵育时间、酶标二抗反应时间和 TMB 显色时间进行优化,表 3 为实验结果。根据 P/N 值最大的标准选择最优条件。因此,最终选择包被缓冲液为 1 \times PBS (pH 7.4),封闭时间为 1 h,抗原孵育时间为 90 min,酶标二抗反应时间为 30 min,TMB 显色时间为 15 min。

表 3 实验条件的优化

Table 3 Optimization of experimental conditions

条件	P 值	N 值	P/N	
包被缓冲液	0.1 mol/L, pH 9.2 碳酸盐	0.56 \pm 0.02	0.07	8.29
	1 \times PBS (pH 7.4)	0.74 \pm 0.01	0.08	9.68
	1	0.75 \pm 0.03	0.08	9.81
96 孔板封闭时间/h	1.5	0.71 \pm 0.02	0.08	9.36
	2	0.70 \pm 0.02	0.07	9.51

转下页

接上页				
抗原孵育时间/min	45	0.68±0.01	0.07	9.21
	60	0.74±0.02	0.08	9.58
	90	0.79±0.02	0.08	10.11
酶标二抗反应时间 (37 °C, min)	30	0.71±0.06	0.06	11.67
	45	0.74±0.03	0.08	9.47
	60	0.77±0.04	0.09	8.6
TMB 显色时间/min	10	0.71±0.02	0.07	9.75
	15	0.75±0.02	0.07	10.23
	20	0.80±0.03	0.09	8.67

注: 加粗字体为最佳实验条件。

2.4 新型肠毒素 SEP 的检测标准曲线

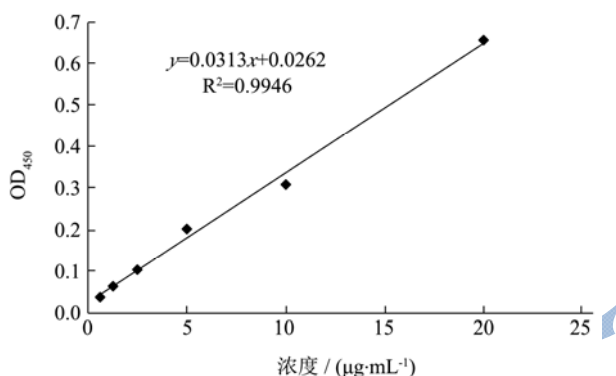


图1 SEP 双抗夹心酶联免疫法的标准曲线

Fig.1 Standard curve of SEP double-antibody sandwich enzyme-linked immunoassay

根据 2.1, 2.2 和 2.3 的实验结果, 在最优条件下, 选取不同浓度的 SEP 纯品蛋白制作标准曲线, 并进行

线性回归分析, 标准曲线的回归方程是 $y=0.0313x+0.0262$, $R^2=0.9946$ 。SEP 的 DAS-ELISA 方法适用检测范围是 0.625~20 µg/mL。

2.5 建立方法的灵敏度实验结果

采用所建立的实验方法, 测定不同质量浓度的 SEP 蛋白纯品, 测定 OD_{450 nm}, 并计算 P/N 值。结果如表 4 所示。当蛋白浓度为 1.8 µg/mL 时, P/N 值为 2.03, 根据 P/N 值大于 2 的标准, 本研究建立的 DAS-ELISA 方法的实际检测灵敏度为 1.8 µg/mL。

2.6 精密度实验结果

SEP 的 DAS-ELISA 检测方法的精密度实验结果如表 5 所示, 由表 5 可以看出, 批内变异系数均小于 6%, 批间变异系数均小于 15%, 说明此方法具有较好的重复性。

表4 检测 SEP 的灵敏度实验

Table 4 The sensitivity of SEP detection

SEP 质量浓度/(µg/mL)	2.4	2.2	2.0	1.8	1.6	1.4
OD _{450 nm}	0.18±0.00	0.17±0.00	0.17±0.03	0.16±0.00	0.15±0.00	0.15±0.00
P/N	2.32	2.23	2.15	2.03	1.96	1.91
SEP 质量浓度/(µg/mL)	1.2	1.0	0.8	0.6	阴性对照	
OD _{450 nm}	0.14±0.01	0.13±0.02	0.12±0.03	0.12±0.00	0.08	
P/N	1.82	1.68	1.58	1.50		

表5 精密度实验结果

Table 5 Precision experiment results

样品/(µg/mL)	检测次数	批内			批间		
		\bar{x}	SD	变异系数 $cv \times 100\%$	\bar{x}	SD	变异系数 $cv \times 100\%$
20	5	0.73	0.007	0.95	0.74	0.042	5.68
10	5	0.39	0.004	1.11	0.39	0.031	7.91
5	5	0.28	0.006	2.04	0.29	0.036	12.29
阴性对照	5	0.08	0.004	5.51	0.09	0.012	14.12

2.7 DAS-ELISA 方法的特异性结果

利用所建立的 DAS-ELISA 方法对实验室保存的金黄色葡萄球菌肠毒素 K、I 和 M 纯品进行检测, 检测结果如表 6 所示, P/N<2.0, 检测结果均为阴性, 说明该方法与金黄色葡萄球菌其他肠毒素蛋白之间不交叉。

表 6 特异性实验结果

Table 6 Specific experimental results

抗原	P 值	N 值	P/N
SEI	0.09±0.01	0.07	1.36
SEK	0.08±0.02	0.07	1.17
SEM	0.09±0.01	0.07	1.38

2.8 人工污染样品中 SEP 的回收率试验结果

通过将牛肉糜、熟米饭、LB 肉汤中添加适当浓度的 SEP 纯品蛋白, 采用建立的检测方法检测样品中 SEP 的回收率。从表 7 可以看出, 牛肉糜、熟米饭、LB 肉汤样品中 SEP 蛋白都具有较好的回收率, 接近 90%及以上。并且三种污染样品中 SEP 的回收率随着添加浓度的增加而增高, 虽然存在样品本身的差异性, 但也能很好说明建立的方法具有较高准确度。

表 7 人工污染样品的回收率

Table 7 Recovery of artificial contaminated samples

待测样品	SEP 浓度/($\mu\text{g/mL}$)		回收率/%
	实际值	检测值(mean \pm SD)	
牛肉糜	20	19.95 \pm 0.98	99.75
	10	10.04 \pm 0.72	100.00
	5	4.98 \pm 0.75	99.60
	2.5	2.32 \pm 0.02	92.80
熟米饭	20	21.12 \pm 1.12	106.00
	10	9.87 \pm 0.93	98.70
	5	4.32 \pm 0.89	86.40
	2.5	2.18 \pm 0.69	87.20
LB 肉汤	20	19.97 \pm 1.23	99.85
	10	9.98 \pm 0.85	99.80
	5	4.87 \pm 0.98	97.40
	2.5	2.37 \pm 0.71	94.80

3 讨论

ELISA 方法具有灵敏度高, 特异性好, 检测成本低等优点, 已经在生物、化学、医学等领域有了广泛应用^[14]。目前文献报道的相关金黄色葡萄球菌肠毒素的检测也采用了该方法, 如 Morissette 等^[15]建立检测奶酪中肠毒素 SEB 的夹心 ELISA 方法, 市场上也有

相应试剂盒销售, 经过改良后其灵敏度可达到 0.5 ng/mL。又如 Rahimi 等^[16]检测生牛乳中金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的时候采用了 ELISA 试剂盒, 灵敏度达到了 0.2 ng/mL。但是, 这些方法的建立和试剂盒的应用大部分集中在对传统金黄色葡萄球菌肠毒素 A-D 的检测上。而针对新型肠毒素检测方法的研究相对比较少。

随着研究的不断发展, 开发针对新型肠毒素蛋白的检测手段具有必要性。近年来, Nagaraj 等^[8]、朱安妮等^[9]和 Zhao 等^[10]分别建立了检测肠毒素 SEG、SEI 和 SEM 的夹心 ELISA 方法。这些方法不断丰富调查金黄色葡萄球菌肠毒素污染食品的检测手段。

本研究也建立了一种检测金黄色葡萄球菌肠毒素 SEP 的 DAS-ELISA 方法, 该方法在 0.625~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内都具有较好的线性关系, 建立方法的灵敏度为 1.8 $\mu\text{g/mL}$, 通过批内变异系数和批间变异系数以及人工加标的回收率实验, 证实建立的方法具有较好的重复性和稳定性, 可用于金黄色葡萄球菌肠毒素 P 的定量检测, 也将具有良好的应用前景。

在进行实验条件优化时, 我们发现单抗和多抗的浓度并不是添加量越高效果就越好, 抗体浓度过高, 会增加体系中的非特异性反应, 同时也会影响单抗的抗原表位, 降低抗原抗体复合物的形成, 使 OD_{450 nm} 降低。但如果抗体浓度过低, 又会使抗原的结合位点减少, 造成测量值比实际值低。本研究中使用的单克隆抗体的包被浓度为 3.28 $\mu\text{g/mL}$, 抗 SEP 兔血清的浓度为 3.14 $\mu\text{g/mL}$ 。同时, 封闭时间、抗原孵育时间、二抗反应时间和 TMB 底物显色时间也会对实验结果产生影响, 一般来说 TMB 显色时间越长, 颜色越深, OD_{450 nm} 值越高。但如果延长显色时间也会使阴性孔的值升高, 使 P/N 值反而降低, 这与朱安妮等^[9]的发现相似, 本研究优化的显色时间为 15 min。另外, 食品基质的复杂性也会影响实验的结果, 在加标回收实验中发现, 对于牛肉糜和熟米饭这两种基质来说, SEP 的浓度越高, 回收率越好, 而 LB 肉汤的回收率在不同 SEP 的浓度下都较好。以后可进一步探索样品的前处理手段和方法, 以进一步降低待测基基本身对实验结果影响。还有在特异性实验中, 我们把实验室保存的金黄色葡萄球菌肠毒素 K、I 和 M 蛋白进行对照检测, 发现肠毒素 K、I 和 M 与肠毒素 P 之间不存在交叉反应, 这是一个很好的结果。但本研究也还存在一定的缺陷, 建立的方法的检测限不够灵敏, 在今后的研究中我们将进一步优化条件, 并且将建立更加丰富的样品评价方案。

综上所述, 本研究初步建立了一种检测金黄色葡萄

萄球菌肠毒素 SEP 的 DAS-ELISA 方法,该方法可用于检测被金黄色葡萄球菌污染食品中的 SEP 含量,将具有一定的应用前景和借鉴意义。

4 结论

本研究建立了一种检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素 P 的双抗夹心 ELISA 方法;该方法的回归方程为 $y=0.0313x+0.0262$, $R^2=0.9946$;该方法检测 SEP 毒素的灵敏度为 $1.8 \mu\text{g/mL}$,精密度批内变异低于 6%,批间变异低于 15%,对 LB 肉汤、牛肉糜和熟米饭回收率可达 90%以上。

参考文献

- [1] Jans C, Merz A, Johler S, et al. East and West African milk products are reservoirs for human and livestock-associated *Staphylococcus aureus* [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 64
- [2] Thapaliya D, Forshey B M, Kadariya J, et al. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 122-129
- [3] 彭国华,胡主花,薛琳,等.食物中毒样品中金黄色葡萄球菌及肠毒素检测[J].现代预防医学,2008,35(20):3943-3945
PENG Guo-hua, HU Zhu-hua, XUE Lin, et al. The detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in food poisoning samples [J]. Modern Preventive Medicine, 2008, 35(20): 3943-3945
- [4] Argudín M Á, Mendoza M C, Rodicio M R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins [J]. Toxins, 2010, 2(7): 1751
- [5] 李琼琼,范一灵,宋明辉,等.食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法[J].食品安全质量检测学报,2016, 7(2):555-560
LI Qiong-qiong, FAN Yi-ling, SONG Ming-hui, et al. Food-borne staphylococcal enterotoxins and detection methods [J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2016, 7(2): 555-560
- [6] Letertre C, Perelle S, Dilasser F, et al. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes sea to sej [J]. Molecular and Cellular Probes, 2003, 17(4): 139-147
- [7] Rahimi E. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus*, in raw sheep, goat, camel, and water buffalo milk by ELISA method [J]. Comparative Clinical Pathology, 2013, 22(2): 181-184
- [8] Nagaraj S, Ramlal S, Kingston J, et al. Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 136-141
- [9] 朱安妮,唐俊妮,赵燕英,等.金黄色葡萄球菌新型肠毒素 I 双抗夹心-酶联免疫检测方法的建立[J].食品科学,2016,37(16):193-198
ZHU An-ni, TANG Jun-ni, ZHAO Yan-ying, et al. Development of a double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin I (SEI) [J]. Food Science, 2016, 37(16): 193-198
- [10] Zhao Y, Zhu A, Tang J, et al. Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin M (SEM) from *Staphylococcus aureus* isolate associated with staphylococcal food poisoning [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(1): 27-34
- [11] Hait J, Tallent S, Melka D, et al. Bennett R. Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence [J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(3): 866-875
- [12] Calderwood M S, Desjardins C A, Sakoulas G, et al. Staphylococcal enterotoxin P predicts bacteremia in hospitalized patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Infectious Diseases, 2014, 209(4): 571
- [13] 黄艺婧,刘赛,徐平,等.检测BDV抗原的双抗夹心ELISA法的建立[J].免疫学杂志,2013,29(5):430-433
HUANG Yi-jing, LIU Sai, XU Ping, et al. The establishment of sandwich ELISA to detect BDV antigen [J]. Immunological Journal, 2013, 29(5): 430-433
- [14] 范祚舟,徐加发,沈萍萍.酶联免疫分析技术研究进展[J].分析科学学报,2011,27(1):113-118
FAN Zuo-zhou, XU Jia-fa, SHEN Ping-ping. Research progress of enzyme - linked immunosorbent assay [J]. Journal of Analytical Science, 2011, 27(1): 113-118
- [15] Morissette C, Goulet J, Lamoureux G. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(3): 836-842
- [16] Rahimi E. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus*, in raw sheep, goat, camel, and water buffalo milk by ELISA method [J]. Comparative Clinical Pathology, 2013, 22(2): 181-184