

论著

建立金黄色葡萄球菌肠毒素 B 悬浮芯片定量检测方法

孙肖红¹ 王 静¹ 姜永强² 张晓龙¹ 杨 宇¹ 胡孔新¹ 单麟军¹ 杨永莉¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123;2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘 要:目的 建立金黄色葡萄球菌肠毒素 B 悬浮芯片定量检测方法。方法 利用双抗体夹心法免疫学原理,以金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的特异性抗体包覆微球为载体,利用悬浮芯片(Bio-Plex)系统建立检测模型;检测不同浓度金黄色葡萄球菌肠毒素 B,测定方法的灵敏性;通过该方法对大肠杆菌、普通变形杆菌、蓖麻毒素和禽流感病毒 HA、NH 蛋白和金黄色葡萄球菌热休克毒素的检测,判断方法的特异性;将不同浓度金黄色葡萄球菌肠毒素 B 添加到奶粉中验证方法的实用性和稳定性。结果 悬浮芯片方法对金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的检测线性范围为 0.2 ~ 1 653.4 ng/ml,最低检测值为 203 pg/ml,均优于酶联免疫吸附实验;除与 2.3 μg/ml 金黄色葡萄球菌热休克毒素有交叉反应外,和其他几种细菌、毒素、蛋白均无交叉反应;对添加相同浓度金黄色葡萄球菌肠毒素 B 奶粉的检测的相对标准偏差在 1.30 % ~ 16.93 %。结论 悬浮芯片定量检测方法对于模拟添加的金黄色葡萄球菌肠毒素 B 具有良好的检测效果。

关键词:肠毒素类;葡萄球菌,金黄色;悬浮芯片;芯片分析技术;超抗原;抗体

Developing a Detection Method for Staphylococcal Enterotoxin B by Suspension Array

SUN Xiao-hong, WANG Jing, JIANG Yong-qiang, ZHANG Xiao-long, YANG Yu, HU Kong-xin, SHAN Lin-jun, YANG Yong-li

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: **Objective** To develop a method for the detection of *Staphylococcal* enterotoxin B by suspension array. **Method** Applying the principle of double antibody sandwich immunoassay, coupled with fluorescent beads coated with specific antibody against *Staphylococcal* enterotoxin B as a carrier and using Bio-Plex suspension array system to detect the content of *Staphylococcal* enterotoxin B and the sensitivity of the method. The specificity of the method was conformed by the detection of *E. coli*, *P. vulgaris*, ricin, avian influenza virus HA, NH protein and *Staphylococcal* heat-shock toxin, and the practicability and stability of the method were conformed by adding *Staphylococcal* enterotoxin B to milk powder. **Results** The sensitivity of the newly developed suspension array for *Staphylococcal* enterotoxin B was about 203 pg/ml, and the dynamic ranges were 0.2 to 1 653.4 ng/ml, which were higher than the sensitivity of corresponding conventional ELISA. There was no cross reaction with other bacteria and proteins except for 2.3 μg/ml of *Staphylococcal* toxic shock toxin. **Conclusion** The suspension array method had been developed for the detection of *Staphylococcal* enterotoxin B.

Key words: Enterotoxins; *Staphylococcus aureus*; Suspension Array; Microchip Analytical Procedures; Superantigens; Antibodies

金黄色葡萄球菌肠毒素 (*Staphylococcal* enterotoxin, SE)是引起食物中毒的主要致病因素之一^[1],也是重要的生物恐怖战剂。通过血清学方法

可分为 7 个型:SEA、SEB、SEC1 ~ 3、SED、SEE,金黄色葡萄球菌肠毒素 B (*Staphylococcal* enterotoxin B, SEB)是金黄色葡萄球菌肠毒素中的一种,除了导致

[20] 黄海云. 乳品禁令是否执行尚无说法 法规不敌利益集团[Z/OL]. <http://old.news.hexun.com/1674-1999998A.shtml>.
[21] 关于加强液态奶标识标注管理的通知[Z]. 国质检食监联[520]号.

[22] 中华人民共和国国务院. 关于促进奶业持续健康发展的意见[Z]. 国发[31]号,2007.

[收稿日期:2009-04-30]

中图分类号:R15; TS252; X56 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)06-0481-05

基金项目:国家十一五科技支撑计划项目(2006BAK10B07);质检公益项目(2007GY023)。
作者简介:孙肖红 女 副研究员
通讯作者:王 静 女 研究员

食物中毒外,还可以作为超抗原与多种免疫性疾病的发生密切相关^[1],因此受到高度重视。SE的传统检测方法有动物实验^[2]、放射免疫法(RIA)^[2]、酶联免疫吸附实验(ELISA)^[2]和PCR^[2]等方法,但存在使用实验动物和放射性同位素,以及敏感性较低等不足之处,不适合在国境口岸进行快速筛查。

2001年“9·11”恐怖袭击事件发生后不久,美国国会议员办公室及政府部门等收到含炭疽粉末的邮件,造成恐慌。此后,为了应对恐怖分子将生物恐怖因子掺杂于奶粉、淀粉等可食用的白色粉末状物质中制造生物恐怖事件,王静等将炭疽杆菌芽胞、鼠疫杆菌、大肠杆菌O157等生物恐怖因子添加到奶粉、淀粉、面粉中,模拟“可疑白色粉末”建立各种检测方法^[3,4]。

悬浮芯片技术(suspension array)是近年来迅速发展起来的一种检测技术,与常规检测方法相比,具有高通量、操作简便、重复性好、灵敏度高以及线性范围宽等优点^[5]。国外已经利用悬浮芯片技术开展了抗体^[6,7]、肿瘤标志物和细胞因子等检测^[8,9],应用前景十分广泛。但是悬浮芯片能否从粉末样品中直接检测毒素和病原,尚缺乏模型和评价。本研究利用悬浮芯片技术,建立了一种快速、敏感的方法,能够从模拟添加SEB的粉末中检测出SEB。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

纯化SEB(1 mg/ml)、兔抗SEB抗体,由军事医学科学院提供;生物素化羊抗兔IgG(美国Rockland公司);羊抗兔IgG、兔抗羊IgG、羊抗鼠IgG抗体(北京鼎国生物技术公司);鸡IgG和兔抗鸡IgG抗体(北京欣经科生物技术有限公司)。

PBS购自Sigma公司,储存缓冲液(PBS, 0.1% BSA, 0.02% TWEEN, 0.05% Azide, pH 7.4)、检测缓冲液(PBS, 1% BSA, pH 7.4)、样品稀释液(PB, 0.01 mol/L, pH 7.2)、辣根酶标记链霉亲和素,均购自北京鼎国生物公司。

大肠杆菌(44104)、普通变形杆菌(49027)购自中国药品生物制品鉴定所,蓖麻毒素、金黄色葡萄球菌热休克毒素(TSST-1)、禽流感病毒HA蛋白、禽流感病毒NH蛋白等由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供。

编码微球购自美国LUMINEX公司;生物素 Biotin Labeling Kit-SH, Biotin Labeling Kit-NH₂, Sulfo-NHS, EDC,购自美国Pierce Chemicals(Rockford, IL);BCA Protein Assay Kit购自美国BD Clontech Pierce公司。

微球交联试剂盒、SA-PE、芯片仪光路校正试剂、

芯片仪分析校准试剂等,购自美国BIO-RAD公司。

1.2 仪器

悬浮芯片系统 Bio-Plex System(Luminex-100),购自美国BIO-RAD公司;微孔滤板吸滤器和气泵,购自美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 抗体包被编码微球及质控 按照微球交联试剂盒操作说明并参考文献方法^[10],用相应抗体包被羧基化编码微球(100 μl含 1.25×10^6 个编码微球),用血球计数板计数。

吸取适量微球,用储存缓冲液稀释至100个/μl;按1:250稀释生物素化的羊抗兔IgG抗体;吸取标记和未标记的微球各5000个,分别与50 μl生物素化羊抗兔IgG抗体稀释液充分振荡混匀,室温作用30 min;加入50 μl SA-PE(用检测缓冲液稀释成1:100),室温作用30 min;用Bio-Plex悬浮芯片系统读取荧光强度值(MFI)并分析数据。如果未标记微球的MFI低于100,而包被微球MFI大于2000,则显示标记微球成功,可使用;若包被微球MFI小于2000,则说明包被不成功。

1.3.2 生物素标记抗体及质控 用超纯水配制浓度为0.01 mol/L生物素溶液,用PBS将待标记抗体稀释至2 mg/ml,按试剂盒操作说明将计算好体积的生物素加入到待标记抗体溶液中,在室温振摇30 min, -20℃冻存备用。用双抗体夹心法ELISA方法检测生物素化抗体是否标记成功。

1.3.3 检测用SEB的制备 将储存浓度为1 mg/ml的SEB用样品稀释液稀释成7.5 μg/ml,然后4倍系列稀释至10 pg/ml。

1.3.4 模拟“白色粉末”的制备及检测 将62.5 μg/ml SEB进行4倍梯度稀释,分别把5 ml不同浓度的SEB添加到0.5 g奶粉中(按1 ml/0.1 g比例),充分混匀,静置2 h。1000 r/min离心4 min,上清液用悬浮芯片检测,绘制标准曲线。

将SEB定量添加到奶粉中制备模拟“白色粉末”进行定量检测,以检测值与实际添加的理论值之间的比例为回收率。

1.3.5 悬浮芯片检测模型的建立 在96孔滤板上,利用双抗体夹心免疫学检测原理^[10],用Bio-Plex悬浮芯片系统读取MFI数值并分析数据,绘制标准曲线并得到标准曲线方程式。标准曲线的x轴代表SEB的浓度(ng/ml),y轴代表悬浮芯片仪检测的荧光值,每个数据代表3次的检测结果,空白对照(Blank)为不加检测物时该编码微球产生的荧光背景。临界值(Cut off值)为空白对照荧光检测信号MFI均值加3倍标准偏差。

用悬浮芯片检测的同时用双抗体夹心ELISA检

测,比较两种方法的灵敏性。ELISA 检测中使用的抗体与悬浮芯片方法相同,结果通过 SA/HRP(辣根酶标记链霉亲和素)和 TMB 显色系统检测^[10]。取 3 次 ELISA 检测的平均值作为检测值绘制标准曲线,零含量检测样品的检测值为空白值。ELISA 的最低检测限(LOD 值)取检测孔 A 值与空白孔 A 值之比为 2.1 时的检测浓度^[11]。

1.3.6 方法的特异性检测 使用优化条件,用建立的方法检测大肠杆菌(44104)、普通变形杆菌(49027),以及蓖麻毒素、金黄色葡萄球菌热休克毒素(TSST-1)、禽流感病毒 HA 蛋白、禽流感病毒 NH 蛋白等细菌、毒素和蛋白质,考核方法对试样检测的特异性。菌检测时使用大肠杆菌、普通变形杆菌悬液的浓度范围为 $10 \sim 10^8$ CFU/ml,毒素和蛋白质的浓度范围为 $10 \text{ pg/ml} \sim 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 。

1.3.7 方法的重复性检测 检测添加不同浓度

SEB 的奶粉试样 3 次,以荧光检测信号的平均值(MFI)作为检测结果,计算相对标准偏差(RSD)。

2 结果

2.1 方法优化结果

经过多种优化后的抗体对组合为:微球包被兔抗 SEB 单抗(抗体包被量为 $10 \text{ } \mu\text{g}/1.25 \times 10^6$ 个编码微球),检测抗体为 1:50 的生物素-兔抗 SEB(标记浓度为 1 mg/ml)。

2.2 SEB 定量检测模型的建立

2.2.1 SEB 检测的标准曲线 通过检测从 $7.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ 开始 4 倍系列稀释至 10 pg/ml 的 SEB,绘制检测标准曲线,得到拟合方程 $FI = 0.154277 + (2953.29 - 0.154277) / [1 + (\text{Conc}/40.1862)^{-1.30131}]^{0.894441}$,利用 Bio-Plex 提供的软件计算检测的浓度值。从标准曲线(图 1)可见,方法

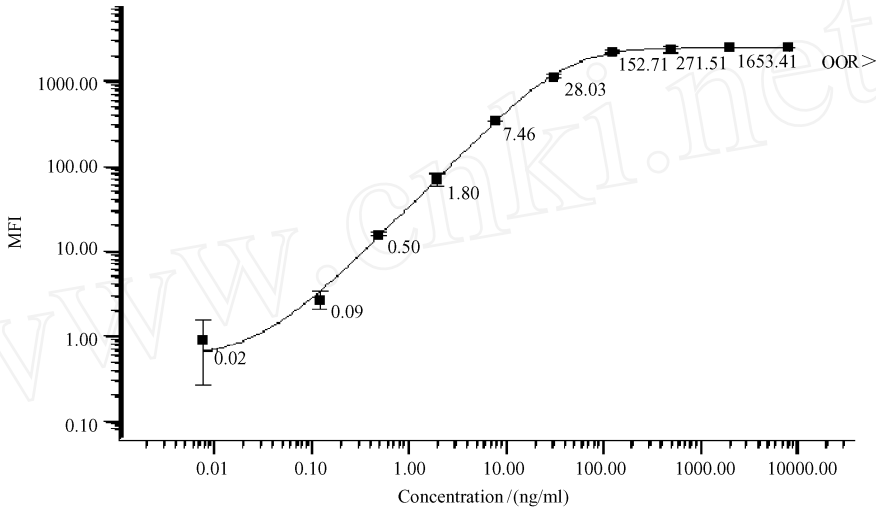


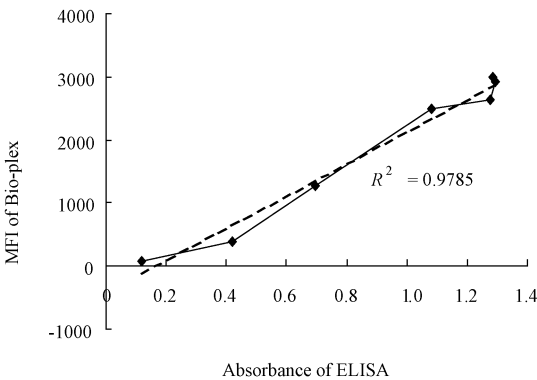
图 1 悬浮芯片方法检测 SEB 标准曲线图

的检测线性范围为 $0.2 \sim 1653.4 \text{ ng/ml}$,从拟合方程计算出最低检测限(LOD)为 203 pg/ml 。

2.2.2 方法敏感性与 ELISA 的比较 将 SEB 用样品稀释缓冲液稀释成不同浓度梯度,同时用悬浮芯片及 ELISA 方法检测,两种方法的检测结果吻合性比较见图 2。可见悬浮芯片和 ELISA 方法有很好的—致性(R^2 为 0.9785),但 ELISA 检测 SEB 的最低检测浓度为 60 ng/ml ,高于悬浮芯片 203 pg/ml 的最低检测浓度;且 ELISA 检测的线性范围为 $100 \sim 800 \text{ ng/ml}$,比悬浮芯片的线性范围($0.2 \sim 1653.4 \text{ ng/ml}$)窄。

2.3 方法的特异性检测

用建立的方法检测奶粉试样中大肠杆菌、普通变形杆菌,以及蓖麻毒素、禽流感病毒 HA 蛋白、禽流感病毒 NH 蛋白、金黄色葡萄球菌热休克毒素(TSST-1)。发现 SEB 的检测除了与 $2.3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ TSST-1



注:实线代表两种方法分别对相同试样检测值的连接线,虚线为添加的趋势线。前 4 个浓度时两种方法结果不同浓度的吻合,最后 2 个浓度说明两种方法对同一个浓度试样检测的线性范围不同:ELISA 的吸光度不变,即检测浓度不再升高,而悬浮芯片的 MFI 值继续升高,表示检测范围还在加大。

图 2 悬浮芯片与 ELISA 方法检测 SEB 的吻合性

有交叉反应外,和其他几种细菌、毒素、蛋白均无交叉反应。

2.4 模拟试样中 SEB 的定量检测

对添加有不同浓度 SEB 的奶粉进行检测,添加 SEB 含量为 15.26、61.04、301.45 和1 387.24 ng/ml 的奶粉的检测值分别为 16.34、48.95、258.69 和 1 256.23 ng/ml,回收率在 80.2 % ~ 107.1 %。

2.5 重复性检测

用优化条件检测添加 SEB 的理论值为 0.46、1.83、29.30、117.19、468.75 ng/ml 的样品 3 次,结果见表 1。

表 1 方法的重复性检测 (n=3)

理论值 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	MFI	标准差	RSD (%)
0.46	0.50	22.3	1.06	5.98
1.83	1.77	81.8	13.08	16.93
29.30	28.54	1278.3	80.26	6.30
117.19	131.21	2486.8	85.21	3.43
468.75	329.08	2638.8	0.98	1.30

3 讨论

随着现代分子生物学技术的发展,新型金黄色葡萄球菌肠毒素不断被发现,如 SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK、SEL、SER 等。建立敏感、快速的 SE 检测方法对于有效预防食物中毒、应对生物恐怖事件都具有重要意义。

本研究建立的 SEB 悬浮芯片检测方法的检测线性范围为 0.2 ~ 1 653.4 ng/ml,最低检测限为 203 pg/ml,虽然和 ELISA 具有良好的检测吻合性,但敏感性优于 ELISA(最低检测浓度为60 ng/ml),比文献报道的荧光免疫层析法^[12]、磁免疫层析法^[13]、芯片传感器^[14]等方法的灵敏度高,与免疫磁分离和流式细胞仪联用技术^[15]、生物传感器质谱联用技术^[16]、毛细管芯片技术的灵敏性在同一数量级,不及免疫磁-电化学发光法^[17]、手持式免疫层析法^[18]。检测灵敏度的差异可能与所检测毒素纯度不同有关。

经过特异性检测,发现本方法对 SEB 的检测和大肠杆菌、变形杆菌、蓖麻毒素和禽流感病毒蛋白均无交叉反应,但是与高浓度(2.3 μg/ml) TSST-1 有交叉反应。可能与二者均为金黄色葡萄球菌产生的毒素有关。

由于奶粉作为食物更容易被用于制备白色粉末,本方法将 SEB 添加于奶粉中作为模拟添加样品。在检测范围内,悬浮芯片可以对奶粉中的 SEB 进行定量,检测值与理论值近似。

参考文献

[1] 雷祚荣. 细菌毒素分子生物学[M]. 中国科学技术出版社,

1993:88-94.
[2] 梁毅珊. 金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法的研究进展[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1658-1659.
[3] 李伟,王静,胡孔新,等. 应用胶体金免疫层析技术建立炭疽杆菌芽孢的快速检测方法[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2004, 27(6): 329-331.
[4] 王静,胡孔新,李伟,等. 2 种免疫层析技术用于 4 种传染病及其病原体检测的研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006 (B08): 27-34.
[5] FULTON R J, MCDADE R L, SMITH, et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system[J]. Clin Chem, 1997, 43(9): 1749-1756.
[6] GORDON R F, MCDADE R L. Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FlowMetrix system[J]. Clin Chem, 1997, 43(9): 1799-1801.
[7] MARTINS TB. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(1): 41-45.
[8] OLIVER K G, KETIMAN J R, FULTON R J. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system[J]. Clin Chem, 1998, 44(9): 2057-2060.
[9] PRABHAKAR U, EIRIKIS E, DAVIS H M. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay[J]. J Immunol Methods, 2002, 260(1-2): 207-218.
[10] 丁艳丽,王静,侯友松,等. 编码微球悬浮芯片和改良 ELISA 鼠疫菌检测方法比较研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29: 35-37.
[11] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 科学出版社, 2001:160-162.
[12] KHANHAN A S, CAOAO C J, THOPSON R G, et al. A simple and rapid fluorescence-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. Mol Cell Probes 2003, 17(2-3): 125-126.
[13] ALEFANTIS T, GREWAL P, ASHTON J, et al. A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-through put screening[J]. Mol Cell Probes, 2004, 18(6): 379-382.
[14] LIQLER F S, TAITT C R, SHRIVER-LAKE L C, et al. Array biosensor for detection of toxins[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(3): 469-477.
[15] NEDEL KOV D, RASOOL Y A, NELSON R W. Multitoxin biosensor-mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real-time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food[J]. Int J Food Microbiol, 2000, 60(1): 1-13.
[16] MIYAMOTO T, KAMIKADO H, KOBAYASHI H, et al. Immunomagnetic flow cytometric detection of staphylococcal enterotoxin B in raw and dry milk[J]. J Food Prot, 2003, 66(7): 1222-1226.
[17] KJEK T M, ROSSI C A, MOSS D, et al. Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. J Immunol Methods, 2000, 236(1-2): 9-17.
[18] SCHOTTE U, LANGFELDT N, PERUSKI A H, et al. Detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) by enzyme-linked immunosorbent assay and by a rapid hand-held assay[J]. Clin Lab, 2002, 48(7-8): 395-400.

[收稿日期:2009 - 03 - 25]