



专论与综述

凝集素在食源致病菌快速检测中应用的研究进展

杨国泰¹ 李鹏² 胡烈海¹ 孟祥玉¹ 王钰童¹ 许恒毅^{*1}

1 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 江西 南昌 330047

2 日照职业技术学院 山东 日照 276800

摘要: 凝集素是一类具有独特糖专一性、能够与糖非共价可逆结合的蛋白质。食源致病菌表面存在大量糖蛋白分子,凝集素因能够与其发生高亲和力的结合,被广泛应用于食源致病菌的快速检测中。凝集素作为识别分子用于食源致病菌的分离与检测,能够改善检测新方法的实用性、消除食品基质的干扰、缩短样品的处理时间、提高检测的灵敏度。本文介绍了凝集素的基本信息及其糖特异性识别机制,并对凝集素在食源致病菌快速检测领域的应用进展进行了综述。

关键词: 凝集素, 食源致病菌, 分离, 检测

Progress in application of lectin in rapid detection of food-borne pathogens

YANG Guo-Tai¹ LI Peng² HU Lie-Hai¹ MENG Xiang-Yu¹ WANG Yu-Tong¹
XU Heng-Yi^{*1}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China

2 Rizhao Polytechnic, Rizhao, Shandong 276800, China

Abstract: Lectin can bind with carbohydrate specifically, non-covalently and reversibly, known as a kind of carbohydrate-binding proteins. The presence of a large number of glycoprotein molecules on the surface of food-borne pathogens makes it possible that lectin bind with food-borne pathogens with high affinity, making lectin been widely used in the rapid detection of food-borne pathogens. When applied as a recognition agent for the separation and detection of food-borne pathogens, lectin harbors the merits of improving the practicability of the new detection methods, eliminating matrix interference, improving sensitivity and shortening sample processing time. In this article, the basic information of the lectins and the mechanism of carbohydrate specificity recognition were introduced, and the application progress of lectin used in the field of rapid detection of food-borne pathogens were reviewed.

Keywords: Lectin, Food-borne pathogens, Separation, Detection

Foundation items: Research Foundation from State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University (SKLF-ZZB-201720); Educational Commission of Jiangxi Province (GJJ150014)

***Corresponding author:** Tel: 86-791-88304447-222-9520; E-mail: kidyxu@163.com

Received: 31-05-2018; **Accepted:** 22-08-2018; **Published online:** 15-09-2018

基金项目: 食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-201720); 江西省教育厅基金(GJJ150014)

***通信作者:** Tel: 0791-88304447-222-9520; E-mail: kidyxu@163.com

收稿日期: 2018-05-31; **接受日期:** 2018-08-22; **网络首发日期:** 2018-09-15

凝集素(Lectin)是一类从各种植物、无脊椎动物以及高等动物中提取并纯化出的可与某一种糖分子及其衍生物专一性结合的蛋白质^[1], 因其具有独特的与碳水化合物特异性结合的能力, 在临床医学、药剂学、生物学等诸多领域得到广泛的应用^[2]。细菌可产生多种糖缀合物并以多糖作为其细胞壁组成成分^[3], 为凝集素的结合提供了充分条件, 因此在细菌的快速检测领域中凝集素作为细菌的识别分子得到了广泛的应用。

食源致病菌是指可以引起食物中毒或以食品为传播媒介的致病性细菌, 食源致病菌感染是导致食源性疾病发生的主要原因之一, 因此对食源致病菌的监测一直是各国食源性疾病预防的重点^[4]。为了克服传统食源致病菌检测方法检测周期长、费时费力的缺点^[5-6], 同时满足食品生产、销售等过程中即时检测的实际应用需求, 操作简便、快速和灵敏的新型检测方法不断涌现。凝集素作为一类与食源

致病菌具有较强亲和力的蛋白质, 相较于同为蛋白质、在食源致病菌分离和检测领域应用较为成熟的抗体而言, 具有成本低廉、稳定性高、制备方便等特点, 在食源致病菌快速检测方法的建立过程中得到越来越多的应用。本文对凝集素在食源致病菌快速检测中的应用进行了综述, 旨在为凝集素在该领域中的进一步发展和应用提供参考。

1 凝集素的分类及其糖特异性识别机制

凝集素最早是 Stillmark 于 1888 年在蓖麻子中发现的^[7], 迄今为止人们已发现 1 000 余种凝集素^[8]。表 1 列举了一些常用的凝集素及其基本信息。随着分子生物学、生物信息学和生物化学的发展, 人们对凝集素的蛋白质结构及功能、生物学特性等都有了深刻的了解, 关于凝集素等的糖类生物学的研究更是成为了近年来继蛋白质和核酸后的又一研究热点^[19]。

表 1 常见凝集素及其基本信息

Table 1 General lectins and their basic information

凝集素 Lectins	来源 Source	碳水化合物结合类型 Carbohydrate binding type	参考文献 References
刀豆蛋白 A Concanavalin A (Con A)	洋刀豆 <i>Canavalia ensiformis</i> , jack bean	α -D-Man; α -D-Glc	[9]
豌豆凝集素 Pea lectin	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	D-Man; D-Glc; D-Fru; D-sorbose	[10]
麦胚凝集素 Wheat germ lectin (WGA)	小麦 <i>Triticum vulgaris</i>	N-GlcNAc	[11]
大豆凝集素 Soybean lectin (SBA)	大豆 <i>Glycine max</i>	α -D-GalNAc; β -D-GalNAc	[12]
蜗牛凝集素 <i>Helix pomatia</i> lectin (HPA)	食用蜗牛 Edible snail	β -D-GalNAc; α -GlcNAc	[13]
花生凝集素 Peanut lectin (PNA)	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc; D-Gal	[14]
蓖麻凝集素 <i>Ricinus communis</i> lectin (RCA)	蓖麻子 <i>Castor bean</i>	β -D-Gal; α -D-Gal	[12]
莲花豆凝集素 Lotus tetragonolobus lectin (LTL)	四棱豆 <i>Asparagus pea</i>	α -L-Fuc	[15]
菜豆凝集素 Phytohemagglutinin (PHA)	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> , red kidney bean	Bisecting GlcNAc; Biantennary N-glycans	[16]
鲎凝集素 Limulin	鲎 <i>Limulus polyphemus</i> , horseshoe crab	NANA; KDO	[12]
荆豆凝集素 <i>Ulex europaeus</i> lectin (UEA)	荆豆 <i>Ulex europaeus</i>	α -L-Fuc	[17]
怀槐凝集素 <i>Maackia amurensis</i> lectin (MAL)	怀槐 <i>Maackia amurensis</i>	Gal- β -(1 \rightarrow 4)-N-GlcNAc	[18]

Note: All hexoses are in the pyranose form. Man: Mannose; Glc: Glucose; Gal: Galactose; Fru: Fructose; Fuc: Fucose; GlcNAc: N-Acetylglucosamine; GalNAc: N-Acetylgalactosamine; NANA: N-Acetylneuraminic acid; KOO: 2-Keto-3-deoxyoctonate.

1.1 凝集素的分类

随着对凝集素开发和应用的增多,将这些来源各异、功能和结构千差万别的凝集素进行分类势在必行。根据不同的需求,目前建立了3种凝集素的分类系统,即按照凝集素的物种来源、亚基特征和所结合糖类型进行分类。

按凝集素的物种来源,凝集素大致分为3类:动物凝集素、植物凝集素和微生物凝集素。动物凝集素根据氨基酸序列的同源性以及进化上的相关性又分为C型凝集素、P型凝集素、I型凝集素、S型凝集素和五聚体蛋白等五大类^[20]。几乎所有的动物体内都发现了凝集素,这些凝集素主要以膜整合及水溶性的两种形式存在。植物凝集素根据氨基酸序列的同源性及其在进化上的关系可以分为7大类:豆科凝集素、单子叶甘露糖结合凝集素、几丁质结合凝集素、苋科凝集素、II型核糖体失活凝集素、木菠萝素家族、葫芦科韧皮部凝集素^[21]。其中,豆科凝集素是目前鉴定最清楚的植物凝集素,该类型中诸如刀豆蛋白A和大豆凝集素等在化学、生物学、免疫学以及医学等多个领域都有广泛应用^[22]。微生物凝集素来源非常广泛,常存在于微生物细胞表面,包括细菌的菌毛、病毒的刺突、真菌的子实体等,有的也存在于细胞内部,如原生质、周质等。通过与细胞膜表面的单糖或寡糖进行专一性结合,微生物凝集素能够识别寄主细胞膜上的糖链,与寄主发生关系^[23]。例如,大肠杆菌菌毛含有I型、P型、S型及FIC型等多种凝集素,这些菌毛凝集素能与肠道上皮细胞表面的聚糖发生特异性相互作用黏附于肠道中上,引发肠道疾病^[24-25]。

按凝集素的亚基特征,凝集素能大致分为四类:部分凝集素(Merolectins),只含1个糖结合结构域;全凝集素(Hololectins),含至少2个相同或非常相似的糖结合结构域;嵌合凝集素(Chimmerolectins),由1个或多个糖结合结构域与1个具有生物活性的结构域组成;超凝集素(Superlectins),含2个以上不同的糖结合结构域^[8]。

按凝集素的糖结合特异性,凝集素可以分成若干类,即能与某糖分子特异性结合就称为该糖凝集素,按此一般可把凝集素分为六大类:D-甘露糖或D-葡萄糖凝集素(如刀豆蛋白A)、N-乙酰氨基葡萄糖凝集素(如麦胚凝集素)、N-乙酰氨基半乳糖凝集素(如大豆凝集素)、D-半乳糖凝集素(如蓖麻凝集素)、L-岩藻糖凝集素(如荆豆凝集素)、N-乙酰神经氨酸(唾液酸)凝集素(如鲎凝集素)^[19]。

但无论按何种系统分类,所有凝集素都有一个共同特点:能特异性地与糖类分子结合。自然界中糖类分子广泛存在,且近年来对糖类分子生物学研究的热度不断上升,因此基于糖特异性识别的特点,凝集素在各领域的研究和应用也在逐步深入。

1.2 凝集素的糖特异性识别机制

凝集素与糖类分子之间的相互作用力主要包括氢键、金属配位键、静电相互作用力以及疏水相互作用力等^[26]。糖基表面存在大量的羟基,能够与凝集素表面的氨基和巯基形成氢键;大多数豆科植物凝集素都是与 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 紧密结合的金属蛋白,这些金属离子是与糖结合时所必需的,通过与凝集素形成配位键参与到糖与凝集素的相互作用过程中;疏水相互作用力在凝集素与糖分子特异性识别中也起着重要作用。

凝集素对糖分子的选择性主要来自于氢键的结合和单糖环的疏水面与芳香氨基酸侧链面对面堆积形成的疏水相互作用力,进一步的选择性则可能是通过增加糖和蛋白质的接触得以实现的,而这有时需要桥连水分子或二价阳离子才能实现^[20]。大部分凝集素的单个糖结合位点只有较低的亲和力,但具有高度的专一性,而凝集素实现生物学相互作用所需的高亲和力主要来源于其具有的多价性。以麦胚凝集素为例说明其结合特点,麦胚凝集素由两个相同的亚基组成,每个亚基包含4个结构域(1-4)(图1A),完整的二聚体麦胚凝集素具有8个功能化的糖结合位点,通过氢键、疏水相互作用力以及静电相互作用力等能够

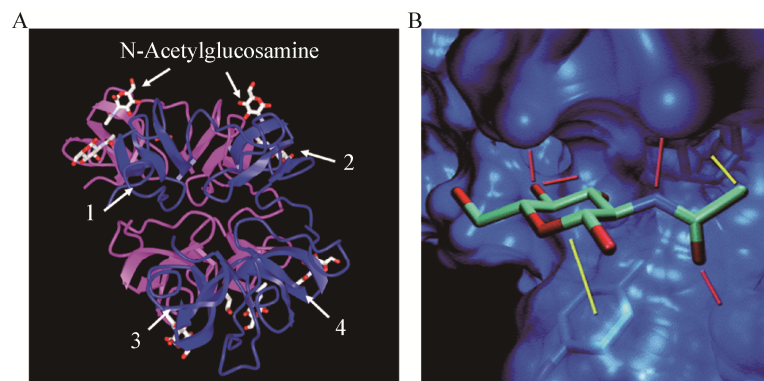


图 1 麦胚凝集素的晶体结构(A)和糖分子结合模型(B)

Figure 1 Crystal structure (A) and carbohydrate in the binding site (B) of WGA

注: A 图片引自 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2UVO>. B: 黄线: 疏水相互作用力; 红线: 氢键及静电相互作用力^[27].

Note: The picture A was quoted from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2UVO>. B: Yellow lines: Hydrophobic interactions; Red lines: Electrostatic interactions and hydrogen bonds^[27].

实现与 N-乙酰葡萄糖胺及其衍生物的特异性结合(图 1B)^[27-28]。麦胚凝集素与单个目标糖分子的亲和力达到 5×10^5 L/mol^[29], 当与细菌结合时, 由于麦胚凝集素具有多个糖结合位点, 且细菌表面具有丰富的多糖结构, 与细菌的结合具有多价性, 亲和力显著提升, 达到 2.07×10^8 L/mol^[30]。

细菌种类繁多, 能够产生多种糖缀合物并以多糖作为其细胞壁组成成分, 而这些糖缀合物表现出极大的结构多样性和复杂性, 使其在结构上具有丰富的多样性。细菌表面丰富的糖缀合物能够与凝集素发生特异性结合, 使得凝集素在细菌检测中的应用成为可能。

凝集素与细菌的结合机理是识别细菌表面对应的糖分子基团, 但具体哪种凝集素能够对应识别哪种细菌的系统性研究尚未见报道。由于细菌表面的多糖除了具有多样性与复杂性外, 还具有一定的相似性, 如革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞膜都具有肽聚糖、革兰氏阴性菌外膜具有大量的脂多糖等, 这些结构相似的多糖能够给凝集素提供充足的结合位点, 但也使得凝集素与细菌结合的特异性比抗体弱, 无法像抗体一样特异性地识别细菌, 只能识别某一类细菌(如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌), 如刀豆蛋白 A 能够识别大肠杆菌等革兰氏阴性菌^[31], 麦胚凝集素能够广谱识别金黄色葡萄球

菌、大肠杆菌等细菌^[32], 蓖麻凝集素能够广谱识别枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌^[33]等。

2 凝集素在食源致病菌快速检测中的应用

食品中食源致病菌的快速检测主要分为两个部分: 样品的前处理和检测。凝集素与食源致病菌具有较强的亲和力, 可以作为识别分子应用于快速检测方法的建立。相较于抗体而言, 凝集素具有成本低廉、易于制备等特点, 可应用于食源致病菌的富集分离, 用以对食品样品进行前处理, 也可与电化学、等离子共振传感器以及各种纳米材料结合开发新型检测方法, 在食源致病菌检测领域的应用越来越广泛。

2.1 凝集素在食源致病菌分离中的应用

食源致病菌检测中常见的前处理手段包括传统的增菌培养和细菌分离两类。而细菌分离因具备消除食品基质后续干扰、提高检测灵敏度以及缩短样品处理时间的优点被广泛开发利用。早在 20 世纪 90 年代, Payne 等^[34]就建立了基于磁珠、聚苯乙烯微球、滤纸以及琼脂糖凝胶等载体的凝集素共价修饰分离体系, 将修饰有刀豆蛋白 A、麦胚凝集素、蜗牛凝集素以及双孢菇凝集素的各种材料用于多种食源致病菌的分离富集, 并通过平板涂布法对分离效果进行评价。实验结果显示:

麦胚凝集素修饰的磁珠对金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌和大肠杆菌均有一定的分离效果；双孢菇凝集素修饰的磁珠能够分离单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌，对沙门氏菌仅有极差的分离效果；蜗牛凝集素修饰的磁珠对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌有较好的分离效果，却无法分离革兰氏阴性菌。研究还表明基于磁珠的分离体系相较于聚苯乙烯微球、滤纸和琼脂糖凝胶等载体具有更好的分离效果^[34]。在同一作者次年发表的另一篇文章^[35]中，作者将麦胚凝集素和双孢蘑菇凝集素固定到磁性纳米微球表面，用于分离生鸡蛋、牛肉馅等食品样品中的肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌以及金黄色葡萄球菌；本文重点研究了基于凝集素的磁分离体系在致病菌实际检测中的效果，结果显示该磁分离体系有效地排除了食品基质的干扰，并基于磁分离技术富集浓缩细菌的特性将部分基质中致病菌的检测灵敏度提升了 1-2 个数量级。这两项研究为凝集素在致病菌分离中的应用提供了新思路，但所建立的分离体系缺乏系统优化，分离效果不够稳定，后续的致病菌检测手段也相对繁琐，仍有很大的进一步研究空间。

随后，越来越多的研究聚焦于基于凝集素的细菌分离，建立起了越来越多更加系统全面的细菌分离方法。目前常见的细菌分离方法分为两类：具有选择性的磁分离及其类似方法和不具有选择性的离心、过滤、交换树脂、吸附等方法^[36]。相较其他细菌分离方法而言，具有选择性的细菌磁分离方法能够更大程度地排除基质干扰，不需要复杂的仪器设备，是近年来细菌分离的主要研究方向。El-Boubbou 等^[37]将刀豆蛋白 A 应用到磁分离技术中，在糖基化的磁珠表面修饰刀豆蛋白 A，实现了致病菌的分离检测。该研究提出了更加稳定有效的磁分离方案，系统优化了磁分离的相关参数，进一步证实了刀豆蛋白 A 在大肠杆菌磁分离领域中的良好应用潜力。He 等^[38]将羧基化的甘露糖固定在磁珠表面，使其结合刀豆蛋白 A，得到表面修饰有刀豆蛋白 A 的磁分离材料，

用于矿泉水中大肠杆菌 O157:H7 的分离，分离得到的细菌结合流式细胞术实现检测，最低检测限达到 6 CFU/mL。本实验室的前期研究建立了多个基于免疫磁分离的致病菌富集分离体系，实现了多种食源致病菌的特异性分离^[39-43]，并进一步探讨了以万古霉素作为识别分子的革兰氏阳性菌磁分离方法^[6,44]，但在食源致病菌的广谱性分离以及磁分离成本控制方面还有待提升。而凝集素中诸如刀豆蛋白 A、麦胚凝集素等具有识别某一类或者广谱识别细菌的能力，且易于制备、成本低廉，在磁分离技术中具有较高的应用价值，有望实现多种致病菌的同时捕获，结合多重检测方法能够实现同时灵敏检测多种致病菌。将凝集素作为识别分子应用到磁分离技术中的研究也已见报道^[29]，本实验室也将会着力于进一步研究凝集素磁分离，以期建立起更加系统、完善可行的细菌磁分离方法。

除在磁分离技术中得到广泛应用以外，在很多新颖的细菌分离技术中凝集素也起着重要作用。Campuzano 等^[45]将刀豆蛋白 A 固定的微引擎装置应用于大肠杆菌的分离。微引擎装置的动力能够使整个装置在基质中游走，当遇到大肠杆菌时，装置表面的刀豆蛋白 A 能够特异性地与大肠杆菌表面含有 α -甘露糖或葡萄糖的糖蛋白结合，从而将大肠杆菌吸附在装置表面，实现大肠杆菌的分离。该装置巧妙地凝集素对细菌的结合功能与微引擎的动力系统结合，构建了一种方便直接、无需标记的细菌分离方法，且该方法能够直接应用到食品及临床样品。Dao 等^[46]把刀豆蛋白 A 固定在微流控装置表面用于富集分离鼠伤寒沙门氏菌，并结合恒温扩增技术实现了检测。结果显示，微流控富集分离装置的应用能够将恒温扩增技术对鼠伤寒沙门氏菌的检测限提高 1.76 个数量级，达到 5 CFU/mL。

在致病菌的分离过程中，凝集素展现出了优良的识别性能，且相比于抗体、适配子等特异性的识别分子，部分凝集素(如刀豆蛋白 A、麦胚凝集素)具有广谱的细菌识别能力，能够通过一种分离材料实现多种致病菌的同时分离，再结合细菌

的多重检测手段便能实现多种致病菌同时检测，具有极高的实际应用潜力。

2.2 凝集素在食源致病菌检测中的应用

为克服传统食源性致病菌检测方法存在的检测周期长、费时费力等缺点，满足实际生产需求，越来越多的研究致力于建立操作简便、快速

灵敏的新型致病菌检测方法。而凝集素在快速检测方法中的应用，对建立快速检测方法的思路拓展、新型分析仪器的开发应用以及检测成本的合理控制等方面都起到了重要作用。表 2 总结了近几年以凝集素作为细菌识别分子用于食源致病菌快速检测的研究。

表 2 凝集素在致病菌检测中的应用

Table 2 The application of lectin in the detection of pathogenic bacteria

凝集素 Lectins	致病菌 Pathogen bacteria	检测方法 Detection method	检测限 Limit of detection	检测时间 Detection time	参考文献 References
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	石英晶体微天平 Quartz crystal microbalance (QCM)	7.5×10^2 cells/mL	NR	[47]
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	电化学位移传感器 Electrochemical displacement sensor	600 cells/mL	15 min	[31]
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	电致化学发光传感器 Electrogenenerated chemiluminescence biosensor	127 cells/mL	70 min	[48]
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	电化学传感器、石英晶体微天平 Electrochemical biosensor, quartz crystal microbalance (QCM)	电化学传感器: 25 cells/mL; 石英晶体微天平: 50 cells/mL	NR	[49]
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	磁弹性传感器 Magnetoelastic sensors	Electrochemical biosensor: 25 cells/mL; QCM: 50 cells/mL	3 h	[50]
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	电化学石英晶体微天平 Electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM)	1.0×10^4 CFU/mL	NR	[51]
刀豆蛋白 A Con A	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	荧光成像 Fluorescence imaging	0.9×10^2 CFU/mL	NR	[52]
刀豆蛋白 A、 蓖麻凝集素 Con A, RCA	大肠杆菌、 枯草芽孢杆菌、 荧光假单胞菌 <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i>	共振光散射 (RLS)	10^3 cells	15 h	[33]
麦胚凝集素 WGA	大肠杆菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	表面等离子共振 Surface plasmon resonance (SPR)	3×10^3 CFU/mL	NR	[30]
麦胚凝集素 WGA	大肠杆菌 O157:H7 <i>E. coli</i> O157:H7	电化学阻抗传感器 Electrochemical impedance immunosensor	10^2 CFU/mL	1 h	[53]
C 型凝集素 C-like lectin	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	紫外可见光谱、荧光光谱 Optical spectrum, fluorescence spectrum	紫外可见光谱: 6×10^4 CFU/mL; 荧光光谱: 6×10^3 CFU/mL	NR	[54]
甘露糖结合凝集素 Mannose-binding lectin	金黄色葡萄球菌、 大肠杆菌 <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	微流控-聚合酶链式反应 Microfluidic chip-polymerase chain reaction (PCR)	Optical spectrum: 6×10^4 CFU/mL; Fluorescence spectrum: 6×10^3 CFU/mL 金黄色葡萄球菌: 3 CFU; 大肠杆菌: 9 CFU <i>S. aureus</i> : 3 CFU; <i>E. coli</i> : 9 CFU	1 h	[55]

注: NR: 未报道.

Note: NR: Not report.

凝集素作为识别分子,能够与不同的检测方法和检测材料结合,建立思路各异、各具优势的食源致病菌快速检测方法。Xu 等^[56]基于刀豆蛋白 A 在不同 pH 条件下结构会发生变化的特点,结合免疫磁分离技术和胶体金显色技术,建立了一个大肠杆菌 O157:H7 的快速检测方法用于牛奶样品的检测,检测限达 41 CFU/mL。Mikaelyan 等^[32]分别把麦胚凝集素和小扁豆凝集素固定到银纳米粒子表面用于检测细菌,结果显示麦胚凝集素修饰的银纳米粒子对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)和革兰氏阳性菌(大肠杆菌)的检测限分别达到 10^3 cells/mL 和 3×10^3 cells/mL,小扁豆凝集素修饰的银纳米粒子对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的检测限分别达到 5×10^3 cells/mL 和 5×10^4 cells/mL。

虽然凝集素作为抗体的替代分子能够实现细菌的快速检测,并且具有了抗体所不具有的易于制备、成本低廉的特点,但从凝集素与细菌的结合机理可以看出,凝集素与细菌的结合不具有类似抗体识别特定细菌的特异性,只能广谱性识别某一类细菌,因此要想做到单一种类细菌的检测,仍需要结合具有特异性的方法(如免疫学方法等)。Zhang 等^[57]利用抗体、刀豆蛋白 A、酶等生物分子构建了一个新型酶联免疫吸附测定实验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),单克隆抗体用于捕获大肠杆菌 O157:H7,刀豆蛋白 A 修饰的含有辣根过氧化物酶的多壁碳纳米管用于形成“夹心结构”,再通过生物素化的辣根过氧化物酶抗体和亲和素修饰的辣根过氧化物酶层层结合以实现辣根过氧化物酶的叠加,将最终的显色信号放大。结果显示该方法实现了对大肠杆菌 O157:H7 的特异性裸眼检测,最低检测限达到 10^2 CFU/mL。随着近年来各种纳米材料及检测方法的不断涌现,凝集素作为识别分子可以搭载在各种材料和方法上,充分发挥其特点,给各种材料和方法赋予更多价值,在食源致病菌检测领域的应用前景也将越来越广阔。

生物技术的不断发展也使得各种新型分析仪器在致病菌检测领域的应用越来越广泛,而在各种新型检测仪的开发应用中也不乏凝集素的身影。Wang 等^[30]将麦胚凝集素、刀豆蛋白 A、荆豆凝集素、花生凝集素和怀槐凝集素等植物凝集素作为生物识别分子固定到等离子共振传感器(Surface plasmon resonance, SPR)表面用于结合黄瓜和牛肉馅基质中的大肠杆菌 O157:H7,大肠杆菌 O157:H7 的结合会导致传感器上反射光的强度发生改变,通过实时监测反射光信号实现样品中大肠杆菌 O157:H7 的检测。结果显示该研究构建的基于凝集素修饰的 SPR 生物传感器能够灵敏、准确、高效地实现大肠杆菌 O157:H7 的检测,在食品安全领域具有广泛的应用前景。Shen 等^[47]将刀豆蛋白 A 与石英晶体微天平(Quartz crystal microbalance, QCM)结合构建生物传感器用于大肠杆菌的快速检测,该研究发现通过刀豆蛋白 A 修饰电极以选择性结合大肠杆菌能够大大提高 QCM 传感器的检测灵敏度和特异性,检测的线性范围达到 7.5×10^2 – 7.5×10^7 cells/mL。Li 等^[53]将麦胚凝集素作为信号放大分子,结合丝网印刷互相交叉微电极(Screen-printed interdigitated microelectrodes, SPIMs)构成的阻抗传感器,用于检测大肠杆菌 O157:H7。该方法能够在 1 h 之内完成检测,线性范围为 10^2 – 10^7 CFU/mL ($r^2=0.98$),检测限达 10^2 CFU/mL。Yang 等^[58]将刀豆蛋白 A 应用到电化学阻抗法(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)中用于检测大肠杆菌,检测限达到 75 cells/mL。Serra 等^[51]将刀豆蛋白 A 修饰在镀金石英晶体表面形成压电生物传感器用于检测大肠杆菌,检测限达 1.0×10^4 CFU/mL。

3 总结与展望

凝集素具有独特的糖专一性,能够与糖非共价可逆地结合,且因其种类繁多,被应用到分子生物学、制药学、临床医学等诸多领域。凝集素因对细菌表面糖蛋白具有特异性结合能力,且相较于抗体

具有成本低廉、稳定性高等特点, 被逐步应用到了食源致病菌的分离和检测中。目前, 凝集素在食源致病菌分离和检测中的应用已逐渐趋于成熟, 刀豆蛋白 A 和麦胚凝集素等在食源致病菌快速检测方法建立中的应用屡见不鲜。更有报道^[56]进一步应用了凝集素的其他特性, 结合其他细菌检测技术, 开发出的快速检测方法极具创新性。但现有的应用凝集素对食源性致病菌检测的报道仍存在很大的局限性, 应用到的凝集素种类十分有限, 对各种凝集素的开发利用也不够彻底, 实际应用方面更是欠缺。相信随着生物学相关领域的不断发展, 人们对凝集素的认知不断深入, 凝集素定能够在食源性致病菌快速检测领域发挥更大的价值。

REFERENCES

- [1] Liao JH, Chien CTH, Wu HY, et al. A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(14): 4787-4795
- [2] Coelho LCBB, dos Santos Silva PM, de Menezes Lima VL, et al. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017(2017): 1594074
- [3] Wang XC. Biochemistry[M]. 3rd ed. Beijing: Tsinghua University Press, 2010: 127 (in Chinese)
王希成. 生物化学[M]. 3 版. 北京: 清华大学出版社, 2010: 127
- [4] Kirk MD, Pires SM, Black RE, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis[J]. PLoS Medicine, 2015, 12(12): e1001921
- [5] Xu LZ, Lu Z, Cao LL, et al. In-field detection of multiple pathogenic bacteria in food products using a portable fluorescent biosensing system[J]. Food Control, 2017, 75: 21-28
- [6] Meng XY, Yang GT, Li FL, et al. Sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with Vancomycin-conjugated magnetic beads as enrichment carriers combined with flow cytometry[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(25): 21464-21472
- [7] Dan XL, Liu WL, Ng TB. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research[J]. Medicinal Research Reviews, 2016, 36(2): 221-247
- [8] van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1998, 17(6): 575-692
- [9] Ohyama Y, Kasai K, Nomoto H, et al. Frontal affinity chromatography of ovalbumin glycoasparagines on a concanavalin A-sepharose column. A quantitative study of the binding specificity of the lectin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(11): 6882-6887
- [10] van Wauwe JP, Loontjens FG, de Bruyne CK. Carbohydrate binding specificity of the lectin from the PEA (*Pisum sativum*)[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 1975, 379(2): 456-461
- [11] Yamamoto K, Tsuji T, Matsumoto I, et al. Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin[J]. Biochemistry, 1981, 20(20): 5894-5899
- [12] Pistole TG. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances[J]. Annual Review of Microbiology, 1981, 35(1): 85-112
- [13] Hammarström S, Murphy LA, Goldstein IJ, et al. Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-"specific" lectins: *Helix pomatia* A hemagglutinin, soy bean agglutinin, lima bean lectin, and *Dolichos biflorus* lectin[J]. Biochemistry, 1977, 16(12): 2750-2755
- [14] Lotan R, Skutelsky E, Danon D, et al. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(21): 8518-8523
- [15] Montisci MJ, Dembri A, Giovannucci G, et al. Gastrointestinal transit and mucoadhesion of colloidal suspensions of *Lycopersicon esculentum* L. and *Lotus tetragonolobus* lectin-PLA microsphere conjugates in rats[J]. Pharmaceutical Research, 2001, 18(6): 829-837
- [16] Zhao WZ, Chen YJ, Yu HJ, et al. The enrichment and characterization of ginger-derived glycoprotein using magnetic particles[J]. Food Chemistry, 2018, 244: 164-168
- [17] Jass JR, Allison LJ, Stewart SM, et al. Ulex europaeus agglutinin-1 binding in hereditary bowel cancer[J]. Pathology, 1993, 25(2): 114-119
- [18] Knibbs RN, Goldstein IJ, Ratcliffe RM, et al. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(1): 83-88
- [19] Hu YH. A biological study of lectin[J]. Journal of Jiangxi Institute of Education (Natural Sciences), 2001, 22(6): 47-49 (in Chinese)
胡业华. 凝集素的生物学研究[J]. 江西教育学院学报: 自然科学, 2001, 22(6): 47-49
- [20] Varki A. Essentials of Glycobiology[M]. Zhang SZ, trans. Beijing: Science Press, 2003 (in Chinese)
A. 瓦尔基. 糖生物学基础[M]. 张树政, 译. 北京: 科学出版社, 2003
- [21] Li J, Li YB, Xu CJ. Research progress of classification and purification of the biological lectin[J]. Food and Nutrition in China, 2013, 19(9): 30-33 (in Chinese)
李疆, 李应彪, 许程剑. 生物凝集素分类与纯化的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2013, 19(9): 30-33

- [22] Wang YQ, Jing YX. Legume lectins and their role in the recognition of rhizobial bacteria in symbiosis between legume plants and rhizobia[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000, 17(2): 127-132 (in Chinese)
王逸群, 荆玉祥. 豆科植物凝集素及其对根瘤菌的识别作用[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 127-132
- [23] Shi LR. Advances in research of lectins[J]. Journal of Hengshui Normal College, 2001, 3(1): 46-48 (in Chinese)
时丽冉. 凝集素研究进展[J]. 衡水学院学报, 2001, 3(1): 46-48
- [24] Zourob M, Elwary S, Turner APF. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems[M]. New York: Springer, 2008: 138-148
- [25] Dai WG, Liu N, Liu YW. *E. coli* adhesion sugar specificity and function[J]. Journal of Handan Medical College, 1995, 8(4): 320-322 (in Chinese)
戴维国, 刘娜, 刘彦威. 大肠杆菌粘着素糖特异性和作用[J]. 邯郸医学学报, 1995, 8(4): 320-322
- [26] Cui FY, Xu Y, Zhao B, et al. Specific recognition of pathogenic bacterium towards glycan and its applications in analytical chemistry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(6): 817-828 (in Chinese)
崔飞云, 徐溢, 赵斌, 等. 致病菌与糖的特异性识别及其分析应用研究[J]. 分析测试学报, 2017, 36(6): 817-828
- [27] Neumann D, Lehr CM, Lenhof HP, et al. Computational modeling of the sugar-lectin interaction[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56(4): 437-457
- [28] Schwefel D, Maierhofer C, Beck JG, et al. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(25): 8704-8719
- [29] Harito JB, Campbell AT, Tysnes KR, et al. Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR[J]. Water Research, 2017, 114: 228-236
- [30] Wang YX, Ye ZZ, Si CY, et al. Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor[J]. Food Chemistry, 2013, 136(3/4): 1303-1308
- [31] Dechtrirat D, Gajovic-Eichelmann N, Wojcik F, et al. Electrochemical displacement sensor based on ferrocene boronic acid tracer and immobilized glycan for saccharide binding proteins and *E. coli*[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 58: 1-8
- [32] Mikaelyan MV, Poghosyan GG, Hendrickson OD, et al. Wheat germ agglutinin and *Lens culinaris* agglutinin sensitized anisotropic silver nanoparticles in detection of bacteria: a simple photometric assay[J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 981: 80-85
- [33] Gao JQ, Liu C, Liu DJ, et al. Antibody microarray-based strategies for detection of bacteria by lectin-conjugated gold nanoparticle probes[J]. Talanta, 2010, 81(4/5): 1816-1820
- [34] Payne MJ, Campbell S, Patchett RA, et al. The use of immobilized lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp. from pure cultures and foods[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992, 73(1): 41-52
- [35] Payne MJ, Campbell S, Kroll RG. Lectin-magnetic separation can enhance methods for the detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*[J]. Food Microbiology, 1993, 10(1): 75-83
- [36] Huang XL, Xu HY, Xiong YH, et al. Research progress on magnetic nanomaterials for separation of foodborne pathogenic bacteria[J]. Food Science, 2014, 35(11): 280-285 (in Chinese)
黄小林, 许恒毅, 熊勇华, 等. 磁性纳米材料在食源性致病菌分离中应用的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 280-285
- [37] El-Boubbou K, Gruden C, Huang XF. Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(44): 13392-13393
- [38] He XX, Zhou LX, He DG, et al. Rapid and ultrasensitive *E. coli* O157:H7 quantitation by combination of ligand-magnetic nanoparticles enrichment with fluorescent nanoparticles based two-color flow cytometry[J]. Analyst, 2011, 136(20): 4183-4191
- [39] Mao Y, Huang XL, Xiong SC, et al. Large-volume immunomagnetic separation combined with multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in lettuce[J]. Food Control, 2016, 59: 601-608
- [40] Li FL, Li F, Aguilar ZP, et al. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-mediated biotin amplified immunomagnetic separation method coupled with flow cytometry for viable *Listeria monocytogenes* detection[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 257: 286-294
- [41] Huang XL, Xu ZD, Mao Y, et al. Gold nanoparticle-based dynamic light scattering immunoassay for ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in lettuce[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 66: 184-190
- [42] Luo D, Huang XL, Mao Y, et al. Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7883-7890
- [43] Li F, Li FL, Chen BL, et al. Sextuplex PCR combined with immunomagnetic separation and PMA treatment for rapid detection and specific identification of viable *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovars Paratyphi B, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Enteritidis in raw meat[J]. Food Control, 2017, 73: 587-594
- [44] Meng XY, Li FL, Li F, et al. Vancomycin modified PEGylated-magnetic nanoparticles combined with PCR for efficient enrichment and detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 247: 546-555
- [45] Campuzano S, Orozco J, Kagan D, et al. Bacterial isolation by lectin-modified microengines[J]. Nano Letters, 2012, 12(1): 396-401
- [46] Dao TNT, Yoon J, Jin CE, et al. Rapid and sensitive detection of

- Salmonella* based on microfluidic enrichment with a label-free nanobiosensing platform[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 262: 588-594
- [47] Shen ZH, Huang MC, Xiao CD, et al. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(6): 2312-2319
- [48] Yang HY, Wang YQ, Qi HL, et al. Electrogenerated chemiluminescence biosensor incorporating ruthenium complex-labelled concanavalin A as a probe for the detection of *Escherichia coli*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 35(1): 376-381
- [49] Ma F, Rehman A, Liu HY, et al. Glycosylation of Quinone-fused polythiophene for reagentless and label-free detection of *E. coli*[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(3): 1560-1568
- [50] Lu QZ, Lin HL, Ge ST, et al. Wireless, remote-query, and high sensitivity *Escherichia coli* O157: H7 biosensor based on the recognition action of concanavalin A[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(14): 5846-5850
- [51] Serra B, Gamella M, Reviejo AJ, et al. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(5): 1853-1860
- [52] Zheng LB, Yi W, Peng Q, et al. Lectin functionalized ZnO nanoarrays as a 3D nano-biointerface for bacterial detection[J]. *Talanta*, 2017, 167: 600-606
- [53] Li ZM, Fu YC, Fang WH, et al. Electrochemical impedance immunosensor based on self-assembled monolayers for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with signal amplification using lectin[J]. *Sensors*, 2015, 15(8): 19212-19224
- [54] Hovhannisyan VA, Bazukyan IL, Gasparyan VK. Application of silver nanoparticles and CdSe quantum dots sensitized with of C-like lectin for detection of *St. aureus* Comparison of various approaches[J]. *Talanta*, 2017, 175: 366-369
- [55] Yu JC, Hu CC, Chang WH, et al. An integrated microfluidic system using mannose-binding lectin for bacteria isolation and biofilm-related gene detection[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2018, 22(1): 13
- [56] Xu XH, Yuan YW, Hu GX, et al. Exploiting pH-regulated dimer-tetramer transformation of concanavalin A to develop colorimetric biosensing of bacteria[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1452
- [57] Zhang H, Shi YP, Lan F, et al. Detection of single-digit foodborne pathogens with the naked eye using carbon nanotube-based multiple cycle signal amplification[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(15): 1848-1850
- [58] Yang HY, Zhou HF, Hao HY, et al. Detection of *Escherichia coli* with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 229: 297-304

~~~~~  
(上接 p.1099)

## 征 稿 简 则

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>