

文章编号: 1001-7453(1999)02-0028-05

双歧杆菌免疫学检测方法的研究

孙 震,张 灏,解 晴,厉 凡

(无锡轻工大学食品学院,江苏无锡 214036)

摘要: 建立双歧杆菌快速检测方法——间接 ELISA法。应用双歧杆菌细胞壁作为抗原所获得的抗血清,能够检测出双歧杆菌的最低浓度范围在 10^5 mL左右。在检测过程中无需纯化抗原。所建立的方法具有较强的特异性,能够有效地将两歧双歧杆菌与其它种属的微生物区别开来。

关 键 词: 双歧杆菌;免疫学方法;检测

中图分类号: TS207.4 **文献标识码:** A

国内外诸多专家学者对双歧杆菌深入、广泛的研究表明:双歧杆菌是人类及某些动物肠道中对机体有益的正常菌,它与机体的健康状况密切相关。关于细菌分类鉴定,目前国内外常采用的方法有:传统的生物学培养法,代谢产物法,核酸分子杂交技术,基因型分析法,菌细胞蛋白凝胶电泳谱分析技术,酶免疫学方法及 PCR技术等。至于双歧杆菌制品质量的鉴定,目前一般仍采用传统的生物学培养法。双歧杆菌是一种严格厌氧菌,现有的检测方法或需特殊的设备,或操作复杂、耗工费料,很难达到快速、准确的检测要求。本文旨在通过对双歧杆菌的血清学研究,利用抗原抗体间特异性结合的特性建立一种灵敏、快速、简便的方法,从而为利用 ELISA技术快速检测双歧杆菌提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

1) 两歧双歧杆菌 F-35 (*Bifidobacterium bifidum* F-35):作者所在实验室保存,从正常婴儿粪便中分离获得。

2) 双歧杆菌 XS(*Bifidobacterium* sp. XS):作者所在实验室从市售双歧制剂中分离获得^[1]。

3) 其它种属的细菌:作者所在实验室分离、鉴定和保存。

收稿日期:1998-11-13;修订日期:1998-02-26

基金项目:江苏省应用基础研究项目(BJ970008)

作者简介:孙 震(1966年 3月生),女,山西太原人,医学硕士,讲师。

1.2 检测样品

国内有关企业生产的双歧制剂,分别编号.

1.3 实验动物

ICR小鼠,购自江苏原子医学研究所. 6~8周龄,雌雄随机.

1.4 酶标抗体

购自上海细胞所,工作浓度 1:2 000.

1.5 培养基

MRS液体培养基^[2].

1.6 免疫原(细胞壁)的制备

方法^[3-4]:双歧杆菌接种于 MRS液体培养基中,39℃厌氧培养 24 h后,1 000 g 离心,收获菌体,以 0.9% NaCl(预冷)洗涤 2次,高速均质机 13 000 r/min,1 min;1 000 g 离心,弃沉淀;20 000 g,4℃冷冻高速离心,20 min,弃上清液;生理盐水洗涤 2次;分别加入质量浓度为 10 g/L的胰蛋白酶,10 mg/mL DNA酶 37℃,2 h;20 000 g 离心,弃上清液;加 10%三氯醋酸,35℃,24 h;以生理盐水洗涤 2次;丙酮,乙醚依次洗涤,脱水,干燥.

1.7 免疫血清的制备

用生理盐水稀释免疫原(细胞壁)至质量浓度为 1 mg/mL,每只小鼠每次背部皮下多点注射 0.1 mL;第一次注射时将稀释的免疫原与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,以后的 4次注射,则与等量的不完全佐剂乳化,注射间隔时间 14 d. 最后一次注射后 3 d,摘眼球放血处死,离心,收集血清.

1.8 待测抗原的制备

1.8.1 待测细胞碎片抗原的制备 将收获的菌体细胞用 pH9.6的碳酸包被液洗涤 2次,调整细胞浓度至 10^8 mL⁻¹,用高速均质机以 13 000 r/min进行 1 min破碎,使用时用碳酸包被液稀释至不同浓度,用于检测.

1.8.2 待测完整全细胞抗原的制备 将收获的双歧杆菌细胞,以 0.9%的 NaCl洗涤 2次,以 100℃ 5 min热致死,用 pH9.6的碳酸包被液洗涤 2次,用该包被液调整细胞浓度,用于检测.

1.9 间接 ELISA法^[5]检测双歧杆菌

待测抗原用碳酸包被液包被,4℃过夜,PBS-BSA封闭,抗血清用 PBS-BSA稀释 300倍作用,酶标二抗作用,OPD显色,490 nm测 O.D.值.各过程 37℃温育 2 h,每一步骤间用 PBST洗涤 3次.

1.10 夹心 ELISA法检测双歧杆菌

免疫血清包被,4℃过夜,PBS-BSA封闭,待测抗原作用,酶标二抗作用,OPD显色,490 nm测 O.D.值.各过程 37℃温育 2 h,每一步骤间用 PBST洗涤 3次.

2 结果与讨论

2.1 检测抗原的灵敏度

以 F-35的全细胞碎片,稀释成不同浓度包被,利用间接 ELISA法检测.结果见表 1.可看出,利用间接 ELISA法能够检测出双歧杆菌的最低浓度范围在 $10^5 \sim 10^4$ mL⁻¹.这一结果与 Kenji yasuda^[6]等报道的用单克隆抗体检测 *Porphyromonas gingivalis*的灵敏度接近.

据报道^[7]一般细菌细胞用 ELISA法检测的范围在 $\times 10^6 \sim \times 10^8$,用 DNA探针技术的检测范围是 $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^5$,本实验能获得较高的灵敏度,说明双歧杆菌的抗原主要集中在细胞壁表面,以细胞壁为免疫原所获得的抗血清能够灵敏地检测相应的抗原.但在本试验中所获得的抗血清的效价不够理想,不同批次之间也存在有一定的差异,其原因有待于进一步研究.

表 1 检测抗原的灵敏度

抗原	空白 ¹⁾	阴性 ²⁾	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
OD ₄₉₀	0.00	0.01	0.96	0.85	0.62	0.21	0.16	0.07	0.00	0.00

注: 1) 包被缓冲液包被反应板作空白对照; 2) 正常血清代替抗血清作阴性对照.

2.2 抗原的不同检测方式

分别以 F-35的全细胞碎片及完整全细胞作为抗原,利用间接 ELISA法进行检测.结果见表 2 在检测过程中所包被的抗原可以是经过处理的全细胞碎片,也可以是完整的全细胞,以何种方式处理抗原对检测结果影响不明显.说明在检测工作中无需纯化抗原,这使得该方法在使用中操作更简便实用,易于推广.

表 2 抗原不同被检方式的比较

抗原	空白	阴性对照	1.5×10^8	10^8	10^7	10^6	10^5
细胞碎片 OD _{490nm}	0.00	0.06	1.18	0.96	0.85	0.62	0.21
完整细胞 OD _{490nm}	0.00	0.02	1.04	1.00	0.56	0.53	0.11

2.3 不同检测方法的比较

以 F-35的全细胞碎片作为抗原,分别利用间接 ELISA法及夹心 ELISA法进行检测.结果见表 3.

表 3 不同检测方法的比较 (O. D. _{490nm}值)

检测方法	空白	阴性对照	10^8	2.5×10^7	1.2×10^7	6×10^6	3×10^6
间接 ELISA	0.00	0.00	0.80	0.62	0.48	0.38	0.22
夹心 ELISA	0.00	0.05	0.70	0.59	0.54	0.42	0.30

从表 3可看出,间接 ELISA法的灵敏度与夹心 ELISA法的基本一致.这一结果与 Oladepo^[8]等用多克隆抗体检测 *Listeria monocytogenes*的结果接近.但据 Oladepo报道,夹心 ELISA法具有较高的交叉反应,说明在检测中应直接包被抗原,利用间接 ELISA法进行检测.本实验关于间接 ELISA法的交叉反应性研究见 2.5,夹心 ELISA法的交叉反应性有待于进一步研究.由于在本实验中采用的抗血清的批次与其它实验不同,导致 OD值明显偏低,其原因笔者在 2.1中已提到,但其结果不影响两种检测方法的比较.

2.4 不同培养时间下的间接 ELISA法检测结果

通过对不同培养时间下双歧杆菌的间接 ELISA法的检测,可以得出 F-35在不同生长时期 OD_{490nm}值的变化,其结果与双歧杆菌的生长曲线 O. D. _{620nm}接近,见图 1.

细菌细胞的光密度值可表示培养物中菌量的多少,但发酵产物和培养基成分不能吸收在所用的波长范围内的光.而且培养物中有非细胞固体存在时,该技术也不能使用.从图 1中可看出,间接 ELISA法能够反映培养过程中菌体数量的变化,且不受培养物的影响,可以作为测量菌体数量的一种方法.

2.5 抗血清的特异性

利用双歧杆菌的细胞壁抗血清,检测本实验室保存的乳酸菌、双歧杆菌以及其它种属的

细菌,结果见表 4. 从表中可看出,以双歧杆菌的细胞壁作为免疫原得到的抗血清用来检测双歧杆菌,所得结果不仅与 *Bifidobacterium bifidum* F-35 具有良好的反应,且与来源形态上与之差异很大的另一种(尚未鉴定到种)双歧杆菌(*Bifidobacterium* sp XS)具有良好的反应性,同时所得抗血清与双歧杆菌属以外的其它乳酸菌及其它种属的微生物不具有交叉反应性. 实验结果表明,所建立的方法能够有效地将双歧杆菌及其它种属的微生物区分开来,具有较强的特异性. 关于双歧杆菌 XS 的种的地位有待于进一步确定,但根据对其的初步鉴定^[1],与 F-35 同属于一个菌种的可能性不大,因此,实验结果同时说明,在双歧杆菌属的表面存在有相同的抗原,这为我们今后试剂盒的研制提供了理论依据.

2.6 利用抗血清检测双歧制品及乳酸菌制品

利用间接 ELISA 法检测了市售的 6 种双歧制品及 5 种乳酸菌制品,结果见表 5. 结果发现双歧杆菌抗血清能与制剂中的双歧杆菌发生明显的阳性反应,而在乳酸菌制品中没有发现该反应,因而所建立的方法可以用来检测保健食品中的双歧杆菌.

表 4 抗血清的特异性		
菌种名称	O. D. 490nm	结果
双歧杆菌 F-35 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	0.96	+
双歧杆菌 XS <i>Bifidobacterium</i> sp.	0.91	+
保加利亚乳杆菌 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0.00	-
嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	0.00	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0.00	-
白葡萄球菌 <i>Staphyloæccus albus</i>	0.04	-
腊状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	0.05	-
四联球菌 <i>Microæccus tetra</i>	0.00	-
沙门氏菌 <i>Salmonella</i> sp.	0.00	-
大肠杆菌 <i>Escherichia wil</i>	0.00	-

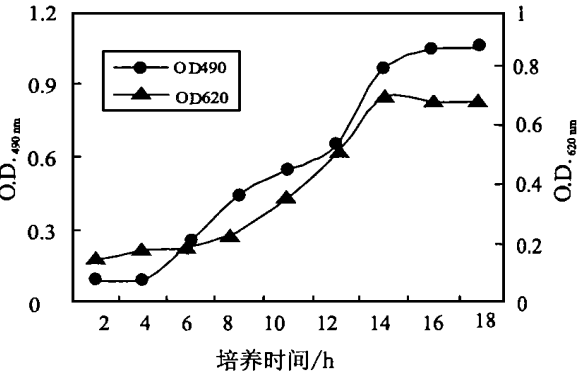


图 1 间接 ELISA 法与光密度法测定菌体数量的比较

关于双歧杆菌 XS 的种的地位有待于进一步确定,但根据对其的初步鉴定^[1],与 F-35 同属于一个菌种的可能性不大,因此,实验结果同时说明,在双歧杆菌属的表面存在有相同的抗原,这为我们今后试剂盒的研制提供了理论依据.

表 5 利用双歧杆菌抗血清检测市售商品

序号	制剂中所含主要微生物种类	O. D. 490nm	结果
样品 A ₁	<i>B. sp.</i> & <i>L. lactis</i>	0.54	+
样品 B ₁	<i>B. sp.</i>	0.84	+
样品 C ₁	<i>B. sp.</i> & <i>L. acidophilus</i>	0.45	+
样品 D ₁	未注明	0.76	+
样品 E ₁	<i>B. sp.</i> , <i>L. bulgarius</i> & <i>S. thermophilus</i>	0.16	±
样品 F ₁	<i>B. sp.</i> , <i>Enterococcus</i> sp & <i>Lactobacillus</i> sp.	0.27	+
样品 A ₂	<i>S. faecalis</i>	0.13	-
样品 B ₂	<i>L. lactis</i> & <i>S. thermophilus</i>	0.05	-
样品 C ₂	<i>S. thermophilus</i> & <i>L. bulgarius</i>	0.10	-
样品 D ₂	同样品 C ₂	0.02	-
样品 E ₂	同样品 C ₂	0.06	-

3 结 语

双歧杆菌制品是一种微生态调节剂,其活菌的数量决定或影响着制剂的品质. 由于微生态制剂是以其所含活菌的积极生命活动而达到其宿主微生态平衡的,因此其活菌含量的高低,始终是评定产品品质的关键指标. 然而,国内外至今尚缺乏真正有效的用以测定其活菌数量进而实现其品质评价的基本方法. 作者所建立的双歧杆菌免疫血清学检测方法快速、灵敏和专一. 该方法的推广应用不仅有助于双歧杆菌制剂产品的生产和品质监测,而且为制定

统一的行业质量标准提供了理论基础。对免疫血清学的进一步研究,将为双歧制剂中活菌数量的动态测定,提供一种可能的选择。

参考文献:

[1] 谢晴.双歧杆菌的分离鉴定及检测 [D]. 无锡:无锡轻工大学,1998

[2] DE MAN J C, ROGOSA M, SHARPE M E, et al. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* J [J]. **Appl Bacteriol**, 1960, 23 130~ 135.

[3] TULSKAYA E M, STRESHINSKAYA G M, NAUMOVA I B, et al. A new structural type of teichoic acid and some chemotaxonomic criteria of two species *Nocardiopsis dassonvillei* and *Nocardiopsis antarcticus* [J]. **Arch Microbiol**, 1993, 160 299~ 305.

[4] 诸葛健,王正祥编著. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.

[5] YASUDA T, OGAWA T, SHIMAUCHI H, et al. Identification of *Porphyromonas gingivalis* by an ELISA using a cellulose acetate paper point[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1995, 24 21~ 27.

[6] MELVIN W L, ASSAD D A, MILLER G A, et al. Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis [J]. **J Periodontal**, 1994, 65 576~ 582.

[7] OLADEPO D K, CANDLISH A A G, STIMSON W H, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* using polyclonal antibody[J]. **J of Appl Microbio**, 1992, 14 26~ 29

Studies on Immunology Methods Detect *Bifidobacterium Bifidum*

SUN Zhen, ZHANG Hao, XIE Qing, LI Fan

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract The indirect ELISA testing method for rapidly detecting *Bifidobacterium bifidum* has been developed. Mouse polyclonal antibodies against the cell wall from *Bifidobacterium bifidum* are obtained. The minimum value of *Bifidobacterium bifidum* concentration which is capable of being determined is about 10⁵ mL. Using the method can effectively differ *bifidobacterium bifidum* from other species of microbes without the purification of the antibody, which is highly specific.

Key words *bifidobacterium bifidum*; immunology method; detecting