

# 食源性致病菌快速检测技术研究进展

封莉, 黄继超, 刘欣, 黄明\*, 周光宏

(南京农业大学 国家肉品质量安全控制工程技术研究中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 食源性致病菌是引发食源性疾病的主要因素, 如何有效地检测出食源性致病菌的存在是食源性疾病预防与控制的关键环节。本文较为系统地介绍了利用免疫学、代谢学、分子生物学和生物传感器等技术手段快速检测食源性致病菌的方法, 其中免疫学技术由于快速简便和低操作要求等特点便于目前的普及, 而分子生物学方法则是致病菌检测的主要发展方向。

**关键词:** 食源性致病菌; 快速检测; 免疫学技术; 代谢学技术; 分子生物学技术; 生物传感器技术

## Research Progress on Rapid Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens

FENG Li, HUANG Ji-chao, LIU Xin, HUANG Ming\*, ZHOU Guang-hong

(National Centre of Meat Quality and Safety Control, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Food-borne diseases are mainly caused by bacterial pathogens present in foods. How to effectively detect food-borne bacterial pathogens is the key to prevent and control food-borne disease. This systematic review describes immunological, metabolomics, molecular biological and biosensor techniques for rapid detection of food-borne bacterial pathogens. Immunological techniques are currently very popular due to rapidity, simplicity and low operating requirements. But molecular biological techniques are the main development direction.

**Key words:** food-borne bacterial pathogens; rapid detection; immunological technique; metabolomics analysis; molecular biotechnology; biosensor technology

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0332-08

近几年来, 世界范围内的食品安全恶性事故频繁爆发, 食源性疾病的爆发率一直在上升<sup>[1]</sup>, 给世界人民带来了巨大的痛苦和损失, 引起了世界各地政府的关注。据报道, 美国每年有7600万人患食源性疾病, 有5000致死病例; 据2000年的报道, 英国有130万人患食源性疾病, 有480个致死病例<sup>[2]</sup>。我国也有统计资料表示, 2003年国家食源性疾病预防网地区爆发食源性疾病总数为802起, 食源性疾病患者为17462人, 11556人住院, 106人死亡, 其中微生物病原占病因物质的46.1%<sup>[3]</sup>。由此可见, 食源性疾病与食品污染构成了一个巨大的并不断扩大的世界性的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。而如何快速灵敏地检测出食源性致病菌的存在已成为控制食品安全问题的关键。

传统的食源性疾病的检测方法都要经过分离培养、生化鉴定等步骤, 存在操作较为耗时繁琐、检测灵敏度低和容易出现假阴性等缺点, 在应对突发性食品安全公共事件上, 不能满足快速、准确、灵敏和特异性高等要求<sup>[4]</sup>。一些快速检测方法的产生和不断发展, 满足了食源

性致病菌快速并大量样本检测的需求。

## 1 基于常规检测的快速检测技术

常规微生物检测主要根据病原体不同的生理生化特性对细菌进行鉴定。微量化和自动化是微生物检测的发展方向, 目前常规的临床细菌学诊断已由系列的试剂盒商品成套供应, 代替了自行配制试剂的缓慢繁琐状态<sup>[5]</sup>。

### 1.1 微生物专有酶快速反应技术

微生物专有酶快速反应是根据细菌在其生长繁殖过程中的代谢产物含有某些特异性的酶, 选用相应的底物和指示剂, 将它们配制在相应的培养基中, 根据细菌培养后出现的明显颜色变化, 有助于快速确定待分离的可疑菌株<sup>[5]</sup>。目前, 沙门氏菌、埃希氏大肠杆菌和白色念珠菌等均可以根据相应的酶达到快速灵敏的检测效果<sup>[6]</sup>。

### 1.2 疏水性栅格滤膜法(hydrophobic grid membrane filter method, HGMF)

收稿日期: 2011-08-20

基金项目: 国家公益性行业科研专项(200903012)

作者简介: 封莉(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉品质量与安全控制。E-mail: fenglifcdc@yahoo.cn

\*通信作者: 黄明(1970—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为肉品质量与安全控制。E-mail: mhuang@njau.edu.cn

HGMF在微生物检测中应用十分广泛,该法是将经过预过滤的食品样品再用过滤器过滤,微生物由于疏水效应就留在了上千个小格的滤膜上,然后将滤膜放在适当的琼脂表面上培养后便可进行菌落计数。HGMF可对许多普通的食源性病原微生物进行检测,许多HGMF技术已被AOAC公定通过。

## 2 免疫学检测技术

免疫学技术始于Widal在1896年利用伤寒病人血清与伤寒杆菌发生特异性的凝集现象成功诊断出伤寒病<sup>[7]</sup>,此后各种免疫学相关的新方法不断涌现。免疫学方法的基本原理是抗原抗体反应,即指抗原与相应抗体之间所发生的特异性结合。不同的微生物有其特异的抗原,并能激发机体产生相应的特异性抗体。由于细菌表面抗原较多,同属细菌中既有致病菌也有非致病菌,且不同细菌之间或细菌与宿主之间可能存在共同抗原,所以实际应用中很少根据抗原检测致病菌。

### 2.1 免疫磁性分离技术(immunomagnetic separation, IMS)

免疫磁性分离技术,又称为免疫磁珠法,是以特异的抗原抗体反应为基础的一种分离技术,具体操作是将磁性微珠与特定的待测菌抗体结合,以得到被待测菌抗体包被的超顺磁性粒子,再将待测样品与免疫磁珠混合,则待测菌抗原就能与包在磁珠上的抗体发生特异性结合而被吸附在磁珠上,然后通过磁场的作用吸附着待测菌的磁珠向磁极移动,从而使待测菌得到有效地富集和分离<sup>[8]</sup>。以上步骤可取代增菌肉汤的增菌过程,能有效地收集浓缩大量样品中的少量病原菌<sup>[9]</sup>,可使采样和检测的时间减少1d。该方法具有分离样品快速、特异性强、操作简单和仪器设备简单等特点,已经广泛应用于细胞分离、病原体检测等领域<sup>[10]</sup>。张凡飞等<sup>[9]</sup>研究表明IMS法与一般的细菌培养分离方法相比,极大地提高了环境样品及食品中病原性副溶血性弧菌的检出率。刘光明等<sup>[11]</sup>应用抗血清和磁珠制备得到弯曲菌的免疫磁珠,则直接捕获得到检样中的菌,不需要增菌过程,结合荧光PCR法,可以在24h内完成检测,并到达10CFU/mL的检测限。

### 2.2 免疫扩散技术(immune diffusion technique, IDT)

IDT的原理为:抗原抗体分别在凝胶内扩散,特异性的抗原抗体相遇结合后,在凝胶内电解质的参与下沉淀形成可见的沉淀线。代明娟<sup>[12]</sup>用琼脂免疫扩散法检测伪狂犬病,认为该法操作简便、快捷、适合用于现场定性诊断,尤其是在一些使用敏感性较高的微量中和实验也检测不出的情况下,使用IDT法的检测效果比较理想。

### 2.3 免疫荧光技术(immunofluorescence technique, IFT)

IFT就是用不影响抗原抗体活性的荧光色素标记抗体(或抗原),待相应的抗原抗体反应结合后,在荧光显微

镜下可呈现特异性荧光反应,从而指示目标菌的存在。

IFT在实际应用上主要分为直接法和间接法:直接法直接添加荧光标记的特异性抗体,洗涤后能在荧光显微镜下直接观察到结果;间接法则需先加入荧光标记的第一抗体,反应后洗涤,再加入荧光标记的第二抗体才能在荧光显微镜下观察到结果。IFT可用于多种致病菌如沙门氏菌、大肠杆菌、葡萄球菌毒素和单核细胞增生李斯特菌等的快速检测<sup>[13-14]</sup>。姚裴等<sup>[15]</sup>用间接IFT技术,可检测到处于非可培养状态但仍有毒力威胁的细菌,从而减少了因漏检此类细菌而产生的危害,检测过程只需3h,因此该法是一种快速、准确、灵敏的检测技术。

### 2.4 酶联免疫吸附技术(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

酶联免疫吸附技术是将抗原(或抗体)吸附于固相载体上并保持其免疫活性,再加入酶标抗体在载体上进行免疫酶染色,底物显色后,分析有色产物量即可确定样品中待测物质的含量。ELISA根据操作的不同,常用的有双抗体夹心法、间接法和竞争法。ELISA技术利用酶促反应来放大显示初级免疫学反应,具有特异性高和敏感性高等优点,几乎所有可溶性的抗原抗体反应均可检测,灵敏度能达到纳克甚至皮克水平<sup>[5]</sup>;但该法对试剂的选择性高,很难同时分析多种成分,对结构类似的化合物有一定的交叉反应<sup>[16]</sup>。国内外学者分别应用此法对不同的细菌进行研究,结果都表明ELISA法能在24h内对多种食源性致病菌达到较为灵敏的检测结果,如应用ELISA制造的mini-Vidas全自动免疫分析仪可在24~48h内快速鉴定沙门氏菌、大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌和空肠弯曲菌等<sup>[5]</sup>。随着商品化和自动化仪器的普及,ELISA将在很多领域逐渐取代IFT和放射免疫技术。

### 2.5 酶联免疫荧光分析技术(VIDAS)

酶联免疫荧光分析技术将酶系统与荧光免疫分析方法结合起来,在ELISA的基础上用理想的荧光底物代替生色底物,从而提高了检测分析的灵敏度和测量范围。Vidas将酶放大技术、固相分离技术和荧光检测技术三者有效地结合起来,使之成为荧光免疫分析中最为灵敏的方法<sup>[17]</sup>。国内外早有研究人员在采用自动酶联荧光免疫分析系统检测冻肉中的沙门氏菌、李斯特菌和大肠杆菌<sup>[18]</sup>。

### 2.6 免疫印迹技术(immunoblot technique, IBT)

免疫印迹法分别由聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、电转移和酶免疫定位三步组成。第一步,用SDS-PAGE将目的蛋白分子按大小及所带电荷不同分离;第二步,通过电转移将凝胶中的蛋白质转移到化学惰性的高分子膜(如硝酸纤维素膜)上;第三步,将目的蛋白的特异性一级抗体(一抗)与高分子膜上的目的蛋白进行免疫结合反应,然后用特异性酶标记过的二级抗体(二抗)与一抗结合,再与能生成不溶性显色物的底物作用,最

终导致区带染色<sup>[19]</sup>。IBT综合了SDS-PAGE的高分辨率和ELISA的高灵敏度和高特异性等特点,但该方法操作复杂,如电转印的转膜缓冲液的选择、封闭作用及抗体的选择都是影响实验效率的关键,目前IBT已被广泛应用于酵母和真菌的检测中<sup>[20]</sup>。

### 2.7 乳胶凝集法(latex agglutination)

乳胶凝集法是采用人工大分子乳胶颗粒标记抗体,从而使之与待测抗原发生肉眼可见的凝集反应,以达到检测出目标病原微生物目的的方法。任利珍<sup>[21]</sup>、曹芸<sup>[22]</sup>等验证证明该法实验时间只需15min,可缩短24h报告结果,是一种快速、简便、准确、无需特殊仪器的好方法,便于在基层推广使用。

### 2.8 免疫胶体金技术(immunogold labelling technique)

胶体金技术最早由英国科学家迈克尔·法拉第发现于1857年,他用还原法从氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )水溶液中制备出了胶体金,并发现在其中加入电解质后可使胶体金最终凝集称无色,而加入明胶或其他大分子物质便可阻止这种变化。1962年Feldherr等<sup>[23]</sup>首次提出将胶体金作为一种用于电子显微镜示踪标记物的观点。1971年Faulk等<sup>[24]</sup>等用免疫沙门氏菌抗体与胶体金结合制成金标抗体,用于检测沙门氏菌的表面抗原分布。免疫胶体金技术以胶体金作为示踪标志物,应用到免疫反应中的一种新的免疫标记技术。 $\text{HAuCl}_4$ 在还原剂的作用下被还原析出纳米级金颗粒,形成带负电荷的疏水胶,由于静电作用形成稳定的疏水胶状态;蛋白质等高分子则通过静电吸附牢固地包被到胶体金表面,待测物质加入后发生抗原抗体反应而吸附到胶体金表面,从而被胶体金标记,于是显微镜下可见褐色颗粒<sup>[25]</sup>。当这些标记物大量聚集时,肉眼可见红色或粉红色的斑点,因此该技术可用于定性或半定量的快速免疫检测<sup>[26]</sup>。该技术简单快速(几分钟即可用肉眼观察到实验结果)、特异敏感、不需复杂设备和试剂,发展十分迅速,在生物学各领域尤其是动植物检疫和食品安全监督等领域得到了广泛的应用<sup>[27]</sup>。

## 3 代谢学检测技术

代谢学技术是指以对微生物生长代谢为基础,通过对其生长过程中相关的底物和代谢产物的变化特点进行监控,从而达到微生物检测的目的。代谢学技术有极大的应用潜力,尤其是在一些全球性的食品安全问题上可作为有效的工具<sup>[28]</sup>。

### 3.1 电阻抗技术

电阻抗技术是一种电化学研究方法,1899年Stewart等<sup>[29]</sup>首次提出了“阻抗微生物学”的概念,将电阻抗技术与微生物检测结合形成一个独立的研究领域。电阻抗技术是指利用细菌在培养基内生长繁殖时,培养基中的

大分子电中性物质(如碳水化合物、蛋白质等)代谢为具有电活性的小分子物质(如乳酸盐、氨基酸等),从而使培养基的导电性发生变化的现象,通过检测培养基导电性的变化情况,即可判断细菌在培养基中的繁殖特性<sup>[30]</sup>。微生物浓度达到检测下限所需时间称为检测时间(DT),在微生物生长速率近似的情况下可用DT来估计初始浓度<sup>[31]</sup>。电阻抗法已被AOAC接收,适于食品安全中病原体的检测,目前已用于食品中细菌总数、大肠杆菌和沙门氏菌等的检测中,具有敏感、快速、特异性高和重复性好等优点<sup>[13]</sup>。目前已有相关分析仪器如BacTrac自动微生物快速检测系统(奥地利Sylab)和Malthus微生物自动快速分析仪(英国Malthus公司)<sup>[32]</sup>。电阻抗法检测中,建立覆盖面广和具有代表性的标准曲线是最为关键的工作,应在检验的过程中不断完善充实标准曲线,使标准曲线的描述更加可靠<sup>[33]</sup>。

### 3.2 微量量热技术(microcalorimetry)

微量量热技术是指通过测定细菌生长代谢时的热效应进行细菌检测的技术。主要操作过程为:将微生物在生长过程中产生的热量变化用微量热计测量并记录,再根据产热量和时间的变化制作热曲线图(微量热计将数据传导给计算机),最后将得到的热曲线图与标准曲线对比,即可对细菌进行鉴别<sup>[13]</sup>。该技术发展方向为通过微量热计测定反应过程中的热量变化和时间延迟来鉴别细菌,所以标准数据库的建立是关键。虽然微量量热技术的通用性强,适用于所有微生物检测<sup>[34]</sup>,但目前此技术的发展也受到微生物热效应过程周期长、热信号小导致的测量误差大等因素的制约,因此对热信号的放大是改良该技术的关键点。

### 3.3 放射测量技术(radioassay)

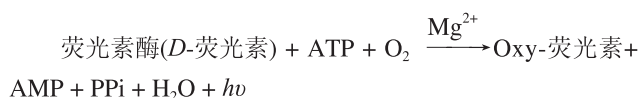
放射测量技术是指将放射性 $^{14}\text{C}$ 标记引入到碳水化合物底物中,根据细菌在生长繁殖过程中代谢碳水化合物生成 $\text{CO}_2$ 含量的多少来判断细菌的数量<sup>[35]</sup>。该方法用于检测细菌,快速、准确度高、自动化。Previte<sup>[36]</sup>首次将放射测量技术应用于食品中微生物的检测中,但由于放射性物质的限制,使得该方法还未能得到广泛应用。

### 3.4 ATP生物发光技术(bioluminescence)

ATP是活细胞内(死亡微生物体内的ATP会很快降解掉,不会对活体微生物的测量产生影响)的一种必需的代谢产物,一定条件下其含量比较稳定,因此测定细菌的ATP含量可作为计算活菌数的一个指标<sup>[37]</sup>。生物发光是依靠天然的酶促化学反应产生的能量而发光,它天然地存在于许多生物体内,如萤火虫、海里的水母和一些细菌<sup>[38]</sup>。ATP生物发光技术是基于细胞内的ATP在荧光素酶(firefly luciferase)的作用下,以D-荧光素(D-luciferin)、ATP和 $\text{O}_2$ 为底物,在 $\text{Mg}^{2+}$ 的催化下反应生成对应的Oxy-荧光素、AMP、PPi(焦磷酸)、 $\text{H}_2\text{O}$ 以及荧光素由激发态



回到基态所释放的光能,反应原理下述方程所示。可以说APT生物发光技术是将化学能转化为光能的过程,反应产生的荧光与ATP浓度成正比,反应以荧光强度来定量ATP的浓度<sup>[39]</sup>。美国NHD公司和CharmScience公司都分别推出了相应的检测系统和检测产品,已经成功地应用在鲜肉、鲜鱼、牛奶、矿泉水等多种领域的细菌检测中<sup>[40]</sup>。李春艳等<sup>[41]</sup>研究表明,用ATP生物发光法能在5~10min内检测出牛奶中细菌含量。舒柏华等<sup>[42]</sup>认为,对于熟肉制品的细菌污染状况,无需清除体细胞,其分析时间只需4min,测量下限为 $10^3$ CFU/g。生物发光法可能存在的问题是,若样品中含有大量非细胞性ATP,则检测结果可受干扰<sup>[37]</sup>。



### 3.5 聚二乙炔(polydiacetylenes, PDAs)显色技术

聚二乙炔(PDAs)是一种由交替的双键和三键组成的线性碳水化合物的聚合物,可以形成小囊泡、分子薄膜或人造细胞膜。很多细菌活细胞可代谢产生与活细胞细胞膜相关的复合物,这些复合物能够与PDAs发生使PDAs由蓝色变为红色的化学反应,从而可方便地检测到细菌活细胞的存在与否。目前关于此技术的研究还不多。

## 4 分子生物学检测技术

随着分子生物学的飞速发展,对食源性致病菌的检测鉴定已不再局限于对其外部形态及生理特性等常规检验上,而是从分子生物学水平上研究生物大分子,在此基础上建立众多的检测技术。

### 4.1 DNA探针技术

DNA探针检测微生物的依据是两条碱基互补DNA链在适当条件下按碱基互补配对的原则形成杂交DNA分子,通过检测待测样品与标记性DNA探针之间能否形成杂交分子即可判断样品中是否含有目标微生物,此外还可通过测定放射性或荧光等的强度来确定样品中微生物的含量<sup>[43]</sup>。DNA探针技术以目标菌遗传物质高度保守的核酸序列设计特异引物进行扩增,所以其最大特点是特异性和敏感性。近几年来,DNA探针已经成为非常有用的检测工具,广泛应用于食品中微生物污染的检测<sup>[44]</sup>,单核细胞增生李斯特菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌等的DNA探针技术的应用均比常规方法快速、灵敏、准确<sup>[45-46]</sup>。

### 4.2 聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)

PCR技术是在体外合适条件下,以DNA(或RNA)为模板,以一对人工合成的寡核苷酸为引物在耐热DNA聚合酶作用下特异性扩增目的DNA片段的技术。整个反应过程约由20~45个PCR循环组成,每个PCR循环包括高

温变性、低温退火和适温延伸3个步骤,反应过程先将双链DNA热变性成单链DNA,然后人工合成的引物与单链DNA靶序列结合,在碱基底物的作用下形成新的双链,新的双链则成为了复制的模板进入到下一轮复制中去。PCR法检测食源性病原菌先要经过离心沉淀富集细菌细胞、裂解细胞以释放DNA等前处理,然后用进行PCR反应数小时,即可根据所得的拷贝数来判断检样中的目标菌的含量。近年来用PCR技术检测食品中食源性致病菌的方法有很多种,如常规PCR、不对称PCR、免疫PCR、套式PCR、实时荧光定量PCR、多重PCR、逆转录PCR和电化学发光PCR<sup>[47]</sup>等,也可将几种方法结合使用。

逆转录PCR指先用逆转录酶将mRNA逆转录成cDNA,再以此cDNA为模板,使用特异性引物对特定序列进行PCR扩增<sup>[48]</sup>。逆转录PCR可以有效地只检测有活性的菌株,防止假阳性的出现。多重PCR指同一反应体系中含有多个引物,可以同时扩增多个核酸片段,所以可以同时检测多个目标菌,具有高效、系统、能降低成本等优点。实时荧光PCR是在反应体系中加入荧光分子,通过荧光信号的强弱来实时反应模板的扩增量,实现了PCR产物的实时检测。实时荧光PCR技术能够实现PCR技术从定性到定量的飞跃,该法采用全密闭管检测,不需PCR后处理,具有快速、能避免电泳带来的误差和污染、重复性好和自动化程度高的优点<sup>[49]</sup>。

PCR方法起源于20世纪90年代,为国外科学家所发明,但由于其快速、高效和定量灵敏等特点,很快被我国研究人员和检测人员所吸收并改进,并对其进行了推广宣传,目前已分别被应用到食品中大肠杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、志贺氏菌和空肠弯曲杆菌等的检测中<sup>[50-53]</sup>。

### 4.3 生物芯片技术(microarray)

生物芯片技术是将生命科学中不连续的分析过程通过分子间特异性的相互作用集成于硅芯片或玻璃芯片表面的微型生物化学分析系统中,以实现对核酸、蛋白质及其他生物组分的高通量的快速检测。根据所固化的材料的不同,可以将生物芯片分为基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片及组织芯片<sup>[54]</sup>,其中目前最为成功的是基因芯片。

#### 4.3.1 基因芯片技术

现有的PCR技术一管内只能对有限种的基因成分进行检测,对含有复杂细菌污染的食品基质则不能一次诊断,基因芯片技术则弥补了这种缺陷,其高通量的特点能一次检测出大量未知病原菌。第一块基因芯片由Fodor等<sup>[55]</sup>在1993年运用半导体照相平板技术原位合成制备。1995年,第一块以玻璃为载体的基因微矩阵芯片的发明则标志着基因芯片技术进入了广泛地应用研究阶段。此后基因芯片成为国内外研究的热门课题。

基因芯片技术是采用原位合成或显微点样技术将大

量DNA探针有规律地固化于支持物表面,然后与待测的标记样品按碱基配对原理杂交,通过放射自显影、激光共聚焦荧光检测系统等扫描芯片对杂交信号检测分析,获得样品的基因序列、基因表达等遗传信息。基因芯片上能固定的探针除了DNA片段和寡核苷酸外,也可以是cDNA或来自基因组的基因片段,它们固化于芯片上构成基因探针阵列。所以,基因芯片又称:DNA chip、DNA array、DNA microarray、Oligonucleotide microarray等<sup>[56]</sup>。根据制备方式,基因芯片可分为原位合成芯片(synthetic gene chip)和DNA微列阵(DNA microarray)两大类<sup>[57]</sup>。原位合成芯片采用光诱导印刷或压电打印、分子印章等技术在芯片的特定部位原位合成寡核苷酸制成的;DNA微列阵则采用常规分子生物学技术,如PCR、分子克隆和DNA合成技术等,将预先扩增或合成的DNA或基因片段以点样方式有序地固化于支持物表面制成<sup>[56]</sup>。一般用于致病菌检验的基因芯片只需采用DNA微列阵。基因芯片虽然源于核酸杂交技术,并利用PCR技术制备检测模板,但基因芯片所体现的优势是超越前两者的,主要表现在以下几方面:1)高密度基因芯片可同时成对成千上万个样品进行检测分析,即可实现样品的高通量检测;2)可对大量样品进行并行检测;3)反应体积小,降低了试剂的消耗;4)反应物在单位体积内浓度高,反应快,缩短了检测时间;5)特异性强;6)可完全实现自动化等<sup>[56]</sup>。基因芯片技术理论上能做到在一次实验中检测出所有潜在的致病原,也可以用同一张芯片检测某一致病原的各种遗传学指标,且具有很好的检测灵敏度和快捷性,所以在致病菌的检测分析中前景很好。Keramas等<sup>[58]</sup>研究表明,用基因芯片技术检测发热鸡粪便中的空肠弯曲菌和大肠弯曲菌的阳性检出率明显高于常规检测方法;Borucki等<sup>[59]</sup>构建的混合基因组微阵列可准确检测出各种近缘单核细胞增生李斯特菌的分离物;Wilson等<sup>[60]</sup>制备的一种多病原体识别芯片可准确检测出18种致病性病毒、原核生物和真核生物。基因芯片技术还可结合其他方法以达到更好的检测效果,如Call等<sup>[61]</sup>建立了一种对多重PCR扩增EHEC的产物进行鉴定的寡核苷酸芯片,该方法将免疫诱捕技术与PCR和基因芯片技术相结合,对鸡肉中致病菌检测的灵敏度可达到低于 $10^2$ CFU/mL,具有很高的灵敏度。

虽然基因芯片技术在微生物检测方面有很多独特的优势,但还有不少问题和缺陷亟待解决。目前主要有以下几个问题制约了基因芯片技术的应用和发展:1)基因序列信息的缺乏远不能满足实际检测与诊断的需要;2)基因芯片相关技术专利的限制,减慢了基因芯片技术的普及;3)基因芯片技术是一项多学科交叉的技术,仍有很多技术问题需要改进和提高;4)目前基因芯片的制备和检测费用都很高,只能在大型实验室研究,极大地限制了其开发进展。虽然基因芯片技术目前存在诸多问

题,但在其发展不过十几年的时间内已经在诸多领域得到了广泛的研究和应用,相信随着科技的进步,基因芯片技术将在未来有巨大的影响。

#### 4.3.2 蛋白芯片技术

蛋白芯片技术借鉴了基因芯片技术,其点样系统和信号扫描系统与基因芯片没有差别,但一方面要保持蛋白质的生理活性必须在芯片的制备分析过程中维持其高级结构,另一方面蛋白质的获得没有类似于PCR的放大技术,所以蛋白芯片的制备更为困难。蛋白芯片是一种固定了能保持天然活性的蛋白质微阵列。制备蛋白芯片的方法是:选择合适的固定相载体并对其进行特殊化学处理,将已知的大量蛋白质有序地固定在载体上捕捉能与之特异性结合的待测蛋白质,然后用扫描系统检测分析。蛋白质固定在载体上的方法主要有非共价结合、共价结合、吸附结合和末端连接高亲和力的标签,其中在蛋白质氨基端或羧基端连接高亲和力的标签可在保持蛋白质天然构象的基础上将蛋白质有序地固定在固体表面<sup>[62]</sup>。根据固定在芯片上蛋白质种类的不同,可将蛋白质芯片分为抗体芯片和抗原芯片,用于检测致病菌的通常是单克隆抗体芯片。高志贤等<sup>[63]</sup>在玻片表面分别固定兔抗原SEA、SEB和SEC共3种抗体,检测葡萄球菌肠毒素(SE),检测灵敏度达到ng/mL水平。蛋白芯片技术目前还不完全成熟,存在很多问题如:如何选择载体,如何高通量获得抗体和能特异识别蛋白质的亲和物质,蛋白质芯片中的反应与生理条件下反应的相关性等,因此需要不断地改进研究。

### 5 生物传感器检测技术

生物传感器(biosensor)是对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的设备。生物传感器起源于20世纪60年代,1962年Clark等<sup>[64]</sup>在氧电极的基础上设计出了一种新型的葡萄糖酶电极,利用酶的生物活性与待测物反应,把反应中的理化变化转换为电信号测定;1967年Updike等<sup>[65]</sup>将葡萄糖氧化酶固定化膜和氧电极组装起来,造出了第一个生物传感器葡萄糖酶传感器。生物传感器的工作原理是:待测物质扩散进入固定化的生物敏感材料(包括酶、核酸、细胞、组织等生物活性材料),发生特定的生物化学反应,产生的信息被适当的理化换能器转换为电信号,再经信号放大装置放大并输出。生物传感器有多种分类方式:根据所用生物敏感物质的不同,可分为酶传感器、免疫传感器、DNA传感器、细胞传感器、组织传感器及微生物传感器等;根据转换原理的不同,可分为电化学生物传感器、热学生物传感器、光学生物传感器、压电生物传感器和半导体生物传感器等<sup>[66]</sup>。目前在致病菌检测方面研究较多的是电化学生物传感器、光学生物传感器和压电生物传感器。



### 5.1 电化学生物传感器

电化学生物传感器将电极作为能量转换元件,利用在电极介质面上进行的电化学反应将被测化学信号转换为电信号的一种生物传感器。电化学生物传感器是最早发明、研究最充分的传感器技术,目前病原菌生物传感器检测中大多数采用电化学换能元件<sup>[67]</sup>。电化学生物传感器主要有电流型、电势型和电阻型3种,前两种主要用于病毒检测,电阻型则可用于检测细菌。Ruan Chuanmin<sup>[68]</sup>、Kim<sup>[69]</sup>等分别构建了针对大肠杆菌和沙门氏菌的阻抗生物传感器,都能达到 $10^3$ CFU/mL的检测限,所需孵化期仅约5min。

### 5.2 光学生物传感器

光学生物传感器源于传统的物理传感器,它将反应产生的化学信号转换为光信号,所以除了有快速灵敏的特点外,其最大的优势是抗外界干扰能力强。光学生物传感器的光学检测模式有吸收、反射、荧光、化学发光和磷光等,在致病菌检测中最有应用前景的应该是表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)和荧光原理的传感器。SPR技术是一种基于反射光谱的非标记检测技术,它将已知生物分子固化在几十纳米厚的金属膜表面,加入能够与之结合的目标生物分子,由此引发的光学信号随机被SPR传感器转化为电信号进行检测分析,SPR技术能够实时对有机分子或无机分子之间的相互作用模式及动力学进行检测<sup>[70]</sup>。Subramanian等<sup>[71]</sup>将*E. coli* O157:H7抗体用自组装膜法固定到传感器芯片表面,并对其进行双抗体夹心操作,能达到 $10^3$ CFU/mL的检测限。

### 5.3 压电生物传感器

压电生物传感器以压电材料作为能量转换元件,通过压电效应(即某些电解质晶体在外力作用下发生变形时,由于应力而在晶体内产生电极化的现象)将化学信号或生物信号转化为电信号的一种传感器。相对其他生物传感器而言,压电生物传感器设备简单、反应快速灵敏、样品无需标记且易于自动化。Vaughan等<sup>[72]</sup>用石英体微天平快速检测李斯特菌,能达到 $10^7$ CFU/mL的检测限;Wong等<sup>[73]</sup>在此基础上结合抗原抗体结合原理检测沙门氏菌,利用血清特异性单克隆抗体能达到 $10^5$ CFU/mL的检测限,并能区分不同株型。

## 6 结 语

免疫学技术在试剂选用恰当的情况下能表现出较好的特异性、准确性、高效率、价廉、不需要大型仪器、技术含量低等的优点,但当待测物中含有目标菌的竞争性物质时则很有可能出现假阳性,并且免疫学方法一般需要提供数量较多的纯化细菌,所以在短时间内快速富集目标菌是该方法提高检测速度的关键;分子生物学方

法虽然也有快速、高效、特异性等优点,但由于价格昂贵、基因测序的研究还不完全等缺陷,导致该方法不利于推广;代谢学技术和生物传感器技术则由于需要大量的数据支撑以建立相应的数学模型,目前还未得到推广。

食源性致病菌的快速检测方法在我国的国标中仍然沿用着传统的选择性增菌、生化鉴定等方法,至少耗时4~5d,在基层检验和食品加工厂检测中不能达到良好的时效性,所以很难应对和控制大型食源性疾病的爆发,这对人口世界第一的我国来说是极大的挑战。所以,食源性疾病在基层检验中必须普及较为快速、灵敏的方法以代替目前的滞后状况。要达到食源性疾病检测系统的完善,应该在不断发展新技术的同时,综合现有的技术得到更有效的检测方法,将不同的方法应用到其适合推广的领域。目前,免疫学技术等低操作要求的方法应该会得到最为广泛的应用,而分子生物学方法则是食源性致病菌快速检测方法的最主要发展方向。在生物芯片技术与荧光探针技术相结合并日益成熟的情况下,形成一整套的分子生物学的方法,将使食源性致病菌的快速检测达到灵敏度高、特异性强、重复性好和经济简便的水平。

### 参考文献:

- [1] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004(1): 3-9.
- [2] LUKINMAA S, NAKARI U, EKLUND M, et al. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens[J]. APMIS, 2004, 112: 908-929.
- [3] 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 201-204.
- [4] 崔晓燕, 陈峰, 谭湘凌, 等. 食源性致病菌多重聚合酶链反应快速检测[J]. 现代预防医学, 2010, 37(3): 519-520.
- [5] 陈庆森, 冯永强, 黄宝华, 等. 食品中致病菌的快速检测技术的研究现状与进展[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 148-152.
- [6] 王金良. 微生物快速检验技术进展[J]. 当代医学, 2000, 6(5): 53-57.
- [7] QLOPENIA L A, KING A L. Widal agglutination test-100 years later: still plagued by controversy[J]. Postgraduate Medical, 2000, 76: 80-84.
- [8] FITZMAURICE J, DUFFY B, GILBRIDE B, et al. Comparison of a membrane surface adhesion recovery method with an IMS method for use in a polymerase chain reaction method to detect *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59: 243-252.
- [9] 张凡飞, 杉山宽治, 西尾智裕, 等. 利用免疫磁珠法分离环境及食品中产生TDH副溶血性弧菌的研究[J]. 中国卫生监督杂志, 2004, 11(1): 7-9.
- [10] 李雅静, 吴绍强. 免疫磁性分离技术在食源性疾病检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2008(12): 248-251.
- [11] 刘光明, 苏文金, 蔡慧农, 等. 空肠弯曲菌的磁捕获-荧光PCR检测方法的建立[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 336-340.
- [12] 代明娟. 应用琼脂免疫扩散试验检测猪伪狂犬病[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002(7): 40.
- [13] 代娟, 李玉峰, 杨潇. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 110-112.

- [14] YAN B, CHENG A C, WANG M S, et al. Application of an indirect immunofluorescent staining method for detection of *Salmonella enteritidis* in paraffin slices and antigen location in infected duck tissues[J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14(5): 776-781.
- [15] 姚斐, 寇运同, 陈刚, 等. 间接免疫荧光抗体技术检测活的非可培养状态的副溶血弧菌[J]. 海洋科学, 2000, 24(9): 10-12.
- [16] 吴清平, 范宏英, 张菊梅. 食源性致病菌免疫及分子检测新技术研究进展[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 269-273.
- [17] 龚波林, 郑震. 荧光法酶免疫分析测定血清中肝癌细胞的研究[J]. 宁夏大学学报, 1998, 19(2): 135-137.
- [18] 陈思强, 钟伟强, 曾镇兴, 等. 自动酶联荧光免疫分析系统检测冻肉中沙门菌的评价[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2004, 27(5): 309-310.
- [19] 佟平, 陈红兵. 免疫学技术在食品微生物检测中的应用[J]. 江西食品工业, 2007(1): 36-38.
- [20] 张燕婉, 叶珏, 时那, 等. 蛋白质免疫印迹技术的实验研究[J]. 实验技术与管理, 2008, 25(10): 35-37.
- [21] 任利珍, 干迪郁, 朱立军. 乳胶凝集法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(8): 1020.
- [22] 曹芸, 陈品, 何启盖, 等. 乳胶凝集试验快速检测副猪嗜血杆菌[J]. 动物医学进展, 2009, 30(12): 8-13.
- [23] FELDHER C M, MARSHALL J M. The use of colloidal gold for studies of intracellular exchanges in the ameba chaos[J]. The Journal of Cell Biology, 1962, 12(3): 640-645.
- [24] FAULK W, TAYLOR G M. An immunocolloidal gold method for the electronmicroscope[J]. Immunochemistry, 1971, 8: 1081-1087.
- [25] 曾庆梅, 张冬冬, 杨毅, 等. 食品微生物安全检测技术[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 632-637.
- [26] 方莹. 免疫胶体金技术及其在微生物检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1399-1401.
- [27] BEGGS M, NOVOTNY M, SAMPEDRO S, et al. A self performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophic (HCG) in wine and serum[J]. Clin Chem, 1990, 36(12): 1084-1085.
- [28] CEVALLOS-CEVALLOS J M, REYES-DE-CORCUERA J I, ETEXBERRIA E, et al. Metabolomic analysis in food science: a review[J]. Trends in Food Science And Technology, 2009, 20: 557-566.
- [29] STEWART G N. The changes produced by the growth of bacteria in the molecular concentration and electrical conductivity of the culture media[J]. J Exp Med, 1899, 4(2): 235-243.
- [30] 陈广全, 张惠媛, 饶红, 等. 电阻抗法检测食品中沙门氏菌[J]. 食品科学, 2001, 22(9): 66-70.
- [31] CADY P, DUFOUR S W, LAWLESS P, et al. Impedimetric screening for bacteriuria[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1978, 7(3): 273-278.
- [32] 胡珂文, 王剑平, 盖玲, 等. 电化学方法在微生物快速检测中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 526-530.
- [33] 易敏英, 李志勇. 电阻抗法快速检测鲜牛奶中细菌总数[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(3): 30-31.
- [34] HIGUERA-GUISSET J, RODRIGUEZ-VIEJO J, CHACÓN M, et al. Calorimetry of microbial growth using a thermopile based microreactor[J]. Thermochimica Acta, 2005, 427: 187-191.
- [35] FUNG D Y C. What's needed in rapid detection of foodborne pathogens[J]. Food Technology, 1995, 49(6): 64-67.
- [36] PREVITE J J. Radiometric detection of some food-borne bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1972, 24(4): 535-539.
- [37] 唐银, 文斌, 郭思健, 等. 生物发光法快速测定尿标本中的病原菌[J]. 湖南医科大学学报, 1997, 22(6): 533-534.
- [38] CHENG J, WOOD K, FAN F. 生物发光技术在生命科学中的应用[J]. 生物物理学报, 2009, 25(5): 356-360.
- [39] MURPHY S C, KOZLOWSKI S M, BANDLER D K, et al. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems[J]. Journal of Dairy Science, 1998, 81(3): 817-820.
- [40] 王福厚, 霍贵成, 王德国, 等. 食品中沙门氏菌检测方法的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(10): 38-41.
- [41] 李春艳, 霍贵成, 王德国, 等. ATP生物发光法快速测定生乳中微生物总数的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 233-238.
- [42] 舒柏华, 孙丹陵, 王胜利, 等. 肉类食品细菌污染生物发光快速分析技术研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 483-484.
- [43] 甘玉东, 阳成波. 转基因产品检测方法研究进展[J]. 中国饲料, 2004(14): 22-23.
- [44] 刘继青, 邵春花, 吕慧卿. DNA探针及基因放大技术对食品中微生物类致病菌的快速检测[J]. 食品科学, 1996, 17(8): 47-50.
- [45] 樊慧珍, 于化鹏, 黄文杰. DNA探针杂交快速检测肺炎链球菌和流感嗜血杆菌[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(12): 1503-1506.
- [46] 吴仲梁, 李晓虹, 韩伟. 利用商品DNA探针检测食品中单核细胞增生李斯特菌的快速检测评估[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(5): 64-68.
- [47] WEI Jie, ZHOU Xiaoming, XING Da, et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* in sea foods by electrochemiluminescence polymerase chain reaction method[J]. Food Chemistry, 2010, 123: 852-858.
- [48] CHENG Anchun, WANG Mingshu, XIN Hongyi, et al. Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(1): 1-5.
- [49] 李洁莉, 钱凯, 周晓薇. 荧光定量PCR法与常规PCR法检测牛奶中肠道致病菌的比较[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 273-277.
- [50] 毛红霞, 黎源倩, 裴晓方. 多重聚合酶链反应-毛细管电泳-激光诱导荧光法检测三种食源性致病菌[J]. 色谱, 2007, 25(4): 473-477.
- [51] 陈苏红, 张敏丽, 张政. 复合探针实时荧光PCR检测大肠杆菌O157:H7[J]. 解放军预防医学杂志, 2005, 23(6): 403-405.
- [52] 蒋鲁岩, 蔡潭溪, 邵景东. 应用双重Real time PCR同步定量检测食品中的副溶血性弧菌及金黄色葡萄球菌[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(3): 205-209.
- [53] ASLAM M, HOGAN J, SMITH K L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk[J]. Food Microbiology, 2003, 20(3): 345-350.
- [54] 李谨. 基因芯片技术的发展与应用[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(8): 87-89.
- [55] FODOR S P A, RAVA R P, HUANG X C, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chip[J]. Nature, 1993, 364: 555-556.
- [56] 戴亚斌, 何农跃, 刘梅. 基因芯片技术及其在微生物检测中的应用[J]. 动物医学进展, 2006, 27(10): 41-46.
- [57] HOHEISEL J D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis[J]. Nature Reviews Genetics, 2006, 7(3): 200-210.
- [58] KERAMAS G, BANG D D, LUND M. Use of culture, PCR analysis, and DNA microarrays for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken feces[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(9): 3985-3991.
- [59] BORUCKI M K, KRUG M J, MURAOKA W T, et al. Discrimination among *Listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 92(4): 351-362.
- [60] WILSON W J, STROUT C L, DESANTIS T Z, et al. Sequence-

- specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(2): 119-127.
- [61] CALL D R, CHANDLER D P, BROCKMAN F. Fabrication of DNA microarrays using unmodified oligonucleotide probes[J]. *Biotechniques*, 2001, 30(2): 368-379.
- [62] 杜宗敏, 杨瑞馥. 蛋白质芯片在功能蛋白组学研究中的应用[J]. *军事医学科学院院刊*, 2005, 29(1): 72-77.
- [63] 高志贤, 杨明早, 王涛, 等. 用于检测葡萄球菌肠毒素的免疫芯片技术[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(8): 99-104.
- [64] CLARK L C, LYONS C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1962, 102: 29-45.
- [65] UPDIKE S J, HICKS G P. Sensitivity of electro chemical enzyme sensor for glucose determination[J]. *Nature*, 1967, 214: 986-988.
- [66] 郝全义, 王太宏. 生物传感器及其在传染病检测中的应用[J]. *中国基础科学*, 2009(6): 8-14.
- [67] MEADOWS D. Recent developments with biosensing technology and applications in the pharmaceutical industry[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 21(3): 179-189.
- [68] RUAN Chuanmin, YANG Liju, LI Yanbin. Immunobiosensor chips for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(18): 4814-4820.
- [69] KIM G, MORGAN M, HAHM B K, et al. Interdigitated microelectrode based impedance biosensor for detection of *Salmonella enteritidis* in food samples[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2008, 100(5): doi:10.1088/1742-6596/100/5/052044.
- [70] 刘学勇, 自延强, 熊江辉, 等. 表面等离子体共振生物传感器在微生物检测中的应用[J]. *空间科学学报*, 2006, 26(4): 264-267.
- [71] SUBRAMANIAN A, IRUDAYARAJ J, RYAN T. A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E.coli* O157:H7[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(7): 998-1006.
- [72] VAUGHAN R D, O'SULLIVAN K, GUIBBAULT G G. Development of a quartz crystal microbalance(QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29: 635-638.
- [73] WONG Y Y, NG S P, NG M H, et al. Immunosensor for the differentiation and detection of *Salmonella* species based on a quartz crystal microbalance[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, 17: 676-684.