

# 呋喃它酮代谢物的可视化免疫亲和凝胶柱检测分析

张冬昊<sup>1,2</sup>, 赵桐桐<sup>1,2</sup>, 魏东<sup>1</sup>, 李佳仪<sup>1</sup>, 何扩<sup>1</sup>

(1. 河北北方学院, 河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室, 河北张家口 075000)

(2. 唐山市食品药品综合检验检测中心, 河北唐山 063000)

**摘要:** 为了建立一种用于检测动物源性食品中呋喃它酮代谢物(AMOZ)的可视化免疫亲和凝胶柱检测方法, 利用对醛基苯甲酸(CPA)对AMOZ进行衍生处理得到衍生物CPAMOZ, 制备CPAMOZ完全抗原, 并通过免疫小鼠获取CPAMOZ多克隆抗体, 使用间接ELISA法对抗体的效价及特异性进行测定。实验采用恒温振荡法将溴化氰活化的琼脂糖凝胶分别与CPAMOZ抗体、HRP抗体偶联制得CPAMOZ抗体胶和HRP抗体胶, 作为亲和凝胶柱的检测层与质控层。建立AMOZ可视化免疫亲和凝胶柱分析方法, 确定了该方法在酶标抗原的稀释倍数为5000、HRP胶稀释20倍、CPAMOZ抗体胶稀释15倍的条件下, 达到最佳工作状态。实验结果表明CPAMOZ多克隆抗体效价为1:64000, IC<sub>50</sub>值为2.19 μg/L, 具有良好的灵敏度及特异性。建立的AMOZ可视化免疫亲和凝胶柱检测方法检测限为4 μg/L, 动物源实际样品中AMOZ的检测限为2 μg/kg。该方法快速便捷, 符合我国高通量筛选食品中AMOZ的要求。

**关键词:** 呋喃它酮; 抗体; 凝胶柱; 特异性

文章编号: 1673-9078(2019)09-304-310

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.040

## An Immunoaffinity Gel Column Assay for Visualizable Detection of Furaltadone Metabolites

ZHANG Dong-hao<sup>1,2</sup>, ZHAO Tong-tong<sup>1,2</sup>, WEI Dong<sup>1</sup>, LI Jia-yi<sup>1</sup>, HE Kuo<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Analysis and Testing of Agricultural Products Food Quality and Safety in Hebei Province, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

(2. Tangshan Food and Drug Comprehensive Inspection and Testing Center, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** To establish a visualizable immunoaffinity gel column detection method for analysis of the furoxone metabolites (AMOZ) in animal-derived foods, derivatization of AMOZ with aldehyde benzoic acid (CPA) was conducted to yield the derivative CPAMOZ for the preparation of AMOZ complete antigen. The CPAMOZ polyclonal antibody was obtained *via* immunization of the mouse, and the titer and specificity of the antibody were determined using an indirect ELISA. CPAMOZ antibody gel and HRP antibody gel were prepared by coupling the cyanogen bromide-activated agarose gel with CPAMOZ antibody and HRP antibody, respectively, as a detection layer and a quality control layer of the affinity gel column. The AMOZ visualized immunoaffinity gel column analysis method was established with the optimal working conditions as: dilution factor 5000, HRP gel dilution 20 times, and CPAMOZ antibody gel dilution 15 times. The experimental results showed that the CPAMOZ polyclonal antibody had a titer of 1:64000 and an IC<sub>50</sub> value of 2.19 μg/L, with good sensitivity and specificity. The detection limit of the established AMOZ visualizable immunogel column method was 4 μg/L, and the detection limit of AMOZ in the actual sample of animal origin was 2 μg/kg. The method is fast and convenient and meets the requirements for high-throughput screening of AMOZ in foods in China.

**Key words:** 5-methylmorpholin-3-amino-2-oxazolone (AMOZ); antibody; gel column; specificity

呋喃它酮, 属于硝基呋喃类, 具有良好的抗菌效

收稿日期: 2018-12-04

基金项目: 河北省科技攻关重点研发项目(16236802D-5); 河北省教育厅科技研发项目(QN206242); 河北省重点研发计划项目(18227148)

作者简介: 张冬昊(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品污染物免疫检测

通讯作者: 何扩(1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品污染物免疫检测

果和药动学特性, 曾普遍作为动物生产中的饲料添加剂和生长促进剂<sup>[1]</sup>。呋喃它酮在进入体内后迅速代谢, 主要代谢物为5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮(AMOZ)<sup>[2]</sup>, 已有文献报道: 在长期的动物实验中发现AMOZ对动物有致癌和致突变的作用<sup>[3]</sup>。由于AMOZ残留对人体健康和安全具有潜在的风险, 可轻易与肌肉组织或蛋白结合, 从而长时间残留于机体并积累。自1995年起, 欧盟就完全禁止在食用动物生产中使用

呋喃它酮。此外,在美国和中国也相继禁止硝基呋喃在动物饲料使用,并规定此类药物在动物源食品中不得检出<sup>[4-6]</sup>。于2003起,全球动物源食品贸易受硝基呋喃残留限制<sup>[7-10]</sup>,从而引起相关检测技术的改进。在监测研究中,分析方法多为分析仪器法。这些仪器方法昂贵、前处理复杂且费时,因而不符合基层现场检测工作的需要。因此,开发一种快速、低成本、灵敏度高的筛选AMOZ残留物的检测方法成为必然趋势。

可视化凝胶柱免疫检测技术是时兴的一种免疫快速检测新技术<sup>[11]</sup>,此技术将抗体固定在溴化氰活化的琼脂糖凝胶上,当样品溶液通过柱子时,待检测物会被结合到柱子上,利用抗原、抗体的特异性结合,然后加入适量底物液通过显色进行测定。该技术在兽药残留检测当中应用最广,国内外已开始对可视化凝胶柱免疫检测技术进行开发并实际应用,具有良好的市场需求和远大的发展前景。与分析仪器法相比,具有成本低、操作易、耗时短等优点,同时满足了基层现场检测工作的要求<sup>[12]</sup>。本研究以 AMOZ 为原料,先将 AMOZ 进行衍生处理制备 CPAMOZ 多克隆抗体,最终建立一种用于检测动物源性食品中 AMOZ 的可视化免疫凝胶柱。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

呋喃它酮(100 mg):北纳创联科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA 200 mg)、卵清白蛋白(OVA 200 mg)、弗氏完全佐剂(10 mL)、弗氏不完全佐剂(10 mL):Sigma 公司;TMB 显色液(500 mL)、辣根过氧化物酶(HRP 100 mg)、HRP 抗体(100  $\mu$ L)、溴化氰活化的琼脂糖凝胶(10 mL):北京索莱宝科技有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(100  $\mu$ L)、 $\beta$ -环糊精(100 g)、过氧化氢脲(50 g)、二甲基亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF 100 mL)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS 100 mg):北京中杉金桥生物技术有限公司;无填料 SPE 小柱(1 mL)、具砂板层析柱、聚乙烯垫片、转接口购自商城北纳创联生物科技有限公司

### 1.2 仪器与设备

磁力搅拌器(型号为 RH-2)购自德国 IKA 公司;酶标仪(Multiskan Mk3 型)购自美国热电公司;无填料 SPE 小柱(1 mL)、具砂板层析柱、聚乙烯垫片、转接口购自商城北纳创联生物科技有限公司;恒温振荡器购自苏州市培英设备有限公司;紫外可见分光光

度计(型号为 U-3900)购自日立高新技术公司;双杰电子天平(型号为 JJ100)购自常熟市双杰测试仪器厂;仪都离心机(型号为 TGL-16A)购自金坛市岸头仪都仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 人工半抗原 CPAMOZ 的合成

称取 25 mg AMOZ、39 mg 对醛基苯甲酸和 1 mL 超纯水于安装有磁力搅拌器装置的烧杯中,然后将 DMF 逐滴加入混合液中,直至完全溶解,避光,室温,反应 3 h 后,有黄色沉淀生成,过滤,保留固体,洗涤冻干,即得到人工半抗原 CPAMOZ。

#### 1.3.2 CPAMOZ 完全抗原的合成及鉴定

取 15 mg CPAMOZ 溶解于 1.5 mL DMF,再分别加入 42 mg EDC 和 17 mg NHS,室温,避光,搅拌反应 6 h,制得 a 液。取 50 mg BSA 溶于 7 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),得 b 液。将 a 液逐滴加入到 b 液中,4  $^{\circ}$ C,避光反应 12 h。将混合液装入透析袋中,用 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4)透析 72 h,每 8 h 换一次透析液,制得免疫抗原 CPAMOZ-BSA。同样的方法将 BSA 换成 OVA,制得包被抗原 CPAMOZ-OVA。-20  $^{\circ}$ C 保存。使用紫外光谱扫描鉴定完全抗原合成效果。

#### 1.3.3 CPAMOZ 多克隆抗体的制备

选取 5 只小鼠进行腹腔注射免疫,每次免疫 150  $\mu$ L,免疫间隔时间为 14 d,共免疫 4 次。第 1 次吸取等量免疫抗原 CPAMOZ-OVA 与弗氏完全佐剂,充分混匀后免疫小鼠,第 2、3 次分别吸取等量弗氏不完全佐剂与免疫抗原 CPAMOZ-OVA,充分混匀后免疫小鼠,最后一次免疫直接使用 CPAMOZ-OVA。7 d 后,眼球取血,保留血清,-20  $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.3.4 多克隆抗体的鉴定

①抗体效价及灵敏度的测定。首先使用间接 ELISA 法测定抗体效价。其次采用棋盘法确定最适抗原包被浓度及抗体最佳工作浓度。最终利用抗原、抗体最优浓度建立间接竞争 ELISA,测定 CPAMOZ 抗体的半抑制浓度 IC<sub>50</sub>值,以 IC<sub>50</sub>评价抗体灵敏度。

②抗体特异性的鉴定。采用间接竞争 ELISA 法分别检测抗体与 AMOZ、CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD、SEM 的交叉反应性,计算交叉反应率。

#### 1.3.5 CPAMOZ 酶标抗原的制备

称取 9.4 mg CPAMOZ、4.6 mg NHS、7.8 mg EDC 充分溶解于 200  $\mu$ L DMF 中,室温,避光,搅拌反应 18 h,5000 r/min 下离心 10 min 后得到的上清液为 A 液。称取 5 mg 辣根过氧化物酶溶解于 2 mL 的 PBS 中为 B 液。取 50  $\mu$ L A 液逐滴加入到 B 液中,4  $^{\circ}$ C 下

反应过夜。将混合液装入透析袋中,用 0.01 mol/L 的 PBS (pH 7.4) 4 °C 下透析 72 h, 每 8 h 换一次透析液, 制得酶标抗原 CPAMOZ-HRP, 4 °C 备用。

### 1.3.6 封闭胶的制备

称取 2.0 g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶于稀盐酸中充分溶胀, 使用偶联缓冲液冲洗三次。加入 20 mL 封闭缓冲液, 振荡反应 3 h, 清洗后封存, 置于 4 °C 下保存备用。

### 1.3.7 抗体胶和 HRP 抗体胶的制备

称取 0.5 g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶于稀盐酸中充分溶胀后用偶联缓冲液冲洗三次, 加入 0.5 mg CPAMOZ 抗体、2 mL 偶联缓冲液, 振荡反应 3 h, 经封闭处理后封存, 置于 4 °C 下保存备用。

同样的方法将 AMOZ 抗体换成 HRP 抗体, 制得 HRP 抗体胶。置于 4 °C 下保存备用。

### 1.3.8 AMOZ 可视化免疫凝胶柱分析方法的建立

#### 1.3.8.1 免疫亲和凝胶检测柱的组装及检测步骤

免疫亲和凝胶检测柱主要由质控层和检测层构成。质控层: 将第一个垫片固定在检测柱最底部, 加入最适浓度的 HRP 抗体胶再固定一个垫片。检测层: 将第三个垫片固定在质控层上方约 5 mm 处, 然后加入最适浓度的抗体胶盖上第四个垫片。

检测步骤如下:

(1) 加样: 将 1 mL 待测液 (最佳浓度酶标抗原与一定浓度 AMOZ 标品的混合液) 由进样口加入到柱内反应 1 min, 使用转接口连接注射器加压将柱内液体匀速打出。

(2) 洗柱: 使用 PBST 与 PBS 交替冲洗柱子 2 次。

(3) 显色: 加入 500  $\mu$ L 底物液显色 1 min 后加压排空, 记录 5 min 内质控层和检测层颜色变化。

#### 1.3.8.2 酶标抗原的优化

在 SPE 小柱最底部放入垫片, 加入 600  $\mu$ L 封闭胶, 使用转接口连接注射器加压将柱内液体打出后再放入一个垫片, 即为封闭胶测定柱。使用磷酸盐缓冲液按照酶标抗原:磷酸盐缓冲液 (体积比) 为 1:2999、1:3999、1:4999、1:5999 的比例进行稀释。在封闭胶测定柱中加入 1 mL 酶标抗原稀释液, 使用转接口连接注射器加压将柱内液体匀速打出, 最终加入 500  $\mu$ L 底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。检测结果为无色时酶标抗原的稀释比例为酶标抗原最佳稀释倍数。

#### 1.3.8.3 凝胶柱检测层的优化

使用封闭胶对抗体胶进行稀释, 稀释倍数依次为

5、10、15、20。在 SPE 小柱中固定稀释抗体胶, 加入 1 mL 酶标抗原稀释液, 将柱内液体匀速打出, 最终加入 500  $\mu$ L 底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。

#### 1.3.8.4 凝胶柱质控层的优化

使用封闭胶对 HRP 抗体胶进行稀释, 稀释倍数依次为 10、20、30、40、50。在 SPE 小柱中固定最佳工作浓度抗体胶, 加入 1 mL 最优工作浓度酶标抗原稀释液, 将柱内液体匀速打出, 最终加入 500  $\mu$ L 底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。

#### 1.3.8.5 AMOZ 可视化免疫凝胶柱检出限的确定

使用组装好的凝胶柱对含 CPAMOZ 的样品液进行检测, 样品液中 CPAMOZ 的浓度分别为 1  $\mu$ g/L、2  $\mu$ g/L、3  $\mu$ g/L、4  $\mu$ g/L、5  $\mu$ g/L。当检测后检测层无色且质控层显蓝色时, CPAMOZ 的最小浓度为检测柱的检出限。

#### 1.3.8.6 AMOZ 可视化免疫凝胶柱特异性的确定

实验选用与 CPAMOZ 结构相似的 7 种药品: AMOZ、CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD、SEM。用可视化免疫凝胶柱对上述标品进行检测以确定 AMOZ 可视化免疫凝胶柱特异性。

#### 1.3.8.7 实际样品的检测

实验选择猪肉、鸡肉、牛肉、鲫鱼作为实际样品进行检测。前处理: 将样品肉粉碎, 取一定浓度 AMOZ 标品加入到均质试样种中, 称取 2.0 g 肉糜放入锥形瓶中, 加入 10 mL 磷酸盐缓冲液, 放入恒温振荡器中在 37 °C 震荡 10 min 后, 4000 r/min, 离心 15 min, 然后用滤纸过滤去除杂质。再加入 6 mL 正己烷进行提取, 放入恒温振荡器中在 37 °C 震荡 10 min 后, 4000 r/min, 离心 15 min, 经过滤去除杂质后用 PBS 定容至 10 mL, 即得到实际样品提取液。

在实际样品中加入一定量的 AMOZ 标品, 使实际样品中 AMOZ 含量依次为 0  $\mu$ g/kg、1  $\mu$ g/kg、2  $\mu$ g/kg、3  $\mu$ g/kg、4  $\mu$ g/kg、5  $\mu$ g/kg。使用可视化免疫亲和凝胶柱检测提取液, 观察凝胶柱的测定结果, 得到实际样品的检测限。

#### 1.3.8.8 凝胶柱稳定性的检测

分别配制 AMOZ 浓度为 0  $\mu$ g/L、1  $\mu$ g/L、2  $\mu$ g/L、3  $\mu$ g/L、4  $\mu$ g/L、5  $\mu$ g/L 的样品液, 随机抽取不同批次凝胶柱进行重复性检测实验, 通过分析测试结果可以判断建立的 AMOZ 免疫亲和凝胶柱检测方法是否具有稳定性。

### 1.3.9 数据统计分析

所有数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 软件统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 完全抗原的鉴定

由图1可知, CPAMOZ的最大吸收峰在291.00 nm处, BSA的最大吸收峰在278.00 nm处, 而完全抗原CPAMOZ-BSA的最大吸收峰在294.00 nm处, 合成物最大吸收峰的漂移, 可初步证明偶联成功。经免疫后测定抗体的效价及特异性后可进一步证明完全抗原的偶联成功。

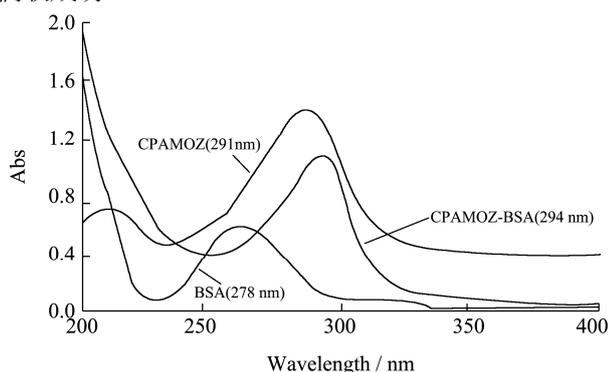


图1 CPAMOZ-BSA 的紫外光谱图

Fig.1 Ultraviolet scanning of CPAMOZ-BSA

### 2.2 CPAMOZ 多克隆抗体的鉴定

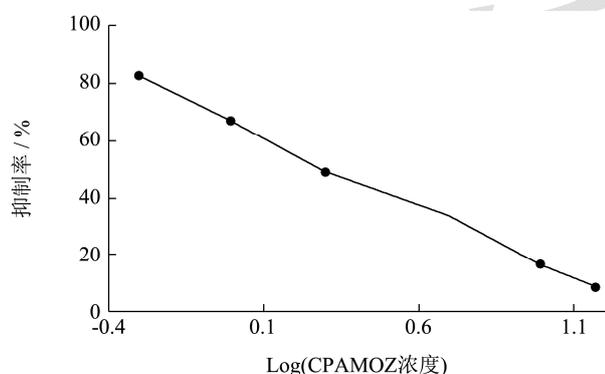


图2 CPAMOZ 抗体的竞争曲线

Fig.2 Competition curve of CPAMOZ antibody

①经CPAMOZ-BSA免疫的小鼠所得多克隆抗体的效价均达1:64000以上, 如图2, 使用间接竞争ELISA法测定抗体灵敏度, 以添加CPAMOZ浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制CPAMOZ的抑制曲线, 回归方程 $y = -0.4946x + 0.6679$  ( $R^2 = 0.9981$ ), 经计算可得CPAMOZ抗体的 $IC_{50}$ 为2.19  $\mu\text{g/L}$ 。

②选取7种与CPAMOZ结构相似的药品: AMOZ、CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD、SEM。使用间接竞争ELISA法测定以上药品与CPAMOZ多克隆抗体的交叉反应, 如表1, 可说明CPAMOZ多克隆抗体与AMOZ有交叉反应, 其交叉反应率为75.4%,

与CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD及SEM均无交叉反应, 故CPAMOZ多克隆抗体具有良好的特异性。

表1 CPAMOZ 抗体的交叉反应率

Table 1 Cross-reaction rate of CPZMOZ antibody

药品	交叉反应/%
AMOZ	75.4
CPAOZ	<0.01
CPAHD	<0.01
CPSEM	<0.01
AOZ	<0.01
AHD	<0.01
SEM	<0.01

### 2.3 AMOZ 可视化免疫凝胶柱酶标抗原的确定

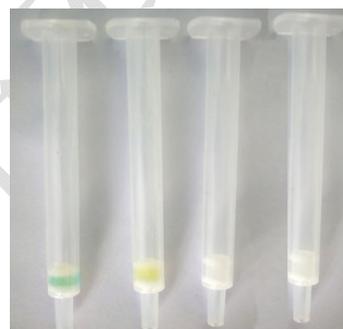


图3 酶标抗原稀释检测结果

Fig.3 Enzyme standard antigen dilution test results

由于酶标自身经TMB液可以显色, 这种显色影响可视化亲和免疫凝胶柱显色判断, 故使用磷酸盐缓冲液对其进行稀释, 以消除酶标抗原对显色反应的影响, 图3所示从左至右酶标抗原:磷酸盐缓冲液的比例分别为1:2999、1:3999、1:4999、1:5999, 当酶标抗原:磷酸盐缓冲液的比例为1:2999时, 凝胶层呈青黄色; 当酶标抗原:磷酸盐缓冲液的比例为1:3999时, 凝胶层呈橙黄色, 当酶标抗原:磷酸盐缓冲液的比例为1:4999及1:5999时, 凝胶层无色。经多次实验最终确定AMOZ酶标原的最低稀释倍数为5000。

### 2.4 AMOZ 可视化免疫凝胶柱检测层的确定

使用封闭胶对抗体胶进行稀释, 稀释倍数依次为5、10、15、20。在SPE小柱中固定稀释抗体胶, 加入1 mL酶标抗原稀释液, 将柱内液体匀速打出, 最终加入500  $\mu\text{L}$ 底物液显色30 s后加压打出柱内溶液, 记录3 min内凝胶层颜色变化。当抗体胶被稀释15倍时, 如图4, 其检测结果呈蓝色, 辨识度高且颜色保留时间久。



图4 检测层优化结果

Fig.4 Detection layer optimization results

### 2.5 AMOZ 可视化免疫凝胶柱质控层的确定



图5 质控层优化结果

Fig.5 Quality control layer optimization results

注：左侧柱子为封闭胶对HRP胶稀释20倍后质控层和检测层的显色结果，右侧柱子为封闭胶对HRP胶稀释20倍后空白对照显色结果。

如图5，当使用封闭胶对HRP胶稀释20倍时，空白对照、质控层及检测层显色结果基本一致。

### 2.6 AMOZ 可视化免疫凝胶柱检测限的确定

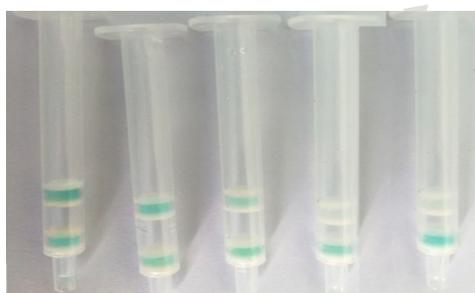


图6 AMOZ 可视化免疫亲和凝胶柱检出限的确定

Fig.6 Determination of the detection limit of AMOZ visualized immunoaffinity gel column

注：从左至右样品液中CPAMOZ的浓度分别为1 μg/L、2 μg/L、3 μg/L、4 μg/L、5 μg/L。

用最佳条件组装AMOZ免疫亲和凝胶检测柱对含

表2 凝胶柱的检出限的测定结果

Table 2 Determination of the detection limit of the gel column

样品	AMOZ添加浓度/(μg/kg)	检测结果	样品	AMOZ添加浓度/(μg/kg)	检测结果
	0	-, -, -		0	-, -, -
	1	-, -, -		1	-, -, -
猪肉	2	+, +, +	牛肉	2	+, +, +
	3	+, +, +		3	+, +, +
	4	+, +, +		4	+, +, +

转下页

待测物CPAMOZ的样品液进行检测，样品液中CPAMOZ的浓度分别为1 μg/L、2 μg/L、3 μg/L、4 μg/L、5 μg/L。如图6所示，经多次试验，当样品液中CPAMOZ浓度达到4 μg/L时，凝胶柱的检测层无色且质控层显蓝色，故AMOZ可视化免疫凝胶柱的检测限为4 μg/L。

### 2.7 AMOZ 可视化免疫凝胶柱特异性的确定

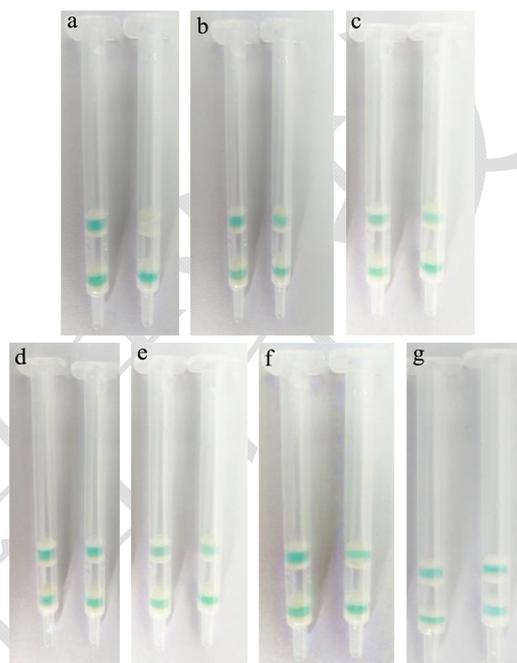


图7 特异性测定结果

Fig.7 Specificity determination results

注：a~g依次为AMOZ、CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD、SEM。

实验选用AMOZ、CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD及SEM对AMOZ可视化免疫凝胶柱的特异性进行测定。如图7，从左至右依次为AMOZ、CPAOZ、CPAHD、CPSEM、AOZ、AHD、SEM，当加入AMOZ标品浓度为6 μg/L时，凝胶柱检测层无色且质控层显蓝色，加入其他药品浓度达1 mg/L时检测柱仍为阴性结果。AMOZ可视化免疫凝胶柱的特异性与CPAMOZ多克隆抗体的特异性一致，均具有良好的灵敏度。

接上页					
	0	- , - , -		0	- , - , -
	1	- , - , -		1	- , - , -
鸡肉	2	+ , + , +	鲫鱼	2	+ , + , +
	3	+ , + , +		3	+ , + , +
	4	+ , + , +		4	+ , + , +

注: +: 表示为阳性结果; -: 表示为阴性结果。

## 2.8 实际样品的检测结果

实际样品中AMOZ含量依次为0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。每个添加浓度使用可视化免疫亲和凝胶柱检测3次, 观察凝胶柱的测定结果。表2为凝胶柱检出限的测定结果, 结果表明, 当实际样品中AMOZ浓度达到2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 检测层颜色消失, 即阳性结果。图8是在样品中添加AMOZ浓度为1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时的检测结果。经多次检测确定了AMOZ可视化免疫凝胶柱在检测动物源食品中的样品检出限为2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

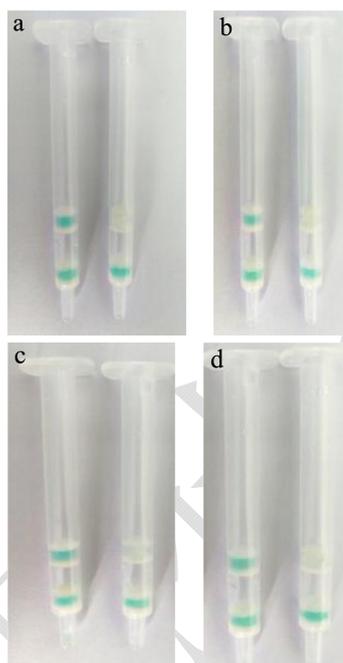


图8 实际样品的检测

Fig.8 Detection of actual samples

注: a为猪肉; b为鸡肉; c为牛肉; d为鲫鱼。

## 2.9 凝胶柱稳定性的检测

实验制备了三批凝胶柱用于稳定性测试, 制备时间分别为2019年3月4日、2019年3月5日, 2019年3月6日。随机抽取不同批次和同批次间制备的凝胶柱进行重复试验检测。由试验结果表3可知, 同批内与不同批次间的检测结果均一致, 从而可以证明AMOZ可视化免疫亲和凝胶柱检测结果具有稳定性和可靠性。

表3 凝胶柱稳定性测试

Table 3 Stability test of the gel column

AMOZ浓度 /( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	第一批 凝胶柱	第二批 凝胶柱	第三 批凝胶柱
0	- , - , -	- , - , -	- , - , -
1	- , - , -	- , - , -	- , - , -
2	+ , + , +	+ , + , +	+ , + , +
3	+ , + , +	+ , + , +	+ , + , +

## 3 结论

3.1 实验成功制备了灵敏度高、特异性强的CPAMOZ多克隆抗体。AMOZ经CPA衍生后偶联大分子载体蛋白, 使用紫外光谱初步证明了完CPAMOZ-BSA的偶联成功, 免疫小鼠, 获得性质良好的多克隆抗体, 其 $\text{IC}_{50}$ 值仅为2.19  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 不仅再次证明完全抗原偶联成功, 而且验证了此方法得到的CPAMOZ免疫性质优良。实验制备的CPAMOZ多克隆抗体的性质较已有文献均得到提升<sup>[13-15]</sup>。

3.2 利用得到的CPAMOZ多克隆抗体, 成功建立了AMOZ可视化免疫凝胶柱检测方法, 与分析仪器法相比, 具有成本低、操作易、耗时短等优点, 该方法检出限为4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 检测动物源食品中的样品检出限为2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实际样品中添加AMOZ后进行前处理, 部分AMOZ经前处理会衍生为CPAMOZ共同作用 (AMOZ可视化免疫凝胶柱的特异性), 从而降低了样品的检出限。因此实际样品的前处理至关重要, 后期实验可对此进行优化。同时说明了此方法不受样品基质影响, 具有良好的稳定性, 对探索简便快捷的临场检测提供了新方法。

## 参考文献

- [1] 刘宣兵,张改平,侯玉泽,等.庆大霉素人工抗原的合成与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2008,12:64-65  
LIU Xuan-bing, ZHANG Gai-ping, HOU Yu-ze, et al. Synthesis and identification of the antigen for gentamicin [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2008, 12: 64-65
- [2] XIE X, ZHOU Q, HE Z, et al. Physiological and potential

- genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 9(4): 922-928
- [3] 束建花,郭红艳,王立琦,等.呋喃它酮代谢物人工抗原的合成及抗体的制备[J].华南农业大学学报,2014,35(2): 18-23  
SU Jian-hua, GUO Hong-yan, WANG Li-qi, et al. Synthesis of artificial antigens and preparation for specific antisera against 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of furaltadone [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2014, 35(2): 18-23
- [4] 田园.展青霉素特异性抗体的制备及其免疫学检测方法的研究[D].泰安:山东农业大学,2012  
TIAN Yuan. Preparation of patulin specific antibodies and their application in development of immunoassay for patulin [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012
- [5] 李春生,刘静静,杜顺丰,等.呋喃唑酮代谢物单克隆抗体和胶体金免疫层析试纸条的研制[J].现代食品科技,2017, 33(6):1-6  
LI Chun-sheng, LIU Jing-jing, DU Shun-feng, et al. Preparation of monoclonal antibody and colloidal gold immunochromatographic test strip against furazolidone metabolites [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(6): 1-6
- [6] Skeritt J H, Hill A S. Sample matrix interference in immunoassays for organochlorine residues in plant-derived foods and some strategies for their removal [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2003, 15: 17-34
- [7] Liu L Q, Xu L G, Suryoprabowo S, et al. Rapid detection of tulathromycin in pure milk and honey with an immunochromatographic test strip [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 358-368
- [8] 生威,吴雪宁,李诗洁,等.呋喃它酮代谢物可视化凝胶柱快速免疫检测方法研究[J].现代食品科技,2017,33(5): 277-281,318  
SHENG Wei, WU Xue-ning, LI Shi-jie, et al. Study of a gel-based immunoassay method for the rapid visual detection of furaltadone metabolites [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(5): 277-281, 318
- [9] Chopra I. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance [J]. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2001, 65(2): 232-260
- [10] Kai H, Suryoprabowo S, Song S S, et al. Development of an immunochromatographic test strip for the detection of procaine in milk [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 1150-1161
- [11] Sheng W, Li Y Z, Xu X, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold-based immunochromatographic assay for several quinolones in milk [J]. *Microchim Acta*, 2012, 173(3): 307-316
- [12] 李诗洁,生威,王俊平,等.量子点标记免疫亲和凝胶柱快速检测动物组织中恩诺沙星[J].中国食品学报,2018,18(10): 223-227  
LI Shi-jie, SHENG Wei, WANG Jun-ping, et al. Rapid detection of the enrofloxacin reduce in animal tissues using immunophilic gel column of quantum dots tags [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(10): 223-227
- [13] 罗锦霞.酶联免疫吸附技术在食品检测分析中的应用[J].化工设计通讯,2018,44(4): 65  
LUO Jin-xia. Application of enzyme-linked immunosorbent assay in food testing and analysis [J]. *Chemical Engineering Design Communications*, 2018, 44(4): 65
- [14] 齐玉杰,生威,王俊平,等.乳制品中三聚氰胺的免疫亲和凝胶柱检测方法[J].中国乳品工业,2017,45(8):47-50  
QI Yu-jie, SHENG Wei, WANG Jun-ping, et al. Gel-based immunoaffinity test column method for the detection of melamine in dairy products [J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(8): 47-50
- [15] 生威,吴雪宁,胡高爽,等.恩诺沙星可视化凝胶柱快速免疫检测方法研究[J].食品研究与开发,2016,37(19):114-117  
SHENG Wei, WU Xue-ning, HU Gao-shuang, et al. Development of a gel-based rapid visual immunoassay for the detection of enrofloxacin [J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(19): 114-117

---

(上接第328页)

- [47] 蔡教英,欧阳克蕙,上官新晨,等.脂质代谢组学的研究进展[J].动物营养学报,2011,23(11):1870-1876  
CAI Jiao-ying, OUYANG Ke-hui, SHANGGUAN Xin-chen, et al. Recent advances in lipidomics [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(11): 1870-1876
- [48] Hui-Zeng S, Di-Ming W, Hong-Yun L, et al. Metabolomics integrated with transcriptomics reveals a subtle liver metabolic risk in dairy cows fed different crop by-products [J]. *Proteomics*, 2018, 18(16): e1800122