

基于纸芯片的大肠杆菌检测的创新实验教学

涂琴^{1,*}, 陶安驹¹, 马彤彤^{1,2}, 王进义^{1,*}

¹西北农林科技大学化学与药学院, 陕西 杨凌 712100

²楚雄师范学院, 云南 楚雄 675099

摘要: 设计了一种基于微流控纸基芯片用于特异性检测*E. coli*的综合创新实验。制备纸基芯片, 在芯片上实现水样中*E. coli*的检测。主要内容包括纸芯片的制备, 纸芯片上*E. coli*的裂解和检测, 检测条件的优化, 以及实际样品中*E. coli*的检测。该实验结合学科前沿, 综合性和创新性较强。可实现“基础性实验→综合性实验→科研性实验”为特色的实践育人理念, 提高学生分析和解决问题的能力。

关键词: 大肠杆菌; 纸基芯片; 可视化定量检测; 创新实验

中图分类号: G64; O6

Innovative Experimental Teaching of *Escherichia coli* Detection Based on Paper Chip

Qin Tu^{1,*}, Anju Tao¹, Tongtong Ma^{1,2}, Jinyi Wang^{1,*}

¹ College of Chemistry & Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China.

² Chuxiong Normal University, Chuxiong 675099, Yunnan Province, China.

Abstract: An innovative experimental approach based on a microfluidic paper-based chip has been designed for specific detection of *Escherichia coli* (*E. coli*). The chip is fabricated for detecting *E. coli* in water samples. The main contents include the preparation of paper chips, lysis of *E. coli* on the chip, detection of *E. coli*, optimization of detection conditions, and detection of *E. coli* in actual samples. This experiment integrates cutting-edge disciplines, demonstrating robust comprehensive and innovative characteristics. It aligns with the practical education concept marked by the progression from “basic experiment → comprehensive experiment → research-oriented experiment”, effectively strengthening students’ capacities for problem analysis and solution.

Key Words: *E. coli*; Paper-based chip; Visual and quantitative detection; Innovative experimental

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) 是一种常见于人和许多动物肠道的常住菌, 作为温血动物肠道细菌的代表, *E. coli*被用作饮水和食物的卫生学指标。因此, 快速准确地检测水中的*E. coli*是预防和控制水污染的关键^[1]。

目前, 常用的检测*E. coli*的方法依赖于生物学方法, 通过分析化学方法检测*E. coli*的教学实验却未见报道。于是, 我们根据综合实验的实验性和基础性, 结合其可操作性和必要性, 针对本课题组多年基于微流控芯片进行生命分析化学检测的基础^[2], 创新设计了基于纸芯片的大肠杆菌检测的创新实验教学, 将科学知识与教育相结合, 以提高学生的科学素养和创造能力。

收稿: 2023-09-18; 录用: 2024-01-10; 网络发表: 2024-01-31

*通讯作者, Emails: tuqin@nwsuaf.edu.cn (涂琴); jywang@nwsuaf.edu.cn (王进义)

基金资助: 国家自然科学基金(21505105)

1 实验部分

1.1 实验目的

- (1) 了解*E. coli*常用的检测方法;
- (2) 掌握细菌的培养方法;
- (3) 掌握纸芯片的制备方法;
- (4) 掌握大肠杆菌的裂解和检测原理。

1.2 实验原理

*E. coli*的胞质空间和表面含有的 β -葡萄糖苷酸酶,被认为是检测*E. coli*的理想指标。据文献资料显示,97%的*E. coli*能够正常分泌该酶,因此在饮用水和食品样品的*E. coli*检测中,它被视为主要检测目标。

*E. coli*中的 β -葡萄糖苷酸酶能够将5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡萄糖苷酸盐(X-Gluc)分解为5-溴-4-氯-3-吡啶。随后,溴氯吡啶在空气氧化作用下转变为靛蓝染料,呈现蓝色^[3]。因此,本实验以X-Gluc作为底物。如图1所示,我们可以通过观察样品中颜色的有无来定性判断其是否含有*E. coli*,并通过颜色强度确定*E. coli*的浓度。

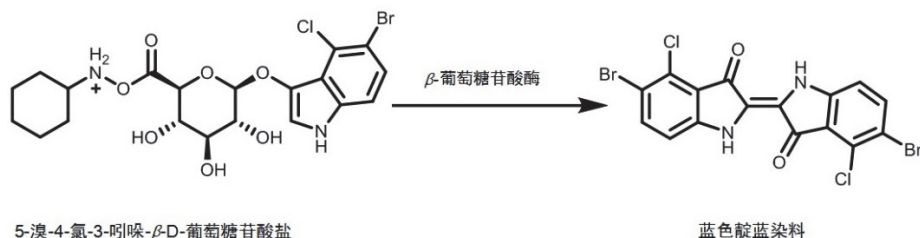


图1 *E. coli*的检测原理图

1.3 仪器与试剂

仪器: 匀胶机(日本Thinky公司)、电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、纯水仪(德国Sartorius公司)、电热板(甄诚现代实验仪器有限公司)、恒温摇床(上海苏坤实业有限公司)、pH计(中国上海精密科学仪器有限公司)、离心机(美国Beckman公司)、高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、电热式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)、数码相机(日本卡西欧公司)。

材料: Whatman No.1滤纸(美国GE公司)、硅片(上海祥精科技有限公司)、压花器、剪刀,在本地超市购买。

试剂: 多聚赖氨酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子、大肠杆菌(*E. coli* ATCC 25922),由实验室提供。5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡萄糖苷酸盐(美国Amresco分装)、食用色素、氢氧化钠、盐酸、超纯水、纯净水。

1.4 实验操作步骤

1.4.1 纸芯片的制备与修饰

首先,使用压花器在滤纸上切割出裂解区和检测区(直径0.80 cm),并裁剪出尺寸为0.15 cm \times 0.50 cm (长 \times 宽)的管道。接着,用3.0 cm \times 2.0 cm \times 0.10 cm的透明玻璃薄片将纸芯片封装起来。然后,将细菌裂解液(40 μ L)滴加到纸芯片的裂解区,并将一定浓度的X-gluc滴加到检测区。最后,在自然环境下避光晾干,待后续使用。

1.4.2 *E. coli*的裂解和检测

首先,用一定pH的PBS缓冲液将*E. coli*分散,然后滴加在滤纸芯片的裂解区,与预先滴加在裂解区的裂解液混合,以进行细菌的裂解。接下来,通过缓冲液垫将Phosphate Buffered Saline (PBS)缓冲液引导至芯片内部,使裂解物随着PBS的流动从裂解区经过管道被带至检测区。然后,将芯片避光、适合的温度反应一定时间后,取出芯片进行观察。用数码相机记录下检测结果。最后,将这些图片

导入IPP 6.0进行分析, 通过灰度值来表示检测区的颜色强度, 从而获取实验数据。

1.4.3 *E. coli*检测相关参数优化

(1) 对底物浓度进行优化。在全程避光的条件下, 分别配制浓度为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、10、12 mmol·L⁻¹的X-Gluc, 然后各取20 μL分别均匀涂抹在纸芯片上, 检测1.0 × 10⁹ CFU·mL⁻¹的*E. coli*, 观察并量化检测结果。

(2) 对反应温度进行优化。将滴加*E. coli*的纸芯片分别置于4、25、37、50、65、80 °C条件下进行反应, 保持2 h, 观察并量化结果。

(3) 对反应时间进行优化。从滴加PBS缓冲液时开始计时, 分别在10、20、30、40、60、90、120、150 min时取出纸芯片并拍照, 然后将照片导入IPP进行分析。

(4) 对pH进行优化。配制pH为4.0–9.0的PBS缓冲液, 分别用于*E. coli*的分散以及纸芯片上*E. coli*的检测。检测结果拍照后进行量化分析。

(5) 研究不同浓度的*E. coli*检测。使用pH = 6.0的PBS缓冲液将菌液浓度依次调整为1.0 × 10⁹–1.0 × 10¹ CFU·mL⁻¹, 然后在纸芯片上进行检测。

在上述优化后的条件下进行检测, 然后用数码相机拍照, 并将图片导入IPP 6.0中进行分析。

1.4.4 实际水样中*E. coli*的检测

将本实验设计的纸芯片装置用于实际水样中的*E. coli*检测。首先, 从超市购买一瓶矿泉水, 并向矿泉水中添加不同浓度的*E. coli*, 浓度范围为1.0 × 10¹–1.0 × 10⁹ CFU·mL⁻¹。接着, 在纸芯片上进行*E. coli*的裂解检测。裂解结束后, 使用pH = 6的PBS缓冲液将裂解好的细菌从裂解区缓慢冲向检测区。采用6.0 mmol·L⁻¹的X-Gluc作为底物, 在50 °C, pH = 6.0的条件下, 反应2 h。最后, 使用数码相机拍摄检测结果, 并将图片导入IPP 6.0中进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 纸芯片制备与修饰

图2(A)展示了本实验制备的纸芯片。对纸芯片的不同区域分别使用红色和绿色染料进行修饰(图2(B)), 并采用PBS进行冲洗, 可以实现较好的混合效果, 如图2(C)所示。

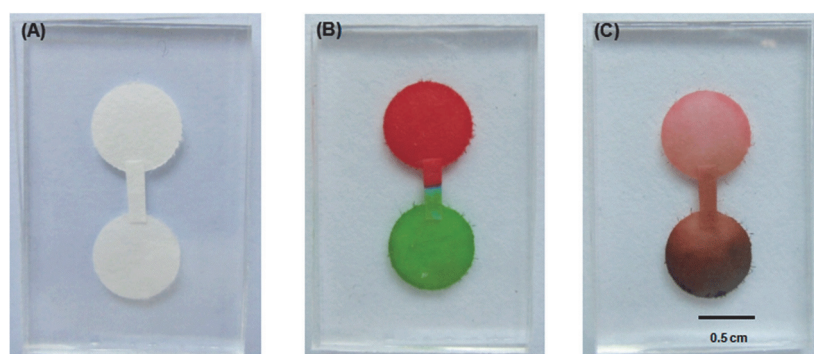
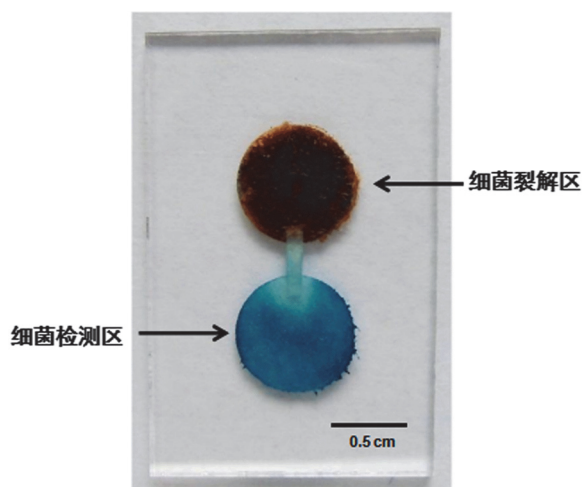


图2 芯片及染料测试图

(A) 芯片实物图; (B) 芯片上滴加红绿染料; (C) PBS为冲洗缓冲液使红绿染料混合
电子版为彩图

2.2 *E. coli*的裂解与检测

首先用多聚赖氨酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子对*E. coli*进行富集, 将富集后的*E. coli*浓度稀释为1.0 × 10⁹ CFU·mL⁻¹, 将细菌溶液滴加在裂解区, 用PBS分散。反应一段时间后, 使用缓冲液垫将PBS缓冲液引入芯片, 使裂解物随着缓冲液流向检测区。将芯片置于37 °C避光条件下反应一定时间后, 进行拍照记录, 结果如图3所示。

图3 用于*E. coli*的裂解和检测纸基芯片实物图

可以清楚地看到，将富集后的细菌滴加在裂解区进行裂解后，裂解物可以通过PBS缓冲液缓慢地被冲到检测区。在37 °C的条件下，*E. coli*裂解物中的 β -葡萄糖苷酸酶与检测区的X-Gluc发生反应，检测区的纸芯片呈现出蓝色，证实了本实验方法具有出色的检测效果。

2.3 *E. coli*的检测相关参数优化

随后，本实验优化底物浓度。首先，分别用20 μL 浓度为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、10、12 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的X-Gluc对纸芯片的检测区进行修饰并晾干待用。随后，将浓度为 $1.0 \times 10^9 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的*E. coli*先裂解再检测，最终得到的检测结果如图4所示。

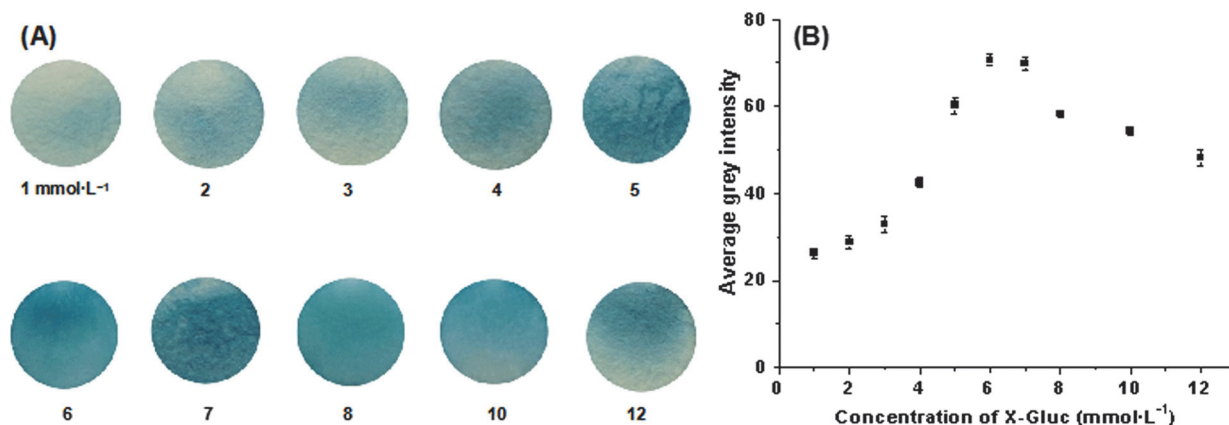


图4 不同底物浓度下的检测结果

(A) 不同底物浓度下的检测结果；(B) A图的灰度值统计图

由于温度对 β -葡萄糖醛酸酶活性存在影响。因此，在该实验中，我们探讨了在不同温度条件下(4、25、37、50、65、80 °C)纸芯片的检测效果，如图5所示。实验结果表明，在37 °C时并未达到最佳的检测效果。相反，在50 °C时，灰度值达到最大。当温度继续升高时，灰度值略有下降，这可能是由于高温使得酶蛋白变性从而导致酶活性降低所致。因此，选择50 °C作为实验的最佳反应温度。

本实验探讨了完成检测所需的理想反应时间。该实验从开始滴加PBS缓冲液计时，分别在10、20、30、40、60、90、120、150 min的时候，取出样品进行拍照，以获取检测结果的图片。接着将获得的图片导入软件进行分析，结果如图6所示。

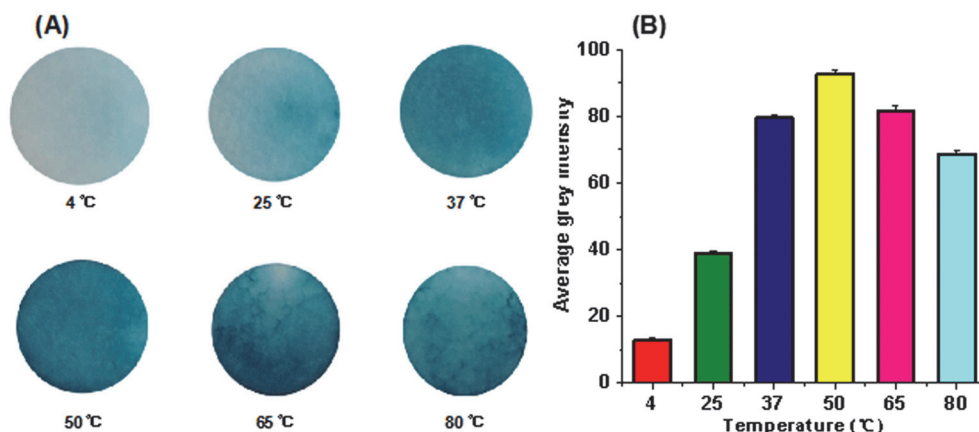


图5 不同温度下的检测结果

(A) 不同温度下的检测结果图; (B) A图的灰度值统计图

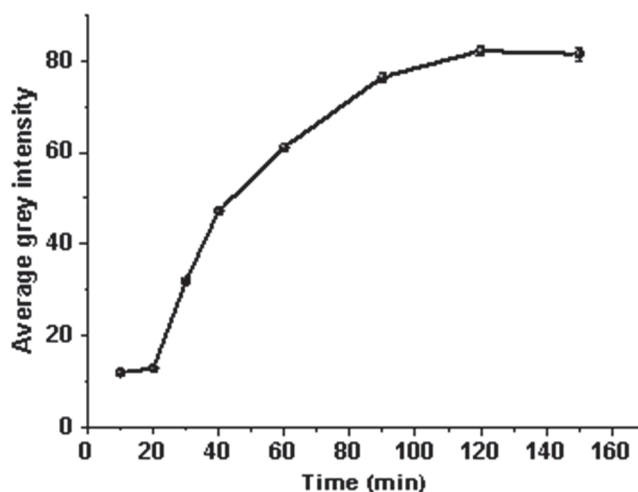


图6 不同时间下的检测结果

实验结果显示,灰度值随着时间的增加而增大,在120 min时达到最大,再往后灰度值基本保持不变,我们推测在120 min时反应已经进行完全。因此,本实验确定120 min为检测的最佳时间,在此期间,酶与底物能够充分反应。

酶活性受环境pH的影响较大,过高或过低的pH均可能是导致 β -葡萄糖醛酸酶活性降低甚至是失活的原因。因此,本实验旨在探究pH对检测结果的影响。我们分别制备了pH为4.0–9.0的PBS缓冲液用于大肠杆菌的裂解以及大肠杆菌裂解物的检测步骤,并将检测结果量化,如图7所示。实验结果显示在pH为4.0–9.0的范围内,灰度值均大于80。灰度值在pH为6.0时达到最大。因此,本实验确定pH为6.0作为检测的最佳条件。

实验在确定了最适底物浓度、温度、时间、pH后,使用纸芯片装置检测不同浓度的*E. coli*。在 $6.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的X-Gluc底物、 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 和pH为6.0的条件下,反应2 h,然后使用数码相机记录结果并将其导入相关软件进行分析。检测结果如图8所示。

从图8可以看出,随着细菌浓度的降低,检测区纸芯片上的颜色逐渐变浅。当细菌浓度在 1.0×10^9 – $1.0 \times 10^2 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围内时,可以用肉眼观察到纸芯片上的颜色变化,且灰度值均高于20。然而,当细菌浓度低至 $1.0 \times 10^1 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,肉眼无法观察到纸上的颜色变化。因此,本实验所设计的纸芯片装置能够实现对 $1.0 \times 10^2 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上浓度的*E. coli*的检测。

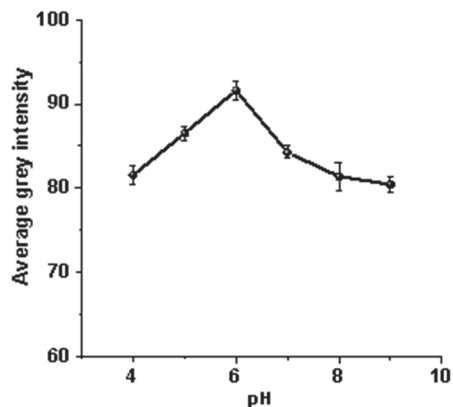


图7 不同pH下的检测结果

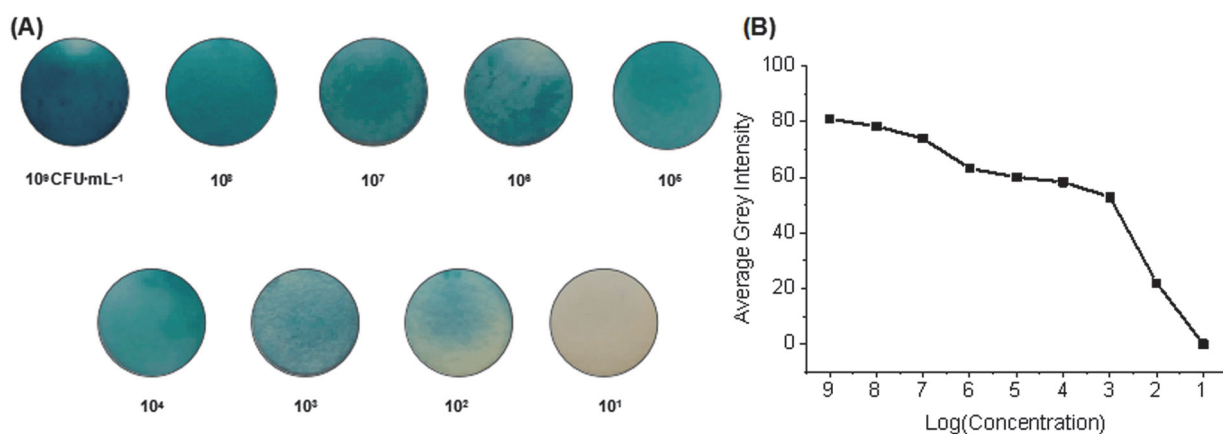


图8 不同浓度的*E. coli*在纸基芯片上的检测结果

(A) 不同浓度的*E. coli*在纸基芯片的检测结果图；(B) A图纸芯片的灰度值统计图

2.4 实际水样中的*E. coli*检测

接下来，该实验使用制作的纸芯片装置对实际水样中的*E. coli*进行检测。首先，从超市购买了一瓶矿泉水，并向其中接种了*E. coli*，利用pH = 6.0的PBS缓冲液将其浓度调整至 1.0×10^1 – 1.0×10^9 CFU·mL⁻¹。然后，使用多聚赖氨酸修饰的四氧化三铁磁性纳米粒子对细菌进行富集。在纸芯片上对富集后的细菌进行检测(6.0 mmol·L⁻¹ X-Gluc、50 °C、pH为6.0、反应2 h)，检测结果如图9所示。

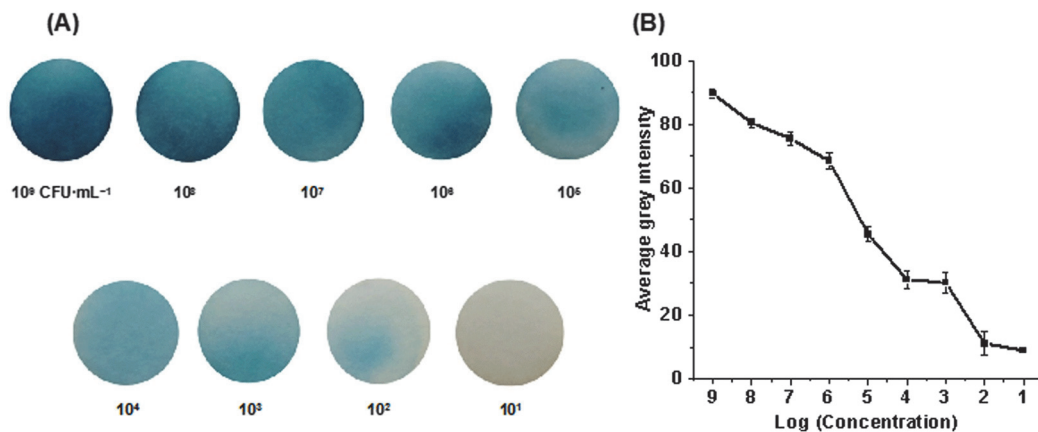


图9 矿泉水中的*E. coli*检测

(A) 纸芯片用于矿泉水的*E. coli*检测结果图；(B) A图纸芯片的灰度值统计图

由图9可知,灰度值与细菌浓度呈正相关,细菌浓度越低灰度值也越低。当细菌浓度在 1.0×10^9 – 1.0×10^2 CFU·mL⁻¹的范围内时,纸芯片上的颜色变化较为明显,肉眼可观察到蓝色。然而,当细菌浓度低至 1.0×10^1 CFU·mL⁻¹时,肉眼无法观察到纸上的颜色变化。因此,本实验设计的纸芯片装置可以用于矿泉水中的*E. coli*检测,其检测限达到 1.0×10^2 CFU·mL⁻¹。

3 结语

本创新实验设计了一种能够可视化检测*E. coli*的纸芯片。这一创新实验不仅结合了学科前沿,同时涵盖了细菌富集、裂解、检测以及纸芯片构建等多个前沿领域,实现了科研与教学的有机融合。通过将创新的实验技术和现代化的分析方法引入到本科实验教学中,打破了教学与科研之间的壁垒,从而提升了教学质量。理论与实践相结合,致力于培养学生的科研思维和创新思维。尤为重要的是,这个实验是一项“科教融合”的综合创新实验,体现了“基础实验→综合性实验→科研性实验”的特色实践育人理念,从而提升了学生分析和解决问题的能力。总的来说,本实验不仅推动了科研与教学的相互转化,提高了育人质量,同时也为今后的教学和科研工作提供了新的方向和思路。

参 考 文 献

- [1] Shaibani, P. M.; Jiang, K.; Haghighat, G.; Hassanpourfard, M.; Etayash, H.; Naicker, S.; Thundat, T. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **2016**, *226*, 176.
- [2] 马彤彤. 大肠杆菌富集与检测纸基芯片构建[硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [3] Hossain, S. M. Z.; Brennan, J. D. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (22), 8772.