

王俊韵, 沈静雯, 陆利霞, 等. 食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 348-355. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060210

WANG Junyun, SHEN Jingwen, LU Lixia, et al. Research Progress of Compound Techniques for Enrichment and Detection of Foodborne Pathogens [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 348-355. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060210

· 专题综述 ·

食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展

王俊韵¹, 沈静雯², 陆利霞^{1,*}, 卢一辰¹, 刘元键¹, 熊晓辉^{1,2}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211816;

2. 国家轻工业食品质量监督检测南京站, 江苏南京 211816)

摘要: 食源性致病菌对食品安全及人体健康造成威胁。食品中极低浓度的病原菌需要通过前处理再结合有效的检测技术才可检出。现有快速检测方法受到增菌液成分、食品成分或菌体浓度低的影响, 需要进行致病菌的分离富集后才能缩短检测时间、进行准确检测。本文分析了单一的致病菌富集法, 包括裸磁珠及功能化磁珠的富集法。进而综述了富集与检测一体法, 包括电泳技术、微流控技术等。对于致病菌的特异性富集, 需要进一步提高吸附率及灵敏度。富集检测复合技术的检测灵敏度及检测限有待不断改进。

关键词: 食源性, 致病菌, 富集, 快速检测

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)11-0348-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060210

Research Progress of Compound Techniques for Enrichment and Detection of Foodborne Pathogens

WANG Junyun¹, SHEN Jingwen², LU Lixia^{1,*}, LU Yichen¹, LIU Yuanjian¹, XIONG Xiaohui^{1,2}

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China;

2. National Light Industry Food Quality Supervision and Inspection in Nanjing, Nanjing 211816, China)

Abstract: Foodborne pathogen poses a threat to food safety and human health. The low concentrations pathogens in food can only be detected by pretreatment combined with effective detection techniques. The rapid detection methods are affected by the composition of the enrichment solution, food components, or low cell concentration, so it is necessary to separate and enrich the pathogenic bacteria from the samples in order to shorten the detection time and carry out accurate detection. In this paper, enrichment methods for pathogenic bacteria were analyzed, including bare magnetic beads and functional magnetic beads. Moreover, the integrated methods of enrichment and detection were reviewed, including electrophoresis technology, microfluidic technology and so on. For the enrichment of specific pathogenic bacteria, it is necessary to further improve the adsorption rate and sensitivity. It is continuously improved in detection sensitivity and detection limit for the completed technology of enrichment and detection.

Key words: food borne; pathogenic bacteria; enrichment; rapid determination

食源性病原菌是可以引起食物中毒或以食品为传播媒介的致病性细菌, 能够入侵宿主并产生致病性。常见的食源性病原菌有痢疾杆菌、致病性大肠

杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、结核菌、猪丹毒杆菌等。世界卫生组织宣布, 每年食物中毒约数十亿人。美国疾控中心报告称^[1], 美国每年有 4800 万例食源

收稿日期: 2020-06-18

基金项目: 国家食品安全重点研发项目 (2018YFC1602800)。

作者简介: 王俊韵 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 541298851@qq.com。

* 通信作者: 陆利霞 (1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: LLXHN66@126.com。

性疾病。在中国,食品安全面临的重大威胁也是食源性病原体污染。据报道^[2],2015 年中国有 3181 例食源性病原体中毒,占总食物中毒病例的 53.7%。一般情形下,食品中病原菌的浓度偏低,传统的食源性病原菌检测需要进行增菌、分离、鉴定等多个步骤,约 4~7 d,在实践中具有一定的局限性^[3]。目前常用的食源性致病菌快速检测方法包括电化学传感器^[4]、PCR 技术^[5]、免疫层析技术、DNA 探针技术^[6]等。即使经过选择性增菌培养后,致病菌的快速检测仍然受到培养基成分、食品成分等影响。因此为了减少和避免干扰成分,需要采用有效的菌体分离及富集技术。

磁珠分离富集技术因富集量大且富集时间短而受到广泛关注。磁珠表面可针对不同目标菌而进行特定修饰,将病原菌特异性吸附于磁珠表面。但磁珠尺寸分布不均匀且缺乏长期稳定性^[7],并受食品基质的影响较大,在实际应用中存在局限性。复合病原菌富集与检测一体的电泳技术,将电泳分离和免疫反应相结合,使分辨率达到微量、超微量(1~0.001 ng)水平,更好地应用于微生物分析领域。随着电子芯片的发展,微流控技术成为热点^[8]。将样品制备、反应、分离和检测等缩微到一个几平方厘米的芯片上,实现对目标物的在线实时分析^[9]。本文对食品中病原菌的富集与分离技术进行了综述,分析了不同富集及检测方法的优缺点,为食源性病原菌快速检测的开发提供参考。

1 磁珠富集技术

免疫磁珠分离技术作为一种新的免疫学方法,是将免疫学的高度特异性与磁珠特有的磁性相结合而发展出来的一种新技术。利用包被于磁珠表面的抗体与样品中的目标物结合,形成抗原-抗体复合物。在外加磁场的作用下,标记复合物的磁珠进行定向运动,使样品中的目标物与杂质分离,达到富集、纯化、浓缩目标物的目的。

在磁珠富集技术中,磁珠的粒径、均一性、磁响应强度、分散性等性质决定了磁珠对病原菌的富集与分离速度。磁珠粒径影响其在样品中的稳定性。通常,粒径 1 μm 以上的磁珠,在样品中沉降速度较快,不具备悬浮的稳定性,因此对病原菌的吸附并不理想。未进行表面修饰的磁珠为裸磁珠,能够吸附基质中的各类不同菌种;而功能化磁珠是在裸磁珠的表面进行官能团修饰,表面修饰成分对特异性吸附影响显著,可增强对特定致病菌的富集能力,提高目标菌体浓度,减少杂菌干扰。均一稳定的表面修饰使磁珠产生最大的表面吸附能力,使病原菌与修饰的识别体间结合更加牢固。

1.1 裸磁珠富集法

未经抗体包被的超顺性 Fe_3O_4 粒子即为裸磁珠。超顺磁性颗粒的尺寸通常在纳米到微米之间,可应用于分子成像、药物传递、临床诊断或食品安全等

诸多领域^[10]。裸磁珠的制备已较为成熟,可通过共沉淀法、溶剂热法、乳液聚合法等方法制备。

吴俊等^[11]研究表明浓度为 $10^2\sim 10^7$ CFU/mL 的金黄色葡萄球菌,裸磁珠在 10 min 之内可对其进行富集,且吸附率达到 95% 以上;在金黄色葡萄球菌与大肠杆菌的混合菌体中,裸磁珠对金黄色葡萄球菌的吸附占优势,可达到 86% 左右。也对牛肉样品中金黄色葡萄球菌富集进行了实验,吸附浓度为 10^2 CFU/mL,吸附率降为 80%~87.27%,但仍可满足 PCR 法检测要求,为实际样品中裸磁珠富集金黄色葡萄球菌以实现快速检测提供了参考。邱晋等^[12]在 37 $^{\circ}\text{C}$ 利用裸磁珠对常见的食源性病原菌(蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌等)进行吸附,其吸附率均高于 97%,即使存在食品基质的影响,裸磁珠的最低吸附率仍为 58.42%。裸磁珠较强的吸附性,能够对食品中的多种病原菌进行非特异性富集,经富集的菌体在后续的培养和检测中可减少食品基质对其干扰。

由于裸磁珠不具有特异性吸附的特点,因此适用于判断样品中微生物区系差异。当食源性疾病爆发时,可用裸磁珠富集样品中所有类型的病原菌,避免特异性分离导致的漏检。由于裸磁珠的吸附性能极易受到环境的影响,如食品中的固体颗粒、过量盐离子、过量的酸碱度等多种因素,使其难以有效捕获和检测样品中的微量病原菌,增加了在实际应用中出现假阴性结果的风险^[13]。

1.2 功能化磁珠富集法

裸磁珠由于各向异性的偶极距作用容易产生团聚,无法形成稳定的分散体系。因此,对磁珠表面加以修饰对减少团聚,增强生物相容性及提高分散性有重要的意义^[14]。磁珠具有较大的表面积-体积比,利于高效功能化^[15]。免疫磁珠作为功能化磁珠中的一类,通常分为两种结构:核-壳式与壳-核-壳式,其中核为磁性材料,壳为无机材料或高分子材料。壳材料的加入能够保护磁珠不受环境的影响,且官能团的存在便于对磁性聚合物进行修饰,提高病原菌的特异性吸附效率^[16]。常见的无机材料有 TiO_2 、 SiO_2 等,高分子材料有多糖、聚氯乙烯、氢化胍^[17]、聚乙烯醇等,其中聚苯乙烯由于其表面具有较多的活性官能团,易于表面修饰,是较理想的骨架结构。这些高分子材料的表面通常存在官能团(-NH、-COOH、-OH 等)以便与生物活性蛋白(抗体、核酸适配体、噬菌体等)进行偶联,对病原菌起到吸附作用。经功能化磁珠富集后目标菌的检出限如表 1 所示。

1.2.1 无机材料修饰法 无机材料修饰法即在磁珠表面通过共价或非共价的形式包覆上无机材料,以提供羧基、氨基等官能团。在外加磁场的作用下,致病菌能够与这些官能团偶连而达到富集的效果。Zhan 等^[18]制备了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ 纳米颗粒,氨基作为普适基团,可捕获各种细菌,如金黄色葡萄球菌

表 1 功能化磁珠富集致病菌及检出限

Table 1 Enrichment and detection limit of pathogenic bacteria by functional magnetic beads

修饰物	具体修饰成分	检测菌体	检测方法	检出限(CFU/mL)	参考文献
抗体修饰	ViroStat	沙门氏菌	微流控	10^2	[19]
	相应抗体	大肠杆菌	微流控	$10^2\sim 10^5$	[20]
		沙门氏菌			
适配体	DNA适配体33	沙门氏菌	RT-PCR	10	[21]
噬菌体	融合蛋白pVIII	金黄色葡萄球菌	紫外可见光谱	10	[22]
	T7噬菌体	大肠杆菌	PCR	100	[23]
链霉亲和素		大肠杆菌	电化学阻抗谱生物传感器	$10^{4.45}$	[24]
溶解酶		金黄色葡萄球菌	荧光检测	525	[25]
甘露糖结合凝集素		白色念珠菌	微流控	1	[26]

菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌和枯草杆菌,对这些目标菌的吸附率分别为 93.40%、90.08%、90.14%、97.39%。以制备好的氨基化纳米磁珠进行富集,对大肠杆菌 O157:H7 的非特异性去除率达 97.39% 以上,而 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 颗粒的非特异性去除率仅为 29.8%。由此可见,对磁珠进行修饰是对目标物进行有效富集的重要手段。王聘等^[27]在磁珠表面以羧基(-COOH)修饰,以此来吸附食品中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、阪崎克罗诺杆菌,并进行 PCR 检测。研究了不同浓度混合菌液在模拟食品中磁珠的吸附性能。在果汁中,磁珠对目标菌的捕获率在 57%~66%;奶粉中,磁珠对目标菌的捕获率在 40%~54%;鸭肉中,磁珠对目标菌的捕获率在 44%~64%。最后通过 PCR 检测表明,羧基化磁珠在不同浓度的菌液、单一菌株或混合菌株的环境下,都可对目标菌进行有效富集,满足对后续 PCR 的检测需求。

无机材料范围较广,易于获取。但修饰的无机材料厚度和形态(无孔、微孔等)等都会影响到富集性能。因此,寻找富集时间短、富集量大,富集干扰物少的无机材料种类和包覆条件尤为重要。

1.2.2 抗体修饰法 抗体修饰法即是在磁珠表面修饰抗体,在外加磁场的作用下通过抗原-抗体结合达到富集效果。李倩倩等^[28]将金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和志贺氏菌的三种抗体均修饰于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 磁珠表面,实现对三种病原菌的同时富集,并将此功能化磁珠与裸磁珠的吸附性能进行比较。洗涤优化后的结果表明功能化磁珠对目标菌的平均吸附率为 93.67%,对非目标菌的吸附率为 16.67%;而裸磁珠对目标菌及非目标菌的吸附率都低至 13.33%。由此可见,功能化磁珠不仅可以提高目标菌的富集效率,还可降低对非目标菌体的富集。Kim 等^[19]研究了一种用于食源性沙门氏菌分子分析的微量全分析系统,使用抗体修饰磁珠对磷酸盐溶液(PBS)和牛奶样本中的病原菌进行富集,从 DNA 提取到检测,整个过程在 30 min 内全自动完成。在 PBS 和牛奶样品中的检出限分别为 10 CFU/mL 和 10^2 CFU/mL。Agrawal 等^[20]将抗体修饰的磁性纳米颗粒嵌入于用

永磁体的圆形微流控聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片中,从而使磁珠可在有限空间内捕获抗原,增强荧光信号,便于检测。多路微流控芯片可以同时水中的大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌进行可视化检测和定量。采用磁珠预浓缩技术在微通道中检测大肠杆菌和鼠伤寒杆菌的细胞密度在 $10^3\sim 10^7$ CFU/mL 之间。这项研究开启了使用微通道进行细菌检测的可能性,使之用于筛选多种临床、水、食品和环境样本中的多种微生物。

1.2.3 适配体修饰法 DNA 和 RNA 适配体作为抗体的潜在竞争方法已被广泛研究,用于包括食品安全检测在内的各种应用领域^[29]。Raghavendra Joshi 等^[21]采用 SELEX 方案获得了针对鼠伤寒菌外膜制剂的适配体。将 DNA 适配体与磁珠结合,在粪便基质中捕获鼠伤寒杆菌,进而采用实时定量 RT-PCR 检测,可得到目标菌的检出限为 10 CFU/g。并且即使是在极低浓度($10^1\sim 10^2$ CFU/mL)时,此方法富集的目标菌也可在 PCR 中检出。

在磷酸盐缓冲盐水或其他原始缓冲液中对食源性致病菌的超灵敏检测显示^[30],病原菌经带有核酸适配体的磁珠富集后,通过适配体-量子点夹心检测,检测限均可达到 100 CFU/mL。但目前实验的重复性较差,食品中的不同基质可能会使荧光强度显著降低甚至完全猝灭,导致检测失败。Abbaspour 等^[31]研究构建了一种新型的磁性生物传感器用于金黄色葡萄球菌的检测,采用微量磁珠(Fe_3O_4)与单链 DNA 相结合,通过静电吸引提高捕获元件在工作电极上的吸附能力。因此,当夹心元件均为单链 DNA 或适配体时,由于适配体在纳米材料上的固定具有比抗体更好的稳定性,且吸附目标物的特性优于抗体。目前,适配体和抗体同时修饰于磁珠表面用于对病原菌的富集还有待研究,Abbaspour 等^[31]认为将适配体与抗体混合使用在未来的研究中或许会带来令人惊喜的成果。

1.2.4 噬菌体修饰法 噬菌体修饰磁珠为控制和检测有害生物提供新手段^[32]。噬菌体由于较强的稳定性,易溶解、易与抗原结合、免疫原性低的特点而备受关注。噬菌体能在裂解后期产生内溶酶素,内溶酶

素能够作用于细菌的肽聚糖层,通过高特异性来检测和鉴定细菌^[33]。Liu 等^[22]研究了以牛血清白蛋白为模板的 Co_3O_4 磁性纳米酶(Co_3O_4 MNE)与一种新的特异性融合噬菌体蛋白和电泳层析法结合起来检测金黄色葡萄球菌的特异和灵敏的比色分析方法。 Co_3O_4 MNE 与金黄色葡萄球菌特异性融合蛋白 pVIII 偶联(Co_3O_4 MNE@Fusion-pVIII),所制备的三功能 Co_3O_4 MNE@Fusion-pVIII 颗粒能够捕获牛奶中的金黄色葡萄球菌,并将其从牛奶中分离富集出来。将带有金黄色葡萄球菌的磁珠转移至 96 孔板上进行显色。该方法的检出限为 8 CFU/mL,此方法对牛奶中浓度为 10~10000 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌均可检出。

Wang 等^[23]将 T7 噬菌体的头部与生物素受体蛋白结合,使噬菌体颗粒定向固定在链霉素磁珠上,研制的 T7 标记磁珠在 20 min 内从肉汤中大肠杆菌吸附率为 86.2%,用 PCR 检测细菌 16S rRNA 时,检出限约为 100 CFU/mL。但噬菌体极具感染性,如何避免噬菌体的大量繁殖还需要进一步的研究。

1.2.5 其他修饰法 目前,越来越多的生物识别分子:链霉亲和素、多肽、溶解酶、甘露糖等都可用于高效捕获病原菌。

链霉亲和素作为高度稳定的蛋白质,可抵抗蛋白酶消化、极端 pH 和温度,其非特异性吸附极低。报道表明^[34],聚乙二醇的存在更能进一步抑制链霉亲和素的非特异性吸附,这极其有利于对目标菌的特异性吸附,减少杂菌干扰。在生物传感器的构建中,由链霉亲和素包覆的磁珠可作为信号放大剂用于电化学研究中。Wang 等^[24]提供了用于检测碎牛肉中大肠杆菌 O157:H7 的电化学阻抗谱生物传感器。研究者将大肠杆菌抗体与大肠杆菌混合。并将用链霉亲和素包被的纳米棒倒入两个独立的试管中,将大肠杆菌样品加入其中一个试管中,混合后,用磁力分离。在 1 h 内,用阻抗传感器测得大肠杆菌 O157:H7 的检出限达到了 $10^{4.45}$ CFU/mL,线性范围为 $10^4 \sim 10^7$ CFU/mL。

多肽对不同细菌的捕获能力突出了其微生物识别的潜力,主要是因为多肽普遍具有活性和内在稳定性。Magainin I 是非洲爪蛙皮肤上自然产生的短序列肽之一,它可以选择性地与大肠杆菌 O157:H7 结合。并且,这种肽对其他革兰氏阴性菌也有广谱亲和性。尽管肽在细菌捕获方面的潜力已被证明,但这些生物分子的主要缺点是非特异性或半选择性结合,因此限制了多肽在特异性识别时的作用^[35]。

溶解酶作为一种碱性蛋白质,由吞噬细胞所分泌,对革兰氏阳性细菌更为敏感。Yi 等^[25]在磁珠表面结合了溶解酶,将金黄色葡萄球菌从样品中分离出来。通过金黄色葡萄球菌裂解,胞内氧化氢酶溢出与底物作用,由荧光系统进行检测,在磷酸盐缓冲液中检出限为 78 CFU/mL,总的检测时间不超过 50 min。

甘露糖结合凝集素被认为是宿主体内的第一道防御机制,它通过与 90 多种不同的细菌、真菌、原生动物和病毒的表面表达的末端甘露糖和岩藻糖残基结合而形成^[36]。研究者利用这种自然现象对病原菌进行富集和锁定。Cooper 等^[36]利用重组甘露糖结合凝集素改性磁珠进行富集白色念珠菌,通过微流控平台进行检测,并在 3 h 内完成检测,该装置组合体现了极高的灵敏度(1 CFU/mL)。

1.3 磁珠富集法的比较

磁珠富集技术因其富集效率高,可重复性好,操作简便,不破坏目标物的生物性状和功能而广受关注^[37]。裸磁珠不具有特异性及选择性,因此对所有菌株都具有富集作用,与功能化磁珠比较,裸磁珠的吸附率稍低。在目标致病菌浓度较高的条件下,可用裸磁珠对致病菌进行富集,减少磁珠表面的修饰过程,方便快捷。免疫磁珠是富集病原菌的有力手段,通常在 pH 为中性^[38]的样品中先进行 30 min 免疫反应,再进行 3 min 磁分离即可达到较为理想的富集效果,其吸附效率>80%,特异性>90%,敏感性可在 10~14 CFU/mL^[39]。但是,免疫磁珠富集技术也存在一定的局限性,如果偶联在免疫磁珠上的生物识别配体不具有较强的特异性,则会吸附较多杂菌,且杂菌可能会抑制目标物的生长,对结果产生影响。

采用磁珠富集法获得的致病菌,需要进一步采用 PCR^[5-40]、生物传感器^[41-43]、免疫层析检测^[44]等方法进行鉴别检测,确定具体的致病菌浓度及种类。因此,在实际操作中,往往会将功能化磁珠与多种检测手段相结合。磁珠富集可避免后续检测过程中再受培养基成分的干扰,提高检测灵敏度,缩短检测时间。

2 富集与检测复合技术

食源性致病菌的富集与检测复合技术报道见表 2。

2.1 电泳技术

2.1.1 毛细管凝胶电泳 毛细管电泳是以毛细管为分离通道,高压直流电场为驱动力的液相分离技术,是将柱富集与毛细管分离相结合的技术。在直流电场的作用下,带电粒子向着与之电性相反的电极方向移动。由于带电粒子在电场中的游动速度不同,可以将组分分离为不同的狭小区带,从而达到对目标物分离和富集的目的。GAO 等^[45]将含有特异性抗体的乳液与毛细管电泳相结合,在细菌样品中快速分离出金黄色葡萄球菌,检出限为 9×10^5 CFU/mL。此外,毛细管凝胶电泳适用于区分生理形态特性相近的病原菌。陈萍等^[46]利用毛细管区带电泳并配合超声波处理快速分离出大肠杆菌的 3 种亚型: *E.coli* K88、K99 和 987P。何玲等^[47]将毛细管电泳结合 PCR 和荧光检测技术,对 3 种病原菌(单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌)进行了检测。其在提取细菌 DNA 后,分别对单增李斯特菌的 *hly* 基因,芽孢杆菌的 *16S-23SITS* 和金黄色葡萄球菌的 *nuc* 进行

表 2 食源性致病菌富集与检测复合技术的比较

Table 2 Comparison of different composite techniques in enrichment and detection for food borne pathogen

复合技术	技术的应用和发展	检测菌体	优势	不足	参考文献
电泳技术	毛细管电泳	<i>E.coli</i> K88 K99 987P	易区分生理形态特性相近的病原菌;耗时短	仪器灵敏度和结果重现性较差	[46]
		单增李斯特菌 金黄色葡萄球菌 蜡状芽孢杆菌			[47]
		沙门氏菌			[49]
	介电电泳	大肠杆菌(O157:H7)			[52]
	介电电泳阻抗技术	大肠杆菌(O157:H7) 大肠杆菌(O55:H7) 大肠杆菌(O6:K1:H1)			[54]
	梯度绝缘介电电泳	副溶血性弧菌 沙门氏菌 大肠杆菌(O157:H7)			[57]
微流控技术	光学检测	志贺氏菌 沙门氏菌 大肠杆菌	实现自动、在线、实时、高通量富集与检测	芯片设计难度较大	[58]
	电化学检测	李斯特菌			[60]
					[61]

扩增,以胶筛分毛细管电泳进行分离,后用多重PCR进行检测。研究表明,在20 min内即可完成对三种病原菌的同时检测,相对标准偏差为0.92%~1.58%。为食品中快速检测病原菌提供了基础。

毛细管电泳技术对于目标病原菌的分离快速高效,可在几秒至几十分钟内完成分离,且所需样本量较少;但是在灵敏度和结果重现性方面仍需改进。

2.1.2 介电电泳 由电泳发展而来的介电电泳技术从本质来说,是基于Max-well经典电磁场理论的技术。其原理是中性粒子在非均匀电场中受到电场力而进行定向运动的现象。中性粒子在介电液中由于受到非均匀电场的作用,产生不同的极化率。中性粒子表面的离子基团与介电液中的正负电荷会向粒子与介电液的交界面运动,使得正、负电荷聚于交界面两侧^[48]。胡冲等^[49]将介电电泳结合荧光纳米颗粒和微流控技术,对沙门氏菌进行了富集,在实际样品中沙门氏菌的检测限为56 CFU/mL,并且检测时间为40 min。Yang等^[50]研究了沙门氏菌的免疫捕获率,在无介电电泳时,沙门氏菌的免疫捕获率为17.6%;而加入介电电泳的情况下,免疫捕获率提升至64.0%。

随着电泳技术的不断发展,采用介电电泳阻抗技术(DEPIM)来捕获和检测病原菌成为更好的选择。通过改变悬浮液的电导率和电场频率,介电电泳阻抗的变化反映了被富集病原菌的数量^[51]。Wang等^[52]将正介电电泳与阻抗检测相结合,形成自组装的微系统装置对大肠杆菌O157:H7进行富集并检测,检测限为 5×10^4 CFU/mL,且总的检测时间为6 min。

梯度绝缘介电电泳(g-iDEP)可检测病原菌浓度^[53]。g-iDEP设备的锯齿设计能够选择性地捕获通道中不同位置的各种生物病原菌,基于局部电场强度测量的电动特性能够分离单一物种的相似菌株。

Paul等^[54]根据g-iDEP的电动特性对三种大肠杆菌相似菌株(O157:H7, O55:H7, O6:K1:H1)进行分离,并使用适当的电位条件进行浓缩、检测。细菌暴露于磁场后仍能存活,这是由细胞运动所决定的。这些结果表明,潜在的g-iDEP在分离能力和诊断应用的可能性方面都具有潜力。

2.2 微流控技术

微流控技术是一门多学科交叉的新兴技术,涉及了物理学、数学、微加工学、工程学等。它是将生物、化学实验室等基本功能如样品制备、反应、分离和检测等缩微到一个几平方厘米的芯片上,由微通道形成的网络,能够在微纳米尺寸空间中对流体进行精确操控^[55],实现对目标物的在线实时分析。微流控技术由于其高度的集成化和微型化,对微生物病原菌的检测提供了新的思路。Yonghee Kim等^[56]结合3D打印技术制备微流控平台,首次将磁珠分离与DNA纯化技术集成与同一设备中,通过对样品流速的控制,极大的缩短了富集时间,提高了富集效率。微流控技术的迅速发展,微流控元件自组装的灵活性,使微流控这一技术成为快速富集和检测病原菌的新手段。

2.2.1 光学检测 LI等^[57]基于激光诱导荧光检测微流控芯片系统,应用于四重PCR分析的产物中,对副溶血性弧菌、沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7和志贺氏菌进行检测,4种病原菌均可检出 10^2 CFU/mL。迁移时间的相对标准偏差为0.7%~2.1%。本方法也可用于人工接种食品样品中致病菌多重PCR产物的快速分析。Kim等^[58]将抗体“三明治”方法应用于微流控技术,将沙门氏菌的多克隆抗体共价固定在量子点上,将第二多克隆抗体连接到超顺磁粒子上,用永磁体和便携式荧光计来测量附着在沙门氏菌上的量子点纳米颗粒的荧光信号,以此判断沙门氏菌的含

量。此方法在硼酸缓冲盐和鸡精中对沙门氏菌的检测限均为 10^3 CFU/mL。

2.2.2 电化学检测 与光学检测相比,电化学的优势不仅在于其固有的微型化和可移植性,而且还在于其检测时不受样品浑浊度的影响、极低的成本、低功耗以及与微加工技术的兼容性^[59]。Altintas 等^[60] 组装了一种全自动微流体电化学生物传感器,采用纳米修饰的免疫测定法对 $10\sim 3.97\times 10^7$ CFU/mL 范围内的大肠杆菌进行检测,检出限为 50 CFU/mL。将建立的方法应用于纳米材料修饰的水样中大肠杆菌的定量分析。在实际样品分析中,大肠杆菌的检测限相同,但传感器信号略有下降。传感器表面可多次再生,大大降低了系统成本。Qi 等^[61] 将电化学阻抗分析、脲酶催化与微流体相结合,通过磁珠-李斯特氏菌-纳米金-脲酶三明治复合物捕获李斯特氏菌,再通过微流控检测芯片的互相交叉微电极阻抗测量来确定李斯特氏菌的数量。在 30 min 内,对李斯特氏菌的捕获效率达到了 93%;在 1 h 内,对李斯特氏菌的检测限为 1.6×10^2 CFU/mL;在生菜样品中,回收率为 82.1%~89.6%。

微流控技术由计算机、数学、化学等多学科交叉应运而生,在微平台上灵活组合和大规模合成实现对病原菌自动、实时、在线的富集和检测^[62],微流控芯片显著优点是多元技术(包括样品制备、反应、分离和检测)在微平台上的灵活组合和大规模集成。与传统方法相比,微流控芯片具有小型化、高通量、集成化、低功耗,携带方便、检测速度快、便于现场诊断等优点。但是微流控技术是一门多学科交叉的技术,需要多方面的技术结合。目前,微流控技术的应用还属于一个起步阶段,如何将多项操作集成于同一芯片上,仍是需要突破的关键难点。

2.3 复合检测方法比较

免疫磁珠分离和电泳技术作为单独技术,无法实现病原菌富集与检测效果的最大化;而微流控技术具有的自组装特点,可将这些技术进行偶联,获得富集与检测效率最优的方案。通过富集与鉴定检测的复合,一方面提高了对致病菌的检测限,同时能够缩短检测时间、提高灵敏度,实现自动化检测。

Thaitrong 等^[63] 创建了微流控夹心 ELISA 用于快速检测病原菌,微流控浓缩器采用微通道制备,所有反应均在微流控通道中,借助毛细力驱动反应物流动实现富集与检测。该微流控系统速度更快、便携、更节能,且不受样品污染,为病原菌的富集与检测提供了新的选择。而将磁分离与微流控技术结合时,特异性和敏感性更高,速度更快,操作更简便。Kanayeva 等^[64] 将磁性纳米颗粒、微流控芯片和交叉微电极结合在一起,集成了阻抗免疫传感器,用于高效分离和检测单核细胞增生李斯特杆菌。虽然免疫学和微流体学的结合极大改善了传统方法的性能,但仍需进一步研究。目前,研究较多的是对病原菌的特异

性结合,而非特异性结合还是一个难题^[65]。DNA 和 RNA 适配体作为抗体的潜在竞争对手已被广泛研究,用于包括食品安全检测在内的各种应用领域。通过双向电泳,可以得到适配体在微流体系统中定位并集中在规定的位置,从而完成对病原菌的富集^[66]。

3 结论与展望

电泳技术发展较快,免疫电泳不仅具有抗原抗体的高特异性,还具有快速分离,高灵敏度和高分辨率的特点,但是电泳技术在结果重现性方面仍旧不足,因此在应用上存在局限性。取代了传统实验室中的人工操作,速度快、效率高、避免人为失误的可能性,为科学研究提供了新的发展方向。如果能将多种富集、检测技术集成于自组装的微流体元件中,将有望实现病原菌富集与检测效率的最大化。免疫磁珠分离多应用于病原菌的富集,磁珠的超顺磁性能够使病原菌与生物识别体结合的更加牢固,提高捕获率。磁珠操作的简便性,可使免疫磁珠与多种检测技术相结合,增强检测技术的灵敏度,提高检出限^[37]。但是,由于磁场效应,可能会吸附杂菌,这就需要有高特异性的生物识别体对磁珠进行修饰,降低杂菌污染几率。因此,免疫磁珠作为富集速度快,富集率高的便携材料可打破其他仪器在实际应用中的局限性,对快检技术的开发有重要意义。

参考文献

- [1] Kirk M D, Pires S M, Black R E, et al. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis[J]. *PLOS Medicine*, 2015, 12(12): e1001921.
- [2] Wei Wu, Chundi Yu, Qi Wang, et al. Research advances of DNA aptasensors for foodborne pathogen detection[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(14): 2353-2368.
- [3] 白亚龙,索玉娟,周昌艳. 食源性致病菌 PCR 检测前处理方法研究进展[J]. *食品与机械*, 2017, 33(12): 191-196.
- [4] Reta N, Saint C P, Michelmor A, et al. Nanostructured electrochemical biosensors for label-free detection of water- and food-borne pathogens[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(7): 6055-6072.
- [5] Tao J, Liu W, Ding W, et al. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(3): 744-754.
- [6] 苏粉良,李冰燕,陈雨欣,等. 食源性致病菌的检测技术研究进展[J]. *农产品加工*, 2018(4): 58-61.
- [7] Sharma A, Tok A I, Palaniappan A, et al. Gold nanoparticle conjugated magnetic beads for extraction and nucleation based signal amplification in lateral flow assaying[J]. *Sensors and Actuators B-chemical*, 2020, 312: 127959.
- [8] Salehi S S, Shamloo A, Hannani S K, et al. Microfluidic technologies to engineer mesenchymal stem cell aggregates — applications and benefits[J]. *Biophysical Reviews*, 2020, 12(1): 123-133.
- [9] Kerrouche A, Lithgow J, Muhammad I, et al. Towards the development of rapid and low-cost pathogen detection systems using

- microfluidic technology and optical image processing[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(7): 2527.
- [10] Brandao D, Liebana S, Campoy S, et al. Immunomagnetic separation of *Salmonella* with tailored magnetic micro and nanocarriers. A comparative study[J]. *Talanta*, 2015, 143: 198–204.
- [11] 吴俊, 陆利霞, 刘元建, 等. 基于裸磁珠的金黄色葡萄球菌富集优化[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(2): 186–192.
- [12] 邱晋, 樊学军, 沈圣, 等. 自制裸磁珠对常见食源性致病菌吸附性能的研究[J]. *现代预防医学*, 2006(1): 4–5.
- [13] Li J, Liu Q, Wan Y, et al. Rapid detection of trace *Salmonella* in milk and chicken by immunomagnetic separation in combination with a chemiluminescence microparticle immunoassay[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(23): 6067–6080.
- [14] 李云霞. 纳米磁珠对单增李斯特菌低场磁共振检测的影响研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
- [15] Jalal U M, Jin G J, Eom K S, et al. On-chip signal amplification of magnetic bead-based immunoassay by aviating magnetic bead chains[J]. *Bioelectrochemistry*, 2017, 122: 221–226.
- [16] 吴孟娟. 基于纳米抗体的免疫磁珠捕获-qPCR技术建立河弧菌的快速检测方法[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [17] Huang J, Bian X, Chang K, et al. Capture and analysis of cell surface n-glycans by hydrazide-modified magnetic beads and CE-LIF[J]. *Chromatographia*, 2019, 82(7): 1079–1088.
- [18] Zhan S, Yang Y, Shen Z, et al. Efficient removal of pathogenic bacteria and viruses by multifunctional amine-modified magnetic nanoparticles[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 274: 115–123.
- [19] Kim T, Park J, Kim C, et al. Fully integrated lab-on-a-disc for nucleic acid analysis of food-borne pathogens[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 3841–3848.
- [20] Agrawal S, Morarka A R, Bodas D, et al. Multiplexed Detection of waterborne pathogens in circular microfluidics[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167(6): 1668–1677.
- [21] Joshi R, Janagama H K, Dwivedi H P, et al. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovar[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, 23(1): 20–28.
- [22] Liu P, Wang Y, Han L, et al. Colorimetric assay of bacterial pathogens based on Co_3O_4 magnetic nanozymes conjugated with specific fusion phage proteins and magnetophoretic chromatography[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(8): 9090–9097.
- [23] Wang C, Sauvageau D, Elias A L, et al. Immobilization of active bacteriophages on polyhydroxyalkanoate surfaces[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(2): 1128–1138.
- [24] Wang R, Lum J, Callaway Z, et al. A label-free impedance immunosensor using screen-printed interdigitated electrodes and magnetic nanobeads for the detection of *E. coli* O157: H7[J]. *Biosensors*, 2015, 5(4): 791–803.
- [25] Yi Z, Wang S, Meng X, et al. Lysin cell-binding domain-functionalized magnetic beads for detection of *Staphylococcus aureus* via inhibition of fluorescence of Amplex Red/hydrogen peroxide assay by intracellular catalase[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(27): 7177–7185.
- [26] Cooper R M, Leslie D C, Domansky K, et al. A microdevice for rapid optical detection of magnetically captured rare blood pathogens[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(1): 182–188.
- [27] 王婷, 胡玥, 田雪, 等. 食品中4种常见致病菌的磁珠吸附-PCR检测方法研究[J]. *卫生研究*, 2014, 43(4): 556–561.
- [28] 李倩倩, 陈萍, 任常菲. 不同磁珠对致病菌吸附性能的比较研究[J]. *卫生研究*, 2012, 41(2): 293–297.
- [29] Bruno J G. Predicting the uncertain future of aptamer-based diagnostics and therapeutics[J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6866–6887.
- [30] Bruno J G, Sivills J C, Phillips T, et al. Aptamer-magnetic bead quantum dot sandwich assays for foodborne pathogen detection: Pros, cons, and lessons learned[J]. *Journal of AOAC International*, 2017, 100(4): 895–899.
- [31] Abbaspour A, Norouzsarvestani F, Noori A, et al. Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *Staphylococcus Aureus*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 68: 149–155.
- [32] Osullivan L, Bolton D, McAuliffe O, et al. The use of bacteriophages to control and detect pathogens in the dairy industry[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2020, 73(1): 1–11.
- [33] Sultan K S, Ali T A, Fahmy N A, et al. Using millimeter waves for rapid detection of pathogenic bacteria in food based on bacteriophage[J]. *Engineering Reports*, 2019, 1(1): 1–24.
- [34] Tu S, Uknalis J, Irwin P L, et al. The use of streptavidin-coated magnetic beads for detecting pathogenic bacteria by light addressable potentiometric sensor (laps)[J]. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2000, 8(2): 95–109.
- [35] Kant K, Shahbazi M, Dave V P, et al. Microfluidic devices for sample preparation and rapid detection of foodborne pathogens[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(4): 1003–1024.
- [36] Hyun-Ju Hwang, Jin-Wook Han, Hanchoul Jeon, et al. Characterization of a novel mannose-binding lectin with antiviral activities from red alga, *Grateloupia chiangii*[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 333.
- [37] Chen J, Park B. Effect of immunomagnetic bead size on recovery of foodborne pathogenic bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 267(1): 1–8.
- [38] 张璇, 戴娟, 王祖忠, 等. 基于纳米免疫磁珠快速富集4种海洋致病性弧菌的研[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(6): 1478–1486.
- [39] 周莉, 王永, 王法云, 等. 免疫磁珠检测食品中金黄色葡萄球菌的研究[J]. *河南科学*, 2015, 33(7): 1119–1123.
- [40] Mao Y, Huang X, Xiong S, et al. Large-volume immunomagnetic separation combined with multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovi* in lettuce[J]. *Food Control*, 2016, 59: 601–608.
- [41] Rainbow J, Sedlackova E, Jiang S, et al. Integrated electrochemical biosensors for detection of waterborne pathogens in low-resource settings[J]. *Biosensors*, 2020, 10(4): 36.

- [42] Meng Xu, Ronghui Wang, Yanbin Li. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation[J]. *Talanta*, 2016, 148(8): 200–208.
- [43] Majeti Narasimha Vara Prasad, Anna Grobelak. Waterborne pathogens detection and treatment[M]. Butterworth-Heinemann Press, 2020.
- [44] Li Q, Zhang S, Cai Y, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2017, 52(7): 1559–1566.
- [45] Gao P, Xu G, Shi X, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by a combination of monoclonal antibody-coated latex and capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(9): 1784–1789.
- [46] 陈萍, 李仁宽, 徐小华, 等. 毛细管电泳法快速分离和检测肠毒性大肠杆菌[J]. *色谱*, 2002(5): 439–441.
- [47] 何玲, 黎源倩. 多重 PCR-毛细管电泳-激光诱导荧光检测食源性致病菌[J]. *现代预防医学*, 2009, 36(3): 523–525.
- [48] Vijayaraghavan A. Bottom-up assembly of nano-carbon devices by dielectrophoresis[J]. *Physica Status B*, 2013, 250(12): 2505–2517.
- [49] 胡冲. 基于荧光纳米颗粒标记的芯片介电电泳技术检测沙门氏菌[D]. 长沙: 湖南大学, 2012.
- [50] Yang L. Dielectrophoresis assisted immuno-capture and detection of foodborne pathogenic bacteria in biochips[J]. *Talanta*, 2009, 80(2): 551–558.
- [51] Nakano M, Obara R, Ding Z, et al. Detection of norovirus and rotavirus by dielectrophoretic impedance measurement[C]// 2013 Seventh International Conference on Sensing Technology (ICST). IEEE, 2013: 374–378.
- [52] Wang R, Xu Y, Liu H, et al. An integrated microsystem with dielectrophoresis enrichment and impedance detection for detection of *Escherichia coli*[J]. *Biomedical Microdevices*, 2017, 19: 34.
- [53] Ding J, Lawrence R M, Jones P V, et al. Concentration of Sindbis virus with optimized gradient insulator-based dielectrophoresis[J]. *Analyst*, 2016, 141(6): 1997–2008.
- [54] Jones Paul V, DeMichele Alexa F, Kemp LaKeta, et al. Differentiation of *Escherichia coli* serotypes using DC gradient insulator dielectrophoresis[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(1): 183–192.
- [55] Liu WT, Zhu L, Qin QW, et al. Microfluidic device as a new platform for immunofluorescent detection of viruses[J]. *Lab Chip*, 2005, 5(11): 1327–1330.
- [56] Yonghee Kim, Jinyeop Lee, Sungsu Park. A 3D-printed millifluidic platform enabling bacterial preconcentration and DNA purification for molecular detection of pathogens in blood[J]. *Micromachines*, 2018, 9(427): 1–12.
- [57] 李永新, 黎源倩, 渠凌丽, 等. 微流控芯片-激光诱导荧光快速检测 4 种食源性致病菌[J]. *分析化学*, 2008, 36(12): 1667–1671.
- [58] Kim G, Moon J, Moh C, et al. A microfluidic nano-biosensor for the detection of pathogenic *Salmonella*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67: 243–247.
- [59] Safavi M, Ahmed M U, Tolba M, et al. Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of *Escherichia coli*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 31(1): 523–528.
- [60] Altintas Z, Akgun M, Kokturk G, et al. A fully automated microfluidic-based electrochemical sensor for real-time bacteria detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 100: 541–548.
- [61] Chen Q, Wang D, Cai G, et al. Fast and sensitive detection of foodborne pathogen using electrochemical impedance analysis, urease catalysis and microfluidics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 770–776.
- [62] Cong H, Xu X, Yu B, et al. Recent progress in preparation and application of microfluidic chip electrophoresis[J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2015, 25(5): 053001.
- [63] Thaitrong N, Charlermroj R, Himananto O, et al. Implementation of microfluidic sandwich ELISA for superior detection of plant pathogens[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83231.
- [64] Kanayeva D, Wang R, Rhoads D D, et al. Efficient separation and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* using an impedance immunosensor based on magnetic nanoparticles, a microfluidic chip, and an interdigitated microelectrode[J]. *Journal of Food Protection*, 2012, 75(11): 1951–1959.
- [65] Yao L, Wang L, Huang F, et al. A microfluidic impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for continuous-flow detection of *E. coli* O157: H7[J]. *Sensors and Actuators B-chemical*, 2018, 259: 1013–1021.
- [66] Beyor N, Seo T S, Liu P, et al. Immunomagnetic bead-based cell concentration microdevice for dilute pathogen detection[J]. *Biomedical Microdevices*, 2008, 10(6): 909–917.