

免疫学技术在食源性微生物检测中的应用综述

胡金强¹, 雷俊婷¹, 詹丽娟², 纵伟¹,
白艳红¹, 景建洲¹, 孙新城¹, 董彩文¹

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 河南农业大学 食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

摘要:对酶联免疫吸附技术、免疫层析技术、免疫磁珠分离技术、酶联荧光免疫分析技术、化学发光免疫分析技术以及免疫传感器技术在食品安全检测中的应用进行了综述,并指出食品中待检靶抗原的筛选与纯化、免疫学检测方法的合理应用,以及敏感性和特异性这2个相矛盾的方面的统筹提高等问题有待解决。

关键词:免疫学;食源性微生物;食品安全检测

中图分类号:TS201.6;TS207.4 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.03.002

Application review of immunology technology in detection for foodborne microorganism

HU Jin-qiang¹, LEI Jun-ting¹, ZHAN Li-juan², ZONG Wei¹,
BAI Yan-hong¹, JING Jian-zhou¹, SUN Xin-cheng¹, DONG Cai-wen¹

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Food Science and Technology, He'nan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Applification of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunochromatography (IC), immunomagnetic separation (IMS), enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFIA), chemiluminescence immunoassay (CLIA) as well as immunosensor (IS) in the detection of food safety has been summarized. Moreover, screening and purification of antigens to be detected in food, rational utilization, and sensibility and the unification of the two contradictory aspects of the method need to be resolved.

Key words: immunology; foodborne microorganism; food safety detection

0 引言

食品安全问题对各个国家的社会、经济发展以及消费者的身心健康有重要影响,是当今世界普遍关注的重大问题.因此,保障食品安全具有十分重

要的公共卫生意义.众所周知,食源性微生物常伴随食品原料的生产、加工、包装与贮运过程进入食品中,从而造成食品污染,影响消费者的饮食安全.若微生物含量超标,食品会在短期内变质,丧失食用价值,严重的还会产生毒素,对人体造成伤害.

收稿日期:2014-03-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31201901);河南省教育厅科学技术重点研究项目(14A180025);郑州轻工业学院博士基金项目(2011BSJJ033)

作者简介:胡金强(1979—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为病原生物学、免疫学与食品安全.

免疫学技术发展至今,具有简便、快速、灵敏度高、特异性强等特点^[1],可检测细菌、病毒、真菌、各种毒素、寄生虫等,还可用于检测蛋白质、激素、其他生理活性物质、药物残留、抗生素等。免疫检测技术是世界粮农组织(FAO)向许多国家推荐的食源性微生物检测技术,也是21世纪最具竞争力与挑战性的检测分析技术。本文拟就国内外食源性微生物免疫学检测方法的研究进展进行综述。

1 酶联免疫吸附测定技术

酶联免疫吸附测定 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 是在酶联免疫技术的基础上发展起来的免疫测定技术。它的基本原理是将抗原或抗体吸附在固相载体表面,通过加入酶标抗体或抗原,进行抗原抗体反应,形成酶标免疫复合物,洗涤后,游离的酶标抗体或抗原被洗掉,再加入酶底物与免疫复合物结合显色,进而进行定性或定量测定。阪崎肠杆菌(ES)是一种对新生儿和免疫力低下人群的高危致病微生物,周鹤峰等^[2]通过制备 ES 高特异性单克隆抗体对其进行特异性间接 ELISA 检测,大幅降低检测成本,具有灵敏度高、稳定性强、特异性强、便捷等特点,为食品中 ES 的快速检测奠定了研究基础。

传统 ELISA 适用范围广,但在灵敏度、特异性方面不足。近年通过对其改进,在食源性微生物的快速、灵敏检测方面取得了许多显著成效^[3]。目前其检测灵敏度一般可达到 ng 级,若再与全自动酶标仪联合使用,ELISA 方法的特异性和灵敏度还能进一步提高^[4]。

2 免疫层析技术

免疫层析技术 IC (immunochromatography) 始于 M. Beggs 等^[5]设计的人绒毛促性腺激素免疫胶体金层析系统,是自 1990 年代发展起来的快速免疫分析技术。它结合免疫学和层析原理,借助毛细作用,样品得以在纤维膜上泳动,根据待测物与膜上特定区域配体的结合,通过酶反应或着色标记物的显色,在短时间(20 min)内能够直接观测。

2.1 荧光微球免疫层析技术

荧光微球免疫层析技术的原理是利用荧光微球表面修饰的羧基可共价结合抗体发出的荧光信号强而稳定的特点发展起来的新型检测技术,具有易于定量检测的特点。

解泉源等^[6]通过以下方法制备大肠杆菌

O157:H7 荧光微球免疫层析试纸条进行食源性微生物检测。先将荧光微球羧基化,用 EDC 介导共价偶联鼠源抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体,将喷涂在硝酸纤维素膜上的兔多抗和驴抗鼠抗体分别作为检测线(T线)和质控线(C线),进而确定免疫层析反应动态平衡时间,再利用双抗体夹心显色,测定吸光度,进而达到定量检测的目的。应用荧光微球免疫层析技术制备的试纸条能同时检测 4 株目标菌与 34 株不同种类的食源性微生物,目标菌仅与金黄色葡萄球菌有微弱交叉反应,特异性较好,并且具有操作简便、速度快的特点。

荧光微球具有相对稳定的形态结构,粒度均一、分散性好、稳定性好、发光效率高、重复性好,生物相容性较好^[7]。此外,发射光谱型标记物荧光微球因信号强度可随激发光增强而增强,在理论上可以有效降低层析方法的检测限^[8]。基于以上这些优点,荧光微球免疫层析技术在食源性微生物检测中得到快速发展。

2.2 胶体金免疫层析技术

免疫胶体金技术 GICA (immune colloidal gold technique) 是以胶体金作为示踪标记物应用于免疫反应的新型免疫标记技术^[9],可用于检测食品中常见的致病菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、布氏杆菌、霍乱弧菌等)。

王玉金等^[10]通过 3 步建立大肠杆菌 O157:H7 的胶体金免疫层析快速筛查方法。首先制备单克隆抗体 4F8 胶体金标记物、包被单克隆抗体 1H2 和兔抗鼠 IgG 多抗;再通过对比试验,确定胶体金标记的最佳 pH 值、最适标记蛋白浓度、包被抗体的浓度;最后通过组装成品试纸条进行检测。目标菌与 9 种常见食源性微生物(非 O157:H7 大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌、变形杆菌、霍乱杆菌、副溶血性弧菌、肠球菌、黏质沙雷氏菌、肺炎克雷伯杆菌)同时检测无交叉反应,特异性强,检出限为 1×10^5 cfu/mL,灵敏度高。对不同种类食品样品进行人工增菌,检测灵敏度与纯菌液一致,准确度高。检测全过程仅需 10 min,速度快,并且无需结合、分离游离标记物,无需(或只需简单)仪器。王静等^[11]应用胶体金免疫层析技术检测大肠杆菌 O157,检测限为 1×10^5 cfu/mL,检测时间仅需 15 min。邵晨东等^[12]制备出检测沙门氏菌的试纸条,对沙门氏菌 O₉ 抗原的最小检出量 4×10^5 cfu/条。徐小婧等^[13]应用胶体金免疫层析技术制备的试纸条检测 T-2 毒素(食源性真菌产生的剧毒毒素),灵敏度可达 50 μg/L,检测时间

10 min,重复性好,便捷,适用于现场检测。

胶体金免疫层析技术具有简便、快速、灵敏、直观、无需仪器等特点^[14],并且能够通过肉眼直接判定结果^[15],因此被广泛应用于食源性微生物的快速检测,临场检测以及高通量检测。

2.3 纳米金技术

自从16世纪欧洲现代化学的奠基人、杰出的医师化学家 Paracelsus 制备出“饮用金”用来治疗精神类疾病以来,纳米金(nanogold)就开始受到重视。纳米金指金的微小颗粒,直径1~100 nm,具有高电子密度、介电特性和催化作用,能与多种生物大分子结合,且不影响其生物活性。由于易于制备和修饰,因此被广泛使用^[16-17]。

经过5个世纪的发展,纳米金标记技术(nanogold labelling technique)已经成为现代四大标记技术之一^[18]。其在食源性微生物检测中的应用集中于以纳米金为免疫标记物的检测技术,该技术本质是蛋白质等高分子被吸附到纳米金颗粒表面的包被过程。

金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)是一种常见的影晌食品特别是乳品质量安全的高风险食源性微生物毒素,孙秀兰等^[19]采用离子液体保护的聚苯胺纳米金复合膜传感器对其进行检测:先制备聚苯胺修饰纳米金的复合膜 PANI/Au,再加入复合膜保护溶剂(离子液体1,3-二丁基-3-咪唑六氟磷酸盐)修饰。PANI/Au比传统纳米金离子能更有效地阻止金的聚合,且具有更高的分散性,聚苯胺导电膜可提高材料导电性以降低检出限,复合膜保护剂进一步稳定抗体,进而提高检测结果的稳定性。修饰的复合膜传感器克服了ELISA易出现假阳性的缺陷,乳品检测回收率在88%~119%之间。干宁等^[20]制备的食源性黄曲霉毒素B₁(AFB₁)新型纳米金电化学传感器,经验证可反复使用。另外,X. Chu等^[21]构建用于准确检测黄曲霉毒素的电化学传感器,进一步证明纳米金标记技术可用于食源性黄曲霉毒素的检测。

以纳米金为标记物的免疫分析快速检测技术虽然在开发过程中需投入较多资金和较长时间,但具有简单、快速、灵敏度高、特异性强、价廉、样品所需量少等优点^[22],并且根据纳米金颗粒的颜色变化,利用肉眼和紫外-可见吸收光谱就可进行定性定量分析^[23]。

3 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠分离法是将磁性微球与免疫化学技

术结合起来的一种方法。该方法先用抗体包被的磁珠与样品混合,再用一个磁场装置收集磁珠。免疫磁珠分离法能快速地从食品成分中分离出靶细菌,克服选择性培养基的抑制作用。

闻一鸣等^[24]用免疫磁珠-选择性平板法检测单增李斯特菌。先用免疫磁珠对样品特异性筛选和富集,再联合选择性培养基进行微生物学鉴定,最后进行一步增菌。该方法克服了传统免疫磁珠分离法检测限较高以及传统选择性平板耗时较长的缺点,无需预增菌即可在数小时内完成对样品的检测。单增李斯特菌与3种常见食源性微生物(李斯特菌、金黄色葡萄球菌及副溶血弧菌)检测无交叉反应,特异性好,并且具有步骤简单、结果可靠的优点。

免疫磁珠分离技术被广泛认为是分离目标分析物敏感而简单的方法^[25]。免疫磁珠在病原微生物检测中具有富集微生物的作用,可以有效缩短检测时间^[26]。

4 酶联荧光免疫分析技术

酶联荧光免疫分析技术 ELFIA (enzyme-linked fluorescent immunoassay)是在酶联免疫吸附技术基础上发展起来的将酶系统与荧光免疫分析结合的微生物快速检测技术。它是利用理想的荧光底物代替生色底物,实现提高分析灵敏度,扩大测量范围以及减少试剂用量的目的。

林涛等^[27]通过以下2个步骤完成沙门氏菌的全自动荧光酶免疫分析仪(mini-VIDAS)和全自动微生物鉴定仪(VITEK 2 COMPACT)联用检测:先用VIDAS法初筛,再用VITEK法对阳性菌株生化鉴定,从而实现对食源性沙门氏菌的快速检测。该联用法针对7种不同食源性菌株检测,能准确鉴定出其中的沙门氏菌菌株,而非沙门氏菌菌株在初筛时即能被准确排除,准确度高。7种参考菌株初筛后显示阴性的样品48 h之内得出最终结果,显示阳性的样品4~6 h得出最终结果。联用法中VITEK法的使用能够避免检测结果的假阳性和假阴性,大幅提高准确度,其最低检出限为10³ cfu/mL,灵敏度高。对目标菌和124种水产品同时检测的结果与国标法完全一致,准确性好,并且还具通量高、自动化程度高的优点。

ELFIA具有快速、准确、高通量的优点。该技术能够同时进行2种不同项目的检测,48 h内对于阴性样品直接出具准确的报告^[28-29]。

5 化学发光免疫分析技术

化学发光免疫分析 CLIA (chemiluminescence immunoassay technique) 是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应结合的新型免疫测定技术。

M. Magliulo 等^[30] 利用增强鲁米诺过氧化物酶发光体系电耦合照相系统 CCD (charge-coupled imaging device) 对发光信号进行检测. 可应用该系统同时检测 4 种常见食源性微生物 (大肠杆菌 O157 : H7、小肠结肠炎耶尔氏菌、鼠伤寒沙门氏菌以及李斯特单胞菌); 检测限在 $10^4 \sim 10^5$ cfu/mL 之间, 灵敏度高; 并且样品回收率在 90% ~ 120% 之间, 准确度高。

CLIA 技术具有特异性强、灵敏度高、线性范围宽、仪器简单、操作方便、无放射性污染等优点, 完全能够满足食品中病原微生物快速检测的要求. 此外, 该技术还为食品安全检测提供了一种超痕量的免疫检测手段, 在食品安全分析方面具有广阔的应用前景^[31]。

6 免疫传感器

免疫传感器基于抗原抗体特异性结合原理设计, 因其便捷、灵敏及可重复使用等优点而受到科研工作者的青睐. 免疫传感器的结构与传统的生物传感器相似, 可分为生物敏感元件、换能器和信号数据处理器 3 部分. 当待测物与分子识别元件特异性结合后, 所产生的复合物通过信号转换器转变为可以输出的电信号、光信号, 从而达到分析检测的目的。

许丽等^[32] 设计的食物致病菌快速检测一体化系统, 采用 TiO_2 纳米线束作为敏感元件以及高集成度芯片 AD5933 的阻抗设计, 电化学阻抗谱法测量阻抗变化量, 实现了对菌体的定量计算. 以大肠杆菌为例进行测试实验, 1 h 内即可检出食品中的大肠杆菌, 检出限达 4.5×10^2 cfu/mL, 灵敏度高. 该传感器能重复多次使用. 马静等^[33] 制备的大肠杆菌免疫传感器检出限为 1.0×10^2 cfu/mL, 检测时间仅为 20 min. S. H. Ohk 等^[34] 采用多重光纤免疫传感器同时检测即食用肉中的李斯特菌、大肠杆菌 O157 : H7 及沙门氏菌, 检出限达 1.0×10^3 cfu/mL, 此法可同时检测多个样品, 灵敏度高。

免疫传感器具有灵敏度高、仪器简单、方法灵活多样等优点, 已广泛应用食源性微生物检测领

域. 该法在未来数年内将向功能多样化、小型化、智能化与集成化、低成本、高灵敏度、高稳定性和高寿命的方向发展^[35]。

7 结语

免疫学检测技术具有快速、灵敏、专一的特点, 已在食源性疾病以及微生物检测方面得到了广泛的应用. 食品中污染的病原微生物或者毒素都可能直接或间接地成为抗原, 因此可应用免疫学方法对其进行定性和半定量分析, 从而实现对各种病毒害物质的控制和评估, 保证食品安全. 然而, 目前免疫学技术应用于食品安全检测中仍有一些问题需要解决, 例如, 食品中待检靶抗原的筛选与纯化、免疫学检测方法的合理应用, 以及敏感性和特异性这 2 个相矛盾的方面的统筹提高等. 随着对免疫学技术研究的不断深入和完善, 免疫学技术将在食源性致病菌的快速鉴定、检测, 中毒事件的甄别、处理、预防及病人的应急救治方面提供可靠的信息, 为人类的公共卫生、营养健康与疾病预防作出应有的贡献。

参考文献:

- [1] 赵杰文, 孙永海. 现代食品检测技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [2] 周鹤峰, 邵敏, 李长福, 等. 检测阪崎肠杆菌间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国乳品工业, 2013, 41 (1): 51.
- [3] 李建科, 王峰, 夏凯. 苹果浓缩汁中耐热菌的间接 ELISA 快速检测方法 [J]. 中国农业科学, 2011, 44 (22): 4669.
- [4] 石良, 王锡昌, 刘源, 等. 食物过敏原免疫学检测技术研究进展 [J]. 分析测试学报, 2010, 29 (9): 981.
- [5] Beggs M, Novotny M, Sampedro S, et al. A self-performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic-gonadotropin (HCG) in urine and serum [J]. Clin Chem, 1990, 36 (6): 1084.
- [6] 解泉源, 赖卫华, 刘春梅, 等. 大肠杆菌 O157 : H7 荧光微球免疫层析试纸条的研制 [J]. 食品科学, 2013, 34 (16): 353.
- [7] 吴伟兵, 王明亮, 景宜, 等. 单分散荧光微球的制备及其光学性能研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2010, 34 (3): 15.
- [8] 刘道峰, 邓省亮, 赖卫华, 等. 莱克多巴胺荧光微球免疫层析检测方法的建立 [J]. 食品与机械, 2012, 28 (1): 73.
- [9] 许艳丽, 鲍蕾, 吴振兴, 等. 免疫胶体金技术及其在真菌毒素检测中的应用 [J]. 中国酿造, 2010 (7): 13.
- [10] 王玉金, 杨书豪, 刘丽, 等. 大肠杆菌 O157 : H7 胶体金免疫层析快速检测法的建立 [J]. 河南科学, 2012, 30

- (7):874.
- [11] 王静,陈维娜,胡孔新,等. 大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J]. 卫生研究,2006,35(4):439.
- [12] 邵景东,陈飞,肖国平. O₁₅₇ 群沙门氏菌胶体金检测试剂盒的研制[J]. 检验检疫科学,2005,15(3):30.
- [13] 徐小婧,王俊平,王霄雪,等. T-2 毒素胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制[J]. 食品研究与开发,2013,34(17):96.
- [14] 刘自平,李静,吴春霞,等. 胶体金免疫层析技术快速检测蜂蜜中 5-羟甲基糠醛[J]. 食品与发酵工业,2013,39(7):200.
- [15] 夏敏,杜美红,贾瑜,等. 胶体金免疫层析技术测定食品中黄原胶[J]. 食品科学,2012,33(20):270.
- [16] Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, et al. Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin[J]. J Am Chem Soc,2004,126(38):11768.
- [17] Wang J B, Profitt J A, Pugia M J, et al. Au nanoparticle conjugation for impedance and capacitance signal amplification in biosensors[J]. Anal Chem,2006,78(6):1769.
- [18] 蒲小平,杨海麟,周楠迪. 基于生物条形码探针和金纳米颗粒的大肠杆菌 O157:H7 检测[J]. 食品科学,2011,32(8):177.
- [19] 孙秀兰,高博,张银志,等. 应用焦磷酸测序技术快速检测食品中沙门氏菌[J]. 食品科学,2013,34(2):182.
- [20] 千宁,王峰,刘飞,等. 饲料中黄曲霉毒素 B1 的纳米金修饰电化学免疫传感器研究[J]. 动物生产,2009,45(15):47.
- [21] Chu X, Fu X, Chen K, et al. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label [J]. Biosens Bioelectron, 2005, 20(9):1805.
- [22] Yuichi O, Kumiko K, Hisanori K, et al. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multiparameter detection [J]. J Immunol Methods, 2001, 258:73.
- [23] 何建仁. 试论食品微生物检测技术新发展[J]. 科技资讯,2011(20):2.
- [24] 闻一鸣,李志清,童吉宇,等. 免疫磁珠富集技术联合选择性培养基快速检测单增李斯特菌[J]. 生物工程学报,2012,29(5):672.
- [25] Apaire-Marchais V, Kempf M, Lefrancois C, et al. Evaluation of an immunomagnetic separation method to capture *Candida* yeasts cells in blood[J]. BMC Microbiol,2008,8(157):1471.
- [26] 余楠,车小燕. 免疫磁珠技术在病原微生物检测中的应用前景[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(3):280.
- [27] 林涛,兰敏,黄伟,等. 荧光酶免疫分析仪-微生物鉴定仪在水产品沙门氏菌检测中的应用[J]. 食品与发酵工业,2008,34(8):133.
- [28] 林涛,刘真真,杨雪娇,等. 全自动荧光酶免疫分析仪-国标法检测水产品中单核细胞增生李斯特氏菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(4):655.
- [29] 林涛,刘真真,冯小军,等. 全自动荧光酶免疫分析仪检测冻肉产品中致病菌的研究[J]. 食品科技,2007(7):216.
- [30] Magliulo M, Simoni P, Guardigli M, et al. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria[J]. J Agric Food Chem,2007,55(13):4933.
- [31] 张燕,杨金易,曾道平,等. 化学发光免疫分析技术及其在食品安全检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(5):1421.
- [32] 许丽,董文钧,王学斌,等. 食物致病菌快速检测系统的设计与实现[J]. 传感技术学报,2012,25(2):151.
- [33] 马静,张伟尉,李闻,等. 基于纳米金固定大肠杆菌 O157:H7 酶免疫传感器的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(12):2156.
- [34] Ohk S H, Bhunia A K. Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* from ready-to-eat meat samples[J]. Food Microbiol,2013,33(2):166.
- [35] 陈慧莲,陈伟锐. 电化学免疫传感器的发展概述[J]. 广州化工,2013,41(11):26.