

# AlphaLISA 技术在食品安全检测中的研究进展

洪小柳, 吕敬章, 张恒, 范放, 刘慧玲, 赵芳\*

(深圳出入境检验检疫局, 深圳 518045)

**摘要:** 纳米均相时间分辨荧光免疫法(AlphaLISA)是一种基于纳米微珠的光激化学发光的新型均相检测技术, 较传统的酶联免疫吸附测定(ELISA)具有均相、免清洗、敏感度高、特异性强等特点。本文介绍了 AlphaLISA 的原理和特点, 简要总结了近年来国内外 AlphaLISA 技术的应用研究, 重点综述了食品安全领域(包括生物毒素和药物残留)的研究进展, 并对此技术的发展前景进行了展望。

**关键词:** 纳米均相时间分辨荧光免疫法; 检测; 食品安全

## Research progress of AlphaLISA technology in food safety detection

HONG Xiao-Liu, LV Jing-Zhang, ZHANG Heng, FAN Fang, LIU Hui-Ling, ZHAO Fang\*

(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

**ABSTRACT:** Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay (AlphaLISA) is a new homogeneous detection technology based on light stimulating of the chemiluminescence of nano micro-bead. Compared with the traditional ELISA, the AlphaLISA has characteristics of homogeneity, free of cleaning, high sensitivity and specificity. This paper introduced the principles and characteristics of AlphaLISA, briefly summarized the application research of AlphaLISA technology at home and abroad in recent years, reviewed the research progress of food safety field (including biological toxins and drug residues), and the future development of this technology was also prospected.

**KEY WORDS:** homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay; detection; food safety

近年来食品安全问题层出不穷, 食品安全的快速检测方法研究越来越受到人们的关注, 传统的免疫学检测方法被广泛应用于食品安全检测。光激化学发光纳米均相时间分辨荧光免疫法(AlphaLISA)技术在分子生物学和医学领域上得到广泛应用, 但在食品安全检测领域才刚刚起步。本文就目前 AlphaLISA 技术在国内外的研究应用进展作一综述, 并且着重对食品安全检测应用领域作出分析和展望。

## 1 光激化学发光技术的概述

纳米均相荧光免疫 (luminescent oxygen channeling immunoassay, LOCI) 在 1994 年最初由 Ullman 等<sup>[1]</sup>报道, 以均相、一步、免清洗的操作优势, 以高灵敏度、特异性强和高通量的技术特点, 成为近几年免疫研究分析的热点。目前, 美国 PerkinElmer 公司已生产多种相关试剂(AlphaScreen™)。AlphaLISA

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科技项目(SZ2011001); 国家科技支撑计划子课题(2012BA08B01-5)

**Fund:** Supported by Shenzhen CIQ Science & Technology Program (SZ2011001) and The national science and Technology Support Program (2012BA08B01-5)

\*通讯作者: 赵芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物及兽药残留检测。E-mail: zf.ff@163.com

\*Corresponding author: ZHAO Fang, Engineer, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: zf.f@163.com

技术是由 AlphaScreen 发展而来的用于高通量筛选的光激化学发光技术。

### 1.1 AlphaLISA 的原理

AlphaLISA 技术的核心原理是单体氧的产生和传递(图 1)。AlphaLISA 检测试剂盒中包含感光微粒和发光微粒两种微粒, 这两种微粒直径约为 188 nm。在两种微粒表面覆盖有一层水凝胶, 微粒通过水凝胶表面的功能团与生物分子相偶联。每个微粒表面可以覆盖成百上千个生物分子, 可捕获待测分子。当两种微粒受到 680 nm 的激光照射后, 感光微粒表面的光敏剂就会将周围环境中的氧气转化为单体氧。单体氧的传播直径约为 200 nm, 如果发光微粒与感光微粒之间的距离小于 200 nm, 单体氧就能扩散至发光微粒, 产生高能级的发光。相反, 如果发光微粒和感光微粒的距离大于 200 nm, 单体氧无法扩散至发光微粒, 就不会有光信号的产生。AlphaLISA 均相反应就是基于以上原理, 如果包被在两种微粒表面的生物分子存在相互作用时, 就拉近了两种微粒之间的距离, 产生光信号。通过对光信号的强度检测, 来判断实际检测样品中有无待测目标物。

### 1.2 AlphaLISA 技术的特点

AlphaLISA 技术与传统 ELISA 相比, 具有以下多种优势: ①灵敏度高。采用的是纳米级微粒, 供体微珠含有高密度的光敏剂, 增加了反应表面积, 极大地提高了检测灵敏度, 灵敏度由 ELISA 的  $10^{-10}$  mol/L<sup>[2]</sup>数量级提高到  $10^{-17}$  mol/L; ②均相反应模式实现了一步、免清洗检测、操作简便、易于自动化、2 h

内完成整个实验流程; ③稳定性好。AlphaLISA 长波长激发, 短波长发射, 能完全避免反应体系中的自发光, 具有较强的抗淬灭能力, 检测过程也不易受到样本组织干扰和 pH 值、离子强度及温度等因素干扰; ④样本用量少(低至 5  $\mu$ L 或更少), 更易实现小型化、芯片化和高通量检测<sup>[3]</sup>; ⑤用途广泛, 可进行多种形式的实验, 包括竞争性实验、结合实验、解聚实验、多种生物性分子间的检测等<sup>[4]</sup>, 可以使用直接检测的方式, 也可以选择间接检测的方式。

## 2 国内外的研究现状和应用

基于 AlphaLISA 技术的原理, 单体氧分子在溶液中可扩散 200 nm, 供体微珠和受体微珠在小于 200 nm 的范围内都可被检测到。而其他均相技术, 例如时间分辨荧光(TR-FRET)、荧光偏振(FP), 供体和受体之间的距离为 10 nm, 仅限于小分子的检测。AlphaLISA 不受分子大小的影响, 可以应用于酶活性、受体配体反应、DNA、RNA、蛋白、多肽、碳水化合物等检测<sup>[5-9]</sup>。近年来, AlphaLISA 技术广泛应用于多种组织、细胞来源的生物分子检测、新药物开发分析<sup>[10]</sup>和临床医学病原体检验等领域。

### 2.1 分子生物检测

Poulsen 等<sup>[4]</sup>用 AlphaLISA 和 ELISA 两种方法分别定量人体血浆中的胰岛素含量。结果显示, 使用相同的抗体条件下, 两种方法的定量结果一致性非常好。AlphaLISA 方法不受血红素等样品中其他成分干扰, 比 ELISA 具有更高的灵敏度和精确性。

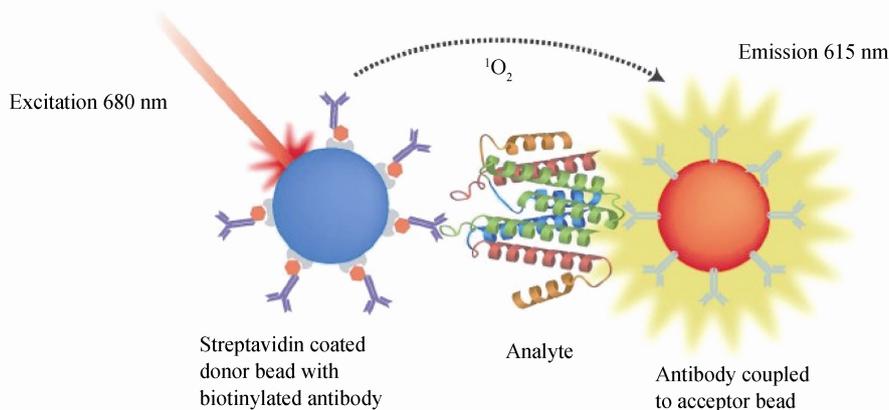


图 1 AlphaLISA 的技术原理<sup>[2]</sup>

Fig. 1 Principle of AlphaLISA

只需要 ELISA 1/5 的样本量, 就能达到比 ELISA 低 15 倍的检出限, 同时操作简便, 更易实现自动化。王柯等<sup>[12]</sup>应用 ELISA、TRFIA 以及 AlphaLISA 技术建立了小鼠肿瘤坏死因子的检测方法, 从反应动力学、方法学参数、相关性等方面比较这三种方法, 结果显示三种方法的相关性非常好, 而 AlphaLISA 技术由于不需要洗板孵育的过程, 耗时短、灵敏度高, 最适合痕量样品的检测。

## 2.2 新药物开发

在药物研发过程中, AlphaLISA 技术对样本的小型化和高灵敏度特点, 可以减少筛选成本、提高产量, 尤其对数量少又珍贵的样本极其重要。

2012 年, Schneider 等<sup>[13]</sup>使用 AlphaLISA 技术将泛素化结合矩阵作为通用组件检测泛素化蛋白。泛素—蛋白酶体通路(UPP)是蛋白质的选择性降解中一项非常重要的机制, 特别是在这个通路的 E3 连接酶的失调与多种疾病发生机理有关, 如癌症、炎症和代谢性疾病。E3 连接酶是一类重要的药物靶标, 传统的筛选技术通量低, 并多采用免疫印迹技术。AlphaLISA 法结合生化检测能识别出泛素化 E3 连接酶的抑制因子, 废除发病机制。该方法未来在泛素的药物开发和诊断上将有广阔的应用前景。

Beaudet 等<sup>[10]</sup>将生物素化的针对磷酸化的靶物质的抗体作为一抗, 二抗直接偶联于受体微珠, 来分别检测未受刺激的细胞及用抗癌药物治疗的细胞内靶物质的去磷酸化作用, 结果 Z 值达到 0.9。

## 2.3 病原体检测

AlphaLISA 技术近两年已在国内被广泛应用于乙肝病毒抗原抗体检测和试剂盒研制。马强等<sup>[14]</sup>应用 AlphaLISA 法来定量出人血清乙型肝炎病毒 e 抗体(HBeAb)浓度, 检测结果显示自制试剂盒灵敏度为 0.003 NCU/mL, 可测范围为 0.003~16 NCU/mL, 136 份临床血样试剂盒测定数值有显著相关性, R 值为 0.961。自制试剂盒的各项指标能够达到临床检测要求, 可取代昂贵的进口试剂盒应用于临床检测和基础医学研究。

陈桂兰等<sup>[15]</sup>比较了 AlphaLISA 法与电化学发光免疫分析法(ECLIA)、ELISA 及胶体金法测定低浓度 HBsAg, 并评价 AlphaLISA 测定 HBsAg 的临床效果。结果表明, AlphaLISA 检测 HBsAg 与 ECLIA 有很高的符合率, 在低浓度的 HBsAg 检测中, 可最大程度

地减少假阴性结果, 大大优于其他方法。由于 AlphaLISA 已经实现了仪器和试剂的国产化, 成本较低, 可以有效降低医疗费用且该法可进行自动化定量检测, 适于临床使用。

在大量的可溶性抗原细菌和病毒的检测基础上, Mechaly 等<sup>[16]</sup>首次报道了颗粒性抗原的检测, 即炭疽芽孢杆菌孢子和保护性抗原(PA)在复杂样品中的检测。为了避免供体珠聚集在孢子的表面上, 供体与受体浓度比例应该高于 4:1。检测灵敏度为  $10^6$  孢子/mL。兔血清中 PA 的检测范围在 10~100 pg/mL, 整个检测过程只需 50 min。该研究为检测其他颗粒性抗原如细菌或病毒奠定了基础。

## 3 AlphaLISA 技术在食品安全检测中的研究应用

AlphaLISA 技术虽在国内外已得到迅速的发展, 尤其在医学领域已广泛应用, 但在食品安全领域的方法学研究和试剂盒研制方面的报道较少, 仅在生物毒素和兽药残留上有报道。

### 3.1 食品中的毒素检测

毒素可分为动物毒素、植物毒素和微生物毒素, 其中微生物毒素包括细菌毒素、真菌毒素和藻类毒素等。毒素对食品生产各个环节的危害性很大, 极少量即可引起人中毒, 因此加强对其检测至关重要。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON) 又称呕吐毒素, 主要由禾谷镰刀菌产生, 被欧盟分类为三级致癌物。Bin 等<sup>[17]</sup>在用 AlphaLISA 技术检测谷物及制品中的 DON 时, 通过 DON - BSA 包被发光微粒和 DON 竞争 DON 抗体, 与生物素化羊抗兔 IgG 以及包被有链霉亲和素的感光微粒形成复合体, 建立间接竞争 DON 定量检测方法, 结果显示其灵敏度达到 0.007 ng/mL, 检测范围为 0.007~100 ng/mL。该方法是目前 DON 检测中最灵敏的方法之一。

微囊藻毒素(microcystin)是一种从蓝藻水华中分离出的多肽毒素, 微囊藻毒素-LR 是毒素最强的一种。我国生活饮用水标准限制饮用水中该毒素含量为 1  $\mu$ g/L。钮伟民等<sup>[18]</sup>建立了微囊藻毒素-LR(MC-LR)的纳米均相时间分辨荧光免疫分析法, 将偶联的 MC-LR 的牛血清白蛋白(MC-LR-BSA)人工抗原连接到发光微粒, 抗 MC-LR 单克隆抗体和亲和素通过生物素连接感光微粒, MC-LR 人工抗原特异性地与

生物素抗 MC-LR 单克隆抗体结合, 形成一个免疫复合物, 拉近感光微粒和发光微粒, 激发级联放大化学反应以大幅增强信号。其检出限达 0.02 ng/mL, 与 MC-LR 的其他免疫测定法相比, AlphaLISA 方法的操作简便、耗时短、高灵敏度、稳定性好的特点, 尤其适合于生活饮用水中微量 MC-LR 的分析。

### 3.2 食品中兽药残留物的检测

动物源性食品中的兽药残留问题近年来日益受到人们的关注, 是食品安全中最重要的问题之一。动物性食品中最常见的兽药残留是抗生素的残留。

江南大学的赵莉莉<sup>[19]</sup>建立了恩诺沙星的两免疫检测方法, 包括时间分辨免疫(TRFIA)和均相荧光免疫技术(LICLIA)。恩诺沙星是一类具有良好杀菌效果的动物专用药。TRFIA 法主要是利用双功能螯合剂标记稀土钬离子和抗体, 采用两步法间接竞争模式, 该检测灵敏度为 5 ng/L, 检测范围为 0.01~100  $\mu\text{g/L}$ 。LICLIA 法中最重要的影响因素是选择合适的稀释比例, 该实验中选择了 Enrofloxacin-OVA-发光珠 1: 500、抗恩诺沙星多克隆 1: 2500、生物素化羊抗兔抗体 1: 200 的浓度稀释比例, 两步反应仅需要 30 min, 其方法灵敏度为 2 ng/L, 检测范围为 0.007~100  $\mu\text{g/L}$ , 将两种免疫检测方法和酶联免疫分析法(ELISA)进行方法相关性的比较, 结果表明三种方法的相关性很好, LICLIA 法的灵敏度最高, 可应用于样品更复杂的检测目的。

氯霉素(Chloramphenicol)是一种广谱抗生素。由于其具有效果好以及价格低廉等优点, 已被普遍应用于各类家禽、家畜、水产品以及蜂制品的各种传染性疾病的治疗。Zhang 等<sup>[20]</sup>首次用 AlphaLISA 法对牛奶、蜂蜜和鸡蛋中的氯霉素(CAP)进行检测时, 因 CAP 作为小分子物质, 是半抗原没有免疫原性, 故采用混合酸酐法活化, 再与大蛋白偶联, 形成 CAP-BSA 和 CAP-OVA 结合物。该方法的灵敏度为 0.0086 ng/mL, 低于 ELISA 方法的灵敏度 0.05 ng/mL, 检测范围为 0.0096~20 ng/mL, 可达 3-5 个数量级, 整个操作在 30 min 内完成, 可以进行 384、1536、3456 孔板的高通量检测。

## 4 展 望

近年来, 食品安全的重要性越来越凸显, 动物

源性食品在人们的日常生活中所占比重越来越大, 尽快建立食品中兽药和生物毒素等有害物质残留的高灵敏快速筛选检测方法已成为当务之急。目前, 食品中兽药和生物毒素有害物质残留的检测方法包括气质联用法、液质联用法、放射受体法(Charm II)和酶联免疫法(ELISA)<sup>[21]</sup>。气质联用法和液质联用法检测灵敏度高、特异性强但普遍存在着仪器昂贵, 方法复杂, 操作烦琐, 试剂消耗量大的局限性, 不适用快速检测技术; 放射受体法(Charm II)法可达到  $\mu\text{g/kg}$ (ppb)级的检测灵敏度, 但由于检测的物质范围有限, 而且检测成本居高不下, 其推广应用受到限制; 酶联免疫法(ELISA)由于操作简便、检测成本低和检测通量高而被广泛应用, 是目前最为高效和普遍使用的检测筛选技术, 但随着食品检测向着更加微量级发展, 传统 ELISA 的灵敏度已不能满足快速检测的要求。

AlphaLISA 技术是超微量检测领域中出现的新兴检测技术, 被誉为免洗的 ELISA, 具有快速、均相(免洗)、高灵敏、量程宽和操作简便的特点<sup>[22,23]</sup>, 非常便于快速筛选和自动化。目前, 高通量的生物标志物筛选分析对于自动化检测仪器平台的要求较迫切, AlphaLISA 技术将是未来致病菌、生物毒素和抗生素残留快速检测平台的发展方向。

### 参考文献

- [1] Ullman EF, Kirakossian H, Singh S, *et al.* Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(12): 5426-5430.
- [2] Eglen RM, Reisine T, Roby P, *et al.* The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status [J]. *Curr Chem Genom*, 2008, 1: 2-10.
- [3] Szekeres PG, Leong K, Day TA, *et al.* Development of homogeneous 384-well high-throughput screening assays for  $\alpha\text{B1-40}$  and  $\alpha\text{B1-42}$  using alphascreen™ technology [J]. *J Biomol Screen*, 2008, 13(2): 101-111.
- [4] 王颖, 宋娟, 崔雨, 等. AlphaLISA 技术的发展及应用[J]. *医学分子生物学杂志*, 2011, 8(3): 261-264.  
Yang Y, Song J, Cui Y, *et al.* Development and Application of AlphaLISA Technology [J]. *J Med Mol Biol*, 2011, 8(3): 261-264.
- [5] Rouleau N, Silva LR, Ryabov I, *et al.* Development of a Non-Radioactive, No-Wash Biochemical Assay for High-Throughput Screening of Small Molecule Modulators of

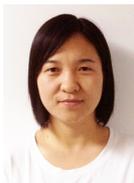
- DNA Methyltransferases [C]. Proc SBS Conf, 2011.
- [6] Bouchecareilh M, Caruso ME, Roby P, *et al.* AlphaScreen®-Based Characterization of the Bifunctional Kinase/RNase IRE1 $\alpha$ A Novel and Atypical Drug Target [J]. J Biomol Screen, 2010, 15(4): 406-417.
- [7] Mechaly A, Cohen N, Weiss S, *et al.* A novel homogeneous immunoassay for anthrax detection based on the AlphaLISA method: detection of B. anthracis spores and protective antigen (PA) in complex samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2013: 1-8.
- [8] Simard JR, Plant M, Emkey R, *et al.* Development and implementation of a high-throughput AlphaLISA assay for identifying inhibitors of EZH2 methyltransferase [J]. Assay Drug Dev Technol, 2013, 11(3): 152-162.
- [9] Nutu M, Zetterberg H, Londos E, *et al.* Evaluation of the Cerebrospinal Fluid Amyloid- $\beta$ 1-42/Amyloid- $\beta$ 1-40 Ratio Measured by Alpha-LISA to Distinguish Alzheimer's Disease from Other Dementia Disorders [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2013, 36(1-2): 99-110.
- [10] Beaudet L, Rodriguez-Suarez R, Venne MH, *et al.* AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery [J]. Nat Methods, 2008, 5(12).
- [11] Poulsen F, Jensen KB. A luminescent oxygen channeling immunoassay for the determination of insulin in human plasma [J]. J Biomol Screen, 2007, 12(2): 240-247.
- [12] 王柯, 张艺, 张珏, 等. 小鼠肿瘤坏死因子 ELISA、TRFIA 及 ALPHAScreen 检测方法的建立及评估[J]. 免疫学杂志, 2010 (2): 152-155.  
Wang K, Zhang Y, Zhang J, *et al.* Establishment and comparison of ELISA TRFIA and ALPHAScreen as assay methods for mouse TNF- $\alpha$ . [J]. Immunol J, 2010 (2): 152-155.
- [13] Schneider S, Chen H, Tang J, *et al.* Development of a homogeneous AlphaLISA ubiquitination assay using ubiquitin binding matrices as universal components for the detection of ubiquitinated proteins [J]. BBA Mol Cell Res, 2012, 1823(11): 2038-2045.
- [14] 马强, 贺安, 董志宁, 等. HBeAb 光激化学发光免疫分析试剂盒的研制[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31 (5):810-812.  
Ma Q, He A, Dong ZN, *et al.* Development of an amplified luminescent proximity homogeneous immunoassay kit for detecting human hepatitis B virus e antibody [J]. J South Med Univ. 2011, 31 (5): 810-812.
- [15] 陈桂兰, 陆燕. 光激化学发光免疫分析法测定低浓度 HBsAg 效果评价[J]. 重庆医学, 2012, 41(25): 2652-2654.  
Chen GL, Lu Y. Light induced chemiluminescent immunoassay method for the determination of low concentrations of HBsAg evaluation [J]. Chongqing Med, 2012, 41(25): 2652-2654.
- [16] Mechaly A, Cohen N, Weiss S, *et al.* A novel homogeneous immunoassay for anthrax detection based on the AlphaLISA method: detection of B. anthracis spores and protective antigen (PA) in complex samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2013: 1-8.
- [17] Bin Z, Ke W, Jian J, *et al.* Quantitative determination of deoxynivalenol (DON) using the amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA) [J]. Food Anal Methods, 2011, 4 (2):228-232.
- [18] 钮伟民, 何恩奇, 张艺, 等. 微囊藻毒素-LR 的纳米均相时间分辨荧光免疫分析法[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28 (8):714-716.  
Niu WM, He EQ, Zhang Y, *et al.* Determination of Microcystin-LR by Nano-Homogeneous Time-Resolved Fluoroimmunoassay Method [J]. J Environm Health, 2011, 28 (8):714-716.
- [19] 赵莉莉. 恩诺沙星时间分辨荧光免疫和纳米均相荧光免疫技术的建立与考核[D]. 无锡: 江南大学, 2011.  
Zhao LL. Establishment and Evaluation of Time-resolved Fluoroimmunoassay and LICLIA for Enrofloxacin [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.
- [20] Zhang Y, Huang B, Zhang J, *et al.* Development of a homogeneous immunoassay based on the AlphaLISA method for the detection of chloramphenicol in milk, honey and eggs [J]. J Sci Food Agr, 2012, 92(9): 1944-1947.
- [21] Toldra F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods [J]. Trends Food Sci Tech, 2006, 17(9): 482-489.
- [22] Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko AC, *et al.* Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method [J]. Clin Chem, 1996, 42(9): 1518-1526.
- [23] Cauchon E, Liu S, Percival M.D, *et al.* Development of a homogeneous immunoassay for the detection of angiotensin I in plasma using AlphaLISA acceptor beads technology [J]. Anal Biochem, 2009, 388(1): 134-139.

(责任编辑: 张宏梁)

## 作者简介



洪小柳, 本科, 工程师, 主要研究方向为食品微生物及兽药残留检测。  
E-mail: siluerhxl@163.com



赵芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物及兽药残留检测。  
E-mail: zf.ff@163.com