

# 基于 SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子快速检测果汁中大肠杆菌的免疫传感器研究

孙晓萌, 张志涛, 王轶鹏, 许强, 孙雪梅, 刘文敏\*

(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

**摘要:** **目的** 设计一种基于 SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子快速检测果汁中大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的新型传感器。**方法** 采用超分子组合法将荧光基团嵌入到 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒中合成 SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子, 然后将抗大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的单抗偶联到纳米粒子表面, 最后通过抗原-抗体反应使纳米粒子与待检细菌结合, 使用荧光显微镜观察并统计大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的个数。**结果** 本方法与革兰氏染色法相比, 对大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 计数结果无统计学差异 ( $P=0.930$ ); 该方法整个检测过程能够在 15 min 内完成, 检测下限小于 10 CFU/mL。**结论** 该方法能增强检测果汁中大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的灵敏度, 缩短检测时间, 对其他病原体检测方法的改进具有重要的指导意义。**关键词:** SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子; 大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>; 快速检测; 生物传感器; 果汁

## Biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* in juice by luminophore-doped silica

SUN Xiao-Meng, ZHANG Zhi-Tao, WANG Yi-Peng, XU Qiang, SUN Xue-Mei, LIU Wen-Min\*

(Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

**ABSTRACT: Objective** To design a new biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> in juice by synthesized luminophore-doped silica (LDS) nanoparticles. **Methods** The fluorescent groups were embed into SiO<sub>2</sub> nanoparticles to synthesize LDS by supramolecular combination method. Then *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> specific monoclonal antibody was coupled to the surface of the dye doped nanoparticles. Finally, antibody-coated nanoparticles incorporated with the cells of O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> by antigen-antibody reaction to form conglutinations, which represented the images of the detected germs and could be observed and counted by fluorescence microscope. **Results** The number of *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> was detected and counted with methods of fluorescent nanoparticles staining and gram staining, which had no significant difference ( $P=0.930$ ). The novel developed LDS nanoparticles could finish the detection within 15 mins, and had the limit of detection of 10 CFU/mL. **Conclusion** The method of LDS nanoparticles can enhance the sensitivity of O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> detection and obviously shorten testing time, which has important significance for the improvement of inspection methods for other pathogenic microorganisms.

**KEY WORDS:** luminophore-doped silica; *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>; rapid detection; biosensor; juice

\*通讯作者: 刘文敏, 研究员, 主要研究方向为生物传感器研究。E-mail: 691076871@qq.com

\*Corresponding author: LIU Wen-Min, Research Fellow, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China. E-mail: 691076871@qq.com

## 1 引言

提高食源性致病菌检测方法的灵敏度与时效性对于促进食品行业的规范性及提升相关疾病的诊断均具有积极的意义。目前, 检测食品中致病菌的各种方法的主要缺点是花费时间长、检出速度慢, 主要与以下因素有关, 即食品中污染菌的含量比病人排泄物中的含量要低很多; 食品中的非致病菌会影响致病菌的选择性分离和鉴定, 干扰病原菌的检测; 食品加工过程中, 致病菌受到了损伤, 形成了不同生长特性的细菌群。

目前, 对微生物的检验包括传统的培养方法, 利用抗原-抗体反应为基础的酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[1,2]</sup>、荧光抗体染色法(免疫荧光法)、同位素标记抗体法(放射免疫试验)以及基因检测为基础的 PCR 法<sup>[3,4]</sup>等, 这些方法检出病菌的灵敏度范围在 10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup> CFU/mL<sup>[5-7]</sup>。而食品中细菌含量低, 必须进行预增殖及选择性培养, 需要耗费大量的时间成本, 因此目前食品中微生物检测中用时最短的也在 48 h 左右, 如何快速检测、提高检测的灵敏度一直是该领域的研究重点<sup>[8-12]</sup>。

超分子化学经过近 20 多年的发展, 已经从基础研究稳步走向高技术的应用, 如纳米超分子材料、超分子组装体作用力研究等。纳米粒子与蛋白、微分子及有机染料和荧光染料结合, 用于免疫生物反应能够增加反应的表面积, 并且具有催化反应、缩短反应时间等特性<sup>[13-15]</sup>。因此, 微生物学、分子生物学与纳米技术相结合对于疾病检测和传染病控制具有较大的意义。利用超分子组合法将荧光基团嵌入到纳米颗粒中, 不仅能够增强荧光发光的稳定性, 而且能够使荧光的发光效率大大增强; 另外, SiO<sub>2</sub> 纳米材料制作工艺简便, 容易控制合成纳米粒子粒径。使用特异性抗体(单抗或多克隆抗体)偶联到纳米粒子表面后, 通过抗原-抗体反应使纳米粒子与待检细菌表面抗原结合, 在荧光显微镜下统计致病菌的个数, 能够增强检测的灵敏度、降低检测时限, 为建立食品中致病菌的快速检测方法提供理论和实验依据。

本研究设计了一种基于 SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子(luminophore-doped silica, LDS)快速检测果汁中大肠杆菌 O157:H7 的新型传感器, 该方法能在 15 min 内完成, 操作简便, 灵敏度高, 为食品中微生物的快速检测提供了一种新思路。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

荧光显微镜(Olympus BX-51, 日本 Olympus 公司); JEM-2100F 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); 756PC 紫外可见分光光度计(南京东迈科技仪器有限公司)。

*Escherichia coli* O157:H7 菌株(编号: 01838)、抗 O157:H7 单克隆抗体(中国疾病预防控制中心传染病防治所); 联吡啶([Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>)(国药试剂有限公司公司); 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)(Sigma 公司); 其余试剂均为分析纯。

某品牌果汁(超市购买)。

### 2.2 试验方法

#### 2.2.1 大肠杆菌 O157:H7 的培养和待检测标本的制备

将菌株在琼脂平板培养基上增殖培养 12 h 后, 根据计数的结果, 用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH=7.3), 1:10 稀释为最低浓度为约为 10 CFU/mL 的一系列细菌悬液, 备用。

在某品牌果汁中使用添加法配制含有 10<sup>5</sup> CFU/mL 大肠杆菌 O157:H7 浓度的果汁溶液, 备用。

#### 2.2.2 荧光 SiO<sub>2</sub> 纳米粒子的合成和表征测量

将 1.7 mL Triton X-100、7.5 mL 环己烷、1.8 mL 正己醇和 340 μL 去离子水混合, 加入 7.2 mg/mL 的 [Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub> 水溶液 200 μL。向上述混合物中加入 100 μL 四乙基正硅烷(tetraethyl silane, TEOS)超声振荡 30 min, 加入 30% 的氨水 60 μL 引发聚合反应。将上述反应体系于 25 °C、75 r/min 振荡 24 h。反应结束, 使用丙酮抽提荧光嵌合 SiO<sub>2</sub> 纳米粒子(LDS nanoparticles), 于 4000 r/min 离心 3 min 分离纳米粒子, 用乙醇和水交替洗涤纳米粒子沉淀 3 次, 除去表面活性剂及吸附于粒子表面的荧光染料, 负压抽干得 SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子(luminophore-doped silica, LDS)。

#### 2.2.3 荧光 SiO<sub>2</sub> 纳米粒子与抗体偶联

##### (1) 荧光 SiO<sub>2</sub> 纳米粒子羧基化

取 1.0 mmol/L 的醋酸配制的 1.0% APTES 溶液 20 mL, 加入 30 mg LDS 粒子, 搅拌反应 30 min 后, 3000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用去离子水洗涤 3 次, 用 N,N-二甲基酰胺洗涤 1 次, 在 N<sub>2</sub> 保护下加入 20 mL 10% 的琥珀酸酐 N,N-二甲基酰胺溶液, 超声振荡混悬, 继续通 N<sub>2</sub> 搅拌反应 6 h, 3000 r/min 离心得羧基化的 LDS 粒子沉淀充分干燥备用。

##### (2) 荧光 SiO<sub>2</sub> 纳米粒子与抗体偶联

取 15 mg 干燥的羧基化 LDS 粒子与 2.5 mg 抗-O157:H7 单克隆抗体冻干粉混合, 滴加三乙胺 3 mL, 搅拌 5 min 后, 使用冰水浴冷却, 加入新配的 200 mg/mL 二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液 3.5 mL 和 300 mg/mL 1-羟基苯并三氮唑(1-hydroxy-6-chlorobenzotriazole, HOBt)浓溶液 3.5 mL, 搅拌 0 °C 反应过夜, 3000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 pH=6.8 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 混悬于 1 mL 上述 PBS 液中, 即得抗体偶联的 LDS 粒子。

#### 2.2.4 LDS 纳米粒子标记抗体测定大肠杆菌 O157:H7

取 5 μL 待测液用常规革兰氏染色, 采用光学显微镜

进行观察并计数。然后取 5  $\mu\text{L}$  待测液涂片后立即加入 1  $\mu\text{L}$  制备的 LDS 粒子溶液, 置室温反应 10 min, 自然干燥后用中性树脂封片, 荧光显微镜下以 300–450 nm 光源激发, 观察计数。

### 3 结果与分析

#### 3.1 LDS 纳米粒子的表征特性

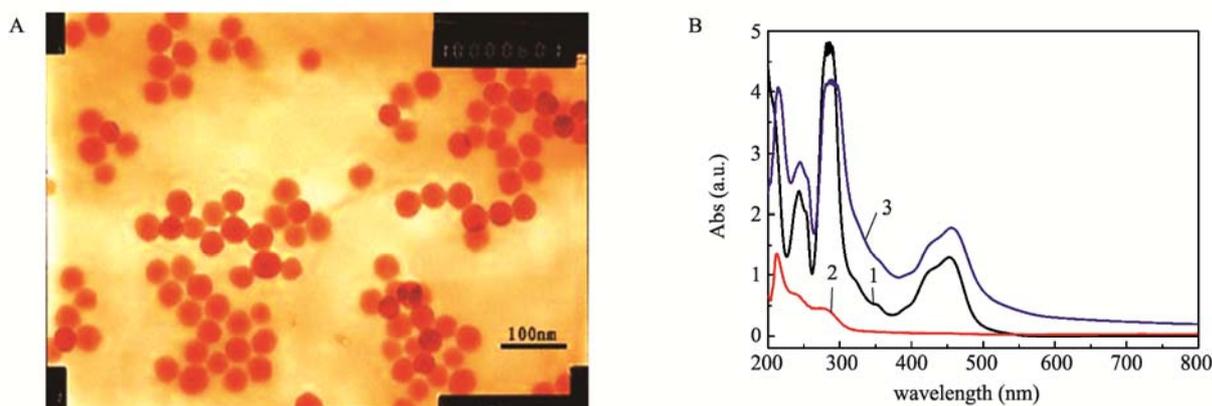
采用高分辨率透射电镜测量纳米粒子大小, 粒子透射电子显微镜图见图 1A。由图 1A 中数据分析可见, 纳米粒子的粒径为 35 nm, 粒径偏差为  $\pm 2$  nm, 大小分布比较均匀, 基本符合本研究的需要。使用紫外可见吸收光谱测试合成的纳米颗粒的光学特性, 分析  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  染料、 $\text{SiO}_2$  纳米粒子和荧光嵌合  $\text{SiO}_2$  纳米粒子(LDS 纳米粒子)在不同波长下的吸光度的差异, 如图 1B 所示; 通过光谱可以看出荧光染料和 LDS 纳米粒子最大吸收均在 300 nm 左右, 而

$\text{SiO}_2$  在该波长处没有吸收, 因此可以看出,  $\text{SiO}_2$  与荧光染料偶联成功, 且染料的最佳激发波长为 300 nm 左右。

#### 3.2 革兰氏染色法与 LDS 纳米粒子染色法检测结果比较

将浓度约为 100000 CFU/mL 实验用菌液在载玻片上点 6 个半径均为 4 mm 的平行样, 每点点菌液 5  $\mu\text{L}$ , 随机分为 2 组, 分别用革兰氏染色法和抗体包被的荧光纳米粒子进行染色, 用光学显微镜(图 2A)和荧光显微镜(图 2B)分别观测染色结果, 每个圆样观察若干个视野并计算细菌个数, 结果见表 1 和表 2。

将表中数值代入公式计算实验用菌液中的细菌计数浓度。其中  $N$  为原菌液细菌数量,  $n$  为每个高倍视野内细菌平均数,  $R$  为圆形涂片的半径(4 mm),  $r$  为高倍物镜视野的半径(0.4 mm),  $V$  为用于涂片的菌液体积(5  $\mu\text{L}$ ),  $d$  为稀释倍数(1 倍)。



1.  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ ; 2.  $\text{SiO}_2$ ; 3. LDS 纳米粒子

图 1 荧光  $\text{SiO}_2$  纳米粒子透射电镜图(A)和紫外可见吸收光谱图(B)

Fig. 1 Transmission electron microscopy graph (A) and UV-Vis absorption spectrogram (B) of LDS nanoparticles

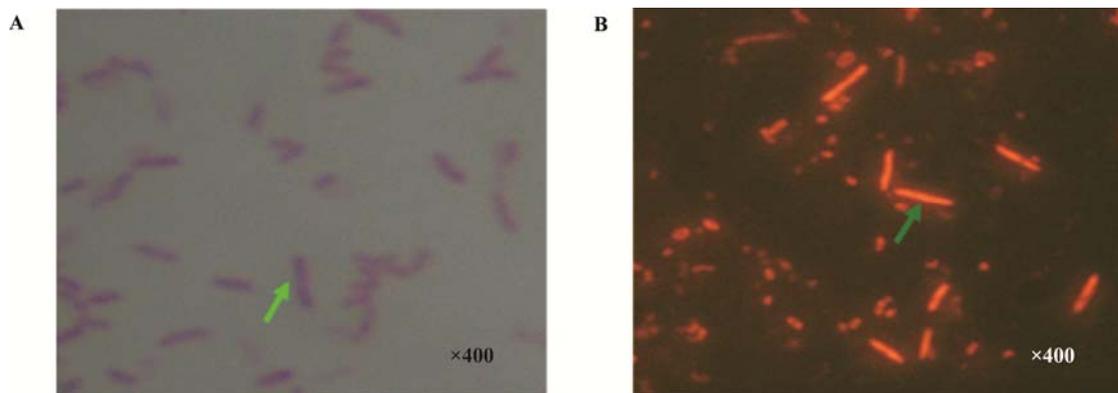


图 2 革兰氏染色(A)和 LDS 粒子染色(B)检测大肠杆菌 O157:H7

Fig. 2 Detection of *E. coli* O157:H7 by gram staining (A) and LDS nanoparticles (B)

表 1 荧光计数法检测大肠杆菌 O157:H7 结果  
Table 1 Results of *E. coli* O157:H7 counted by fluorescence

涂片号	选择视野个数	每个视野内的平均个数
1	19	4.2105
2	13	3.6154
3	15	4.0667
合计	47	4.0000

表 2 革兰氏染色计数法检测大肠杆菌 O157:H7 结果  
Table 2 Results of *E. coli* O157:H7 counted by gram staining

涂片号	选择视野个数	每个视野内的平均个数
4	16	3.9375
5	19	4.0000
6	21	4.1429
合计	56	4.0357

$$N = n \times \frac{R^2}{r^2} \times \frac{1000}{V} \times d$$

计算得知, 用 LDS 粒子染色法检测样本得细菌计数值为 80000 CFU/mL; 革兰氏染色法计数值为 80714 CFU/mL, 两者差异很小。经统计学处理,  $t = 0.089$ ,  $P = 0.930$ , 说明两者统计学上无明显差异, 因此常规革兰氏染色法与 LDS 纳米粒子染色法检测高含量菌液的能力无显著性差别。

### 3.3 LDS 纳米粒子染色法的灵敏度测试

将上述细菌悬液进行 10 倍比稀释, 配制 8 CFU/mL 的细菌悬液, 在载玻片上制作 10 个涂片, 每个涂片均以 LDS 纳米粒子染色, 使用荧光显微镜 400 倍视野观察涂片, 共找到大肠杆菌 5 个, 其中阴性涂片 6 个, 1 个涂片找到 2 个细菌, 3 个涂片各找到 1 个细菌; 同样步骤采用革兰氏染色, 使用光学显微镜 400 倍放大倍数观察, 没有观察到大肠杆菌影像。因此, LDS 纳米粒子染色法的检测灵敏度可达 < 10 CFU/mL, 优于革兰氏染色法检测方法。

### 3.4 一步法检测果汁中大肠杆菌 O157:H7

在某品牌果汁中使用添加法添加 100000 CFU/mL 大肠杆菌 O157:H7 配制梯度浓度的果汁溶液, 使用 LDS 纳米粒子染色法直接测定果汁中细菌含量, 做 3 个涂片, 每个涂片分别取 20 个视野进行计数, 实验结果见表 3。计算得大肠杆菌浓度为 110000 CFU/mL。

## 4 结 论

本研究中所采用的细菌检测方法, 首先利用超分子化学的方法将大量荧光基团嵌入到 SiO<sub>2</sub> 纳米粒子内, 与特异性抗体偶合后, 用于检测细菌, 检测时每个细菌菌体可

以同时与多个纳米粒子相结合, 与传统的单个荧光基团标记法相比较相当于经过了 2 次发光强度的放大作用, 因此具有非常高的检测灵敏度; 而且结合到纳米粒子表面的特异性抗体只与某一种或某一类细菌发生反应, 保证了该方法具有较高的检测特异性。

表 3 添加法测定果汁中大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> (n=20)  
Table 3 Detection results of *E. coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> of fruit juice by addition method (n=20)

涂片号	视野个数	每个视野内的平均个数	RSD
1	20	5.40	1.87504
2	20	5.55	2.28208
3	20	5.05	3.01706
合计	60	5.50	2.11932

本研究尚存在以下不足之处, 有待后续研究计划加以解决: 所合成荧光纳米粒子存在抗体包被效率较低, 提高抗体偶联的效率能够进一步提高检测的灵敏度; 该方法在向实际应用推广时, 仍需要对待检测食品标本进行充分的预处理, 以去除食品中的各种成分如蛋白质等对检测的影响, 否则易造成造成假阳性结果; 该检测方法的特异性还有待提高, 即使使用单克隆抗体包被纳米粒子, 如果待检样品中同时存在多种细菌, 也有可能造成假阳性结果; 纳米微球的稳定性相对较差, 在低温冷藏条件下长时间放置会出现凝聚和荧光染料泄露等问题, 降低检测效率。

综上所述, 应用 SiO<sub>2</sub> 荧光纳米粒子快速检测大肠杆菌 O157:H7, 不仅能增强检测的灵敏度, 缩短检测时间, 对目前食品检测也具有十分重要的应用价值; 同时对其它病原体检测以及生物大分子的检测、示踪和分离纯化等方面的新的应用领域的的应用也具有重要的指导意义。

### 参考文献

- [1] 胡金强, 雷俊婷, 白艳红, 等. 食品中金黄色葡萄球菌 PCR-ELISA 检测技术建立[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20): 63-67.  
Hu JQ, Lei JT, Bai YH, et al. Establishment of PCR-ELISA technology for *Staphylococcus aureus* in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(20): 63-67.
- [2] 田晓菊, 张宝善. 荧光酶标免疫分析在食品微生物检测中的应用[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(5): 47-51.  
Tian XJ, Zhang BS. Application of enzyme-linked fluorescent immunoassay in microbiological detection of foods [J]. Prog Mod Biomed, 2006, 6(5): 47-51.
- [3] 王华, 刘斌. PCR 技术在食品微生物检测中的应用[J]. 生物技术通报, 2010, 2: 63-67.  
Wang H, Liu B. Latest application of PCR technology in food microorganism inspection [J]. Biotechnol Bull, 2010, 2: 63-67.
- [4] 庞璐, 宋喆, 吴冬雪, 等. PCR-免疫胶体金试纸条方法检测食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2):

- 447-451.  
Pang L, Song Z, Wu DX, *et al.* Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food by PCR-immunogold method [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(2): 447-451.
- [5] 代娟, 李玉峰, 杨潇. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(5): 110-112.  
Zou XL, Jiang C, Hao DW. The development of rapid detection techniques on food microbe [J]. *Food Res Dev*, 2006, 27(5): 110-112.
- [6] 金大智, 文思远, 王升启. 基因芯片技术在检测肠道致病菌方面的应用[J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 500-503.  
Jin DZ, Wen SY, Wang SQ. DNA microarrays and their application in detection and identifying intestinal pathogens [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2006, 46(3): 500-503.
- [7] 汪盈盈, 黄瑛, 洪建光. 快速检测技术在食品微生物检测中的应用[J]. *科技与创新*, 2014, 13: 51-54.  
Wang YY, Huang Y, Hong JG. Rapid detection technology in food microbiology detection [J]. *Sci Technol Innov*, 2014, 13: 51-54.
- [8] 刘雨潇, 刘士敏, 王民, 等. 分子生物学方法在食品微生物检测中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(3): 451-454.  
Liu YX, Liu SM, Wang M, *et al.* Application of molecular biology methods in food microbiological detection [J]. *Lett Biotechnol*, 2009, 20(3): 451-454.
- [9] 周钧, 尹建军, 侯玉柱, 等. 食品中细菌总数快速检测技术的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(12): 276-280.  
Zhou J, Yin JJ, Hou YZ, *et al.* Development of methods for rapid detection technology of total bacteria in food [J]. *Food Res Dev*, 2010, 31(12): 276-280.
- [10] 罗金平, 田青, 周爱玉, 等. 微生物快速检测用生物传感器基本特性研究[J]. *微纳电子技术*, 2007, 7(8): 383-386.  
Luo JP, Tian Q, Zhou AY, *et al.* Study on the response characteristics of biosensor for rapid detection of microbe [J]. *Micronanoelectronic Technol*, 2007, 7(8): 383-386.
- [11] 毛佳文, 李抄, 陈锋, 等. 痕量微生物快速检测技术[J]. *军事医学*, 2015, 39(4): 316-318.  
Mao JW, Li Chao, Chen F, *et al.* Technology for rapid detection of trace microbes [J]. *Milit Med Sci*, 2015, 39(4): 316-318.
- [12] 谢雪欣. 两种方法测定菌落总数和大肠菌群的比较研究[J]. *食品工业*, 2016, 36(10): 283-285.  
Xie XX. A comparative study on two methods in test of total bacteria and coliform [J]. *Food Ind*, 2016, 36(10): 283-285.
- [13] Bagwe RP, Yang C, Hillard LR, *et al.* Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method [J]. *Langmuir*, 2004, 20: 8336-8342.
- [14] Bagwe RP, Khilar KC. Effects of intermicellar exchange rate on the formation of silver nanoparticles in reverse microemulsions of AOT [J]. *Langmuir*, 2000, 16: 906-910.
- [15] Zhao XJ, Hilliard LR, Mechery SJ, *et al.* A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15027-15032.

(责任编辑: 姚 菲)

## 作者简介



孙晓萌, 研究实习生, 主要研究方向为食品分析。

E-mail: sxm\_060@sina.com



刘文敏, 研究员, 主要研究方向为生物传感器研究。

E-mail: 691076871@qq.com