

基于 Au-Fe₃O₄ 纳米颗粒的磁弛豫免疫传感器 快速检测食源性单核细胞增生李斯特菌

董永贞, 陈翊平*

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 食源性单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌)引发的食品安全问题日益严重, 寻求快速灵敏的检测方法对保障人体健康、减少经济损失具有重要意义。该研究研发了一种过氧化氢(H₂O₂)介导的 Au-Fe₃O₄ 磁探针组装策略, 并基于此, 构建了一种用于单增李斯特菌快速检测的磁弛豫免疫传感方法。H₂O₂ 能够将银离子还原为银单质, 而银单质沉积到 Au 部分的表面, 进而将分散的 Au-Fe₃O₄ 磁探针组装为聚集状态, 从而引起横向弛豫时间(T₂)的变化。结合免疫反应, 单增李斯特菌浓度决定辣根过氧化物酶(HRP)-抗体的含量, 而 HRP 能够调控 H₂O₂ 浓度, 进而调控 Au-Fe₃O₄ 磁探针组装程度, 引起 T₂ 信号的改变, 从而实现单增李斯特菌的定量检测。本方法检测单增李斯特菌的灵敏度为 50 CFU/mL, 线性范围为 10² CFU/mL~10⁶ CFU/mL, 回收率为 79.4%~105.9%, 在火腿中单增李斯特菌的检测中与荧光定量 PCR 方法一致性良好。该研究所构建的 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器具有灵敏度高、稳定性好、方法简单、特异性强的优点, 对食源性致病菌的快速检测提供了有力的工具。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 磁弛豫免疫传感器; Au-Fe₃O₄ 磁探针; 过氧化氢; 横向弛豫时间; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2022)01-21-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1311

Au-Fe₃O₄-mediated Magnetic Relaxation Switching Immunosensor for the Rapid Detection of Foodborne *Listeria monocytogenes*

DONG Yongzhen, CHEN Yiping*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: With the food safety problems caused by foodborne *Listeria monocytogenes* becoming increasingly widespread and severe, the development of rapid and sensitive methods for detecting the pathogen will have great significance in ensuring the protection of human health and reducing economic losses. Here, we describe the development of a hydrogen peroxide-mediated Au-Fe₃O₄ magnetic nanoprobe assembly strategy to construct a magnetic relaxation switching (MRS) immunosensor for the rapid detection of foodborne *L. monocytogenes*. Hydrogen peroxide reduces the silver ions to elemental silver atoms, which then deposit on the surface of the gold atoms in the probe. This causes the assembly of the dispersed Au-Fe₃O₄ probes into an aggregated state, leading to a change in the transverse relaxation time (T₂). During the immunoreaction, the content of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody is determined using the concentration of *L. monocytogenes*. Consequently, the HRP content regulates the hydrogen peroxide concentration, which in turn regulates the degree of Au-Fe₃O₄ probe assembly. Thus, the resultant change in the T₂ signal based on the degree of nanoprobe assembly enables the quantitative detection of *L. monocytogenes*. This method achieved a sensitivity of 50 CFU/mL, a linear range of 10²~10⁶ CFU/mL, and a recovery rate range of 79.4%~105.9% in the detection of *L. monocytogenes*. When used to quantify the pathogen in ham, the nanoprobe assay returned results that were highly consistent

引文格式:

董永贞,陈翊平.基于 Au-Fe₃O₄ 纳米颗粒的磁弛豫免疫传感器快速检测食源性单核细胞增生李斯特菌[J].现代食品科技,2022,38(1): 21-28

DONG Yongzhen, CHEN Yiping. Au-Fe₃O₄-mediated magnetic relaxation switching immunosensor for the rapid detection of foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 21-28

收稿日期: 2021-11-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605502); 岭南现代农业实验室自主科研项目(NZ2021036)

作者简介: 董永贞(1993-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食品安全快速检测, Email: dongyongzhen@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 陈翊平(1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全快速检测, Email: chenyingping@mail.hzau.edu.cn

with those obtained using quantitative PCR. Given its high sensitivity and specificity, good stability, and ease of use, this Ag@Au-Fe₃O₄-MRS immunosensor should be a powerful tool for the rapid detection of foodborne pathogens.

Key words: *Listeria monocytogenes*; magnetic relaxation switching immunosensor; Au-Fe₃O₄ magnetic nanoprobe; hydrogen peroxide; transverse relaxation time; rapid detection

食源性致病菌引发的食源性疾病是国际公共卫生领域最受关注的食品安全问题之一。目前,常见的食源性致病菌主要包括单核细胞增生李斯特菌(简称单增李斯特菌, *Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等。其中,单增李斯特菌因其环境适应能力强、危害严重、分布广泛等特性被列为重点检测对象。单增李斯特菌是一种嗜冷的人畜共患病原菌,能够在低温下长时间存活,易在食品加工生产链中传播,且难以被灭杀^[1-3]。人体感染后会引发流感样疾病、脑膜炎、败血症等,严重时危及生命,致死率高达20%~30%^[4-7]。单增李斯特菌引发的食品安全事件也屡见不鲜。因此,对单增李斯特菌进行有效的监控是保障人体健康、降低经济损失、提升社会效益的重要手段。

目前针对单增李斯特菌的常规检测方法主要包括以下三类^[8-10]:(1)培养鉴定法;(2)免疫分析法,如酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析法等^[11];(3)基于聚合酶链式反应(PCR)的分子生物学方法,如荧光定量PCR方法、微滴数字PCR方法、多重PCR方法等^[12-13]。虽然已有多种用于单增李斯特菌定量定性的检测方法,但以上方法在一定程度上存在增菌时间长、样品前处理复杂、成本高等问题,难以满足高流行性的单增李斯特菌现场、快速检测的需求。

生物传感器是一类近年来发展迅速、性能优异的快速检测方法。生物传感器以生物分子(如抗体、核酸等)作为识别元件,通过信号转换器将识别信息转换为便于检测的光、电、磁等信号,从而实现目标物的快速分析^[14]。目前,已有大量报道将生物传感器用于单增李斯特菌的快速检测^[15-18]。不同于光、电信号,磁信号在食品基质中背景低,在检测过程中具有更高的信噪比。而基于磁信号的磁弛豫免疫传感器也逐渐步入广大研究者的视野。传统的磁弛豫(magnetic relaxation switching, MRS)免疫传感器是以偶联有致病菌单克隆捕获抗体和识别抗体的超顺磁纳米颗粒为磁信号探针,通过免疫反应诱导磁探针聚集,引起磁信号增强,从而实现目标致病菌快速检测的均相免疫分析方法^[19]。虽然传统磁弛豫免疫传感器具有样品前处理简单、信噪比高等优点,但传统的磁弛豫免疫传感器线性范围较窄,灵敏度不足,易受基质干扰而引起非特异性聚集,无法实现食源性致病菌的灵敏准确

分析^[20,21]。开发高性能的磁探针和探索有效的信号转化机制是解决这一问题的有效途径。

本研究设计并合成了一种双球状的 Au-Fe₃O₄ 二聚体纳米颗粒,并以其为磁信号探针,开发了一种过氧化氢介导的 Ag@Au-Fe₃O₄ 磁探针组装信号传感策略。在此基础上,构建了新型的 MRS 免疫生物传感器,用于食品中单增李斯特菌的快速、高灵敏检测,以期对食源性致病菌的快速检测提供有力的工具。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

本研究中涉及的单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19115,单核细胞增生李斯特菌 CMCC 54002、威尔斯李斯特菌 ATCC 35897、绵羊李斯特菌 ATCC 19119、副溶血弧菌 ATCC 17802、肠炎沙门氏菌 ATCC 14028、大肠杆菌 ATCC 25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213,均在本实验保存。

羧基修饰的磁性纳米颗粒(MNP₁₈₀) (直径为180 nm; 10 mg/mL), Thermo Fisher Scientific 公司。单增李斯特菌抗体,美国 GeneTex 公司。牛血清白蛋白(BSA), 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯(NHS),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤(TSB)和胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA),青岛海博生物技术有限公司。其他普通的试剂均为化学分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

便携式磁分离架,美国 Ocean NanoTech 公司;低场核磁共振仪(Low field nuclear magnetic resonance spectrometer, LF-NMR),纽迈分析仪器股份有限公司(中国上海);旋转混匀仪,大龙兴创实验仪器股份有限公司;MS-3 涡流旋转振荡器,德国 IKA 公司;电热恒温培养箱,天津市泰斯特股份有限公司。

1.3 菌株活化和菌液制备

将冻存的单增李斯特菌菌种在常温下解冻,并通过平板划线法,在 TSA 培养基上对其进行活化(37 °C 下恒温培养 18 h)。然后,选取单个典型菌落接种于

TSB 液体培养基中, 在 37 °C 下恒温震荡 (转速为 180 r/min) 培养 24 h。吸取培养后的菌液 1 mL 于 1.5 mL 无菌离心管中, 10000 r/min 离心 3 min, 除去上清, 用 0.9% 生理盐水洗涤 2 次并重悬, 通过平板计数法确定菌数, 得到浓度为 10^8 CFU/mL 的菌液备用。

1.4 $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$ 溶液的配制

将 200 μL 氨水 (15 mol/L) 加入到 6 mL AgNO_3 (0.1 mol/L) 中, 并混合均匀。然后加入 3 mL KOH (0.8 mol/L) 溶液, 并继续缓慢加入 190 μL 氨水 (15 mol/L)。最后加入 25 mL 去离子水得到 $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$ 溶液, 保存在 4 °C 备用。

1.5 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁探针的合成

本实验首先参考曾景斌等人^[22]的方法合成了 Fe_3O_4 纳米磁颗粒。在此基础上, 将 1.25 mL HAuCl_4 (10 mmol/L), 5 mg 柠檬酸三钠, 0.5 mL Fe_3O_4 纳米磁颗粒加入到沸腾去离子水中, 并保持 30 min。离心洗涤后, 得到 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁探针。

1.6 $\text{MNP}_{180}\text{-Ab}_1$ 的制备

在 1 mg MNP_{180} 溶液中加入 50 μL EDC (10 mg/mL) 和 25 μL NHS (10 mg/mL), 在室温下缓慢震荡反应 15 min。磁分离并除去上清液后, 用 PBS 缓冲液重悬, 并加入 40 μg 单增李斯特菌的捕获抗体 (Ab_1), 在室温下缓慢震荡反应 2 h。磁分离并除去上清液后, 加入 500 μL 含 3% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液, 在室温下封闭 1 h。封闭结束后用 PBST (含 0.05% 吐温 20 的 PBS) 缓冲液洗涤 3 次并重悬, 得到的 $\text{MNP}_{180}\text{-Ab}_1$ 的保存于 4 °C 备用。

1.7 $\text{Ag@Au-Fe}_3\text{O}_4\text{-MRS}$ 免疫传感器的构建并

用于单增李斯特菌的定量分析

在 100 μL $\text{MNP}_{180}\text{-Ab}_1$ 中分别加入 100 μL 单增李斯特菌菌液 ($50 \text{ CFU/mL} \sim 10^7 \text{ CFU/mL}$), 置于 37 °C 下反应 1 h。反应完成后, 磁分离用 PBST 洗三次, 分别加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的单增李斯特菌检测抗体 (HRP-Ab_2 , 5 $\mu\text{g/mL}$), 37 °C 反应 1 h。磁分离用 PBST 洗三次, 去离子水洗一次, 分别加入 50 μL H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/L}$), 在 37 °C 下反应 15 min。反应完成后, 取 20 μL 上清液加入 200 μL $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$ 溶液 (4.8 mmol/L) 和 100 μL $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$ 溶液 (稀释 100 倍) 混合液中, 在室温下反应 10 min。反应完成后, 将反应液进行横向弛豫时间 (T_2) 的测定。

1.8 实际样品检测

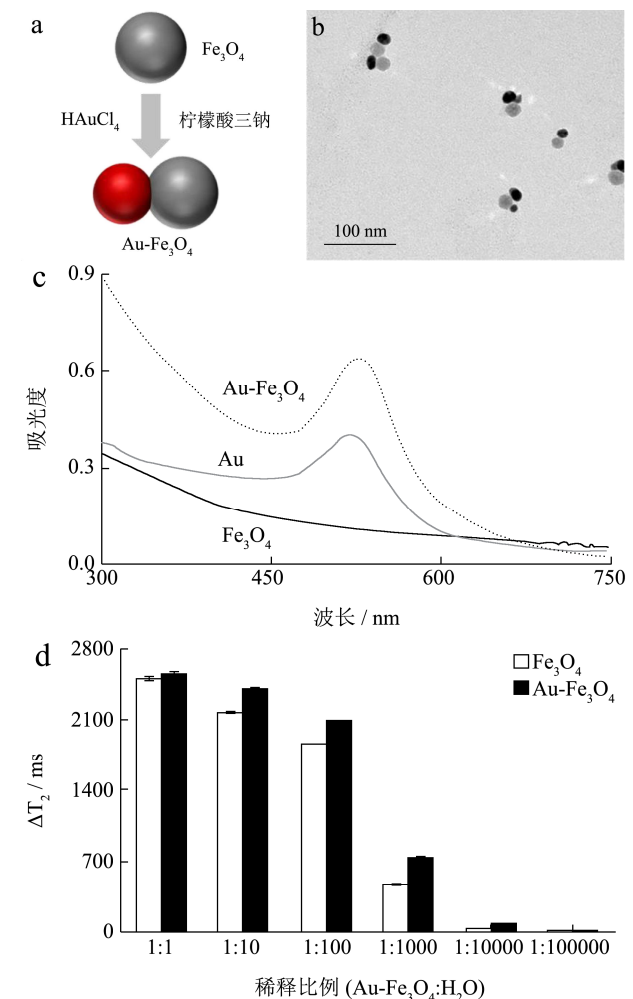
取 10 g 火腿样品切碎后与 90 mL 无菌生理盐水 (0.9% NaCl) 混合, 然后以中速均质 15 min。在 900 μL 匀浆中加入不同浓度的单增李斯特菌, 振荡混匀, 使其终浓度分别达到 10^2 、 10^4 、 10^6 CFU/g。配制的加标样品以 500 r/min 低速离心 30 s, 以去除大颗粒食品颗粒, 并对上清液通过本方法进行分析。此外, 在本地超市中购买 15 个火腿盲样, 取 10 g 火腿样品切碎后与 90 mL 无菌生理盐水 (0.9% NaCl) 混合。均质 15 min 后, 在 37 °C 下震荡培养 6 h。增菌后, 低速离心得到上清液, 通过所构建的 $\text{Ag@Au-Fe}_3\text{O}_4\text{-MRS}$ 传感器对其进行检测。每个样品设置三个平行。

1.9 数据处理

数据采用 Microsoft Excel、Origin 软件进行分析处理。

2 结果与讨论

2.1 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4$ 纳米磁探针的表征



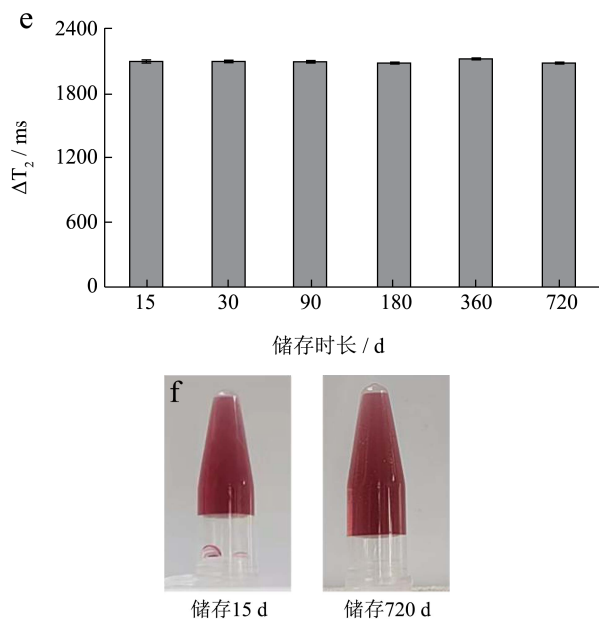


图1 Au-Fe₃O₄纳米磁探针的表征

Fig.1 Characterization of Au-Fe₃O₄ magnetic nanoprobes

本研究首先合成了 Au-Fe₃O₄ 纳米磁颗粒(图 1a), 并通过透射电子显微镜 (TEM) 对其进行了微观表征。如图 1b 所示, 所合成的 Au-Fe₃O₄ 纳米磁颗粒为双球体结构, 其中黑色球体为 Au 纳米颗粒, 经计算, 其粒径约为 15 nm, 灰色球体为 Fe₃O₄ 纳米磁颗粒, 其粒径约为 20 nm。整个 Au-Fe₃O₄ 纳米磁颗粒的粒径约为 35 nm。本研究也利用紫外分光光度计对其进行了表征(图 1c), 与 Fe₃O₄ 纳米磁颗粒相比, Au-Fe₃O₄ 纳米磁探针在 520 nm 附近出现显著的吸收峰, 与单纯的 Au 纳米颗粒吸收峰相同。本研究进一步对其磁响应性能进行了测定。实验结果发现, Au-Fe₃O₄ 纳米磁探针相比 Fe₃O₄ 颗粒具有更好的横向弛豫效率(图 1d)。同时也研究了 Au-Fe₃O₄ 纳米磁颗粒的储存稳定性, 在 4 °C 储存 720 d 内, 其磁信号无显著变化(图 1e), 且其颜色无显著变化(图 1f), 证明所合成的 Au-Fe₃O₄ 纳米磁探针具有良好的稳定性。综上, 本研究成功合成出了磁响应性能优异的 Au-Fe₃O₄ 纳米磁探针。

2.2 Ag@Au-Fe₃O₄ 信号读出系统性能评价

本研究通过 H₂O₂ 引起 Au-Fe₃O₄ 磁探针状态变化来构建 MRS 信号读出系统(图 2a)。当 H₂O₂ 存在时, 体系中的银离子 (Ag⁺) 能够被还原为 Ag 单质, 沉积在 Au-Fe₃O₄ 纳米颗粒中 Au 部分的表面, 形成 Ag@Au-Fe₃O₄ 纳米颗粒, 而在银单质充足的情况下, 所形成的 Ag@Au-Fe₃O₄ 纳米颗粒能够进一步组装为 Fe₃O₄-Au@Ag@Au-Fe₃O₄ 聚集体, 从而实现 Au-Fe₃O₄ 磁探针从单分散状态变为聚集状态, 引起 T₂ 信号的增

强。H₂O₂ 含量的不同, 所引起的聚集状态的变化程度不同, 产生的 T₂ 信号的变化值 (ΔT₂) 也不同, 从而实现 H₂O₂ 的定量分析。

本研究对 Ag@Au-Fe₃O₄ 磁颗粒所形成的聚集体进行了表征。TEM 结果显示, 经组装后, Au-Fe₃O₄ 磁探针由图 1b 中的分散状态变为图 2b 的聚集状态。同时, 本研究通过 UV-vis 对 Au-Fe₃O₄ 磁探针聚集前后的紫外吸收进行了测定(图 2c)。结果显示, 聚集后体系的紫外吸收峰的位置由原来的 520 nm (红色线) 偏移到了 480 nm (蓝色线), 这是由于 Ag 壳的包覆使 Au 纳米颗粒被掩盖, 从而产生了蓝移。

基于上述验证结果, 本研究进一步对 Ag@Au-Fe₃O₄ 信号读出系统的性能进行了评价。如图 2d 所示, 随着 HRP 浓度的增加, 剩余 H₂O₂ 浓度降低, ΔT₂ 值逐渐减小 (ΔT₂ 值=T₂ (H₂O) -T₂ (H₂O₂))。这表明该信号读出系统对 HRP 具有良好的响应, 可用于 MRS 生物传感器的开发。

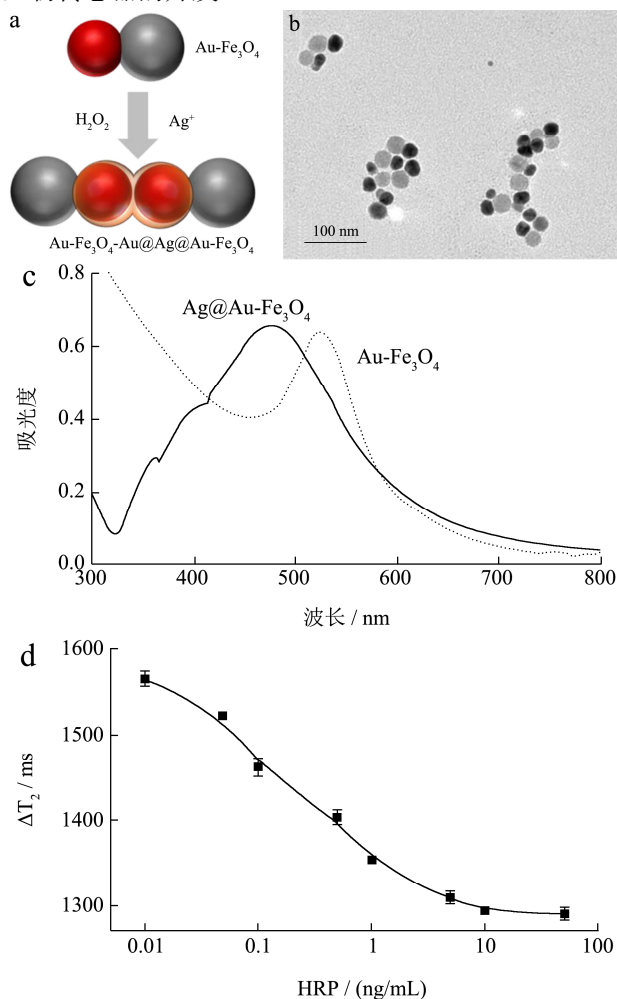


图2 Ag@Au-Fe₃O₄信号读出系统的验证与性能评价

Fig.2 Verification and performance evaluation of Ag@Au-Fe₃O₄-mediated signal readout system

2.3 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器检测单增李斯特菌的性能评价

李斯特菌的性能评价

在上述 Ag@Au-Fe₃O₄ 磁信号读出系统可行且具有良好响应性的基础上, 本研究结合免疫分析方法, 构建了 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器 (图 3a)。当单增李斯特菌存在时, MNP₁₈₀-Ab₁ 能够对其进行捕获, 进而结合 HRP-Ab₂, 形成带有 HRP 的“双抗夹心”免疫复合物。HRP 的量与单增李斯特菌浓度正相关。HRP 能够催化 H₂O₂ 降解, 而剩余的 H₂O₂ 能够被 Ag@Au-Fe₃O₄ 信号读出系统定量分析, 从而实现单增李斯特菌的检测。

2.3.1 灵敏度实验

本研究研究了 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器检测单增李斯特菌的灵敏度。实验结果显示, 随着单增李斯特菌浓度的增大, ΔT₂ 值逐渐增大。经计算, 本 MRS 传感器检测单增李斯特菌的检测限为 50

CFU/mL (图 3a), 线性范围为 10² CFU/mL~10⁶ CFU/mL (线性方程: Y=39.38X+1315.18, R²=0.99) (图 3b)。

本研究对不同单增李斯特菌的检测方法进行了对比 (表 1)。与现有的基于酶联免疫吸附法 (ELISA) 和聚合酶链式反应 (PCR) 的方法相比, 本 MRS 传感器在灵敏、线性范围、简便性、检测成本等方面均具有较好的优势, 在致病菌检测方面有良好的应用前景。

本研究中 MRS 免疫传感器的高灵敏度主要归因于三方面的因素: (1) HRP-H₂O₂ 介导的信号转化系统既具有酶促反应的高效性, 同时信号转化降低了基质干扰, 避免了因基质引起的非特异性聚集, 有助于传感器灵敏度的提高; (2) H₂O₂ 介导的 Ag@Au-Fe₃O₄ 信号读出系统是一种高效的组装及信号产生策略, 能够解决传统 MRS 传感器聚集效率低的难题, 有利于提高灵敏度; (3) 所合成的 Au-Fe₃O₄ 磁探针具有更强的磁弛豫效率, 为灵敏度的提高提供有利的基础。

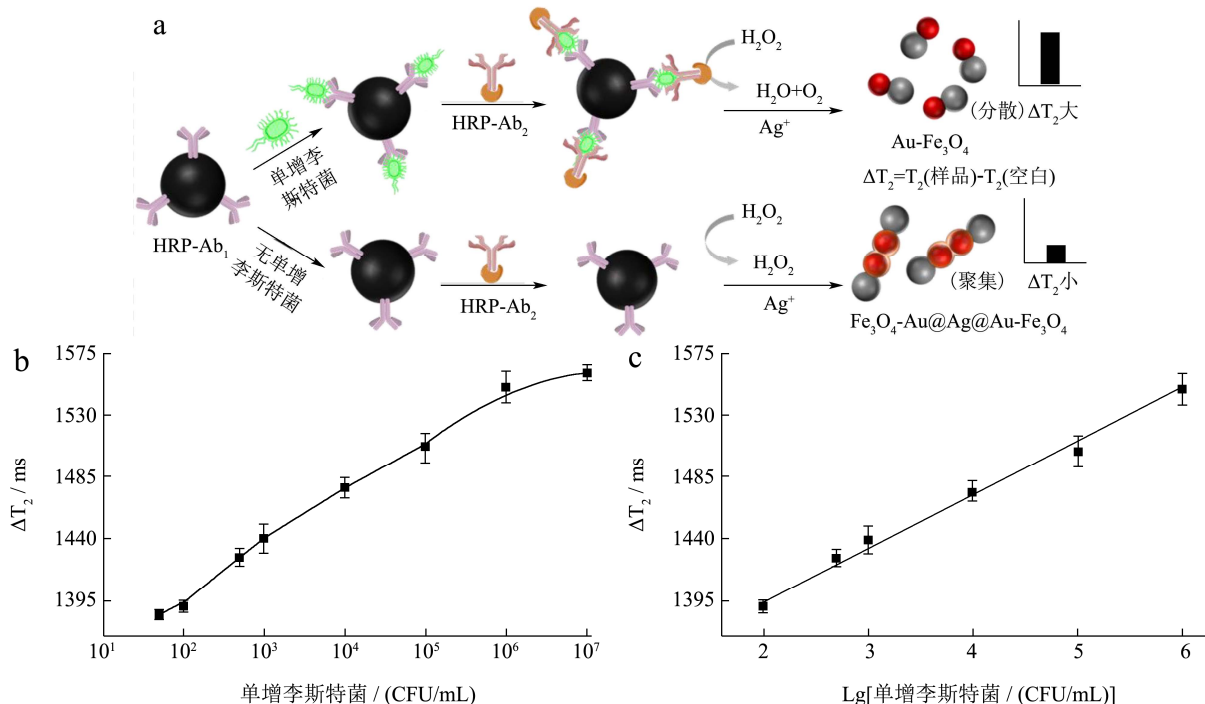


图 3 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器的原理图及其检测单增李斯特菌的标准曲线和线性范围

Fig.3 Schematic diagram, standard curve and linear range of Ag@Au-Fe₃O₄-MRS immunosensor for detection of *Listeria monocytogenes*

表 1 单增李斯特菌的检测方法的对比

Table 1 Comparison of detection methods for *Listeria monocytogenes*

方法	灵敏度/ (CFU/mL)	线性范围/ (CFU/mL)	简便性	检测成本	参考文献
荧光 HCR-ELISA	70	约 10 ^{1.5} ~10 ^{5.5}	中等	中等	[23]
PCR-磁分离-流式细胞术	35	-	低	高	[24]
磁分离-脲酶-pH 光学传感器	100	1.1×10 ² ~1.1×10 ⁶	中等	高	[25]
本 MRS 传感器	50	10 ² ~10 ⁶	高	低	本工作

2.3.2 特异性实验

本研究进一步测试了 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器检测单增李斯特菌的特异性。以威尔斯李斯特菌、绵羊李斯特菌、副溶血弧菌、肠炎沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为阴性对照组，验证方法的特异性。其中所有细菌的浓度均为 10⁵ CFU/mL。如图 4a 所示，单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 19115 和 CMCC 54002 的 ΔT₂ 值显著高于阴性对照组，证明本 MRS 免疫传感器在检测单增李斯特菌时具有良好的特异性。

2.3.3 稳定性实验

本研究通过对本 MRS 免疫传感器元件 (MNP₁₈₀-Ab₁、Ab₂-HRP、Au-Fe₃O₄) 进行不同时间的储存，测试了本 MRS 免疫传感器的稳定性。如图 4b 所示，MNP₁₈₀-Ab₁、Ab₂-HRP、Au-Fe₃O₄ 在 4 °C 储存 0、3、7、10、14、21、30 d 后，对单增李斯特菌 (10⁵ CFU/mL) 的信号响应无显著变化，证明本 MRS 免疫传感器的稳定性良好。

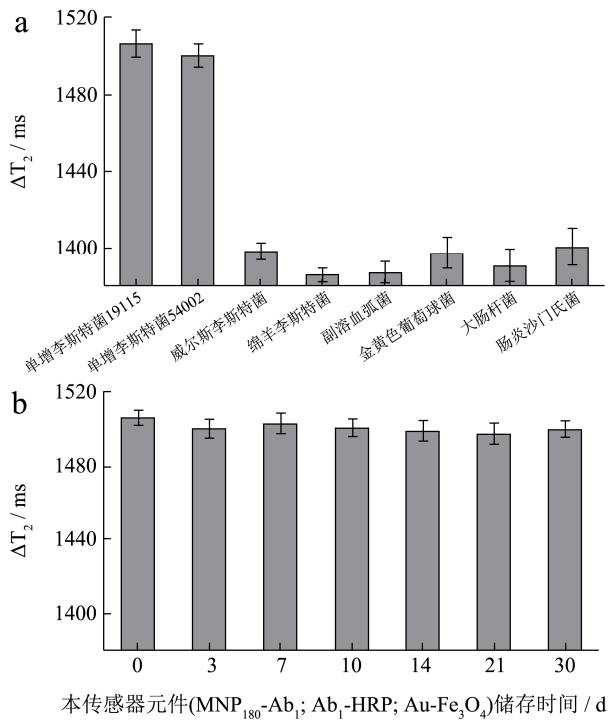


图4 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器的特异性和稳定性
Fig.4 Specificity and stability of Ag@Au-Fe₃O₄-MRS immunosensor

2.4 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器检测火腿中的单增李斯特菌

实际应用性是分析方法的重要方面，为了评估本研究所构建的 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器在复杂

基质中检测单增李斯特菌的实用性，本研究进行了加标回收率实验和实际样品检测实验。

2.4.1 回收率实验

表 2 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器的加标回收率

Table 2 Recovery rates of Ag@Au-Fe₃O₄-MRS immunosensor

加标浓度 / (CFU/g)	检测浓度 / (CFU/g)	回收率 / %	变异系数 / %
10 ²	(1.06±0.121)×10 ²	105.9	11.42
10 ⁴	(0.88±0.056)×10 ⁴	88.3	6.34
10 ⁶	(0.79±0.064)×10 ⁶	79.4	8.06

本研究通过在空白火腿样品中分别添加不同浓度水平 (低: 10² CFU/g, 中: 10⁴ CFU/g, 高: 10⁶ CFU/g) 的单增李斯特菌来测定本 MRS 免疫传感器的加标回收率情况。如表 2 所示，火腿样品中平均回收率为 79.4%~105.9%，且变异系数为 6.34%~11.42%。该结果表明，Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器对复杂食品样品中的单增李斯特菌检测具有良好的抗基质干扰作用，具有较高的准确性。这是由于 (1) 复杂的食品样品基质中无磁信号，背景信号低; (2) 本方法中磁探针的组装过程中，Au 纳米颗粒起到了桥梁作用，降低了基质干扰; (3) 高效的信号转化系统排除了很大部分的机制干扰。

2.4.2 实际样品检测

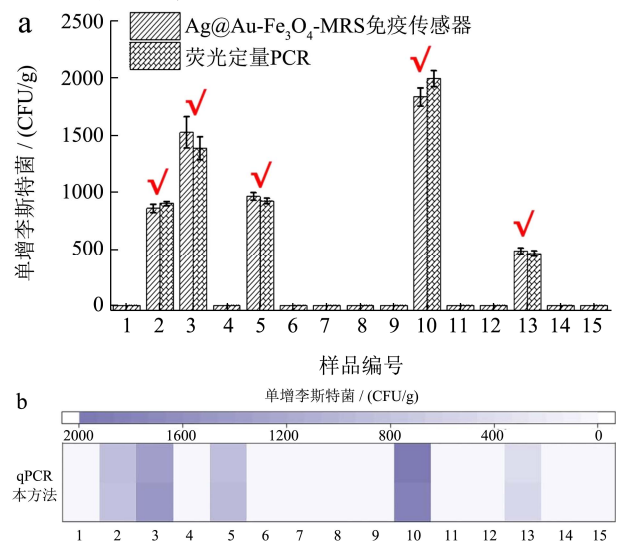


图5 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器用于火腿中单增李斯特菌的快速检测

Fig.5 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS immunosensor for detection of *Listeria monocytogenes*

基于上述研究结果，本研究采用所构建的 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器和 qPCR 方法进行了随机火腿样品 (采购自武汉当地的超市) 中单增李斯特菌的检测。如图 5a 所示，在所检测的 15 个火腿样品中，样品 2、3、5、10、13 均检测为单增李斯特菌

阳性,其他样品均检测为阴性,并且本方法与 qPCR 方法检测结果具有良好的一致性(图 5b)。本研究构建的 MRS 免疫传感器不需要复杂的前处理和 DNA 提取步骤,反应体系简单,成本较低,在食源性致病菌快速检测方面具有良好的应用前景。

3 结论

本研究构建了一种快速高灵敏的 MRS 免疫传感器,并将其用于单增李斯特菌的定量分析。在该传感器中,HRP-H₂O₂ 介导的信号转化系统能够有效地放大信号,并通过将单增李斯特菌的浓度信号转化为 H₂O₂ 的浓度信号,降低了食品基质的干扰。而 H₂O₂ 介导的 Ag@Au-Fe₃O₄ 信号读出系统是一种高效的信号组装策略,避免了传统基质与抗体修饰磁颗粒的直接接触模式,在提高传感器灵敏度的同时,避免了磁颗粒的非特异性聚集,提高了方法的准确性。因此,本研究开发的 Ag@Au-Fe₃O₄-MRS 免疫传感器具有良好的灵敏度和准确性,在食源性致病菌检测方面具有良好的潜力。

参考文献

- [1] Bahrami A, Baboli Z M, Schimmel K, et al. Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 61-78
- [2] Robin L T Churchill, HUNG Lee, J Christopher Hall, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64: 141-170
- [3] 陈月桃,陈谋通,吴清平,等.单核细胞增生李斯特菌 *lad R* 基因在两种原核表达载体中的克隆表达及纯化分析[J].现代食品科技,2019,35(10):58-65
CHEN Yuetao, CHEN Moutong, WU Qingping, et al. Expression and purification of *lad R* gene of *Listeria monocytogenes* in two prokaryotic vectors [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(10): 58-65
- [4] 刘慧,曾祥权,谢文东,等.食源性单增李斯特菌检测技术研究进展[J].现代食品科技,2021,37(6):333-344
LIU Hui, ZENG Xiangquan, XIE Wendong, et al. Advances on detection techniques for foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 333-344
- [5] 黄新新,何宇平,袁辰刚,等.荧光重组酶介导等温扩增检测食品中单增李斯特菌 [J/OL]. 微生物学通报, 2021.https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.210670
HUANG Xinxin, HE Yuping, YUAN Chengang, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in food by fluorescent recombinase mediated isothermal amplification [J/OL]. Microbiology China, 2021. https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.210670
- [6] Maury Mylene M, Bracq Dieye Helene, Huang Lei, et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products [J]. Nature Communication, 2019, 10(1): 2488
- [7] 崔荣飞,赵义良,田梅,等.重组酶介导扩增技术快速检测食品中单核细胞增生李斯特菌[J].食品安全质量检测学报, 2021,12(5):1773-1777
CUI Rongfei, ZHAO Yiliang, TIAN Mei, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by recombinase aided amplification method [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(5): 1773-1777
- [8] LI Wei, MAO Rui, YUE Xiqing, et al. Competitive annealing mediated isothermal amplification (CAMP) for rapid and simple detection of *Listeria monocytogenes* in milk [J]. Food Control, 2020, 117: 107347
- [9] KIM Jin-Hee, OH Se-Wook. Pretreatment methods for nucleic acid-based rapid detection of pathogens in food: a review [J/OL]. Food Control, 2021, 121. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107575
- [10] 刘雅莉.单核细胞增生性李斯特菌快速检测技术研究[D].兰州:甘肃农业大学,2012
LIU Yali. Research on rapid detection technology of *Listeria monocytogenes* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2012
- [11] Leonardo Lopes Luz, Marcelo Mendonça, Matheus Bernardes Fogaca, et al. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(5): 647-666
- [12] Alia A, Andrade M J, Cordoba J J, et al. Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants [J]. Food Microbiology, 2020, 87: 103367
- [13] 徐晓可,吴清平,张菊梅,等.食品中单核细胞增生李斯特菌特异性二重 PCR 检测方法的研究[J].中国卫生检验杂志, 2009,19(6):1199-1201,1221
XU Xiaoke, WU Qingping, ZHANG Jumei, et al. Studies on specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods by duplex PCR [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2009, 19(6): 1199-1201, 1221

- [14] 董永贞,吴紫荆,王知龙,等.磁弛豫生物传感器在食品安全快速检测中的应用研究进展[J].华中农业大学学报,2021,40(1):24-33
DONG Yongzhen, WU Zijing, WANG Zhilong, et al. Progress of magnetic relaxation switching biosensors for rapid detection in food safety [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(1): 24-33
- [15] LI Fan, YE Qinghua, CHEN Moutong, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 179: 113073
- [16] Dharmendra Kumar Soni, Rafiq Ahmad, Suresh Kumar Dubey. Biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*: emerging trends [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2018, 44(5): 590-608
- [17] LI Yue, WU Long, WANG Zhilong, et al. A magnetic relaxation DNA biosensor for rapid detection of *Listeria monocytogenes* using phosphatase-mediated Mn(VII)/Mn(II) conversion [J]. Food Control, 2021, 125: 107959
- [18] QI Xiaobao, WANG Zhilong, LU Rongsheng, et al. One-step and DNA amplification-free detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples: combining magnetic relaxation switching and DNA hybridization reaction [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127837
- [19] Haun J B, Yoon T J, Lee H, et al. Magnetic nanoparticle biosensors [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2010, 2: 291-304
- [20] CHEN Yiping, XIANYU Yunlei, WANG Yu, et al. One-step detection of pathogens and viruses: combining magnetic relaxation switching and magnetic separation [J]. ACS Nano, 2015, 9(3): 3184-3191
- [21] 刘子欣.基于二氧化锰纳米组装体的新型磁性传感器的构建[D].北京:北京工业大学,2018
LIU Zixin. Construction of new type magnetic biosensor based on MnO₂ nanoassembly [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2018
- [22] ZENG Jingbin, GONG Mingfu, WANG Dawei, et al. Direct synthesis of water-dispersible magnetic/plasmonic heteronanostructures for multimodality biomedical imaging [J]. Nano Letter, 2019, 19: 3011-3018
- [23] LV Xi, HUANG Yanmei, LIU Daofeng et al. Multicolor and ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the fluorescence hybrid chain reaction for simultaneous detection of pathogens [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67: 9390-9398
- [24] LI Fulai, LI Fan, Aguilar Zoraida P, et al. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-mediated biotin amplified immunomagnetic separation method coupled with flow cytometry for viable *Listeria monocytogenes* detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 257: 286-294
- [25] CHEN Qi, HUANG Fengchun, CAI Gaozhe, et al. An optical biosensor using immunomagnetic separation, urease catalysis and pH indication for rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 258: 447-453

(上接第 237 页)

- [18] 罗紫倩.基于生命周期评价法的外卖食品包装能耗研究[J].改革与战略,2021,37(1):111-124
LUO Ziqian. Research on energy consumption of takeaway food packaging based on life cycle assessment method [J]. Reformation & Strategy, 2021, 37(1): 111-124
- [19] Vink E, Glassner D, Kolstad J, et al. The eco-profiles for current and near-future NatureWorks® polylactide (PLA) production [J]. Industrial Biotechnology, 2007, 3(1): 58-81
- [20] Fröhlich T, Liebich A, Volz Susanne. Eco-profiles and environmental product declarations of the European plastics manufacturers - polypropylene (PP) [R]. Plastics Europe, 2014
- [21] Korol J, Burchart-Korol D, Pichlak M, et al. Expansion of environmental impact assessment for eco-efficiency evaluation of biocomposites for industrial application [J]. Journal of Cleaner Production, 2016, 113(1): 144-152
- [22] Hilty L M, Seifert E K, Treibert R. Information Systems for Sustainable Development [M]. IGI Global, 2005
- [23] 杨卫华,李静,戴本慧.生活垃圾焚烧发电碳排放计算方法研究[J].能源环境保护,2011,30(7):61-63
YANG Weihua, LI Jing, DAI Benhui, et al. Carbon emission calculation method for household waste incineration power generation [J]. Energy Conservation, 2011, 30(7): 61-63