

毛细管-激光诱导荧光免疫分析在食品安全领域的应用与研究展望

洪晓明, 刘斌, 张世伟, 赖心田, 杨国武* (广东省深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518102)

摘要 毛细管-激光诱导荧光免疫分析以其分析时间短、前处理简单、检测灵敏度高优势, 一直以来都是研究的热点。综述了其在食品检测中的应用, 并对其潜在的应用领域和发展方向进行了展望。

关键词 毛细管; 激光诱导荧光; 免疫分析; 食品安全

中图分类号 S609.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03644-03

Progress and Prospect on Capillary Electrophoresis Immunoassay with Laser-Induced Fluorescence in Food Safety

HONG Xiao-ming et al (Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen, Guangdong 518102)

Abstract Capillary electrophoresis immunoassay with laser-induced fluorescence has been a research hotspot because of its advantage of short assay time, easy pretreatment and high detection sensitivity. The application in food detection was reviewed, and the potential application fields and development direction was forecasted.

Key words Capillary electrophoresis; Laser-induced fluorescence; Immunoassay; Food safety

随着社会、经济的发展及食品工业进入新阶段, 食品安全问题已引起全世界的广泛关注。食品安全关系到人类生存繁衍、国家安危以及社会的发展, 如何快速、准确地检测出食品中的有毒有害物质即食品安全检测已成为重中之重。免疫分析已被应用到食品安全检测的多个方面, 发挥着重要的作用。免疫分析是建立在抗原和相应抗体之间免疫结合反应的基础上, 利用抗体(或抗原)作为选择性试剂测定抗原、半抗原(或抗体)的方法。根据示踪物的标记方法不同, 传统的免疫分析方法包括放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析、发光免疫分析等, 但传统的免疫分析方法在技术上仍在一定局限性, 主要为操作繁琐、自动化程度低、测定周期长等。将免疫分析与自动化分离技术联用, 可弥补免疫分析技术上的一些局限性, 提高免疫分析的速度与自动化程度。20世纪80年代初发展的毛细管电泳是一种新型分离分析技术, 统指以高压电场为驱动力, 以毛细管为分离通道, 依据样品中各组分之间的迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术, 在分离机理上与液相色谱之间有互补性, 比液相色谱更适合生物样品的分析。近几年来, CE与免疫分析的联用越来越受到人们的关注, 这种联用技术的发展为毛细管电泳开拓了一个新的应用领域, 也为免疫分析注入了新的活力^[1-3]。毛细管电泳的分析对象十分广泛, 具有样品用量少、分析速度快和自动化程度高等优点^[4]。但毛细管检测的灵敏度一直是其弱点, 常规的紫外光度检测法不能满足检测的高灵敏度要求。激光诱导荧光检测法是迄今为止灵敏度最高的光学检测方法, 其对荧光物质的检测限可达到 1×10^{-21} mol数量级, 在适当的条件下甚至可以实现单分子检测^[5-6]。因此, 激光诱导荧光检测可以作为一种高灵敏度的柱上检测方法而与毛细管液相色谱、毛细管电泳等微分离模式连用, 实现微量物质的高效分离分析。笔者仅就毛细管-激光诱导荧光免疫技术及其在食品安全检测中

的应用进行综述。

1 毛细管-激光诱导荧光免疫分析

1.1 免疫毛细管 免疫毛细管电泳可以用于快速分离均相免疫反应混合液中游离和结合的抗原(或抗体)。与传统的免疫分析相比, 其具有以下优势: ①检测时间短, 前处理简单。免疫反应在均相溶液中进行, 无基质效应的干扰而影响反应速度。并且由于毛细管扩散路径缩短, 使得免疫反应孵化时间大大减少。如对于25 μ l毛细管, 从管中心到表面的扩散距离约是0.0125 cm, 而一般的免疫板, 这个距离为0.3500 cm, 由于时间与距离具有平方的关系, 所以后者的扩散时间大约是前者的784倍。其继承了免疫学检测前处理简单的优点, 待检测样品不需要复杂的预先纯化或提取处理, 可选取离线或在线的免疫检测方法, 直接进样进行分离检测。②样品用量少。毛细管电泳免疫分析一般只需要 1×10^{-9} L级的样品与 1×10^{-6} L级的缓冲溶液, 既减少了免疫分析试剂的消耗, 又适合于微量免疫分析。Shimura等的试验表明, 1 μ g的标记抗体可以用于数千次的分析测定^[7]。

1.2 激光诱导荧光检测 激光诱导荧光检测方法由于具有高灵敏度和易得到的随心所欲制备的荧光标记物, 至今仍然是毛细管免疫分析的常规检测器。表1收集了已报道的荧光标记物和激光诱导荧光检测器, 最常用的商品化激光诱导荧光检测器为Ar⁺激光器, 其激光波长为488 nm, 主要对应的荧光染料为荧光素, 激发波长(λ_{ex})=490 nm, 发射波长(λ_{em})=520 nm。Giovannoli等分别用FITC标记人血清白蛋白(HSA)单克隆抗体和多克隆抗体, 结合毛细管电泳激光诱导荧光法测定了人体尿样中HSA含量, 方法的检出下限分别为9.0和14.0 nmol/L^[8]。此外, 半导体激光器(或称激光二极管)以其价格低、体积小、寿命长、稳定可靠、有效地减少背景荧光等优势, 在激光诱导荧光分析方面, 得到了人们的广泛重视。Wang等利用半导体激光诱导荧光检测法定量测定了Cys标记的BSA, 激发波长为635 nm^[9]。与FITC标记的BSA测定方法相比, 检出限由原来的8.0 nmol/L提高到1.2 nmol/L。

作者简介 洪晓明(1985-), 男, 广东揭阳人, 助理工程师, 从事食品检测研究, E-mail: xiaominghong@126.com。* 通讯作者。

收稿日期 2013-03-14

表 1 常用激光器及标记物

激光器	激发波长		标记物	激光器	激发波长		标记物
	nm						
Ar ⁺	488	FITC ^[10] ,绿色荧光蛋白 ^[11] ,B-藻红蛋白 ^[12]		Blue DPSS	473	量子点 ^[13]	
HeCd	325	4-溴甲基-7-甲氧基香豆素 ^[14]		Green He-Ne	543.5	罗明丹 ^[15] ,4-甲基罗明丹 ^[16] ,TR/TC ^[17]	
LI-COR	787	NN382 ^[18]		He-Ne	635	Cy5 ^[19]	

1.3 毛细管-激光诱导荧光免疫分析模式 CEIA 按免疫机制可分为竞争性免疫和非竞争性免疫。竞争性免疫多用于小分子抗原、半抗原的免疫分析。对于这种模式,小分子抗原和与它绑定的大分子抗体复合物,电泳流动性差别显著,分离相对容易。但是竞争模式受抗原抗体亲和常数的影响,灵敏度较差,并且峰数比较多,抗体的交叉反应不容易直接从图谱上发现。非竞争模式依靠标记抗体(或抗原)与样品中的抗原(或抗体)的直接反应,只需要依据免疫结合物这一个峰进行定量,灵敏度较高,适合于大分子抗原的免疫分析。但至今非竞争模式依然处于检测模式的探索阶段,应用于实际样品检测的报道不多。其主要有 2 个原因:①抗原和免疫复合物的荷质比差别不大,给分离带来困难。②非竞争模式对抗体的均一性也有很高的要求。多克隆抗体蛋白比较复杂不适合标记。单克隆抗体蛋白单一,但在 Fc 片段上连有一定数目的唾液酸,唾液酸数目的变化是导致抗体不均一性的主要原因。因此抗体经酶解产生的 Fab 或 Fab' 片段比整个抗体更适合作为毛细管电泳免疫分析中的选择性试剂^[20]。随着基因工程抗体研究的不断深入,商品化的 Fab 片段抗体的出现为非竞争法提供了有效的试剂支持。

2 在食品分析中的应用

2.1 农兽药残留的检测 常用农兽药大多属于小分子化合物,采用标记半抗原竞争免疫法进行检测。Zhou 等于 2006 年首先将免疫毛细管电泳-激光诱导检测器联用技术用于食品中兽药残留的检测^[21]。其将克伦特罗分子和牛血清蛋白偶联后标记 FITC,和样品中的游离目标待测克伦特罗分子竞争结合抗体,分离时间仅需要 8 min。方法的检测限可达 0.7 ng/ml,接近 ELISA 水平。Zhang 等报道了动物源性食品中氯霉素和大米中西维因的检测方法^[22-23]。检测下限可分别达到 0.001 6 和 0.05 ng/ml,分别优于相同抗体、抗原构建的 ELISA 方法 20 倍和 14 倍。并且这些方法都不需要复杂的前处理。Liu 通过 FITC 标记建立了 3 min 内检测速灭威的竞争免疫毛细管电泳法,也取得了很好的重现性和灵敏度^[24]。这说明,免疫毛细管电泳-激光诱导检测器联用技术能方便地应用在单批样品量较少或灵敏度要求高的检测中。

2.2 蛋白的检测 蛋白一般分子量超过 10 kD,且结构较为复杂,检测模式也各有不同。Yang 采用竞争法检测疯牛病 prion 蛋白,将荧光素标记至 prion 蛋白上,竞争结合抗体,取得 80 ng/ml 的检测限^[25]。该研究选取了感染病毒的羊血液和正常的羊血液进行对比,证明了该方法高度特异,为监控疯牛病提供了有力的工具。荧光素标记抗体进行非竞争毛细管电泳检测报道较少,在临床检验中有少数几篇报

道^[26-28],食品安全领域还未见报道。这可能和“1.3”中分析的高质量荧光标记抗体的获得有关,该类抗体的研究主要集中在医学领域。但随着技术的成熟和仪器的普及,该方法以其高灵敏度的优势,势必成为日后研究的重点。

3 毛细管-激光诱导荧光免疫分析在食品安全领域的应用展望

3.1 潜在的应用领域

3.1.1 过敏原的检测。食品过敏现已成为一个新兴的公众性健康问题,特别是在发达国家。调查显示,全世界范围内有 1%~2% 的成年人对食品过敏,而低于 3 岁的儿童中有 8% 以上对食品过敏^[29]。因此,对食品过敏原的检测与分析是一个极其重要的问题。毛细管-激光诱导荧光免疫分析只需要制备高灵敏度的荧光标记抗体试剂即可完成检测,为过敏原的检测提供灵敏、方便的检测方法。

3.1.2 大分子蛋白毒素的检测。在自然界中,许多动物、植物、细菌和真菌都能产生大分子的蛋白毒素,对食品安全构成威胁。在处理食物中毒突发事件时,毛细管-激光诱导荧光免疫分析以其过程短、前处理简单等特点,在毒素蛋白的分析中具有不可替代的作用。

3.1.3 食品中免疫球蛋白的检测。免疫球蛋白是机体受抗原刺激后,由淋巴细胞特别是浆细胞合成的一类具有抗体活性的球蛋白。将免疫球蛋白添加到保健食品中,对于改善婴幼儿、中老年人及免疫力低下的人群的健康有重要意义。Buchanan 等曾报道在血液检测免疫球蛋白 E 的毛细管-激光诱导荧光免疫分析方法^[30]。其采用标记抗原构建非竞争检测模式,与标记抗体的检测方法比,该方法获得高质量标记物的难度较小。基于相同的原理,其在食品检测中也同样适用。

3.2 检测技术的发展方向

3.2.1 灵敏度的进一步提高。高灵敏度一直是分析方法所追求的目标。为进一步提高检测灵敏度,发展了亲和毛细管电泳免疫检测方法^[31-32]。它是将特异性的抗体结合在毛细管壁或填料上,选择性地吸附特异的抗原,从而达到分离的目的,再更换流动相系统将被测物质洗脱下来,因它的预浓缩作用,灵敏度更高,可达到 1×10^{-12} mol/L。在标记技术上,各种新型的标记物大大推动了检测灵敏度的提高。另外,对仪器的不断改进和发展也为毛细管-激光诱导荧光免疫分析方法灵敏度的提高提供了保障。

3.2.2 多组分同时测定。毛细管-激光诱导荧光免疫分析利用电泳的高分辨率,在电泳图谱上显示不同的迁移时间,解决抗原与抗原类似物因差异很小而造成的假阳性现象,及免疫反应中的“交叉反应”问题,使之表现为不同的峰而加以

识别,这是传统免疫反应中难以解决的问题。根据毛细管免疫检测的这一特性,交叉反应可以被利用检测多个组分。此外,作为一种分离检测方法,毛细管电泳可以如色谱检测一样,同时检测多个可以彼此分离的组分。多个抗体和抗原可以同时反应,再进行毛细管电泳分离。因其迁移时间彼此不同,故不影响彼此的定量,节省了检测时间。

3.2.3 高通量检测。尽管毛细管电泳免疫分析有众多优势,但其通量较低仍然是当前限制该方法广泛应用的主要因素。进一步发展高通量的 CEIA 方法十分重要。Tao 等首次提出了完全自动化的在线样品混合方法^[33]。待测样品与荧光标记的胰岛素和抗胰岛素抗体在线混合后经毛细管电泳分离检测。使用在线混合分离装置每 3 s 进样 1 次即可完成。该研究为毛细管电泳免疫分析的高通量、全自动化奠定了基础。

4 结语

现今,毛细管-激光诱导荧光免疫分析主要的研究领域还是在临床检验,但随着人们对食品安全的日益重视和检测研究的不断深入,毛细管-激光诱导荧光免疫分析以其不可替代的优势必将在食品安全领域发挥重要的作用。

参考文献

- [1] SHIMURAM K, KARGER B L. Affinity probe capillary electrophoresis: analysis of recombinant human growth hormone with a fluorescent labeled antibody fragment[J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 9-15.
- [2] 丁娟娟, 金葆康, 康经武. 毛细管电泳-激光诱导荧光用于中药制剂中氨基酸成分的分析[J]. *化学学报*, 2009, 67(9): 945-950.
- [3] REIF O W, LAUSCH R, SCHEPER T. Fluorescein isothiocyanate-labeled protein G as an affinity ligand in affinity immunocapillary electrophoresis with fluorescence detection[J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 4027-4033.
- [4] 徐汉琴. 毛细管电泳免疫分析综述[J]. *中国医学研究与临床*, 2006(4): 27-30.
- [5] MALEK A, KHALEDI M G. Steroid analysis in single cells by capillary electrophoresis with collinear laser-induced fluorescence detection[J]. *Anal Biochem*, 1990, 270: 50-58.
- [6] 陈泓序, 张新祥. 免疫亲和毛细管电泳的研究进展[J]. *色谱*, 2009, 27(5): 631-641.
- [7] SHIMURA K, KARGEER B L. Affinity probe capillary electrophoresis: analysis of recombinant human growth hormone with a fluorescent labeled antibody fragment[J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 9-15.
- [8] GIOVALNOLI C, ANFOSSI L, BAGGIANI C, et al. A novel approach for a non competitive capillary electrophoresis immunoassay with laser-induced fluorescence detection for the determination of human serum albumin[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1155: 187-192.
- [9] WANG Q, LUO G, WANG Y, et al. Capillary electrophoresis based immunoassay for monoclonal antibody with diode laser induced fluorescence detection[J]. *Anal Lett*, 2000, 33: 589-602.
- [10] JACKMAN R, SCHMERR M J. Analysis of the performance of antibody capture methods using fluorescent peptides with capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24: 892-896.
- [11] KORF G M, LANDERS J P, OKANE D J. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for the analysis of free and immune-complexed green fluorescent protein[J]. *Anal Biochem*, 1997, 251: 210-218.
- [12] CHEN F T, PENTONEY S L. Characterization of digoxigenin-labeled B-phycoerythrin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence Application to homogeneous digoxin immunoassay[J]. *J Chromatogr A*, 1994, 680: 425-430.
- [13] FENG H T, LAW W S, YU L J, et al. Immunoassay by capillary electrophoresis with quantum dots[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1156: 75-79.
- [14] ZAUGG S, THORNAMM W. Capillary electrophoretic separation, immunochemical recognition and analysis of the diastereomers quinine and quinine and two quinidine metabolites in body fluids[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2001, 24: 785-799.
- [15] CHOI J, KIM C, CHOI M J. Immunological analysis of methamphetamine antibody and its use for the detection of methamphetamine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence[J]. *J Chromatogr B*, 1998, 705: 277-282.
- [16] TAN W G, CARNELY T J, MURPHY P, et al. Detection of DNA adducts of benzo[a]pyrene using immuno-electrophoresis with laser-induced fluorescence: analysis of A549 cells[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 924: 377-386.
- [17] LAMA M T, BOULET C A, CHRIS L X. Development of a tetramethylrhodamine-labeled probe for a capillary electrophoresis-based competitive immunoassay of staphylococcal enterotoxin B[J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 457: 21-28.
- [18] SOWELL J, PARIHAR R, PATONAY G. Capillary electrophoresis-based immunoassay for insulin antibodies with near-infrared laser induced fluorescence detection[J]. *J Chromatogr B*, 2001, 752: 1-8.
- [19] SHINICHI M, TAKASHI K, TORATO I. Capillary electrophoresis immunoassay based on an on-column immunological reaction[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066: 197-203.
- [20] SCHMALZING D, NASHABEH W, YAO X W, et al. Capillary electrophoresis-based immunoassay for cortisol in serum[J]. *Analytical Chemistry*, 1995, 67: 606-612.
- [21] ZHOU J, XU X, WANG Y. Competitive immunoassay for clenbuterol using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 848: 226-231.
- [22] ZHANG C, WANG S, FANG G, et al. Competitive immunoassay by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence for the trace detection of chloramphenicol in animal-derived foods[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29: 3422-3428.
- [23] ZHANG C, MA G, FANG G, et al. Development of a capillary electrophoresis-based immunoassay with laser-induced fluorescence for the detection of carbaryl in rice samples[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 8832-8837.
- [24] LIU C C, FANG G Z, DENG Q L, et al. Determination of metolcarb in food by capillary electrophoresis immunoassay with a laser-induced fluorescence detector[J]. *Electrophoresis*, 2012, 33: 1471-1476.
- [25] YANG W C, SCHMERR M J, JACKMAN R. Capillary electrophoresis-based noncompetitive immunoassay for the prion protein using fluorescein-labeled protein a as a fluorescent probe[J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 4489-4494.
- [26] HAFNER F T, KAUTZ R A, IVERSON B L, et al. Noncompetitive immunoassay of small analytes at the femtomolar level by affinity probe capillary electrophoresis: Direct analysis of digoxin using a uniform-labeled scFv immunoreagent[J]. *Anal Chem*, 2000, 72: 5779-5786.
- [27] OU J P, CHAN S T, YEUNG W S. Separation of bovine serum albumin and its monoclonal antibody from their immunocomplexes by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis and its application in capillary electrophoresis-based immunoassay[J]. *J Chromatogr B*, 1999, 731: 389-394.
- [28] ATTIYA S, DICKINSON-LAING T, CESARZ J, et al. Affinity protection chromatography for efficient labeling of antibodies for use in affinity capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23: 750-758.
- [29] SAMPSON H A. Food allergy. part 1. immunopathogenesis and clinical disorders[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 103: 717-728.
- [30] BUCHABNAN D D, JANMESON E E, PERLETTE J, et al. Effect of buffer, electric field, and separation time on detection of aptamer-ligand complexes for affinity probe capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24: 1375-1382.
- [31] WANG Q, LUO G, OU J, et al. Noncompetitive immunoassays using protein G affinity capillary chromatography and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *J Chromatogr A*, 1999, 848: 139-148.
- [32] WANG Q G, LUO G A, WANG Y M, et al. Sandwich immunoassay for monoclonal antibody using protein G immunoaffinity capillary chromatography and diode laser-induced fluorescence detection[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2000, 23: 1489-1498.
- [33] TAO L, KENNEDY R T. On-Line competitive immunoassay for insulin based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *Anal Chem*, 1996, 68: 3899-3903.