

蛋白芯片技术在食品安全检测中的应用进展

李周敏^{1*}, 李心爱¹, 康 希¹, 许丹科^{2*}

(1. 南京大学金陵学院, 南京 210089; 2. 南京大学化学化工学院生命分析化学国家重点实验室, 南京 210023)

摘 要: 随着生命科学与生物技术的快速发展, 国际上农畜产品安全检测技术正在向着检测方法与技术通量化、快速化、自动化和智能化等方向发展。而免疫检测方法由于其具有特异性和灵敏性、其试剂具有稳定性、操作具有简便性, 因此适合推广应用。其中蛋白芯片法与传统酶联免疫吸附(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)方法比较, 具有高通量, 样品用量少, 一份样品可同时进行多指标分析, 大大降低了检测的成本, 提高了检测的效率, 并且检测限与灵敏度等均与 ELISA 方法相当。动物源性食品种类和成分较为复杂, 目标化合物的检测限较低, 各目标化合物的性质差异大, 且可能同时存在多种组分。因此, 近年来蛋白芯片在食品安全检测等领域的应用也日渐增多。本文就蛋白芯片技术在食品安全检测中的应用进行综述, 以期食品安全现场快速检测提供参考。

关键词: 蛋白芯片; 食品安全检测; 综述

Progress in the applications of protein chip in food safety detection

LI Zhou-Min^{1*}, LI Xin-Ai¹, KANG Xi¹, XU Dan-Ke^{2*}

(1. Jinling College, Nanjing University, Nanjing 210089, China;
2. State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: With the rapid development of life sciences and biotechnology, the international safety testing technology for agricultural and livestock products is developing towards the high throughput, rapid, automated and intelligent of the detection methods and technologies. The immunoassay method is suitable for popularization and application because of its specificity and sensitivity, its reagent stability and ease of operation. Compared with the traditional ELISA method, the protein chip method has high throughput and small sample consumption, and one sample can simultaneously perform multi-index analysis, which greatly reduces the cost of detection, improves the detection efficiency, and has the limit of detection and sensitivity equivalent to the ELISA method. The types and components of animal-derived foods are complex, the limit of detection of target compounds is low, the properties of each target compound vary greatly, and multiple components may exist at the same time. Therefore, in recent years, the application of protein chips in food safety testing and other fields has also increased. This article reviewed the

基金项目: 江苏省高等学校自然科学基金项目(18KJD150003)、南京大学生命分析化学国家重点实验室开放研究基金项目(SKLACLS1918)

Fund: Supported by Natural science fund for colleges and universities in Jiangsu Province(18KJD150003), and Nanjing University State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life science (SKLACLS1918)

***通讯作者:** 李周敏, 博士, 主要研究方向为生物芯片检测技术。E-mail: lizhoumin@126.com

许丹科, 博士, 教授, 主要研究方向为分析化学。E-mail: xudanke@nju.edu.cn

***Corresponding author:** LI Zhou-Min, Ph.D, Jinling College, Nanjing University, No.8, Xuefu Road, Pukou District, Nanjing 210089, China. E-mail: lizhoumin@126.com

XU Dan-Ke, Ph.D, Professor, State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, 163 Xianlin Avenue, Qixia District, Nanjing 210023, China. E-mail: xudanke@nju.edu.cn

application of protein chip technology in food safety detection, in order to provide a reference for food safety field rapid detection.

KEY WORDS: protein chip; food safety detection; review

1 引言

20 世纪 80 年代末以来,由于一系列食品原料的化学污染、畜牧业中抗生素的应用、基因工程技术的应用,使食品污染导致的食源性疾病呈上升趋势,食品安全问题为全世界所关注。现场的食品快速检测方法要求实验准备简化,使用的试剂较少,配制好的试剂保存期长;样品前处理简单,对操作人员要求低;分析方法简单、准确和快速。化学比色法、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫胶体金试纸法是目前应用比较成熟的现场快速检测方法。随着食品安全相关检测装备的进步,食品安全检测车的出现,一些新的现场快速检测技术得以应用,如蛋白芯片技术的加入为现场检测提供了更广阔的发展空间^[1-5]。本文就蛋白芯片技术在食品安全检测中的应用进行综述,以期为食品安全现场快速检测提供参考。

2 蛋白芯片概述

蛋白芯片技术是近年来蛋白质组学研究中兴起的一种新方法,它是在基因芯片的基础上发展起来的。蛋白芯片技术主要采用微阵列点样等方法将大量生物大分子如抗原或抗体等样品有序地固定在玻片、膜、硅胶片、多孔板等支持物的表面,组成密集的二维分子阵列,然后与标记的待测生物样品中的靶分子实现特异性反应,反应结果用化学发光法、荧光法、酶催化底物显色法、同位素法等方法显示,最后通过特定的仪器对信号的强度进行快速、并行、高效地检测分析,并进行数字化处理提供定性和定量分析结果,判断样品中靶分子的含量,从而达到分析检测的目的^[6-9]。

蛋白芯片技术不仅适用于大分子化合物(如蛋白质、核酸、细菌)的检测,也适用于小分子化合物(如抗生素、激素等)的测定^[10]。蛋白芯片法与传统 ELISA 方法比较,具有高通量,样品用量少,一份样品可同时进行多指标分析等优势,大大降低了检测的成本,提高了检测的效率,并且检测限与灵敏度等均与 ELISA 方法相当。动物源性食品种类和成分较为复杂,目标化合物的检测限较低,各目标化合物的性质差异大,且可能同时存在多种组分。因此,近年来蛋白芯片在食品安全检测等领域的应用也日渐增多。

3 蛋白芯片在食品安全检测中的应用

蛋白芯片分析方法在食品中的农兽药残留、生物毒素

残留、食源性致病微生物及转基因食品的检测等方面具有巨大的应用潜力,具有使用样品体积小,不需要复杂的样品预处理,并且高通量和快速等特点。

3.1 在农兽药残留检测中的应用

在食品安全检测中,农兽药残留检测是非常重要的一个环节。在实际生产过程中,快速筛选方法比实验室中确证的定量分析更具有实际意义,而蛋白芯片具有高通量、快速的检测特点正适用于大规模生产中的快速筛选。Knecht 等^[11]在硅烷化修饰的片基上制备 10 种抗生素抗原点阵,包括 β -内酰胺类、磺胺类及氨基糖苷类等,通过化学发光法检测牛奶中抗生素残留含量。整个检测过程只需 5 min,且实现了自动化。Kloth 等^[12]建立的蛋白芯片间接竞争化学发光免疫法,能在几分钟内同时定量检测牛奶中磺胺类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类等 13 种抗生素含量。该方法灵敏度较高,但化学发光的检测设备较昂贵,很难在基层推广应用。刘楠等^[13,14]建立了一种高通量悬浮蛋白芯片检测方法,将方法首先应用于氯霉素和克伦特罗两种兽药残留的同时高通量检测,此后应用于氯霉素、克伦特罗、雌二醇、泰乐菌素 4 种兽药和阿特拉津、吡虫啉、甲萘威 3 种农药的同时检测,整个检测过程只需 1~2 h,可满足多种农兽药残留检测的灵敏、特异、快速和高效的需求。左鹏等^[15,16]报道了一种基于载玻片的荧光免疫微阵列蛋白芯片法,用于同时检测食品中氯霉素和磺胺二甲嘧啶 2 种抗生素残留,以及牛奶中磺胺二甲嘧啶、链霉素和泰乐菌素 3 种抗生素的含量,该方法简单、快速、灵敏度高、可满足大量样本快速初筛,检测限均低于国家规定的最大允许残留量。Liu 等^[17]用荧光免疫微阵列蛋白质芯片法同时测定鳗鱼中孔雀石绿、己烯雌酚、甲羟孕酮和 3-氨基-2-恶唑烷酮的含量。并将该蛋白质微阵列方法与用于这四种分析物的市售试剂盒进行比较,两种方法的结果一致。Raz 等^[18]描述了基于表面等离子体共振的免疫传感器建立了牛奶中氨基糖苷类(新霉素、庆大霉素、卡那霉素和链霉素),磺胺类(磺胺二甲嘧啶),氯霉素类(氯霉素)和氟喹诺酮类(恩诺沙星)残留物的无标记多重检测系统。多重残留的检测可用于测量 $\mu\text{g/L}$ 水平的所有目标化合物,其对于欧盟确定的最大允许残留水平的牛奶控制足够敏感。本实验室基于可视化微孔板芯片开发了多种检测方法,实现了同时检测牛奶中庆大霉素^[19],牛奶中磺胺类和喹诺酮类^[20],牛奶中诺氟沙星和恶喹酸^[21],牛奶中黄曲霉毒素、头孢氨苄,三聚氰胺^[22],以及蜂蜜中四环素^[23],蜂蜜中 4 种硝基呋喃代谢物的同时检测^[24],检测灵敏度高,可满足

高通量快速检测需求。此外,基于智能手机可视化微孔板芯片同时检测牛奶中喹诺酮类和四环素类抗生素残留检测^[25],实现单孔定量检测。目前蛋白芯片法检测各种残留物为食品生产企业对产品出厂的把关,以及相关部门对食品安全的快速抽查提供了技术支持。

3.2 在生物毒素残留检测中的应用

在过去的几十年里,农业食品系统中的霉菌毒素污染一直是全球的一个严重问题。真菌毒素是真菌在农产品和饲料中生长时产生的有毒次生代谢产物。近年来开发了多种霉菌毒素的检测技术,基于免疫的蛋白芯片检测方法由于其灵敏度高和检测时间短而得到了广泛应用^[26,27]。Wang 等^[28]开发了一种免疫芯片,可在 4 h 内同时定量检测水中黄曲霉毒素 B₁, 黄曲霉毒素 M₁, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇,赭曲霉毒素 A, T-2 毒素和玉米赤霉烯酮 6 种霉菌毒素的浓度,具有使用样品量少和肉眼可视半定量的优点。Hu 等^[29]研究了一种基于无污染聚合物刷的荧光竞争免疫测定微阵列用于黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁), 赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)多种真菌毒素的灵敏检测,检测限分别为 4.4 和 3 pg/mL,并且与常规 ELISA 方法相当或甚至更好。Li 等^[30]基于表面增强拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS)的免疫传感器被开发用于检测食品中的 3 种真菌毒素(AFB₁、ZEA、OTA)。测定的检测限 AFB₁ 为 0.061~0.066 μg/kg, ZEA 为 0.53~0.57 μg/kg, OTA 为 0.26~0.29 μg/kg。Wang 等^[31]使用 3D 等离子体纳米柱阵列的表面增强拉曼散射对多种霉菌毒素(OTA、伏马菌素 B(Fumonisin B, FUMB)和 AFB₁)进行免疫分析。对于 OTA、FUMB 和 AFB₁, 检出限(limit of detection, LOD)被确定为 5.09、5.11、6.07 pg/mL。Pagkali 等^[32]介绍了一种无标记的光学生物传感器,用于快速同时测定啤酒样品中的黄曲霉毒素 B₁(AFB₁), 伏马菌素 B₁(fumonisins B₁, FB₁)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON) 3 种霉菌毒素。AFB₁、FB₁、DON 的检测限分别为 0.8、5.6、24 ng/mL,而检测时间仅为 12 min。表面等离子体共振成像(surface plasmon resonance imaging, SPRi)是无标记,实时和高通量免疫测定的强大工具,但其灵敏度需要必要的改进。Wei 等^[33]报道了单层石墨烯涂层金芯片可以有效地增强表面等离子体共振(surface plasma resonance, SPR)的灵敏度。以抗玉米赤霉烯酮(ZEN)为研究对象,结果表明检测信号可以增强 40%。Schulz 等^[34]基于电化学学生物芯片用于快速和便携式自动化现场检测蛤蚌毒素, T-2 毒素以及黄曲霉毒素 M₁ 及其相应的同源物等低分子量毒素,能够在 17 min 内检测到 ng/mL 水平。Beloglazova 等^[35]使用基于量子点(quantum dot, QDs)的免疫化学技术开发了多重荧光免疫吸附测定(fluorescence immunosorbent assay, FLISA)方法。使用基于

直接竞争性免疫测定法同时检测 ZEA 和 AFB₁, 检出限为 1.8 和 1 μg/kg。

3.3 在食源性致病微生物检测中的应用

食源性致病微生物是食源性流行病的原因,因此需要迅速检测食品中的病原体。在琼脂平板上接种进行预富集培养是标准检测方法, qPCR 的分子检测方法实现了 24 h 内检测病原体。此外,生物传感器可以在富集培养早期实现快速检测。Magliulo 等^[36]已经开发了一种简单快速的多重夹心化学发光酶免疫测定法,用于同时检测大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)。为了实现 4 种病原体的多重检测,设计了一种新的聚苯乙烯 96 孔微量滴定板形式,其中每个主要孔在底部包含 4 个子孔。对每种细菌特异的单克隆抗体分别固定在每个子孔中。当将样品加入主孔中时,能够特异性结合相应单克隆抗体的细菌被捕获在 4 个子孔中的一个。随后,加入针对 4 种细菌的过氧化物酶标记的多克隆抗体混合物,并使用基于鲁米诺的化学发光法进行检测。该测定简单快速,所有细菌种类的定量限为 10⁴~10⁵ CFU/mL。通过将结果与常规培养方法进行比较来评估该方法的准确性,结果令人满意,回收率为 90%~120%。该方法可用作筛选试验,以评估这些病原菌在不同食品中的含量。熊亮斌等^[37]在硝酸纤维素膜上制备的可视化蛋白芯片,可检测西瓜中果斑病菌,具有较好的特异性和重复性。与酶联免疫吸附法(ELISA)相比,可视化蛋白芯片的检测灵敏度和阳性检出率均相当,但检测时间更短,仅为 ELISA 法的八分之一,所需检测样本量更少,结果肉眼可视等优点。胡娟等^[38]也在硝酸纤维素膜上制备的可视化蛋白芯片,用于黄瓜绿斑斑花叶病毒的检测,以 50 批葫芦科种子为样品,对可视化蛋白芯片检测与 ELISA 检测结果进行了比较,其检测结果吻合率达 98.0%,经 PCR 检验,检测结果一致性良好。说明该方法能对植物病毒做出快速、准确的检测。Palmiro 等^[39]开发并测试了一种蛋白质芯片,用于筛选和鉴定 5 种常见病原体,包括沙门氏菌(*Salmonella* spp.), 大肠杆菌(*E. coli*), 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*), 弯曲杆菌(*Campylobacter* spp.)和李斯特菌(*Listeria* spp.), 该蛋白质芯片在病原体鉴定中具有高度特异性,可以快速、可靠地筛选出污染食品中这 5 种常见病原体。

3.4 在转基因食品检测中的应用

随着全球转基因技术的迅猛发展,研究人员利用转基因技术培育出了抗除草剂、抗重金属、抗病虫害、抗干旱、耐盐碱和营养价值高的品种,这对于提高产量、减少损失以及增加农产品营养价值具有重要作用。然而转基因作物在带来巨大社会和经济效益的同时也存在许多问题,

主要集中在转基因食品的安全性及对生态环境的安全性方面。因此世界各国都在加强对转基因食品的管理。蛋白芯片法可以检测出转基因食品中外源基因表达出来的蛋白质,汪琳等^[40]研制了一种蛋白芯片可同时检测 3 种转基因成分表达的 BTCry1Ac 蛋白、植酸酶蛋白、BTCry1Ah 蛋白。将 3 种蛋白质所对应的单克隆抗体点于环氧基修饰的片基上,其检测灵敏度分别为: BTCry1Ac 蛋白 35 ng/mL、植酸酶蛋白 20 ng/mL、BTCry1Ah 蛋白 30 ng/mL,具有较高的灵敏度、特异性和可靠性。

3.5 在动物疫病检测中的应用

病毒感染是全世界畜禽养殖场发病率的主要原因。血清学检测技术包括血细胞凝集抑制(hemagglutination inhibition, HI)、琼脂凝胶沉淀素(AGAR gel precipitin, AGP)测试、免疫荧光测定(immunofluorescence assay, IFA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)等。虽然这些方法的价值和重要性是显而易见的,但它们不能同时进行检测。蛋白芯片法可同时检测多个血清样品中的抗体^[41,42]。石霖等^[43,44]利用可视化蛋白芯片法对禽流感、新城疫 2 种禽病血清抗体和禽流感、新城疫、鸡传染性支气管炎和传染性法氏囊病 4 种禽病血清抗体同时检测。该芯片具有快速、简便、灵敏、特异性的特点,无需特殊仪器,成本低。血清样品检测可信度高,且灵敏度高于琼脂扩散实验,可推广到基层使用。Wang 等^[45]开发了一种可视化蛋白芯片可以同时检测禽流感病毒、新城疫病毒,传染性支气管炎病毒和传染性法氏囊病毒诱导的抗体。与传统方法相比,该蛋白芯片显示出良好的灵敏度,是琼脂凝胶沉淀法的 400 倍以上,且相互之间无交叉反应。Sheng 等^[46]制备的琼脂糖凝胶蛋白芯片,实现了对鱼淋巴囊肿病毒的检测。通过优化琼脂糖凝胶基片表面的化学结构和检测抗体的标记物等,实现鱼淋巴囊肿病毒的最低检测限为 0.0686 $\mu\text{g/mL}$,与酶联免疫吸附测定(ELISA)的一致率为 100%,免疫荧光测定技术的一致率为 98%。赵玉辉等^[47]建立一种检测 A 型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)抗体的蛋白芯片,利用蛋白芯片分别对 15 个亚型流感病毒免疫血清、SPF 鸡血清、抗新城疫病毒血清、抗法氏囊病毒血清和现地血清样品进行检测,通过与血凝抑制试验比较,表明建立的蛋白芯片方法具有良好的灵敏性和特异性,为 AIV 抗体检测及制备检测 AIV 不同亚型或多种病原抗体的蛋白芯片提供方法。顾大勇等^[48]将禽流感病毒 H1、H3、H5、H7、H9、N1、N2、NP、NS1 等 9 种亚型抗原以最佳浓度,点样于玻璃载体表面,构建相应抗体的检测芯片,分别用于禽类不同类型禽流感病毒血清及随机选择的人血清检测,并对特异性、敏感性、重复性进行测试,与血凝抑制法进行双向验证比较,结果一致。刘志玲等^[49]建立了牛地方流行性白血病的液相蛋白芯片检测方法,检测结果与 ELISA 试剂盒检测结果的符合率为 94.6%,为牛地方流行性白血病的进出境检疫、疫

病监测和流行病学调查研究提供了一种特异、敏感的新型快速检测技术。曾梦等^[50]建立了猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的荧光微球免疫学检测方法,纪方晓等^[51]建立了猪戊型肝炎病毒液相蛋白芯片检测方法,方法与商品化 ELISA 试剂盒检测结果一致,为建立猪病多重检测方法提供了基础。

4 总结与展望

已报道的蛋白芯片方法相比于传统的检测方法如色谱-质谱联用等技术虽有多靶标、快速、高灵敏度等优点,但是存在诸如检测仪器复杂、价格昂贵、操作繁琐、通量低等问题,不适合在基层检测机构和小的食品生产企业推广应用。本课题组建立的基于可视化蛋白芯片的检测方法^[52-54],可同时检测多种药物及有害物残留^[22,24,25]和同时检测多种营养蛋白质的含量^[55]。与传统生物芯片相比,具有可视化,可直接用肉眼观察芯片结果,无需使用昂贵的荧光或化学发光检测设备。可视化生物芯片摆脱了昂贵的生物芯片分析仪器,大大降低了检测成本,提高了可操作性、应用性和推广性。

参考文献

- [1] 黄强力, 闵成军, 凡强胜, 等. 蛋白芯片技术在食品安全检测中的应用[J]. 肉类工业, 2013, (2): 46-48.
Huang QL, Min CJ, Fan QS, *et al.* Application of protein chip on food safety detection [J]. Meat Ind, 2013, (2): 46-48.
- [2] 李周敏, 孙艳艳, 姚开安, 等. 动物源性食品中抗生素残留检测前处理及其分析方法研究进展[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(6): 901-906.
Li ZM, Sun YY, Yao KA, *et al.* Progress of pretreatment and analytical methods for antibiotic residues in animal derived food [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(6): 901-906.
- [3] 张娟, 谭嘉力, 梁宇斌, 等. 可视芯片技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 381-385.
Zhang J, Tan JL, Liang YB, *et al.* Optical biochip technology and its application on food safety detection [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(8): 381-385.
- [4] 李周敏, 方惠群, 许丹科. 牛奶中残留抗生素免疫检测方法研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, (11): 66-72.
Li ZM, Fang HQ, Xu DK. Immunoassay methods for antibiotic residues in milk [J]. Biotech Bull, 2012, (11): 66-72.
- [5] 范晓燕, 由璐, 葛伟楠, 等. 生物技术在食品检测中的应用进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2018, 32(2): 6-11.
Fan XY, You L, Ge YN, *et al.* Application of biotechnology in food testing [J]. J Hebei Norm Univ Sci Technol, 2018, 32(2): 6-11.
- [6] 邱实, 刘芳, 袁晓红, 等. 蛋白芯片应用研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 332-337.
Qiu S, Liu F, Yuan XH, *et al.* An overview of the application of protein chip [J]. Food Sci, 2014, 35(17): 332-337.
- [7] 翟绪昭, 王广彬, 赵亮涛, 等. 高通量生物分析技术及应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 38-46.
Zhai XZ, Wang GB, Zhao LT, *et al.* An overview of high throughput biological screening methods and its application [J]. Biotech Bull, 2016,

- 32(6): 38–46.
- [8] 张仙, 常晓霞, 赵松, 等. 可视化芯片技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(4): 100–103.
Zhang X, Chang XX, Zhao S, *et al.* Advance in visual biology chip [J]. Prog Vet Med, 2015, 36(4): 100–103.
- [9] 夏俊芳, 刘箐. 生物芯片应用概述[J]. 生物技术通报, 2010, (7): 73–77.
Xia JF, Liu Q. Overview of bio-chip application [J]. Biotech Bull, 2010, (7): 73–77.
- [10] 张煜超, 王芳芳, 李周敏, 等. 小分子药物人工抗原的合成与鉴定研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 947–951.
Zhang YC, Wang FF, Li ZM, *et al.* Research progress of artificial antigen synthesis and identification for micromolecule drug [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(6): 947–951.
- [11] Knecht BG, Strasser A, Dietrich R, *et al.* Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk [J]. Anal Chem, 2004, 76(3): 646–654.
- [12] Kloth K, Rye-Johnsen M, Didier A, *et al.* A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk [J]. Analyst, 2009, 134(7): 1433.
- [13] 刘楠, 高志贤, 苏璞, 等. 用于氯霉素和克伦特罗兽药残留检测的高通量悬浮芯片技术研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(1): 41–44.
Liu N, Gao ZX, Su P, *et al.* Detection of chloramphenicol and clenbuterol residues by high-throughput suspension array technology [J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2009, 33(1): 41–44.
- [14] 刘楠, 苏璞, 朱茂祥, 等. 高通量悬浮芯片技术检测多农兽药残留[J]. 分析化学, 2010, 38(5): 673–677.
Liu N, Su P, Zhu MX, *et al.* High-throughput suspension array technology for simultaneous detection of multiple pesticide and veterinary drug residues [J]. Chin J Anal Chem, 2010, 38(5): 673–677.
- [15] 左鹏, 叶邦策. 蛋白芯片法快速测定食品中氯霉素和磺胺二甲嘧啶残留[J]. 食品科学, 2007, (2): 254–258.
Zuo P, Ye BC. CAP and SM2 residues quantitation and fast detection in foodstuff by protein microarray [J]. Food Sci, 2007, (2): 254–258.
- [16] Ye BC, Li SY, Zuo P, *et al.* Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA [J]. Food Chem, 2008, 106(2): 797–803.
- [17] Liu YC, Wang Q, Jiang W, *et al.* Simultaneous determination of malachite green, diethylstilbestrol, medroxyprogesterone, and 3-amino-2-oxazolidone in synbranchoid eels by a protein microarray method [J]. Food Anal Methods, 2015, 8(4): 1058–1066.
- [18] Raz RS, Maria GE, Willem H, *et al.* Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor [J]. Anal Chem, 2009, 81(18): 7743–7749.
- [19] 李周敏, 许丹科. 可视化蛋白芯片检测牛奶中庆大霉素的方法研究[J]. 分析科学学报, 2014, 30(5): 687–691.
Li ZM, Xu DK. Protein chip for visualized determination of gentamicin residues in milk [J]. J Anal Sci, 2014, 30(5): 687–691.
- [20] 钟文英, 王兴如, 许丹科, 等. 可视化蛋白芯片法同时检测牛乳中残留的磺胺类和喹诺酮类药物[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 193–197.
Zhong WY, Wang XR, Xu DK, *et al.* Simultaneous determination of multiresidues of sulfonamides and quinolones in milk with visual protein chip [J]. Food Sci, 2016, 37(2): 193–197.
- [21] 李周敏, 李心爱, 姚开安, 等. 可视化蛋白芯片法同时检测牛奶中诺氟沙星和恶喹酸[J]. 分析试验室, 2019, 38(2): 182–186.
Li ZM, Li XA, Yao KA, *et al.* Simultaneous detection of norfloxacin and oxolinic acid in milk by visualized microarray [J]. Chin J Anal Lab, 2019, 38(2): 182–186.
- [22] Li ZH, Li ZM, Jiang JD, *et al.* Simultaneous detection of various contaminants in milk based on visualized microarray [J]. Food Control, 2017, (73): 994–1001.
- [23] 王兴如, 钟文英, 李周敏, 等. 微孔板生物芯片测定蜂蜜中四环素残留方法的研究及应用[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(7): 1240–1244.
Wang XR, Zhong WY, Li ZM, *et al.* Visual microplate biochip for determination of tetracycline residues in honey [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(7): 1240–1244.
- [24] Li ZH, Li ZM, Xu DK. Simultaneous detection of four nitrofurant metabolites in honey by using a visualized microarray screen assay [J]. Food Chem, 2017, 221: 1813–1821.
- [25] Li ZM, Li ZH, Zhao DY, *et al.* Smartphone-based visualized microarray detection for multiplexed harmful substances in milk [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 874–880.
- [26] Jonathan NS, Zhou L, Wang Y, *et al.* Mycotoxin detection-Recent trends at global level [J]. J Integr Agric, 2015, 14(11): 2265–2281.
- [27] Man Y, Liang G, Li A, *et al.* Recent advances in mycotoxin determination for food monitoring via microchip [J]. Toxins, 2017, 9(10): 324.
- [28] Wang Y, Liu N, Ning B, *et al.* Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 34(1): 44–50.
- [29] Hu WH, Li X, He GL, *et al.* Sensitive competitive immunoassay of multiple mycotoxins with non-fouling antigen microarray [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 50: 338–344.
- [30] Li Y, Chen Q, Xu XF, *et al.* Microarray surface enhanced Raman scattering based immunosensor for multiplexing detection of mycotoxin in foodstuff [J]. Sens Actuat B, 2018, 266: 115–123.
- [31] Wang XK, Park SG, Ko JH, *et al.* Sensitive and reproducible immunoassay of multiple mycotoxins using surface-enhanced Raman scattering mapping on 3D plasmonic nanopillar arrays [J]. Small, 2018, 14(39): 1801623.
- [32] Pagkali V, Petrou PS, Makarona E, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and deoxynivalenol in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor [J]. J Hazardous Mater, 2018, 359: 445–453.
- [33] Wei W, Nong JP, Mei YH, *et al.* Single-layer graphene-coated gold chip for enhanced SPR imaging immunoassay [J]. Sens Actuat B, 2018, 273: 1548–1555.
- [34] Schulz K, Pöhlmann C, Dietrich R, *et al.* Electrochemical biochip assays based on anti-idiotypic antibodies for rapid and automated on-site detection of low molecular weight toxins [J]. Front Chem, 2019, 7: 31–42.
- [35] Beloglazova NV, Speranskaya ES, Wu A, *et al.* Novel multiplex fluorescent immunoassays based on quantum dot nanolabels for mycotoxins determination [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 62: 59–65.
- [36] Magliulo M, Patrizia S, Massimo G, *et al.* A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* Pathogen Bacteria [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 4933–4939.

- [37] 熊亮斌,高丽萍,刘箐,等.应用蛋白宏阵列快速检测西瓜细菌性果斑病菌[J].植物病理学报,2011,41(4):432-436.
Xiong LB, Gao LP, Liu Q, *et al.* Rapid detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using protein macroarray [J]. Acta Phytopathol Sin, 2011, 41(4): 432-436.
- [38] 胡娟,周小平,韩舜愈,等.利用可视化蛋白芯片快速检测黄瓜绿斑花叶病毒[J].甘肃农业大学学报,2014,49(5):116-122.
Hu J, Zhou XP, Han SY, *et al.* Rapid detection of cucumber green mottle mosaic virus by antibody macroarray [J]. J Gansu Agric Univ, 2014, 49(5): 116-122.
- [39] Palmiro P, Fabio C, Enrico DL, *et al.* Protein chips for detection of *Salmonella* spp. from enrichment culture [J]. Sensors, 2016, 16(4): 574.
- [40] 汪琳,邢佑尚,周琦,等.3种转基因成分检测蛋白芯片的研制[J].植物检疫,2011,25(3):1-6.
Wang L, Xing YS, Zhou Q, *et al.* Development of protein chip for detection three elements of GMO [J]. Plant Quarant, 2011, 25(3): 1-6.
- [41] 刘新生,王永录.蛋白质芯片技术及其在病毒学研究中的应用[J].中国农学通报,2010,26(16):44-47.
Liu XS, Wang YL. Application of protein microarray technique in virology research [J]. Chin Agric Sci Bull, 2010, 26(16): 44-47.
- [42] 肖西志,陈煜,邓明俊,等.蛋白质芯片技术在传染病检测中的应用研究进展[J].动物医学进展,2010,31(5):94-98.
Xiao XZ, Chen Y, Deng MJ, *et al.* Progress on protein chip technology in detection of infectious diseases [J]. Prog in Vet Med, 2010, 31(5): 94-98.
- [43] 石霖,王秀荣,杨忠萃,等.禽流感、新城疫可视化诊断蛋白芯片的制备及初步应用[J].中国预防兽医学报,2009,31(1):60-64.
Shi L, Wang XR, Yang ZP, *et al.* Preparation and preliminary application of a visual diagnostic protein chip for avian influenza and Newcastle disease [J]. Chin Prev Vet Med, 2009, 31(1): 60-64.
- [44] 石霖,王秀荣,杨忠萃,等.4种禽病毒抗体可视化蛋白芯片的制备及应用[J].中国农业科学,2009,42(4):1413-1420.
Shi L, Wang XR, Yang ZP, *et al.* Production and preliminary application of a visual protein chip to differentiate antibodies of four poultry diseases [J]. Sci Agric Sin, 2009, 42(4): 1413-1420.
- [45] Wang XR, Shi L, Tao QM, *et al.* A protein chip designed to differentiate visually antibodies in chickens which were infected by four different viruses [J]. J Virol Methods, 2010, 167(2): 119-124.
- [46] Sheng XZ, Xu XL, Zhan WB. Development and application of antibody microarray for lymphocystis disease virus detection in fish [J]. J Virol Methods, 2013, 189(2): 243-249.
- [47] 赵玉辉,王馥梅,包红梅,等.禽流感病毒NP基因的真核表达及抗体检测芯片的建立[J].中国预防兽医学报,2011,33(5):362-365.
Zhao YH, Wang FM, Bao HM, *et al.* Preparation of protein microarray analysis with eukaryotic expressed NP protein for detection of avian influenza virus antibody [J]. Chin Prev Vet Med, 2011, 33(5): 362-365.
- [48] 顾大勇,徐云庆,史蕾,等.人及禽类禽流感病毒蛋白芯片检测方法建立[J].中国公共卫生,2012,28(1):71-73.
Gu DY, Xu YQ, Shi L, *et al.* Detection of avian influenza virus in birds and human using protein chip [J]. Chin J Public Health, 2012, 28(1): 71-73.
- [49] 刘志玲,陈茹,舒鼎铭,等.牛地方流行性白血血液相蛋白芯片检测方法的建立[J].中国兽医学,2012,42(1):26-30.
Liu ZL, Chen R, Shu DM, *et al.* Development of a fluorescent microsphere-based assay for the detection of enzootic bovine leukosis [J]. Chin Vet Sci, 2012, 42(1): 26-30.
- [50] 曾梦,纪方晓,冀池海,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的荧光微球免疫学检测方法的建立[J].中国兽医学,2017,47(12):1497-1502.
Ceng M, Ji FX, Ji CH, *et al.* Development of a fluorescent microbead-based immunoassay for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus IgG [J]. Chin Vet Sci, 2017, 47(12): 1497-1502.
- [51] 纪方晓,陈济钊,梁焕斌,等.猪戊型肝炎病毒液相蛋白芯片检测方法的建立[J].中国兽医学,2017,37(1):60-65.
Ji FX, Chen JD, Liang HB, *et al.* Development of a fluorescent microsphere-base immunoassay for detection of antibodies against swine hepatitis E virus [J]. Chin J Vet Sci, 2017, 37(1): 60-65.
- [52] 许国峰,李慧,张翠,等.量子点银增强可视化检测方法的研究与应用[J].分析化学,2010,38(10):1383-1387.
Xu GF, Li H, Zhang C, *et al.* Research and application of visual detection based on quantum dots coupled with silver enhancement [J]. Chin J Ana Chem, 2010, 38(10): 1383-1387.
- [53] 李慧,钟文英,许丹科.生物素修饰纳米银探针的制备及在蛋白芯片可视化检测中的应用[J].高等学校化学学报,2010,31(11):2184-2189.
Li H, Zhong WY, Xu DK. Preparation of biotinylated silver nanoparticles and its application of visual detection method for protein chip [J]. Chem J Chin Univ, 2010, 31(11): 2184-2189.
- [54] 钟文英,李周敏,许丹科.微孔板蛋白芯片可视化检测方法的研究[J].分析实验室,2010,29(5):5-8.
Zhong WY, Li ZM, Xu DK. Visual detection method for microplate protein arrays [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(5): 5-8.
- [55] Li ZM, Wen F, Li ZH, *et al.* simultaneous detection of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and lactoferrin in milk by visualized microarray [J]. BMC Biotechnol, 2017, 17(1): 72-80.

(责任编辑:武英华)

作者简介



李周敏,博士,主要研究方向为生物芯片检测技术。

E-mail: lizhoumin@126.com

许丹科,博士,教授,主要研究方向为分析化学。

E-mail: xudanke@nju.edu.cn