

基于纳米免疫磁珠快速富集 4 种海洋 致病性弧菌的研究*

张璇 戴娟 王祖忠 周君 张迪骏 张春丹 李晔 苏秀榕

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 为研究海洋中常见致病性弧菌的快速分离富集方法——免疫磁珠法, 本文以副溶血弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌、灿烂弧菌为研究对象, 制备纳米免疫磁珠, 并通过一系列优化条件, 用 3M 试纸计算捕获率来确定免疫磁珠最佳捕获条件。最后分别对 4 种致病性弧菌的不同菌液稀释浓度、对 1 株目标菌和 8 株非目标菌、4 种混合菌进行捕获, 从而评价免疫磁珠的灵敏度、特异性以及抗干扰能力。结果表明, 4 种磁珠偶联最佳抗体量为 300、600、150、150 μg 。最佳捕获条件: 副溶血弧菌免疫磁珠用量 3mg, 免疫反应 45min, 磁分离 3min, pH 7.4 缓冲液体系。哈维氏弧菌免疫磁珠用量 3mg, 免疫反应 45min, 磁分离 1min, pH 6.0 缓冲液体系。创伤弧菌免疫磁珠用量 12mg, 免疫反应 60min, 磁分离 5min, pH 8.0 缓冲液体系。灿烂弧菌免疫磁珠用量 6mg, 免疫反应 30min, 磁分离 3min, pH 7.4 缓冲液体系。在纯培养情况下, 4 种免疫磁珠灵敏度均达到 10 CFU/mL 数量级; 分别对 9 株菌进行捕获, 对目标菌的捕获率均达到 87% 以上, 对非目标菌的捕获率均低于 32%; 对 4 种混合菌进行捕获时, 免疫磁珠捕获率不受其它杂菌干扰。本研究证明了该免疫磁珠有较好的灵敏度、特异性和抗干扰能力, 且与其它增菌方法相比, 大大缩短了时间, 具有较好的应用前景。

关键词 纳米免疫磁珠; 致病性弧菌; 富集; 捕获率

中图分类号 R155.5 doi: 10.11693/hyhz20150600167

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)均属于革兰氏阴性、兼性厌氧、嗜盐性弧菌, 主要分布于海水、盐湖等水域环境以及鱼虾、蟹贝类等海产品中, 是引起海洋生物发生细菌性疾病的首要原因(Baker-Austin *et al*, 2010; 刘瑞等, 2011; 赵永刚等, 2013; Tanguy *et al*, 2013; 高磊等, 2014; Sun *et al*, 2014)。目前, 直接检测海洋中的致病性弧菌, 往往由于目标菌太少而难以检测, 所以一般都采用先增菌后检测的方式, 而传统增菌方法不仅费时, 且灵敏度低(赵玲等, 2013)。为了加快对以上致病弧菌的检测速度及提高检测限, 采用高效、简便的免疫磁珠法对样品进行分离富集, 该法作为一

种前处理手段, 与其它检测方法结合使用, 可大大缩短检测时间, 提高检测限(苏晨曦等, 2012)。Wang 等(2013)用免疫磁分离技术结合酶联免疫吸附法(ELISA)检测苹果汁中的脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus* spp.), 检测限为 10³ CFU/mL, 与传统培养法相比, 检测时间缩短了 24—40 倍。Zeng 等(2014)用免疫磁分离与环介导等温扩增(LAMP)技术联合检测生蚝中的副溶血弧菌, 在纯培养中, 检测限为 1.4 \times 10² CFU/mL, 且不受其它菌群的干扰; 在生蚝样品中, 检测限可达到 1.9—0.19 CFU/g。目前, 国内外已有不少学者利用免疫磁珠快速富集食品中的致病菌, 如副溶血弧菌(黄韵仪等, 2012; 苏晨曦等, 2012)、大肠杆菌 O157: H7 (*Escherichia coli* O157: H7)

* 海洋公益性行业科研专项, 201105007 号; 宁波大学研究生科研创新基金项目, G14045 号。张璇, 硕士研究生, E-mail: 1010578718@qq.com

通讯作者: 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-17, 收修改稿日期: 2015-06-29

(Zhu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015)、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)(徐金亭等, 2012)等, 并结合 ELISA、LAMP、各种 PCR 等方法实现对单个或者多种目标菌的定量检测(Yang *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2014)。

免疫磁珠分离技术基于抗原抗体间的特异性反应, 高效浓缩目的样品, 且可保留样品原有的生物活性, 有利于后续检测, 并广泛应用于致病菌检测的样品前期处理(闻一鸣等, 2013a, b)。该法可以快速、特异性地从样品基质中富集致病弧菌, 解决了传统致病菌检测过程中食品组份复杂、致病菌难分离、基质干扰大等问题(黄韵仪等, 2012; 王程程等, 2013), 如海水样品, 只要将海水加到某种特异性免疫磁珠中, 就能立即分离富集对应的致病菌, 有效对样品中的目标菌进行捕获, 起到富集浓缩的作用, 从而减少前期增菌时间, 缩小寻找目的菌范围, 为后续检测减少了工作量(苏晨曦等, 2012)。本研究制备的纳米免疫磁珠, 可分别实现对 4 种海洋致病性弧菌的快速、特异性富集, 这大大提高了检测的灵敏度和准确度, 具有简便、快速、经济等特点, 为更简便、快捷地定量检测致病弧菌做好了前期准备, 也为开发 4 种海洋弧菌免疫磁珠试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

副溶血弧菌(VP)ATCC 17802、创伤弧菌(VV)ATCC 27562、哈维氏弧菌(VH)ATCC 33868、灿烂弧菌(VS)ATCC 33125、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*, EC)ATCC 13047、黄海希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*, SM) MCCC 1A02628、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*, VA) ATCC 43308、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*, SF) ATCC 14506、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, ET) ATCC 15947 购于青岛日水生物技术有限公司; 4 种弧菌抗体、牛血清白蛋白(BSA)、叠氮化钠(NaN_3)购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 纳米四氧化三铁购于阿拉丁试剂(中国)有限公司; 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)、25%戊二醛购于沃凯化成工业(上海)有限公司; 3M Petrifilm 菌落总数测试片购于美国 3M 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫磁珠的制备 将纳米四氧化三铁用 APTES 氨基化修饰后, 再用戊二醛进行醛基化处理, 然后用 PBS 清洗 3 次, 最后加 PBS 重悬, 4°C 保存备

用(何磊等, 2008)。取 5 份 1mL 醛基化磁珠于 1.5mL 离心管, 磁分离, 用 PBS 清洗 3 次; 分别加入 75、150、300、600、1200 μg VP 多克隆抗体, 37°C 于旋转混匀仪中偶联 2h; 置于磁分离器, 去液相, 用 PBS 清洗 3 次; 加 1mL 含 0.1% BSA 和 0.02% NaN_3 的 PBS 缓冲液, 37°C 于旋转混匀仪中封闭 1h (王程程等, 2013); 磁分离, 去液相, PBS 清洗 3 次; 最后加 1mL PBS 重新分散免疫磁珠, 标为 IMB-VP1—5 (75mg/mL), 4°C 保存备用。VH、VV、VS 免疫磁珠的制备同上。

1.2.2 抗体加入量的优化 将-80°C 保存的菌接种至 5mL 海水牛肉膏蛋白胨培养基中, 28°C 振荡培养 24h, 用无菌 PBS 稀释菌液浓度。取 IMB-VP1—5 各 3mg 于 1.5mL 离心管, 加 1mL VP 菌悬液, 不加免疫磁珠的作为空白对照, 37°C 于旋转混匀仪中富集 45min, 磁分离 3min, 去液相, 用 PBS 清洗 3 次。最后将免疫磁珠-菌复合物重新分散在 1mL PBS 中, 接种于 3M 试纸, 平行 3 次, 28°C 培养 1—2d, 计算其捕获率。

捕获率(capture efficiency, CE)(%) = $N_c/N_0 \times 100$, 其中, N_c 是免疫磁珠捕获到的细菌数, 单位为 CFU/mL; N_0 是空白对照中的细菌数, 单位为 CFU/mL。

1.2.3 免疫磁珠量的优化 分别取 0.75、1.5、3、6、12mg IMB-VP3 于 1.5mL 离心管, 加 1mL VP 菌悬液, 不加免疫磁珠的作为空白对照, 37°C 于旋转混匀仪中富集 45min, 磁分离 3min, 其它操作同 1.2.2, 计算捕获率。

1.2.4 免疫反应时间的优化 取 3mg IMB-VP3 于 1.5mL 离心管, 加 1mL VP 菌悬液, 不加免疫磁珠的作为空白对照, 37°C 于旋转混匀仪中分别富集 5、15、30、45、60、90min, 磁分离 3min, 其它操作同 1.2.2, 计算捕获率。

1.2.5 免疫磁珠分离时间的优化 取 3mg IMB-VP3 于 1.5mL 离心管, 加 1mL VP 菌悬液, 不加免疫磁珠的作为空白对照, 37°C 于旋转混匀仪中富集 45min, 磁分离分别为 0.5、1、3、5、7 min, 其它操作同 1.2.2, 计算捕获率。

1.2.6 pH 的优化 取 3mg IMB-VP3 于 1.5mL 离心管, 加 1mL 分别用 pH 6.0、pH 7.4、pH 8.0 和 pH 9.6 的 PBS 缓冲液稀释的 VP 菌悬液, 不加免疫磁珠的作为空白对照, 37°C 于旋转混匀仪中富集 45min, 磁分离 3min, 其它操作同 1.2.2, 计算捕获率。VH、VV、VS 免疫磁珠捕获细菌条件的优化同上。

1.2.7 超微结构观察 VP、VH、VV 和 VS 免疫

磁珠分别与 VP、VH、VV 和 VS 菌体在 PBS 中结合, 经过戊二醛固定以及乙醇梯度脱水后(闻一鸣等, 2013a, b), 在扫描电子显微镜(SEM)下观察免疫磁珠与其对应致病弧菌的结合情况。

1.2.8 免疫磁珠的灵敏度检测 分别取 1mL 菌浓度为 10^0 — 10^7 CFU/mL 数量级的 VP、VV、VH、VS 菌悬液, 添加 3mg IMB-VP3, 37°C 于旋转混匀仪上孵育 45min, 磁分离 3min, 用 PBS 清洗 3 次, 最后用 1mL PBS 重悬。涂 3M 试纸, 重复 3 次, 28°C 培养 1—2d, 计算捕获率。检测 VV、VH、VS 免疫磁珠的灵敏度时按照各自最佳捕获条件进行实验, 具体操作同上。

1.2.9 免疫磁珠的特异性以及抗干扰能力检测 分别取 VP、VV、VH、VS、EC、SF、ET、VA、SM 菌液 1mL, 添加 3mg IMB-VP3, 37°C 于旋转混匀仪上孵育 45min, 磁分离 3min, 用 PBS 清洗 3 次, 最后用 1mL PBS 重悬。涂 3M 试纸, 重复 3 次, 28°C 培养 1—2d, 计算捕获率。用 IMB-VP3 对 VP、VV、VS、VH 4 种混合菌进行捕获, 从而确定 VP 免疫磁珠的抗干扰能力。检测 VV、VH、VS 免疫磁珠的特异性以及抗干扰能力操作同上。

2 结果与分析

2.1 抗体加入量

当 VP 抗体加入量在 75—300 μ g 之间时, 捕获率逐渐增加, 当加入的抗体量大于 300 μ g 时, 捕获率开始下降, 最后稳定在 65%左右。当 VH 抗体加入量在 75—600 μ g 之间时, 捕获率逐渐增加, 当加入的抗体量大于 600 μ g 时, 捕获率下降。当 VV、VS 抗体加入量在 75—150 μ g 之间时, 捕获率逐渐增加, 当加入的抗体量大于 150 μ g 时, 捕获率下降。VP 免疫磁珠的最佳抗体加入量为 300 μ g, 捕获率为 87.5%, VH 免疫磁珠的最佳抗体加入量为 600 μ g, 捕获率达到 94.2%, VV 和 VS 免疫磁珠的最佳抗体加入量为 150 μ g, 捕获率分别为 98.1%和 85.5% (见图 1)。

2.2 免疫磁珠量

当 VP、VH 免疫磁珠的加入量为 0.75—3mg 时, VP、VH 免疫磁珠的捕获率逐步上升, 分别达到 89.8%和 99.1%, 当加入的免疫磁珠用量大于 3mg 时, 捕获率会有所下降。VV 免疫磁珠的加入量为 12mg 时, 捕获率达到最高, 为 98.3%。当 VS 免疫磁珠的加入量为 0.75—6mg 时, VS 免疫磁珠的捕获率逐步上升, 当加入的免疫磁珠用量大于 6mg 时, 捕获率基本趋于饱和(见图 2)。

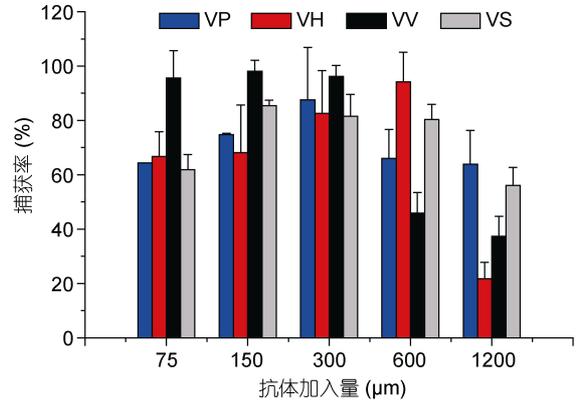


图 1 抗体加入量对捕获率的影响

Fig.1 Effect of antibody amount on capture efficiency

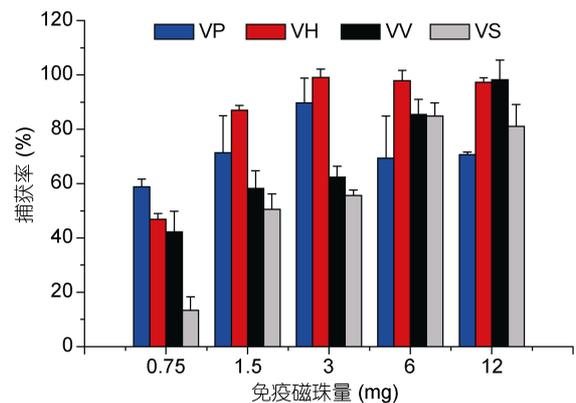


图 2 免疫磁珠量对捕获率的影响

Fig.2 Effect of IMBs (immunomagnetic beads) amount on capture efficiency

2.3 免疫反应时间

免疫反应时间在 5—45min 内, VP、VH 免疫磁珠的捕获率逐渐增大, 捕获率分别为 54.9%、63.0%、88.2%、89.1%和 75.2%、90.1%、92.1%、97.5%, 说明磁珠与菌液反应的时间越长效果越好, 但是当反应时间大于 45min, 效果就不明显。VV、VS 免疫磁珠分别在 60min、30min 时捕获率最高(见图 3)。

2.4 免疫磁分离时间

VP 和 VS 免疫磁珠在不同免疫磁分离时间的捕获效率分别为 57.3%、67.2%、89%、88.5%、85.8%和 69.7%、71.5%、85.9%、69.7%、65.9%, 捕获率随着磁分离时间延长到 3min 时达到最高, 时间再延长捕获率反而降低, 说明 3min 为最佳磁分离时间。VV 免疫磁珠在不同免疫磁分离时间内的捕获率分别为 50.5%、58.2%、75.8%、98.9%、96.7%, 免疫磁分离时间在 5min 时, 捕获率达到最高。VH 免疫磁珠在磁分离 1min 时达到 85.9%的最高捕获率(见图 4)。

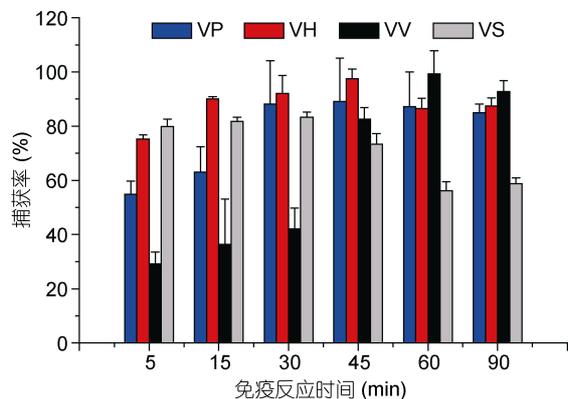


图 3 免疫反应时间对捕获率的影响

Fig.3 Effect of immunoreaction times on capture efficiency

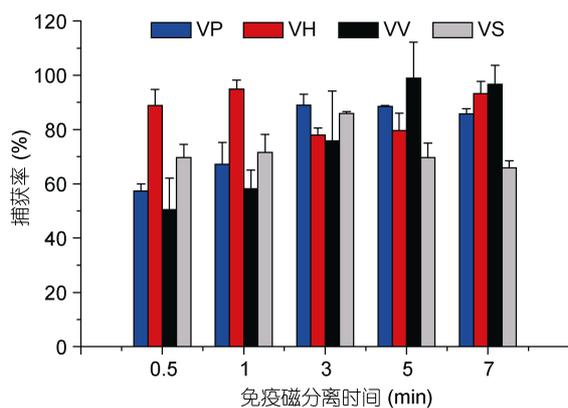


图 4 免疫磁分离时间对捕获率的影响

Fig.4 Effect of immunomagnetic separation times on capture efficiency

2.5 缓冲液 pH

VP、VS 免疫磁珠在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中捕获率最佳, VH 免疫磁珠在 pH 6.0 的 PBS 缓冲液中捕获率最佳, VV 免疫磁珠在 pH 8.0 的 PBS 缓冲液中捕获率最佳。在 pH 9.6 的 PBS 缓冲液中, VP 免疫磁珠的捕获率为 0, VS 免疫磁珠的捕获率为 12.3%, VH、VV 免疫磁珠的捕获率均低于 80%(见图 5)。

2.6 超微结构

裸磁珠大部分颗粒呈现圆形, 无不规则形状, 颗粒大小相对均一, 分散性较好, 基本上没有成堆成团的现象(图 6a), 可用于制备免疫磁珠。当加入抗体后, 醛基化磁珠分布在抗体液中, 与抗体结合, 开始出现聚集现象(图 6b)。图 6c—图 6f 分别表示 VP、VH、VV 和 VS 4 种免疫磁珠均能通过其表面的抗体分别与各自的抗原相结合, 且菌体表面结合磁珠数量较多。4 种弧菌都呈月牙般的弧状, 免疫磁珠仍呈圆形, 但大量聚集, 一个菌体表面可与多个磁珠结合, 从而使磁珠和菌体聚集在一起, 呈团状。除 VH 免疫磁珠

较少捕获到 VH 外, 其余 3 种免疫磁珠均能大量捕获对应致病弧菌。

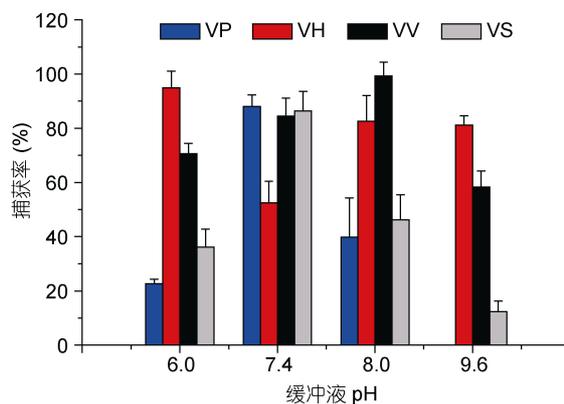


图 5 不同 pH 缓冲液对捕获率的影响

Fig.5 Effect of buffer at different pH values on capture efficiency

2.7 灵敏度

在最佳免疫捕获条件下, VP、VH、VV 免疫磁珠分别捕获 10^0 — 10^7 CFU/mL 数量级的 VP、VH 和 VV, 结果如图 7 所示, 在 10^1 — 10^7 CFU/mL 浓度下, 捕获率逐渐下降。VS 免疫磁珠分别捕获 10^0 — 10^4 CFU/mL 数量级的 VS, 在 10^1 — 10^4 CFU/mL 浓度下, 捕获率逐渐下降。4 种免疫磁珠均可捕获到 10^0 CFU/mL 数量级的相应致病弧菌, 表明该免疫磁珠具有较高的灵敏度。

2.8 特异性和抗干扰能力

VP、VH、VV、VS 4 种免疫磁珠对 9 株菌分别进行捕获。VP 免疫磁珠对 VP 的捕获率为 87.3%, 对其它菌株的捕获率均低于 20%。VH、VV、VS 免疫磁珠对其相应致病弧菌的捕获率均达到 90%以上, VH 免疫磁珠对 VV 和 VS 的捕获率均为 18.6%, 对其余菌株的捕获率均低于 15%; VV 免疫磁珠对 VS 的捕获率为 31.8%, 对其余菌株的捕获率均低于 20%; VS 免疫磁珠对 EC 的捕获效率为 26%, 对其余菌株的捕获率均低于 20%。VP、VH、VV、VS 4 种免疫磁珠抗干扰能力实验中, 分别对 VP、VV、VS、VH 4 种混合菌进行捕获, 4 种免疫磁珠对其相应致病弧菌的捕获率均在 90%以上, 且不受其它杂菌影响, 说明此次制备的免疫磁珠特异性和抗干扰能力较强(见图 8)。

3 讨论

用免疫磁珠富集样品中的目标菌, 不仅能显著

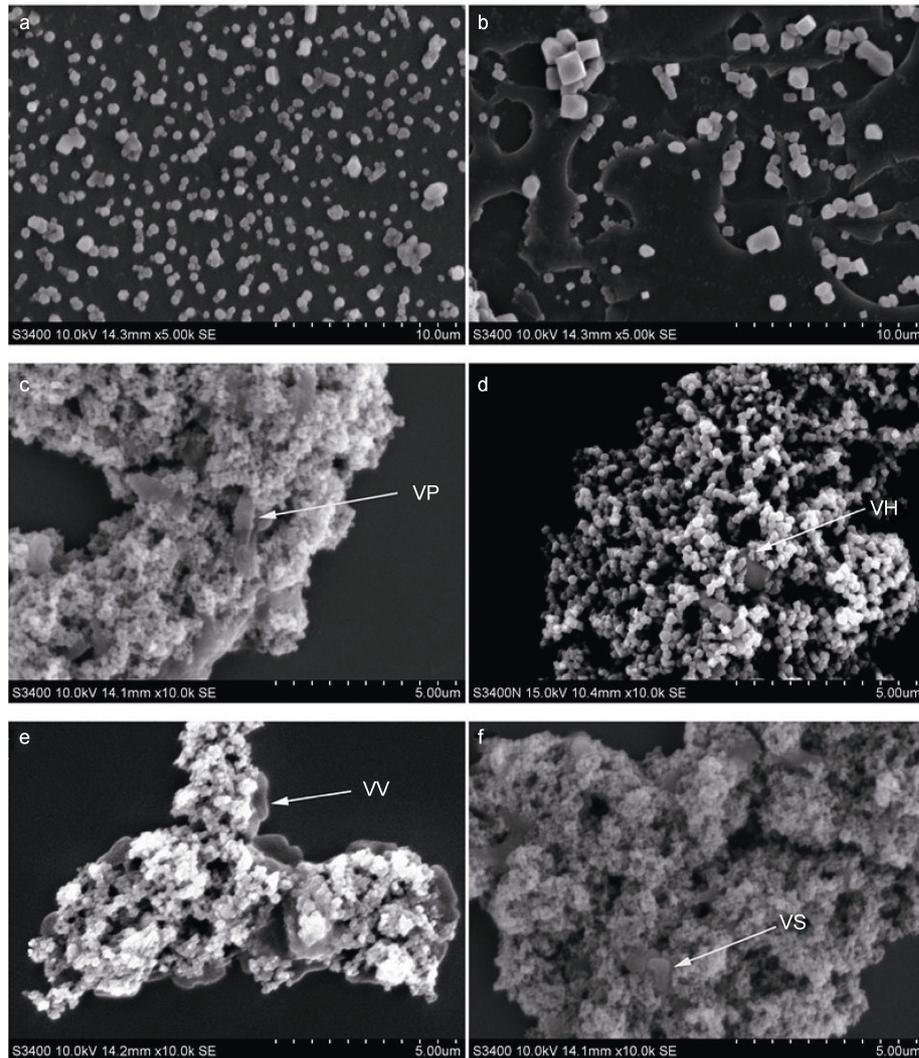


图6 免疫磁珠与致病弧菌结合的扫描电镜图
Fig.6 SEM of pathogenic vibrio interacting with IMBs

减少背景细菌的干扰,还能消除样品基质中的复杂成分,纳米免疫磁珠因其光学特性、比表面积等优势而在致病菌检测方面受到越来越多的关注(Leon-Velarde *et al*, 2009; Wadud *et al*, 2010; Wang *et al*, 2013)。首先,随着磁珠粒径的减小,细菌表面可结合的磁珠数量增多,在磁分离时细菌从免疫磁珠上脱落下来的概率减少,同时,纳米磁珠比表面积较微米磁珠大,连接的抗体量更多,弥补了抗体亲和力不足的缺点,从而使捕获率增加(Pamme *et al*, 2006)。其次,纳米磁珠粒径小,受布朗热运动作用大,在溶液中呈现单分散状态,加上纳米磁珠比表面积大,使得纳米磁珠表面上的抗体与抗原接触概率显著增加(McCloskey *et al*, 2003a, b)。本研究所采用的是200nm的免疫磁珠,所以在致病菌捕获率方面较微米磁珠

有极大优势,在 10^6 — 10^7 CFU/mL数量级下,VP、VH、VV和VS免疫磁珠分别在最优捕获条件下获得高达90%左右的捕获率,而之前报道的微米免疫磁珠捕获致病菌的效率通常在32%—56%之间(Datt *et al*, 2008)。Yang等(2007)分别用纳米磁珠与微米磁珠捕获单增李斯特菌,结果显示,纳米磁珠捕获率是微米磁珠捕获率的1.4—26倍,另外,单增李斯特菌浓度越低,纳米磁珠捕获率与微米磁珠捕获率的差异更显著。钟子清等(2013)采用不同粒径免疫磁珠捕获单增李斯特菌,结果显示180nm、350nm、1180nm的免疫磁珠捕获细菌效率分别为95%、18%和9%。但是,免疫磁珠并不是粒径越小捕获率就越高。研究表明(王报贵等, 2013),小于50nm的磁珠由于粒径太小可能会使目标菌死亡,且需要超强磁场和长时间的分

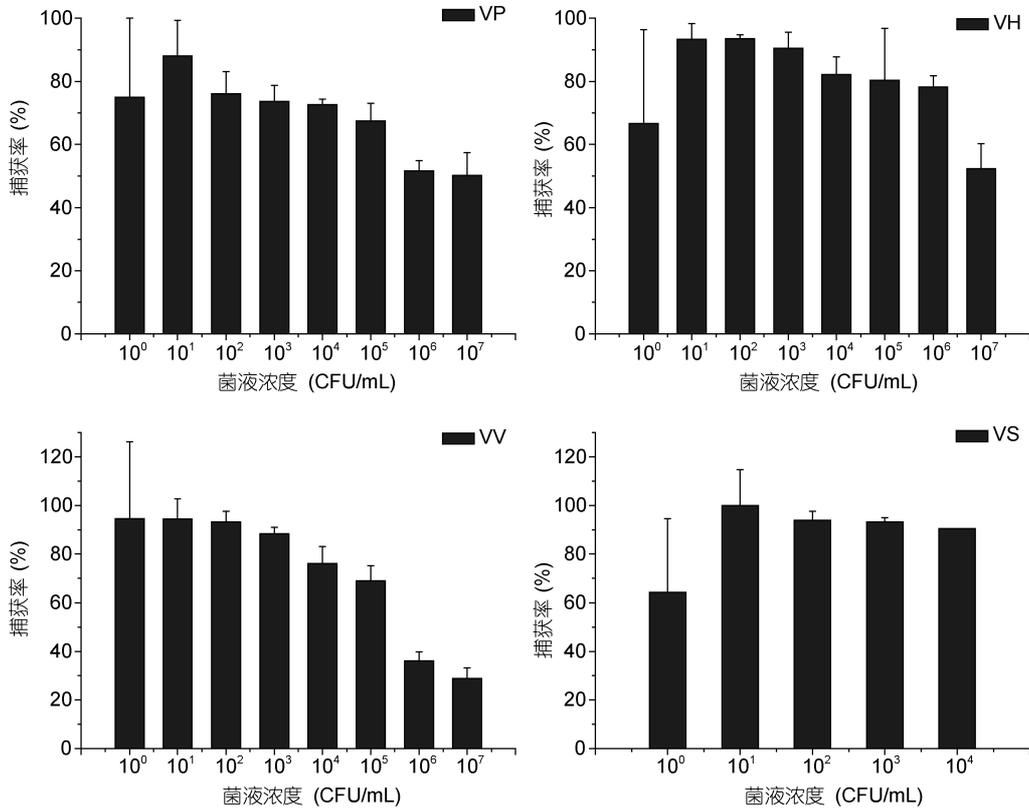


图 7 免疫磁珠捕获的灵敏度实验
Fig.7 The sensitivity of the IMBs capture

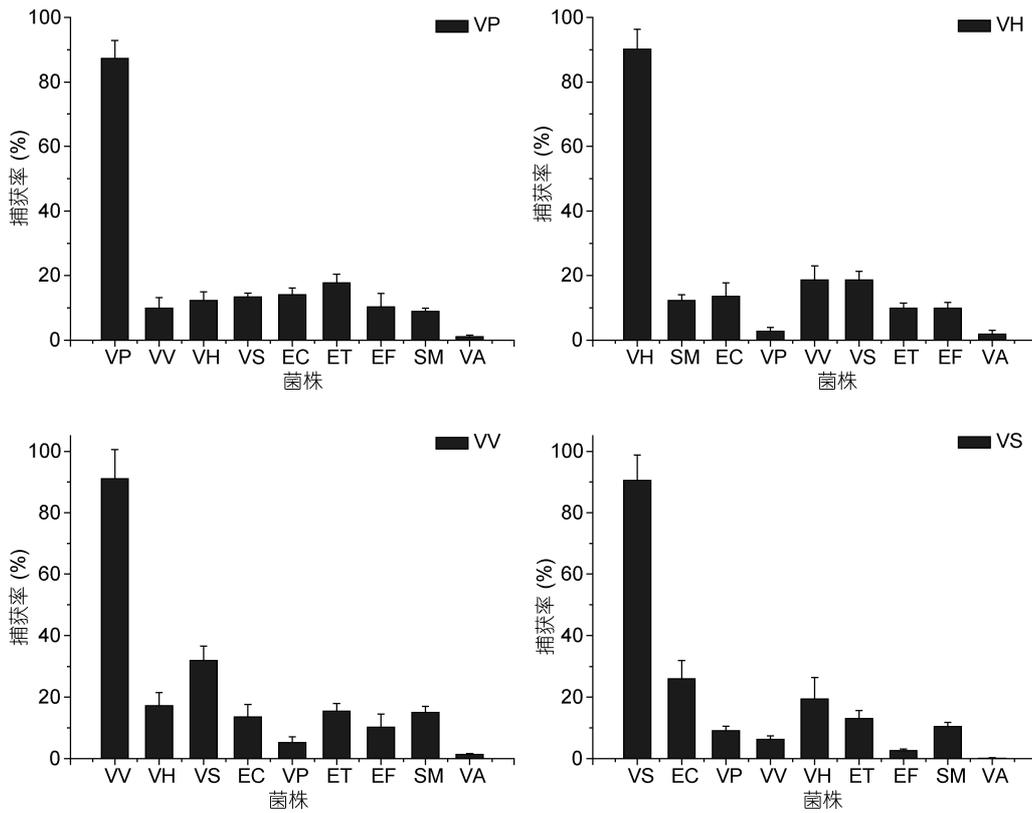


图 8 免疫磁珠捕获的特异性实验
Fig.8 The specificity of the capture of IMBs

离,才能有效富集目的菌。本实验采用平均粒径为 200nm 的免疫磁珠,在普通磁力架上 3min 左右就可以有效分离致病菌,又由于比表面积大,不仅能与抗体有较多的结合位点,也使其与目标菌体表面积接触机会增大,所以捕获率较其它磁珠更高。即使菌液浓度很低(10^0 CFU/mL 数量级),磁珠也能捕获到目标菌,即检测限高,可达到 2 CFU/mL。灵敏度实验中,VP、VH、VV 和 VS 菌液浓度分别为 10^1 、 10^2 、 10^0 和 10^1 CFU/mL 数量级时,捕获率达到最高,分别为 88%、93.5%、94.7%和 100%,且捕获率随着菌液浓度的升高而降低,这表明超出反应体系中纳米免疫磁珠容量后,磁珠捕获致病菌的数量不再增加,反而会受到限制(Zhu *et al*, 2011)。

抗体亲和力也会直接影响免疫磁珠捕获细菌的灵敏度,前期试验证明,4 种多克隆抗体分别与其对应的菌株具有良好的亲和力,所以本实验 4 种免疫磁珠具有较高的灵敏度。特异性是评价免疫磁分离体系的另一个重要标准,本实验中,为了评价 VP、VH、VV 和 VS 4 种免疫磁珠的特异性,在 10^6 — 10^7 CFU/mL 数量级浓度下,对 8 株非目标菌和 1 株目标菌进行捕获,对目标菌的捕获率分别为 87.3%、90.1%、91.1%和 90.5%,对非目标菌的捕获率除创伤弧菌对灿烂弧菌的捕获率在 31.8%外,其余均在 30%以内。4 种免疫磁珠能分离出一部分非目标菌,原因可能是:(1) 本实验采用的是多克隆抗体,多克隆抗体结合非目标菌的概率大于单克隆抗体;(2) 非目标菌会被一些较大的磁颗粒吸附,当用磁场分离时,这些被较大的磁性颗粒吸附的非目标菌也会被分离。有研究证明(Zeng *et al*, 2014; Lin *et al*, 2015),微米磁珠比纳米磁珠的非特异性吸附强,原因是粒径大的磁珠的总磁力比粒径小的磁珠的总磁力强,在磁分离时间内,粒径大的磁珠更容易将菌(目标菌和非目标菌)吸附。所以,本实验采用 200nm 的免疫磁珠,其优势就在于能减少非特异性吸附率。另外,由于免疫反应时间短,清洗次数多(3—5 次),加上本研究制备的纳米免疫磁珠最终均用 0.1% BSA 和 0.02% NaN_3 进行封闭,所以实验获得的免疫磁珠对其目标菌的捕获率均在 87%以上,对非目标菌的捕获率大部分在 30%以内,因为有研究证明(Chen *et al*, 2014),这可以有效增强免疫磁珠与其抗原的特异性结合,从而减少非特异性吸附。

利用醛基化免疫磁珠对细菌进行富集,捕获率受抗体加入量、磁珠用量、免疫反应时间、免疫磁分

离时间、缓冲体系 pH 等诸多因素的影响(山珊等, 2013; 王程程等, 2013; 谢芳等, 2013)。抗体加入量与免疫磁珠捕获细菌的效率呈正相关,但是当捕获率达到平台期后,增加抗体量并不能提高免疫磁珠的捕获率,有时候反而会使捕获率下降。实验中,当 VP、VH、VV 和 VS 抗体加入量分别为 300、600、150、150 μg 时,免疫磁珠的捕获率达到最高,分别为 87.5%、94.2%、98.1%和 85.5%,当抗体量再增加时,捕获率或降低或趋于平稳,导致该现象的原因是过量的抗体会使空间发生阻碍和竞争现象(黄韵仪等, 2012),又由于免疫磁珠捕获细菌的整个过程是在不断振荡和洗脱中完成的,这就使得即使较多数量的抗体与磁珠结合,但其结合的稳度程度也远不如适量抗体和磁珠的结合,从而使抗体与磁珠分离,导致捕获率下降(王程程等, 2013)。由此可见,抗体加入量过多不仅不能提高捕获率,还会造成抗体的浪费,增加检测成本。另外,免疫磁珠的用量也是影响捕获率的主要因素。在一定范围内,磁珠的用量与免疫磁珠捕获细菌的效率也呈正相关,但当达到一定捕获率后,增加磁珠用量并不能显著提高捕获率。实验中,VP、VH、VV 和 VS 免疫磁珠用量分别超过 3、3、12 和 6mg 时,捕获率开始下降,该原因是捕获细菌需要在强磁场下进行,免疫磁珠用量过多,细菌表面多个抗原位点与磁珠结合,分离时会造成部分细菌受损,从而造成捕获率下降(赵玲等, 2013)。除上述两个因素,免疫磁珠与细菌的作用时间也是影响捕获率的重要因素之一。随着免疫反应时间的增加,磁珠的捕获率也随之增加,但反应时间过长,反而会导致捕获率下降。本实验中分别研究免疫反应时间在 5、15、30、45、60 和 90min 时的 4 种免疫磁珠的捕获率情况,结果显示,VP、VH、VV 和 VS 分别在 45、45、60、30min 时达到了 89.1%、97.5%、99.3%、83.3% 的最高捕获率,即免疫反应可在 30—60min 内完成,而一般用微米磁珠捕获致病菌都是在 60—120min 内完成的(Seo *et al*, 2010; Zhu *et al*, 2011),出现这种差异的原因是纳米免疫磁珠与靶细胞结合时具有较快的反应动力学。实验表明(Varshney *et al*, 2005),在反应动力学方面,纳米免疫磁珠比 1-100 μm 的磁珠快 5—20 倍。由于本实验采用的是纳米免疫磁珠,所以免疫反应时间较短。免疫反应一般是在 pH 6.0—8.0 之间进行, pH 过低或者过高都可能影响抗体抗原的结合(刘伟伟等, 2011; 闻一鸣等, 2013a, b)。pH 过低会使抗体抗原解离,免疫磁珠捕获细菌效率降低; pH 过高会使蛋白质

破坏或者变性, 抗体抗原无法结合, 从而使捕获率下降, 甚至出现零捕获, 比如 VP 免疫磁珠在 pH 9.6 的时候, 捕获率为 0。所以在免疫反应过程中, 选择一个合适的 pH 是相当重要的。

免疫磁珠可直接从样品中捕获目标菌, 解决了其它菌群的干扰和抑制问题, 所以在抗干扰性实验中, 加入其它菌群并不影响免疫磁珠对其靶细菌的富集。此外, 免疫磁分离技术结合其它快速检测方法, 可大大缩短检测时间, 提高特异性和灵敏度。若用于实际食品检测中, 可将待检样品富集浓缩, 这将大大提高检测灵敏度和准确度, 具有简便、快速、经济等特点, 该检测方法对于食品(瘦肉精的磁珠富集)安全的筛查、诊断、治疗、监测和控制等也都具有重要的意义。

参 考 文 献

- 山 珊, 牛瑞江, 赖卫华等, 2013. 免疫磁珠法富集沙门氏菌的优化及应用. 食品工业科技, 34(13): 153—156
- 王报贵, 武晓丽, 董素琴等, 2013. 副溶血弧菌的磁珠捕获及检测. 食品工业科技, 34(13): 147—152
- 王程程, 赵 玲, 李敏通等, 2013. 基于免疫磁珠快速分离金黄色葡萄球菌的研究. 食品工业科技, 34(9): 175—178
- 刘 瑞, 赵明君, 杨 慧等, 2011. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)*tdh2* 基因和鳃弧菌(*V. anguillarum*)*ompU* 基因二联 DNA 疫苗制备及其对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)免疫保护作用. 海洋与湖沼, 42(4): 580—586
- 刘伟伟, 孙秀兰, 张银志等, 2011. 超顺磁性免疫磁珠体系用于植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的检测研究. 分析测试学报, 30(12): 1345—1350
- 苏晨曦, 孙晓红, 卢 瑛等, 2012. 副溶血性弧菌免疫磁珠的制备及其应用. 食品工业科技, 33(17): 313—316
- 何 磊, 郭雅飞, 李智洋等, 2008. 免疫磁珠的制备. 化工时刊, 22(7): 5—6
- 赵 玲, 王程程, 李敏通等, 2013. 基于免疫纳米磁珠对福氏志贺氏菌的快速富集研究. 食品工业科技, 34(9): 290—292
- 赵永刚, 唐小千, 战文斌, 2013. 副溶血弧菌 *trh* 基因的克隆、表达及基因缺失株的构建. 海洋与湖沼, 44(1): 38—42
- 钟子清, 熊勇华, 赖卫华等, 2013. 纳米免疫磁珠富集单核增生李斯特菌. 食品科学, 34(23): 212—215
- 闻一鸣, 李志清, 董吉宇等, 2013a. 免疫磁珠富集技术联合选择性培养基快速检测单增李斯特菌. 生物工程学报, 29(5): 672—680
- 闻一鸣, 徐金亭, 向军俭, 2013b. 免疫磁珠富集技术进展. 中国免疫学杂志, 29(1): 88—92
- 徐金亭, 李志清, 向军俭等, 2012. 单增李斯特菌免疫磁珠的制备研究. 食品工业科技, 33(5): 323—327
- 高 磊, 邓益琴, 刘助红等, 2014. 石斑鱼及暂养环境中副溶血弧菌分离鉴定与毒力评价. 海洋与湖沼, 45(6): 1280—1287
- 黄韵仪, 胡莲花, 孙力军等, 2012. 副溶血性弧菌免疫磁珠偶联条件优化及捕获性能评价. 微生物学杂志, 32(6): 7—11
- 谢 芳, 赖卫华, 史爱武等, 2013. 免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素 B₁. 食品科学, 34(18): 165—169
- Baker-Austin C, Stockley L, Rangdale R *et al*, 2010. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. Environmental Microbiology Reports, 2(1): 7—18
- Chen J, Shi X M, Gehring A G *et al*, 2014. Automated immunomagnetic separation for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 from spinach. International Journal of Food Microbiology, 179: 33—37
- Datta S, Janes M E, Simonson J G, 2008. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody. Clinical and Vaccine Immunology, 15(10): 1541—1546
- Leon-Velarde C G, Zosherafatein L, Odumeru J A, 2009. Application of an automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella enterica* subspecies enterica from poultry environmental swabs. Journal of Microbiological Methods, 79(1): 13—17
- Lin J H, Li M, Li Y B *et al*, 2015. A high gradient and strength bioseparator with nano-sized immunomagnetic particles for specific separation and efficient concentration of *E. coli* O157: H7. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 378: 206—213
- McCloskey K E, Chalmers J J, Zborowski M, 2003a. Magnetic cell separation: characterization of magnetophoretic mobility. Analytical Chemistry, 75(24): 6868—6874
- McCloskey K E, Moore L R, Hoyos M *et al*, 2003b. Magnetophoretic cell sorting is a function of antibody binding capacity. Biotechnology Progress, 19(3): 899—907
- Pamme N, Wilhelm C, 2006. Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. Lab on a Chip, 6(8): 974—980
- Seo S M, Cho I H, Jeon J W *et al*, 2010. An ELISA-on-a-chip biosensor system coupled with immunomagnetic separation for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* within a single working day. Journal of Food Protection, 73(8): 1466—1473
- Sun B G, Dang W, Sun L *et al*, 2014. *Vibrio harveyi* Hsp70: Immunogenicity and application in the development of an experimental vaccine against *V. harveyi* and *Streptococcus iniae*. Aquaculture, 418—419: 144—147
- Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S *et al*, 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. Developmental & Comparative Immunology, 39(4): 419—429
- Varshney M, Yang L J, Su X L *et al*, 2005. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef. Journal of Food Protection, 68(9): 1804—1811
- Wadud S, Leon-Velarde C G, Larson N *et al*, 2010. Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria* chromogenic agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Journal of Microbiological Methods, 81(2): 153—159
- Wang Z L, Yue T L, Yuan Y H *et al*, 2013. Development and

- evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1): 28—33
- Yang H, Qu L W, Wimbrow A N *et al*, 2007. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 118(2): 132—138
- Zeng J, Wei H Y, Zhang L *et al*, 2014. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 123—128
- Zhu P X, Shelton D R, Li S H *et al*, 2011. Detection of *E. coli* O157: H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1): 337—341

RAPID ENRICHMENT OF FOUR COMMON PATHOGENIC VIBRIO IN THE OCEAN WITH IMMUNOMAGNETIC NANOBEADS

ZHANG Xuan, DAI Juan, WANG Zu-Zhong, ZHOU Jun, ZHANG Di-Jun,
ZHANG Chun-Dan, LI Ye, SU Xiu-Rong
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract To develop a quick separation and enrichment of pathogenic vibrio in the ocean with immunomagnetic nanobeads (IMBs), for which four vibrios (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio splendidus*) were tested. We evaluated the sensitivity, specificity, and anti-interference ability of each IMB made from these vibrios. Results show that for the four types of IMBs, the optimal amount of antibody conjugate was 300, 600, 150, and 150 μ g, respectively. The optimum capturing conditions were, in the turns of IMS amount (in mg) / immunoreaction (in min) / separation (in min) / pH: 3/45/3/7.4 for *V. parahaemolyticus*, 3/45/1/6.0 for *V. harveyi*, 12/60/5/8.0 for *V. vulnificus*, and 6/30/3/7.4 for *V. splendidus*. In pure culture, the capture limit could reach 10⁰ CFU/mL for all four IMBs. In our test on nine bacteria, the capture rate on target bacteria could reach 87% and that on non-target bacteria was below 32%. In addition, the capture rate by IMB of the four vibrios mixed was not affected by other bacteria. Therefore, the IMBs have good sensitivity, specificity, and anti-interference ability, and can reduce detection time considerably, showing good application prospects.

Key words immunomagnetic nanobeads; pathogenic vibrio; enrichment; capture rate