

免疫技术在动物源性食品快速检测中的研究进展

职爱民, 余 曼, 乔苗苗, 柴兴宽
(郑州工程技术学院化工食品学院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 本文回顾了近年来免疫技术在动物源性食品快速检测中的应用研究, 主要涵盖酶联免疫吸附测定法、胶体金免疫层析法、电化学免疫分析法、放射免疫法、荧光免疫分析法和免疫磁分离技术6种免疫技术对动物源性食品中抗生素、致病菌、激素、毒素、重金属、中枢神经系统组织和肉掺假检测的研究进展, 以期为此领域的研究提供参考。

关键词: 免疫技术; 动物源性食品; 检测

Recent Progress of Immunoassay in Rapid Detection of Animal-Derived Food

ZHI Aimin, YU Man, QIAO Miaomiao, CHAI Xingkuan

(College of Chemical and Food, Zhengzhou Institute of Engineering and Technology, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This paper reviews recent progress in the application of various immunoassays in animal-derived food. Special emphasis is on the application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), colloidal gold immunochromatography, electrochemical immunoassay, radioimmunoassay, fluorescence immunoassay and immunomagnetic separation in the detection of antibiotics, pathogenic bacteria, hormones, toxins, heavy metals, central nervous system tissues and adulterants in meat products. This review is expected to provide valuable information for research in the field.

Keywords: immunoassay; animal-derived food; detection

DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20190124-020

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2019) 05-0060-07

引文格式:

职爱民, 余曼, 乔苗苗, 等. 免疫技术在动物源性食品快速检测中的研究进展[J]. 肉类研究, 2019, 33(5): 60-66.

DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20190124-020. <http://www.rlyj.net.cn>

ZHI Aimin, YU Man, QIAO Miaomiao, et al. Recent progress of immunoassay in rapid detection of animal-derived food[J].

Meat Research, 2019, 33(5): 60-66. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20190124-020. <http://www.rlyj.net.cn>

随着社会的发展和人民生活水平的不断提升, 膳食结构发生重大变化, 动物源性食品的需求大幅上升, 并且消费者对动物源性食品的安全也体现出前所未有的关注。党中央和国务院一直对肉制品的质量安全极为重视^[1]。特别是近年出现的新型瘦肉精事件、抗生素残留、致病菌污染及动物本身毒素残留等诸多问题, 更使得动物源性食品安全问题成为万众瞩目的焦点。理化检测虽然具有假阳性率低、灵敏度高等优势, 但因其仪器昂贵、技术复杂、检测周期长, 不适合现场检测和批量筛选^[2]。免疫分析技术的出现, 以其快速、简便、特异性好、灵敏度高和低成本的特性, 弥补了理化检测的固有缺点^[3]。酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法、胶体金免疫层析法

(immune colloidal gold technique, GICT) 等免疫学方法已经在动物源性食品快速检测中得到广泛应用, 本文对近年来国内外的相关研究进展进行概述。

1 ELISA方法

ELISA方法通过抗原-抗体的特异识别反应来进行检测, 其具有很高的灵敏度和特异性, 有操作简单、分析容量大、安全可靠及仪器成本较低等优点^[4]。

1.1 ELISA在致病菌检测中的应用

ELISA是在致病菌检测中应用最广泛的方法之一^[5]。王利刚^[6]分别利用全自动ELISA荧光分析仪法和常规培养法对生鲜肉中单核细胞增生李斯特氏菌进行检测,

收稿日期: 2019-01-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31272547)

第一作者简介: 职爱民 (1976—) (ORCID: 0000-0003-1210-0394), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为营养与食品安全检测。

E-mail: 50384000@qq.com

结果表明：全自动ELISA荧光分析仪筛选法仅需51 h左右即可得到初步筛选结果，在二次增菌后直接进行检测，上机仅70 min即可报告结果；而使用常规培养法（VITEK2 compact全自动微生物鉴定系统）对选择性培养基上生长的可疑菌株进行鉴定，也只可把传统的检测周期缩短为4~5 d。且ELISA法假阳性率低于常规培养法，实验过程操作简单。杜玄等^[7]选择最佳反应条件，建立一种快速检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素SEP的双抗夹心ELISA法，结果表明，批间变异低于15%，灵敏度为1.8 $\mu\text{g/mL}$ ，对牛肉糜的回收率可达90%以上，批内变异低于6%。Ballamoole等^[8]通过制备单克隆抗体创建sandwich ELISA方法，在海鲜样本中致病菌的快速筛查中发挥重要作用。ELISA在致病菌检测中的研究已经取得诸多成果，但却很少见到同时检测多种致病菌的报道。

1.2 ELISA在中枢神经组织检测中的应用

Schmidt等^[9]应用荧光ELISA快速、灵敏地检测胶质细胞原纤维酸性蛋白，进而判断牛肉及其制品中是否含有中枢神经系统组织（引发疯牛病的一种特殊风险性物质，主要集中在中枢神经组织），结果表明，该法的灵敏度为0.2 ng胶质细胞原纤维酸性蛋白，变异系数为2.0%。李冰玲等^[10]运用ELISA研制试剂盒，可以用于检测生牛肉产品和加热处理牛肉（疯牛病病原具有耐热特性）产品中的中枢神经组织，具有很高的灵敏度。

1.3 ELISA在药物残留检测中的应用

ELISA可以应用于磺胺类、抗生素类和激素类等多种兽药残留的检测。万宇平等^[11]经免疫鼠和羊制备替米考星的单克隆抗体，基于该抗体建立替米考星间接竞争ELISA方法，结果表明，此法对动物组织、肝脏、鸡蛋和牛乳中替米考星的检测限分别为0.5、10.0、5.0、5.0 $\mu\text{g/kg}$ ，回收率为70%~110%，变异系数小于15%。孙俐等^[12]将5种肉及肉制品经 C_{18} 柱分离纯化，利用ELISA检测己烯雌酚，结果表明，假阴性率为0，检测下限为0.5 $\mu\text{g/kg}$ ，精密密度为7.6%~7.8%，回收率达88.36%~90.68%，相对标准偏差为4.1%~8.6%。柴铭骏等^[13]采用ELISA法检测肉制品中的莱克多巴胺，经液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS）法确证，此方法在进出口肉制品药物残留检测中可以得到很好的应用。Dixon-Holland等^[14-15]报道了猪组织及牛乳中磺胺二甲基嘧啶的ELISA检测。

1.4 ELISA在重金属检测中的应用

重金属具有高毒性、持久性和难解性等特点，因而重金属的检测问题迫切需要解决，金属检测器已是禽肉制品企业不可缺少的装置，但它的灵敏度和稳定性始终是一个问题，且造价较高^[16]。方淑兵等^[17]以皮皮虾为

基质，采用湿法硝化处理样品，建立间接竞争ELISA方法检测基质中的重金属汞离子，检测灵敏度为4.10 $\mu\text{g/L}$ ，检测限为0.45 $\mu\text{g/L}$ ，添加回收率为79%~120%。刘功良等^[18]以镉特异性单克隆抗体与酶标抗原为基础，构建一种直接竞争ELISA方法，能快速、准确测定小龙虾中镉残留量，检测下限为0.2 $\mu\text{g/L}$ ，半抑制质量浓度（semi-inhibitory concentration, IC_{50} ）为3.01 $\mu\text{g/L}$ ，其他金属螯合物的交叉反应率均低于1.6%，检测的变异系数为6.67%~9.09%，与石墨炉原子吸收光谱法检测结果的相关系数为0.988。

1.5 ELISA在掺假肉检测中的应用

食用掺假肉品存在安全隐患，如掺假物质有毒、减少肉品中维持健康所需的营养、过敏问题等^[19]。早在20世纪90年代，ELISA技术就已经开始应用于肉类的物种鉴别^[20-21]，可实现肉中掺假的定性和定量检测。常用于肉中掺假检测的ELISA方法有间接法和双抗体夹心法，目前主要通过利用抗体对肌肉和血清蛋白或热稳定性蛋白建立ELISA来鉴别不同种类的动物肉类^[4]。Rencova等^[22]应用不同热稳定性的蛋白作抗原，免疫兔，基于多克隆抗体建立间接竞争ELISA方法，鉴别热加工后的家禽、马、袋鼠和老鼠的肌肉组织，且敏感性较好。免疫琼脂扩散法虽然也可以鉴别掺假肉，且操作简单，形成的沉淀线易于观察，但不能对熟肉中的掺假问题进行鉴别，因此现阶段应用免疫学方法鉴别掺假肉的研究多集中在ELISA上。

2 GICT法

GICT是一种将免疫检测技术、胶体金标记技术和层析分析技术等多种方法相结合的固相标记免疫快速检测技术^[23]。该检测技术大多用单克隆抗体标记，基于该方法组装GICT试纸条的敏感度高、不需要昂贵的仪器、对操作人员要求低、便于携带和现场检验，但不可进行定量检测。

2.1 GICT在致病菌检测中的应用

赵鑫等^[24]制备抗原免疫小鼠，再通过杂交瘤技术进行细胞融合，得到单克隆抗体，并通过双抗夹心ELISA体系筛选出一对高效、稳定的最佳配对抗体，利用GICT技术初步制备出可快速、准确检测冷鲜猪肉中单增李斯特菌的试纸条，其灵敏度为 10^4 CFU/mL ，且特异性良好。利用GICT研制的胶体金试纸条，一般5~15 min就会出结果，结果肉眼可判定，适合动物源性食品安全领域的现场快速筛查。刘志科^[25]通过克隆*invA*基因及原核表达，将获得的*invA*重组蛋白作为诊断抗原，制备出鸡沙门氏菌病抗体免疫胶体金试纸条。Wu Wende等^[26]开发用于快速检测罗非鱼无乳链球菌的GICT试纸条，其

灵敏度为 1.5×10^5 CFU/mL, 与其他常见细菌没有交叉反应, 且与ELISA法检测结果一致, 检测时间小于15 min, 在4 °C条件下, 试纸条的有效性可保持6个月。夏诗琪等^[27]制备能同时检测5种典型沙门氏菌的GICT试纸条, 具有重要的应用价值。

2.2 GICT在药物残留检测中的应用

将GICT应用在药物残留检测中, 容易实现多残留检测。赵福民等^[28]研制出用于牛乳中卡那霉素、红霉素和林可霉素3种药物同时检测的胶体金试纸条, 检测限分别为50.0、20.0、75.0 $\mu\text{g/L}$, 假阳性率和假阴性率均为0, 样本无需前处理, 检测操作简单, 10 min内能够实现3种药物的同时检测, 与LC-MS/MS法测定结果一致, 该法适用于牛乳和乳粉中抗生素的检测。刘冰等^[29]基于多克隆抗体研制氟甲喹的GICT试纸条, 对鱼肉、虾肉、鸡肉、牛肉、猪肉和猪肝6种样品进行检测, 检出限为50 $\mu\text{g/L}$ 。王森等^[30]运用GICT技术, 研制一种可以用于同时检测畜肉中莱克多巴胺、沙丁胺醇及克伦特罗残留的快速检测板, 适宜进行商业化生产。同时, GICT技术在水产品兽药残留检测中也发挥着越来越重要的作用。陈贵生等^[31]运用GICT法对采集的水产样品中可能残留的违禁药物氟苯尼考进行快速筛查, 其检测限能达到 $\leq 50 \mu\text{g/kg}$ 。曹志海等^[32]优化样品的前处理方法, 建立一种快速检测水产品中硝基喹啉代谢物的方法, 使检测下限提高至1.0 $\mu\text{g/kg}$, 且缩短了检测时间。此外, 可以快速检测水产品中甲基睾酮^[33]、恩诺沙星残留^[34]的胶体金试纸条也已经被制备出来。

2.3 GICT在毒素检测中的应用

河鲀毒素是一种剧毒的天然非蛋白质类神经毒素, 其毒力相当于氰化钠的1 250倍, 人畜误食后均能致死^[35-37]。张世伟等^[38]建立河鲀毒素的GICT检测方法, 所建立的方法 IC_{50} 为48 ng/mL, 线性范围为10~160 ng/mL, 最低检出限为20 $\mu\text{g/kg}$, 其前处理过程简单快速, 在现场仅需10 min就可判断样品是否有毒, 该方法适用于热加工样品的检测, 为河鲀餐前快检提供了有力的技术手段。近年来, 贝类中毒事件频发, 贝类毒素是由有毒藻类通过食物链将毒素传递给食藻贝类, 国内外检测贝类毒素主要是基于竞争性抑制反应来建立GICT快速检测试纸条, 已制备出的双鞭甲藻毒素^[39]、软骨藻酸^[40]和软海绵酸^[41]试纸条, 其灵敏度分别为20、20、12 ng/mL。但由于抗贝毒有毒成分的单克隆抗体的制备水平有限、高纯度毒素制备困难及毒素与载体蛋白偶联技术难度较大等因素, GICT法检测贝类毒素的研究水平需要进一步提升, 这些因素也将成为今后要攻克的难题^[42]。

2.4 GICT在重金属检测中的应用

赵小旭等^[43]开发出快速检测乳制品中重金属离子铅的GICT试纸条, 结果表明, 试纸条特异性和稳定性较

好, 生鲜乳和酸乳中的检出限为25 $\mu\text{g/kg}$, 乳粉和干酪中为300 $\mu\text{g/kg}$, 成品乳中为30 $\mu\text{g/kg}$, 与原子吸收光谱法检测结果一致。对于重金属离子污染, 近年来研制出的免疫层析试纸条比较多, 但很少有以动物源性食品为样本展开研究的, 其成果较少。

3 电化学免疫分析法

电化学免疫分析法(electrical chemical immunoassay analysis, ECIA)是将免疫技术与现代电化学分析技术结合在一起的新型免疫方法。与GICT法相比, 其表现更直观, 可进行定量分析^[2]。

3.1 ECIA在毒素检测中的应用

利用电化学免疫传感器同样可以检测河豚毒素。刘媛等^[44]以Nafion(一种聚阴离子全氟磺酸盐离子聚合物)固定钉联吡啶Au纳米颗粒于玻碳电极, 借助Au-N共价键固定河豚毒素抗体, 通过抗原、抗体的特异性结合, 构建超灵敏检测河豚毒素的免标记自增强电化学发光免疫传感器, 检出限为0.01 $\mu\text{g/L}$, 此免标记自增强型电化学发光免疫传感器显示出优异的稳定性、重现性和灵敏度。

3.2 ECIA在药物残留检测中的应用

免疫传感器具有造价低、灵敏度高等优点, 与电化学技术分析联用对残留药物进行检测, 灵敏度得到进一步提高。汤庆会^[45]以L-半胱氨酸作为稳定剂, 并运用在水相中合成的CdSe量子点构建一种超灵敏的量子点基电化学发光免疫传感器, 对新型瘦肉精药物苯乙醇胺A进行检测, 检测限为0.015 ng/mL, 与其他检测方法相比, 表现出更宽的检测范围和较低的检测限。郑舒^[46]基于四环素单克隆抗体与三电极体系的电化学传感器, 构建四环素单克隆抗体-四氧化三铁磁纳米粒子-壳聚糖/金电极(anti-tetracycline monoclonal antibody- Fe_3O_4 magnetic nanoparticles-chitosan/gold electrode, Ab-MNPs-CS/GCE)和四环素单克隆抗体-四氧化三铁磁纳米粒子-壳聚糖/五氧化二铌(anti-tetracycline monoclonal antibody- Fe_3O_4 magnetic nanoparticles-chitosan/ Nb_2O_5 , Ab-MNPs-CS/ Nb_2O_5)2种免疫传感器, 应用于牛乳中四环素的快速检测, 并通过与ELISA法检测结果进行比对判断准确性, 其中, 在最优实验条件下, Ab-MNPs-CS/GCE传感器在灵敏性、准确性和稳定性方面均优于Ab-MNPs-CS/ Nb_2O_5 传感器, 最低检测限仅为0.082 ng/mL, 样品的加标回收率为75.8%~83.5%。Wang Hongwu等^[47]研发基于AuNPs/cMWCNTs(碳纳米管及纳米金溶胶/羧基化多壁碳纳米管)的新型分子印记电化学传感器, 用于噻乙醇的痕量检测, 在优化条件下, 该法检测噻乙醇的选择性和灵敏度很高, 检测限为2.7 nmol/L, 检测猪肉和鱼肉中噻乙醇残留时, 相对标准偏差小于11.4%, 回收率为



80.7%~115.8%。国外在用电化学免疫传感器检测兽药残留方面的研究很多,可根据兽药种类和检测标准要求选择免疫传感器类型和标记酶。

4 放射免疫法

放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)是利用同位素标记与未标记的抗原,与抗体发生竞争性抑制反应的方法。放射性免疫分析存在常用核素半衰期短、试剂盒稳定期不长和需要做放射性标记等不足,限制了其广泛应用^[48]。

目前,国外用受体替代抗体结合盐酸克伦特罗,已生产出测定盐酸克伦特罗的试剂盒产品,检测限高达2.4 ng/g^[48]。这对肉制品中瘦肉精的检测提供了便利和又一技术支持。此外,RIA可在保持家畜鲜活状态的情况下,对动物血清进行检测。苏明明等^[49-50]采用Charm II放射免疫分析方法检测牛血清中四环素类和磺胺类药物残留,检测限均为20 µg/kg,短时间可出检测结果,且特异性强、操作简便。

5 荧光免疫分析法

荧光免疫分析法(fluorescence immunoassay, FIA)将抗原抗体反应与荧光技术的敏感性相结合,对抗原或抗体进行定性、定位或定量检测,常用量子点、荧光素、稀土离子螯合物和上转换纳米粒子作为荧光标记物^[51],该方法具有操作简单快捷、灵敏度高、特异性强及准确度高特点。

5.1 FIA在致病菌检测中的应用

量子点作为一种新型标记物具有发射光谱窄而对称、激发光谱宽而连续、荧光寿命长、发光颜色可调、光化学稳定性高、发光效率高及不易光漂白等特点,可显著降低检测方法的检出限,从而提高分析方法的灵敏度和分辨率^[52],在致病菌检测中多以其为标记物。袁列江等^[53]利用自制水溶性量子点静电偶联肠出血性大肠杆菌O157:H7单克隆抗体,开发出检测大肠杆菌O157:H7的CdTe量子点免疫层析试纸,最低检测限为10⁴ CPU/mL,检测时间小于5 min,特异性良好,在肉制品和乳制品中的灵敏性与自来水中相当,运用胶体金标记虽然也能准确、快速地得到测定结果,却无法使用肉眼进行判断,且灵敏度比量子点免疫层析试纸低了1个数量级。

5.2 FIA在药物残留检测中的应用

余宇燕等^[54]运用杂交瘤技术制备诺氟沙星的单克隆抗体,从而建立以抗诺氟沙星单克隆抗体为基础的荧光免疫分析方法,可应用于检测动物性食品中残留的微量诺氟沙星,在10~500 µg/L范围内,抑制率与诺

氟沙星质量浓度的对数值呈良好的线性关系,最低检出限达6.09 µg/L,在鱼样品中对诺氟沙星的回收率为89.8%~106.5%,且与其他结构类似喹诺酮类药物氧氟沙星、恩诺沙星、依诺沙星、洛美沙星、环丙沙星和芦氟沙星的交叉反应率分别为3.10%、0.83%、0.04%、1.50%、0.12%和2.80%。

时间分辨FIA是一种非同位素免疫分析技术,利用镧系元素标记抗原或抗体,采用时间分辨技术测量荧光,同时对波长和时间2个参数进行信号分辨,可消除非特异性荧光的干扰。邓丽华等^[55]建立Eu³⁺标记的间接竞争时间分辨FIA法,用于鱼肉样品中呋喃它酮代谢物的检测,并通过单因素试验筛选出最佳反应条件。在优化的条件下,IC₅₀为0.26 ng/mL,检出限为0.01 ng/mL,线性范围为0.025~2.830 ng/mL,鱼样中呋喃它酮代谢物的回收率为78.0%~86.0%,各样品变异系数均小于15%,与高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)检测结果的相关性良好,且灵敏度高、特异性好,能够满足实际样品的检测需求。李贞^[56]基于抗莱克多巴胺的单克隆抗体,初步建立检测莱克多巴胺的时间分辨直接竞争免疫分析法,其灵敏度超过传统免疫分析法EILSA,IC₅₀为1.6 ng/mL,检测范围为0.39~12.77 ng/mL,最低检测限达0.136 ng/mL,猪肉、猪肝样品中莱克多巴胺的平均加标回收率分别为98.02%、96.03%。沙丁胺醇是克伦特罗的替代品,侯文慧^[57]基于抗沙丁胺醇的单克隆抗体,以稀土离子Eu³⁺为荧光标记物,利用同种方法测定出沙丁胺醇在猪肉、猪肝样品中的平均加标回收率分别为98.02%、96.03%。结果表明,优化的时间分辨直接竞争免疫分析法IC₅₀为1.6 ng/mL,最低检测限为0.136 ng/mL,检测范围为0.39~12.77 ng/mL。此研究为莱克多巴胺的时间分辨荧光免疫试剂盒的开发提供了重要依据。Secundo等^[58]基于特定多克隆抗体研究时间分辨荧光分析法检测牛乳中的己烯雌酚,此方法可直接用于原料乳样品,回收率可达96.0%~104.2%。随着各种检测试剂盒不断被研发出来,检测设备的使用越来越普遍,时间分辨荧光免疫分析法最终会在食品安全领域施展更大的作用。

荧光偏振免疫法常用于半抗原的药物浓度测定。Wang等^[59]优化荧光偏振免疫法,检测食品中马杜霉素残留,检出限达0.002 µg/L,鸡肉组织、猪肉、鸡蛋中马杜霉素回收率为82%~130%。鉴于荧光偏振分析具有通量高、速度快、成本低和方便自动化等特点,在不久的将来荧光偏振免疫检测会成为食品快速检测的主要技术之一。宋佩等^[60]采用薄层色谱法提纯,优化反应时间、标记物与抗体的工作浓度,将异硫氰酸荧光素作为标记物,建立氟喹诺酮类药物沙拉沙星的快速荧光偏振免

疫分析法,在缓冲液中的 IC_{50} 为43.2 $\mu\text{g/L}$,检测范围为5.7~327.0 $\mu\text{g/L}$,与环丙沙星有明显的交叉反应,与其他3种药物(恩诺沙星、加替沙星及氧氟沙星)的交叉反应率均低于2%。在优化条件下,牛乳中沙拉沙星的回收率为71%~94%,该方法操作简单快捷、特异性强,适用于动物源性食品中沙拉沙星残留的灵敏、快速筛选检测。

5.3 FIA在毒素检测中的应用

腹泻性贝类毒素是一种脂溶性毒素,人在食用后会产以腹泻为特征的中毒反应。李军涛等^[61]制备检测贝类样品中腹泻性毒素的荧光免疫层析试纸条,此方法检测限小于0.125 $\mu\text{g/mL}$,且对于其他贝类毒素具有高度特异性。孙成彪等^[62]以量子点作为荧光标记物,应用荧光偏振免疫分析技术检测河豚毒素, IC_{50} 为11.76 $\mu\text{g/L}$,检测范围为1.36~101.27 $\mu\text{g/L}$,检测限可达0.67 $\mu\text{g/L}$ 。在该方法的检测范围内,变异系数为2.60%,平均回收率为(99.91 $\pm$ 2.60)%,且河豚毒素测定值与竞争性ELISA测定值呈线性相关。

6 免疫磁分离技术

免疫磁分离技术(immunomagnetic separation, IMS)作为食物样品的有效预浓缩工具,能够快速从复杂的食品基质中选择性分离和浓缩靶细菌^[63-64],需要与其他检测技术联用,目前主要用于动物源性食品中致病菌的检测。

样品进行免疫磁分离后,可避免由于食品中的大颗粒物质对免疫胶体金试纸条造成干扰,导致出现其在试纸条上的移动速度较慢和降低细菌检出限的现象,从而显著提高检出率^[65]。顾培科^[66]建立免疫磁分离结合胶体金免疫层析法,用于检测实际样品(牛肉糜)中的大肠杆菌O157:H7,检出限为 7.6×10^3 CFU/mL。近年来,PCR及其衍生技术联合免疫磁分离技术,因其特异性强、灵敏度高和检测时间短成为目前联合IMS快速检测食源性致病菌中应用最广泛、最成熟的技术之一。国外有研究利用IMS-PCR联合测定虾中的副溶血弧菌,检出限可达10 CFU/mL,检测时间仅为4~5 h^[67]。对于牡蛎中的副溶血弧菌,利用IMS-环介导恒温核酸扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),使检测限达到 1.9×10^3 CFU/mL,阳性率与传统国标法无显著差异,并且稳定、快速、简单且经济有效^[68]。Ma Kai等^[69]运用IMS-实时-多重PCR(IMS-real time-multiplex PCR, IMS-RT-mPCR)技术同时检测出猪肉中的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和志贺氏菌,检测限分别可达9.6、2.0、6.8 CFU/mL。IMS因具有靶向特异性强、分离效率高、操作方便等特点,同时能有效减轻过程交叉污染,是最具潜力的食品样品前处理技术^[70]。

7 结 语

在人们日常的饮食中,动物源性食品占了很大比例。近些年,对于动物源性食品中常出现的问题已经涌现出许多检测方法。其中,免疫技术由于其成本低、灵敏度高、适合现场检测等诸多优点,在动物源性食品的快速检测中越来越占据主导地位。但免疫技术在动物源性食品中重金属检测中的应用很少,其对于重金属的检测选取的样本多为水,这主要与肉类样本处理复杂、过程耗时及基质干扰大有关^[71]。目前重金属检测多需要大型仪器,价格昂贵,操作起来费时费力。因此,在接下来的研究中,免疫快速检验应用于动物源性食品检测中时应集中于重金属检测,实现核心技术的突破,使其可以实现工业化生产。

参考文献:

- [1] 赵燕,刘蕾,董刘敏.食品检验对肉制品安全的重要性解析[J].食品安全导刊,2017(30): 81. DOI:10.3969/j.issn.1674-0270.2017.30.063.
- [2] 蔡尽忠.大肠菌群快速检测方法研究进展[J].生命科学仪器,2015(2): 14-18.
- [3] 王素香.论免疫检测技术在食品检验中的应用[J].现代食品,2017(16): 35-37. DOI:10.1673736/j.cnki.cn41-1434/ts.2017.16.013.
- [4] 李欣南,关一夫.掺假肉检验技术发展现状[J].食品研究与开发,2016,37(5): 189-193. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2016.05.044.
- [5] 李璐.食品微生物快速检测技术研究[J].食品安全导刊,2018(11): 76-77. DOI:10.3969/j.issn.1674-0270.2018.11.044.
- [6] 王利刚.生鲜牛肉中单核细胞增生李斯特氏菌检验方法的比较[J].肉类工业,2018(2): 54-57. DOI:10.3969/j.issn.1008-5467.2018.02.011.
- [7] 杜玄,赵燕英,刘骥,等.金黄色葡萄球菌肠毒素P双抗夹心酶联免疫检测方法的建立[J].现代食品科技,2018,34(4): 264-269. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.039.
- [8] BALLAMOOLE K K, PENDRU R, DEVANANDA D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 45(1): 244-249. DOI:10.1016/j.ijfoodmic. 2010.12.030.
- [9] SCHMIDT G B, YEMM R S, CHILD K D. et al. The detection of central nervous system tissue on beef carcasses and in comminuted beef[J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(12): 2047-2052. DOI:10.4315/0362-028x-64.12.2047.
- [10] 李冰玲,马贵平,李炎鑫,等.酶免疫试验检测牛肉中污染的牛中枢神经组织的研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2005(3): 286-289. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2005.03.022.
- [11] 万宇平,韩深,吴小胜,等.动物性食品中替米考星酶联免疫检测方法的研究[J].食品研究与开发,2017,38(22): 158-163. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2017.22.032.
- [12] 孙俐,高晓敏.酶联免疫法测定肉及肉制品中己烯雌酚残留量[J].食品研究与开发,2010,31(1): 122-125. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2010.01.039.
- [13] 柴铭骏,惠洪文,黄晨.酶联免疫法检测进出口肉制品中的莱克多巴胺[J].食品研究与开发,2013,34(8): 78-80. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2013.08.021.



- [14] DIXON-HOLLAND D E, KATZ S E. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue[J]. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 1988, 71(6): 1137-1140. DOI:10.1007/BF02166957.
- [15] DIXON-HOLLAND D E, KATZ S E. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sulfamethazine residues in milk[J]. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 1989, 72(3): 447-450. DOI:10.1007/BF02046625.
- [16] 金江涛, 张文文. 金属检测器在速冻制品中的应用[J]. 肉类研究, 2011, 25(3): 46-48.
- [17] 方淑兵, 王俊平, 王硕, 等. 重金属汞酶联免疫检测方法的建立[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 86-88; 91. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2012.16.050.
- [18] 刘功良, 王菊芳, 李志勇, 等. 一种检测滩尿虾中镉残留的直接 ELISA[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2008(4): 21-26.
- [19] BANSAL S, SINGH A, MANGAL M, et al. Food adulteration: sources, health risks, and detection methods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(6): 1174-1189. DOI:10.1080/10408398.2014.967834.
- [20] KANGETHE E K, JONES S J, PATTERSON R L. Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure[J]. Meat Science, 1982, 7(3): 229-240. DOI:10.1016/0309-1740(82)90088-2.
- [21] MACEDO-SILVA A, BARBOSA S F, ALKMIN M G, et al. Hamburger meat identification by dot-ELISA[J]. Meat Science, 2000, 56(2): 189-192. DOI:10.1016/S0309-1740(00)00039-5.
- [22] RENCOVA E, SVOBOBA I, NECIDOVA L. Identification by ELISA of poultry, horse kangaroo, and rat muscle specific proteins in heat-processed products[J]. Veterinarni Medicina, 2000, 45(12): 353-356. DOI:10.1023/A:1005285720169.
- [23] 曹德康, 苏建忠, 张瑛, 等. 胶体金免疫层析技术在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(10): 1322-1325. DOI:10.13704/j.cnki.jyyx.2017.10.046.
- [24] 赵鑫, 张帅, 祁文婧, 等. 冷鲜猪肉中单增李斯特菌快速检测试纸条的初步研制[J]. 北京农学院学报, 2019(1): 1-4. DOI:10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2019.0116.
- [25] 刘志科. 鸡沙门氏菌病检测方法的建立及初步应用[D]. 石河子: 石河子大学, 2018: 45-58.
- [26] WU Wende, LI Min, CHEN Ming, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in tilapia[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 97(15): 66-69. DOI:10.1016/j.bios.2016.11.038.
- [27] 夏诗琪, 徐超莲, 刘道峰, 等. 胶体金免疫层析法联检食品中 5 种典型沙门氏菌模型的建立和优化[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 154-158. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201422029.
- [28] 赵福民, 熊雅婷, 钱博, 等. 乳品中多种抗生素残留胶体金检测方法研究[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 135-139.
- [29] 刘冰, 童贝, 生威, 等. 氟甲唑胶体金免疫层析试纸条研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22): 115-118. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2016.22.027.
- [30] 王森, 周亚莲, 盛慧萍, 等. 瘦肉精三合一胶体金快速检测板的研制及在畜肉中的应用[J]. 浙江农业科学, 2012(12): 1715-1719. DOI:10.3969/j.issn.0528-9017.2012.12.037.
- [31] 陈贵生, 桑丽雅, 桂淦, 等. 基于 GICT 技术快速筛查水产品中氟苯尼考残留[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(26): 167-169. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2018.26.051.
- [32] 曹志海, 王伟萍, 张宏伟, 等. 硝基呋喃类代谢物胶体金法检测的前处理研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(21): 70-73. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2014.21.21.
- [33] 夏武强, 胡叶军, 孙琛, 等. 甲基睾酮免疫胶体金试纸条的研制及在水产品中的应用[J]. 淡水渔业, 2016, 46(1): 93-98. DOI:10.3969/j.issn.1000-6907.2016.01.015.
- [34] 余法建, 水柏年, 龚云飞. 水产品中恩诺沙星残留胶体金免疫层析技术的研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(7): 2059-2061. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2014.07.059.
- [35] LAGO J, RODRIGUE L P, BLANCO L, et al. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses[J]. Marine Drugs, 2015, 13(10): 6384-6406. DOI:10.3390/md13106384.
- [36] TSUJIURAK K, YAMNOCHI K. A rapid method for tetrodotoxin (TTX) determination by LC-MS/MS from small volumes of human serum, and confirmation of pufferfish poisoning by TTX monitoring[J]. Food Additives and Contaminants, 2015, 32(6): 977-983. DOI:10.1080/019440049.2015.1027879.
- [37] CHEN R, CHUNG S H. Mechanism of tetrodotoxin block and resistance in sodium channels[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014(1): 370-374. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.02.115.
- [38] 张世伟, 王士峰, 姚添淇, 等. 河鲀毒素胶体金免疫层析快速定量方法[J]. 食品科技, 2017, 42(7): 313-317. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2017.07.057.
- [39] LIU Renyan, LING Yubo, CHEN Yuan, et al. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24(8): 2744-2747. DOI:10.1016/j.bios.2009.01.034.
- [40] 高利利, 程金平, 刘元嫒, 等. 软骨藻酸胶体金免疫层析检测试纸条的研制[J]. 环境科学, 2011, 32(8): 2492-2496. DOI:10.13227/j.hjxx.2011.08.031.
- [41] LIU Renyan, LING Yubo, CHEN Yuan, et al. Development of gold immunochromatography assay for the detection of okadaic acid[J]. Journal of Analytical Science, 2010, 26(1): 31-34.
- [42] 徐超莲, 赖卫华, 刘道峰. 胶体金免疫层析法检测食品中天然存在的有害物质的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(5): 257-261. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201405050.
- [43] 赵小旭, 柳家鹏, 柴艳兵, 等. 胶体金免疫层析法快速检测乳制品中重金属离子铅[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(3): 51-54. DOI:10.16465/j.gste.cn431252ts.20180308.
- [44] 刘媛, 王遂. 免标记自增强电化学发光免疫传感器超灵敏检测河豚毒素[J]. 分析测试学报, 2018, 37(6): 676-681. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2018.06.006.
- [45] 汤庆会. 低毒性量子点和 CdSe@SiO₂ 的合成及用于电化学发光检测小分子物质[D]. 苏州: 苏州大学, 2015: 1-49.
- [46] 郑舒. 基于五氧化二铌的电化学免疫传感器检测牛奶中四环素的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016: 1-42.
- [47] WANG Hongwu, YAO Su, LIU Yanqing, et al. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on Au nanoparticles in carboxylated multi-walled carbon nanotubes for sensitive determination of olaquindox in food and feedstuffs[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 87: 417-421. DOI:10.1016/j.bios.2016.08.092.
- [48] 吴钰冰. 克伦特罗检测方法的应用[J]. 食品安全导刊, 2017(27): 91.
- [49] 苏明明, 王楠, 王晓薇, 等. 放射免疫法快速检测牛血清中四环素类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 629-633.
- [50] 苏明明, 王琦, 曹际娟, 等. 放射免疫法快速检测牛血清中磺胺类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 634-638.
- [51] 左晓维, 雷琳, 刘河冰, 等. 荧光免疫分析法检测食品中黄曲霉毒素的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(1): 236-245. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.018496.

- [52] YUM K, NA S, XIANG Y, et al. Mechanochemical delivery and dynamic tracking of fluorescent quantum dots in the cytoplasm and nucleus of living cells[J]. Nano Letters, 2009, 9(5): 2193-2198.
- [53] 袁列江, 李萌立, 王书源, 等. 大肠杆菌O157:H7量子点免疫层析试纸条的研制[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 38-42. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2015.04.010.
- [54] 余宇燕, 陈莉, 卢玲, 等. 动物性食品中诺氟沙星残留的荧光免疫分析方法研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 856-858. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2012.07.007.
- [55] 邓丽华, 戴尽波, 徐振林, 等. 呋喃它酮代谢物时间分辨荧光的建立与应用[J]. 分析化学, 2016, 44(8): 1286-1290. DOI:10.11895/j.issn.0253-3820.160192.
- [56] 李贞. 莱克多巴胺钆标记时间分辨荧光免疫分析方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 36-40. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.010.
- [57] 侯文慧. 沙丁胺醇钆标记时间分辨荧光免疫分析方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 154-160. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2016.07.038.
- [58] SECUNDO F, BACIGALUPO M A, SCALERA C, et al. Rapid time-resolved fluoroimmunoassay for diethylstilbestrol in cow milk samples with a highly luminescent Tb³⁺ chelate[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 25(2): 221-225. DOI:10.1016/j.jfca.2011.09.003.
- [59] WANG Z, ZHANG S, MURTAZINA N R, et al. Determination of the veterinary drug maduramicin in food by fluorescence polarisation immunoassay[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 43(1): 114-122.
- [60] 宋佩, 孟萌, 张太昌, 等. 荧光偏振免疫分析方法快速检测沙拉沙星残留[J]. 分析化学, 2012, 40(8): 1247-1251. DOI:10.3724/SP.J.1096.2012.20010.
- [61] 李军涛, 候水平, 姬泽薇, 等. 腹泻性贝类毒素的免疫荧光层析检测方法的初步建立[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(2): 189-192.
- [62] 孙成彪, 许娜, 刘洋, 等. 河豚毒素荧光偏振免疫分析方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(3): 459-463. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2016.03.17.
- [63] 王力均. 基于免疫磁分离和核酸适配子技术快速检测食源性致病菌的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016: 61-71.
- [64] LIM M, PARK J Y, PARK K, et al. An automated system for separation and concentration of foodborne pathogens using immunomagnetic separation[J]. Food Control, 2017, 73: 1541-1547. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.11.021.
- [65] 解泉源. 免疫磁珠分离结合荧光微球免疫层析方法的建立及在大肠杆菌O157:H7检测中的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2013: 22-24.
- [66] 顾培科. 免疫磁分离结合胶体金免疫层析法快速检测大肠杆菌O157:H7[J]. 大家健康(学术版), 2015, 9(2): 155-156. DOI:10.3969/j.issn.1009-6019.2015.01.212.
- [67] LUN Jingsheng, LIU Dan, LIU Tiankai, et al. Evaluation of outer membrane protein U (OmpU) as a novel capture target of *Vibrio parahaemolyticus* and rapid detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) using PCR combined with immunomagnetic separation[J]. Aquaculture, 2018, 485: 225-232. DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.11.046.
- [68] ZENG Jing, WEI Haiyan, ZHANG Lei, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 174(9): 123-128. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.004.
- [69] MA Kai, DENG Yi, BAI Yu, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation[J]. Food Control, 2014, 42(3): 87-93. DOI:10.1016/J.foodcont.2014.01.042.
- [70] LIM M C, LEE G H, HUYNH D T N, et al. Biological preparation of highly effective immunomagnetic beads for the separation, concentration, and detection of pathogenic bacteria in milk[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 145: 854-861. DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.05.077.
- [71] 杨春江, 马孝斌, 李妍, 等. 免疫学方法在重金属快速检测中的应用[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(8): 1287-1290; 1303. DOI:10.16178/j.issn.0528-9017.20160841.