

实验技术与方法

胶体金免疫层析技术快速定量检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B

谢士嘉¹ 王 静¹ 姜永强² 张 然¹ 杨 宇¹ 孙肖红¹ 胡孔新¹ 周文君¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123;

2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘要:目的 建立胶体金免疫层析技术快速定量检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的方法。方法 利用胶体金标记和双抗体夹心免疫层析技术,建立金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的快速检测方法,评价其特异性和敏感性,并拟合检测曲线进行定量检测;在牛奶样品中添加金黄色葡萄球菌肠毒素 B 作为模拟污染样品进行检测。结果 该法可在 5~10 min 内完成定性和半定量检测,检出限为 8 ng/ml,线性范围 8~1000 ng/ml。结论 建立的检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的胶体金免疫层析方法,能快速、灵敏、特异、准确地检测样品中的金黄色葡萄球菌肠毒素 B,并可实现定量,适用于现场快速检测。

关键词:金黄色葡萄球菌肠毒素 B;胶体金;免疫层析;双抗体夹心

中图分类号: S852.44; R378.11 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-8456(2010)01-0031-05

**Rapid and Quantitative Detection of Staphylococcal Enterotoxin B
with Colloid Gold Immunochromatography**

XIE Shi-jia, WANG Jing, JIANG Yong-qiang, ZHANG Ran, YANG Yu,
SUN Xiao-hong, HU Kong-xin, ZHOU Wen-jun

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Objective To develop a rapid method for the detection and quantification of *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB) in foods. **Method** Using colloid gold as a marker and utilizing double-antibody sandwich immunochromatographic assay to rapidly detect *Staphylococcal* enterotoxin B in foods, and to evaluate the specificity and sensitivity of the method. The quantification was realized by constructing a standard curve. The feasibility of the method was tested by adding SEB to various food samples, such as milk powder. **Results** The qualitative as well as semi-quantitative detection could be completed in 5-10 min. The limit of detection was 8 ng/ml; the linear range was from 8 ng/ml to 1000 ng/ml. The recovery rate was 120.82% and 120.23%. The specificity and sensitivity of the method was good, and the samples could be detected directly after simple processing. **Conclusion** The established colloidal gold immunochromatographic assay was able to detect SEB in food samples rapidly, specifically, sensitively and accurately, and was able to realize quantitative detection in the fields.

Key words: *Staphylococcal* Enterotoxin B; Colloid Gold; Immunochromatography; Double-Antibody Sandwich

金黄色葡萄球菌肠毒素 (*Staphylococcal* enterotoxin, SE)是由血浆凝固酶或耐热酸酶阳性的金黄色葡萄球菌所产生的一类结构相关、毒力相似、抗原性不同的胞外蛋白质,能引起食物中毒。葡萄球菌肠毒素 B (*Staphylococcal* enterotoxin B, SEB)是其中一种,其小鼠半数致死量 (lethal dose 50%,

LD₅₀)值为 0.023~5 μg/kg^[1]。SEB 是一种可溶性蛋白质,耐热,经 100℃ 煮沸 30 min 不被破坏,也不受胰蛋白酶的影响,误食被肠毒素污染的食物会引起急性胃肠炎^[2]。

目前 SEB 的检测方法主要依靠动物毒理实验和酶联免疫法,不适合快速和现场在线检测^[3,4]。胶体金快速诊断试纸条技术是 20 世纪 90 年代以来发展起来的一项新型体外诊断技术^[5,6]。近年来该方法发展迅速,在生物医学领域特别是医学检验中得到了广泛应用,但用于食品卫生领域检测的产品较少。本研究针对 SEB 研制出了食品污染物中 SEB 的免疫胶体金检测技术。

收稿日期:2009-06-21

基金项目:国家十一五科技支撑计划(2006BAK10B07);质检公益项目(2007GYJ023);国家质检总局科技计划(2006IK165)。

作者简介:谢士嘉 女 学士 实习研究员 研究方向为生物快速检测技术 E-mail: xieshijia1105@126.com

通信作者:王 静 女 博士 研究员

1 材料和方法

1.1 材料

SEB重组抗原和兔抗 SEB均由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供,羊抗兔 IgG购自鼎国生物技术公司。葡萄球菌肠毒素 A, C, D, E (SEA, SEC, SED, SEE)、肉毒毒素、蓖麻毒素各 100 ng均由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供。

结合垫(玻璃纤维)、硝酸纤维素膜(NC膜, SHF 1350225)、样品垫(采用玻璃纤维素膜)及吸水垫和滤纸购自 Minipore公司。

金标免疫分析仪由中国科学院上海光学精密机械研究所和中国检验检疫科学研究院联合研制^[7]。

1.2 试剂

0.1 mol/L 碳酸钾, 0.01 mol/L PBS(pH 7.4), 0.1 mol/L 盐酸、1.0 mol/L 氢氧化钠, 0.01 mol/L Tris. HCl (pH 7.4), 牛血清白蛋白购自 Sigma公司。样品处理液(PBS体系),具体内容已申请了专利,专利号: ZL200410091168.4。

1.3 胶体金免疫层析试纸条的制备

样品垫、结合垫(加入标记好的胶体金结合垫干燥)、硝酸纤维素膜(检测带:兔抗 SEB多克隆抗体 2 mg/ml + 1% BSA;质控带:羊抗兔 1 mg/ml)、吸水垫依次贴上带有粘合剂的底衬卡,切割成 0.4厘米/条,干燥备用^[8-10]。

1.4 样品处理方法

首先用 0.1 mol/L 碳酸钾将牛奶的 pH 值调至 7.4,再分别将不同浓度的 SEB 添加到 1 ml 牛奶中。

1.5 检出限试验

将 SEB 用样品处理液进行 10 倍梯度稀释,浓度分别为 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml,依次用试纸条进行检测。

1.6 特异性试验

以样品处理液将 SEA、SEC、SED、SEE、肉毒毒素和蓖麻毒素等稀释至浓度为 0.2 mg/ml,用制备好的胶体金免疫层析试纸条检测,同时检测 SEB 样品和空白对照。

1.7 样品实用性试验

分别将 1、10、100 和 1000 ng 的 SEB 添加到 1 ml 牛奶试样中,10 倍稀释,作为模拟样品。

1.8 定性检测

将样品处理液稀释后的模拟样品 100 μ g,添加到制备好的层析条样品垫端,静置 10 min,观察结果。检测带(T)和质控带(C)均出现红色判为阳性,仅质控带出现红色为阴性,检测带和质控带均不显色,则为试纸条失效。

1.9 定量检测

判定值(CUT-OFF)的确定 样品处理液作为阴性样品进行检测 20 次,用金标免疫分析仪扫描读取信号 T/C 比值。20 个样品 T/C 比值的平均值与其 3 倍标准差之和为 CUT-OFF 值。

定量检测判定 将显色后的金标条放入金标免疫分析仪扫描,读取信号 T/C 比值,大于判定值为阳性。

2 结果

2.1 样品处理方法及系统优化

实验不同 pH、缓冲液、盐离子浓度、检测时间、牛血清白蛋白(BSA)量、样品加样量条件对结果的影响,确定最佳反应条件为胶体金标金溶液 pH 为 8.2~8.5, PBS 体系缓冲液, 5~10 min 检测,包被含 1% BSA。

2.2 直观检出限评价

直接目测试纸条检出限可达到 10 ng/ml (图 1)。



图 1 SEB 胶体金免疫层析试纸条的检测敏感性

2.3 特异性检测

结果如图 2 所示, SEB 测试条检测 SEA、SEC、SED、SEE、肉毒毒素、蓖麻毒素均为阴性。说明 SEB 测试条检测具有很强的特异性,同其他毒素和其他类型的金黄色葡萄球菌肠毒素未发现交叉反应。

2.4 结果判定

样品处理液作为阴性样品进行检测 50 次,用金标免疫分析仪扫描读取信号 T/C 比值。50 个样品 T/C 比值的平均值与其 3 倍标准差之和为 CUT-OFF 值。经过计算判定值(CUT-OFF)为 0.0243。而判定值 0.0243 所对应的浓度为 1.788 ng/ml。

检测不同浓度 SEB,浓度为 1 ng/ml 的 SEB 的 T/C 比值低于 CUT-OFF 值,为阴性; 8 ng/ml ~ 10 μ g/ml 的 SEB 的 T/C 比值均高于 CUT-OFF 值,结果为阳性。当 SEB 浓度大于 8 ng/ml 时, T/C 比值大于 CUT-OFF 值,故 SEB 检出限为 8 ng/ml。

2.5 标准曲线拟合

以 LOG₁₀ 样品浓度为横坐标(x),以 T/C 值为纵坐标(y)作图,并建立胶体金检测标准曲线(图 3、



注：1: SEB; 2: SEA; 3: SEC; 4: SED; 5: SEE; 6:肉毒毒素; 7:蓖麻毒素; 8:相思子毒素; 9: BSA; 10:空白对照。

图 2 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的特异性检测

表 1 50份阴性样品结果

序号	检测值 T(V)	质控值 C(V)	T/C	序号	检测值 T(V)	质控值 C(V)	T/C
1	0.002	0.418	0	26	0.011	6.342	0
2	0.000	0.349	0	27	0.000	4.791	0
3	0.000	0.430	0	28	0.001	5.234	0
4	0.000	0.336	0	29	0.002	6.435	0
5	0.000	0.461	0	30	0.000	5.961	0
6	0.003	0.513	0	31	0.294	6.438	0.04
7	0.000	0.443	0	32	0.004	7.024	0
8	0.000	0.394	0	33	0.000	4.694	0
9	0.001	0.456	0	34	0.000	5.956	0
10	0.000	0.304	0	35	0.001	5.699	0
11	0.000	0.398	0	36	0.021	5.677	0
12	0.002	0.537	0	37	0.000	4.858	0
13	0.001	0.516	0	38	0.100	0.850	0.01
14	0.000	0.355	0	39	0.014	0.809	0.01
15	0.000	0.481	0	40	0.000	0.200	0
16	0.000	0.298	0	41	0.000	0.060	0
17	0.000	0.593	0	42	0.000	0.161	0
18	0.000	0.463	0	43	0.000	0.260	0.01
19	0.000	0.427	0	44	0.003	0.063	0.01
20	0.000	0.571	0	45	0.000	0.146	0
21	0.000	5.470	0	46	0.000	0.963	0
22	0.230	6.588	0.03	47	0.002	0.065	0
23	0.007	5.490	0	48	0.000	0.689	0
24	0.003	5.318	0	49	0.000	0.286	0
25	0.000	4.656	0	50	0.000	0.307	0

表 2 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 胶体金免疫层析试纸条各浓度定量检测结果

浓度	检测值 T(V)	质控值 C(V)	T/C	结果判读
0	0.002	0.418	0.00	-
1 ng/ml	0.003	0.784	0.00	-
8 ng/ml	0.007	0.175	0.04	+
40 ng/ml	0.047	0.339	0.14	+
200 ng/ml	0.219	0.593	0.37	+
1 μg/ml	0.462	0.625	0.54	+
5 μg/ml	0.326	0.391	0.73	+
10 μg/ml	0.485	0.436	1.11	+

图 4) ,当 SEB 浓度为 8 ~ 1000 ng/m 之间时 ,毒素的浓度与其金标分析仪读值 T/C 值之间呈良好的线性关系 ,对此进行线性回归分析。线性方程为 : y =

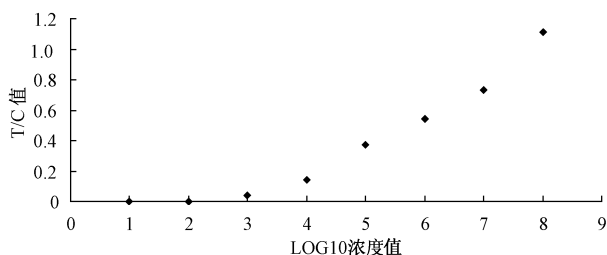


图 3 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 胶体金免疫层析试纸条浓度散点图

$0.2576x - 0.2536; r = 0.9675。$

2.6 回收率

依据标准曲线得出检测浓度 ,利用检测浓度与理论浓度的比值百分率计算回收率。5 次重复检测

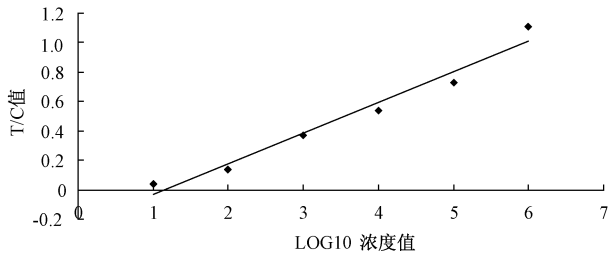
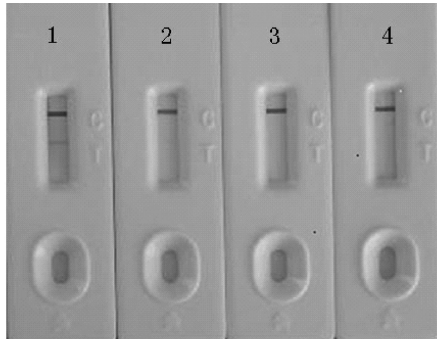


图 4 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 胶体金免疫层析试纸条检测系统标准曲线图



注: 1: 10 ng/ml SEB; 2: 1% BSA; 3: 10 ng/ml SEA; 4: 空白对照。

图 5 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 胶体金免疫层析试纸条稳定性

的标准差均为 0.004 472, 均值为 0.292 (100 ng/ml)和 0.538 (1000 ng/ml)。理论浓度为 100 ng/ml、1000 ng/ml 时, 其回收率为 120.82%

和 120.23%, 相对标准偏差在 0.83% ~ 1.53% 之间。

2.7 稳定性试验

将 SEB 胶体金检测试纸条在 37℃ 放置进行加速破坏试验, 7 天后仍能特异性的检出 SEB, 灵敏度没有明显下降, 特异性良好。

2.8 样品测定试验

含 SEB 10、100、1000 ng/ml 牛奶试样经处理后, 检测均为阳性。含 SEB 0.1 和 1 ng/ml 牛奶试样经处理后, 检测结果为阴性。

3 讨论

3.1 pH 值的选择

用 0.1 mol/L 碳酸钾调制胶体金溶液的 pH, 取 11 只洁净的试管, 分别编号 1、2、3、...、11, 在已编号的 11 个试管内, 分别加入 0.1 mol/L 碳酸钾 0 ~ 10 μl, 颠倒混匀, 静置 10 min, 待胶体金溶液 pH 值稳定后, 每个试管分别加入 SEB 多抗 10 μg, 颠倒混匀后, 静置 15 min, 待抗体与胶体金稳定结合后, 每个试管分别加入 10% BSA 100 μl 封闭, 观察胶体金颜色变化, 离心后以沉淀出来的金子是否易溶解完全及颜色和溶解性来判定最佳 pH 值。

结果 (表 3) 表明, 胶体金标记的最佳 pH 值为 0.1 mol/L 碳酸钾 8 ~ 9 μl/m 金, 并且测得 pH 为 8.2 ~ 8.5。

表 3 抗标记胶体金最佳 pH 选择

反应条件及结果	试管编号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
胶体金 (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.1 mol/L 碳酸钾 (μl)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEB 多抗 (μg)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
胶体金颜色	蓝色	蓝色	蓝色	蓝色	蓝色	蓝色	红色	红色	红色	红色	红色
溶解性	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全	完全	完全	完全	完全

3.2 缓冲液选择

本试验还更换了不同体系的缓冲液, 有 0.01 mol/L PBS 体系、0.01 mol/L TWEEN 体系、0.1 mol/L Tris 体系、0.1 mol/L NP 体系的样品处理液, 经过样品检测和定量分析表明, 0.01 mol/L TWEEN 体系、0.1 mol/L Tris 体系都降低了试纸条的检出限, 0.1 mol/L NP 体系产生了非特异性吸附, 因此确定本试验的缓冲体系为 0.01 mol/L PBS 体系。

3.3 盐离子浓度的选择

0.1、0.05、0.01 mol/L PBS 对样品稀释及检测, 结果发现, 离子强度过高 (0.1、0.05 mol/L PBS) 容易破坏抗体与胶体金溶液中金颗粒的结合, 导致非特异性吸附。

3.4 检测时间的确定

针对 5、10、15、20 以及 30 min 进行读取数据、定量分析, 试验表明, 超过 10 min 读取数值容易受环境潮湿等影响, 5 ~ 10 min 读取数值稳定、准确。

3.5 牛血清白蛋白 (BSA) 量确定

在硝酸纤维素膜上包被检测带时尝试了 0.5% BSA、1% BSA、1.5% BSA 的量, 经试验表明, 0.5% BSA 不能有效封闭非特异性吸附, 1.5% BSA 又将标记的胶体金结合位点封闭, 严重影响试纸条的检出限, 因此确定最佳牛血清白蛋白 (BSA) 量为 1% BSA。

3.6 样品加样量的确定

在检测样品时, 尝试上样剂量 50、100、150 μl, 实验发现 50 μl 样品不能与标记好的结合垫充分结

合,影响抗体与待检物的结合;150 μ l样品不能全部被硝酸纤维素膜产生虹吸作用而滞留在试纸条上,因此确定最佳样品加样量为 100 μ l。

综上,确定了最佳反应条件,保证了检测方法的敏感性和特异性。

4 总结

本研究利用胶体金标记和双抗体夹心免疫层析技术,研制了 SEB 胶体金免疫层析试纸条,并将胶体金测试条与胶体金生物传感器有机整合为胶体金定量检测系统,研制适用于现场 SEB 快速检测的双抗体夹心胶体金免疫层析测试系统,能够在人眼无法正确识别可疑物检测是否存在阳性的情况下,正确判读该试纸条检测结果,减少了因人为主观判读带来的错误率,增加了客观性、准确性、可靠性。经过多种条件的优化,能在 5~10 min 内完成样品检测,并在人为肉眼判断 10 ng/ml 的基础上提高了检测的敏感性,检出限为 8 ng/ml,特异性强,并且具有良好的稳定性及重复性。免疫层析测试条和胶体金免疫分析仪携带方便、使用简单、判定准确、结果客观、易保留,为现场检验工作带来了方便,可满足现场快速检测要求。

参考文献

- [1] BUONPANE R A. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by soluble, high-affinity receptor antagonists [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13: 725-729.
- [2] 李小兵,谢光洪,周昌芳,等.金葡菌肠毒素 B 型 (SEB)-a 的纯化及鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28 (3): 310-313.
- [3] 李小兵,谢光洪,周昌芳,等.金葡菌肠毒素 B 型 (SEB)-a 双抗体夹心 ELISA 法的建立和初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28 (8): 962-967.
- [4] 穆惠,董朝阳,郝兰群,等.双抗体夹心 ELISA 法检测金葡菌肠毒素 B 型 (SEB) [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23 (8): 763-766.
- [5] 李永勤,杨瑞馥.以膜为固相载体的免疫胶体金快速试验 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2003, 31 (1): 74-78.
- [6] 汪黎,朱虹,端青.检测嗜肺军团菌胶体金免疫层析法建立 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2008, 32 (1): 55-57.
- [7] 王静,陈维娜,李伟,等.大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立 [J]. *卫生研究*, 2006, 35 (4): 439-441.
- [8] 胡孔新,王静.胶体金免疫层析法快速检测鼠疫耶尔森菌 F1 抗体 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22 (3): 198-201.
- [9] 彭伏虎,王政.胶体金试纸条检测 H9 亚型禽流感病毒的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39 (8): 1081-1086.
- [10] PAPASIAN C J, Carrison B1 [J]. *Diagn Microbial Infect Dis*, 1999, 33: 201-2031.
- [11] 吴斌,秦成,裴轶君,等.食品中金黄色葡萄球菌肠毒素的快速检测方法 [J]. *微生物学报*, 2004, 31 (5): 93-95.

法规文件

卫生部监督局关于公开征求拟批准新资源食品意见的函

有关单位:

根据《食品安全法》的规定,经新资源食品评审专家委员会审核,拟批准玫瑰花 (重瓣红玫瑰 *Rose rugosa* cv. Plena)、仙草、夏枯草、布渣叶、蛋花作为普通食品,其中夏枯草、布渣叶、蛋花作为食品使用时仅限于凉茶饮料原料。现公开征求意见,截止时间为 2010 年 2 月 13 日,请将意见反馈至卫生部卫生监督中心。

传 真: 010-64047878-2231

邮 箱: zhangxx3961@yahoo.com.cn; gb2760@gmail.com

中华人民共和国卫生部

二 一 年一月十三日