

一种快速鉴别牛肉中大肠杆菌 O157 : H7 检测方法的建立及应用

赵亚男¹, 曾德新¹, 郭德华², 蒋原², 蒋鲁岩³, 李鑫妮⁴, 陈伟⁴, 汤芳¹, 薛峰¹, 戴建君¹

摘要:目的 建立一种快速、准确检测牛肉中大肠杆菌 O157 : H7 的方法。方法 利用抗大肠杆菌 O157 : H7 单克隆抗体 2G5(捕获抗体), 酶标单克隆抗体 2E3(HRP-2E3, 检测抗体), 建立可用于检测大肠杆菌 O157 : H7 的双抗体夹心 ELISA 方法, 同时对反应条件进行优化并对该方法进行评价。结果 通过优化得到最佳反应条件, 单克隆抗体 2G5 最佳包被浓度为 4.48 μg/mL, HRP-2E3 最佳检测浓度为 19.9 μg/mL。该方法对纯培养菌液最低检出限为 1×10⁵ CFU/mL, 具有良好的敏感性, 且特异性良好, 与其他大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特菌等均无交叉反应。板内及板间变异系数均小于 7%, 具有较高的精密度。人工污染牛肉样品增菌 8 h 后, 对大肠杆菌 O157 : H7 的检出限为 1 CFU/25 g。结论 建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法灵敏度、准确度、重复性良好, 特异性强, 可用于临床实际样品检测。

关键词: 大肠杆菌 O157 : H7; 双抗体夹心 ELISA; 单克隆抗体; 牛肉

中图分类号: S852.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2694(2020)04-0272-08

Establishment and application of a rapid detection method for *Escherichia coli* O157 : H7 in beef

ZHAO Ya-nan¹, ZENG De-xin¹, GUO De-hua², JIANG Yuan², JIANG Lu-yan³,
LI Xin-ni⁴, CHEN Wei⁴, TANG Fang¹, XUE Feng¹, DAI Jian-jun¹

(1. International Cooperative Laboratory for Animal Health and Food Safety,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Shanghai Customs Animal and Plant and Food Inspection and Quarantine Technology Center,
Shanghai 200135, China;

3. Nanjing Customs Animal and Plant and Food Testing Center, Nanjing 210001, China;

4. College of Food and Bioengineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: To establish a rapid and accurate method for the detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in beef. The anti-*E. coli* O157 : H7 monoclonal antibody 2G5 as capture antibody and enzyme-labeled monoclonal antibody 2E3 (HRP-2E3) as detection antibody were used to establish a double-antibody sandwich ELISA method for detecting *E. coli* O157 : H7. Then, the reaction conditions and the method were optimized. The optimal coating concentration of monoclonal antibody 2G5 was 4.48 μg/mL, and the optimal detection concentration of HRP-2E3 was 19.9 μg/mL. The limit of detection (LOD) of *E. coli* O157

: H7 reached 10⁵ CFU/mL, showing in good sensitivity. Also, this method had no cross-reaction with other *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, etc, which showed high specificity. Variable coefficient of intra-and inter-plate were all less than 7% showing high precision. LOD of *E. coli* O157 : H7 in artificial contamination of beef samples was 1 CFU/25g after enrichment for 8h. Thus, the established sandwich ELISA method has good sensitivity, specificity and reproducibility. It can be used for the detection of clinical actual samples.

Keywords: *Escherichia coli* O157 : H7; double-antibody sandwich ELISA; monoclonal antibody; beef

“十三五”国家重点研发计划重点专项(No.2018YFC1603600); 南京海关科研项目(No.2018KJ32); 江苏省农业自主创新项目(No.CX(18)2011)

通讯作者: 薛峰, Email: xuefeng@njau.edu.cn;

ORCID: 0000-0001-8378-5226

作者单位: 1. 南京农业大学动物健康与食品安全国际合作实验室, 南京 210095;

2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135;

3. 南京海关动植物与食品检测中心, 南京 210001;

4. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230601

Supported by the National Key R&D Project of 13th Five-Year Plan(No.2018YFC1603600); Nanjing Customs Scientific Research Project (No.2018KJ32); Jiangsu Agricultural Independent Innovation Project [No.CX(18)2011].

Corresponding author: Xue Feng, Email: xuefeng@njau.edu.cn

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 是一种危害严重的人兽共患病原体,主要通过受污染的食物传播,如牛肉、奶制品、蔬菜和水果^[1]。反刍动物,特别是牛,是大肠杆菌 O157:H7 的主要宿主^[2-3]。虽然大肠杆菌 O157:H7 对成年牛没有致病性,但却可以导致人的出血性腹泻、溶血性尿毒症综合征(HUS)以及血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。人的感染剂量一般很低,摄入 10 个活菌就足以引起感染^[4-5],幼儿最容易感染这种微生物^[6-7]。由它引起的溶血性尿毒症综合征可导致红细胞的破坏和肾功能衰竭。据报道,全球平均每年有 3 890 例溶血性尿毒症病例,死亡人数达 230 人^[8]。自 1982 年在美国首次被分离出来,并被认为是一种新型的肠道致病菌^[9],美国又发生了多起该病的暴发流行^[10-11]。此外,加拿大^[12]、日本^[13]等多个国家相继发生此病原菌引起的暴发感染。我国受此病原菌的威胁也越来越大,自 1986 年在江苏徐州首次发现以来,福建、甘肃、安徽等省先后自人畜以及其他动物中分离出 O157 大肠杆菌^[14]。

因此,大肠杆菌 O157:H7 的检测在食品安全、疾病控制、环境保护等领域受到广泛的关注。鉴于现在主流的检测方法,如国标法金标准,其检测灵敏度高,但工序复杂,检测时间长,并对检测人员要求高^[15],使其无法及时预防疫情的暴发;如分子生物学方法,其时效快,成本低,但特异性易受引物、环境等因素影响而产生假阳性或假阴性结果^[16]。而基于单克隆抗体的 ELISA 方法检测病原体具有简单、灵敏度高、特异性好等优点。因此本研究利用抗 O157:H7 特异性单克隆抗体 2G5 及辣根过氧化物酶标记单克隆抗体 2E3 (HRP-2E3),建立双抗体夹心 ELISA 方法,为大肠杆菌 O157:H7 提供可靠的检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与抗体 38 株 O157:H7 和沙门氏菌、志贺杆菌等 29 株菌种由南京农业大学动物医学实验室保存(见表 2),本次实验所用的 2 株大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体(2G5、2E3)的杂交瘤细胞由南京农业大学动物医学实验室筛选获得。

1.2 主要试剂与设备 脱脂奶、BSA、Tween 20 购自南京鼎思生物技术有限公司,10×PBS 购自北京

索莱宝生物科技有限公司,TMB 单组份显色液、辣根过氧化物酶购自 Sigma 公司,PCR Kit 购自 Takara 公司,DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司,新生霉素增菌肉汤购自北京陆桥公司,PCR 仪为美国 ABI 公司,电泳仪、凝胶成像系统均为上海天能公司,酶标仪为西班牙基立福公司。

1.3 PCR 引物设计与合成 以大肠杆菌 O157:H7 的菌体抗原基因 rfbE^[17-18] 为目的基因,参考陈雅君等^[19] 报道的引物序列(表 1),委托金斯瑞生物技术有限公司合成。

表 1 rfbE 基因引物序列及预计扩增长度
Tab.1 Primer sequence of rfbE and expected amplification length

引物	序列(5'-3')	扩增长度/bp
rfbE-F	ACTACAGGTGAAGGTGGAATG	327
rfbE-R	TTCCTCTCTTCCTCTGCGGT	

1.4 单克隆抗体的纯化与标记 冻融实验室存储的单克隆抗体腹水,根据 Protein A 预装重力柱(上海斯信生物技术有限公司)说明书进行纯化并进行 SDS-PAGE 分析,测定单抗纯度后冻存于 -80 °C 备用。

取纯化后的单克隆抗体 2E3,与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联,得到酶标记抗体(HRP-2E3)。采用过碘酸钠法进行标记^[20],原理是过碘酸钠将 HRP 分子表面的多糖氧化为醛基,可与加入的 IgG 上的氨基形成 Schiff 氏碱而结合。

1.5 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 以 2G5 为捕获抗体,辣根过氧化物酶标记单克隆抗体 2E3 (HRP-2E3)为检测抗体建立双抗体夹心 ELISA 检测方法。具体步骤如下:①抗体包被:将 2G5 用包被液稀释至一定浓度后包被酶标板,每孔 100 μL,4 °C 包被过夜;②封闭:PBST 洗涤 3 次后,每孔 300 μL 封闭液于 37 °C 进行封闭;③加抗原:PBST 洗涤 3 次,拍干,加入待测菌液,每孔 100 μL,37 °C 孵育;④加酶标抗体:PBST 洗 3 次,拍干,酶标抗体(HRP-2E3)稀释至适宜浓度后,每孔 100 μL,37 °C 孵育;⑤加底物显色:洗板 4 次,拍干后每孔加入 100 μL TMB 单组份显色液,置于 37 °C 避光显色;⑥终止:用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,每孔 100 μL,

于 450 nm 波长处测各孔 OD 值。

为了得到最优检测体系,分别对 2G5 包被浓度(1:100、1:200、1:400、1:800),HRP-2E3 检测浓度(1:100、1:200、1:400、1:800)^[21],封闭液(1%BSA、2%BSA、10%BSA、1%明胶、2%明胶、5%脱脂奶),最佳封闭时间(60 min、90 min、120 min),抗原作用时间(45 min、60 min、90 min、120 min),酶标抗体作用时间(45 min、60 min、90 min、120 min)以及显色液显色时间(5 min、10 min、15 min、20 min)进行优化。

1.6 双抗体夹心 ELISA 灵敏度的检测 将大肠杆菌 O157:H7 培养至对数期($OD_{600}=0.6$,平板计数确定浓度为 1×10^8 CFU/mL),0.4%甲醛灭活 24 h 后,用无菌 PBS 进行 10 倍比稀释得 $10 \sim 10^8$ CFU/mL 浓度菌液,按照已优化好的最佳条件进行双抗体夹心 ELISA 检测,每个浓度做 3 孔平行检测,确定灵敏度。

1.7 双抗体夹心 ELISA 特异性的检测 受试菌株包括 38 株 O157:H7 和 29 株其它菌种,菌浓度均为 10^8 CFU/mL,验证建立的双抗体夹心 ELISA 方法的特异性,同时使用国标方法及 PCR 方法进行对比验证。

1.8 双抗体夹心 ELISA 重复性的检测 板内重复性检测,选取 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 CFU/mL 这 4 个浓度进行分析,每个浓度做 5 个重复,计算其板内变异系数。板间重复性检测,选择同样的浓度在 5 块不同的酶标板上不同时间进行检测,计算其板间变异系数。

1.9 样品检测

1.9.1 模拟样品检测 构建人工污染牛肉样品,使用建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法,PCR 检测方法和国标培养法对比检测,验证所建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法的实用性。

牛肉样品(购自南京农业大学附近农贸市场),用超纯水冲洗干净后经组织捣碎机加工成肉馅,用国标培养法确定无 O157:H7 自然污染后,置于高压灭菌锅内 121 °C 灭菌 20 min。冷却后,人工污染大肠杆菌 O157:H7,接种剂量分别为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 、 1 CFU/25 g,每个接种量设置 3 个平行,并以无菌生理盐水作空白对照,取各浓度剂量人工污染样品和空白无污染样品 25 g 于 225 mL 新生霉素增菌肉汤,使用拍击式均质器连续均质 2 min,在 37 °C,100 r/min 摇床增菌培养。

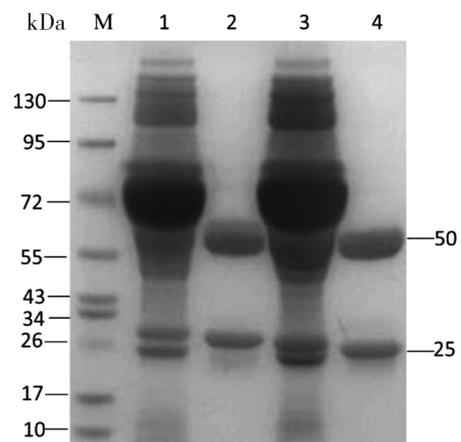
增菌至 4、6、8、10 h,分别从各浓度增菌液和空白菌液取 3 份样品,每份 1 mL,800 r/min 离心 3

min 去除沉渣,吸上清,10 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次,重悬后煮沸 10 min,用上述建立的双抗体夹心 ELISA 方法检测;同样取 4、6、8、10 h 增菌液,每份 1 mL,设 3 个平行对照, PBS 洗涤去除油脂和沉渣后,使用 TINAGEN 试剂盒说明书提取 DNA,参考陈雅君等^[19]报道的 PCR 扩增体系进行 PCR 检测;参照 GB 4789.36-2016,增菌 24 h 后,对不同浓度人工污染样品和空白无污染样品进行国标法检测。

1.9.2 实际样品检测 从南京农业大学附近的农贸市场、超市采集 100 份样品(牛肉 40 份、猪肉 20 份、鸡肉 20 份、鲜奶 20 份),用已建立的双抗体夹心 ELISA 方法进行检测,同时采用国标(GB 4789.36-2016)对比检测。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 检测纯化后 2E3、2G5 抗体纯度 结果见图 1,在 50 kDa 和 25 kDa 处分别出现两条蛋白带,它们分别与鼠 IgG 重链和轻链的分子量相符合,说明纯化效果比较好。



注:M 为蛋白 Marker;1 为纯化前 2E3;2 为纯化后 2E3;3 为纯化前 2G5;4 为纯化后 2G5

图 1 纯化前后 2E3、2G5 单抗的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of monoclonal antibodies (2E3 and 2G5) before and after purification

2.2 2G5 和 HRP-2E3 工作浓度的测定 方阵法测定结果见表 2,基于检测效果和经济性考虑,选择 2G5 抗体 1:400 稀释($4.48 \mu\text{g/mL}$),HRP-2E3 抗体 1:100 稀释($19.9 \mu\text{g/mL}$)为最终工作浓度,此时阳性值 $OD_{450} \approx 1$,P/N 值为 26.15。

表 2 2G5 和 HRP-2E3 工作浓度测定结果

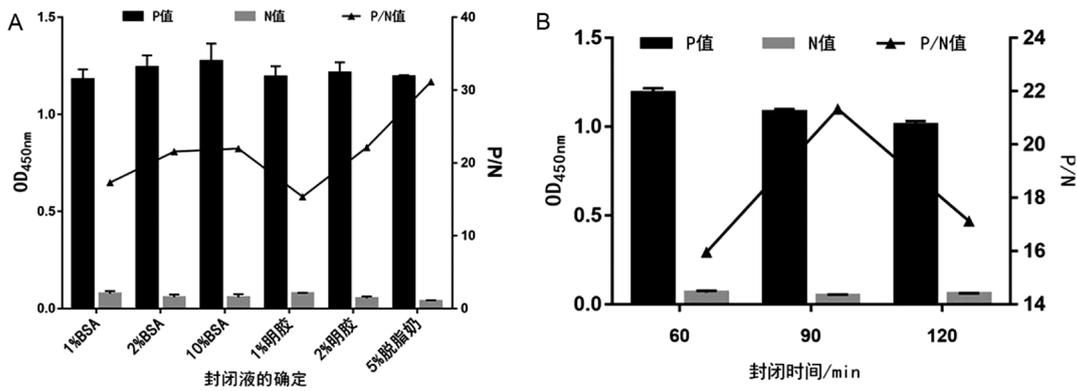
Tab.2 Results of working concentrations of 2G5 and HRP-2E3

酶标抗体 HRP-2E3 稀释倍数	单克隆抗体 2G5 稀释倍数							
	P 值				N 值			
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
1 : 100	1.517	1.342	1.064	0.509	0.038	0.065	0.040	0.058
1 : 200	0.386	0.336	0.344	0.226	0.063	0.037	0.040	0.035
1 : 400	0.228	0.218	0.199	0.130	0.033	0.029	0.026	0.020
1 : 800	0.162	0.189	0.151	0.090	0.050	0.032	0.033	0.031

注:P 值为阳性样品 OD₄₅₀ nm 值;N 值为阴性样品 OD₄₅₀ nm 值

2.3 最佳封闭液及封闭时间的优化 封闭对 ELISA 反应至关重要,可以减少非特异性吸附,提高反应的灵敏度及特异性。以阳性孔 OD₄₅₀ 值与阴

性对照孔 OD₄₅₀ 值之比(P/N 值)最大为最优条件,经测定 5%脱脂奶为最适封闭液(图 2A),1.5 h 为最佳封闭时间(图 2B)。



注:A 最适封闭液的确定;B 最佳封闭时间的确定

图 2 最适封闭液及封闭时间的确定

Fig.2 Determination of optimal blocking solution and blocking time

2.4 抗原、酶标抗体及显色液作用时间的优化 反应时间的长短会对 OD₄₅₀ nm 值产生影响,为提高反应的特异性和灵敏度,本次实验分别对抗原、酶标抗体及显色液作用时间进行优化,P/N 值最大判定为

最优条件。结果如图 3 所示,抗原、酶标抗体(HRP-2E3)、TMB 单组份显色液最佳作用时间分别为 90 min(图 3A)、45 min(图 3B)、10 min(图 3C)。

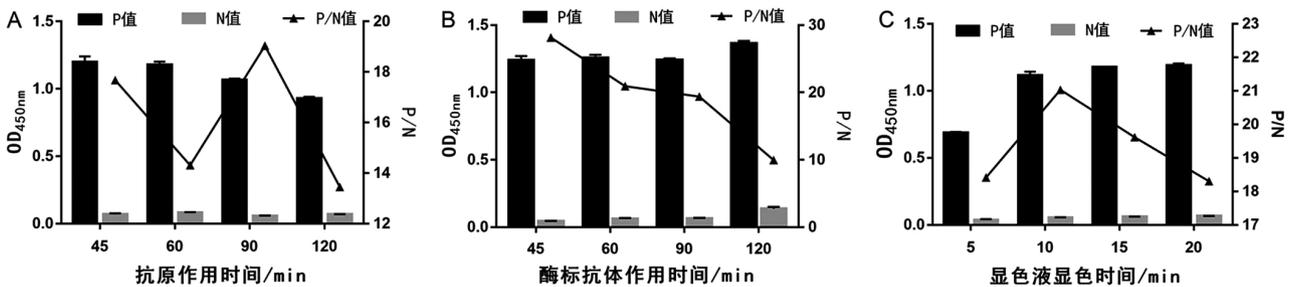


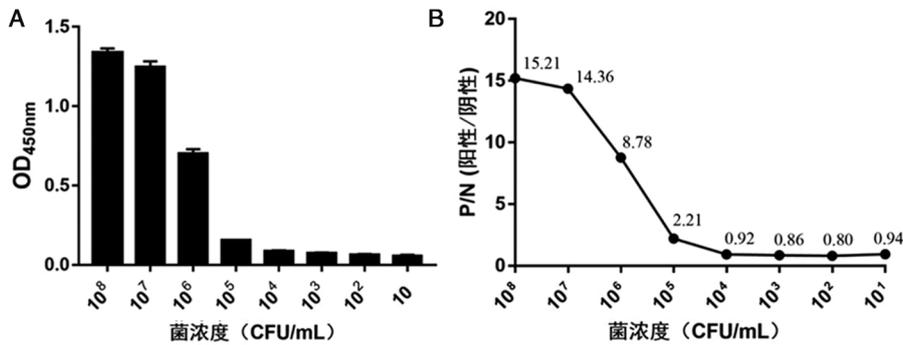
图 3 抗原、酶标抗体及显色液作用时间的优化

Fig.3 Optimization of reaction time of antigen, enzyme-labeled antibody and chromogenic liquid

2.5 双抗体夹心 ELISA 灵敏度检测 对 $10 \sim 10^8$ CFU/mL 的 8 个浓度梯度的菌液进行检测,结果如图 4 所示,每个浓度做 3 个平行,随着抗原浓度的降低,检测 OD_{450nm} 值也随之下降(见图 4A),以测定孔与阴性孔 OD 值之比大于 2.1 为阳性的判断标准,本方法对大肠杆菌 O157:H7 的检测限为 1×10^5 CFU/mL,此时比值为 2.21(见图 4B)。

2.6 双抗体夹心 ELISA 检测方法的特异性 同时使用建立的双抗夹心 ELISA 方法、PCR 检测法和

国标方法对 38 株大肠杆菌 O157:H7 和 29 株其他菌株进行特异性检测,结果见表 3。ELISA 检测方法和国标法相同,38 株大肠杆菌 O157:H7 检测结果显示阳性,其他 29 株菌株检测结果为阴性,与预期结果一致,显示了高度的特异性。PCR 检测法和其他两种方法的检出结果也基本一致,但是温和气单胞菌出现了假阳性结果,可见相比培养法和免疫学检测方法,PCR 等分子生物学检测方法在特异性方面还存在一定的弊端。



注:A 为每个稀释度的 OD_{450nm} 值;B 为每个稀释度的 P/N 值

图 4 双抗体夹心 ELISA 灵敏度检测

Fig.4 Sensitivity test of established double-antibody sandwich ELISA

表 3 特异性检测实验结果

Tab.3 Results of specific test

菌株	编号	数量	ELISA 检测结果	PCR 检测结果	国标法 检测结果
大肠杆菌 O157:H7	ATCC 43859	1	+	+	+
	EH1-EH37	37	+	+	+
大肠杆菌	ATCC 25922	1	-	-	-
大肠杆菌 O127:H6	AH1-1	1	-	-	-
大肠杆菌 O8	AH3-4	1	-	-	-
大肠杆菌 O20	AH3-52	1	-	-	-
大肠杆菌 O25	JS2-3	1	-	-	-
大肠杆菌 O78	JS2-5	1	-	-	-
大肠杆菌 O128	JS2-31	1	-	-	-
大肠杆菌 K88	JS3-7	1	-	-	-
沙门氏菌	JS 5-3	1	-	-	-
单核细胞增多李斯特菌	ATCC	1	-	-	-
铜绿假单胞菌	ATCC35923	1	-	-	-
表皮葡萄球菌	ATCC12228	1	-	-	-
最小弧菌	CICC10474	1	-	-	-
霍乱弧菌	BNCC232030	1	-	-	-
创伤弧菌	CICC10383	1	-	-	-

表 3(续)

菌株	编号	数量	ELISA 检测结果	PCR 检测结果	国标法 检测结果
奇异变形杆菌	CMCC49005	1	—	—	—
普通变形杆菌	CMCC49027	1	—	—	—
弗氏耶尔森菌	ATCC23715	1	—	—	—
副溶血弧菌	ATCC33847	1	—	—	—
枯草芽孢杆菌	NJXW 1805028	1	—	—	—
志贺杆菌	NJXW 1805033	1	—	—	—
金黄色葡萄球菌	NJXW 1805001	1	—	—	—
嗜水气单胞菌	NJXW 1803028	1	—	—	—
副猪嗜血杆菌	NJXW 1801	1	—	—	—
腊样芽孢杆菌	NJXW 1711001	1	—	—	—
禽分支杆菌	NJXW 1305067	1	—	—	—
鸭疫里氏杆菌	NJXW 1803001	1	—	—	—
温和气单胞菌	NJXW 1803039	1	—	+	—
链球菌	NJXW 1711020	1	—	—	—

注:“+”代表阳性,“—”代表阴性

2.7 双抗体夹心 ELISA 重复性检测 由检测结果可知,板内变异系数小于 5%(见表 4),板间变异系数小于 7%(见表 5),板间变异系数略大于板内变异系数,可能是由于每天环境条件不同,如温度和湿度

变化有关,也可能与溶液的再制备有关,但均小于 10%,说明建立的 ELISA 检测方法具有较好的重复性和精密度^[22-23]。

表 4 板内重复性检测结果

Tab.4 Results of intraplate repeatability test

菌浓度 (CFU/mL)	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
A 孔	1.096	1.007	0.448	0.105
B 孔	1.007	0.964	0.507	0.112
C 孔	1.016	0.934	0.478	0.107
D 孔	0.992	0.944	0.495	0.115
E 孔	0.995	0.948	0.488	0.109
平均值(\bar{x})	1.021	0.959	0.483	0.110
标准差(s)	0.043	0.029	0.022	0.004
变异系数(CV%)	4.20	2.99	4.62	3.63

表 5 板间重复性检测结果

Tab.5 Results of interplate repeatability test

菌浓度 (CFU/mL)	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5
酶标板 1	1.105	0.995	0.515	0.100
酶标板 2	1.067	0.959	0.531	0.108
酶标板 3	0.980	0.937	0.460	0.101
酶标板 4	1.029	0.990	0.494	0.103
酶标板 5	0.991	0.887	0.465	0.091
平均值(\bar{x})	1.034	0.954	0.493	0.101
标准差(s)	0.052	0.044	0.031	0.006
变异系数(CV%)	5.05	4.62	6.25	6.15

2.8 样品检测

2.8.1 牛肉模拟样品检测 双抗体夹心 ELISA 检测结果见表 6,以测定孔与阴性孔 OD 值之比大于 2.1 为阳性的判断标准,增菌 4 h、6 h、8 h、10 h 后,检测灵敏度分别为 10^2 CFU/25 g、10 CFU/25 g、1 CFU/25 g、1 CFU/25 g。可见经 8 h 增菌培养后,建立的 ELISA 检测方法对牛肉中大肠杆菌

O157:H7 的检测限可达 1 CFU/25 g。

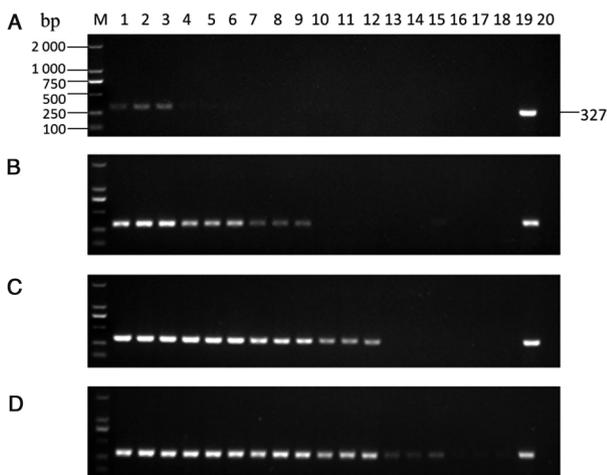
普通 PCR 检测结果见图 5,每个稀释度设 3 个平行,增菌 4 h、6 h、8 h 后,检测灵敏度分别为 10^4 CFU/25 g、 10^2 CFU/25 g、10 CFU/25 g,增菌 10 h 后,才可检测到 1CFU/25 g,且阳性条带较浅。阴性样品均无条带,说明检测过程无污染。该方法增菌 8 h 后对牛肉样品检测灵敏度只能达到 10 CFU/

25 g,比 ELISA 检测降低一个数量级。

按照国标法操作规范对不同浓度污染样品和无污染样品进行检测,经可疑菌落挑选和大肠杆菌 O157:H7 干制生化鉴定试剂盒鉴定,各浓度污染样均为检测阳性,且空白样为检测阴性,说明国标培养法检测灵敏度很高,达 1 CFU/mL,但是其检测周期较长,需 7 d 左右,对于有些 H 鞭毛不易凝集的菌株,其检测周期更长。

表 6 牛肉模拟样品检测结果
Tab.6 Results of beef simulation sample test

样品剂量 (cfu)	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1	空白
4 h	+	+	+	-	-	-
6 h	+	+	+	+	-	-
8 h	+	+	+	+	+	-
10 h	+	+	+	+	+	-



注: A 为增菌 4 h; B 为增菌 6 h; C 为增菌 8 h; D 为增菌 10 h; 1-3 为 10⁴ CFU/25 g; 4-6 为 10³ CFU/25 g; 7-9 为 10² CFU/25 g; 10-12 为 10 CFU/25 g; 13-15 为 1 CFU/25 g; 16-18 为阴性样品; 19 为阳性对照; 20 为阴性对照

图 5 样品增菌 4、6、8、10 h rfbE 基因扩增结果

Fig.5 Results of rfbE gene amplification after sample enrichment for 4, 6, 8 and 10 h

2.8.2 实际样品检测 用已建立的夹心 ELISA 检测方法和国家标准方法(GB 4789.36-2016)分别对 100 份样品进行检测,两种方法结果一致,均为阴性,进一步证明了所建立方法的准确性和实用性。

3 讨论

大肠杆菌 O157:H7 是一种严重的食源性致病微生物,常常引起食品安全事故,威胁着我们的生

命安全^[24-25]。因此,建立高效、快速的检测方法是预防和及时发现该暴发的关键因素。单克隆抗体因其具有专一的特异性,性质稳定,一经制备可长时间获得等优势而广泛应用于疾病的诊断。因此,本实验利用前期制备的 2 株抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体建立夹心 ELISA 检测方法。该免疫学方法具有灵敏度高、特异性强和检测周期短等优点。

包被是双抗体夹心 ELISA 实验非常重要的一步,若抗体包被浓度过低,不能完全覆盖固相载体表面,使捕获抗体吸附的抗原量不够,则可能出现假阴性;若包被浓度过高,抗体分子间的相互作用就会造成蛋白分子层叠,在随后的洗涤过程中,这些抗体容易被洗去,影响实验的灵敏度。制得的酶标记抗体需要确定其最适工作浓度,浓度过高,则可使非特异性反应增加,阴性结果偏高;而浓度过低又可影响测定的敏感性。所以本实验通过方阵法,确定了最佳的抗体包被浓度(4.48 μg/mL)和酶标抗体反应浓度(19.9 μg/mL)。

为了验证建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法的实用性,设计人工污染牛肉样品,用 ELISA 检测法同 PCR 和国标培养法进行对比检测,从灵敏度、检测时长等因素综合分析,展现其在实际样品检测中的优越性。结果显示,选择性前增菌 8 h 后,ELISA 检测灵敏度可达 1 CFU/25 g,比 PCR 检测高一个数量级。国标法需增菌 18~24 h,才达到 1 CFU/25 g 的检测灵敏度;而完成整个检测过程,ELISA 只需 5~6 h,而国标培养法则需要 7 d 乃至更长时间。由此可见,建立的 ELISA 检测法集合了国标培养法检测灵敏度高、特异性强和 PCR 法检测周期短的优点,更能满足实际应用的需求。

本实验建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法对污染样品的检测灵敏度高于吴大成等^[14]采用双抗体夹心 ELISA 的检测方法,增菌培养 12 h 后,最低检测限为 0.4~4 CFU/g;黄海燕等^[26] 40 °C 增菌 8 h 检测限为 2 CFU,即 0.08 CFU/g;以及宋宏新等^[27] 增菌 14 h,检测线为 0.1~0.2 CFU/g。因此,本检测方法具有较好的特异性及灵敏度,可用于实际样品中大肠杆菌 O157:H7 检测。

综上所述,本次实验建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法特异性、灵敏度、精密度良好,优于国标法及普通 PCR 检测。但是最近有学者^[28]用一种新的方法(纸基夹心 ELISA)检测大肠杆菌,该方法检测快速,不需依赖酶标仪等昂贵仪器,整个操作过程不到 1 h,并且其最低检测限为 1×10⁵ CFU/mL,灵敏度较高,可以用于现场即时检测。可以预见如将所建

立的 ELISA 体系应用于纸基微流控芯片,建立纸基夹心 ELISA 检测方法,将会大大缩短检测的时间及成本,取得更为可观的效果。

利益冲突:无

引用本文格式:赵亚男,曾德新,郭德华,等.一种快速鉴别牛肉中大肠杆菌 O157:H7 检测方法的建立及应用[J].中国人兽共患病学报,2020,36(4):272-279,296. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.036

参考文献:

- [1] Sharma VK, Akavaram S, Schaut RG, et al. Comparative genomics reveals structural and functional features specific to the genome of a foodborne *Escherichia coli* O157:H7 [J]. BMC genomics, 2019, 20(1):196. DOI:10.1186/s12864-019-5568-6
- [2] Mir RA, Schaut RG, Allen HK, et al. Cattle intestinal microbiota shifts following *Escherichia coli* O157:H7 vaccination and colonization travel [J]. PloS One, 2019, 14(12): e0226099. DOI:10.1371/journal.pone.0226099
- [3] Sharma VK, Akavaram S, Schaut RG, et al. Comparative genomics reveals structural and functional features specific to the genome of a foodborne *Escherichia coli* O157:H7 [J]. BMC genomics, 2019, 20(1):196. DOI:10.1186/s12864-019-5568-6
- [4] Lee JI, Kim SS, Kang DH. Susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 grown at low temperatures to the krypton-chlorine excilamp [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):563. DOI:10.1038/s41598-018-37060-1
- [5] Yang G, Wang H, Dong Y, et al. High-throughput photoelectrochemical determination of *E. coli* O157:H7 by modulation of the anodic photoelectrochemistry of CdS quantum dots via reversible deposition of MnO [J]. Mikrochim Acta, 2019, 187(1):16. DOI:10.1007/s00604-019-3968-6
- [6] Li B, Liu H, Wang W. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* [J]. BMC microbiol, 2017, 17(1):215. DOI:10.1186/s12866-017-1123-2
- [7] Pang B, Zhao C, Li L, et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection [J]. Anal Biochem, 2018, 542(1):58-62. DOI:10.1016/j.ab.2017.11.010
- [8] Valiolahi M, Najafi MA, Eskandani MA, et al. Effects of organic acid alone and in combination with HO and NaCl on *Escherichia coli* O157:H7; an evaluation of antioxidant retention and overall acceptability in Basil leaves (*Ocimum basilicum*) [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 292(1):56-63. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.010
- [9] Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, et al. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype [J]. J Clin Microbiol, 1983, 18(3):512-520.
- [10] Curran K, Heiman KE, Singh T, et al. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with dairy education event attendance-Whatcom County, Washington, 2015 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015, 64(42):1202-1203. DOI:10.15585/mmwr.mm6442a5
- [11] Gieraltowski L, Schwensohn C, Meyer S, et al. Notes from the field: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to dough mix-United States, 2016 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2017, 66(3):88-89. DOI:10.15585/mmwr.mm6603a6
- [12] Gaulin C, Ramsay D, Catford A, et al. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with the consumption of beef and veal tartares in the Province of Quebec, Canada, in 2013 [J]. Foodborne Pathog Dis, 2015, 12(7):612-618. DOI:10.1089/fpd.2014.1919
- [13] Furukawa I, Suzuki M, Masaoka T, et al. Outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with minced meat cutlets consumption in Kanagawa, Japan [J]. J Infect Dis, 2018, 217(6):436-441. DOI:10.7883/yoken.JJID.2017.495
- [14] 吴大成,孙洋,袁洁,等.双抗夹心 ELISA 检测肠出血性大肠杆菌 O157 方法的建立 [J].中国兽医学报,2011,31(12):1745-1748.
- [15] Cheng S, Chen MH, Zhang GG, et al. Strategy for accurate detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground pork using a lateral flow immunoassay [J]. Sensors (Basel), 2017, 17(4):E753. DOI:10.3390/s17040753
- [16] Jia M, Liu J, Zhang J, et al. An immunofiltration strip method based on the photothermal effect of gold nanoparticles for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Analyst, 2019, 144(2):573-578. DOI:10.1039/c8an01004h
- [17] Bai J, Shi X, Nagaraja TG. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7 [J]. J Microbiol Meth, 2010, 82(1):85-89. DOI:10.1016/j.mimet.2010.05.003
- [18] Farahmandfar M, Moori-Bakhtiari N, Gooraninezhad S, et al. Comparison of two methods for detection of O157:H7 in unpasteurized milk [J]. Iran J Microbiol, 2016, 8(5):282-287.
- [19] 陈雅君,王亚宾,张莉娟,等.动物源性肠出血性大肠杆菌 O157:H7 及其 3 个毒力基因的多重 PCR 快速检测研究 [J].中国人兽共患病学报,2013,29(7):686-691. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2013.03.009
- [20] 王智群.犬瘟热病毒单克隆抗体夹心 ELISA 方法的建立与胶体金免疫层析试纸条的制备[D].南京:南京农业大学,2012.
- [21] 刘金,王丽威,岳喜庆.牛初乳中免疫球蛋白 G 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立 [J].食品科学,2016,37(14):74-79.
- [22] Qu H, Wang X, Qu B, et al. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for naringin [J]. Anal Chim Acta, 2016, 903(1):149-155. DOI:10.1016/j.aca.2015.09.058
- [23] 李木子,刘佳丽,王瑞琳,等.牛轮状病毒 VP6 蛋白单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 方法的建立 [J].中国兽医学报,2018,48(11):1352-1357. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0201