

可视化抗体阵列快速联合检测 大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌

夏俊芳^{1,2} 刘芳³ 刘箐^{4*} 刘雅莉⁵

- (1. 新疆农业大学 食品科学与药学学院 新疆 乌鲁木齐 830052)
- (2. 甘肃农业大学 食品科学与工程学院 甘肃 兰州 730070)
- (3. 甘肃出入境检验检疫局 甘肃 兰州 730020)
- (4. 上海理工大学 医疗器械与食品学院 上海 200093)
- (5. 兰州大学第二医院 甘肃 兰州 730030)

摘要:【目的】建立一种同时快速检测大肠杆菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7)和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)的可视化抗体阵列技术。【方法】将免疫学技术与蛋白芯片技术相结合,基于双抗体夹心法检测原理利用蛋白质芯片技术的高通量,结合可视化结果判定技术,用一份样品,同步检测大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌两种病原。【结果】检测结果肉眼可见,检测周期短至 90 min,纯菌液检测灵敏度达 10^5 CFU/mL,模拟带菌检测灵敏度为 10^6 CFU/mL,与常规的 ELISA 灵敏度等同且具有良好的特异性和重复性。【结论】该可视化抗体阵列检测结果肉眼可见,检测通量高,无需大型设备,操作简便,检测成本低廉,同时为快速检测致病菌提供一种新途径。

关键词: 可视化抗体阵列, 大肠杆菌 O157:H7, 鼠伤寒沙门氏菌

Visual antibody array for rapidly detecting *Escherichia coli* O157:H7 and *Samonella typhimurium*

XIA Jun-Fang^{1,2} LIU Fang³ LIU Qing^{4*} LIU Ya-Li⁵

- (1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)
- (2. Food Science and Engineering College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)
- (3. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou, Gansu 730020, China)
- (4. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)
- (5. Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: [Objective] The visual antibody array for rapidly detecting *Escherichia coli* O157:H7 and *Samonella typhimurium* was built. [Methods] Combined with immunology and protein chip tech-

基金项目: 上海市科委重点支撑项目(No. 13430502400); 国家质检总局科研项目(No. GSCIQ_2010IK220); 甘肃省科技支撑计划项目(No. 1304FKCA056)

*通讯作者: Tel: 86-21-65710368; ✉: liuq@usst.edu.cn

收稿日期: 2013-09-20; 接受日期: 2014-01-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

nology, Based on double antibody sandwich assay principle. Used high-throughput protein chip and visualization technology, the method for simultaneous detecting *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* has been selected, and only one sample was used. **[Results]** The test results could be visible to the naked eye, the detection of time was as short as 90 min. The sensitivity of pure broth was 10^5 CFU/mL and artificially contaminated food was 10^6 CFU/mL. The sensitivity was coincided with conventional ELISA and had good detection specificity and repeatability. **[Conclusion]** The visual antibody array could be examined by naked eye, which owned high-throughput detection, easy operation, low cost of detection and didn't need large equipment. The study showed a satisfactory prospect and provided a new rapid assay for detection of Pathogenic microorganisms.

Keywords: Visual antibody array, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*

大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7) 和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)已成为世界公认的引起食源性疾病的重要致病菌。大肠杆菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7)属于肠杆菌科埃希氏菌属,它是肠出血性大肠杆菌的主要血清型,是一种常见的、重要的人畜共患致病菌,通过食物传播能引起人的出血性肠炎、腹泻、溶血性尿路综合症^[1-3]。它的感染剂量非常低,随食品摄入不足 10 个细菌就可能致病^[4]。自 1982 年美国首次发生由大肠杆菌 O157:H7 引起的食物中毒暴发以来,欧美各国、日本等国家先后多次发生由此菌引发的中毒事件:1996 年,在日本发生了大肠杆菌 O157:H7 的暴发流行,患者达 9 500 余人,死亡 11 人,引起了全世界的关注^[5]。2000 年,加拿大安大略省沃克顿镇的农场暴发的大肠杆菌 O157:H7 感染性腹泻是因水源被牛粪污染所致^[6];2006 年美国菠菜被大肠杆菌 O157:H7 污染事件,波及 26 个州,共有 200 余人染病,其中 3 人死亡^[7];2011 年 7 月,美国遭受大肠杆菌 O157:H7 侵袭,造成至少 16 人感染,其中一名被感染的老妇因肾衰竭死亡,感染源头是俄勒冈州一个农场的草莓,这是美国首次在草莓中发现该菌^[8]。我国受到该菌的威胁也越来越大,自 1987 年首次分离到该菌后相继发现大肠杆菌 O157:H7 引起的感染:1999 年在我国东部地区发生了由该菌引起的一起较大规模的暴发疫情,病例主要发生在广大农村地区,50 岁以上患者占发病总数的 85.6%,女性多于男性,疫区家禽家畜携带病菌非常普遍。主要危险因素为不良的个人卫生习惯和恶劣的家庭生活环境。2000 年春夏两季上

述地区又发生疫情,并且范围扩大到西部的中原地区,甚至在东北、华北及华东少数地区也发生散发的大肠杆菌 O157:H7 感染^[9-11]。近年来在多个省市的多个食品中都检测到该菌^[12-14]。这表明我国随时有食源性大肠杆菌 O157:H7 感染暴发的危险性。因此,建立快速准确灵敏的检测大肠杆菌 O157:H7 的方法用于食品检测、食物中毒调查研究及预防控制具有重要意义。

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)可以导致人畜患病,其感染发病率居沙门氏菌感染的首位。患者染病后的临床表现主要包括头痛、恶心、腹痛、呕吐、腹泻和发热等。鼠伤寒沙门氏菌常被作为沙门氏菌病研究的模式菌^[15]。该菌在东欧、美国、中非、南美均居食物中毒病例的首位,据世界卫生组织调查美国每年发生鼠伤寒沙门氏菌感染占沙门氏菌属感染的 27.7%,匈牙利、芬兰的鼠伤寒沙门氏菌感染暴发病例分别为 1/3 和 2/3,东南亚几个国家流行也较广泛^[16]。美国疾病预防控制中心发表的新闻公报称 2008 年 9 月至 2009 年 1 月,美国共有 43 个州发现食用鼠伤寒沙门菌污染花生酱导致的疫情,染病人数达 410 人,并有 3 人被怀疑在感染沙门氏菌后死亡^[17]。可见,为降低沙门氏菌食物中毒发生率更应针对鼠伤寒沙门氏菌采取有效地检测和防治措施。

目前对于这两种菌株的主要检测方法有:传统生物学培养、PCR、ELISA、全自动鉴定系统、基因芯片技术^[18]等,以上检测技术存在检测周期长、成本高、灵敏度低、操作繁琐等问题,且除去基因芯片技术、多重 PCR 技术^[19-25]、双抗体夹心 ELISA

以外,其余方法只能进行单独检测,但食品往往存在同时感染多个致病菌的现象。而基因芯片技术、多重 PCR 技术都需要昂贵的设备,同时也需要会核酸提取、分子标记以及数据采集阵列扫描的专业人士来完成,无法满足基层实验室对于便携、低廉、简单的需要。因此建立一种可以同时快速、灵敏、特异地针对上述两种病原的联合检测方法显得尤为重要。

本研究选取分别针对这两种病原的特异性捕获抗体,以宏阵列模式固定在硝酸纤维素膜基片上,建立了大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌抗体阵列。采用双抗体夹心法原理,致病菌经过单克隆、多克隆两种抗体的识别,保证了检测结果的准确性和灵敏度,并且检测周期短,检测通量高,一次实验同时检测两种病原,无需大型设备判读,结果肉眼可见。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

本实验所用的标准菌株见表 1,硝酸纤维素膜(孔径 0.22 μm),Solarbio 公司;增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体(货号 ab20976),Abcam 公司;HRP-标记的多克隆大肠杆菌抗体(货

号 ab68450),Abcam 公司;鼠伤寒沙门氏菌单克隆抗体(货号 3G12D5G7E3),ProMab 公司;HRP-标记的多克隆沙门氏菌抗体(货号 ab20771),Abcam 公司。阳性质控:辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(货号 ZB2301),中杉金桥;可溶性单组分 TMB 底物溶液,天根生化科技(北京)有限公司;Spectra Max Plus 384 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Well Wash AC,芬兰 Thermoubsystem 公司。

1.2 方法

1.2.1 梯度菌液的制备:大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌标准菌株分别用营养肉汤 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 倍比稀释,平板计数确定细菌悬液浓度。大肠杆菌 O157:H7 原菌液平均浓度是 6.32×10^8 CFU/mL,相应的梯度菌液分别为 6.2×10^1 – 6.2×10^8 CFU/mL。鼠伤寒沙门氏菌原菌液平均浓度是 9.8×10^8 CFU/mL,相应的梯度菌液分别为 9.8×10^1 – 9.8×10^8 CFU/mL。实验采用的食品样品(牛奶、果汁、酸奶、雪糕、香肠)均按国标法检测证实不含有大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌,分别取 25 g 样品加入 225 mL 磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.2, 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液)然后将不同浓度的大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌分别混匀到样品匀浆中,进行模拟带菌,模拟带菌的浓度依次为 10^7 – 10^0 CFU/mL。

表 1 12 株食源性致病菌标准菌株
Table 1 Twelve kinds of standard strains

菌株名称 Strain names	来源 Sources
单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC43251
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	CICC22956
肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC13076
猪霍乱沙门氏菌 <i>Salmonella choleraesuis</i>	CICC21493
副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802
小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC23715
福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022
宋内氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931
乙型溶血性链球菌 <i>Streptococcus hemolyticus</i> β	ATCC10373
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cencus</i>	ATCC 11778
痢疾志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	珠海出入境检验检疫局
大肠杆菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	珠海出入境检验检疫局

1.2.2 可视化抗体阵列的构建:将硝酸纤维素膜裁成适当大小(1.0 cm×1.0 cm),以碳酸盐点样缓冲液稀释抗体,大肠杆菌 O157:H7 捕获抗体(图 1, E 点)工作浓度 0.18 g/L,鼠伤寒沙门氏菌捕获抗体(图 1, S 点)工作浓度 0.2 g/L,同时以辣根过氧化物酶标记的 IgG 为阳性对照(图 1, P 点),点样缓冲液为阴性对照(图 1, N 点)。在膜表面,按阳性对照、捕获抗体、阴性对照自左向右的顺序,各 4 个重复,依次点样。4 °C 固定 24 h,4 °C 保存。

1.2.3 可视化抗体阵列反应过程:取点样保存的抗体阵列置于杂交盒中,将 300–500 μL 检测样品加入杂交盒中。室温下与阵列 60 r/min 水平振荡 30 min。反应完毕后,小心弃去样品液,用 300–500 μL 1×PBST、80 r/min 振荡洗涤 3 次,每次 1 min。取 100–300 μL 的检测抗体稀释缓冲液,加入杂交盒中与阵列孵育 30 min。若样品液中含特定目标抗原,此时抗体阵列表面将形成特异性的“捕获抗体-抗原-检测抗体”夹心复合物。反应完毕后,小心弃去抗体液,以 300–500 μL 1×PBST、80 r/min 振荡洗涤 3 次,每次 1 min。配好辣根过氧化物酶显色液(现配现用),加于阵列表面室温避光孵育 5–15 min,ddH₂O 洗涤终止反应,晾干保存结果。

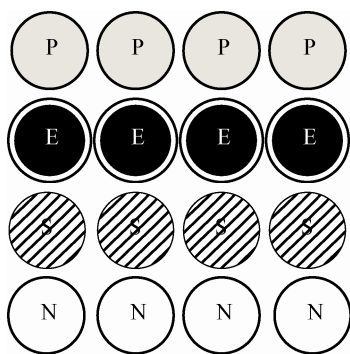


图 1 可视化抗体阵列点样示意图

Figure 1 Schematic diagram of visual antibody array design

注: P: 阳性对照; E: 大肠杆菌 O157:H7 的特异性捕获抗体; S: 鼠伤寒沙门氏菌的特异性捕获抗体; N: 阴性对照。碳酸盐缓冲液。

Note: P: Positive control; E: Specific capture antibodies of *E. coli* O157:H7; S: Specific capture antibodies of *Salmonella typhimurium*; N: Negative control.

1.2.4 可视化抗体阵列特异性验证:将抗体阵列按 1.2.3 法,分别与 300 μL 表 1 中 12 种常见食源性致病菌制备成 10^7 CFU/mL 菌悬液,以抗体阵列检测上述菌液,测试其对大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌的特异性检测能力。以上实验重复 3 次,以验证阵列检测的稳定性。

1.2.5 可视化抗体阵列灵敏度测试:实验的反应液分为 3 组:第 1 组,以大肠杆菌 O157:H7 梯度菌液(6.2×10^8 – 6.2×10^4 CFU/mL)为反应液;第 2 组,以鼠伤寒沙门氏菌梯度菌液(9.8×10^8 – 9.8×10^4 CFU/mL)为反应液;第 3 组,以大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌对半混合菌液(10^8 – 10^4 CFU/mL)为反应液。按 1.2.3 反应。以上实验重复 3 次,以验证阵列检测的稳定性。

1.2.6 梯度纯菌液 ELISA 灵敏度检测:按双抗体夹心法 ELISA 法推荐流程(一抗 4 °C 过夜包被, PBST 洗涤 3 次,加入梯度抗原,37 °C 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的二抗 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, TMB 显色, 450 nm 读数。

1.2.7 五种食品模拟带菌抗体阵列检测与 ELISA 检测对比:按 1.2.1 法分别制备大肠杆菌 O157:H7 模拟带菌梯度菌液和鼠伤寒沙门氏菌模拟带菌梯度菌液,对模拟梯度菌液食品样品不进行前增菌以可视化抗体阵列(图 1)和 ELISA 方法同时检测(见表 2–5),对比两种方法在检测实际食品样品方面的差异及两种方法的灵敏度,评估可视化抗体阵列用于实际食品样品检测的前景。

2 结果与分析

2.1 可视化抗体阵列的特异性验证

按图 1 点至抗体阵列若干块。将表 1 中 12 种常见食源性致病菌复苏制备成 10^7 CFU/mL 菌悬液,按 1.2.3 步骤检测上述菌液,测试其特异性检测能力。

测试结果如图 2 所示,在分别对大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌菌悬液的检测中,在相应地捕获抗体处显色点样点清晰,为阳性信号

(图 2A、B); 在含鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O157:H7 的混合菌液中显色点清晰可辨, 为阳性信号(图 2C), 而在对其余 11 种菌悬液的检测中, 检测点都未显色, 检测结果为阴性[图 2D-M]; 尤其对沙门氏菌的鉴定中, 对肠炎沙门和猪霍乱沙门的检测都为阴性。以 PBS 为检测样品的阴性对照实验, 抗体阵列检测点未显色(图 2N), 显示出可视化联检抗体阵列的良好特异性。

2.2 可视化抗体阵列灵敏度测试

可视化抗体阵列的检测结果如图 3 所示, 以普通平板扫描仪获取检测结果灰度图, 利用 ImageJ 软件分析灰度。同时以单独检测大肠杆菌 O157:H7 (6.2×10^8 CFU/mL)、单独检测鼠伤寒沙门氏菌 (9.8×10^8 CFU/mL) 及二病原菌对半混合的 3 份菌液为反应液对抗体阵列结果扫描灰度值作图 4。由

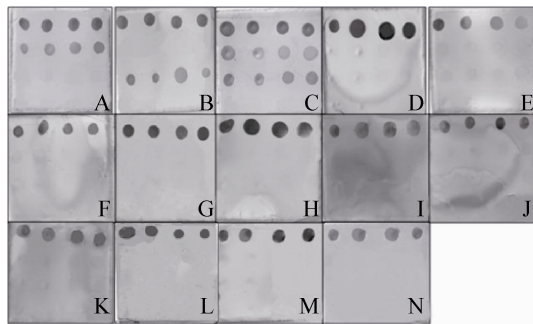


图 2 可视化抗体阵列的特异性测试结果

Figure 2 Results of specificity test by visual antibody array

注: A: 大肠杆菌 O157:H7; B: 鼠伤寒沙门氏菌(CICC 22956); C: 大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌(CICC 22956)混合液; D: 猪霍乱沙门氏菌(CICC 21493); E: 肠炎沙门氏菌(ATCC 13076); F: 单核细胞增生李斯特菌(ATCC 43251); G: 副溶血性弧菌(ATCC 17802); H: 蜡样芽胞杆菌(ATCC 11778); I: 痢疾志贺氏菌; J: 宋内氏志贺氏菌(ATCC 25931); K: 福氏志贺氏菌(ATCC 12022); L: 乙型溶血性链球菌(ATCC10373); M: 小肠结肠炎耶尔森氏菌(ATCC 23715); N: 阴性对照。

Note: A: *E. coli* O157:H7; B: *Salmonella typhimurium* (CICC 22956); C: *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* (CICC 22956); D: *Salmonella choleraesuis* (CICC 21493); E: *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076); F: *Listeria monocytogenes* (ATCC 43251); G: *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802); H: *Bacillus cereus* (ATCC 11778); I: *Shigella dysenteriae*; J: *Shigella sonnei* (ATCC 25931); K: *Shigella Flexneri* (ATCC 12022); L: *Streptococcus hemolyticus* β (ATCC 10373); M: *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715); N: Negative control.

图 3 可知被检菌液只有大肠杆菌 O157:H7 时, 大肠杆菌 O157:H7 抗体处样点清晰可辨; 当被检菌液只有鼠伤寒沙门氏菌时, 鼠伤寒沙门氏菌抗体处样点清晰可辨; 当被检测样品含有二者菌液时, 大肠杆菌 O157:H7 处抗体信号及鼠伤寒沙门氏菌抗体信号样点清晰可辨。表明此抗体阵列既可以单独检测大肠杆菌 O157:H7 及鼠伤寒沙门氏菌, 又可以同时检测二者病原菌液, 检测灵敏度为 10^5 CFU/mL。

由图 4 可知抗体阵列检测两种混合菌液大肠杆菌 O157:H7 的检测信号灰度值(校正值)高于单独检测大肠杆菌 O157:H7 信号强度, 而鼠伤寒沙门氏菌则相反, 这可能是由于过高的菌浓度引起的非特异结合, 导致抗体阵列信噪比及最终的校正信号下降。

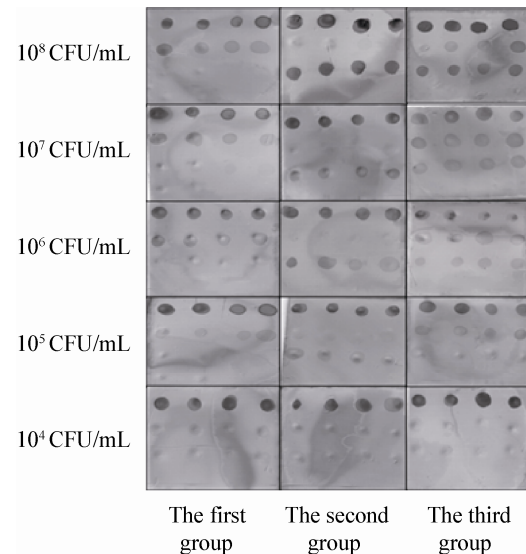


图 3 可视化抗体阵列的梯度菌液测试结果

Figure 3 Detection results of diluted bacterial suspensions by visual antibody array

注: 实验的反应液分为 3 组; 第 1 组: 以大肠杆菌 O157:H7 梯度菌液(6.2×10^8 – 6.2×10^4 CFU/mL)为反应液; 第 2 组: 以鼠伤寒沙门氏菌梯度菌液(9.8×10^8 – 9.8×10^4 CFU/mL)为反应液; 第 3 组: 以大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌对半混合菌液(10^8 – 10^4 CFU/mL)为反应液。

Note: The reaction solution divided into three groups: The first group react with *E. coli* O157:H7 (6.2×10^8 – 6.2×10^4 CFU/mL) suspension; The second group react with *Salmonella typhimurium* (9.8×10^8 – 9.8×10^4 CFU/mL) suspension; The third group react with (10^8 – 10^4 CFU/mL) *E. coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* suspension.

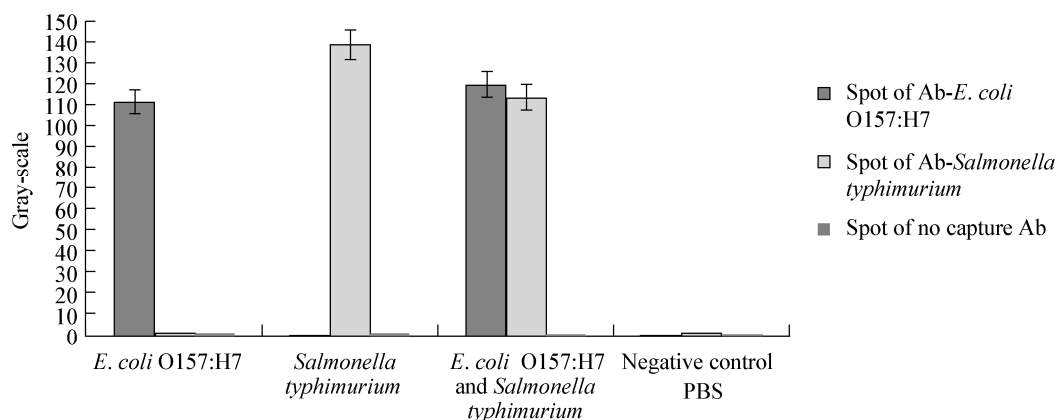


图4 可视化抗体阵列灰度分析结果

Figure 4 Analysis of visual antibody array gray-scale

注: 单独检测大肠杆菌 O157:H7: 6.2×10^8 CFU/mL; 单独检测鼠伤寒沙门氏菌: 9.8×10^8 CFU/mL; 二病原菌对半混合菌液为反应液: 10^8-10^4 CFU/mL; PBS: 阴性对照。

Note: React with *E. coli* O157:H7 suspension: 6.2×10^8 CFU/mL; React with *Salmonella typhimurium* suspension: 9.8×10^8 CFU/mL; React with *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* suspension: 10^8-10^4 CFU/mL; PBS: Negative control.

2.3 可视化抗体阵列纯菌液检测灵敏度和 ELISA 检测灵敏度对比

为对比可视化抗体阵列、ELISA 两种方法在检测灵敏度方面的差异, 按图 1 点至抗体阵列若干块。分别以大肠杆菌 O157:H7 梯度菌液 ($6.2 \times 10^8-6.2 \times 10^4$ CFU/mL) 和鼠伤寒沙门氏菌梯度菌液 ($9.8 \times 10^8-9.8 \times 10^4$ CFU/mL) 为反应液。同时以上述梯度菌液, 按 1.2.6 节 ELISA 标准流程检测, 酶标仪读取 OD_{450} 结果 (加样孔内吸光值 \geq 临界值判定为阳性结果, 见表 3、5)。

以梯度菌液为横坐标, 同时以经归一化校正

后的检测灰度值和 ELISA 的 OD 值为纵坐标, 绘制双 Y 轴对比曲线。两种方法的对比见图 5, 在对两种菌液单独检测时, 可视化抗体阵列的检测灵敏度与 ELISA 灵敏度一致, 都达到 10^5 CFU/mL; 而可视化抗体阵列整个检测时间为 90 min, 双抗体夹心法 ELISA 至少需 3 h, 表明可视化抗体阵列更为快速便携; 可视化抗体阵列整体灵敏度变化趋势与 ELISA 变化的趋势基本吻合: 随着菌液浓度的下降, 检测灰度值呈现逐渐降低的趋势, 说明可视化抗体阵列用于定量分析的可能。

表 2 ELISA 法在大肠杆菌 O157:H7 临界值确定
Table 2 The thresholds of *E. coli* O157:H7 by ELISA

ELISA 实验结果(OD 值) ELISA (OD)	阳性质控 Positive control	阴性质控 Negative control	空白 Blank	临界值 Thresholds
1	0.792 4	0.079 4	0.064 3	
2	0.814 5	0.077 9	0.074 6	0.225 8
3	0.807 2	0.070 0	0.061 7	

表3 ELISA法在大肠杆菌 O157:H7 纯菌液及食品模拟带菌灵敏度
Table 3 The sensitivity of *E. coli* O157:H7 by ELISA

ELISA 实验结果(OD 值) ELISA (OD)	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
纯菌液 Pure broth								
1	0.824 5	0.753 8	0.612 6	0.365 1	0.152 2	0.103 7	0.075 4	0.068 9
2	0.790 4	0.731 2	0.609 5	0.360 1	0.145 0	0.129 2	0.066 9	0.070 0
3	0.797 2	0.750 7	0.593 3	0.362 2	0.143 2	0.130 8	0.065 3	0.074 6
判定结果 Results	+	+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌雪糕 Artificially contaminated ice cream								
1		0.688 4	0.588 8	0.418 2	0.152 5	0.080 6	0.068 9	0.062 1
2		0.681 6	0.581 0	0.412 6	0.157 7	0.071 7	0.067 1	0.065 2
3		0.701 1	0.578 2	0.405 3	0.146 4	0.067 0	0.070 0	0.074 8
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌酸奶 Artificially contaminated yogurt								
1		0.680 6	0.621 6	0.398 1	0.079 1	0.083 1	0.073 0	0.067 0
2		0.673 6	0.598 8	0.401 1	0.077 0	0.081 7	0.074 3	0.079 4
3		0.656 5	0.571 1	0.387 5	0.091 0	0.072 0	0.075 1	0.071 9
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌果汁 Artificially contaminated juice								
1		0.716 4	0.495 0	0.356 7	0.156 1	0.077 7	0.062 4	0.067 0
2		0.694 4	0.512 0	0.358 7	0.149 5	0.072 5	0.083 8	0.071 8
3		0.683 4	0.527 0	0.356 8	0.133 1	0.070 5	0.074 2	0.062 1
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌牛奶 Artificially contaminated milk								
1		0.675 0	0.481 2	0.410 8	0.131 1	0.083 8	0.062 3	0.069
2		0.710 9	0.473 3	0.405 4	0.143 1	0.074 9	0.079 5	0.067
3		0.720 0	0.476 9	0.397 7	0.158 2	0.079 9	0.074 3	0.071
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌香肠 Artificially contaminated sausage								
1		0.777 2	0.633 9	0.356 7	0.155 0	0.092 0	0.080 6	0.079 4
2		0.790 4	0.615 9	0.358 9	0.141 8	0.104 5	0.073 2	0.071 9
3		0.735 3	0.604 9	0.356 8	0.150 5	0.093 0	0.069 0	0.067 0
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-

注: +: 阳性结果, ELISA 法 OD_{450} 加样孔内吸光值 \geq 临界值判定为阳性结果。

Note: +: When OD_{450} of ELISA exceed thresholds, the results can be judged positive.

表 4 ELISA 法在鼠伤寒沙门氏菌临界值确定

Table 4 The thresholds of *Salmonella typhimurium* by ELISA

ELISA 实验结果(OD 值) ELISA (OD)	阳性质控 Positive control	阴性质控 Negative control	空白 Blank	临界值 Thresholds
1	0.781 4	0.071 9	0.056 8	
2	0.816 8	0.071 1	0.056 1	0.221 0
3	0.809 1	0.070 1	0.057 8	

表 5 ELISA 法在鼠伤寒沙门氏菌纯菌液及食品模拟带菌灵敏度

Table 5 The sensitivity of *Salmonella typhimurium* by ELISA

ELISA 实验结果(OD 值) ELISA (OD)	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
纯菌液 Pure broth								
1	0.814 5	0.761 1	0.601 3	0.445 4	0.233 1	0.111 6	0.090 4	0.092 0
2	0.876 9	0.759 1	0.607 6	0.448 3	0.135 6	0.122 4	0.084 6	0.089 4
3	0.818 0	0.780 1	0.599 2	0.428 1	0.121 6	0.132 2	0.087 6	0.086 8
判定结果 Results	+	+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌雪糕 Artificially contaminated ice cream								
1		0.755 7	0.543 9	0.230 2	0.119 8	0.106 3	0.070 3	0.084 8
2		0.743 7	0.546 7	0.216 5	0.111 7	0.093 3	0.070 9	0.071 1
3		0.801 1	0.579 2	0.207 6	0.110 8	0.092 4	0.077 3	0.096 4
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌酸奶 Artificially contaminated yogurt								
1		0.745 1	0.541 2	0.301 1	0.102 9	0.093 3	0.070 3	0.076 6
2		0.747 6	0.557 1	0.287 6	0.099 7	0.092 4	0.077 3	0.080 3
3		0.753 6	0.547 6	0.296 5	0.106 3	0.096 6	0.082 4	0.079 7
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌果汁 Artificially contaminated juice								
1		0.683 9	0.550 0	0.247 1	0.117 7	0.088 8	0.084 6	0.099 7
2		0.750 5	0.543 7	0.257 3	0.119 0	0.082 9	0.086 1	0.086 0
3		0.751 0	0.555 7	0.233 8	0.119 7	0.091 8	0.090 6	0.085 7
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌牛奶 Artificially contaminated milk								
1		0.603 8	0.456 5	0.307 2	0.109 1	0.086 0	0.102 7	0.097 3
2		0.595 9	0.451 0	0.297 3	0.093 9	0.085 7	0.098 2	0.103 3
3		0.612 2	0.454 4	0.283 8	0.103 6	0.096 4	0.100 5	0.103 7
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-
模拟带菌香肠 Artificially contaminated sausage								
1		0.769 1	0.462 0	0.245 9	0.107 9	0.091 7	0.081 0	0.070 1
2		0.685 9	0.466 5	0.258 1	0.106 1	0.086 0	0.083 0	0.074 8
3		0.747 7	0.458 1	0.257 1	0.104 1	0.071 1	0.086 4	0.080 6
判定结果 Results		+	+	+	-	-	-	-

注: +: 阳性结果, ELISA 法 OD_{450} 加样孔内吸光值 \geq 临界值判定为阳性结果。

Note: +: When OD_{450} of ELISA exceed thresholds, the results can be judged positive.

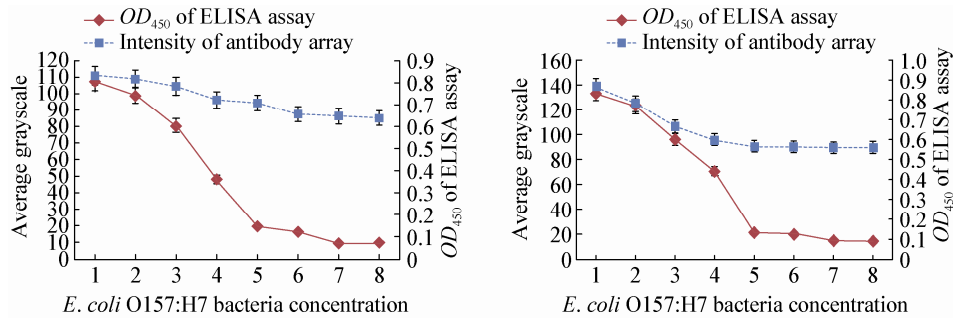


图5 可视化抗体阵列与 ELISA 检测纯菌液灵敏度比较

Figure 5 The sensitivity of pure broth compared visual antibody array with ELISA

Note: 1-8: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 CFU/mL.

2.4 可视化抗体阵列模拟带菌检测和 ELISA 检测灵敏度对比

从图 6 的这组结果中可以看到无论是单独检测还是混合检测样品, 可视化抗体阵列都能准确、特异地检测到这两种病原, 灵敏度都达到 10^6 CFU/mL, 若在实际检测中对样品进行前增菌步骤, 以增加污染菌数到检测水平, 便可使用可视化抗体阵列进行快速检测。同时以梯度菌液为横坐标, 以经归一化校正后的检测灰度值和 ELISA 的 OD 值为纵坐标, 绘制双 Y 轴对比曲线, 见图 7。可视化抗体阵列单独检测大肠杆菌 O157:H7 及鼠

伤寒沙门氏菌模拟带菌食品(牛奶、香肠、雪糕、酸奶)的检测灵敏度(10^6 CFU/mL)比 ELISA 灵敏度(10^5 CFU/mL)低一个数量级; 可能是因为食品中的脂肪含量影响了灵敏度, 而对于果汁的检测可视化抗体阵列灵敏度与 ELISA 灵敏度一致, 达 10^5 CFU/mL, 更说明对与复杂的食品样本进行前处理对于提高灵敏度的重要性。可视化抗体阵列结果随着菌液浓度的下降, 检测灰度值呈现逐渐降低的趋势, 这与 ELISA 检测结果的的变化趋势基本吻合, 说明可视化抗体阵列用于定量分析的可能, 显示可视化抗体阵列的实用前景。

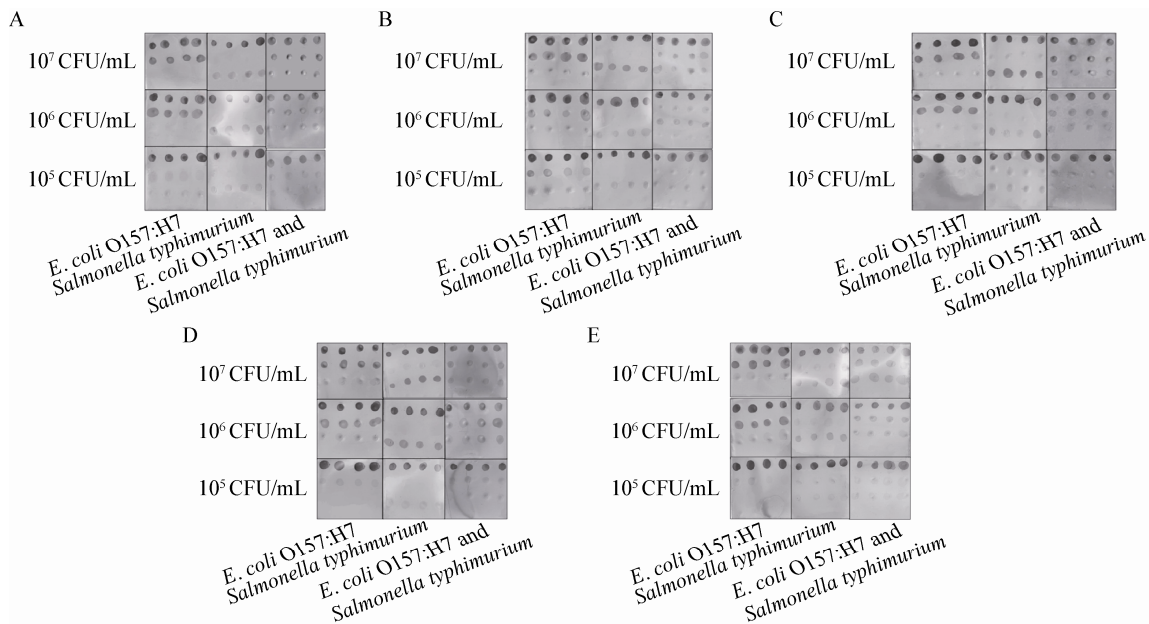
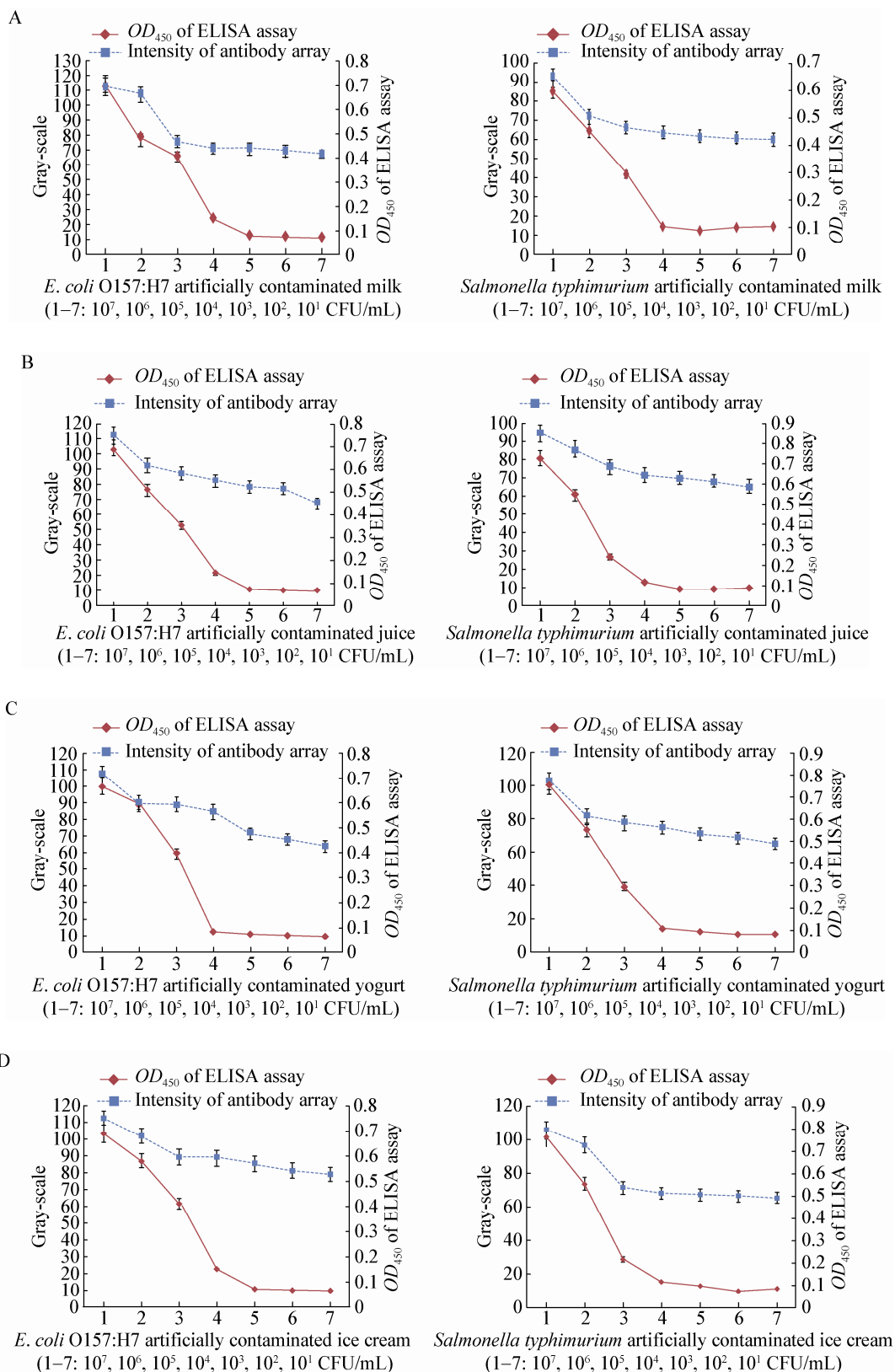


图6 模拟带菌可视化抗体阵列检测的灵敏度

Figure 6 The sensitivity of artificially contaminated food by visual antibody array

注: A: 模拟带菌牛奶; B: 模拟带菌果汁; C: 模拟带菌酸奶; D: 模拟带菌雪糕; E: 模拟带菌香肠。

Note: A: Artificially contaminated milk reaction solution; B: Artificially contaminated juice reaction solution; C: Artificially contaminated yogurt reaction solution; D: Artificially contaminated ice cream reaction solution; E: Artificially contaminated sausage reaction solution.



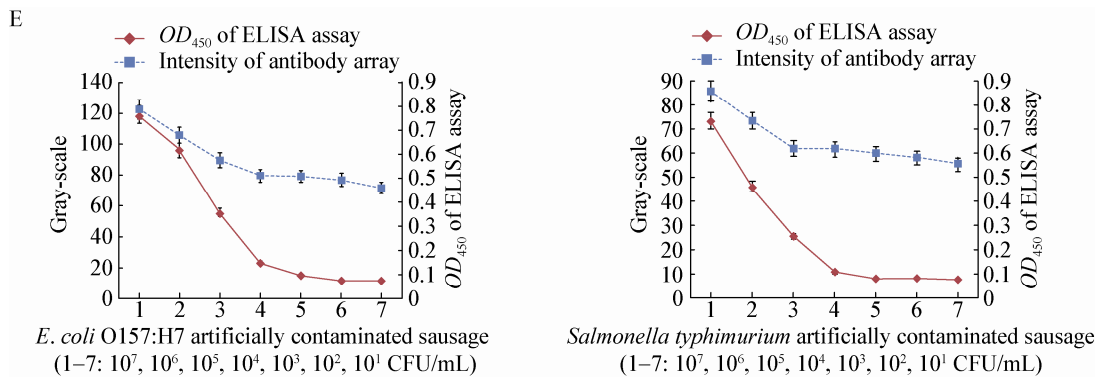


图7 可视化抗体阵列与ELISA检测模拟带菌样品灵敏度比较
Figure 7 The sensitivity of artificially contaminated food compared visual antibody array with ELISA

3 讨论

本研究以硝酸纤维素膜为基片,依据双抗体夹心法原理,制备了大肠杆菌 O157:H7 及鼠伤寒沙门氏菌可视化抗体阵列。结果显示具有良好的特异性,与其他常见食源性致病菌均无交叉反应;模拟带菌结果良好,其检出限为 10^5 – 10^6 CFU/mL,灵敏度与 ELISA 技术相当^[26],达到甚至高于同类产品(Nitsara 等^[27]利用聚-L-赖氨酸修饰的玻璃基片同时检测大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌抗体芯片,其检测大肠杆菌 O157:H7 灵敏度达 10^5 – 10^6 CFU/mL,沙门氏菌灵敏度达 10^6 – 10^7 CFU/mL)。与传统 ELISA 相比,可视化抗体阵列耗时仅为 ELISA 的一半甚至更少,并且操作简便快捷,无需特殊设备,对实验人员要求低,适合基层实验室进行快速高通量样品筛查。

尽管本研究利用可视化抗体阵列进行食源性致病菌检测取得了一定进展,但在实验过程中,也发现了可视化抗体阵列进行致病菌检测遇到的问题:(1)在可视化抗体阵列特异性验证中,因实验室没有大肠杆菌的其他标准菌株,未做大肠杆菌属其它种的验证试验,在后续实验中应补充相关数据。(2)在实验中抗体阵列的点制是纯手工点制,样点大小不是很匀,在未来可以利用点样仪进行点制,这样更为节省抗体用量,使得捕获的抗体样点匀称,节省成本、劳力。在检测时只需进行加样,大大缩短检测时间。(3)本实验对于纯菌液检测灵

敏度为 10^5 CFU/mL,而在模拟带菌样品中的检测灵敏度为 10^6 CFU/mL,所以在实际检测中可增加增菌环节,使目标菌大量增殖后使用可视化抗体阵列进行快速定性检测。(4)在实验中发现可视化抗体阵列结果随着菌液浓度的下降,检测灰度值呈现逐渐降低的趋势,说明可视化抗体阵列用于定量分析的可能,后续实验可以探讨将高通量的可视化抗体阵列运用于单样品多指标食源性致病菌快速定量检测中去。

抗体阵列是指将抗体固定在基片上检测抗原的蛋白芯片,目前主要用于各种病原物的检测^[28-31]。可视化抗体阵列用于食源性致病菌的检测快速、低廉、检测时间短,相对传统免疫学方法,可视化抗体阵列以更短的检测时间、更少的抗体消耗、更简单易掌握的操作,达到了与传统方法基本等同的病原检测能力。同时有传统方法不可代替的同时检测的优势,显示了其在食品安全领域的优势前景。目前制约可视化抗体阵列发展的主要因素是特异地、高效地捕获抗体。伴随着抗体技术的进步,会有大量特异、高效的抗体问世,基于此可视化抗体阵列的原理、技术路线,在未来可以研发出用于多种食源性致病菌同时检测的可视化抗体阵列,发挥其高通量、快速检测的优势,以满足社会发展对食品安全检测的需求。

参考文献

- [1] Van Dyck M, Proesmans W, Depraetere M. Hemolytic uremic syndrome in childhood: renal function ten years

- later[J]. *Clinical Nephrology*, 1988, 29(3): 109-112.
- [2] Tuttle J, Gomez T, Doyle P, et al. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties[J]. *Epidemiol Infect*, 1999, 122(2): 185-192.
- [3] Karmalim A, Pereic M, Lim C, et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Infectious Diseases*, 1985, 151(5): 775-782.
- [4] Ony J, Zhe L, Robins R, et al. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* serotype O157:H7 in children with diarrhoea attending sydney hospital[J]. *Paediatr Child Health*, 1993, 29(3): 185-187.
- [5] 徐志洪. 日本 O157 大肠杆菌感染流行因素分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 1997, 20(1): 60-61.
- [6] Krewski D. Managing health risks from drinking water—a report to the Walkerton inquiry[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 2002, 65(21): 1635-1823.
- [7] 王志刚, 黄棋, 陈岳. 美国“毒菠菜”事件始末及其对中国食品安全的启示[J]. 世界农业, 2008(4): 26-28.
- [8] 孟祥升, 辛崇兴, 邵晔, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测方法综述[J]. 中国畜牧业, 2012(1): 76-78.
- [9] 吴永宁. 现代食品安全科学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [10] 李洪卫, 景怀琦, 逢波, 等. 徐州市 2000 年肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染性腹泻的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 23(2): 119-122.
- [11] 倪大新, 汪华, 顾玲, 等. 江苏省 1999 年大肠埃希菌 O157:H7 宿主动物带菌情况调查[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 3(2): 102-104.
- [12] 张芳, 马国柱, 潘立, 等. 陕西省 O157 出血性大肠杆菌分布研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(9): 796-800.
- [13] 王红, 李秀桂, 唐振柱, 等. 2002-2004 年广西食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的监测分析[J]. 广西预防医学, 2005, 11(5): 286-287.
- [14] 增毅, 林建燕, 黄世美, 等. 2008-2012 年南宁市肠出血性大肠杆菌 O157:H7 监测结果[J]. 职业与健康, 2013, 29(14): 1748-1749.
- [15] 张成栋. I 型菌毛介导鼠伤寒沙门氏菌对小鼠的毒力及对抗原递呈细胞侵袭力的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2009.
- [16] 王玉兰, 高杰谦, 王燕. 鼠伤寒沙门氏菌食物中毒后追踪调查研究[J]. 河南预防医学杂志, 1992, 3(2): 67-70.
- [17] 任海军. 美“花生酱”事件愈演愈烈[N]. 新华每日电讯, 2009-1-20.
- [18] 高爽. 运用寡核苷酸芯片鉴定检测食源性致病菌技术的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学硕士学位论文, 2006.
- [19] 牟恺, 陈智, 王春民, 等. 同时检测四种病原菌的 PCR 方法研究[J]. 山东农业大学学报, 2010, 41(2): 253-257.
- [20] 杨军, 张弛, 刘新梅. 多重 PCR 法对乳制品中 3 种致病菌的同时快速检测[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(4): 50-53.
- [21] 徐伟, 刘军, 李素芳. 单增李斯特菌与致贺氏菌多重 PCR 检测技术的建立[J]. 中国食品学报, 2009, 2(1): 201-207.
- [22] 李博, 陈福生, 王小红, 等. 多重 PCR 检测食品中的金黄色葡萄球菌、志贺菌和沙门氏菌[J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 438-442.
- [23] 许一平, 成炜, 邵彦春, 等. 沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测[J]. 微生物通报, 2006, 33(6): 89-94.
- [24] Li Y, Zhuang S, Mustapha A. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products[J]. *Meat Science*, 2005, 71(2): 402-406.
- [25] Wolffs PF, Glencross K, Norling B, et al. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(1): 50-54.
- [26] 葛萃萃, 钟青萍, 张旺, 等. 双抗夹心 ELISA 检测食品中大肠杆菌 O157:H7 方法研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 171-175.
- [27] Nitsara K, Rattaphol C, Umaporn U, et al. Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(6): 1641-1648.
- [28] Tang JF, Xu ZH, Zhou L, et al. Rapid and simultaneous detection of *Ureaplasma parvum* and *Chlamydia trachomatis* antibodies based on visual protein microarray using gold nanoparticles and silver enhancement[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010, 67(2): 122-128.
- [29] Xiong LB, Gao LP, Lin Q, et al. A simple, rapid and visual antibody array for the simultaneous detection of multiple plant pathogen[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5: 2413-2418.
- [30] 熊亮斌, 刘箐, 王天昌, 等. 改良 DAS-Dot-Elisa 检测西瓜细菌性果斑病菌[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1551-1556.
- [31] Huang RP, Huang RC, Fan Y, et al. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody based protein array system[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 294(1): 55-62.