

# 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了检测验证, 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 nano flow 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>[1]</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。

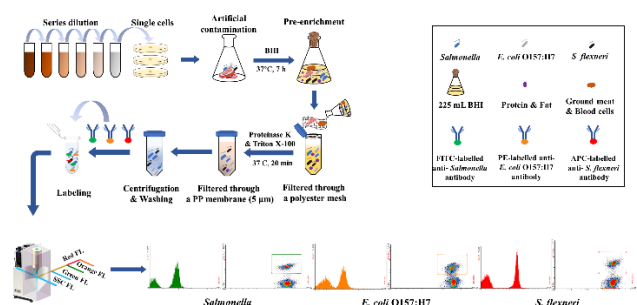


图 1. 超灵敏流式细胞仪荧光通道参数设置与多重检测单个活菌流程图

## 2.2 多重检测单个活菌 FCM 方法的特异性

对于流式细胞术方法来同时分析检测多种目标菌株，方法的特异性是十分重要的。对于同时检测沙门氏菌、大肠杆菌 O157 和志贺氏菌而言，三种抗体的特异性是否满足检测是建立流式多重分析方法的一个决定性因素。因此，选取肉制品中常见的 50 株菌株对沙门氏菌，大肠杆菌 O157 和志贺氏菌多克隆抗体进行特异性检测。结果如表 1 所示，FITC 修饰的沙门氏菌多克隆抗体只与沙门氏菌产生反应，PE 修饰的大肠杆菌 O157 多克隆抗体只与大肠杆菌 O157 产生反应，APC 修饰的志贺氏菌抗体只与志贺氏菌产生反应，表明三种抗体特异性符合预期效，方法特异性良好。

表 1. 流式分析法检测的特异性

| 细菌              | 菌株编号       | 是否检测到<br>绿色荧光 | 是否检测到<br>橙色荧光 | 是否检测到<br>红色荧光 |
|-----------------|------------|---------------|---------------|---------------|
| 鼠伤寒沙门氏菌         | CICC 21483 | 是             | 否             | 否             |
| 肯塔基沙门氏菌         | CICC 21488 | 是             | 否             | 否             |
| 等 12 个沙门氏菌菌株    | \          | 是             | 否             | 否             |
| 大肠杆菌 O157       | ATCC 43895 | 否             | 是             | 否             |
| 大肠杆菌 O157       | CICC 21530 | 否             | 是             | 否             |
| 2 个大肠杆菌 O157 菌株 | \          | 否             | 是             | 否             |
| 福氏志贺氏菌          | ATCC 12022 | 否             | 否             | 是             |
| 宋氏志贺氏菌          | ATCC 25931 | 否             | 否             | 是             |
| 等 10 个志贺氏菌菌株    | \          | 否             | 否             | 是             |
| 大肠杆菌            | ATCC 10798 | 否             | 否             | 否             |
| 金黄色葡萄球菌         | ATCC 27217 | 否             | 否             | 否             |
| 等 26 个其他菌株      | \          | 否             | 否             | 否             |

## 2.3 多重检测单个活菌 FCM 方法检测时间优化

对于检测多重致病菌的单个菌，需要对富集时间进行优化使得三种致病菌终浓度都要达到流式分析法的检测限。通过稀释法获得多种菌的单个菌，同时污染单个沙门氏菌，单个大肠杆菌 O157 和单个志贺氏菌的牛肉样本在富集培养 5 h、6 h、7 h 和 8 h 后，采用图 1 方法进行检测，同时在富集培养 18 h 后采用平板计数法进行检测（只检测阴阳性，存在菌落为阳性，不存在菌落为阴性）。根据实际获得真实阳性结果如表 2 所示，富集培养 5 h 后流

式分析法的检测沙门氏菌的阳性结果数为 0，而平板计数法检测沙门氏菌的阳性结果数为 8，因此，5 h 的富集检测达不到流式方法检测限，结果不可取。同理 6 h 的富集检测结果不可取，7 h 可作为流式分析方法的最佳富集时间，即单个沙门氏菌，单个大肠杆菌 O157 和单个志贺氏菌通过富集培养 7 h 后，则可以通过流式分析法检测到，加上处理时间，该方法可以在 8 h 内同时检测牛肉中沙门氏菌单个菌、大肠杆菌 O157 单个菌和志贺氏菌单个菌。

表 2. 样品中三种菌单个菌的检测结果

| 样品编号    | 富集培养时间 (h) | 流式分析法结果为阳性的数量 |              |      | 平板计数法结果为阳性的数量 |              |      |
|---------|------------|---------------|--------------|------|---------------|--------------|------|
|         |            | 沙门氏菌          | 大肠杆菌 O157:H7 | 志贺氏菌 | 沙门氏菌          | 大肠杆菌 O157:H7 | 志贺氏菌 |
| 01 - 08 | 5          | 0             | 4            | 1    | 8             | 8            | 8    |
| 09 - 10 | 5          | 0             | 0            | 0    | 0             | 0            | 0    |
| 11 - 18 | 6          | 3             | 8            | 6    | 8             | 8            | 8    |
| 19 - 20 | 6          | 0             | 0            | 0    | 0             | 0            | 0    |
| 21 - 28 | 7          | 8             | 8            | 8    | 8             | 8            | 8    |
| 29 - 30 | 7          | 0             | 0            | 0    | 0             | 0            | 0    |
| 31 - 38 | 8          | 8             | 8            | 8    | 8             | 8            | 8    |
| 39 - 40 | 8          | 0             | 0            | 0    | 0             | 0            | 0    |

3、FCM 方法多维验证—成功完成三种菌的特异性区分

为了评估多重流式分析法检测三种病原菌时对于三种菌的特异性区分，通过对牛肉中添加不同浓度混合菌进行检测。将沙门氏菌、大肠杆菌 O157 以及志贺氏菌分别以不同的浓度比例进行混合（0:0:0，1:0:0，0:1:0，0:0:1，1:1:0，1:0:1，0:1:1，1:2:7，2:7:1，7:1:2）然后加入准备好的牛肉样品中。按照图 1 流程进行流式方法检测。结果如图 2 所示，流式检测的沙门氏菌（R1），大肠杆菌 O157（R2）和志贺氏菌（R3）的检测比例与实际添加比例一致，因此成功建立多重检测单个活菌 FCM 方法可对三种菌准确区分。

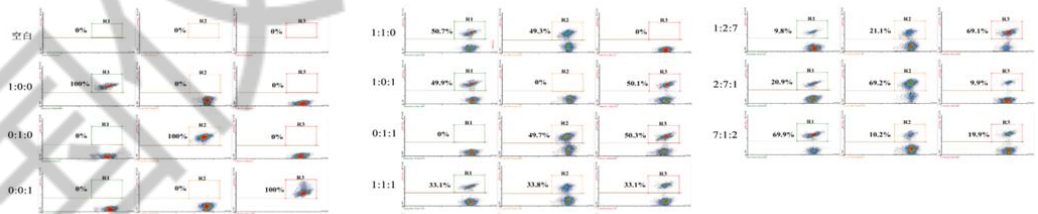


图 2. FCM 多重检测三种病原菌不同浓度比例结果

4、FCM 方法成功应用—极限灵敏活菌检测筑牢食品安全防线

从卫生条件不同的菜市场购买了 10 份真实牛肉样品进行 FCM 方法检测，其中发现 2 例三种病原菌均少量存在的样品，这也间接反映出该样品所在菜市场的卫生条件有待改善。

此外，整个检测过程在实验室中仅用时 8 h，相较于传统平板法第二天的获得结果，实验室基于超灵敏纳米流式细胞仪的检测方法将时间大大缩短。极限灵敏检测样品中多种病原菌单个活菌外加快速获得检测结果，该方法极大提高了食品安全风险预警效果。

## 5、结论与展望

本研究基于本实验室超灵敏纳米流式细胞仪，首次开发了可在 8 h 内多重检测沙门氏菌、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，并具有良好特异性。用三种菌不同比例进行人工污染的牛肉样品方法进行了检测验证后结果均符合添加比例，实现牛肉中多重病原菌的快速监控和监测，也为其他病原菌检测提供了一个新的思路，未来也有很大的潜力应用到市场的食品安全检测工作中，筑牢食品安全防线。

## 参考文献

- [1] 吕英楷, 刘文丽, 胡志雄. 荧光流式细胞仪的标准化研究进展 [J]. 激光与光电子学进展, 2023, 60(04): 38-50.
- [2] 程振, 杨斌, 徐友春. 用于流式细胞仪的超声聚焦系统的仿真与设计 [J]. 仪器仪表学报, 2017, 38(06): 1547-1553.
- [3] 史亮. 流式细胞仪的发展历史及其原理和应用进展研究 [J]. 中国设备工程, 2021, (12): 13-14.
- [4] 周羽, 陈路. 量化成像流式细胞仪在免疫相关研究中的应用 [J]. 中国医疗器械信息, 2022, 28(09): 64-66.
- [5] Wang B, Liu S, Sui Z, et al. Rapid Flow Cytometric Detection of Single Viable *Salmonella* Cells in Milk Powder[J]. Foodborne Pathog Dis. 2020, 17(7): 447-458.
- [6] Mao C, Xue C, Wang X, et al. Rapid quantification of pathogenic *Salmonella* Typhimurium and total bacteria in eggs by nano-flow cytometry[J]. Talanta, 2020, 217: 121020.
- [7] Williams AJ, Cooper WM, Ramsaroop S, et al. Rapid Flow Cytometry Detection of a Single Viable *Escherichia coli* O157:H7 Cell in Raw Spinach Using a Simplified Sample Preparation Technique[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1493.
- [8] Wang Z, Wang M, Xu Q, et al. Rapid and Multiplexed Detection of Single Cells of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, and *Shigella flexneri* in Ground Beef by Flow Cytometry[J]. Foodborne Pathog Dis, 2022, 21(1): 8