

氨基化磁珠非靶向富集食源性致病菌的条件筛选及优化

李诗瑶^{1*}, 彭青枝¹, 王鸣秋¹, 刘艳¹, 董婉婷²

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 国家市场监管重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北武汉 430075) (2. 武汉软件工程职业学院, 湖北武汉 430205)

摘要: 该研究基于氨基化磁珠静电富集细菌技术, 建立了一种可同时富集鼠伤寒沙门氏菌, 金黄色葡萄球菌, 单增李斯特氏菌的方法。在每 2 mL 单菌液中 (10^3 CFU/mL) 分别加入 5~200 μ g 的 3 种粒径的氨基化磁珠 (1 μ m、300 nm、100 nm), 当孵育 5~90 min 时检测各细菌的富集效率。将单菌液体系的富集正交试验结果应用至混和菌体系的单因素试验和正交试验, 将最终结果应用至大体积实验体系以及实际样本 (市售牛奶、水果沙拉)。结果表明, 当氨基化磁珠添加量为 50 μ g、孵育时间为 30 min 时对 3 种病原菌可以达到 60% 以上的捕获率, 所有反应均在 pH 值 7.4 的 PBS 中进行。磁珠粒径选择 300 nm ($p < 0.05$)。在实际样本牛奶、水果沙拉中, 当三种混合菌的最低浓度为 2×10^2 CFU/g (mL) 时, 捕获率高于 55%, 结果可达到荧光定量 PCR 的检测下限。氨基化磁珠与免疫磁珠比较, 其具有稳定保存、低成本, 高效率等优势, 其非靶向富集的能力为下游食源性致病菌的快速检测提供有效前处理富集手段。

关键词: 非靶向富集; 氨基化磁珠; 食源性致病菌

文章编号: 1673-9078(2022)10-297-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1301

Screening and Optimization of Conditions for Untargeted Enrichment of Foodborne Pathogens by Amino Magnetic Beads

LI Shiyao^{1*}, PENG Qingzhi¹, WANG Mingqiu¹, LIU Yan¹, DONG Wanting²

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, China Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

(2. WuHan Vocational College of Software and Engineering, Wuhan 430205, China)

Abstract: In this study, a method for the simultaneous enrichment of *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* was developed based on the electrostatic enrichment technology using amino magnetic beads. Three different sized amino magnetic beads (5~200 μ g; 1 μ m, 300 nm, 100 nm) were added respectively into each bacterial solution (2 mL; 10^3 CFU/mL), and the enrichment efficiency of each bacteria was detected after the incubation was conducted for 5~90 min. The results of the orthogonal enrichment tests for the single bacteria system were applied to the single factor tests and orthogonal tests of the mixed bacteria system, and the final results were applied to the large-volume experimental system and actual samples (commercially available milk and fruit salad). The results showed that when the addition amount of amino magnetic beads was 50 μ g and the incubation time was 30 min, the capture rate for the three kinds of pathogens could reach over 60%. All reactions were performed in PBS at pH 7.4. The bead diameter was selected to be 300 nm ($p < 0.05$). The capture rate was higher than 55% when the minimum concentration of the three mixed bacteria was 2×10^2 CFU/g (mL) in the actual samples of milk and fruit salad. This result could reach the detection limit of fluorescence quantitative PCR. Compared with immunomagnetic beads, the amino magnetic beads had many advantages, such as high stability over storage, low cost and high efficiency. The ability of untargeted enrichment provides an effective pretreatment enrichment method for the rapid detection of downstream foodborne pathogens.

引文格式:

李诗瑶, 彭青枝, 王鸣秋, 等. 氨基化磁珠非靶向富集食源性致病菌的条件筛选及优化[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 297-302

LI Shiyao, PENG Qingzhi, WANG Mingqiu, et al. Screening and optimization of conditions for untargeted enrichment of foodborne pathogens by amino magnetic beads [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 297-302

收稿日期: 2021-11-22

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2020BCA091)

作者简介: 李诗瑶 (1989-), 女, 硕士, 质量工程师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: 927312490@qq.com

Key words: untargeted enrichment; amino magnetic beads; food-borne pathogens

食源性病原菌是指可以引起食物中毒或以食品为传播媒介的致病性细菌,其入侵宿主并具有致病性。常见的食源性致病菌有金黄色葡萄球菌、致病性大肠杆菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、结核菌等^[1]。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)提供的数据,全世界每年有近200万人死于食源性病原体引起的肠道疾病^[2]。现阶段,食源性致病菌的主要检测方法有培养法、生化鉴定及聚合酶链式反应法等^[3-5],其中培养法是黄金标准方法^[1],需要进行增菌、分离、鉴定等多个步骤,耗时长,具有一定的局限性。即使经过选择性增菌培养后,致病菌的快速检测仍然受到培养基成分、食品成分等影响^[6-9]。因此,选择合适的分离富集方法使低浓度靶细菌能从食品基质中分离出来且减少食品成分对检测方法的干扰,对实现靶细菌快速、灵敏的检测显得尤为重要。

磁性纳米粒子(Magnetic Nanoparticles, MNPs)因其比表面积大,具有良好的生物相容性且具有超顺磁性等特点,为在食品基质中快速吸附分离致病菌提供了一种解决方案^[10-12]。氨基化磁珠(N-MNPS)是在 Fe_3O_4 MNPs表面修饰了大量氨基,在pH值为5~9的条件下,其表面电荷为正电荷,与裸磁珠相比带正电荷的纳米粒子与细菌间的相互作用更强,更容易吸附细菌^[13]。本研究基于表面带正电荷的(N-MNPS)与表面带负电荷的细菌间的静电相互作用,无需在MNPs表面修饰特异性识别元件,省去了复杂的生物偶联步骤,减少了制备成本;因为对细菌不具有特异性,因此能对几乎所有带负电细菌都有吸附捕获作用,当食源性疾病爆发时,可用N-MNPS富集样品中所有类型的病原菌实现非靶向检测,可以避免漏检导致的阴性结论,下游可结合多重检测手段,实现对多种食源性致病菌同步检测,提高检测效率^[14]。本研究通过一系列优化确定了氨基化磁珠的最佳吸附条件,并初步验证了在模拟添加食品样品中其对常见食源性病原菌的吸附效果,为下游多重检测奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

1.1.1 实验菌种

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC14028、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538、单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC19115、大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli*

O157:H7),均购自美国菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂

脑心浸液(Brain Heart Infusion, BHI)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐平板(Xylose Lysine Deoxycholate, XLD)、Baird-Parker(Baird-parker agar, BP)琼脂培养基、单增李斯特氏菌显色培养基(Listeria Chromogenic Medium, LC)、大肠埃希氏菌 O157 显色培养基、磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS),均购自北京陆桥;氨基化磁珠(NH₂-magnetic Nanoparticles, N-MNTPs),粒径分别为1 μm、300 nm、100 nm,均购自海狸生物;其他分析试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

BSC-1600 II A2 二级生物安全柜,苏州安泰空气技术有限公司;Heratherm IGS400 生化培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific Inc;ZQTY-70F 台式全温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;SX-700 压力蒸汽灭菌器,日本 TOMY 公司;ST40R 离心机,美国 Thermo Fisher Scientific Inc;wi114629 麦氏比浊仪,梅里埃中国有限公司;磁力架,上海奥润微纳新材料科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养及制备

用接种环分别从培养基斜面(保存在4℃的冰箱)挑取实验菌株 *Salmonella typhimurium*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、*Escherichia coli* O157:H7 至 BHI 溶液中,随后于振荡培养箱 36℃,120 r/min 培养 24 h,将培养得到的菌液 5000 r/min 离心 10 min,然后将离心后的沉淀菌体用 10 mmol/L、pH 值 7.4 的无菌 PBS 缓冲液洗涤三次,离心收集菌体,重悬于 5 mL PBS 缓冲液中。通过麦氏比浊仪制备 10²~10⁸ CFU/mL 的菌液。

1.3.2 不同 pH 缓冲液中 N-MNPS 以及病原菌 zeta 电位测定

细菌的表面电位遵循大岛软粒子理论,其表面电位取决于细菌电荷密度和膜结构^[15]。根据四种细菌的最适生长 pH 范围,用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 将 10 mmol/L PBS 分别调节至 pH 值:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11。通过测定不同 pH 值细菌菌悬液以及三种粒径(100 nm、300 nm、1 μm) N-MNPS 的 zeta 电位值来对细菌与 N-MNPS 静电结合进行评估。

1.3.3 N-MNPS 的用量对四种病原菌捕获率的影响

分别取不同量的 N-MNPS (1 mg/mL) 5、10、20、30、50、75、100、125、150、175、200 μg 于 2 mL 离心管中, 磁分离后弃上清, 分别加入 1 mL 10^3 CFU/mL 四种菌的新鲜菌液, 在振荡培养箱 36°C , 120 r/min 下温育 60 min, 混合均匀后磁分离 N-MNPS, 吸取上清液 0.1 mL 分别涂布于 XLD、BP、LC、大肠杆菌 O157 显色平板上, 同时将未使用 N-MNPS 捕获的菌液同步温育, 作为初始加入的总菌量, 每组实验设置 3 个平行, 培养结束后, 进行捕获率的计算。

捕获率计算公式:

$$X = (1 - \frac{D}{D_0}) \times 100\%$$

式中:

X ——捕获率, %;

D ——上清液中的菌落数, CFU;

D_0 ——未磁捕获的总菌落数, CFU。

1.3.4 N-MNPS 的吸附时间对四种病原菌捕获率的影响

于 2 mL 离心管中, 分别加入 1 mL 10^3 CFU/mL 四种菌的新鲜菌液, 添加由 1.3.3 计算出捕获率最高的 N-MNTPs 添加量, 孵育 5、10、20、30、45、60、90 min 后, 磁吸取上清, 同时将未使用 N-MNPS 捕获的菌液同步温育, 依照 1.3.3 的温育条件及公式进行捕获率的计算。

1.3.5 单菌正交实验

表 1 单菌正交实验因素水平表

Table 1 Levels and factors to orthogonal test in individual

bacteria				
菌液	水平	A 磁珠 粒径	B 磁珠 用量/ μg	C 吸附 时间/min
沙门 氏菌	1	100 nm	80	3
	2	300 nm	90	5
	3	1 μm	100	8
金黄色 葡萄球菌	1	100 nm	80	45
	2	300 nm	85	50
	3	1 μm	90	55
单增李斯 特氏菌	1	100 nm	70	25
	2	300 nm	80	30
	3	1 μm	90	35
大肠杆菌 O157:H7	1	100 nm	150	10
	2	300 nm	175	15
	3	1 μm	200	20

根据四种病原菌的单因素实验结果, 选用 $L_9(3^3)$ 正交表, 以磁珠粒径, 磁珠用量, 吸附时间为考察因

素, 进行 3 因素 3 水平的正交实验, 选取 1.5 mL 浓度为 10^3 CFU/mL 的各菌液进一步优化捕获的条件。因素水平表如表 1 所示。

1.3.6 混菌单因素实验

依据 1.3.5 单菌正交试验的结果设计混菌单因素实验, 选出最适宜在该条件下混合的目标菌, 设计条件尽量覆盖所有目标菌。分别吸取 0.5 mL 10^3 CFU/mL 各菌液至 2 mL 离心管充分混匀, 单因素磁珠添加量为 10、25、50、75、100、150、175、200 μg 孵育 60 min, 使用最优添加量, 单因素孵育时间 5、10、20、30、45、60、90 min, 依照 1.3.3 的温育条件及公式进行捕获率的计算。

1.3.7 大体积中 N-MNTPs 对混菌的捕获效率

根据 1.3.6 的小体系中最优实验结果, 设计在 10、50 mL 的 PBS 中, 平均添加三种菌液使混合菌液浓度至 10^3 、 10^2 CFU/mL, 计数结果依照 1.3.3 的温育条件及公式进行捕获率的计算。

1.3.8 实际样品中 N-MNTPs 的捕获效率

取牛奶、水果沙拉各 5 份, 匀浆后分装为 5 g 每份, 向 100 mL 锥形瓶中分别加入 5 g 样品和 45 mL PBS, 于 121°C 灭菌 15 min 后冷却至室温, 加入目标病原菌菌液, 使得样品中病原菌混菌终浓度为 $10^2 \sim 10^6$ CFU/mL (g)。以 1.3.6 的最优结果进行试验, 依照 1.3.3 的温育条件及公式进行捕获率的计算。

1.3.9 统计与分析

本文中所有捕获率实验平行三次。运用 SPSS Statistics 26 软件统计, 对数据进行显著性差异分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 N-MNTPs 以及各病原菌在不同 pH 缓冲

体系中的带电荷数

Zeta 电位可以监测出不同缓冲体系中细菌表面的带电荷数、N-MNTPs 表面的带电荷数。不同 pH 值条件下各细菌的 Zeta 电位值结果见图 1。金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌在 pH 值 4~11 之间 Zeta 电势值均低于 -40 mV, 沙门氏菌在 pH 值 6~11 之间低于 -10 mV, 大肠杆菌 O157:H7 在 pH 值 5~11 之间电势低于 -5 mV。由图 2 可以看出 N-MNPS 在 pH 值 2~7 之间处于 20 mV, 在 pH 值 8~11 时电势值下降在 pH 值 9~11 电势值为负值。由此可以得出四种菌在 pH 值 2~11 之间, 表面均带负电荷。如图 2 可知, 三种粒径的 N-MNPS 在 pH 值 2~9 时, 表面均带正电荷, 所以

吸附环境在 pH 值 2~9 时对带负电荷的细菌静电吸附能力会更强, 考虑到大部分病原菌最适生长 pH 值 7.2~7.6, 为保证活菌数量, 选择 pH 值 7.4 作为后续实验体系的 pH 值。

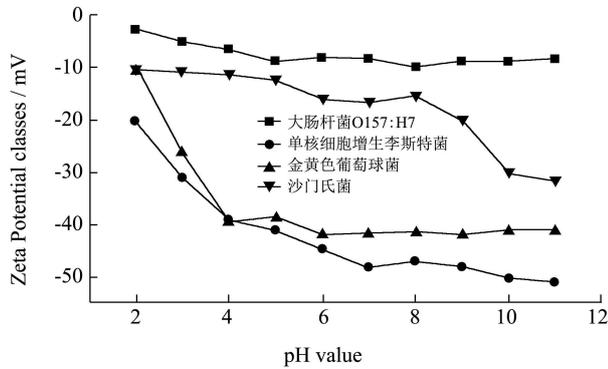


图1 不同 pH 条件下各细菌的 Zeta 电位值

Fig.1 Zeta potential of bacteria under different pH conditions

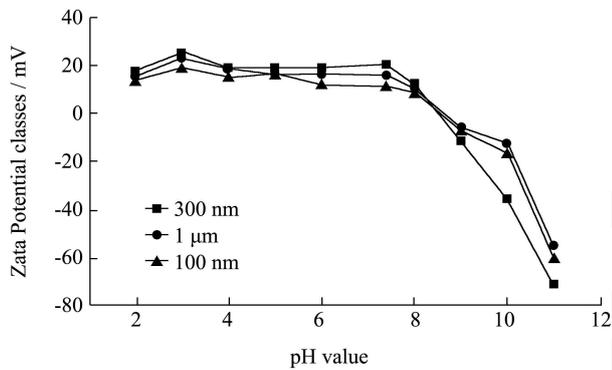


图2 不同 pH 条件下 N-MNPS 的 Zeta 电位值

Fig.2 Zeta potential of N-MNPS under different pH conditions

2.2 N-MNTPs 用量及时间对四种病原菌捕获

率的结果分析

由图 3 可以看出在 1 mL 10³ CFU/mL 的各菌液中加入不同量的 N-MNPS, 四种菌在 N-MNPS 添加量为 100 μg 时, 捕获率均可达到 70% 以上, 其中除了大肠埃希氏菌 O157:H7, 其余三种菌均可在磁珠添加量为 75 μg 时捕获率达到 70% 以上。以 100 μg 添加量作为最优条件对孵育时间进行优化, 如图 4 可以看出沙门氏菌在孵育时间为 5 min 捕获率就可以达到 90% 以上, 金黄色葡萄球菌和大肠 O157:H7 在 45 min 时能达到 80%, 单核细胞增生李斯特菌在 45 min 时捕获率为 66%。正交试验显著性分析沙门氏菌: 粒径有显著影响 ($p < 0.05$), 因素主次顺序为粒径 > 时间 > 添加量; 金黄色葡萄球菌: 三因素均无显著影响 ($p > 0.05$), 因素主次顺序为粒径 > 添加量 > 时间; 单核增生李斯特菌: 粒径有显著影响 ($p < 0.05$), 因素主次顺序为粒径 > 时间 > 添加量, 大肠埃希氏菌 O157:H7 粒径有显

著影响 ($p < 0.05$), 因素主次顺序为粒径 > 时间 > 添加量, 单菌体系中正交实验极差分析最优结果见表 3。综合正交结果, 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌三者磁珠吸附的最优粒径均为 300 nm, 大肠埃希氏菌 O157:H7 的最优粒径为 1 μm, 为保证富集病原菌的多样性, 后续试验使用 300 nm 的 N-MNPS 富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌的混合菌液进行捕获。

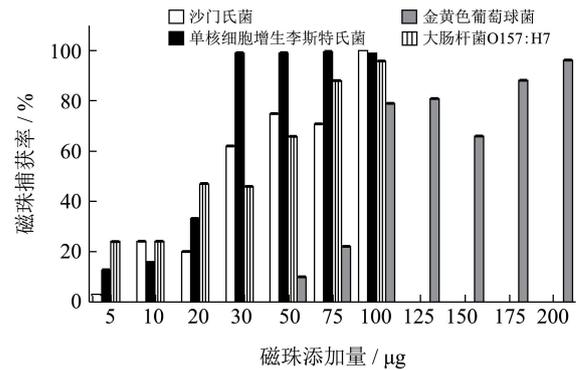


图3 单菌体系中 N-MNPS 用量对捕获率的影响

Fig.3 Effect of N-MNPS dosage on capture rate in single bacteria system

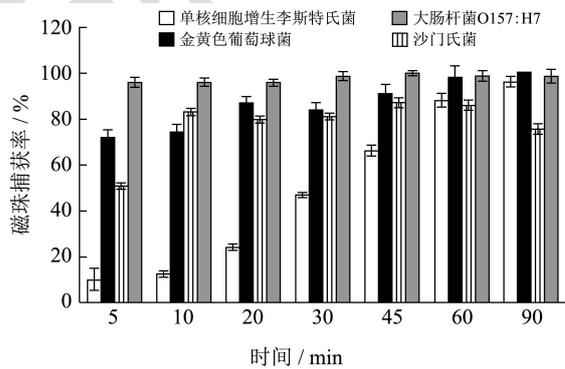


图4 单菌体系中孵育时间对捕获效率的影响

Fig.4 Effect of incubation time on capture efficiency in single bacteria system

表2 正交实验极差分析最优结果

Table 2 The optimal results of range analysis to orthogonal test

目标菌	粒径	添加量/μg	时间/min
沙门氏菌	300 nm	100	5
金黄色葡萄球菌	300 nm	85	45
单核增生李斯特菌	300 nm	25	85
大肠埃希氏菌 O157:H7	1 μm	175	10

2.3 N-MNTPs 在混菌体系中不同的磁珠添加

量和孵育时间的捕获结果分析

在 1.5 mL 混菌体系中加入不同量 300 nm 粒径的 N-MNTPs, 不同孵育时间, 结果如图 5、图 6。当磁

珠添加量为 50 μg ，孵育 60 min，三种混菌吸附率分别可达到 90% 以上；即使在添加量为 50 μg ，孵育 30 min 三种混菌吸附率分别可达 60% 以上。证明在沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌三种菌的混合体系中，菌体之间并未对捕获率造成很大影响，混合菌体的捕获率达到预期 ($\geq 50\%$)。

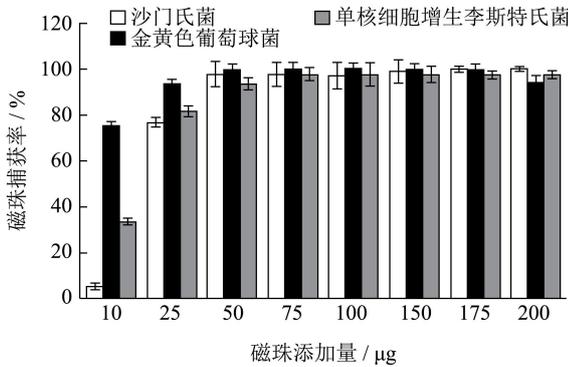


图5 合菌体系中磁珠添加量对捕获效率的影响

Fig.5 Effect of adding amount of magnetic beads on capture efficiency in mixed bacteria system

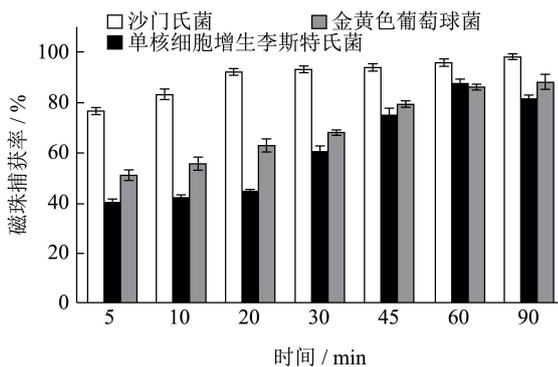


图6 合菌体系中孵育时间对捕获效率的影响

Fig.6 Effect of incubation time on capture efficiency in mixed bacteria system

2.4 N-MNTPs 在大体积中对混菌的捕获结果分析

依据 2.3 的结果，选取 300 nm 粒径、50 μg 每 1.5 mL 添加量、60 min 孵育时间作为大体积实验条件。根据反应体系的倍数增大将磁珠添加量提高至 500 μg ，孵育 60 min，分别在 10、50 mL 无菌 PBS 中，平均添加的混合菌液使其终浓度为 10^3 、 10^2 CFU/mL。结果如图 7 所示，混合菌液浓度为 10^3 CFU/mL 时，随着反应体系体积的加大，成倍数加大投入磁珠的量，沙门氏菌捕获率为 60% 左右，金黄色葡萄球菌的捕获率为 75% 左右，单核细胞增生李斯特氏菌在反应体系为 50 mL 时，捕获率由 80% 下降至 70%；混合菌液浓度为 10^2 CFU/mL 时各菌的捕获率也均可达到 55% 以上。由此得出，大体积的反应体系与小体积反应体系，在磁珠投入量与反应体系体积比例不变的情况下捕获

效率影响并未受到明显影响。证明该优化后的条件可应用至 50 mL 的样品前处理稀释液中。

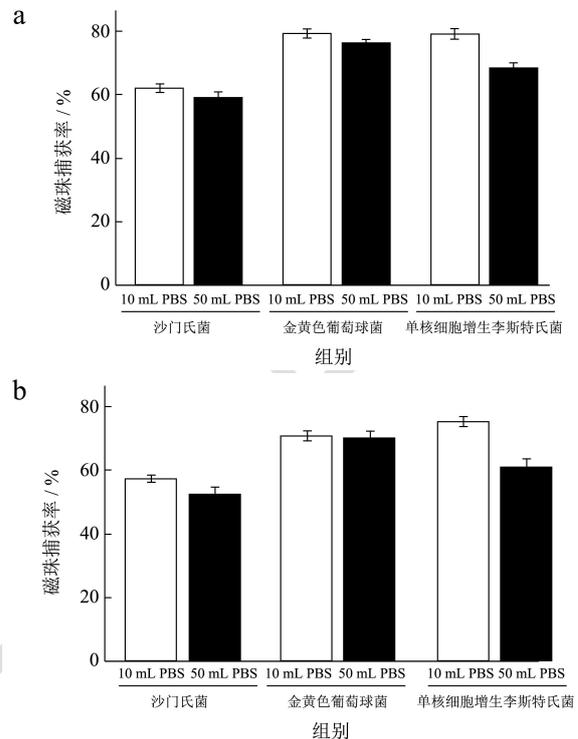


图7 在 10 mL 与 50 mL 体系中混菌终浓度为 10^3 (a) 与 10^2 (b) 时的捕获率

Fig.7 The capture rate at the final concentration of 10^3 (a) and 10^2 (b) in 10 mL and 50 mL systems

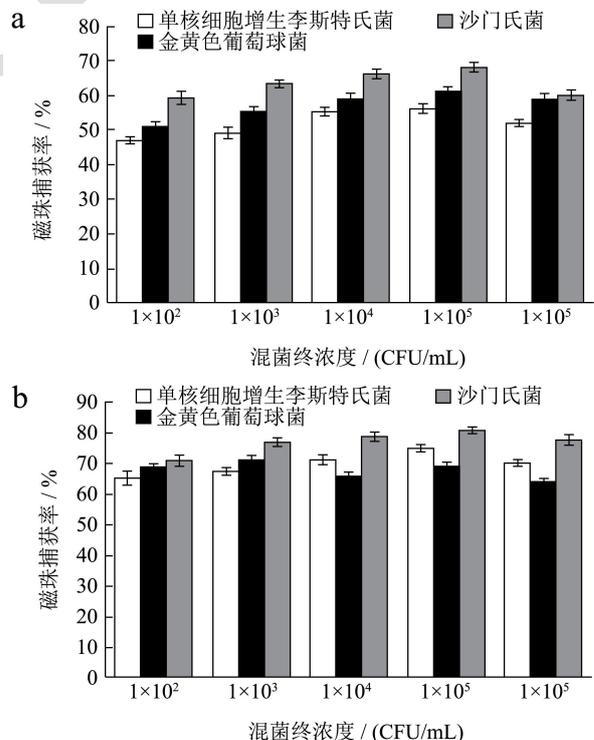


图8 人工污染牛奶 (a) 和水果沙拉 (b) 中各菌的捕获率

Fig.8 Capture rate of bacteria in artificially contaminated milk (a) and fruit salad (b)

2.5 N-MNTPs 在人工污染样本中的捕获结果分析

牛奶、水果沙拉实际样品中三种病原菌混菌终浓度为 $10^2\sim 10^6$ CFU/mL (g), 加入 N-MNTPs 进行捕获。牛奶中混菌的浓度在 $1\times 10^2\sim 1\times 10^5$ CFU/mL 时捕获率从 48%~70% 逐步增加, 在混菌终浓度为 1×10^6 CFU/mL 时, 捕获率下降至 50%~60%, 在水果沙拉中, 混菌终浓度在 $1\times 10^2\sim 1\times 10^5$ CFU/mL 时捕获率从 64%~78% 逐步增加, 在混菌终浓度为 1×10^6 CFU/mL 时, 捕获率下降至 65%~73%。结果如图 8 所示, N-MNTPs 对牛奶和水果沙拉中的病原菌捕获效率均大于 48%。水果沙拉的基质相比较于牛奶的基质更为复杂, 理论上捕获率应低于牛奶基质, 但是捕获率更优, 证明在食品基质中 N-MNTPs 捕获效果较好。

3 结论

本探究基于 N-MNPS 在 pH 值为 2~9 范围内带正电荷, 与表面带负电荷的细菌存在静电吸附作用, 确立了在 *Salmonella typhimurium*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes* 三种食源性致病菌的混合菌液体系中 N-MNPS 对于这三种菌的吸附条件, 并将其应用至实际食物样本牛奶以及蔬菜沙拉中。研究初步证实, N-MNPS 的吸附效果于细菌本身是革兰氏阴性菌还是革兰氏阳性细菌无直接关联, 通过对细菌的不同 pH 值下表面带电情况的研究, 侧面证明 N-MNPS 与细菌间存在很强的静电吸附, 同样的结果研究结果也在孙程^[16]的研究中被证实, 在 pH 值为 4~8 时对 *Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、*Escherichia coli* O157:H7 的捕获效率大于 70%, $100\ \mu\text{g}$ 的氨基功能化磁性纳米粒子对 $10^2\sim 10^6$ CFU/mL 的菌液浓度捕获率高于 85%。本实验表明, 在 50 mL 的混菌体系 (*Salmonella typhimurium*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*) 中, 加入 $550\ \mu\text{g}$ 、粒径 300 nm 的 N-MNPS, 在孵育 60 min 时, 最低可捕获 1×10^2 CFU/mL 各菌, 捕获效率 > 50%。对人工污染的牛奶、水果沙拉进行目标菌捕获, 在混合菌终浓度为 1×10^2 CFU/mL 时也可达到 40% 以上的捕获率, 捕获效率较好。捕获后的细菌提取 DNA 可满足下游荧光 PCR 检测的检出限要求, 免去了繁琐耗时的培养增菌的过程, 为后续食品中食源性致病菌的快速检测奠定基础。

参考文献

- [1] 王俊韵, 沈静雯, 陆利霞, 等. 食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 348-355
- [2] Kirk M D, Pires S M, Black R E, et al. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis [J]. PLOS Medicine, 2015, 12(12): e1001921
- [3] 白亚龙, 索玉娟, 周昌艳. 食源性致病菌 PCR 检测前处理方法研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 191-196
- [4] Reta N, Saint C P, Michelmore A, et al. Nanostructured electrochemical biosensors for label-free detection of water and food-borne pathogens [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(7): 6055-6072
- [5] Tao J, Liu W, Ding W, et al. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(3): 744-754
- [6] 张偲偲, 刘兴泉, 杨媚婷, 等. 食源性致病菌现场即时检测技术研究进展[J]. 分析化学, 2021, 49(10): 1631-1639
- [7] Kojima T, Takei Y, Ohtsuka M, et al. PCR amplification from single DNA molecules on magnetic beads in emulsion: application for high-through put screening of transcription factor targets [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: e150
- [8] Michael B Murphy, Shirin T Fuller, Paul M Richardson, et al. An improved method for the *in vitro* evolution of aptamers and applications in protein detection and purification [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31: e110
- [9] Kalamasz Dale, Long S A, Taniguchi R, et al. Optimization of human T-cell expansion *ex vivo* using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies [J]. Journal of Immunotherapy, 2004, 27(5): 405-418
- [10] Mcder Mott A B, Spiegel H M, Irsch J, et al. Simple and rapid magnetic bead separation technique for the isolation of tetramer-positive virus - specific CD8T cells [J]. AIDS, 2001, 15(6): 810-812
- [11] Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, et al. Formation of magnetite by bacteria and its application [J]. J R Soc Interface, 2008, 5(26): 977-999
- [12] 熊国权, 周红雨. 磁分离技术及其在食源性致病菌监测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2840-2842
- [13] Azam A, Ahmed O, Khan H, et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria: a comparative study [J]. Int J Nanomed, 2012, 7: 6003-6009
- [14] 王娉, 胡玥, 田雪, 等. 食品中 4 种常见致病菌的磁珠吸附-PCR 检测方法研究[J]. 卫生研究, 2014, 43(4): 556-561
- [15] 刘轶男. 细菌界面作用过程的微观解析[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021
- [16] 孙程. 氨基功能化磁性纳米粒子富集结合多重 PCR 检测食源性致病菌[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019

现代食品科技