

基于上转换荧光标记和磁分离技术的沙门氏菌 DNA 检测新方法

马小媛^{1,2}, 李双¹, 吴世嘉^{1,2}, 段诺¹, 王周平^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用水热法制备 NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺ 荧光纳米颗粒, 表面氨基化修饰后与探针核酸单链共价偶联, 形成荧光标记显示探针。再将氨基化的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒与捕获核酸单链进行共价偶联, 制备磁分离捕获探针。基于 DNA 杂交互补反应, 加入体系中的目标 DNA 链分别与两端互补的荧光显示探针和磁分离捕获探针形成三明治夹心结构, 通过外加磁场收集分离。加入的目标 DNA 链浓度越大, 体系荧光强度越大。结果表明, 复合结构的荧光强度与目标 DNA 链浓度成正比, 在 0.01~10 pmol/L 范围内呈现良好的线性关系, 最低检测限达 3 fmol/L。

关键词: 上转换荧光纳米材料; 磁性纳米材料; 沙门氏菌

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1303—08

Magnetic Nanoparticles-Based Bioassay for the Detection of Salmonella Using Upconversion Nanoparticles as Labels

MA Xiao-yuan^{1,2}, LI Shuang¹, WU Shi-jia^{1,2}, DUAN Nuo¹, WANG Zhou-ping^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this work, a sensitive fluorescent bioassay was developed for the detection of gram-negative bacterium Salmonella specific target DNA sequences. The NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺ upconversion nanoparticles (UCNPs) was prepared with high green upconversion fluorescent intensity. The biotinylated Salmonella target DNA complementary sequence 2 was attached to the avidin-conjugated UCNPs and served as the fluorescent signal probe. Then, the as-prepared Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs) was first surface modified with avidin molecule, and then combined with the biotinylated Salmonella target DNA complementary sequence 1 which served as the magnetic capture probe. The target DNA could be detected based on the DNA hybridization reaction. The fluorescent intensity was proportional to the concentration of target DNA in the range of 0.01 pmol/L to 10 pmol/L with detection limit as low as 3 fmol/L. The presented upconversion fluorescent method is simple, fast, sensitive, specific, and furthermore, it offers another great promise

收稿日期: 2013-07-01

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2011621, BE2012614); 中央高校基础研究基金项目(JUSRP11224, JUSRP51309A)。

* 通信作者: 王周平(1974—), 男, 陕西宝鸡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品营养与安全检测研究。

E-mail: wangzp@jiangnan.edu.cn

for the application of nanomaterials in biosensor design.

Keywords: upconversion nanoparticles, magnetic nanoparticles, salmonella bacterium

常见的荧光材料,如染料分子、量子点等,由于其大小可调,具有良好的生物相容性,易于表面改性等优点,在生物分析中广泛应用^[1-3]。通常,这些材料被高能紫外光或者可见光激发,发射光则是低能量、长波长的光子。高能光作为激发源可能会破坏被测生物组织并诱发自体荧光,导致高信噪比和较低的检测灵敏度。因此,寻找具有荧光量子产率高、光化学稳定性好、荧光寿命长、光谱可区分等优良特性的新的荧光标记物具有重要意义^[4]。

上转换荧光纳米材料是一种能够通过多光子机制把长波辐射(近红外光)转换成短波辐射,发射出比激发光波长短的荧光(紫外可见光),即上转换荧光^[5-6]。它所吸收光子的能量低于发射光子的能量,是一种反 Stokes 发光。上转换发光纳米粒子具有诸多优点,如:发射峰型窄,斯托克斯位移明显,生物相容性好,毒性低,良好的化学和物理稳定性,易于表面修饰等,使他们逐渐替代传统的荧光材料成为新的荧光标记物。上转换发光纳米材料的制备方法包括沉淀法、热裂解法、水热法、溶胶-凝胶法、微乳液法、高温煅烧法等^[7-10]。上转换荧光现象自被发现以来已在固态激光器,太阳能电池,波导信号放大器等方面广泛应用^[11-13]。掺杂了稀土元素的上转换荧光材料在无损的光学成像及其他生物医学领域被广泛应用。在癌症治疗中,上转换荧光材料由于其良好的渗透性,较低的毒性,高稳定性和易于表面修饰等特点被成功用于癌细胞的光动力疗法中^[14-15]。此外,基于上转换荧光成像的技术还被较多用于细胞、组织、活体成像的研究^[16-17]。

作者将所制备上转换荧光纳米颗粒($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$)作为标记物,磁性纳米颗粒作为高效分离介质,基于荧光分析技术、核酸杂交技术和纳米探针技术,发展出一种革兰氏阴性菌沙门氏菌特异性目标 DNA 的新型快速高灵敏检测方法。上转换荧光纳米颗粒通过表面的氨基与核酸单链(探针核酸链, probe DNA)进行共价偶联,构成荧光标记显示探针。另外,氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒与捕获核酸单链(capture DNA)进行共价偶联,形成磁分离探针。由于 capture DNA 和 probe DNA 是被测目标 DNA(target DNA)两端的互补链。因此,通过 DNA

杂交反应,三者会形成复合体,即荧光纳米颗粒会通过核酸链连接到磁球表面。当加入体系的被测目标核酸链越多,负载到磁球表面的荧光纳米颗粒也就越多,复合纳米颗粒发射的上转换荧光的发光强度也就越高,通过荧光强度的变化,就可知道加入体系的被测目标核酸链的多少,从而实现对目标核酸链的分析检测。

1 材料与方法

1.1 试剂

氧化钇(Y_2O_3),氧化镱(Yb_2O_3),氧化铒(Er_2O_3),硝酸,EDTA,氢氟酸,乙二醇,十六烷基三甲基溴化胺(CTAB),异丙醇,氨水,正硅酸四乙酯(TEOS),乙醇,戊二醛,柠檬酸三钠,购自国药集团;3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),亲和素,购自 Sigma 公司;双蒸水,实验室自制;沙门氏菌 DNA 链,上海生工提供;Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购于杭州伯尔迪生物科技有限公司;氯金酸(HAuCl_4),购自上海久岳化工有限责任公司;鼠伤寒沙门氏菌 50013 菌种,取自作者所在实验室;DNA 序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

沙门氏菌特异寡核苷酸探针序列:

Seq 1:5'-biotin-GAG CGT GCC TTA CCG ACG ATA-3'(捕获 DNA);

Seq 2:5'-ATA TCC ACG CAG GAA ATA ACA GGA CTT-biotin-3'(显示 DNA);

Seq 3:5'-TAT CGT CGG TAA GGC ACG CTC AAT TGT CGT TAA AGT CCT GTT ATT TCC TGC GTG GAT AT-3'(目标序列);

Seq 4:5'-TAT CGT CAG TAA GGC ACA CTC AAT TGT CGT TAA AGT CGT GTT ATT ACC TGC GAG GAT AT-3'(对照序列)。

1.2 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ 纳米颗粒的制备和表面功能化修饰

1.2.1 制备方法 参照文献[18]并做修改:

1)取 0.5 g Y_2O_3 , 0.035 g Yb_2O_3 , 0.085 g Er_2O_3 , 置于 50 mL 的烧杯中,加入 5~7 mL 浓硝酸,加热蒸干,加入 1.36 g EDTA,5 mL 超纯水搅拌溶解,缓慢加入 0.5 g NaOH 至溶液澄清透明,调节 pH 值至

8.5,加水定容至 8 mL 备用;

2)在磁力搅拌条件下加入 25 mL 乙二醇,0.4 g CTAB,再逐滴加入 3.0 mL 氢氟酸,得白色乳状胶体,再加入 5.5 mL 浓硝酸,搅拌均匀,转移至 50 mL 容量的带聚四氟乙烯内衬的反应釜中,195 °C 烘箱中反应 24 h;

3)自然冷却至室温,弃上层黑色液体,反应釜底固体用热水冲洗到烧杯中,超声 5 min,静置 10 min,待固体沉淀至底部,弃上层液体,加热水超声,重复 3 次。加无水乙醇超声分散,并以 6 000 r/min 离心 10 min,所得固体置于 70 °C 烘箱干燥 8~10 h,得白色固体粉末,即为 NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺纳米颗粒。

1.2.2 氨基化修饰 采用改良的 Stober 法:

1)取 20 mg NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺粉末,加入 60 mL 异丙醇中超声分散,35 °C 水浴锅中磁力搅拌条件下加入 2.5 mL 氨水和 20 mL 纯水;

2)将 25 μL TEOS 溶于 20 mL 异丙醇中,在 1 h 内逐滴滴加到上述溶液中,剧烈搅拌,35 °C 下继续搅拌 4 h;

3)将 200 μL APTES 溶于 30 mL 异丙醇中,逐滴加入到上述反应液中,35 °C 剧烈搅拌 1 h;

4)4 800 r/min 离心 15 min,所得固体用无水乙醇清洗 3 次,在 60 °C 烘箱内干燥 8~12 h,所得白色固体粉末即为表面氨基化修饰后的纳米颗粒。

1.3 磁性纳米颗粒的制备和氨基化修饰

根据文献[19]方法稍作修改:

1)在圆底烧瓶中加入 6.5 g 1,6-己二胺、2.0 g 无水醋酸钠、1.0 g 氯化高铁和 30 mL 乙二醇,50 °C 下磁力剧烈搅拌混匀;

2)将上述溶液转移到 50 mL 容量带聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中,198 °C 烘箱中反应 6 h;

3)自然冷却至室温,弃上层液体,下层黑色固体用超纯水冲洗至烧杯中,利用磁铁收集,重复 2 次,按此方法再用无水乙醇洗涤 2 次,所得黑色固体在 50 °C 条件下干燥 5~10 h,得氨基化磁性纳米颗粒。

1.4 纳米颗粒和亲和素的结合

NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺与亲和素结合的方法参照文献[20]:

1)取 2 mg NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺超声分散在质量分数 5%戊二醛的 PBS(10 mmol/L,pH 7.4)溶液中,置于摇床上室温反应 4 h;

2)6 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 PBS 清洗 3 次;

3)将沉淀超声分散在 PBS 中,加入亲和素,亲和素与原纳米颗粒质量比为 1/10,4 °C 反应 12 h;

4)6 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 PBS 清洗 3 次,将沉淀分散在 1 mL PBS 中。

磁性纳米颗粒与亲和素的结合方法与上述方法相同,但反应后的分离纯化过程采用磁力收集。

1.5 纳米探针的制备

1.5.1 上转换荧光显示探针的制备 取 1 mL 亲和素化的上转换纳米颗粒 PBS 溶液,加入生物素化的沙门氏菌 Seq 2 DNA 单链,使 DNA 终浓度为 50 nmol/L,37 °C 摇床振荡 12 h,6 000 r/min 离心 15 min 去上清。

1.5.2 磁分离捕获探针的制备 取 1 mL 亲和素化的磁性纳米颗粒 PBS 溶液,加入生物素化的沙门氏菌 Seq 1 DNA 单链,使 DNA 终浓度为 50 nmol/L,37 °C 摇床振荡 12 h,磁力收集,弃废液,用 PBS 洗涤 3 次,弃未连接的 DNA 链。

1.6 沙门氏菌目标 DNA 的检测

1)取 10 μL 磁分离捕获探针溶液(0.2 mg/mL),加入 90 μL 不同浓度的目标 DNA 序列 Seq 3(PBS 缓冲液配制),37 °C 摇床振荡 1 h,磁分离除去多余未反应的 DNA;

2)加入 100 μL 荧光显示探针溶液(1.2 mg/mL),37 °C 摇床振荡 1 h,磁分离收集的固体溶于 100 μL PBS 缓冲液超声分散;

3)将上述 100 μL PBS 样品溶液放入自制石英检测池中,设置 980 nm 激发光源电流为 1.5 A,固定光源距检测池 0.5 cm。

1.7 沙门氏菌 DNA 的提取与检测

1)取 1 mL 实验室冷藏沙门氏菌菌液,放入装有 9 mL 液体培养基的 50 mL 的三角瓶中,置于摇床上 37 °C 摇晃过夜,使菌种细胞分散、活化。

2)用无菌移液枪吸取 100 μL 移入装有 900 μL 液体培养基的离心管中,吹吸 3 次,让菌液混合均匀,即成 10⁻¹ 稀释液;再换一支无菌枪头吸取 10⁻¹ 稀释液 100 μL,移入装有 900 μL 液体培养基的离心管中,混匀后即成 10⁻² 稀释液;以此类推,连续稀释,制成 10⁻¹~10⁻⁸ 等一系列稀释菌液。

3)将固体培养基融化后趁热倒入无菌平板中,待凝固后编号,然后用无菌移液枪分别吸取 100 μL

菌液对号接种在不同稀释度编号的琼脂平板上,每个稀释度设3个平行。将涂抹好的平板平放于桌上20~30 min,使菌液渗透入培养基内,然后将平板倒转,37 °C恒温培养24 h后计数^[21-22]。

4)取过夜培养的细菌培养物进行梯度稀释,制成 10^{-1} ~ 10^{-8} 的稀释菌液。将稀释液于 OD_{600} 测其菌体浓度是否符合成品试剂盒的最佳提取要求,即 OD_{600} 在1.0~2.0之间。然后采用成品试剂盒提取不同稀释度的沙门氏菌DNA,而后在95 °C水浴5 min,再在0 °C冰浴5 min制备成单链DNA作为目标DNA,利用上转换荧光标记-磁分离模式进行检测,得出该种检测模式下,同体积、同浓度的沙门氏菌菌落个数和荧光强度的相互关系和最低检测限。

2 结果与讨论

图1所示为基于上转换荧光显示标记和磁分离富集技术的沙门氏菌目标DNA链检测原理示意图。对预先制备好的 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 荧光纳米颗粒和 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒表面进行亲和素化修饰后,分别共价耦合连接上生物素化的沙门氏菌目标链的互补链(显示探针DNA链和捕获探针DNA链)。当在反应体系中加入沙门氏菌目标DNA链后,基于DNA杂交互补配对反应,目标DNA两端分别连接上显示探针和捕获探针。在外加磁场作用下,对所形成的三明治复合结构进行磁分离富集收集,复合物的荧光强度与目标DNA链浓度成正比,待测DNA浓度越高,荧光强度就越大。

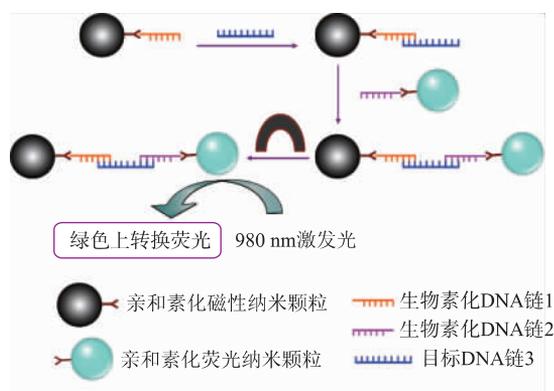
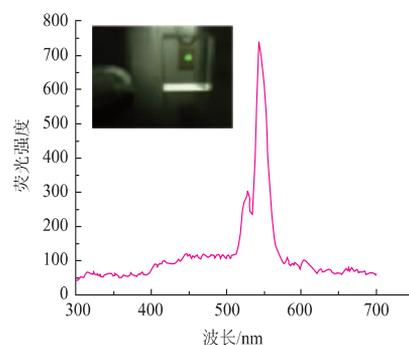


图1 基于荧光标记和磁分离技术的沙门氏菌目标DNA链检测原理示意图

Fig. 1 Schematic illustration for principle of Salmonella DNA detection based on combining magnetic capture probe and UCNPs labelling

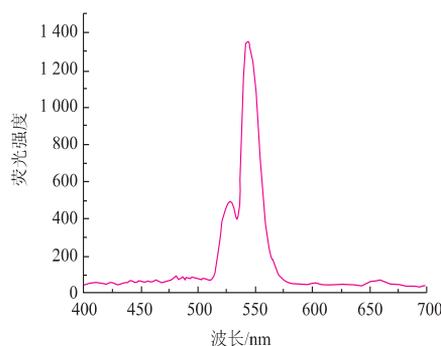
2.1 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 纳米颗粒和 Fe_3O_4 磁性纳米材料的制备与表征

作者利用水热法制备 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 荧光纳米颗粒,粒径约为 (40 ± 5) nm。图2(a)所示为纳米材料的荧光光谱图,从图中可以看出,在980 nm光源激发下, $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 发射了特征的可见绿色上转换荧光,3个特征峰分别位于528、544 nm和657 nm处,分别对应 Er^{3+} 离子的 $2H_{11/2}\rightarrow 4I_{15/2}$ (528 nm), $4S_{3/2}\rightarrow 4I_{15/2}$ (544 nm)和 $4F_{9/2}\rightarrow 4I_{15/2}$ (657 nm)跃迁。图2(b)所示为表面氨基化的 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 纳米颗粒的荧光光谱图,与之前未功能化的 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 纳米颗粒的光谱图相比,发射峰位置并无变化,只是在同等条件下,表面功能化后的 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 发光强度更大。



插入图为 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 纳米粒子在980 nm激发光波长下的可见绿色上转换荧光照片。

(a) 修饰前



(b) 修饰后

图2 $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ 纳米材料修饰前后的荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescent spectrum of $NaYF_4:Yb^{3+}Er^{3+}$ nanoparticles before and after the surface modification

实验制备的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒是黑色粉末状固体,超声后在水中分散形成黑色悬浊液。在外加磁铁作用下,可以在2 min内实现聚集,这种快速有效的富集作用能极大地提高分离效率。图3(a)所示

为磁性纳米颗粒的 TEM 电镜表征,由图可知,制备的磁性纳米颗粒粒径在 35~55 nm。为了使磁性纳米颗粒能与生物分子反应,用 APTES 对颗粒表面进行氨基化修饰,图 3(b)所示为氨基化磁性纳米颗粒的红外光谱图。

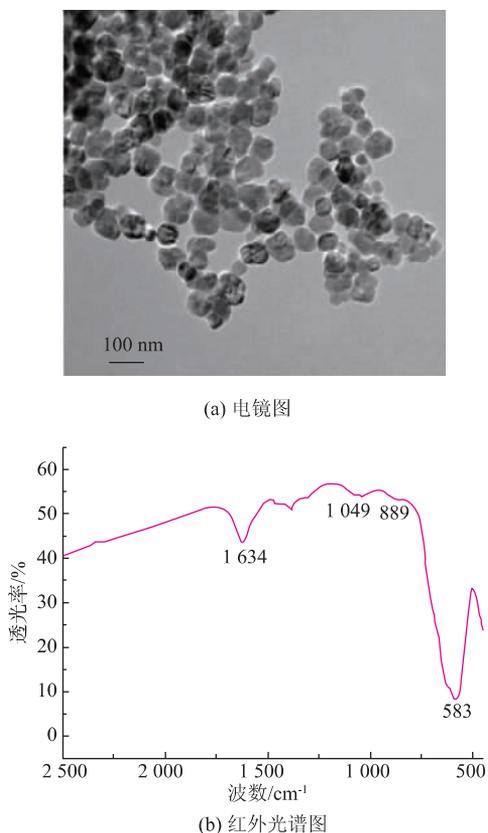


图 3 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒的 TEM 电镜图和 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒表面氨基化修饰后的红外光谱图

Fig. 3 TEM image of Fe₃O₄ nanoparticles and the FT-IR spectra of Fe₃O₄ nanoparticles functionalized with APTES

583 cm⁻¹ 处的强峰是 Fe—O 的振动峰,因在制备 Fe₃O₄ 纳米颗粒时引入了 1,6-己二胺,1 634 cm⁻¹ 处为一级胺的 N—H 剪式振动吸收峰,889 cm⁻¹ 和 1 049 cm⁻¹ 处为胺的 N—H 摇摆振动吸收峰,表明氨基基团已成功地包覆在 Fe₃O₄ 颗粒表面。

2.2 纳米材料与亲和素的偶联

由于亲和素在 280 nm 有吸收,而上转换荧光纳米颗粒和磁性纳米颗粒无紫外特征吸收,所以可以用紫外分光光度法对上转换纳米颗粒、磁性纳米颗粒与亲和素的结合情况进行表征。图 4 中 a 为亲和素原液的紫外吸收谱图,b 为上转换纳米颗粒与

亲和素原液反应结束离心后的上清液的紫外吸收谱图,c 为磁性纳米颗粒与亲和素原液反应结束离心后的上清液的紫外吸收谱图。

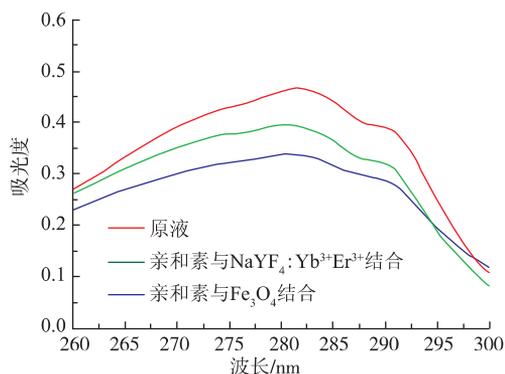


图 4 亲和素原液以及亲和素与氨基化的 NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺、Fe₃O₄ 纳米颗粒结合后离心所得上清液的紫外可见吸收光谱图

Fig. 4 Absorbance spectra of avidin solution and supernatant after avidin conjugated amino-functionalized NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺ nanoparticles and supernatant after avidin conjugated amino-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles

可以看到,上转换纳米颗粒、磁性纳米颗粒的上清液中亲和素的量都有不同程度的下降,证实了亲和素与两种纳米颗粒表面的氨基连接成功。

2.3 纳米探针的优化分析

磁分离捕获探针的优化是以 2 mg/mL 磁性纳米材料结合 50 nmol/L 捕获 DNA 作为原始浓度,设为 100%,然后按照不同的稀释倍数做 6 个梯度,分别表示为 100%,50%,25%,10%,5%,2.5%,加入等量的目标 DNA (10 pmol/L) 做优化分析。

由图 5(a)可以得到,随着磁分离捕获探针体积分数的升高,在 2.5%~10% 之间,荧光强度显著增强,而之后体积分数增大,其荧光强度的信号增加并不大。即将磁分离捕获探针原始浓度稀释至原液的 10% 时,此时的磁分离捕获探针体积分数为最佳。

为了获得高灵敏度,理想的纳米颗粒修饰的显示探针 DNA 应该是由一个荧光纳米颗粒结合一个探针 DNA 组成,并且一个荧光纳米颗粒修饰的 DNA 探针可以检测一个目标 DNA。理论上,当杂交反应发生时,可以检测到单个的目标 DNA。但是由于纳米颗粒-DNA 探针会发生非特异性连接和物理吸附,所以检出限很难低至单个目标 DNA。而且,如

果纳米颗粒表面修饰不完全或者没有进行有效的清洗,非特异性连接可能造成较高的背景信号。合适的表面修饰和有效的清洗对于防止非特异性连接是十分重要的。

上转换荧光探针的优化是以 2 mg/mL 上转换纳米材料结合 50 nmol/L 显示 DNA 作为原始浓度,设为 100%,然后按照不同的稀释倍数做 5 个梯度,分别表示为 100%,80%,60%,40%,20%,并用采用磁分离捕获探针的最优条件下测量 10 pmol/L 目标 DNA 的荧光强度。

实验结果如图 5(b)所示,检测的目标 DNA 的浓度为 10 pmol/L,当荧光纳米探针的体积分数从 20%增加到 60%时,荧光强度有明显的增强。但当荧光纳米探针体积分数大于 60%时,由于探针 DNA 序列与目标 DNA 序列特异性结合,荧光信号增加不明显。因此,当显示探针体积分数为 60%时,即为原始浓度的 60%时为最佳的荧光纳米探针体积分数。

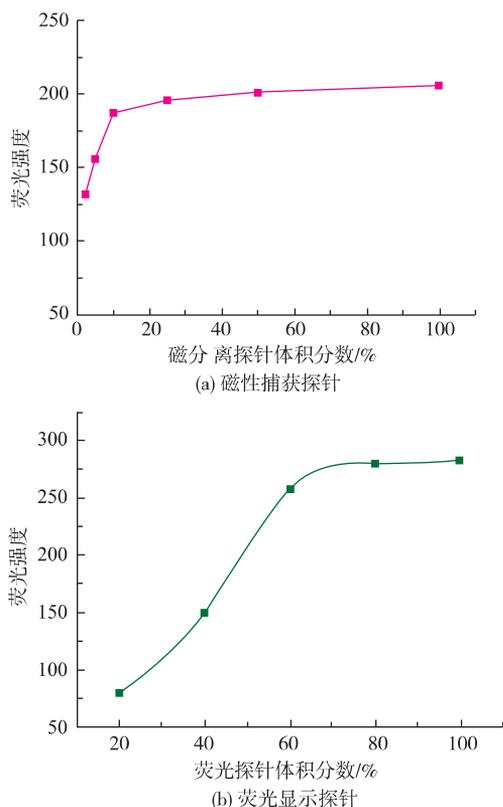
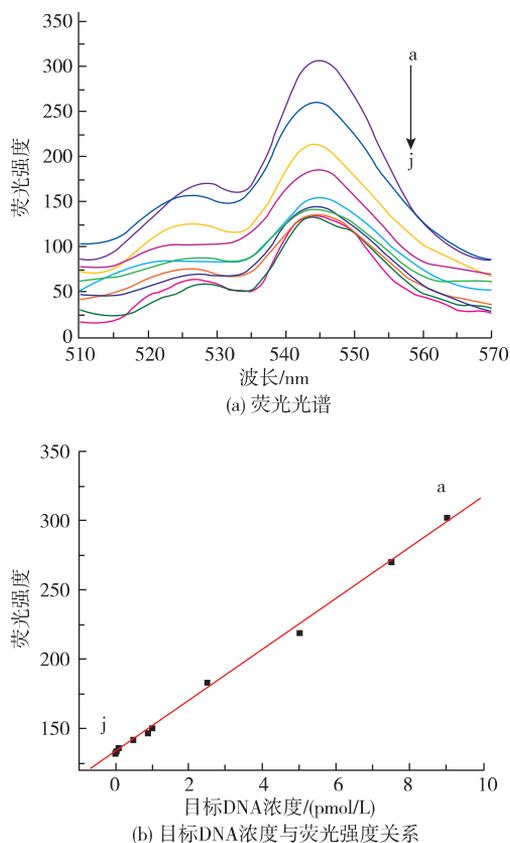


图 5 磁性捕获探针和荧光显示探针的体积分数与荧光强度关系曲线

Fig. 5 Calibration curve for different concentrations of the magnetic capture probe and the fluorescent signal probe and their corresponding fluorescent intensity

2.4 目标 DNA 的检测分析

在选定的最佳条件下,考察了不同浓度目标 DNA 的荧光强度,图 6(a)为不同浓度目标 DNA 加入检测体系中所获得的荧光光谱图,荧光强度随目标 DNA 浓度的降低而下降。研究发现(图 6(b)),荧光强度与目标 DNA 浓度在 0.01~10 pmol/L 浓度范围内呈良好的线性关系,线性回归方程 $I=18.495 9 [DNA](\text{pmol/L})+132.997 4$, $R^2=0.998 0$,检出下限为 3 fmol/L。11 次重复测量 1 pmol/L 目标 DNA 来评价该方法的精密度,相对标准偏差为 2.6%,可见本章所述方法具有较高的灵敏度且精密度良好。



目标 DNA 浓度 a—j:9 pmol/L,7.5 pmol/L,5 pmol/L,2.5 pmol/L,1 pmol/L,0.9 pmol/L,0.5 pmol/L,0.1 pmol/L,0.05 pmol/L,0.01 pmol/L

图 6 不同浓度目标 DNA 检测所得荧光光谱图和目标 DNA 浓度与荧光强度的关系曲线

Fig. 6 Fluorescence spectrum recorded by different concentration of target DNA ranging from a to j respectively with the proposed method and corresponding calibration curve for different concentrations of target DNA with the proposed method

按照上述标准操作过程,测定了相同浓度(10 pmol/L)的完全匹配目标链和随机对照 DNA 链的荧光信号。实验结果如图 7 所示,若把完全匹配目标链的相对发光强度定为 100,则随机对照链为 1.45,表明本文作者建立的方法具有良好的选择性。

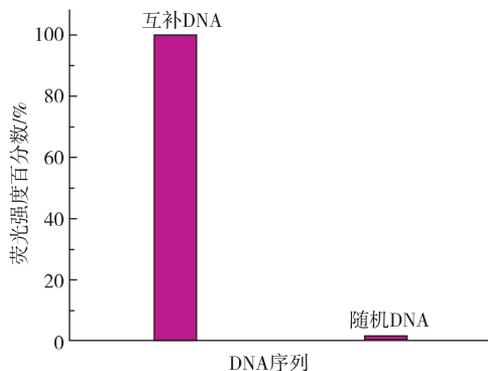


图 7 本方法对沙门氏菌分析的特异性评价

Fig. 7 Specificity evaluation of the proposed method

2.5 沙门氏菌 DNA 的提取与检测

取过夜培养的细菌培养物,于 OD₆₀₀ 测其菌体浓度,然后取菌液进行梯度稀释(10⁻¹~10⁻⁸),紫外分光光度计测得各稀释梯度 OD 值在 1.0~2.0 间,符合成品试剂盒的提取要求。各取 100 μL 不同稀释度的菌液进行平板计数,并取相同体积菌液采用成品试剂盒提取沙门氏菌 DNA。以所提取 DNA 作为目标 DNA,采用所建立方法体系进行检测。将平板计数得到的数据与荧光光谱仪得到的荧光强度进行

分析处理,可以得到同体积的菌液经过平板计数和用本方法检测的荧光强度具有良好的相关性(图 8),线性范围在 90~6 500 cfu/mL,回归方程为 $I=0.008\ 43[\text{cfu}](\text{cfu/mL})+234.447\ 9$, $R^2=0.998\ 2$,检出限为 17 cfu/mL。

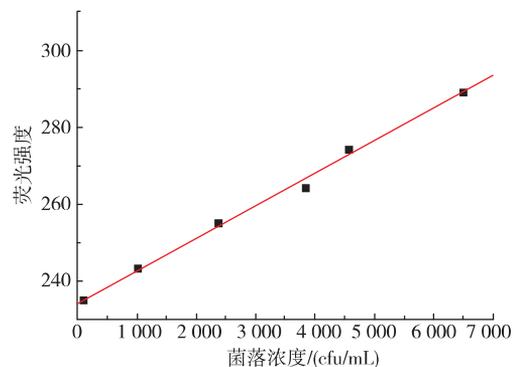


图 8 荧光强度与沙门氏菌菌落浓度的关系曲线

Fig. 8 Calibration curve of the Salmonella bacterial count and the fluorescent intensity

3 结 语

以 NaYF₄:Yb³⁺Er³⁺上转换荧光纳米颗粒为荧光显示探针,结合磁性纳米材料的磁分离富集作用实现了对沙门氏菌目标 DNA 的高灵敏检测,检出下限为 3 fmol/L,具有较高的检测灵敏度和特异性。实验方法操作简便,有望应用于乳制品中沙门氏菌的检测。

参考文献:

- [1] Gao X H, Yang L, Petros J A, et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2005, 16(1): 63-72.
- [2] Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, et al. Biological applications of quantum dots[J]. **Biomaterials**, 2007, 28(31): 4717-4732.
- [3] Wang X, Li Y D. Monodisperse nanocrystals: general synthesis, assembly, and their applications[J]. **Chemical Communications**, 2007, 28: 2901-2910.
- [4] Shen J, Sun L D, Yan C H. Luminescent rare earth nanomaterials for bioprobe applications[J]. **Dalton Transactions**, 2008, 42: 5687-5697.
- [5] Boyer J C, Vetrone F, Cuccia L A, et al. Synthesis of colloidal upconverting NaYF₄ nanocrystals doped with Er³⁺, Yb³⁺ and Tm³⁺, Yb³⁺ via thermal decomposition of lanthanide trifluoroacetate precursors[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2006, 128(23): 7444-7445.
- [6] Chen J, Zhao J X. Upconversion nanomaterials: Synthesis, mechanism, and applications in sensing[J]. **Sensors**, 2012, 12(3): 2414-2435.
- [7] Li Z Q, Zhang Y. Monodisperse silica-coated Polyvinylpyrrolidone/NaYF₄ nanocrystals with multicolor upconversion fluorescence emission[J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2006, 45(46): 7732-7735.
- [8] Yi G S, Sun B Q, Yang F Z, et al. Synthesis and characterization of High-Efficiency nanocrystal Up-Conversion phosphors:

- Ytterbium and erbium codoped lanthanum molybdate[J]. **Chemistry of Materials**, 2002, 14(7):2910–2914.
- [9] Zeng J H, Su J, Li Z H, et al. Synthesis and upconversion luminescence of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb, Er³⁺ phosphors of controlled size and morphology[J]. **Advanced Materials**, 2005, 17(17):2119–2123.
- [10] Wei Y, Lu F Q, Zhang X R, et al. Synthesis of Oil-Dispersible Hexagonal-Phase and Hexagonal-Shaped NaYF₄:Yb, Er nanoplates[J]. **Chemistry of Materials**, 2006, 18(24):5733–5737.
- [11] Sandrock T, Scheife H, Heumann E, et al. High-Power Continuous-Wave upconversion fiber laser at room temperature[J]. **Optics Letters**, 1997, 22(11):808–810.
- [12] Ivanova S, Pelle F. Evaluating upconversion materials developed to improve the efficiency of solar cells: reply to comment[J]. **Journal of the Optical Society of America B**, 2010, 27(7):1356–1358.
- [13] Kik P G, Polman A. Cooperative upconversion as the gain-limiting factor in Er doped miniature Al₂O₃ optical waveguide amplifiers[J]. **Journal of Applied Physics**, 2003, 93(9):5008–5012.
- [14] Qian H S, Guo H C, Ho P C, et al. Mesoporous-Silica-Coated Up-Conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy [J]. **Small**, 2009, 5(20):2285–2290.
- [15] Zhang P, Steelant W, Kumar M, et al. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2007, 129(15):4526–4527.
- [16] Zhou J C, Yang Z L, Dong W, et al. Bioimaging and toxicity assessments of near-infrared upconversion luminescent NaYF₄:Yb, Tm nanocrystals[J]. **Biomaterials**, 2011, 32(34):9059–9067.
- [17] Cheng L, Yang K, Shao M, et al. Multicolor in vivo imaging of upconversion nanoparticles with emissions tuned by luminescence resonance energy transfer[J]. **The Journal of Physical Chemistry C**, 2011, 115(6):2686–2692.
- [18] Wang L Y, Li Y D. Green upconversion nanocrystals for DNA detection[J]. **Chemical Communications**, 2006, 24:2557–2559.
- [19] Wang L Y, Bao J, Wang L, et al. One-Pot synthesis and bioapplication of Amine-Functionalized magnetite nanoparticles and hollow nanospheres[J]. **Chemistry-A European Journal**, 2006, 12(24):6341–6347.
- [20] Kiselev M V, Gladilin A K, Melik-Nubarov N S, et al. Determination of cyclosporin a in 20% ethanol by a magnetic beads-based immunofluorescence assay[J]. **Analytical Biochemistry**, 1999, 269(2):393–398.
- [21] 王磊, 阎磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5):82–85.
WANG Cui, YAN Lei, ZENG Qing-zhu. Detection technologies and methods of Salmonella [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2007, 23(5):82–85. (in Chinese)
- [22] 钟伟军, 赵明秋, 邓中平, 等. 荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3):220–224.
ZHONG Wei-jun, ZHAO Qing-ming, DENG Zhong-ping, et al. Establishment and preliminary application of real-time PCR method for detection of salmonella in food[J]. **Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine**, 2008, 30(3):220–224. (in Chinese)