

适配体结合聚酰胺-胺修饰的磁性纳米粒子富集单增李斯特菌

林淑凤¹, 徐珍霞², 吴仁蔚^{1*}

(1. 华中农业大学食品科学与技术学院, 武汉 430070; 2. 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

摘 要: 目的 制备聚酰胺-胺聚合物修饰的磁性纳米粒子, 增加连接适配体的数量, 提高富集单增李斯特菌的效率。**方法** 通过迈克尔加成和酰胺化的级联反应, 在 Fe_3O_4 磁性纳米粒子表面接枝 3.0 代聚酰胺-胺树枝状聚合物(poly(amidoamine)dendrimers, PAMAM), 制得聚酰胺-胺磁性纳米粒子(G3-MNPs), 并对其表征。G3-MNPs 偶联生物素标记的单增李斯特菌特异性适配体, 获得适配体磁性纳米粒子(AP-G3-MNPs)。然后对 AP-G3-MNPs 富集单增李斯特菌的工作条件和捕获率进行测定。**结果** 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析、Zeta 电位测定以及碳、氮元素分析结果表明, PAMAM 已接枝在 MNPs 表面, G3-MNPs 偶联适配体的效率为 1.412 nmol/mg。AP-G3-MNPs(200 μg)对浓度为 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL 的单增李斯特菌的捕获率均大于 90%。**结论** 接枝 PAMAM 提高了 MNPs 的负载能力, 增强了其富集单增李斯特菌的能力。

关键词: 单增李斯特菌; 磁性纳米粒子; 适配体; 聚酰胺-胺树枝状聚合物; 细菌富集

Enrichment of *Listeria monocytogenes* by aptamer-conjugated polyamide-amine polymer-magnetic nanoparticles

LIN Shu-Feng¹, XU Zhen-Xia², WU Ren-Wei^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

ABSTRACT: Objective To prepare magnetic nanoparticles modified by polyamide-amine polymer to increase the number of joint aptamers and improve the efficiency of enrichment of *Listeria monocytogenes*. **Methods** The surface of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles were grafted with three gaps of poly(amidoamine)dendrimers (PAMAM) (G3-MNPs) by michael addition and amidation cascade reaction. Then G3-MNPs were characterized. G3-MNPs were conjugated with biotined aptamers against *L. monocytogenes* to get AP-G3-MNPs. The enrichment conditions of AP-G3-MNPs and capture efficiency for *L. monocytogenes* were determined. **Results** PAMAM was successfully grafted on MNPs based on FT-IR spectra, zeta potential determination and element analysis of carbon and nitrogen. The loading rate of G3-MNPs for biotined aptamers was 1.412 nmol/mg. The specific capture rate of AP-G3-MNPs (200 μg) was higher than 90% for *Listeria monocytogenes* with concentration of $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL. **Conclusion** Grafting

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201374)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(2662015PY152)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201374), Special Fund Project of Basic Scientific Research Operating Expenses of Central Universities (2662015PY152)

***通讯作者:** 吴仁蔚, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为食品生物技术与食品安全。E-mail: wurenwei@mail.hzau.edu.cn

***Corresponding author:** WU Ren-Wei, Associate Professor, School of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China. E-mail: wurenwei@mail.hzau.edu.cn

PAMAM on MNPs increased its loading rate for aptamers and the capture efficiency for *L. monocytogenes*.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; magnetic nanoparticles; aptamer; poly(amidomine)dendrimers; bacterial enrichment

1 引言

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)在自然环境中分布广泛,可经果蔬、乳和肉及其制品等食物进行传播,是一种非常重要的食源性致病菌。单增李斯特菌感染可引发胃肠道炎症,严重者可发生败血症、脑膜炎等,孕妇感染可能引起流产、死胎等严重后果^[1-3]。加强对食品的安全检测是预防该菌引起食物中毒的重要保障,单增李斯特菌的检测方法包括以细菌分离鉴定为基础的方法、免疫学方法、分子生物学方法等^[4,5]。

通常食品中污染的细菌数量不多,而且可能是多种细菌混合污染,另外食品本身的成分复杂,这些原因都会对检测方法造成干扰,降低灵敏度或特异性。所以对食品中的微生物进行富集和分离,对提高检出率和准确性具有重要意义。磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, MNPs)具有较好的磁响应性,在外加磁场的作用下能简便、快速地从混合物中分离,在生物富集和分离方面备受关注^[6]。由于 MNPs 体积小,结合配体的能力有限,所以采用合适的方法增加 MNPs 的负载能力,是加强 MNPs 应用的一个重要研究方向。聚酰胺-胺树枝状聚合物(poly(amidoamine) dendrimers, PAMAM)是一种超支化聚合物,其特有的超支化结构可有效增加 MNPs 负载能力,从而增强对靶标的捕获效率^[7,8]。为了实现对靶标的特异性识别, MNPs 通常连接不同的配体,如抗体^[9-11], 适配体^[12-14]、噬菌体^[15], 以及受体蛋白^[16]等。其中适配体是经过指数富集配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选获得的,可以与靶标特异性结合的单链 DNA 或 RNA,具有生物学性质稳定,可以体外无限合成,便于修饰,亲和力高等独特的优点^[17]。目前适配体结合聚酰胺-胺修饰的磁性纳米粒子富集单增李斯特菌的研究相对较少。

本研究将 PAMAM 直接固定于 MNPs 表面,增加 MNPs 负载适配体的能力,在外加磁场的作用下,即可实现靶标的分离,简化了操作步骤。同时结合适配体特异性好和易于合成等优势,可以更好地发挥 MNPs 在细菌富集和分离方面的优势,为相关研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Nexus470 傅里叶红外光谱仪(美国 Nicolet 公司);

Elementar Vario PYRO cube and Isoprime100 元素分析仪-稳定同位素比例质谱仪(德国元素公司); 纳米粒度及 zeta 电位分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, CVCC 1598)购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心(China Veterinary Culture Collection Center, CVCC); 肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, ATCC 13076)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、副溶血弧菌(*Vibriopara haemolyticus*, ATCC 33846)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922),均来自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

单增李斯特菌单链 DNA 适配体(single strand DNA, ssDNA)由本实验室筛选获得^[18], 5'端标记生物素的适配体(biotined aptamer)由上海生工生物工程股份有限公司合成。

胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)、PALCAM、Baird-Parker 等培养基(青岛海博生物有限公司); 氨基化磁性纳米粒子(郑州英诺生物有限公司); 链霉亲和素、戊二醛、乙二胺等(分析纯, 国药集团); 实验用水为蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 AP-G3-MNPs 制备和工作原理

采用发散合成法在 Fe_3O_4 MNPs 表面接枝 3.0 代 PAMAM, 然后偶联链霉亲和素。基于链霉亲和素和生物素的特异性结合, 将生物素标记的单增李斯特菌特异性适配体连接在 G3-MNPs 表面, 制得适配体磁性纳米粒子(AP-G3-MNPs), 并将其用于单增李斯特菌的富集和分离(AP-G3-MNPs 制备和工作原理见图 1)。

2.2.2 PAMAM 聚合物的合成及表征

参考徐珍霞等^[19]制备 PAMAM 的反应条件, MNPs 的氨基与丙烯酸甲酯进行迈克尔加成反应制备 0.5 代 PAMAM, 然后与乙二胺进行酰胺化反应形成末端为氨基的 1.0 代 PAMAM, 重复进行上述迈克尔加成反应和酰胺化反应, 最终获得接枝 3.0 代 PAMAM 的 G3-MNPs。将 G3-MNPs 以甲醇洗涤 3 次, 然后蒸馏水洗涤 5 次, 重悬于磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)备用。

对接枝不同代数 PAMAM 的 MNPs 进行表征。FT-IR 分析功能基团, 采用溴化钾压片法, 扫描波数范围 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。元素分析仪测定 C、N 元素含量。zeta 电位分析仪测量 zeta 电位值。

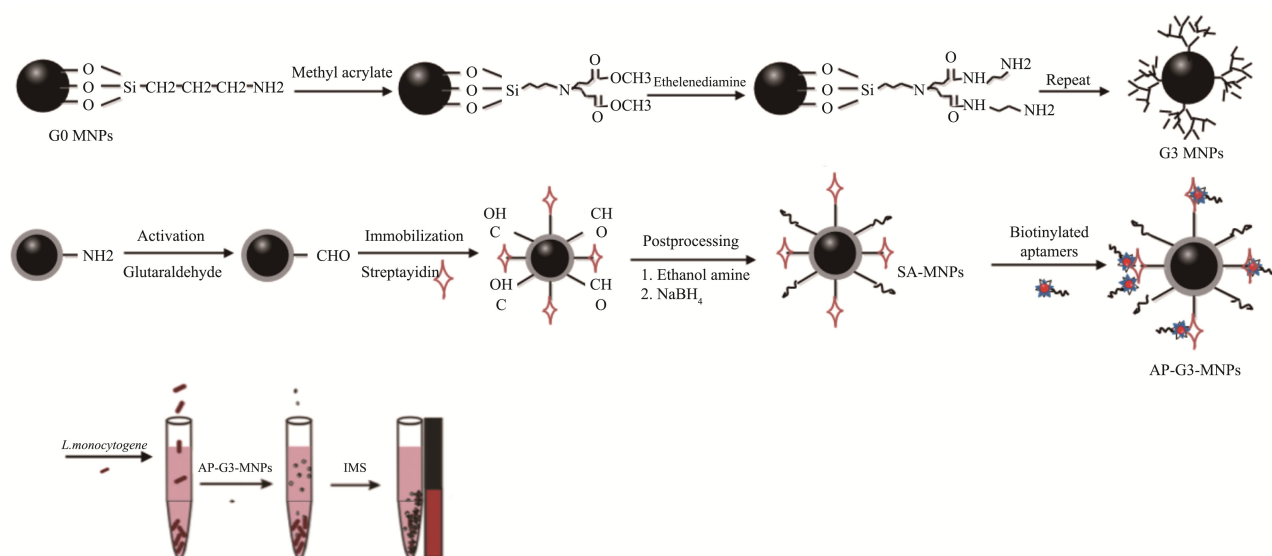


图 1 适配体磁纳粒子的制备及其富集单增李斯特菌的示意图
Fig.1 Schematic diagram of preparation of AP-G3-MNPs and enrichment to *L. monocytogenes*

2.2.3 适配体的连接

在 G3-MNPs 表面包覆链霉亲和素(streptavidin, SA)^[20]。将 20 mg 氨基化 MNPs 滴加到 20 mL 2.5%戊二醛溶液中,于室温通氮气搅拌反应 2 h。磁分离 MNPs,以 PBS(0.1 mol/L, pH 7.2)洗涤 3 次,将 MNPs 溶于 5 mL PBS,即得到醛基磁性微球。0.5 mL 醛基磁性微球与 0.5 mL PBS 混合均匀,向其中滴加 0.5 mL SA(1.0 mg/mL),4 °C 振荡反应 24 h。回收 MNPs,将其重悬于 1 mL PBS,向其中加入 50 μ L 三乙醇胺,室温孵育 1 h,封闭 MNPs 上残留的醛基,得到 SA-MNPs。最后,加入 50 μ L NaBH₄(0.2 mol/L)作用 15 min,以减少在固定化反应中产生的席夫碱。PBS 洗涤 SA-MNPs 3 次,重悬于 4 mL PBS,备用。

基于链霉亲和素与生物素之间的高度特异性结合,将生物素标记的适配体连接到 SA-MNPs,得到适配体磁性纳米粒子(AP-G3-MNPs)。将 100 μ L 生物素标记的适配体(5 μ mol/L),加入到 500 μ L SA-MNPs(0.5 mg/mL,以 MNPs 量计),于 37 °C 以 180 r/min 振荡 3 h,反应结束后回收 MNPs, PBS 洗涤 3 次,然后将 AP-G3-MNPs 重悬于 500 μ L PBS,备用。

采用竞争酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定适配体的负载量。将 0.05 mg SA-MNPs 与 200 μ L 含 2%牛血清白蛋白的 PBS 混合,37 °C 静置 2 h,磁分离 MNPs,以 PBST 洗涤 3 次;每孔分别加入 100 μ L 不同浓度的生物素标记的适配体,37 °C 振荡反应 1 h,回收磁珠并以 PBS 洗涤 3 次;加入 100 μ L 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的生物素,37 °C 振荡反应 1 h, PBS 洗涤并回收 MNPs;加入 100 μ L 邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD)底物液,避光反应 10

min;最后以 2 M H₂SO₄终止反应,于 492 nm 测定其吸光度值(A₄₉₂),每组设 3 个平行。以 95% 的生物素-辣根过氧化物酶活力被抑制的点作为适配体的结合容量饱和点,按公式 Bcap(nmol/mg)=n_{95%}/0.05 计算 SA-MNPs(1 mg)对适配体的结合力^[21]。

2.2.4 适配体磁性纳米粒子富集条件的确定

(1)捕获率的计算方法

AP-G3-MNPs 与菌液孵育,同时设未接枝 PAMAM 聚合物的 MNPs(AP-G0-MNPs)作为对照。磁分离单增李斯特菌与 MNPs 结合物,取上清液,以鉴别培养基 PALCAM 进行菌落总数测定,计算 AP-G3-MNPs 对靶标的捕获率。每组实验设 3 个平行,结果以平均数±标准差表示。

捕获率计算方法:捕获率(%)=(1-上清液的菌落数/初始菌数)×100%。

(2) AP-G3-MNPs 的富集条件

取一定量的 AP-G3-MNPs 与培养至对数期的细菌(2×10³ CFU/mL)混合,于 37 °C 振荡孵育 120 min,磁分离后取上清液进行菌落总数测定,计算捕获率。

AP-G3-MNPs 与单增李斯特菌混合,于 37 °C 以 180 r/min 振荡孵育不同时间,磁分离 MNPs 与菌体复合物,取上清液进行菌落总数测定,计算 AP-G3-MNPs 的捕获率。

为确保 AP-G3-MNPs 的用量可以保证高浓度菌液的最大捕获效率,将 AP-G3-MNPs(200 μ g)与浓度为 10²~10⁸ CFU/mL 的菌液混合,于 37 °C 振荡孵育,磁分离后取上清液进行菌落总数测定,计算捕获率。

(3)适配体磁性纳米粒子识别靶标的特异性

分别取单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、大肠埃希氏菌的菌液,调整菌浓度为 2×10³ CFU/mL。

将 AP-G3-MNPs 加入到 1 mL 不同的菌液中, 于 37 °C 振荡孵育 60 min, 然后磁分离细菌与 AP-G3-MNPs 复合物, 取上清液进行菌落总数测定, 计算捕获率。

2.2.5 数据与统计学分析

每实验组设置 3 个平行, 同时设置空白对照, 结果用平均值±标准差表示; 通过 SPSS 20.0 采用双侧 *T* 检验法进行显著性分析。

3 结果与分析

3.1 接枝 PAMAM 聚合物的磁性纳米粒子的表征

FT-IR 分析不同代数 PAMAM 修饰的 MNPs 的结构, 结果见图 2(A)。584 cm^{-1} 为 Fe-O 的伸缩振动峰, 3429 和 1631 cm^{-1} 为水中 -OH 的伸缩振动和弯曲振动吸收峰, 1057 cm^{-1} 附近的强吸收峰为 Si-O-Si 的非对称伸缩振动峰, 均为 MNPs 自身结构的基团; 经 PAMAM 修饰的 MNPs 在 2924、2852 cm^{-1} 的振动吸收峰, 分别对应亚甲基的非对称伸缩和对称性伸缩, 这主要是因为聚酰胺含有大量 -CH₂; 3429 和 1628 cm^{-1} 为 N-H 的特征吸收峰, 其与 -OH 的振动

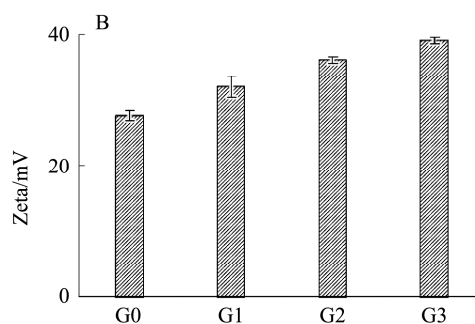
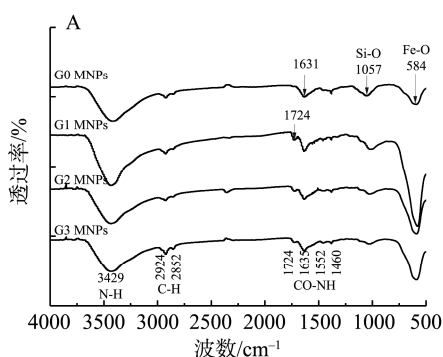
吸收峰叠加。同时每接枝一代 PAMAM 的 MNPs 分别在 1724、1635、1552 和 1460 cm^{-1} 处出现了吸收峰, 其对应于接枝过程形成的特征基团 -CO-NH 的吸收峰, 说明 PAMAM 接枝在 MNPs 上。

PAMAM 携带氨基基团, PAMAM-MNPs 的 Zeta 电位值测定结果见图 2(B)。由图可见, 在 PAMAM 生成过程中, MNPs 的 Zeta 电位值逐渐增大, 而且每接枝一代 PAMAM, 增加的电荷数基本一致, 说明 PAMAM 已接枝在 MNPs 表面。

由 G0-MNPs 至 G3-MNPs, 随着 MNPs 表面 PAMAM 的增加, 元素分析仪测定其 C、N 元素含量(wt%)分别由 1.58 和 0.69 增加到 3.24 和 1.10, 说明 PAMAM 树状分子是在 MNPs 表面逐步增长的。

3.2 适配体的负载量

采用竞争 ELISA, 以不同浓度的辣根过氧化物酶标记的生物素与生物素标记的适配体竞争 SA-MNPs 上的链霉亲和素, 评估 SA-MNPs 与生物素标记适配子的结合量, 测定曲线见图 3。计算结果显示, G3-MNPs 的适配子结合量为 1.412 nmol/mg, 而 G0-MNPs 为 0.655 nmol/mg。



注: G0 表示未接枝聚合物的 MNPs, G1-G3 分别表示接枝不同代数 PAMAM 聚合物的 MNPs, $n=3$ 。

图2 接枝 PAMAM 聚合物 MNPs 的 FT-IR 光谱(A)和 Zeta 电位分析(B)

Fig.2 FT-IR spectra(A) and Zeta potential(B) of MNPs modified with PAMAM dendrimers

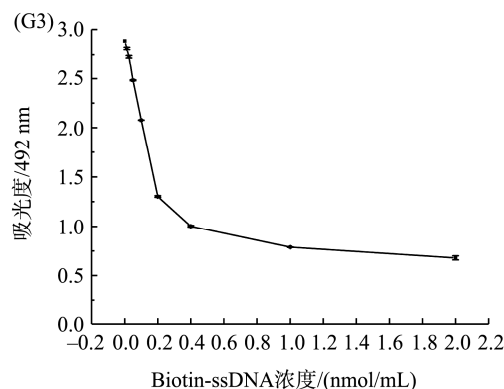
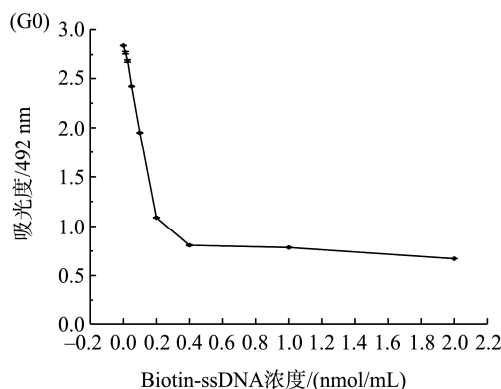


图3 G0-MNPs 和 G3-MNPs 对适配体的结合量测定($n=3$)

Fig.3 Binding efficiency of G0-MNPs and G3-MNPs for biotinylated aptamer($n=3$)

3.3 适配体磁性纳米粒子捕获体系的确定

为了达到最佳的捕获效率,对 AP-G3-MNPs 的用量、与细菌的孵育时间,进行测定,同时以 AP-G0-MNPs 作为对照,结果见图 4。

以不同用量的 AP-G3-MNPs 对单增李斯特菌(10^3 CFU/mL)进行富集(图 4A),捕获率随 MNPs 用量的增加而提高,当 MNPs 用量为 50 μ g 时捕获率达到 $91.2\% \pm 1.3\%$,MNPs 用量继续增加,捕获率变化不明显。此时,

AP-G3-MNPs 显著高于 AP-G0-MNPs 对照($78.2\% \pm 1.1\%$)($P < 0.01, n=3$)。

根据捕获率确定最佳孵育时间,AP-G3-MNPs 与菌液(2×10^3 CFU/mL)的最佳孵育时间结果见图 4B。当孵育时间为 60 min 时,AP-G3-MNPs 对单增李斯特菌的捕获达到饱和,捕获率为 $92.6\% \pm 2.3\%$,显著高于 AP-G0-MNPs 对照($76.3\% \pm 5.0\%$)($P < 0.01, n=3$)。因此,确定磁性纳米粒子与靶细菌的孵育时间为 60 min。

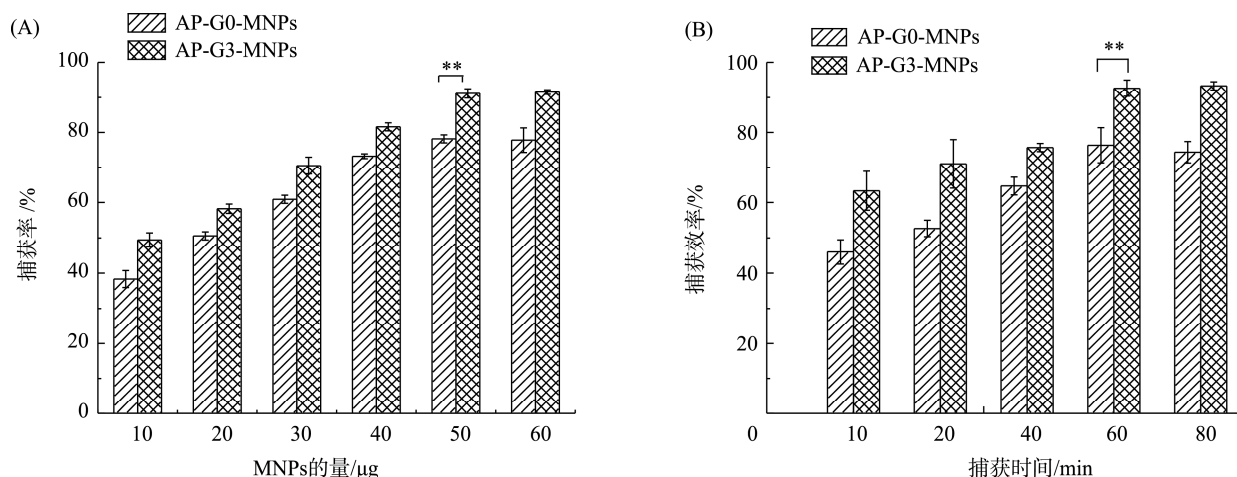


图 4 AP-G3-MNPs 用量(A)和反应时间(B)的确定($n=3$)

Fig.4 Determination of dosage (A) and reaction time (B) of AP-G3-MNPs($n=3$)

为了保证 MNPs 能够满足不同细菌含量的样品的最大捕获效率,以 200 μ g AP-G3-MNPs 对浓度为 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL 的菌液进行捕获。如图 5 所示,当细菌浓度为 2×10^8 CFU/mL 时,200 μ g AP-G3-MNPs 仍可以保持 90%以上的捕获率。明 AP-G3-MNPs 用量充足,可以确保浓度高达 2×10^8 CFU/mL 时靶标的高效富集。而当细菌浓度大于 2×10^5 CFU/mL,对照组 AP-G0-MNPs 的捕获效率明显下降,最低至 68%。说并且经 PAMAM 修饰后 MNPs 的捕获效率优于 AP-G0-MNPs。

以食源性病原菌金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌作为对照,对 AP-G3-MNPs 与靶标的结合特异性进行了验证,结果见图 6。AP-G0-MNPs 和 AP-G3-MNPs 对单增李斯特菌的捕获率分别为 $76.3\% \pm 5\%$ 和 $92.6\% \pm 2.3\%$,但对非目标菌,金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌和肠炎沙门氏菌的捕获率均小于 20%,表明制备的适配体磁性粒子能够特异性识别单增李斯特菌。

4 讨论

磁性纳米粒子可以连接不同的配体从而特异性识别靶标,在外磁场的作用下快速地从混合物中分离,操作简便^[22],所以在生物分离方面的应用受到高度关注。Sung 等

^[6]将抗体与磁性纳米粒子偶联富集金黄色葡萄球菌,在 PBS 和牛奶样品中的捕获效率分别为 96%和 78%。Meng 等^[23]制备了万古霉素功能化磁性纳米粒子,以万古霉素对革兰氏阳性细菌进行富集,在 PBS 和生菜中单增李斯特菌

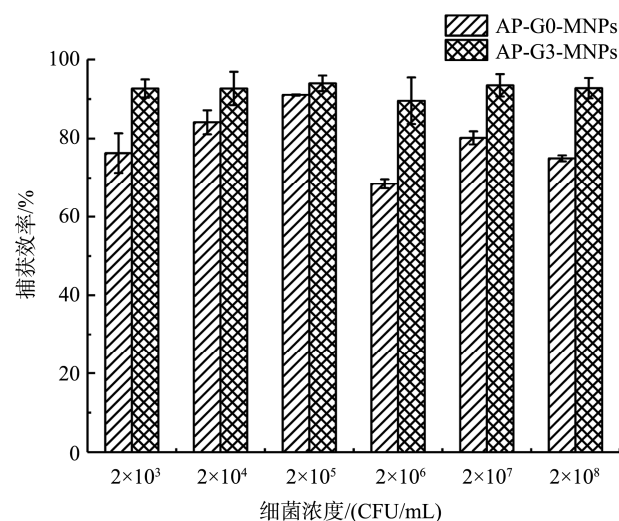


图 5 适配体磁性纳米粒子对不同浓度单增李斯特菌的捕获效率($n=3$)

Fig.5 Capture efficiency of the AP-G3-MNPs for *Listeria monocytogenes* in different concentration ($n=3$)

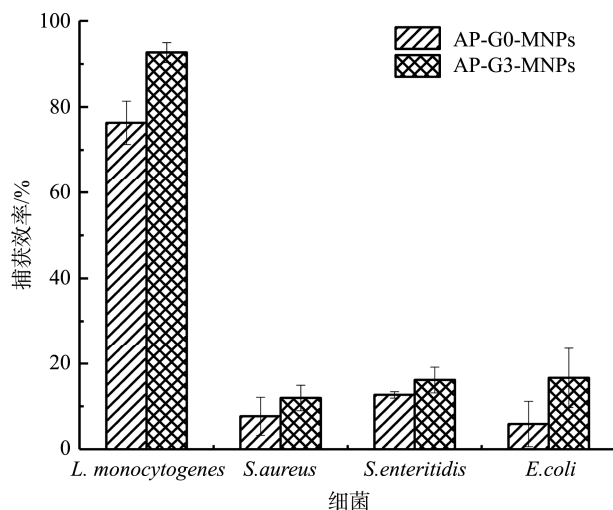


图6 适配体磁性纳米粒子识别靶标的特异性(n=3)

Fig.6 Specificity of the AP-G3-MNPs for *Listeria monocytogenes*(n=3)

的捕获率分别为90%和83%。Poshtiban等^[16]以噬菌体受体结合蛋白为配体对空肠弯曲杆菌进行磁富集,结合定量PCR进行检测,无需增菌培养,可以达到良好的检测效果。本研究以适配体作为捕获细菌的配基,适配体与磁性纳米粒子结合,很好地发挥了二者的优势,能以较高的亲和力和特异性地从混合物中分离靶标,是富集靶标的良好载体。

PAMAM 树枝状聚合物是一种超支化聚合物,其表面富含官能团,可缀合多种生物分子探针,用于食品安全检测,以富集靶标和减少食品自身的成分对检测方法的干扰^[24,25]。Li等^[17]开发了PAMAM树状大分子介导的生物素扩增磁性分离方法,结合流式细胞仪检测单增李斯特菌,在细菌浓度低于 10^4 CFU/mL的PBS溶液和人工污染生菜样品中均可检测到超过89.15%的靶细菌。Dong等^[8]利用PAMAM开发电化学阻抗免疫传感器,可检测到 5.0×10^2 CFU/mL的鼠伤寒沙门氏菌。Castillo等^[26]采用PAMAM-适配体复合物可实现对浓度低至0.40 nmol/L黄曲霉毒素B₁的直接电化学检测。本研究将PAMAM接枝到MNPs,连接的适配体量明显增加,提高了磁性纳米粒子的负载能力。其富集靶标的效率均显著高于未接枝PAMAM的MNPs,说明PAMAM聚合物修饰是增强MNPs的生物活性和捕获靶标能力的有效途径。

以200 μg饱和用量的AP-G3-MNPs在最佳工作条件下,对浓度为 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL的菌液的最大捕获率约92%,仍有提高空间。这就需要提高PAMAM的接枝效率和预期反应的准确性,减少空间位阻,更高效地利用MNPs的比表面积。另外PAMAM包覆层可能降低MNPs的磁反应性,降低MNPs的回收效率,影响其对靶标的捕获率。

5 结 论

在磁性纳米粒子表面接枝3.0代聚酰胺-胺树枝状聚合物,然后连接特异性适配体,对浓度为 $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL的单增李斯特菌的捕获率均高于90%,显著高于未经聚合物修饰的AP-G0-MNPs,富集效果明显。表明聚酰胺-胺聚合物修饰可以显著提高磁性纳米粒子的负载能力,与适配体联合应用,在单增李斯特菌的分离、富集,以及排除检测干扰方面具有较好的应用潜能。

参考文献

- [1] 冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 单核细胞增生性李斯特菌分子生物学检测技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 392-396.
Feng K, Hu WZ, Jiang AL, et al. Research progress on molecular biological detection technology of *Listeria monocytogenes* [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(4): 392-396.
- [2] 孙静娟, 曾海娟, 丁承超, 等. 单核细胞增生李斯特菌检测技术研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(4): 120-125.
Sun JJ, Zeng HJ, Ding CC, et al. Research progress on detection technology of *Listeria monocytogenes* [J]. J Microbiol, 2017, 37(4): 120-125.
- [3] Radosheovich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 16(1): 32-46.
- [4] 孙玉霜, 李颖, 李秀梅, 等. 食源性单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(8): 76-80.
Shun YS, Li Y, Li XM, et al. Research progress on detection technology of food-borne *Listeria monocytogenes* [J]. Chin Anim Health Insp, 2017, 34(8): 76-80.
- [5] Law WF, Ab-Mutalib NS, Chan KG, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations [J]. Front Microbiol, 2015, 5: 770.
- [6] Zhao Y, Li Y, Jiang K, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance [J]. Food Control, 2017, 71: 110-116.
- [7] Li FL, Li F, Aguilar ZP, et al. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-mediated biotin amplified immunomagnetic separation method coupled with flow cytometry for viable *Listeria monocytogenes* detection [J]. Sensor Actuat B- Chem, 2018, 257: 286-294.
- [8] Dong J, Zhao H, Xu MR, et al. A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of *Salmonella typhimurium* in milk [J]. Food Chem, 2013, 141(3): 1980-1986.
- [9] Sung YJ, Suk HJ, Sung HY, et al. Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 43: 432-439.
- [10] Taheri H, Amini B, Kamali M, et al. Functionalization of anti-Brucella antibody based on SNP and MNP nanoparticles for visual and spectrophotometric detection of *Brucella* [J]. Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc, 2019, 1386-1425.
- [11] Zhang LD, Du XW, Chen ZX, et al. Instrument-free and visual detection

- of salmonella based on magnetic nanoparticles and an antibody probe immunosensor [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4645.
- [12] Shi L, Ba L, Xiong Y, *et al.* A hybridization chain reaction based assay for fluorometric determination of exosomes using magnetic nanoparticles and both aptamers and antibody as recognition elements [J]. *Microchim Acta*, 2019, 186(12): 796.
- [13] Zhang X, Wang X, Yang Q, *et al.* Conductometric sensor for viable *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* based on magnetic analyte separation via aptamer [J]. *Microchim Acta*, 2019, 187(1): 43.
- [14] Haghighi FH, Binaymotlagh R, Mirahmadi-Zare SZ, *et al.* Aptamer/magnetic nanoparticles decorated with fluorescent gold nanoclusters for selective detection and collection of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells from a mixture [J]. *Nanotechnology*, 2019, 31(2): 025605.
- [15] Zhou Y, Ramaraja R. Isolation and separation of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100-modified magnetic particles [J]. *Colloids Surf B, Biointerf*, 2019, 175: 421–427.
- [16] Poshtiban S, Javed MA, Arutyunov D, *et al.* Phage receptor binding protein-based magnetic enrichment method as an aid for real time PCR detection of foodborne bacteria [J]. *Analyst*, 2013, 138(19): 5619–5626.
- [17] Li ZH, Orc ID, Mona A, *et al.* Application of electrochemical aptasensors toward clinical diagnostics, food, and environmental monitoring: Review [J]. *Sensors*, 2019, 19(24): 5435.
- [18] 孙程, 徐宝霞, 徐珍霞, 等. 全细胞 SELEX 法筛选单增李斯特菌的 ssDNA 适配体[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(8): 110–115.
- Sun C, Xu BX, Xu ZX, *et al.* Selection of ssDNA aptamers of *Listeria monocytogenes* by whole SELEX [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2018, 34(8): 110–115.
- [19] 徐珍霞, 孙程, 陈福生, 等. 富含氨基的聚酰胺-胺树枝状大分子的合成与表征[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(4): 772–776.
- Xu ZX, Sun C, Chen FS, *et al.* Synthesis and characterization of polyamidoamine dendrimers with amine groups [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2018, 45(4): 772–776.
- [20] Gong P, Peng Z, Wang Y, *et al.* Synthesis of streptavidin-conjugated magnetic nanoparticles for DNA detection [J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15(4): 1558.
- [21] 张志锋, 朱宏莉, 唐一通, 等. 链亲和素-磁性微粒的制备及其应用[J]. *中国科学(B 辑 化学)*, 2006, 36(4): 353–360.
- Zhang ZF, Zhu HL, Tang YT, *et al.* Preparation and application of streptavidin-magnetic particles [J]. *Sci China Series B-Chem*, 2006, 36(4): 353–360.
- [22] Rezaei SJT, Malekzadeh AM, Ramazani A, *et al.* pH-sensitive magnetite nanoparticles modified with hyperbranched polymers and folic acid for targeted imaging and therapy [J]. *Curr Drug Deliv*. 2019, 16(9): 839–848.
- [23] Meng X, Li FL, Li F, *et al.* Vancomycin modified PEGylated-magnetic nanoparticles combined with PCR for efficient enrichment and detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2017, 247: 546–555.
- [24] Wu Y, Zhou Q, Yuan Y, *et al.* Enrichment and sensitive determination of phthalate esters in environmental water samples: A novel approach of MSPE-HPLC based on PAMAM dendrimers-functionalized magnetic-nanoparticles [J]. *Talanta*, 2020, 206: 120213.
- [25] Ho MN, Bach LG, Nguyen DH, *et al.* PEGylated PAMAM dendrimers loading oxaliplatin with prolonged release and high payload without burst effect [J]. *Biopolymers*, 2019, 110(7): e23272.
- [26] Castillo G, Spinella K, Poturnayová A, *et al.* Detection of aflatoxin B₁ by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform [J]. *Food Control*, 2015, 52: 9–18.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



林淑凤, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: ddvia8023@163.com



吴仁蔚, 副教授, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: wurenwei@mail.hzau.edu.cn