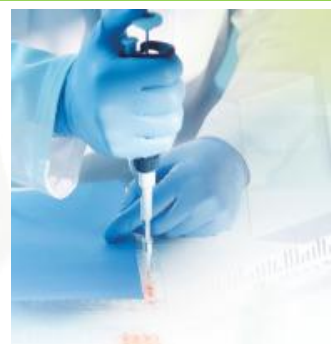


# 免疫层析技术在乳品安全检测中的应用

马立才 博士  
2017年08月 北京



# 主要内容

- 我国奶业发展现状
- 乳品主要危害因素
- 免疫层析检测技术
  1. 胶体金免疫层析
  2. 荧光免疫层析技术
- 检测卡常见问题分析

# 一、我国奶业发展现状

## □ 市场情况：

### ● 人均乳品消费量：

全球：107公斤；发达国家：>200公斤；

我国：约**30公斤**；

### ● 全球乳品年产量：约8.02亿吨；

我国：**3725万吨**，仅占**4.6%**；

### ● 2015年我国生鲜牛乳产量3755万吨，比2014年增加0.8%；

奶制品加工量2761.1万吨，比2014增长4.1%；

## □ 我国奶业存在的问题

- 洋牛奶、洋奶粉疯狂冲击了国内市场，危及养牛业
- 疫情防控未做好，如布氏病有上升趋势
- 消费者对国产奶缺乏信心，**行业信任危机**依然存在
- 企业诚信欠失：改生产日期，**乳品使用防腐剂**
- **乳源质量安全**仍然让人放心不下

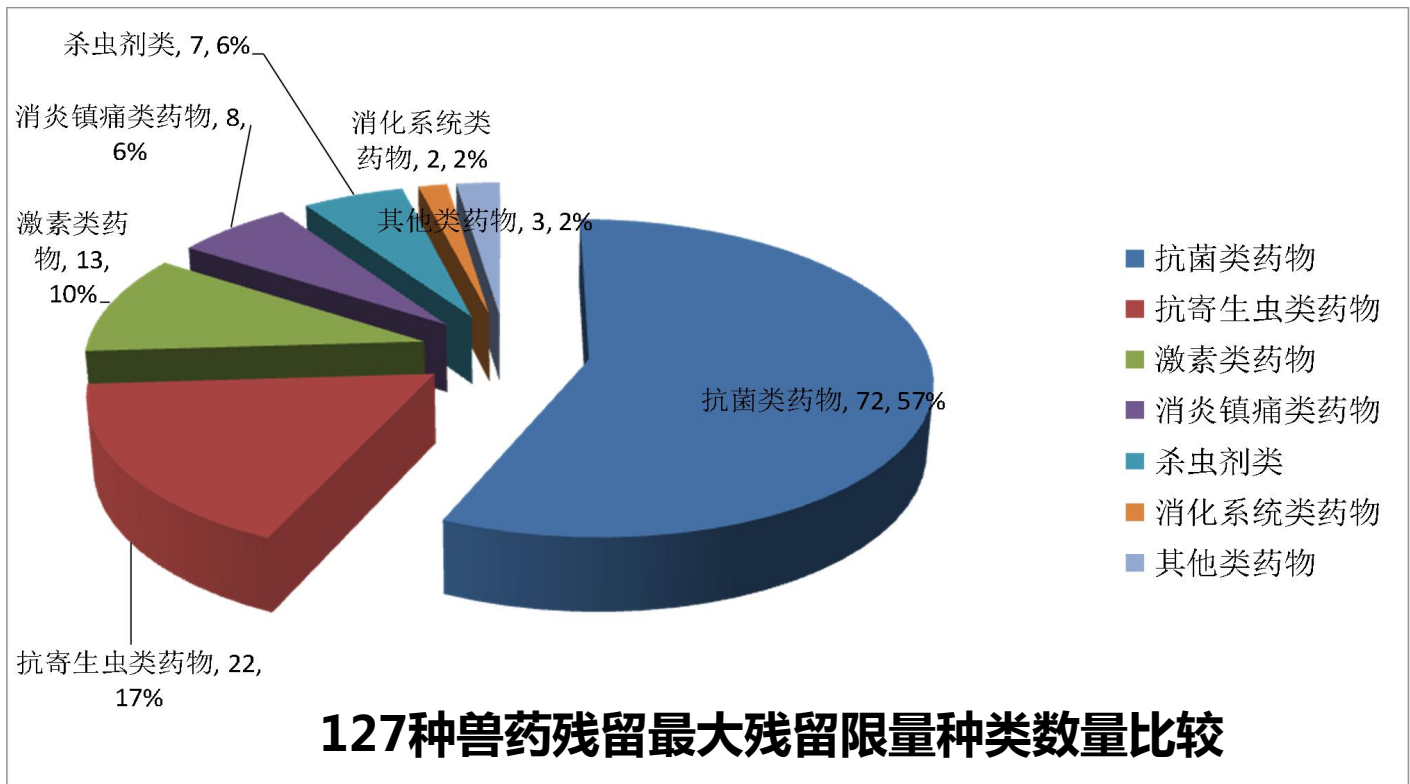


## 二、乳品主要危害因素

- ❖ 兽药残留
- ❖ 霉菌毒素
- ❖ 非法添加
- ❖ 农药残留
- ❖ 微生物

## □ 兽药残留

**兽药残留**是指动物产品的任何可食部分所含兽药的母体化合物及其代谢物，以及与兽药有关的杂质。



## ● 兽药残留的危害

奶牛饲养过程中由于不合理使用治疗药物和饲料药物添加剂，导致牛奶中广泛存在兽药残留。兽药残留对人体健康有较大危害作用，主要表现为**过敏反应、细菌耐药性、致畸致癌作用，以及激素作用**等方面。



# 2017年动物及动物产品兽药残留监控计划

化合物	动物/组织	推荐检测方法	检测限(或定量限) ( $\mu\text{g/L}$ )	残留限量 MRL ( $\mu\text{g/kg}$ )
$\beta$ -内酰胺类	牛/奶	动物性食品中 $\beta$ -内酰胺类药物多残留检测 超高效液相色谱-串联质谱法	青霉素G: 1	4
			阿莫西林、氨苄西林: 1	10
			苯唑西林: 1	30
			氯唑西林: 1	30
			头孢唑肟: 1	20
			头孢氨苄: 1	100
阿维菌素类	牛/奶	高效液相色谱法HPLC (GB 29696-2013)	阿维菌素、多拉菌素: 1	ND
			伊维菌素: 1	10
地塞米松	牛/奶	液相色谱质谱法LC-MS-MS (1031号公告-2-2008)	地塞米松e0.2 (定量限)	0.3
氟喹诺酮类	牛/奶	液相色谱质谱法LC-MS-MS (GB/T 21312-2007) 高效液相色谱法HPLC (GB 29692-2013)	环丙沙星、恩诺沙星: 25	100
			达氟沙星: 7.5	30
			氟甲喹: 12.5	50
			洛美沙星、氧氟沙星: 0.5 诺氟沙星、培氟沙星1.0	ND
磺胺类	牛/奶	液相色谱质谱法LC-MS-MS (781号公告-12-2006)	磺胺(二)甲基嘧啶 2.0	100
			磺胺二甲异嘧啶1.0	
			磺胺甲氧嘧啶3.0	
			磺胺甲基异噁唑 4.0	
			磺胺异噁唑 5.0	
甲砒霉素	牛/奶	高效液相色谱法HPLC (GB 29689-2013)	甲砒霉素10	50
林可胺类和大环内酯类	牛/奶	动物性食品中林可胺类和大环内酯类药物多残留检测超高效液相色谱-串联质谱法	1	150
四环素类	牛/奶	牛奶中四环素类药物残留检测—超高效液相色谱-串联质谱法	四环素、土霉素、金霉素 5	100
			多西环素 5	ND



## □ 霉菌毒素

- **霉菌毒素**是丝状真菌或霉菌在生长繁殖过程中通过不同的代谢途径产生的代谢物，如多聚乙酰途径（黄曲霉毒素）、氨基酸途径（黄曲霉毒素）等；
- 目前已发现了300多种的霉菌毒素，其中黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马菌素、T-2毒素、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇等倍受关注。
- 乳品中最受关注的霉菌毒素是**黄曲霉M1**；奶牛摄入被黄曲霉毒素B1污染的饲料后，通过羟基化作用转化成黄曲霉毒素M1。
- 黄曲霉毒素M1危害主要表现在致癌性和致突变性，对人及动物肝脏组织有破坏作用，可导致肝癌甚至死亡。

## □ 非法添加或超标超限添加物

### A. 非法添加添加物：

三聚氰胺、 $\beta$ -内酰胺酶、碱性物质、皮革水解蛋白等

### B. 超标超限添加物：

增稠剂、防腐剂、抗氧化剂等，其他未允许用的食品添加剂



## □ 农药残留

**农药残留**是指任何由于使用农药而在食品、农产品和动物饲料中出现的特定物质。分为杀虫剂（包括杀螨剂）、杀菌剂、除草剂、植物生长调节剂、杀鼠剂等。

中国牛奶中农药限量共涉及**10种农药**（艾氏剂和狄氏剂、氟丹、滴滴涕、硫丹、倍硫磷、六六六、七氯、林丹、马拉硫磷、甲胺磷），其中GB 2763-2005及其第一号修改单中限定7种，《无公害食品生鲜牛奶》（NY5045-2008）限定3种。



## □ 微生物

牛乳中含有一定数量的微生物，主要来源于两方面：一是**患病乳牛**对生鲜乳的污染，二是**挤奶过程**中的污染，三是挤奶后**运输途中**受到的污染或原有微生物的增殖。

牛奶中的微生物主要有**细菌**（乳酸菌、丙酸菌、肠细菌、孢子杆菌等）、**真菌**（霉菌有乳粉胞霉、乳酪粉胞霉、黑念珠霉、变异念珠霉、乳酪青霉、灰绿青霉和黑曲霉等）和噬菌体（侵害细菌的滤过性病毒统称为噬菌体，亦称为**细菌病毒**。目前已发现**大肠杆菌**、乳酸菌、赤痢菌、沙门氏杆菌、霍乱菌、葡萄球菌、结核菌、放线菌等。



## □ 乳品主要危害因素的检测方法

### ● 主要有色谱分析技术和快速检测技术

- 气相色谱法 (GC)
- 高效液相色谱法 (HPLC)
- 超高效液相色谱法 (UPLC)
- 气谱-质谱法 (GC-MS)
- 气谱-串联质谱法 (GC-MS/MS)
- 液谱-质谱法 (LC-MS)
- 液谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)
- 其他新技术, 如飞行时间质谱等
- 胶体金免疫层析法
- 荧光免疫层析检测法
- 酶联免疫吸附测定法
- 化学发光免疫检测法
- 放射免疫测定法
- 荧光偏振免疫检测法
- 微生物抑制测定法
- 生物传感器
- 生物芯片

## 仪器确证方法和快速检测方法比较

方法名称	优点	缺点	适用范围
液相色谱-质谱仪等仪器	灵敏、准确，可靠性好	检测费用高、操作繁琐耗时、人员要求很高	省部级以上检测机构及有条件的食品进出口企业
酶联免疫试剂盒	灵敏、快速、成本低，可大批量同时检测，既能定性也能定量，一般检测时间 <b>1-2h</b>	对检测人员要求较高	市县级以上检测机构及一定规模的生产加工企业
免疫层析检测	灵敏、快速、成本低，可现场大批量筛查，样品无需或仅需简单前处理，检测时间 <b>3-10min</b> ，判定快速简单，对场所和人员无要求	有假阳性和假阴性的可能	乡镇级以上检测机构及食品生产加工流通企业

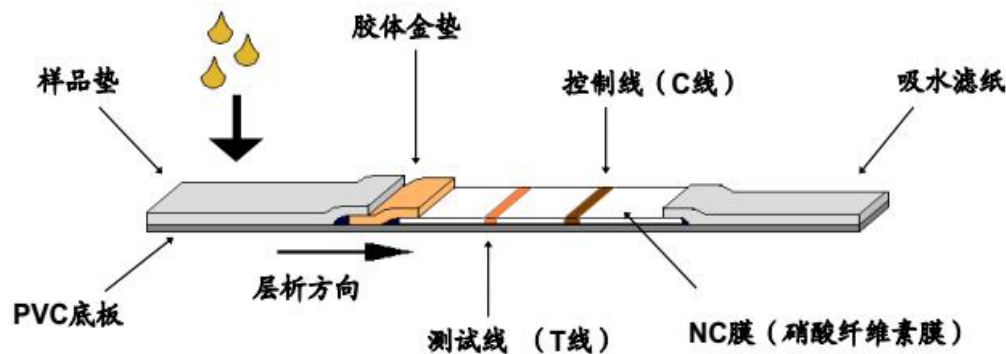
## 三、免疫层析检测技术

### □ 免疫层析技术（LFIA）的发展

- 第一代免疫层析：胶体金技术
- 第二代免疫层析：荧光素标记免疫层析技术
- 第三代免疫层析：量子点标记技术(QD)  
时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)  
上转发光技术(UPT)

# 1、胶体金免疫层析技术

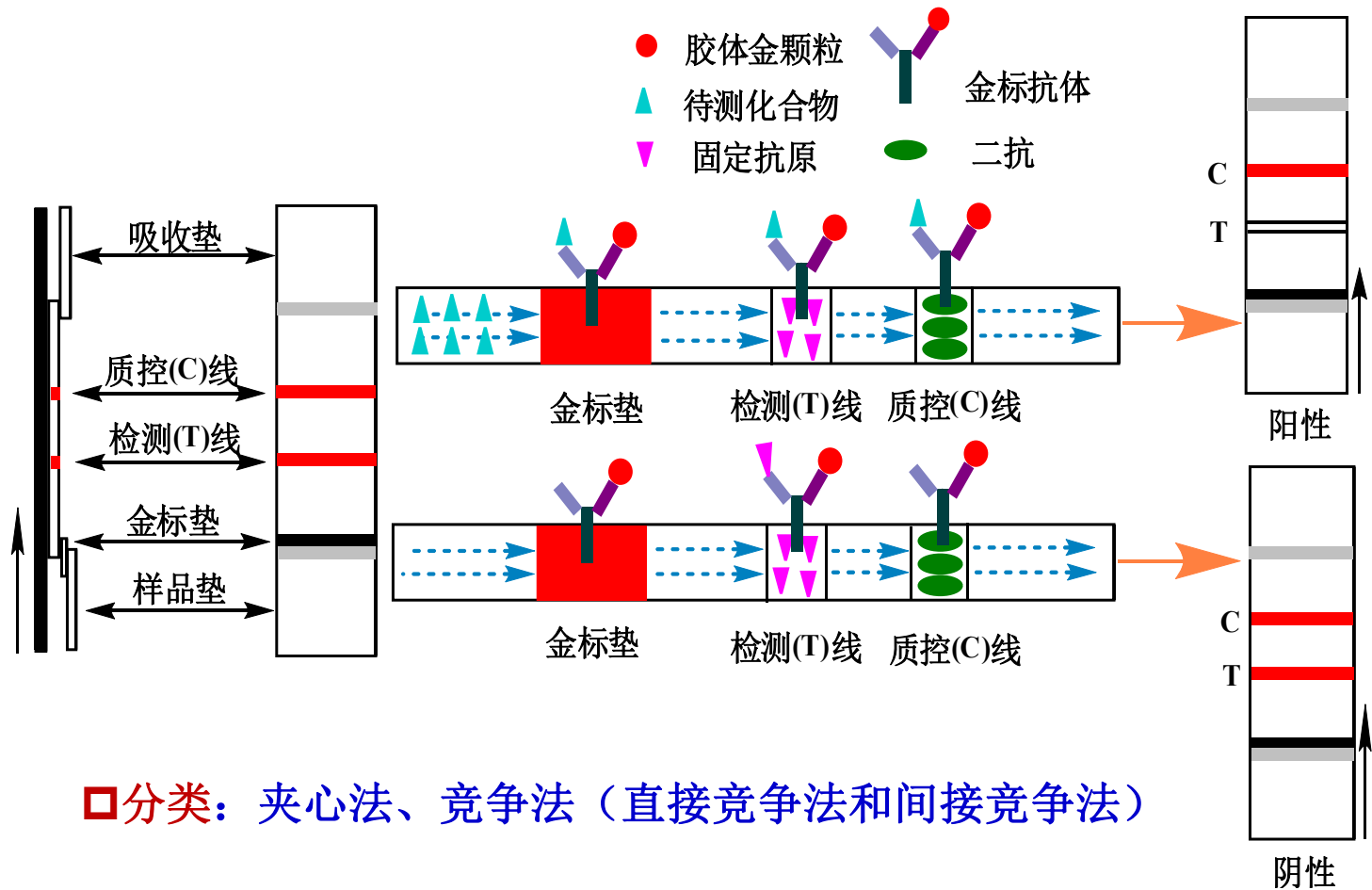
## □ 胶体检测试纸条的结构与作用



- **样品垫**：具有过滤和缓冲作用，降低样本离子强度或酸碱度对检测结果的干扰；
- **金标垫**：将胶体金标记Ab固定在金标垫上，目标物首先在此与金标Ab的反应；
- **NC膜**：预先包被检测线（T线）和质控线（C线），与胶体金标记物通过免疫反应相结合，使胶体金颗粒在检测线发生聚集。
- **吸水垫**：通过层析作用使样品、金垫上的金标Ab移动。



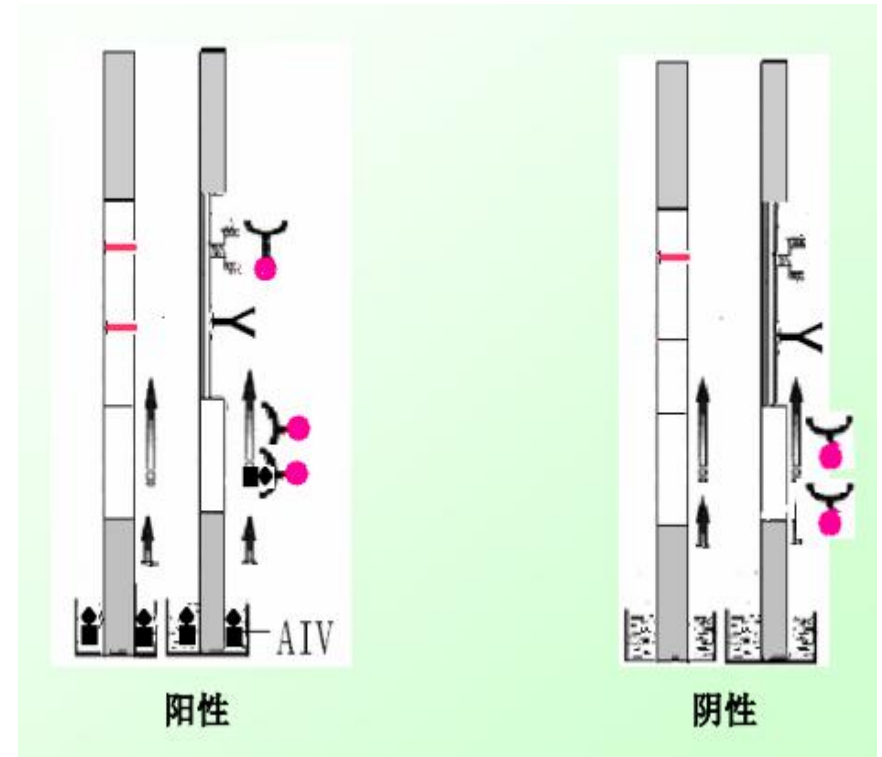
## □ 原理图示（小分子抗原为例）



## (1) 双抗体夹心法

- 抗体1：检测线（T线）位置；
- 金标抗体2：金标垫上；
- 样本中的抗原先与金标抗体2结合，形成的“抗原+金标抗体2”再与T线位置的抗体1结合，从而金标抗体复合物在T线处聚集显色。

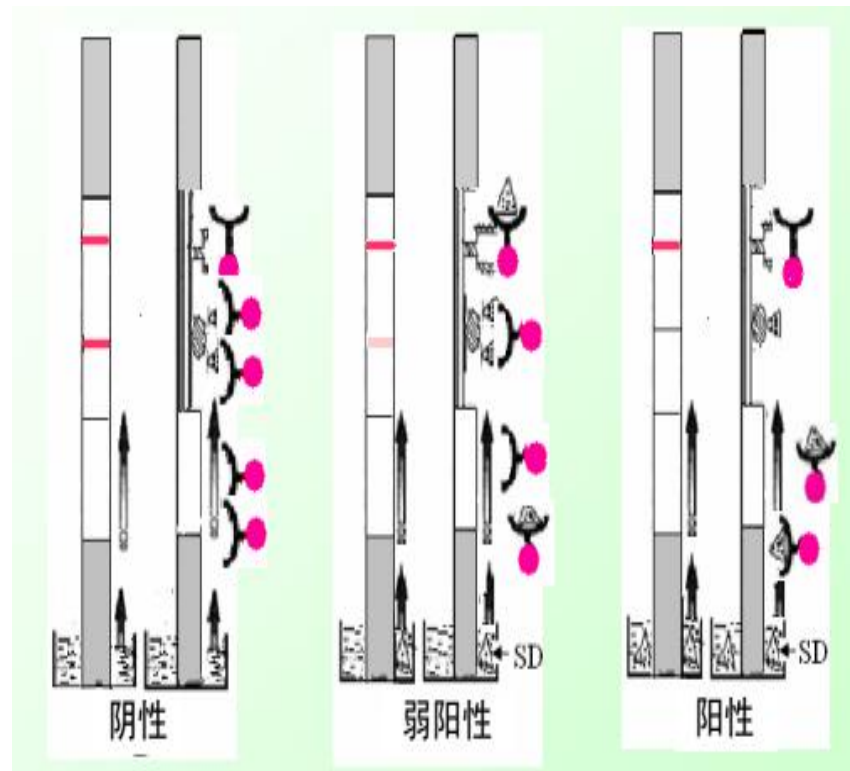
### ■ 用于大分子抗原的检测



T线的显色强度与目标物的浓度呈正相关

## (2) 直接竞争法免疫层析

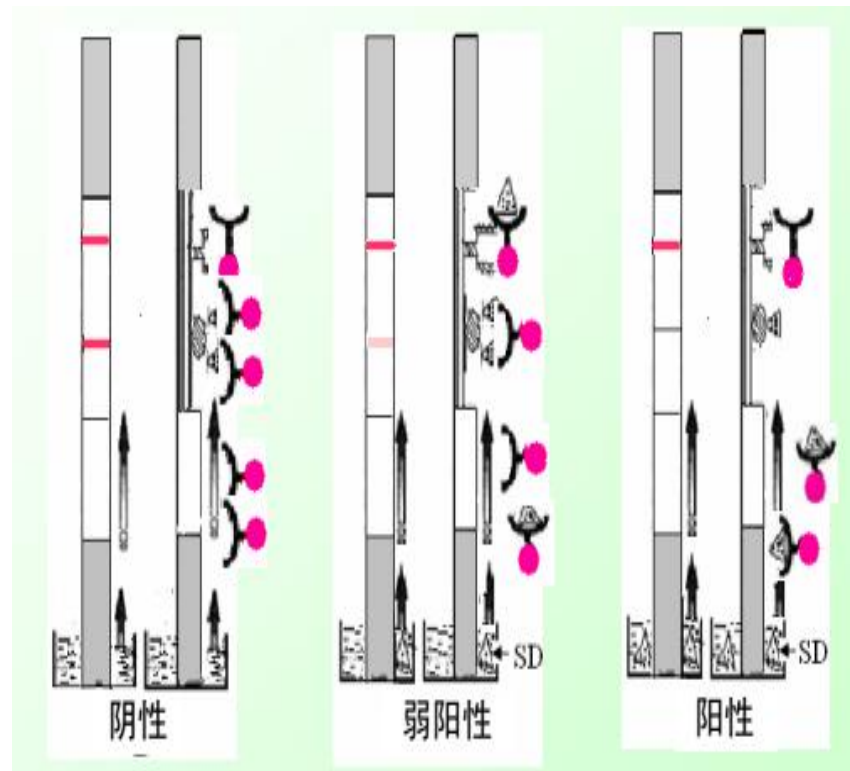
- 抗体：检测线（T线）；
- 金标抗原：金标垫；
- 样本中的抗原与释放垫上的金标抗原竞争，与T线上的抗体结合；
- 样品中目标物的含量越高则T线处结合聚集的金标抗原越少，显色越弱。



T线的显色强度与目标物的浓度呈负相关

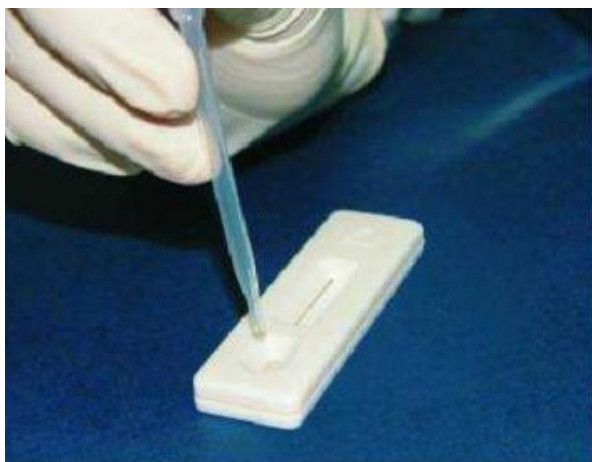
### (3) 间接竞争法免疫层析

- 抗原：检测线（T线）；
- 金标抗体：金标垫；
- 样本中的抗原与金标抗体结合，形成的“Ag+金标Ab”复合物；
- 游离的金标抗体与T线上的抗原结合，从而金标抗体在T线处聚集显色。



T线的显色强度与目标物的浓度呈负相关

## □ 产品形式与检测步骤



### 检测卡

- 取适量液体乳品样本加到检测卡加样孔中；
- 3-10min后，通过T和C线显色情况进行阴阳性判定



### 试纸条

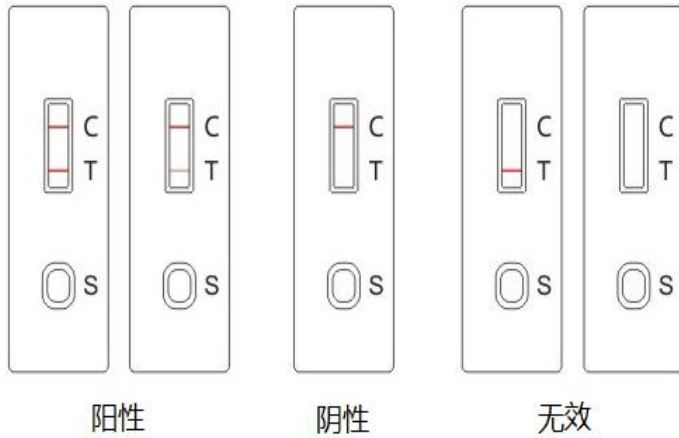
- 将试纸条插入含有适量乳品样本的微孔中；
- 3-10min后，通过T和C线显色情况进行阴阳性判定



### 金标微孔+试纸条

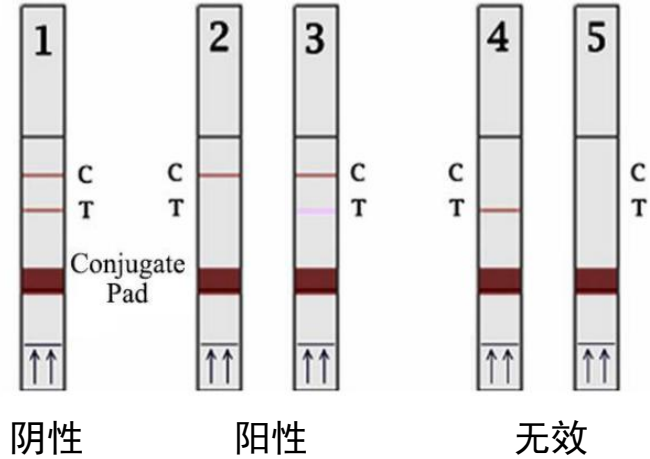
- 取适量液体乳品与微孔中的金标抗体混合，反应3-5min；
- 将试纸条插入金标微孔，3-10min后，通过T和C线显色情况进行阴阳性判定

## □ 结果判定方法



### (A) 夹心法胶体金免疫层析

阳性:T线与C线都显色;  
 阴性:C线显色, T线不显色;  
 无效:C线不显色, 结果判定为无效。



### (B) 竞争法胶体金免疫层析

阴性:T线与C线都显色, 表明样品中目标物含量低于检测限;  
 阳性:C线显色, T线不显色, 表明样品中目标物的浓度高于检测限;  
 无效:C线不显色, 结果判定为无效。

## □胶体金免疫层析的优缺点

优势	不足之处
<ul style="list-style-type: none"><li>■<b>快速</b>：全部检测过程大概3-10min</li><li>■<b>简便</b>：不需要复杂的仪器设备，也无需专业人员操作，可进行现场检测</li><li>■<b>廉价</b>：价格低，支持单样本检测</li><li>■<b>稳定</b>：金标试剂稳定性好，可长期保存</li><li>■<b>适用性范围广</b>：可应用于多种类型样本的检测</li><li>■<b>前处理简单</b>：对于某些液体样本，无需样本前处理，直接检测</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ 定量问题</li><li>■ 灵敏度问题</li></ul>

## 2、荧光免疫层析技术

### 荧光免疫层析技术 (Fluorescence immunoassay)

- 以荧光物质为标记物；
- 将抗原抗体反应的特异性与荧光技术的敏感性相结合；
- 荧光物分子在特定条件下吸收激发光的能量后，呈激发态而极不稳定，在其迅速回到基态时，以电磁辐射形式释放出光能，发射出波长比激发光波长长或短的荧光，从而通过荧光检测仪器进行检测。

- 使用具有超高光子激发效率的新型发光材料；
- 利用具有更宽动态线性范围的发光能量共振转移 (LRET)；
- 实现高精度的定量检测。

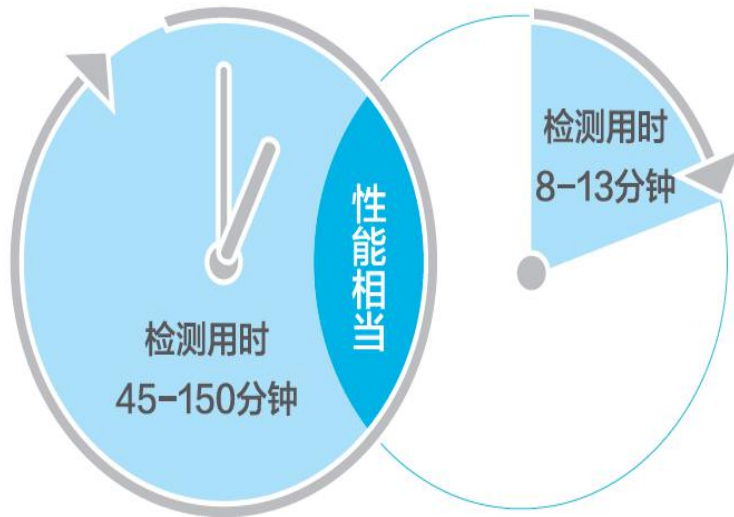




## ■ 与胶体金免疫层析技术比较分析

性能指标	胶体金检测卡	荧光定量检测卡
灵敏度	—	相对较高
判读方式	肉眼判读	仪器判读
结果判读一致性	不同人判读结果稍有差异	结果判读不依赖于人
结果显示形式	阴性或阳性	定量数值
样本测试范围	只能判读阴性、1/2检测限、检测限的结果	能判读定量范围内任意浓度样本的定量值
自带定量曲线	—	直接加样即可读出定量结果
数据保存	人工输入判读结果做记录保存	软件记录仪器测试过的所有样本数据并自动保存，后台数据中心远程监控

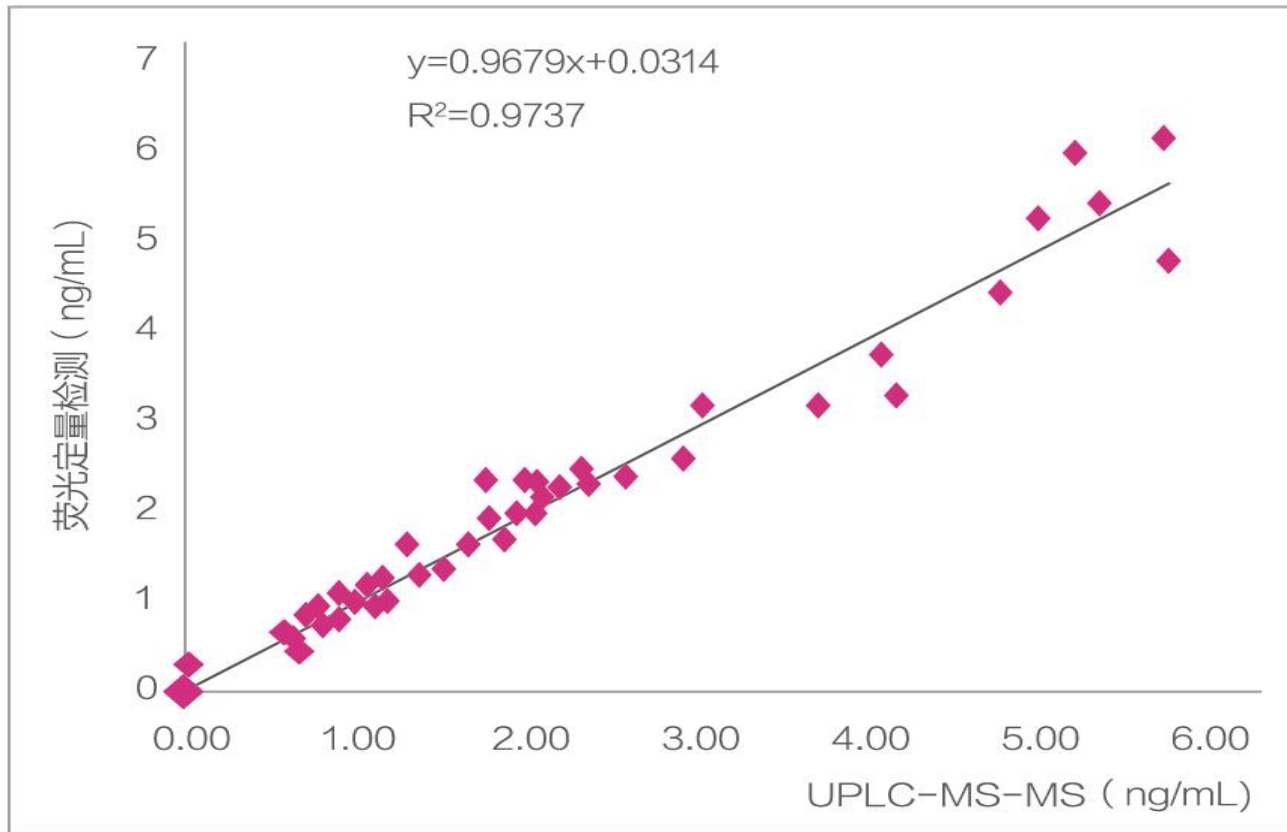
## ■ 与ELISA检测方法比较



	荧光定量快速检测	ELISA检测
检测用时	13分钟	45分钟
结果稳定性	稳定	易受人为因素影响
检测限	50ppb	50ppb
添加回收率	87%-93.4%	97%

兼具胶体金检测卡和 ELISA 的优点，避免了大量的分离和洗涤步骤，适宜进行高通量和定量检测，并且同样具有**简便、快捷、低廉**等优点。

## ■ 与UPLC-MS-MS的比较



线性方程为 $y=0.9679x+0.0314$ ， $R^2=0.9737$

## ■ 维德维康荧光定量检测卡产品（乳品）

产品名称	检测样本	检测限
林可霉素快速定量检测卡	牛奶、奶粉	20 ppb
黄曲霉毒素M1快速定量检测卡	原奶	0.2 ppb
红霉素快速定量检测卡	原奶	10 ppb
卡那霉素快速定量检测卡	牛奶、奶粉	10 ppb
氯霉素快速定量检测卡	原奶	0.05 ppb
磺胺类快速定量检测卡	牛奶、奶粉	3 ppb
四环素类快速定量检测卡	原奶	5 ppb
喹诺酮类快速定量检测卡	牛奶、奶粉	0.4 ppb
$\beta$ -内酰胺类抗生素快速定量检测卡	原奶	0.5-20 ppb
三聚氰胺快速定量检测卡	牛奶、奶粉	10 ppb

## □ 普通荧光免疫层析

### 间接竞争法：

- 在免疫层析过程中，有机荧光染料或荧光微球标记的抗体，与样品中的目标物结合形成Ag+荧光标记Ab复合物；
- 之后，游离的荧光标记抗体与T线位置上包被的抗原结合，从而荧光物质在T线聚集；
- 在激发光的作用下，荧光物质发射荧光，荧光信号的强弱目标物的含量相关。由此，依据荧光信号的强弱可实现对样本中目标物的定量检测。

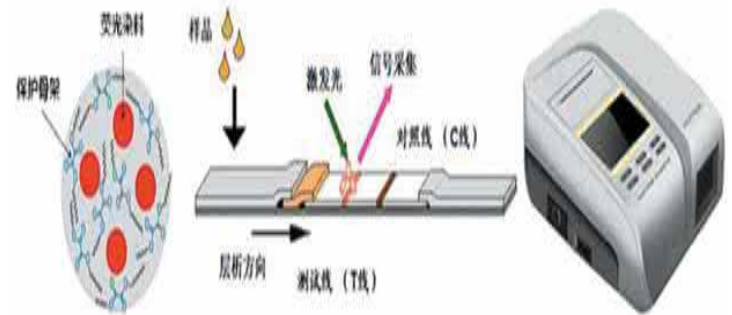


图1 荧光微球

图2 荧光定量示意图

图3 荧光读数仪

### 常用的有机染料：

罗丹明

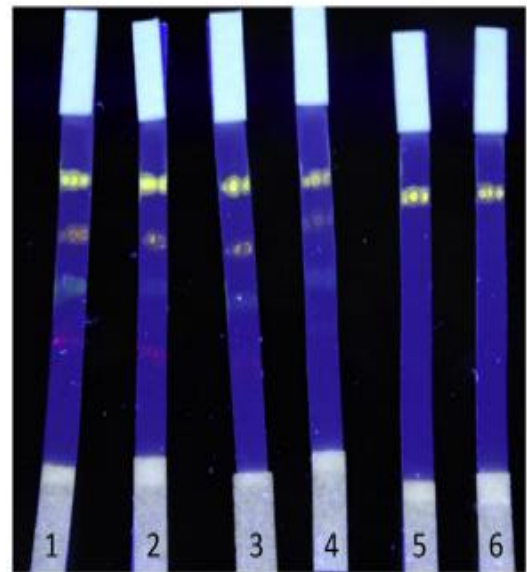
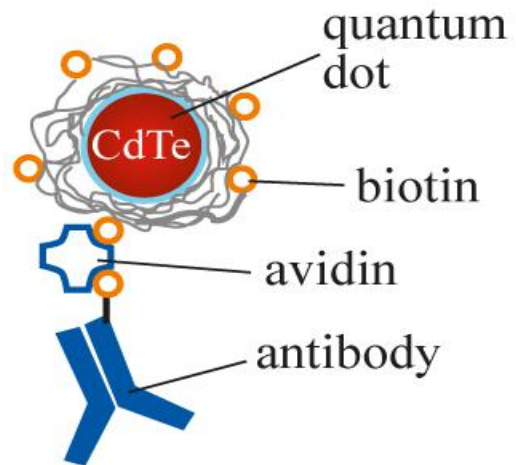
FITC(异硫氰酸荧光素)

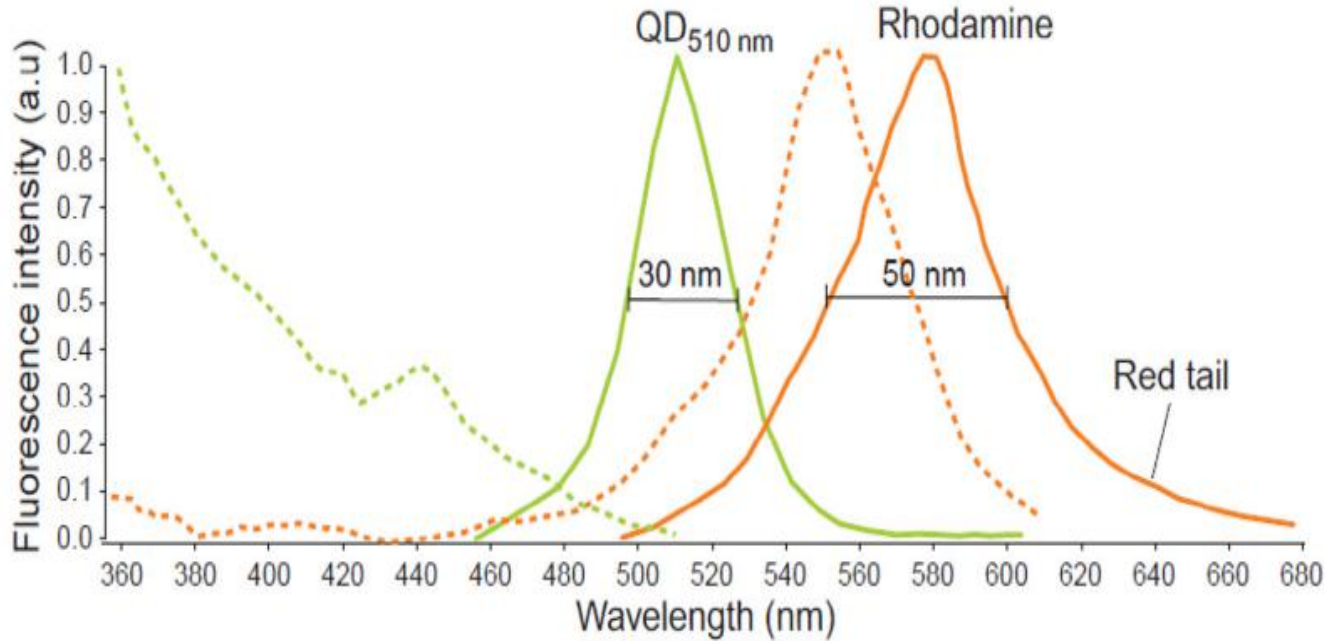
花青染料 (如：cy3 和cy5)

DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚)

## 量子点荧光免疫层析

- 量子点(Quantum dots, QDs), 是一种由II-VI族(如CdTe、CdSe、ZnS)或III-V族(如InAs、InP等)组成的纳米颗粒。
- 较于传统的有机染料, 其具有激发光谱宽、发射光谱窄且重叠小等优点;
- 单一光源激发, 不同量子点所发出荧光不同, 故可进行多组分检测。
- 量子点的荧光强度可比普通荧光染料高100倍左右, 灵敏度, 且稳定性较好;
- 具有良好的生物兼容性, 可与抗体、核酸等生物分子进行特异性的连接。





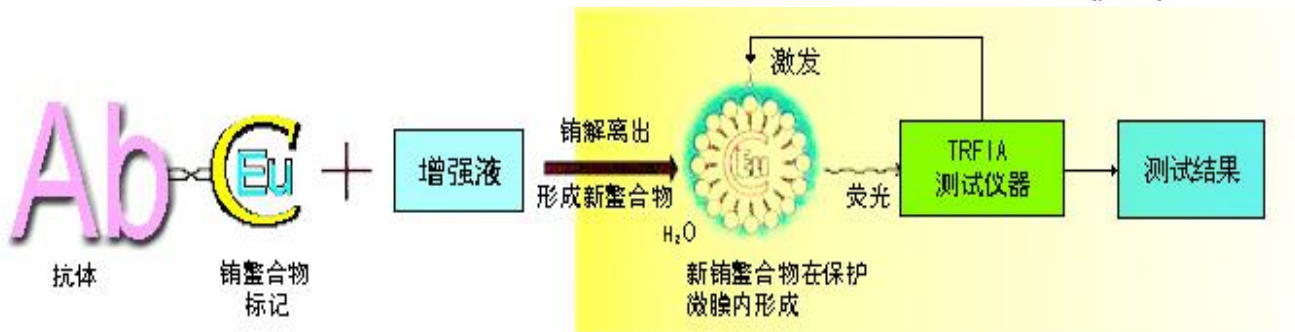
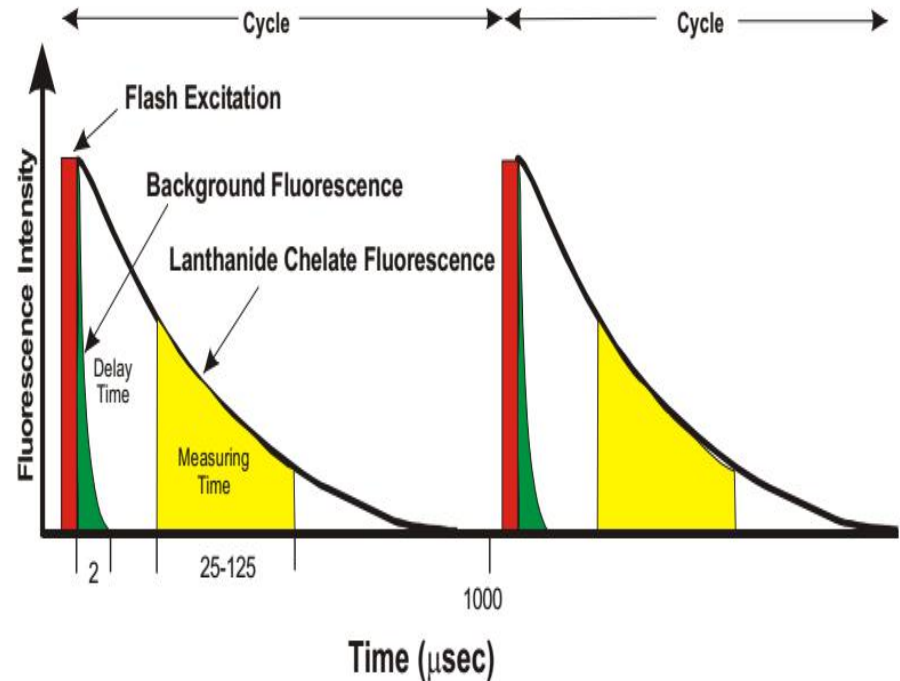
## 量子点CdSe和罗丹明6G染料激发光/发射光的比较

### ■ 相比于罗丹明6G染料：

- 量子点的激发光（绿色短划线）波长范围较宽
- 量子点的发射光（绿线）基本上是对称的，且波长范围更窄。

## □ 时间分辨荧光免疫层析

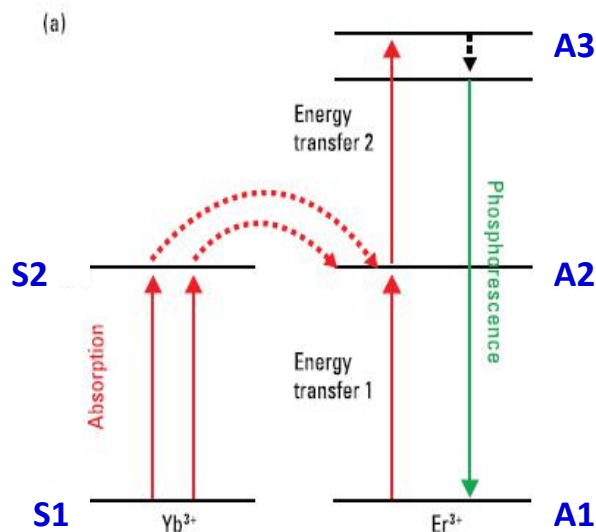
- 将镧系元素螯合物或微球用作抗体或抗原荧光标记物；如铕(Eu)、钐(Sm)、镝(Dy)、铽(Te)
- 镧系元素的荧光光谱有较大的Stokes位移，最大可达290nm；
- 激发光谱和发射光谱间不相互重叠；
- 发射光谱很窄，荧光寿命长；





## □ 上转发光免疫层析

利用UCP颗粒（稀土离子）作为荧光材料，通过连续吸收较低能量的长波红外光，发射高能量的短波实现能量上转换，此现象称**反Stokes效应**。



### ◆ 优点

- stocks位移大：>200nm
- 发射光谱窄，颜色可调
- 光化学稳定性高
- 上转发光在自然界是不存在的，极大程度降低样本自发荧光的干扰
- NaYF<sub>4</sub>是目前上转换发光效率最高的基质材料。

## 四、检测卡常见问题分析

### 1、T线浅或没有，样本的假阳性率高

- 人为操作原因，样本前处理未按照说明书操作；
- 检测卡失效；
- 温度原因，温度过低造成；
- 环境湿度大，试剂造成降解；
- 样本差异性，不同地区的样本之间差异性可能比较大。



**应对方案：**严格按照说明书操作；检测卡保存在适宜的环境中；注意检测卡有效期；样本检测在适宜的温度条件下进行等；

## 2、阳性样本检验不出，假阴性率高

- 混淆同一产品的不同型号；
- 未使用规定配套的稀释液；
- 试剂失效；加样量未按照说明书；未在规定时间内读取结果；

**应对方案：**重新确认检测卡的检测限和灵敏度；确保使用与产品型号相对应的稀释液或是相应的前处理方法；按照说明书加上样量，并在规定时间内读取结果。

## 3、加样后液体无法正常上吸到吸水垫处

- 未按照说明书方法进行稀释；未使用配套的稀释液；加样量过少；

**应对方案：**按照说明书方法使用配套的稀释液进行稀释；按照说明书加上样量；

## □ 检测卡（条）使用的注意事项

- ① 在做实验值之前，实验人员仔细阅读产品说明书；
- ② 使用前先将产品恢复至室温（ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ），但要避免长时间暴露在潮湿和光照的环境下，试纸条开封后1h内使用；
- ③ 不要混用来自不同批号的试纸条和金标微孔；
- ④ 应避免延误将试纸条的检测时间，以保证各样品孵育时间一致；
- ⑤ 开封后的试纸条每次取出试剂一定要第一时间把袋子的口封好；
- ⑥ 做实验之前保证奶样恢复至室温，要把奶样摇匀，拿起奶样摇动；
- ⑦ 吸取奶样的时，要先把枪头润洗一两次，保证取样量准确。

# Thanks !



北京维德维康生物技术有限公司  
地址：北京市海淀区地锦路9号院3号楼1-4层

网址：[www.wdwkbio.com](http://www.wdwkbio.com)

服务热线：400-860-8088

400-860-8088