

食源性致病菌生物快速检测技术研究进展

宋心怡¹, 明双喜², 王华伟¹, 何金兴^{1*}

[1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院, 济南 250000; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250000]

摘要: 随着人民生活水平的提高和食品行业的发展, 食品安全问题频繁发生, 成为人们的重点关注问题。食源性致病菌是造成食品安全问题的主要因素之一, 使用可靠、快速、有效的检测方法对保证食品安全至关重要。现如今生物技术发展迅速, 其在食品致病菌检测中的应用是当前的研究热点。本文综述了免疫学、生物学、生物传感器技术等基于生物技术在食品中致病菌的技术开发和应用研究进展, 并提出双功能抗体在食品检测领域的研究前景, 以为食品致病菌的微生物快速检测与筛查技术提供方法及参考。

关键词: 食源性致病菌; 生物快速检测; 食品安全

Research progress of biological rapid detection of foodborne pathogens

SONG Xin-Yi¹, MING Shuang-Xi², WANG Hua-Wei¹, HE Jin-Xing^{1*}

[1. College of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250000, China; 2. Shandong Institute of Food and Drug Control, Jinan 250000, China]

ABSTRACT: With the improvement of people's living standard and the development of food industry, food safety problems occur frequently and become the focus of people's attention. Foodborne pathogens are one of the main factors causing food safety problems. It is very important to use reliable, rapid and effective detection methods to ensure food safety. Nowadays, with the rapid development of biotechnology, its application in food pathogen detection is the current research hotspot. This paper reviewed the development and application of biotechnology based on immunology, biology and biosensor technology in food pathogens, and the research prospect of bifunctional antibody in food detection was proposed, in order to provide a method for rapid detection and screening of food pathogenic bacteria.

KEY WORDS: foodborne pathogens; rapid biological detection; food safety

0 引言

食品安全关系到广大人民群众的身体健康和生命安全, 食品安全已成为衡量人民生活质量、社会管理水平和国家法制建设的一个重要方面^[1]。然而近几年, 国家食品安全抽检不合格情况的汇总分析和中国食源性疾病爆发监测的数据显示, 微生物性因素导致的不合格问题及食源性

疾病一直居于首位^[2]。据市场监管总局 2020 年 7 月 29 日发布的食品监督抽检结果可以看出微生物污染占检测不合格项目总数的 18.78%, 食品致病菌是导致食品安全隐患的主要问题之一^[3]。由此可见, 使用可靠、快速、有效的检测方法对保证食品安全至关重要

近年来, 食源性致病菌的快速检测发展迅速, 其技术快速进步, 免疫学、分子生物学、生物传感器等技术受

基金项目: 山东省重点研发计划(公益类专项)项目(2018GNC110029)

Fund: Supported by the Shandong Provincial Key Research and Development Program (Public Welfare Special Project) (2018GNC110029)

*通信作者: 何金兴, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jinhe.h@163.com

*Corresponding author: HE Jin-Xing, Ph.D, Associate Professor, Qilu University of Technology, No.3501, Daxve Road, Changqing District, Jinan 250000, China. E-mail: jinhe.h@163.com

到高度重视, 广泛应用到了实验室或工厂生产中。其中免疫学技术中的酶联免疫吸附法和金标法等都是较为经典的方法, 相较于传统培养的方法, 大大减少了检测时间, 但其选择性、灵敏性等问题需进一步改进。其次, 较为常见的检测方法还有聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR), PCR 应用较广, 但检测能力有限, 其中实时荧光 PCR 和数字 PCR 技术的研究报道要更多一些, 数字 PCR 相较于实时荧光 PCR 可实现绝对定量, 检测结果的准确性和精密度更高。近年来, 高通量、高灵敏度的生物传感器技术受到广大研究者的青睐, 传感器的选择开发一直是该技术的一个研究重点, 目前关于电化学传感器的研究较多, 与其他检测方法相比, 电化学方法与特异性强的噬菌体结合作为生物传感器是未来实际应用方面一种极具前途的研究方向。此外, 研究者在酶联免疫法领域尝试开发新试剂来用于方法分析, 以期提高方法的选择性和敏感性。随着纳米技术的发展, 研究者也在进行将新型纳米标记材料应用于免疫层析试纸条中的尝试; 免疫磁珠技术是一种有效的检测方法, 磁珠可以在磁场的帮助下直接从食品基质的干扰中分离和浓缩目标, 从而实现在食品基质中检测到本身低浓度的致病菌; 近年来, 研究者对磁颗粒的整合进行探索, 以实现致病菌的多重检测。腺苷三磷酸生物发光技术关于腺苷三磷酸的提取方法及提取剂的选择开发一直是该方法的一个关键部分, 它直接影响到检测的可靠性, 进一步开发合适的方法或提取试剂能够保证腺苷三磷酸的活提且减少对方法敏感性的抑制作用, 从而推动该方法的发展。本文将对这些技术进行介绍和对比, 并提出双功能抗体在食品检测方面的应用前景, 以期为我国致病菌快速检测的研究发展提供参考。

1 食源性致病菌快速检测技术研究进展

1.1 免疫学技术

免疫学技术是一种基于抗原抗体结合的技术, 该技术因抗原抗体结合的特异性而被应用于微生物检测中, 下面就酶联免疫吸附技术、胶体金免疫层析技术及免疫磁珠分离技术进行综述。

1.1.1 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附技术 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种特殊的试剂分析法, 它是在免疫酶技术的基础上研发出来的一种新型免疫测定技术。该方法的检测原理是用酶标记表面吸附抗原或抗体的固相载体, 在检测时, 让受检样品的抗体或抗原与其相结合, 形成带有酶标记的抗原抗体复合物, 加入酶反应的底物后, 底物因催化作用从而发生颜色反应, 故可根据其颜色变化及程度来对待测成分进行定性或定量分析^[4]。ELISA 可用于测定

抗原, 也可用于测定抗体, 在实际应用中, 根据不同的检测需求可设计出各种不同类型的检测方法, 主要有检测抗体的间接法、检测抗原的双抗夹心法及检测小分子抗原或半抗原的抗原竞争法。

食源性致病菌的检测通常采用双抗夹心 ELISA 法, 该方法能更好的捕获抗原, 不受样品杂质的影响, 其原理如图 1 所示。朱芳茜等^[5]对双抗夹心 ELISA 法进行研究并应用该方法检测水产品中的志贺氏菌, 检测限可达 4.12×10^4 CFU/mL, 用此体系检测未发生交叉反应, 且具备较好的灵敏性和特异性。另外, 重链抗体在 ELISA 中的应用进一步推动了该技术的发展。1993 年, 科学家在骆驼血液内发现了一种抗体, 这种抗体本身缺乏轻链, 被称为重链抗体^[6]。重链抗体的可变结构域仅由一个可变结构域 (variable domain, VHH) 组成。这些 VHHs 重组表达产生一个单域重链抗体, 称为“纳米体”。纳米体与单克隆抗体和普通多克隆抗体不同的地方在于可以通过噬菌体将展示和编码序列一起分离, 并通过细菌表达系统来进行高产量表达, 易从周质空间中提取, 同时仍保留其单克隆特性^[7], 是下一代免疫分析中很有前途的试剂。WANG 等^[8]首次利用纳米体进行黄曲霉及黄曲霉毒素的检测, 此外, 还将纳米体和多克隆抗体与夹心 ELISA 法结合来测定农产品中的曲霉菌, 检出限均可低至 $1 \mu\text{g/mL}$ 。

ELISA 检测时间快, 灵敏度高, 但也存在着一定的缺陷, 如重复性差, 易发生交叉反应导致结果偏差等, 此外, 由于抗原抗体之间的免疫反应具有高度特异性, 针对不同的目标检测物要建造不同的检测工具, 阻碍了该方法在食品快检中的普及。

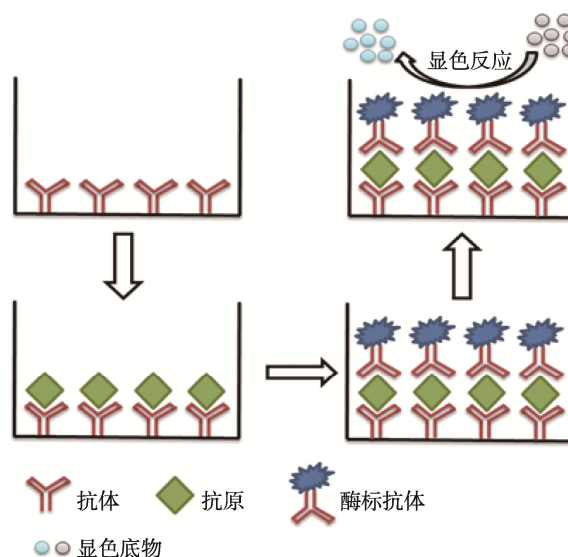


图 1 双抗夹心 ELISA 法

Fig.1 Double-antibody sandwich ELISA

1.1.2 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术(gold immunochromatographic assay, GICA)也是一种新型免疫标记技术,该技术以胶体金作为示踪标记物,利用层析效应、抗原-抗体结合反应及胶体金显色效应,可以将待检菌株的抗体制备成胶体金试纸条^[9]。

WU 等^[10]研制了一种快速检测无乳链球菌的胶体金免疫层析试纸条,该试纸条灵敏度较高,可达到 1.5×10^5 CFU。胶体金试纸条的制备和操作简单,检测时间短,一般 5~15 min 即可得出检测结果,但也存在一些问题亟待解决,例如多数只能进行定性或半定量检测;采用物理吸附的方法结合,抗体或抗原容易从金颗粒表面脱落,标记物不稳定等。

1.1.3 免疫磁珠技术

免疫磁珠技术(immune magnetic, IMS)作为一种新的免疫学方法,是将免疫学的高度特异性与磁珠特有的磁性相结合而发展起来的一种新技术。利用包被于磁珠表面的抗体与样品中的目标物进行结合,形成抗原-抗体复合物。在外加磁场的作用下,标记复合物的磁珠做定向运动,使样品中的目标物与杂质分离,从而达到检测目标物的目的^[11]。

ABBASPOUR 等^[12]采用 IMS 建立了一种新型磁性生物传感器来检测金黄色葡萄球菌,传感器将微量磁珠与单链 DNA 结合以提高吸附性,该方法在灵敏度和选择性方面均有明显提高,并且可用于真实水样的检测。WU 等^[13]首次将 3 种颜色的上转换纳米颗粒(upconversion nanoparticles, UCNPs)作为检测标志物,成功研制了一种基于多色 UCNPs 与磁性纳米颗粒耦合的多色适配体传感器,利用 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的磁分离和浓度效应,实现同时、快速、特异、高灵敏地检测金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和鼠伤寒沙门氏菌,该方法对这 3 种菌的检出限可低至 25、10 和 15 CFU/mL。IMS 与其他技术结合使检测方法特异性更强,灵敏度更高,但该方法在应用时容易与其他杂菌发生交叉反应,导致假阳性结果或高背景信号,这在一定程度上限制了基层的应用。

1.2 腺苷三磷酸生物发光技术

腺苷三磷酸(adenosine triphosphoric acid, ATP)生物发光法是一种方便快捷的操作技术,检测时间短,只需几分钟就可以得出检测结果^[14]。该方法的原理是从细胞中提取出的 ATP 和荧光素酶在氧气和镁的存在下共同和荧光素发生荧光反应,根据产生的荧光强度来推算细胞中 ATP 的含量,进而得出受检样品中微生物的含量^[15-16]。

ATP 的活提是该检测技术的一个关键部分,它直接影响到检测的可靠性。一般情况下,细菌表面由细胞壁和细胞膜包裹,因此,需使用 ATP 提取剂将样品和微生物混合,使微生物的细胞壁和细胞膜开孔,将 ATP 提取出来后

测定。国内关于微生物 ATP 提取方法的研究报道内容较少,目前所报道的方法主要有加热、超声、连续直流电压、强酸、表面活性剂及有机溶剂提取。其中大部分提取剂如三氯醋酸(trichloro-acetic acid, TCA)都对酶的活性有一定的抑制作用,必须经过稀释才能进行使用,这也是导致该方法灵敏度降低的一个原因^[17]。因此,建立一种高效实用的 ATP 提取方法对促进该技术的广泛应用具有重大的意义。LEE 等^[18]开发了一种蛋白质转导结构域结合的荧光素酶(PTD-Luc),该技术可以直接测定活细胞内 ATP 的含量,进而实现实时动力学分析。笔者认为,这也在解决 ATP 提取的问题上提供了另一种思考方向,将 PTD-Luc 作为高通量药物筛选工具,可替代提取工作从而直接在胞内对 ATP 含量进行测定,从而实现了对微生物的检测。

由于 ATP 也以非微生物 ATP 的形式存在于各类食品中,因此需要将体细胞 ATP 与细菌细胞 ATP 进行分离,用体细胞释放剂溶解所有非细菌细胞,使其释放它们的 ATP。经磷酸腺苷脱氨酶与脱氨酶之间的酶促反应可去除胞外 ATP,随后 ATP 和相应的腺苷衍生物反应转化为肌苷一磷酸^[19]。HATTORI 等^[20]使用抗苯扎氯铵(benzalkonium chloride, BCA)的突变体荧光素酶对 ATP 萃取剂中 BAC 的浓度进行优化,既实现了从微生物细胞内最大量提取 ATP,又使 ATP 消除酶失活以去除细胞外 ATP。另外,研究者们就 ATP 生物发光技术的实际应用也进行了探索。郭立芸等^[21]以 ATP 生物发光法为基础,快速评估啤酒酿造过程中的微生物污染风险,可实现酿造过程的实时监控。陈盟等^[22]利用 ATP 生物发光法对空气中的微生物展开研究,结果显示,ATP 生物发光法可通过相对发光单位(relative luciferase units, RLU)来判断被测样本中的细菌含量;PARK^[23]和 BOTTARI 等^[19]还分别利用该技术检测大肠杆菌及饮料中的菌落总数。

ATP 生物发光法操作简便,用时短,可应用于快速检测方面,但该检测方法检测限高,易受游离 ATP、体细胞和酶促反应之间的相互影响,目前在水质检测和食品生产环境监测中应用较多。

1.3 聚合酶链式反应检测技术

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是目前可用于食源性致病菌检测最有效的一种生物学技术,不论是在实验室检测方面还是工业化方面,都得到了广泛的应用。PCR 主要用于放大扩增特定的 DNA 片段,根据不同的核酸扩增和检测方法,可以将其分为实时荧光 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)、多重 PCR(multiplex PCR, mPCR)、数字 PCR(digital PCR, dPCR)等,下面就该 3 种方法进行介绍。

1.3.1 实时荧光 PCR 技术

实时荧光 PCR 是在普通 PCR 反应体系中加入荧光基

团, 整个过程根据荧光信号的积累来进行实时监测, 最后通过标准曲线对样品中的待检成分进行定量分析。qPCR 根据荧光模式的不同可以分为 DNA 染料法、荧光探针法和化学引物试剂法, 前两种方法的使用更广泛^[24]。不同方法采用不同的荧光材料, Sybr-Green 是 DNA 染料法中应用最广泛的中间体染料之一, 它是一种荧光染料, 通过插入 DNA 碱基来非特异性地结合双链 DNA 分子, 荧光在每个扩增周期结束时进行测量, 以确定被扩增 DNA 的数量。TaqMan 探针是使用最广泛的荧光探针, 探针技术减少了由引物二聚体和非特异性产物造成的影响。荧光发射与扩增子产生的数量有关, 可以根据产生的荧光信号进行定量检测。扩增子的大小对检测结果至关重要, 扩增子越小, 灵敏度和反应性能越好^[25]。qPCR 根据定量方法可分为绝对定量和相对定量, 基于 TaqMan 探针的 qPCR 技术可用于定量分析, 根据生物分布来分析组分, 每个 qPCR 板上包含标准曲线和质量控制样本, 对拷贝的目的 DNA 进行绝对定量^[26]。

关于 qPCR 的研究, KIM 等^[27]将 qPCR 技术与过滤器富集方法结合, 在过滤后 2~4 h 内便检测到了 0~7 CFU/25 g 的大肠杆菌 0157:H7, 与常规检测方法相比显著减少了分析时间。相较于传统的 PCR 技术, qPCR 技术具有实时定量监测待检成分, 灵敏度高的优点。此外, 由于省去了电泳部分, 检测过程节省了大量的时间。昂贵的台式设备和高技术要求是该方法的主要局限之处, 而基于探针的 qPCR 在探针生产方面的花费要更高一些^[26]。另外, 食品是一种含有 DNA 和各种化合物的混合物, 是一种复杂的基质, 食品中的 DNA 通常是碎片化或降解的, 化合物如果能通过 DNA, 可能会对 PCR 反应产生抑制和干扰, 进而导致 PCR 敏感性降低和假阴性结果^[28]。因此, 如何快速高效获取高纯度的 DNA 对 PCR 过程十分重要^[29]。

1.3.2 多重 PCR 技术

多重 PCR 是在同一 PCR 反应体系中加入两对及两对以上的引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。其反应原理、反应试剂和操作过程与一般 PCR 相同。一般 PCR 仅应用一对引物, 通过 PCR 扩增产生一个核酸片段, 主要用于单一因子的鉴定。然而, 由于细菌死后 DNA 仍然存在, 因此, 传统的 mPCR 技术不能区分活细胞和死细胞。活性插入染料如单叠氮丙啶(propidium monoazide, PMA)可以选择性地穿透膜受损的死亡细胞, 并在光活化时通过叠氮化物基团交联 DNA, 使其在 PCR 过程中无法进行聚合酶活性, 从而消除死细胞的 DNA 扩增。近年来, 许多研究将 PMA 对活菌的选择性和 PCR 对活菌精确检测的敏感性结合起来, 利用 PMA 进行活性 PCR, 这已经成为一种区分活细胞和死细胞的替代方法^[30]。另外, 传统的 mPCR 技术可能会引起假阴性或假阳性结果, 假阴性结果造成的原因可能是食品基质中的抑制物质、错误的 PCR 混合物和 PCR

仪器故障等。关于假阴性的情况, 在 PCR 过程中常通过在每个 PCR 反应中添加一对 rRNA 引物作为非竞争性内扩增控制(internal amplification control, IAC)来消除^[31]。

周杨等^[32]根据 mPCR 原理, 研制了一种快速检测 3 种致泻性大肠埃希氏菌的 mPCR 检测试剂盒, 该试剂盒检出限可达到 1.5×10^3 CFU/mL 和 2.1×10^3 CFU/mL, 且两种菌检测重复率均为 100%。杨广珠等^[33]利用多重双启动寡核苷酸引物技术来检测食品样品中产志贺毒素的大肠杆菌 O26, 该方法效率高, 特异性强, 不受退火温度限制, 可为食品样品中产志贺毒素大肠杆菌 O26 的快速准确检测提供一种高效的辅助检测方法。LEE 等^[34]建立了多重荧光 PCR 方法来检测食品样品中的多种致病菌, 该方法仅在 12 h 内便可对 6 种目的菌达到 1 CFU/mL 的检测限。

由于 mPCR 技术是同时对多个 DNA 片段进行放大扩增, 相比于单重 PCR 反应, 该技术可在同一反应物内检测出多种待检成分, 具有省时、高效、系统等优点^[35]。但传统的 mPCR 不能区分活细胞和死细胞, PMA 的联合使用使这个问题得到了有效的解决, PMA 预处理是排除死亡细胞的关键步骤, 但目前该技术还不是十分成熟, 在 PMA 孵育时间、孵育温度或光照时间等条件上还有待探究。

1.3.3 数字 PCR 技术

随着高通量技术的发展, 数字 PCR 技术(digital polymerase chain reaction, dPCR)也随之发展起来, dPCR 中的“数字”表示单个实体中的信号切换, 例如关闭或打开, 激活或不激活, 凝结或不凝结, 荧光或非荧光等, dPCR 是继普通 PCR 和 qPCR 之后的第三代 PCR 技术, 是一种具有单分子敏感性的精确核酸定量技术^[36]。dPCR 绝对定量方法是对传统 PCR 检测方法的一种技术革新, 检测方法采用了新的定量方式和检测思路, 可用于精确定量包括 DNA、cDNA 和 RNA 在内的核酸靶点, 更方便、灵敏、快捷的对目的核酸的拷贝数进行绝对的定量计算, 不需要像 qPCR 建立标准曲线后再进行定量检测。dPCR 将一个 PCR 反应分隔成多个子反应, 每个子反应分区作为一个单独的 PCR 微反应器, 在热循环之后, 反应被分为阳性或阴性, 为数字格式输出提供了基础, 通过确定空分区的比例, 应用泊松统计估计目标分子的初始数量^[37]。

微滴式数字聚合酶链式反应(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)是一种新型核酸扩增技术, 可对 DNA 或 RNA 分子采用绝对定量的方式进行分析^[38]。样品的划分用到许多主动和被动的微流体方法, 如物理分区、液滴分区, 大多数方法可以使用一定量的试剂和简单的自动化。基于微流控液滴的 dPCR 应用已经通过单分子扩增实现, 使用液滴微流体时, 可通过调整分区的数量来满足应用程序的要求^[39]。但目前所用的多喷嘴系统等液滴的制造方法对液滴体积变化的影响尚不清楚, 且液滴的尺寸主要取决于喷嘴的尺寸, 因此使用液滴微流体进行多体积检测并不容易。

NETZER 等^[40]应用 dPCR 对硫酸盐还原菌和主要病原体进行绝对定量,此外,还评估了单核细胞增生李斯特菌的定量分析,该方法能够同时定量多重分析目标菌。目前已有多种食源性致病菌,如大肠杆菌 O157:H7、副溶血性弧菌、副猪嗜血杆菌及放线杆菌等均建立了 dPCR 检测方法^[41-44]。与 qPCR 相比,该方法对 PCR 抑制效应的敏感性要低得多,大大提高了准确性和精密度,可实现核酸分子的绝对定量^[45]。在评估检测准确性时,需要考虑 dPCR 对分子或样品制备的可变性和敏感性,适当的实验设计和验证可有效减少由分子缺失、假阳性和信号阈值差引起的问题^[46]。

1.4 生物传感器检测技术

生物传感器主要由生物感受器和换能器两大部分组成,待测样品与抗原或抗体、敏感酶、基因序列和生物碱等发生特异性生化反应,信号转换器将信号转换为电、热、光等化学信号,再通过信号放大器进行读取检测^[47]。近年来,生物传感器技术在食品安全方面的研究愈来愈多,目前已开发的用于食源性致病菌检测方向的生物传感器大多是基于抗原抗体特异性反应的免疫传感器,将抗体固定在传感器平台,通过电化学、光学、压电读数来进行致病菌检测。此外,生物基因技术和噬菌体也在生物传感器技术中广泛应用,核酸适配体和噬菌体鉴定是当前的研究热点,相应适配体传感器和噬菌体传感器也得到了迅速发展,可应用于电化学传感器、光学传感器、磁传感器、离子敏场效应传感器和压电晶体传感器等。

生物识别组件中噬菌体作为检测探针在快速筛选致病菌方面具有如下几个优点:对宿主细菌具有极强的特异性,能够快速繁殖子代噬菌体;在不影响抗体活性的前提下,可培养抗体对有机溶剂、超高温和不同 pH 值等临界条件的耐受性;噬菌体只能在活细胞中才能分裂,所以该方法可以区分细菌死活。基于这些优势,与其他生物识别元件相比,噬菌体在快速特异性检测致病菌方面具有广阔的应用前景^[48]。在电传感方法中,噬菌体作为生物识别元件固定在电极表面,或以溶解的噬菌体感染溶液中细菌的形式来进行检测。电化学生物传感器具有低成本、现场适用性强、灵敏度高等优点^[49]。近年来,电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)得到了广泛的关注,基于阻抗的噬菌体电化学方法是指将噬菌体固定在电极表面,当其捕获细菌时通过测定阻抗的变化来检测细菌存在的一种方法。MARTELET 等^[50]首次报道了一种高灵敏度检测方法,将金纳米粒子包覆在石墨电极表面,通过固定化特异性 T4 噬菌体的方式用以检测食品基质中的大肠杆菌,这种方法不仅增强了表面导电性,还改善了噬菌体在电极表面的固定化。ZHOU 等^[51]将 T2 噬菌体固定在聚乙烯胺功能化碳纳米管传感器上,利用 EIS 来监

测大肠杆菌 B 与 T2 噬菌体结合后电极界面阻抗的变化,从而实现了对大肠杆菌 B 的检测。

另外,纳米材料在生物传感器中的应用也推动了该技术的发展。HUONG 等^[52]对纳米材料介导的纸基生物传感器进行了研究,操作简单,有利于现场检测。MOHGA 等^[53]开发了一种基于抗体和 DNA 受体的植物致病菌检测的生物传感器,该技术适合于原位检测,为现场快速检测提供了廉价且实用的传感系统。除此之外,微流控纸芯片技术(microfluidic paper-based device, μ PADs)的高通量、多目标物同时检测也是近年来 μ PADs 的一个热点研究方向, μ PADs 是以纸基为载体,建立厘米大小的多路流通通道,是微流控技术的载体,称为“纸上实验室”^[54]。该方法可与电化学发光免疫分析^[55]、化学发光酶免疫分析^[56]、化学发光免疫分析^[57]等多种分析方法结合来进行食品致病菌的检测。HAO 等^[58]对传统的微流控纸芯片装置进行了改进,实现对动力学匹配方法的简化。PARK 等^[59]通过将 PCR 技术与微流控技术进行结合建立了一个简单的无泵微流体芯片,将大肠杆菌 O157:H7 作为目标菌,检测限可低至 10^2 CFU/mL。微流控纸芯片可与多种技术进行结合,且设备操作简单,具有广阔的应用前景,但由于各个通道间是相互独立的,因此如何保证各反应通道的平行性还有待进一步的研究。

生物传感器具有缩短样品提取和检测结果之间时间跨度的优势,且具有良好的灵活性,可以与 IMS、PCR 等技术相结合,以提高检测方法的灵敏度、特异性等。但该方法在检测中对大型仪器的依赖性较高,对实验环境有一定的要求,未来在其低维护及连续运行等方面需要考虑^[60]。

2 结束语与展望

近年来,“食安问题”日益受到人民和国家乃至国际的重视,从而人们对食品致病菌快速检测技术的研究也在不断深入,食品工业迫切需要快速、方便、可靠的微生物检测方法,研究重点是应用能够替代传统培养方法的分析方法直接评估食品基质中微生物的存在,从而达到快速检测的目的。科学技术在不断进步,这些快检技术也在不断提升,不同的检测技术各有千秋,可根据不同的检测需求选择不同的检测方法。ELISA 作为一种特殊的试剂分析方法,检测速度快,灵敏度高,但重复性差,由于抗原抗体之间的高特异性免疫反应,需针对不同的检测目标建立不同的检测工具,开发用于分析的新试剂是目前该技术的发展方向。免疫层析试纸条的方法检测时间短,15~20 min 就可出结果,但大多是定性或半定量结果,可从开发新型纳米标记材料角度展开研究,替代传统的胶体金,以提高该方法的检测效果。免疫磁珠分离技术是检测方法中常用的一种方法,富集食品基质中低浓度的致病菌,从而快速检测致

病菌, 通过整合磁颗粒的方式, 有望实现致病菌的多重检测, 进一步提高检测效率。ATP 技术因检测快速已被大众接受, 但由于微生物释放 ATP 的机制尚未研究清楚, 游离 ATP 去除剂的去除效果在国内还没有得到论证等原因至今没有得到广泛的应用。qPCR 和 dPCR 是 PCR 技术中研究较热的两种, 理论上 dPCR 比 qPCR 更具优势, 但由于

qPCR 具有更高的灵敏度, 在特定应用方面仍然可以胜过 dPCR。生物传感器是近年来的研究热点, 尤其是电化学传感器, 具有成本低、现场适用性强、操作简单、灵敏度高等优点, 核酸适配体筛选和噬菌体鉴定是目前的研究热点, 可作为识别元件应用到生物传感器中。上文中所提到的食源性致病菌检测技术的优缺点具体如表 1 所示。

表 1 食源性致病菌检测技术优缺点
Table 1 Advantages and disadvantages of foodborne pathogens detection technology

技术	优点	局限
酶联免疫吸附技术	检测时间快; 灵敏度高	重复性差; 易发生交叉反应导致结果偏差; 针对不同的目标检测物需要建造不同的检测工具
胶体金免疫层析技术	灵敏度高; 设备和操作简单; 检测时间短	只能进行定性或半定量检测; 标记物不稳定
免疫磁珠技术	特异性强; 灵敏度高	易发生交叉反应导致假阳性结果或高背景信号
腺苷三磷酸生物发光技术	操作简便; 用时短; 可用于快速检测	检测限高; 易受游离 ATP、体细胞和酶促反应之间的相互影响
实时荧光定量 PCR 技术	显著减少了分析时间; 实时定量监测待检成分; 灵敏度高	设备和技术要求高; 可能会受到食品基质的影响进而导致 PCR 敏感性降低和假阴性结果
多重 PCR 技术	可在同一反应物内检测出多种待检成分; 省时、高效、系统	区分活死细胞的技术不够成熟
数字 PCR 技术	能够有效进行样本分割和单个 PCR 反应, 直接进行绝对的定量计算	相比于 qPCR 灵敏度较低
生物传感器检测技术	具有良好的灵活性; 可以与其他技术相结合, 进一步提高检测方法的灵敏度、特异性	对大型仪器的依赖性较高; 对实验环境有一定的要求

双功能抗体是一种新兴的技术, 在性能等方面优于抗体分子, 能够同时结合两个不同的抗原表位, 目前主要应用在肿瘤靶向治疗方面, 致病菌筛查和检测方面的潜力还未被充分发掘。笔者认为, 将其作为一种新型识别元素应用在生物传感器技术中, 两个不同的表位一个用来识别微生物抗原, 另一个可发挥指示作用, 通过肉眼可见的变化来指示是否检测到微生物, 省去信息转换部分的工作, 进一步提高检测速度, 由此可见, 双功能抗体作为当前热门的一种新兴技术, 其在食品致病菌检测方面具有广阔的研究和应用前景, 需要进一步的研究与探索可以预见, 随着食品及时快速监测现实需求的增加, 低成本、微型化、高通量、无痕、快速简便、准确高效的检测方式将是未来研究和应用的重点发展方向之一。

参考文献

[1] 冯殿清. 食品安全管理与法规监管保障体系的有效性探究[J]. 现代食品, 2019, (6): 107-109.
FENG DQ. Study on the effectiveness of food safety management and regulatory guarantee system [J]. Mod Food, 2019, (6): 107-109.

[2] 许雅欣, 宋明翰, 高敏, 等. 我国食品安全满意度调查研究流程、现存问题和改善措施[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2223-2230.
XU YX, SONG MH, GAO M, et al. The process of food safety satisfaction survey in China, the existing problems and improvement

measures [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(9): 2223-2230.

[3] 王丹丹, 刘鸣畅, 杨艳歌, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 45(8): 1-16.
WANG DD, LIU MC, YANG YG, et al. Research progress in rapid detection of food-borne pathogens [J]. Food Sci, 2021, 45(8): 1-16.

[4] 申孟, 杨宏苗, 刘杨, 等. 食源性致病菌快速检测研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(1): 23-25.
SHEN M, YANG HM, LIU Y, et al. Research progress in rapid detection of food-borne pathogens [J]. J Cere Oils, 2020, 33(1): 23-25.

[5] 朱芳茜, 何扩, 张秀媛, 等. 水产品中志贺氏菌双抗夹心 ELISA 检测方法建立与应用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 156-160.
ZHU FQ, HE K, ZHANG XY, et al. Establishment and application of double anti-Shigella sandwich ELISA for detection of Shigella in aquatic products [J]. Food Res Dev, 2021, 42(4): 156-160.

[6] FERRARI A, RODRÍGUEZ MM, POWER P, et al. Immunobiological role of llama heavy-chain antibodies against a bacterial β -lactamase [J]. Vet Immunol Immunop, 2007, 117(3): 173-182.

[7] MUYLDERMANS S, BARAL TN, RETAOZZO VC, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. Vet Immunol Immunop, 2009, 128(1-3): 178-183.

[8] WANG T, LI P, ZHANG Q, et al. Determination of *Aspergillus* pathogens in agricultural products by a specific nanobody-polyclonal antibody sandwich ELISA [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 54-60.

[9] PAN R, JIANG Y, SUN L, et al. Gold nanoparticle-based enhanced lateral flow immunoassay for detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered

- infant formula [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(5): 3835–3843.
- [10] WU WD, LI M, CHEN M, *et al.* Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in tilapia [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91(9): 66–69.
- [11] 王俊韵, 沈静雯, 陆利霞, 等. 食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 24(9): 1–11.
WANG JY, SHEN JW, LU LX, *et al.* Research progress on the enrichment and detection of food-borne pathogens [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 24(9): 1–11.
- [12] ABBASPOUR A, NOROUZ-SARVESTANI F, NOORI A, *et al.* Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68(25): 149–155.
- [13] SHIJIA W, NUO D, ZHAP S, *et al.* Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(6): 113–126.
- [14] HUNTER DAWN M, LIM DANIEL V. Rapid detection and identification of bacterial pathogens by using an ATP bioluminescence immunoassay [J]. *J Food Protect*, 2010, 73(4): 25–39.
- [15] 常超, 王凌, 伍金娥. 基于 ATP 再生体系快速检测乳品中微生物[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 320–324.
CHANG C, WANG L, WU JE, *et al.* Rapid detection of microorganisms in dairy products based on ATP regeneration system [J]. *Food Sci*, 2018, 39(4): 320–324.
- [16] 吴磊磊. 食品微生物快检技术的发展[J]. *现代食品*, 2016, (17): 25–27.
WU LL. Development of fast detection technology of food microorganism [J]. *Mod Food*, 2016, (17): 25–27.
- [17] 李利霞, 常超, 伍金娥. ATP 生物荧光法及其应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(9): 394–397.
LI LX, CHANG C, WU JE, *et al.* Research progress of ATP bioluminescence and its application [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(9): 394–397.
- [18] LEE M, PARK W, KIM Y, *et al.* Intracellular ATP assay of live cells using PTD-Conjugated luciferase [J]. *Sensors*, 2012, 12(11): 12–18.
- [19] BOTTARI B, SANTARELLI M, NEVIANI E. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2015, 44(1): 36–48.
- [20] HATTORI N, SAKAKIBARA T, KAJIYAMA N, *et al.* Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride [J]. *Anal Biochem*, 2003, 319(2): 287–295.
- [21] 郭立芸, 向杰, 谢鑫, 等. ATP 生物发光法快速检测短乳杆菌的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(18): 1–6.
GUO LY, XIANG J, XIE X, *et al.* Study on rapid detection of lactobacillus brevis by ATP bioluminescence [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(18): 1–6.
- [22] 陈盟, 祁建城, 李玲君, 等. ATP 生物发光法在空气微生物监测评估中的应用研究[J]. *军事医学*, 2020, 44(7): 523–529.
CHEN M, QI JC, LI LJ, *et al.* Application of ATP bioluminescence in monitoring and evaluation of airborne microorganisms [J]. *Mil Med*, 2020, 44(7): 523–529.
- [23] PARK CW, PARK J, LEE SH, *et al.* Real-time monitoring of bioaerosols via cell-lysis by air ion and ATP bioluminescence detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 52(10): 379–383.
- [24] LINACERO R, SANCHIZ A, BALLESTEROS I, *et al.* Application of real-time PCR for tree nut allergen detection in processed foods [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2020, 60(7): 1077–1093.
- [25] LINACERO R, BALLESTEROS I, SANCHIZ A, *et al.* Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods [J]. *Food Chem*, 2016, 202(24): 334–340.
- [26] MA H, BELL K N, LOKER R N. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies [J]. *Mol Ther-meth Clin D*, 2021, 20(17): 152–168.
- [27] JIN-HEE K, SE-WOOK O. Rapid detection for low numbers of *Escherichia coli* O157:H7 by real-time PCR in cabbage using a combination of filtration, short microbial enrichment, and DNA concentration within 4 h [J]. *LWT*, 2021, 58(29): 139.
- [28] KANG TS. Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 91(55): 574–585.
- [29] DEVI A, CHIU Y, HSUEH H, *et al.* Quantitative PCR based detection system for cyanobacterial geosmin/2-methylisoborneol (2-MIB) events in drinking water sources: Current status and challenges [J]. *Water Res*, 2021, 188(49): 116–478.
- [30] ARAVIND S, LITTY B, SHYLAJA R, *et al.* Selective and concurrent detection of viable *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, and *Shigella* spp., in low moisture food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2017, 86(22): 586–593.
- [31] LI F, XIE G, ZHOU B, *et al.* Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, 74(67): 176–182.
- [32] 周杨, 万强, 蔡芷荷, 等. 3种致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测试剂盒的研制与效用评价[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(12): 243–251.
ZHOU Y, WAN Q, CAI ZH, *et al.* Development and utility evaluation of three multiplex PCR kits for detection of diarrhea-causing *Escherichia coli* [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(12): 243–251.
- [33] 杨广珠, 张淑红, 黄远斌, 等. 产志贺毒素大肠杆菌 O26 多重双启动寡核苷酸引物-PCR 检测方法的建立[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(4): 290–295.
YANG GZ, ZHANG SH, HUANG YB, *et al.* Development of multiple double-priming oligonucleotide primers for detection of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O26 [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(4): 290–295.
- [34] NARI L, YOON KK, KYUNG OS, *et al.* A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11(7): 442–458.
- [35] LI B, CHEN J. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food [J]. *Bio Med Central*, 2013, 13(1): 16–31.
- [36] XU L, QU H, ALONSO DG, *et al.* Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 175(97): 112–908.
- [37] WILKES T, ELLISON S. dPCR-the digital polymerase chain reaction [J].

- Anal Methods, 2017, 9(29): 4225–4227.
- [38] 牛会敏, 王静怡, 姚晓洁, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应在食品安全检测领域的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9295–9300. NIU HM, WANG JY, YAO XJ, *et al.* Application of droplet digital polymerase chain reaction in the field of food safety detection [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(24): 9295–9300.
- [39] HUIFA Z, GARETH J, YUAN Z, *et al.* Massively parallel single-molecule and single-cell emulsion reverse transcription polymerase chain reaction using agarose droplet microfluidics [J]. Anal Chem, 2012, 84(8): 692–699.
- [40] NETZER R, RIBIČIĆ D, AAS M, *et al.* Absolute quantification of priority bacteria in aquaculture using digital PCR [J]. J Microbiol Meth, 2021, 183(6): 106–171.
- [41] 方佩佩, 赵丽青, 马云, 等. 副溶血性弧菌微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 252–257. FANG PP, ZHAO LQ, MA Y, *et al.* Establishment of digital PCR method for quantification of *Vibrio parahaemolyticus* microdroplet [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(19): 252–257.
- [42] 石磊, 温雯, 李丽丽. 副猪嗜血杆菌微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2018, 34(12): 216–220. SHI L, WEN W, LI LL. Development of digital PCR method for quantitative detection of *Haemophilus parasuis* [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(12): 216–220.
- [43] 魏咏新, 马丹, 李丹, 等. 食品中 *Escherichia coli* O157:H7 微滴数字 PCR 绝对定量检测方法的建立[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 259–265. WEI YX, MA D, LI D, *et al.* Determination of *Escherichia coli* O157:H7 droplets in food by digital PCR [J]. Food Sci, 2020, 41(16): 259–265.
- [44] 石磊, 刘雨琦, 陈洵, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2019, 35(3): 212–217. SHI L, LIU YQ, CHEN X, *et al.* Development of a digital PCR method for the quantitative detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(3): 212–217.
- [45] 张艳, 井汇源, 孙彦婷, 等. 数字 PCR 精准定量方法研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2020, 40(6): 55–59. ZHANG Y, JING HY, SUN YT, *et al.* Research progress of accurate quantitative methods by digital PCR [J]. Chin Herbivore Sci, 2020, 40(6): 55–59.
- [46] TAYLOR SEAN C, GENEVIEVE L, HUGO G. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data [J]. Sci Rep-Uk, 2017, 7(1): 657–662.
- [47] PARK M, TSAI S, CHEN W. Microbial biosensors: Engineered microorganisms as the sensing machinery [J]. Sensors, 2013, 13(5): 87–94.
- [48] FAROOQ U, YANG Q, ULLAH MW, *et al.* Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors [J]. Biosens Bioelectron, 2018, 124(9): 118.
- [49] FARIDBOD F, GUPTA VK, ZAMANI HA. Electrochemical sensors and biosensors [J]. Int J Electrochem, 2011, 46(5): 1–2.
- [50] MARTELET A, L'HOSTIS G, NEVERS M, *et al.* Phage amplification and immunomagnetic separation combined with targeted mass spectrometry for sensitive detection of viable bacteria in complex food matrices [J]. Anal Chem, 2015, 87(11): 5553–5560.
- [51] ZHOU Y, ABHIJIT M, PETER K, *et al.* Charge-directed immobilization of bacteriophage on nanostructured electrode for whole-cell electrochemical biosensors [J]. Anal Chem, 2017, 89(11): 54–60.
- [52] HUONG NQ, IL KM. Nanomaterial-mediated paper-based biosensors for colorimetric pathogen detection [J]. Trac Trend Anal Chem, 2020, 88(56): 132.
- [53] MOHGA K, DE LEA, ARBEN M. Biosensors for plant pathogen detection [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 93(67): 105–109.
- [54] 郭磊. 基于微流控纸芯片的多标志物同时检测化学发光免疫分析技术研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2020. GUO L. Multi-marker simultaneous detection chemiluminescence immunoassay technology based on microfluidic paper chip [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020.
- [55] WANG Y, LUO J, LIU J, *et al.* Label-free microfluidic paper-based electrochemical aptasensor for ultrasensitive and simultaneous multiplexed detection of cancer biomarkers [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 4(32): 136.
- [56] WANG S, GE L, SONG X, *et al.* Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 31(1): 121–127.
- [57] LEI G, SHOUMEI W, XIANRANG S, *et al.* 3D origami-based multifunction-integrated immunodevice: Low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device [J]. Lab Chip, 2012, 12(17): 36–41.
- [58] HAO Z, ZHENG Q, JIN L, *et al.* Rapid measurement of total polyphenol content in tea by kinetic matching approach on microfluidic paper-based analytical devices [J]. Food Chem, 2021, 342(45): 312–317.
- [59] PARK YM, PARK J, SUN YL, *et al.* Integrated pumpless microfluidic chip for the detection of foodborne pathogens by polymerase chain reaction and electrochemical analysis [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2021, 329(5): 21–27.
- [60] LAZCKA O, CAMPO FJD, MUÑOZ FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(7): 43–49.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



宋心怡, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: songxinyi0130@163.com



何金兴, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: jinhe.h@163.com