

# 量子点在食源性致病微生物检测中的应用

李晓丽, 万翠香, 熊凯华, 魏 华, 熊勇华\*

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

**摘要:**量子点在生物、医学领域,尤其是在微生物快检中的应用引起了广泛关注。本文对量子点的特性、多元检测中的应用以及量子点在检测食源性致病微生物中的应用进行了综述。

**关键词:**量子点, 食源性, 致病微生物, 检测

## Application of quantum dots on the detection of foodborne pathogen

LI Xiao-li, WAN Cui-xiang, XIONG Kai-hua, WEI Hua, XIONG Yong-hua\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Quantum dots have been used in biological and medical fields, especially for rapid detection of microorganisms. In this paper, the characteristics and multiple detection of quantum dots as well as the application of this technology in the detection of foodborne pathogens were reviewed.

**Key words:** quantum dots; foodborne; pathogenic microorganism; detection

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)10-0363-04

食源性疾病是人体摄入致病微生物、毒素或化学物质污染的食品,而引起感染性或中毒性症状的疾病。大多数的食源性疾病都是由致病微生物引起,其临床表现为恶心、呕吐、痉挛、腹痛和腹泻等。常见的食源性致病微生物有沙门氏菌(*Salmonella*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、志贺氏菌(*Shigella*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等。食源性致病微生物是影响食品质量和安全的主要因素之一。全球每年发生食源性疾病的病例高达数十亿例,其危害在国内也是屡见不鲜。例如 1999~2000 年,在中国东部部分地区发生了较大规模的大肠杆菌 O157:H7 爆发,造成了重大经济损失。针对近十年来致病微生物引起的食源性疾病逐渐增多的趋势,我国先后启动十五和十一五科技支撑计划,要求建立食源性致病微生物预警、溯源、评估的整套体系。而其核心是建立快速、准确、便捷的检测食源性致病微生物方法。作为一类新型的荧光标记物,量子点在食源性致病微生物检测领域中的应用吸引了许多学者的兴趣。量子点具有激发光谱宽而发射光谱窄、量子产率高,检测光谱明亮度好、耐光漂白等良好的光电性能;能同时进行多重标记,在单一波长激发下,可满足生物样品的多重检测、超灵敏分析和实时跟踪检测的需求。目前量子点在检测大肠杆菌

O157:H7、沙门氏菌等研究中已经有少量成功的报道,本文就量子点在食源性致病微生物检测中的应用最新进展做如下综述。

### 1 量子点的特性

#### 1.1 量子点的荧光特性

量子点(Quantum Dots, QDs)通常是两种或两种以上的 II B~VI B 或 III B~V B 族元素在纳米尺度上的复合,直径稳定在 2~10nm<sup>[1]</sup>。由于量子点的物理尺寸小,电子被限制在势垒中,形成一系列离散的能级,改变了电子的量子态及光场下的相互作用,形成量子限域效应和表面效应,表现出独特的光致发光性能。量子点的荧光特性优越,可作为一种探针使用。

#### 1.2 量子点的合成和功能化

合成高质量的量子点最成熟的是液相合成方法,它可分为 TOP/TOPO 有机相合成和水相合成两种。TOP/TOPO 有机相合成法在高温下合成单分散疏水性量子点,其表面没有与生物分子发生反应的化学基团,不溶于水,限制了量子点相关的生物学功能。因此通过表面修饰作用,如共价偶合包被、活性物质包被,配体交换,使量子点具有水溶性和生物兼容性,能更好地应用于微生物检测领域。而水相合成法利用水溶性疏基作稳定剂,在水相中直接制备水溶性量子点。水体系中合成量子点比有机相合成操作简单、表面荷质比可控,易引入各种官能团分子,生物亲和性高。目前,常用的水溶性量子点主要由 CdY(Y 为 S, Se, Te)核心和一些复合结构或多层结构组成。

收稿日期:2008-12-12 \* 通讯联系人

作者简介:李晓丽(1986-),女,硕士研究生,研究方向:食品安全。

## 2 量子点的应用

自从量子点水溶性和生物相容性的问题得到了解决,量子点迅速成为科学界研究热点。水溶性量子点生物具有良好的生物相容性,主要运用于细胞成像和染色。量子点在生物活体成像,蛋白质示踪技术、生物传感器、生物医学等领域得到应用,Bruchez et al<sup>[2]</sup>用荧光标记物量子点二元标记鼠成纤维细胞。在免疫测定法检测毒素和微生物的研究中,量子点荧光标记也得到应用。有文献报道<sup>[3]</sup>,量子点可作为荧光标签,双色成像小球隐孢子虫和贾第虫。随着量子点技术的发展与成熟,量子点在多元检测中所表现的优越性日益明显。

### 2.1 量子点应用于多元检测

随着生物科学的快速发展,从复杂系统中同时大量检测出多种生物分子和化合物的需求越来越多。量子点最大的优点在于它具有丰富的颜色,可同时进行多重标记和检测。单一种类的纳米半导体材料按尺寸变化就能够产生一个发光波长不同的、颜色分明的标志物家族,这是传统染料分子无法实现的。量子点的发射光谱狭窄且对称,耐光漂白度高,荧光强度和稳定性分别是罗丹明 6G 的 20 倍和 100 倍以上<sup>[4]</sup>。近年来,量子点作为一种新型荧光标记物已广泛应用于生物检测领域,特别是免疫检测领域。与传统荧光试剂相比,量子点为免疫荧光标记研究提供一个更具发展潜力的多元检测平台。

### 2.2 量子点在检测食源性致病微生物中的应用

2.2.1 常见食源性致病微生物的爆发情况 以常见单核细胞增生李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌为代表的食源性致病微生物引起的世界范围的食源性疾病的爆发,引起了各国疾病预防控制中心以及科技界的重视。其爆发情况的部分例子如表 1 所示。

在这些致病菌中,单核细胞增生李斯特氏菌是一种能在低温(甚至 4℃)代谢、繁殖的嗜冷菌。它通过 2 个毒力岛基因分别编码不同的致病物质引起人畜共患病,主要症状为败血症、脑膜炎、流产和单核细胞增多。美国每年约有 1600~2000 例疾病发生。国际上已将其列为食品四大致病菌之一,大部分国家对即食食品单核细胞增生李斯特氏菌采用零容忍标准,如美国食品和药物管理局规定任何 25g 样品中不得检出。

大肠杆菌 O157:H7 主要通过污染的食物和水源传播,通过产生溶血素、志贺样毒素和坏死性毒素使人致病,最低的感染剂量可少于 10 个病原菌<sup>[11]</sup>。感

染后常出现轻度腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒综合症、血栓性血小板减少性紫癜等症状,致死率约 5%~10%<sup>[12]</sup>。在美国和加拿大分离的肠道致病菌中,大肠杆菌 O157:H7 排在第二或第三位。我国食品卫生标准规定,在动物产品中不得检出大肠杆菌 O157:H7。

沙门氏菌主要通过污染的水源和食品使人畜患病。人体摄入含有  $10^5 \sim 10^6$  个/g 沙门氏菌的畜产品就能引起感染<sup>[13]</sup>。沙门氏菌侵染宿主后分泌内毒素和肠毒素等致病物质,引起的疾病主要分为两大类:一类是伤寒和副伤寒症,另一类是急性肠胃炎,死亡率达 1%~4%。我国有 70%~80% 的细菌性食物中毒由沙门氏菌引起,居我国微生物性食物中毒的首位。因此所有食品及食品原料中不得检出沙门氏菌。

金黄色葡萄球菌对不良环境有较强抵抗能力,能分泌 20 多种引起人类疾病的毒性蛋白质,主要有溶血毒素、杀白细胞素、血浆凝固酶、肠毒素,引起局部化脓感染、肺炎、伪膜性肠炎、心包炎,甚至败血症、脓毒症等全身感染。尤其是肠毒素,可使淋巴细胞产生强烈的细胞毒性作用。在美国由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒,占整个细菌性食物中毒的 33%,居于第二位。我国每年发生的此类中毒事件也非常多,因此规定所有食品及食品原料中不得检出金黄色葡萄球菌。

2.2.2 量子点在致病微生物检测中的应用 “十一五”食品安全重大专项要求建立我国食品病原微生物的风险评估以及高通量分析技术体系,其核心内容是建立微生物快速检测的方法。而目前传统的培养、生理生化鉴定等技术手段已经满足不了食品安全快速检测的要求,致病微生物的检测技术面临着由耗时费力的传统方法向省时、简便的现代检测技术转变的挑战,即采用免疫学、分子生物学、生物传感器的技术手段实现致病菌的高通量检测。免疫学方法包括酶联免疫法、免疫胶体金技术等,具有操作简便、不需要复杂仪器等优点,但该方法一般检测灵敏度偏低,需提供数量较多的纯化细菌,或需对样品进行浓缩后分析,因此较难在短时间内得到检测结果,如酶联免疫法(ELISA),一般检测时间需 8~24h。分子生物学法包括如依赖 PCR 的 DNA 指纹图谱技术、多重 PCR 检测技术、基因芯片技术、定量 PCR 检测技术等,虽然具有较高的检测灵敏度,但由于无法分辨死/活致病菌以及 DNA 片段的同源性,易造成假阳性或阳性结果偏高等现象。生物传感器技术目前还处于实验室的研发阶段,技术的稳定性和成熟度尚需完善。

表 1 全球食源性疾病的爆发情况

细菌名称	年份	地点	引发疾病	病例/死亡人数	参考文献
<i>Listeria monocytogenes</i>	2000	美国	NR	30/4	[5]
<i>Listeria monocytogenes</i>	2000	美国北卡罗来纳州	NR	12/0	[6]
<i>E.coli</i> O157:H7	1999	美国,华盛顿	溶血性尿毒症	37/0	[7]
<i>E.coli</i> O157:H7	2006	美国	溶血性尿毒症、肾衰竭	199/3	[8]
<i>Salmonella</i> Typhimurium DT104	2005	荷兰	NR	165/NR	[9]
<i>Staphylococcus aureus</i>	1991~1992	美国,弗吉尼亚	菌血症、结膜炎、尿道管感染	16/0	[10]

注:NR 表示没有报道。

表2 量子点在食源性致病微生物检测中的实验研究

菌种名称	检测限	检测时间	方法	使用仪器	参考文献
<i>Listeria monocytogenes</i>	1~10 <sup>7</sup> CFU/mL	1.5h	免疫磁分离,量子点标记	LED 灯源检测	[15]
<i>E.coli</i> O157:H7	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>7</sup> CFU/mL	<2h	免疫磁分离,量子点标记	光谱仪, LED 激发灯, CCD 检测器	[19]
<i>E.coli</i> O157:H7	10CFU/mL	2h	噬菌体鉴定技术,量子点标记	流式细胞仪, 荧光显微镜	[20]
<i>E.coli</i> O157:H7	10 <sup>6</sup> CFU/mL	NR	流式细胞计量术	流式细胞仪; 荧光显微镜	[21]
<i>Salmonella</i>	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>7</sup> CFU/mL	2h	免疫磁分离,量子点标记	光谱仪, LED 灯源检测, CCD 检测器	[22]
<i>Staphylococcal enterotoxins</i>	15ng/mL	NR	免疫荧光法	LED 灯源检测, CCD 检测器	[23]

注:NR 表示未报道。

表3 传统荧光试剂与量子点性质对比

类别	传统荧光试剂	量子点	参考文献
光稳定性	易漂白,光稳定性差	耐漂白,光稳定性好	[4]
颜色多样性	颜色单一	多种颜色可供选择 CdSe 可覆盖可见光区	[4]
激发谱范围	较窄难以实现多组分同时激发	很宽,连续分布一元激发,多元发射	[4]
发射谱范围	较宽,易重叠,对称性差,拖尾严重, 荧光发射半峰宽在 100nm 以上	峰形狭窄,重叠小,对称性好, 无红拖尾现象,荧光发射半峰宽小于 40nm	[4]
荧光寿命	短	长	[16]
生物相容性	相容性差,毒性较大	相容性好,毒性小	[17-18]
仪器要求	光学系统要求严格	光学系统要求不高	[18]

近年来,在实验室中出现了有关致病微生物检测的一些新技术,如表2所示。在这些新技术中,量子点作为一种新型荧光标记材料,具有高荧光强度、强抗光漂白能力和窄发射光谱等独特的光学特性。与传统荧光试剂相比,量子点纳米材料在光稳定性、颜色多样性、激发谱范围、发射谱范围、荧光寿命、生物相容性和仪器要求等七个方面具有优越性(如表3所示)。量子点标记检测法灵敏度高、特异性强,具有较短的操作时间,且不易受样品基质影响的优点。Li<sup>[14]</sup>采用两种不同发射波长的量子点分别标记 *E.coli* O157:H7 和 *Salmonella* Typhimurium 的检测抗体,采用二抗一夹心的原理对两种致病菌同时检测,其检测范围在 10<sup>4</sup>~10<sup>7</sup>CFU/mL,检测时间在 2h 内。Wang<sup>[15]</sup>采用同样的检测原理,对单核增生李斯特菌进行检测,其检测范围 1~10<sup>7</sup>CFU/mL,检测时间 1.5h。

### 3 展望

随着人们对量子点性质认识的逐步深入,量子点标记物在食品安全检测中的应用将越来越广泛。在食源性致病微生物检测中,量子点标记法灵敏度非常高,能有效地检测到食品中含量极少的致病微生物。然而在标记检测中,量子点探针还存在着一定的缺陷。如表面带有大量电荷的量子点,特别是表面带有大量羧基和胺基的量子点,结合细胞膜、蛋白质、胞外基质和不同组织物的非特异性很高,导致背景荧光增强,降低了标记的特异性和检测的灵敏度。另外,量子点在溶液中还表现出一定的粘性。相信在今后的研究中,科技工作者将致力于攻克量子点相关的技术问题。预计未来量子点不仅将应用于致病微生物的快速检测,还将广泛运用于其它的生物领域。

### 参考文献

[1] Jilin Y, Carmen M E, Joshua E S, et al. Dye - doped nanoparticles for bioanalysis [J]. Nanotoday, 2007, 2(3) :44-51.

[2] Bruchez M, J Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [J]. Science, 1998, 281:2013-2015.

[3] Zhu L, Ang S, Liu W. Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70:597-598.

[4] William W, Yu E C, Rebekah D. Water-soluble quantum dots for biomedical applications [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 348:781-786.

[5] Multistate outbreak of *listeriosis*—United States [R]. Centers for Disease Control and Prevention, 2000, 49:1129-1130.

[6] Outbreak of *listeriosis* associated with homemade Mexican-style cheese—North Carolina, October 2000–January 2001 [R]. Centers for Disease Control and Prevention, 2001, 50:560-562.

[7] Michael G B, Michael B C, Melanie M P, et al. Lake - Associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington, 1999 [J]. Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine, 2003, 157:1016-1021.

[8] Lonnie J K. CDC food safety activities and the recent *E.coli* Spinach outbreak [R]. Centers for Disease Control and Prevention, 2006.

[9] Marten K, Wifrid V P, Daan N. Large outbreak of *salmonella* typhimurium DT104 [J]. The netherlands Euro Surveil, 2005, 10 (48):2847.

[10] John A J, Maureen G T, Dieter H.M.G, et al. Effectiveness of contact isolation during a hospital outbreak of methicillin resistant

- Staphylococcus aureus* [J]. American Journal of Epidemiology, 1996, 143 (5) :496-504.
- [11] Tuttle J, Gomez T, Doyle M P, et al. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties [J]. Epidemiol Infect, 1999, 122:185-192.
- [12] Meng J, Doyle M P, Zhao T, et al. Food microbiology: fundamentals and frontiers, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. [J]. Enterohemorrhagic *Escherichia*, 2001:327-336.
- [13] 曾晓芳. 畜产品中沙门氏菌污染的检测与控制[J]. 四川畜牧医药, 2003, 30(4):28-30.
- [14] Liju Y, Yanbin L. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels [J]. Analyst, 2006, 131:394-401.
- [15] Hong W, Yanbin L, Michael S. Rapid detection of *Listeria Monocytogenes* using quantum dots and nanobeads-based optical biosensor [J]. Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2007, 15:67-76.
- [16] Oleg V P. Multiple excitons and the electron-phonon bottleneck in semiconductor quantum dots: An ab initio perspective [J]. Chemical Physics Letters, 2008, 460:1-9.
- [17] Fontes A, Chaves C R, Santos B S, et al. Application of core-shell PEGylated CdS/Cd(OH)<sub>2</sub> quantum dots as biolabels of *Trypanosoma cruzi* parasites [J]. Applied Surface Science, 2007 (10):1061-1069.
- [18] Andrew J S. Quantum dots as luminescent probes in biological systems [J]. Solid State and Materials Science, 2002 (6):365-370.
- [19] Xiaoli S, Yanbin L. Quantum dot biolabeling coupled with immunomagnetic separation for detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76:4806-4810.
- [20] Rotem E, Michael M, Jeeseong H, et al. High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(13):4841-4845.
- [21] Megan A H, Peter C K, Todd D K. Flow cytometric analysis to detect pathogens in bacterial cell mixtures using semiconductor quantum dots [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80:864-872.
- [22] Liju Y, Yanbin L. Quantum dots as fluorescent labels of quantitative detection of *salmonella typhimurium* in chicken carcass wash water [J]. International Association for Food Protection, 2005, 68(6):1241-1245.
- [23] Ellen R G, Aaron R C, George P A, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. Analytical Chemistry, 2004, 76:684-688.
- (上接第362页)
- specific inhibitors with a new mode of action [J]. J Med Chem, 1996, 39:10565-1068.
- [12] Hashimoto F, Kashiwada Y, Cosentino L M, et al. Anti-AIDS agents. XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulonic acid derivatives [J]. Bioorg Med Chem, 1997, 5:2133-2143.
- [13] Pisha E, Chai H, Lee I S, et al. Discovery of betulonic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis [J]. Nat Med, 1995, 1:1046-1051.
- [14] Schmidt M L, Kuzmanoff K L, Ling Indeck L, et al. Betulonic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines [J]. Eur J Cancer, 1997, 33:2007-2010.
- [15] Pisha E, Chai H, Lee I S, et al. Discovery of betulonic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis [J]. Nat Med, 1995, 1:1046-1051.
- [16] Kouzi SA, Chatterjee P, Pezzuto JM, et al. Microbial transformations of the antimelanoma agent betulonic acid [J]. J Mat Prod, 2000, 63:1653-1657.
- [17] Redio M C, Giner R M, Manez S, et al. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas* [J]. Planta Med, 1995, 61:9-12.
- [18] Steele JCP, Warhurst DC, Kirby GC, et al. In vitro and in vivo evaluation of betulonic acid as an antimalarial [J]. Phytother Res, 1999, 13:115.
- [19] 张秀娟, 等. 桦木酸生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18:508-513.
- [20] 祁逸梅. 长白山白桦树皮中白桦脂醇的提取、衍生化及生物活性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2005.
- [21] 王国梁. 桦木醇的提取及桦木酸合成工艺研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2006.
- [22] 张泽. 高效液相色谱法测定白桦树皮中的白桦脂醇的含量[J]. 林产化学与工业, 2004(1):61-63.
- [23] Zhang Yu-hong, Yu Tao, Wang Yang. Extraction of Betulin from Bark of *Betula platyphylla* by Supercritical Carbon dioxide Extraction [J]. Journal of Forestry Research, 2003, 14(3):202-204.
- [24] Carcache-Blanco Esperanza J, Kang Young-Hwa, Jung Park Eun, et al. Constituents of the stem bark of *Pongamia pinnata* with the potential to induce quinine reductase [J]. J Nat Prod, 2003, 66:1197-1202.
- [25] 赖玲, 杨昕, 杨光, 等. 正交实验法优选酸枣仁中白桦脂酸的提取工艺[J]. 中草药, 2006, 37(4):532-534.
- [26] 马慧丽, 姚军, 陈慧. 桦木酸制备的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(4):551-552.
- [27] Krasutsky, Pawl A, Carlson, et al. Method for manufacturing betulonic acid [P]. US:6280778, 2001.
- [28] Kim DSHL, Chen Z, Nguyen V T, et al. A conese semi-synthetic approach to betulonic acid from betulin [J]. Synth Commun, 1997, 27:1607-1612.
- [29] Denise Z.L. Bastos, Ida C. Pimentel, et al. Biotransformation of betulonic and betulonic acids by fungi [J]. Phytochemistry, 2007, 68:834-839.
- [30] Parnali C, Samir A K. Biotransformation of the Antimelanoma Agent Betulonic Acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368 [J]. Applied and Environment Microbiology, 2000, 66(9):3850-3855.