

基于酶联适配体快速检测食品中葡萄球菌肠毒素 A

林祥群¹, 杨国江², 卢春霞^{3*}, 陶思桦³, 闫圣坤⁴

(1. 新疆石河子职业技术学院轻纺化工分院, 新疆石河子 832000) (2. 新疆农垦科学院水土研究所, 新疆石河子 832000) (3. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100)
(4. 新疆农业科学院农业机械化研究所, 新疆乌鲁木齐 830091)

摘要: 该研究基于双适配体夹心原理, 建立了一种酶联适配体检测葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal enterotoxin A, SEA) 的新方法, 并对适配体浓度、链霉亲和素-辣根过氧化物酶浓度、反应体系、封闭条件、反应时间等条件进行了优化。结果显示, 在适配体浓度 40 nmol/L、牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 封闭浓度为 1%、封闭时间 4 h、反应体系为 SEA 适配体筛选缓冲液、链霉亲和素-辣根过氧化物酶稀释体积比 1:40000、靶标与适配体反应时间 30 min 等优化条件下, SEA 在 5~500 ng/mL 浓度范围内呈良好线性 ($R=0.996$), 方法检出限为 0.18 ng/mL, 加标回收率为 91.22%~101.30%, 批内和批间相对标准偏差为 2.82%~7.50%。将建立的方法应用于食品样品中 SEA 检测, 并与国标法 (GB 4789.10-2016) 对比验证, 两种方法的检测结果具有高的相关性 ($R=0.994$)。以上结果表明本方法具有高的灵敏度、准确性和特异性, 该研究为食品中 SEA 检测提供一种简便、经济、高通量的快速检测新技术。

关键词: 葡萄球菌肠毒素 A; 核酸适配体; 酶联适配体分析

文章编号: 1673-9078(2022)02-305-312

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0556

Colorimetric Enzyme-linked Aptamer Assay for Determination of Staphylococcal Enterotoxin A in Foods

LIN Xiangqun¹, YANG Guojiang², LU Chunxia^{3*}, TAO Sihua³, YAN Shengkun⁴

(1. Xinjiang Shihezi Vocational Technical College Textile and Chemical Branch, Shihezi 832000, China) (2. Institute of Irrigation and Soil Fertilizer, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)
(3. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China)
(4. Institute of Agricultural Mechanization Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: In this study, an enzyme-linked aptamer assay (ELAA) was developed for detection of staphylococcus enterotoxin A (SEA) based on sandwich-type format strategy. Several experimental conditions have been investigated, including the concentration of aptamer, BSA and streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP), reaction system, blocking conditions, and incubation time between SEA and aptamer. The results showed that the optimal conditions for ELAA were as follows: aptamers concentration of 40 nmol/L; BSA concentration of 1%; blocking time of 4 h; SEA aptamer screening buffer was used as the reaction system; the dilution volume ratio of streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) was 1:40000; and the incubation time between SEA and aptamers was 30 min. Under the optimal conditions, the calibration curves for SEA showed good linearity in the range of 5~500 ng/mL with correlation coefficients (R) better than 0.996. The limit of detection (LOD) for SEA was 0.18 ng/mL. The recoveries of SEA in food samples were in the range of 91.22%~101.30%. There lative standard deviation (RSD) of intra-assay and inter-assay were in the range of 2.82%~7.50%. Subsequently, the proposed method was applied to measure SEA in real samples, and was validated using official standard method. A good correlation ($R=0.994$) was obtained between the results of the

引文格式:

林祥群, 杨国江, 卢春霞, 等. 基于酶联适配体快速检测食品中葡萄球菌肠毒素 A [J]. 现代食品科技, 2022, 38(2): 305-312

LIN Xiangqun, YANG Guojiang, LU Chunxia, et al. Colorimetric enzyme-linked aptamer assay for determination of staphylococcal enterotoxin A in foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 305-312

收稿日期: 2021-05-25

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxmX0080); 苏州相城区科技领军人才计划

作者简介: 林祥群(1980-), 女, 副教授, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: 36642501@qq.com

通讯作者: 卢春霞(1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: shzlcx2002@163.com

two methods. These results suggest that the proposed method had good sensitivity, accuracy and specificity. This study provides a simple, economical and high-throughput new rapid detection technology for SEA detection in food.

Key words: staphylococcus enterotoxin A; aptamer; enzyme-linked aptamer assay

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是引发食源性疾病的主要致病菌之一, 而引起金黄色葡萄球菌食物中毒的主要致病因子是葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcus enterotoxin, SEs)。据统计, 在世界上由 SEs 引起的食物中毒事件占细菌性食物中毒事件的 25%~45%, 其中 SEA 引起的食物中毒事件占所报道的葡萄球菌中毒病例的 80%^[1]。因此, 如何快速、及时、准确地检出 SEA 是保障食品安全及有效预防食源性疾病的先决条件。

目前, SEA 的鉴定和检测方法主要包括: (1) 分子生物学方法: 该法是基于 SEs 特异基因序列作为检测目标, 采用聚合酶链式反应技术^[2]、基因芯片技术^[3]等对目标物进行快速检测。该法需要昂贵的仪器和专业的技术人员, 无法满足现场快速检测的要求。(2) 基于抗原-抗体识别的免疫分析技术, 是目前最常用 SEA 快速检测技术, 主要包括酶联免疫吸附分析 (ELISA)^[4]、胶体金试纸条^[5]和各种生物传感器^[6,7]。但是抗体的制备需要免疫动物, 制备周期长、成本高。因此, 迫切需要建立简便、经济、灵敏、快速的 SEA 检测方法, 作为现有检测技术的补充, 满足批量样品中 SEA 的快速筛查。而核酸适配体可弥补抗体在检测应用中的不足, 为 SEA 检测提供了新的思路。

核酸适配体 (Aptamer) 是能与特定靶标结合的一段单链寡核苷酸, 通过折叠成发夹、茎环、假结体及 G-四聚体等结构与靶标进行特异性分子识别。基于随机文库的庞大库容和单链核苷酸空间结构的多样性, 适配体几乎可与所有种类的靶标包括大到微生物小到有机小分子^[8-16]发生结合。相较于抗体, 核酸适配体还具有制备简单、生产成本低、应用范围广、易于修饰和标记等特点^[17]。因此, 适配体作为一种新型识别探针在食品安全领域成为人们研究的焦点^[18-22]。2014年, Huang 等^[23]筛选出 SEA 核酸适配体, 适配体亲和力达到 nmol/L 级别, 并通过氧化石墨烯与标记 FAM 荧光基团的 SEA 适配体之间的荧光共振能量转移原理, 实现了对牛奶中 SEA 的检测, 方法检出限达 8.7 ng/mL。马欣月^[24]以荧光标记的 SEA 适配体为分子识别元件, 利用带正电荷的金纳米棒对核酸的静电吸附作用, 以及对荧光基团的猝灭原理, 建立一种特异性强、灵敏度高的 SEA 检测方法。在优化条件下, SEA 线性检测范围为 0.01~0.8 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 5.66 ng/mL, 并将其成功应用于牛奶样品中的 SEA 检测。

酶联适配体分析技术是将传统 ELISA 中的识别元件抗体替换为核酸适配体, 借助酶催化显色及信号放大作用实现对目标物的高灵敏度、高特异性检测。因此酶联适配体分析法有望发展成为商业化试剂盒, 具有广阔的市场前景。但目前尚未见到基于酶联适配体检测 SEA 的研究报道。因此, 本研究以 SEA 适配体为识别分子, 基于夹心模式建立了一种简便、经济、灵敏的检测新方法, 为 SEA 检测提供新的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究中所用核酸适配体^[23]由生物工程 (上海) 股份有限公司合成并纯化。生物素化适配体 1: 5'-bio-TACTTATGCATTTCTCCACGATCTTATTTGAGAGTGAC-3'; 生物素化适配体 2: 5'-bio-AGGCGATTACGCTTCTTGACTTCAATAACGACTCAACTC-3'。

SEA、SEB、SEC1, 上海起发实验试剂有限公司; 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白 (Oval albumin, OVA)、吐温-20 (Tween-20)、链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (Streptavidin-horseradish peroxidase, SA-HRP)、TMB 显色试剂盒, 生物工程 (上海) 股份有限公司; 其余分析纯试剂国药集团化学试剂有限公司; SEA ELISA 检测试剂盒, 南京卡米洛生物工程有限公司; 实验用水为超纯水 (18.2 M Ω ·cm); 链霉亲和素包被的酶标板, 苏州海狸生物医学工程有限公司; 鸡肉和牛奶等食品样品, 本地超市。

1.2 仪器设备

Thermo Scientific™ Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪, 美国 Thermo 公司; 5MX 96 孔板混匀仪, 美国 Scilogex 公司; 5424R 台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Milli-Q Reference 超纯水系统, 美国密理博公司; 万分之一天平, 德国 Sartorius 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶联适配体分析 (ELAA) 的建立

酶标板使用前用 PBST 缓冲液 (10 mmol/LPBS, 0.05% Tween-20) 洗涤 3~5 次, 拍干。加入 200 μL 适配体 1 溶液, 室温孵育, PBST 洗涤、拍干。随后加

入 300 μL 的 BSA 封闭液, 室温孵育, PBST 洗涤。加入 200 μL 待测样品, 室温孵育, PBST 洗涤。加入 200 μL 适配体 2 溶液, 室温孵育一定时间, PBST 洗涤。然后加入 200 μL SA-HRP, 室温孵育 20 min, PBST 洗涤。加入 100 μL TMB 底物显色液, 反应 5~7 min 后, 加入 100 μL 终止液终止反应, 通过颜色变化定性检测 SEA。定量检测时, 采用全波长扫描式多功能读数仪在 450 nm 处测其吸光值。

实验过程中对适配体浓度、封闭剂 BSA 浓度、封闭时间、SA-HRP 浓度、反应体系、靶标与适配体反应时间等条件进行优化。每个实验重复 3 次。

1.3.2 ELAA 检测性能评价

1.3.2.1 灵敏度

在优化条件下, 将 SEA 稀释成系列梯度浓度, 采用 ELAA 方法进行测定, 以不同 SEA 浓度的对数值为横坐标, 以 SEA 各浓度对应的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 对标曲进行线性拟合, 求得线性方程和相关系数。计算 \bar{x}_0+2s (\bar{x}_0 和 s 为 10 份零标准浓度的吸光值的平均值和标准差), 以此该数据在标准曲线上计算出对应的浓度, 即为检出限 (Limit of detection, LOD) [25]。每个实验重复 3 次。

1.3.2.2 特异性

采用建立的 ELAA 方法分别检测 SEA、SEB、SEC1、BSA、OVA, 同时设置空白对照 (SEA 适配体筛选缓冲液), 以评估方法的特异性。

1.3.2.3 加标回收率

采用加标回收实验来考察该 ELAA 方法的准确性。取鸡肉和牛奶空白样品, 分别添加低、中、高三种浓度水平的 SEA。参照 GB/T 4789.10-2016 [26] 中附录 B4.2 的方法提取食品中 SEA, 按照 ELAA 方法进行检测。根据标准曲线计算样品中各 SEA 浓度, 然后计算加标回收率及其相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD)。每个添加水平设置 3 个重复。

1.3.2.4 重复性实验

采用批内和批间误差以评估 ELAA 的精密度。批内精密度: 分别采集 3 份 SEA 添加 (阳性) 样品及 2 份空白 (阴性) 样品, 采用同一批次的适配体, 在同一块酶标板上对样品进行 3 次重复检测, 测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 计算相对标准偏差 (RSD)。批间精密度: 按照建立的 ELAA 方法, 采用 3 个批次的适配体, 在同一酶标上分别检测 3 份阳性样品和 2 份阴性样品, 每个实验重复 3 次, 测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 计算 RSD。

1.4 ELAA 方法的应用

参照 GB/T 4789.10-2016 [27] 中附录 B4.2 的方法提

取不同食品中 SEA。取 200 μL 样品提取液, 按照上述 ELAA 方法进行检测, 计算样品中 SEA 含量。同时采用国标法 (GB/T 4789.10-2016) 进行检测, 并与检测结果对比验证, 以评价本方法的准确性和可靠性。

1.5 数据处理

实验数据用平均值 \pm 标准偏差方式表示, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 方法分析实验数据, 显著性水准为 $\alpha=0.05$, 使用 Origin 8.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 检测条件优化

2.1.1 适配体浓度

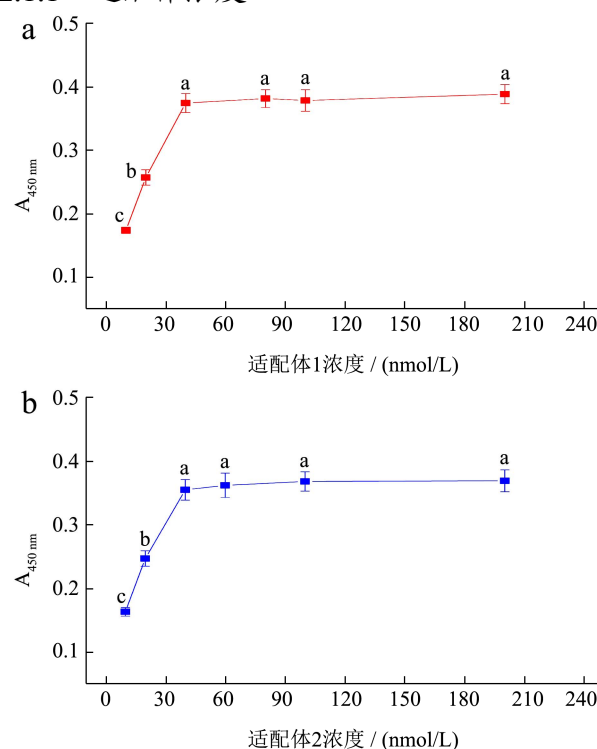


图1 适配体1包被浓度(a)和适配体2浓度(b)对检测性能的影响

Fig.1 The effect of aptamer1 (a) and aptamer 2 concentration (b) on the detection performance

注: 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)。图3、4、5、7同。

适配体 1 (bio-apt1) 的包被浓度对检测灵敏度有一定影响。因此, 本实验固定 SEA 浓度为 500 ng/mL, 适配体 2 浓度为 100 nmol/L, 结合时间 1 h, SA-HRP 稀释比例为 1:40000, 考察了不同 bio-apt1 包被浓度 (10~200 nmol/L) 对检测灵敏度的影响, 实验结果如图 1a 所示。从图中可以看出, 吸光值随着 bio-apt1 包被浓度的增加而增加, 意味着结合 SEA 的量也逐渐增

加,当 bio-apt1 包被浓度超过 40 nmol/L 后,吸光值变化趋于平缓。因此,后续实验选择 40 nmol/L 为 bio-apt1 的包被浓度。

固定适配体 1 包被浓度,考察适配体 2 不同浓度(10~200 nmol/L)对检测性能的影响,结果如图 1b 所示,吸光值随着适配体 2 浓度的增加而增加,当浓度为 40 nmol/L 时,吸光值变化趋势平缓。因此,适配体 2 浓度也选择 40 nmol/L。

2.1.2 封闭条件

在酶联适配体分析中,封闭酶标板上多余位点至至关重要,若封闭不完全,SA-HRP 会与聚苯乙烯板发生非特异性结合,造成较高的背景值^[27]。本实验固定适配体浓度为 40 nmol/L,采用 1% BSA 封闭后直接加入 SA-HRP (1:40000, *V/V*),观察 BSA 浓度和封闭时间对 SA-HRP 非特异性吸附的影响。结果显示(图 2),当 BSA 封闭浓度低于 0.5%,封闭不完全,随着 BSA 浓度的增加,吸光值逐渐下降,说明 SA-HRP 非特异性吸附降低。另外,非特异性吸附随着封闭时间的延长而降低,当封闭时间超过 4 h 后,吸光值无明显变化。综上分析,后续实验选择 1% BSA 封闭 4 h。

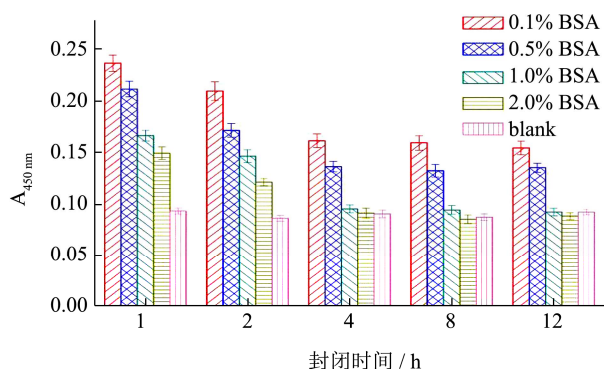


图 2 不同封闭条件对 SA-HRP 非特异性吸附的影响

Fig.2 The influence of different blocking conditions on non-specific adsorption of SA-HRP

2.1.3 反应体系对检测性能的影响

适配体的动态结构和稳定性易受环境变化影响,即反应溶液 pH、离子成分及浓度等显著影响适配体的亲和力及特异性^[28,29],因此最佳的反应缓冲液对检测性能至关重要。本实验分别采用 SEA 适配体筛选缓冲液(20 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂ 和 1 mmol/L MgCl₂·6H₂O, pH 7.4)^[23]和 10 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)作为反应溶液用于稀释适配体、样品和 SA-HRP 等,考察不同反应体系对检测性能的影响。结果如图 3 所示,筛选缓冲液作为反应体系时,吸光显著高于 10 mmol/L PBS 缓冲液。有研究证明,在分析过程中,改变适配体反应体系及离子强度等环境条件可能影响适配体的折叠结构,进

而影响靶标与适配体的相互作用^[28],故检测体系与配体筛选体系之间的一致性对提高检测性能至关重要。因此,后续实验选择 SELEX 缓冲液作为检测体系。

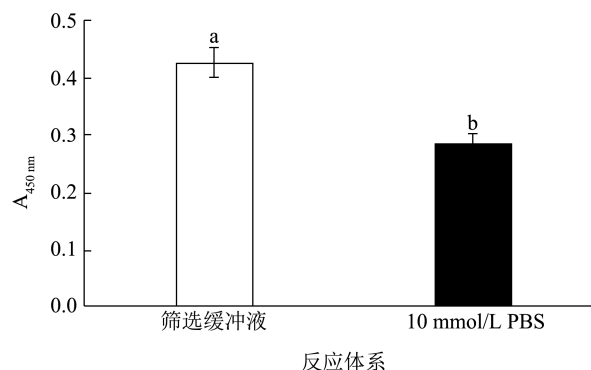


图 3 反应体系对检测性能的影响

Fig.3 The effect of reaction system on the detection performance

2.1.4 反应时间

充足的反应时间可保障 SEA 与适配体充分结合,但反应时间过长,则会影响检测效率。因此,本实验调查了不同反应时间对检测性能的影响。结果如图 4 显示,随着结合时间的增加,吸光值逐渐增大,当反应时间超过 30 min 后,吸光值没有明显变化。表明 SEA 与适配体反应 30 min 即达到平衡状态,延迟反应时间并没有提高检测灵敏度。所以,后续实验选择反应时间为 30 min。

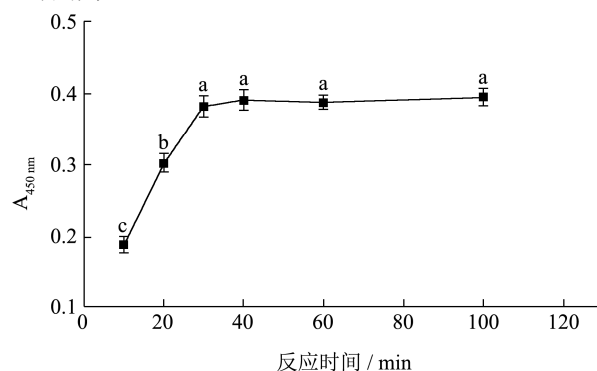


图 4 反应时间对检测性能的影响

Fig.4 The effect of incubation time between SEA and aptamer on the detection performance

2.1.5 SA-HRP 稀释比例

SA-HRP 是酶联适配体显色反应的关键因素,SA-HRP 浓度低,显色反应不充分,浓度过高易引起非特异性吸附。本研究固定以上优化的实验条件,将 SA-HRP 稀释不同比例(1:10000~1:100000),检测结果如图 5 所示,当 SA-HRP 稀释比例在 1:10000~1:40000 范围时,吸光值无明显变化,随着稀释比例进一步增大,吸光值显著降低。故后续实验选择 SA-HRP 稀释比例为 1:40000。

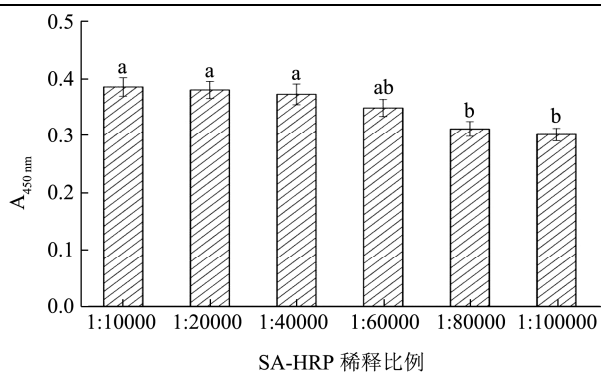


图 5 SA-HRP 浓度对检测性能的影响

Fig.5 The effect of SA-HRP concentration on the detection performance

2.2 检测性能评价

2.2.1 灵敏度

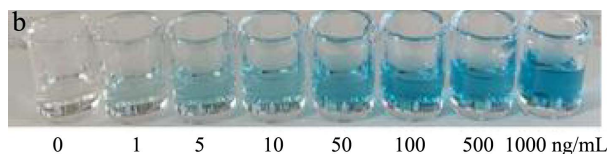
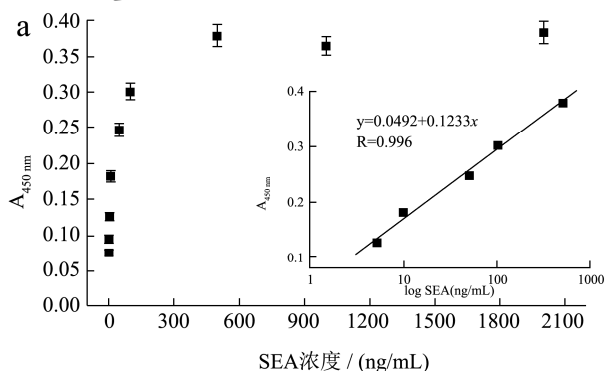


图 6 (a) 不同 SEA 的反应曲线 (外) 及标准曲线 (内), (b) 不同浓度 SEA 的比色反应

Fig.6 (a) The calibration plot of the absorbance versus concentration of SEA, (b) Photograph of colorimetric responses of the detection system in the presence of different concentrations of SEA

在优化条件下,采用 ELAA 方法测定不同浓度的 SEA (0、1、5、10、50、100、500、1000、5000 ng/mL),以 SEA 不同浓度为横坐标,以各浓度对应的 OD_{450 nm} 值为纵坐标,绘制标准曲线。图 6 为 SEA 的剂量反应曲线 (外) 和标准曲线 (内),如图 6a 所示,OD_{450 nm} 值随 SEA 浓度的增加而增大,SEA 在 5~500 ng/mL 浓度范围内与 OD 值呈良好线性关系,相关系数 (R) 为 0.996。基于 \bar{x}_0+2s 计算方法检出限为 0.18 ng/mL。同时溶液颜色的变化与 OD_{450 nm} 值的变化一致 (图 6b),在 SEA 浓度 1 ng/mL 时,溶液显色呈蓝色,故该方法目测可视化检测限为 1 ng/mL。以上结果表明,

本方法具有高的灵敏度。

2.2.2 特异性分析

采用 ELAA 分别检测 SEA、SEB、SEC1、BSA、OVA,同时设置空白对照 (结合缓冲液),以评估方法的特异性。结果见图 7 所示,BSA、OVA 不产生识别信号,与空白对照吸光值相近,说明适配体与无关蛋白没有交叉反应。但适配体与 SEB 和 SEC1 有一定交叉反应,吸光值约 0.12~0.13。这与适配体本身特异性有关,推断原因在于 SEA 与 SEB、SEC1 具有 40%~60% 序列同源性,适配体对该共同结构域具有相同的识别位点^[23]。

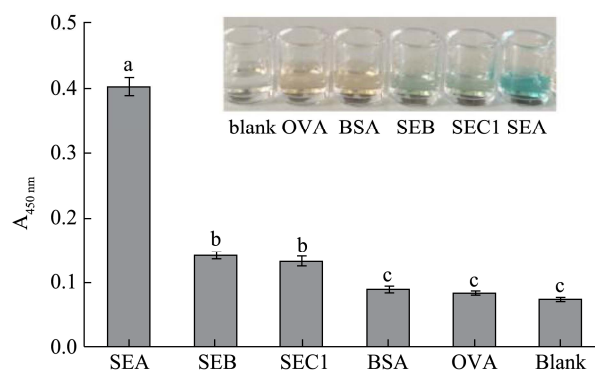


图 7 特异性分析

Fig.7 Specificity analysis

2.2.3 加标回收率

表 1 本方法检测食品中 SEA 的加标回收率 (n=3)

Table 1 Recovery rates of SEA spiked from the food by the developed method (n=3)

样品	添加量/(ng/g)	测定值/(ng/g)	回收率/%	RSD/%
鸡肉	10	9.33±0.37	93.30±3.70	3.96
	50	47.21±2.14	94.42±4.28	4.53
	200	202.56±8.22	101.28±4.11	4.06
牛奶	10	9.122±0.29	91.22±2.90	3.18
	50	46.92±2.42	93.84±4.84	5.16
	200	193.66±8.67	96.83±4.34	4.48

利用所建立的检测方法,对空白样品进行添加回收测定,进一步评价该方法的准确性和精密度。实验结果如表 1 所示,SEA 在空白样品中的平均回收率为 91.22%~101.30%,相对标准偏差 (RSD) 小于 6.00%。以上结果说明所建立的 ELAA 方法具有较高的准确性。

2.2.4 重复性

采用批内和批间误差评估本方法的精密度。研究结果显示,批内相对标准偏差为 2.82%~5.00% (表 2),批间相对标准偏差为 3.33%~7.50% (表 3),结果表明批间和批内重复性良好,本方法具有高的精密度。

表2 批内精密度 (n=3)

Table 2 The precision of intra-batch (n=3)

样品编号	OD _{450 nm} 值			平均值	相对标准偏差/%
阳性 1	0.37	0.39	0.36	0.37	3.42
阳性 2	0.39	0.37	0.37	0.38	3.78
阳性 3	0.39	0.40	0.38	0.39	2.82
阴性 1	0.07	0.08	0.08	0.08	5.00
阴性 2	0.09	0.08	0.08	0.08	5.00

2.3 SEA 检测方法比较

本研究以适配体代替抗体建立的 ELAA 方法, 具有较高的灵敏度和回收率 (见表 4), 与基于适配体的荧光传感检测方法比较, 本方法不需要制备纳米材料

和对适配体过多修饰, 不需要特殊的仪器, 简化了操作步骤。与基于抗体的免疫检测技术比较, 本方法所用适配体可体外筛选获得 (1~2 周) 和人工合成, 具有制备周期短、成本低等优势, 可极大降低检测成本。

表3 批间精密度 (n=3)

Table 3 The precision of inter-batch (n=3)

样品编号	OD _{450 nm} 值			平均值	相对标准偏差/%
	适配体 1	适配体 2	适配体 3		
阳性 1	0.40	0.38	0.39	0.39	3.33
阳性 2	0.37	0.41	0.38	0.39	5.64
阳性 3	0.41	0.41	0.38	0.40	4.75
阴性 1	0.09	0.09	0.08	0.09	6.67
阴性 2	0.09	0.08	0.08	0.08	7.50

表4 本方法与文献报道方法的检测性能比较

Table 4 Comparison of detection performance of between proposed method and reported methods

检测方法	识别探针	检测限/(ng/mL)	线性范围/(ng/mL)	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	参考文献
ELAA	适配体	0.18	5~500	91.22~101.3	2.82~5.00	3.33~7.50	本方法
荧光传感器	适配体	8.70	10~10000	86.93~101.60	-	-	[23]
非标记荧光传感器	适配体	0.67	1~60	95.25~103.5	-	-	[24]
非标记荧光传感器	适配体	0.34	0.5~1000	87.70~94.65	-	-	[30]
ELISA	抗体	0.03	0.06~2	82.67~111.95	3.16~6.05	5.16~10.79	[4]
胶体金试纸条	抗体	10	10~100	-	-	-	[5]
表面等离子免疫传感器	抗体	5	-	-	-	-	[6]
免疫传感器	抗体	20	50~1000	-	-	-	[7]
电化学免疫传感器	抗体	20	50~1000 或 2000	-	-	-	[31]

2.4 检测方法应用

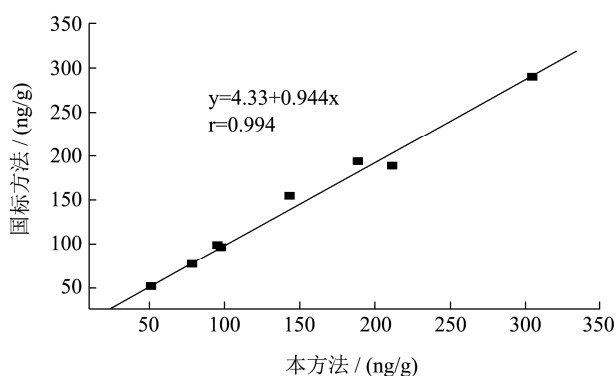


图8 本方法与国标方法 SEA 检测结果相关性分析

Fig.8 Correlation of SEA assay between the proposed method and the official standard method

为了验证本方法在实际样品中的应用效果, 分别采用本方法与国标方法测定 10 组加标样本, 计算样品中 SEA 含量。以本方法测定值为 X 轴, 国标法测定值为 Y 轴作图, 将二者浓度值进行相关性分析。从图 8 中可以看出, 两种方法的检测结果具有高的相关性 ($R^2=0.994$), 表明建立的方法准确度和可靠性较好。

3 结论

本研究以 SEA 适配体为识别分子, 代替抗体建立了一种酶联适配体分析方法, 在优化条件下, 该方法具有低的检测限 (0.18 ng/mL)、高的回收率 (91.22%~101.30%) 和精密度 (RSD<8%)。将建立的 ELAA 应用于食品中 SEA 检测, 检测结果与国标法相关性较高 ($R=0.994$)。且该方法操作简单, 适用于批量样品中 SEA 的高通量快速筛查。本研究为 SEA 检测提供一张简便、经济、准确的快速检测新技术。

参考文献

[1] Argudin M Á, Mendoza M C, Rodicio M R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins [J]. *Toxins*, 2010, 2(7): 1751-1773

[2] 左乐, 姜尹祥, 石晓路, 等. 高通量荧光 PCR 组合方法鉴定 16 种金黄色葡萄球菌肠毒素的方法建立及评估 [J]. *疾病监测*, 2018, 33(9): 753-757

ZUO Le, JIANG Yinxiang, SHI Xiaolu, et al. Establishment and evaluation of high-throughput fluorescent PCR assay for

- identifying 16 kinds of *Staphylococcus aureus* enterotoxins [J]. Disease Surveillance, 2018, 33(9): 753-757
- [3] Lin C M, Chiang Y C, Tsen H Y. Development and use of a chromogenic macroarray system for the detection of *Staphylococcus aureus* with enterotoxin A, B, C, D, E, and G genes in food and milk samples [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(4): 445-452
- [4] Kuang H, Wang W, Xu L, et al. Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013, 10(4): 1598-1608
- [5] 刘晶,李珊珊,李树玲,等.胶体金免疫层析法快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 和 B[J].中国热带医学,2017,17(2):185-187
- LIU Jing, LI Shanshan, LI Shuling, et al. Rapid detection of staphylococcal enterotoxin A and B by colloidal gold immunochromatography [J]. China Tropical Medicine, 2017, 17(2): 185-187
- [6] Haddada M B, Hu D, Salmain M, et al. Gold nanoparticle-based localized surface plasmon immunosensor for staphylococcal enterotoxin A (SEA) detection [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(26): 6227-6234
- [7] Salmain M, Ghasemi M, Boujday S, et al. Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2012, 173: 148-156
- [8] Lu C X, Gao X X, Chen Y, et al. An aptamer-based lateral flow test strip for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* [J]. Analytical Letters, 2020, 53: 646-659
- [9] Wu Q, Wang Y, Wang H, et al. DNA aptamers from whole-cell SELEX as new diagnostic agents against glioblastoma multiforme cells [J]. Analyst, 2018, 143(10): 2267-2275
- [10] 赵丽萍,杨歌,张小敏,等.蛋白质的核酸适配体筛选及应用的研究进展[J].分析化学,2020,48(5):560-570
- ZHAO Liping, YANG Ge, ZHANG Xiaomin, et al. Development of aptamer screening against proteins and its applications [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2020, 48(5): 560-570
- [11] Yu X C, He L, Pentok M, et al. An aptamer-based new method for competitive fluorescence detection of exosomes [J]. Nanoscale, 2019, 11(33): 15589-15595
- [12] Gao S X, Hu W, Zheng X, et al. Functionalized aptamer with an antiparallel G-quadruplex: structural remodeling, recognition mechanism, and diagnostic applications targeting CTGF [J]. Biosensors Bioelectronics, 2019, 142: 111475
- [13] Qian J, Ren C, Wang C, et al. Magnetically controlled fluorescence aptasensor for simultaneous determination of ochratoxin A and aflatoxin B1 [J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1019: 119-127
- [14] 王婷婷,郑思洁,战艺芳,等.结合纳米材料的适配体传感器在重金属检测中的研究进展[J].食品与发酵工业,2021,8:283-289
- WANG Changchang, ZHENG Sijie, ZHAN Yifang, et al. Research progress of aptasensors combined with nanomaterials in heavy metal detection [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 8: 283-289
- [15] Xiao Q, Feng J R, Feng M M, et al. A ratiometric electrochemical aptasensor for ultrasensitive determination of adenosine triphosphate via a triple-helix molecular switch [J]. Microchimica Acta, 2019, 186(7): 478-483
- [16] 刘洪美,栾云霞,陆安祥,等.核酸适配体在小分子目标物快速检测中的应用[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):2958-2965
- LIU Hongmei, LUAN Yunxia, LU Anxiang, et al. Application of aptamers in rapid detection of small molecule targets [J]. Journal of Food Safety Quality, 2017, 8(8): 2958-2965
- [17] Clark S L, Remcho V T. Aptamers as analytical reagents [J]. Electrophoresis, 2002, 23: 1335-1340
- [18] 周迎卓,王欣,刘宝林.基于适配体的功能化纳米探针在食品安全检测中的应用进展[J].食品工业科技,2018,39(10):335-341
- ZHOU Yingzhuo, WANG Xin, LIU Baolin. Progress of functionalized nano probe based on aptamer in food safety and detection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(10): 335-341
- [19] 付瑞杰,周静,田风玉,等.基于纳米材料的光学适配体传感器在农药残留检测中的应用研究进展[J].食品科学,2021,42(3): 330-338
- FU Ruijie, ZHOU Jing, TIAN Fengyu, et al. Recent progress in nanomaterial-based optical aptasensors for the detection of pesticide residues [J]. Food Science, 2021, 42(3): 330-338
- [20] 周静,田风玉,焦必宁,等.基于纳米材料的可视化比色检测技术在食源性致病菌检测中的应用研究进展[J].食品发酵与工业,2019,45(11):259-267
- ZHOU Jing, TIAN Fengyu, JIAO Bining, et al. Applications of visual colorimetric detection methods based on nanomaterials in detecting foodborne pathogens [J]. Food

- and Fermentation Industries, 2019, 45(11): 259-267
- [21] 梁刚,满燕,李安,等.核酸适配体生物传感技术在食品污染物检测中的应用[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):2936-2942
LIANG Gang, MAN Yan, LI An, et al. Applications of aptamer-based biosensing technology in the detection of food contaminants [J]. Journal of Food Safety Quality, 2017, 8(8): 2936-2942
- [22] Mehlhorn A, Rahimi P, Joseph Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: areview [J]. Biosensors, 2018, 8(2): 54-115
- [23] Huang Y K, Chen X J, Xia Y, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against *Staphylococcus aureus* enterotoxin A [J]. Analytical Methods, 2014, 6: 690-697
- [24] 马欣月.基于纳米材料的核酸适配体荧光传感策略快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素A[D].吉林:吉林大学,2020
MA Xinyue. A nanomaterial-based aptamer fluorescence sensing strategy for rapid detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A [D]. Jilin: Jilin University, 2020
- [25] GB/T-2016.酶联免疫分析试剂盒通则[S]
GB/T-2016. Guidelines for Enzyme Immunoassays Kit [S]
- [26] GB/T 4789.10-2016.食品安全国家标准 食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验[S]
GB/T 4789.10-2016, Food Safety National Standard Food Microbiology Test *Staphylococcus aureus* [S]
- [27] Zhang D W, Sun C J, Zhang F T, et al. An electrochemical aptasensor based on enzyme linked aptamer assay [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 31: 363-368
- [28] Sola M, Menon A P, Moreno B, et al. Aptamers against live targets: is *in vivo* SELEX finally coming to the edge? [J]. Molecular Therapy-nucleic Acids, 2020, 21: 192-204
- [29] Ding Yu J, Gao Z H, Li H. Real milk sample assisted selection of specific aptamer towards sarafloxacin and its application in establishment of an effective aptasensor [J]. Sensors and Actuators: B. Chemical, 2021, 343: 130113
- [30] Zhang X Y, Khan I M, Ji H, A label-free fluorescent aptasensor for detection of staphylococcal enterotoxin A based on aptamer-functionalized silver nanoclusters [J]. Polymers, 2019, 12(1): 152-163
- [31] Salmain M, Ghasemi M, Boujday S, et al. Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 29(1): 140-144

(上接第 357 页)

- [64] Lasik-Kurdyś M, Gumienna M, Nowak J. Influence of malolactic bacteria inoculation scenarios on the efficiency of the vinification process and the quality of grape wine from the central European region [J]. European Food Research and Technology, 2017, 243(12): 2163-2173
- [65] 文连奎,王立芳,王贵珍,陆生伊萨酵母降解 L-苹果酸和柠檬酸的研究[J].食品科学,2011,32(7):220-223
WEN Liankui, WANG Lifang, WANG Guizhen. Degradation of L-malic and citric acids by *Issatchenkia terricola* [J]. Food Science, 2011, 32(7): 220-223
- [66] 陈思睿,唐莹,董丹,等.红树莓果汁降酸发酵过程中活性成分的变化[J].食品科学,2021,42(10):241-248
CHEN Sirui, TANG Ying, DONG Dan. Variation of active components of red raspberry juice during acid-reducing culture [J]. Food Science, 2021, 42(10): 241-248
- [67] 陈思睿,唐琳琳,冯建文,等.高效降解柠檬酸酵母菌的筛选鉴定及其在红树莓果汁中降酸特性[J].食品科学,2020,41(22):133-139
CHEN Sirui, TANG Linlin, FENG Jianwen, et al. Isolation and identification of yeast capable of efficiently degrading citric acid and its acid degradation characteristics in red raspberry juice [J]. Food Science, 2020, 41(22): 133-139
- [68] 隋韶奕,张素敏,文连奎,等.陆生伊萨酵母生物降酸酿造树莓干型酒工艺研究[J].食品研究与开发,2014,35(10):51-54
SUI Shaoyi, ZHANG Sumin, WEN Liankui, et al. Use *Issatchenkia terricola* brewing technique of raspberry wine by biological acid-degradation [J]. Food Research and Development, 2014, 35(10): 51-54
- [69] 郝爱玲.降酸酵母菌株筛选及其在果酒发酵中的应用初探[D].咸阳:西北农林科技大学,2017
HAO Ailing. Screening of deacidification yeast strains and application for fruit wine fermentation [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2017
- [70] Zhong W, Liu S Q, Yang H, et al. Effect of selected yeast on physicochemical and oenological properties of blueberry wine fermented with citrate-degrading *Pichia fermentans* [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 145(11): 111261