

食源性致病微生物的检测新技术

陈玉婷¹, 程楠¹, 许文涛^{1,2*}

(1. 食品安全与分子生物学实验室, 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 食品质量与安全北京实验室, 北京 100083)

摘要: 研究和建立食源性致病微生物的有效检测方法对于食品安全风险控制及人们的身体健康具有重要意义。本文在简要介绍微生物传统检测技术的基础上, 系统地介绍了各类食源性致病微生物检测新方法, 包括微生物试纸片检测技术、微生物代谢物检测技术、微生物免疫学检测技术、微生物DNA检测技术、微生物传感器检测技术等, 分析了各类食源性微生物检测方法的基本原理、优缺点和应用, 并对食源性致病微生物的检测新技术的发展提出了设想。

关键词: 食源性致病微生物; 检测技术; 食品安全

Novel technologies for foodborne pathogenic microorganism detection

CHEN Yu-Ting¹, CHENG Nan¹, XU Wen-Tao^{1,2*}

(1. Food Safety and Molecular Biology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Food Quality and Safety Laboratory, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: It is very important to establish an effective detection method of foodborne pathogenic microorganism for food safety risk control and people's health. Based on a brief introduction to traditional microbial detection technology, some novel methods to detect foodborne pathogenic microorganism were introduced in this paper, including microbial test paper detection technology, microbial metabolites detection technology, microbial immunological detection technology, microbial DNA detection technology, microbial sensor detection technology, etc. Then the basic principle, advantages and disadvantages and application were analyzed, respectively. Finally, the trends of novel detection technologies for foodborne pathogenic microorganism were proposed.

KEY WORDS: foodborne pathogenic microorganism; detection technologies; food safety

1 引言

随着食品工业的快速发展, 食品的种类极大的丰富, 食品的包装方式和贮藏方式也多种多样; 随着城镇化的快速发展以及人们生活生产方式的改变, 外出消费和购买食品已经变成大家生活的重要内容, 改变了传统自给自足的

生产生活方式。这些食品原料的安全以及食品加工、流通及贮藏的安全也直接影响着我们的食品安全以及身体健康。而食源性致病微生物导致的全球食品安全问题层出不穷, 防不胜防, 波及大量无辜人群, 如日本及中国的毒牛奶事件, 德国的毒草莓、毒黄瓜, 中国的福寿螺事件等。无处不在、防不胜防的食源性致病微生物造成的食品安全问

基金项目: 北京市科技新星计划 (XX2014B069)、国家高技术研究发展计划(863)计划(2012AA101606)

Fund: Supported by Beijing Nova Program (XX2014B069) and the National Hi-Tech Research and Development Program (863 Program) of China (2012AA101606)

*通讯作者: 许文涛, 副教授, 主要研究方向为食品病原微生物的检测和食用安全性评价。E-mail: xuwentao1111@sina.com

*Corresponding author: XU Wen-Tao, Associate Professor, Food Safety and molecular Biology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China. E-mail: xuwentao1111@sina.com

题以前是、现在是、以后也将是食品安全的主要问题,所以备受关注。

为了对食品安全进行有效、快速的监测,控制食品加工中的致病微生物,研究和建立食源性致病微生物的有效检测方法对于食品安全风险控制、监管及人们的健康也就越来越重要。食源性致病菌的传统检测方法周期较长、繁琐复杂,因而简便、快速、特异、高通量的检测新技术成为研究的热点。这些检测新技术应用范围越来越广泛,检测越来越灵敏和精准。本文主要介绍了目前国内外用于食品微生物检测的先进技术,对这些在当前较为先进的主流检测新技术进行了较为系统的总结和分析,并对未来的检测技术发展进行了展望。

2 微生物传统检测技术

微生物的传统检测方法主要是基于分离培养技术根据形态学上的不同来区分鉴别不同微生物,首先在培养基上进行分离培养,然后进行生化鉴定或直接镜检。

2.1 指示菌培养法

在进行食源性致病菌检测时,传统的方法主要采用指示菌培养法来确定菌株的来源,而对于这些指示菌的要求是必须可以快速培养计数,且这些指示菌是不能有病原性的,最后要求其所关注的病原菌具有相似的生存特征,如大肠杆菌数、总大肠杆菌群数、粪大肠杆菌群和肠杆菌等^[1]。

2.2 生理生化反应

生理生化特征是传统菌株分型的主要根据。如对特定环境条件的耐受性,这些特定的耐受性包括耐酸、耐碱、耐高温等,或者可以使底物变色的对不同物质的代谢产生特异的生化反应。而这种传统的检测方法现在已逐步被广泛采用的VITEK(全自动微生物鉴定系统)和DADE(美国戴德)等细菌自动化检测仪所替代。更为常见的是使用微量稀释肉汤法、纸片法、或T实验法等测定分离株的耐药谱。特异血清分析是一种将分离菌株分为不同血清型较为常用的方法。细菌的菌体抗原(O抗原)、鞭毛抗原(H抗原)及荚膜抗原(K抗原)是对细菌血清学分型的主要依据^[2]。

这种方法可以比较准确地进行检测食源性致病菌,但是也有很多缺陷,表型技术的分辨力不够高,对细菌的生长环境很敏感,需要较多的人力及多种辅助实验,很难区分到种以下,没有能力溯源。因而要想实现对各种病原微生物的诊断研究,仅仅依靠表型技术是不可能的。对于食品安全领域中微生物的检测来说,表型技术无法对难培养或不可培养的食品微生物进行检测,而且在灵敏度、特异性、时效性等方面均不能满足检测要求。同时,在食品加工过程中必然会导致食源性微生物菌体遭到破坏,而且食品中的其他成分也会干扰检测,种种原因使得传统的表

型技术检测方法受到限制。

尽管存在这些缺点,但是传统的分离培养技术仍然是微生物检测中的金标准^[3],其具有准确性高、能发现新的病原物、可用于其他方法的进一步分析、可作为有效对照方法等特点,这些特点使其在食源性微生物检测中仍然占据不可替代的位置。

3 微生物试纸片检测技术

微生物试纸片一般情况下由印有网格的聚丙烯薄膜和覆盖有培养基和显色物质的聚乙烯薄膜组成。待测样品经过处理后可直接接种在微生物试纸上,放置在适宜的温度下培养使得固定在试纸片上的显色物质与待检微生物生长产生的特异性酶发生反应,形成有颜色的菌落,通过对这些菌落进行计数便可实现检测。

试纸片法菌落典型,易判定,且因其制作成本低廉、生产周期较短、操作相对简便、显色反应迅速和结果显示直观等优点成为应用最为广泛、技术最为成熟的食源性微生物快速检测方法。但由于在保存期和灵敏度等方面存在一定的局限性,假阳性和假阴性率较高,且容易受到环境干扰,因此在食源性微生物检测中的应用受到一定限制^[4,5]。目前市场上较为成熟的系列微生物测试片主要生产厂家包括美国3M公司、RCP Scientific Inc公司、北京路桥公司、北京福德安科技有限公司等。可分别检测菌落总数^[6]、大肠菌群计数、霉菌和酵母计数、沙门氏菌、检测乳杆菌等^[7-9],这些产品与传统检测方法之间的相关性非常好,加入了染色剂、显色剂,增强了菌落的视觉效果,而且避免了热琼脂法不适宜受损细菌恢复的缺陷,已应用于我们的食品产业。

4 微生物代谢物检测技术

微生物代谢物检测技术是指利用微生物代谢的原理,通过对微生物生理生长产生的底物、电阻抗、代谢产物等的变化进行分析达到对微生物检测的方法^[10]。主要包括:电阻抗技术、ATP生物发光法、微热量计技术、放射测量技术等。

4.1 电阻抗技术

电阻抗法是对待测样品中微生物含量进行定性定量分析的一种微生物检测方法,其原理是基于微生物生长繁殖伴随的代谢会引起培养基电特性变化,进而通过电极连续性对培养基的电阻抗进行测量,便可知道某种细菌在特定的培养基中的生长繁殖情况^[10]。与传统的检测方法相比,电阻抗法检测食品微生物最大的优点是检测快速、灵敏度高、简单易行。电阻抗技术已经在食品病原菌检测中得到广泛应用,但由于食品中微生物种群庞大,互相干扰严重,因此电阻抗技术还需要进一步优化设计。

4.2 ATP 生物发光法

ATP 生物发光法的基本原理是基于死活菌的 ATP 含量差别^[11]。活的菌体中 ATP 的含量是恒定的,而细菌死亡后,由于细胞内酶的作用,菌体中的 ATP 将迅速被分解掉。因此可以通过测定待测菌体中 ATP 的浓度从而计算出活菌数。与传统微生物检测方法相比,ATP 生物发光法检测食源性微生物时更简便灵敏、快速高效^[12],并且相关仪器的开发应用也同时发展起来,例如液闪计数器、照度计等小型化的测试仪器非常便于携带,适合在现场对食品卫生进行监测,是目前检测微生物数目最快捷的方法,因此被国内外广泛应用于微生物检验和食品生产环境清洁度的检测。ATP 生物发光法的缺点在于其受到盐分及其他化学物质、游离态等非目标的干扰^[13,14],如果忽略这些干扰因素,必然会使检测结果受到影响,而且此方法不能区分微生物与非微生物 ATP。

4.3 微热量计技术

微热量计技术的基本原理是测定细菌生长时热量的变化而实现对细菌的检测^[15]。不同的细菌产生的热曲线因其各自的新陈代谢不同而不同,在实际检测中用微量热计测量细菌在生长过程中产生的热量,绘制成以产热量和时间组成的热曲线图,通过和已知微生物热曲线进行比较从而达到对细菌的检测。该技术所需时间较少,一般只需要数小时。利用该技术对牛奶工业中常用的 4 种不同的乳酸菌进行微量热研究,可以快速测得 4 种乳酸细菌的热曲线,并且重现性好。

4.4 放射测量技术

放射测量技术是利用细菌在生长繁殖过程中因代谢碳水化合物而产生二氧化碳的原理,把微量的放射性 ^{14}C 标记引入碳水化合物分子中,这些底物在细菌生长时被利用并释放出含放射性的二氧化碳,然后通过自动化放射测定仪测量二氧化碳的含量来判断细菌的数量^[15]。放射检测技术已广泛应用于检测食源性致病微生物,较传统方法更快速,且准确度和自动化程度高。

5 微生物免疫学检测技术

免疫学技术的核心是抗体制备技术以及免疫标记技术。免疫标记技术是将标记技术与抗原抗体反应的免疫化学技术结合,分别用荧光素、酶、放射性核素标记抗体或抗原进行抗原抗体反应。免疫学技术应用于食品安全领域对食源性致病微生物进行检测,具有特异性好、易于观察、灵敏度高优点。

5.1 微生物抗体制备及应用

1975 年德国科学家 Kohler 和英国科学家 Milstein 利用杂交瘤技术将产生抗体的 B 淋巴细胞同骨髓瘤细胞融合,

成功的建立了单克隆抗体制备技术^[16]。单克隆抗体技术的基本原理为:1、小鼠受到外界抗原刺激后诱发免疫反应,B 淋巴细胞产生相应的抗体;2、肿瘤细胞在体外培养的条件下可以无限传代。把经免疫过的小鼠的脾细胞与小鼠的骨髓瘤细胞在诱导下发生融合,融合细胞具有两种亲本细胞的特性,可以分泌特定的抗体且具备无限增殖的能力,从而分泌大量单克隆抗体。食源性微生物的检测抗体制备主要分为三类,一类是微生物分泌的毒素直接作为抗原,这与传统的蛋白质抗体制备技术一样;一类是微生物菌体直接作为抗原来制备抗体,微生物菌体具有很大的分子量,且具有足够多的表面抗原决定簇,适合作为完全抗原来制备抗体。另一类是提取和分析微生物表面单一蛋白或者成分来作为抗原。微生物抗体的制备的难点主要是需要大量的相关微生物以及无关微生物来验证所制备单抗的交叉反应性,提高抗体的特异性。微生物的基因组及其菌体表面结构时刻随着环境的变化在发生改变,如荚膜的有无变化,鞭毛的长短变化,菌体的死活变化等。

5.2 酶联免疫技术

检测微量物质的固相免疫测定方法(称为酶联免疫吸附试验)于 1971 年被瑞典学者 Engvall 和 Perlmann,荷兰学者 VanWeerman 和 Schuurs 分别报道^[17]。最初的免疫酶测定是使酶与抗体或抗原结合以检查组织中相应的抗原或抗体的存在。经过优化发展,成为目前应用最广的酶联免疫吸附试验(ELISA),首先用固相载体将抗原或抗体吸附,然后在载体上对免疫酶进行染色,一段时间后用肉眼或分光光度计进行结果判定分析。酶是一种极为敏感的有机催化剂,少量的酶便可催化大量的反应。酶可以在与抗体或抗原结合的情况下仍然保持酶本身的生物活性,而且不改变抗体或抗原的特性,反应后的有色产物可用肉眼定性观察、以及用酶标仪等光学仪器进行精准定量检测。

5.3 免疫试纸技术

免疫试纸技术是以医学中的血清学检测手段为基础,利用抗原与抗体之间反应的高度专一性来完成检测^[18]。免疫层析试纸有夹心法、竞争法和间接法 3 种,以夹心法为例,其原理是将待测物质的特异性抗体交联到有色物质(如纳米金)上以及试纸条(检测线)上,当“有色物质——抗体”和抗原结合后,该复合物再与纸上包被的抗体相结合,形成类似于三明治的夹心结构。通过观察检测线和控制线颜色的变化实现目视定性检测,根据检测线颜色的深浅与待测物的含量呈正比的原则进行定量的检测,如果没有待测物则只有控制线有颜色。免疫分析技术广泛用于检测农药残留、微生物及转基因食品,这种技术灵敏度和特异性都比较高,适合于监管部门在现场进行初筛检测;其不足之处在于这种方法的广谱性很难实现,因为抗原和抗体之间反应专一性较强,这就需要针对不同的待测物质建立

专门的检测试剂和条件;并且检测结果的准确程度还要取决于在加工过程中食品中的抗原成分是否遭到破坏。目前,国外利用免疫分析技术研发的试纸条已经商业化,如美国 Charm Science 公司研发的 ROSA 系列免疫层析胶体金试纸条,可以用于检测牛奶中各种抗生素残留和食源性致病微生物。

6 微生物 DNA 检测技术

6.1 微生物内参基因鉴定技术

16S rRNA 基因序列分析是菌种分类的重要方法,但对于亲缘关系比较近的种,其分辨率有限,与 16S rRNA 基因的高度保守性相比较,内参基因具有更高的分化程度,更适用于菌种的分类鉴定。目前,用于菌种鉴定常用的内参基因有 *gyrA*、*atpD*、*pheS* 等,利用看家基因应用于微生物菌种鉴定在某些种、亚种、株间有较好的分辨效果。Byoung 等^[19]经过试验证明 *rpoB* 基因对于双歧杆菌的基因序列相似度为 84.1%~99.0%,可以有效鉴定双歧杆菌。多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)利用不同基因组位点的保守基因确定细菌的分类地位,具有快速、准确、可操作性强等特点,更适用于菌种的分类鉴定。Naser 等^[20]采用 MLSA 对已知的肠球菌(*Enterococcus*)进行了鉴定,将 16S rRNA 基因序列无法分辨的乳酸菌区分开来。McTaggart 等^[21]通过对 *gyrB*、16S rRNA、*secA1*、*hsp65*、*rpoB* 5 个基因位点序列分析,证明 MLSA 对诺卡氏菌的鉴定比生理生化试验、形态观察、脂肪酸分析等具有更高的分辨率。相比 16S rRNA 基因的高度保守性,内参基因具有更高的碱基置换率,更适用于细菌分类。

在基因表达分析中,存在很多可变参数,例如起始样品材料的数量、酶的活性以及不同组织和细胞来源样品的转录水平,这些参数的差异都会影响基因的表达量。因此,需要引入内参基因对所有样品进行归一化处理,然后再对目的基因的表达量进行比较研究。实际研究中常选择稳定表达的管家基因作为内参基因,如 *ACTB*、*GAPDH*、18S rRNA 和 28S rRNA 等。理想的内参基因应在各种实验因素条件下,各种类型的组织或细胞中及不同生长阶段都能稳定表达。但大量的研究表明,任何一种内参基因都只能在一定类型的实验因素或细胞下恒定表达,在其他类型的实验因素或细胞中则是变化的,且差异显著。如果单纯使用一种内参基因作为内参,可能难以发现基因表达的微小差异并引致错误甚至相反的结论。进一步研究表明,在样品和实验条件确定的条件下,可以通过平行测定 2 个或以上内参基因的量来排除系统偏差,使得实验结果更加可靠。李沁等^[22]利用 qRT-PCR 技术评价了 *GAPDH*、*pvuA*、*pvsA* 和 *rpoS* 4 种常用管家基因在不同条件下的表达稳定性,最终确定 *pvuA* 和 *pvsA* 这两种基因可作为副溶血性弧菌毒力基因表达变化研究的内参基因。近年来随着科技的进步

出现了 GeNorm 软件、基因芯片数据、EST 数据库等筛选稳定性好的内参基因的新方法。

6.2 微生物基因分型检测技术

目前对突发感染性或传染性疫情溯源和预警的需求越来越多,传统的分型技术分辨能力有限,已无法满足这些需求,因此促进了基因分型技术的产生,从分子生物水平上研究生物大分子,包括核酸结构及其组成成分。现在已经发展起来的基因分型技术大致上分为两类:非 PCR 技术和 PCR 的技术。最初的非 PCR 基因分型技术是酶切和杂交方法,需要预知基因组信息,费用巨大,对操作人员的技术要求较高。PCR 技术的发明为食源性病原微生物的检测提供了非常有力的手段,如环介导等温扩增^[23],扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP),随意引物扩增 PCR(random amplified polymorphic DNA, RAPD)等。这些方法具有快速便宜,不需预知基因组信息的优点。基因分型技术不但为细菌传播动力学提供许多重要的结论,而且为进一步研究细菌种系发生特征提供了新的途径。

Sharples 等^[24]于 1990 年在 *E.coli* 中发现肠杆菌间共有重复序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC),且该序列主要存在于肠杆菌科,故称之为 ERIC。Versalovic^[25]根据 ERIC 中心一段保守性很高的反向重复序列设计了反向引物,扩增两端 ERIC 之间的片段,发展出了 ERIC-PCR 技术。各种细菌、噬菌体、真菌甚至植物和动物的 DNA 中也得到了扩增条带^[26]。PCR 的反应参数和电泳条件容易影响 ERIC 结果的带型和条带的强弱,因此将所有的样本在相对集中的时间用同一条件进行分析可以保证其结果的可比性。Corich^[27]等于 2005 年发明了 Sau-PCR,该技术结合低频率酶切和 PCR 扩增进行基因分型,可以应用于所有能提取基因组的有机体。该方法是在 AFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的,具有 RAPD 的简单快捷和 AFLP 的良好重复性,且同克服了 RAPD 的不稳定性和 AFLP 的繁琐工作等^[28-30]。Corich 还发现 Sau-PCR 的重复性比 ERIC-PCR 好,其引物不会引起非特异退火。

1984 年 Schwarz 和 Cantor^[31]首次将脉冲电场技术与琼脂糖凝胶电泳结合用来分离大片段基因组,称为脉冲场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis, PFGE)技术。其工作原理是 DNA 分子在交替变换方向的电场中做出反应所需的时间因其大小不同而不同,较小的分子在凝胶中泳动快,从而达到分离不同大小 DNA 分子的目的^[32-35]。PFGE 可以在恒强的水平场琼脂糖凝胶中分离大于 40 kb 的片段,是目前比较理想的分子分型方法。通过设定有效的参数,通过肉眼观测 PFGE 产生的图谱便可比较各菌株类型。目前 PFGE 已经广泛应用于大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肠球菌等多种菌属的分型。但费时费力、花费较高等是 PFGE 本身存在的问题,而且不能高通量检测,使得 PFGE 在基

层的推广使用受到限制^[36,37]。

变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术于20世纪80年代由Fischer和Lerman提出^[38],是一种快速检测DNA片段点突变的技术。其工作原理是:在含有不同变性梯度变性剂(尿素、甲酰胺)的聚丙烯酰胺凝胶中,双链DNA分子因其内部核苷酸的排列顺序和数量不同而在进行电泳时会有不同的解链温度,从而导致不同的解链速度和程度。当双链DNA分子迁移到凝胶的特定位置并达到适宜的解链温度时,就会开始部分解链,其迁移速度与其解链程度成反比,从而会使不同的DNA片段在凝胶的不同位置停留,最后形成分离的不同带谱将存在差异的DNA片段分离开。近几年,PCR-DGGE技术已经应用到了食源性致病微生物菌相变化研究中。PCR-DGGE技术的优点在于检测速度快、重现性强、可靠性高等,但操作过程中可能会产生优先扩增和异源双链等现象,因此该技术还需进一步发展。

细菌DNA序列的变化是所有基因分型的依据,所以理论上只要完成对种内多株细菌的全基因组测序就可得到精确分型^[39,40]。但细菌基因组碱基对的数目庞大,对多株细菌DNA序列进行全长测序不具有实践性,所以事实上DNA测序的分型能力是有限的。在应用DNA测序分析对细菌进行分型时应该考虑到DNA测序只能选择一部分相对较小的DNA片段,大片段和多个序列测序并不现实。用于测序分析的DNA片段应当包含一个变化的区域和一个相对保守的区域以满足对所有菌株进行分型的要求及测序时设计引物的需求,这一片段中的变化区域足以将种以内的菌株进行分型且不能在菌株之间水平转移。

6.3 微生物高通量检测技术

培养法、免疫学方法、PCR技术等是目前比较成熟的病原微生物检测方法,应用广泛,虽然这些现有的方法可以准确、灵敏地鉴定病原微生物,但是不能实现高通量,每次只能鉴定一种或少量几个样品。近年发展起来的高通量检测技术所需样品量少,自动化程度高,精准省时,很适合病原微生物的检测。目前用于病原微生物鉴定的高通量检测技术主要有多重PCR技术、变性高效液相色谱分析技术、芯片技术等。

Chamberian等^[41]于1988年提出多重PCR的概念,在普通PCR基础上发展起来的多重PCR(multiplex PCR)的原理与常规PCR基本相同,二者的区别在于相比常规PCR反应体系中只加入一对引物,多重PCR是在同一反应体系中加入一对以上的特异性引物,如果待测样品中存在与这些引物特异性互补的模板,那么可在同一反应体系中扩增出一条以上的目的DNA片段,适合大量样本的分析与鉴定。刘家云等^[42]利用多重PCR体系检测志贺菌、沙门菌和霍乱弧菌,可快速诊断高危腹泻致病菌。多重PCR在食源性致病微生物分子类型鉴定中也起着重要的作用,

Kirschberg^[43]等应用多重PCR更简捷、准确率更高地鉴定了乙肝病毒的6种基因型,且易于进行大量标本的检测。多重PCR技术的优点在于高效经济,但多重PCR技术的不足在于敏感性偏低,扩增效率不高,可能出现引物间干扰,因此该技术还有待发展。

近年来发展起来的变性高效液相色谱分析技术(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)^[44]是一种利用离子配对逆相层析的原理来分析核酸的检测方法,其原理是利用离子配对试剂TEAA(triethyl-ammonium acetate)在核酸非变性条件下与DNA的磷酸基团离子配对,在流动相中带正电的TEAA会将表面带负电的DNA包裹,并以非极性的烷基端吸附在非极性的固定相上,双链DNA在分离管柱的滞留主要由TEAA中带正电离子和DNA中带负电离子的结合力决定,DNA链的长度越长磷酸基团越多,越多的TAEE与之相结合,使其在柱内保留的时间增长^[45]。乙腈具有亲水性,增加流动相中乙腈浓度可将DNA洗脱,使DNA和TEAA解离,从而使DNA分子随流动相洗脱,达到分离目的。DHPLC对核酸进行分离可以在非变性温度(40~50℃)条件下,在部分变性温度(51~75℃)条件下以及在完全变性温度(70~80℃)条件下对不同长度的双链DNA进行分离。DHPLC技术具有敏感度及特异度高,快速,价廉等优点,可以大大节省工作量,已经在微生物诊断中得到了广泛的应用。William等^[45]利用DHPLC对不同谱系39种细菌进行检测以进行细菌菌种的鉴定。

结合分子生物学、免疫学、半导体微电子、激光和化学等领域,上世纪90年代发展起来的微量检测新技术^[46]生物芯片技术是一种高通量检测食源性微生物的技术。液相芯片和固相芯片是生物芯片技术的两种常见形式。液相芯片即悬浮芯片技术,悬浮芯片技术的载体一般为微球体,并结合流式细胞仪对核酸、蛋白质等生物分子进行大规模检测。固相芯片首先将基因、蛋白质等生物分子固定在固态固定载体上,使其与固定载体上的标记信号反应,然后对标记信号分析达到对样品检测的目的。

6.4 微生物死活菌检测技术

平板菌落计数法是典型的传统的活菌计数法,其原理是每个活的细菌能长出一个菌落。该方法将定量稀释后的细菌悬浮液在一定条件下进行平板培养,根据平板培养出的菌落数计算出待测样品中的活菌数^[47]。这种方法灵敏度高,是一种目前国际上许多国家所采用的检测污染活菌数的方法。利用叠氮溴乙锭(EMA)或者叠氮溴化丙锭(PMA)联合PCR技术的应用,使得PCR无法区分死活菌的问题得以解决^[48,49]。该方法是将EMA或PMA染料与细菌进行孵育,染料进入死菌后与DNA分子结合,使得死菌在染色后不能被溶解,同时染料不能穿透活菌,从而通过PCR技术很容易将死活菌区分开。叠氮溴化乙锭(EMA)虽然不能穿

过完整的细胞膜,但能与细胞膜受损后暴露出来的 DNA 结合,从而阻断 DNA 分子进行聚合酶链反应(PCR),可用于 PCR 检测中区分死活菌^[50]。但 EMA 的细胞毒性使其在临床诊断和食品安全中的应用受到一定的限制。因此使用无细胞毒性的代替 EMA 与 PCR 结合,对死活菌进行检测成为应用广泛的检测方法。Wang 等^[51]已经通过 PMA 与 PCR 结合研究建立了食品中沙门菌的死活菌检测方法,该方法高效快速,基本可以在数小时内检测出食品中的沙门氏菌的活菌数目。

6.5 微生物精准检测技术

数字 PCR(digital PCR, D-PCR)是一种新型的检测和定量核酸的技术,其原理是尽可能将待检测的微量样品稀释至每个小的反应体系中所含的待测分子数不超过 1 个,再将所有 PCR 管置于完全相同的条件下进行 PCR 扩增,有 PCR 扩增荧光信号记为 1,无荧光信号记为 0,便可计算出样本的最初拷贝数或浓度。数字 PCR 是 DNA 绝对定量的方法,不依赖于扩增曲线的循环阈值,也不需要内标基因和标准曲线。近年来数字 PCR 在基因拷贝数变化分析(copy number variation, CNV)、遗传突变检测、基因分型、基因定量、单细胞基因表达)等方面的研究取得了突破性的发展。总体而言,数字 PCR 技术目前在食源性致病微生物检测的研究方面还处于起始阶段,有很大的发展空间。

流式细胞仪(FCM)是 20 世纪 70 年代发展起来的一种用于测量细胞或其他生物粒子的物理和化学特性的技术,通常以激光作为发光源。FCM 是通过光学信号来反映每一个粒子提供的数据,从而获得整个生物种群的参数。流式细胞计数可同时对细菌进行定性和定量鉴定,具有高度的敏感性。目前已经建立了沙门菌、细菌总数、大肠埃希菌等的流式细胞仪检验方法。FCM 干扰小、区分度好、简便快速、结果准确可靠,并具备多参数测定的优点,在实验室和食品安全现场对食源性致病菌测定都能起到很好的效果。

近年来发展起来的实时定量技术在检测食源微生物方面体现出灵敏、快速的特点,而且有效解决了普通 PCR 技术中存在假阳性污染和不能进行准确定量的缺点^[52-54]。重复性好、省力、低费用等也是荧光定量 PCR 的优点。目前人们已经通过研究应用该方法可以定量检测大肠杆菌 O157、单增李斯特菌和沙门菌等^[55]。实时荧光定量 PCR 分为两大类:探针类和染料类,两者的区别在于用来指示扩增产物增加量的指标不同,前者是利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加量,后者是利用与双链 DNA 小沟结合发光的理化特征指示扩增产物的增加量,探针类特异性高,染料类更简便易行,成本低^[56,57]。

7 微生物传感器检测技术

微生物传感器的组成元件主要包括识别元件和识别信号,并利用这些组成元件进行特异性生化反应进而进行

信号识别来达到检测目的。生物识别元件主要包括酶、免疫制剂、细胞器或全细胞等,识别信号主要包括电、热、光等。生物传感器分析技术在特异性、检测速度、检测效率等方面均优于传统的食源微生物检测方法。在提高对食源微生物检测能力的研究方面,Song 等^[58]和 Kim 等^[59]研制了特异性检测沙门菌和单增李斯特菌的生物传感器,进一步证明了传感器在检测微生物方面的优越性。生物传感器技术的检测效率非常高,检测时间通常在数小时乃至数分钟内,对食源性致病微生物的有效监测发挥着重要作用。

7.1 酶传感器

最早的酶传感器由 Updike 和 Hicks^[60]制成,他们将氧电极与固定化的葡萄糖氧化酶(GOD)膜结合制成了可以检测生物活性物质的装置。酶传感器的发展时间较长,已经得到了充分应用并且实现了商品化,是一类被普遍接受的生物传感器。自从 1967 年来,酶传感器得到了迅速的发展。酶之所以能作为生物传感器中的首选生物活性物质,是因为酶的反应迅速,并且在温和的条件下就可以反应,不需要借助外力。但制备和纯化困难,价格昂贵是制约酶传感器开发利用的首要问题。

7.2 免疫传感器

免疫传感器是利用抗体(抗原)对抗原(抗体)的识别功能而研制成的生物传感器,对痕量物质进行高灵敏度、高选择性的检测。免疫传感器的基本原理是抗体与相应的抗原具有识别和结合的双重功能使得其能有选择的与抗原结合而不与其它物质结合^[18]。免疫传感器分为两大类,竞争法和非竞争法。竞争法的基本原理是利用样品中的抗原和一定量的标记抗原同时竞争少量定量抗体来实现检测的,竞争之后再分离结合在抗体上的抗原和未在抗体上结合的抗原,并测定抗体或抗原中标记剂的量来求待测抗原量。竞争法一般用来测定蛋白质及小分子半抗原。非竞争法主要是夹心法,将样品中的抗原与固定载体表面上的抗体结合,分离出未结合的抗原后,加入标记抗体与固相上的抗原结合,把抗原夹在固定抗体和标记抗体的中间,测定结合在固相上标记剂的量来求出待测抗原量。

7.3 微生物适配体检测技术

种类多、遗传变异快、引发的早期临床症状非常相似,是病毒、细菌等病原微生物具有的特点,使得对其进行检测不仅要求灵敏度高,而且要求能在实际样品中实现检测才可^[61]。基于抗原抗体互相结合的免疫传感器在检测实际样品方面受到限制,而适配体的特性很好地解决了这一难题。适配体的优点在于其用于传感器的识别元件,不仅能检测食品样品中的微生物而且在真实环境中也一样可行,并且将适配体修饰后,即将适配体固定或标记上报告分子后,适配体对靶分子的亲和力不会受到影响。除此之外,适配体能进行反复的变性和复性使适配体芯片能够重复使用,

符合经济高效的检测要求。除了以上优点之外,适配体比抗体更易被化学方法修饰和标记,有助于纳米颗粒和其表面的功能化。但适配体也有一定的缺点,目前发现的可以用于检测的适配体大部分都是核糖核酸(RNA),而核糖核酸十分容易被核酸酶降解^[62]。研究表明,利用对核酸酶有抵抗作用的镜像类似物和采用对核糖第2位点的化学修饰能够一定程度克服这个问题^[62]。适配体传感器相比传统的检测方法和核酸传感器具有更高的特异性,为食源性致病微生物的检测提供了一条新的途径。

8 检测技术发展趋势

食品中致病微生物的检测方法的发展趋势决定了现阶段研究的重点是寻求更快速、更高通量和更简便的检测方法。现阶段PCR技术是微生物检测的基础。同时由于等温PCR技术的扩增效率更高,设备要求方面相对于普通PCR技术更简单经济,使得更多的研究者对等温PCR十分关注,等温技术在食品致病微生物检测将会占有越来越重要的地位。

食源性微生物检测方法的发展取决于新技术的发掘。保障食品安全的关键在于对食源性细菌进行快速准确的检测和鉴定。传统食源性细菌检测方法已无法满足现代化食品工业以及社会发展的食品安全快速检测需求。快速、简单、现场的食品微生物污染检测方法成为目前研究的重点。分子生物学技术、测序技术、蛋白质组学技术、流式细胞技术等新型微生物检测技术都具有非常广阔的应用前景。可以预见在不远的将来,传统的微生物检测技术将逐渐被各种新型简便的微生物快速诊断技术所取代,对食品安全产生巨大影响的更灵敏、更有效和更可靠的微生物快速检测法将不断地开发出来。食品微生物的快速检测方法相比医学微生物领域的研究较滞后,但随着检测新技术的大力开发应用,食源性细菌检测方法必将得到巨大改进与提高。加速推进食品安全的实时监控和食品安全事件的及时、快速和高效处理要求食源性微生物准确快速检测方法逐步向自动化、高灵敏度、高准确度、高通量方向发展,并不断向食源性微生物的分类、分型及其结构分析与表征等更深层次方向迈进。

参考文献

- [1] 牛玉倩,孙宇梅,何聪芬. 细菌总数快速检测技术的研究现状[J]. 香料香精化妆品, 2011, 6: 51–55.
Niu YQ, Sun YM, He CF. Research status of fast detection techniques of total bacterial [J]. J Flavors Cosmetics, 2011, 6: 51–55.
- [2] 王庆忠,姜峰,宣瑛. 病原菌分子分型方法研究进展[J]. 检验医学, 2009, 24(5): 397–400.
Wang QZ, Lou Z, Xuan Y. Pathogen molecular classification method research [J]. J Lab Med, 2009, 24(5): 397–400.
- [3] Anderson JM, Mihalik R, Soll DR. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype [J]. J Bacteriol, 1990, 172(1): 224–235.
- [4] Parolo C, Merkoçi A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(2): 450–457.
- [5] 句立言,王世平,王勇. 食品安全快速检测技术应用进展[J]. 中国卫生工程学, 2011, 10(2): 165–168.
Ju LY, Wang SP, Wang Y. Pathogen molecular classification method research [J]. Chin J Public Health Eng, 2009, 24 (5): 397–400.
- [6] 师邱毅,纪其雄,许莉勇. 食品安全快速检测技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
Shi QY, Ji QX, Xu LY. Pathogen molecular classification method research [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.
- [7] Wang SM, Ge L, Song XR, *et al.* Paper-based chemiluminescence ELISA: lab-on-paper based on chitosan modified paper device and ax-screen-printing [J]. Biosensors Bioelectronics, 2012, 31(1): 212–218.
- [8] 李宇,姚卢悦. 菌落总数检测纸片法与国标方法的比较研究[J]. 食品工业, 2012, 33(10): 157–159.
Li Y, Yao LY. Total number of colonies test paper method and national standard method of comparative study [J]. J Food Ind, 2012, 33(10): 157–159.
- [9] 范譔萍,王婷,梁炎. 快速检验纸片在食品微生物检测中的应用[J]. 中国医药指南, 2008, 6(19): 48–49.
Fan YP, Wang T, Liang Y. Rapid test paper application in the detection of food microorganism [J]. China Med Guide, 2008, 6(19): 48–49.
- [10] 周向华,王衍彬,叶兴乾,等. 电阻抗法在食品微生物快速检测中的应用[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, 10: 73–75.
Zhou XH, Wang YB, Ye XQ, *et al.* Bioelectrical impedance analysis in rapid detection of food microorganism [J]. Journal Grain Oil Process Food Mach, 2003, 10: 73–75.
- [11] James DM, Hendson JF. Nucleoside triphosphate specificity of firefly luciferase [J]. Anal Biochem, 1983, 131(1): 187–189.
- [12] Gronroos M, Maenpää J, Nieminen AL, *et al.* Correlation of steroidreceptor contents with medroxyprogesterone and tamoxifen effects in endometrial cancer assayed by bar in vitro ATP-bioluminescence method [J]. J Steroid Biochem, 1983, 19(1): 194.
- [13] 唐倩倩,叶尊忠,王剑平,等. ATP生物发光法在微生物检验中的应用[J]. 食品科学, 2009, 29(6): 460–465.
Tang QQ, Ye ZZ, Wang JP, *et al.* The application of ATP bioluminescence for in the microbiological [J]. Food Sci, 2009, 29(6): 460–465.
- [14] 杨晓林. 生物发光及化学发光在生物医学领域中应用的进展[J]. 生物物理学报, 2000, 16(1): 11–15.
Yang XL. Luminous progress application in the field of biomedical bioluminescence and chemistry [J]. Acta Biophysica Sin, 2000, 16(1): 11–15.
- [15] 李霞,陆利霞,熊晓辉. 食品致病菌快速检测技术研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2007, 3: 16–20.
Li X, Lu LX, Xiong XH. Research progress of rapid detection technology of food pathogenic bacteria [J]. Jiangsu Food Ferment, 2007, 3: 16–20.
- [16] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, 1975 [J]. J Immunol, 2005, 174(5): 2453–2455.
- [17] 李文敏. 酶联免疫吸附反应的技术进展及应用[J]. 湖北职业技术学院

- 学报, 2003, 6(4): 65-69.
- Li WM. The technical progress and application of enzyme-linked immunosorbent reaction [J]. J Hubei Vocat Tech Coll, 2003, 6(4): 65-69.
- [18] 曹成. 胶体金核酸层析检测 5 种检疫性植物病毒的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011.
- Cao C. Colloidal gold nucleic acid chromatography detection of 5 kinds of quarantine of plant virus research [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.
- [19] Byoung JK, Hee-Youn K, Yeo-Jun Y, *et al.* Differentiation of *Bifidobacterium* species using partial RNA polymerase {beta}-subunit (rpoB) gene sequences [J]. Int J Syst Evol Micr, 2010, 60: 2697-2704.
- [20] Naser SM, Thompson FL, Hoste B, *et al.* Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of enterococcus species based on *rpoA* and *pheS* genes [J]. Microbiology, 2005, 151:2141-2150.
- [21] McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, *et al.* Phylogeny and Identification of Nocardia Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48: 4525-4533.
- [22] 李沁, 彭织云, 陈鑫鹏, 等. 副溶血性弧菌毒力基因表达时内参基因的选择[J]. 微生物学报, 2013, 53(3): 306-312.
- Li Q, Peng ZY, Chen XP, *et al.* Deputy hemolytic vibrio virulence gene expression when internal gene selection [J]. J Microbiol, 2013, 53(3): 306-312.
- [23] Chow WHA, McCloskey C, Tong Y, *et al.* Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic clostridium difficile [J]. J Mol Diagn, 2008, 10(5): 452-458.
- [24] Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6503-6508.
- [25] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [26] 孙永艳, 申泉, 李艳琴. 肠杆菌基因间重复共有序列及 ERIC-PCR [J]. 生命的化学, 2004, 24(4): 288-290.
- Sun YY, Shen Q, Li YQ. Enterobacter intergenic repetitive consensus sequence and ERIC-PCR [J]. Chem Life, 2004, 24(4): 288-290.
- [27] Corich V, Mattiazzi A, Soldati E, *et al.* Sau-PCR, a novel amplification technique for genetic fingerprinting of microorganisms [J]. Appl Environ Microb, 2005, 71(10): 6401-6406.
- [28] Iacumin L, Comi G, Cantoni C, *et al.* Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis [J]. Meat Sci, 2006, 74(2): 281-288.
- [29] 毕水莲, 李琳, 张学武, 等. Sau-PCR 和 AILP 技术对一起副溶血弧菌引起食物中毒的分型研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 158-161.
- Bi SL, Li L, Zhang XW, *et al.* Sau-PCR and AILP technology of deputy hemolytic vibrio together cause food poisoning classification study [J]. J Food Sci Technol, 2009, 30(8): 158-161.
- [30] Yan H, Shi L, Alam MJ, *et al.* Usefulness of Sau-PCR for molecular epidemiology of nosocomial outbreaks due to Burkholderia cepacia which occurred in a local hospital in Guangzhou, China [J]. Microbiol Immunol, 2008, 52(5): 283-286.
- [31] Schwarz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis [J]. Cell, 1984, 37(1): 67-75.
- [32] Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of Shigella sonnei infection associated with eating fresh parsley-United States and Canada, July-August 1998 [J]. Mmwr Morb Mortal Wkly Rep, 1999, 48(14): 285-289.
- [33] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [34] Murray BE, Singh KV, Heath JD, *et al.* Comparison of genomic DNAs of different Enterococcus isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(9): 2059-2063.
- [35] Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, *et al.* Resolution of recent evolutionary divergence among Escherichia coli from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology [J]. J Infect Dis, 1990, 161(2): 230-235.
- [36] Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, *et al.* Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(4): 982-985.
- [37] Prevost G, Jaulhac B, Piedmont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 967-973.
- [38] Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, *et al.* Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(9): 3131-3145.
- [39] Vanbelkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR [J]. Clin Microbiol Rev, 1994, 7(2): 174-184.
- [40] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [41] Chamberian JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Detection screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. Nucl Acids Res, 1988, 16: 1141-1156.
- [42] 刘家云, 龙钊, 苏明. 志贺菌、沙门菌和霍乱弧菌多重 PCR 快速检测体系的建立[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(11): 1190-1191.
- Liu JY, Long Y, Su M. Shigella, Salmonella and Vibrio cholerae multiple PCR rapid detection system [J]. Med J Chin PLA, 2007, 32(11): 1190-1190.
- [43] Kirschberg O, Schuttler C, Repp R, *et al.* A multiplex-PCR to identify Hepatitis B virus-genotypes A-F [J]. J Clin Virol, 2004, 29(1): 39-43.
- [44] Theru A, Sivakumara N, Kiran K, *et al.* Denaturing high performance liquid chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders [J]. Current Sci, 2003, 84(3): 291-296.
- [45] William H, David S, Erik H, *et al.* Denaturing HPLC for Identifying Bacteria [J]. Biotechniques, 2002, 33: 386-391.
- [46] 霍金龙, 苗永旺, 曾养志. 基因芯片技术及其应用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 329-332.
- Hou JL, Miao YW, Zeng YZ. Gene chip technology and its application [J]. J Biotechnol Commun, 2007, 18(2): 329-332.
- [47] 刘玉娥, 高桂华, 陶墨奎, 等. 微菌落法快速定量检测食品中细菌总数

- [J]. 解放军预防医学杂志, 2007, 25(6): 406–408.
- Liu YE, Gao GH, Tao MK, *et al.* Micro colony method fast quantitative detection of total number of bacteria in food [J]. J Prev Med Chin PLA, 2007, 25(6): 406–408.
- [48] Wang LX, Mustapha A. EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable *Salmonella* in chicken and eggs [J]. J Food Sci, 2010, 75(3): M134–139.
- [49] Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability [J]. J Microbiol Meth, 2003, 53(2): 175–183.
- [50] 伦镜盛, 夏常艳, 罗鹏, 等. 副溶血弧菌 EMA-PCR 检测技术的建立 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 952–956.
- Lun JS, Xia CY, Lou P, *et al.* Deputy hemolytic vibrio EMA-the establishment of the PCR detection technology [J]. J Microbiol Bull, 2011, 38(6): 952–956.
- [51] Wang LX, Mustapha A. EMA-Real-Time PCR as a reliable method for detection of viable *Salmonella* in chicken and eggs [J]. J Food Sci, 2010, 75 (3): M134–139.
- [52] Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies [J]. Anal Biochem, 2002, 309(2): 293–300.
- [53] Lossos IS, Czerwinski DK, Wechsler MA, *et al.* Optimization of quantitative real time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies [J]. Leukemia, 2003, 17(4): 789–795.
- [54] Radonic A, Thulke S, Mackay IM, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(4): 856–862.
- [55] Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experiment treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR [J]. Biochem Biophys Methods, 2000, 46(1–2): 69–81.
- [56] Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, *et al.* Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of Thelper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR [J]. Anal Biochem, 2001, 299(1): 63–70.
- [57] González-Escalona N, Hammack TS, Russell M, *et al.* Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-Based quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting *invA* mRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(11): 3714–3720.
- [58] Song Y, Li W, Duan Y, *et al.* Nicking enzyme-assisted biosensor for *Salmonella enteritidis* detection based on fluorescence resonance energy transfer [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 55 (15): 400–404.
- [59] Kim HS, Cho IH, Seo SM, *et al.* In situ immuno-magnetic concentration-based biosensor systems for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Mat Sci Eng: C, 2012, 32(2): 160–166.
- [60] Urdike SJ, Hicks GP. Sensitivity of electrochemical enzyme sensor for glucose determination [J]. Nature, 1967, 214:986.
- [61] Edith TC, Evangelyn C. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(11): 3175–3182.
- [62] Eulberg D, Klusmann S. Spiegelmers: biostable aptamers [J]. Chem Biochem, 2003, 4(10): 979–983.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



陈玉婷, 硕士研究生, 主要研究方向为水中风险因子的检测。
E-mail: tianshirouou@sina.com



许文涛, 副教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品病原微生物的检测和食用安全性评价。
E-mail: xuwentao1111@sina.com