

实验技术与方法

快速检测大肠埃希菌 O157 H7 免疫层析试纸条的研制

谌志强 王新为 金 敏 李君文

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所,天津 300050)

摘要:目的 建立一种快速、特异性强、方法简便和经济实用的检测大肠埃希菌 O157 H7 的免疫学方法。方法 微波炉法制备胶体金,自制的大肠埃希菌 O157 H7 多克隆抗体包被胶体金制备探针,通过免疫渗滤法检测大肠埃希菌 O157 H7。结果 制备的胶体金颗粒均一、稳定性好,此法检测的灵敏度为 3.1×10^6 CFU/ml,特异性强,假阳性率为 2.5%,检测时间只需 3~5 min。结论 该方法简单、快速,无需特殊的仪器设备,适合现场检测之用。

关键词:胶体金;大肠杆菌 O157;免疫层析;免疫测定

肠出血性大肠埃希菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, O157 H7) 是新出现的肠道致病菌,可引起人腹泻、出血性肠炎、血栓性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒综合症。自 1982 年在美国报道出现此菌引起的食物中毒以来^[1],已在世界范围内多次爆发流行。我国也于 1986 年在徐州发现感染病人^[2]。近年来,由该菌引起的食物中毒有明显上升的趋势,为此,建立一种快速、特异性强、简便的检测方法十分必要。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 氯化金、氢氧化钠,分析纯,天津市化学试剂三厂;盐酸,分析纯,天津翔宁科技贸易公司;柠檬酸三钠,分析纯,上海化学试剂中心;氯化钠,分析纯,天津市塘沽化学试剂厂;碳酸钾,分析纯,天津市四通化工厂;叠氮钠,分析纯,上海化学试剂采购供应站;牛血清白蛋白(BSA),美国 sigma 公司;金黄色葡萄球菌白蛋白 A(SPA),美国 sigma 公司;DEAE 纤维素(DE-32),英国 whatman 公司。硝

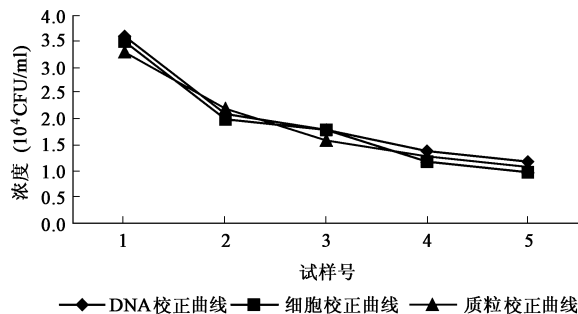


图 8 不同校正曲线检测单增李斯特菌的平均结果比较

结果表明,3 种线性校正曲线定量方法,在 $1 \sim 10^5$ CFU 或 Copies/ml 线性范围内对样品的检测结果保持高度的一致性。

参考文献

[1] 张顺合. 单核细胞增生李斯特氏菌在食品中的污染[J]. 中国公共卫生杂志, 2000, 6 (16): 564-566.

- [2] 李郁,魏建忠,王桂军. 产单核李斯特菌的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 8 (15): 1018-1020.
- [3] KESSH J S V, KARN S J S, GORSKI L, et al. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 2822-2830.
- [4] 金大智,谢明杰,曹际娟. 食品中单增李氏菌实时荧光 PCR 检测鉴定方法的建立[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2003, 3 (26): 73-76.
- [5] 蔡刚,李闻捷,沈茜. 实时定量 PCR 应用中的问题及优化方案[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, 24 (6): 330-332.
- [6] 罗勇军,刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用[J]. 重庆医学, 2005, 3 (24): 414-415.
- [7] GITIKA PANICKER, MICHAEL L, MYERS, et al. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of mexico water by real-time PCR[J]. Applied and environmental microbiology, 2004, 1: 498-507.

[收稿日期: 2006-10-10]

中图分类号: R15; Q939.122; O655

文献标识码: B

文章编号: 1004-8456(2007)03-0248-04

作者简介: 谌志强 男 助理实验师

通讯作者: 李君文 男 研究员

酸纤维素膜、玻璃纤维膜、样品板, Millpore 公司; UV-8500 分光光度计, 上海天美科学仪器厂; 79.3 型磁力恒温搅拌器, 上海市曹行无线电元件厂; 高速冷冻离心机, 德国 Hittch 公司; TTN 型托盘扭力天平, 上海第二天平仪器厂; AE240 电子分析天平, 瑞士 Mettler 公司; WD700 型微波炉, 韩国 LG 公司。

1.2 菌种 共 80 株, 其中大肠埃希菌 19 株, 金黄色葡萄菌 6 株, 沙门菌 26 株, 志贺菌 24 株, 小肠结肠炎耶杆菌 3 株, 粪链球菌 2 株(所有菌株均为本室保存)。

1.3 抗血清的制备 制备大肠埃希菌 O157 H7 抗原, 耳缘静脉注射免疫兔子。每次注射抗原浓度均为 6×10^8 CFU/ml, 首次注射 1.0 ml/只, 第二、三次注射 1.5 ml/只, 第四、五次注射 2.0 ml/只, 每次间隔 4 d, 末次注射 7 d 后, 耳动脉采血, 用试管凝集法测效价。当效价达到 1 1600 ~ 1 3200 时, 颈动脉采血, 分装血清, 于 -20 °C 低温保存并冷冻干燥^[3]。

1.4 抗血清的纯化 采用李成文报道的反相吸附法, 利用 DEAE 纤维素 (DE-32) 进行大肠埃希菌 O157 H7 抗血清的纯化^[4]。

1.5 胶体金及胶体金探针的制备 对王文勇等报道的微波炉法适当改良制备胶体^[5]。取 247.5 ml 水放入 500 ml 锥形瓶中, 把锥形瓶放在微波炉中央位置调中高档加热 5 min, 迅速加入 15 ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液, 放入微波炉的同一位置调中低档继续加热 4 min, 精确加入 2.5 ml 的 1% 氯化金贮备液, 放入微波炉的同一位置调中低档加热 6 min。取出锥形瓶, 此时胶体金颜色为葡萄酒红色, 室温下自然冷却, 冷却后用 0.2% 碳酸钾溶液调 pH 值为 8.2, 最后放入 4 °C 冰箱中保存备用。

稳定胶体金最适抗体量的测定 利用试管观测法^[6]测得稳定胶体金最适大肠埃希菌 O157:H7 抗体量为 18 μg/ml。

胶体金探针的制备 取调好 pH 值的胶体金 25 ml 放入装有磁转子的小烧杯中后放在磁力搅拌器上, 磁力搅拌器的转速为使液面不出现气泡为宜。加入已纯化好的浓度为 0.5 mg/ml 的大肠埃希菌 O157 H7 抗体 0.9 ml, 缓慢搅拌 10 min 后, 加入牛血清白蛋白 (BSA), 使其终浓度为 1%, 继续搅拌 10 min 以上。将上面初步制得的胶体金探针以 4 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 以 10 000 r/min 离心 60 min; 弃上清, 留下管底为暗红色疏松状沉淀, 沉淀用 0.005 mol/L、pH 为 7.6 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (PB) (含 1% BSA, 0.02% NaN_3) 重新悬浮, 再同前离心洗涤 1 次。最后将沉淀用同前的 PB 缓冲液悬浮, 置 4 °C 冰箱保存备用。

1.6 金标结合垫的处理 将玻璃纤维膜裁成 6 mm 的细长条, 即成未处理的金标结合垫。将大肠埃希菌 O157 H7 胶体金探针溶液调到在 520 nm 时吸光度值为 5.5 的浓度, 然后灌注在金标结合垫上, 放入 -20 °C 冰箱免疫层析试纸条冷冻 30 min, 再放入冷冻干燥机干燥 10 h 以上, 取出放 4 °C 冰箱保存备用。

1.7 样品板和硝酸纤维素膜 不需任何处理。

1.8 免疫层析试纸条的组装 免疫层析试纸条一般由顶部的吸水板、硝酸纤维素膜、金标结合垫、样品板及底部的垫板组成。试纸条各组份的尺寸为: 吸水板 30 mm、硝酸纤维素膜 25 mm、金标结合垫 6 mm、样品板 15 mm、垫板 75 mm。整个试纸条的组装方式如图 1。

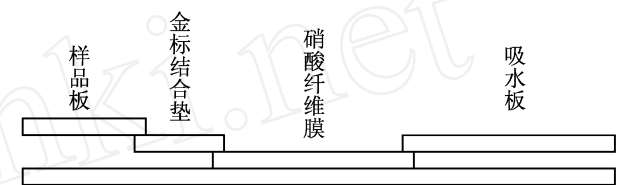


图 1 免疫层析试纸条组装方式

1.9 大肠埃希菌 O157 H7 的检测 取大肠埃希菌 O157 H7 免疫层析试纸条, 分别浸入不同浓度的大肠埃希菌 O157 H7 的菌悬液中, 2 min 后开始观察结果, 持续 10 min。对结果的判定: 出现一条红色 (质控) 沉淀线为阴性, 即无大肠埃希菌 O157 H7 检出。出现 2 条红色 (检测 and 质控) 沉淀线为阳性, 即有大肠埃希菌 O157 H7 检出。

2 结果

2.1 用微波炉法制备的胶体金, 于透射电镜下可见胶体金颗粒呈圆形或椭圆形, 大小均匀一致, 颗粒直径约为 20 nm。并且每次所制备的胶体金重复性强, 稳定性好, 同传统的在水浴加热情况下快速搅拌的制备方法相比, 时间缩短了约 30 min。

2.2 特异性 用自制的大肠埃希菌 O157 H7 胶体金探针分别与肠杆菌科、金黄色葡萄球菌属、沙门菌属、志贺菌属、小肠结肠炎耶杆菌属、粪链球菌属的共 80 株菌进行胶体金免疫层析实验, 除肺炎克雷伯菌和宋内志贺菌 51424 出现假阳性外, 其他均为阴性。用大肠埃希菌 O157 H7 菌株做对照实验, 结果为阳性, 结果见表 1。从表 1 可以看出大肠埃希菌 O157 H7 胶体金免疫层析试纸条具有很强的特异性, 其假阳性率只有 2.5%。

2.3 灵敏度 用无菌生理盐水配制大肠埃希菌 O157 H7 的纯菌悬液, 利用平板计数法得出待检菌悬液的浓度。检测此菌悬液的结果表明, 用此法对该菌悬液的检测下限为 3.1×10^6 CFU/ml。

表1 胶体金探针特异性的观察

菌种	株数	阳性株数	阴性株数	阳性率 (%)
肠杆菌科	19	1	18	5.3
金黄色葡萄球菌属	6	0	6	0.0
沙门菌属	26	0	26	0.0
志贺菌属	24	1	23	4.2
小肠结肠炎耶杆菌属	3	0	3	0.0
粪链球菌属	2	0	2	0.0
合计	80	2	78	2.5

2.4 稳定性 将新制备的与放置在 4℃ 冰箱保存 5 个月的大肠埃希菌 O157 H7 胶体金探针,用免疫层析法同时检测大肠埃希菌 O157 H7 的纯菌悬液,结果完全一致。

3 讨论

胶体金的制备大多数都是在水浴加热、快速搅拌的条件下完成的,这种作法中的人为因素较多,且时间长、重复性也不是很好。为此,我们利用了微波炉加热的方法制备胶体金,从而大大节省了制备时间,且每次制备的胶体金的重复性相当好。为大量制备胶体金打下了良好的基础。

大肠埃希菌 O157 H7 是重要的食源性致病菌,对该菌的检测目前国际通常先以山梨醇麦康凯琼脂 (SMAC) 进行初筛,然后用生化和血清学试验做鉴

定,一般需要 24~48 h。Park 等^[17]用免疫荧光法可以在 2 h 内完成对该菌的检测。此外,还有免疫磁化分离法,PCR 及基因芯片检测法等,但这些方法所需仪器设备昂贵,且操作繁琐复杂。我们所建立的胶体金免疫层析法,不需要特殊的仪器设备,所用的国产试剂价廉,操作简便、特异性强,且可在很短的时间内出结果。

参考文献

- [1] RILEY W, REMIS R S, HELGERSON S D, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype [J]. *New Engl J Med*, 1983, 308: 681-685.
- [2] 权太淑, 范天锐, 李乐民, 等. 首次从出血性结肠炎病人中分离到 O157 H7 大肠埃希菌 [J]. *中华流行病学杂志*, 1988, 9 (腹泻病特刊): 24-29.
- [3] 宋农, 李君文, 王新为, 等. 胶体金探针制备及滴金免疫法检测产肠毒素金葡菌 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 9: 1143-1145.
- [4] 李成文. 免疫化学研究进展 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 50-56.
- [5] 王文勇, 李玉松, 赵一岭. 一种快速、稳定制备胶体金的新方法 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997, 13 (增刊 1): 18-19.
- [6] 严杰, 罗海波, 陆德源. 现代微生物学实验技术及其应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 222-223.
- [7] PARK C H, HIXON D L, MORRISON W L, et al. Rapid diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain [J]. *Am J Clin Pathol*, 1994, 101 (1): 91-94.

[收稿日期: 2006 - 12 - 20]

中图分类号: R15; Q939.122; R378.21

文献标识码: B

文章编号: 1004 - 8456 (2007) 03 - 0251 - 03

[上接第 247 页]

重要依据。但在本次调查中,并不是所有具有毒性基因的菌株都呈神奈川现象阳性。14 株具有毒性基因的菌株中有 4 株呈神奈川阴性,10 株呈神奈川现象阳性。这表明 PCR 检测毒性基因的方法比传统的神奈川实验在判断副溶血性弧菌的致病性上更准确。

参考文献

- [1] BLAKE P A, WEAVER R E, HOLLIS D G. Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1980, 34: 341-367.
- [2] KAYSNER C A, DEPAOLA A. *Vibrio*. food and drug administration bacteriological analytical manual [M]. 8th ed. Revision A, 1998. Chapter 9. Substantially rewritten and revised, 2004.
- [3] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Thermostable direct hemolysin gene of

Vibrio parahaemolyticus: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. *Infect Immun*, 1995, 63: 2093-2099.

- [4] KAYSNER C A, ABEYATA C, TROST P A, et al. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 3020-3022.
- [5] OSAWA R, OKITSU T, MOROZUMI H, et al. Occurrence of Urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related hemolysin genes [J]. *Applied and environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 725-727.
- [6] NAKAGUCHI Y, OKUDA J, LIDA T, et al. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene [J]. *Microbiol Immunol*, 2003, 47 (3): 233-239.

[收稿日期: 2006 - 11 - 23]

中图分类号: R155.55; R378.3

文献标识码: A

文章编号: 1004 - 8456 (2007) 03 - 0245 - 04