

基于微流控芯片的鼠伤寒沙门氏菌免疫磁分离

金彦¹, 王敬依^{1,*}, 程佳宁², 于乐民¹, 张壁臣¹, 张一博¹, 许童羽^{1,*}

(1.沈阳农业大学信息与电气工程学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 开发一种用于鼠伤寒沙门氏菌快速分离与富集的免疫磁分离微流控系统, 该系统由微流控芯片、微控制器、电磁分离与混合模块组成, 具备电磁驱动混合和磁分离功能, 能够实现免疫磁珠与鼠伤寒沙门氏菌的快速孵育、分离与富集。在最优条件下, 可以在13 min内实现对牛奶样品中浓度范围为 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL鼠伤寒沙门氏菌的快速捕获与分离, 捕获率在33.3%~67.5%之间, 最低检测限为20 CFU/mL。因此, 这种高度集成的免疫磁分离微流控系统能够从复杂食品基质中迅速、准确地富集目标细菌, 为食源性致病菌的快速检测提供了有效的解决方案, 对于应对食源性疾病引发的公共卫生问题具有重要意义。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌; 免疫磁珠; 免疫磁分离; 主动电磁混合; 微流控芯片

Immunomagnetic Separation of *Salmonella* Typhimurium Based on Microfluidic Chip

JIN Yan¹, WANG Jingyi^{1,*}, CHENG Jianing², YU Lemin¹, ZHANG Bichen¹, ZHANG Yibo¹, XU Tongyu^{1,*}

(1. College of Information and Electrical Engineering, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: This study developed an immunomagnetic separation microfluidic system for rapid isolation and enrichment of *Salmonella* Typhimurium. The system consisted of a microfluidic chip, a microcontroller, and an electromagnetic separation and mixing module, which had the functions of electromagnetically driven mixing and magnetic separation. It enabled rapid incubation, isolation and enrichment of immunomagnetic beads with *Salmonella* Typhimurium. Under the optimal conditions, the rapid capture and separation of *Salmonella* Typhimurium in milk samples in the concentration range from 2×10^1 to 2×10^6 CFU/mL were achieved within 13 min, with capture rates between 33.3% and 67.5%. The limit of detection was 20 CFU/mL. This highly integrated immunomagnetic separation microfluidic system can enrich target bacteria from complex food matrices rapidly and accurately, thus providing an effective solution for the rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, which is of great significance in addressing public health problems caused by foodborne diseases.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; immunomagnetic beads; immunomagnetic separation; active electromagnetic mixing; microfluidics chip

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240110-099

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 01-0200-10

引文格式:

金彦, 王敬依, 程佳宁, 等. 基于微流控芯片的鼠伤寒沙门氏菌免疫磁分离[J]. 食品科学, 2025, 46(1): 200-209.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240110-099. <http://www.spkx.net.cn>

JIN Yan, WANG Jingyi, CHENG Jianing, et al. Immunomagnetic separation of *Salmonella* Typhimurium based on microfluidic chip[J]. Food Science, 2025, 46(1): 200-209. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240110-099. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-01-10

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金计划项目 (2022-BS-175)

第一作者简介: 金彦 (1993—) (ORCID: 0009-0007-7983-8269), 男, 博士研究生, 研究方向为微流控芯片与生物传感器。

E-mail: jinyan@stu.syau.edu.cn

*通信作者简介: 王敬依 (1989—) (ORCID: 0000-0002-1458-4890), 男, 讲师, 博士, 研究方向为微流控芯片与生物传感器。

E-mail: wangjingyi@syau.edu.cn

许童羽 (1967—) (ORCID: 0000-0001-9864-6640), 男, 教授, 博士, 研究方向为农业信息化。

E-mail: xutongyu@syau.edu.cn

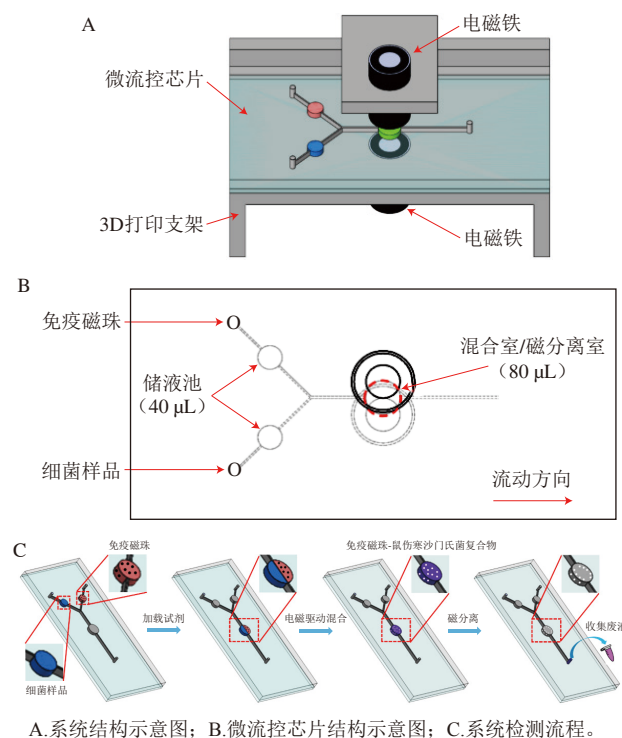
食源性疾病已成为全球日益严重的公共卫生问题^[1],而食源性致病菌是影响食品质量与安全的关键因素之一^[2]。据美国疾病预防控制中心的统计,每年约有48万人患食源性疾病,其中12.8万人需要住院治疗,3000人不幸死亡。我国国家卫生健康委员会公布的数据表明,2010—2022年,已报告46430起食源性疾病暴发事件,导致330870人感染,1679人死亡。在日常生活中,肉类、水产品、蛋类、乳类等食品均易受到食源性致病菌的污染^[3]。而沙门氏菌(*Salmonella*)作为常见的食源性致病菌之一,全球范围内由其引起的食物中毒事件更是位居前列^[4],每年对数百万人的生命健康造成严重威胁。沙门氏菌属于肠杆菌科,菌体宽度为0.6~0.9 μm、长度为1~3 μm,能够在20℃以上的环境中快速繁殖。沙门氏菌具有致病性的根本原因源于其多种毒力因子的相互作用,如质粒毒力因子、菌毛毒力因子、鞭毛毒力因子和肠毒素毒力因子等,轻微感染者可能表现为恶心、呕吐和腹泻等症状,而重症患者可能表现为急性肠胃炎、败血症甚至死亡。因此,快速、灵敏地检测沙门氏菌对于预防食源性疾病的传播至关重要^[5]。

食品基质通常十分复杂,常含脂肪、蛋白质、色素、淀粉等成分,而复杂的食品基质则会影响目标细菌的分离与富集^[6-7]。沙门氏菌的传统检测方法通常包括增菌、选择性富集培养、鉴别性培养、挑选特定表型菌株、生理生化鉴定5个步骤^[8-9],检测步骤复杂、耗时费力,无法满足快速检测的需求。因此,建立高效、灵敏的前处理技术对于沙门氏菌的快速检测至关重要^[10]。免疫磁分离(immunomagnetic separation, IMS)技术作为一种理想的样品前处理技术,能够迅速地从食品基质中选择性富集目标细菌^[11]。IMS的原理是在磁性纳米粒子上偶联功能分子(抗体和适配体等),使其与抗原发生特异性结合,并在外加磁场的作用下实现目标细菌的分离与富集^[12]。IMS灵敏度高、特异性强、操作简单等特点使其成为众多食源性致病菌前处理方法中的首要选择^[13-15]。Xue Li等^[16]开发了一种用于快速检测鼠伤寒沙门氏菌的生物传感器,能够在10 mL鸡肉样品中连续分离目标细菌,捕获效率约为60%。平洋等^[17]建立了一种捕获率高、特异性强的蜡样芽孢杆菌IMS方法,对多种熟制食品样品中蜡样芽孢杆菌的捕获率均在62.9%以上。黄震等^[18]提出的IMS方法能够在35 min内完成对牛奶样品中大肠杆菌O157:H7的高效富集,捕获率高达93.4%。

尽管IMS方法在对目标细菌的快速富集方面具有高效性,但其繁琐的操作步骤(如冲洗、离心、洗涤、孵育、磁分离等)容易造成目标细菌的损耗或丢失^[19]。微流控技术具有检测速度快、试剂消耗少及成本低等特点,已成为食源性致病菌现场快速检测的理想平台^[20-22]。目前,基于微流控芯片技术的IMS装置在食源性致病菌检测领域得到了广泛应用^[23-25]。例如, Qi Wuzhen等^[26]研

制了一种用于快速检测沙门氏菌的微流控装置,能够在1 h内检测浓度范围为 $1.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^7$ CFU/mL的鼠伤寒沙门氏菌,检测限为14 CFU/mL。Wang Yuhe等^[27]基于微流控技术设计了一种IMS装置,能够实现对沙门氏菌的快速富集、DNA提取及聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测,最低检测限为 10^2 CFU/mL。Cai Gaozhe等^[28]将微流控技术与IMS进行深度结合,研制一种具有高集成度的检测装置,能够在2 h内检测浓度低至150 CFU/mL的沙门氏菌。

为了实现复杂食品基质中目标细菌的高效、准确富集,本研究提出一种基于微流控芯片的鼠伤寒沙门氏菌IMS检测方法,该IMS微流控系统具备电磁驱动混合和磁分离功能,能够实现免疫磁珠与鼠伤寒沙门氏菌的快速混合孵育、分离与富集。系统示意图如图1所示,通过注射泵将免疫磁珠和鼠伤寒沙门氏菌样品同时注入微流控芯片中,直至充满整个混合室;位于混合室上下两侧的电磁铁交替通电,免疫磁珠在变化磁场的作用下定向移动,以捕获鼠伤寒沙门氏菌;待捕获完成后,混合室两侧的电磁铁同时通电,将免疫磁珠-鼠伤寒沙门氏菌复合物牢牢吸附在混合室内壁,随后将多余废液排出芯片,并收集、计数;最后,将电磁铁全部断电,用磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with tween-20, PBST)冲洗芯片,回收免疫磁珠-鼠伤寒沙门氏菌复合物。该系统旨在为食源性致病菌的现场快速检测提供有效的解决方案。



A. 系统结构示意图; B. 微流控芯片结构示意图; C. 系统检测流程。

图1 IMS微流控系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of immunomagnetic separation microfluidic system

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028)、大肠杆菌O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* ATCC 11778) 宁波泰斯拓生物技术公司。

100 nm链霉亲和素磁珠 (Q-0174305-1 mL) 西安齐岳生物科技有限公司; 200 nm链霉亲和素磁珠 (P2151-1 mL) 上海碧云天生物技术有限公司; 1 000 nm链霉亲和素磁珠 (HY-K0208-1 mL) 美国MedChemExpress公司; 鼠伤寒沙门氏菌抗体 (60C-CR7100RB-1 mL, 以肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌及海德堡沙门氏菌的混合物为免疫原培养所得抗体) 美国Fitzgerald公司; 聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 美国Dow Corning公司; 聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 深圳快造科技有限公司; 光敏聚合物树脂 美国Formlabs公司; 压敏胶 (pressure-sensitive adhesive, PSA) 美国Adhesive Research Inc公司; 平板计数琼脂 (plate count agar, PCA) 培养基、Luria-Bertani肉汤培养基 上海博微生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; Vortex-M微型漩涡混匀仪 上海沪析实业有限公司; BE-1100垂直混匀仪 海门其林贝尔仪器制造有限公司; Micro 17高速台式离心机 美国Thermo Fisher Scientific公司; BSA224S-CW万分之一天平 德国Sartorius AG公司; XS-TD1台式恒温振荡培养箱 上海象尚昱科实验仪器有限公司; BS-MGS-050-08磁分离架 北京信钰仪器有限公司; DW-86L486超低温冰箱 海尔集团; Snapmaker Original 3D打印机 深圳快造科技有限公司; Form 3 3D打印机 美国Formlabs公司; LDZF-50L立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械有限公司; ZH-ZKRHD-30B真空高温干燥箱 东莞正航仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养与计数

取鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7、副溶血性弧菌及蜡样芽孢杆菌的菌液各50 μ L, 加入5 mL Luria-Bertani液体培养基中, 在37 $^{\circ}$ C恒温摇床上振荡12~16 h, 以完成重新活化。随后, 取500 μ L培养物加入10 mL EP管中, 使用PBST (pH 7.2, 含0.85 g/100 mL氯化钠和体积分数0.05% Tween-20) 进行浓度梯度稀释。取20 μ L菌液均匀涂布在PCA固体培养基上, 置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中, 倒置培养12~16 h后进行计数。

1.3.2 免疫磁珠的制备

链霉亲和素修饰的磁珠和鼠伤寒沙门氏菌抗体按照质量比100:3进行偶联, 免疫磁珠制备流程如下: 取1 mg

磁珠, 加入1 mL PBST, 涡旋振荡混匀后, 放置于磁性分离架上进行磁分离, 持续3 min, 弃上清液。随后, 使用PBST进行3次重复清洗。取30 μ g抗体并加入1 mL PBST, 将混合物置于EP管中, 在室温下孵育45 min。孵育结束后, 将EP管放入磁性分离架上进行磁分离, 持续3 min, 弃上清液。使用PBST重复清洗3次, 然后加入1 mL PBST保存液 (pH 7.4, 含1 g/100 mL牛血清白蛋白) 重悬免疫磁珠, 并贮藏在4 $^{\circ}$ C冰箱中以备后续实验。

1.3.3 免疫磁珠的反应条件优化

使用PBST将鼠伤寒沙门氏菌菌液浓度稀释至 2×10^4 CFU/mL, 进行免疫磁珠粒径、用量及捕获时间的优化实验。首先, 选择不同粒径的磁珠 (Q-0174305, 直径100 nm; P2151, 直径200 nm; HY-K0208, 直径1 000 nm) 分别制备免疫磁珠。取200 μ L不同粒径的免疫磁珠悬液添加至1.5 mL EP管中, 将EP管放置于磁性分离架上磁分离3 min, 然后弃去上清液。随后, 加入1 mL鼠伤寒沙门氏菌菌液, 将EP管放入垂直混匀仪中, 室温孵育45 min。孵育结束后, 将EP管放入磁性分离架上进行磁分离, 持续3 min, 收集上清液。最后, 取20 μ L上清液和 2×10^4 CFU/mL菌液分别均匀涂布于PCA固体培养基上, 于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中倒置培养12~16 h后进行计数。每个样品进行3次重复, 根据式(1)计算免疫磁珠的捕获率:

$$\text{捕获率}/\% = \left(1 - \frac{N_1}{N_2}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: N_1 为上清液中鼠伤寒沙门氏菌细胞数量; N_2 为 2×10^4 CFU/mL菌液中鼠伤寒沙门氏菌细胞数量。

根据免疫磁珠的粒径优化结果, 选择50、100、200、300、400 μ g最佳粒径的免疫磁珠与 2×10^4 CFU/mL鼠伤寒沙门氏菌菌液进行IMS实验, 以确定免疫磁珠的最佳用量。最后, 选择最佳粒径的免疫磁珠并按照最适用量与 2×10^4 CFU/mL鼠伤寒沙门氏菌菌液分别孵育15、30、45、60 min, 以确定免疫磁珠的最佳捕获时间。

1.3.4 常规IMS方法的灵敏度和特异性分析

用PBST将鼠伤寒沙门氏菌菌液稀释至 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ CFU/mL, 按照免疫磁珠的最佳反应条件进行灵敏度分析。以鼠伤寒沙门氏菌为目标细菌, 选择大肠杆菌O157:H7、副溶血性弧菌和蜡样芽孢杆菌作为非目标细菌, 制备菌液浓度为 2×10^4 CFU/mL的鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌及混合细菌样品 (含上述4种细菌), 按照免疫磁珠的最佳反应条件进行特异性分析。

1.3.5 IMS微流控系统

本研究设计的IMS微流控系统如图2A所示, 主要包括微流控芯片、微控制器 (STM32F103)、继电器模块、电源模块、电磁铁及注射泵等组件, 具备电磁驱动混合和磁分离功能。微流控芯片的尺寸为长100 mm、宽50 mm、高4 mm, 包括玻璃基底、PDMS层和PSA层,

具体结构见图2B、C。微流控芯片的制作流程根据课题组前期研究成果^[29]进行,具体步骤如下:首先,利用Form 3 3D打印机制作模具,并通过异丙醇溶液反复冲洗模具,将其浸泡30 min,以清除模具表面残留的树脂材料。然后,将PDMS预聚物和固化剂按照10:1的质量比混合均匀,倒入模具中,经真空处理30 min后,将其放置在65℃的恒温环境下固化过夜。最后,将切割好的PSA粘贴在玻璃基底上,将从模具剥离下来的PDMS层与PSA层对齐黏接,制得最终的微流控芯片。系统工作流程如图2D所示:1)将40 μL免疫磁珠悬液(含16 μg免疫磁珠)和40 μL鼠伤寒沙门氏菌菌液同时注入芯片内,直至充满整个混合室;2)位于混合室两侧的电磁铁交替通电,使免疫磁珠在混合室内往返移动,以捕获鼠伤寒沙门氏菌;3)捕获鼠伤寒沙门氏菌后,电磁铁同时通电,将免疫磁珠-鼠伤寒沙门氏菌复合物吸附在混合室内壁,多余液体被排出,并收集、计数;4)最后,同时对2个电磁铁停止供电,用PBST冲洗芯片,收集免疫磁珠-鼠伤寒沙门氏菌复合物。

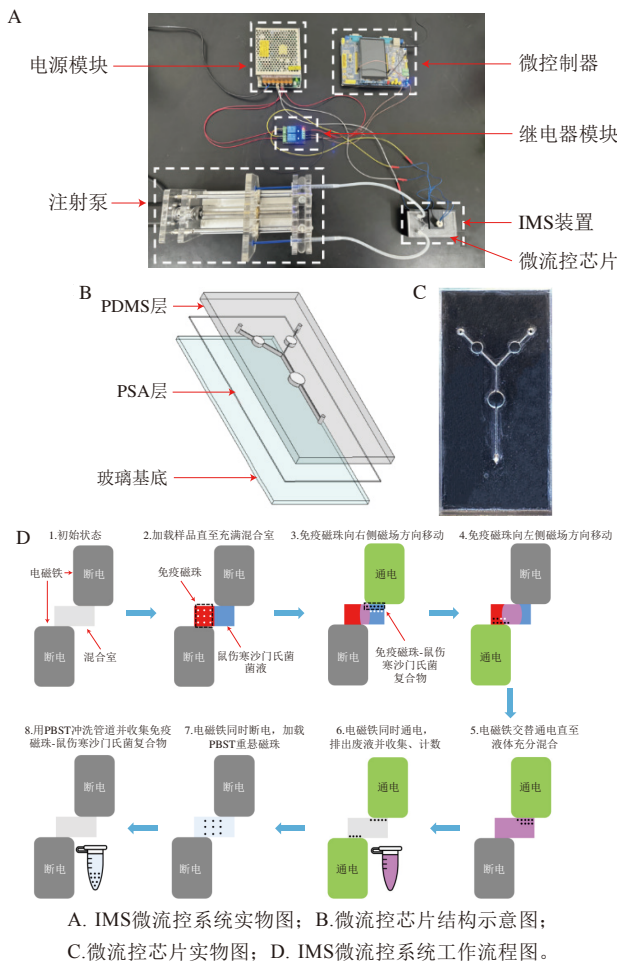


图2 IMS微流控系统

Fig. 2 Schematic diagrams of immunomagnetic separation microfluidic system

1.3.6 IMS微流控系统功能验证

为了验证IMS微流控系统对鼠伤寒沙门氏菌有效捕获和分离的可行性,本研究首先采用COMSOL Multiphysics软件对电磁驱动混合器的电磁驱动混合能力和磁分离能力进行仿真分析,随后通过混合实验评估混合器的混合性能。将1 mL IMS反应体系按比例缩小至80 μL,对IMS微流控系统的驱动磁场强度和磁分离时间进行优化。随后,制备40 μL含有不同浓度($2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ CFU/mL)鼠伤寒沙门氏菌的缓冲液和牛奶样品,对系统的检测灵敏度进行评估。最后,制备40 μL含有鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌及混合细菌的缓冲液和牛奶样品(浓度为 2×10^4 CFU/mL),对系统的检测特异性进行评估。

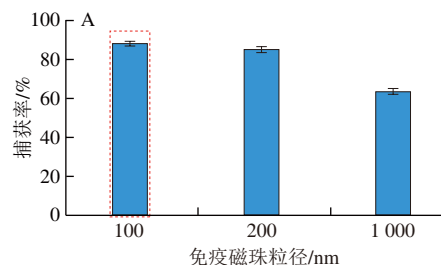
1.4 数据处理与分析

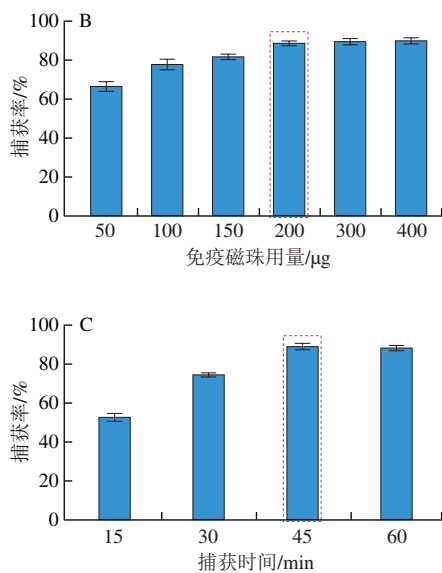
捕获率实验数据以平均值±标准差表示,利用Origin软件进行绘图与分析。

2 结果与分析

2.1 免疫磁珠的反应条件优化结果

如图3A所示,100 nm免疫磁珠的捕获率最高,达到88.1%,而1 000 nm免疫磁珠的捕获率最低,仅为63.5%,原因在于纳米级免疫磁珠与微米级免疫磁珠相比具有更大的比表面积,能够更有效地固定捕获抗体,因此纳米级免疫磁珠的捕获效果最佳。如图3B所示,随着免疫磁珠用量的逐渐增多,捕获率呈明显上升趋势,随后逐渐趋于平缓。对于1 mL PBST反应体系,免疫磁珠用量为400 μg时,具有最高捕获率,高达89.3%;当免疫磁珠用量为200 μg时,捕获率为88.0%。基于检测成本考虑,选择200 μg为免疫磁珠的最佳用量。如图3C所示,随着捕获时间的延长,捕获率逐渐升高随后趋于平缓。当捕获时间为45 min时,捕获率为88.6%,与60 min的测试结果基本一致。在综合考虑免疫磁珠的捕获时间、成本及捕获率等因素后,确定免疫磁珠的最佳反应条件为:100 nm免疫磁珠(Q-0174305),磁珠用量为200 μg,捕获时间为45 min。





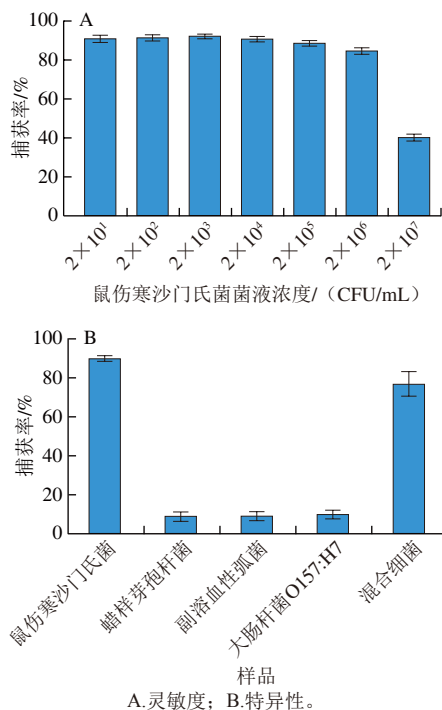
A. 免疫磁珠粒径优化结果; B. 免疫磁珠用量优化结果; C. 免疫磁珠捕获时间优化结果。

图3 免疫磁珠的反应条件优化

Fig. 3 Optimization of reaction conditions for immunomagnetic beads

2.2 常规IMS方法的灵敏度和特异性

如图4A所示, 该方法对 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL浓度菌液的捕获率相对稳定, 均保持在84.4%以上。然而, 对于高浓度菌液(2×10^7 CFU/mL), 捕获率较低, 原因在于免疫磁珠已达到饱和状态, 无法再捕获更多的鼠伤寒沙门氏菌。



A. 灵敏度; B. 特异性。

图4 常规IMS方法的灵敏度和特异性分析

Fig. 4 Sensitivity and specificity analysis of conventional immunomagnetic separation method

如图4B所示, 该方法对只含有鼠伤寒沙门氏菌样品的捕获率高达89.8%, 同时在混有多种细菌的样品中也能高效富集鼠伤寒沙门氏菌, 捕获率为76.7%。对于蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌O157:H7, 捕获率均低于10.0%, 这是因为样品中的非目标细菌通过范德华力或静电作用与免疫磁珠非特异性结合, 造成对非目标细菌的少量捕获。研究结果表明, 常规IMS方法能够高效富集样品中的鼠伤寒沙门氏菌, 具有良好的特异性。

2.3 电磁驱动混合器的混合效率评估

首先, 对电磁驱动混合器的电磁驱动混合和磁分离能力进行仿真验证。在电磁驱动混合过程中, 电磁铁通电-断电周期设为30 s (每次通电15 s、断电15 s), 2个电磁铁始终保持交替通电状态, 电磁铁工作时长为10 min; 在磁分离过程中, 2个电磁铁始终保持通电状态, 电磁铁工作时长为4 min。将电磁铁与混合室接触面积设为50%, 以提高免疫磁珠在混合室内横向和纵向的移动距离。电磁铁线圈匝数和工作电压分别设为1 000和12 V, 磁珠直径设为100 nm。在混合室内, 免疫磁珠所受力主要包括磁场力、黏滞阻力、自身重力、浮力等, 其中发挥主要作用的是磁场力和黏滞阻力。忽略免疫磁珠的加速项, 根据牛顿第二定律得到式(2):

$$F_M + F_{VR} = 0 \quad (2)$$

式中: F_M 和 F_{VR} 分别为磁场力/N和黏滞阻力/N。

将免疫磁珠近似看作球状, 黏滞阻力表达式如式(3)所示:

$$F_{VR} = -6\pi\tau r(u-v) = 0 \quad (3)$$

式中: τ 为动力黏度/($N \cdot s/m^2$); r 为免疫磁珠半径/m; u 为流体速率/(m/s); v 为免疫磁珠速率/(m/s)。

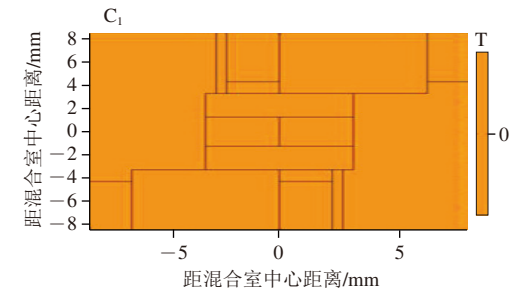
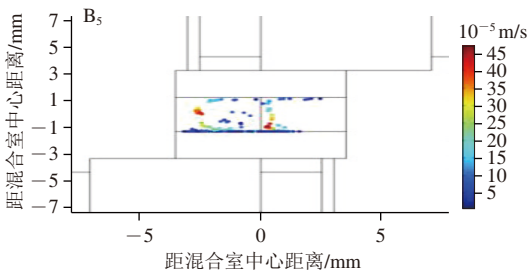
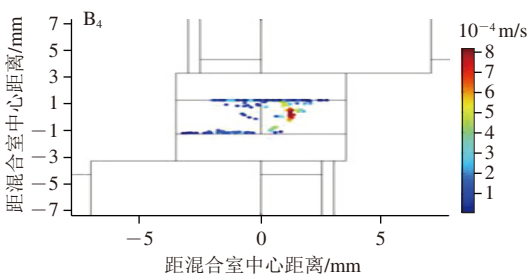
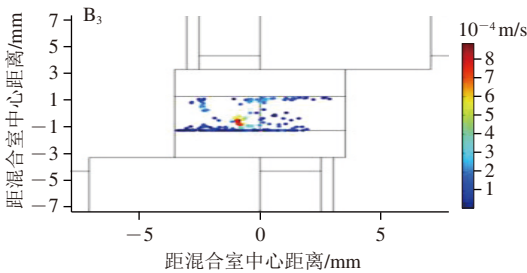
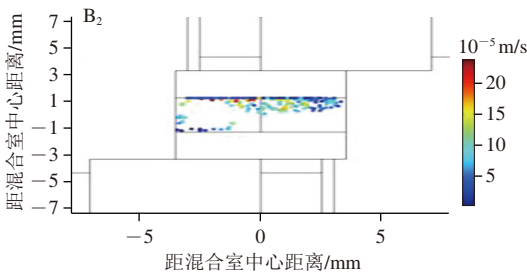
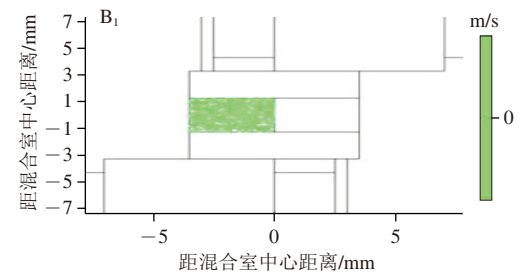
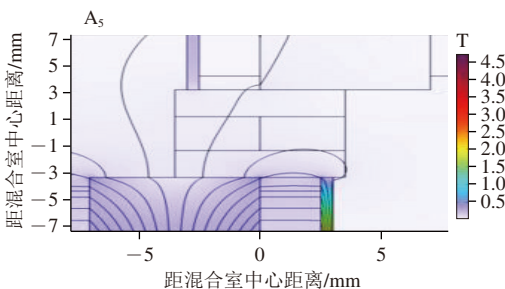
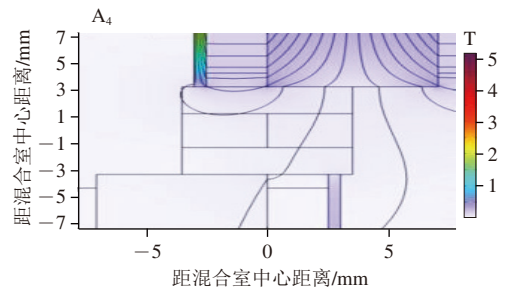
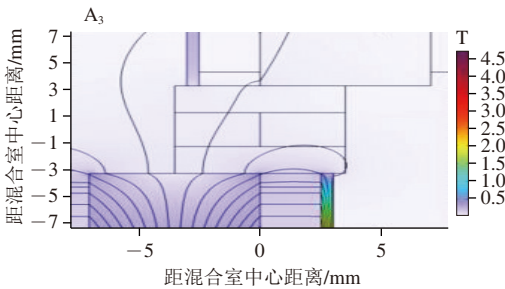
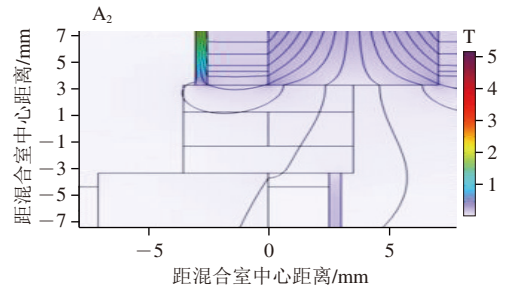
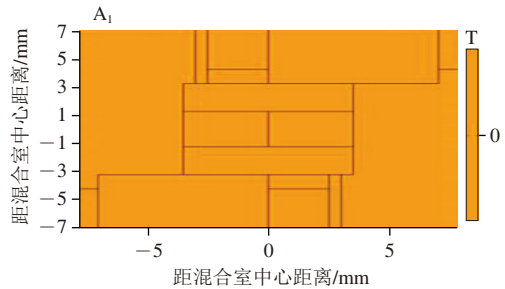
采用麦克斯韦方程组描述外加磁场的磁场强度, 得到表达式如式(4)所示:

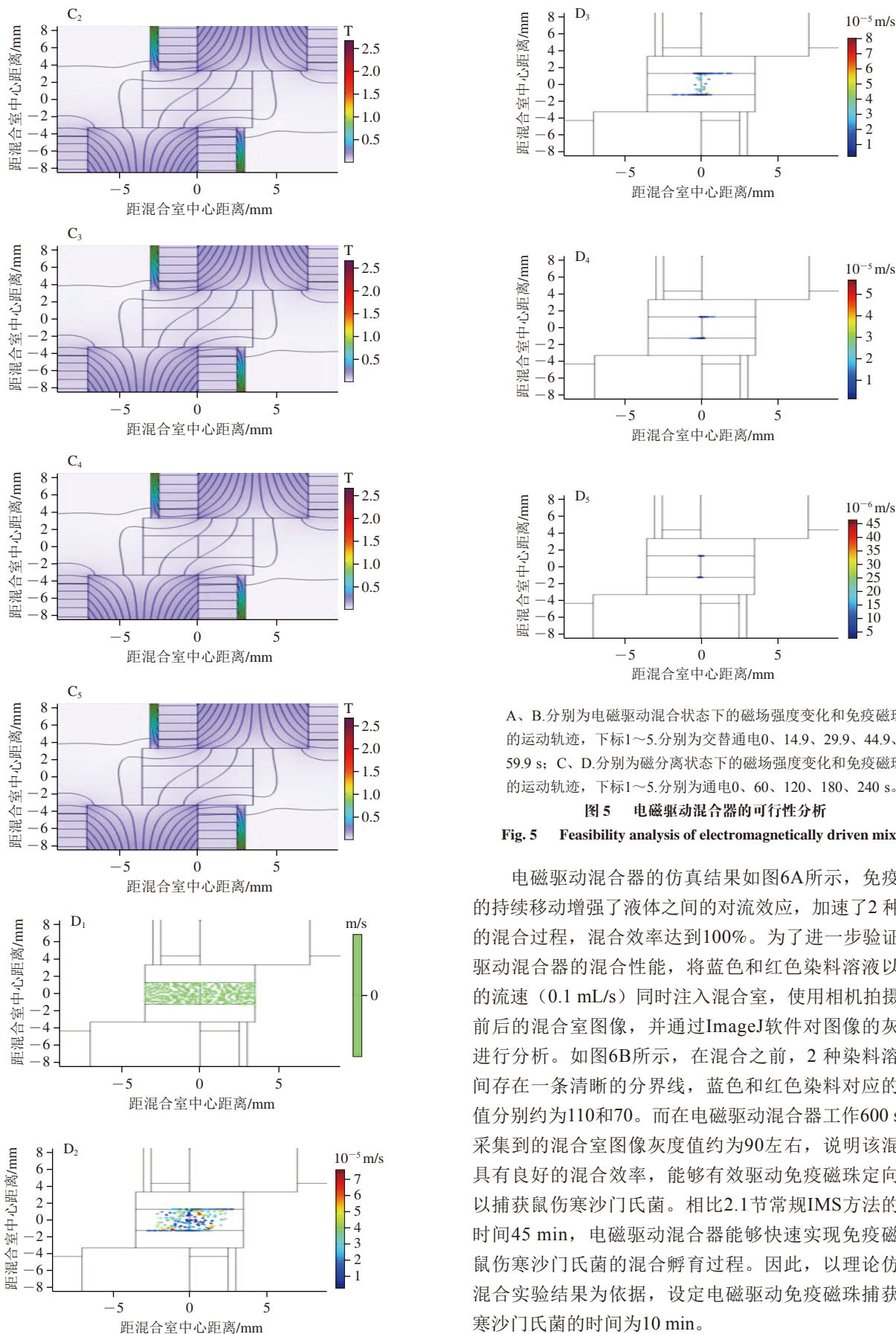
$$F_M = \mu V_{IM} \chi_{IM} (H \times \nabla) H \quad (4)$$

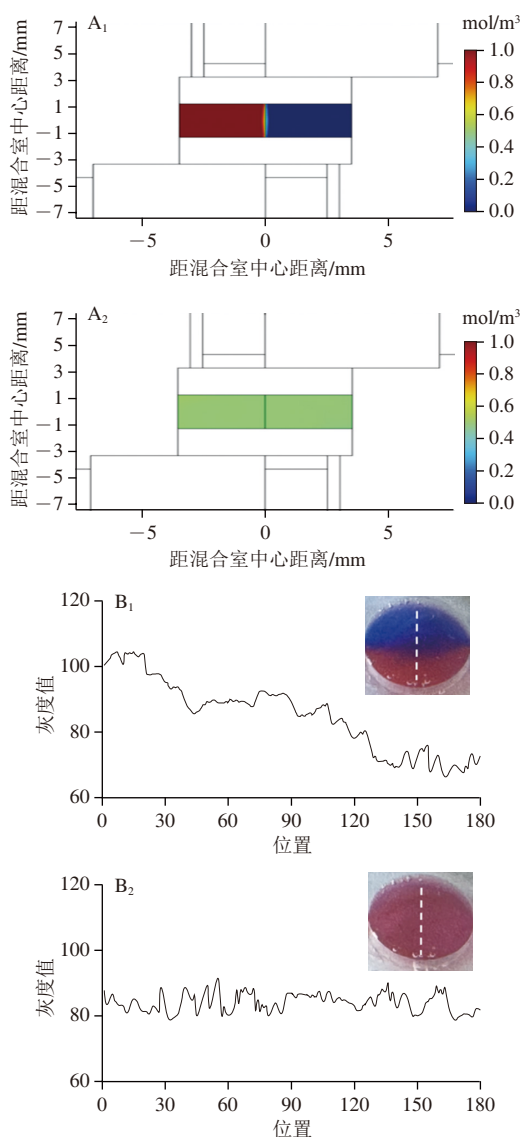
式中: μ 为磁导率; V_{IM} 和 χ_{IM} 分别为磁珠的体积和磁化系数。

通过COMSOL Multiphysics软件对磁场-流场-浓度场进行多物理场耦合仿真, 并使用流体流动颗粒追踪模块模拟免疫磁珠的运动轨迹。在电磁驱动混合过程中, 磁场强度变化及磁珠的运动轨迹如图5A、B所示, 驱动磁场的磁力线能够覆盖整个混合室, 其内部磁通密度范围为0.01~0.07 T。多数磁珠可以在15 s以内完成定向移动, 其运动轨迹基本覆盖整个混合室, 表明驱动磁场可以将磁珠精确移动至混合室内的各个位置, 实现对鼠伤寒沙门氏菌的高效捕获。在磁分离过程中, 磁场强度变化及磁珠的运动轨迹如图5C、D所示, 混合室内的平均

磁通密度约为0.03 T。当电磁铁持续通电2 min后，仅有少量磁珠未被吸附在混合室内壁。而在持续通电3 min后，所有磁珠均已被牢牢吸附在混合室内壁表面。仿真结果表明，电磁驱动混合器对磁珠展现了良好的驱动控制能力，能够在混合室内完成对目标细菌的捕获和分离过程。







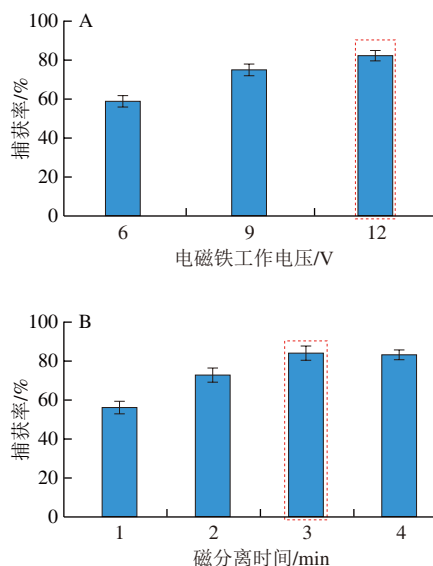
A₁、A₂分别为混合0 s和600 s的COMSOL Multiphysics软件模拟结果；B₁、B₂分别为混合前后的灰度值分析结果；插图中的白色虚线为用于灰度值分析的像素点。

图6 电磁驱动混合器的混合效果评估

Fig. 6 Evaluation of the mixing effect of electromagnetically driven mixer

2.4 IMS微流控系统的磁场条件优化

为确定IMS微流控系统的最佳检测条件，对驱动磁场强度和磁分离时间进行优化实验。如图7A所示，当电磁铁的工作电压在6~9 V时，驱动磁场对免疫磁珠的控制效果相对较差，鼠伤寒沙门氏菌与免疫磁珠的混合效果变差，从而导致捕获率较低。然而，当电磁铁的工作电压增加至12 V时，系统表现出最佳的捕获效果，捕获率为82.3%。如图7B所示，当磁分离时间设定为3 min或4 min时，系统对免疫磁珠-鼠伤寒沙门氏菌的分离回收效果最佳，捕获率均在83.1%以上。基于上述结果，IMS微流控系统的最佳检测条件设置为：电磁铁工作电压12 V，磁分离时间3 min。



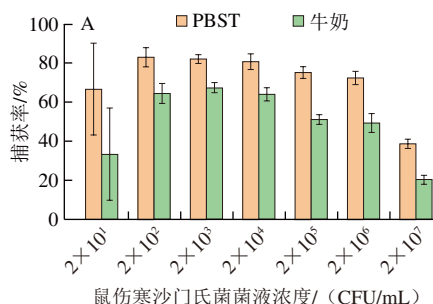
A.电磁铁工作电压优化结果；B.磁分离时间优化结果。

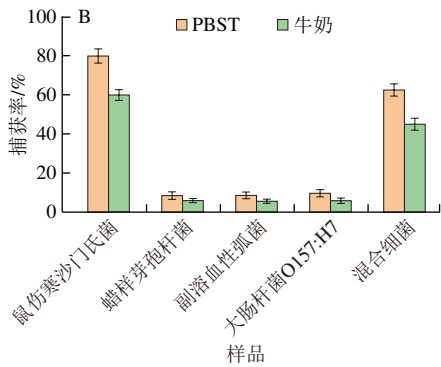
图7 IMS微流控系统的磁场条件优化

Fig. 7 Optimization of magnetic field conditions for immunomagnetic separation microfluidic system

2.5 IMS微流控系统的性能评估

如图8A所示，对于PBST样品的检测，系统对鼠伤寒沙门氏菌（浓度为 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ CFU/mL）的捕获率为38.6%~83.0%，而对牛奶样品的捕获率为20.3%~67.5%，捕获率出现一定程度的下降。如图8B所示，系统能够快速地对不同基质中的鼠伤寒沙门氏菌进行高效富集，对PBST和牛奶样品中的鼠伤寒沙门氏菌（浓度为 2×10^4 CFU/mL）的捕获率分别为80.1%和60.0%；对于混有多种细菌的PBST和牛奶样品，系统对鼠伤寒沙门氏菌的捕获率分别为62.6%和45.0%。研究表明，本研究提出的IMS微流控系统能够有效地从牛奶样品中快速富集鼠伤寒沙门氏菌，捕获率为20.3%~67.5%，较PBST样品的捕获效果相比下降约20%，造成此现象的原因是牛奶基质中存在的蛋白质、脂肪、碳水化合物等成分影响了免疫磁珠对鼠伤寒沙门氏菌的捕获效果，针对此现象，可以通过延长电磁驱动混合时间以进一步提高系统的捕获效果。





A. IMS微流控系统的灵敏度分析结果;
B. IMS微流控系统的特异性分析结果。

图8 IMS微流控系统的性能评估

Fig. 8 Performance evaluation of immunomagnetic separation microfluidic system

3 讨论

食源性致病菌的污染与传播可能发生在食品供应链的各环节中,因此及时监测和识别污染源对确保食品供应链的安全至关重要。在全球范围内,每年有将近1/10的人口受到食源性疾病的威胁,其中由沙门氏菌引起的食物中毒事件更是频繁发生。因此,本研究研发了一种IMS微流控系统,用于从复杂食品样品中快速检测鼠伤寒沙门氏菌。与表1列举的其他IMS方法相比,本研究提出的检测系统对牛奶样品中的鼠伤寒沙门氏菌捕获率在20.3%~67.5%范围内,最低检测限为20 CFU/mL,此结果与现有的IMS装置基本一致。与传统的IMS方法相比,本系统通过延长电磁驱动混合时间,进一步提高了对目标细菌的富集效果,检测用时缩短近70%。另外,该系统能够与PCR、重组酶聚合酶扩增及环介导等温扩增等方法结合,实现对鼠伤寒沙门氏菌的快速检测。然而,此系统仍存在一些不足,如不能对大体积样品中的目标细菌进行连续富集及依赖注射泵注入试剂。未来的研究方向将聚焦于大体积食品样品的检测,朝着IMS检测系统微型化和自动化方向进行深入研究。

表1 IMS微流控系统与现有IMS方法的比较

Table 1 Comparison of immunomagnetic separation microfluidic system with existing immunomagnetic separation methods

方法	目标菌	时间/min	检测限/(CFU/mL)	捕获率/%	基质	参考文献
传统IMS	鼠伤寒沙门氏菌	40	100	55	牛奶	[30]
传统IMS	鼠伤寒沙门氏菌	60	100	~60	牛奶	[31]
IMS装置	鼠伤寒沙门氏菌	45	10	~65	PBS	[32]
IMS装置	大肠杆菌O157:H7	120	10	~25	牛奶	[33]
IMS系统	鼠伤寒沙门氏菌	13	20	33.3	牛奶	本研究

4 结论

本研究开展了基于微流控芯片的鼠伤寒沙门氏菌IMS检测技术研究,所开发的IMS微流控系统由微流控芯片、微控制器、电磁分离与混合模块组成,具备电磁驱动混合和磁分离功能,能够实现13 min内完成免疫磁珠与鼠伤寒沙门氏菌的快速混合孵育、分离与富集,从而提高鼠伤寒沙门氏菌的检测效率。通过免疫磁珠粒径、用量、捕获时间条件的优化实验,本研究在最优条件下可以实现牛奶样品中浓度范围 $2\times 10^1\sim 2\times 10^6$ CFU/mL的鼠伤寒沙门氏菌快速捕获与分离,捕获率在33.3%~67.5%之间,最低检测限为20 CFU/mL,且具有良好的灵敏度和特异性。因此,本研究提出的基于微流控芯片的鼠伤寒沙门氏菌IMS检测方法能够实现复杂食品基质中目标细菌的迅速、准确富集,为食源性致病菌的快速检测提供有效的解决方案,也为后续食品中食源性致病菌的快速检测提供一定参考。

参考文献:

[1] XUE L, HUANG F C, HAO L, et al. A sensitive immunoassay for simultaneous detection of foodborne pathogens using MnO₂ nanoflowers-assisted loading and release of quantum dots[J]. Food Chemistry, 2020, 322: 126719. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126719.

[2] 王丹丹,刘鸣畅,杨艳歌,等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 276-285. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201105-048.

[3] GHATAK S. Chapter 15-Strategies for elimination of foodborne pathogens, their influensive detection techniques and drawbacks[M]// BISWAS A K, MANDAL P K. Meat quality analysis, Elsevier, 2020: 267-286. DOI:10.1016/B978-0-12-819233-7.00015-X.

[4] 尹德凤,张莉,张大文,等. 食品中沙门氏菌污染研究现状[J]. 江西农业学报, 2015, 27(11): 55-60. DOI:10.19386/j.cnki.jxnyxb.2015.11.014.

[5] SILVA N F D, MAGALHES J M C S, FREIRE C, et al. Electrochemical biosensors for *Salmonella*: state of the art and challenges in food safety assessment[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 9(15): 667-682. DOI:10.1016/j.bios.2017.08.019.

[6] ŠVARC P L, JENSEN M B, LANGWAGEN M, et al. Nutrient content in plant-based protein products intended for food composition databases[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 106: 104332. DOI:10.1016/j.jfca.2021.104332.

[7] 朱奇,郑丹桂,陈玉翡,等. 食源性致病菌单核细胞增生李斯特菌检测能力验证结果分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(17): 2619-2621. DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.17.047.

[8] 王俊韵,沈静雯,陆利霞,等. 食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 348-355. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020060210.

[9] 杜娟,陈鑫,刘楷,等. 基于磁性金属有机框架分离的纳米金比色法检测单核细胞增生李斯特菌[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 360-367. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220316-179.

[10] 杜世龙,卢菲,周帆,等. 磁性纳米分离技术在食源性致病菌快速检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 361-371. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2023050235.

[11] 姚帮本,闫超,姚丽,等. 食源性致病菌快速检测方法研究进展[J]. 分析测试学报, 2021, 40(5): 617-627. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2021.05.001.

- [12] 潘晖, 许银, 王小红, 等. 磁分离结合qPCR快速检测酱卤肉中的沙门氏菌[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 330-336. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.0235.
- [13] TIAN Y M, BU T, ZHANG M, et al. Metal-polydopamine framework based lateral flow assay for high sensitive detection of tetracycline in food samples[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 127854. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127854.
- [14] ZHANG X, ZHOU J, ZHANG C D, et al. Rapid detection of *Enterobacter cloacae* by immunomagnetic separation and a colloidal gold-based immunochromatographic assay[J]. RSC Advances, 2016, 6: 1279. DOI:10.1039/C5RA23533B.
- [15] HUANG F C, XUE L, LI W Z, et al. An ultrasensitive impedance biosensor for *Salmonella* detection based on rotating high gradient magnetic separation and cascade reaction signal amplification[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 176: 112921. DOI:10.1016/j.bios.2020.112921.
- [16] XUE L, GUO R Y, HUANG F C, et al. An impedance biosensor based on magnetic nanobead net and MnO₂ nanoflowers for rapid and sensitive detection of foodborne bacteria[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 173: 112800. DOI:10.1016/j.bios.2020.112800.
- [17] 平洋, 谭静, 王晓瑞, 等. 免疫磁珠技术分离检测熟制食品中的蜡样芽孢杆菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 6963-6967. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq.11-5956/ts.2019.20.040.
- [18] 黄震, 罗梅霞, 汪泽祥, 等. 免疫磁分离法高效富集牛奶中大肠杆菌O157:H7[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4492-4497. DOI:10.3969/j.issn.2095-0381.2019.14.009.
- [19] 曹潇, 赵力超, 陈洵, 等. 免疫磁分离技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 338-345. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20180702-025.
- [20] JIN Y, XIONG P, XU T Y, et al. Time-efficient fabrication method for 3D-printed microfluidic devices[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 1233. DOI:10.1038/s41598-022-05350-4.
- [21] WANG S Y, ZHENG L Y, CAI G Z, et al. A microfluidic biosensor for online and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using fluorescence labeling and smartphone video processing[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 140: 111333. DOI:10.1016/j.bios.2019.111333.
- [22] WANG S Y, LIU N, ZHENG L Y, et al. A lab-on-chip device for the sample-in-result-out detection of viable *Salmonella* using loop-mediated isothermal amplification and real-time turbidity monitoring[J]. Lab on a Chip, 2020, 20: 2296-2305. DOI:10.1039/d0lc00290a.
- [23] GUO R Y, XUE L, CAI G Z, et al. Fe-MIL-88NH₂ metal-organic framework nanocubes decorated with Pt nanoparticles for the detection of *Salmonella*[J]. ACS Applied Nano Materials, 2021, 4(5): 5115-5122. DOI:10.1021/acsanm.1c00574.
- [24] HOU Y, CAI G Z, ZHENG L Y, et al. A microfluidic signal-off biosensor for rapid and sensitive detection of *Salmonella* using magnetic separation and enzymatic catalysis[J]. Food Control, 2019, 103: 186-193. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.04.008.
- [25] HUANG F C, GUO R Y, XUE L, et al. An acid-responsive microfluidic *Salmonella* biosensor using curcumin as signal reporter and ZnO-capped mesoporous silica nanoparticles for signal amplification[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, 312: 127958. DOI:10.1016/j.snb.2020.127958.
- [26] QI W Z, ZHENG L Y, WANG SI H, et al. A microfluidic biosensor for rapid and automatic detection of *Salmonella* using metal-organic framework and raspberry Pi[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 178: 113020. DOI:10.1016/j.bios.2021.113020.
- [27] WANG Y H, QI W Z, WANG L, et al. Magnetic bead chain-based continuous-flow DNA extraction for microfluidic PCR detection of *Salmonella*[J]. Micromachines, 2021, 12(4): 384. DOI:10.3390/mi12040384.
- [28] CAI G Z, ZHENG L Y, LIAO M, et al. A microfluidic immunosensor for visual detection of foodborne bacteria using immunomagnetic separation, enzymatic catalysis and distance indication[J]. Microchimica Acta, 2019, 186: 757. DOI:10.1007/s00604-019-3883-x.
- [29] JIN Y, WANG J Y, WANG Z Q, et al. An integrated microfluidic biosensing system based on a versatile valve and recombinase polymerase amplification for rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Biosensors, 2023, 13(8): 790. DOI:10.3390/bios13080790.
- [30] 李静雯, 杜美红, 杨寅, 等. 不同粒径的免疫磁珠对食源性致病菌捕获效率的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(9): 46-52. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2020.09.007.
- [31] 李诗瑶, 彭青枝, 王鸣秋, 等. 氨基化磁珠非靶向富集食源性致病菌的条件筛选及优化[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 297-302. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1301.
- [32] CAI G G, WANG S Y, ZHENG L Y, et al. A fluidic device for immunomagnetic separation of foodborne bacteria using self-assembled magnetic nanoparticle chains[J]. Micromachines, 2018, 9(12): 624. DOI:10.3390/mi9120624.
- [33] LIM M C, PARK J Y, PARK K, et al. An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation[J]. Food Control, 2017, 73: 1541-1547. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.11.021.