

分类号:

密级: 否



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

氨基功能化磁性纳米粒子富集结合多重 PCR 检测食源性
致病菌

DETECTION OF FOOD-BORNE PATHOGENIC
BACTERIA BY AMINO FUNCTIONALIZED
MAGNETIC NANOPARTICLES ENRICHMENT
COMBINED WITH MULTIPLEX PCR

研究生: 孙程
CANDIDATE: SUN CHENG

学号: 2016309110016
STUDENT NO.: 2016309110016

专业: 食品科学
MAJOR: FOOD SCIENCE

导师: 吴仁蔚 副教授
SUPERVISOR: WU RENWEI ASSOCIATE PROFESSOR

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇一九年 六月

JUNE, 2019

华中农业大学硕士学位论文

氨基功能化磁性纳米粒子富集结合多重 PCR 检测
食源性致病菌

**Detection of Food-borne Pathogenic Bacteria by
Amino Functionalized Magnetic Nanoparticles
Enrichment Combined with Multiplex PCR**

研 究 生：孙程

学 号：2016309110016

指导教师：吴仁蔚 副教授

指导小组：陈福生 教授
王小红 教授
邵彦春 教授
张秀艳 副教授
周有祥 副教授
李锦铨 副教授
陈涛 副教授
李牧 副教授
王佳 讲师

专业：食品科学

研究方向：食品安全

获得学位名称：工学硕士

获得学位时间：2019 年 6 月

华中农业大学食品科学技术学院

二〇一九年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	
独创性声明			
<p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
研究生签名: 孙程		时间: 2019年6月24日	
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p>注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。</p>			
学位论文作者签名: 孙程		导师签名: 吴仁藩	
签名日期: 2019年6月24日		签名日期: 2019年6月24日	

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

目 录

摘 要.....	i
Abstract.....	iii
缩略语表.....	vi
第一章 文献综述.....	1
1 食源性致病菌.....	1
1.1 沙门氏菌.....	1
1.2 单增李斯特菌.....	1
1.3 金黄色葡萄球菌.....	2
1.4 大肠杆菌.....	2
2 磁性纳米粒子.....	2
2.1 Fe ₃ O ₄ 磁性纳米粒子的制备.....	3
2.2 磁性纳米粒子的表面功能化.....	4
2.3 功能化磁性纳米粒子的应用.....	6
2.3.1 分离纯化生物分子.....	6
2.3.2 环境检测与修复.....	7
2.3.3 细菌的富集和检测.....	8
3 食源性致病菌检测方法.....	10
4 研究目的及意义.....	11
5 技术路线.....	12
第二章 AF-MNPs 的制备及表征.....	13
1 材料与方法.....	13
1.1 主要试剂.....	13
1.2 主要仪器.....	14
1.3 主要试剂及培养基的配制.....	14
1.4 方法.....	15
1.4.1 Fe ₃ O ₄ 磁性纳米粒子的制备.....	15
1.4.2 氨基功能化磁性纳米粒子的制备.....	15
1.4.3 磁性纳米粒子的表征.....	16

2 结果与分析.....	17
2.1 磁性纳米粒子形态及粒径.....	17
2.2 磁性纳米粒子 Zeta 电位值及分散性.....	17
2.3 磁性纳米粒子表面功能基团的分析.....	18
2.4 不同 pH 条件下磁性纳米粒子 Zeta 电位值.....	19
3 小结与讨论.....	20
3.1 讨论.....	20
3.2 小结.....	22
第三章 氨基功能化磁性纳米粒子富集食源性病原菌.....	23
1 材料与方法.....	23
1.1 主要试剂.....	23
1.2 主要仪器.....	24
1.3 实验菌株.....	24
1.4 方法.....	25
1.4.1 细菌培养.....	25
1.4.2 AF-MNPs 对捕获效率的影响.....	25
1.4.2.1 AF-MNPs 用量对捕获率的影响.....	25
1.4.2.2 AF-MNPs 捕获时间对捕获率的影响.....	26
1.4.3 细菌自身对捕获效率的影响.....	26
1.4.3.1 细菌 Zeta 电位值的测定.....	26
1.4.3.2 细菌生长状态对捕获率的影响.....	26
1.4.3.3 菌液浓度对捕获率的影响.....	27
1.4.4 缓冲体系对捕获效率的影响.....	27
1.4.4.1 缓冲液浓度对捕获率的影响.....	27
1.4.4.2 缓冲液 pH 对捕获率的影响.....	28
1.4.4.3 大体积溶液中 AF-MNPs 的捕获能力.....	28
1.4.5 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌.....	28
1.4.5.1 AF-MNPs 富集人工污染牛奶和西瓜中的病原菌.....	28
1.4.5.2 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌.....	29

2 结果与分析.....	29
2.1 AF-MNPs 对捕获效率的影响.....	29
2.1.1 AF-MNPs 用量和捕获时间的影响.....	29
2.2 细菌对捕获效率的影响.....	31
2.2.1 不同种类细菌的影响.....	31
2.2.2 不同生长阶段细菌的捕获率.....	32
2.2.3 不同浓度 S.aureus 的捕获率.....	34
2.3 缓冲体系对捕获效率的影响.....	35
2.3.1 不同浓度缓冲液的捕获率.....	35
2.3.2 不同 pH 缓冲液的捕获率.....	35
2.3.3 大体积溶液中 AF-MNPs 的捕获效率.....	37
2.4 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌.....	37
2.4.1 AF-MNPs 富集人工污染牛奶和西瓜中 4 种食源性致病菌.....	37
2.4.2 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌.....	38
3 小结与讨论.....	40
3.1 讨论.....	40
3.2 小结.....	42
第四章 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测食源性致病菌.....	44
1 材料与方法.....	44
1.1 主要试剂.....	44
1.2 主要仪器.....	45
1.3 实验菌株.....	45
1.4 引物.....	46
1.5 方法.....	46
1.5.1 模板 DNA 的制备.....	46
1.5.2 PCR 反应体系及扩增程序.....	46
1.5.3 引物特异性验证.....	47
1.5.4 灵敏度验证.....	47
1.5.5 多重 PCR 反应体系优化.....	47

1.5.6 人工污染牛奶的检测.....	48
2 结果与分析.....	49
2.1 引物的特异性.....	49
2.2 PCR 反应体系的灵敏度.....	51
2.3 多重 PCR 体系优化.....	53
2.4 退火温度优化.....	54
2.5 检测三种食源性致病菌人工污染的牛奶样品.....	54
3 小结与讨论.....	58
3.1 讨论.....	58
3.2 小结.....	59
第五章 总结与展望.....	60
1 总结.....	60
2 展望.....	61
参考文献.....	63
附录 攻读硕士学位期间已发表的论文.....	73
致 谢.....	74

摘要

食品生产过程中可能受到多重病原菌的污染，对消费者的健康造成严重威胁，快速检测食品中的致病菌，对保障食品安全十分重要。然而食品中污染的病原菌通常数量较少，且食品成分中存在干扰性物质，影响检测方法的灵敏度及特异性，因此，对食品中致病菌进行分离或富集是十分重要的。磁性纳米粒子（Magnetic Nanoparticles, MNPs）具有良好的生物相容性，而且容易分离，在食源性致病菌的分离和检测方面受到青睐。

本研究制备一种带正电荷的氨基功能化磁性纳米粒子（Amino functionalized magnetic nanoparticles, AF-MNPs），与负电荷的细菌间静电相互作用，对细菌进行富集，结合多重 PCR 法检测食品中金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、单增李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）和肠炎沙门氏菌（*Salmonella enteritidis*）。具体研究内容和结果总结如下。

1) AF-MNPs 的制备及表征。通过化学共沉淀法制备 Fe_3O_4 MNPs，表面修饰 3-氨丙基三乙氧基硅烷（APTES），合成了表面携带正电荷的 AF-MNPs，并进行表征。结果表明制备的 AF-MNPs 呈球形或类球形，粒径约为 10 nm，电镜下一定程度上有团聚现象，纳米粒度分析仪测定分散型指数（Polydispersity index, PDI）为 0.10 ± 0.036 ，分散性良好，等电点在 9.4 左右，在 pH 2-9 其表面带正电荷。

2) AF-MNPs 富集食源性致病菌。AF-MNPs 对细菌的吸附捕获主要是基于带正电荷的 MNPs 和带负电荷的细菌之间的静电相互作用。以 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*S.enteritidis* 和大肠杆菌（*Escherichia coli*）为目标菌株，研究 AF-MNPs 与细菌之间相互作用的影响因素，包括 AF-MNPs、细菌和缓冲体系。结果表明，以 100 μg AF-MNPs 与浓度为 10^3 CFU/mL 的细菌在 PBS 中温育 60 min，对 *S.aureus*、*E.coli*、*L.monocytogenes* 的捕获率均高于 97%，但对 *S.enteritidis* 的捕获率低于 40%；在 pH 5-9 PBS（10 mmol/L）中，AF-MNPs 对 *S.aureus* 和 *E.coli* 的捕获率均大于 80%，在 pH 4-8 PBS（10 mmol/L）时，AF-MNPs 对 *L.monocytogenes* 的捕获率均大于 75%；在 PBS 浓度为 5-30 mmol/L 范围内对 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*E.coli* 的捕获率分别保持在 75%、85% 以及 90% 以上；在研究的 4 种细菌中，*S.enteritidis* 的 Zeta 电位值最小，捕获率最低；100 μg 的 AF-MNPs 对细菌浓度在 10^2 - 10^6 CFU/mL 的范围内捕获率高于 85%；在体积

为 10 mL 的缓冲溶液中，对浓度为 4 CFU/mL、40 CFU/mL 和 400 CFU/mL 的细菌捕获率超过 90%。

人工污染牛奶中，AF-MNPs 对 *S.aureus*，*E.coli*，*L.monocytogenes* 和 *S.enteritidis* 的最高捕获效率分别为 67.14%±1.33%、62.89%±0.68%、57.92%±2.93% 和 30.26%±0.69%；在人工污染的西瓜样品中，AF-MNPs 对于 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*E.coli* 和 *S.enteritidis* 的最高捕获率分别为 85.38%±0.63%、69.84%±2.97%、79.28%±0.90% 和 31.66%±3.30%。为了检验 AF-MNPs 的适用性，采集 8 种咸菜样品和 6 种卤肉样品，AF-MNPs 对咸菜食品中细菌的捕获率均高于 75%，对卤肉样品的捕获率均高于 65%。

3) AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测食源性致病菌。以 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测人工污染牛奶中的 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 和 *S.enteritidis*。牛奶受到污染时，经 AF-MNPs 富集的人工污染牛奶样品中，*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *L.monocytogenes* 的灵敏度分别为 2 CFU/mL、 2×10^2 CFU/mL 和 2 CFU/mL。而未经 AF-MNPs 分别捕获富集的人工污染牛奶样品中，*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *L.monocytogenes* 的灵敏度分别为 2×10^2 CFU/mL、 2×10^3 CFU/mL 和 2×10^3 CFU/mL。将三种食源性致病菌进行等浓度污染牛奶样品，经 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测，对 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 和 *S.enteritidis* 的灵敏度为 20 CFU/mL、 2×10^2 CFU/mL 和 2×10^2 CFU/mL，较直接进行多重 PCR，灵敏度分别提高 100 或 1000 倍，因此，AF-MNPs 富集可以减少食品成分对检测方法的干扰，有效提高多重 PCR 检测的灵敏度。

关键词：氨基功能化磁性纳米粒子；食源性致病菌；静电相互作用；细菌富集；多重 PCR；

Abstract

During food processing, it may be polluted by multiple pathogens, which poses a serious threat to the health of consumers. So it is of great importance for the rapid detection of the pathogenic bacteria in food to ensure food safety. However, pathogenic bacteria in food are usually in a low concentration, and there is the presence of disruptive substances in food components, all of which leads to a decrease in the sensitivity and specificity of the detection method. Therefore, it is very important to isolate or enrich pathogenic bacteria from foods. Magnetic nanoparticles (Magnetic Nanoparticles, MNPs) have been favored in the separation and detection of food-borne pathogens due to their good biological properties and easy to separate.

The aim of this paper is to prepare amino-functionalized magnetic nanoparticles (AF-MNPs) with positive charge. Based on the electrostatic interaction between AF-MNPs with positive charge and bacteria with negative charge on the surface, the enrichment of bacteria by AF-MNPs can be realized. And then, the multiplex PCR method combined with the enrichment of bacteria by AF-MNPs was used to detect *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in food. The detailed contents and results of the study are as follows:

1) Preparation and characterization of AF-MNPs. We applied the chemical coprecipitation method to prepare Fe_3O_4 MNPs. Then the surface modification of 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) was carried out on the surface of Fe_3O_4 MNPs to synthesize the AF-MNPs with positive charge. The results showed that the prepared AF-MNPs were spherical or spherical, and the particle size was about 10 nm under electron microscope. The polydispersion index (PDI) showed good dispersion by ZetaSizer Nano-Particle size analyzer. And the isoelectric point of AF-MNPs is about 9.4, also when the pH is in the range of 2-9, the surface of AF-MNPs is in positive charge.

2) Enrichment of food-borne pathogens by AF-MNPs. The capture of AF-MNPs on bacteria was mainly based on the electrostatic interaction between AF-MNPs with positive charge and bacteria with negative charge. We use *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* as representative strains to study the influencing factors of interaction between AF-MNPs and bacterium, including the amount of AF-MNPs, bacteria and buffer system. The results showed that the capture efficiency of AF-MNPs to *S. aureus*, *E. coli* and *L. monocytogenes* was higher than 97% when the bacteria with 10^3 CFU/mL was captured by 100 μg AF-MNPs,

however the capture efficiency for *S. enteritidis* was less than 40%. The capture efficiency of AF-MNPs to *S. aureus* and *E. coli* were higher than 80% when the 10 mmol/L PBS was in the range of pH 5 -9 , while the capture efficiency of AF-MNPs to *L. monocytogenes* was higher than 75% when the 10 mmol/L PBS was in the range of pH 4-8. When the concentration of PBS was 5-30 mmol/L, the capture efficiency for *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *E. coli* were more than 75%, 85% and 90% respectively. Among the four bacteria studied, the Zeta potential of *S. enteritidis* was the smallest and the capture efficiency was the lowest. The capture efficiency of AF-MNPs was higher than 85% when the concentration of bacteria was in the range of 10^2 - 10^6 CFU/mL. When the system volume increased to 10 mL and the bacterial concentrations were at 4 CFU/mL, 40 CFU/mL and 400 CFU/mL, the capture efficiency was still more than 90%.

The capture efficiency for bacteria in artificially contaminated milk samples by AF-MNPs decreased significantly due to the effect of composition in milk. For *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis* the capture efficiency was $67.14\% \pm 1.33\%$ 、 $62.89\% \pm 0.68\%$ 、 $57.92\% \pm 2.93\%$ respectively. For *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*, the capture efficiency for bacteria in artificially contaminated watermelon samples by AF-MNPs was $85.38\% \pm 0.63\%$ 、 $69.84\% \pm 2.97\%$ 、 $79.28\% \pm 0.90\%$ and $31.66\% \pm 3.30\%$ respectively. In order to detect the applicability of AF-MNPs, 8 kinds of pickle samples and 6 kinds of brine samples were randomly selected in this chapter. The capture efficiency of bacteria in 8 kinds of actual salted vegetable foods by AF-MNPs were higher than 75%, and the capture efficiency of 6 kinds of brine meat samples were higher than 65%.

3) Detection of Food-borne pathogenic bacteria by AF-MNPs enrichment combined with multiple PCR. Using *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis* as target bacteria, a multiplex PCR was established. The three kinds of food-borne pathogens in artificially contaminated milk samples were detected by multiplex PCR after magnetic separation. After magnetic separation and PCR detection, the results showed that the sensitivity of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis* were 2 CFU/mL, 2 CFU/mL and 2×10^2 CFU/mL respectively. However, using the direct multiplex PCR method, the sensitivity of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis* were 2×10^2 CFU/mL, 2×10^3 CFU/mL and 2×10^3 CFU/mL respectively. Three kinds of food-borne pathogens were mixed and contaminated with the same concentration. After detection by multiple PCR combined with capture and enrichment by AF-MNPs, the sensitivity of *S. aureus*, *L. monocytogenes*

and *S. enteritidis* was 20 CFU/mL, 2×10^2 CFU/mL and 2×10^2 CFU/mL respectively. Compared with the direct multiplex PCR method, the sensitivity of *S. aureus*, *S. enteritidis* and *L. monocytogenes* increased by 100 or 1000 times respectively. Therefore, AF-MNPs enrichment combined with multiplex PCR can effectively improve the sensitivity of multiple PCR detection.

Key words: amino functional magnetic nanoparticle; food-borne pathogen; electrostatic interaction; bacteria enrichment; multiple PCR

缩略语表

缩写名	英文全称	中文名字
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilane	3-氨丙基三乙氧基硅烷
Baird-Parker	Baird-Parker agar base	<i>S.aureus</i> 选择性培养基
CFU	Colony Forming Unit	菌落形成单位
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxy-Ribonucleoside Triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
MNPs	Magnetic Nanoparticles	磁性纳米粒子
PALCAM	PALCAM Agar	单增李斯特菌选择性培养基
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detecting System	实时荧光定量核酸 扩增检测系统
RNA	Ribose Nucleic Acid	核糖核酸
TEM	Transmission Electron Microscope	透射电子显微镜
TSA	Trypose Soya Agar	胰蛋白胨大豆琼脂
TSB	Trypose Soya Broth	胰蛋白胨大豆肉汤

第一章 文献综述

1 食源性致病菌

食品安全事件的频发对人类公共卫生健康构成重大威胁，在发达国家和发展中国家都造成了巨大的经济损失。据报道，全球每年爆发的食品安全事件中，由食源性致病菌引起的占总数的 45% 以上 (Suaifan et al 2017)，造成这些食源性疾病的致病菌主要包括沙门氏菌 (*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*)、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L.monocytogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, *B.cereus*)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*, *S.flexneri*)、溶血性链球菌 (Hemolytic *Streptococcus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 等。

1.1 沙门氏菌

Salmonella 是常见的食源性致病菌，最适生长温度为 37℃。美国疾病控制与预防中心估计，沙门氏菌每年在美国导致 120 万人患病，2.3 万人住院，450 人死亡，而这些患者中约有 100 万人是由食物中毒引起的 (Scallan et al 2011)。沙门氏菌是肠道上皮感染的罪魁祸首，而肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, *S.enteritidis*) 是最常见的沙门氏菌，是人类食源性疾病的重要病原之一，能引起严重腹泻、发烧和腹部绞痛 (De-Freitas et al 2010)。

1.2 单增李斯特菌

L. monocytogenes 是一种革兰氏阳性、兼性厌氧菌，适合在 37℃、中性或偏碱性环境中生长。该菌在自然界中广泛存在，能够引起严重的李斯特病，患病影响最大的人群包括孕妇、新生儿、老年人和免疫系统较弱的人，可引起败血症、脑膜炎或流产 (Buchanan et al 2017)，85-90% 的病例是由于食用 *L.monocytogenes* 污染的食品引起的，李斯特菌病的特征是发病率低、致死率高 (30%) (Mook et al 2011, Lomonaco et al 2015)。此外，*L.monocytogenes* 在 4℃ 条件下依然能够繁殖，是冷藏食品威胁人类健康的主要致病菌之一。

1.3 金黄色葡萄球菌

S.aureus 是革兰氏阳性菌，最适生长温度 37℃，对营养要求不高，广泛存在于自然界，能引起人畜共患病。*S.aureus* 可导致多种疾病，如食物中毒、皮肤感染、心内膜炎、肺炎、感染性关节炎和骨髓炎（Pragman and Schlievert 2004, Tang et al 2006）。

1.4 大肠杆菌

E.coli 是一种革兰氏阴性细菌，一些特殊血清型的大肠杆菌能够引起人畜共患病，尤其是对婴儿或幼畜，常导致严重腹泻和败血症。根据不同的生物学特性将致病性大肠杆菌分为 6 类：肠致病性大肠杆菌（EPEC）、肠产毒性大肠杆菌（ETEC）、肠侵袭性大肠杆菌（EIEC）、肠出血性大肠杆菌（EHEC）、肠黏附性大肠杆菌（EAEC）和弥散粘附性大肠杆菌(DAEC)。EHEC 是导致人类出血性结肠炎和溶血性尿毒症综合征的原因（Yoon and Hovde 2008），在 EHEC 中，O₁₅₇ 型大肠杆菌致病性最严重（Kaper et al 2004）。

2 磁性纳米粒子

MNPs 是一类由于自身具有磁性，可以通过外部磁场的作用对其进行追踪、操纵和靶向定位的纳米粒子（Kaur et al 2014）。这使得 MNPs 除了具有粒径小、比表面积大这些纳米粒子的共性外，还具有通过磁响应性在外部磁场的作用下聚集甚至靶向定位等特点。

通常粒径小于 20 nm 的 MNPs，在室温时呈现出超顺磁性，即在外加磁场的作用下，MNPs 自身磁性能够达到饱和，一旦撤除外部磁场，自身磁性会消失（Hao et al 2010）。常见的 MNPs 主要包括纯金属，如 Fe、Ni、Co；金属氧化合物，如 Fe₃O₄、 γ -Fe₂O₃；磁性化合物，如 MFe₂O₄（M 为 Cu, Ni, Mn, Mg 等）；金属合金，如 CoPt₃、FePt（Faraji et al 2009）。高磁性材料如镍和钴及其氧化物由于易被氧化和其潜在的毒性应用较少（Akbarzadeh et al 2012），而氧化铁 MNPs（Fe₃O₄ 和 γ -Fe₂O₃）由于具有化学性质稳定、优异的生物相容性以及潜在无毒性等（Salehiabar et al 2017）被广泛应用于催化剂（Lu et al 2004）、生物医药（Mody et

al 2013)、核磁共振成像 (Na et al 2009)、环境修复 (Akbarzadeh et al 2012) 以及生物分离 (姜源 等 2018) 等领域 (Ferreira et al 2016), 氧化铁 MNPs 在临床诊断中还被广泛应用于从复杂样品中快速、高效地磁分离富集细菌, 作为细菌检测的样品前处理, 如图 1.1 (Dinali et al 2017)。氧化铁 MNPs 的广泛应用主要是因为其自身一些优异的特点 (Li et al 2013): 易于制备 (Fe_3O_4 可以通过简单、高效且能大规模生产的水相共沉淀法来制备); 易于进行表面改性 (氧化铁表面有大量的羟基可以方便地使用官能团进行改性修饰); 易于操作 (由于具有超顺磁性, 在外部磁场的的作用下, 无需经过离心或分离, 即可从溶液中进行回收磁颗粒); 良好的可恢复性 (磁性粒子通常可以重复利用); 良好的分散性。

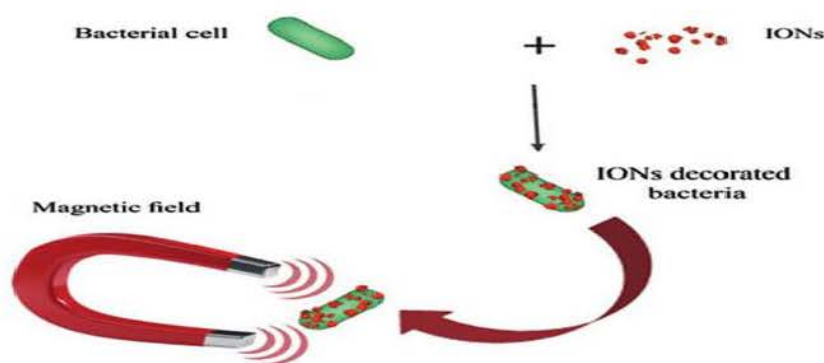


图 1.1 氧化铁磁性纳米粒子对细菌的分离

Fig. 1.1 Magnetic separation of bacterial cells using IONs (Dinali et al 2017)

2.1 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备

随着 MNPs 的广泛应用, 近几十年来, 众多科学研究者对于合成尺寸分布可控、高度稳定以及单分散性 MNPs 展开了深入的研究 (吴潜 2017)。常用的 MNPs 的合成方法主要分为三大类: 物理方法、化学合成法以及生物合成法 (Mohammed et al 2017)。

化学共沉淀法是合成超顺磁性氧化铁纳米粒子 (平均直径小于 50 nm) 最简单、高效的化学方法 (Wu et al 2011, Ebrahimezhad et al 2013)。该方法是基于在单相水质中进行的化学反应, 能够实现对氢氧化铁磁核成核和生长的控制 (Mohapatra et al 2007)。合成过程是在氮气保护下, 二价铁盐与三价铁盐在以一定比例 (一般摩尔比 1:2) 进行混合均匀, 加入过量的碱性溶液进行反应, 生成氧

化铁黑色沉淀，洗涤、磁分离后得到 Fe_3O_4 MNPs (Martínez-Mera et al 2007, Song et al 2014)。

2.2 磁性纳米粒子的表面功能化

表面裸露的 Fe_3O_4 MNPs 由于粒子间的强磁性吸引、范德华力和高表面能而易于团聚，严重影响其在溶液中的分散性和稳定性，且 Fe_3O_4 MNPs 极易被氧化形成 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ，导致对生物体产生一定的毒性 (Hui et al 2011, Xia et al 2012)。为了克服这些不足，科研工作者们开发出各种针对 MNPs 的表面改性，可以通过在 Fe_3O_4 MNPs 表面涂覆上其它化学物质或生物材料，提高其亲水性和生物-环境兼容性并能够根据需要使其功能化 (Setyawan et al 2014)。最常用的涂覆方法主要分为三大类：有机材料涂覆，包括表面活性剂和聚合物；无机材料涂层以及生物功能分子修饰。

目前有机涂层包括聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、丙烯酸(PAA)、壳聚糖、葡聚糖、脂质体等 (Iyer et al 2017) 因具有生物相容性，能够提高 MNPs 在溶液中的稳定性，提高 MNPs 的亲水性以及改变 MNPs 的水溶性 (Wu et al 2008)，可以对 Fe_3O_4 纳米粒子表面进行包覆，这类型涂层可以通过保护磁芯不被氧化来保持 MNPs 的磁性能 (Mahmoudi et al 2008)。

无机涂层包括金属氧化物、贵金属、 SiO_2 以及 C 等 (Manchón et al 2015)。表面硅烷化具有反应性好、细胞毒性低、酸性条件下稳定性好、易发生氧化还原反应、易进行表面化学修饰等特点，是目前应用最广泛的在裸 MNPs 表面引入表面官能团的技术。此外，该反应在中等温度条件下，既可在水介质中进行，也可在有机溶剂中进行，不需要特殊的条件或昂贵的设备，因此被认为是保护内磁芯的理想方法。

Fe_3O_4 MNPs 的性质可随表面涂层的变化而改变，通常将肽、蛋白质、酶、核酸适配体碳水化合物及抗体等生物分子修饰在 MNPs 的表面，使其功能化并广泛应用于生物领域。这些生物分子通常是通过三种方式连接在 MNPs 表面的，物理法、共价偶联以及生物亲和性结合 (Tan et al 2004, Hermanson 2008)。物理吸附主要是基于生物大分子和 MNPs 之间的静电相互作用、范德华力，氢键和疏水相互作用，该方法易于操作且无需进行表面处理，然而不具备特异性，吸附物的结合稳定性受

环境条件的影响较大（pH、离子强度和生物分子浓度），因此科学研究者更倾向于利用共价偶联的方法对 MNPs 表面进行修饰。共价偶联是基于生物分子和 MNPs 之间的共价相互作用，通常有三种用于两者间的偶联方法：1) 在纳米颗粒上涂上聚合物，然后在聚合物涂层和生物功能分子之间形成共价键，该方法的主要缺点是对非靶标物质具有非特异性吸附因此，主要是通过以下两种方法来制备；2) 首先在纳米颗粒表面偶联一层具有反应基团的分子，再与生物功能分子反应（A）线路；3) 与表面反应的基团首先与生物功能分子结合，然后，共轭物与纳米颗粒反应（B）线路，如图 1.2。

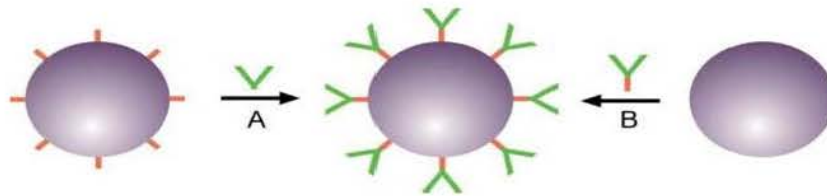


图 1.2 将生物功能分子附着在纳米颗粒上的两种方法（Gu et al 2006）

Fig. 1.2 Two ways to attach biofunctional molecules to a nanoparticle (Gu et al 2006)

目前的趋势是在同一 MNPs 表面上应用多种表面改性方法和/或几种表面改性剂，如图 1.3。

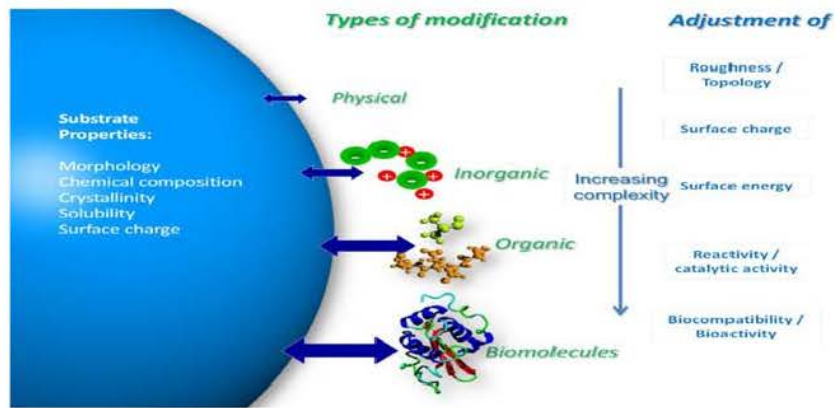


图 1.3 基材性能、改性类型及对材料表面特性的影响（Treccani et al 2013）

Fig. 1.3 Substrate properties, types of modification and impact on material surface features (Treccani et al 2013)

2.3 功能化磁性纳米粒子的应用

MNPs 的超顺磁性、在可变磁场下的受热能力、高的表面积/体积比以及在合成中的多功能性等显著的物理化学性质使纳米粒子在使其在催化剂（陈红云等 2019）、 生物医学（Blank et al 2017）、 药物靶向储运（Shen et al 2016）、 核磁成像（Barrow et al 2015）、 磁流体（姚军等 2017）、 生物分离（Calatayud et al 2014）、 环境修复（Pandey and Fulekar 2012）以及食品分析（Brosel-Oliu et al 2015）等领域具有广泛的潜在应用，图 1.4 为功能化 Fe_3O_4 MNPs 在生物医学方面的应用（Sun et al 2008）。这里仅介绍功能化的 Fe_3O_4 MNPs 在分离分析方面的应用。

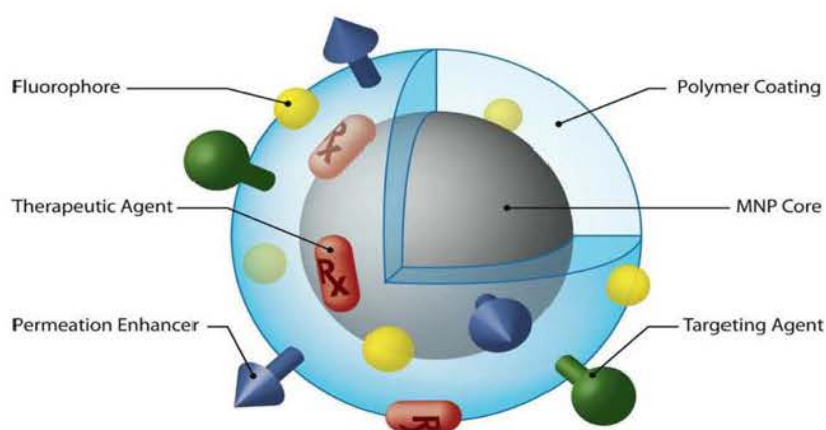


图 1.4 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒在生物医学方面的应用 (Sun et al 2008)

Fig. 1.4 Schematic diagram showing applications of iron oxide nanoparticles in biomedicine(Sun et al 2008)

2.3.1 分离纯化生物分子

在生物医药领域，功能化 MNPs 从复杂样品中分离、纯化核酸以及对蛋白进行分离、纯化、固定等方面的应用越来越受到关注。Zhao 等人（2003）开发和应用了一种通过将分子信标 DNA 探针偶联到磁性纳米颗粒表面构建而成的新的基因磁性纳米载体(GMNC)，收集、分离和检测浓度低至 10^{-15} mol/L 微量的单碱基差异的 DNA/ RNA 分子。GMNC 在法医、医学和生物技术领域的多种样品来源中对微量 DNA/ mRNA 靶标的采集具有重要的应用价值。功能化 MNPs 在蛋白的分离、纯化方面也有重要应用。Xu 等人（2006）首次制备了硅烷偶联(GLYMO-IDA)与 Fe^{3+} 功

能化后的磁性二氧化硅微球，该磁性微球从 β -酪蛋白胰蛋白酶消化液中提取磷酸肽。功能化 Fe_3O_4 MNPs 也能用于分离富集糖蛋白/糖肽，通常基于凝集素亲和层析法和亲水相互作用液相层析法的机理。

2.3.2 环境检测与修复

近年来，由于 MNPs 具有超顺磁性、高比表面积、小粒径以及易表面功能化等优点，使其在环境修复、污染检测等领域的有着吸附效率高、污染物去除率高、吸附剂通过磁场易于快速从溶液中分离等优点 (Xu et al 2012)。不同于在生物应用方面对 MNPs 的尺寸、形状和生物相容性等性质有着严苛的要求，在环境修复领域，MNPs 只需要具有好的化学稳定性。未经修饰的 Fe_3O_4 MNPs 能够以较快的动力学固定 SeO_3^{2-} 以去除水溶液中的 Se (VI) (Sha et al 2008)；但是为了更好的磁力操控和减少吸附时间，可以对 Fe_3O_4 MNPs 进行适当地改性，不仅能够提高其亲和力，还能促进解吸过程。江辉等 (2019) 利用 SiO_2 和半胱氨酸 (Cys) 对 Fe_3O_4 纳米粒子进行表面修饰，并用于水中 Pb (II) 的去除研究。实验结果表明， $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2 @ \text{Cys}$ 对 Pb (II) 的水中去除率可达 95% 以上，同时与另外两种未修饰 Cys 的磁性纳米材料 (Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$) 相比， $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2 @ \text{Cys}$ 的吸附效率明显提高。Bao 等人 (2016) 采用氨基功能化 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 磁性纳米吸附剂作为新型吸附剂，在 Fe (II) 存在的情况下，对热浸镀锌酸洗废液中的 Zn (II) 进行了高选择性的去除 (如图 1.5)。

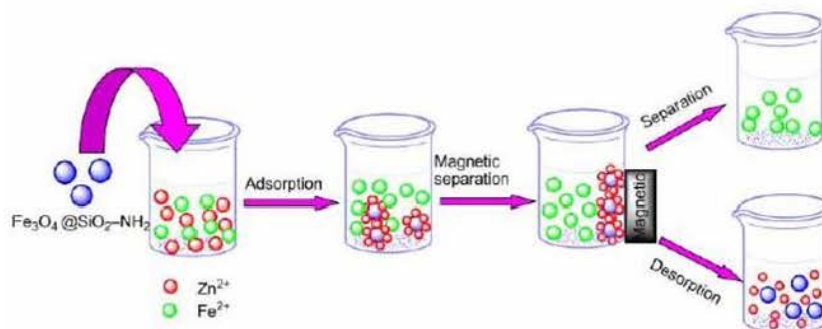


图 1.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2 - \text{NH}_2$ 对 Zn (II) 选择性吸附的示意图 (Bao et al 2016)

Fig. 1.5 Schematic diagram of selective adsorption of Zn(II) on $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2 - \text{NH}_2$

(Bao et al 2016)

2.3.3 细菌的富集和检测

在食品安全和临床诊断中，病原微生物快速、灵敏的检测和分离是具有重要意义，现有的检测方法对经过预增菌培养的食品样品灵敏度高，但对污染的靶细菌浓度低且有干扰基质成分的食品样品检测灵敏度低且特异性不好，因此，选择合适的分离方法使低浓度靶细菌能从食品基质中分离出来且减少食品成分对检测方法的干扰，对实现靶细菌快速、灵敏的检测显得尤为重要。MNPs 由于其比表面积大，具有良好的生物相容性且具有超顺磁性等特点，为快速吸附分离致病菌提供了诱人的方案。

用于细菌捕获和检测的 MNPs 通常需要在其表面修饰对细菌具有识别功能的元素（抗体、核酸适配体、抗生素、糖蛋白），以获得捕获细菌的能力，再利用外部磁场进行磁分离，实现对细菌的分离、富集，分离出的 MNPs-细菌复合物可以结合不同的技术，如 PCR、ELISA、生物传感器、ATP 生物发光分析等实现对细菌的快速、灵敏检测。如图 1.6 所示为在 Fe_3O_4 MNPs 表面修饰不同的元素（抗体、凝集素、万古霉素和核苷酸），其不同捕获细菌的作用方式（黄小林等 2014）。

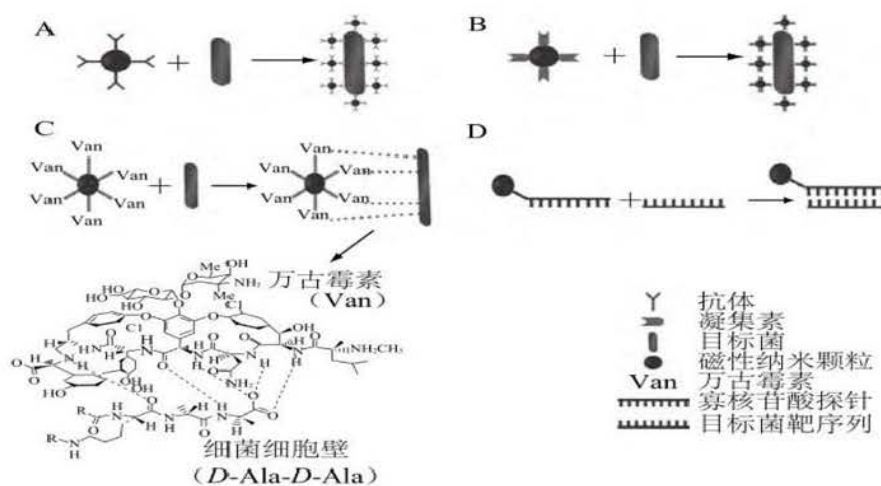


图 1.6 Fe_3O_4 磁性纳米粒子捕获细菌的方式（黄小林等 2014）

Fig1.6 Ways of capturing pathogenic bacteria with Fe_3O_4 MNPs

表 1.1 为不同类型功能化的 MNPs 对于分离食品基质中食源性致病菌的研究。

表 1.1 磁性纳米粒子在食源性致病菌分离中的应用

Table 1.1 Summary of the application of MNPs in the separation of foodborne pathogens

致病菌	修饰类型	检测方法	检出限	参考文献
大肠杆菌 O157:H7	抗体	表面等离子体 共振传感器	50 CFU/mL	Wang et al 2013
大肠杆菌	抗体	酶联免疫吸附 试验	2.6×10^5 cells/mL	Lee et al 2012
单增李斯特菌	抗体	免疫传感器	10^2 CFU/mL	Chen et al 2012
大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌	抗体	荧光光度计	10^3 CFU/mL	Kell et al 2008
单增李斯特菌	核苷酸探针	聚合酶链式反 应	10 CFU/mL	Tan et al 2004
沙门氏菌、单增 李斯特菌	核苷酸探针	实时荧光定量 聚合酶链式反应	10^3 CFU/g	Zhao et al 2004
单增李斯特菌	万古霉素	电化学发光法	10 CFU/mL	Zhu et al 2015
金黄色葡萄球菌	万古霉素	化学发光法	3.3 CFU/mL	Yang et al 2016
金黄色葡萄球菌	万古霉素	实时荧光定量 聚合酶链式反应	5 ± 0.58 CFU/mL	Hassan et al 2018
沙门氏菌	菌体抗原	电化学传感器	8.18 CFU/mL	Gu et al 2003

3 食源性致病菌检测方法

食源性致病菌的感染剂量低，但健康风险高，因此迫切需要对食源性致病菌进行快速、灵敏的检测。对于食源性致病菌的检测目前主要有传统的微生物鉴定法、免疫学分析、分子学法以及生物传感器等。

传统的微生物鉴定法依然是食源性致病菌检测方法的“金标准”（Cocolin and Rantsiou 2016, Rohde et al 2017），该方法需要进行选择性培养富集、筛选、计数和生化/血清学检测，费时费力且检测灵敏度低（Braga et al 2013）；免疫学分析法是应用免疫学理论设计的一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及分泌的细胞因子的实验方法，包括免疫层析测定法、酶联免疫吸附测定以及酶联荧光测定法等，是基于抗原抗体反应的特异性用于对病原体的检测（Jadhav et al 2012）。其优点是通量较高，与传统的培养法相比，检测时间缩短，但检测结果容易出现假阳性，灵敏度不高且易出现交叉反应；生物传感器，由生物感受器、传感器、数据记录装置和显示装置组成，基于测量光学或电化学信号变化实现检测（Law et al 2015），生物传感器能够通过检测复杂样品中的光谱，来分析微生物的种类，目前也有多种生物传感器开始应用于食品安全的检测，具有灵敏度高，重复性好的优点，但很多仍然处于研究阶段，且检测费用较高，不利于推广。

在食品检测中最广泛使用的现代快速检测方法主要是基于核酸的分子学检测方法，如聚合酶链式反应（PCR）、多重聚合酶链式反应（mPCR）、实时荧光定量核酸扩增检测系统（qPCR）等，这些体外核酸扩增方法能够在数小时内将单个特定的 DNA 或 RNA 序列扩增多达一百万倍，并为单个细菌细胞提供了理论检测限（Erlich et al 1991, Bej 1994）。qPCR 已成功应用于多种食品中病原菌的鉴定，然而，该方法不仅成本高且每次仅限于两到三种病原菌的同时检测（Wang et al 2007, Elizaqui' vel and Aznar 2008, Suo et al 2010）。多重 PCR 是在在单管反应中同时检测几种病原菌，该方法的主要优点是其潜在的用特异性核酸序列富集取代培养富集，从而减少检测时间，此外，该方法具有较高的检测特异性，可以方便地识别难以培养的微生物，并有可能降低检测的总成本（Bej and Mahbubani 1992），具有一定的应用价值。但与其它传统或现代检测技术一样，受食品基质和靶细菌浓度

干扰较大，因此，在检测前实现对致病菌的高效分离、富集以降低食品成分对检测结果的干扰显得十分重要。

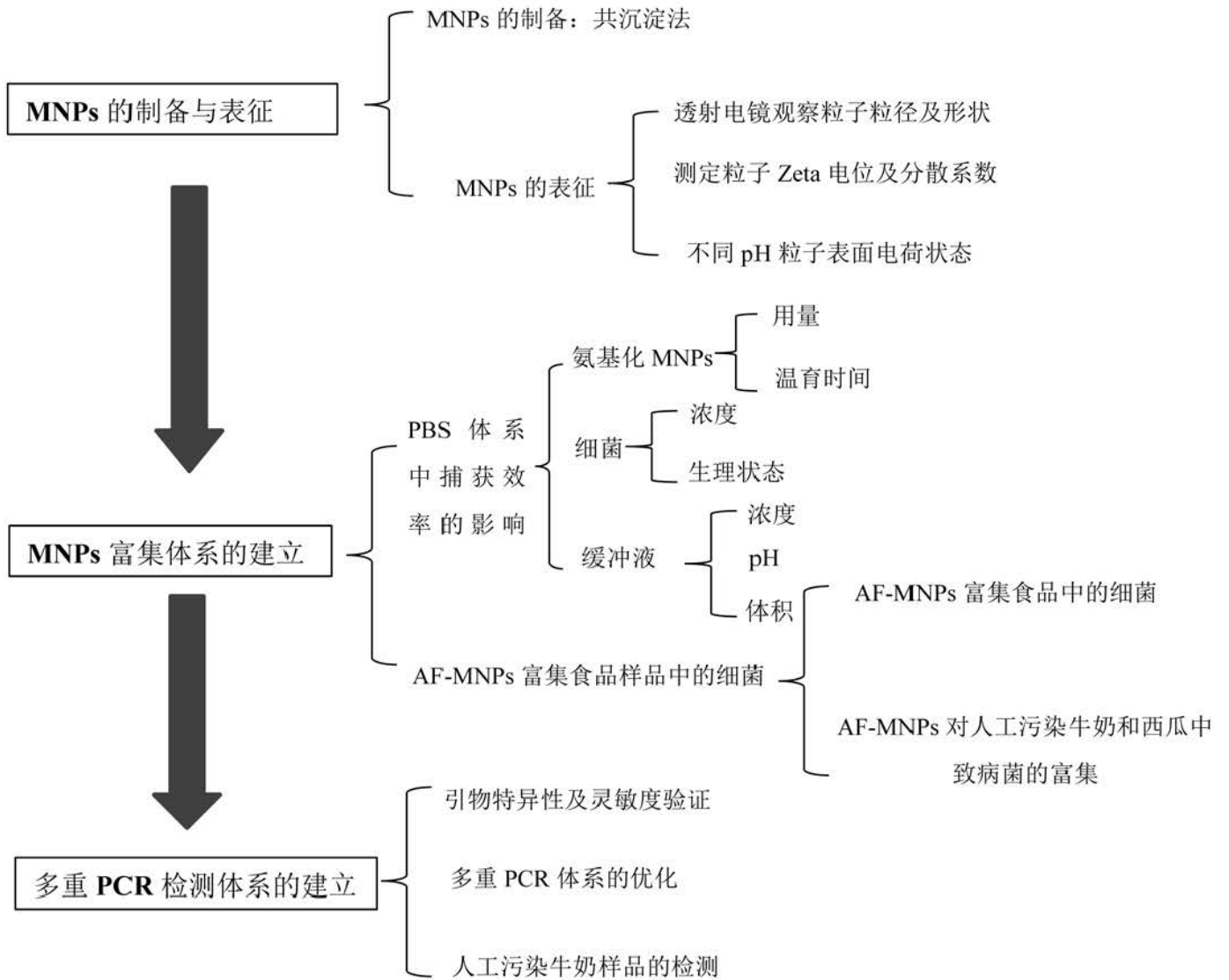
4 研究目的及意义

食源性致病菌能够引起许多食源性疾病，严重威胁人们的健康问题。由于食源性致病菌的感染剂量低，但健康风险高，因此迫切需要开发快速、灵敏和可靠的检测方法来严格监测不同的食源性病原体。由于目标致病菌在食品中的含量较少，不易检出，此外，复杂的食品基质会对检测产生干扰或抑制，从而影响精准定量或检测灵敏度，因此，样品增加和靶标富集十分重要。氧化铁 MNPs 因具有良好的生物相容性、超顺磁性、易于修饰等特点被广泛应用于对食源性致病菌的分离、富集，对 MNPs 进行表面修饰，引入功能基团，使其具有更好的抗氧化性、分散性和一定的功能性。表面修饰大量的氨基基团，以获得捕获细菌的能力，再利用外部磁场进行磁分离，实现对细菌的分离、富集，分离出的 MNPs-菌复合物结合多重 PCR 法，实现对食源性致病菌快速、灵敏的检测。

本论文通过化学共沉淀法制备出 AF-MNPs，基于表面带正电荷的 AF-MNPs 与表面带负电荷的细菌间的静电相互作用，无需在 MNPs 表面修饰任何对细菌具有识别功能和靶标作用的元素，省去了复杂的生物偶联步骤，缩减了制备成本，正是因为 AF-MNPs 对细菌不具有特异性，因此能对几乎所有细菌都有吸附捕获作用，提高对细菌捕获的广泛性，同时，基于 AF-MNPs 富集，结合多重 PCR 检测细菌，能有效提高多重 PCR 的灵敏度，实现对多种食源性致病菌同步检测，提高检测效率，实现对食源性致病菌灵敏、高效、高通量的检测。

5 技术路线

本文以化学共沉淀法制备 Fe_3O_4 MNPs，表面修饰 APTES，合成了表面携带正电荷的 AF-MNPs，并进行表征。然后测定 AF-MNPs 在 PBS 体系中对细菌的捕获工作条件以及在食品样品中对细菌的捕获效果的测定。最后 AF-MNPs 结合多重 PCR 检测人工污染牛奶样品中的食源性致病菌。



第二章 AF-MNPs 的制备及表征

Fe_3O_4 MNPs 容易发生团聚, 影响其生物性能, 适当的表面修饰能确保其生物相容性和化学吸附的耐久性且能避免或至少减少其氧化, 此外, 合适的官能团修饰还可以使其具有一定的功能性, 提高其吸附性能 (Giakisikli and Anthemidis 2013)。通常来说, 用于细菌检测的 MNPs, 常功能化一些具有特异性识别功能的生物元素, 如抗体和核酸适配子等已用于 MNPs 的表面修饰以识别和捕获靶细菌 (Chang et al 2012, Liu et al 2013, 吕菊波等 2018)。作为生物识别元件, 抗体和适配体等具有特异性好、灵敏度高等优点, 但也存在如成本高、稳定性差、制备工艺复杂及只能特异性富集一种病原菌等缺陷 (Qi et al 2013, Zhu et al 2015)。AF-MNPs 主要是通过静电相互作用对表面带有负电荷的细菌进行高效、经济的捕获和富集。与带负电荷的 Fe_3O_4 MNPs 相比, 带正电荷的纳米粒子与细菌间的相互作用更强, 更容易吸附细菌 (Azam et al 2012), AF-MNPs 不需要在 MNPs 表面修饰任何对靶细菌具有识别功能的生物元件, 因此不必经过复杂的化学偶联。而且, 由于 AF-MNPs 表面带有大量氨基基团, 不具有生物特异性, 理论上与带负电荷的细菌都有一定的吸附捕获作用, 实现对食品中混合微生物的同时捕获与富集。

因此, 本章利用水相共沉淀法制备 Fe_3O_4 MNPs, 再通过 Fe_3O_4 MNPs 表面修饰 APTES, 制备出表面带正电荷的 AF-MNPs, 利用透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM)、傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 和 ZS 纳米粒度及 Zeta 电位对修饰前后的 MNPs 进行表征, 分析改性材料 APTES 对 Fe_3O_4 MNPs 粒径大小、形状、分散性、表面基团及表面电荷的影响, 制备具有超顺磁性、分散性更好、表面携带正电荷的 AF-MNPs, 为对食源性致病菌的高效捕获和富集提供了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

六水合氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
四水合氯化亚铁 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

氨水 ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28 wt%)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES, 99%)	分析纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钠, 二水 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠 (NaOH)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
盐酸 (HCl, 36%-38%)	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

1.2 主要仪器

集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101S	武汉科尔仪器设备有限公司
高功率数控超声波清洗器	KQ-400KDE	昆山市超声仪器有限公司
冻干机	BTP-8ZL00X	美国 Virtis 公司
透射电子显微镜	Hitachi-700FA	日本日立公司
傅里叶红外光谱仪	Nexus 470	美国 Nicolet 公司
数显 pH 计	PSH-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
ZS 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪	Zetasizer Nano ZS	英国马尔文仪器有限公司

1.3 主要试剂及培养基的配制

1 mol/L HCl: 将 42 mL 质量分数为 36%-38% 的盐酸溶液加入到约 500 mL 的蒸馏水中, 稀释得到 1 mol/L HCl, 室温保存, 备用。

0.5 mol/L NaOH: 准确称取 4.0 g 氢氧化钠固体, 加入少量蒸馏水溶解, 待恢复到室温温度时, 将溶液转移到容量瓶中, 定容至 200 mL, 室温保存, 备用。

0.2 mol/L PBS : 称取 71.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 溶于 1 L 蒸馏水中, 配制 0.2 mol/L Na_2HPO_4 ; 称取 31.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 蒸馏水中, 配制 0.2 mol/L NaH_2PO_4 。取 81 mL 0.2 mol/L Na_2HPO_4 和 19 mL 0.2 mol/L NaH_2PO_4 至 100 mL, 配制成 pH 7.4 的 0.2 mol/L PBS, 室温保存, 备用。

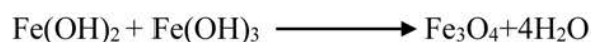
10 mmol/L PBS: 准确量取 50 mL 上述 0.2 mol/L PBS, 用蒸馏水溶解稀释至 1000 mL, 稀释得到的溶液即为 10 mmol/L PBS, 室温保存, 备用。

1.4 方法

1.4.1 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子的制备

Fe₃O₄ MNPs 的合成采用改进的化学共沉淀方法 (He et al 2005)。在三口圆底烧瓶中, 取 12 g FeCl₃·6H₂O 和 4.92 g FeCl₂·4H₂O 共同溶解于 100 mL 蒸馏水中, 混合均匀于 60℃ 下磁力搅拌反应 30 min, 期间持续通入氮气。然后升温至 80℃, 在持续通入氮气的条件下, 将 40 mL 浓 NH₃·H₂O, 逐滴加入, 此时逐渐有黑色沉淀生成, 900 r/min 搅拌反应 1 h。冷却至室温后, 在外部磁场的辅助下, 以乙醇和蒸馏水交替洗涤数次, 进行 MNPs 的分离收集。最后, 向所得的黑色沉淀中加入 100 mL 蒸馏水, 取部分 MNPs 进行冷冻干燥, 称重, 即可得到已知浓度的 Fe₃O₄ MNPs。

合成 Fe₃O₄ 的化学反应方程式如下:



总反应式可写为:



1.4.2 氨基功能化磁性纳米粒子的制备

用 APTES 对 Fe₃O₄ MNPs 进行表面改性 (Buzoglu et al 2014), 形成表面带有氨基基团的 MNPs。将合成的 Fe₃O₄ MNPs 重新分散于 150 mL 乙醇水溶液中 (乙醇与水的体积比为 1:1), 超声分散均匀。在氮气的保护下, 加入一定量的 APTES (APTES 与 Fe₃O₄ 的表面改性摩尔比为 4:1), 40℃ 下机械搅拌 2 h。待溶液冷却至室温后, 用无水乙醇洗涤数次, 在外部磁场的辅助下, 分离并收集经 APTES 改性的 MNPs。然后, 向所得的黑色沉淀中加入 100 mL 蒸馏水, 取部分进行冷冻干燥, 称重, 得到已知浓度的经 APTES 改性的 AF-MNPs。

Fe_3O_4 MNPs 与 APTES 的反应过程如图所示：

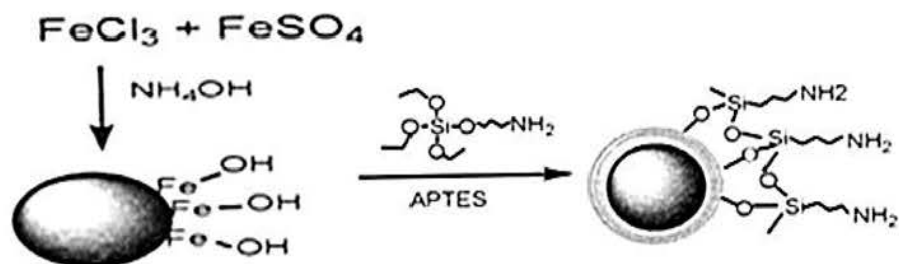


图 2.1 AF-MNPs 的制备示意图 (Huang et al 2010)

Fig. 2.1 Schematic diagram for the synthesis of AF-MNPs (Huang et al 2010)

1.4.3 磁性纳米粒子的表征

(1) TEM 观察 MNPs 形态及粒径

TEM 观察 MNPs 的形态及粒径大小。将样品稀释至适宜浓度，并用超声波分散均匀，将样品溶液滴在带有碳支撑膜的铜网上，待铜网自然干燥后于 Hitachi-700FA 型透射电镜进行观察。

(2) MNPs Zeta 电位值及分散性的测定

一般情况下，当固体颗粒和含水电解质溶液接触的时候会获得其表面电荷，但是往往 MNPs 的表面电荷很难通过实验性结果来验证 (陈保利 2017)，但在一定程度上我们可以以 Zeta 电位值来代替。取 1 mL 0.1 mol/L 的 MNPs，磁分离弃上清后加入 1 mL 超纯水，超声形成分散均匀的悬浮液，纳米粒度及 Zeta 电位分析仪分别测定其 Zeta 电位值及分散指数 PdI。

(3) FTIR 分析 MNPs 的功能基团

FTIR 是分子吸收光谱，物质中不同的官能团、化学键的振动或者转动对不同波数的红外光有吸收，可用于测量样品对红外辐射的吸收强度或吸收波长 (Parkinson 2016)，可以测定出样品组成的化学键或官能团。采用 Nexus 470 型傅里叶变换红外光谱仪，对 MNPs 进行红外分析。将 MNPs 与纯溴化钾以 1:100 的质量比混合，在研钵内研细均匀后通过溴化钾压片法进行红外光谱测定，测量取三次平均值，每一次测量扫描样品 64 次，扫描波数范围为 $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 。

(4) 测定 MNPs Zeta 电位值

以 pH 值为 7.4 的 0.2 mol/L PBS 为母液，配制 pH 分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 浓度为 10 mmol/L PBS，取 1 mL 一定浓度的 MNPs，磁分离弃上清后分别加入上述不同 pH 的 PBS，超声形成分散均匀的悬浮液，分别测定其 Zeta 电位值。

2 结果与分析

2.1 磁性纳米粒子形态及粒径

为了观察所制备的两种 MNPs 的形态和粒径大小，通过 TEM 进行观察，结果如图 2.2。

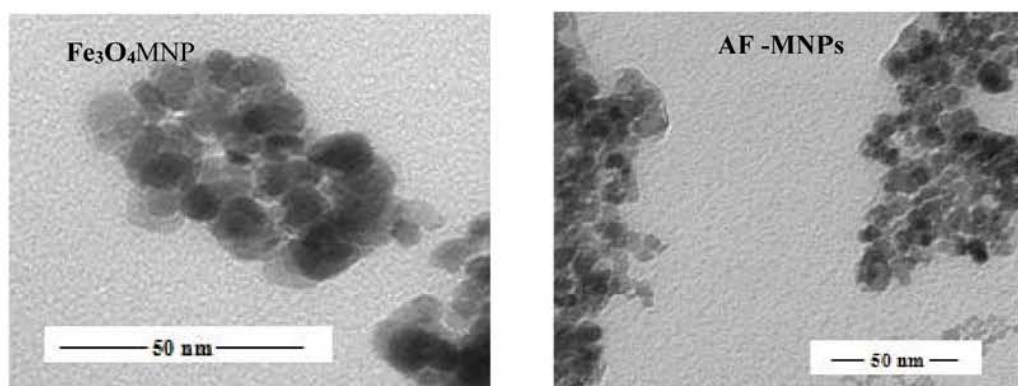


图 2.2 MNPs 的透射电镜图 ($\times 400000$)

Fig. 2.2 TEM image of MNPs ($\times 400000$)

由图 2.2 可看出， Fe_3O_4 MNPs 和 AF-MNPs 的颗粒大多数为球形或者近似球形，MNPs 的尺寸大小在修饰前后并未有太大的变化，磁核直径均约 10 nm，修饰前后的两种 MNPs 均具有潜在的超顺磁性，能够受外部磁场操控。

2.2 磁性纳米粒子 Zeta 电位值及分散性

为了研究 MNPs 表面电荷状态和分散性的变化，通过纳米粒度及 Zeta 电位分析仪分别测定 MNPs Zeta 电位值及分散指数 PDI，结果如图 2.3 所示。

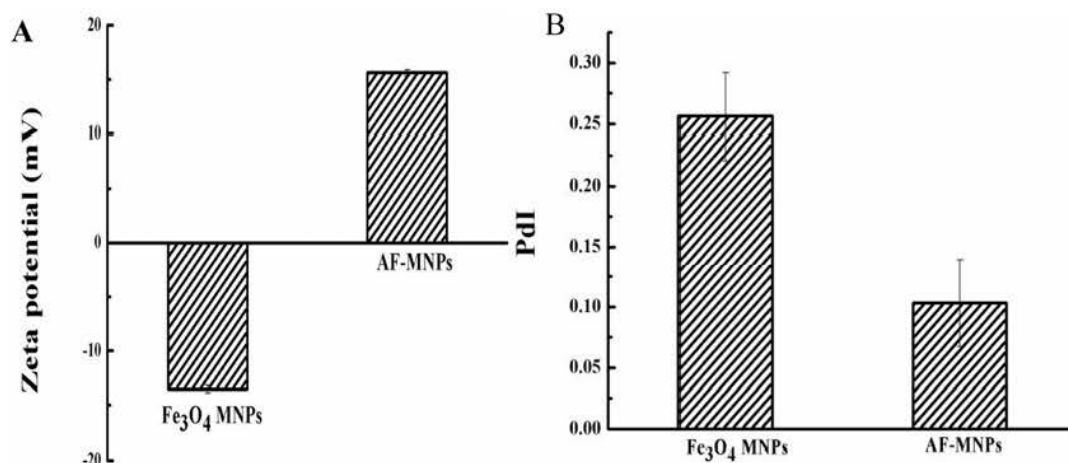


图 2.3 MNPs 的 Zeta 电位 (A) 及分散系数 PDI (B)

Fig. 2.3 Zeta potential (A) and PDI (B) of MNPs

图 2.3 (A) 是 Fe₃O₄ MNPs 和 AF-MNPs 的 Zeta 电位值。改性后的 AF-MNPs, Zeta 电位值的绝对值在增大, 说明体系分散性更好, 这是因为通过 APTES 在 Fe₃O₄ 表面的改性, 降低了纳米粒子的表面能, 一定程度上抑制了粒子的团聚, 提高了体系的分散性。从图 2.3 (A) 可以看出, 未经修饰的 Fe₃O₄ MNPs 的 Zeta 电位值为负, 而修饰后的 AF-MNPs 的 Zeta 电位值为正, 这是由于 Fe₃O₄ 表面带有羟基, 呈电负性, 由于在 Fe₃O₄ 表面涂覆了氨基硅烷, AF-MNPs 表面带有大量氨基, 电荷为正, 证明了在 Fe₃O₄ 表面修饰上了氨基基团。

图 2.3 (B) 是纳米粒度仪测定的 MNPs 的分散性指数 PDI (Polymer dispersity index)。由图可看出, 对于相同浓度相同质量的 Fe₃O₄ MNPs 和 AF-MNPs 来说, 当 Fe₃O₄ MNPs 在体系中的分散指数 PDI 值为 0.26 ± 0.036 时, AF-MNPs 的 PDI 值为 0.10 ± 0.036 。PDI 是表征粒径的均一度, 0.1 以内可认为是单分散的 (Doussinea et al 2009), 由此可知, 经修饰后的 AF-MNPs 分散性更好, 体系更加稳定。

2.3 磁性纳米粒子表面功能基团的分析

为了探讨修饰前后, MNPs 表面官能团的变化, 采用溴化钾压片法对两种 MNPs 进行红外光谱测定, Fe₃O₄ MNPs 和 AF-MNPs 的红外光谱鉴定结果如图 2.4 所示。

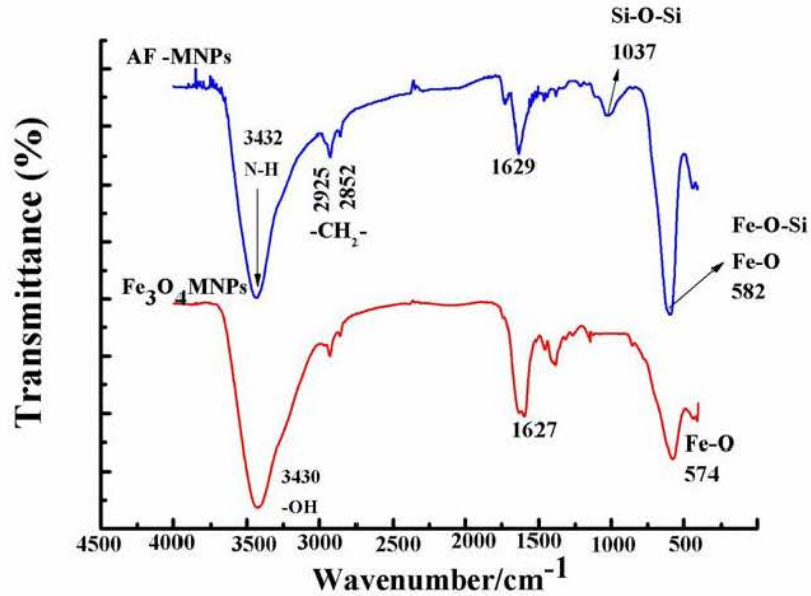


图 2.4 MNPs 的红外光谱图

Fig. 2.4 FTIR result of Fe_3O_4 MNPs and AF-MNPs

由图 2.4 可以看出, Fe_3O_4 MNPs 和 AF-MNPs 在 574 和 582 cm^{-1} 处的吸收峰为 Fe-O 的振动吸收及 Fe-O 与 Fe-O-Si 的叠加吸收, 这说明两种 MNPs 中都有 Fe_3O_4 ; 对于 Fe_3O_4 MNPs, 在 3430 cm^{-1} 和 1627 cm^{-1} 处是 -OH 的伸缩振动和弯曲振动吸收峰, 说明在 Fe_3O_4 MNPs 表面包覆有羟基, 而 Parkinson (2016) 通过扫描隧道显微镜也观察到这一结果。对于 AF-MNPs, 在 1037 cm^{-1} 处的吸收峰对应于 Si-O-Si 键的振动吸收; 2925 和 2852 cm^{-1} 处的吸收峰对应于 CH_2 的伸缩振动 (Luan et al 2005); 在 1629 cm^{-1} 为 N-H 的弯曲振动峰, 3432 和 1629 cm^{-1} 是 N-H 的特征吸收谱带。 CH_2 和 N-H 都是 APTES 的特征基团, FTIR 结果表明, Fe_3O_4 MNPs 表面成功地涂覆了 APTES, 修饰上了大量的氨基基团, 形成具有氨基功能化的 MNPs。

2.4 不同 pH 条件下磁性纳米粒子 Zeta 电位值

将 MNPs 悬浮于不同 pH (2-11) 的 10 mmol/L PBS 中, 以纳米粒度及 Zeta 电位分析仪在室温下测定不同 pH 条件下 MNPs 的 Zeta 电位值, 结果如图 2.5 所示。

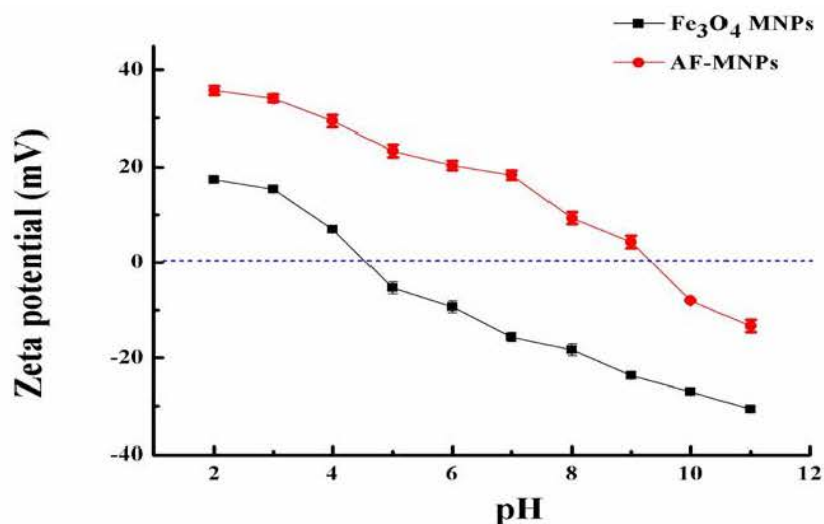


图 2.5 不同 pH 条件下 Fe₃O₄ MNPs 和 AF-MNPs 的 Zeta 电位值

Fig. 2.5 The pH-dependent zeta potential of Fe₃O₄ MNPs and AF-MNPs

由图 2.5 可以看出，在不同的 pH 条件下，Fe₃O₄ MNPs 和 AF-MNPs 所带表面电荷的正负值也有所不同。当体系 pH 小于 4 时，两种 MNPs 表面电荷均为正值，当体系 pH 大于 9 时，Fe₃O₄ MNPs 和 AF-MNPs 表面均带有负电荷，然而在 pH 在 5-9 范围内时，Fe₃O₄ MNPs 表面携带负电荷，而 AF-MNPs 表面携带正电荷，该结果表明 Fe₃O₄ MNPs 经修饰后，在 pH 为 2-11 宽范围内，其表面电荷状态会发生改变。由图可看出，Fe₃O₄ MNPs 的等电点 pH 约为 4.6，而 AF-MNPs 的等电点 pH 约为 9.4，即 pH < 9.4 其表面均带正电荷。

3 小结与讨论

3.1 讨论

1. 磁性纳米粒子的制备

采用水相共沉淀法合成了粒径约为 10 nm 的 Fe₃O₄ MNPs，与其它制备 MNPs 的方法相比（Kolvari et al 2014, Koukabi et al 2014, Veisi et al 2016），该方法具有简单、高效、重现性好、条件温和且能大量制备的优点（陈红云等 2019），但另一方面，该方法在合成过程中由于碱需要在剧烈搅拌的条件下尽可能的快速加入，引起成核速率和晶体生长速率较高，导致磁性纳米颗粒大小没有得到很好的控制，且粒径分布较广。Fe₃O₄ MNPs 因具有较大的比表面积，同时具有较高的化学活性

和磁偶极矩，使得粒子易团聚和氧化且导致 MNPs 磁性消失和分散性降低，用合适的表面涂层涂覆 MNPs 可以避免或至少降低其自身团聚和氧化，保护壳层不仅可以稳定纳米粒子，而且可以进一步功能化，为其提供更大的应用潜力。

2. 磁性纳米粒子的表征

由透射电镜结果可知，修饰前后的 MNPs 粒径均约 10 nm，具有超顺磁性，为其在微生物、生物医药等方面的应用提供了发挥平台。然而 Santoyo-Salazar 等人（2011）报道认为，尺寸在 20 nm 以下的氧化铁纳米粒子不能被称为“磁铁矿”，Gnanaprakash 等人（2007）也表示，当氧化铁纳米粒子粒径小于 10 nm 时，表面积/体积比增加会导致大量的表面原子，这将很容易使得 Fe^{3+} 氧化，从而在磁铁矿表面产生磁赤铁矿，虽然相比于磁铁矿，磁赤铁矿的磁化强度略有下降，但在 MNPs 技术的应用上，磁铁矿和磁赤铁矿都是适用的，因为它们本质都是铁磁性的，且都具有超顺磁性（Gnanaprakash et al 2007）。同时从电镜结果图也可以看出， Fe_3O_4 MNPs 和 AF-MNPs 粒子之间出现团聚现象，这是因为纳米尺度的磁性粒子比表面积大，为了降低表面能，MNPs 会趋于团聚，形成聚集体（郝凌云和张宏 2011）；另外一方面，由于 MNPs 是在铜网上干燥后进行透射电镜观察的，其分散性相较于溶液中大大降低，引起部分团聚。MNPs 的尺寸大小在修饰前后并未有太大的变化，平均磁核直径均约 10 nm，这主要是因为 AF-MNPs 表面的氨基基团对粒子尺寸的增加非常有限。化学共沉淀法制备的 MNPs 粒径不可控，无法实现制备粒径合适的 MNPs，导致粒径过小引起团聚，但通过纳米粒度仪测定 MNPs 分散系数可知，经改性后的 AF-MNPs 与 Fe_3O_4 MNPs 相比，分散性提高。Zeta 电位是粒子剪切面处的静电电荷，与粒子的表面电荷有关（Reddy et al 2014），我们利用纳米粒度 Zeta 电位仪测定不同 pH 条件下两种 MNPs 的 Zeta 电位值， Fe_3O_4 MNPs 的等电点 pH 约为 4.6，而 AF-MNPs 的等电点 pH 约为 9.4，这与 Gu 等人（2006）关于“AF-MNPs 的等电点大于 9，当 $\text{pH} < 9$ 时，AF-MNPs 表面带有正电荷”的结果一致。AF-MNPs 在 pH 为 2-9 的范围内粒子表面带有正电荷，这主要是因为 AF-MNPs 在 Fe_3O_4 MNPs 表面修饰有大量氨基基团，使得粒子在一般环境条件下表面携带正电荷。另一方面，与 Fe_3O_4 MNPs 相比，经修饰后的 AF-MNPs 在更宽的 pH 范围内，粒子表面携带正电荷，Azam 等人（2012）的研究结果表明，与带负电荷

的 Fe_3O_4 MNPs 相比，带正电荷的纳米粒子与细菌间的相互作用更强，更容易吸附细菌，为后续富集细菌提供了强有力的支撑。

3. MNPs 在细菌分离、富集方面的应用

通常用于在细菌分离、富集和检测领域的 MNPs 需要在其表面修饰对细菌具有识别功能或靶向的生物分子，如抗体、核酸适配体、抗生素、糖类等，MNPs 通过不同的生物修饰，以获得不同捕获细菌的能力，然后在外部磁场的作用下，进行磁分离，捕获并富集病原体。Wang 等（2010）利用抗体和细菌表面抗原间的特异性结合，制备了用于同时分离 *S.aureus* 和沙门氏菌的两种特异性抗体共修饰的 Fe_3O_4 MNPs；Yang 等（2016）利用万古霉素与革兰氏阳性菌表面 D-Ala-D-Ala 分子形成五个氢键的特异性识别作用构建了多价分子刷磁性纳米探针分离富集 *L.monocytogenes*；Jin 等（2017）基于荧光共振能量转移效应的上转换 MNPs 适配体传感器通过核酸适配体结合靶细菌。作为生物识别元件，抗体和适配体等具有特异性好、灵敏度高等优点，但也存在如成本高、制备工艺复杂及只能特异性富集一种病原菌没有普适性等缺陷（Qi et al 2013, Zhu et al 2015），而基于万古霉素的表面修饰，只能对革兰氏阳性菌具有较高的分离、捕获效率，对食品样品中病原微生物的分离具有单一性的限制。本章通过在 Fe_3O_4 MNPs 表面涂覆 APTES，成功修饰上氨基基团，制备出氨基功能化的 MNPs。表面带正电荷的 AF-MNPs 主要是与表面带有负电荷的细菌通过静电力进行相互作用，实现对细菌的吸附、分离，而且，由于 AF-MNPs 表面带有大量氨基基团，不具有生物特异性，因此能对大多数细菌都有一定的吸附捕获作用，实现对食品中混合微生物的同时捕获与富集。

3.2 小结

本章首先通过化学共沉淀法制备出粒径约为 10 nm 的 Fe_3O_4 MNPs，然后在其表面涂覆 APTES，修饰上了大量氨基基团，成功实现了对 Fe_3O_4 MNPs 的改性。改性后，MNPs 的分散性、表面电荷及表面官能团都有所改变，但粒子的尺寸大小和形状没有明显的变化，修饰前后，粒子的粒径大小均在 10 nm 左右，且都呈现球形或类球形，通过测定分散系数 Pdl 值后可知，修饰后的 MNPs 和 AF-MNP 分散性良好。通过测定在不同 pH 条件下两种 MNPs 的 Zeta 电位，修饰后的 AF-MNPs 在更宽的 pH 范围内表面带有正电荷，为后续对食源性致病菌的富集提供了基础。

第三章 氨基功能化磁性纳米粒子富集食源性病原菌

AF-MNPs 是在 Fe_3O_4 MNPs 表面修饰了 APTES，使其表面带有大量氨基，在一般条件下，其表面电荷为正电荷，与带负电荷的 Fe_3O_4 MNPs 相比，带正电荷的纳米粒子与细菌间的相互作用更强，更容易吸附细菌（Azam et al 2012），MNPs 与细菌大小相比，约相差两个数量级，这表明多个 MNPs 可以同时吸附于一个细菌上，更容易进行磁介导分离。

本研究中 AF-MNPs 对细菌的吸附捕获主要是由 AF-MNPs 和细菌之间的静电相互作用引起的。在食品基质的环境中，大多数细菌的表面都带有负电荷，而 AF-MNPs 表面带有大量氨基，带正电荷，通过静电吸附作用，表面带有负电荷的细菌就能被 AF-MNPs 吸附捕获。由于 AF-MNPs 不具有生物特异性，对大多数细菌都有高效捕获的能力，因此可以同时捕获样品中不同微生物病原体，大大提高分离效率。在介导 AF-MNPs 与细菌之间快速、高效的相互作用中，AF-MNPs 的用量及捕获时间、细菌细胞自身因素（细菌的生理状态、细菌细胞壁的性质和菌液浓度）、介质溶液体系（缓冲液 PBS 浓度、pH 及反应体系体积）等因素会对两者之间的相互作用产生影响。因此，对上述影响因素进行研究，确定 AF-MNPs 的工作条件。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

纯牛奶	内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司
PALCAM 琼脂	青岛海博生物技术有限公司
PALCAM 琼脂添加剂 1	青岛海博生物技术有限公司
PALCAM 琼脂添加剂 2	青岛海博生物技术有限公司
伊红美蓝琼脂	青岛海博生物技术有限公司
Baird-Parker 琼脂基础	青岛海博生物技术有限公司
亚硝酸盐卵黄增菌液	青岛海博生物技术有限公司
蜡样芽孢杆菌选择性琼脂基础	青岛海博生物技术有限公司

Pfizer 肠球菌选择性琼脂	青岛海博生物技术有限公司
PCA 培养基	青岛海博生物技术有限公司
亮绿琼脂培养基	青岛海博生物技术有限公司

1.2 主要仪器

电子天平	JF502	上海浦春计量仪器有限公司
高功率数控超声波清洗器	KQ-400KDE	昆山市超声仪器有限公司
磁分离架	MP-SP-1	郑州英诺生物科技有限公司
电热鼓风干燥箱	WGL-30B	天津市泰斯特仪器有限公司
涡旋振荡仪	VORTEX-5	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
超净工作台	DL-CJ-2NDI	北京佳源兴业科技有限公司
数显 pH 计	PSH-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
生化培养箱	SHP-250	上海精宏实验设备有限公司
脱色摇床	TS-2	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
高速冷冻离心机	5417R	艾本德中国有限公司
数显恒温水浴锅	HH-2	金坛市鸿科仪器厂
紫外分光光度计	UV-1700	日本岛津公司

1.3 实验菌株

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L.monocytogenes*) (CVCC-1598) 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心, 华中农业大学何启盖教授惠赠。大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*) (ATCC 6538)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, *S.enteritidis*) (ATCC 13076) 均由中国食品药品检定研究院提供。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养

实验中细菌培养所用到的 TSA 培养基和 TSB 液体培养基都不含抗生素。PALCAM 琼脂、伊红美蓝琼脂、Baird-Parker 琼脂基础和亮绿琼脂培养基分别作为 *L.monocytogenes*、*E.coli*、*S.aureus* 和 *S.enteritidis* 的显色培养基。所用无菌 PBS 缓冲液为 10 mmol/L、pH 7.4。具体培养步骤如下：

1) 将于 -80℃ 冰箱冷冻保存的 *S.aureus*、*S.enteritidis*、*L.monocytogenes* 和 *E.coli* 以平板划线法接种于 TSA 培养基，置于 37℃ 恒温培养箱中倒置培养过夜。

2) 琼脂平板上用接种环分别挑取 *S.aureus*、*S.enteritidis*、*L.monocytogenes* 和 *E.coli* 的单菌落接种于 5 mL TSB 中，于 37℃ 恒温摇床中 160 r/min 振荡培养过夜。

3) 将过夜培养的菌液按照 1:100 的比例接种到 5 mL TSB 中，于 37℃ 恒温摇床中 160 r/min 振荡培养 6 h。

4) 将培养得到的菌液于 8000 r/min 离心 10 min，然后用 10 mmol/L、pH 7.4 的无菌 PBS 缓冲液洗涤三次，离心收集菌体，重悬于 1 mL PBS 缓冲液中，备用。

1.4.2 AF-MNPs 对捕获效率的影响

本实验选取了食品中常见的食源性致病菌，以 *L.monocytogenes* 和 *S.aureu* 作为革兰氏阳性菌的代表菌株，以 *E.coli* 和 *S.enteritidis* 作为革兰氏阴性菌的代表菌株，初步探讨 AF-MNPs 的用量和捕获时间对捕获效率的影响。

1.4.2.1 AF-MNPs 用量对捕获率的影响

将新培养的菌液用 10 mmol/L、pH 7.4 的无菌 PBS 缓冲液 10 倍梯度稀释至 10^3 CFU/mL，分别取不同量的 AF-MNPs (1 mg/mL) 于 1.5 mL 离心管中，在磁分离架上进行磁分离，弃上清，加入 1 mL 上述稀释菌液，在脱色摇床上 37℃ 220 r/min 条件下温育 60 min，使 AF-MNPs 与菌液均匀混合后在外部磁场辅助下分离 MNPs-细菌结合物，吸取上清液涂布于显色培养基上，同时将未用 MNPs 捕获的菌液作为初始加入的总菌数，每组设置 3 个平行，于 37℃ 培养 24 h，培养结束后，进行磁捕获率的计算。

AF-MNPs 对细菌的磁捕获率的计算方法:

捕获率 (%) = (1-上清液中未结合的菌落数/初始加入的总菌落数) × 100%

1.4.2.2 AF-MNPs 捕获时间对捕获率的影响

分别选取在各菌捕获率达到最高时的 AF-MNPs (1 mg/mL) 的用量, 于 1.5 mL 离心管中, 磁场作用下进行磁分离, 弃上清, 加入 10^3 CFU 菌液, 在脱色摇床上 37°C 220 r/min 条件下温育不同时间, 使 AF-MNPs 与菌液均匀混合后在磁场作用下分离 MNPs-细菌结合物, 吸取上清液涂布于显色培养基上, 同时将未用 MNPs 捕获的菌液作为初始加入的总菌数, 每组设置 3 个平行, 于 37°C 培养 24 h, 培养结束后, 进行磁捕获率的计算。

1.4.3 细菌自身对捕获效率的影响

1.4.3.1 细菌 Zeta 电位值的测定

Saito 等人 (1997) 的研究表明, 细菌的 Zeta 电位是细菌表面和溶液界面区域的电势, 细菌表面的净电荷可以通过 Zeta 电位来评估。为了检测不同细菌的表面电荷状态, 本实验对上述 4 种细菌的 Zeta 电位值进行了测定。

用 10 mmol/L PBS (pH 7.4), 将全部菌液浓度调整到 10^7 CFU/mL, 各取 1 mL 上述菌液于 1.5 mL 离心管中, 用 Zeta 电位分析仪测定其 Zeta 电位值, 分析其表面电荷情况。

1.4.3.2 细菌生长状态对捕获率的影响

通过光电比浊法分别对 *L.monocytogenes*、*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *E.coli* 的生长曲线进行测定。具体测定步骤如下:

1) 用接种环分别挑取 *S.aureus*、*S.enteritidis*、*L.monocytogenes*、*E.coli* 的单菌落接种于 5 mL TSB 中, 于 37°C 恒温摇床中 160 r/min 振荡培养过夜。

2) 分别取 12 支试管, 取上述过夜培养的菌液 100 μ L 于装有 10 mL 液体培养基的试管中, 分别编号 1-12, 随后将全部试管置于恒温摇床 37°C、220 r/min 条件下培养。

3) 以未接种的液体培养基作为空白对照, 分别取培养时间为 1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、10、12、14、24 h 的菌液, 于紫外分光光度计进行测定 (OD_{600nm})。

4) 以培养时间为横坐标, OD_{600nm} 的吸光度值为纵坐标, 利用细菌数量与菌悬液的浊度 (OD 值) 成正比这一规律, 分别绘制四种细菌的生长曲线。

根据 *L.monocytogenes*、*S.aureus* 和 *E.coli*、*S.enteritidis* 生长曲线的测定结果, 将四种不同生长阶段的菌液用 pH 为 7.4 的 10 mmol/L 无菌 PBS 稀释至浓度为 10^4 CFU/mL, 各取 100 μ L (1 mg/mL) 的 AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中, 磁分离去除上清, 加入 1 mL 上述稀释菌液, 在 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 条件下温育 30 min, 磁分离 MNPs-细菌结合物, 吸取上清液涂布于显色培养基上, 每组设置 3 个平行, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 培养结束后, 进行磁捕获率的计算。

1.4.3.3 菌液浓度对捕获率的影响

研究细菌不同菌液浓度对于 AF-MNPs 和菌静电相互作用的影响。以 *S.aureus* 作为研究对象, 将新鲜培养的菌液用无菌 PBS 以 10 倍梯度稀释至 10^2 CFU/mL- 10^8 CFU/mL, 取 75 μ L (1 mg/mL) 的 AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中, 磁分离去除上清, 加入 1 mL 上述稀释菌液, 在 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 条件下温育 15 min, 磁分离 MNPs-细菌结合物, 吸取上清液涂布于 Baird-Parker 琼脂基础显色培养基上, 每组设置 3 个平行, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 培养结束后, 进行磁捕获率的计算。

1.4.4 缓冲体系对捕获效率的影响

1.4.4.1 缓冲液浓度对捕获率的影响

配制 pH 为 7.4 的 200 mmol/L PBS, 稀释得到浓度分别为 5、10、30、50、100、150、200 mmol/L 的 PBS。将新鲜培养的菌液用不同浓度的无菌 PBS 以 10 倍梯度稀释至 10^3 CFU/mL, 各取 100 μ L (1 mg/mL) 的 AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中, 磁分离去除上清, 加入 1 mL 上述稀释菌液, 在 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 条件下温育 30 min, 磁分离 MNPs-细菌结合物, 吸取上清液涂布于显色培养基上, 每组设置 3 个平行, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 培养结束后, 进行磁捕获率的计算。

1.4.4.2 缓冲液 pH 对捕获率的影响

将 pH 7.4 的 10 mmol/L PBS 用 0.2 mol/L HCl 和 0.2 mol/L NaOH 分别调节成 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的 10 mmol/L PBS。将新鲜培养的菌液用不同 pH 的 10 mmol/L 无菌 PBS 10 倍梯度稀释至 10^3 CFU/mL，各取 100 μ L (1 mg/mL) 的 AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中，磁分离去除上清，加入 1 mL 上述稀释菌液，在 37°C 220 r/min 条件下温育 30 min，磁分离 MNPs-细菌结合物，吸取上清液涂布于显色培养基上，每组设置 3 个平行，于 37°C 培养 24 h，培养结束后，进行磁捕获率的计算。

1.4.4.3 大体积溶液中 AF-MNPs 的捕获能力

将新鲜培养的菌液用无菌 PBS 进行 10 倍梯度稀释，在 5 mL 和 10 mL 无菌 PBS 体系中，分别使菌液浓度稀释至 400 CFU/mL、40 CFU/mL 和 4 CFU/mL，分别取 200 μ L (1 mg/mL) AF-MNPs 与 5 mL 和 10 mL 无菌 PBS 中的 400 CFU/mL、40 CFU/mL 和 4 CFU/mL 的 *S.aureus* 于 37°C 220 r/min 条件下温育 15 min，磁分离 MNPs-细菌结合物，吸取上清液涂布于 Baird-Parker 琼脂基础显色培养基上，每组设置 3 个平行，于 37°C 培养 24 h，培养结束后，进行磁捕获率的计算。

1.4.5 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌

1.4.5.1 AF-MNPs 富集人工污染牛奶和西瓜中的病原菌

为了研究 AF-MNPs 对于人工污染牛奶和西瓜样品中食源性致病菌的富集效率，分别将 100 μ L 不同浓度的 *L.monocytogenes*、*S.aureus*、*E.coli* 和 *S.enteritidis* 菌液加入到处理后的牛奶混合液和鲜切西瓜中，使其菌液终浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL。取 200 μ L (1 mg/mL) AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中，磁分离去除上清，加 1 mL 上述人工污染的牛奶样品和西瓜样品，于 37°C 220 r/min 条件下温育 60 min，磁分离 MNPs-细菌结合物，吸取上清液涂布于显色培养基上，每组设置 3 个平行，于 37°C 培养 24 h，培养结束后，进行磁捕获率的计算。

1.4.5.2 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌

为了研究 AF-MNPs 对于食品样品中细菌的富集效率，我们在农贸市场中随机选取 8 种咸菜样品和 6 种卤肉样品，8 种咸菜样品分别为八宝咸菜、海白菜、泡白菜、腌黄瓜、雪里红、白萝卜菜、豆角以及蔓菁，按照 1-8 进行依次编号；6 种卤肉样品分别为卤叉烧、卤猪肉、卤鸭脖、卤鸭锁骨、卤鸡腿以及卤鸡爪，按照 9-12 进行依次编号。将 25 g 样品溶于 225 mL 无菌 PBS 中，充分混合均匀后，形成样品混合液。取 200 μ L (1 mg/mL) AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中，磁分离去除上清，加 1 mL 上述样品混合液，于 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 条件下温育 60 min，磁分离 MNPs-细菌结合物，去除上清液，向沉淀物中重新加入 1 mL 无菌 PBS，涂布于 PCA 培养基中，同时将未用 AF-MNPs 捕获的样品混合液作为初始加入的总菌数，每组设置 3 个平行，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 48h，培养结束后，进行磁捕获率的计算。

2 结果与分析

2.1 AF-MNPs 对捕获效率的影响

2.1.1 AF-MNPs 用量和捕获时间的影响

由图 3.1 可看出，在 10 mmol/L、pH 为 7.4 的无菌 PBS 缓冲液中，AF-MNPs 对 *S.aureus* (G^+) 用量为 75 μ g 时就能达到 99.60% \pm 0.57% 的捕获率；当 AF-MNPs 用量分别为 100 μ g 时，对 *L.monocytogenes* (G^+) 的捕获率为 99.09% \pm 1.29%；当 AF-MNPs 用量分别为 60 μ g 和 80 μ g 时，AF-MNPs 对 *E.coli* (G^-) 和 *S.enteritidis* (G^-) 的捕获率分别为 98.68% \pm 0.37% 和 37.65% \pm 0.58%。AF-MNPs 对四种菌的捕获效率随着其用量的增加，捕获效率逐渐增强，并在达到一定量时趋于稳定。除 *S.enteritidis* 之外，AF-MNPs 对其他三种菌的捕获率均在 98% 以上，有着较高的捕获率，捕获效率相当，差异不明显。

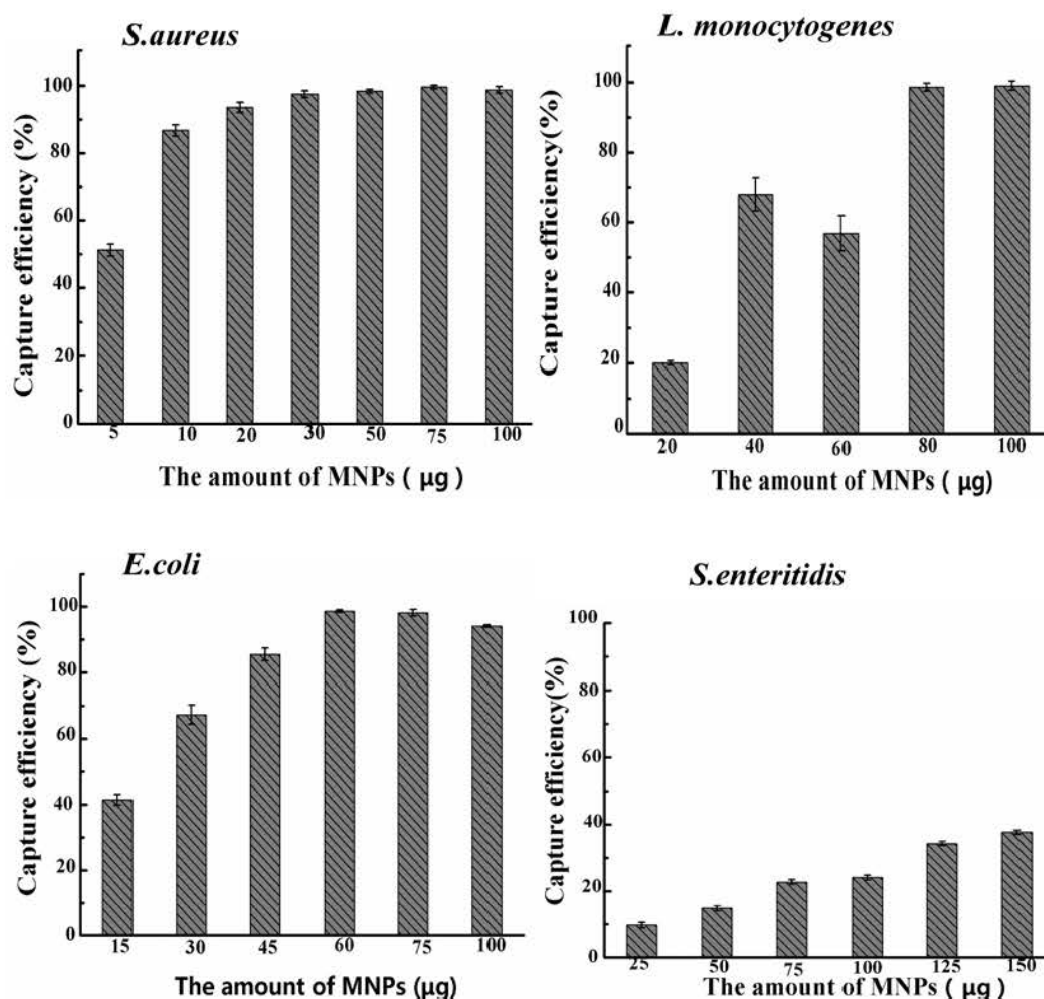


图 3.1 AF-MNPs 不同用量对菌的磁捕获效率

Fig. 3.1 Capture efficiency for the different amount of AF-MNPs with bacterium

由图 3.2 可以看出, 在 10 mmol/L、pH 7.4 的无菌 PBS 缓冲液中, AF-MNPs 对 *S. aureus* (G^+) 在用量为 75 μg , 捕获时间短至 5 min 时就能达到 99.60% \pm 0.57% 的捕获率, 随着捕获时间的增加, 捕获率波动不大, 基本保持稳定; 对于 *L. monocytogenes* (G^+), 当 AF-MNPs 用量为 80 μg , 捕获 60 min 后, AF-MNPs 的捕获率为 97.48% \pm 1.78%; 当 AF-MNPs 用量为 60 μg 时, 对 *E. coli* (G^-) 捕获 15 min 后, 其磁捕获效率接近 100%, 即能将 PBS 体系中几乎所有 *E. coli* 吸附捕获; 而对于 *S. enteritidis* (G^-) 来说, 当 AF-MNPs 用量为 150 μg , 捕获 30 min 时, 捕获率仅达到 38.24% \pm 2.08%, 且随着捕获时间的不断增加, 其捕获率也没有增大。结合图 3.1 可知, 不管 AF-MNPs 的用量和捕获时间如何增加, 其对 *S. enteritidis* 的磁

捕获效率都较低，低于 40%。作为同为革兰氏阴性菌，且菌株结构较为相似的 *E.coli* 和 *S.enteritidis* 来说，AF-MNPs 对二者的捕获效率有着明显的区别，造成这种结果的主要原因还未可知，需要对细菌表面电荷进行进一步的测定。

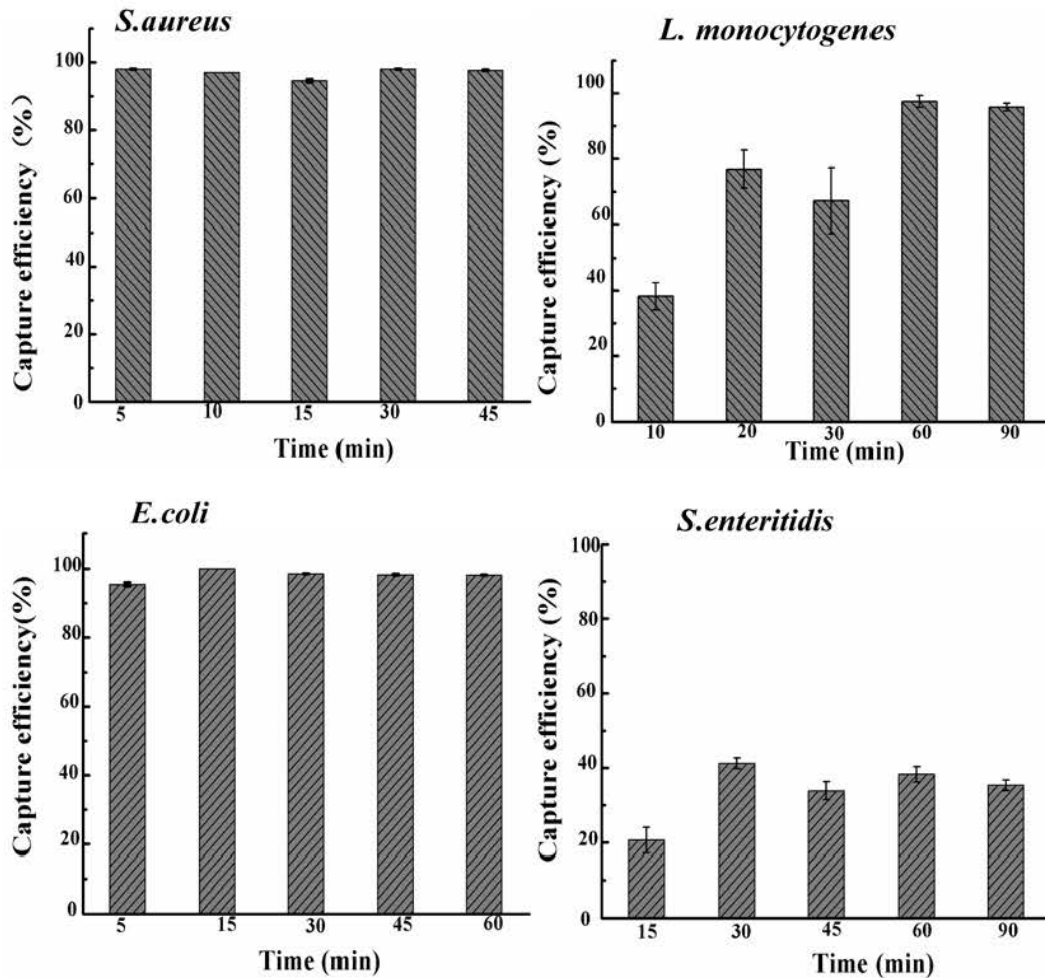


图 3.2 AF-MNPs 与细菌温育时间的选择

Fig. 3.2 Optimization of incubation time between AF-MNPs with bacterium

2.2 细菌对捕获效率的影响

2.2.1 不同种类细菌的影响

细胞表面净电荷可以通过 Zeta 电位来进行评估，本实验在 10 mmol/L、pH 7.4 的无菌 PBS 缓冲液中，且菌液浓度为 10^7 CFU/mL 时测定不同细菌的 Zeta 电位值，结果如图 3.3 所示。

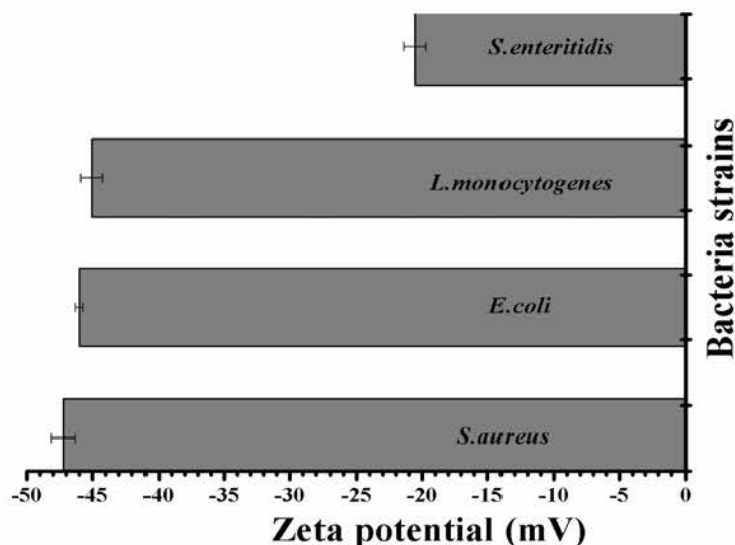


图 3.3 不同种细菌的 Zeta 电位值

Fig. 3.3 The zeta potential of bacteria

根据图 3.3 可看出，测定的上述 4 种细菌 Zeta 电位值均为负值，其表面均携带有负电荷。由于静电相互作用，表面带正电荷的 AF-MNPs 通过静电吸附促使其与表面带有负电荷的细菌间的相互作用。由图 3.3 可看出，作为革兰氏阳性菌的 *S. aureus*、*L. monocytogenes* 和作为革兰氏阴性菌的 *E. coli* Zeta 电位值在 -50 mV--45 mV 之间，而对 *S. enteritidis* (G⁻) 来说，其 Zeta 电位值接近 -20 mV，所带负电荷相比于其它三种菌较少。

2.2.2 不同生长阶段细菌的捕获率

分别取培养时间为 1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、10、12、14 h、24 h 的菌液，经一定程度的稀释于紫外分光光度计进行测定 (OD_{600nm})。分别绘制生长曲线，如图 3.4。由于采用的是光电比浊法测定的细菌生长曲线，衰亡期测定的 OD 值包括活菌和死菌，所以细菌的衰亡期不明显，但曲线的整体趋势是符合细菌的生长曲线的。

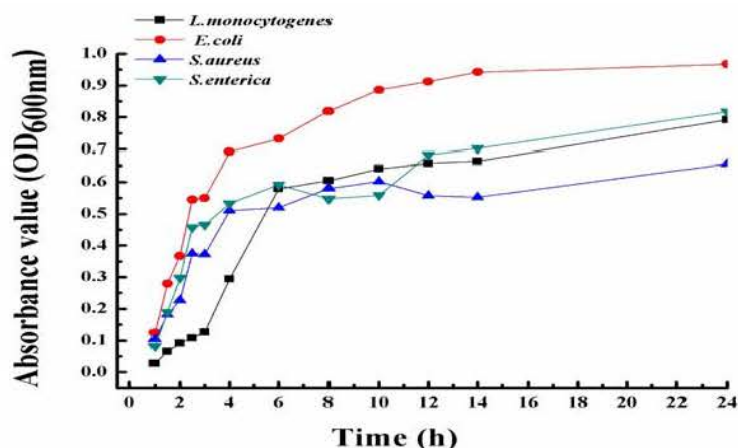


图 3.4 四种细菌的生长曲线

Fig. 3.4 Growth curves of bacteria

AF-MNPs 对四种细菌四个不同生长时期的菌液进行捕获, 根据图 3.4 四种细菌的生长曲线, 分别选取 2 h、6 h、10 h、24 h 的菌液作为 *L.monocytogenes* 的迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期的点; 选取 1 h、3 h、8 h、24 h 的培养液分别作为 *S.aureus* 四个生长阶段的点; 对于 *E.coli*, 分别选取 1 h、4 h、10 h、24 h 的菌液作为四个时期的点; 而对于 *S.enteritidis* 来说, 选取 1 h、2.5 h、8 h、24 h 的菌液分别作为四个生长阶段的点。将各菌液浓度调整至 10^4 CFU/mL, AF-MNPs 分别对其进行吸附捕获, 捕获效率如图 3.5 所示。

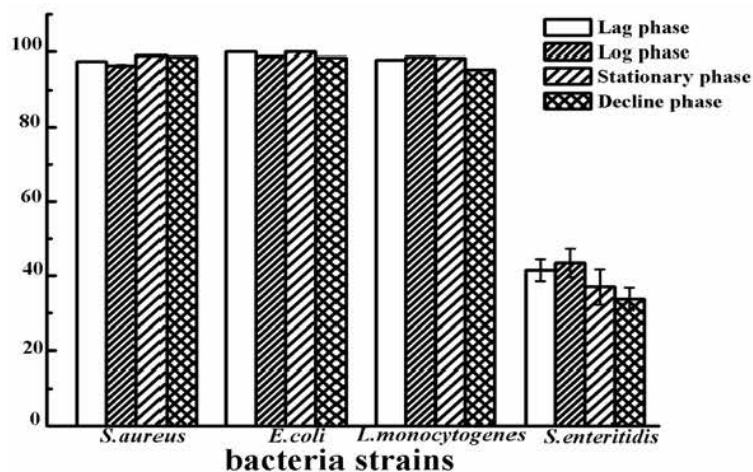


图 3.5 AF-MNPs 对不同生长阶段细菌的捕获效率

Fig. 3.5 Capture efficiency of AF-MNPs for bacteria at different growth phases

由图 3.5 可看出, AF-MNPs 对迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期的 *S. enteritidis* 的捕获率分别为 $41.47\% \pm 2.94\%$ 、 $43.45\% \pm 3.77\%$ 、 $36.99\% \pm 4.78\%$ 、

33.75%±3.07%，尽管捕获率相比其他三种菌较低，但四个时期的捕获率相差不大。而对于 *S.aureus*、*E.coli* 和 *L.monocytogenes* 来说，AF-MNPs 对其不同生长期的捕获率均在 95%-99% 的范围内，没有因为细菌的生长时期不同，使得捕获效率有着明显的差别。根据图 3.5 可知，AF-MNPs 对于同一种菌四个不同生长时期菌液在 PBS 体系中的捕获效率几乎没有差异。

2.2.3 不同浓度 *S.aureus* 的捕获率

为了评估在不同菌浓度下，AF-MNPs 对细菌的吸附作用，以 *S.aureus* 为代表菌株，在最佳捕获 *S.aureus* 的条件下，测定了 AF-MNPs 对不同浓度（ 10^2 CFU/mL- 10^8 CFU/mL）的 *S.aureus* 的捕获效率，结果如图 3.6 所示。

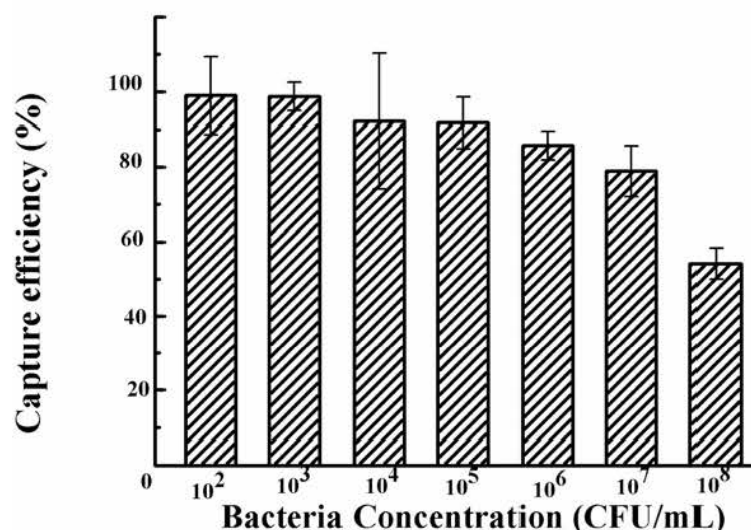


图 3.6 AF-MNPs 对不同浓度金黄色葡萄球菌的捕获效率

Fig. 3.6 Capture efficiency of AF-MNPs for different concentration of *S.aureus*

如图 3.6 所示，在 PBS 体系中，当细菌浓度在 10^2 CFU/mL- 10^5 CFU/mL 范围内时，AF-MNPs 对 *S.aureus* 的捕获率超过 90%；当浓度增加至 10^6 CFU/mL 时，捕获效率下降至 85.77%±3.85%，而当细菌浓度增加至 10^8 CFU/mL 时，AF-MNPs 对细菌的捕获效率明显下降至 54.17%±4.17%，说明随着菌液浓度的增加，负电荷的量增多，MNPs 的量相对不足，导致 AF-MNPs 与细菌间的静电相互作用减弱，应随着菌量的增加来调整 AF-MNPs 的用量，以提高 AF-MNPs 对 *S.aureus* 的捕获效率。

2.3 缓冲体系对捕获效率的影响

2.3.1 不同浓度缓冲液的捕获率

缓冲溶液的离子强度会改变细菌和 AF-MNPs 的 Zeta 电位，从而影响细菌与 MNPs 之间的静电相互作用，为了确定溶液离子强度是否会影响捕获效率，我们在大范围的 PBS 浓度下 (0-500 mmol/L) 进行了细菌捕获实验，结果如图 3.7 所示。

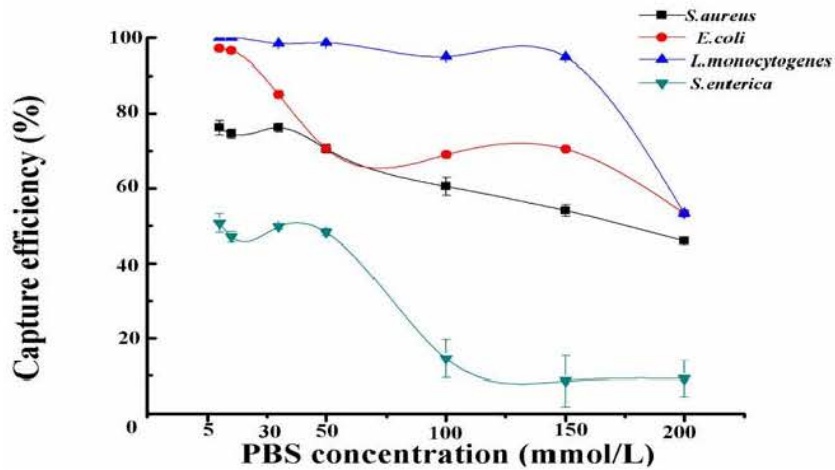


图 3.7 缓冲液 PBS 浓度对四种细菌磁捕获效率的影响

Fig. 3.7 Effect of PBS concentration on capture efficiency of bacterium

由图 3.7 可知，在 PBS 浓度为 5、10、30、50、100 和 150 mmol/L 时，AF-MNPs 对 *L.monocytogenes* 的捕获率高于 90%，但当 PBS 浓度增加至 200 mmol/L 时，其捕获率下降至 $53.25\% \pm 0.87\%$ ；*S.aureus* 和 *E.coli* 分别在 PBS 浓度为 0-30 mmol/L 和 0-10 mmol/L 时有着高捕获率，；AF-MNPs 对 *S.enteritidis* 的捕获率仍然维持着较低的捕获率，但在 PBS 浓度为 0-50 mmol/L，其捕获率接近 50%。当 PBS 溶液浓度处于高浓度时，MNPs 对四种细菌的捕获率也大大的降低了，造成这一结果的原因可能是过量的磷酸盐屏蔽了纳米粒子表面或细菌表面的电荷。最终选定浓度为 10 mmol/L 磷酸缓冲液作为介质溶液。

2.3.2 不同 pH 缓冲液的捕获率

由于 AF-MNPs 对细菌的捕获主要是靠静电力所驱动的，所以缓冲液 PBS 体系的 pH 和离子强度都会对其捕获率有所影响。本实验研究了在不同 pH (2、3、4、

5、6、7、8、9、10、11) PBS 缓冲液中, AF-MNPs 对四种细菌的捕获效率。结果如图 3.8 所示。

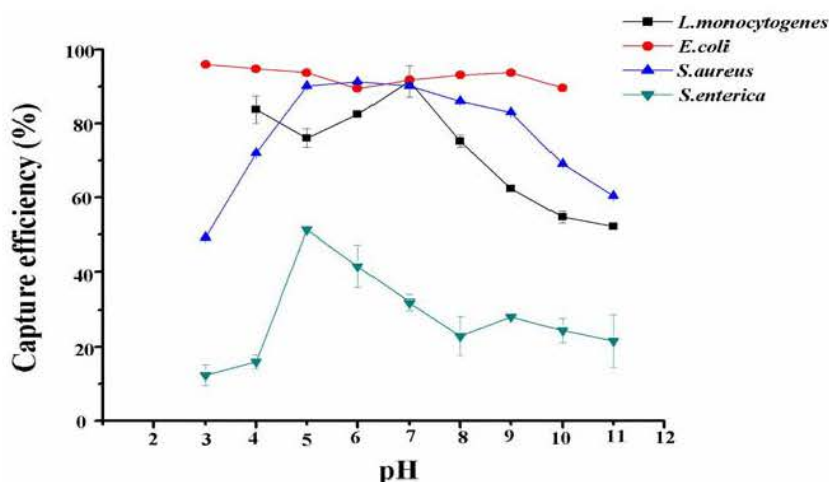


图 3.8 PBS pH 对四种细菌磁捕获效率的影响

Fig. 3.8 Effect of pH on capture efficiency of bacterium

由图 3.8 可知, 对于 *E.coli* 来说, 当缓冲液 pH 在 3-10 的范围时, AF-MNPs 对其捕获率没有明显的影响, 捕获率均高于 90%, 即 AF-MNPs 吸附捕获 *E.coli* 的最适 pH 范围为 3-10; 无论缓冲液 pH 如何改变, AF-MNPs 对 *S.enteritidis* 的捕获率都很低, 只有当 pH=5 时, 其捕获率能达到 51.28%; 对于革兰氏阳性菌 *L.monocytogenes* 来说, 当缓冲液 pH 在 4-9 的范围时, AF-MNPs 对其捕获率均高于 60%, pH 在 4-8 时, AF-MNPs 对其捕获率均高于 70%, 最佳吸附 pH 为 4-8; AF-MNPs 对 *S.aureus* 的捕获效率在 pH 范围为 4-11 的时候, 均高于 60%, pH 在 5-9 时, 捕获效率均高于 80%, 最佳吸附 pH 为 5-9。AF-MNPs 吸附捕获 *L.monocytogenes* 和 *S.aureus* 的最佳 pH 范围分别为 4-8 和 5-9, 这与 AF-MNPs 吸附细菌的静电相互作用的机理是一致的。通常细菌的等电点为 pH 2-3.5 (Mozes and Rouxhet 1987), 在 pH 为 5-9 的条件下, 细胞壁表面的羧酸盐和磷酸基团因为裸露于胞外环境, 容易被质子化, 使得大多数细菌的表面是带有负电荷的 (Horká et al 2006), 而结合上一章对于 AF-MNPs 在不同 pH 缓冲液 PBS 体系的条件下 Zeta 电位的测定结果可知, AF-MNPs 等电点大于 9, 当 pH > 9 时, AF-MNPs 表面带有正电荷。所以, 当缓冲液 $5 < \text{pH} < 9$ 时, 带有正电荷的 AF-MNPs 通过静电相互作用, 对表面带有负电荷的细菌具有强吸附捕获作用。因此, AF-MNPs 在较广的 pH 范围内, 都能够对细菌进行高效地捕获、富集。

2.3.3 大体积溶液中 AF-MNPs 的捕获效率

在食品样品中污染的细菌浓度较低，为了评估 AF-MNPs 对于大体积溶液中低浓度 *S.aureus* 的磁捕获效率，本实验将 AF-MNPs 分别与 5 mL 和 10 mL PBS 中 4 CFU/mL、40 CFU/mL、400 CFU/mL 的 *S.aureus* 进行吸附捕获，结果如图 3.9 所示。

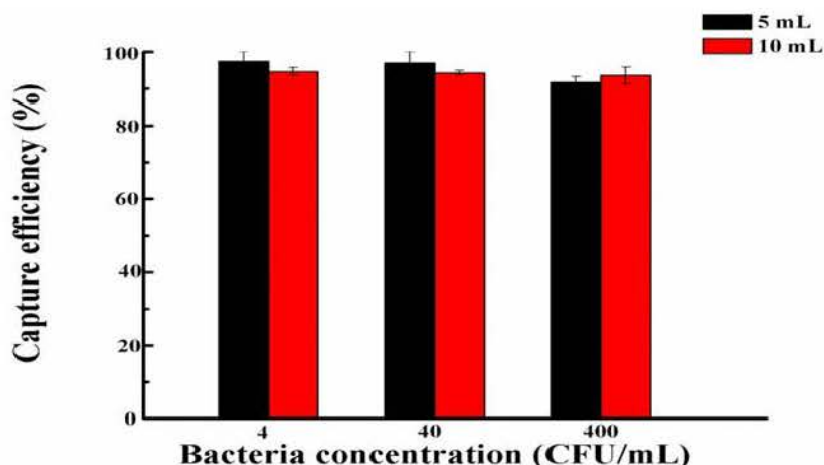


图 3.9 AF-MNPs 对不同体积中金黄色葡萄球菌的捕获效率

Fig. 3.9 Capture efficiency of AF-MNPs for *S.aureus* in different volumes

由图 3.9 可知，随着反应体系体积的增大，AF-MNPs 对 *S.aureus* 的捕获效率有所下降，但下降幅度不大，磁捕获效率均超过 90%。对于 *S.aureus* 三种低浓度的菌液均有较高的磁捕获率，说明 AF-MNPs 对 *S.aureus* 在大体积体系中也具有较强的静电相互作用。

2.4 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌

2.4.1 AF-MNPs 富集人工污染牛奶和西瓜中 4 种食源性致病菌

为了评估 AF-MNPs 对人工污染的牛奶样品中 4 种致病菌的磁捕获效率，对人工污染的牛奶样品和西瓜样品（污染浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL）进行捕获，结果如图 3.10 (A)、(B) 所示。

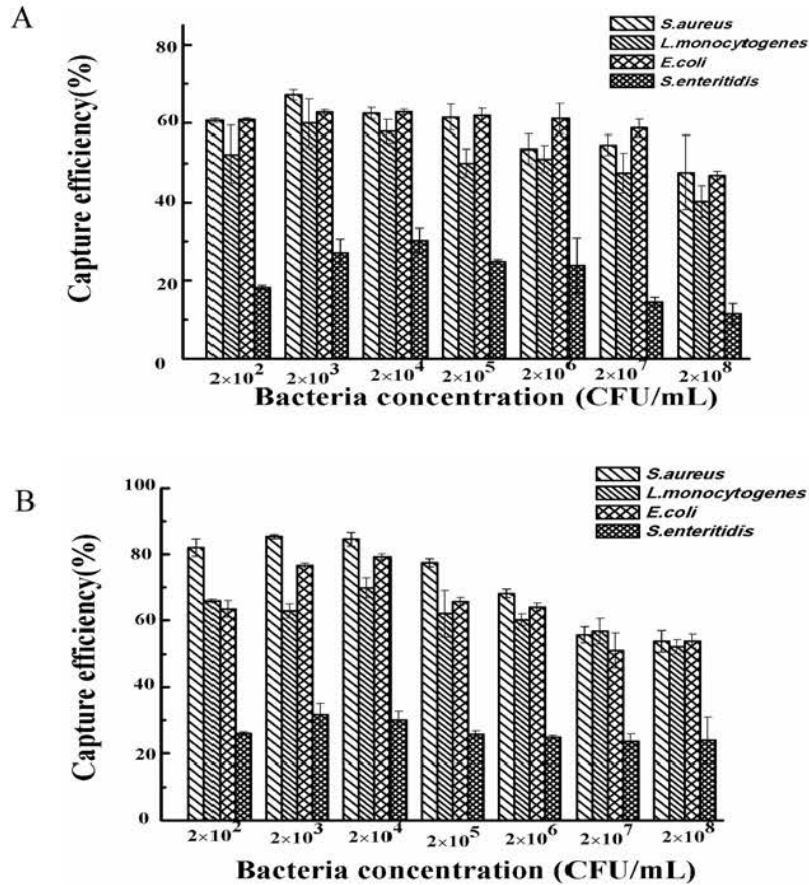


图 3.10 人工污染牛奶 (A) 和鲜切西瓜 (B) 中 AF-MNPs 对四种细菌的捕获效率

Fig. 3.10 Capture efficiency of AF-MNPs with bacterium at artificial contaminated milk (A) and watermelon (B)

从图 3.10 可以看出, 在人工污染牛奶样品中, AF-MNPs 对于 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*E.coli* 和 *S.enteritidis* 的捕获率均在 2×10^3 CFU/mL 时, 捕获率达到最高, 分别为 $67.14\% \pm 1.33\%$ 、 $62.89\% \pm 0.68\%$ 、 $57.92\% \pm 2.93\%$ 和 $30.26\% \pm 0.69\%$ 。在人工污染的西瓜样品中, AF-MNPs 对于 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*E.coli* 和 *S.enteritidis* 的最高捕获率分别为 $85.38\% \pm 0.63\%$ 、 $69.84\% \pm 2.97\%$ 、 $79.28\% \pm 0.90\%$ 和 $31.66\% \pm 3.30\%$ 。

2.4.2 AF-MNPs 富集食品样品中的细菌

为了评估 AF-MNPs 对食品样品中细菌的捕获效果, 本研究随机选取 8 种不同咸菜样品和 6 种不同卤肉样品, 以 $200 \mu\text{L}$ (1 mg/mL) AF-MNPs 分别对其进行磁捕获, 结果如表 3.1 所示。

表 3.1 AF-MNPs 对食品样品中细菌的捕获效率

Table 3.1 Capture efficiency of AF-MNPs for bacteria in food samples

编号	样品名称	捕获效率
1	八宝咸菜	76.67%±1.67%
2	海白菜	80.77%±1.92%
3	泡白菜	87.89%±0.93%
4	腌黄瓜	78.26%±4.35%
5	雪里红	85.78%±1.47%
6	白萝卜菜	78.38%±2.70%
7	豆角	76.19%±4.76%
8	蔓菁	75.93%±1.85%
9	卤叉烧	67.22%±2.08%
10	卤猪肉	67.78%±1.81%
11	卤鸭脖	65.52%±2.08%
12	卤鸭锁骨	65.47%±3.79%
13	卤鸡腿	70.57%±3.13%
14	卤鸡爪	70.01%±3.13%

由表 3.1 可看出, AF-MNPs 对随机选取的 8 种咸菜样品中细菌的捕获效率均大于 75%, 对于泡白菜中细菌的捕获率高达 87.89%±0.93%; 由于卤肉基质较咸菜来说复杂, 理论上来, AF-MNPs 对卤肉中菌的捕获效果会有所降低, 然而 AF-MNPs 对随机选取的 6 种卤肉中菌的捕获效率均大于 65%, 表明 AF-MNPs 对食品样品中的菌捕获效果较好。

3 小结与讨论

3.1 讨论

1. MNPs 在细菌富集方面的应用

通常，食品样品中污染的细菌浓度较低，而较低浓度的细菌通常需要很长时间的富集培养才能被检测到（Gao et al 2009），一般来说，需要对复杂样品中的微生物进行分离和浓缩，MNPs，如 Fe_3O_4 MNPs 和功能化 MNPs，由于其磁性、电子性、光子性和光学特性等已成为复杂食品样品中目标致病菌的有限分离和浓缩载体。MNPs 对于细菌的分离富集不仅能够提高检测方法的灵敏度和准确性，同时还能减少食品基质的干扰，缩短检测所需时间。为了提高 MNPs 对细菌的检测特异性，通常需要对纳米颗粒表面进行生物分子修饰，如抗体、核酸适配体、糖类等，以实现细菌的靶向性，有效地捕获和富集目标致病菌（Chen et al 2012, Wen et al 2013, Jin et al 2017）。然而这样的生物分子相对来说是大分子，它们会减少成功修饰在 MNPs 表面的数量，从而影响对细菌的捕获效率；另一方面，由于抗体、核酸适配体等是通过亲和作用对特定的病原体的特异性吸附捕获，对其它细菌可能无效，同时这些生物分子的修饰成本较高。本研究通过在 Fe_3O_4 MNPs 表面修饰 APTES，使其表面带有大量氨基，AF-MNPs 主要是通过与细菌间的静电相互作用对带有负电荷的细菌进行高效、经济的捕获和富集，不需要在 MNPs 表面修饰任何对靶细菌具有识别功能的生物元件，因此无需经过复杂的化学偶联。而且，相比较抗体等生物分子，尽管氨基基团具有较低的特异性和选择性，但可以在实际样品中捕获更多种类的病原微生物，能同时分离、捕获样品中的混合微生物，增加适用性。

2. AF-MNPs 与细菌之间的相互作用

AF-MNPs 能够快速、高效地捕获和富集致病菌的主要原因是在一般环境条件下，MNPs 表面带有正电荷，而细菌表面带有负电荷，通过静电相互作用，二者之间有着强烈的吸附作用。MNPs 之间的静电吸引或排斥以及 MNPs 与细菌细胞间的相互作用受细菌细胞壁表面电荷的控制（Dinali et al 2017）。理论上讲，在与 AF-MNPs 相互作用时，由于细胞壁的差异，革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的捕获

效率也应该有所差异。革兰氏阳性菌的细胞壁含有一层厚的肽聚糖，与革兰氏阳性菌细胞壁特有的磷壁酸结合，肽聚糖层与磷壁酸形成具有多功能的聚阴离子基质（Scott and Barnett 2006）。革兰氏阳性细菌的肽聚糖细胞壁通过位于取代基磷壁酸和磷壁酸残基上的磷酸化基团以及未取代的羧基影响表面电负性，相反，革兰氏阴性细菌的肽聚糖通过外膜被隔离在质周空间内，因此不暴露于细胞外环境，在这些生物体中，负的静电表面电荷是由位于外膜外小叶的磷酸基和 2-酮-3-脱氧辛酯羧酸酯基脂多糖赋予的（Beveridge 1990）。革兰氏阴性菌较之革兰氏阳性菌，主要是其表面有一层外膜，外膜中包含大量的脂多糖和蛋白质（Aruguete and Hochella 2010），Ismail 等人（2015）的研究结果表明，含有脂多糖的外膜会使细胞壁对亲脂溶质不渗透，并限制带负电荷自由基的渗透。细胞壁的结构不同使得二者在表面成分和性质等方面都有所差异（Covas et al 2016）。

在本实验中，我们分别选取 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 作为革兰氏阳性菌代表菌株，以 *E.coli*、*S.enteritidis* 作为革兰氏阴性菌代表菌株，研究 AF-MNPs 对不同种类细菌的捕获效率及影响捕获效率的影响因素。如图 3.1，除了 *S.enteritidis* 外，在 PBS 缓冲液中，AF-MNPs 对其它 3 种菌的捕获率均高达 98% 以上，而对 *S.enteritidis* 的捕获率略低，造成这一结果的原因可能是 *S.enteritidis* 表面负电荷太少（根据 Zeta 电位结果得知），与 AF-MNPs 间的静电力较弱。结合图 3.1 和 3.2 中 AF-MNPs 对 *S.enteritidis* 的低捕获率可知，AF-MNPs 对细菌的捕获效率与其表面电荷有着较大联系，表面负电荷越多，AF-MNPs 对细菌的捕获率越高，同时也证明了 AF-MNPs 对细菌的捕获富集作用主要由静电相互作用驱动的。另一方面，Zeta 电位值的测定结果也能初步表明，这四种细菌表面电荷的性质与革兰氏阴性或革兰氏阳性菌无直接联系，即初步证明，AF-MNPs 对细菌的捕获效率与是否为革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌无关。Jin 等人（2014）通过在 Fe_3O_4 MNPs 表面修饰三种带正电的氨基酸（精氨酸、赖氨酸和赖氨酸）合成了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Arg$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@@Lys$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@PLL$ ，这三种经氨基酸修饰的功能化磁性纳米粒子（ $\text{Fe}_3\text{O}_4@AA$ ）在无菌 PBS 体系中，对革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌和革兰氏阴性菌 *E.coli* 的捕获率均在 97% 以上。

Honda 等人（1998）的研究也发现，在 Fe_3O_4 表面偶联壳聚糖得到的 MNPs 等电点为 6.9，当 $\text{pH} < 7.0$ 时，90% 以上的 *E.coli* 能够被捕获。Loosdrecht 等人

(1987) 认为当溶液 pH 值高于 MNPs 等电点时, 氢键相互作用和疏水吸引可能取代静电力来主导 MNPs 与细菌间的相互作用。本研究中, 对于 *E.coli*、*S.aureus* 和 *L.monocytogenes* 来说, 当体系 pH>9 时, 尽管 AF-MNPs 表面带有负电荷, 与细菌电负性相同, 但 AF-MNPs 对其捕获率仍能保持一定的吸附。

我们研究了 PBS 浓度 (0-500 mmol/L) 对于捕获效率的影响, 如图 3.7, 当 PBS 溶液浓度处于高浓度时, MNPs 对四种细菌的捕获率也大大的降低了, Huang 等 (2010) 将其归因于高离子强度溶液会中和细菌和 MNPs 表面的电荷, 导致 MNPs 和细菌之间的静电相互作用减弱, 从而导致捕获率的下降。而在 Jin 等人 (2014) 的研究中, 在 PBS 浓度为 0-1000 mmol/L 范围内, $\text{Fe}_3\text{O}_4@AA$ 对于 *E.coli* 的捕获效率随着浓度的变化并没有发生显著性改变, 对 *E.coli* 的捕获率均达到 98% 以上, Jin 等 (2014) 认为, 在高浓度条件下, 氢键相互作用和疏水吸引参与了 MNPs 对细菌的捕获, 且提高了捕获效率, 综合在捕获过程中的作用来看, 离子强度对于细菌捕获效率几乎没有影响。

从以上实验结果可知, AF-MNPs 对不同种类细菌的捕获效率跟革兰氏阳性或革兰氏阴性无直接关系, MNPs 在捕获细菌的过程中涉及到许多复杂的因素, 虽然静电力是主导 MNPs 高效捕获细菌的主要驱动力, 但 MNPs 也很容易通过氢键或疏水相互作用附着在细菌表面, Li 等人 (2009) 认为纳米尺寸效应对其相互作用也有影响, 因为即使经修饰后表面带负电荷的 MNPs 也能附着在带负电荷的细菌表面。Ebrahiminezhad 等人 (2016) 的研究表明细菌细胞具有黏附因子, 能够介导细菌细胞与各种底物的黏附。这些因子也可以介导 MNPs 与细菌表面的相互作用。

3.2 小结

本章基于表面带正电荷的 AF-MNPs 与表面带负电荷的细菌间的静电相互作用, 研究了 AF-MNPs 对细菌的富集捕获效率、初步探讨了影响富集效率的因素以及 AF-MNPs 对食品样品中细菌的富集效果。

研究 AF-MNPs 分别对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的吸附效率, 研究结果初步表明 AF-MNPs 对不同种类细菌的捕获效率跟革兰氏阳性或革兰氏阴性无直接关系。初步确定 AF-MNPs 捕获细菌的工作条件: 在缓冲液 PBS 体系中, 除 *S.enteritidis* 外, 以 100 μg AF-MNPs 与浓度为 10^3 CFU/mL 的细菌在 10 mmol/L pH

4-8 PBS 中温育 60 min, AF-MNPs 对于细菌的捕获效率大于 70%, 100 μg 的 AF-MNPs 对细菌浓度在 10^2 - 10^6 CFU/mL 的范围内捕获率高于 85%; 在体积为 10 mL 的缓冲溶液中, 对浓度为 4 CFU/mL、40 CFU/mL 和 400 CFU/mL 的细菌捕获率超过 90%。

为了探究 AF-MNPs 对细菌在食品样品中的捕获效率, 本章以 4 种食源性致病菌 *L.monocytogenes*、*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *E.coli* 为研究对象, 人工污染经国标法检测不含这 4 种致病菌的纯牛奶和鲜切西瓜, 用 AF-MNPs 分别对污染样品进行捕获, AF-MNPs 对人工污染牛奶样品中细菌的捕获, 相比与对 PBS 体系中细菌的捕获, 效率均有明显的降低。本章随机选取了 8 种咸菜样品和 6 种卤肉样品, AF-MNPs 对这 8 种咸菜样品的捕获率均高于 75%, 对 6 种卤肉样品的捕获率均高于 65%, 捕获效果较好。

第四章 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测食源性致病菌

食源性致病菌对人类公共卫生健康构成重大威胁，在发达国家和发展中国家都造成了巨大的经济损失。为缩短检测时间，快速检测方法不断被开发，在食品检测中最广泛使用的现代快速检测方法主要是基于核酸的分子学检测方法，如 PCR、多重 PCR、qPCR 等，这些体外核酸扩增方法能够在数小时内将单个特定的 DNA 或 RNA 序列扩增多达一百万倍，并为单个细菌细胞提供了理论检测限（Erlich et al 1991, Bej 1994）。其中，多重 PCR 为高效、快速、特异性地检测食源性提供了可能（白亚龙等 2017），它可以在一个反应体系中，使用多对特异性引物，实现对多种致病菌的同时检测，更加节省时间和成本。另一方面，在食品中，通常靶细菌浓度小，相比于小的扩增体积（10-50 μL ），样品体系体积较大，而且食品成分会抑制酶反应，降低该检测方法的特异性和敏感性，导致检测结果不理想（Stevens et al 2004），因此在检测前将细菌进行分离富集并从样品基质中浓缩纯化以降低食品成分对检测结果的干扰显得十分重要。基于多重 PCR 的检测方法，与磁分离技术结合使用能提高检测方法的灵敏度。

本章通过 AF-MNPs 对人工污染牛奶样品中的 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 和 *S.enteritidis* 进行捕获，并利用特异性引物 16S rDNA、hly 和 invA 进行多重 PCR 同时检测人工污染牛奶样品中的三种食源性致病菌。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

纯牛奶	内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司
SSL 增菌肉汤	青岛海博生物技术有限公司
2 x Utaq PCR Mix 等 PCR 相关试剂	北京庄盟国际生物基因科技有限公司
细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒	北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Triton X-100	广州赛国生物技术有限公司
多重 PCR 引物	生工生物工程（上海）股份有限公司
GoldView TM	北京庄盟国际生物基因科技有限公司

50 x TAE 电泳缓冲液	北京庄盟国际生物基因科技有限公司
琼脂糖	北京沃比森科技有限公司

1.2 主要仪器

超净工作台	DL-CJ-2NDI	北京佳源兴业科技有限公司
电子天平	JF502	上海浦春计量仪器有限公司
生化培养箱	SHP-250	上海精宏实验设备有限公司
脱色摇床	TS-2	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
高速冷冻离心机	5417R	艾本德中国有限公司
数显恒温水浴锅	HH-2	金坛市鸿科仪器厂
磁分离架	MP-SP-1	郑州英诺生物科技有限公司
高功率数控超声波清洗器	KQ-400KDE	昆山市超声仪器有限公司
梯度 PCR 仪	C1000*	联想生物技术有限公司
PCR 仪	T100™	联想生物技术有限公司
电泳仪/电泳槽	DYY-8C	北京市六一仪器厂
凝胶成像系统	Gel Doc XR+	美国伯乐 BIO-RAD 公司

1.3 实验菌株

单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L.monocytogenes*) (CVCC-1598)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*) (ATCC 6538)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*, *S.enteritidis*) (ATCC 13076), 菌株来源同第三章。蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, *B.cereus*) (CMCC(B) 63303)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*, *S.flexneri*) (CMCC(B) 51572)、粪链球菌 (*streptococcus faecalis*, *S.faecalis*) (ATCC 29212) 均由中国食品药品检定研究院提供。

1.4 引物

三种食源性致病菌的引物序列及目的片段大小等如表 4.1 所示。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 4.1 多重 PCR 引物序列
Table 4.1 Primer for multiplex PCR

细菌名称	靶基因	引物序列 (5'-3')	产物大小 (bp)	参考文献
<i>S. enteritidis</i>	<i>invA</i>	F:TCCCTTTGCGAATAACATCC R:ATTACTTGTGCCGAAGAGCC	786	Tang et al (2006)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i>	F:CAAGTCCTAAGACGCCAATC R:ATAAAGTGTAGTGCCCCAGA	1412	Chen et al (2012)
<i>S. aureus</i>	16S rDNA	F:GTGCACATCTTGACGGTACC R:CGAAGGGGAAGGCTCTATC	565	Chen et al (2012)

1.5 方法

1.5.1 模板 DNA 的制备

对于未经 AF-MNPs 捕获的细菌 DNA 的提取，参考 Tang 等人（2006）以及 Fratamico 和 Strobaugh（1998）的提取方法。而经 AF-MNPs 捕获的细菌，采用煮沸法提取 DNA。将 MNPs-细菌沉淀物溶于 200 μ L 无菌 PBS 中形成悬浮液，在 85 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min，以从 AF-MNPs 上分离细菌，将上清液转移到新的离心管中。将上清液于 100 $^{\circ}$ C 水浴煮沸 10 min，冰水浴 10 min，12000 r/min 离心 5 min 后，去上清液作为 PCR 模板。

1.5.2 PCR 反应体系及扩增程序

采用 25 μ L 体系反应体系，具体为：12.5 μ L 2 \times Utaq PCR Mix，9.5 μ L ddH₂O 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L，1 μ L DNA 模板，9.5 μ L ddH₂O。扩增程序为：PCR 扩增条件：预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min，每个循环条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，62 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，24 个循环，产物末端 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，用 GoldView 染色，并在凝胶成像系统下观察。

1.5.3 引物特异性验证

按照 4.2.1 纯菌液中细菌 DNA 的提取方法，分别提取 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*S.enteritidis*、*E.coli*、*B.cereus*、*S.flexneri* 及 *S.faecalis* 的基因组 DNA，分别加入本次研究的三种细菌对应的特异性引物，按照 4.2.2 中的扩增体系和扩增程序进行 PCR 扩增，以检测引物的特异性。

将三种食源性致病菌的 DNA 随机组合进行添加，组合方式分别为：*L.monocytogenes*、*S.aureus*、*S.enteritidis*；*L.monocytogenes*、*S.enteritidis*；*L.monocytogenes*、*S.aureus*；*S.aureus*、*S.enteritidis*；*L.monocytogenes*；*S.enteritidis*；*S.aureus*，进行多重 PCR，以检测多重 PCR 体系的特异性。

1.5.4 灵敏度验证

提取经过夜培养的 *S.aureus*、*L.monocytogenes*、*S.enteritidis* 各 1 mL 菌液中的 DNA，分别测定其核酸浓度。对其进行 10 倍梯度稀释，以各稀释度的 DNA 分别作为 DNA 模板，按照 4.2.2 中的扩增体系和扩增程序分别进行 PCR 扩增，分析 PCR 的灵敏度。

1.5.5 多重 PCR 反应体系优化

对引物、dNTP、Taq 酶、 Mg^{2+} 4 个因素设计 4 个水平进行正交实验，确定各因素的适宜水平范围，优化多重 PCR 反应体系。为了达到理想的多重 PCR 扩增结果，根据 PCR 反应体系中 Taq 酶(0.25、0.5、0.75、1.0 μ L)、dNTP(1.5、2、2.5、3.0 μ L)、 Mg^{2+} (1.25、1.5、1.75、2.0 μ L)、引物(0.5、0.75、1.0、1.25 μ L) 4 个因素设计不同的 4 种水平，从而得到 16 种不同的多重 PCR 反应体系组合，从中找出最佳多重 PCR 反应体系。除了上述 4 因素外，在总体 25 μ L 反应体系中，需加入 2.5 μ L 的 10 \times Buffer，3 种细菌的模板 DNA 各加 1 μ L，用无菌 ddH₂O 补足 25 μ L 反应体系。多重 PCR 扩增条件：预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min，每个循环条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，62 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，24 个循环，产物末端 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。选用 L₁₆(4⁴) 正交设计表（见表 4.2）进行实验。

表 4.2 $L_{16}(4^4)$ 实验方案Table 4.2. The project of $L_{16}(4^4)$ experiment

编号	引物 (μL) (10 $\mu\text{mol/L}$ each)	Mg^{2+} (25 mmol/L)	Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL)	dNTP (1.25 $\mu\text{mol/L}$ each)
1	0.5	1.25	0.25	1.5
2	0.75	1.5	0.25	2
3	1	1.75	0.25	2.5
4	1.25	2.0	0.25	3
5	0.75	1.25	0.5	2.5
6	0.5	1.5	0.5	3
7	1.25	1.75	0.5	1.5
8	1	2.0	0.5	2
9	1	1.25	0.75	3
10	1.25	1.5	0.75	2.5
11	0.5	1.75	0.75	2
12	0.75	2.0	0.75	1.5
13	1.25	1.25	1.0	2
14	1	1.5	1.0	1.5
15	0.75	1.75	1.0	3
16	0.5	2.0	1.0	2.5

注：添加量单位为 μL

在实验确定了最佳反应体系的基础上，对多重 PCR 退火温度进行优化，温度分别设为 52°C 、 53.8°C 、 56.1°C 、 58°C 、 59.5°C 、 61.9°C 、 64.2°C 、 66.0°C 、 67.7°C ，确定最佳退火温度。

1.5.6 人工污染牛奶的检测

经国标验证不含本实验研究的三种食源性致病菌的纯牛奶 25 mL，加入 225 mL 无菌 PBS 缓冲液中充分混匀，得到处理后的牛奶混合液。将 *L. monocytogenes*、*S. aureus* 和 *S. enteritidis* 菌液分别梯度稀释至 2×10^9 CFU/mL-20 CFU/mL，分别将 1 mL 三种细菌各浓度菌液加入到 9 mL 处理后的牛奶混合液中，使混合菌液终浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL，形成人工污染的牛奶样品。取 200 μL (1 mg/mL) AF-MNPs 于 1.5 mL 离心管中，磁分离去除上清，每个浓度各加 1 mL 上述菌液，于 37°C 220 r/min 条件下温育 60 min，磁分离 MNPs-细菌结合

物，去除上清，将 AF- MNPs 细菌沉淀物溶解于 1 mL 无菌 PBS 中，加入到 9 mL 无菌 SSL 肉汤培养基（能够同时富集 *L. monocytogenes*、*S.aureus* 和 *S.enteritidis* 的复合增菌肉汤）中培养，37°C 160 r/min 条件下培养 8 h。分别提取基因组 DNA，进行 PCR 扩增。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，用 GoldView 染色，并在凝胶成像系统下观察。以未经 AF- MNPs 富集的人工污染牛奶样品直接进行 PCR 作为对照。

将三种菌等浓度混合加入到处理后的牛奶混合液中，使混合菌液终浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL，形成人工污染的牛奶样品。取 500 μ L（1 mg/mL）AF- MNPs 于 1.5 mL 离心管中，磁分离去除上清，每个浓度各加 1 mL 上述菌液，于 37°C 220 r/min 条件下温育 60 min，磁分离 MNPs-细菌结合物，去除上清，将 AF- MNPs 细菌沉淀物溶解于 1 mL 无菌 PBS 中，加入到 9 mL 无菌 SSL 肉汤培养基中培养，37°C 160 r/min 条件下培养 8 h。分别提取基因组 DNA，按最优多重 PCR 体系进行扩增。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，用 GoldView 染色，并在凝胶成像系统下观察。以未经 AF- MNPs 富集的人工污染牛奶样品直接进行多重 PCR 作为对照。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性

为验证选取的三对引物 *invA*、*hly* 及 16S rDNA 的特异性，本实验选取了三种目标菌和其它四种非目标菌进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳，结果如图 4.1 所示。由图 4.1 可看出，对应的菌株扩增结果均出现目的条带，其余菌株的扩增结果均呈阴性，且无非特异性条带，这表明该实验选取的三对引物特异性较好。

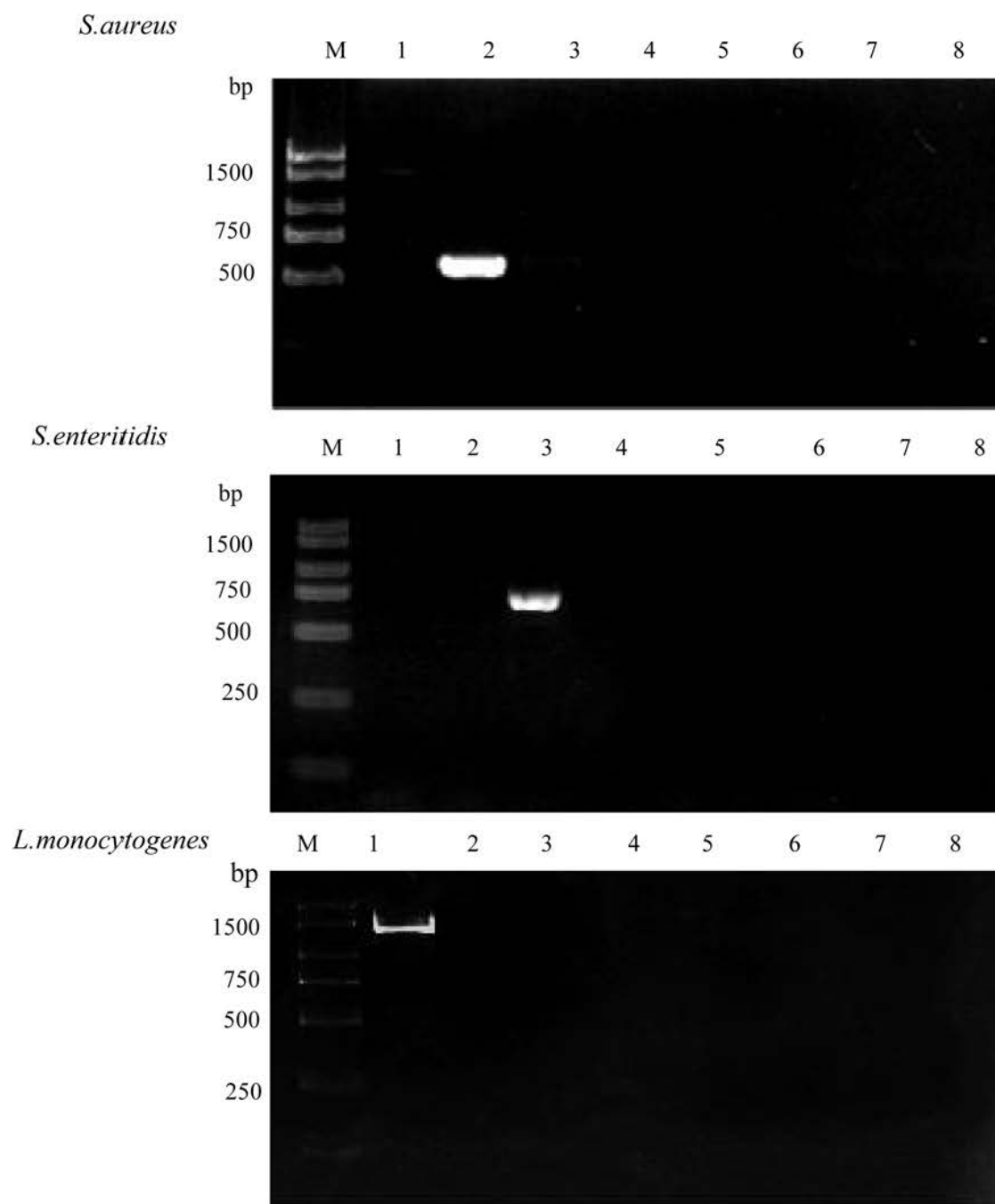


图 4.1 PCR 引物特异性验证

Fig. 4.1 Results of PCR amplification for primer specificity

注：M 为 DNA marker DL2000，泳道 1-8 分别为 *L.monocytogenes*、*S.aureus*、*S.enteritidis*、*E.coli*、*S.faecalis*、*S.flexneri*、*B.cereus* 及阴性对照。

将三种食源性致病菌的基因组 DNA 组合后进行多重 PCR 扩增，组合方式如图 4.2 所示。根据图 4.2 可看出，三种 DNA 组合后无交叉影响，均能够得到目的片段，且条带清晰无非特异性条带出现。结果表明本实验选用的三对引物可用于多重 PCR 的扩增。

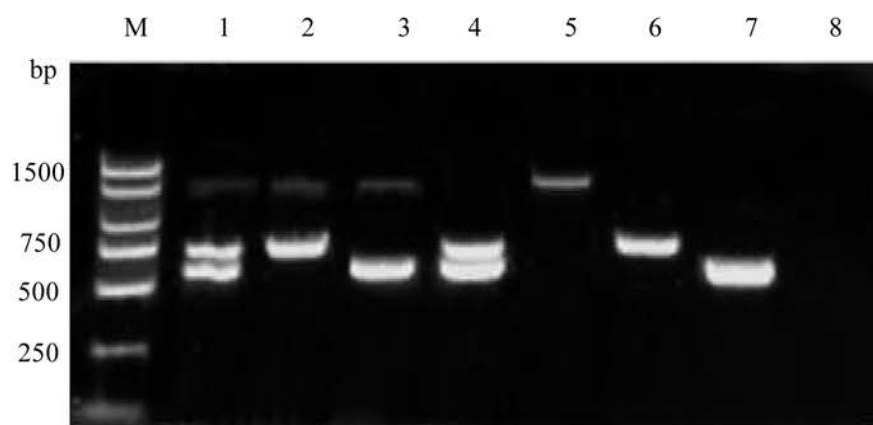


图 4.2 引物特异性的多重 PCR 扩增结果

Fig. 4.2 Results of multiplex PCR amplification for primer specificity

注：M 为 DNA marker DL2000；1: *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. enteritidis*；2: *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*；3: *L. monocytogenes* and *S. aureus*；4: *S. aureus* and *S. enteritidis*；5: *L. monocytogenes*；6: *S. enteritidis*；7: *S. aureus* c；8: 阴性对照

2.2 PCR 反应体系的灵敏度

以 Nano 核酸测定仪测定的 *S. aureus*、*L. monocytogenes*、*S. enteritidis* DNA 浓度分别为 51.25 ng/ μ L、78.55 ng/ μ L、81.65 ng/ μ L。分别以各稀释度的 DNA 作为模板，进行 PCR 扩增，扩增结果如图 4.3 所示。

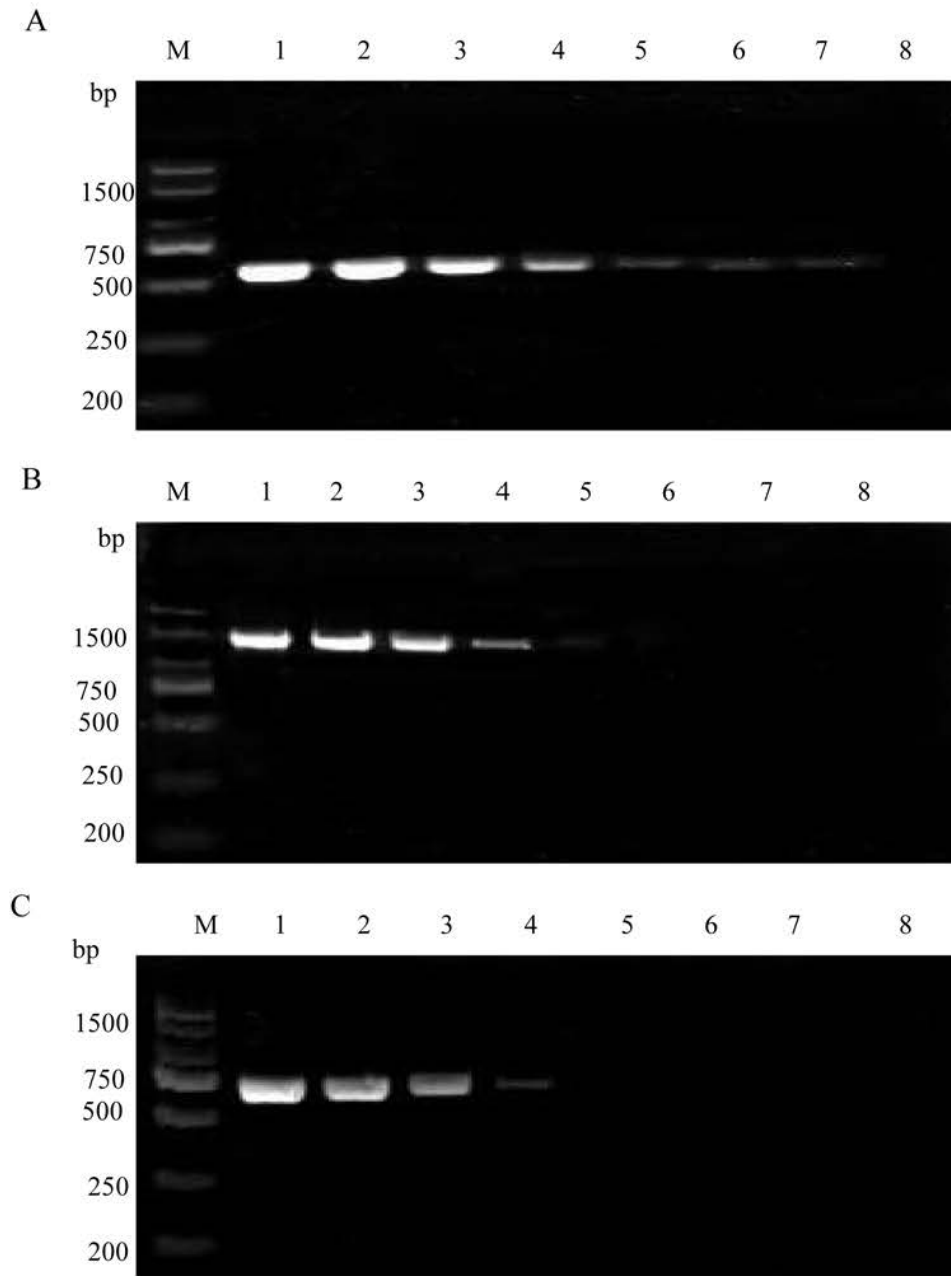


图 4.3 PCR 反应体系的灵敏度

Fig. 4.3 Sensitivity of PCR reaction system

注：M 为 DNA marker DL2000，A 中泳道 1-8 表示为 *S.aureus* DNA 浓度分别为 51.25 ng/μL、5.125 ng/μL、 5.125×10^{-1} ng/μL、 5.125×10^{-2} ng/μL、 5.125×10^{-3} ng/μL、 5.125×10^{-4} ng/μL、 5.125×10^{-5} ng/μL 以及阴性对照；B 中泳道 1-8 表示为 *L.monocytogenes* DNA 浓度分别为 78.55 ng/μL、7.855 ng/μL、 7.855×10^{-1} ng/μL、 7.855×10^{-2} ng/μL、 7.855×10^{-3} ng/μL、 7.855×10^{-4} ng/μL、7.855 ng/μL 以及阴性对照；C 中泳道 1-8 表示为 *S.enteritidis* DNA 浓度分别为 81.65 ng/μL、8.165 ng/μL、 8.165×10^{-1} ng/μL、 8.165×10^{-2} ng/μL、 8.165×10^{-3} ng/μL、 8.165×10^{-4} ng/μL、 8.165×10^{-5} ng/μL 以及阴性对照。

从图 4.3 可以看出, PCR 反应体系中 *S.aureus* 的 DNA 灵敏度为 5.125×10^{-5} ng/ μ L, *L.monocytogenes* 的 DNA 灵敏度为 7.855×10^{-3} ng/ μ L, *S.enteritidis* 的 DNA 灵敏度为 8.165×10^{-2} ng/ μ L。

2.3 多重 PCR 体系优化

按照表 4.2 正交试验设计表的组合方式, 对多重 PCR 体系中引物、dNTP、Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 4 个因素设计 4 个水平进行正交实验, 编号为 1-16。扩增结果如图 4.4 所示。

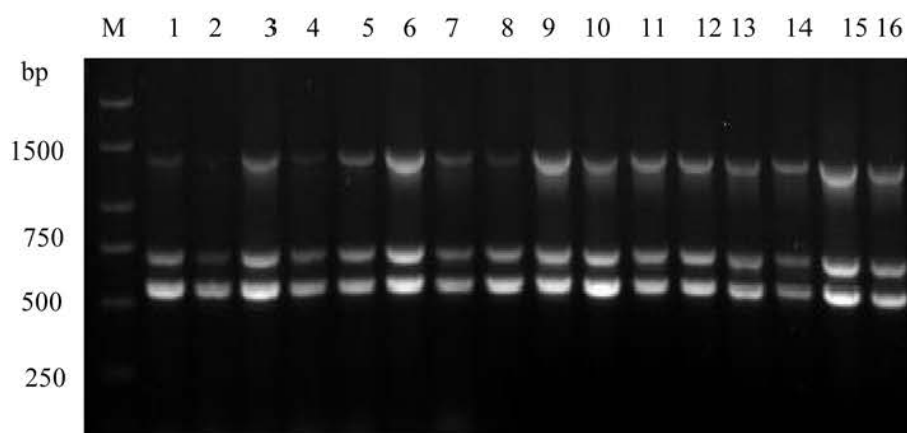


图 4.4 多重 PCR 体系正交优化实验结果

Fig. 4.4 Optimization of multiplex PCR by orthogonal experiment design

注: M 为 DNA marker DL2000, 1-16 同表 2.2 编号。

从图 4.4 可看出, 在这 16 组扩增体系中, 由于引物、dNTP、Taq 酶和 Mg^{2+} 四个因素不同添加量的组合方式, 导致扩增结果出现了差异, 其中, 泳道 6、泳道 9 和泳道 15 的效果均最好, 在后续实验中, 选择泳道 6 中添加量的组合方式作为多重 PCR 反应体系。因此, 25 μ L 的多重 PCR 反应体系确定为: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L each)各 0.5 μ L, dNTP (1.25 μ mol/L each) 3 μ L, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.5 μ L, DNA 模板各 1 μ L, 添加无菌 dd H₂O 至反应体系为 25 μ L。

2.4 退火温度优化

在确定的最佳多重 PCR 体系的基础上, 对退火温度进行优化, 扩增结果如图 4.5 所示。

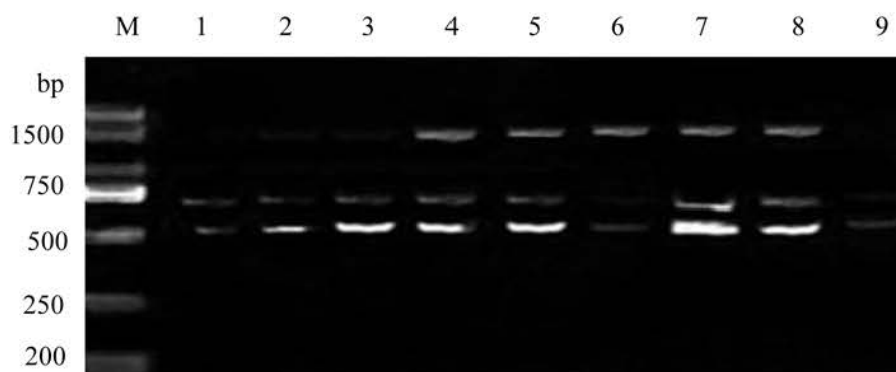


图 4.5 退火温度的选择

Fig. 4.5 Optimization of annealing temperature

注: M 为 DNA marker DL2000, 泳道 1-9 分别表示为退火温度为 52°C、53.8°C、56.1°C、58°C、59.5°C、61.9°C、64.2°C、66.0°C、67.7°C。

选择 52-68°C 温度梯度进行 PCR 扩增, 每种温度条件下扩增都能得到目的条带, 其中第 7 泳道的条带最亮, 因此选择 64.2°C 作为最佳退火温度, 用于后续实验。

2.5 检测三种食源性致病菌人工污染的牛奶样品

分别对由三种食源性致病菌人工污染浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL 的牛奶样品 8 h 增菌后直接 PCR 法对其进行检测, 结果如图 4.6 所示, 同时以 AF-MNPs 富集结合 PCR 检测, 结果如图 4.7 所示。

图 4.6 (A)、(B)、(C) 分别表示 *S.aureus*、*S.enteritidis*、*L.monocytogenes* 污染浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL 的牛奶样品增菌 8 h 后进行直接 PCR 扩增后的结果。由图 4.6 可知, 增菌 8 h 后, 未经 AF-MNPs 富集直接 PCR 检测, *S.aureus* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL, *S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^3 CFU/mL, *L.monocytogenes* 的灵敏度为 2×10^3 CFU/mL。

图 4.7 (A)、(B)、(C) 分别表示 *S.aureus*、*S.enteritidis*、*L.monocytogenes* 污染浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL 的牛奶样品进行 AF-MNPs 富集增菌后结合 PCR 扩增后的结果。

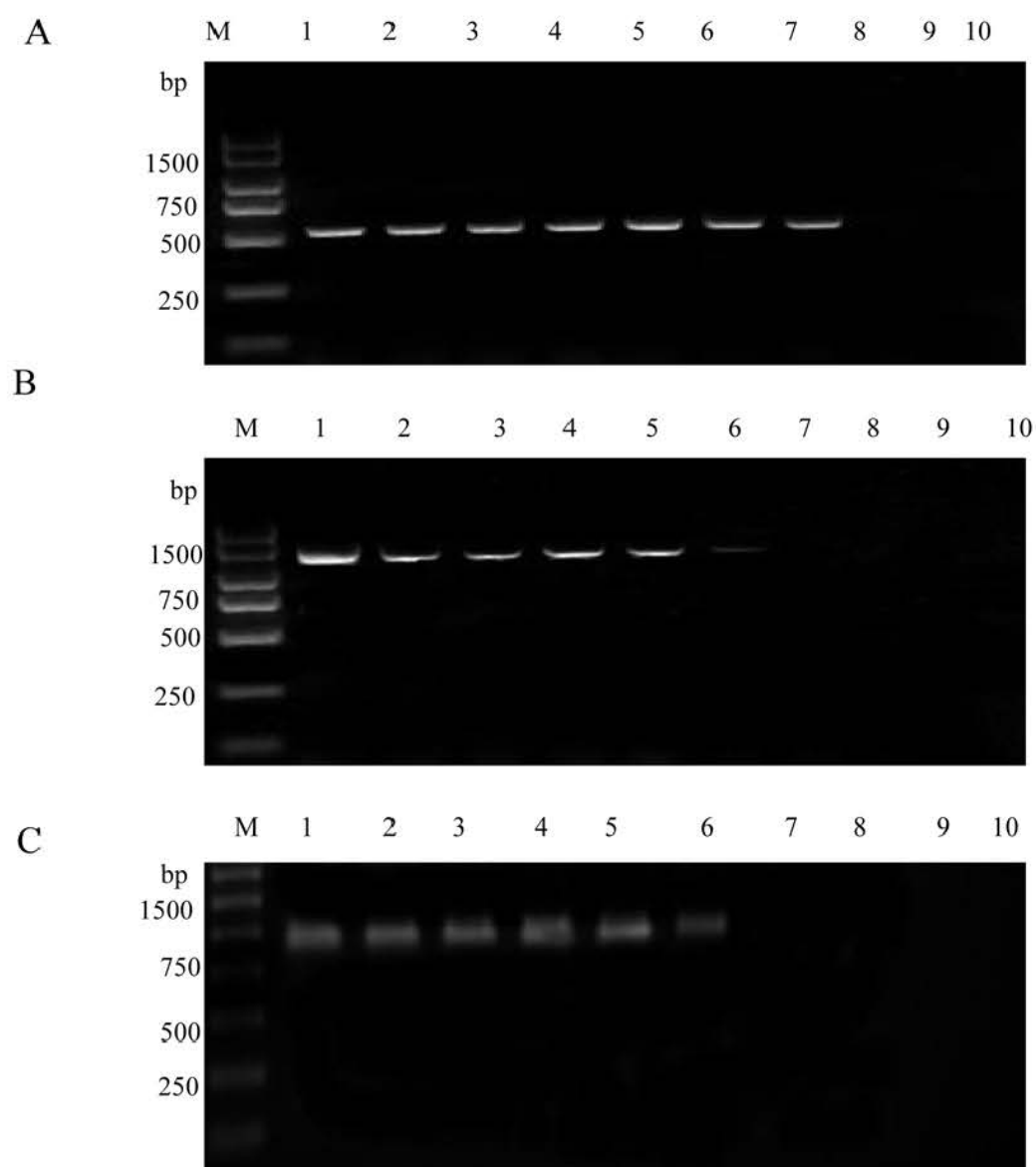


图 4.6 PCR 检测牛奶样品三种食源性致病菌扩增结果

Fig. 4.6 Results PCR for three food-borne pathogens respectively in milk

注：M 为 DNA marker DL2000，图 A、B、C 分别表示由 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 以及 *S.enteritidis* 污染的牛奶样品扩增结果；泳道 1-9 分别表示牛奶样品中细菌污染的浓度依次为 2×10^8 CFU/mL-2 CFU/mL，泳道 10 为阴性对照。

由图 4.7 可知，AF-MNPs 富集并增菌后的人工污染牛奶样品，经 PCR 检测，*S.aureus* 的灵敏度为 2 CFU/mL，*S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL，*L.monocytogenes* 的灵敏度为 2 CFU/mL。

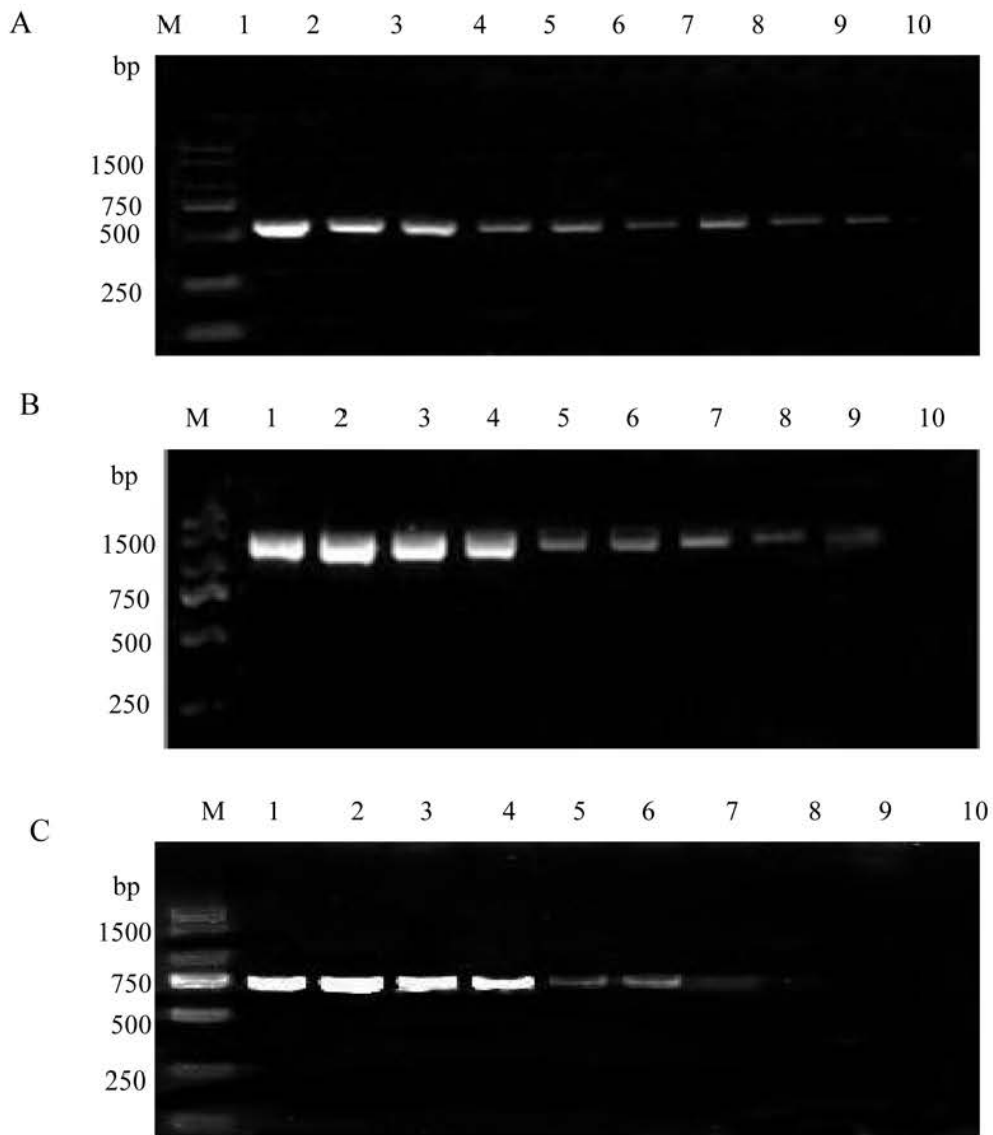


图 4.7 AF-MNPs 富集结合 PCR 检测牛奶样品扩增结果

Fig. 4.7 Results of AF-MNPs enrichment combined with PCR in milk

注：M 为 DNA marker DL2000，图 A、B、C 分别表示由 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 以及 *S.enteritidis* 污染的牛奶样品扩增结果；泳道 1-9 分别表示牛奶样品中细菌污染的浓度依次为 2×10^8 CFU/mL-2 CFU/mL，泳道 10 为阴性对照。

将三种食源性致病菌进行等浓度混合并污染牛奶样品，污染的菌浓度依次为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL。图 4.8 (A)、(B) 分别为污染浓度为 2 CFU/mL- 2×10^8 CFU/mL 的牛奶样品增菌 8 h 后进行直接多重 PCR、AF-MNPs 富集并增菌 8 h 后结合多重 PCR 扩增后的结果。

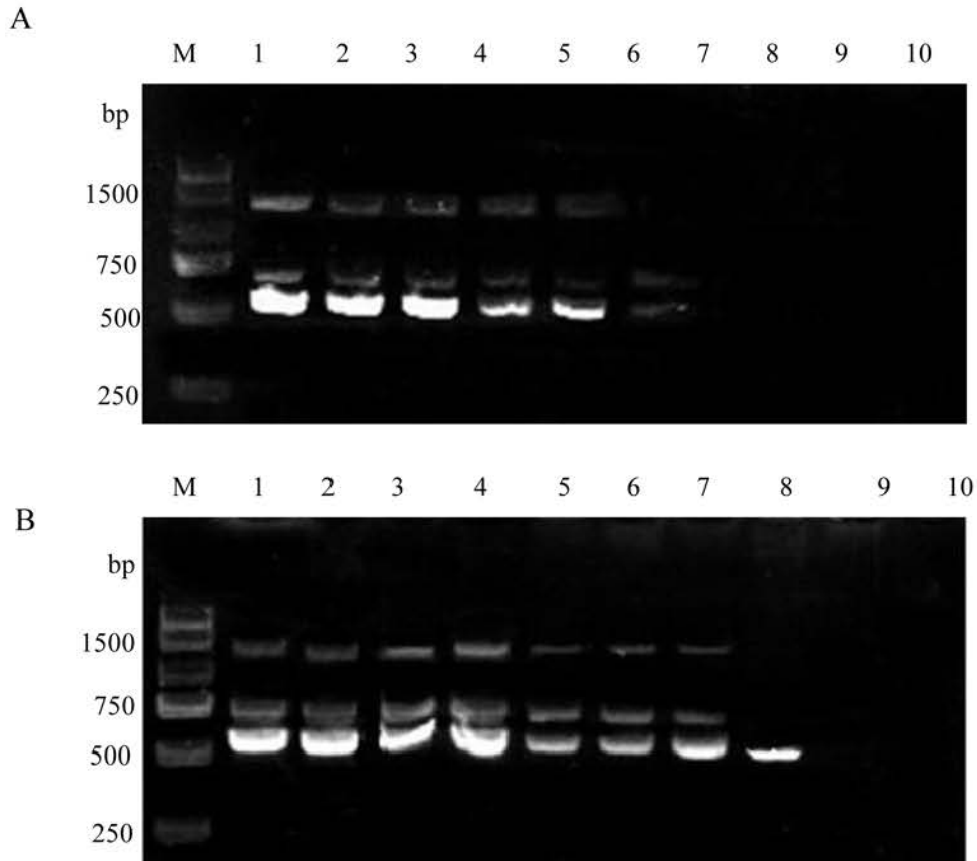


图 4.8 多重 PCR 与 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测牛奶样品扩增结果

Fig. 4.8 Results of multiple PCR (A) and AF-MNPs enrichment combined with multiple PCR (B) in milk

注：M 为 DNA marker DL2000，图 A 中泳道 1-9 表示牛奶样品中三种食源性致病菌等浓度混合污染的浓度依次为 2 CFU/mL - $2 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ，泳道 10 为阴性对照；图 B 中泳道 1-9 表示经 AF-MNPs 富集的牛奶样品中三种食源性致病菌等浓度混合污染的浓度依次为 $2 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ - 2 CFU/mL ，泳道 10 为阴性对照。

由图 4.8 (A) 可知，未经 AF-MNPs 富集直接多重 PCR 检测法中，对 *S.aureus* 和 *S.enteritidis* 的灵敏度均为 $2 \times 10^3 \text{ CFU/mL}$ ，对 *L.monocytogenes* 的灵敏度为 $2 \times 10^4 \text{ CFU/mL}$ ，而由图 4.8 (B) 可知，经 AF-MNPs 富集并增菌 8 h 后再进行多重 PCR 扩增后对 *S.aureus* 的灵敏度为 20 CFU/mL ，对 *L.monocytogenes* 的灵敏度为 $2 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$ ，对 *S.enteritidis* 的灵敏度为 $2 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$ 。与未经 AF-MNPs 富集直接进行多重 PCR 法相比，用 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 法对牛奶样品中同时检测的三种食源性致病菌，*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *L.monocytogenes* 的灵敏度提高 100 倍或 1000 倍，因此，AF-MNPs 富集结合多重 PCR 法可有效提高多重 PCR 检测的灵敏度。

3 小结与讨论

3.1 讨论

到目前为止,因检测方法的快速、高效、低成本等优点,多重 PCR 被广泛应用于食源性致病菌的检测中,然而,众多报道表明,脂肪、蛋白质、多糖等物质对 PCR 检测的灵敏度有干扰 (Kim et al 2010, Hu et al 2014),因样品前处理复杂、检测结果受样品基质成分影响等缺点,无法真正实现对食源性致病菌的快速检测,而 MNPs 由于其制备过程简单、易于操控、具有超顺磁性和良好的生物性能等特性,用于分离、捕获和富集细菌可以有效地解决检测方法的局限性。Luo 等人 (2017) 通过两步法在 10 mL 巴氏杀菌牛奶体系中磁分离浓缩 *L.monocytogenes*, 生物素化的抗 *L.monocytogenes* 抗体通过抗原抗体相互作用与 10 mL 巴氏杀菌牛奶体系中的 *L.monocytogenes* 结合,然后利用链霉亲和素标记的磁性微球,通过生物素与亲和素相互作用,捕获上述复合物,结合 PCR 检测方法,检出限为 80 CFU/mL。Chen 等人 (2017) 用免疫磁珠分离、捕获婴幼儿奶粉中的阪崎肠杆菌,然后用 PCR 进行检测,在未经过增菌步骤灵敏度可以达到 5.2×10^2 CFU/mL。Meng 等人 (2017) 用万古霉素修饰的磁珠捕获生菜中的 *L.monocytogenes*, 然后结合 PCR 进行检测,检出限可以达到 30 CFU/g。本章中,经 AF-MNPs 富集并增菌 8 h 后结合 PCR 检测分别由金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和肠炎沙门氏菌污染的牛奶样品,其污染浓度低至 2 CFU/mL、2 CFU/mL 和 2×10^2 CFU/mL 的牛奶样品均可被检测到。结合图 4.6、图 4.7 和图 4.8 可知,AF-MNPs 富集结合 PCR/多重 PCR 法可有效提高 PCR/多重 PCR 检测的灵敏度。与三种食源性致病菌分别人工污染的牛奶样品经 AF-MNPs 富集后再进行 PCR 相比,在 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 反应体系中,同时检测三种致病菌的混合模板的灵敏度会有所降低,造成这一结果的原因主要是多重 PCR 的影响因素比较复杂,在同一个 PCR 反应体系中存在的物质比较多,在多重 PCR 扩增时容易出现相比 PCR 较多的干扰导致检测灵敏度的降低。

3.2 小结

本章通过 AF-MNPs 对人工污染牛奶样品中的 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 和 *S.enteritidis* 进行富集，并利用特异性引物 16S rDNA、hly 和 invA 进行多重 PCR 同时检测人工污染牛奶样品中的三种食源性致病菌。

三种细菌分别污染牛奶样品，PCR 检测结果显示，增菌 8 h 后，未经 AF-MNPs 富集直接进行 PCR 检测人工污染牛奶样品，其中 *S.aureus* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL，*L.monocytogenes* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL，*S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^3 CFU/mL，而经 AF-MNPs 富集并增菌 8 h 进行 PCR 检测后，*S.aureus* 的灵敏度为 2 CFU/mL，*S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL，*L.monocytogenes* 的灵敏度为 2 CFU/mL。

将三种食源性致病菌进行等浓度混合并污染牛奶样品，未经 AF-MNPs 富集直接多重 PCR 检测法中，对 *S.aureus* 和 *S.enteritidis* 的灵敏度均为 2×10^3 CFU/mL，对 *L.monocytogenes* 的灵敏度为 2×10^4 CFU/mL，经 AF-MNPs 富集并增菌 8 h 后再进行多重 PCR 扩增后对 *S.aureus* 的灵敏度为 20 CFU/mL，对 *L.monocytogenes* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL，对 *S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL。与未经 AF-MNPs 富集直接进行多重 PCR 法相比，用 AF-MNPs 富集并增菌 8 h 后结合多重 PCR 法对牛奶样品中同时检测的三种食源性致病菌，*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *L.monocytogenes* 的灵敏度提高 100 倍或 1000 倍，因此，AF-MNPs 富集结合多重 PCR 法可有效提高多重 PCR 检测的灵敏度。

第五章 总结与展望

1 总结

基于 MNPs 制备过程简单、易于操控、高比表面积、具有超顺磁性和良好的生物性能以及在外部磁场容易分离的特性，在食品分析、生物分离、细菌检测和环境治理等领域表现出巨大的潜力，本论文首先讨论了 MNPs 的合成及其表面氨基功能化，然后基于表明带正电荷的 AF-MNPs 与表面带负电荷的细菌间的静电相互作用，研究了 AF-MNPs 对细菌的捕获效率的影响因素，最后 AF-MNPs 富集细菌结合多重 PCR 检测人工污染牛奶样品中三种食源性致病菌。主要结论如下：

1) MNPs 的制备和表征。本章首先通过简单、高效的化学共沉淀法制备 Fe_3O_4 MNPs，然后在其表面涂覆 APTES，修饰上了大量氨基基团，合成 AF-MNPs。修饰前后，粒子的粒径大小均在 10 nm 左右，且都呈现球形或类球形，但两种 MNPs 在一定程度上有团聚现象，通过测定分散系数，修饰后的 MNPs AF-MNP 分散性良好；傅里叶红外光谱和 Zeta 电位结果表明，APTES 成功包覆 Fe_3O_4 MNPs，表面携带正电荷；修饰后的 AF-MNPs 在更宽的 pH 范围内表面带有正电荷，为下一步对食源性致病菌的富集提供了基础。

2) AF-MNPs 与细菌间的相互作用。本章基于表面带正电荷的 AF-MNPs 与表面带负电荷的细菌间的静电相互作用，初步探讨了 AF-MNPs 捕获细菌的工作条件。AF-MNPs 对不同种类细菌的捕获效率跟革兰氏阳性或革兰氏阴性无直接关系，MNPs 在捕获细菌的过程中涉及到许多复杂的因素，虽然静电力是主导 MNPs 高效捕获细菌的主要驱动力，但 MNPs 也很容易通过氢键或疏水相互作用附着在细菌表面。虽然 AF-MNPs 对于细菌的捕获效率依赖于 AF-MNPs 的用量、捕获时间、PBS pH、PBS 浓度、细菌浓度等因素，但仍然能够高效捕获富集多种细菌，并能够和其它技术联用进行进一步的检测分析，提高检测方法的灵敏度和准确度。为了探究 AF-MNPs 对细菌在食品样品中的捕获效率，以 4 种食源性致病菌 *L.monocytogenes*、*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *E.coli* 为研究对象，人工污染经国标检测不含这 4 种致病菌的纯牛奶和鲜切西瓜，相比与对 PBS 体系中细菌的捕获，AF-MNPs 对人工污染牛奶和西瓜样品中细菌的捕获，效率均有明显的降低。而西

瓜样品相较于牛奶样品来说，食品基质成分较简单，对应的捕获率也相应提高。而对于食品样品的捕获效果，本章随机选取了 8 种咸菜样品和 6 种卤肉样品，AF-MNPs 对这 8 种咸菜样品的捕获率均高于 75%，对 6 种卤肉样品的捕获率均高于 65%，捕获效果较好。

3) AF-MNPs 富集细菌结合多重 PCR 检测三种食源性致病菌。通过 AF-MNPs 对人工污染牛奶样品中的 *S.aureus*、*L.monocytogenes* 和 *S.enteritidis* 进行富集，并利用特异性引物 16S rDNA、hly 和 invA 进行多重 PCR 同时检测人工污染牛奶样品中的三种食源性致病菌。PCR 检测结果显示，未经 AF-MNPs 富集直接进行多重 PCR 检测时，增菌 8 h 的人工污染牛奶样品中 *S.aureus* 的灵敏度为 2×10^3 CFU/mL，*S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^3 CFU/mL，*L.monocytogenes* 的灵敏度为 2×10^4 CFU/mL。而经 AF-MNPs 富集结合多重 PCR 检测，*S.aureus* 的灵敏度为 20 CFU/mL，*S.enteritidis* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL，*L.monocytogenes* 的灵敏度为 2×10^2 CFU/mL。将三种食源性致病菌进行等浓度混合并污染牛奶样品，与未经 AF-MNPs 富集直接增菌 8 h 后进行多重 PCR 法相比，用 AF-MNPs 富集并增菌 8 h 后结合多重 PCR 法对牛奶样品中同时检测的三种食源性致病菌，*S.aureus*、*S.enteritidis* 和 *L.monocytogenes* 的灵敏度分别提高 100 倍或 1000 倍，因此，AF-MNPs 富集结合多重 PCR 法可有效提高多重 PCR 检测的灵敏度。

2 展望

本论文成功制备 AF-MNPs，用 AF-MNPs 富集致病菌并应用于多重 PCR 检测中，但实验中仍然有一些不足之处，可以从以下几个方面进行改进：

1) 本研究基于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁结构的不同可能会影响 AF-MNPs 与细菌间的相互作用，对 AF-MNPs 分别与革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的吸附捕获作用的影响因素进行了初步探讨，但是对于细胞壁带负电荷的结构成分，如脂多糖、蛋白质和肽聚糖对于 AF-MNPs 与细菌间的相互作用是否有重要影响还未进行实验性的探究，因此可以通过用乙醇（溶解细菌表面脂膜）、胰蛋白酶（消化细菌表面蛋白）分别处理细菌表面，继续展开研究，深入探讨细菌细胞壁结构不同对于 MNPs 和细菌间静电相互作用的影响。

2) 本研究在 AF-MNPs 富集细菌结合多重 PCR 检测人工污染牛奶样品中的致病菌时, 没有考虑到杂菌的影响, 尤其是高浓度杂菌对方法的干扰作用, 如果杂菌浓度过高形成竞争, 低浓度的目标菌很可能漏检。在多重 PCR 检测时, 应该同时加入高浓度的杂菌, 探讨在高浓度杂菌下, 该检测方法的高效灵敏性。

3) 本研究探讨了 AF-MNPs 在食品中捕获细菌的效率, 由于食品基质非常复杂, 对磁性纳米粒子在相应的食品液体中的分散行为与食品基质的干扰作用研究还不够, 可对其进行进一步的研究探索。

4) 本研究基于 AF-MNPs 捕获富集细菌结合多重 PCR 检测技术仅对人工污染的牛奶样品进行了检测, 仍需对多种且多量的食品样品进行检测, 以验证捕获和检测的适用性及准确性。

参考文献

1. 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. 食品与机械, 2017, 33 (12): 191-196
2. 陈保利. 磁性纳米粒子的功能化及与细菌的相互作用的研究. [硕士学位论文]. 武汉: 武汉理工大学图书馆, 2017
3. 陈红云, 杨方红, 李宇鹏, 何佳玉, 车梦琴, 王美晨, 程传杰. 水溶性 Fe_3O_4 磁性纳米催化剂的合成及应用. 应用化学, 2019, 2: 188-194
4. 郝凌云, 张宏. 磁性纳米粒子的合成及应用研究进展. 金陵科技学院学报, 2011, 27 (2): 11-22
5. 黄小林, 许恒毅, 熊勇华, 曲锋, 杨林. 磁性纳米材料在食源性致病菌分离中应用的研究进展. 食品科学, 2014, 35 (11): 280-285
6. 江辉, 王荣忠, 黄丹莲, 曾光明, 许飘, 赖翠, 晏铭, 陈国敏, 徐娟娟. 半胱氨酸改性 Fe_3O_4 纳米材料对 $\text{Pb}(\text{II})$ 的吸附研究. 环境污染与防治, 2019, 41 (2): 191-195
7. 姜源, 赵震昊, 赵敏. 关于磁性纳米粒子在生物医学中的应用. 生物化工, 2018, 4 (5): 112-114
8. 吕菊波, 张亚会, 孟凡斌, 刘刚, 徐慧. 基于 DNA 双链取代策略免标记检测铅离子的研究. 分析测试学报, 2018, 37 (1): 92-97
9. 姚军, 黄涛, 黄朝琴, 谢昊君, 刘均荣, 张建光. 磁场-渗流场耦合作用下的铁磁流体多孔介质流动数值模拟. 科学通报, 2017, 62 (8): 836-846
10. 吴潜. 磁性纳米材料研究进展及展望. 化学工业, 2017, 35 (6): 19-22
11. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*, 2012, 7 (1): 144
12. Aruguete DM, Hochella MF. Bacteria-nanoparticle interactions and their environmental implications. *Environ Chem*, 2010, 7: 3-9
13. Azam A, Ahmed O, Khan H, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomed*, 2012, 6003-6009
14. Bao S, Tang L, Li K, Ning P, Peng J, Guo H, Zhu TT, Liu Y. Highly selective removal of $\text{Zn}(\text{II})$ ion from hot-dip galvanizing pickling $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$ magnetic nanoadsorbent. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 462: 235-242

15. Barrow M, Taylor A, Murray P, Rosseinsky MJ, Adams DJ. Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI. *Chem Soc Rev*, 2015, 44 (19): 6733-6748
16. Bej A. Detection of Salmonella spp. in Oysters by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60 (1): 368-373
17. Bej AK, Mahbubani MH. Applications of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. *PCR Methods Appl*, 1992, 1 (3): 151-159
18. Beveridge TJ. Mechanism of gram variability in select bacteria. *J Bacteriology*, 1990, 172 (3):1609-1620
19. Blank F, Fytianos K, Seydoux E, Rodriguez-Lorenzo L, Petri-Fink A, Garnier C, Rothen-Rutishauser B. Interaction of biomedical nanoparticles with the pulmonary immune system. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15 (1): 6
20. Braga PAC, Tata A, Goncalves dos Santos V, Barreiro JR, Schwab NV, Veiga dos Santos M, Eberlin MN, Ferreira CR. Bacterial identification: from the Agar Plate to the Mass Spectrometer. *RSC Adv*, 2013, 3: 994-1008
21. Brosel-Oliu S, Abramova N, Bratov A, Vigués N, Mas J, Muñoz FX. Sensitivity and response time of polyethyleneimine modified impedimetric transducer for bacteria detection. *Electroanalysis*, 2015, 27 (3): 656–662
22. Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 2017, 75: 1
23. Buzoglu L, Maltas E, Ozmen M, Yildiz S. Interaction of donepezil with human serum albumin on amine-modified magnetic nanoparticles. *Colloid Surface A*, 2014, 442:139-145
24. Calatayud MP, Sanz B, Raffa V, Riggio C, Ibarra MR, Goya GF. The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. *Biomater*, 2014, 35 (24): 6389-6399
25. Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Mater*, 2012, 5 (12): 2850-2871
26. Chen J, Duncan B, Wang Z, Wang LS, Rotello VM, Nugen SR. Bacteriophage-based nanoprobes for rapid bacteria separation. *Nanoscale*, 2015, 7: 16230-16236

27. Chen J, Tang J, Liu J, Cai Z, Bai X. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *J Appl Microbiol*, 2012, 112 (4): 823-830
28. Chen LY, Zhang J. Bioconjugated magnetic nanoparticles for rapid capture of gram-positive bacteria. *J Biosens Bioelectron*, 2012, 9 (12): 1951-1961
29. Chen Q, Li Y, Tao T, Bie X, Lu F, Lu Z. Development and application of a sensitive, rapid, and reliable immunomagnetic separation PCR detection method for *Cronobacter* spp. *J Dairy Sci*, 2017, 100 (2): 961-969
30. Cocolin L, Rantsiou K. Advances in the detection of food-borne pathogens using molecular methods. *Novel Food Preserv Microb Assess Tech*, 2016, 56 (9): 1519-1531
31. Covas G, Vaz F, Henriques G, Pinho MG, Filipe SR. Analysis of cell wall Teichoic Acids in *Staphylococcus aureus*. *Methods mol Biol*, 2016, 1440: 201-213
32. De Freitas CG, Santana AP, Silva PH, Goncalves VS, Barros Mde A, Torres FA, Murata LS, Perecmanis S. PCR multiplex for detection of *S. enteritidis*, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat. *Int J Food Microbiol*, 2010, 139: 15-22
33. Dinali R, Ebrahiminezhad A, Manley-Harris M, Ghasemi Y, Berenjian A. Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43 (4): 493-507
34. Doussineau T, Trupp S, Mohr GJ. Ratiometric pH-nanosensors based on rhodamine-doped silica nanoparticles functionalized with a naphthalimide derivative. *J Colloid Interface Sci*, 2009, 339 (1): 266-270
21. Ebrahiminezhad A, Ghasemi Y, Rasoul-Amini S, Barar J, Davaran S. Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 102: 534-539
22. Ebrahiminezhad A, Raei MJ, Manafi Z, Jahromi AS, Ghasemi Y. Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. *JAMSAT*, 2016, 2: 122-128
23. Elizaquível P, Aznar R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol*, 2008, 25 (5): 705-713
24. Erlich H, Gelfand D, Sninsky J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Sci*, 1991, 252 (5013): 1643-1651
25. Faraji M, Yamini Y, Rezaee M. Magnetic nanoparticles: Synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *J Iran Chem Soc*, 2009, 7 (1): 1-37

26. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 161-171
27. Ferreira RV, Silva-Caldeira PP, Pereira-Maia EC, Fabris JD, Cavalcante LCD, Ardisson JD, Domingues RZ. Bio-inactivation of human malignant cells through highly responsive diluted colloidal suspension of functionalized magnetic iron oxide nanoparticles. *J Nanopart Res*, 2016, 18 (4):92-107
28. Fratamico PM, Strobaugh TP. Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1998, 21 (3): 92-98
29. Gao J, Gu H, Xu B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. *Acc Chem Res*, 2009, 42 (8): 1097-1107
30. Giakisikli G, Anthemidis AN. Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. *Anal. Chim. Acta*, 2013, 789: 1-16
31. Gnanaprakash G, Mahadevan S, Jayakumar T, Kalyanasundaram P, Philip J, Raj B. Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles. *Mater Chem Phys*, 2007, 103 (1): 168-175
32. Gu H, Ho PL, Tsang KW T, Wang L, Xu B. Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture vancomycin-resistant enterococci and other gram-positive bacteria at ultralow concentration. *JACS*, 2003, 125 (51): 15702-15703
33. Gu HW, Xu KM, Xu CJ, Xu B. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem. Commun.* 2006, 9: 941-949
34. Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Adv Mater*, 2010, 22 (25): 2729-2742
35. Hermanson GT. The chemistry of reactive groups. *Bioconjugate Techn*, 2008, 37-166
36. Hassan MM, Ranzoni A, Cooper MA. A nanoparticle-based method for culture-free bacterial DNA enrichment from whole blood. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99: 150-155
37. Honda H, Kawabe A, Shinkai M, Kobayashi T. Development of chitosan-conjugated magnetite for magnetic cell separation. *J Ferment Bioeng*, 1998, 86 (2): 191-196
38. Hu Q, Lyu D, Shi X, Jiang Y, Lin Y, Li Y, Li Q. A modified molecular beacons-based multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of eight foodborne pathogens in a single reaction and its application. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11 (3): 207-214

39. Huang YF, Wang YF, Yan XP. Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens. *Environ Sci Technol*, 2010, 44 (20): 7908-7913
40. Hui C, Shen C, Tian J, Bao L, Ding H, Li C, Tian Y, Shi XZ, Gao HJ. Core-shell Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles synthesized with well-dispersed hydrophilic Fe₃O₄ seeds. *Nanoscale*, 2011, 3 (2): 701-705
41. Ismail RA, Sulaiman GM, Abdulrahman SA, Marzoog TR. Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 53: 286-297
42. Iyer SR, Xu S, Stains JP, Bennett CH, Lovering RM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in musculoskeletal biology. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23 (4): 373-385
43. Jadhav S, Bhave M, Polombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Meth*, 2012, 88 (3):327-341
44. Jin B, Wang S, Lin M, Jin Y, Zhang S, Cui X, Gong Y, Li A, Xu F, Lu TJ. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection. *Biosens Bioelectron*, 2017, 90: 525-533
45. Jin Y, Liu F, Shan C, Tong M, Hou Y. Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles. *Water Res*, 2014, 50: 124-134
46. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 123-140
47. Kaur R, Hasan A, Iqbal N, Alam S, Saini MK, Raza SK. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: a review. *J Sep Sci*, 2014, 37 (14): 1805-1825
48. Kell AJ, Stewart G, Ryan S, Peytavi R, Boissinot M, Huletsky A, Bergeron MG. Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of gram-positive and gram-negative bacteria. *ACS Nano*, 2008, 2 (9): 1777-1788
49. Kim JS, Taitt CR, Ligler FS, Anderson GP. Multiplexed magnetic microsphere immunoassays for detection of pathogens in foods. *Sens Instrumen Food Qual*, 2010, 4 (2): 73-81
50. Kolvari E, Koukabi N, Armandpour O. A simple and efficient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones via biginelli reaction catalyzed by nanomagnetic-supported sulfonic acid. *Tetrahedron*, 2014, 70 (6) : 1383-1386

51. Koukabi N, Kolvari E, Zolfigol MA, Khazaei A, Shaghasemi BS, Fasahti B. A magnetic particle-supported sulfonic acid catalyst: Tuning catalytic activity between homogeneous and heterogeneous catalysis. *Adv Synth Catal*, 2012, 354 (10): 2001-2008
52. Law JWF, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, 2015, 5: 770-788
53. Lee HJ, Park BJ, Wang KK. Photosensitizer and vancomycin-conjugated novel multifunctional magnetic particles as photoinactivation agents for selective killing of pathogenic bacteria. *Chem Commun*, 2012, 48: 4591-4593
54. Li XS, Zhu GT, Luo YB, Yuan BF, Feng YQ. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 45: 233-247
55. Liu X, Zhang L, Zeng J, Gao Y, Tang Z. Superparamagnetic nano-immunobeads toward food safety insurance. *J Nanopart Res*, 2013, 15 : 1796-1805
56. Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect Genet Evol*, 2015, 35: 172-183
57. Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53 (8): 1893-1897
58. Lu A, Kiefer A, Schmidt W, Schüth, F. Synthesis of polyacrylonitrile-based ordered mesoporous carbon with tunable pore structures. *Chem Mater*, 2004, 16 (1): 100-103
59. Luan ZH, Fournier JA, Wooten JB, Miser DE. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified mesoporous SBA-15 silica molecular sieves. *Microporous Mesoporous Mater*, 2005, 83: 150-158
60. Luo D, Huang XL, Mao Y, Chen CC, Li FL, Xu HY, Xiong HY. Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J Dairy Sci*, 2017, 100 (10): 7883-7890
61. Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P. Optimal design and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for targeted delivery and imaging. *J Phys Chem B*, 2008, 112 (46): 14470-14481
62. Manchón A, Hamdan Alkhraisat M, Rueda-Rodríguez C, Prados-Frutos JC, Torres J, Lucas-Aparicio J, Gbureck U, Ewald A, López-Cabarcos E. A new iron calcium phosphate material to improve the osteoconductive properties of a biodegradable ceramic: a study in rabbit calvaria. *Biomed Mater*, 2015, 10 (5): 14470-14481

63. Martínez-Mera I, Espinosa-Pesqueira ME, Pérez-Hernández R, Arenas-Alatorre J. Synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Mater Lett*, 2007, 61 (23-24): 4447-4451
64. Meng X, Yang G, Li F, Liang T, Lai W, Xu H. Sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with Vancomycin-conjugated magnetic beads as enrichment carriers combined with flow cytometry. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9 (25): 21464-21472
65. Mody VV, Cox A, Shah S, Singh A, Bevins W, Parihar H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Appl Nanosci*, 2013, 4 (4): 385-392
66. Mohapatra S, Pramanik N, Mukherjee S, Ghosh SK, Pramanik P. A simple synthesis of amine-derivatised superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bioapplications. *J Mater Sci*, 2007, 42 (17), 7566-7574
67. Mohammed L, Gomaa HG, Ragab D, Zhu J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 2017, 30: 1-14
68. Mook P, Patel B, Gillespie IA. Risk factors for mortality in non-pregnancy-related listeriosis. *Epidemiol Infect*, 2011, 21: 1-10
69. Mozes N, Rouxhet PG. Microbial hydrophobicity and fermentation technology. In: Doyle RJ, Rosenberg M eds., Microbial cell surface hydrophobicity. American Society for Microbiology: The University of Chicago Press, 1990, 75-105
70. Na HB, Song IC, Hyeon T. Inorganic nanoparticles for MIR contrast agents. *Adv Mater*, 2009, 21 (21): 2133-2148
71. Nabiyouni G, Julaei M, Ghanbari D, Aliabadi PC, Safaie N. Room temperature synthesis and magnetic property studies of Fe_3O_4 nanoparticles prepared by a simple precipitation method. *J Ind Eng Chem*, 2015, 21: 599-603
72. Ozalp VC, Bayramoglu G, Kavruk M, Keskin BB, Oktem HA, Arica MY. Pathogen detection by core-shell type aptamer-magnetic preconcentration coupled to real-time PCR. *Anal Biochem*, 2014, 447: 119-125
73. Parkinson GS. Iron Oxide Surfaces. *Surf Sci Rep*, 2016, 71 (1): 272-365
74. Pandey B, Fulekar MH. Nanotechnology: Remediation technologies to clean up the environmental pollutants. *Res J Chem Sci*, 2012, 2 (2): 90-96
75. Pragman AA, Schlievert PM. Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 42 (2): 147-154

76. Qi G, Li L, Yu F, Wang H. Vancomycin-modified mesoporous silica nanoparticles for selective recognition and killing of pathogenic gram-positive bacteria over macrophage-like cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5 (21): 10874-10881
77. Reddy PM., Chang KC, Liu ZJ, Chen CT, HoYP. Functionalized magnetic iron oxide(Fe_3O_4) nanoparticles for capturing gram-positive and gram-negative bacteria. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10: 1429-143
78. Rohde A, Hammerl JA, Boone I, Jansen W, Fohler S, Klein G, Dieckmann R, Al Dahouk S. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. *Trend Food Sci Technol*, 2017, 62: 113-118
79. Salehiabar M, Nosrati H, Davaran S, Danafar H, Manjili H. Facile synthesis and characterization of L-aspartic acid coated iron oxide magnetic nanoparticles (IONPS) for biomedical applications. *Drug Res*, 2017, 68 (5): 280-285
80. Santoyo Salazar J, Perez L, deAbril O, Truong Phuoc L, Ihiwakrim D, Vazquez M, Greneche JM, Begin-Colin S, Pourroy G. Magnetic iron oxide nanoparticles in 10–40 nm range: Composition in terms of magnetite/maghemite ratio and effect on the magnetic properties. *Chem Mater*, 2011, 23 (6): 1379-1386
81. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infect Dis*, 2011, 17 (1): 7-15
82. Scott JR, Barnett TC. Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annu Rev Microbiol*, 2006, 60: 397-423
83. Setyawan H, Fajaroh F, Pusfitasari MD, Yuwana M., Affandi S. A facile method to prepare high-purity magnetite nanoparticles by electrooxidation of iron in water using a pulsed direct current. *Asia-Pac J Chem Eng*, 2014, 9 (5): 768-774
84. Sha Y, Deng C, Liu B. Development of C18-functionalized magnetic silica nanoparticles as sample preparation technique for the determination of ergosterol in cigarettes by microwave-assisted derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2008, 5 (49): 27-33
85. Shen Z, Nieh MP, Li Y. Decorating nanoparticle surface for targeted drug delivery: Opportunities and challenges. *Polym*, 2016, 8 (3): 83-100
86. Song JY, Liu HX, Li W, Dai J, Liu Y, Liu H, Zhao G, Wang P, Zheng ZM. Enhanced production of Vitamin K2 from *bacillus subtilis*(natto)by mutation and optimization of the fermentation medium. *Braz Arch Biol*, 2014, 57 (4): 606-612

87. Stevens KA, Jaykus LA. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review. *Crit Rev Microbiol*, 2004, 30 (1): 7-24
88. Suaifan GA, Alhogail S, Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron*, 2017, 90: 230-237
89. Sun C, Lee J, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev*, 2008, 60 (11): 1252-1265
90. Suo B, He Y, Tu SI, Shi X. A multiplex real time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, 7: 619-628
91. Tan W, Wang K, He X, Zhao XJ, Drake T, Wang L, Bagwe RP. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Med Res Rev*, 2004, 24 (5): 621-638
92. Tang JN, Shi XM, Shi CL, Chen HC. Characterization of a duplex polymerase chain reaction assay for the detection of enterotoxigenic strains of staphylococcus aureus. *J Rapid Methods Autom Microbiol*, 2006, 14 (3): 201-217
93. Treccani L, Yvonne Klein T, Meder F, Pardun K, Rezwani K. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomater*, 2013, 9 (7): 7115-7150
94. Veisi H, Taheri S, Hemmati S. Preparation of polydopamine sulfamic acid-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles with a core / shell nanostructure as heterogeneous and recyclable nanocatalysts for the acetylation of alcohols, phenols, amines and thiols under solvent-free conditions. *Green Chem*, 2016, 18 (23): 6337-6348
95. Wang L, Li Y, Mustaphai A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Prot*, 2007, 70: 1366-1372
96. Wang Y, Ye Z, Si C, Ying Y. Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. *Food Chem*, 2013, 136 (3-4): 1303-1308
97. Wang Y, Ravindranath S, Irudayaraj J. Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 399 (3): 1271-1278
98. Wen CY, Hu J, Zhang ZL, Tian ZQ, Ou GP, Liao YL, Pang DW. One-step sensitive detection of *salmonella typhimurium* by coupling magnetic capture and fluorescence identification with functional nanospheres. *Anal Chem*, 2013, 85 (2): 1223-1230

99. Wu KT, Kuo PC, Yao Y.D, Tsai EH. Magnetic and optical properties of Fe_3O_4 nanoparticle ferrofluids prepared by coprecipitation technique. *IEEE Trans Magn*, 2011, 37 (4): 2651-2653
100. Wu W, He Q, Jiang C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res Lett*, 2008, 3: 397-415
101. Xia T, Wang J, Wu C, Meng F, Shi Z, Lian J, Feng J, Meng J. Novel complex-coprecipitation route to form high quality triethanolamine-coated Fe_3O_4 nanocrystals: Their high saturation magnetizations and excellent water treatment properties. *Cryst Eng Comm*, 2012, 14 (18): 5741-5751
102. Xu P, Zeng GM, Huang DL, Lai C, Zhao MH, Wei Z, Li NJ, Huang C, Xie GX. Adsorption of Pb(II) by iron oxide nanoparticles immobilized phanerochaete chrysosporium: Equilibrium, kinetic, thermodynamic and mechanisms analysis. *Chem Eng J*, 2012, 203: 423-431
103. Xu X, Deng C, Gao M, Yu W, Yang P, Zhang X. Synthesis of magnetic microspheres with immobilized metal ions for enrichment and direct determination of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Adv Mater*, 2006, 18 (24): 3289-3993
104. Yang SJ, Ouyang H, Su XX, Gao HF, Kong W, Wang MY, Shu Q, Fu Z. Dual-recognition detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin-functionalize magnetic beads as concentration carriers. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 174-180
105. Yoon JW, Hovde CJ. All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Vet Sci*, 2008, 9: 219-231
106. Zhao X, Tapecc-Dytioco R, Wang K, Tan W. Collection of trace amounts of dna/mrna molecules using genomagnetic nanocapturers. *Anal Chem*, 2003, 75 (14): 3476-348
107. Zhao XJ, Hilliard LR, Mecgery SJ, Wang Y, Bagwe RP, Jin S, Tan W. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *Proc Acad Sci*, 2004, 101 (42): 15027-15032
108. Zhu M, Liu W, Liu H, Liao Y, Wei J, Zhou X, Xing D. Construction of Fe_3O_4 /Vancomycin/PEG magnetic nanocarrier for highly efficient pathogen enrichment and gene sensing. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7 (23): 12873-12881

附录 攻读硕士学位期间已发表的论文

1. 孙程,徐宝霞,徐珍霞,陈福生,吴仁蔚. 全细胞 SELEX 法筛选单增李斯特菌的 ssDNA 适配体[J].现代食品科技, 2018,34(8):110-115.
2. 徐珍霞,孙程,陈福生,吴仁蔚. 富含氨基的聚酰胺-胺树状大分子的合成与表征[J].安徽农业大学学报,2018, 45(4): 772-776.

致 谢

光阴似箭，岁月如梭，转瞬间，三年研究生生活即将结束了，回想起大一刚入学的情景仿佛昨日，如果说本科四年的时光我匆匆而过，那么研究生三年的生活我真的是满载而归，回首这段难忘的时光，心中感慨万千。在这三年中，我不仅在学业上取得一定的进步，同时也收获了纯真的友谊和美满的爱情，这一切将会使我终身受益。在论文即将完成之际，在此撰文表示感谢。

首先，由衷的感谢我的导师吴仁蔚副教授。在学习上，从论文选题、中期、写作到修改，都得到了导师的悉心指导，在换课题、论文盲评和增评的过程中，吴老师不厌其烦的为我指点迷津，针对论文出现的问题提出了许多宝贵的意见和建议，帮助我理清思绪，倾注了许多时间和精力。吴老师严谨的治学态度、渊博的知识、一丝不苟的工作作风以及平易近人的性格都影响了我许多。此外，在生活上，吴老师也给予我无私的指导和鼓励，给我勇气和动力去完成我的论文。千言万语也诉说不了对恩师的感谢之情，在此，谨向恩师献上我最诚挚的敬意。

其次，要感谢课题组陈福生老师、王小红老师、邵彦春老师、张秀艳老师、陈涛老师、周有祥老师、李牧老师、王佳老师、李锦全老师每次例会对我的细心指导与帮助。此外，感谢同实验室的冯武老师和齐小宝老师对我实验和生活上的关心和帮助。在此，我向各位老师表示衷心的感谢。

感谢陈亚丽、徐珍霞、张珊珊等师姐以及张昭、邵佩、聂若男等同窗好友在实验和论文写作的过程中给予我的热心支持与帮助。感谢龚云霞、苏蓉蓉、林淑凤、熊蝶等师妹的认真配合及支持。感谢一直关心和支持我的刘纯、王静、王玥、夏蒙蒙、武芳伊、刘雪、张晗等朋友，你们给予我的真诚鼓励和无私帮助是终生难忘的，这些情谊我会永远地记在心间，衷心的感谢你们！

感谢家人在物质和精神上的奉献和支持，让我毫无顾虑地完成我的学业，特别感谢我的恋人张汇捷，在最艰难的时候陪伴着我，给予我精神上极大的支持，带给我许多美好的回忆以及乐观面对困难的勇气。感谢你们对我付出的一切！

最后，感谢在百忙之中抽出时间参加论文审阅与答辩的各位专家和老师们，谢谢你们！

孙程

2019 年 5 月