

现代生物技术在食品检验中的应用

The application of modern biotechnology in food inspection

刘重慧^{1,2} 范誉川^{1,2} 徐明宇^{1,2} 魏 涛^{1,2}

LIU Chong-hui^{1,2} FAN Yu-chuan^{1,2} XU Ming-yu^{1,2} WEI Tao^{1,2}

(1. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100191; 2. 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

(1. College of Biochemical Engineering of Beijing Union University, Beijing 100191, China;

2. Municipal Key Laboratory of Biologically Active Substances and Functional Food, Beijing 100191, China)

摘要:现代生物检验技术因特异性强、灵敏度高、检测结果精确等优点,在食品检验中有良好的应用前景。文章就生物传感器技术、生物芯片技术、ELISA、PCR 等生物技术方法在食品检验中的应用进行探讨,以期为上述技术在食品检验中的应用提供参考。

关键词:生物传感器技术;生物芯片技术;ELISA;PCR;食品检验

Abstract: As the modern biological technology has such advantages as strong specificity, high sensitivity and accuracy in detection, it has good application prospect in food inspection. In this paper, discuss and study the application of biological sensor technology, the biochip technology, the ELISA (ELISA) and the PCR in the field of food inspection so as to provide some references for the food test in the future.

Keywords: biosensor technology; biological chip technology; ELISA; PCR technology; food test

食品安全问题与人民群众的身体健康和生命安全息息相关,民众对食品的质量与安全问题越来越关注,这对食品的检验方法和技术提出了更严格的要求。传统食品检验主要通过物理、化学仪器的检测,在检测过程中易受到多种因素的影响,检测效率低,结果不稳定,无法满足现代化食品检测的需要。随着分子生物学、基因工程等研究的不断深入,现代生物检测技术也得到了迅速发展。现代生物检测技术特异性强、安全、环保、检测结果准确,对现代食品检测的发展起到了积极作用。文章阐述了生物传感器技术、生物芯片

技术、ELISA、PCR 等现代生物技术的研究现状、发展方向及在食品检验中的应用,这些现代生物技术在食品的检验中表现出了巨大的优势和良好的应用前景。

1 生物传感器技术

1.1 原理及特点

最权威的关于生物传感器的定义是 Bio-sensor 杂志于 1990 年提出来的,它将一种生物材料或生物衍生材料、生物模拟材料与物理化学传感器或者微系统密切结合起来,行使其检测分析功能,这种传感器或微系统可以是光学的、热学的、电化学的、压电的或磁学的^[1]。生物传感器由 2 个元件组成:生物传感器识别元件和信号转换元件(换能器)。生物传感器技术的创新之处在于将生物反应技术和生物特征二者整合分析,使之在生物传感器的识别系统中被识别并分析,然后通过被测信号的转换进而得出食品中的成分和有害物质的含量^[2]。基于抗原-抗体特异性结合为理论基础的免疫传感器在实际中的应用最为广泛^[3]。

生物传感器分析技术具有操作简便、灵敏度高、精确度高、快速筛查、便于携带、对待测样品进行定量分析、在线监测及成本低等优点。它作为一种多学科交叉的新技术,在食品质量安全检测中正发展成为一种强有力的分析工具^[4]。

1.2 研究现状

随着生物学和物理化学的不断发展,各种检测技术的不断进步,生物传感器技术也得到了快速发展。电化学生物传感器是一种将生物反应技术与电化学分析方法相结合而发展起来的具有高效、灵敏、选择性好、操作简单且成本低等优点的生物传感器^[5]。石墨烯等碳纳米材料具有生物相容性高、比表面积大、表面活性位点高等优点,因而被广泛地应用到生物传感器领域。近年来将碳纳米复合材料、化学以及生物等多种放大技术相结合构建电化学生物传感器的研究越来越多^[6]。基于新型纳米材料催化、酶催化、无酶催化^[6]以及生物学放大技术用于蛋白质检测的电化学生物传感器

基金项目:北京联合大学教学改革及专业建设项目(编号:JJ2015Y071)

作者简介:刘重慧,女,北京联合大学在读硕士研究生。

通信作者:魏涛(1969—),女,北京联合大学教授,硕士。

E-mail: weitao@buu.edu.cn

收稿日期:2017-04-14

的研究也成为了相关研究人员关注的热点。纳米传感器在检测食品包装内气体、食品中小分子和食源性致病菌方面的研究取得了很好的效果,与传统检验方法相比,其最大的优势在于可在不破坏食品包装的情况下实现对食品质量的动态监测^[7],在食品检验中有巨大的发展潜力和应用价值。然而,这项技术尚不能完全取代传统的食品检验技术,纳米传感器材料成本控制、纳米材料向食品中的迁移及食用安全性评价、纳米传感器与宏观世界的沟通等问题,是这项技术发展过程中有待解决的课题^[8]。近年发展起来的生物传感器无损检测技术——电子鼻检测技术检测灵敏、高效^[9-10],但其易受环境因素的影响,开发特异性强的新型传感器材料是该技术的主要方向^[11]。近年来在生物传感器基础上发展起来的电子舌技术可以模拟人类的味觉,快速方便地检测食品的特性,该技术也是目前研究的热点^[12]。

1.3 在食品检验中的应用

生物传感器技术可以对食物中的有害微生物、病毒、农药及非法添加物进行检测。Luo 等^[13]建立了一种 ATP 生物发光法快速检测细菌数量的生物传感器,该生物传感器由 2 个主要元件构成,包括作为采样器的一次性敏感元件和作为检测器的光电倍增管。该方法通过细菌细胞内 ATP 与荧光素—荧光素酶试剂反应发光,生物发光信号转化为相应的电信号,经由光度计测量检测细菌数量。Grossi 等^[14]介绍了一种便携式基于阻抗测量方法的生物传感器系统,该系统含有待测样品孵化室系统,用来控制目标温度的调温板和阻抗测量板,该技术可监测由于细菌代谢使待测样品产生的电特性的变化,从而检测细菌浓度。Yang 等^[15]第一次报道了以电渗流为基础的生物传感器的实时监测,该生物传感器是基于电渗流通过单壁碳纳米管(SWNTs)-抗体复合物,形成一个网络作为“生物半导体”,再通过银电极连接欧姆表,通过监测电阻的变化反映抗原-抗体变化。此外,还可以采用第二抗体用来标记靶分子,作为一个额外的测量,以验证或放大信号。近年来,国内外学者做了许多农药残留检测方面的生物传感器的研究。其中酶、免疫传感器等的应用最为广泛^[16]。莱克多巴胺、盐酸克仑特罗等药物是目前监测出来的“瘦肉精”的主要成分,它们属于中度蓄积性药物,对人体有害,中国已明确禁止在动物饲料及其饮用水中使用。目前已研究出各种 SPR(表面等离子体共振)生物传感器可对食品中的这些物质进行精确地监测,李会芹等^[17]报道了一种基于光学表面等离子共振测量方法的生物传感器技术,该技术将盐酸克仑特罗抗原固定于表面金膜的表面,通过竞争抑制法监测其微量的物质质量的波动,从而测得样品中盐酸克仑特罗含量。

2 生物芯片技术

2.1 原理及特点

采用光导原位合成或微量点样等方法,将生物大分子比如核酸片段、多肽分子、组织切片、细胞等生物样品有序地固定于玻片、聚丙烯酰胺凝胶等支持物的表面,然后通过已与标记的待测生物样品中的靶分子杂交,用特定的检测仪器对

杂交信号的强度进行高效快速地检测分析,从而判断样品中靶分子的数量^[18]。

生物芯片技术是食品检验中最快速、高通量、最适用的高新检测技术。生物芯片技术使用方便、分析速度快、样品和试剂消耗低,由于标准化和自动化程度高使检测重现性较好^[19]。生物芯片具有多样性、微型化和自动化特点,可在单个芯片上进行高通量的检测,而且可以对样本的多个方面进行分析,由于检测过程是平行的,可以排除其他因素造成的试验差异,使结果更准确。

2.2 研究现状

可视芯片是近几年发展起来的一种新型芯片技术,与传统生物芯片相比,芯片杂交信号可直接用肉眼或显微镜下观察,不需要使用昂贵的荧光扫描仪,极大地降低了检测成本,该技术为快速准确地进行食品安全检测提供了一种崭新的技术平台^[20]。

毒理芯片 Toxchip 技术,通过构建模型化化合物的毒理效应数据库,研究人员通过在同一模型系统下将未知的毒物所引起的基因表达与库中的数据相对比,通过比照分析,从而获得未知毒物的作用机理,它可在分子水平上评价外界有毒物质的毒性状况^[21]。此技术还可为毒理学试验,提供有意义的信息,避免许多不必要的动物试验,同时又能降低成本、缩短时间。

芯片实验室是生物芯片研究领域的热点和发展方向,是一种高度集成的便携式生物系统,包括从生物样品的制备到生物活性物质的分离、浓缩、扩增、检测分析及结果显示等都会在一块芯片上体现,从而使现有繁琐的、不精确的生化分析过程实现微型、连续、自动化,由于整套芯片系统是高度自动化的,使检测结果更加准确和客观^[22]。生物芯片技术由于其具有巨大的分析检验能力、样品用量少、平行性好、通量高、使用简便、高效快速化的优点,使其越来越有可能在未来的生物学研究、食品检测等方面得到应用。随着大量基因序列被测定、生物芯片技术将为生物体生命遗传信息的处理和应用提供可靠的手段,生物芯片技术的应用有很好的产业化前景。但也有一些需要解决的问题,如信号检测系统,计算机软件及分析系统价格昂贵,芯片的特异性,检测信号的灵敏度有待于进一步提高,样品制备和标记的操作需要进一步简化。

2.3 在食品检验中的应用

所有通过摄食进入人体,使人患感染性或中毒性疾病的病原体,统称为食源性疾病。食品安全检测中的一个重要环节就是检测是否存在食源性致病微生物。食源性致病微生物广泛存在于禽肉及制品、奶制品、水产品中^[23]。食源性致病微生物对食品的污染,不仅会严重威胁人类的身体健康,同时会造成巨大的经济损失。Kim 等^[24]专为 11 个主要的食源性致病菌,使用比较基因组学选择了 70 个寡聚核苷酸探针用于微阵列分析,发现该微阵列与各个食源性致病菌的基因组 DNA 表现出高度特异性。Bai 等^[25]报道了利用硅基质的薄膜型基因芯片可同时快速、可靠、灵敏地检测出 11 种

食源性致病菌。朱许强等^[26]运用可视基因芯片技术快速准确检测食品中肠出血性大肠埃希菌、沙门菌、单核细胞增生李斯特菌和志贺菌 4 种常见产毒微生物;通过选取这些微生物的基因设计探针和引物,在下游引物的 5'端标记生物素,探针 5'端标记一段 polyT,通过 PCR 扩增后,将产物与固定于可视芯片的特异性探针进行杂交,可以准确且稳定地实现对这 4 种常见产毒微生物的通用检测。

伴随着基因工程技术的迅速发展,以基因工程为基础的转基因技术得到广泛应用。由于转基因食品不同于相同生物来源的传统食品,转基因食品中含有通过转基因技术导入的外源目的基因以及目的基因在受体细胞内的表达产物,其遗传性状发生了改变,因而可能导致有毒物质产生或引起人的过敏症状^[27]。消费者对转基因食品有知情权和选择权,为了维护消费者的合法权益,对转基因食品的检验成为相关法规的必然要求,转基因食品的检测技术的研究已成为当前食品检验领域的热点。成晓维等^[28]采用基因芯片成功地对转基因大豆、玉米、水稻等样品进行检测,杂交结果明显直观,检测结果高效、准确。Bai 等^[29]建立了可快速检测 6 种转基因玉米品种的可视基因芯片检测方法,该方法特异性强、灵敏度高。

3 酶联免疫法

3.1 原理及特点

酶联免疫法 (enzyme linked immunodeficient assay, ELISA)是在免疫酶基础上发展起来的一种免疫测定技术。其主要是利用抗原与抗体的高特异性反应以及酶的高效催化作用,通过合适的载体,使酶标抗原或抗体与待测样品发生反应,形成酶标抗原抗体复合物,加入相应的酶底物后,复合物上的酶催化底物显色。一定条件下,有色产物量与待测样品的含量直接相关,由此可对待测样品进行定性定量分析^[30]。酶联免疫法作为一种免疫分析检测方法,具有操作简便、针对性强、分析容量大、不需要昂贵仪器设备等优点,常被用于食品的安全检测^[31]。

3.2 研究现状

随着亲合力高、特异性强的抗体生产技术日臻完善,酶联免疫法在超微量农药残留分析检测以及现场快速检测等方面的技术也在逐渐完善,使 ELISA 在食品检验方面具有广阔的应用前景和开发潜力。ELISA 技术的研究热点是开发特异性强的重组抗原,并且可以进行多项标记的全自动酶联免疫测定方法。提高检测样品的稳定性,有利于检测技术的产业化发展。目前研究方便快捷的酶联免疫试剂盒是 ELISA 的发展方向。于洪侠等^[32]公开了一种检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒,可快速准确地检测饲料及畜产品中残留的三聚氰胺。免疫胶体金技术是继酶标记技术后发展起来的固相标记免疫测定技术,因其易制备、价格低、可控性强、不影响待测样品的生物活性、检测方便、应用范围广等优点在食品检测方面有极大的发展潜能^[33]。目前,利用胶体免疫层析技术检测饲料食品中的真菌毒素^[34]、基于胶体金免疫层析技术结合免疫金银染色法检测食品中的有害物质是

目前研究的热点^[35]。

3.3 在食品检验中的应用

Wang 等^[36]建立了基于多克隆抗体和免疫层析试剂条法检测黄曲霉毒素 M₁的竞争 ELISA 快速分析方法,该方法是将辣根过氧化物酶与黄曲霉毒素 M₁单克隆抗体进行偶联后与黄曲霉毒素 M₁竞争性反应。伍燕华等^[37]建立了快速检测食品中沙门氏菌的双抗夹心 ELISA 法,采用该法检测时与其他杂菌不存在交叉反应,可以快速准确地检测食品中的沙门氏菌,其特异性强、灵敏度高。过敏原检测方法可以避免许多因食物过敏造成的健康危害。谈超等^[38]建立了绿豆过敏原蛋白间接竞争性酶联免疫检测方法,通过制备绿豆过敏原,经由新西兰大耳白兔体内免疫,从而制备绿豆过敏原多克隆抗体,建立间接竞争酶联免疫方法。ELISA 法在转基因食品中也有广泛的应用,通过制备特异性抗体,建立异种动物双抗体夹心 ELISA 法可检测转基因棉花中的外源蛋白^[39]。

4 聚合酶链式反应

4.1 原理及特点

聚合酶链式反应技术 (PCR)是在体外一定条件下,以一条单链 DNA 作为模板,加入 dNTP、引物,在人工合成的热稳定 DNA 聚合酶作用下沿着 5'-3'方向特异性扩增 DNA 片段的技术。PCR 由高温变性,低温退火,恒温延伸 3 个步骤组成^[40]。广泛应用于微生物领域。PCR 技术是 20 世纪 80 年代诞生的一项 DNA 体外扩增技术,该技术自问世以来,就在生物科学的众多领域得到了广泛的应用。聚合酶链式反应技术在微生物检测中具有快速准确、灵敏度高、操作简单等优点,且对起始材料质量要求不是很高。

4.2 研究现状

随着分子生物学的不断发展,PCR 技术也得到了快速发展。近来发展起来许多衍生技术,如:多重 PCR 技术、实时荧光定量 PCR 技术、ET-PCR 等。多重 PCR 是 PCR 技术的发展,通过在同一反应体系中加入 2 对或 2 对以上引物,从而可以同时扩增出多个目的基因或 DNA 序列。多重 PCR 可以扩增一个物种的一个 DNA 片段也可以同时扩增多个物种的不同 DNA 片段,对高效快速检测具有重要意义,已经成为近年来的研究热点^[41]。实时荧光定量的基本原理:使样本核酸扩增呈指数增长,在反应体系和条件完全一致的情况下,反应体系中加入荧光染料或荧光探针,由于反应体系中的荧光染料或荧光探针 (荧光标记物)与待测样品扩增产物结合发光,产生荧光量与扩增产物量呈正比,通过监测荧光信号的积累实时了解整个反应进程,反应结束后通过与标准曲线比对,可对未知模板进行定量分析,该方法操作简便,高通量^[42-43]。ET-PCR(限制性核酸内切酶介导的实时聚合酶链反应)允许单链单基因和多基因的实时分析,并提供核酸重复的定量分析。经检验 ET-PCR 分析的灵敏度和特异性均较高,且操作简单、可重复性强和低污染的优点,具有良好的应用前景^[44]。

4.3 在食品检验中的应用

Belgin 等^[45]采用免疫磁珠(IMS)分离技术和多重 PCR 方法分析大肠杆菌 O157:H7 的类型,主要通过检测分析待测新鲜牛肉样品中大肠杆菌 stx1、hly、stx2、fliCH7、eae 等因子。赵洁等^[46]研究了实时荧光定量 PCR 技术在肠道微生物的相关研究中的应用,该方法快速准确,可以提供全面深入的信息。

根据 PCR 技术的作用原理,PCR 技术的应用可以改变生物体遗传物质的性质,因此,在实际应用过程中,PCR 往往用于转基因食品的检测,PCR 技术在转基因食品中的应用使转基因类食品的检测更加规范化,且过程便捷。董立明等^[47]应用多重 PCR 技术,建立了能同时检测 *CaMV35S* 启动子、*FMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*bar* 基因、*CP4-EPSPS* 基因和 *NPTH* 基因 6 种最具代表性的商品化的转基因成分,该方法通过特异性引物设计与筛选,优化反应体系和反应程序,能够准确检测转基因玉米、大豆、棉花、油菜等各类样品中相应的转基因成分。该方法为食品中常见转基因成分检测提供了一种高效的检测手段,有较高的应用价值。邢珍娟等^[48]以 *CP4-EPSPS* 基因玉米为研究对象,用玉米常见的 3 种转基因成分作为检测靶标,建立了直接 PCR 技术快速筛查转基因玉米的方法。

5 展望

近些年来,食源性疾病接连不断地出现,食品安全问题形势严峻。如中国三聚氰胺事件、瘦肉精事件、苏丹红事件等令人感到恐慌,还有食品加工新技术、转基因食品所带来的不确定性,及由于环境的日益恶化,空气、水质、土壤的污染,农药的大量使用等导致农牧渔产品的污染,食品安全面临严峻考验,进出口产品的检验也越来越严格。新型、高效、准确、灵敏的食品安全检测分析技术的深入研究和推广应用变得刻不容缓。生物传感器技术、生物芯片技术、酶联免疫反应技术、PCR 技术等生物技术由于其特异性强、检测快速准确在食品检验方面有良好的应用前景。目前,降低成本是使这些生物技术实现产业化的主要方向和趋势。

参考文献

[1] LETH S, MALTONI S, SIMKUS R, et al. Engineered bacteria based biosensors for monitoring bioavailable heavy metals[J]. Electroanalysis, 2002, 14(1): 35-42.

[2] 赵涛,郝红,管晓玉,等.生物传感器研究及应用进展[J].化学研究与应用,2009,21(11):1481-1485.

[3] 肖飞.新型电化学免疫传感器的制备及其在食品安全检测中的应用研究[D].上海:华东师范大学,2012:46-47.

[4] 蒋雪松,许林云,卢利群,等.生物传感器在食品污染物检测中的应用研究进展[J].食品科学,2013,34(23):357-362.

[5] 韩静.基于碳纳米复合材料与信号放大技术构建电化学生物传感器的研究[D].重庆:西南大学,2015:1-3.

[6] 申文君.纳米材料的无酶催化放大策略在电化学生物传感器中的应用研究[D].重庆:西南大学,2016:6-7.

[7] 何大星.略探食品检验中采用纳米传感器的功效[J].中国科技

博览,2015(45):174-174.

[8] 王晓岑,井晶,滕刚,等.纳米传感器在食品检验中的应用[J].食品与发酵工业,2014,40(1):180-186.

[9] MARIÁ de las Nieves López de Lerma, BELLINCONTRO A, GARCÍA-MARTÍNEZ T, et al. Feasibility of an electronic nose to differentiate commercial Spanish wines elaborated from the same grape variety[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 790-796.

[10] 万赐晖,贾文坤,王纪华,等.基于人工神经网络算法的电子鼻系统在食品无损检测中的应用[J].食品与机械,2016,32(10):221-225.

[11] 史晓亚,高丽霞,李鑫,等.无损检测技术在食品安全快速筛查中的应用[J].食品安全质量检测学报,2017(3):747-753.

[12] 王艳芬.基于电子舌鉴别的传感器阵列优化方法研究[J].食品与机械,2016,32(7):93-95.

[13] LUO Jin-ping, LIU Xiao-hong, TIAN Qing, et al. Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 394(1): 1-6.

[14] GROSSI M, LANZONI M, POMPEI A, et al. An embedded portable biosensor system for bacterial concentration detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2010, 26(3): 983-990.

[15] YANG Ming-hui, SUN S, BRUCK H A, et al. Electrical percolation-based biosensor for real-time direct detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB)[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2010, 25(12): 2573-2578.

[16] 戴莹,王纪华,韩平,等.生物传感器在有机磷农药残留量检测中的应用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2015(8):2976-2980.

[17] 李会芹,李遂亮,李伟,等.光学表面等离子共振测定盐酸克伦特罗的试验研究[J].河南农业大学学报,2012(2):198-202.

[18] 张奇志,邓欢英.生物芯片技术及其在食品检测中的应用[J].中国食品学报,2007(2):134-137.

[19] 汪琳.食品中病原生物芯片检测技术及设备的研究开发[J].中国科技成果,2014(10):36-37.

[20] 张娟,谭嘉力,梁宇斌,等.可视芯片技术及其在食品安全检测中的应用[J].食品工业科技,2013(8):381-385.

[21] 曹明楠,崔俊,李卫东.基因芯片技术在抗肿瘤药物研究和肿瘤诊断中的应用[J].中国药理学与毒理学杂志,2014,28(6):932-938.

[22] YOON J Y, KIM B. Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety[J]. Sensors, 2012, 12(8): 10713-10741.

[23] 刘军.食源性致病菌定量检测技术研究近况[J].中国卫生检验杂志,2016(2):302-304.

[24] KIM H J, PARK S H, LEE T H, et al. Microarray detection of food-borne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2008, 24(2): 238-246.

[25] BAI Su-lan, ZHAO Jin-yi, ZHANG Yao-chuan, et al. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 86(3): 983-990.

[26] 朱许强,冯家望,王小玉,等.应用可视芯片技术检测食品中常见产毒微生物的方法研究[J].华南农业大学学报,2011,32

(3): 68-72.

[27] 郝蕾. 浅谈转基因食品现状及其安全性[J]. 口岸卫生控制, 2016, 21(2): 28-30.

[28] 成晓维, 王小玉, 胡松楠, 等. 可视芯片检测大豆、水稻和玉米中的转基因成分[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 654-659.

[29] BAI Su-lan, ZHANG Jie, LI Shu-cheng, et al. Detection of six genetically modified maize lines using optical thin-film biosensor chips[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(15): 8 490-8 494.

[30] 张占军, 王富花. 酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011(1): 157-160.

[31] 冯敏, 李亚楠, 高丽霞, 等. 酶联免疫吸附法在食品安全性指标检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(10): 3 973-3 979.

[32] 杨曙明, 于洪侠. 一种检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒: 中国, CN 101183105[P]. 2008-05-21.

[33] 许艳丽, 鲍蕾, 吴振兴, 等. 免疫胶体金技术及其在真菌毒素检测中的应用[J]. 中国酿造, 2010(7): 13-17.

[34] 刘晓玥, 侯亚楠, 吕丽卿. 饲料中黄曲霉毒素 B1 快速筛查胶体金免疫层析检测方法应用研究[J]. 吉林农业, 2017(18): 64-65.

[35] 付林峰, 汪雨, 娄越, 等. 免疫金银染色法快速检测水产品中孔雀石绿残留的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2 146-2 153.

[36] WANG J J, LIU B H, HSU Y T, et al. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk[J]. Food Control, 2011, 22(6): 964-969.

[37] 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.

[38] 谈超, 高爱华, 张燕, 等. 绿豆过敏原多克隆抗体制备及间接竞争酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 170-174.

[39] 王新桐. 转基因棉花中新霉素磷酸转移酶(NPTⅡ)双抗体夹心 ELISA 定量检测方法的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014: 12-33.

[40] 金宇良. PCR 技术的研究进展[J]. 现代农业科技, 2012(10): 47-48.

[41] 李凡, 许恒毅, 李福来. 多重 PCR 技术在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015(21): 372-375.

[42] KUBISTA M, ANDRADE J M, BENGTTSSON M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27(2/3): 95-125.

[43] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010(8): 148-155.

[44] WANG Yi, WANG Yan, ZHANG Lu, et al. Endonuclease restriction-mediated real-time polymerase chain reaction: A novel technique for rapid, sensitive and quantitative detection of nucleic-acid sequence[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01104.

[45] SARIMEHMETOGLU B, AKSOY M H, AYZAN D, et al. Detection of Escherichia coli, O157: H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR[J]. Food Control, 2009, 20(4): 357-361.

[46] 赵洁, 马晨, 席晓敏, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在肠道微生物领域中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(12): 61-66.

[47] 董立明, 邢珍娟, 李葱葱, 等. 应用多重 PCR 技术快速筛查食品中的转基因成分[J]. 食品与生物技术学报, 2017(1): 56-61.

[48] 邢珍娟, 董立明, 刘娜, 等. 应用直接 PCR 技术快速筛查转基因玉米方法研究[J]. 玉米科学, 2017(1): 29-33.

(上接第 161 页)

参考文献

[1] MUNIER M, MORANCAIS M, DUMAY J, et al. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 992: 23-29.

[2] 李春霞. 坛紫菜藻红蛋白规模制备、结构鉴定及体外抗肿瘤活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.

[3] SEKAR S, CHANDRAMOHAN M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization[J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(2): 113-136.

[4] DUMAY J, MORANCAIS M, MUNIER M, et al. Chapter eleven-phycoerythrins: valuable proteinic pigments in red seaweeds[J]. Advances in Botanical Research, 2014, 71: 321-343.

[5] PANGESTUTI R, KIM S K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae[J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3: 255-266.

[6] 施瑛, 裴斐, 周玲玉, 等. 响应面法优化复合酶法提取紫菜藻红蛋白工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 51-57.

[7] 何思佳, 王洪新, 王远辉. 条斑紫菜藻红蛋白提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011(11): 334-338.

[8] DUMAY J, CLÉMENT N, MORANCAIS M, et al. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 21-27.

[9] 蔡春尔, 李春霞, 藤一悦, 等. 条斑紫菜藻红蛋白粗提方法比较[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 368-373.

[10] SENTHILKUMAR N, SURESH V, THANGAM R, et al. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 55(8): 150-160.

[11] 付复华, 袁洪燕, 潘兆平, 等. 黄桃超声波辅助酶法去皮工艺优化及其品质分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 182-187.

[12] 孔祥佳, 连至楠. 杨梅清汁加工中的酶解工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(12): 131-134.

[13] 孔祥佳, 刘廉荣. 超声波乙醇浸提法提取橄榄叶总多酚工艺的研究[J]. 福建中医药, 2017, 48(2): 34-37.

[14] 徐颖, 樊凡, 阴鹏涛, 等. 紫薯花青素超声波辅助酶法提取工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 150-154.

[15] 徐效圣, 潘俨, 傅力, 等. 响应面法优化水酶法提取核桃油的工艺条件[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 92-96.