

肠毒素大肠杆菌 K88 可视化快速检测方法的建立

付梦玉¹, 林丽萍¹, 吴云², 王瑾¹, 吴国平¹

(1. 江西农业大学食品科学与工程学院, 南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 江西南昌 330045)

(2. 江西省湖口县市场监督管理局, 江西湖口 332500)

摘要: 本研究通过肠毒素大肠杆菌 (*E.coli*) K88 菌毛蛋白的适配体识别, 结合纳米金标记和银增强信号放大技术, 建立了一种快速、灵敏、特异的 *E.coli* K88 可视化快速检测方法。该检测方法是能将与 *E.coli* K88 特异性结合的生物素化的适配体 1 (aptamer 1), 与目标菌 *E.coli* K88 以及纳米金-巯基化适配体 2 复合物 (aptamer 2-AuNPs) 在一定条件下孵育, 形成三明治式的 aptamer 1-*E.coli* K88-aptamer 2-AuNPs 复合物, 随后通过生物素与亲和素的结合将复合物固定到修饰了链霉亲和素的微孔板上, 最后运用银增强显色将反应信号放大。通过对检测方法条件的优化, 本方法可特异、定量地检测 *E.coli* K88, 在 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/孔目标菌株范围内, 其定量拟合线性曲线决定系数 R^2 可达 0.9903, 且检测灵敏度达 10 cfu/孔, 而检测其它非目标菌株均为阴性。本方法为 *E.coli* K88 在临床样品中的可视化检测奠定了基础。

关键词: 肠毒素大肠杆菌 K88; 适配体; 纳米金; 银增强显色; 可视化检测

文章编号: 1673-9078(2016)10-283-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.042

Establishment of a Visual and Rapid Detection Method for Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88

FU Meng-yu¹, LIN Li-ping¹, WU Yun², WANG Jin¹, WU Guo-ping¹

(1. College of Food Science and Engineering and Key Lab for Agricultural Products Processing and Quality Control of Nanchang City, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China) (2. Hukou County Market Supervisory Authority, Hukou 332500, China)

Abstract: A method that could rapidly, sensitively, specifically, and visually detect *E. coli* K88 was established based on the aptamer recognition of the *E. coli* K88 fimbriae protein, combined with gold nanoparticles (AuNPs) labeling and silver enhancement signal amplification. Biotinylated aptamer 1 that could specifically bind to *E. coli* K88 was incubated with target bacterium *E. coli* K88 and the AuNPs-aptamer 2 conjugates, to form a sandwich-type aptamer 1-*E. coli* K88-aptamer 2-AuNPs complex. Then, the sandwich-type complex was immobilized onto the surface of a 96-microwell plate modified with streptavidin through the binding of biotin and streptavidin. Finally, the responding signal was amplified using silver enhancement. After the optimization of the detection conditions, this method could detect *E. coli* K88 specifically and quantitatively. When the *E. coli* K88 concentration was in the range of $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/well, the coefficient of determination (R^2) for quantitative linear curve fitting was 0.9903, the detection sensitivity could reach 10 cfu/well, and negative results were obtained in the detection of other non-target bacterial strains. This paper provides a basis for the visual detection for *E. coli* K88 in clinical samples.

Key words: enterotoxigenic *Escherichia coli* K88; aptamer; gold nanoparticles; silver enhancement; visual detection

产肠毒素大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 是引起发展中国家婴幼儿及旅游者急性腹泻的常见病因, 也是引起仔猪腹泻和水肿的常见病

收稿日期: 2015-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560480); 江西农业大学科学研究基金项目 (CX201107)

作者简介: 付梦玉(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品微生物检测技术研究

通讯作者: 吴国平(1972-), 博士, 副教授, 硕导, 主要从事食品微生物检测和生物技术

原体之一^[1,2]。*E.coli* K88 可以通过污染的土壤、水源、空气、运输等途径污染食品^[3], 引起食源性疾病。

E.coli K88 的传统检测方法主要依赖于生理生化鉴定、毒素试验以及血清学鉴定和 ELISA 等常规检测方法。近些年也建立了一些新的检测方法, 如 PCR 方法, 基因芯片技术, 生物传感器, LAMP 法等^[4]。这些方法各自有不同的优点, 可以满足不同的实验要求, 但是它们也有些缺点, 如假阳性现象、需昂贵仪器设备、不易在现场应用等。随着病原微生物引起的食品安全问题凸显, 致病菌的检测技术尤其是快速检测技

术作为保障食品安全的重要技术支撑,在食品生产、流通全过程控制和监管以及进出口贸易中发挥着越来越重要的作用。因此, *E.coli* K88 等病原微生物的准确、灵敏、简便快速检测方法的研发极其重要。

适配体是通过指数富集系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)体外筛选得到的一类能高亲和力和特异性与其目的分子,如药物、蛋白质和其它的有机或无机分子结合的DNA或RNA分子^[5]。基于适配体的稳定性好、靶分子广、亲和力高、特异性强、易改造修饰等优良特性,已经被广泛运用到医疗诊断、新药物的开发、危害检测、食品检验等领域,特别是适配体结合纳米金等材料在光学、电学和生物学方面展现的优势,可实现在食品安全领域对食品中的危害因子进行高灵敏度、高特异性的检测^[6]。同时纳米金标记以及银增强信号放大技术通过与目的分子结合后产生明显的颜色变化,实现检测技术的可视化和简便化,不需昂贵的仪器设备,在分析检测技术尤其是临床检测中的应用日益受到重视。目前,仍未见 *E.coli* K88 的适配体技术结合纳米金标记和银增强信号放大的可视化检测方法的报道。本研究拟通过 *E.coli* K88 特异性菌毛蛋白的适配体,结合纳米金标记和银增强信号放大技术,构建一种快速、稳定、灵敏、特异的 *E.coli* K88 可视化检测方法,为 *E.coli* K88 的快速检测提供新的分析检测技术。

1 材料与方法

1.1 菌株及主要试剂

E.coli K88, *E.coli* K99 菌株由江西农业大学兽医院惠赠;普通大肠杆菌,沙门氏菌,金黄色葡萄球菌,猪链球菌均由本实验室保存;氯金酸,柠檬酸三钠购于阿拉丁;链霉亲和素,牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA),对苯二酚购于 Solarbio 公司;大肠杆菌 K88 适配体参考 Li 等^[5]设计,生物素化适配体 1 (aptamer 1): 5'-biotin-GGA GAC CGT ACC ATC TGT TCG TGG AAG CGC TTT GCT CGT CCA TTA GCC TTG TGC TCG TGC C-3', 巯基化适配体 2 (aptamer 2): 5'-SH-C6 GGA GAC CGT ACC ATC TGT TCG TGG AAG CGC TTT GCT CGT CCA TTA GCC TTG TGC TCG TGC C-3', 适配体 1 和 2 均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 纳米金的制备、表征及稳定性评价

1.2.1 柠檬酸三钠还原法制备纳米金

将制备纳米金所用器皿用酸液浸泡过夜,冲洗烘干后用王水浸泡 2 h,蒸馏水洗涤 2 次,再用超纯水洗涤 2 次,置于烘箱烘干待用。

取 50 mL、0.01% (m/V) 的氯金酸水溶液加入圆底烧瓶中,置于恒温加热磁力搅拌器上加热,加热至沸后,一次性快速加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 2 mL,继续加热。溶液颜色变为紫红色时,继续搅拌煮沸至溶液呈透亮的酒红色,停止加热,继续搅拌至室温。冷却后将所得纳米金溶液转入棕色容量瓶中,加入超纯水定容至 50 mL, 4 °C 避光保存。

1.2.2 纳米金的表征

制备的纳米金溶液进行紫外可见分光光度计扫描和电镜观察。将溶液用分光光度计在可见光范围(400~600 nm)下进行波长扫描,确定最大吸收峰波长,观察最大吸收峰的峰形和峰宽,初步确定其粒径大小。制备好的纳米金样品送江西省景德镇陶瓷大学检测中心进行透射电镜观察。同时基于电镜图片,用 Nano Measurer 1.2 软件取多个点测量纳米金颗粒直径,求取纳米金颗粒的平均直径及标准差,这两者分别表征纳米金颗粒的大小及颗粒均匀度。

1.2.3 纳米金贮存稳定性评价

纳米金溶液在不同温度下避光贮存 4 °C、25 °C (室温) 和 37 °C 一定时间后,测定其最大吸收峰波长,以衡量其贮存稳定性。

1.3 纳米金-巯基化适配体复合物的制备

纳米金-巯基化适配体探针 (AuNPs-aptamer 2) 的制备步骤简述如下:移液枪吸取 1 mL 纳米金溶液于 1.5 mL 的离心管中,4 °C、12000 r/min 离心 30 min,去除 500 μ L 上清液,加入 20 μ L 巯基化 aptamer 2 (终浓度为 2×10^{-6} mol/L)。将混合溶液在 37 °C 下孵育 12 h 后,在体系中加入 0.1 mol/L 的 PB 缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4),使缓冲液的终浓度达到 0.01 mol/L,缓慢加入 1 mol/L 的 NaCl 溶液,使其终浓度达 0.3 mol/L,同时加入终浓度 1% SDS。溶液在 37 °C 振荡孵育 24 h 后,12000 r/min 离心 25 min,去除上清液后,向红色沉淀加入适量的含 0.1 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L PB (pH 7.4) 缓冲液洗涤,离心后沉淀加入含 0.1 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L PB (pH 7.4) 缓冲液重悬,即为 AuNPs-aptamer 2 溶液,于 4 °C 避光保存。

1.4 检测方法的建立

1.4.1 菌株的培养与计数

将菌株接种至 LB 培养基中 37 °C 下过夜培养。次

日无菌条件下用移液枪吸取 1 mL 菌液, 经 5000 r/min 于 4 °C 离心 5 min, 用 1×BB 缓冲液 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 5 mmol/L KCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 121 °C 灭菌]在室温下洗涤两次, 最后 1×BB 缓冲液重悬, 用于检测实验。细菌悬液稀释至适当浓度, 用平板计数法在 37 °C 下培养 18 h, 计数细菌浓度。

1.4.2 链霉亲和素孵育标记酶标板

链霉亲和素(1 mg/mL)用碳酸盐包被液(0.16 g Na₂CO₃, 0.29 g NaHCO₃, 100 mL dH₂O, pH 9.6)稀释后, 每孔加入 200 μL, 置于 4 °C 下包被孵育 12 h, 用含 0.2 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液(Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4)淋洗微孔板 3 次, 每次 3 min, 再向微孔板每孔加入 100 μL、2% 的 BSA, 37 °C 孵育封闭 30 min 后, 用 PB 缓冲液淋洗微孔板 3 次, 晾干后, 4 °C 下保存备用。

1.4.3 适配体识别 E.coli K88

取不同浓度菌液 1 mL 离心后, 菌体用 70 μL 1×BB 缓冲液重悬, 加入 20 μL AuNPs-aptamer 2 和 10 μL 生物素化 aptamer 1 于 37 °C 孵育一定时间, 之后将混合液转移至包被有链霉亲和素的微孔板, 37 °C 潮湿环境下孵育 30 min, 用含 0.2 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液淋洗微孔板 1 次, 再用 0.02 mol/L 的 PBN 缓冲液(0.2 mol/L NaNO₃, 20 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4)淋洗 2 次, 每次 3 min, 弃上清后微晾干用于后续银增强显色。

1.4.4 银增强显色及其吸光度的检测

参考文献^[7]配制银增强溶液, 即将 0.2 mL 柠檬酸缓冲液(1.275 g C₆H₈O₇ 和 1.175 g Na₃C₆H₅O₇ 溶解于 5 mL H₂O) 和 0.3 mL 氢醌(0.17 g C₆H₄(OH)₂ 溶解于 3 mL H₂O, 避光)混合, 于 37 °C 避光反应 30 min, 再加入 1.2 mL 33% 阿拉伯胶混合均匀, 再加入 0.3 mL 硝酸银溶液(0.1 g AgNO₃ 溶解于 15 mL H₂O), 现用现配。将银增强溶液每孔加入 100 μL, 在室温下避光反应, 反应一定时间后倾弃银溶液, 加入 200 μL 超纯水后将微孔板拍照或用酶标仪测定 630 nm 下吸光值。

1.4.5 数据统计分析

实验数据利用 Excel 进行统计分析, 并分析每组数据的重复误差。

2 结果与讨论

2.1 纳米金的光学性质及粒径分析

从图 1a 可看出, 纳米金的最大吸收峰为 520 nm, 仅一个主吸收峰, 峰型明显, 初步说明纳米金粒径分布比较均匀。制备的纳米金颗粒在透射电镜下观察大

多数为圆形(图 1b), 少数呈多角形, 颗粒大小均匀一致, 呈分散分布, 没有团聚现象, 说明制备的纳米金符合胶体特性。

基于电镜照片, 使用 Nano Measurer 软件选取 60 个点测量纳米金颗粒直径, 得到纳米金颗粒的粒径分布如图 1c。由图 1c 可知, 所制备的纳米金颗粒的粒径主要分布在 15.20~16.40 nm 之间, 平均直径与标准差为 16.00±0.70 nm。参照 Storhoff 等^[8]的论文, 可知粒径 16 nm 左右的纳米金溶液在 520 nm 下的消光系数 ε₅₂₀ 约为 2.40×10⁸ L/(mol·cm), 再根据朗伯比尔定律, 算出所制备的纳米金的浓度为 3.57×10⁻⁹ mol/L。

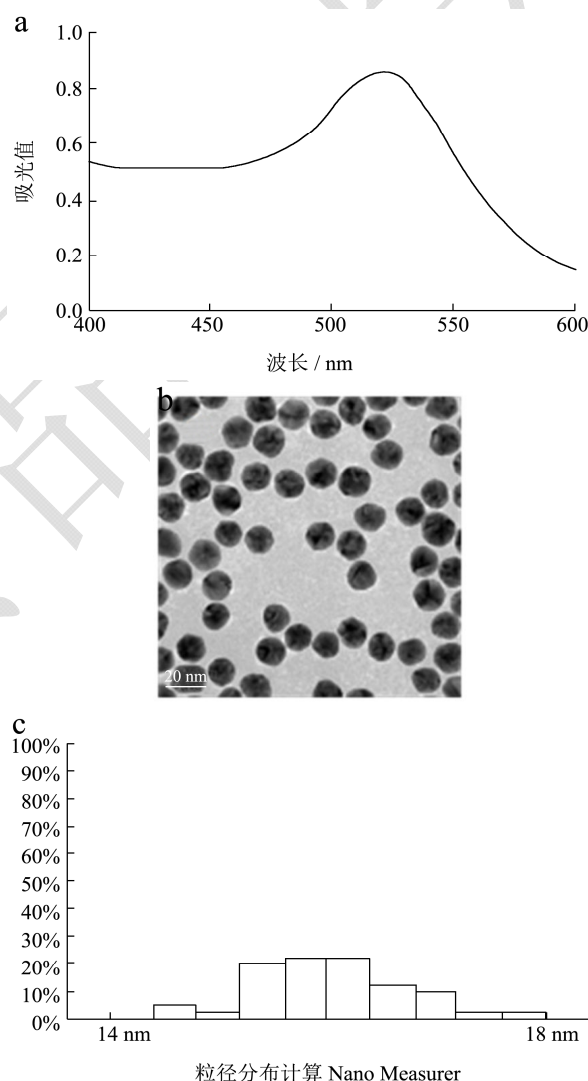


图 1 纳米金的可见光扫描图谱 (a)、投射电镜图 (b) 和粒径分布图 (c)

Fig.1 UV-vis spectrum (a), TEM image (b), and particle distribution of the AuNPs (c)

2.2 纳米金贮存稳定性评价

由图 2 可知, 纳米金溶液在 4 °C 下贮存后, 其最大吸收峰变化很小, 至第 50 d 仅由 520 nm 红移至 522

nm; 而在 25 °C 和 37 °C 条件下贮存, 纳米金的最大吸收峰随着贮存时间的延长, 红移现象逐步明显, 至第 50 d 分别红移至 525 nm 和 531 nm, 同时在贮存容量瓶底部黑色颗粒沉淀也越明显, 预示着纳米金颗粒在贮存过程中逐渐发生聚集。据李卫玲等报道^[9], 随着贮存温度的升高, 纳米金的布朗运动加剧, 逐渐合并成较大的颗粒, 同时纳米金溶液的吸附能力则逐渐变弱, 溶剂化程度变低, 溶剂化层变薄, 纳米金颗粒聚结, 胶体性状变弱。因此, 制备的纳米金溶液尽量于 4 °C 避光贮存。

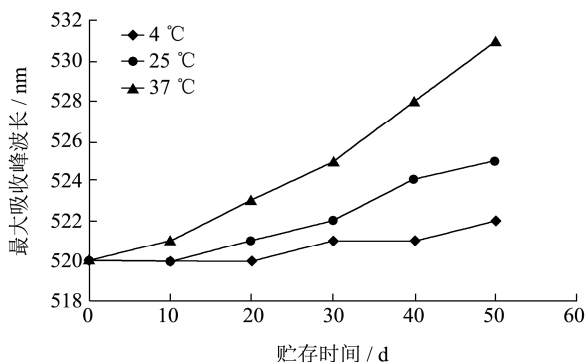


图2 纳米金在不同温度下贮存不同时间后的最大吸收峰波长
Fig.2 Maximum absorption wavelength of AuNPs after storage under different temperatures

2.3 检测条件的优化

如图3所示, 本研究检测原理主要是: 基于识别 *E.coli* K88 的适配体, 通过适配体对 *E.coli* K88 的特异识别, 形成 aptamer 1-*E.coli* K88-aptamer 2-AuNPs 三明治式复合物, 再通过生物素与链霉亲和素的结合将复合物连接到包被有链霉亲和素的孔板上, 再通过银增强显色放大信号, 产生肉眼可见的颜色反应, 实现可视化检测。

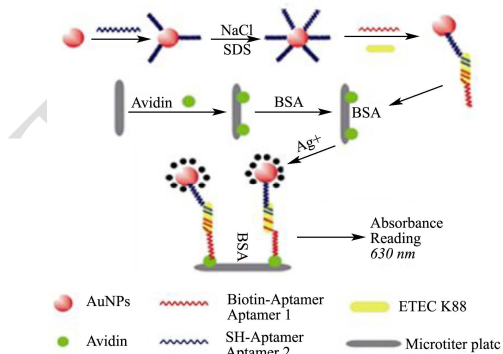


图3 *E. coli* K88 可视化检测原理图

Fig.3 Schematic illustration of the visual detection of *E. coli* K88 by aptamers and AuNPs

2.3.1 链霉亲和素包被浓度的优化

在微孔板表面包被上适量的链霉亲和素, 从而组

装形成链霉亲和素-aptamer 1-*E.coli* K88-aptamer 2-AuNPs 复合物, 实现对 *E.coli* K88 的检测。链霉亲和素浓度标记微孔板是影响检测信号的重要因素。以 1.0×10^5 cfu/mL *E.coli* K88 为检测菌浓度, 分别选取了 0.01、0.02、0.05、0.1 和 0.2 mg/mL 五种链霉亲和素浓度包被微孔板, 测定 $A_{630\text{nm}}$ 下的吸光值, 以获得链霉亲和素包被浓度与银增强后吸光度值之间的关系 (图4a)。由图4a可知, 随着链霉亲和素浓度的增加, 吸光度值呈一定的线性增强, 当链霉亲和素浓度增加至 0.1 mg/mL 时, 吸光度值则趋于稳定。因此, 链霉亲和素的最佳包被浓度确定为 0.1 mg/mL。

2.3.2 Aptamer 2 浓度的优化

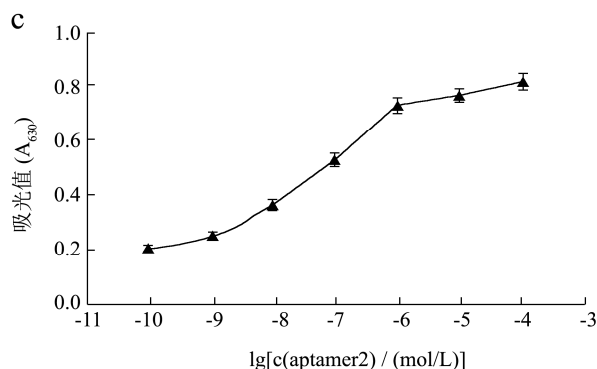
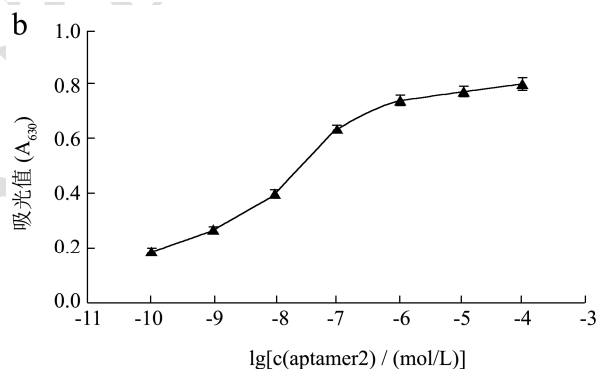
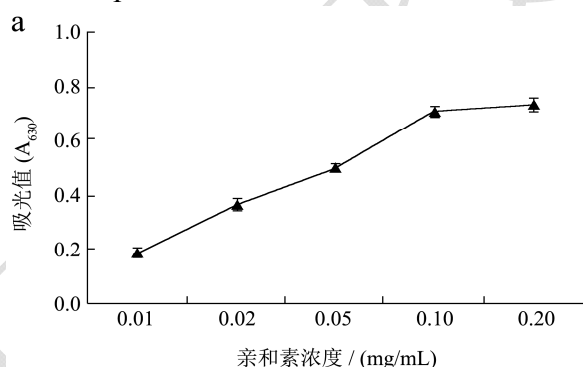


图4 链霉亲和素(a)、aptamer 2(b)和 aptamer 1(c)的浓度优化 (n=3)

Fig.4 Optimization of the concentrations of streptavidin (a), aptamer 2 (b), and aptamer 1 (c) (n=3)

Aptamer 2 的浓度影响修饰纳米金, 从而影响形成的 aptamer 2-AuNPs 复合物量。在纳米金修饰巯基化

适配体 2 过程中, 根据制备的纳米金的浓度, 本实验设定 aptamer 2 的终浓度为 $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L, 以 1.0×10^5 cfu/mL *E.coli* K88 为检测菌浓度, 测定 aptamer 2 的终浓度与银增强后吸光度值之间的关系, 以优化巯基化 aptamer 2 浓度。从图 4b 可知, 随着巯基化适配体浓度的增加, 银增强后的吸光度值也逐渐增加。当巯基化适配体浓度超过 1.0×10^{-6} mol/L, 吸光值逐渐趋于稳定。因此, 1.0×10^{-6} mol/L 为 aptamer 2 结合纳米金的最优浓度。

有报道^[10]表明, 巯基化 DNA 与纳米金结合的比例一般应大于 200:1, 即巯基化适配体的浓度应大于 200 倍的纳米金浓度。本实验所用纳米金的浓度推算为 3.57×10^{-9} mol/L, 因此巯基化适配体的终浓度应大于 7.14×10^{-7} mol/L, 这与本实验确定的 aptamer 2 浓度即 1.0×10^{-6} mol/L 相吻合, 说明 aptamer 2 与纳米金实现了充分结合。

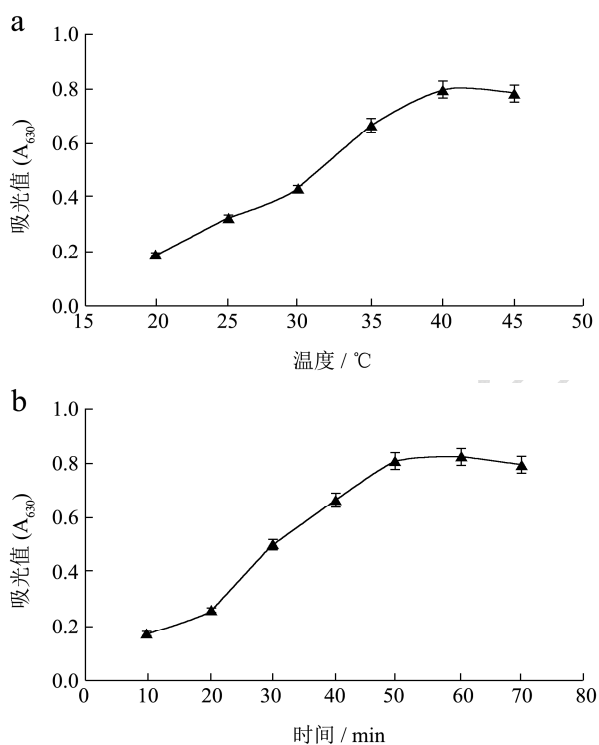


图 5 适配体识别 *E. coli* K88 过程中温度 (a) 和时间 (b) 的优化 (n=3)

Fig.5 Optimization of reaction temperature (a) and time (b) during the process of recognizing *E. coli* K88 by aptamers

2.3.3 Aptamer 1 浓度的优化

Aptamer 1 通过生物素与亲和素的结合从而连接固定到微孔板上, 而 aptamer 1 则通过特异连接捕获 *E.coli* K88, 因此 aptamer 1 的浓度也影响捕获的 *E.coli* K88 量。本实验为了获得最佳的 aptamer 1 浓度, 选取 $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内的 aptamer 1, 以 1.0×10^5 cfu/mL *E.coli* K88 为检测菌浓度, 以确定

aptamer 1 的最佳浓度。由图 4c 可知, 随着 aptamer 1 浓度的增加, 银增强后吸光度值随之增加, 当达到 1.0×10^{-6} mol/L 时, 吸光值则逐渐趋于稳定。因此, 1.0×10^{-6} mol/L 作为 aptamer 1 的最佳使用浓度, 这一结果也与 aptamer 2 结合纳米金的最佳浓度相符合。

2.3.4 适配体识别 *E.coli* K88 的最佳温度和时间

以 *E.coli* K88 菌液 (1.0×10^5 cfu/mL) 为检测菌浓度, 分别在不同温度 (20、25、30、35、40、45 °C) 以及不同识别时间 (10、20、30、40、50、60、70 min) 下, 考察适配体与 *E.coli* K88 识别的最佳反应温度和时间。由图 5a 可知, 在适配体识别 *E.coli* K88 过程中 (固定反应时间为 1 h), 随着温度的升高, 银增强后吸光度值逐渐增加, 当温度为 40 °C 时, 吸光度值趋于稳定, 达到最大。因此 40 °C 为反应的最佳温度。

由图 5b 可知, 在 40 °C 条件下, 随着孵育时间的延长, 适配体逐渐与 *E.coli* K88 进行结合, 即纳米金-aptamer 2-*E.coli* K88-aptamer 1 复合物逐渐形成, 使得银增强后的吸光度值逐渐增加; 当反应 50 min, 吸光度值便趋于平稳, 达到最大吸光值。因此, 50 min 作为最佳识别时间。

2.3.5 银染时间的影响

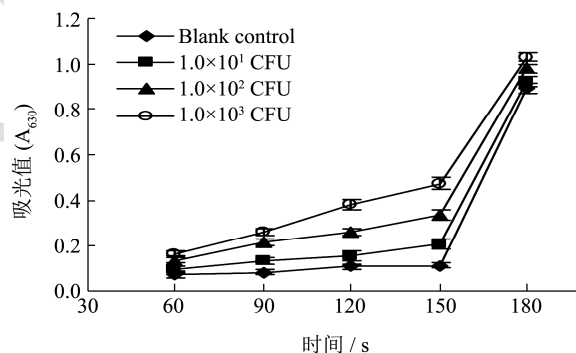


图 6 银染时间对银增强后吸光度值的影响

Fig.6 Effect of the silver staining time on absorbance value

银染增强显色作用是通过纳米金颗粒的催化还原反应, 将周围溶液中的银离子还原成单质银沉积于纳米金表面, 这些银颗粒又进一步催化还原更多的银离子, 使得纳米金周围的银颗粒层不断增大, 银壳结构粒径呈几何倍增加, 使得检测信号显著增强, 产生明显的颜色反应, 从而实现检测结果的肉眼可视化。为了优化检测过程中银染时间, 本实验选取了三组较低浓度的菌液 (1.0×10^1 cfu/mL、 1.0×10^2 cfu/mL、 1.0×10^3 cfu/mL) 为检测目标, 在上述确定的最优反应条件下, 测定不同银染反应时间的吸光值。

由图 6 可知, 当银染时间在 90~150 s 时, 菌液浓度与银增强后的吸光值增加呈较好的线性关系, 其中

150 s 的吸光值更高, 检测灵敏度更好。但是, 当银染时间继续延长至 180 s 时, 各浓度菌液的吸光值则基本达到同一水平, 甚至与空白对照都没有明显差异。推测原因是, 随着银染时间增加, 银离子在微孔内本身会发生沉淀聚集而产生很高的背景值, 从而影响检测结果的判断。因此本研究选定 150 s 作为最佳银染时间。据赵立凡等^[11]的影响报道, 在 100~150 s 终止银染反应, 检测结果呈现良好的线性关系。

2.4 特异性与定量检测

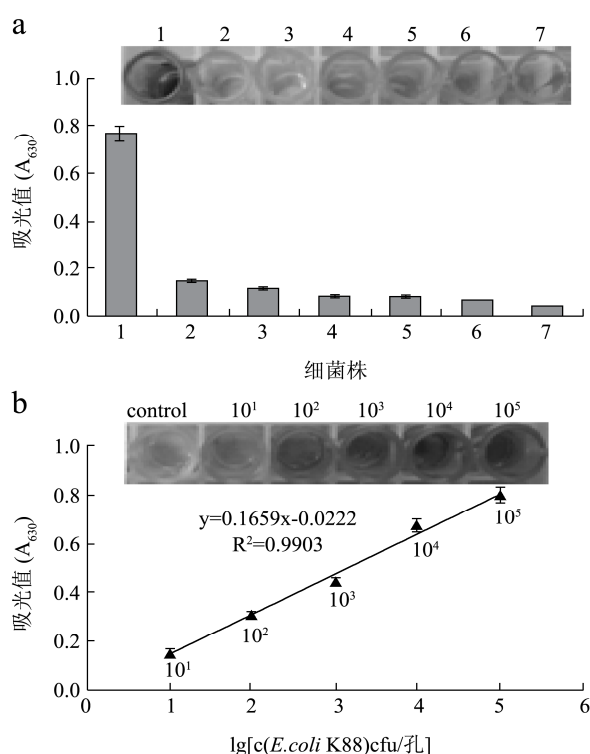


图7 特异性试验检测(a)与 *E. coli* K88 在优化条件下定量检测结果(b)

Fig.7 Detection specificity (a) and quantitative test of *E. coli* K88 under the optimized conditions (b)

注: 1, *E. coli* K88; 2, *E. coli* K99; 3, *E. coli*; 4, *Salmonella* Typhimurium; 5, *Staphylococcus aureus*; 6, *Streptococcus suis*; 7, control.

为了验证本方法检测 *E. coli* K88 的特异性, 根据上述确立的最佳检测条件, 检测了 *E. coli* K88 和其它 5 种常见细菌, 测定细菌浓度均为 1.0×10^5 cfu/mL。由图 7a 可知, 银增强后目标菌 *E. coli* K88 的颜色变化最明显 (吸光值达 0.756), 空白对照和其它 5 种菌株银增强后的颜色变化微小 (吸光值均小于 0.150), 表明建立的 *E. coli* K88 检测方法特异性良好。

在最佳检测条件下, 检测一系列浓度 ($1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu) 的 *E. coli* K88, 得到银增强后吸光值与菌浓度的关系 (如图 7b)。由图 7b 可观察到, 随着菌液

浓度的增大, 酶标板内的金标银染效果逐渐增强, 肉眼可见颜色反应逐渐加深, 实现了该方法检测结果的肉眼可视化。此外, 测定各菌液浓度在 $A_{630 \text{ nm}}$ 下的吸光值, 将吸光值与菌液浓度对数值进行线性分析拟合, 在 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/孔的菌液浓度范围内, 吸光值与菌液浓度呈线性关系, $R^2=0.9903$, 3 次重复检测结果的相对标准偏差小于 5%, 表明该检测方法具有很好的灵敏度和精确度, 可定量检测分析。当检测的菌体数量为 1.0×10^6 cfu/孔、 1.0×10^7 cfu/孔和 1.0×10^8 cfu/孔时, 肉眼可见颜色均较深, 吸光值则分别为 0.835、0.869 和 0.899, 趋于稳定 (图略)。推测当检测的目标菌超过 1.0×10^5 cfu 时, 其与纳米金-aptamer 2 和 aptamer 1 的结合逐步趋于饱和, 菌量与吸光值的线性拟合度降低。

3 结论

本研究制备的纳米金颗粒均匀, 平均直径为 16.00 ± 0.70 nm, 4°C 条件下可稳定贮存 50 d 以上, 为建立细菌适配体纳米金可视化检测技术提供了条件。通过优化检测的实验条件, 本研究确立了链酶亲和素包被微孔的最佳浓度为 0.1 mg/mL, 适配体 1 和适配体 2 的最佳工作浓度均为 1.0×10^{-6} mol/L, 适配体 1、纳米金-适配体 2 复合物与 *E. coli* K88 菌株结合的最佳条件为 40°C 下反应 50 min, 银染增强显色最佳时间 150 s, 肉眼可观察到显色的颜色反应。经实验条件的优化, 定量检测 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/孔范围内的 *E. coli* K88, 其菌浓度对数值与吸光值之间呈线性关系, $R^2=0.9903$, 检测灵敏度可达 10 cfu/孔, 检测时间约 1 h, 对其它常见细菌的检测结果则为阴性。相比于 PCR^[12]、LAMP^[13]等细菌快速检测方法, 本文建立的 *E. coli* K88 适配体纳米金可视化检测技术, 具有快速 (约 1 h)、灵敏 (10 cfu/孔)、特异、可定量检测的优势, 并不需昂贵仪器设备, 这为后续应用于临床样品的可视化快速检测奠定了基础。由于适配体具有靶分子广、稳定性好的特点, 适配体-纳米金技术在食品安全检测领域具有广泛适用性。当然, 目前该方法仍有许多不足, 如适配体-纳米金储存的稳定性有待延长, 如何实现检测操作的进一步简便化和自动化等; 同时, 由于食品等临床样品成分的复杂性, 本文所建立方法对实际样品检测的特异性、准确性、灵敏性等有待验证和条件进一步的优化, 本课题组正在就这些问题进一步研究探索。

参考文献

[1] Walk R I. New vaccines against enteric bacteria for children

- in less developed countries [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(6): 807-812
- [2] 王劫.产肠毒素大肠杆菌菌毛的 DNA 疫苗研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(12):178-181
WANG Jie. The review of dna vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) fimbriae [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(12): 178-181
- [3] 张艳英,高贵生,史秋梅,等.动物性食品源大肠杆菌 O 血清型鉴定及其 K88 菌毛基因检测[J].中国畜牧兽医,2013, 40(3):185-188
ZHANG Yan-ying, GAO Gui-sheng, SHI Qiu-mei, et al. O serotype identification and k88 fimbriae genes analysis of *E.coli* isolated from animal foods [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(3): 185-188
- [4] 张小飞,张召军,张广州,等.产肠毒素大肠杆菌快速检测方法的建立和评价[J].中国实验动物学报,2013,21(5):31-35
ZHANG Xiao-fei, ZHANG Shao-jun, ZHANG Guang-zhou, et al. Establishment and evaluation of the loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay in detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2013, 21(5): 31-35
- [5] Li H, Ding X, Peng Z, et al. Aptamer selection for the detection of *Escherichia coli* K88 [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(6):453-459
- [6] 王周平,张维潇.适配体及其研究进展[J].食品与生物技术学报,2013,32(9):897-906
WANG Zhou-ping, ZHANG Wei-xiao. Aptamer and related progress [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(9): 897-906
- [7] Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals [J]. *Histochemistry*, 1981, 71: 1-16
- [8] Storhoff J J, Lazarides A A, Mucic R C, et al. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 4640-4650
- [9] 李卫玲,叶阳,周友祥,等.柠檬酸三钠法制备纳米金的工艺条件优化[J].湖北农业科学,2010,49(10):2529-2532
LI Wei-ling, YE Yang, ZHOU You-xiang, et al. Optimization of preparation technique of colloidal gold by sodium citrate method [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(10): 2529-2532
- [10] Ding B Q, Deng Z T, Yan H, et al. Gold nanoparticle self-similar chain structure organized by DNA origami [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132(10): 3248-3249
- [11] 赵立凡,李柏生,黑笑涵,等.银染增强的纳米金探针技术检测微量核酸[J].中国生物化学与分子生物学报,2006,22(11): 919-923
ZHAO Li-fan, LI Bo-sheng, HEI Xiao-han, et al. A colorimetric polynucleotides detection method based on nanoparticle probes with silver staining enhancement [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 22(11): 919-923
- [12] 曲泽慧,陈佩佩,张爱芹,等.产肠毒素大肠杆菌双重 PCR 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2013,40(7):65-68
QU Ze-hui, CHEN Pei-pei, ZHANG Ai-qin, et al. Double PCR of virulence genes K88 and K99 of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(7): 65-68
- [13] 罗海,郑春亮,万红梅,等.环介导等温扩增法快速检测产肠毒素大肠杆菌的研究[J].食品研究与开发,2010,31(7):127-130
LUO Hai, ZHENG Chun-liang, WAN Hong-mei, et al. Rapid detection of food-borne enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-mediated isothermal amplification technology [J]. *Food Research and Development*, 2010, 31(7): 127-130