

分类号

密级

江南大学

硕士学位论文

题目：副溶血性弧菌免疫检测新方法研究

英文并列题目：Research on a novel immunoassay for
V.parahaemolyticus

研究生：王燕

专业：营养与食品卫生学

研究方向：食品安全分析与检测

导师：王周平 教授

指导小组成员：夏雨 副教授

学位授予日期：

答辩委员会主席：张晓鸣

江南大学

地址：无锡市蠡湖大道 1800 号

二〇一三年六月

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名： 日 期：

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名： 导师签名：

日 期：

摘要

食源性疾病是目前世界上最为常见、分布最广的疾病之一，由致病菌所引起的食源性疾病在国内外都是极为重要的公共卫生安全问题。随着经济发展，近年来我国各地区尤其是沿海地区因食用副溶血性弧菌污染的水产品所引起的食物中毒已经高居微生物性食物中毒的首位。目前已报道的副溶血性弧菌检测方法均各有其优缺点，因此有必要不断探索研发操作更为便捷、检测更为快速、灵敏度更高的新型检测方法。本课题对目前广泛应用的免疫学检测方法进行了改进，制备、评价了针对副溶血性弧菌表面蛋白的三种抗体探针，并结合磁分离富集技术和稀土上转换发光纳米探针技术，建立了针对副溶血性弧菌的新型免疫检测方法。

本文首先通过基因工程方法，扩增得到了副溶血性弧菌鞭毛蛋白 FlaA、外膜蛋白 OmpU 和 OmpW 的对应（编码）基因，分别克隆到 pET28a、pET24a 质粒载体上。将构建成功的重组表达载体 pET28a-FlaA、pET24a-OmpW、pET24a-OmpU 转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3)。然后对表达宿主菌进行 IPTG 诱导表达，并用 Ni-NTA resin 柱对三种目标蛋白进行了纯化，经 SDS-PAGE 电泳验证得到了单一条带的抗原蛋白。

其次，分别以副溶血性弧菌灭活菌体、纯化的 FlaA、OmpU 和 OmpW 蛋白作为抗原对家兔进行免疫，制备多克隆抗血清，并经饱和硫酸铵分级沉淀法纯化获得多克隆抗体。得到纯化后效价为 1:160,000 的全菌抗体；针对全菌抗原效价为 1:16000 的 FlaA 抗体、效价为 1:16,000 的 OmpU 抗体、效价为 1:8,000 的 OmpW 抗体。用流式细胞术对四种抗体的特异性进一步量化评估，全菌抗体与副溶血性弧菌的结合率为 $91.57 \pm 5.40\%$ ；FlaA 抗体为 $89.77 \pm 6.89\%$ ；OmpU 抗体为 $34.32 \pm 2.78\%$ ；OmpW 抗体为 $63.53 \pm 5.40\%$ 。由此选择全菌抗体、FlaA 抗体进行后续实验方法的建立。

随后，采用水热-溶剂热方法成功制备了氨基化磁性纳米粒子，在最佳初始抗体溶液浓度 $600 \mu\text{g/mL}$ 、反应 40 min 条件下将其与全菌抗体组装成免疫磁珠。同时采用水热法制备得到了具有稳定、灵敏、可避免生物样本自发荧光干扰等优点的稀土上转换发光纳米粒子 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ ，在最佳初始抗体溶液浓度 $800 \mu\text{g/mL}$ 、反应 60 min 条件下将其与 FlaA 抗体组装成信号探针。然后将磁珠-全菌抗体与目标菌孵育，外加磁场分离后再与 UCNPs-FlaA 抗体孵育，形成“三明治”夹心型复合体，980 nm 激发测定其特征荧光峰强度。结果显示，在 5×10^3 - 5×10^5 cfu/mL 范围内，副溶血性弧菌菌落数与荧光强度呈现良好的线性关系，线性回归方程为 $Y=178.25X-506.41$ ($R^2=0.9919$)，检出限为 10^3 cfu/mL。在模拟水产品样品的检测中，加标回收率为 90.7%-96.7%，与传统的平板计数法结果一致。

关键词：副溶血性弧菌；抗体；免疫分析；磁性纳米粒子；稀土上转换发光纳米粒子

Abstract

Food-borne Disease is one of the most common and widespread diseases in the currently world. The food-borne disease caused by pathogenic bacteria is an significant public health security problem at home and abroad. Along with economic development, the food poisoning cases caused by eating aquatic product polluted by *Vibrio Parahaemolyticus* has topped the list of microorganism food poisoning in a lot of areas especially coastal regions in China. There are respective advantages and disadvantages in each of the methods has been reported for *V. parahaemolyticus* detection. Therefore, it is necessary to continuously explore a novel method which is more convenient, efficient and sensitive. The immunoassay which is most widely used was improved in this research. We prepared three kinds of polyclonal antibody probes specific to surface proteins of *V. parahaemolyticus*. Then combined with magnetic separation and upconversion nanoparticles probe technology, developed a novel detection method of *V. parahaemolyticus*.

Firstly, The complete flagellin gene (FlaA), two kinds of outer membrane protein gene (OmpU and OmpW) from *V. parahaemolyticus* ATCC1780 were amplified. Next, the genes were cloned into pET28a、pET24a plasmid vectors, and then the recombinant plasmid (pET28a-FlaA、pET24a-OmpW、pET24a-OmpU) were transferred into *E. coli* BL21(DE3). After that, the genes coded proteins were expressed by IPTG and purified using Ni-NTA resin affinity chromatography. A clear single target band of the antigen protein was proved by SDS-PAGE.

Secondly, 2 rabbits a team were immunized by inactivated *V. parahaemolyticus*, purified FlaA, OmpU and OmpW proteins repectively. The obtained four kinds of polyclonal antibodies were purified by saturated ammonium sulfate method. The titers of polyclonal antibodies above were 1:160,000, 1:16,000, 1:16,000, 1:8,000 approximately afer purified. Whats more, in order to further quantitative evaluate the specificity of the antibodies, Flow cytometry was employed. Measured binding fraction of *V. parahaemolyticus* and antibodies are: $91.57\pm5.40\%$, $89.77\pm6.89\%$, $34.32\pm2.78\%$, and $63.53\pm5.40\%$. Thus, anti-*V. parahaemolyticus* antibody and anti-FlaA antibody were employed for subsequent experiments.

Thirdly, amine-functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles(MNPs) were synthesized by Hydrothermal-Solvothermal method. Assembled with anti-*V. parahaemolyticus* antibody into immunomagnetic beads when the optimal initial concentration of antibody solution is 600 $\mu\text{g/mL}$, incubating time is 40 min. Meanwhile, amine-functionalized NaYF₄:Yb,Er upconversion nanoparticles(UCNPs) which are stable, sensitive and no autofluorescence were synthesized by Hydrothermal method. Assembled with anti-FlaA antibody into immunoUCNPs when the optimal initial concentration of antibody solution is 800 $\mu\text{g/mL}$, incubating time is 60 min. After incubating with these two conjugation, a sandwich-type immunoassay format could be determined by analysis its characteristic flurescence peak intensity. The detection limit for *V. parahaemolyticus* was 10^3 cfu/mL, and the linear range was from 5×10^3 to 5×10^5 cfu/mL($Y=178.25X-506.41$, $R^2=0.9919$). In simulated samples

inspection of aquatic products, the recovery was 90.7%-96.7%, consistent with the traditional plate count method.

Keywords: *V. parahaemolyticus*; Antibody; Immunoassay; Magnetic nanoparticles; Upconversion nanoparticles

第一章 引言

1.1 副溶血性弧菌检测的意义与方法

1.1.1 副溶血性弧菌检测的意义

食源性疾病（Food-borne Disease）是指通过食物进入人体内的各种致病因子所引起的中毒或感染，致病因子包含有毒素、细菌、病毒、寄生虫等，所引发的症状轻度则表现为头痛、腹泻、肠胃炎等，而严重的则是危及生命的神经、肾脏、肝脏综合征^[1]。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。流行病学监测数据表明食源性疾病的发病率持续上升，在发达国家，每年估计有三分之一以上的人群感

染食源性疾病。威尔士和英格兰每年约有 23,616 万人患病, 21,138 人进入医院治疗, 718 人死亡^[2]。美国每年约有 7,000-8,000 万人患病, 3,215 万人入院治疗, 5,000 人死亡^[3]。我国 2001-2010 年食源性疾病暴发检测与报告系统统计, 食源性疾病暴发共 5021 起, 发病 1,401,01 人, 死亡 1427 人^[4]。食源性疾病成为了食品安全的最关键问题, 世界范围内食品安全恶性事件频频发生, 而食源性疾病并没有随经济发展和技术的进步而减少或者消失。

据 WHO 估计, 全世界每年发生食源性疾病高达数十亿人, 每年约有两百万儿童死于腹泻, 其中 66% 以上是由细菌性致病菌所导致^[5]。在我国 2001-2010 年所统计的食源性疾病暴发事件中, 细菌性暴发事件起数和发病人数最多, 分别占总数的 40.93% 和 56.39%^[4]。而根据中国食源性疾病监测网 2003-2007 年报告细菌性食源性疾病暴发事件共 1060 起, 涉及发病人数 3,226,1 例, 住院 1,642,6 例, 死亡 16 例^[6]。常见的食源性致病菌有: 沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌等。

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, 腹部痉挛性疼痛和水样腹泻是病人主要的临床症状, 其发病机制主要是大量活菌侵入肠道或分泌毒素所致^[7]。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 *V. parahaemolyticus* 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^[8]。因此, 提高 *V. parahaemolyticus* 引起食物中毒的原因查明率, 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, 而且对于分析研究地区性食物中毒发病率、针对性地采取有效预防措施, 最大限度的控制 *V. parahaemolyticus* 食物中毒的发生具有极为重要的意义^[9]。鉴于食源性致病菌 *V. parahaemolyticus* 对人体造成的健康危害, 我国《食品安全国家标准食品中致病菌限量》(征求意见稿) 规定其在水产品及相关产品中均不得超过 5 cfu/25 g^[10]。由上可知, *V. parahaemolyticus* 通过污染新鲜水产及水产制品而广泛的存在于我们身边, 这种污染导致中毒的现象在全球范围内普遍存在且呈上升趋势, 严重威胁了人类的健康和生命安全。因此, 建立有效、便捷、快速的 *V. parahaemolyticus* 检测方法尤为重要。

1.1.2 副溶血性弧菌的检测方法

V. parahaemolyticus 的检测方法较多, 传统方法包括平板培养法、细胞计数法、生物发光法、阻抗测定法、免疫学方法^[11]。分子生物学方法包括 DNA 杂交法、聚合酶链反应 (PCR) 法、实时荧光定量 PCR、基因芯片 (Microarray)^[12-13]。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。

1、传统方法

(1) 平板培养法

Vibrio parahaemolyticus 食物中毒的检验仍以传统的平板培养法为主, 此法费用低、灵敏度高。我国国标规定其操作过程包括: 样品制备; 选择性增菌 8-18 h; TCBS 选择

性培养基分离；纯培养；氧化酶试验、涂片镜检、嗜盐性试验初步鉴定；生化鉴定；血清型鉴定^[14]。平板培养法操作繁琐，耗时费力，获得结果往往需要 4-7 天时间，并且要求 *V. parahaemolyticus* 增殖为可见菌落。虽然近年来，研究者在样品制备环节研制了自动化的重量稀释器、灭菌研磨袋^[15]；平板技术方面发明了旋转接种仪，减少了菌落计数所需的时间^[16]；在菌落计数环节 Colonycount 公司的 MACE 系统、Geno-Tech 公司的 SC-2010 型全自动彩色菌落计数器将微生物计数阶段自动化，提高了效率降低了实验的操作时间^[17]；鉴定系统如 API 系列、VIDAS 系统、BBL-crystal、Biolog 细菌鉴定仪等通过生理和生化方法对单个微生物能够进行自动鉴别，减少了人为误差同时明显地节省了检验时间。但是，前期的菌种分离仍然依赖手工，而且同时带来了试剂仪器昂贵等不足。

（2）细胞计数法

流式细胞计数法是一种以光学为基础的在复杂基质中分析单个细胞的方法。悬浮在液体中的细菌细胞通过激光束，光被散射并被其吸收，散射的自然特性和宽度作为细胞的固有特性，可以利用透镜和光电元件收集散射光，从而评价其数量、大小和形状^[18]。流式细胞术灵敏度较高，可以达到 10^2 - 10^3 cfu/mL，几分钟内就可以得到实验结果。由于这种技术需要排除干扰颗粒的均质溶液进入分析系统检测，因此，流式细胞计数法适合于检测液体样品，而 *V. parahaemolyticus* 往往存在于新鲜水产及其制品当中，这些复杂的固体食物限制了该法在检测 *V. parahaemolyticus* 领域的应用。

（3）生物发光法

被检样品成分中的微生物含有 ATP，可以通过荧光素酶复合物对其进行检测。经过初步选择性分离后，样品所释放出来的光强度和其中 ATP 含量直接相关，通过照度计进行定量检测^[19]。从几秒到几分钟的快速反应时间是该法的优势，但这种方法至少需要 10^4 个菌才能产生光信号，而可能会影响到样品的检测结果的因素包括温度、pH、荧光素酶抑制物以及其他因素，这也成为了该法应用实施的短板。

（4）阻抗测定法

采用生物电阻抗测量仪对微生物生长、代谢时电导力的变化值进行测定就称为阻抗测定。以阻抗测定为原理的自动系统大多已成功商品化并且自动化和计算机化。这些自动系统不但可以持续监测样品中的电导力变化还可以与校正曲线比对从而评估样品中微生物的数量，大部分检测分析在 24 h 内就可以完成。虽然这些系统可以用来评估微生物总数、能够对大量样品进行筛选还可以节省实验耗材和时间，但是这种方法并不利于检测微生物较少的样品，并且检测结果可能受到食物基质的影响。这种方法现已被用来检测李斯特菌、沙门氏菌和空肠弯曲菌^[20]。将该法应用到 *V. parahaemolyticus* 的检测当中，仍然需要对样品中的微生物进行选择分离。

（5）免疫学方法

免疫学方法是指以抗原抗体特异性结合反应为基础的检测方法。为了检测特异性的微生物及其毒素，抗体被广泛应用于各种免疫学检测方法研究。该方法中，大部分抗体都来源于鼠或兔血清，其主要评价指标包括特异性和灵敏性，种类包括多克隆抗体和单

克隆抗体。在免疫学检测方法中应用多克隆抗体的比例较大，因为其制备过程操作较单克隆抗体制备简单，制备周期也较短，成本较低。但是，应用多克隆抗血清也有其自身弊端，由于动物免疫反应具有可变性和偶然性，多克隆抗体在特异性方面仍不如功能一致、来源可靠的单克隆抗体。

①酶联免疫法（ELISA）

ELISA 是一种常用固相酶免疫测定方法，以酶或辅酶作为标记物来标记抗原或抗体，再通过酶促反应的放大作用来显示免疫学反应。ELISA 法具有灵敏度较高、选择性强，所用试剂易保存、性质稳定，结果判断客观、样品处理量大等优点。目前 ELISA 法已被广泛应用于致病菌的检测，张晓华等使用自制 *V. parahaemolyticus* 多抗建立了检测 *V. parahaemolyticus* 的间接 ELISA 方法，其检测的敏感性阈值为 10^5 cfu/mL^[21]。近年来，在食源性致病菌检测中，ELISA 法由于操作简便、迅速得到了较为广泛的应用，但是 ELISA 实验的影响因素较多，必须充分控制其质量才能发挥其方法学的优点^[22]，并且需要具备一定的实验条件才可以开展应用，所以对于野外现场及基层应用等仍有一定的局限性。

②免疫胶体金技术

免疫胶体金技术起源于 1971 年，由 Faulk 等应用电镜免疫胶体金染色法（IGS）观察沙门氏菌。而 20 世纪 90 年代以来，一项基于免疫胶体金技术的新型体外诊断技术——胶体金快速诊断试纸条得到了迅猛发展，在生物医学领域特别是医学检验中得到了广泛的应用。该方法的核心技术以硝酸纤维素膜材料为固相，通过毛细管作用使得样品溶液在上层玻璃纤维膜层析材料上泳动，并同时使胶体金标记的抗体包被在层析材料上。由于抗原和抗体的高特异、高亲和性免疫反应，富集在检测带上的胶体金发生沉积，能够通过目测得到直观的显色现象。显色程度与抗原含量呈正比，也可用于半定量的免疫检测方法中。因为该法灵敏度和特异性都较高，且操作快速、简便，易于判读并可保存实验结果，目前已有针对大肠杆菌、李斯特菌、霍乱弧菌、空肠弯曲杆菌、沙门氏菌、炭疽芽孢杆菌的试纸条发明专利报道^[23-30]。但针对 *V. parahaemolyticus* 的胶体金试纸条暂未见报道。

③免疫磁性分离技术（IMS）

免疫磁性分离技术是指以免疫捕获为基础的浓缩分离技术，包括免疫结合，然后从混合样品中物理分离目标微生物两个步骤^[31]。免疫磁性分离技术通过将特异性抗体偶联在磁性颗粒的表面组成免疫磁珠特异吸附目标微生物，载有目标的磁珠在外加磁场的作用下向磁极的方向聚集，能够直接从样品中或增菌培养基中分离目标菌^[32]。因此，免疫磁性分离技术代替了常规的分离、浓缩，也代替了常规的选择性增菌培养过程，能够特异有效地将 *V. parahaemolyticus* 从样品中快速分离^[33]。在实际应用中，免疫磁分离技术往往与显微镜镜检技术、ELISA 技术、PCR 技术等结合使用。

2、分子生物学方法

近 10 多年以来，分子生物学的相关研究发展迅速，在微生物的分离、早期鉴定、特性描述和计数方面有了长足的发展。分子生物学检测技术的发展为食源性致病菌的快

速检测提供了良好的技术发展平台。

（1）DNA 杂交法

核糖核酸（RNA）和脱氧核糖核酸（DNA）探针的应用在微生物的鉴别和诊断方面是一个重要的发展里程碑。根据 DNA 碱基互补原理，从基因水平对细菌等进行检测和鉴定，DNA 探针可以和特定微生物的核酸相结合，因而具有很高的特异性和相当的敏感性，在微生物的检测中得到了广泛应用^[34]。曹小红等人制备了地高辛标记 450 bp DNA 探针，建立了斑点杂交方法检测副溶血性弧菌 *tlh* 基因。其探针具有较高的灵敏度和特异性，可重复使用 4 次^[35]。DNA 杂交法的一个主要不利方面在于基因探针杂交技术需要 DNA 抽提、酶切、片段标记等制备过程，操作比较繁琐，而且样品中若含有大量干扰杂菌就会干扰杂交结果。因此，在食品样品的检测方面主要是利用 LB 平板上的细菌菌落来进行杂交。

（2）聚合酶链反应（PCR）法

聚合酶链反应（PCR）是 19 世纪 80 年代后期以来应用最为广泛的分子生物学方法，作为生物技术的一个里程碑受到了科研人员的青睐。该技术由加利福尼亚大学的 Henery A、Erllich 和 Cetus 公司的 Kary B Mullis 于 1985 年联合创造，PCR 技术能将极其微量的目标 DNA 特异地扩增上百万倍，从而很大的提高对 DNA 分子的检测和分析能力。利用 PCR 技术来鉴定微生物种类的主要依据是，微生物所在分类单元中的不一致性和与其他分类单元之间的遗传进化距离。其中，16S rDNA 和 23S rRNA 的可变区域可以用以鉴别细菌的属和种，能够用做细菌特异性 PCR 扩增片段^[36]。PCR 法灵敏度高、特异性强、反应快速，因而被应用于食源性致病菌的快速诊断当中^[37]，目前商品化的系统包括有 Applied Biosystems 公司的 TaqMan 系统、Bio-rad 公司的 Probelia 系统等。PCR 技术应用于食品样品检测的一个重要问题是该技术的操作过程比较复杂，而且该法的灵敏度可能因食物成分、DNA 提取液和培养基而降低，所以它需要非常洁净的环境条件。因此，PCR 法主要是用来对 LB 平板上的纯细菌菌落进行鉴定，就意味着需要至少 18 h 以上的培养时间^[38]。

（3）实时荧光定量 PCR

由于常规的 PCR 方法只能得出定性结果，所以该方法的应用受到了限制，而其后发展起来的以 PCR 法为基础的新型 PCR 技术包括定量 PCR、实时 PCR、实时荧光定量 PCR 等则受到了更多关注。实时 PCR 能够检测 PCR 反应过程中的每个循环扩增产物的量，可以监测整个 PCR 过程。实时 PCR 技术不但实现了 PCR 从定性到定量的飞跃，而且比常规 PCR 具有更强的特异性，能够有效解决 PCR 污染问题。其快速、无需后续电泳等突出优点使其得到了广泛的采用。而实时荧光定量 PCR，则是指在 PCR 反应的体系中加入荧光基团，常用的荧光物质分为荧光探针和荧光染料两种。利用荧光信号在 PCR 过程中的积累对整个过程进行实时监测。荧光探针法包括 LightCycler 法、Taqman 探针法、和 Molecular beacon（分子信标）法；荧光染料法则是指 SYBR Green I 法。*V. parahaemolyticus* 携带两个致病因子：耐热相关溶血素（TRH）和耐热直接溶血素（TDH）。其中 TDH 基因常被作为检测 *V. parahaemolyticus* 的特异性标志基因。孙宏迪等人将 TDH

基因作为靶基因，设计了引物和 TaqMan 探针，建立了一种检测 *V. parahaemolyticus* 的实时荧光定量 PCR 法，该法的检测限为 10^2 cfu/mL^[39]。扈庆华等人采用改良分子信标技术建立了 *V. parahaemolyticus* 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的双重实时 PCR 方法^[40]。George M.Blackstone 等人^[41]建立了蚌类水产品中 *V. parahaemolyticus* 的实时 PCR 检测方法，该法检测限低至 1 cfu，但仍需要 24 h 左右的增菌时间。由于 PCR 技术普遍存在仪器昂贵、需要增菌培养等缺陷，所以并不适用于现场检测。

(4) 基因芯片 (Microarray)

基因芯片技术是一种食源性致病菌鉴定领域新兴的技术方法，引起了研究者广泛的关注，为在分子水平快速鉴别致病菌提供了依据^[42]。基因芯片技术是利用从细菌中扩增得到的序列标记荧光以作为探针，按照预定位置将千万个核酸分子组成的微点阵列固定在玻片上与探针进行杂交^[43]。其结果可以通过酶学方法或直接的荧光扫描来进行测定。该法的优点是能够同时鉴定多种细菌的混合污染。现在基因芯片技术主要用来快速鉴定致病菌基因。陈昱运用基因芯片技术建立了检测和鉴定志贺氏菌 (*Shigella*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、大肠杆菌 O157 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、*Vibrio cholerae*、*V. parahaemolyticus* 等食源性致病菌的方法^[44]。然而基因芯片技术往往需要昂贵的扫描仪和点样仪，给该技术的使用带来了不便。

(5) 核酸适配子 (Aptamer) (另起一段)

核酸适配子是从一个体外合成的随机寡核苷酸文库中筛选到的与目标物质特异性结合的一簇 DNA 或 RNA 片段。针对致病菌的适配子筛选通过指数富集配体的系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) 进行，适配子拥有许多优于传统方法的优点：适配子在体外能够大量合成，性质更加稳定；它的表面积大，有更多的受体结合位点，有很强的亲和力；适配子具有很强的特异性，易于形成三维特定的假结、发卡等构象与目标物质特异性结合^[45]。Duan 等针对 *V. parahaemolyticus* 进行了适配子的筛选，得到了特异性较高、亲和力较强的适配子序列^[46]。

1.2 副溶血性弧菌外膜蛋白的研究进展

以抗原抗体特异性反应为基础的免疫学检测技术比较易于自动化和降低成本，但在其发展的进程中无一例外都受到了检测探针——抗体的特异性、灵敏度和稳定性的影响。抗原抗体反应的原理是：具有免疫原性的抗原能够刺激机体相应的 B 细胞增殖和分化从而形成浆细胞并可以分泌特异性的抗体。在过去的研究当中，窦勇^[47]等人在建立 *V. parahaemolyticus* ELISA 检测法时，均采用甲醛对 *V. parahaemolyticus* 进行灭活后对家兔或豚鼠进行免疫以制备得到多克隆抗体将其应用于后续试验当中。由于抗原分子表面的不同抗原决定簇能够被不同的特异性 B 细胞所识别，从而产生针对该抗原分子表面不同抗原决定簇的抗体混合物。以全菌作为抗原免疫动物制备抗体时，由于全菌表面具有多个抗原决定簇制备得到的抗体就可能与其他常见致病菌如：*Shigella*、*Salmonella*、*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、*Vibrio cholerae* 等产生

交叉反应，影响检测结果。1975 年英国科学家 Milstein 和 Kohler 发明了单克隆抗体技术，单克隆抗体能够目标明确地与单一特异性抗原决定簇结合，极大地提高了抗体探针的特异性^[48]。然而，单克隆抗体的制备过程耗时长达半年，并且对于操作人员有很高的技术要求，需要配套的研究仪器和实验室环境，研究成本比较高^[49]。

由于 *V. parahaemolyticus* 等海洋性致病菌所引起的弧菌病可危害鱼类、贝类和甲壳类等水生经济动物，对海水养殖业造成了巨大的威胁，所以我国目前对 *V. parahaemolyticus* 的研究集中在疫苗制备方面。杨智慧等人^[50]对于该菌的免疫预防已经作了初步的尝试，发现其暴露的表面成分如外膜蛋白、脂多糖等与宿主能够直接接触，在决定宿主免疫反应的特异性上起到了关键作用^[51]。外膜蛋白(Outer Membrane Protein)是革兰氏阴性细菌所特有的结构，它暴露在菌体表面，具有比较强的免疫原性，并且能够刺激机体产生抗体^[52]。近年来，外膜蛋白的研究受到了广泛关注和特性分析^[53-59]。李研东^[60]等人对 *V. parahaemolyticus* 外膜蛋白 OmpK 基因进行了克隆和原核表达，获取了高效价的抗血清，得到该蛋白具有较好的免疫原性的结论。毛芝娟^[61]等人对 *V. parahaemolyticus* ZJ2003 菌株的两种铁调外膜蛋白 psuA 和 pvuA 的基因进行了克隆和原核表达，并将其应用于大黄鱼的免疫试验中^[62]，研究结果显示这两种铁调外膜蛋白都具有良好的免疫原性，可以作为高效疫苗成份。杜玉萍^[63-64]等人则利用 *V. parahaemolyticus* TLH 蛋白对新西兰大白兔进行了免疫，得到相应的多克隆抗体，并依此建立了 ELISA 双抗体夹心法。同时，袁野^[65]等人还对 *V. parahaemolyticus* 的鞭毛蛋白 FlaA 基因进行了克隆和原核表达。由于鞭毛运动力能帮助微生物移动到适宜的环境当中，对具有致病性的微生物而言，鞭毛能帮助其粘附感染宿主。McCarter^[66]等人研究发现，*V. parahaemolyticus* 的鞭毛组成复杂，包含了 6 种极性鞭毛蛋白，其中 FlaA 鞭毛蛋白对于鞭毛的运动性及 *V. parahaemolyticus* 对宿主的侵染共生性起着关键性的作用。因此，鞭毛蛋白与外膜蛋白均有可能作为特异性抗原，免疫动物制备得到具有高特异性的多克隆抗体。

1.3 稀土上转换发光纳米材料的研究与应用

由于生物分子自身可供分析的信号比较弱，常需要借助外源标记物来获取可供测量的分析信号以得到高灵敏度的检测，因此，生物标记已成为生命科学的研究热点之一。以光信号为探测机制的生物传感统称为发光标记，光学成像所采用的荧光技术是通过激发荧光报告基团发光以进行标记的^[67]。近年来，由于纳米科技的迅速发展，除传统的有机荧光染料(FITC 等)之外，以纳米材料为基础的新型纳米发光探针如半导体量子点(CdSe, CdTe)、碳纳米材料(Carbon Nanotubes)、钻石纳米粒子(Diamond Nanoparticles)、稀土纳米发光材料在生物分析和生物技术领域迅速发展。

由于短波长激发、长波长发射的传统下转化荧光材料仍存在光穿透率小、潜在的被测生物样本光损伤和生物样本自体荧光干扰的缺陷，为了克服这些问题，具有独特发光特性的上转换材料受到了极大的关注，针对其的研究应用也得到了长足的发展。

稀土上转换发光纳米材料(Upconversion Nanoparticles, UCNPs)是指稀土掺杂的

各种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)转换成可见光现象^[67]。由于该现象违背了吸收光子能量高于发射光子能量的 Stokes 定律,因此又称之为反 Stokes 发光。稀土离子的上转换发光几乎能够覆盖可见光的各个波段,由于近红外区激发光能量较低,所以其对生物组织损伤小^[68];而生物组织对近红外光无吸收,因此该激发光在生物样本内具有很深的穿透力,且生物分子无上转换发光特性,可以避免生物样品自发荧光和散射光的干扰;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;此外,通过调节所掺杂的稀土元素种类和基质材料可以在同一近红外波长激发下实现多色上转换发射,可用于多目标的同时标记。这些优点都证明稀土上转换发光纳米材料在生物标记领域有着广泛的应用前景^[69]。

目前,在关于 UCNPs 的研究中,对 $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 共掺杂的基质上转换材料研究最为活跃、应用也最广,其中, Er^{3+} 离子作为激活剂、 Yb^{3+} 离子作为敏化剂。Yi 等人以 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 上转换荧光纳米材料为标记物,在芯片上通过免疫反应实现了对蛋白的检测^[70]。而后 Yi 等又采用 50 nm 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 上转换荧光纳米材料为标记探针以磁珠作为分离载体建立了一种 DNA 杂交检测方法,能够检测到 7.8 nmol/L 的目标 DNA^[71]。Wu 等以单克隆抗体功能化的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 两种 UCNPs 为信号探针,建立了针对黄曲霉毒素 B_1 (Aflatoxin B_1 , AF B_1)、赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 的多色检测方法^[72],但目前将 UCNPs 应用于致病菌检测的研究仍然较少。

UCNPs 的制备方法有多种,包括:沉淀法、水热法、溶胶-凝胶法、热裂解法、燃烧法、微乳液法等^[73]。本课题组在 UCNPs 的制备方面做了大量的研究工作,本论文采取其中效果较好的水热法进行实验。

1.4 论文的立题意义与研究内容

1.4.1 论文立题意义

目前 *V. parahaemolyticus* 的检测仍多采用传统的平板培养法,该方法耗时长的缺陷也导致部分机构、公司开始采用免疫学方法,而鉴于技术、成本等因素免疫学方法中所使用的检测探针多为全菌免疫制备得到的多克隆抗体。由于全菌表面具有多个抗原决定簇,由其制备得到的多克隆抗体的特异性表现仍有待提高,经参考目前针对 *V. parahaemolyticus* 特有外膜蛋白和鞭毛蛋白的研究,本研究预计由其特有蛋白免疫得到的多克隆抗体可能会在特异性方面有新的表现。由于分离、纯化天然 *V. parahaemolyticus* 的外膜蛋白和鞭毛蛋白仍然存在较高难度,为保证其纯度本课题采取了基因工程合成外源蛋白并使用 Ni-NTA resin 柱亲和纯化的方法对抗原蛋白进行了制备、纯化。本课题旨在研究针对 *V. parahaemolyticus* 特异性蛋白的多克隆抗体探针,对其进行进一步评估,选取特异性、灵敏性好的抗体探针并结合本实验室制备的磁性纳米材料 (Magnetic Nanoparticles, MNPs) 和稀土上转换发光纳米材料 (UCNPs) 建立针对 *V. parahaemolyticus* 的新型检测方法。

1.4.2 论文主要研究内容

1、根据 GenBank 上发表的鞭毛蛋白 A (FlaA) 的基因序列 GI:256750559、外膜蛋白 U(OmpU)的基因序列 GI:297242388 和外膜蛋白 W(OmpW)的基因序列 GI:256750557 设计引物, 将扩增得到的目的基因克隆到 pET28a、pET24a 质粒载体上。将构建成功的重组表达载体转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3)。

2、对表达宿主菌进行 IPTG 诱导表达, 分析目标蛋白的存在形态, 并用 Ni-NTA resin 柱对其进行纯化条件摸索, 制备得到纯化抗原蛋白。

3、分别以 *V. parahaemolyticus* 菌体、纯化的 FlaA、OmpU、OmpW 蛋白作为抗原对家兔进行免疫, 制备多克隆抗血清, 经饱和硫酸铵分级沉淀法纯化获得多克隆抗体。并用间接 ELISA 法对四种抗体进行特异性、灵敏性评价, 用流式细胞术对四种抗体的特异性进行进一步的量化评估, 比较分析。

4、采用水热-溶剂热方法制备氨基化磁性纳米粒子, 并选用其中一种特异性、灵敏性评价较好的抗体作为捕获探针, 将其组装成免疫磁珠用以磁分离、富集 *V. parahaemolyticus*, 并优化其反应条件; 采用水热法制备稀土上转换发光纳米材料 NaYF₄:Yb,Er, 并选用另一种特异性、灵敏性评价较好的抗体作为信号探针, 将其组装成免疫 UCNP 并优化其反应条件。

5、建立基于磁分离富集、稀土上转换发光纳米材料标记的 *V. parahaemolyticus* 检测方法, 考察该方法的线性范围、检测下限并与国标方法进行比较评价其可靠性。

第二章 实验材料与方法

2.1 材料与主要试剂

2.1.1 菌株、质粒和实验动物

V. parahaemolyticus ATCC17802 菌株由江苏省出入境检验检疫局提供; 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)及实验所用到的大肠杆菌 *E.coli* ATCC 25922、单核细胞增生李斯特氏菌 *L.monocytogenes* CMCC (B) 54002、鼠伤寒沙门氏菌 *S.typhimurium* CMCC50013、福氏志贺氏菌 *S.dysenteriae* CMCC51302、金黄色葡萄球菌 *S.aureus* ATCC6538 均由本室保存; 原核表达质粒 pET24a、pET28a 由江南大学食品学院食品技术生物中心提供; 免疫实验所用家兔购自无锡市惠山江南实验动物场。

2.1.2 主要试剂与工具酶

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；Taq plus DNA 聚合酶、T4 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I、*Xho* I 购自 Fermentas 公司；HRP 标记羊抗兔 IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司；Ni-NTA resin 柱购自上海生工生物工程公司。

3%氯化钠碱性蛋白胨水、LB 肉汤、营养琼脂、TCBS 均购自于北京陆桥技术有限责任公司；dNTP、10×PCR Buffer、10×R Buffer、T4 Buffer、卡那霉素、琼脂糖粉、DNA Marker、蛋白质分子量标准 Marker、6×DNA Loading Buffer、2×SDS-PAGE Loading Buffer 均购自于上海生工生物工程公司；弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 sigma 公司；三羟甲基氨基甲烷、冰乙酸、乙二胺四乙酸二钠、溴化乙锭、葡萄糖、氢氧化钠、乙酸钾、苯酚、氯仿、乙醇、氯化钙、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷、30%聚丙烯酰胺、盐酸、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、四甲基乙二胺、甘氨酸、考马斯亮蓝 R-250、甲醇、硫酸镍、咪唑、脲、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、溴酚蓝、氨水、碳酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、氯化钾、吐温-20、牛血清白蛋白、硫酸铵、硫酸等均购自于中国医药上海化学试剂公司。

2.1.3 主要溶液的配制：

碱裂解液 I：称取 1.98 g 葡萄糖、0.74 g 乙二胺四乙酸二钠、0.61 g 三羟甲基氨基甲烷溶于去离子水中，以盐酸调 pH 至 8.0，定容至 200 mL，灭菌后 4℃ 保存。

碱裂解液 II：1 mL 体系由 20 μL 的 NaOH (10 M, 更改成 10 mol/L)，100 μL 的 SDS (m/v=1%)，880 μL 的去离子水配制，要求现用现配。

碱裂解液 III：称取 29.43 g 乙酸钾，量取 11.5 mL 冰乙酸溶于去离子水中，定容至 100 mL，灭菌后 4℃ 保存。

考马斯亮蓝染色液：称取 0.6 g 考马斯亮蓝 R250，量取 150 mL 甲醇、30 mL 冰乙酸，溶于 120 mL 去离子水。

考马斯亮蓝脱色液：量取 100 mL 冰乙酸、50 mL 乙醇、850 mL 去离子水，混匀。

5×SDS-PAGE 电泳缓冲液：称取 15.1 g 三羟甲基氨基甲烷、94.0 g 甘氨酸、5.0 g 十二烷基硫酸钠，溶于去离子水中，定容到 1 L。

抗原包被缓冲液：称取 0.159 g 碳酸钠、0.293 g 碳酸氢钠，溶于去离子水中，调 pH 至 9.6，定容至 100 mL。

饱和硫酸铵溶液：称取硫酸铵 400 g，以 50-80℃ 去离子水 500 mL 溶解，搅拌 20 min，过滤冷却后用浓氨水调 pH 至 7.4。

2.1.3 主要仪器

Centrifuge 5424R 台式高速冷冻离心机购自艾本德 (Eppendorf) 中国有限公司；UV-2100 紫外可见光分光光度计购自尤尼柯 (上海) 仪器有限公司；Bio-Rad 凝胶成像

分析系统、Mini-protein Tetra System、C1000 Thermal Cycler PCR 仪购自美国伯乐 (Bio-Rad) 公司；FL-7000 荧光分光光度计购自日本日立公司；FD-1CE 冷冻干燥机购自北京德天佑科技发展有限公司；JEM-2100 (HR) 加速电压 200KV 购自日本 (JEOL) 公司；NICOLET NEXUS 470 FTIR 购自赛默飞世尔 (Thermo) 公司；KS-900 超声波细胞粉碎机购自宁波科生仪器厂；OD-1000+ Onedrop Spectrophotometer 购自上海采邑生物科技有限公司；Multiskan MK3 酶标仪购自赛默飞世尔 (Thermo) 公司；Htpot50 Dry Bath 购自艾本森 (Abson) 科学仪器集团；电热鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅购自常州荣冠实验分析仪器厂；SW-CJ-1FD 洁净工作台购自苏州尚田洁净技术有限公司；ZD-85 气浴恒温振荡器购自常州恒隆仪器有限公司；Direct-Q3 超纯水系统购自美国 (Millipore) 公司；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器购自巩义市予华仪器有限责任公司；DHP -420 电热恒温培养箱购自金坛市新航仪器厂；SYQ-DSX-280B 不锈钢高压灭菌锅购自上海申安医疗器械厂；Φ2200 Sanpure Ultrasonic Cleaner 购自无锡市科洁超声电子设备有限公司；85-1 磁力搅拌器购自巩义市予华仪器有限责任公司；GL-88B 旋涡混合器购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司；AR224CN 电子天平购自奥豪斯仪器 (中国) 有限公司；Starter 3C 实验室 pH 计购自奥豪斯仪器 (中国) 有限公司。

2.3 实验原理

2.3.1 抗体与氨基化磁珠连接原理

由水热-溶剂热方法制备氨基化磁性纳米粒子 (amino-modified MNPs)，加入终浓度为 5% 的戊二醛后，伯胺基团和醛基发生缩合反应。该反应机理是胺的孤对电子先进攻羰基发生亲核加成，得到半缩醛胺 (-C(OH)(NHR)-) 中间体，而后继续消除一分子水得到亚胺。后与抗体反应，免疫球蛋白 (IgG) 上的氨基末端与戊二醛的另一醛基发生缩合反应，从而组装形成免疫磁珠。

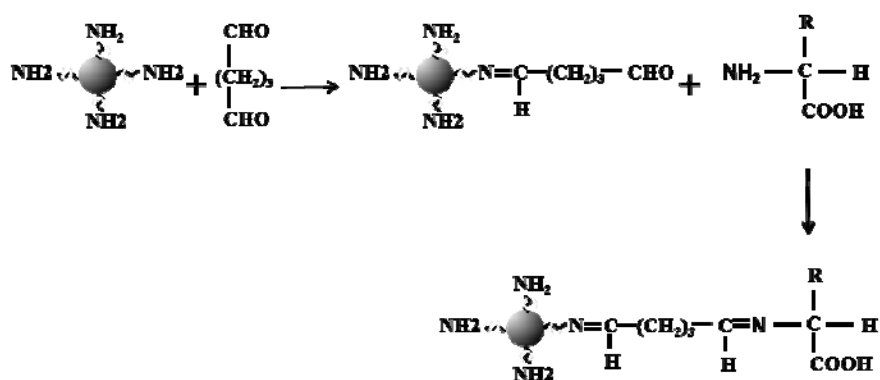


图 2-1 抗体与氨基化磁珠连接图

Fig.2-1 The synthesis path of antibody and amine-functionalized Fe_3O_4

2.3.2 基于磁分离、上转换荧光材料标记的 *V. parahaemolyticus* 检测方法原理

基于磁分离、上转换荧光材料标记的 *V. parahaemolyticus* 检测方法采用“三明治”夹心结构，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 *V. parahaemolyticus* 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。

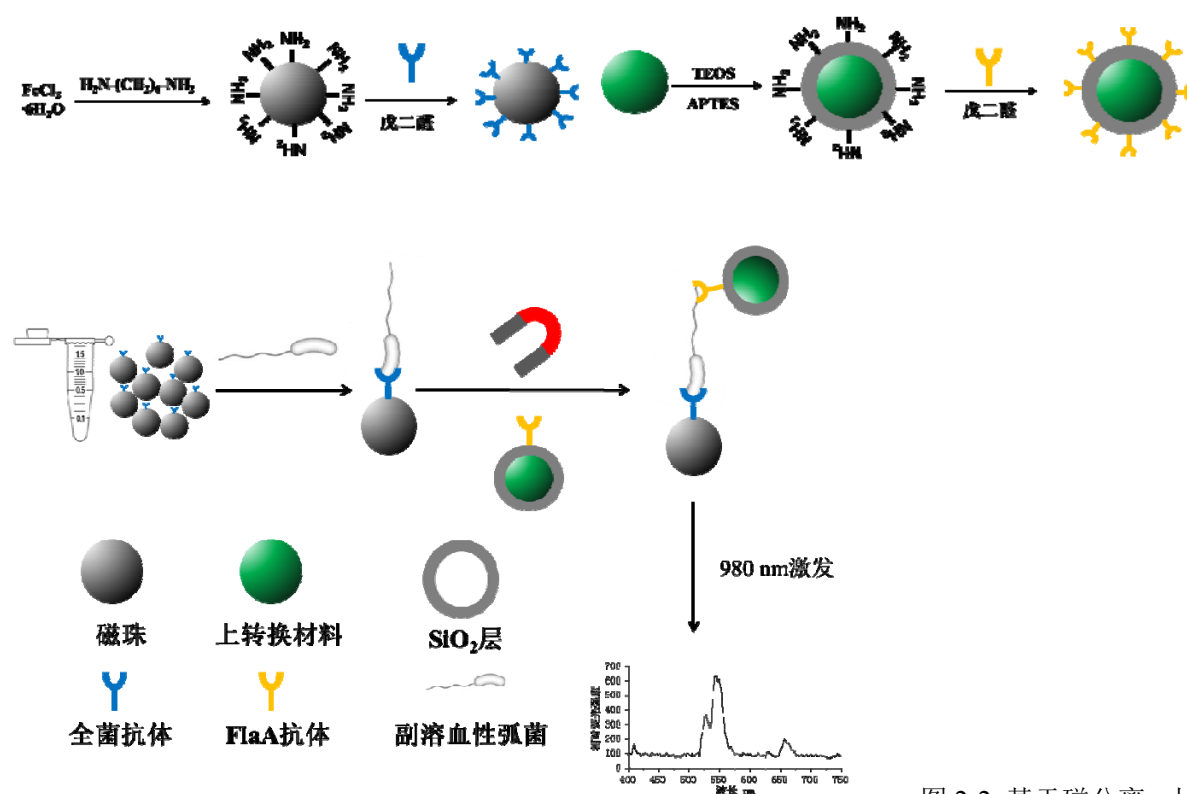


图 2-2 基于磁分离、上转

换材料发光的 *V. parahaemolyticus* 检测方法原理图

Fig.2-2 Schematic diagram of *V. parahaemolyticus* detection method base on immunomagnetic separation and upconversion luminescence

2.4 实验方法

2.4.1 菌株的复苏（更改为“活化”）与培养鉴定

贮存于 -80°C 甘油管中的 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株，用 3% 氯化钠碱性蛋白胨水进行活化培养，在选择性培养基 TCBS 上平板划线鉴定菌落形态是否正确。再进行革兰氏染色镜检判断其是否为革兰氏阴性弧菌。

2.4.2 重组表达载体的构建

2.4.2.1 副溶血性弧菌 FlaA、OmpU、OmpW 编码基因的扩增

将 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 接种于 3%氯化钠碱性蛋白胨水中,摇床 200 r/min 振荡培养 12 h。试剂盒提取其基因组 DNA 并进行琼脂糖凝胶电泳验证。根据 GenBank 上发表的鞭毛蛋白 A (FlaA) 的基因序列 GI:256750559、外膜蛋白 U (OmpU) 的基因序列 GI:297242388 和外膜蛋白 W (OmpW) 的基因序列 GI:256750557 设计引物 (登录号为: GQ433373、HM042874、GQ433372.1)。

表 2-1 引物设计表 (基因小写开头, 斜体, 另外 1131bp 是什么意思? 表格格式不对)

Tab.2-1 The primer design table		
目的基因	引物	酶切位点
FlaA	上游引物: 5'-GCCCCCCCATGGCTATGGCGATTACGTTAATACT-3'	<i>Nco</i> I
1131bp	下游引物: 5'-AAAAAACTCGAGGCCCAACAAGCTTAGCGCT-3'	<i>Xho</i> I
OmpU	上游引物: 5'-GGGCCCCATATGAAGAAGACTCTATTGGCTCTT-3'	<i>Nde</i> I
993bp	下游引物: 5'-GGTATATCTCGAGGAAGTCGTAACGTAGACCGAG-3'	<i>Xho</i> I
OmpW	上游引物: 5'-GTATATCTCGAGGAAGTTGTAACCGCCGCT-3'	<i>Xho</i> I
645bp	下游引物: 5'-GGGCCCCATATGCATAAACAAGGTGACTTCGTT-3'	<i>Nde</i> I

PCR 体系为: 模板 DNA 1 μ L, 上游引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, dNTP (2.5 mmol/each) 4 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, Taq plus 酶 0.5 μ L, 水 37.5 μ L。PCR 循环参数为: 初始变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 主循环 95 $^{\circ}$ C 45 s, FlaA、OmpU、OmpW 基因对应退火温度分别为 52 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、51 $^{\circ}$ C, 退火时间为 45 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸时间分别为 66 s、58 s、40 s, 30 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2.4.2.2 琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物和切胶回收

制胶: 称取琼脂糖粉 0.12 g, 加入三角瓶中, 量取 12 mL 1 \times TAE 缓冲液溶解琼脂糖粉, 放入微波炉加热至无色透明, 加入 10 μ L EB 溶液 (0.5 μ g/mL), 稍混匀。在胶板中插入梳子, 倒板, 从一角缓慢加入, 至胶凝固, 取出梳子。将 1 \times TAE 溶液倒入电泳池中, 以没过胶 1 mm 为佳。点样: DNA Marker 2 μ L, 样品 6-8 μ L 加上样缓冲液 2 μ L 混匀上样。点样孔两侧尽量不用, 电压 93 V, 电泳 35 min 左右。用凝胶成像仪观察样品条带位置, 与 Marker 比较其大小, 判断是否扩增成功。若确定扩增成功则用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目的基因进行切胶回收, 回收后再次进行琼脂糖凝胶电泳验证回收产物的质量和效率。

2.4.2.3 质粒 pET24a、pET28a 抽提

取含有所需质粒的相应大肠杆菌 12 h 培养液倒入 2 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 下 12000 rpm 离心 30 s。弃上清, 将离心管倒置于卫生纸上, 使液体流尽。菌体沉淀重新悬浮于 100 μ L 碱裂解液 I 中 (需剧烈震荡), 室温下放置 5 min, 加入新配置的碱裂解液 II 200 μ L, 快速温和地颠倒离心管数次, 以混匀内容物, 室温放置 10 min 以上。然后缓慢加入 150 μ L 预冷的碱裂解液 III, 倒置离心管并温和振荡 10 s, 使沉淀混匀, 冰浴 5 min 以上, 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 5 min。上清液移入干净的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的酚/氯仿 1:1 (V:V)

溶液，振荡混匀，4℃下 12000 rpm 离心 5 min。将水相小心移入干净的 1.5 mL 离心管中，加入 2 倍体积的预冷无水乙醇，振荡混匀后 4℃放置 15 min 以上，然后 4℃ 12000 rpm 离心 5 min。弃上清，将管口敞开倒置于卫生纸上使所有液体流出，加入 1 mL 70%乙醇，洗沉淀一次，4℃ 12000 rpm 离心 3 min。吸除上清液，将离心管倒置于卫生纸上使液体流尽，干燥 10 min 至透明。最后将沉淀溶于 20 μ L TE 缓冲液(pH8.0, 含 20 μ g/mL RNAase)中，取 2 μ L 进行琼脂糖电泳验证，若条带大小位置正确并清晰明亮，则储存于-20℃等待酶切。

2.4.2.4 目的基因、质粒双酶切

将切胶回收得到的目的基因 FlaA、抽提得到的质粒 pET28a 使用限制性内切酶 *Nco* I、*Xho* I 进行双酶切。30 μ L 双酶切体系为：*Nco* I 2 μ L，*Xho* I 1 μ L，pET28a（或目的基因 FlaA）10 μ L，10 \times R Buffer 3 μ L，水 14 μ L。将 30 μ L 双酶切体系加入离心管中，混匀后放置在 37℃水浴锅内酶切 12 h。酶切结束后，先取 2 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳，对应 DNA Marker 比较判断其位置大小是否正确。若正确则用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对其进行切胶回收，回收后再次进行琼脂糖凝胶电泳验证回收产物的质量和效率。若电泳条带明亮，位置正确则储存于-20℃等待连接。酶切后目的基因 FlaA 大小应为 1.1 kbp 左右，pET28a 应为 5.3 kbp 左右。参照该法对目的基因 OmpU、OmpW，质粒载体 pET24a 使用限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 进行双酶切，并进行琼脂糖凝胶电泳验证^[52]。酶切后目的基因 OmpU 大小应为 0.9 kbp 左右，OmpW 在 0.6 kbp 左右，pET24a 应为 5.2 kbp 左右。

2.4.2.5 表达载体的构建

将回收得到的目的基因 FlaA 酶切产物与质粒 pET28a 酶切产物进行连接^[51]，构建表达载体 pET28a-FlaA。10 μ L 连接体系为：FlaA 酶切产物 7 μ L，pET28a 酶切产物 1 μ L，T4 连接酶 1 μ L，T4 Buffer 1 μ L。将 10 μ L 连接体系加入 EP 管中，混匀后放入 16℃恒温反应 8 h。得到重组表达载体 pET28a-FlaA。参照该法，连接 OmpU 酶切产物与 pET24a 酶切产物，OmpW 酶切产物与 pET24a 酶切产物，得到重组表达载体 pET24a-OmpU，pET24a-OmpW。

2.4.2.6 大肠杆菌的感受态细胞制备和转化

制备：从-80℃活化 *E.coli* DH5 α ，划 LB 平板，37℃培养过夜。然后从培养平板上挑取单菌落接种到 LB 液体培养基试管，37℃ 200 r/min 过夜培养。将过夜培养的菌液接种到含有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中（按 1%比例接种即 0.5 mL）放置于摇床中 200 r/min，37℃振荡培养 1-2 h，从 1 h 开始测 OD 值，OD₆₀₀ 到 0.2-0.3 时，转入 50 mL 离心管，冰浴 10 min 左右。以 4000 rpm，4℃冷冻离心 10 min 收集菌体。去除上清，用 0.1 mol/L 10 mL CaCl₂ 溶液重悬菌体，冰浴 20 min 左右。再以 4000 rpm，4℃冷冻离心 10 min 收集菌体。去除上清，将收集的菌体用 1 mL 0.1 mol/L CaCl₂ 甘油溶液

重悬，分装成 100 μ L 每管于-80℃保存。同法，制备得到 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞于-80℃保存。

转化：取一管-80℃保存的 *E.coli* DH5 α 感受态细胞，置冰上融化。向其中加入连接产物重组表达载体 pET28a-FlaA (10 μ L 经短暂离心)，缓慢吹吸以混匀内容物，置冰浴 30 min。将离心管置于 42℃水浴锅中热激 90 s，然后再迅速置冰浴 2 min，该过程切忌摇动离心管。然后再向每个离心管中加入 500 μ L LB 液体培养基（不含卡那霉素），混匀后置于 200 r/min 37℃摇床振荡培养 45 min 以上。该操作目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，从而使菌体复苏。将离心管 5000 rpm 离心 5 min，吸取上清至余 100-200 μ L，吹吸重悬，涂布含卡那霉素的 LB 营养琼脂平板，再将平板置于 37℃直至液体被吸收，倒置平板，37℃培养 12-16 h。观察是否有菌落生长，挑取 10 个生长状况良好的单菌落，用 LB 液体培养基培养过夜。以菌液为 PCR 模板，按照目的基因扩增体系与参数进行 PCR 验证重组表达载体是否构建转化成功。若琼脂糖凝胶电泳结果显示有目的基因条带，则可将该菌液抽提 pET28a-FlaA 后，同法转化表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。将其涂布含卡那霉素的 LB 营养琼脂培养平板，37℃培养 12-16 h，挑单菌落进行增菌培养。从该菌液中抽提重组表达载体 pET28a-FlaA，参照上法进行双酶切并进行琼脂糖凝胶电泳验证。若能得到目的基因 FlaA 条带和质粒载体 pET28a 条带，则证明该菌株为阳性克隆菌。将菌液交由上海博尚生物技术有限公司进行核苷酸测序。重组表达载体 pET24a-OmpU，pET24a-OmpW 进行同法操作^[74]。

2.4.2.7 表达宿主菌种保存

将转化成功的表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 用 LB 液体培养基增菌培养 12 h，按 1:1 体积比与 30%甘油混合，保存于-80℃。

2.4.3 外源蛋白表达与纯化

2.4.3.1 蛋白表达

取-80℃保存的 *E. coli* BL21 (DE3) (含质粒 pET28a)，*E. coli* BL21 (DE3) (含重组子 pET28a-FlaA) 划 LB 平板（含卡那霉素），16 h 后，挑取单菌落在含有 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 200 r/min 37℃振荡培养过夜。次日，将过夜培养的菌液按照 1:100 (V:V) 加入 100 mL LB 液体培养基中（含 100 μ g/mL 卡那霉素），200 r/min 37℃振荡培养至 OD₆₀₀=0.6^[75]。向菌液中加入的 100 μ L IPTG（异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 1 mmol/L）溶液，继续培养 4-5 h。4℃下 5000 rpm 离心 10 min，收集菌体。用 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液洗涤菌体一次。离心后用 1×Ni-NTA 缓冲液（含 20 mM/L 咪唑）10 mL 重悬菌体。冰浴 30 min 后，将菌悬液在冰浴中超声破碎(400 W，10 min)，然后 12000 rpm，4℃离心 10 min。分别取两组上清、沉淀进行 SDS-PAGE 电泳验证蛋白是否表达成功，以及蛋白表达形态为可溶性蛋白或是包涵体。同法用于 OmpU、OmpW 蛋白的表达^[76]。

2.4.3.2 SDS-PAGE 验证

首先将玻璃板固定在制胶架上，配制 12%分离胶 5 mL：蒸馏水 1.0 mL，30%聚丙烯酰胺溶液 2.0 mL，1M Tris-HCl 溶液（pH8.8）1.9 mL，10% SDS 50 μ L，10% AP（过硫酸铵）50 μ L，TEMED（四甲基乙二胺）2 μ L。混匀后加入玻璃板间，再以蒸馏水液封（缓慢、小心加入），放置 40 min 左右待胶完全凝固后，将上层蒸馏水倾倒，用滤纸吸去残余水。配制 5%浓缩胶 2 mL：蒸馏水 1.4 mL，30%聚丙烯酰胺溶液 0.33 mL，1M Tris-HCl 溶液（pH6.8）0.25 mL，10% SDS 15 μ L，10% AP 15 μ L，TEMED 1.5 μ L。混匀后加入玻璃板间，插上梳子，放置 40 min 左右待胶完全凝固后将梳子拔出。取下玻璃板放置在电泳槽内，按标示刻度加 Tris-甘氨酸电泳缓冲液。将 10 μ L 样品和 Protein Marker 分别按 1:1(V:V)与上样缓冲液混匀，煮沸 10 min，经短暂离心后加入上样孔。调节电压 80 V 约 20 min 后（至条带跑过浓缩胶与分离胶结合线），改变电压至 120 V，继续电泳至条带达到分离胶底部，停止电泳。染色：小心取下凝胶放入大的平皿中，加入考马斯亮蓝 R250 染色液，没过凝胶即可，在 37℃摇床上缓慢摇动染色 30 min。脱色：回收考马斯亮蓝染色液，用自来水冲洗凝胶去掉残留的染色液，加入脱色液没过凝胶，在 37℃摇床上缓慢摇动脱色 3-4 h。脱去背景色后，可将各蛋白样品条带与 Protein Marker 条带位置进行比较，判断表达的目标蛋白大小是否与理论值相同^[77]。

2.4.3.3 可溶性蛋白纯化

由于重组表达载体带有 His 标签，所以选用 Ni-NTA resin 柱（上海生工）进行纯化。洗脱程序如下：（注意排版）

- 1、加入 10 倍柱体积的 Buffer（含 20 mM/L 咪唑）以平衡柱子，控制流速 1 mL/min。
- 2、加入样品溶液，控制流速 0.5 mL/min，收集洗出液。
- 3、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 20 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 4、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 50 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 5、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 100 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 6、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 150 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 7、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 200 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 8、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 250 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 9、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 350 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 10、加入 5-10 倍柱体积的 Buffer（含 500 mM/L 咪唑），控制流速 1 mL/min，收集洗出液。
- 11、加入 10 倍柱体积不含咪唑的 Buffer 溶液，平衡柱子后，用 2 mL 20%乙醇清洗柱子，并将其保存在 20%乙醇中。过柱纯化蛋白后，将收集的各梯度洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳验证，确定目标蛋白的洗脱梯度^[78]。

2.4.3.4 包涵体蛋白纯化

经蛋白表达，超声波破碎后，若蛋白表达成包涵体则存在于沉淀当中，不能进行直接纯化。需要先用脲使目标蛋白变性，经 Ni 柱纯化后再透析复性。诱导表达目标蛋白后，摸索加入脲使蛋白变性的最适浓度，设置浓度梯度优化实验，分别加入 2 M/L，4

M/L, 6 M/L, 8 M/L 的脲。柱纯化洗脱步骤参照可溶性蛋白纯化洗脱步骤,但需要在 Buffer 中加入最适浓度的脲。过柱纯化蛋白后,将收集的各梯度洗脱液进行 SDS-PAGE 验证,确定目标蛋白的洗脱梯度。

2.4.3.5 目标蛋白真空冷冻干燥

经纯化的目标蛋白溶液装入纤维素透析袋 8000 (上海生工) 中, 4℃ 下在 0.02 mol/L PBS (pH7.4) 溶液中磁力搅拌透析 12 h, 每两小时换新鲜透析液, 以除去洗脱蛋白液中的高浓度盐离子和脲。透析结束后, 将透析袋中的蛋白溶液转移至 50 mL 离心管中, 放入真空冷冻干燥机进行冷冻干燥。干燥后的蛋白粉末保存于 4℃ 冰箱。

2.4.4 动物免疫及抗血清制备

2.4.4.1 抗原准备

免疫实验分为全菌免疫组和外源蛋白免疫组。全菌抗原制备: 取 -80℃ 保存的 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株, 划 LB 营养琼脂平板, 37℃ 过夜培养后挑单菌落于 LB 液体培养基中在 200 r/min 37℃ 下进行振荡增菌培养。12 h 后, 进行菌落计数。用生理盐水配制成 1×10^{10} cfu/mL 的菌悬液, 加入 0.05% 甲醛, 37℃ 灭活 24 h。5000 rpm 离心 10 min, 用生理盐水洗三次除去残留的甲醛溶液, 再用 1 mL 生理盐水重悬菌体, 取 50 μL 涂布 LB 营养琼脂进行无菌试验, 证明其已被灭活。蛋白抗原制备: 将 4℃ 保存的 FlaA、OmpU、OmpW 蛋白干粉用生理盐水配制成 1 mg/mL 蛋白溶液^[79]。用 BCA 蛋白定量试剂盒 (北京庄盟) 测定蛋白浓度^[80]。

2.4.4.2 实验动物准备

健康家兔 8 只, 雌性, 2-2.5 kg/只(四月龄)。观察一周后, 若生长情况良好, 可进行免疫。

2.4.4.3 免疫方案及方法

将 8 只家兔平均分为四组, 分别进行全菌免疫、FlaA 蛋白免疫、OmpU 蛋白免疫、OmpW 蛋白免疫。在免疫前, 由各家兔耳缘静脉分别取血 2 mL, 取血前先将家兔耳缘静脉处的绒毛剪去, 用酒精棉球擦拭, 手指轻弹以让其充血。取一支 2 mL 无菌注射器将针头平行于血管扎入, 缓慢抽取血液。在 37℃ 静置 1 h 后, 4℃ 静置过夜后 4000 rpm 离心 10 min 分离血清, 保存于 -80℃ 留作阴性对照。首次免疫, 用弗氏完全佐剂与抗原溶液 1:1(V:V) 乳化后经家兔腹股沟进行多点注射免疫(1 mg/只), 30 天后进行加强免疫, 用弗氏不完全佐剂与抗原溶液 1:1(V:V) 乳化经家兔腹股沟多点注射免疫(1 mg/只), 20 天后进行末次免疫, 取抗原溶液 (500 μg), 经家兔耳缘静脉注射免疫, 10 天后耳缘静脉采血, 分离血清, 用间接 ELISA 法测定抗血清效价, 效价达标后颈动脉取血, 离心分离血清, 经饱和硫酸铵盐析沉淀法纯化后 -80℃ 保存^[80]。

2.4.4.4 抗血清效价测定

抗原稀释于包被缓冲液中, 包被 96 孔板, 浓度为 2-5 μg/mL, 加入量为 100 μL/孔, 4℃ 孵育 12 h (设空白对照, 只加包被缓冲液)。用洗涤液洗板三次, 拍干。每孔加 200 μL

BSA (3%) 封闭液, 37℃封闭 2 h, 洗涤液洗板 3 次, 拍干。将抗血清稀释成 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷, 1:10⁸, 1:10⁹。加样品和阴性对照 (1:1000 稀释) 每孔 100 μL, 37℃恒温孵育 1 h。洗涤液洗板三次, 拍干。加 HRP 标记羊抗兔 IgG (1:5000 稀释) 100 μL /孔, 37℃孵育 40 min, 洗涤液洗涤三次, 拍干。加显色剂 TMB (四甲基联苯胺), 100 μL /孔孵育 10-20 min。加 2 M 稀硫酸 50 μL /孔终止反应。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值^[81-82]。

2.4.4.5 家兔颈动脉取血

配制 20%乌拉坦溶液, 称量家兔体重, 按照 5 mL/kg 体重由耳缘静脉缓慢注射麻醉, 至家兔呼吸平稳, 手指靠近眼球而眼睑无眨眼反应。将麻醉后的家兔仰面固定在解剖台上, 用绳子将其四肢绑定于台脚, 同时将门牙固定于台杆上。若麻醉不够, 可在腹部补注射 5 mL 麻醉剂。用水打湿家兔颈部菱形区域, 贴近皮肤剪毛至裸肉。用两个镊子拈起皮肤, 以钝头剪剪开家兔皮肤、粘膜, 找到气管, 并在一侧确定颈动脉位置, 挑起并分离颈动脉。用泡过生理盐水的细线扎紧截断远心端, 用动脉夹夹住近心端, 在靠近远心端处用尖剪剪破斜面小口, 在颈动脉内插入细管, 以细线固定细管。松开近心端的动脉夹, 弃前 1 mL 动脉血不用, 然后用 50 mL 离心管开始收集血液, 注意贴管壁收集^[83]。

2.4.4.6 抗体纯化

家兔颈动脉取血后, 按上法分离血清, 保存于-80℃。各组血清取 5 mL 加等体积生理盐水, 混匀后逐滴加入饱和硫酸铵溶液 10 mL, 边加边搅拌。在 4℃静置 3 h, 使其充分沉淀。4℃ 3500 rpm 离心 20 min, 弃上清。再用 10 mL 生理盐水溶解沉淀, 逐滴滴加饱和硫酸铵溶液 5 mL, 在 4℃静置 3 h, 使其充分沉淀。4℃ 3500 rpm 离心 20 min, 弃上清。用 5 mL 0.02 mol/L PBS (pH7.4) 溶液溶解沉淀, 将抗体溶液装入纤维素透析袋 8000 (上海生工) 中, 4℃下在 0.02mol/L PBS (pH7.4) 溶液中磁力搅拌透析 48 h, 每两小时换新鲜透析液, 以除去抗体溶液中的硫酸铵。透析结束后, 取纯化前的抗血清和纯化后的抗体溶液进行 SDS-PAGE 电泳验证纯化效果。用 BCA 蛋白定量试剂盒 (北京庄盟) 测定抗体浓度。

2.4.5 间接 ELISA 法评价抗体

2.4.5.1 效价测定

按 2.4 所用方法对纯化后的全菌抗体、FlaA 抗体、OmpU 抗体、OmpW 抗体测定效价。

2.4.5.2 棋盘滴定法确定抗体、抗原最适工作浓度

设 10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ cfu/mL 四个抗原菌液浓度梯度。将全菌抗体、FlaA 抗体、OmpU 抗体、OmpW 抗体设 1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 四个稀释度, 并设置阴性对照和空白对照。以测得的 OD₄₉₂ 吸光值为 1.0 左右, 且 P/N 值 (阳性 A₄₉₂ 值-空白 A₄₉₂

值) / (阴性 A₄₉₂ 值-空白 A₄₉₂ 值) 最大的抗原浓度和抗体稀释度作为抗原、抗体最适工作浓度^[84]。

2.4.5.3 敏感性实验

在确定了各抗体的最适工作浓度后, 将抗原即 *V. parahaemolyticus* 设 10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ cfu/mL 六个浓度梯度。用最适稀释度的抗体, 通过间接 ELISA 实验, 测定抗原检测的灵敏度。

2.4.5.4 特异性实验

选取常见食源性致病菌: 大肠杆菌 *E.coli* ATCC 25922、单核细胞增生李斯特氏菌 *L.monocytogenes* CMCC (B) 54002、鼠伤寒沙门氏菌 *S.typhimurium* CMCC50013、福氏志贺氏菌 *S.dysenteriae* CMCC51302、金黄色葡萄球菌 *S.aureus* ATCC6538 作为特异性实验的对比菌株。将以上五种菌株按照各抗体对应的抗原最适工作浓度包被于 96 孔板上, 选用各抗体的最适稀释度进行实验。根据 P/N 大小来判断抗体的特异性。

2.4.5.5 流式细胞术评价抗体特异性

取五种对比菌株及 *V. parahaemolyticus* 37℃培养过夜, 分别挑取单菌落用 LB 液体培养基增菌至 10⁸ cfu/mL。各种菌液均取 1 mL 分别加入 1.5 mL 离心管中, 4000 rpm 离心 10 min, 用 0.02 mol/L PBS(pH7.4)溶液洗涤 2 次。然后用 1 mL 各抗体溶液(0.1 mg/mL)重悬菌体, 混匀后 37℃孵育 1 h。4000 rpm 离心 10 min, 用 0.02 mol/L PBS (pH7.4)溶液洗涤 2 次。再用 100 μL FITC 标记的羊抗兔 IgG (10 μg/mL) 溶液重悬菌体。混匀后 37℃避光孵育 1 h。4000 rpm 离心 10 min, 用 0.02 mol/L PBS (pH7.4)溶液洗涤 2 次后, 用 100 μL PBS 重悬菌体。使用流式细胞仪测定样品中 FITC 的信号值, 按每 10000 个细菌细胞中含有 FITC 信号的细胞个数进行比较以评价各抗体的特异性^[85-87]。

2.4.6 免疫磁珠的制备

2.4.6.1 氨基化磁珠的制备与表征

本实验采用水热-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: 1、称取 1, 6-己二胺 6.5 g, 无水醋酸钠 2.0 g, FeCl₃·6H₂O 1.0 g 溶于 30 mL 乙二醇加入 100 mL 圆底烧瓶中。50℃剧烈搅拌 0.5 h 左右至溶液较为透明, 将溶液转移至带聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中, 放置在 198℃高温反应 6 h。反应结束后取出自然冷却至室温, 将反应釜中液体倒在烧杯中, 用无水乙醇和纯水交替清洗三次, 将黑色固体在 50℃条件下干燥过夜, 得到氨基化磁性纳米粒子。称取 10 mg 氨基化磁性纳米粒子放在 10 mL 0.01 mol/L 的 PBS (pH7.4) 溶液中, 4℃存放备用。用透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 对氨基化的磁珠进行表征^[88-89]。

2.4.6.2 磁珠与全菌抗体的结合与表征

(1) 结合时间的优化将 4℃保存的 10 mL PBS (含 10 mg 磁珠) 超声 10 min 使其均匀分散, 分装成 1 mL 每管。取一管磁珠 (1 mg/mL) 将 250 μL 25%的戊二醛 (终浓度为

5%) 加入其中, 37℃缓慢振荡反应 1 h。外加磁场分离磁纳米粒子并弃去未连接上的戊二醛溶液, 用 PBS 清洗三次以去除残留的及物理吸附的戊二醛溶液。加入 1 mL 的全菌抗体 (1 mg/mL) 溶液, 37℃振荡孵育, 每隔 20 min 外加磁场分离磁纳米粒子, 并使用 onedrop 微量紫外分光光度计监测上清中的抗体浓度变化。当上清中抗体浓度趋于恒定, 则可以时间为横轴, 抗体吸附量为纵轴绘制结合时间曲线, 确定最优结合时间^[90-91]。

(2) 结合抗体初始浓度的优化

设定 50、100、200、300、400、500、600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 初始抗体的九个浓度梯度。37℃缓慢振荡反应 0.5 h, 测上清中抗体浓度 A。外加磁场分离磁纳米粒子后, 吸去未连接上的抗体溶液, 再加入 1 mL PBS 超声并振荡 2 min 以使物理性吸附在磁纳米粒子上的抗体重新溶于 PBS 中, 外加磁场分离后, 测定上清中抗体浓度 B。用 A-B 的值确定 1 mg 磁纳米粒子饱和连接抗体的绝对量, 确定最优的结合抗体初始浓度^[92]。

(3) 表征

用紫外分光光度计对连接上抗体的磁性纳米材料进行表征。

2.4.7 抗体的稀土发光上转换纳米粒子标记

2.4.7.1 稀土发光上转换纳米粒子的制备与表征

取 0.28 mmol 硬脂酸钇、0.7 mmol 硬脂酸镱、0.02 mmol 硬脂酸铒和 5 mmol 氟化钠溶于 10 mL 去离子水与 15 mL 无水乙醇、5 mL 油酸的均匀混合体系, 搅拌约 15 min 后转移至 50 mL 带聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中, 195℃反应 24 h。待其自然冷却降至室温后, 离心后取沉淀部分, 以无水乙醇清洗三次, 将黑色固体在 50℃条件下干燥 12 h, 得到稀土发光上转换纳米粒子。用 TEM、FT-IR、荧光分光光度计 (Fluorescence Spectrophotometer, FS) 对 UCNPs 进行表征^[93]。

2.4.7.2 稀土发光上转换纳米粒子的表面修饰与表征

取 20 mg UCNPs 溶于 60 mL 异丙醇中, 混匀后超声 40 min 以使其充分分散。在 35℃条件下加入 2.5 mL 氨水、20 mL 去离子水并强力搅拌, 将 20 mL 异丙醇和 50 μL 正硅酸乙酯 (TEOS) 混匀后逐滴加入混合溶液中, 反应 3 h。再将 30 mL 异丙醇和 200 μL 氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 混匀后逐滴加入混合溶液中, 反应 1 h。反应结束后, 室温下陈化 2 h, 离心分离沉淀。用无水乙醇清洗三次在 50℃条件下干燥 12 h, 得到氨基化 UCNPs。用 TEM、FT-IR 对氨基化 UCNPs 进行表征^[94]。

2.4.7.3 氨基化 UCNPs 与 FlaA 抗体的结合与表征

(1) 结合时间的优化

取 10 mg 氨基化的 UCNPs 溶于 10 mL PBS, 超声 10 min 使其均匀分散, 分装成 1 mL 每管。取一管氨基化 UCNPs (1 mg/mL) 将 250 μL 25% 的戊二醛 (终浓度为 5%) 加入其中, 37℃缓慢振荡反应 1 h。12000 rpm 离心 5 min 分离氨基化 UCNPs 并弃去未连接上的戊二醛溶液, 用 PBS 清洗三次以去除残留的及物理吸附的戊二醛溶液。加入 1 mL 的 FlaA 抗体 (1 mg/mL) 溶液, 37℃振荡孵育, 每隔 20 min 12000 rpm 离心分离氨基化

UCNPs, 并使用 onedrop 微量紫外分光光度计监测上清中的抗体浓度变化。当上清中抗体浓度趋于恒定, 则可以时间为横轴, 抗体吸附量为纵轴绘制结合时间曲线, 确定最优结合时间。

(2) 结合抗体初始浓度的优化

设定 50、100、200、300、400、500、600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 初始抗体的九个浓度梯度。37 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢振荡反应 1 h, 测上清中抗体浓度 A。12000 rpm 离心分离氨基化 UCNPs 后, 吸去未连接上的抗体溶液, 再加入 1 mL PBS 超声并振荡 2 min 以使物理性吸附在其上的抗体重新溶于 PBS 中, 离心分离后, 测定上清中抗体浓度 B。用 A-B 的值确定 1 mg 氨基化 UCNPs 饱和连接抗体的绝对量, 确定最优的结合抗体初始浓度。

(3) 表征

用紫外分光光度计对连接上抗体的 UCNPs 进行表征。

2.4.8 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 *V. parahaemolyticus* 6 h 培养液稀释成 1×10^3 cfu/mL、 5×10^3 cfu/mL、 1×10^4 cfu/mL、 5×10^4 cfu/mL、 1×10^5 cfu/mL、 5×10^5 cfu/mL 6 个浓度梯度。取组装好的免疫磁珠 (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 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 1 h, 外加磁场分离 MNPs-菌结合物, 用 PBS 清洗三次以去除未捕获的目标菌。取组装好的免疫 UCNPs (1 mg/mL) 200 μL 重悬 MNPs-菌结合物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 1 h, 外加磁场分离 MNPs-菌-UCNPs 结合物, 用 PBS 清洗三次以去除未结合的游离 UCNPs。用 100 μL PBS 重悬 MNPs-菌-UCNPs 结合物, 加入比色皿中, 在外接激发光源激发波长 980 nm, 发射波长 544 nm, 光电倍增管电压 700 V 条件下测定荧光强度。寻求荧光强度变化与目标菌浓度之间的关系。

2.4.9 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, 水产食品检验要求: 如须检验水产食品是否带染某种致病菌时, 鱼类的检样部位应采胃肠道和鳃等呼吸器官。本实验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 $^{\circ}\text{C}$, 15min), 然后用灭菌纱布将样品均液过滤三次, 再低速离心取上清液分成 5 管, 每管 1 mL。将 *V. parahaemolyticus* 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培养基 TCBS 平板计数; 按照 2.4.8 基于磁分离、上转换荧光标记的 *V. parahaemolyticus* 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。

第三章 结果与讨论

3.1 副溶血性弧菌 ATCC 17802 菌株的复苏及革兰氏染色镜检

本实验目标菌 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株在选择性培养基 TCBS 上平板划线鉴定菌落形态为稍隆起、边缘不整齐、光滑湿润的绿色菌落。进行革兰氏染色镜检，其在显微镜下呈弧形、红色，证明其为革兰氏阴性弧菌。（这步验证可以不要，因为既然是已知菌，就无需证明什么，如果要证明这个菌没错，这些结果是不够的）



图 3-1 选择性培养基 TCBS 平板鉴定 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株

Fig.3-1 Selective medium TCBS plate identification of *V. parahaemolyticus* ATCC17802



图 3-2 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株革兰氏染色镜检图

Fig.3-2 Gram staining microscopy diagram for *V. parahaemolyticus* ATCC17802

3.2 重组表达载体 pET28a-FlaA、pET24a-OmpU、pET24a-OmpW 的构建

以试剂盒提取的 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株的基因组为模板，经 PCR 扩增出 FlaA 1131 bp、OmpW 645bp、OmpU 993bp 大小的特异条带，分别克隆到 pET28a、pET24a 质粒载体上，成功构建重组表达载体 pET28a-FlaA、pET24a-OmpW、pET24a-OmpU。重组子经双酶切，在琼脂糖凝胶电泳图上出现两条干净条带，其中 1.1 kbp 附近条带与酶切 FlaA 基因条带位置相同，5.3 kbp 附近条带与酶切质粒 pET28a 条带位置相同；0.6 kbp 附近条带与酶切 OmpW 基因条带位置相同，1.0 kbp 附近条带与酶切 OmpU 基因条带位置相同，5.3 kbp 附近条带与酶切质粒 pET24a 条带位置相同(图 3-3)，并经测序验证。测序结果显示，重组表达载体中 FlaA、OmpW、OmpU 序列与 Genbank 报道完全相同。FlaA 基因含有一个 1131 bp 的开放读码框 (ORF)，编码 376 个氨基酸，预测蛋白分子量为 41.78 kD；OmpW 基因含有一个 645 bp 的开放读码框 (ORF)，编码 215 个氨基酸，预测蛋白分子量为 23.58 kD；OmpU 基因含有一个 993 bp 的开放读码框 (ORF)，编码 331 个氨基酸，预测蛋白分子量为 35.63 kD。

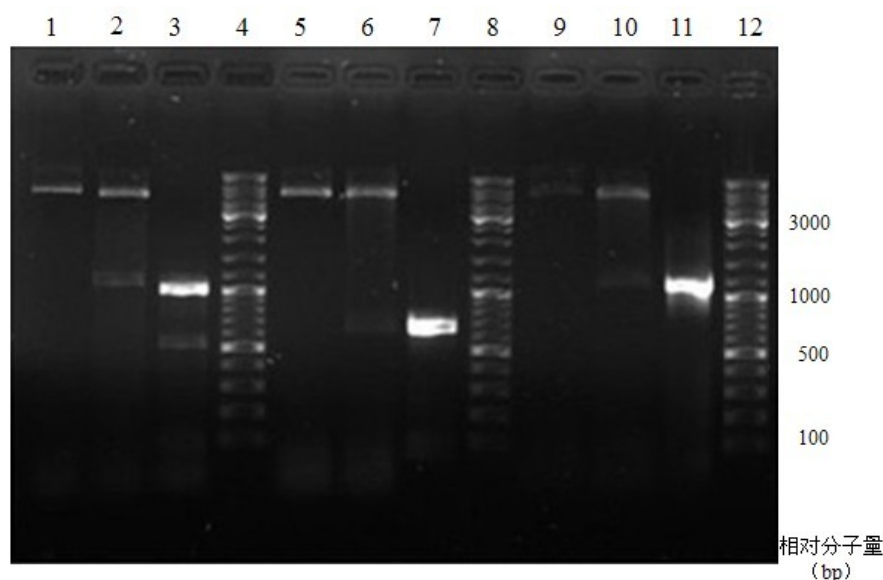


图 3-3 琼脂糖凝胶电泳分析酶切重组表达载体 pET28a-FlaA、pET24a-OmpW、pET24a-OmpU (泳道 1、5, 酶切质粒 pET24a; 2, 酶切 pET24a-OmpU; 3, 酶切基因 OmpU; 4、8、12, 10000bp DNA Fragment 标准分子量 Marker; 6, 酶切 pET24a-OmpW; 7, 酶切基因 OmpW; 9, 酶切质粒 pET28a; 10, 酶切 pET28a-FlaA; 11, 酶切 FlaA 基因;)

Fig. 3-3 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant vector pET28a-FlaA, pET24a-OmpW, pET24a-OmpU enzyme digestion result

(Lane 1,5, enzyme digestion of pET24a; Lane2, enzyme digestion of pET24a-OmpU; Lane 3, enzyme digestion of OmpU ; Lane 4, 8,12, 10000bp DNA Fragment standard molecular Marker; Lane 6, enzyme digestion of pET24a-OmpW; Lane 7, enzyme digestion of OmpW; Lane 9, enzyme digestion of pET28a; Lane 10, enzyme digestion of pET28a-FlaA; Lane 11, enzyme digestion of FlaA ;)

3.3 目标蛋白的表达与纯化

3.3.1 FlaA 蛋白的表达与纯化

根据袁野等人^[65]研究 FlaA 蛋白诱导表达的最优条件, 200 r/min 37℃振荡培养 5 h。收集到的 *E. coli* BL21 (DE3) (含重组子 pET28a-FlaA) 菌体经超声波破碎后, 离心分离取上清、沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳并与 *E. coli* BL21 (DE3) (含质粒 pET28a) 菌体破碎液的蛋白组成进行比较。电泳结果显示上清和沉淀均在 42 kD 附近出现了一条新的蛋白条带, 而上清中该蛋白条带更为显著。证明在 *E. coli* BL21 (DE3) (含重组子 pET28a-FlaA) 菌体破碎液的上清和沉淀中均存在有 FlaA 蛋白, 而大多数表达得到的 FlaA 蛋白为可溶性蛋白。采用 Ni-NTA resin 柱进行 FlaA 蛋白纯化, 其原理是: 重组 FlaA 蛋白上的组氨酸标签含有咪唑环可与过渡态金属 Ni 离子形成稳定的化学配位键, 因此能够特异、牢固、可逆地吸附于固定有 Ni 离子的琼脂糖基质, 而洗脱缓冲液中含有不同浓度梯度的咪唑, 可与组氨酸标签的咪唑环形成竞争, 从而将其从 Ni 离子上替换洗脱。实验中, 洗脱缓冲液咪唑浓度设有从 20 mM/L 到 500 mM/L 梯度。当洗脱缓冲液中含 100 mM/L 咪唑时, 大量 FlaA 蛋白被洗脱下来, 进行电泳验证结果显示 42 kD 附近有

干净、清晰的一条蛋白条带。该蛋白条带的分子量与 FlaA 蛋白预测理论分子量大小 41.78 kD 相符。证明 FIA 蛋白表达成功，且纯度较高，可以用于后续免疫实验。

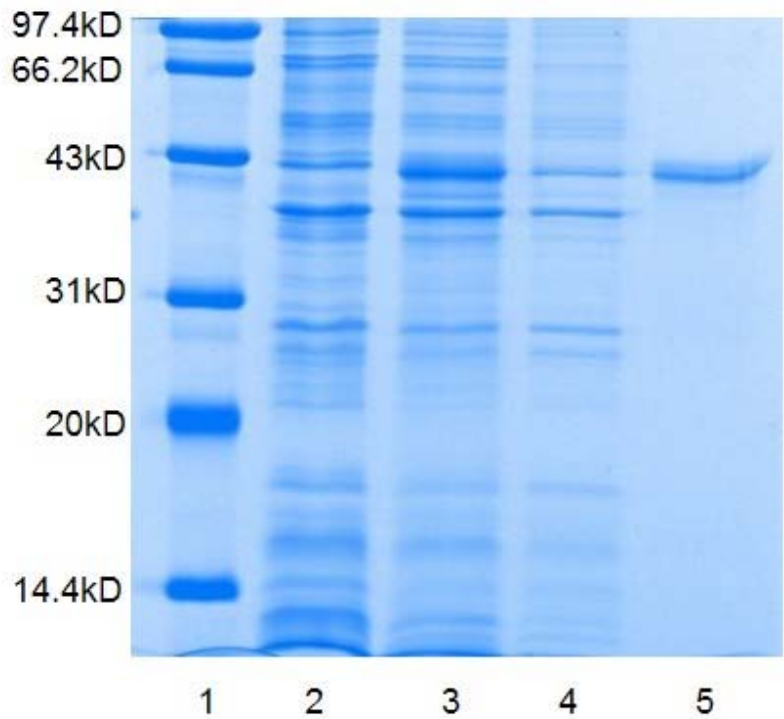


图 3-4 FlaA 蛋白的诱导表达及纯化产物的 SDS-PAGE 电泳图

(泳道 1，蛋白质分子量标准 Marker；泳道 2，pET28a 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液；泳道 3，pET28a-FlaA 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液离心后上清；泳道 4，pET28a-FlaA 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液离心后沉淀；泳道 5，100 mM/L 咪唑洗脱纯化的 FlaA 蛋白)

Fig. 3-4 SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of the expression and purified FlaA protein (Lane 1, Protein molecular standard marker ; Lane 2, ultrasonic disruption liquid of pET28a with 1mmol/L IPTG 5 h induction ; Lane 3, ultrasonic disruption liquid supernatant of pET28a-FlaA with 1 mmol/L IPTG 5 h IPTG induction ; Lane 4, ultrasonic disruption liquid sedimentation of pET28a-FlaA with IPTG 1 mmol/L IPTG 5 h induction ; Lane 5, the100mM/L imidazole eluted FlaA fraction)

3.3.2 OmpW 蛋白的表达与纯化

参考 FlaA 蛋白的表达条件，对 OmpW 蛋白进行诱导表达，考察其表达量与存在形态。如图 3-5 的电泳结果所示 *E. coli* BL21 (DE3) (含重组子 pET24a-OmpW) 菌体破碎液上清和沉淀均在 24 kD 附近出现了一条新的蛋白条带，而沉淀中该蛋白条带更为显著。证明在菌体破碎液的上清和沉淀中均存在有 OmpW 蛋白，而绝大多数表达得到的 OmpW 蛋白为包涵体。包涵体是指细菌表达的蛋白在细胞内凝集，形成无活性的固体颗粒，呈非水溶性，只溶于变性剂如尿素、盐酸胍等。为得到纯化的 OmpW 蛋白，需在缓冲液中加入尿素使其变性为可溶状态，实验选取含 4 M/L 尿素的缓冲液溶解菌体破碎后的沉淀，依照上述方法对其进行纯化。结果如图 3-5 所示，当洗脱缓冲液中含 100 mM/L 咪唑时，大量 OmpW 蛋白被洗脱下来，进行电泳验证结果显示 24 kD 附近有干净、清晰的一条蛋白条带。该蛋白条带的分子量与 OmpW 蛋白预测理论分子量大小 23.58 kD 相

符。证明 OmpW 蛋白表达成功，且纯度较高，可以用于后续免疫实验。

INCLUDEPICTURE "H:\\Application
Data\\Tencent\\Users\\599290131\\QQ\\WinTemp\\RichOle\\FTG\\HBTO'_(SW[8XXCES)GG.jpg" *

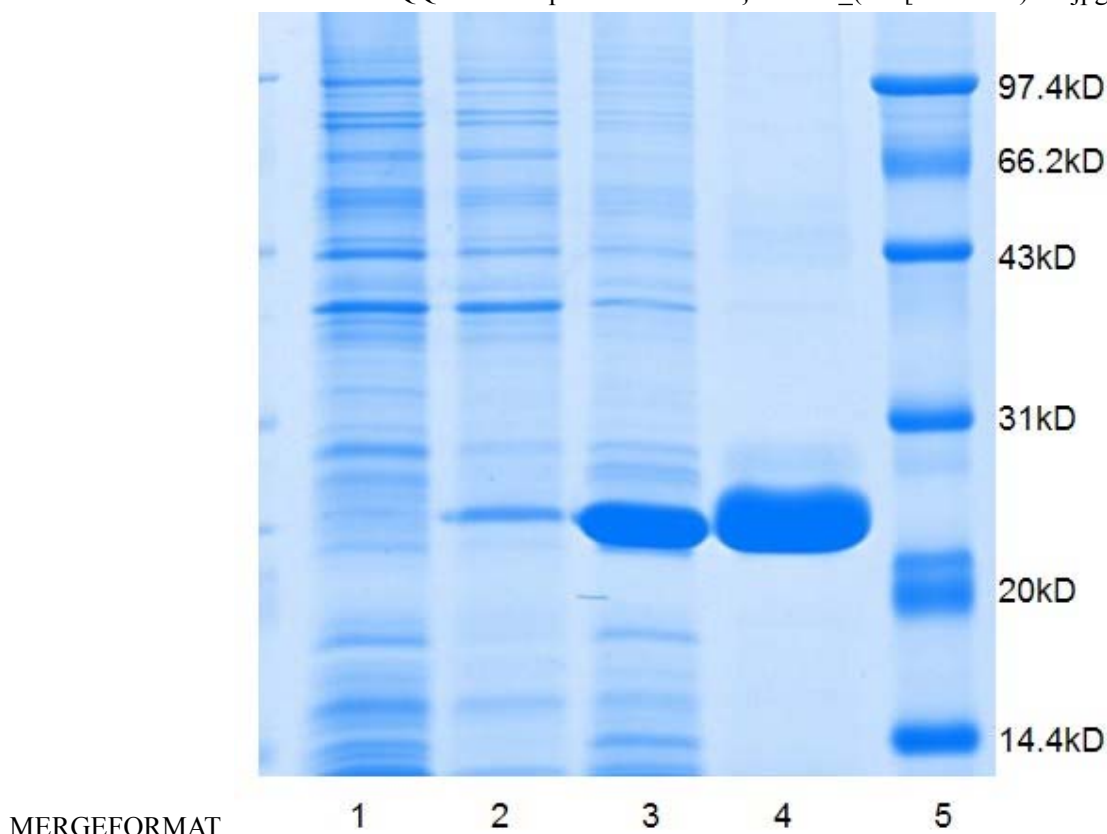


图 3-5 OmpW 蛋白的诱导表达及纯化产物的 SDS-PAGE 电泳图

(泳道 1, pET24a 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液; 泳道 2, pET24a-OmpW 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液离心后上清; 泳道 3, pET24a-OmpW 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液离心后沉淀; 泳道 4, 100 mM/L 咪唑洗脱纯化的 OmpW 蛋白泳道; 5, 蛋白质分子量标准 Marker)

Fig. 3-5 SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of the expression and purified OmpW protein
(Lane 1, ultrasonic disruption liquid of pET24a with 1 mmol/L IPTG 5 h induction ; Lane 2, ultrasonic disruption liquid supernatant of pET24a-OmpW with 1 mmol/L IPTG 5 h IPTG induction ; Lane 3, ultrasonic disruption liquid sedimentation of pET24a-OmpW with IPTG 1 mmol/L IPTG 5 h induction ; Lane 4, the 100mM/L imidazole eluted OmpW fraction ; Lane 5, protein molecular standard marker)

3.3.3 OmpU 蛋白的表达与纯化

本部分实验考察了 OmpU 蛋白的表达量和存在形态。如图 3-6 所示，OmpU 蛋白部分表达为包涵体，为得到更多的 OmpU 蛋白，实验同样选取含 4 M/L 尿素的缓冲液溶解菌体破碎后的沉淀，依照上述方法对其进行纯化。电泳结果显示，36 kD 附近有单一、清晰蛋白条带，该蛋白条带的分子量与 OmpU 蛋白预测理论分子量大小 35.63 kD 相符。证明 OmpU 蛋白表达成功，且纯度较高，可以用于后续免疫实验。

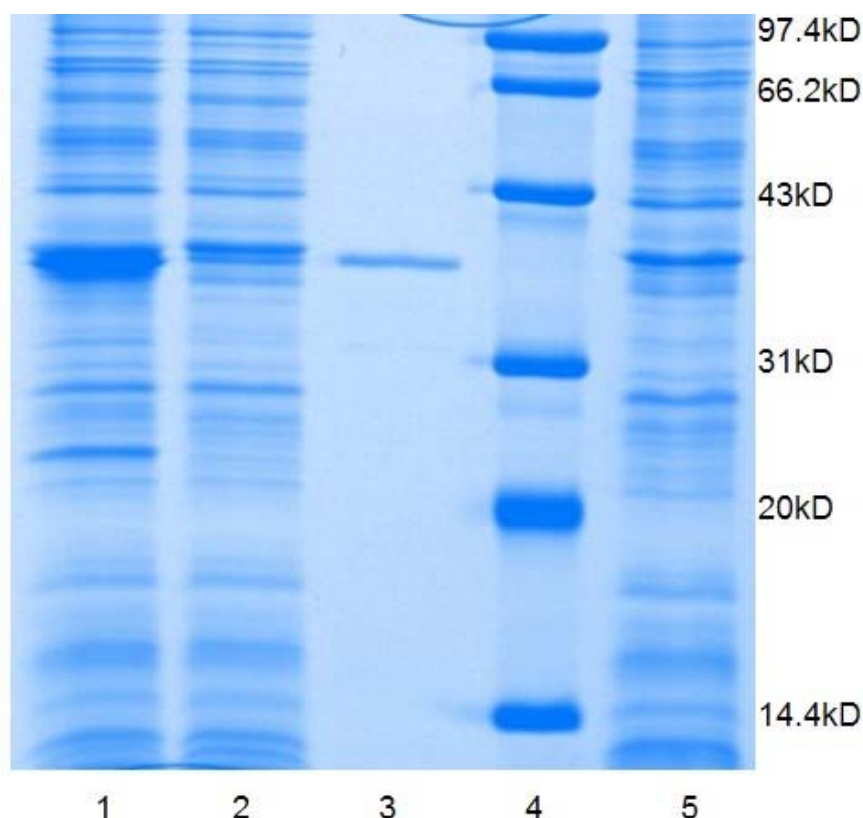


图 3-6 OmpU 蛋白的诱导表达及纯化产物的 SDS-PAGE 电泳图

(泳道 1, pET24a-OmpU 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液离心后上清; 泳道 2, pET24a-OmpU 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液离心后沉淀; 泳道 3, 100 mM/L 咪唑洗脱纯化的 OmpU 蛋白; 泳道 4, 蛋白质分子量标准 Marker; 泳道 5, pET24a 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h 破碎液)

Fig. 3-6 SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of the expression and purified OmpU protein
(Lane 1, ultrasonic disruption liquid supernatant of pET24a-OmpU with 1 mmol/L IPTG 5 h IPTG induction ; Lane 2, ultrasonic disruption liquid sedimentation of pET24a-OmpU with 1 mmol/L IPTG 5 h induction ; Lane 3, the 100 mM/L imidazole eluted OmpU fraction ; Lane 4, Protein molecular standard marker ; Lane 5, ultrasonic disruption liquid of pET24a with 1 mmol/L IPTG 5 h induction)

3.4 抗体纯化

动物免疫制备所得的抗血清是一个非常复杂的混合物体系，它包括有血清的全部成分。但是和抗原特异性结合的抗体主要是血清中的免疫球蛋白。为了制备实验所需的特异性抗体，则需要分离和纯化免疫球蛋白 IgG。最简单、常用的抗体纯化方法是饱和硫酸铵法，硫酸铵因其溶解度大、温度系数小和不易使蛋白质变性而应用最广。据文献报道^[95-96]饱和硫酸铵分级沉淀法可获得与 DEAE 树脂提纯法、辛酸和硫酸铵两步法同样纯度的 IgG。如图 3-7 所示，纯化后的四种抗体溶液主要含 43 kD 左右的蛋白条带，而杂带较少。(这步纯化仅仅是硫酸铵分级沉淀吗？这样得到的抗体杂蛋白如何去除？)

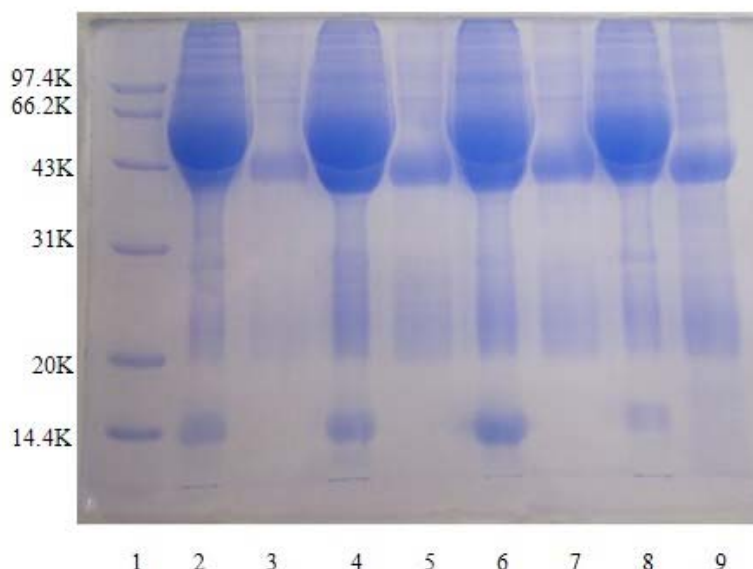


图 3-7 全菌、FlaA、OmpW、OmpU 免疫抗血清及纯化后抗体溶液 SDS-PAGE 电泳图
(泳道 1, 蛋白质分子量标准 Marker; 泳道 2, 全菌免疫抗血清; 泳道 3, 纯化后全菌抗体; 泳道 4, FlaA 免疫抗血清; 泳道 5, 纯化后 FlaA 抗体; 泳道 6, OmpU 免疫抗血清; 泳道 7, 纯化后 OmpU 抗体; 泳道 8, OmpW 免疫抗血清; 泳道 9, 纯化后 OmpW 抗体)

Fig. 3-7 SDS-PAGE gel electrophoresis of *V. parahaemolyticus*, FlaA, OmpW, OmpU antiserum and purified antibody solution

(Lane 1, Protein molecular standard marker ; Lane 2, *V. parahaemolyticus* antiserum; Lane 3, purified antibody of *V. parahaemolyticus*; Lane 4, FlaA antiserum; Lane 5, purified antibody of FlaA; Lane 6, OmpU antiserum; Lane 7, purified antibody of OmpU; Lane 8, OmpW antiserum; Lane 9, purified antibody of OmpW)

3.5 抗体纯化前后效价测定

以 *V. parahaemolyticus*、FlaA 蛋白、OmpU 蛋白、OmpW 蛋白为抗原包被于 96 孔板中，用间接 ELISA 法分别检测对应抗体纯化前后的效价。 A_{450} 值在 1.0-2.0 之间，P/N 值 > 2.1 的最大抗体稀释度即为其效价。

3.5.1 全菌抗体效价

纯化前全菌抗体效价达到 1:320,000，经饱和硫酸铵分级纯化法分级纯化处理后，不可避免的会造成抗体绝对量及活性的损失；而由于纯化处理避免了全抗血清中的大量非特异性反应，这也反映在数据结果上，全菌抗体效价降至 1:160,000 左右^[97]。部分结果见表 3-1。

表 3-1 间接 ELISA 法检测不同稀释度全菌抗体与 *V. parahaemolyticus* (1×10^7 cfu/mL) 反应的吸光度 (A_{450}) 值 (表格格式不对, 以下表格皆需注意)

Tab.3-1 The A_{450} of reactions between different titer of anti-*V. parahaemolyticus* antibody and *V. parahaemolyticus* (1×10^7 cfu/mL) tested by indirect ELISA

A_{450} 值	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000	阴性	空白
纯化前	2.987	2.715	1.828	1.571	0.813	0.427	0.198	0.055
P/N	19.5	17.6	11.4	9.6	4.3	1.6		
纯化后	2.830	2.400	1.442	0.670	0.455	0.355	0.198	0.055
P/N	18.4	15.4	8.7	3.3	1.8	1.1		

3.5.2 FlaA 抗体效价

纯化前 FlaA 抗体效价达到 1:625,000,0; 经饱和硫酸铵分级纯化法分级纯化处理后, FlaA 抗体效价降至 1:125,000 左右。部分结果见表 3-2。

表 3-2 间接 ELISA 法检测不同稀释度抗体与 FlaA 蛋白 (1 μ g/mL) 反应的吸光度 (A_{450}) 值
Tab.3-2 The A_{450} of reactions between different titer of anti-FlaA antibody and FlaA protein (1 μ g/mL) tested by indirect ELISA

A_{450} 值	1:5000	1:10000	1:50000	1:250000	1:1250000	1:6250000	阴性	空白
纯化前	2.942	2.846	2.435	2.108	1.615	1.042	0.350	0.155
P/N	14.3	13.8	11.7	10.0	7.5	4.5		
纯化后	2.926	2.895	2.108	1.519	1.156	0.646	0.350	0.155
P/N	14.2	14.0	10.0	6.9	5.1	1.9		

3.5.3 OmpU 抗体效价

纯化前 OmpU 抗体效价达到 1:125,000,0; 经饱和硫酸铵分级纯化法分级纯化处理后 OmpU 抗体效价降至 1:25,000 左右。部分结果见表 3-3 。

表 3-3 间接 ELISA 法检测不同稀释度抗体与 OmpU 蛋白 (1 μ g/mL) 反应的吸光度 (A_{450}) 值
Tab.3-3 The A_{450} of reactions between different titer of anti-OmpU antibody and OmpU protein (1 μ g/mL) tested by indirect ELISA

A_{450} 值	1:5000	1:10000	1:50000	1:250000	1:1250000	1:6250000	阴性	空白
纯化前	2.953	2.926	1.661	0.988	0.615	0.416	0.292	0.108
P/N	15.4	15.3	8.4	4.8	2.7	1.7		
纯化后	2.942	2.435	1.485	0.689	0.401	0.384	0.292	0.108
P/N	15.5	12.6	7.5	3.1	1.6	1.5		

3.5.4 OmpW 抗体效价

纯化前 OmpW 抗体效价达到 1:125,000,0; 经饱和硫酸铵分级纯化法分级纯化处理后, OmpW 抗体效价降至 1:25,000 左右。部分结果见表 3-4。

表 3-4 间接 ELISA 法检测不同稀释度抗体与 OmpW 蛋白 (1 $\mu\text{g/mL}$) 反应的吸光度 (A_{450}) 值
Tab.3-4 The A_{450} of reactions between different titer of anti-OmpW antibody and OmpW protein (1 $\mu\text{g/mL}$) tested by indirect ELISA

A_{450} 值	1:5000	1:10000	1:50000	1:250000	1:1250000	1:6250000	阴性	空白
纯化前	2.933	2.897	1.986	1.134	0.674	0.397	0.364	0.126
P/N	20.3	20.0	13.5	7.3	3.9	1.9		
纯化后	2.897	2.675	1.776	0.786	0.335	0.384	0.364	0.126
P/N	20.0	18.5	11.9	4.8	1.5	1.8		

3.6 抗体针对全菌抗原效价测定

由于全菌抗体、FlaA 抗体、OmpU 抗体、OmpW 抗体最终都要应用于 *V. parahaemolyticus* 的检测当中,所以在评价抗体的特异性、敏感性时,包被的抗原均应为 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株及其他菌株。以 *V. parahaemolyticus* 为抗原包被在 96 孔板上,检测三种以外源蛋白免疫得到抗体针对全菌抗原的效价。

纯化后 FlaA 抗体针对全菌抗原效价达到 1:16000, OmpU 抗体针对全菌抗原效价达到 1:16000, OmpW 抗体针对全菌抗原效价达到 1:8000。部分结果见表 3-5。

表 3-5 间接 ELISA 法检测不同稀释度 FlaA 抗体与 *V. parahaemolyticus* (1×10^8 cfu/mL) 反应的吸光度 (A_{450}) 值

Tab. 3-5 The A_{450} of reactions between different titer of anti-FlaA antibody and *V. parahaemolyticus* (1×10^8 cfu/mL) tested by indirect ELISA

A_{450} 值	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	阴性	空白
FlaA 抗体	3.036	2.982	2.876	1.898	1.276	0.478	0.316	0.122
P/N	15.0	14.7	14.1	9.2	5.9	1.8		
OmpU 抗体	3.109	2.902	2.598	1.742	1.253	0.563	0.397	0.134
P/N	11.3	10.5	9.4	6.1	4.2	1.6		
Omp 抗体	2.997	2.932	2.489	1.831	0.689	0.632	0.434	0.149
P/N	10.0	9.7	8.2	5.9	1.9	1.7		

3.7 棋盘法滴定法确定抗体、抗原最适工作浓度

3.7.1 全菌抗体及 *V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度

通过棋盘法,考察确定了全菌抗体和 *V. Parahaemolyticus* 的最适工作浓度,为后续抗体特异性及灵敏性评价提供了依据。如表 3-6 所示,全菌抗体最佳稀释度为 1:16000, *V. parahaemolyticus* 抗原包被最佳浓度为 3×10^4 cfu/mL。

表 3-6 全菌抗体、*V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度Tab.3-6 The optimum concentration of anti-*V. parahaemolyticus* antibody and *V. parahaemolyticus*

V.p 抗原包被浓度 (cfu/mL)	全 菌 抗 体 稀 释 度			
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
3×10^7	3.119	3.065	2.951	2.897
P/N	27.4	26.8	25.9	24.6
3×10^6	3.002	2.967	2.876	2.854
P/N	26.4	26.0	24.4	24.2
3×10^5	2.939	2.765	2.567	2.343
P/N	25.8	23.9	21.7	18.4
3×10^4	2.853	2.264	1.877	1.275
P/N	24.2	17.6	14.8	9.6

3.7.2 FlaA 抗体及 *V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度

通过棋盘法, 确定了 FlaA 抗体和 *V. Parahaemolyticus* 的最适工作浓度, 为后续 FlaA 抗体特异性及灵敏性评价提供了依据。如表 3-7 所示, FlaA 抗体最佳稀释度为 1:8000, *V. parahaemolyticus* 抗原包被最佳浓度为 3×10^6 cfu/mL。

表 3-7 FlaA 抗体、*V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度Tab.3-7 The optimum concentration of anti-FlaA antibody and *V. parahaemolyticus*

V.p 抗原包被浓度 (cfu/mL)	全 菌 抗 体 稀 释 度			
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
3×10^7	2.198	1.591	1.134	0.636
P/N	7.76	5.53	3.85	2.20
3×10^6	2.088	1.436	1.008	0.662
P/N	9.09	6.10	4.14	2.55
3×10^5	0.880	0.537	0.373	0.215
P/N	9.96	5.78	3.78	1.85
3×10^4	0.656	0.396	0.256	0.154
P/N	12.24	7.04	4.24	2.20

3.7.3 OmpU 抗体及 *V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度

通过棋盘法, 确定了 OmpU 抗体和 *V. Parahaemolyticus* 的最适工作浓度, 为后续 OmpU 抗体特异性及灵敏性评价提供了依据。如表 3-8 所示, OmpU 抗体最佳稀释度为 1:4000, *V. parahaemolyticus* 抗原包被最佳浓度为 3×10^6 cfu/mL。

表 3-8 OmpU 抗体、*V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度Tab.3-8 The optimum concentration of anti-OmpU antibody and *V. parahaemolyticus*

V.p 抗原包被浓度 (cfu/mL)	全 菌 抗 体 稀 释 度			
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
3×10^7	1.916	1.303	0.845	0.528
P/N	16.51	10.89	6.69	3.78
3×10^6	1.514	1.095	0.688	0.481
P/N	13.42	9.27	5.24	3.19
3×10^5	0.664	0.401	0.273	0.234
P/N	5.05	2.98	1.89	1.67
3×10^4	0.493	0.280	0.217	0.185
P/N	3.73	1.94	1.59	1.34

3.7.4 OmpW 抗体及 *V. parahaemolyticus* 抗原最适工作

通过棋盘法, 确定了 OmpW 抗体和 *V. Parahaemolyticus* 的最适工作浓度, 为后续

OmpW 抗体特异性及灵敏性评价提供了依据。如表 3-9 所示, OmpW 抗体最佳稀释度为 1:4000, *V. parahaemolyticus* 抗原包被最佳浓度为 3×10^6 cfu/mL。

表 3-9 OmpW 抗体、*V. parahaemolyticus* 抗原最适工作浓度

Tab.3-9 The optimum concentration of anti-OmpW antibody and *V. parahaemolyticus*

V.p 抗原包被浓度 (cfu/mL)	全 菌 抗 体 稀 释 度			
	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
3×10^7	1.205	0.860	0.494	0.346
P/N	4.29	2.92	1.48	0.89
3×10^6	1.610	1.046	0.606	0.451
P/N	6.38	3.93	2.02	1.34
3×10^5	1.705	0.485	0.303	0.191
P/N	5.66	3.29	1.33	0.13
3×10^4	0.492	0.300	0.235	0.152
P/N	7.90	4.14	2.86	1.24

3.8 抗体浓度测定

使用 BCA 蛋白定量试剂盒对四种抗体溶液的浓度进行检测, 结果显示: 全菌抗体浓度为 11.61 mg/mL, FlaA 抗体浓度为 24.32 mg/mL, OmpU 抗体浓度为 24.15 mg/mL, OmpW 抗体浓度为 28.82 mg/mL。

3.9 敏感性试验

3.9.1 全菌抗体敏感性试验

通过设定 6 个 *V. parahaemolyticus* 稀释梯度来进行抗原包被, 以测定全菌抗体在最适工作稀释度 1:16000 的条件下, 可以检测到的目标菌个数。如表 3-10 所示, 全菌抗体的敏感性表现良好, 当 *V. parahaemolyticus* 浓度为 10^2 cfu/mL 时, 检测结果仍呈阳性。

表 3-10 全菌抗体敏感性实验结果分析

Tab.3-10 Sensitivity experiment results analysis of anti-*V. parahaemolyticus* antibody

	V.p 抗 原 浓 度 (cfu/mL)					
	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
A ₄₅₀ 值	2.471	2.346	1.750	1.077	0.516	0.455
P/N	30.09	27.04	25.56	19.24	9.35	5.91
+/-	+	+	+	+	+	+

3.9.2 FlaA 抗体敏感性实验

同样通过设定 10^2 - 10^7 cfu/mL 6 个 *V. parahaemolyticus* 稀释梯度来进行抗原包被, 以测定 FlaA 抗体在最适工作稀释度 1:8000 的条件下, 可以检测到的目标菌个数。如表 3-11 所示, FlaA 抗体的敏感性较全菌抗体敏感性低, 对 *V. parahaemolyticus* 的阳性检出限为 10^4 cfu/mL。

表 3-11 FlaA 抗体敏感性实验结果分析

Tab.3-11 Sensitivity experiment results analysis of anti-FlaA antibody

V.p 抗 原 浓 度 (cfu/mL)					
10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2

A ₄₅₀ 值	1.472	1.480	1.245	1.196	0.865	0.532
P/N	4.94	4.96	3.83	3.79	1.98	1.74
+/-	+	+	+	+	-	-

3.9.3 OmpU 抗体敏感性实验

采用上述方法测定 OmpU 抗体在最适工作稀释度 1:4000 的条件下，可以检测到的目标菌个数。如表 3-12 所示，OmpU 抗体对 *V. parahaemolyticu* 的阳性检出限为 10⁴ cfu/mL。

表 3-12 OmpU 抗体敏感性实验结果分析
Tab.3-12 Sensitivity experiment results analysis of anti-OmpU antibody

	V.p 抗 原 浓 度（cfu/mL）					
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
A ₄₅₀ 值	1.539	1.427	1.231	0.965	0.635	0.476
P/N	6.91	5.88	5.27	3.44	1.67	1.24
+/-	+	+	+	+	-	-

3.9.4 OmpW 抗体敏感性实验

同样采用上述方法测定 OmpW 抗体在最适工作稀释度 1:4000 的条件下，可以检测到的目标菌个数。如表 3-13 所示，OmpW 抗体对 *V. parahaemolyticu* 的阳性检出限为 10⁴ cfu/mL。

表 3-13 OmpW 抗体敏感性实验结果分析
Tab.3-13 Sensitivity experiment results analysis of anti-OmpW antibody

	V.p 抗 原 浓 度（cfu/mL）					
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
A ₄₅₀ 值	1.714	1.567	1.286	0.976	0.559	0.523
P/N	5.66	5.43	4.03	3.21	1.94	1.67
+/-	+	+	+	+	-	-

3.10 抗体特异性实验

3.10.1 全菌抗体特异性实验

实验选取了五种常见致病菌与 *V. parahaemolyticus* 进行特异性评价实验，以评价全菌抗体的特异性。如表 3-14 所示，全菌抗体的 A₄₅₀ 值（A450 值是特异性的表征参数？这部分表述不清晰）与其他五种杂菌相比差异性显著，特异性表现优秀，与其他五种常见致病菌无交叉反应现象。

表 3-14 全菌抗体特异性实验结果分析
Tab.3-14 Specificity experiment results analysis of anti-*V. parahaemolyticus* antibody

抗 原 种 类	阳性血清 A ₄₅₀ 值	阴性血清 A ₄₅₀ 值	空 白 对 照	P/N	交叉反应 (+/-)
大肠杆菌	0.169	0.158	0.141	1.65	-
金黄色葡萄球菌	0.162	0.192	0.152	0.25	-
单增李斯特氏菌	0.165	0.156	0.122	1.26	-
沙门氏菌	0.115	0.153	0.103	0.24	-
副溶血性弧菌	0.732	0.163	0.138	23.76	+
志贺氏菌	0.282	0.235	0.168	1.70	-

3.10.2 Fla 抗体特异性实验

按上述方法,对 FlaA 抗体进行特异性评价实验。如表 3-15 所示,FlaA 抗体的 A_{450} 值与其他五种杂菌相比差异性显著,特异性表现优秀,与其他五种常见致病菌无交叉反应现象。

表 3-15 FlaA 抗体特异性实验结果分析

Tab.3-15 Specificity experiment results analysis of anti-FlaA antibody

抗 原 种 类	阳性血清 A_{450} 值	阴性血清 A_{450} 值	空 白 对 照	P/N	交叉反应 (+/-)
大肠杆菌	0.366	0.264	0.134	1.79	-
金黄色葡萄球菌	0.421	0.329	0.116	1.43	-
单增李斯特氏菌	0.327	0.269	0.106	1.35	-
沙门氏菌	0.405	0.274	0.146	2.01	-
副溶血性弧菌	1.178	0.240	0.144	10.74	+
志贺氏菌	0.392	0.276	0.144	1.87	-

3.10.3 OmpU 抗体特异性实验

按上述方法,对 OmpU 抗体进行特异性评价实验。如表 3-16 所示,虽然实验结果中 A_{450} 值显示 OmpU 抗体与 *V. parahaemolyticus* 的反应和其他五种常见致病菌有明显差异,但根据阳性判定公式 A_{450} 值在 1.0-2.0 之间, P/N 值 >2.1 即为阳性,判定 OmpU 抗体与大肠杆菌、单增李斯特氏菌、沙门氏菌有交叉反应。

表 3-16 OmpU 抗体特异性实验结果分析

Tab.3-16 Specificity experiment results analysis of anti-OmpU antibody

抗 原 种 类	阳性血清 A_{450} 值	阴性血清 A_{450} 值	空 白 对 照	P/N	交叉反应 (+/-)
大肠杆菌	0.394	0.181	0.059	2.75	+
金黄色葡萄球菌	0.458	0.277	0.102	1.98	-
单增李斯特氏菌	0.347	0.161	0.084	3.43	+
沙门氏菌	0.472	0.260	0.183	3.89	+
副溶血性弧菌	1.076	0.329	0.156	5.32	+
志贺氏菌	0.404	0.273	0.082	1.65	-

3.10.4 OmpW 抗体特异性实验

按上述方法,对 OmpW 抗体进行特异性评价实验。如表 3-17 所示,OmpW 抗体的特异性表现优秀,与其他五种常见致病菌无交叉反应现象。

表 3-17 FlaA 抗体特异性实验结果分析

Tab.3-17 Specificity experiment results analysis of anti-OmpW antibody

抗 原 种 类	阳性血清 A_{450} 值	阴性血清 A_{450} 值	空 白 对 照	P/N	交叉反应 (+/-)
大肠杆菌	0.449	0.349	0.161	1.53	-
金黄色葡萄球菌	0.669	0.453	0.232	1.98	-
单增李斯特氏菌	0.442	0.310	0.100	1.63	-
沙门氏菌	0.532	0.314	0.097	2.00	-
副溶血性弧菌	1.254	0.511	0.194	8.60	+
志贺氏菌	0.619	0.393	0.163	1.87	-

3.11 流式细胞术评价抗体特异性

3.11.1 全菌抗体特异性评价

由于间接 ELISA 法对抗体特异性进行评价时，只能以阳性、阴性结果作为判断依据，并不能量化评价抗体的特异性。所以，本实验部分采用流式细胞术利用 FITC 标记的羊抗兔 IgG 对样本内有抗原抗体反应的部分进行间接荧光标记，从而量化评价各抗体的特异性。如图 3-8 所示，以流式细胞仪计细菌数一万个为样本，全菌抗体与六种致病菌按实验方法 2.4.5.5 分别孵育后，有荧光反应的百分比率分别是：*V. parahaemolyticus* $91.57\pm5.40\%$ ，*E.coli* $7.72\pm0.65\%$ ，*S.aureus* $7.55\pm0.62\%$ ，*L.monocytogenes* $8.70\pm0.74\%$ ，*S.typhimurium* $5.30\pm0.47\%$ ，*S.dysenteriae* $5.12\pm0.46\%$ 。除 *V. parahaemolyticus* 外，其它五种常见致病菌与全菌抗体的结合率均低于 10%，证明全菌抗体具有良好的特异性。（特异性的评价标准是什么？需要交代。）

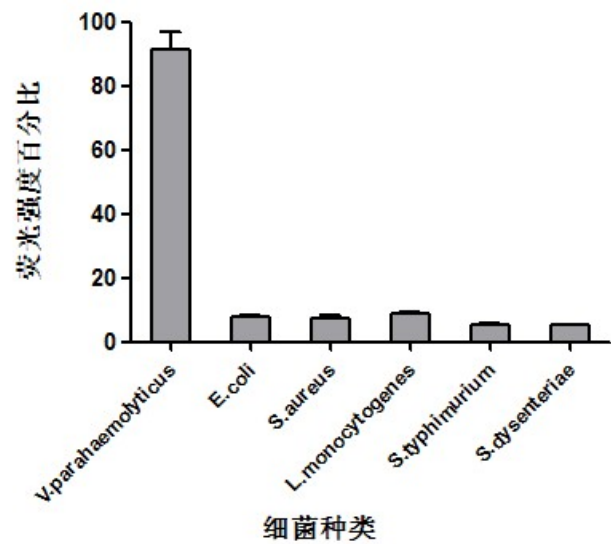


图 3-8 流式细胞术评价全菌抗体特异性结果

Fig. 3-8 Results of anti-*V. parahaemolyticus* antibody specificity by FCM

3.11.2 FlaA 抗体特异性评价

同法，以流式细胞仪计细菌数一万个为样本，FlaA 抗体与六种致病菌按实验方法分别孵育。如图 3-9 所示，有荧光反应的百分比率分别是：*V. parahaemolyticus* $89.77\pm6.89\%$ ，*E.coli* $11.85\pm0.96\%$ ，*S.aureus* $7.84\pm0.58\%$ ，*L.monocytogenes* $9.49\pm0.85\%$ ，*S.typhimurium* $11.13\pm0.97\%$ ，*S.dysenteriae* $5.46\pm0.43\%$ 。五种常见致病菌与 FlaA 抗体的结合率差别显著，由于大肠杆菌、李斯特氏菌、沙门氏菌本身具有鞭毛，因而反应结果稍高。

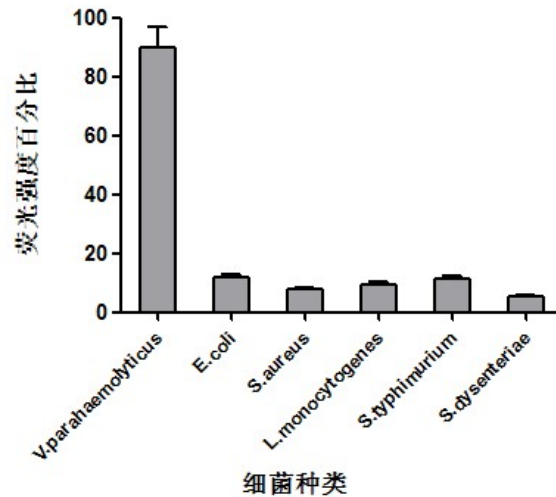


图 3-9 流式细胞术评价 FlaA 抗体特异性结果

Fig. 3-9 Results of anti-FlaA antibody specificity by FCM

3.11.3 OmpU 抗体特异性评价

以流式细胞仪计细菌数一万个为样本，OmpU 抗体与六种致病菌按实验方法分别孵育。如图 3-10 所示，有荧光反应的百分比率分别是：*V. parahaemolyticus* $34.32 \pm 2.78\%$ ，*E.coli* $5.20 \pm 0.45\%$ ，*S.aureus* $3.79 \pm 0.29\%$ ，*L.monocytogenes* $11.58 \pm 1.56\%$ ，*S.typhimurium* $14.10 \pm 0.97\%$ ，*S.dysenteriae* $6.43 \pm 0.44\%$ 。OmpU 抗体与 *V. Parahaemolyticus* 的结合率较全菌抗体和 FlaA 抗体低，分析可能的原因：1、外膜蛋白 U 的免疫结合位点在菌体表面暴露不完全，导致抗体结合概率低（这个推论有依据吗？有依据需要给出来。）；2、由于全菌菌体免疫得到的全菌抗体具有多个免疫结合位点，其在一万个菌体样本中的绝对结合数远远高于 OmpU 抗体与 *V. Parahaemolyticu* 的绝对结合数，导致了 OmpU 抗体的荧光反应百分率相对较低。（这与全菌抗体有什么关系？）

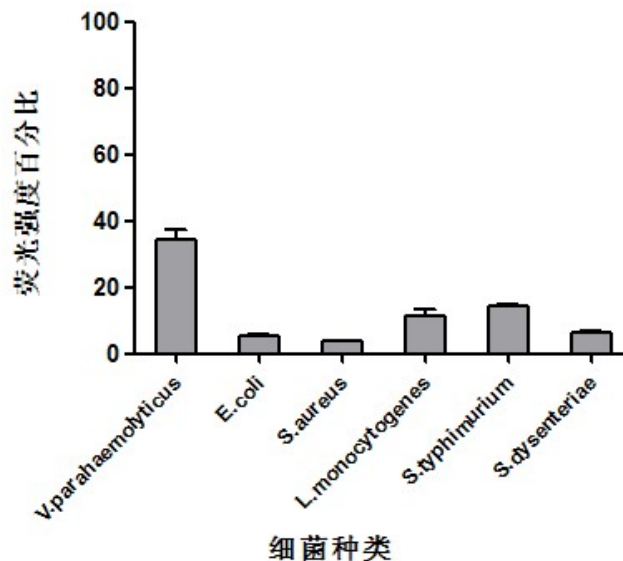


图 3-10 流式细胞术评价 OmpU 抗体特异性结果
Fig. 3-10 Results of anti-OmpU antibody specificity by FCM

3.11.4 OmpW 抗体特异性评价

采用上述方法，以流式细胞仪计细菌数一万个为样本，OmpW 抗体与六种致病菌按实验方法分别孵育后。如图 3-11 所示，有荧光反应的百分比率分别是：*V. parahaemolyticus* $63.53 \pm 5.40\%$ ，*E.coli* $5.65 \pm 0.39\%$ ，*S.aureus* $7.91 \pm 0.56\%$ ，*L.monocytogenes* $7.38 \pm 0.62\%$ ，*S.typhimurium* $4.46 \pm 0.38\%$ ，*S.dysenteriae* $3.54 \pm 0.29\%$ 。OmpW 抗体与 *V. Parahaemolyticus* 的结合率同样较全菌抗体和 FlaA 抗体低。

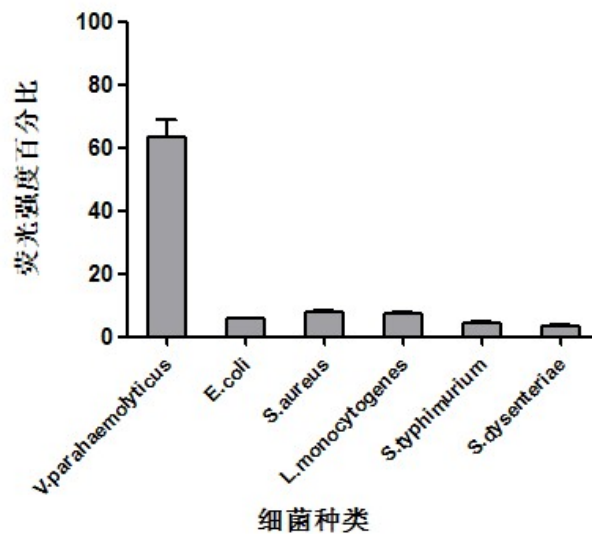


图 3-11 流式细胞术评价 OmpW 抗体特异性结果
Fig. 3-11 Results of anti-OmpW antibody specificity by FCM

综上所述，以基因工程方法合成的外源蛋白 FlaA、OmpU、OmpW 为抗原免疫家兔得到的纯化抗体针对 *V. Parahaemolyticus* 的灵敏性和特异性表现均弱于全菌抗体。分析可能的原因 1、蛋白免疫所得抗体的免疫结合位点在活菌菌体表面暴露不完全，导致抗体结合概率低；（这个说法需要有依据）2、由于菌体免疫得到的全菌抗体具有多个免疫结合位点，其与样本中 *V. Parahaemolyticus* 的绝对结合数会高于各蛋白抗体与 *V. Parahaemolyticus* 的绝对结合数，这就导致了全菌抗体与 *V. Parahaemolyticus* 的荧光反应百分率高而 OmpU 抗体、OmpW 抗体的低，这是抗体性质评价方法本身有待解决的不足。本文后续实验选取灵敏性较好的全菌抗体为捕获探针，特异性较好的 FlaA 抗体为信号探针。（在这里 FlaA 怎么又变成特异性较好的抗体？）

3.12 磁珠与全菌抗体的结合与表征

3.12.1 氨基化磁珠的表征

磁纳米粒子由于粒径小、比表面积大，与目标菌识别分子偶联后可捕获较多的目标

菌；当外加磁场时，能够在短时间内迅速分离富集样品当中的目标菌；同时氨基化后的磁纳米粒子还具有生物相容性好、易于实现自动化等优点^[98]。本实验采用水热-溶剂热法，利用乙二醇对氯化高铁的还原作用，在醋酸钠共同作用下，由 1,6-己二胺提供氨基成功制备得到了氨基化磁珠^[99]。如图 3-12 所示，所制备的氨基化磁珠直径约为 30 -50 nm，形貌为球状，与文献报道相符^[100]。

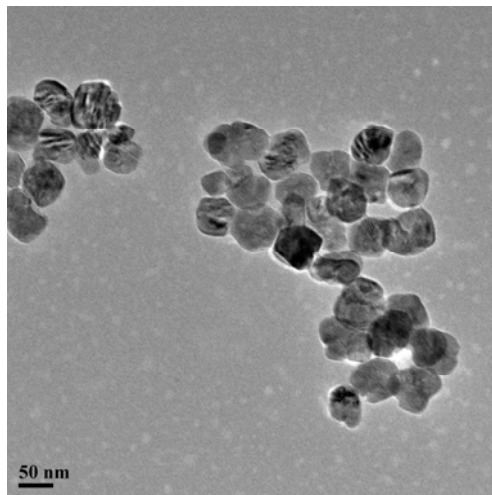


图 3-12 氨基化磁珠的 TEM 图
Fig.3-12 TEM image of amino-modified MNPs

3.12.2 氨基化磁珠与全菌抗体结合的表征

图 3-13 是氨基化磁珠及其与全菌抗体结合后的红外光谱图，如图中特征峰所示：3419 cm^{-1} 出现的强吸收峰属于 N-H 的伸缩振动吸收峰，在 b 线中由于氨基化磁珠与全菌抗体的结合，羧基中 O-H 在 3000-3400 cm^{-1} 的吸收峰使得原本该处的吸收峰有明显增宽；1576 cm^{-1} 和 1642 cm^{-1} 两处吸收峰是羧基中 C=O 的振动吸收峰；1052 cm^{-1} 是羧基中 C-O 的振动吸收峰。以上吸收峰证明氨基化磁珠成功结合了全菌抗体。氨基化磁珠通过戊二醛法与全菌抗体进行偶联，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，所以同时采用紫外分光光度法对两者的结合情况进行表征。如图 3-14 所示，初始浓度下的抗体溶液 280 nm 处吸光度值比反应结束后通过磁分离所得上清中的吸光度值有明显降低。说明部分全菌抗体已经连接到了氨基化磁珠上，也侧面印证了磁性纳米粒子表面氨基化是成功的。

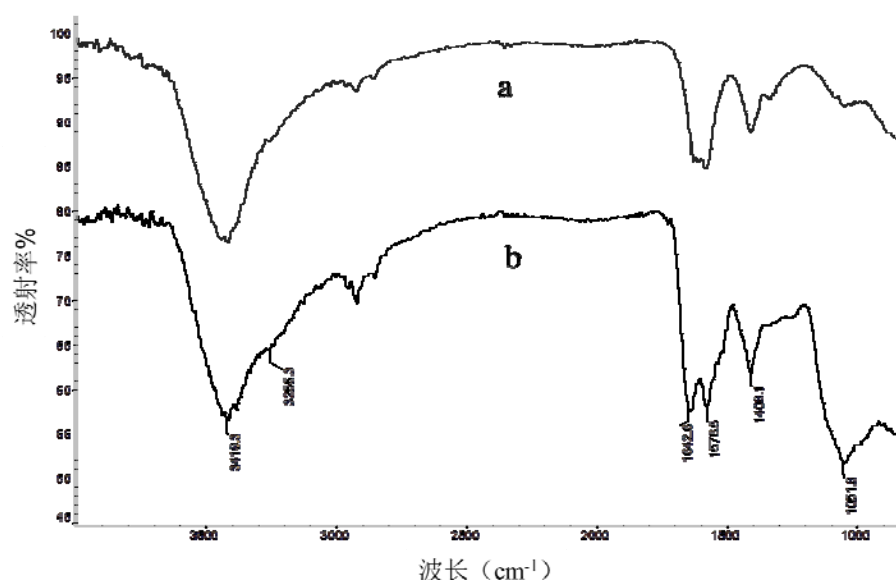


图 3-13 氨基化磁珠 (a) 及其与全菌抗体结合后 (b) 的红外光谱图

Fig.3-13 FT-IR spectrum of the amino-modified MNPs (a) and anti-*V. parahaemolyticus* antibody conjugation to amino-modified MNPs (b)

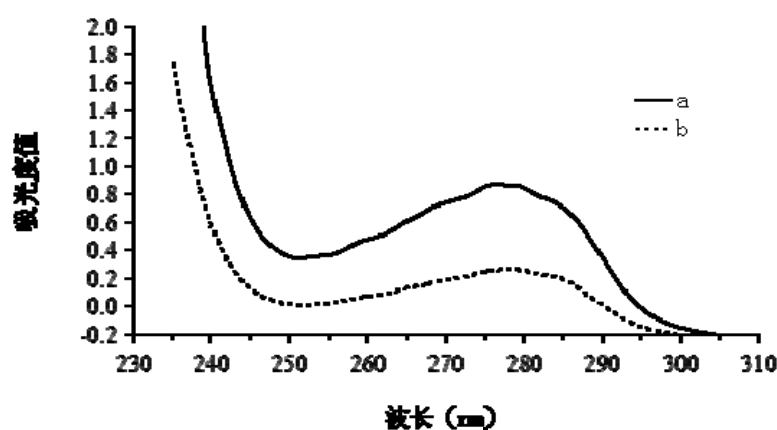


图 3-14 初始浓度下 (a), 与氨基化磁珠孵育后剩余的全菌抗体 (b) 的紫外可见吸收图谱

Fig.3-14 The UV spectra of initial (a) and supernatant liquor after anti-*V. parahaemolyticus* antibody conjugation to amino-modified MNPs

3.12.3 孵育时间的优化

由于本实验是通过磁珠-全菌抗体来特异捕获 *V. parahaemolyticus*, 而抗体活性会随反应温度、反应时间而变化, 在连接抗体量基本恒定的情况下应尽量缩短反应时间。因此, 磁珠在多长时间反应时间内可以连接上足够多的全菌抗体, 即达到饱和状态需要进行时间梯度实验进行探讨。实验结果如图 3-15 所示, 初始抗体溶液浓度为 **1 mg/mL** 时, 1 mg 磁珠对抗体的结合量在 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 为氨基化磁珠与全菌抗体孵育的最优时间。

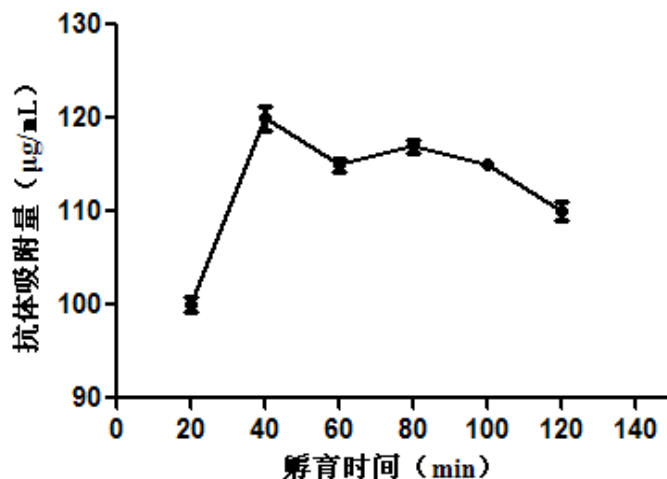


图 3-15 全菌抗体与氨基化磁珠孵育时间的优化

Fig.3-15 Optimization of incubating time of anti-*V. parahaemolyticus* antibody conjugation to amino-modified MNPs

3.12.4 全菌抗体初始浓度的优化

如图 3-16 所示, 实验设定了 50、100、200、300、400、500、600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 初始抗体溶液的九个浓度梯度。当 1 mg 磁珠结合的抗体量从 20 μg 增加到 120 μg 时, 抗体溶液初始浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$, 继续增大抗体溶液的初始浓度, 1 mg 磁珠结合的抗体量趋于稳定。所以, 实验选取 600 μg 为全菌抗体初始浓度的最佳值。

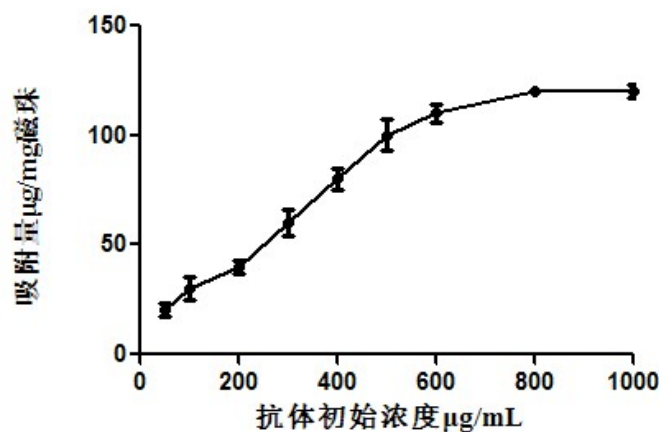


图 3-16 全菌抗体初始浓度的优化

Fig.3-16 Optimization of anti-*V. parahaemolyticus* antibody solution initial concentration

3.13 氨基化 UCNP 与 FlaA 抗体的结合与表征

3.13.1 UCNP 的表征

本实验以硬脂酸钇、硬脂酸镱、硬脂酸铒和氟化钠为原料，其中， Er^{3+} 离子作为激活剂、 Yb^{3+} 离子作为敏化剂。在有机相中 195°C 反应 24 h 成功制备得到了 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ UCNP。如图 3-17 所示，本批次合成的 UCNP 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。图 3-18 所示为 UCNP 荧光光谱图，激发光源为 980 nm，在 410、525、544 和 660 nm 处出现了 Er^{3+} 离子的四个特征发射峰。 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ UCNP 发绿色荧光，对应波长为 544 nm。

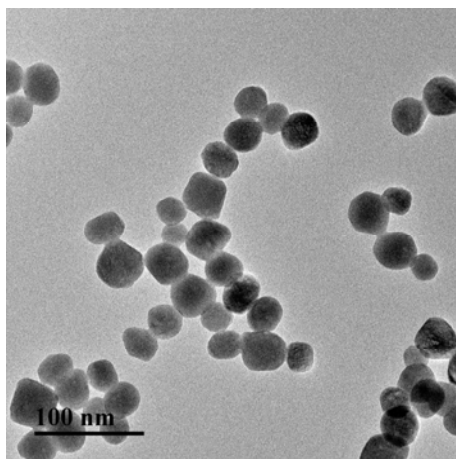


图 3-17 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 稀土发光上转换纳米粒子的 TEM 图
Fig.3-17 TEM image of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ UCNP

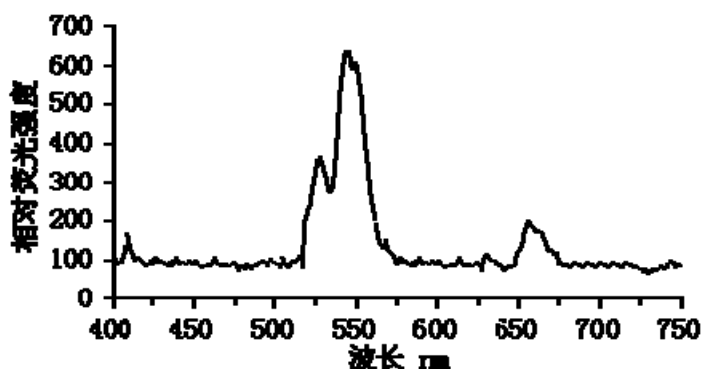


图 3-18 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 稀土发光上转换纳米粒子的荧光光谱图
Fig.3-18 Fluorescence spectra of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ UCNP

3.13.2 氨基化 UCNP 的表征

由水热法合成的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ UCNP 表面没有自带的功能基团 ($-\text{COOH}$ 或 $-\text{NH}_2$)，因此裸露的 UCNP 不具有水溶性，在后续生物检测的应用中必须对其进行表面修饰。

图 3-19 是首先由 SiO_2 包被的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ 上转换发光纳米晶, 然后采用 Stober 法对其表面进行功能化修饰。包被硅层的厚度约为 10 nm, 纳米粒子大小增大至 50 nm 左右, 证明 SiO_2 已经均匀地包被在 UNCPs 的外层。包被后的 UNCPs 具有更好的水溶性、在水溶液中分散均匀。图 3-20 是表面氨基功能化的 SiO_2 包被 UCNP 的红外光谱图, 如图中特征峰所示: 1090 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 UCNP 包硅成功; 氨基中 N-H 键的伸缩振动和弯曲振动的吸收峰是 3461 cm^{-1} 和 1629 cm^{-1} ; 2930 cm^{-1} 是 APTES 中亚甲基的伸缩振动。以上吸收峰证明了 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ UCNP 在包被了 SiO_2 的同时也成功的连接了氨基。

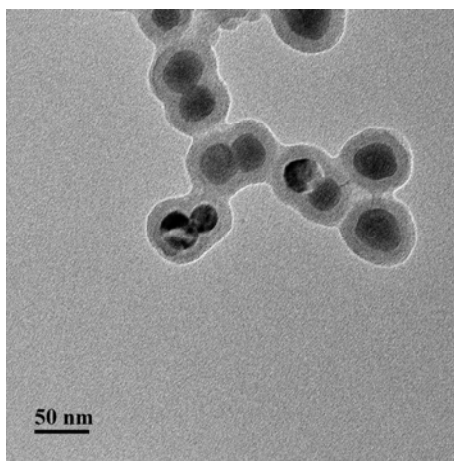


图 3-19 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ 稀土发光上转换纳米粒子包被二氧化硅层后的 TEM 图
Fig.3-19 TEM image of surface silica layer modification of $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ UCNP

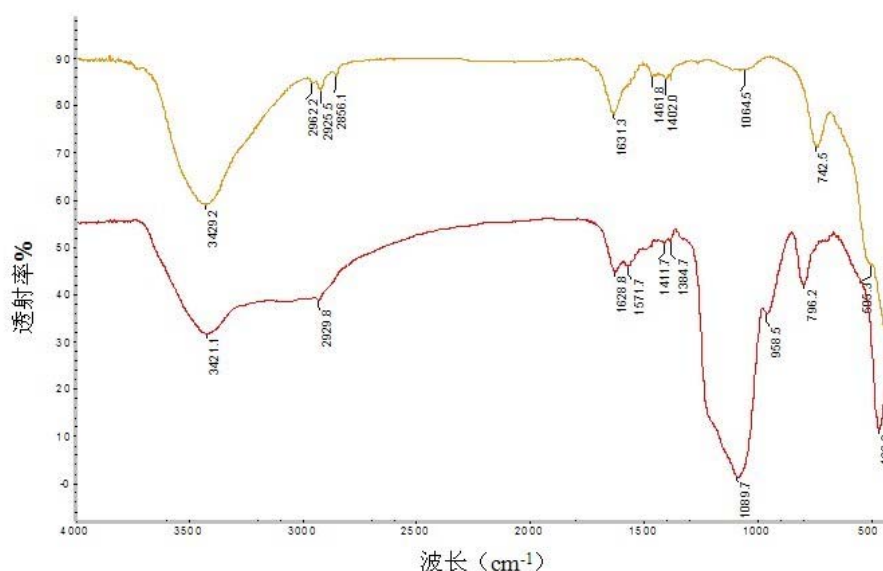


图 3-20 稀土发光上转换纳米粒子 (a) 及其包被二氧化硅层并氨基化后 (b) 的红外光谱图
Fig.3-20 FT-IR spectrum of the upconversion nanoparticles (a) and amino-modified silica-capped upconversion nanoparticles (b)

3.13.3 氨基化 UCNP 与 FlaA 抗体结合的表征

与 FlaA 抗体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，因此 UCNP 是否能连接上足够的抗体以便能够充分地识别磁珠捕获的目标菌，对后续的荧光强度具有重要的影响。氨基化 UCNP 与 FlaA 抗体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 3-21 所示，初始浓度下的抗体溶液 280 nm 处吸光度值比反应结束后通过离心分离所得上清中的吸光度值有明显降低，证明部分 FlaA 抗体已经连接到了氨基化 UCNP 上。

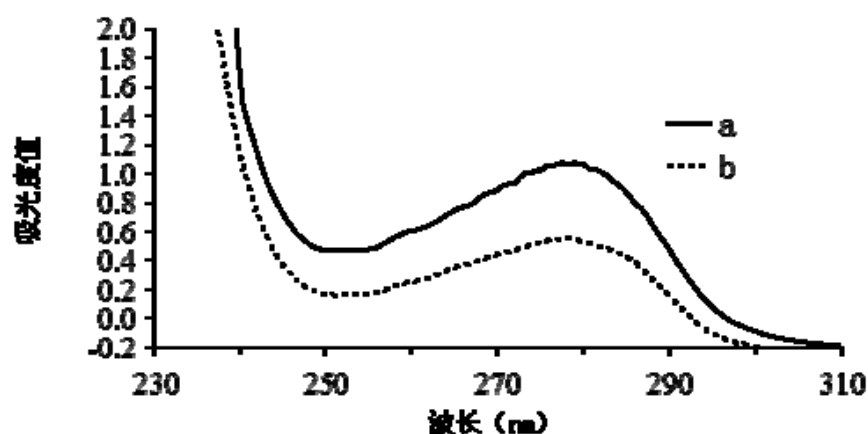


图 3-21 初始浓度下 (a)，与氨基化 NaYF₄:Yb 上转换材料孵育后剩余的 FlaA 抗体 (b) 的紫外可见吸收图谱

Fig.3-21 The UV spectra of initial (a) and supernatant liquor after anti-FlaA antibody conjugation to amino-modified NaYF₄:Yb, Er UCNP (b)

3.13.4 孵育时间的优化

如图 3-22 所示，初始抗体溶液浓度为 1 mg/mL 时，1 mg 氨基化 UCNP 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 UCNP 与 FlaA 抗体孵育的最优时间。

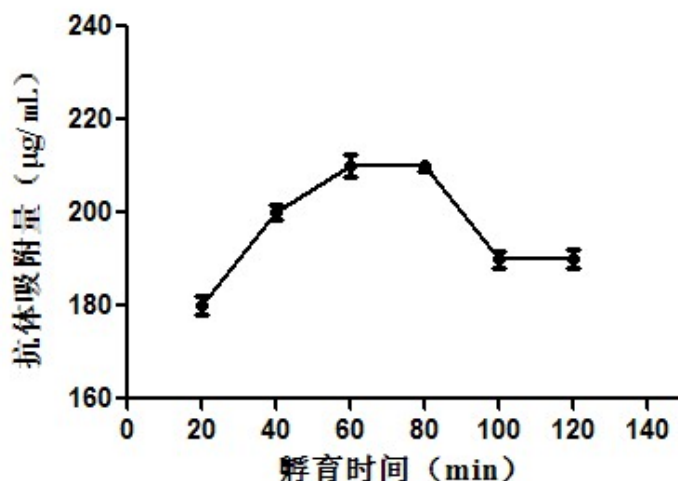


图 3-22 FlaA 抗体与氨基化上转换材料孵育时间的优化

Fig. 3-22 Optimization of incubating time of anti-FlaA antibody conjugation to amino-modified NaYF₄: Yb, Er UCNP

3.13.5 FlaA 抗体初始浓度的优化

如图 3-23 所示，实验设定了 50、100、200、300、400、500、600、800、1000 μg/mL 初始抗体溶液的九个浓度梯度。当 1 mg UCNP 结合的抗体量从 20 μg 增加到 210 μg 时，抗体溶液初始浓度为 800 μg/mL，继续增大抗体溶液的初始浓度，1 mg 磁珠结合的抗体量趋于稳定。所以，实验选取 800 μg 为 FlaA 抗体初始浓度的最佳值。

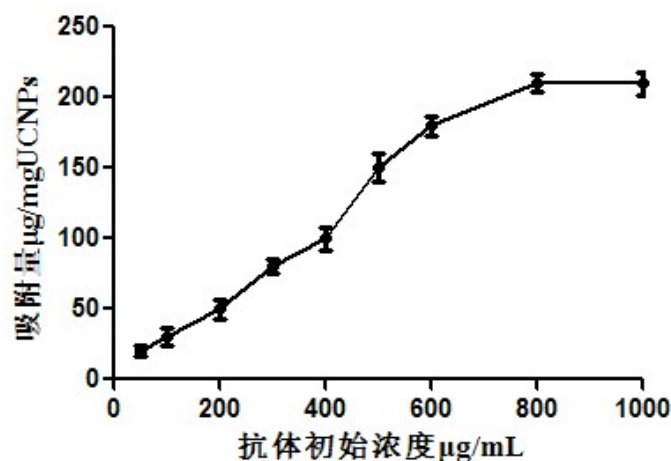


图 3-23 FlaA 抗体初始浓度的优化

Fig.3-23 Optimization of anti-FlaA antibody solution initial concentration

3.14 副溶血性弧菌的检测

在实验选定的最优反应条件下，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 3-24 所示：在 5×10^3 - 5×10^5 cfu/mL 浓度范围内加入的 *V. Parahaemolyticus* 经平板计数得到的菌个数与本方法所检测到的荧光强度呈现良好的线性关系，线性回归

方程为 $Y=178.25X-506.41$ ($R^2=0.9919$)，检出限为 10^3 cfu/mL。进行三次平行实验，重复性良好。

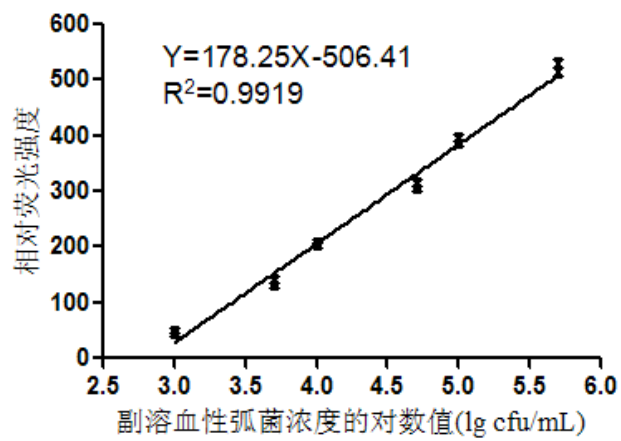


图 3-24 菌落个数与荧光强度的关系曲线

Fig. 3-24 Calibration curve of colony number and fluorescence intensity

由于副溶血性弧菌在食品中的检测限量（5 cfu/25 g）低于本方法的检测限 10^3 cfu/mL，所以现阶段该方法的应用仍需要增菌预处理。提高检测方法的灵敏度还应继续寻找探究信号更为灵敏的标记物质。

3.15 模拟水产品中副溶血性弧菌的检测

将五份模拟水产品样品测得的荧光强度带入已建立的菌落个数和荧光强度的线性相关方程，计算各样品中加入的 *V. Parahaemolyticus* 菌落个数，与平板计数结果（加入浓度）进行比较得到回收率。如表 3-18 所示，在五个模拟水产品样品中，除加入浓度为 125 cfu/mL 时新建方法没有检出，其他四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、上转换荧光材料标记的 *V. Parahaemolyticus* 检测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 *V. Parahaemolyticus* 的检测。

表 3-18 模拟水产品中 *V. Parahaemolyticus* 的检测回收率

Tab.3-18 Recovery results of detection *V. Parahaemolyticus* in spiked simulated aquatic production

编号	初始浓度	加入浓度(cfu/mL)	检出浓度(cfu/mL)	回收率(%)
1	0	1.25×10^2	ND	0
2	0	1.23×10^3	1.15×10^3	93.5%
3	0	2.46×10^3	2.23×10^3	90.7%
4	0	1.42×10^4	1.37×10^4	96.5%
5	0	7.20×10^4	6.96×10^4	96.7%

主要结论与展望

主要结论

1、PCR 扩增得到了 *V. parahaemolyticus* ATCC17802 菌株的鞭毛蛋白 A 基因 FlaA、外膜蛋白 U 基因 OmpU 和外膜蛋白 W 基因 OmpW；成功构建重组表达载体并转化表达宿主菌，得到 *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-FlaA)、*E. coli* BL21 (DE3) (pET24a-OmpW)、*E. coli* BL21 (DE3) (pET24a-OmpU)。

2、对三种表达宿主菌进行 IPTG 诱导表达并纯化，经 SDS—PAGE 电泳分析，证实得到了纯度较高的 FlaA 蛋白、OmpU 蛋白和 OmpW 蛋白。

3、分别以 *V. parahaemolyticus* 菌体、纯化的 FlaA、OmpU、OmpW 蛋白作为抗原对家兔进行免疫，制备多克隆抗血清，经饱和硫酸铵分级沉淀法纯化获得多克隆抗体。并用间接 ELISA 法对四种抗体进行特异性、灵敏性评价，纯化后全菌抗体效价为 1:160,000；FlaA 抗体针对全菌抗原效价达到 1:16000；OmpU 抗体针对全菌抗原效价达到 1:16,000；OmpW 抗体针对全菌抗原效价达到 1:8,000。用流式细胞术对四种抗体的特异性进一步量化评估，全菌抗体与 *V. parahaemolyticus* 的结合率为 $91.57\pm5.40\%$ ；FlaA 抗体的结合率为 $89.77\pm6.89\%$ ；OmpU 抗体的结合率为 $34.32\pm2.78\%$ ；OmpW 抗体的结合率为 $63.53\pm5.40\%$ 。由此选择全菌抗体、FlaA 抗体进行后续实验方法的建立。

4、采用水热-溶剂热方法成功制备氨基化磁性纳米粒子，将其与全菌抗体组装成免疫磁珠用以磁分离、富集 *V. parahaemolyticus*，其最优反应时间为 40 min，全菌抗体溶液最优初始浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 。采用水热法制备稀土上转换发光纳米材料 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ ，将其与 FlaA 抗体组装成免疫 UCNPs，其最优反应时间为 60 min，FlaA 抗体溶液最优初始浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 。5、建立基于磁分离富集、上转换荧光材料标记的 *V. parahaemolyticus* 检测方法，在 5×10^3 - 5×10^5 cfu/mL 范围 *V. Parahaemolyticus* 菌落数与荧光强度呈现良好的线性关系，线性回归方程为 $Y=178.25X-506.41$ ($R^2=0.9919$)，检出限为 10^3 cfu/mL。在模拟水产品样品中的加标回收率为 90.7%-96.7%。

展望

本文在试验设计之初，预计 *V. parahaemolyticus* 的特有外膜蛋白免疫得到的多克隆抗体应该比全菌免疫得到的抗体特异性更强，但实验结果与预估有所出入。由于试验时间有限，我们仅分析推测了可能导致这一结果的原因，在未来，可以从外膜蛋白的结构、免疫位点的氨基酸序列着手深入探讨其原因。另外，本文仅考察了各抗体与其他常见致病菌的交叉反应，后续研究还应对其与副溶血性弧菌不同菌株分型之间的反应能力进一步探讨。

另外，稀土上转换发光纳米粒子在致病菌的检测领域还拥有很大的研究价值，未来也可以尝试将其应用于其他致病菌的检测当中。

致 谢

白驹过隙，逝者如斯。满怀着对硕士学习生活的憧憬，对江南大学食品学院的向往迈进实验室的那一瞬间，已定格在 2010 年的 9 月。选课题时的彷徨、开始试验时的紧张和遇到瓶颈时的一筹莫展这些种种都渐渐沉淀在了我三年走来的路上，成为我生命中最重要的印迹。我怀着对生活的感恩之心感激每一位出现在我生命中的师长和同伴。

首先，我由衷的感谢我的导师王周平教授，感谢您在学习上对我的谆谆教诲，在生活上给予我的鼓励和关怀，同时感谢您在论文选题、试验设计、试验过程和撰写论文过程中给予的悉心指导。在实验方法上，王老师尽量多的培养了我的学习和动手能力；在实验一筹莫展之际他循循善诱，引导我自主解决问题；在我求职期间，他给予了我最多的理解和最大的支持。非常荣幸能够成为王老师的学生，他知识渊博、治学严谨、对待工作一丝不苟、待人处事极为宽容，这些都将成为我今后工作生活当中的榜样，将不断地激励着我努力和进取。在此对您表示最诚挚的敬意与谢意。

其次，要感谢夏雨副教授在实验过程中对我的精心指导和帮助，感谢马淑凤老师、代卉老师在实验室仪器使用方面给予我的指导和在学习、生活中对我的关心与支持。他们博学的知识、乐于助人的品质、平易近人的态度，都是我学习努力的方向。

感谢吴世嘉师兄、段诺、陈秀娟、黄玉坤师姐，你们勤奋钻研的学习精神、严肃认真的科研态度为我们率先垂范，营造了良好的学术氛围。本课题的顺利完成离不开你们的指导和无私的付出。感谢李莉蓉师姐，你爽朗的性格和助人为乐的优秀品质让我在实验之余学会了快乐生活的方法。感谢王鑫、王芳、韩晓晓、张伟龙、丁寅翼、管露、马喆喆对我实验上的支持与帮助，很怀念大家在一起紧张忙碌而又无比快乐的实验室生活。感谢孙莹莹、李龙因、李圆圆、冷雪、蒋爽等好友三年来的陪伴与关心。还要感谢袁京磊、倪丽丽、郝丽玲、史召、贾飞等师弟师妹对我实验的帮助与支持。祝大家学业有成，前程似锦！

感谢参与论文评审和答辩的各位教授与专家，谢谢你们在百忙之中对我的学位论文进行评阅和审议，感谢答辩委员会的老师对我提出的宝贵意见。谢谢各位的辛勤工作，同时也感谢学校各部门老师为我们提供了良好的实验环境和生活环境。

最后，我要深深的感谢我的父母和所有关心我的家人，你们是我永远的港湾和最坚实的后盾。感谢你们多年来无私的付出和无尽的关爱。在这个温馨、民主的小家中我快乐的成长，现在长大成身体健康、心智明澈的样子，这于我而言是最大的幸福和幸运。

王 燕

2013 年 4 月 15 日

参考文献

1. Liu X, Chen Y, Wang X. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2004, 33(6): 725-729
2. Adak G K, Long S M, et al. Intestinal infection: trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000[J]. Gut, 2002, 51: 832-841
3. Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States[J]. Emer Inf Dis, 1999, 5: 607-625
4. 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 2003-2007 年中国 1060 起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生学杂志, 2010, 3: 224-228
5. 韩春来. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 家禽科学, 2009, 1: 43-46
6. 徐君飞, 张居作. 2001-2010 年中国食源性疾病暴发情况分析[J]. 中国卫农学通报, 2012, 28(27): 313-316
7. 张淑红, 申志新, 王英豪. 副溶血性弧菌污染现状及其研究进展[J]. 中华医学研究杂志, 2006, 4: 687-690
8. 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
9. 冯建良, 童鹤泉. 影响细菌性食物中毒原因查明率的有关因素及对策探讨[J]. 中国卫生监督杂志, 2003, 10(5): 299-301
10. 中国国家标准化管理委员会. GB/T4789.20-2003 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
11. 焦振泉, 郭云昌等. 食源性致病菌检测方法研究进展—I.传统检测方法[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(1): 58-61
12. Croci L, Suffredini E, et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 10(2): 229-237
13. 焦振泉, 郭云昌等. 食源性致病菌检测方法研究进展—II.分子生物学检测方法[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(1): 153-157
14. 中国国家标准化管理委员会. GB/T4789.7-2008 食品卫生微生物学检验水产食品检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
15. Salo S, Alanko T, Sjöberg A M, et al. Validation of the Hygicult E dipslides method in surface hygiene control: a Nordic collaborative study[J]. J AOAC Int. 2002, 85(2): 388-394
16. SMITH W L, MCGARVEY K L, CULLOR J S. The use of spiral plating and microscopic colony counting for the rapid quantitation of *Mycobacterium paratuberculosis*[J]. Lett Appl Microbiol, 2003, 36(5): 293-296
17. Shintani T, Yamada K, Torimura M. Optimization of a rapid and sensitive identification system for *Salmonella enteritidis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 210(2): 245-249
18. Seo K H, Brackett R E, Frank J F. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immune-magnetic flow cytometry in ground beef, apple juice, and milk[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 44(1-2): 115-123
19. Van H, Huis J H. Rapid and alternative screening methods for micro biological analysis[J]. J AOAC Int, 1997, 80(4): 934-940

-
20. Gibson D M, Coombs P, Pimbley D W. Automated conductance method for the detection of Salmonella in foods:collaborative study[J]. J AOAC Int, 1992, 75: 231-236
 21. 张晓华, Raberason P, Auatin B. 检测海洋弧菌的酶联免疫吸附试验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 111-112
 22. 王克波, 杨俊, 杨志俊. ELISA 试验的质量控制[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 111-112
 23. 刘明. 一种 O157:H7 大肠杆菌抗原胶体金检测试纸条[P]. 中国专利, 200510086856.6
 24. 王静, 等. 一种单增李斯特菌胶体金试纸条及其制备方法和应用[P]. 中国专利, 200910084970.3
 25. 刘明. 一种用于检测空肠弯曲菌特异性抗原的快速检测试纸条[P]. 中国专利, 200810112731.X
 26. 刘明. 一种炭疽芽孢杆菌荚膜抗体胶体金检测试纸条[P]. 中国专利, 200510086849.6
 27. 熊国华, 于莉, 曹际娟等. 单增李斯特菌免疫胶体金试纸条快速检测[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(2): 248-249
 28. 朱明磊, 郭鄂平. 胶体金免疫层析技术在病原微生物检测中的应用[J]. 青岛医药卫生, 2011, 43(1): 43-45
 29. 刘洪贵, 武瑞. 免疫层析法快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(3): 283-287
 30. 陈琼, 孔繁德, 张长弓等. 沙门氏菌快速检测试纸条的研制与应用[J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28(5): 6-8
 31. Olsvik O, Popovic T, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1994, 7(1): 43-54
 32. 郝华. 用于海洋弧菌快速检测的免疫磁珠技术的研究[D]: [硕士学位论文]. 福建: 集美大学, 2010
 33. 张凡非, 杉山宽治, 西尾智裕. 利用免疫磁珠法分离环境及食品中产生 TDH 副溶血性弧菌的研究[J]. 中国卫生监督杂志, 2004, 11(1): 7-9
 34. 卢强, 陈贵连, 林万明. 沙门氏菌属基因探针检测研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 1995, 5(1): 58-60
 35. 曹小红, 朱雪兰, 陈艳. PCR 法制备地高辛标记 DNA 探针斑点杂交检测副溶血性弧菌 *tlh* 基因[J]. 中国食品卫生, 2009, 21(4): 340-343
 36. WANG R F, CAO W W, FRANKLIN W, et al. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of clostridium perfringens in food[J]. Mol Cell Probes, 1994, 8(2): 131-137
 37. 钱玉春, 类延花, 胡中旺. 4 种食源性致病菌的多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(9): 2042-2045
 38. 葛菲菲, 徐锋, 等. 副溶血性弧菌 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3): 229-232
 39. 孙宏迪, 杜昕颖, 等. 副溶血弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(8): 969-972
 40. 扈庆华, 郑薇薇等. 双重实时 PCR 快速同时检测霍乱弧菌和副溶血弧菌[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 1004-1007
 41. George M B, Jessica L N, Michael C L. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, (53): 149-155
 42. Xaver Y Z, Karsunke R N, Michael S. Development of a multichannel flow-through chemiluminescence microarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria[J]. Anal Bioanal Chem, 2009 (395): 1623-1630

43. Ho S E, Byeong H H, et al. Multiple detection of food-borne pathogenic bacteria using a novel 16S rDNA-based oligonucleotide signature chip[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007(22): 845–853
44. 陈昱. 基因芯片技术在食源性致病微生物检测中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2009
45. 丁晓莹. 基于核酸适配子识别的致病菌及可卡因检测方法研究[D]: [硕士学位论文]. 江苏: 江南大学, 2011
46. Nuo D, Shi J W, et al. Selection and identification of a DNA aptamer targeted to *Vibrio Parahaemolyticus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 4034–4038
47. 窦勇, 胡佩红. ELISA 法快速检测水产品中副溶血性弧菌[J]. 现代食品科技, 2008, 24(6): 598-602
48. Wannipa P, Sirirat R, et al. Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*[J]. Dis Aquat Ory, 2005, 63: 161–168
49. 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
50. 杨智慧, 李宁求, 白俊杰等. 19 株海水鱼致病性弧菌 OmpK 基因序列及其抗原性分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 807-812
51. Hui L, Ming Z Y, et al. Immunoproteomic Identification of Polyvalent Vaccine Candidates from *Vibrio parahaemolyticus* Outer Membrane Proteins[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(5): 2573–2583
52. 李忠明主编. 当代新疫苗[M]: 第 1 版. 北京: 高等教育出版社, 2001
53. 唐小千, 战文斌, 周丽, 绳秀珍. 6 种海洋致病性弧菌 36 kDa 外膜蛋白特性分析[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(2): 197-202
54. 董传甫, 林天龙, 许斌福等. 电泳和免疫印迹分析副溶血性弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(7): 619-623
55. 张晓华, 徐怀恕. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(4): 49-52
56. 居尔毅, 宁喜斌. 副溶血性弧菌外膜蛋白的提取与免疫鉴定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 14116-14117
57. 周末, 曹世诺, 李艳茹等. 林蛙嗜水气单胞菌外膜蛋白基因的克隆、分析及蛋白结构预测[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(2): 158-160
58. 臧大鹏. 牛结核分支杆菌外膜蛋白 OMP37、OMP12 基因的克隆表达及免疫活性检测[D]: [硕士学位论文]. 山东: 山东农业大学, 2008
59. Fethi B A, Ali E, et al. Identification of outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* altered in response to γ -irradiation of long-term starvation[J]. Research in Microbiology, 2010 (161): 869–875
60. 李研东, 卢士英, 任洪林等. 副溶血弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及原核表达[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(5): 572-574
61. 毛芝娟, 由振强, 魏永伟, 于涟. 副溶血弧菌 ZJ2003 株两种铁调外膜蛋白的克隆、表达和免疫原性[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 563-568
62. Zhang C, Yu L, Qian R. Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK-GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007 (103): 1587–1599

-
63. 杜玉萍, 陈清等. 抗副溶血弧菌 TLH 蛋白多克隆抗体的制备及其 ELISA 双抗体夹心检测法的研究[J]. 华南预防医学, 2007, 33(1): 43-45
64. 李志峰, 聂军, 戴迎春等. 副溶血弧菌 *tlh* 基因的克隆、表达及功能的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(3): 193-195
65. Ye Y, Sheping W, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of recombinant flagellin A from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(6): 1254-1260
66. McCarter L L. Polar flagellar motility of the Vibrionaceae[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(3): 445-462
67. 胡鹤. 稀土上转换发光纳米材料的制备及其在生物医学成像中的应用[D]: [博士学位论文]. 上海: 复旦大学, 2009
68. Wang F, Liu X G. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals[J]. Chem. Soc. Rev. 2009, 38: 976-989
69. 刘成辉. 稀土氟化物发光纳米晶的可控合成、表征及表面修饰[D]: [博士学位论文]. 北京: 清华大学, 2009
70. Yi G S, Lu H C, Zhao S Y, et al. Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nano crystalline NaYF₄:Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors[J]. Nano Lett., 2004, (4): 2191-2196
71. Wang L Y, Li Y D. Green upconversion nanocrystals for DNA detection[J]. Chem. Commun., 2006: 2557-2559
72. Shi J W, Nuo D, et al. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and Ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011 (30): 35-42
73. Zhao H H, Shi J W, et al. Sensitive detection of carcinoembryonic antigen with magnetic nano-bead and upconversion nanoparticles-based immunoassay[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012 (66): 225-231
74. 弓紫丰. 丙酮酸磷酸双激酶基因克隆、表达及其在生物发光检测中的应用[D]: [硕士学位论文]. 江苏: 江南大学, 2012
75. Yan D L, Hong L R, et al. Cloning, Expression, and Genus-Specificity Analysis of 28 kDa OmpK from *Vibrio alginolyticus*[J]. Food Microbiology and Safety, 2010, 75(4): 198-203
76. Zhi J M, Lian Y, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2007 (23): 567-575
77. 杜玉萍. 四种常见食物中毒致病胶体金免疫渗滤法快速诊断的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 第一军医大学, 2006
78. Rong H Q, Zhao H X, et al. Expression and purification of two major outer membrane proteins from *Vibrio alginolyticus*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008 (24): 245-251
79. 李涛, 柳增善, 魏艳华等. 副溶血性弧菌融合鞭毛基因的表达与免疫学性质[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(4): 394-398
80. 戴启宇, 宋蓓, 王会英等. AIF 多克隆抗体的制备纯化和鉴定[J]. 实用医药杂志, 2009, 26(10): 67-68
81. 樊景凤, 梁玉波等. 凡纳滨对虾红体病原菌间接 ELISA 快速检测方法的研究[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 113-117
82. 窦勇, 宁喜斌. 副溶血弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. 食品工业科技, 2007, 28(6): 205-209

83. 马兴铭主编. 医学免疫学实验技术[M]: 第1版. 兰州: 兰州大学出版社, 2005.8
84. 金伯泉主编. 细胞核分子免疫学实验技术[M]: 第1版. 西安: 第四军医大学出版社, 2002.11
85. Anita M, Tania F, et al. Detection of environmental *Vibrio parahaemolyticus* using a polyclonal antibody by flow cytometry[J]. *environmental microbiology reports*, 2010, 2(1): 158–165
86. 刘道亮, 赵占民, 胡连霞等. 应用流式细胞技术快速检测液态商品中的细菌总数[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 67-68
87. 余楠, 袁小澎, 晋晶等. 流式细胞术鉴定特异性识别曲霉孢子单克隆抗体[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(3): 157-163
88. 喻伟. 免疫磁珠的制备及其初步应用[D]: [硕士学位论文]. 湖北: 华中农业大学, 2010
89. 王文凤. 真菌毒素寡核苷酸适配体的筛选与应用[D]: [硕士学位论文]. 江苏: 江南大学, 2012
90. Gha-Young K, Ahjeong S. Development and characterization of a magnetic bead-quantum dot nanoparticles based assay capable of *Escherichia coli* O157:H7 quantification[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010 (677): 90–96
91. Xiao F W, Qiang Z. A fluorescent sandwich assay for thrombin using aptamer modified magnetic beads and quantum dots[J]. *Microchim Acta*, 2012(178): 349–355
92. 苏晨曦, 孙晓红, 等. 副溶血性弧菌免疫磁珠的制备及其应用[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(17): 313-316
93. Shi J W, Nuo D, et al. Aptamer-functionalized magnetic nanoparticle-based bioassay for the detection of ochratoxin a using upconversion nanoparticles as labels[J]. *The Royal Society of Chemistry*, 2011: 845–853
94. Shi J W, Nuo D, et al. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011(30): 35–42
95. 汪翠玲, 潘南胜, 任怀之. 兔血清免疫球蛋白的非层析法纯化及方法比较[J]. *湖北预防医学杂志*, 2002, 13(1): 12-13
96. Michella M, Andrew P. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and asites fluid[J]. *J Immunol Methods*, 1987, 96(2): 271-278
97. 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 312-314
98. 阳德. 纳米生物技术学[M]. 北京: 科学出版社, 2009
99. 缪婷婷. 基于 CdTe 量子点的致病菌及巨噬细胞检测方法研究[D]: [硕士学位论文]. 江苏: 江南大学, 2010
100. Wang L Y, Bao J, Wang L, et al. One pot synthesis and bioapplication of amine-functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres[J]. *Chem Eur*, 2006, 12(24): 6341-6347

附 录：作者在攻读硕士学位期间发表的论文

王燕，夏雨，王周平. 副溶血性弧菌鞭毛蛋白 FlaA 的重组表达与多克隆抗体制备 [OL]. 中国科技论文在线 (<http://www.paper.edu.cn>) . 2013-03-01. 评定五星