

抗体技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展

全美淋¹, 李飞³, 刘金燕², 王婷婷², 年锐², 刘文帅², 张鸣^{3*}, 池哲^{1*}

1 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266100

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

3 日照康惠生物医药科技有限公司, 山东 日照 276800

全美淋, 李飞, 刘金燕, 王婷婷, 年锐, 刘文帅, 张鸣, 池哲. 抗体技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3985-4005.

QUAN Meilin, LI Fei, LIU Jinyan, WANG Tingting, NIAN Rui, LIU Wenshuai, ZHANG Ming, CHI Zhe. Research progress of antibody technology in rapid detection of foodborne pathogens[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3985-4005.

摘 要: 食源性致病菌是导致食品安全问题的重要因素之一, 对国民健康造成严重危害, 实现对食源性致病菌的快速检测是目前防治食源性疾病的关键策略。抗体具有高特异性、高灵敏度的优势, 是食源性致病菌关键特异性识别元件的首选。本文介绍了不同种类的抗体及其特点, 以及不同抗体技术在食源性致病菌快速检测中的应用, 并提出抗体技术与其他食源性致病菌检测方法的联用可以有效提升检测效果。最后, 对目前的研究现状与潜在问题进行了分析与总结, 以期对食源性致病菌快速检测的发展提供理论依据与实践思路。

关键词: 抗体; 食源性致病菌; 食源性疾病; 快速检测; 特异性识别

Research progress of antibody technology in rapid detection of foodborne pathogens

QUAN Meilin¹, LI Fei³, LIU Jinyan², WANG Tingting², NIAN Rui², LIU Wenshuai²,
ZHANG Ming^{3*}, CHI Zhe^{1*}

1 College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

2 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

3 Rizhao Kanghui Bio-pharmaceutical Technology Co., Ltd, Rizhao 276800, Shandong, China

Abstract: Foodborne pathogens are one of the major factors leading to food safety issues,

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2022MH123, ZR2022MB062)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2022MH123, ZR2022MB062).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Ming, chembuyer@126.com; CHI Zhe, cz1108@ouc.edu.cn

Received: 2024-05-13; Accepted: 2024-08-07; Published online: 2024-08-07

causing harm to the national economy and people's livelihood. Achieving rapid detection of foodborne pathogens is currently a key strategy for preventing and controlling foodborne diseases. Antibodies naturally possess high specificity and sensitivity, serving as preferred tools for specific recognition of foodborne pathogens. We list the main methods for detecting foodborne pathogens, introduce the evolution and development of polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, and genetically engineered antibodies, and review the application of different antibody technologies in the rapid detection of foodborne pathogens. Furthermore, we recognize that the combination of antibody technology and other foodborne pathogen detection methods is currently a reliable means to improve detection performance. Finally, we elaborate on the existing limitations of different antibodies and summarize the current research status and potential issues, aiming to provide a theoretical basis and practical ideas for the development of rapid detection of foodborne pathogens.

Keywords: antibodies; foodborne pathogens; foodborne diseases; rapid detection; specific recognition

食源性疾病是全球范围内备受关注的公共安全问题。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报告,全球每年出现食源性疾病数十亿例,腹泻类疾病导致死亡的人数约 180 万^[1],产生的治疗成本高达数千亿美元^[2]。根据国家卫生健康委员会发布的《2022 年我国卫生健康事业发展统计公报》^[3],2022 年全国共报告食源性疾病暴发事件 4 902 起,发病 24 282 人,死亡 90 人,对人民健康与经济发展造成巨大影响。

在食源性疾病的致病途径中,食源性致病菌的感染是最为常见的一类,其通过污染食品、畜禽以及水源,进入人体繁殖或生产毒素。常见的食源性致病菌包括沙门氏菌(*Salmonella* sp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)以及副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等。成年人感染食源性致病菌后,一般会出现高烧、呕吐以及腹泻等肠道性疾病症状,甚至会导致死亡,例如感

染 *C. jejuni* 会引发格林-巴利综合征,损害中枢神经与大脑运动皮质锥体细胞;感染 EHEC 会引发出血性腹泻与肠炎。WHO 于 2015 年发布的《全球食源性疾病负担的估算报告》^[4]指出,全球每年有 12.5 万 5 岁以下的儿童死于食源性疾病。而根据我国多个城市、市辖区^[5-8]关于食源性疾病的监测结果的流行特征的分析可知,食源性疾病在不同人群中的致病率以及死亡率受到不同饮食文化、不同季节以及不同致病菌的共同影响。疾病预防部门将儿童、老年人等免疫力低下的人群归为食源性疾病重点监测人群,为了保障人体健康,监督监控食品安全势在必行。在食品原料、成品以及感染人群中快速、准确地检测出食源性致病菌,对预防、诊断以及治疗食源性疾病具有重大意义。

食源性致病菌的检测方法发展至今,逐步从传统的培养检测过渡到分子生物学检测与基于抗原抗体特异性反应的免疫学检测。近年来,随着纳米、荧光等材料的开发,利用其构建的生物传感器在食源性致病菌检测中扮演着重要角色(表 1)。食源性致病菌的各类检测方法并非孤立式发展,而是逐步集成分子

表 1 常见的食源性致病菌检测方法

Table 1 Common detection methods for foodborne pathogens

Methods types	Methods	Advantages	Disadvantages	References
Conventional culturing method	Conventional culturing method	Low cost, weak instrument dependence	Long detection time, easy to miss detection	[9-10]
Immunological methods	Immunomagnetic bead method	High sensitivity, strong specificity	Long detection time	[11-12]
	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	High sensitivity, strong specificity, quantifiable and highly reproducible	High technical operation, prone to false positives, and less effective for complex sample detection	[13-14]
	Chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA)	High sensitivity, strong anti-interference capability	Poor selectivity, high requirements for detection environment	[15]
	Lateral flow immunoassay (LFIA)	Short detection time, high sensitivity	False negative, sample pretreatment	[16-17]
Molecular biology method	Latex agglutination test	Low cost, simple operation	Prone to missed detections, unable to quantify	[18]
	Polymerase chain reaction (PCR)	High accuracy	Complex operation, strong instrument dependence, inability to distinguish between live/dead cells and easy to cross-contamination	[12,19]
	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	High accuracy, strong specificity, and short detection time	High technical operation, easy to cross-contamination and inability to distinguish between live/dead cells	[19-20]
	Cross priming amplification (CPA)	Simple operation, high sensitivity, and strong specificity	Poor repeatability, poor stability and inability to distinguish between live/dead cells	[21]
	Rolling circle amplification (RCA)	Short detection time, weak instrument dependence	High cost, unstable reaction system and inability to distinguish between live/dead cells	[22-23]
	Isothermal multiple self-matchinginitiated amplification (IMSA)	High sensitivity, strong specificity	Complex primer design, inability to distinguish between live/dead cells	[24]
	Recombinase polymerase amplification (RPA)	Short detection time, high sensitivity, and strong specificity	High cost, purification required, inability to distinguish between live/dead cells and non-specific amplification	[25-27]
	Recombinase-aided amplification (RAA)	Short detection time, high sensitivity, easy operation, and weak instrument dependency	High cost, false positives, inability to distinguish between live/dead cells	[28-29]
	Multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA)	Easy operation, low cost, and short detection time	Slightly lower sensitivity, inability to distinguish between live/dead cells	[10,30]

(待续)

(续表 1)

Methods types	Methods	Advantages	Disadvantages	References
Biosensor method	CRISPR/Cas system	High sensitivity and strong specificity	High professionalism, strong instrument dependence, high cost, and inability to distinguish between live/dead cells	[12,31,32]
	Electrochemical-biosensor method	High sensitivity, reusable	High requirements for detection environment, susceptible to interference, long response time, and short lifespan	[33]
	Raman scattering-biosensor method	High sensitivity	Susceptible to interference, high professionalism, and strong instrument dependency	[34]
	Fluorescence nanoparticle biosensor method	High sensitivity, strong selectivity, miniaturization, and integration	Some toxic fluorescent nanomaterials , high raw materials and instrument costs	[35]
	Ultraviolet absorption-biosensor	High sensitivity, intuitive results	Low accuracy	[33]
Other methods	Phage typing screening technology	Low cost	Low specificity, bacteria resistance	[36-37]

生物学、免疫学以及材料学等学科，融合跨越式发展。其中，抗体技术作为生物学中发展最快的热门技术之一，其研究成果经过百年的积累，已经在抗体生产与应用领域取得了许多突破性的进展。抗体的种类也从传统的多克隆抗体 (polyclonal antibody, pAb)、单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb)发展到基因工程抗体 (genetically engineered antibody/recombinant antibody)。利用抗体技术检测食源性致病菌具有操作简单、准确性高和检测速度快等优点。

本文对检测食源性致病菌的相关方法以及研究进展进行了总结，并在此基础上介绍了抗体技术在食源性致病菌检测方面的发展情况以及一些新兴的抗体技术，另外基于本课题组在纳米抗体 (nanobody, Nb)制备、修饰以及平台化构建方面的研究基础，对其存在的关键“卡脖子”问题提出建议并对未来发展方向提出展望，旨在为食源性致病菌检测技术的发展提供参考。

1 抗体的种类及其发展现状

1.1 多克隆抗体

多克隆抗体即传统意义上的抗体，一般使用重组或天然的蛋白作为抗原，注射进免疫动物体内，由不同的 B 淋巴细胞自然产生针对该抗原的抗体混合物。多克隆抗体可以识别同一抗原中的多个不同表位，通常收集免疫动物的血液分离免疫球蛋白 (immunoglobulin, Igs)，亲和纯化后即可获得。生产多克隆抗体常用的免疫动物为兔、有蹄类动物 (绵羊、山羊、马、猪等)、啮齿类动物以及鸡等。其中，兔的耐受性强且血量大，取血相对其他动物更容易，制备所得的抗体量相对较大^[38]；且兔的 Igs 有 4 类，不含 IgD，具有丰富的 IgG，其特异性高、结构简单且更稳定；另外，兔产生的抗体具有更好的亲和力^[39]，故应用更为广泛。

由于多克隆抗体是免疫动物体内自然产生的，可以识别同一抗原中的多个不同表位，故

其亲和力较强,敏感性较高,但特异性较弱。因此多克隆抗体更适合前期检测、二次检测或检测一些丰度较低的抗原物质。另外,多克隆抗体具有一定局限性,同一只免疫动物不会产生完全相同的抗体混合物,所以其提供的抗体较为有限,每一批次的质量都有一定差距^[40]。

1.2 单克隆抗体

单克隆抗体是指一个 B 淋巴细胞经无性繁殖成为一个细胞系,即一个克隆所分泌的针对单一抗原决定簇而组成的均一的抗体。故与多克隆抗体相反,单克隆抗体只能识别特定单一的抗原表位,具有良好的特异性、但亲和力和敏感性较弱,可以用来检测表达水平较高的抗原。单克隆抗体的制备也与多克隆抗体不同,需要采用体外组织培养技术,将某一个特定的抗原多次注射入动物体内,当免疫动物产生免疫反应后,动物脾脏中的 B 淋巴细胞会被分离出来和骨髓瘤细胞融合,生成融合瘤,该融合瘤同时具有 B 细胞分泌抗体以及癌细胞不断分裂而不受次数限制的特性,进一步筛选后便可得到想要的单克隆抗体。自 1975 年, Köhler 和 Milstein^[41]首次利用细胞融合技术,以杂交瘤细胞方式制备单克隆抗体后,该技术在近几十年来发展迅速,制备单克隆抗体的方案已从鼠源性 B 淋巴细胞瘤杂交技术发展到人-鼠杂交瘤技术和人-人杂交瘤技术,人源性单克隆抗体已经出现。

然而,单克隆抗体的制备成本较高,理论上杂交瘤细胞系具有不断分裂而不受次数限制的特性,但实际研究中杂交瘤细胞系并不是无限分裂的,同样有死亡或失去抗体基因的情况出现^[42],这些都限制着单克隆抗体的发展。

1.3 基因工程抗体

基因工程抗体,也称重组抗体,指利用重组 DNA 和蛋白质工程技术,对抗体基因进行加

工改造或重新装配,在适当的受体细胞表达,并折叠成有功能的抗体分子片段。基因工程抗体种类繁多,包括纳米抗体/单域抗体(single domain antibody, sdAb)、抗原结合片段(fragment antigen-binding, Fab)、单链抗体(single-chain fragment variable, ScFv)以及嵌合抗体(chimeric antibody, CAb)等,可以根据需要进行制备。基因工程抗体可以在无需免疫的情况下,利用哺乳动物细胞系、细菌以及酵母等稳定大规模生产,可以大幅降低成本,且其具有良好的一致性、高重复性和较好的再现性。

Fab 是由木瓜蛋白酶水解 IgG 铰链区二硫键近 N 端所形成的 2 个结构相同的片段,由第一重链恒定区(constant region of heavy chain 1, CH1)和重链可变区(variable region of heavy chain, VH)结构域以及一条完整的轻链组成^[43]。而 ScFv 相比, Fab 结构更加微小,由 VH 和轻链可变区(variable region of light chain, VL)连接组成,其多肽连接物的长度在 10–25 个氨基酸之间,平均分子质量约为 25 kDa^[44]。使用 Fab、ScFv 等基因工程抗体开发检测食源性致病菌的生物传感器具有一定优势,即工程化改造空间大、可根据应用场景灵活进行修饰,例如引入含有组氨酸或半胱氨酸的多肽连接物,可将其固定在金属表面上;或将生物素连接到 ScFv 的游离胺上,以固定在链霉亲和素修饰的表面上^[45],适合在多场景下构建生物传感器。CAb 一般是指将鼠源抗体的可变区与人源抗体的恒定区嵌合而成,从而降低了鼠源抗体不良反应的一类基因工程抗体,CAb 多用于临床治疗,在食源性致病菌检测中甚少应用。

抗体在检测与治疗时需要发展更优异的穿透性、递送性以及与功能物质的偶联性等,因此近年来对于抗体微型化的需求逐步加深,而纳米抗体的出现即代表了最新、最为热门的基

因工程抗体发展方向。传统的抗体一般是由 2 条相同的重链和轻链构成的“Y”字型蛋白质分子, 1993 年, Hamerscatterman 等^[46]首次在骆驼的血液中发现了一种天然缺失轻链和 CH1 的抗体, 即为重链抗体(heavy chain antibody, HcAb), 其存在于一些骆驼科和软骨鱼纲动物血清中, 通过基因手段克隆 HcAb 的可变区, 可得到一个重链单域抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH), VHH 与传统 mAb 的 VH 具有较高的同源性, 都是由 3 个互补决定区和 4 个骨架区构成, 因其晶体结构处于纳米级水平, 故被称为纳米抗体, 是迄今为止发现的最小的基因工程抗体。

从免疫库中筛选特异性强、亲和力高的抗体, 是目前最普遍的制备纳米抗体的方法。然而, 免疫库虽然具有抗体特异性强、亲和力高等优点, 但是也具有非常明显的缺点: (1)不仅需要花费高昂的成本饲养和维护动物, 尤其是

多靶标抗原免疫所需动物数量更大, 还会对动物受体产生永久性伤害, 甚至出现致死情况; (2)抗原用量大, 珍贵抗原应用受限; (3)构建免疫库前需要进行动物免疫, 周期长、风险高, 筛选工作费时费力; (4)具有动物毒性的抗原不适合进行体内免疫。体外免疫能够有效解决传统免疫过程中的诸多问题, 永生 B 细胞可能在体外免疫产生及筛选高亲和力纳米抗体方面具有研究价值。然而目前尚无相关研究, 但这也也许将成为纳米抗体进一步发展的趋势。

目前, 食源性致病菌检测出现了集成化、平台化的趋势。研究者更倾向于使用可以修饰或偶联功能基团的特异性识别元件, 例如核酸适配体, 其具有较高的稳定性、批次均一性, 可在一定程度上取代传统的多/单克隆抗体。然而, 纳米抗体的出现(表 2)可能将克服传统抗体的局限性, 在食源性致病菌的检测中发挥重要作用。

表 2 不同种类抗体的特点

Table 2 Characteristics of different types of antibodies

	Polyclonal antibodies	Monoclonal antibodies	Nanobodies
Molecular structure	Two heavy chains, two light chains	Two heavy chains, two light chains	One heavy chain
Production process	Simple, produced by rabbits, ungulates, rodents, chickens, and other animals	Complex, produced by Chinese hamster ovary cells	Simple, produced by bacteria or yeast
Production cycle	2–3 months	4–6 weeks	1–6 weeks
Stability	Decomposes under high temperature, strong acid, strong alkali, must be stored at low temperature	Decomposes under high temperature, strong acid, strong alkali, must be stored at low temperature	Resistant to high temperature, strong acid, strong alkali, can be stored at room temperature
Repeatability	Lower	High	High
Specificity	Weak	Strong	Strong
Genetic modification	Complex	Complex	Simple
Antigen binding surface	Can recognize multiple epitopes on antigens, flat or concave antigen binding surfaces, unable to recognize internal epitopes of antigens	Flat or concave antigen binding surface, unable to recognize internal epitopes of antigens	The exposed convex ring structure allows for better contact with the surface and interior of the antigen, and can bind to epitopes that traditional mAbs cannot recognize
Cost	Low	High	High

2 抗体技术在食源性致病菌检测中的应用

目前,食源性致病菌的检测仍以分子生物学、免疫学方法为主,随着光学、电化学以及材料学等诸多学科的进步,食源性致病菌的检测也逐渐走向智能化与实时化。抗体技术凭借其准确可靠的优势,在食源性致病菌的检测中发挥着重要作用,故难以取代(图 1)。由抗体技术与多项先进技术耦合的检测方法,既能高效完成食源性致病菌的检测,又能弥补单一技术的缺陷,使得抗体技术焕发出新的活力。

2.1 多克隆抗体在食源性致病菌检测中的应用

多克隆抗体发展至今,其制备与生产工艺相对成熟,选择多克隆抗体检测食源性致病菌既能达到一定的灵敏度和准确度要求,同时又又可以控制成本。Wenbap 等^[47]使用计算机技术设计了来源于空肠弯曲菌黏附纤连蛋白(*Campylobacter* adhesion to fibronectin protein,

CadF)保守区的嵌合多表位抗原(multiepitope antigen, MEA)生产多克隆抗体;并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达并成功纯化了由 2 个组氨酸标签嵌合的 MEA,产率较高;间接 ELISA 结果表明,兔血清中的抗 MEA 多克隆抗体效价达到 16 000 倍;生产的抗 MEA 抗体可以特异性识别 *C. jejuni* 和结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)全细胞,对非弯曲杆菌没有交叉反应。样品的富集往往有利于食源性病原体的检测, Wang 等^[48]将磁珠与针对革兰氏阴性菌外膜蛋白(outer membrane protein A, ompA)通用抗原 LAMOA-1 的多克隆抗体相结合,捕获和浓缩多种病原体,根据 432 个肠道革兰氏阴性菌 ompA 序列的比对结果,鉴定了一个由 241 个氨基酸组成的蛋白质序列,其空间构象与 *E. coli* ompA 相似,并在原核生物中表达为重组蛋白;从兔血清中纯化的抗 LAMOA-1 抗体能有效识别 12 种食源性致病菌;当人工污染样品中的致病菌浓度在 10–100 CFU/mL 时,使用该抗体偶联磁珠浓缩细菌,可将检测时间缩短 8–24 h。

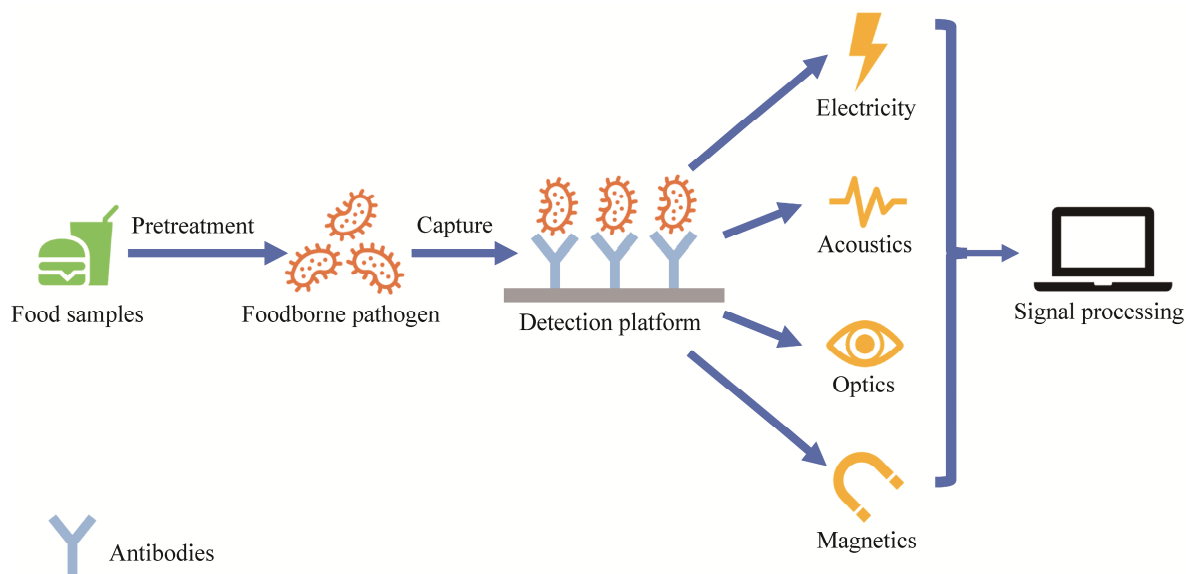


图 1 抗体技术检测食源性致病菌的原理

Figure 1 The principle of antibody technology for detecting foodborne pathogens.

然而,多克隆抗体特异性较弱,单独使用其进行致病菌检测难免出现漏检情况,故研究者多将其与其他检测方法联用,使其作为检测中关键识别元件发挥功效。免疫荧光传感器是食源性致病菌常见的检测工具之一,其一般会利用抗体、核酸适配体等作为捕获模块,与致病菌结合,产生荧光信号。Dehghani 等^[49]利用氧化石墨烯和石墨烯碳量子点设计了一种新的免疫荧光传感器,检测食品样品中的 *C. jejuni*;该传感器利用石墨烯碳量子点偶联的多克隆抗体与 *C. jejuni* 细胞膜表面蛋白的相互作用,发生特异性结合导致碳量子点与氧化石墨烯之间产生距离来开启荧光;而在缺乏 *C. jejuni* 或仅存在非 *C. jejuni* 的其他细菌的情况下,石墨烯碳量子点和氧化石墨烯的距离非常近,石墨烯碳量子点荧光发射关闭;该传感器的检测限可达到 10 CFU/mL。Bai 等^[50]开发了一种快速、灵敏的免疫色谱试纸,使用时间分辨荧光技术,可定量检测海鲜样品中的 *V. parahaemolyticus* 耐热性直接溶血素(thermotolerant direct hemolysin, TDH);基于双抗体夹心的原理,将镧系荧光纳米球与自制的高亲和力 pAb 偶联,构建出荧光检测抗体;使用的镧系荧光纳米球具有较大斯托克斯位移与较长的荧光寿命,有效降低了背景噪声,提高了检测灵敏度;此外,该方法可在 15 min 内完成 TDH 的检测,检测限低于 50 ng/mL,并具有良好的特异性,与创伤弧菌溶细胞素(*Vibrio vulnificus* hemolysin, VVH)等其他毒素无交叉反应。除免疫荧光法外,免疫磁珠(impetiCbead, IMBs)法在食源性致病菌检测中也甚为常见,PagN 蛋白位于 *Salmonella* 的外膜表面,含有多个表位,Sun 等^[51]制备了针对重组 PagN 蛋白的 pAb,并与羧化磁珠偶联,构建用于捕获 *Salmonella* 的 IMBs,然后将其与 qPCR 技术相结合,利用 *invA* 基因的特异性引

物准确地定量菌落数,用于猪肉和牛奶样品中 *Salmonella* 的检测和计数,稳定捕获效率为 80%,最低检测限为 10 CFU/mL。

免疫磁分离(immuno-magnetic separation, IMS)技术是通过表面固定抗体或抗原的超顺磁性复合材料,在抗体与抗原发生特异性的结合后,在磁场中实现对目标物分离的过程。Tejada 等^[52]利用 IMS 技术检测鸡肉制品中的 *C. jejuni*,使用微粒磁性连接抗 *C. jejuni* 的多克隆抗体来富集 *C. jejuni*;将该方案与传统方法进行了比较,当使用该法时, *C. jejuni* 检出率高达 7%,而使用传统方法时仅有 3%。在此基础上,Wenbap 等^[53]报道了一种用于同时检测并区分 *C. jejuni* 和 *E. coli* 的 IMS 多重降落 PCR (IMS-multiplex TD-PCR)方法;将抗 MEA 的多克隆抗体与磁性纳米颗粒(ferromagnetic nanoparticles, FMNs)偶联以产生抗 MEA FMNs;该法结合了 IMS 技术与分子生物学技术,无需富集步骤,在鸡胸肉样品中的检测限为 10^4 CFU/g, *C. jejuni* 和 *E. coli* 的特异性均为 100%,可在 4 h 内获得结果。除此之外,Fabiani 等^[54]开发了一种酶联免疫磁珠电化学(enzyme-linked-immuno-magnetic-electrochemical, ELIME)测定法,为了同时检测 *C. jejuni* 和 *C. coli*,使用 ELISA 筛选了 4 种抗弯曲菌抗体;抗体对由山羊抗弯曲菌多克隆抗体(包被在磁珠表面)和与碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)缀合的相同抗体(标记捕获的细胞)组成,对 *C. jejuni* 和 *C. coli* 都具有极低的检测限(*C. jejuni*: 9×10^3 CFU/mL; *C. coli*: 2×10^4 CFU/mL)。

近年来,新兴物理技术不断涌现,逐渐应用在食品检测中。Masdor 等^[55]设计了一种基于表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)的减法抑制测定法(subtractive inhibition assay, SIA),用于快速检测 *C. jejuni*;首先将对

C. jejuni 具有特异性的兔多克隆抗体与 *C. jejuni* 细胞混合, 随后使用连续离心过程分离未结合的抗体, 然后使用 SPR 传感器芯片上的固定化山羊抗兔 IgG 多克隆抗体进行检测; 该方法对 *C. jejuni* 显示出极好的灵敏度, 检测限为 (131 ± 4) CFU/mL。该方法对 *C. jejuni* 具有良好的特异性, 对其他细菌病原体具有低交叉反应率, 例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*) (交叉反应率为 7.8%)、*L. monocytogenes* (3.88%) 和 *E. coli* (1.56%) 等。Poonlapdech 等^[56]开发一种基于纳米颗粒的细胞捕获系统, 结合横向流测试条(lateral flow immunoassay, LFIA)测定法, 用于快速检测家禽样品中的 *C. jejuni*; 合成的 FMNs 用戊二醛修饰, 再用多克隆抗体功能化, 用于从家禽样品中捕获和浓缩 *C. jejuni*; 该测定需要大约 3 h。

综上所述, 多克隆抗体在食源性致病菌检测中的应用较为广泛, 然而, 其本身具有的局限性因素在一定程度上难以克服, 例如, 需要通过免疫动物获得, 随着抗体用量的增加, 所需要的免疫动物将更多, 成本无法控制, 且多克隆抗体的特异性较弱, 在食源性致病菌的检测中多与其他方法联用, 才可取得较好效果。

2.2 单克隆抗体在食源性致病菌检测中的应用

基于多克隆抗体本身的局限性, 研究者将目光放在了具有高特异性优势的单克隆抗体上, 期待单克隆抗体可以在食源性致病菌检测中发挥理想效果。Perruzza 等^[57]分离出 2 种人源单克隆抗体(CAA1 和 CCG4), 产生的口服重组分泌性免疫球蛋白 A, 具有捕获弯曲菌活性鞭毛成帽蛋白 FliD 的效果, 具备成为弯曲菌检测靶点的潜力。Castillo 等^[58]开发了针对产志贺毒素 *E. coli* (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) 相关溶血性尿毒症综合征血清群的脂

多糖中 O-多糖部分的高度特异性单克隆抗体, 对临床诊断和食品质量控制应用具有重要价值。

正因为单克隆抗体所具有的高特异性, 研究者更青睐将其与其他食源性致病菌检测方法的联用, 以达成理想检测效果。Wang 等^[59]通过将小鼠抗 *C. jejuni* 单克隆抗体固定在传感器表面上以特异性捕获 *C. jejuni*, 制备流动细胞中的石英晶体微量天平(quartz crystal microbalance, QCM)传感器, 用 QCM 分析仪测量共振频率, 并将共振频率的变化与 *C. jejuni* 的细胞数量相关联; 检测限为 20–30 CFU/mL, 无需预先富集, 总检测时间小于 30 min。Bu 等^[60]建立了用于食源性病原体的 LFIA 生物传感器, 用结晶紫标记目标菌, 优于 LFIA 检测中的传统信号标记技术; 且该方法由高特异性单克隆抗体保证其筛选能力; 以肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)为模型靶标, 可在 11 min 内选择性检测 80 CFU/mL 的 *S. enteritidis*; 此外, 可以将 *L. monocytogenes* 作为另一个模型靶标, 该生物传感器对革兰氏阴/阳性菌的检测具有很高的通用性。Shi 等^[61]提出了一种基于表面增强拉曼散射(surface enhancement of Raman scattering, SERS)的 LFIA 快速检测生物传感器, 用于生物样品中 *E. coli* O157:H7 的灵敏定量分析; 利用金壳-硅核(SiO_2/Au)纳米球为基于 SERS 的 LFIA 系统制备了高性能标签, 用 2 层拉曼信号分子和单克隆抗体修饰的 SiO_2/Au SERS 标签可以有效地与 *E. coli* O157:H7 结合, 并在测试线上形成三明治免疫复合体; 通过检测试验体系的拉曼强度, 可以容易地定量检测 *E. coli* O157:H7, 检测限为 50 Cells/mL。与之类似, Tu 等^[62]设计了一种基于 SERS 的 LFIA 技术, 使用小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)修饰的 Au@MNP-WGA 纳米标签, 对食品和环境样品中的食源性细菌进行高灵敏度检测, 并将单克隆抗

体分别固定在不同 LFIA 条带的测试线上,可以实现对 3 种常见食源性细菌,即 *L. monocytogenes*、*C. jejuni* 和 *S. aureus* 的高灵敏度测定,检测限为 10 Cells/mL,检测时间小于 35 min,重现性高。一般来说,检测结果直观性强的检测平台更受检测人员青睐。胶体金免疫层析试纸条技术(colloidal gold immunochromatographic strip test, CGICST)是一种结合了胶体金标记技术、免疫检测技术、层析分析技术和抗体技术等多种技术的一种固相标记检测技术,利用胶体金标记抗原/抗体作为示踪剂,硝酸纤维素膜作为反应的载体,依据微孔膜的毛细管层析原理,含有游离胶体金颗粒的待测液体,于检测线处通过抗原抗体特异性结合,在硝酸纤维素膜捕获区域上聚集显色,具有可视化、反应时间短且准确度高的优势^[63]。Zeng 等^[64]开发了一种基于 CGICST 快速检测小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*) O:8 的方法,用胶体金标记的 mAb 和固定在测试线上的 mAb 分别用作捕获抗体和检测抗体,CGICST 对 *Y. enterocolitica* O:8 CICC 21669、CICC 21681 和 CICC 21567 的检测限分别为 1.3×10^3 、 3.0×10^2 和 8.0×10^2 CFU/mL,并且该法对其他食源性致病菌没有交叉反应。Alamer 等^[65]也开发了一种能够可视化检测不同的食源性致病菌的平台,其用固定了乳铁蛋白的棉球收集各种食源性致病菌,并与缀合了不同颜色纳米珠的抗体接触,来检测特定细菌的存在;靶细胞被捕获在乳铁蛋白和特异性单克隆抗体缀合的纳米珠之间,导致一定的颜色变化;使用 *S. typhimurium*、*S. enteritidis*、*S. aureus* 和 *C. jejuni* 均证明有效;棉球表面的颜色强度随着致病菌浓度的增加而增加,鸡肉表面的 *S. typhimurium* 和 *C. jejuni* 的检测限低至 10 CFU/mL, *S. enteritidis* 的检测限为 100 CFU/mL, *S. aureus* 的检测限则低至

100 CFU/mL。以上案例均证明,单克隆抗体在目前各种先进的食源性致病菌检测手段中,已成为其检测准确性与精确度的保障。

在传统免疫法中利用单克隆抗体检测食源性致病菌十分常见,孟闯等^[66]制备了能特异性识别不同血清型 *Salmonella* 的 PhoN 蛋白 MAb,并基于该 MAb 制备了 *Salmonella* 免疫富集磁珠,对 *S. typhimurium* 等 5 种不同血清型 *Salmonella* 的捕获率达 70%以上,对非 *Salmonella* 捕获率低于 7%。Zhang 等^[67]以 *Salmonella* 为抗原制备单克隆抗体,通过 3 次亚克隆制备 mAb;将具有高亲和力的 mAb 1B12 涂覆在 IMBs 表面以捕获 *Salmonella*;使用针对 *Salmonella* 的保守 *invA* 基因的特殊引物将富集产物(IMBs-*Salmonella*)用于环介导等温扩增。检测时间从 3 d 缩短到 50 min。Luciani 等^[68]开发了一种基于单克隆抗体的快速检测 *Y. enterocolitica* O:8 的新方法,表征和筛选了 9 种单克隆抗体,筛选出 2 种针对 *C. jejuni* 具有弱交叉反应的单克隆抗体,同时筛选出 MAb 54B11,建立捕获 ELISA 法用于在食品基质(肉类和乳制品)中检测 *Y. enterocolitica*,将该方法与检测 *Y. enterocolitica* 的官方方法(ISO 10273:2003)^[69]进行了比较,相对准确度、敏感性和特异性均达到 100%,并对其他食品样品的选择性进行了评估,显示出 90.3%的置信下限和 100%的置信上限。而 Schnee 等^[70]基于单克隆抗体设计的夹心酶免疫测定法(enzymeimmunoassay, EIAs),也可用于检测 *C. jejuni* 或 *C. coli* 的粪便抗原。

纳米材料因其优越的光学、化学或电磁学特性被大量应用,成为了一种快速、简单、低成本的食源性致病菌检测工具,为其发展提供了新的方向。Chen 等^[71]将葡萄球菌肠毒素 A(*Staphylococcus enterotoxin A*, SEA)蛋白注射到 BALB/c 小鼠体内,制备了抗 SEA 单克隆抗

体(anti-SEAmAb),并以高发光量子点荧光微球(quantum dot beads, QB)为信号扩增探针,建立了一种新的免疫色谱法(immunochromatographic assay, ICA),可快速灵敏地测定巴氏灭菌乳中的SEA,所提出的QB-ICA对牛奶样品中的SEA测定表现出高灵敏度,检测限为1.89 ng/mL,对常见类似物(包括SEB、SEC、SED和SEE)几乎没有交叉反应。Bu等^[72]设计了一种无标记免疫测定法,通过引入由不同正电荷功能化的AuNPs来检测致病菌;通过静电相互作用负载在带负电的细菌上,从而对目标细菌进行彩色标记,故固定在测试线上的单克隆抗体可以特异性捕获AuNPs细菌复合物;在最佳条件下,对*S. enteritidis*的检测限为 10^3 CFU/mL,可很好地应用于饮用水、生菜和猪肉样品检测。此外,该法具有普遍的适用性,也可用于检测*E. coli* O157,解决了抗体标记繁琐和敏感性差的问题。Ha等^[73]合成氮掺杂的碳量子点(N-carbon nanodots, N-CNDs),并将其以10 mg/mL的浓度添加到富集培养基中。使用波长为425 nm的发光二极管照射N-CNDs补充的富集培养基。并使用杂交瘤细胞开发了对*C. jejuni* NCTC11168特异性的单克隆抗体以帮助检测;补充N-CNDs的富集培养基显示出比传统的Bolton肉汤更好的检测能力与更短的检测时间。Poonlapdech等^[74]开发了基于抗体偶联荧光染料掺杂二氧化硅纳米颗粒的快速检测鸡肉样品中*C. jejuni*的方法,检测时间仅需30 min,该测定的检测限为 10^3 CFU/mL;*C. jejuni*的包容性试验为100%阳性,与32株非弯曲菌菌株没有交叉反应。免疫标记技术是将抗原抗体反应与标记技术相结合,在已知的抗体或抗原标记上示踪物质,可极大程度地提高检测抗原抗体反应的灵敏度,并且可结合电镜技术,观察抗原、抗体及二者混合物的分布,20世纪40年代,已有通过标

记抗体实现对相应抗原的检测的研究^[75]。Jin等^[76]将游离生物素捕获单克隆抗体和生物素检测单克隆抗体特异性结合到牛奶样品中*Salmonella*的不同靶标上,然后将链霉亲和素包被的超小型氧化铁纳米粒子探针与抗体偶联以捕获*Salmonella*,该方法对*Salmonella*具有较高的特异性和抗干扰性,在150 min内,纯培养物和真实样品的检测限为 2.3×10^3 CFU/mL。Bonaiuto等^[77]同样进行了偶联天然抗体和生物素化抗体的研究,表面活性磁纳米颗粒(surface active maghemite nanoparticles, SAMNs)是一种构建免疫磁性纳米载体的通用平台,用异硫氰酸罗丹明B(rhodamine B isothiocyanate, RITC)对纳米颗粒进行功能化,可得到荧光纳米缀合物,并用于结合抗胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)单克隆抗体(SAMN@RITC@Anti-Cf);PCR验证结果显示,当存在另外2种弯曲杆菌(*C. jejuni*和*C. coli*)的情况下,可实现选择性捕获;另外,用抗生物素蛋白修饰SAMNs,形成生物素特异性磁性纳米载体,并用于固定生物素化的抗*L. monocytogenes*多克隆抗体(SAMN@avidin@Anti-Lm);将这种免疫磁性载体集成在QCM传感器中,用于检测牛奶中的*L. monocytogenes*,检测限低至15 Cells/mL。单克隆抗体技术与IMS技术结合也有着良好的检测性能,Zhang等^[78]研究了针对*L. monocytogenes*表面蛋白产生的mAbs,以观察其通过IMS从样品中分离*L. monocytogenes*的能力;其中,mAb M3686显示出独特的特异性,能够捕获7种血清型的*L. monocytogenes* (1/2a、1/2b、1/2c、3a、4a、4b和4d),可以进一步探索适用于从食品和环境样品中常规分离*L. monocytogenes*的IMS方法。

单克隆抗体是目前食品检测、医药开发等领域中应用广泛的抗体技术。然而,其制备工

艺与成本仍然制约其发展,研究者需要考虑进一步优化单克隆抗体制备工艺,例如提升杂交瘤细胞系的稳定性与使用寿命。更重要的是,在食源性致病菌复杂的检测环境中,能够稳定保存、结构简单且易于改造的抗体更契合未来技术发展方向。

2.3 基因工程抗体在食源性致病菌检测中的应用

抗体技术推动了食源性致病菌快速检测的发展,由于多克隆抗体和单克隆抗体的局限性,促使研究者深入探索基因工程抗体(图 2)。基因工程抗体对食源性致病菌的高度敏感性、特异性,在恶劣条件下的稳定性、灵活性、可改造性、低成本等的优势,使其在检测方面具有潜力。

基因工程抗体的生产成本一般较低,且具有高度的重复性;此外,还可以根据使用场景进一步设计;然而,基因工程抗体来源不同,并不总是通过动物免疫获得。Nzuma 等^[79]报道了对 *C. jejuni* 细胞特异性重组 scFv 抗体的产生和表征,以及对一种 scFv 抗体联用 IMS 定量 PCR (IMS-qPCR)方法的评估,该方法可快速、灵敏和特异性检测低数量的 *C. jejuni*, IMS-qPCR 方法能够在 3 h 内检测混合培养物中的 *C. jejuni*。噬菌体展示技术是目前最广泛使用的体外产生抗体的方法之一,其具有易于操作,灵活性高的优势,且不需要动物免疫;此外,从噬菌体展示抗体库中进行筛选可以在几周内完成,这相比单克隆抗体利用杂交瘤细胞生产具有较大优势^[80]。Moreira 等^[81]报道了结合 3 种噬菌体展示技术的方法,用于发现和表征一种新型抗 *Listeria* 重组抗体,该抗体能够针对选择性细菌生物标志物—丙酮酸脱氢酶复合物-酶 2 (pyruvate dehydrogenase complex enzyme 2, PDCE2);该团队使用了 2 个未经选择的人源抗体库,用于分离针对 *Listeria* 蛋白部分的 scFv

片段,并转化为 scFv-Fc 形式;通过 ELISA 评估了重组抗体与 *Listeria* 的相互作用;应用 ORFeome 噬菌体展示技术以及 IMS-质谱技术用于目标识别,证实 PDCE2 可作为 *Listeria* 检测的新靶标。

纳米抗体相比于传统的多/单克隆抗体,具有极简的结构,只含一条重链,这大大降低了抗体在食源性致病菌检测过程中,由于其结构复杂可能出现的干扰。例如传统 Igs 和 *S. aureus* 的 Ig 结合表面蛋白之间的相互作用阻碍了对其进行免疫法检测。Hu 等^[82]用灭活的 *S. aureus* 菌株免疫羊驼,然后构建 Nb 文库,从中检索到 4 个靶特异性 Nb;随后,建立了使用 Nb 捕获和检测 *S. aureus* 的夹心 ELISA,其检测限为 1.4×10^5 CFU/mL;经过 8 h 富集步骤后,可检测出牛奶样品中 10 CFU/mL 的 *S. aureus*。He 等^[83]首次报道分离出针对 *S. enteritidis* 的纳米抗体;这些纳米抗体显示出良好的热稳定性和特异性,并用其建立了夹心 ELISA,其检测限为 1.4×10^5 CFU/mL;该方法也用于检测牛奶样品中的 *S. enteritidis*,富集 10 h 后可检测牛奶中的 *S. enteritidis*,检测限为 6 CFU/mL。葡萄球菌蛋白 A (staphylococcal protein A, SpA)可能与传统抗体的可结晶片段(fragment crystallizable, Fc)末端结合,并导致假阳性,限制了免疫法的实际应用。因此, Ji 等^[84]开发了通过用缺乏 Fc 末端的纳米抗体代替传统抗体的 ELISA 法,在最佳条件下,目前的免疫测定具有从 1–512 ng/mL 的宽定量范围和 0.3 ng/mL 的检测限;加标牛奶、奶粉、奶酪和牛肉的回收率在 87.66%–114.2%之间;在检测 SEB 过程中, Nbs-ELISA 不受 SpA 的影响。

由于纳米抗体具有可耐高温、酸碱等极端条件等优点,在食源性致病菌的检测中,在保留了单克隆抗体所具有的高特异性优势外,又保证了优异的稳定性。Sun 等^[85]使用纳米抗体-

碱性磷酸酶(nanobody-alkaline phosphatase, Nb-ALP)融合蛋白开发了一种用于检测 SEB 的夹心化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)方法,SEB 结合的纳米体来自一个未经选择的噬菌体展示库,而 Nb-ALP 融合蛋白则通过构建获得,被证明具有热稳定性,并且在 CLIA 中可能是一种用于检测抗体的物质;基于抗 SEB 单克隆抗体和融合蛋白 Nb37-ALP,夹心化学发光免疫分析的工作范围为 3.12–50.0 ng/mL,半饱和信号浓度(50% of maximal signals, SC50)为(8.59±0.37) ng/mL,检测限为 1.44 ng/mL。Liu 等^[86]以白斑角鲨源纳米抗体,即鲨源新抗原受体可变区(variable domain of immunoglobulin new antigen receptor, VNAR)为框架构建了噬菌体合成文库,获得特异性识别 SEB、蓖麻毒素和肉毒杆菌毒素的 VNAR,检测限分别低至 10 ng/mL、40 ng/mL 与 1 µg/mL,同样证明了纳米抗体在食源性致病菌检测中的优异能力。

纳米抗体为疾病诊断提供了替代传统多/单克隆抗体的有效方法。本课题组^[87]开发了一种新型的基于五聚纳米体的免疫测定法(pentameric nanobodies-based immunoassay, PNIA),对癌胚抗原相关细胞黏附分子 5(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CEACAM-5)的检测具有增强的灵敏度和特异性。为了增强 CEACAM-5 在免疫测定中的捕获和检测效力,设计了双特异性纳米抗体(bispecific nanobodies, Nb1-Nb2-rFc)作为捕获抗体,并采用了异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)标记的五聚体纳米抗体(FITC-labeled pentameric nanobodies, Nb3-VT1B)作为检测抗体。Nb1-Nb2-rFc 和 Nb3-VT1B 的结合亲和力显著高于未修饰的纳米抗体,该 PNIA 对 CEACAM-5 抗原的检测显示出优越的

敏感性和高特异性。这种双特异性或多价纳米抗体设计将为未来免疫测定的设计提供新思路。

研究者将纳米抗体应用在食源性致病菌治疗中的同时,也考虑其在检测中的应用。Yu 等^[88]研究发现了 *V. parahaemolyticus* 外膜蛋白 OmpU 在细菌致病机制中的关键作用;使用 sdAb 噬菌体展示库筛选与 *V. parahaemolyticus* OmpU 结合的候选 sdAb,分离出几个阳性噬菌体克隆;其中一个阳性克隆 UAb28 是一种具有高富集和高亲和力的针对 *V. parahaemolyticus* OmpU 的 sdAb;通过分子对接,推测 UAb28 的 CDR 区可以执行 OmpU 结合功能;通过结合和抑制实验验证了 UAb28 具有识别 OmpU 的能力;UAb28 可能在未来的研究中有助于开发基于 sdAb 的免疫治疗药物,以对抗 *V. parahaemolyticus* 感染,下一步将用于海鲜产品的分析检测。

纳米抗体由于其分子量较小、结构极简,目前在固体载体上的物理吸附能力较差,因此在制备食源性致病菌检测平台时,面临着一定限制。本课题组^[89]从合成库中发现了与聚苯乙烯结合的纳米抗体;并且,二价纳米抗体 B2 对聚苯乙烯具有较高的亲和力,并对 pH 存在依赖;将 B2 与抗癌胚胎抗体 11C12 融合,构建了一种双特异性纳米抗体;值得注意的是,尽管该蛋白表达水平较低,但无需进行蛋白纯化;此外,该融合结构在化学发光酶联免疫法中表现出了极好的线性度,工艺处理时间从 2.5 h 缩短到 1 h,在食源性致病菌检测平台的构建中潜力十足。

然而,部分基因工程抗体在敏感性方面仍无法与单克隆抗体竞争,故在食品分析检测领域没有得到广泛关注。单克隆抗体和多克隆抗体的发展已经领先基因工程抗体 40 年之久。并且, Fab 与 ScFv 等小分子基因工程抗体,亲和

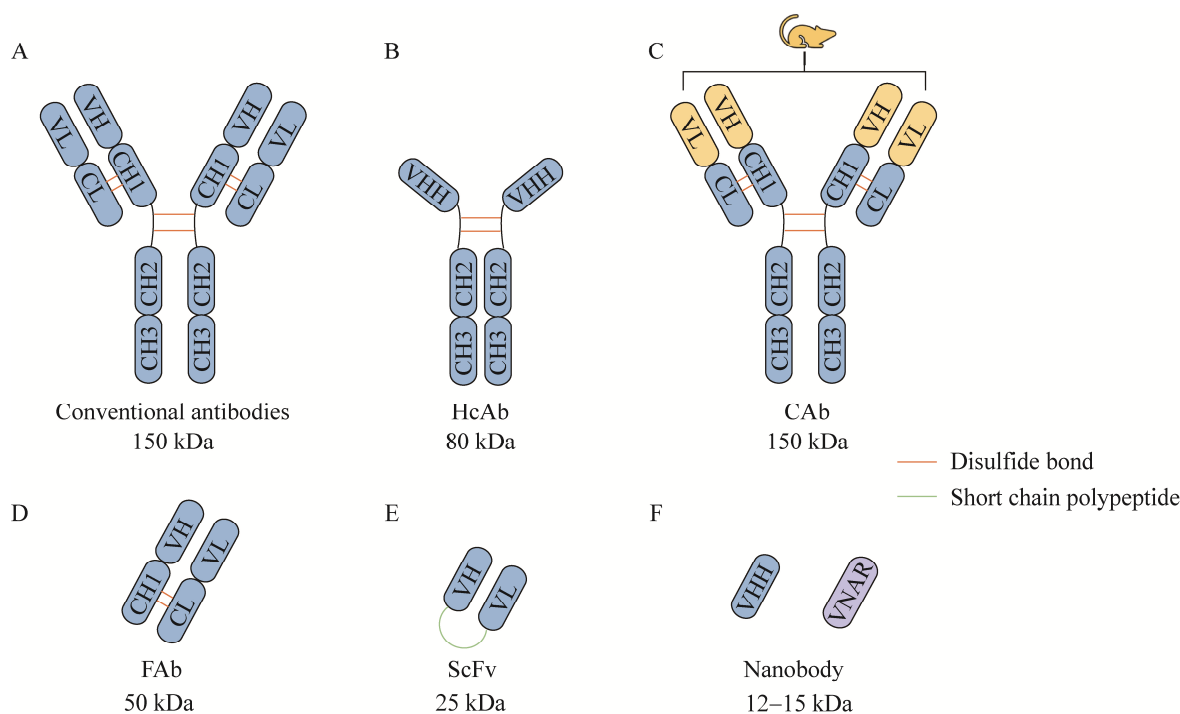


图2 传统抗体与不同基因工程抗体结构的差异 A: 传统抗体. B: 重链抗体. C: 嵌合抗体. D: 抗原结合片段. E: 单链抗体. F: 纳米抗体

Figure 2 Differences in structure between traditional antibodies and different genetically engineered antibodies. A: Conventional antibodies. B: HcAb. C: CAb. D: Fab. E: ScFv. F: Nanobody.

力与稳定性并不尽如人意^[90-91]。因此,高亲和力、高稳定性的纳米抗体受到研究者广泛关注。

目前,由于骆驼科动物的饲养难度与成本较鲨鱼均更低,所以纳米抗体多为驼源。鲨源纳米抗体即VNAR是迄今为止在脊椎动物中发现的尺寸最小的抗原结合域,对其研究甚为冷门。然而,关于VNAR的研究多关注其特异性、亲和力和稳定性等,预示其在食品检测和疾病治疗领域中具有潜力。

3 结论与展望

抗体作为食源性致病菌关键特异性识别元件,对于基础研究、诊断和治疗应用必不可缺。MarketandMarkets™发布的报告指出,预计到2026年,全球抗体市场将从2021年的3.93亿

美元达到6.52亿美元,复合年增长率为10.6%^[92],抗体市场已然成为高新技术产业中不可忽视的一大领域。然而,抗体技术发展目前仍受到一定制约,这归因于以下几点原因:(1)抗体与医药发展息息相关,有严格的法律、研发与临床验证规程;(2)我国抗体研发与市场化的进程受制于国外,基础研究相对薄弱,缺乏理论与技术的突破;(3)多克隆抗体与单克隆抗体对免疫动物依赖性强,伦理问题限制重重,摆脱免疫动物依赖的体外免疫基因工程抗体正在起步发展中;(4)基因工程抗体目前的技术和基础研究部分还停留在实验室规模,扩大发展仍需一段时间,且定制基因工程抗体成本极高,研究与生产机构难以承担。

目前,抗体技术的发展已到达一个新的高

度, 基因工程抗体替代传统的多/单克隆抗体已成为趋势。但同时, 基因工程抗体的重复性问题仍备受重视, 研发者与生产者应对抗体进行多项表征, 如利用免疫印迹、免疫荧光法以及流式细胞术等保证批次质量, 避免时间、金钱和人力资源的浪费; 其次, 建立驼/鲨源免疫、噬菌体展示文库构建、固相亲和淘选、高通量融合表达和配对以及规模化制备工艺等关键技术, 以克服结构修饰对抗体的影响和抗体配对筛选困难等局限性; 另外, 应加大对抗体技术人才培养的投入, 吸收多学科背景交叉的专业人才, 从研发到生产环节, 构建系统完备、传承性强的技术团队, 积极跟进前沿突破性研究, 快速推进新型抗体开发进程; 最后, 鼓励实施布局全方位专利保护, 形成核心技术体系, 降低抗体产品定价, 缓解研发机构经费压力, 逐步推进我国在抗体市场的话语权。

不可否认的是, 多克隆抗体与单克隆抗体仍然是抗体技术在食源性致病菌的检测中的主流工具, 基因工程抗体作为新一代生物检测传感器关键选择性识别元件潜力十足, 特别是纳米抗体, 虽然国内对其研究起步较晚, 但本课题组在对其进行大量的研究基础上, 认为其具有灵活的修饰改造空间, 可以根据具体使用需要, 进行定向筛选、进化以及改造。相比于抗体在疫苗、医药方向的研究投入, 研究者对其在食品检测方面的关注较少。目前, 食源性致病菌的检测摒弃了单一模式, 逐渐向集成化、平台化的趋势发展, 能够同时具备高特异性、高稳定性、可灵活改造、成本低等优势纳米抗体将逐渐崭露头角。虽然目前涌现出众多可以替代抗体作为识别元件的新型技术, 但是出于成本、仪器依赖性、人员操作难度以及产业化进度方面的考虑, 可以预见的是, 在未来很

长一段时间里, 抗体技术仍将作为食源性致病菌的高效检测工具发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] 中国营养学会. 中国居民膳食指南: 2016[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
Dietary guide for China residents: 2016[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016 (in Chinese).
- [2] ZHONG ZZ, ZHONG ZY. Characterization of Bacteriophage Insensitive *Escherichia coli* Mutants and Their Subsequent Fitness Changes Using Genomic and Phenotypic Methods[D]. Montreal: McGill University, 2021.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2022 年我国卫生健康事业发展统计公报[EB/OL]. [2024.04.28]. <http://www.nhc.gov.cn/guihuaxxs/s3585u/202309/6707c48f2a2b420fbfb739c393fcc92.shtml>
- [4] World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases[R]. World Health Organization, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/zh/>
- [5] 李艳飞, 谭云鹤, 蓝剑. 2017—2021 年柳州市食源性疾病监测结果分析[J]. 右江医学, 2024, 52(3): 249-255.
LI YF, TAN YH, LAN J. Analysis on surveillance results of food-borne diseases in Liuzhou City from 2017 to 2021[J]. Chinese Youjiang Medical Journal, 2024, 52(3): 249-255 (in Chinese).
- [6] 杨艳丽, 梁小勇, 韩宗辉. 2017—2021 年西安市食源性疾病监测结果的流行特征分析[J]. 食品安全导刊, 2023, (33): 46-8.
YANG YL, LIANG XY, HAN ZH. Epidemiological Analysis of Food-Borne Disease Surveillance Results in Xi'an from 2017 to 2021[J]. China Food Safety Magazine, 2023, (33): 46-48 (in Chinese).
- [7] 张冠, 陈晓珑. 2019—2022 年洛阳市食源性疾病监测结果分析[J]. 应用预防医学, 2024, 30(2): 118-122.
ZHANG G, CHEN XL. Analysis of monitoring results of food-borne diseases in Luoyang from 2019 to 2022[J]. Applied Preventive Medicine, 2024, 30(2): 118-122 (in Chinese).
- [8] 李功, 仲宇, 刘静. 2019—2022 年青岛市城阳区食源性疾病监测结果分析[J]. 中国初级卫生保健, 2023, 37(8): 78-81, 85.

- LI G, ZHONG Y, LIU J. Analysis of surveillance results of foodborne diseases in Chengyang district of Qingdao from 2019 to 2022[J]. Chinese Primary Health Care, 2023, 37(8): 78-81, 85 (in Chinese).
- [9] ZENG DX, CHEN Z, JIANG Y, XUE F, LI BG. Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1833.
- [10] 周炳武, 于泽, 闫兆伦, 刘雨涵, 侯嘉欣, 刘晓倩, 谢婧宜, 刘晔. 食品中肠出血性大肠杆菌 O157 : H7 的检测技术研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(1): 303-313.
- ZHOU BW, YU Z, YAN ZL, LIU YH, HOU JX, LIU XQ, XIE JY, LIU Y. Research progress in detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in food[J]. China Food Additives, 2024, 35(1): 303-313 (in Chinese).
- [11] CHEN J, PARK B. Effect of immunomagnetic bead size on recovery of foodborne pathogenic bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 267: 1-8.
- [12] ZHENG SM, YANG Q, YANG HY, ZHANG YZ, GUO W, ZHANG W. An ultrasensitive and specific ratiometric electrochemical biosensor based on SRCA-CRISPR/Cas12a system for detection of *Salmonella* in food[J]. Food Control, 2023, 146: 109528.
- [13] SINGH M, AGRAWAL RK, SINGH BR, MENDIRATTA SK, KUMAR D, KUMAR B. Development and evaluation of sandwich ELISA for detection and quantification of staphylococcal enterotoxin-a in food[J]. Journal of Food Safety, 2024, 44(2): e13114.
- [14] HUO BY, XIA L, HU YL, LI GK. Flexible microfluidic co-recognition coupled with magnetic enrichment and silent SERS sensing for simultaneous analysis of bacteria in food[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2024, 255: 116227.
- [15] 辛思培, 蒋蔚, 龙梦瑶, 李思, 王权, 孙卫东. 检测牛奶中肠出血性大肠杆菌 O157 : H7 的双抗夹心化学酶联免疫方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(4): 116-121.
- XIN SP, JIANG (W/Y), LONG MY, LI S, WANG Q, SUN WD. Development of a double-antibody sandwich chemiluminescence enzyme immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in milk[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 52(4): 116-121 (in Chinese).
- [16] SHI LH, WANG ZQ, LI YC, WANG JM, SHAN JR, ZHUO JC, YIN XC, SUN J, ZHANG DH, WANG JL. Dual-readout ultrasensitive lateral flow immunosensing of *Salmonella typhimurium* in dairy products by doping engineering-powered nanoheterostructure with enhanced photothermal performance[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(8): 4405-4414.
- [17] YAO YY, HOU L, WEI FH, LIN TR, ZHAO SL. An intelligent readable and capture-antibody-independent lateral flow immunoassay based on Cu_{2-x}Se nanocrystals for point-of-care detection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Analyst, 2024, 149(2): 357-365.
- [18] YADAV JP, MALIK SVS, DHAKA P, KUMAR M, SIRSANT B, GOURKHEDE D, BARBUDDHE SB, RAWOOL DB. Comparison of two new in-house Latex Agglutination Tests (LATs), based on the DnaK and Com1 synthetic peptides of *Coxiella burnetii*, with a commercial indirect-ELISA, for sero-screening of coxiellosis in bovines[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 170: 105859.
- [19] BALAGA KB, PAVON RDN, CALAYAG AMB, JUSTO CAC, ADAO DEV, RIVERA WL. Development of a closed-tube, calcein-based loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Salmonella* spp. in raw meat samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2024, 220: 106922.
- [20] PRIYA GB, AGRAWAL RK, MILTON AAP, MISHRA M, MENDIRATTA SK, SINGH BR, KUMAR D, GANDHAM RK, DUBAL ZB, RAJKHOWA S, LUKE A, PATIL G. Rapid and visual detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in carabeef meat harnessing loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2024, 55(2): 1723-1733.
- [21] JIANG H, WANG K, YAN MX, YE Q, LIN XJ, CHEN L, YE YR, ZHANG L, LIU JY, HUANG TY. Pathogenic and virulence factor detection on viable but non-culturable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12:

- 630053.
- [22] NDRAHA N, LIN HY, WANG CY, HSIAO HI, LIN HJ. Rapid detection methods for foodborne pathogens based on nucleic acid amplification: recent advances, remaining challenges, and possible opportunities[J]. Food Chemistry Molecular Sciences, 2023, 7: 100183.
- [23] ZHOU ND, CAI RF. Quantitative determination of *Staphylococcus aureus* using aptamer-based recognition and DNA amplification machinery[J]. Methods in Molecular Biology, 2023, 2681: 1-18.
- [24] 丁雄. 新型等温核酸扩增技术(IMS)的建立及其对传染病病原 EV71、CVA16、H7N9 和 HIV-1 的快速检测应用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2014.
- DING X. Establishment of a new isothermal nucleic acid amplification technique (IMS) and its application in rapid detection of infectious disease pathogens EV71, CVA16, H7N9 and HIV-1[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2014 (in Chinese).
- [25] LUO JW, XU DH, WANG JB, LIU H, LI Y, ZHANG Y, ZENG HJ, DENG B, LIU XF. A Dual-mode platform for the rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 based on CRISPR/Cas12a and RPA[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2024, 416(15): 3509-3518.
- [26] LIN LY, LUO QL, LI LJ, ZHENG YZ, WEI HG, LIAO JY, LIU YQ, LIU MQ, WANG ZH, LIN WL, ZOU XH, ZHU H, LIN M. Recombinase polymerase amplification combined with *Pyrococcus furiosus* Argonaute for fast *Salmonella* spp. testing in food safety[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 417: 110697.
- [27] FENG F, YUAN Y, FU Q, CAO FR, KONG RX, JI DD, LIU HY. An integrated self-heating recombinase polymerase amplification lateral flow strip biosensor for quantification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7[J]. Microchemical Journal, 2024, 199: 109979.
- [28] 孙晓红, 后来旺, 李达容, 赵勇, 黄新新, 何宇平, 蓝蔚青. 重组酶等温扩增技术在分析检测中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 265-270.
- SUN XH, HOU LW, LI DR, ZHAO Y, HUANG XX, HE YP, LAN WQ. Research progress on the application of isothermal recombinase amplification in analytical detection[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 265-270 (in Chinese).
- [29] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 李红娜, 李涛, 孙冬梅, 袁飞. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(09): 297-305.
- WANG S, YANG YG, WU ZW, LI HN, LI T, SUN DM, YUAN F. A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens[J]. Food Science, 2023, 44(9): 297-305 (in Chinese).
- [30] 王淑娟, 范一灵, 冯震, 蒋波, 宋明辉, 李琼琼, 刘浩, 秦峰, 杨美成. 多酶恒温核酸快速扩增法检测大肠杆菌 O157 : H7[J]. 上海预防医学, 2022, 34(6): 511-518.
- WANG SJ, FAN YL, FENG Z, JIANG B, SONG MH, LI QQ, LIU H, QIN F, YANG MC. Multi-enzyme isothermal rapid amplification assay for the detection of *Escherichia coli* O157 : H7[J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2022, 34(6): 511-518 (in Chinese).
- [31] 戴永进, 孙静, 张莫然, 刘玉娟, 陈洪周, 陆颖健. 反式切割 CRISPR/Cas 技术在食源致病微生物检测方面的原理及应用[J/OL]. 食品科学, 2024, DOI: <https://www.spkx.net.cn/CN/abstract/abstract58613.shtml>.
- DAI YJ, SUN J, ZHANG MR, LIU YJ, CHEN HZ, LU YJ. Principles and applications of trans-cleavage CRISPR/Cas technology for the detection of foodborne pathogenic microorganisms[J/OL]. Food Science, 2024, <https://www.spkx.net.cn/CN/abstract/abstract58613.shtml>.
- [32] GU XJ, TANG Q, KANG XX, JI HY, SHI XY, SHI LY, PAN AL, ZHU YD, JIANG WJ, ZHANG J, LIU JX, WU MM, WU L, QIN YL. A portable CRISPR-Cas12a triggered photothermal biosensor for sensitive and visual detection of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*[J]. Talanta, 2024, 271: 125678.
- [33] 王琦, 颜春蕾, 高洪伟, 吴薇, 杨庆利. 基于核酸适配体传感器检测食品致病菌的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 245-258.
- WANG Q, YAN CL, GAO HW, WU W, YANG QL. Research progress of DNA aptasensors for foodborne pathogen detection[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(11): 245-258 (in Chinese).
- [34] YANG YQ, WASIEWSKA LA, BURGESS CM,

- DUFFY G, LOVERA P, O'RIORDAN A. Detection of stx2 from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by a surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) sensor using recycled silicon chips[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 373: 132618.
- [35] 李宁. 基于量子点构建的荧光纳米生物传感器及其在生物传感中的应用[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2023.
- LI N. Fluorescent nano biosensor based on quantum dots and its application in biosensing[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2023 (in Chinese).
- [36] YE JM, GUO JQ, LI TR, TIAN JX, YU MX, WANG XC, MAJEED U, SONG W, XIAO JB, LUO YE, YUE TL. Phage-based technologies for highly sensitive luminescent detection of foodborne pathogens and microbial toxins: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(2): 1843-1867.
- [37] 王璇, 戚敏钰, 马荟琳, 姚一青, 陆斌, 曹岩. 基于噬菌体的食源性致病菌检测技术研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(10): 1645-1652.
- WANG X, QI MY, MA HL, YAO YQ, LU B, CAO Y. Advances in bacteriophage technology for foodborne pathogenic bacteria detection[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2023, 43(10): 1645-1652 (in Chinese).
- [38] 郭佳. 肾透明细胞癌定量蛋白质组学研究及 ANXA4 对肾透明细胞癌生物学功能的调控[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2021.
- GUO J. Quantitative protein omics study of renal clear cell carcinoma and regulation of ANXA4 on biological function of renal clear cell carcinoma[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2021 (in Chinese).
- [39] 李世佳. 利用 CRISPR 技术敲除兔细胞 HGPRT 基因[D]. 福州: 福州大学硕士学位论文, 2018.
- LI SJ. Knocking out HGPRT gene in rabbit cells by CRISPR technology[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fuzhou University, 2018 (in Chinese).
- [40] COLWILL K, PERSSON H, JARVIK NE, WYRZUCKI A, WOJCIK J, KOIDE A, KOSSIAKOFF AA, KOIDE S, SIDHU S, DYSON MR, PERSHAD K, PAVLOVIC JD, KARATT-VELLATT A, SCHOFIELD DJ, KAY BK, McCAFFERTY J, MERSMANN M, MEIER D, MERSMANN J, HELMSING S, et al. A roadmap to generate renewable protein binders to the human proteome[J]. *Nature Methods*, 2011, 8: 551-558.
- [41] KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256: 495-497.
- [42] BRADBURY A, PLÜCKTHUN A. Reproducibility: standardize antibodies used in research[J]. *Nature*, 2015, 518: 27-29.
- [43] 钟可馨. SARS-CoV-2 感染者血浆抗体保护性特征[D]. 广州: 广州医科大学硕士学位论文, 2023.
- ZHONG KX. Protective characteristics of plasma antibodies in SARS-CoV-2 infected patients[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangzhou Medical University, 2023 (in Chinese).
- [44] PELTOMAA R, BARDERAS R, BENITO-PEÑA E, MORENO-BONDI MC. Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(1): 193-217.
- [45] ZENG XQ, SHEN ZH, MERRAUGH R. Recombinant antibodies and their use in biosensors[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(10): 3027-3038.
- [46] HAMERSCASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, ROBINSON G, HAMMERS C, SONGA EB, BENDAHMAN N, HAMMERS R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363: 446-448.
- [47] WENBAP P, SEETANG-NUN Y, LUANGTONGKUM T, KHUNRAE P, TUITEMWONG P, RATTANAROJPONG T. Construction, expression and purification of a novel CadF-based multi-epitope antigen and its immunogenic polyclonal antibody specific to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 180: 105818.
- [48] WANG L, KE YH, LI Y, LI YX, YAN YF, SONG YJ, YANG RF, GAO B, HAN YP. Preparation of polyclonal antibody against a universal bacterial antigen OmpA deduced by bioinformatic analysis and preliminary evaluation of concentration effects on foodborne pathogens[J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e16353.
- [49] DEHGHANI Z, MOHAMMADNEJAD J, HOSSEINI

- M, BAKHSI B, REZAYAN AH. Whole cell FRET immunosensor based on graphene oxide and graphene dot for *Campylobacter jejuni* detection[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125690.
- [50] BAI XX, HU CY, WANG J, LI YW, XIN WW, KANG L, JIN ZY, WAN W, LI Y, YANG H, WANG JL, GAO S. A lanthanide-based high-sensitivity fluorescence method for the on-site rapid detection of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Food Protection, 2023, 86(1): 100005.
- [51] SUN RQ, CAO HW, FU YL, TAN Z, LIU N, LI HL, FENG ZH, CHI H, HUA DP, HUANG JH. Development of IMBs-qPCR method for detection of foodborne *Salmonella*[J]. International Food Research Journal, 2023, 30(4): 978-991.
- [52] TEJADA TS, CONCEIÇÃO RCS, TIMM CD. Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando separação imunomagnética[J]. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia, 2019, 71(5): 1565-1570.
- [53] WENBAP P, RATTANAROJPONG T, KHUNRAE P, LUANGTONGKUM T, ERICKSON LE, HANSEN RR, TUITEMWONG P. Biofunctionalized magnetic nanoparticles with multiplex touchdown PCR for simultaneous and rapid detection/identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Journal of Nanomaterials, 2022, 2022: 5104187.
- [54] FABIANI L, DELIBATO E, VOLPE G, PIERMARINI S, de MEDICI D, PALLESCHI G. Development of a sandwich ELIME assay exploiting different antibody combinations as sensing strategy for an early detection of *Campylobacter*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 290: 318-325.
- [55] MASDOR NA, ALTINTAS Z, SHUKOR MY, TOTHILL IE. Subtractive inhibition assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in chicken samples using surface plasmon resonance[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 13642.
- [56] POONLAPDECHA W, SEETANG-NUN Y, WONGLUMSOM W, TUITEMWONG K, ERICKSON LE, HANSEN RR, TUITEMWONG P. Antibody-conjugated ferromagnetic nanoparticles with lateral flow test strip assay for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 286: 6-14.
- [57] PERRUZZA L, JACONI S, LOMBARDO G, PINNA D, STRATI F, MORONE D, SEEHUSEN F, HU Y, BAJORIA S, XIONG J, KUMRU OS, JOSHI SB, VOLKIN DB, PIANTANIDA R, BENIGNI F, GRASSI F, CORTI D, PIZZUTO MS. Prophylactic activity of orally administered FliD-reactive monoclonal *SIgA* against *Campylobacter* infection[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1011.
- [58] CASTILLO DS, REY SERANTES DA, MELLI LJ, CIOCCHINI AE, UGALDE JE, COMERCI DJ, CASSOLA A. A recombinant O-polysaccharide-protein conjugate approach to develop highly specific monoclonal antibodies to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O145 serogroups[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0182452.
- [59] WANG H, WANG LJ, HU QQ, WANG RH, LI YB, KIDD M. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter jejuni* in poultry products using a nanoparticle-based piezoelectric immunosensor integrated with magnetic immunoseparation[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(8): 1321-1330.
- [60] BU T, HUANG Q, YAN LZ, ZHANG WT, DOU LN, HUANG LJ, YANG QF, ZHAO BX, YANG BW, LI T, WANG JL, ZHANG DH. Applicability of biological dye tracer in strip biosensor for ultrasensitive detection of pathogenic bacteria[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 816-821.
- [61] SHI LL, XU L, XIAO R, ZHOU ZH, WANG CW, WANG SQ, GU B. Rapid, quantitative, high-sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7 by gold-shell silica-core nanospheres-based surface-enhanced Raman scattering lateral flow immunoassay[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 596005.
- [62] TU ZJ, CHENG SY, DONG H, WANG WQ, YANG XS, GU B, WANG SQ, WANG CW. Universal and ultrasensitive detection of foodborne bacteria on a lateral flow assay strip by using wheat germ agglutinin-modified magnetic SERS nanotags[J]. RSC Advances, 2022, 12(42): 27344-27354.
- [63] 董旭旭, 孙威, 曹攀, 刘晓丹. 胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用研究现状[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3243-3254.

- DONG XX, SUN W, CAO P, LIU XD. Colloidal gold immunochromatographic test strip for virus detection: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(9): 3243-3254 (in Chinese).
- [64] ZENG L, XU XX, DING HL, SONG SS, XU LG, XU CL, KUANG H. A gold nanoparticle based colorimetric sensor for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 8 in food samples[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10(6): 909-914.
- [65] ALAMER S, EISSA S, CHINNAPPAN R, HERRON P, ZOUBOUB M. Rapid colorimetric lactoferrin-based sandwich immunoassay on cotton swabs for the detection of foodborne pathogenic bacteria[J]. Talanta, 2018, 185: 275-280.
- [66] 孟闯, 高杨, 刘钧, 徐双媛, 丁睿清, 康喜龙, 潘志明, 焦新安. 沙门菌 PhoN 蛋白单克隆抗体及其免疫磁珠的制备[J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(3): 287-294.
- MENG C, GAO Y, LIU J, XU SY, DING RQ, KANG XL, PAN ZM, JIAO XA. Preparation of monoclonal antibodies and its immunomagnetic beads against *Salmonella* PhoN protein[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2023, 45(3): 287-294 (in Chinese).
- [67] ZHANG L, DU X, CHEN C, HAN Q, CHEN Q, ZHANG M, XIA X, SONG Y, ZHANG J. Development of a rapid, one-step-visual method to detect *Salmonella* based on IC-LAMP method[J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2020, 21(1): 20-25.
- [68] LUCIANI M, SCHIRONE M, PORTANTI O, VISCIANO P, ARMILLOTTA G, TOFALO R, SUZZI G, SONSINI L, Di FEBBO T. Development of a rapid method for the detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 8 from food[J]. Food Microbiology, 2018, 73: 85-92.
- [69] International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs-----Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*: ISO 10273:2003[S]. <https://www.iso.org/standard/34564.html>.
- [70] SCHNEE AE, HAQUE R, TANIUCHI M, UDDIN MJ, JR PETRI WA. Evaluation of two new membrane-based and microtiter plate enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Campylobacter jejuni* in stools of Bangladeshi children[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(9): e00702-e00718.
- [71] CHEN P, ZHOU MJ, CHEN XR, XIONG SC, SU Y, ZHOU H, PENG J, XIONG YH. Quantum dot bead-based competitive immunochromatographic assay for enterotoxin aureus A detection in pasteurized milk[J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(6): 4938-4945.
- [72] BU T, JIA P, LIU JH, LIU YN, SUN XY, ZHANG M, TIAN YM, ZHANG DH, WANG JL, WANG L. Diversely positive-charged gold nanoparticles based biosensor: a label-free and sensitive tool for foodborne pathogen detection[J]. Food Chemistry: X, 2019, 3: 100052.
- [73] HA J, SEO Y, KIM Y, LEE J, LEE H, KIM S, CHOI Y, OH H, LEE Y, PARK E, KANG J, YOON Y. Synthesis of nitrogen-doped carbon nanodots to destroy bacteria competing with *Campylobacter jejuni* in enrichment medium, and development of a monoclonal antibody to detect *C. jejuni* after enrichment[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 339: 109014.
- [74] POONLAPDECHA W, SEETANG-NUN Y, TUITEMWONG K, TUITEMWONG P. Validation of a rapid visual screening of *Campylobacter jejuni* in chicken using antibody-conjugated fluorescent dye-doped silica nanoparticle reporters[J]. Journal of Nanomaterials, 2018, 2018: 4571345.
- [75] SCHNEIDER AFL, HACKENBERGER CPR. Fluorescent labelling in living cells[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 48: 61-68.
- [76] JIN L, LI T, YANG T, LIANG XH, WU B, ZOU DC, HU LW, HUANG GH, ZHANG JS. NMR rapid detection of *Salmonella* in milk based on ultra-small iron oxide nanobiosensor[J]. International Dairy Journal, 2020, 110: 104807.
- [77] BONAIUTO E, MAGRO M, FASOLATO L, NOVELLI E, SHAMS S, PICCIRILLO A, BAKHSHI B, MOGHADAM TT, BARATELLA D, VIANELLO F. Versatile nano-platform for tailored immuno-magnetic carriers[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(29): 7575-7589.
- [78] ZHANG CXY, DAN HH, van FAASSEN H, BROOKS BW, HUANG HS, LIN M. Targeting novel LPXTG

- surface proteins with monoclonal antibodies for immunomagnetic separation of *Listeria monocytogenes*[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2023, 20(5): 186-196.
- [79] NZUMA RM, LIU FQ, GRANT IR. Generation and characterization of a novel recombinant scFv antibody specific for *Campylobacter jejuni*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(11): 4873-4885.
- [80] PELTOMAA R, LÓPEZ-PEROLIO I, BENITO-PEÑA E, BARDERAS R, MORENO-BONDI MC. Application of bacteriophages in sensor development[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(7): 1805-1828.
- [81] MOREIRA GMSG, KÖLLNER SMS, HELMSING S, JÄNSCH L, MEIER A, GRONOW S, BOEDEKER C, DÜBEL S, MENDONÇA M, MOREIRA ÂN, CONCEIÇÃO FR, HUST M. Pyruvate dehydrogenase complex—enzyme 2, a new target for *Listeria* spp. detection identified using combined phage display technologies[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 15267.
- [82] HU YZ, SUN Y, GU JX, YANG FE, WU SH, ZHANG C, JI XM, LV H, MUYLDERMANS S, WANG S. Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting *Staphylococcus aureus* in milk[J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129481.
- [83] HE YX, REN YR, GUO B, YANG YF, JI YW, ZHANG DH, WANG JL, WANG YR, WANG H. Development of a specific nanobody and its application in rapid and selective determination of *Salmonella enteritidis* in milk[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125942.
- [84] JI YW, LI X, LU YL, GUO PL, ZHANG GW, WANG YR, ZHANG Y, ZHU WX, PAN JC, WANG JL. Nanobodies based on a sandwich immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B free from interference by protein A[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(21): 5959-5968.
- [85] SUN TQ, ZHAO ZQ, LIU WT, XU ZH, HE HW, NING BA, JIANG YQ, GAO ZX. Development of sandwich chemiluminescent immunoassay based on an anti-staphylococcal enterotoxin B Nanobody-Alkaline phosphatase fusion protein for detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1108: 28-36.
- [86] LIU JL, ANDERSON GP, GOLDMAN ER. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library[J]. BMC Biotechnology, 2007, 7: 78.
- [87] GU Y, GUO Y, DENG Y, SONG HP, NIAN R, LIU WS. Development of a highly sensitive immunoassay based on pentameric nanobodies for carcinoembryonic antigen detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1279: 341840.
- [88] YU JF, SUN Z, SUN XY, SUN XY, WEI HM, JIA WL, PANG MZ, ZHANG LM, DENG HK. Selection and characterization of a *Vibrio parahaemolyticus* OmpU antibody by phage display[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 143: 104136.
- [89] DENG Y, LIU JY, LU YP, FAN XY, YANG YS, XU YZ, QIN XS, NIAN R, LIU WS. Novel polystyrene-binding nanobody for enhancing immunoassays: insights into affinity, immobilization, and application potential[J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(4): 1597-1605.
- [90] NELSON AL. Antibody fragments: hope and hype[J]. mAbs, 2010, 2(1): 77-83.
- [91] MUYLDERMANS S. Nanobodies: natural single-domain antibodies[J]. Annual Review of Biochemistry, 2013, 82: 775-797.
- [92] MarketsandMarketsTM. Markets and Markets Custom Antibody Market worth \$652 million by 2026[EB/OL]. [2024.04.28]. <https://www.prnewswire.com/>

(本文责编 郝丽芳)