

基于 KMnF_3 纳米探针的 NMR 快速检测沙门氏菌捕获条件的优化

邹灯超, 畅姝怡, 赵茹, 徐晓丽, 张锦胜
(南昌大学食品学院, 江西南昌 330047)

摘要: 本研究尝试了一种新型的基于 KMnF_3 纳米探针的 NMR 方法对沙门氏菌进行快速检测。通过将沙门氏菌单抗与羧基磁珠偶联制备免疫磁珠, 并以此为 NMR 分子探针, 以免疫磁珠为生物传感器, 特异性地捕获并检测出样品中的致病菌, 从而建立一种更快的检测沙门氏菌的方法。实验发现, 活化剂的添加量, 捕获沙门氏菌的缓冲液, 细菌培养时间和探针添加量在不同程度上影响着检测样品的弛豫时间。通过实验对捕获条件进行优化, 得出的最佳捕获条件是: 一份的 KMnF_3 , 活化时加入是 KMnF_3 质量五倍的 EDC·HCL、NHS; 用灭菌的蒸馏水作为捕获沙门氏菌的缓冲液; 加入 80 μL 的抗体- KMnF_3 捕获培养 10 h 的沙门氏菌。本研究为沙门氏菌的检测提供了新的方法和途径, 缩短了检测时间, 为低磁场核磁共振技术在食品安全领域开辟新的空间。

关键词: 沙门氏菌; 免疫磁珠; 核磁共振技术; 最佳捕获条件

文章篇号: 1673-9078(2017)6-321-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.047

Optimal Conditions for Rapid Detection of *Salmonella* spp. via Potassium Manganese Trifluoride Nanoprobe-based Nuclear Magnetic Resonance

ZOU Deng-chao, CHANG Shu-yi, ZHAO Ru, XU Xiao-li, ZHANG Jin-sheng
(College of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: This work attempted to establish a new method for the rapid detection of *Salmonella* spp., using a nuclear magnetic resonance (NMR) method based on potassium manganese trifluoride (KMnF_3) nanoprobe. Immunomagnetic beads were produced by coupling an anti-*Salmonella* monoclonal antibody with carboxyl magnetic beads, which were used as NMR molecular probes and biological sensors to specifically capture and detect the pathogenic bacteria in samples, in order to create a more rapid method to detect *Salmonella* spp. The results showed that the relaxation time in sample detection was influenced to various degrees by the amount of added activator, the choice of buffer solution for the capture of *Salmonella* spp., the bacterial incubation time, and the volume of added NMR probes. The capturing conditions were optimized as follows: the mass ratio of potassium manganese trifluoride to 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride- and *N*-hydroxysulfosuccinimide-modified magnetic beads at activation was 1:5; 80 μL of antibody-potassium manganese trifluoride was required to specifically capture *Salmonella* spp. incubated for 10 h; sterile distilled water was used as the buffer. A new method and approach for the detection of *Salmonella* spp. was provided in this study, and the method shortened the detection time and expanded the application of low-field nuclear magnetic resonance in the field of food safety.

Key words: *Salmonella* spp.; immunomagnetic beads; nuclear magnetic resonance; optimal capturing conditions

沙门氏菌(*Salmonella*)是一类广泛分布于自然界, 在肠杆菌科中是一种重要的人畜共患、革兰氏阴性病原菌, 为四大食源性致病菌之一, 在各类食品标准中该致病菌都不得检出。目前对于沙门氏菌的检测方法主要有传统检测方法国标法^[1], 酶联免疫分析法

(ELISA), 免疫磁珠分离技术(IMS), 核酸探针技术, 聚合酶链式反应(PCR)等^[2]。上述这些方法都具有各自的优缺点, 但都少不了对检测样品的预处理, 需要对检测菌进行增菌处理等, 这些处理步骤耗时长久。本研究尝试一种新的基于纳米探针的核磁共振技术对沙门氏菌进行快速检测的方法。

在 NMR 成像的造影剂中, 以纳米 Fe_3O_4 为代表, 得到了广泛的研究与应用。一方面, 纳米级 Fe_3O_4 是一种顺磁物质, 会表现出超顺磁性, 可以作为一种很好的分离载体。利用纳米材料的顺磁性和超顺磁性,

收稿日期: 2016-11-01

基金项目: 江西省科技计划项目(20151BBG70049)

作者简介: 邹灯超(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与加工

通讯作者: 张锦胜(1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与食

品安全

磁分离被成功地用于研究分析副溶血弧菌^[3,4]、癌胚抗原^[5]、血吸虫^[6]、氯霉素^[7]、鼠疫杆菌^[8]、大肠杆菌 O157:H7^[9,10]、结核杆菌^[11]和志贺菌^[12]等, 这些研究中, 磁分离作为一种分离、富集的手段, 取得了非常好的效果。另一方面, 顺磁性和超顺磁特性能够显著影响磁场的净磁化矢量, 因而改变组织的弛豫时间。其表面可连接生化活性功能基团, 通过包被修饰特异性抗体使纳米磁珠成为免疫磁珠, 特异性捕获目的菌, 利用 NMR 检测弛豫时间的变化可以间接测定目标菌总数。本研究尝试一种新的基于纳米探针的核磁共振技术对沙门氏菌进行快速检测的方法。该方法将核磁共振技术、NMR 纳米探针与分离技术相结合, 设想采用偶联技术将特异性抗体偶联到羧基化的纳米 KMnF_3 材料表面, 因为纳米级的 KMnF_3 和 Fe_3O_4 一样具有超顺磁性, 对 NMR 弛豫时间信号影响非常大, KMnF_3 纳米粒子经过特异性修饰后偶联特异性抗体, 将其加入待检样品中, 可与目标菌结合形成空间网状结构而团聚, 从而对周围水质子的影响降低, 因而将待测样品与无菌缓冲液进行对照, 两者的弛豫时间的下降幅度是不一样的。通过对比核磁共振的弛豫信号, 检测出样品中的目标致病菌。利用 KMnF_3 的超顺磁性对目标菌进行富集、分离, 检测是一种创新的尝试, 用于快速检测食品中的微生物, 检测时间只需十几分钟, 整个准备过程也不超过 2 h。本研究主要研究不同活化剂添加量、缓冲溶液、培养时间和探针加入量等对磁共振信号的影响, 优化检测参数。

1 材料与方法

1.1 实验材料

沙门氏菌(菌株编号: ATCC9270, *Salmonella*, 由南昌大学食品科学与技术国家重点实验室提供); 沙门氏菌单克隆抗体(编号: 2C11-F3 由南昌大学食品科学与技术国家重点实验室提供); 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐盐酸(EDC·HCL, 上海晶纯生化科技股份有限公司); N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 上海晶纯生化科技股份有限公司); 牛血清蛋白(BSA, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 实验仪器

特斯拉 CUTE NMR 小型核磁共振仪, 宁波健信有限公司; 核磁共振分析仪, 上海纽迈电子科技有限公司; SCILOGEX(赛洛捷克) MX-RL-Pro 数显性旋转混匀仪(美国); SHZ-82A 恒温振荡器, 江苏东鹏仪器制造有限公司; PYX-190H-B 恒温恒湿培养箱,

厦门精艺兴业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 EDC·HCL、NHS 的添加量对 T1 的影响

称取四份每份 0.0025 g 的 KMnF_3 , 放入 1 mL 的离心管中, 其中一份作对照组, 再分别称取质量为 0.005 g、0.0125 g 和 0.025 g 的 EDC·HCL 和 NHS, 加入到编号分别为 1、2 和 3 号离心管, 再向四只离心管加入 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4) 各 1 mL。将离心管放在转速为 15 r/min 的混匀仪上混匀 45 min, 让其充分反应。活化后将样品放入离心机, 10000 r/min 离心 5 min, 然后再加 0.01 M 的 PBS 进行洗涤离心, 重复 3 次。向离心完的样品中各加入浓度为 4.44 mg/mL 的抗体 5 μL , 放在混匀仪上偶联 1 h。偶联完成后, 加入 112 μL 、10% BSA 封闭, 在混匀仪上封闭 45 min。封闭完成后, 10000 r/min 离心 5 min, 移去上清液, 加入 0.01 M 的 PBS 1 mL 洗涤, 重复 3 次, 最后加入 1 mL PBS 进行重悬。每个样品移取 300 μL , 放入核磁共振检测管测定其 T1 值。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。

1.3.2 不同缓冲液对 T1、T2 值的影响

KMnF_3 与抗体的偶联, 称取三份 0.0025 g KMnF_3 于 1 mL 的离心管中, 向每个离心管加入 0.02 g EDC·HCL、0.02 g NHS, 加 1 mL 蒸馏水, 放在混匀仪上活化 45 min。活化后的样品 10000 r/min 离心 5 min, 然后再加入蒸馏水进行洗涤离心, 除去上清液, 重复 3 次。向离心完的样品中各加入浓度为 4.44 mg/mL 的抗体 20 μL , 放在混匀仪上偶联 1 h。偶联完成后加入 112 μL 的 10% BSA 封闭液, 在混匀仪上封闭 45 min。封闭完成后, 10000 r/min 离心 5 min, 蒸馏水清洗离心, 重复 3 次, 最后加入 1 mL 蒸馏水进行重悬。

挑取 LB 培养基中长势好的沙门氏菌菌落, 加入到含有 4 mL LB 液体培养基的试管中, 摇床培养 10 h, 平板计数测定菌液的浓度。取 1 mL 离心管 21 只, 分成三组, 每组离心管分别编号为 0、1、2、3、4、5 和 6。每组离心管分别加入 0.01 mol/L 磷酸盐吐温缓冲溶液(PBST, pH 7.4)、0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4)、蒸馏水(pH 6.8) 1080 μL , 然后从摇菌 10 h 的试管中吸取 120 μL , 依次稀释, 最后将所有离心管中的液体配成 1.5 mL。将偶联抗体的 KMnF_3 移入到离心管中, 每只离心管移入 100 μL , 为使 KMnF_3 上偶联的抗体与沙门氏菌在离心管中反应时间一致, 每隔 5 min 添加一个样, 然后放在混匀仪上, 0.5 h 后移取样液 300 μL 加入到核磁共振管检测其 T1、T2 值, 每个样品平行测定三次。

1.3.3 不同培养时间的菌对 T1、T2 值的影响

挑取 LB 培养基中长势好的沙门氏菌菌落，加入到含有 4 mL LB 液体培养基的试管中，分别摇床培养 7 h 和 10 h。取 14 只 1 mL 的离心管，分成 A、B 两组，编号为 0、1、2、3、4、5 和 6，分别加入 1080 μ L 灭菌蒸馏水，然后从摇菌 7 h 和 10 h 的试管中分别移取菌液 120 μ L，依次稀释，最后将所有离心管中溶液配成 1.5 mL 的体积。将偶联抗体的 KMnF_3 分别移取 100 μ L，加入到 14 只离心管中，为保证每只离心管反应时间一致，每隔 5 min 添加一个样。然后在混匀仪上反应，0.5 h 后在核磁共振仪器上检测 T1 和 T2 值，每个样品平行测定三次。

1.3.4 抗体- KMnF_3 添加量对 T1、T2 的影响

抗体与 KMnF_3 偶联按照 1.2.2 所述的方法。

挑取 LB 培养基中长势好的沙门氏菌菌落，加入到含有 4 mL LB 液体培养液的试管中，再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 10 h。通过计数，计算培养 10 h 后菌液的浓度。在超净工作台上，用无菌蒸馏水梯度稀释菌液，取 3 \times 7 只 1 mL 离心管其中三只为对照组，对这些离心管进行标记，依次稀释到 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍。

取第一组梯度稀释的离心管，每隔 5 min 向离心管分别加入 35 μ L 的抗体- KMnF_3 ，放在转速为 12 r/min 的混匀仪上，1 h 后测定其 T1 和 T2 值，每个样品平行测定三次。接着依次取第二组、第三组梯度稀释的离心管，除向离心管加入抗体- KMnF_3 改为 50 μ L 和 80 μ L 外，其它条件不变。

2 结果与分析

核磁共振成像学上有两个重要的概念，自旋—晶格弛豫时间(T1)和自旋—自旋弛豫时间(T2)。T1 是指自旋质子把吸收的能量释放给周围晶格介质而恢复到平衡状态的过程所需的时间，它体现了自旋质子与所处体系之间的能量关系，反应了所处体系的状态；T2 是指自旋质子之间的相互作用，导致质子矢量的无序化，它体现了局部结构及质子的自由度。水质子所处周围大分子环境不同，会对 T1/T2 造成影响，反过来通过测量 T1/T2 的变化可以评估水质子周围大分子的状态。

本研究的主要原理是设想将这 NMR 造影剂技术和免疫磁分离方面的研究结合起来，研究一种基于 KMnF_3 纳米生物传感器针对食源性致病菌的 NMR 快速检测方法，其特征是利用 KMnF_3 具有超顺磁特性，进行磁分离， KMnF_3 粒径在 20 nm 左右，在溶液中有很好的分散性，同时也是一种造影剂， KMnF_3 纳米粒

子由于具有元素 Mn，其最外层有未成对电子，因而具有持久的电子自旋。非成对电子自旋的总磁矩是质子自旋的 657 倍。由于弛豫效率随着磁矩的平方变化，所以电子弛豫效率是质子弛豫效率的 50 万倍，其粒子对周围水分子的 T1/T2 弛豫时间的影响非常大。因此，非常微量的 KMnF_3 纳米粒子就会造成水的 T1/T2 弛豫时间大幅下降，通过空白对照就能明确，是由于存在这种物质引起的。

无菌的缓冲溶液在一定的均匀场强下，T1 和 T2 是基本固定的。其检测原理^[13]如图 1 所示。

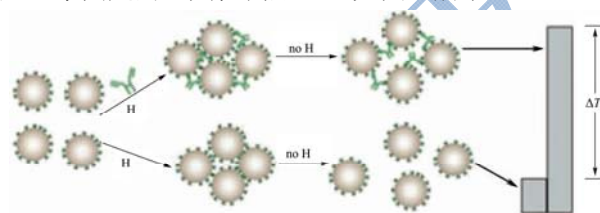


图 1 NMR 检测原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of NMR detection

KMnF_3 纳米粒子经过修饰后可以偶联多个沙门氏菌单抗，将其加入待检样品中，偶联单抗的 KMnF_3 纳米粒子可以特异性识别沙门氏菌，一个沙门氏菌有多个单抗的抗原决定簇，能被多个偶联沙门单抗的 KMnF_3 纳米粒子识别，一个 KMnF_3 纳米粒子可以偶联多个单抗能结合多个沙门氏菌，沙门氏菌和 KMnF_3 纳米粒子结合形成空间网状结构而使 KMnF_3 纳米粒子团聚，形成空间位阻从而使 KMnF_3 对周围水质子弛豫时间的影响降低，弛豫时间的下降幅度与目标菌的数量相关，而无菌的缓冲溶液测得的弛豫时间是一定的。通过空白对照在已知浓度梯度的目标菌液中，加入探针捕获目标菌，取适量的反应液测定其弛豫时间，并于对照组比较就能有效检测出目标菌，本文尝试建立一种新的测定沙门氏菌的检测模型，并对其检测条件进行优化。

2.1 EDC·HCL、NHS 添加量对 T1 值影响

在 EDC·HCL、NHS 添加量的影响实验中发现，0.0025 g KMnF_3 加入 0.0050 g EDC·HCL、NHS，活化 45 min 后， KMnF_3 不能很好的溶解于 PBS，溶液不均匀，这可能是因为 0.0025 g KMnF_3 分子数量大于 EDC·HCL、NHS 的分子数，所以只能对其部分进行活化，导致溶液不均匀。当 EDC·HCL、NHS 加入量为 0.0125 g 和 0.0250 g 时，溶质在溶液里分散性很好，溶液均匀，呈现淡棕色。测得 PBS 的 T1 为 1551.8 ms，加入 KMnF_3 纳米粒子后 T1 值大幅度降低至 49.29 ms，如图 2 所示。当 EDC、NHSS 加入量是 0.0125 g 和 0.025 g 时，T1 值基本保持不变。结合实验现象和图 2 可以

知道 0.0025 g $KMnF_3$ ，活化时加入 EDC·HCL、NHS 0.125 g 可以使 $KMnF_3$ 羧基化达到比较理想状态。

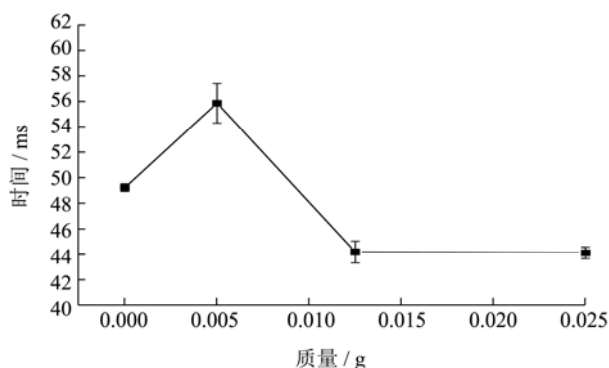


图2 T1 值与加入 EDC·HCL、NHS 的质量关系

Fig.2 Relationship between T1 and the amounts of added EDC·HCL and NHS

2.2 不同缓冲液对T1、T2值的影响

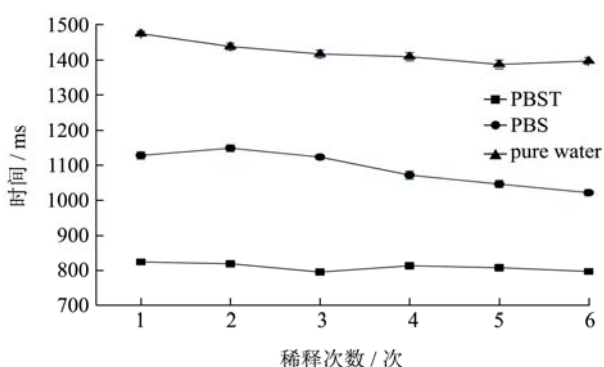


图3 不同缓冲液的 T1 值

Fig.3 T1 value of different buffers

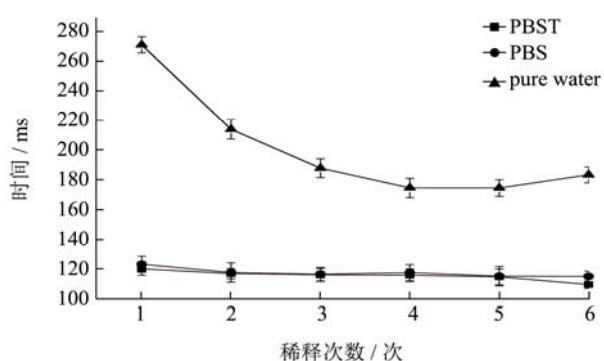


图4 不同缓冲液的 T2 值

Fig.4 T2 value of different buffers

不同缓冲溶液液对 T1 及 T2 的影响如图 3 和 4 所示。图中的稀释次数即“1”指稀释了 10 倍，“2”指稀释了 100 倍，即 10 的次方数倍。培养 10 h 后菌液的浓度为 1.3×10^8 CFU/mL。如图 3 所示，纯水和 PBS 的 T1 值比 PBST 大，使用 PBST 作缓冲溶液得到的曲线较为平缓。由图 4 可以看出，使用纯水得到的 T2 值下降明显，易区分不同浓度梯度的细菌。而 PBS 和

PBST 的 T2 值变化趋势不明显，曲线很平缓，即使测得 T2 值，也无法区分菌液的浓度。由图 3 和图 4 可以得出，上述三种缓冲液中，使用灭菌的蒸馏水的效果较佳。

2.3 不同培养时间的菌对 T1、T2 值的影响

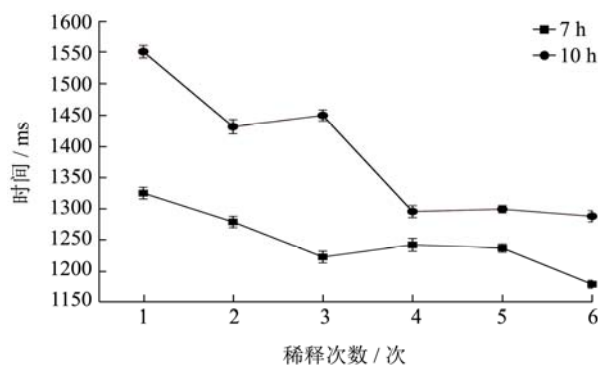


图5 不同培养时间的T1值

Fig.5 T1 value of different incubation times

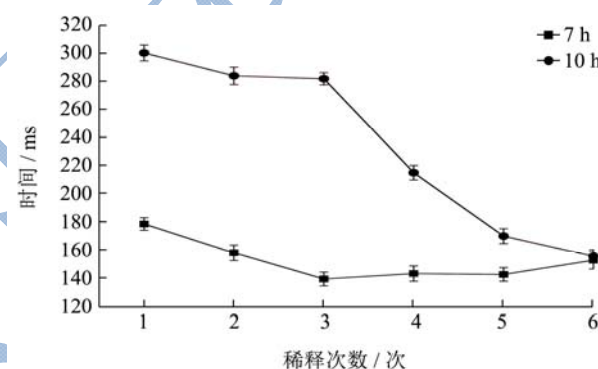


图6 不同培养时间的T2值

Fig.6 T2 value of different incubation times

不同培养时间的菌对 T1 及 T2 值的影响如图 5 和 6 所示。从图中可以看出 T1 及 T2 值会随着培养时间的增加而增大。10 h 时的细菌数量多，与抗体- $KMnF_3$ 结合的量也就多，而结合了细菌的 $KMnF_3$ 与细菌构成空间网络结构而团聚，对水弛豫时间的影响减小，所以测得的弛豫时间大。培养 10 h 的细菌与抗体- $KMnF_3$ 结合后，在不同浓度梯度中弛豫时间区分度比培养 7 h 要明显，因此根据弛豫时间能更准确测定菌液的浓度。综上所述，选用培养 10 h 的细菌更适合。

2.4 抗体- $KMnF_3$ 加入量对 T1、T2 的影响

摇床培养 10 h，通过平板计数测得菌液的浓度为 1.3×10^8 CFU/mL。从图 7 可以看出，随着抗体- $KMnF_3$ 加入量的增加，整体趋势是 T1 和 T2 都随着稀释次数的增加而减少，当添加量是 35 μ L 和 50 μ L 时，T1 值高于添加量为 80 μ L 的 T1 值，而随着稀释次数的增加两者的差别越来越大，表明当抗体- $KMnF_3$ 添加量

是 35 μL 和 50 μL 时, 抗体-KMnF₃ 在溶液中与沙门氏菌完全反应, 还有一部分细菌没有机会与抗体-KMnF₃ 结合, 测得的弛豫时间就比较大。这从不同样品第一次稀释后所测的 T1 可以明显看出, 说明抗体-KMnF₃ 的添加量不足, 而当抗体-KMnF₃ 的添加量改为 80 μL 时, 弛豫时间明显下降。说明抗体-KMnF₃ 在溶液中与菌结合后, 多余的抗体-KMnF₃ 降低水的弛豫时间, 测得的 T1 就小, 随着稀释程度的增加, 这种变化就越明显, 样品的 T2 也是这规律。综上所述, 抗体-KMnF₃ 的添加量为 80 μL 时, T1 和 T2 的检测能取得比较好的效果。

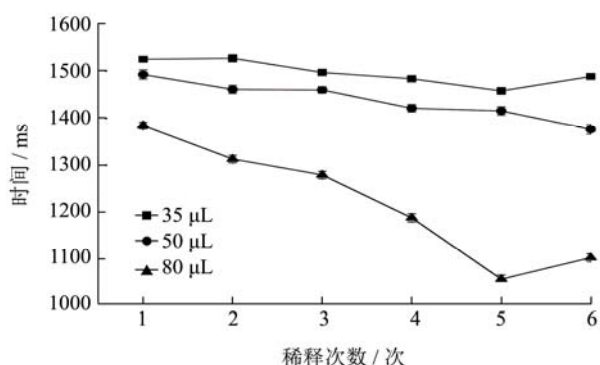


图7 不同抗体-KMnF₃加入量的T1值

Fig.7 T1 value of the amount of added antibody-potassium manganese trifluoride

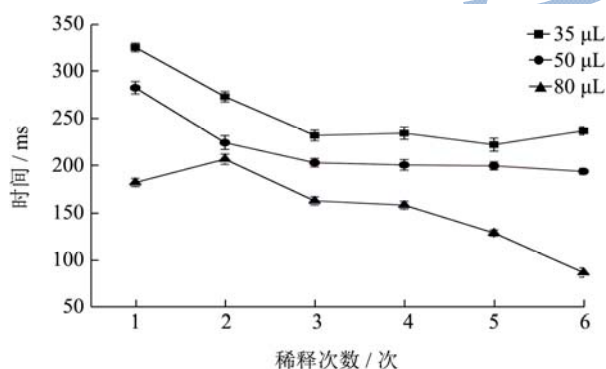


图8 不同抗体-KMnF₃加入量的T2值

Fig.8 T2 value of the amount of added antibody-potassium manganese trifluoride

3 结论

本研究通过将微生物技术、免疫磁珠分离与核磁共振技术相结合, 建立一种全新的基于 KMnF₃ 纳米粒子的食源性致病菌 NMR 快速检测方法。利用 KMnF₃ 纳米粒子具有超强电子弛豫能够大幅降低周围水分子的 T1/T2 弛豫时间效应, 通过偶联特异性抗体对目标进行捕获检测, 通过对照组比较两者弛豫时间的差异来判断食品样本中是否含有目标致病菌, 并在一定范围定量检测目标菌。本次研究表明, 基于 KMnF₃ 纳米

探针的 NMR 快速检测沙门氏菌的最佳条件: 对于 0.0025 g 的 KMnF₃, 活化时加入 0.0125 g EDC·HCL、NHS 就可以达到比较理想状态; 选择缓冲液时使用灭菌的蒸馏水较佳; T1 及 T2 值会随着菌龄时间增长而增大, 相比于培养 7 h 的菌选用培养 10 h 的菌; 同一批不同浓度的沙门氏菌菌液, 分别加入 35 μL 、50 μL 和 80 μL 的抗体-KMnF₃, 加入 80 μL 抗体-KMnF₃ 较为合理。

参考文献

- [1] GB 4789.4-2010, 食品安全国家标准食品微生物学检验:沙门氏菌检验[S]
GB 4789.4-2010, National food safety standard food microbiological examination: *Salmonella* [S]
- [2] 孙园园,赵鹏,刘骏,等.沙门氏菌检测方法研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(1):218-221
SUN Yuan-yuan, ZHAO Peng, LIU Jun, et al. Research progress of *Salmonella* detection methods [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(1): 218-221
- [3] S Datta, M E Janes, J G Simonson. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2008, 15(10): 1541-1546
- [4] 苏晨曦,孙晓红,卢瑛,等.副溶血性弧菌免疫磁珠的制备及其应用[J].食品工业科技,2012,33(17):313-316
SU Chen-xi, SUN Xiao-hong, LU Ying, et al. Preparation and application of *Vibrio parahaemolyticus* using immunomagnetic beads [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(17): 313-316
- [5] Hou Jing-Yuan, Liu Tian-Cai, Lin Guan-Feng, et al. development of an immunomagnetic bead-based time-resolved fluorescence immunoassay for rapid determination of levels of carcinoembryonic antigen in human serum [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 734(13): 93-98
- [6] Jia-hui Lei, Fei Guan, Hong Xu, et al. application of an immunomagnetic bead elisa based on igy for detection of circulating antigen in urine of mice infected with *Schistosoma japonicum* [J]. Veterinary Parasitology, 2012, 187(1-2): 196-202
- [7] Jing Xu, Wei-wei Yin, Yuan-yang Zhang, et al. establishment of magnetic beads-based enzyme immunoassay for detection of chloramphenicol in milk [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2526-2531
- [8] Cecilia S M Lucero Estrada, Lidia del Carmen Velázquez,

- Gabriela Isabel Favier, et al. detection of *yersinia* spp in meat products by enrichment culture immunomagnetic separation and nested PCR [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 157-163
- [9] Lu-xin Wang, Chung-Shieh Wu, Xu-dong Fan, et al. detection of *escherichia coli* o157:h7 and *Salmonella* in ground beef by a bead-free quantum dot-facilitated isolation method [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 156(1): 83-87
- [10] 李梦,韩国成,刘又年.用于分离大肠杆菌O157:H7的免疫磁珠的制备与表征[J].应用化工,2012,41(6):1044-1047
- LI Meng, HAN Guo-cheng, LIU You-nian. Preparation and characterization of immunomagnetic nanoparticle used for separating *E.coli* O157: H7 [J]. Applied Chemical Industry, 2012, 41(6): 1044-1047
- [11] Satoshi Mitarai, Ryouji Karinaga, Hiroyuki Yamada, et al. a novel bead-based specimen concentration method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 90(3): 152-155
- [12] 盛跃颖,陈洪友,张曦,等.免疫磁珠捕获法检测志贺菌的模拟研究[J].检验医学,2012,27(3):167-169
- SHENG Yue-ying, CHEN Hong-you, ZHANG Xi, et al. The simulation study of immunomagnetic separation method for the detection of shigella species [J]. Laboratory Medicine, 2012, 27(3): 167-169
- [13] Karen D Daniel, Grace Y Kim, Christophoros C Vassiliou, et al. Implantable diagnostic device for cancer monitoring [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24(11): 3252-3257