

# 免疫层析试纸条技术及其在食源性致病菌检测中应用的研究进展

李怀明<sup>1,2,3</sup>, 许恒毅<sup>1</sup>, 熊勇华<sup>1,2,\*</sup>

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 3.南昌大学环境与化学工程学院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 食源性致病菌是引起食物中毒的最主要原因之一, 全球每年由其引发的食物中毒事件达上亿例。免疫层析试纸条法是一种简便、快速且价格低廉的检测方法, 广泛应用于国内基层单位对食源性致病菌现场快速检测及诊断。本文就其在食源性致病菌检测方面的研究现状及发展方向进行综述。

**关键词:** 免疫层析试纸条; 食源性致病菌; 食物中毒; 快速检测

## Research Progress on the Application of Immunochromatographic Test Strip Technology in Foodborne Pathogen Detection

LI Huai-ming<sup>1,2,3</sup>, XU Heng-yi<sup>1</sup>, XIONG Yong-hua<sup>1,2,\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. School of Environmental and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Foodborne pathogen is one of the major resources of food poisoning, which causes more than 100 million cases of food poisoning per year all over the world. Immunochromatographic test strip has been widely used for onsite detection and diagnosis of foodborne pathogen because of its simplicity, rapidness and low cost. In this paper, current research progress, application and future development direction of immunochromatographic test strip for foodborne pathogen detection are reviewed.

**Key words:** immunochromatographic test strip; foodborne pathogen; food poisoning; rapid detection

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0380-04

近年来, 由食源性致病菌引发的食物中毒事件已广为关注, 引起这些中毒的细菌主要有: 沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7 以及单增李斯特菌等。这些菌会引起疾病的爆发和流行, 给社会带来巨大经济损失。据报道, 美国每年由食源性致病菌引起的疾病大约有 7600 万例<sup>[1]</sup>; 相关的医疗花费和生产损失达 29~67 亿美元<sup>[2]</sup>; 我国也爆发过多起由食源性致病菌引起的食物中毒, 其中 1999 年爆发的大肠杆菌 O157:H7 中毒事件, 给我国经济造成了巨大损失<sup>[3]</sup>。因此建立一种快速、准确、便捷的检测技术, 对于从源头制止食源性致病菌污染, 预防中毒事件的发生具有重要意义。

食源性致病菌传统的检测方法主要有培养法<sup>[4]</sup>、分

子生物学法<sup>[5-6]</sup>(如常规 PCR 以及荧光定量 PCR 方法)、免疫学方法<sup>[7]</sup>(如 ELISA 以及免疫层析试纸条法)等。其中免疫层析试纸条法因具有简便、快速、廉价、适应性广等优点, 可用于基层单位中各种食源致病菌的快速筛查检测<sup>[8]</sup>。

### 1 免疫层析试纸条的检测原理

免疫层析试纸条技术是 20 世纪 80 年代初发展起来的一种基于免疫学方法的快速检测技术。其结构主要包括样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC 膜)、检测线(T 线)、质控线(C 线)、吸水垫及黏性底板等几个部分(如图 1 所示)。依据其免疫层析反应时抗原与抗体结合方式

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 江西省教育厅产学研课题(GJJ10009); 江西省研究生创新专项资金项目(YC10A029)

作者简介: 李怀明(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物转化及分离提取技术。E-mail: lihuaiming01@126.com

\* 通信作者: 熊勇华(1970—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: yhxiongchen@163.com

的不同,主要分为两类:双抗夹心免疫层析法和竞争免疫层析法<sup>[9]</sup>。

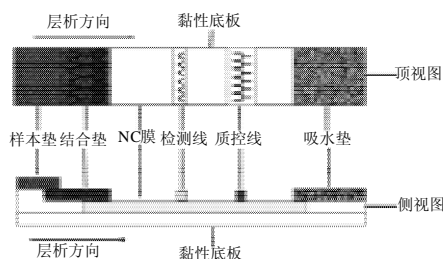


图1 免疫层析试纸条结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of immunochromatographic test strip

### 1.1 双抗夹心免疫层析法原理

以胶体金为例检测流程及原理如下:将金标抗体(Ab1)吸附在金标结合垫上,捕获抗体(Ab2)喷涂于T线。待测样品滴加到样品垫上,通过毛细管作用向前层析,当其层析到结合垫上时溶解其上的金标抗体并一同向前泳动,如果样品中含有抗原,则会与金标抗体结合,形成胶体金-待测抗原的免疫复合物,最后被T线上的捕获抗体捕获形成金标抗体-抗原-捕获抗体的免疫复合物,T线显现红色条带(阳性结果);反之则无条带,为阴性结果。

### 1.2 竞争免疫层析法原理

以胶体金为例检测流程及原理如下:将金标抗体吸附于结合垫上,抗原偶联物喷涂于T线。待测样品滴加到样品垫上,通过毛细管作用,样品迅速湿透结合垫,将其上的金标抗体溶解,并随着样品向前泳动,当金标抗体到达T线时,如样品中含有待测抗原,则与T线处包被的抗原竞争结合金标抗体上的抗原结合位点。样品中待检抗原较少时,则T线上捕获到的金标抗体较多,显示红色条带(阴性结果);反之则不显示条带,为阳性结果。

双抗夹心免疫层析法具有直观性强、检测灵敏度高等优点,常用于检测带有多个抗原表位的大分子抗原,如大分子蛋白质、病毒、致病菌等。目前,检测食源性致病菌的免疫层析试纸条均采用该方法。然而在小分子抗原检测中,待测小分子抗原与金标抗体(Ab1)结合后,由于空间位阻作用,捕获抗体(Ab2)很难再与小分子抗原结合。因此,具有单一抗原表位的小分子抗原检测多采用竞争免疫层析法检测,如兽药残留、违禁药物等的检测。双抗夹心免疫层析法和竞争免疫层析法都是基于抗原抗体反应来实现对待检物的检测,如何提高抗原抗体的亲和力是提高免疫层析试纸条检测性能的关键,尤其是在检测食源性致病菌时,应用纯度高、

亲和性强的抗体是提高其检测灵敏度和特异性的最主要的方法,也是其研究发展的方向之一。近来,刘洪贵等<sup>[10]</sup>以金黄色葡萄球菌重组凝集因子A蛋白与灭活的金黄色葡萄球菌全菌同时免疫相同生长状况的小鼠的实验结果表明,免疫抗原的不同是影响其产生抗体质量的重要原因之一。由此,如何制备高质量的免疫抗原也成了近来研究的热点。

## 2 免疫层析试纸条检测食源性致病菌的发展方向

### 2.1 提高检测灵敏度

免疫层析试纸条技术已成为检测食源性致病菌最简单快速、特异敏感的免疫学检测技术之一<sup>[8]</sup>,但其检测灵敏度相对其他检测方法(PCR、电化学传感器等)仍然较低。因此,如何提高免疫层析试纸条检测灵敏度是其进一步发展的研究重点。提高其检测灵敏度主要有两种方法:采用纯度高、亲和力强的单克隆抗体和采用新型标记物。

#### 2.1.1 采用纯度高、亲和力强的单克隆抗体提高检测灵敏度

免疫层析试纸条采用的抗体种类主要有多克隆抗体、单克隆抗体两种。多克隆抗体具有制备周期短、价格低廉等优点,但在检测食源性致病菌时与单克隆相比灵敏度较低<sup>[11]</sup>,如崔焕忠等<sup>[12]</sup>采用单克隆抗体为标记抗体制备的检测单增李斯特菌的胶体金免疫层析试纸条,检出限为 $3.9 \times 10^5$  CFU/mL,比采用多克隆抗体的胶体金免疫层析试纸条低10倍<sup>[13]</sup>。可见,采用纯度高、亲和力强的单克隆抗体是提高免疫层析试纸条检测灵敏度的有效方法。

#### 2.1.2 采用新型标记物提高检测灵敏度

目前常用的标记物主要是胶体金、胶体硒、乳胶微球、炭黑等吸收光谱型标记物<sup>[14-19]</sup>;该类标记物易受光学干扰,且大量聚集后才能被检测,灵敏度相对偏低。而以上转荧光颗粒、量子点和荧光纳米颗粒等为代表的新型发射光谱型标记物<sup>[20-22]</sup>,光学特性优良,纳米材料发光强度高,作为标记物用于试纸条检测灵敏度较高。例如王静等<sup>[23]</sup>以上转荧光颗粒研制了检测大肠杆菌的上转荧光免疫层析试纸条,用该试纸条检测人工污染大肠杆菌 O157:H7 的奶粉、咖啡粉以及果汁等,检测灵敏度为 $5 \times 10^3$  CFU/mL,比常规胶体金免疫层析试纸条高10~100倍<sup>[24-25]</sup>;范放等<sup>[26]</sup>以荧光纳米颗粒为标记物,研制了检测 O139 群霍乱弧菌的免疫层析试纸条,用该试纸条检测人工污染 O139 群霍乱弧菌的海鱼肉,检测灵敏度为 $3.5 \times 10^4$  CFU/mL,比传统的胶体金免疫层析试纸条高一个数量级<sup>[27]</sup>。由此可见,采用发射光谱型标记物来替代吸收光谱型标记物是一种提高检测灵敏度的有效方法。

表1 免疫层析试纸条在食源性致病菌检测方面的应用  
Table 1 Application of immunochromatographic test strip in foodborne pathogen detection

待检物	标记抗体	标记物	检测样品	灵敏度	参考文献
沙门氏菌	抗沙门氏菌的单克隆抗体	胶体金	生鸡蛋	$10^7$ CFU/mL	[33]
沙门氏菌	抗沙门氏菌的多克隆抗体	胶体金	鱼粉	$2.3 \times 10^5$ CFU/mL	[34]
大肠杆菌 O157	抗大肠杆菌 O157 脂多糖的单克隆抗体	胶体金	猪、牛粪便等	$1.8 \times 10^5$ CFU/mL	[22]
大肠杆菌 O157	抗大肠杆菌 O157 的单克隆抗体	胶体金	奶粉、面粉等	$1 \times 10^5$ CFU/mL	[35]
大肠杆菌 O157	抗大肠杆菌 O157 的单克隆抗体	胶体金	牛肉、莴苣等	$10^4$ CFU/mL	[25]
大肠杆菌 O157	抗大肠杆菌 O157 的单克隆抗体	上转磷光颗粒	奶粉、果汁等	$5 \times 10^3$ CFU/mL	[23]
单增李斯特菌	抗单增李斯特菌的单克隆抗体	胶体金	蔬菜、牛奶等	$3.9 \times 10^5$ CFU/mL	[12]
金黄色葡萄球菌	标记抗protein A的IgG	胶体金	猪肉、牛肉等	25 CFU/g	[36]
金黄色葡萄球菌	抗重组凝集因子 A 的多克隆抗体	胶体金	牛奶	$1 \times 10^4$ CFU/mL	[10]
猪链球菌(血清 2 型)	抗猪链球菌(血清 2 型)的多克隆抗体	胶体金	磷酸盐缓冲液	$1 \times 10^6$ CFU/mL	[37]
空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌	抗弯曲杆菌表面蛋白的单克隆抗体	胶体金	人粪便	$1.8 \times 10^4$ CFU/mL 和 $4 \times 10^5$ FU/mL	[38]
O139 群霍乱弧菌	抗 O139 群霍乱弧菌单克隆抗体	荧光纳米颗粒	海鱼肉	$9.5 \times 10^4$ CFU/mL	[26]
鼠疫杆菌	抗鼠疫杆菌多克隆抗体	上转磷光颗粒	磷酸盐缓冲液、老鼠肺组织等	$10^4$ CFU/mL	[39]

## 2.2 定量检测

近年来,由于高新技术的不断发展和应用,检测能力不断提高,免疫层析试纸条也趋向定量检测发展。例如 Zhao 等<sup>[28]</sup>通过采用试纸条扫描仪读取试纸条 T 线的光密度值进行定量,检测范围为 0.038~22.75ng/mL,对加标的样品进行检测,其回收率在 85.3%~96.1%,表现了较好的检测能力;Li 等<sup>[29]</sup>以上转磷光颗粒为标记物研制了上转磷光免疫层析试纸条,采用试纸条扫描仪器来读取试纸条 T 线和 C 线的磷光强度并通过其比值进行定量,与商业化的 ELISA 及其他试剂对照检测,表现了较好的相关性, $R^2$  分别为 0.6389 和 0.5702;Zou 等<sup>[21]</sup>和 Li 等<sup>[30]</sup>分别报道了采用光学和化学性能优良的半导体量子点作为显色标记物,并结合一种便携式荧光读取仪读取 T 线处量子点荧光强度,通过对血浆样品的加标检测,实现了待测物的超灵敏定量分析。以上这些方法在实际样本快速检测应用方面表现突出,可以为食源性致病菌定量检测试纸条的研制提供借鉴,有望应用于致病菌的快速定量检测。

## 2.3 多元检测

多元检测即在同一个试纸条上同时检测多种物质,它能够提高检测效率,降低检测成本,对需要多个指标联检物质的检测具有很大的应用价值<sup>[31]</sup>。例如 Guo 等<sup>[18]</sup>研制的检测磺胺二甲基嘧啶、磺胺嘧啶以及磺胺喹啉的胶体金免疫层析试纸条,可以同时检测这 3 种药物在鸡蛋、鸡肉中的残留情况,与高压液相色谱对照检测表现了较高的符合率(99.7%)。Hong 等<sup>[32]</sup>研制的检测鼠疫耶尔森氏菌抗体的 10 通道上转磷光免疫层析试纸条装置,可以同时检测多种鼠疫耶尔森氏菌抗体,与 ELISA 对照检测表现了较高的符合率( $R^2=0.93\sim0.99$ ),37℃ 保存 10d,平均变异系数为 10.3%,表现了较好的稳定性。目前关于食源性致病菌多元检测的文献报道较少,可借

鉴其他物质多元检测的研制方法和思路,并加以改进,从而研制出能够同时检测多种食源性致病菌的免疫层析试纸条。

## 3 免疫层析试纸条在检测食源性致病菌中的应用

免疫层析试纸条作为检测食源性致病菌的主要方法之一,在沙门氏菌、大肠杆菌 O157、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌、弯曲杆菌、霍乱弧菌以及鼠疫杆菌等的检测中已有广泛的研究及应用,如表 1 所示。

## 4 结 语

免疫层析试纸条法作为检测食源性致病菌的主要方法之一,不仅检测快速,操作简便,而且价格低廉,适用于基层单位的现场快速检测及诊断。但免疫层析试纸条还面临着一些需要改进的地方,如灵敏度偏低、只能定性和单元检测食源性致病菌等,这些问题限制了免疫层析试纸条在食源性致病菌检测方面的进一步发展。采用纯度高、亲和力强的单克隆抗体以及新型发射光谱型标记物并配合试纸条荧光读取仪,不仅能提高免疫层析试纸条的灵敏度,而且可对食源性致病菌进行定量分析和多元检测。如果这些问题能够得到较好的解决,那么免疫层析试纸条在食源性致病菌检测中的经济价值、产业需求以及发展前景将不可限量。

## 参考文献:

- [1] MEAD P S, SLUTSKER L, DIETZ V, et al. Food-related illness and death in the United States[J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [2] BUZBY J C, ROBERTS T, LIN C T J, et al. Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses[R]. Agricultural Economics Reports No. 741: 100. USDA, Washington, DC, USA, 1996.
- [3] 李杜娟,王剑平,应义斌,等.检测食源性致病菌的生物传感器[J].

- 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(3): 194-199.
- [4] SANDERS S Q, BOOTHE D H, FRANK J F, et al. Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel[J]. Intern Assoc Food Prot, 2007, 70(6): 1379-1385.
- [5] KIM J S, LEE G G, PARK J S, et al. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Int Assoc Food Prot, 2007, 70(7): 1656-1662.
- [6] DESAI P T, WALSH M K, WEIMER B C. Solid phase capture of pathogenic bacteria using gangliosides and detection with real time PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(7): 2254-2258.
- [7] MAGLIULO M, SIMONI P, GUARDIGLI M, 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, 5(13): 4933-4939.
- [8] NGOM B, GUO Yancheng, WANG Xiliang, et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(3): 1113-1135.
- [9] 陈珠丽. 胶体金免疫层析技术快速检测水中微囊藻毒素-LR的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [10] 刘洪贵, 武瑞. 免疫层析法快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(4): 283-287.
- [11] LEONARD P, HEARTY S, BRENNAN J, et al. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water[J]. Enzyme and Microb Technol, 2003, 32(1): 3-13.
- [12] 崔焕忠, 张辉, 王兴龙. 胶体金试纸快速检测食品中单增李斯特菌[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 239-242.
- [13] 熊国华. 单增李斯特菌及溶血素O与葡萄球菌三种肠毒素免疫胶体金检测技术研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.
- [14] GANDHI S, CAPLASH N, SHARMA P, et al. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 25(2): 502-505.
- [15] OSIKOWICZ G, BEGGS M, BROOKHART P, et al. One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choriongonadotropin in urine[J]. Clin Chem, 1990, 36(9): 1586a.
- [16] ATTAR Z J, CHANCE M L, EL-SDFI S, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis[J]. Acta Tropica, 2001, 78(1): 11-16.
- [17] BLA KOVA M, KOETS M, RAUCH P, et al. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in food[J]. Eur Food Res Technol, 2009, 229(6): 867-874.
- [18] GUO Yancheng, NGOM B, LE Tao, et al. Utilizing three monoclonal antibodies in the development of an immunochromatographic assay for simultaneous detection of sulfamethazine, sulfadiazine, and sulfaquinolaxaline residues in egg and chicken muscle[J]. Anal Chem, 2010, 82(18): 7550-7555.
- [19] WANG Xiliang, LI Kui, SHI Deshi, et al. Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(6): 2072-2078.
- [20] CORSTJENS P L A M, CHEN Z, ZUIDERWIJK M, et al. Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB)[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1098(1): 437-445.
- [21] ZOU Zhexiang, DU Dan, WANG Jun, et al. Quantum dot-based immunochromatographic fluorescent biosensor for biomonitoring trichloropyridinol, a biomarker of exposure to chlorpyrifos[J]. Anal Chem, 2010, 82(12): 5125-5133.
- [22] 朱海, 范放, 洪小柳, 等. 氯霉素荧光纳米颗粒免疫层析法的建立[J]. 现代农业科学, 2009, 16(9): 13-17.
- [23] 王静, 周蕾, 李伟, 等. 上转磷光免疫层析检测肠出血性大肠杆菌 O157[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(1): 41-44.
- [24] JUNG B Y, JUNG S C, KWEON C H. Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157[J]. J Food Prot, 2005, 68(10): 2140-2143.
- [25] 黄岭芳, 段霞, 陈媛, 等. 大肠杆菌 O157: H7 胶体金试纸条研制[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 355-359.
- [26] 范放, 朱海, 洪小柳, 等. O139 群霍乱弧菌荧光纳米颗粒试纸条的研制[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(1): 9-12.
- [27] 王家豪, 吴捷, 许永炎, 等. 胶体金免疫层析法快速检测霍乱弧菌的初步应用[J]. 中国热带医学, 2001, 1(1): 71-72.
- [28] ZHAO Yinli, ZHANG Gaiping, LIU Qingtang, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(24): 12138-12142.
- [29] LI Luping, ZHOU Lei, YU Yang, et al. Development of up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay for rapidly quantitative detection of hepatitis B surface antibody[J]. Diag Microbiol Infec Dis, 2009, 63(2): 165-172.
- [30] LI Zhaohui, WANG Ying, WANG Jun, et al. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip[J]. Anal Chem, 2010, 82(16): 7008-7014.
- [31] RAO R S, ALBALA J S, LANE S M, et al. Developing rapid point-of-care multiplex detection for use in lateral flow devices[J]. Proc SPIE, 2005, 6007: pages 600711.
- [32] HONG Wenyang, HUANG Lihua, WANG Haoran, et al. Development of an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay for profiling antibodies against *Yersinia pestis*[J]. J Microbiol Methods, 2010, 83(2): 133-140.
- [33] SEO K H, HOLT P S, STONE H D, et al. Simple and rapid methods for detecting *Salmonella enteritidis* in raw eggs[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 87(1/2): 139-144.
- [34] 陈琼, 孔繁德, 张长弓, 等. 沙门氏菌快速检测试纸条的研制与应用[J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28(5): 6-8.
- [35] 王静, 陈维娜, 胡孔新, 等. 大肠杆菌 O157 胶体金免疫层析快速筛查方法的建立[J]. 卫生研究, 2006, 35(4): 439-441.
- [36] HUANG Suhua, WEI Hsienchin, LEE Yeunchung. One-step immunochromatographic assay for the detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2007, 18(8): 893-897.
- [37] JU Ying, HAO Huaijie, XIONG Guohua, et al. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Veter Immunol Immunopathol, 2010, 133(2/4): 207-211.
- [38] KAWATSU K, KUMEDA Y, TAGUCHI M, et al. Development and evaluation of immunochromatographic assay for simple and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1226-1231.
- [39] YAN Zhongqiang, ZHOU Lei, ZHAO Yongkai, et al. Rapid quantitative detection of *Yersinia pestis* by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor[J]. Sens Actuators B, 2006, 119(2): 656-663.