

胶体金免疫渗滤法检测淡水鱼及牛乳中氯霉素残留

王玮, 张燕, 刘俊伟, 王莉, 王凤侠, 王硕

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津 300457)

摘要: 制备了平均粒径 20 nm 的胶体金, 用以标记抗氯霉素多克隆抗体; 将氯霉素半抗原与卵清蛋白的偶联物包被在硝酸纤维素膜上作为检测带, 羊抗兔二抗作为质控带, 依据免疫竞争法原理, 建立通过免疫胶体金渗滤式试纸条检测六种淡水鱼及牛乳中氯霉素残留的方法。样品前处理方法简便, 方法灵敏度为 1 $\mu\text{g/L}$, 只需 10~15 min 即可目测判断结果, 可以作为淡水鱼及牛乳中氯霉素残留现场大量筛选的有效手段。

关键词: 胶体金; 渗滤; 氯霉素; 淡水鱼; 牛乳

中图分类号: TS207.5; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)01-0072-04

Detection of Chloramphenicol Residue in Freshwater Fish and Milk by Dot Immunogold Filtration Assay

WANG Wei, ZHANG Yan, LIU Jun-wei, WANG Li, WANG Feng-xia, WANG Shuo

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstracts: An immunogold assay for detection of chloramphenicol (CAP) residue in freshwater fish and milk was established using the colloidal gold with the average diameter of 20 nm for labeling the anti-chloramphenicol (CAP) polyclonal antibody. CAP was conjugated to (OVA) and then they were dispersed on a nitrocellulose (NC) membrane forming the test zone. Goat anti-rabbit IgG was chose as control zone. The method was simple and fast (10~15 minutes) with the sensitivity of 1 $\mu\text{g/L}$, which could be widely used to detect the CAP residues in freshwater fish and milk.

Key words: colloidal gold; flow through; chloramphenicol; freshwater fish; milk

氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 是一种广谱抗生素, 长期微量摄入不仅使沙门氏菌、大肠杆菌产生耐药性, 而且还会引起机体正常菌群失调, 使人类易患各种疾病^[1]。许多世贸组织成员国对动物源性食品中的氯霉素残留表示了极大的关注。欧盟、美国等国在相关食品卫生法规中规定氯霉素不得检出; 我国也明令其为禁用兽药, 所有动物可食组织均不得检出^[2]。但是, 由于氯霉素价格相对低廉, 抗菌效果好, 仍有不少动物养殖者及饲料生产企业违规使用, 国内动物性食品中氯霉素残留现象依然十分严重。因此, 发展快速、灵敏的检测技术, 降低方法的检出限成为氯霉素残留检测技术研究焦点^[3]。

金标免疫渗滤法 (dot immunogold filtration assay, DIGFA) 是近几年发展的以胶体金为标记物的快速斑

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (NO. 2006BAD05A06)

作者简介: 王玮 (1982-), 女, 硕士, 研究方向为食品安全。

通讯作者: 王硕 (1969-), 教授, 博导, 研究方向为食品安全和免疫学检测

点免疫试验。它以硝酸纤维素膜为载体, 利用其微孔膜的可滤过性, 使抗原抗体反应迅速发生在一个特殊的渗滤装置上, 反应过程为 2~3 min, 无需任何仪器设备和特殊操作技术, 目测判断结果^[4]。本论文建立了氯霉素金标免疫渗滤法用于六种淡水鱼和牛乳中的氯霉素残留的快速筛查, 样品前处理方法简便, 适于现场快速检测。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料和试剂

Linomat 5 半自动点样仪 (瑞士, Camag); 酶标测定仪 (美国, Thermo); CARY 50 Bio 紫外/可见分光光度计 (美国, Varian); Milli-Q 纯水发生器 (美国, Millipore, 实验用水均为经此装置净化的二次去离子水, 并经 0.22 μm 滤膜过滤, 电阻率 >18.2 $\text{M}\Omega\text{-cm}$); 硝酸纤维素膜 (美国, Pierce, catalog no. 88018); Hi-flow plus membrane and cards (美国, Millipore, part no. HF090MC100); 吸收垫 (美国

Millipore, part no. CFSP223000); 氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 分析纯) 购于上海化学试剂有限公司; 氯霉素标准品、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、辣根过氧化物酶和羊抗兔二抗购于美国 Sigma 公司; 胶体金透射电镜扫描由天津师范大学电镜室完成; 氯霉素半抗原、抗体、包被抗原 (CAP-OVA)、酶标抗原 (天津科技大学食品安全研究室自制^[5,6]); 淡水鱼 (鲤鱼、草鱼、罗非鱼、鳙鱼、鲢鱼、鲫鱼) 及牛乳为市售, 经液相检测为不含氯霉素的阴性样品; 金标抗体储存液 (conjugate storage buffer): 0.3814 g 硼酸钠, 0.5 g BSA 和 0.5 g 叠氮钠 (NaN_3), 溶于 500 mL 二次水; 0.01 M 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH 7.4; 包被液: pH 9.6 碳酸盐缓冲溶液; 封闭液: 1% BSA-PBS; 洗涤液: PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS); 显色底物溶液: TMB/ H_2O_2 ; 终止液: 1.25 mol/L 浓硫酸; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 胶体金及其标记物的制备

本文中胶体金的制备采用柠檬酸三钠还原法: 将 100 mL 的 0.01% HAuCl_4 水溶液加热至沸腾, 不断搅拌的同时迅速加入 2 mL 1% 的柠檬酸三钠水溶液, 待溶液颜色变为透明的红色并不再变化时, 再煮沸 5 min, 撤去热源, 继续搅拌 15 min。胶体金溶液自然冷却后, 用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 调节其 pH 值到 9.0, 在磁力搅拌下, 向 20 mL 胶体金溶液中逐滴加入 0.234 g 亲和层析后的抗体, 10 min 后逐滴加入 10% 的牛血清白蛋白 (BSA) 使溶液中 BSA 的终浓度为 1%, 以稳定胶体金标记物, 搅拌 30 min 后置于 4 °C 过夜。1500 r/min 离心 10 min, 取上清液于 4 °C, 10000 r/min 离心 30 min, 弃去上清液。用储存液溶解胶体金至 1 mL, 重复上一步离心步骤, 弃去上清, 胶体金用储存液重悬为原体积的 1/10, 4 °C 保存。

1.3 试纸条的制备及组装

以硝酸纤维素膜为固相载体, 检测带 (Test zone, T 带) 包被 CAP-OVA (1 $\mu\text{g}/\text{strip}$); 质控带 (Control zone, C 带) 包被羊抗兔二抗 (0.5 $\mu\text{L}/\text{strip}$), T 带与 C 带间隔 3 mm, 然后将膜用剪刀剪成条状 (1.5 cm \times 0.8 cm)。先于 37 °C 恒温箱中固定 15 min, 再经封闭液封闭 30 min, PBST 冲洗三次后, 用滤纸吸干多余的水分, 37 °C 干燥后 4 °C 保存。检测前将滤纸润湿后紧贴在惰性塑料板上 (保证无气泡产生), 再把裁剪好的膜正面朝上紧贴在湿润的滤纸上, 加样时另取一张干净的滤纸在边缘吸水以促进样液的渗透。

1.4 Flow through 检测

将金标记抗体 (经 conjugate storage buffer 1:2 稀释) 与含 CAP 的待测液按 1:3 的体积比例 (30 μL +90 μL) 混合均匀, 取 100 μL 混合液加入包被有半抗原的区域。待液体完全渗透过膜上的反应区后, 在 C 带显色的前提下, 目视 T 带的颜色, 与空白对照, 颜色越浅, 代表 CAP 含量越高。

1.5 样品预处理

1.5.1 淡水鱼

称取 2 g 鱼用 4 mL 甲醇漩涡振荡提取 2 min, 过滤, 滤液用 PBST 稀释 10 倍待测。

1.5.2 牛乳

量取 1 mL 牛乳用 2 mL PBST 稀释, 再加入 60 μL 1.04 mol/L 硫酸锌, 混匀后再加入 60 μL 0.36 mol/L 亚铁氰化钾混匀, 过滤, 滤液用 PBST 稀释 6 倍待测。

1.6 交叉反应

对使用的抗氯霉素多克隆抗体的特异性即其与结构类似化合物的交叉反应程度进行了测定, 以抑制抗体最大结合率的 50% 所需目标分析物的浓度 I_5 (CAP) 与所需各种结构类似化合物的浓度 I_{50} (其它抗生素) 之比的百分数表示, 交叉反应越小, 抗体特异性越高。交叉反应率的公式如下:

$$\text{交叉反应率} / \% = \frac{IC_{50}(\text{CAP})}{IC_{50}(\text{其他抗生素})} \times 100$$

实验选择了 5 种氯霉素结构类似物和相关兽药, 采用酶联免疫吸附实验进行抗体结合反应, 分别是: 氯霉素琥珀酸钠、甲砒霉素、氟甲砒霉素、胺卞西林和磺胺二甲基嘧啶。

1.7 稳定性实验

将试纸条和金标记抗体分装后放置于 4 °C 进行稳定性实验。每 3 周进行 1 次实验, 以 1 $\mu\text{g}/\text{L}$, 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的氯霉素浓度标准溶液进行竞争反应, 观察颜色的变化。

2 结果与分析

2.1 胶体金质量鉴定

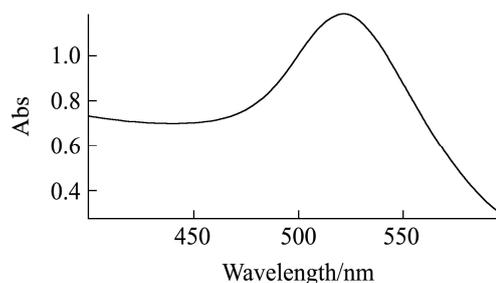


图1 胶体金溶液在可见光范围内 (400~600 nm) 扫描图

Fig.1 UV-visible spectra of colloidal gold solution

胶体金的质量鉴定一般包括本实验制备的胶体金状态为澄清的红色溶液，表面无漂浮物。对自然冷却后的胶体金溶液利用紫外/可见分光光度计在可见光范围内（400~600 nm）进行扫描，得到单一的吸收峰，最大吸收峰波长为 521.0 nm（见图 1），经透射电镜扫描，制得的胶体金粒子形状规则呈圆形，大小基本一致，测量得平均粒径为 20 nm（见图 2）。



图2 胶体金的透射电镜图

Fig.2 Transmission electron micrograph of colloidal gold

2.2 检出限

实验结果表明：随着氯霉素的浓度升高，检测带上的红色逐渐变浅。当 CAP 浓度低于 1 μg/L 时，胶体金显色结果与空白溶液（不含氯霉素）相比无法通过目测区别，当氯霉素的浓度高于 200 μg/L 时，几乎无颜色反应。如图 3 所示当氯霉素的浓度为 1 μg/L，颜色与空白溶液虽然很接近，但仍能通过目测将两者区分，因此免疫胶体金渗滤法快速检测对氯霉素的检出限为 1 μg/L。

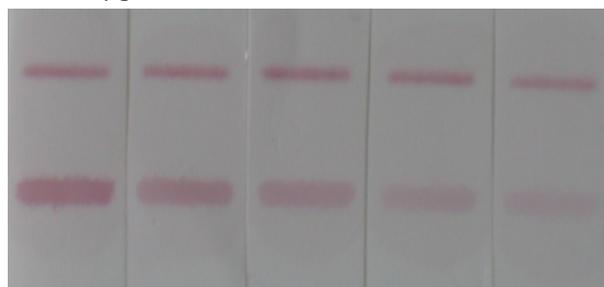


图3 Flow-through实验结果

Fig.3 Detection by the flow-through assay

2.3 交叉反应

表1 CAP抗体与结构类似物及其它抗菌药物的交叉反应

Table 1 Cross-reactivity of CAP antibody with challenging antimicrobial agents and chemical compounds

药物名称	交叉反应率/%
氯霉素(CAP)	100
氯霉素琥珀酸钠	189
氟甲砜霉素 (FF)	0.07
甲砜霉素 (TAP)	<0.01
氨卞西林	<0.01

磺胺二甲基嘧啶

<0.01

实验选择了 5 种氯霉素结构类似物和相关兽药进行抗体结合反应即交叉反应，结果见表 1，结果显示该抗体与氯霉素琥珀酸钠有较大的交叉反应，这是因为免疫原合成时是以氯霉素琥珀酸钠为主要反应物。而抗体与其结构类似物：氟甲砜霉素，甲砜霉素交叉反应很小，与其它常用抗菌药物氨卞西林，磺胺二甲基嘧啶并无交叉反应，由此说明该抗体特异性强。采用该抗体建立的方法可有效地检测淡水鱼和牛乳中的氯霉素，其它兽药的干扰很小。

2.4 ELISA 验证渗滤法有效性

采用 ELISA 方法来验证试纸条检测方法的有效性。ELISA 的最低检测浓度为 0.05 μg/L。样品经液相检测不含氯霉素。在 Flow through 试纸条检测中，以不含氯霉素的空白溶液作为参照点，向阴性样品中添加一系列浓度的氯霉素后，按照 2.5 所示方法进行处理，然后进行竞争反应。若颜色明显比参照点浅，则氯霉素浓度大于等于 1 μg/L，为阳性；若颜色与参照点颜色相同，则氯霉素浓度小于 1 μg/L，为阴性；若颜色相近，通过目视较难区别，为不确定。对 60 份阴性样品按照表 2 进行添加实验（其中以鲢鱼和牛奶为例，每个浓度做五个平行），同时进行 ELISA 和 Flow through 的检测，比较结果见表 2。

表2 阴性样品不同添加水平的ELISA及试纸条测定结果比较

样品	添加水平 /(μg/L)	Three Levels	
		ELISA 测定结果 /(μg/L)	试纸条测定结果
鲢鱼	10	8.62	-; -; -; -; ±
	20	19.65	+; +; +; +; +
	40	39	+; +; +; +; +
牛奶	10	10.89	-; -; -; -; -
	20	20.7	+; +; +; +; ±
	40	47.7	+; +; +; +; +

注：-：阴性 +：阳性 ±：不确定

如表 2 所示，试纸条检测结果在其检测范围内与 ELISA 相比基本吻合，实验结果稳定可靠。

2.5 稳定性实验

4 °C 保存的试纸条和金标记抗体在前 3 个月内都能得到阳性（与不含氯霉素的相比）的结果，重现性很好。3 个月以后，重现性仍达到 90%左右。6 个月后稳定性开始下降，重现性较差。结果表明：试纸条在 4 °C 干燥的条件下可存放 6 个月。

3 结论

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 通过紫外扫描和透射电镜观察其颗粒均一, 平均直径为 20 nm, 以其标记抗氯霉素多克隆抗体, 优化建立了渗滤式金标氯霉素快速筛选方法, 成功检测了淡水鱼及牛乳中的氯霉素残留, 方法的检出限为 1 μg/L。样品的前处理方法简便, 稳定性好, 可以作为现场快速筛选氯霉素残留的有效手段。

参考文献

- [1] Allen EH. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food-producing animals [J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1985, 68(5): 990-999
- [2] 中华人民共和国农业部. 动物食品中兽药最高残留限量 (235 号公告)[S]. 2002-12-24
- [3] 秦红, 韩剑众. 动物性食品氯霉素残留检测技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(10): 160-163
- [4] 许静, 严自助, 张瑞鉴, 等. 胶体金免疫渗滤法检测日本血吸虫病血清抗体的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(2): 146-147
- [5] Wang, S., Allan, R.D., Skerritt, et al. Development of a class-specific competitive ELISA for the benzoylphenylurea insecticides[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998, 46 (8), 3330-3338.
- [6] Wang, S., Zhang, J., Yang, Z.Y., et al. Development of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of endosulfan residues in agricultural products[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53 (19): 7377-7384

(上接第 68 页)

由正交试验结果可以看出, 影响中性蛋白酶酶解荞麦蛋白水解度的四个因素中, 其影响程度为 C>B>A>D, 最优组合为 A₂B₂C₃D₂, 即在加酶量为 5000 U/g、温度 50 ℃、pH7.5、底物浓度 4%的条件下水解荞麦蛋白 2 h。由于表 2 没有此组合, 故有必要对其做验证实验, 经实验得此组合的条件下其水解度为 42.31%, 高于表 2 中所有的实验结果。

3 结论

中性蛋白酶对荞麦蛋白具有较好的酶解作用。通过试验最终确定了中性蛋白酶水解荞麦蛋白的最优条件: 加酶量 5000 U/g, 温度 50 ℃, pH7.5, 底物浓度 4%, 水解时间 2 h, 此条件下水解度可达 42.31%, 如果再适当延长酶解反应的时间, 其水解度还会有适当

的增加。

参考文献

- [1] 吴建平. 荞麦蛋白的新功能. 西部粮油科技, 1998, 23(3): 37
- [2] 赵钢, 唐宇等. 中国的荞麦资源及其药用价值. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 31
- [3] 刘大川, 钟方旭. 酶水解制备大豆蛋白肽的研究. 中国油脂, 1997(6): 14
- [4] 大连轻工业学院, 华南理工大学等合编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996
- [5] 檀志芬, 生庆海, 等. 蛋白质水解度的测定方法. 食品工业科技, 2005, 26(7): 174-175
- [6] 袁玉荪, 宋婉华, 等. 生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1985

食用柑橘类水果对健康有益

有关柚子与处方药会相互作用的负面报道以及现在的食用低卡食物 (low-carb diets) 的潮流使柑橘类水果的消费量持续下降。但最近又有诸多证据显示这些水果中的多种成分在对抗癌症、肥胖症和降低胆固醇方面有着多种功效。在第 228 届美国化学学会全国年会上发表的研究报告《柑橘类水果对健康的潜在益处》(Potential Health Benefits of Citrus) 指出: 柑橘类成分可能有助于预防直肠癌 (AGFD 129, 130); 陈皮中的成分可以降低胆固醇 (AGFD 140); 柚子有助于减轻体重 (AGFD 141); 此外, 还有证据显示, 柚子中的某些成分还有助于处方药发挥疗效。

(新闻来源: 中国食品科技学会)