

# 基于超灵敏纳米流式细胞仪多重检测单个活性病原菌— 极限灵敏活菌检测筑牢食品安全防线

王梓权<sup>1</sup>, 刘思渊, 王蒙, 隋志伟<sup>2</sup>  
(中国计量科学研究院, 北京市, 100029)

**摘要:** 流式细胞仪主要由液流系统、光学系统、检测系统和分析系统四部分组成。在四个系统的协助下对被测细胞的一系列重要的生理生化方面的特征参量进行分析的技术即流式细胞分析技术 (Flow cytometry method, FCM)。本研究基于本实验室超灵敏纳米流式细胞仪, 开发建立了超灵敏多重检测肉类中沙门氏菌、大肠杆菌 O157 和志贺氏菌三种病原菌单个活菌的流式分析方法。以生牛肉为例, 样品通过培养和前处理后, 进行流式分析, 在可 8 h 内准确同时特异性检测到沙门氏菌、大肠杆菌 O157 和志贺氏菌三种病原菌单个活菌。此外, 用三种病原菌不同比例进行人工污染的牛肉样品和真实市场销售牛肉样品对方法进行检验, 结果符合均与平板法检测结果一致, 说明所建立的流式分析方法可快速准确多重检测三种病原菌单个活菌, 可极大提高食品安全风险预警效果。

**关键词:** 超灵敏纳米流式细胞仪; 多重检测; 灵敏; 单个细菌; 活菌

## Multiple detection of single viable bacteria based on ultra-sensitive nanoflow cytometry —Building a food safety line through extreme sensitive detecting viable bacteria

WANG Zi-quan<sup>1</sup>, LIU Si-yuan, WANG Meng, SUI Zhi-wei<sup>2</sup>  
(National Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** The flow cytometry is mainly composed of four parts: a liquid flow system, an optical system, a detection system, and an analysis system. The method of analyzing a series of important physiological and biochemical characteristic parameters of the tested cells with the assistance of four systems is called flow cytometry method (FCM). This study is based on ultra-sensitive nanoflow cytometry to develop FCM for single cells of the three pathogens. After cultivation and pre-treatment, the ground beef sample was subjected to flow cytometry analysis, and within 8 h, a single viable pathogen of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, and *Shigella* could be accurately and specifically detected. The method of artificially contaminated beef samples with three different ratios of bacteria was tested and validated, and the results were in line with the addition ratio, indicating that the established FCM can accurately detect of multiple pathogens and greatly improve the warning effect of food safety risks.

**Keywords:** Ultra-sensitive nanoflow cytometry; Multiple detection; Sensitive; Single cell of bacteria; Viable bacteria

<sup>1</sup> 第一作者信息: (王梓权, 男, 研究实习员, 微生物活菌定量检测研究, wangzq@nim.ac.cn)

<sup>2</sup> 通讯作者信息: (隋志伟, 男, 研究员, 微生物计量研究, suizhw@nim.ac.cn)

# 1、引言

流式细胞仪 (Flow cytometry) 主要由液流系统、光学系统、检测系统和分析系统四部分组成。流动室是液流系统的核心其由样品管、鞘液管和喷嘴等组成<sup>[1]</sup>。单个细胞悬液在液流压力作用下从样品管射出；鞘液由鞘液管从四周流向喷嘴，由于鞘液的作用，被检测细胞被限制在液流的轴线上经光学系统和检测系统处理<sup>[2]</sup>。光学系统则由发光器和激光器组成，只有经特异荧光染色的细胞需要合适的光源照射激发才能发出荧光供收集检测。检测系统的任务是将被检测细胞激发后所产生的荧光通过光电转换器转变成电信号而进行测量。最后经放大后的电信号被送往计算机分析器，通过分析系统对被测细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量进行分析<sup>[3]</sup>。

流式细胞分析技术 (Flow cytometry method, FCM) 即使用流式细胞仪对待测液相中悬浮的细胞或微粒进行检测的分析技术<sup>[4]</sup>。由于不同类型的细胞，具有不同的粒径、结构、丰度等性质，因此根据所产生的散射光信号和荧光信号的不同，可对不同类型的细胞进行分类和分析。FCM 现已广泛应用于各种细胞研究分析中，如细胞凋亡检测可通过分别检测不透膜核酸染料等信号，对凋亡中期和末期细胞的比例进行定量；通过对细胞瞬间的快速测定，判断细胞所处的细胞周期时相，研究细胞的周期等<sup>[4]</sup>。近年来随着流式细胞仪在技术机构上取得了一系列的突破，流式分析技术开始越来越多的被应用于病原菌的检测中<sup>[5]</sup>。

目前，病原菌微生物检测的金标准方法是平板计数法，该方法通过培养基培养后观察计数，具有直观、稳定、准确的优点，但其属于劳动密集型方法，耗时较长大于 48 h，无法同时进行多重检测。随着生物技术的发展，许多新颖的技术已被应用于病原菌的检测，如多重聚合酶链式反应 (PCR) 检测，重组酶聚合酶扩增 (RPA) 分析、气相色谱-质谱检测等<sup>[6]</sup>。这些方法可以减少实验操作的步骤，并可同时处理多个样本但是这些方法依然存在无法分死活菌、前处理时间较长而且对待检测样品基质纯度要求较高等不足。Williams 等人也建立了大肠杆菌 O157 的流式方法<sup>[7]</sup>，但是没有克服多荧光相互干扰开发出多重检测流式方法，而牛肉食品中不仅仅容易被大肠杆菌 O157 污染还极易被沙门氏菌和志贺氏菌污染，这些病原菌还会对人体造成严重伤害，因此研究建立精确定量、快速灵敏、多重检测微生物病原菌的流式细胞分析方法非常有意义。

## 2、多重检测单个活菌 FCM 方法建立

### 2.1 超灵敏流式细胞仪荧光通道参数设置与检测

通过对荧光探针对应病原菌的选择和对流式细胞仪的设置优化，最终确定用 FITC 修饰的沙门氏菌多克隆抗体来标记沙门氏菌，用 PE 修饰的大肠杆菌 O157 多克隆抗体来标记大肠杆菌 O157 以及用 APC 修饰的志贺氏菌多克隆抗体来标记志贺氏菌。仪器设置如下：其 FL1, FL2, FL3 通道分别对应 Green FL, Orange FL, Red FL 通道，以 Green FL 荧光通道检测 FITC 修饰的沙门氏菌多克隆抗体来标记沙门氏菌，呈现绿色；以 Orange FL 荧光通道检测 PE 修饰的大肠杆菌 O157 多克隆抗体来标记大肠杆菌 O157，呈现橙色；以 Red FL 荧光通道检测 APC 修饰的志贺氏菌多克隆抗体来标记志贺氏菌，呈现红色，通过相应荧光信号，可获得沙门氏菌，大肠杆菌 O157 以及志贺氏菌的浓度。单个菌的制备参照实验室公开的方法<sup>[8]</sup>，整体检测过程如图 1 所示。