

[研究简报]

# 化学发光磁酶免疫法检测 O157: H7 大肠埃希菌

朱广华<sup>1</sup>, 贺艳峰<sup>1</sup>, 郭小英<sup>2</sup>, 刘和平<sup>3</sup>

(1. 东南大学公共卫生学院, 南京 210009; 2. 东南大学生物科学与医学工程系分子电子学国家重点实验室, 南京 210096; 3. 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

**关键词** 免疫分析; 化学发光; 磁性微球; 大肠埃希菌

**中图分类号** O657.39

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)08-1453-03

O157: H7 大肠埃希菌是一种致病力非常强的微生物. 近年来, 陆续有其引起食物中毒事件的报道. 1996 年日本发生 O157: H7 大肠埃希菌食物中毒的爆发流行, 感染病例逾万人, 死亡 9 例. 2001 年我国江苏及安徽等地也发生了肠出血性 O157: H7 大肠埃希菌所引发的感染性腹泻事件.

目前 O157: H7 大肠埃希菌实验室常规检测方法为分离培养计数法, 此法费时费力, 需要几天的时间才能得到检测结果<sup>[1,2]</sup>, 缺乏应对突发事件的能力, 因此亟需开发快速检测技术. 近年来, 多种微生物快速检测技术如 ELISA 法<sup>[3]</sup>、热解质谱测定法<sup>[4]</sup>、多聚酶链反应<sup>[5]</sup>、荧光成像技术<sup>[6]</sup>、生物发光法<sup>[7]</sup>及化学发光磁酶免疫法<sup>[8,9]</sup>等被相继应用于 O157: H7 大肠埃希菌的检测中, 其中化学发光磁酶免疫法因具有灵敏度高和操作简便等特点而受到广泛重视.

本文通过自行制备的免疫磁珠结合新型发光底物(AMPPD), 改进了化学发光磁酶免疫检测法, 对人工猪肉样品中 O157: H7 大肠埃希菌进行了检测, 并与人工计数法进行了比较.

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂 BPCL(-1-KGC)微弱发光测定仪; 磁性分离器; DYNEX MRX-HD 型酶标仪; XB-K-25 型血球计数板.

牛肠碱性磷酸酯酶(ALP, 1000 U/mL); BCA 蛋白浓度测定试剂盒; O157: H7 大肠埃希菌单克隆抗体 A 与 B(质量浓度均为 2 mg/mL); 质量分数为 2.0% 的表面经过氨基修饰的超顺磁聚合物磁珠; 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-邻氧酰苯基)-1,2-二氧杂环丁烷(即 AMPPD)<sup>[10]</sup>; O157: H7 大肠埃希菌菌株; 其它试剂均为分析纯试剂, 实验用水均为 Millipore 超纯去离子水.

1.2 实验过程 (1) O157: H7 大肠埃希菌的培养与计数及样品制备: 将 1 mL 新鲜解冻 O157: H7 大肠埃希菌菌液接种于 EC 肉汤培养基中, 于 37 °C 下以 160 r/min 速率振荡培养 18 h, 以血球计数板计数后稀释备用. 称取数份切碎的新鲜猪肉各 10 g, 放入样品袋中, 加入 20 mL pH 为 7.4 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液, 将 5 μL 6 种不同浓度菌液加至样品袋中, 混匀, 于 37 °C 增菌 6 h. 取该菌液各 10 μL, 加至无菌试管中, 用 TTBS 缓冲液适当稀释, 制备出人工菌液样品.

(2) 磁珠的活化与磁珠表面抗体的偶联: 取氨基修饰磁珠 0.1 g, 用 PBS 缓冲液清洗 1 次, 然后加至 10 mL 体积分数为 5% 的戊二醛溶液中, 反应 16 h, 磁性分离, 清洗 3 次, 制备出活化磁珠<sup>[11,12]</sup>. 再加抗体 B, 混匀反应 4 h, 磁性分离, 吸取上清液, 测蛋白浓度. 用 PBS 缓冲液洗涤除去游离抗体, 加过量的质量分数为 1% 的 BSA 溶液反应 2 h, 封闭游离醛基, 从而制备出免疫活性磁珠.

(3) 碱性磷酸酯酶标记抗体: 将抗体 A 按文献[13]的方法制备碱性磷酸酯酶标记抗体.

(4) 化学发光磁酶免疫法检测 O157: H7 大肠埃希菌: 用 TTBS-Casein 缓冲液将细菌浓度分别稀释

收稿日期: 2005-12-22.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 60121101, 60223002)和国家“八六三”计划项目(批准号: 2002AA2Z2041, 2004AA302070)资助.

联系人简介: 朱广华(1963 年出生), 男, 教授, 现从事光化学分析研究. E-mail: yanfenghe2003@163.com

至  $1.0 \times 10^8$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^2$  和 0 个/mL. 取样 5  $\mu\text{L}$ , 加入 30  $\mu\text{L}$  免疫磁珠与 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液, 反应 30 min, 再加入 15  $\mu\text{L}$  ALP 标记抗体 A, 反应 30 min, 磁性分离 2 min, 洗涤, 加入 AMPPD, 于室温下反应 30 min (见图 1), 检测发光强度.

## 2 结果与讨论

**2.1 磁珠表面抗体的偶联** 采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定结合前后抗体浓度的变化, 磁珠结合抗体的能力为 39 mg/g. 表明修饰后的磁珠可结合抗体, 进而识别及并捕捉待测细菌.

**2.2 发光反应时间的选择** 分别对发光反应时间、免疫磁珠及酶标抗体与细菌结合时间与发光信号强度变化的规律进行了考察. 结果如图 2 所示. 随着反应时间的延长, 发光信号增大, 约 35 min 时信号趋于稳定 [见图 2(A)]. 这是由于 ALP 催化 AMPPD 分解产生光信号的反应, 随着时间的延长, 信号增大, 约经过 35 min 达到平衡, 产生较为稳定的检测信号.

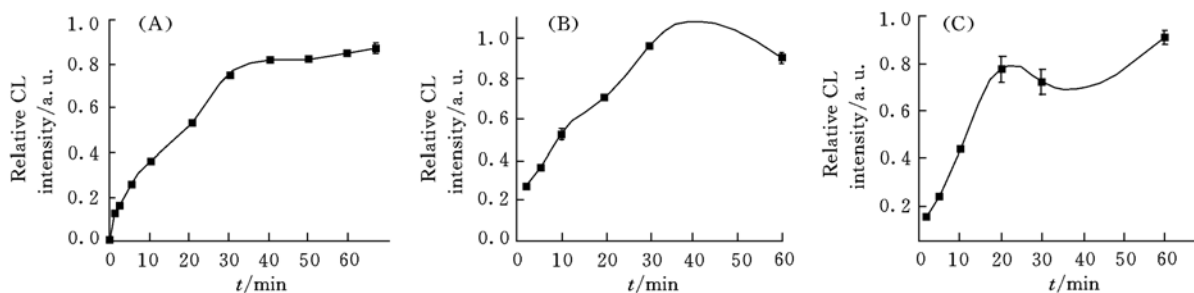


Fig. 2 Effects of time on the chemiluminescent intensity

(A) Chemiluminescent reaction time; (B) reaction time of magnetic microsphere with bacteria; (C) reaction time of ALP-antibody and bacteria.

**2.3 免疫磁珠与细菌反应时间的选择** 分别检测免疫磁珠与细菌反应 2, 5, 10, 20, 30 和 60 min 后的发光强度 [见图 2(B)], 结果发现, 30 min 后结合过程完成, 信号趋于稳定.

**2.4 酶标抗体与细菌反应时间的选择** 分别检测酶标抗体与细菌反应 2, 5, 10, 20, 30 和 60 min 后的发光强度 [见图 2(C)], 结果发现, 30 min 信号较为稳定, 60 min 后随着时间的延长, 非特异性吸附也随之增加, 信号也有一定的增加.

**2.5 酶标抗体用量的选择** 分别加入酶标抗体 0, 5, 10, 15, 20, 30 和 40  $\mu\text{L}$  后, 检测发光强度 [见图 3(A)]. 酶标抗体的加入量过少, 不能充分结合相应的细菌, 发光信号较低, 无法达到定量检测的目的. 过多则会引起非特异性吸附增多.

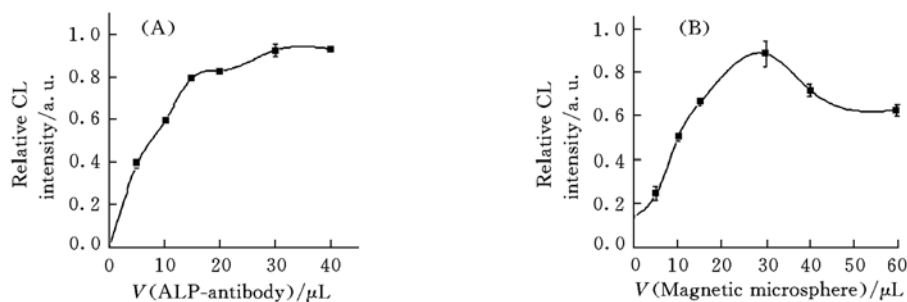


Fig. 3 Effects of volume on the chemiluminescent intensity

(A) ALP-antibody volume; (B) magnetic microsphere volume.

**2.6 磁珠用量的选择** 分别加磁性微珠 0, 5, 10, 20, 30, 50 和 100  $\mu\text{L}$  后, 检测发光强度 [见图 3(B)]. 结果表明, 随着磁珠量的增加, 发光强度先增加后减少. 这是因为当磁珠量较少时, 所加入的磁珠几乎都可与细菌及酶标抗体充分结合, 随着加入量的增加, 细菌与酶标抗体被充分结合, 再

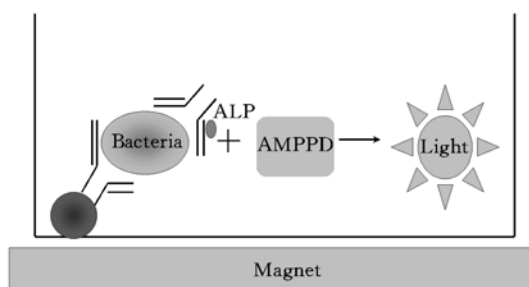


Fig. 1 Schematic diagram of chemiluminescent magnetic enzyme immunoassay for detecting *Escherichia Coli* O157:H7

增加磁珠的量并不能使发光信号增强, 相反由于磁珠对光的遮蔽作用而会使发光信号降低。

2.7 标准曲线和灵敏度 取各浓度的 O157: H7 大肠埃希菌溶液, 按实验步骤测定发光强度的变化, 绘制标准曲线。方法的检测限为  $8.50 \times 10^4$  个/mL, 线性范围为  $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^6$  个/mL, 线性方程为  $Y = 0.0037X + 4.3 \times 10^3$ ,  $R = 0.982$ 。本法与 EHEC-TEK 细菌快速检测系统<sup>[14]</sup>相比, 检测下限降低了近十倍, 而与“UNI”试剂盒<sup>[14]</sup>相比, 检测下限提高了两个数量级。

2.8 精密度实验和样品的测定 分别取 3 个批次的猪肉样品, 每个样品进行 11 次重复测定, 计算出组内差异 [CV (%) ] 为 14.8%, 组间差异 [CV (%) ] 为 20.0%。与细菌培养计数法相比较, 采用 *F* 检验统计方法, 计算出两种方法的相关系数为 0.981, 说明化学发光磁酶免疫法可用于对 O157: H7 大肠埃希菌进行检测。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] WANG Shi-Qiang(汪士蔷). Chinese J. Health Lab. Technol. (中国卫生检验杂志)[J], 2004, **14**(5): 643—644
- [ 2 ] ZHOU Zhi-Jiang(周志江). Enterohemorrhagic Escherichia coli O157(肠道出血性大肠杆菌 O157)[M], Beijing: Military Medicine Science Press, 2003: 127—142
- [ 3 ] Padhye N. V., Doyle M. P.. J. Clin. Microbiol. [J], 1991, **29**(1): 99—103
- [ 4 ] Freeman R., Sisson P. R., Jenkins D. R. et al.. Epidemiol. Infect. [J], 1995, **114**(3): 433—440
- [ 5 ] Fratamico P. M., Sackitey S. K., Wiedmann M. et al.. J. Clin. Microbiol. [J], 1995, **33**(8): 2188—2191
- [ 6 ] Shelton Daniel R., Karns Jeffrey S.. Appl. Environ. Microb. [J], 2001, **67**: 2908—2915
- [ 7 ] Romanova N. A., Brovko L. Y., Moore L. et al.. Appl. Environ. Microb. [J], 2003, **69**: 6393—6398
- [ 8 ] Andrew G. G., Peter L. I., Sue A. R. et al.. J. Immuno. Methods[J], 2004, **293**: 97—106
- [ 9 ] Tu Shu-I., Uknalis Joseph., Gehring Andrew. Proc. SPIE[J], 2004, **5587**: 183—189
- [ 10 ] Bronstein I., McGrath P.. Nature[J], 1989, **338**: 599
- [ 11 ] Liu Xiao-qiao., Guan Yue-ping., Yang Yu et al.. J. Appl. Polym. Sci. [J], 2004, **94**: 2205—2211
- [ 12 ] LIU Ai-Li(刘爱丽), PENG Tu-Zhi(彭图治), CHENG Qiong(程琼). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(2): 231—234
- [ 13 ] YIN Bo-Yuan(尹伯元), WANG Ren-Zhi(王仁芝), LI Zhen-Jia(李振甲) et al.. Labeled Immunology(标记免疫学)[M], Beijing: Atom Energy Press, 1998: 48
- [ 14 ] WANG Gang(王刚), TANG Shou-Ting(唐守亭), ZHANG Zhuo-Ran(张卓然) et al.. Chinese J. Microbiol(微生物杂志)[J], 2000, **20**(1): 52—54

## Determination of *Escherichia Coli* O157: H7 in Food Based on Chemiluminescent Magnetic Enzyme-linked Immunoassay

ZHU Guang-Hua<sup>1\*</sup>, HE Yan-Feng<sup>1</sup>, GUO Xiao-Ying<sup>2</sup>, LIU He-Ping<sup>3</sup>

(1. College of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory for Molecular Electronics, Department of Biological Science and Medicinal Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China; 3. Jiangsu Centers for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China)

**Abstract** A high sensitive chemiluminescent magnetic enzyme-linked immunoassay method was established for *Escherichia coli* O157: H7 determination. The bacterium antibody was labeled by alkaline phosphatase (ALP) that catalyzed the decomposing of substrate 3-(2-spiroadamantane)-4-methoxy-4(3-phosphoryloxy) phenyl-1,2-dioxetane (AMPPD) to give the light emission. The sensitivity of the method is  $8.5 \times 10^4$  Cell/mL with a linear range of  $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^7$  Cell/mL. The intra- and inter-assay CVs are 14.8% and 20.0% in pork samples, respectively. The correlation coefficient of present and the standard plate counting method is 0.981. The experiments with the spiked samples show that this method has great potential to be applied to detecting the concentration of *Escherichia coli* O157: H7 in a variety of samples.

**Keywords** Immunoassay; Chemiluminescence; Magnetic beads; *Escherichia coli*. (Ed.: A, G)