

# 食品中植物源成分分子生物学检测技术及应用研究进展

董旭婉<sup>1</sup>,高东微<sup>2</sup>,王菊芳<sup>1</sup>,李志勇<sup>2</sup>,刘 津<sup>2,\*</sup>

(1.华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州 510006;

2.广州海关技术中心,动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室,广东广州 510623)

**摘要:**植物性食品是人类膳食主要组成部分,其掺假现象刺激了植物源性成分鉴别检测技术的发展。本文基于体外扩增的基因检测技术和基于免疫的特定蛋白检测技术两方面,综述了近年来国内外食品中植物源成分鉴别检测技术及其应用实例与研究进展,并对其发展前景予以展望。

**关键词:**食品,植物源性成分,分子生物学检测技术,掺假

## Research and Application Advances of Molecular Biological Detection for Plant-derived Ingredients in Foods

DONG Xu-wan<sup>1</sup>, GAO Dong-wei<sup>2</sup>, WANG Ju-fang<sup>1</sup>, LI Zhi-yong<sup>2</sup>, LIU Jin<sup>2,\*</sup>

(1.School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2.Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510623, China)

**Abstract:** Plant-derived foods are considered as the major part of human diet. Adulteration of such food promotes the development of identification and detection technology for plant-derived ingredients in processed foods. In this paper, molecular biological detection, based on PCR and immunity, for plant-derived ingredients in foods and its applicational research in recent years are reviewed, and its development prospect are expected.

**Key words:** food; plant-derived ingredient; molecular biological detection; adulteration

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)22-0340-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.059

**引文格式:**董旭婉,高东微,王菊芳,等.食品中植物源成分分子生物学检测技术及应用研究进展[J].食品工业科技,2019,40(22):340-346.

我国第一本医学专著《黄帝内经》明确提出“五谷为养”、“五果为助”、“五菜为充”,以植物为主要组成的膳食理念早在战国时期就已植根于华夏民族的饮食思想当中<sup>[1]</sup>。现代食品工业的发展和人民生活改善的需要,催生出五花八门以植物原料为主要成分的加工食品。植物源性加工食品庞大的消费市场,吸引了各种各样“经济利益驱动掺假”(Economically Motivated Adulteration, EMA)<sup>[2]</sup>的不法逐利行为:不含植物源性成分的植物蛋白饮料<sup>[3]</sup>、以芸豆为原料制成的“莲蓉”月饼<sup>[4]</sup>、以绿豆为原料制成的板栗酥饼<sup>[5]</sup>、贵价养生五谷粉和代餐粉中掺入廉价淀粉<sup>[6-8]</sup>、扁桃仁伪充杏仁制作糕点<sup>[9-10]</sup>。层出不穷的EMA行为引发社会广泛关注,也对食品安全监管提出了新的挑战,为此国内外研究出了大量的针

对食品中植物源成分鉴别的检测技术。

除少量的轻加工植物源性食品可采用肉眼或显微学判别外,市场上存在的植物源性加工食品大部分难以采用传统的形态学方法进行鉴别检测。利用植物源性加工食品中或多或少残余植物细胞成分,采用分子生物学方法对特定植物种类保守基因或蛋白质进行检测是国内外植物源性成分鉴别及加工食品鉴伪的重要手段。常规PCR(Polymerase Chain Reaction)和实时荧光PCR是行业应用主流,新型的数字PCR技术为定量检测提供了新的方案,恒温扩增技术有效补充了现场快筛和基层实验室检测能力,DNA条形码因实现高效筛检样品中多物种成分而成为新兴发展方向。

本文从基因水平和蛋白质水平两个方面对食品

收稿日期:2019-02-19

作者简介:董旭婉(1994-),女,硕士研究生,研究方向:分子生物学,E-mail:dongxuwan@foxmail.com。

\*通讯作者:刘津(1983-),女,硕士,高级工程师,研究方向:食品检测,E-mail:ivfhone@126.com。

基金项目:广东省科技计划项目(2017B020207008);广州市科技计划项目(201704030125);广东出入境检验检疫局科技计划项目(2017GDK44)。

中植物源性成分的分子生物学检测技术及应用研究进展进行综述,并对将来的发展趋势进行展望,以期作为食品中植物源性成分鉴别监管提供技术参考。

## 1 基于基因水平的检测

### 1.1 核酸的提取和纯化

食品中植物源性成分基因检测技术创新发展的物质基础,是获得适合于下游检测的优质足量核酸。如何获得高纯度的植物 DNA,是技术研发和应用中需要突破的瓶颈<sup>[11]</sup>。植物物种的复杂性以及大量次生物质的存在,对植物 DNA 提取造成困难<sup>[12-15]</sup>。作为食品原料的植物组织中往往富含碳水化合物和次生物质如多糖、酚类、色素以及果胶等,会造成比较大的背景干扰。此外 DNA 提取过程中一些提取试剂的残留也会影响后续的分子操作<sup>[16]</sup>。此外,从粗加工到深加工,食品中的 DNA 破损程度不断加深,核酸的提取和纯化也需充分考虑对小片段 DNA 的回收效率。

### 1.2 基于聚合酶链式反应的特定基因检测

**1.2.1 常规 PCR (Conventional PCR)** 常规 PCR 是在热稳定 DNA 聚合酶的作用下,以脱氧核糖核苷三磷酸 (Deoxy-ribonucleotide triphosphate, dNTP) 为原料,在严格的变温程序中通过特异性引物对目的片段进行体外扩增,经过 DNA 双链变性、引物退火、聚合酶延伸等环节,由单个核酸分子扩增生成数十亿个拷贝,实现基因检测信号的放大,通过琼脂糖凝胶电泳可以对检测结果进行判断<sup>[17]</sup>。常规 PCR 以作为生物遗传信息载体的 DNA 为模板,其对物种鉴定的权威性和科学性不容置疑,也是基于聚合酶链式反应的特定基因检测技术中发展最早、应用最广的检测技术,已经成为食品检验领域的常规技术方法。

Kim 等<sup>[18]</sup>设计了基于 ITS2 序列的物种序列特征扩增区 (Sequence characterized amplified region, SCAR) 标记,采用常规 PCR 对目的序列进行扩增,建立将贵价青花椒和其他 3 种花椒属掺伪品种进行区分鉴别的有效方法,其中,青花椒 ITS2 序列碱基数为 385,其他 3 种花椒属物种的 ITS2 碱基数分别为 383、388、385,序列比对结果证明 ITS2 序列的物种特异性优于 matK 和 rbcL。Zhang 等<sup>[19]</sup>设计了油棕属物种特异基因 MT3-B 的引物,对食用油中的廉价棕榈油掺假成分进行鉴定,采用常规 PCR 方法可实现拷贝数检测限低至 5 个单倍体拷贝,具有较高的灵敏性。Mooney 等<sup>[20]</sup>采用常规 PCR 对加工橙汁中柑桔源性成分的含量进行测定,针对叶绿体 trnT-trnL 基因的检测能有效的区分单独的橙汁、柑桔汁和两者的混合物,检测结果显示该方法重复性较好,变异系数为 7.5%,对加工果汁的盲样测试中正确识别了 20/22 个样品,没有假阳性结果。常规 PCR 方法的应用开创了物种鉴别的 PCR 时代。采用该技术进行检测时需要通过琼脂糖凝胶电泳和荧光染色对扩增产物进行分析,操作繁复、耗时较长、未能实现精准定量,且荧光染料试剂对操作员的身体健康有一定的危害,因此,开发检测手段更加方便快捷、检测试剂低毒害的 PCR 衍生技术是 PCR 技术研究发展的指向标。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR (Real-time Fluorescence PCR, qPCR)** qPCR 技术在常规 PCR 反应体系中加入荧光染料 (如 SYBR Green I) 或荧光探针 (如 Taq Man),利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 反应进程,实现对目的 DNA 片段的分析。在植物源性成分检测方面主要是采用 Taq Man 荧光探针。利用梯度浓度标准品建立标准曲线后,qPCR 还可利用标准曲线对未知模板进行定量分析<sup>[21-22]</sup>。qPCR 与常规 PCR 相比,由于增加了特异性结合目的基因片段的荧光探针,扩增片段相对更短小,且采用灵敏的光电检测元件检测荧光信号,在一个离心管中同时实现目的基因片段扩增和产物分析,因此具有特异性高、灵敏度好、交叉污染风险低、检测耗时少等特点。特别是 qPCR 检测灵敏度可达到 0.01%,对于背景物质干扰多、细胞残余少、核酸破坏程度高的植物源性加工食品具有更好的检测效果,是目前食品安全监管检验和食品行业生产质量控制中主流的检测技术。

Brzezinski 等<sup>[23]</sup>根据芝麻 2S 白蛋白基因设计特异性引物探针,利用 qPCR 法能够特异性的检测芝麻样品,对扁桃仁、腰果、榛子、胡桃、巴西胡桃、花生、南瓜籽、葵花籽、罂粟籽等无交叉反应,灵敏度可达 5 pg DNA。Elisa 等<sup>[24]</sup>根据醇溶蛋白基因设计了双重 qPCR 用于鉴别硬质小麦和普通小麦,首次实现面粉中掺杂/掺伪的分子生物学分析,检测灵敏度达 0.15%,符合相关法律 3% 的检测灵敏度要求,可用于检测部门对意大利面进行成分鉴别。孙良广等<sup>[4]</sup>以芸豆 pvsbe2 基因高度保守区域设计特异性引物探针,建立莲蓉制品中芸豆成分 qPCR 检测的方法, DNA 质量浓度的检测灵敏度达到 1 pg/ $\mu$ L,质量百分比检测灵敏度可达 0.01%。Ferreira 等<sup>[25]</sup>设计了咖啡及其掺伪物种大麦、玉米、水稻等谷物的特异性引物,通过连续稀释咖啡、大麦、玉米、水稻的 DNA 溶液,分别建立 4 个物种的标准曲线,线性相关系数均达到 0.99,结果显示这些物种 DNA 的定量检测限分别达到 0.4、0.6、14、16 pg,由此开发了一种较好的基于 qPCR 检测烘焙咖啡、可溶咖啡中谷物成分掺假的方法。Soares 等<sup>[26]</sup>基于大豆凝集素基因 Lectin gene 建立肉制品中大豆添加量测定的 qPCR 方法,利用正态校正曲线对猪肉中的大豆蛋白进行添加量测定,线性相关系数达到 0.998,可检测添加量在 0.01% ~ 6% 范围内的干大豆蛋白,该方法为食品检测相关部门规范和管理加工肉制品中大豆成分的过量添加现象提供了借鉴。qPCR 是目前成分鉴定方法中最主要的技术之一,已广泛用于植物源性食品的定性和定量检测,尤其在食品中植物源性过敏原成分和转基因成分的相关应用实例众多。但是 qPCR 在进行定量分析时对标准曲线有较大的依赖性,且标准品与实际样品在 DNA 提取、PCR 扩增等方面存在着不容忽视的巨大差异,因此限制了 qPCR 在食品样品定量分析领域的应用。

**1.2.3 数字 PCR (Digital PCR, dPCR)** dPCR 是一项基于单分子目的序列 PCR 扩增的拷贝数定量技术,根据泊松分布 (Poisson distribution) 统计学原理对大量反应室中单分子核酸的 PCR 扩增结果进行分析,

从而计算出初始样品中目的序列的精确拷贝数<sup>[27-29]</sup>。dPCR 摆脱了依赖系列梯度标准品绘制标准曲线的基因定量方式,直接对样品中的目的序列进行拷贝数准确定量<sup>[30-31]</sup>。商业化 dPCR 仪的出现,克服了 dPCR 技术在实际应用中面临的操作复杂、重复性差、通量低等困难,实现了自动化和高通量的应用。主流 dPCR 分为芯片式数字 PCR (chip digital PCR, cdPCR) 和微滴式数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR)。dPCR 的优势推动和扩大了其发展与实际应用范围,近年来该技术在食品中动植物源性成分鉴别检测方面取得了不少研究成果<sup>[32]</sup>。

在食品中植物源性成分方面,郭楠楠等<sup>[33]</sup>基于 ddPCR 技术,建立了定量分析市售杏仁露中杏仁源性成分和掺假花生源性成分含量的检测方法,通过建立两物种的质量与拷贝数之间的计算公式进行特异性、人为掺假样品和市售样品的检验,定量方法的建立、验证和实际应用中各重复实验之间变异系数均小于 15%,可以较好地达到定量分析和甄别掺假的目的。Scollo 等<sup>[34]</sup>建立了 ddPCR 定量检测橄榄油 DNA 的方法,结果显示检测灵敏度为  $10^{-3}$ ,线性拟合相关系数为 0.9972,相关性比较理想。在食品中动物源性成分方面已有较多采用 cdPCR 或 ddPCR 建立鉴别定量检测方法的研究报道,可检测低至 10 pg 的 DNA,且定量检测限达 8 拷贝<sup>[35-38]</sup>。

现有报道显示,ddPCR 可以显著排除干扰背景的影响<sup>[39-40]</sup>,有效提高了检测性能。有学者认为,ddPCR 不依赖于标准曲线,对稀有事件检测准确灵敏,具有较好的准确性和应用性<sup>[41]</sup>。目前,ddPCR 以其通量高、操作便捷、定量检测精准等突出优势,已经成为 dPCR 检测技术的主要技术。dPCR 搭建精准定量平台,为判别食品中物种源性成分无意掺杂和有意掺伪提供了新的研究思路。

### 1.3 基于恒温扩增的特定基因检测

1.3.1 环介导等温扩增 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) LAMP 通过对目的基因的 6 个特定区域进行 4 种引物设定,在 60~65 °C 恒温条件下利用具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶对目的基因进行高效扩增,从而实现高效灵敏的检测<sup>[42]</sup>。与 PCR 技术相比,LAMP 无需提供精确的变温反应条件,反应时间可短至 30~60 min,检测结果判读可视化。而且由于引入多条引物对目的序列多个特定区域识别匹配才能发生反应,因此 LAMP 具有很高的特异性<sup>[43-45]</sup>。由于 LAMP 技术特异性强、检测效率高、操作简便、对仪器设备要求低、结果判读简单,已经在食品检测中得到越来越广泛的应用<sup>[46-47]</sup>。

Focke 等<sup>[47]</sup>以 rDNA 的 ITS1 区域为模板设计引物,采用 LAMP 技术检测面包混合物中的植物源性成分,检测出黑芥、白芥和芹菜,定性检测限为 16 mg/kg,定量检测限分别达到 16 mg/kg,与 qPCR 实验结果进行对比发现。Vaagt 等<sup>[48]</sup>采用 LAMP 方法对亲缘关系密切的食用菌和来路不明甚至有毒性的蘑菇进行鉴别,通过蘑菇样品(原料和油炸原料)的交叉反应研究和分析验证了该方法的适用性,在

不同的蘑菇混合物中,可以检测到 2% (w/w) 的掺杂污染,为食用菌的现场快速鉴定提供技术手段。目前 LAMP 在食品领域中关于转基因成分和过敏原的检测应用已较成熟<sup>[49-51]</sup>,在动物源性成分检测方面的应用也较为广泛<sup>[52-53]</sup>。但是该技术在引物设计时,其对应的序列均为较大的片段,而深度加工食品中的 DNA 片段较小,因此,其在深加工食品检测领域的应用受到了限制。在较小的目的序列区域设计高灵敏度和特异性的引物也是 LAMP 亟需突破的技术难点<sup>[54]</sup>。

1.3.2 重组酶聚合酶扩增 (Recombinase polymerase amplification, RPA) RPA 通过设计 2 种特异性引物(可增加 1 种探针),在 25~42 °C 恒温条件下,重组酶与寡核苷酸引物结合形成酶-引物复合物,复合物在重组酶催化下以及单链 DNA 结合蛋白 (Single-strand DNA binding protein, SSB) 协助下,定位到模板的目的序列,使 DNA 双链解旋,并在 DNA 聚合酶催化下形成新链<sup>[55]</sup>。与 LAMP 检测方法相比,RPA 具有更短的反应时间,一般 5~20 min 即可完成反应,且反应温度条件更低,接近人的正常体温。RPA 灵敏度高、成本低、反应速度快、样品预处理要求低、引物设计更灵活便捷,可以在条件简陋的实验室和资源不足的户外等地实现应用,近年来 RPA 技术在食品检测中的应用越来越广泛<sup>[56-57]</sup>。

Nosi 等<sup>[57]</sup>基于 RPA 对加工食品中的芒果肉进行检测,建立食品中芒果成分掺假的鉴别方法,检测低限为 1 copies/ $\mu$ L。Liu 等<sup>[58]</sup>采用 RPA 建立了鉴别草本银杏叶及其掺伪物种槐树叶的方法。RPA 以其独特的优越性引起了广泛的关注,近年来发展迅速。但是该技术本身还存在着许多缺点和不足,比如所需的探针(46~52 bp)和引物(30~35 bp)比其他核酸扩增技术的探针和引物长,增加了设计的难度,限制了其深加工食品中的应用范围。

### 1.4 基于基因序列多态性分析的通用基因检测

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是一种新兴的基因序列分析技术,其基本原理是利用 DNA 序列“低的种内变异”且“高的种间变异”的特点,通过分析一段较短的 DNA 标准序列的多态性来实现快速、准确的物种鉴定<sup>[59]</sup>。目前,DNA 条形码已经被认为是一种强大、快速、成本低廉且用途广泛的物种鉴别检测技术,在食品真伪鉴别技术领域已经成为有效的检测工具之一。

Kumar 等<sup>[60]</sup>以 DNA 条形码技术对橄榄油及其假冒样品蓖麻和向日葵的识别区域进行单核苷酸多态性分析,通过扩增目标区域,将所得序列同蓖麻和向日葵的 DNA 序列相匹配,检测出橄榄油中存在 5% 的掺假成分。Madesis 等<sup>[61]</sup>利用植物通用条形码 trnL 结合高分辨率溶解曲线 (High-resolution melting, HRM) 对希腊和地中海地区常见豆科作物的识别和掺假进行检测,检测结果发现大豆粉中存在 1% 的羽扇豆属掺假成分。Uncu 等<sup>[62]</sup>通过与气相色谱分析方法作比较,发现 PCR 毛细管电泳条形码 (PCR-CE barcode) 在鉴别橄榄油的植物来源掺假物

种时,表现出更好的灵敏度和检测效率,验证了PCR-CE条形码技术在检测橄榄油中成分掺假现象的可行性。韩晴等<sup>[63]</sup>设计并筛选同时能对杏仁、花生、核桃、大豆、芝麻和榛子六个物种进行扩增的通用引物,试验表明引物 ITS2-2 和 trn H-psb A-1 分别对六个物种的扩增成功率和测序成功率均较高,且引物 ITS2-2 对于掺入 85.80% 的花生检测结果为杏仁, trn H-psb A-1 对于掺入 6.94% 的花生检测结果为花生,这两种引物可作为鉴别杏仁露中花生源性成分的植物 DNA 条形码组合。Bruni 等<sup>[64]</sup>使用 rbcL 和 trnH-psbA 质体区域作为条形码标记,对意大利北部阿尔卑斯山区的植物区系中不同地方产生的 4 种多花蜂蜜的植物来源进行检测,在 4 种蜂蜜样品中鉴定出 39 种植物物种,发现样品均来自于栗属、栎属和几种草本植物分类群的常见植物的混合物,且在所检测的 4 种蜂蜜样品中都发现了至少 1 种特有植物,为这些产品的地理特征提供了明确的标识,同时也可以对蜂蜜植物来源的毒性进行安全性评估。

## 2 基于蛋白质水平的检测

基于蛋白质水平的分子生物学检测技术,主要依据免疫学原理,通过植物源性成分中具有抗原活性的特定蛋白质与特异性抗体的结合为基础开展定性或定量检测。确保进行免疫特异性反应的蛋白质抗原表面决定簇不受破坏、蛋白质浓度适宜以及干扰杂质较少的反应背景<sup>[65-67]</sup>是蛋白质水平免疫学检测技术的关键。植物组织细胞中的次生物质会对蛋白质免疫反应的背景和结果读取造成极大干扰,反应体系中的 RNA、DNA 和其他抗原表面决定簇相近的蛋白质可能会产生竞争性结合<sup>[67]</sup>。深加工植物源性食品具有抗原活性的特定蛋白质可能因为加工过程的温度、酸碱度、高盐高糖等因素而发生蛋白质变性,失去进行免疫学特异性反应的特定结构,影响抗原和抗体之间的结合力,会造成假阴性检测结果<sup>[68]</sup>。有些蛋白质难以制备合适的血清抗体。有些蛋白质的表达具有时空或组织特异性等。这些因素都会制约蛋白质水平检测技术在食品中植物源性成分鉴别检测领域的应用。

食品中植物源性成分蛋白质水平的检测技术主要分为免疫胶体金技术(Immune colloidal gold, ICA)和酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)两大类型,集中应用于食品致敏原成分如芝麻<sup>[69]</sup>、杏仁<sup>[70]</sup>、花生<sup>[71-72]</sup>和转基因成分如大豆<sup>[73]</sup>的检测。ICA 操作简便,可以快速得到定性检测结果<sup>[74]</sup>;ELISA 通过引入系列浓度标准品和显色生化反应,利用光学检测设备实现定量检测目的,具有高通量的优势<sup>[75-76]</sup>。

## 3 展望

与蛋白质相比,核酸对温度、化学物质、酸碱度、紫外线等具有更好的稳定性,且所具有的物种保守性更为理想,因此基因检测成为食品中动植物源性成分分子生物学检测技术研究和应用的主要方向。食品掺假时有发生,食品成分检测技术的应用范围

也不同。原料经过破碎、搅拌、高温、高压等加工过程,残余植物源性特征成分的质与量发生了极大下降,检测技术应能够适用于核酸含量低、破碎程度高的样品;有意掺假和无意混杂在性质和安全风险上差别巨大,检测技术应能够为评价和区分的解决方案提供技术依据;食品生产、流通和安全监管对要求检测时长不断缩短,快速检测甚至是现场检测将会是未来一个重要的发展方向。

目前,食品中植物源性成分基因检测技术的发展趋势,一方面以 dPCR 为代表,正在逐步实现精准定量的目标,从而为有意掺假和无意混杂提供可靠的评价依据;另一方面以 DNA 条码技术为新兴发展方向,对复杂样品中未知物种成分鉴别从“大海捞针”转变为“撒网捕鱼”,改变以往 PCR 技术只能针对已知特定物种的保守基因进行逐个检测、对未知物种成分无能为力的窘况,实现高效筛检样品中多种物种成分的目的。

## 参考文献

- [1] 宗锦耀. 大力发展食药同源产业 提高人民营养健康水平 [N]. 农民日报, 2017-09-23(003).
- [2] Karen E, John S, Shaun K. Economically motivated adulteration (EMA) of food: Common characteristics of EMA incidents [J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(4): 723-735.
- [3] 丁清龙, 曾晓琼, 周露, 等. 广东省植物源性饮料掺假情况摸底调查 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2953-2957.
- [4] 孙良广, 黄文婧. 实时荧光 PCR 技术快速检测莲蓉制品中芸豆成分 [J]. 食品科学, 2017, 38(22): 330-334.
- [5] 浙江在线. 曝光! 风靡杭城的板栗酥饼里没有板栗只有绿豆和香精 [EB/OL]. [2015-04-21]. <http://news.163.com/15/0421/14/AN00H4EA00014SEH.html>.
- [6] 罗舜菁, 刘成梅, 黄丽, 等. 真假百合粉的鉴别及掺假率测定方法的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(6): 267-270.
- [7] 张晶, 郭军, 张美莉. 荞麦掺假近红外快速检测模型的建立 [J]. 食品工业, 2018, 39(10): 195-199.
- [8] 陈嘉, 刘嘉, 马雅钦, 等. 葛粉掺假的近红外漫反射光谱快速检测 [J]. 食品科学, 2014, 35(8): 133-136.
- [9] 梁艳霞, 马碧虎. 扁桃仁与杏仁的区别 [J]. 福建农业, 2015(8): 35.
- [10] 新华网. 美国扁桃仁假冒大杏仁被指骗国人多花 185 亿元 [EB/OL]. [2012-12-16]. <http://finance.huanqiu.com/Consumer/2012-12/3384016.html?agt=15438>.
- [11] Lo Y, Shaw P. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements [J]. Food Chem, 2018, 240: 767-774.
- [12] Tapia-T R, Quijano-R A, Rojas-H R, et al. A fast, simple, and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species [J]. Molecular Biotechnology, 2005, 31(2): 137-139.
- [13] Ramos S, Salazar M, Pereira G A, et al. Plant and metagenomic DNA extraction of mucilaginous seeds [J]. MethodsX, 2014, 1: 225-228.
- [14] Costa J, Amaral J, Fernandes T, et al. DNA extraction from

- plant food supplements: Influence of different pharmaceutical excipients[J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 29(6): 473-478.
- [15] Cavallari M, Siqueira M, Val T, et al. A modified acidic approach for DNA extraction from plant species containing high levels of secondary metabolites [J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2014, 13(3): 6497-6502.
- [16] Hein I, Williamson S, Russell J, et al. Isolation of high molecular weight DNA suitable for BAC library construction from woody perennial soft-fruit species [J]. *Bio Techniques*, 2005, 38(1): 69-71.
- [17] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986: 263-273.
- [18] Kim W, Yang S, Choi G, et al. Development of conventional PCR and real-time PCR assays to discriminate the origins of Chinese pepper oil and herbal materials from *Zanthoxylum* [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99: 2021-2029.
- [19] Zhang L, Wu G, Wu Y, et al. The gene MT3-B can differentiate palm oil from other oil samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16): 7227-7232.
- [20] Mooney R, Chappell L, Knight A. Evaluation of a polymerase chain reaction-based heteroduplex assay for detecting the adulteration of processed orange juice with mandarin juice [J]. *Journal of AOAC International*, 2006, 89(4): 1052-1060.
- [21] 胡金强, 雷俊婷, 孙新城, 等. 植物源性转基因食品 PCR 衍生技术研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(22): 379-383.
- [22] Livak K, Flood S, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization [J]. *PCR Methods and Applications*, 1995, 4(6): 357-362.
- [23] Brzezinski J. Detection of sesame seed DNA in foods using real-time PCR [J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(4): 1033-1036.
- [24] Elisa C, Giulia A, Enrica O, et al. Validation and application of a quantitative real-time PCR assay to detect common wheat adulteration of durum wheat for pasta production [J]. *Food Chemistry*, 2017, 224: 86-91.
- [25] Ferreira T, Farah A, Oliveira T, et al. Using Real-Time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 433-438.
- [26] Soares S, Amaral J S, Oliveira M B, et al. Quantitative detection of soybean in meat products by a TaqMan real-time PCR assay [J]. *Meat Science*, 2014, 98(1): 41-46.
- [27] Dressman D, Yan H, Traverso G, et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(15): 8817-8822.
- [28] Liao P, Huang Y. Digital PCR: Endless frontier of 'divide and conquer' [J]. *Micromachines*, 2017, 8: 231-237.
- [29] Pinheiro L, Coleman V, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2): 1003-1111.
- [30] David S, Tichopad A, Novosadova V, et al. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments [J]. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2015, 3: 9-16.
- [31] Quan P, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A technology review [J]. *Sensors*, 2018, 18(4): 1271-1297.
- [32] 刘津, 刘二龙, 谢力, 等. 数字聚合酶链式反应技术在食品安全检测领域的研究应用进展 [J]. *食品科学*, 2016(17): 275-280.
- [33] 郭楠楠, 张岩, 李永波, 等. 微滴式数字 PCR 定量检测杏仁露中杏仁、花生源性成分的分析研究 [J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 23-30.
- [34] Scollo F, Egea L A, Gentile A, et al. Absolute quantification of olive oil DNA by droplet digital-PCR (ddPCR): Comparison of isolation and amplification methodologies [J]. *Food Chemistry*, 2016, 213: 388-394.
- [35] Shehata H, Li J, Chen S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182872.
- [36] Ren J, Deng T, Huang W, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173567.
- [37] Xiang W, Shang Y, Wang Q, et al. Identification of a chicken (*Gallus gallus*) endogenous reference gene (Actb) and its application in meat adulteration [J]. *Food Chemistry*, 2017, 234: 472-478.
- [38] 李伟琦, 刘津, 李志勇, 等. 火鸡源性成分数字 PCR 通用定量检测方法的研究 [J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2018, 35(3): 309-316.
- [39] Dingle T, Sedlak R, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. *Clinical Chemistry*, 2013, 59(11): 1670-1672.
- [40] Racki N, Dreo T, Gutierrez-A I, et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples [J]. *Plant Methods*, 2014, 10(1): 42.
- [41] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(5): 877-882.
- [42] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3): 223-229.
- [43] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(1): 150-154.
- [44] Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, et al. A novel and more

- sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. *Microbiological Research*, 2010, 165(3): 211-220.
- [45] Li Y, Fan P, Zhou S. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 54-61.
- [46] Wong Y, Othman S, Lau Y, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(3): 626-643.
- [47] Focke F, Haase I, Fischer M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Methods for plant species identification in food [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(12): 2943-2949.
- [48] Vaagt F, Haase I, Fischer M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based method for rapid mushroom species identification [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(8): 1833-1840.
- [49] Fukuta S, Mizukami Y, Ishida A, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms [J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 218: 496-500.
- [50] Liu M, Luo Y, Tao R, et al. Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (Roundup Ready) by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(11): 2365-2369.
- [51] Der R, Sengar G, Singh U, et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of cow components adulterated in buffalo milk/meat [J]. *Molecular Biotechnology*, 2016, 58(12): 850-860.
- [52] Cho A, Dong H, Cho S. Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2014, 34(6): 799-807.
- [53] Sahoo P, Sethy K, Mohapatra S, et al. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases [J]. *Veterinary World*, 2016, 9(5): 465-469.
- [54] Piepenburg, Williams C, Stemple D, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. *Plos Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [55] Daher R, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. *Clinical Chemistry*, 2016, 62(7): 947-958.
- [56] Li J, Macdonald J, Stetten F. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. *The Analyst*, 2018, 144(1): 31-67.
- [57] Nosi J, Szalai G, Szab E, et al. Breed-specific detection of mangalica meat in food products [J]. *Food Anal Methods* 2015, 9(4): 889-894.
- [58] Liu Y, Wang X, Wei X, et al. Rapid authentication of ginkgo biloba herbal products using the recombinase polymerase amplification assay [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 8002.
- [59] Herbert P, Cywinska A, Ball S, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [60] Kumar S, Kahlon T, Chaudhary S. A rapid screening for adulterants in olive oil using DNA barcodes [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1335-1341.
- [61] Madesis P, Ganopoulos I, Anagnostis A, et al. The application of Bar-HRM (Barcode DNA-high resolution melting) analysis for authenticity testing and quantitative detection of bean crops (Leguminosae) without prior DNA purification [J]. *Food Control*, 2012, 25(2): 576-582.
- [62] Uncu A, Uncu A, Frary A, et al. Barcode DNA length polymorphisms vs fatty acid profiling for adulteration detection in olive oil [J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1026-1033.
- [63] 韩晴, 王赞, 章晶晶, 等. 基于植物 DNA 条形码技术对杏仁露中花生源性成分的鉴别研究 [J]. *现代食品科技*, 2018, 34(2): 232-240.
- [64] Bruni I, Galimberti A, Caridi L, et al. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey [J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 308-315.
- [65] Trilling A, Beekwilder J, Zuilhof H. Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview [J]. *Analyst*, 2013, 138: 1619-1627.
- [66] Cohen L, Walt D. Highly sensitive and multiplexed protein measurements [J]. *Chem Rev*, 2019, 119(1): 293-321.
- [67] Jeyachandran Y, Mielczarski J, Mielczarski E, et al. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, 341: 136-142.
- [68] Bonanno L, DeLouise L. Steric crowding effects on target detection in an affinity biosensor [J]. *Langmuir*, 2007, 23: 5817-5823.
- [69] Husain F, Bretbacher I, Nemes A, et al. Development and validation of an indirect competitive enzyme linked-immunosorbent assay for the determination of potentially allergenic sesame (*Sesamum indicum*) in food [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(3): 1434-1441.
- [70] 张洁琼, 高淑霞, 生威, 等. 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测杏仁过敏原苦杏仁球蛋白 [J]. *食品科学*, 2013(16): 173-177.
- [71] Chen J, Xia L, Wu X, et al. A practical test system for sensitive, rapid screening and authentication of peanut allergens in imported and exported food products in Chinese Customs [J]. *Food Control*, 2012, 23(1): 154-158.
- [72] Ji K, Chen J, Gao C, et al. A two-site monoclonal antibody immunochromatography assay for rapid detection of peanut allergen Ara h1 in Chinese imported and exported foods [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 541-545.
- [73] 李小宇, 张春雨, 郭东全, 等. 双抗夹心 ELISA 检测转基因抗除草剂大豆 [J]. *食品科学*, 2016(4): 222-225.
- [74] Shyu R, Shyu H, Liu H, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin [J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2002,

# 农药残留免疫分析技术研究进展

高思远<sup>1,2</sup>, 李丽娅<sup>1,2</sup>, 孟利<sup>1,2,\*</sup>

(1.黑龙江大学, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150500;

2.黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江省普通高校分子生物学重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080)

**摘要:**免疫分析技术因其操作简单、结果呈现快速、通量高等优点成为检测农药残留的重要手段之一。本文综述了免疫分析技术在农药残留检测中的应用, 比较了酶联免疫吸附技术、胶体金侧向流免疫层析、荧光免疫分析技术、电化学免疫传感器、表面等离子共振传感器、仿生免疫等技术的优缺点, 探讨了免疫分析技术在农药残留快速检测方面的发展趋势。

**关键词:**农药残留, 免疫, 胶体金, 传感器

## Advances in Immunoassay Detection Technology for Pesticide Residues

GAO Si-yuan<sup>1,2</sup>, LI Li-ya<sup>1,2</sup>, MENG Li<sup>1,2,\*</sup>

(1.Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology,  
Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin 150500, China;

2.Key Laboratory of Molecular Biology, College of Heilongjiang Province, School of  
Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

**Abstract:**Immunoassay technology has become one of the important method to detect pesticide residues because of its simplicity of operator, rapid detection and high throughput. The applications and relative merits of immunoassay technology in pesticide residue detection are reviewed. The advantages and disadvantages of methods such as enzyme-linked immunosorbent assay, colloidal gold lateral flow immunochromatography, fluorescent immunoassay, electrochemical immunosensor, surface plasmon resonance sensor and biomimetic immunity are compared. The development trends of immunoassay technology are provided in the rapid detection of pesticide residues.

**Key words:** pesticide residue; immunity; colloidal gold; sensor

中图分类号: TS207.5<sup>+</sup>3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)22-0346-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.060

引文格式: 高思远, 李丽娅, 孟利. 农药残留免疫分析技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 346-353.

现代农业和粮食生产中需要使用农药等化学物质, 但这些化学物质的滥用对人类和生物体造成严重危害, 引起严重的环境和食品安全问题<sup>[1-2]</sup>。目前有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类农药在市场上应用广泛, 特别是有机磷类杀虫剂仍在生产上起主导作用。近年来, 在各种基质中农药的检测技术取得了许多进展<sup>[3]</sup>, 如高效液相色谱(HPLC)<sup>[4-5]</sup>、气相色谱(GC)、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)<sup>[6-9]</sup>、气相色谱-质谱联用(GC-MS)<sup>[10-11]</sup>等。这些方法精密性与灵敏度很高, 但对检测人员技术要求高, 设备昂贵, 前处理过程复杂费时, 不适用于现场快速检测。免疫分析方法样品前处理简单、结果呈现快速、

现场携带方便, 受到越来越多的关注。本文将对免疫分析技术在农药残留检测中的应用及研究进展进行综述, 以为农药残留快速检测工作提供一定的理论基础和依据。

### 1 标记免疫分析技术

标记免疫分析一般是将酶、荧光素等标记物对抗体或抗原进行标记, 保持抗体或抗原的活性的同时也不影响标记物的活性, 当相应抗体或抗原发生反应后, 可以直接测定复合物中的标记物而对目标物质进行定量分析。标记物的信号放大作用可以提高免疫分析技术的敏感性<sup>[12]</sup>。检测领域的免疫分析标记方法主要有酶标记、纳米金标记、免疫荧光标记等。

收稿日期: 2019-03-07

作者简介: 高思远(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物与食品质量安全检测, E-mail: gaosiyuan1116@qq.com。

\*通讯作者: 孟利(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与食品质量安全检测, E-mail: mengli198026@126.com。

基金项目: 2018年黑龙江省高校基本科研业务费黑龙江大学专项资金项目(KJCX201817)。

40(3): 255-258.

[75] Van W, Schuurs A. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates[J]. *Febs Letters*, 1971, 15(3): 232-6.

[76] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G [J]. *Immunochemistry* 1971, 8(9): 871-874.