

基于预孵育处理的牛奶中四环素 增敏型胶体金检测

Study of tetracycline detection in milk by pre-incubation mediated
signal enhanced colloidal gold method

陈菊移^{1,2} 吴玉晗² 姚 丽² 许 宙³ 吴 倩² 陈 伟²

CHEN Ju-yi^{1,2} WU Yu-han² YAO Li² XU Zhou³ WU Qian² CHEN Wei²

(1. 安徽省科学技术研究院, 安徽 合肥 230088; 2. 合肥工业大学食品与生物工程学院,

安徽 合肥 230009; 3. 长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南 长沙 410114)

(1. Anhui Academy of Science & Technology, Hefei, Anhui 230088, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China; 3. School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:在传统胶体金检测方法的基础上,采用预孵育反应模式,在均匀的液相中进行胶体金标记抗体与待测物的反应,提高抗原抗体间免疫识别反应的效率。将反应后的溶液滴加至试纸条上进行结果判读。结果表明:通过简单的反应模式改变,预孵育反应后再滴加至试纸条检测,四环素检测灵敏度提高了 5 倍,达 1 $\mu\text{g/L}$ 。说明改变传统胶体金试纸条反应的模式,从直接加样改为预孵育再加样,可以提高胶体金试纸条方法学的检测灵敏度。

关键词:四环素;胶体金;预孵育;信号增敏

Abstract: Based on the traditional colloidal strip, the pre-incubation reaction model was adopted, which was performed in the homogeneous aqueous solution between the colloid gold labeled antibody and analyte. This pre-incubation reaction was used to improve the efficiency of the immunoreaction. The pre-incubation solution was added to the colloidal gold strip for detection. Taking advantage of the pre-incubation model, the pre-incubated products were added to the colloidal gold strip for detection and the sensitivity for tetracycline was improved by 5 folds, as low as 1 $\mu\text{g/L}$. Changing the reaction model of the traditional colloidal gold strip from the direction adding sample to pre-incubation and adding sample could obviously improve the sensitivity of the tra-

ditional colloidal gold strip method.

Keywords: food safety; rapid detection; antibiotics; tetracycline; lateral flow strip; signal amplification

四环素类抗生素是一类由放线菌产生的广谱抗生素^[1-3],属于氧化并四苯环衍生物。因其价格便宜,抗菌效果好,在畜牧业中被广泛作为药物添加剂使用,用于防治畜禽的肠道感染和促进生长^[4]。动物的肌肉、肝脏、牛奶等中残留的四环素通过食物链进入人体,造成肾毒、过敏、产生抗生素耐药性等危害^[5-6]。长期食用四环素残留超标的牛奶更容易诱导体内微生物的抗生素耐药性,造成人体肠道菌群紊乱。因此,中国和欧盟国家规定牛奶中四环素类药物的最大残留限量为 100 $\mu\text{g/L}$ ^[7-9]。传统的四环素检测方法主要有微生物法、仪器法以及用于快速检测的酶联免疫吸附法等^[10-12]。微生物法是利用四环素对相关微生物生长的抑制原理,实现样品中四环素的检测,其操作繁琐、费时;仪器法是目前的国标法,能够实现精准定量,但需要复杂的样品前处理步骤、昂贵的仪器硬件,以及专业的操作人员;酶联免疫吸附法在一定程度上减少了对仪器的依赖,实现了普通实验室即可开展四环素残留检测工作,但其相对繁琐的操作步骤仍无法满足大批量牛奶样品的现场快速筛查需求。

胶体金侧向层析技术是利用胶体金纳米粒子标记识别抗体,然后在微孔膜载体上利用液体的毛细作用对识别产物进行层析迁移,在微孔膜上固定抗体或抗原的作用下将金纳米粒子聚集在检测线上,使检测线显色。不同浓度的检测对象其线上显色强度不同,通过肉眼观察

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFC1603606);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004b11020017);2018 安徽省科技厅直属预算单位科技服务能力建设项目

作者简介:陈菊移,女,安徽省科学技术研究院副研究员。

通信作者:陈伟(1982—),男,合肥工业大学教授,博士。

E-mail: chenweishnu@163.com

收稿日期:2020-07-08

检测线上颜色的深浅,即可在现场实现目标检测物的快速筛查和检测。该方法具有操作简便、结果简单易懂、成本低等优势,作为食品安全快速检测的重要方法学之一,在食品安全危害物快速筛查和监控方面发挥重要作用^[13-15]。随着各国在危害物残留限量方面要求的提高,除大型仪器的检测方法能满足较高的检测要求外^[16-18],传统的胶体金侧向层析方法无法满足某些残留物不断提高的检测限量要求。进一步提高传统胶体金侧向层析检测方法的灵敏度,更好地满足特定危害残留物的快速检测需求,同时可进一步拓展胶体金试纸条在痕量超灵敏检测领域的应用范围。由于快速的反应特点,胶体金侧向层析在免疫反应方面存在反应不充分、效率不高的可能性,从而造成灵敏度低,检测结果不准确。在液体均相中进行快速预孵育前,进行胶体金侧向层析的免疫识别,再进行层析作用,能够保证免疫识别反应的效率,提高检测的灵敏度和准确性。试验拟将传统胶体金试纸条直接滴加检测的反应模式,变更为快速预孵育的模式,旨在提高免疫识别反应的效率,提高胶体金试纸条对牛奶中四环素类残留物快速检测的灵敏度,为食品安全抗生素残留快速检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

液体奶:市售;

柠檬酸钠、氯金酸:分析纯,百灵威化学试剂有限公司;

酪蛋白钠(纯度>98%)、牛血清白蛋白(纯度>98%)、人血清蛋白(纯度>99%):国药集团化学试剂有限公司;

硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜、吸水纸、PVC 支撑底:上海捷宁生物科技有限公司;

羊抗鼠二抗、四环素单克隆抗体、四环素人工合成抗原、四环素标准品溶液(99.8%):北京点石生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

超纯水发生系统:Milli-RO Plus 型,美国密理博公司;

加热磁力搅拌器:RCT 型,广州仪科实验室技术有限公司;

双喷头喷膜仪:XYZ3000 型,美国 Biodot 公司;

全自动切条机:CM4000 型,美国 Biodot 公司;

紫外可见分光光度计:UV5100 型,安徽皖仪科技股份有限公司;

pH 计:pHS-3C 型,雷电科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 胶体金纳米粒子的制备 根据文献^[19-20]。

1.2.2 胶体金与四环素抗体的偶联 取 500 μL 1.2.1 制备的胶体金溶液于 1.5 mL 离心管,加入一定量的 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液,调节 pH;加入一定量的四环素单克隆抗体,震荡混匀,旋转反应 1 h;加入一定量的封闭蛋白,震荡混匀,旋转混合 0.5 h;9 800 r/min 离心 10 min;去除上清,加入一定量的重悬液,震荡混匀后备用;将重悬后的溶液分别滴加至微孔板中,4 μL /孔,冷冻干燥后备用。

1.2.3 胶体金试纸条的制备及组装 将已知浓度羊抗鼠二抗溶液和四环素包被原溶液分别用 PB 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)稀释至 1 mg/mL,分别吸入喷膜仪的不同喷头,在 NC 膜上划出两条线分别作为质控线(C 线)和检测线(T 线),于 27 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中老化备用。在 PVC 塑料底板上分别粘贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,利用自动切条机进行分切,得到宽度为 5 mm 的胶体金试纸条备用。

1.2.4 牛奶样品中四环素的检测 通过液相色谱—质谱鉴定为四环素类阴性后,向其中添加一定浓度的四环素,得到不同四环素添加浓度的牛奶样品。分别取 80 μL 不同浓度的牛奶样品,加入至冷冻干燥的胶体金—抗体复合物的微孔中进行预孵育。室温下预孵育反应 10 min 后,直接将胶体金试纸条样品垫一端插入微孔板中,或者将微孔板中的混合溶液滴加于胶体金试纸条的样品垫上,5 min 后观察试纸条上 C 线和 T 线的出线情况,判读结果。将判读后的试纸条结果,通过专业灰度分析软件 ImageJ 对 C 线和 T 线的显色强度进行定量分析,实现对牛奶中四环素残留的快速定量分析。

2 结果与分析

2.1 胶体金试纸条检测条件优化

2.1.1 抗体修饰量 胶体金纳米粒子表面固定标记的抗体的量直接影响金纳米粒子的稳定性和试纸条检测的灵敏度。由图 1 可知,当抗体修饰量从 1 μL 增加至 3 μL 时,T 线的显色强度有所增加;继续增加至 5 μL 时,T 线的显色强度无明显增加。因此选择 3 μL 作为增强型胶体金试纸条的抗体修饰量。

2.1.2 K_2CO_3 用量 胶体金与抗体的偶联是基于表面电荷吸附进行抗体固定的。由图 2 可知,当在胶体金溶液中加入 3 μL K_2CO_3 调节 pH 后,随着牛奶中目标四环素浓度的增加,T 线竞争抑制的效果不明显,至 2 $\mu\text{g/L}$ 仍有明显的显色,灵敏度不够;随着胶体金中 K_2CO_3 溶液添加量的增加,相同四环素浓度下,竞争抑制消线效果越来越明显,当胶体金体系中加入 7 μL K_2CO_3 溶液后,体系中 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的四环素就能引起 T 线的完全消线。但与 5 μL K_2CO_3 溶液调节后的检测结果相比,T 线的显色变浅。考虑到肉眼判断的敏感性,选择在胶体金体系中加入 5 μL K_2CO_3 溶液作为最佳 pH 调节条件。

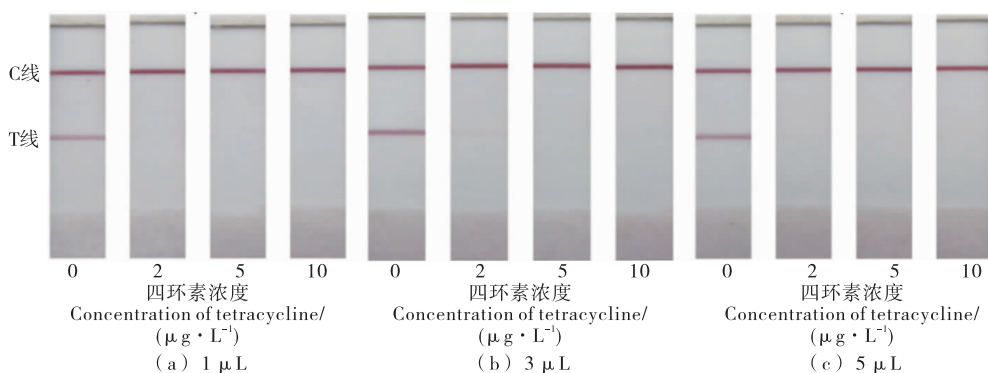
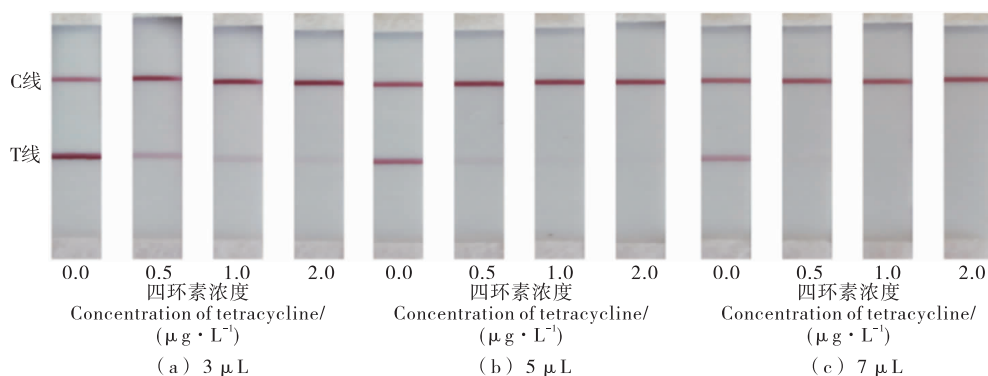


图1 抗体修饰量对预孵育增强型胶体金试纸条标记的影响

Figure 1 The optimization results of the antibody amount for the labeling of the gold nanoparticles

图2 K_2CO_3 用量对预孵育增强型胶体金试纸条标记的影响Figure 2 The optimization results of the K_2CO_3 amount for the pH regulation of the gold nanoparticles

2.1.3 偶联物复溶体积 将识别抗体与胶体金偶联后,分散体系的大小决定偶联物浓度高低,直接影响所制备预孵育增强型胶体金试纸条的检测结果。由图3可知,随着胶体金偶联物复溶体积的增加,C/T线显色强度逐渐减弱,但灵敏度却没有显著提高。与50 μ L复溶体积相比,60,70 μ L复溶体积的C/T线在0.5 μ g/L时已基本消线。阴性条件下,T线显线强度不高,达不到检测要求。50 μ L复溶体积条件下,1 μ g/L基本消线,同时阴性T线强度高,对比明显。因此,选择50 μ L作为胶体金偶

联物最佳复溶体积。

2.2 预孵育增强型胶体金试纸条四环素标准溶液检测结果

由图4可知,经预孵育后上样的胶体金试纸条在0~2 μ g/L,竞争免疫识别模式下,试纸条上T线的显色强度随目标四环素浓度的增加越来越弱,当四环素浓度为1 μ g/L时,T线的强度与阴性结果相比有明显的减弱,可作为预孵育胶体金试纸条检测四环素的灵敏度;当检测样品中四环素浓度增加至2 μ g/L时,T线被完全抑制不

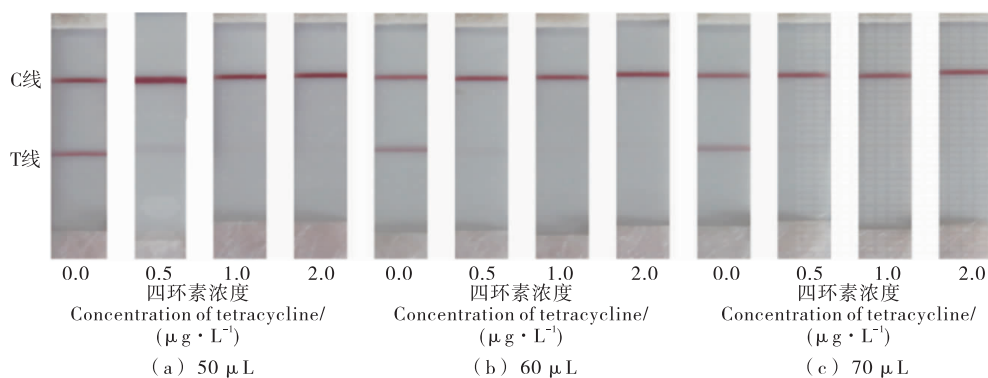


图3 偶联物复溶体积对预孵育增强型胶体金试纸条标记的影响

Figure 3 The optimization results of the redispersion volume of the gold nanoparticles-antibody conjugates

显色,作为预孵育胶体金试纸条检测四环素的消线浓度。由图 5 可知,传统胶体金试纸条在检测样品中四环素浓度为 $5 \mu\text{g/L}$ 时,T 线相比于阴性检测发生明显的减弱,当四环素浓度进一步增加至 $10 \mu\text{g/L}$ 时,T 线完全被抑制。综上,通过对待测样品与胶体金进行预孵育后,再利用胶体金试纸条进行检测,其灵敏度和检测线均有显著提高和改善,利用胶体金预孵育后,四环素的检测灵敏度提高了 5 倍,有利于低浓度条件下牛奶中四环素的准确检测。

2.3 基于预孵育增强型胶体金试纸条的牛奶中四环素检测结果

由图 6 可知,随着牛奶中四环素浓度的增加,试纸条

检测 T 线的显色越来越弱。当牛奶中四环素浓度为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 时,胶体金试纸条上 T 线显色已明显降低;当牛奶中四环素浓度进一步增加至 $2 \mu\text{g/L}$ 后,胶体金试纸条上 T 线被完全抑制不显色。说明预孵育增强型胶体金试纸条能够在无需复杂样品前处理的条件下,直接利用牛奶上样,预孵育处理样品后,利用胶体金试纸条进行现场快速检测。与图 4 相比,牛奶中复杂的样品基质对目标四环素的检测没有明显的影响,具有较强的抗基质效应。当四环素浓度为 $0.05 \sim 2.00 \mu\text{g/L}$ 时,检测信号具有很好的线性响应($R^2=0.9873$),可以基于此规律实现牛奶中四环素残留物的快速半定量分析。

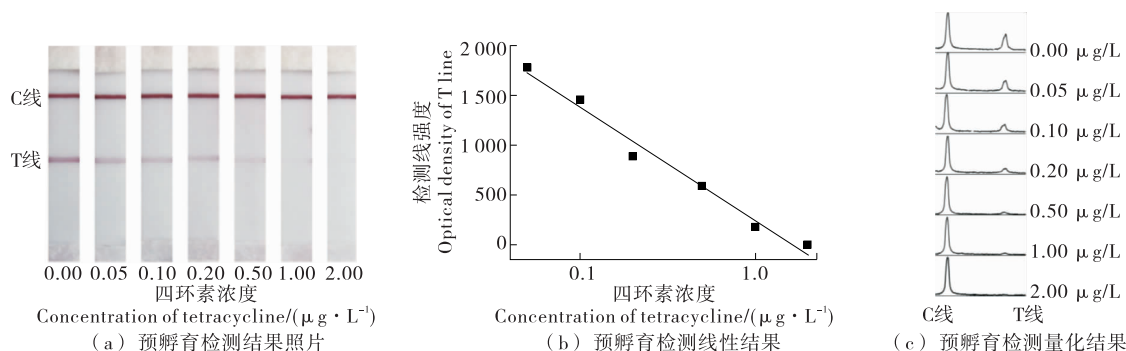


图 4 预孵育增强型胶体金试纸条的四环素标准溶液检测结果

Figure 4 Comparison results of pre-culture based signal enhanced lateral flow strip for tetracycline

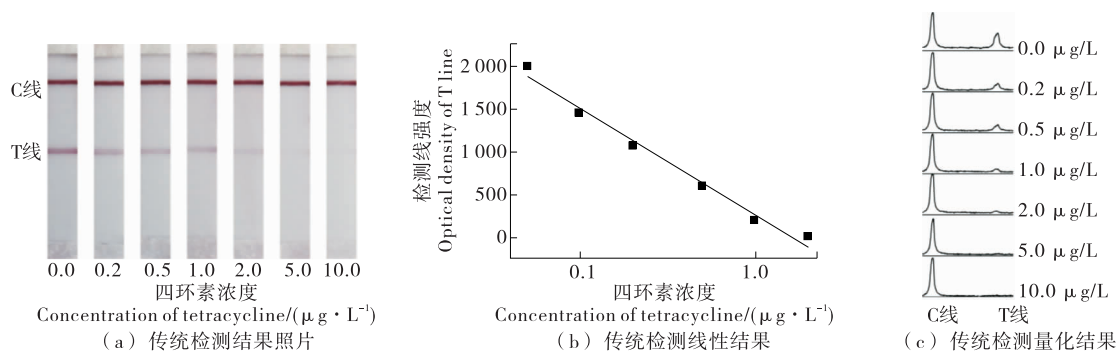


图 5 传统胶体金试纸条的四环素标准溶液检测结果

Figure 5 Comparison results of classic lateral flow strip for tetracycline

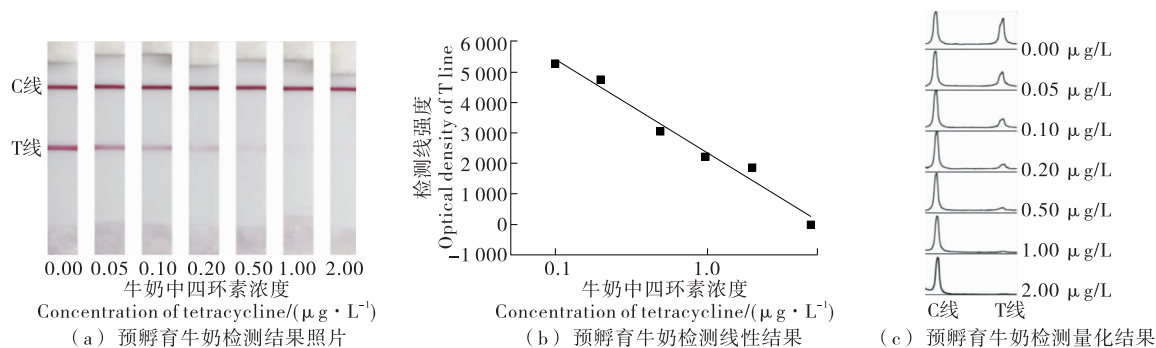


图 6 预孵育增强型胶体金试纸条的牛奶中四环素检测结果

Figure 6 Comparison results of pre-incubation based signal enhanced lateral flow strip with classic lateral flow strip for tetracycline

3 结论

对传统胶体金试纸条检测牛奶中四环素残留的反应模式进行了改进,将直接加样的反应模式改为预孵育反应模式,对牛奶中四环素残留检测的灵敏度进行了优化。结果表明,牛奶样品中四环素残留检测限提高了5倍,达 $1\text{ }\mu\text{g/L}$,说明进一步提高胶体金侧向层析检测中免疫识别反应的效率对侧向层析方法学检测灵敏度的提高具有重要意义。后续拟采用微流控芯片封装试纸条的预孵育模式,从而进一步简化检测步骤和提高方法学的操作性。

参考文献

- [1] MACNEIL J D, MARTZ V K, KORSRUD G O, et al. Chlortetracycline, oxytetracycline, and tetracycline in edible animal tissues, liquid chromatographic method: Collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 1996, 79(2): 405-417.
- [2] KEBLER D N, FOKUHL V K, PETRI M S, et al. Abiotic transformation products of tetracycline and chlortetracycline in salt solutions and manure[J]. Chemosphere, 2019, 224: 487-493.
- [3] QIN Jian-yuan, XIE Li-juan, YING Yi-bing. Rapid analysis of tetracycline hydrochloride solution by attenuated total reflection terahertz time-domain spectroscopy[J]. Food Chem, 2017, 224: 262-269.
- [4] 江玲, 曾昆, 邵杰, 等. 四环素类抗生素快速分析方法研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(8): 15-21.
- [5] 李妍, 闫蕊, 王孝研, 等. 动物源性食品中氟喹诺酮类抗生素残留检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(10): 2 918-2 928.
- [6] EDWARD E S, NIEUWENHUIS M R V, ANNEMIEKE K, et al. Oral antibiotics as a novel therapy for arthritis: Evidence for a beneficial effect of intestinal Escherichia coli[J]. Arthritis & Rheumatism, 2010, 43(11): 2 583-2 589.
- [7] 吴宁鹏, 班付国, 方忠意, 等. 鸡蛋中四环素类药物残留量测定的高效液相色谱法研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(8): 9-12.
- [8] 王赛. 基于核酸适配体传感器的蜂蜜中四环素残留快速检测方法研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2017: 15.
- [9] 陈丹, 姚冬生, 谢春芳, 等. 四环素核酸适配体电化学传感器的研制[J]. 中国生物工程, 2013, 33(11): 56-62.
- [10] 王承平, 秦宇, 侯蓓蓓, 等. UPLC-MS/MS 检测生鲜牛奶中 72 种抗生素残留[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 56-62.
- [11] 林津, 范小龙, 江丰, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中万古霉素类抗生素残留量[J/OL]. 食品与机械. [2020-07-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20200629.1529.008.html>.
- [12] 陈婷婷, 王鑫, 陶晓奇. 基于特异性识别生物探针检测食品中雌激素残留研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 221-225.
- [13] QIN Pan-zhu, QIAO Dong-qing, XU Jian-guo, et al. Rapid visual sensing and quantitative identification of duck meat in adulterated beef with a lateral flow strip platform[J]. Food Chem, 2019, 294: 224-230.
- [14] ZHONG You-hao, CHEN Yin-ji, YAO Li, et al. Gold nanoparticles based lateral flow immunoassay with largely amplified sensitivity for rapid melamine screening[J]. Microchimica Acta, 2016, 183: 1 989-1 994.
- [15] YAO Li, TENG Jun, ZHU Meng-ya, et al. MWCNTs based high sensitive lateral flow strip biosensor for rapid determination of aqueous mercury ions[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 85: 331-336.
- [16] 张婧, 贡松松, 吴剑平, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查与确证猪尿中 74 种抗生素及其他化合物[J]. 分析测试学报, 2019, 38(8): 905-912.
- [17] 黄坤, 吴婉琴, 罗彤, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中 11 种喹诺酮类兽药残留[J]. 肉类研究, 2019, 33(3): 40-45.
- [18] 王志昱, 张桂芳, 张晓瑜, 等. QuEChERS-高效液相色谱-质谱联用法同时检测鸡肝和鸡肝中 15 种喹诺酮类和四环素类抗生素[J]. 肉类科学, 2020(3): 51-57.
- [19] MEI Zhan-long, QU Wei, DENG Yi, et al. One-step signal amplified lateral flow strip biosensor for ultrasensitive and on-site detection of bisphenol A (BPA) in aqueous samples[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 49: 457-461.
- [20] YAO Li, YE Ying-wang, TENG Jun, et al. In vitro isothermal nucleic acid amplification assisted surface-enhanced raman spectroscopic for ultrasensitive detection of vibrio parahaemolyticus[J]. Anal Chem, 2017, 89: 9 775-9 780.

信息窗

更正启事

因作者疏忽,刊登于本刊 2020 年第 3 期的《低硬度调和牛油的制备及品质分析》,2020 年第 4 期的《精炼对牛油主要理化指标及挥发性成分的影响》两篇论文,文中基金项目均为“天津市科技重大专项与工程项目(编号:18ZXYENC00141)”,该项目基金编号有误,正确编号应为“18ZXYENC00120”,特此更正。

《食品与机械》编辑部
2020 年 8 月