

# 免疫-核酸扩增技术检测食品中小分子危害物的研究进展

周宇欣, 邓欣, 胥天然, 马磊\*, 龚云飞, 张明洲\*

(中国计量大学生命科学学院, 国家市场监督管理总局重点实验室  
(微生物计量检测与生物制品质量安全), 浙江杭州 310018)

**摘要:** 小分子危害物是引起食品安全问题的重要风险因子, 对人体健康构成严重威胁。实现食品安全风险因子的灵敏筛查有利于提升人民群众安全感, 而传统检测方法难以满足痕量小分子危害物检测的时代需求。结合免疫反应的核酸扩增技术是一种快速高效、敏感准确的新兴方法, 兼具免疫学识别高特异性和核酸检测高灵敏性的优势, 逐渐在小分子危害物的日常筛查中发挥重要作用。该文综述了近年来基于免疫-核酸扩增技术的研究进展, 详细介绍了变温和等温两种模式下的免疫-核酸扩增技术的发展现状, 展望了该方法在食品中小分子危害物检测中的应用前景, 为该方法在食品安全领域的进一步研究和推广提供参考依据。

**关键词:** 免疫-核酸扩增技术; 小分子危害物; 食品安全; 快速检测; 高灵敏度

文章编号: 1673-9078(2025)05-386-398

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0379

## Advances in Immuno-nucleic Acid Amplification for Detecting Small-molecule Hazards in Food

ZHOU Yuxin, DENG Xin, XU Tianran, MA Biao\*, GONG Yunfei, ZHANG Mingzhou\*

(Key Laboratory of Microbiological Metrology, Measurement & Bio-product Quality Security, State Administration for Market Regulation, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Small-molecule hazards are important risk factors in food safety and pose serious threats to human health. Comprehensive screening of food safety risk factors helps enhance the public's sense of security. However, conventional detection methods fail to meet the requirements for trace detection of small-molecule hazards. The combination of immune response and nucleic acid amplification technology is a rapid, efficient, sensitive, and accurate emerging method for the detection of small-molecule hazards. Immuno-nucleic acid amplification combines the high specificity of immunoassays and

引文格式:

周宇欣, 邓欣, 胥天然, 等. 免疫-核酸扩增技术检测食品中小分子危害物的研究进展[J]. 现代食品科技, 2025, 41(5): 386-398.

ZHOU Yuxin, DENG Xin, XU Tianran, et al. Advances in immuno-nucleic acid amplification for detecting small-molecule hazards in food [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 386-398.

收稿日期: 2024-03-26

基金项目: 浙江省基础公益研究计划农业农村项目 (LGN22C200015); 浙江省大学生科技创新活动计划资助项目 (2023R409A026); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目 (202310356048)

作者简介: 周宇欣 (2004-), 女, 本科, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: xxisjacky@gmail.com; 共同第一作者: 邓欣 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 19858120027@163.com

通讯作者: 马磊 (1990-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: mb@cjlu.edu.cn; 共同通讯作者: 张明洲 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: zmzcjlu@cjlu.edu.cn

the high sensitivity of nucleic acid amplification. This effective, sensitive, and accurate method is gradually playing a more important role in the routine screening of small-molecule hazards. This study reviews the recent advances in research on immuno-nucleic acid amplification, discusses in detail the current state of development of immuno-nucleic acid amplification applicable to non-isothermal and isothermal conditions, and predicts the application prospects of this method in detecting small-molecule hazards in food. Overall, this study provides a reference for further research and promotes the use of this method in food safety inspection.

**Key words:** immuno-nucleic acid amplification; small-molecule hazard; food safety; rapid detection; high sensitivity

小分子危害物是指分子量小、易对生物体造成毒害作用的化学物质，包括动植物源性食品中的兽药残留<sup>[1]</sup>、农药残留<sup>[2]</sup>、细菌和真菌产生的毒素<sup>[3,4]</sup>以及人为添加的违禁物<sup>[5]</sup>等。小分子危害物质极易由食品进入人体，引起神经系统紊乱、生殖系统异常，甚至诱发癌症<sup>[6]</sup>。面对食品需求由量转质的现状，建立食品中小分子危害物快速灵敏的检测分析方法，对于保证食品安全、保护公众健康意义重大。传统检测方法多依赖大型仪器，包括气相色谱-质谱法<sup>[7]</sup>、液相色谱串联质谱法<sup>[8]</sup>和高效液相色谱法<sup>[9]</sup>等，虽然准确度高，但操作复杂<sup>[10]</sup>、成本高、耗时长<sup>[11]</sup>，难以实现快速检测<sup>[12]</sup>。免疫分析技术具有操作简单、成本低、速度快等优点，在食品中小分子危害物快速检测领域备受青睐<sup>[13]</sup>。胶体金免疫层析法（Immune Colloidal Gold Technique, ICGT）和酶联免疫吸附法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA）是两种常见的免疫分析技术，前者多用于定性分析，检测速度快，但灵敏度不足<sup>[14]</sup>，后者灵敏度高，但易受样品基质干扰<sup>[15]</sup>，重现性较差。因此，亟需开发快速简易的新型检测技术，满足食品中小分子危害物精准筛查的现实需求。

随着分子生物学的发展，免疫-核酸扩增技术逐渐崭露头角。该技术将免疫反应与核酸扩增结合，是实现小分子危害物高灵敏检测的理想手段之一，其中基于 ELISA 的免疫反应按照原理可分为三种，分别是直接竞争法、间接竞争法和双抗夹心法。直接竞争法中，固定的抗体捕获标记 DNA 的抗原。当样品中存在待测目标物时，标记 DNA 的抗原会与待测目标物竞争。若阳性样本中待测目标物浓度较高，会优先通过非共价键与固定抗体结合，未结合的标记抗原被洗涤去除，核酸扩增并不会获得检测信号，反之则说明待测样本为阴性。间接竞争法中，固定的抗原与标记 DNA 的抗体识别并结合。当样品中存在待测目标物时，载体上的固定抗原与待测目标物竞争。若阳性样本中待测目标物浓度较

高，标记 DNA 的抗体会优先结合待测目标物，产生的游离态抗体-待测目标物复合物经洗涤后去除，核酸检测后无扩增信号，而不含待测目标物的阴性样本则会明显观察到扩增信号。不论固定抗体还是抗原，直接竞争法和间接竞争法均是固相免疫分析方法。邻位连接技术（Proximity Ligation Assay, PLA）是在双抗夹心模式上衍生出来的液相免疫连接方法，并不需要洗涤步骤。当样品中存在目标物时，DNA 标记的抗体特异性捕获待测目标物，随后互补 DNA 标记的另一个检测抗体结合待测目标物，从而形成三元复合物。两个抗体间产生邻位连接效应，生成环状识别分子，互补的双链 DNA 经核酸扩增后得到阳性信号，若是阴性样本则不存在扩增信号（图 1）。

免疫-核酸扩增技术中的核酸检测包含两大类，一类是在变温条件下放大核酸信号的免疫变温扩增技术，一类是恒定温度下的免疫等温扩增技术。前者在食品中小分子危害物检测领域应用成熟<sup>[16]</sup>，后者克服了热循环仪器依赖性，缩短了反应时间，操作更简单，结果判读形式更多样<sup>[17,18]</sup>。这两类免疫-核酸扩增技术的核酸检测部分的原理不同，但免疫反应部分的原理相同。本文详细介绍了免疫变温扩增技术和免疫等温扩增技术的研究进展，总结了这两类技术在食品中生物毒素、农药残留、兽药残留等小分子危害物检测领域的应用情况，为食品安全领域小分子危害物检测发展提供参考。

## 1 免疫变温扩增技术

### 1.1 免疫 PCR

#### 1.1.1 基于生物素-亲和素系统的免疫 PCR

1992 年，Sano 等<sup>[19]</sup>联用 ELISA 和聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR），建立了基于生物素-亲和素系统（Biotin-Avidin System, BAS）的免疫 PCR 技术（Immuno PCR, IPCR）。BAS-IPCR 利用链霉亲和素蛋白 A 嵌合体作为连接

分子，连接抗原抗体结合物和 DNA 标记分子，同时还能识别抗体的 Fc 片段<sup>[20]</sup>。IPCR 利用分子手段放大特定报告 DNA 的信号，替代了传统 ELISA 的酶催化底物显色过程<sup>[21]</sup>。当 PCR 反应扩增报告 DNA 后，通过琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 扩增产物，进而实现待测目标物的定量检测<sup>[22]</sup>。该方法能检测近 600 个抗原分子，灵敏度比传统 ELISA 法高出十万倍，且非特异性 PCR 信号影响较小，满足检测要求。BAS-IPCR 方法打破了传统 PCR 只能检测核酸的局限性，将其应用范围拓宽至小分子检测领域<sup>[23]</sup>，利用生物素与亲和素之间高亲合性<sup>[24]</sup>和多级放大效应，提升了免疫标记和痕量分析能力，已在食品中生物毒素<sup>[25]</sup>、抗生素<sup>[26,27]</sup>(表 1)、类雌激素<sup>[28]</sup>等小分子危害物检测中成功应用。

多环芳烃是一类存在于食品中的小分子污染物，主要来源于工业有机物质的不完全燃烧，易产生“三致”作用，严重危害人类健康<sup>[29]</sup>。由于其亲脂特性，多环芳烃会通过食物链不断累积在动物脂肪及组织中，多出现在精加工肉类产品中<sup>[30]</sup>。Ma 等<sup>[31]</sup>利用 BAS-IPCR 技术检测蔬菜和烧烤类食品中的苯并芘 (Benzopyrene, BaP)，在烤羊肉、烤鸭中的 BaP 平均浓度分别为 6.65 和 2.69 ng/g，而油菜、萝卜中的 BaP 平均浓度分别为 0.57 和 0.97 ng/g，对比发现，蔬菜中 BaP 残留浓度低于烧烤肉类。该方法灵敏度优于免疫分析技术，检测效率较大型仪器

提升明显。不过，在检测化学结构与 BaP 极为相似的花和茛苳并茛苳时，略高的交叉反应率不足以体现方法的特异性。此外，花生油、芝麻油等食用植物油中也检测出 BaP 且残留量大于 2 μg/kg，这可能是加工过程中的污染导致<sup>[32]</sup>。Ma 等<sup>[33]</sup>将 BAS-IPCR 技术应用到 4 种海鱼 (鳕鱼、黄鱼、鲳鱼、鲭鱼) 肌肉组织中的四溴二苯醚 (2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, BDE-47) 残留监测中，结果发现 BDE-47 的检测限低至皮克 (Picogram, pg) 级别，与常见同系物间的交叉反应率低于 10%，表明 BAS-IPCR 技术具有高灵敏和高特异的优点。孙瑞艳<sup>[34]</sup>利用 BAS-IPCR 检测生肉、鸡蛋等高蛋白类食品中 4 种常见的邻苯二甲酸酯类物质，研究表明该方法在 15 种实际样品的检测中表现出良好的重复性和稳定性，灵敏度较传统 ELISA 提高了 5-8 倍，检测时长少于 5 h。不过，BAS-IPCR 繁琐的步骤导致了较长的检测时间。Sun 等<sup>[35]</sup>利用金纳米颗粒 (Gold Nanoparticles, GNP) 改进的免疫 PCR (GNP-BAS-IPCR)，检测食品中邻苯二甲酸二乙酯 (Diethyl Phthalate, DEP)，利用抗体-DNA 双标记的 GNP 探针的特异性，成功将交叉反应率降低至 5%，与 ELISA 相比，灵敏度大幅提升，且避免了制备抗体-DNA 复合物的复杂过程，大幅度缩短了检测时间。不过，大多数 BAS-IPCR 涉及抗体-DNA 复合物的制备，复杂的共价偶联化学方法，限制了 IPCR 的应用范围。

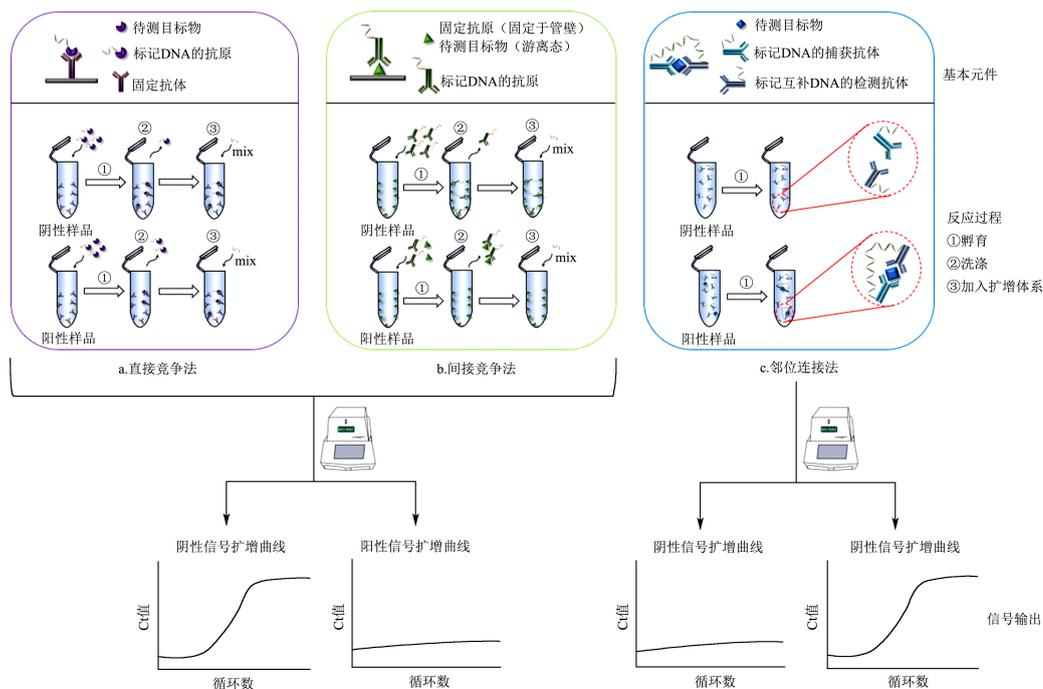


图 1 免疫-核酸扩增技术原理图

Fig.1 Schematic diagram of immuno-nucleic acid amplification technology

1.1.2 重组噬菌体介导的免疫PCR

重组噬菌体展示技术 (Phage Display Technology, PD) 又称纳米抗体技术, 是将多肽对应的 DNA 序列插入噬菌体的适当位置, 伴随噬菌体外壳蛋白的表达, 外源蛋白同时在噬菌体表面展示。因重组噬菌体表面具有不同的抗原结合域, PD 技术在提高表位结合效率和稳定性等方面展现优势<sup>[36,37]</sup>。利用重组噬菌体可以替代抗体和标记物共价偶联的繁琐步骤<sup>[38]</sup>, 避免共价偶联或化学交联剂带来的负面影响<sup>[39]</sup>, 使其成为取代抗体-DNA 偶联物的理想材料, 已成为小分子危害物的高效识别元件<sup>[40]</sup>。目前, PD-IPCR 主要应用于赭曲霉毒素 (Ochratoxin, OTA)<sup>[41-43]</sup>、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN)<sup>[44]</sup>等真菌毒素的检测 (表 1)。

PD-IPCR 在识别真菌毒素时, 通常会使用标准品作为抗原, 易引起重现性差、环境污染等问题。抗独特型纳米抗体重复性好、安全性高, 被科学家们视为有潜力的替代方案。宁振强<sup>[45]</sup>以模拟抗原噬菌体 A9 为识别元件, 建立 PD-RT-IPCR 检测面粉和米粉中桔霉素 (Citrinin, CIT), 结果与超高效液相色谱联用质谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS) 并无明显差异, 灵敏度与传统 phage-ELISA 相近, 文库中高灵敏纳米抗体的筛选效率有待解决。Huang 等<sup>[46]</sup>以抗独特型纳米抗体 X27 作为 CIT 的模拟抗原, 建立实时免疫 PCR, 检测面粉和米粉中的 CIT, 该方法线性检测范围比 phage-ELISA 扩大 10

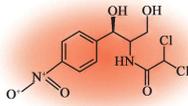
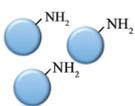
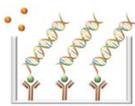
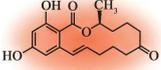
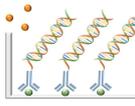
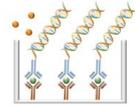
倍, 对常见的霉菌毒素无交叉反应, 准确性和特异性提升明显, 同时纳米抗体作为小分子危害物的竞争抗原又能有效降低毒素抗原合成带来的污染风险<sup>[47]</sup>。

1.1.3 基于生物条形码的免疫PCR

2003 年, Nam 等<sup>[48]</sup>首次提出生物条形码 (Bio-barcode, BB) 检测技术, 是将大量序列相同的寡核苷酸作为探针, 通过化学键固定在纳米颗粒表面形成复合物, 以此代替目标物输出检测信号, 相比 BAS-IPCR, 其检测灵敏度明显提高。BB-IPCR 存在两种功能化的纳米粒子, 即磁性纳米颗粒 (Magnetite Microparticles, MMPs) 和胶体金纳米粒子 (Au Nanoparticles, AuNPs), 前者分离目标物, 后者捕获目标物, 两者共同完成对目标分子的富集。霍冰洋<sup>[49]</sup>利用 BB-qRT-IPCR 检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B (Staphylococcal Enterotoxin B, SEB), 制备了抗 SEB 单克隆抗体-MMPs 和羊抗 SEB 多克隆抗体-AuNPs-DNA 生物条形码两种金属纳米探针, 前者可在液相环境中快速捕获待测样品中的 SEB, 后者可通过核酸扩增放大信号, 实现新鲜牛奶、变质牛奶和果汁中的 SEB 检测。该方法的线性检测范围较广, 灵敏度高出 ELISA 2 个数量级, 不过探针制备成本较高, 稳定性有待提升。Li 等<sup>[50]</sup>利用 AuNPs-ZEN 单克隆抗体和生物条形码, 检出了玉米和小麦中的 8 个低浓度水平 ZEN 污染的阳性样品, 但特异性欠佳, 对  $\alpha$ -ZEN 和  $\beta$ -ZEN 这两类衍生物的交叉反应率高于 10%, 精准度需要进一步提高。

表 1 免疫PCR检测流程示意表

Table 1 Schematic table of immuno PCR detection process

小分子危害物	固定载体	结合方式	结果检测	参考文献
a. 氯霉素 	氨基化磁珠 	直接竞争法 	荧光检测 	[27]
b. 玉米赤霉烯酮 	PCR 管 	间接竞争法 	荧光检测 	[44]
c. 金黄色葡萄球菌肠毒素 	硝化纤维素膜 	双抗夹心竞争法 	荧光检测 	[64]



● 固有抗原    ● 待测抗原    ● 带DNA标记的抗原    Y 捕获抗体    Y 检测抗体

寡核苷酸功能化的 AuNPs 不仅具有良好的生物分析能力<sup>[51]</sup>, 还能改良 IPCR 的检测性能, 增强报告 DNA 的信号放大效果, 同时表现出复杂检测环境的高适应性。Guan 等<sup>[52]</sup>设计双功能化的 AuNPs 探针, 建立生物条码免疫 PCR, 能在 1.5~3.5 h 内完成大豆、玉米和油菜中草甘膦 (Glyphosate, GLYP) 含量检测, 灵敏度比 ELISA 提高了 7 个数量级, 比荧光免疫层析 (Fluorescent Immunoassay, FIA) 提高了 4 个数量级, 操作简便, 成本低廉。

## 1.2 多重免疫PCR

研究表明, 小分子同系物同时存在于同一食品基质中的可能性极高, 如金黄色葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcus Aureus Enterotoxin, SE)、肉毒神经毒素 (Botulinum Neurotoxin, BoNT) 等, 前者的 A 型、B 型毒素通常同时出现<sup>[53]</sup>, 后者的同系物多且序列同源性高。BAS-IPCR 检测单一目标时, 一些同系物或者化学结构类似物极易与抗体发生非特异性吸附, 导致假阳性结果。为实现食品中多个目标小分子危害物的高效、灵敏检出, 多重免疫 PCR 技术应运而生, 它利用多条引物和多个标记核酸, 可通过扩增不同基因片段实现多个目标小分子危害物的高通量检测。Rajkovic 等<sup>[54]</sup>采用多重免疫 PCR 检测脱脂牛奶和半脱脂牛奶中残留的 A 型和 B 型 BoNT, 结果表明该方法可以满足不同食品基质中同类目标物的联合检测需求。另外, 研究发现两类 BoNT 毒素在半脱脂牛奶中的检出限优于脱脂牛奶, 推断出脂肪含量是影响抗原抗体结合的关键因素。

谷物在贮存和加工环节中, 霉菌易产生多种有毒的次级代谢物质, 如黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFT) 和 ZEN 等, 多目标同步检测尤其重要<sup>[55]</sup>。Ren 等<sup>[56]</sup>设计了特异性识别 AFT 和 ZEN 的纳米抗体, 建立了同时检测谷物及其副产品中 AFT 和 ZEN 的 PD-RT-IPCR 方法。结果显示, 小麦、玉米等谷物中的 AFT 和 ZEN 检测限低至纳克 (Nanogram, ng) 水平, PD-RT-IPCR 的灵敏度高于已报道的免疫色谱分析<sup>[57]</sup>, 与金标准高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 方法结果高度吻合, 准确度和可靠性良好。不过, 多重免疫 PCR 仍是通过制备抗体-DNA 标记复合物来实现目标物的检测, 步骤复杂费时, 且会出现非特异性结合<sup>[58]</sup>, 检测能力有待提升。

## 1.3 实时荧光定量免疫PCR (qRT-IPCR)

IPCR 多通过凝胶电泳分析扩增产物, 繁琐耗时, 且定量待测物浓度或含量存在困难, 多样品检测还易造成交叉污染。Amy 等<sup>[59]</sup>将实时荧光定量分析技术 (Quantitative real-time, qRT) 引入 IPCR, 建立 qRT-IPCR 方法, 利用荧光标记实时监测每个扩增循环的荧光信号, 建立循环阈值 (Cycle threshold, Ct) 与待测物浓度的标准曲线, 实现定量分析。整个反应过程在密闭的 PCR 管中进行, 简化操作流程, 解决了开盖带来的污染问题, 结果读取更加直观可靠<sup>[60]</sup>。

特异性抗体的挖掘有助于提升 qRT-IPCR 的检测能力。Mondal 等<sup>[61]</sup>建立的 qRT-IPCR 方法, 利用禽类抗体 (IgY) 对金黄色葡萄球菌肠毒素蛋白 A 无固有亲和力的特性<sup>[62]</sup>, 特异性地检出牛奶样品中低浓度的 SEB (表 1), 虽然实现了 A 型、B 型毒素的有效区分, 但仍面临其它类型肠毒素带来的假阳性干扰。Panneerseelan 等<sup>[63]</sup>将免疫磁珠应用到 qRT-IPCR 方法中, 检测柠檬奶油派、金枪鱼沙拉和火鸡肉等熟食中的 SE 残留, 检测限低至 7.5 pg/mL。Kwon 等<sup>[64]</sup>建立的夹心法 qRT-IPCR, 实现了巴氏杀菌奶和三明治中新型肠毒素 SEH 的特异性检测。不过, 当待检样品被超高温加热后, 上述两种 qRT-IPCR 方法灵敏度会显著降低, 这与蛋白变性后的免疫识别效率相关。此外, 抗体易受样本复杂基质干扰, 给 qRT-IPCR 检测结果准确性带来影响。Babu 等<sup>[65]</sup>利用 qRT-IPCR 检测乳制品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 时性能较好, 面对复杂基质中过量的 AFB<sub>1</sub> 时仍存在困难, 前处理环节的富集效率和高剂量残留引发的钩状效应<sup>[66]</sup>是主要制约因素。qRT-IPCR 集成了免疫识别、核酸扩增、产物检测和定量分析等环节, 实现了小分子危害物一体化检测, 但仍需要提高抗体和 DNA 的偶联成功率<sup>[67]</sup>, 拓宽复杂且成本高昂的热循环仪器应用场景<sup>[68]</sup>。

## 2 免疫等温扩增技术

### 2.1 免疫LAMP

免疫环介导等温扩增技术 (Immuno Loop Mediated Isothermal Amplification, ILAMP) 将免疫分析技术和环介导等温扩增技术结合, 其中的免疫反应与 IPCR 相同。在核酸扩增环节, ILAMP 针对靶基因设计了 4~6 条引物, 利用链置换型 DNA 聚合酶在 65 °C 恒温条件下完成核酸信号放大, 无需

热循环过程<sup>[69]</sup>。Pourhassan 等<sup>[70]</sup>介绍了不同类型的 ILAMP 平台, 基于纳米探针的 ILAMP 在蛋白质多重检测方面表现出色, 灵敏度显著提高, 联合微流控装置的 ILAMP 能够实现现场分析, 减少交叉污染。另外, ILAMP 可通过更换免疫识别元件, 与其它分析方法联用, 提高检测性能。

利用 PLA 形成的环状识别分子, ILAMP 在双探针夹心模式下可以获得更高的特异性和灵敏度<sup>[71]</sup>。目标物只被一条探针结合或双探针间距过远, 都不能产生互补序列进而无法进行核酸扩增。Lu 等<sup>[72]</sup>开发了 PLA-ILAMP 传感器(表 2), 通过 AFB<sub>1</sub> 抗体(Antibody, Ab)偶联的 DNA<sub>1</sub>(Ab-DNA<sub>1</sub>)、AFB<sub>1</sub>-BSA 标记的 DNA<sub>2</sub>(AFB<sub>1</sub>-DNA<sub>2</sub>)和发夹 DNA, 诱发邻位效应形成 Omega 样 DNA, 若目标 AFB<sub>1</sub> 存在, 则与 Omega 样 DNA 发生竞争性免疫反应, 进而通过 LAMP 反应放大检测信号。结果显示, PLA-ILAMP 对花生样本 AFB<sub>1</sub> 的检测限达 3.2 pg/mL。然而, 由于小分子结合位点有限, 两个抗体并不能同时识别同一目标物, 导致常规 PLA-ILAMP 难以实现超敏检测。为提升灵敏度, 江学成<sup>[73]</sup>将多个小分子偶联到 BSA 上制备抗原, 建立了基于竞争免疫微球固相 PLA 的 LAMP 方法(表 2), 成功实现了猪肉中莱克多巴胺(Ractopamine, RAC)和克伦特罗(Clenbuterol, CLE)的双重检测。对比间接竞争固相 PLA-LAMP、直接竞争固相 PLA-LAMP、间接竞争 ELISA 和直接竞争 ELISA 等 4 种方法, 发现间接竞争固相 PLA-LAMP 的灵敏度最高, 最低检测限达到 0.001 pmol, 将 ELISA 的灵敏度提升 100 倍, 准确性和重复性均优于直接竞争固相 PLA-LAMP。

ILAMP 还能与噬菌体展示技术联合使用, 实现对有机农药、真菌毒素<sup>[74,75]</sup>等小分子化合物的筛查。Lei 等<sup>[76]</sup>筛选了四种抗独特型纳米噬菌体, 建立了花生中 AFT 的 PD-ILMAP 检测方法(表 2), 并与 PD-ELISA、PD-IPCR 比对, 发现 PD-ILMAP 检出的毒素种类最多, 灵敏度相较于 PD-ELISA、PD-IPCR 方法分别提高 12 倍和 3 倍。不过, PD-ILAMP 与基于小分子偶联物的 ELISA 和 ICA 对比, 灵敏度反而有所降低, 过高的稀释倍数是直接原因, Apollonio 等<sup>[77]</sup>认为高稀释倍数会降低体系灵敏度。PD-ILAMP 方法不需制备繁琐的抗原偶联物和抗体标记物, 满足了检测便捷化、结果可视化的需求。不过, 即便使用同种噬菌体, 应用不同免疫检测原理的 ILAMP 表现略有差异。Hua 等<sup>[78]</sup>利

用肽库中分离出的噬菌体多肽, 开发了两种不同的 ILAMP, 并对白菜、苹果等有机食品中 8 种有机磷农药进行检测, 稳定性和重现性的实验结果表明, 间接竞争噬菌体展示的 ILAMP(表 2)比直接竞争噬菌体展示 ILAMP 更具优势。免疫 LAMP 无需复杂仪器, 其扩增效率、特异性和简便性均优于免疫 PCR, 但仍需要严格的物理空间分区来降低人工操作带来的污染问题。另外, 环引物的加入提高了 ILAMP 的扩增效率, 但引物数量的增加也会增加多目标检测难度。

## 2.2 免疫 RCA

免疫滚环等温扩增技术(Immuno Rolling Circle Amplification, IRCA)利用线性引物和探针杂交形成圆形结构, 在连接酶作用下通过共价连接形成闭环, 23~60 °C 下产生大量与环形探针互补的重复序列, 完成核酸扩增过程<sup>[79]</sup>。RCA 能在靶标上形成闭合的环状序列, 确保产生的信号集中于一点, 保持检测分析多元性。在免疫探针的制备上, IRCA 能利用 PLA、生物条形码和噬菌体展示技术等多种途径提高探针性能, 实现高灵敏、高特异检测。Ebai 等<sup>[80]</sup>设计了能形成环状 DNA 的 PLA 探针, 利用 IRCA 检测微量蛋白, 与 PLA-ILAMP 相比, PLA-IRCA 灵敏度达到 fmol 级别, 检测蛋白的种类更多。

PLA-IRCA 不仅能够检测蛋白类大分子物质, 还能检测食品中的小分子危害物。Tang 等<sup>[81]</sup>建立了基于电化学的 PLA-IRCA 方法用于花生中 AFB<sub>1</sub> 的检测, 灵敏度达 pg 级, 且无需复杂的前处理过程, 操作方便, 适用范围广, 仅需更换对应目标物的抗体即可用于其它小分子危害物的检测。但制备的 AFB<sub>1</sub> 抗体特异性不强, 当样品中存在的 AFB<sub>2</sub> 时, 会对电化学信号造成严重干扰。为解决交叉反应的难题, Zhang 等<sup>[82]</sup>建立了基于生物条形码探针的 IRCA 用于检测燕麦、小米和面粉中的 T-2 毒素(表 3), 特异性实验结果显示, 除 T-2 毒素外, AFB<sub>1</sub>、伏马毒素(Fumonisin, FB)、OTA、ZEN 等四种真菌毒素并未与抗 T-2 抗体发生特异性结合。张祎奇<sup>[83]</sup>制备 VHH 2-21 抗体, 搭建实时免疫多引物滚环扩增体系(表 3), 对市售的玉米、小麦和大米样品中 OTA 展开检测, 检出限范围在 5~7 pg/mL 之间。IRCA 采用环形探针可实现单个目标分子的特异性检测, 但仍需过滤未成环探针或游离核酸序列产生的干扰信号, 固相 IRCA 则可在一定程度上减弱背景信号, 但受限于载体的固定效率。

表 2 免疫LAMP检测流程示意图

Table 2 Schematic table of immuno LAMP detection process

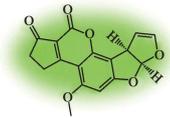
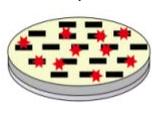
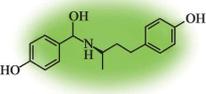
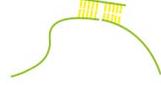
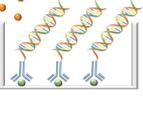
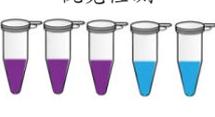
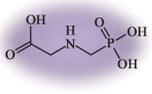
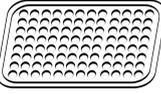
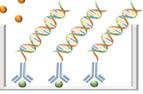
小分子危害物	固定载体	结合方式	结果展示	参考文献
a. 黄曲霉毒素 B1 	发卡 DNA 	间接竞争法 	电化学检测 	[72]
b. 莱克多巴胺 	短链寡核苷酸 	直接竞争法 	荧光检测 	[73]
c. 黄曲霉毒素 G1 	PCR 管 	间接竞争法 	视觉检测 	[76]
d. 草甘膦 	微量滴定板 	间接竞争法 	荧光检测 	[78]



表 3 免疫RCA检测流程示意图

Table 3 Schematic table of immuno RCA detection process

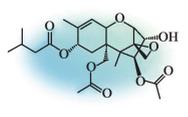
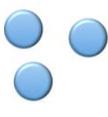
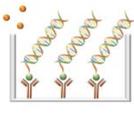
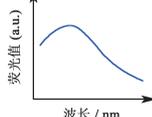
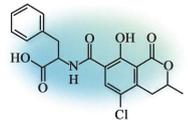
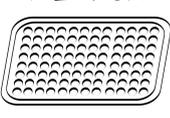
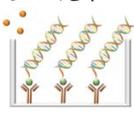
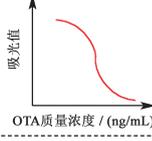
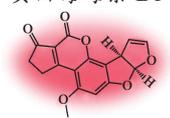
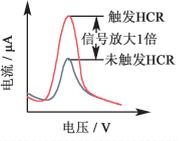
小分子危害物	固定载体	结合方式	结果展示	参考文献
a. 镰刀霉菌毒素 T-2 	磁性微粒 	直接竞争法 	荧光检测 	[82]
b. 赭曲霉毒素 A 	微量滴定板 	直接竞争法 	色度法检测 	[83]



表 4 免疫HCR检测流程示意图

Table 4 Schematic table of immuno HCR detection process

小分子危害物	固定载体	结合方式	结果展示	参考文献
黄曲霉毒素 B1 	碳纳米管 	直接竞争法 	电化学检测 	[87]



### 2.3 免疫HCR

免疫杂交链式反应 (Immuno Hybridization Chain Reaction, IHCR) 是一种无需酶参与反应的免疫等温扩增技术<sup>[84]</sup>, 其核酸扩增反应以特定的单链 DNA 为引物, 促使两种稳定共存的发卡探针在恒温条件下发生杂交反应并获得信号<sup>[85]</sup>。IHCR 方法结构灵活, 不依赖聚合酶, 具备超高灵敏度, 比 ILAMP 更能实现目标分子的高效扩增。IHCR 方法除了应用在大分子<sup>[86]</sup>检测领域, 还可与基于纳米抗体的免疫传感器结合, 捕获小分子目标物。Liu 等<sup>[87]</sup>筛选了灵敏度高的纳米抗体作为识别元件, 开发出检测玉米中 AFB<sub>1</sub> 的 IHCR 传感器 (表 4), 并通过比对实验验证了 IHCR 的信号放大效果。研究发现, 具备成对发卡探针的 IHCR 体系电流响应信号强度比缺少发卡探针的体系高出一倍, 说明纳米抗体探针能以更大密度结合在传感器表面, 进而产生更多的连接 DNA, 输出更强信号, 提高检测的灵敏度。该传感器并未与脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON)、FB 等其他四种真菌毒素发生交叉反应, 其检测范围和检测限均优于电化学发光和石墨烯量子点技术, 展示出良好的稳定性和可靠性, 但并不适用于干燥样品和高油样品的检测。

### 2.4 免疫SDA

免疫链置换扩增技术 (Immuno Strand Displacement Amplification, ISDA) 借助特定限制性内切酶定位目的基因的特异性位点, 切开后开始延伸、合成、替换互补链, 被替换的互补链与引物结合, 在缺失 5' 端外切酶活性的 DNA 聚合酶作用下延伸形成双链, 反复循环直至完成检测。ISDA 无需设计复杂引物即可避免非特异性扩增, 特异性与 ILAMP 相当, 同时兼具低成本、高效率、易实现自动化等多项优势。相比于其它免疫等温扩增技术, ISDA 扩增效率易受扩增子长度影响, 过短的桥联寡核苷酸不能形成稳定的全长扩增子, 过长的扩增子序列会诱导探针自杂交而造成链位移不足<sup>[88]</sup>。利用筛选得到长度合适的扩增子, ISDA 在检测沙丁胺醇 (Salbutamol, SAL) 时显著提高了灵敏度, 其最低检测限达到 0.65 fg/mL, 而特异性实验中并未获取到莱克多巴胺、克伦特罗等常见瘦肉精的检测信号, 展现出良好的检测性能, 为食品质控领域小分子危害物检测提供了新思路。

### 2.5 免疫RPA

免疫重组酶聚合酶扩增技术 (Immuno Recombinase Polymerase Amplification, IRPA) 依赖重组酶、单链 DNA 结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶, 可在 37 °C 等温条件下、5~10 min 内实现微量核酸的快速扩增。重组酶与引物结合, 形成的复合物结合到模板链上的相应位点, 在链置换 DNA 聚合酶催化下形成双链, 而单链结合蛋白结合游离单链 DNA 并保持其稳定性。不同于其他免疫等温扩增技术, IRPA 的核酸扩增温度与免疫反应温度均为 37 °C, 这不仅能有效解决 ILAMP 反应体系温度不兼容引起的低效问题, 还减弱了反应温度变化带来的 IRCA 效率影响。目前, IRPA 在食品安全领域的研究尚处于起步阶段, 只有 Ivanov 等<sup>[89]</sup>利用双夹心免疫法辅助 RPA 检测肌钙蛋白的报道, 相较 IPCR, 灵敏度提高 3 个数量级, 分析时间大大缩短。IRPA 技术不仅在灵敏度和检测时间上具备显著优势, 还展现出十分突出的适用性与实用性。理论上, 适用于蛋白大分子检测的 IRPA 方法, 也能用于食品小分子危害物的检测。未来对 IRPA 的技术改良, 可以拓展其应用范围, 更好地满足食品中痕量小分子危害物检测的时代需求。

## 3 总结与展望

食品安全问题备受重视, 监测食品中小分子危害物的残留情况, 对维护人民群众健康意义重大。食品样品基质复杂、小分子危害物种类多且污染方式多样是当前检测面临的突出问题。免疫-核酸扩增技术的快速发展为食品中痕量小分子危害物检测提供了新策略, 为药物残留、生物毒素以及非法添加物的检测提供了多样化的解决方案。免疫-核酸扩增技术兼具双重放大效应, 极大提高了小分子危害物检测的敏感性、特异性和实用性 (表 5), 经改良革新, 未来将更好地解决待测目标物与同系物间的交叉反应、温度变化带来的复合物连接效率低、假阳性或假阴性干扰结果等问题, 提升技术的检测能力, 简化检测流程, 缩短检测时间。作为新型检测技术, 免疫-核酸扩增技术已逐渐成为更适合现场快检的有力工具, 为促进食品安全生产和市场监管有序化、有量化、有质化提供了更高效的解决方案。

表 5 检测食品中小分子危害物的免疫-核酸扩增技术

Table 5 Immuno-nucleic acid amplification techniques for detecting small and medium-sized molecular hazards in food

检测技术	适用样品	检出种类	检出限	交叉反应	参考文献	
基于生物素-链霉亲和素的实时免疫 PCR	饮料	邻苯二甲酸二甲酯	1.98 pg/L	—	[28]	
	梨、萝卜、烧烤食品	苯并芘、茚并芘、聚苯等	2.85 pg/L	<11%	[31]	
	海鱼类	四溴联苯醚、三溴联苯醚、二溴联苯醚等	2.96 pg/L	<6.12%	[33]	
	生肉、鸡蛋、食用油	邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯等	1.98~4.85 pg/L	<10%	[34]	
实时荧光定量免疫 PCR	牛奶	氯霉素、四环素等	1.38 pg/mL	较小或无	[26]	
	牛奶	葡萄球菌肠毒素 B、A、C、G	1 pg/mL	0	[61]	
基于磁珠的实时定量免疫 PCR	牛奶	氯霉素	8 ng/L	—	[27]	
	金枪鱼沙拉、火鸡肉、奶油派	葡萄球菌肠毒素 A、B	7.5 fg/mL	—	[63]	
基于金纳米颗粒的实时定量免疫 PCR	饮料、肉及肉制品、奶制品	邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丙酯等	1.06 pg/L	<5%	[35]	
IgY 免疫球蛋白介导的免疫 PCR	原料乳	葡萄球菌肠毒素 A、E	~10 pg/mL	轻微	[62]	
免疫 PCR	基于 DNA 探针的实时定量免疫 PCR	牛奶、三明治	葡萄球菌肠毒素 H 及其它典型肠毒素	4.5 pg/mL	0	[64]
噬菌体展示技术介导的免疫 PCR	玉米、小麦、大米	赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素、伏马菌素等	4.17 pg/mL	忽略不计	[41]	
	玉米、小麦、大米	赭曲霉毒素 A、B	3.7 pg/L	<3.5%	[42]	
	玉米、小麦、大米	玉米赤霉烯酮	6.5 pg/mL	—	[43]	
	米粉、面粉	桔霉素、黄曲霉毒素 B1、赭曲霉毒素 A 等	0.46 ng/mL	<0.1%	[44]	
	米粉、面粉	桔霉素、玉米赤霉烯酮等常见霉菌毒素	0.08 ng/mL	<0.1%	[45]	
	玉米、大米、花生	黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮	0.03~0.09 ng/mL	—	[56]	
基于生物条形码的免疫 PCR	牛奶、果汁等	葡萄球菌肠毒素 B	0.269 pg/mL	—	[49]	
	玉米、小麦	玉米赤霉烯酮	0.056~152.12 g	<13.2%	[50]	
基于双功能化纳米探针的免疫 PCR	大豆、玉米	草甘膦	4.5 pg/g	0.02%~2.36%	[52]	
基于 PLA 原理的免疫 LAMP 传感器	花生	黄曲霉毒素 B1	3.2 pg/mL	—	[72]	
	花生	黄曲霉毒素 B1	4.8 pg/mL	—	[81]	
基于固相 PLA 的免疫 LAMP	猪肉	莱克多巴胺、克伦特罗	0.01 ng/mL	<0.01%	[73]	
免疫 LAMP	基于竞争性结合噬菌体的免疫 LAMP	大白菜、苹果等有机食品	甲基对硫磷等 23 种有机磷农药	2~128 ng/mL	<0.02%	[78]
	基于噬菌体展示技术的免疫 LAMP	花生	黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2	1.6~3.2 μg/kg	—	[76]
免疫 RCA	基于生物条形码的免疫 RCA	燕麦、小米、面粉	镰刀霉菌毒素 T-2	0.26 pg/mL	—	[82]
	噬菌体展示技术介导的免疫 RCA	玉米、小麦、大米	赭曲霉毒素 A	5~7 pg/mL	—	[83]
免疫 HCR	基于纳米体的免疫 HCR 电化学传感器	玉米	黄曲霉毒素 B1	68 fg/mL	—	[87]

## 参考文献

- [1] 刘迪,韩莉,江丰,等.液相色谱-串联质谱法高通量定性筛查畜禽肉中221种兽药残留[J].现代食品科技,2023,39(5): 290-303.
- [2] 常利民,张洋,汪春明,等.鸡蛋、鸡肉及奶粉中22种有机氯农药残留的测定[J].食品与生物技术学报,2022,41(5): 98-105.
- [3] 潘晖,许银,王小红,等.磁分离结合qPCR快速检测酱卤肉中的沙门氏菌[J].现代食品科技,2023,39(9):330-336.
- [4] 林健聪,梁科,柳彬,等.基于吡啶酯-磁微球的自动化学发光免疫法检测赭曲霉毒素A[J].现代食品科技,2023, 39(3):313-322.
- [5] 袁利杰,赵光升,张培毅,等.UPLC-MS/MS测定小麦粉及其制品与小麦粉添加剂中新型非法添加物乙酰氧肟酸[J].现代食品科技,2024,40(1):281-287.
- [6] FENG H, LIU J P, ALI Q, et al. Responsive small-molecule luminescence probes for sulfite/bisulfite detection in food samples [J]. *Trac, Trends in Analytical Chemistry (Regular Ed.)*, 2021, 136: 116199.
- [7] 刘宇星,易守福,徐文泱,等.气相色谱——三重四极杆质谱法测定食用植物油中57种有机污染物[J].食品与机械,2023,39(6):65-74.
- [8] 杨韵,曹阳,李菁,等.液相色谱——串联质谱法测定蜂蜜中4种喹诺酮类药物残留量的不确定度评定[J].食品与机械,2024,40(3):75-81.
- [9] 李倩,汤凯洁,冀坤霞,等.固相萃取-高效液相色谱法同时测定水产品中15种磺胺类药物残留[J].食品与生物技术学报,2024,43(1):36-47.
- [10] 赵赟,蔡伊娜,张存政,等.基于比色和荧光双信号检测戊唑醇的免疫层析试纸条的构建[J].食品与生物技术学报,2022,41(1):36-43.
- [11] ZHOU T, JI W, FAN H, et al. A metasurface plasmonic analysis platform combined with gold nanoparticles for ultrasensitive quantitative detection of small molecules [J]. *Biosensors-Basel*, 2023, 13(7): 681-692.
- [12] 毛家洛,韩奕奕,王震,等.啮虫脘分子印迹荧光传感器的构建及检测研究[J].食品与生物技术学报,2022,41(12): 40-47.
- [13] SANG P, HU Z, CHENG Y, et al. Nucleic acid amplification techniques in immunoassay: an integrated approach with hybrid performance [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(21): 5783-5797.
- [14] WU Y, WU M, LIU C, et al. Colloidal gold immunochromatographic test strips for broad-spectrum detection of Salmonella [J]. *Food Control*, 2021, 126: 108052.
- [15] 张小雨,李木子,秦立得,等.基于单抗的免疫分析方法及其在兽药残留检测中的应用[J].中国动物检疫,2022, 39(6):100-106.
- [16] 成书艳.小分子化合物邻位连接检测技术研究[D].杭州:浙江大学,2012.
- [17] NIESSEN L, BECHTNER J, FODIL S, et al. LAMP-based group specific detection of aflatoxin producers within *Aspergillus section Flavi* in food raw materials, spices, and dried fruit using neutral red for visible-light signal detection [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 266: 241-250.
- [18] NURUL N A B, FOO P C, ISMAIL N, et al. Probe-specific loop-mediated isothermal amplification magnetosensor assay for rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 44: 63-68.
- [19] SANO T, SMITH C L, CANTOR C R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates [J]. *Science*, 1992, 258(5079): 120-122.
- [20] RYAZANTSEV D Y, VORONINA D V, ZAVRIEV S K. Immuno-PCR: achievements and perspectives [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(13): 1754-1770.
- [21] 周振杰.PCR技术在食品微生物检测中的应用[J].现代食品,2022,28(11):174-176.
- [22] DAHIYA B, MEHTA P K. Detection of potential biomarkers associated with outrageous diseases and environmental pollutants by nanoparticle-based immuno-PCR assays [J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 587: 113444.
- [23] 袁莹.PCR技术在食品微生物检测中的应用[J].食品安全导刊,2019,3:110.
- [24] 王敏思,柳双,朱文博,等.生物素-亲和素增敏抑制型SPR等离子共振传感器检测牛奶中链霉素[J].中国食品学报, 2021,21(10):262-268.
- [25] CHAO H Y, WANG Y C, TANG S S, et al. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum neurotoxin type A* [J]. *Toxicon*, 2004, 43(1): 27-34.
- [26] 刘京.建立免疫PCR方法检测牛奶中氯霉素的残留[D].南昌:南昌大学,2013.
- [27] TAO X, HE Z, CAO X, et al. Development of a highly sensitive real-time immuno-PCR for the measurement of chloramphenicol in milk based on magnetic bead capturing [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(23): 9340-9347.
- [28] SUN R, ZHUANG H. Biotin-streptavidin-amplified real-time immune-PCR assay for detecting dimethyl phthalate in beverage and drinking water samples [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(4): 1261-1265.
- [29] 鞠香,陈克云,李海霞,等.同位素稀释-气相色谱-串联质谱法同时测定肉制品中16种欧盟优控多环芳烃[J].食品安全质量检测学报,2023,14(23):179-187.
- [30] TSUTSUMI T, ADACHI R, MATSUDA R, et al. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked

- foods in Japan [J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(4): 692-701.
- [31] MA Z, ZHUANG H. A highly sensitive real-time immuno-PCR assay for detecting benzo[a]pyrene in food samples by application of biotin-streptavidin system [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(3): 862-872.
- [32] ZHAO J, SUN L, MA L, et al. Investigation of benzo(a)pyrene contamination in edible vegetable oil sold in Henan Province from 2017 to 2019 [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2020, 49: 759-762.
- [33] MA Z, ZHUANG H. Biotin-streptavidin system-based real-time immuno-polymerase chain reaction for sensitive detection of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in marine fish [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 1012-1015.
- [34] 孙瑞艳.痕量邻苯二甲酸酯类塑化剂的新型免疫分析方法的研究[D].上海:上海交通大学,2016.
- [35] SUN R, ZHUANG H. An ultrasensitive gold nanoparticles improved real-time immuno-PCR assay for detecting diethyl phthalate in foodstuff samples [J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 480: 49-57.
- [36] SAFARZADEH K P, NASERI A, MIRAREFIN S M J, et al. Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy [J]. *Biomarker Research*, 2022, 10(1): 24-42.
- [37] BAO C, GAO Q, LI L, et al. The application of nanobody in CAR-T therapy [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 238.
- [38] 任显凤,张奇,李培武,等.噬菌体免疫PCR技术及其在真菌毒素检测中的应用[J].*农产品质量与安全*,2017,1:15-20.
- [39] LIND K, KUBISTA M. Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2005, 304(1-2): 107-116.
- [40] 何婷.黄曲霉毒素纳米抗体研制及其免疫分析技术研究[D].北京:中国农业科学院,2016.
- [41] JI Y, HE Q, XU Y, et al. Phage displayed anti-idiotypic nanobody mediated immuno-PCR for sensitive and environmentally friendly detection of mycotoxin ochratoxin A [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(43): 7824-7831.
- [42] LIU X, XU Y, XIONG Y H, et al. VHH phage-based competitive real-time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochratoxin A in cereal [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(15): 7471-7477.
- [43] SUN Z, WANG X, CHEN Q, et al. Nanobody-alkaline phosphatase fusion protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for one-step detection of ochratoxin A in rice [J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2018, 18(11): 4044.
- [44] WANG X, HE Q, XU Y, et al. Anti-idiotypic VHH phage display-mediated immuno-PCR for ultrasensitive determination of mycotoxin zearalenone in cereals [J]. *Talanta*, 2016, 147: 410-415.
- [45] 宁振强.提升基于抗独特型纳米抗体的桔霉素免疫分析灵敏度的研究[D].南昌:南昌大学,2017.
- [46] HUANG W, TU Z, NING Z, et al. Development of real-time immuno-PCR based on phage displayed an anti-idiotypic nanobody for quantitative determination of citrinin in *monascus* [J]. *Toxins*, 2019, 11(10): 572.
- [47] SHU M, XU Y, LIU X, et al. Anti-idiotypic nanobody-alkaline phosphatase fusion proteins: Development of a one-step competitive enzyme immunoassay for fumonisin B1 detection in cereal [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 924: 53-59.
- [48] NAM J M, THAXTON C S, MIRKIN C A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins [J]. *Science*, 2003, 301(5641): 1884-1886.
- [49] 霍冰洋.基于免疫生物条形码及杂交链式反应高灵敏快速检测牛奶中SEB的研究[D].长春:吉林大学,2018.
- [50] LI M, HONG X, QIU X, et al. Ultrasensitive monitoring strategy of PCR-like levels for zearalenone contamination based DNA barcode [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(11): 4490-4497.
- [51] 关乃瑜.基于AuNPs-寡聚核苷酸探针的草甘膦免疫学检测技术研究[D].长春:吉林大学,2021.
- [52] GUAN N, LI Y, YANG H, et al. Dual-functionalized gold nanoparticles probe based bio-barcode immuno-PCR for the detection of glyphosate [J]. *Food Chemistry*, 2021, 338: 128133.
- [53] FISCHER A, EIFF V C, KUCZIUS T, et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins [J]. *Journal of Molecular Medicine-Imm*, 2007, 85(5): 461-469.
- [54] RAJKOVIC A, MOUALIJ E B, FIKRI Y, et al. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A and B in milk by ELISA and immuno-PCR at higher sensitivity than mouse bio-assay [J]. *Food Analytical Methods*, 2012, 5(3): 319-326.
- [55] 戴海蓉,梁思慧,王春民,等.同时检测食品中多种类真菌毒素的研究进展[J].*中国食品学报*,2022,22(8):398-415.
- [56] REN X, ZHANG Q, WU W, et al. Anti-idiotypic nanobody-phage display-mediated real-time immuno-PCR for sensitive, simultaneous and quantitative detection of total aflatoxins and zearalenone in grains [J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 124912.
- [57] LI X, LI P, ZHANG Q, et al. Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in agro-food [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 426-432.
- [58] TABATABATEI M S, ISLAM R, AHMED M. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1143: 250-266.

- [59] AMY C, JONATHAN S, SUCHETA T, et al. Virus detection and identification using random multiplex (RT)-PCR with 3'-locked random primers [J]. *Virology Journal*, 2007, 4(1): 65.
- [60] 陈清华.PCR及其改进技术在食品安全检测中的应用研究[J].*福建分析测试*,2014,2:23-27.
- [61] MONDAL B, RAMLAL S, SETLEM K, et al. A real-time immunocapture PCR (RT-IPCR) without interference of protein A for convenient detection of staphylococcal enterotoxin B from food and environmental samples [J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70(1): 25-33.
- [62] REDDY P, RAMLAL S, SRIPATHY M H, et al. Development and evaluation of IgY ImmunoCapture PCR ELISA for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A devoid of protein A interference [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2014, 408: 114-122.
- [63] PANNEERSEELAN L, MURIANA P M. An immunomagnetic PCR signal amplification assay for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in foods [J]. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(12): 2538-2546.
- [64] KWON K H, HWANG S Y, PARK Y K, et al. A quantitative real-time immuno-PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin H [J]. *Journal of Food Safety*, 2014, 34(3): 249-256.
- [65] BABU D, MURIANA P M. Sensitive quantification of aflatoxin B1 in animal feeds, corn feed grain, and yellow corn meal using immunomagnetic bead-based recovery and real-time immunoquantitative-PCR [J]. *Toxins*, 2014, 6(12): 3223-3237.
- [66] BABU D, MURIANA P M. Immunomagnetic bead-based recovery and real time quantitative PCR (RT iq-PCR) for sensitive quantification of aflatoxin B1 [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(2): 188-194.
- [67] BHAWNA D, SUMAN S, ANISH K, et al. Detection of mycobacterial CFP-10 (Rv3874) protein in tuberculosis patients by gold nanoparticle-based real-time immuno-PCR [J]. *Future Microbiology*, 2020, 15: 601-612.
- [68] QIU Y, JIANG K, WU J, et al. Ultrasensitive plasmonic photothermal immunomagnetic bioassay using real-time and end-point dual-readout [J]. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 2023, 377: 133110.
- [69] TANG Y, YU X, CHEN H, et al. An immunoassay-based reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of avian influenza H5N1 virus viremia [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 255-261.
- [70] POURHASSAN M M, RAHMATI Y M, AKBARZADEH A, et al. Protein detection through different platforms of immuno-loop-mediated isothermal amplification [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2013, 8(1): 485.
- [71] FREDRIKSSON S, GULLBERG M, JARVIUS J, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(5): 473-477.
- [72] LU M, TANG D. Proximity ligation assay-induced structure-switching hairpin DNA toward development of electrochemical immunosensor [J]. *Electroanalysis (New York, N.Y.)*, 2016, 28(8): 1777-1782.
- [73] 江学成.新型邻位连接技术用于生物分子的高灵敏度检测研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [74] WANG Y, WANG H, LI P, et al. Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(10): 2426-2433.
- [75] HE Q, XU Y, HUANG Y, et al. Phage-displayed peptides that mimic zearalenone and its application in immunoassay [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 1312-1315.
- [76] LEI J, HAN X, TANG X, et al. Development of anti-idiotypic nanobody-phage based immuno-loop-mediated isothermal amplification assay for aflatoxins in peanuts [J]. *Toxins*, 2020, 12(9): 564-576.
- [77] APOLLONIO L G, WHITTALL I R, PIANCA D J, et al. Matrix effect and cross-reactivity of select amphetamine-type substances, designer analogues, and putrefactive amines using the bio-quant direct ELISA presumptive assays for amphetamine and methamphetamine [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2007, 31(4): 208-213.
- [78] HUA X, YIN W, SHI H, et al. Development of phage immuno-loop-mediated isothermal amplification assays for organophosphorus pesticides in agro-products [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(16): 8441-8447.
- [79] ZHOU Y, CALCIANO M, HAMANN S, et al. In Situ Detection of messenger RNA using digoxigenin-labeled oligonucleotides and rolling circle amplification [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2001, 70(3): 281-288.
- [80] EBAL T, SOUZA D O F, LOF L, et al. Analytically sensitive protein detection in microtiter plates by proximity ligation with rolling circle amplification [J]. *Clinical Chemistry*, 2017, 63(9): 1497-1505.
- [81] TANG J, HUANG Y, LIU H, et al. Homogeneous electrochemical immunoassay of aflatoxin B(1) in foodstuff using proximity-hybridization-induced omega-like DNA junctions and exonuclease III-triggered isothermal cycling signal amplification [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(30): 8593-8601.
- [82] ZHANG M, HUO B, YUAN S, et al. Ultrasensitive detection of T-2 toxin in food based on bio-barcode and rolling circle amplification [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1043: 98-106.
- [83] 张伟奇.农产品赭曲霉毒素A核酸扩增检测技术研究[D].

- 北京:中国农业科学院,2020.
- [84] 刘永新,袁旦,陈沁,等.杂交链式反应技术结合纳米材料用于核酸检测的研究进展[J].中国材料进展,2020,39(4): 325-331.
- [85] JONGHOON C, ROUTENBERG K L, YUAN G, et al. Immuno-hybridization chain reaction for enhancing detection of individual cytokine-secreting human peripheral mononuclear cells [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(17): 6890-6895.
- [86] DUAN M, XIAO X, HUANG Y, et al. Immuno-HCR based on contact quenching and fluorescence resonance energy transfer for sensitive and low background detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Food Chemistry, 2021, 334: 127568.
- [87] LIU X, WEN Y, WANG W, et al. Nanobody-based electrochemical competitive immunosensor for the detection of AFB(1) through AFB(1)-HCR as signal amplifier [J]. Microchimica Acta, 2020, 187(6): 352.
- [88] ZHAO L, ZHOU H, SUN T, et al. Complete antigen-bridged DNA strand displacement amplification immuno-PCR assay for ultrasensitive detection of salbutamol [J]. Science of the Total Environment, 2020, 748: 142330.
- [89] IVANOV A V, SAFENKOVA I V, ZHERDEV A V, et al. Recombinase polymerase amplification combined with a magnetic nanoparticle-based immunoassay for fluorometric determination of troponin T [J]. Microchimica Acta, 2019, 186(8): 549.