



## 检测大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7 免疫磁珠的制备、保存与应用

曲晓莹<sup>1,2,3,4</sup> 吴清平<sup>\*4</sup> 熊争<sup>3</sup> 蔡芷荷<sup>3,5</sup> 卢勉飞<sup>3,5</sup> 万强<sup>1,2,3</sup> 周杨<sup>3,5</sup>

1 华南理工大学 广东 广州 510641

2 广东粤微食用菌技术有限公司 广东 广州 510663

3 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510663

4 广东省微生物研究所 广东 广州 510070

5 广东环凯生物科技有限公司 广东 肇庆 526238

**摘要:**【背景】大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7 是导致肠出血性大肠杆菌食源性疾病暴发的主要血清型,免疫磁珠(Immunomagnetic beads, IMBS)在 *E. coli* O157 的检测中发挥着重要作用,而免疫磁珠的稳定性、特异性、广谱性等性能指标关系着在实际应用中的使用效果。【目的】制备高效、稳定且具有广谱性的免疫磁珠,联合分子检测技术如环介导恒温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术、PCR 等,提高目标菌的检出率。【方法】采用新型的磁珠活化剂 MIX&GO 制备 *E. coli* O157 免疫磁珠,并进行广谱性以及特异性检测;针对 6 种试剂牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、酪蛋白(Casein)、海藻糖(Trehalose)、聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)、抗坏血酸(Vitamin C)和防腐剂 ProClin 300,利用正交试验  $L_{18}(3^7)$  优化免疫磁珠保存液组分;采用 IMBS-LAMP、IMBS-PCR、IMBS-生化、菌液-LAMP、菌液-PCR、显色平板-生化鉴定 6 种方式对 20 份生猪肉样品进行检测。【结果】利用 MIX&GO 活化剂制备的免疫磁珠捕获率最高达到  $81.5\% \pm 1.3\%$ ;免疫磁珠保存液最优配方为:牛血清白蛋白 15.0 g/L,酪蛋白 10.0 g/L,海藻糖 10.0 g/L, PVP 2.0 g/L,抗坏血酸 5.0 g/L, ProClin 300 2.5 g/L,保存 6 个月后免疫磁珠捕获率为 75.5%;在 20 份生猪肉样品的检测中,自制磁珠和商品化磁珠与 LAMP 联用均检出 9 例阳性样品;IMBS-LAMP 在 6 种检测方式中具有最高的检测灵敏度,但检出的样品会因磁珠抗体的差异而有所不同。【结论】与商品化磁珠相比,实验制备的免疫磁珠具有良好的特异性和广谱性,免疫磁珠-LAMP 联用提高了目标菌的检出率,是一种高灵敏度、具有应用前景的检测方法。

**关键词:** 大肠杆菌 O157:H7, 免疫磁珠, 环介导恒温扩增, 快速检测

**Foundation items:** Guangzhou Key Science and Technology Special Project (201604016068); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030310090)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

**Received:** 24-01-2019; **Accepted:** 10-06-2019; **Published online:** 10-07-2019

**基金项目:** 广州市产学研协同创新重大专项(201604016068); 广东省自然科学基金(2017A030310090)

**\*通信作者:** Tel: 020-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

**收稿日期:** 2019-01-24; **接受日期:** 2019-06-10; **网络首发日期:** 2019-07-10

## Preparation, preservation and application of immunomagnetic beads for detecting *Escherichia coli* O157:H7

QU Xiao-Ying<sup>1,2,3,4</sup> WU Qing-Ping<sup>\*4</sup> XIONG Zheng<sup>3</sup> CAI Zhi-He<sup>3,5</sup> LU Mian-Fei<sup>3,5</sup>  
WAN Qiang<sup>1,2,3</sup> ZHOU Yang<sup>3,5</sup>

1 South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China

2 Guangdong Edible Mushroom Technology Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China

3 Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China

4 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China

5 Guangdong Huankai Biological Science and Technology Co. Ltd., Zhaoqing, Guangdong 526238, China

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* O157:H7 is the main serotype of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* causing outbreak of foodborne disease. [Objective] Our goal is to prepare immunomagnetic beads (IMBS) which are high efficient, stable and broad-spectrum, and also to improve the detection rate of target bacteria from food samples by combining immunomagnetic separation and molecular detection technology like loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR, etc. [Methods] We used MIX&GO as activating agent of carboxyl magnetic beads, and successfully prepared immunomagnetic beads coupled with commercial polyclonal antibody. Subsequently, its universality and specificity were evaluated. The preservation solution of immunomagnetic beads consisting of bovine serum albumin, casein, trehalose, polyvinyl pyrrolidone (PVP), ascorbic acid and ProClin300, has been optimized by orthogonal experimental design  $L_{18}(3^7)$ . Six detecting methods including IMBS-LAMP, IMBS-PCR, IMBS-biochemistry, LAMP, PCR and biochemistry respectively without IMBS were adopted to detect *E. coli* O157:H7 in 20 ground raw pork meat samples. [Results] The capture efficiency of prepared immunomagnetic beads is  $81.5\% \pm 1.3\%$  when applied in the sample matrix of PBS solution, but decreasing in complex food matrix. The optimal formula for the preservation solution of the immunomagnetic beads is bovine serum albumin 15.0 g/L, casein 10.0 g/L, trehalose 10.0 g/L, PVP 2.0 g/L, ascorbic acid 5.0 g/L, and ProClin300 2.5 g/L. The results showed that the most sensitive method was the combination of IMBS and LAMP; 9 positive samples were respectively detected by self-prepared IMBS-LAMP and commercial IMBS-LAMP. But there was an inconsistency in two groups of positive samples because of different antibody sources of self-prepared and commercial IMBS. [Conclusion] Compared to commercial immunomagnetic beads, the prepared beads have good specificity and broader spectrum of *E. coli* O157 strains. Our study also showed that the IMBS-LAMP scheme could effectively enhanced detection rate of target bacteria. The IMBS-LAMP technique could be considered a high sensitive detection method of application prospect.

**Keywords:** *Escherichia coli* O157:H7, Immunomagnetic beads, LAMP, Rapid detection

肠出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 是导致肠出血性大肠杆菌食源性疾病暴发的主要血清型, 会引发腹泻、出血性结肠炎 (Hemorrhagic colitis, HC)、溶血性尿毒综合征 (Hemolytic uremic syndrome, HUS) 及血栓性血小板减少性紫癜 (Thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) 等疾病, 严重者可导致死亡<sup>[1]</sup>。10–100 个 *E. coli* O157:H7 活菌就可以引起人体的感染<sup>[2]</sup>。当前主流的检测方法主要依靠

前增菌、生化 (如山梨醇发酵、葡萄糖醛酸酶活性) 和血清检测 (O157 血清、H7 血清), 整个操作周期长且工作量大。

应用分子学检测技术已测序完成 *E. coli* O157:H7 的基因组<sup>[3]</sup>, 与血清型和毒力相关的基因序列及基因组定位在目前确认清楚的前提下, 分子学检测技术逐渐应用到微生物检测领域里来。目前分子学检测方法包括聚合酶链式反应 PCR、荧光 PCR、环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal

amplification, LAMP)等技术, 其中荧光 PCR、LAMP 检测方法已经有商品化的产品出现。与传统生化鉴定方法相比, 分子学检测方法的优势是快速、检测限低、准确度高。LAMP 是 Notomi 等建立的一种新的核酸扩增方法<sup>[4]</sup>, 其特点是能在恒温条件下 1h 内特异、高效、快速地扩增出  $10^9$  靶序列拷贝的 DNA, 比 PCR 具有更高的灵敏度<sup>[5]</sup>。与荧光 PCR 相比, LAMP 结果的判读可以直接通过观察颜色的变化而无需依赖特殊的仪器, 降低了费用, 减少了操作流程。

但分子学检测方法应用的前提是获得不含基因片段扩增抑制物的高质量 DNA 模板。PCR 抑制物种类较多, 包括有机物或者无机物如钙离子, 然而大部分已知的抑制物主要是有机化合物, 例如胆汁盐、尿素、苯酚、乙醇、多糖、十二烷基硫酸钠(SDS)、腐殖酸、单宁酸、黑色素, 以及不同的蛋白质, 如胶原蛋白、肌红蛋白、血红蛋白、乳铁蛋白、免疫球蛋白(IgG)和蛋白酶<sup>[6]</sup>。PCR 抑制物存在于广泛的检测样本中, 如生物材料(器官、血液等)、环境样本(水、土壤、空气等)和食品样本(肉、奶、水果、蔬菜等)。

通常情况下, 实际样本中背景菌的含量远高于目标菌的含量, 加之食品基质多样且复杂, 对目标菌的分离带来了很大的难度。目前用于食品样本中目标菌分离和富集的方法包括过滤和免疫吸附技术。过滤的方法最大的应用限制是滤膜会被样本基质中的颗粒堵塞, 过滤的样本量有限且样本也会损失, 从而无法准确定量。免疫吸附技术如免疫磁珠是从复杂的基质如食品、临床、环境样本中分离并富集到目标菌的行之有效的办法<sup>[7-9]</sup>。免疫磁珠(Immunomagnetic beads, IMBS)是对具有超顺磁性的微粒表面进行化学修饰, 使之与特异性抗体牢固结合, 成为能捕获特异性抗原的磁珠。将免疫磁珠与待测溶液混合, 若有相应抗原存在, 免疫磁珠就会将其捕获, 形成抗原-免疫磁珠复合物, 并在适当的磁场条件下分离出来, 达到富集目标抗原的目的。在食源性致病微生物的

检测过程中, 利用免疫磁珠分离技术作为样品处理方法, 从复杂的食品基质中分离和富集到一定量的目标菌, 可以极大地降低食品基质对 PCR、LAMP、荧光 PCR、多重 PCR 等分子学检测技术的影响。MIX&GO 活化剂是一种聚合物, 可以模拟蛋白 A/G 的结合区域利用配体结合抗体的 Fc 端; 同时, 对供电子基团如-COOH 也有很强的结合力<sup>[10-11]</sup>。单克隆抗体比多克隆抗体具有更高的稳定性和特异性, 也可被用作捕获抗体<sup>[12-14]</sup>, 但多克隆抗体的亲和力更高。本研究采用新型的磁珠活化剂 MIX&GO 偶联商品化多克隆抗体制备 *E. coli* O157 免疫磁珠, 与商品化免疫磁珠进行了性能比较; 分别利用免疫磁珠-LAMP (IMBS-LAMP)、免疫磁珠-PCR (IMBS-PCR)技术对实际样品进行了验证, 还对免疫磁珠的保存液进行了优化, 力求提高免疫磁珠在 4 °C 保存过程中能够有较好的稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

实验中所用到的菌种如表 1 所示, 均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

表 1 实验所用菌株

Table 1 The strains used in the experiment

编号 No.	菌株 Strains	来源 Sources
1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NCTC 12900
2	<i>Escherichia coli</i>	CMCC 44102
3	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
4	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
5	<i>Listeria monocytogene</i>	ATCC 19115
6	<i>Shigella flexneri</i>	CMCC 51572
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26003
9	<i>Staphylococcus sonnei</i>	CMCC 51592
10	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMCC 10104
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
13	<i>Salmonella enteritidis</i>	CMCC 50335
14	<i>Salmonella typhi</i>	CMCC 50071
15	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
16	<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544
17	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864

## 1.2 主要试剂和仪器

大肠杆菌 *E. coli* O157 多克隆抗体, SeraCare 公司; 羧基磁珠(粒径 700 nm), 惠尔纳米科技有限公司; 4-Morpholineethanesulfonic acid monohydrate (MES), Sigma 公司; 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 [N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidehydrochloride, EDC]和 N-羟基琥珀酰亚胺 (Nhydroxysulfosuccinimide sodium salt, NHS), 赛默飞世尔科技有限公司; MIX&GO Sub-Micron, Anteo Diagnostics 公司; 大肠杆菌 O157:H7 LAMP 快速检测试剂盒, 广东环凯微生物科技有限公司。

恒温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司; 稳压稳流电泳仪, 北京市六一仪器厂; 磁力架, 百迈格生物科技有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 大肠杆菌 O157 免疫磁珠的制备

采用 MIX&GO 活化剂进行免疫磁珠的制备, 过程如下: 取 1 mg 羧基磁珠加 100  $\mu$ L 超纯水洗涤 3 遍, 重悬于 100  $\mu$ L 超纯水中; 磁珠悬液缓慢加入 100  $\mu$ L MIX&GO 活化剂中, 涡旋 10 s, 超声 5 min, 置于混匀仪上室温活化 1 h; 取 300  $\mu$ L 多克隆抗体(0.5 mg/mL)进行超滤, 除去 PBS、叠氮化钠等试剂; 将磁珠用 MES 溶液(25 mmol/L, pH 6.0)洗涤 2 遍, 重悬于 100  $\mu$ L MES 溶液中, 缓慢加入抗体中, 最后用 MES 补充到 500  $\mu$ L; 放在混匀仪上偶联 1 h; 用 TBST 洗涤磁珠 2 遍, 重悬于 500  $\mu$ L TBST 溶液中 4  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.3.2 免疫磁珠捕获率的测定

无菌生理盐水稀释菌液至  $10^3$  CFU/mL 并用螺旋接种仪计数, 之后取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中, 加入 20  $\mu$ L 免疫磁珠, 室温下旋转混合吸附 10 min, 放在磁力架上进行磁力分离 3 min, 移去残液并将其进行 TSA 平板涂布计数, 避免吸到磁珠, 用 PBST 洗液洗涤 3 次, 最后加入 100  $\mu$ L PBST 溶液重悬磁珠, 把全部磁珠悬液均匀涂在 TSA 平板上, 放在 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h, 平板进行菌落

计数, 按照公式(1)计算捕获率(Capture efficiency,

$$CE): CE = \frac{N_1}{N_1 + N_2} \times 100\% \quad (1)$$

其中,  $N_1$  表示磁珠吸附到的菌落数;  $N_2$  表示残液中的菌落计数。

### 1.3.3 免疫磁珠特异性及广谱性检测

分别对表 1 中的 17 株常见食源性致病菌株测定捕获率, 进行免疫磁珠特异性比较; 将检测到的非特异性吸附菌与目标菌按照 1:1 混合, 做干扰吸附实验, 检测其对目标菌的磁珠吸附有无影响; 分别对广东环凯微生物科技有限公司菌种资源库保存的 68 株 *E. coli* O157 分离株(全国范围内采样分离得到的菌株)进行捕获率的测试; 以商品化免疫磁珠进行以上实验, 作为对照。

### 1.3.4 不同样品基质对捕获率的影响

将搅碎的猪肉沫灭菌之后与改良 EC 增菌液按照 1:10 比例混合并均质, 用 NCTC 12900 作为目标菌对样本进行  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$  CFU/mL 三个水平的污染; 其他 3 种基质, PBS、改良 EC 增菌液、无菌纯牛奶与改良 EC 增菌液 1:10 混合液做相同水平的人工污染; 对以上样品分别取 1 mL 进行捕获率的比较, 同时以偶联 BSA 的磁珠作为对照。

### 1.3.5 免疫磁珠保存液组分优化及保质期测试

在前期实验中筛选到了有利于免疫磁珠稳定性的影响因素, 其中包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白(Casein)、海藻糖(Trehalose)、聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)、抗坏血酸(Vitamin C)和防腐剂 ProClin 300。按照  $L_{18}(3^7)$  正交试验设计方案以及表 2 中所列出的影响因素水平, 用 0.1 mol/L

表 2 正交试验影响因素及水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	BSA (g/L) (A)	Casein (g/L) (B)	Trehalose (g/L) (C)	PVP (g/L) (D)	Vitamin C(g/L) (E)	ProClin 300 (g/L) (F)	Blank
1	5	5	10	1	3	0.5	0
2	10	10	20	2	5	1.5	0
3	15	15	30	3	7	2.5	0

PBS (pH 7.4) 缓冲液配制免疫磁珠保存液, 保存液优化指标为 37 °C 保存条件下 15 d 后的免疫磁珠捕获率, 之后对筛选到的最优配方进行实际保存效果验证。

### 1.3.6 LAMP 与 PCR 检测

DNA 的提取: 将上述 100  $\mu$ L 磁珠富集液放在磁力架中静置 3–4 min, 移除废液, 加入 30  $\mu$ L 裂解液并将混合物转移到 PCR 管中, 在振荡器上将样品分散均匀后放于 PCR 仪上 99 °C 热裂解 10 min, 取出 PCR 管 12 000 r/min 离心 10 min, 管中上清液即为 DNA 提取物。

LAMP 检测按照试剂盒的操作说明书进行, 在冻干的 LAMP 试剂中分别加入 20  $\mu$ L 复溶液, 待冻干的试剂完全溶解后, 依次加入 2.5  $\mu$ L 样品 DNA 粗提物、2.5  $\mu$ L 显色液; 混匀后放在 PCR 仪上 65 °C 恒温反应 50 min, 反应结束后以颜色是否变为绿色来判断样品是否为阳性。

PCR 选择用 *E. coli* O157:H7 特异性基因 *rfbE* 设计引物, 上游引物序列为 5'-FACCAGTTTACCAACCGTCA-3', 下游引物序列为 5'-GGGTGGCTCC TGTGTATTT-3', 目的片段长度为 277 bp。PCR 反应体系: DNA 模板(10 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, *Taq* 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 35.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 25 s, 72 °C 10 min, 30 个循环。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

### 1.3.7 生猪肉样品中 *E. coli* O157:H7 的检测

在农贸市场采集 20 份生猪肉样品并编号, 按照国标 GB/T4789.36-2016<sup>[15]</sup>规定, 各取 25 g 加入改良 EC 增菌液中 37 °C 增菌 18 h, 分别取 1 mL 增菌液于 1.5 mL 离心管中, 经本实验室制备磁珠(B)富集后, 分别采用 LAMP、PCR 以及国标生化鉴定方法进行 *E. coli* O157:H7 的检测; 另取 1 mL 增菌液, 不经磁珠富集直接采用以上 3 种方法进行鉴定, 比较 6 种方式的阳性检出率; 以商品化免疫磁珠(A)作为对照。

### 1.3.8 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件做单因素方差分析 (One-way ANOVA), 比较组间均值差异的显著性,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 自制磁珠的捕获率及其特异性

使用 MIX&GO 活化剂、O157 多克隆抗体制备的免疫磁珠对菌株 NCTC 12900 的捕获率为 81.5% $\pm$ 1.3% (图 1), 而商品化的免疫磁珠的捕获率仅为 52.5% $\pm$ 1.1%; 本实验室制备的免疫磁珠对 *P. aeruginosa* CMCC 10104、ATCC 27853 都有极高的吸附率; 商品化的免疫磁珠对 *S. aureus* ATCC 6538、CMCC 26003 具有极高的捕获率。但通过干扰实验结果可知, *P. aeruginosa* CMCC 10104、ATCC 27853 这两株菌并未影响免疫磁珠对目标菌 NCTC 12900 的捕获效果。这一结果也表明以此多克隆抗体制备的免疫磁珠特异性良好。免疫磁珠的捕获率主要取决于抗体对 *E. coli* O157:H7 的高亲和力, 以及对其他菌株的低交叉反应。

### 2.2 免疫磁珠的广谱性

为进一步评价本实验制备的免疫磁珠的有效性和适用性, 检测了其对 66 株大肠杆菌 *E. coli* O157 的吸附性能。由图 2 可知, 对于自制免疫磁珠, 捕获率在 40%–50% 之间的菌株数是 14 个, 在 10 个区间中为数最多, 捕获率高于 40% 的共有 31 株。而商品化的磁珠, 捕获率在 10%–20%、20%–30% 两个区间的菌株数最多, 都是 17 株, 并且捕获率高于 40% 的菌株总数仅 6 株。通过比较可以看出, 本实验室制备的免疫磁珠具有更好的性能。

### 2.3 不同食品基质下免疫磁珠的灵敏度

本实验选取了 4 种常见基质: PBS 溶液、改良 EC 增菌液、无菌纯牛奶与改良 EC 增菌液 1:10 混合液、无菌猪肉沫与改良 EC 增菌液 1:10 混合液, 比较了免疫磁珠在 4 种不同基质, 3 个菌浓度 10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup> CFU/mL 下对 *E. coli* O157:H7 的捕获率。如图 3 所示, 与 PBS 溶液相比, 改良 EC 增菌液并未对免疫磁珠的捕获率造成明显影响( $P > 0.05$ ); 而

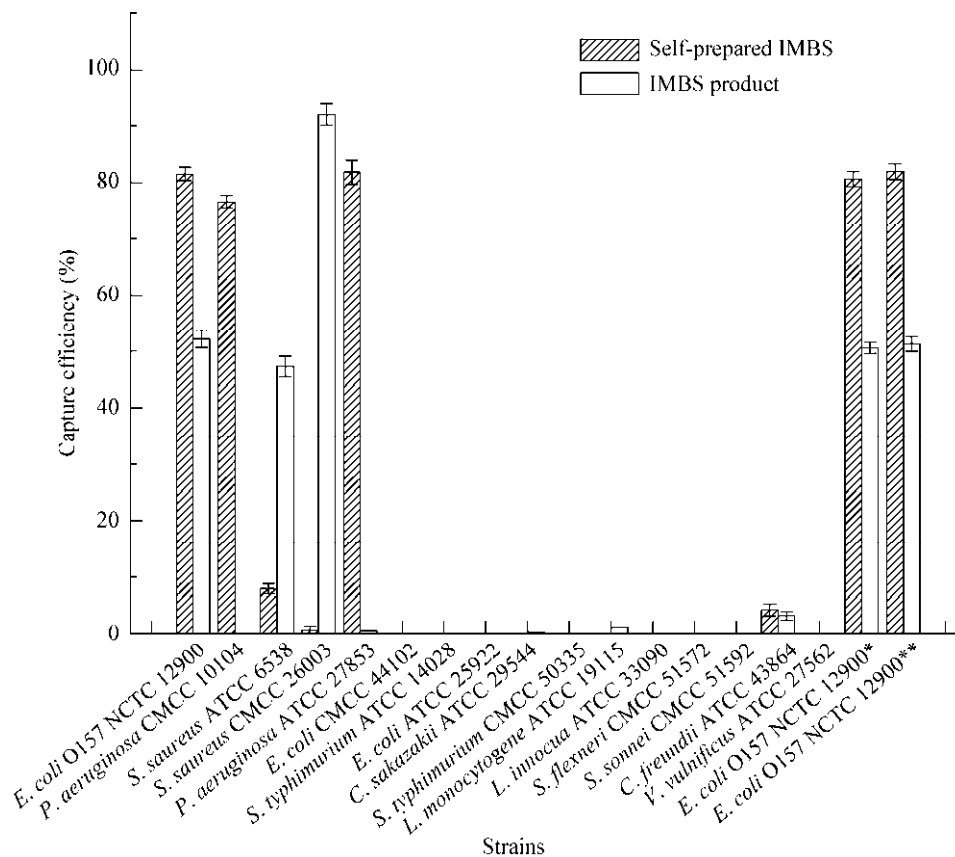


图1 免疫磁珠特异性检测及干扰实验结果

Figure 1 Results of IMBS specificity and interference experiment

注: *E. coli* O157 NCTC 12900\*: NCTC 12900 与 CMCC 10104 按 1:1 的混合菌液; *E. coli* O157 NCTC 12900\*\*: NCTC 12900 与 ATCC 27853 按 1:1 的混合菌液。

Note: *E. coli* O157 NCTC 12900\*: Mixture of NCTC 12900 and CMCC 10104 by 1:1; *E. coli* O157 NCTC 12900\*\*: Mixture of NCTC 12900 and ATCC 27853 by 1:1.

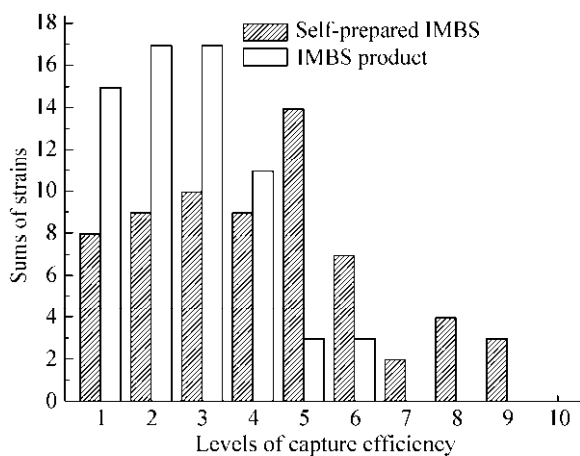


图2 免疫磁珠广谱性评价

Figure 2 Evaluation of IMBS universality

牛奶、猪肉与增菌液的混合基质明显降低了免疫磁珠的捕获率( $P < 0.05$ ), 猪肉对捕获率的影响则更大。PBS 菌液样品  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$  CFU/mL, 捕获率分别为  $83.7\% \pm 1.2\%$ 、 $85.6\% \pm 2.0\%$ 、 $81.5\% \pm 1.3\%$ ; 牛奶混合基质的捕获率分别为  $65.3\% \pm 2.1\%$ 、 $63.3\% \pm 1.6\%$ 、 $70.1\% \pm 1.7\%$ , 猪肉混合基质的捕获率分别为  $57.6\% \pm 2.3\%$ 、 $59.7\% \pm 1.5\%$ 、 $55.6\% \pm 2.2\%$ 。

## 2.4 保存液优化结果及验证

如表 3 所示, 6 种因素对免疫磁珠稳定性的影响程度依次为: 牛血清白蛋白>抗坏血酸>防腐剂 ProClin 300>酪蛋白>PVP>海藻糖, 最优配方为  $A_3B_2C_1D_2E_2F_3$ 。根据表 4 可知, 牛血清白蛋白、抗

坏血酸以及 ProClin300 对免疫磁珠的稳定性具有极显著的影响( $P < 0.01$ ), 酪蛋白与 PVP 为显著性影响因素( $P < 0.05$ )。将最优配方  $A_3B_2C_1D_2E_2F_3$  保存液 (Formula 2) 与正交试验中捕获率最高的保存液  $A_3B_2C_3D_2E_1F_3$  (Formula 1) 进行实际保存效果验证, 结果表明两种保存液在半年内均具有较好的保存效果, 其中 Formula 2 (牛血清白蛋白 15.0 g/L, 酪蛋白 10.0 g/L, 海藻糖 10.0 g/L, PVP 2.0 g/L, 抗坏血酸 5.0 g/L, ProClin300 2.5 g/L) 的保存效果最佳, 保存 6 个月 后免疫磁珠捕获率为 75.5%, 仅降低了 7.4% (图 4)。

### 2.5 生猪肉样品中 *E. coli* O157:H7 的检测结果

采用 6 种方式对 20 份实际样品中的 *E. coli* O157:H7 进行了检测, 同时也与商品化磁珠进行了对比。结果如表 5 所示, 自制磁珠和商品化磁珠 IMBS-LAMP 检测方法均检测出 9 例阳性样品, 其中共同检出的阳性样本有 6 例; IMBS-PCR 检测方

表 3 正交试验及结果分析

Table 3 Results analysis of the orthogonal experiment

No.	影响因素 Factors							捕获率 Capture efficiency (%)
	BSA (A)	Casein (B)	Trehalose (C)	PVP (D)	Vitamin C (E)	ProClin 300 (F)	Blank	
1	1	1	1	1	1	1	1	60.5
2	1	2	2	2	2	2	2	73.8
3	1	3	3	3	3	3	3	72.2
4	2	1	1	2	2	3	3	73.3
5	2	2	2	3	3	1	1	70.5
6	2	3	3	1	1	2	2	67.3
7	3	1	2	1	3	2	3	80.4
8	3	2	3	2	1	3	1	81.0
9	3	3	1	3	2	1	2	80.6
10	1	1	3	3	2	2	1	76.0
11	1	2	1	1	3	3	2	78.5
12	1	3	2	2	1	1	3	70.6
13	2	1	2	3	1	3	2	68.6
14	2	2	3	1	2	1	3	70.8
15	2	3	1	2	3	2	1	74.8
16	3	1	3	2	3	1	2	76.4
17	3	2	1	3	1	2	3	78.2
18	3	3	2	1	2	3	1	80.7
$k_1$	72.0	72.5	74.3	73.0	71.0	71.6	73.9	
$k_2$	70.9	75.5	74.1	75.0	75.9	75.0	74.2	
$k_3$	79.6	74.4	74.0	74.4	75.5	75.7	74.3	
$R$	8.7	2.9	0.4	2.0	4.8	4.2	0.3	
因素主次 Factor order	A>E>F>B>D>C							
最优条件 Optimal conditions	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>		

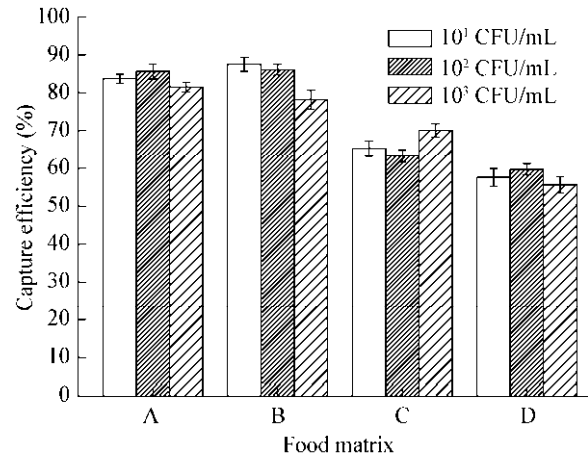


图 3 不同食品基质中免疫磁珠的灵敏度比较

Figure 3 Comparison of IMBS sensitivity in different food matrices

注: A: PBS 溶液; B: 改良 EC 增菌液; C: 无菌纯牛奶与改良 EC 增菌液 1:10 混合液; D: 无菌猪肉沫与改良 EC 增菌液 1:10 混合液。

Note: A: PBS solution; B: Modified EC solution; C: Mixture of milk and modified EC solution by 1:10; D: Mixture of sterile pork meat and modified EC solution by 1:10.

表 4 正交试验方差分析表

Table 4 Variance analysis of the orthogonal experiment

方差来源 Sources of variance	离差平方和 Sum of deviation square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
A	268.5	2	134.25	691.9	<0.01	**
B	26.4	2	13.20	67.9	<0.05	*
C	0.4	2	0.20	1.1	>0.1	
D	11.9	2	5.95	30.6	<0.05	*
E	86.4	2	43.20	222.6	<0.01	**
F	60.0	2	30.00	154.6	<0.01	**
Error	0.4	2				
Sum	454	14				

注: \*: 显著; \*\*: 极显著.

Note: \*: Significant; \*\*: Highly significant.

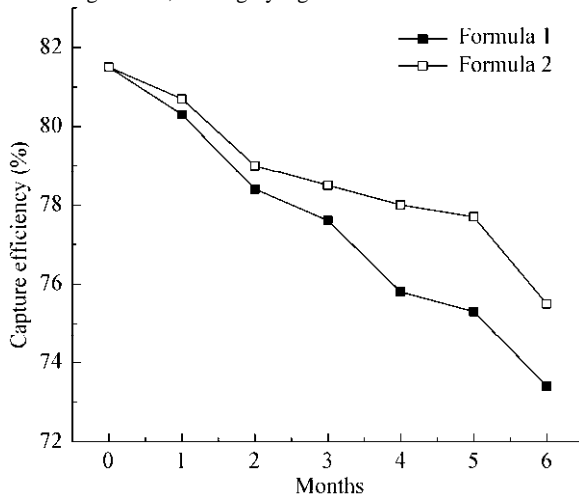


图 4 免疫磁珠保存稳定性实验结果

Figure 4 Results of IMBS stability during storage

法分别检出 6 例(图 5B)和 4 例阳性样本(图 5A), 其中共同检出的有 1 例阳性样本; IMBS-生化检测方法没有阳性检出; 不经磁珠富集样品只有 LAMP 方法检测到 1 例阳性样本。由此可以看出, IMBS-LAMP 方法具有更高的灵敏度。在广谱性检测中已经验证了自制磁珠和商品化磁珠对不同 *E. coli* O157 分离菌株的不同吸附能力, 在实际样品的检测中两种磁珠联合 LAMP、PCR 检测结果的差异也同样表明了捕获能力具有差异性。

### 3 讨论与结论

本研究利用了新型的磁珠活化剂 MIX&GO, 偶联商品化多克隆抗体, 成功制备了 *E. coli* O157

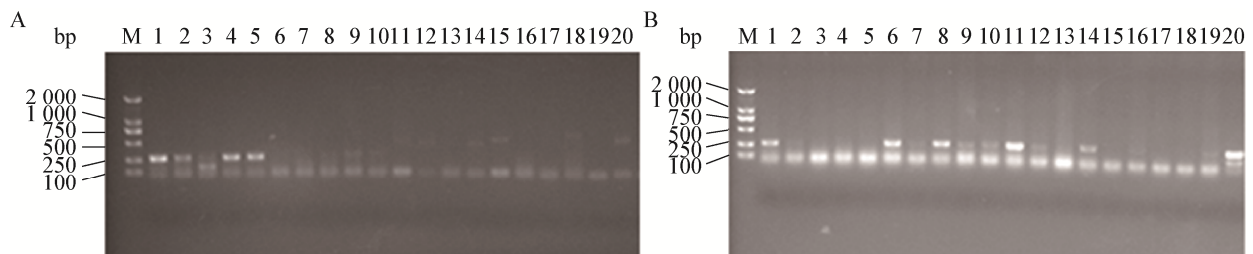
表 5 不同鉴定方法的检出率比较

Table 5 Comparison of detection results by different methods

Groups	IMBS-LAMP	IMBS-PCR	IMBS-biochemistry	LAMP	PCR	Biochemistry
A	1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 20	1, 2, 4, 5	0	11	0	0
B	1, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 20	1, 6, 8, 11, 14, 20	0	11	0	0

注: A: 商品化磁珠; B: 自制免疫磁珠.

Note: A: IMBS product; B: IMBS prepared in our lab.

图 5 生猪肉样品中 *E. coli* O157:H7 的 IMBS-PCR 鉴定结果Figure 5 Detection of *E. coli* O157:H7 in raw pork meat samples by IMBS-PCR method

注: A: 商品化磁珠; B: 自制免疫磁珠.

Note: A: IMBS product; B: IMBS prepared in our lab.



免疫磁珠, 捕获率达到  $81.5\% \pm 1.3\%$ 。抗体的亲和力对捕获率有重要的影响, 有研究者利用高亲和力单克隆抗体制备了 *E. coli* O157 免疫磁珠, 捕获率可以达到  $98\%$ <sup>[16]</sup>。虽然已经有很多文献报道过免疫磁珠的制备以及应用<sup>[17-19]</sup>, 但极少有研究关注免疫磁珠的保存效果对实际应用的影响, 本文对免疫磁珠保存液进行了优化, 保存 6 个月后免疫磁珠捕获率为  $75.5\%$ , 仅降低了  $7.4\%$ , 满足了免疫磁珠在实际检测工作中的稳定性要求。

灵敏度是免疫磁珠性能评价的重要指标, 食品基质的复杂多样是影响免疫磁珠灵敏度的重要因素<sup>[20]</sup>。有研究表明牛肉样品中脂肪、细胞组织和其他有机成分的存在严重影响了免疫磁珠对 *E. coli* O157:H7 的捕获率<sup>[21]</sup>。通过比较免疫磁珠在 4 种常见反应基质中的灵敏度, 证明了复杂的食品基质如猪肉样品会对磁珠的灵敏度造成干扰, 在实际应用中免疫磁珠的用量要根据不同的样本进行优化选择。不同来源的抗体可能因选用的抗原不同、制备工艺的水平差异造成最终生产出的抗体质量优劣不等, 使其对同一个菌株表现出不同的吸附能力, 这一点直接影响了免疫磁珠的性能。有些加工食品中的 *E. coli* O157 可能会受到食品加工过程、食品储存环境的影响而活力变弱或者菌体受到损伤, 出现生长延迟、增菌后菌含量仍旧过低<sup>[22-23]</sup>、菌体表面蛋白受损等情况<sup>[23]</sup>, 进而影响了免疫磁珠的捕获效果。不同菌株的菌体表面差异性也可能造成抗体与之结合能力的强弱差异。文献中大多都对免疫磁珠的特异性进行了评价, 而忽略了免疫磁珠的广谱性这一指标。在本文中, 对实验制备的免疫磁珠在特异性和广谱性两个方面都进行了评价, 并与商品化磁珠的性能进行了比较; 自制免疫磁珠与商品化免疫磁珠因抗体的差异而对 66 株 *E. coli* O157 分离株具有不同的吸附能力, 本实验室制备的免疫磁珠广谱性较好。

商品化磁珠同时采用 IMBS-LAMP、IMBS-PCR、

IMBS-生化、LAMP、PCR、生化鉴定 6 种方式对 20 份生猪肉样品进行检测, 自制磁珠与商品化磁珠与 LAMP 联用均检出 9 例阳性样品, IMBS-LAMP 在 6 种检测方式中具有最高的检测灵敏度, 有研究指出 IMBS-LAMP 的检测牛肉样品中 *E. coli* O157 的灵敏度低至  $30 \text{ CFU/mL}$ , 是常规 PCR 的 10 倍<sup>[24]</sup>。免疫磁珠富集之后, 对 *E. coli* O157:H7 的特异性基因进行扩增可以极大地提高检测的特异性和灵敏度<sup>[25]</sup>。也有文献表明, 磁珠分离之后进行增菌可以进一步提高检测的灵敏度<sup>[26]</sup>。与传统检测方法相比, 分子学技术如 LAMP、PCR 具有更高的灵敏度, 但容易受到食品基质的影响; 免疫磁珠分离技术与其联合使用能够有效地排除食品基质的影响, 提高目标菌的检出率, 尤其是免疫磁珠-LAMP 联用灵敏度更高, 是一种具有应用前景的检测方法。

## REFERENCES

- [1] Zhu PX, Shelton DR, Li SH, et al. Detection of *E. coli* O157:H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 30: 337-341
- [2] Phillips CA. The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(11): 1367-1381
- [3] Perna NT, Plunkett III G, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Nature*, 2001, 409(6819): 529-533
- [4] Zhang J, Xia SL, Ma H. The epidemiological investigation on infection cases of Shiga's toxin-producing *E. coli* O157:H7 in eastern Henan, China[J]. *Strait Journal of Preventive Medicine*, 2003, 9(5): 26-28 (in Chinese)  
张锦, 夏胜利, 马宏. 河南豫东地区产志贺毒素 *E. coli* O157:H7 感染病例的流行病学调查研究[J]. *海峡预防医学杂志*, 2003, 9(5): 26-28
- [5] Zhou Y, Wan Q, Cai ZH, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification based kits for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(8): 1996-2004 (in Chinese)  
周杨, 万强, 蔡芷荷, 等. 基于环介导恒温扩增技术的大肠杆菌 O157:H7 快速检测试剂盒的评价[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1996-2004
- [6] Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113: 1014-1026
- [7] Pyle BH, Broadaway SC, McFeters GA. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry[J].

- Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(5): 1966-1972
- [8] Ochoa ML, Harrington PB. Immunomagnetic isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and database searches[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(16): 5258-5267
- [9] Omisakin F, MacRae M, OGDEN ID, et al. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2444-2447
- [10] Sánchez-Tirado E, Martínez-García G, González-Cortés A, et al. Electrochemical immunosensor for sensitive determination of transforming growth factor (TGF) -  $\beta$ 1 in urine[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 88: 9-14
- [11] Ojeda I, Barrejón M, Arellano LM, et al. Grafted-double walled carbon nanotubes as electrochemical platforms for immobilization of antibodies using a metallic-complex chelating polymer: application to the determination of adiponectin cytokine in serum[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 74: 24-29
- [12] Jadeja R, Janes ME, Simonson JG. Immunomagnetic separation of *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(7): 1288-1293
- [13] Shields MJ, Hahn KR, Janzen TW, et al. Immunomagnetic capture of *Bacillus anthracis* spores from food[J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(7): 1243-1248
- [14] Shim WB, Choi JG, Kim JY, et al. Enhanced rapidity for qualitative detection of *Listeria monocytogenes* using an enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatography strip test combined with immunomagnetic bead separation[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(4): 781-789
- [15] National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. National food safety standard Food microbiological examination: *Escherichia coli* O157:H7/NM[S]. Beijing: China Standards Press, 2017 (in Chinese)  
国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [16] Xiong QR, Cui X, Saini JK, et al. Development of an immunomagnetic separation method for efficient enrichment of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Control, 2014, 37: 41-45
- [17] Zhang Y, Yan CH, Yang H, et al. Rapid and selective detection of *E. coli* O157:H7 combining phagomagnetic separation with enzymatic colorimetry[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 332-338
- [18] Lim MC, Lee GH, Huynh DTN, et al. Biological preparation of highly effective immunomagnetic beads for the separation, concentration, and detection of pathogenic bacteria in milk[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 145: 854-861
- [19] Luciani M, di Febo T, Zilli K, et al. Rapid detection and isolation of *Escherichia coli* O104:H4 from milk using monoclonal antibody-coated magnetic beads[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 942
- [20] Fu Z, Rogelj S, Kieft TL. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(1): 47-57
- [21] Varshney M, Yang LJ, Su XL, et al. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(9): 1804-1811
- [22] Hosotani Y, Noviyanti F, Koseki S, et al. Growth delay analysis of high-salt injured *Escherichia coli* O157:H7 in fermented soybean paste by real-time PCR and comparison of this method with other estimation methods[J]. LWT, 2018, 96: 426-431
- [23] Kawasaki S, Hosotani Y, Noviyanti F, et al. Growth delay analysis of heat-injured *Salmonella* Enteritidis in ground beef by real-time PCR[J]. LWT, 2018, 90: 499-504
- [24] Qin Y, Puthiyakunnon S, Zhang YD, et al. Rapid and specific detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2018, 68(2): 115-123
- [25] Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic CS, et al. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(3): 516-519
- [26] Hepburn NF, MacRae M, Johnston M, et al. Optimizing enrichment conditions for the isolation of *Escherichia coli* O157 in soils by immunomagnetic separation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 34(5): 365-369