

创伤弧菌快速检测法的建立

徐宸¹, 王鑫^{2*}, 钟江¹

(1. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433; 2. 默克化工技术(上海)有限公司, 上海 201203)

摘要 [目的]针对创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)采用杂交瘤技术制备单克隆抗体,基于单克隆斑点杂交技术进行改良,建立一种创伤弧菌快速检测方法。[方法]由水产品牡蛎中分离获得一株创伤弧菌 FD-1,以其灭活全菌为抗原免疫小鼠,采用杂交瘤技术制备单克隆抗体。在此基础上,对传统斑点杂交技术进行优化改进,以化学发光试剂 ECL 替代传统 TMB 底物,进一步提高其灵敏度、缩短检测时间和简化操作步骤。[结果]与传统斑点杂交法相比,改良斑点杂交法的检测时间可缩短至 2 h,检测限可达 1×10^5 CFU/mL。[结论]改良斑点杂交法比传统 TMB 底物斑点杂交法(1×10^7 CFU/mL)灵敏度提高了 100 倍,操作过程简单,在水产品检验和医疗诊断方面具有良好的开发应用前景。

关键词 创伤弧菌;杂交瘤技术;单克隆抗体;斑点杂交;ECL

中图分类号 Q93-331 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)19-0114-03

Development of Rapid Detection of *Vibrio vulnificus*

XU Chen¹, WANG Xin², ZHONG Jiang¹ (1. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433; 2. Merck Chemicals (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203)

Abstract [Objective] An ECL-based dot blot assay was developed for the rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* based on MAbs against *V. vulnificus*. [Method] The FD-1 was isolated from the oyster, taking inactivated whole bacteria as antigen, monoclonal antibody was prepared by hybridoma technique, on this basis, the traditional dot hybridization technology was optimized and improved. The enhanced chemiluminescent (ECL) substrate was used to replace the traditional TMB substrate, which can further improve the sensitivity, shorten the detection time and simplify the operation steps. [Result] Compared with the traditional dot blot assay, the incubation time was shortened to 2 h. The detection limit can reach 1×10^5 CFU/mL. [Conclusion] The LOD is 100-fold more sensitive than the traditional dot blot assay (1×10^7 CFU/mL). The operation process is simple, and has a good prospect for development and application in aquatic product inspection and medical diagnosis.

Key words *Vibrio vulnificus*; Hybridoma technique; Monoclonal antibody; Dot blot; Chemiluminescent (ECL)

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一种革兰氏阴性杆菌,是广泛存在于海洋和盐湖中的嗜盐病原菌。它是一种重要的水产品污染病原,可造成养殖水产品的病害。同时也是一种致命的人类机会致病菌,与全世界大部分食用污染海鲜致死的案例有关^[1]。创伤弧菌感染最致命的后果是原发性败血症,其死亡率在免疫功能低下的人群中可达 50%以上^[2]。由于创伤弧菌感染的高死亡率,创伤弧菌污染严重地区海鲜食品(尤其是生蚝)的安全问题是常见的。创伤弧菌的感染不仅给水产养殖业带来经济损失,而且也对人类健康造成危害。我国水产品品种丰富多样,每年因食用水产品而引起食物中毒、急性胃肠炎或腹泻等疾病屡有报道。因此,建立创伤弧菌的快速检测方法显得尤为非常重要。

传统的创伤弧菌的检测方法基于生理生化鉴定,由于弧菌属主要病原表型相似性较高,给鉴别工作带来较大困难,且鉴定过程费力耗时,不利于病原的确定和采取应对措施。PCR 和实时定量 PCR (qPCR) 技术被用来检测创伤弧菌^[3-4]。然而,使用 PCR 和定量 PCR 需要昂贵的热循环仪,阻碍了这种方法的广泛应用。灵敏度更高的环介导等温 PCR 技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)也被用于检测创伤弧菌,但该方法在现场操作过程中受环境影响较大,容易造成假阳性^[5]。几种免疫分析方法,包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫层析试纸条也被应用于创伤弧菌的鉴定,检测试纸的灵敏度可达 2×10^6 CFU/mL。Li 等^[6]报

道了采用改良斑点杂交技术检测哈维氏弧菌,灵敏度可达 2×10^5 CFU/mL,且整个操作时间由 8 h 缩短至 2 h。笔者探索了将此改良方法用于创伤弧菌的检测,以期创伤弧菌快速准确检测方法的建立提供参考。

1.2 材料

1.2.1 菌株及试验动物。创伤弧菌标准株 ATCC 27562、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)标准株 ATCC17749 购自美国菌种保藏中心(ATCC),阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) CM-CC43501 购自中国医学微生物菌种保藏管理中心。创伤弧菌 FD-1、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)由复旦大学生命科学学院 A301-8 实验室保存。Sp2/0-Ag14(Sp2/0)小鼠骨髓瘤细胞株由复旦大学生命科学学院 A301-8 实验室冻存。6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠购于上海杰思捷公司。

1.2.2 试剂及仪器。化学发光试剂 ECL 和 TMB 底物购自上海纪宁实业有限公司。硝酸纤维素膜(NC 膜)和聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜)购自美国 Millipore。羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP 和 BSA 购自北京索莱宝科技有限公司。封闭剂 PBSTB 为 2% (W/V) BSA 溶解在 PBST 溶液中;封闭剂 PBSTM 为 5% 脱脂奶粉充分溶解在 PBST 溶液中,以上 2 种溶液 4℃ 保存备用。

1.3 方法

1.3.1 抗创伤弧菌单克隆抗体的制备。将创伤弧菌 FD-1 用 TCBS 培养基活化,标准株 ATCC27562 为对照,培养后 2 株均呈现黄色特征性菌落。通过 16 s rDNA 测序后 Blast 比

作者简介 徐宸(1988—),男,上海人,硕士,从事生物技术研究。* 通讯作者,博士,从事生物制药研究。

收稿日期 2018-03-07

对 FQ-1 与创伤弧菌标准株 ATCC27562 的同源度达 99%。将创伤弧菌 FQ-1 扩大培养,保存备用。测得菌液浓度约为 1×10^{10} CFU/mL,细菌用 0.3% 的甲醛灭活 24 h,灭活后菌液经细菌检验平板不再长菌。灭活后的菌液于 4 ℃ 保存备用。以灭活创伤弧菌菌体制备单克隆抗体,参照李强等^[7]方法免疫 BALB/c 小鼠。筛选融合细胞采用新鲜培养的创伤弧菌 FQ-1。经亚克隆化筛选后获得可稳定产生抗创伤弧菌抗体的杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞密度调至 2×10^6 个/mL,以每只 0.5 mL 的量注入 8 周龄 BALB/c 小鼠腹腔内,形成腹水后,以间接 ELISA 法检测腹水效价。采用 Protein A 亲和层析法对单克隆抗体进行纯化,以紫外分光光度计测量纯化抗体浓度,将单抗溶液稀释 50 倍,分别于 260 nm 和 280 nm 波长测吸光度,于 -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 改良斑点杂交法。

1.3.2.1 斑点杂交条件优化。根据文献[5]首先对封闭试剂、杂交膜以及封闭时间 3 个条件进行优化。将 NC 和 PVDF 膜剪成边长为 1 cm 的正方形。将不同封闭剂 PBSTB 和 PBSTM 分别以每孔 1 mL 加入浸没膜块,于 37 ℃ 培养箱中孵育 10、20、40 min,依次取出并以 PBST 将膜彻底冲洗干净。将封闭后的膜块放入稀释度为 1:3 000 的羊抗鼠二抗溶液中孵育 90 min 后取出并用 PBST 冲洗 3 次,最后用 150 mL TMB 显色液将膜浸润并孵育 10 min。

1.3.2.2 改良斑点杂交法特异性检测。分别将创伤弧菌 FD-1、创伤弧菌(ATCC27562)、溶藻弧菌(ATCC17749)、哈维氏弧菌、副溶血弧菌置于 TAB 培养基(2.5% NaCl)于 30 ℃ 过夜培养,将菌悬液稀释成 1×10^8 CFU/mL,以空白 TAB 培养基(2.5% NaCl)为对照;取 5 mL 5 种菌悬液加入膜中间并在 60 ℃ 烘烤 20 min 使其固定在膜上;将膜取出放入含 5% 脱脂奶粉的封闭剂中,37 ℃ 封闭 25 min;接着将封闭后的膜放入抗创伤弧菌单克隆抗体的稀释液中,于 37 ℃ 孵育 60 min;用 PBST 将膜彻底冲洗干净后放入稀释度为 1:3 000 的羊抗鼠二抗稀释液中,同样在 37 ℃ 孵育 90 min;最后将膜取出彻底洗净并用滤纸吸干残留的水分,将膜置于化学发光检测仪中,同时加入 ECL 显色液将膜浸润并在不同曝光时间下进行拍照。

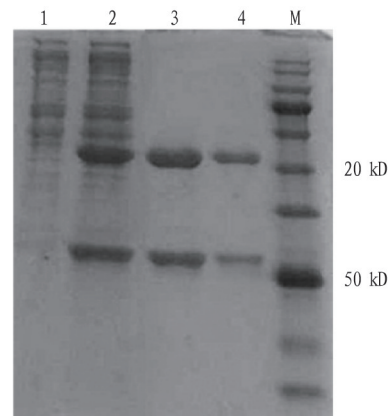
1.3.2.3 改良斑点杂交法灵敏度检测。将创伤弧菌悬液稀释成 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 和 1×10^5 CFU/mL 共 4 种浓度,并以稀释液 PBS 作为空白对照。随后,分别取 5 mL 不同浓度的菌悬液点于膜中央并置于 60 ℃ 烘烤 20 min 将其固定在膜上;将膜取出放入含 5% 脱脂奶粉的封闭剂中,37 ℃ 封闭 25 min;接着将封闭后的膜放入抗创伤弧菌单克隆抗体的稀释液中,于 37 ℃ 孵育 60 min;用 PBST 将膜彻底冲洗干净后放入稀释度为 1:3 000 的羊抗鼠二抗稀释液中,同样在 37 ℃ 孵育 90 min;最后将膜取出彻底洗净并用滤纸吸干残留的水分,将膜置于化学发光检测仪中,同时加入 ECL 显色液将膜浸润并在不同曝光时间下进行拍照。

2 结果与分析

2.1 抗创伤弧菌单克隆抗体的制备

以甲醛灭活的创伤弧

菌作为抗原免疫小鼠后,以其他水体常见弧菌属和非弧菌属菌株作为检测抗原用于杂交瘤细胞的交叉反应试验。筛选到一株特异性分泌抗创伤弧菌抗体的杂交瘤细胞株 3A8,对其产生单克隆亚型进行分型定量检测发现,IgG1 亚型的丰度为 66.5%,其余依次为 Kappa 亚型(22.3%)、IgM 亚型(2.7%)。因此,检测表明该抗体属于 IgG1 亚型,且效价在 60 000 以上,SDS-PAGE 显示抗体分子量为 55 kD(图 1),为斑点杂交法提供了原材料。



注:1 为蛋白 G 结合后的上清样品;2 为硫酸氨抽提的腹水样品;3、4 为纯化的抗体样品;M 为蛋白分子量标签

Note:1. Supernatant flowing through protein G;2. Extracted solution of ascite by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;3,4. Purified antibody;M. Marker

图 1 创伤弧菌单克隆抗体纯化 SDS-PAGE 结果

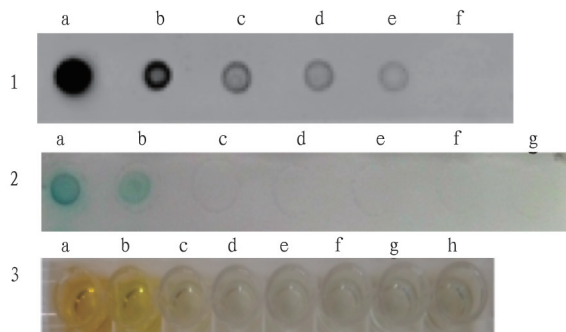
Fig.1 SDS-PAGE of the purified *V. vulnificus* antibody

2.2 改良斑点杂交法灵敏度 根据文献[6]采用 Western blot 化学发光试剂(ECL)代替 TMB 显色剂。由图 2 可知,改良 ECL 斑点杂交法对创伤弧菌的最低检测限为 1×10^5 CFU/mL,而间接 ELISA 最低检测限为 1×10^7 CFU/mL,与之前报道的检测结果一致^[6]。与传统斑点杂交法及间接 ELISA 法相比,改良后的 ECL 介导的斑点杂交法具有更高的灵敏度,较传统的斑点杂交法的灵敏度高 100 倍;与间接 ELISA 法在单菌落(CFU)水平上相比,改良后的 ECL 介导的斑点杂交法灵敏度较其高 1 000 倍。

2.3 改良斑点杂交法特异性 以创伤弧菌标准菌株 ATCC 27562 为阳性对照考察了该方法的特异性,并考察是否与水体常见细菌存在交叉反应,检测结果如图 3 所示,结果表明除与创伤弧菌 FD-1 株外,与哈维氏弧菌、金黄色葡萄球菌、溶藻弧菌 ATCC17749、副溶血弧菌、嗜水气单胞菌、阴沟肠杆菌 CMCC43501 均无交叉反应。当抗原包被浓度分别为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 CFU/mL 时,均可检出创伤弧菌,证明该方法可以用于创伤弧菌的检测。

3 讨论

创伤弧菌是广泛分布在世界沿海和河口的病原菌,可感染多种水生动物,导致养殖行业的重大经济损失。因此,对于创伤弧菌的检测显得尤为重要。目前已报道的创伤弧菌的检测方法主要有 PCR 检测、LAMP 以及胶体金免疫层析试纸条法。PCR 法虽然能够较快检测出创伤弧菌^[8],但需要特



注:创伤弧菌菌液梯度稀释并固定至硝酸纤维素膜上(5 $\mu\text{L}/\text{孔}$),以创伤弧菌单克隆抗体作为一抗,分别以化学发光试剂 ECL 和 TMB 作为显色剂。第 1 行为 ECL 显色剂:a~e. 分别为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL 10 倍梯度稀释创伤弧菌菌液;f 为空白对照。第 2 行为 TMB 显色剂:a~f. 分别为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4$ CFU/mL 10 倍梯度稀释创伤弧菌菌液;g 为空白对照。第 3 行:ELISA 分别包被从加入 1:4 000 比例稀释的创伤弧菌单克隆抗体作为一抗,a~g. 分别为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ CFU/mL 10 倍梯度稀释创伤弧菌菌液(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),h 为空白对照

Note:Sensitivity of *V. vulnificus* serial dilutions were spotted onto the NCM (5 $\mu\text{L}/\text{spot}$) and conducted dot blot using MAb as the primary antibody. Chemiluminescent reagents ECL and TMB were used as colorants respectively. Row 1, ECL as a colorant; a. 1×10^9 CFU/mL, b. 1×10^8 CFU/mL, c. 1×10^7 CFU/mL, d. 1×10^6 CFU/mL, e. 1×10^5 CFU/mL, f. blank. Row 2, TMB as a colorant; a. 1×10^8 CFU/mL, b. 1×10^7 CFU/mL, c. 1×10^6 CFU/mL, d. 1×10^5 CFU/mL, e. 1×10^4 CFU/mL, f. 1×10^3 CFU/mL, g. blank. Row 3: The ELISA plate was coated with serial dilutions (from 1×10^8 to 1×10^2 CFU/mL, 100 $\mu\text{L}/\text{spot}$) of *V. harveyi*, and 1:4 000 dilutions of MAb was used as the primary antibody. a. 1×10^8 CFU/mL, b. 1×10^7 CFU/mL, c. 1×10^6 CFU/mL, d. 1×10^5 CFU/mL, e. 1×10^4 CFU/mL, f. 1×10^3 CFU/mL, g. 1×10^2 CFU/mL, h. blank

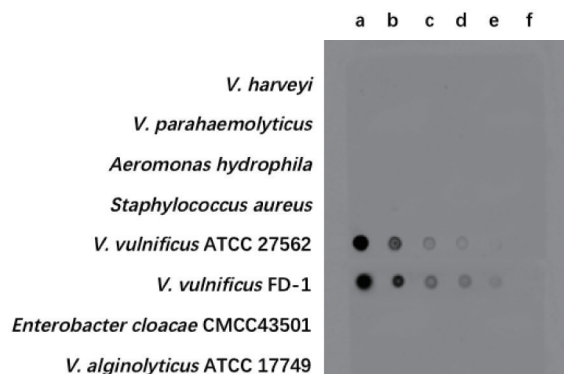
图 2 几种创伤弧菌单克隆抗体检测法灵敏度比较

Fig. 2 Comparison of the sensitivity of the detection methods of monoclonal antibodies in *V. vulnificus*

殊的设备和一定的技能,无法在基层养殖单位进行现场检测,而 LAMP 法虽然不需要特殊设备,但对操作环境要求较高,且易产生假阳性。胶体金免疫层析试纸条虽然操作简便,但灵敏度最高只能达 1×10^5 CFU/mL,无法用于病害的日常监测。

(上接第 113 页)

- [4] YARMOLINSKY M B, STERNBERG N. Bacteriophage P1 [J]. *Viruses*, 1988, 1936(3938): 1322.
- [5] LIU J, CHEN C Y, SHIOMI D, et al. Visualization of bacteriophage P1 infection by cryo-electron tomography of tiny *Escherichia coli* [J]. *Virology*, 2011, 417(2): 304-311.
- [6] SCHOLL D, ADHYA S, MERRIL C. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7 [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(8): 4872-4874.
- [7] WHITFIELD C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* [J]. *Annual review of biochemistry*, 2006, 75(1): 39-68.



注:a~e. 分别为细菌浓度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL 10 倍梯度稀释菌液固定的样品;f 为空白对照

Note:a~e. Bacterial concentration with 10-fold dilution: $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL; f. Blank

图 3 创伤弧菌改良斑点杂交法灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity detection of the modified speckle hybridization method of *V. vulnificus*

该研究基于传统斑点杂交技术,以灵敏性更好的 ECL 替代 TMB 底物显色液,实现了创伤弧菌高灵敏度检测,与之前报道的传统斑点杂交法相比灵敏度提高了 100 倍,比 ELISA 法提高了 1 000 倍,而且反应时间大幅度缩短,孵育时间从 8 h 缩短至 2 h,可以用于创伤弧菌的现场快速检测。

参考文献

- [1] HENG S P, LETCHUMANAN V, DENG C Y, et al. *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1-25.
- [2] HORSEMAN M A, SURANI S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: An important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection [J]. *Int J Infect Dis*, 2011, 15(3): 157-166.
- [3] BAKER-AUSTIN C, GORE A, OLIVER J D, et al. Rapid *in situ* detection of virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oyster matrices using real-time PCR [J]. *Environ Microbiol*, 2010, 2(1): 76-80.
- [4] CHATZIDAKI-LIVANIS M, HUBBARD M A, GORDON K, et al. Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(9): 6136-6141.
- [5] HAN F F, WANG F, GE B L. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(8): 2589-2595.
- [6] LI H, XIAO J F, ZHOU Y, et al. Sensitivity improvement of rapid *Vibrio harveyi* detection with an enhanced chemiluminescent-based dot blot [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2017, 65(3): 206-212.
- [7] 李强, 黄华, 张显昱, 等. 鲎爱德华菌单克隆抗体的制备及其在黄颡鱼“红头病”研究中的应用 [J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(4): 323-328.
- [8] 陈艳, 付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展 [J]. *国外医学(卫生学分册)*, 2008, 35(2): 91-96.
- [8] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [9] YAN H H, BAO F F, ZHAO L P, et al. Cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex regulates heparosan production in *Escherichia coli* strain nissle 1917 [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2015, 81(22): 7687-7696.
- [10] WANG Z Y, ZHANG Z Q, MCCALLUM S A, et al. Nuclear magnetic resonance quantification for monitoring heparosan K5 capsular polysaccharide production [J]. *Analytical biochemistry*, 2010, 398(2): 275-277.
- [11] WHITFIELD C, TRENT M S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides [J]. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 99-128.