

大肠杆菌 O157:H7 量子点免疫层析试纸条的研制

Study on quantum dot immune chromatography test strip for *Escherichia coli* O157:H7

袁列江¹ 李萌立² 王书源² 杨梦昕² 李忠海²

YUAN Lie-jiang¹ LI Meng-li² WANG Shu-yuan² YANG Meng-xin² LI Zhong-hai²

(1. 湖南产商品质量监督检验检疫局, 湖南 长沙 410007;

2. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004)

(1. Institute of Product Quality Supervision and Inspection of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China;

2. School of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:研制一种大肠杆菌 O157:H7 量子点免疫层析试纸。利用自制水溶性量子点静电偶联大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体,将大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体和羊抗兔二抗划线于硝酸纤维素膜分别作为检测线和质控线,制备双抗体夹心法检测大肠杆菌 O157:H7 的量子点免疫层析试纸。该试纸条能在 5 min 内完成检测,检测限制为 1×10^4 CFU/mL,对常见的 8 种食源菌无交叉反应。基于量子点的大肠杆菌 O157:H7 免疫层析试纸操作简便,灵敏度和特异性较好,可用于食品快速检测。

关键词:大肠杆菌 O157:H7;量子点;免疫层析

Abstract: To develop a quantum dots (QDs) immune chromatographic strip test for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. Water soluble QDs was electrostatic coupled with mouse anti-*Escherichia coli* O157:H7 monoclonal antibody and mouse anti-*Escherichia coli* O157:H7 and rabbit anti-mouse IgG were marking on the NC membrane as test line and control line, respectively. The rapid detection of immune chromatographic strip test paper was based on double antibody sandwich. With the immune chromatographic strip test, only 5 min was needed for detection. The limit of detection was 1×10^4 CFU/mL. No cross-reactivity was found with 8 kinds of common food borne pathogens. The QDs immune chromatographic strip test offers a rapid and sensitive tool for the detection of *Escherichia coli* O157:H7

基金项目:国家科技支撑计划课题(编号:2012BAD29B05, 2012BAC01B07);质检公益性行业科研专项(编号:2013100128,201210035)

作者简介:袁列江(1973-),男,湖南产商品质量监督检验检疫局研究员,博士。E-mail:yuanliejiang@163.com

通讯作者:李忠海

收稿日期:2015-06-12

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7; quantum dots; immune chromatographic

在中国的食品中毒事件中,约一半由微生物引起,其中又以大肠杆菌引起的最多^[1-4]。大肠杆菌 O157:H7 型(*Escherichia coli* O157:H7)是一种肠道出血性大肠杆菌,是主要食源致病菌之一^[5]。大肠杆菌 O157:H7 的致病性极强,有文献^[6]报道仅需 100~200 个细菌即可对人体产生中毒反应。大肠杆菌 O157:H7 在全球频繁发生,传播范围广,致病性强,往往一爆发就会造成严重危害,因此引起了各国政府的普遍关注。2011 年肠出血性大肠杆菌菌株(EHEC)在欧洲的传播非常迅猛,有 13 个国家的 2 400 多人被感染,其中 23 人死亡^[7]。中国也爆发过多次,1999 年发生的大肠杆菌 O157:H7 中毒事件,对中国的经济造成了巨大损失^[8]。

传统的大肠杆菌检测方法为平板培养法,试验条件要求简单,但操作繁琐,检测周期较长。分子生物学方法灵敏度高,但在实际应用中受试验仪器的制约^[9-13]。免疫层析技术^[14]是近年发展的一种快速检测方法,其检测简单迅速,每个样品检测时间在 5 min,方便快捷、特异灵敏、稳定性强、不需要设备支撑,是一种优良快速检测技术。解泉源等^[15]以荧光微球为标记物建立了大肠杆菌 O157:H7 荧光微球免疫层析试纸条,不借助检测仪器条件下检测限可达 1.2×10^4 CFU/mL。王静等^[16]以胶体金做标记物,建立了大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法,检测能在 15 min 内完成,检测限为 1×10^5 CFU/mL。

量子点 (quantum dots, QDs) 是一种由 II~VI 族元素或 III~V 族元素组成,直径在 1~10 nm 的半导体荧光纳米粒子^[17,18]。量子点中电子的能量状态与原子相似,由于电子和空穴被量子限域,连续的能带结构变成具有分子特性的分立能级结构,所以量子点受激后可以发射荧光。量子点显示出

了优良的荧光特性,量子点荧光强度和稳定性好,分别是传统荧光染料的1 000倍和100倍,几乎不受环境的影响,抗光漂白性强,可以反复激发,有利于长时间的试验观察。蔡朝霞等^[19]利用化学偶联剂使得量子点表面基团与菌体之间的成功结合,建立了一种快速简便的大肠杆菌定量检测分析方法,但此法几乎没有特异性。王玉娇等^[20]利用量子点甘露糖与大肠杆菌表面含有的FimH凝集素的特有识别性质,通过配体交换合成甘露糖修饰的量子点,作为检测大肠杆菌的荧光探针,但此法针对大肠杆菌的特异性识别程度不如大肠杆菌抗原抗体反应。Wu等^[21]利用兔抗山羊抗体交联水溶性ZnS/CdSe量子点,合成了量子点荧光免疫探针,其方便性和特异性佳,应用广泛。在免疫层析技术中,相比于其他标记物,以量子点为标记物,由于其基于荧光显色,抗干扰性和检测灵敏度理论上都更强。结合量子点的优良荧光性质和抗原抗体反应的特异性,本研究拟应用双抗体夹心量子点免疫层析法检测大肠杆菌O157:H7,并评价该方法的灵敏度、特异性、和适用性。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

分析天平:FA1004B型,上海佑科仪器仪表有限公司;
磁力搅拌加热器:CJJ79-1型,金坛大地自动化仪器厂;
超纯水机:ZWL-LS1-10型,湖南中沃水务环保科技有限公司;

荧光分光光度计:F96pro型,上海棱光仪器有限公司;
结合垫G10194、层析膜Immunopore RP、PVC底板DB-4、吸水纸H5076:上海杰一生物科技有限公司;

Te粉、巯基乙酸、硼氢化钠、氯化镉:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

大肠杆菌ATCC8739、鼠抗E. coli0157单克隆抗体(LM-Mab-01)、兔抗鼠IgG抗体:上海慧耘生物科技公司;

沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、肉毒杆菌、金黄色葡萄球菌:均为本实验室保藏。

1.2 细菌培养

各种细菌采用LB固体培养基上划线培养24 h,挑选特征菌落接种与液体LB培养基培养24 h。以生理盐水梯度稀释进行菌落计数。

1.3 免疫层析试纸条的制备

1.3.1 量子点制备 采用巯基乙酸作为修饰剂制备水溶性量子点。称取31.9 mg Te粉和28.4 mg NaBH₄至预先通氮除氧的圆底烧瓶中,加5 mL除氧水,磁力搅拌至Te粉完全溶解,生成NaHTe溶液;称取114.2 mg的CdCl₂·2.5H₂O,加入250 mL去氧水溶解;用移液枪量取混合修饰剂93 μL,加入氯化铬溶液中,滴加NaOH调节pH至9,使白色絮状沉淀完全溶解;将溶液转移至三口烧瓶中,通氮气除氧,加入NaHTe溶液,100 °C下加热回流2 h,得量子点溶液。透析纯化后4 °C冷藏。

1.3.2 大肠杆菌O157:H7与量子点偶联最佳pH的确定

采用静电结合的方法偶联抗体蛋白和量子点(图1)。移液枪取20 μL纯化过的量子点,0.1 mol/L磷酸缓冲液分别调节pH至6.2,6.7,7.2,7.7,8.2。分别向其中加入20 μL

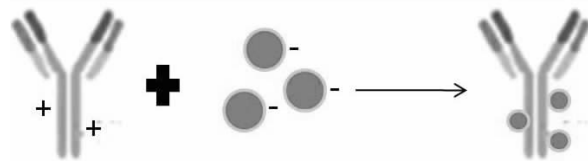


图1 抗体与量子点偶联原理图

Figure 1 Outline of antibody and quantum dot coupling

兔大肠杆菌抗体EC-MAB-01,在37 °C条件下,150 r/min震动反应2 h,后置于冰箱中4 °C过夜。为纯化反应量子点大肠杆菌抗体混合物,将混合物用40 000 r/min超速离心,去上清液,将沉淀用BSA溶液重悬,相同条件下离心两次,重悬得到大肠杆菌量子点荧光偶联物。采用免疫层析法确定偶联效果^[22]。

1.3.3 免疫层析试纸条组装 免疫层析试纸由样品垫、结合垫、层析膜、吸水纸和底板构成。样品垫和结合垫采用BSA溶液浸泡后洗涤干燥,以减少实际检测时的蛋白吸附。将免疫量子点加入结合垫中,干燥。层析膜检测带和质控带为鼠抗E. coli0157单克隆抗体(LM-Mab-01)划线。将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴于底板上,切成3 mm的试纸条,-20 °C低温保藏待用。

1.3.4 试纸条特异性的评价 将浓度在 1×10^7 CFU/mL的大肠杆菌、沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、肉毒杆菌、黄色葡萄球菌各取0.5 mL,以制备好的量子点荧光免疫层析试纸条检测。

1.3.5 试纸条灵敏度评价 将大肠杆菌O157:H7菌悬液按10倍梯度稀释制备的 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL大肠杆菌菌液分别滴加到试纸条加样孔,待免疫反应达到平衡后,在紫外灯下观察质控线和检测线。

1.3.6 试纸条在食品样品中检测适用性评价 选取火腿肠为肉制品模拟物作检验对象。称取1 g火腿肠加4 mL超纯水捣碎,滤去火腿肠渣,将100 μL大肠杆菌污染至0.9 mL火腿肠滤液中,得到肉制品待测液。选取纯牛奶为乳制品模拟物作检测对象,将100 μL大肠杆菌污染至0.9 mL牛奶中,得到乳制品待测液。选取小白菜为蔬菜模拟物作检测对象,剪下面积约5 cm²的叶子加水4 mL捣碎,滤去叶渣,将100 μL大肠杆菌污染至0.9 mL小白菜滤液中,得蔬菜待测液。3个样品分别10倍梯度稀释成菌浓度约 $1 \times 10^5, 1 \times 10^4, 1 \times 10^3$ CFU/mL待测。各个待测样取100 μL的待测液体用量子点荧光免疫层析试纸样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 量子点的透射电镜及X衍射分析

将等体积比的异丙醇倒入CdTe量子点水溶液中,充分搅拌,沉淀,离心后,将得到的固体产品置于真空干燥箱中干燥得到CdTe量子点固体粉末。

如图2所示,利用本试验方法制备的CdTe量子点在水溶液中具有很好的分散性与稳定性,CdTe量子点呈近似球形,尺寸大约在5 nm左右,分散均匀。X衍射如图3所示,CdTe量子点结晶性良好,其晶型结构为闪锌矿立方晶相。

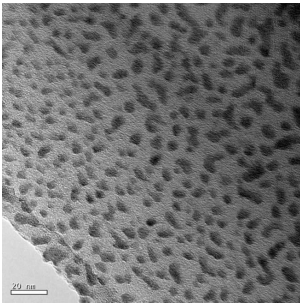


图 2 CdTe 量子点的 TEM 图像

Figure 2 TEM photography of CdTe QDs

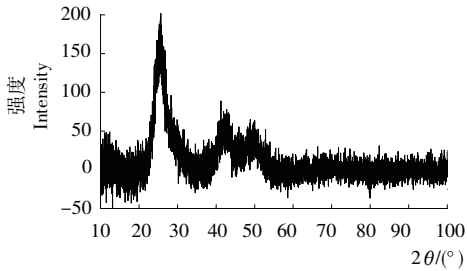


图 3 CdTe 量子点的 X 衍射图谱

Figure 3 XRD pattern of CdTe QDs

2.2 量子点与大肠杆菌抗体的偶联效果

量子点的荧光发射光谱显示,550~700 nm 为荧光发射峰波段,发射峰为 620 nm,半峰宽为 75 nm,荧光发射峰对称性好。CdTe 量子点在与大肠杆菌抗体偶联之后,最大荧光值及发射峰的半峰宽都没有变化(见图 4),表明 CdTe 量子点与大肠杆菌 O157:H7 抗体偶联之后,分散性保持良好,没有聚团,其荧光性质保持稳定^[23]。荧光发射峰位置红移了 2 nm,引起发射峰位置移动的原因可能是,CdTe 量子点在与蛋白质通过电荷相互作用的过程中,由于蛋白质大分子偶联多个量子点,从而引起其偶极相互作用增加,斯托克斯位移增大,发射光谱红移^[24]。

如图 5 所示,在层析法验证量子点与大肠杆菌抗体偶联效果中,pH 6.7,7.2,7.7 时出现了两条明显的荧光带,其中

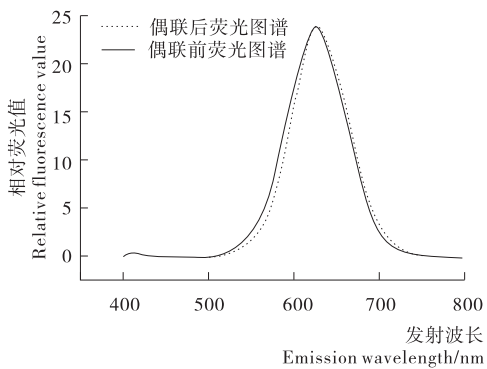


图 4 量子点与大肠杆菌 O157:H7 抗体静电偶联前后荧光图谱对比

Figure 4 Comparison of fluorescence spectrum before and after electrostatic coupling

7.2 尤其清晰。说明静电偶联的办法是可行的,偶联之后能保持抗体的特异性,并且最佳偶联 pH 值为 7.2。大肠杆菌单克隆抗体是一种免疫球蛋白,其等电点为 pI 8.0,在 pH 为 8 时,其不适用结合其他物质。在 pH<8 时,免疫球蛋白带正电荷。以巯基乙酸为稳定剂合成的量子点表面为巯基和羧基,且在碱性条件下合成,其表面带负电。由于带电性相反,两者在溶液中容易发生静电吸引从而产生偶联。理论上来说,量子点与抗体之间的带电差异越大偶联越好,所以应在偏碱环境偶联,具体在 pH 7~8 进行,这在试验结果中得到验证。综上,量子点与大肠杆菌抗体静电偶联技能保持量子点的荧光性质也能保持抗体的特异性,是一种成功的偶联方式。

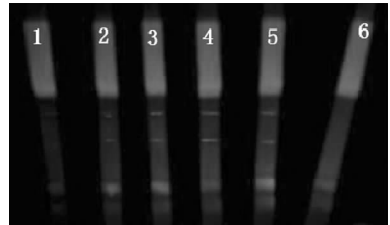


图 5 不同 pH 值下量子点与大肠杆菌的偶联效果

Figure 5 Coupling effect observation of quantum dots in *Escherichia coli* under UV lamp

2.3 量子点免疫层析试纸条组装

如图 6 所示,量子免疫层析试中羊抗兔二抗为质控线,大肠杆菌抗体为检测线,分别用划膜仪固定在硝酸纤维素膜上,结合垫采用量子点大肠杆菌抗体偶联物浸润,在 37 °C 条件下经干燥后制得。将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,按顺序粘贴到 PVC 底板上,各部分重叠以保证样品液体的流动。其检测原理为双抗体夹心法,在检测过程中,样品中的大肠杆菌在毛细作用下往吸水纸方向移动,结合垫中的量子点抗体偶联物会标记到大肠杆菌上,在继续往吸水纸方向移动的过程中,检测线上的大肠杆菌抗体会将标记量子点的大肠杆菌捕获,形成检测带,未标记大肠杆菌的量子点抗体偶联物继续移动至质控线被羊抗兔二抗捕获形成质控线。

2.4 量子点免疫层析试纸特异性评价

用纯净水分别稀释各种细菌至 1×10^7 CFU/mL,各取 0.5 mL 滴加至量子点荧光免疫层析试纸上进行检测,结果(图 7)表明,大肠杆菌 O157:H7 样品呈阳性反应,其余样品

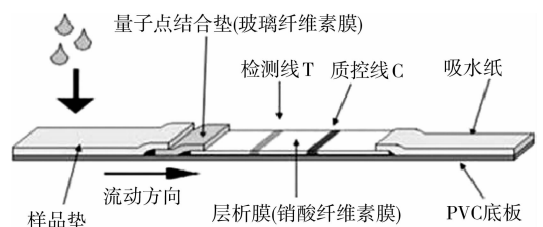
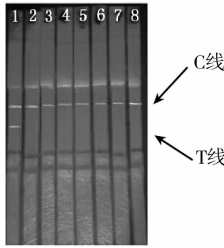


图 6 量子点免疫层析试纸结构图

Figure 6 Structure of QDs immunochromatographic strip

均为阴性反应,包括沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、肉毒杆菌、金黄色葡萄球菌。试验显示,大肠杆菌 O157:H7 量子点荧光免疫层析试纸条与其它细菌之间不发生反应,其特异性良好。



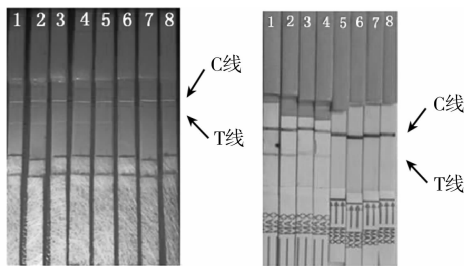
1. 大肠杆菌 O157:H7 2. 枯草芽孢杆菌 3. 沙门氏菌 4. 蜡样芽孢杆菌 5. 副溶血性弧菌 6. 霍乱弧菌 7. 肉毒杆菌 8. 金黄色葡萄球菌

图7 量子点免疫层析试纸条特异性测试

Figure 7 Specific test of QDs immunochromatographic strips

2.5 量子点免疫层析试纸条灵敏度评价

大肠杆菌 O157:H7 最初源于出血性结肠炎病的人畜及感染此菌的人畜排泄物。在处理不到位的地区,这些排泄物通过一些方式,会释放到水体,对水体造成污染。将大肠杆菌 O157:H7 样品用自来水按照 10 倍梯度稀释,通过倾注平板法测得其浓度分别约为 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 CFU/mL。分别取 100 μ L 不同浓度的菌悬液用量子点荧光免疫层析试纸条检测,结果最低的检出浓度为 1×10^4 CFU/mL,同市售的大肠杆菌 O157:H7 胶体金免疫层析试纸条检测相比,其最低检测浓度要低一个数量级,灵敏度更高(见图 8)。



(a) 量子点免疫层析试纸条 (b) 胶体金免疫层析试纸条
1~8分别为 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 CFU/mL大肠杆菌菌悬液

图8 两种免疫层析试纸条灵敏度测试对比

Figure 8 Contrast of sensitivity testing of two kinds immunochromatographic strip

2.6 量子点免疫层析试纸条适用性评价

受大肠杆菌的生物学性质影响,肉制品的生产加工过程中极易产生大肠杆菌污染事件^[25-26]。牛、羊、猪等动物是大肠杆菌 O157:H7 的宿主,会由于肉制品本身携带、操作工人携带、不按规范操作导致产品污染^[27]。乳制品中大肠杆菌

污染也非常常见,同肉制品一样,乳制品来源于动物,且主要为牛奶,其生产、加工、运输、储藏过程中也容易受大肠杆菌的污染^[28]。蔬菜中的大肠杆菌污染主要来自农家肥的使用,清洗不净会导致致病菌的残留。此外,肉制品和乳制品能为大肠杆菌 O157:H7 的生长提供极佳的环境,因此容易造成其大规模富集。

实际的检测结果(表 1)表明,量子点荧光免疫层析试纸在实际样品中适用性良好,在肉制品、乳制品和蔬菜样品中灵敏度与在自来水中检测相当。与胶体金试纸条相比,其灵敏度仍要高一个数量级。

表1 量子点荧光免疫层析试纸条适用性测试

Table 1 Applicability test of quantum dot fluorescent immune chromatography

样品	浓度	量子点试纸	胶体金试纸
肉 1	1×10^3	阴性	阴性
肉 2	1×10^4	阳性	阴性
肉 3	1×10^5	阳性	阳性
乳 1	1×10^3	阴性	阴性
乳 2	1×10^4	阳性	阴性
乳 3	1×10^5	阳性	阳性
蔬 1	1×10^3	阴性	阴性
蔬 2	1×10^4	阳性	阴性
蔬 3	1×10^5	阳性	阳性

量子点荧光免疫层析试纸条保藏于 -20 $^{\circ}$ C 的低温冰箱中。分别在保藏 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 d 时用试纸对大肠杆菌进行检测。结果表明,60 d 内在 -20 $^{\circ}$ C 条件下,量子点荧光免疫层析试纸条中的抗体保持良好的活性,量子点荧光性质稳定,整个试纸的性质保持良好。

3 讨论

大肠杆菌 O157:H7 是一个全球范围的公共卫生问题,各国都将其列为必检项目^[29]。其各种检测技术中,以免疫层析技术的检测最为方便快捷,现最流行的为胶体金免疫层析技术。在检测某些目标物质浓度较低的样品时,胶体金本身的颜色太浅,无法使用肉眼进行判断。量子点具有极佳的荧光性质,激发光谱宽,荧光强度高而且稳定,十分有利于降低免疫层析技术的检测限。本试验将大肠杆菌抗体与羊抗兔二抗划线固定于层析膜,量子点大肠杆菌单克隆抗体偶联物浸润与结合垫干燥,通过构建免疫层析系统,完成了量子点大肠杆菌荧光免疫层析试纸。该法不仅结合了免疫反应与层析技术准确快速的优点,并且相比于胶体金试纸,由于量子点基于荧光显色,因而其抗干扰性更强,检测限更低。

本研究构建的量子点试纸的特异性良好,最低检测限为 10^4 CFU/mL,检测时间小于 5 min,能适用于多种实际样品的现场快速检测。

参考文献

- 1 中国国家卫生部. 卫生部关于 2011 年全国食物中毒事件报告情况的通报[Z/OL]. 卫办应急发[2012]18号(2012-02-24)[2013-07-20]. <http://www.moh.gov.cn/mohwsbwstjxxzx/s7967/201202/54200.shtml>.
- 2 中国国家卫生部. 卫生部关于 2012 年全国食物中毒事件报告情况的通报[Z/OL]. 卫办应急发[2013]4号(2013-03-04)[2013-07-20]. <http://www.moh.gov.cn/mohwsbwstjxxzx/s7967/201303/b70872682e614e4189d0631ae5527625.shtml>.
- 3 中国国家卫生部. 卫生部关于 2013 年全国食物中毒事件报告情况的通报[Z/OL]. 卫办应急发[2014]15号(2013-02-20)[2014-09-21]. <http://www.moh.gov.cn/yjb/s3585/201402/f54f16a4156a460790caa3e991c0abd5.shtml>.
- 4 中国国家卫生部. 卫生部关于 2014 年全国食物中毒事件报告情况的通报[Z/OL]. 卫办应急发[2015]9号(2015-02-15)[2015-03-12]. <http://www.moh.gov.cn/yjb/s3585/201502/91fa4b047e984d3a89c16194722ee9f2html>.
- 5 O'Beirne D, Gleeson E, Auty M, et al. Effects of processing and storage variables on penetration and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut packaged carrots[J]. *Food Control*, 2014, 40(2):71~77.
- 6 陈萍,李泽鸿,邴伟. 致泻性大肠杆菌研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2007(4):11~13.
- 7 爆发性大肠杆菌对人体的危害[J]. *质量与标准化*, 2012, 14(8):30~31.
- 8 徐尚荣. 大肠杆菌 O157:H7 的生物学特性[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2008, 38(4):56~57.
- 9 巢强国,杨学明,葛宇,等. PCR 法检测食品中大肠杆菌 O157:H7[J]. *食品科学*, 2010, 31(8):212~215.
- 10 葛萃萃,钟青萍,张旺,等. 双抗夹心 ELISA 检测食品中大肠杆菌 O157:H7 方法研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(1):171~175.
- 11 赵志晶,刘秀梅. 大肠杆菌 O157 多克隆抗体及食品中双抗 ELISA 测定方法的研究[J]. *卫生研究*, 2003, 32(6):606~609.
- 12 Jomalyn T Italia, Hope G Rovira, Joseph S, et al. Conventional isolation and polymerase chain reaction assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 from intestines of philippine bats. [J]. *Veterinary Archives*, 2012, 82(3):283~294.
- 13 Bindu Kiranmayi C, Krishnaiah N. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in foods of animal origin by cultural methods and PCR technique[J]. *Veterinary World*, 2010, 3(1):13~16.
- 14 黄岭芳,段霞,陈媛,等. 大肠杆菌 O157:H7 胶体金试纸条研制[J]. *食品科学*, 2010, 31(24):355~359.
- 15 解泉源,赖卫华,刘春梅,等. 大肠杆菌 O157:H7 荧光微球免疫层析试纸条的研制[J]. *食品科学*, 2013, 34(16):353~357.
- 16 王静,陈维娜,胡孔新,等. 大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J]. *卫生研究*, 2006, 35(4):439~441.
- 17 熊强,史纯珍,刘钊. 食品微生物快速检测技术的研究进展[J]. *食品与机械*, 2009, 25(5):133~136.
- 18 Rong Xiao-long, Zhao Qin, Tao Guan-hong. Aqueous synthesis of CdSe and CdSe/CdS quantum dots with controllable introduction of Se and S sources [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2012, 23(8):961~964.
- 19 蔡朝霞,阮晓娟,石宝琴,等. 水溶性 CdSe 量子点的合成及其作为荧光探针针对大肠杆菌的快速检测[J]. *分析试验室*, 2011, 30(3):107~110.
- 20 王玉娇. 糖量子点的合成及其对大肠杆菌的检测[D]. 长春:长春理工大学,2012.
- 21 Wu S M, 谢冰. 用量子点标记的抗体作为免疫荧光探针检测药物中的大肠杆菌[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(1):116.
- 22 白亚龙. 一种基于量子点荧光微球的高灵敏度免疫层析技术初步研究[D]. 上海:上海师范大学,2010.
- 23 Yang Li-ju, Li Yan-bin. Quantum dots as fluorescent labels for quantitative detection of *Salmonella typhimurium* in chicken carcass wash water[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(6):1241~1245.
- 24 Yu Zhao, Ye Ming-qiang, Chao Qiang-guo, et al. Simultaneous detection of multifood-borne pathogenic bacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation in food samples [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 57(2):517~524.
- 25 黄潇,蔡颖慧,郭捷,等. 冷冻鱼糜中金黄色葡萄球菌生长预测模型的筛选[J]. *食品与机械*, 2015, 31(2):191~195.
- 26 王燕,谢贵林,杜琳. 大肠杆菌 O157:H7 感染流行概况[J]. *微生物学免疫学进展*, 2008, 36(1):51~58.
- 27 车达平,张志诚,陈家. 出血性大肠杆菌 O157:H7 感染研究现状[J]. *江西医药*, 2001, 36(4):315~317.
- 28 周微,张伟钦,付宇,等. 荧光定量 PCR 方法快速检测原料乳中的大肠杆菌[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(11):39~42.
- 29 中华人民共和国上海出入境检验检疫局,中华人民共和国深圳出入境检验检疫局,3M 中国有限公司,等. SN/T 0973—2010 进出口肉、肉制品及其他食品中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.