

免疫磁珠分离技术在食源性致病菌检测中的应用

林吉恒*, 黄朱梁, 彭志兰, 孙 瑛

(舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 316012)

摘 要: 免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMB)是一种均匀、具有超顺磁性及保护性壳的球形小粒子, 由载体微球和免疫配基结合而成。免疫磁珠分离技术(immunomagnetic beads separation techniques, IMBS)则是利用免疫磁珠上包被的特异性抗体与抗原发生亲和反应, 从复杂的样品中分离到目标抗原。再利用磁珠的磁响应性, 实现对目标抗原的富集。在食源性致病菌检测方面, 该技术通过与其他检测手段相结合而得到广泛应用, 具有灵敏度高、检测时间短、操作简单等优势。本文综述了免疫磁珠的结构特点、免疫磁珠分离技术的原理, 着重阐述了该技术在食源性致病菌检测方面的应用进展, 以为免疫磁珠分离技术的广泛应用提供参考。

关键词: 免疫磁珠; 免疫磁珠分离技术; 食源性致病菌

Application of immunomagnetic beads separation techniques in detection of foodborne pathogenic bacteria

LIN Ji-Heng*, HUANG Zhu-Liang, PENG Zhi-Lan, SUN Ying

(Food and Drug Testing Institute of Zhoushan, Zhoushan, 316012, China)

ABSTRACT: Immunomagnetic beads (IMB) is a kind of uniform, has superparamagnetism and protective shell of small spherical particles, by the carrier on the combination of microspheres and immune ligands. The immunomagnetic bead separation techniques (IMBS) use the specific antibody coated on the immunomagnetic beads to affinity with the antigen to separate the target antigen from the complex sample. In the detection of foodborne pathogens, this technology has been widely used by combining with other detection methods, and has the advantages of high sensitivity, short detection time and simple operation. This paper reviewed the structural characteristics of immunomagnetic beads and the principles of immunomagnetic beads separation techniques, emphasized the application progress of this technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria, so as to provide references for the wide application of immunomagnetic separation techniques.

KEY WORDS: immunomagnetic beads; immunomagnetic beads separation techniques; foodborne pathogens

1 引 言

免疫磁珠分离技术(immunomagnetic bead separation techniques, IMBS)作为一项新的免疫学技术, 它将固化试剂特有的优点与免疫学反应的高度特异性结合于一体, 以

免疫学为基础, 渗透到病理、生理、药理、微生物、生化以及分子遗传学等各个领域。IMBS 最初用于血液中细胞的分离, 目前广泛应用于致病菌的分离与检测^[1]。

本文简单介绍了免疫磁珠分离技术的基本原理, 综述了近些年免疫磁珠分离技术在食源性致病菌检测中的研

基金项目: 浙江省食品药品监督管理局 2017 年度科技计划项目(BH201704)

Fund: Supported by the Science Plan Project of Food and Drug Supervision System in Zhejiang Province (BH201704)

*通讯作者: 林吉恒, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品微生物检验。E-mail: 83270685@qq.com。

*Corresponding author: LIN Ji-Heng, Master, Engineer, Food and Drug Testing Institute of Zhoushan, Zhoushan 316012, China. E-mail: 83270685@qq.com.

究进展, 为该技术的进一步发展提供参考依据。

2 免疫磁珠的结构特点

免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMB)由载体微球和免疫配基组合而成。微球载体的核心为顺磁性粒子, 使磁性微球能在磁场的作用下快速聚集, 其主要成分为 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 Fe_3O_4 和 MeFe_2O_3 ; 核心外层包裹一层高分子材料, 以保证磁性密封良好, 避免漏磁, 其主要成分为聚苯乙烯、聚乙烯亚胺或聚丙烯酸等; 最外层为功能基层, 如氨基、羧基、羟基等。这些微球在没有磁性的情况下不会发生磁性聚合, 当出现外加磁场时, 这些微球能出现响应, 向统一方向聚集。免疫配基则是指抗原、抗体、凝集素或者一些化学基团, 配基具有生物专一性, 且微球和配基的结合不要影响或改变配基原有的生物学特性, 保证微球的特殊识别功^[2]。常见的配基主要有羧基、氨基、巯基、甲磺酸基和环氧基等。

3 免疫磁珠分离技术的基本原理

IMBS 借助免疫磁珠捕获样品中的靶物质, 通过磁珠在磁场中的运动使靶物质(如病原微生物)分离。具体过程是将带有特异性抗体的免疫磁珠加到待测样品中, 相应的抗原物质就会和免疫磁珠上的抗体发生特异性结合, 形成抗原-抗体-磁珠免疫复合物, 这种复合物具有较强的磁响应性, 在外加磁场作用下发生力学移动, 使复合物与其他物质分离, 从而达到快速分离抗原物质的目的^[3]。

免疫配基包被于磁珠外表面, 主要包括一抗、二抗和蛋白质 A/G。免疫磁珠分离技术的方法可分为直接法和间接法。直接法是指一抗通过化学结合或者物理吸附直接和磁珠共价偶联, 然后加入待测样品(含待测微生物或抗原物质), 抗原与免疫磁珠上的抗体结合形成复合物, 在磁场的作用下与其他物质分离^[4]。该方法方便快捷, 但仅适用于特定靶物质的分离。

间接法是将二抗和磁珠共价偶联, 使磁珠成为第二抗体(如羊抗兔 IgG)的载体。然后在待测样品中加入一抗(如兔 IgG), 若存在目标抗原, 则可先于一抗结合, 形成抗原-一抗复合物, 再加入已制备的免疫磁珠, 通过二抗-一抗相互作用, 形成磁珠-二抗-一抗-抗原/微生物的复合物, 然后在磁力的作用下达到分离特定物质的效果^[5]。

4 免疫磁珠分离技术在食源性致病菌检测方面的应用

传统的食源性致病菌检测方法需经分离培养、生化和血清学鉴定等多个步骤, 操作复杂, 检验周期长, 而且检验结果容易受到样品复杂成分的干扰而出现假阴性。而免疫磁珠则能有效去除样品中的绝大部分杂质, 使检测过程

更快速、高效。因此, 一系列依靠免疫磁珠分离和富集待测样品, 并结合各种检测技术的高灵敏检测方法应运而生(表 1), 以下就免疫磁珠分离技术在食源性致病菌检测中的近些年的研究进展做一介绍。

表 1 基于免疫磁珠分离技术的食源性致病菌检测
Table 1 Detection of food borne pathogens that based on the immunomagnetic beads separation techniques

致病菌	检测方法	参考文献
	免疫磁珠分离技术+电化学免疫传感器	[6]
大肠埃希菌	免疫磁珠分离技术+LAMP	[7]
	免疫磁珠分离技术+量子点	[8]
单核细胞增生李斯特菌	免疫磁珠分离技术+实时荧光 PCR	[9]
	免疫磁珠分离技术+选择性培养基	[10]
	免疫磁分离技术-荧光定量 PCR	[11]
沙门氏菌	免疫磁珠分离技术+免疫层析	[12]
	免疫磁珠分离技术+ELISA	[13]
	免疫磁珠分离技术+量子点	[14]
志贺氏菌	免疫磁珠分离技术-双重荧光定量 PCR	[15]
	免疫磁珠分离技术+量子点	[16]
霍乱弧菌	免疫磁珠分离技术+LAMP	[17]
	免疫磁珠分离技术+PCR	[18]
金黄色葡萄球菌	免疫磁珠分离技术+量子点	[19]
	免疫磁珠分离技术+LAMP	[20]
	免疫磁珠分离技术+ LAMP	[21,22]
副溶血弧菌	免疫磁珠分离技术+显色平板	[23]
	免疫磁珠分离技术+显色平板+荧光 PCR	[24]
空肠弯曲菌	免疫磁珠分离技术+量子点	[25]

4.1 免疫磁珠分离技术结合各类培养基

该方法是利用免疫磁珠对食源性致病菌的分离富集作用, 结合选择性培养基或者显色培养基实现对食源性致病菌的高特异性检测。

闻一鸣等^[26]联合免疫磁珠与选择性培养基对不同浓度($10^1\sim 10^5$ CFU/mL)的单核细胞增生李斯特菌进行检测, 并对李斯特菌、金黄色葡萄球菌及副溶血弧菌进行交叉实验。结果显示特异性免疫磁珠联合选择性平板可检出浓度

为 10^3 CFU/mL 及以上的单核细胞增生李斯特菌; 牛奶样品中的单核细胞增生李斯特菌仅需 6 h 增菌就能被检出, 检测限为 0.7 CFU/mL。联合使用免疫磁珠富集技术与选择性培养基, 能在 30 h 内完成对牛奶样品的检测, 较国标法减少 38 h 以上, 且具有同等的灵敏度。郭璞等^[27]采用免疫磁珠并结合使用增加赤藓醇、血清选择性培养基, 布鲁氏杆菌检出限达到 25 CFU/mL。Tatavarthy 等^[28]在美国食品和药物管理局的细菌分析手册中鼠伤寒沙门菌检测方法的基础上, 提出了新的 6IX 法, 该方法将样品在缓冲蛋白胨水中预增菌 6 h, 再通过免疫磁珠分离技术和木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂选择性培养基结合对鼠伤寒沙门菌进行检测, 检测时间缩短了 1~2 d。由此可见, 将 IMS 技术结合各类选择性培养基或者显色培养基, 为致病菌传统分离培养建立一种新的技术路线, 提高实验室的工作效率。同时, 使用免疫磁珠分离技术还可以实现对不同血清型的食源性致病菌的分离。Kanki 等^[29]将 IMS 技术联合山梨醇麦康凯琼脂培养基或科玛嘉产志贺毒素大肠杆菌显色培养基来同时检测产志贺毒素大肠杆菌 O26、O111 和 O157。非 O157 产志贺毒素大肠杆菌 O26、O45、O103、O111、O121 和 O145 6 种血清型因为没有特殊的生化特性, 在平板培养基上很难与其他大肠杆菌区分开。Kalchayanand 等^[30]根据这 6 类细菌对碳水化合物的利用率、 β -半乳糖苷酶的活性, 及耐药性的不同开发出一种显色培养基。通过免疫磁珠技术结合该种显色培养基来区分 O26、O45、O103、O111、O121 和 O145 这 6 种血清型, 并成功地从人工污染牛肉中分离检测出这 6 种血清型。

4.2 免疫磁珠结合 PCR 技术

目前, 越来越多的研究者将免疫磁珠分离技术与传统 PCR、逆转录 PCR、多重 PCR、实时 PCR 等技术相结合来进行致病菌的鉴定, 该方法将免疫磁珠消除基质干扰和 PCR 技术快速定性或定量的优点很好的结合起来。

李婧姮等^[31]利用免疫磁珠富集单核细胞增生李斯特菌, 建立的免疫磁珠捕获-PCR 技术的灵敏度是直接 PCR 检测限的 10 倍。张蕾等^[32]采用副溶血性弧菌单克隆抗体、纳米免疫磁分离技术, 结合实时荧光聚合酶链式反应检测方法, 建立海产品中副溶血性弧菌纳米免疫磁分离-实时荧光 PCR 检测方法。副溶血性弧菌纳米免疫磁珠在菌体浓度为 10^3 CFU/mL 水平时, 对副溶血性弧菌的捕获率达到 74%。在纯培养、无需增菌情况下, 该方法检测灵敏度达到 140 CFU/mL; 具有良好的特异性; 在食品基质添加实验中, 其检测限为 2 CFU/25 g 样品, 增菌时间缩短到 8 h。龙梦瑶等^[33]采用免疫磁珠分离法与实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantification, RT-PCR)技术 相结合快速检测肉制品中肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*,

EHEC)O157 的方法。当肉制品中 EHEC O157 含量 ≥ 1 CFU/g (2.5 g 样本), 免疫磁珠能够捕获, 并通过 EC 肉汤培养基增殖 3 h 后, RT-PCR 即可成功检测, 全程只需 6~7 h。在大大缩短了检测时间的基础上, 再次提高了 EHEC O157 的检测限, 在防范肉制品源性致病性 EHEC O157 传染方面具有重要意义。

4.3 免疫磁珠分离技术结合免疫层析技术

4.3.1 免疫磁珠分离技术结合量子点免疫层析技术

量子点又称纳米晶体, 是粒径小于或接近激子波尔半径、受激发能够产生荧光发射的纳米晶体颗粒, 一般由 II-VI 族, III-V 族或 IV-VI 元素构成。相对于有机荧光标记物, 量子点具有非常好的量子产额、耐光漂白的稳定性好、生物相容性好、背景噪声小、荧光寿命长以及较宽的激发光的波长范围而发射光波长范围很窄等优点^[34-36]。将量子点与免疫磁珠结合来检测致病菌可显著降低检测方法的检测限, 从而提高灵敏度和分辨率。

目前已有许多基于量子点荧光标记结合免疫磁珠分离技术检测食源性致病菌的研究报道。白冰等^[34]基于抗原抗体反应捕获目标菌, 结合生物素与亲和素间的特异性相互作用, 联合免疫纳米磁珠磁性分离、免疫量子点荧光标记技术, 运用荧光检测系统, 建立了福氏志贺氏菌的定量检测模型。当福氏志贺氏菌浓度为 $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL, 相对荧光强度与菌浓度呈良好的线性关系, 决定系数 $R^2=0.9761$ 。进一步对模型的准确度和精确度进行验证, 得到菌落浓度预测值与真实值差异小, 检测相对标准偏差为 1.8%, 表明模型的准确度好, 精密度高。该方法可简单、快速(2 h)、高效地检测福氏志贺氏菌。在之后的研究中, 白冰等^[35]建立了快速检测金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌 2 种食源性致病菌的量子点免疫标记方法, 利用免疫磁珠富集, 量子点标记, 微型光纤光谱仪对金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌进行定量检测, 结果显示 2 种目标菌的最佳捕获条件为免疫捕获时间 45 min、磁分离时间 1.5 min、磷酸盐缓冲液浓度为 0.01 mol/L。目标菌浓度在 $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL 范围, 线性关系良好, 金黄色葡萄球菌决定系数 $R^2=0.9626$, 福氏志贺氏菌决定系数 $R^2=0.9778$, 说明具有很好的拟合性。重复性测试结果中相对标准偏差为 2.9%, 检测时间在 2 h 内。Wang 等^[36]使用量子点和纳米磁珠的荧光免疫分析法对绞碎的牛肉、鸡肉的洗水、鲜切生菜以及西兰花中的单核细胞增生李斯特菌进行快速检测, 检测限为 2~3 CFU/0.1 mL, 说明该方法可对多种食品样品中的致病菌进行有效检测。Wang 等^[37]使用 3 种量子点, 发射光波长分别为 620、580、530 nm, 作为荧光标记物, 同时对单核细胞增生李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌进行免疫磁分离和量子点荧光检测, 这种方法可同时检测到样品中浓度低至 20~50 CFU/mL 的 3 种菌。Hu 等^[38]将免疫磁珠分离技术

与量子点荧光探针技术相结合来检测金黄色葡萄球菌, 检出限为 10^3 CFU/mL, 这个方法的样品不需要进行预处理和分离富集就可以直接进行检测, 整个过程只需 3 h。

4.3.2 免疫磁珠分离技术结合胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术(gold immunochromatography assay, GICA)是一种将胶体金标记技术、免疫学检测和层析分析技术有机结合的快速筛查法。其原理是利用胶体金标记的抗原或抗体与相应的抗体或抗原特异性结合, 通过胶体金显色来达到定性或者定量的目的。将 IMBS 技术和 GICA 计数相结合, 首先通过免疫磁珠将目标菌富集, 再加入到胶体金免疫层析试纸条上进行检测, 可以去除食品基质和杂菌的干扰, 将待检样品富集浓缩到更小体积, 从而大大提高了检测灵敏度和准确度, 具有简便、快速、经济等特点。

崔希等^[39]利用免疫磁珠分离技术从样本中分离出大肠杆菌 O157:H7, 再将分离得到的靶细菌重悬液利用胶体金层析法定量检测大肠杆菌 O157:H7, 其检出限为 7.6×10^3 CFU/mL。对于 10 CFU/g 大肠杆菌 O157:H7 污染的食品样本, 经过 6 h 预增菌, 免疫磁珠分离和胶体金试纸条检测 72 min 即可检出。该方法的建立对于食源性致病菌的现场快速检测具有重要意义。王报贵等^[40]通过胶体金与特异性针对于副溶血弧菌的单抗偶联, 同时在 NC 膜上包被兔多抗、驴抗鼠的 IgG 分别作为检测线和质控线, 制备免疫层系试纸条, 测定试纸条的灵敏性与特异性。结果表明当加入由胶体金标记的羊抗鼠二抗, 能将显色强度提高 5 倍, 明显有利于肉眼的观察。在纯培养物中试纸条的灵敏度为 10^6 CFU/mL, 且与 3 株不同的副溶血弧菌均有阳性反应, 与 26 株常见的菌均无交叉反应。改良的副溶血弧菌胶体金免疫层系试纸条的建立, 有助于加强食品中该菌的检测。

4.3.3 免疫磁珠分离技术结合荧光免疫层析技术

荧光微球表面修饰的羧基、氨基可共价结合抗体, 荧光信号强而稳定, 易于量化, 这使其成为了一种新型的标记物。

李倩茹等^[41]以荧光微球为标记物建立了荧光微球免疫层析检测法, 将羧基化的磁性微球与抗体偶联制备了抗-鼠伤寒沙门氏菌免疫磁珠, 并将荧光微球免疫层析检测法与 IMB 联合用于富集和检测 3 种食品样本中的鼠伤寒沙门氏菌。结果显示联合检测的灵敏度可达到 1×10^5 CFU/mL, 比单一荧光微球免疫层析检测法方法提高了 30 倍, 同时整个检测过程可在 2 h 内完成。

4.4 免疫磁珠分离技术结合酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种敏感性高、特异性强、重复性好的实验诊断方法。将抗原、抗体免疫反应的特异性和酶的高效催化作

用原理有机地结合起来, 可敏感地检测样品中的微量抗原。将 IMB 技术和 ELISA 技术相结合应用于致病菌检测中, 使检测更灵敏。

伍燕华等^[42]以抗沙门氏菌多克隆抗体和抗沙门氏菌单克隆抗体 C1359 建立了双抗夹心 ELISA 方法检测沙门氏菌, 5 种典型的沙门氏菌 A、B、C、D、E 可以被快速检测出来。该方法对沙门氏菌纯培养液的最低检测量为 1×10^4 CFU/mL。同时该方法对接种有 5 CFU/mL 沙门氏菌的牛奶样品进行了检测, 检验过程中联用免疫磁珠富集法, 样品在培养 8 h 后检出阳性结果。通过采用 VP 特异性抗体包被磁珠吸附分离, Seo 等^[43]将芯片 ELISA 法检测样品中 VP 的前增菌时间从 >24 h 缩至 <9 h, 实现在 1 个工作日内完成检验, 为及时处置染菌食品、防止其流通扩散发挥重要作用。Wang 等^[44]用免疫磁分离技术结合 ELISA 检测苹果汁中的脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus* spp.), 检测限为 10^3 CFU/mL。

4.5 免疫磁珠分离技术结合多种化学发光免疫分析技术

根据化学发光免疫分析体系中所选标记物的不同, 将化学发光免疫分析方法分为化学发光免疫分析、化学发光酶免疫分析及电化学发光免疫分析 3 大类。

Mendonca 等^[45]将免疫磁分离技术结合光纤免疫传感器用于单核细胞增生李斯特菌以及绵羊李斯特菌的检测, 其检测灵敏度为 3×10^2 CFU/mL。李智洋等^[46]用一种基于化学发光和磁性纳米颗粒的方法检测大肠杆菌 O157:H7, 其检测灵敏度为 10^3 CFU/mL, 检测时间约为 3 h。吴世嘉等^[47]分别以包被 VP 抗体的纳米磁珠和上转荧光颗粒为捕获、信号探针, 构建了“捕获探针-VP-信号探针”三明治结构式免疫识别及检测方法。通过荧光激发可实现 VP 的定性及定量检测, 灵敏度达 10^3 CFU/mL, 上转荧光强度与目标菌浓度在 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ CFU/mL 范围内呈良好线性关系。Afonso 等^[48]建立了一种用金纳米粒子为信号标记物的电化学检测沙门氏菌的方法。在试验中, 首先以免疫磁珠对样品中的沙门氏菌进行识别和富集, 形成了免疫磁珠免疫耦合沙门氏菌的复合物 MBs-pSAb/S, 同时金纳米粒子表面被修饰上沙门氏菌多克隆抗体 II 形成 sSAb-AuNPs, 修饰上抗体后的纳米金和 MBs-pSAb/S 发生抗原抗体反应形成 MBs-pSAb/S/sSAb-AuNPs 的三明治式的复合物, 将此复合物修饰到丝网印刷碳电极上, 用电化学示差脉冲法进行检测, 检测得到的电流值越大, 则样品中沙门氏菌的含量越大。该方法对沙门氏菌的检测限为 143 CFU/mL, 线性范围为 $10^3 \sim 10^6$ CFU/mL。

4.6 免疫磁珠分离技术结合红外和拉曼光谱技术

红外和拉曼散射已经用于完整细菌细胞的分类和鉴定。根据分子组成中化合物含量的不同, 每个分子都有一个完全的属于自己的特征光谱。已有学者将免疫磁珠分离

技术结合红外和拉曼散射来进行食源性致病菌的检测。

Najafi 等^[49]通过免疫磁珠分离技术结合表面增强拉曼光谱来检测苹果汁等液体介质中的大肠杆菌 O157。在 1 h 内便可完成大肠杆菌 O157 的检测, 检测限 10^2 CFU/mL。Davis 等^[50]通过傅里叶变换红外光谱和免疫磁珠分离技术来检测牛肉中的大肠杆菌 O157:H7。在细胞光谱采集前通过免疫磁珠分离技术来富集样品中的大肠杆菌 O157:H7, 通过 6 h 的前增菌, 该方法的检测限为 $10^1\sim 10^2$ CFU/g, 可用来快速检测复杂基质中的食源性致病菌。有研究者还将 IMS 技术与傅里叶变换红外分光镜(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)结合使用, 在免疫磁珠捕获样品中的沙门菌后转到疏水性网膜上, 真空干燥后采用 FT-IR 进行检测。结果显示, 结合磁珠的沙门菌具有特征性的红外光谱^[51]。

4.7 免疫磁珠分离技术结合流式细胞术

目前, 基于流式细胞术进行致病菌检测的报道多是通过流式细胞仪来实现的。流式细胞仪在检测食源性致病菌时多利用抗原抗体间的反应来实现对细菌特异性荧光染色, 即将细菌与标记有荧光染料的抗体混合进行反应, 反应结束后直接进行检测。而在此之前需对待测样品中的细菌进行分离培养, 这一过程可通过免疫磁珠的分离来实现。

Hibi 等^[52]将免疫磁珠分离技术和流式细胞术结合, 快速检测单核细胞增生李斯特菌。该方法的最佳检测范围是 $10^2\sim 10^8$ CFU/mL, 可以实现 1 min 对细胞进行计数, 总的检测时间少于 2 h。Ozawa 等^[53]利用流式细胞术和荧光活化细胞分选法, 发现当水样中大肠 O157:H7 大于 10 CFU/mL 时即可被检出。

5 展望

免疫磁珠分离技术操作简单, 只需在检测样品或者增菌液中加入免疫磁珠, 室温振荡混匀一定的时间后, 在磁场作用下反复用缓冲液洗涤即可, 捕获目标菌的免疫磁珠不用与目标菌分离便可直接进行后续实验。具有分离速度快、效率高、可重复性好、操作简单、不需要昂贵的仪器设备, 不影响被分离细胞或其它生物材料的生物学性状和功能等特点。目前, 该技术主要代替了常规的选择性增菌这一步骤, 而该技术与其他检测技术相结合, 在致病菌检测过程中可以发挥更大的作用。如与各类选择性培养基或显色培养基、PCR 等分子方法、免疫层析技术、酶联免疫吸附法、化学发光免疫分析技术、光谱分析法、流式细胞等技术相结合, 可提高分离效果和检出限。目前, 更多学者将免疫磁珠分离技术结合 2 种甚至多种检验方式来进行食源性致病菌的鉴定^[54-58], 在食源性致病菌检测中开辟了一条新思路。

但是, IMS 技术也有一定的局限性: 选择的抗原靶标

应具有较强的特异性, 能特异地富集目标菌, 避免富集到杂菌。因此, 免疫磁珠分离技术要在食源性致病菌检测领域得到迅速地发展, 必须筛选到致病菌的特异性抗体。目前, 市场上已有较成熟的商品化免疫磁珠。这些商品化的免疫磁珠具有较高的检测灵敏度和较广的检测范围, 操作简便, 深受广大科研工作者的喜爱, 但由于其价格昂贵, 也制约了其应用的广泛性。因此, 开发研究低价、高效的免疫磁珠是未来市场的发展趋势。

参考文献

- [1] 郭莺, 汪文华, 刘黎卿, 等. 甘蔗宿根矮化病多克隆抗体和免疫磁珠的制备[J]. 生物技术通报, 2018, 34(6): 79-83.
Guo Y, Wang WH, Liu LQ, et al. Preparation of polyclonal antibody against ratoon stunting disease and its immunomagnetic beads [J]. Biotechnol Bull, 2018, 34(6): 79-83.
- [2] 孙剑飞, 张宇, 杨芳, 等. 医药磁性氧化铁纳米材料的研究和发展[J]. 科学通报, 2019, 64(8): 842-853.
Sun JF, Zhang Y, Yang F, et al. Research and development of medical magnetic nanomaterials [J]. Chin Sci Bull, 2019, 64(8): 842-853.
- [3] 陈奇. 基于免疫磁分离及酶促反应的致病菌检测用生物传感器研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
Chen Q. Immunomagnetic separation and enzymatic reaction based biosensors for detection of foodborne bacteria [D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.
- [4] Gehring AG, Tu SI. High-throughput biosensors for multiplexed food-borne pathogen detection [J]. Anal Chem, 2011, 4: 151-172.
- [5] Chunglok W, Khownarumit P, Rijiravanich P, et al. Electrochemical immunoassay platform for high sensitivity protein detection based on redox-modified carbon nanotube labels [J]. Analyst, 2011, 136: 2969-2974.
- [6] Chan KY, Ye WW, Zhang Y, et al. Ultrasensitive detection of *E. coli* O157:H7 with biofunctional magnetic bead concentration via nanoporous membrane based electrochemical immunosensor [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 41: 532-537.
- [7] 金婷婷, 马福金, 袁耀武. 免疫捕获 LAMP 法快速检测大肠埃希氏 O157:H7 的研究[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 318-322.
Jin TT, Ma FJ, Yuan YW. Rapid detection of *E. coli* O157:H7 by immunocapture and loop-mediated isothermal amplification [J]. Food Sci Technol, 2013, 38(8): 318-322.
- [8] 张燕辉, 谢服役, 陈效黎. 基于量子点和磁珠的大肠埃希氏 O157:H7 检测研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(9): 1366-1368.
Zhang YH, Xie FY, Chen XL. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on quantum dot and magnetic bead [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(9): 1366-1368.
- [9] 高涛, 张丽萍, 魏雯, 等. 免疫磁珠富集-实时荧光 PCR 技术在食源性致病菌监测中的应用研究[J]. 医学动物防制, 2017, 33(1): 18-20.
Gao T, Zhang LP, Wei W, et al. Immunomagnetic enrichment real-time fluorescent PCR technology in the application of food borne pathogenic bacteria monitoring [J]. J Med Pest Control, 2017, 33(1): 18-20.
- [10] 童吉宇, 李志清, 闻一鸣, 等. 原核表达 MurA 蛋白并制备其多克隆抗

- 体用于免疫磁珠快速检测单增李斯特菌[J]. 微生物学通报, 2016, 41(6): 1234-1242.
- Tong JY, Li ZQ, Wen YM, *et al.* Prokaryotic expression of MurA protein and development of polyclonal antibody for rapid detecting *Listeria monocytogenes* using immunomagnetic beads [J]. Microbiol China, 2016, 41(6): 1234-1242.
- [11] 杨小鹏, 李海刚, 吴清平, 等. 免疫磁捕获-荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35(24): 79-83.
- Yang XJ, Li HG, Wu QP, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* in food by immunomagnetic separation-real-time PCR assay [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(24): 79-83.
- [12] Yuan JL, Tao Z, Yu Y. A visual detection method for *Salmonella Typhimurium* based on aptamer recognition and nanogold labeling [J]. Food Control, 2014, (37): 188-192.
- [13] 颜成英, 汤晓艳, 王敏, 等. 鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白提取及多抗制备[J]. 食品工业科技, 2014, 35(22): 176-178.
- Yan CY, Tang XY, Wang M, *et al.* Extraction of flagellin from *Salmonella typhimurium* and preparation of its polyclonal antibody [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(22): 176-178.
- [14] Kuang H, Cui G, Chen X, *et al.* A one-step homogeneous sandwich immunosensor for *Salmonella* detection based on magnetic nanoparticles(MNPs) and quantum dots (QDs) [J]. Int J Mol Sci, 2013, (14): 8603-8610.
- [15] 马凯, 高丽娟, 武会娟, 等. 基于免疫磁分离-双重荧光定量 PCR 的鲜猪肉中沙门氏菌和志贺氏菌的检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3373-3379.
- Ma K, Gao LJ, Wu HJ, *et al.* Detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in fresh pork using duplex real-time PCR based on immunemagnetic separation [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 3373-3379.
- [16] 白冰. 基于免疫纳米磁珠和量子点快速检测两种食源性致病菌方法的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- Bai B. Research of rapid detection method of two foodborne pathogens based on immunomagnetic nanobeads and quantum dots [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014.
- [17] 程晋霞, 曾静, 张西萌, 等. 海产品中霍乱弧菌免疫磁分离和环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 168-173.
- Cheng JX, Zeng J, Zhang XM, *et al.* A novel method of nano-immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification for detecting *Vibrio cholerae*s from seafoods [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, 15(2): 168-173.
- [18] 邓奕, 许迪莘, 赵琳娜, 等. 免疫磁珠捕获 PCR 检测牛奶中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(7): 304-307.
- Deng Y, Xu DX, Zhao LN, *et al.* Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of *Staphylococcus aureus* in milk [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(7): 304-307.
- [19] 吕观, 常彦磊, 石磊. 免疫磁珠-环介导等温扩增快速检测牛肉中的鼠伤寒沙门氏菌与金黄色葡萄球菌[J]. 肉类研究, 2019, 33(7): 42-48.
- Lv G, Chang YL, Shi L. Rapid detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in beef by immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification method [J]. Meat Res, 2019, 33(7): 42-48.
- [20] 张琨, 王伟华, 万一, 等. 基于顺磁微粒的金黄色葡萄球菌肠毒素 B 免疫层析试纸条的制备[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2016, 46(3): 403-407
- Zhang K, Wang WH, Wan Y, *et al.* Preparation of a rapid paramagnetic particles-based immunochromatographic test for staphylococcal enterotoxins B [J]. J Northwest Univ (Nat Sci Ed), 2016, 46(3): 403-407
- [21] 苏晨曦, 孙晓红, 卢瑛, 等. 副溶血性弧菌免疫磁珠的制备及其应用[J]. 食品工业科技, 2010, 33(17): 313-316.
- Su CX, Sun XH, Lu Y, *et al.* Preparation and application of *Vibrio parahaemolyticus* using immunomagnetic beads [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 33(17): 313-316.
- [22] Zeng J, Wei H, Zhang L, *et al.* Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification [J]. Int J Food Microbiol, 2014, (174): 123-128.
- [23] 李雨辰, 闻一鸣, 童吉宇, 等. 副溶血弧菌外膜蛋白 ompK 免疫磁珠检测方法的建立[J]. 生物技术通报, 2013, (6): 209-214.
- Li YC, Wen YM, Tong JY, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by outer membrane protein ompK immunomagnetic beads [J]. Biotechnol Bull, 2013, (6): 209-214.
- [24] 王壮, 欧瑜, 唐泰山, 等. 空肠弯曲菌免疫磁珠富集方法的建立[J]. 药物生物技术, 2014, 21(1): 43-47.
- Wang Z, Ou Y, Tang TS, *et al.* The method for enrichment of *Campylobacter Jejuni* based on immunomagnetic beads [J]. Pharm Biotechnol, 2014, 21(1): 43-47.
- [25] Wang H, Li YB, Slavik M. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry samples using quantum dots based fluorescent immunoassay coupled with magnetic immunoseparation [J]. Int J Poult Sci, 2014, (13): 611-618.
- [26] 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, 2013, 29(5): 672-680.
- Wen YM, Li ZQ, Tong JY, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by immunomagnetic separation combined with selective medium [J]. Chin J Biotechnol, 2013, 29(5): 672-680.
- [27] 郭瑛, 王爱媛, 杨维英, 等. 一种免疫磁珠结合优化选择性培养基的布鲁氏杆菌检验方法[J]. 农业与技术, 2016, 36(18): 30.
- Guo Y, Wang AY, Yang WY, *et al.* The invention relates to a method for testing *brucella* bacteria by immunomagnetic beads combined with optimized selective medium [J]. Agric Technol, 2016, 36(18): 30.
- [28] Tatavarthy A, Peak K, Veguilla W, *et al.* An accelerated method for isolation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* from artificially contaminated foods, using a short preenrichment, immunomagnetic separation, and xylose-lysine- desoxycholate agar (6IX method) [J]. J Food Prot, 2009, 72(3): 583-590.
- [29] Kanki M, Seto K, Kumeda Y. Simultaneous immunomagnetic separation method for the detection of *Escherichia coli* O26, O111, and O157 from food samples [J]. J Food Prot, 2014, 77(1): 15-22.
- [30] Kalchayanand N, Arthur TM, Bosilevac JM. Chromogenic agar medium for detection and isolation of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from fresh beef and cattle feces [J]. J Food Prot, 2013, 76(2): 192-199.

- [31] 李婧姮, 郭慧琴, 高晓强, 等. 免疫磁珠捕获 PCR 快速检测单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品科学, 2015, 36(12): 226–229.
Li JH, Guo HQ, Gao XQ, *et al.* Immunomagnetic capture PCR for rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Sci, 2015, 36(12): 226–229.
- [32] 张蕾, 曾静, 魏海燕, 等. 纳米免疫磁分离-实时荧光聚合酶链式反应快速检测海产品中副溶血性弧菌[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 107–110.
Zhang L, Zeng J, Wei HY, *et al.* A novel method of nano-immunomagnetic separation-real time-polymerase chain reaction for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods [J]. Food Sci, 2014, 35(4): 107–110.
- [33] 龙梦瑶, 蒋蔚, 陈永军, 等. 采用 IMS-RT-PCR 方法快速检测肉制品中大肠杆菌 O157[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(3): 68–76.
Long MY, Jiang W, Chen YJ, *et al.* Rapid detection of *Escherichia coli* O157 in meat products by immunomagnetic beads and real-time PCR [J]. Anim Husb Vet Med, 2018, 50(3): 68–76.
- [34] 白冰, 胡耀华, 李敏通, 等. 量子点免疫标记法检测福氏志贺氏菌[J]. 中国酿造, 2013, 32(11): 43–46.
Bai B, Hu YH, Li MT, *et al.* Quantum dots as fluorescent labels for detection of *Shigella flexneri* [J]. China Brew, 2013, 32(11): 43–46.
- [35] 白冰, 胡耀华, 李敏通, 等. 量子点免疫标记法同时检测 2 种食源性致病菌[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 219–225.
Bai B, Hu YH, Li MT, *et al.* Simultaneous detection of two foodborne pathogens using quantum dots as fluorescence labels [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(1): 219–225.
- [36] Wang H, Li YB, Slavik MF. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in different food samples using magnetic nanobeads and a quantum dots based fluorescent immunosensor method [J]. Biol Eng, 2011, 4(4): 183–194.
- [37] Wang H, Li YB, Wang A, *et al.* Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay [J]. J Food Protect, 2011, 74(12): 2039–2047.
- [38] Hu YH, Wang CC, Bai B, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* using quantum dots as fluorescence labels [J]. Int J Agric Biol Eng, 2014, 7(1): 77–83.
- [39] 崔希, 熊齐荣, 熊勇, 等. 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]. 分析化学, 2013, 41(12): 1812–1816.
Cui X, Xiong QR, Xiong YH, *et al.* Establishment of a method combined immunomagnetic separation with colloidal gold lateral flow assay and its application in rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(12): 1812–1816.
- [40] 王报贵, 王广峰, 武晓丽, 等. 副溶血弧菌胶体金检测试纸条的改进[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 57–65.
Wang BG, Wang GF, Wu XL, *et al.* Improvement of colloidal gold based immunochromatographic strip test for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(10): 57–65.
- [41] 李倩茹, 胡霏, 杨悦熙, 等. 基于荧光微球的免疫层析法结合免疫磁珠分离技术快速定量检测鼠伤寒沙门氏菌[J]. 现代食品科技, 2018, 34(3): 196–202.
Li QR, Hu F, Yang YX, *et al.* Rapid and quantitative detection of *Salmonella typhimurium* by immunomagnetic separation method coupled with immunochromatography assay based on fluorescence microsphere [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(3): 196–202.
- [42] 伍燕华, 牛瑞江, 赖卫华, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附法检测沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 62–65.
Wu YN, Niu RJ, Lai WH, *et al.* Detection of *Salmonella* by double antibody sandwich ELISA [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(10): 62–65.
- [43] Seo SM, Cho IH, Jeon JW, *et al.* An ELISA-on-a-chip biosensor system coupled with immunomagnetic separation for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* within a single working day [J]. J Food Prot, 2010, 73(8): 1466–1473.
- [44] Wang ZL, Yue TL, Yuan YH, *et al.* Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 166(1): 28–33.
- [45] Mendonca M, Conrad NL, Conceicao FR, *et al.* Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 275.
- [46] 李智洋, 何磊, 何农跃, 等. 一种实用的基于化学发光和磁性纳米颗粒的 *E. coli* O157: H7 免疫鉴定方法[J]. 化学学报, 2010, 68(3): 251–256.
Li ZY, He L, He NY, *et al.* An applied approach in detecting *E. coli* O157: H7 using immunological method based on chemiluminescence and magnetic nanoparticles [J]. Acta Chim Sin, 2010, 68(3): 251–256.
- [47] 吴世嘉, 王艳, 段诺, 等. 基于磁分离-上转换荧光标记的副溶血性弧菌免疫检测新方法研究[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(7): 682–689.
Wu SJ, Wang Y, Duan N, *et al.* Novel immunodetection method for *Vibrio parahaemolyticus* based on magnetic separation and upconversion nanoparticles labeling [J]. J Food Sci Biotechnol, 2014, 33(7): 682–689.
- [48] Afonso AS, Briza PL, Faria RC, *et al.* Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 40: 121–126.
- [49] Najafi R, Mukherjee S, Hudson J, *et al.* Development of a rapid capture-cum-detection method for *Escherichia coli* O157 from apple juice comprising nano-immunomagnetic separation in tandem with surface enhanced Raman scattering [J]. Int J Food Microbiol, 2014, (189): 89–97.
- [50] Davis RI, Joseph R, Bradley L, *et al.* Detection of *E. coli* O157: H7 from ground beef using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics [J]. J Food Sci, 2010, 75(6): 340–346.
- [51] De-Lamo C, Manning A, Rodriguez-Saona LE. Fourier-transform infrared spectroscopy combined with immunomagnetic separation as a tool to discriminate *Salmonella* serovars [J]. Analyst, 2010, 135 (11): 2987–2992.
- [52] Hibi K, Abe A, Ohashi E, *et al.* Combination of immunomagnetic separation with flow cytometry for detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Anal Chim Acta, 2006, (573-574): 158–163.
- [53] Ozawa S, Okabe S, Ishii S. Cell Isolation of *Escherichia coli* O157 from environmental water samples by using flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting [J]. Foodborne Pathog Dis, 2016, 13(8): 456–461.
- [54] Taha EG, Mohamed A, Srivastava KK, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* in chicken meat using immunomagnetic separation, CHROMagar, ELISA and realtime polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Int J Poultry Sci, 2010, 9(9): 831–835.

- [55] 许海波, 魏华, 王报贵. 利用双标记 PCR 产物的量子点检测副溶血性弧菌[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 283-287.
Xu HB, Wei H, Wang BG. Development of quantum dot by double labeling PCR products for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Ind, 2015, 36(6): 283-287.
- [56] Hara K Y, Konishi N, Ohtsuka K, *et al.* An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 2(230): 81-88.
- [57] Delbeke S, Ceuppens S, Holvoet K, *et al.* Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella Thompson* in strawberries, a lettuce mix and basil [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 16(193): 1-7.
- [58] 王报贵, 武晓丽, 董素琴, 等. 副溶血弧菌的磁珠捕获及检测[J]. 食品

工业科技, 2013, 34(13): 147-152.

Wang BG, Wu XL, Dong SQ, *et al.* Bead capture and detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 147-152.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



林吉恒, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、药品、化妆品微生物检验。

E-mail: 83270685@qq.com.



“功能性食品微生物”专题征稿函

随着经济的发展和人们生活水平的不断提高, 人们对食品的要求已从单纯的温饱转向了“功能、营养和健康”的新要求; 膳食结构和组成是影响健康和疾病发生的重要因素, 在人们多年以来追求中医、西医或中西医结合预防和治疗疾病模式外, 渐渐转“医补”为“食疗”, 期望利用食品的功能性达到促进健康和干预疾病的目的。因此, 以功能性食品微生物为核心的功能性食品如益生菌、乳酸菌、微生物源 PUFA、红曲等已逐渐深入人心, 这也推动了功能性食品微生物资源开发与应用的发展。在 21 世纪生物技术大发展的时代背景下, 利用食品微生物的特定功能性质, 开发系列健康的功能食品成为重要的发展趋势。目前, 以功能性微生物为核心的技术与产品已广泛用于食品、保健品、医药和饲料行业, 应用前景十分广阔。

功能性食品微生物是一类通过菌体细胞或代谢产物能够赋予食品具有特定功能性质、或者显著改进和优化食品制造工艺的微生物。鉴于此, 本刊特别策划了“功能性食品微生物”专题, 由江南大学食品学院的 **田丰伟 教授** 担任专题主编, 围绕 **(1) 功能性食品微生物的资源发掘、高效筛选、分离鉴定, (2) 功能性食品微生物的生物性质、功能机理与作用机制, (3) 基于功能性食品微生物的食品生物加工与制造的基础和应用研究, (4) 功能性食品微生物的评价与优化方面** 或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2019 年 12 月份出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编 **吴永宁 研究员** 及专题主编 **田丰伟 教授** 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2019 年 11 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与与支持!

投稿方式: (请注明功能性食品微生物专题)

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部