

利用光纤倏逝波生物传感器检测食品中大肠杆菌 O157:H7

刘金华¹, 刘 韬¹, 孟日增¹, 聂丹丹¹, 刘 阳¹, 薛力刚^{2*}

(1. 吉林出入境检验检疫局, 长春 130062; 2. 长春科技学院, 长春 130600)

摘要: **目的** 建立一种应用光纤倏逝波生物传感器快速检测食品中大肠杆菌 O157:H7 的方法。**方法** 对光纤用大肠杆菌 O157:H7 抗体包被制备检测探针, 用纳米量子点对抗体进行偶联制备检测抗体, 并确定其检测的灵敏度和特异性, 同时通过对人工污染样品的检测确认该方法检测实际样本的可行性。**结果** 建立的光纤倏逝波生物传感器检测大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度达到 50 CFU/mL, 并具有较强的特异性。**结论** 利用光纤倏逝波生物传感器检测食品中污染的大肠杆菌 O157:H7 方法快速、准确, 具有较强应用价值。

关键词: 光纤倏逝波生物传感器; 检测; 大肠杆菌 O157:H7

Detecting *Escherichia coli* O157:H7 with the fiber-optic evanescent wave biosensor in foods

LIU Jin-Hua¹, LIU Tao¹, MENG Ri-Zeng¹, NIE Dan-Dan¹, LIU Yang¹, XUE Li-Gang^{2*}

(1. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China;
2. Changchun University of Science and Technology, Changchun 130600, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid detection method of *E. coli* O157:H7 using fiber-optic evanescent wave biosensors. **Methods** The optical fiber with *E. coli* O157:H7 antibody coated preparation detection probe and the detection sensitivity and specificity were confirmed. At the same time through the detection of artificially contaminated samples confirm the feasibility of the method for detecting the actual sample. **Results** The detection sensitivity of *E. coli* O157:H7 was 50 CFU/mL. This method also had a high specificity. **Conclusion** The fiber-optic evanescent wave biosensor can provide a new method for rapid screening of food samples that polluted by *E. coli* O157:H7.

KEY WORDS: fiber-optic evanescent wave biosensors; detection; *Escherichia coli* O157:H7

1 引言

光纤生物传感器是激光技术和现代光纤技术共同发展的产物, 是目前应用较为广泛的生物传感器

之一^[1,2]。光纤倏逝波生物传感器主要是利用倏逝波场来激发光纤表面标记在生物分子(抗体或核酸片段)上的荧光染料, 从而检测通过特异性反应附着于纤芯表面倏逝波场范围内的生物分子^[3,4]。由于倏逝波

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011IK206, 2012IK163)

Fund: Supported by Science and Technology Projects of AQSIQ (2011IK206, 2012IK163)

*通讯作者: 薛力刚, 讲师, 硕士, 主要研究方向为兽医微生物。E-mail: ganglixue@163.com

*Corresponding author: XUE Li-Gang, Lecturer, master, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130600, China. E-mail: ganglixue@163.com

是光在光纤中以全反射传播时产生的部分穿透界面的光波,它只存在于界面附近薄层内,只对来自光纤界面附近极薄的一层荧光分子进行荧光激发和收集,而样品中游离的荧光分子则几乎不会被激发和收集,这样便省去了传统生化检测方法中繁冗复杂的清洗步骤,简化了操作步骤,将检测时间从常规分析的几个小时缩短到十几分钟,大大缩短了检测时间从而提高了检测效率^[5,6]。大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)是一种重要的肠道致病菌,目前常用的检测方法一般以生化培养鉴定、血清学检测等为主^[7,8],此外,还有一些基于分子生物学的方法用于大肠杆菌 O157 的检测^[9-11]。本研究基于光纤倏逝波生物传感器技术建立一种快速、高效检测大肠杆菌 O157:H7 的方法,该方法为食品卫生检验提供一种新的技术手段。

2 材料与方 法

2.1 实验菌株

大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli*, ATCC35150)、大肠杆菌 (*E.coli*, ATCC25922)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, ATCC13124)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, ATCC13311)、英诺克李斯特氏菌 (*Listeria innocua*, ATCC19119)、绵羊李斯特氏菌 (*Listeria ivanovii*, ATCC19119)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, ATCC13076)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*, ATCC11778)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*, ATCC33291)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC25923)、大肠杆菌 O104(*E.coli*, O104)、大肠杆菌 O111(*E.coli*, O111)、大肠杆菌 O26(*E.coli*, O26)等均为本实验室保存菌种。

2.2 主要仪器与试剂

光纤生物传感器,聚苯乙烯光纤均由中国科学院长春光学精密机械研究所提供。大肠杆菌 O157:H7 多克隆抗体、大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体、纳米量子点 CdFe 标记的抗大肠杆菌 O157:H7 的多克隆抗体均由本实验室制备,磷酸盐缓释液 PBS 购自北京索莱宝科技有限公司, LB 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司, 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐 (EDC) 购于北京晶美有限公司;超滤膜, PW8040F 型,美国 GE 公司。

2.3 实验方法

2.3.1 量子点与抗体的偶联

取 1 mL 的水溶性 CdTe 量子点与 1 mL PBS (pH=7.4) 缓冲液混合,将 400 μ L 的大肠杆菌 O157:H7 多克隆抗体 (1 mg/mL) 加入到上述混合液中,然后将 100 μ L 新制备的 EDC 溶液 (4 mg/mL) 加入到混合液中,样品在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光反应 2 h,然后 4 $^{\circ}$ C 过夜。将 2.5 mL 反应混合液 5000 r/min 离心 2 min,取上清液,上清用超滤膜反复进行超滤,去除小分子物质和未反应的 CdTe 量子点,收集超滤膜截留的 CdTe 抗体偶联物,然后用 PBS (pH 7.4) 溶解,4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

2.3.2 光纤的包被

对光纤进行大肠杆菌 O157:H7 抗体包被,将光纤表面先用清洗液 (浓 HCl:乙醇体积比为 1:1) 清洗 10 min,再用浓硫酸清洗 10 min,接下来在超纯水中煮沸 10 min,使光纤表面具有亲水的极化层。然后将处理好的光纤放入大肠杆菌 O157:H7 单抗的溶液中浸泡 1h,取出用去离子水洗净。用 PBS 溶液冲洗干净,制成用于检测大肠杆菌 O157:H7 光纤探针。

2.3.3 检测灵敏度的确定

将大肠杆菌 O157:H7 菌株在 LB 液体培养基中 42 $^{\circ}$ C 培养 18 h。营养琼脂平板进行计数。将包被大肠杆菌 O157 单克隆抗体的光纤分别插入浓度为 5×10^0 CFU/mL、 5×10^1 CFU/mL、 5×10^2 CFU/mL、 5×10^3 CFU/mL、 5×10^4 CFU/mL、 5×10^5 CFU/mL 和 5×10^6 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7 溶液中孵育 10 min,加阴性对照, PBS 清洗三遍后再与标记量子点的多抗反应 10 min,每个浓度测量三次,取平均值作为测量结果。

2.3.4 特异性实验

用建立的免疫光纤生物传感器检测大肠杆菌 O157:H7 的方法对上述产气荚膜梭菌、绵羊李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、大肠埃希菌、蜡样芽胞杆菌、大肠杆菌 O157、大肠杆菌 O104、大肠杆菌 O111、大肠杆菌 O26、空肠弯曲杆菌进行特异性交叉实验,每个样本测量 3 次,取平均值作为测量结果,同时设空白对照。

2.3.5 人工污染样品的检测

取鸡肉 25 g 加入 225 mL 的 LB 培养基中,分别

加入大肠杆菌 O157:H7 菌悬液,使其初始菌液浓度达到 5 CFU/mL, 10 CFU/mL, 20 CFU/mL, 50 CFU/mL, 100 CFU/mL, 均质后,取 2 mL 上清,煮沸灭菌,各取 1 mL 用于检测。每组实验重复 3 次。

3 结果与讨论

3.1 灵敏度实验结果

将纯培养的菌液用 PBS 缓冲液稀释成 $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL 的浓度梯度,当大肠杆菌 O157:H7 菌体浓度为 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL 时,阳性样品的相对荧光强度大于 cutoff 值,检测结果呈阳性;当菌液浓度小于 5×10^1 CFU/mL 时结果为阴性。因此该方法对大肠杆菌 O157:H7 检测的灵敏度可达到 5×10^1 CFU/mL,见图 1。

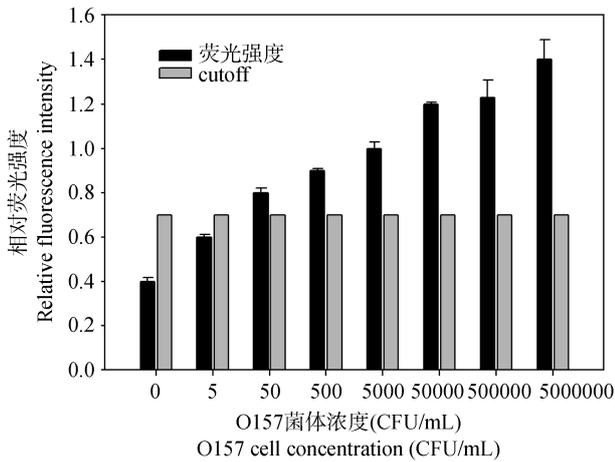


图 1 大肠杆菌 O157:H7 灵敏度的检验

Fig. 1 *Escherichia coli* O157:H7 sensitivity test

3.2 特异性实验结果

用建立的免疫光纤生物传感器分别对 10^5 CFU/mL 不同菌株的菌液检测,显示该方法对于大肠杆菌 O157:H7 具有较好的特异性,可以得到较明显信号。其他菌株的检测结果均为阴性,结果见图 2。

3.3 人工污染样品的检测

将标准大肠杆菌 O157:H7 稀释到一定浓度加入鸡肉中,检测结果如表 1 所示,其检测灵敏度可达到 50 CFU/mL,即在样品中若含有 50 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7 即可被检出。结果见表 1。

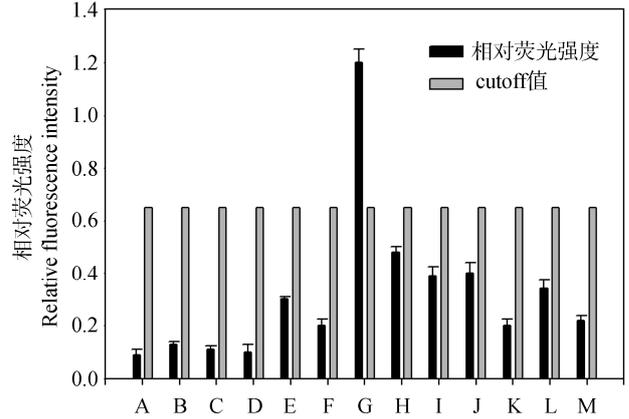


图 2 大肠杆菌 O157:H7 特异性的检验

Fig. 2 Specific test of *Escherichia coli* O157:H7
(注:图中,A-M 分别代表实验菌株产气荚膜梭菌、绵羊李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、大肠埃希菌、蜡样芽胞杆菌、大肠杆菌 O157、大肠杆菌 O104、大肠杆菌 O111、大肠杆菌 O26、空肠弯曲杆菌)

表 1 人工污染样品检测

Table 1 The result of artificially contaminated samples detection

初始菌浓度 (CFU/mL)	平均荧光强度 (cutoff 值=0.7)	结果
5	0.25	-
10	0.32	-
20	0.64	-
50	1.23	+
100	1.45	+
空白对照	0.02	-

4 讨论

光纤倏逝波生物传感器是以光纤和光电转换器为主要转换元件的一种光电转换设备^[12],当光纤倏逝波生物传感器检测目标菌时,光纤表面固定的生物识别分子抗体与目标菌发生特异性反应,进而与荧光染料标记的检测抗体结合,使荧光染料固定于光纤表面,倏逝波激发出荧光,其中部分荧光进入光纤,通过信号转换器将光信号转换为物理信号,之后经放大处理,获得数据。通过检测是否激发出荧光信号及荧光信号的强度大小来分析待测物的有无及

含量^[13,14]。

与其他生物检测手段相比, 光纤生物传感器具有如下优点: 首先该方法不受光纤表面倏逝波场以外的生物分子的干扰具有较高的检测灵敏度; 其次该技术操作简单, 测量用时较短可应用于现场检测^[15]。在本研究实验中, 用纳米量子点做荧光标记物, 相对于传统的有机荧光染料来说, 纳米量子点具有更高的灵敏性和稳定性。使用纳米量子点代替传统的荧光染料检测食品中的病原性微生物, 能够获得了更强的荧光强度, 更长的发光时间以及能够对荧光信号更精确的检出, 从而使得大大的提高了检测的灵敏度。本实验中, 在最佳检测条件下, 完成一次检测过程只需 30 min, 而且该检测方法的灵敏度可达到 5×10^1 CFU/mL 并具有较好的特异性, 该方法对大肠杆菌、大肠杆菌 O104、大肠杆菌 O111 等相近血清型菌种以及其他食源性致病菌的特异性检测中, 未发现交叉反应, 通过对人工污染样品的检测, 表明该方法能够用于实际样品的检测, 该技术具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 毕卫红, 郭璇, 王凌霄. 免标记光纤生物传感器的研究进展[J]. 燕山大学学报, 2013, 37(3): 189-194.
Bi WH, Guo X, Wang LX. Development of label-free optical fiber biosensor [J]. J Yanshan Univ, 2013, 37(3): 189-194.
- [2] 李博, 郑磊, 王前, 等. 电化学 DNA 生物传感器设计及在医学检验中的应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 46-50.
Li B, Zheng L, Wang Q, et al. Progress of electrochemical DNA biosensor and application in medical laboratory[J]. J Mol Diagn Ther, 2011, 3(1): 46-50.
- [3] Rabbany SY, Donner BL, Ligler FS. Optical immunosensors [J]. Crit Rev Biomed Eng, 1994, 22(5-6): 307-346.
- [4] Anderson GP, Rowe-taitt CA, Ligler FS. Raptor: a portable, automated biosensor[R]. Proceedings of the First Joint Conference on Point Detection for Chemical and Biological Defense. Williamsburg, 2000: 138-144.
- [5] Carolina B, Fabio VBN, et al. Tapered plastic optic fiber-based biosensor-Tests and application [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 30(1): 328-332.
- [6] 单聪, 陈西平. 光纤倏逝波生物传感器在微生物检测中的应用[J]. 卫生研究, 2010, 39(2): 254-257.
Shan C, Hen XP. Fiber optic evanescent wave biosensor in microbial detection[J]. J Hyg Res, 2010, 39(2): 254-257.
- [7] 山珊, 赖卫华, 陈明慧, 等. 农产品中大肠杆菌 O157:H7 的来源及分布研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 289-293.
Shan S, Lai WH, Chen MC, et al. Research Progress in Sources and Distribution of Escherichia coli O157:H7 in Agricultural Products[J]. Food Sci, 2014, 35(1): 289-293.
- [8] 刘慧玲, 吕敬章, 朱智壕, 等. 生物传感器检测食源性大肠杆菌 O157:H7 研究新进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1828-1834.
Liu HL, Lv JZ, Zhu ZH, et al. New progress in detection of foodborne pathogenic Escherichia coli O157:H7 based on biosensors [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(6): 1828-1834.
- [9] Thomas KM, McCann MS, Collery MM, et al. Tracking verocytotoxigenic Escherichia coli O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle[J]. Int J Food Microbiol, 2012, 53(3): 288-296.
- [10] Medina MB, Shelver WL, Fratamico PM, et al. Latex agglutination assays for detection of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coliserogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145[J]. J Food Prot, 2013, 76(7):1250-1254.
- [11] 刘道亮, 胡连霞, 赵占民, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测肉类中的大肠杆菌 O157: H7[J]. 微生物学报, 2011, 38(3): 430-435.
Liu DL, Hu LX, Zhao ZM, et al. Rapid detection of Escherichia Coli O157: H7 in meat using an improved loop-mediated isothermal amplification technology[J]. Microbiol China, 2011, 38(3): 430-435.
- [12] 黄惠杰, 翟俊辉, 赵永凯, 等. 多探头光纤倏逝波生物传感器及其性能研究[J]. 中国激光, 2004, 31(6): 718-722.
Huang HJ, Zhai JH, Zhao YK, et al. Multi -probe fiber-optic evanescent wave biosensor and its Characterization[J]. China J Lasers, 2004, 31(6): 718-722.
- [13] 李蓉卓, 刘霞, 李蕾, 等. 生物传感器在大肠杆菌 O157 检测中的应用[J]. 化学传感器, 2013, 33(1): 12-16.
Li RZ, Liu X, Li L, et al. Application of the biosensor for detection E.coli O157:H7[J]. Chem Sensors, 2013, 33(1):12-16.
- [14] 李斯本, 陈哲, 谢梦圆, 等. 用于地沟油快速检测的光纤传感器[J]. 仪表技术与传感器, 2013, (1): 4-6.
Li SB, Chen Z, Xie MY, et al. Optical fiber sensor for illegal cooking oil detecting[J]. Instr Tech Sensor, 2013, (1):4-6.
- [15] 徐锁生, 魏华. 光纤倏逝波生物传感器及其研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(1): 148-151.
Xu SS, Wei H. Evanescent wave fiber optic biosensor and its progress[J]. Lett Biotechnol, 2008, 19(1): 148-151.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介

刘金华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: liujh02@163.com

薛力刚, 硕士, 主要研究方向为兽医微生物。
E-mail: ganglixue@163.com

“食品安全快速检测技术”专题征稿

近年来, 随着经济的高速发展, 食品安全问题也越来越严重, 受到了世界各国的广泛关注。如何快速地检测食品的安全问题具有重要的意义。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品安全快速检测技术”专题, 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所的高志贤教授担任专题主编, 围绕化学比色分析方法、酶联免疫法(ELISA)、免疫胶体金试纸检测方法、生物芯片、生物传感器、便携式色谱质谱联用仪、生物化学发光检测仪等食品安全快速检测技术或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2014 年 6 月份出版。

本刊编辑部及高教授诚邀各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2014 年 5 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部