

基于荧光微球的免疫层析法结合免疫磁珠分离技术快速定量检测鼠伤寒沙门氏菌

李倩茹^{1,2}, 胡霏³, 杨悦熙³, 刘晓云³, 何小维¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088)

(3. 广州万孚生物技术股份有限公司自检型快速诊断国家地方联合工程实验室, 广东广州 510663)

摘要: 为了建立一种能快速、灵敏、特异检测鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ST)的方法, 本研究以荧光微球(FM)为标记物建立了荧光微球免疫层析检测法(FM-ICA), 将羧基化的磁性微球与抗体偶联制备了抗-ST免疫磁珠(IMB), 并将FM-ICA与IMB联合用于富集和检测三种食品样本中的ST。在优化条件下, FM-ICA检测的线性范围为 $3.16 \times 10^6 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL, 回收率为80%~120%, 变异系数均小于5%。当菌液浓度大于 1×10^8 CFU/mL时, 结果显示与同属沙门氏菌的交叉反应; 而当菌液浓度小于或等于 1×10^8 CFU/mL时, 常见的12株非目标菌检测结果为阴性, 特异性较好。FM-ICA+IMB联合检测三种模拟食品时的回收率为38%~55%, 其中, 西红柿对回收率影响较小, 鸡蛋和猪肉影响较大。然而, 联合检测的灵敏度可达到 1×10^5 CFU/mL, 比单一FM-ICA方法提高了30倍, 同时, 整个检测过程可在2 h内完成。本检测方法的建立对于快速筛查鼠伤寒沙门氏菌具有重要意义。

关键词: 荧光; 免疫层析; 磁分离; 鼠伤寒沙门氏菌; 检测

文章编号: 1673-9078(2018)03-196-202

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.029

Rapid and Quantitative Detection of *Salmonella typhimurium* by Immunomagnetic Separation Method Coupled with Immunochromatography Assay Based on Fluorescence Microsphere

LI Qian-ru^{1,2}, HU Fei³, YANG Yue-xi³, LIU Xiao-yun³, HE Xiao-wei¹

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)(3. National & Local United Engineering Lab of Rapid Diagnostic Test, Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: Immunochromatography assay (ICA) was established in this study by using fluorescent microspheres (FMs) as the probe to obtain a rapid, sensitive and specific method for the detection of *Salmonella typhimurium* (ST). Anti-*ST* immunomagnetic beads (IMB) was prepared by coupling magnetic carboxyl-microspheres with antibodies, and FM-ICA was combined with IMB for enrichment and detection of ST in three food samples. Under optimal conditions, the linear range of FM-ICA was $3.16 \times 10^6 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL with the recovery of 80% ~ 120%, and the coefficient of variation was less than 5%. The results showed a cross-reaction with *Salmonella* when the concentration of bacteria was more than 1×10^8 CFU/mL, and the test results of other 12 non-target bacteria were negative when the concentration was less than 1×10^8 CFU/mL. The recoveries of three simulated foods by FM-ICA+IMB were 38%~55%. The tomato samples had little effect on the recovery while eggs and pork showed significant effect on the recovery. In addition, the sensitivity of the combined method could be 1×10^5 CFU/mL, which was a 30 times higher than that of FM-ICA method, and the detection process could be completed within 2 hours. The combined method established in this study was of great significance for rapid screening of *Salmonella typhimurium*.

Key words: fluorescence; immunochromatography assay; magnetic separation; *Salmonella typhimurium*; detection

收稿日期: 2017-09-11

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAK08B07); 广东省科技计划项目(2017A020208014)

作者简介: 李倩茹(1976-), 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 何小维(1959-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 功能碳水化合物材料理论与技术

沙门氏菌(*Salmonella*)在自然界中分布较广,通常能引起人和动物的食物中毒,是人类细菌性食物中毒中最重要的病原菌之一^[1,2]。在已知的 2500 多个血清型中,我国发现的约有 100 个。最常见的引起食物中毒的有鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ST)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)和猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)。Kuang 等^[3]对我国健康活鸡、猪和奶牛进行了沙门氏菌调查,检出率分别为 12.55%、4.09%和 25.12%,并且分离到的这些菌株主要属于 B 血清型的 ST。沙门氏菌能产生一种“多糖-类脂-蛋白质”的内毒素,这些毒素可导致肠黏膜发炎、水肿、充血,严重的引起败血症甚至死亡。为防止 ST 污染,消除食品安全隐患,一种简单、快速筛查方法已成为大家共同的期待。

目前关于食源性致病菌的检测方法,常用的有基于选择性培养基的菌落计数法,基于抗原抗体反应的酶联免疫检测法(ELISA)^[4]、免疫层析法(ICA)和新型免疫传感器检测法等,基于核酸检测的聚合酶链反应(PCR)^[5,6]、环介导等温扩增技术(LAMP)等^[7,8]。传统的分离培养法费时费力,达不到快速检测的目的。基于核酸的检测方法检测灵敏度高,但所需仪器设备昂贵,且需要专业的技术人员操作^[9]。基于免疫学的检测方法中,ICA 简单快速,15 min 内可出检测结果^[10]。胶体金通常用作 ICA 标记物,通过物理吸附作用与抗体蛋白结合。此种方法被用于检测炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*),其灵敏度为 3×10^7 CFU/mL^[11]。Wang 等也利用胶体金作为标记物制备了免疫层析试纸条,检测纯牛奶中的 ST,检测灵敏度为 1.25×10^6 CFU/mL^[12]。这种基于胶体金标记的 ICA,检测的灵敏度低,且不能够定量检测。把荧光素包裹进聚苯乙烯微球中而制得的 FM,其荧光由于聚苯乙烯的阻隔作用而不会受环境中各种因子的影响,荧光信号强而稳定,其表面修饰的羧基能与抗体表面的氨基通过 EDC/NHS 的作用而发生稳定的结合,使其不会从抗体表面脱落。Xie 等比较了 FM 与胶体金用于标记检测,结果表明 FM 与抗体的偶联率和检测的灵敏度都高于胶体金标记^[13]。然而食品中致病菌的检测结果还受到食品基质的影响,为了消除这种干扰,免疫磁分离技术是一种很好的方法。该方法是通过磁性微球上偶联特异性抗体形成 IMB,与食品中存在的抗原发生特异性结合后,在磁力的作用下,抗原抗体复合物与其它杂质分离,从而达到快速富集致病菌的作用。该技术与其它检测技术的结合可使检测灵敏度得到大大提高^[14]。本研究采用的 FM-ICA+IMB 检测鼠伤寒沙门氏菌的方法未见报道,该方法的建立对快速监测食品中的鼠伤寒

沙门氏菌具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株及培养条件

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ST, ATCC 14028)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*, ST, CMCC 50071)、甲型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi*, SP, ACMCC50093)、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi*, SP, BCMCC 50094)、大肠埃希氏菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7, E.coli O57:H7, NCTC 12900)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, BT, ATCC 10792)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA, BNCC 339952)、八叠球菌(*Sarcina*, CMCC 28001)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, E. coli, CMCC 44108)接种于 LB 培养液中 37 °C 培养 18 h;单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM, ATCC 19115)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM, CMCC 54004)接种于脑心浸液中 37 °C 培养 24 h;副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP, ATCC 33847)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP, ATCC 17802)接种于碱性蛋白胨水中 37 °C 增菌培养 18 h。增菌后的菌液加入 0.5%的甲醛置于 4 °C 冰箱中 12 h 灭活,然后 12000 r/min 离心 10 min,重悬于 PBS (0.1 M, pH 7.4, 0.1% Na₂S₂O₃)中 4 °C 保存备用。

1.1.2 试剂及仪器

鼠伤寒沙门氏菌多克隆抗体为广州万孚生物抗体实验室自制;鼠伤寒沙门氏菌单克隆抗体购自台湾 Abnova 公司;羊抗兔 IgG (GAR)、兔 IgG、羊抗鼠 IgG (GAM)购自北京中杉金桥生物技术公司;羧基磁珠 xMag 购自西安金磁纳米生物技术有限公司;荧光微球购自美国 Merck 公司;乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、吐温-20、一水吗啉乙磺酸(MES)购自美国 Sigma 公司;硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫、PVC 板购自美国 Millipore 公司;荧光微球稀释液、标记 A 液、C 液、S 系统及包被缓冲液等由广州万孚生物技术股份有限公司提供。

喷膜机(IsoFlow),美国 Biodot 公司;切条机(HGS201),杭州峰航科技有限公司;荧光检测仪(飞测),广州万孚生物技术股份有限公司;多功能磁性分离器(MS-12),上海奥润微纳科技有限公司;超纯水机(Milli-Q),美国 Millipore 公司;恒温培养振荡器

(2HWY-21029 型), 上海智诚分析仪器制造。

1.2 方法

1.2.1 磁性微球与抗体偶联

采用 EDC/NHS 偶联法^[15], 磁性微球(0.5 mg)用 MEST (10 mM, pH 6.0, 0.05% Tween-20)清洗 3 次, 加入新鲜配制的 50 μ L EDC (5 mg/mL)和 50 μ L NHS (5 mg/mL)反应 30 min 活化磁性微球表面的羧基基团, 磁分离去除未反应的 EDC 和 NHS, 加入 250 μ L MES 缓冲液(含抗-ST 多克隆抗体 80 μ g)悬浮磁性微球, 置于恒温振荡器中混匀反应 3 h; 磁分离去除未偶联的抗体, 然后加入 PBST (含 1% BSA)于 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 封闭磁珠表面的自由基团; 最后加入 250 μ L PBST 缓冲液 (pH 7.4、含 0.02% NaN_3 及 0.5% BSA) 悬浮磁珠, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。偶联率用磁性微球与抗体偶联前后的蛋白浓度来计算, 用 Micro BCA 检测试剂盒测定偶联液中的抗体浓度。

1.2.2 荧光微球与抗体偶联

取 2.5 mg 荧光微球于稀释液中洗涤 2 次, 然后加入活化缓冲液(A 液)新鲜配制的 Sulfo-NHS 和 EDC 溶液各 250 μ L (10 mg/mL), 超声混匀, 置于振荡器上闭光反应 20 min, 然后 12000 r/min 离心 10 min, 去除多余的 EDC 和 NHS 并洗涤 3 次得到活化的荧光微球; 加入偶联缓冲液(C 液)稀释的抗体超声分散后闭光震荡反应 3 h, 反应完成后, 洗涤 3 次, 去除未偶联的抗体, 然后再加入 1 mL 0.5% BSA 封闭未偶联的羧基基团, 然后保存于 S 系统中备用。

1.2.3 免疫层析试纸条的制备及条件优化

免疫层析试纸条由样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成, 样品垫预先用 PBS (10 mM, pH 7.2, 0.05% 吐温-20, 2% BSA, 3% 蔗糖, 0.05% NaN_3)处理, 硝酸纤维素膜上的分别设置检测线(T 线)和质控线(C 线), 两线间间隔 4 mm, 把抗-ST 抗体和羊抗鼠 IgG (GAM)稀释至一定浓度, 分别以 2 μ L/cm 的量喷到 T 线和 C 线上, 置于 50 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 48 h。然后按顺序把处理过的样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫相互搭接在聚氯乙烯 (PVC) 板上, 用切条机切割成 4 mm 宽的试纸条。试纸条装入检测卡中待用。测试时把荧光微球标记的抗-ST 抗体和鼠 IgG 进行稀释, 然后加入到待检样本中, 混合反应 1 min, 形成抗原抗体免疫复合物, 然后取 75 μ L 滴加于免疫层析试纸条的加样孔中, 层析 15 min 后用荧光定量检测仪检测 T 线和 C 线的荧光值。

T 线和 C 线包被浓度的确定: 用包被液稀释抗-ST 多克隆抗体至终浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/mL,

GAM 稀释至终浓度为 0.1、0.2、0.5、1 mg/mL; 并分别喷到对应的 T 线和 C 线上, 然后进行荧光检测。

标记浓度的筛选: 将抗-ST MAb 浓度调整至终浓度 0.2、0.4、0.5、1.0 mg/mL, 并与荧光微球进行偶联。标记后 GAM 稀释比例为 1:800, 标记后 ST MAb 稀释比例为设置为 1:50、1:75、1:100、1:150、1:200, 然后与样品以 2:3 比例混合, 加样 80 μ L 检测 T/C 值。

1.2.4 FM-ICA 性能评价

1.2.4.1 敏感性

用 PBS 缓冲液将已知浓度的 ST 菌液稀释至 1×10^6 、 3×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 、 3×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 5×10^9 、 8×10^9 、 5×10^{10} CFU/mL, 每个浓度用 FM-ICA 重复测定三次, 以菌液浓度对数值 [LG(CFU/mL)]为横坐标, 以 T/C 值为纵坐标, 绘制剂量反应曲线, 确定检测的线性范围。20 份阴性样本(20 PBS)的 T/C 值加上 3 倍标准差即为 CUT-OFF 值, 通过 CUT-OFF 值求出最低检测限(Limit of Detection, LOD), 定量限的计算是通过 20 份阴性样本的平均值加上 10 倍标准差而求出。测定的 T/C 值大于或等于 CUT-OFF 值则为阳性, 小于 CUT-OFF 值则为阴性。

1.2.4.2 特异性

对 13 株非目标菌的高浓度菌悬液(10^9)进行测试, 如果所得 T/C 值高于 CUT-OFF 值则判断有交叉反应。

1.2.4.3 回收率

通过向 PBS 缓冲液中添加一定量的标准 ST 菌液制得已知浓度的菌悬液, 然后取不同批次制作的试纸条进行测试。回收率是通过检测值与实际添加量的百分比, 每个浓度测定 5 个平行, 回收率越高, 该检测方法越准确。

1.2.4.4 精密度

板内精密度的测定: 通过选取同一张 PVC 板制作的试纸条对 5 个 ST 菌液进行检测, 每个菌液浓度测 10 次; 板间精密度的测定: 选取不同的 PVC 板进行测试, 每个浓度测 10 次。

1.2.5 IMB+FM-ICA 对模拟样本的检测

从市场上购买鸡蛋、鲜猪肉和西红柿三种常见食物作为模拟样本。分别根据国家食品卫生微生物学检验: 蛋与蛋制品检验、肉与肉制品检验, 对蛋、鲜肉进行预处理得到 10 倍稀释的蛋清液、10 倍稀释的蛋黄液; 西红柿用匀质机匀质, 将其捣烂分别提取西红柿汁及过滤后西红柿汁。然后分别向 1 mL 样液中添加 ST 至终浓度为 1×10^7 、 3×10^6 、 1×10^5 CFU/mL, 然后向 3×10^6 、 1×10^5 CFU/mL 两个浓度中加入 0.5 mg 制备好的免疫磁珠, 于 37 $^{\circ}$ C 190 r/min 混合 30 min, 磁分离后去上清, 再加入磷酸-柠檬酸缓冲液(pH 2.6,

0.2 M)进行洗脱,分离 ST 和 IMB,上清液加入 Tris-HCl 调 pH 至 7.0 左右,然后取 80 μ L 加入荧光检测卡中进行测试。

2 结果与讨论

2.1 FM-ICA 制备

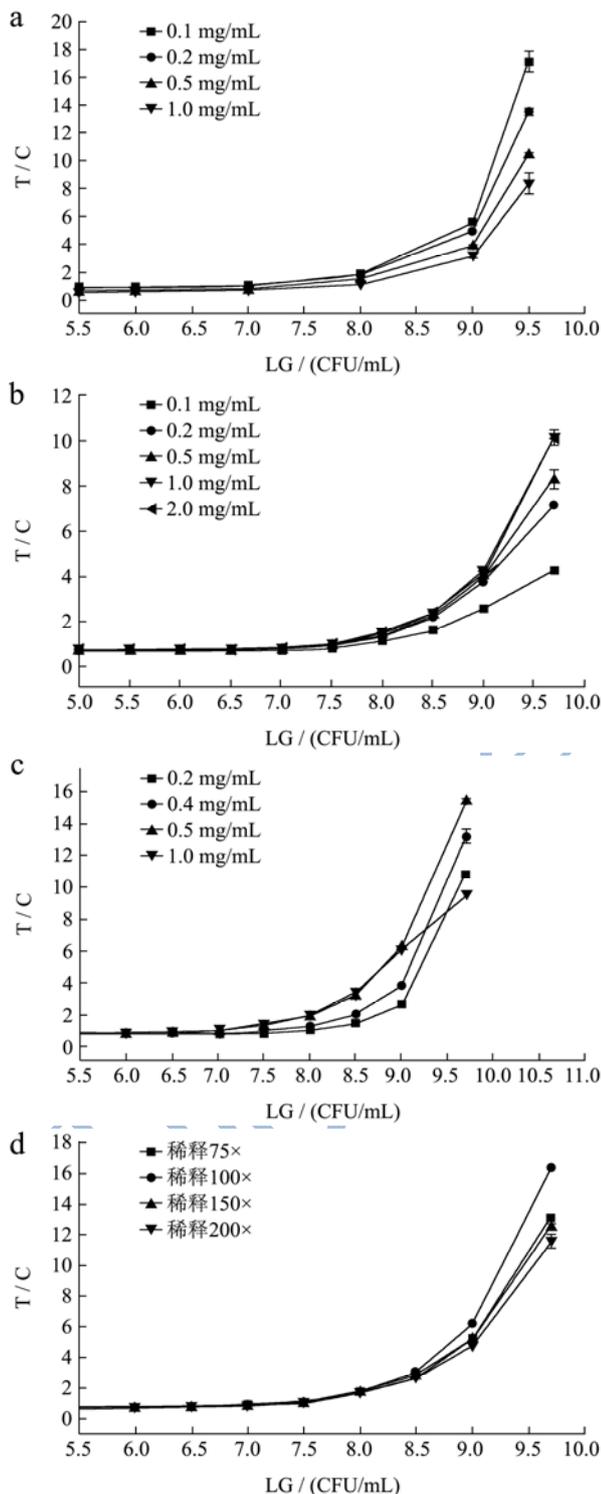


图 1 FM-ICA 试纸条优化

Fig.1 Optimization of FM-ICA test strip

注: a: C 线包被抗体的浓度; b: T 线包被抗体的浓度; c: FM 标记抗体的浓度; d: T 线标记抗体的稀释倍数。

抗体的标记浓度直接影响检测的荧光信号,理论上随着抗体浓度的增加,更多的抗体可以结合到荧光微球上,从而增加捕获抗原机会,然而,当标记浓度过高时,可能会造成抗体表面抗原表位的空间位阻效应,从而阻碍了抗原抗体的结合。C 线和 T 线上抗体的包被量也直接影响荧光信号值,阳性/阴性的荧光信号值随着包被抗体浓度的升高而出现先增加后降低的趋势,而且 C 线上抗体浓度过高, T/C 值便会减小,过小的 T/C 值影响检测的敏感性;标记抗体的量与待测抗原的量也影响检测的敏感性。因此,FM-ICA 制备的最优条件需要从荧光信号强度、T/C 值、SD 值、线性范围、成本节约及变异系数等方面进行筛选。通过一系列的优化实验,本实验确定 C 线包被浓度为 0.5 mg/mL(图 1a),在此包被浓度下, T/C 值较大,对不同浓度菌液的敏感性较高,且 C 线的荧光信号较强;T 线包被抗体的浓度越高, T/C 值越大,但当包被浓度为 1 mg/mL 时的 T/C 值不再增大,几乎与 2 mg/mL 时的 T/C 值一样(图 1b),说明 T 线的包被浓度为 1 mg/mL 时,检测的敏感性最高;在 GAM 的标记浓度为 0.5 mg/mL 并稀释 800 倍的条件下, ST MAb 标记浓度为 0.5 mg/mL 时 T/C 值最大,稀释 100 倍后用于检测不同菌液浓度的 T/C 值最高(图 1c 和 d),敏感性最好,因此选择 0.5 mg/mL 作为最佳标记浓度。

2.2 FM-ICA 敏感性

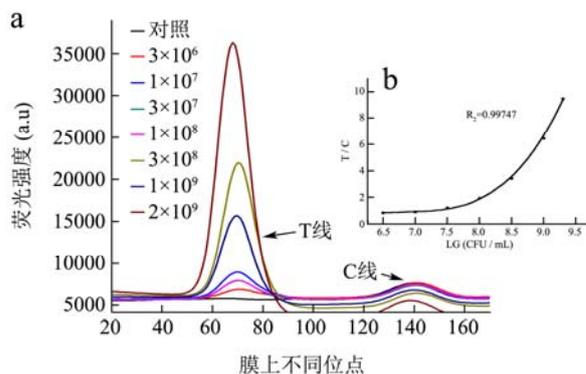


图 2 荧光强度随菌液浓度的变化 (a) 及对应的标准曲线 (b)

Fig.2 Changes of fluorescence intensity with the concentration of bacteria (a) and the corresponding standard curve (b)

免疫层析过程容易受很多因素的影响,如样品的基质、样品的粘度、环境温度、空气湿度以及硝酸纤维素膜的材质及孔径大小等,即使同一样品不同批次检测荧光信号值也会有差异。为了消除这些差异带来的影响,采用检测线与质控线的比值(T/C 值)校正上述因素引起的误差,使结果更稳定。在最优条件下,

试纸条的荧光强度随菌液浓度的增加而增大, 检测的线性范围为 $3.2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL(图 2a)。曲线拟合得三次曲线 $y=0.62x^3-12.96x^2+90.63x-210.56$, $R^2=0.9997$ (图 2b)。对 20 份空白样品测得的 T/C 值, 分别为 0.83 和 0.89, 根据标准曲线计算出检测限为 3.2×10^6 CFU/mL, 定量限为 4.1×10^6 CFU/mL。本实验所测得的检测限值与其他学者的研究结果相比, 相对偏高, 笔者认为这可能与不同的抗体材料、不同检测仪器的敏感性有关。

2.3 回收率

表 1 FM-ICA 对不同浓度菌液的回收率

Table 1 Recoveries of FM-ICA for different bacterial concentrations

添加浓度/(CFU/mL)	第一批		第二批		第三批	
	实测浓度/(CFU/mL)	回收率/%	实测浓度/(CFU/mL)	回收率/%	实测浓度/(CFU/mL)	回收率/%
6.00E+06	4.42E+06	73.69	4.18E+06	69.67	4.10E+06	68.38
6.00E+07	5.65E+07	94.11	5.74E+07	95.67	6.64E+07	110.74
1.58E+08	1.35E+08	85.58	1.37E+08	86.74	1.42E+08	89.72
6.00E+08	4.95E+08	82.57	5.16E+08	86.01	4.97E+08	82.85
1.50E+09	1.54E+09	102.46	1.71E+09	113.68	1.61E+09	107.12

2.4 精密度

精密度是指重复测定同一均匀样品所得结果的一致程度, 它表示了分析方法的可重复性及测量系统随机误差的大小^[16]。本实验采用变异系数法(CV 值)来评价试纸条的精密度大小, 变异系数越小, 则分析方法的精密度越高。4 个菌液浓度 10 次重复测定结果如表 2, 从表 2 中可以看出, 不同的菌液浓度所测得的 T/C 值变异系数均小于 5%。

表 2 FM-ICA 精密度分析

Table 2 Precision analysis of FM-ICA

	T/C	SD	CV%
空白	0.82	0.01	0.81
板内精密度 (n=10)	3×10^6	0.85	0.00
	3×10^7	1.14	0.02
	3×10^8	3.04	0.08
	2×10^9	8.67	0.17
板间精密度 (n=10)	空白	0.83	0.01
	3×10^6	0.87	0.01
	3×10^7	0.96	0.01
	3×10^8	3.06	0.07
	2×10^9	8.53	0.25

2.5 特异性

添加回收实验一般用来评价试纸条定量检测的准确度, 回收率是指检测值与添加量的百分比, 回收率越高检测越接近真实值, 准确度越高。本实验通过在样品中添加已知浓度菌液, 然后用 3 个批次的检测卡进行模拟检测, 结果如表 1, 从表 1 中可以看出, 三个批次的回收率都差不多, 不同批次的检测卡对检测结果的影响不大。

但添加菌液浓度为 10^6 CFU/mL 时, 回收率相对较低, 三个批次分别为 73.69%、69.67%和 68.38%, 但当检测较高浓度菌液时, 回收率均在 80%~120%之间。

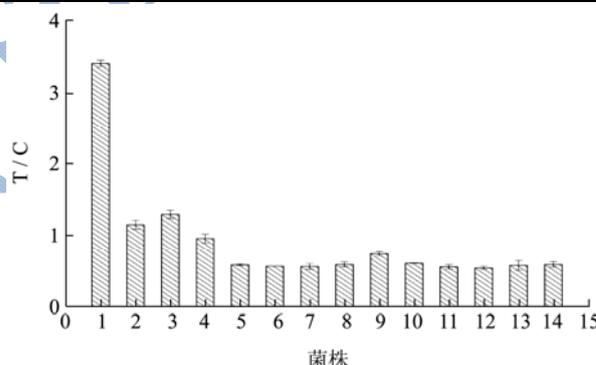


图 3 FM-ICA 的特异性分析

Fig.3 Specificity analysis of FM-ICA

注: 1. ST, ATCC 14028; 2. SP, BCMCC 50094; 3. SP, ACMCC50093; 4. ST, CMCC 50071; 5. VP, ATCC 33847; 6. SA, BNCC 339952; 7. VP, ATCC 17802; 8. LM, ATCC 19115; 9. LM, CMCC 54004; 10. BT, ATCC 10792; 11. *E. coli*, CMCC 44108; 12. *E. coli* O57:H7, NCTC 12900; 13. *Sarcina*, CMCC 28001; 14.对照。

由于沙门氏菌属内的菌株会有相同抗原的存在, 当用 5×10^8 CFU/mL 菌液进行检测时, 发现伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌检测的 T/C 值高于 CUT-OFF 值, 显示阳性信号, 结果见图 3。但当菌液浓度低于 1×10^8 CFU/mL, 非目标菌(包括沙门氏属内菌株)的检测结果显示阴性, 特异性较好。

2.6 FM-ICA+IMB 对模拟样本检测

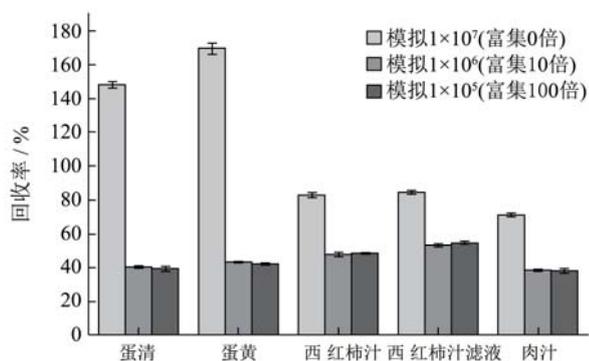


图4 不同食品基质对回收率的影响

Fig.4 Effects of different food matrices on recoveries

经过均质后的三种样本稀释液分别接种已知浓度的鼠伤寒沙门氏菌至终浓度为 1×10^7 、 3×10^6 和 1×10^5 CFU/mL, 对 3×10^6 、 1×10^5 CFU/mL 的模拟样本加磁珠富集 10 倍和 100 倍后再用 FM-ICA 进行检测, 结果如图 4。从图中可看出, 不加磁珠富集的模拟样本, 回收率为 71%~169.8%, 鸡蛋(无论是蛋清还是蛋黄)中的回收率远超出实际添加量, 分别达到 147.94%和 169.83%, 西红柿汁和西红柿滤液中的回收率最接近真实值, 都达到 80%以上, 肉汁中的回收率最低, 说明不同的食品基质对 FM-ICA 检测结果影响较大。加磁珠富集后, 模拟样本的回收率为 38%~55%, 远低于不加磁珠的模拟样本, 但灵敏度可达 1×10^5 CFU/mL, 较单一 FM-ICA 检测至少提高了 30 倍。

结果表明, 无论单一方法检测或联合检测, 西红柿汁和西红柿汁滤液作为基质样本时检测回收率均高于蛋清、蛋黄和肉汁样本, 西红柿作为检测基质对信号值的影响最小, 其余两种样本对荧光信号值影响较大。本实验是根据国家食源性致病菌检测标准对样本进行 10 倍稀释处理, 所得回收率出现偏高和偏低的情况, 这可能与食品基质的稀释倍数有关^[17]。免疫磁珠用于捕获食源性致病菌是一种快速富集的方法, 可代替传统的增菌培养而节约检测所需的时间, 理论上磁珠富集后所得的回收率应该与添加量相当, 然而, 本方法中磁珠富集到的致病菌需进行洗脱才能进行检测, 在洗脱的过程中, 可能造成了菌体表面抗原的破坏而使回收率降低, 另外, 洗脱的过程本身也造成了细菌的损失。因此, 如何提高磁珠捕获后的洗脱率及如何防止细菌表面抗原遭到破坏将作进一步的研究。

3 结论

3.1 本研究采用荧光微球作标记物, 建立了 FM-ICA 快速检测鼠伤寒沙门氏菌的方法, 并筛选出 FM-ICA

的最佳制备工艺为: C 线包被浓度为 0.5 mg/mL、T 线包被浓度为 1 mg/mL、鼠伤寒沙门氏菌 MAb 标记浓度为 0.5 mg/mL 并稀释 100 倍, GAM 的标记浓度为 0.5 mg/mL 并稀释 800 倍。

3.2 FM-ICA 用于检测鼠伤寒沙门氏菌纯培养时其最低检测限为 3.16×10^6 CFU/mL, 最低定量限为 4.08×10^6 CFU/mL, 对高浓度菌液的回收率均在 80%~120%之间, 板内和板间变异系数均小于 5%, 该方法可用于鼠伤寒沙门氏菌快速定量, 准确度高。当菌液浓度低于 1×10^8 CFU/mL, 与同属沙门氏菌无交叉反应信号, 特异性较好。

3.3 食品基质影响 FM-ICA+IMB 联合检测的回收率, 但使用 IMB 富集能使检测的灵敏度提高 30 倍, 最低检测限为 10^5 CFU/mL, 并在 2 h 内完成检测过程。本研究所制备的 FM-ICA+IMB 是一种快速、灵敏、特异的检测方法, 能用于食品加工过程的快速筛查鼠伤寒沙门氏菌, 但捕获后的洗脱过程有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kotova A L, S A Kondratskaya, I M Yasutis. *Salmonella* carrier state and biological characteristics of the infectious agent [J]. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology & Immunology*, 1988, 32(1): 71
- [2] Callejón R M, M I Rodríguez-naranjo, C Ubeda, et al. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2015, 12(1): 32-38
- [3] Kuang X, H Hao, M Dai, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from farm animals in China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 602
- [4] Wu X, W Wang, L Liu, et al. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples [J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(21): 9047-9053
- [5] 宫强,李战丽,牛明福,等.鼠伤寒沙门氏菌 ompc 基因 PCR 的检测方法[J].食品科学,2015,36(16):251-254
GONG Qiang, LI Zhan-li, NIU Ming-fu, et al. Establishment of PCR detection method for *Salmonella typhimurium* based on ompc gene [J]. *Food Science*, 2015, 36(16): 251-254
- [6] Mcguinness S, E McCabe, E O'Regan, et al. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat [J]. *Meat Science*, 2009, 83(3): 555-562
- [7] 黄文宇,柳陈坚.食源性沙门氏菌检测方法的研究进展[J].生物技术,2009,9(3):95-97

- HUANG Wen-yu, LIU Chen-jian. Research progress of detection methods of foodborne *Salmonella* [J]. Biotechnology, 2009, 19(3): 95-97
- [8] Ravan H, M Amandadi, N Sanadgol. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 91: 161-165
- [9] Law J W F, N S Ab Mutalib, K G Chan, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 5: 770
- [10] Yeni F, S Acar, Ö G Polat, et al. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce [J]. Food Control, 2014, 40: 359-367
- [11] Fisher M, Y Atiya-Nasagi, I Simon, et al. A combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of *Bacillus anthracis* spores-assessment in water and dairy products [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(4): 413-418
- [12] Wang W, L Liu, S Song, et al. A highly sensitive ELISA and Immunochromatographic strip for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk samples [J]. Sensors, 2015, 15(3): 5281-5292
- [13] Xie Q Y, Y H Wu, Q R Xiong, et al. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 54: 262-265
- [14] Zhang X, J Zhou, C D Zhang, et al. Rapid detection of *Enterobacter cloacae* by immunomagnetic separation and a colloidal gold-based immunochromatographic assay [J]. Rsc Advances, 2016, 6(2): 1279-1287
- [15] 张赛,何小维,刘晓云,等. 荧光免疫层析法结合免疫磁珠分离技术快速检测单增李斯特菌 [J]. 现代食品科技, 2014, 11: 229-234
- ZHANG Sai, HE Xiao-wei, LIU Xiao-yun, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using a fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic bead separation [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 11: 229-234
- [16] Lönnberg M, J Carlsson. Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner [J]. Analytical Biochemistry, 2001, 293 (2): 224
- [17] Wu X, M Huang, S Yu, et al. Rapid and quantitative detection of 4(5)-methylimidazole in caramel colours: a novel fluorescent-based immunochromatographic assay [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 843-7