

# 食源性病原微生物快速检验技术的应用 与研究进展

李慧琴\*, 黄亚娟

(广州市食品检验所, 广州 511400)

**摘要:** 食源性病原微生物是食品安全控制的主要因子, 随着国家对食品安全的重视, 不断加大对食品检测的力度, 将食品风险监测、监督及保障性抽检作为食品安全保障的重要手段, 对食品快速检验技术需求日益增强, 快速检验技术具有时效性强、操作便捷、检验成本低的特点, 但微生物的检验专业特点限制了快检技术的开发与应用。本研究根据目前微生物最新快速检验技术的研究及实际应用, 主要论述了免疫胶体金技术、免疫磁珠技术、基于核酸扩增的微流控技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术的研究进展和应用, 总结了各种技术开发和改进的内容和方向, 以及应用的范围拓展和存在的问题。

**关键词:** 食源性; 病原微生物; 快速检验技术

## Application and research progresses of rapid detection technology for foodborne pathogenic microorganism

LI Hui-Qin\*, HUANG Ya-Juan

(Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 511400, China)

**ABSTRACT:** Foodborne pathogenic microorganisms are the main factors of food safety control. With the emphasis on food safety in the country, the intensity of food testing is continuously increased. Food risk monitoring, supervision and safeguard sampling are important means of food safety. The demand for rapid inspection technology is increasing. The rapid inspection technology has the characteristics of strong timeliness, convenient operation and low inspection cost. However, the professional characteristics of microbial inspection limit the development and application of rapid inspection technology. Based on the current research and practical application of the latest rapid detection technology of microorganisms, this paper mainly discussed the research progress and application of the immunocolloid gold technology, the immunomagnetic bead technology, the microfluidic technology based on nucleic acid amplification, and the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology, summarized the contents and directions of various technology development and improvement as well as the application scope expansion and existing problems.

**KEY WORDS:** foodborne; pathogenic microorganism; rapid detection technology

\*通讯作者: 李慧琴, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检验技术。E-mail: muqinhuizi@163.com

\*Corresponding author: LI Hui-Qin, Master, Engineer, Guangzhou Institute for Food Inspection, NO.53, Jiejn 2 Road, Shiqiao Street, Panyu District, Guangzhou 511400, China. E-mail: muqinhuizi@163.com

## 1 引言

食源性病原微生物是影响食品质量与安全的首要因素,在国内外食品生产加工、流通、餐饮环节安全控制上一直占据主要的位置。尤其是食源性中毒事件的爆发,往往是食源性病原微生物引起的群体事件,影响范围广,造成的损失大,且很难进行预判。世界卫生组织提供的数据指出,每年超过 300 万的 5 岁以下儿童会由于食源性疾病导致的腹泻而丧命<sup>[1]</sup>。而据我国卫生监督部门统计,我国每年发生的食物中毒事件中,由微生物引起的中毒人数最多<sup>[2]</sup>,因此,由食源性病原微生物引起的食源性疾病构成了一个巨大并不断扩大的世界性公共卫生问题,如何快速准确、灵敏地检测出食源性病原微生物的存在已成为控制食品安全问题的关键。

食源性病原微生物的检测,需要对样品进行增菌,并通过选择性培养进行筛选,才能够有效提高检测的灵敏度和可靠性,这也是制约微生物快速检验技术发展的因素之一,目前检验前期对微生物富集和筛选步骤一般需 8~48 h,占用较长的时间,怎样提高技术的灵敏度,通过较短的增菌时间,达到检测的目的,是目前快检方法的一个研究方向;另外,常规方法对不同微生物检测需要不同的增菌方法,使得检测工作量大大增加,检测效率不高,快检技术需要解决样品基质干扰及样品中非优势菌的检验问题。近年来,食源性致病菌的检测相关技术得到了飞速发展,经历了从生化检测、免疫学、分子生物学到质谱分析检测几个阶段,朝着快速、高通量、特异性强、准确度高的方向发展。

目前已经开发使用的病原微生物快速检测方法,主要有以下几大类,(1)以免疫学为基础的酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)技术、免疫磁珠技术、免疫荧光技术、免疫胶体金技术等;(2)以分子生物学为基础的 PCR 技术、DNA 指纹图谱技术、基因芯片技术等;(3)电化学与微量生化法;(4)以纸片法为代表的细菌代谢为基础的酶触反应技术等;(5)以蛋白质为检测对象的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)检测技术,这些快速检测方法能够大大提高病原微生物的检验效率。本文就目前微生物最新快速检验技术的研究和应用热点,主要从免疫胶体金技术、免疫磁珠技术、基于核酸扩增的微流控技术、MALDI-TOF-MS 质谱技术的研究进展和应用进行论述,加快食源性病原微生物快速检测新技术在食品安全各种检测活动中推广应用。

## 2 免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是一种以胶体金作为标记物参与的

免疫学检测技术,它是 20 世纪 90 年代以来在 ELISA、免疫层析技术、单克隆抗体技术和乳胶凝集试验等技术基础上发展起来的一种新型体外快速诊断方法<sup>[3,4]</sup>。胶体金技术具有灵敏度高、快速、操作简单、不需要仪器、成本低等优点,在食品安全领域已被广泛应用于农药、兽药、添加剂、真菌毒素检测<sup>[5-9]</sup>,在目前微生物检测中,应用范围较窄,主要涉及到检测灵敏度和选用抗体特异性问题,一般灵敏度不高于  $10^6$  CFU/mL<sup>[10]</sup>,但是,一些高致病性的病原微生物比如沙门氏菌、单增李斯特氏菌、大肠杆菌 O157 等是不允许检出的,此方法不能带来实际的应用价值。

目前,有研究采用分子生物学技术结合免疫技术开发 PCR-免疫胶体金技术<sup>[11]</sup>,能够提高检测灵敏度和特异性。刘志科等通过采用 PCR 方法扩增得到目标微生物鸡白痢沙门氏菌 *invA* 基因,并在大肠杆菌中表达,获得了目标微生物菌种特异性的 *invA* 融合蛋白,作为检测抗体的标记物<sup>[12]</sup>,这种标记物的制备方法能够大大提升检测的特异性,降低假阳性率;在此基础上进一步发展了生物胶体金银染技术<sup>[13]</sup>,设计与目标微生物沙门菌 *invA* 基因,大肠杆菌 *uidA* 基因 5'端和 3'端互补的巯基化探针和氨基化探针以及靶探针,氨基化探针连接醛基化玻片,并与提取的靶 DNA 或靶探针互补连接,靶 DNA 或靶探针另一端再与巯基化探针连接形成复合结构,利用胶体金生物亲和性好的特点,使胶体金和巯基化探针连接,银染放大信号,有效检测目标微生物的灵敏度和特异性,该技术可以发展为 DNA 芯片,实现高通量检测。

## 3 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠分离技术(immunomagnetic beads separation techniques, IMBS)属于生物亲和技术,是利用抗原抗体的特异性反应和磁珠的磁响应性相结合进行分离富集的一项技术,是一种简单有效的核酸提纯方法,它具有特异性强、灵敏度高、分离速度快的特点<sup>[14]</sup>,解决了传统的致病性微生物检测过程中食品成分复杂、微生物菌群多样化带来的难分离、基质干扰大等问题,同时解决了不可培养状态微生物富集分离检测问题,并能够极大地缩短检测的时间,提高微生物快检技术的应用可行性,在微生物快检技术开发中占据重要的部分。

Ugelstad<sup>[15]</sup>于 1979 年成功地制备了一种均匀性和粒度适宜的聚苯乙烯微球,将其磁化并与抗体连接后,即成为一种分离细胞效果极佳的免疫磁珠。随着材料科学发展进步及其与他多学科的交叉利用,使得免疫磁珠技术应用有了飞跃的发展。例如,免疫磁珠分离技术结合免疫荧光技术对病原微生物进行检测<sup>[16]</sup>,能够实现快速特异性富集并有可视化的反应结果;免疫磁珠分离技术与电化学技术相结合,检测时间与细菌细胞浓度成线性关系,通过电化学技术对食源性致病菌进行实时检测<sup>[17]</sup>;免疫磁珠技术与

PCR、Real-time PCR 技术结合<sup>[18-20]</sup>, 能够降低基质干扰, 在较短时间内检出目标微生物, 提高 PCR 快速检测技术的灵敏度和特异性, 实现高通量快速检测; 免疫磁珠技术和 ATP(三磷酸腺苷)发光技术联合用于食品致病微生物检测<sup>[21]</sup>, 不仅可大大缩短检测周期, 还可提高检测的敏感性和特异性。免疫磁珠技术结合其他检测技术应用于食源性病原微生物的检测, 具有推广应用前景。

IMBS 技术的关键点在于合成磁珠的大小及磁珠上包被抗体的种类及稳定性, 因此, 在技术开发上, 重点针对磁珠材料及抗体的种类进行研究。纳米磁珠的质量影响检测结果, 其制备难度大, 开发高质量的纳米磁珠是 IMBS 技术研究的重点之一。在抗体制备上, 将针对特定病原微生物的多抗或单抗偶联到磁珠微球体上, 将该修饰后的磁珠与待检标本混合后, 通过抗原抗体反应, 将目标微生物分离出来。因此, 筛选到致病菌的特异性抗原靶标是 IMBS 技术在食源性病原微生物免疫检测中应用的一个关键。但因食品基质复杂, 微生物菌群复杂多样, 对于抗体的干扰较大, 选择的抗原靶标不特异, 将导致富集到很多杂菌, 无法正确检测到目标菌, 富集到杂菌将会抑制目标菌的生长, 也导致无法正确检测到目标菌, 目前的技术产品通用性较差, 在复杂食品样品微生物的检测中, 灵敏度较低, 稳定性较差, 因此, 找到合适的特异性较高的抗原靶标, 使用多种单克隆抗体技术或结合其他新技术是未来 IMBS 研究的重点方向。

#### 4 基于核酸扩增的微流控技术

微流控芯片技术是通过生物学、化学、医学、电子、材料、机械等多学科交叉, 将分子生物学、化学分析、医学等领域所涉及的样品前处理、分离及检测等过程集成到几平方厘米的芯片上, 从而实现从样品前处理到后续分析的微型化、自动化、集成化和便携化的技术, 具有样品消耗少、检测速度快、操作简便、多功能集成、体积小和便于携带等优点, 已在多个领域得到应用<sup>[22]</sup>。环介导恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种全新的核酸扩增方法, 原理是针对靶基因上的 6 个区域设计 4 条引物, 利用链置换型 DNA 聚合酶在恒温条件下进行扩增反应, 可肉眼直接观察反应结果, 具有简单、快速、特异性强的特点, 在食源性病原微生物检测上已经得到广泛的应用<sup>[22]</sup>。

集成微流控芯片技术和 LAMP 技术各有优点, 将 2 个技术结合应用是目前研究的热点<sup>[23,24]</sup>。将 LAMP 反应体系集成到芯片上, 建立了常见食源性致病菌基于 LAMP 微流控芯片的检测技术, 该技术将引物冻干后固化到芯片上, 制成 LAMP 微流控芯片, 选择合适的 LAMP 反应体系, 添加显色剂, 加入芯片中, 反应结果通过肉眼或仪器判读,

形成恒温微流控检测系统, 在病原微生物检测中进行应用。同时在研究微流控芯片的基础上, 改变核酸扩增及相应的条件, 可以提高检测的准确性, 比如: 将光学传感器和 LAMP 微流控系统结合<sup>[25]</sup>, 提高了检测的灵敏度; 利用荧光嵌合染料检测产物也开发出多种 LAMP 微流控芯片<sup>[26]</sup>, 针对 SYBR Green 染料检测 LAMP 反应产物时会存在弱阳性难以鉴别的问题, 优选其他染料与 SYBR Green 混合, 对微流控芯片内的 LAMP 产物进行指示, 显著提升了检测结果的准确率。

另外, 结合数字 PCR 技术, 开发出可定量检测的 LAMP 微流控芯片<sup>[27]</sup>, 同时实现精确定量和高通量检测的目的, 但开发的难度很高, 微液滴的制备需要十分精密的进样装置与设备, 增加了芯片的设计难度和操作要求。有研究通过对 PDMS(聚二甲基硅氧烷)表面的亲水性改性实现了反应体系的自动流入, 待体系完全进入芯片之后, 配合独特设计的气动微阀可将芯片分隔为一个一个封闭的反应单元, 构成微阵列芯片, 实现数字化 LAMP 检测<sup>[28]</sup>。如何将微滴生成与微滴进入反应通道效率而不影响检测结果、设计制作反应单元数目更多的数字化 LAMP 芯片是定量微流控检测技术灵敏度和准确性的关键技术难题。

微流控芯片的研究、应用及产业化是当前研究的热点, 作为微流控系统的核心, 微流控芯片的设计、材料选择、表面处理、芯片加工, 都存在相当大的技术难度。但微流控芯片具有检测的多方面的优点, 研究将分子生物学最新发展技术, 使用微流控技术平台, 建立新型的检测技术, 可同时检测多种病原微生物或同时检测多种样品的同一微生物, 实现高通量快速检测目的。

#### 5 飞行时间质谱技术

20 世纪 70 年代, Anhalt 和 Fenselau 在 300~350 °C 下高温裂解冻干细菌, 采用质谱技术对肠杆菌科微生物进行分析鉴定, 奠定了质谱技术鉴定致病菌的基础<sup>[29]</sup>。目前对于细菌检测, 发展和使用的主要是基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser analytical ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 其原理是每一种微生物都有其特征的蛋白质指纹图谱, 细菌蛋白质与基质结合后, 通过激光电离提取总蛋白, 并通过检测器进行捕获, 根据不同分子量的蛋白质通过飞行管的时间不同进行分离和定性分析, 详见图 1<sup>[29]</sup>。

样品预处理简单, 可选取直接涂抹法, 使用纯菌落上靶板, 或采用甲酸萃取法提取蛋白后上靶板, 获得高质量的质谱图, 无需对样品预先评估, 实现快速、高通量检测, 且成本低廉、结果准确, 分辨率更高(可区分同一菌种的不同菌株), 简单易用。具体检测流程见图 2<sup>[29]</sup>。

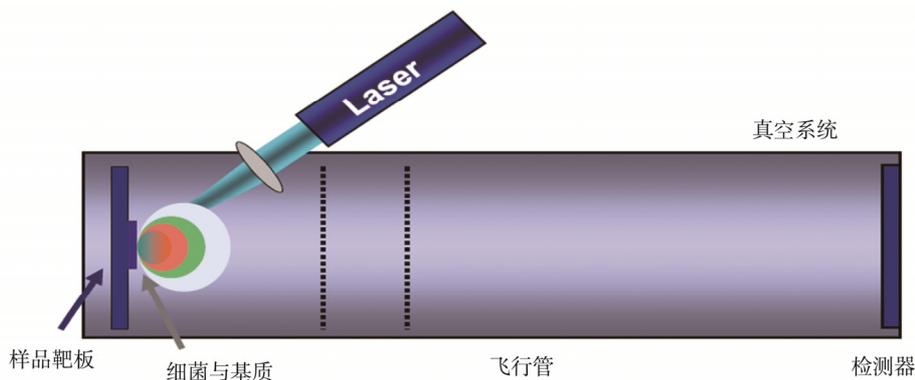


图 1 MALDI-TOF-MS 微生物检测原理

Fig.1 Principles of MALDI-TOF-MS in microbiological detection

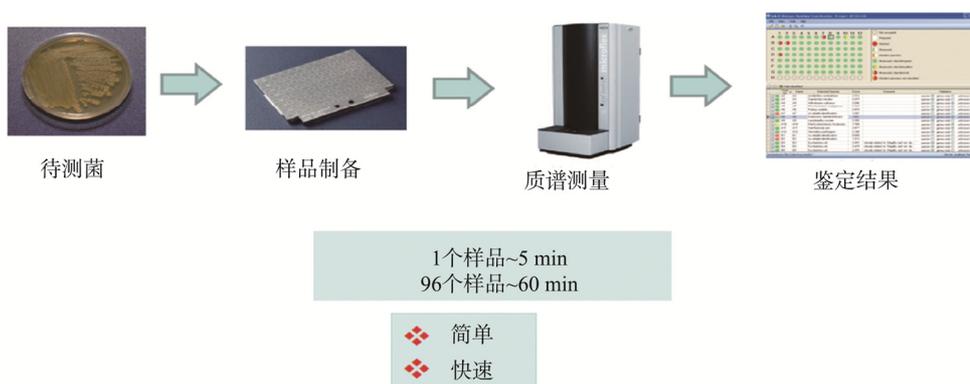


图 2 MALDI-TOF-MS 微生物样品处理检测流程

Fig.2 Process of MALDI-TOF-MS in microbiological detection

MALDI-TOF-MS 在病原微生物的鉴定中已经得到广泛的应用和技术开发,该方法相对于传统生化鉴定方法,分析时间短,可实现高通量检测,相对于分子生物学鉴定,试验成本较低。最新研究使用 MALDI-TOF-MS 技术鉴定艰难梭状芽胞杆菌<sup>[30]</sup>,建立了特异性的离子峰鉴别系列(2691.43、2704.91、2711.93、3247.27、3290.76 Da);对堪萨斯分枝杆菌<sup>[31]</sup>进行鉴定和分型,能够准确鉴定堪萨斯分枝杆菌I-VI基因型;通过补充数据库,能够准确鉴定曲霉及常见菌种和隐匿菌种<sup>[32]</sup>。对我国常见食品监控的病原微生物铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌、克罗诺杆菌、沙门氏菌、大肠埃希氏菌、产气荚膜梭菌、空肠弯曲菌及李斯特氏菌等食源性致病菌的快速鉴定进行方法研究,建立了相应的检测数据库,为微生物的快速准确鉴定提供了一种新的技术方法<sup>[33-38]</sup>。但由于微生物蛋白质的信息量大,细菌蛋白质表达存在一些不确定性,对于微生物的溯源分型存在一些困难,需要采用更多的分析手段,建立准确的数据库,满足准确分型的应用,目前一些研究者主要针对微生物的溯源分型开展了相应的研究,主要是补充数据,开展基础的研究。除此之外,研究者重点对微生物的培养基、培养状态、菌体前处理、上样量等方面进行 MALDI-TOF-

MS 操作和技术方法的研究,获得了相应的最适合检测的优化条件<sup>[39]</sup>;对上机测试的靶板进行研究,获得成本低、可替代的一次性纸靶板,节省了检测洗靶的时间<sup>[40]</sup>;在不进行前处理的情况下,直接对血流感染的病原菌进行鉴定<sup>[41]</sup>。

另外,通过 MALDI-TOF-MS 技术与其他技术结合,能够提高检测的准确性及拓宽检测使用范围。有研究使用 MALDI-TOF-MS 蛋白质分析技术与代谢产物分析快速对细菌功能进行研究<sup>[42]</sup>。通过 N-烷基吡啶同位素季铵化反应结合 MALDI-TOF MS 对中药材的霉变情况进行了快速鉴定<sup>[43]</sup>,通过对还原糖进行吉腊德试剂 T 衍生化,提高 MALDI-TOF MS 糖组学分析灵敏度<sup>[44]</sup>。采用纳米磁珠联合 MALDI-TOF-MS 技术开展微量蛋白筛选和检测<sup>[45]</sup>。

除了对微生物的鉴定分型外,采用 MALDI-TOF-MS 研究了耐药性微生物的产毒毒素分析、耐药机制及对耐药性的病原微生物检测<sup>[46-48]</sup>,证实了能够依据质谱技术开展耐药性及微生物产毒的研究。同时, MALDI-TOF-MS 技术还可应用于鉴别牛乳脂肪甘油三酯种类<sup>[49]</sup>,通过与苾连接的肽探针 MALDI-TOF-MS 定量检测蛋白酶的活性<sup>[50]</sup>,应用在寄生虫鉴定<sup>[51]</sup>、中草药鉴别<sup>[52]</sup>、羊绒掺假、牛奶掺假及植物油掺假等方面。

目前基于 MALDI-TOF-MS 技术对病原微生物的检测, 还未形成相应的检测标准, 但由于其快速、试剂耗材成本低、操作简单等优点, 未来在微生物的鉴定中将会起到重要作用。但由于一些菌属的蛋白质水平差异不明显, 较难获得准确的鉴定结果, 比如: 李斯特菌属和芽胞杆菌属, 较难获得单增李斯特氏菌和蜡样芽胞杆菌的准确检验结果, 需要进一步的研究或使用二级质谱进行蛋白质的细分, 当然需要更加优良的分析系统和软件支撑。另外, 对于各种常见食源性病原微生物的溯源分型, 仍需要进一步补充数据库, 对原有的数据库进行优化。

## 6 总结与展望

微生物快速检测方法由于其专业的局限性, 需要增菌培养、需要无菌操作, 因此, 不如农兽药残留、真菌毒素、食品添加剂、非法添加物等指标的快速检测方法应用广泛。但近年来, 多学科的交汇和发展、食品检验体量的增加、各种会议保障的需求等因素, 促进了对食源性病原微生物检验技术方法的开发。通过对原有技术的改进和创新, 提高了检验技术的准确性, 解决了部分专业局限性的问题, 对其快速检测技术的发展和应用提供了机遇, 比如分子生物学技术的飞速发展带来的高通量及绝对定量的检测分析技术、以蛋白质组学为基础的飞行质谱技术的发展和应用及胶体金技术与多学科的结合等, 这些技术虽然还存在各方面的不足, 需要进一步的研究改进和拓展, 但对于未来食源性病原微生物的快速检测分析将起到非常重要的引领作用。

## 参考文献

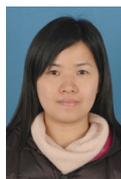
- [1] 赵彤. 食源性致病菌检测现状与食品微生物危险性评估[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(4): 7-9.  
Zhao T. Detection status of foodborne pathogenic bacteria and food microbial risk assessment [J]. China Health Stand Manag, 2019, 10(4): 7-9.
- [2] 国家卫生计生委办公厅关于 2015 年全国食物中毒事件情况的通报[Z]. 国卫办应急发, 2016, 5 号.  
The national notification of Food poisoning in 2015 [Z]. The Office of National Health and Family Planning Commission, 2016, NO. 5.
- [3] 贺昕, 熊晓东, 梁敬博, 等. 免疫检测用纳米胶体金的制备及粒径控制[J]. 稀有金属, 2005, (4): 471-474.  
He X, Xiong XD, Liang JB, et al. Preparation of colloidal gold used in immunoassay and control of particle size [J]. Chin J Rare Met, 2005, (4): 471-474.
- [4] 吴皎, 刘亚刚, 贾清, 等. 免疫胶体金技术在畜禽疫病检测中的应用和研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2005, 31(增刊 1): 46-49.  
Wu J, Liu YG, Jia Q, et al. Application and research progress of the immune colloidal gold technique in domestic animal and birds disease examine [J]. J Southwest Minzu Univ (Nat Sci Ed), 2005, 31(s): 46-49.
- [5] 李淑群, 曹碧云, 常化仿, 等. 胶体金免疫层析法快速检测牛奶、奶粉、饲料中的三聚氰胺[J]. 分析化学, 2013, (7): 1025-1030.  
Li SQ, Cao BY, Chang HF, et al. A colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of melamine in milk, milk powder and animal feeds [J]. Chin J Anal Chem, 2013, (7): 1025-1030.
- [6] 李翹, 桑丽雅, 陈笑笑, 等. 玉米赤霉烯酮胶体金快速检测试剂板的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, (2): 457-462.  
Li Q, Sang LY, Cheng XX, et al. Development of colloidal gold rapid test strip for zearalenone in grain [J]. J Food Saf Qual, 2013, (2): 457-462.
- [7] 谢瑜杰, 呼秀智, 孙晓铮, 等. 胶体金免疫层析技术在水产品磺胺类药物残留检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, (2): 375-379.  
Xie YJ, Hu XZ, Sun XZ, et al. Research progress of application of colloidal gold assay in determination of sulfonamides residues in aquatic products [J]. J Food Saf Qual, 2017, (2): 375-379.
- [8] Liu LQ, Chen YN, Song SS. Development of an antibody-based colloidal gold immunochromatographic lateral flow strip test for natamycin in milk and yoghurt samples [J]. Food Agric Immunol, 2017, 28(6): 1283-1292.
- [9] 施海燕, 盛恩泽, 马明, 等. 氯噻唑胶体金增强免疫层析分析方法的建立[J]. 分析化学, 2017, (3): 403-408.  
Shi HY, Sheng EZ, Ma M, et al. Development of an enhanced colloidal gold immunochromatographic assay for detection of imidaclothiz [J]. Chin J Anal Chem, 2017, (3): 403-408.
- [10] 王中民, 李君文, 王新为, 等. 胶体金免疫层析法快速检测沙门氏菌[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 32(4): 36-38.  
Wang ZM, Li JW, Wang XW, et al. Detection of *Salmonella* by using gold-immunochromatography [J]. Prog Microbiol Immunol, 2014, 32(4): 36-38.
- [11] 庞璐, 宋喆, 吴冬雪, 等. 食品中单增李斯特氏菌检测 PCR-免疫胶体金试纸条方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 452-456.  
Pang L, Song Z, Wu DX, et al. PCR-immunogold method for detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(2): 452-456.
- [12] 刘志科, 杨宁宁, 徐明国, 等. 鸡白痢沙门氏菌胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制及初步应用[J]. 河南科技学院学报, 2018, 46(1): 40-48.  
Liu ZK, Yang NN, Xu MG, et al. Development and primary application of colloidal gold immunochromatography test strip for rapid detection of *Salmonella pullorum* [J]. J Henan Instit Sci Technol (Nat Sci Ed), 2018, 46(1): 40-48.
- [13] 马生龙, 李云霞, 马莉萍, 等. 2 种食源性微生物胶体金银染技术的检测方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(4): 385-388.  
Ma SL, Li YX, Ma LP, et al. Study on the detection of two kinds of food borne microorganisms by colloidal gold and silver staining [J]. Chin J Health Lab Technol, 2018, 28(4): 385-388.
- [14] 刘细霞, 涂俊铭. 免疫磁珠分离技术及其在食源性致病菌检测中的应用的进展[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(12): 956-960.  
Liu XX, Tu JM. Immunomagnetic beads separation techniques and its application progress in detection of food borne pathogens [J]. Chin J Antibiot, 2014, 39(12): 956-960.
- [15] Ugelstad A. process for preparing aqueous emulsion or dispersion of a partly water-soluble material and use of polymer particles prepared according to this process as a toner in xerography: European, 0003905 [P]. 1979-09-05.
- [16] Zhu PX, Shelton DR, Li SH, et al. Detection of *E. Coli O157: H7* by

- immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 30(1): 337–341.
- [17] Yang LJ, Li YB. Detection of viable *Salmonella* using microelectrode-based capacitance measurement coupled with immunomagnetic separation [J]. *J Microbiol Meth*, 2006, 64(1): 9–16.
- [18] Hudson JA, Lake RJ, Savill MG, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in hair samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction [J]. *Appl Microbiol*, 2001, 90(4): 614–621.
- [19] Bakthavathsalam P, Rajendran VK, Saran U, *et al.* Immunomagnetic nanoparticle based quantitative PCR for rapid detection of *Salmonella* [J]. *Microchim Acta*, 2013, 180: 1241–1248.
- [20] 杨柳, 苏明权, 马越云, 等. 免疫磁珠与荧光定量 PCR 联合检测乳制品中阪崎肠杆菌的实验研究 [J]. *现代预防医学*, 2011, 38(6): 1086–1089.
- Yang L, Su MQ, Ma YY, *et al.* Rapid detection of *enterobacter sakazakii* in dairy using immunomagnetic bead combined with real time fluorescence quantitative PCR [J]. *Mod Prev Med*, 2011, 38 (6): 1086–1089.
- [21] 寇晓晶, 高峰, 谢春. 3 种食源性细菌免疫磁珠联合 ATP 发光检测技术研究 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(1): 85–91.
- Kou XJ, Gao F, Xie C. Development of a technology of immunomagnetic beads combined with ATP chemiluminescence for detection of three kinds of foodborne bacteria [J]. *China Anim Health Inspect*, 2019, 36(1): 85–91.
- [22] 孙薇, 陆敏, 李立. 微流控芯片技术应用进展 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2019, 42(3): 221–224.
- Sun W, Lu M, Li L. Application progress on microfluidic chip technology [J]. *Chin Front Health Quarant*, 2019, 42(3): 221–224.
- [23] 鞠鹤鹏, 戴菁, 谢逸欣. LAMP 微流控芯片快速检测三种食源性致病菌 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2018, 36(3): 309–312.
- Ju HP, Dai J, Xie YX. Quick detection of three food-borne pathogens by LAMP micro fluidic chip [J]. *J Prev Med Chin PLA*, 2018, 36(3): 309–312.
- [24] Xia Y, Liu Z, Yan S, *et al.* Identifying multiple bacterial pathogens by loop-mediated isothermal amplification on a rotate & react slip chip [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2016, (228): 491–499.
- [25] Fang X, Liu Y, Kong J, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(7): 3002–3006.
- [26] Pang B, Fu K, Liu Y, *et al.* Development of a self-priming PDMS/paper hybrid microfluidic chip using mixed-dye-loaded loop-mediated isothermal amplification assay for multiplex foodborne pathogens detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1040: 81–89.
- [27] Rane TD, Chen L, Zec HC, *et al.* Microfluidic continuous flow digital loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Lab Chip*, 2015, 15(3): 776–782.
- [28] Ma YD, Chang WH, Luo K, *et al.* Digital quantification of DNA via isothermal amplification on a self-driven microfluidic chip featuring hydrophilic film-coated polydimethylsiloxane [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 99: 547–554.
- [29] Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1975, 47(2): 219–225.
- [30] Cheng JW, Liu C, Timothy K, *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry to identify MLST clade 4 *Clostridium difficile* isolates [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 92(1): 19–24.
- [31] Jayaseelan M, Astrid L, Elisabeth K, *et al.* MALDI spectra database for rapid discrimination and subtyping of *Mycobacterium kansasii* [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9(4): 587.
- [32] Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de PM, Torres-Sánchez MJ, *et al.* Identification of clinical isolates of *aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. *Med Mycol*, 2018, 56(7): 838–846.
- [33] 苗丽, 陈静, 徐耀辉, 等. 利用 MOLDI-TOF-MS 方法对沙门氏菌野毒株的鉴定与分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, (15): 173–176, 293.
- Miao L, Cheng J, Xu YH, *et al.* Identification and analysis of *Salmonella* field strains through the method of MOLDI-TOF-MS [J]. *Finan Account Heilongjiang*, 2017, (15): 173–176, 293.
- [34] 魏超, 代晓航, 郭灵安. MALDI-TOF-MS 对草莓中铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌的检测 [J]. *食品科学技术学报*, 2018, 36(4): 105–109.
- Wei C, Dai XH, Guo LA. Research on Identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* in Strawberry by MALDI-TOF-MS [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 36(4): 105–109.
- [35] 赵贵明, 刘洋, 陈颖, 等. 克罗诺杆菌 MALDI-TOF-MS 数据库的建立及应用 [J]. *食品科学*, 2014, 35(8): 105–110.
- Zhao GM, Liu Y, Chen Y, *et al.* Establishment and application of an analytical database for *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2014, 35(8): 105–110.
- [36] 魏超, 郭灵安, 代晓航. MALDI-TOF-MS 对金桔表面肠杆菌科微生物分布的研究 [J]. *现代食品科技*, 2017, 33(11): 219–223.
- Wei C, Guo LA, Dai XH, *et al.* Distribution of *Enterobacteriaceae* on kumquat surface by MALDI-TOF-MS [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(11): 219–223.
- [37] 汪琦, 王紫薇, 赵娟娟, 等. 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速鉴定产气荚膜梭菌 [J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 219–224.
- Wang Q, Wang ZW, Zhao XJ, *et al.* Rapid identification of *Clostridium perfringens* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(10): 219–224.
- [38] 屠博文, 吉俊敏, 杜强, 等. 基质辅助激光解吸飞行质谱法检测空肠弯曲菌及李斯特菌 [J]. *食品科学*, 2017, 38(20): 262–267.
- Tu BW, Ji JM, Du Q, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Sci*, 2017, 38(20): 262–267.
- [39] 徐淑菲, 孔繁德, 林双庆. MALDI-TOF-MS 用于微生物鉴定的影响因素分析 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(2): 88–96.
- Xu SF, Kong FD, Lin SQ. Influence factors analysis on MALDI-TOF-MS in microorganism identification [J]. *China Anim Health Inspect*, 2019, 36(2): 88–96.
- [40] 曾真, 喻俊俊, 刘平. 基于 MALDI-TOF MS 微生物检测的一次性纸基靶板开发 [J]. *分析测试学报*, 2019, 38(6): 655–660.
- Zeng Z, Yu JJ, Liu P. Development of a disposable paper-based plate for identification of microorganism by MALDI-TOF-MS [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(6): 655–660.
- [41] 方盼盼, 杨俊梅, 杨俊文, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在直接鉴定血流感染病原菌中的应用 [J]. *中国临床新医学*, 2019,

- 12(5): 518–521.
- Fang PP, Yang JM, Yang JW, *et al.* Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in direct identification of pathogenic bacteria in bloodstream infection [J]. *Chin J New Clin Med*, 2019, 12(5): 518–521.
- [42] Chase MC, Maria SC, Laura M. Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function [J]. *PNAS*, 2018, 115(19): 4981–4986.
- [43] 徐小雁, 苏越, 郭寅龙. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对中药材霉菌污染的快速鉴定[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(5): 546–551.
- Xu XY, Su Y, Guo YL. Rapid identification of microbial contamination in herbs by matrix-assisted laser desorption /ionization time of flight mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(5): 546–551.
- [44] Zhang Y, Wang B, Jin WJ, *et al.* Sensitive and robust MALDI-TOF-MS glycomics analysis enabled by Girard's reagent T on-target derivatization (GTOD) of reducing glycans [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 10487(7): 105–114.
- [45] 詹宇红, 马丽珍, 张险峰, 等. 纳米磁珠联合 MALDI- TOF- MS 技术在甲状腺微小乳头状癌诊断中的应用价值[J]. *浙江医学*, 2018, 40 (24): 2661–2663.
- Zhang YH, Ma LZ, Zhang XF, *et al.* Magnetic bead combined with MALDI-TOF-MS in diagnosis of papillary thyroid microcarcinoma [J]. *Zhejiang Med J*, 2018, 40(24): 2661–2663.
- [46] 郭庆昕, 杨滨, 强华. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌  $\delta$ -毒素的应用[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(4): 455–459.
- Guo QX, Yang B, Qiang H. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in the detection of MRSA  $\delta$ -toxin [J]. *Chin J Antibiot*, 2019, 44(4): 455–459.
- [47] 项鹰羽, 胡诗曼, 阚鹏飞, 等. 耐药 *E. coli* 的 MALDI-TOF 质谱分析[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(7): 884–886.
- Xiang YY, Hu SM, Kan PF, *et al.* Detection of Resistant *E. coli* by MALDI-TOF-MS [J]. *J Qiqihar Univ Med*, 2016, 37(7): 884–886.
- [48] 余佳佳, 俞静, 刘瑛. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测  $\beta$ -内酰胺酶的研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(4): 566–570.
- Yu JJ, Yu J, Liu Y. Research progresses of applying MALDI-TOF mass spectrometry in the detection of  $\beta$ -lactamase [J]. *J ShangHai Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2017, 37(4): 566–570.
- [49] Sine Y, Hein JF. Characterisation of triacylglycerols from bovine milk fat fractions with MALDI-TOF-MS fragmentation [J]. *Talanta*, 2019, 204(1): 533–541.
- [50] Ling L, Xiao CS, Wang S, *et al.* A pyrene linked peptide probe for quantitative analysis of protease activity via MALDI-TOF-MS [J]. *Talanta*, 2019, 55(3): 236–241.
- [51] Adriana C, Mirko B, Sara M, *et al.* MALDI-TOF MS as a new tool for the identification of *Dientamoeba fragilis* [J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11: 11.
- [52] Wang SJ, Bai HR, Cai ZW, *et al.* MALDI imaging for the localization of saponins in root tissues and rapid differentiation of three panax herbs [J]. *Electrophoresis*, 2016, 37: 1956–1966.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



李慧琴, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检验技术。

E-mail: muqinhuizi@163.com