

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

49(6): 820–825; 4 June 2009

ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

## 基于免疫纳米颗粒强化的压电免疫传感器检测大肠杆菌 O157:H7

谌志强, 王景峰, 邱志刚, 金敏, 王新为, 陈照立, 李君文\*, 晁福寰

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

**摘要:**【目的】结合纳米技术建立检测大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 高灵敏检测技术。【方法】采用化学共沉淀法制备出核心粒径约为 10 nm 的免疫纳米磁颗粒, 柠檬酸钠还原法制备粒径约为 20 nm 的免疫胶体金。压电免疫传感器通过金黄色葡萄球菌蛋白 A (Protein A from *Staphylococcus aureus* SPA) 法将抗体固定于石英晶振上, 两种免疫纳米颗粒借助不同的抗体连接于传感器上对检测频率信号进行放大。【结果】SPA 在石英晶振上的最佳固定浓度和时间为 1.2 mg/mL 和 40 min, 抗体的最佳固定浓度和时间为 1.0 mg/mL 和 60 min。压电免疫传感器通过两种免疫纳米颗粒的放大作用, 使其对大肠杆菌 O157:H7 的检测限从  $10^4$  cfu/mL 提高到  $10^1$  cfu/mL。【结论】免疫纳米颗粒强化对压电免疫传感器的检测频率信号具有很好的放大效应, 可以明显提高其检测灵敏度。

**关键词:** 大肠杆菌 O157:H7; 压电免疫传感器; 纳米免疫磁颗粒; 免疫胶体金; 增强; 检测

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0820-06

1982 年大肠杆菌 O157:H7 首次在美国分离并确认为一种新型的肠道致病菌<sup>[1]</sup>, 它是肠出血性大肠杆菌的一个主要菌型, 可引起人类腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒综合征 (uremic syndrome hemolytic, HUS) 和血栓形成性血小板减少性紫癜 (thrombocytopenic purpura, TTP), 个别患者可因急性或慢性肾功能衰竭而死亡。由该菌引起的食物中毒已在世界范围内多次出现, 1996 年日本发生了世界上规模最大、涉及上万人的由出血性大肠杆菌 O157:H7 引起的食物中毒暴发流行。我国自 1986 年在徐州发现感染病人<sup>[2]</sup>, 已在全国其它城市分离到了大肠杆菌 O157:H7。为此, 建立一种快速, 高灵敏度及操作简便的检测方法在目前尤为迫切。

传统的大肠杆菌 O157:H7 检测方法主要包括山

梨醇麦康凯琼脂 (sorbitol-MacConkey agar, SMAC) 分离培养法, 生化方法等, 这些方法大多操作步骤繁琐, 且耗时较长。随着科学技术的发展, 出现了一些新兴检测方法, 如 PCR 法<sup>[3]</sup>, ELISA 法<sup>[4]</sup>, 免疫磁珠分离法<sup>[5]</sup>, 流式细胞仪法<sup>[6]</sup> 及基因芯片法<sup>[7]</sup> 等, 这些方法同样也存在着仪器昂贵, 操作复杂, 费时等缺点。

随着科技的发展, 生物传感器以其灵敏度高、分析速度快、成本低等优点开始广泛用于大肠杆菌 O157:H7 的检测研究。1999 年 DeMarco 利用光纤生物传感器, 借助青蓝色 5-染料标记多克隆抗体检测碎牛肉中的大肠杆菌 O157:H7, 可检测到的范围为  $3 \sim 30$  cfu/mL<sup>[8]</sup>, 2002 年 DeMarco 又将生物素-亲和素系统引入该方法内检测碎牛肉中的大肠杆菌 O157:H7, 其分别为灵敏度为  $9.0 \times 10^3$  cfu/25 g 和  $5.2 \times 10^2$

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA06Z408); 国家科技支撑计划(2006BAD01B06)

\* 通信作者。Tel: +86-22-84655418; Fax: +86-22-23328809; E-mail: junwen9999@hotmail.com

作者简介: 谌志强(1978–), 男, 江西南昌人, 博士研究生, 从事食品与环境中原微生物的检测。E-mail: szq922990@126.com

收稿日期: 2008-12-04; 修回日期: 2009-03-02

cfu/10 g<sup>[9]</sup>。2005 年 Radke 利用高密度微电极传感器检测大肠杆菌 O157:H7, 检测范围为 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>7</sup> cfu/mL<sup>[10]</sup>。2007 年 Varshney 采用交叉微电极作为阻抗传感器, 并借助免疫磁颗粒的特异性分离作用检测大肠杆菌 O157:H7, 其检测灵敏度为 10<sup>4</sup> cfu/mL<sup>[11]</sup>。Zhu 在 2005 年利用集成光波导传感器检测大肠杆菌 O157:H7, 能定量检测到 75 μL 样品中的 10 个细菌<sup>[12]</sup>。压电传感器作为生物传感器的一个重要分支, 在大肠杆菌 O157:H7 检测方法中也开展了广泛的研究。

压电传感器(Piezoelectric biosensor)是 20 世纪 60 年代建立起来的一种新型测量技术, 其检测的理论基础是固载在晶体表面的沉积物质量与晶体频率变化存在着一定的比例关系, 即 Sauerbrey 方程<sup>[13]</sup>:  $\Delta F = -2.26 \times 10^{-6} F^2 \Delta m/A$ , 式中,  $F$  为石英晶体天然谐振频率(Hz);  $\Delta m$  为沉积在晶体表面的质量变化(g);  $\Delta F$  为晶体频率的变化(Hz);  $A$  为参与晶振的面积(cm<sup>2</sup>); 负号表示质量的增加导致频率的下降。1986 年 Muranmatsu 等首次利用压电传感器以戊二醛交联特异性抗体法检测白色念珠菌<sup>[14]</sup>, 自此, 压电传感器广泛应用于微生物的检测。为了提高传感器的检测灵敏度, Su 等将免疫磁性微球对传感器进行质量放大, 结果使传感器对鼠伤寒沙门氏菌检测限从 10<sup>5</sup> cfu/mL 提高到 10<sup>2</sup> cfu/mL<sup>[15]</sup>, 另有学者利用胶体金提高 DNA 传感器的检测灵敏度<sup>[16]</sup>。

2004 年 Su 等利用压电传感器在检测微生物时具有具仪器装置简单、分析速度快、特异性高、灵敏度高、样品无需标记、易于自动化和集成化等优点, 将其应用于大肠杆菌 O157:H7 的检测, 检测灵敏度达到 10<sup>3</sup> cfu/mL<sup>[17]</sup>。Mao 等利用 DNA 压电传感器检测大肠杆菌 O157:H7, 并借助免疫磁颗粒的放大作用, 将检测灵敏度提高到 10<sup>2</sup> cfu/mL<sup>[18]</sup>。2009 年 Poitras 采用耗散因子压电传感器(QCM-D)检测大肠杆菌 O157:H7, 发现检测不同浓度的大肠杆菌 O157:H7 时, 传感器耗散因子的变化比频率变化灵敏, 检测灵敏度要高一个数量级<sup>[19]</sup>。

本研究拟采用纳米免疫磁颗粒和纳米免疫胶体金两种纳米免疫颗粒强化压电生物传感器技术, 以提高传感器对大肠杆菌 O157:H7 的检测灵敏度。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和抗体:** 大肠杆菌 O157:H7 44752 本研究室保存, 其兔和鼠多克隆抗体本研究室自制, 羊抗

兔 IgG 由军事医学科学院流行病研究所赠。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA), 牛血清白蛋白(BSA)和丙烯葡聚糖凝胶 S-300(Sigma); 葡聚糖 T-40(Amersham); 柠檬酸三钠和氯金酸(上海化学试剂中心); 压电石英晶体微天平, 9MH AT 切型石英晶振(Princeton Applied Research, QCM922); 电子分析天平(Mettler 公司, AE240); 高速冷冻离心机(Hittch 公司, Universar32); 硝酸纤维素膜(Millpore 公司); 磁力恒温搅拌器(上海市曹行无线电元件厂, 79.3 型); 超强磁分离器(北京钢铁研究所制, 场强为 1.2T); 电动搅拌器(天津市威华实验仪器厂, WH8401-50A)。

### 1.2 菌悬液的制备和计数方法

大肠杆菌 O157:H7 经山梨醇麦康凯琼脂(SMAC)纯培养 20 h 后, 采用梯度稀释法对菌悬液进行稀释, 并用平板倾注法进行计数。将所得到的菌悬液分为 2 份, 1 份在 100℃下煮 15 min 灭活, 1 份不灭活。

### 1.3 免疫纳米磁颗粒的制备

参照文献[20], 采用化学共沉淀法制备纳米磁颗粒, 取浓度为 0.5 mg/mL 纯化好的大肠杆菌 O157:H7 兔多克隆抗体连接到 1 mL 纳米磁颗粒上制成免疫纳米磁颗粒。

### 1.4 免疫胶体金的制备

胶体金采用 Frens<sup>[21]</sup>的柠檬酸钠还原法制备, 用此法制备的胶体金直径约为 20 nm, 将 0.5 mg/mL 羊抗兔 IgG 连接至胶体金上即为免疫胶体金。

### 1.5 压电免疫传感器检测

**1.5.1 压电免疫传感器测定方法:** 先将石英晶振用 piranha 液(浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3/1, 现用现配)进行洗涤, 再用无水乙醇和超纯水洗涤, 每次 5 min, 重复 3 次。石英晶振在固定物质之前在气相中进行基础频率检测, 固定物质之后进行洗涤, 氮气吹干 10 min 后在气相中进行频率检测, 频率变化稳定在 ± 1 Hz 间时计数。

**1.5.2 SPA 最佳固定浓度和时间的确定:** 石英晶振在检测基础频率  $f_0$  之后, 取不同浓度的 SPA 溶液 10 μL 滴加于石英晶振上, 常温下固定 60 min。用超纯水洗涤石英晶振 5 min, 再用 PBS(0.01 mol/L, pH 为 7.4)洗涤 5 min, 氮气吹干 10 min 后进行频率测定, 频率稳定后计数  $f_{1c}$ , 并计算其频移值( $\Delta f_{1c} = f_{1c} - f_0$ )。在确定 SPA 最佳固定浓度之后, 取最佳浓度的 SPA 溶液 10 μL 滴加于石英晶振上, 固定不同时间

间后,进行频率测定,频率稳定后计数  $f_{IT}$ , 并计算其频移值( $\Delta f_{IT} = f_{IT} - f_0$ )。

**1.5.3 抗体最佳固定浓度和时间的确定:**按 SPA 最佳固定浓度和时间将 SPA 固定于石英晶振上,检测其频率为  $f_1$ ,取不同浓度的大肠杆菌 O157:H7 鼠多克隆抗体溶液 10  $\mu\text{L}$  滴加于石英晶振上,置于水浴锅中 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 60 min,超纯水洗涤,氮气吹干 10 min 后进行频率测定,计数为  $f_{2C}$ ,并计算其频移值( $\Delta f_{2C} = f_{2C} - f_1$ )。在确定抗体最佳固定浓度之后,取最佳浓度的抗体溶液 10  $\mu\text{L}$  滴加于石英晶振上,固定不同时间后,进行频率测定,频率稳定后计数  $f_{2T}$ ,并计算其频移值( $\Delta f_{2T} = f_{2T} - f_1$ )。

**1.5.4 原子电显微镜表征:**分别对裸石英晶振和固定了 SPA 及抗体的石英晶振用原子力显微镜进行表征。

**1.5.5 大肠杆菌 O157:H7 两级放大检测:**将 SPA 和大肠杆菌 O157:H7 鼠多克隆抗体分别固定于石英晶振上后,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_2$ 。再在其上滴加 1% BSA 溶液 10  $\mu\text{L}$  进行封闭,37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 60 min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_2'$ 。取不同浓度的大肠杆菌 O157:H7 菌悬液 10  $\mu\text{L}$  分别滴加于石英晶振上,37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 60 min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_3$ ,并计算其频移值( $\Delta f_3 = f_3 - f_2'$ )。取制备好的免疫纳米磁颗粒 10  $\mu\text{L}$  滴加于石英晶振上,37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 60 min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_4$ ,并计算其频移值( $\Delta f_4 = f_4 - f_3$ ),这是对检测频率信号进行了 1 级放大。继续利用免疫胶体金对检测频率信号进行 2 级放大,取制备好的免疫胶体金 10  $\mu\text{L}$  滴加于石英晶振上,37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 60 min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_5$ ,并计算其频移值( $\Delta f_5 = f_5 - f_4$ )。

**1.5.6 压电免疫传感器的重复性和再生性的观察:**免疫传感器能否重复使用直接影响它的实用性,对制备好的 SPA 自组装压电免疫传感器在 4  $^{\circ}\text{C}$  下存放时间进行了检测;另对石英晶振的重复使用次数进行测定。

## 2 结果

### 2.1 压电免疫传感器石英晶振 SPA 最佳固定浓度和时间

压电传感器在整个检测实验过程中的频率变化

在 5 min 之内即能达到稳定状态,且能稳定保持 2 h (该数据未给出)。作 SPA 浓度与石英晶振频率变化( $\Delta f_{IC}$ )曲线图(图 1-A),当 SPA 浓度为 1.2 mg/mL 时,其频率变化值趋于平缓,固定此点为 SPA 的最佳固定浓度。SPA 固定时间与石英晶振频率变化( $\Delta f_{IT}$ )曲线图(图 1-B)显示,当 SPA 在常温下固定于石英晶振上 40 min 时,曲线出现拐点,随着时间的延长,频率变化值甚至下降,因此认为 40 min 为 SPA 在石英晶振上的最佳固定时间。

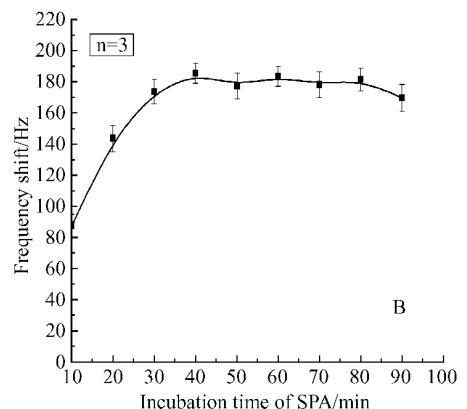
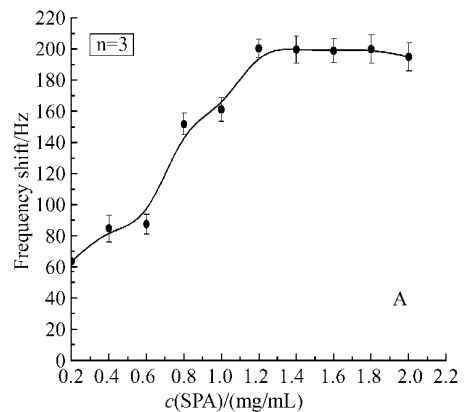


Fig. 1 SPA 浓度(A)和固定时间(B)对传感器频率变化的影响

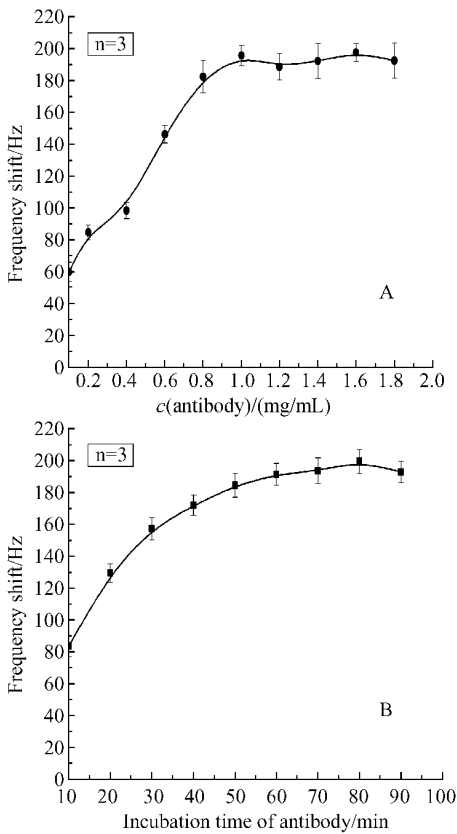
Fig. 1 Relationship between frequency change of QCM immunosensor and concentration of SPA (A), incubation time of SPA (B).

### 2.2 抗体的最佳固定浓度和时间

SPA 固定于石英晶振上后,不同浓度的大肠杆菌 O157:H7 鼠多克隆抗体滴加于石英晶振上,其与 SPA 结合后引起传感器频率变化( $\Delta f_{2C}$ )(图 2-A),可知抗体与 SPA 的最佳结合浓度为 1.0 mg/mL。从传感器频率变化( $\Delta f_{2T}$ )与抗体固定时间曲线(图 2-B)可知抗体在石英晶振上的最佳固定时间为 60 min。

### 2.3 不同状态下石英晶振原子力显微镜图

利用原子力显微镜对不同状态下的石英晶振进行扫描拍摄,裸的石英晶振表面凹凸不平,十分的不



2 抗体浓度(A)和固定时间(B)对传感器频率变化的影响

Fig.2 Relationship between frequency change of QCM immunosensor and concentration of antibody (A), incubation time of antibody (B).

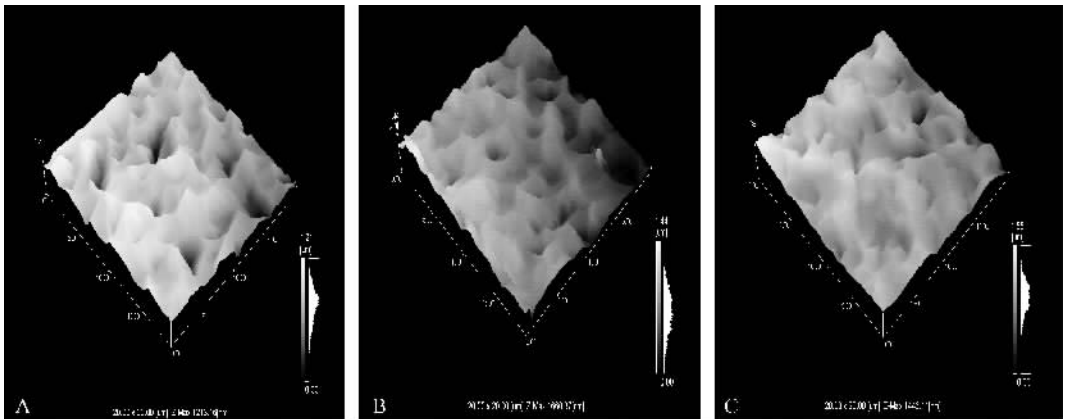


图3 不同状态下石英晶振原子力显微镜图

Fig.3 AFM images of different electrode status. A: bare electrode; B: SPA drop-coated surface; C: SPA and antibody drop-coated surface.

### 3 讨论

大肠杆菌 O157:H7 感染剂量极低,摄入量在 2 ~ 2000 个即可引起感染<sup>[22]</sup>,因此,建立敏感、快速的检测技术对保障食品安全具有重要意义。

规整(图 3 - A),当把 SPA 和抗体先后固定于石英晶振上后,其表面逐渐趋于平整(图 3-B, C),说明 SPA 和抗体都很好的固定到了石英晶振上。

#### 2.4 压电免疫传感器的两级放大检测

压电免疫传感器检测浓度为  $7.8 \times 10^8$  cfu/mL 的大肠杆菌 O157:H7 菌悬液时,引起了 227.6 Hz 的频率值下降,而当利用免疫纳米磁颗粒对检测频率信号进行放大时,又引起了 296.5 Hz 的频率值下降,当再次利用免疫胶体金对检测频率进行第 2 次放大时,再次引起了 122.2 Hz 的频率值下降,压电免疫传感器总的频率值下降了 646.3 Hz。可见两种纳米颗粒在压电免疫传感器的检测过程中具有非常大的放大作用。压电免疫传感器检测不同浓度的大肠杆菌 O157:H7 菌悬液,以及分别利用两种纳米颗粒进行放大引起的频率变化( $\Delta f_3, \Delta f_4, \Delta f_5$ )(图 4-A)。压电免疫传感器在没有两种纳米颗粒放大作用下,其检测限为  $10^4$  cfu/mL,而经过两级放大后,检测下限增至为  $10^1$  cfu/mL(图 4-B)。

#### 2.5 重复性和再生性

重复性和再生性是评价压电免疫传感器的一个重要指标,经测定,SPA 自组装压电免疫传感器在 4 °C 下可以保存 5 天,石英晶振在用 piranha 液处理后可以反复使用约 10 次。

随着生命科学的发展,生物传感技术凭借其操作简便、快速等优点在微生物检测领域应用越来越广泛,但是在早期阶段其检测灵敏度较低。为此研究者们利用质量放大技术可使检测信号明显增加,使得检测灵敏度得到了很大的提高。这些质量放大

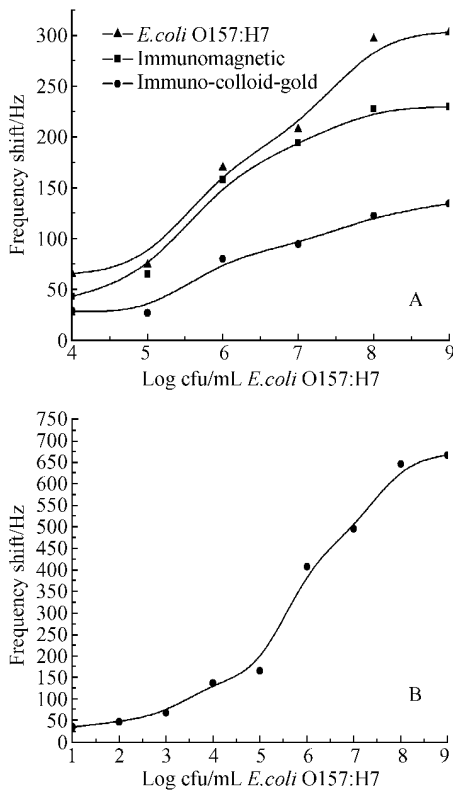


图4 大肠杆菌 O157:H7 菌悬液浓度与频率变化关系

Fig.4 Frequency shift of the immunosensor as a function of *E. coli* O157:H7 concentration. A: the frequency change of the each step; B: the frequency change of all.

技术包括基于酶催化作用的响应信号放大技术<sup>[23]</sup>, 生物素-亲和素系统放大技术<sup>[24]</sup>, 磁性颗粒增强技术<sup>[25]</sup>和胶体金放大技术<sup>[26]</sup>。而压电免疫传感器借助某一放大技术细菌检测时,其灵敏度只能提高到 $10^2$  cfu/mL<sup>[15, 18]</sup>。

本文采用 SPA 法将抗体固定于压电免疫传感器上进行检测,同时为了提高传感器的检测灵敏度,将两种纳米免疫颗粒——免疫磁颗粒和免疫胶体金利用免疫技术连接到传感器上对检测频率信号进行放大。压电免疫传感器在借助两种纳米免疫颗粒的作用下,将检测大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度从 $10^4$  cfu/mL 提高到 $10$  cfu/mL。该技术由于操作简便、快速,而且只要更换检测中的抗体就可以检测不同的微生物,在微生物的检测中具有广阔的前景。

## 参考文献

[1] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 1983, 308(12): 681 – 685.  
 [2] 权太淑, 徐建国, 范天锐, 等. 首次从出血性结肠病人中分离到 *E. coli* O157:H7 大肠埃希菌. 中华流行病学

学杂志 (*Chinese Journal of Epidemiology*), 1988, 9(4): 24 – 28.

[3] Johnston LM, Elhanafi D, Drake M, et al. A simple method for the direct detection of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 from raw alfalfa sprouts and spent irrigation water using PCR. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(11): 2256 – 2263.  
 [4] Choong HP, Nancy MV, Deborah LH. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34: 988 – 990.  
 [5] 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. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(6): 1366 – 1372.  
 [6] Gunasekera TS, Atfield PV, Veal DA. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66: 1228 – 1232.  
 [7] Jin HY, Tao KH, Li YX, et al. Microarray analysis of *Escherichia coli* O157:H7. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(37): 5811 – 5815.  
 [8] DeMarco DR, Saaski EW, McCrae DA, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using a fiber-optic biosensor. *Journal of Food Protection*, 1999, 62(7): 711 – 716.  
 [9] Demarco DR, Lim DV. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in 10- and 25-gram ground beef samples with an evanescent-wave biosensor with silica and polystyrene waveguides. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(4): 596 – 602.  
 [10] Radke SM, Alocilja EC. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosens and Bioelectron*, 2005, 20(8): 1662 – 1667.  
 [11] Varshney M, Li Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Biosens and Bioelectron*, 2007, 22(11): 2408 – 2414.  
 [12] Zhu P, Shelton DR, Kams JS, et al. Detection of water-borne *E. coli* O157 using the integrating waveguide biosensor. *Biosens and Bioelectron*, 2005, 21(4): 678 – 683.  
 [13] Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagubg. *Zeitschrift Fur Physik*, 1959, 155: 206 – 212.  
 [14] Muramatsu H, Kimura K, Ataka T. Computation of equivalent circuit parameters of quartz crystal in contact with liquid

- and study of liquid properties. *Analytical Chemistry*, 1988, 60(19): 2142 – 2146.
- [15] Su XL, Li YB. A QCM immunosensor for Salmonella detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(6): 840 – 848.
- [16] Liu T, Tang JA, Jiang L. Sensitivity enhancement of DNA sensors by nanogold surface modification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 295: 14 – 16.
- [17] Su XL, Li YB. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(6): 563 – 574.
- [18] Mao XL, Yang LJ, Su XL, et al. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(7), 1178 – 1185.
- [19] Poitras C, Tufenkji N. A QCM-D-based biosensor for *E. coli* O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(1): 2137 – 2142.
- [20] Duan HL, Shen ZQ, Wang XW, et al. Preparation of immunomagnetic iron-dextran nanoparticles and application in rapid isolation of *E. coli* O157:H7 from foods. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(24): 3660 – 3664.
- [21] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physics*, 1973, 241(105): 20 – 22.
- [22] Buchanan RL, Doyle M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology*, 1997, 51(10): 69 – 76.
- [23] Ebersole RC, Ward MD. Amplified mass immunosorbent assay with a quartz crystal microbalance. *Journal of American Chemical Society*, 1988, 110(26): 8623 – 8628.
- [24] 裴仁军. 生物素-亲和素系统在压电免疫传感器中质量放大作用研究. 高等学校化学学报(*Chemical Journal of Chinese Universities*), 1999, 20(6): 879 – 880.
- [25] Kim GH, Rand AG, Letcher SV. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor part II: *Salmonella typhimurium* detection using magnetic enhancement. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18(1): 91 – 99.
- [26] Chen SH, Yuan R, Chai YQ, et al. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase(HRP) on the layer-by-layer assembly films of gold colloidal nanoparticles and toluidine blue. *Electroanalysis*, 2006, 18(5): 471 – 477.

## Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with piezoelectric immunosensor based on enhancement with immuno-nanoparticles

Zhiqiang Shen, Jingfeng Wang, Zhigang Qiu, Min Jin, Xinwei Wang, Zhaoli Chen, Junwen Li\*, Fuhuan Cao  
(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

**Abstract:** [Objective] We developed a sensitive method to detect *Escherichia coli* O157:H7 based on enhancement with immuno-nanoparticles. [Method] About 10 nm ultrafine immunomagnetic particles were prepared by a co-precipitation method, about 20 nm immuno-colloid-gold was prepared by sodium citrate reduction. The immunosensor was fabricated by using Protein A from *Staphylococcus aureus* (SPA) for the antibody immobilization. Two immuno-nanoparticles by two antibodies were used to amplify frequency changing. [Result] The most suitable immobilization concentration and time for SPA was 1.2 mg/mL and 40 min, and dose for the antibody was 1.0 mg/mL and 60 min. With the signal amplification of the two immuno-nanoparticles, the detection limit of *E. coli* O157:H7 was increased from  $10^4$  colony-forming units (cfu) /mL to  $10^1$  cfu/mL. [Conclusion] The prepared immuno-nanoparticles might be used to significantly amplify the frequency signal of the piezoelectric immunosensor and improve the detect sensitivity.

**Keywords:** *Escherichia coli* O157:H7; piezoelectric immunosensor; immuno-nanoparticles; enhancement; detection

( 本文责编 :王晋芳 )

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA06Z408) and the National Key Technology R & D Program (2006BAD01B06)

\* Corresponding author. Tel: + 86-22-84655345; Fax: + 86-22-23328809; E-mail: junwen9999@hotmail.com

Received: 4 December 2008/Revised: 2 March 2009

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>