

单位代码：10472

学术学位

学号：50210212006

中图分类号：TP212.3

密级：公开

新乡医学院

硕士学位论文

基于磁分离技术构建食源性致病菌免疫分析新方法

**Novel Immunoassays Based on Magnetic Separation for
the Detection of Foodborne Pathogens**

申请人姓名：田歌

导师姓名、职称：张赟 副教授

一级学科：医学技术

二级学科：

培养单位：医学技术学院

完成时间：2024年3月19日

Novel Immunoassays Based on Magnetic Separation for the Detection of Foodborne Pathogens

A Thesis Submitted for the Degree of Master

Candidate: Tian Ge

Supervisor: Prof. Zhang Yun

School of Medical Technology

Xinxiang Medical University

目 录

引言.....	6
1 基于酶催化荧光与磁分离技术构建大肠杆菌 O157:H7 检测新方法.....	8
1.1 实验仪器与材料.....	8
1.1.1 主要实验仪器.....	8
1.1.2 主要实验材料与试剂.....	9
1.1.3 其他试剂的配制.....	10
1.2 实验部分.....	11
1.2.1 细菌培养与计数.....	11
1.2.2 生物素修饰鼠抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体的制备	12
1.2.3 荧光底物 Ampliflu Red 的配制	12
1.2.4 免疫磁珠的制备.....	12
1.2.5 本方法的检测步骤.....	13
1.2.6 实验条件的优化.....	14
1.2.7 本方法在 PBS 中检测大肠杆菌 O157:H7	15
1.2.8 本方法对大肠杆菌 O157:H7 检测的特异性.....	16
1.2.9 本方法在实际样本中检测大肠杆菌 O157:H7.....	16
1.3 实验结果.....	16
1.3.1 实验条件的优化结果.....	16
1.3.2 本方法在 PBS 中检测大肠杆菌 O157:H7 的结果	20
1.3.3 本方法对大肠杆菌 O157:H7 检测的特异性结果	21
1.3.4 本方法在实际样本中检测大肠杆菌 O157:H7 的结果	21
1.4 讨论.....	23
2 基于麦胚凝集素和 IgY 双重识别模式建立金黄色葡萄球菌检测新方法	24
2.1 实验仪器与材料.....	25
2.1.1 主要实验仪器.....	25
2.1.2 主要实验材料与试剂.....	25
2.1.3 其他试剂的配制.....	26
2.2 实验部分.....	26
2.2.1 细菌培养与计数.....	26
2.2.2 WGA 识别金黄色葡萄球菌的荧光表征	27
2.2.3 WGA 功能化羧基磁珠的制备	28
2.2.4 本方法的检测步骤.....	28

2.2.5 实验条件的优化.....	29
2.2.6 本方法在 PBS 中检测金黄色葡萄球菌	30
2.2.7 本方法对金黄色葡萄球菌检测的特异性	31
2.2.8 本方法在实际样本中检测金黄色葡萄球菌	31
2.3 实验结果.....	31
2.3.1 验证 WGA 与金黄色葡萄球菌结合	31
2.3.2 实验条件的优化结果.....	33
2.3.3 本方法在 PBS 中检测金黄色葡萄球菌的结果	34
2.3.4 本方法对金黄色葡萄球菌检测的特异性结果	35
2.3.5 本方法在实际样本中检测金黄色葡萄球菌的结果	37
2.4 讨论.....	39
3 结论.....	40
参考文献.....	41
综述 磁分离技术在金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 检测中的研究进展	47
1 磁分离技术用于检测食源性致病菌的原理	47
2 磁分离技术用于检测金黄色葡萄球菌	48
2.1 抗体作为识别分子.....	48
2.2 具有广谱结合能力的物质作为识别分子	49
2.3 适配体作为识别分子.....	51
3 磁分离技术用于检测大肠杆菌 O157:H7	52
3.1 抗体作为识别分子.....	52
3.2 适配体作为识别分子.....	54
4 结论与展望.....	56
参考文献.....	58
附录 英文缩略词表	61

基于磁分离技术构建食源性致病菌免疫分析新方法

摘 要

目的

食源性致病菌 (Foodborne pathogens) 能够污染食物, 被人误食后, 可引发多种疾病。大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* O157:H7) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 作为两种常见的食源性致病菌, 给人类的日常健康带来严重影响。如何实现大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的快速、灵敏、特异性检测已成为全球公共卫生领域关注的热点问题。本研究旨在基于磁分离技术构建大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的检测新方法。

方法

1. 基于酶催化荧光与磁分离技术构建大肠杆菌 O157:H7 检测新方法

辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 能够利用过氧化氢 (Hydrogen peroxide, H_2O_2) 作为氧化剂, 将无荧光的 Ampliflu Red 转化为具有强烈荧光的产物。本研究将 HRP-Ampliflu Red- H_2O_2 催化荧光体系与磁分离技术相结合应用于大肠杆菌 O157:H7 的检测。首先, 我们将鼠抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体 (IgG) 偶联于羧基磁珠表面制备成免疫磁珠。然后在大肠杆菌 O157:H7 存在的条件下, 利用生物素修饰的 IgG 作为第二识别抗体, 形成双抗体夹心结构。最后, 借助生物素-亲和素的桥联作用, HRP 标记链霉亲和素 (HRP-streptavidin, HRP-SA) 被固定于磁珠 (Magnetic beads, MBs) 表面, 催化 Ampliflu Red 和 H_2O_2 产生荧光信号, 荧光信号强度与样本中的大肠杆菌 O157:H7 浓度成正比。

2. 基于麦胚凝集素和 IgY 双重识别模式建立金黄色葡萄球菌检测新方法

麦胚凝集素 (Wheat germ agglutinin, WGA) 能够与细菌表面的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖及其衍生物特异性紧密结合。鸡抗蛋白 A IgY 具有特异性结合金黄色葡萄球菌表面蛋白 A 的能力。本研究将 WGA 与 HRP 标记鸡抗蛋白 A IgY (HRP-IgY) 形成夹心结构来检测金黄色葡萄球菌。首先, 我们以牛血清白蛋白 (BSA) 作为载体, 将 WGA 偶联于 MBs 表面, 形成 “MBs-BSA-WGA” 捕获元件。该捕获元件能够从样本

中捕获、富集金黄色葡萄球菌，形成“MBs-BSA-WGA-*S. aureus*”复合体结构。然后，HRP-IgY 被作为信号示踪剂加入反应体系中，形成三明治夹心复合结构。最后，HRP 通过催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB）/ H_2O_2 产生显色信号，信号强度与样本中的金黄色葡萄球菌浓度成正比。

结果

1. 在最优条件下，本方法在 PBS 溶液中大肠杆菌 O157:H7 的检测范围为 1.3×10^3 CFU/mL $\sim 8.0 \times 10^4$ CFU/mL，检测限为 8.3×10^2 CFU/mL；在牛奶和苹果汁中大肠杆菌 O157:H7 的检测范围均为 1.3×10^3 CFU/mL $\sim 8.0 \times 10^4$ CFU/mL，检测限分别为 8.9×10^2 CFU/mL 和 7.8×10^2 CFU/mL，全部检测过程可在 2 h 内完成。本方法表现出对大肠杆菌 O157:H7 检测的高特异性，不易受其他常见食源性致病菌的干扰。此外，本研究提出的检测策略具有高灵敏度、快速性、特异性和操作简便性，可适用于其他抗原的检测。

2. 在最优条件下，本方法对 PBS 中金黄色葡萄球菌检测的线性范围为 7.8×10^2 CFU/mL 至 2.0×10^5 CFU/mL，检测限为 3.9×10^2 CFU/mL，全部检测过程可在 90 min 内完成。本方法对一些常见的非目标细菌呈阴性结果，表明该方法具有出色的特异性。并且本方法已成功应用于氯化钠注射液和苹果汁中金黄色葡萄球菌的测定，加标回收率在 91.4 %至 124.7 %之间。此外，本研究利用 WGA 和针对目标细菌的特异性 IgY 的双重识别，可开发针对多种病原体（一些细胞壁不含 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的菌株除外）的检测试剂盒。

结论

本研究基于磁分离技术分别构建了大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的新型检测方法。两种方法均具有良好的灵敏度和特异性，并成功应用于多种实际样本检测。研究成果不仅为新型检测试剂盒的研发提供了新的思路，也为公众健康提供了有力的支持。

关键词 大肠杆菌 O157:H7；金黄色葡萄球菌；磁分离技术；免疫分析

Novel Immunoassays Based on Magnetic Separation for the Detection of Foodborne Pathogens

Abstract

Objective

Foodborne pathogens have the potential to contaminate food, leading to the onset of numerous diseases when consumed by humans. *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*, two common food-borne pathogens, have the capacity to severely impact human daily health. The rapid, sensitive, and specific detection of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* has become a hotspot in the field of global public health. The aim of our study is to establish novel methods for detecting *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* based on magnetic separation technology.

Methods

1. The new detection method of *E. coli* O157:H7 utilizing enzyme-catalyzed fluorescence coupled with magnetic separation technology

HRP can use H_2O_2 as an oxidant to convert non-fluorescent Ampliflu Red into a strongly fluorescent product. In this study, the HRP-Ampliflu Red- H_2O_2 catalytic fluorescence system was combined with magnetic separation to detect *E. coli* O157:H7. Firstly, mouse anti-*E. coli* O157:H7 monoclonal antibodies (IgG) were coupled to the surface of carboxylated magnetic beads to prepare immunomagnetic beads. Biotin-modified IgG was used as a second recognition antibody to form a sandwich format in the presence of *E. coli* O157:H7. HRP-labeled streptavidin (HRP-SA) was immobilized on the surface of magnetic beads (MBs) via the interaction between biotin-SA, hence catalyzing the production of fluorescent signals from Ampliflu Red and H_2O_2 . The intensity of the fluorescent signal was directly proportional to the concentration of *E. coli* O157:H7 in the sample.

2. The new detection method of *Staphylococcus aureus* was established based on

wheat germ agglutinin and IgY double recognition mode

WGA can specifically bind with N-acetyl-D-glucosamine and its derivatives on the surface of bacteria, and chicken anti-protein A IgY has the ability to specifically bind to protein A on the surface of *S. aureus*. In this study, WGA was used as a recognition molecule to pair with HRP-IgY to perform a sandwich format for the detection of *S. aureus*. Firstly, BSA was used as a carrier to couple WGA to the surface of MBs, creating “MBs-BSA-WGA” capture elements. These capture elements were able to capture and enrich *S. aureus* from samples, forming a “MBs-BSA-WGA-*S. aureus*” complex. Subsequently, HRP-IgY was added to the reaction system as a signal tracer to form a sandwich-type complex. Finally, HRP catalyzed the oxidation of TMB by H_2O_2 to produce a colorimetric signal, with the intensity of the signal being directly proportional to the concentration of *S. aureus* in the sample.

Results

1. Under optimal conditions, the detection range of this method for *E. coli* O157:H7 in PBS was 1.3×10^3 CFU/mL to 8.0×10^4 CFU/mL with a detection limit of 8.3×10^2 CFU/mL. The detection range of *E. coli* O157:H7 in both milk and apple juice was 1.3×10^3 CFU/mL to 8.0×10^4 CFU/mL, with detection limits of 8.9×10^2 CFU/mL in milk and 7.8×10^2 CFU/mL in apple juice, respectively. The entire detection process can be completed within 2 hours. This method exhibited high selectivity in the detection of *E. coli* O157:H7 and was not easily interfered with by other common food-borne pathogenic bacteria. Additionally, the proposed strategy in this study could be applied for detecting other antigens with high sensitivity, rapidity, specificity, and simple operation.

2. Under optimum conditions, the proposed strategy was able to access a linear relation ranging from 7.8×10^2 CFU/mL to 2.0×10^5 CFU/mL, and it could drop the LOD to 3.9×10^2 CFU/mL within 90 min. Some common non-target bacteria yielded negative results, indicating the excellent specificity of the method. And the developed strategy was successfully applied to the determination of *S. aureus* in both sodium chloride injection

and apple juice samples, with satisfactory recoveries ranging from 91.4 % to 124.7 %. In addition, the platform, according to the dual recognition of WGA and IgY specific to target bacteria, exhibited potential in the development of sandwich detection protocols for multiple target pathogens (except for the strains whose cell walls do not contain N-acetyl-D-glucosamine).

Conclusion

This study successfully developed novel detection methods for *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* based on magnetic separation. Both methods exhibited excellent sensitivity and specificity, and were successfully applied to the detection of various actual samples. The research findings not only provide new insights for the development of novel detection kits, but also offer strong support for public health.

Keywords *E. coli* O157:H7; *S. aureus*; Magnetic separation; Immunoassay

引 言

在全球化的大背景下，食源性致病菌引发的疾病呈现出高发趋势，对人们的生命安全构成了严重威胁，同时也对经济社会的发展造成了巨大的阻碍。大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌是两种常见的食源性致病菌，可通过污染乳制品、熟肉制品等给人们的健康带来不利影响。其中，大肠杆菌 O157:H7 是致人住院的主要食源性致病菌之一，与之相关的病例约占全球所有病例数的 20 %^[1, 2]。健康人若不慎摄入加工不当、被大肠杆菌 O157:H7 污染的食品，可能罹患感染性腹泻、出血性结肠炎及溶血性尿毒症综合征等严重疾病，甚至面临生命危险^[3]。因此，美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 对某些食品（如碎牛肉）中存在的大肠杆菌 O157:H7 实施了“零容忍”的政策^[4]。而金黄色葡萄球菌也是一种常见的食源性致病菌，属革兰氏阳性细菌，可引发皮肤感染、血管内感染等多种类型感染^[5]。该感染每年在美国导致约 50 万人入院治疗^[6, 7]，给公共卫生安全带来了严峻的挑战。因此，及时有效地检测出样本中大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌，将有助于降低食源性致病菌污染对人类健康所带来的威胁，避免造成更大的经济损失。

目前，食源性致病菌检测的“金标准”是基于培养和菌落计数的培养法，该方法具有精度高、成本低的特点。然而，细菌的培养和分离大约需要 24 h 至 72 h，耗时较长，操作过程也繁琐复杂。另外，当细菌进入“viable but non-culturable”的状态时，无法在选择性培养基中被增殖培养，将影响检测结果^[8-10]。与细菌培养法相比，PCR 检测技术在大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的特异性基因序列检测方面更具优势^[11-13]。但是 PCR 检测技术对靶基因的扩增需要技术人员对细菌进行裂解、DNA 提取、纯化和扩增等一系列处理。在细菌裂解和 DNA 提取过程中，若操作不当，容易形成气溶胶，使细菌的裂解产物通过空气传播污染实验室环境和其他样本。此外，PCR 检测体系还容易受到食物样品基质的干扰，也限制了其在食品检测领域中的应用^[14]。

而免疫分析是一种基于抗原抗体特异性结合原理发展出的检测技术，具有操作简便、特异性高、亲和性强等优点^[15, 16]，已被广泛应用于食源性致病菌的检测。免疫分析可以与磁分离技术结合使用，在这一过程中，抗体^[17]、抗生素^[18, 19]等第一分子识别元件将首先偶联于磁珠表面，与目标菌种以高亲和力结合，并在外加磁场的作用下，

完成对目标菌^[18, 20]的快速分离与富集。之后，第二分子识别元件将作为信号示踪剂被加入，与第一分子识别元件形成双抗体夹心复合物，进而引发底物发生电化学^[21, 22]、荧光^[20, 23]、化学发光^[24, 25]和显色^[26]等多种反应，以指示目标菌的浓度。本研究结合磁分离技术成功研发出两种新型免疫分析方法：一是基于酶催化荧光与磁分离技术构建大肠杆菌 O157:H7 的检测方法，二是基于麦胚凝集素和 IgY 双重识别模式建立金黄色葡萄球菌的检测方法，成功实现了对大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌高效、准确的检测，具有重要的科学意义和应用价值。

1 基于酶催化荧光与磁分离技术构建大肠杆菌 O157:H7 检测新方法

目前, 荧光免疫分析已实现高灵敏度检测致病菌, 成为免疫分析技术研究的热点之一。根据文献报道, 多种荧光纳米材料 (例如量子点^[27]、碳点^[28]和 Ag^+ 掺杂的金纳米团簇^[29]) 和荧光染料 (例如 Cy5^[30]) 成功应用于大肠杆菌 O157:H7 的检测, 并取得令人满意的检测结果。但是荧光生物传感器的开发仍面临多重挑战, 这些荧光物质的合成过程较为复杂且需要危险化学品或重金属 (例如镉和铅), 同时荧光检测中存在光稳定性有限、生物样品中背景信号的干扰以及生物功能化实现等, 是荧光免疫分析中亟待解决的难题^[31]。非荧光 Ampliflu Red (10-乙酰基-3, 7-二羟基吩噻嗪) 可以在 H_2O_2 的存在下, 通过酶催化氧化反应转化为具有强荧光响应的荧光底物, 具有低背景信号、危险性小等特点, 可应用于荧光生物传感器的开发^[32-34]。免疫磁分离技术利用抗体与磁珠表面的偶联, 制备出具有特定识别功能的免疫磁珠, 从而实现目标菌种的快速富集^[35]。由于食品基质中常含有脂肪、蛋白质、糖等多种成分, 这些物质的存在往往会对荧光免疫分析的灵敏度和准确性造成不利影响^[36]。免疫磁分离技术凭借其独特的分离富集能力, 能够有效地克服这些干扰因素, 确保检测结果的准确性和可靠性。基于此, 我们构建了一种基于酶催化荧光与磁分离技术相结合的策略来检测大肠杆菌 O157:H7。

1.1 实验仪器与材料

1.1.1 主要实验仪器

表 1.1 本研究所用的实验仪器

Table 1.1 The experimental instruments used in this study

实验仪器名称	型号	生产厂家
pH 计	PB-10	德国 Sartorius
旋涡振荡器	Vortex-2-Genie	美国 Scientific Industries
磁力架	8 孔	西安金磁纳米生物技术 有限公司

续表 1.1 本研究所用的实验仪器

Continued from Table 1.1 The experimental instruments used in this study

实验仪器名称	型号	生产厂家
摇床	ZWY-100H	上海智成分析仪器制造有限公司
电子分析天平	Precisa GravimetricsAG Moosmattstrasse 32, 8953	瑞士 Precisa
多功能酶标仪	Multiskan MK3 microplate reader	美国 Thermo Scientific
超纯水仪	PALL Cascada I	美国 PALL

1.1.2 主要实验材料与试剂

表 1.2 本研究所用的实验材料与试剂

Table 1.2 The experimental materials and reagents used in this study

实验材料与试剂名称	生产厂家
Ampliflu Red	美国 Sigma-Aldrich
鼠抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体 (IgG) (3.4 mg/mL)	上海慧耘生物科技有限公司
1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
羧基磁珠 (粒径 820 nm, 浓度 25 mg/mL)	美国 SpheroTech 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	北京索莱宝科技有限公司
生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (Biotin-NHS) 冻干粉	美国 Sigma-Aldrich
沙门氏菌 (<i>Salmonella</i> , ATCC 14028)	北纳生物菌种保藏中心
<i>E. coli</i> O157:H7 (EDL 933)	北纳生物菌种保藏中心
无乳链球菌 (<i>S. agalactiae</i>)	中科院武汉病毒研究所危宏平课题组 赠送
痢疾志贺氏菌 (<i>Sh. Dysenteriae</i> , CMCC 51252)	广东省微生物菌种保藏中心
单核细胞增生李斯特菌 (<i>L. monocytogenes</i> , ATCC 19115)	北纳生物菌种保存中心

续表 1.2 本研究所用的实验材料与试剂

Continued from Table 1.2 The experimental materials and reagents used in this study

实验材料与试剂名称	生产厂家
辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (HRP-SA) (1 mg/mL)	北京 BiodragonImmunotechnologies 公司
无菌透析袋 (分子截留量: 7000 Da)	美国 Biolegend 公司
牛血清白蛋白	中国 Biosharp 公司
脱脂牛奶	北京索莱宝科技有限公司
96 孔血清板	广州洁特生物过滤股份有限公司
脑心浸液培养基 (BHI)	英国 Oxoid 公司
胰蛋白胨 (Tryptone)	英国 Oxoid 公司
酵母浸粉 (Yeast extract)	英国 Oxoid 公司
吐温 20	美国 Sigma-Aldrich
甘油	北京索莱宝科技有限公司
牛奶	伊利
苹果汁	汇源

1.1.3 其他试剂的配制

(1) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (pH 7.4): 依次称取 NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄ 12 H₂O 和 KCl 为 8 g、0.24 g、3.63 g 和 0.2 g 加入盛有 1 L 超纯水的烧杯内充分溶解。

(2) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (pH 6.8): NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄ 12 H₂O 和 KCl 依次称取 4 g、0.12 g、1.815 g 和 0.1 g, 然后加入盛有 400 mL 的超纯水烧杯内充分溶解, 用 1 mol/L 稀盐酸调节该溶液的 pH 为 6.8, 并用超纯水定容至 500 mL。

(3) LB 液体培养基: 依次称取 NaCl、Yeast extract 和 Tryptone 为 2 g、1 g、2 g 于 500 mL 的锥形瓶内。然后加入超纯水并定容至 200 mL, 使其充分溶解后, 将锥形瓶

置于高压锅内以 121 °C，20 min 高压灭菌。

(4) LB 固体培养基：依次称取 NaCl、Yeast extract 和 Tryptone 为 2 g、1 g、2 g 于 500 mL 的锥形瓶内，同时加入 3.4 g 的琼脂粉，用超纯水定容至 200 mL 使其充分溶解，然后置于高压锅内以 121 °C，20 min 高压灭菌。

(5) BHI 液体培养基：称取 7.4 g BHI 粉末于 500 mL 的锥形瓶内，超纯水定容至 200 mL，使其充分溶解，然后置于高压锅内以 121 °C，20 min 高压灭菌。

(6) BHI 固体培养基：称取 7.4 g BHI 粉末于 500 mL 的锥形瓶内，同时加入 1.5 % ~ 2 % 的琼脂粉，用超纯水定容至 200 mL，使其充分溶解，然后置于高压锅内以 121 °C，20 min 高压灭菌。

(7) pH 7.4 磷酸盐-吐温 20 缓冲液 (phosphate buffer saline-Tween 20, PBST)：将吐温 20 与 pH 7.4 的 PBS 按 1: 2000 充分混合均匀。

(8) 磁珠封闭剂：按照脱脂牛奶和 BSA 3: 1 的混合比例，分别精确地称取 0.15 g 和 0.05 g 加入 1 mL PBST，使两者完全溶解在 PBST 中，需确保没有未溶解的颗粒。

(9) 含 20 % 甘油的 PBS (pH: 7.4)：甘油与 PBS (pH: 7.4) 按照 1: 4 体积充分混合后，置于高压锅内以 121 °C，20 min 高压灭菌。

(10) 50 % 甘油：甘油与纯净水按照 1: 1 体积混合后，放置于高压锅内以 121 °C，20 min 高压灭菌。

1.2 实验部分

1.2.1 细菌培养与计数

考虑到不同菌株在培养过程中的营养需求差异，选择适当的培养基对于促进细菌的培养至关重要。将大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌、无乳链球菌和痢疾志贺氏菌依次接种于 LB 培养基，促使细菌能更好地生长。将单核细胞增生李斯特菌用 BHI 进行培养。具体操作如下：

(1) 取出保存在 -80 °C 的目标菌株，灼烧接种环冷却后，蘸取少量菌液，采用三区划线法将目标菌株接种于固体培养基上，放置培养基于 37 °C 的培养箱中培养过夜，形成肉眼可见的单个菌落。

(2) 选择生长良好、大小合适的单个菌落置于液体培养基中，以 180 r/min，37 °C

连续摇动条件下，直至细菌生长进入对数期。

(3) 将进入对数期的菌液在 3500 r/min、4 °C 下离心 5 min，然后用无菌 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次。

(4) 最后，将收集到的细菌沉淀用含 20 % 甘油的无菌 PBS (pH 7.4) 重悬。重悬后的细菌菌液需无菌操作，以每管 100 μ L 分装于无菌 Eppendorf (Ep) 管。留取一管做细菌浓度测定，剩余的分装管放于 -80 °C 冰箱保存备用。

(5) 采用平板计数法计算所保存的细菌浓度，将留取的 100 μ L 细菌菌液用无菌 PBS (pH 7.4) 依次稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 倍等。然后从 10^4 倍的稀释菌液开始，每个稀释倍数的菌液取 100 μ L 均匀涂布到 LB 固体培养基上，待菌液干后，将涂布好的固体培养基倒置放入 37 °C 的隔水式培养箱内，培养过夜。

(6) 次日，待菌落生长出来后，将菌落数在 30 ~ 300 CFU 范围内的培养基，进行菌落计数。最终得出的菌落数通过公式 (细菌浓度 (CFU/mL) = 菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10$) 计算出原始的细菌浓度。

1.2.2 生物素修饰鼠抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体的制备

大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体与 Biotin-NHS 以 1: 20 的摩尔比混合，从而得到生物素修饰的抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体 (Biotin-IgG)。详细的操作步骤如下，大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体与 Biotin-NHS 以 1: 20 的摩尔比在 Ep 试管中混合后，用箔纸包裹避光，在 220 r/min 摇床中以 25 °C 孵育 2 h。然后在磁力搅拌器的作用下，将得到的 Biotin-IgG 置于 PBS (pH 7.4) 进行透析，以去除未结合的 Biotin-NHS。最终透析后得到的生物素修饰抗体，用无菌的 50 % 甘油等体积重悬并保存于 -20 °C 备用。

1.2.3 荧光底物 Ampliflu Red 的配制

准确称取 0.0052 g Ampliflu Red，溶解于 2 mL DMSO 中。以每管 100 μ L 分装后，避光保存于 -20 °C 的冰箱中。

1.2.4 免疫磁珠的制备

本实验制备抗大肠杆菌 O157:H7 抗体偶联的羧基磁珠，用于高效捕获大肠杆菌。操作如下：

(1) 将 1 mg 羧基磁珠吸入 Ep 管中，在磁力架上吸除上清液，用 200 μ L PBS (pH

6.8)洗涤磁珠 2 次。然后将磁珠重新悬浮在含有 2 mg EDC 和 1 mg NHS 的 120 μ L PBS (pH 6.8) 溶液中。重悬后的磁珠用锡箔纸包裹避光, 置于 37 $^{\circ}$ C 的摇床内以 180 r/min 活化 30 min。

(2) 活化完成后, 用 200 μ L PBS (pH 7.4) 清洗磁珠 2 次, 去除多余的 EDC 和 NHS。此时, 加入 54.4 μ g 抗大肠杆菌单克隆抗体, 振荡混匀。将混合物放置于摇床内并以上述相同条件下继续孵育 4 h, 使抗体与磁珠充分偶联。

(3) 再次取出后, 用含吐温 20 的磷酸盐缓冲盐水(PBST, pH 7.4 的 PBS, 含 0.05 % 吐温 20) 仔细洗涤磁珠 4 次, 并用 1 mL 封闭剂 (PBST, 含 5 % BSA 和 15 % 脱脂奶粉) 封闭磁珠 2 h。

(4) 最后, 用 PBST 清洗磁珠 5 次, 洗去残留的封闭剂后, 将磁珠重新悬浮于 1 mL pH 7.4 的 PBS 中, 振荡混合, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2.5 本方法的检测步骤

具体的检测过程原理如图 1.1:

(1) 将 100 μ L 含有一定浓度大肠杆菌 O157:H7 的样品与一定量的免疫磁珠在 Ep 管中充分混合, 在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 的摇床中孵育 30 min。

(2) 使用 PBST 清洗磁珠复合物 4 次, 去除样本基质和未结合的成分, 随后加入 100 μ L Biotin-IgG 振荡混匀, 摇床内 (37 $^{\circ}$ C, 180 r/min) 继续孵育 30 min。

(3) 使用 PBST 洗涤磁珠复合物 4 次, 去除未结合的 Biotin-IgG 后, 加入 100 μ L HRP-SA, 将 Ep 管放置在涡旋振荡器上混合均匀, 然后置于摇床内以特定条件 (37 $^{\circ}$ C, 180 r/min) 孵育 30 min。

(4) 使用 PBST 仔细清洗磁珠复合物 5 次, 加入 100 μ L 荧光底物 Ampliflu Red 和 100 μ L H₂O₂, 充分混合, 置于 37 $^{\circ}$ C 隔水式培养箱中, 避光孵育 10 min。

(5) 将 Ep 管置于磁力架进行磁分离后, 将 100 μ L 上清液转移到 96 孔板中。使用多功能酶标仪测量液体后, 在激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 的条件下, 获得荧光信号强度。

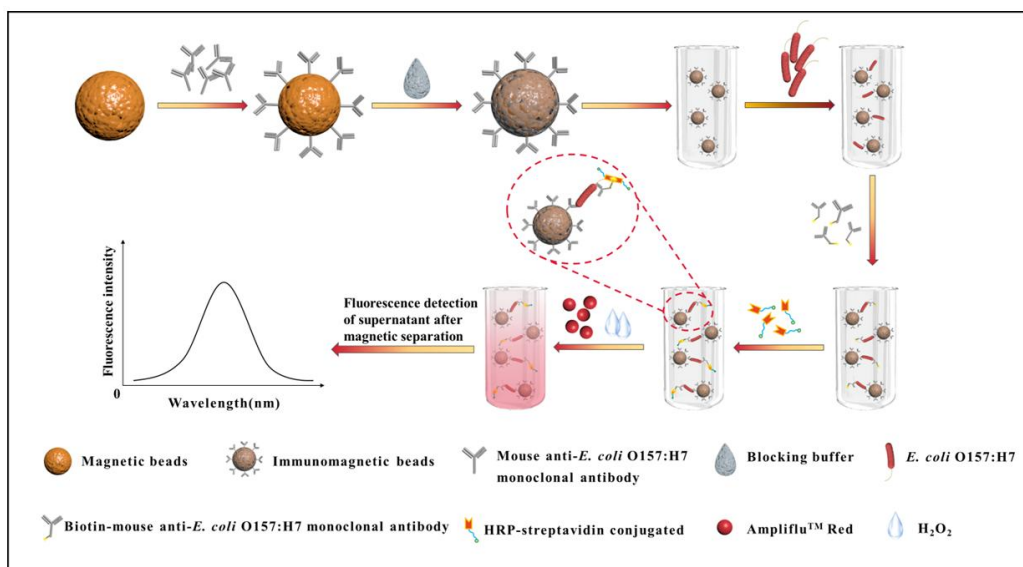


图 1.1 基于酶催化荧光与磁分离技术构建检测大肠杆菌 O157:H7 的新方法原理图

Fig. 1.1 Schematic diagram of a novel approach for detecting *E. coli* O157:H7 utilizing enzyme-catalyzed fluorescence and magnetic separation

1.2.6 实验条件的优化

免疫试剂用量与荧光底物浓度可以影响荧光免疫分析的灵敏度。因此，我们在这项工作中优化了荧光反应物（Ampliflu Red、H₂O₂）的浓度以及免疫磁珠、Biotin-IgG 和 HRP-SA 的量，以取得最佳的 F/F_0 （ F 代表含有 8×10^4 CFU/mL 大肠杆菌 O157:H7 样品的荧光检测信号， F_0 是相同条件下仅孵育 PBS（pH 7.4）的荧光检测信号）。

1.2.6.1 荧光底物 Ampliflu Red 和 H₂O₂ 的优化

Ampliflu Red 与 H₂O₂ 的反应浓度比是影响荧光强度的关键因素。本实验分别选择荧光底物 Ampliflu Red 在 50 $\mu\text{mol/L}$ ~ 250 $\mu\text{mol/L}$ （50、100、150、200、250）和 H₂O₂ 在 100 $\mu\text{mol/L}$ ~ 2100 $\mu\text{mol/L}$ （100、600、1100、1600、2100）的浓度范围内进行探索，以获取最佳的检测效果。

首先探究了底物 Ampliflu Red 的系列浓度（50、100、150、200、250（ $\mu\text{mol/L}$ ））以选取最佳检测浓度。以 20 μg 的免疫磁珠用量，1: 500 稀释比例的 Biotin-IgG 和 1: 2000 稀释比例的 HRP-SA 的实验条件下，按照 1.2.5 的检测过程，依次检测 Ampliflu Red 每个浓度对应的 F_0 和 F 值，并依照 F/F_0 的比值随浓度的变化趋势来选择底物的最佳浓

度。

其次，我们选用 H_2O_2 在 100、600、1100、1600、2100 ($\mu\text{mol/L}$) 的浓度范围内，探索 H_2O_2 最佳检测浓度。此时，选取上述优化所得的底物 Ampliflu Red 最佳浓度，按照 1.2.5 的 protocol，测得每个 H_2O_2 浓度下所对应的 F 和 F_0 。通过观察每组的 F_0 、 F 和 F/F_0 的趋势，来得出 H_2O_2 的最优浓度。

1.2.6.2 免疫磁珠用量的优化

该检测步骤按照 1.2.5 的 protocol，依次取 5 μg 、10 μg 、15 μg 、20 μg 、25 μg 范围内的磁珠，依照上述步骤所优化已得的最佳条件下，研究不同的磁珠用量对荧光检测信号的影响，以探索最佳检测效果时的磁珠用量。以磁珠用量为横坐标，荧光检测信号为纵坐标来做作图，观察并分析 F_0 、 F 和 F/F_0 随磁珠用量的变化趋势。当 F/F_0 比值为最大时，磁珠用量即为最优。

1.2.6.3 Biotin-IgG 稀释比例的优化

通过上述对不同的底物浓度、 H_2O_2 浓度和磁珠用量的优化后，我们分别选用已得出的最佳优化条件来探索 Biotin-IgG 的最佳检测浓度。本研究用含 1 % 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBST (稀释液) 对 Biotin-IgG 进行梯度稀释，其中 Biotin-IgG 与稀释液稀释比例依次按照体积比 1: 1000, 1: 500, 1: 200, 1: 100, 1: 50 的比例进行稀释。按照 1.2.5 的 protocol，测得每个 Biotin-IgG 稀释比例下所对应的 F 和 F_0 。观察 F_0 、 F 和 F/F_0 随 Biotin-IgG 浓度变化而出现的变化趋势。当 F/F_0 比值为最大时，所对应的浓度即为 Biotin-IgG 的最佳检测浓度。

1.2.6.4 HRP-SA 稀释比例的优化

在上述优化的最佳检测条件下，来确定最佳检测效果下 HRP-SA 的浓度。按照 1.2.5 的步骤，检测 HRP-SA 在稀释比例分别为 1: 1000, 1: 2000, 1: 3000, 1: 4000 和 1: 5000 稀释范围内的荧光检测信号。分析 F 、 F_0 和 F/F_0 随 HRP-SA 浓度的变化趋势，当 F/F_0 的比值达到最大时，所对应的 HRP-SA 的浓度即为最佳。

1.2.7 本方法在 PBS 中检测大肠杆菌 O157:H7

在上述优化的最佳检测条件下，用 PBS (pH 7.4) 将大肠杆菌 O157:H7 依次稀释为不同的浓度 (1.3×10^3 CFU/mL、 2.5×10^3 CFU/mL、 5.0×10^3 CFU/mL、 1.0×10^4 CFU/mL、

2.0×10^4 CFU/mL、 4.0×10^4 CFU/mL 和 8.0×10^4 CFU/mL) 进行检测, 进一步验证该方法的性能。按照 1.2.5 的 protocol, 测出每个浓度所对应的荧光信号, 将大肠杆菌 O157:H7 的浓度以 10 为底取对数作为横坐标, 所测得的荧光信号以 10 为底取对数作为纵坐标, 来拟合标准曲线。

1.2.8 本方法对大肠杆菌 O157:H7 检测的特异性

为探讨本实验方法的特异性, 我们使用 4 种常见的食源性致病菌: 沙门氏菌、无乳链球菌、单核细胞增生李斯特菌、痢疾志贺氏菌来作为本实验的干扰菌。干扰菌浓度均选择为 1.0×10^6 CFU/mL, 目标菌株大肠杆菌 O157:H7 浓度选择为 8.0×10^4 CFU/mL。组 1 为空白对照, 组 2 为沙门氏菌, 组 3 为无乳链球菌, 组 4 为单核细胞增生李斯特菌, 组 5 为痢疾志贺氏菌, 组 6 为大肠杆菌 O157:H7。在最优的检测条件下, 比较各组所测得的荧光检测值。

1.2.9 本方法在实际样本中检测大肠杆菌 O157:H7

我们选择牛奶和苹果汁作为模拟样本, 来探讨本方法在实际食物样品中实际应用潜力。按照 1.2.7 的步骤, 我们用上述的牛奶和处理后的苹果汁直接代替 PBS 来对大肠杆菌 O157:H7 进行稀释, 浓度依次为 1.3×10^3 CFU/mL、 2.5×10^3 CFU/mL、 5.0×10^3 CFU/mL、 1.0×10^4 CFU/mL、 2.0×10^4 CFU/mL、 4.0×10^4 CFU/mL、 8.0×10^4 CFU/mL。将大肠杆菌 O157:H7 的浓度以 10 为底取对数为横坐标, 所测得的荧光信号以 10 为底取对数为纵坐标, 拟合出本方法在牛奶和苹果汁中的标准曲线。

1.3 实验结果

1.3.1 实验条件的优化结果

1.3.1.1 荧光底物 Ampliflu Red 和 H_2O_2 的浓度优化

如图 1.2 A 所示, 随着 Ampliflu Red 添加量的增加, 阳性对照组的 F 呈上升趋势, 达到 $150 \mu\text{mol/L}$ 时, F 的增长变缓。而 F_0 呈现较为平缓的增长趋势。如图 1.2 B 所示, 当 Ampliflu Red 的添加量在 $50 \mu\text{mol/L} \sim 150 \mu\text{mol/L}$ 的范围内时, F/F_0 呈上升的趋势。但是当超过 $150 \mu\text{mol/L}$ 时, F/F_0 开始下降并进入平台期。因此, 我们选择 $150 \mu\text{mol/L}$ 作为 Ampliflu Red 的最佳检测浓度。而另一个关键的反应底物 H_2O_2 也被优化, 如图 1.3 A 所示, 当 H_2O_2 的量低于 $1100 \mu\text{mol/L}$ 时, F 迅速增加。但当 H_2O_2 的量大于 $1100 \mu\text{mol/L}$,

F 几乎不增加。如图 1.3 B 所示, F/F_0 在 $100 \mu\text{mol/L} \sim 1100 \mu\text{mol/L}$ 的范围内呈增长趋势, 当超过 $1100 \mu\text{mol/L}$ 后, F/F_0 增加不明显, 进入平台期。这是因为在过高 H_2O_2 浓度下, 如果 Ampliflu Red 的浓度有限, HRP 有可能将试卤灵进一步氧化为无荧光的无色产物^[37, 38], 使荧光信号强度减弱。综上所述, $1100 \mu\text{mol/L}$ 是本实验中 H_2O_2 的最佳浓度。

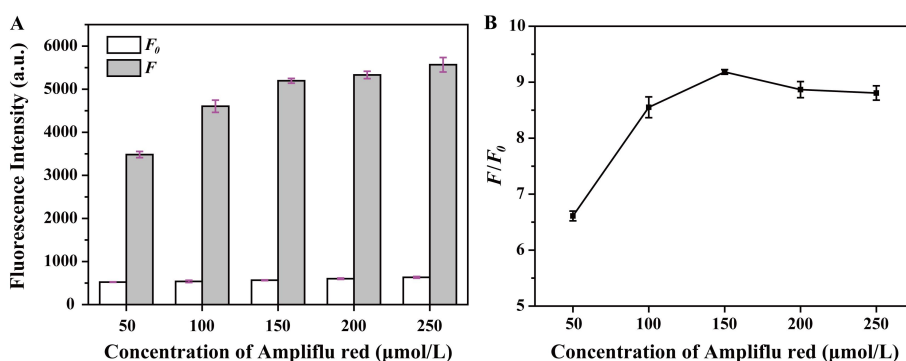


图 1.2 Ampliflu Red- H_2O_2 荧光体系中荧光底物 Ampliflu Red 的浓度优化; (A): Ampliflu Red 的浓度对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F 及 F_0 的影响; (B): Ampliflu Red 的浓度对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F/F_0 的影响

Fig. 1.2 Optimization of the concentration of fluorescent substrate Ampliflu Red in Ampliflu Red- H_2O_2 fluorescence system; (A): Effect of Ampliflu Red concentration on F and F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm; (B): Effect of Ampliflu Red concentration on F/F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm

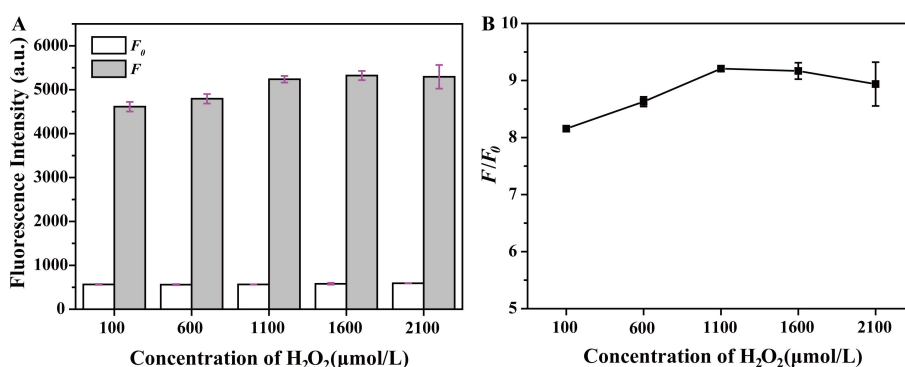


图 1.3 Ampliflu Red- H_2O_2 荧光体系中 H_2O_2 的浓度优化; (A): H_2O_2 的浓度对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F 及 F_0 的影响; (B): H_2O_2 的浓度对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F/F_0 的影响

Fig. 1.3 Optimization of H_2O_2 concentration in Ampliflu Red- H_2O_2 fluorescence system; (A): Effect of H_2O_2 concentration on F and F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm; (B): Effect of H_2O_2 concentration on F/F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm

1.3.1.2 免疫磁珠用量的优化

为了评估免疫磁珠用量对荧光信号强度的影响,并找到最佳用量以最大化检测灵敏度。我们逐步增加免疫磁珠的用量,从 $5\ \mu\text{g}$ 到 $25\ \mu\text{g}$,并监测每次添加后产生的荧光信号强度。如图 1.4 A 所示,随着磁珠用量的增加, F 呈增加趋势。 F_0 较为平缓。在图 1.4 B 中,随着免疫磁珠的不断添加, F/F_0 比值在 $15\ \mu\text{g}$ 时达到最大,并逐渐接近平台期。这有效地说明 $15\ \mu\text{g}$ 的磁珠量可以为大肠杆菌 O157:H7 提供充足的结合位点且减少检测背景的干扰。因此,免疫磁珠的最佳用量为 $15\ \mu\text{g}$ 。

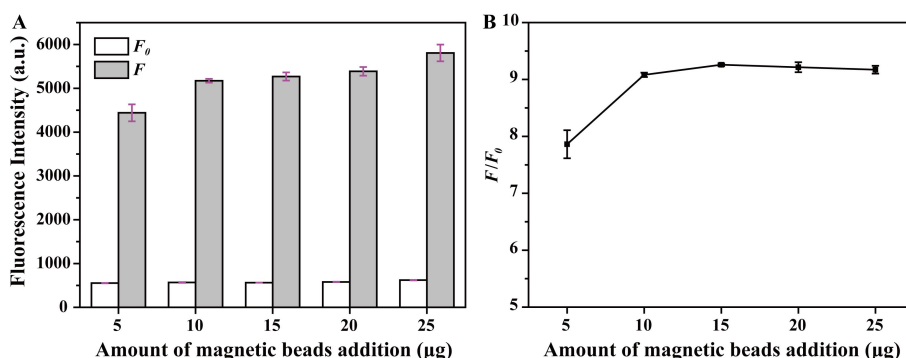


图 1.4 免疫磁珠添加量对 F/F_0 的影响,细菌浓度为 8.0×10^4 CFU/mL; (A): 免疫磁珠的添加量对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F 及 F_0 的影响; (B): 免疫磁珠的添加量对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F/F_0 的影响

Fig. 1.4 The influence of the amount of immunomagnetic beads on F/F_0 , the bacterial concentration was 8.0×10^4 CFU/mL; (A): Effect of the amount of immunomagnetic beads on F and F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm; (B): Effect of the amount of immunomagnetic beads on F/F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm

1.3.1.3 Biotin-IgG 稀释比例的优化

夹心生物复合物的形成主要涉及两种主要的免疫试剂,即免疫磁珠与 Biotin-IgG 偶

联物的结合和 Biotin-IgG 偶联物与 HRP-SA 偶联物的结合。Biotin-IgG 的浓度优化如图 1.5 A 所示，当 Biotin-IgG 的稀释比例达到 1: 200 时，可以清楚地观察到 F 和 F_0 的增加，以及图 1.5 B 中显示出 F/F_0 在 1: 200 时出现最高峰，即 F/F_0 比值在此时达到最大。这证实了此刻免疫磁珠与 Biotin-IgG 偶联物的结合已达到了饱和状态，当添加过量的 Biotin-IgG 会产生大量的非特异性吸附， F 的增长变缓，而 F_0 会继续升高， F/F_0 比值开始出现下降趋势。因此，我们选择稀释比例为 1: 200 的 Biotin-IgG 作为后续实验的最佳检测浓度。

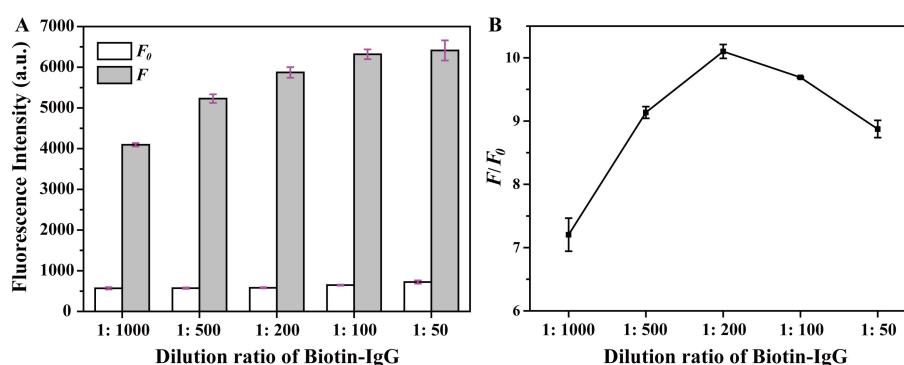


图 1.5 Biotin-IgG 的稀释比例优化；（A）：Biotin-IgG 的稀释比例对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F 及 F_0 的影响；（B）：Biotin-IgG 的稀释比例对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F/F_0 的影响

Fig 1.5 Optimization of dilution ratio of Biotin-IgG; (A): Effect of dilution ratio of Biotin-IgG on F and F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm; (B): Effect of dilution ratio of Biotin-IgG on F/F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm

1.3.1.4 HRP-SA 稀释比例的优化

HRP 在催化氧化生成荧光的过程中起着重要作用。HRP-SA 在稀释比例为 1: 1000 ~ 1: 5000 的浓度范围内进行优化，以获得最佳检测效果。如图 1.6 A 所示， F 随着 HRP-SA 浓度的增加而逐渐增大， F_0 则呈现出较缓的增长趋势。如图 1.6 B 所示，HRP-SA 稀释比例为 1: 2000 时， F/F_0 出现显著峰值，这说明此刻形成的夹心结构物所产生的特征荧光信号最强，背景值较低。故我们选用 1: 2000 作为 HRP-SA 的最佳稀释比例来进行后续的实验。

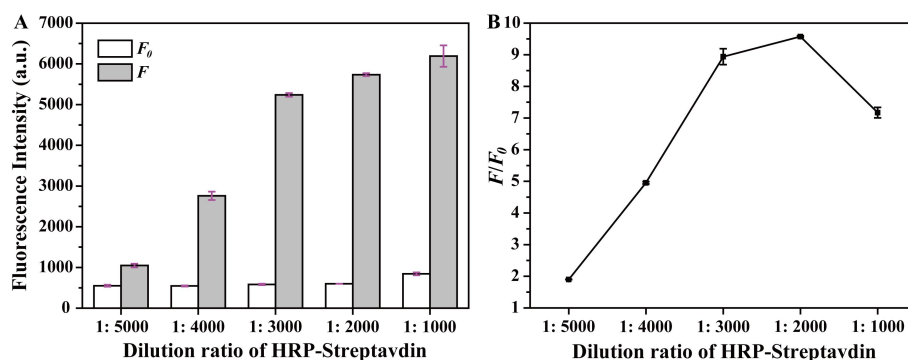


图 1.6 HRP-SA 的稀释比例优化; (A): HRP-SA 的稀释比例对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F 及 F_0 的影响; (B): HRP-SA 的稀释比例对激发光为 571 nm、发射光为 585 nm 处 F/F_0 的影响

Fig 1.6 Optimization of dilution ratio of HRP-SA; (A): Effect of dilution ratio of HRP-SA on F and F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm; (B): Effect of dilution ratio of HRP-SA on F/F_0 at excitation light of 571 nm and emission light of 585 nm

1.3.2 本方法在 PBS 中检测大肠杆菌 O157:H7 的结果

如图 1.7 所示, 本方法在最优的检测条件下, 荧光信号强度随着大肠杆菌 O157:H7 浓度在 1.3×10^3 CFU/mL $\sim 8.0 \times 10^4$ CFU/mL 范围内的增加, 呈现出良好的上升趋势。测得的荧光信号与大肠杆菌 O157:H7 浓度均选择以 10 为底的对数来进行拟合曲线, 线性回归方程为 $Y = 0.5016X + 1.3503$ ($R^2 = 0.9904$), 其中 Y 表示荧光信号取 10 为底的对数, X 表示大肠杆菌 O157:H7 的浓度取以 10 为底的对数。本方法在 PBS 中检测大肠杆菌 O157:H7 的检测限为 8.3×10^2 CFU/mL。

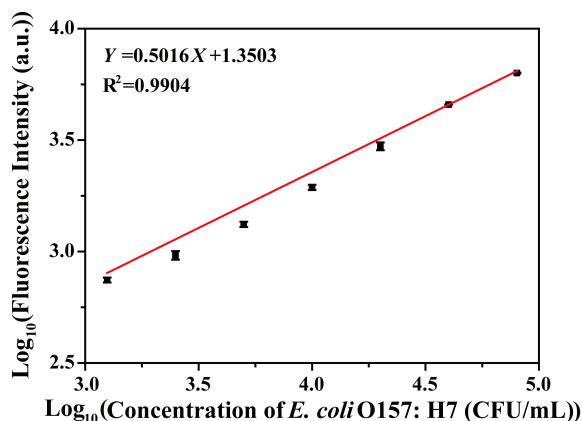


图 1.7 本方法在 PBS 中检测大肠杆菌 O157:H7 的标准曲线

Fig 1.7 The standard curve for detecting *E. coli* O157:H7 in PBS using this method

1.3.3 本方法对大肠杆菌 O157:H7 检测的特异性结果

如图 1.8 所示, 1 为 PBS 的空白对照, 2、3、4 和 5 分别为沙门氏菌、无乳链球菌、单核细胞增生李斯特菌和痢疾志贺氏菌, 6 为大肠杆菌 O157:H7 的阳性对照。2、3、4 和 5 所获得的荧光检测信号与 1 (空白对照) 接近, 表明了本试验所选择的抗体对大肠杆菌 O157:H7 具有良好的选择性和特异性, 不与其他干扰菌发生交叉反应, 高浓度的干扰细菌几乎无法对该检测方法产生荧光信号响应。

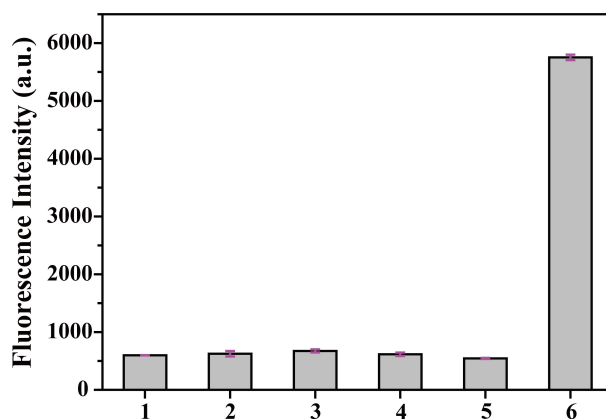


图 1.8 本方法的特异性

1: 空白对照; 2: 沙门氏菌; 3: 无乳链球菌; 4: 单核细胞增生李斯特菌; 5: 痢疾志贺氏菌; 6:

大肠杆菌 O157:H7

Fig. 1.8 Specificity of this method

1: Blank; 2: *Salmonella*; 3: *S. agalactiae*; 4: *L. monocytogenes*; 5: *Sh. Dysenteriae*; 6: *E. coli* O157:H7

1.3.4 本方法在实际样本中检测大肠杆菌 O157:H7 的结果

我们分别使用牛奶和苹果汁来稀释大肠杆菌 O157:H7 以获取本方法在实际样本中的标准曲线。如图 1.9 和 1.10 所示, 随着样本中大肠杆菌 O157:H7 浓度的升高, 荧光信号强度也在逐步增大, 在 1.3×10^3 CFU/mL $\sim 8.0 \times 10^4$ CFU/mL 的检测范围内, 测得的荧光信号与大肠杆菌 O157:H7 浓度之间存在线性关系。如图 1.9 所示, 在牛奶中, 检测信号与大肠杆菌 O157:H7 浓度均选择以 10 为底的对数来进行拟合曲线, 线性回归方程为 $Y = 0.5018 X + 1.3328$ ($R^2 = 0.9984$), 其中 Y 表示测得的荧光信号取以 10 为底的

对数， X 表示大肠杆菌 O157:H7 的浓度取以 10 为底的对数。

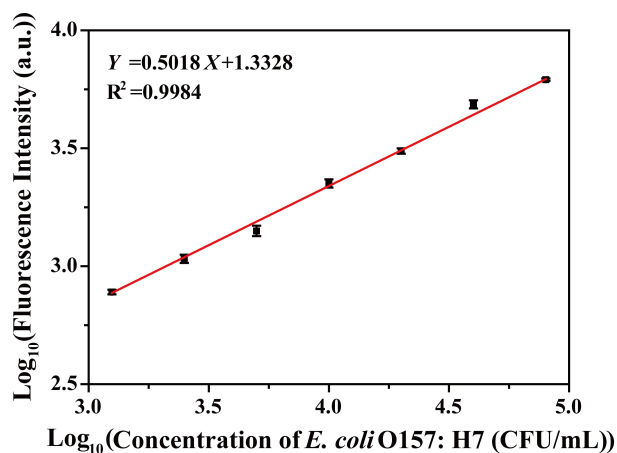


图 1.9 本方法在牛奶中应用的标准曲线

Fig 1.9 The standard curve of the application of this method in milk

如图 1.10 所示，在果汁中检测大肠杆菌 O157:H7，线性回归方程为 $Y = 0.4613X + 1.4793$ ($R^2 = 0.9944$)。经计算得，对于牛奶样本，检测限为 8.9×10^2 CFU/mL，这意味着即使牛奶中含有微量的大肠杆菌 O157:H7，本方法也能准确地检测出来。同样，对于果汁样本， 7.8×10^2 CFU/mL 的检测限也显示了本方法的高灵敏度。

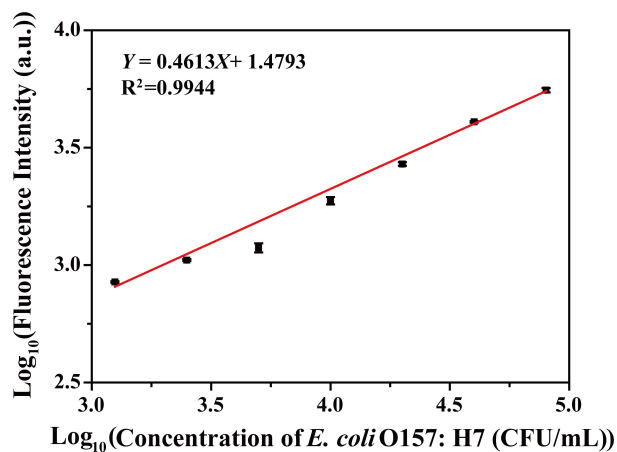


图 1.10 本方法在苹果汁中应用的标准曲线

Fig 1.10 The standard curve of application of this method in apple juice

结果表明，本检测方法不易受到外界物质的干扰，在实际样品的检测中具有极高的性能（高特异性和高灵敏度）。与已报道的相关研究相比较^[39, 40]，本方法无需对实际

样本进行稀释，即可直接进行检测，展现了较强的应用潜力。

1.4 讨论

本研究基于 Ampliflu Red-H₂O₂ 的酶催化荧光体系与免疫磁分离技术的结合，成功研发出了一种大肠杆菌 O157:H7 快速且灵敏的检测方法。该方法通过检测上清液荧光信号强度精准测定大肠杆菌 O157:H7 的浓度，有效避免磁珠自发光荧光对灵敏度的潜在干扰。无需高端设备、复杂纳米材料或专业实验人员，简化了检测流程，降低了技术门槛。本方法可在 2 h 内完成大肠杆菌 O157:H7 的检测，检测的线性范围在 1.3×10^3 CFU/mL ~ 8.0×10^4 CFU/mL，检测限为 8.3×10^2 CFU/mL，并且检测结果不受沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌等其他微生物的干扰。相较于传统的基于双抗体夹心结构的 Elisa 方法，本方法经过精心设计和优化，展现出了显著更高的检测灵敏度，其检测限更是降低了约 100 倍^[41]。此外，本方法展现出显著的应用优势，不仅能够直接检测未经稀释的牛奶和苹果汁中的大肠杆菌 O157:H7，而且检测效果与在 PBS 中的表现几乎一致，这在病原微生物检测中具有重要意义。本方法还具有广泛的通用性和可拓展性，其检测策略同样适用于其他病原微生物或生物标志物的检测，为未来的生物医学研究和应用提供了更多可能性。

2 基于麦胚凝集素和 IgY 双重识别模式建立金黄色葡萄球菌检测新方法

广谱抗生素（例如万古霉素、替考拉宁）搭档非特异性哺乳动物 IgG 形成夹心结构来检测金黄色葡萄球菌已成为当前研究的热点^[42, 43]。相比传统的双抗体夹心模式，广谱抗生素的使用既能快速检测金黄色葡萄球菌，又降低了检测成本。但是哺乳动物 IgG 可以与产蛋白 G 链球菌结合，从而影响检测特异性，造成假阳性的检测结果^[44]。因此，寻找一组高效的识别元件以构建一种既灵活又敏感且具备高度特异性的金黄色葡萄球菌检测方法，具有重要的实际意义和应用价值。

WGA 是一种二聚体形态的植物凝集素，具有 8 个功能化糖结构域^[45]。它能够通过疏水相互作用力、静电相互作用力以及氢键等多种作用力，与细菌表面的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖及其衍生物实现高亲和力的多价结合，其亲和系数高达 2.07×10^8 L/mol^[45, 46]。考虑到 WGA 的低廉价格且易于获取，同时它具备与细菌表面大量结合位点结合的能力，因此 WGA 在细菌的富集和检测中展现出巨大的应用潜力。这使得 WGA 成为一个有力的候选者，可用于同时检测多种细菌。然而，值得注意的是，WGA 的多价结合特性不仅限于金黄色葡萄球菌，还包括其他种类的细菌，这在某种程度上影响了其在检测中的特异性。幸运的是，金黄色葡萄球菌在细胞壁上含有丰富的葡萄球菌蛋白 A（staphylococcal protein A, SPA），SPA 可以作为金黄色葡萄球菌的特异性抗原表位^[47, 48]。鸡免疫球蛋白 Y（Immunoglobulin Y, IgY）是鸟类血清和蛋黄中存在的一类重要的血清抗体，为我们提供了另一个有力的工具^[49, 50]。与哺乳动物 IgG 不同，IgY 不会与蛋白 A 和蛋白 G 发生非特异性亲和，这一特性能够有效克服哺乳动物抗体的局限性^[51-53]。作为抗蛋白 A 抗体，鸡来源的 IgY 能够解决 WGA 非特异性结合的问题^[35]。本研究首次提出了 WGA-IgY 双重识别元件检测金黄色葡萄球菌的方法。WGA 和鸡抗蛋白 A IgY 分别识别金黄色葡萄球菌的不同位点，为形成稳定的 WGA/金黄色葡萄球菌/IgY 三明治结构提供了理论上的可能性。这一创新性的方法不仅有望提高金黄色葡萄球菌检测的准确性，同时也为食品安全监测提供了新的思路和技术手段。

2.1 实验仪器与材料

2.1.1 主要实验仪器

其它同 1.1.1

表 2.1 本研究所用的实验仪器

Table 2.1 The experimental instruments used in this study

实验仪器名称	型号	生产厂家
荧光显微镜	Pannoramic DESK P-MIDI	匈牙利 3DHISTECH
荧光显微镜	Dragonfly 202	英国 Andor

2.1.2 主要实验材料与试剂

其他同 1.1.2

表 2.2 本研究所用的实验材料与试剂

Table 2.2 The experimental materials and reagents used in this study

实验材料与试剂名称	生产厂家
<i>S. aureus</i> (ATCC 12598)	北纳生物菌种保藏中心
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	北纳生物菌种保藏中心
<i>S. aureus</i> (N315)	中科院武汉病毒研究所危宏平 课题组赠送
<i>S. aureus</i> (Cowan 1)	中科院武汉病毒研究所危宏平 课题组赠送
猪霍乱沙门氏菌 (<i>S. choleraesuis</i> , ATCC 13312)	广东省微生物菌种保藏中心
停乳链球菌 (<i>S. dysgalactiae</i> , 分离于生乳)	中科院武汉病毒研究所危宏平 课题组赠送
tdTomato-CBD (1mg/mL)	中科院武汉病毒研究所危宏平 课题组赠送
麦胚凝集素 (WGA)	美国 Sigma-Aldrich 公司

表 2.2 本研究所用的实验材料与试剂

Table 2.2 The experimental materials and reagents used in this study

实验材料与试剂名称	生产厂家
HRP-鸡抗蛋白 A IgY (18596)	英国 Abcam 公司
异硫氰酸荧光素-链霉亲和素 (FITC-SA)	北京 Biotopped Science and Technology 公司
底物 (TMB/H ₂ O ₂)	北京博奥龙免疫技术有限公司
氯化钠注射液	科伦 KL
苹果汁	汇源

2.1.3 其他试剂的配制

其他试剂配制同 1.1.3

2.2 实验部分

2.2.1 细菌培养与计数

单核细胞增生李斯特菌和停乳链球菌作为两种特定的微生物，具有较为苛刻的营养需求。因此，在实验中选择合适的培养基是至关重要的。在本实验中，采用 BHI 来培养这两种微生物是非常合适的。而大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌、痢疾志贺氏菌和猪霍乱沙门氏菌在培养时可接种于普通的 LB 培养基。具体的细菌培养和计数操作步骤如下：

(1) 从-80℃冰箱内，取出 1 管冻存的甘油菌种。灼烧接种环以灭菌，然后待冷却后蘸取少量菌液，采用三区划线法依次在固体培养基上接种三个区域，接种后的固体培养基在 37℃的培养箱内培养 12~16 h。

(2) 次日，待固体培养基上长出单菌落后，用高压无菌枪头挑出单一菌落接种于液体培养基内，置于摇床内以 180 r/min，37℃振荡孵育过夜。

(3) 取上述菌液与液体培养基以 1:400 的比例再次转接于液体培养基内，置于摇床内以 180 r/min，37℃振荡孵育至对数期。

(4) 将转接后的菌液以 3500 r/min，5 min，4℃条件下快速离心后，弃去上清，

并用无菌的 pH 为 7.4 的 PBS 清洗两次，最终将细菌沉淀重悬于高压无菌的含 20 % 甘油的 pH 为 7.4 的 PBS 中。

(5) 将重悬后的菌液以 100 μ L 依次分装于 2 mL 的无菌 Ep 管内，冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内备用。

(6) 冻存菌种前，留取一管用于菌落计数。将留取的菌液进行一系列的倍比稀释，并将各浓度梯度稀释的菌液分别取 100 μ L 接种于固体培养基内，均匀涂布后倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养过夜。

(7) 待菌落长出后，观察平板上菌落数在 30 ~ 300 范围内的进行计数，并通过公式：细菌浓度 (CFU/mL) = 菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 10 计算出冻存备用的菌液浓度。

2.2.2 WGA 识别金黄色葡萄球菌的荧光表征

为了验证 WGA 是否能识别金黄色葡萄球菌，我们设计了一个荧光染色实验（步骤如图 2.1 所示）。具体操作如下：

(1) 首先，将 100 μ L 生物素-WGA (1 mg/mL) 与 100 μ L 金黄色葡萄球菌 (1.0×10^8 CFU/mL) 混合，混合物在 180 r/min 和 37 $^{\circ}$ C 下振荡孵育 30 min。

(2) 用 PBST 仔细地洗涤金黄色葡萄球菌，以去除未能与金黄色葡萄球菌结合的游离生物素-WGA。然后将已结合的生物素-WGA-金黄色葡萄球菌重新悬浮于 100 μ L FITC-SA (0.075 mg/mL) 中，在摇床 (37 $^{\circ}$ C, 180 r/min) 中孵育 30 min。

(3) 再次用 PBST 仔细洗涤复合物，并重新悬浮在 1 mL 高压灭菌的 PBS (pH 7.4) 中。

(4) 最后，取上述制备的菌液取 10 μ L 于载玻片上，通过荧光显微镜来观察 FITC 染色后的金黄色葡萄球菌的形态、分布和荧光特性。

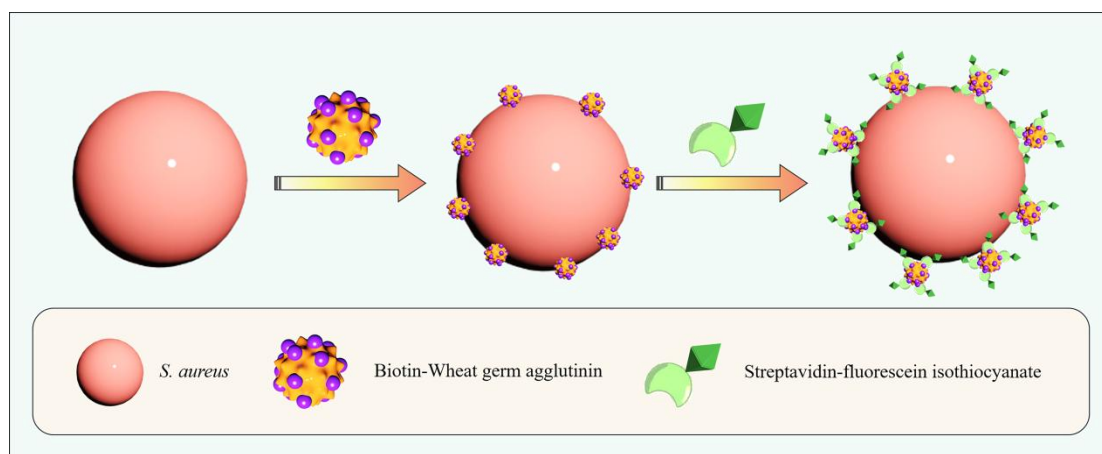


图 2.1 荧光染料染色金黄色葡萄球菌的制备示意图（不按比例）

Figure. 2.1 Schematic illustration of the preparation of fluorochrome-stained *S. aureus* (not to scale)

2.2.3 WGA功能化羧基磁珠的制备

（1）取 40 μL 25 mg/mL 的 MBs 于 Ep 管内，用 200 μL 的 PBS（pH 6.8）清洗两次。用含有 2 mg EDC 和 1 mg NHS 的 200 μL PBS（pH 6.8）活化 MBs 并将 MBs 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的摇床中避光孵育 30 min。

（2）用 PBS（pH 7.4）清洗 MBs 3 次，去除多余的 EDC 和 NHS。将活化后的 MBs 与含有 1 % BSA 的 500 μL PBST 充分混匀，在摇床内（37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min）振荡孵育 2 h。孵育结束后，立即用 200 μL PBST 洗涤 4 次，得到 MBs-BSA 偶联物。

（3）将 MBs-BSA 与含有 12 mg EDC、4 mg NHS 和 0.4 mg WGA 的 600 μL PBST 混合，放置摇床内（37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min）内偶联孵育 6 h。用 PBST 彻底洗涤 MBs-BSA-WGA 4 次，分散在 1 mL PBS（pH 7.4）内，保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

2.2.4 本方法的检测步骤

金黄色葡萄球菌检测的整个过程如图 2.2 所示：

（1）用 PBS（pH 7.4）稀释为一定浓度的金黄色葡萄球菌悬浮液，取其 100 μL 与 MBs-BSA-WGA 在涡旋振荡器上充分混匀，再将混合物置于摇床中（37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min）孵育 30 min。

（2）孵育结束后，用 PBST 在磁力架上将磁珠仔细清洗 4 次，以除去未捕获的金黄色葡萄球菌。获得的 MBs-BSA-WGA-*S. aureus* 用 1 % 脱脂牛奶稀释的 100 μL 的

HRP-IgY 重新悬浮，在 37 ℃、180 r/min 的摇床内持续振荡孵育 30 min。

(3) 用 PBST 再次洗涤磁珠复合物 5 次以除去过量的未结合的 HRP-IgY，将结合形成的磁珠复合物（MBs-BSA-WGA-*S. aureus*-HRP-IgY）与 100 μL TMB 色原底物涡旋混匀，在避光培养箱中于 37 ℃孵育 10 min。

(4) 孵育结束后，加入反应管内 100 μL 硫酸溶液（2 mol/L）来终止催化反应。

(5) 将 Ep 管置于磁力架上进行磁分离后，小心移取上清液 100 μL 于 96 孔透明聚苯乙烯板中，最终使用多功能酶标仪测得反应溶液在 450 nm 处的吸光度值。

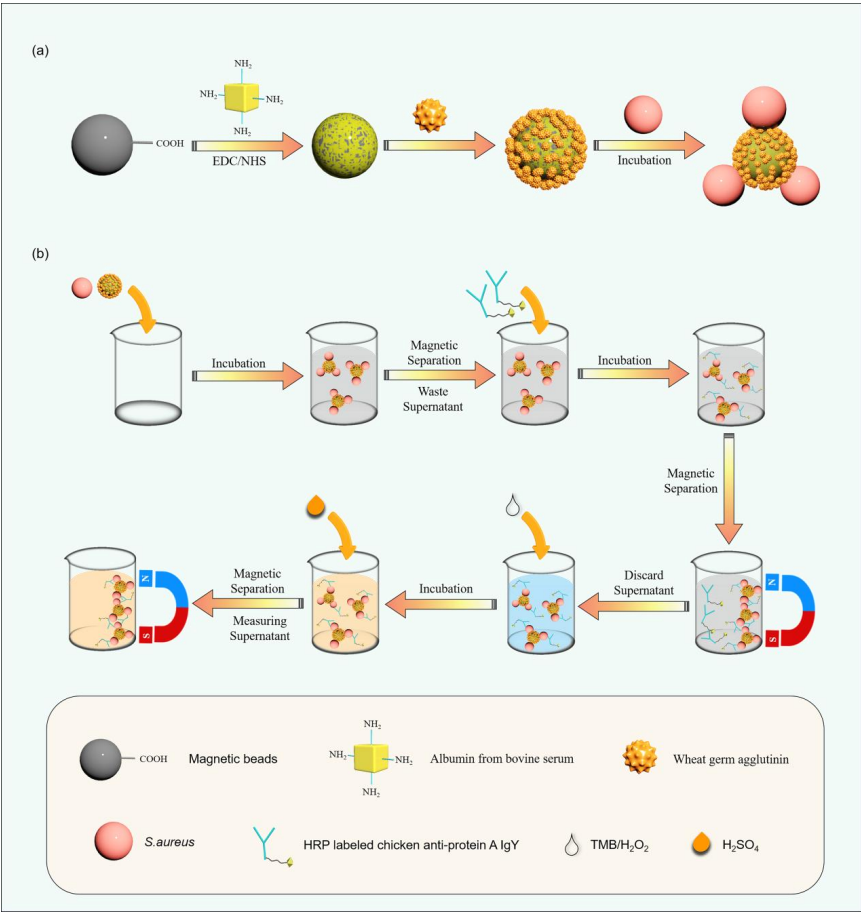


图 2.2 基于 WGA-IgY 显色法检测金黄色葡萄球菌的示意图

Fig. 2.2 A graphical depiction of the colorimetric assay for detecting *S. aureus* on the basis of WGA-IgY

2.2.5 实验条件的优化

在本研究中，金黄色葡萄球菌的检测是通过形成识别部分-金黄色葡萄球菌-信号检测部分的夹心结构来实现的。为了实现所提出的方法的优异性能，我们采用单一变

量法依次对 MBs-BSA-WGA 的磁珠添加量和 HRP-IgY 的浓度这两项实验参数进行了优化。

2.2.5.1 MBs-BSA-WGA 添加量的优化

按照 2.2.4 的显色测定步骤来对识别部分的 MBs-BSA-WGA 的添加量进行优化。依次取 15、20、25、30、35 (μg) 的磁珠量分别与 100 μL 浓度为 1.0×10^5 CFU/mL 金黄色葡萄球菌悬浮液涡旋混匀, 来作为阳性检测。同样的磁珠量分别与不含金黄色葡萄球菌的 100 μL PBS 振荡混匀做阴性检测, 然后全部放于摇床内 (37°C , 180 r/min) 孵育 30 min。下一步仔细清洗孵育过后的磁珠复合物, 以去除过剩未结合的目标菌, 再加入一定浓度的 HRP-IgY 振荡孵育 30 min, 最终上机检测显色信号。其中, A 和 A_0 分别代表孵育 1.0×10^5 CFU/mL 金黄色葡萄球菌溶液的阳性和孵育 PBS 的阴性在 450 nm 处的显色信号。若 A/A_0 的信号比值随着磁珠的用量增多而呈现出一定的变化趋势, 观察得到 A/A_0 的最大值, 此时的比值所对应的磁珠添加量即为最优。

2.2.5.2 HRP-IgY 的浓度优化

按照 2.2.4 构建方法对本方法测定步骤中加入的 HRP-IgY 浓度进行优化。依次选用 0.25、0.5、1、2、4 ($\mu\text{g/mL}$) 的 HRP-IgY 作为单一变量, 取固定量的磁珠用量分别与 100 μL 浓度为 1.0×10^5 CFU/mL 金黄色葡萄球菌溶液和不含金黄色葡萄球菌的 100 μL PBS 涡旋混匀, 并摇床内孵育 30 min。PBST 彻底清洗 4 次后, 分别向孵育细菌与孵育 PBS 的管内加入上述不同浓度的 HRP-IgY 来依次做每个浓度所对应的阳性及阴性。 A 代表孵育了金黄色葡萄球菌的显色信号值, A_0 代表了孵育 PBS 的信号值。 A/A_0 会随着 HRP-IgY 浓度的增大而呈现出一定的趋势, 当 A/A_0 的比值达到最大时, 此时所对应的 HRP-IgY 浓度为最佳。

2.2.6 本方法在 PBS 中检测金黄色葡萄球菌

首先将金黄色葡萄球菌的浓度从 2.0×10^5 CFU/mL 用 PBS 向下稀释到 7.8×10^2 CFU/mL。每个浓度梯度的阴性对照为孵育 100 μL 不含目标菌的 PBS (pH 7.4), 阳性对照为孵育含一定浓度金黄色葡萄球菌的 PBS (pH 7.4)。阴性与含不同浓度菌的阳性均做 3 个空白对照, 同样, 按照 2.2.4 步骤的方法来操作。最终通过测量不同细菌浓度在 450 nm 处的吸光度, 并绘制标准曲线图, 可以建立起细菌浓度与吸光度之间的

定量关系。

2.2.7 本方法对金黄色葡萄球菌检测的特异性

本实验选用了大肠杆菌 O157:H7, 停乳链球菌, 单核细胞增生李斯特氏菌, 痢疾志贺氏菌, 猪霍乱沙门氏菌来作为干扰菌, 检测该实验方法的特异性。为证明干扰菌不会对本方法的检测产生影响, 在最佳的优化条件下, 本实验分为 12 组实验对照。12 组对照分别为空白(孵育 PBS), 大肠杆菌 O157:H7, 停乳链球菌, 单核细胞增生李斯特氏菌, 痢疾志贺氏菌, 猪霍乱沙门氏菌, 大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的混合物, 停乳链球菌和金黄色葡萄球菌的混合物, 单核细胞增生李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌混合物, 痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的混合物, 猪霍乱沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的混合物及金黄色葡萄球菌(单独孵育)。其中金黄色葡萄球菌浓度选定为 1.0×10^5 CFU/mL, 各类干扰菌浓度均选定为 1.0×10^6 CFU/mL (比目标菌种高 10 倍), 最终通过上机检测得到各组的检测信号值。

2.2.8 本方法在实际样本中检测金黄色葡萄球菌

常见的饮用果汁容易受到金黄色葡萄球菌的污染, 还有医学上常用的氯化钠注射液更要重视金黄色葡萄球菌的潜在污染。因此, 为了监测基于 WGA-IgY 策略方法的可靠性和适用性, 我们选用当地超市内购买的汇源苹果汁和药店内购买的氯化钠注射液作为真实样品来进行回收实验并评估。该过程直接按照 2.2.6 的步骤进行操作, 不同的是将真实样本直接代替 PBS (pH 7.4) 来对金黄色葡萄球菌进行梯度稀释, 最终通过观察不同的细菌浓度产生的吸光度值来绘制出标准曲线图并计算得出真实样品中的加标回收率。

2.3 实验结果

2.3.1 验证WGA与金黄色葡萄球菌结合

为了验证 WGA 能够与金黄色葡萄球菌结合, 我们将 WGA 用生物素修饰 (Biotin-WGA), 通过 Biotin-SA 的桥联作用, 将 FITC-SA 标记于 Biotin-WGA 表面从而来观察 WGA 是否能与金黄色葡萄球菌结合。我们采用了荧光显微镜 (Pannoramic DESK P-MIDI, 3DHISTECH) 对 WGA 与金黄色葡萄球菌的结合行为进行了表征, 其中图 2.3 A 和 2.3 B 分别是明场图像和相应的绿色荧光图像。如图 2.3 A 和 2.3 B 所示,

明场图像显示金黄色葡萄球菌为圆形，直径约为 $0.8\ \mu\text{m}$ ，荧光图像显示 FITC 发出的强绿色荧光均匀分布在金黄色葡萄球菌的细胞壁上。这一现象成功证明了 WGA 对金黄色葡萄球菌具有很强的结合亲和力。

接下来，我们验证 MBs-BSA-WGA 能否与金黄色葡萄球菌相结合。tdTomato-CBD 是一种荧光蛋白，我们利用其可以与金黄色葡萄球菌的结合而使金黄色葡萄球菌带荧光的特性，将准备好的 MBs-BSA-WGA 与 tdTomato-CBD 染色的金黄色葡萄球菌进行孵育。图 2.3 C 和 2.3 D 依次为 MBs-BSA-WGA @ tdTomato-CBD 染色的金黄色葡萄球菌（来自 plyV12, Biosens Bioelectron 的细胞结合结构域）的明场图像和相应的红色荧光图像。在图 2.3 C 中，体积左上角体积偏大的圆形物质是 MBs-BSA-WGA 的磁珠复合物，四周与其紧密结合且均一的圆形物便为金黄色葡萄球菌。在图 2.3 D 中，与磁珠紧密结合的 tdTomato-CBD 所标记的金黄色葡萄球菌发出红色荧光，而 MBs-BSA-WGA 磁珠复合物不发荧光，与明场图像相对应。以上结果证明了 WGA 能偶联在磁珠的表面，制备得到 MBs-BSA-WGA 的磁珠捕获探针，且该探针具备捕获金黄色葡萄球菌的功能。

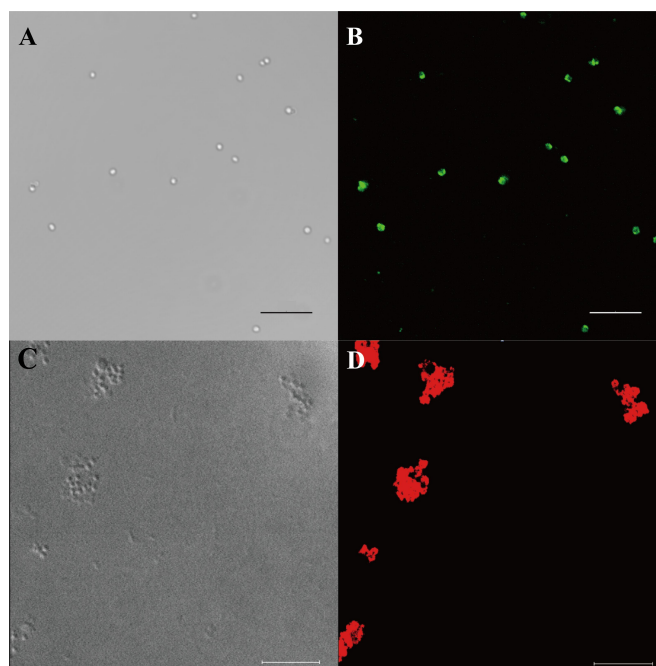


图 2.3 与 WGA 标记的 FITC 结合的金黄色葡萄球菌的荧光显微照片。（A）和（B）：分别是明场图像和相应的绿色荧光图像（标尺： $10\ \mu\text{m}$ ）；MBs-BSA-WGA @ tdTomato-CBD 染色的金黄色葡萄球菌（来自 plyV12, Biosens Bioelectron 的细胞结合结构域的荧光显微照片。2016, 77: 366-71）。

(C) 和 (D)：分别为明场图像、相应的红色荧光图像（标尺：10 μm ）

Fig. 2.3 Fluorescence micrographs of *S. aureus* bound with WGA tagged FITC. (A) and (B): bright-field image and corresponding green fluorescence image, respectively (Bar: 10 μm); fluorescence micrographs of MBs-BSA-WGA @ tdTomato-CBD stained *S. aureus* (cell bind domain from plyV12, Biosens Bioelectron. 2016, 77: 366-71.). (C) and (D): bright-field image, corresponding red fluorescence image, respectively (Bar: 10 μm)

2.3.2 实验条件的优化结果

2.3.2.1 HRP-IgY 浓度与 MBs-BSA-WGA 磁珠添加量的优化

为了获得最佳的检测灵敏度，我们探讨了 HRP-IgY 浓度对 A/A_0 的影响。图 2.4 A 中的柱状图表明，随着 HRP-IgY 浓度的增大，阳性信号值 A 逐步升高。然而较高浓度的 HRP-IgY 会产生更强的信号，因为过低浓度的 HRP-IgY 会导致不饱和反应，高浓度的 HRP-IgY 将会给磁珠带来较多的非特异性吸附，降低检测灵敏度。图 2.4 B 中所示的 A/A_0 比值最初会随着 HRP-IgY 浓度的增加而显著增加，当 HRP-IgY 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大值，然后随着 HRP-IgY 浓度的进一步增加而降低。因此，1 $\mu\text{g/mL}$ HRP-IgY 被选为后续试验中的最佳浓度。

MBs-BSA-WGA 磁珠的添加量也会对该实验的灵敏度产生影响。因此，实验选用磁珠量为 15、20、25、30、35 (μg) 来进行优化。由图 2.4 C 可知，在 450 nm 检测后，阳性信号值 A 会随着磁珠量的增加而呈现出上升的趋势。当磁珠量达到 25 μg 时，阳性信号增长趋于平缓而进入平台期。这意味着 25 μg 的 MBs-BSA-WGA 磁珠量可以有效地捕获具有足够结合位点的金黄色葡萄球菌。同时，随着 MBs-BSA-WGA 添加量的不断增加， A_0 逐渐增加。如图 2.4 D 所示，随着 MBs-BSA-WGA 添加量的增加， A/A_0 急剧增加，直到达到 25 μg 时出现高峰值，此后，观察到轻微下降。这些结果表明，加入的 MBs-BSA-WGA 越多，HRP-IgY 对磁性载体的非特异性吸附反而越多，导致背景升高。因此，我们选择 25 μg 作为进一步实验的最佳 MBs-BSA-WGA 添加量。

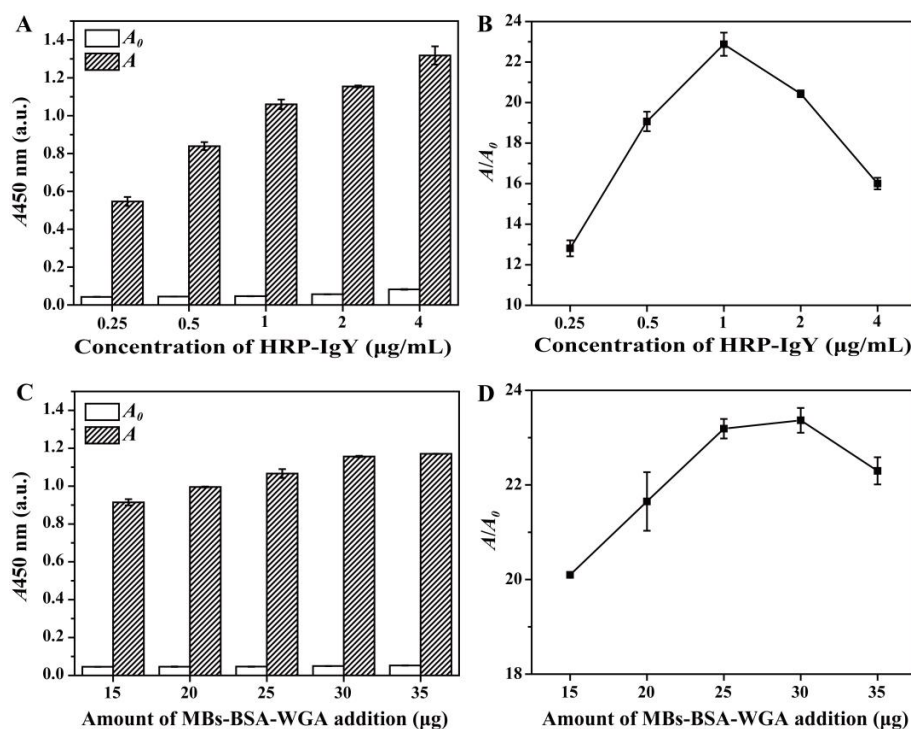


图 2.4 基于 WGA-IgY 的双重识别方法的条件优化。(A) HRP-IgY 浓度对 450 nm 处 A 和 A_0 的影响；(B) HRP-IgY 浓度对 A/A_0 的影响；(C) MBs-BSA-WGA 添加量对 450 nm 处的 A 和 A_0 的影响；(D) MBs-BSA-WGA 添加量对 A/A_0 的影响，细菌浓度为 $1.0 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$

Fig. 2.4 Condition optimization of dual identification method based on WGA-IgY. (A) The effect of HRP-IgY concentration on A and A_0 at 450 nm; (B) The effect of HRP-IgY concentration on A/A_0 ; (C) Effect of MBs-BSA-WGA addition on A and A_0 at 450 nm; (D) Effect of MBs-BSA-WGA addition on A/A_0 . The bacterial concentration was $1.0 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$

2.3.3 本方法在 PBS 中检测金黄色葡萄球菌的结果

在优化后的最佳条件下，450 nm 处的吸收强度随着目标金黄色葡萄球菌浓度的增加而增加，从而建立了双重识别策略检测金黄色葡萄球菌浓度的标准曲线（如图 2.5）。在 7.8×10^2 至 $2.0 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ 的范围内吸光度强度与金黄色葡萄球菌浓度之间具有良好的线性关系。回归方程可描述为 $Y = 1.0770 \times 10^{-5} X + 0.0550$ （决定系数 $R^2 = 0.9907$ ），其中 Y 为反应溶液的吸光度强度（450 nm）， X 为金黄色葡萄球菌的浓度（CFU/mL）。检测限计算为 $3.9 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$ ，即 100 μL 溶液中的 39 个金黄色葡萄

球菌无需任何富集即可被检测到。考虑到磁珠的富集效应，当在更大的检测体积中进行时，灵敏度将进一步提高。我们如果将检测体积从 0.1 毫升扩大到 1 毫升或更多，有可能检测到 1 个 CFU。与已报道的基于双重识别的方法相比^[36, 43, 54]，本方法所取得令人满意的检测限。理想的检测限可能归因于以下因素：（1）固定化的 MBs-BSA-WGA（ $\sim 0.82 \mu\text{m}$ ）在分离和富集金黄色葡萄球菌（ $\sim 0.8 \mu\text{m}$ ）方面表现出色，这对于提升检测灵敏度具有显著优势。在此体系中，BSA 不仅有助于增强 WGA 的负载能力，还减少了空间位阻，进而促进了 WGA 与金黄色葡萄球菌之间的多价相互作用。（2）由于 HRP-IgY 具有相对较小的分子量，它能够在金黄色葡萄球菌表面的 SPA 分子上找到众多结合位点，从而有效地放大了显色信号，进一步提升了检测的灵敏度和准确性。然而，所提出的方法存在一个限制，即某些特定的金黄色葡萄球菌菌株（如 52A2）的细胞壁中并不含有 N-乙酰-D-葡萄糖胺^[55]。由于这些菌株的细胞壁缺乏这种关键成分，MBs-BSA-WGA 无法有效地识别它们，进而导致了漏检的可能性。

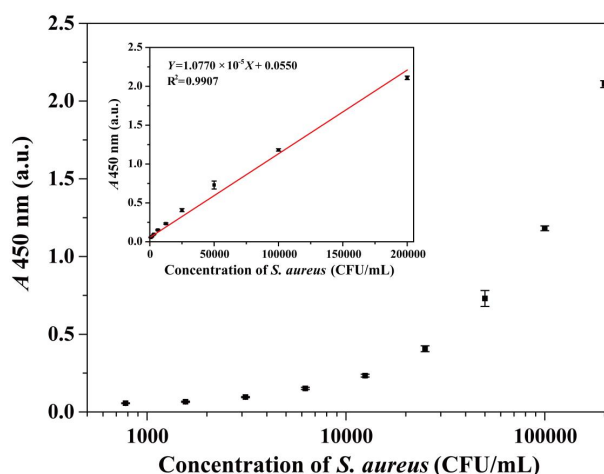


图 2.5 450 nm 处的吸收强度与 PBS 中金黄色葡萄球菌浓度的关系（图中显示了检测金黄色葡萄球菌的标准曲线）

Fig. 2.5 Relationship between absorption intensity at 450 nm and concentration of *S. aureus* in PBS

(The calibration curve of *S. aureus* detection was shown in the illustration)

2.3.4 本方法对金黄色葡萄球菌检测的特异性结果

因为 WGA 具有识别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的广谱功能，所以基于凝集素

亲和力的这种策略的特异性是一个关键问题。因此，我们对大肠杆菌 O157:H7、停乳链球菌、单核细胞增生李斯特菌、痢疾志贺氏菌以及猪霍乱沙门氏菌等多种细菌进行了深入分析。值得注意的是，这些细菌的浓度均被设定为 1.0×10^6 CFU/mL，这一浓度是目标金黄色葡萄球菌浓度的十倍，以确保实验结果的准确性和可靠性。见图 2.6 可得，2、3、4、5 和 6 为大肠杆菌 O157:H7，停乳链球菌，单核细胞增生李斯特菌，痢疾志贺氏菌，猪霍乱沙门氏菌等干扰菌，其产生的信号值与空白对照 1 结果相似。另外，7、8、9、10 和 11 均为干扰菌与金黄色葡萄球菌混合物的检测信号值，其结果与金黄色葡萄球菌产生的信号强度基本一致。研究结果表明我们所建立的金黄色葡萄球菌检测双重识别策略不易受其他常见致病菌的干扰，也证明鸡抗蛋白 A IgY 与金黄色葡萄球菌之间具有特异性结合。因此，根据以上实验结果，我们所建立的检测策略可以成功地应用于金黄色葡萄球菌的识别鉴定。

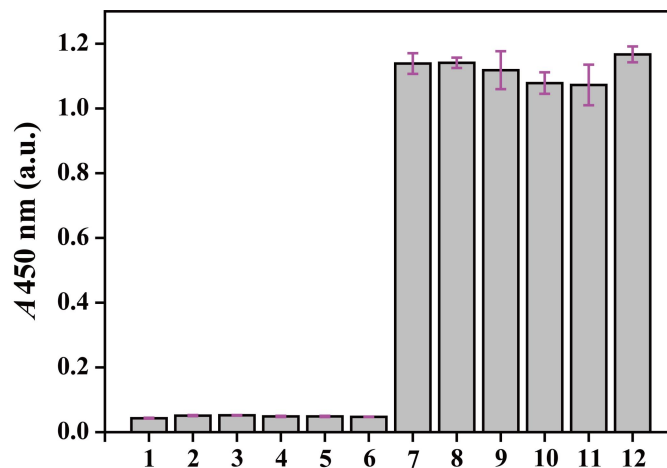


图 2.6 基于 WGA-IgY 的双重识别策略在 450 nm 处的吸光度强度，用于检测金黄色葡萄球菌和干扰细菌。1：空白；2：大肠杆菌 O157:H7；3：停乳链球菌；4：单核细胞增生李斯特菌；5：痢疾志贺氏菌；6：猪霍乱沙门氏菌；7：大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的混合物；8：停乳链球菌和金黄色葡萄球菌的混合物；9：单核细胞增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌混合物；10：痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的混合物；11：猪霍乱沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的混合物；12：金黄色葡萄球菌

Fig. 2.6 Absorbance intensity at 450 nm based on WGA-IgY dual recognition strategy, which was used to detect *Staphylococcus aureus* and interfering bacteria. 1:Blank; 2: *E. coli*

O157:H7; 3: *S. dysgalactiae*; 4: *L. monocytogenes*; 5: *Sh. Dysenteriae*; 6: *S. choleraesuis*; 7: The mixture of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*; 8: The mixture of *S. dysgalactiae* and *S. aureus*; 9: The mixture of *L. monocytogenes* and *S. aureus*; 10: The mixture of *Sh. Dysenteriae* and *S. aureus*; 11: The mixture of *S. choleraesuis* and *S. aureus*; 12: *S. aureus*

2.3.5 本方法在实际样本中检测金黄色葡萄球菌的结果

为了评估基于 WGA-IgY 策略的分析可靠性和潜在适用性, 在实际样品中进行加标回收试验是一种有效的方法。考虑到金黄色葡萄球菌强大的生存能力, 它能在多种环境中存活, 尤其常见于液体环境。因此, 我们选取了氯化钠注射液作为模拟真实医疗环境的条件之一。同时, 鉴于近年来因饮用未经巴氏杀菌的苹果汁或苹果醋而频繁发生的食品污染事件, 苹果汁也被纳入我们的食品样本考虑范畴如图 2.7、2.8 所示, 在最优反应条件下, 450 nm 处测得的显色信号强度会随着金黄色葡萄球菌浓度的增加而逐渐增强, 在 7.8×10^2 至 2.0×10^5 CFU/mL 的范围呈现良好的线性关系。在氯化钠注射液和苹果汁样品中不同浓度金黄色葡萄球菌的线性回归方程分别为 $Y = 8.5617 \times 10^{-6} X + 0.0441$ ($R^2=0.9956$)、 $Y = 8.7777 \times 10^{-6} X + 0.0445$ ($R^2=0.9954$)。

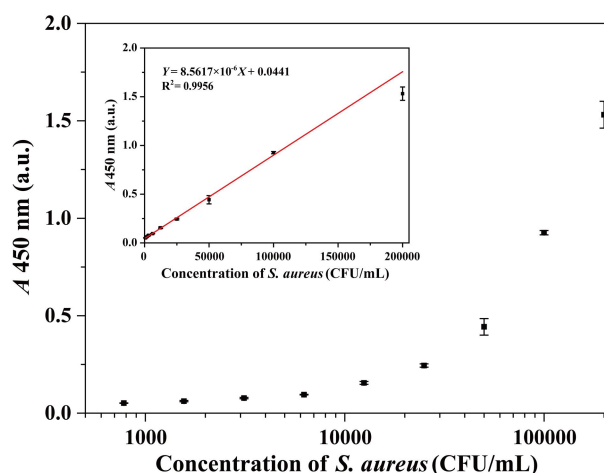


图 2.7 450 nm 处的吸收强度与氯化钠注射液中金黄色葡萄球菌浓度的关系图 (插图中显示了金黄色葡萄球菌检测的标准曲线)

Fig. 2.7 The plot of absorbance intensity at 450 nm versus concentration of *S. aureus* in sodium chloride injection (The calibration curve for *S. aureus* detection was shown in the inset)

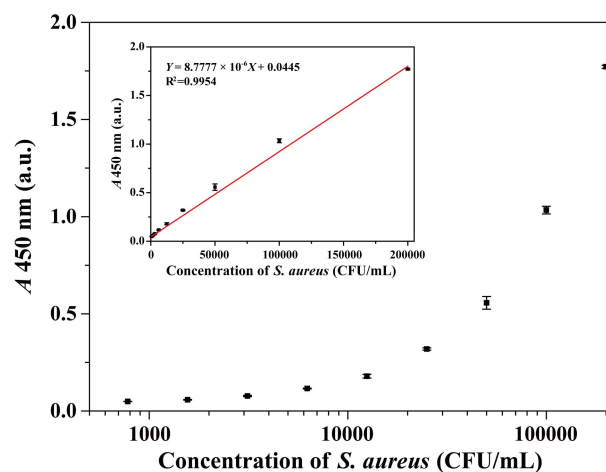


图 2.8 450 nm 处的吸收强度与苹果汁中金黄色葡萄球菌浓度的关系图（插图中显示了金黄色葡萄球菌检测的标准曲线）

Fig. 2.8 The plot of absorbance intensity at 450 nm versus concentration of *S. aureus* in apple juice
(The calibration curve for *S. aureus* detection was shown in the inset)

如表 2.3 所示，氯化钠注射液加标样品的回收率范围为 91.4 %至 111.5 %，可接受的相对标准偏差（RSD）值均在 5.8 %以内。苹果汁加标样品的回收率在 102.0 %至 124.7 %，相对标准偏差（RSD）值均在 5 %左右。结果充分验证了本策略对实际样品中金黄色葡萄球菌的检测具有良好的应用前景。

表 2.3 加标样品中检测到的金黄色葡萄球菌回收率

Table 2.3 Recovery rate of *S. aureus* detected in spiked samples

样品	添加浓度 (CFU/mL)	基础浓度 (CFU/mL)	相对标准偏差 (%) (n=3)	回收率 (%)
氯化钠注射液	1.6×10^3	1.4×10^3	4.7	91.4
	1.3×10^4	1.4×10^4	5.8	109.9
	1.0×10^5	1.1×10^5	4.1	111.5
苹果汁	1.6×10^3	1.6×10^3	5.1	102.0
	1.3×10^4	1.5×10^4	4.6	124.7
	1.0×10^5	1.1×10^5	2.0	112.7

2.4 讨论

本研究创新性地设计了一种双重识别传感平台，应用于金黄色葡萄球菌的检测。该平台使用 MBs-BSA-WGA 修饰的 MBs 对金黄色葡萄球菌进行富集，使用 HRP-IgY 产生信号，利用 WGA 和 IgY 之间的协同作用提高了检测的灵敏度和特异性。在最佳条件下，本方法在 7.8×10^2 至 2.0×10^5 CFU/mL 的范围呈现良好的线性关系，并在 90min 内即可实现最低 3.9×10^2 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌检测。通过在实际样品如氯化钠注射液和苹果汁中的加标回收试验，我们验证了该平台在模拟环境中识别金黄色葡萄球菌的可靠性。鉴于其操作简便、成本低廉和高灵敏度的优势，我们所构建的基于 WGA 和细菌特异性 IgY 的检测平台在开发针对多种目标病原体（除细胞壁中不含 N-乙酰-D-葡萄糖胺的菌株外）的检测试剂盒方面，展现出了一定的应用潜力。

3 结论

本研究基于磁分离技术，成功研发了针对大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的两种新型检测方法。这两种方法均具有良好的灵敏度和特异性，并在实际样本检测中得到了成功应用。本研究的成果不仅为新型检测试剂盒的研发提供了创新思路，同时也为公众健康领域提供了有力的技术支持，对提升食源性致病菌的检测能力具有重要意义。

参考文献

- [1] Rani A, Ravindran V B, Surapaneni A, *et al.* Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water[J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 349: 109233.
- [2] Moon Y, Bae J, Kim S, *et al.* Simultaneous detection using a portable multiplex PCR-dual lateral flow immunoassay for *P. carotovorum subsp. brasiliense* and *E. coli* O157:H7[J]. *Microchemical Journal*, 2023, 195.
- [3] Etayash H, Khan M F, Kaur K, *et al.* Microfluidic cantilever detects bacteria and measures their susceptibility to antibiotics in small confined volumes[J]. *Nature Communications*, 2016, 7.
- [4] Bazsefidpar S, Serrano-Pertierra E, Gutierrez G, *et al.* Rapid and sensitive detection of *E. coli* O157:H7 by lateral flow immunoassay and silver enhancement[J]. *Mikrochim Acta*, 2023, 190(7): 264.
- [5] 杨金洪, 朱勇. 奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌病诊断与防治[J]. *畜牧兽医科学(电子版)*, 2022(24): 192-194.
- [6] Suaifan G A R Y, Alhogail S, Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 90: 230-237.
- [7] Zhan L, Li C M, Fu Z F, *et al.* Dual-aptamer-based enzyme linked plasmonic assay for pathogenic bacteria detection[J]. *Colloids and Surfaces B-biointerfaces*, 2022, 214.
- [8] Kim J, Oh S. Pretreatment methods for nucleic acid-based rapid detection of pathogens in food: A review[J]. *Food Control*, 2021, 121.
- [9] Jayan H, Pu H, Sun D. Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 95: 233-246.
- [10] Han L, Wang K, Ma L, *et al.* Viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in fresh produce: Rapid determination by loop-mediated isothermal amplification coupled with a propidium monoazide treatment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(7).
- [11] Hu Y, Sun Y, Gu J, *et al.* Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting *Staphylococcus aureus* in milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353.

- [12] Lee J, Touthik S H, Park H, *et al.* Rapid detection of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 based on a colorimetric loop-mediated isothermal amplification (cLAMP) assay using a molecular beacon paired with HRPzyme[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(20): 4973-4984.
- [13] Kim Y L, Kim D, Park J, *et al.* A carbon-black-embedded poly (dimethylsiloxane)-paper hybrid device for energy-efficient nucleic-acid amplification in point-of-care testing[J]. *Analytical Methods*, 2022, 14(26): 2569-2577.
- [14] Leva-Bueno J, Peyman S A, Millner P A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2020, 209(3): 343-362.
- [15] Jing X, Shan S, Xing K, *et al.* Sensitive fluorescence ELISA with streptavidin scaffolded DNA tetrads for the detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Journal of Dairy Science*, 2023, 106(9): 5930-5939.
- [16] Zeng L, Guo L, Wang Z, *et al.* Immunoassays for the rapid detection of pantothenic acid in pharmaceutical and food products[J]. *Food Chemistry*, 2021, 348.
- [17] Wei J, Zhang L, Yang H, *et al.* Double-site recognition of *Staphylococcus aureus* using a metal-organic framework material with an alkaline hydrolysis property as a sensitive fluorescent probe[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(29): 12546-12552.
- [18] Yang S, Ouyang H, Su X, *et al.* Dual-recognition detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin-functionalized magnetic beads as concentration carriers[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 78: 174-180.
- [19] Feng X, Meng X, Xiao F, *et al.* Vancomycin-dendrimer based multivalent magnetic separation nanoplatfroms combined with multiplex quantitative PCR assay for detecting pathogenic bacteria in human blood[J]. *Talanta*, 2021, 225: 121953.
- [20] Chen G, Wang Z, Deng M, *et al.* Biomimetic dandelion-like magnetic nanoparticles for capture and detection of *S. aureus* and *L. monocytogenes*[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 355: 131289.
- [21] Zhu F, Zhao G, Dou W. Electrochemical sandwich immunoassay for *Escherichia coli* O157:H7

- based on the use of magnetic nanoparticles and graphene functionalized with electrocatalytically active Au@Pt core/shell nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(10).
- [22] Xu M, Wang R, Li Y. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation[J]. *Talanta*, 2016, 148: 200-208.
- [23] Zhu P, Shelton D R, Li S, *et al.* Detection of *E. coli* O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 30(1): 337-341.
- [24] Xi J, Cui G, Dong M, *et al.* Bioinspired fabrication of bifunctional antibody-enzyme co-assembled nanocomposites for chemiluminescence immunoassays of *E. coli* O157:H7[J]. *Analytical Methods*, 2022, 14(14): 1414-1419.
- [25] Wu Y, Wang M, Ouyang H, *et al.* Teicoplanin-functionalized magnetic beads for detection of *Staphylococcus aureus* via inhibition of the luminol chemiluminescence by intracellular catalase[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(8): 391.
- [26] Zhang Y, Yan C, Yang H, *et al.* Rapid and selective detection of *E. coli* O157:H7 combining phagomagnetic separation with enzymatic colorimetry[J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 332-338.
- [27] Chen R, Huang X, Li J, *et al.* A novel fluorescence immunoassay for the sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk based on catalase-mediated fluorescence quenching of CdTe quantum dots[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 947: 50-57.
- [28] Zhao Y, Li Y, Zhang P, *et al.* Cell-based fluorescent microsphere incorporated with carbon dots as a sensitive immunosensor for the rapid detection of *Escherichia coli* O157 in milk[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 179.
- [29] Fang B, Peng J, Zhang G, *et al.* I₂/I⁻-mediated fluorescence quenching of an Ag⁺-doped gold nanocluster-based immunoassay for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(4): 2922-2930.
- [30] Duan M, Xiao X, Huang Y, *et al.* Immuno-HCR based on contact quenching and fluorescence resonance energy transfer for sensitive and low background detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Food Chemistry*, 2021, 334.

- [31] Huang Z, Wen J, Ma G, *et al.* Time-resolved fluorescence immunoassay based on glucose oxidase-encapsulated metal-organic framework for amplified detection of foodborne pathogen[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1287.
- [32] Chen W, Vazquez-Gonzalez M, Kozell A, *et al.* Cu²⁺-modified metal-organic framework nanoparticles: A peroxidase-mimicking nanoenzyme[J]. *Small*, 2018, 14(5).
- [33] Albada H B, Golub E, Willner I. Rational design of supramolecular hemin/G-quadruplex-dopamine aptamer nucleozyme systems with superior catalytic performance[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(5): 3092-3101.
- [34] Liu Y, Lin X, Ji X, *et al.* Smartphone-based enzyme-free fluorescence sensing of organophosphate DDVP[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(7).
- [35] Yao S, Li J, Pang B, *et al.* Colorimetric immunoassay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* based on etching-enhanced peroxidase-like catalytic activity of gold nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(9).
- [36] Wang Z, Liu J, Chen G, *et al.* An integrated system using phenylboronic acid functionalized magnetic beads and colorimetric detection for *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Control*, 2022, 133.
- [37] Zhao B, Summers F A, Mason R P. Photooxidation of Amplex Red to resorufin: implications of exposing the Amplex Red assay to light[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 53(5): 1080-1087.
- [38] Reszka K J, Wagner B A, Burns C P, *et al.* Effects of peroxidase substrates on the Amplex red/oxidase assay: Antioxidant properties of anthracyclines[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 342(2): 327-337.
- [39] Zhao L, Guo J, Li S, *et al.* The development of thermal immunosensing for the detection of food-borne pathogens *E. coli* O157:H7 based on the novel substoichiometric photothermal conversion materials MoO₃-x NPs[J]. *Sensors and Actuators B Chemical*, 2021, 344.
- [40] Fu J, Zhou Y, Huang X, *et al.* Dramatically enhanced immunochromatographic assay using cascade signal amplification for ultrasensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(4): 1118-1125.

- [41] Feng M , Yong Q , Wang W ,et al. Development of a monoclonal antibody-based ELISA to detect *Escherichia coli* O157:H7[J].Food & Agricultural Immunology, 2013, 24(4):481-487.
- [42] He Y, Wang Y, Shi Y, *et al.* Molecular recognition strategy for detection and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* by utilizing teicoplanin and porcine IgG as indicator molecules[J]. Sensors and Actuators B-chemical, 2018, 267: 51-57.
- [43] Wang M, Yang H, Wu Y, *et al.* Fluorescent analysis of *Staphylococcus aureus* by using daptomycin and immunoglobulin G for dual sites affinity[J]. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 215: 340-344.
- [44] Zhang Y, Tan W, Zhang Y, *et al.* Ultrasensitive and selective detection of *Staphylococcus aureus* using a novel IgY-based colorimetric platform[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2019, 142.
- [45] 杨国泰, 李鹏, 胡烈海, 等. 凝集素在食源致病菌快速检测中应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2019,46(05): 1136-1145.
- [46] Xiao Y, Liu W, Zhang Y, *et al.* Simple and rapid co-freezing construction of SERS signal probes for the sensitive detection of pathogens[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 466: 143066.
- [47] Zhang Y, Shi S, Xing J, *et al.* A novel colorimetric sensing platform for the detection of *S. aureus* with high sensitivity and specificity[J]. RSC Adv, 2019, 9(58): 33589-33595.
- [48] Madkour E, Abou Zeid A, Abdel Ghany S, *et al.* Sensitive and selective colorimetric detection of *Staphylococcus aureus*-SPA gene by engineered gold nanosensor[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2023, 30(2).
- [49] Isah M B, Yusuf A, Usman A, *et al.* Mapping the landscape of IgY antibody research in Africa: A capacity and output analysis[J]. Scientific African, 2024, 23: e2019.
- [50] Zhang X, Calvert R A, Sutton B J, *et al.* IgY: a key isotype in antibody evolution[J]. Biological Reviews, 2017, 92(4): 2144-2156.
- [51] Gan W, Xu Z, Li Y, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* by using a long-period fiber grating immunosensor coated with egg yolk antibody[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 199.
- [52] Yakhkeshi S, Wu R, Chelliappan B, *et al.* Trends in industrialization and commercialization of IgY

- technology[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13.
- [53] Guo X, Yao S, Li H, *et al.* Multi-functional magnetic molecular imprinting probe for visual detection of IgY antibodies[J]. *Microchimica Acta*, 2021, 188(11).
- [54] Gao H, Yang S, Han J, *et al.* Double-site recognition of pathogenic bacterial whole cells based on an antibiotic-affinity strategy[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(62): 12497-12500.
- [55] Lotan R, Sharon N, Mirelman D. Interaction of wheat - germ agglutinin with bacterial cells and cell - wall polymers[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1975, 55(1): 257-262.

综述

磁分离技术在金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 检测中的研究进展

摘要

目前,监测环境和食物样品中是否存在食源性致病菌的污染对人类的生命健康至关重要。金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和大肠杆菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7) 是常见的食源性致病菌,能够通过污染食物而对人类的健康产生危害。金黄色葡萄球菌污染食品后能够在短时间内迅速繁殖并产生多种肠毒素(A型危害性最大),误食肠毒素 A 超 100 ng 就可以引起成人食物中毒。大肠杆菌 O157:H7 是一种具有潜在危害的病原体,它可以通过污染水果、蔬菜等食物链中的各个环节,从而导致食用者患病。大肠杆菌 O157:H7 的感染对于婴幼儿、老年人和免疫功能低下的群体而言,其危险性尤为突出。由于这些人群的抵抗力相对较弱,他们更容易受到致病菌的侵害。因此预防和控制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 的感染具有重要意义。磁分离技术在食源性致病菌生物传感器的开发中展现出广阔的应用前景。该技术的主要优势在于其能够快速且高效地捕获并富集食品样本中的致病菌,从而显著提升检测的灵敏度和准确性。近年来,磁分离技术在快速灵敏检测金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 的研究中取得了显著的进展。该技术凭借其对目标菌群快速捕获与富集能力,成为公共卫生安全领域的一大亮点。

关键词 磁分离技术; 免疫分析; 食源性致病菌; 食品检测

1 磁分离技术用于检测食源性致病菌的原理

磁珠(MBs)是由顺磁性或超顺磁性核心和适合固定化生物分子的聚合外层组成^[1]。它的大小与自然界中的分子相似,从纳米到几毫米不等。其中,直径为 20~200 nm 的磁珠由于其高表面积、多功能性、位阻小、分布均匀和高生物相容性的特点,受到了广泛的关注^[2]。科研人员使用不同种类的识别分子直接修饰/间接修饰 MBs,成功制备出了高效的磁珠识别元件。这些识别元件在磁场的作用下,能够迅速将靶标从复杂的样本基质中凝聚并分离出来,为后续的食源性致病菌检测提供了极大的便利^[3]。

直接修饰和间接修饰是两种常用的将识别分子连接到 MBs 表面的方法,它们各有

其独特优势和应用场景。直接修饰法简单直观,通过将识别分子如抗体直接偶联于磁珠表面,能够实现对靶向致病菌的高效捕获^[4];而间接修饰是将识别分子间接偶联于 MBs 表面,例如先将 BSA 作为中介物质修饰于磁珠表面,再用识别分子来修饰 BSA 化的磁珠。间接修饰的优点是减少了空间位阻,提高了识别分子的负载量,更有利于提高检测的灵敏性。鉴于 MBs 表面可修饰多种识别分子的特性,磁分离技术可广泛应用于不同的食源性致病菌的检测^[3]。本文将从检测金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 两个方向来阐述磁分离技术在食源性致病菌检测中的应用。

2 磁分离技术用于检测金黄色葡萄球菌

近年来,基于磁分离技术的检测方法在金黄色葡萄球菌检测领域取得了显著的成就,展现出捕获率高、操作简便、快速高效等优点。其核心在于利用不同种类的识别分子对磁珠进行功能化修饰,使其能够与金黄色葡萄球菌结合,并实现食物样本中金黄色葡萄球菌的快速富集^[5]。抗体、具有广谱结合能力的抗生素和适配体作为三种常见的识别分子^[5],接下来,我们将主要围绕这三种识别分子展开详述,探讨它们在金黄色葡萄球菌检测中的应用。

2.1 抗体作为识别分子

抗体作为备受青睐的生物识别元件之一,因其高度的特异性和亲和性被广泛应用于生物传感器中。为了进一步提高基于抗体检测的灵敏度,科研人员在不断探索并应用新型纳米级信号探针或结合核酸分子技术,这两种方法各具优势,为金黄色葡萄球菌的检测带来了革命性的进展。例如,Wei 等利用猪 IgG 直接偶联于 MBs 表面,制备出可以与金黄色葡萄球菌特异性结合的免疫磁珠。为进一步提高检测灵敏度,科研人员合成了一种荧光材料-金属有机骨架材料(MOF)^[4],并用 MPF 标记替考拉宁来荧光定量检测金黄色葡萄球菌^[4];Cheng 等科研人员通过碳二亚胺法制备了免疫磁珠,并成功将其与重组酶聚合酶扩增技术相结合,用于检测牛奶和猪肉中的金黄色葡萄球菌,检测灵敏度低至 2.5×10^1 CFU/mL^[6]。

据上所述,抗体在作为金黄色葡萄球菌的识别分子时,对靶标具有高度的识别特异性。为了进一步满足极低含量的金黄色葡萄球菌检出的需求,科研人员开始致力于纳米级信号探针的开发及核酸分子技术与免疫磁珠的联合检测。这两种方法各具特色,并且

在联合应用时展现出令人瞩目的协同效应。尽管抗体在金黄色葡萄球菌检测中具有高特异性和灵敏度，但其制备过程步骤繁琐、成本较高。因此寻找更经济、灵敏的识别分子非常迫切。

2.2 具有广谱结合能力的物质作为识别分子

目前，抗体作为识别分子的方法层出不穷，它们凭借独特的识别特性展现出了显著优势。然而，制备这些抗体的过程通常相对繁琐，成本也相对较高，这些局限性使得科研人员开始寻求新的解决方案。在这个背景下，具有广谱结合能力的物质逐渐进入了科研人员的视野。例如，由于细菌均存在丰富的肽聚糖和脂多糖，因此已广泛应用于糖和糖基分子鉴定的 3-氨基苯硼酸（APBA）可作为一种潜在的细菌识别分子。但是这种结合是非特异性的，容易受其他细菌的干扰。因此，Wang 等制备出的 APBA 功能化磁珠（APBA-MBs）对金黄色葡萄球菌进行预富集后，选用了 HRP-猪 IgG 与金黄色葡萄球菌表面蛋白 A 特异性结合来提高检测方法的特异性。在最佳实验条件下，该技术可在纯培养物、果汁、池水和菠菜中的检测限达 3.0×10^2 CFU/mL^[7]。

另外，替考拉宁（Teicoplanin, Teic）作为一种糖肽类抗生素，展现出了与细菌细胞壁中的 D-丙氨酰-D-丙氨酸（D-Ala-D-Ala）强结合的能力。这种特异性结合机制使得替考拉宁在抗菌治疗中发挥重要作用。同时，由于替考拉宁的成本低、稳定性高以及结合能力强等优点，使其在作为金黄色葡萄球菌检测识别分子方面具有很大的潜力。因此，Wu 等使用替考拉宁作为识别分子，将其直接偶联于磁珠表面制备得 Teic-MBs，并加入溶葡萄球菌蛋白对捕获的金黄色葡萄球菌进行特异性裂解，从而释放出胞内 H_2O_2 酶。最后，通过金黄色葡萄球菌内释放的 H_2O_2 酶对由过氧化物酶、鲁米诺、 H_2O_2 和对碘酚组成的化学发光体系的抑制作用来实现金黄色葡萄球菌的量化检测，是一种创新的检测策略^[8]；Chen 等使用牛血清白蛋白（BSA）和聚乙二醇（PEG）作为桥联，将替考拉宁间接修饰到磁珠上，形成仿生蒲公英状磁性纳米粒子（MBs-PEG-BSA-Teic），以捕获金黄色葡萄球菌。在磁分离后加入金黄色葡萄球菌的特异性荧光探针，通过 525 nm 波长下的荧光信号强度来反映金黄色葡萄球菌的含量^[9]；Bai 等同样用聚乙二醇和牛血清白蛋白做桥联来制备替考拉宁功能化磁珠用于分离目的菌，并利用 nuc、cesB 和 flic 基因进行目标菌的特异性检测^[10]。

万古霉素 (Vancomycin, Van) 作为一种小分子广谱糖肽抗生素, 在预防和治疗细菌感染方面发挥着重要作用。它可以通过五点氢键与革兰氏阳性菌的细胞壁肽聚糖末端的 D-丙氨酰-D-丙氨酸 (D-Ala-D-Ala) 紧密结合。由于革兰氏阳性菌的细胞壁含有丰富的 D-丙氨酰-D-丙氨酸序列, 万古霉素能够精准地针对这些细菌, 而对其他类型的细菌则表现出较低的活性, 这使得万古霉素成了一个高效的金黄色葡萄球菌的识别分子。因此, Chen 等科研人员以卵清蛋白 (OVA) 作为桥联来间接偶联 Van, 形成 MBs-OVA-Van 的功能化磁珠。在最佳条件下, 利用万古霉素制备的捕获元件与多重聚合酶链反应 (mPCR) 技术相结合, 展现出在 PBS 和果汁样品中对金黄色葡萄球菌的高效检测能力^[11]; Yang 等也使用 Van 功能化磁珠来有效富集金黄色葡萄球菌, 并采用碱性磷酸酶 (ALP) 标记的兔免疫球蛋白 G (ALP-IgG) 作为第二识别剂来提高检测特异性^[5]; 而 Wang 等科研人员则采用了以 BSA 为载体的 Van 功能化磁珠, 通过结合生物素-猪 IgG 的特异性识别, 并结合滚环核酸扩增技术 (RCA), 构建了一种高效、特异的金黄色葡萄球菌检测方法^[12]; 另外, Zhang 等首次报道了一种基于万古霉素和适配体双重识别的灵敏表面增强拉曼散射 (SERS) 策略, 用于同时检测大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌两种致病菌。该双重识别策略使用万古霉素修饰磁性纳米颗粒, 利用 Van 广谱识别的特点来高效富集细菌, 并使用适配体功能化的 SERS 标签来特异性和敏感性地对真实标本中的目标细菌进行定量检测^[13]; Xue 等科研人员首先利用 Van 和丁酰胆碱酯酶 (BChE) 共功能化的磁珠来捕获金黄色葡萄球菌。这种磁珠具有高度的特异性, 能够准确识别并捕获目标细菌。随后, 捕获到的细菌与预包被的 IgG 结合, 固定在 96 孔板上, 为后续的检测步骤提供了稳定的平台^[14]。

据上所述, 科研人员为了代替高昂抗体的使用, 开始致力于市场上更廉价并具有广谱结合能力的识别分子, 例如使用替考拉宁、苯硼酸、万古霉素等来修饰磁珠。可惜的是, 此类识别分子的功能化磁珠捕获靶标的过程是不具备特异性的。为了弥补这一不足, 科研人员巧妙地结合了具有特异性识别功能的抗体或其他物质, 并联合了 mPCR 技术、RCA 技术及 SERS 技术等以增强整个反应的特异性。这样的策略确保了即便使用具有广谱结合能力的识别分子, 也能实现对目标细菌的高效、准确检测。

2.3 适配体作为识别分子

适配体，作为一类具有极高亲和力的分子，在定点检测领域中的表现非常亮眼，充分展现出了其巨大的应用潜力。适配体与靶标的结合能力十分出色，其亲和力与多数单克隆抗体相比不仅相当，甚至在特定情况下还能更胜一筹。因此 Abdolkarim Abbaspour 等人采用间接修饰的方式将金黄色葡萄球菌适配体固定在链霉亲和素包被的磁珠上，成功构建了一种灵敏且高选择性的基于双适配体的夹心结构免疫传感器^[15]；Zhou 等人设计的碱性磷酸酶-寡核苷酸功能化的磁珠（MBs-DNA-ALP）作为一种新型的探针，为金黄色葡萄球菌的检测提供了一种富有创新性的方法。此方法依赖于金-银合金纳米棒生成后引起的局域表面等离子体共振峰的显著移动，导致溶液颜色发生明显变化。这种颜色变化的直观性使得该检测方法在低资源环境下具有特别的优势^[16]。

据上所述，适配体在修饰磁珠上发挥着至关重要的作用，其高度的特异性使得适配体成为金黄色葡萄球菌快速检测与分离的有力工具，极大地提升了检测的准确性和效率。

本节中，主要介绍了近几年中磁分离技术在检测金黄色葡萄球菌上的应用，其具体的技术指标见表 1。由表 1 可知，基于抗体作为识别分子的功能化磁珠多属直接修饰，检测限在 $25 \sim 5.3 \times 10^2$ CFU/mL 范围内浮动；而基于具有广谱性结合能力的物质被作为识别分子的研究是近些年来的热点，科研人员通过直接修饰或者间接修饰的方式来负载更多的识别分子，以提高对金黄色葡萄球菌的捕获效率。此类方法的检测限主要分布于 $3.3 \sim 3.3 \times 10^2$ CFU/mL 的范围内；基于适配体的生物传感器检测限最低，低至 $1 \sim 25$ CFU/mL。

表 1 磁分离技术检测金黄色葡萄球菌的方法

Table 1 Detection of *S. aureus* by magnetic separation technology

识别分子	制备的磁珠	修饰方式	检测限 (CFU/mL)	相关文献
猪 IgG	MBs-猪 IgG	直接修饰	5.3×10^2	[4]
兔抗 <i>S. aureus</i> 多抗	MBs-兔抗 <i>S. aureus</i> 多抗	直接修饰	2.5×10^1	[6]
3-氨基苯硼酸	MBs-APBA	直接修饰	3.0×10^2	[7]
替考拉宁	MBs-Teic	直接修饰	47	[8]
替考拉宁	MBs-PEG-BSA-Teic	间接修饰	10^1	[9]
替考拉宁	MBs-PEG-BSA-Teic	间接修饰	100	[10]
万古霉素	MBs-OVA-Van	间接修饰	10^2	[11]
万古霉素	MBs-OVA-Van	间接修饰	3.3	[5]
万古霉素	MBs-BSA-Van	间接修饰	3.3×10^2	[12]
万古霉素	Fe ₃ O ₄ @Au-Van MNPs	直接修饰	50	[13]
万古霉素	Van 和 BChE 共功能化磁珠	直接修饰	5	[14]
适配体	MBs-链霉亲和素-适配体	间接修饰	1	[15]
DNA	MBs-DNA-ALP	直接修饰	25	[16]

3 磁分离技术用于检测大肠杆菌 O157:H7

大肠杆菌 O157:H7 作为常见的食源性致病菌之一，可引起严重腹泻和溶血性尿毒症综合征，对公众健康构成严重威胁^[17]。磁分离技术在大肠杆菌 O157:H7 的检测中也发挥了重要作用。下面仍根据识别分子（抗体或适配体）的不同，对该技术应用于大肠杆菌 O157:H7 检测的研究展开叙述。

3.1 抗体作为识别分子

在以抗体作为识别分子的大肠杆菌 O157:H7 检测中，研究人员分别采用直接修饰和间接修饰的方法，来增强功能化磁珠对大肠杆菌 O157:H7 的捕获能力。其中，Abdel-Rahim Hussein Abdel-Azzem Hassan 的研究展示了另一种利用磁珠分离技术与丝网印刷碳电极（SPCEs）进行大肠杆菌 O157:H7 检测的方法。这种方法的核心在于

使用抗大肠杆菌 O157:H7 抗体直接修饰磁珠，作为识别大肠杆菌 O157:H7 的捕获元件。随后，利用金纳米粒子标记的特异性抗体作为第二识别抗体，增强了与大肠杆菌 O157:H7 的结合能力，并进一步放大了检测信号。科研人员使用 SPCEs 进行计时电流测量，通过监测三明治结构与电极接触时引发的电流响应变化，实现对大肠杆菌 O157:H7 的定量检测^[18]。

而抗体间接修饰磁珠的方式也被广泛地应用于大肠杆菌 O157:H7 的检测。例如，科研人员将链霉亲和素用于修饰磁珠，通过生物素-链霉亲和素的结合机制，将生物素化抗体间接偶联于磁珠表面来形成抗体-磁珠复合物。这种偶联方式得到了广泛的应用，不仅提高了目标菌的捕获效率，还增强了检测的稳定性和可靠性。例如 Lian 等采用链霉亲和素修饰磁珠与生物素修饰抗体结合来特异性捕获大肠杆菌 O157:H7，随后又加入金纳米粒子（AuNPs）与巯基修饰的适配体（SH-Aptamers），形成夹层结构。随后，科研人员通过加入罗丹明 B，来获得荧光信号变化^[19]；Xu 等为了制备一种新型电化学生物传感器，主要是通过链霉亲和素-生物素反应将葡萄糖氧化酶固定在 MBs 表面，形成 MBs-葡萄糖氧化酶偶联物。该传感器结合了双功能葡萄糖氧化酶（GOx）-聚多巴胺（PDA）基聚合物纳米复合材料（PMNCs）以及普鲁士蓝（PB）修饰的丝网印刷交叉指型微电极（SP-IDMEs），为大肠杆菌 O157:H7 的快速检测提供了有力工具^[20]；Xu 等科研人员利用生物素修饰的抗体与涂有链霉亲和素的磁珠进行孵育，制备出功能化抗体的磁珠。这些磁珠能够特异性地捕获食品样本中的大肠杆菌 O157:H7 或鼠伤寒沙门氏菌。为了进一步增强检测信号，科研人员引入了葡萄糖氧化酶（GOx）-抗体偶联物。这种偶联物能够识别并标记已捕获的目标细菌，形成更为稳定的夹心结构。然后，科研人员将含有夹心结构的溶液与 SP-IDMEs 接触。当溶液中的葡萄糖氧化酶催化葡萄糖产生葡萄糖酸时，会导致溶液的电化学性质发生变化，进而影响电极上的阻抗测量。科研人员通过精确测量这些阻抗变化，就能够实现对目标细菌的快速、准确检测^[21]。

据上所述，抗体因其高度的特异性而在大肠杆菌 O157:H7 的检测中得到了广泛应用。在抗体修饰磁珠方面，主要存在两类方式：一是抗体直接对磁珠进行修饰，二是通过生物素-链霉亲和素桥联将抗体间接修饰于磁珠表面。值得一提的是，部分科研

人员还创新性地结合了 SP-IDMEs 及 SPCEs 技术,在大肠杆菌 O157:H7 的检测中取得了令人瞩目的成果,进一步证明了抗体修饰磁珠技术的广阔应用前景。

3.2 适配体作为识别分子

适配体作为识别分子在修饰磁珠作为大肠杆菌 O157:H7 的捕获元件方面展现出了独特的优势。根据修饰方式的不同,我们可以将适配体修饰磁珠的方法划分为以下三类。

第一类修饰方法是适配体直接修饰磁珠来捕获目标细菌。例如, Zhang 等制备 MBs-dsDNA 磁珠复合物后,在大肠杆菌 O157:H7 存在的情况下,适配体才会与其结合,并释放大肠杆菌适配体-引发剂(EA-I)^[22]。这一步骤是检测过程的关键,因为它确保了只有在目标细菌存在的情况下才会触发后续的扩增反应。随后,通过磁分离技术收集上清液,其中包含了释放的引物。这些引物会与环状序列杂交,形成挂锁探针。这种挂锁探针的设计允许后续的滚环核酸扩增反应高效进行。接下来,加入 T4 DNA 连接酶、phi29 DNA 聚合酶和脱氧核苷酸(dNTPs),从而启动滚环扩增反应。这一步骤是检测方法的核心,因为它能够产生大量的扩增产物,从而显著增强检测信号。重要的是,只有当目标细菌存在并触发释放引物的过程时,滚环扩增反应才会被启动。在没有目标细菌的情况下,无法触发这一反应,从而确保了检测的高特异性^[22]。综上所述, Zhang 等的研究通过结合 MBs、适配体和 RCA 技术,开发了一种高灵敏度和高特异性的大肠杆菌 O157:H7 检测方法。

第二类修饰方法是利用生物素-链霉亲和素的桥联作用,将适配体间接修饰于磁珠表面。例如, Li 等采用噬菌体展示技术对大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生乳杆菌和羊布鲁氏菌 16 M 三种常见人畜共患致病菌的特异性肽进行了筛选^[23]。筛选得到 3 个的肽段经生物素修饰合成三个生物素化的多肽,并将其偶联到链霉亲和素磁珠上形成生物素多肽-链霉亲和素 MBs,从而来富集上述三种致病菌。此外, Li 等还巧妙地将多克隆抗体与不同荧光波长的量子点结合,构建出具有多色荧光标记的量子点探针。这种设计使得每种致病菌都能被特定的量子点探针所识别,从而实现了对三种致病菌的同时检测^[23]。其中,对大肠杆菌 O157:H7 的检测限为 10^3 CFU/mL^[23]; Liang 等根据大肠杆菌 O157:H7 特异性 fliCh7 基因专门设计了一个阻断正向引物和一个生物

素反向引物，用于聚合酶链式反应（PCR）扩增，产生带有生物素的单双链 DNA（ss-dsDNA~生物素）^[24]。这些 PCR 产物（ss-dsDNA~生物素）被用链霉亲和素修饰的磁珠（SA~MBs）捕获，形成 ss-dsDNA~生物素-SA~MBs^[24]。值得注意的是，Liang 等的研究创新性地使用了 HCR 来进一步放大检测信号。他们设计了发夹探针（H1 和 H2），这些探针在 PCR 产物上的 ssDNA 作用下被打开，触发 HCR 反应。HCR 是一种高效的信号扩增技术，能够产生大量的长链 DNA，从而显著增强检测信号的强度。通过这种 PCR-HCR 双重信号扩增方法，Liang 等成功实现了对牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的高灵敏度检测^[24]。

第三种修饰方法是利用与适配体互补的单链来修饰磁珠，并通过互补结合的方式将适配体牢固地固定于磁珠表面。这种方法具备高效且特异的特性，对于捕获大肠杆菌 O157:H7 展现出了显著的效果。例如，Zhang 等的研究展示了一种创新性基于适配体修饰磁珠的大肠杆菌 O157:H7 检测方法。他们首先成功地将单链捕获探针（CP）固定在 MBs 表面，这些 CP 随后与特异性针对大肠杆菌 O157:H7 的适配体（AP）结合，形成稳定的双链结构。这种结构的设计允许 AP 优先与目标细菌结合，一旦结合发生，部分 CP 会被释放，从而触发后续的检测机制^[25]。在最佳条件下，该方法对于大肠杆菌 O157:H7 的检测限为 530 CFU/mL^[25]；同样，Yu 等将短单链 DNA 作为捕获探针（CPs）固定在 MBs 表面，然后大肠杆菌 O157:H7 适配体与 CPs 杂交而形成双链 DNA 结构并固定在 MBs 上^[26]。适配体可优先与目标细菌大肠杆菌 O157:H7 结合，从而使 CP 暴露。这些暴露的 CPs 随后与由引物交换反应（PER）自主合成的长单链 DNA 的 5'-end 序列发生杂交反应。为了进一步提高检测的灵敏度和实用性，Yu 等引入了亲和素标记的转化酶缀合物。他们通过添加转化酶的底物-蔗糖，使得缀合物能够催化蔗糖转化为葡萄糖。随后，他们成功利用血糖仪对产生的葡萄糖进行了精确检测，从而间接地实现了对大肠杆菌 O157:H7 的可视化检测。这种方法不仅提高了检测的准确性，还增强了其在实际应用中的便捷性和实用性^[26]。

据上所述，在大肠杆菌 O157:H7 的检测中，适配体修饰磁珠的方法呈现多样化。此外，科研人员还巧妙地结合了血糖仪，实现了大肠杆菌 O157:H7 浓度的可视化检测。同时，RCA 技术与 PCR 技术的引入，也为大肠杆菌 O157:H7 的快速、准确检测提供

了新的有效策略。

本节基于抗体/适配体结合磁分离技术来检测大肠杆菌 O157:H7 的各类方法，具体的技术指标见表 2。由表可知，基于抗体的检测方法检测限为 $0.35 \sim 10^2$ CFU/mL，检测灵敏度较高。相比于抗体检测，基于适配体的检测方法的灵敏度较低，检测限为 $10 \sim 4 \times 10^3$ CFU/mL。

表 2：磁分离技术检测大肠杆菌 O157:H7 的方法

Table 2: Methods of detecting *E. coli* O157:H7 by magnetic separation technology

识别分子	制备的磁珠	修饰方式	检测限 (CFU/mL)	相关文献
抗体	MBs-抗体	直接修饰	148	[18]
抗体	链霉亲和素修饰磁珠与生物素修饰抗体结合	间接修饰	0.35	[19]
抗体	MBs-葡萄糖氧化酶偶联物	间接修饰	10^2	[20]
抗体	链霉亲和素修饰磁珠与生物素修饰抗体结合	间接修饰	10^2	[21]
适配体	dsDNA-MBs	直接修饰	4×10^3	[22]
多肽	生物素多肽-链霉亲和素 MBs	间接修饰	10^3	[23]
适配体	生物素化 ss-dsDNA-链霉亲和素 MBs	间接修饰	7.2×10^1	[24]
适配体	单链捕获探针 (CP) -MBs	间接修饰	530	[25]
适配体	短单链 DNA-MBs	间接修饰	10	[26]

4 结论与展望

近年来，磁分离技术在食品安全检测领域的应用取得了显著进展，特别是在金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 的检测方面。科研人员主要使用抗体/广谱性识别分子/适配子，通过直接修饰/间接修饰的方式偶联于磁珠表面，对两种致病菌进行高效捕获和分离，为食品安全监管提供了有力支持。

在金黄色葡萄球菌的检测中，相较于抗体修饰磁珠，基于广谱性识别分子修饰磁珠的各类检测具备成本低廉、灵敏度更高的优势，但是在检测灵敏上仍不及适配子修饰磁珠的各类检测。这是由于适配子能够与目标分子进行高度特异性的结合，因此在检测灵敏度上具有更高的表现；对于大肠杆菌 O157:H7 的检测，抗体修饰磁珠的各类检测展现出了较高的灵敏度。这是因为抗体与目标抗原的结合具有高度的特异性和亲和力，从而提高了检测的准确性。然而，与金黄色葡萄球菌的检测相比，大肠杆菌 O157:H7 在广谱性识别分子修饰磁珠的各类检测方式上的探索并不广泛。这可能是由于大肠杆菌 O157:H7 的特异性较强，需要更加精准的检测手段来确保其被准确识别。

未来，随着磁分离技术的不断发展和完善，相信该技术将在食品安全检测领域发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] Gaiani G, O Sullivan C K, Campàs M. Magnetic beads in marine toxin detection: A review[J]. *Magnetochemistry*, 2019, 5(4): 62.
- [2] Pedrero M, Campuzano S, Pingarrón J M. Magnetic beads-based electrochemical sensors applied to the detection and quantification of bioterrorism/biohazard agents[J]. *Electroanalysis*, 2012, 24(3): 470-482.
- [3] 王钰童, 李晖, 杨国泰, 等. 基于识别分子的磁分离技术在食源性致病菌分离中应用[J]. *化学通报*, 2019, 82(1): 27-31.
- [4] Wei J, Zhang L, Yang H, *et al.* Double-site recognition of *Staphylococcus aureus* using a metal-organic framework material with an alkaline hydrolysis property as a sensitive fluorescent probe[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(29): 12546-12552.
- [5] Yang S, Ouyang H, Su X, *et al.* Dual-recognition detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin-functionalized magnetic beads as concentration carriers[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 78: 174-180.
- [6] Cheng R, Li L, Zhen S, *et al.* Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk and pork via immunomagnetic separation and recombinase polymerase amplification[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2).
- [7] Wang Z, Liu J, Chen G, *et al.* An integrated system using phenylboronic acid functionalized magnetic beads and colorimetric detection for *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Control*, 2022, 133: 108633.
- [8] Wu Y, Wang M, Ouyang H, *et al.* Teicoplanin-functionalized magnetic beads for detection of *Staphylococcus aureus* via inhibition of the luminol chemiluminescence by intracellular catalase[J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(8): 391.
- [9] Chen G, Wang Z, Deng M, *et al.* Biomimetic dandelion-like magnetic nanoparticles for capture and detection of *S. aureus* and *L. monocytogenes*[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 355: 131289.
- [10] Bai X, Chen G, Wang Z, *et al.* Simultaneous detection of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus*

- aureus* by teicoplanin functionalized magnetic beads combined with triplex PCR[J]. Food Control, 2022, 132: 108531.
- [11] Chen G, Yang G, Wang Y, *et al.* Antibiotic-based magnetic nanoprobe combined with mPCR for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*[J]. Food Analytical Methods, 2021, 14(9): 1964-1976.
- [12] Wang Y, Wang Z, Zhan Z, *et al.* Fluorescence detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin functionalized magnetic beads combined with rolling circle amplification in fruit juice[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1189: 339213.
- [13] Zhang C, Wang C, Xiao R, *et al.* Sensitive and specific detection of clinical bacteria via vancomycin-modified Fe₃O₄@Au nanoparticles and aptamer-functionalized SERS tags[J]. J Mater Chem B, 2018, 6(22): 3751-3761.
- [14] Xue J, Wang R, Yang J, *et al.* Sensitive plasmonic ELISA assay based on butyrylcholinesterase catalyzed hydrolysis for the detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 365: 131948.
- [15] Abbaspour A, Norouz-Sarvestani F, Noori A, *et al.* Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 68: 149-155.
- [16] Zhou J, Fu R, Tian F, *et al.* Dual enzyme-Induced Au-Ag alloy nanorods as colorful chromogenic substrates for sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. ACS Applied Bio Materials, 2020, 3(9): 6103-6109.
- [17] Wu C F, Valdes J J, Bentley W E, *et al.* DNA microarray for discrimination between pathogenic O157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains[J]. Biosens Bioelectron, 2003, 19(1): 1-8.
- [18] Abdel-Azzem Hassan A H, de la Escosura-Muniz A, Merkoci A. Highly sensitive and rapid determination of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and water using electrocatalytic gold nanoparticle tags[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 67: 511-515.

- [19] Lian F, Wang D, Yao S, *et al.* A detection method of *Escherichia coli* O157:H7 based on immunomagnetic separation and aptamers-gold nanoparticle probe quenching Rhodamine B's fluorescence[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(8): 1129-1138.
- [20] Xu M, Wang R, Li Y. An electrochemical biosensor for rapid detection of *E. coli* O157:H7 with highly efficient bifunctional glucose oxidase-polydopamine nanocomposites and Prussian blue modified screen-printed interdigitated electrodes[J]. Analyst, 2016, 141(18): 5441-5449.
- [21] Xu M, Wang R, Li Y. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation[J]. Talanta, 2016, 148: 200-208.
- [22] Zhang T, Tao Q, Bian X, *et al.* Rapid visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7 by DNA hydrogel based on rolling circle amplification[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(3): 377-386.
- [23] Li L, Zhang H, Song D, *et al.* Simultaneous detection of three zoonotic pathogens based on phage display peptide and multicolor quantum dots[J]. Analytical Biochemistry, 2020, 608: 113854.
- [24] Liang T, Wu X, Chen B, *et al.* The PCR-HCR dual signal amplification strategy for ultrasensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 130: 109642.
- [25] Zhang W, Bu S, Zhang J, *et al.* Point-of-care detection of pathogenic bacteria based on pregnancy test strips and metal-organic frameworks[J]. Microchemical Journal, 2022, 175: 107142.
- [26] Yu S, Bu S, Xue L, *et al.* Ultrasensitive detection of pathogenic bacteria by primer exchange reaction coupled with PGM[J]. Microchemical Journal, 2023, 187: 108401.

附录

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
SPA	Staphylococcal protein A	金黄色葡萄球菌表面蛋白 A
BHI	Brain heart infusion	脑心浸液培养基
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HRP-IgY	HRP-chicken anti-protein A IgY	HRP-鸡抗蛋白 A IgY
HRP-SA	Horseradish peroxidase-streptavidin	HRP-链霉亲和素
FITC-SA	Fluorescein isothiocyanate-streptavidin	异硫氰酸荧光素-链霉亲和素
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate buffer saline-Tween 20	磷酸盐-吐温 20 缓冲液
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride	1- (3-二甲氨基丙基) -3-乙基碳二亚胺盐酸盐
NHS	N-hydroxy succinimide	N-羟基丁二酰亚胺
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
WGA	Wheat germ agglutinin	麦胚凝集素
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
TMB	Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺