

# 同时检测沙门氏菌和炭疽杆菌磁致伸缩生物传感器制备与应用

胡 静<sup>1,2,3</sup>, 胡佳佳<sup>1,2</sup>, 沈 雯<sup>2,3</sup>, Bryan A. Chin<sup>2</sup>

(1. 常州大学材料科学与工程学院, 江苏省表面工程技术重点实验室, 常州 213164; 2. 奥本大学材料工程学院, 食品检测与安全中心, 奥本 36849, 美国; 3. 江苏省光伏科学与工程协同创新中心(常州大学), 常州 213164)

**摘 要:** 为探索 2 个磁弹性生物传感器进行串联是否会存在耦合干扰, 继而影响各自的检测精度, 该文以磁致伸缩带材(2826 MB MetglasTM)为传感器膜片, 不同种类噬菌体为生物识别元件, 制备了可同时检测沙门氏菌和炭疽杆菌 2 种病菌的磁致伸缩生物传感器系统。采用物理吸附法在部分磁致伸缩传感器表面固定了对沙门氏菌具有检测专一性的 E2 噬菌体, 用于检测沙门氏菌; 部分磁致伸缩传感器表面固定了对炭疽杆菌具有检测专一性的 JRB7 噬菌体, 用于检测炭疽杆菌。在磁致伸缩传感器表面固定噬菌体后, 采用牛血清蛋白作为阻滞剂覆盖没有固定噬菌体的局部区域, 防止检测中非专一性细菌吸附导致的检测误差。同时, 制备了一种没有固定任何噬菌体只覆盖牛血清蛋白阻滞剂的参考传感器, 目的是探索牛血清蛋白对被检病菌吸附到传感器表面的阻滞效果。在检测过程中, 传感器由磁场定位, 将传感器浸入到病原体溶液中, 吸附细菌后传感器质量增加, 导致其共振频率降低。研究发现: 所研制的生物传感器系统不存在相互耦合干扰, 每种生物传感器能专一性地吸附与表面噬菌体对应的被测病菌。对浓度范围为  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$  CFU/mL 菌液检测还发现, 该系统具有良好的检测灵敏度, 本研究所采用尺寸规格的传感器灵敏度同单个传感器检测灵敏度一样, 为  $10^3$  CFU/mL。同时, 参考传感器浸入到病原体溶液中频率无变化证明了牛血清蛋白阻滞剂可有效消除没有固定噬菌体的局部表面对细菌的非专一性结合。扫描电镜对传感器样品表面进行观察, 直观地证明了生物传感器与其目标被测物之间的吸附情况, 观察结果为生物传感器对细菌的检测提供了可靠的参考证据。

**关键词:** 生物传感器; 抗体; 细菌; 磁致伸缩; 噬菌体; 沙门氏菌; 炭疽杆菌

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.043

中图分类号: TP212.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-05-0297-05

胡 静, 胡佳佳, 沈 雯, Bryan A. Chin. 同时检测沙门氏菌和炭疽杆菌磁致伸缩生物传感器制备与应用[J]. 农业工程学报, 2016, 32(5): 297—301. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.043 http://www.tcsae.org

Hu Jing, Hu Jiajia, Shen Wen, Bryan A. Chin. Preparation and application of magnetoelastic biosensors system for simultaneously detecting *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(5): 297—301. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.043 http://www.tcsae.org

## 0 引 言

食品安全是在食品加工、包装、储藏、运输、销售等过程不存在可能损害或威胁人体健康的有毒有害物质。因此, 从食品加工到消费的整个过程都需要进行实时可靠的检测, 才能确保食品安全。目前用于食品安全检测的标准方法虽然测定结果精确可靠, 但存在着检测时间较长、过程繁琐、成本高等缺点。新鲜食品在生产加工的每一环节中, 都有可能受到细菌的污染, 因此迫切需要研究和开发一些快速、方便、可靠的安全检测技术, 使食品从加工到消费的整个过程都得到全面系统的实时检测<sup>[1-2]</sup>。

与传统检测方法相比, 生物传感器检测技术具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、成本低、无线远距离检测病原体等优点, 它作为一种检测手段已经成为食品安全检测的发展趋势<sup>[3-5]</sup>。磁弹性生物传感器已经成功应

用于检测食源性病原体, 如沙门氏菌和大肠杆菌<sup>[4-5]</sup>。磁弹性技术是将磁弹性的条带作为传感器膜片, 然后将生物分子识别元件(抗体或噬菌体等)固定在其表面, 作为专一性吸附沙门氏菌和炭疽杆菌等被检病菌。该种传感器的工作原理是基于磁弹性材料的特性, 在激励线圈产生随时间变化的外加磁场中, 传感器膜片会发生尺寸的振荡变化, 从而有效地将施加的磁能转化为机械能。当所施加的外磁场的频率和传感器膜片的特征频率一致时, 将会以最大的振幅振荡, 产生最大的机械能。从而导致接收线圈的电流发生变化, 由此实现对振动的远距离检测。研究中, 激励线圈和接受线圈可以为同一线圈, 这样可以实现远距离无线检测, 而不需要传感器和检测系统之间的物理连接<sup>[6-9]</sup>。

已有的研究都是利用单个磁弹性生物传感器检测单一目标病菌(如沙门氏菌)<sup>[10-13]</sup>。本研究采用 2 个磁弹性生物传感器组合系统同时检测如下 2 种病菌: 容易引起食源性疾病的沙门氏菌和污染食品安全供应的炭疽杆菌。旨在探索 2 个磁弹性生物传感器进行串联组合是否可以实现不同病菌的同时检测; 还是会出现恼人的耦合干扰, 继而影响检测灵敏度。

为此, 以磁致伸缩带材(2826MB MetglasTM)作为

收稿日期: 2015-08-30 修订日期: 2015-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(51271039), 江苏省教育厅留学基金(JS-2012-173)和江苏高校优势学科建设工程(JS-2014-16)项目资助。

作者简介: 胡 静, 女, 湖南长沙人, 博士, 教授, 主要从事生物传感器研究。常州 常州大学材料科学与工程学院, 213164. Email: jinghuo@126.com

传感器膜片, 不同种类噬菌体作为生物识别元件, 制备用于同时检测沙门氏菌和炭疽杆菌的磁致伸缩生物传感器系统。同时, 研制的检测系统附加了没有固定噬菌体的参考传感器, 目的是用于对温度、压力和湿度等环境参数进行校正和标定。研究结果为需要同时检测多种病菌的实际应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 传感器平台

传感器膜片为 METGLAS® 2826MB 合金, 由美国 Honeywell International 提供, 其成分为  $\text{Fe}_{40}\text{Ni}_{38}\text{Mo}_4\text{B}_{18}$ 。为提高灵敏度, 用细砂纸将传感器厚度从  $30\text{ }\mu\text{m}$  打磨到  $15\text{ }\mu\text{m}$  以减小初始质量, 再用自动控制的微切割锯制成尺寸为  $2\text{ mm}\times 0.4\text{ mm}\times 15\text{ }\mu\text{m}$  和  $1.9\text{ mm}\times 0.4\text{ mm}\times 15\text{ }\mu\text{m}$  2 种长度的磁致伸缩传感器, 然后用甲醇超声清洗掉传感器表面的油脂和割据过程中留下的残片。为提高传感器耐腐蚀性和生物活性, 采用美国 Moorestown, NJ 公司生产的高真空 RF 喷溅系统, 在表面溅射涂覆 Cr 和 Au 薄层<sup>[14-16]</sup>。

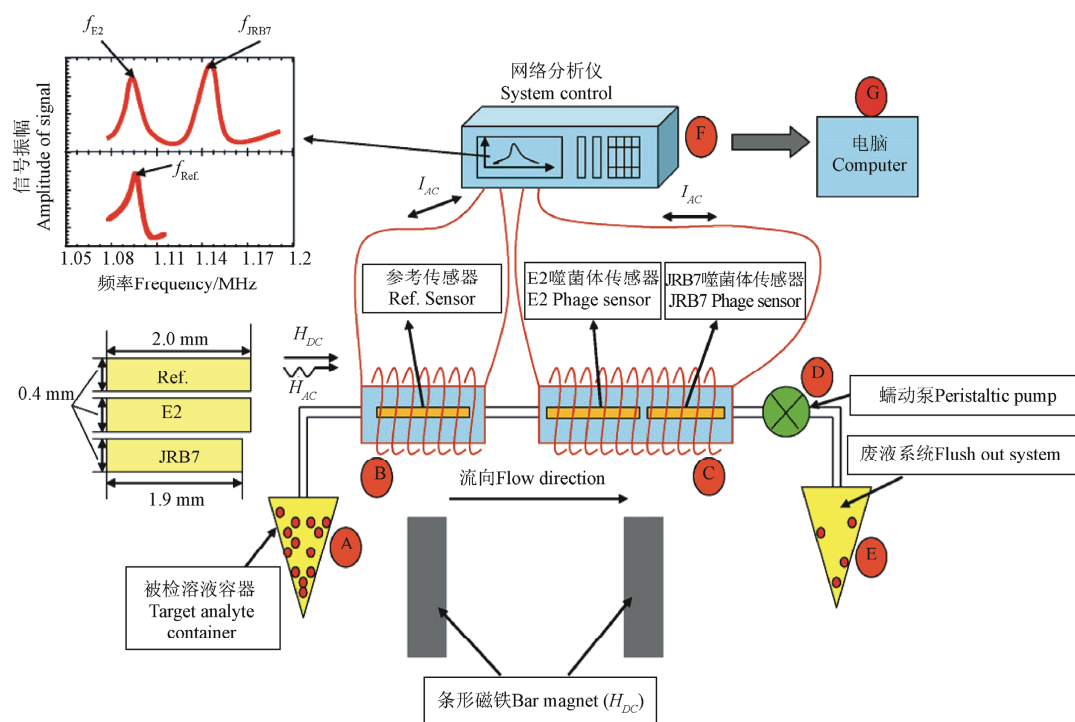
### 1.2 单一生物传感器制备

将磁弹性传感器同时浸在浓度为  $5\times 10^{11}\text{ vir/mL}$  的 E2 (对沙门氏菌有专一性吸附) 和 JRB7 (对炭疽杆菌有专一性吸附) 噬菌体 TBS 溶液 ( $300\text{ }\mu\text{L}$ ) 中, 保持 1 h, 通过物理吸附法使噬菌体固定在传感器表面<sup>[17-18]</sup>。之后用蒸馏水清洗传感器以去除表面结合不紧密的噬菌体和残留的盐。为了阻止细菌的非专一性结合, 将牛血清白蛋白进一步固定在传感器的表面作为阻滞剂。制备结束后, 将传感器浸在浓度为  $5\times 10^7\sim 5\times 10^8\text{ CFU/mL}$  的被测溶液

中进行细菌检测。

### 1.3 同时检测 2 种细菌的生物传感器系统

图 1 为同时检测 2 种细菌的生物传感器系统示意图。该体系由被测液容器、蠕动泵、2 个测试室 (用毛细管相连)、冲洗室、3 个磁弹性生物传感器及数据采集和控制的网络分析仪构成。如图 1 所示, 2 个检测传感器都放置在测试室内 (C), 其中一个表面固定 E2 噬菌体, 另一个固定 JRB7 噬菌体。为便于区分, 两个检测传感器采用了不同长度, 分别为: 2 和 1.9 mm。如图 3c 所示, 目的是同时检测沙门氏菌 (吸附 JRB7 噬菌体的传感器) 和炭疽杆菌 (吸附 E2 噬菌体的传感器)。参考传感器放置在第二个测试室内 (B), 采用独立的线路将测试室分别与网络分析仪 (F) 相连, 该分析仪可以同时测量并显示 2 个线路上的信号, 由此实现同时测量、显示和记录 3 个传感器的共振频率, 即实现了实时检测。表面固定 E2 噬菌体的传感器和参考传感器的长度均为 2 mm; 表面固定 JRB7 噬菌体的传感器长度为 1.9 mm, 根据文献[1]对磁致伸缩传感器共振频率的计算公式, 可得到其共振频率分别约为 1.8 和 1.14 MHz。试验中采用蠕动泵 (D) 使含有沙门氏菌或炭疽芽胞杆菌的被测溶液从容器 (A) 输送到检测室, 流量为  $50\text{ }\mu\text{L/min}$ , 采用网络分析仪 (F) 和计算机 (G) 连续监测并记录共振频率, 当生物传感器捕获到被测溶液中目标细菌时, 网络分析仪将检测到频率的漂移。最后, 被测菌液的废料收集在废液系统内 (E) 进行处理。沙门氏菌和炭疽芽胞杆菌由奥本大学生物科学部提供, 所有菌液都在  $4^\circ\text{C}$  下保存, 在试验使用前预热到  $25^\circ\text{C}$ 。



注: A 为被测液容器, B 和 C 为 2 个测试室, D 为蠕动泵, E 为废液系统, F 为网络分析仪, G 为电脑,  $H_{AC}$  和  $H_{DC}$  为外加磁场,  $I_{AC}$  为电流,  $f$  为共振频率。  
Note: A is target analyte Container, B and C are 2 testing rooms, D is peristaltic pump, E is flush out system, F is system control and G is computer,  $H_{AC}$  and  $H_{DC}$  is applied magnetic field,  $I_{AC}$  is electricity,  $f$  is resonant frequency.

图 1 同时检测 2 种细菌的生物传感器系统示意图

Fig.1 Schematic illustration of magnetostrictive biosensors system for simultaneously detecting two kinds of bacterias

#### 1.4 传感器灵敏度测试

为了测试该同时检测 2 种细菌生物传感器系统的灵敏度,将 2 种长度不同的生物传感器分别浸在 1 mL 菌液浓度都为  $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$  CFU/mL 的沙门氏菌和炭疽芽孢杆菌溶液中,用于检测不同浓度下频率漂移情况。

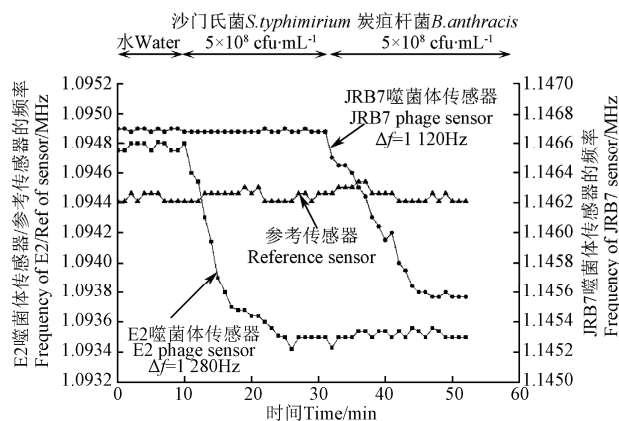
#### 1.5 传感器表面扫描电子显微镜 (SEM) 观察

采用日本电子株式会社生产的 JEOL-7000F 型扫描电子显微镜 (SEM) 来证实并量化细菌的吸附情况。先用蒸馏水清洗检测过的生物传感器,再浸在四氧化锇 ( $\text{OsO}_4$ ) 蒸汽中 40 min。然后,用双面的碳胶带将传感器粘在铝柱上,放进扫描电镜的样品台上进行 SEM 观察,并统计每个传感器上结合的细菌数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 传感器体系检测专一性研究

图 2 为制备的同时检测 2 种细菌生物传感器的系统在水、沙门氏菌和炭疽芽孢杆菌溶液 (2 种菌液浓度都为  $5 \times 10^8$  CFU/mL) 的响应曲线。在最初的 10 min 内,将过滤水连续以  $50 \mu\text{L}/\text{min}$  速度泵进 2 个腔室内,直到 3 个传感器的频率都达到稳定。然后将水流切换为 1 mL 沙门氏菌溶液,持续 20 min;再切换为 1 mL 炭疽芽孢杆菌溶液,持续 20 min。整个试验过程流速保持恒定值  $50 \mu\text{L}/\text{min}$ 。



注: 菌液浓度为  $5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>。  
Note: Concentration is  $5 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>。

图 2 生物传感器体系在不同检测液体中的响应曲线  
Fig.2 Real-time frequency spectrum of biosensors in different solutions

可见,前 10 min 在水中测试时,所有传感器的响应频率都处于稳定状态。当切换为沙门氏菌 1 min 后,表面固定 E2 噬菌体的传感器因捕获了细菌,共振频率连续下降,15 min 后,当沙门氏菌与传感器表面的噬菌体结合达到饱和时,其频率值趋于稳定。在这 15 min 内,其他 2 种传感器的频率保持稳定,说明参考传感器和表面固定 JRB7 噬菌体的传感器表面没有吸附沙门氏菌。20 min 后,将沙门氏菌溶液换为炭疽杆菌溶液,此时发现表面固定 JRB7 噬菌体的传感器的共振频率急剧下降,而参考传感器和表面固定 E2 噬菌体的传感器共振频率均保持稳定。说明参考传感器和表面固定 E2 噬菌体的传感器表面没有

吸附炭疽杆菌。因此,图 2 所示的传感器系统在 3 种不同溶液中的响应曲线可清晰地表明,所研制的多重检测磁致伸缩生物传感器系统对目标细菌具有良好的检测专一性。

### 2.2 传感器体系检测灵敏度研究

将 3 种磁致伸缩传感器分别浸泡在 1 mL 浓度为  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^8$  CFU/mL 的沙门氏菌或炭疽芽孢杆菌溶液中,检测不同浓度下传感器共振频率,并计算不同溶液中共振频率漂移与细菌浓度的关系,如图 3 所示。由图 3 可见,在整个测试过程中,不管被测菌液为哪种、浓度为多少,参考传感器的共振频率均保持稳定,进一步说明通过牛血清白蛋白 (BSA) 作为阻滞剂处理过的生物传感器对细菌吸附具有良好的专一性。从图 3 还可见,在检测的不同浓度沙门氏菌溶液中,只有表面固定 E2 噬菌体的传感器才有频率漂移,且频率漂移与沙门氏菌浓度密切相关,随细菌浓度增加而单调增加;同样,在所有检测的不同浓度的炭疽杆菌溶液中,只有表面固定 JRB7 噬菌体的传感器才有频率漂移,且频率漂移也同样随细菌浓度增加而单调增加。由此说明本研究制备的生物传感器系统不仅具有良好的检测专一性;同时具有良好的检测灵敏度,本研究采用尺寸的传感器检测灵敏度为  $10^3$  CFU/mL,与检测单一病菌时灵敏度一致<sup>[1]</sup>。

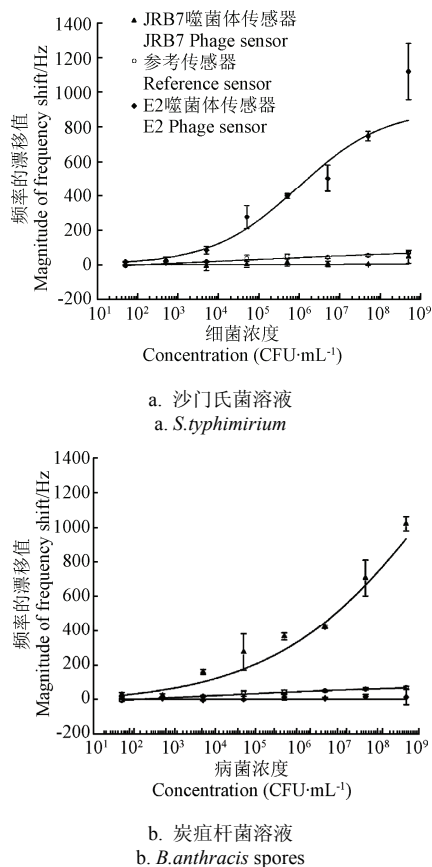


图 3 传感器共振频率的漂移值与细菌浓度的关系  
Fig.3 Relationship between frequency shift and concentration of bacteria

需要特别说明的是:本研究目标是探索 2 个磁弹性生物传感器进行串联是否会存在耦合干扰,继而影响各



自的检测精度。至于如何进一步提高传感器系统检测灵敏度,以达到不同使用环境的灵敏度要求,本课题组将通过减小传感器尺寸实现灵敏度的提高。这部分研究正在开展中,发现随传感器尺寸或质量减小,检测灵敏度单调增加。

### 2.3 生物传感器表面扫描电子显微镜 (SEM) 观察

为了证实生物传感器共振频率的漂移由细菌吸附所引起,采用扫描电子显微镜 (SEM) 观察生物传感器在细菌溶液中浸泡后的表面形貌。图 4 为不同种类生物传感器在浓度为  $5 \times 10^8$  CFU/mL 的不同细菌溶液中检测后的表面形貌。可见,参考传感器在任何检测溶液中都没有吸附细菌,固定 E2 噬菌体的传感器表面吸附了大量沙门氏菌,固定 JRB7 噬菌体的传感器表面吸附了大量炭疽杆菌。SEM 观察的生物传感器表面形貌与图 3 显示的频率漂移所对应的吸附结果相吻合,由此进一步说明引起共振频率漂移的原因是目标细菌吸附导致生物传感器质量增加。

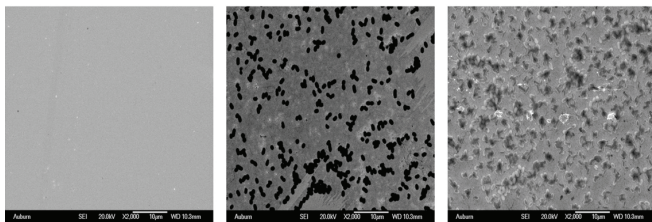


图 4 不同种类生物传感器在浓度为  $5 \times 10^8$  CFU/mL 菌液中检测后的表面形貌 (放大倍数: 2 000)

Fig.4 Typical SEM images of biosensor surface after binding bacterium with concentration of  $5 \times 10^8$  CFU/mL ( $\times 2\,000$ )

### 2.4 成本分析及应用前景

本检测方法一次性投入的设备成本主要为数据采集和控制网络分析仪 (单价为 5.8 万/套) 及小型蠕动泵 (单价为 3 000 元/台)。检测过程中耗材主要包括磁致伸缩传感器膜片、Cr 和 Au 溅射靶材、JRB7 和 E2 噬菌体。检测用耗材成本情况详见表 1。

表 1 磁致伸缩传感器原材料成本

Table 1 Cost of materials for ME biosensors

原材料 Materials	单位成本 Unit cost	来源 Source
磁致伸缩传感器膜片 $\text{Fe}_{40}\text{Ni}_{38}\text{Mo}_4\text{B}_{18}$	438 元/kg	Honeywell International
Au 溅射靶材	1 850 元/g	Fisher Company
Cr 溅射靶材	160 元/kg	Fisher Company
TBS	1 元/g	Fisher Company

注: JRB7 和 E2 噬菌体由奥本大学生物实验室培养。

Note: JRB7 and E2 phage are cultivated at bio-laboratory in Auburn University.

需要说明的是: 基于传感器上喷涂的 Au 和 Cr 层很薄, 一个靶材可以用于几十万个传感器的溅射, 因此单个传感器溅射所用 Au 和 Cr 涂层成本很低。综上所述, 可以预期本技术具有良好的应用前景, 目前在美国已经试用于饮料检测。

## 3 结 论

1) 以磁致伸缩带材为传感器膜片, 不同种类噬菌体为生物识别元件, 制备了用于同时检测沙门氏菌和炭疽杆菌的磁致伸缩生物传感器系统。该系统不存在相互耦合干扰, 分别对目标病菌具有良好的检测专一性。参考传感器在检测菌液中共振频率均保持稳定。在沙门氏菌溶液检测过程中, 只有表面固定 E2 噬菌体的传感器共振频率快速下降; 在炭疽杆菌溶液检测过程中, 只有表面固定 JRB7 噬菌体的传感器共振频率急剧下降。

2) 所研制的生物传感器系统对目标细菌具有良好的检测灵敏度。在浓度范围为  $5 \times 10 \sim 5 \times 10^8$  CFU/mL 菌液中, 表面固定 E2 噬菌体的传感器频率漂移随沙门氏菌浓度增加而增加; 表面固定 JRB7 噬菌体的传感器频率漂移随炭疽杆菌浓度增加而增加。该同时检测 2 种病菌系统的灵敏度与相同尺寸规格的单一传感器检测灵敏度一致, 为  $10^3$  CFU/mL。

3) 扫描电镜表面形貌观察进一步证实了研制的生物传感器具有良好的检测专一性, 参考传感器在任何检测溶液中没有吸附任一种类病菌, 固定 E2 噬菌体的传感器表面只吸附了沙门氏菌, 固定 JRB7 噬菌体的传感器表面只吸附了炭疽杆菌。

### 【参 考 文 献】

- [1] Guntupalli R, Hu J, Lakshmanan R S, et al. A Magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of salmonella typhimurium[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(7): 1474—1479
- [2] Lakshmanan R S, Guntupalli R, Hu J, et al. Phage Immobilized Magnetoelastic sensor for the detection of Salmonella typhimurium[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 71(1): 55—60.
- [3] 叶雪梅, 胡佳佳, 胡静. 检测食品沙门氏菌的生物传感器持久性研究[J]. 农业工程学报, 2014, 30(20): 334—338.  
Ye Xuemei, Hu Jiajia, Hu Jing. Preparation and longevity analysis of biosensor for food safety detection[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(20): 334—338. (in Chinese with English abstract)
- [4] Ye X M, Guntupalli R, Chin B A, et al. Comparative study of thermal stability of magnetostrictive biosensors between two kinds of biorecognition elements[J]. Materials Science & Engineering C, 2014, 41: 78—82.
- [5] 蒋雪松, 王剑平, 应义斌, 等. 用于食品安全检测的生物传感器的研究进展[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 272—277.  
Jiang Xuesong, Wang Jianping, Ying Yibin, et al. Recent advances in biosensors for food safety detection[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2007, 23(5): 272—277. (in Chinese with English abstract)
- [6] Chai YT, Shin H, Wickle H C, et al. Surface-scanning coil detectors for magnetoelastic biosensors: A comparison of planar-spiral and solenoid coils[J]. Appl. Phys. Lett. 2013, 103(173510): 1—4.
- [7] Reynisson E, Josefsen M H, Krause M, et al. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(2): 206—216.
- [8] Levi K, Smedley J, Towner K J. Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples[J]. Clin Microbiol Infect, 2003, 9(7): 754—758.

- [9] 胡静, 胡佳佳, Guntupalli R, 等. 磁致伸缩生物传感器尺寸对检测沙门氏菌灵敏度的影响[J]. 农业工程学报, 2015, 31(6): 277–281.  
Hu Jing, Hu Jiajia, Guntupalli R. A study on magnetoelastic biosensors with different size for the detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(6): 277–281. (in Chinese with English abstract)
- [10] Petrenko V A, Smith G P, Phages from Landscape Libraries as Substitute Antibodies[J]. Protein Engineering Design and Selection, 2000, 13(8): 589–592
- [11] Olsen E V, Sorokulova I B, Petrenko V A, et al. Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of *Salmonella typhimurium*[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(8): 1434–1442.
- [12] Pang P, Huang S, Cai Q, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a wireless magnetoelastic sensing device[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23(2): 295–299.
- [13] Chai Y T, Shin Horikawa, Li S Q, et al. A surface-scanning coil detector for real-time, in-situ detection of bacteria on fresh food surfaces[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 50(15): 311–317.
- [14] Chai Y T, Howard C Wickle, Wang Z Y, et al. Design of a surface-scanning coil detector for direct bacteria detection on food surfaces using a magnetoelastic biosensor[J]. Journal of Applied Physics, 2013, 114(104504): 1–7.
- [15] Park M K, Wickle H C, Chai Y, et al. The effect of incubation time for *Salmonella Typhimurium* binding to phage-based magnetoelastic biosensors[J]. Food Control 2012, 26(2): 539–545.
- [16] Sorokulova I B, Olsen E V, Chen, I H, et al. Landscape phage probes for *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63(1): 55–72
- [17] Nanduri V, Sorokulova I B, Samoylov A M, et al. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(6): 986–992.
- [18] Horikawa S, Bedi D, Li S, et al. Effects of surface functionalization on the surface phage coverage and the subsequent performance of phage-immobilized magnetoelastic biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(5): 2361–2367.

## Preparation and application of magnetoelastic biosensors system for simultaneously detecting *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores

Hu Jing<sup>1,2,3</sup>, Hu Jiajia<sup>1,2</sup>, Shen Wen<sup>2,3</sup>, Bryan A. Chin<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Materials Surface Technology, School of Materials Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Food Detection and Safety Center, School of Materials Engineering, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Photovoltaic Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** A biosensor essentially consists of 2 main components viz., a physical transducer and a biorecognition element. In this study, a magnetostrictive platform is served as the transducer, and as the mass sensitivity, the magnetoelastic resonance sensors have a characteristic resonant frequency that can be determined by monitoring the magnetic flux emitted by the sensor in response to an applied time-varying magnetic field. Due to the magnetoelastic nature of the amorphous magnetostrictive alloy, the sensor exhibits a physical resonance when it undergoes a time-varying magnetic field, and a shift in resonance frequency of the magnetostrictive sensor depends only on the mass change when environmental parameters are invariable. This magnetostrictive platform has a unique advantage over conventional sensor platforms in that its measurement is wireless and remote. And phage, which has been verified to be thermally stable, is used as the biorecognition element. In this paper, a multiple phage-based magnetoelastic (ME) biosensor system for simultaneously detecting *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores was prepared by immobilizing 2 different kinds of phages as biorecognition element onto the magnetoelastic thin film made from 2826 MB Metglas™, and the 2 kinds of phages were the E2 phage specific to *Salmonella typhimurium* and the JRB7 phage specific to *Bacillus anthracis* spores, respectively. Finally, 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA) was immobilized onto the magnetoelastic thin film as blocking agent for getting specific binding of target bacteria. The multiple phage-based magnetoelastic (ME) biosensor system was simultaneously monitored for the detection of different biological pathogens that were sequentially introduced to the measurement system. The detection system included a reference sensor as a control, an E2 phage-coated sensor specific to *Salmonella typhimurium*, and a JRB7 phage-coated sensor specific to *Bacillus anthracis* spores. The sensors were free standing during the test, and held in place by a magnetic field. In the detection process, the environment parameters were kept constant, and the changes in the resonance frequency of the biosensors, which were recorded by HP network analyzer 8751A over the testing period, were attributed only to the binding of the phages with target analyte of *Salmonella typhimurium* or *Bacillus anthracis* spores; the binding was also visually confirmed by the scanning electron microscopy (SEM) micrographs by observing the surface of each kind of biosensor, and there were up to 10 different regions on each sensor surface which were examined and photographed by the SEM to obtain the reliable and statistical data. According to the shift in resonance frequency due to the binding of the phages with *Salmonella typhimurium* or *Bacillus anthracis* spores, the binding specificity and sensitivity of the biosensor were evaluated. The detection results showed that after sequential exposure to pathogenic solutions individually, only the biosensor coated with the corresponding specific biorecognition element of phage had the response. As the cells or spores were captured by the specific phage-coated sensor, the mass of the sensor increased, resulting in a decrease in the sensor's resonance frequency. Additionally, non-specific binding was effectively eliminated by BSA blocking agent and verified by the reference sensor, and the SEM measurement showed there was no frequency shift after the reference sensor was immersed in the solution for the same duration. The detection results also demonstrated that the multiple magnetoelastic sensors could be used simultaneously to detect specifically targeted pathogenic species and had good selectivity. The results show that the developed magnetostrictive biosensors can be applied for detecting *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores simultaneously.

**Keywords:** biosensors; antibodies; bacteria; magnetostrictive materials; phage; *Salmonella typhimurium*; *Bacillus anthracis* spores