现代食品检测技术第二部分

第15章 免疫学检测技术

赵杰文 邹小波

江苏大学食品与生物工程学院

第一节 免疫学检测技术原理

- 抗原（**Antigen**）：凡能刺激机体产生抗体和致敏淋巴细胞，并能与之结合引起特异性免疫反应的物质称为抗原。

- 抗体（**antibody**）：抗体是在抗原刺激下产生的，并能与之特异性结合的免疫球蛋白。

- **抗原或抗体检测原理：**借助抗原和抗体在体外特异结合后出现的各种现象，对标本中的抗原或抗体进行定性或定量的检测。

- 抗原或抗体检测的方法：

1. 免疫荧光技术

2. 酶联免疫分析法

3. 放射免疫分析法

第二节 免疫荧光技术在食品检测中的应用

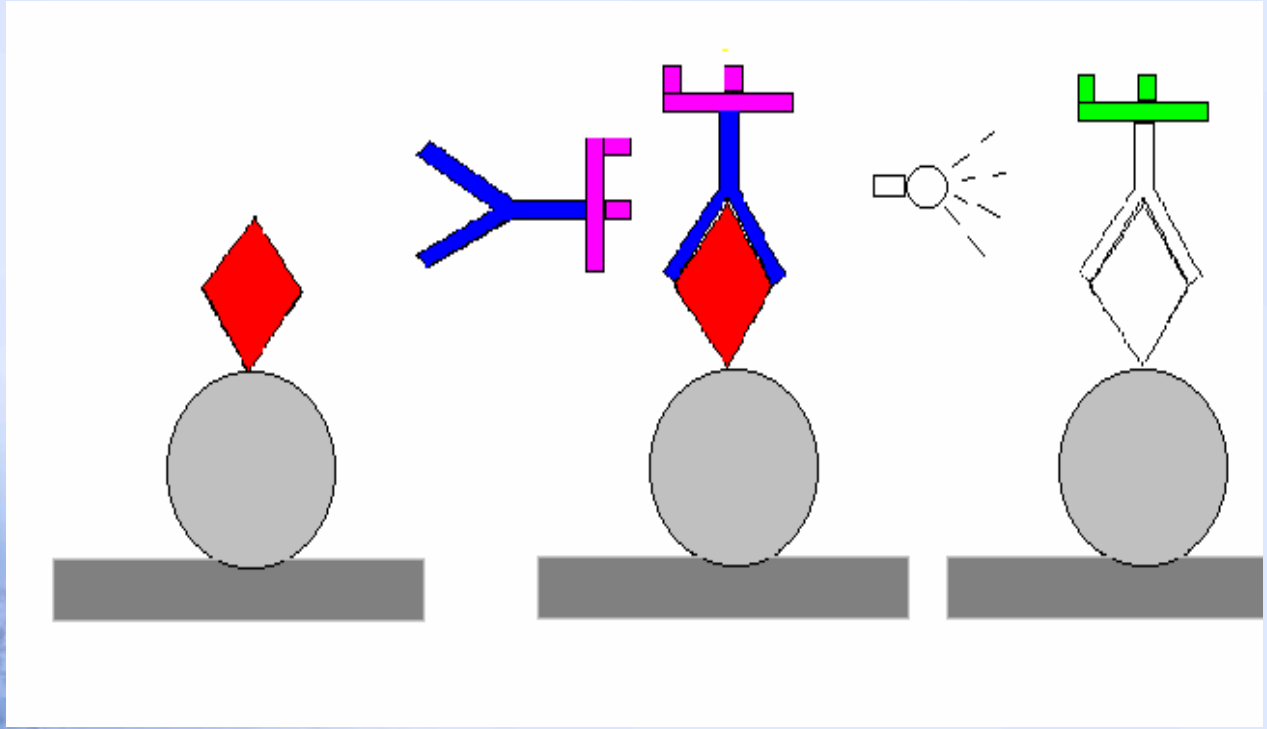
- 一、基本概念：
  - 将试剂抗原或试剂抗体用荧光素进行标记，试剂与标本中相应的抗体或抗原反应后，测定复合物中的荧光素，这种免疫技术，称为免疫荧光素技术。

- 二、抗体的荧光标记
  - （一）荧光抗体的制备
    - 搅拌法
    - 透析法
  - （二）荧光抗体的鉴定
    - 鉴定指标：
    - 效价、荧光素与蛋白质的结合比率

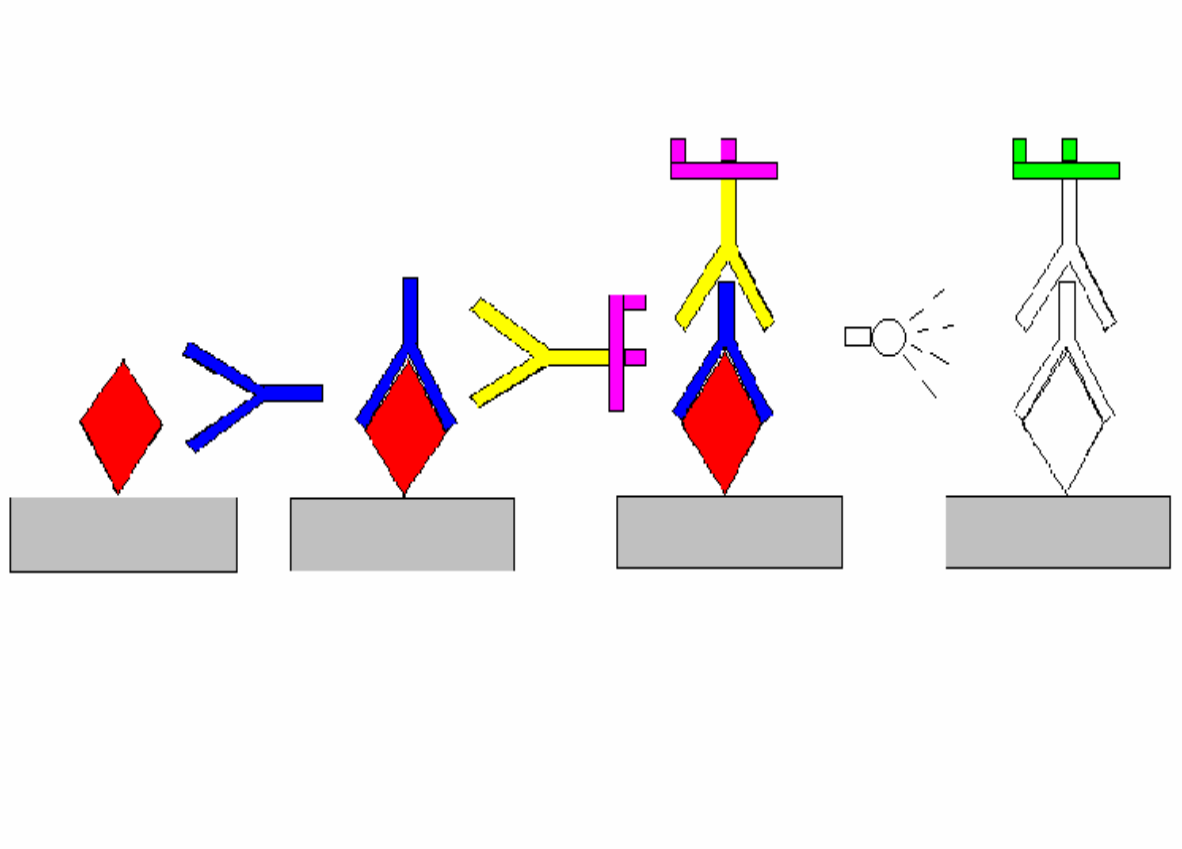
三、标本的制作

- 食品卫生检验中，荧光标记抗体检测标本的制作方法是将样品增菌液涂在载玻片上，涂片应薄而均匀，干燥后用化学方法固定，然后进行荧光染色

- 四、荧光抗体染色方法
  - 直接法



- 间接法



- 五、荧光显微镜检查
  - 染色当天即作镜检
  - 通风良好的暗室内进行
  - 选择好光源或滤光片

- 六、在食品检验中的应用
  - 免疫荧光检测技术已经广泛应用于医药卫生领域，可检测细菌、病毒、寄生虫等，在食品卫生领域也应用的越来越多
  - 例子：沙门氏菌的荧光抗体检验

第三节 免疫酶技术在食品检测中的应用

- 一、基本原理

  - 利用酶催化底物反应的生物放大作用，提高特异性抗原-抗体免疫学反应的检测敏感性的一种标记免疫技术。

二、ELISA的种类

- 直接法测定抗原
- 间接法测定抗体
- 双抗体夹心法测定抗原
- 竞争法测定抗原

- 三、抗体的酶标记
  - 戊二醛法
  - 过碘酸盐氧化法

- 四、酶与底物
  - 是ELISA成败的关键试剂
- 五、固相载体
  - 最常用的是聚苯乙烯
  - ELISA载体的形状主要有三种：小试管、小珠和微量反应板（酶标板 ）

- 六、最适工作浓度的选择
  - 以夹心法测抗原为例
- 七、**ELISA**测定方法
  - 加样
  - 保温
  - 洗涤
  - 比色
  - 结果判定

- 八、酶免疫技术在食品检验中的应用
  - 用于细菌及毒素、真菌及毒素、病毒和寄生虫的检测
  - 用于蛋白质、激素、其他生理活性物质、药物残留、抗生素等的检测
  - 应用实例：以ELISA法检测致泻性大肠埃希氏菌肠毒素为例

第四节 放射免疫技术在食品检测中的应用

- 一、基本原理
  - 放射免疫分析的基本原理是标记抗原Ag*和非标记抗原Ag对特异性抗体Ab的竞争结合反应。它的反应式为：

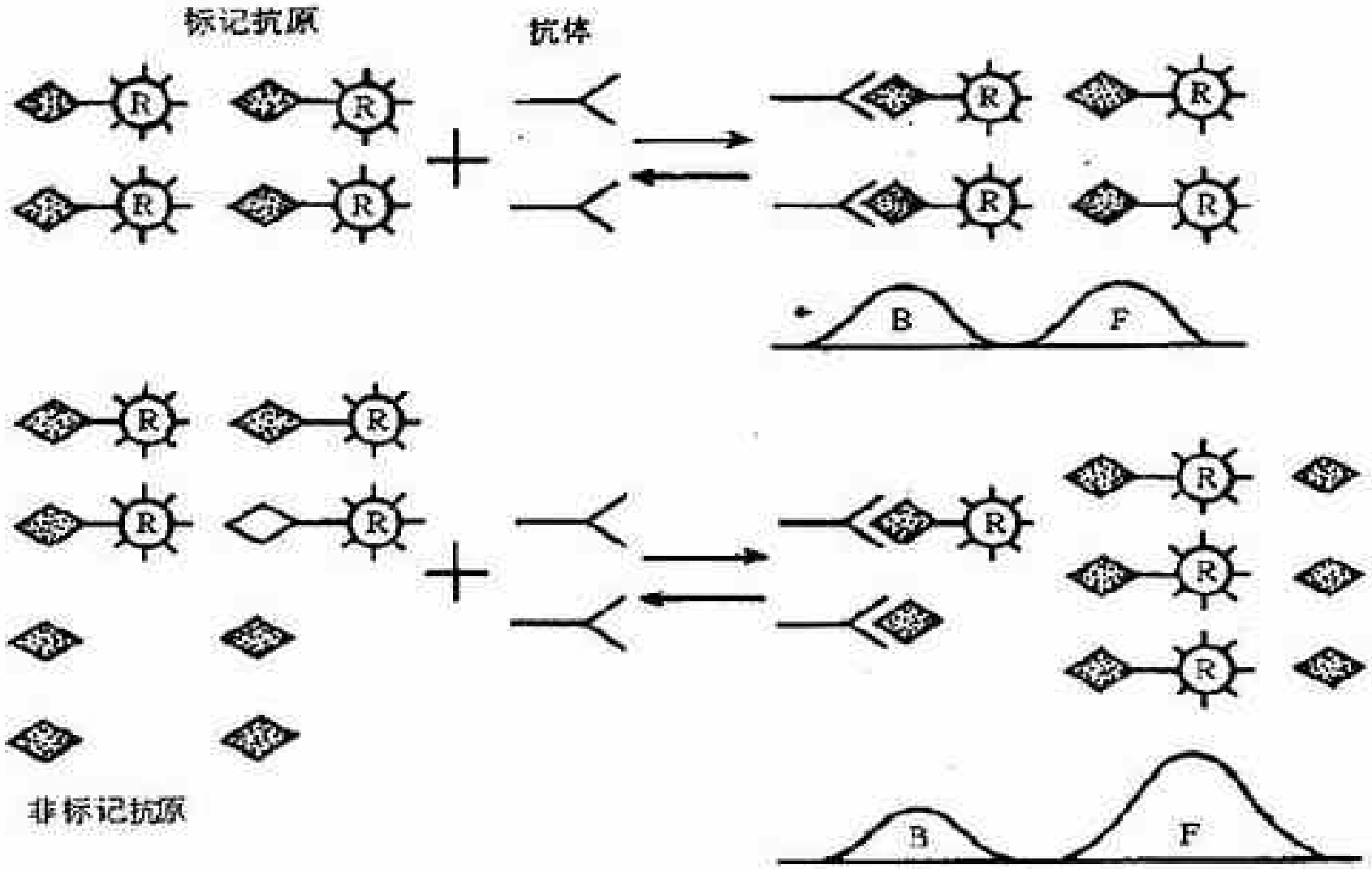
Ag* + Ab = Ag*Ab

+

Ag

‖

AgAb


标记抗原
抗体
R
B
F
非标记抗原

- 二、标记物

常用的核素有两大类

γ射线： ^{131}I、^{125}I、^{57}Cr和^{60}Co

β射线：^{14}C、^{3}H和^{32}P。

使用最广泛的是：^{125}I

①性质活泼、易制备标记物

②对被标记物的免疫活性影响小

③测量方法简便、已推广

④半衰期较长、核素丰度高

- 三、标记方法

^{125}I的标记

原理：取代分子中酪氨酸或酪胺残基及组胺残基上的氢原子

方法：

- 直接标记法

氯胺T法和乳过氧化物酶法

- 间接标记法　联接标记法

- 四、标记物鉴定
  - 放射化学纯度　　单位标记物中结合在被标记物上的放射性占总放射性的百分率。一般要求大于95％。
  - 免疫活性　　标记过程中，被标记物活性损伤程度。B/T％ >80％，　B/T％　↑　　抗原损伤↓。
  - 比放射性　　单位化学量标记物中所含的放射性强度.　常用Ci/g、mCi/mg、Ci/mmol等单位表示。

比放射性↑　方法更灵敏；过高　辐射自损伤大，对标记物免疫活性影响大，储存稳定性差　。

五、放射免疫测定技术的步骤

1. 抗原抗体反应：平衡法或非平衡法
2. 分离结合与游离标记物

沉淀剂沉淀复合物，离心分离。如第二抗体沉淀法、聚乙二醇沉淀法或活性炭吸附法等。要求：分离彻底，迅速；分离试剂和过程不影响反应平衡；操作简便，重复性好且经济。

3. 放射性测定及数据处理

晶体闪烁计数仪（γ射线）或液体闪烁计数仪（ β射线）绘制标准曲线，计算待检抗原浓度。

- 六、放射免疫在食品中的应用
  - 不仅可以检测经食品传播的细菌及毒素、真菌及毒素、病毒和寄生虫，还可测定小分子量和大分子量物质，在食品检验中应用极为广泛
  - 在食品农药残留检测中应用

第五节 单克隆抗体技术在食品检验中的应用

- 一、单克隆抗体的基本概念

  - 通过B细胞杂交瘤技术，获得特异性针对某一种抗原决定簇的细胞克隆，产生均一性的抗体.

- 二、单克隆抗体技术的基本原理

要制备单克隆抗体需先获得能合成专一性抗体的单克隆B淋巴细胞，但这种B淋巴细胞不能在体外生长。而实验发现骨髓瘤细胞可在体外生长繁殖，应用细胞杂交技术使骨髓瘤细胞与免疫的淋巴细胞二者合二为一，得到杂种的骨髓瘤细胞即杂交瘤细胞。

- 三、单克隆抗体技术在食品中的应用

  1970年Sinkovics等人已经报导过产生特异性病毒抗体的淋巴细胞和由病毒引起的肿瘤细胞可以自然地在体内形成杂交瘤分泌特异性抗体。

- 四、单克隆抗体技术在食品中的应用

单克隆抗体在食品检测中的最大优点是特异性强，不易出现假阳性，在食品检验中具有广阔的应用前景。目前，人们已经制备出了各种经食品传播和引起食物中毒的细菌及毒素，真菌毒素，病毒、寄生虫、农药、激素等的单克隆抗体，并建立了检测方法。