

基于近红外免疫层析技术的食源性副溶血弧菌快速检测方法研究

张捷^{1,2}, 侯义宏³, 畅晓晖^{1,2}, 杨向莹^{1,2}, 赵琢⁴, 柳明⁴, 陈广全^{1,2}

(1. 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026)

(2. 出入境食品安全检测北京市重点实验室, 北京 100026) (3. 常德出入境检验检疫局, 湖南常德 415000)

(4. 天津出入境检验检疫局工业产品安全技术中心, 天津 300308)

摘要: 建立一种应用近红外荧光免疫层析技术快速检测副溶血弧菌的方法。采用近红外荧光标记副溶血弧菌单克隆抗体, 将副溶血弧菌多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上分别作为检测线和质控线, 研制检测副溶血弧菌的近红外免疫层析试纸条及配套标准物质。研究表明, 所建立的近红外免疫法对检测副溶血弧菌具有良好的特异性和较高的灵敏度, 最低检测限为 1.2×10^2 CFU/mL, 与沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、单增李斯特菌无交叉反应。通过效果评价试验发现, 与传统检测方法相比较, 所建立的近红外荧光法检测时间最短, 检测限与 RT-PCR 法接近。近红外荧光法在 45 min 内即可完成检测, 可用于食品中副溶血弧菌的高效检测, 为食品安全监管提供可靠的技术支持。

关键词: 副溶血弧菌; 近红外荧光; 免疫层析检测试纸条; 特异性; 灵敏度; 检测限

文章编号: 1673-9078(2017)5-282-287

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.045

Rapid Detection of Foodborne *Vibrio parahaemolyticus*, Based on a Near-infrared Immunochromatographic Technique

ZHANG Jie^{1,2}, HOU Yi-hong³, CHANG Xiao-hui^{1,2}, YANG Xiang-ying^{1,2}, ZHAO Zhuo⁴, LIU Ming⁴,
CHEN Guang-quan^{1,2}

(1. Beijing Entry-Exit Inspection Quarantine Bureau Inspection Quarantine Technical Center, Beijing 100026, China)

(2. Beijing Key Laboratory of Entry-Exit Food Safety Testing, Beijing 100026, China) (3. Changde Entry-Exit Inspection

Quarantine Bureau, Changde 415000, China) (4. Technical Center for Safety of Industrial Products, Tianjin Entry-Exit Inspection Quarantine Bureau, Tianjin 300308, China)

Abstract: This study was designed to establish a method for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*, using a near-infrared fluorescence immunochromatographic technique. Near-infrared fluorescence was used to label anti-*Vibrio parahaemolyticus* monoclonal and polyclonal antibodies, and a goat anti-mouse IgG polyclonal antibody. These were then coated onto a nitrocellulose membrane as the detection line and control line, respectively, to develop a near-infrared immunochromatographic test dipstick for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and a standard substance. The results showed that the established near-infrared immunochromatographic method had good specificity and high sensitivity for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*, the limit of detection was 1.2×10^2 CFU/mL, and there were no cross-reactions with *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, or *Listeria monocytogenes*. The performance evaluation test found that, compared with the traditional detection method, the established near-infrared fluorescence method had a shorter detection time, and a detection limit close to that of the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. A measurement using this near-infrared immunochromatographic method could be completed in 45 minutes. This method can be used for the efficient detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food and provide reliable technical support for food safety supervision.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; near-infrared fluorescence; immunochromatographic test dipstick; specificity; sensitivity; detection limit

收稿日期: 2016-06-17

基金项目: 质检公益性行业科研专项项目 (201410049); 国家质检总局科技计划项目 (2015IK011)

作者简介: 张捷 (1965-), 男, 博士研究生, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测及评价

通讯作者: 赵琢 (1978-), 男, 博士研究生, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测

食源性致病菌是当前世界范围内食品中毒事件中的最主要威胁之一。其中副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种广泛分布于海洋与盐湖的革兰氏阴性嗜盐菌, 可导致患者腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐和发烧等典型胃肠炎反应。我国食源性疾病监控网络数据显示, 中国东部沿海城市近年来由副溶血弧菌引起的食物中毒事件呈显著上升趋势, 已超过沙门氏菌成为食源性疾病暴发的首要致病菌^[1]。在我国, 每年因副溶血弧菌导致急性腹泻 665.5 万人, 导致急性胃肠炎病例估计为 728.1 万人, 副溶血弧菌感染的食源性比例为 68.0%^[2]。副溶血性弧菌是重要的食源性致病菌, 常常引起严重的公共卫生与食品安全问题。目前对副溶血弧菌的检测方法主要有传统检测方法、分子生物学和免疫学方法等^[3-7]。传统检测方法耗时长且工作量大, 难以满足对食品进行批量且迅速的检测需求。分子生物学方法快速, 但不能分离目标菌, 且容易出现假阳性。近年来, 近红外荧光探针鉴于其背景干扰小、组织穿透力强等突出的优点, 备受关注^[8-10]。尽管当前体外及体内生物造影仍是近红外探针的主要应用领域, 但其在免疫分析中的应用自 Boyer 等于 1992 年开始从未间断^[11,12]。本研究通过研制近红外免疫层析试纸条及配套标准物质, 针对副溶血弧菌建立一种近红外荧光免疫层析快速检测方法, 以期进一步提高副溶血弧菌快速检测的灵敏度和特异性。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

副溶血弧菌标准菌株 ATCC17802; 羊抗鼠 IgG (上海慧耘生物科技有限公司); 副溶血性弧菌单克隆抗体、多克隆抗体由 pierce 公司提供; 稀释液 (5% BSA, 0.1% Tween 20, PBS); 荧光染料 dylight 800 由武汉珈源量子点开发有限公司提供; 缓冲蛋白胍水、亚硒酸盐胱氨酸 (SC) 增菌液, 以上均为陆桥技术有限公司提供; 3%氯化钠碱性蛋白胍水; 3%氯化钠胰蛋白胍大豆琼脂; 3%氯化钠三糖铁琼脂; 3%氯化钠溶液。

1.2 仪器与设备

恒温摇床 (江苏太仓实验仪器设备厂); 高速低温离心机 (Sigma, 3-18K); 超纯水仪 (Thermo); 超声破碎仪 (宁波市先倡电子科技有限公司, XC-CD2500 型); 高压灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 恒温培养箱 (SANYOO); 便携式高灵敏度近红外点荧光扫描仪 (北京博润福得科技发展有限公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 细菌培养

将-80 °C 保存的副溶血弧菌划线接种于硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖 (TCBS) 琼脂培养基平板上, 37 °C 培养 18 h 后挑取典型单菌落接种于液体 LB 培养基上, 37 °C 培养 18 h。

1.3.2 近红外荧光染料标记副溶血弧菌单抗

将 dylight 800 原液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍, 取 1.4 μL 与 20 μg 副溶血弧菌单克隆抗体 (上海慧耘生物科技有限公司) 轻柔混合均匀后于室温避光反应 2 h。反应结束后, 将标记产物放入透析袋中, 用 PBS 4 °C 透析过夜, 去除游离的荧光染料。标记好的抗体溶液中添加终浓度为 1% BSA 和 0.1% Tween 20, 叠氮化钠 0.1%, 4 °C 保存。使用前标记产物以层析缓冲液稀释 10000 倍。

1.3.3 副溶血弧菌免疫层析试纸条的制备

试纸条由样品垫、结合垫、抗体承载膜、吸水垫及反应支持基质组成, 按次序依次搭接, 而后以切割机切成试纸条。结合垫: 选取玻璃纤维素膜, 喷涂上述稀释好的标记抗体, 室温风干。样品垫: 选取纤维素膜带, 将封闭液 (5% BSA, 0.1% Tween20, PBS) 喷洒在膜带上, 室温风干后备用。抗体承载膜: 选取硝酸纤维素膜, 将副溶血弧菌捕获多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体用划线机在膜上划检测线和质控线, 间距 0.5 cm, 室温风干。

1.3.4 定性检测

取副溶血弧菌稀释液, 吸取 1 mL 样本至 7 mL PBS 缓冲液中, 超声破菌, 工作 15 s, 休息 15 s, 40% 能量, 共计 30 次循环。吸取 100 μL 经超声处理的样本滴加到样品垫上, 待吸收干后再滴加 50 μL 层析液。室温放置 15 min 后, 用便携式近红外荧光扫描仪读数。若检测线区域和质控区域同时出现荧光峰为阳性结果。

1.3.5 定量检测

取 10^7 CFU/mL 的副溶血弧菌纯菌 (ATCC), 用 PBS (pH 7.4) 稀释液将所述纯菌进行倍数系列稀释, 制成 2.4×10^5 CFU/mL、 1.2×10^5 CFU/mL、 2.4×10^4 CFU/mL、 1.2×10^4 CFU/mL、 2.4×10^3 CFU/mL、 1.2×10^3 CFU/mL、 2.4×10^2 CFU/mL、 1.2×10^2 CFU/mL 菌液进行检测限检测。超声破菌处理, 工作 15 s, 休息 15 s, 40% 能量, 共计 30 次循环。取 100 μL 经超声处理的样本滴加到样品垫上, 待吸收干后再滴加 50 μL 层析液。室温静置 15 min, 将试纸条放入便携式近红外荧

光扫描仪读数。上述系列稀释的副溶血弧菌标准品分别进行检测，扫描获得检测线和质控线的荧光值，同时出现检测区域荧光峰和质控区域荧光峰方表明反应正常。每个稀释度样本平行测量两次，取平均值作为测量值，以该值对应的样品浓度作标准工作曲线。

1.3.6 特异性实验

在无菌条件下，分别取实验室分离的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、大肠埃希氏菌、单增李斯特菌和副溶血弧菌，原始浓度分别为 1.2×10^8 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL、 1.5×10^7 CFU/mL、 1.2×10^7 CFU/mL、 1.5×10^8 CFU/mL 和 1×10^7 CFU/mL，调制成 0.6×10^4 CFU/mL 的菌液，然后超声处理方法进行破菌处理，工作 15 s，休息 15 s，40% 能量，共计 30 次循环。吸取 50 μ L 经超声处理的样本滴加到样品垫上，待吸收干后再滴加 50 μ L 上述的 PBS 缓冲液，室温放置 15 min 后，用便携式近红外荧光扫描仪读数。

1.4 评价方法

1.4.1 传统检测方法

按照《GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血弧菌检验》对来自实验室的 30 份样品进行检测。样品种类主要包括大西洋鲑鱼、黑蟹、棕蟹、珍宝蟹、螯龙虾和皇帝蟹等。

1.4.2 标准菌株添加回收实验

取未检出副溶血弧菌鱼肉样品 75 g，分三份，分别加入一定量的标准菌株副溶血弧菌，剪碎，用 225 mL 含 5% BSA，0.1% Tween 20 的 PBS (pH 为 7.4) 缓冲液稀释样品，取洗脱液进行超声破菌，直径 3 mm 探头，工作 5 s，休息 5 s，40% 能量，共计 30 次循环，吸取 50 μ L 经超声处理的检样滴加到样品垫上，待吸收干后再滴加 50 μ L 层析液，另取缓冲液作为阴性对照，用上述的试纸条进行免疫层析。

1.4.3 近红外免疫层析试纸条检测实际样品

按照所建立的近红外荧光法，对来自实验室的 30 份样品（与 1.4.1 的 30 份样品一致）进行检测，并将检测结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 定性检测结果分析

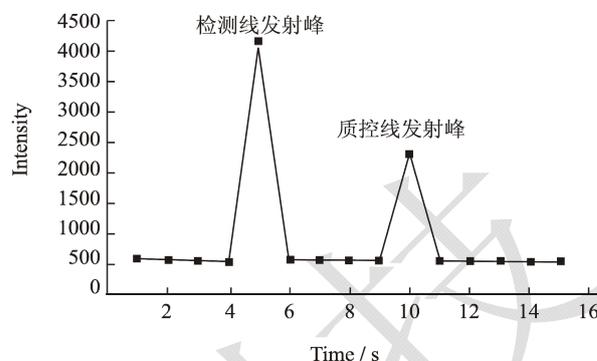


图 1 副溶血弧菌低噪声激发式荧光检测图

Fig.1 Low noise excitation fluorescence detection of *Vibrio parahaemolyticus*

本实验采用近红外荧光染料标记的双抗体夹心免疫层析试纸条检测副溶血性弧菌。当含有目标菌的样品滴加到样品垫上时，溶液将结合垫上固定的分子解离，靶标菌与解离出来的荧光标记副溶血弧菌单抗形成复合物。抗原抗体复合物随溶液向试纸条前端迁移。当抗原抗体复合物迁移至检测线时，被固定于检测线上的副溶血性弧菌多克隆抗体捕获。而游离的单抗分子/抗原抗体复合物则随溶液继续迁移，到达质控线时被交联于质控线上的参照物抗体所捕获。免疫层析反应结束后，以荧光扫描仪测定检测线和质控线的荧光强度。经过实验发现，检测中所使用的近红外荧光染料为发射波长位于 777 nm 的有机分子，优选活化的近红外荧光染料 Dylight 800。分别测定检测线和质控线区域的荧光强度，若质控线区域出现荧光发射峰，则表明该试纸条有效，反之则无效；若检测线区域同时出现荧光发射峰则为阳性结果，反之则为阴性。图 1 为副溶血性弧菌低噪声激发式荧光检测图。

2.2 定量检测结果

表 1 不同浓度副溶血弧菌菌株悬液对应的检测结果

Table 1 Detection results of suspensions of *Vibrio parahaemolyticus* at different concentrations

测量值	浓度/(CFU/mL)							
	2.4×10^5	1.2×10^5	2.4×10^4	1.2×10^4	2.4×10^3	1.2×10^3	2.4×10^2	1.2×10^2
第一次	1.89	1.87	1.88	1.46	1.11	0.87	0.51	0.26
第二次	1.85	1.83	1.82	1.56	1.05	0.80	0.59	0.26
平均值	1.87	1.85	1.86	1.51	1.08	0.83	0.55	0.26

将 1.3.5 系列稀释的副溶血弧菌标准品分别进行检测，扫描获得检测线和质控线的荧光值，同时出现

检测区域荧光峰和质控区域荧光峰方表明反应正常。每个稀释度样本平行测量两次，取平均值作为测量值，

检测结果见表 1, 以该值对相应的样品浓度制作标准工作曲线, 如图 2 所示, 并拟合得适用的标准曲线, $y=1.51x+1.6968$, $R^2=0.9837$ 。由表 1 可见最低检出限为 1.2×10^2 CFU/mL。

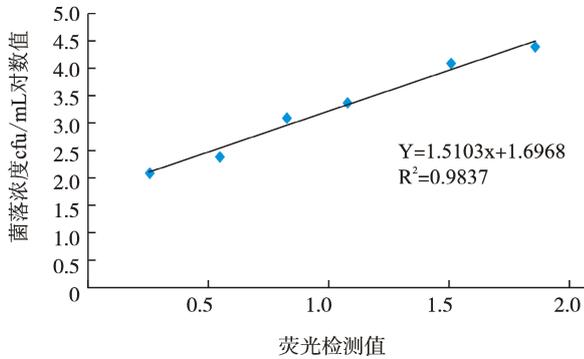


图 2 副溶血弧菌近红外免疫层析标准曲线

Fig.2 Near-infrared immune chromatography standard curve of *Vibrio parahaemolyticus*

2.3 特异性实验结果

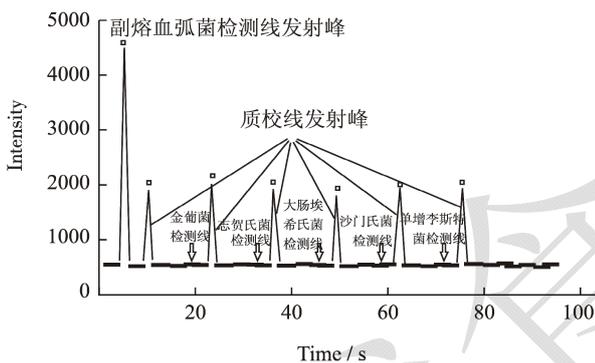


图 3 定性检测副溶血弧菌方法的特异性试验结果图

Fig.3 Specificity test results for the qualitative detection of *Vibrio parahaemolyticus*

采用 1.3.6 所述方法定性检测副溶血弧菌近红外荧光法的特异性。由图 3 可见, 除副溶血弧菌样品外, 其余检测的细菌在检测线位置均未出现发射峰, 各菌的试纸条均在质控线处出现发射峰, 表明该方法对副溶血弧菌的检测特异性好, 与其他五个菌属无交叉反应。

2.4 标准菌株添加回收实验结果

采用添加回收试验方法, 按照 1.4.2 方法, 吸取 100 μ L 经超声处理的样品溶液滴加到样品垫上, 室温静置 10 min, 将所述试纸条放入便携式低噪声激发式荧光扫描仪中读数, 结果如表 2 所示。

由表 2 数据可知, 本研究采用基于荧光标记法测定的副溶血弧菌的浓度较为准确, 可用于副溶血弧菌的日常检测。

表 2 根据标准曲线计算样品中的副溶血弧菌的浓度

Table 2 Calculated concentration of *Vibrio parahaemolyticus* according to the standard curve

样品编号	检测值	VP 浓度 / (CFU/mL)	VP 已知浓度 / (CFU/mL)
1	0.01	0	未添加
2	0.01	0	未添加
3	0.84	0.9×10^4	1.0×10^4

表 3 利用近红外荧光标记免疫层析法和传统方法对 30 份样品的副溶血性弧菌检测结果

Table 3 Measurement results for 30 *Vibrio parahaemolyticus* samples using the near-infrared fluorescence immunochromatographic method and a traditional method

样品编号	近红外检测结果 / (CFU/mL)	传统检测结果	符合性
1	未检出	未检出	一致
2	未检出	未检出	一致
3	未检出	未检出	一致
4	3.5×10^3	检出	一致
5	未检出	未检出	一致
6	1.7×10^4	检出	一致
7	5.6×10^3	检出	一致
8	未检出	未检出	一致
9	未检出	未检出	一致
10	4.9×10^2	检出	一致
11	未检出	未检出	一致
12	3.9×10^3	检出	一致
13	未检出	未检出	一致
14	2.6×10^4	检出	一致
15	未检出	未检出	一致
16	3.5×10^2	检出	一致
17	1.1×10^3	检出	一致
18	4.1×10^3	检出	一致
19	5.9×10^5	检出	一致
20	4.6×10^3	检出	一致
21	未检出	未检出	一致
22	6.4×10^3	检出	一致
23	未检出	未检出	一致
24	4.6×10^3	检出	一致
25	未检出	未检出	一致
26	2.5×10^2	检出	一致
27	未检出	未检出	一致
28	未检出	未检出	一致
29	未检出	未检出	一致
30	3.4×10^4	检出	一致

2.5 副溶血弧菌近红外检测试纸条效果评价

按照传统检测法《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血弧菌检验》(GB 4789.7-2013)和所建立的近红外荧光法,对实验室30份样品进行检测,其结果如下:近红外荧光标记免疫层析法和传统方法检测均检出阳性样品15份(如表3所示)。结果表明两种方法具有良好的符合性。采用近红外免疫层析法检测样品中副溶血弧菌的灵敏度较高,特异性较好,适于口岸进行副溶血性弧菌快速检测。

3 结论

3.1 近年来,副溶血性弧菌的检测方法已经从传统培养法到以免疫学或DNA为基础的快速检测法。传统方法培养时间过长,需5~6d检测周期;PCR技术虽然灵敏度高,特异性强,重复性好,但其仪器、试剂昂贵,要在口岸普及使用尚有一定的难度。免疫试纸条因操作简单且易于携带成为即时检测的有力工具。目前荧光光谱法由于其灵敏度高,选择性好,在生物分析中有广泛的应用^[13-15]。随着近红外荧光探针的持续发掘及免疫分析技术的发展,二者的结合应用在多个分析领域日益流行。2013年有报道称使用近红外荧光染料800CW进行免疫层析试纸条标记^[16]。

3.2 本研究基于近红外免疫层析技术建立了一种副溶血弧菌快速检测方法。采用近红外荧光染料标记的双抗体夹心免疫层析试纸条检测副溶血性弧菌。经过多次试验结果表明,采用该研究方法发现所建立的近红外荧光法的检测限最低为 1.2×10^2 CFU/mL。该方法基于免疫学抗原抗体特异性结合原理,利用近红外荧光的强度的信号放大作用,且受环境因素干扰小,激发后荧光时间长的特点而建立,具有特异性好,检测限量低的特点。它与其它检测方法相比,信噪比高,灵敏度理想。2012年研究报道发现副溶血弧菌胶体金试纸条的灵敏度为 3.592×10^4 CFU/mL^[17],本研究中近红外荧光法试纸条的灵敏度为 1.2×10^2 CFU/mL,且与其他致病菌无交叉反应。与胶体金免疫层析试纸条相比,近红外荧光法对靶标菌的灵敏度提高了100多倍。覃倚莹^[18]等采用toxR基因作为荧光定量PCR靶基因设计TaqMan探针快速检测副溶血弧菌,对纯培养物和模拟食品样品PCR直接检测的灵敏度分别为21 CFU/mL和210 CFU/g,优于该方法。卢昕^[19]等利用SYBR Green I荧光PCR,根据TRH和TDH毒力基因序列设计引物,对33株副溶血弧菌和22株其他细菌进行特异性和灵敏度评价,结果33株副溶血性弧菌检测均为阳性,最低检测下限达50 CFU/ μ L,其他菌株

为阴性。虽然荧光PCR法灵敏度优于近红外荧光法,但PCR仪器、试剂较为昂贵,在口岸普及有一定难度,且检测时间比近红外荧光法长。

3.3 综上所述,副溶血弧菌近红外免疫试纸条特异性好,灵敏度高,稳定性好,操作简单,适用于现场、即时、快速检测。本方法中免疫层析试纸条及近红外荧光扫描仪均属于便携可移动装置,整个检测过程在45 min内即可完成。近红外荧光法相对于传统培养法需要5~6d的检测周期及繁琐的培养基配制等过程具有显著的时效性优势;相对于PCR及实时荧光定量PCR法^[20,21]等分子生物学法在仪器的检测速度、便携性及现场适用性上呈明显优势,特别适合在口岸推广使用,具有良好的应用前景,提高了食源性致病菌的检测效率,为进出口食品的快速检测提供了一种新的检测方法。

参考文献

- [1] 陈茂义,胡婕,陈婷,等.副溶血性弧菌毒力基因研究进展[J].副溶血性弧菌毒力基因研究进展[J].公共卫生与预防医学,2013,24(3):65-67
CHEN Mao-yi, HU Jie, CHEN Ting, et al. Progress virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J. of Pub. Health and Prev. Med., 2013, 24(3): 65-67
- [2] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅.用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌病发病率[J].中华疾病控制杂志,2013,17(3):265-267
MAO Xue-dan, HU Jun-feng, LIU Xiu-mei. Study on incidence of food borne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* by literature review method [J]. Chin. J. Dis. Control Prev., 2013, 17(3): 265-267
- [3] 樊景凤,李光,王斌,等.间接免疫荧光抗体技术检测凡纳滨对虾红体病病原-副溶血弧菌[J].海洋环境科学,2007,26(6):501-503
FAN Jing-feng, LI Guang, WAN Bin, et al. Rapid detection of pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus* associated with redbody disease in *Litopenaeus vannamei* by indirect immuno fluorescent assay [J]. Marine Environmental Science, 2007, 26(6): 501-503
- [4] 徐芊,孙晓红,赵勇,等.副溶血弧菌LAMP检测方法的建立[J].中国生物工程杂志,2007,27(12):66-72
XU Qian, SUN Xiao-hong, ZHAO Yong, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. China Biotechnology, 2007, 27(12): 66-72
- [5] 吕淑霞,祝儒刚,刘月萍,等.扩增内标在副溶血弧菌多重

- PCR 检测方法中的应用[J].沈阳农业大学学报,2010,41(6): 701-705
- LV Shu-xia, ZHU Ru-gang, LIU Yue-ping, et al. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in the presence of internal amplification control [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2010, 41(6): 701-705
- [6] CHAO Guo xiang, JIAO Xi nan, ZHOU Xiao hui, et al. Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different source in coastal province Jiangsu, China [J]. Food Control, 2009, 20(10): 907-912
- [7] 刘阳,孔繁德,彭小莉,等.纳米金 PCR 技术检测副溶血弧菌的建立与初步应用[J].福建畜牧兽医,2012,34(1):9-12
- LIU Yang, KONG Fan-de, PENG Xiao-li, et al. Establishment and primary application of nanoparticle-based assisted PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary medicine, 2012, 34(1): 9-12
- [8] Pyo D J, Yoo J S. New trends in fluorescence immunochromatography [J]. Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2012, 33(2): 203-222
- [9] Amiot C L, Xu S P, Liang S, et al. Near-infrared fluorescent materials for sensing of biological targets [J]. Sensors, 2008, 8(5): 3082-3105
- [10] J T Alander, V Bochko, B Martinkauppi, et al. A review of optical nondestructive visual and near-infrared methods for food quality and safety [J]. International Journal of Spectroscopy, 2013, 2013(3): 1-36
- [11] Boyer A E, Lipowska M, Zen J-M, et al. Evaluation of near infrared dyes as labels for immunoassays utilizing laser diode detection: development of near infrared dye immunoassay (NIRDIA) [J]. Analytical Letters, 1992, 25(3): 415-428
- [12] Guo Z Q, Park S, Yoon J Y, et al. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications [J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(1): 16-29
- [13] 傅妮娜,王红,张华山.近红外荧光探针及其在生物分析中的应用进展[J].分析科学报,2008,24(2):233-239
- FU Ni-na, WANG Hong, ZHANG Hua-shan. Progress in near-infrared fluorescent probe and its bioanalytical application [J]. Journal of Analytical Science, 2008, 24(2): 233-239
- [14] 刘欣,王红,张华山,等.生物分析中近红外荧光探针进展[J].分析科学学报,2001,17(4):246-251
- LIU Xin, WANG Hong, ZHANG Hua-shan, et al. Progress of near-infrared fluorescence probes in bioanalysis [J]. Journal of Analytical Science, 2001, 17(4): 246-251
- [15] 谢雪钦,杨向莹,高静,等.近红外荧光探针及其在免疫分析中的应用[J].食品与生物技术学报,2015,34(3):225-231
- XIE Xue-qin, YANG Xiang-ying, GAO Jing, et al. Near infrared fluorescent probes and their application in immunoassay [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(3): 225-231
- [16] Swanson C, D'Andrea A. Later flow assay with near-infrared dye for multiplex detection [J]. Clinical Chemistry, 2013, 59(4): 641-648
- [17] 孔繁德,刘阳,徐淑菲,等.免疫金层析技术快速检测副溶血弧菌方法的初步研究[J].中国兽医科学,2012,42(8):819-824
- KONG Fan-de, LIU Yang, XU Shu-fei, et al. A preliminary study on the method of rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by immunogold chromatography [J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(8): 819-824
- [18] 覃倚莹,吴晖,肖性龙,等.toxR 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌[J].生物工程学报,2008,24(10):1837-1842
- QIN Yi-ying, WU Hui, XIAO Xing-long, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by Taqman-based real-time PCR assay targeting the toxR gene [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(10): 1837-1842
- [19] 卢昕,徐嘉良,阚飙,等.应用 SYBRGREEN I 荧光 PCR 快速检测副溶血弧菌及其毒力基因[J].中国预防医学杂志,2012, 13(4):241-244
- LU Xin, XU Jia-liang, KAN Biao, et al. Development of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplexed SYBR green I-based real-time PCR assay [J]. Chin. Prev. Med., 2012, 13(4): 241-244
- [20] 林强,李宁求,付小哲,等.牡蛎中副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J].中国水产科学,2011,18(1): 96-102
- LIN Qiang, LI Ning-qiu, FU Xiao-zhe, et al. Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster [J]. Journal of Fishery Science of China, 2011, 18(1): 96-102
- [21] 廖国东,陈家图,李晖,等.应用实时荧光 RT-PCR 技术检测诺如病毒感染[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):91-92
- LIAO Guo-dong, CHEN Jia-tu, LI Hui, et al. Detection of a norovirus infection in a real-time fluorescent RT-PCR [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 32(1): 91-92

现代食品科技