

# 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

李春生<sup>1</sup>, 刘静静<sup>1</sup>, 杜顺丰<sup>2</sup>, 武孝丽<sup>2</sup>, 曹秀梅<sup>2</sup>, 吴萌<sup>1</sup>, 张娜<sup>1</sup>

(1. 河北省科学院生物研究所, 河北石家庄 050081)

(2. 秦皇岛市农产品质量安全监督检验中心, 河北秦皇岛 066001)

**摘要:** 本研究旨在建立一种快速检测呋喃唑酮代谢物残留的方法。试验用呋喃唑酮代谢物的衍生物(CPAOZ)与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物免疫小鼠, 利用单克隆抗体技术制备杂交瘤细胞, 用间接ELISA和间接竞争ELISA法对阳性克隆进行筛选。单克隆细胞株诱生腹水后, 经纯化即为单克隆抗体, 用于胶体金标记, 制备呋喃唑酮代谢物胶体金免疫层析试纸条。融合后得到2株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 其中4G3纯化后的抗体效价达到1:100万, 对CPAOZ的50%抑制质量浓度(IC<sub>50</sub>)为1.7 μg/L, 亲和常数Ka=1.6×10<sup>9</sup> L/mol。该抗体制备的胶体金试纸条的检测限为4 μg/L, 与其他3种硝基呋喃代谢物的衍生物CPAHD、CPSEM和CPAMOZ均不存在交叉反应, 对样品的检测与高效液相色谱结果一致。本研究制备了抗呋喃唑酮代谢物特异性单克隆抗体, 并研制了以单抗为基础的胶体金免疫层析试纸条, 能够实现呋喃唑酮代谢物残留的快速、灵敏的检测。

**关键词:** 呋喃唑酮代谢物; 单克隆抗体; 胶体金免疫层析试纸条

文章编号: 1673-9078(2017)6-326-331

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.048

## Preparation of Monoclonal Antibody and Colloidal Gold

### Immunochromatographic Test Strip against Furazolidone Metabolites

LI Chun-sheng<sup>1</sup>, LIU Jing-jing<sup>1</sup>, DU Shun-feng<sup>2</sup>, WU Xiao-li<sup>2</sup>, CAO Xiu-mei<sup>2</sup>, WU Meng<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>1</sup>

(1. Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050081, China) (2. Qinhuangdao City Agricultural Products Quality and Safety Supervision and Inspection Center, Qinhuangdao 066001, China)

**Abstract:** The aim of the study was to establish a method for the rapid detection of the furazolidone metabolites. A conjugate of the derivatives of furazolidone metabolites and bovine serum albumin (BSA) was used to immunize mice. The cells were prepared by monoclonal antibody technology, and the positive clones were screened by indirect ELISA and icELISA. Monoclonal antibodies purified from ascitic fluid were used in the colloidal gold tag and for the preparation of the colloidal gold immunochromatographic test strip. Two cell types were obtained, which could stably secrete antibodies. The titer of the purified antibody named 4G3 was 1:10<sup>6</sup>, and the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was 1.7 μg/L with affinity constant Ka=1.6×10<sup>9</sup> L/mol. The results showed that the detection using the test strips was limited to four μg/L, there were no cross reactions between CPAHD, CPSEM, and CPAMOZ, and the test results of the samples were consistent with the results of HPLC. In this study, specific monoclonal antibodies against CPAOZ were prepared, and colloidal gold immunochromatographic test strips were developed based on the antibodies, which could achieve rapid and sensitive detection of furazolidone metabolite residues.

**Key words:** furazolidone metabolites; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatographic test paper

呋喃唑酮(Furazolidone, FZD), 又名痢特灵, 是一种硝基呋喃类药物, 对常见的革兰氏阴性菌和阳性菌有抑制作用, 作用于微生物酶系统, 抑制乙酰辅酶A, 干扰微生物糖代谢, 从而起到抑菌作用, 广泛用于水产和禽类, 用以治疗菌痢、肠炎和球虫等, 以及养殖鱼的疥疮、赤鳍病和溃疡等<sup>[1]</sup>。因其杀菌能力强,

收稿日期: 2016-08-03

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(15273205D)

作者简介: 李春生(1981-), 男, 副研究员, 研究方向: 免疫生物化学

抗菌谱广, 不易产生耐药性, 口服吸收迅速, 与其他抗生素无交叉耐药性等优点, 曾广泛应用于临床<sup>[2]</sup>。呋喃唑酮具有很强的副作用, 而且在动物体内很快就代谢为3-氨基-2-唑烷酮(AOZ), AOZ在胃酸条件下直接代谢成为具有强烈致突变性和致癌性的β-羟乙基肼, 对人体健康与生态平衡具有潜在威胁<sup>[3-5]</sup>。目前, 欧盟、美国、日本及中国等规定禁止在食用动物中使用硝基呋喃类抗生素。我国国务院食品安全办等部门于2016年8月至2017年12月, 在全国范围内集中开

展畜禽水产品抗生素、禁用化合物及兽药残留超标专项整治行动,其中水产品环节就以硝基呋喃和孔雀石绿为重点,严厉打击硝基呋喃类药物的非法使用、生产和销售<sup>[15]</sup>。呋喃唑酮原药在动物体内的代谢分解迅速,稳定性只有数小时,很难检出,但其代谢物 AOZ 与蛋白质结合而相当稳定,在体内可残留数周<sup>[6,7]</sup>。因此,可以通过检测组织中的 AOZ 水平达到检测动物源性食品中呋喃唑酮残留的目的。

目前有关呋喃唑酮残留的检测技术主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[8]</sup>及免疫分析技术,前3种方法灵敏、准确,但操作繁琐,对实验设备和技术要求较高,不适合大批量样品的快速检测<sup>[10,11]</sup>。免疫分析方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)和胶体金免疫层析法(GICA),具有灵敏度高、特异性好、成本低和操作方便等特点,适于大批量样品筛选<sup>[12]</sup>。GICA作为一种新的免疫学检测方法,既有免疫学方法的特异性,又有简便快速、不需仪器的特点,其在医学、动植物检疫、食品检测等多领域已得到了广泛应用<sup>[13]</sup>。周克楠<sup>[9]</sup>等获得了1株特异性较好的抗CPAOZ单抗,并以此单抗制备了胶体金免疫层析试纸条,最低检测限为7.5 μg/L。开发呋喃唑酮胶体金试纸条有助于AOZ残留快速、准确的检测,有效遏制其在水产品中的违规使用及残留超标问题,提高人民群众水产品餐桌质量安全水平。本研究应用单克隆抗体技术筛选出阳性细胞株,获得了具有高特异性的CPAOZ单抗,并在此基础上制备了其胶体金免疫层析试纸条,用于样品检测能获得与仪器法一致的结果,为AOZ残留的免疫学检测方法的建立奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

HAT、HT、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG4000、免疫球蛋白亚型试剂盒、氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>)和柠檬酸三钠(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O),均购自Sigma;DMEM培养基,购自Gibco公司;HRP标记羊抗小鼠IgG,购自北京中杉金桥生物科技有限公司;辛酸、硫酸铵均为国产分析纯;SP2/0细胞为本实验室保存;CPAOZ-BSA,CPAOZ-OVA,本实验室自制。二氧化碳培养箱,SANYO公司;净化工作台,苏州净化设备有限公司;酶标仪,美国Bio-TEK;96孔、24孔培养板,Costar公司;三维平面点膜喷金机,上海金桥生物科技有限公司。

### 1.2 试验动物

Balb/c小鼠,河北医科大学实验动物中心。

### 1.3 单抗的制备及特性鉴定

#### 1.3.1 杂交瘤细胞的筛选及单抗的制备

6周龄的雌性Balb/c小鼠,免疫剂量40 μg/只,每隔2周免疫一次。4周免疫后10d断尾取血,间接ELISA检测小鼠血清抗体效价,间接竞争ELISA测定抗血清抑制率,选择效价高,且抑制效果较好的小鼠加强免疫,3d后用于融合。融合小鼠摘眼球放血,将血清作为阳性对照,脱颈处死后无菌条件下取出脾脏,制备脾细胞,与SP2/0细胞按5:1的比例通过PEG融合,将融合后的细胞悬液加入已铺有饲养细胞的96孔板,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,次日检查有无污染。融合后第10d换用HT培养基。换液后2~3d用间接ELISA和间接竞争ELISA进行阳性孔筛选,尽量挑选出强阳性、抑制率高、单个克隆、细胞状态好的孔,通过有限稀释法进行亚克隆,同时进行扩大培养、冻存,直至建立单一分泌抗体的单克隆细胞株。

采用小鼠体内诱生腹水的方法制备抗体,取健康的Balb/c雌性小鼠,每只小鼠体内注射石蜡油0.5mL,7d后调整克隆化阳性杂交瘤细胞10<sup>6</sup>/mL,每只小鼠腹腔注射1mL,7~9d取腹水,离心弃脂肪,先后经辛酸-硫酸铵、Protein A亲和层析柱纯化,冻干后-20℃保存。

#### 1.3.2 单克隆抗体效价的测定

采用间接ELISA法,具体步骤如下:包被:用碳酸盐缓冲液稀释包被原至浓度为2 μg/mL,96孔酶标板100 μL/孔,4℃过夜;洗涤:包被板恢复至室温,倾去包被液,每孔加洗液300 μL,每次静置1min,洗涤3次,最后一次拍干;封闭:每孔加200 μL含10%小牛血清的洗液,37℃、1h;倾去封闭液,洗涤3次,拍干;加一抗:用洗液将单抗以1:2000倍开始倍比稀释,每孔加入100 μL,并设置空白对照孔(PBS)和阴性对照(阴性血清),37℃放置45min;倾去一抗,洗涤3次,拍干;加酶标二抗:每孔加入100 μL的1:10000倍稀释的HRP酶标记的山羊抗鼠IgG,37℃放置30min;倾去二抗,洗涤3次,拍干;显色:每孔加底物显色液100 μL,37℃避光反应15min;终止:每孔加入50 μL终止液,终止反应;检测:测定波长为450nm处的吸光度值(A<sub>450nm</sub>)。结果判定:

$$(A_{\text{样品孔}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}}) \geq 2.1$$

且阴性对照的  $A_{450\text{nm}}$  小于 0.2 时, 此时抗体的稀释倍数即为抗体效价。

### 1.3.3 单克隆抗体敏感性的测定

采用间接竞争 ELISA 法, 包被、洗涤、封闭间接 ELISA。加单抗和标准品: 将标准品母液用 PBS 稀释成 81、27、9、3、1、0.3 和 0.1  $\mu\text{g/L}$ , 每孔加入 50  $\mu\text{L}$ , 再加入一定稀释倍数的单抗, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 同时设置空白对照孔(PBS)和阴性对照(50  $\mu\text{L}$  单抗+50  $\mu\text{L}$  洗液), 37  $^{\circ}\text{C}$  保温保湿 45 min; 以下步骤同单抗效价的测定。

### 1.3.4 单抗免疫球蛋白的类别和亚类的鉴定

采用 Sigma 公司鼠单克隆抗体分类试剂盒鉴定单抗 Ig 类和亚类, 对比不同二抗作用下的显色结果, 以是否显色判定单抗所属类别和亚类。

### 1.3.5 单抗亲和力的测定

采用非竞争 ELISA 法测定亲和常数 ( $K_a$ ), 包被时用碳酸盐缓冲液稀释包被原至浓度为 0.8、0.1、0.05、0.01  $\mu\text{g/mL}$ , 加一抗用洗液将单抗以 100  $\mu\text{g/mL}$  开始倍比稀释, 分别加入 4 个包被原浓度, 其他步骤同单抗效价的测定。测定波长为 450 nm 处的吸光度值 ( $A_{450\text{nm}}$ )。按下列公式计算  $K_a$

$$K_a = (n-1)/2(nAb' - Ab)$$

式中:  $Ab$  为抗原浓度为  $A_g$  时, 产生半数吸光度值的抗体浓度;  $Ab'$  为抗原浓度为  $A_g'$  时, 产生半数吸光度值的抗体浓度;  $n$  为  $A_g$  和  $A_g'$  之间的稀释倍数<sup>[14]</sup>。

## 1.4 胶体金免疫层析检测试纸条的制备

### 1.4.1 胶体金溶液的制备

取 100 mL 蒸馏水, 煮沸 5 min, 加入质量浓度为 1% 的氯金酸 1 mL 和质量浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液 1.5 mL, 继续搅拌加热, 溶液最终经过灰色、酒红色至呈透亮的红色, 冷却到室温, 分别通过目测法、紫外分光光度法进行质量鉴定, 合格的胶体金溶液 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存。

### 1.4.2 胶体金标记抗体最佳 pH 值确定

取 7 只离心管, 编号 1~7, 每管加入胶体金溶液 1 mL, 再依次加入 0.1 mol/L 的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液 0、9、10、11、12、13、14  $\mu\text{L}$ , 分别加入 CPAOZ 抗体 5  $\mu\text{L}$ , 混匀, 静置 30 min。各管加 10% NaCl 10  $\mu\text{L}$ , 混匀, 静置 2 h, 观察结果。对照管只加胶体金溶液, 观察每管溶液的颜色变化。溶液的颜色没有变化的即为胶体金标记抗体的最适 pH 值。

### 1.4.3 胶体金标记抗体最佳蛋白量的测定

取 8 只离心管, 编号 1~8, 每管内加入已调好 pH 的胶体金溶液 1 mL, 然后依次加入 CPAOZ 抗体溶液

0、2、3、3.5、4、4.5、5、6  $\mu\text{L}$ , 混匀, 静置 30 min; 对照管加抗体稀释液, 其余各管分别加 10% NaCl 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 混匀, 静置 2 h, 观察结果。使红色保持不变的最低抗体量, 就是胶体金标记蛋白质最低稳定量, 在此基础上增加 20% 即为胶体金标记最适蛋白用量。

### 1.4.4 胶体金标记单克隆抗体

取已制备好的胶体金溶液 100 mL, 用 0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  将胶体金溶液调至 pH 值为 8.5 左右, 按最适抗体用量边搅拌边加入 CPAOZ 单抗 0.7 mg; 室温避光静置 30 min, 然后搅拌时加入 1 mL、10% 的牛血清白蛋白使其浓度为 1%, 继续搅拌 5 min 后避光反应 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 min, 轻轻吸取上清液, 沉淀加入 10 mL、0.01 mol/L、pH 7.4 的 PBS 缓冲液(含 1% BSA), 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 如此洗涤 3 次, 以彻底去除未结合的蛋白质; 将沉淀用 10 mL 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)溶解, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存备用。

### 1.4.5 胶体金检测试纸条的优化和组装

本实验采用竞争法, 即样品中的 CPAOZ 和固定在 NC 膜上的包被抗原 CPAOZ-OVA 竞争胶体金标记的抗 CPAOZ 单克隆抗体。优化胶体金试纸条层析条件, 抗原及二抗工作浓度、金标抗体稀释度选择一组浓度, 以条带显色均匀, 颜色深浅适合观察为最佳。按优化条件将金标抗体溶液用喷金仪均匀喷到结合垫上(喷量为 0.4  $\mu\text{L}/\text{mm}$ ), 真空干燥后于 4  $^{\circ}\text{C}$  存放; 用划膜仪将 CPAOZ-OVA 和酶标二抗(工作浓度分别为 3.0 mg/mL 和 1.0 mg/mL)包被在 NC 膜上, 形成检测线(T 线)和质控线(C 线), 37  $^{\circ}\text{C}$  烘干 48 h。将干燥好的样品垫、胶体金垫、NC 膜以及吸水纸, 按常规金标试纸条的组装方法, 分别粘贴在 PVC 板上, 用切割机切成 2~3 mm 宽的条状, 即制成试纸条, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  避光干燥保存。

## 1.5 胶体金检测试纸条的性能测定

### 1.5.1 样本处理

取鱼肉、虾肉组织匀浆后, 称取 2 g 于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 去离子水, 1 mL、1 mol/L 盐酸溶液, 振荡 1 min, 再加入 0.5 mL 对羧基苯甲醛, 振荡 1 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴避光孵育 16 h; 取出后加入 0.5 mol/L 磷酸氢二钠溶液 1 mL, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 PH 至 7.5 左右, 振荡 1 min, 加入 5 mL 乙酸乙酯, 振荡 1 min, 5000 r/min 离心 10 min; 移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中, 水相再用 5 mL 乙酸乙酯重复萃取两次, 合并后氮气吹干; 加入 1 mL 正己烷, 加盖振荡 1 min, 然后加入 0.5 mL PBST 缓冲液, 振



荡 1 min, 5000 r/min 离心 10 min; 吸取下层水相溶液用于分析。

### 1.5.2 试纸条灵敏度测试

将 1 mg/mL 呋喃唑酮代谢物衍生物 (1 mg CPAOZ 溶于 1 mL 甲醇) 用 PBS 分别稀释为 0、1、2、3、4、5、10  $\mu\text{g/L}$  的一系列标准溶液, 再分别取 90  $\mu\text{L}$  上述标准溶液滴在试纸条的样品垫上, 5 min 后观察试纸条的显色情况。C 线和 T 线同时显示红色条带时为阴性; C 线显示红色, T 线不显示红色, 为阳性。随着标准溶液的浓度增大, T 线的颜色会越来越浅, 直到肉眼观察不到, 此时标准溶液的浓度为试纸条的检测限。

### 1.5.3 试纸条特异性测试

选取 4 种硝基呋喃代谢物的衍生物 (CPAOZ、CPAHD、CPSEM 和 CPAMAZ) 测试, 将其母液分别用 0.01 mol/L、PH 7.4 的 PBS 稀释至 50  $\mu\text{g/L}$ , 滴加到试纸条的样品孔, 观察试纸条显色效果, PBS 作对照。

### 1.5.4 与仪器方法的比对

随机取 8 份水产样品, 作为供试试样。每份样品分别用 HPLC 法和本研究制备的 CPAOZ 胶体金检测试纸条进行检测, 比较检测结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单克隆抗体筛选

4 免后 2 号小鼠血清抗体效价高且抑制效果好, 加强免疫后用于融合。融合后共选出了 6 个分泌抗体效价高、药物抑制效果好的单个细胞孔。经 4 次亚克隆, 得到 3 株能够稳定分泌 CPAOZ 抗体的细胞株, 命名为 2C8、4E10、4G3, 表明抗 AOZ 单克隆细胞株筛选成功。

### 2.2 单克隆抗体效价的测定

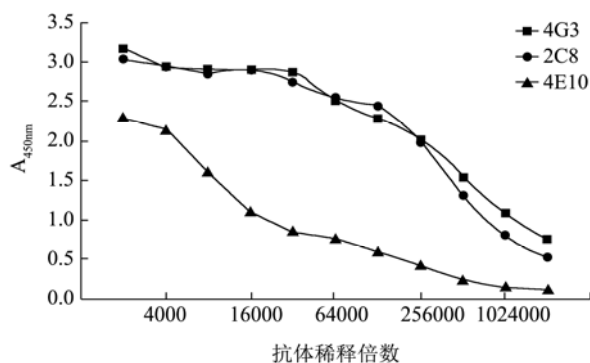


图 1 单克隆抗体间接 ELISA 效价测定

Fig.1 Monoclonal antibody titer by indirect ELISA

将 3 株细胞扩大培养后诱生腹水, 纯化后经检测,

抗体效价均达到 1:100 万以上, 其中以 4G3 的效价最高, 结果见图 1。

### 2.3 单克隆抗体亚型的测定

采用间接 ELISA 方法测定抗 CPAOZ 单克隆抗体的亚类。3 株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体与不同亚类的二抗显色有明显差异, 其中与 Ig G1 二抗的  $A_{450\text{nm}}$  值最高, 与 Ig M 的二抗显色微弱, 而与 Ig G2a、Ig G2b、Ig G3 和 Ig A 二抗几乎不显色, 3 株细胞分泌的抗体类型均以 Ig G1 为主。

### 2.4 单克隆抗体敏感性的测定

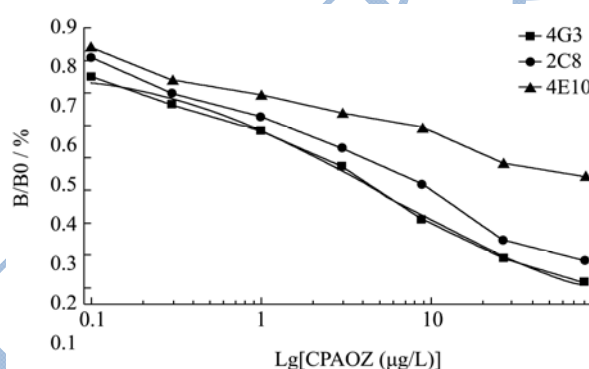


图 2 抗体 CPAOZ-4G3 抑制曲线

Fig.2 Antibody CPAOZ-4G3 inhibition curve

用间接竞争 ELISA 检测, 以吸光度百分比 B/B0% (B 代表不同浓度标准液的  $A_{450}$ , B0 代表零浓度标准液的  $A_{450}$ ) 为纵坐标, 以不同浓度标准液的对数 [Lg(CPAOZ)] 为横坐标, 绘制抗体抑制曲线。如图 2, 抗 CPAOZ 抗体对药物的抑制情况分别为: 4G3  $\text{IC}_{50}$  为 1.7  $\mu\text{g/L}$ , 2C8  $\text{IC}_{50}$  为 3.8  $\mu\text{g/L}$ , 且  $R^2$  均大于 0.99, 对 CPAOZ 具有较高的敏感性; 4E10  $\text{IC}_{50}$  为 27.7  $\mu\text{g/L}$ , 抑制情况较差。4G3 效果最佳, 选做进行后续试验。

### 2.5 单克隆抗体亲和力的测定

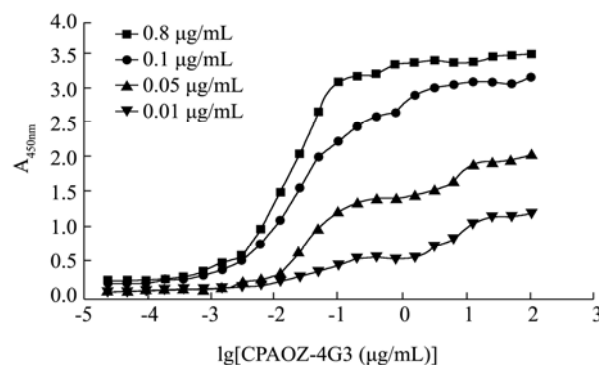


图 3 单克隆抗体亲和力的测定

Fig.3 Determination of the affinity of the monoclonal antibody

亲和常数计算以抗体浓度的对数为横坐标, 相应

的  $A_{450}$  值为纵坐标, 绘制 S 型曲线。以每条曲线上部平坦段的吸光度值作为 100%, 查出 50%  $A_{450}$  值时相对应的抗体浓度, 代入公式计算亲和常数  $K_a$  (CPAOZ-4G3) 为  $1.6 \times 10^9$  L/mol。

### 2.6 胶体金检测试纸条灵敏度

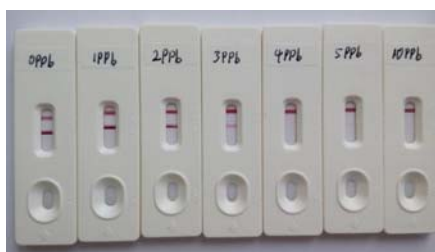


图4 胶体金试纸条的灵敏度试验

Fig.4 Sensitivity of the colloidal gold strip test

由图4所示, 当CPAOZ添加浓度为  $3 \mu\text{g/L}$  时, T线相对于  $0 \mu\text{g/L}$  时的T线的颜色变浅, 而当CPAOZ的添加浓度为  $4 \mu\text{g/L}$  时, T线消线, 说明胶体金试纸条的检测限为  $4 \mu\text{g/L}$ 。

### 2.7 胶体金检测试纸条特异性

检测结果如图5显示, 滴加CPAOZ的试纸条质

表1 呋喃唑酮代谢物胶体金试纸条与高效液相色谱法检测结果比较

Table 1 Comparison of the results of sample analysis by HPLC and colloidal gold test strips

方法	1	2	3	4	5	6	7	8
HPLC( $\mu\text{g/kg}$ )	未检出	未检出	1.73	未检出	未检出	未检出	2.35	未检出
ICA	-	-	+	-	-	-	+	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

## 3 结论

3.1 AOX 分子量小, 只具有反应原性, 所以在抗体制备过程中通常采用其衍生物作为免疫原。小分子抗原免疫融合后常出现阳性率高、抑制率低的结果, 本实验采取多种免疫原分组免疫的方法, 以提高融合后的抑制率, 最终得到 2 株稳定分泌抗体且抑制效果较好的细胞, 可以用于下一步的胶体金标记。

3.2 本研究采用柠檬酸三钠还原法制备出颗粒均匀、分散性好的胶体金溶液, 在最适 pH 值、按标记抗体的最佳标记量制备了金标抗体溶液, 并在此基础上组装了胶体金免疫层析试纸条。经检测, 试纸条的检测限为  $4 \mu\text{g/L}$ , 与其他几种硝基呋喃类代谢物衍生试剂不存在交叉反应, 检测结果准确可靠, 能够应用于 AOX 残留的快速检测, 提高水产品质量安全水平, 维护广大人民群众舌尖上的安全。

### 参考文献

控区 C 线显示一条棕红色线, 检测区 T 线不显示棕红色线, 表示检测结果为阳性, 其他 4 组不能抑制 T 线显色, 说明这 4 种物质不能与抗 CPAOZ 单抗结合, 表明制备的 CPAOZ 胶体金试纸条与其他几种硝基呋喃类代谢物的衍生物不存在交叉反应。



图5 胶体金试纸条的特异性试验

Fig.5 Specificity of the colloidal gold strip test

### 2.8 与仪器方法的比对

8 份水产样品经高效液相色谱检测, 其中 6 份样品未检出呋喃唑酮代谢物残留, 3 号样品检测出 AOX 含量  $1.73 \mu\text{g/kg}$ , 7 号样品检测出 AOX 含量  $2.35 \mu\text{g/kg}$ 。这些样品同时用呋喃唑酮代谢物胶体金试纸条检测, 结果与 HPLC 法完全符合, 见表 1。

[1] 闫叶娜. 呋喃西林代谢物单克隆抗体的制备及其免疫分析方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2010  
YAN Ye-na. Preparation of monoclonal antibody for nitrofurazone and development of its immunity analysis [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010

[2] 宋凯, 肖桂英, 姜桥. 高效液相色谱法同步测定饲料及兽药中 4 种硝基呋喃类药物[J]. 粮食与饲料工业, 2010, 3: 49-51  
SONG Kai, XIAO Gui-ying, JIANG Qiao. Simultaneous determination of four nitrofurazone drugs in feedstuff and veterinary drugs by high performance liquid chromatography [J]. Cereal and Feed Industry, 2010, 3: 49-51

[3] Xu W H, Zhu X B, Wang X T, et al. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 1-8

[4] 李静宇, 何小维, 李敏, 等. 呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备及鉴定[J]. 现代食品科技, 2014, 30(10): 182-186, 273  
LI Jing-yu, HE Xiao-wei, LI Min, et al. Preparation and identification of artificial antigen of furazolidone metabolite

- [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(10): 182-186, 273
- [5] Hoogenboom L A, van Bruchem D, Sonne K, et al. Absorption of a mutagenic metabolite released from proteinbound residues of furazolidone [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2002, 11(3): 273-287
- [6] Wickramanayake P U, Tran T C, Hughes J G. Simultaneous separation of nitrofurantoin antibiotics and their metabolites by using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27: 4069-4077
- [7] Artun Yibar, Figen Cetinkaya, Gul Ece Soyutemiz. Nitrofurantoin Metabolite 3-amino-2-oxazolidinone residues in chicken liver: A screening study [J]. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 7(4): 346-350
- [8] HU Xiao-zhong, XU Ying, Yediler Ayfer. Determinations of residual furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in fish feeds by HPLC-UV and LC-MS/MS, respectively [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(4): 1144-9
- [9] 周克楠,唐勇,蓝彩凤,等.呋喃唑酮代谢物单克隆抗体及其新型免疫层析检测试纸条的制备[J].*中国生物制品学杂志*,2014,27(7):927-931  
ZHOU Ke-nan, TANG Yong, LAN Cai-feng, et al. Preparation of monoclonal antibody against furazolidone metabolite and novel immunochromatographic strips [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2014, 27(7): 927-931
- [10] XIE Chun-hua, CHEN Fa-ju, YANG Tang-bin. A high-affinity anti-salbutamol monoclonal antibody: key to a robust lateral-flow immunochromatographic assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 426: 118-125
- [11] 柳爱春,刘超,赵芸,等.免疫胶体金法快速检测水产品中硝基呋喃类代谢物的研究[J].*浙江农业学报*,2013,25(1):95-102  
LIU Ai-chun, LIU Chao, ZHAO Yun, et al. Rapid determination of nitrofurantoin metabolites in aquatic products by colloidal gold method [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2013, 25(1): 95-102
- [12] Tao Le, Huan Yu. Determination of 3-amino-2-oxazolidinone in animal tissue by an enzyme-linked immunosorbent assay and a time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Analytical Letters*, 2015, 48(8): 1275-1284
- [13] LI Jun-hua, LI Chun-sheng, WU Meng, et al. Development of an ultrasensitive immunochromatographic assay (ICA) strip for the rapid detection of phenylethanolamine a in urine and pork samples [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(4): 894-899
- [14] 吴时敏.功能性油脂[M].北京:中国轻工业出版社,2001  
WU Shi-min. *Function oil and fat* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001
- [15] 国务院食品安全办等五部门关于印发《畜禽水产品抗生素、禁用化合物及兽药残留超标专项整治行动方案》的通知[EB/OL].[食安办(2016)15号]  
Notice of the food safety office of the state Council and other four departments on the issuance of the action plan for special rectification of antibiotics, banned compounds and veterinary drug residues exceeding standard in livestock and poultry aquatic products.[EB/OL].[Food Safety Office (2016) No.15]