

张欣, 王福成, 韩先干, 等. 阪崎克罗诺杆菌双抗夹心酶联免疫吸附检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 66-71.

ZHANG X, WANG F C, HAN X G, et al. Establishment of a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Cronobacter sakazakii* detection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 66-71.

阪崎克罗诺杆菌双抗夹心酶联免疫吸附检测方法的建立

张欣^{1,2,3}, 王福成¹, 韩先干¹, 祁克宗³, 宋祥军³, 董雨豪^{2*}, 蒋蔚^{1*}

(1. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

3. 安徽农业大学兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为建立阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 的免疫学快速检测方法, 分别制备了阪崎克罗诺杆菌的特异性单抗和多抗, 建立阪崎克罗诺杆菌的双抗夹心酶联免疫吸附 DAS-ELISA 检测方法。结果: 获得 4 株抗阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体阳性细胞株, 分泌抗体效价分别是 1:128 000、1:32 000、1:256 000 和 1:256 000, 抗阪崎克罗诺杆菌兔多克隆抗体效价是 1:128 000。建立的阪崎克罗诺杆菌 DAS-ELISA 检测方法, 分别以抗阪崎克罗诺杆菌兔多抗和单抗作为捕获抗体和检测抗体, 兔多抗的最佳稀释度为 1:4 000, 单克隆抗体最佳稀释度为 1:1 000, 灵敏度可达 1×10^6 CFU/mL; 该检测方法具有良好的特异性, 与常见的 6 种食源性病原菌都没有交叉反应, 且能够同时检测 6 种克罗诺杆菌属细菌; 重复性结果显示, 该检测方法的批内批间变异系数均小于 15%, 具有良好的重复性。综上, 利用抗阪崎克罗诺杆菌的单抗和兔多抗成功建立了 DAS-ELISA 方法, 该方法具有良好的敏感性、特异性和重复性, 可为阪崎克罗诺杆菌的快速检测提供技术支撑。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA

中图分类号: S941.42

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)04-0066-06

Establishment of a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Cronobacter sakazakii* detection

ZHANG Xin^{1,2,3}, WANG Fucheng¹, HAN Xiangan¹, QI Kezong³, SONG Xiangjun³, DONG Yuhao^{2*}, JIANG Wei^{1*}

(1. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: To establish a method for rapid immunological detection of *Cronobacter sakazakii*, a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay was tried in this study. The representative strains of *C. sakazakii* were used as mixed antigens to immunize mice. Four strains of monoclonal antibodies (McAbs) against *C. sakazakii* were prepared by the hybridoma technique, with the titers being 1:128 000, 1:256 000, 1:32 000 and 1:256 000, respectively. The titer of polyclonal antibodies (PcAbs) titers was 1:128 000. To establish the double antibody sandwich ELISA, the anti-*C. sakazakii* PcAbs was used as the capture antibodies and anti-*C. sakazakii* McAbs as detecting antibodies, respectively. The optimum dilution concentrations of PcAbs and McAbs were 1:4 000 and 1:1 000, respectively. The sensitivity of this method was 1×10^6 CFU/mL, and the method had good specificity with no cross-reactivity with 6 other foodborne pathogens, and it could simultaneously detect six *Cronobacter* species. The results of the repetitive test showed that the intra- and inter-batch coefficients of variation of the method were less than 15%. In summary, a double-antibody sandwich ELISA method was successfully established here using anti-*C. sakazakii* McAbs and anti-*C. sakazakii* PcAbs. This method possessed good sensitivity, specificity, and reproducibility; which would

收稿日期: 2023-03-21; 修回日期: 2023-11-17

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (2020-02-08-00-08-F01489); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (21N31901000); 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (2018YFE0102200); 兵团财政科技计划项目 (2020AB025-03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2020JB07)

第一作者: 张欣, 女, 硕士

* 通信作者: 蒋蔚, 研究员, 研究方向为病原微生物检测技术和致病机制, E-mail: jiangweijw99@163.com; 董雨豪, 副研究员, 研究方向为微生物致病机制和检测技术, E-mail: dongyuhao@njau.edu.cn。

be a technical support for rapid screening and analysis of *C. sakazakii*.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*; monoclonal antibody; double-antibody sandwich ELISA

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种隶属于肠杆菌科的革兰阴性菌^[1], 曾被称为黄色阴沟杆菌, 后更名为阪崎克罗诺杆菌, 并设立新属克罗诺杆菌属, 该属包括阪崎克罗诺杆菌 (*C. sakazakii*)、丙二酸克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*C. turicensis*)、广泛克罗诺杆菌 (*C. universalis*)、莫氏克罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)、康帝蒙提克罗诺杆菌 (*C. condimenti*) 和都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*) 这 7 个种^[2]。阪崎克罗诺杆菌作为一种重要的食源性致病菌, 广泛存在于植物、食品加工原料及环境中, 被列为婴幼儿配方奶粉 A 类致病菌^[3]。2002 年, 阪崎克罗诺杆菌被列为“某种严重危及某些人群生命并遗留终身严重后遗症的病原体”^[4]。由于该菌对高温和渗透压具有较强的抵抗能力, 因此在奶粉的加工、放置、冲调等过程中可大量存活, 容易感染婴幼儿, 特别是免疫力低下的人群, 引起脑膜脑炎、梗死性结肠炎^[5], 甚至引起成人的骨髓炎血症和恶性肿瘤, 幸存者留有神经系统后遗症, 严重者有致死可能^[6]。正是由于阪崎克罗诺杆菌具有较强致病性, 使得该菌成为全世界范围的研究热点。

目前阪崎克罗诺杆菌的检测方法主要是传统细菌培养法, 但存在检测周期长、试验步骤繁琐等缺点, 因此, 建立便捷、准确且灵敏度高的检测方法尤为重要。目前常用的分子生物学检测手段以 PCR^[7] 和环介导等温扩增技术^[8] 等为主, 虽灵敏度高, 但存在引物设计复杂, 对试验操作技能要求较高, 且需要昂贵的设备等问题。双抗体夹心酶联免疫吸附 (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) 是基于免疫学分析技术建立的快速检测方法^[9], 将已知抗体包被于固相载体, 待测抗原结合后, 再加入检测抗体, 形成单抗原同时结合双抗体的“夹心”结构, 从而特异性检测抗原。该法无需昂贵复杂的设备, 且具有快速便捷、特异性强等优点, 因此被广泛应用在病毒和细菌大批量快速检测中^[10]。

本研究首先制备阪崎克罗诺杆菌效价高、特异性强的单克隆抗体, 在此基础上建立双抗夹心 ELISA 的检测方法, 以期满足阪崎克罗诺杆菌免疫学检测的不同需求。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

阪崎克罗诺杆菌 CICC21552、CICC21561、

CICC21550, 广泛克罗诺杆菌 CICC21570, 莫氏克罗诺杆菌 CICC23943, 苏黎世克罗诺杆菌 CICC24178, 丙二酸克罗诺杆菌 CICC21551, 都柏林克罗诺杆菌 CICC21564, 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) CICC21662 购买自中国工业微生物菌种保藏管理中心。铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC9027 和金黄色葡萄球菌 ATCC6538 购买自美国模式培养物集存库 (ATCC)。阪崎克罗诺杆菌 CMCC1.6765 购买自中国医学细菌保藏管理中心。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157:H7, 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) SH112 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) SL14028 由本实验室保存。

SP2/0 缺陷型骨髓瘤细胞由本实验室保存; 4~6 周龄昆明小鼠和 BALB/c 小鼠购自上海杰思捷生物有限公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗购买自 Abcam 公司; 抗体亚型鉴定试剂盒购买自 Southern Biotech 公司。

1.2 阪崎克罗诺杆菌抗体的制备

1.2.1 免疫及血清效价的测定

阪崎克罗诺杆菌标准株在 37 °C 震荡培养至对数生长期, PBS 梯度稀释, 平板计数法进行活菌计数。等量混合 4 株阪崎克罗诺杆菌标准株, 用终浓度为 0.3% 的甲醛灭活, 用无菌生理盐水调整浓度为 1.0×10^{10} CFU/mL。首次免疫选用等量弗氏完全佐剂进行完全乳化, 足垫注射 BALB/c 小鼠。间隔 2 周后进行再次免疫, 此时细菌用等量不完全佐剂进行乳化, 皮下多点注射。四免后间隔 1 周, 将小鼠断尾采血检测效价。选择血清效价在 1:32 000 以上的小鼠, 取脾细胞准备进行细胞融合, 融合前 3 d, 用无菌生理盐水调整菌液浓度为 5×10^9 CFU/mL, 对小鼠进行腹腔加强免疫。将该阪崎克罗诺杆菌标准菌株按照上述同样的免疫程序免疫新西兰白兔, 第 4 次免疫后, 耳源静脉采血并收集血清, 利用间接 ELISA 检测方法测定效价, 同时设置阴性对照 (健康家兔血清)。测定免疫兔血清 OD_{450} 值 (P) 和阴性对照 OD_{450} 值 (N), $P/N \geq 2.1$ 判定为阳性。

1.2.2 细胞融合及单克隆抗体腹水的制备、效价和单抗亚型测定

无菌分离小鼠脾脏并收集脾淋巴细胞, 与骨髓瘤 SP2/0 细胞进行融合及阳性杂交瘤细胞筛选, 并经亚克隆纯化细胞株, 扩大培养后经小鼠体内诱生单抗腹水获得抗阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体。

阪崎克罗诺杆菌 CICC21552 灭活后 PBS 洗 3 次,

经碳酸盐缓冲液重悬, 调整菌液浓度至 1.0×10^{10} CFU/mL 作为抗原包被 96 孔酶标板, 通过间接 ELISA 方法测定腹水效价, $P/N \geq 2.1$ 判定为阳性。根据抗体亚型鉴定试剂盒说明书要求, 测定单抗的亚型。

1.3 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

抗阪崎克罗诺杆菌兔多抗作为包被抗体 (100 μ L/孔包被酶标板), 4 $^{\circ}$ C 过夜包被, PBST 清洗; 每孔加入 1% 明胶 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, PBST 清洗; 加入检测抗原 (阪崎克罗诺杆菌菌液), 同时设置阴性对照 (非阪崎克罗诺杆菌菌液), 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, PBST 清洗; 加入稀释后的阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h, PBST 清洗; 加入 HRP 标记山羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, PBST 清洗; 加入 TMB 底物显色液进行显色, 2 mol/L 浓硫酸终止反应后使用酶标仪测 OD_{450} 吸光值, $P/N \geq 2.1$ 可判定为阳性。

1.4 双抗夹心 ELISA 反应条件的优化

棋盘稀释法确定阪崎克罗诺杆菌抗体最佳包被的稀释度, 阪崎克罗诺杆菌兔多抗作为捕获抗体, 包被浓度按照 1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000 的梯度进行稀释。按照上述试验方法进行清洗及封闭, 后续加入检测抗原 (阪崎克罗诺杆菌菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL), 阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体 5B9 株作为检测抗体, 检测浓度按照 1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000 的梯度进行稀释, 同时设置阴性对照, 其他步骤参照 1.3。选择测定的 P/N 值最大时, 对应的捕获抗体和检测抗体的稀释度为最佳使用浓度。

1.5 阳性判定标准的确定

使用以上建立的双抗夹心 ELISA 的检测方法, 取 8 份阴性样品用 PBS 稀释后, 经酶标仪检测 OD_{450} 吸光值, 并计算 OD_{450} 的平均值 (X) 以及标准方差 (SD), 最终得到的阴阳性临界值 ($X+3SD$)。当样本 OD_{450} 值 $\geq X+3SD$ 时, 判定为阳性; 当样本 OD_{450} 值 $< X+3SD$ 时, 判定为阴性。

1.6 双抗夹心 ELISA 的特异性和灵敏度测定

分别用金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血弧菌、铜绿假单胞菌、单核细胞增生李斯特菌和大肠杆菌 O157: H7 作为检测抗原, 调整各菌液的浓度为 1×10^7 CFU/mL。测定建立的双抗夹心 ELISA 方法的

特异性, 并设置阴性和空白对照 (无菌水)。每组设置 3 个重复, 按 1.3 中的步骤进行检测。

用阪崎克罗诺杆菌标准菌 CICC21552 作为检测抗原进行梯度稀释 (1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10^1 CFU/mL), 测定双抗夹心 ELISA 检测方法的敏感性。显色结束用酶标仪读取 OD_{450} 值。当 $P/N \geq 2.1$ 时, 可认为是该方法的最低检测限。

1.7 双抗夹心 ELISA 的重复性试验

使用批内差异和批间差异对建立的阪崎克罗诺杆菌双抗夹心 ELISA 检测方法进行重复性评价。板内变异: 取不同浓度的阪崎克罗诺杆菌 CICC21552 进行测定, 每个浓度在同一块酶标板上作 4 个重复, 通过对 OD_{450} 值进行分析, 计算板内变异系数。分别在不用时间段包被酶标板, 每板做 4 个重复, 共包被 5 次, 对得到的 OD_{450} 值进行分析, 计算板间变异系数。

2 结果

2.1 阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体制备

2.1.1 杂交瘤细胞株的融合筛选及克隆

分别收集多次免疫后 7 d 的小鼠血清, 测其效价。4 免后选择血清效价达到 1 : 32 000 以上的小鼠, 收集脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合, 在 HAT 的筛选作用下, 融合成功的杂交瘤细胞能够正常生长, 当细胞团生长至一定数量时, 抽取细胞上清液进行间接 ELISA 检测, 筛选测得 OD_{450} 值在 2.0 左右的克隆为阳性克隆株, 并连续进行 4 次亚克隆筛选, 最终筛选出 4 株能稳定分泌高滴度抗体的阳性克隆株, 命名为 3A6、5B9、AC9 和 EF12。

2.1.2 单克隆抗体 ELISA 效价测定

采用间接 ELISA 方法依次检测 4 株单克隆抗体效价。4 株细胞株的效价分别为 1 : 128 000、1 : 256 000、1 : 32 000 和 1 : 256 000, 参照上述血清效价测定方法测定兔血清效价, 结果显示抗体效价随着免疫次数的增加明显升高, 效价达到 1 : 128 000 (表 1)。

2.1.3 单克隆抗体的亚型测定

结果显示, 4 种抗体的轻链类型皆为 Kappa 型, 单抗细胞株 3A6、5B9 和 2B6 重链均为 IgG1, 细胞株 EF12 重链为 IgG2a (表 2)。

表 1 杂交瘤细胞株培养上清液抗体效价 (OD_{450} 值)

组别	抗体稀释倍数	单克隆细胞株				兔多抗	阴性对照	空白对照
		3A6	5B9	EF12	2B6			
A	8×10^3	1.718 3	2.581 4	1.437 2	1.633 5	3.668 9	0.081 2	0.055 0
B	16×10^3	1.584 3	2.277 3	1.182 2	1.580 9	3.521 3	0.085 4	0.055 4
C	32×10^3	1.553 1	2.277 3	1.073 0	1.528 3	3.286 2	0.084 5	0.071 5
D	64×10^3	1.386 1	1.929 8	0.767 9	1.510 9	2.272 0	0.074 6	0.056 2
E	128×10^3	1.090 5	1.480 6	0.571 6	1.373 1	1.551 2	0.096 8	0.053 8
F	256×10^3	0.841 9	1.150 4	0.332 6	1.091 1	0.839 6	0.093 4	0.055 4

表 2 单克隆抗体的亚型鉴定 (OD_{450} 值)

亚类	单克隆抗体			
	3A6	5B9	EF12	2B6
Goat Anti-Mouse Kappa-HRP	<u>2.18</u>	<u>1.803</u>	<u>0.369</u>	<u>0.626</u>
Goat Anti-Mouse Lambda-HRP	0.261	0.151	0.147	0.199
Goat Anti-Mouse IgG1, Human ads-HRP	<u>3.272</u>	<u>3.348</u>	<u>0.538</u>	<u>2.295</u>
Goat Anti-Mouse IgA-HRP	0.367	0.421	0.308	0.39
Goat Anti-Mouse IgG3, Human ads-HRP	0.224	0.206	0.153	0.252
Goat Anti-Mouse IgG2b, Human ads-HRP	0.27	0.356	0.173	0.29
Goat Anti-Mouse IgG2a, Human ads-HRP	0.252	0.556	<u>0.964</u>	0.906
Goat Anti-Mouse IgM, Human ads-HRP	0.546	0.198	0.171	0.443
Goat Anti-Mouse Ig, Human ads-HRP	3.068	2.998	0.962	1.963

注：下划线表示测定结果为阳性值。

2.2 双抗夹心 ELISA 方法的建立

通过棋盘法对捕获抗体和检测抗体稀释比例进行确定，选择阪崎克罗诺杆菌兔多抗作为捕获抗体，阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体 5B9 株作为检测抗体，HRP 标记羊抗鼠作为酶标二抗。结果显示（图 1），当阪崎克罗诺杆菌兔多抗的稀释倍数为 1 : 4 000 倍，且阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体 5B9 株稀释倍数为 1 : 1 000 倍时的 P/N 值最大，且阴性值为 0.091 8，符合阴性值较小的条件。因此，选择捕获抗体最佳的稀释比例为 1 : 4 000，检测抗体的最佳稀释比例为 1 : 1 000。

2.3 双抗夹心 ELISA 检测方法阴阳临界值的确定

由表 3 可见，采用优化以后的阪崎克罗诺杆菌双抗夹心 ELISA 方法，检测得到的 8 份阴性抗原的 OD_{450} 平均值 (\bar{X}) 为 0.113 7，求得 SD 为 0.015 3，按照公式最终求得的临界值为 0.159 6，当样本 OD_{450} 值 $\geq 0.159 6$ ，同时满足 $P/N \geq 2.1$ 时，判定为阳性；否则，判定为阴性。

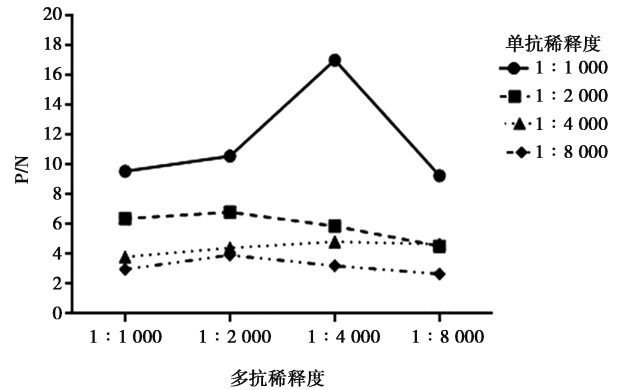


图 1 捕获抗体和检测抗体最佳工作浓度的优化

表 3 双抗夹心 ELISA 检测方法阴性样品的 OD_{450} 值

样品号	OD_{450} 值	样品号	OD_{450} 值
1	0.147 7	5	0.116 1
2	0.118 3	6	0.109 5
3	0.105 7	7	0.118 1
4	0.093 2	8	0.100 8

2.4 双抗夹心 ELISA 检测方法的特异性

用上述建立的双抗夹心 ELISA 方法检测细胞株上清液抗体和腹水抗体，结果表明，抗阪崎克罗诺杆菌单克隆抗体仅能与试验中克罗诺杆菌属的细菌（苏黎士克罗诺杆菌 CICC24178、丙二酸克罗诺杆菌 CICC21551、莫氏克罗诺杆菌 CICC23943、广泛克罗诺杆菌 CICC21570、都柏林克罗诺杆菌 CICC21564）发生反应，而不能和其他 6 种常见的食源性细菌（金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血弧菌、铜绿假单胞菌、单核细胞增生李斯特菌和大肠杆菌 O157:H7）发生交叉反应（图 2）。

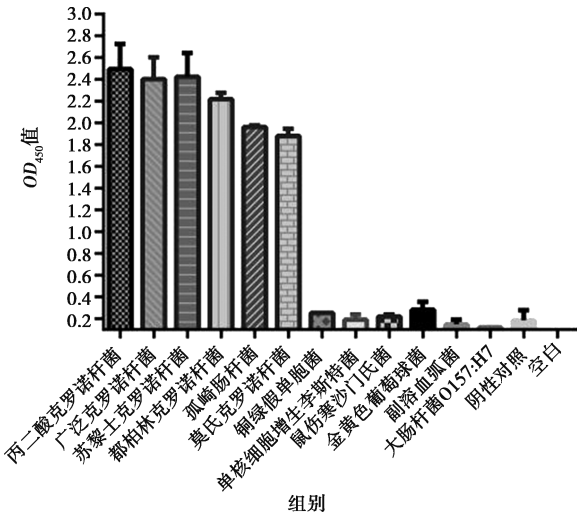


图 2 双抗体夹心 ELISA 的特异性

2.5 双抗夹心 ELISA 检测方法的灵敏度

双抗夹心 ELISA 检测方法的敏感性试验结果表明 (表 4), 该方法最低检测限可以达到 1×10^6 CFU/mL (P/N 值大于 2.1), 建立的双抗夹心 ELISA 标准曲线在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL 检测范围内具有线性关系 ($R^2=0.9507$) (图 3)。

2.6 重复性试验

2.6.1 板内变异系数

板内变异系数结果显示, 板内变异系数最小为 4.57%, 最大为 12.62%, 最大值不超过 15%, 因此

具有良好的重复性, 结果见表 5。

表 4 双抗夹心 ELISA 检测方法敏感性确定

菌液浓度/ (CFU · mL ⁻¹)	OD ₆₀₀ 平均值		P/N 值
	阳性	阴性	
1×10^9	0.915 9	0.084 3	10.864 8
5×10^8	0.885 2	0.084 2	10.513 1
1×10^8	0.809 4	0.095 5	8.475 4
5×10^7	0.614 5	0.085 3	7.204 0
1×10^6	0.348 5	0.099 6	3.499 0
5×10^5	0.128 4	0.074 3	1.728 1
1×10^5	0.109 6	0.076 8	1.427 1

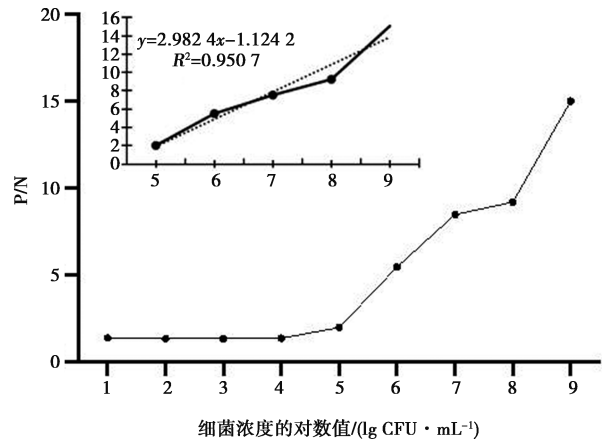


图 3 双抗体夹心 ELISA 检测方法的最低检测限

表 5 板内变异系数的确定

菌液浓度/ (CFU · mL ⁻¹)	P/N 值					SD	变异系数/%
	1	2	3	4	均值		
1×10^9	13.85	14.88	17.16	16.57	15.62	1.52	9.75
5×10^8	9.99	12.15	13.48	12.93	12.14	1.53	12.62
2.5×10^7	9.68	9.51	10.60	9.31	9.78	0.57	5.83
1.25×10^7	9.39	9.39	10.33	9.72	9.71	0.44	4.57
6.25×10^6	5.69	4.99	5.79	5.47	5.49	0.36	6.49

2.6.2 板间变异系数

板间变异系数结果显示, 板间变异系数最小为

4.78%, 最大为 11.14%, 最大值不超过 15%, 因此具有良好的板间重复性, 见表 6。

表 6 板间变异系数的确定

菌液浓度/ (CFU · mL ⁻¹)	P/N					SD	变异系数/%
	1	2	3	4	均值		
1×10^9	12.56	13.97	15.89	13.74	14.04	1.38	9.82
5×10^8	11.13	12.13	11.71	10.93	11.48	0.55	4.78
2.5×10^7	8.65	10.40	9.62	10.31	9.75	0.81	8.30
1.25×10^7	7.54	8.69	8.13	7.16	7.88	0.67	8.52
6.25×10^6	5.33	5.70	6.19	4.74	5.49	0.61	11.14

3 讨论

阪崎克罗诺杆菌免疫学检测方法主要有胶体金试纸条^[11]、酶联免疫吸附试验、免疫磁珠^[12]等,这些检测方法的适用性与所制备抗体的性能密切相关。因此,获得高亲和性和特异性的单克隆抗体对免疫检测方法建立尤为重要。

国家食品安全标准及进出口乳品检验检疫条例中明确规定,婴儿乳制产品中不得检出阪崎克罗诺杆菌^[13]。克罗诺杆菌属包含阪崎克罗诺杆菌等7个种,且均具有致病性。本研究最终筛选出的单克隆抗体对克罗诺杆菌属6个菌种均具有阳性反应,且对其他的食源性致病菌均没有交叉反应,特异性良好,为建立针对阪崎克罗诺杆菌的免疫学检测方法打下良好基础。

基于单抗的免疫检测方法,如免疫胶体金层析法、ELISA、间接免疫荧光检测方法等,已经广泛应用于细胞生物学、微生物学、免疫学等相关临床诊断^[14-16]。该免疫学检测方法可以进行定性或定量检测,具有高效,专一性强等优点,已成功用于很多重要致病菌的快速检测,如肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[17],沙门菌(*Salmonella*)^[18]和嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)^[19]等。与Song等^[20]和丁铭^[21]建立的阪崎克罗诺杆菌免疫检测试纸条法相比,本研究建立的双抗夹心ELISA方法的检测限可达 1.0×10^6 CFU/mL,提高了近10倍,具有更高的灵敏性。此外,本研究建立的双抗夹心ELISA检测方法具有良好的特异性,能快速检测阪崎克罗诺杆菌属6个重要的致病性菌种,且不和其他常见的食源性病原菌发生交叉反应,为阪崎克罗诺杆菌的快速检测奠定基础。

综上,本研究建立的阪崎克罗诺杆菌双抗夹心ELISA方法,具有特异性强、检测结果直观、试验操作便捷等优点,且检测成本较低,可在基层检测中使用。该方法的建立为阪崎克罗诺杆菌的免疫学检测提供有力工具,具有极大的应用前景。

参考文献:

[1] HASTON J C, MIKO S, COPE J R, et al. *Cronobacter sakazakii* infections in two infants linked to powdered infant formula and breast pump equipment - United States, 2021 and 2022 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2023, 72 (9): 223-226.

[2] LVERSEN C, LEHNER A, MULLANE N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* sub sp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter*

sakazakii subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mustjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1 [J]. BMC Evol Biol, 2007, 7 (1): 64-75.

[3] 赵宏, 张霞, 赵良娟. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法鉴定乳粉中致病菌 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10 (24): 8418-8423.

[4] 李艳娟. 婴幼儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的污染防控及其快速检测 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016.

[5] 杨秋萍, 阎彦霏, 张艳. 婴幼儿食品源阪崎克罗诺杆菌的3种分型方法 [J]. 中国食品学报, 2022, 22 (5): 358-366.

[6] CHEN W Y, YANG J L, YOU C P, et al. Diversity of *Cronobacter* spp. isolates from the vegetables in the middle-east coastline of China [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32 (6): 90.

[7] 张清平, 张懿翔, 刘洋. 婴幼儿奶粉中阪崎肠杆菌增菌培养对PCR快速检测的影响 [J]. 中国乳品工业, 2021, 49 (11): 9-12.

[8] 禹兰平, 王楷宸, 潘俊慧, 等. 等温扩增技术概述及其在动物病原检测中的应用 [J]. 中国动物检疫, 2022, 39 (12): 96-103.

[9] SUN J, XU J Y, YANG Q H. Expression and predictive value of NLRP3 in patients with atrial fibrillation and stroke [J]. Am J Transl Res, 2022, 14 (5): 3104-3122.

[10] FREITAS N E M, SANTOS E F, LEONY L M, et al. Double-antigen sandwich ELISA based on chimeric antigens for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in human sera [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2022, 16 (3): e0010290.

[11] 宋姣, 何婷婷, 齐冬琴. 胶体金免疫层析技术在食品快速检测中的应用 [J]. 现代食品, 2022, 28 (21): 75-77.

[12] IRANMANESH M, HULLIGER J. Magnetic separation: its application in mining, waste purification, medicine, biochemistry and chemistry [J]. Chem Soc Rev, 2017, 46 (19): 5925-5934.

[13] 马炳存, 陈学强, 王灿, 等. 即食食品中阪崎克罗诺杆菌的分离鉴定及分子分型 [J]. 中国食品学报, 2022, 22 (3): 273-280.

[14] 杨利, 张浩明, 李丁, 等. 猪瘟病毒中和性单克隆抗体制备及阻断ELISA方法建立 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (5): 68-74.

[15] 陈建凯, 张璞, 赖月辉. 间接免疫荧光检测猪蓝痘疫苗效价方法的建立 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2022 (475): 23-27.

[16] 肖璐, 谢晶, 曹冶, 等. 胶体金免疫层析技术在猪病毒病诊断中的应用与研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53 (1): 136-140.

[17] 陈瑞昶, 牛祥云, 黄金, 等. 羊源肺炎克雷伯菌间接免疫荧光检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (12): 2342-2347.

[18] 黄愈玲, 李少彤, 龚玉姣. 间接免疫荧光检测技术检测沙门菌的实验研究 [J]. 热带医学杂志, 2010 (8): 935-936.

[19] 刘晓雨, 张秀芝, 蔡军, 等. 间接免疫荧光和酶联免疫吸附试验对嗜肺军团菌的检测效果分析 [J]. 现代预防医学, 2016, 43 (11): 2041-2043.

[20] SONG X J, SHRUTI S, LEE G, et al. Immunochromatographic strip assay for detection of *Cronobacter sakazakii* in pure culture [J]. J Microbiol Biotechnol, 2016, 26 (11): 1855-1862.

[21] 丁铭. 阪崎克罗诺杆菌免疫检测技术的建立 [D]. 天津: 天津科技大学, 2017.