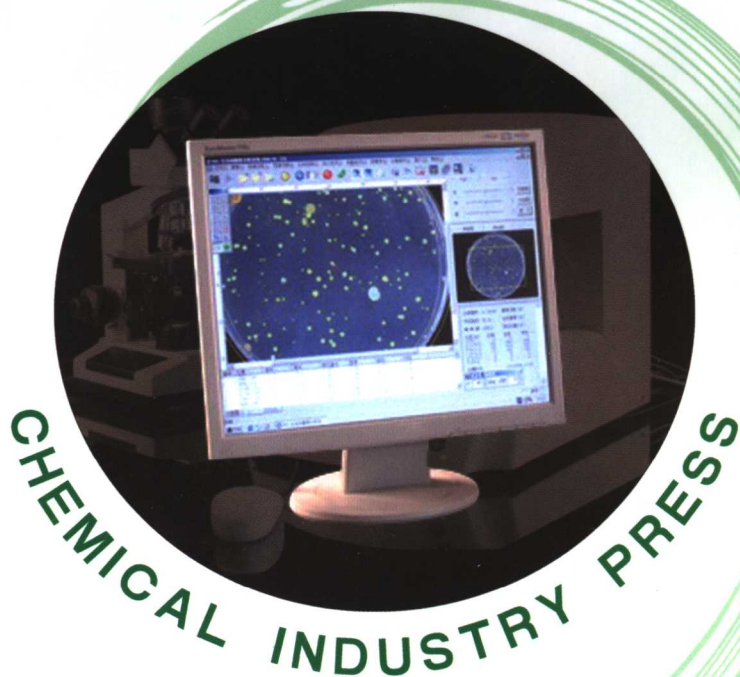


普通高等教育“十一五”规划教材

# 现代食品微生物 检测技术

张伟 袁耀武 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

# 现代食品微生物检测技术

张 伟 袁耀武 主编



化学工业出版社

·北京·

本书是作者在总结多年教学与科研工作的基础上,参考了大量国内外相关资料编写而成的。全书分为十一章,主要介绍现代食品微生物检测的相关技术,包括免疫荧光抗体技术、酶联免疫技术、放射免疫分析技术、单克隆抗体技术、免疫金技术、核酸探针技术、PCR技术、环介导等温扩增技术、基因芯片技术、食品微生物自动化仪器与生物传感器检测技术。本书对这些技术的原理及在现实生活中的应用有较为详细的阐述,内容丰富,语言简练,由浅入深,循序渐进,让学生在掌握基础知识的同时把握现代食品微生物检测技术的最新动态与发展趋势。

本书可以作为食品科学与工程、食品质量与安全等专业的本科生、研究生的教材或教学参考书,也可供食品及相关行业的研究人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

现代食品微生物检测技术/张伟,袁耀武主编. —北京:化学工业出版社,2007.9

普通高等教育“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-01037-7

I. 现… II. ①张…②袁… III. 食品微生物-食品检验-高等学校-教材 IV. TS207.4

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第135579号

---

责任编辑:赵玉清

文字编辑:刘畅

责任校对:宋夏

装帧设计:潘峰

---

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印装:北京云浩印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张14 $\frac{1}{4}$  字数354千字 2007年9月北京第1版第1次印刷

---

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686)

售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

---

定 价:29.00元

版权所有 违者必究

## 编写人员

主 编：张 伟 袁耀武

副 主 编：李英军 马晓燕

编写人员：（按姓氏笔画排列）

马玉清	马晓燕	王 羽	王 林	王雪静
亢春雨	李 艾	李 宁	李 慧	李英军
齐 哲	杨国兴	张 伟	张亚爽	张先舟
张会彦	陈珊珊	苏旭东	宋明明	周 巍
赵丽萍	袁耀武			

# 前 言

随着科学技术日新月异的发展和人们生活水平的不断提高，食品安全、卫生已成为人们关注的焦点。近些年来国际卫生组织及各国食品卫生、安全管理部门一直对食品微生物污染问题给予极大的重视和关注。食品微生物检验是食品质量安全控制方面的重要技术之一，对控制微生物引起的食源性疾病具有重要作用，已成为食品安全中的重要研究领域。

近年来食品微生物检测技术得到了很大的发展，正从传统的培养和生理生化的方法向快速的免疫学检测方法、分子生物学检测方法、快速的基于培养及生理生化特征的检测方法、自动化仪器检测方法、生物传感器检测方法方面发展。食品微生物检验技术现已被食品安全、食品科学与工程等相关专业列为主干课程。编者在总结了自己二十多年的教学经验和科研成果的基础上，吸取了近年来国内外同类教材的优点，参考了大量科技文献资料，编写了这本《现代食品微生物检测技术》以飨读者。本书系统地介绍了近年来食品微生物检验技术中的新方法，具有以下几个突出的特点：一是向读者系统地介绍了当今食品微生物检验的新方法、新技术；二是为了便于读者理解和实践应用，本书注重理论与实践相结合，几乎每章都有相应的应用实例。部分内容是编者多年的研究成果，期望对读者有一定的实践指导意义；三是力求通俗易懂，深入浅出。本教材适合于本专科生及从事食品微生物检验的技术人员使用，既可以作为理论课的教材，也可以作为实验指导书或技术参考书。

本教材由张伟教授、袁耀武副教授、李英军高级实验师等人编写。编写分工为：绪论由陈珊珊、李英军编写，第一章由李艾、袁耀武编写，第二章由王羽、马晓燕编写，第三章由张先舟、李英军、齐哲编写，第四章由李慧、亢春雨编写，第五章由袁耀武、张会彦编写，第六章由赵丽萍、王林编写，第七、八章由张亚爽、亢春雨、马玉清编写，第九章由周巍、苏旭东编写，第十章由杨国兴、李宁编写，第十一章由宋明明、王雪静编写，全书由张伟教授、袁耀武副教授、李英军高级实验师及马晓燕老师统一审定、校阅。

本书由集体编写而成，倾注了每位编者的心血，但由于编写人员的学识和写作水平有限，书中难免会出现缺陷和疏漏，衷心希望读者和同行专家批评指正。

编 者

2007年6月于河北保定

# 目 录

绪论 .....	1
第一节 病原微生物与食品安全 .....	1
一、病原微生物污染现状 .....	1
二、现代食品微生物检测技术在食品安全中的重要作用 .....	2
第二节 现代食品微生物检测的研究内容 .....	2
一、食源性病原菌免疫学快速检测技术 .....	2
二、食源性病原菌分子生物学快速检测技术 .....	3
三、基于培养基生理生化特征的检测技术 .....	4
四、食源性病原菌的自动化检测技术 .....	4
五、食源性致病菌生物传感器检测技术 .....	5
第三节 现代食品微生物检测技术的发展趋势及应用 .....	5
一、现代食品微生物检测技术的发展趋势 .....	5
二、现代食品微生物检测技术的应用 .....	6
第一章 免疫荧光抗体技术检测食品微生物 .....	9
第一节 荧光发射的原理 .....	9
一、荧光 .....	9
二、免疫荧光显微技术 .....	10
第二节 荧光抗体的制备 .....	12
一、荧光色素 .....	12
二、其他荧光物质 .....	14
第三节 荧光抗体的标记与纯化 .....	14
一、荧光抗体的标记方法 .....	14
二、标记抗体的纯化 .....	14
第四节 荧光抗体的质量鉴定 .....	16
一、染色特异性和敏感性的测定 .....	16
二、F/P比值的测定 .....	17
三、抗体工作浓度的确定 .....	17
第五节 免疫荧光抗体的染色技术 .....	17
一、标本制作 .....	17
二、荧光抗体染色方法 .....	17
三、荧光抗原染色法 .....	19
第六节 免疫荧光抗体技术在食品微生物检测中的应用 .....	19
一、试验器材及试剂 .....	20
二、操作步骤 .....	20
三、评定标准 .....	20

四、报告 .....	21
参考文献 .....	21
<b>第二章 酶联免疫技术检测食品微生物 .....</b>	<b>22</b>
第一节 酶联免疫测定的基本原理与常用的酶及其底物 .....	22
一、基本原理 .....	22
二、常用的酶及其底物 .....	22
第二节 酶标记物的制备 .....	24
一、戊二醛法 .....	24
二、过碘酸钠法 .....	25
三、酶标记物工作浓度的确定 .....	26
四、酶标记物的保存 .....	26
第三节 酶联免疫吸附测定技术 .....	26
一、基本原理 .....	26
二、ELISA 的种类 .....	27
三、固相载体 .....	30
四、ELISA 的测定方法 .....	31
第四节 其他类型的 ELISA .....	32
一、斑点 ELISA .....	32
二、BAS-ELISA .....	33
三、免疫印迹法 .....	33
四、发光酶免疫测定 .....	33
第五节 酶联免疫测定技术在食品微生物检测中的应用 .....	34
一、细菌及其毒素的检测 .....	34
二、真菌及其毒素的检测 .....	35
三、病毒的检测 .....	36
四、寄生虫的检测 .....	36
五、应用实例 .....	37
参考文献 .....	37
<b>第三章 放射免疫分析测定技术检测食品微生物 .....</b>	<b>39</b>
第一节 放射免疫分析基本原理 .....	39
一、基本原理 .....	39
二、常用的放射性同位素 .....	47
三、放射免疫技术基本类型 .....	48
第二节 同位素标记物的制备 .....	49
一、直接标记法 .....	49
二、间接标记法 .....	52
三、同位素标记物的纯化 .....	53
四、同位素标记物的鉴定 .....	58
第三节 固相放射免疫测定技术 .....	61
一、SPRIA 的种类 .....	62

二、固相载体 .....	62
三、SPRIA 的测定方法 .....	65
四、放射免疫分析在食品微生物检测中的应用 .....	66
参考文献 .....	66
<b>第四章 单克隆抗体技术检测食品微生物 .....</b>	<b>67</b>
第一节 单克隆抗体技术的基本原理 .....	67
一、抗原的概述 .....	67
二、抗体的概述 .....	67
三、单克隆抗体技术 .....	68
第二节 单克隆抗体制备的基本技术 .....	70
一、免疫动物 .....	72
二、制备融合细胞 .....	76
三、细胞融合 .....	78
四、抗体检测 .....	80
五、杂交瘤细胞的克隆化 .....	81
六、单克隆抗体的制备和冻存 .....	82
七、克隆抗体的纯化 .....	85
第三节 单克隆抗体在食品微生物检测中的应用 .....	86
一、检测致病菌及其毒素 .....	86
二、应用实例 .....	90
三、注意事项 .....	91
参考文献 .....	91
<b>第五章 免疫金技术在食品微生物检测中的应用 .....</b>	<b>92</b>
第一节 基本原理 .....	92
一、血清学诞生与免疫标记技术的出现 .....	92
二、免疫金技术的产生及特点 .....	92
三、免疫金技术的原理 .....	93
四、免疫金技术的应用类型 .....	93
第二节 免疫胶体金的制备 .....	95
一、胶体金的制备 .....	95
二、免疫金的制备 .....	97
第三节 免疫金测定技术 .....	101
一、斑点金免疫渗滤测定 .....	101
二、斑点金免疫层析测定 .....	103
第四节 免疫金银染色 .....	104
一、原理 .....	104
二、染色方法 .....	105
第五节 免疫金技术在食品微生物检测中的应用 .....	105
一、检测致病菌及其毒素 .....	106
二、应用实例 .....	106



参考文献 .....	107
<b>第六章 核酸探针技术检测食品微生物</b> .....	<b>108</b>
第一节 核酸探针技术基本原理 .....	108
第二节 核酸探针的标记方法 .....	109
一、核酸探针的同位素标记 .....	109
二、核酸探针的生物素标记 .....	110
三、核酸探针的地高辛标记 .....	111
四、核酸探针的光敏 DNP 标记 .....	111
五、核酸探针的三硝基苯磺酸 (TNBS) 标记 .....	111
六、核酸探针的辣根过氧化物酶标记 .....	111
第三节 核酸探针的杂交方法 .....	112
一、菌落原位杂交 .....	112
二、斑点杂交 .....	112
三、印迹杂交 .....	113
第四节 分子信标 .....	114
一、分子信标基本原理 .....	115
二、分子信标的设计 .....	115
三、分子信标的应用 .....	116
第五节 核酸探针技术在食品微生物检测中的应用 .....	118
一、应用 .....	118
二、应用实例 .....	118
三、存在的问题及展望 .....	119
参考文献 .....	119
<b>第七章 PCR 技术检测食品微生物</b> .....	<b>121</b>
第一节 PCR 反应的基本原理 .....	121
一、基本步骤 .....	122
二、PCR 的基本特点 .....	122
三、PCR 反应的应用 .....	124
四、PCR 技术应用范围 .....	125
第二节 PCR 反应体系 .....	125
一、引物 .....	125
二、Taq DNA 聚合酶 .....	129
三、dNTP .....	131
四、缓冲液 .....	131
五、模板 .....	132
第三节 PCR 反应参数 .....	134
一、变性 .....	134
二、退火 .....	134
三、延伸 .....	135
四、PCR 循环次数 .....	135

第四节	PCR 扩增产物的鉴定 .....	136
一、	琼脂糖凝胶电泳 .....	136
二、	免疫检测 .....	141
三、	Amplisensor 分析 .....	141
第五节	PCR 的种类 .....	142
一、	多重 PCR .....	142
二、	反转录 PCR .....	143
三、	转录依赖的扩增系统 .....	145
四、	再生式序列复制技术 .....	146
五、	免疫 PCR .....	147
六、	实时 PCR .....	148
第六节	PCR 技术在食品微生物检测中的应用 .....	150
一、	检测食品致病菌 .....	150
二、	PCR 技术检测食品致病菌的基本方法 .....	153
三、	应用实例 .....	156
	参考文献 .....	160
<b>第八章</b>	<b>环介导等温扩增技术</b> .....	<b>161</b>
第一节	LAMP 法的概述 .....	161
第二节	LAMP 法引物的设计 .....	162
第三节	LAMP 法的基本原理 .....	164
第四节	LAMP 法的操作流程 .....	166
一、	LAMP 法的反应体系 .....	166
二、	LAMP 反应过程 .....	168
三、	扩增产物的检测 .....	168
第五节	改良的 LAMP 反应 .....	169
	参考文献 .....	170
<b>第九章</b>	<b>基因芯片技术检测食品微生物</b> .....	<b>172</b>
第一节	基本原理 .....	173
第二节	引物和探针的设计 .....	174
一、	PCR 引物与探针的设计思路 .....	174
二、	PCR 引物的设计 .....	174
三、	基因芯片探针的设计 .....	174
第三节	芯片制备 .....	175
一、	载体 .....	175
二、	点样法 .....	176
三、	光刻 DNA 合成法 .....	178
第四节	基因芯片检测模板的扩增、标记与杂交检测 .....	179
一、	样品 DNA 的扩增与荧光标记 .....	179
二、	探针的标记 .....	179
三、	基因芯片的杂交检测 .....	180

第五节 基因芯片的扫读 .....	181
一、激光系统扫读芯片 .....	181
二、CCD系统扫读芯片 .....	183
三、基因芯片数据分析 .....	183
第六节 芯片在食品微生物检测中的应用 .....	184
一、实验器材及材料 .....	187
二、实验方法 .....	187
参考文献 .....	191
<b>第十章 食品微生物自动化仪器检测</b> .....	<b>193</b>
第一节 全自动微生物鉴定仪器 .....	193
一、ATB Expression 细菌鉴定及药敏智能系统 .....	193
二、全自动微生物快速鉴定仪器 VITEK 系统 .....	197
第二节 全自动微生物总数快速测定仪器 .....	198
一、微生物总数快速测定仪 .....	199
二、ISO—GRID 检测系统 .....	200
第三节 全自动大肠杆菌快速测定仪器 .....	200
一、肠杆菌快速测定仪 .....	200
二、大肠杆菌荧光法现场快速定量检测系统 .....	201
第四节 其他快速测定仪器 .....	201
一、自动菌落计数系统 .....	201
二、应用电阻抗技术的全自动微生物监测系统——BACTOMETER .....	203
三、全自动酶联荧光免疫分析系统——mini VIDAS .....	206
四、API—细菌鉴定系统 .....	207
第五节 自动化仪器检测食品微生物实例 .....	210
一、ATB 细菌鉴定仪快速检测食物中毒样品中的麦氏弧菌 .....	210
二、荧光法快速检测肉制品中的大肠杆菌 .....	210
三、利用 mini VIDAS 快速检测金黄色葡萄球菌肠毒素 .....	210
参考文献 .....	211
<b>第十一章 生物传感器</b> .....	<b>212</b>
第一节 生物传感器的基本概念 .....	212
一、生物传感器的定义及基本组成 .....	212
二、生物传感器的分类和命名 .....	213
第二节 生物传感器的工作原理 .....	213
一、分子识别 .....	213
二、生化反应中量的变化和信号的转换 .....	214
三、生物放大 .....	214
第三节 常见的生物传感器原理及其应用 .....	215
一、酶生物传感器 .....	215
二、组织传感器 .....	216
三、微生物传感器 .....	216

四、免疫传感器 .....	216
五、DNA 生物传感器 .....	217
第四节 生物传感器在微生物检测中的应用 .....	218
一、微生物的检测 .....	218
二、生物毒素的检测 .....	218
三、其他生物类毒素的检测 .....	219
四、应用实例 .....	219
第五节 发展前景 .....	220
参考文献 .....	221

# 绪论

众所周知，微生物无处不在，就食品而言，其微生物的种类、数量、性质和活动规律与人类健康密切相关。微生物与食品的关系极为复杂，它们相互影响又相互利用，而微生物又与食品形影不离，所以必须经过检验才能确保食品的安全性。传统的食品微生物检验学主要是运用微生物学的传统理论与技术，研究食品中的微生物，特别是病原微生物的种类、数量、性质等，从而建立食品微生物学检验方法。然而随着科学的进步，又逐步发展出现了现代食品微生物检验学。现代食品微生物检验学是以微生物学为基础，运用现代免疫学、分子生物学、生物传感器、自动化仪器等方面的理论和技术，研究食品中微生物，特别是病原微生物的种类、数量、性质等，并建立现代食品微生物检验方法。其具有简便、快速、准确、高效、高灵敏度等特点。

面对人类日益增长的生活需求与日益严峻的食品安全现状和隐患，食品微生物检验，特别是现代微生物学检验这门学科对人们提高生活质量起到了极为重要的作用。本书将结合具体实例对现代微生物检验学所包含的相关知识作详细介绍，希望能为读者在此方面的学习和工作提供帮助。

## 第一节 病原微生物与食品安全

### 一、病原微生物污染现状

随着食品生产规模的扩大和食品贸易国际化，全球不断发生重大食品安全事件，如英国“疯牛病”、日本大肠杆菌 O157:H7 食物中毒，一次又一次地敲响了食品安全问题的警钟。这一切也清楚地表明，食源性疾病不会随着经济发展和科技水平的提高而减少或消失，而是不断的以更新型、更广泛的形势发生。无论是在发达国家还是发展中国家，食品污染和食源性疾病都尚未得到有效的控制，依然严重地危害着人们的健康。因此，食源性疾病的控制仍面临严峻挑战。

食源性疾病是指因通过食物进入人体内的致病因子而导致的感染或中毒。大多数食源性疾病是由细菌、病毒、蠕虫和真菌引起的。流行病学监测数据显示，在过去的 10 年间全球食源性疾病发病率不断上升，并且有严重的暴发流行。据报道，发达国家每年大约有 30% 的人患食源性疾病。美国每年约有 7600 万人发生食源性疾病，其中约 5000 人死亡。尽管现在没有关于发展中国家食源性疾病的系统性报道，但发展中国家的问题可能更严重。这些国家食源性疾病的种类较多，常见的有霍乱、空肠弯曲菌、大肠杆菌、沙门感染等，其中腹泻发病率和死亡率较高。世界卫生组织（WHO）统计报告表明，每年约有几亿腹泻病例，导

致约 300 万 5 岁以下儿童死亡，其中约 70% 是因生物性污染的食品所致。在发展中国家，估计每年腹泻及其相关疾病有 2.7 亿病例，导致 240 万 5 岁以下儿童死亡。

由于目前世界上只有少数几个国家建立了食源性疾病年度报告制度（包括美国、英国、加拿大及日本，其中美国食源性疾病监测系统最完善，资料报告最多、最完整），而且其漏报率相当高，发达国家的漏报率约高达 90%，发展中国家约在 95% 以上。所以很难准确估计全球食源性疾病发病率。我国虽有较健全的食物中毒报告系统，但还没有健全食源性疾病监测体系，故难以估计食源性疾病的发病情况。但食品安全形势不容乐观，食物中毒事件屡有发生。尽管各级卫生部门在预防和控制食物中毒方面采取了一系列有效措施，积极开展食品安全专项整治工作，严厉打击产销假冒伪劣和有毒有害食品的违法犯罪行为，取得了一定效果。但从整体上看，各种病原微生物污染尚未得到根本控制，食源性疾病预防控制工作和食品微生物检验工作仍非常艰巨。

## 二、现代食品微生物检测技术在食品安全中的重要作用

食品安全是一个遍及全球的公共卫生问题。尽管科学技术已发展到了相当的水平，但食品污染和食源性疾病在发达国家和发展中国家仍普遍存在，且发病率持续增高，新的病原体感染不断出现。目前的调查数据表明，与其他任何一类疾病相比，由病原微生物引起的食源性疾病是危害最大的一类。

食品微生物检验是衡量食品安全质量的重要指标，也是判定被检食品能否食用的科学依据；通过食品微生物检验，可以判断食品加工环境及食品卫生情况，能够对食品被细菌污染的程度作出正确的评价，为各项卫生管理工作提供科学的依据，提供传染病和人类、动物的食物中毒的防治措施；食品微生物检验是以预防为主措施，可以有效地防止或者减少食物中毒和人畜共患病的发生，同时，食品微生物检验技术可以提高产品质量，避免经济损失等方面具有重大作用。

但是，传统的食品微生物检测技术主要靠微生物培养和生理生化实验，耗时长、效率低、敏感性差，不能及时检出食品中的病原菌。因此，发展快速、准确、高效的现代食品微生物检测技术，可以快速检出食品中的病原微生物，迅速对食品的卫生质量作出评价，防止食物中毒的发生，有效地控制食源性疾病。

## 第二节 现代食品微生物检测的研究内容

现代食品微生物检验技术研究内容主要有食源性病原菌免疫学快速检测技术、食源性病原菌分子生物学快速检测技术、基于培养基生理生化特征的检测技术、食源性病原菌的自动化检测技术、食源性致病菌生物传感器检测技术。

### 一、食源性病原菌免疫学快速检测技术

（一）荧光抗体检测技术（FAT） 一种快速检测细菌的荧光抗体技术，主要有直接法和间接法。直接荧光抗体检测法是在检样上直接滴加已知特异性荧光标记的抗血清，经洗涤后在荧光显微镜下观察结果。间接法是在检样上滴加已知细菌特异性抗血清，待作用后经洗涤，再加入荧光标记的抗体后在荧光显微镜下观察结果。如沙门菌、炭疽杆菌检测，FAT 方法简便、快速经济，但有时受到样本中非特异性荧光的干扰，影响结果的判定，并且需要昂贵的荧光显微镜。

（二）免疫酶技术 免疫酶技术（EIA）是将抗原、抗体特异反应和酶的高效催化作用

原理有机结合的一种新颖、实用的免疫学分析技术。它通过共价结合将酶与抗原或抗体结合,形成酶标抗原或抗体,或通过免疫方法使酶与抗酶抗体结合,形成酶抗体复合物。这些酶标抗体(抗原)或酶抗体复合物仍保持免疫学活性和酶活性,可以与相应的抗原(抗体)结合,形成酶标记的抗原-抗体复合物。在遇到相应的底物时,这些酶可催化底物反应,从而生成可溶或不溶的有色产物,或者发光。可用仪器定性或定量测定。常用酶技术分为固相免疫酶测定技术、免疫酶定位技术、免疫酶沉淀技术、固相免疫酶测定技术分为限量抗原底物酶法、酶联免疫吸附试验(ELISA)。酶联免疫吸附试验又分为间接法、竞争法、双抗体夹心法、酶-抗酶复合物法、生物素-亲和素系统等。在病原菌和真菌毒素检测中,应用较多是竞争法、双抗体夹心法。例如,GB/T 5009.22—1996 食品中黄曲霉毒素 B1 的测定方法第二种方法就采用了该技术。

## 二、食源性病原菌分子生物学快速检测技术

(一) 核酸探针技术 核酸探针是指带有标记的特异 DNA 片断。根据碱基互补原则,核酸探针能特异性的与目的 DNA 杂交,最后用特定的方法测定标记物。探针标记方式分为放射性标记、非放射性标记。用的较多的非放射性标记,又分为生物素标记、地高辛标记、免疫标记、荧光素标记等。特点是直观、准确。例如 AOAC990.13GENE-TRAK 沙门菌检测、AOAC993.09GENE-TRAK 李斯特菌检测均采用了核酸探针技术。

(二) 多聚酶链式反应(PCR)技术 核酸探针技术虽已广泛应用,但主要问题是灵敏度不够高,使其应用受到限制。1983年,美国 Cetus 公司和加利福尼亚大学的 Hulis 和 Erlich 创建了一种能在体外进行 DNA 扩增的简易、快速、灵敏和高特异性的多聚酶链式反应(PCR),在一定程度上解决了核酸探针所存在的问题。测定 PCR 产物的方法较多,如凝胶电泳法、比色测定法以及化学发光测定法等。目前,已有自动化 PCR 检测试剂盒及仪器,使用方便,如美国杜邦快立康公司的 BAX 病原菌检测系统,可检测沙门菌、大肠杆菌 O157、单增李斯特菌等。虽然此法需要增菌且需专用设备,但 PCR 技术是一项全新的技术,快速、灵敏、准确,在细菌诊断方面具有广阔的应用前景。

实时荧光定量 PCR 是 PCR 的一种。随着定量技术的发展,将 PCR 技术和检测技术融为一体,就形成了定量 PCR 仪。由于应用的是荧光技术,同时每个扩增过程都能实施监控,所以称为实时荧光定量 PCR 仪。准确的讲实时荧光定量 PCR 仪没有自动加样和标本处理系统,只能算半自动的。但是实时荧光 PCR 技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,而且与常规 PCR 相比,它具有特异性更强、自动化程度更高、有效解决了 PCR 污染问题等特点,目前已经得到了广泛的应用。

实时荧光定量 PCR 在食品卫生检疫方面的应用前景相当广泛。在海关卫生检疫方面,进口的粮食、食品、花果是否安全,是否含有危险或潜在危险的病原微生物,都可以用实时荧光定量 PCR 技术进行检测。

(三) 生物芯片技术 生物芯片技术的概念源于计算机芯片。狭义的生物芯片是指包被在固相载体上的高密度 DNA、蛋白质、细胞等活性物质的微阵列(microarray),主要包括 cDNA 微阵列、寡核苷酸微阵列和蛋白微阵列。这些微阵列是由生物活性物质以点阵的形式有序地固定在固相载体上形成的。在一定条件下进行生化反应,反应结果用化学荧光法、酶标法、同位素法显示,再用扫描仪等光学仪器进行数据采集,最后通过专门的计算机软件进行数据分析。对于广义生物芯片而言,除了上述被动式微阵列芯片之外,还包括利用光刻技术和微加工技术在固体基片表面构建微流体分析单元和系统,以实现生物分子进行快速,

大信息量并行处理和分析的微型固体薄型器件。包括核酸扩增芯片、阵列毛细管电泳芯片、自动式电磁生物芯片等。

### 三、基于培养基生理生化特征的检测技术

(一) 电阻抗法 电阻抗法是近年发展起来的一项生物学技术,已经开始应用于食品微生物的检验。其原理是细菌在培养基内生长繁殖的过程中,使培养基中的大分子电惰性物质如碳水化合物、蛋白质和脂类等代谢为具有电活性的小分子物质,如乳酸盐、醋酸盐等,这些离子态物质能增加培养基的导电性,使培养基的阻抗发生变化,通过检测培养基的电阻抗变化情况,判定细菌在培养基中的生长繁殖特性,即可检测出相应的细菌。该法目前已经用于细菌总数、霉菌、酵母菌、大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌等的检测。如 AOAC991.38 食品中沙门菌电阻抗检测法。

(二) 微量生化法 Bachman 和 Weaver 在 20 世纪 40 年代后期首先开创了微量生化法的纪元。之后随着人们对细菌进行快速生化特性鉴定的需求增加,使高精密度(90%)和高重现性的商业试剂盒得以快速发展。至今,市售的微生物鉴定用试剂盒有多种,常见的有 MICRO-ID、API 等。API 由 20 个含干燥培养基的微管组成,其中的培养基用于进行酶促反应或糖发酵试验。检验时将预处理的菌悬液加入微管中培养后观察颜色变化,并纪录,输入到 APILAB Plus 软件得出结果。API 创建了独特的数值鉴定法,可鉴定 15 个系列、600 多个细菌种。

(三) 快速酶触反应及代谢产物的检测 快速酶触反应是根据细菌在生长繁殖过程中可合成和释放某些特异性的酶,根据酶的特性,选用相应的底物和指示剂,反应的测定结果可以进行细菌快速诊断。如美国 3M Petrifilm TM 微生物测试片可分别快速测定细菌总数、霉菌、酵母菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠菌群等。

### 四、食源性病原菌的自动化检测技术

(一) ATB Expression 细菌鉴定及药敏智能系统是用于细菌的快速鉴定主要仪器,它是从 API 系统发展而来,以 API 试剂条为基础,测试品种齐全,共有 750 种反应,电脑数据库已得到不断完善和补充,鉴定能力强,可鉴定近 700 多种细菌。

(二) Bactometer 系统主要由 BPU 电子分析器/培养箱组成。它是利用电阻抗、电容抗或总阻抗等参数的自动微生物检测系统。该法目前已经用于细菌总数、霉菌、酵母菌、肠道杆菌如大肠杆菌和沙门菌、金黄色葡萄球菌等的检测。可同时检测 64 个样品,样品不需预先稀释,结果报告可用数字及曲线图显示。如食品中沙门菌用 Bactometer 系统检测一般只需 30h。

(三) Vietk-AMS 即全自动微生物分析系统,能同时进行 60~480 个样品的分析,速度快,易操作,结果准确,细菌鉴定时间 2~3h,可鉴定 G<sup>+</sup> 菌、G<sup>-</sup> 菌、厌氧菌、酵母菌、芽孢杆菌、非发酵菌等,药敏试验时间 3~6h。Vietk 专家系统具有较强的数据处理功能,保证鉴定、药敏试验结果可靠无误,但菌株需分离纯化。

(四) Mini-VIDAS 即微型全自动荧光酶标分析仪,应用酶联荧光技术(ELFA),ELFA 技术具有很高的敏感性和特异性,抗原的检测是应用一种夹 GELFA 技术,SPR 包被针上拥有抗体包被,所测的荧光强度与抗体中抗原的含量成正比。内设自检系统,可检验李斯特菌、单增李斯特菌、沙门菌、葡萄球菌肠毒素、空肠弯曲杆菌、大肠杆菌 O157。使用该仪器操作简便,只加一次样品,按一次键整个检测过程都由仪器自动完成。多数试验 50min 内结束(不含增菌过程),无交叉污染。SN/T 0973-2000 进出口肉及肉制品中肠出血性大肠



杆菌 O157:H7 检验就采用了该仪器。

(五) 微生物总数快速测定仪(又名 ATP 荧光仪)是专门设计用于快速检测微生物数量的测定仪器。此仪器分析从微生物中提取的 ATP,为在数分钟内检测微生物提供了一种简便而灵敏的方法。它简单实用,能快速和方便的得到微生物的增长水平,及时采取有效措施控制微生物的繁殖,这样就可以防止有害微生物大量繁殖而引发的一系列问题。

(六) 肠杆菌快速测定仪是快速检测大肠杆菌生化反应的色原及成套鉴定系统(chromogenic or fluorescence substrates for rapid identification of bacteria)以 API 为代表的细菌生化反应的成套系统中,已用新型的色原或荧光底物代替传统的糖类和氨基酸。此种底物系由色原(呈色)或荧光与糖类或氨基酸人工合成。此底物无色,经细菌的细胞内或细胞外酶的作用而释放出色原(呈色)或荧光,其优点是特异性强,反应迅速,易于自动化检测,明显提高了细菌生化反应的准确性,实现了细菌生化反应革命性变化。

### 五、食源性致病菌生物传感器检测技术

生物传感科学是一门新兴的交叉学科,主要是生物工程和其他技术学科的相互渗透。由生物活性物质做敏感元件,配上适当的换能器所构成的分析工具(或分析系统)称为生物传感器。从 1962 年,Clark 和 Lyons 最先提出生物传感器的设想距今已有 40 余年。生物传感器在发酵工艺、环境监测、食品工程、临床医学、军事及军事医学等方面得到了深度重视和广泛应用。生物传感器由固定化的生物材料及与其密切配合的换能器组成,换能器把生化信号转换成可定量的电信号。生物分子具有能够识别并特异地结合单一化合物或一类化合物的性质。已用于生物传感器的生物分子有酶,抗体,完整的器官和组织。将生物分子用于传感器的优点是特异性强,其次是灵敏度高。某些酶的高周转率导致放大效应,能提高检测的灵敏度。生物传感器主要用于一些食品和污染物浓度的测量,微生物呼吸活性的测定,微生物培养方法的选择等,此外,还可以作为水处理设备的终端。可以预料,生物传感器将向着微型化、实用化、多样化和人工智能化的方向发展,并且还将用于对生物功能进行人工模拟,研究人工感官。生物传感器具有快速、准确、方便等优点,具有广阔的应用前景,必将在市场上开辟出一片新的天地。

## 第三节 现代食品微生物检测技术的发展趋势及应用

### 一、现代食品微生物检测技术的发展趋势

科学技术的发展的带动了食品检测技术的现代化,现代化食品微生物检测技术把食品技术提高到一个新的层次。现代食品微生物检测技术最突出的特点是依靠高新技术,而且仪器设备的设计越来越人性化,具体可如下概括。

(一) 现代食品微生物检测技术更加注重快速、准确、实用,食品微生物检测仪器是食品检测技术的重要载体,其实用性主要体现在微型化、低能耗化、功能专用化、一体化和成像化。

(二) 现代食品微生物检测技术与生物技术成果相结合,比如核酸探针技术、PCR 技术、生物芯片技术等均在食品微生物检验方面有广泛的应用。

(三) 大力发展在线无损的食品微生物检测技术,因为食品生产是一种连续的过程,所以那种破坏性的或侵入性的微生物检测手段将逐步被淘汰,而无损的可以进行原位检测的食