DOI:10.12441/spyswjs.20241129003 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0163-10

Eu-TRFM免疫层析试纸条检测大肠杆菌O157:H7方法的建立

冯昭仪 吴娅芳 王英林 赵思远 程家洛 郭旭东 刘 箐*

(上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093)

摘要:【目的】建立一种快速、高效且灵敏的大肠杆菌(*Escherichia coli, E. coli*) O157:H7检测方法。**【方法】**运用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)介导法,以时间分辨荧光微球为标记物与抗体进行偶联,使用荧光读取仪定量分析检测大肠杆菌O157:H7。通过对缓冲液的标记pH、时间分辨荧光微球探针添加量、T线抗体质量浓度以及样本与标记抗体的孵育时间进行优化来提高检测灵敏度。**【结果】**在最优条件下,大肠杆菌O157:H7的检测灵敏度可达3.2×10^3 CFU/mL,比传统胶体金免疫层析方法提高了10~1 000倍,并且与其他8株常见的食源性致病菌不存在交叉反应。另外,该方法在人工污染的饮用水、牛奶和牛肉实际样品检测中均表现出良好的检测性能。**【结论】**该Eu-TRFM免疫层析试纸条适用于大肠杆菌O157:H7的检测。

关键词:大肠杆菌O157:H7;时间分辨荧光微球;免疫层析试纸条;检测

Establishment of a Eu-TRFM Immunochromatographic Test Strip for Detection of *Escherichia coli* O157:H7

*FENG Zhaoyi WU Yafang WANG Yinglin ZHAO Siyuan CHENG Jialuo GUO Xudong LIU Qing**

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study is to establish a rapid, efficient, and sensitive method for the detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7. [**Method**] The 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) -mediated method was used to conjugate antibodies with time-resolved fluorescent microspheres (markers), and a fluorescence reader was used for quantitative analysis and detection of *E. coli* O157:H7. The detection sensitivity was improved by optimizing the pH of buffer for labeling, the amount of time-resolved fluorescent microspheres, the mass concentration of T-line antibodies, and the incubation time of samples and labeled antibodies. [**Result**] Under the optimal conditions, the detection sensitivity for *E. coli* O157:H7 reached 3.2×10^3 CFU/mL, which was 10~1 000 times higher than that of colloidal gold immunochromatography, and there was no cross-reaction with other 8 common food-borne pathogens. In addition, the established test strip demonstrated good detection performance for the real samples of artificially contaminated drinking water, milk, and beef. [**Conclusion**] The EU-TRFM immunochromatographic test strip is suitable for the detection of *E. coli* O157:H7.

Keywords: *Escherichia coli* O157: H7; time-resolved fluorescent microspheres; immunochromatographic test strip; detection

---

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2023YFF1105002)。

通信作者:刘箐(1970—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食源性致病菌检测研究。E-mail:liuq@usst.edu.cn

收稿日期:2024-11-29 **修回日期:**2025-01-31

食源性病原微生物是全球食品安全的重大威胁，对人类健康和社会经济发展造成严重危害。其中大肠杆菌O157:H7是最具威胁的食源性致病菌之一，属于革兰氏阴性菌，在蔬果、肉类、牛奶等食品及水中均可发生污染，具有较强的耐干性、耐酸性和耐低温性，污染范围广且适应能力强[1-3]。若儿童、老年人以及免疫功能低下的人群感染大肠杆菌O157:H7，轻则出现无症状排毒或非血性腹泻，重则可导致出血性结肠炎、溶血性尿毒症综合征及血栓性血小板减少性紫癜，甚至死亡[4]。

根据GB 4789.36—2016，传统的增菌、分离、培养及鉴定方法仍是检测大肠杆菌O157:H7的金标准[5]，但存在步骤烦琐、耗时长、稳定性差等缺点。目前，已有多种方法应用于大肠杆菌O157:H7的检测，如分子生物学检测、免疫学检测以及结合电化学生物传感器[6]、表面增强拉曼散射[7]等方法。基于分子生物学检测的方法主要有聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）、实时荧光定量PCR、多重PCR、数字PCR及环介导等温扩增等[8-9]。虽然这些方法检测限低，但依赖特殊仪器、操作步骤仍需增菌培养[10]，不适于即时检测（point-of-care testing，POCT）。同样，基于传感器的检测平台虽具备较高的灵敏度和优良的性能，但受制于昂贵的分析仪器和专业的操作人员[11]，无法实现POCT。基于免疫学的检测方法——酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）是应用最为广泛的检测方法，但存在耗时长、步骤烦琐、灵敏度低等缺陷[12]。然而，与ELISA原理相同的免疫层析试纸条技术通过抗原、抗体特异性结合，可实现快速、准确、灵敏、便捷的大肠杆菌O157:H7即时检测[13]。

在免疫层析试纸条的研发中，研究者侧重对不同标记材料进行研究。当前常见的标记物有胶体金、荧光微球、磁性微球、时间分辨荧光微球及量子点等[14-16]。其中，胶体金因成本低、可视化强等优势被广泛用作抗体标记物。如Song等[17]使用胶体金作为志贺氏菌和大肠杆菌O157:H7的抗体标记材料，开发了一种多组分的免疫层析试纸条，其检测灵敏度为1×10^6 CFU/mL。Li等[18]开发了一种以荧光微球作为免疫层析标记物来检测大肠杆菌O157:H7的新型免疫层析试纸条，检测灵敏度达到3×10^3 CFU/mL，相较于胶体金免疫层析试纸条提升了3个数量级。以铕（Eu^{3+}）为代表的镧系元素时间分辨荧光材料，具备荧光寿命长、斯托克斯位移大、信噪比高等优势[19]，能够进一步提高检测灵敏度，是性能最好的时间分辨荧光发光材料之一。Zhang等[20]研发出一种以Eu^{3+}纳米颗粒偶联抗体作为标记探针的免疫层析试纸条，对牛奶和人血清中的鼠伤寒沙门氏菌进行免疫富集，灵敏度可达1×10^3 CFU/mL。因此，作者以时间分辨荧光微球为标记物，采用EDC介导法偶联抗体，研制了一种使用荧光读取仪定量检测大肠杆菌O157:H7的免疫层析试纸条，以期实现大肠杆菌O157:H7的快速、灵敏、高效检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Eu^{3+}纳米颗粒的时间分辨荧光微球（time-resolved fluorescent microspheres，Eu-TRFM）：上海汇智生物科技有限公司；LB培养基、APW培养基：北京陆桥技术股份有限公司；4-吗啉乙磺酸（MES）：分析纯，Sigma-Aldrich（上海）贸易有限公司；牛血清白蛋白（BSA）：分析纯，上海源叶生物科技有限公司；EDC：化学纯，阿拉丁试剂（上海）有限公司；ProClean 300：上海碧云天生物技术股份有限公司；醋酸钠：分析纯，生工生物工程（上海）股份有限公司；聚乙烯吡咯烷酮（PVP）：优级纯，国药集团化学试剂有限公司；N-羟基丁二酰亚胺（NHS）、冰醋酸：化学纯，国药集团化学试剂有限公司；NC膜：德国Sartorius公司；样品垫、结合垫、吸水垫、PVC底板：上海金标生物科技有限公司。

大肠杆菌O157:H7及其他食源性致病菌均保藏于作者所在实验室，试验菌株见表1。

1.2 仪器与设备

二氧化碳细胞培养箱：Thermo3548型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；电热恒温培养箱：DHP-9082型，上海一恒科学仪器有限公司；电热鼓风干燥箱：DHG-9070A型，上海一恒科学仪器有限公司；试剂卡荧光定量分析仪：ZR-12A型，武汉钟瑞生物科技有限公司；蛋白质提纯仪：Biologic LP型，美国BIO-RAD公司；酶标仪：SpectraMaxM2型，美国Molecular Devices公司；多功能薄层点样仪：

表1　试验菌株

Table 1　Experimental strains

序号	菌株编号	菌株名称
1	ATCC43889	大肠杆菌O157:H7
2	ATCC43895	大肠杆菌O157:H7
3	ATCCHG15	大肠杆菌O91
4	ATCC14028	鼠伤寒沙门氏菌
5	CMCC63301	蜡样芽孢杆菌
6	ATCC14966	金黄色葡萄球菌
7	CMCC51346	鲍氏志贺菌
8	ATCC19114	单增李斯特菌
9	ATCC17802	副溶血性弧菌
10	ATCC33847	副溶血性弧菌

AD1520型，美国BioDot公司；微电脑自动切条机：ZQ2000型，上海金标生物科技有限公司；手动贴板组装机：TB300型，上海金标生物科技有限公司；pH计：PE28-standard型，MET-TLER TPLEDO公司；扫描电子显微镜（SEM）：GeminiSEM 300型，德国ZEISS公司；Zeta电位分析仪：Zetasizer Nano ZS90型，英国Malvern公司；紫外分光光度仪：AMR-340M型，上海恒久医疗器械有限公司。

1.3　试验方法

1.3.1　大肠杆菌O157:H7单克隆抗体制备

通过动物体内诱生法制备大肠杆菌O157:H7单克隆抗体。首先对小鼠进行腹腔封闭处理，即每只小鼠用500 μL不完全弗氏佐剂注射腹腔致敏，增强机体对抗原的免疫应答能力。小鼠处理3 d后，接种约1×10^6 CFU/mL大肠杆菌O157:H7杂交瘤细胞。小鼠腹部肿胀后即可用注射器抽取腹水。

1.3.2　大肠杆菌O157:H7单克隆抗体腹水的纯化

腹水收集完成后，采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化。将腹水于4 ℃、10 000 r/min离心15 min，去除沉淀；随后向上清液中添加2倍体积、浓度为0.06 mol/L、pH为4.8的醋酸钠缓冲液，逐滴向上清液中加入正辛酸（每1 mL上清液加33 μL正辛醇），于4 ℃静置2 h；然后于4 ℃、10 000 r/min离心30 min，取上清液加入等体积的饱和硫酸铵，静置30 min；于4 ℃、10 000 r/min离心20 min，将所得沉淀用0.01 mol/L磷酸缓冲液（PB）重悬至原始体积，并于4 ℃透析2 d；透析完成后过0.22 μm滤膜，并采用蛋白质提纯仪进行纯化，最后在抗体溶液中加保护液，于-20 ℃保存。

1.3.3　时间分辨荧光微球偶联大肠杆菌O157:H7抗体（Eu-TRFM-mAb）的制备及表征

取10 μL Eu-TRFM，加入500 μL浓度为0.05 mol/L、pH为6.5的MES缓冲液，在4 ℃、12 000 r/min离心10 min。离心结束后将沉淀重新溶解于500 μL的MES缓冲液，向混合物中分别加入20 μg EDC和20 μg NHS，于4 ℃避光振荡25 min。随后在4 ℃、12 000 r/min离心10 min，用500 μL MES缓冲液重悬沉淀，并加入适量的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体，在4 ℃避光振荡3 h。振荡结束后，离心弃去上清液。在所得沉淀中加入500 μL质量浓度为10 mg/mL的BSA溶液（用于封闭未结合的活性位点），在4 ℃避光条件下振荡过夜。次日离心并弃去上清液，将沉淀重悬于500 μL的时间分辨荧光微球保存液中，超声处理1 min，于4 ℃避光保存备用。通过SEM、Zeta电位分析仪和紫外分光光度仪对该探针进行表征。

1.3.4　Eu-TRFM免疫层析试纸条组装及检测原理

免疫层析试纸条通常由样品垫、结合垫、NC膜、吸水垫及PVC底板5个部分组成。然而，由于Eu-TRFM的直径较大，样品垫-结合垫以及结合垫-NC膜存在2处连接部位，会对层析效果产生影响。因此这种试纸条由样品垫、NC膜、吸水垫及PVC底板4个部分组成，采用Eu-TRFM标记抗体和样本，并于96孔板中孵育检测[21]。

首先需要对样品垫进行处理，将样品垫切成200 mm×30 mm的尺寸，然后将其浸泡在1 L的0.01 mol/L的PB（含有10 mg/mL蔗糖、体积分数0.5%的Tween 20、5 mg/mL PVP和10 mg/mL BSA）中，于4 ℃冰箱摇晃过夜。第2天取出浸润的样品垫于37 ℃的烘箱中烘干备用。用点样仪将大肠杆菌O157:H7捕获抗体和山羊抗小鼠IgG抗体分别作为T线和C线喷涂于NC膜上，静置过夜使其干燥。将干燥后的NC膜、样品垫和吸水纸贴在PVC底板上，通过压板机完成组装，压实后再用切条机切成3 mm的试纸条，试纸条组装完成后存放在密封袋中备用。

Eu-TRFM免疫层析试纸条的检测原理见图1。取100 μL待测样本与9 μL的Eu-TRFM-mAb于96孔板中充分混匀，在37 ℃下孵育20 min。随后将试纸条放入96孔板中，在层析作用下，样本会

从样品垫经NC膜向吸水垫扩散。当样本中存在大肠杆菌O157:H7时，在孵育过程中会与Eu-TRFM-mAb结合，然后在T线上与大肠杆菌O157:H7捕获抗体形成双抗夹心结构，此后过量的Eu-TRFM-mAb会在C线处与山羊抗小鼠IgG抗体结合。此时的C线和T线在紫外光照射下均产生红色荧光，或者阳性样本T线相对荧光强度比阴性样本T线相对荧光强度高2.1倍及以上时，检测结果判定为阳性。反之，当样本中不存在大肠杆菌O157:H7时，仅C线产生红色荧光，此时检测结果判定为阴性。T线相对荧光强度均通过试纸条荧光定量分析仪输出。

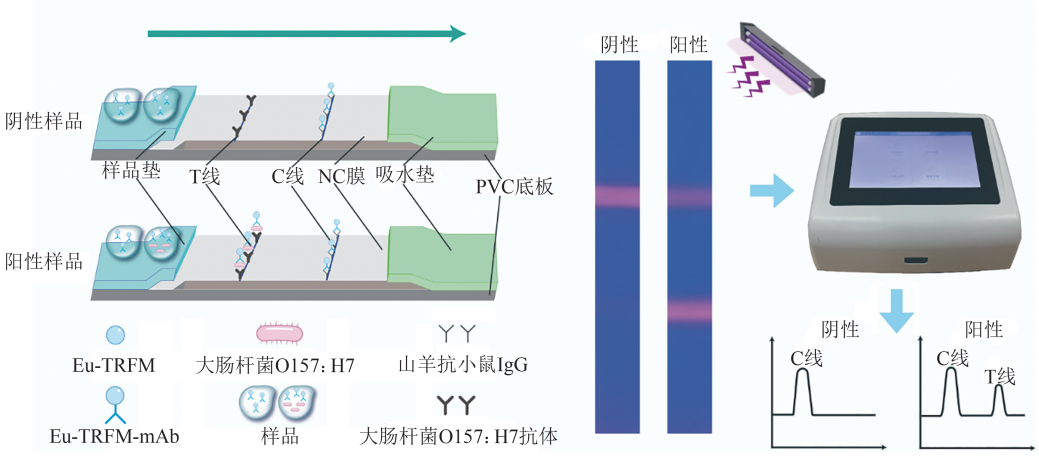


图 1　Eu-TRFM 免疫层析试纸条检测原理示意图

Fig. 1　Schematic diagram of the detection principle of Eu-TRFM immunochromatographic test strips

1.3.5　Eu-TRFM 免疫层析试纸条工艺参数的优化

1）缓冲液的标记pH优化：在Eu-TRFM标记抗体的过程中，MES缓冲液的pH是一个极为关键的参数，它可以影响抗体的活性以及抗体与标记物的偶联效率，进而影响检测方法的灵敏度。因此，设置不同的标记pH（5.0、5.5、6.0、6.5、7.0），并确定Eu-TRFM标记抗体的最优pH，其余步骤与1.3.3时间分辨荧光微球偶联抗体的制备流程一致。

2）探针添加量优化：探针添加量也是影响免疫层析方法灵敏度的关键参数之一。在标记过程中，选用标记抗体最优的pH，研究Eu-TRFM探针添加量（3、5、7、9、11 μL）对T线相对荧光强度的影响，确定最佳探针添加量。

3）T线抗体质量浓度优化：为消除背景值干扰，设置不同T线质量浓度（0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mg/mL），确定最优T线抗体质量浓度。

4）样本与标记抗体的孵育时间优化：设置最优的缓冲液标记抗体pH、探针添加量及T线抗体质量浓度，探究样本与标记抗体孵育时间（5、10、15、20、25、30 min）对T线相对荧光强度的影响，确定最佳孵育时间。

1.3.6　Eu-TRFM 免疫层析试纸条性能测定

1）灵敏度测定：将大肠杆菌O157:H7过夜培养至菌液浓度高于1×10^8 CFU/mL，涂布计算菌落数，用灭菌的LB培养基进行梯度稀释，分别取100 μL不同浓度（1×10^1、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、1×10^8 CFU/mL）的菌液与探针加入96孔板中，混合均匀并孵育，10 min后用荧光定量分析仪测定试纸条T线相对荧光强度，并于紫外灯下观察检测结果，确定其灵敏度。

2）特异性测定：对大肠杆菌O91、鼠伤寒沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、鲍氏志贺菌、单增李斯特菌、2株副溶血性弧菌、大肠杆菌O157:H7标准菌株进行Eu-TRFM免疫层析试纸条的特异性验证。

3）实际样品测定：为测定Eu-TRFM免疫层析试纸条在实际样品中的检测灵敏度，将饮用水和牛奶经0.22 μm的滤膜过滤、牛肉经均质离心过滤，然后分别加入1×10^1~1×10^8 CFU/mL的大肠杆菌O157:H7菌液，分析试纸条在实际样品中的检测效果。另外，为进一步验证试纸条在实际样品中检测低水平大肠杆菌O157:H7的可行性，参考王英林等[22]的方法，用试纸条检测人工污染的食品来模拟

检测被大肠杆菌O157:H7污染的实际样品。

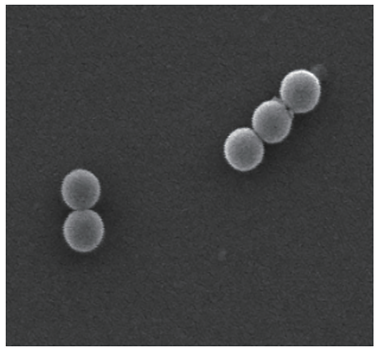
1.4　数据处理与分析

以红米K60手机捕捉试纸条荧光图像，条带图像相对荧光强度由荧光定量分析仪输出，利用Microsoft Office Excel 2016和GraphPad Prism 9软件对试验数据进行处理及绘图。

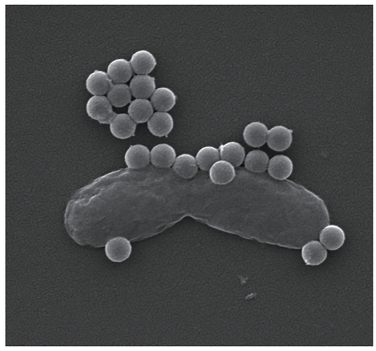
2　结果与讨论

2.1　Eu-TRFM与Eu-TRFM-mAb的表征

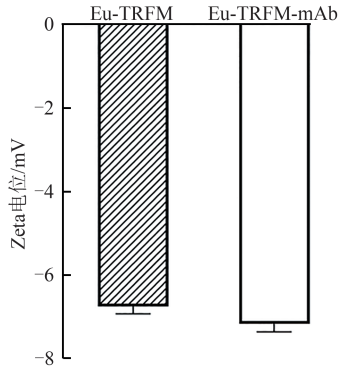
通过SEM、Zeta电位分析仪和紫外分光光度仪对Eu-TRFM和Eu-TRFM-mAb进行表征，结果见图2。SEM结果显示，Eu-TRFM表面光滑、形态均匀且规则，而Eu-TRFM-mAb变化不明显，仅边缘处有轻微凸起。这是因为与抗体相比，Eu^{3+}纳米颗粒粒径相对较大。Zeta电位结果显示，与Eu-TRFM相比，Eu-TRFM-mAb电位明显下降。紫外吸收光谱显示，两者在250 nm处均存在最高峰，且Eu-TRFM偶联抗体后吸光度降低。这些结果均表明大肠杆菌O157:H7抗体与Eu-TRFM偶联成功。



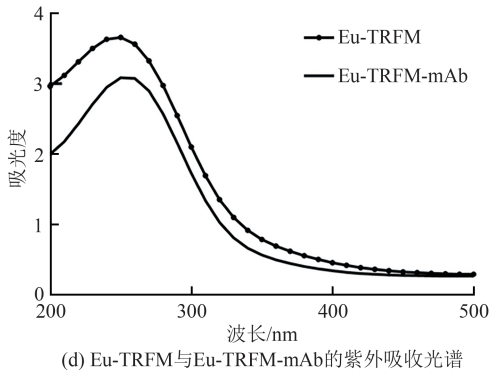
(a) Eu-TRFM的SEM图



(b) Eu-TRFM-mAb捕获大肠杆菌的SEM图



(c) Eu-TRFM与Eu-TRFM-mAb的Zeta电位



(d) Eu-TRFM与Eu-TRFM-mAb的紫外吸收光谱

图2　Eu-TRFM与Eu-TRFM-mAb的表征

Fig. 2　Characterization of Eu-TRFM and Eu-TRFM-mAb

2.2　Eu-TRFM免疫层析试纸条工艺参数的优化

2.2.1　缓冲液的标记pH优化

缓冲液的标记pH会影响抗体活性及抗体与标记物的偶联效率，进而影响方法的灵敏度[23]。缓冲液的标记pH对试纸条T线相对荧光强度的影响见图3(a)。随着标记pH的升高，试纸条T线相对荧光强度先降低后升高，随后再降低。当pH为6.5的MES缓冲液标记抗体时，试纸条的T线相对荧光强度最高，且在紫外光下裸眼观测荧光最强。因此，在pH为6.5时进行抗体标记，试纸条检测效果最佳。

2.2.2　Eu-TRFM探针添加量优化

为提高层析效率，采用样本与探针在96孔板中孵育的方式使抗原与标记抗体结合，以减少结合垫导致的探针堵塞，进而降低试纸条层析不顺畅的问题。此外，探针添加量过多会干扰背景荧光，而探针添加量不足则无法达到所需荧光强度，因此需探索Eu-TRFM探针的最佳添加量[24]。由图3(b)可知，随着探针添加量的增加，T线相对荧光强度逐渐升高，在探针添加量为

11 μL时达到最大值。综合考虑紫外光下裸眼观测荧光强度不宜过强及试验成本等因素，最终确定最佳探针添加量为9 μL。

2.2.3　T线抗体质量浓度优化

在免疫层析试纸条中，T线抗体质量浓度的优化至关重要。若T线抗体质量浓度过高，痕量样本难以被检测，会导致试纸条灵敏度降低；而当T线抗体质量浓度过低时，T线相对荧光强度减弱，导致荧光不易辨别，并且会使定量检测读数出现一定偏差[25]。如图3(c)所示，随着T线抗体质量浓度的增加，T线相对荧光强度先增加后趋于稳定。当T线抗体质量浓度超过1.0 mg/mL时，T线相对荧光强度较为稳定，在1.2 mg/mL时T线相对荧光强度最大。一般情况下，T线抗体质量浓度过高会导致抗原、抗体的非特异性结合，从而影响检测结果。因此，确定最佳T线抗体质量浓度为1.2 mg/mL。

2.2.4　样本与标记抗体孵育时间优化

考虑到样本与标记抗体间存在孵育过程，且孵育时间会影响试纸条的相对荧光强度及检测结果，因此对样本与标记抗体的孵育时间进行优化，结果见图3(d)。随着孵育时间的延长，T线相对荧光强度先小幅度下降，随后上升至最高点，之后再明显下降。当孵育时间为20 min时，T线相对荧光强度最大；而当孵育时间为30 min时，T线相对荧光强度急剧下降，可能是由于长时间的孵育会导致Eu-TRFM与偶联抗体解离，使抗体标记率降低，T线相对荧光强度下降[26]。因此，样本与标记抗体的最佳孵育时间为20 min。

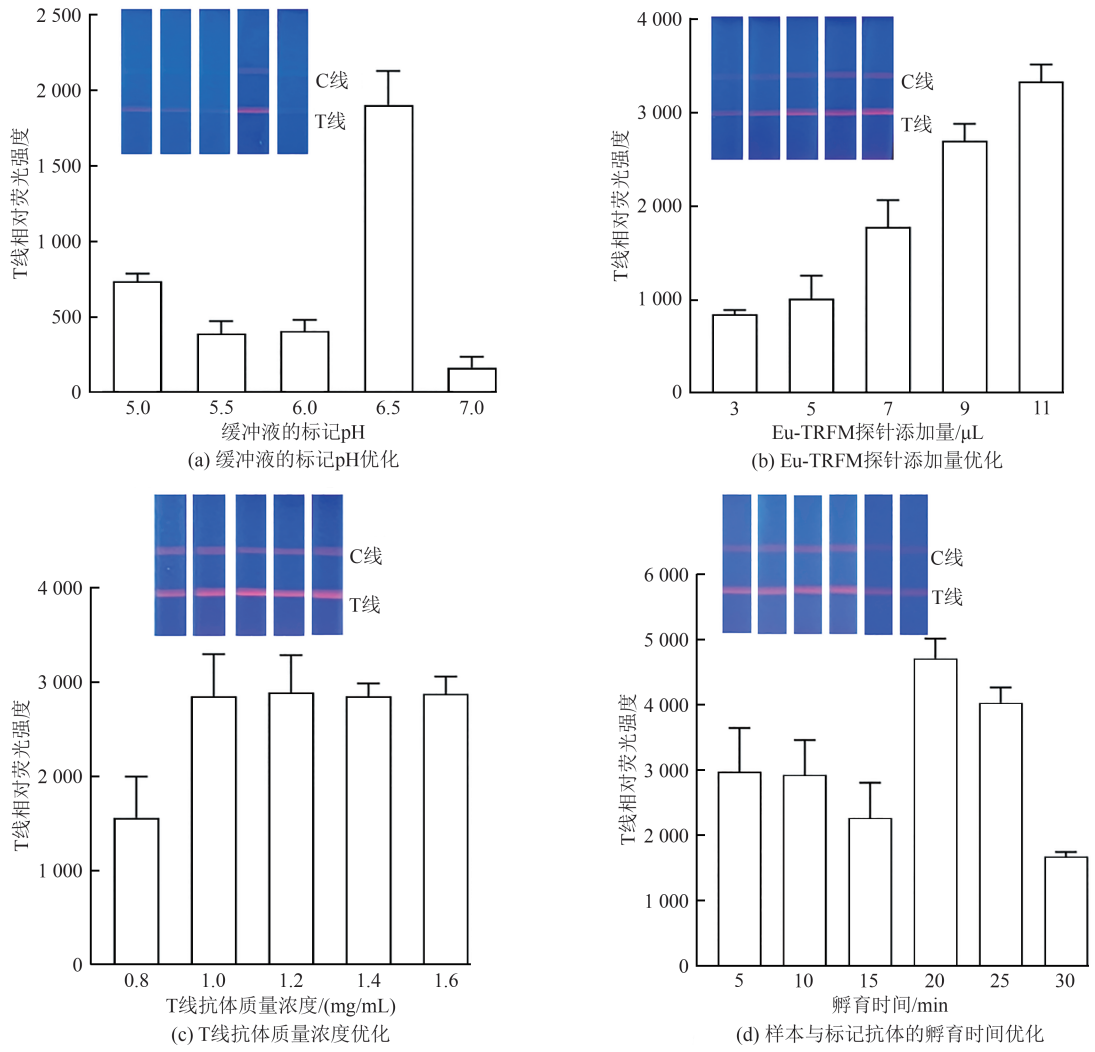


图3　Eu-TRFM免疫层析试纸条工艺参数的优化

Fig. 3　Optimization of process parameters of Eu-TRFM immunochromatographic test strips

2.3　Eu-TRFM 免疫层析试纸条的灵敏度结果

基于上述优化条件，对 Eu-TRFM 免疫层析试纸条的灵敏度进行测定。试纸条的灵敏度检测结果如图 4 所示，在紫外灯下裸眼识别大肠杆菌 O157：H7 的灵敏度为 3.2×10^4 CFU/mL，而经荧光定量分析仪检测分析大肠杆菌 O157：H7 的灵敏度为 3.2×10^3 CFU/mL，满足阳性样本 T 线相对荧光强度高于阴性样本 T 线相对荧光强度的 2.1 倍这一准则。结果表明，仅依靠裸眼识别会产生一定偏差，无法精准判定检测结果；而通过荧光质量分析仪分析，不仅能对样本进行定量，还能使检测灵敏度提升一个数量级，与传统的胶体金免疫层析方法（灵敏度 1×10^4~1×10^6 CFU/mL）相比[17,27]，灵敏度提高了 10~1 000 倍。根据大肠杆菌 O157：H7 浓度与 T 线相对荧光强度的数值关系，校准出 $y=0.002\ 224x+489.7$（$R^2=0.954\ 0$）的标准曲线，用于大肠杆菌 O157：H7 的定量分析。

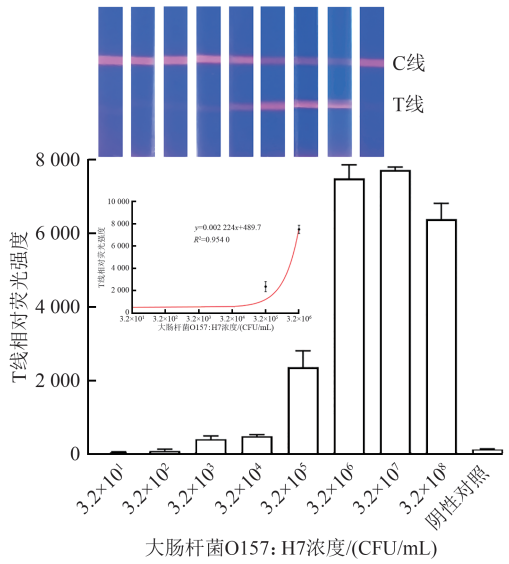
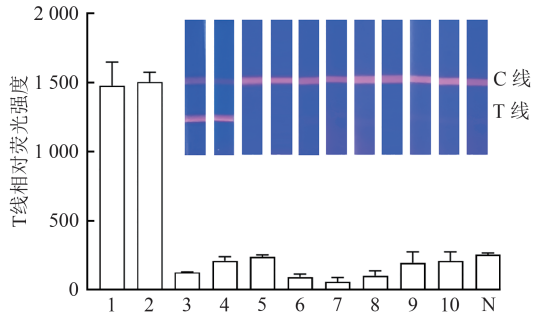


图 4　Eu-TRFM 免疫层析试纸条的灵敏度及校准曲线

Fig. 4　Sensitivity and calibration curve of Eu-TRFM immunochromatographic test strips

2.4　Eu-TRFM 免疫层析试纸条的特异性结果

试纸条的特异性检测结果如图 5 所示，试纸条只有在检测大肠杆菌 O157：H7（ATCC43889、ATCC43895）时，C 线和 T 线会出现明显条带，且其 T 线相对荧光强度远高于阴性 T 线相对荧光强度的 2.1 倍；而试纸条检测其他 8 株常见的食源性致病菌时，仅在 C 线出现荧光条带。结果表明，该 Eu-TRFM 免疫层析试纸条对大肠杆菌 O157：H7 的检测具有良好的特异性且无任何交叉反应。



1—大肠杆菌 O157：H7(ATCC43889)；2—大肠杆菌 O157：H7(ATCC43895)；3—大肠杆菌 O91(ATCCHG15)；4—鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)；5—蜡样芽孢杆菌(CMCC63301)；6—金黄色葡萄球菌(ATCC14966)；7—鲍氏志贺菌(CMCC51346)；8—单增李斯特菌(ATCC19114)；9—副溶血性弧菌(ATCC17802)；10—副溶血性弧菌(ATCC33847)；N—阴性对照。

图 5　Eu-TRFM 免疫层析试纸条的特异性结果

Fig. 5　Specificity of Eu-TRFM immunochromatographic test strips

2.5　Eu-TRFM 免疫层析试纸条的实际样品测定结果

为了验证该方法在实际样品检测中的适用性，选择了饮用水、牛奶和牛肉进行灵敏度的检测，结果见图 6。当菌液浓度为 4.3×10^5 CFU/mL 时，在饮用水、牛奶和牛肉中均可在紫外光下裸眼观察到 T 线上有微弱荧光。而经荧光定量分析仪检测发现，在饮用水中，菌液浓度为 4.3×10^3 CFU/mL 时，T 线相对荧光强度是阴性 T 线相对荧光强度的 2.1 倍；而在牛奶和牛肉基质中，菌液浓度为 4.3×10^4 CFU/mL 时，T 线相对荧光强度是阴性 T 线相对荧光强度的 2.1 倍。结果表明，与 LB 介质中的灵敏度相比，该方法在实际样品中的检测灵敏度明显下降，这主要是由于食品基质中的复杂成分导致了荧光猝灭。另外，与饮用水相比，牛奶和牛肉基质的影响更大。根据荧光定量分析仪的相对荧光强度对实际样品的灵敏度进行曲线拟合，发现在一定线性范围内菌液浓度与相对荧光强度之间仍存在较好的线性相关性。

用 Eu-TRFM 免疫层析试纸条检测人工污染大肠杆菌 O157：H7 的牛肉和牛奶，在增菌 0~12 h 期间每隔 1 h 收集样品，试纸条的模拟带菌试验检测结果见图 7。结果表明，牛肉和牛奶样品孵育 6 h 时，在紫外灯下裸眼观察试纸条的 C 线和 T

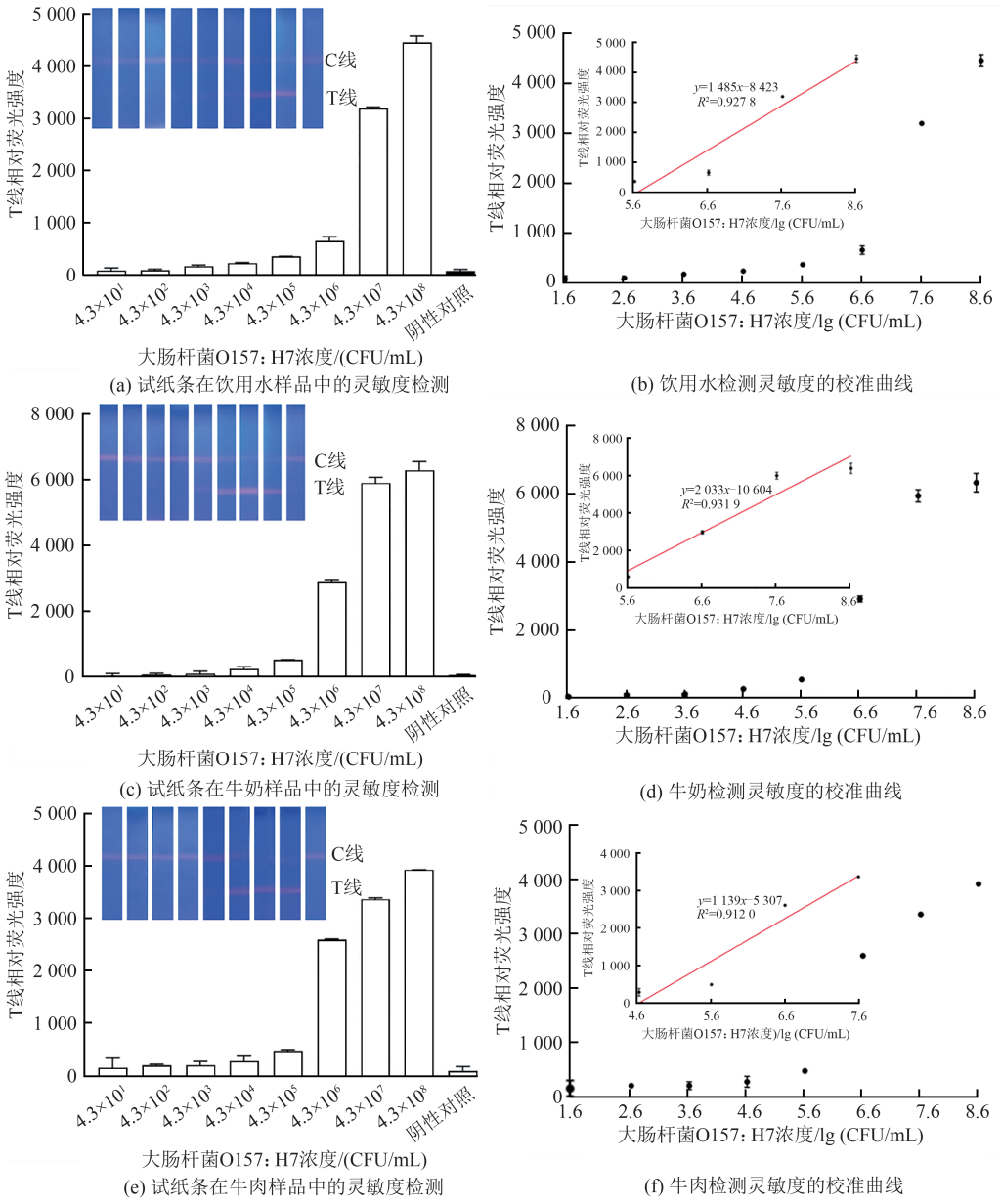


图 6　Eu-TRFM 免疫层析试纸条的实际样品测定结果

Fig. 6　Detection results of Eu-TRFM immunochromatographic test strips for real samples

线均有明显的荧光条带，呈阳性。经荧光定量分析仪检测，在牛肉样品孵育 0、5、6 h 时，T 线相对荧光强度分别为 167.00、158.33、923.33，故在牛肉样品孵育 6 h 时，T 线相对荧光强度是阴性 T 线相对荧光强度的 2.1 倍，呈阳性，与裸眼观测结果一致。在牛奶样品孵育 0、2、3、4、5、6 h 时，T 线相对荧光强度分别为 38.00、111.67、146.33、168.33、212.33、1 195.67，故在牛奶样品孵育 2 h 时，T 线相对荧光强度已是阴性 T 线相对荧光强度的 2.1 倍，但在该孵育时间无法裸眼观察到试纸条的荧光。这主要是由于裸眼识别不够灵敏，存在主观误差；另外，食品基质成分复杂会使荧光猝灭严重，但在牛肉样品中影响较小，可能是因为与牛奶样品相比，取样时的牛肉样品更为澄清，基质影响较小。该模拟带菌试验的研究方法参照的是 GB 4789.36—2016 的常规培养法的增菌流程[5]，一定程度上确保了检测结果的准确性。将该结果与国家标准相比，发现原来需要 18~24 h 的增菌培养，现在仅需 6 h，大大提高了检测效率。

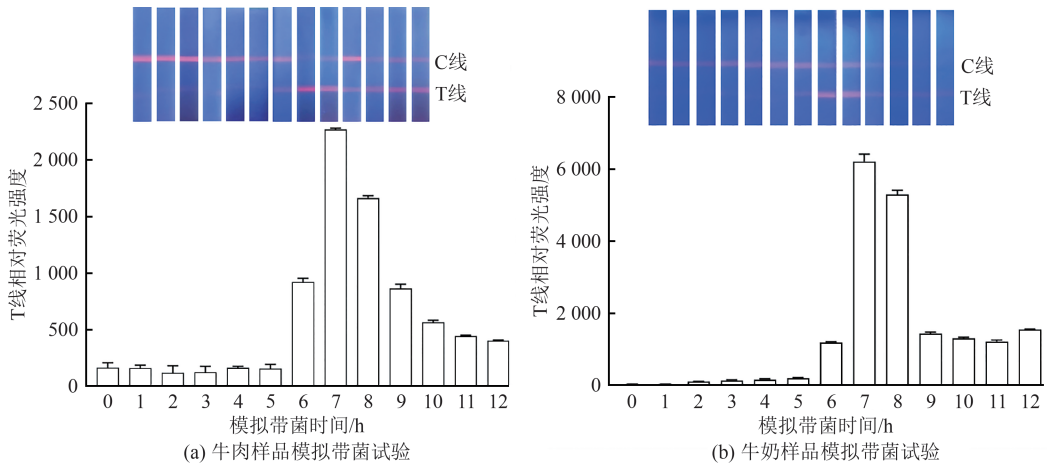


图7　Eu-TRFM免疫层析试纸条的模拟带菌试验结果

Fig. 7　Detection results of Eu-TRFM immunochromatographic test strips for artificially contaminated samples

3　结论

作者建立了一种快速、便捷且可定量检测大肠杆菌O157:H7的Eu-TRFM免疫层析试纸条，比较了在紫外光下裸眼观察荧光和采用荧光定量分析仪检测荧光的差别。结果表明，在缓冲液标记pH 6.5、探针添加量9 μL、T线抗体质量浓度1.2 mg/mL、孵育20 min时，采用Eu-TRFM免疫层析试纸条，在紫外光下裸眼观察大肠杆菌O157:H7的灵敏度为3.2×10^4 CFU/mL，而荧光定量分析仪检测大肠杆菌O157:H7的灵敏度为3.2×10^3 CFU/mL，且与其他8株常见的食源性致病菌不存在交叉反应。另外，在人工污染的饮用水、牛奶和牛肉实际样品检测中均表现出良好的检测性能。作者将Eu-TRFM作为抗体标记材料与荧光定量分析仪结合提高了大肠杆菌O157:H7的检测灵敏度，为开发其他食源性致病菌免疫层析试纸条提供了参考依据及发展方向。但该研究也存在一定的局限性，如对低浓度的大肠杆菌O157:H7无法实现即时检测，仍需增菌富集才可检出。为进一步提高检测灵敏度，未来需要探索新的标记材料及平台。

参考文献

[1] YIN M M, LIU C W, GE R, et al. Paper-supported near-infrared-light-triggered photoelectrochemical platform for monitoring *Escherichia coli* O157: H7 based on silver nanoparticles-sensitized-upconversion nanophosphors[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 203: 114022.

[2] BURGESS C M, GIANOTTI A, GRUZDEV N, et al. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 221: 37-53.

[3] 曹宁，申炳阳，喻梓瑄，等. 用于3种食源性致病菌核酸提取的微流控芯片制备[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(1)：28-35.
CAO N, SHEN B Y, YU Z X, et al. Microfluidic chip for nucleic acid extraction of three food-borne pathogenic bacteria[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(1): 28-35. (in Chinese)

[4] BAI Z Z, XU X B, WANG C, et al. A comprehensive review of detection methods for *Escherichia coli* O157: H7[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2022, 152: 116646.

[5] 中华人民共和国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：GB 4789.36—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2017.

[6] LI Y, LIU H M, HUANG H, et al. A sensitive electrochemical strategy *via* multiple amplification reactions for the detection of *E. coli* O157: H7[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 147: 111752.

[7] YOU S M, LUO K, JUNG J Y, et al. Gold nanoparticle-coated starch magnetic beads for the separation, concentration, and SERS-based detection of *E. coli* O157: H7[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(16): 18292-18300.

[8] XIA X F, ZHANG B C, WANG J, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 by loop-mediated isothermal amplification coupled with a lateral flow assay targeting the *z*3276 genetic marker[J]. Food Analytical Methods, 2022, 15(4): 908-916.

[9] LEI S W, GU X K, ZHONG Q P, et al. Absolute quantification of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex droplet digital PCR for simultaneous detection of *tlh*, *tdh*

and *ureR* based on single intact cell[J]. Food Control, 2020,114:107207.

[10] LEE S Y, OH S W. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Talanta, 2022,241:123186.

[11] 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):9237-9243.

[12] XIONG Y, LENG Y K, LI X M, et al. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples [J]. Trends in Analytical Chemistry,2020,126:115861.

[13] ZHANG Y,XIAO W,KONG H,et al. A highly sensitive immunochromatographic strip test for rapid and quantitative detection of saikosaponin d[J]. Molecules, 2018, 23(2):338.

[14] ZHAO Y, LI Y Z, ZHANG P P, et al. Cell-based fluorescent microsphere incorporated with carbon dots as a sensitive immunosensor for the rapid detection of *Escherichia coli* O157 in milk[J]. Biosensors and Bioelectronics,2021,179:113057.

[15] HUANG Z, PENG J, HAN J J, et al. A novel method based on fluorescent magnetic nanobeads for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Chemistry,2019, 276:333-341.

[16] 张富生,王宇宸,卢礼生,等. 量子点微球免疫层析试纸条检测鸡蛋中恩诺沙星的性能评价[J]. 食品与机械, 2023,39(9):32-37,70.
ZHANG F S, WANG Y C, LU L S, et al. Evaluation of the performance of enrofloxacin in the detection of egg by quantum dot microsphere immunochromatography strip[J]. Food & Machinery,2023,39(9):32-37,70.(in Chinese)

[17] SONG C M, LIU C, WU S Y, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the simultaneous detection of *Shigella boydii* and *Escherichia coli* O157:H7 in bread, milk and jelly samples[J]. Food Control,2016,59:345-351.

[18] LI Q R, YANG Y X, HU F, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by a fluorescent microsphere-based immunochromatographic assay and immunomagnetic separation[J]. Analytical Biochemistry,2019,564:32-39.

[19] SIITARI H, HEMMILÄ I, SOINI E, et al. Detection of hepatitis B surface antigen using time-resolved fluoroimmunoassay [J]. Nature, 1983, 301 (5897): 258-260.

[20] ZHANG Y Y, REN F Z, WANG G X, et al. Rapid and sensitive pathogen detection platform based on a lanthanide-labeled immunochromatographic strip test combined with immunomagnetic separation[J]. Sensors and Actuators B:Chemical,2021,329:129273.

[21] MOLINELLI A, GROSSALBER K, KRSKA R. A rapid lateral flow test for the determination of total type B fumonisins in maize[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2009,395(5):1309-1316.

[22] 王英林,吴娅芳,刘程,等. 纳米金与纳米金花标记的免疫层析法的建立及快速检测大肠杆菌O157∶H7的比较研究[J]. 食品与发酵工业,2023,49(22):287-294.
WANG Y L, WU Y F, LIU C, et al. Establishment of gold nanoparticles and gold nanoflowers labeled immunochromatographic assay and comparison of rapid detection of *Escherichia coli* O157∶H7[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49 (22): 287-294.(in Chinese)

[23] WANG X, WU X, LU Z S, et al. Comparative study of time-resolved fluorescent nanobeads, quantum dot nanobeads and quantum dots as labels in fluorescence immunochromatography for detection of aflatoxin B_1 in grains[J]. Biomolecules,2020,10(4):575.

[24] LI S X, LIU W H, LIU M X, et al. A sensitive lateral flow immunoassay relying on time-resolved fluorescent microspheres immune probe for determination of ceftiofur and its metabolite[J]. Talanta,2024,271:125580.

[25] WEN Z H, HU X L, YAN R F, et al. A reliable upconversion nanoparticle-based immunochromatographic assay for the highly sensitive determination of olaquindox in fish muscle and water samples[J]. Food Chemistry, 2023,406:135081.

[26] WU Y F, WANG Y L, WU Y X, et al. Label-free multi-line immunochromatographic sensor based on TCBPE for broad-spectrum detection *Salmonella* in food [J]. Analytica Chimica Acta,2024,1320:343006.

[27] SHIN J H, HONG J, GO H, et al. Multiplexed detection of foodborne pathogens from contaminated lettuces using a handheld multistep lateral flow assay device[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2018,66(1):290-297.

（责任编辑：刘冬梅）