



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101930002 A

(43) 申请公布日 2010.12.29

(21) 申请号 200910069391.1

(22) 申请日 2009.06.23

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫  
生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道一号

(72) 发明人 湛志强 李君文 王新为 金敏  
王景峰 邱志刚 陈照立

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

水环境中致病菌超敏感检测技术

### (57) 摘要

本发明公开了一种水环境中致病菌的超敏感检测方法,其主要技术特点:(1)采用化学共沉淀法制备粒径大小约 50nm 的磁颗粒,包被上致病菌的兔多克隆抗体制成免疫纳米磁颗粒;(2)采用柠檬酸钠还原法制备粒径大小约为 20nm 的胶体金,包被上羊抗兔 IgG 制成免疫胶体金。(3)利用 SPA 法将致病菌鼠多克隆抗体固定于压电传感器上,在两种纳米免疫颗粒的放大效应下对水中致病菌进行检测,使其检测限达到  $10^1$ cfu/ml。

1. 水环境中致病菌超敏感检测技术及应用,其特征是由如下步骤组成:

(1) 制备 5 种细菌的多克隆抗体

分别利用大白兔和昆明小鼠制备 5 种致病菌的多克隆抗体,ELISA 法测定效价在 1 : 10000 ~ 1 : 200000,采用饱和硫酸铵法和金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 亲和层析法纯化制备的多克隆血清;

(2) 免疫纳米磁颗粒的制备

采用化学共沉淀法制备粒径为 10nm ~ 100nm 的纳米磁颗粒,取纯化好的浓度为 0.2mg/mL ~ 1.0mg/mL 某种致病菌兔多克隆抗体连接到 1mL 纳米磁颗粒上制成免疫纳米磁颗粒。

(3) 免疫胶体金的制备

胶体金采用柠檬酸钠改良法制备,制备粒径为 10nm ~ 50nm 的胶体金,将浓度为 0.2mg/mL ~ 1.0mg/mL 的羊抗兔 IgG 连接至胶体金上即为免疫胶体金。

(4) 压电传感器的检测

①石英晶振用 piranha 液进行洗涤,取浓度为 0.2mg/mL ~ 2.0mg/mL 的 SPA 溶液 10  $\mu$  l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min,检测频率变化。确定 SPA 的最佳固定浓度和时间后,取浓度为 0.1mg/mL ~ 1.8mg/mL 的致病菌鼠多克隆抗体溶液 10  $\mu$  l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min,检测频率变化。确定致病菌鼠多克隆抗体的最佳固定浓度和时间。

②按最佳固定浓度和最佳固定时间分别将 SPA 和抗体固定于压电传感器的石英晶振上,将不同浓度的致病菌液滴加于石英晶振上,检测频率变化;取 10  $\mu$  l 免疫磁颗粒滴加于石英晶振上,检测频率变化;取 10  $\mu$  l 免疫胶体金滴加于石英晶振上,检测频率变化。最后得出 5 种致病菌的检测限。

2. 根据权利要求 1 所述的水环境中致病菌超敏感检测技术及应用,其特征是所述的 5 种致病菌的多克隆抗体,ELISA 法测定效价在 1 : 100000 ~ 1 : 120000。

3. 根据权利要求 1 所述的水环境中致病菌超敏感检测技术及应用,其特征是所述的纳米磁颗粒粒径约为 50nm,连接的抗体浓度要求为 0.5mg/mL。

4. 根据权利要求 1 所述的水环境中致病菌超敏感检测技术及应用,其特征是所述的胶体金改良法为微波炉方法,制备的胶体金粒径约为 20nm,连接的羊抗兔 IgG 浓度要求为 0.5mg/mL。

5. 根据权利要求 1 所述的水环境中致病菌超敏感检测技术及应用,其特征是所述的 SPA 的最佳固定浓度和最佳固定时间分别为 1.2mg/mL 和 40min;抗体的最佳固定浓度和最佳固定时间分别为 1.0mg/mL 和 60min。5 种致病菌的检测限为 10<sup>1</sup>CFU/mL。

## 水环境中致病菌超敏感检测技术

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测技术,尤其是对水环境中致病菌的超敏感检测技术范畴。本发明涉及一套能够检测肠出血大肠杆菌 0157 : H7、沙门氏菌、志贺氏菌、嗜肺军团菌和变形杆菌的技术,并且该套技术可用于实际水环境中的检测。

### 背景技术

[0002] 水是人类赖以生存的物质,不仅供人们饮用和生活用水,同时还是人和动物机体排泄物、生产和生活污水等的排放场所,因此,水中的微生物多种多样。水中对人类健康威胁最大的是致病菌:历史上,曾发生过多次世界范围的霍乱大流行;在印度由于恒河水被非 0-1 群霍乱弧菌(0139)污染而导致了新的霍乱流行;此外,由于自然灾害、战争、制裁、经济落后所导致的卫生状况恶化、饮用水质下降而造成其它细菌性疾病(如伤寒、菌痢、腹泻等)的暴发流行也十分常见。根据 WHO 年度报告,亚(不包括中国)、非、拉各洲仅小于 5 岁的儿童每人每年发生腹泻 2.2 次,细菌性腹泻的病例多达 1.5-2.5 亿人;而我国每年肠道传染病的报告病例数多达 100 万人次(实际发病人数可能远超过这些),占全部 35 种法定传染病报告病例数总数的 80% 以上。目前,虽然城镇卫生水平有明显提高,但由于生活方式的改变,仍然存在引起介水细菌学疾病的隐患,军团杆菌介空调冷却水进行传播和致病就是其中一例。此外,据调查一些家庭使用纯水机、桶装水、矿泉水,由于其暴露时间长,导致二次污染,仍有 25% 的水样细菌总数或大肠菌群超标。

[0003] 传统的细菌学检验方法主要是细菌培养和生化鉴定法,要经过前增菌、选择性培养及生化反应鉴定等,完成这些检验需要数天时间,而且操作繁琐。有时在某些标本中,可能因含有某些干扰物质而降低目标菌的检出率。免疫荧光技术、酶联免疫技术、放射免疫技术等免疫学方法具有快速、特异等优点,但操作仍然比较复杂,或敏感性偏低、或存在放射性污染等。分子生物学方法中的 DNA 探针杂交技术,虽然提高了检测的特异性,但操作步骤较多,所需时间也较长。特别是肠道致病菌的属、种和型别很多,所以快速、系统的检出水中肠道致病菌的方法尚有待建立。

[0004] PCR 技术以其敏感、特异、操作简便、快速等特点,一经建立就受到广泛重视和应用。在微生物学检验方面已有较多的研究报道。但常规 PCR 一次只能检出一种或几种病原微生物,而且常常集中于对模拟样品中的人工污染病原微生物的验证性检测。而水中往往同时含有多种致病菌或病毒,如果遭到生物恐怖袭击则微生物相更复杂。

[0005] 病原微生物的超灵敏检测方法主要集中在致病菌的检测。实时荧光定量 PCR (Real time PCR) 不仅可以提高检测的敏感性 ( $10 \sim 100\text{CFU}/\text{ml}$ ),而且可以进行定量检测,目前已经用于致病细菌的检测。但存在的问题是,①水中致病细菌的检测敏感性偏低;②检测时需要分离到纯菌落,若直接从水中提取核酸,则敏感性仍较低。最近,英国科学家在“新科学家”杂志发布消息称英国科学家研制出一种基于玻璃银电极的免疫传感器,通过对流动样品中的检测,可以在 10min 内检测到只有 4 个细胞的大肠杆菌 0157 : H7,但他们所检测的样品是肉汤中的纯培养细菌,而不是实际样品。随着纳米技术的发展,人们建立了基于纳米

技术的超灵敏微生物检测新技术。据报道,这一技术结合荧光标记技术,可以检测到单一的致病菌,在微生物界引起了较大反响。然而,对于复杂样品中的致病菌,这一技术仍无法达到实际应用的水平。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对现有水环境中致病菌检测技术灵敏度不能满足现实需要,而提供一种超敏感的检测水环境中致病菌技术,本发明的技术方案如下:

[0007] 一种水环境中致病菌超敏感检测技术方法,由如下步骤组成:

[0008] (1) 制备 5 种细菌的多克隆抗体

[0009] 分别利用大白兔和昆明小鼠制备 5 种致病菌的多克隆抗体,ELISA 法测定效价 1 : 10000 ~ 1 : 200000,采用饱和硫酸铵法和金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 亲和层析法纯化制备的多克隆血清;

[0010] (2) 免疫纳米磁颗粒的制备

[0011] 采用化学共沉淀法制备粒径为 10nm ~ 100nm 的纳米磁颗粒,取纯化好的浓度为 0.2mg/mL ~ 1.0mg/mL 某种致病菌兔多克隆抗体连接到 1mL 纳米磁颗粒上制成免疫纳米磁颗粒。

[0012] (3) 免疫胶体金的制备

[0013] 胶体金采用柠檬酸钠还原法制备,制备粒径为 10nm ~ 20nm 的胶体金,将浓度为 0.2mg/mL ~ 1.0mg/mL 的羊抗兔 IgG 连接至胶体金上即为免疫胶体金。

[0014] (4) 压电传感器的检测

[0015] ①石英晶振用 piranha 液进行洗涤,取浓度为 0.2mg/mL ~ 2.0mg/mL 的 SPA 溶液 10  $\mu$  l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min,检测频率变化。确定 SPA 的最佳固定浓度和时间后,取浓度为 0.1mg/mL ~ 1.8mg/mL 的致病菌鼠多克隆抗体溶液 10  $\mu$  l 固定于压电传感器的石英晶振 10 ~ 90min,检测频率变化。确定致病菌鼠多克隆抗体的最佳固定浓度和时间。

[0016] ②按最佳固定浓度和最佳固定时间分别将 SPA 和抗体固定于压电传感器的石英晶振上,将不同浓度的致病菌液滴加于石英晶振上,检测频率变化;取 10  $\mu$  l 免疫磁颗粒滴加于石英晶振上,检测频率变化;取 10  $\mu$  l 免疫胶体金滴加于石英晶振上,检测频率变化。最后得出 5 种致病菌的检测限。

[0017] 本发明水环境中检测某种致病菌技术及应用,压电免疫传感器通过 SPA 法将抗体固定于石英晶振上,两种免疫纳米颗粒借助不同的抗体连接于传感器上对检测频率信号进行放大,从而提高检测灵敏度,达到对水中致病菌的超敏感检测。该发明具有于操作简便、快速,而且只要更换检测中的抗体就可以检测不同的微生物的特点,在微生物的检测中具有广阔的前景。

## 附图说明

[0018] 图 1 为本发明水环境中检测某种致病菌的示意图。

[0019] 图 2 为本发明的压电传感器的石英晶振固定了不同物质后在原子力显微镜下的图片。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例,对本发明作进一步的说明。

### [0021] 实施例 1

[0022] (1) 制备肠出血大肠杆菌 0157 : H7 的多克隆抗体

[0023] 制备肠出血大肠杆菌 0157 : H7 抗原。兔耳缘静脉注射免疫兔子,每次注射抗原浓度均为 60 亿 /mL,首次注射 1.0mL/只,第二、三次注射 1.5mL/只,第四、五次注射 2.0mL/只,每次间隔 4 天,末次注射后 7 天,耳静脉采血,用 ELISA 法测效价。当效价达到 1 : 10000 ~ 1 : 120000,颈动脉采血。小鼠尾静脉注射免疫小鼠,每次注射抗原浓度均为 60 亿 /mL,首次注射 0.1mL/只,第二、三次注射 0.2mL/只,第四、五次注射 0.4mL/只,每次间隔 4 天,末次注射后 7 天,眼静脉采血,用 ELISA 法测效价。当效价达到 1 : 10000 ~ 1 : 120000,断头采血。采用饱和硫酸铵法和 SPA 亲和层析法纯化制备的多克隆血清,将纯化抗体浓度定为 2.0mg/mL 保存。

[0024] (2) 免疫纳米磁颗粒的制备

[0025] ①将 0.7mol/L 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  水溶液 16mL 与 1.6mol/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  水溶液 4mL 混合,在氮气氛下,滴加至 20mL 的 50% 的葡聚糖 T-40 水溶液中,所述葡聚糖 T-40 水溶液的浓度为 g/mL 百分比浓度,混合,60℃,水浴 20min,在 500rpm 的搅拌下,20min 内,向混合液中滴加 5mol/L 的氨水 40mL,温度保持 60℃,并始终通氮气,制成悬液;然后用去离子水透析 24h。离心管离心,2100rpm,15min,保留上清(阻氧避光保存),所制得的磁颗粒其核心大小约为 5nm,整个磁颗粒的大小约为 50nm。

[0026] ②游离的葡聚糖经聚丙烯酰胺葡聚糖 S-300 凝胶层析柱过滤与葡聚糖纳米磁颗粒分离,洗脱平衡液为 pH 为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液,收集的颗粒冷冻干燥,使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 8mg/mL;取葡聚糖纳米磁颗粒悬液 1.0mL,加入 20mmol/L  $\text{NaIO}_4$  水溶液 0.25mL,150 转 / 分钟避光阻氧震荡 6h 后,加入 2mol/L 乙二醇的水溶液 0.21mL 终止氧化,pH 为 7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 4℃透析 24h,去除过量的  $\text{NaIO}_4$ ,使葡聚糖纳米磁颗粒悬液的浓度为 5.5mg/mL;

[0027] ③取 (1) 中制备的肠出血大肠杆菌 0157 : H7 兔多克隆抗体 0.3mL,其浓度为 0.5mg/mL,加入到②中的 1mL 磁颗粒中,混匀后,放入冰箱过夜(避光),次日,每 mL 颗粒加 0.2mL 的 0.5M 甘氨酸溶液,过夜,备用。

[0028] (3) 免疫胶体金的制备

[0029] 取 247.5ml 水放入 500mL 锥形瓶中,用微波炉加热 5min;然后迅速加入 15ml 的 1% 柠檬酸三钠溶液,继续加热 4min;之后精确加入 2.5mL 的 1% 氯化金贮备液加热 6min。取出锥形瓶,此时胶体金颜色为葡萄酒红色,其颗粒大小约为 20nm,冷却后用 0.2% 碳酸钾溶液调 pH 值为 8.2,最后放入 4℃ 冰箱中保存备用。利用试管观测法测得稳定胶体金最适羊抗兔 IgG 量为  $18 \mu\text{g/mL}$ 。取调好 pH 值的胶体金 25ml,加入浓度为 0.5mg/mL 的羊抗兔 IgG 0.9ml,缓慢搅拌 10min,加入牛血清白蛋白(BSA),使其终浓度为 1%,继续搅拌 10min 以上。将上面初步制得的胶体金探针以 4000rpm 离心 20min,收集上清以 10000rpm 4℃ 离心 60min;丢弃上清,留下管底为暗红色疏松状沉淀,沉淀用 0.005mol/L pH 为 7.6 的 PB 缓冲液(含 1% BSA,0.02%  $\text{NaN}_3$ )重新悬浮,再同前离心洗涤一次。最后将沉淀用同前的 PB 缓

冲液悬浮,置 4℃冰箱保存备用

[0030] (4) 压电传感器的检测

[0031] ①先将石英晶振用 piranha 液(浓  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  3/1, 现用现配)进行洗涤,再用无水乙醇和超纯水洗涤,每次 5min,重复 3 次。石英晶振在固定物质之前在气相中进行基础频率检测,固定物质之后进行洗涤,氮气吹干 10min 后在气相中进行频率检测,频率变化稳定在  $\pm 1\text{Hz}$  间时计数。

[0032] ②石英晶振在检测基础频率  $f_0$  之后,取不同浓度的 SPA 溶液  $10\ \mu\text{l}$  滴加于石英晶振上,常温下固定 60min。用超纯水洗涤石英晶振 5min,再用 PBS(0.01mol/L pH 为 7.4) 洗涤 5min,氮气吹干 10min 后进行频率测定,频率稳定后计数  $f_1\text{C}$ ,并计算其频移值( $\Delta f_1\text{C} = f_1\text{C} - f_0$ )。在确定 SPA 最佳固定浓度之后,取最佳浓度的 SPA 溶液  $10\ \mu\text{l}$  滴加于石英晶振上,固定不同时间后,进行频率测定,频率稳定后计数  $f_1\text{T}$ ,并计算其频移值( $\Delta f_1\text{T} = f_1\text{T} - f_0$ ),可以得出 SPA 的最佳固定浓度和最佳固定时间分别为 1.2mg/mL 和 40min

[0033] ③按 SPA 最佳固定浓度和时间将 SPA 固定于石英晶振上,检测其频率为  $f_1$ ,取不同浓度的肠出血大肠杆菌 0157 : H7 鼠多克隆抗体溶液  $10\ \mu\text{l}$  滴加于石英晶振上,置于水浴锅中 37℃ 下孵育 60min,超纯水洗涤,氮气吹干 10min 后进行频率测定,计数为  $f_2\text{C}$ ,并计算其频移值( $\Delta f_2\text{C} = f_2\text{C} - f_1$ )。在确定抗体最佳固定浓度之后,取最佳浓度的抗体溶液  $10\ \mu\text{l}$  滴加于石英晶振上,固定不同时间后,进行频率测定,频率稳定后计数  $f_2\text{T}$ ,并计算其频移值( $\Delta f_2\text{T} = f_2\text{T} - f_1$ ),可以得出抗体的最佳固定浓度和最佳固定时间分别为 1.0mg/mL 和 60min。

[0034] ④将 SPA 和肠出血大肠杆菌 0157 : H7 鼠多克隆抗体分别固定于石英晶振上后,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_2$ 。再在其上滴加 1% BSA 溶液  $10\ \mu\text{l}$  进行封闭,37℃ 下孵育 60min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_2'$ 。取不同浓度的肠出血大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液  $10\ \mu\text{l}$  分别滴加于石英晶振上,37℃ 下反应 60min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_3$ ,并计算其频移值( $\Delta f_3 = f_3 - f_2'$ )。取制备好的免疫纳米磁颗粒  $10\ \mu\text{l}$  滴加于石英晶振上,37℃ 下反应 60min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_4$ ,并计算其频移值( $\Delta f_4 = f_4 - f_3$ ),这是对检测频率信号进行了 1 级放大。继续利用免疫胶体金对检测频率信号进行 2 级放大,取制备好的免疫胶体金  $10\ \mu\text{l}$  滴加于石英晶振上,37℃ 下反应 60min 后洗涤,氮气吹干进行频率检测,频率稳定后计数为  $f_5$ ,并计算其频移值( $\Delta f_5 = f_5 - f_4$ )。压电免疫传感器检测浓度为  $7.8 \times 10^8\text{cfu/ml}$  的肠出血大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液时,引起了 227.6Hz 的频率值下降,而当利用免疫纳米磁颗粒对检测频率信号进行放大时,又引起了 296.5Hz 的频率值下降,当再次利用免疫胶体金对检测频率进行第 2 次放大时,再次引起了 122.2Hz 的频率值下降,压电免疫传感器总的频率值下降了 646.3Hz。可见两种纳米颗粒在压电免疫传感器的检测过程中具有非常大的放大作用。压电免疫传感器检测不同浓度的大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液,以及分别利用两种纳米颗粒进行放大引起的频率变化( $\Delta f_3, \Delta f_4, \Delta f_5$ )。压电免疫传感器在没有两种纳米颗粒放大作用下,其检测限为  $10^4\text{cfu/ml}$ ,而经过两级放大后,检测下限增至为  $10^1\text{cfu/ml}$ 。

[0035] 实施例 2

[0036] 水环境中致病菌的超敏感检测的方法,步骤同实施例 1,将其中的步骤(1) 肠出血

大肠杆菌 0157 : H7 用沙门氏菌取代;步骤 (2) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 兔多克隆抗体用沙门氏菌兔多克隆抗体取代;步骤 (3) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 鼠多克隆抗体用沙门氏菌抗体取代;步骤 (4) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液用沙门氏菌悬液取代进行检测。

[0037] 实施例 3

[0038] 水环境中致病菌的超敏感检测的方法,步骤同实施例 1,将其中的步骤 (1) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 用志贺氏菌取代;步骤 (2) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 兔多克隆抗体用志贺氏菌兔多克隆抗体取代;步骤 (3) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 鼠多克隆抗体用志贺氏菌抗体取代;步骤 (4) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液用志贺氏菌悬液取代进行检测。

[0039] 实施例 4

[0040] 水环境中致病菌的超敏感检测的方法,步骤同实施例 1,将其中的步骤 (1) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 用嗜肺军团菌取代;步骤 (2) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 兔多克隆抗体用嗜肺军团菌兔多克隆抗体取代;步骤 (3) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 鼠多克隆抗体用嗜肺军团菌抗体取代;步骤 (4) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液用嗜肺军团菌悬液取代进行检测。

[0041] 实施例 5

[0042] 水环境中致病菌的超敏感检测的方法,步骤同实施例 1,将其中的步骤 (1) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 用变形杆菌取代;步骤 (2) 肠出血大肠杆菌 0157 : H7 兔多克隆抗体用变形杆菌兔多克隆抗体取代;步骤 (3) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 鼠多克隆抗体用变形杆菌抗体取代;步骤 (4) 中肠出血大肠杆菌 0157 : H7 菌悬液用变形杆菌悬液取代进行检测。

[0043] 沙门氏菌、志贺氏菌、和变形杆菌在中国医学细菌保藏管理中心保存,保藏号分别为:CMCC50013、CMCC 51073、CMCC49032。按规定程序,研究人员可以从该所获得。

[0044] 嗜肺军团杆菌在中国疾病预防控制中心流行病学研究所有保存,但无保藏号。按规定程序,研究人员可以从该所获得。

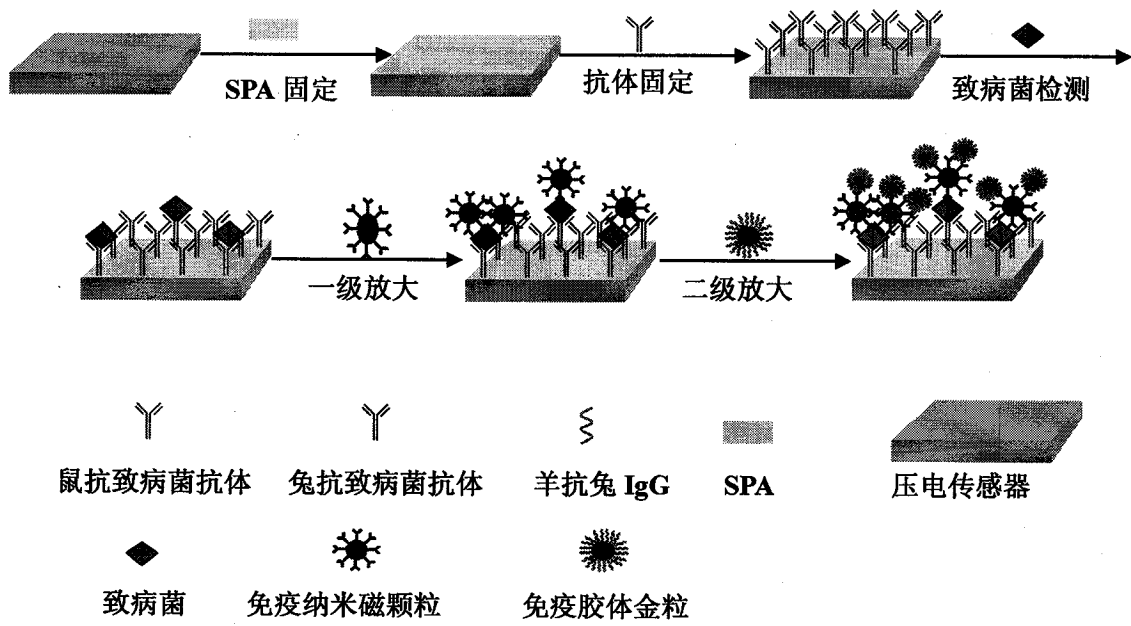


图 1

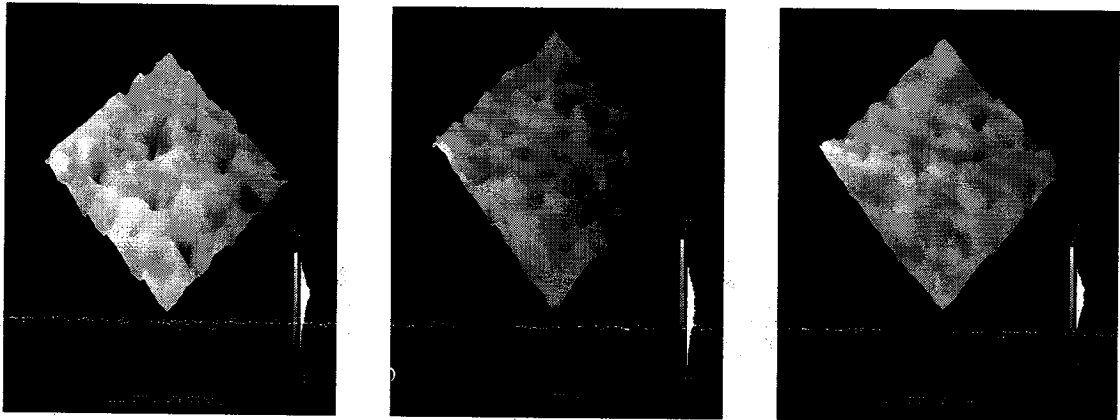


图 2

专利名称(译)	水环境中致病菌超敏感检测技术		
公开(公告)号	<a href="#">CN101930002A</a>	公开(公告)日	2010-12-29
申请号	CN200910069391.1	申请日	2009-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	谌志强 李君文 王新为 金敏 王景峰 邱志刚 陈照立		
发明人	谌志强 李君文 王新为 金敏 王景峰 邱志刚 陈照立		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532 G01N27/414		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种水环境中致病菌的超敏感检测方法，其主要技术特点：(1)采用化学共沉淀法制备粒径大小约50nm的磁颗粒，包被上致病菌的兔多克隆抗体制成免疫纳米磁颗粒；(2)采用柠檬酸钠还原法制备粒径大小约为20nm的胶体金，包被上羊抗兔IgG制成免疫胶体金。(3)利用SPA法将致病菌鼠多克隆抗体固定于压电传感器上，在两种纳米免疫颗粒的放大效应下对水中致病菌进行检测，使其检测限达到101cfu/ml。

