

基于时间分辨纳米荧光微球的免疫层析技术 快速检测副溶血性弧菌

操青青, 赵力超, 方祥, 钟青萍, 廖振林, 王丽*
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 由副溶血性弧菌引起的食品中毒事件频繁爆出, 开发一种简单、快速且能大规模现场检测的方法对确保食品安全、避免经济损失具有重要意义。该研究成功开发了针对副溶血性弧菌现场快速检测的时间分辨荧光免疫层析技术 (TRF-LFIA)。该方法将时间分辨纳米荧光微球 (EuNPs) 标记副溶血性弧菌单克隆抗体形成可以作为特异性免疫荧光探针的微球抗体偶联物, 通过测定探针与目标致病菌结合后的荧光信号值来实现对目标致病菌的定量检测。该研究开发的 TRF-LFIA 方法对副溶血性弧菌检测的灵敏度为 8.2×10^2 CFU/mL, 视觉检测限为 1.2×10^4 CFU/mL, 线性范围为 $1.8 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU/mL, 回收率为 84.25%~105.13%, 变异系数 (CV) 为 2.56%~9.14%, 并且对其他 7 种主要食源性致病菌株检测未发生交叉反应。该研究所建立的 TRF-LFIA 检测方法具有灵敏度高, 操作简单、快速, 重复性、特异性好等优点, 为针对副溶血性弧菌的现场快速检测提供了一种有力的检测工具。

关键词: 副溶血性弧菌; 时间分辨免疫检测技术; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2023)01-326-334

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0249

Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* Based on Time-resolved Fluorescence Lateral Flow Immunoassay

CAO Qingqing, ZHAO Lichao, FANG Xiang, ZHONG Qingping, LIAO Zhenlin, WANG Li*
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus*-induced food poisoning is frequently reported, highlighting the necessity to develop a simple, rapid, large-scale on-site detection method to ensure food safety and avoid financial losses. Time-resolved fluorescence lateral flow immunoassay (TRF-LFIA) was successfully developed for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*, using europium (III) nanoparticles (EuNPs) to label *V. parahaemolyticus* monoclonal antibodies, forming microsphere-antibody conjugations for use as specific immunofluorescent probes. The intensity of fluorescence signals emitted by the combination of the probes and the target pathogenic bacteria could be detected to achieve quantitative detection of the target pathogenic bacteria. The TRF-LFIA has a sensitivity of 8.2×10^2 CFU/mL, a visual detection limit of 1.2×10^4 CFU/mL, a linear range of $1.8 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU/mL, a recovery rate range of 84.25%~105.13%, and a coefficient of the variation range of 2.56%~9.14%. There was no cross-reaction to the other seven major foodborne pathogenic strains. The TRF-LFIA established in this study has high sensitivity, allowing for simple and rapid operation, and good repeatability and specificity, providing a powerful detection tool for rapid on-site detection of *V. parahaemolyticus*.

Key words: time-resolved fluorescence lateral flow immunoassay, *Vibrio parahaemolyticus*, rapid detection

引文格式:

操青青,赵力超,方祥,等.基于时间分辨纳米荧光微球的免疫层析技术快速检测副溶血性弧菌[J].现代食品科技,2023,39(1):326-334

CAO Qingqing, ZHAO Lichao, FANG Xiang, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on time-resolved fluorescence lateral flow immunoassay [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 326-334

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 广东省基础与应用基础研究项目 (2020A1515011561)

作者简介: 操青青 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 2479035954@qq.com

通讯作者: 王丽 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与质量安全, E-mail: wangli_scau@scau.edu.cn

食源性致病菌引发的公共卫生事件是全球食品安全领域最受关注的问题之一^[1,2]。副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种广泛存在的食源性致病菌, 经常在各种海产品包括蛤蜊、虾和牡蛎等中被检测出。食用被副溶血性弧菌污染的食品会导致恶心、头痛、发烧和腹痛等健康问题^[3-5]。据报道, 在其他国家比如

日本、欧美、韩国等由副溶血性弧菌危害导致的食源性疾病频繁发生^[6,7]。在中国,由副溶血性弧菌引起的食物中毒常造成集体发病^[8-10]。因此,由副溶血性弧菌引起的食品安全问题已经关系到人类健康和国际公共卫生安全,而且已有研究表明副溶血性弧菌对抗生素产生了抗性^[11],因此加强对副溶血性弧菌的检测十分必要。

目前针对副溶血性弧菌的检测方法主要包括传统培养计数法、分子诊断法以及免疫诊断法。然而,传统培养法耗时长、过程繁冗、对操作者的实验技术要求较高^[12]。基于核酸扩增的分子诊断法,包括常规 PCR 方法、恒温核酸扩增法以及 RPA 技术。PCR 技术对副溶血弧菌的检测灵敏度较高,达到 10 CFU/mL^[13],但 PCR 技术由于对设备要求较高,限制了其使用的灵活度。恒温核酸扩增和 RPA 技术对设备要求低、灵敏度高,对副溶血性弧菌检测的灵敏度分别达到了 3.6 CFU/mL^[14]、 1.0×10^3 CFU/mL^[15],但样品前处理仍比较繁琐。免疫诊断法中常用的 ELISA 检测技术对实验环境以及技术人员要求高,检测时间较长,其对副溶血性弧菌的检测灵敏度为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL^[16,17]。基于这些方法对副溶血性弧菌检测的特异性好,但普遍存在实验过程复杂,实验设备精密以及实验操作人员专业等问题,尚不能满足现场大规模快速检测的要求。免疫层析技术 (Immunochromatographic assay, ICA) 是一类简单、成本低的快速检测方法^[18]。ICA 的原理是基于抗原抗体特异性反应。目前,已有研究报道过免疫层析技术用于副溶血性弧菌的检测^[19,20]。然而,传统的免疫层析技术中常采用的荧光标记物如胶体金 (AuNPs)、量子点 (QDs) 和荧光微球 (FM) 会受到来自样本细胞组织的影响和自体荧光的干扰,导致检测结果信号偏低^[21-24]。时间分辨荧光微球 (EuNPs) 具备斯托克斯位移大、荧光寿命长以及优异的光稳定性等特征^[25,26],其在免疫层析技术中的应用引起了广大研究者的注意。传统的基于 EuNPs 的时间分辨荧光免疫层析技术 (Time-Resolved Fluorescence Lateral Flow Immuneassay, TRF-LFIA) 针对致病菌的检测在测试样本前要将标记物和待测样本混匀,再进行加样^[27,28]。其检测流程在快速检测的应用中仍旧繁琐且对原材料耗费大,不利于致病菌的快速检测^[29,30]。因此,开发一种检测步骤简单、适合副溶血性弧菌现场快速检测的 TRF-LFIA 检测方法具有实际应用价值。

本研究将 EuNPs 标记技术与免疫层析技术相结合,重建传统 TRF-LFIA 检测致病菌的试纸条结构,并对影响该方法检测性能的关键实验参数进行优化,

最终建立了针对副溶血性弧菌检测的 TRF-LFIA 检测方法。基于 TRF-LFIA 所制备的检测试纸条具有可以批量生产、便于运输、操作简单等优点,适于在现场检测中的应用。本研究建立的 TRF-LFIA 检测方法能对副溶血性弧菌进行有效监测,有望为海产品市场和偏远地区副溶血性弧菌的现场大规模检测提供有力的工具。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与试剂

本研究中涉及的副溶血性弧菌 ATCC 17802、创伤弧菌 ATCC 27562、溶藻性弧菌 ATCC 33787、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19115、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311、大肠杆菌 O157:H7 ATCC 35150 和阪崎肠杆菌 ATCC 29544,均保藏在 -80 °C 条件下的甘油菌种库中。

时间分辨荧光微球 (EU 100 C、EU 180 C、EU 300 C),辉质生物公司。1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺活性酯 (NHS)、牛血清白蛋白 (BSA)、2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES),美国 Sigma-Aldrich 公司。3% NaCl 碱性蛋白胨水 (3% NaCl APW)、胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤 (TSB) 和胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA),广东环凯微生物有限公司。其他普通的试剂均为化学分析纯,广州化学试剂厂。

1.2 主要仪器和设备

生物安全柜,青岛海尔特种电器有限公司;恒温恒湿储存柜,广东执诚生物科技有限公司;恒温生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;干式荧光免疫分析仪,上海执诚生物科技有限公司;酸度计,德国赛多利斯;Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪,英国马尔文仪器公司;高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 菌株活化和菌液制备

用接种环无菌操作取适量 -80 °C 甘油保存的副溶血性弧菌在 $m=3\%$ NaCl TSA 平板上划线接种活化,置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h。然后挑取单个典型菌落,反复吹打于 $m=3\%$ NaCl APW 中,37 °C、180 r/min 震荡培养 18 h,然后取培养后的菌液 1 mL 于 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,除上清,用 pH 值为 7.4 的无菌 PBS 洗涤两次后重悬,用无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释,最后通过平板计数法确定菌数,得到含一系列浓度梯度的溶血性弧菌样本数。

1.4 TRF-LFIA 检测方法的建立

EuNPs 与抗体偶联的标记过程参考 Wang 等^[30]的方法成功制备了微球抗体偶联物。在此基础上,用喷膜稀释液将制备好的微球抗体偶联物稀释 10 倍,并采用三维喷点机以 3 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷量均匀喷在结合垫上,放入烘箱 14 h 后取出。硝酸纤维素 (NC) 膜贴在 PVC 板载体的中间位置,使用三维喷点机以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的包被抗体喷量均与喷涂在 NC 膜上,然后置于温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱环境中干燥固定 14 h。试纸条按吸水纸、NC 膜、样品垫、结合垫的顺序组装,并相互有 2 mm 左右的重叠,最后用切条机切成 3.95 mm 宽的试纸条,安装到试剂卡盖上 (图 1a)。实验测试时,取 100 μL 的样品加入到试剂卡加样孔中,反应 15 min,使用干式免疫荧光分析仪 (图 1b、1c) 进行信号测试。

1.5 实验参数的优化

选取来自不同厂家推荐的抗体组合,选用五种包被抗体蛋白浓度、采用三种不同粒径的 EuNPs (表 1) 以及使用六种喷膜稀释液 (表 2) 进行实验参数优化测试。抗体筛选首先用配置好的阴性样本 (Negative, N) 和阳性样本 (Positive, P) 对所有的抗体组合进行初步筛选,其次用配置好的浓度梯度样本对初步筛选

后的抗体组合进行进一步测试。包被抗体浓度、EuNPs、喷膜稀释液分别使用配置好的浓度梯度样本进行加样测试筛选。所有的样品浓度测试设置三个平行实验。

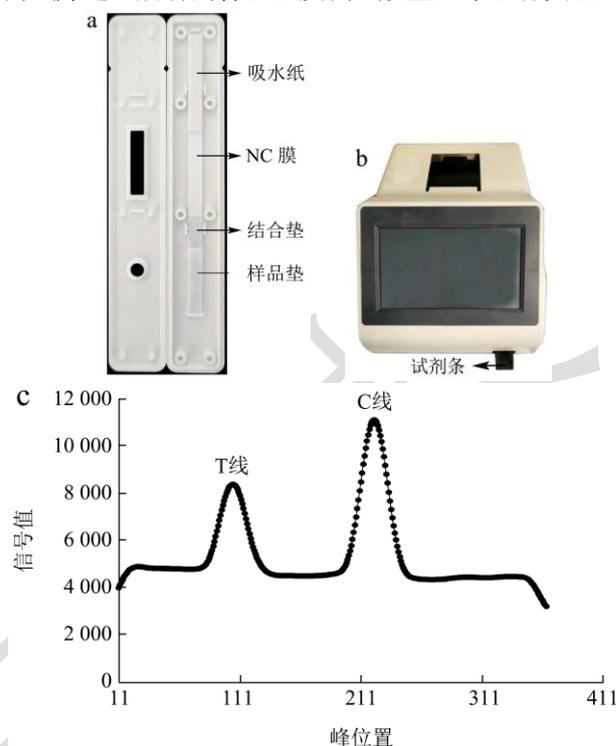


图 1 试纸条信号检测的装备

Fig.1 Test strip signal detection equipment

表 1 三种型号 EuNPs 信息表

Table 1 The information of three kinds of EuNPs

名称	粒径/nm	密度/(g/cm ³)	固含量/%	基团	羧基密度/(ueq/g)
EU 100 C	100	1.05	1	-COOH	118
EU 180 C	180	1.06	1	-COOH	140
EU 300 C	300	1.06	1	-COOH	105

表 2 稀释液配方

Table 2 The formula of diluent

配方编号	缓冲体系	乳化剂	稳定保护剂	蛋白保护剂	大分子赋型剂
1	0.01 MPBS (pH 值 7.4)	0.5% TritonX 100	5% 海藻糖	0.5% 酪蛋白钠盐	0.5% PVP 40
2	0.01 MPBS (pH 值 7.4)	0.5% Tween 20	5% 海藻糖	0.5% 酪蛋白钠盐	0.5% PVP 40
3	0.01 MPBS (pH 值 7.4)	0.5% S9	5% 海藻糖	0.5% 酪蛋白钠盐	0.5% PVP 40
4	0.01 MTris-HCl (pH 值 7.2)	0.5% TritonX 100	5% 海藻糖	0.5% 酪蛋白钠盐	0.5% PVP 40
5	0.01 MTris-HCl (pH 值 7.2)	0.5% Tween 20	5% 海藻糖	0.5% 酪蛋白钠盐	0.5% PVP 40
6	0.01 MTris-HCl (pH 值 7.2)	0.5% S9	5% 海藻糖	0.5% 酪蛋白钠盐	0.5% PVP 40

1.6 TRF-LFIA 检测副溶血性弧菌的性能评价

按菌液制备的流程制备一系列含浓度梯度菌液的样本,通过常规平板计数法测定样本中添加的副溶血性弧菌浓度。采用 TRF-LFIA 试纸条测试同一系列浓度梯度的菌液样本并用干式免疫荧光分析仪测得 T 线上的荧光强度值 (H_T) 与 C 线上的荧光强度值 (H_C),

并分析 H_T/H_C 比值的大小以进行检测评价。该方法以样本检测出的荧光信号值 ≥ 2.1 倍的空白样本检测出的信号值对应的最低菌浓度为该方法的最低检出限。从同一批次的 PVC 大板和不同批次的 PVC 大板中抽取大板制备试纸条,并对副溶血性弧菌进行检测。分析试纸条检测的回收率和变异系数 (CV) 的大小,用于评判 TRF-LFIA 试纸条检测的准确度。

1.7 TRF-LFIA 对实际样品的检测

首先采用标准方法 (GB 4789.7-2013) 验证从当地超市购买的虾样品中不存在副溶血性弧菌。同时, 取 25 g 样品与 225 mL 的无菌 PBS 缓冲液混合并拍打成匀浆, 将不同浓度的副溶血性弧菌对所制备的样品进行污染, 通过常规平板计数法计算人工污染样品中的副溶血性弧菌数。分别取 100 μ L 含不同浓度的副溶血性弧菌人工污染样品用于 TRF-LFIA 试纸条进行检测, 并用干式免疫荧光分析仪进行荧光信号值检测。未污染的食物样品做阴性对照, 所有实验均平行测试三次。

1.8 数据分析

使用 Origin 8.5 绘图软件生成图形。流程原理图通过 PPT 绘制。数据处理采用 SPSS 23.0 软件进行, 当 $p < 0.05$ 时, 不同处理组之间被认为存在显著差异。误差条代表标准偏差, 由至少三个独立实验确定。

2 结果与讨论

2.1 TRF-LFIA 的检测原理

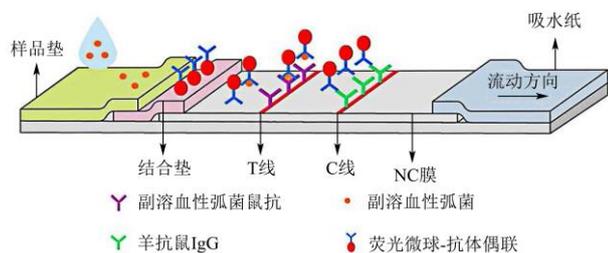


图2 TRF-LFIA 试纸条检测副溶血性弧菌的原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of TRF-LFIA test strip for detection of *vibrio parahaemolyticus*

本研究在传统检测致病菌的 TRF-LFIA 试纸条上加结合垫, 使用喷膜稀释液将微球标记的抗体固定在样品垫上, 按吸水纸、NC 膜、样品垫、结合垫的顺序制备检测试纸条, 其可以批量生产, 在现场检测应用时无需将样本与荧光探针进行混合预处理, 直接加样检测, 这极大简化了现场检测实验操作的流程并节约了荧光原料的使用。TRF-LFIA 检测副溶血性弧菌的原理如图 2, 将 100 μ L 的样品溶液滴加在试纸条的样品垫上进行检测, 液体通过毛细管作用沿样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸方向流动。当样本中存在副溶血性弧菌时, 首先目标细菌被标记抗体偶联物捕获, 并一起沿试纸条吸水纸方向流动, 在测试线 T 上副溶血性单克隆抗体通过抗原-抗体反应把细菌-标记抗体

偶联物截留, 因此形成标记抗体偶联物-副溶血性弧菌-副溶血性弧菌抗体复合物, 过量的标记抗体偶联物会继续沿着试纸条吸水纸的方向流动, 在质控线 C 上山羊抗小鼠抗体通过抗原-抗体反应把标记抗体偶联物截留。样品溶液中副溶血性弧菌浓度越高, 与微球抗体偶联物结合的目标菌就越多, 测试线 T 上的荧光信号越强, 检测出的信号值就越大。

2.2 实验参数的优化

2.2.1 免疫层析抗体对的筛选

试纸条对不同浓度菌液的敏感性与很多因素有关, 其中抗体是主要的影响因素之一。一对好的抗体不仅能增加检测的特异性, 也能提高检测的灵敏度。厂家通常会采用传统的 ELISA 方法对抗体性能进行评估, 但是这也不能反应在所用方法中抗体应用性能的真实情况^[31], 抗体的筛选还需要进行实际测试。十三种抗体组合测试结果见表 3, 理论上说, 阳性样本 (Positive, P) 与阴性样本 (Negative, N) 的信号比值即信噪比 (Signal-to-Noise Ratio, SNR) 的大小反映抗体配对的灵敏度与测试范围, SNR 越大, 试剂的灵敏度和测试范围就越大。

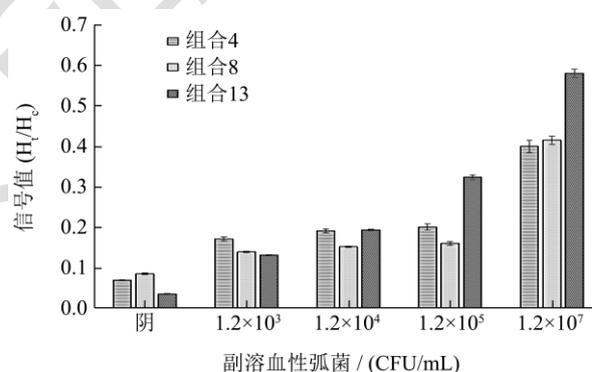


图3 三组副溶血性弧菌抗体组合信号测试结果

Fig.3 Three groups of *vibrio parahaemolyticus* antibody combination signal test results

根据表 3 测试结果, 组合 4、8、13 实验结果的 SNR 远大于其他组合, 对这三对组合进行进一步实验测试。结果如图 3, 组合 13 相比其它两个组合, 在几个浓度测试间具有明显的信号梯度, 且对阴性样本检测结果的信号值最低, 表明本底信号值低, 在后续特异性测试中具有优势, 因此组合 13 是优选配对。

2.2.2 抗体包被浓度的确定

每一对抗原抗体反应都有其最佳的浓度比例, 选择合适的包被抗体浓度可以提高试纸条检测的准确性。表 4 数据显示采用 0.5 mg/mL 和 0.8 mg/mL 包被浓度所制备的试纸条具有较好的检测灵敏度、视觉检测线。

表3 副溶血性弧菌抗体组合 SNR 结果

Table 3 The SNR results of antibody combinations

组合编号	包被抗体	标记抗体	Positive (P)	Negative (N)	SNR
1	mAb ₄	mAb ₁	0.33	0.14	2.39
2	mAb ₄	mAb ₂	0.60	0.27	2.20
3	mAb ₄	mAb ₃	0.27	0.05	5.37
4	mAb ₄	mAb ₅	0.31	0.03	12.46
5	mAb ₅	mAb ₁	0.15	0.07	2.02
6	mAb ₅	mAb ₂	0.32	0.12	2.66
7	mAb ₅	mAb ₃	0.34	0.11	3.00
8	mAb ₅	mAb ₄	0.44	0.04	10.27
9	mAb ₁	mAb ₂	1.17	0.30	3.92
10	mAb ₁	mAb ₃	2.04	0.76	2.68
11	mAb ₁	mAb ₄	1.45	0.60	2.40
12	mAb ₁	mAb ₅	0.29	0.06	4.55
13	mAb ₁	mAb ₁	0.51	0.02	27.56

表4 抗体包被浓度测试结果

Table 4 The performance of antibody coating concentrations

包被浓度/(mg/mL)	0.3	0.5	0.8	1.2	1.4
灵敏度/(CFU/mL)	2.0×10^4	2.0×10^3	2.0×10^3	2.0×10^4	2×10^5
视觉检测线/(CFU/mL)	2.0×10^5	2.0×10^5	2.0×10^5	2.0×10^6	2.0×10^6
R^2	0.894 2	0.904 5	0.903 1	0.887 7	0.874 6

表5 EuNPs 标记前后的参数

Table 5 The parameters of EuNPs before and after coupling

检测样本	Z-Ave/(d.nm)	PdI	检测样本	Z-Ave/(d.nm)	PdI
EU 100 C	109.431	0.051	EU 100 C-mAb ₁	121.221	0.152
EU 180 C	201.611	0.031	EU 180 C-mAb ₁	226.813	0.116
EU 300 C	313.263	0.134	EU 300 C-mAb ₁	357.251	0.149

注: Z-Ave 表示粒径; PdI 为分散度参数。

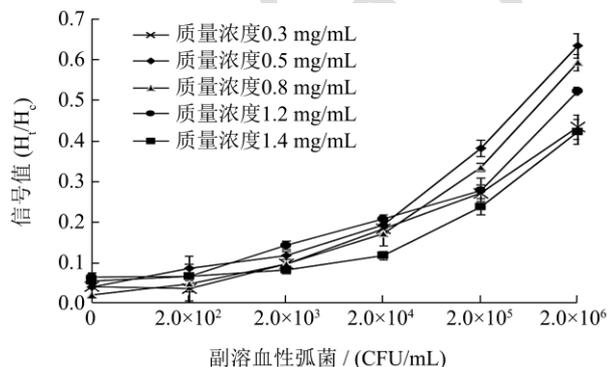


图4 五种包被浓度信号测试曲线

Fig.4 Standard curves of five kinds of antibody coating concentrations

由图4 信号测试结果可知,采用 0.5 mg/mL 的包被浓度所制备的试纸条检测的最大信号值大于 0.8 mg/mL 的包被抗体浓度所制备试纸条检测的最大信号值。这是因为 NC 膜承载抗体蛋白的量有限,当

抗体蛋白过量后可能无法被固定在 NC 膜上。因此实验选择 0.5 mg/mL 包被抗体浓度用于实验。

2.2.3 时间分辨荧光微球的筛选

EuNPs 在标记蛋白过程中,微球的粒径大小会影响抗体标记的效果。通过对微球标记前后的粒径测试结果(表5)分析可知,时间分辨荧光微球在标记抗体后的粒径会变大、分散性变差,这些都符合微球与抗体发生偶联后的正常现象^[32],表明微球与抗体偶联成功。

通过对 2.0×10^3 、 2.0×10^5 、 2.0×10^7 CFU/mL 这三个水平浓度样品的检测完成的信号检测结果如图5所示,基于 EU 300 C 型号微球所制备的试纸条对高、中、低三个浓度检测出的信号值有明显梯度趋势,且其高浓度、低浓度的检测线信号值高于其他两种微球制备的试纸条检测线的信号值。已有研究证明微球的粒径与测试信号值灵敏度成正比关系,粒径越大,单一微

球包含的镧系物质越多,在免疫反应过程中发生的空间位阻效应更轻^[32]。由于快速检测试纸条对灵敏度要求高,因此选择信号 EU 300 C 作为实验测试微球。

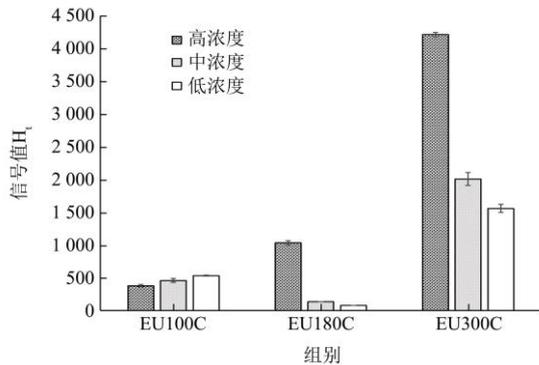


图 5 三种型号 EuNPs 的信号测试结果

Fig.5 The signal test results for three kinds of EuNPs

2.2.4 喷膜稀释液的筛选

采用表 2 中的稀释液分别对微球抗体偶联物进行稀释,通过对菌液浓度为 $0\sim 2.0\times 10^6$ CFU/mL 的样本检测进行喷膜稀释液的筛选。

实验结果如图 6,只有配方 1 处理后制备的试纸条在样本菌液浓度为 2.0×10^3 CFU/mL 时的检测信号值 >2.1 倍的空白样本检测出的信号值,因此使用配方 1 用于实验制备出的试纸条信号检测灵敏度为

2.0×10^3 CFU/mL。该条件下试纸条的检测性能相比其他五种稀释液的更好。因此选择配方 1 的溶液反应体系用于实验,制备出的试纸条具有最优的检测性能。

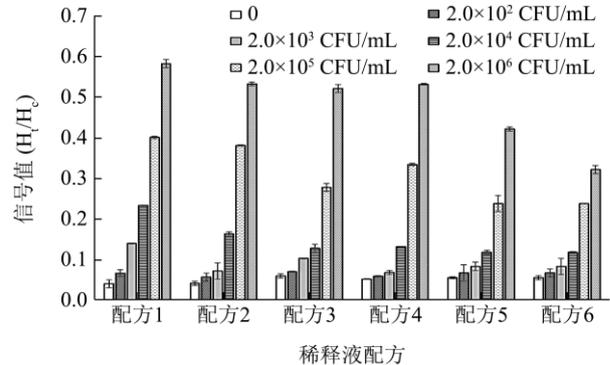


图 6 稀释液的信号测试

Fig.6 The signal test value of diluent

2.3 TRF-LFIA 对副溶血性弧菌检测的性能评价

2.3.1 TRF-LFIA 检测的灵敏度

在紫外光照下,含 1.2×10^4 CFU/mL 的副溶血性弧菌的荧光强度与空白对照组明显不同,读卡区有两条测试线出现,如图 7。因此,我们将 1.2×10^4 CFU/mL 作为 TRF-LFIA 试纸条检测的视觉检测线。

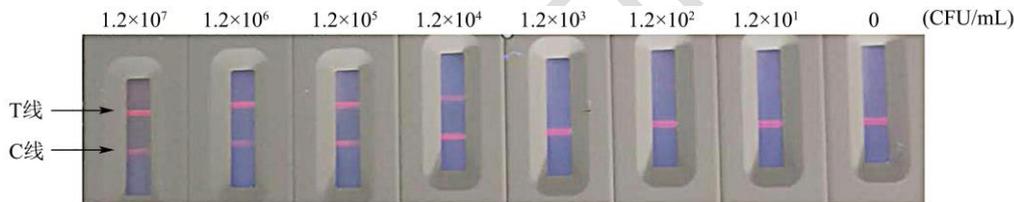


图 7 试纸条灵敏度测试结果

Fig.7 Sensitivity of TRF-LFIA for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*

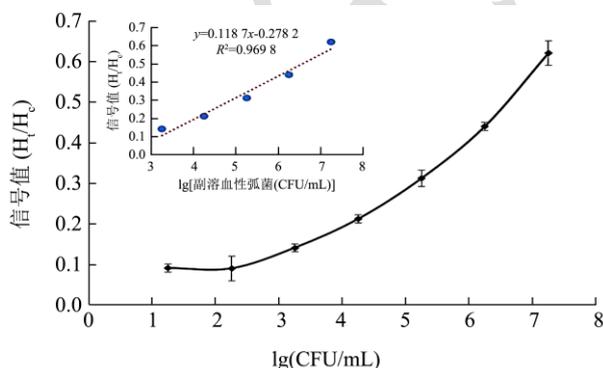


图 8 副溶血性弧菌检测标准曲线

Fig.8 Standard curve of *Vibrio parahaemolyticus* based on TRF-LFIA

本实验空白样本检测的信号值为 0.048,根据最低检出限的定义,阳性样本检测的信号值 ≥ 2.1 倍的空白样本检测出的信号值其对应的最低菌浓度为该方法的

检出限,当菌液浓度为 8.2×10^2 CFU/mL 时检测出的信号值为 0.103,稍大于 2.1 倍的空白样本检测出的信号值,所以 TRF-LFIA 检测方法的检出限为 8.2×10^2 CFU/mL。荧光信号值随检测的副溶血性弧菌浓度增大而增大。如图 8 所示,通过绘制相对荧光强度 (H_t/H_c) 与副溶血性弧菌浓度 ($1.8\times 10^1\sim 1.8\times 10^7$ CFU/mL) 之间的曲线可知, $R^2=0.969 8$,荧光强度在 $1.8\times 10^3\sim 1.8\times 10^7$ CFU/mL 之间呈良好的线性关系。

我们将所建立的方法与已报道的方法进行了比较(表 6)。从表中可以看出,除了 Xue 等^[35]报道的量子点检测方法外,本研究方法的检测灵敏度优于其他的方法。但是,本研究使用的标记材料 EuNPs 比量子点更环保^[37]。研究证明,本研究建立的检测方法具有灵敏度高、检测特异性好等优点,TRF-LFIA 针对致病菌的大规模快速检测具有良好的应用前景。

表 6 不同检测方法的比较

Table 6 The comparison of different methods

检测菌种	方法	灵敏度/(CFU/mL)	特异性	文献
鼠伤寒沙门氏菌	量子点	5.0×10^3	较好	[33]
大肠杆菌 O157:H7	胶体金	5.0×10^6	较差	[34]
金黄色葡萄球菌	量子点	1.0×10^2	好	[35]
单核细胞增生李斯特菌	荧光微球	1.0×10^4	较好	[36]
副溶血性弧菌	时间分辨免疫荧光微球	8.0×10^2	好	本方法

2.3.2 TRF-LFIA 检测的特异性

表 7 TRF-LFIA 检测方法的特异性测试

Table 7 The specificity of TRF-LFIA assay

序号	细菌名称	菌株编号	特异性
1	副溶血性弧菌	ATCC17802	+
2	创伤弧菌	ATCC 27562	-
3	溶藻弧菌	ATCC 33787	-
4	单核细胞增生李斯特菌	ATCC 19115	-
5	大肠杆菌 O157:H7	ATCC 35150	-
6	鼠伤寒沙门氏菌	ATCC 13311	-
7	金黄色葡萄球菌	ATCC 6538	-
8	阪崎肠杆菌	ATCC 29544	-

TRF-LFIA 对不同菌株的特异性测试结果如表 7, 对所提供的 8 株测试菌, TRF-LFIA 对副溶血性弧菌检测结果阳性, 对其它 7 株非目标菌株检测结果阴性, 说明所制备的 TRF-LFIA 试纸条对其它菌的检测无交叉反应, 特异性好。

2.3.3 TRF-LFIA 检测的准确度

回收率试验是用于评价检测准确度的指标, 理论上回收率越高, 越接近 100%, 检测结果越准确。结果如表 8, 试纸条检测的回收率在 84.25%~105.13% 之间。当菌液浓度为 1.2×10^7 CFU/mL 时, 同一批试纸

条与不同一批试纸条的回收率分别为 104.52%、105.13%, 而在菌液浓度为 2.0×10^3 CFU/mL 时, 同一批试纸条与不同一批试纸条的回收率分别只有 86.65%、84.25%, 可以看出浓度越低, 偏离真实值的可能性越大。无论是用哪一批次大板制备的试纸条, 其检测结果的变异系数都小于 10%, 说明 TRF-LFIA 试纸条检测的准确度较好且可以批量生产, 这满足现场副溶血性弧菌检测的需求。

2.4 TRF-LFIA 对实际样品的检测

采用 TRF-LFIA 和 ELISA 对人工污染虾样品进行检测, 考察 TRF-LFIA 对人工虾污染样品中副溶血性弧菌检测的适用性。检测结果如表 9 所示, TRF-LFIA 对人工污染虾样品的检测的回收率在 81.47%~103.52% 之间, 高于 ELISA 检测的回收率, 且采用 TRF-LFIA 对菌浓度为 3.4×10^3 CFU/mL 的样本检测结果阳性, 而 ELISA 未检测出。在低浓度 1.2×10^2 CFU/mL 时, TRF-LFIA 试纸条不能进行污染样的定量检测, 这是因为其测试浓度低于试纸条的检出限, 这符合预期实验结果。研究证明, TRF-LFIA 在测试范围内可以很好地用于对虾样品中副溶血性弧菌的检测。

表 8 TRF-LFIA 检测方法的准确度测试

Table 8 The accuracy of TRF-LFIA assay

试纸条	菌液浓度/(CFU/mL)	H_T/H_C	标准偏差 (SD)	回收率/%	CV/%
同一批次 (n=10)	2.0×10^3	0.19	0.06	86.65	3.23
	4.0×10^4	0.28	0.01	96.55	5.23
	2.0×10^5	0.33	0.01	101.30	2.56
	4.0×10^6	0.48	0.02	102.15	3.93
	1.2×10^7	0.50	0.04	104.52	7.53
不同批次 (n=10)	2.0×10^3	0.18	0.01	84.25	7.31
	4.0×10^4	0.29	0.01	97.11	2.76
	2.0×10^5	0.35	0.02	99.60	4.87
	4.0×10^6	0.46	0.04	101.70	9.14
	1.2×10^7	0.52	0.05	105.13	8.94

表9 TRF-LFIA 和 ELISA 对不同浓度副溶血性弧菌污染的样品检测结果

Table 9 The test results of TRF-LFIA and ELISA for samples contaminated with *Vibrio parahaemolyticus*

样本	添加浓度/(CFU/mL)	TRF-LFIA		ELISA	
		检测结果	回收率/%	检测结果	回收率/%
1	6.3×10^6	+	85.24	+	80.31
2	2.9×10^5	+	103.52	+	89.75
3	4.3×10^4	+	91.57	+	79.95
4	3.4×10^3	+	81.47	-	--
5	1.2×10^2	-	--	-	--

注: -表示阴性结果; +表示阳性结果; --表示不在检测的线性范围。

3 结论

本研究通过重建传统 TRF-LFIA 的试纸条结构及优化实验参数, 最终建立了适于副溶血性弧菌快速检测的 TRF-LFIA 检测方法。该方法将 EuNPs 与标记抗体偶联作为特异性免疫荧光探针, 并使用喷膜稀释液将特异性免疫荧光探针固定在结合垫上, 这有利于提高试纸条检测的准确度、简化实验操作流程、节约实验原料的使用。基于 TRF-LFIA 检测方法制备的试纸条可以批量生产, 便于运输, 为现场检测提供了便利。本研究建立的检测方法具有操作简单、检测快速、特异性好以及灵敏度高优点, 以为食源性致病菌的现场大规模快速检测提供有力的工具。

参考文献

- Bahrami A, Baboli Z M, Schimmel K, et al. Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 61-78
- Yang S C, Lin C H, Aljuffali I A, et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development [J]. Archives of Microbiology, 2017, 199(6): 811-825
- Duan N, Wu S, Zhang H, et al. Fluorometric determination of *Vibrio parahaemolyticus* using an FOF1-ATPase-based aptamer and labeled chromatophores [J]. Microchimica Acta, 2018, 185(6): 1-6
- Minor T, Lasher A, Klontz K, et al. The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States [J]. Risk Analysis, 2015, 35(6): 1125-1139
- Su Y, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558
- Laohaprerthisan V, Chowdhury A, Kongmuang U, et al. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand [J]. Epidemiology and Infection, 2003, 130(3): 395-406
- Kang C, Shin Y, Kim W, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(1): 918-926
- 曾凡夫, 张琰, 潘刚雷, 等. 一起建筑工地副溶血性弧菌引起食物中毒事件调查[J]. 海峡预防医学杂志, 2021, 27(3): 72-74
- 孙健, 张强, 陈凤萍, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒事件溯源调查[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(3): 238-240
- 钟延旭, 赵鹏, 蒋玉艳, 等. 广西一起酒店宴席副溶血性弧菌食物中毒事件调查分析[J]. 应用预防医学, 2020, 26(6): 486-488
- Jun J W, Kim J H, Choresca Jr C H, et al. Isolation, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* in Korean seafood [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2012, 9(3): 224-231
- Kumar B K, Raghunath P, Devegowda D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 244-249
- Messelth äusser U, Colditz J, Th ärigen D, et al. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(3): 360-364
- 董换哲, 苑宁, 张蕴哲, 等. 跨越式滚环等温扩增技术结合 CRISPR/Cas12a 定量检测海产品中的副溶血性弧菌[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 289-295
- 刘小青, 严琼英, 陈国培, 等. RPA 等温扩增技术检测副溶血性弧菌[J]. 食品工业科技, 2020, 41(0): 112-118
- 池信才, 王军, 鄢庆彬, 等. 大黄鱼病原副溶血性弧菌单克隆抗体制备及其应用[J]. 海洋科学, 2007, 31(8): 1-5
- 窦勇, 宁喜斌. 副溶血性弧菌多克隆抗体的制备及其特性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 85-89

- [18] Wang Q, Liu Y, Wang M, et al. A multiplex immunochromatographic test using gold nanoparticles for the rapid and simultaneous detection of four nitrofuran metabolites in fish samples [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(1): 223-233
- [19] 王报贵,王广峰,武晓丽,等.副溶血性弧菌胶体金检测试纸条的改进[J].*食品工业科技*,2014,35(10):57-61,65
- [20] Guo A, Sheng H, Zhang M, et al. Development and evaluation of a colloidal gold immunochromatography strip for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Food [J]. *Journal of Food Quality*, 2012, 35(5): 366-371
- [21] Krizkova S, Nguyen H V, Stanisavljevic M, et al. Microchip Capillary Electrophoresis: Quantum Dots and Paramagnetic Particles for Bacteria Immunoseparation [M]// *Microchip Capillary Electrophoresis Protocols*. Humana Press, New York, NY, 2015: 67-79
- [22] Li Q, Yang Y, Hu F, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 by a fluorescent microsphere-based immunochromatographic assay and immunomagnetic separation [J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 564: 32-39
- [23] Ding C, Li J, Liu X, et al. Development of colloidal gold-based immunochromatographic strip test using two monoclonal antibodies for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Food Safety*, 2018, 38(4): e12468
- [24] Yang H, Li D, He R, et al. A novel quantum dots-based point of care test for syphilis [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2010, 5(5): 875-881
- [25] Lai X H, Liang R L, Liu T C, et al. A fluorescence immunochromatographic assay using europium (III) chelate microparticles for rapid, quantitative and sensitive detection of creatine kinase MB [J]. *Journal of Fluorescence*, 2016, 26(3): 987-996
- [26] Liang R L, Xu X P, Liu T C, et al. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 891: 277-283
- [27] Dilek Ç A M, Öktem H A. Optimizations needed for lateral flow assay for rapid detection of pathogenic *E. coli* [J]. *Turkish Journal of Biology*, 2017, 41(6): 954-968
- [28] Zhang F, Zou M, Chen Y, et al. Lanthanide-labeled immunochromatographic strips for the rapid detection of *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 51: 29-35
- [29] Wang Q, Long M Y, Lv C Y, et al. Lanthanide-labeled fluorescent-nanoparticle immunochromatographic strips enable rapid and quantitative detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples [J]. *Food Control*, 2020, 109: 106894
- [30] Wang X, Huang Y, Wu S, et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* using multicolor time-resolved fluorescence nanoparticles as labels [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 237: 172-179
- [31] 何勇琴,郭桂萍,潘迎捷,等.ELISA 法筛查食源性致病菌特异性抗体的影响因素探讨及其应用 [J]. *免疫学杂志*, 2010,10: 897-901
- [32] 黄锡荣.基于时间分辨微球快速免疫定量分析的肌钙蛋白I检测产品研发[D].广州:华南理工大学,2019
- [33] Hu J, Tang F, Jiang Y Z, et al. Rapid screening and quantitative detection of *Salmonella* using a quantum dot nanobead-based biosensor [J]. *Analyst*, 2020, 145(6): 2184-2190
- [34] Song C, Liu C, Wu S, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the simultaneous detection of *Shigella boydii* and *Escherichia coli* O157: H7 in bread, milk and jelly samples [J]. *Food Control*, 2016, 59: 345-351
- [35] Xue X, Pan J, Xie H, et al. Fluorescence detection of total count of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on water-soluble CdSe quantum dots coupled with bacteria [J]. *Talanta*, 2009, 77(5): 1808-1813
- [36] Li Q, Zhang S, Cai Y, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 52(7): 1559-1566
- [37] Yang H, Li D, He R, et al. A novel quantum dots-based point of care test for syphilis [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2010, 5(5): 875-881