

# 基于纳米金复合探针的沙门氏菌快速定量检测

Rapid quantitative detection of Salmonella based on nanogold composite probes

谢同彬 梅 林

XIE Tong-bin MEI Lin

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036)

(College of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

**摘要:** 鉴于现有沙门氏菌检测方法的缺陷, 研发一种快速、简便、低成本、高灵敏的沙门氏菌新型快速定量检测技术。通过水相合成法制备碲化镉量子点, 用显示 DNA 将一个金纳米粒子连接上百个量子点制备显示探针进行信号放大; 采用水热-溶剂热方法制备氨基化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子, 并利用亲和素与生物素特异性结合的原理, 连接捕获 DNA 制备捕获探针, 测定沙门氏菌 DNA 荧光强度。结果显示: 在  $10 \sim 1\,000$  fmol/L 范围内, 沙门氏菌的 DNA 浓度与荧光强度呈良好的线性关系, 回归方程为  $I_F = 0.198[\text{DNA}] + 55.00$ ,  $R^2 = 0.997$ , 检出限为 8 fmol/L。在检测被沙门氏菌污染的牛奶样品中, 也显示了优良的准确性, 最低检出限为 4 fmol/L。

**关键词:** CdTe 量子点; 纳米金; 磁性纳米粒子; 沙门氏菌

**Abstract:** As the defects of the existing detection methods for Salmonella, a fast, simple, low cost and highly sensitive new rapid detection technology has been developed. The CdTe quantum dots were synthesized by water method, and then the display DNA was used to connect hundreds of quantum dots to a gold nanoparticle. After preparing the amination  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles by using a water hot-solvent hot method, the principle of avidin-biotin specific was used to bind with the capturing probes. Finally the fluorescence intensity of Salmonella DNA was detected. The results showed that the fluorescence intensity and Salmonella DNA concentration had good linear relationship in the range of  $10 \sim 1\,000$  fmol/L, and the regression equation was  $I_F = 0.198[\text{DNA}] + 55.00$ ,  $R^2 = 0.997$ , with the detection limit of 8 fmol/L. Moreover, it also showed good accuracy, with the minimum detection limit of 4 fmol/L, in the detection of milk samples contaminated with salmonella.

**Keywords:** CdTe quantum dots; gold nanoparticle; magnetic nanop-

**基金项目:** 安徽省 2017 年面上科技攻关项目(编号:1704g07020104)

**作者简介:** 谢同彬, 男, 安徽农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:** 梅林(1979—), 女, 安徽农业大学副教授, 博士。

E-mail: meilin8880@sina.com

**收稿日期:** 2017-07-09

articles; Salmonella

近年来, 食品安全问题引起了世界各国的普遍重视。致病菌污染带来的食品安全事故也经常被报道, 如法国的李斯特氏菌病、日本的肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和雪印牛奶的葡萄球菌肠毒素中毒事件等<sup>[1]</sup>。由食源性致病菌引起的食品中毒事件已成为全世界举足轻重的公共卫生问题。

沙门菌属是一种能引起人发生伤寒、副伤寒、急性肠胃炎、败血症等疾病且能寄生在人和动物肠道内的重要人畜共患病病原体, 食品被沙门氏菌感染对其安全构成了严重威胁。

目前中国国标(GB 4789.4—2016)规定沙门氏菌检测方法的主要步骤为前增菌、分离、生化试验和血清学鉴定等。该法耗时费力、繁琐复杂, 需 4~7 d 才能得出检测结果, 且非运动型沙门菌在环境样本中存活时间较短, 需要及时处理样本。另外检测从不同部位分离得到的沙门氏菌, 生化结果并不是完全一致的<sup>[2]</sup>, 因此国标法被认为敏感度较低, 检测结果的判断主观性较强。除了传统的国标法外, 目前应用较多的还有免疫学技术和 PCR 技术<sup>[3-4]</sup>。此外, 还有一些分子生物学技术: 包括基因芯片技术<sup>[5]</sup>、核酸探针技术<sup>[6]</sup>等, 以及电阻抗法<sup>[7]</sup>、SPR 生物传感器法<sup>[8]</sup>。但是鉴于现有的方法都存在一些问题, 比如分子生物学检测方法虽然有快速、灵敏且特异性强的优点, 但成本和技术要求较高, 很难得到广泛应用; 免疫学技术虽然具有重现性好、灵敏度高和较强特异性的优点, 但成本较高, 不适于基层实验室推广应用。因此, 开发一种超灵敏、快速、低成本的检测方法就显得非常有意义。

近年来, 随着纳米技术的发展, 研究发现<sup>[9]</sup> 纳米材料不仅具有许多优良的生物学和理化特性, 使得其在生物领域被广泛应用, 而且功能化的纳米颗粒在食源性致病菌检测方面能够发挥巨大的作用。例如: 量子点具有量子效应, 受激发光刺激会产生荧光, 能够对食源性致病菌进行定量检测<sup>[9-10]</sup>; 纳米金具有优良的光学性能, 当其发生粒子团聚时,

体系颜色会发生变化,可进行食源性致病菌的半定量检测,且耗时较短<sup>[11]</sup>;由于磁性纳米材料具有顺磁性,当对其表面进行生物学修饰后,可以利用其优良的特异性对致病菌进行分离、富集和纯化,从而能快速达到国标法前增菌的效果,大大缩短了检测时间<sup>[12]</sup>。

本试验拟利用量子点的优良发光性质,组装在纳米金粒子上作为显示探针进行信号放大,再用磁性纳米材料作为捕获探针分离提取沙门氏菌,检测量子点的荧光强度,从而定量检测食品中的沙门氏菌含量,以期研发一种新型的快速定量检测沙门氏菌的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

碲粉:分析纯,中国 Alfa Aesar 公司;

氯金酸:分析纯,上海久岳化工有限责任公司;

亲和素:化学纯,美国 Amresco 公司;

巯基丙酸、EDC、NHS:分析纯,美国 Sigma Aldrich 公司;

硼氢化钠、氯化镉、氯化高铁、1,6-己二胺:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

所有沙门氏菌 DNA 序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 主要仪器

透射电镜(TEM):JEM2100 型,日本 JEOL 公司;

荧光/化学发光仪:Zenyth 3100 型,奥地利(Anthos)公司;

集热式磁力加热搅拌器:DF-101S 型,河南巩义市予华仪器厂;

台式高速冷冻离心机:Centrifuge 5804R 型,上海安亭科学仪器厂;

荧光光谱仪:F-7000 型,日本日立公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 CdTe 量子点的制备 采用巯基丙酸制备 CdTe 量子点,具体步骤为:称取 0.031 9 g 碲粉于烧瓶中,称取 0.037 8 g 硼氢化钠于 5 mL 离心管中,用 5 mL 超纯水溶解洗涤,通氮气除氧保护;并始终冰浴以保证反应温度;称取 0.114 2 g 水合氯化镉于三口烧瓶中,同时加入磁性转子和 100 mL 超纯水;用移液枪移取对应量巯基丙酸于三口烧瓶中,滴加 NaOH 溶液调节 pH 至 11.2;安装冷凝回流装置;通入氮气除氧 30 min,将油浴锅升温至 100 ℃;取反应 7 h 后的样品,待合成液冷却至室温后,放入 4 ℃ 冰箱储存,备用。采用透射电镜对其形貌进行表征,并用荧光分光光度计对量子点的光谱性质进行表征<sup>[13-14]</sup>。

1.3.2 纳米金的制备 采用柠檬酸三钠还原法制备纳米金溶液,具体步骤为:准确量取 100 mL 新鲜配制的 0.01% 氯金酸溶液,于圆底烧瓶中,回流加热搅拌至溶液沸腾,并持续 10 min;然后快速加入 10 mL 1% 柠檬酸三钠溶液,继续反应 10 min 至溶液不再变色;停止加热,继续搅拌 15 min 直至得

到棕红色液体,待合成液冷却至室温后,放入 4 ℃ 冰箱储存,备用。用透射电镜对其形貌进行表征<sup>[15]</sup>。

1.3.3 CdTe 量子点-纳米金显示探针的制备 依据亲和素-生物素特异性结合的原理,利用显示 DNA 连接 CdTe 量子点和纳米金粒子,具体步骤为:取 100  $\mu$ L CdTe 量子点溶液,加入到 200  $\mu$ L 含有 4 mg EDC 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,搅拌混合反应;将 1 mg NHS 加入到上述溶液中,混合反应;将 80  $\mu$ L 1 mg/mL 亲和素加入其中,混合反应,离心。用 PBS 清洗一次后,再离心,将最终产品保存于 4 ℃ 备用;取 800  $\mu$ L 上述备用溶液,加入 770  $\mu$ L 显示 DNA(显示 DNA 序列:SH-5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT-3'-biotin)反应 24 h;然后加入 250  $\mu$ L 纳米金溶液,并温和摇晃反应 16 h,离心。用 0.1 mol/L NaCl 和 PBS 的混合液清洗一次后,再离心溶解,保存于 4 ℃ 备用。用透射电镜对其形貌进行表征<sup>[16-17]</sup>。

1.3.4 氨基化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒子的制备 采用水热-溶剂热方法,具体步骤为:准确称取 1.0 g 六合水氯化高铁、6.5 g 1,6-己二胺、2.0 g 无水乙酸钠,置于 50 mL 具塞圆底烧瓶中,加入 30 mL 乙二醇,于 50 ℃ 恒温水浴锅中剧烈搅拌,直至溶液变为透明酒红色,转移至带有四氟乙烯内衬的高压反应釜中,并放置于 198 ℃ 烘箱中反应 6 h,然后停止加热取出,待自然冷却至室温时,用无水乙醇、超纯水交替洗涤 3~5 次,于 50 ℃ 烘箱干燥;最终得到氨基化的磁珠颗粒,存于 4 ℃ 备用。用透射电镜对其形貌进行表征<sup>[18]</sup>。

1.3.5 磁性纳米粒子捕获探针的制备 利用亲和素和生物素的特异性结合原理,制备磁性纳米粒子捕获探针。具体步骤为:称取 5 mg 氨基化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米粒子,倒入含 5% 戊二醛的 PBS 溶液中,反应 4 h;通过磁力收集并用 PBS 清洗 3 次;加入 300  $\mu$ L 1 mg/mL 亲和素,反应 4 h;用 PBS 通过磁力收集清洗 3 次,保存于 4 ℃。吸取 100  $\mu$ L 上述溶液,再吸取 100  $\mu$ L 10 nmol/L 捕获 DNA 溶液(捕获 DNA 序列:GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-biotin-3'),于 37 ℃ 反应 2 h,然后用 PBS 磁力收集洗涤 3 次,存于 4 ℃ 备用。

1.3.6 沙门氏菌目标 DNA 检测 吸取稀释不同数量级浓度( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ )的目标 DNA 溶液,(目标 DNA 序列:5'-TAT CGT CGG TAA GGC ACG CTC AAT TGT CGT TAA AGT CCT GTT ATT TCC TGC GTG GAT AT-3')各 100  $\mu$ L 和杂交缓冲溶液 100  $\mu$ L,于 42 ℃ 反应 2 h,磁力收集洗涤 3 次;然后吸取 100  $\mu$ L 显示探针和 100  $\mu$ L 杂交缓冲溶液,于 42 ℃ 反应 2 h,磁力收集洗涤 3 次;最后用荧光光谱仪测定反应溶液的荧光强度,从而计算得出目标 DNA 浓度和荧光强度的线性关系。

### 1.3.7 复合纳米探针法对含有沙门氏菌的食品样品的检测

为了检验本法的灵敏度和准确性,取人为添加不同浓度沙门氏菌(原液,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ )的市售牛奶样品,用成品试剂盒提取沙门氏菌 DNA,然后用本方法检测溶液的荧光强度,以此来判断本法的可行性和准确性。

## 2 结果与分析

### 2.1 CdTe 量子点的表征

由图 1 可知, CdTe 量子点的粒径为 4 nm 左右, 呈圆球形。由图 2 可知, 碲化镉的最大发射波长为 587 nm。

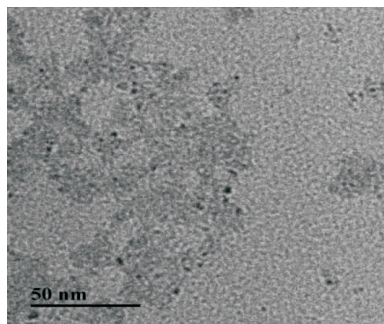


图 1 碲化镉量子点的透射电镜图

Figure 1 TEM image of CdTe QDs

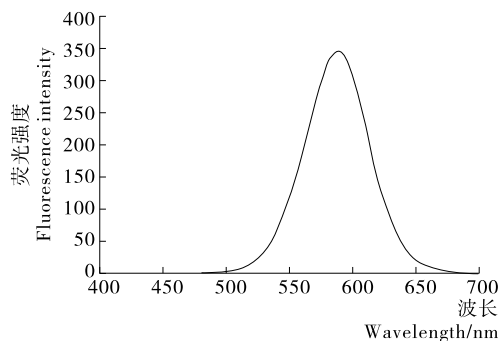


图 2 碲化镉量子点的荧光光谱

Figure 2 Fluorescent spectrum of CdTe QDs

### 2.2 纳米金粒子的透射电镜图

由图 3 可知, 纳米金粒的直径约为 12.5 nm, 适于作核酸标记物。

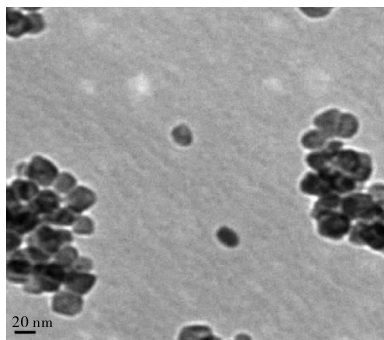


图 3 纳米金的透射电镜图

Figure 3 TEM image of Gold nanoparticles

### 2.3 显示探针的表征

本方法利用亲和素和生物素特异性结合的原理, 将显示 DNA 连接上 CdTe 量子点, 再利用巯基和纳米金特异性结合的特点, 使一个纳米金上连接多个量子点, 以起到信号放大作用。由图 4 可知, 每个纳米金粒子已成功连接了多个量子点。

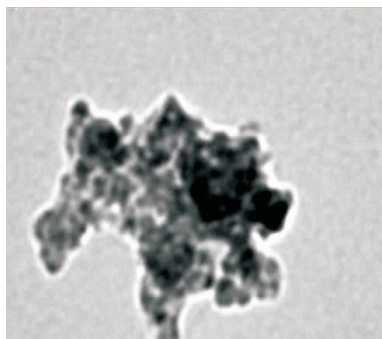


图 4 CdTe-纳米金显示探针的透射电镜图

Figure 4 TEM image of CdTe-Au fluorescence probe

### 2.4 氨基化 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米粒子的透射电镜图

试验采用水热-溶剂热法制备了氨基化的单晶  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒。由图 5 可知, 氨基化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子均为球状的单晶, 粒径大约在 30~60 nm。

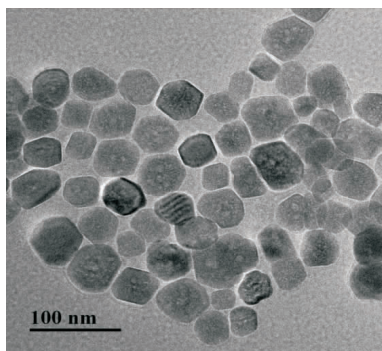


图 5 氨基化磁性纳米粒子的透射电镜图

Figure 5 TEM image of amine-functionalized magnetite nanoparticles

### 2.5 合成的沙门氏菌目标 DNA 检测

在 10~1 000 fmol/L 范围内, 沙门氏菌 DNA 浓度与荧光强度呈良好的线性关系, 回归方程为  $I_F = 0.198[\text{DNA}] + 55.00$ ,  $R^2 = 0.997$ , 且得到的检出限为 8 fmol/L。

### 2.6 纳米探针法检测含有沙门氏菌的食品样品的检测结果分析

根据《食品中致病菌限量》(GB 29921—2013) 的要求, 食品中不得检出沙门氏菌。为了检验本法的灵敏度和准确性, 取人为添加不同浓度沙门氏菌的市售牛奶样品, 用成品试剂盒提取 DNA 后, 分别检测含有梯度稀释沙门氏菌浓度的牛奶(表 1), 当检测到稀释  $10^{-5}$  的牛奶后, 再检测稀释 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍的荧光强度。结果显示稀释到 2 倍时, 已经检测不出。因此, 将  $10^{-5}$  再稀释 1 倍的荧光强度, 带入 2.5 得到的方程中, 计算得出最低检出限是 4 fmol/L。

## 3 结论

为了适应检测需要, 避免现有方法存在的缺陷, 本试验利用发光量子点的高灵敏度, 将多个量子点结合到纳米金上进行信号放大, 以达到超灵敏的检测目的, 克服了国标方法需要前增菌的繁琐步骤。此外, 利用磁性纳米材料的磁分离

表1 牛奶中不同浓度沙门氏菌的检测结果

Table 1 Results of Salmonella with different concentration in milk samples

编号	沙门氏菌浓度/(fmol·L <sup>-1</sup> )
1	2 445
10 <sup>-1</sup>	2 141
10 <sup>-2</sup>	1 448
10 <sup>-3</sup>	1 052
10 <sup>-4</sup>	585
10 <sup>-5</sup>	10

作用,免去了以往的提取分离步骤。同时,本方法一次性取得的显示探针和捕获探针溶液,可以多次使用,减少成本,相比分子生物学和免疫学检测技术的高成本、高技术要求,具有良好的应用推广前景。

对于沙门氏菌的检测,该法显示了良好的稳定性,在10~1 000 fmol/L范围内,沙门氏菌DNA浓度与荧光强度呈现出良好的线性关系,回归方程为 $I_F = 0.198[\text{DNA}] + 55.00$ , $R^2 = 0.997$ ,得到的检出限为8 fmol/L。在检测被沙门氏菌污染的牛奶样品中,也显示了优良的应用性,最低检出限为4 fmol/L。需要指出的是,最低检测限的不同主要是由于将不同浓度的沙门氏菌液加入到牛奶中,用试剂盒提取沙门氏菌DNA,通过这个过程,与直接检测合成的沙门氏菌DNA序列浓度相比更加准确,同时也反映了在今后检测实际样品中沙门氏菌时,本法具有更好的灵敏度,可以达到超灵敏检测的目的。

鉴于纳米金和量子点复合探针的优良检测特性,以及磁性纳米探针的特异分离效应,本试验研发了一种快速、简便、低成本、高灵敏度的沙门氏菌新型快速定量检测技术。后续试验将继续优化检测条件,证实本法的特异性和灵敏度,并扩大其应用范围。

### 参考文献

- [1] 周明东. 食源性致病菌快速检测方法的建立及其试剂盒的研制和应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012: 15-17.
- [2] 王杰, 陈颖钰, 彭清洁, 等. 沙门菌检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2016, 37(4): 94-98.
- [3] 赵平, 杨光, 丁松乔, 等. 食品中沙门氏菌检测研究进展[J]. 食品安全导刊, 2016(5): 100-101.
- [4] 闰琳, 王晓英, 郭云昌, 等. 应用 Taqman 实时 PCR 法检测禽肉中沙门菌的研究[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(8): 731-735.
- [5] 许俊钢. 基因芯片快速检验细菌的临床应用[J]. 中国实用医药, 2016, 11(1): 33-34.
- [6] 贺气志, 宁毅, 陈珂珂, 等. 基于核酸功能化的氧化石墨烯技术快速检测含 SSeC 基因鼠伤寒沙门氏菌的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(6): 453-457.
- [7] 刘喆, 张书萧, 王少辉, 等. 沙门氏菌的检测技术进展[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20(2): 81-86.
- [8] 胡静, 胡佳佳, 沈雯, 等. 同时检测沙门氏菌和炭疽杆菌磁致伸缩生物传感器制备与应用[J]. 农业工业学报, 2016, 32(5): 297-301.
- [9] 李萌立, 李忠海, 李节, 等. 量子点荧光探针技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 241-244.
- [10] WANG Hong, LI Yan-bin, WANG Andrew, et al. Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(12): 2 039-2 047.
- [11] SU Hai-chao, MA Qiang, SHANG Kun, et al. Gold nanoparticles as colorimetric sensor: a case study on *E.coli* O157:H7 as a model for Gram-negative bacteria[J]. Sens Actuators B, 2012, 161(1): 298-303.
- [12] 王馨, 胡文忠, 陈晨, 等. 纳米材料在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 243-247.
- [13] 王书源, 李忠海, 黎继烈, 等. 高荧光 CdTe 量子点荧光探针测定  $\text{Cu}^{2+}$  [J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 125-129.
- [14] HUA Xiao-feng, LIU Tian-cai, CAO Yuan-cheng, et al. Characterization of the coupling of quantum dots and immunoglobulin antibodies[J]. Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386(6): 1 665-1 671.
- [15] SOON C, YOUNGESO M, HYOJONG Y. Finely tunable fabrication and catalytic activity of gold multipod nanoparticles[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2016, 469(1): 269-276.
- [16] XING Yun, CHAUDRY Q, SHEN Christopher, et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry[J]. Nat. Protoc., 2007, 2(5): 1 152-1 165.
- [17] HENNING-KNECHTEL A, WIENS M, LAKATOS M, et al. Dielectrophoresis of gold nanoparticles conjugated to DNA origami structures[J]. Beilstein J Nanotechnol., 2016, 1(7): 948-956.
- [18] BAGHANIL A N, MAHVI A H, GHOLAMI M, et al. One-Pot synthesis, characterization and adsorption studies of amine-functionalized magnetite nanoparticles for removal of Cr(VI) and Ni(II) ions from aqueous solution: kinetic, isotherm and thermodynamic studies[J]. Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2016, 14(1): 11-22.