时间分辨荧光免疫分析高灵敏检测嗜水气单胞菌

林鹏* 卢洁 郭松林 冯建军 王艺磊 陈锦民

(集美大学水产学院 农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门 361021)

摘要 建立了生物素-链霉亲和素时间分辨荧光免疫分析(BAS-TRFIA)高灵敏检测嗜水气单胞菌的新方法。以兔抗 IgG 包被微孔板,加入嗜水气单胞菌株 B18 和生物素化 IgG,生成的夹心复合物用 Eu^{3+} -链霉亲和素作为示踪物, Eu^{3+} 可与离解增强液形成时间分辨荧光(TRF),通过 TRF 值对病原菌定量。方法的检测限为 1.0×10^2 cfu/mL,在 $1.0 \times 10 \sim 1.0 \times 10^6$ cfu/mL 范围内线性良好,相关系数 0.9716。用该法检测时,不同来源的嗜水气单胞菌以及其它气单胞菌均呈阴性。板内和板间的变异系数分别小于 5.00% 和 9.00%。所有相关检测试剂 37 °C 恒温放置 6 d 后,检测性能无明显改变。对 60 份人工感染的美洲鳗鲡组织样品,包括肝、肾、肠、鳃和肌肉等组织进行检测,阳性检测率为 98.33%。结果表明, BAS-TRFIA 法检测嗜水气单胞菌,灵敏度高、特异性好、操作简便,该方法为水产养殖病原菌检测提供了新的思路。
关键词 时间分辨荧光免疫分析;嗜水气单胞菌;生物素-亲和素系统;美洲鳗鲡;水产养殖

Sensitive Detection of *Aeromonas Hydrophila* by Time-Resolved Fluorimmunoassay

Lin, Peng* Lu, Jie Guo, Songlin Feng, Jianjun Wang, Yilei Chen, Jinmin

(Fisheries College, Jimei University, Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021)

Abstract The aim of this study is to establish a biotin-avidin system and time-resolved fluorimmunoassay (BAS-TRFIA) for quantitative analysis of *Aeromonas Hydrophila*. First, *A. Hydrophila* strain B18 isolated from diseased *Anguilla rostrata*, was used for rabbit anti-serum preparation by injecting the formalin-inactivated bacteria. The rabbit immunoglobulin (IgG) was purified by SPA affinity column. Then, a 96-well microtiter plate precoated with the rabbit IgG was incubated with the strain B18, and biotinylated IgG was pipette to the wells to form a typical double-antibody-sandwich immune complex. Finally, Eu^{3+} -labeled streptavidin was added the wells to produce affinity reaction. Time-resolved fluorescence (TRF) of Eu^{3+} was measured in enhancement solution to reflect the quantity of the strain B18. This assay showed a good relationship between TRF and the concentration of the strain B18. The limit of detection (LOD) was 1.0×10^2 cfu/mL, and the LOD of BAS-TRFIA was improved 400-fold compared to the already reported ELISA. The established sandwich BAS-TRFIA showed a good sixth order polynomial fitting from 1.0×10 to 1.0×10^6 cfu/mL for the strain B18 with the correlation coefficient 0.9716. The strain B18 was positive in BAS-TRFIA, while 19 other contrast strains of *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas enteropelogenes*, *Escherichia coli*, *Aeromonas bestiarum* and *Aeromonas media* etc. were negative in the assay, indicating that the antibody had high specificity. The intra-assay and inter-assay standard deviation were less than 5.00% and 9.00%, respectively. The TRF didn't change obviously after the related reagents were placed at 37 °C for 6 days. The method was used to detect the tissues including liver, kidney, intestine, gill and muscle from *A. rostrata* infected artificial with the strain B18. The result showed 98.33% of 60 samples were positive. BAS-TRFIA for *A. hydrophila* strain B18 was sensitive, specific and simple. The results indicate that the established BAS-TRFIA has potential application for screening *A. hydrophila* in aquaculture.

Keywords time-resolved fluorimmunoassay; *Aeromonas hydrophila*; biotin-avidin system; *Anguilla rostrata*; aquaculture

1 引言

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于弧菌科、气单胞菌属,它不仅引发人类败血症、脑膜炎、腹泻等疾病^[1],而且还导致哺乳类等多种动物全身性败血症或局部感染^[2]。嗜水气单胞菌也是水产养殖业的重要病原菌之一,爆发时会引起水产经济动物的大面积死亡^[3,4],

据报道,鳗鲡败血病、红鳍病、烂鳃病均与嗜水气单胞菌感染有关^[5],建立灵敏、特异、快速的检测技术,对嗜水气单胞菌进行监测,不仅可减小病害造成的损失,而且可对疾病的预防和控制起到积极的指导作用。

传统的细菌培养鉴定耗时长^[6],现已不能满足病害防治的需要。分子生物学手段如多重 PCR 检测嗜水气单胞菌^[7],方法灵敏,但是检测之前需要提取病原菌核

* E-mail: linpeng@jmu.edu.cn; Tel.: 0592-6181420; Fax: 0592-6181476

Received November 21, 2016; published February 14, 2017.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31272685).

项目受国家自然科学基金(No. 31272685)资助。

酸、设计和合成基因引物,因此,该方法的缺点是:样品前处理复杂.免疫检测技术具有方法简单、特异性强的优势,更适于检测病原菌.其中,荧光抗体法是以荧光物质为标记物,陈昌福^[8]曾用来检测中华鳖体内的嗜水气单胞菌,但测量时的背景荧光波长与标记物相近,干扰样品测定,灵敏度不高.另外一种免疫检测法是酶联免疫吸附检测(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),该法以酶为标记物,胡大雁等^[9]报道了嗜水气单胞菌的 ELISA 检测,灵敏度可达 4.0×10^4 cfu/mL,虽然灵敏度较荧光抗体法高,但酶为生物大分子,容易失活,不易保存,酶还会对免疫反应造成空间位阻效应,同时 ELISA 法必须经过额外的显色步骤才能进行信号测定.时间分辨荧光免疫检测(Time-resolved fluorimunoassay, TRFIA)以长寿命稀土螯合物作为标记物,免疫反应后,延缓测量时间,短寿命的背景荧光完全衰变后再测量螯合物的荧光.与荧光抗体法相比,可有效消除本底荧光干扰;与 ELISA 相比,稀土螯合物稳定、分子量小,直接显色,TRFIA 法的灵敏度显著高于以上两种免疫检测法,该法已在化学^[10]、医学^[11]等领域得到广泛应用,但在水产病原菌检测领域报道甚少.病原菌是一种颗粒性抗原,而 TRFIA 主要是测定可溶性抗原^[10],在离解增强 TRFIA 系统中,颗粒性抗原有可能使得解离效果发生改变,我们曾经通过 TRFIA 分析产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)^[12],严格控制解离及测定时间,有效控制了颗粒性抗原对荧光测定的干扰,灵敏度达 5.0×10^3 cfu/mL.生物素-链霉亲和素系统(Biotin-Avidin System, BAS)是 70 年代后期应用于免疫学的一种新型生物反应放大系统^[13,14],本文首次采用 BAS-TRFIA 法检测嗜水气单胞菌菌株 B18,灵敏度达到 1.0×10^2 cfu/mL,远高于一般的病原菌 TRFIA 法检测^[12].本实验所用菌株 B18 分离于爆发败血症水病的美洲鳗鲡,人工感染后确定为病原菌,并经 Biolog 自动生化鉴定系统(GeneIII)鉴定为嗜水气单胞菌,已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC M 2015101.

2 结果与讨论

2.1 兔抗嗜水气单胞菌 IgG 的纯化及分析鉴定

兔抗嗜水气单胞菌抗体 IgG 据文献^[15]制备,图 1 为纯化的兔 IgG 溶液 SDS-PAGE 检测结果.由于 SDS 的变性作用, IgG 降解为两条相同的重链(50 kDa)和两条相同的轻链(25 kDa)^[16].图中可知,纯化的 IgG 溶液纯度高,无其它杂蛋白.

2.2 生物素化 IgG 的标记比

标记比为每个 IgG 分子上标记的生物素分子个数,根据生物素标记试剂盒(21435)说明书,得出生物素化

图 1 兔抗嗜水气单胞菌 IgG 的 SDS-PAGE 结果

Figure 1 SDS-PAGE of rabbit Ig G from *A. hydrophila*
M: low molecular protein standards; 1: rabbit Ig G

的 IgG 溶液中,生物素为 3.82×10^{-5} mmol, IgG 为 1.33×10^{-5} mmol,故标记比约为 2.87.

2.3 延迟时间的优化

Eu^{3+} 螯合物的荧光衰变时间约为 700 μs ,而一般荧光免疫分析中荧光团的荧光衰变时间只有 1~100 μs ,生物样品中蛋白质的背景荧光只有 1~10 μs ^[17],因此延迟测量时间,待衰变时间短的干扰荧光完全衰变后测定,所测信号即为完全的 Eu^{3+} 螯合物荧光,可以完全消除其它荧光的干扰.我们将延迟时间分别定为 100、200、300、400、500 μs ,考察样品孔与对照孔的时间分辨荧光(Time-resolved fluorescence, TRF)比值,结果见表 1,延迟时间在 200~400 μs 时,TRF 比值最大且基本不变,延迟时间过短,会导致其它荧光进入检测器干扰 Eu^{3+} 螯合物荧光,而延迟时间过长, Eu^{3+} 螯合物荧光本身也会衰变,导致 TRF 减小.我们选择延迟时间 400 μs 进行测量.

表 1 延迟时间的优化

Table 1 The optimization of delay time

Delay time/ μs	100	200	300	400	500
Ratio of TRF	59.30	61.69	61.14	61.00	53.88

2.4 包被 IgG 的最适工作浓度

包被过程中,若 IgG 浓度过大,则会造成蛋白质分子的多层化,影响载体对蛋白质的吸附,一部分蛋白分子容易被洗掉;若浓度过低,则检测敏感性降低.固定嗜水气单胞菌浓度为 1.0×10^5 cfu/mL,生物素化 IgG 以及 Eu^{3+} 标记链霉亲和素均采用工作浓度.包被 IgG 用碳酸盐缓冲溶液分别从 20 $\mu\text{g/mL}$ 梯度稀释至 0.25 $\mu\text{g/mL}$,在低浓度时,TRF 值随包被 IgG 浓度增大而增大,1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时达最大,其后略有减小,故选择包被 IgG 的浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$.

2.5 生物素化 IgG 的最适工作浓度

生物素化 IgG 分别稀释成 800、400、200、100、50 ng/mL, 包被 IgG 和 Eu^{3+} -链霉亲和素浓度为最适工作浓度, 菌浓度从 1×10^6 至 1×10^2 cfu/mL 作一系列的 10 倍稀释, 每个稀释度 2 孔, 对照孔加入分析缓冲液, 比较不同生物素化 IgG 浓度下的工作曲线. 结果见图 2, 浓度过低, 检测信号不灵敏, 且影响相关系数, 浓度过高, 增加非特异吸附, 且增大对照孔度数. 从线性关系及灵敏度考虑, 我们取生物素化 IgG 浓度为 100 ng/mL.

图 2 生物素化 IgG 浓度对检测信号的影响

Figure 2 Effect of concentration of biotinylated IgG on the signal

2.6 BAS 的信号放大

我们在嗜水气单胞菌的 TRFIA 检测中引入了 BAS^[13,14], 用生物素标记兔抗 IgG, Eu^{3+} 标记链霉亲和素, 一个亲和素分子能结合 4 个生物素小分子, 二者的结合常数 (1×10^{15} mol/L) 远高于抗原抗体的结合常数, 生物素化 IgG 与待测的嗜水气单胞菌发生免疫反应后, 再采用 Eu^{3+} 标记链霉亲和素与生物素结合, 可将标记信号级联放大, 结果有效提高了检测灵敏度, 也增强了免疫复合物的稳定性, 同时 Eu^{3+} 标记链霉亲和素也可作为通用标记物, 检测不同抗原, 降低检测成本.

2.7 增强液离解时间的优化

嗜水气单胞菌是颗粒性的, 当加入 Eu^{3+} -链霉亲和素后, 形成的包被抗体-嗜水气单胞菌-生物素标记抗体- Eu^{3+} -链霉亲和素复合物仍旧是颗粒性的, 在随后加入的离解增强液中的微环境与可溶性抗原不同, 离解效果会改变, 因而影响到荧光值. 通过实验发现, 荧光值初始阶段不能保持稳定, 随着时间的延长而增大, 说明将稀土离子离解出来的效果不如可溶性抗原, 时间越长, 解离出来的稀土离子越多, 室温振荡 10 min 之后基本稳定, 与 TRFIA 测量产酸克雷伯氏菌的解离时间相似^[12], 据此推测大部分稀土离子此时被解离出来. 因此, 控制解离增强时间可有效消除颗粒性抗原的干扰, 本实验控制解离时间为 10 min.

2.8 精密度测定

取 2 份不同浓度 (1×10^4 cfu/mL 和 1×10^6 cfu/mL) 的嗜水气单胞菌样品, 每种浓度在同一块板上进行 TRFIA 检测, 根据 TRF 值计算板内相对标准偏差, 浓度为 1×10^4 cfu/mL 的相对标准偏差为 4.66%, 浓度为 1×10^6 cfu/mL 的相对标准偏差为 2.37%. 在 8 块板上进行 TRFIA 检测, 根据 TRF 值计算板间相对标准偏差, 浓度为 1×10^4 cfu/mL 的相对标准偏差为 8.12%, 浓度为 1×10^6 cfu/mL 的相对标准偏差为 6.21%. 说明该法精密度好, 可重复性高.

2.9 稳定性测定

检测相关试剂选择 4 °C 放置 6 d 后和 37 °C 放置 6 d, 通过建立的 BAS-TRFIA 法进行嗜水气单胞菌的检测, 两种情况下各点的 TRF 值与原数据相比均相差不大, 变化不明显, 尤其是经 37 °C 破坏性实验后稳定性仍旧良好, 可以耐受夏天高温的邮寄, 据此推测在 4 °C 可以保存更长时间.

2.10 抗体的效价与特异性

抗体效价越高, 与抗原亲和性越好, 其检测抗原的灵敏度就越高^[18], 当提纯的兔抗 IgG 浓度为 3.36 mg/mL 时, 间接 ELISA 测得 IgG 溶液的效价高于 1:25600, 说明提纯的兔抗嗜水气单胞菌 IgG 与抗原的亲和性良好, 适于生物素的标记. 选取 11 株不同来源的嗜水气单胞菌、8 株其它气单胞菌与菌株 B18 的抗体进行交叉反应的测定, 浓度均为 1×10^6 cfu/mL, P/N > 2 时判断为阳性, 表 2 表明抗体与菌株 B18 有较强的阳性反应, 与其他日本鳎鲷病原菌株无交叉反应, 说明提纯的抗体特异性良好. 高效价和高特异性是抗体用来进行 BAS-TRFIA 检测的基础.

2.11 标准曲线及灵敏度测定

通过 BSA-TRFIA 测定不同浓度的嗜水气单胞菌 TRF 值, 以 lg TRF 为纵坐标, 不同浓度细菌的对数值 (lg CFU) 为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见图 3, 标准曲线在 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^6$ cfu/mL 范围内线性良好, 线性方程为 $\lg \text{TRF} = 0.3623 \lg \text{cfu} + 3.1825$, $R^2 = 0.9716$. 方法的灵敏度依据文献^[12]确定, 以 P/N > 2 时所对应的最小浓度为检出限, 其灵敏度为 1.0×10^2 cfu/mL, 灵敏度高于 ELISA 检测的 400 倍^[9]. 我们前期用 TRFIA 法检测产酸克雷伯氏菌时, 其灵敏度可达到 5.0×10^3 cfu/mL, 现采用 BSA-TRFIA 检测嗜水气单胞菌, 灵敏度得到了极大提高.

2.12 美洲鳎鲷样品的 BAS-TRFIA 检测

用建立的 BAS-TRFIA 法检测美洲鳎鲷样品, 结果见图 4, 在 60 份样品中只有一份肠样品呈阴性, 阳性检测率占 98.33%. 为验证该方法准确性, 同时对这 60 份样品进行了间接 ELISA 法检测, 由于 ELISA 法的灵敏

表2 BSA-TRFIA 法测定嗜水气单胞菌 B18 抗体的交叉反应

Table 2 Cross reaction of *A. hydrophila* (B18) antibody using BSA-TRFIA

Species	Lab code	P/N values	Results ^a
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B18	19.61	+
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B55	0.85	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B56	1.09	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B57	0.99	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B64	1.38	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B65	1.86	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B66	1.01	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B39	1.55	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B70	1.13	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B11	1.30	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B56-1	0.95	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B60-1	1.17	—
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas eucrenophila</i>	B4224	1.73	—
简达气单胞菌 <i>Aeromonas jandaei</i>	B4228	1.35	—
肠棕色气单胞菌 <i>Aeromonas enteropelogenes</i>	B4255	1.21	—
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	B1003	1.30	—
兽生气单胞菌 <i>Aeromonas bestiarum</i>	B4227	1.21	—
中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	B4232	1.26	—
嗜水气单胞菌嗜水亚种 <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	B839	1.71	—
波波夫气单胞菌 <i>Aeromonas popoffii</i>	B4995	1.41	—

^a+, Represents positive result; —, Represents negative result.

图3 BSA-TRFIA 检测嗜水气单胞菌 B18 的标准曲线

Figure 3 Calibration curve of BSA-TRFIA for *A. hydrophila* B18

度远低于 BAS-TRFIA 法, 部分样品检测不出嗜水气单胞菌, 只有 42 份样品呈阳性, 阳性检测率为 70%. 说明 BAS-TRFIA 可以更好地检测带菌的鳊鱼, 利于早期诊断.

3 结论

建立了 BAS-TRFIA 检测嗜水气单胞菌的新方法,

图4 美洲鳊鱼样品的 BSA-TRFIA 检测结果

1~12 代表 12 条感染后的鳊鱼, B(肝)、C(肾)、D(肠)、E(鳃)、F(肌)

Figure 4 Detectable results of *A. rostrata* samples using BAS-TRFIA
Number 1~12 represent the twelve infected *A. rostrata*, B (liver), C (kidney), D (intestine), E (gill), F (muscle)

通过控制解离时间消除颗粒性抗原对时间分辨荧光的影响, 该法不仅具有线性范围宽的优点, 检出限更是达到了 1.0×10^2 cfu/mL, 远高于荧光抗体法(由于用荧光显微镜观测无法定量)^[8]及 ELISA 法(4.0×10^4 cfu/mL)^[9]. 也高于 TRFIA 检测产酸克雷伯氏菌的检出限(5.0×10^3 cfu/mL). 检测了 60 份人工感染的日本鳊鱼样品, 包括

鳃、肾、肠、肝和肌肉组织, 结果满意. BAS-TRFIA 检测致病菌具有良好的应用前景, 有望在水产养殖业得到推广应用.

4 实验部分

生物素标记兔抗 IgG 的制备: 兔抗血清通过蛋白纯化系统(AKTA Purifier, 100GE Healthcare)纯化, 采用 SPA 亲和层析柱(GE Healthcare), 层析液冻干得纯化的兔抗 IgG, 采用生物素标记试剂盒(21435, Thermo Scientific Pierce)标记, 取 2 mg IgG 溶于 1 mL 0.15 mol/L pH 7.2 的 PBS, 称取 2.2 mg 活化生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin)溶于 400 μ L 超纯水中, 活化生物素分子量为 557, 兔抗 IgG 分子量约为 150000, 按照生物素与 IgG 物质的量比为 20, 取生物素溶液 26.9 μ L 加于兔抗 IgG 溶液中, 4 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 使得活化生物素与 IgG 结合; 用 Zeba Desalt Spin Columns 柱除去未结合的生物素, 以便纯化生物素标记的兔抗 IgG.

标记比的计算: 根据生物素标记试剂盒(21435)说明书, 采用 HABA 试剂测定生物素浓度. HABA 试剂可与亲和素发生反应, 产物在 500 nm 处有最大吸光度, 加入生物素后, 吸光度减小, 减小的吸光度值与生物素成正比, 据此计算出生物素化 IgG 溶液中生物素的物质的量, 而 IgG 的物质的量可根据所称的 IgG 质量求得, 据此可求出生物素对 IgG 的标记比.

嗜水气单胞菌的 BAS-TRFIA 检测: pH 9.6, 0.05 mol/L 的碳酸盐包被液稀释纯化后的兔抗 IgG, 加入到 96 孔微孔板中, 每孔 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 包被 12 h; 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min; 每孔加入 200 μ L 1% BSA, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h; 洗涤 3 次; 每孔加入分析缓冲液稀释的 B18 菌悬液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h; 洗涤 3 次; 每孔加入工作浓度的生物素标记兔抗 IgG 溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h; 洗涤 3 次; 加入工作浓度的 Eu^{3+} -链霉亲和素(1244-360, Perkin-Elmer)溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h, 每次 3 min; 洗涤 6 次; 每孔加入 200 μ L 增强液, 室温振荡 10 min; 多标记分析仪(VICTOR X4, Perkin-Elmer)上测量时间分辨荧光 TRF, 测量参数设置如下: 激发波长 340 nm, 发射波长 615 nm, 延迟时间 0.4 ms, 测量时间 0.4 ms. 以分析缓冲液代替 B18 菌悬液同时进行对照孔的检测.

美洲鳎样品的实际检测: 将 B18 活菌用无菌的

0.85%生理盐水稀释为 5×10^8 cfu/mL, 腹腔注射至美洲鳎活体, 每尾 0.1 mL, 对照组注射生理盐水, 观察人工感染后的鱼体变化. 7 d 后选用无明显症状的日本鳎, 取鳃、肾、肠、肝、肌肉等部位组织 0.05 g, 分别溶于 700 μ L 无菌的 0.85%生理盐水, 匀浆、离心, 上清液备检, 以同样处理的对照组鳎组织样品为阴性对照, 利用建立的 BAS-TRFIA 法检测人工感染后 12 条鳎组织样品.

References

- [1] Meng, S.; Wang, Y.; Wang, Y.; Liu, D.; Ye, C. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, 61(2), 171.
- [2] Chalifoux, L. V.; Hajema, E. M.; Leeparritz, D. *Lab. Anim. Sci.* **1993**, 43(4), 355.
- [3] Fu, X. Z.; Lin, Q.; Liu, L. H.; Liang, H. R.; Huang, Z. B.; Li, N. Q. *Fish Shellfish Immun.* **2016**, 56, 286.
- [4] Griffin, M. J.; Goodwin, A. E.; Merry, G. E.; Liles, M. R.; Williams, M. A.; Ware, C.; Waldbieser, G. C. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2013**, 25(4), 473.
- [5] Guo, S.-L.; Guan, R.-Z. *Journal of Huazhong Agriculture University* **2009**, 28(4), 463 (in Chinese). (郭松林, 关瑞章, 华中农业大学学报, **2009**, 28(4), 463.)
- [6] Chauret, C.; Volk, C.; Creason, R.; Jarosh, J.; Robinson, J.; Warnes, C. *Can. J. Microbiol.* **2001**, 47(8), 782.
- [7] Hussain, I. A.; Jeyasekaran, G.; Shakila, R. J.; Raj, K. T.; Jeevithan, E. *J. Food Sci. Tech. Mys.* **2014**, 51(2), 401.
- [8] Chen, C.-F. *J. Huazhong Agriculture University* **1998**, 17(3), 264 (in Chinese). (陈昌福, 华中农业大学学报, **1998**, 17(3), 264.)
- [9] Hu, D.-Y.; Qian, D.; Liu, W.; Zhang, Y.-P.; Pan, Q.-Q.; Chen, C.-F. *Journal of Huazhong Agriculture University* **2008**, 27(1), 80 (in Chinese). (胡大雁, 钱冬, 刘闻, 张友平, 潘清清, 陈昌福, 华中农业大学学报, **2008**, 27(1), 80.)
- [10] Jiang, H. F.; Wang, G. L.; Zhang, W. Z.; Liu, X. Y.; Ye, Z. Q.; Jin, D. Y.; Yuan, J. L.; Liu, Z. G. *J. Fluoresc.* **2010**, 20(1), 321.
- [11] Kupstat, A.; Kumke, M. U.; Hildebrandt, N. *Analyst* **2011**, 136(5), 1029.
- [12] Lu, J.; Guo, S.-L.; Feng, J.-J.; Wang, Y.-L.; Zhu, H.-Q.; Lin, P. *Chinese J. Anal. Chem.* **2012**, 40(11), 1709 (in Chinese). (卢洁, 郭松林, 冯建军, 王艺磊, 朱洪泉, 林鹏, 分析化学, **2012**, 40(11), 1709.)
- [13] Huang, Y. H.; Xu, Y.; He, Q. H.; Chu, J. S.; Du, B. B.; Liu, J. *Food Agr. Immunol.* **2014**, 25(2), 186.
- [14] Tang, J.; Huang, Y. P.; Liu, H. Q.; Zhang, C. C.; Tang, D. P. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 79, 508.
- [15] Zhu, L.-P.; Chen, X.-Q. *Experimental Methods Used in Immunology*, People's Military Medical Press, Beijing, **2000**, pp. 18~22 (in Chinese). (朱立平, 陈学清, 免疫学常用实验方法, 人民军医出版社, 北京, **2000**, pp. 18~22.)
- [16] Zheng, W.-F. *Medical Immunology*, People's Medical Publishing House, Beijing, **1989**, p. 38 (in Chinese). (郑武飞, 医学免疫学, 人民卫生出版社, 北京, **1989**, p. 38.)
- [17] Shen, J.; Lin, D.-Q.; Xu, J. *Chinese Bulletin of Life Science* **2004**, 16(1), 55 (in Chinese). (沈健, 林德球, 徐杰, 生命科学, **2004**, 16(1), 55.)
- [18] Li, W.-H.; He, X.-W.; Qi, W.; Chen, F.-Y. *Modern Food Science & Technology* **2011**, 27(12), 1480 (in Chinese). (李伟汉, 何小维, 齐维, 陈富裕, 现代食品科技, **2011**, 27(12), 1480.)

(Cheng, B.; Fan, Y.)