

锌/钴双金属无限配位聚合物纳米酶催化比色法 快速检测单增李斯特菌

钟子惠, 邱佩佩, 黄伟平, 尹志娜*, 贺锦灿*

(广东药科大学公共卫生学院, 广州 510310)

摘要: **目的** 基于锌/钴双金属无限配位聚合物(Zn/Co-bimetal infinite coordination polymers, Zn/Co-ICPs)构建快速检测单增李斯特菌的纳米酶催化比色法。**方法** 基于 Zn/Co-ICPs 过氧化物模拟酶活性、核酸适配体对类酶活性的增强作用及特异性识别能力, 以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)为催化显色底物, 建立 Zn/Co-ICPs 纳米酶催化比色法, 对 Zn/Co-ICPs 的形貌和结构进行表征, 并考察适配体浓度、pH、温度和反应时间等因素对催化效果的影响, 并将该方法应用于饮用水和冷冻巴沙鱼样品中单增李斯特菌的测定。**结果** 在优选的条件下, 单增李斯特菌的浓度与蓝色显色产物氧化型 TMB (oxidized TMB, oxTMB) 在 652 nm 处的吸光度呈负相关关系。该方法的线性范围为 $3.2 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^5$ CFU/mL, r^2 为 0.9964, 检出限(limit of detection, LOD)为 1.5×10^2 CFU/mL。加标回收率为 90.7%~108.7%, 相对标准偏差为 0.17%~7.20%。**结论** 该方法无需使用复杂昂贵的仪器即可实现可视化检测, 且检测速度快、准确度高、选择性好, 在复杂样品快速分析中具有一定潜力。

关键词: 锌/钴双金属无限配位聚合物; 适配体; 单增李斯特菌; 纳米酶; 比色法

Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by Zn/Co-bimetal infinite coordination polymers nanozymes-based catalytic colorimetry

ZHONG Zi-Hui, QIU Pei-Pei, HUANG Wei-Ping, YIN Zhi-Na*, HE Jin-Can*

(College of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China)

ABSTRACT: Objective To establish a catalytic colorimetry for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* based on Zn/Co-bimetal infinite coordination polymers (Zn/Co-ICPs) nanozymes. **Methods** Firstly, a Zn/Co-ICPs nanozymes-based catalytic colorimetry was established with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as catalytic chromogenic substrate based on the peroxidase-mimicking activity of Zn/Co-ICPs nanoparticles, and the functional

基金项目: 国家自然科学基金项目(21804025)、广东省教育厅“创新强校工程”项目(2019GCZX012)、西藏自治区科技计划项目(XZ202001ZY0058G)、2022 年广东省科技创新战略专项资金(“攀登计划”专项资金)(pdjh2022b0266)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21804025), the Project for Innovation and Strong School of Department of Education of Guangdong Province, China (2019GCZX012), the Science and Technology Planning Project of Xizang (Tibet) Autonomous Region of China (XZ202001ZY0058G), and the Special Fund for “Climbing Plan” of Science and Technology Innovation Cultivation for Guangdong University Students in 2022 of China (pdjh2022b0266)

*通信作者: 尹志娜, 博士, 讲师, 主要研究方向为营养与食品卫生评估与检测。E-mail: jingshimili@163.com

贺锦灿, 博士, 副教授, 主要研究方向为卫生检验与检疫。E-mail: hejincan300@163.com

*Corresponding author: YIN Zhi-Na, Ph.D, Lecturer, Guangdong Pharmaceutical University, No.283 Jianghai Avenue, Haizhu District, Guangzhou 510310, China. E-mail: jingshimili@163.com

HE Jin-Can, Ph.D, Associate Professor, Guangdong Pharmaceutical University, No.283 Jianghai Avenue, Haizhu District, Guangzhou 510310, China. E-mail: hejincan300@163.com

nucleic acid aptamers for enhancing the peroxidase-mimicking activity and specific recognizing the analytes. Secondly, the morphology and structure of Zn/Co-ICPs were characterized, and the effects of aptamers concentration, pH, temperature and reaction time on catalytic effect were investigated. Finally, the method was applied to the determination of *Listeria monocytogenes* in drinking water and frozen Basa fish samples. **Results** Under the optimal conditions, the concentration of *Listeria monocytogenes* was negatively correlated with the absorbance of blue chromogenic product oxidized TMB (oxTMB) at 652 nm. The linear range of the colorimetric method was $3.2 \times 10^2 - 1.0 \times 10^5$ CFU/mL, with the r^2 of 0.9964 and the limit of detection (LOD) of 1.5×10^2 CFU/mL. The recoveries were 90.7%–108.7%, with the relative standard deviations of 0.17%–7.20%. **Conclusion** The proposed method can realize visual detection without complex and expensive instruments, and has the advantages of rapidness detection, high accuracy and good selectivity, which exhibiting potential promising for rapid analysis of complex samples.

KEY WORDS: Zn/Co-bimetal infinite coordination polymers; aptamers; *Listeria monocytogenes*; nanozymes; colorimetry

0 引言

近年来,由食源性致病菌引起的食源性疾病已成为威胁全球公共卫生的重要因素之一^[1]。单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)是一种常见的革兰氏阳性菌,可引起包括败血症、脑膜炎、流产等一系列严重的疾病^[2-4]。平板计数法是单增李斯特菌的常用检测方法,其准确度高,但往往耗时长^[5]。聚合酶链反应方法灵敏度和特异性较高,但是需要专业的技术人员和复杂昂贵的仪器,不适用于食源性致病菌的快速筛查和现场检测^[6]。因此,亟需建立一种快速、灵敏、准确检测单增李斯特菌的分析方法。

比色分析方法因具有简单、可视化、便携等优势逐渐成为食源性致病菌快速筛查和现场检测领域的研究热点。近年来,研究者发现某些纳米材料具有类似生物酶的催化活性,这类纳米材料被称为纳米酶。纳米酶的出现为新型可视化比色检测技术的开发提供了更多机会^[7-9]。与天然酶相比,纳米酶具有成本低、可批量制备和稳定性好等优势,在催化比色分析中受到研究者的青睐^[10-11]。目前,许多纳米材料如碳纳米材料^[12-13]、贵金属纳米材料^[14-15](如 Au 和 Pt)、金属氧化物纳米材料^[16-17]、金属有机框架(metal organic frameworks, MOFs)纳米材料^[18-19]等,已被发现具有类似天然酶的催化活性。其中 MOFs 是一种配位聚合物(coordination polymers, CPs),由金属离子或由各种有机配体连接的团簇组成^[20]。除了 MOFs, CPs 还包括另一种非晶态纳米材料即无限配位聚合物(infinite coordination polymers, ICPs),尽管它没有有序的晶体结构,但 ICPs 具有自适应封装能力,在合成过程中可以引入分子识别元件,而且其灵活可控的金属节点(如 Fe、Co、Ni、Cu)使其成为潜在的纳米酶,因此在分析化学中具有良好的应用潜力。目前,利用 ICPs 作为纳米酶催化剂应用于比色检测很少报

道。例如, ZENG 等^[21]合成了一种新的镧系配位聚合物纳米粒子,并成功应用于 H_2O_2 的快速、灵敏比色分析。基于此,本课题组 QIU 等^[22]以 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 为金属离子, 2-甲基咪唑为配体,合成具有类酶活性的 ICPs,并成功应用于细菌活性快速和准确的比色检测。

但是,基于纳米酶的食源性致病菌比色分析方法可能存在选择性差的问题,可通过引入生物识别分子(如核酸适配体、抗体等)提高方法的选择性。核酸适配体(aptamer, Apt)是一种体外合成的单链 DNA 或 RNA 小分子,能与金属、有机分子、蛋白质、细菌等特异性结合。有研究报道,核酸适配体能调节某些纳米酶的催化作用^[23-25]。

基于此,本研究采用共沉淀法一步合成锌/钴双金属无限配位聚合物(Zn/Co-bimetal infinite coordination polymers, Zn/Co-ICPs)纳米材料,不同于溶剂热法,该合成方法简单,以水为溶剂,不需要高温,反应时间短。对材料进行核酸适配体功能化,得到 Zn/Co-ICPs-Apt 纳米材料。基于 Zn/Co-ICPs-Apt 建立一种单增李斯特菌的催化比色分析方法,并将该方法应用于饮用水和冷冻巴沙鱼等样品分析,以期对单增李斯特菌的检测提供一种快速、简便、选择性好、灵敏度高的比色检测新方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

样品(瓶装水、冷冻巴沙鱼)购自当地超市。

氯化钴、2-甲基咪唑、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)、冰醋酸(分析纯,上海阿拉丁试剂有限公司);乙酸锌、过氧化氢(分析纯,广州化学试剂厂);无水醋酸钠(分析纯,天津市百世化工有限公司);单增李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌(ATCC19115、ATCC25922、ATCC14028、ATCC6538,广

州环凯微生物有限公司); 单增李斯特菌适配体(碱基序列号: 5'-ATACCAGCTTATTCAATTC AAAAGCGCACCCAT ATATGTTCTATGTCCCCACCTCGAGATTGCACTTACT ATCT-3', 上海生工生物工程有限公司); 实验用水为超纯水(18.2 Ω)。

用冰醋酸(HAc)、无水醋酸钠(NaAc)配制 0.2 mol/L、pH 4.0 的 NaAc-HAc 缓冲溶液。

1.2 仪器与设备

xMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); UV-3010 紫外-可见分光光度计、Hitachi S4800 扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)仪(日本 Hitachi 公司); FEI Talos f200x 能量色散光谱(energy dispersive spectroscopy, EDS)仪、NICOLET AVATAR 330 傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)仪、EscaLab 250Xi X 射线衍射(X-ray diffractometry, XRD)仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Nano-ZS90 Zeta 电位仪(英国 Malvern 公司); H3-18K 高速离心机(湖南可成仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Zn/Co-ICPs 的制备、适配体功能化及表征

参考文献[22]的方法制备 Zn/Co-ICPs, 将 40 mmol/L 乙酸锌水溶液和 40 mmol/L 氯化钴水溶液等体积混合, 取 50 mL 混合溶液加入 50 mL 320 mmol/L 的 2-甲基咪唑水溶液中, 室温搅拌 20 min 后, 6000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用超纯水洗涤 3 次, 冷冻干燥 18 h 后得到 Zn/Co-ICPs 材料。

取等体积的 1 μ mol/L 的单增李斯特菌适配体溶液与 1.0 mg/mL 的 Zn/Co-ICPs 溶液混合孵育 30 min, 6000 r/min 离心 10 min, 得到适配体功能化的 Zn/Co-ICPs(即 Zn/Co-ICPs-Apt)材料。

采用 SEM、EDS、XRD、FTIR 技术表征 Zn/Co-ICPs 的形貌、元素、晶型结构和官能团, 并利用 Zeta 电位和紫外-可见分光光度计表征 Zn/Co-ICPs 表面的适配体修饰情况。

1.3.2 细菌培养

所有菌株均在 Luria-Bertani (LB)肉汤培养基中培养过夜, 摇床温度为 37 $^{\circ}$ C, 转速为 150 r/min, 当菌悬液的 OD₆₀₀ 值达到 1.0 时, 细菌浓度约为 1.0 \times 10⁹ CFU/mL。

1.3.3 分析方法

在 1.5 mL 离心管中分别加入 50 μ L 1.0 μ mol/L 的单增李斯特菌适配体溶液、50 μ L 1.0 mg/mL 的 Zn/Co-ICPs 溶液, 室温孵育 30 min, 再加入 50 μ L 单增李斯特菌悬液, 继续室温孵育 30 min, 然后分别加入各 50 μ L 的 NaAc-HAc 缓冲溶液(pH 4.0)、10 mmol/L TMB 溶液和 100 mmol/L H₂O₂ 溶液, 混匀, 在 40 $^{\circ}$ C 水浴中反应 30 min, 最后用酶标仪测定 652 nm 处的吸光度值 A。对照 A₀ 用无菌生理盐水代替菌悬液。实验每组平行重复 3 次。

1.3.4 样品处理

将巴沙鱼解冻后, 在无菌操作下称取 10 g, 加入 50 mL 无菌生理盐水, 研磨成匀浆。将 1 mL 1%甲酸加入 9 mL 稀释 10 倍后的匀浆, 静置 10 min 沉淀蛋白质和脂肪, 用 0.22 μ m 滤膜过滤, 将滤膜上沉淀用 10 mL 无菌生理盐水洗出作为样品溶液。瓶装饮用水无需预处理。得到样品处理后, 按照 1.3.3 的步骤进行分析。

1.4 数据处理

适配体的修饰率根据式(1)计算。

修饰率/%=(修饰前上清液吸光度-修饰后上清液吸光度)/修饰前上清液吸光度

(1)

采用 Origin 2021 进行数据处理与分析。

2 结果与分析

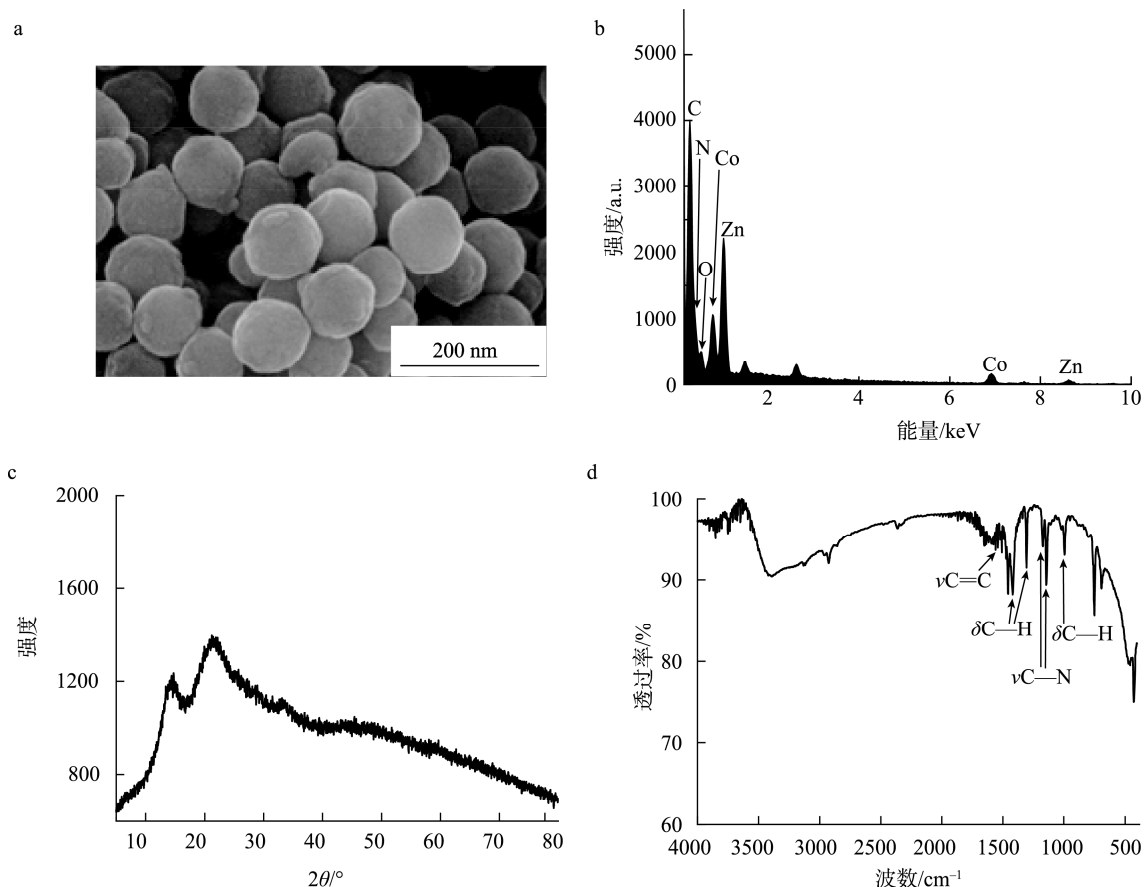
2.1 Zn/Co-ICPs 的表征

用 SEM 表征 Zn/Co-ICPs 的形貌结构, 结果如图 1a 所示, Zn/Co-ICPs 为球形结构, 粒径约为 100 nm。利用 EDS 证实了 Zn/Co-ICPs 中存在的元素(图 1b), Zn/Co-ICPs 中存在 Zn、Co、C、N 和 O 元素。其中 Zn 和 Co 元素来源于锌盐和钴盐的金属离子, C、N、O 元素的存在归因于 2-甲基咪唑的有机配体。用 XRD 表征 Zn/Co-ICPs 的晶体结构(图 1c), Zn/Co-ICPs 无特征衍射峰, 为非晶体结构, 表明 Zn(II)或 Co(II)与有机配体的氮原子之间可能存在无序配位^[26], 此外, 较宽的衍射峰表明其结晶性能较差^[22,27]。用 FTIR 技术表征 Zn/Co-ICPs 的官能团(图 1d), Zn/Co-ICPs 有 7 个 2-甲基咪唑的特征峰^[28]。1145 和 1178 cm⁻¹ 处的峰对应 C—N 键的伸缩振动, 944 和 989 cm⁻¹ 处的峰对应 C—H 键的平面外变形振动, 1302 和 1424 cm⁻¹ 处的峰对应 C—H 键的平面内变形振动, 1583 cm⁻¹ 处的峰对应 C=C 键的伸缩振动。上述结果表明 Zn/Co-ICPs 合成成功。

2.2 Zn/Co-ICPs 的适配体功能化

对 Zn/Co-ICPs 进行适配体功能化, 得到 Zn/Co-ICPs-Apt, 用 Zeta 电位仪验证适配体在 Zn/Co-ICPs 上的成功修饰。在 NaAc-HAc 缓冲溶液(pH 4.0)中, 单增李斯特菌适配体修饰后 Zn/Co-ICPs 的 Zeta 电位从 -(2.88 \pm 0.40) mV 下降到 -(7.39 \pm 0.46) mV, 表明带负电荷的适配体成功地修饰到 Zn/Co-ICPs 上。电位降低使 Zn/Co-ICPs-Apt 复合物更容易允许带正电荷的 TMB 底物接近其表面, 两者的静电作用力增加, 催化活性增强^[29]。

用紫外-可见分光光度计进一步计算单增李斯特菌适配体在 Zn/Co-ICPs 上的修饰率。根据系列浓度适配体溶液在 260 nm 处吸光度值作标准曲线, 线性方程为 $A=0.56c-0.0016$, r^2 为 0.9807。扫描 Zn/Co-ICPs-Apt 修饰前后上清液的紫外-可见吸收光谱, 修饰前 260 nm 处有明显的



注: a: SEM 图; b: EDS 图; c: XRD 图; d: FTIR 图。

图 1 Zn/Co-ICPs 的表征图

Fig.1 Characterization images of Zn/Co-ICPs

吸收峰, 归属于寡核苷酸的特征吸收峰^[30], 修饰后 260 nm 处几乎无吸收峰, 表明溶液中的大部分适配体已通过其磷酸骨架与 Zn/Co-ICPs 的双金属相互作用固定在 Zn/Co-ICPs 表面^[29]。依据式(1)计算出 Zn/Co-ICPs-Apt 中单增李斯特菌适配体的修饰率为 83.0%。

2.3 Zn/Co-ICPs 的类过氧化物酶活性研究

以 TMB 为底物, 评价 Zn/Co-ICPs 类过氧化物酶的催化性能。在含有 TMB (10 mmol/L) 和 H₂O₂ (100 mmol/L) 的 NaAc-HAc 缓冲溶液(pH 4.0) 中加入 Zn/Co-ICPs (2.5 mg/mL), 其由无色变蓝色, 特征峰在 652 nm 附近。TMB 体系和 TMB+H₂O₂ 反应体系在 652 nm 处无明显吸收峰, TMB+H₂O₂+Zn/Co-ICPs 反应体系在 652 nm 处有一强吸收峰, 溶液变蓝色。表明 Zn/Co-ICPs 具有类过氧化物酶活性, 催化 H₂O₂ 氧化 TMB 生成蓝色 oxTMB。

进一步采用稳态动力学对 Zn/Co-ICPs 的类过氧化物酶活性进行评价, 选择反应最适的 pH 和温度, 固定其中一种底物浓度不变, 改变另一种底物浓度, 在 652 nm 吸光度下进行 10 min 稳态动力学扫描。分别测定和计算不同浓度底物 H₂O₂ (1、3、5、10、15、20 mmol/L)、TMB (0.1、0.2、

0.3、0.5、1.0、1.5 mmol/L) 的反应初速率, 计算出米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})。 K_m 是反映酶对底物亲和力的关键参数, K_m 值越低, 酶与底物的亲和力越强。如表 1 所示, 对于 TMB 底物, Zn/Co-ICPs 的 K_m 值大约是辣根过氧化物酶(horseradish Peroxidase, HRP)的 1.5 倍, 这表明需要更高的 TMB 浓度才能达到最大的活性。然而, Zn/Co-ICPs 对 H₂O₂ 底物的 K_m 值比 HRP 低约 3 倍, 这表明 Zn/Co-ICPs 对 H₂O₂ 具有更高的亲和力。值得注意的是, Zn/Co-ICPs 具有比 HRP 更高的 V_{max} 。以上数据表明, Zn/Co-ICPs 具有比 HRP 更高的催化活性。与常见的纳米酶对比分析, Zn/Co-ICPs 具有比 Fe₃O₄ NPs 和 AuNCs-Apt 更高的催化活性。

2.4 分析原理

当体系中不存在单增李斯特菌时, 适配体对 Zn/Co-ICPs 的过氧化物模拟酶(即类酶活性)具有增强作用, 即 Zn/Co-ICPs 催化过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)氧化底物 TMB 生成深蓝色氧化型 TMB (oxidized TMB, oxTMB), 体系呈深蓝色。当体系中存在单增李斯特菌时, 适配体与单增李斯特菌特异性结合, 脱离 Zn/Co-ICPs 表面,

导致 Zn/Co-ICPs 的类酶活性减弱, 适配体增强的催化显色反应受阻, 体系呈浅蓝色(图 2)。基于该原理建立一种单增李斯特菌的催化比色分析方法。

表 1 Zn/Co-ICPs 的稳态动力学参数
Table 1 Steady-state kinetic parameters of Zn/Co-ICPs

催化剂	底物	K_m /(mmol/L)	V_{max} /[$\times 10^{-8}$ mol/(L · s)]
Zn/Co-ICPs	H ₂ O ₂	1.30	47.0
	TMB	0.75	42.0
HRP ^[31]	H ₂ O ₂	3.70	8.70
	TMB	0.43	10.0
Fe ₃ O ₄ NPs ^[27]	H ₂ O ₂	6.66	12.9
	TMB	0.26	35.1
AuNCs-Apt ^[32]	H ₂ O ₂	3.66	30.9
	TMB	0.33	13.6

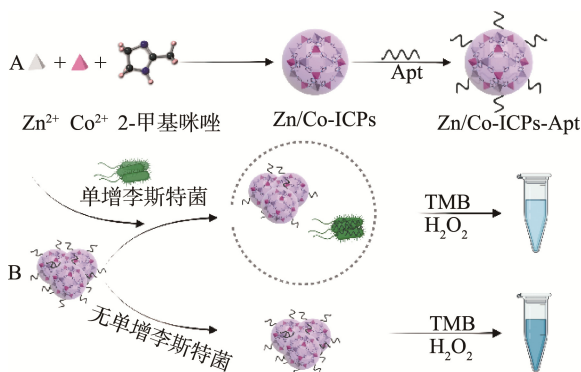


图 2 Zn/Co-ICPs 纳米酶的合成、修饰(A)及在单增李斯特菌的催化比色分析应用(B)示意图

Fig.2 Schematic illustration for the preparation and modification of Zn/Co-ICPs nanozyme (A) and the application of catalytic colorimetric measuring *Listeria monocytogenes* (B)

2.5 分析方法建立

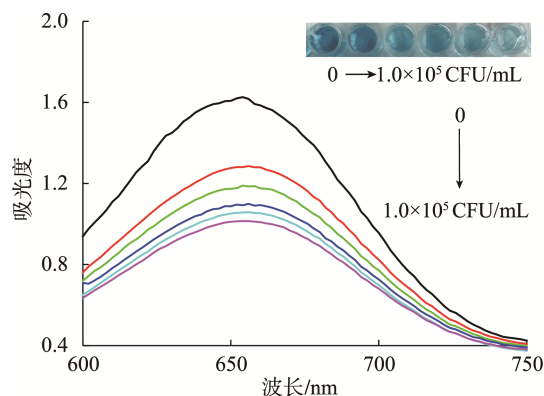
2.5.1 催化反应条件研究

本研究首先考察了 Zn/Co-ICPs-Apt 材料的主要催化条件, 不同适配体浓度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、2.5、4.0 $\mu\text{mol/L}$)、不同 pH (3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)、不同温度(20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$)和不同反应时间(5、10、15、20、30、40 min)对吸光度值的影响, 并与 Zn/Co-ICPs 材料进行比较, 每组平行重复 3 次, 反应测得吸光度平均值分别为 A 和 A₁。首先, 考察了适配体浓度的影响, 当其浓度小于 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, Zn/Co-ICPs-Apt 的催化作用随着 Apt 浓度增加而增强, 浓度大于 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 后吸光度几乎不变, 表明修饰在 Zn/Co-ICPs 表面的适配体达到饱和。其次, 本研究考察了 pH 的影响, 发现随着 pH 增大, Zn/Co-ICPs-Apt 催化活性的增强作用先增加后降低, 在 pH 4.0 时最高, 由于 TMB 带正电荷, 在 pH 4.0 时, Zn/Co-ICPs-Apt 带负电荷, TMB 更容易通过静电作用吸附在 Zn/Co-ICPs-Apt 表面。此外, 本研究考察了温度的影响, 催化活性的增强作用随着温度增加而

先增后降, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时达到峰值, 由于 Apt 为生物识别分子, 温度过高或过低会影响 Apt 的活性进而影响催化活性。最后, 对催化反应时间进行了优化, 催化反应活性的增强作用随着反应时间增加而先增后降, 最佳时间为 30 min, 由于 Zn/Co-ICPs-Apt 的催化活性比 Zn/Co-ICPs 高, 前者比后者更快达到比色终点。因此, 确定反应条件为: 适配体浓度 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、pH 4.0、温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间 30 min。

2.5.2 标准曲线

按照 1.3.3 的分析方法, 在选定的催化反应条件下进行实验, 体系的颜色随着单增李斯特菌浓度的增大逐渐变浅(图 3 插图), 催化反应产物在 652 nm 处的吸光度逐渐降低, 吸光度与单增李斯特菌的浓度呈负相关关系。以单增李斯特菌浓度的对数为横坐标, A₀-A 为纵坐标进行线性拟合, 线性方程为 A₀-A=0.106lgc+0.0893, 线性范围为 3.2 $\times 10^2$ ~1.0 $\times 10^5$ CFU/mL, r² 为 0.9964, 检出限(limit of detection, LOD)为 1.5 $\times 10^2$ CFU/mL。



注: 插图为对应催化反应的显色图。

图 3 基于 Zn/Co-ICPs 纳米酶催化比色法检测单增李斯特菌的吸收光谱图

Fig.3 Absorption spectra for the detection of *Listeria monocytogenes* based on Zn/Co-ICPs nanozyme-based catalytic colorimetry

2.5.3 特异性分析

该方法对单增李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等细菌的特异性结果如图 4 所示, 在细菌浓度均为 10⁴ CFU/mL 条件下, 除单增李斯特菌外, 其他细菌引起吸光度值降低可忽略不计, 说明该方法对单增李斯特菌具有特异性, 推测该适配体对单增李斯特菌具有高度的亲和力^[33]。

2.6 实际样品分析

将所建立的方法应用于饮用水和冷冻巴沙鱼样品中单增李斯特菌的测定, 结果显示, 样品均未检出单增李斯特菌, 对样品进行加标回收实验, 加标回收率为 90.7%~108.7%, 相对标准偏差为 0.17%~7.20%。食品中单增李斯特菌检测的国家标准方法为 ELISA 和平板计数法, 前者只

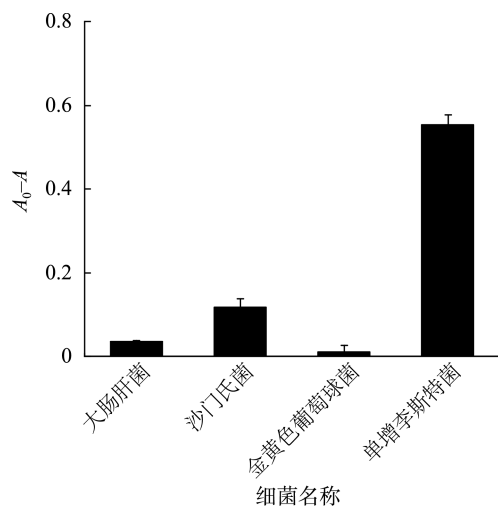


图 4 方法的特异性分析

Fig.4 Selective analysis of the proposed method

能定性检测, 后者可以定量检测, 但检测时间长(48 h)。基于纳米材料检测单增李斯特菌的检测方法比较见表 2, 与其他文献报道的方法相比, 本方法具有更低的检出限, 材

料合成方法更简单、快速、绿色。适用于食品中单增李斯特菌的快速检测。

3 结 论

本研究基于 Zn/Co-ICPs 的类酶活性、适配体对类酶活性的增强作用及对靶分子的特异结合, 建立了一种检测单增李斯特菌的催化比色法。该方法无需使用复杂昂贵的仪器, 可进行可视化检测, 且检测速度快、准确度高、特异性好, 在复杂样品快速分析中具有一定的潜力。通过改变适配体的类型, 有望拓展应用于其他目标物的分析。ICPs 作为纳米酶在食源性致病菌检测中已有应用, 并且越来越多的工作者投入到该领域的研究, 但该纳米酶仍有亟待解决的问题才能更好地从实验室走向实际应用场景。首先, 不同批次的纳米材料往往在形貌、尺寸上存在微小差别, 稳定性和均一性问题也是大部分纳米材料制备所面临的问题。其次, 底物和纳米酶的亲和能力作用机制有待进一步深入研究。最后, 需要结合磁分离等样品前处理技术使得比色方法更好地应用于现场检测。

表 2 不同纳米材料检测单增特菌的方法比较

Table 2 Comparison of methods for *Listeria monocytogenes* detection based on different nanomaterials

检测方法	纳米材料	合成方法	合成时间/h	线性范围/(CFU/mL)	LOD/(CFU/mL)	参考文献
伏安法	rGO/AuNPs	共沉淀法	24	$1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^9$	1.8×10^4	[34]
比色法	Fe_3O_4 NPC	溶剂热法	16	$5.4 \times 10^3 \sim 5.4 \times 10^8$	5.4×10^3	[35]
比色法	MNPs	逐层组装法	5	$1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^7$	1.9×10^4	[36]
比色法	Zn/Co-ICPs	共沉淀法	0.5	$3.2 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^5$	1.5×10^2	本研究

参考文献

- [1] SHI L, WU F, WEN YM, *et al.* A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 529–535.
- [2] 徐建辉, 屠俊玮, 邱瑾芝. 速冻食品中李斯特菌污染状况研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(14): 5.
- [3] XU JH, TU JW, QIU JZ. Study on *Listeria contamination* in quick-frozen food [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(14): 5.
- [4] DOUMITH M, BUCHRIESER C, GLASER P, *et al.* Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8): 3819–3822.
- [5] LOURENCO A, LINKE K, WAGNER M, *et al.* The saprophytic lifestyle of *Listeria monocytogenes* and entry into the food-processing environment [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 789–801
- [6] YANG SJ, OUYANG H, SU XX, *et al.* Dual-recognition detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin-functionalized magnetic beads as concentration carriers [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 174–180.
- [7] LAZCKA O, CAMPO FJD, MUNOZ FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(7): 1205–1217.
- [8] LI S, ZHANG LY, JIANG Y, *et al.* In-site encapsulating gold “nanowires” into hemin-coupled protein scaffolds through biomimetic assembly towards the nanocomposites with strong catalysis, electrocatalysis, and fluorescence properties [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(41): 16005–16011.
- [9] DENG HH, LUO BY, HE SB, *et al.* Redox recycling-triggered peroxidase-like activity enhancement of bare gold nanoparticles for ultrasensitive colorimetric detection of rare-earth Ce^{3+} ion [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(6): 4039–4046.
- [10] YAO S, LI J, PANG B, *et al.* Colorimetric immunoassay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* based on etching-enhanced peroxidase-like catalytic activity of gold nanoparticles [J]. *Mikrochim Acta*, 2020, 187(9): 504.
- [11] VAZQUEZ-GONZALEZ M, LIAO W, GAZELLES R, *et al.* Mimicking horseradish peroxidase functions using Cu^{2+} -modified carbon nitride nanoparticles or Cu^{2+} -modified carbon dots as heterogeneous catalysts [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 3247–3253.
- [12] WANG QQ, WEI H, ZHANG ZQ, *et al.* Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay [J]. *Trends Anal Chem*, 2018, 105: 218–224.
- [13] SHAMSIPUR M, SAFAYI A, MOHAMMADPOUR Z. Indirect colorimetric detection of glutathione based on its radical restoration ability using carbon nanodots as nanozymes [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2014, 199: 463–469.
- [14] DATTA A, KAPRI S, BHATTACHARYYA S. Carbon dots with tunable concentrations of trapped anti-oxidant as an efficient metal-free catalyst

- for electrochemical water oxidation [J]. *J Mater Chem A*, 2016, 4: 14614–14624.
- [14] 梁云燕, 孙芳营, 尚利. 基于金纳米团簇类酶活性的比色传感研究[J]. *分析化学*, 2021, 49(6): 931–940.
LIANG YY, SUN FY, SHANG L. Colorimetric sensing based on enzyme-mimetic activity of gold nanoclusters [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(6): 931–940.
- [15] LU C, TANG LH, GAO F, *et al.* DNA-encoded bimetallic Au-Pt dumbbell nanozyme for high-performance detection and eradication of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 187: 113327
- [16] SINGH N, SAVANUR MA, SRIVASTAVA S, *et al.* A redox modulatory Mn₃O₄ nanozyme with multi-enzyme activity provides efficient cytoprotection to human cells in a parkinson's disease model [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(45): 14267–14271.
- [17] ZHANG X, BAO N, LUO XL, *et al.* Patchy gold coated Fe₃O₄ nanospheres with enhanced catalytic activity applied for paper-based bipolar electrode-electrochemiluminescence aptasensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 114: 44–51.
- [18] 刘俊桃, 陈晓培, 王川川, 等. 金属有机骨架材料作为纳米酶在食品安全快速检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(8): 2490–2496.
LIU JT, CHEN XP, WANG CC, *et al.* Review on the application of metal-organic framework materials as nano-enzymes for rapid food safety detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(8): 2490–2496.
- [19] XU WQ, KANG YK, JIAO L, *et al.* Tuning atomically dispersed Fe sites in metal-organic frameworks boosts peroxidase-like activity for sensitive biosensing [J]. *Nanomicro Lett*, 2020, 12: 184.
- [20] WANG L, HUO XT, ZHENG LY, *et al.* An ultrasensitive biosensor for colorimetric detection of *Salmonella* in large-volume sample using magnetic grid separation and platinum loaded zeolitic imidazolate framework-8 nanocatalysts [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 150: 111862.
- [21] ZENG H, QIU W, ZHANG L, *et al.* Lanthanide coordination polymer nanoparticles as an excellent artificial peroxidase for hydrogen peroxide detection [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(12): 6342–6348.
- [22] QIU PP, YUAN P, DENG ZC, *et al.* One-pot facile synthesis of enzyme-encapsulated Zn/Co-infinite coordination polymer nanospheres as a biocatalytic cascade platform for colorimetric monitoring of bacteria viability [J]. *Microchim Acta*, 2021, 188(10): 322–332.
- [23] WEERATHUNGE P, RAMANATHAN R, SHUKLA R, *et al.* Aptamer-controlled reversible inhibition of gold nanozyme activity for pesticide sensing [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(24): 11937–11941.
- [24] LIU BW, LIU JW. DNA adsorption by magnetic iron oxide nanoparticles and its application for arsenate detection [J]. *Chem Commun*, 2014, 50(62): 8568–8570.
- [25] LIU BW, LIU JW. Accelerating peroxidase mimicking nanozymes using DNA [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(33): 13831–13835.
- [26] SPOKOYNY AM, KIM D, SUMREIN A, *et al.* Infinite coordination polymer nano- and microparticle structures [J]. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(5): 1218.
- [27] FENG J, ZHAO XR, BIAN W, *et al.* Microwave-assisted synthesis of nitrogen-rich carbon dots as effective fluorescent probes for sensitive detection of Ag⁺ [J]. *Mater Chem Front*, 2019, 3(12): 2751–2758.
- [28] HOU C, WANG Y, DING QH, *et al.* Facile synthesis of enzyme-embedded magnetic metal-organic frameworks as reusable mimic multi-enzyme system: Mimetic peroxidase properties and colorimetric sensor [J]. *Nanoscale*, 2015, 7: 18770–18779.
- [29] LI S, ZHAO XT, YU XX, *et al.* Fe₃O₄ nanozymes with aptamer-tuned catalysis for selective colorimetric analysis of ATP in blood [J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 14737–14742.
- [30] MARUSIC M, PLAVEC J. The effect of DNA sequence directionality on G-quadruplexfolding [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54(40): 11716–11719.
- [31] WANG Y, LIU J, ADKINS GB, *et al.* Enhancement of the intrinsic peroxidase-like activity of graphitic carbon nitride nanosheets by ssDNAs and its application for detection of exosomes [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(22): 12327–12333.
- [32] ZHANG Z, TIAN Y, HUANG P, *et al.* Using target-specific aptamers to enhance the peroxidase-like activity of gold nanoclusters for colorimetric detection of tetracycline antibiotics [J]. *Talanta*, 2020, 208: 120342.
- [33] FENG JL, DAI ZY, TIAN XL, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* based on combined aptamers magnetic capture and loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Control*, 2017, 85: 443–452.
- [34] 马骏爽, 窦文超, 赵广英. 还原氧化石墨烯/纳米金非酶标记免疫传感器检测单核细胞增生李斯特氏菌[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(4): 6.
MA JS, DOU WC, ZHAO GY. Detection of *Listeria monocytogenes* using reduced grapheneoxide/AuNPs nanocomposites as non-enzymatic immunosensor [J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2017, 39(4): 6.
- [35] ZHANG L, HUANG R, LIU W, *et al.* Rapid and visual detection of *Listeria monocytogenes* based on nanoparticle cluster catalyzed signal amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 1–7.
- [36] HU J, JIANG Y, TANG M, *et al.* Colorimetric-fluorescent-magnetic nanosphere-based multimodal assay platform for *Salmonella* detection [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(1): 1178–1184.

(责任编辑: 郑丽黄周梅)

作者简介



钟子惠, 硕士, 主要研究方向是公共卫生。

E-mail: zzh201906@163.com



尹志娜, 博士, 讲师, 主要研究方向为营养与食品卫生评估与检测。

E-mail: jingshimili@163.com



贺锦灿, 博士, 副教授, 主要研究方向为卫生检验与检疫。

E-mail: hejincan300@163.com