

食源性致病菌的核酸可视微阵列检测技术

李云霞, 马生龙, 聂莹莹, 马莉萍*

(甘肃省科学院传感技术研究所 甘肃省传感器与传感技术重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 建立了一种快速检测 3 种食源性致病菌的核酸可视微阵列。分别设计与沙门氏菌 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因、志贺氏菌 *ipaH* 基因两端互补的基片探针和检测探针, 设计 3 种基因的特异靶序列, 特异靶序列或基因组 DNA 一端与固定在玻片上的氨基化基片探针杂交, 另一端与巯基化检测探针连接形成复合体。使胶体金与检测探针结合, 通过银染放大信号, 检测 3 种食源性致病菌 DNA。结果表明: 通过对检测探针分别与基因组 DNA、PCR 产物及特异靶序列的杂交银染结果比较, 3 种结果都显示阳性, 表明该方法可直接利用基因组 DNA 实现对食源性微生物的快速、高效检测, 对 3 种食源性致病菌 DNA 的检测下限为 1 pmol/L, 在 1 mmol/L ~ 1 pmol/L 浓度范围内得到肉眼可见的清晰结果。探针与基因组 DNA 的杂交实验结果表明, 微阵列对 3 种食源性微生物的检测具有较好的特异性。说明该技术可快速、简便检测食源性微生物, 市场前景广阔。

关键词: 食源性致病菌; 基因组 DNA; 可视化微阵列; 银染

中图分类号: R 446.5 文章编号: 1673-1689(2020)09-0105-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.09.015

Nucleic Acid Visual Microarray Detection of Food-Borne Pathogenic Bacteria

LI Yunxia, MA Shenglong, NIE Yingying, MA Liping*

(Gansu Key Laboratory of Sensor and Sensing Technology, Institute of Sensor Technology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: A visualized microarray for rapid detection of nucleic acid of three food-borne pathogenic bacteria was developed. Substrate and detection probes which were complementary to both ends of *Salmonella invA*, *Staphylococcus aureus nuc* and *Shigella ipaH* genes were designed, respectively. Specific target sequences of three genes were also designed. One end of the specific target sequence or genomic DNA was hybridized with the amination probe fixed on the slide, and the other end was complementary to the sulfhydrylation probe to form a complex. The detection probe was connected with colloidal gold, and the signal was amplified by silver staining for the detection of food-borne pathogenic bacteria. Through comparative analysis of hybridization silver staining with genomic DNA, PCR products and specific target sequences, all results were positive, which demonstrated that the method could directly use genomic DNA to detect food-borne microorganisms rapidly and efficiently. The detection limit of genomic DNA of three foodborne pathogenic bacteria was 1 pmol/L,

收稿日期: 2019-06-14

基金项目: 甘肃省科学院应用开发项目(2016JK-07); 甘肃省科技计划资助项目(18JR3RA249)。

作者简介: 李云霞(1974—), 女, 本科, 高级工程师, 主要从事微生物传感技术研究。E-mail: 864315576@qq.com

* 通信作者: 马莉萍(1973—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事生物传感技术方面研究。E-mail: 279559916@qq.com

and clear results could be observed by naked eyes in the concentration range of 1 mmol/L ~1 pmol/L. The results of hybridization between probe and genomic DNA indicated that visual microarray had good specificity for the detection of microorganisms. Therefore, this method can detect food-borne microorganisms quickly and easily, and has broad market prospects.

Keywords: food-borne pathogenic bacteria, genomic DNA, visual microarray, silver staining

近年来,食源性微生物中毒成为一个广泛且日益严重的全球性公共卫生问题^[1-2]。调查表明,沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌是我国主要的食源性致病菌,由其引发的食物中毒平均发病率和病死率高,食品安全问题突出^[3]。加强对有害病菌的检测研究,从而及时准确地检测出食品中的致病菌,是控制食品中病原菌污染和各类传染病蔓延的根本措施^[4]。目前,国内外在食品中病原菌检测时常用的检测方法主要有传统生化培养检测法、免疫学方法、探针杂交、PCR法等^[5-8],这些方法普遍存在速度慢或者假阳性率高的缺点,在相当大的程度上限制了对其快速检测和识别能力。因此,有必要建立起食源性致病菌的高通量、快速、准确的检测体系,以确保在相对较短的时间内正确判定食品的安全性,有效地预防和控制食源性疾病。

可视化检测技术^[9-10]是一种新型技术。与传统检测方法不同,它可以将特定的分子结合转变成可以直接通过肉眼观察到的信号,摆脱普通检测技术对专业人员和大型设备的依赖,具有快速、准确、方便的特点,在致病菌检测中具有良好的应用前景^[11-13]。本研究中利用纳米金结合银染放大信号的方法,建立了一种可视化的食源性微生物快速检测微阵列,实现对3种食源性微生物的可视化快速检测。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

沙门氏菌(21842)、金黄色葡萄球菌(10001)、志贺氏菌(10865):购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);纳米金(自制)、醛基化玻片(自制)、吐温20(Tween 20)、牛血清蛋白(BSA)、0.1 mol/L磷酸缓冲液(PB)(pH 7.2)、0.1 mol/L磷酸缓冲生理盐水(PBS)、0.1 mol/L NaCl、0.2×洗液(SSC:质量分数0.1%十二烷基磺酸钠(SDS)、0.03 mol/L NaCl、0.3 mmol/L $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)、对苯二酚、柠檬酸、柠檬酸钠、硝酸银、DNA Marker、所需探针序列:由

生工生物公司合成;核酸提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)、PCR 扩增试剂盒:购自上海生工生物有限公司。

杂交液:45.5 μ L 检测探针,17.5 μ L 20×SSC,3 μ L 质量分数10% SDS,5 mg 硫酸葡聚糖,2 μ L 去离子甲酰胺,32 μ L 去离子水。

JEM-2100HR 高分辨透射电镜:日本电子产品;Bio-Rad T100 PCR 仪、Bio-Rad powerpac Universal 电泳仪、Bio-Rad ChemiDoc MP 凝胶成像分析系统:美国伯乐公司产品;HZQ-FX 全温振荡器:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司产品;EMS-20 恒温水浴锅:金坛市宏凯仪器厂制造;岛津紫外分光光度计:日本岛津公司产品;Sartorius ST124 分析天平:德国赛多利斯公司产品;H1650 型离心机:湖南湘仪公司产品;微量移液器:德国 Eppendorf 公司产品;DZF-6050 真空干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司产品;压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂制造。

1.2 引物、探针的设计与合成

在 GenBank 中获取细菌核酸序列,找到沙门氏菌 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因序列、志贺氏菌 *ipaH* 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计与 *invA* 基因、*nuc* 基因、*ipaH* 基因序列两端互补的特异性探针(氨基化修饰的基片探针,巯基化修饰的检测探针)和 PCR 引物,并利用 NCBI 数据库在线 Blast 分析筛选。引物和探针均由上海生工生物有限公司合成。设计的探针和 PCR 引物见表 1—2。

1.3 检测探针的标记

检测探针标记到纳米金表面:取 10 nmol/L 粒径为 17 nm 的纳米金溶液 1 mL,以 9 000 r/min 离心 40 min 弃上清液,加入 100 μ L 去离子水重悬;加浓度为 100 μ mol/L 的检测探针 5 μ L,使总探针的终浓度达到 5 μ mol/L,在室温中放置过夜;之后分 3 次逐渐加入 1 mol/L NaCl、0.1 mol/L PB (pH 7.2)至

表 1 核酸探针序列表

Table 1 List of nucleic acid probe sequences

名称	探针序列 5'-3'
沙门氏菌芯片探针	NH ₂ -ATGTTGTCCTGCCCCTGCTAAGAGA
沙门氏菌检测探针	CACCAGAGAAAGGGATAACGCCGAT-SH
沙门氏菌靶探针	ATCGGCGTTATCCCTTTCTCTGCTG...CTACCAGGGGCAGGACAACAT
志贺氏菌芯片探针	NH ₂ -TCCGCAGAGGCACTGAGTTT
志贺氏菌检测探针	CGACCTGTTACGGAATCCGGAGGTATTGCG-SH
志贺氏菌靶探针	CGCAATACCTCCGGATTCCGTGAACAGGTC...CTGGAAAACTCAGTGCCTCTGCCGA
金黄色葡萄球菌靶探针	AGATAACGGCGTAAATAGAAGTGG...TATGCTCCTGAAGCAAGTGCA
金黄色葡萄球菌检测探针	AGATAACGGCGTAAATAGAAGTGG-SH
金黄色葡萄球菌芯片探针	NH ₂ -TGCACCTTGCTTCAGGACCATA...

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Sequences of PCR primers

名称	探针序列 5'-3'
沙门氏菌 <i>invA</i> 基因	ATCGGCGTTATCCCTTTCTCTGCTA...TCTCTTACCAGGGGCAGGACAACAT
沙门氏菌引物 F	ATCGGCGTTATCCCTTTCTCTGCTG
沙门氏菌引物 R	ATGTTGTCCTGCCCCTGCTAAGAGA
志贺氏菌 <i>ipaH</i> 基因	CGCAATACCTCCGGATTCCGTGAACAGGTC...CTGGAAAACTCAGTGCCTCTGCCGA
志贺氏菌引物 F	CGACCTGTTACGGAATCCGGAGGTATTGCG
志贺氏菌引物 R	TCCGCAGAGGCACTGAGTTT
金黄色葡萄球菌 <i>nuc</i> 基因	AGATAACGGCGTAAATAGAAGTGG...TATGCTCCTGAAGCAAGTGCA
金黄色葡萄球菌引物 F	AGATAACGGCGTAAATAGAAGTGG
金黄色葡萄球菌引物 R	TGCACCTTGCTTCAGGACCATA

最终浓度分别为 0.1 mol/L 和 10 mmol/L, 充分混匀, 室温放置 30 h; 用 0.01 mol/L PB (0.1 mol/L NaCl) 溶液 9 000 r/min 离心 40 min, 清洗 2 次, 弃上清液, 再加 100 μ L 含有 1 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L PB (pH 7.2) 的重悬液, 于 4 $^{\circ}$ C 下储存备用。

1.4 微阵列的制备

将 5 个不同浓度 (1 mmol/L、100 nmol/L、1 nmol/L、100 pmol/L、1 pmol/L) 氨基化探针点样于醛基化基片的表面, 点样直径 100 μ m, 点间距 3 mm, 点样量 0.1 μ L, 每个浓度多次重复, 水浴 37 $^{\circ}$ C 固定 18 h, 经质量浓度为 10 mg/mL 的 BSA 封闭未反应的醛基, 37 $^{\circ}$ C 水浴放置 1 h, 用 0.1 mol/L 的 PBST (1 $\times$ PBS+质量分数 0.05% 吐温) 清洗 2 次, 每次 3 min, 干燥后备用。

1.5 细菌基因组 DNA 的提取和扩增

快速提取细菌基因组 DNA, 用试剂盒提取: 将细菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12 h, 取 3 mL 培养液 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 mL 进行核酸提取, 按 DNA 快速

提取试剂盒说明书操作。

20 μ L PCR 反应体系: 10 $\times$ Taq Buffer 含 KCl 2 μ L, 引物各 0.5 μ L (100 μ mol/L), 4 种 dNTP 混合物各 1 μ L (0.2 mmol/L), 模板 DNA 1 μ L (100 μ mol/L), 1.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 加三蒸水至 20 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 经变性 (94 $^{\circ}$ C, 30 s), 退火 (55 $^{\circ}$ C, 30 s), 延伸 (72 $^{\circ}$ C, 30 s), 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.6 微阵列的杂交

在基片的每个点样区滴加 1 μ L 杂交液, 并将基片放置在保湿盒中, 置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中杂交 2.5 h。清洗液 (0.03 mol/L 氯化钠、0.3 mmol/L SSC、质量分数 0.1% SDS) 预热到 42 $^{\circ}$ C, 轻轻冲洗芯片 3 次。ddH₂O 冲洗 2 次, 氮气吹干。

1.7 银染

取 350 μ L 柠檬酸缓冲液, 加入 150 μ L 对苯二酚 (0.51 mol/L), 再加入 50 μ L AgNO₃ 溶液, 常温避光银染 10 min, 终止银染反应, 用清水冲洗 3 次观察结果。

2 结果与讨论

2.1 检测探针的标记

从图 1(a)中可见 17 nm 纳米金颗粒均匀,界面清晰而且分散性良好;图 1(b)(c)(d)标记探针的纳米金可见周围有一层物质,纳米金在一定范围有聚集现象,表明探针已经标记到了纳米金上。随着探针的标记,纳米金粒径增大,对应的紫外吸收峰有向长波段红移的趋势^[14-15];由图 1(e)可看出:标记前纳米金最大吸收峰值在 521 nm;标记沙门氏菌探针后最大吸收峰在 528 nm;标记金黄色葡萄球菌探针后的最大吸收峰在 527 nm;标记志贺氏菌探针后的最大吸收峰在 525 nm,标记了探针的纳米金最大吸收峰波长移动了 7 nm。这也说明核酸探针标记到了纳米金颗粒表面,使纳米金粒子尺寸和形状有所改变,改变了纳米金的光谱特性^[16]。

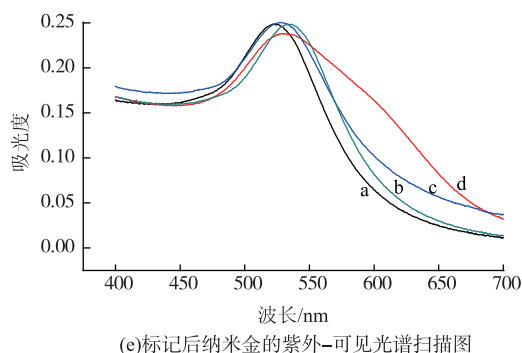
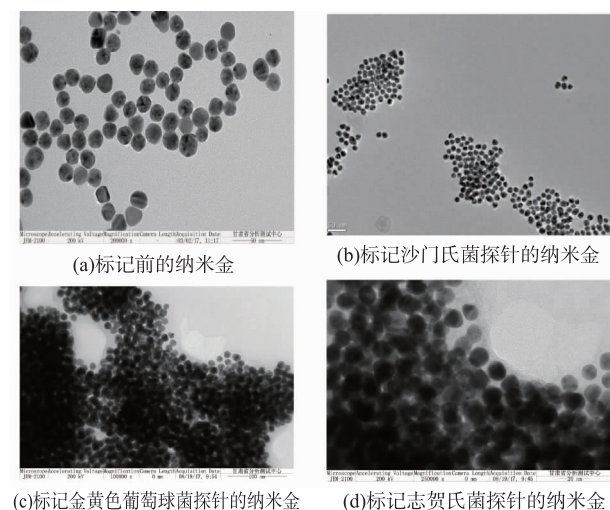
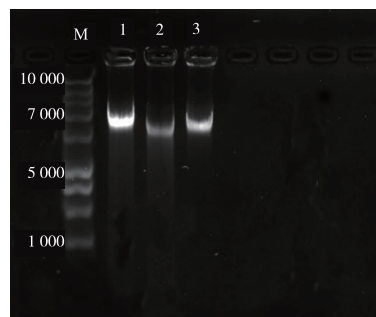


图 1 纳米金及修饰后的 3 种检测探针的 TEM 图和紫外-可见光谱扫描图

Fig. 1 Scanning results of AuNP probes with TEM and UV-Vis spectrum

2.2 细菌基因组 DNA 的提取结果

将提取的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌的基因组 DNA, 采用分光光度计对提取的 DNA 溶液纯度、浓度进行检查, 在 1.5 g/dL 琼脂糖凝胶中, 100 V 电压下, 电泳时间 30 min 进行电泳检测, 凝胶成像仪观察分析, 与标记物 (Marker) 相比在 6 500 bp 附近有 3 条明亮条带 (见图 2)。



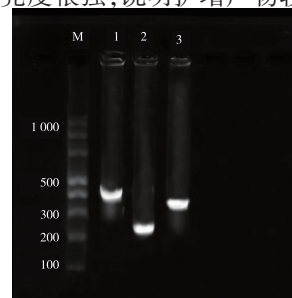
M: 10 000 bp Marker; 1: 沙门氏菌基因组; 2: 金黄色葡萄球菌基因组; 3: 志贺氏菌基因组

图 2 3 种菌的基因组 DNA 电泳图

Fig. 2 *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Shigella* DNA electrophoresis

2.3 细菌基因组 DNA 的 PCR 扩增

通过查阅沙门氏菌 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因、志贺氏菌 *ipaH* 基因的相关文献, 并根据本实验中探针的位置, 从表 1 中相对应引物对 3 株致病菌株进行扩增。对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌 PCR 扩增结果做凝胶电泳: 1.5 g/dL 琼脂糖凝胶, 100 V 电压, 电泳时间 25 min, 凝胶成像仪观察分析, 1、2、3 泳道分别得到长度为 425、280、312 bp 左右目的片段, 片段符合预期扩增片段长度。而且泳道亮度很强, 说明扩增产物较多 (见图 3)。



M: 1 000 bp Marker; 1: 沙门氏菌基因组; 2: 金黄色葡萄球菌基因组; 3: 志贺氏菌基因组

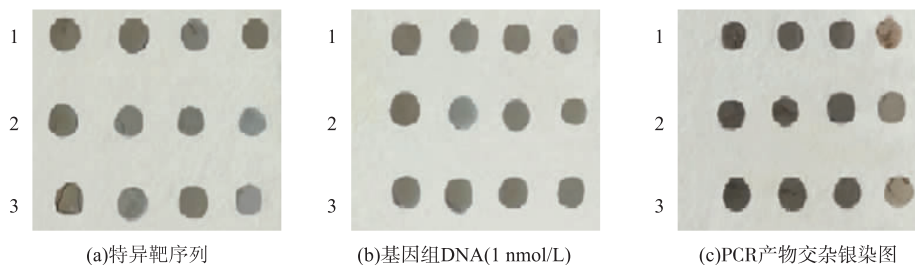
图 3 沙门氏菌 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因序列和志贺氏菌 *ipaH* 基因 PCR 电泳图

Fig. 3 *Salmonella invA* gene, *Staphylococcus aureus nuc* gene and *Shigella ipaH* gene PCR

2.4 微阵列杂交

将检测探针分别与基因组 DNA (1 nmol/L)、

PCR 产物及特异靶序列在醛基化玻片上进行杂交,银染放大信号后呈现出肉眼可见的信号,见图 4。



1:沙门氏菌、2:金黄色葡萄球菌、3:志贺氏菌

图 4 特异靶序列、DNA 及 PCR 银染显色

Fig. 4 Results of silver staining with specific target sequences, DNA and PCR

由实验可以看出检测探针分别与基因组 DNA、PCR 产物及特异靶序列杂交,银染显色,三者的结果一致都显示阳性,证明了提取的基因组 DNA 与检测探针杂交、PCR 产物与检测探针杂交的方法都是可行的,但从操作的过程来讲用提取的基因组 DNA 与检测探针杂交银染显色,这一方法更简便快捷。

2.5 微阵列特异性实验

采用 3 种检测探针分别与 3 种菌的基因组 DNA 做杂交实验,通过银染放大信号,研究其特异性。

如图 5(a)为特异靶序列 *invA* 只与沙门氏菌基因组 DNA 有杂交结合,结果显示阳性,而与金黄色葡萄球菌基因组 DNA、志贺氏菌基因组 DNA 没有杂交反应,结果显示阴性;图 5(b)为特异靶序列 *nuc* 只和金黄色葡萄球菌基因组 DNA 有杂交结合显示阳性结果,而与沙门氏菌、志贺氏菌 DNA 没有杂交反应,结果显示阴性;图 5(c)为特异靶序列 *ipaH* 只和志贺氏菌基因组 DNA 有杂交结合,显示阳性,而与沙门氏菌、金黄色葡萄球菌 DNA 没有杂交反应,结果显示阴性。表明该方法的检测具有较高的特异性。

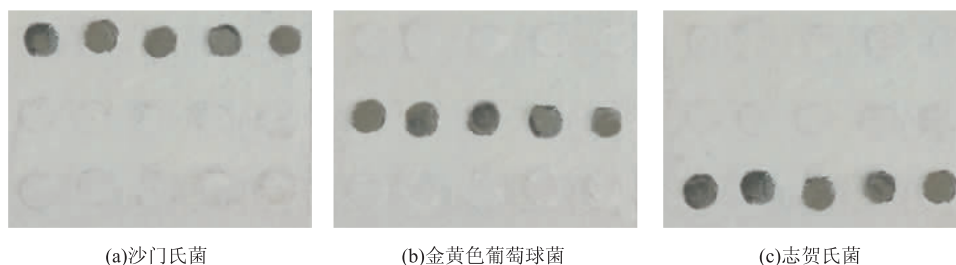


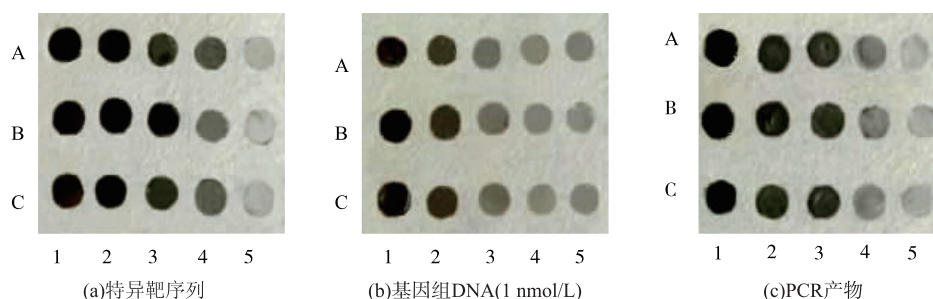
图 5 微阵列特异性实验结果

Fig. 5 Specific experimental results of microarray substrate

2.6 微阵列灵敏度实验

将特异靶序列、基因组 DNA (1 nmol/L) 和 PCR 产物,使用 UV-2550 岛津紫外分光光度计测定其浓度,稀释原液配成 5 个不同浓度 (1 mmol/L、100 nmol/L、1 nmol/L、100 pmol/L、1 pmol/L),进行杂交显色实验(见图 6)。

由实验可以看出在 5 种不同浓度下,检测探针分别与基因组 DNA、PCR 产物及特异靶序列的杂交银染,结果一致都显示阳性,但随着浓度的减小,阳性信号相应的减弱。实验结果显示该微阵列检出限为 1 mmol/L ~ 1 pmol/L。



A:沙门氏菌、B:金黄色葡萄球菌、C:志贺氏菌;1—5 分别为 5 种不同浓度 (1 mmol/L、100 nmol/L、1 nmol/L、100 pmol/L、1 pmol/L)

图 6 微阵列基片灵敏度实验结果

Fig. 6 Sensitivity experimental results of microarray substrate

3 结 语

银染信号放大技术已在致病菌的检测中被广泛应用,其有效提高了检测灵敏度。李向丽等^[17]采用纳米金标记结合银染信号放大技术实现了对福氏志贺氏菌的检测,银染后检测信号增强了上万倍,对目标菌 DNA 检测限达 2 fmol/L。刘小兰等^[18]将 PCR 扩增的金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因与生物素探针、纳米金探针形成的三明治结构固定在已包被链霉亲和素的微孔板上,然后在低温下逐步银染显色,从而放大检测信号,检测灵敏度为 1 pmol/L。

作者通过银染放大信号技术,建立了一种同时检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌的可视化微阵列,为 3 种食源性微生物的检测提供了快速、准确、灵敏的方法。首先对 *invA* 基因序列、*nuc* 基因序列、*ipaH* 基因序列进行扩增,分别得到 425、280、312 bp 左右 PCR 产物。通过比较检测探针与基

因组 DNA、PCR 产物及特异靶序列的杂交银染,目标菌都显示了阳性,非目标菌显示阴性。在微阵列特异性实验中,基因组 DNA 跟设计对应检测探针杂交结果显示阳性,跟其他菌检测探针不杂交,结果显示阴性,证明了该方法具有特异性。在微阵列灵敏性实验中,检测探针分别与基因组 DNA、PCR 产物及特异靶序列杂交时,在 1 mmol/L ~1 pmol/L 浓度范围内,银染结果肉眼清晰可见。通过上述实验数据比较,证明作者建立的可视化核酸微阵列检测食源性微生物的方法是成功的。

作者建立的可视化核酸微阵列对食源性致病菌的检测灵敏、准确、简便,实用性强,摆脱了基因芯片在杂交结果分析阶段对荧光扫描仪的依赖,杂交结果明显直观。为食源性致病菌的检验提供了新的思路和方法,可在基层或偏远地区的快速初筛领域推广应用。

参考文献:

- [1] MOHAMADI E, MOGHADDASI M, FARAHBAKHSI A, et al. A quantum-dot-based fluoroassay for detection of food-borne pathogens[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, 174: 291-297.
- [2] DEB P. Foodborne Diseases, Environmental Pollution and the Burden of Food-Borne Diseases[M]. Amsterdam: Elsevier, 2018: 473-500.
- [3] WANG Y Z, YU Y G, HUANG X L, et al. An enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Science*, 2013, 34(17): 171-175.
- [4] ARORA P, SINDHU A, DILBAGHI N, et al. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 28(1): 1-12.
- [5] KIM H J, PARK S H, LEE T H, et al. Microarray detection of food-borne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(2): 238-246.
- [6] YU Q, ZHAI L G, BIE X M, et al. Survey of five food-borne pathogens in commercial cold food dishes and their detection by

- multiplex PCR[J]. **Food Control**, 2016, 59: 862-869.
- [7] ZHOU B L, XIAO J W, LIU S F, et al. Simultaneous detection of six food-borne pathogens by multiplex PCR with a GeXP analyzer[J]. **Food Control**, 2013, 32(1): 198-204.
- [8] ARNANDIS-CHOVER T, MORAIS S, TORTAJADA-GENARO L A, et al. Detection of food-borne pathogens with DNA arrays on disk[J]. **Talanta**, 2012, 101(15): 405-412.
- [9] YANG C, FENG W J, LI Y, et al. Graphene oxide based ratiometric fluorescent paper sensor for hypochlorous acid visual detection[J]. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 2019, 375: 141-147.
- [10] PANG B, YAO S, XU K, et al. A novel visual-mixed-dye for LAMP and its application in the detection of foodborne pathogens [J]. **Analytical Biochemistry**, 2019, 574: 1-6.
- [11] JUNILLON T, VIMONT A, MOSTICONE D, et al. Simplified detection of food-borne pathogens: an in situ high affinity capture and staining concept[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2012, 91(3): 501-505.
- [12] SUAIFAN G A R Y, NOBANI S W A A, SHEHADEH M B, et al. Engineered colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* extracellular proteases[J]. **Talanta**, 2019, 198: 30-38.
- [13] SUAIFAN G A R Y, ALHOGAIL S, ZOYEOB M. Paper-based magnetic nanoparticle-peptide probe for rapid and quantitative colorimetric detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2017, 92: 702-708.
- [14] 朱晓光. 麻疹病毒属 6 种重要病毒目视化基因芯片检测方法的建立及其初步应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- [15] 杨冰, 黄乐群. 双功能化胶体金纳米探针的制备及其特异性考察[J]. 浙江大学学报(医学版), 2010, 39(3): 296-300.
- [16] YOU Q H, SHAO P L, LING K, et al. A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering[J]. **Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy**, 2005, 61(13/14): 2861-2866.
- [17] LI X L, TAN G L, YUAN X J. Fast detection of *Shigella flexneri* by gold nanoparticle labeling-silver staining signal amplification [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2011, 27(11): 1387-1392.
- [18] LIU X L, QI T Q, LIN T. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by nanogold labeling-silver staining[J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 2012, 28(7): 671-676.

科技信息

欧盟批准 L-组氨酸盐酸盐一水合物作为所有动物的饲料添加剂

据欧盟官方公报消息, 2020 年 7 月 24 日, 欧盟委员会发布法规 (EU) 2020/1090 号条例, 根据欧洲议会和理事会法规 (EC) No 1831/2003, 批准 L-组氨酸盐酸盐一水合物 (L-histidine monohydrochloride monohydrate) 作为所有动物的饲料添加剂。

据条例, 这种 L-组氨酸盐酸盐一水合物由大肠杆菌 (*Escherichia coli*) NITE BP- 02526、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 菌株 KCCM 80172 或 KCCM 80179 生产。根据附件中规定的条件, 这种添加剂被授权作为动物营养添加剂所属添加剂类别为“营养添加剂”, 大肠杆菌 NITE BP- 02526 和谷氨酸棒杆菌 KCCM 80179 生产的 L-组氨酸盐酸盐一水合物也适用于添加剂类别“感官添加剂”。授权结束日期为 2030 年 8 月 16 日。本条例自发布之日起第二十天生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准 L-组氨酸盐酸盐一水合物作为所有动物的饲料添加剂 [EB/OL]. (2020-07-28). <http://news.foodmate.net/2020/07/567476.html>