

金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及应用

时玉菲 章先 谢琿 王歆 方维焕*

(浙江大学动物科学学院 浙江省动物预防医学重点实验室 浙江 杭州 310058)

摘要: 【目的】建立一种快速、灵敏、特异的金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素(Staphylococcal enterotoxin A, SEA)检测方法。【方法】以原核表达的可溶性重组 SEA 蛋白为免疫原,获得特异性强、亲和力高的单克隆抗体作为捕获抗体,同时制备抗 SEA 兔多抗血清作为检测抗体建立双抗体夹心 ELISA (Double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA)检测方法。【结果】该方法对 SEA 的线性检测区间为 2–128 $\mu\text{g/L}$ ($y=1.102x-0.07$, $R^2=0.994$),检测下限为 1.89 $\mu\text{g/L}$,与 SEB、SEC2 和 SED 之间无交叉反应;鲜奶 SEA 人工污染试验测定回收率为 94%–114%,变异系数小于 10%。应用该方法对 46 株金黄色葡萄球菌水产品分离株和 164 株奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌分离株的体外培养上清进行检测,阳性率分别为 4.4%和 50.6%,表明 SEA 污染普遍存在。【结论】建立的 DAS-ELISA 方法特异性、灵敏度和稳定性好,为检测 SEA 的食源性污染提供了有效手段。

关键词: 金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素,单克隆抗体,双抗体夹心 ELISA

Development and application of DAS-ELISA for detection of staphylococcal enterotoxin A

SHI Yu-Fei ZHANG Xian XIE Hui WANG Xin FANG Wei-Huan*

(Zhejiang Province Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: [Objective] The research aimed to establish a rapid, sensitive and specific method for detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA). [Methods] The soluble protein His-tagged SEA expressed in *Escherichia coli* was used as the immunogen to produce specific antibodies with high affinity. A double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) was developed using anti-SEA monoclonal and polyclonal antibodies as capture antibody and detection antibody respectively. [Results] There was good linearity in the toxin range of 2–128 $\mu\text{g/L}$ ($y=1.102x-0.07$, $R^2=0.994$) with the detection limit at 1.89 $\mu\text{g/L}$. The assay showed no cross-reactivity with SEB, SEC2 or SED. The average recovery rates for SEA in milk ranged from 94%–114% with the variation coefficient less than 10%. In addition, the method was also successfully used to detect SEA-producing strains in culture filtrates. Of

Foundation item: National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA101602)

*Corresponding author: Fax: 86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

Received: May 25, 2015; **Accepted:** June 09, 2015; **Published online** (www.cnki.net): July 20, 2015

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA101602)

*通讯作者: Fax: 86-571-88982242; E-mail: whfang@zju.edu.cn

收稿日期: 2015-05-25; **接受日期:** 2015-06-09; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-07-20

46 *Staphylococcus aureus* isolates from aquatic products, 4.4% were SEA-producing, while 50.6% for 164 bovine mastitis isolates. **[Conclusion]** Therefore, the DAS-ELISA method was sensitive and specific, and could be used as a mean for monitoring food-borne SEA contamination.

Keywords: Staphylococcal enterotoxin A, Monoclonal antibody, DAS-ELISA

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是一种广泛分布的重要人兽共患病病原,其致病力强弱主要取决于其产生的毒素以及侵袭性酶^[1],包括肠毒素(Staphylococcal enterotoxins, SEs)、溶血素、杀白细胞素、血浆凝固酶等。该菌不仅能够引起人和动物的化脓性感染及脓毒败血症,是造成奶牛乳腺炎的最主要病原^[2],其肠毒素还可通过污染食物而引起食源性疾病的暴发^[3]。

SEs 是由耐热核酸酶或血浆凝固酶阳性菌株产生的一类对热稳定的低分子量可溶性胞外蛋白质,除了 5 种传统肠毒素 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 外,SEG、SEH、SEI、SEJ、SEK、SEL、SEM、SEN、SEO、SEIP、SEIQ、SEIR、SEIU 和 SEIV 等肠毒素也随着研究不断被发现^[4],已成为第二大类细菌毒素^[5]。

近年来,由 SEs 引起的食物中毒已成为世界性的公共卫生问题之一^[6],其中以 A 型肠毒素(Staphylococcal enterotoxin A, SEA)引起的食物中毒发生率最高、毒性最大、危害最为严重。在美国,SEA 引起的食物中毒占肠毒素引起的中毒事件的 77.8%,其次是 SED 和 SEB,分别占 37.5%和 10%;在日本、法国、英国的 SEs 食物中毒事件中,SEA 的地位居高不下^[7];我国也以 A 型最为常见^[8-10],被分泌 SEA 的金黄色葡萄球菌污染的食品原料是造成食物中毒的重要原因。因此,建立快速、灵敏、特异的检测方法以实现对其食品及其原料中微量 SEA 的检出是预防 SEA 食物中毒的必要条件,具有重要的公共卫生意义。本研究以筛选特异性强、亲和力高的单克隆抗体为基础,建立了 DAS-ELISA 检测方法,可实现对 SEA 样品的定性及定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及菌株: 6 周龄 Balb/c 雌性小鼠和

2-3 kg 清洁级新西兰大白兔雌兔均购自浙江省中医学院实验动物中心;金黄色葡萄球菌水产品分离株 46 株由浙江省舟山市出入境检验检疫局惠赠;金黄色葡萄球菌奶牛乳房炎分离株 164 株由浙江大学奶业科学研究所惠赠;pMD-18T 克隆载体购自 TaKaRa 宝生物(大连)公司;产 A 型肠毒素的金黄色葡萄球菌(SA120926),DH5 α 和 Rosetta 大肠杆菌感受态细胞及原核表达载体 pET-28a 质粒,骨髓瘤细胞 SP2/0 等为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: SEA、SEB 和 SED 标准品购自北京军事医学科学院;His-SEC2 重组蛋白由本实验室制备冻存;PrimerSTAR 高保真酶、*Nde* I、*Xho* I 和 DNA 连接试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物(大连)公司;弗氏完全佐剂(FCA)和不完全佐剂(FIA)购自美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基及次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷(HAT)和次黄嘌呤胸腺嘧啶脱氧核苷(HT)均购自 GIBCO 公司;ProteinA/G 抗体纯化柱购自上海悦克生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG 均购自天津三箭生物技术有限公司;TMB 显色液购自北京泰天河生物技术有限公司;肠毒素产毒培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 主要器材: SpectraMax M5 酶标仪购自美国 Molecular Device 公司;96 孔 ELISA 酶标板、细胞培养板和细胞培养皿购自美国 Corning 公司。

1.2 重组 SEA 免疫抗原制备

1.2.1 sea 基因的扩增和克隆: 根据 GenBank 公布的 sea 基因序列(GenBank:M18970.1)设计特异性引物(*S. aureus*-sea-F-*Nde* I: 5'-GAATTCATATGAGCGAGAAAAGCGAAG-3', *S. aureus*-sea-R-*Xho* I: 5'-CCGCTCGAGTTAACTTGTATATAAATATATATCAATATGC-3'),并在引物的 5'端分别引入 *Nde* I 和基因组抽提试剂盒提取产 SEA 毒素金黄色葡萄球

菌菌株(SA120926)基因组后, 用设计的引物进行 PCR 扩增。反应体系为: DNA 模板(118 mg/L) 1 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, PrimerSTAR 0.3 μ L, dNTPs mixture (2.5 mmol/L) 2.4 μ L, 2 \times PrimerSTAR[®] GC buffer 15 μ L, ddH₂O 10.3 μ L。反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物纯化后连接到 pMD-18T 载体中, 转化重组质粒 pMD-18T-sea 至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。挑取单菌落, PCR 鉴定为阳性之后, 提取质粒。

1.2.2 重组质粒 pET-28a-sea 构建: 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 分别对阳性质粒 pMD-18T-sea 和表达载体 pET-28a 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳回收后连接, 将连接产物转化入表达感受态细胞 Rosetta 中, 提取质粒, 经酶切鉴定后, 将含有阳性重组质粒的菌命名为 Rosetta-pET-28a-sea, 将菌液送北京华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.3 可溶性 SEA 的低温诱导表达及纯化: 将测序正确的阳性菌接入含有卡那霉素的 LB 液体培养基(g/L, 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 5 h, 设置梯度摸索最佳诱导时间。将最佳诱导条件下表达的菌液经超声波裂解, 分离上清与沉淀并进行 SDS-PAGE 分析。经镍螯合层析柱纯化获得目的蛋白, SDS-PAGE 电泳分析其纯度, 利用 BCA 法测定浓度后加甘油分装, -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 抗 SEA 单克隆抗体的制备及纯化

根据免疫程序^[11], 利用纯化后的重组 His-SEA 免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠 4 次后, 取血清抗体效价最高小鼠的脾细胞与杂交瘤细胞进行融合, 先后用含 HAT 和 HT 的细胞培养基对融合后的细胞进行筛选。间接 ELISA 检测细胞上清筛选阳性杂交瘤细胞, 以 His-SEA 作为抗原, 以杂交瘤细胞上清作为一抗, 以羊抗鼠 IgG-HRP 作为二抗, 同时设立 His-SEC 为阴性对照排除与 His 标签反应的假阳性

孔, 选出特异性高、敏感性好、细胞生长旺盛的阳性孔有限稀释。3-5 次亚克隆后, 将阳性单克隆细胞株扩大培养注入石蜡提前致敏的小鼠腹腔, 制备腹水, Protein A/G 抗体纯化柱纯化, SDS-PAGE 对纯化效果进行分析。

1.4 抗 SEA 多克隆抗体的制备

将 SEA 与等量弗氏完全佐剂混合, 乳化后对新西兰大白兔进行背部皮下多点注射免疫, 500 μ g/只。之后改用弗氏不完全佐剂乳化, 隔两周免疫一次, 四免后两周心脏采血获得血清, 离心初纯后-20 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 单克隆抗体的鉴定

1.5.1 单克隆抗体亲和力常数的测定: 参考文献[12]所述方法对单克隆抗体进行亲和力常数测定, 用 2.5 mg/L 和 1.25 mg/L 的 SEA 进行包被, 倍比稀释已知浓度的单克隆抗体进行间接 ELISA, 酶标仪读波长为 450 nm 处的 OD 值, 将平台期(抗体过量、抗原饱和, 该区间内 OD_{450} 值波动极小)的 OD_{450} 值记为 100%, 并根据公式计算单克隆抗体亲和力常数:

$$Ka=(n-1)/2(n \times Ab_1 - Ab_2), n=Ag_2/Ag_1$$

式中: Ag_1 、 Ag_2 为两个不同的抗原包被质量浓度(mg/L); Ab_1 、 Ab_2 为相应抗原包被浓度下 OD_{450} 值为平台期一半时的对应的抗体摩尔浓度(mmol/L)。

1.5.2 单克隆抗体特异性的测定: 用 Western blot 对单克隆抗体的特异性进行鉴定, 将 His-SEA、SEA、SEB、His-SEC2、SED 以及产 SEA 菌株(SA120926)上清蛋白浓缩样 SDS-PAGE, 转膜后分别与腹水抗体作用来鉴定单克隆抗体与 SEA 的反应特异性。

1.6 DAS-ELISA 检测方法的建立

1.6.1 方阵试验确定最佳抗体工作浓度: 采用亲和力最高的单克隆抗体及兔多抗血清分别作为捕获抗体及检测抗体, 方阵法确定最佳抗体浓度。捕获抗体包被浓度为 1:250、1:500、1:1 000、1:2 000 倍

稀释, 检测抗体工作浓度为 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000 倍稀释, 固定夹心抗原 SEA 浓度同时设立阴性对照, 然后用 DAS-ELISA 一般方法进行试验, 选择检测下限最低且对应夹心抗原浓度下 P/N 值最大的组合确定为最佳抗体工作浓度。

1.6.2 DAS-ELISA 试验条件优化: 根据 1.6.1 确定的抗体最佳工作浓度, 分别试验在不同反应条件下, 不同包被时间(37 °C 2 h, 4 °C 12 h); 封闭液(5% 脱脂奶粉, 10% 脱脂奶粉, 5% BSA, 1% BSA), 封闭时间(37 °C 1 h, 37 °C 2 h, 4 °C 12 h); 多抗血清作用时间(37 °C 0.5 h, 37 °C 1 h, 37 °C 1.5 h, 37 °C 2 h); 酶标二抗(1:2 000–1:10 000), 二抗作用时间(37 °C 0.5 h, 37 °C 1 h, 37 °C 1.5 h, 37 °C 2 h), 采用方阵法进行 ELISA 试验。检测同一阳性样品和阴性样品, 选择 P/N 值最大时为最佳反应条件。

1.6.3 临界值的确定: 选取 40 株经 PCR 鉴定为 SEA 阴性的金黄色葡萄球菌菌株, 经肠毒素产毒培养基培养 24 h 后滤除菌体取上清作为 SEA 阴性样品, 按照上述建立的 DAS-ELISA 方法进行测定。每份样品重复 2 孔, 测定 OD_{450} 值, 进行统计学分析, 计算 40 份培养上清 OD_{450} 值的平均值(\bar{x})和标准方差(s), 根据统计学原理, 大于等于 $\bar{x}+3s$ 为阳性, 小于等于 $\bar{x}+2s$ 为阴性, 小于 $\bar{x}+3s$ 且大于 $\bar{x}+2s$ 为可疑样品。

1.6.4 标准曲线的绘制: 根据 1.6.1 和 1.6.2 确定最佳反应条件, 在该条件下建立 DAS-ELISA 曲线, 夹心抗原的浓度区间为 0.5–512 $\mu\text{g/L}$ 。以 SEA 的浓度对数为横坐标、 OD_{450} 为纵坐标构建 DAS-ELISA 标准曲线, 并求得曲线方程和相关系数。

1.7 DAS-ELISA 检测的特异性、灵敏性及重复性评价

用建立的 DAS-ELISA 方法检测 1 mg/L 的 SEB、His-SEC2、SED 等毒素样品, SEA 标准品为阳性对照, 同时设立空白对照, 根据结果判定其特异性。根据 1.6.3 计算 $\bar{x}+2s$ 在曲线中对应的质量浓度, 计算该试验方法的检测下限^[13]。在线性范围内选择 3 个质量浓度点, 在一次试验中每个质量浓度

测 8 个重复, 连续测 4 个批次, 计算批内及批间变异系数。

1.8 初步应用

1.8.1 鲜奶加标回收检测: 应用 DAS-ELISA 对光明、伊利、蒙牛等品牌的 15 种产品(涵盖奶粉, 鲜奶, 酸奶, 纯奶等)进行检测, 选择不含肠毒素的产品进行加标回收试验。将已知浓度的 SEA 添加到不含肠毒素的鲜奶中, 制备不同污染程度的样品。采用 DAS-ELISA 对污染后的样品进行检测, 每个质量浓度测 5 个重复, 计算 OD_{450} 平均值在 DAS-ELISA 标准曲线中对应的质量浓度为实测浓度, 根据实测浓度/添加浓度 $\times 100\%$ 计算回收率。

1.8.2 金黄色葡萄球菌分离株中 SEA 阳性株检测: 应用 DAS-ELISA 对 2012 年舟山进出口检验检疫局自水产品中分离的 46 株金黄色葡萄球菌以及 2005–2015 年期间浙江大学奶业科学研究所从浙江、上海、新疆、山东、内蒙、河北、兰州、重庆、广东、陕西等地奶牛乳腺炎中分离到的 164 株金黄色葡萄球菌进行检测。金黄色葡萄球菌分离株接种 LB 复苏后转接入 5 mL 肠毒素产毒培养基, 37 °C 产毒培养 24 h 后 DAS-ELISA 检测培养上清筛选阳性菌株。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET28a-sea 的鉴定

琼脂糖凝胶电泳可见, 双酶切后得到约 750 bp 和 5 000 bp 的片段, 与预期条带大小相符。测序结果与 GenBank 中 M18970.1 相比, 核苷酸的相似性为 100%。

2.2 重组蛋白的可溶性表达及纯化

Rosetta-pET28a-sea 经 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 16 °C 低温诱导表达 5 h 后表达量理想, 收集菌体超声破碎后进行 SDS-PAGE 发现, SEA 重组蛋白总表达量的 90% 以上位于上清中。SEA 重组蛋白大小在 30 kD 左右, 与预期相符。收集 Rosetta-pET28a-sea 经 IPTG 16 °C 诱导 5 h 后的菌体裂解上清, 通过镍柱纯化获得高纯度的重组 SEA 蛋白(图 1)。

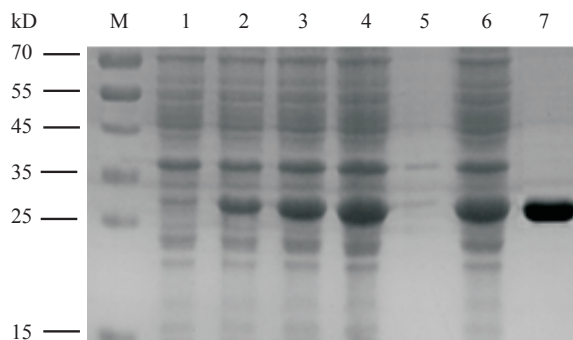


图 1 SEA 重组蛋白的可溶性表达及纯化

Figure 1 The soluble detection and purification of recombinant SEA protein

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导的 Rosetta-pET28a-sea 全菌蛋白; 2-4: 诱导 1、3、5 h 的全菌蛋白; 5: 诱导 5 h 后的菌裂解沉淀; 6: 诱导 5 h 后的菌裂解上清; 7: 纯化后的重组 SEA。

Note: M: Protein molecular marker; 1: Non-induced Rosetta-pET28a-sea; 2-4: Whole bacteria with IPTG induction for 1, 3 and 5 hours; 5: Precipitate after ultrasonication; 6: Supernatant after ultrasonication; 7: Purified recombinant SEA protein.

2.3 单克隆抗体的纯化

获得 6 株单克隆细胞株, 分别命名为 3D12、2C10、1G6、1F8、2A12 和 4C9, 腹水效价均高于 20 万。Protein A/G 纯化柱纯化后 SDS-PAGE, 在泳道中仅出现两条带, 分子量大约在 50 kD 和 25 kD 左右(图 2), 与抗体的重、轻链分子质量大小一致, 纯化效果较好。

2.4 单克隆抗体的鉴定

2.4.1 单克隆抗体亲和力常数的测定: 亲和力常数 $3D12 > 2C10 > 1G6 > 1F8 > 2A12 > 4C9$, 分别为 9.61×10^8 、 1.45×10^8 、 1.18×10^8 、 9.07×10^7 、 8.93×10^7 、 5.37×10^7 L/mol, 一般认为亲和常数为 10^7 – 10^{12} L/mol 的抗体亲和力高^[14], 所以 6 株单克隆抗体细胞株均具有较高的亲和力, 选择亲和力最强的 Anti-SEA-3D12 细胞株进行后续 DAS-ELISA 试验体系的建立。

2.4.2 单克隆抗体特异性的测定: Anti-SEA-3D12 细胞株与 His-SEA、SEA 标准品、产 SEA 菌株提取物反应呈阳性, 与 SEB、His-SEC2、SED 无交叉反应(图 3), 表明单抗特异性好。

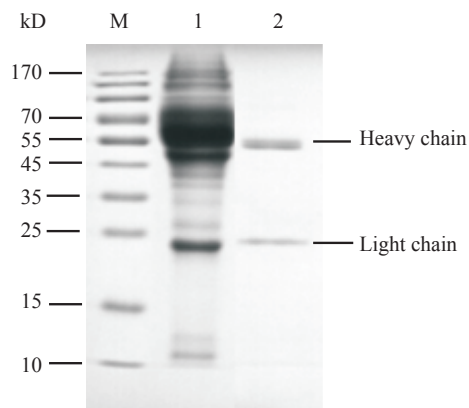


图 2 纯化的腹水抗体 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified ascitic mAb

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未纯化的腹水; 2: 纯化后的腹水。

Note: M: Protein molecular marker; 1: Non-Purified ascitic mAb; 2: Ascitic mAb purified by protein A/G plus beads.

2.5 DAS-ELISA 方法的建立

2.5.1 DAS-ELISA 方法的建立及反应条件的优化: 通过方阵法和多次试验, 得到了 DAS-ELISA 方法的最佳条件(表 1)。

2.5.2 临界值的确定: 40 份阴性样品 OD_{450} 值最高为 0.283, 最低为 0.129, 平均值(\bar{x})为 0.181, 标准方差(s)为 0.043, 临界值 $\bar{x} + 3s = 0.309$, 因此 OD_{450} 值 ≥ 0.309 即可判定为阳性。

2.5.3 DAS-ELISA 标准曲线的绘制: 由绘制得到

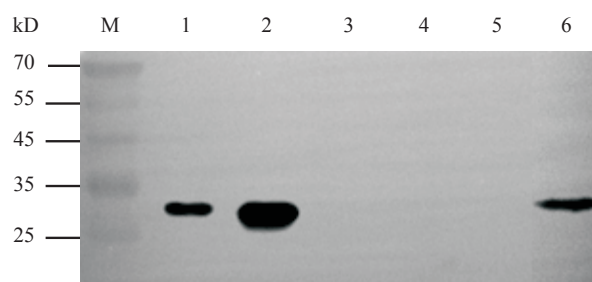


图 3 腹水抗体 3D12 的 Western-blot 分析

Figure 3 Western-blot of anti-SEA ascitic mAb 3D12

注: M: 蛋白 Marker; 1: His-SEA; 2: SEA; 3: SEB; 4: His-SEC2; 5: SED; 6: 产毒 SEA 菌株 SA12096 三氯醋酸法提取上清蛋白。

Note: M: Protein molecular marker; 1: His-SEA; 2: SEA; 3: SEB; 4: His-SEC2; 5: SED; 6: SEA natural toxin deposited by trichloroacetic acid from SA12096.

表1 DAS-ELISA 检测方法的最佳反应条件的确定
Table 1 The optimized conditions of the DAS-ELISA

项目 Items	单抗包被 mAb 3D12	封闭条件 Blocking conditions	样品 Sample	多抗检测 Rabbit Ab	HRP标记二抗 IgG-HRP
Optimized dilutions	1:500	5% Skim milk powder		1:2 000	1:2 000
Reaction conditions	4 °C, 12 h	37 °C, 2 h	37 °C, 1 h	37 °C, 1 h	37 °C, 1 h

的曲线图(图 4A), 可知曲线在 SEA 质量浓度为 2–128 $\mu\text{g/L}$ 范围时具有良好的线性, 且包括了 6 个标准点。根据这 6 个标准点绘制标准曲线(图 4B), 曲线方程为 $y=1.102x-0.07$, $R^2=0.994$ 。

2.6 DAS-ELISA 检测的特异性、灵敏性及重复性评价

DAS-ELISA 方法检测 His-SEA 和 SEA 呈阳性, SEB、His-SEC2 和 SED, OD_{450} 值均小于 0.2 呈阴性, 说明建立的 DAS-ELISA 方法特异性良好。DAS-ELISA 的有效检测范围为 2–128 $\mu\text{g/L}$, $\bar{x}+2s$ 为 0.233, 计算 OD_{450} 值 0.233 在标准曲线 ($y=1.102x-0.07$) 中对应的质量浓度, 该试验方法检

测下限为 1.89 $\mu\text{g/L}$ 。重复试验中, 批内和批间变异系数均小于 10% (表 2), 说明该方法重复性好。

2.7 初步应用

2.7.1 鲜奶加标回收检测: 15 种牛奶产品的 SEA 检测均为阴性。选择保质期为 7 d 的食用鲜奶进行加标回收试验, 在 4 次试验中, 对 5 个质量浓度点的蛋白样品测量, 得到的平均回收率在 94%–114% 范围内(表 3), 证明该方法对牛奶样品的检测效果较好, 可用于实际检测。

2.7.2 金黄色葡萄球菌分离株中 SEA 阳性株检测: DAS-ELISA 自 46 株水产品金黄色葡萄球菌菌株中检出 2 株 SEA 阳性菌株, 阳性率为 4.4%, 自 164 株奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌分离株中检出

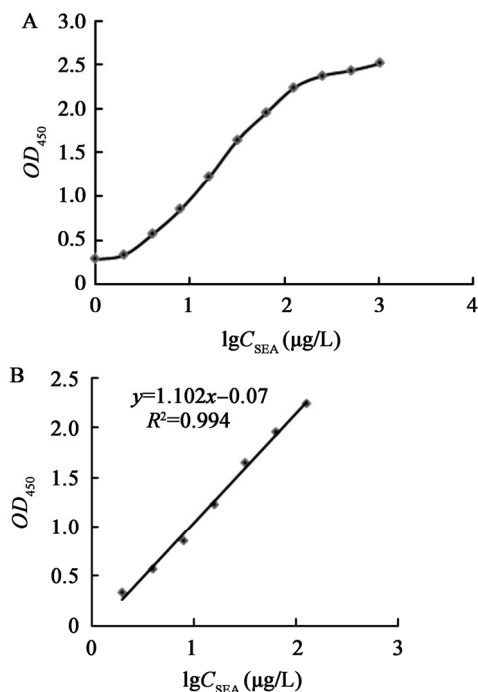


图4 SEA 的 DAS-ELISA 检测曲线(A)和线性回归分析(B)
Figure 4 Detection of SEA by DAS-ELISA (A) and linear analysis (B)

表2 重复性试验结果
Table 2 Repeatability assay for DAS-ELISA

SEA ($\mu\text{g/L}$)	批内变异系数 Intra batch ($n=8$)		批间变异系数 Inter batch ($n=4$)	
	平均数 $\bar{x} \pm s$	变异系数 CV (%)	平均数 $\bar{x} \pm s$	变异系数 CV (%)
8	0.85 \pm 0.061	7.17	0.85 \pm 0.073	8.61
32	1.66 \pm 0.076	4.59	1.67 \pm 0.101	6.04
64	1.95 \pm 0.055	2.82	2.04 \pm 0.185	9.06

表3 鲜奶肠毒素加标回收试验结果
Table 3 Recovery rates of DAS-ELISA for milk samples spiked with SEA

SEA ($\mu\text{g/L}$)	批内变异系数 Intra batch ($n=5$)		批间变异系数 Inter batch ($n=4$)	
	平均数 $\bar{x} \pm s$	变异系数 CV (%)	平均数 $\bar{x} \pm s$	变异系数 CV (%)
5	94.9 \pm 6.09	6.41	97.8 \pm 9.82	9.12
10	99.1 \pm 3.94	3.97	98.0 \pm 6.62	6.75
20	103.9 \pm 5.08	4.89	100.2 \pm 9.37	9.71
50	102.9 \pm 4.12	4.00	107.9 \pm 10.56	9.79
100	114.0 \pm 2.91	2.55	111.4 \pm 6.59	5.92

SEA 分离株 83 株, 阳性率为 50.6%, 表明 SEA 在食品及原料中的污染普遍存在。

3 讨论

SEs 基因往往以基因簇(cgc)^[15]的形式存在, 导致同一株金黄色葡萄球菌能够同时产生多种分子量相近、理化性质相似的肠毒素, 用一般方法无法从金黄色葡萄球菌培养上清中完成 SEs 的分离和纯化, 严重限制了 SEA 的纯化及检测方法的发展。本实验通过原核表达, 利用 PCR 技术从产 SEA 的金黄色葡萄球菌菌株中扩增了 sea 序列, 将该片段克隆至 pET-28a 载体中, 在 16 °C 低温条件下对重组菌 Rosetta 进行诱导表达, 表达产物主要以可溶状态存在。原核表达的可溶性重组 SEA 与野生 SEA 在结构和活性上都基本一致^[16]。

抗 SEA 单克隆抗体筛选过程中, 以重组的 His-SEC2 作为阴性对照, 排除了 His 标签以及其他相似结构的影响, 确保了筛选出的单克隆抗体是针对 SEA 抗原的, 具有良好的特异性。同时, 通过比较 6 株单克隆抗体的亲和性, 最终选择了高亲和力单克隆抗体杂交瘤细胞株 3D12 作为检测抗体并以此为基础建立了 DAS-ELISA 检测方法。该方法与 SEB、His-SEC2、SED 均无交叉反应, 检测下限为 1.89 µg/L, 精密度和回收率均良好, 可以实现对 SEA 样品的定量检测。采用 DAS-ELISA 检测方法对不同来源的金黄色葡萄球菌分离株进行产毒检测, 均检测到 SEA 阳性菌株的存在。近年来的研究表明, 奶牛乳腺炎已经成为发生最普遍、防治最难的奶牛疾病之一, 在国内奶牛场的检出率可达 54.3%^[17], 而金黄色葡萄球菌作为其最主要的病原菌, 在奶牛乳腺炎特别是隐性乳腺炎中的带菌率高达 85.4%^[18]。本研究对 2005–2015 年从浙江、上海、新疆、山东、内蒙、河北、兰州、重庆、广东和陕西等地奶牛乳腺炎中分离到的 164 株金黄色葡萄球菌分离株进行产毒检测, SEA 产毒菌株阳性率高达 50.6%, 表明具有 SEA 毒素分泌能力的金黄色葡萄球菌产毒菌株在国内的奶牛场广泛存在, 揭示乳及乳制品从来源

到成品都存在很大的安全风险。

目前常用的 SEA 检测方法均有其局限性。PCR 方法仅能检测出肠毒素基因而不能直接检测肠毒素, 而一般烹饪方法可以杀灭食物中的金黄色葡萄球菌却无法杀灭食物中的肠毒素, 因此 PCR 方法很容易造成漏检^[19-20]。SN/T2416-2010 规定了 Western blot 法检测进出口食品中的 SEA, 但该方法中易产生假阳性, 检测下限也较高, 为 50 µg/L。在目前的生产及实验中, ELISA 方法仍是应用最广泛、可信度较高的方法, 但普遍采用多克隆抗体^[21-22], 无法排除非特异性结合。刘鹏翀等^[23]虽然利用单克隆抗体建立了 SEs 检测体系, 但筛选的单克隆抗体可以与多种肠毒素反应, 检测下限高达 307 µg/L, 无法满足高精度的检测要求。目前, SEA 检测试剂盒主要由美国 Biocontrol 公司和德国拜发公司生产, 前者只能进行定性检测, 后者的检测下限为 2 µg/L。进口试剂盒价格高昂, 无法广泛应用于生产。本研究建立的 DAS-ELISA 检测方法特异性强、灵敏度高, 能够与进口试剂盒相媲美, 可用于 SEA 的初步定量及大批量样品检测, 为相关食品中 SEA 污染的检测及 SEA 阳性菌株的筛选提供了有效手段。

参考文献

- [1] Yang B, Zhang XM, Luo SP, et al. Investigation on virulence determinants and genetic typing of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis milk[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2009, 18(5): 1-6 (in Chinese)
杨波, 张雪梅, 罗淑萍, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌毒力因子检测与基因分型[J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 1-6
- [2] Memon J, Yang YC, Kashif J, et al. Genotypes, virulence factors and antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine subclinical mastitis from Eastern China[J]. Pakistan Veterinary Journal, 2013, 33(4): 486-491
- [3] Liu W, Wang JG, Sun XH, et al. Analysis of enterotoxin of *Staphylococcus aureus* isolated from food and food poisoning samples[J]. Chinese Preventive Medicine, 2013, 14(8): 608-611 (in Chinese)
刘伟, 王菊光, 孙晓华, 等. 日常食品及食物中毒样本中金黄色葡萄球菌肠毒素的分型检测分析[J]. 中国预防医学杂志, 2013, 14(8): 608-611
- [4] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61(1): 1-10
- [5] Li JP, Zhou HJ, Yuan L, et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis using pulsed-field gel electrophoresis[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(9): 684-687 (in Chinese)
李建平, 周海健, 袁林, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(9):

- 684-687
- [6] Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: Article ID 827965
- [7] Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins[J]. Toxins, 2010, 2(7): 1751-1773
- [8] Shen XY, Song QF, Xu JY, et al. Study on the distribution of enterotoxin genotypes in foodborne *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, 24(5): 427-429 (in Chinese)
沈玄艺, 宋启发, 徐景野, 等. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因型分布研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 427-429
- [9] Wang T, Lin L, Yan WL, et al. Effects of storage temperature and inoculum amount on the growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin in whipping cream[J]. Food Science, 2014, 35(23): 210-214 (in Chinese)
王彤, 林露, 严维凌, 等. 温度和接种量对搅打奶油中金黄色葡萄球菌生长及产肠毒素的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 210-214
- [10] Cui Y, Zhang D, Zhang XL. Laboratory analysis of a food poisoning case caused by *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(8): 1162-1164 (in Chinese)
崔莹, 张丁, 张秀丽. 一起由金黄色葡萄球菌及其肠毒素引起的食物中毒实验室分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(8): 1162-1164
- [11] Tong TG, Bai Y, Liu GL, et al. Expression, purification and monoclonal antibodies preparation of recombinant equine mature interleukin-18[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2010, 136(3/4): 194-200
- [12] Wan WH. Monoclonal antibody affinity constant determination[J]. Journal of Monoclonal Antibody, 1993, 9(2): 72-75 (in Chinese)
万文徽. 单克隆抗体亲和常数的测定[J]. 单克隆抗体通讯, 1993, 9(2): 72-75
- [13] Sun JZ, Wang XT, Liu XH, et al. Development and preliminary application of double antibody sandwich ELISA for detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(6): 930-935, 941 (in Chinese)
孙佳芝, 王新桐, 刘雪慧, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(6): 930-935, 941
- [14] Sun YN, Teng M, Hu XF, et al. Preparation and immunological characterization of monoclonal antibody against ochratoxin A[J]. Food Science, 2011, 32(9): 236-240 (in Chinese)
孙亚宁, 滕蔓, 胡晓飞, 等. 抗赈曲霉毒素 A 单克隆抗体的制备及免疫学鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 236-240
- [15] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 100(1/2): 173-179
- [16] Xu QB, Liu CX, Ma QJ. Gene cloning, soluble expression and activity analysis of rSEA[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(4): 402-406 (in Chinese)
胥全彬, 刘传喧, 马清钧. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的基因克隆、表达及活性试验[J]. 生物工程学报, 2003, 19(4): 402-406
- [17] Li JP, Zhou HJ, Yuan L, et al. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2009, 10(10): 753-760
- [18] Ren M. Establishment of multiple PCR detection method for *staphylococcus aureus* virulence gene and the investigation of *Staphylococcus aureus* contamination in the raw milk at Yangling[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese)
任敏. 金黄色葡萄球菌毒力基因多重 PCR 方法的建立及杨凌市售生鲜牛乳中该菌污染状况调查[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014
- [19] Li ZR. Enterotoxin gene profiles and genotypes of food-borne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiaotong University, 2012 (in Chinese)
李自然. 上海市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因多样性及分型研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2012
- [20] Peng GH, Hu ZH, Xue L, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in food poisoning samples[J]. Modern Preventive Medicine, 2008, 35(20): 3943-3945 (in Chinese)
彭国华, 胡主花, 薛琳, 等. 食物中毒样品中金黄色葡萄球菌及肠毒素检测[J]. 现代预防医学, 2008, 35(20): 3943-3945
- [21] Xu DD, Huang JH, Liu Y, et al. An indirect competitive ELISA method for quantitative analysis of staphylococcal enterotoxin A[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010(10): 380-382, 385 (in Chinese)
徐丹丹, 黄金海, 刘莹, 等. 葡萄球菌 A 型肠毒素检测竞争 ELISA 方法的建立[J]. 食品工业科技, 2010(10): 380-382, 385
- [22] Poli MA, Rivera VR, Neal D. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer[J]. Toxicon, 2002, 40(12): 1723-1726
- [23] Liu PC, Huang JH, Liu L, et al. Development and application of DAS-ELISA for detection of staphylococcal enterotoxin[J]. Food Science, 2012, 33(8): 195-198 (in Chinese)
刘鹏翀, 黄金海, 刘莉, 等. 葡萄球菌肠毒素 DAS-ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 195-198