研究论文

基于磁分离-上转换荧光标记的副溶血性弧菌免疫检测新方法研究

吴世嘉， 王 艳， 段 诺， 王周平*

（食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要：将上转换荧光标记与磁分离富集技术相结合，通过免疫识别成功构建了一种检测副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）的新方法。首先通过水/溶剂热法合成 $NaY_{0.78}F4:Yb_{0.20},Er_{0.02}$ 上转换荧光纳米颗粒，并对其表面进行氨基功能化修饰，同时一步法合成了氨基化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒。分别将副溶血性弧菌全菌抗体与磁性纳米颗粒连接作为捕获探针，将副溶血性弧菌的鞭毛蛋白 A 抗体与上转换荧光纳米颗粒连接作为信号探针。通过免疫识别形成捕获探针-目标菌-显示探针的“三明治”结构复合物，利用 980 nm 激光诱导荧光进行检测。在实验优化条件下，上转换荧光强度与副溶血性弧菌浓度在 5×10^3~5×10^5 cfu/mL 范围内呈良好线性关系，检测限为 1×10^3 cfu/mL。用鲫鱼进行加标回收实验，结果表明，本方法准确性良好。

关键词：副溶血性弧菌；上转换荧光；磁分离；FlaA 抗体

中图分类号：R 595.7　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)07—0682—08

Novel Immunodetection Method for *Vibrio parahaemolyticus* Based on Magnetic Separation and Upconversion Nanoparticles Labeling

WU Shijia, *WANG Yan*, *DUAN Nuo*, *WANG Zhouping**

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Based on upconversion fluorescence labeling, magnetic separation and immunological recognition, a novel detection method of *Vibrio parahaemolyticus* was constructed. Primarily, the $NaY_{0.78}F4:Yb_{0.20},Er_{0.02}$ upconversion nanoparticles (UCNPs) were synthesized through hydrothermal method, and then amino group was modified on the surface of UCNPs. Meanwhile, amino-modified MNPs were synthesized by one-step process. Secondly, the antibodies of *Vibrio parahaemolyticus* binding with MNPs and antibodies of flagellin binding with UCNPs were used as capture probes and signal probes, respectively. The composite of MNPs-target bacteria-UCNPs was obtain, and detected by 980 nm laser. Under the optimum conditions, the upconversion fluorescence was a good linear in the range of 5×10^3~5×10^5 cfu/mL of *Vibrio parahaemolyticus*, and the detection of limit was 1×10^3 cfu/mL. This method was accurate in the recovery text in the crucian.

收稿日期：2013-12-25

基金项目：国家自然科学基金项目(21375049)。

* **通信作者**：王周平(1974—)，男，陕西宝鸡人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事营养与食品安全研究。

E-mail：wangzp@jiangnan.edu.cn

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, upconversion fluorescence, magnetic separation, antibodies of flagellin

食源性疾病是目前世界上最为常见、分布最为广泛的疾病之一。现今,无论是在发展中国家或是发达国家,食源性疾病都是一个极为重要的公共卫生安全问题。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰阴性嗜盐弧菌,常存在于近海岸海水、海产品及盐渍食品中,是导致海水养殖经济动物感染弧菌病的主要致病菌。它是我国沿海地区最为常见的食物中毒病原菌,病人主要的临床症状表现为腹部痉挛性疼痛和水样腹泻,其发病机制主要是大量活菌侵入肠道或分泌毒素所致[1]。由于空运的发展,食用新鲜海产品的地域和人群在不断地扩增,而由副溶血性弧菌所引起的食物中毒、人群暴露规模和发生规模呈明显上升趋势,已经高居微生物性食物中毒的首位。因此,建立有效、便捷、快速的副溶血性弧菌检测方法尤为重要。不但有利于对食物中毒具体案例的调查处理和对重症患者的抢救治疗,而且对于最大限度的控制副溶血性弧菌食物中毒的发生具有极为重要的意义[2-3]。目前副溶血性弧菌的检测方法较多,包括平板培养法、细胞计数法、生物发光法、阻抗测定法、免疫学方法[4-8]以及分子生物学方法[9-10]。目前应用最广泛的是平板计数法和以抗原-抗体反应为基础的免疫学方法,但这些方法都有各自的优势和不足,例如检测周期长,特异性不高等。

稀土上转换荧光纳米材料(Upconversion Nanoparticles,UCNPs)是指稀土元素掺杂的基质材料在受到外界激发时,吸收两个或两个以上低能光子而辐射一个高能光子的非线性发光现象,即通常所指的将近红外光(典型的是 980 nm)转换成可见光的现象[11]。UCNPs 一般选用无机基质材料,其化学稳定性好,不易光解、抗光漂白能力强、发光稳定无闪烁,可以避免生物样品自发荧光和散射光的干扰。这些优点都证明稀土上转换荧光纳米材料在生物标记领域有着广泛的应用前景[12],但目前将 UCNPs 应用于致病菌检测的研究仍然较少。

作者利用水/溶剂热法制备得到磁性纳米颗粒和上转换荧光纳米颗粒,分别连接副溶血性弧菌的全菌抗体和副溶血性弧菌的鞭毛蛋白 A 抗体,构成捕获探针和显示探针。最终通过抗体与菌体的免疫识别作用形成捕获探针—目标菌—显示探针的"三明治"结构复合物,通过外界磁场分离富集,利用 980 nm 激光诱导荧光检测副溶血性弧菌浓度。本方法与传统方法相比无需增菌培养,大大缩短检测周期,且操作简便,可以用于实际样品中副溶血性弧菌的检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氧化钇(Y_2O_3,99.99%),氧化镱(Yb_2O_3,99.99%),氧化铒(Er_2O_3,99.99%):阿拉丁试剂(上海)有限公司产品;氢氟酸,25%氨水,无水醋酸钠,氢氧化钠,硝酸,异丙醇,25%戊二醛,1,6-己二胺,六水合三氯化铁,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),乙二胺四乙酸(EDTA),正硅酸四乙酯(TEOS)等:上海化学试剂公司产品。3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES):购自美国 Alfa Aesar 公司;*V. parahaemolyticus* ATCC 17802 菌株:江苏省出入境检验检疫局提供;副溶血性弧菌全菌抗体以及副溶血性弧菌鞭毛蛋白(FlaA)抗体:作者所在实验室制备。

1.2 主要仪器

JEM-2100HR 透射电子显微镜:日本电子公司产品;X 射线衍射仪:德国布鲁克有限公司产品;F-7000 全波长荧光扫描仪:日本日立有限公司产品;980 nm 半导体激光器:北京海特光电有限责任公司产品;UV-2300 紫外分光光度计:日本岛津公司产品;OD-1000+ Onedrop 微量紫外分光光度计:上海采邑生物科技有限公司产品;Nicolet Nexus 470 傅立叶变换红外光谱仪:美国热电公司产品;高压反应釜:上海金鹏仪器有限公司产品;超纯水仪:密理博(中国)有限公司产品;超声波清洗仪:无锡科洁仪器设备公司产品。

2 实验步骤

2.1 氨基化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的制备

采用水热—溶剂热法,以六水合氯化高铁为铁源,1,6-己二胺作为氨基功能化试剂。具体方法如下:称取 6.5 g 1,6-己二胺,2.0 g 无水醋酸钠和 1.0 g 六水合三氯化铁加入 30 mL 乙二醇中,加热至 50 ℃下搅拌形成较均匀的胶体溶液。将所得溶液转移到 100 mL 带聚四氟乙烯内衬的反应釜中,198 ℃件下反应 6 h。取出反应釜后自然冷却至室温,然后利用磁铁分离收集黑色固体,弃釜内上层液体,收集得到的黑色固体用去离子水冲洗至烧杯中,超声分散,然后磁分离收集。按照上述操作再用乙醇洗涤 2 次,所得黑色固体在 60 ℃条件下干燥 10 h 备用。

2.2 氨基化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒与全菌抗体结合

利用经典的戊二醛交联方法将氨基化 Fe_3O_4 MNPs 与副溶血性弧菌全菌抗体连接。具体方法为:分别称取 5 mg Fe_3O_4 MNPs 分散在 5 mL 10 mmol/L PBS 中超声分散 20 min, 加入 1.25 mL 体积分数 25%的戊二醛溶液。将混合溶液在室温下缓慢摇晃 1 h, 反应结束后磁性纳米材料经过磁分离收集,除去未起作用的戊二醛溶液, 得到的固体粉末用 PBS 洗 3 次,重悬在 5 mL 10 mmol/L PBS 中,超声分散开,加入 1 mL 的全菌抗体溶液。此溶液在室温下缓慢摇晃 40 min,反应结束通过外界磁场分离得到磁性材料,同时收集上清,将材料清洗多次,得到免疫 MNPs 最后分散在 5 mL PBS 中 4 ℃条件下保存。

2.3 $NaY_{0.78}F4:Yb_{0.20},Er_{0.02}$ 上转换荧光纳米颗粒的制备及修饰

首先制备稀土元素硬脂酸盐前驱物,具体操作方法如下:称取 1.129 g Y_2O_3(5 mmol/L)加入适量硝酸混合搅拌加热,并挥发掉多余的硝酸,得到 Y 的硝酸盐粉末。在 500 mL 三口烧瓶中,将得到的粉末和 8.534 g 硬脂酸(30 mmol/L)加入到 60 mL 乙醇溶液中,加热到 50 ℃并快速搅拌混合均匀。随后,温度上升到 78 ℃,将 1.190 g NaOH(30 mmol/L)溶于 15 mL 水中,向上述溶液中逐滴加入,保持 78 ℃条件下,冷凝回流反应 30 min。反应结束后,将得到的沉淀产物过滤蒸馏水清洗 3 遍, 乙醇清洗一遍,之后在 60 ℃烘箱干燥 10 h, 得到硬脂酸钇的固体粉末,备用。按照上述方法,分别利用 Yb_2O_3,Er_2O_3 制备得到相应的硬脂酸盐产物,用来制备上转换纳米材料[17]。

在烧杯中加入 10 mL 水 15 mL 乙醇和 5 mL 油酸,快速搅拌后形成均一溶液。然后向其中加入已经制备得到的硬脂酸钇 (0.78 mmol/L), 硬脂酸镱 (0.2 mmol/L),硬脂酸铒(0.02 mmol/L)和 0.21 g NaF (5 mmol/L)。将此混合溶液快速持续搅拌 15 min,随后转移到 100 mL 带聚四氟乙烯内衬的反应釜中,195 ℃反应 24 h。反应结束后, 让其自然冷却至室温,离心得到白色沉淀,用乙醇清洗 3 遍,最后在 60 ℃下烘干 12 h 得到白色粉末即为 $NaY_{0.78}F4:Yb_{0.20}$,$Er_{0.02}$ 上转换纳米颗粒 (UCNPs), 贮存备用。利用 TEM 和 XRD 对上转换纳米颗粒的形貌和晶型进行表征。

利用 Stober 法[18]对以上制备得到的 UCNPs 表面做二氧化硅包覆:称取上转换纳米材料 20 mg,加入盛有 60 mL 异丙醇的圆底烧瓶中,超声 30 min 完全分散。依次加入 20 mL 的蒸馏水和 2.5 mL 的质量分数 25%的氨水, 封口快速磁力搅拌。在 35 ℃下,继续磁力搅拌 15 min 后逐滴加入 20 mL 异丙醇和 60 μL TEOS 的混合溶液。反应 3 h 后,再逐滴加入 30 mL 异丙醇和 200 μL 的 APTES 的混合溶液,继续反应 1 h 后停止搅拌室温下陈化 2 h。最后将产物离心分离,水洗多次,60 ℃烘干 12 h,得到表面带有氨基修饰的核壳型 UCNPs。

2.4 氨基化上转换荧光纳米颗粒与 FlaA 抗体的结合

同样利用戊二醛交联方法将 UCNPs 与副溶血性弧菌 FlaA 抗体连接。得到免疫 UCNPs 最后分散在 5 mL PBS 中 4 ℃条件下保存。

2.5 基于磁分离—上转换荧光标记的副溶血性弧菌检测方法的建立

将副溶血性弧菌培养液稀释成 6 个浓度梯度。取制备得到的免疫 MNPs(1 mg/mL)200 μL,分别加入到上述 6 个稀释度菌液中, 使最后反应体积为 1.2 mL。37 ℃ 振荡孵育 1 h,外加磁场分离 MNPs—菌结合物, 用 PBS 清洗 3 次以去除未捕获的目标菌。取制备得到的免疫 UCNPs(1 mg/mL)200 μL 重悬 MNPs—菌结合物,37 ℃振荡孵育 1 h, 外加磁场分离 MNPs—菌—UCNPs 结合物, 用 PBS 清洗 3 次以去除未结合的游离 UCNPs。用 100 μL PBS 重悬 MNPs—菌—UCNPs 结合物,加入微量比色皿中,在 980 nm 激光激发下利用荧光分光光度计收集信号,

监测 542 nm 处的上转换荧光信号，空白组检测无上转换荧光信号(I_0),随着菌液浓度的增加上转换荧光信号(I)逐步增大。

2.6 模拟水产样品中副溶血性弧菌的检测

根据 GB/T 4789.20–2003 食品卫生微生物学检验水产食品的要求。作者由水产市场购买鲫鱼一条,洗净剖开后取鱼肠及鱼鳃共 25 g,放入灭菌研钵内,用灭菌剪子将其剪碎、研磨,待其磨碎后加入 225 mL 灭菌生理盐水,混匀制成样品均液。对其进行无菌化处理(121 ℃,15 min),然后用灭菌纱布将样品均液过滤 3 次，再低速离心取上清液分成 5 管,每管 1 mL。将副溶血性弧菌 6 h 培养液稀释成 5 个不同稀释度,加入样品上清液中,将 5 个试样分别进行选择性培养基 TCBS 平板计数；按照实验部分 2.5 基于磁分离—上转换荧光标记的副溶血性弧菌检测方法进行孵育,测定其荧光强度并代入线性方程计算目标菌个数。对比两种方法的测定结果,计算加标回收率并评价新建立方法的可靠性。

3 结果与讨论

3.1 基于磁分离—上转换荧光材料标记的副溶血性弧菌检测方法原理

如图 1 所示,采用“三明治”夹心结构,利用磁性纳米颗粒进行分离富集以及上转换荧光颗粒标记,通过免疫识别构建了一种检测副溶血性弧菌的新方法。首先通过戊二醛法分别将 MNPs 与全菌抗体、UCNPs 与 FlaA 抗体组装成捕获探针与信号探针。第一步将被副溶血性弧菌污染的样品与 MNPs—全菌抗体孵育，待抗体与目标菌结合捕获后,外加磁场分离,得到(MNPs—全菌抗体—目标菌)结合物;第二步向上述结合物中加入 UCNPs—FlaA 抗体并孵育,FlaA 抗体能够识别结合到目标菌上,再通过外加磁场分离得到(MNPs—全菌抗体—目标菌—FlaA 抗体—UCNPs) 结合物；第三步 980 nm 激发光激发 UCNPs，荧光光谱仪测定其特征发射峰的相对荧光强度。

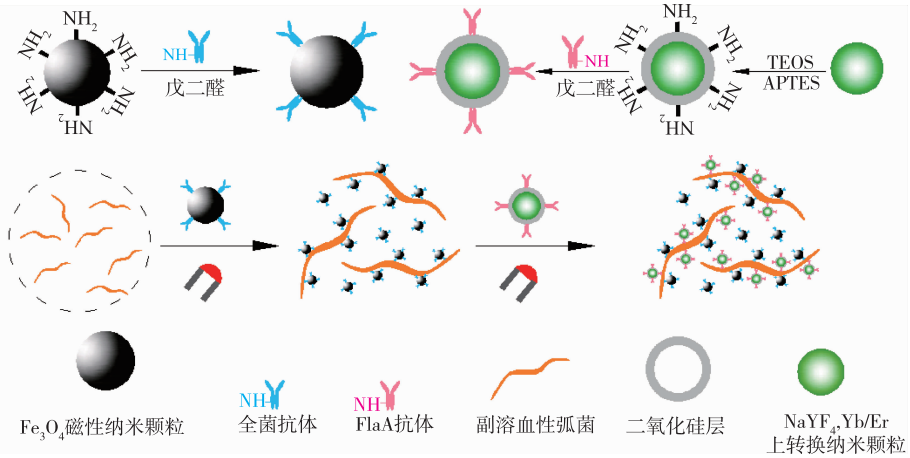


图 1 基于磁分离—上转换荧光标记的副溶血性弧菌检测方法原理图

Fig. 1 Schematic diagram of *V. parahaemolyticus* detection method base on immunomagnetic separation and upconversion fluorescence labeling

3.2 氨基化磁性纳米颗粒表征以及与全菌抗体结合的研究

磁性纳米颗粒由于粒径小、比表面积大,与目标菌识别偶联后可捕获较多的目标菌,在外加磁场作用下,能够在短时间内迅速分离富集样品当中的目标菌。但一般来说,共沉淀法制备得到的裸Fe_3O_4 MNPs 极容易发生团聚，表面未经修饰的 Fe_3O_4 MNPs 化学性质也比较活跃，容易在有氧气存在的情况下被氧化。因此,必须对裸 Fe_3O_4 MNPs 的表面进行修饰。利用 1,6 己二胺作为功能化配体,一步法即可得到带有氨基基团的 Fe_3O_4 MNPs,无需对材料进一步修饰,大大缩减了制备步骤。对制备得到的氨基化 Fe_3O_4 MNPs 进行表征,通过 TEM(图 2)可以清楚辨别磁性纳米颗粒的粒径约 30~40 nm 左右,形貌近似球形。

利用红外光谱图对氨基化 Fe_3O_4 MNPs 与全菌抗体结合前后进行了表征，如图 3 中特征峰所示:3 419 cm^{-1} 出现的强吸收峰属于 N–H 的伸缩振

动吸收峰,在图 3(b)中由于氨基化 Fe_3O_4 MNPs 与全菌抗体的结合，羧基中 O–H 在 3 000~3 400 cm^{-1} 的吸收峰使得原本该处的吸收峰有明显增宽;1 576 cm^{-1} 和 1 642 cm^{-1} 两处吸收峰是羧基中 C=O 的振动吸收峰;1 052 cm^{-1} 是羧基中 C–O 的振动吸收峰。以上吸收峰证明氨基化 Fe_3O_4 MNPs 成功结合了全菌抗体。另外,由于抗体存在含共轭双键的酪氨酸和色氨酸，因此抗体在 280 nm 处具有紫外特征吸收峰。如图 4 所示,全菌抗体与氨基化 Fe_3O_4 MNPs 反应结束后通过磁分离所得上清液中 280 nm 处吸光度值比初始质量浓度下的抗体溶液相比有明显降低。说明部分全菌抗体已经连接到了氨基化 Fe_3O_4 MNPs 上,得到了具有免疫识别能力的捕获探针。该结果同时也印证了磁性纳米粒子表面氨基化修饰成功。

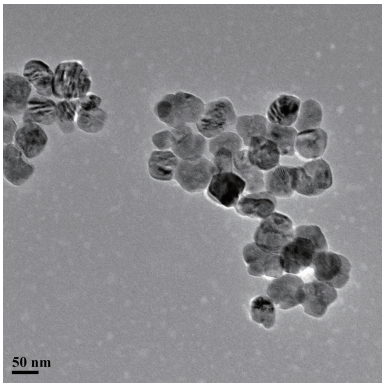


图 2　氨基化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的透射电镜图

Fig. 2　TEM image of amino–modified MNPs

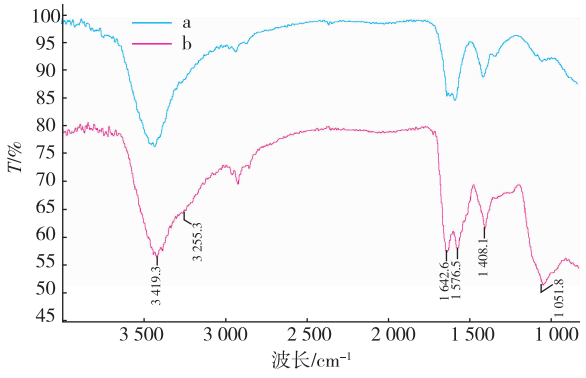


图 3　氨基化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒(a)及其与全菌抗体结合后(b)的红外光谱图

Fig. 3　FT–IR spectrum of the amino–modified MNPs (a) and anti–*V. parahaemolyticus* antibody conjugation to amino–modified MNPs (b)

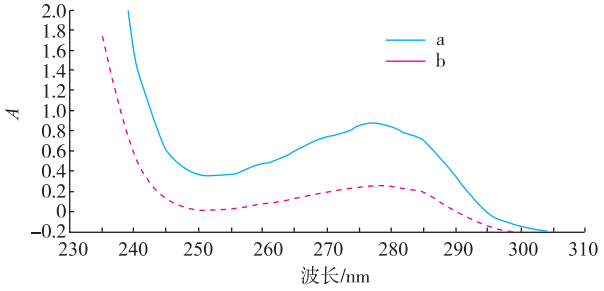


图 4　初始质量浓度下(a)以及与氨基化 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒孵育后上清液中全菌抗体(b)的紫外可见吸收图谱

Fig. 4　UV spectra of initial (a) and supernatant liquor after anti –*V. parahaemolyticus* antibody conjugation to amino–modified MNPs

3.3　氨基化上转换荧光纳米颗粒表征以及与 FlaA 抗体结合的研究

本实验中采用水/溶剂热法在一定的温度、压力和时间的条件下制备得到以 $NaYF_4$ 为基质材料,在 Y:Yb:Er 摩尔比为 0.78:0.20:0.02 时,$NaYF_4$:Yb,Er UCNPs 上转换纳米颗粒在 980 nm 激光激发下,如图 5 显示在 410、525、542 和 660 nm 处得到四组荧光发射谱带，实验中选取谱带中最明显的 542 nm (绿光区) 处为监测菌液浓度变化的特征荧光发射峰。制备的上转换纳米颗粒,呈规则球状晶体,分散性良好,粒径大小均匀,平均直径为 30 nm 左右。由水热法合成的 $NaYF_4$:Yb,Er UCNPs 表面没有自带的功能基团(–COOH 或–NH_2),在后续生物检测的应用中必须对其进行表面修饰。图 6(a)所示为裸露的 $NaYF_4$:Yb,Er UCNPs,通过经典的 Stober 法利用正硅酸四乙酯(TEOS)在碱性条件下的水解以及缩合反应对纳米颗粒表面进行二氧化硅包裹,硅层的厚度约为 10 nm，纳米颗粒大小增大至 50 nm 左右(图 6(b)),证明 SiO_2 已经均匀地包被在 UNCPs 的外层。包被后的 UNCPs 在水溶液中分散均匀。利用红外光谱表征表面二氧化硅包覆并且氨基功能化的核壳型 UCNPs(图 7),如图中特征峰所示:1 090 cm^{-1} 出现的强吸收峰属于 Si–O 的对称伸缩振动吸收峰,证明 UCNPs 包硅成功,在 3 461 cm^{-1} 和 1 629 cm^{-1} 两处出现氨基中 N–H 键的伸缩振动和弯曲振动的特征吸收峰,而 2 930 cm^{-1} 是 APTES 中亚甲基的伸缩振动。以上各处特征吸收峰证明了 $NaYF_4$:Yb,Er UCNPs 表面不但包被了二氧化硅层,同时也成功的连接了氨基基团。

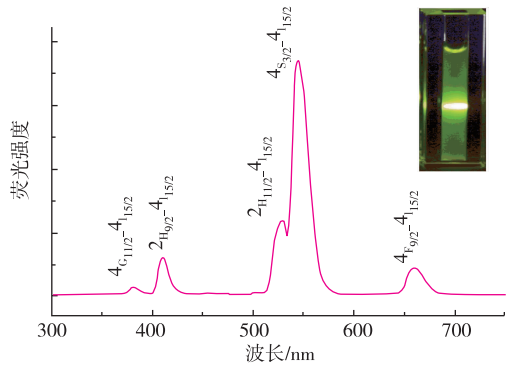


图 5　$NaYF_4$:Yb,Er UCNPs 稀土发光上转换纳米粒子的荧光光谱图

Fig. 5　Fluorescence spectra of $NaYF_4$:Yb,Er UCNPs UCNPs

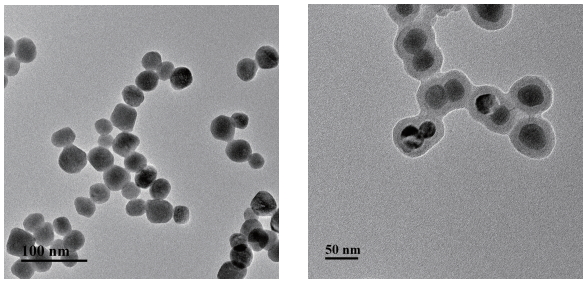


图 6　二氧化硅包覆前(a)后 $NaYF_4$:Yb,Er 上转换荧光纳米颗粒的透射电镜图(b)

Fig. 6　TEM images of before (a) and after silica layer modification of $NaYF_4$:Yb,Er UCNPs (b)

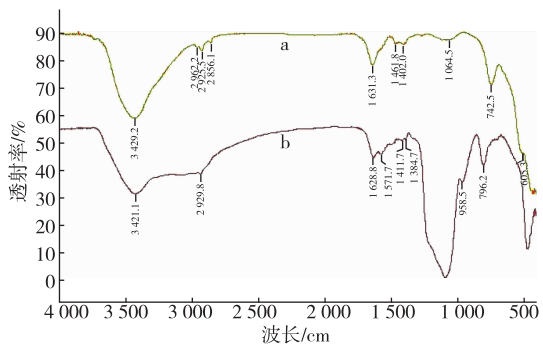


图 7　稀土发光上转换纳米颗粒(a)及其包被二氧化硅层并氨基化后(b)的红外光谱图

Fig. 7　FT-IR spectrum of the upconversion nanoparticles (a) and amino -modified silica -capped upconversion nanoparticles(b)

氨基化修饰的 UCNPs 与 FlaA 抗体连接的偶联物是本实验所建立的“三明治”夹心结构中的信号探针部分,两者同样使用戊二醛法进行偶联,使用紫外分光光度计对两者的结合情况进行表征。如图 8 所示,反应结束后通过离心分离所得上清中 FlaA 抗体在 280 nm 处的吸光度值与初始质量浓度下的 FlaA 抗体溶液相比明显降低,这一结果证明部分 FlaA 抗体已经成功连接到了氨基化修饰的 UCNPs 上。通过 FlaA 抗体与副溶血性弧菌的特异免疫识别,能够将 UCNPs 标记到目标菌表。

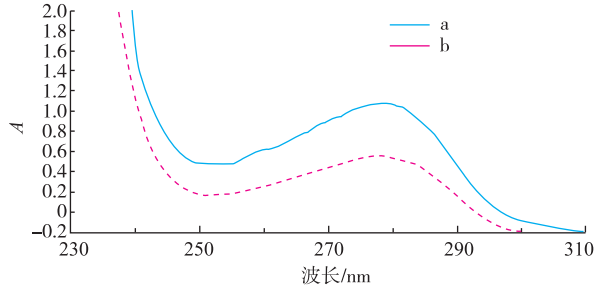


图 8　初始质量浓度下(a)与氨基化 NaYF4:Yb,Er 上转换颗粒孵育后剩余的 FlaA 抗体(b)的紫外可见吸收图谱

Fig. 8　UV spectra of initial (a) and supernatant liquor after anti-FlaA antibody conjugation to amino-modified NaYF4:Yb,Er UCNPs(b)

3.4　实验条件优化

3.4.1　*纳米材料与抗体孵育时间的优化*　抗体与目标菌的免疫识别作用是本方法的关键,而抗体活性会随反应温度、反应时间而变化。因此在实验中对全菌抗体与 MNPs 以及 FlaA 抗体与 UCNPs 的结合效率,即达到饱和状态需要进行时间梯度实验进行探讨。使用 onedrop 微量紫外分光光度计监测上清中的抗体质量浓度变化。实验结果如图 9 (a)所示,初始全菌抗体溶液质量浓度为 1 mg/mL 时,1 mg MNPs 对全菌抗体的结合量在 40 min 时达到饱和,吸附到的绝对抗体量为(120±7) μg/mL。所以选取 40 min 为氨基化 MNPs 与全菌抗体孵育的最优时间。同样,如图 9(b)所示,初始 FlaA 抗体溶液质量浓度为 1 mg/mL 时,1 mg 氨基化 UCNPs 对抗体的结合量在 60 min 时达到饱和,吸附到的绝对抗体量为(210±3) μg/mL。所以选取 60 min 为氨基化 UCNPs 与 FlaA 抗体孵育的最优时间。

3.4.2　*全菌抗体以及 FlaA 抗体初始浓度的优化*　抗体的用量也是本实验研究的一个重要方面,抗体浓度过低不能提供足够的识别位点,导致检测灵敏度下降,而抗体浓度过量也会导致试剂不必要的消

耗。因此实验中对全菌抗体以及 FlaA 抗体初始质量浓度进行了优化，确定最优的结合抗体初始浓度。实验结果表明(图 10(a))，当 1 mg MNPs 结合的全菌抗体量从 20 μg 增加到 120 μg，即全菌抗体溶液初始质量浓度为 600 μg/mL 时继续增大全菌抗体溶液的初始质量浓度，MNPs 结合的全菌抗体量趋于稳定。所以，实验选取 600 μg 为全菌抗体初始质量浓度的最佳值。相同的方法(图 10(b))得到当 1 mg UCNPs 结合的 FlaA 抗体量从 20 μg 增加到 210 μg，即 FlaA 抗体溶液初始质量浓度为 800 μg/mL 时继续增大抗体溶液的初始质量浓度，UCNPs 结合的 FlaA 抗体量趋于稳定。所以，实验选取 800 μg 为 FlaA 抗体初始质量浓度的最佳值。

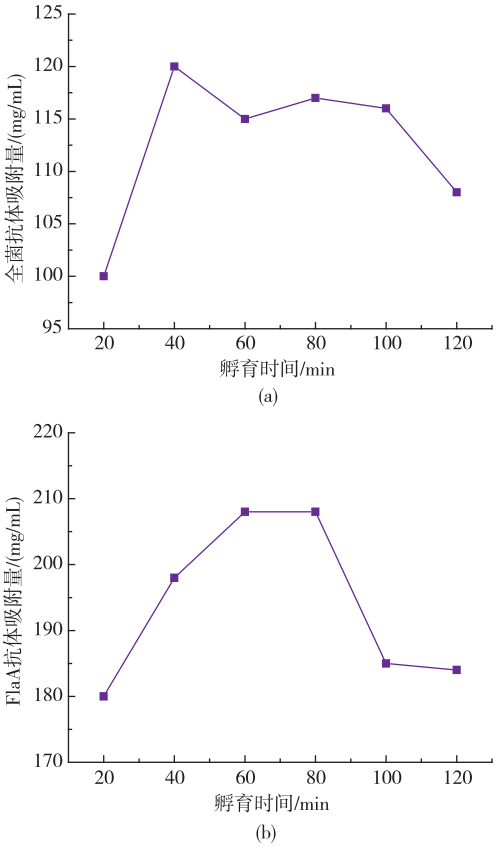


图 9　全菌抗体与氨基化磁性纳米颗粒(a)以及 FlaA 抗体与氨基化上转换荧光颗粒(b)孵育时间的优化

Fig. 9　Optimization of incubating time of anti-*V. parahaemolyticus* antibody conjugation to amino-modified MNPs (a) and anti-FlaA antibody conjugation to amino-modified $NaYF_4$:Yb,Er UCNPs (b)

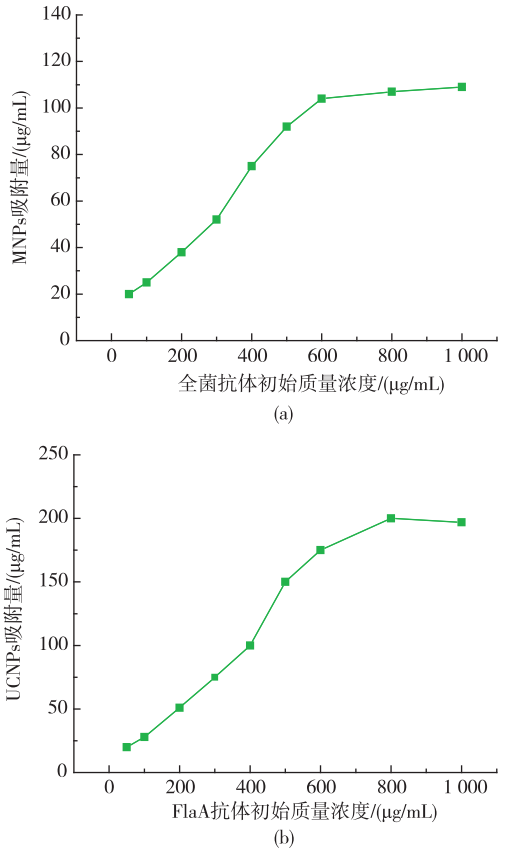


图 10　全菌抗体(a)以及 FlaA 抗体(b)初始质量浓度的优化

Fig. 10　Optimization of anti-*V. parahaemolyticus* antibody solution (a) and anti-FlaA antibody solution (b) initial concentration

3.5　副溶血性弧菌的定量检测

利用磁分离—上转换荧光标记的“三明治”模式，在实验优化的最佳反应条件下，考察了不同浓度目标菌对所建立方法的响应情况结果如图 11 所示：在 5×10^3~5×10^5 cfu/mL 浓度范围内副溶血性弧菌菌个数与上转换荧光强度呈现良好的线性关系，线性回归方程为 $Y=178.25X-506.41$ ($R=0.995\ 9$)，检出限为 1×10^3 cfu/mL。进行 3 次平行实验，重复性良好。

3.6　模拟水产品中副溶血性弧菌的检测

利用本方法对 5 份经处理的模拟水产品样品进行检测，根据已建立的菌落个数与上转换荧光强度的线性相关方程，计算出各样品中加入的副溶血性弧菌菌落个数，与平板计数结果(加入浓度)进行比较得到回收率。在 5 个模拟水产品样品中，除加入浓度为 125 cfu/mL 的样品本方法未能检出，其他 4 个样品检测的结果与传统平板计数结果基本相

同,加标回收率在90.7%-96.7%,回收率良好。由此说明本实验建立的基于磁分离—上转换荧光标记的副溶血性弧菌检测新方法与传统平板计数法相比具有较高的可靠性,可以用于实际样品中副溶血性弧菌的检测。

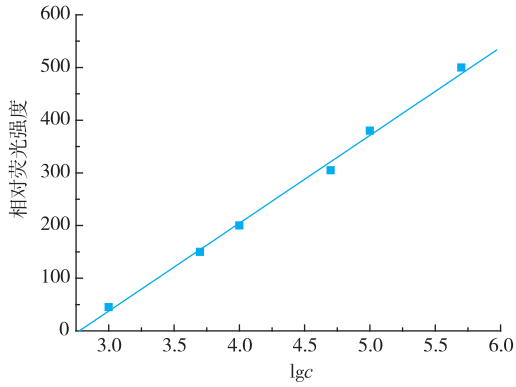


图 11　菌落个数与荧光强度的关系曲线

Fig. 11　Calibration curve of colony number and fluorescence intensity

4 结　语

作者基于氨基化磁性纳米颗粒的快速分离富集效应,以及激光诱导上转换荧光高灵敏标记,结合免疫识别技术,成功建立了一种"三明治"夹心模式检测副溶血性弧菌的新型方法。实验中利用水/溶剂热法分别制备了磁性纳米颗粒和上转换荧光纳米颗粒,并对其表面进行生物功能化修饰,以全菌抗体功能化磁性纳米颗粒作为捕获探针,以FlaA抗体功能化上转换荧光纳米颗粒为信号探针,基于免疫识别原理最终形成MNPs—目标菌—UCNPs的复合物。在优化实验条件下,上转换荧光强度与副溶血性弧菌在5×10^3~5×10^5 cfu/mL浓度范围呈现良好的线性关系,检出限为1×10^3 cfu/mL。通过模拟水产品样品的加标回收实验证明该方法具有较高的准确性,同时该方法检测周期短,在实际应用中具有良好的前景。

参考文献:

[1] Liu X,Chen Y,Wang X,et al. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system[J]. **Journal of Hygiene Research**,2004,33(6):725-729.

[2] Wu H,Nie J,Bao H N. Expression of thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* in *E.coli* and activity of expressed product[J]. **Cellular and Molecular Immunology**,2001,17(5):426-427.

[3] Bisha B,Simonson J,Janes M,et al. A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **International Journal of Food Science and Technology**,2012,47(5):885-899.

[4] Di Pinto A,Terio V,Di Pinto P,et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2012,54(6):494-498.

[5] Lewallen D M,Steckler C J,Knuckley B,et al. Probing adenylation:using a fluorescently labelled ATP probe to directly label and immunoprecipitate VopS substrates[J]. **Molecular Biosystems**,2012,8(6):1701-1706.

[6] Wei J,Zhou X M,Xing D,et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* in sea foods by electrochemiluminescence polymerase chain reaction method[J]. **Food Chemistry**,2010,123(3):852-858.

[7] Parveen S,Hettiarachchi K A,Bowers J C,et al. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2008,128(2):354-361.

[8] Datta S,Janes M E,Simonson J G. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody[J]. **Clinical and Vaccine Immunology**,2008,15(10):1541-1546.

[9] Sudheesh P S,Jie K,Xu H S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V-alginolyticus* isolated from cultured shrimps[J]. **Aquaculture**,2002,207(1-2):11-17.

[10] Croci L,Suffredini E,Cozzi L,et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identifucation of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2007,10(2):229-237.

[11] Auzel F. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids[J]. **Chemical Reviews**,2004,104(1):139-173.

[12] Nyk M,Kumar R,Ohulehanskyy T Y,et al. High contrast in vitro and in vivo photo luminescence bioimaging using near infrared to near infrared up- conversionin Tm^{3+} and Yb^{3+} doped fluoride nanophosphors[J]. **Nano Letters**,2008,8(11):3834-383.