

# 副溶血性弧菌单克隆抗体的制备及特性鉴定

谢曼曼<sup>1</sup>, 李建武<sup>1</sup>, 王广彬<sup>2</sup>, 曾海娟<sup>1</sup>, 翟绪昭<sup>1</sup>, 丁承超<sup>1</sup>, 刘武康<sup>1</sup>, 刘 篓<sup>1,\*</sup>

(1.上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2.徐州绿健乳品饮料有限公司, 江苏 徐州 221006)

**摘要:** 为制备特异性强的副溶血性弧菌的单克隆抗体, 解决单克隆抗体对免疫学检测产品研发的制约, 以副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802标准菌株免疫Balb/c小鼠, 经细胞融合、间接酶联免疫吸附测定法筛选, 获得稳定分泌抗副溶血性弧菌 (ATCC 17802) 菌株的单克隆杂交瘤细胞株3F7D7E8C4, 通过体内诱导腹水大量制备抗体, 用亚类试剂盒测定抗体亚类为IgG1; 采用辛酸硫酸铵沉淀法以及亲和层析柱对腹水进行纯化, 聚丙烯酰胺凝胶电泳实验鉴定单克隆抗体的纯度。制备得到腹水抗体效价为1:16 000, 纯化后抗体效价为1:8 000, 抗体敏感性IC<sub>50</sub>达到10<sup>6</sup>CFU/mL。纯化后的抗体与12株副溶血性弧菌均能特异性结合, 与其他9种非副溶血性弧菌的食源性致病菌均无交叉反应。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附测定

Preparation and Immunological Characteristics of Monoclonal Antibodies against *Vibrio parahaemolyticus*

XIE Manman<sup>1</sup>, LI Jianwu<sup>1</sup>, WANG Guangbin<sup>2</sup>, ZENG Haijuan<sup>1</sup>, ZHAI Xuzhao<sup>1</sup>, DING Chengchao<sup>1</sup>, LIU Wukang<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>1,\*</sup>

(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;  
2. Xuzhou Lüjian-Dairy Beverage Co. Ltd., Xuzhou 221006, China)

**Abstract:** This study aimed to prepare a highly specific monoclonal antibody (mAb) against *Vibrio parahaemolyticus* for the purpose of solving the constraints on the development of immunological assays for this pathogenic microorganism. We injected Balb/c mice with *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. The hybridoma cell line 3F7D7E8C4, which could stably secrete mAb against ATCC 17802, was obtained after cell fusion and screening by indirect ELISA. By using a commercial kit, the mAb was identified to belong to the IgG1 subclass. The antibody titer of the ascites was 1:16 000. After purification with saturated ammonium sulfate precipitation and protein G affinity chromatography and purity analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the titer of the antibody was 1:8 000 and the sensitivity (IC<sub>50</sub>) was 10<sup>6</sup>CFU/mL. The purified antibody could specifically bind to 12 *V. parahaemolyticus* strains, and had no cross-reaction with 9 non-*V. parahaemolyticus* foodborne pathogens.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; monoclonal antibody (mAb); enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708011

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 08-0063-06

引文格式:

谢曼曼, 李建武, 王广彬, 等. 副溶血性弧菌单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 63-68.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708011. <http://www.spkx.net.cn>

XIE Manman, LI Jianwu, WANG Guangbin, et al. Preparation and immunological characteristics of monoclonal antibodies against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Science, 2017, 38(8): 63-68. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/  
spkx1002-6630-201708011. <http://www.spkx.net.cn>

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*) 是革兰氏阴性菌、嗜盐菌, 海产品中常见的食源性致病菌<sup>[1]</sup>, 被认为是食用海鲜者患胃肠炎的主要原因, 海产品中最

收稿日期: 2016-05-12

基金项目: 上海市科委“科技创新行动计划”长三角科技联合攻关领域项目 (15395810900) ;

徐州绿健乳品饮料有限公司“乳制品生产体系致病菌快速检测”项目 (3A15308006) ; 上海理工大学研究生创新基金项目

作者简介: 谢曼曼 (1988—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品营养与安全. E-mail: xiemanman880224@163.com

\*通信作者: 刘箐 (1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理、疫苗及快速检测技术. E-mail: liuq@usst.edu.cn

主要的病原体<sup>[2-3]</sup>。人们食用被*Vp*污染的食物很可能会引起急性肠胃炎, 重症患者则表现为脱水、休克昏迷甚至死亡<sup>[4]</sup>。为减少*Vp*相关的食源性疾病的风险, 需要对食

品中 *Vp* 密切监测。传统的食品中检测弧菌的方法是使用选择性培养基如硫柠胆蔗琼脂 (thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS) 培养基、科玛嘉弧菌显色培养基富集培养<sup>[5-6]</sup>, 但某些弧菌如创伤弧菌、拟态弧菌、哈氏弧菌或坎氏弧菌形成的菌落与副溶血弧菌类似<sup>[7]</sup>, 需要生化实验进一步检测识别, 消耗的时间较长。基于分析生物学技术的检测方法如聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术、环介导等温扩增技术、基因探针技术提供了快速、特异性强、灵敏度高的检测手段, 但对于技术人员和检测设备有较高的要求<sup>[8]</sup>。因此, 需要一种能检测 *Vp* 的快速简单的方法。

与传统的培养方法和分子生物学方法相比, 利用单克隆抗体检测细菌是一种快速、简单的方法<sup>[9]</sup>。但遗憾的是, 由于 *Vp* 血清型复杂、同属弧菌种类较多, 加之弧菌属基因组研究滞后, 其特异性靶抗原至今未知<sup>[10]</sup>, 因此获得能涵盖所有副溶血弧菌血清型, 又和其他同属弧菌没有交叉反应的单克隆抗体, 成为包括免疫层析试纸条、免疫色谱系统、免疫传感器在内的免疫学检测产品研制的主要障碍<sup>[11-13]</sup>。与 *Vp* 相关的研究报道很少, 有 Guo Ailing<sup>[5]</sup>、Anand<sup>[6]</sup> 等利用多克隆抗体进行 *Vp* 的免疫层析试纸条, 检测灵敏度达到  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL, 但特异性较差。Sakata 等<sup>[16]</sup> 研究出的一种免疫层析试纸, 使用两种针对 *Vp* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP 合成酶的单克隆抗体, 用于 *Vp* 的检测, 检测覆盖率高, 但存在交叉反应。本研究通过传统的杂交瘤技术, 以期制备出具有较强特异性的单克隆抗体, 为 *Vp* 的快速检测提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 动物、细胞与菌株

6~8 周龄 SPP 级 Balb/c 雌性小鼠 上海市第二军医大学动物实验中心; SP2/0 细胞由本实验室保藏; *Vp* 标准株 (ATCC 17802)、*Vp* (ATCC 33847)、创伤弧菌 (ATCC 27562)、霍乱弧菌非 O1 (V 80)、出血性大肠杆菌 O157:H7 (ATCC 43895)、单核细胞增生李斯特菌 (ATCC 43251)、阪崎肠杆菌 (ATCC 29004)、肠炎沙门氏菌 (ATCC 13076)、蜡样芽孢杆菌 (ATCC 11778)、空肠弯曲菌 (ATCC 33560)、宋氏志贺氏菌 (ATCC 9290)、肺炎链球菌 (ATCC 49619)、变形杆菌 (ATCC 12453) 由医疗器械与食品学院实验室保藏; 10 株野生型 *Vp* (A~J) 由本实验室从常见海产品中分离保藏; 溶藻弧菌 (R 5)、鳗弧菌 (M 1) 由上海海洋大学微生物菌种保藏中心保藏。

#### 1.1.2 试剂

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、羟乙基哌嗪

乙硫磺酸、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfonate, SDS)、考马斯亮蓝 G250 染色液、四乙基乙二胺、过硫酸铵、巯基乙醇、四甲基联苯胺盐酸盐二水显色液、过氧化脲 国药集团化学试剂有限公司; 杜尔伯科极限必需培养基 (dulbecco minimum essential medium, DMEM) 美国 Gibco 公司; 50×HAT (次黄嘌呤 (hypoxanthine)、氨喋呤 (aminopterin)、胸腺嘧啶核昔 (thymidine)) 培养基、50×HT 美国 Sigma 公司; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、青链霉素混合液 (双抗) 美国 Hyclone 公司; 其余常规试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

SpectraMax/n2 酶标仪 美国 Molecular Devices 公司; PCR system 9700 PCR 仪 美国 Applied Biosystems 公司; G:BOX Chemi XR5 凝胶成像仪 英国 Syngen 公司; NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计 美国 Thermo 公司; Biologic LP 蛋白纯化仪、JY1000C 电泳仪、1658001SevenEasy 电泳槽 美国 Bio-Rad 公司; Protein G 亲和层析柱 美国 GE 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 *Vp* 的鉴定

取 *Vp* (ATCC 17802) 干粉少许加入到 3% 氯化钠碱性蛋白胨水, 置于摇床 37 °C 培养 12 h, 菌液于 TCBS 培养基上划线, 37 °C 培养箱培养 12 h, 挑取单菌落进行摇床扩大培养, 培养条件为 200 r/min、37 °C、12 h。得到的菌液进行 PCR 鉴定, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列为 5'-AAAGCGGATTATGCAGAACGACTG-3', 5'-GCTACTTTCTAGCATTTCTCTGC-3'; 目标条带大小约为 450 bp; 并将 PCR 的产物进行 1% 琼脂糖电泳鉴定。

#### 1.3.2 免疫小鼠及小鼠血清效价测定

免疫小鼠使用 6 只 8 周龄, 体质量约 20 g 的 Balb/c 雌鼠, *Vp* 鉴定后用 0.3% 的甲醛灭活 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 使用生理盐水将其配制到浓度约  $10^8$  CFU/mL ( $OD_{600\text{ nm}} \approx 0.6$ )。首次免疫使用免疫原与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后免疫, 2、3 次以及冲击免疫使用同剂量免疫原与弗氏不完全佐剂乳化后免疫, 免疫方式为背部皮下多点注射。冲击免疫在细胞融合前 3 d 进行。剂量如表 1 所示。3 次免疫 7 d 后小鼠尾部静脉取血, 采用间接酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测小鼠抗血清的效价。间接 ELISA 条件参考文献 [8] 进行。

表1 免疫周期与免疫剂量

Table 1 Immunization cycles and corresponding doses

小鼠编号	免疫间隔/周	1次免疫剂量/mL	2次免疫剂量/mL	3次免疫剂量/mL	冲击免疫剂量/mL
1	2	0.6	0.4	0.3	0.6
2	3	0.6	0.4	0.6	0.8
3	2	0.4	0.2	0.2	0.6
4	3	0.4	0.2	0.4	0.8
5	2	0.2	0.1	0.1	0.6
6	3	0.2	0.1	0.2	0.8

### 1.3.3 杂交瘤细胞株的建立

#### 1.3.3.1 细胞融合

加入8-氮鸟嘌呤20 μg/mL的DMEM完全培养液培养SP2/0三代后备用。细胞融合过程参考文献[18]进行。将正常的未处理的Balb/c小鼠颈椎脱臼致死，无菌条件下制备饲养层细胞并分装到96孔细胞培养板中，每孔100 μL，每孔含有 $4 \times 10^3$ 个细胞；细胞培养板置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中备用。

取冲击免疫3 d后的Balb/c小鼠，摘除眼球采血，4 °C放置2 h后离心分离血清，−20 °C保存供检测抗体效价时作为阳性对照；无菌条件下将脾摘除，研磨得到脾细胞。经计数后，将骨髓瘤细胞及脾细胞按照数量比为1:5充分混匀，缓慢加入1 mL的PEG再缓慢加入10 mL 37 °C预温含10%血清的DMEM培养基，混匀、离心、重悬细胞后将细胞液转入到含有饲养层细胞的96孔培养板中每孔100 μL，37 °C，5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养24 h后，补加50 μL含20%胎牛血清和5×HAT的完全培养液。

#### 1.3.3.2 杂交瘤细胞的筛选克隆

融合细胞培养5 d后，HAT培养液隔天换液，培养14 d后，改用HT培养液培养。当细胞铺满70%~80%的孔底时，取细胞培养板的培养上清液进行间接ELISA实验测定阳性率。选择阳性强、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化。得到的单克隆扩大培养、冻存、建株。

#### 1.3.4 小鼠腹水制备、纯化及效价测定

取Balb/c雌性小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡(0.5 mL/只)，1周后腹腔注射单克隆细胞株( $10^6$ 个/只)，诱导腹水产生，12 d后采集腹水。腹水抗体使用小鼠单克隆抗体试剂盒进行亚类鉴定后，使用辛酸硫酸铵沉淀法进行粗提，选择protein G柱亲和层析系统进一步纯化。纯化后的单克隆抗体于4 °C磷酸盐缓冲液中进行透析，每4 h换一次透析液，得到腹水单克隆抗体，使用Nanodrop测定浓度后，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分析纯化的效果。效价测定采用间接ELISA法，实验组OD<sub>450 nm</sub>(P)与阴性对照组OD<sub>450 nm</sub>(N)的比P/N不小于2.1的抗体最大稀释倍数为该单克隆抗体的效价。

#### 1.3.5 单克隆抗体的特异性分析

采用间接ELISA法鉴定单克隆抗体的敏感性，以抗

体对Vp菌悬液的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)作为敏感度。采用间接ELISA法鉴定单克隆抗体与其他菌株的交叉反应即单抗的特异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 免疫原PCR鉴定结果

利用PCR对实验用Vp菌株进行鉴定，鉴定的结果如图1所示，在450 bp处出现明显电泳条带，与Vp特异性基因条带大小一致，说明该菌株为Vp。

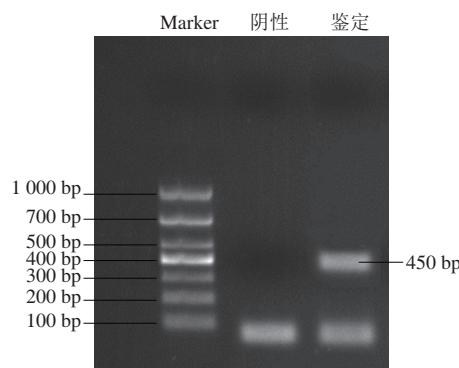


图1 Vp菌株PCR鉴定

Fig. 1 PCR identification of Vp

### 2.2 小鼠血清效价

小鼠3次免疫后采用间接ELISA法测定小鼠血清效价，结果如表2所示。以实验组P/N不小于2.1判定为阳性，其中阴性对照OD<sub>450 nm</sub>为0.090。1、3、4、5、6号小鼠血清效价达1:16 000，2号小鼠血清效价达到1:32 000。本实验选择2号小鼠进行细胞融合。

表2 小鼠血清效价

Table 2 Serum titers of mice

小鼠 编号	血清稀释倍数( $\times 10^3$ )						
	1	2	4	8	16	32	64
1	1.067	0.845	0.616	0.453	0.282	0.168	0.144
2	1.157	0.925	0.663	0.435	0.296	0.211	0.152
3	1.051	0.809	0.569	0.381	0.261	0.174	0.130
4	0.839	0.707	0.475	0.318	0.212	0.154	0.114
5	1.194	0.917	0.604	0.381	0.276	0.183	0.137
6	1.021	0.916	0.461	0.302	0.197	0.138	0.116

注：表中数据为OD<sub>450 nm</sub>。

### 2.3 杂交瘤细胞筛选

细胞融合14 d后在倒置显微镜下观察细胞融合效果，10块细胞培养板960孔中，均存在杂交瘤细胞克隆，即融合率为100%；通过间接ELISA筛选出1株高特异性杂交瘤3F7D7E8C4。经多次传代建株检测显示此株杂交瘤分泌抗体性能稳定。

### 2.4 腹水亚型的鉴定及纯化后效价

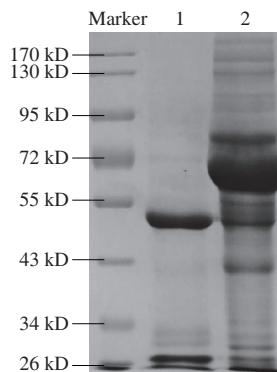
得到的单克隆杂交瘤细胞株在腹腔注射液体石蜡7 d

后腹腔注射小鼠制备腹水，采集腹水进行3F7D7E8C4抗体亚类鉴定，结果如表3所示，说明得到的抗体属于IgG1亚型，轻链类型为 $\kappa$ 型。

**表3 抗体亚型测定结果**  
**Table 3 Identification of antibody subtypes**

亚型	高特异性杂交瘤 3F7D7E8C4	亚型	高特异性杂交瘤 3F7D7E8C4
IgG1	0.620	IgM	0.061
IgG2a	0.093	阳性	0.576
IgG2b	0.078	$\kappa$	0.593
IgG3	0.056	$\lambda$	0.057
IgA	0.054		

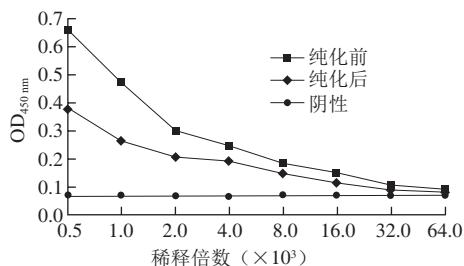
经辛酸-硫酸铵沉淀初步纯化和Protein G亲和层析纯化后采用SDS-PAGE进行单克隆抗体纯度鉴定，如图2所示。3F7D7E8C4单克隆抗体经辛酸硫酸铵沉淀法和亲和层析柱后无明显杂蛋白，抗体只有两条清晰的条带，大的条带为重链约50 kD，小的条带为轻链约26 kD，纯化效果明显，抗体蛋白纯度较高。



Marker.分子质量标准蛋白；1.纯化后抗体；2.小鼠腹水。

**图2 单克隆抗体SDS-PAGE结果**

**Fig. 2 SDS-PAGE result of mouse ascites and purified antibodies**



**图3 抗体纯化前后效价测定结果**

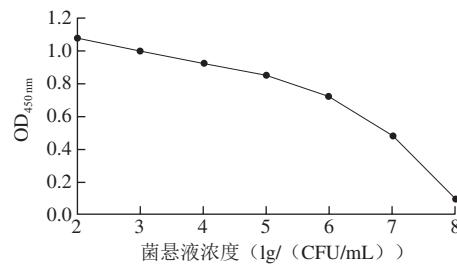
**Fig. 3 Titters of ascites and purified antibodies**

纯化前后单克隆抗体效价测定结果如图3所示，腹水抗体纯化后，效价从1:16 000降低到1:8 000，纯化后的抗体质量浓度为2.037 mg/mL。

## 2.5 单克隆抗体敏感性鉴定结果

采用间接竞争ELISA法测定抗体对*Vp*菌悬液的IC<sub>50</sub>，

P/N为0.5时所对应的菌浓度为IC<sub>50</sub>。IC<sub>50</sub>值越小抗体的敏感性越高。本实验对照组OD<sub>450 nm</sub>为1.0，对应的抗体使用量为25 ng。从图4可知，菌浓度为10<sup>6</sup> CFU/mL时，OD<sub>450 nm</sub>达到0.5，即10<sup>6</sup> CFU/mL为3F7D7E8C4细胞株产生抗体的检测限。



**图4 单克隆抗体敏感性**

**Fig. 4 Sensitivity of monoclonal antibodies**

## 2.6 单克隆抗体的特异性

用间接ELISA方法检测所得抗体与常见25株致病菌的交叉反应，其中包括本实验室从常见水产品中分离保藏的10株野生型副溶血弧菌及2株标准菌株，结果如表4所示，所得抗体与12株副溶血弧菌均能结合，与其他致病菌株均无交叉反应，表明该抗体具有较高的特异性。

**表4 抗体与细菌反应谱**  
**Table 4 Specificity of monoclonal antibodies**

编号	菌株名称	保藏编号	交叉反应
1	<i>Vp</i> 标准株	ATCC 17802	+
2	<i>Vp</i>	ATCC 33847	+
3	野生型 <i>Vp</i>	A	+
4	野生型 <i>Vp</i>	B	+
5	野生型 <i>Vp</i>	C	+
6	野生型 <i>Vp</i>	D	+
7	野生型 <i>Vp</i>	E	+
8	野生型 <i>Vp</i>	F	+
9	野生型 <i>Vp</i>	G	+
10	野生型 <i>Vp</i>	H	+
11	野生型 <i>Vp</i>	I	+
12	野生型 <i>Vp</i>	J	+
13	创伤弧菌	ATCC 27562	-
14	霍乱弧菌非O1	V 80	-
15	溶藻弧菌	R 5	-
16	鳗弧菌	M 1	-
17	出血性大肠杆菌O157:H7	ATCC 43895	-
18	单核细胞增生李斯特菌	ATCC 43251	-
19	阪崎肠杆菌	ATCC 29004	-
20	肠炎沙门氏菌	ATCC 13076	-
21	空肠弯曲菌	ATCC 33560	-
22	宋氏志贺氏菌	ATCC 9290	-
23	肺炎链球菌	ATCC 49619	-
24	变形杆菌	ATCC 12453	-
25	蜡样芽孢杆菌	ATCC 11778	-

注：+有交叉反应；-无交叉反应。

### 3 讨论与结论

单克隆抗体能够识别抗原的特异性结构，已经作为重要工具应用在检测和医学等领域<sup>[19]</sup>。基于单克隆抗体的检测技术不断发展，新的单克隆抗体制备方法也被不断开发，如使用特异性蛋白制备单克隆抗体<sup>[20-21]</sup>、蛋白嵌合单克隆抗体制备技术<sup>[22]</sup>、通过转基因技术制备单克隆抗体<sup>[23-24]</sup>、噬菌体技术等新技术<sup>[25]</sup>。本实验选择传统的杂交瘤技术有以下几点原因，首先，至今还未找到Vp的特异性靶抗原<sup>[9]</sup>，采用全菌免疫方式能够得到特异、稳定的高亲和力抗体；其次，杂交瘤细胞注射到小鼠体内诱发腹水能大量产生单克隆抗体，此外，这种杂交瘤技术耗时较短，成本低。

制备单克隆抗体核心的技术是细胞融合技术，本实验融合细胞初次筛选出现15个阳性孔，但部分杂交瘤细胞株不稳定，经克隆，筛选最终得到的杂交瘤细胞较少，但得到的杂交瘤细胞的特异性强。研究证明，具有高纯度与强特异性的单克隆抗体能准确与目标抗原相结合发挥效用<sup>[26]</sup>。本实验获得单克隆抗体的与10株Vp反应呈阳性，与其他常见的非Vp食源性致病菌均无交叉反应，抗体的特异性强。

本实验以Vp为抗原免疫Balb/c小鼠，使用不同的免疫剂量与免疫周期，以期优化免疫方法，但免疫结果中除2号小鼠血清效价较高外，其余并未体现出差异。一般制备单克隆抗体的方法采用每两周注射，剂量按照致病菌的半致死剂量定，实验采用统一免疫方法<sup>[27-28]</sup>。本实验免疫小鼠的血清效价结果，可能是因为小鼠个体的差异导致。经克隆获得一株能稳定分泌抗体的细胞株3F7D7E8C4，使用操作简单、纯化和回收效果较好的辛酸硫酸铵法<sup>[29]</sup>对腹水进行粗提，后经Protein G亲和层析进一步纯化，除去杂蛋白，透析过程去除小分子杂蛋白和盐离子，得到纯度较高的抗体蛋白。抗体亚型为IgG1型，具有生物活性，半衰期较长<sup>[30]</sup>，可用于建立免疫试纸条等快速、简便的快速检测产品研发。

### 参考文献：

- [1] SU Y C, LIU C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558.
- [2] YEUNG P S, BOOR K J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2004, 1(2): 74-88.
- [3] XIE T F, WU Q P, ZHANG J M, et al. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus*, isolates from aquatic products and clinical by antibiotic susceptibility, virulence, and molecular characterisation[J]. Food Control, 2016, 71: 315-321. DOI:10.1016/j.fm.2007.01.005.
- [4] 陈炳卿. 营养与食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 212-214.
- [5] GOMEZ-GIL B, ROQUE A. Isolation, enumeration, and preservation of the Vibionaceae[M]. Washington, DC: ASM Press, 2006: 15-26. DOI:1128/9781555815714.ch2.
- [6] 陈瑞英, 鲁建章, 苏意诚, 等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 341-347.
- [7] SHIMA T, ISOBE J, KIMATA K, et al. Evaluation of a rapid test for determination of most probable number of viable *Vibrio parahaemolyticus* by using etidium monoazide[J]. Japanese Journal of Food Microbiology, 2011, 28(1): 21-28.
- [8] 刘程, 刘芳, 刘箐, 等. 出血性大肠杆菌O157:H7单克隆抗体制备及免疫胶体金试纸条的研制[J]. 食品与发酵工业, 2014(5): 199-205. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2014.05.004.
- [9] QIAN H L, ERVINNA P, DU Q Y, et al. Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 833-839. DOI:10.1128/AEM.01559-07.
- [10] BISHA B, SIMONSON J, JANES M, et al. A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(5): 885-899. DOI:10.1111/j.1365-2621.2012.02950.x.
- [11] LIU X, GUAN Y, CHENG S, et al. Development of a highly sensitive lateral immunochromatographic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 131: 78-84. DOI:10.1016/j.mimet.2016.10.007.
- [12] SHA Yuhong, ZHANG Xuan, LI Wenrou, et al. A label-free multi-functionalized graphene oxide based electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seawater and seafood[J]. Talanta, 2016, 147: 220-225. DOI:10.1016/j.talanta.2015.09.058.
- [13] LIU Y Y, ZHANG Z H, WANG Y L, et al. A highly sensitive and flexible magnetic nanoprobe labeled immunochromatographic assay platform for pathogen *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 211: 109-116. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.005.
- [14] GUO A L, SHENG H L, ZHANG M, et al. Development and evaluation of a colloidal gold immunochromatography strip for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food[J]. Journal of Food Quality, 2012, 35(5): 366-371. DOI:10.1111/j.1745-4557.2012.00449.x.
- [15] ANAND P S S, SOBHANA K S, GEORGE K C, et al. Selection of specific cell wall antigen for rapid detection of fish pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by enzyme immunoassay[J]. Indian Journal of Fisheries, 2016, 63(2). DOI:10.21077/ijf.2016.63.2.44334-11.
- [16] SAKATA J, KAWATSU K, IWASAKI T, et al. Development of a rapid and simple immunochromatographic assay to identify *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 116: 23-29. DOI:10.1016/j.mimet.2015.06.009.
- [17] 曾海娟, 王广彬, 郭慧琴, 等. 抗瓜类细菌性果斑病菌单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 228-232. DOI:10.7506/spkx002-6630-201523042.
- [18] FASIHI R M, NEDJAD M A, ARABSALMANY F, et al. Production and characterization of monoclonal and polyclonal antibody against recombinant outer membrane protein[J]. American Journal of Immunology, 2014, 105662(10): 56-62. DOI:10.3844/ajisp.2014.56.62.
- [19] MEIBOHM B. Protein engineering for improved pharmacologic characteristics of established monoclonal antibody-based therapeutics[J]. Clinical Pharmacokinetics, 2014, 53(10): 863-864. DOI:10.1007/s40262-014-0186-6.
- [20] KAUSHAL N A, KAUSHAL D C. Production and characterization of monoclonal antibodies against substrate specific loop region of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase[J]. Immunological Investigations, 2014, 43(6): 1118-1123. DOI:10.3109/08820139.2014.892962.

- [21] LIU B H, CHU K, YU F Y. Novel monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M<sub>1</sub> in milk[J]. Food Control, 2016, 66: 1-7. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.01.036.
- [22] MARCOSSILVA L, NARIMATSU Y, HALIM A, et al. Characterization of binding epitopes of CA125 monoclonal antibodies[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(7): 3349-3359. DOI:10.1021/pr500215g.
- [23] FUJIMOTO Y, OZAKI K, MAEDA M, et al. Resistance to influenza A virus infection in transformed cell lines expressing an anti-PB2 monoclonal antibody[J]. Veterinary Journal, 2013, 198(2): 487-493. DOI:10.1016/j.tvjl.2013.09.019.
- [24] KIM S H, KIM Y N, TRUONG T T, et al. Development of a monoclonal antibody specific to envelope domain III with broad-spectrum detection of all four dengue virus serotypes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 473(4): 894-898. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.03.146.
- [25] 张蕾, 张西萌, 张海予, 等. 副溶血性弧菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备及其活性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(7): 734-738.
- [26] HAN L N, HE S, WANG Y T, et al. Advances in monoclonal antibody application in myocarditis[J]. Journal of Zhejiang University: Science B, 2013, 14(8): 676-687. DOI:0.1631/jzus.BQICC711.
- [27] LI G P, ZHAO L, ZHOU F, et al. Monoclonal antibody production and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay development of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid based on novel haptens[J]. Food Chemistry, 2016, 209: 279-285. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.04.083.
- [28] KAROONUTHAISIRI N, CHARLERMROJ R, TEERAPORNOUNTAKIT J, et al. Bead array for *Listeria monocytogenes*, detection using specific monoclonal antibodies[J]. Food Control, 2015, 47: 462-471. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.07.049.
- [29] 周玉, 李岩松, 潘风光, 等. 小鼠腹水IgG类单克隆抗体纯化方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(10): 14-16.
- [30] KEIZER R J, HUITEMA A D R, SCHELLENS J H M, et al. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies[J]. Clinical Pharmacokinetics, 2010, 49(8): 493-507. DOI:2165/11531280-00000000-00000.