

基于 dsDNA-CuNCs 的荧光 ELISA 检测 牛奶中的 *E. coli* O157:H7

A fluorescence ELISA based on dsDNA-CuNCs for the
detection of *E. coli* O157:H7 in milk

曹文凯¹ 山珊² 刘道峰^{3,4} 彭娟¹ 邢克宇⁵ 赖卫华¹

CAO Wenkai¹ SHAN Shan² LIU Daofeng^{3,4} PENG Juan¹ XING Keyu⁵ LAI Weihua¹

(1. 南昌大学食品学院, 江西 南昌 330047; 2. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022;

3. 江西省疾病预防控制中心, 江西 南昌 330029; 4. 江西省食源性疾病预防溯源重点实验室,

江西 南昌 330029; 5. 长沙理工大学食品科学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

(1. College of Food Science, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China; 2. College of Life

Science, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 3. Jiangxi Provincial Center for

Disease Control and Prevention, Nanchang, Jiangxi 330029, China; 4. Jiangxi Provincial Key Laboratory

of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease, Nanchang, Jiangxi 330029, China; 5. School of Food

Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:目的:建立了一种灵敏检测牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的新型荧光酶联免疫吸附方法。方法:以碱性磷酸酶水解焦磷酸盐-Cu²⁺ 配位复合物,释放出 Cu²⁺ 形成铜纳米簇作为信号报告探针,通过对关键因素 Cu²⁺ 浓度、焦磷酸盐浓度、DNA 模板的浓度和长度进行优化。结果:在最优条件下,大肠杆菌 O157:H7 的菌数为 5×10⁴~1×10⁸ CFU/mL 时,与荧光信号值有较好的线性关系(R²=0.980 8),最低检出限为 2.4×10⁴ CFU/mL。结论:该方法成功地应用于低脂牛奶和脱脂牛奶样本中大肠杆菌 O157:H7 的测定,平均回收率为 92.2%~108.5%,相对标准偏差为 4.9%~10.4%。

关键词:酶联免疫吸附;铜纳米簇;大肠杆菌 O157:H7;检测

Abstract: Objective: This study aimed to developed a novel fluorescent enzyme-linked immunosorbent assay method for the sensitive detection of *E. coli* O157:H7 in milk samples.

Methods: The pyrophosphate-Cu²⁺ coordination complex was hydrolyzed by alkaline phosphatase, and Cu²⁺ was released from copper nanoclusters as signal reporting probes. Key factors such

as Cu²⁺ concentration, pyrophosphate concentration, and DNA template concentration and length were optimized. **Results:** Under the control of the optimized conditions, the method exhibited a good linear relationship (R² = 0.980 8) with the target *E. coli* O157:H7 in the range of 5×10⁴~1×10⁸ CFU/mL. The limit of detection was 2.4×10⁴ CFU/mL. **Conclusion:** The method was successfully applied to the determination of *E. coli* O157:H7 in samples of low-fat milk and skim milk. The average recovery was 92.2%~108.5% with relative standard deviation 4.9%~10.4%.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay; copper nanocluster; *E. coli* O157:H7; detection

E. coli O157:H7 是一种常见食源性致病菌,它可以通过被污染的食物来传染人类,如未煮熟的肉制品、生牛奶等^[1]。感染 *E. coli* O157:H7 后可能会出现腹痛和腹泻等症状,严重时会导致肾衰竭甚至死亡。

目前,用于检测食源性致病菌的方法(例如,平板培养、菌落计数法、Lamp 和 PCR 等),存在既费力又费时的问题。近年来,研究者已经开发了多种快速、灵敏和可靠的方法来检测 *E. coli* O157:H7。免疫分析技术如酶联免疫吸附^[9]、化学发光免疫分析^[10]和免疫层析等具有快速、灵敏度高和特异性强等优势,在食源性致病菌检测中发挥着重要作用。其中酶联免疫吸附技术(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种基于抗原和抗体特

基金项目:国家自然科学基金地区项目(编号:82260644);江西省高层次高技能领军人才培养工程项目(2021 年度)

作者简介:曹文凯,男,南昌大学在读硕士研究生。

通信作者:赖卫华(1968—),男,南昌大学教授,博士。

E-mail: talktolaiwh@163.com

收稿日期:2023-06-31 **改回日期:**2023-08-17

异性反应的分析技术,现已被广泛地应用于 *E. coli* O157:H7 的快速检测。在传统的 ELISA 中,通常采用辣根过氧化物酶催化显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)作为信号输出,存在灵敏度相对较低的问题,严重妨碍了 ELISA 在实际检测中的应用。高信号的荧光与 ELISA 结合起来,可以解决 ELISA 灵敏度较低的问题。

铜纳米团簇(Copper nanocluster, CuNCs)因其独特的超小尺寸和较宽的斯托克斯位移,与传统荧光探针相比,具有更优越的荧光特性,在生物传感和生物示踪等领域具有广阔的应用前景。其中以腺嘌呤-胸腺嘧啶双链 DNA (Adenine-thymine double stranded DNA, AT dsDNA)为模板合成的 CuNCs,具有合成简单、荧光强度高和尺寸可调等优势。在抗坏血酸的作用下 Cu^{2+} 会在 AT dsDNA 模板上被还原成 Cu^{0+} 形成 CuNCs,在特定的激发波长下,能够产生稳定的荧光信号^[16]。而焦磷酸盐(Pyrophosphate, PPI)对 Cu^{2+} 的强配位作用将抑制 Cu^{2+} 的还原,从而抑制荧光信号的产生。PPI 是公认的碱性磷酸酶的天然底物,当其被碱性磷酸酶水解成磷酸盐(Phosphate, Pi)后, Cu^{2+} 会从 PPI- Cu^{2+} -PPI 配位复合物中释放出来,被抗坏血酸在模板 DNA 上还原成 Cu^{0+} ^[19],形成 CuNCs。

研究拟通过碱性磷酸酶水解 PPI 释放 Cu^{2+} ,在抗坏血酸的作用下 Cu^{2+} 在 AT dsDNA 模板上被还原成 Cu^{0+} ,形成 CuNCs。以具有较强荧光信号的 CuNCs 作为荧光信号探针,建立一种新型的荧光 ELISA,用于检测低脂牛奶和脱脂牛奶样本中的 *E. coli* O157:H7。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

低脂牛奶、脱脂牛奶:市售;

含 20,30,40,50,60,70 个碱基的 AT dsDNA(AT₂₀、AT₃₀、AT₄₀、AT₅₀、AT₆₀ 和 AT₇₀):生工生物工程股份有限公司;

焦磷酸盐(Pyrophosphate, PPI)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸(Ascorbic acid):分析纯,阿拉丁生物试剂股份有限公司;

牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma-Aldrich 公司;

3-吗啉丙磺酸(MOPS)、PBS、(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)TMB 显色液和碱性磷酸酶:阿拉丁生物试剂股份有限公司;

其他试剂:分析纯,市售;

E. coli O157:H7 鼠源单抗(Monoclonal antibody, mAb)、*E. coli* O157:H7 兔源多抗(Polyclonal antibody, pAb)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(HRP-IgG)和碱性磷酸酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(ALP-IgG):迈迪胺生物科技有限公司;

黑色 96 孔酶标板:康宁有限公司;

菌种:大肠杆菌 O157:H7(ATCC 43888)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 18S51)、猪霍乱沙门氏菌(ATCC 10708)、鸭沙门氏菌(ATCC 9270)、肠炎沙门氏菌(ATCC 13076)、单核增生李斯特菌(ATCC 13932)、蜡样芽孢杆菌(CICC 21493)、福氏志贺氏菌(CMCC 2457)、大肠杆菌 O157:H7 (SR0981D)、大肠杆菌(ATCC 25922):江西省疾病预防控制中心。

1.2 主要仪器

酶标仪:SpectraMax i3x 型,美谷分子仪器(上海)有限公司;

透射电镜:JEM 2100 F 型,捷欧路(北京)科贸有限公司;

恒温培养箱:GZX-9246MBE 型,上海福玛实验设备有限公司;

分析天平:FA1024 型,梅特勒托利多科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 PPI- Cu^{2+} -PPI 复合物制备 将 50 nmol 的 Cu^{2+} 和 90 nmol 的 PPI 加入到 130 μL 含有 80 nmol 的 AT₅₀ 的 MOPS 缓冲溶液(20 mmol/L, MOPS, pH 7.6)中混合均匀,室温下避光孵育 30 min,得到 PPI- Cu^{2+} -PPI 复合物。

1.3.2 荧光 ELISA 的操作步骤 用碳酸盐缓冲液(0.2 mg/mL, pH 9.6)稀释的 pAb(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL)作为捕获抗体包被酶标板,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜包被,用 PBST(按 0.05 mL/100 mL 将吐温 20 加入到 0.02 mg/mL 的 1 \times PBS 中)洗板 4 次后拍干,然后加入 230 μL 的封闭剂(3 mg/100 mL BSA),在恒温培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭 2 h,用 PBST 洗板后备用。

检测时将 100 μL 的 *E. coli* O157:H7 菌液加入酶标板,并设置阴性对照(1 \times PBS, 100 μL),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h 后用 PBST 洗板;然后将 mAb(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL)作为检测抗体加入酶标板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min 后用 PBST 洗板;将酶标二抗 ALP-IgG (3 万倍稀释, 100 μL)加入酶标板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min 后用 PBST 洗板;再加入 190 μL 的 PPI- Cu^{2+} -PPI 复合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 60 min,最后加入 10 μL , 10 mmol/L 的抗坏血酸用酶标仪读取在 365 nm 激发下 610 nm 处的荧光值。

1.3.3 关键参数优化 试验参数: Cu^{2+} 浓度、PPI 浓度、DNA 模板浓度、DNA 模板长度和抗坏血酸浓度,采用单一变量的原则,对各个参数进行优化。除 1.3.3(1)外均在 1 $\times 10^6$ CFU/mL 的 *E. coli* O157:H7、1 μg 的 mAb、1 μg 的 pAb 和 3 万稀释的 ALP-IgG 情况下进行。

(1) Cu^{2+} 浓度优化:由于 Cu^{2+} 是影响 PPI- Cu^{2+} -PPI 复合物以及产生 CuNCs 的关键因素,因此在缓冲溶液(1 \times PBS, pH 7.6)中对其浓度进行优化。在 20 μL 的

AT₄₀ (1 mmol/L)、20 μL 不同浓度的 Cu²⁺ (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mmol/L)、20 μL 的 PPi (5 mmol/L) 和 10 μL 的抗坏血酸 (10 mmol/L) 以及 130 μL 的 MOPS 体系下, 37 °C 反应 30 min, 考察不同浓度 Cu²⁺ 所形成的 PPi-Cu²⁺-PPi 复合物对荧光强度的影响。

(2) PPi 浓度的优化: 在 20 μL 的 AT₄₀ (1 mmol/L)、20 μL 的 Cu²⁺ (2.5 mmol/L)、20 μL 不同浓度的 PPi (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 mmol/L) 和 10 μL 的抗坏血酸 (10 mmol/L) 以及 130 μL 的 MOPS 体系下, 37 °C 反应 30 min, 通过信噪比 F/F_0 (F : 阳性荧光信号值, F_0 : 阴性荧光信号值) 来考察不同浓度 PPi 所形成的 PPi-Cu²⁺-PPi 复合物对荧光强度的影响。

(3) DNA 模板长度的优化: 在 20 μL 4 mmol/L 不同长度的 DNA 模板 (AT₂₀、AT₃₀、AT₄₀、AT₅₀、AT₆₀)、20 μL 的 Cu²⁺ (2.5 mmol/L)、20 μL 的 PPi (4.5 mmol/L) 和 10 μL 的抗坏血酸 (10 mmol/L) 以及 130 μL 的 MOPS 体系下, 37 °C 反应 30 min, 通过信噪比 F/F_0 考察 DNA 模板长度对荧光强度的影响。

(4) DNA 模板浓度的优化: 在 20 μL 不同浓度的 AT₅₀ (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mmol/L)、20 μL 的 Cu²⁺ (2.5 mmol/L)、20 μL 的 PPi (4.5 mmol/L) 和 10 μL 的抗坏血酸 (10 mmol/L) 以及 130 μL 的 MOPS 体系下, 37 °C 反应 30 min, 通过信噪比 F/F_0 考察 DNA 模板浓度对荧光强度的影响。

(5) 抗坏血酸浓度的优化: 在 20 μL 的 AT₅₀ (4 mmol/L)、20 μL 的 Cu²⁺ (2.5 mmol/L)、20 μL 的 PPi (4.5 mmol/L) 和 10 μL 不同浓度的抗坏血酸 (6, 8, 10, 12, 14 mmol/L) 以及 130 μL 的 MOPS 体系下, 37 °C 反应 30 min, 通过信噪比 F/F_0 考察抗坏血酸浓度对荧光强度的影响。

1.3.4 荧光 ELISA 检测 *E. coli* O157:H7 在 1.2.3 的最优条件下, 将 100 μL 不同稀释倍数下的 *E. coli* O157:H7 (菌数为 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 CFU/mL), 使用酶标仪测量荧光, 激发波长

365 nm, 发射波长 610 nm。

1.3.5 传统显色 ELISA 检测 *E. coli* O157:H7 ELISA 步骤同 1.3.2。加入 mAb 孵育并洗板后, 将 3 000 倍稀释的 HRP-IgG, 加入酶标孔孵育 30 min 并洗板后, 加入 100 μL 的 TMB 显色液, 反应 15 min 后加入 200 nmol 的 H₂SO₄ 终止液, 用酶标仪读取 450 nm 处的 OD 值。

1.3.6 荧光 ELISA 的特性鉴定

(1) 灵敏度: 以最低检测限 (Limit of detection, LOD) 作为评价方法灵敏度的标准。用超纯水稀释 *E. coli* O157:H7, 利用 ELISA, 通过 PPi-Cu²⁺-PPi 复合物水解恢复 CuNCs 荧光作为信号输出方式。以 *E. coli* O157:H7 菌数的对数值为横坐标, 以荧光信号值为纵坐标, 绘制荧光 ELISA 的标准曲线。然后将空白样品进行 20 次重复测定, 根据标准曲线回归方程得到对应菌数, 计算重复测定结果的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD), 以 $\bar{X} + 3SD$ 作为检测限^[20]。

(2) 特异性: 通过交叉反应试验鉴定检测方法的特异性。利用荧光 ELISA 法分别检测 *E. coli* O157:H7 与相同浓度的其他菌种: 大肠杆菌 O157:H7 (SR0981D)、大肠杆菌 (ATCC 25922)、鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 18S51)、猪霍乱沙门氏菌 (ATCC 10708)、鸭沙门氏菌 (ATCC 9270)、肠炎沙门氏菌 (ATCC 13076)、单核增生李斯特菌 (ATCC 13932)、蜡样芽孢杆菌 (CICC 21493) 和福氏志贺氏菌 (CMCC 2457) 的荧光值对比来评估检测 *E. coli* O157:H7 的特异性。

1.3.7 精密度和准确度 在两种不同的牛奶样本中添加, 低中高 3 种倍数稀释的 *E. coli* O157:H7, 每个水平的添加样品利用荧光 ELISA 法重复检测 3 次, 通过计算添加 *E. coli* O157:H7 的平均回收率和变异系数 (CV) 来鉴定方法的精密度和准确度。

2 结果与分析

2.1 荧光 ELISA 检测 *E. coli* O157:H7 的原理

试验方法的检测原理如图 1 所示。当不存在目标菌 *E. coli* O157:H7 时, 在 ELISA 孔中不会形成双抗夹心

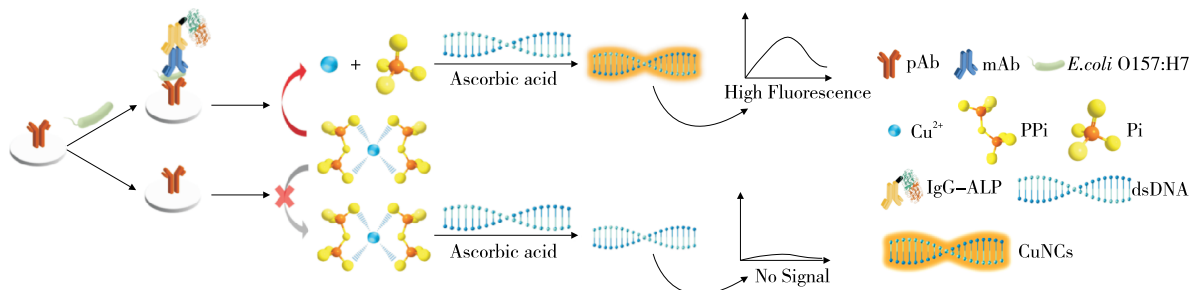


图 1 基于 dsDNA-CuNCs 的荧光 ELISA 检测 *E. coli* O157:H7 原理

Figure 1 Schematic illustration of the fluorescence ELISA based on dsDNA-CuNCs for the detection of *E. coli* O157:H7

结构, IgG-ALP 不会结合在 ELISA 孔中, 因此 PPi-Cu²⁺-PPi 复合物不会被水解, 并阻止抗坏血酸将 Cu²⁺ 在 dsDNA 链上还原成 Cu⁰⁺ 形成 CuNCs。当存在目标菌 *E. coli* O157:H7 时, IgG-ALP 会通过双抗夹心结构结合到 ELISA 孔中来水解 PPi-Cu²⁺-PPi 复合物, 释放出的 Cu²⁺ 会被抗坏血酸在 dsDNA 上还原成 Cu⁰⁺ 形成 CuNCs, 产生荧光信号。试验通过测定荧光强度的变化来判断 PPi-Cu²⁺-PPi 是否会水解并产生荧光信号, 设计了一种荧光 ELISA 来检测 *E. coli* O157:H7。

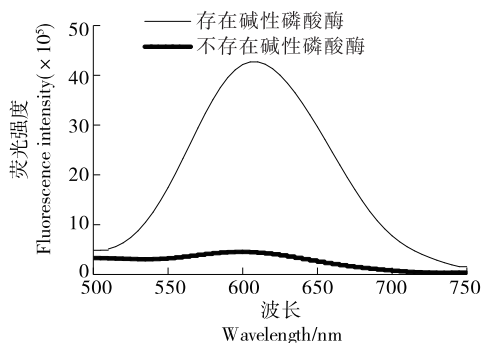
2.2 用 ALP 水解 PPi 恢复 CuNCs 用于检测的可行性分析

为了检验该 ELISA 用于检测 *E. coli* O157:H7 的可行性, 即 ALP 能否催化水解 PPi 并恢复 CuNCs 荧光, 测定了 ALP 存在与不存在时的荧光值。如图 2(a) 所示, 当在 PPi-Cu²⁺-PPi 复合体系中存在 ALP (2 μL, 10 U) 时, 会产生较强的荧光信号, 如图 2(b) 所示, 形成的 CuNCs 的粒径为 5 nm。当不存在 ALP 时, 几乎没有荧光信号, 以上结果表明, PPi 的存在会阻碍 CuNCs 荧光的形成, 并且通过 ALP 来水解 PPi 恢复 CuNCs 荧光用于检测 *E. coli* O157:H7 是可行的。

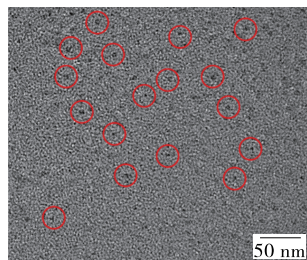
2.3 试验条件优化

2.3.1 Cu²⁺ 浓度优化

根据检测原理, Cu²⁺ 是桥接 ELISA 以及 CuNCs 荧光信号形成的关键因素。因此, 在缓冲溶液中, 考察了 Cu²⁺ 对 CuNCs 荧光信号的影响。如图 3 所示, 不存在 PPi 时, 荧光信号会随着 Cu²⁺ 浓度的增



(a) 存在 ALP 和不存在 ALP 时的荧光强度



(b) 投射电镜图

图 2 存在 ALP 和不存在 ALP 时的荧光强度和投射电镜图

Figure 2 Fluorescence intensity in the presence and absence of ALP and the image of TEM

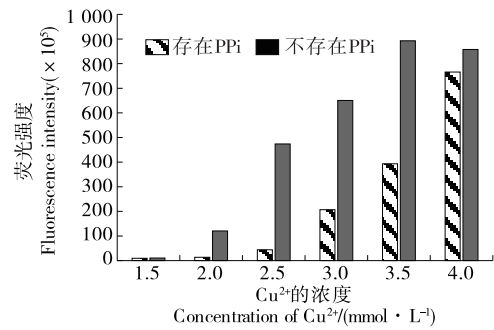


图 3 Cu²⁺ 浓度的优化

Figure 3 Optimization of the concentration of Cu²⁺

加而升高, 当 Cu²⁺ 浓度达到 3.5 mmol/L 时, 荧光信号达到最高, 当 Cu²⁺ 浓度达到 4 mmol/L 时, 荧光强度降低, 可能是由于高浓度的 Cu²⁺ 在抗坏血酸的作用下, 会生成氧自由基来降解 dsDNA 模板, 导致荧光强度降低。存在 PPi 时, 随着 Cu²⁺ 浓度的增加, 荧光信号随之升高的原因是尽管一部分的 Cu²⁺ 会与 PPi 配位形成 PPi-Cu²⁺-PPi 复合物, 但是过剩的 Cu²⁺ 仍会被抗坏血酸还原, 形成 CuNCs。结果表明, Cu²⁺ 的最佳浓度为 2.5 mmol/L。

2.3.2 PPi 浓度的优化

如图 4 所示, 随着 PPi 浓度的增加, F/F_0 逐渐增加, 当 PPi 浓度达到 4.5 mmol/L 时, F/F_0 达到最大值, 当 PPi 浓度 > 4.5 mmol/L 时, F/F_0 开始降低, 可能是由于高浓度的 PPi 不能完全被 ALP 所水解, 过剩的 PPi 通过强配位作用结合 Cu²⁺, 抑制 CuNCs 荧光的产生。因此, PPi 的最佳浓度为 4.5 mmol/L。

2.3.3 DNA 模板长度优化

如图 5(a) 所示, 随着 dsDNA 长度的增加, F/F_0 逐渐增加, 当 dsDNA 长度达到 50 bp 时, F/F_0 达到最大值, 之后 F/F_0 不再发生明显变化。因此, dsDNA 的最佳长度为 AT₅₀。

2.3.4 DNA 模板浓度优化

如图 5(b) 所示, 随着 AT₅₀ 浓度的增加, F/F_0 逐渐增加, 当 dsDNA 浓度达到 4 mmol/L 时, F/F_0 达到最大值, 之后 F/F_0 不再发生明显变化。因此, AT₅₀ 的最佳浓度为 4 mmol/L。

2.3.5 抗坏血酸浓度优化

如图 6 所示, 随着抗坏血酸浓度的增加, F/F_0 逐渐增加, 当抗坏血酸浓度达到

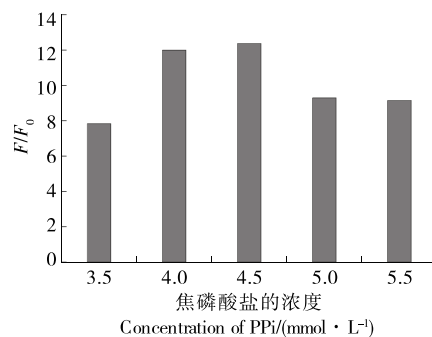


图 4 PPi 浓度优化

Figure 4 Optimization of the concentration of PPi

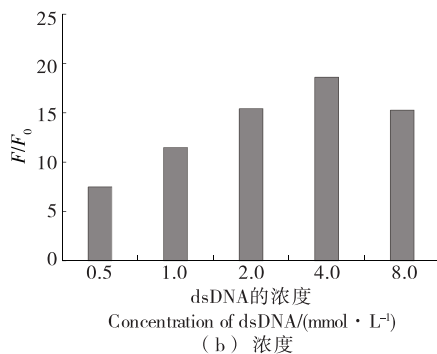
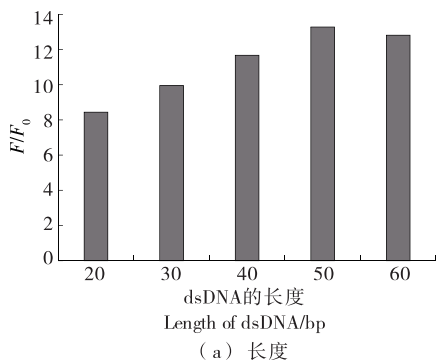


图 5 dsDNA 长度和浓度的优化

Figure 5 Optimization of the concentration of dsDNA and the length of dsDNA

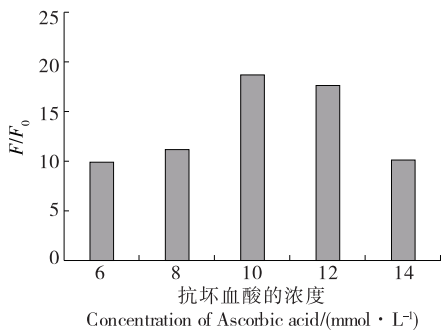


图 6 抗坏血酸浓度优化

Figure 6 Optimization of the concentration of Ascorbic acid

10 mmol/L 时, F/F_0 达到最大值, 之后 F/F_0 开始降低, 可能是高浓度的还原剂会抑制 CuNCs 荧光。因此, 抗坏血酸的最佳浓度为 10 mmol/L。

2.4 检测方法的性能

2.4.1 灵敏度鉴定 稀释菌数为 $1 \times 10^2, 5 \times 10^2, 1 \times 10^3, 5 \times 10^3, 1 \times 10^4, 5 \times 10^4, 1 \times 10^5, 5 \times 10^5, 1 \times 10^6, 5 \times 10^6, 1 \times 10^7, 5 \times 10^7, 1 \times 10^8, 5 \times 10^8$ CFU/mL 的 *E. coli* O157:H7, 经荧光 ELISA 检测后, 以 *E. coli* O157:H7 菌数为横坐标, 检测所得的荧光强度值为纵坐标, 绘制的标准校准曲线如图 7 所示, 曲线的线性范围为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mL, 线性回归方程为 $y = 2.1 \times 10^7 \lg(x) - 9 \times 10^7, R^2 = 0.9808$, 最低检出限为 2.4×10^4 CFU/mL。如图 8 所示, 普通的 HRP 催化 TMB 显色 ELISA 的线性范围为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ CFU/mL, 线性回归方程为 $y = 0.41 \lg(x) - 1.16, R^2 = 0.9834$, LOD 为 3.36×10^5 CFU/mL。相比而言, 研究开发的荧光 ELISA 比传统 ELISA 灵敏 14 倍, 且检测线性范围更宽。

2.4.2 特异性鉴定 利用荧光 ELISA 法检测菌数为 5×10^6 CFU/mL 的 *E. coli* O157:H7 和其他菌株。以所测定的荧光值作为评判该方法特异性的标准。如图 9 所示, 只有 *E. coli* O157:H7 存在时, 才会恢复 CuNCs 荧光, 产生较高的荧光信号值。由于方法建立所使用的捕

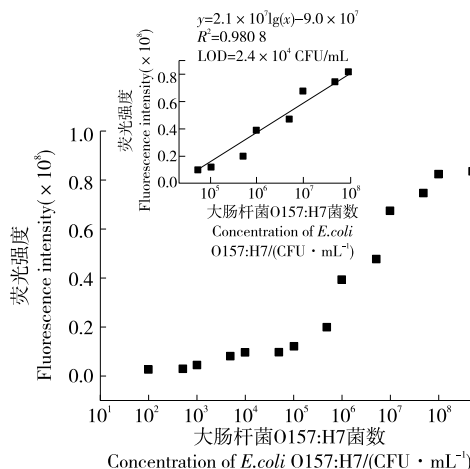


图 7 *E. coli* O157:H7 定量分析荧光 ELISA 标准校准曲线

Figure 7 Standard calibration curve of the fluorescence ELISA for quantitative analysis of *E. coli* O157:H7

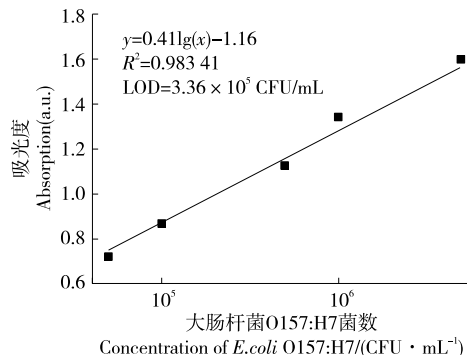


图 8 基于 HRP 的传统 *E. coli* O157:H7 定量分析 ELISA 标准曲线

Figure 8 Standard curve of the traditional ELISA based on HRP for quantitative analysis of *E. coli*

获抗体的特异性较好, 因此能够对单一菌株识别捕获, 使检测方法显示出良好的特异性。

2.4.3 实际样本分析 为探讨该方法检测食品中 *E. coli*

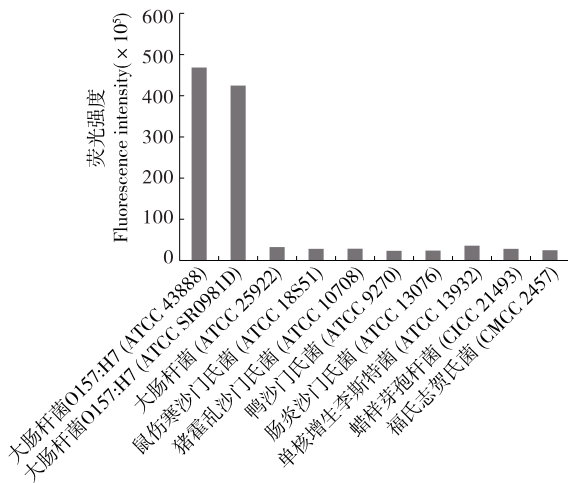


图 9 荧光 ELISA 的特异性

Figure 9 The specificity of fluorescence ELISA

O157:H7 的可行性,在两种牛奶样品中加入 *E. coli* O157:H7 进行分析,采用外标法评价了该方法的可行性。结果见表 1。牛奶样品中,3 个加标水平的平均回收率在 92.2%~108.5%,相对标准偏差 4.9%~10.4%,表明该检测方法准确性较好,可用于实际样品检测。

表 1 实际样本中 *E. coli* O157:H7 的加标回收率

Table 1 Recovery of *E. coli* O157:H7 in real samples

样本	加标浓度/ (CFU · mL ⁻¹)	测定平均值/ (CFU · mL ⁻¹)	回收率/ %	变异系 数/%
低脂牛奶	1 × 10 ⁵	92 963	92.2	7.3
	5 × 10 ⁵	513 293	108.5	4.9
	1 × 10 ⁶	877 146	86.0	10.4
脱脂牛奶	1 × 10 ⁵	95 918	95.9	8.7
	5 × 10 ⁵	517 428	103.5	10.0
	1 × 10 ⁶	939 195	93.9	7.6

3 结论

试验利用 Cu²⁺ 与焦磷酸盐的强配位原理,设计了一种基于碱性磷酸酶水解焦磷酸盐释放 Cu²⁺ 形成铜纳米团簇的荧光酶联免疫吸附技术,用于低脂和脱脂牛奶样品中 *E. coli* O157:H7 的检测。在最佳条件下,*E. coli* O157:H7 的菌数与荧光信号值在 5 × 10⁴ ~ 1 × 10⁸ CFU/mL 范围内呈良好的线性关系,最低检测限为 2.4 × 10⁴ CFU/mL 比传统显色酶联免疫吸附技术灵敏 14 倍,且检测线性范围更宽。该方法特异性好、灵敏度高,在低脂和脱脂牛奶样品中回收率理想(92.2%~108.5%),适用于 *E. coli* O157:H7 或其他病原微生物的灵敏检测。

参考文献

[1] 杨同香,常小静,吴孔阳,等. 乳品真菌污染及快速检测技术研究进展[J]. 食品与机械, 2018, 34(5): 169-172, 182.

YANG T X, CHANG X J, WU K Y, et al. Recent advances in rapid detection techniques of fungus contamination in dairy products[J]. Food & Machinery, 2018, 34(5): 169-172, 182.

[2] 姜佩,张慧,汪新,等. 多重 LAMP-溶解曲线法检测食品中两种食源性致病菌[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 87-92.

JIANG K, ZHANG H, WANG X, et al. Development of multiplex LAMP combined with melting curves analysis for detection of two kinds of food borne pathogens[J]. Food & Machinery, 2015, 31(2): 87-92.

[3] 宋涛平,邱华丽,王淑娟,等. 金黄色葡萄球菌 LAMP 可视化快速检测方法的建立[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 55-58.

SONG T P, QIU H L, WANG S J, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Food & Machinery, 2015, 31(5): 55-58.

[4] 王芳妹,钟文涛,王淑好,等. 5 种致泻大肠埃希氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测技术[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 88-95.

WANG F M, ZHONG W T, WANG S H, et al. Study on the rapid detection of five strains of diarrheagenic *Escherichia coli* by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Food & Machinery, 2019, 35(5): 88-95.

[5] 赵一鸣,石磊,孟赫诚,等. 食源性单增李斯特菌的 ERIC-PCR 和 Sau-PCR 分型研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 54-58.

ZHANG Y M, SHI L, MENG H C, et al. ERIC-PCR and Sau-PCR analysis of food-borne *Listeria monocytogenes* [J]. Food & Machinery, 2015, 31(1): 54-58.

[6] 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.

BAI Y L, SUO Y J, ZHOU C Y. A review of the development in pretreatment methods for PCR detection of food-borne pathogens[J]. Food & Machinery, 2017, 33(12): 191-196.

[7] WU W S, NGUYEN B T T, LIU P Y, et al. Single *Escherichia coli* bacteria detection using a chemiluminescence digital microwell array chip[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 215: 114594.

[8] 谢同彬,梅林. 基于纳米金复合探针的沙门氏菌快速定量检测[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 57-60.

XIE T L, MEI L. Rapid quantitative detection of *Salmonella* based on nanogold composite probes[J]. Food & Machinery, 2017, 33(11): 57-60.

[9] WANG Y, BU T, CAO Y Y, et al. A versatile PdRu bimetallic nanoenzyme-integrated enzyme-linked immunosorbent assay for highly sensitive *Escherichia coli* O157:H7 detection[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(24): 9 237-9 243.

[10] YUN Z, CHEN T, FEI R H, et al. Sensitive chemiluminescence immunoassay for *E. coli* O157:H7 detection with signal dual-amplification using glucose oxidase and laccase[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(2): 1 115-1 122.

[11] 袁列江,李萌立,王书源,等. 大肠杆菌 O157:H7 量子点免疫层析试纸条的研制[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 38-42.

YUAN L J, LI M L, WANG S Y, et al. Study on quantum dot immune chromatography test strip for *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food & Machinery, 2015, 31(4): 38-42.

(下转第 94 页)

- 别[J]. 食品与机械, 2022, 38(7): 91-98.
WANG X L, LI X. Beef quality recognition based on classification feature extraction and deep learning[J]. Food & Machinery, 2022, 38(7): 91-98.
- [11] 刘云, 杨建滨, 王传旭. 基于卷积神经网络的苹果缺陷检测算法[J]. 电子测量技术, 2017, 40(3): 108-112.
LIU Y, YANG J B, WANG C X. Apple defect detection algorithm based on convolutional neural network[J]. Electronic Measurement Technology, 2017, 40(3): 108-112.
- [12] 周雨帆, 李胜旺, 杨奎河, 等. 基于轻量级卷积神经网络的苹果表面缺陷检测方法[J]. 河北工业科技, 2021, 38(5): 388-394.
ZHOU Y F, LI S W, YANG K H, et al. Apple surface defect detection method based on lightweight convolutional neural network[J]. Hebei Industrial Technology, 2021, 38(5): 388-394.
- [13] 梅金波, 李涛, 秦寅初. 苹果采摘机器人监测系统和表面缺陷检测方法研究[J]. 计算机测量与控制, 2023, 31(6): 19-26.
MEI J B, LI T, QIN Y C. Research on apple picking robot monitoring system and surface defect detection methods [J]. Computer Measurement and Control, 2023, 31(6): 19-26.
- [14] 杨双艳, 杨紫刚, 张四伟, 等. 基于近红外光谱和 PSO-SVM 算法的烟叶自动分级方法[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(12): 141-144.
YANG S Y, YANG Z G, ZHANG S W, et al. Automatic tobacco grading method based on near infrared spectroscopy and PSO-SVM algorithm[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(12): 141-144.
- [15] 王阳阳, 黄勋, 陈浩, 等. 基于同态滤波和改进 K-means 的苹果分级算法研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 47-51, 112.
WANG Y Y, HUANG X, CHEN H, et al. Apple grading algorithm based on homomorphic filtering and improved k-means[J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 47-51, 112.
- [16] 王立扬, 张瑜, 沈群, 等. 基于改进型 LeNet-5 的苹果自动分级方法[J]. 中国农机化学报, 2020, 41(7): 105-110.
WANG L Y, ZHAN G Y, SHEN Q, et al. Automatic Apple classification method based on improved lenet-5[J]. Chinese Journal of Agricultural Mechanochemistry, 2020, 41(7): 105-110.
- [17] 于蒙, 李雄, 杨海潮, 等. 基于图像识别的苹果的等级分级研究[J]. 自动化与仪表, 2019, 34(7): 39-43.
YU M, LI X, YANG H C, et al. Apple grading based on image recognition[J]. Automation and Instrumentation, 2019, 34(7): 39-43.
- [18] 樊泽泽, 柳倩, 柴洁玮, 等. 基于颜色与果径特征的苹果果实检测与分级[J]. 计算机工程与科学, 2020, 42(9): 1 599-1 607.
FAN Z Z, LIU Q, CHAI J W, et al. Apple fruit detection and grading based on color and fruit diameter characteristics [J]. Computer Engineering and Science, 2020, 42(9): 1 599-1 607.
- [19] 王冉冉, 刘鑫, 尹孟, 等. 面向苹果硬度检测仪的声振信号激励与采集系统设计[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2020, 46(1): 111-118.
WANG R R, LIU X, YIN M, et al. Design of acoustic vibration signal excitation and acquisition system for apple hardness tester [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences Edition), 2020, 46(1): 111-118.
- [20] 王泽霞, 陈革, 陈振中. 基于改进卷积神经网络的化纤丝饼表面缺陷识别[J]. 纺织学报, 2020, 41(4): 115-120.
WANG Z X, CHEN G, CHEN Z Z. Surface defect recognition of chemical fiber cake based on improved convolutional neural network[J]. Journal of Textile Research, 2020, 41(4): 115-120.
- [21] 王博, 刘俊康, 陆逢贵, 等. 基于卷积神经网络的食品图像识别[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6 241-6 247.
WANG B, LIU J K, LU F G, et al. Food image recognition based on convolutional neural network[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2019, 10(18): 6 241-6 247.
- [12] HAN J J, ZHANG L, HU L M, et al. Nanozyme-based lateral flow assay for the sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(7): 5 770-5 779.
- [13] LAI Y Q, TENG X, ZHANG Y L, et al. Double stranded DNA-templated copper nanoclusters as a novel fluorescent probe for label-free detection of rutin[J]. Analytical Methods, 2019, 11(28): 3 584-3 589.
- [14] QING T P, LONG C C, W X, et al. Detection of micrococcal nuclease for identifying *Staphylococcus aureus* based on DNA templated fluorescent copper nanoclusters[J]. Mikrochimica Acta, 2019, 186(4): 248.
- [15] HE J L, WANG X X, MEI T T, et al. DNA-templated copper nanoclusters obtained via TdT isothermal nucleic acid amplification for mercury(ii) assay[J]. Analytical Methods, 2019, 11(32): 4 165-4 172.
- [16] SHI Y E, MA J Z, FENG A R, et al. Aggregation-induced emission of copper nanoclusters[J]. Aggregate, 2021, 2(6): e112.
- [17] PANG J W, LU Y X, GAO X Y, et al. Single-strand DNA-scaffolded copper nanoclusters for the determination of inorganic pyrophosphatase activity and screening of its inhibitor [J]. Microchimica Acta, 2020, 187(12): 672.
- [18] LI Y, HUANG Z Z, WENG Y H, et al. Pyrophosphate ion-responsive alginate hydrogel as an effective fluorescent sensing platform for alkaline phosphatase detection [J]. Chemical Communications, 2019, 55(76): 11 450-11 453.
- [19] HU Y L, XIN G, LIN Z, et al. Nitrogen-doped carbon dots mediated fluorescent on-off assay for rapid and highly sensitive pyrophosphate and alkaline phosphatase detection [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 5 849.
- [20] CAO W K, SHAN S, XING K Y, et al. Novel rapid detection of melamine based on the synergistic aggregation of gold nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2023, 428: 136789.

(上接第 43 页)