

# 活鼠伤寒沙门氏菌检测方法的建立及其应用

陈翠梅<sup>1</sup>, 相 珊<sup>3</sup>, 李佳怡<sup>1</sup>, 谭贵花<sup>2\*</sup>

(1. 湘南学院公共卫生学院, 湖南省郴州市, 423000; 2. 湘南学院附属医院, 湖南省郴州市, 423000;  
3. 江苏省盐城市疾病预防控制中心, 江苏省盐城市, 224000;)

**摘要** 目的:本研究构建基于MWCNT/CS复合材料的电化学传感平台,以刃天青作为氧化还原探针,建立直接对活鼠伤寒沙门氏菌进行检测,并对其生长进行电化学监测的新方法。方法:通过超声法制备MWCNT/CS复合材料,采用单因素分析法优化检测条件。以刃天青作为氧化还原探针,利用构建的电化学传感体系。检测不同浓度的活鼠伤寒沙门氏菌,确定线性范围、检出限,评价方法重复性、灵敏度和稳定性等。结果:MWCNT/CS的投料比为0.5:1,用量8 $\mu$ L, pH=7.4,将5mL浓度为1 $\mu$ mol/L的刃天青溶液与5mL OD<sub>600</sub>=0.6的鼠伤寒沙门氏菌菌液混合均匀,孵育时间为10min,利用构建好的MWCNT/CS电化学传感器,使用DPV检测刃天青与细菌的混合液,活鼠伤寒沙门氏菌检测的方法的线性范围为10<sup>2</sup>CFU/mL~10<sup>7</sup>CFU/mL,检出限为10<sup>2</sup>CFU/mL,标准曲线方程为 $y=-0.2533x+4.937$ , R<sup>2</sup>=0.9317。RSD=5.1%,7天内的稳定性保持在74%以上。结论:新建电化学传感方法检测限较低,具有良好的准确度和稳定性。并能实时监测细菌的代谢水平,为开发新型活菌检测方法、改善临床护理与治疗措施提供了科学理论依据。

**关键词** 鼠伤寒沙门氏菌;刃天青;电化学传感器

中图分类号:R378.2+2 文献标识码:B  
文章编号:1008-0899(2024)12-0077-03

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, S. typh)是沙门氏菌属大约2500种不同血清型中的一种,它在环境、家畜和野生动物中广泛分布,通过污染的食物或水经粪口传播,是导致肠道感染的重要人畜共患病原菌<sup>[1]</sup>。因此临床、食品等样品中检测活鼠伤寒沙门氏菌,对于了解细菌污染与感染情况,指导临床合理使用抗生素至关重要。传统的细菌检测方法包括基于核酸、免疫学和培养的方法。虽特异度高,但是操作复杂,涉及多种分子技术,且耗时长,成本高<sup>[2]</sup>,部分方法无法区分活菌或死菌,易出现假阳性结果。不便研究细菌特性和准确判断细菌感染情况,而导致过度医疗。因此,建立一

种简便、经济、灵敏、可靠的活菌检测方法对细菌感染的治疗具有十分重要的意义。

多壁碳纳米管(Multi-walled carbon nanotubes, MWCNT)具有良好的机械稳定性、高比表面积、低廉的价格、电催化性能和生物相容性等特点<sup>[3]</sup>。壳聚糖(chitosan, CS)是一种具有抗菌、无毒、易改性和生物降解等功能的生物活性聚合物<sup>[4]</sup>, CS的引入有利于优化电化学传感器的检测性能。刃天青是一种非荧光蓝色染料,可毒化活细胞并通过细胞内代谢中间体还原为粉红荧光色的试卤灵。本研究构建基于MWCNT/CS复合材料的电化学传感平台,以刃天青作为氧化还原探针,建立直接对活鼠伤寒沙门氏菌进行检测,并对其生长进行电化学监测的新方法。

## 1 材料与方法

S.typh菌株来自于湖南省食品质量监督检验研究院, LB肉汤培养基、胰蛋白胨、牛肉膏, 酵母浸膏, 蛋白胨、氯化钠、浓硫酸、氯化钾、浓盐酸、醋酸、硝酸钾、磷酸二氢钾、铁氰化钾、多壁碳纳米管, 乙醇、刃天青、壳聚糖、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粉。培养箱、高速冷冻离心机、全温振荡培养箱、压力蒸汽灭菌器、电化学工作站、精密pH计、紫外可见分光光度计、超声波清洗

基金项目:湖南省自然科学基金项目(特异性金纳米/碳纳米管生物传感器检测食品中鼠伤寒沙门氏菌的研究,项目编号:2021JJ30637)。

作者简介:陈翠梅(1979~),女,汉族,湖南冷水江人,博士,副教授,研究方向:分子生物与卫生检测方法建立。

器、电子天平。

制备MWCNT/CS溶液,采用示差脉冲伏安法(Differential Pulse Voltammetry, DPV)测定,优化pH、复合材料比例、修饰量和孵育时间等实验条件,以刃天青作为氧化还原探针构建电化学传感体系。检测不同浓度的活S.typh,确定线性范围、检出限,进行重复性、灵敏度和稳定性等方法学评价。

## 2 结果

### 2.1 电化学传感器条件优化

通过单因素分析结果显示,pH7.4时峰电流最大,MWCNT:CS投料比0.5:1时,以最大化电信号并减少背景干扰,修饰量8 $\mu$ L时峰电流达到最大,孵育时间10min时吸附变化量最大,以此为最佳实验条件。DPV检测结果表明,选择0.2V/s速率扫描,刃天青浓度在10~50 $\mu$ mol/L时与峰电流呈线性正相关,回归方程为 $y=0.0015x+1.1289$ , $R^2=0.9932$ ,检出限为5.8nmol/L(如图1所示)。

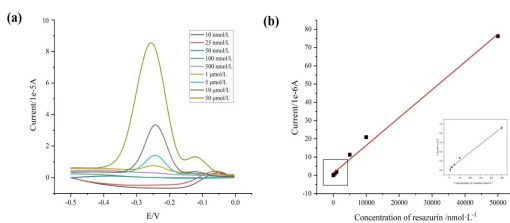


图1 MWCNT/CS/GCE检测体系电信号与刃天青浓度的关系 (a)DPV;(b)标准曲线

### 2.2 方法学评价

MWCNT/CS检测体系下,刃天青和细菌作用时间1h。检测不同浓度的S.typh。DPV结果显示(如图2所示),在102CFU/mL~107CFU/mL范围内,峰电流值与细菌浓度呈负相关。回归方程 $y=-0.2533x+4.937$ , $R^2=0.9317$ 。活菌检出限为102CFU/mL。RSD=5.1%,重复性良好。方差分析结果显示,7天内的稳定性保持在74%以上,P值为0.057(前3天)和P<0.01(第7天)。

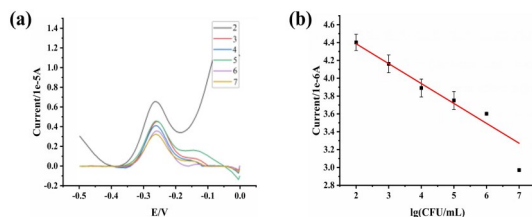


图2 MWCNT/CS/GCE体系检测不同浓度的细菌 (a)DPV;(b)标准曲线

## 3 结论

本研究创新性构建了基于MWCNT/CS电化学传感器,MWCNT/CS比例0.5:1,取8 $\mu$ L,pH=7.4,将刃天青溶液与鼠伤寒沙门氏菌菌液混合均匀,孵育10min,利用构建好的MWCNT/CS电化学传感器,使用DPV检测刃天青与细菌的混合液,活鼠伤寒沙门氏菌检测的方法的线性范围为 $10^2\sim 10^7$ CFU/mL,检出限为 $10^2$ CFU/mL,标准曲线方程为 $y=-0.2533x+4.937$ , $R^2=0.9317$ 。新建电化学传感方法检测限低,灵敏度高,具有良好的准确度和稳定性。将刃天青作为氧化还原探针,实现对活鼠伤寒沙门氏菌检测,并能实时监测细菌的代谢水平,为开发新型活菌检测方法改善细菌感染护理与治疗措施提供了科学理论依据。

## 4 讨论与展望

本研究有望用于其他活体菌检测和其他抗生素的药敏试验研究。利用一次性丝网印刷电极,或者与微流控等先进技术串联,构建微型芯片,进一步缩减检测时间,降低活鼠伤寒沙门氏菌检测的检出限,实现快速、便携式、即时检测。

### 参考文献

- [1] PARK C J, LI J, ZHANG X, et al. Diverse lineages of multidrug resistant clinical *Salmonella enterica* and a cryptic outbreak in New Hampshire, USA revealed from a year-long genomic surveillance [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 87(104645).
- [2] BRANCHU P, BAWN M, KINGSLEY R A. Genome Variation and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathovariants [J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(8): 17.
- [3] KUMAR A, HSIEH P Y, SHAIKH M O, et al. Flexible Temperature Sensor Utilizing MWCNT Doped PEG-PU Copolymer Nanocomposites [J]. *Micromachines (Basel)*, 2022, 13(2).
- [4] MUXIKA A, ETXABIDE A, URANGA J, et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105: 1358-1368.