

牛奶中新霉素残留胶体金免疫层析快速检测技术的研制

刘淑华¹, 何方洋^{2,*}, 冯才伟², 付军权², 聂雯莹², 于君²
(1. 乌鲁木齐市农产品质量安全检测中心, 新疆乌鲁木齐830000;
2. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206)

摘要:建立了一种快速、简单的检测牛奶中新霉素残留量的胶体金免疫层析法, 将抗新霉素单克隆抗体-胶体金标记物冻干于微孔板中, 将新霉素人工抗原和羊抗鼠抗体分别包被在醋酸纤维素膜上作为检测线(T线)和质控线(C线), T线的新霉素人工抗原与待测牛奶样品中的新霉素竞争结合新霉素单克隆抗体-胶体金标记物, 通过T线和C线的显色情况读出结果。试纸条对牛奶样品的检测限为200 $\mu\text{g/L}$, 牛奶样品无需稀释, 可直接检测, 检测时间只需3~5min, 与磺胺类、四环素类、氯霉素类等药物均无交叉反应, 检测结果重复性好, 可作为现场快速筛查牛奶中新霉素残留的有效手段。

关键词:新霉素, 胶体金免疫层析, 快速检测试纸条, 牛奶

Development of colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of neomycin residue in milk

LIU Shu-hua¹, HE Fang-yang^{2,*}, FENG Cai-wei², FU Jun-quan², NIE Wen-ying², YU Jun²

(1. The Quality and Safety of Agricultural Products Testing Center in Urumqi, Urumqi 830000, China;
2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102206, China)

Abstract: A rapid and simple colloidal gold immunochromatographic assay was established for the determination of Neomycin (NEO) Residue in milk. NEO monoclonal antibody-colloidal were freeze-dried in the microvoids. NEO-OVA and anti-antibody were coated on the nitrocellulose (NC) membrane to be the test line (T line) and the control line (C line). NEO-OVA and NEO in milk sample combined with NEO antibody by immune competition reaction. Test result was obtained by comparing the color of the T line and C line. Limit value of detection to NEO in milk sample could be 200 $\mu\text{g/L}$. Milk sample could be detected directly without dilution. The detection time could be 3~5min. No cross-reaction was observed to sulfonamides, tetracyclines, chloramphenicols, etc. The detection result had high reproducibility. The method could be efficiently used for the in-situ detection of NEO residue in milk sample.

Key words: neomycin; colloidal gold immunochromatographic assay; rapid detection strip; milk

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)06-0073-04

新霉素(NEO)属于氨基糖苷类抗生素,广泛应用于治疗奶牛的乳腺炎和子宫内膜炎。但新霉素的耳毒性和肾毒性较大。美国食品和药物管理局(FDA)规定牛奶中新霉素最高残留限量为150ng/mL^[1-2]。我国农业部发布的“动物性食品中兽药残留限量”(农业部235号公告)中规定,新霉素在牛奶中残留不超过500 $\mu\text{g/kg}$ ^[3]。目前,牛奶中新霉素残留的检测主要采用高效液相色谱分离分析法、液质联用法、离子色谱法等。上述方法虽然准确度高,但需要昂贵的检测仪器,检测成本高,分析速度慢,主要在检测实验室中使用^[4-8]。随着人们对食品安全的日益重视和乳品

进出口贸易的高速增长,目前迫切需要一种能够快速、稳定地检测牛奶中新霉素残留的检测方法。本研究建立了一种快速检测牛奶中新霉素的试纸条胶体金免疫层析法,方法灵敏度高、操作简单、检测快速、不需要仪器设备,适合在基层抽检、乳品企业质控、原料奶站现场大量筛查使用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛奶 市售;羊抗鼠抗体、新霉素标准品 Sigma公司;氯金酸 上海化学试剂有限公司;结合物释放垫、PVC背板 上海金标生物科技有限公司;硝酸纤维素膜、吸收垫、样品垫 普利来基因技术公司;新霉素人工抗原、新霉素单克隆抗体 均为自制;其他试剂 均为国产分析纯。

FA2104型电子天平 上海良平仪器仪表有限公

收稿日期:2012-09-18 * 通讯联系人

作者简介:刘淑华(1968-),女,在职硕士研究生,研究方向:农产品质量安全检测及监管。

司;90-2型磁力搅拌器 上海振荣科学仪器有限公司;L500型低速离心机 湘仪集团;CT300型数控切条机 上海金标生物科技有限公司;IsoFlow卷轮式喷膜仪 美国Imagene公司;FD-1A-50型冷冻干燥机 北京博医康;752S型分光光度计 上海凌光技术有限公司;DHP-600型生化培养箱 天津市中环实验电炉有限公司;Milli-Q Reference纯水仪 美国Millipore公司;液相色谱-串联质谱系统(LC-MS/MS) 日本岛津。

1.2 实验方法

1.2.1 胶体金的制备 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液。取0.01%氯金酸水溶液100mL加热至沸腾,边搅拌边加入1%柠檬酸三钠溶液2mL,待氯金酸水溶液变为紫红色,继续将上述溶液煮沸15min,冷却后,即为胶体金溶液。

1.2.2 新霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备 取胶体金溶液100mL,用0.2mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至7.2,按每毫升胶体金溶液中加入15 μ g抗体量的标准向胶体金溶液中加入新霉素单克隆抗体^[9-11],搅拌30min,加入10%牛血清白蛋白(BSA)使其在胶体金溶液中的终浓度为1%,静置30min,12000r/min,4 $^{\circ}C$ 离心30min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液(BSA 0.4%(体积百分含量)、吐温-80 0.1%(质量百分含量)、pH为7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液(PBS))洗涤两次,用10mL的复溶缓冲液将沉淀重悬,放置于4 $^{\circ}C$ 备用。

1.2.3 新霉素单克隆抗体-胶体金标记物的冻干 向微孔板中加入50 μ L新霉素单克隆抗体-胶体金标记物,放入冷冻干燥机中,在冷阱温度为-50 $^{\circ}C$ 条件下,欲冻4h后,再真空干燥15h,取出,即得到冻干的新霉素单克隆抗体-胶体金标记物,密封保存,金标抗体的冻干量为1 μ g/mL。

1.2.4 样品吸收垫的制备 将样品吸收垫置于含0.5%(体积百分含量)BSA、pH为7.2的0.1mol/L PBS中浸泡3min,烘干备用。

1.2.5 新霉素人工抗原和羊抗鼠抗抗体的包被 用pH为7.2的0.01mol/L PBS将新霉素人工抗原稀释至浓度为1mg/mL,用喷膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线T线上;用pH为7.4的0.01mol/L PBS缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释,用喷膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线C线上,包被量为1.0 μ L/cm。将包被好的反应膜置于37 $^{\circ}C$ 下干燥2h,备用。

1.2.6 试纸条组装 将样品吸收垫1、反应膜2、吸水垫3和保护膜7依次按顺序黏贴在PVC底板6上;样品吸收垫的末端与反应膜的始端相连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连接,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐吸水垫的末端与底板的末端对齐;在组装好的试纸条样品吸收垫上黏贴保护膜,保护



图1 新霉素快速检测试纸条平面结构图

Fig.1 Plane structure figure of rapid detection strip for neomycin

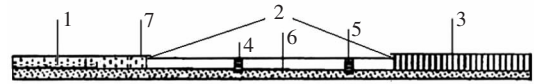


图2 新霉素试纸条剖面结构图

Fig.2 Profile of rapid detection strip for neomycin

注:1为样品吸收垫;2为反应膜;3为吸水垫;4为检测线(T);5为质控线(C);6为PVC底板;7为保护膜。

膜上印有MAX标记线^[11]。新霉素快速检测试纸条平面结构图和新霉素试纸条剖面结构图如图1和图2所示。

2 结果与分析

2.1 胶体金质量鉴定

制备的胶体金状态为澄清的红色溶液,表面无漂浮物。经投射电镜扫描,制得的胶体金颗粒形状规则呈圆形,大小基本一致,测量得到平均粒径为20nm,如图3所示。

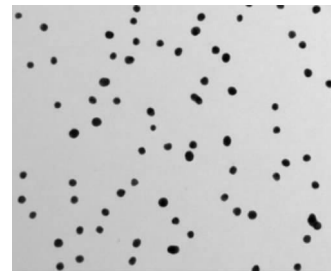


图3 胶体金透射电镜图(100000 \times)

Fig.3 Colloidal gold transmission electron micrograph(100000 \times)

2.2 新霉素人工抗原和羊抗鼠抗抗体最适包被浓度

新霉素人工抗原和羊抗鼠抗抗体用0.01mol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液分别配制浓度为0.2、0.5、1.0、1.5、2.0mg/mL和0.05、0.1、0.2、0.4、0.6mg/mL,用喷膜仪将上述浓度的新霉素人工抗原和羊抗鼠抗抗体包被于硝酸纤维素膜上,分别制备得到检测线T线和质控线C线,并与金标抗体装配成试纸条,取空白牛奶样品用试纸条进行检测,检测结果如表1所示。结果显示,采用1mg/mL的新霉素人工抗原和0.2mg/mL的羊抗鼠抗抗体的浓度即可满足灵敏度要求。增加羊抗鼠抗抗体的浓度并不能够提高检测灵敏度。

2.3 金标抗体的最适标记浓度

将新霉素单克隆抗体用pH7.2,0.2mol/L的PBS逐级稀释为5~40 μ g/mL,各取0.1mL按顺序加入一系列装有1mL胶体金的试管中,5min后在上述试管内分别加入0.1mL 10%氯化钠溶液,混匀,静置2h后观察结果,结果见表2、表3。

结果显示第1管加入氯化钠后胶体金溶液的颜色立刻产生变化,出现由红变蓝的聚沉现象。第9管中未加入氯化钠,颜色不发生变化。从第4管开始胶体金溶液的颜色基本一致,这是由于加入新霉素抗体量达到或超过了稳定胶体金的最适抗体量所致。因此1mL胶体金溶液中加入的最适抗体量为15 μ g,即金标抗体的最适浓度为15 μ g/mL。

2.4 试纸条检测限的确定

表1 阴性牛奶样品新霉素人工抗原和羊抗鼠抗体不同包被浓度的检测结果

Table 1 The detection results of different coating concentration for NEO-OVA and anti-antibody

羊抗鼠抗体 质量浓度 (mg/mL)	新霉素人工抗原质量浓度 (mg/mL)				
	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0
0.05	T线极浅红	T线浅红色	T线红色	T线红色	T线红色
	C线极浅红	C线极浅红	C线极浅红	C线极浅红	C线极浅红
0.1	T线极浅红	T线浅红色	T线红色	T线红色	T线红色
	C线浅红色	C线浅红色	C线浅红色	C线浅红色	C线浅红色
0.2	T线极浅红	T线浅红色	T线红色	T线红色	T深红色
	C线红色	C线红色	C线红色	C线红色	C线红色
0.4	T线极浅红	T线浅红色	T线红色	T线红色	T线红色
	C线红色	C线红色	C线红色	C线红色	C线红色
0.8	T线极浅红	T线浅红色	T线红色	T线红色	T线红色
	C线红色	C线红色	C线红色	C线红色	C线红色

表3 胶体金与标记蛋白比例实验结果

Table 3 The test result of quantity proportion of colloidal gold and marker protein

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蛋白质含量 (μg)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
10%氯化钠体积 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0
显色结果	蓝色	蓝色	深红	红色	浅红	浅红	浅红	浅红	浅红

表2 胶体金标记抗体最适量的测定

Table 2 Determine of NEO monoclonal antibody-colloidal for the most suitable concentration

项目	试管编号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
胶体金 (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
蛋白质含量 (μg)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
10%氯化钠 (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0

注:第1管为没有加入抗体的对照管,其内加入0.1mL的三重蒸馏水;第9管为没有加入氯化钠的对照管,其内加入0.1mL的三重蒸馏水。

向空白牛奶样品中添加新霉素标准品至终浓度分别为0、100、200、400μg/L,用试纸条进行检测,每个样品做5个重复,5min后观察结果,验证试纸条的最低检测限,根据图4判定结果。当牛奶样品中新霉素浓度为200μg/L,试纸条质控线显色,检测线不显色,因此该试纸条检测线为200μg/L。

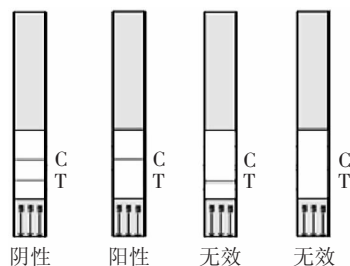


图4 胶体金试纸条法检测结果判定图

Fig.4 Determination of CGS test results

注:当样品为阴性(-)时,质控线C线和检测线T线均显示条带,表示样品中新霉素含量低于试纸条检测限;当样品为阳性(+)时,C线显示条带,而T线不显示,表示样品中新霉素含量高于或等于检测限;当C线不显示时试纸条无效。

2.5 特异性的测定

将磺胺二甲基嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺异噁唑、红霉素、氯霉素、甲砒霉素、四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、诺氟沙星、恩诺沙星、庆大霉素、链霉素溶于pH为7.4,浓度为0.01mol/L的磷酸盐缓冲溶液中,用试纸条检测,结果见表4,表4中结果显示新霉素与上述药物之间均无交叉反应,特异性强。

表4 NEO试纸条特异性实验 (n=5)

Table 4 Specificity test of NEO strip (n=5)

药物种类	化合物浓度 (μg/L)				
	0	100	200	400	600
新霉素	-	-	+	+	+
磺胺二甲基嘧啶	-	-	-	-	-
磺胺嘧啶	-	-	-	-	-
磺胺异噁唑	-	-	-	-	-
红霉素	-	-	-	-	-
氯霉素	-	-	-	-	-
甲砒霉素	-	-	-	-	-
四环素	-	-	-	-	-
土霉素	-	-	-	-	-
金霉素	-	-	-	-	-
强力霉素	-	-	-	-	-
诺氟沙星	-	-	-	-	-
恩诺沙星	-	-	-	-	-
庆大霉素	-	-	-	-	-
链霉素	-	-	-	-	-

注:“-”表示检测结果为阴性;“+”表示检测结果为阳性。

2.6 重复性观察

取试纸条检测阴性牛奶样品和含有新霉素的阳性牛奶样品各5份,每个样品重复测定5次,观察检测结果确定试纸条重复性。试纸条检测结果显示,对新

霉菌阳性样品进行检测,结果均为阳性,对阴性样品检测,结果均为阴性。试纸条检测未出现错误结果,因此试纸条的假阴性率为0,假阳性率为0。

3 结论

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,通过透射电镜观察胶体金颗粒均一,平均直径为20nm。以胶体金标记新霉素单克隆抗体,建立并优化胶体金免疫层析法检测牛奶中新霉素残留量的方法,方法的检测限为200 $\mu\text{g/L}$ 。试纸条的金标抗体冻干在微孔中,并且没有试纸卡壳的束缚,检测时直接插入较为粘稠的原料奶样品溶液中,加快了样品溶液在试纸条上的层析速度,金标抗体与原料奶样品中的新霉素药物充分反应,可显著提高检测灵敏度。因此,试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。其中,将金标抗体冻干在微孔试剂中,在检测过程中,能够使金标抗体与待检样品液充分接触,充分反应,从而减少误差,提高试纸条反应灵敏度。牛奶样品无需稀释,可直接检测,检测结果重复性好,并且能够满足我国对牛奶中新霉素最高残留量的检测要求,可以作为现场快速筛查牛奶中新霉素残留的有效手段。

参考文献

[1] 官斌,袁东星. 牛奶样品中新霉素残留量的离子色谱法测

定[J]. 分析实验室,2007,26(7):1-3.

[2] Stolker A A M, Brinkman UATH. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—review[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067:15-33.

[3] 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.

[4] 张晓剑. 新霉素单克隆抗体的制备及初步应用[D]. 扬州:扬州大学,2010.

[5] 刘宣兵,滕蔓,张改平,等. 新霉素单克隆抗体的制备及其免疫学特性鉴定[J]. 华北农学报,2009,24(4):80-83.

[6] Sherma J. Current status of pesticide residue analysis[J]. J AOAC Int, 1997, 80(4):283-287.

[7] 管斌. 水样中新霉素残留分析方法的建立及其在动物性样品分析中的应用[D]. 厦门:厦门大学,2007.

[8] 杨美成,刘振,严小蕾,等. 柱前衍生化HPLC法测定硫酸庆大霉素和硫酸新霉素的含量[J]. 中国临床药理学杂志,2004,13(5):288-291.

[9] 高以明,张敬友,王水明,等. 单克隆抗体直接竞争ELISA检测新霉素方法的建立和初步应用[C]. 2011食品安全技术与标准国际研讨会暨AOAC中国区会议论文集,2011:231-238.

[10] 王爱萍,李发弟,胡晓飞,等. 新霉素阻断ELISA试剂盒的研制与应用[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(6):857-864.

[11] 徐蓓. 食品中新霉素兽药残留酶联免疫检测方法研究[D]. 天津:天津科技大学,2007.

(上接第72页)

时荧光PCR筛选检测方法,采用了新型的MGB荧光探针,不仅特异性强而且检测灵敏度高,能够在2~3h内检测出微生物酶制剂中是否残留有转基因成分,能够监测微生物酶制剂中转基因微生物及其DNA的分离状况,对生产起到极大的帮助作用,还可为政府职能部门对微生物酶制剂的监测提供一定的技术支持。

转基因微生物检测方法的建立面临的问题主要是阳性标准品(转基因微生物菌株)难以获得,目前转基因微生物酶制剂的生产主要被一些大企业垄断,优良的转基因微生物工程菌株难以获得。由于AOX1启动子具有高效的基因表达效率,因此在转基因微生物育种中被广泛应用^[6-11],基于此情况,本实验建立了转基因微生物的筛选检测方法,主要应用于转基因微生物的筛选检测,不能进行转基因生物品种鉴定,在实际应用有一定的选择性,主要针对含AOX1启动子基因的转基因微生物。本实验方法的建立将对今后转基因微生物检测工作的开展提供了一定的借鉴和参考作用,本课题组将继续深入开展转基因微生物检测方面的研究工作。

参考文献

[1] 侯振建. 食品添加剂及其应用技术[M]. 北京:化学工业出版社,2004:81-82.

[2] 陈红兵,高金燕. 来源于转基因微生物的食品酶制剂[J]. 食品添加剂,2001(4):23-26.

[3] 姚继承. 现代生物技术在食品添加剂及配料产业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2007:184-197.

[4] 孙彩霞,沈平,刘信,等. 欧盟转基因微生物风险评估[J]. 浙江农业科学,2010(6):1182-1185.

[5] 姚晶,吴正均,任婧. 巴氏德毕赤酵母表达系统的研究进展[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):35-38.

[6] BIN Y, CHUN YI Z, JIAN HUA W, et al. Efficient expression of recombinant *Pichia pastoris* yeast of biologically active phytase[J]. Science in China(series C), 1998, 41(3):330-336.

[7] Hartner F S, Ruth C, Langenegger D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(12):76.

[8] Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(5):1039-1047.

[9] Wang J, Nguyen V, Glen J, et al. Improved yield of recombinant merozoite surface protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* using chemically defined media[J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 90(7):838-847.

[10] 汪志浩,张东旭,李江华,等. 混合碳源流加对重组毕赤酵母生产碱性果胶酶的影响[J]. 生物工程学报,2009,25(12):1955-1961.

[11] 祝建洪,孙建,陈珈,等. 植酸酶分泌型酵母工程菌的构建[J]. 南开大学学报:自然科学版,2002,35(4):1-5.