

基于免疫磁分离的荧光微球免疫层析法 检测猪霍乱沙门氏菌

黄震¹ 夏诗琪² 刘道峰³ 刘成伟³ 赖卫华^{*1}

¹(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,南昌 330047)

²(江西省林业科学院,南昌 330032) ³(江西省疾病预防控制中心,南昌 330096)

摘 要 建立了基于免疫磁分离的荧光微球免疫层析法,检测猪霍乱沙门氏菌。待检样品经免疫磁分离富集和热洗脱处理后,用荧光微球免疫层析试纸条进行检测。每毫克纳米磁珠标记 30 μg 抗体制备的免疫磁珠,对浓度为 $10^2 \sim 10^6$ CFU/mL 的猪霍乱沙门氏菌的捕获率均大于 90%,特异性好;在 pH=6 时,以 300 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 猪霍乱沙门氏菌单抗 11D8-D4 标记荧光微球,制备免疫荧光微球;以 2.0 mg/mL 猪霍乱沙门氏菌单抗 5F11-B11 喷涂检测线(T 线),以 1.0 mg/mL 驴抗鼠 IgG 喷涂质控线(C 线),制备免疫层析试纸条。采用建立的基于免疫磁分离的荧光微球免疫层析方法检测猪霍乱沙门氏菌,在 PBS 缓冲液中检出限为 1.5×10^5 CFU/mL,牛奶中检出限为 7.6×10^5 CFU/mL,与直接采用荧光微球免疫层析方法检测相比,检出限分别降低了 10 倍和 200 倍。本方法可有效富集牛奶中的沙门氏菌,避免了基质干扰,灵敏度大大提高,具有较好的应用前景。

关键词 免疫磁分离; 荧光微球; 免疫层析; 猪霍乱沙门氏菌

1 引言

沙门氏菌是一类能够导致人畜共患疾病的食源性致病菌^[1],可以引起肠胃炎、伤寒、败血症等多种疾病^[2,3]。传统的沙门氏菌检测方法,需经过前增菌、选择性增菌、分离培养等过程,费时(5~7 天)费力^[4]。而其它检测方法,如聚合酶链式反应^[5]、电化学法^[6]、酶联免疫吸附法^[7]和石英晶体微天平法^[8]等,虽然灵敏度较高,但操作繁琐,难以满足现场检测的需求。

免疫层析法具有简便、快速和灵敏等优势,已广泛应用于食品安全^[9]、医学检验^[10]和环境检测^[11]等领域。荧光微球(Fluorescent microspheres, FMs)为发射光谱类的新型标记物,能有效消除背景干扰^[12],提高检测灵敏度^[13~15]。但荧光微球免疫层析方法(FM lateral flow assay, FM-LFA)用于实际样品的检测时,常由于目标菌浓度低、基质成分复杂,对检测结果有较大的影响^[16,17]。

免疫磁分离(Immunomagnetic separation, IMS)利用免疫磁性材料的磁性和特异性,在外加磁场作用下,将基质中的目标物分离、富集^[18]。此方法能有效浓缩目标物,避免基质对检测过程的干扰,因此常作为食品、医学、环境检测中的前处理手段^[19,20]。

目前,已有集成 IMS 和胶体金免疫层析方法的报道^[21,22],与传统胶体金免疫层析方法相比,此方法的灵敏度更高,检出时间更短,但灵敏度偏低^[23],因此,将高灵敏的荧光微球免疫层析法与 IMS 结合,有望进一步提高方法的检测灵敏度。本研究建立了基于 IMS 的 FM-LFA 法检测猪霍乱沙门氏菌的方法,对于食品中食源性致病菌的检测具有重要参考意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

荧光微球试纸条读取仪(上海互恒科学仪器有限公司);XYZB3050 喷点平台(美国 BIODOT 公司);HGS-201 切条机(杭州峰航科技有限公司)。

表面羧基化的荧光微球(直径 175 nm,最大激发波长 470 nm,最大发射波长 525 nm,10 mg/mL,德

2016-07-28 收稿;2016-12-07 接受

本文系国家自然科学基金(No. 31271863),江西省教育厅落地项目(No. KJLD13009),江西省生猪产业质量安全岗位专家项目(No. JXARS-03)资助

* E-mail: talktolaiwh@163.com

国默克公司);表面羧基化的磁珠(Magnetic nanobeads, MNBs, 上海奥润微纳新材料科技有限公司,直径 180 nm, 10 mg/mL);抗猪霍乱沙门氏菌单克隆抗体 11D8-D4、5F11-B11(实验室自制)^[22];驴抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);PVC 底板、聚酯膜、吸水纸(上海金标生物技术有限公司);牛血清蛋白(BSA, Amresco 公司);酪蛋白(美国 Sigma 公司);硝酸纤维素膜(NC 膜, 德国 Sartorius 公司);BCA 蛋白微量定量试剂盒(美国赛默飞公司);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基硫代琥珀酰亚胺(NHSS)、2-(*N*-吗啉)乙磺酸(MES)等化学试剂均为分析纯,购于上海阿拉丁试剂有限公司;牛奶购自本地超市。

猪霍乱沙门氏菌(ATCC 10708)、甲型副伤寒沙门氏菌(ATCC9150)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 13311)、肠炎沙门氏菌(ATCC 13076)、鸭沙门氏菌(ATCC 9270)、普通大肠杆菌(ATCC 25922)、大肠杆菌 O157:H7(ATCC 43888)、阪崎肠杆菌(CMCC 45401)、单增李斯特菌(ATCC 13932)、枯草芽孢杆菌(BD168, 菌株来自江西省疾病预防控制中心)、普通变形杆菌(CMCC 49027)、蜡样芽孢杆菌(CMCC 63305)、福氏志贺菌(CMCC 2457)、藤黄微球菌(CMCC 28001)保存于本实验室。

2.2 免疫磁珠的制备与优化

2.2.1 免疫磁珠的制备 取 100 μL 磁珠母液,用 MEST 缓冲液(0.01 mol/L MES, pH 5.5, 0.02% Tween-20)洗涤 3 次。加入 1 mL 新配制的 10 mg/mL 的 EDC 和 NHSS 溶液重悬。室温下混旋,活化 1 h 后,磁分离,弃上清液,沉淀用 1 mL 0.01 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液(BS, pH 8.5)重悬。加入 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (抗体/磁珠)单抗 11D8-D4,室温下混旋标记 1 h,磁分离,弃上清液。沉淀以 1 mL 含 1% BSA 的 BS 缓冲液重悬,室温下混旋封闭 1 h。经磁分离弃上清液,沉淀用 BST 缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 8.5, 0.02% Tween-20)洗涤 3 次,以 100 μL 重悬液(0.01 mol/mL PBS, pH 8.5; 1% BSA; 5% 蔗糖; 3% 海藻糖; 0.05% PEG-20000; 0.4% Tween-20; 0.05% NaN_3)重悬,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.2.2 免疫磁珠抗体标记量的优化 按照 2.2.1 节方法,分别按抗体/磁珠=0、20、30、40 和 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (w/w)的比例加入单抗 11D8-D4 制备免疫磁珠(Immunomagnetic beads, IMBs)。分别取 100 μg IMBs 与 1 mL 猪霍乱沙门氏菌菌液(2.1×10^6 CFU/mL)混合,室温下混旋反应 1 h,磁分离,取上清液,用平板计数法计算菌数,按公式(1)计算捕获率(Capture efficiency, CE)。所有数据均为 3 次实验的平均值。

$$\text{CE} = \frac{n_1 - n_2}{n_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中, n_1 为总菌数, n_2 为上清液中菌数。

2.3 免疫磁分离条件优化与评价

2.3.1 IMBs 用量的优化 分别取 5, 20, 50, 100 和 200 μg IMBs 与 1 mL 猪霍乱沙门氏菌菌液(2.1×10^6 CFU/mL)混合,室温反应 1 h,磁分离,计算 CE。

2.3.2 IMBs 对不同浓度猪霍乱沙门氏菌的捕获率 分别取 1 mL 不同浓度的猪霍乱沙门氏菌菌液(2.1×10^2 , 2.1×10^3 , 2.1×10^4 , 2.1×10^5 和 2.1×10^6 CFU/mL),加入 100 μg IMBs,室温反应 1 h,磁分离,计算 CE。

2.3.3 IMBs 的特异性分析 1 株猪霍乱沙门氏菌和 13 株非猪霍乱沙门氏菌被用于 IMBs 的特异性分析实验。分别取 1 mL 待检菌菌液(10^6 CFU/mL),加入 100 μg IMBs,室温反应 1 h,磁分离,计算 CE。

2.4 免疫荧光微球的制备与条件优化

2.4.1 免疫荧光微球的制备 取 1 mL 磷酸盐缓冲液(PB, pH 6, 0.02 mol/L),加入 50 μg 荧光微球,涡旋混匀后加入 5 μL EDC 溶液(1 mg/mL)。磁力搅拌下,缓慢加入 11D8-D4 抗体,反应 2 h, 11000 r/min 离心 20 min,取上清液,用 BCA 试剂盒测上清中的游离抗体含量,按公式(2)计算抗体偶联率(Conjugating ratio, CR)。沉淀以 1 mL PB 缓冲液重悬,加入 100 μL 5% 酪蛋白封闭 1 h。11000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀用 100 μL 重悬液(0.02 mol/L Na_2HPO_3 , pH 7.4; 3% 海藻糖; 1% 酪蛋白; 3% 蔗糖; 0.1% 叠氮化钠; 1% Tween-20)重悬,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

$$\text{CR} = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中, c_1 为加入抗体量, c_2 为上清液中游离抗体量。

2.4.2 标记参数的优化 在不同 pH 条件下制备免疫荧光微球 (Immunofluorescent microspheres, IFMs), 测量抗体偶联率, 然后以制备的 IFMs 检测猪霍乱沙门氏菌 (1.52×10^6 和 1.52×10^7 CFU/mL); 分别按抗体/荧光微球=100, 200, 300, 400, 500 和 600 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (w/w) 的比例加入单抗 11D8-D4 制备 IFMs, 并测量抗体偶联率, 然后以制备的 IFMs 检测猪霍乱沙门氏菌。

2.5 FM-LFA 的优化与评价

2.5.1 荧光微球免疫层析试纸条的组装 NC 膜上分别喷涂抗猪霍乱沙门氏菌单抗 5F11-B11 和驴抗鼠 IgG (1.0 mg/mL) 作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线), 30 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 4 h。将样本垫、结合垫、NC 膜、吸水纸依次粘贴在 PVC 底板上, 组装成试纸条。

2.5.2 T 线抗体浓度的优化 分别以 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 mg/mL 的 5F11-B11 抗体喷涂 T 线, 取 100 μL 猪霍乱沙门氏菌 (1.52×10^7 , 3.8×10^6 和 1.9×10^6 CFU/mL) 与 2 μL IFMs 预反应 5 min, 然后用荧光微球免疫层析试纸条检测, 10 min 后用荧光读取仪测定 T 线信号值。

2.5.3 FM-LFA 的特异性分析 1 株猪霍乱沙门氏菌和 13 株非猪霍乱沙门氏菌被用于试纸条的特异性实验。分别取 100 μL 待检菌液 (1×10^7 CFU/mL) 和 2 μL 免疫荧光微球预反应 5 min, 然后用荧光微球免疫层析试纸条检测, 10 min 后用荧光读取仪测定 T 线信号。

2.6 基于 IMS 的 FM-LFA 的建立与评价

2.6.1 基于 IMS 的 FM-LFA 的建立 向 1 mL 猪霍乱沙门氏菌菌液中加入 100 μg 免疫磁珠, 室温下反应 1 h, 磁分离, 弃上清液, 沉淀以 100 μL PBS 重悬, 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 洗脱磁珠上的目标菌^[24], 磁分离后用 FM-LFA 检测。

2.6.2 FM-LFA 与基于 IMS 的 FM-LFA 在不同基质中灵敏度的比较 取 PBS 梯度稀释猪霍乱沙门氏菌 (0 , 7.6×10^4 , 1.52×10^5 , 7.6×10^5 , 1.52×10^6 , 3.8×10^6 , 7.6×10^6 和 1.52×10^7 CFU/mL), 分别按照 2.5.3 和 2.6.1 节的方法进行检测。

取 100 μL 猪霍乱沙门氏菌加标的牛奶 (终浓度为 0 , 7.6×10^4 , 1.52×10^5 , 7.6×10^5 , 1.52×10^6 , 3.8×10^6 , 7.6×10^6 , 1.52×10^7 , 1.52×10^8 和 3.14×10^8 CFU/mL), 按照 2.5.3 节的方法进行检测。取 1 mL 猪霍乱沙门氏菌加标的牛奶 (终浓度为 0 , 7.6×10^4 , 1.52×10^5 , 7.6×10^5 , 1.52×10^6 , 3.8×10^6 , 7.6×10^6 和 1.52×10^7 CFU/mL), 按照 2.6.1 节的方法进行检测。

3 结果与讨论

3.1 IMBs 抗体标记量及 IMBs 用量的优化

如图 1A 所示, 随着标记抗体投入量的增加, IMBs 对猪霍乱沙门氏菌的捕获率不断升高, 当抗体投入量为 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁珠时, 捕获率为 93.75%, 随抗体投入量不断增加, 捕获率趋于稳定。这是由于磁珠表面羧基量是一定的, 随着标记抗体量的增加, 磁珠表面偶联的抗体量逐渐增加, 并趋于稳定, 免疫磁珠对猪霍乱沙门氏菌的捕获率也趋于稳定。因此最优抗体投入量选择为抗体/磁珠=30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (w/w)。

如图 1B 所示, 随着 IMBs 用量的增加, IMBs 对猪霍乱沙门氏菌的捕获率逐渐增大, 当 IMBs 的用量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 捕获率达到 90%, 增加 IMBs 的用量到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 捕获率没有明显增加。因此, 最优 IMBs 用量选择为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2 对不同浓度的猪霍乱沙门氏菌的捕获效率

如图 1C 所示, 制备的 IMBs 对 2.1×10^2 , 2.1×10^3 , 2.1×10^4 , 2.1×10^5 和 2.1×10^6 CFU/mL 的猪霍乱沙门氏菌捕获率均达到 90% 以上, 说明制备的 IMBs 可对浓度 $10^2 \sim 10^6$ CFU/mL 的猪霍乱沙门氏菌进行有效富集。

3.3 IMBs 特异性实验的结果

IMBs 对 1×10^7 CFU/mL 猪霍乱沙门氏菌的捕获率可达 93%, 对 1×10^7 CFU/mL 的 13 株非猪霍乱沙门氏菌的捕获率小于 5%, 表明 IMBs 捕获特异性较好。

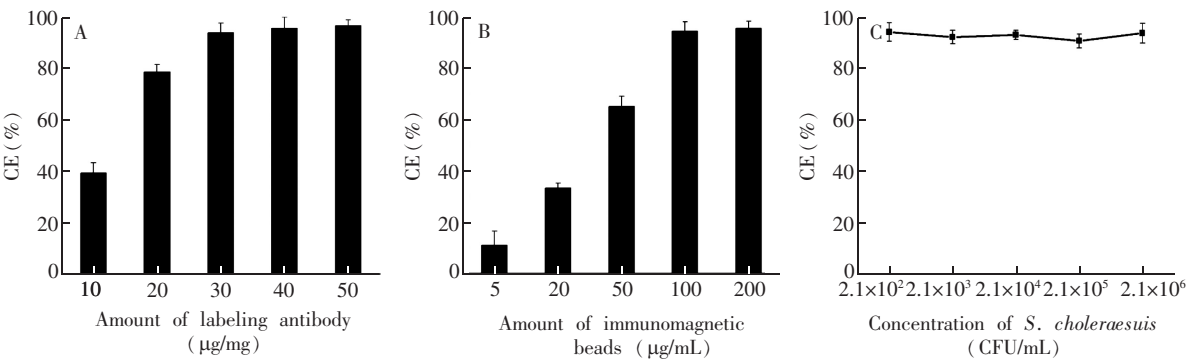


图1 (A)不同抗体标记量时的捕获率;(B)不同 IMBs 用量时的捕获率;(C)对不同浓度猪霍乱沙门氏菌的捕获率

Fig.1 Capture efficiency (CE) of immunomagnetic beads (IMBs) under different conditions: (A) CE with different amount of labeling antibody, (B) CE with different amount of IMBs, and (C) CE with different concentrations of *S. choleraesuis*

3.4 IFMs 标记条件的优化

3.4.1 IFMs 标记 pH 值的优化 pH 值对荧光微球的标记影响很大,会影响抗体表面可供偶联的活性基团的数量和其暴露程度,从而影响偶联率,也可能影响抗体和荧光微球的结合方式,从而影响 IFMs 的活性^[25]。如表 1 所示,当 pH=6 时,偶联率最高。检测 1.52×10^7 CFU/mL 的目标菌时,T 线的信号值最大。检测 1.9×10^6 CFU/mL 目标菌时,只有 pH=6 的条件对应试纸条 T 线出现信号。因此,最佳标记条件选择 pH 6。

表 1 免疫荧光微球标记 pH 值的优化*

Table 1 Optimization of pH for preparation of immunofluorescent microspheres (IFMs) (n=3) *

pH	抗体偶联率 Conjugating rate (CR, %)	荧光微球上偶联的抗体 Amount of antibody conjugated to IFMs (µg)	T 线荧光信号值 Fluorescence signal of T line (a. u.)	
			1.52×10^7 CFU/mL	1.90×10^6 CFU/mL
5	65.5	196.5	104.7±12.2	—
6	77.7	233.1	295.9±21.8	64.1±2.2
7	72.3	216.9	138.9±4.8	—
8	70.6	211.8	113.2±7.4	—
9	33.7	101.1	31.0±7.0	—

* : The amount of antibody was 300 µg/mg and the concentration of antibody sprayed on T line was 2 mg/mL.

3.4.2 IFMs 标记时抗体用量的优化 如表 2 所示,当菌浓度为 1.52×10^7 CFU/mL 时,T 线信号值随着抗体投入量的增大呈现先上升后下降的趋势。这是由于荧光微球表面积一定,标记到荧光微球上的抗体过多会导致空间位阻效应,从而使 IFMs 和猪霍乱沙门氏菌的结合量减少, T 线信号值反而降低。当抗体投入量为 300 µg/mg 时,T 线信号值较高且抗体用量较少,故选择最优抗体投入量为300 µg/mg。

表 2 荧光微球标记抗体用量的优化*

Table 2 Optimization of labeling antibodies amount for IFMs (n=3) *

标记抗体量 Amount of labeling antibody (µg/mg)	抗体偶联率 Conjugating rate (CR, %)	荧光微球上偶联的抗体 Amount of antibody conjugate with IFMs (µg)	T 线荧光信号值 Fluorescence signal of T line (a. u.)	
			1.52×10^7 CFU/mL	1.90×10^6 CFU/mL
100	94.9	94.9	139.7±13.7	—
200	75.5	151.0	150.5±6.4	—
300	66.2	198.6	217.2±13.9	62.2±3.8
400	61.1	244.4	223.5±15.6	64.1±4.7
500	74.1	370.5	179.7±12.5	53.3±2.5
600	62.6	375.6	161.0±12.3	—

* : pH value of coupling system was 6 and concentration of antibody sprayed on T line was 2 mg/mL.

3.5 T 线抗体浓度的优化

由表 3 可知,当目标菌浓度为 1.52×10^7 CFU/mL, 3.80×10^6 CFU/mL 和 1.90×10^6 CFU/mL 时,T 线信号值随着 T 线抗体浓度的增加而增大,这是因为 IFMs 用量固定时,T 线抗体浓度越高,捕获的猪霍乱沙门氏菌-IFMs 复合物越多,T 线信号值逐渐增大。当 T 线抗体浓度达到 2.0 mg/mL 时,T 线荧光信号强度最大;继续增加 T 线抗体浓度至 2.5 mg/mL,T 线荧光信号没有明显增高。选择 2.0 mg/mL 为 T 线喷涂抗体最优浓度。

表 3 T 线喷涂抗体浓度的优化*
Table 3 Optimization of concentration of antibodies sprayed on test (T) line (n=3) *

T 线喷涂抗体浓度 Concentration of antibody sprayed on T line (mg/mL)	T 线荧光信号值 Fluorescence signal of T line (a. u.)		
	1.52×10 ⁷ CFU/mL	3.80×10 ⁶ CFU/mL	1.90×10 ⁶ CFU/mL
0.5	49.8 ± 1.1	—	—
1.0	82.0 ± 4.5	32.7±2.4	—
1.5	89.0±3.4	50.3±3.0	—
2.0	289.3±9.6	96.9±5.0	71.0±7.2
2.5	330.1±11.0	107.0±7.5	86.4±8.4

* : pH of coupling system was 6 and amount of antibody was 300 μg/mg.

3.6 FM-LFA 的特异性

用荧光微球试纸条检测时,猪霍乱沙门氏菌为强阳性结果,13 株非猪霍乱沙门氏菌为阴性结果(表 4),表明本方法的特异性较好。

表 4 试纸条特异性实验结果*
Table 4 Specificity test of fluorescent lateral flow test strip

菌种 Bacterial strain	结果 Result	菌种 Bacterial strain	结果 Result
猪霍乱沙门氏菌 <i>S. choleraesuis</i>	++	阪崎肠杆菌 <i>E. sakazakii</i>	—
甲型副伤寒沙门氏菌 <i>S. paratyphi A</i>	—	单增李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i>	—
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	—	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	—
肠炎沙门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	—	普通变形杆菌 <i>P. vulgaris</i>	—
鸭沙门氏菌 <i>S. anatum</i>	—	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereous</i>	—
普通大肠杆菌 <i>E. coli</i>	—	福氏志贺氏菌 <i>S. flexneri</i>	—
大肠杆菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	—	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	—

“++”: Indicates a strong positive result, “—”: Indicates a negative result.

3.7 FM-LFA 与基于 IMS 的 FM-LFA 在不同基质中的灵敏度

以猪霍乱沙门氏菌为目标菌,选择 T 线可检测出信号时所对应的最低菌浓度为检出限^[13,26]。如图 2A 所示,在 PBS 基质中,基于 IMS 的 FM-FLA 的检出限为 1.5×10^5 CFU/mL,而 FM-LFA 的检出限为 1.5×10^6 CFU/mL。基于 IMS 的 FM-FLA 的灵敏度比 FM-LFA 灵敏度提高 10 倍,表明 IMS 能有效浓缩目标菌,提高检测灵敏度。

图 2C 为基于 IMS 的 FM-FLA 检测牛奶中的猪霍乱沙门氏菌的结果,当牛奶中的猪霍乱沙门氏菌浓度为 7.6×10^5 CFU/mL 时,T 线可检测到荧光信号,检出限为 7.6×10^5 CFU/mL。而 FM-LFA 在牛奶中的检出限为 1.5×10^8 CFU/mL(图 2B),表明牛奶基质会严重影响荧光微球免疫层析试纸条的灵敏度,而 IMS 能有效避免基质对检测的干扰。

4 结 论

本研究建立了一种基于 IMS 的 FM-LFA 用于猪霍乱沙门氏菌的快速检测。通过 IMBs 对猪霍乱沙门氏菌进行富集,荧光微球试纸条在 PBS 和牛奶中的检出限分别为 1.5×10^5 和 7.6×10^5 CFU/mL,结果表明,基于 IMS 的 FM-LFA 能有效避免食品基质对检测结果的干扰,又能对目标物进行富集,从而提高检测方法的灵敏度。本方法可广泛应用于食源性致病菌的快速检测。

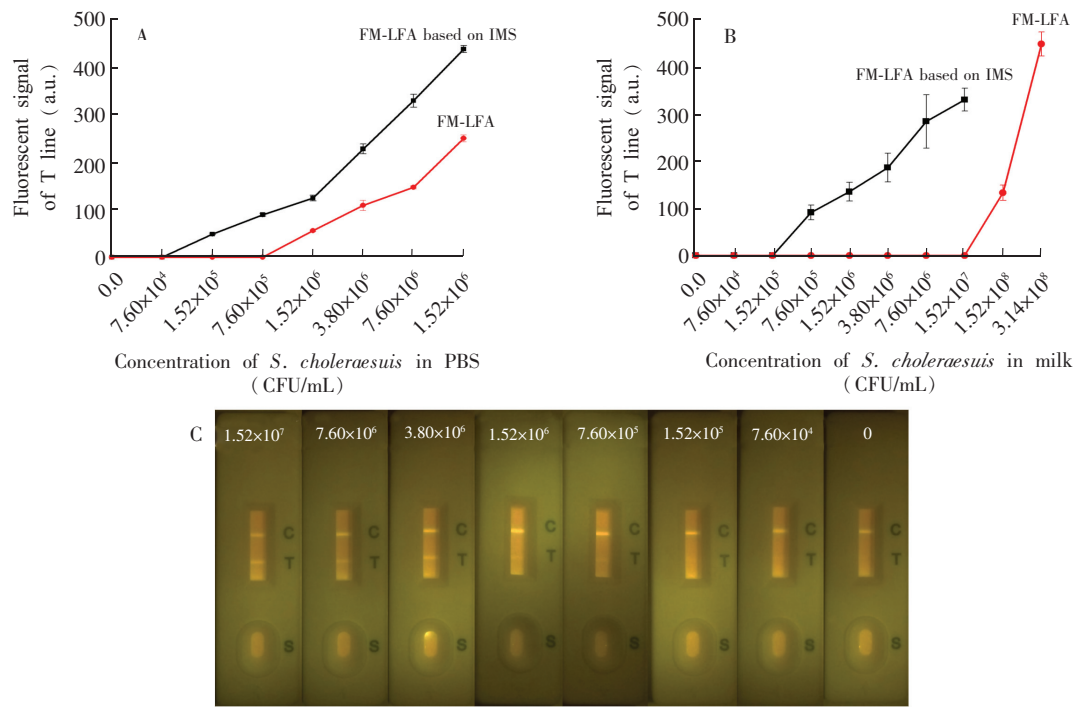


图2 FM-LFA 和基于 IMS 的 FM-LFA 检测灵敏度的比较。(A) 检测 PBS 基质中的猪霍乱沙门氏菌；(B) 检测牛奶中的猪霍乱沙门氏菌；(C) 基于 IMS 的 FM-LFA 检测牛奶中的猪霍乱沙门氏菌

Fig.2 Comparison of sensitivity between fluorescent microsphere (FM)-lateral flow assay (LFA) and FM-LFA based on immunomagnetic separation(IMS): (A) detection of *S. choleraesuis* in PBS by FM-LFA and FM-LFA based on IMS; (B) detection of *S. choleraesuis* in milk by FM-LFA and FM-LFA based on IMS; (C) strips image of FM-LFA based on IMS for detection of *S. choleraesuis* in milk

References

1 Maurischat S, Baumann B, Martin A, Malorny B. *Int. J. Food Microbiol.*, **2015**, 193: 8–14

2 Iwabuchi E, Maruyama N, Hara A, Nishimura M, Muramatsu M, Ochiai T, Hirai K. *J. Food Protect.*, **2010**, 73(11): 1993–2000

3 Müller L, Kjelsø C, Frank C, Jensen T, Torpdahl M, Søbørg B, Dorleans F, Rabsch W, Prager R, Gossner C. M, Ethelberg S. *Epidemiol. Infect.*, **2016**, 144(13): 2802–2811

4 Wang J Y, Chen M H, Sheng Z C, Liu D F, Wu S S, Lai W H. *RSC Adv.*, **2015**, 5(76): 62300–62305

5 Zhang Z, Xiao L, Lou Y, Jin M, Liao C, Malakar P K, Pan Y G, Zhao Y. *Food Control*, **2015**, 51: 31–36

6 Xiang C, Li R, Adhikari B, She Z, Li Y, Kraatz H B. *Talanta*, **2015**, 140: 122–127

7 Jain S, Chattopadhyay S, Jackeray R, Abid C Z, Kohli G S, Singh H. *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, 31(1): 37–43

8 Shen Z Q, Wang J F, Qiu Z G, Jin M, Wang X W, Chen Z L, Li J W. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26(7): 3376–3381

9 Giyoung K, Jongguk L, Changyeun M. *J. Biosyt. Eng.*, **2015**, 40(3): 277–283

10 Yang Y J, Li C H, Wang W, Dong T T, Xiong Y H, Shen J, Lai W H. *Anal. Methods.*, **2015**, 7(20): 8683–8688

11 Zhou Y, Li Y S, Meng X Y, Zhang Y Y, Yang L, Zhang J H, Wang X R, Lu S Y, Ren H L, Liu Z S. *Sensors Actuat. B.*, **2013**, 183: 303–309

12 Liu D F, Huang Y M, Chen M H, Wang S Y, Liu K, Lai W H. *Food Control*, **2015**, 50: 659–662

13 Xie Q Y, Wu Y H, Xiong Q R, Xu H Y, Xiong Y H, Liu K, Jin Y, Lai W H. *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 54(12): 262–265

14 ZHOU Yao-Feng, XIONG Si-Cheng, JIANG Hu, DUAN Hong, XIONG Yong-Hua, Andrew W. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(12): 1837–1843

周耀锋, 熊斯诚, 江湖, 段宏, 熊勇华, Andrew W. *分析化学*, **2015**, 43(12): 1837–1843

- 15 DUAN Hong, CHEN Xue-Lan, JIANG Hu, SHEN Jun, DONG Sheng-Ming, XIONG Yong-Hua, Andrew W. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(3): 338–343
段宏, 陈雪岚, 江湖, 沈骏, 董胜明, 熊勇华, Andrew W. 分析化学, **2015**, 43(3): 338–343
- 16 Zhou J, Zhu K, Xu F, Wang W J, Jiang H Y, Wang Z H, Ding S Y. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62(49): 12061–12066
- 17 Boris B D, Nadezhda A B, Alexandr E U, Anatoly V Z. *TRAC-Trend Anal. Chem.*, **2014**, 55: 81–93
- 18 CHENG Qiong, PENG Tu-Zhi, LIU Ai-Li, HE Liang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2005**, 33(8): 1068–1072
程琼, 彭图治, 刘爱丽, 何亮. 分析化学, **2005**, 33(8): 1068–1072
- 19 DU Chong-Lei, DU Wei, WANG Bing, FENG Wei-Yue, WANG Zhuo, ZHAO Yu-Liang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(6): 902–908
杜崇磊, 杜伟, 汪冰, 丰伟悦, 王卓, 赵宇亮. 分析化学, **2010**, 38(6): 902–908
- 20 LAN Xin-Yi, LIU Hui-Min, ZHENG Nan, LI Fa-Di, WANG Jia-Qi. *SAS*, **2015**, 48(S): 49–57
兰欣怡, 刘慧敏, 郑楠, 李发弟, 王加启. 中国农业科学, **2015**, 48(S): 49–57
- 21 CUI Xi, XIONG Qi-Rong, XIONG Yong-Hua, SHAN Shan, LAI Wei-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(12): 1812–1816
崔希, 熊齐荣, 熊勇华, 山珊, 赖卫华. 分析化学, **2013**, 41(12): 1812–1816
- 22 Xia S Q, Yu Z B, Liu D F, Xu C L, Lai W H. *Food Control*, **2016**, 59: 507–512
- 23 Etvi J, Tiina M, Teppo S, T EroS, Kim P. *Anal. Biochem.*, **2016**, 428(1): 31–38
- 24 Mao Y, Huang X L, Xiong S C, Xu H Y, Aguilar Z P, Xiong Y H. *Food Control*, **2016**, 59: 601–608
- 25 Chen Y, Xin Y, Yang H, Zhang L, Zhang Y, Xia X, Tong Y, Wang W. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2013**, 56(5): 6–13
- 26 Taro Y, Ryuji O, Eri H, Naoki M, Takashi M, Tomoyasu A, Fumiki M. *J. Microbiol. Meth.*, **2013**, 93(3): 251–256

Fluorescent Microspheres Lateral Flow Assay Based on Immunomagnetic Separation for Detection of *S. choleraesuis*

HUANG Zhen¹, XIA Shi-Qi², LIU Dao-Feng³, LIU Cheng-Wei³, LAI Wei-Hua^{*1}

¹(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

²(Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China)

³(Jiangxi Province Centers for Disease Control and Prevention, Nanchang 330096, China)

Abstract Immunomagnetic separation (IMS) was coupled with fluorescent microspheres lateral flow assay (FM-LFA) for rapid detection of *S. choleraesuis* in this study. The target bacteria were firstly enriched from sample by immunomagnetic beads (IMBs), then eluted by heat treatment and detected by fluorescent microspheres lateral flow test strip. The IMBs was labeled with 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ antibody, and the capture efficiency was greater than 90% against $10^2 - 10^6$ CFU/mL of *S. choleraesuis* with great specificity. The immunofluorescent microspheres were prepared by coupling 300 μg of 11D8-D4 monoclonal antibody with 1 mg of fluorescent microspheres at pH 6. Monoclonal antibody 5F11-B11 (2.0 mg/mL) and donkey anti-mouse IgG (1.0 mg/mL) were sprayed on nitrocellulose membrane as test line and control line, respectively. The FM-LFA based on IMS was used to detect *S. choleraesuis* in PBS and milk. The limits of detection in PBS buffer and milk were 1.5×10^5 CFU/mL and 7.6×10^5 CFU/mL respectively, which were 10 and 200 times lower than that of traditional fluorescent microspheres lateral flow assay, respectively. The results showed that the method, which could enrich *S. choleraesuis* in milk effectively, could avoid matrix interference and improve the detection sensitivity, thus had a good application prospect.

Keywords Immunomagnetic separation; Fluorescent microspheres; Lateral flow assay; *S. choleraesuis*

(Received 28 July 2016; accepted 7 December 2016)

This work was supported by the Jiangxi Agriculture Reseach System (No. JXARS-03) and the Jiangxi Education Bureau Technology (No. KJLD13009)