

# 抗副溶血弧菌 IgY 的提纯及检测副溶血弧菌的间接 ELISA 的建立

何彬斌<sup>1</sup>, 钟青萍<sup>1</sup>, 王 斌<sup>2</sup>

(1 广东省高等学校食品质量安全重点开放实验室, 华南农业大学 食品质量安全研究所, 广东 广州 510642;

2 广州市华南农大生物药品有限公司, 广东 广州 510642)

**摘要:**分离纯化抗副溶血弧菌 IgY, 并建立一种快速检测副溶血弧菌的间接酶联免疫吸附法(indirect ELISA), 分析了该方法的敏感性、特异性和重复性。将水稀释法、乙醇沉淀法和 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析联用以分离纯化抗副溶血弧菌 IgY, 然后以纯化的 IgY 为一抗, 辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY 为二抗, 建立检测副溶血弧菌的间接 ELISA 方法。结果表明:建立的间接 ELISA 方法, 一抗的最佳工作质量浓度为 15  $\mu\text{g/mL}$ , 二抗的最佳稀释度为 1:10 000, 副溶血弧菌培养液的检出限为  $1.0 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$ , 该方法对测定的其他 8 种菌株没有交叉反应。建立的间接 ELISA 方法具有良好的灵敏度、特异性和稳定性, 能够快速、准确地对副溶血弧菌进行检测。

**关键词:**鸡卵黄免疫球蛋白;间接 ELISA;副溶血弧菌;检测

中图分类号:TS207.4

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0095-05

## Purification of Anti-*Vibrio parahaemolyticus* IgY and Establishment of Indirect ELISA for Detecting *Vibrio parahaemolyticus*

HE Bin-bin<sup>1</sup>, ZHONG Qing-ping<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>2</sup>

(1 The Higher Education Key Lab of Guangdong Province Food Quality and Safety,

Institute of Food Quality and Safety, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangzhou South China Biological Medicine Co. Ltd, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The objectives of the present study were to establish an indirect ELISA for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*, and analyse the specificity, sensitivity and reliability of the method. Water dilution method, ethanol precipitation and DEAE-Sepharose FF chromatography were used to extract and purify the anti-*V. parahaemolyticus* IgY. Then the purified anti-*V. parahaemolyticus* IgY was used as the first antibody and rabbit anti-chicken IgY-HRP was used as the second antibody. The suitable concentration of anti-*V. parahaemolyticus* IgY and rabbit anti-chicken IgY-HRP were decided, and the indirect ELISA for the detection of *V. parahaemolyticus* was established. The suitable mass concentration of the first antibody was 15  $\mu\text{g/mL}$ , and the dilution of the second antibody was 1:10 000. The detection limits of this method were  $1.0 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$ , and the specificity of the method was also determined, *V. parahaemolyticus* can be detected, while other bacteria strains can not be detected. The established indirect ELISA is stable, highly specific and sensitive, and it can detect *V. parahaemolyticus* quickly.

**Key words:** yolk immunoglobulin(IgY); indirect ELISA; *Vibrio parahaemolyticus*; detection

副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) 是 虾、贝等多种水产动物的疾病, 还能通过污染水产品海水养殖中的主要病原菌之一, 它不但能引起鱼、 进而导致人的食物中毒, 由副溶血弧菌导致的食物

收稿日期:2008-03-25

作者简介:何彬斌(1983—), 女, 硕士研究生; 通讯作者:钟青萍(1967—), 女, 副教授, 博士, E-mail: zhongqp@scau.edu.cn

中毒已成为我国微生物食源性疾病的首要病因<sup>[1-2]</sup>。常规的副溶血弧菌检测方法由于周期长和操作复杂等缺点,已不能满足目前食品安全检测的需要,因此,需要建立一种快速、准确地检测副溶血弧菌的方法。间接酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是食品安全检测中最常用的免疫学方法之一<sup>[3]</sup>,该方法因为有标记酶的放大作用,所以灵敏度高,而且其操作较简便,所需仪器设备简单,可同时测定大批量样品。鸡卵黄免疫球蛋白(yolk immunoglobulin, IgY)来源方便,且具有比哺乳动物 IgG 更高的特异性和敏感性,是一种良好的免疫学检测工具<sup>[4]</sup>。本研究以副溶血弧菌为抗原免疫产蛋母鸡,从卵黄中提取抗副溶血弧菌的特异性 IgY,然后进行纯化,获得电泳纯的 IgY,并以此建立间接 ELISA 方法检测副溶血弧菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试剂 辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY:Sigma 公司产品;TMB:Amresco 公司产品;低分子量标准蛋白:上海生物化学研究所产品;DEAE-Sepharose FF:Pharmacia 公司产品。

1.1.2 菌株 副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* VPL 4-90 购自广东省微生物研究所;痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae* 1.1869 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心;大肠杆菌 *Escherichia coli* O157:H7、沙门氏菌 *Salmonella* spp.、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 均为华南农业大学食品学院保藏。

### 1.2 抗原制备

将副溶血弧菌接入 2216E 液体培养基中,30 ℃ 摇瓶培养 18 h,4 000 r/min 离心 15 min,用无菌生理盐水洗涤菌体后,加入终体积分数为 0.1% 的甲醛,30 ℃ 灭活 12 h,然后用无菌生理盐水洗涤 5 次,得到  $10^{10}$  cfu/mL 的 Vp 菌液备用。

### 1.3 母鸡免疫

取备用 Vp 菌悬液,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化,使抗原浓度为  $5 \times 10^8$  cfu/mL,免疫健康产蛋母鸡。免疫采取皮下、肌肉多点注射,免疫剂量为 1 mL/只。间隔 3 周后进行第 1 次加强免疫,再间隔 3 周进行第 2 次加强免疫,加强免疫时改用弗氏不完全佐剂。同时设未免疫对照组。

### 1.4 抗 Vp IgY 的分离纯化

采用水稀释法进行 IgY 的初步分离<sup>[5]</sup>。免疫鸡

所产鸡蛋的外壳用清水洗干净后,用酒精擦拭,去除蛋清,取出卵黄,蒸馏水漂洗,用滤纸轻轻擦拭卵黄表面,尽可能去除卵黄表面残余的蛋清,去除卵黄膜得到纯的卵黄液,并量其体积,用蒸馏水稀释 9 倍后调节 pH 至 5.1~5.2,4 ℃ 静置过夜,取其上清液以 12 000 r/min 冷冻离心 30 min,去除沉淀取其上清液,其中上清液中包含所要提取的 IgY 即卵黄水提液。

在卵黄水提液中加入终浓度为  $\varphi = 50\%$  的冷乙醇(-20 ℃ 预冷 3 h),4 ℃ 静置 1 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清。用蒸馏水溶解沉淀物后,加入终浓度为  $\varphi = 25\%$  的冷乙醇进行第 2 次沉淀。进行 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析,分别用含有 0.15、0.20 和 0.40 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)分段洗脱,收集效价峰,并通过 SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。

### 1.5 间接 ELISA 操作程序

间接 ELISA 检测的步骤为:①用碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH9.6)将 Vp 菌液稀释为适当浓度后,以每孔 100  $\mu$ L 包被酶标板,4 ℃ 放置过夜;②弃包被液,以磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)洗板 3 次后加入封闭液 200  $\mu$ L,37 ℃ 温育 2 h;③弃封闭液,磷酸盐缓冲液洗板 3 次,将 IgY 溶液以每孔 100  $\mu$ L 加入酶标板中,37 ℃ 温育 2 h;④弃抗体溶液,磷酸盐缓冲液洗板 3 次,每孔加入 100  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY,37 ℃ 温育 1 h;⑤弃二抗并洗板 5 次,每孔加入 TMB 显色液 100  $\mu$ L,37 ℃ 显色 10 min;⑥每孔加入 50  $\mu$ L 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应,酶标仪检测  $D_{450\text{ nm}}$  值。

结果判定:以  $P/N > 2.1$  判定为阳性( $P$  为样品测定孔  $D_{450\text{ nm}}$  平均值 - 空白孔  $D_{450\text{ nm}}$  平均值,  $N$  为阴性对照孔  $D_{450\text{ nm}}$  平均值 - 空白孔  $D_{450\text{ nm}}$  平均值)。

### 1.6 建立间接 ELISA 方法检测 Vp

1.6.1 确定酶标抗体工作浓度 将辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY 抗体稀释为不同浓度后,进行间接 ELISA 检测,Vp 菌液包被浓度为  $10^8$  cfu/mL,抗 Vp 特异性 IgY 和阴性 IgY 的稀释度为 1:500。以  $P/N$  最大、阳性 IgY 的  $D_{450\text{ nm}}$  接近 1.0 的酶标抗体最大稀释度为酶标抗体的最佳工作浓度。

1.6.2 确定抗 Vp IgY 的最佳工作浓度 用碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH9.6)将 Vp 菌液稀释为不同的梯度( $10^5 \sim 10^9$  cfu/mL)后包被酶标板,对照孔不加抗原。将 6 mg/mL 的阳性 IgY 稀释为 1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200,酶标抗体采用最佳稀释度,进行间接 ELISA 测定,以能产生  $D_{450\text{ nm}}$  为 1.0 左右,且  $P/N$  最大的 IgY 浓度为抗 Vp IgY 的最

佳工作浓度。

**1.6.3 敏感性试验** 包被缓冲液将 Vp 纯培养菌液稀释为  $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^9$  cfu/mL 10 个梯度,4 ℃ 包被过夜,用建立的间接 ELISA 方法进行检测。分析 ELISA 检测结果,确定最低检出限。

**1.6.4 特异性试验** ①阻断试验:将抗 Vp IgY 以 1:200 倍比稀释,然后分别加入等量的 Vp 菌液,混匀后,37 ℃ 作用 2 h,5 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行 ELISA 测定。同时设不做阻断的 Vp 阳性 IgY 和阴性 IgY 作为对照,进行 ELISA 测定,比较  $D_{450 \text{ nm}}$  值。

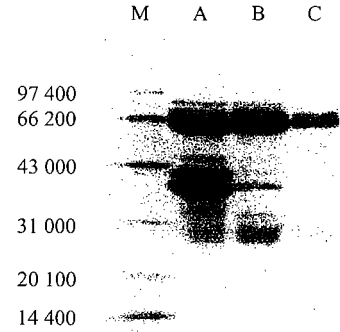
②交叉试验:用浓度均为  $10^8$  cfu/mL 的副溶血弧菌、大肠杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、产碱杆菌、枯草芽孢杆菌及假单胞菌包被酶标板,抗体采用最佳工作浓度,间接 ELISA 检测是否有交叉反应。

**1.6.5 重复性试验** 取 Vp 菌悬液,用包被缓冲液稀释为  $10^5$  cfu/mL,分别包被 4 个酶标板,每个板中做 3 个重复,阴性对照为包被缓冲液,用建立的间接 ELISA 方法进行测定,由每个样品的  $D_{450 \text{ nm}}$  值和对应的阴性  $D_{450 \text{ nm}}$  值计算出平均  $P/N$  值与标准差(SD),进而计算出每个样品的变异系数(CV) =  $SD/(P/N \text{ 均值})$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 SDS-PAGE 检测样品纯度

图 1 为抗 Vp IgY 纯度检测结果。从图 1 可以看出,纯化后抗 Vp IgY 杂蛋白去除明显,经还原裂解为重链和轻链 2 条带,相对分子质量约为 66 000 和 27 000,与 Shimizu<sup>[6]</sup> 报道一致。说明将水稀释法、乙醇沉淀法以及离子交换层析联用进行纯化后,得到了电泳纯的抗 Vp IgY,为下一步的准确检测创造了



M:低相对分子质量蛋白 marker;A:水稀释法粗提的抗副溶血弧菌 IgY;B:乙醇沉淀法纯化后的 IgY;C:DEAE Sepharose FF 离子交换层析纯化后的 IgY

M: low relative molecular mass of protein marker;A: IgY extracted by the water dilution method;B: IgY extracted by alcohol precipitation;C: IgY purified by DEAE-Sepharose FF chromatography

图 1 SDS-PAGE 检测的抗副溶血弧菌 IgY 纯度

Fig. 1 Determination of the purity of anti-*Vibrio parahaemolyticus* IgY by SDS-PAGE

条件。

### 2.2 检测 Vp 的间接 ELISA 方法的建立

**2.2.1 酶标抗体的最佳工作浓度** 以不同稀释度的辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY 抗体进行检测,结果如图 2 所示,当酶标抗体以 1:10 000 稀释时,测得的阳性 IgY 的  $D_{450 \text{ nm}}$  接近 1.0,并且  $P/N$  最大,所以选择酶标抗体的最适工作浓度为 1:10 000。

**2.2.2 抗 Vp IgY 的最佳工作浓度** 对抗原作不同稀释度处理,测得阳性 IgY 的  $D_{450 \text{ nm}}$  及  $P/N$  如图 3 所示,在各种抗原浓度下,6 mg/mL 的抗 Vp IgY 经稀释 400 倍时,  $P/N$  最大;且当抗原浓度为  $10^8$  cfu/mL, IgY 稀释 400 倍时  $D_{450 \text{ nm}}$  值接近 1.0,  $P/N$  最大,所以确定 IgY 的最佳稀释度为 1:400,即抗 Vp IgY 的工作质量浓度为 15  $\mu\text{g/mL}$ 。

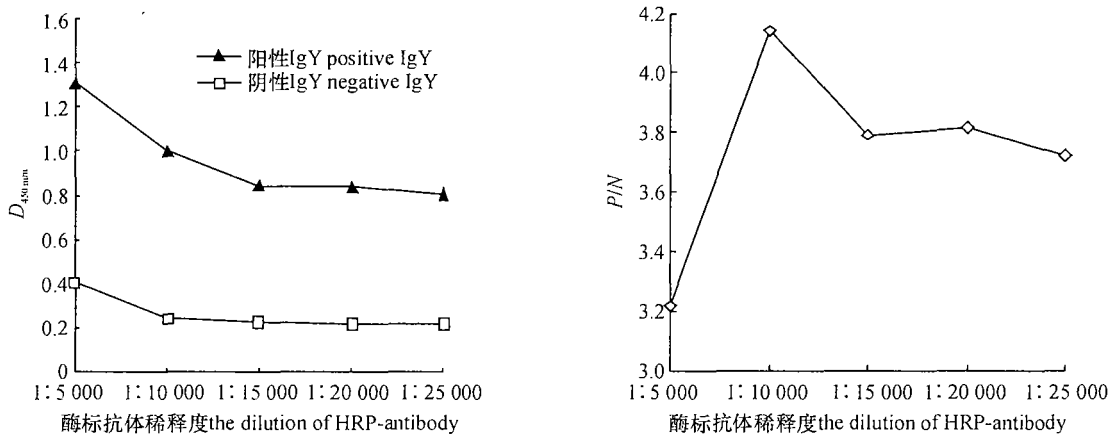


图 2 不同酶标抗体稀释度的 ELISA 检测结果

Fig. 2 ELISA results at different HRP-antibody concentrations

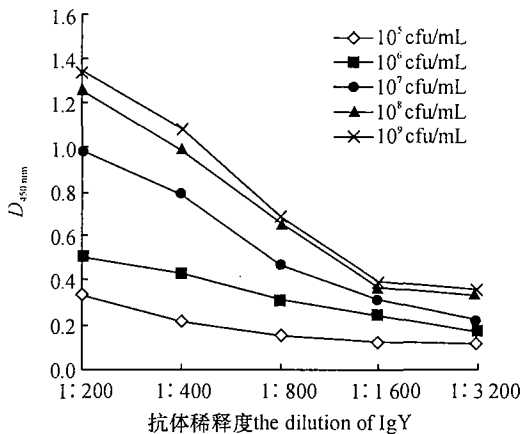


图3 不同副溶血弧菌(Vp)抗原浓度和抗Vp IgY稀释度的ELISA测定结果

Fig. 3 ELISA results at different antigen and anti-*Vibrio parahaemolyticus* IgY concentrations

2.2.3 敏感性试验 将副溶血弧菌菌液系列稀释,测定该方法的敏感性,结果如图4所示,以不加抗原(Vp菌液)为阴性对照.以 $P/N > 2.1$ 为阳性判断标准.对副溶血弧菌纯培养液的最低检测限为 $1.0 \times 10^5$  cfu/mL.

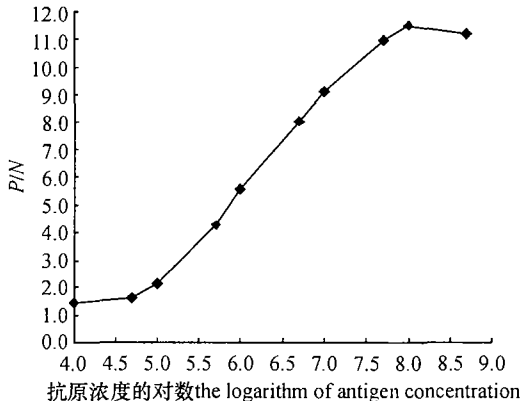


图4 间接ELISA检测副溶血弧菌的敏感性

Fig. 4 Sensitivity of indirect ELISA for detecting *Vibrio parahaemolyticus*

2.2.4 特异性试验 图5为阻断试验的结果.从图5可以看出,阳性IgY中加入副溶血弧菌阻断后, $D_{450\text{ nm}}$ 比阻断前明显降低,阻断率大于50%.可见,检测时所用的阳性IgY具有高度特异性.

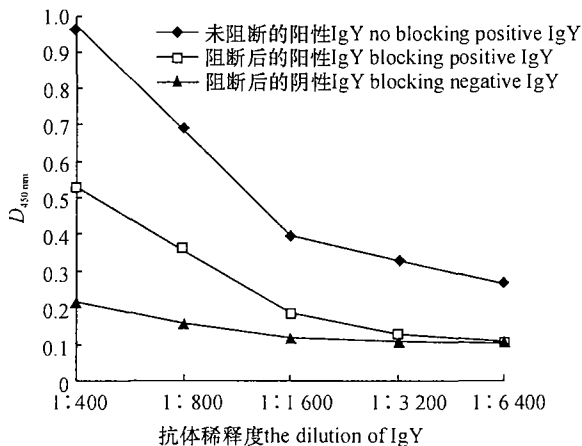


图5 抗副溶血弧菌IgY的阻断试验结果

Fig. 5 Blocking results of anti-*Vibrio parahaemolyticus* IgY

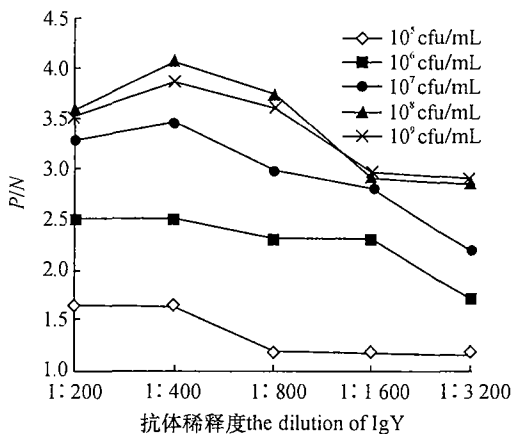
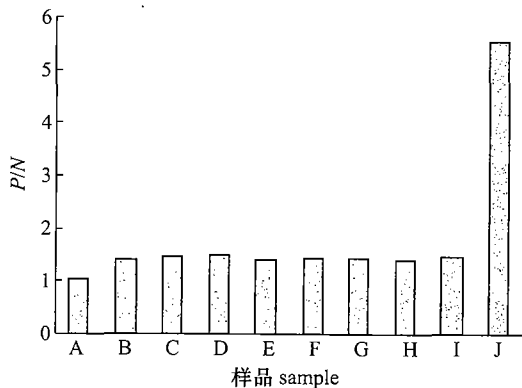


图6为交叉试验结果.由图6可知,除副溶血弧菌的 $P/N$ 为5.06,呈强阳性外,其他几种细菌抗原的 $P/N$ 值均低于1.50,均为阴性,证明所建立的ELISA方法具有较高的特异性.



A: 阴性对照 control; B: 假单胞菌 *Pseudomonas* sp.; C: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*; D: 产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis*; E: 蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*; F: 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*; G: 沙门氏菌 *Salmonella* spp.; H: 痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae*; I: 大肠杆菌 *Escherichia coli*; J: 副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*

图6 建立的间接ELISA交叉试验结果

Fig. 6 Determination of cross reactivity of indirect ELISA

2.2.5 重复性试验结果 用建立的间接ELISA方法检测4个浓度为 $10^5$  cfu/mL的副溶血弧菌菌悬液样品(表1).结果表明,4个样品测定的变异系数在1.567%~3.324%,表明建立的ELISA方法重复性较好.

表1 重复性试验结果

Tab. 1 Reproducibility results of indirect ELISA

| 试验号<br>number | $P/N$ 均值<br>$P/N$ | 标准差<br>SD | 变异系数<br>CV |
|---------------|-------------------|-----------|------------|
| 1             | 2.142 68          | 0.061 35  | 0.028 63   |
| 2             | 2.207 34          | 0.034 59  | 0.015 67   |
| 3             | 2.223 23          | 0.073 89  | 0.033 24   |
| 4             | 2.255 60          | 0.041 26  | 0.018 29   |

### 3 讨论与结论

#### 3.1 卵黄抗体的提纯方法

提取 IgY 首先要有效去除卵黄中大量的脂类物质,目前报道的去除脂类物质的方法包括水稀释法、聚乙二醇沉淀法、硫酸葡聚糖沉淀法、天然胶沉淀法、有机溶剂抽提法等,其中,水稀释法简便高效,适合大规模生产。得到卵黄中的水溶性成分后,可用硫酸铵沉淀、有机溶剂沉淀、离子交换层析法、凝胶过滤法、亲和层析等方法进一步纯化。这些方法各有优缺点,例如沉淀法最简便、经济,但提取的抗体纯度低,而亲和层析虽然能得到高纯度的抗体,但产率低、费用高,不能得到大规模应用。许多学者通过将多种方法联用来纯化 IgY,得到了高纯度的抗体,如 Akita 等<sup>[5]</sup>将离子交换层析和凝胶过滤层析结合,使用纯化 IgY,使产物纯度高达 94%。本试验采用乙醇沉淀法和离子交换层析联用来纯化 IgY,结合 2 种方法的优点,以简单的工艺分离出较高纯度的卵黄抗体。

#### 3.2 副溶血弧菌快速检测技术

食源性病原菌的常规检测方法是通过培养、分离、生化及血清学鉴定进行检测,但许多研究表明,副溶血弧菌在不良环境(如低温、贫营养)下进入“活的未可培养状态”(viable but nonculturable state, VBNC)。所谓 VBNC 菌是指活的、具有生长繁殖潜力,且现有的培养方法和培养条件无法使其恢复生命活性,处于休眠状态的一类菌<sup>[7-11]</sup>,它们在适当的条件下还可以复苏,仍具有致病力。常规的培养法无法检测到处于这种状态的细菌,造成漏检。大量研究证实,进入 VBNC 的细菌仍然保持着和正常细菌一样的表面抗原<sup>[9]</sup>,因此可以利用免疫学技术进行检测。ELISA 具有标记试剂较稳定、灵敏度高、重复性好、检测时间短、操作方便、所需仪器设备简单等优点,是目前应用最多的免疫学检测方法。ELISA 在检测 VBNC 菌方面具有很大优势。

#### 3.3 结论

采用水稀释法、乙醇沉淀法和离子交换层析联用纯化抗副溶血弧菌 IgY,以此为基础建立间接 ELISA 法检测副溶血弧菌,该方法稳定性、重复性良好,对纯培养菌液的检出限为  $1.0 \times 10^5$  cfu/mL,具有良好的敏感性。阻断试验和交叉试验结果表明,该方法具有

良好的特异性。本研究建立的方法为快速检测副溶血弧菌打下了基础。

#### 参考文献:

- [1] 陈瑞英,鲁建章,苏意诚,等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. 食品科学,2007,28(1):341-342.
- [2] 刘秀梅. 食源性疾病预防控制技术研究[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(1):3-9.
- [3] 朱启尚. 酶联免疫分析技术在食品检验中的应用[J]. 徐州工程学院学报,2006,21(9):72-74.
- [4] NTAKARUTIMANA V, DEMEDTS P, SANDE M, et al. A simple and economical strategy for down stream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk[J]. Immunol Methods, 2002,153:133-140.
- [5] AKITA E M, NAKAI S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain[J]. J Immunol Method, 1993,160(2):207-214.
- [6] SHIMIZU M, NAGASHIMA H, SANO K, et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G[J]. Bio-science Biotechnology and Biochemistry, 1992,56(2):270-274.
- [7] 王军,鄢庆彬,苏永全,等. 养殖大黄鱼副溶血弧菌的酶联免疫吸附法研究[J]. 台湾海峡,2001,20(3):346-350.
- [8] 姚斐,寇运同,陈刚,等. 间接免疫荧光抗体技术检测活的非可培养状态的副溶血弧菌[J]. 海洋科学,2000,9:11-13.
- [9] HIROYUKI Y. Viable but nonculturable stage as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and it's modeling[J]. Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Association for Infectious Diseases, 2000,6:112-114.
- [10] ROMESRANEL B, DRAGESCO A, BREUI A, et al. An ELISA technique for rapid diagnosis of Vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1993,15:137-143.
- [11] SUN N W, YOSHIMITSU M, AKEMI T, et al. A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation-and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila* [J]. Arch Microbiol, 2000,173:307-310.

【责任编辑 李晓丹】