

## 论著

## 海产品中副溶血性弧菌免疫磁分离和环介导等温扩增快速检测方法的建立

张蕾<sup>1,2</sup>,张海予<sup>2</sup>,曾静<sup>1</sup>,程晋霞<sup>1,2</sup>,魏海燕<sup>1</sup>,张西萌<sup>1</sup>,马丹<sup>1</sup>

(1. 北京出入境检验检疫局,北京 100026; 2. 北京农学院,北京 102206)

**摘要:**目的 采用纳米免疫磁珠分离副溶血性弧菌,建立副溶血性弧菌环介导等温扩增检测方法。方法 采用副溶血性弧菌单克隆抗体,制备纳米免疫磁珠,特异性吸附副溶血性弧菌,结合环介导等温扩增技术,建立副溶血性弧菌快速检测方法。结果 副溶血性弧菌纳米免疫磁珠在菌体浓度为  $10^3$  cfu/ml 水平时,对副溶血性弧菌的捕获率达到 74%。免疫磁分离结合环介导等温扩增技术,在纯培养、无需增菌情况下,检测灵敏度达到 140 cfu/ml 增菌液;通过对 134 株副溶血性弧菌和 74 株非目标菌的测试,环介导等温扩增技术具有良好的特异性;食品基质添加试验中,在增菌时间缩短至 8 h 的条件下,其检测限为 2 cfu/25 g 样品。结论 副溶血性弧菌免疫纳米磁珠结合环介导等温扩增技术,有效缩短了增菌时间,适用于副溶血性弧菌的快速检测。

**关键词:**副溶血性弧菌;海产品;免疫磁分离;环介导等温扩增;食源性致病菌

中图分类号:R155.3;R378.3;TS254.7 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0401-05

### A novel method of nano-immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification for detecting *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods

ZHANG Lei, ZHANG Hai-yu, ZENG Jing, CHENG Jin-xia, WEI Hai-yan, ZHANG Xi-meng, MA Dan  
(Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

**Abstract: Objective** A novel method of nano-immunomagnetic separation (Nano-IMS) plus loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was established for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** The Nano-Immunomagnetic Beads (Nano-IMB) were created by using the monoclonal antibody of *V. parahaemolyticus* and named Nano-IMB-Vp, which was highly specific to *V. parahaemolyticus*. The method of Nano-IMS-LAMP was established for the rapid detection of *V. parahaemolyticus* from seafoods. **Results** The capture ratio of Nano-IMB-Vp was reached 74% at the level of 103 cfu/ml. In pure culture, the sensitivity of Nano-IMS-LAMP was reached 140 cfu/ml culture medium. The specific of this LAMP method was tested by using 134 targets and 74 non-targets bacteria. The results showed that the LAMP method was highly specific to *V. parahaemolyticus*. No cross-reaction was founded. The detection limit of Nano-IMS-LAMP reached 2 cfu/25 g in artificial samples when the period of time for enrichment was shorted to 8 h. **Conclusion** The method of Nano-IMS-LAMP could shorten the period of time for enrichment effectively, which can apply to the rapid detection of *V. parahaemolyticus*.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; seafoods; nano-immunomagnetic separation; LAMP; food-borne pathogen

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种革兰氏阴性嗜盐菌,广泛分布于近海区域、盐湖及鱼、贝类等海产品中,是沿海地区引起食物中毒的主要病原菌,可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应,严重者可引起败

血症,危及生命<sup>[1-2]</sup>,由该菌引发食物中毒案例居微生物食源性疾病暴发案例之首,且呈上升趋势<sup>[3-4]</sup>。副溶血性弧菌的检验多采用 GB/T 4789.7—2008<sup>[5]</sup>的方法检测,一般需要 5~7 d,周期长、过程繁琐。纳米免疫磁珠 (Nano-immunomagnetic beads, Nano-IMB) 又称纳米免疫磁性微球,是将直径为 0.05~4  $\mu\text{m}$ ,具有超顺磁性的微粒表面经过化学修饰与特异性抗体结合,为免疫磁性分离 (Nano-immunomagnetic separation, Nano-IMS) 技术提供材料<sup>[6-7]</sup>。将 Nano-IMS 技术与环介导等温扩增 (LAMP)<sup>[8]</sup> 技术结合,可有效地富集菌体,缩短检测时间,提高检出率。同时,由于免疫磁珠是特异性捕获目标菌

收稿日期:2013-06-17

基金项目:国家质检总局公益性行业科研专项(201110034),国家质检总局科技计划项目(2009IK184)

作者简介:张蕾 女 硕士生 研究方向为食品安全与控制

E-mail:zlei0605@yahoo.cn

通讯作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail:zengj@bjciq.gov.cn

体,因而有效地去除了核酸扩增抑制成分,提高了扩增效率。本研究建立了 Nano-IMS-LAMP 检测方法,并对该方法的特异性和灵敏度进行了验证,旨在缩短副溶血性弧菌检测时间,提高检测效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

本试验所用菌株见表 1。

表 1 试验所用菌株名称及编号

Table 1 The name and serial number of strains

菌株名称	菌株编号	菌株名称	菌株编号
副溶血性弧菌	ATCC 17802	腊样芽孢杆菌	ATCC 11778
副溶血性弧菌	ATCC 1.1997	表皮葡萄球菌	ATCC 12228
副溶血性弧菌	实验室分离株,共 132 株	粪肠球菌	CGMCC 1.2135
霍乱弧菌	实验室分离株,共 41 株	阴沟肠杆菌	CGMCC 1.57
创伤弧菌	ATCC 1758	甲型副伤寒沙门菌	CMCC 50001
河流弧菌	ATCC 1.1611	马红球菌	ATCC 6936
拟态弧菌	ATCC 1.1969	福氏志贺菌	CMCC 51571
溶藻弧菌	ATCC 1.1607	痢疾志贺菌	CMCC 51252
溶藻弧菌	ATCC 1833	阪崎肠杆菌	ATCC 29544
费尼斯弧菌	ATCC 1.1612	枸橼酸杆菌	CMCC 48017
解蛋白弧菌	ATCC 1.1826	丙型溶血性链球菌	CMCC 32206
单增李斯特菌	ATCC 15313	乙型溶血性链球菌	CMCC 32210
格氏李斯特菌	ATCC 700545	小肠结肠炎耶尔森菌	CMCC 52212
西尔李斯特菌	ATCC 35967	大肠杆菌	ATCC 25922
英诺克李斯特菌	ATCC 33090	肠炎沙门菌	CMCC 50041
默氏李斯特菌	ATCC 2540	金黄色葡萄球菌	ATCC 25923
伊氏李希特菌	ATCC 19119	鼠伤寒沙门菌	CMCC 50115
威氏李斯特菌	ATCC 35897	铜绿假单胞菌	ATCC 15442
肺炎克雷伯菌	CGMCC 1.1736		

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

磁力架、LAMP 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪 (7900, Life 美国)、恒温加热块、微量移液器 (10、100、200、1 000  $\mu$ l)、恒温培养箱。

甜菜碱 (5 mol/L, Sigma 美国)、dNTP (10 mmol/L, 上海生工)、MgSO<sub>4</sub> (50 mmol/L)、Bst DNA 聚合酶 (8 U/ $\mu$ l, NEB 美国)、10  $\times$  ThermoPol 缓冲液 (1  $\times$  ThermoPol 缓冲液含 0.1% TritonX-100、10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10 mmol/L KCl、20 mmol/L Tris-HCl, NEB 美国)、钙黄绿素荧光染料、TaqMan Gene Expression Master Mix (2  $\times$ , Life 美国)、大豆酪蛋白琼脂培养基 (TSA)、碱性蛋白胨水培养基 (APW)、脑心浸液琼脂培养基 (BHI)、弧菌显色培养基均购于北京陆桥有限责任公司,引物由上海生工合成。10  $\times$  PBS 缓冲溶液为: NaCl 80 g, NaHPO<sub>4</sub>  $\times$  12 H<sub>2</sub>O 29 g, KCl 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, 先溶于 900 ml 去离子水,待充分溶解后再加去离子水至 1 000 ml,室温保存,使用时进行 1:10 稀释。

## 1.2 方法

### 1.2.1 副溶血性弧菌纳米免疫磁珠的制备

副溶血性弧菌纳米免疫磁珠 (Nano-IMB-VP) 委托国家纳米科学中心制备。采用本实验室 (北京出入

境检验检疫局检验检疫技术中心食品检测一室) 制备的副溶血性弧菌单克隆抗体<sup>[9]</sup>, 通过 134 株副溶血性弧菌和 74 株非副溶血性弧菌进行特异性试验, 结果表明 134 株副溶血性弧菌呈阳性反应, 74 株非副溶血性弧菌呈阴性反应, 抗体具有良好的特异性。

### 1.2.2 用 Nano-IMS-VP 分离副溶血性弧菌

取 2.5 mg Nano-IMB-VP 于 1 ml 无菌离心管中, 置于磁分离架上, 吸附 1 min, 弃上清, 用 30  $\mu$ l PBS 重悬 Nano-IMB-VP, 加入 1 ml 菌悬液, 300 r/min 条件下, 室温孵育 30 min, 置于磁力架上吸附 1 min, 弃上清, 沉淀用 PBS 洗涤 2 次, 30 s/次, 重悬于 50  $\mu$ l 无菌水中, 备用。

### 1.2.3 平板菌落计数

将副溶血性弧菌 (ATCC 17802) 接种到 APW 培养基 (含 1% NaCl), 36  $^{\circ}$ C 过夜培养, 制备 10 倍系列稀释菌悬液, 吸取 1 ml 菌悬液于无菌平皿内, 每个稀释度做 2 个平行, 用冷却至 46  $^{\circ}$ C 的平板计数 TSA 琼脂培养基倾注平皿 (含 2% NaCl), 36  $^{\circ}$ C 培养 (24  $\pm$  2) h, 进行计数。

### 1.2.4 Nano-IMB-VP 捕获效率的测定

按照 1.2.3 方法制备参比菌株副溶血性弧菌 (ATCC 17802) 菌悬液并进行平板计数。选取 10<sup>2</sup> ~ 10<sup>3</sup> cfu/ml

的菌悬液进行捕获率测定。Nano-IMB-VP 捕获后的上清液再进行菌落计数,根据以下公式计算 Nano-IMB-VP 的捕获率。每次试验设置 3 个平行,重复 2 次。

Nano-IMB-VP 捕获率(%) = [(磁分离前的菌落数 - 磁分离后的菌落数)/磁分离前的菌落数] × 100。

### 1.2.5 菌体 DNA 的提取

DNA 的提取采用热裂解法,取 1 ml 菌悬液,10 000 r/min 离心 2 min,加入 50 μl 无菌水,沸水裂解 10 min,冰浴 5 min,相同条件离心 2 min,上清液为 DNA 模板, -20 °C 保存备用。

### 1.2.6 环介导等温扩增(LAMP)方法的建立

LAMP 引物:靶基因选择副溶血性弧菌不耐热溶血素(*tlh*)基因(NCBI 收录号 M36437)。应用引物设计软件 Primer Explorer 4.0 设计的引物序列详见表 2。

表 2 LAMP 引物序列

Table 2 The primer sequences of LAMP

引物名称	引物序列(5'-3')
外侧上游引物 F3	GCGCAAGGTTACAACATCAC
外侧下游引物 B3	GCGTGACATTCCAGAACACA
内侧上游引物 FIP	CGCGTTCACGAAACCGTGCTGATACTACGCGCTT GTTCCA
内侧下游引物 BIP	TTGGACATCAACCGCTCATCGTGACGCTGCACA CTCAGAG
环状上游引物 LF	TCGGGGCCGAGAAGTTAGC
环状下游引物 LB	CTGTGATTACATGTACACCCAC

25 μl 反应体系包括 10 × ThermoPol 缓冲液 12.5 μl, F3、B3 各 0.2 μmol/L, FIP、BIP 各 2.0 μmol/L, LF、LB 各 1.0 μmol/L, dNTPs 1.6 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 2.0 mmol/L, Bst DNA 聚合酶 2 μl, DNA 模板 3 μl, 钙黄绿素荧光染料 2 μl, 用无菌水补足体系。LAMP 反应条件:65 °C, 60 min, 通过 LAMP 扩增仪收集荧光信号,判定反应结果。

### 1.2.7 Nano-IMS-VP LAMP 方法的建立和灵敏度的确定

按照 1.2.3 方法制备 ATCC 17802 菌悬液,选取几个连续梯度的菌悬液,每个梯度取 10 ml 菌液,做 2 个平行,10 000 r/min,离心 2 min,弃上清,用 1 ml 无菌生理盐水重悬菌体,用 Nano-IMB-VP 富集菌体,煮沸法提取 DNA,进行 LAMP 检测。同时,选取的每个稀释度划线接种弧菌显色培养基,按照 GB/T 4789.7—2008 方法进行鉴定。

### 1.2.8 人工模拟样品的检测

称取经过 GB/T 4789.7—2008 验证无 VP 的扇贝样品 25 g 于均质袋中,加入 225 ml APW 培养基(含 1% NaCl),胃蠕动器击拍混匀 30 s,按此方法制备 2 份样品匀浆液。每份匀浆液添加 1 ml 经梯度稀释的 VP 菌悬液,添加的菌体浓度分别为 23 和 2 cfu/ml,另设不

添加 VP 的样品基质为阴性对照,36 °C 培养,分别在 2、4、6、8、10、12 h 取样,分别采用 Nano-IMS-LAMP 方法、Nano-IMS 结合 GB/T 4789.7—2008 方法,LAMP 方法和 GB/T 4789.7—2008 方法进行检测。

## 2 结果

### 2.1 Nano-IMB-VP 捕获效率的测定

取 1 ml 浓度为  $8.4 \times 10^2$  cfu/ml 的副溶血性弧菌菌悬液,分别与 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mg 的 Nano-IMB-VP 进行结合,吸附后计数上清液的菌落数,按照 1.2.4 的公式计算捕获率,结果见表 3。

表 3 Nano-IMB-VP 的捕获率

Nano-IMB-VP 用量/mg	磁分离后菌落总数/(cfu/ml)			捕获效率 /%
	平行 1	平行 2	平行 3	
0.5	718	706	712	16.15 ± 0.72
1.0	596	612	603	28.13 ± 0.96
1.5	475	489	470	44.23 ± 1.34
2.0	364	382	377	54.10 ± 2.80
2.5	226	212	218	73.97 ± 0.83
3.0	213	210	221	74.44 ± 0.68
3.5	220	218	215	74.09 ± 0.30

随着 Nano-IMB-VP 用量的增加,捕获效率不断提高,当其用量为 2.5、3.0 和 3.5 mg 时,捕获效率达到 74%,表明当磁珠用量为 2.5 mg 以上时,其捕获效率没有增加。因此,后续试验均采用 2.5 mg Nano-IMB-VP。

### 2.2 Nano-IMB-VP 捕获特异性的测定

为了进一步验证 Nano-IMB-VP 的特异性,选择霍乱弧菌等 6 株非目标菌,Nano-IMB-VP 用量为 2.5 mg 进行捕获试验。结果见表 4,Nano-IMB-VP 对 6 株非目标菌的捕获率均在 13% 以下,虽然存在一定的非特异性吸附,但经过 LAMP 方法检测,其结果均为阴性,不会影响本方法的检测特异性。

表 4 Nano-IMB-VP 捕获特异性

Table 4 The specific of Nano-IMB-VP

菌株名称	磁分离前 菌落总数 /(cfu/ml)	磁分离后菌落 总数/(cfu/ml)			捕获效率 /%
		平行 1	平行 2	平行 3	
霍乱弧菌-75	794	709	701	689	11.5 ± 0.71
创伤弧菌	650	576	583	572	11.2 ± 0.85
单增李斯特菌	718	649	643	637	10.5 ± 0.84
沙门菌	869	765	752	759	12.7 ± 0.75
金黄色葡萄球菌	732	671	654	660	9.6 ± 1.18
大肠杆菌	812	717	724	726	10.7 ± 0.58

### 2.3 LAMP 方法的特异性

采用 134 株副溶血性弧菌,包括实验室分离株和 2 株 ATCC 参比菌株(副溶血性弧菌 ATCC 17802 和

ATCC 1.1997), 41株霍乱弧菌实验室分离株, 以及包括创伤弧菌 ATCC 1758、河流弧菌 ATCC 1.1611、拟态弧菌 ATCC 1.1969、溶藻弧菌 ATCC 1.1607、溶藻弧菌 ATCC 1833、费尼斯弧菌 ATCC 1.1612、解蛋白弧菌 ATCC 1.1826 在内的 33 株非目标菌株, 对于 LAMP 引物特异性进行了测试。结果见表 5。特异性验证结果表明, 所设计的 LAMP 引物具有良好的特异性, 与非目标菌不存在交叉反应。

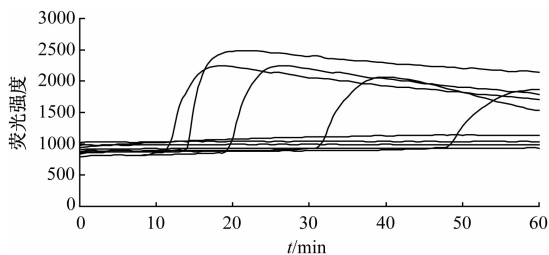
表 5 LAMP 方法特异性  
Table 5 The specific of LAMP

菌株	菌株数	LAMP
副溶血性弧菌分离株	132	+
副溶血性弧菌标准菌株	2	+
霍乱弧菌分离株	41	-
非副溶血性弧菌标准菌株	33	-

注: “+”表示 LAMP 反应阳性; “-”表示 LAMP 反应阴性

## 2.4 Nano-IMS-LAMP 检测灵敏度的确定

将参比菌株副溶血性弧菌 ATCC 17802 过夜培养物, 进行梯度稀释, 菌悬液原始浓度为  $1.4 \times 10^8$  cfu/ml, 从  $1.4 \times 10^5$  cfu/ml 菌体浓度水平进行 Nano-IMS-LAMP 方法检测灵敏度的测试, Nano-IMS-LAMP 用量为 2.5 mg, 结果如图 1 所示。该方法可检测到  $1.4 \times 10^2$  cfu/ml 菌悬液。同时采用 GB/T 4789.7—2008 方法进行检测, 该方法的检测灵敏度为  $1.4 \times 10^4$  cfu/ml。因此, Nano-IMS-LAMP 的检测灵敏度比传统检测方法高 100 倍。



注: 横坐标从左到右出现扩增曲线依次是: 阳性对照,  $1.4 \times 10^5$  cfu/ml 菌液,  $1.4 \times 10^4$  cfu/ml 菌液,  $1.4 \times 10^3$  cfu/ml 菌液,  $1.4 \times 10^2$  cfu/ml 菌液; 未出现扩增的曲线包括: 14 cfu/ml 菌液, 1.4 cfu/ml 菌液, 阴性对照

图 1 Nano-IMS-LAMP 检测灵敏度

Figure 1 The sensitivity of Nano-IMS-LAMP

## 2.5 Nano-IMS-LAMP 检测人工模拟样品

在经传统方法验证不含目标菌的扇贝样品中进行人工添加试验。每 25 g 样品中, 分别添加 1 ml 菌体浓度为 23 和 2 cfu/ml 的 VP 菌悬液。多时间点取样, 用 Nano-IMS-LAMP 方法、Nano-IMS-LAMP 结合 GB/T 4789.7—2008 方法、LAMP 法、GB/T 4789.7—2008 方法同时检测, 结果见表 4。当添加菌体浓度为 23 cfu/25 g 样品时, Nano-IMS-LAMP 的检出时间是 6 h, Nano-IMS-LAMP 结合 GB/T 4789.7—2008 方法

检出时间是 8 h; 在不用 Nano-IMS-LAMP 富集菌体的情况下, LAMP 检测方法的检出时间是 10 h, GB 4789.7—2008 方法检出时间是 12 h。当添加菌体浓度为 2 cfu/25 g 样品时, Nano-IMS-LAMP 的检出时间是 8 h, Nano-IMS-LAMP 结合 GB/T 4789.7—2008 方法检出时间是 10 h; 在不用 Nano-IMS-LAMP 富集菌体的情况下, LAMP 检测方法的检出时间是 12 h, GB/T 4789.7—2008 方法在增菌 12 h 时未检出。

表 6 扇贝模拟样品检测结果

Table 6 The results of scallop artificial samples

菌体个数 / (cfu/25g)	取样时间 /h	Nano-IMS-LAMP	Nano-IMS-VP 结合 GB/T 4789.7—2008	LAMP	GB/T 4789.7—2008	
23	2	-	-	-	-	
	4	-	-	-	-	
	6	+	-	-	-	
	8	+	+	-	-	
	10	+	+	+	-	
	12	+	+	+	+	
	2	2	-	-	-	-
		4	-	-	-	-
		6	-	-	-	-
		8	+	-	-	-
		10	+	+	-	-
		12	+	+	+	-

注: “+”表示反应阳性; “-”表示反应阴性

## 3 结论

使用本实验室制备的经验证具有良好特异性的副溶血性弧菌单克隆抗体, 委托国家纳米研究中心制备副溶血性弧菌免疫纳米磁珠 (Nano-IMS-LAMP), 通过多次试验确定了在菌体浓度为  $10^3$  cfu/ml 水平的 Nano-IMS-LAMP 用量, 即当 Nano-IMS-LAMP 用量为 2 mg/ml 时, 对 VP 的捕获效率达到 74%。采用 6 株非目标菌株对 Nano-IMS-LAMP 的特异性进行了进一步验证, 结果显示针对 6 株非目标菌的吸附率在 13% 以下, 为非特异性吸附。使用 2 株 ATCC 副溶血性弧菌菌株和 132 株本实验室分离的菌株、41 株自分离霍乱弧菌和 33 株非目标菌对 LAMP 方法的引物进行了特异性验证, 结果表明所设计的 LAMP 引物具有良好的特异性, 与弧菌属内和属外的非目标菌均不存在交叉反应。在纯培养条件下, Nano-IMS-LAMP 方法的检测灵敏度为 140 cfu/ml 菌液。基质添加试验结果表明, 在低水平添加, 即副溶血性弧菌添加浓度为 2 cfu/25 g 样品时, Nano-IMS-LAMP 方法的增菌时间只需 8 h, Nano-IMS-LAMP 结合 GB/T 4789.7—2008 方法的增菌时间需要 10 h。LAMP 方法缩短了 2 h, 而在不使用 Nano-IMS-LAMP 富集菌体的情况下, 增菌 12 h 时 GB/T 4789.7—2008

方法未检出。

纳米免疫磁珠不仅可以富集目标菌体,亦可有效地去除抑制剂成分,如食物残渣中的有机物、酚类化合物、脂肪、糖原或微生物代谢产物,可致LAMP和RT-PCR检测灵敏度降低甚至反应完全失败,因此必须通过富集和纯化对样品进行前处理<sup>[10]</sup>。免疫磁珠分离技术可以解决以上问题。但IMS技术作为一种较新的免疫学技术,其本身也存在一些较难克服的问题。首先是免疫磁珠本身的质量,特别是对于单克隆抗体包被的磁珠,由于单抗效价批次间易出现波动,可直接影响免疫磁珠对目标菌的捕获率。其次是在不同的标本性状及杂菌污染程度下,免疫磁珠和目标微生物相互作用会受到影响,会降低该技术的灵敏度和特异性。如杂菌污染较多的牛肉类制品,并不适用于IMS技术的检测<sup>[11-13]</sup>。本研究将纳米免疫磁珠与LAMP检测方法结合,建立以免疫磁分离为前处理步骤的快速检测方法,由以上结果得出:Nano-IMB-VP可以高效、特异性富集副溶血性弧菌,本研究所建立的Nano-IMS-LAMP方法缩短了检测时间,在实际检测工作中具有良好的应用前景。

## 参考文献

- [1] 张俊彦,梅玲玲,朱敏,等. 301份海水产品副溶血弧菌定量检测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(3):509-510.
- [2] 张隽娴,郭爱玲,郑华英. 市水产品副溶血弧菌污染状况的调查[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(3):718-719.
- [3] 张淑红,申志新,关文英,等. 河北省沿海地区海产品副溶血

弧菌污染状况调查分析[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(3):333-334.

- [4] A Manti, T Falcioni, R Campana. Detection of environmental *Vibrio parahaemolyticus* using a polyclonal antibody by flow cytometry[J]. Environmental Microbiology Reports,2010,2(1):158-165.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.7—2008 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [6] 王路梅,杨晋川,郭惠,等. 荧光PCR与免疫磁珠技术相结合用于霍乱弧菌的检索[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(7):1807-1808.
- [7] 张东方,袁飞,王娉,等. 免疫磁捕获-实时荧光PCR快速检测鸡肉中沙门氏菌[J]. 食品与发酵工业,2011,37(8):142-146.
- [8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000,28(12):63-68.
- [9] 张蕾,张西萌,张海予,等. 副溶血性弧菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备和在食品检测中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(7):734-738.
- [10] 余楠,车小燕. 免疫磁珠技术在病原微生物检测中的应用前景[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(3):280-283.
- [11] 盛跃颖,陈敏. 免疫磁珠分离技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(5):478-480.
- [12] Tatarvarthy A, Peak K, Vequilla W, et al. An accelerated method for isolation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from artificial contaminated foods, using a short pre-enrichment, immunomagnetic separation, and xylose-lysine-desoxycholate agar (61X method)[J]. J Food Prot, 2009, 72(3):583-590.
- [13] 徐晓可,吴清平,张菊梅,等. 免疫磁珠分离技术在常见食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2011,19(5):1196-1198.

## 论著

# 应用酶联免疫技术建立鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶间接检测方法

姜侃<sup>1</sup>, 厉永纲<sup>2</sup>, 沈泓<sup>1</sup>, 刘鹏鹏<sup>1</sup>, 吴晨露<sup>1</sup>, 金燕飞<sup>1</sup>

(1. 浙江省质量检测科学研究院, 浙江 杭州 310013; 2. 捷和泰(北京)生物科技有限公司, 北京 102206)

**摘要:**目的 建立酶联免疫间接快速测定鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的方法。方法 应用氨苄青霉素抗体,人工制备氨苄青霉素和辣根过氧化物酶的结合物 Amp-HRP,建立氨苄青霉素酶联免疫检测方法。应用该方法分别检测样品反应管和阴性对照管中氨苄青霉素,通过比较两者 OD<sub>450</sub>值,间接判断样品中是否含有 $\beta$ -内酰胺酶。结果 成功建立了酶联免疫间接快速测定鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的方法,检测灵敏度可达0.0005 IU/ml。结论 该方法检测结果准确可靠,可广泛应用于鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的检测。

**关键词:** $\beta$ -内酰胺酶; 酶联免疫; 鲜乳; 快速检测; 兽药残留; 抗生素

中图分类号:R155.5<sup>+</sup>7; TS207 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0405-05