

食源性大肠杆菌 O157:H7 检测方法的研究进展

Research progress in detection of food-borne Escherichia coli O157:H7

石瑞智^{1,2}, 范龙兴¹, 田赛², 宁保安², 刘颖¹

SHI Rui-zhi^{1,2}, FAN Long-xing¹, TIAN Sai², NING Bao-an², LIU Ying¹

1.内蒙古医科大学公共卫生学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2.军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室, 天津 300050

摘要 食源性病原体性质多样, 这些病原体通过各种媒介进入食物, 已成为威胁人群健康的重要公共卫生问题。食源性病原体的快速和特异性鉴定不仅对食品生产者而且对消费者以及食品安全行政主管部门都很重要。细菌污染造成的食物中毒严重危害着人们的健康, 其中大肠杆菌 O157:H7 是一种病死率高的肠道传染病。为此, 该文就大肠杆菌 O157:H7 的传统分离鉴定法、分子生物学法和免疫学法等检测方法研究进展作一综述。

关键词 大肠杆菌 O157:H7; 检测方法; 食源性病原体

中国图书资料分类号 R117

文献标识码 A

文章编号: 1004-1257(2018)03-0425-05

DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2018.0119

Research progress in detection of food-borne Escherichia coli O157:H7

SHI Rui-zhi^{1,2}, FAN Long-xing¹, TIAN Sai², NING Bao-an², LIU Ying¹

1.College of Public Health, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia, 010110, China; 2.Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Tianjin, 300050, China

Abstract Food-borne pathogens are diverse in nature and these pathogens enter food through a variety of media and have become an important public health problem that threatens the health of the population. The rapid and specific identification of food-borne pathogens is important for not only food producers but also consumers as well as food safety authorities. Food poisoning caused by bacterial contamination seriously endangers people's health, including Escherichia coli O157:H7 is an intestinal infectious disease with high mortality rate. Therefore, the paper summarizes the detection methods of Escherichia coli O157:H7, such as traditional separation and identification method, molecular biology method and immunological method.

Key words : Escherichia coli O157:H7; Detection method; Food-borne pathogens

大肠杆菌 O157:H7 是大肠杆菌的一种特殊血清型, 这种血清又叫“肠出血性大肠杆菌”。大肠杆菌 O157:H7 是两端钝圆的革兰氏阴性菌, 周身鞭毛, 能运动, 最适的生长温度为 37 °C, 44~45 °C 时生长不良。E.coli O157:H7 对热敏感, 在 60 °C 30 min 或 75 °C 1 min, 可被杀死^[1]。它是一种动物源性传染病, 其宿主主要是牛^[2]。此外 TALLEY 等^[3]的研究结果表明, 家蝇可以携带大肠杆菌 O157:H7, 污染菠菜和生菜。另外一些 pH 值较低的食物如牛肉、牛奶和面食等也成为大肠杆菌 O157:H7 感染的来源。牛的肠道是大肠杆菌 O157:H7 的主要寄居地, 大肠杆菌 O157:H7 在牛粪中会瞬间繁殖^[4]。大肠杆菌 O157:H7 的感染剂量很低, 每克感染载

体含 10 个活菌即可致病^[5]。其致病机理主要是粘附和产毒, 病菌进入宿主肠道后与上皮细胞结合破坏其绒毛, 目前普遍认为这种损伤作用与肠上皮细胞纤毛清除素(eae)基因有关^[2]。据 WHO 统计, 在 2004 年, 欧洲联盟(17 个成员国)和挪威经实验室确认的病例数为每 10 万人口 1.3 例, 而美国同年的发病率为每 10 万人 0.9 例。在 2001 年, 新西兰报告的发病率为每 10 万人 2 例, 澳大利亚的发病率为每 10 万人 0.2 例。肠出血性大肠杆菌 (EHEC)[溶血性尿毒症 (haemolytic uraemic syndrome, HUS)] 的发生频率在阿根廷最高, 在 6~48 个月儿童中的估计值约为每 10 万儿童 22 例 HUS。虽然世界其它地方, 包括若干非洲国家, 也报告发生 EHEC 感染, 但并不总能收集或方便地获取具体的发病率数据。EHEC 感染及相关疾病可在任何年龄组发生, 但这种疾病似乎最常见于幼儿。例如, 日本报道的 EHEC 患病年龄中值为 8 岁。2011 年美国俄勒冈州共

作者简介 石瑞智, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为流行病与食品安全。

通讯作者 刘颖, 副教授, 硕士生导师, E-mail: yingruru@sina.com; 宁保安, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: ningba@163.com

有15人因食用草莓而感染大肠杆菌 O157:H7 6名患者住院,其中4名患者发展为 HUS 2名病人因 HUS 死亡^[6]。2016年美国9个州共有13人因食用特定面粉制成的披萨和面包而感染大肠杆菌 O157:H7 8名患者住院,其中2名患者发展为 HUS^[7]。1987年,我国首次分离出该菌之后,十多个省份相继报道了关于大肠杆菌 O157:H7 感染的情况。2005年郑州市内发现3例大肠杆菌 O157:H7 的感染病例^[8]。因此,建立大肠杆菌 O157:H7 快速诊断的检测方法尤为重要。为此,本文就大肠杆菌 O157:H7 的传统分离鉴定法、分子生物学法和免疫学法等检测方法研究进展综述如下。

1 大肠杆菌 O157:H7 检测方法

大肠杆菌 O157:H7 的研究方法有传统分离鉴定法、分子生物学法和免疫学法。根据同种研究方法的相似原理,搭建不同的检测平台,来构建致病菌的多种检测手段。

1.1 传统分离鉴定法 传统分离鉴定法需要通过液体培养基培养提前增菌 10~20 h,然后将其定量涂布到培养基上,37℃培养 18~24 h。利用绝大多数大肠杆菌 O157:H7 菌株不发酵山梨醇的特性,可以在山梨醇麦康凯琼脂(SMAC)培养基上进行初步分离,培养的大肠杆菌 O157:H7 菌落呈无色半透明。但有其他血清型的大肠杆菌 O157 和革兰氏阴性菌如变形菌等也不发酵山梨醇。因此金鑫等^[9]在 SMAC 中加入 0.05 mg/L 的头孢克肟和 0.5% 的鼠李糖,可以减少 60% 变形杆菌和其他细菌生长形成的无色菌落。王静等^[10]通过优化实验得到 CTV-MUG-RSMAC 培养基,发现该培养基可以用于分离大肠杆菌 O157:H7,方法可靠且灵敏度高。此外,将大肠杆菌 O157:H7 培养在科玛嘉显色培养基上,菌落呈紫红色而其他型号大肠杆菌呈蓝色,其他类别的细菌则呈无色或被抑制生长。因此传统分离鉴定法可根据大肠杆菌 O157:H7 在培养基表面形成的颜色来进行区分。

1.2 分子生物学检测方法

1.2.1 聚合酶链式反应(PCR)技术 PCR 是用于扩增特定的 DNA 片段的一种分子生物学技术:在 DNA 模板、引物和 4 种 dNTP 和反应缓冲液的存在下,首先 DNA 高温变性成单链,然后低温退火,引物与单链按照碱基互补配对结合,最后在 DNA 聚合酶的作用下,引物沿着 5'-3' 的方向合成互补链,再经过适温延伸,最终形成一条新的 DNA 互补链^[11]。MENG 等^[12]根据 eae3' 和 5' 端的序列设计不同引物,用煮沸法和基因释放法制备模板,检测限分别为 25 和 38 CFU/ml,检测时间为 3 h。该方法具有省时、易操作、高灵敏度和半自动化,

同时扩增多个样品的优点。HASAN 等^[13]利用 PCR 检测大肠杆菌 O157:H7 中志贺样毒素 1 (shiga-like toxin1, stx1), stx2 和 eaeA 毒力基因,采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,用分光光度计检验 DNA 浓度和纯度,3 种基因均使用 25 ul 的 PCR 扩增体系,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。分离的 18 株大肠杆菌 O157:H7 的 PCR 结果显示, stx1 的百分比高于 stx2。eaeA 是粘附和清除活动的必要基因,研究者发现携带 eaeA 基因和产志贺毒素的大肠埃希菌之间有着强烈的联系,更能引起严重的人类疾病。

1.2.2 基因芯片技术 基因芯片技术是近年来人类基因组及分子生物学技术的迅速发展,使许多动植物和微生物的基因序列得以测定,因此对基因大数据进行快速筛选并探究众多基因的不同生命功能,具有一定的研究价值。其原理是将多个 DNA 探针分子固定在固相芯片上与样品中目的片段进行杂交,通过杂交信号强度,来分析有无目的分子及其数量和序列。优点是可以对多基因同时检测,具有高效、快速、微型化和自动化等特点。缺点是多个分子之间存在交叉反应,不能区分活菌和死菌,因此存在假阳性可能^[2]。徐晓静等^[14]选择大肠杆菌 O157:H7 志贺样毒素基因 β -葡糖醛酸糖苷酶基因 (uidA) 和 stx1、stx2 设计探针和引物,其中 uidA 引物间序列包含 +93 位突变位点,是区别于其他产肠道菌的特异性基因。反向引物序列用荧光素 Cy3 在 5' 端标记,与探针的核苷酸序列互补,并在 3' 端用氨基修饰。通过优化 PCR 和杂交反应条件,分别进行三重 PCR 扩增,检测时间为 4~6 h。

1.2.3 噬菌体检测技术 噬菌体作为病毒的一种,能引起宿主菌的裂解,可视为一种“捕食”细菌的生物,对宿主菌具有特异性。基于宿主菌与噬菌体的特异性关系,开发的噬菌体检测技术,具有简单快速、特异性高、灵敏性好的优点。ZHANG 等^[15]将大肠杆菌 O157:H7 噬菌体 Phi V10 用纳米荧光素酶(Nluc)修饰,一旦被 Phi V10 噬菌体感染,加入荧光素(Nano-Glo)的大肠杆菌 O157:H7 产生强烈的生物发光信号。使用浓度为 1.76×10^2 PFU/ml 的噬菌体检测 LB 肉汤中的大肠杆菌 O157:H7,能够在 7h 内大约检测出 5 CFU/ml。因此用纳米荧光素酶修饰的噬菌体来检测食源性疾病具有广阔的应用前景。

1.2.4 生物传感器技术 生物传感器技术是模拟生物功能的一种快速识别系统,由分子识别部分(包括抗体、抗原、细胞和核酸等生物活性物质)、转换部分(如光敏管、氧电极和压电晶体等)及信号放大装置构成的分析系统组成。生物传感器利用浓度转换为电信号的

原理给实际检测工作提供了一个新的思路和方向,具有快速、可视化及结构小巧等优点^[16]。GUO等^[17]基于DNA杂交链式反应和通过酶联免疫吸附测定(ELISA)的生物素-链霉亲和素信号放大检测大肠杆菌O157:H7。将抗大肠杆菌O157:H7的多克隆抗体(pAb)包被在ELISA孔中,并将抗大肠杆菌O157:H7的单克隆抗体(mAb)和起始链DNA1标记在金纳米颗粒上,在大肠杆菌O157:H7的环境中,形成pAb-大肠杆菌O157:H7-mAb-AuNP-DNA1夹心免疫复合物。两种类型生物素化发卡随后加入到ELISA孔中,通过DNA杂交链式反应,形成含有丰富生物素的带切口的双链DNA。通过辣根过氧化物酶-链霉亲和素和底物的显色液反应来检测。在纯培养基中检测线为 1.08×10^2 CFU/ml。WANG等^[18]构建了基于钙离子信号的B细胞生物传感器,运用B细胞对大肠杆菌O157:H7的特异性识别,进而介导B细胞内一系列信号通路的开启,导致胞质内钙离子浓度的升高,用胞内装载的化学钙离子指示剂Fura-2与钙离子结合前后的荧光比率来间接反应大肠杆菌O157:H7的浓度。该生物传感器可以在10 min内检测纯培养物和牛肉样品中大肠杆菌O157:H7,检测线达102 CFU/ml。WU等^[19]成功构建一种快速比色检测大肠杆菌O157:H7的适体生物传感器。将聚丁二炔纳米囊泡作为生物传感器信号输出元件,通过活化聚丁二炔囊泡表面游离的羧基,并与截短的针对大肠杆菌O157:H7的氨基修饰的脂多糖的适配体结合,进而完成生物传感器的组装。在大肠杆菌O157:H7的环境中,聚丁二炔纳米囊泡上修饰的寡核苷酸序列发生折叠,进一步识别并结合大肠杆菌O157:H7,引起聚丁二炔的结构变化,导致整个体系从蓝色变为红色。这种检测方法具有可视化、定性定量、稳定性好、节省时间及检测成本低等优点,是疾病大范围传播的重要检测手段。

1.3 免疫学检测方法

1.3.1 免疫胶体金试纸检测法 免疫胶体金层析技术以硝酸纤维素膜为载体,以胶体金作为标记物,样品滴加至微膜孔后,在毛细管作用下,通过抗原抗体特异性结合,利用胶体金颜色反应,达到检测抗原或抗体的免疫标记技术^[20]。该方法以其检测快速、检测成本低、灵敏度高、适合现场检测等优点在检测领域中快速发展,但易出现假阳性结果。陈明慧^[21]用改良的麦康凯肉汤培养基,优化添加剂浓度为0.1 mg/L的噻孢霉素和5 mg/L的亚硝酸钾,来防止假阳性反应的发生。同时还建立了信号放大的免疫层析试纸条,T线包被兔抗大肠杆菌O157:H7多抗,C线包被抗鼠二抗。用胶体金

标记的大肠杆菌O157:H7单抗、另一胶体金标记的抗鼠二抗同样品在酶标孔里孵育,加入试纸条后,T检测线有两种胶体金,起到信号增强作用。检测线为 1.14×10^3 CFU/ml,有效地提高了大肠杆菌O157:H7的检测灵敏度。

1.3.2 免疫荧光法 免疫荧光法是一种用荧光物质标记抗原或抗体来进行相应抗体或抗原定位的技术。BALAKRISHNAN等^[22]利用免疫球蛋白(Ig)结合蛋白A,作为磁珠和抗体(Ab)的连接分子,将蛋白A涂覆在磁珠表面作为检测平台,这些蛋白特异性地与Ab结合。Ab固定化程序通过使用异硫氰酸荧光素(FITC)标记,并在显微镜下证实。大肠杆菌O157:H7细胞用四甲基罗丹明(TRITC)荧光染料标记。TRITC标记的细菌被固定在蛋白A磁珠上的抗体(Ab)所捕获。免疫复合物的形成由显微镜下的荧光证实,在荧光分光光度计中记录捕获的细菌的荧光,显示的荧光值与捕获在免疫珠上的细菌数量成正比。通过该方法检测的最小细菌浓度为 $(1.2 \pm 0.06) \times 10^3$ CFU/ml。DEMIRKOL等^[23]利用在多聚赖氨酸包被的96孔酶标板上修饰巯基化的适配体作为捕获平台,与修饰氨基化适配体的量子点构成夹心免疫来检测大肠杆菌O157:H7,利用荧光分光光度计检测,检测线达102 CFU/ml,方法简易且灵敏度高。量子点作为一种无机荧光染料,广泛用于食源性致病菌、肿瘤标记物、太阳能电池等,具有高的荧光量子产率和寿命长等特殊性质,是一种比荧光染料分子更理想的生物探针。

1.3.3 电化学免疫传感器检测法 电化学免疫传感器检测法是将特异性免疫反应与高灵敏的电化学传感技术相结合的新型检测方法,具有省时、特异性好、稳定性高等优点^[24]。GUO等^[25]通过磺化石墨烯(GR)并进一步用聚3,4-乙烯二氧噻吩(PEDOT)及纳米金(AuNPs)对石墨烯表面进行功能化修饰,制备了SG-PEDOT-AuNPs复合物,并将特异性抗体绑定至复合物后,共同修饰到玻碳电极表面。该电化学免疫传感器不仅能增加电子传递效率,还能增加生物分子的固定效率。电极在大肠杆菌O157:H7环境中孵育,辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体被拉至电极表面,形成一个夹心结构,在 H_2O_2 的检测底液中,会形成明显的电化学信号,通过强烈的电流峰,来实现对大肠杆菌O157:H7的定量,检测线达 3.4×10^1 CFU/ml。HASSAN等^[26]将抗大肠杆菌O157-磁珠复合物作为捕获平台,与金纳米颗粒修饰的二抗构成夹心结构,利用金纳米颗粒氢析反应的电化学性能,在丝网印刷碳电极(SPCE)上形成的计时电流来检测。该方法在碎牛肉和水样品

检测线达 457 CFU/ml 和 309 CFU/ml ,检测时间 70~80 min ,具有高灵敏度和特异性。

2 结 语

食品安全事件发生在各国地区，其中食源性致病菌所引起的食品安全事件所占比例较大，食源性疾病与食品污染成为不断扩大的世界性公共卫生问题，大肠杆菌 O157:H7 则是众多食源性致病菌中最为典型，对人类影响最为严重的一种细菌。如何快速检测食源性大肠杆菌 O157:H7 已成为食品安全问题的关键。目前检测样品的前处理程序具有复杂、成本高和技术普及困难等缺陷。因此建立快速和准确的检测方法来提高检测的灵敏度和准确性尤为重要。本文通过对比不同检测技术，可以发现不同检测方法有不同的优点和不足。传统分离鉴定法耗时长，操作繁琐，但具有“金标准”的检测权威。分子生物学法如生物传感器及基因芯片技术，具有快速和灵敏度高的优点，但昂贵的检测费用常难以普及。免疫学检测如免疫荧光及免疫胶体金技术，具有检测成本低、灵敏度高和检测迅速的优点，但易出现假阳性和假阴性结果。近年来不断发展的环介导等温扩增技术，具有操作简单、灵敏度高和特异性好等优点，但其引物设计复杂，需要科研人员的不断探索来完成。新兴光学检测将常规检测方法与光学检测相结合，如 ATP 生物荧光检测法，依靠生物体内天然的酶促化学反应产生的能量而发光，具有检测快速和可视化等优点^[27]。因此随着科技的不断发展，未来有很长的路值得我们去不断探索，去研发更快速、简便、特异性好和灵敏度高的食源性致病菌检测技术，来应对突发性食品安全公共事件，从而保障食品安全及公共卫生健康。

作者声明 本文无实际或潜在的利益冲突

参考文献

[1] 叶青, 史明坤, 刘波, 等. 河北省大肠杆菌 O157:H7 病原学和流行病学研究 [J]. 中国公共卫生, 2000, 16(7) : 613- 614.

[2] 方珍. 应用液相蛋白芯片技术检测食源性大肠杆菌 O157:H7 的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.

[3] TALLEY JL, WAYADANDE AC, WASALA LP, et al. Association of Escherichia coli O157 :H7 with Filth Flies (Muscidae and Calliphoridae) Captured in Leafy Greens Fields and Experimental Transmission of E. coli O157 :H7 to Spinach Leaves by House Flies (Diptera : Muscidae)[J]. J Food Prot , 2009 , 72(7) : 1547-1552.

[4] BACH SJ, MCALLISTER TA, VEIRA DM , et al. Transmission and control of Escherichiacoli O157 :H7-A review [J]. Can J Anim Sci , 2002 , 82(4) : 475-490.

[5] 徐金雷, 陈熔熔, 张晏, 等. 免疫传感器在大肠杆菌 O157:H7 检测

中的研究进展 [J]. 科技视界 , 2015(25) : 22-23.

[6] LAIDLER MR ,TOURDJMAN M ,BUSER GL , et al. Escherichia coli O157 :H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer [J]. Clin Infect Dis , 2013 , 57(8) : 1129-1134.

[7] GIERALTOWSKI L. Multistate Outbreak of Escherichiacoli O157:H7 Infections Linked to Dough Mix-United States , 2016 [J]. Morb Mortal Wkly Rep , 2017 , 66(3) : 88-89.

[8] 武恩平, 刘灵芝, 张燕. 郑州市 2005 年肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染状况调查 [J]. 现代预防医学, 2006 , 33(12) : 2455-2456.

[9] 金鑫, 许恒毅, 谢建华, 等. 食源性致病大肠杆菌 O157:H7 检测方法研究进展 [J]. 食品科技, 2015 , 40(5) : 339-343.

[10] 王静, 邱茂锋, 林修光. 食品中大肠杆菌 O157:H7 快速分离培养方法的研究 [J]. 卫生研究, 2002 , 31(1) : 44-46.

[11] 吴艳敏. PCR 技术在食品检验中的应用 [J]. 黑龙江科技信息 , 2014(4) : 77.

[12] MENG J, ZHAO S, DOYLE MP. Virulence genes of Shiga toxin-producing Escherichiacoli isolated from food , animals and humans [J]. Int J of Food Microbiol , 1998 , 45(3) : 229-235.

[13] HASAN MS, YOUSIF AA, ALWAN MJ. Detection of Virulent Genes in E. coli O157:H7 Isolated from Puppies and Adult Dogs by Polymerase Chain Reaction[J]. Res J Vet Pract , 2016 , 4(1) : 1-6.

[14] 徐晓静, 文思远, 陈苏红, 等. 基因芯片技术鉴定出血性大肠杆菌 O157:H7 和霍乱弧菌 O139[J]. 军事医学科学院院刊 2006 , 30(2) : 122-126.

[15] ZHANG D, CORONEL-AGUILERA CP, ROMERO PL , et al. The Use of a Novel NanoLuc-Based Reporter Phage for the Detection of Escherichia coli O157:H7 [J/OL]. Sci Rep , 2016 , 6 : 33235.https://www.researchgate.net/publication/308134057_The_Use_of_a_Novel_NanoLuc_-Based_Reporter_Phage_for_the_Detection_of_Escherichia_coli_O157H7.DOI : 10.1038/srep33235.

[16] 刘慧玲, 吕敬章, 朱智壕, 等. 生物传感器检测食源性大肠杆菌 O157:H7 研究新进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013 , 4(6) : 1828-1834.

[17] GUO Q, HAN JJ, SHAN S , et al. DNA-based hybridization chain reaction and biotin-streptavidin signal amplification for sensitive detection of Escherichia coli O157 :H7 through ELISA [J/OL]. Biosens Bioelectron , 2016 , 86 990-995.https://www.researchgate.net/publication/305385518_DNA_-based_hybridization_chain_reaction_and_biotin-streptavidin_signal_amplification_for_sensitive_etection_of_Escherichia_coli_O157H7_through_ELISA. DOI : 10. 1016/j. bios. 2016. 07.049.

[18] WANG L, WANG R, KONG BW , et al. B cells Using Calcium Signaling for Specific and Rapid Detection of Escherichia coli O157 : H7 [J/OL]. Sci Rep , 2015 , 5 : 10598.http://www.docin.com/p-1356415535.html.DOI :10.1038/srep10598.

[19] WU W, ZHANG J, ZHENG M , et al. An aptamer-based biosensor for colorimetric detection of Escherichia coli O157 :H7 [J]. PLoS ONE , 2012 , 7(11) : e48999.

(下转第 432 页)

- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(2015版一部)[M]. 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] 董巧珍, 周日宝, 高彦宁, 等. 龙牙百合质量的研究[J]. 中医导报, 2006, 12(6): 1-2, 10.
- [4] 傅春燕, 刘永辉, 李明娟, 等. 百合总皂苷提取工艺及抗抑郁活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(5): 682-686.
- [5] 彭程, 周晓琛, 敬黎, 等. 百合化学成分及其提取方法研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2011, 32(4): 11-14.
- [6] 李卫民, 孟宪舒. 中药百合的研究概况[J]. 中草药, 1991, 22(6): 277-278.
- [7] 傅春燕, 刘永辉, 李明娟, 等. HPLC测定中药百合种2个甙体皂苷的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1250-1252, 1256.
- [8] 谢焕松, 周鸣鸣, 刘鑫燕, 等. 南通军山卷丹水提物镇痛消炎作用的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(4): 176-177.
- [9] 何咏梅, 杜绍礼. 抗抑郁中药的研究进展 [J]. 湖南中医导报, 2003, 9(6): 71-73.
- [10] 郭秋平. 百合的质量研究及抗抑郁作用探讨[D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [11] 郭秋平, 高英, 李卫民. 百合有效部位对抑郁症模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响[J]. 中成药, 2009, 31(11): 1669-1672.
- [12] 尹玲珑, 彭察安, 张宜, 等. 道地药材湘西龙山百合对慢性应激抑郁模型小鼠脑内5-HT表达影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 357-358.
- [13] 张洁, 谢焕松, 周鸣鸣. 卷丹水提物对小鼠睡眠的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 12(31): 4609-4610.
- [14] 李卫民, 孟宪舒, 俞腾飞, 等. 百合的药理作用研究[J]. 中药材, 1990, 13(6): 31-35.
- [15] 王润丰, 牛立新, 张彦龙, 等. 野生卷丹百合黄酮类化合物抗氧化能力的研究[J]. 西北农业学报, 2011, 20(11): 152-155, 187.
- [16] 周中流, 石任兵, 刘斌, 等. 卷丹乙醇提取物及其不同极性部位抗氧化活性的比较研究[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 55-56.
- [17] 周中流, 石任兵, 刘斌, 等. 卷丹甙体皂苷和酚类成分及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2011, 42(1): 21-22.
- [18] 焦灏琳, 张延龙, 牛立新. 卷丹鳞茎多酚组成及其抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(7): 150-154.
- [19] 谢焕松, 周鸣鸣, 刘鑫燕, 等. 卷丹水提物活血化淤药理作用及对小鼠耐力的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(9): 146-147.
- [20] 曾春兰, 钟振国. 中药抗菌作用的研究进展 [J]. 广西中医学院学报, 2006(1): 51-53.
- [21] 周英, 段震, 王寒, 等. 卷丹百合提取物的体外抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 94-95.
- [22] 苗明三. 百合多糖抗氧化作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(2): 12.
- [23] 曾嵘, 李福元, 龙洛娜. 3种百合水煎液抗疲劳与耐缺氧作用比较[J]. 医药导报, 2007, 26(8): 850-851.
- [24] 卢连华, 迟玉聚, 徐建华, 等. 两种百合对某口服液耐缺氧作用影响的实验研究[J]. 预防医学文献信息, 2000, 6(3): 210-211.
- [25] 王少康, 孙桂菊, 张建新, 等. 亚急性衰老动物模型的建立及评价[J]. 东南大学学报(医学版), 2002, 21(3): 217.
- [26] 薛红丽, 赵佩霞, 魏睦新, 等. 衰老小鼠皮层NO, MDA, SOD水平变化及其相互关系的研究[J]. 中国老年学杂志, 2000, 20(2): 89-90.
- [27] 谢焕松, 周鸣鸣. 卷丹水提物对D-半乳糖衰老模型小鼠的影响[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(7): 1376-1377.
- [28] 高沛业, 谢焕松, 周鸣鸣. 卷丹水提物的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(12): 7074-7075.
- [29] 艾庆燕, 康思源, 赵豫凤. 中药百合的研究与应用[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2016, 14(2): 63-64.
- [30] 何新民. 百合地黄汤加减治疗肺气肿和肺心病52例[J]. 职业卫生与病伤, 2005, 20(4): 272.
- [31] 申秀丽, 闻永举. 百合知母汤临床应用概述 [J]. 宜春学院学报, 2008, 30(2): 111.
- [32] 管家齐, 焦悦. 百合地黄汤临床应用与实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(5): 322-323.
- [33] 张淑英. 百合地黄汤合甘麦大枣汤治疗顽固性老年皮肤瘙痒症142例[J]. 河南中医, 2006, 26(11): 14.
- [34] 杨林莎, 孙艳红, 方晓艳. 中药百合的研究进展[J]. 河南中医药学刊, 2002, 17(1): 74-76.

收稿日期: 2017-04-27 修回日期: 2017-12-27 责任编辑: 马运明

(上接第428页)

- [20] 刘程. 免疫胶体金试纸条法快速联检出血性大肠杆菌O157:H7和鲍氏志贺氏菌[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [21] 陈明慧. 快速检测猪肉中大肠杆菌O157:H7胶体金免疫层析试纸条的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [22] BALAKRISHNAN B, BARIZUDDIN S, WULJI T, et al. A rapid and highly specific immunofluorescence method to detect Escherichia coli O157:H7 in infected meat samples[J/OL]. Int J Food Microbiol, 2016, 231: 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.017>.
- [23] DEMIRKOL DO, TIMUR S. A sandwich-type assay based on quantum dot/aptamer bioconjugates for analysis of E. coli O157:H7 in microtiter plate format [J]. Int J of Polym Mater Polym Biomater, 2016, 65(2): 85-90.
- [24] 梁文斌. 基于纳米材料为载体的免疫传感器的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [25] GUO Y, WANG Y, LIU S, et al. Electrochemical immunosensor assay (EIA) for sensitive detection of E. coli O157:H7 with signal amplification on a SG-PEDOT-AuNPs electrode interface [J]. Analyst, 2015, 140(2): 551-559.
- [26] HASSAN ARH, DECEA, MERKOCI A. Highly sensitive and rapid determination of Escherichiacoli O157:H7 in minced beef and water using electrocatalytic gold nanoparticle tags [J/OL]. Biosens Bioelectron, 2015, 67: 511-515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.019>.
- [27] KIYAMA M, SAITO R, IWANO S, et al. Multicolor bioluminescence obtained using firefly luciferin [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(24): 2648-2655.

收稿日期: 2017-07-07 修回日期: 2017-09-25 责任编辑: 马运明