

基于裸磁珠的金黄色葡萄球菌富集优化

吴俊, 陆利霞, 刘元建, 林丽军, 熊晓辉

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 210009)

摘要: 本文研究了裸磁珠对金黄色葡萄球菌吸附效果, 优化吸附条件, 研究金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液的吸附情况, 最终将其应用于牛肉样品中金黄色葡萄球菌的检测。通过实验, 优化裸磁珠吸附菌体的最小磁珠用量, 最小吸附体积和最短吸附时间, 并分析是否满足荧光 PCR 检测需要。结果表明: 裸磁珠对浓度为 $10^2 \sim 10^7$ cfu/mL 金黄色葡萄球菌的吸附率在 95% 以上, 有较好吸附效果; 10 mg 裸磁珠在 5 mL 菌液中吸附 10 min, 从磁珠上提取的 DNA 浓度和纯度可以满足荧光 PCR 的检测要求; 裸磁珠在混合菌体中吸附到的金黄色葡萄球菌可以被荧光 PCR 检测出来, 裸磁珠在牛肉样品中吸附浓度为 10^2 cfu/mL 金黄色葡萄球菌提取的 DNA 可以被荧光 PCR 检测出来。因此, 裸磁珠可用于食品中金黄色葡萄球菌的富集, 满足荧光 PCR 检测菌体量要求。

关键词: 裸磁珠; 吸附率; 金黄色葡萄球菌; 富集; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2019)02-186-192

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.026

Study on Optimization of Enrichment of *Staphylococcus aureus* by Bare Magnetic Particles

WU Jun, LU Li-xia, LIU Yuan-jian, LIN Li-jun, XIONG Xiao-hui

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The adsorption efficiency of bare magnetic particles for different concentrations of *Staphylococcus aureus* and for mixed bacteria was studied. And the method was applied to the detection of *S. aureus* in beef samples. The quantity of beads, the broth volume and the reaction time were optimized for enrichment the bacteria, to examine if the method of Real-Time Fluorescent Quantitative PCR is suitable for measuring the content of bacteria. The results showed that the bare magnetic particles had high adsorption rate to *S. aureus* in the broth, with the content of $10^2 \sim 10^7$ cfu/mL in the culture broth. The adsorption rate was over 95%. The DNA from the bacterium cells enriched by 10mg beads and 5mL culture broth for 10 minutes could be detected by Fluorescent Quantitative PCR. The DNA extracted from *S. aureus* was detected by Fluorescent Quantitative PCR after enriched by beads in beef broth at the concentration of 10^2 cfu/mL. Moreover, the DNA extracted from *S. aureus* was tested after enriched by beads from the mixture broth with *Escherichia coli*. The method could be used for enrichment and detection of *S. aureus* in food.

Key words: bare magnetic particles; adsorption efficiency; *Staphylococcus aureus*; enrichment; food safety

基因分子生物学和免疫学检测技术的发展, 为病原微生物快速检测提供了良好的技术平台。较之传统的致病菌检测方法检测时间长, 检测程序繁琐, 工作量大等缺点, 现代检测方法如多重PCR、基因芯片等不仅可实现多种致病菌的同时、快速检测, 而且可保持较高的特异性和灵敏度, 然而运用这些方法时, 为了达到检测的需要仍然要对其进行前增菌, 延长了检测时间。因此, 微生物的快速富集具有非常重要的意义。

未经包被单克隆抗体的超顺磁性 Fe_3O_4 粒子为裸磁珠, 因其具有磁响应性、生物相容性、超顺磁性且能活化结合丰富的表面功能基团, 在细胞学、免疫学、

收稿日期: 2018-09-11

基金项目: 江苏省科技厅社会发展项目 (BE2016803)

作者简介: 吴俊 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物

微生物学和分子生物学方面有着广泛的应用^[1-4]。细菌的磁性分离技术包括特异性分离 (免疫磁分离) 和非特异性分离两种形式。免疫磁珠的应用由于受到了包被抗体种类的限制, 吸附率并不理想。同时考虑到食源性疾病一旦发生, 往往很难确定致病菌的种类, 用免疫磁珠吸附有可能导致漏检。有学者研究了裸磁珠对近 20 种常见细菌的吸附性, 包括常见的食源性细菌, 发现裸磁珠可非特异性吸附细菌 (革兰氏阳性和阴性)^[5-7]。与传统检测方法不同, 裸磁珠吸附不受样品中的成分和杂质的影响, 近年来对裸磁珠吸附性能的研究已有报道^[8,9], 但是目前已有的研究成果菌液用量浓度偏高 ($10^4 \sim 10^7$ cfu/mL), 而实际食品样品中致病菌含量偏低, 不能满足实际需要。因此, 本研究探究低菌浓下裸磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附效果, 优化

磁珠用量, 吸附菌液体积, 吸附时间, 并探究混合菌体中裸磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附情况, 为后续食品中细菌的快速检测应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 系本实验组保藏。

1.1.2 试剂与实验仪器

试剂: 7.5%氯化钠肉汤, 平板计数琼脂 (PCA), 直径 20 nm 裸磁珠, 3M 金黄色葡萄球菌测试片

仪器: SHZ-B 水浴恒温振荡器 (上海跃进医疗器械有限公司), SHP-100 智能生化培养箱 (上海三发科学仪器有限公司), BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪 (爱本德中国有限公司), LightCycler96 荧光定量 PCR 仪 (德国罗氏 Roche)

1.2 实验方法

1.2.1 接种培养金黄色葡萄球菌

用接种环从培养基斜面 (保存在 4 °C 的冰箱) 挑取实验菌株至 7.5%氯化钠肉汤溶液中, 随后于摇床 37 °C, 150 r/min 培养 24 h, 作为原菌液。

1.2.2 裸磁珠对不同菌浓金黄色葡萄球菌吸附效果

取 1 mL 培养后的原菌液于 9 mL 生理盐水中, 充分混匀, 稀释到 $10^2\sim 10^7$ cfu/mL, 进行平板倾注接种测出菌浓。于离心管中加入 10 mg 裸磁珠和上述稀释后的菌液 5 mL, 充分混匀。放至水浴恒温振荡器中 37 °C 吸附富集振荡 10 min。用永磁铁沉淀, 取 1 mL 上清液进行平板倾注接种, 测出菌浓, 计算吸附率。弃离心管中的上清液, 使用离心管中裸磁珠进行 DNA 提取及后续 DNA 浓度和纯度测定和荧光 PCR 测定。

1.2.3 磁珠用量对裸磁珠吸附率影响实验

实验操作同 1.2.2, 但保持 5 mL 吸附菌液的菌浓为 10^5 cfu/mL。改变磁珠用量, 控制离心管中干式裸磁珠用量分别为 5、7.5、10、12.5、15 mg。

1.2.4 不同吸附体积对裸磁珠吸附率影响实验

向 150 mL 锥形瓶中加入 100 mL 7.5%氯化钠肉汤, 接入 3 cfu 金黄色葡萄球菌, 至 37 °C 恒温培养箱中培养 6 h。培养后以平板倾注培养法计数, 测出菌浓。

向另一个 150 mL 锥形瓶中加入 10 mg 裸磁珠, 同时分别加入 5、10、30、50、100 mL 上述 6 h 培养后的菌液, 充分震荡后, 按 1.2.2 中的方法 37 °C 吸附

富集振荡 10 min, 测出菌浓, 计算吸附率 (因平板计数需要一定量的菌液, 以及操作中可能存在的损失, 故选取 5 mL 为最小吸附体积)。弃离心管中的上清液, 使用离心管中的裸磁珠进行 DNA 提取, 并对提取的 DNA 进行浓度和纯度检测。

1.2.5 不同吸附时间对裸磁珠吸附率影响实验

实验操作同 1.2.4, 但保持离心管中加入菌液体积 5 mL 不变, 吸附富集温度 37 °C, 仅改变吸附富集时间, 控制吸附富集的时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min 和 25 min。

1.2.6 裸磁珠饱和吸附量

按 1.2.1 方法接种培养金黄色葡萄球菌, 测出菌浓。取一定量培养液, 加入一定量裸磁珠, 充分混匀, 37 °C 振荡吸附富集 10 min, 取出后用永磁铁沉淀, 沉淀后取上清 1 mL 进行平板倾注培养并计数, 测出菌浓, 根据公式计算磁珠饱和吸附量。

1.2.7 混合菌种的吸附

为了考察裸磁珠对金黄色葡萄球菌的特异性吸附效果, 我们又分别从培养斜面接入金黄色葡萄球菌和大肠杆菌至营养肉汤, 37 °C 培养 24 h, 并测出菌浓。分别取 1 mL 上述两菌种培养液稀释至 10^2 cfu/mL, 同时将 5 mL 金黄色葡萄球稀释菌液和 5 mL 大肠杆菌稀释菌液等比例混合, 加入 10 mg 裸磁珠, 充分混匀, 37 °C 吸附富集振荡 10 min, 取出后用永磁铁沉淀, 用 3M 金黄色葡萄球菌测试片检测上清液中金黄色葡萄球菌数量, 计算吸附率, 实验平行 3 次。弃离心管中的上清液, 使用离心管中的裸磁珠进行 DNA 提取, 对提取的 DNA 进行浓度和纯度检测, 并将提取到的 DNA 用于荧光 PCR 检测。

1.2.8 最优条件下对牛肉样品中金黄色葡萄球菌吸附影响

将牛肉去筋用绞肉机打碎, 分装为 10 g 每份。向 250 mL 锥形瓶中分别加入 10 g 碎牛肉和 90 mL 7.5%氯化钠肉汤, 密封并 121 °C 灭菌 15 min。冷却至室温, 接入活化的金黄色葡萄球菌 3 cfu, 至培养箱中 37 °C 恒温培养 6 h。培养后取上清 1 mL 进行平板倾注培养计数, 测出菌浓。剩余上清过滤后取 5 mL 滤液加入 10 mg 裸磁珠, 吸附过程与 1.2.2 相同, 吸附后计算吸附率, 实验平行 3 次。吸弃离心管中的上清液, 使用离心管中的裸磁珠进行 DNA 提取及 DNA 浓度和纯度测定实验, 并将提取到的 DNA 用于荧光 PCR 检测。

1.3 检测方法

1.3.1 吸附率与吸附量的计算

吸附前菌浓记为 N, 吸附后上清液菌浓记为 n,

吸附率计算公式:

$$\text{吸附率}(\%) = (N-n) / N \times 100\%$$

$$\text{菌体被吸附量} = \text{吸附前菌浓} \times \text{吸附体积} \times \text{吸附率}$$

1.3.2 裸磁珠饱和吸附量的计算

每 mg 磁珠饱和吸附量 = 1 mL 菌液被吸附数量 × 吸附体积 / 磁珠用量 (mg)

1.3.3 混合菌种吸附率的计算

金黄色葡萄球菌吸附率 (%) = (吸附前金黄色葡萄球菌菌量 - 3M 试纸金黄色葡萄球菌计数) / 吸附前金黄色葡萄球菌菌量 × 100%

大肠杆菌吸附率 (%) = [吸附前大肠杆菌菌量 - (吸附后混合菌量 - 3M 试纸金黄色葡萄球菌计数)] / 吸附前大肠杆菌菌量 × 100%

1.3.4 DNA 浓度和纯度的测量

首先向吸附后的离心管中加入 100 μL 超纯水或浓度为 0.1 mol/L NaOH 溶液, 100 °C 煮沸 10 min。然后于高速离心机中 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液(即所需的 DNA 模板)。用核酸蛋白测定仪测定 DNA 的浓度和纯度 A_{260}/A_{280} 。

1.3.5 荧光 PCR 检测方法^[10]

PCR 反应体系: TaqDNA 聚合酶 10 μL, 上游引物 0.4 μL, 下游引物 0.4 μL, 探针 0.8 μL, DNA 2 μL, ddH₂O 6.4 μL。

PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 40 s, 进行 40 个循环。

结果判定: 当 Ct 值 ≥ 40.0, 可判断样品结果为金黄色葡萄球菌阴性, 可直接报告未检出金黄色葡萄球菌; 当 Ct 值 ≤ 35.0, 可判定该样品结果为金黄色葡萄

球菌阳性; 当 Ct 值 > 35.0, 而 < 40.0, 样品需重复检测, 结果 Ct 值 ≥ 40.0 时报告为金黄色葡萄球菌阴性, 否则为阳性。

1.3.6 统计与分析

本文中所有实验均平行三次。数据以平均值 (mean) ± 标准差 (SD) 表示。运用 IBM SPSS Statistics 22 软件统计, 对数据进行显著性差异分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 裸磁珠吸附不同菌液浓度金黄色葡萄球菌

培养后的金黄色葡萄球菌菌液浓度为 1.3×10^9 cfu/mL, 取裸磁珠 10 mg、菌液 10 mL, 37 °C 吸附富集 10 min, 进行不同菌液浓度下裸磁珠吸附率测定实验。裸磁珠吸附不同浓度金黄色葡萄球菌吸附率如表 1 所示。

表 1 结果表明, 无论是高菌液浓度 ($10^5 \sim 10^7$ cfu/mL), 还是低菌液浓度 ($10^2 \sim 10^4$ cfu/mL), 裸磁珠对金黄色葡萄球菌均有较高吸附性 (>95%) (其中吸附菌浓为 10^7 cfu/mL 的吸附率为 99.28%, 表中未给出), 与樊学军^[8]等人的结果相比, 不仅吸附率提高(其结果中吸附率为 70%~90%), 10 min 的吸附时间也远远低于其 1 h 的吸附时间。

吸附后提取磁珠上富集的菌体 DNA, 用于荧光 PCR 检测, 结果均为阳性。提取 DNA 时使用浓度为 0.1 mol/L NaOH 比使用超纯水得到的 DNA 浓度高。

表 1 裸磁珠吸附不同菌液浓度金黄色葡萄球菌吸附率结果

Table 1 Results of adsorption efficiency of bare magnetic particles for different concentrations of *Staphylococcus aureus*

菌液浓度/(cfu/mL)	吸附率/%	DNA 浓度/(ng/μL)	DNA 提取液	DNA 纯度(A_{260}/A_{280})	Ct 值
10^6	96.31±0.38	19.98±2.62	超纯水	1.81±0.06	21.41±0.32
10^5	95.59±0.87	16.76±2.04	超纯水	1.88±0.01	32.40±0.11
10^4	97.06±0.57	16.02±3.07	超纯水	1.78±0.01	33.46±0.21
10^3	99.39±0.59	721.20±5.92	NaOH	1.89±0.02	29.76±0.27
10^2	98.72±0.79	749.10±11.42	NaOH	1.81±0.05	33.49±0.28

表 2 磁珠用量对磁珠吸附性能影响

Table 2 Effect of the quantity of beads on adsorption efficiency

磁珠用量/mg	吸附前菌液浓度/(cfu/mL)	吸附率/%	金黄色葡萄球菌被吸附量/cfu
5.0	1.9×10^5	90.72±1.40 ^b	$8.6 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$
7.5		86.08±2.76 ^c	$8.2 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^4$
10.0		95.23±2.41 ^a	$9.0 \times 10^5 \pm 4.6 \times 10^4$
12.5		95.23±2.03 ^a	$9.0 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^4$
15.0		97.94±1.42 ^a	$9.3 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$

注: 不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 以下各表中含义相同。

2.2 不同磁珠用量对裸磁珠吸附性能的影响

培养后的金黄色葡萄球菌菌液浓度为 1.9×10^5 cfu/mL, 取菌液 5 mL, 37 °C 吸附富集 10 min, 进行不同裸磁珠用量下吸附率测定实验。不同磁珠用量下磁珠对菌液吸附率如表 2 所示。

表 2 结果表明, 裸磁珠加入量会对吸附效率产生显著影响。当加入量在 5.0~10.0 mg 范围时, 菌体的吸附率有显著差异。磁珠用量在 10 mg 以上时对吸附率无显著 ($p>0.05$) 影响。已有报道表明, 一方面随着裸磁珠用量的增加, 细菌表面吸附的磁珠变多, 强磁场分离时会损伤部分细菌, 导致吸附率的下降^[11]; 另一方面过多的裸磁珠可能会导致对金黄色葡萄球菌吸附时间的延长^[9]。因此选择裸磁珠用量 10 mg 为适宜。与李倩倩报道^[12]的结果相比, 减少了磁珠用量, 节约了成本, 且达到有效的富集。

2.3 不同吸附体积对裸磁珠吸附性能的影响

接种 3 cfu 金黄色葡萄球菌于 150 mL 培养基 37 °C 恒温培养 6 h, 培养后浓度为 207 cfu/mL, 进行裸磁珠吸附实验。磁珠用量为 10 mg, 37 °C 吸附富集 10 min, 进行不同菌液体积下吸附率检测实验。不同

吸附菌液体积下裸磁珠对菌液吸附率及磁珠上菌液提取到的 DNA 浓度与纯度如表 3 所示。

表 3 结果表明, 在起始金黄色葡萄球菌浓度为 207 cfu/mL 时, 随着吸附菌液体积从 5 mL 增加至 100 mL, 磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附率不断下降但均大于 90%, 菌液体积 5~30 mL 时吸附率下降不显著 ($p>0.05$); 而当菌液体积超过 30 mL 时, 菌体吸附率无显著差异 ($p<0.05$)。分析原因可能是菌液体积的增大使得金黄色葡萄球菌菌量增多, 而体积小利于菌体与磁珠更加充分地接触。Hao 等^[13]研究也说明了这一现象, 文献中用 5 mg 的裸磁珠吸附 1 mL 浓度为 104 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌, 吸附率为 99.9%。提取到的 DNA 浓度随着吸附体积的增大, 菌体量的增多而增大。分析表 3 表明, 裸磁珠吸附 5 mL 金黄色葡萄球菌菌液浓度为 10^2 cfu/mL 的菌液提取到的 DNA 浓度和纯度已满足荧光 PCR 的检测要求。采用本实验条件进行富集过程中, 由于采用金黄色葡萄球菌发酵液, 未进行离心洗涤菌体, 因此在吸附富集的过程中, 菌体仍在继续生长, 因此所获得的菌体量大于其实菌体数量。这与实际使用方法一致, 也可以缩短菌体富集培养时间, 利于快检实施。

表 3 吸附体积对磁珠吸附率影响

Table 3 Effect of volume on adsorption efficiency

菌液体积/mL	菌液浓度/(cfu/mL)	不同吸附体积下 磁珠吸附量/cfu	吸附率/%	DNA 纯度 (A_{260}/A_{280})	DNA 浓度/(ng/ μ L)
5	207	1011±8	97.69±0.80 ^a	1.73±0.02	806.5±15.3
10		2000±38	96.62±1.82 ^a	1.75±0.03	1552.2±54.8
30		5998±32	96.58±0.52 ^a	1.77±0.01	4339.2±148.6
50		9682±49	93.55±0.47 ^b	1.72±0.02	7476.7±119.0
100		19315±76	93.31±0.37 ^b	1.74±0.02	12383.3±945.3

表 4 吸附富集时间对裸磁珠吸附性能影响

Table 4 Effect of reaction time on adsorption efficiency

吸附富集时间/min	培养 6h 后 菌液浓度/(cfu/mL)	磁珠吸附菌量/cfu	吸附率/%	DNA 纯度	DNA 浓度/(ng/ μ L)
5	207	980±7	94.69±0.68 ^d	1.68±0.02	644.08±38.47
10		1000±9	96.62±0.91 ^c	1.70±0.04	795.84±30.14
15		1010±14	97.58±1.36 ^{bc}	1.67±0.03	855.74±40.90
20		1020±5	98.55±0.47 ^b	1.67±0.06	775.92±58.21
25		1030±5	99.52±0.52 ^{ab}	1.60±0.04	825.84±13.00

2.4 不同吸附时间对裸磁珠吸附性能的影响

菌液培养 6 h 后金黄色葡萄球菌浓度为 207 cfu/mL, 裸磁珠 10 mg, 菌液 5 mL, 37 °C 吸附富集, 进行不同吸附时间下的吸附率检测实验。不同吸附时

间下磁珠对菌液吸附率及磁珠上菌液提取到的 DNA 浓度与纯度如表 4 所示。

表 4 结果表明, 磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附率: 随着吸附富集时间从 5 min 增加至 25 min, 吸附率逐渐从 94.69% 增加到 99.52%; 吸附时间为 10 min 时,

吸附率已经达到 95%以上,与文献报道^[8]的 20~40 min 相比更短,有效缩短了菌体吸附富集时间;吸附大于 10 min 后吸附率无显著变化 ($p>0.05$)。分析表 4 提取的 DNA 浓度及纯度,吸附所获得金黄色葡萄球菌菌体提取到的 DNA 浓度与纯度已满足荧光 PCR 的检测要求,结合吸附率,10 min 较高为 96.62%。综合分析,为达到吸附富集及检测的需要,选择适合的吸附富集时间为 10 min。

2.5 裸磁珠饱和吸附量

选择金黄色葡萄球菌菌液浓度为 10^9 cfu/mL,吸附时间 10 min, 37 °C 吸附富集,裸磁珠对金黄色葡萄球菌的饱和吸附量结果见表 5。

表 5 结果表明,相同裸磁珠用量,随着金黄色葡萄球菌菌液体积的增大,吸附率显著下降;相同吸附体积下,随着磁珠量的增加,吸附率逐渐上升。根据方

法计算得到每 mg 磁珠饱和对金黄色葡萄球菌的吸附量约 6×10^8 cfu。根据梁光明等^[14]研究报道,金黄色葡萄球菌免疫磁珠的饱和吸附量为 10^6 cfu/mL。说明裸磁珠可以吸附富集更多的菌体,因此更利于菌体的富集收集,用于食品安全快速检测。

2.6 两种混合菌种的吸附结果

大肠杆菌是食品中常见污染菌种,通过比较其与金黄色葡萄球菌混合后对裸磁珠菌体富集影响,对实际应用具有重要意义。选择起始金黄色葡萄球菌浓度为 72 cfu/mL、大肠杆菌浓度为 75 cfu/mL,吸附菌液体积为 10 mL (5 mL 金黄色葡萄球菌与 5 mL 大肠杆菌等比例混合),裸磁珠用量 10 mg, 37 °C 吸附富集 10 min,进行混合菌液吸附率实验。两种菌吸附率如表 6 所示。

表 5 裸磁珠饱和吸附量

Table 5 The maximum adsorption capacity of beads

菌液体积/mL	磁珠用量/mg	吸附率/%	裸磁珠吸附菌量/cfu	裸磁珠吸附菌量/(cfu/mg)
10	10	81.99±1.29 ^a	$5.8 \times 10^9 \pm 1.0 \times 10^8$	5.8×10^8
30	10	29.73±1.68 ^d	$6.3 \times 10^9 \pm 3.6 \times 10^8$	6.3×10^8
50	10	17.73±1.41 ^e	$6.3 \times 10^9 \pm 5.0 \times 10^8$	6.3×10^8
50	20	34.68±3.64 ^c	$12.3 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$	6.1×10^8
50	30	51.27±1.94 ^b	$18.2 \times 10^9 \pm 6.9 \times 10^8$	6.1×10^8

表 6 裸磁珠在混合菌液中的吸附菌体后指标结果

Table 6 Results of the adsorption of beads in mixed bacteria

3M 试纸金黄色葡萄球菌计数/(cfu/mL)	吸附后混合菌液浓度/(cfu/mL)	金黄色葡萄球菌吸附率/%	大肠杆菌吸附率/%	DNA 纯度/(A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	DNA 浓度/(ng/μL)	Ct 值
4±1	14±1	88.89	73.33	1.87±0.06	1011.80±23.85	33.35±0.50
5±1	17±2	86.11	68.00	1.89±0.03	1007.08±28.88	33.57±0.32
5±0	16±2	86.11	70.67	1.81±0.02	899.32±64.25	33.07±0.14

表 7 优化条件下裸磁珠对牛肉样品中金黄色葡萄球菌吸附结果

Table 7 Adsorption efficiency of beads for *Staphylococcus aureus* in beef broth by optimal method

序号	吸附前菌量/cfu	吸附后菌量/cfu	吸附率/%	裸磁珠吸附菌量/cfu	DNA 浓度/(ng/μL)	DNA 纯度/(A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Ct 值
1	275±14	35±7	87.27	240	819.20±13.82	1.98±0.08	33.58±0.32
2	405±17	81±3	80.00	324	852.84±35.14	1.93±0.03	33.08±0.11
3	620±26	96±14	84.52	524	911.68±24.02	1.92±0.02	33.40±0.40

分析表 6 结果表明,金黄色葡萄球菌与大肠杆菌等比例混合菌液吸附率小于单一菌种吸附率,表明大肠杆菌会干扰裸磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附。金黄色葡萄球菌吸附率高于大肠杆菌,前者为 86%左右,后者为 70%左右,说明裸磁珠对细菌的吸附没有选择性,但对金黄色葡萄球菌吸附占优势。将吸附富集后的菌体提取 DNA,再采用荧光 PCR 检测,金黄色葡

萄球菌结果均为阳性,可以表明裸磁珠吸附金黄色葡萄球菌与大肠杆菌的混合菌体,一定程度上减少了对金黄色葡萄球菌吸附率,但仍未超过磁珠的饱和吸附量,因此仍然可以有效的吸附富集金黄色葡萄球菌,提取的金黄色葡萄球菌 DNA 可用于荧光 PCR 检测。说明模拟实际的食物中常污染的大肠杆菌,裸磁珠对金黄色葡萄球菌吸附富集率仍然可以满足食品安全快

速检测的需要。

2.7 最优条件下对牛肉样品中金黄色葡萄球菌

菌吸附影响

选择碎牛肉样品进行金黄色葡萄球菌菌液制备。90 mL 菌液中加入 10 g 碎牛肉,磁珠用量 10 mg, 37 °C 吸附富集 10 min, 进行实际牛肉样品中的吸附率实验。裸磁珠对牛肉样品中金黄色葡萄球菌吸附率及裸磁珠吸附菌体的 DNA 浓度与纯度, 如表 7 所示。

表 7 结果表明, 牛肉培养液中加入金黄色葡萄球菌菌液 ≤ 10 cfu/mL, 37 °C 恒温培养 6 h 后, 金黄色葡萄球菌可以生长至 10^2 cfu/mL 浓度。培养 6 h 后的菌液中加入 10 mg 裸磁珠, 37 °C 吸附富集 10 min, 裸磁珠吸附牛肉样品中菌液提取到的 DNA 浓度和纯度已满足荧光 PCR 的检测要求, 金黄色葡萄球菌荧光 PCR 法结果均为阳性。

加入牛肉后, 裸磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附率降至 80%~87.27%, 与表 4、6 结果相比, 金黄色葡萄球菌的吸附率降低, 但不影响金黄色葡萄球菌的 DNA 提取及荧光 PCR 检测。与文献报道现象一致^[15], 样品成分^[16] (如油脂等) 或食品自身条件 (如 pH) 对裸磁珠吸附性可能存在影响。

3 结论

本文探究了裸磁珠对不同浓度下金黄色葡萄球菌(未存在食品样品)的吸附效果, 吸附率均大于 95%, 裸磁珠对金黄色葡萄球菌的最大吸附量约为 6×10^8 cfu/mg。并研究了裸磁珠对大肠杆菌与中金黄色葡萄球菌混合菌的吸附效果, 表明其对金黄色葡萄球菌的吸附富集率大于大肠杆菌的吸附率, 虽然吸附率相较于单一金黄色葡萄球菌菌液的吸附有所降低, 但吸附的金黄色葡萄球菌菌量仍能满足荧光 PCR 检测的要求。同时优化了裸磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附富集条件, 即以 10 mg 裸磁珠用量, 对浓度为 10^2 cfu/mL 的 5 mL 金黄色葡萄球菌菌液进行吸附富集, 吸附富集时间 10 min, 吸附率 $>95\%$, 吸附后提取的 DNA 可以满足荧光 PCR 检测要求, 缩短了该致病菌检测时间。对含有牛肉样品的金黄色葡萄球菌菌液也可以有效吸附富集, 满足荧光 PCR 检测方法的要求。

参考文献

[1] Mcdermott A B, Spiegel H M, Irsch J, et al. A simple and rapid magnetic bead separation technique for the isolation of tetramer-positive virus-specific CD8 T cells [J]. AIDS, 2001,

15(6): 810-812

- [2] Kojima T, Takei Y, Ohtsuka M, et al. PCR amplification from single DNA molecules on magnetic beads in emulsion: Application for high-throughput screening of transcription factor targets [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: e150
- [3] Michael B Murphy, Shirin T Fuller, Paul M Richardson, et al. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31, e110
- [4] Kalamasz Dale, Long S A, Taniguchi R, et al. Optimization of human T-cell expansion *ex vivo* using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies [J]. Journal of Immunotherapy. 2004, 27(5): 405-418
- [5] 孙祖越, 卢惠纯. 硬磁铁粉用于检测污染水体中沙门菌含量 [J]. 中华预防医学杂志, 1998, 32(3): 180-182
- SUN Zu-yue, LU Hui-chun. Detection of *Salmonella* in polluted water by magnetic powder [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 1998, 32(3): 180-182
- [6] 王新为, 李君文, 晁福寰, 等. 免疫磁性粒子的制备及性能初步观察 [J]. 解放军预防医学杂志, 2000, 18(3): 185-187
- WANG Xin-wei, LI Jun-wen, CAO Fu-huan, et al. Preparation of immune magnetic beads and preliminary observation on its performance [J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2000, 18(3): 185-187
- [7] 邱晋, 樊学军, 沈圣, 等. 自制裸磁珠对常见食源性致病菌吸附性能的研究 [J]. 现代预防医学, 2006, 33(1): 4-5, 11
- QIU Jin, FAN Xue-jun, SHEN Sheng, et al. Study on the adsorption capacity of lab made magnetic particles to the common food-borne pathogenic bacteria [J]. Modern Preventive Medicine, 2006, 33(1): 4-5, 11
- [8] 樊学军, 陈恒, 孙敏, 等. 裸磁珠对高菌量细菌吸附性能的初步研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(12): 1429-1431
- FAN Xue-jun, CHEN Heng, SUN Min, et al. A study on adsorption efficiency of lab made magnetic beads for large amounts of bacteria [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(12): 1429-1431
- [9] 杨柳, 苏明权, 岳乔红, 等. 裸磁粒子对常见食源菌吸附效果的实验研究 [J]. 实用预防医学, 2009, 16(5): 1381-1383
- YANG Liu, SU Ming-quan, YUE Qiao-hong, et al. Study on adsorption effect of bare magnetic particles on common food-borne pathogenic bacteria [J]. Practical Preventive Medicine, 2009, 16(5): 1381-1383
- [10] SN/T1870-2016, 出口食品中食源性致病菌检测方法实时荧光 PCR 法 [S]
- SN/T1870-2016, Method for detection of pathogens in food

- for export Real-time PCR method [S]
- [11] 王程程,赵玲,李敏通,等.基于免疫磁珠快速分离金黄色葡萄球菌的研究[J].食品工业科技,2013,34(9):175-178
WANG Cheng-cheng, ZHAO Ling, LI Ming-tong, et al. Research of rapid separation of *Staphylococcus aureus* based on immunomagnetic beads [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(9): 175-178
- [12] 李倩倩,陈萍,任常菲.用于富集食源性致病菌的裸磁珠的制备及吸附条件优化[J].农产食品科技,2011,5(3):20-23
LI Qian-qian, CHEN Ping, REN Chang-fei. Preparation of the bare magnetic beads used in enrichment of food-borne pathogenic bacteria and optimization of the adsorption conditions [J]. Agriculture Food Products Science and Technology, 2011, 5(3): 20-23
- [13] Zuo H, Xie Z, Ding X, et al. A novel magnetic capture-multiplex PCR assay for the simultaneous detection of three foodborne pathogens [J]. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2011, 3(4): 212-220
- [14] 梁光明,刘阳,孙力军,等.利用人免疫球蛋白构建免疫磁珠富集金葡菌条件优化[J].食品与生物技术学报,2013,32(3):265-271
LIANG Guang-ming, LIU Yang, SUN Li-jun, et al. Condition optimization of building immunomagnetic bead using human immunoglobulin G for enrichment *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 32(3): 265-271
- [15] 章建辉.免疫磁珠快速检测金黄色葡萄球菌方法的研究[D].长沙:湖南师范大学,2013
ZHANG Jian-hui. The Study on the methods of immuno-magnetic separation rapid detection of *Staphylococcus aureus* [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2013
- [16] 邱晋.食品中常见病原菌快速检测系统的研究-自制裸磁珠吸菌性能研究和实时荧光 PCR 检测副溶血性弧菌方法的建立[D].四川:四川大学,2007
QIU Jin. The rapid detection system for the common foodborne pathogenic bacteria-study on the adsorption capacity of lab made magnetic beads and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using TaqMan real-time PCR [D]. Sichuan: Sichuan University, 2007