

胶体金免疫层析法快速检测氯霉素残留

李余动¹ 张少恩¹ 吴志刚² 张晓辉³ 袁彩君¹ 叶晓娟¹

(1. 博顿生物检验技术(杭州)有限公司,浙江 杭州 310022;2. 浙江省出入境检验检疫局,浙江 杭州 310012;3. 浙江省水产质量检测中心,杭州 浙江 310012)

摘要:为建立用于快速检测样品中氯霉素残留含量的胶体金免疫层析试纸条,采用免疫竞争法,将抗氯霉素单克隆抗体-胶体金复合物包被在胶体金结合垫上,并将人工合成的氯霉素抗原包被在硝酸纤维素薄膜表面作为检测线(T线),其与待测样品中氯霉素竞争结合胶体金标记的氯霉素单克隆抗体,并能以颜色直观显示检测的定性结果。检测虾肉等组织试样时,灵敏度最低值可达到1 ng/ml,只需5~10 min,与类似物无交叉反应。试纸条具有较高的灵敏度及特异性,操作便捷,稳定可靠,可作为氯霉素残留现场监控的有效筛检手段。

关键词:氯霉素;半抗原;免疫测定;胶体金

Nanocolloidal gold-based immunoassay for rapid detection of chloramphenicol residues

LI Yir-dong, ZHANG Shao-en, WU Zhi-gang, ZHANG Xiao-hui, YUAN Cai-jun, YE Xiao-juan
(Bioden Inspection Biotech (Hangzhou) Co., Ltd., Zhejiang Hangzhou 310022, China)

Abstract: A rapid, simple colloidal gold immunochromatographic assay for detecting chloramphenicol (CAP) residues has been established. Nanocolloidal gold particles were prepared and labeled to an anti-CAP monoclonal antibody (MAb). CAP was conjugated to bovine serum albumin (BSA) and dispersed on a nitrocellulose (NC) membrane to be the test line (T). The more analyte present in the sample, the more effectively it would compete with the CAP-BSA for binding to the limited amount of gold-labeled anti-CAP MAb. The presence or absence of a colored band on the test line indicates a negative or positive result. When measuring the water sample spiked with chloramphenicol, the minimum detection concentration can reach 1 ng/ml. The major advantage of the one-step strip test is that the test can be completed in less than 10 minutes.

Key word: Chloramphenicol; Haptens; Immunoassay; Gold Colloid

氯霉素(Chloramphenicol, CAP)是一种高效广谱抗生素,对多种病原菌有较强的抑制作用,常用于动物各种传染性疾病的治疗。但其在动物肉、奶、蛋等食品中的残留严重威胁人体健康,能引起再生障碍性贫血和粒状白细胞缺乏症等疾病,低浓度的药物残留还会诱发致病菌的耐药性。欧盟、美国等许多国家已明确禁止CAP用于生产动物源性食品,并制定了严格的限量标准。加入WTO后,农、兽药残留日益成为各发达国家限制我国农副产品出口的技术壁垒。2002年1月30日,欧盟委员会以从中国进口的虾仁中检出氯霉素为由,发布2002/69/EC决议,禁止中国动物源性食品进口,直接造成我国水产品出口6亿多美元的经济损失。

氯霉素等半抗原(分子量<1 000 Da)的检测方

法,通常采用酶联免疫吸附反应(ELISA)及高效液相色谱(HPLC)及气-质联用(GC-MS)等方法^[1]。然而,这些方法需要较长的实验时间及相应昂贵的实验设备,主要被限制在实验室中使用。随着人们对食品安全的日益重视和进出口贸易的高速增长,迫切需要一种能快速、稳定地检测农、兽药残留的方法。胶体金免疫层析试条因其使用方便已被广泛用于小分子物质的诊断检测,目前已经开发出用于链霉素、磺胺嘧啶等农、兽药残留检测的试纸条^[2]。本实验开发了一种快速检测氯霉素残留的免疫层析试纸条,具有灵敏度高,操作快捷,不需要附加设备等优点,适用于加工企业对原辅材料验收,人员用药,成品分析以及养殖场对投入品的检测等工作。

作者简介:李余动 男 硕士 工程师

1 材料与方法

1.1 材料 氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、氯霉素标准品、牛血清白蛋白(BSA)和聚乙二醇 20000 购于 SIGMA 公司;抗氯霉素单克隆抗体(MAb),购于 Biotest 公司(免疫原为 KLH 与氯霉素的偶联物,鼠源性);水溶性碳二亚胺(EDC)、氯霉素琥珀酸钠盐,购于 Fluka 公司;羊抗鼠 IgG 购于北京鼎国生物技术有限公司;氯霉素 ELISA 检测试剂盒购于 EURO - DIAGNOSTICA 公司;Bradford 蛋白定量试剂盒购于 Bio-Rad 公司;BioJet XYZ3000 型点膜仪购于美国 BioDot 公司;硝酸纤维素膜(NC)、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫购于 Millipore 公司。

1.2 胶体金的制备及抗氯霉素 MAb 的金标记 胶体金颗粒的大小平均为 30 nm,参照文献^[3]制备胶体金颗粒,在 100 ml 去离子水中加入 1%柠檬酸三钠 1 ml,煮沸后迅速加入 1%氯金酸 1 ml,继续煮沸 10 min,冷却后,4℃下保存备用。

取已制备好的胶体金溶液 100 ml,用 0.1 mol/L 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入抗氯霉素 MAb 1.5 mg,搅拌 20 min,再逐滴加入 2 ml 25 mg/ml 聚乙二醇 20000 (PEG 20000),搅拌 15 min。20 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 10 ml pH 7.4 PBS 缓冲液(含 0.4 mg/ml PEG)清洗 2 次。将沉淀用 5 ml 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)溶解,用 0.22 μm 无菌过滤器过滤后,4℃保存备用。

1.3 样品制备 氯霉素标准样品配制 以甲醇配成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准贮液,后以超纯水稀释成各浓度梯度。

肉类样品预处理 取 10 g 均质过的试样,加入 10 ml PBS,37℃混合保温 90 min 后,3 000 r/min 离心 20 min,收集上清液备用。

牛奶样品预处理 取 5 ml 新鲜牛奶,放入离心管中,10 3500 r/min 离心 10 min,吸除上层的脂肪层,取去脂牛奶用 PBS 适当稀释后备用。

将上述试样处理液与各种浓度的氯霉素标准品按不同体积比混合成所需浓度的试样。

部分实际待测试样的处理方法参考荷兰 EURO - DIAGNOSTICA 氯霉素检测试剂盒产品试样处理方法。

1.4 氯霉素全抗原的合成 包被抗原为氯霉素与 BSA 的偶联物(CAP - BSA),其合成方法为活性酯法及叠氮法,参见文献^[4],其中活性酯法为:先将 20 mg 氯霉素琥珀酸盐、15 mg EDC 及 30 mg BSA 混合溶于 1 ml Tris 缓冲液中,0~4℃下避光搅拌 1 h,再加入 5 mg EDC,在 0℃下搅拌反应 12 h,静置过夜后,后用 Tris 缓冲液透析 3 d。

将合成的 CAP - BSA 全抗原稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (蛋白浓度),后做 200~300 nm 波长的紫外扫描,参照杨利国介绍的计算方法^[8]测算偶联比,即 CAP 与载体蛋白 BSA 的摩尔比。其中 BSA 浓度以 BRADFORD 蛋白定量试剂测定。

用 EURO - DIAGNOSTICA 公司的 ELISA 试剂盒检测氯霉素浓度,操作方法参见产品说明书。在 450 nm 波长处测 A 值,计算抑制率:

$$\text{抑制率} = B/B_0 \times 100\%$$

B_0 为不含待测试样中氯霉素的吸光值,B 为含待测试样中氯霉素吸光值。

1.5 试纸条组装 用点膜机把适当浓度的 CAP - BSA 及羊抗鼠 IgG 喷在 NC 膜上,分别作为检测线(T)和控制线(C),在 37℃烘箱干燥 8 h。以同样方法,将制备好的金标记 CAP 单克隆抗体包被在胶体金结合垫上。

试纸条组成为一个 PVC 背板,在其上按顺序粘上样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫(图 1)。用带 MARK 胶带绕背板覆盖在样品垫、胶体金结合垫及吸水垫上。用切割机将贴好的板切割成 3 mm 宽的条,放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

1.6 检测方法 将 CAP 检测试纸条带 MARK 线的一端插入装有待测试样的容器中,使试样溶液沿膜从下往上移动。5 min 以后,即可判读结果。

2 结果与讨论

2.1 检测结果的判读 试纸条的组成如图 1 所示。当样品垫端放入检测试样时,由于毛细作用液体向前移动。到达 T 线时,试样中的氯霉素与固定在 T 线上的 CAP - BSA 复合物竞争结合抗氯霉素 MAb - 胶体金复合物,若试样中氯霉素浓度小于 1 ng/ml,则胶体金结合垫中的抗氯霉素 MAb - 胶体金复合物与 T 线上 CAP - BSA 及 C 线上羊抗鼠 IgG 大量结合,T 线呈色与 C 线相近,结果为阴性;若试样中氯霉素的浓度大于 1 ng/ml,则抗氯霉素 MAb - 胶体金复合物基本上与检测试样中的氯霉素结合,不能与 T 线上的 CAP - BSA 结合,因此 T 线将比 C 线浅很多或完全看不到线,而且试样中氯霉素浓度越高 T 线显色越浅,结果为阳性。如检测正确进行的话,控制线总会显示红色线条。

2.2 CAP - BSA 人工抗原合成 本试纸条检测线所用的包被抗原为 CAP - BSA 偶联物,由本实验室人工合成。偶联反应后所得产物经紫外光谱分析,参照文献^[8]所介绍的方法计算其偶联比率。多次实验所得抗原的偶联比率在 10~40 左右,部分数据

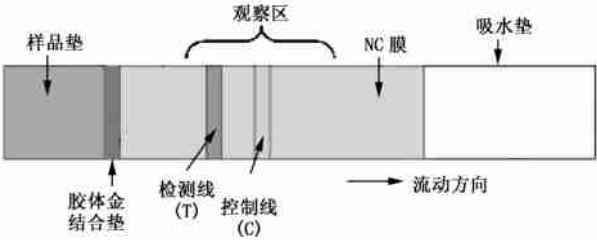


图 1 免疫层析试纸条的示意图

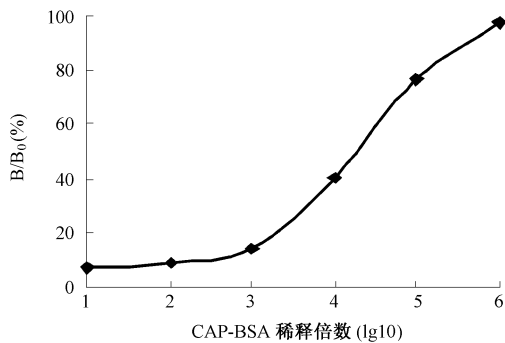


图 2 氯霉素合成抗原竞争抑制曲线

见表 1。由表 1 可以看出,BSA 与 CAP 偶联后最大吸收峰都发生蓝移,可能是其分子结构发生变化及环境极性增大的原因。对氯霉素与 BSA 的偶联是否成功,还采用竞争抑制 ELISA 检测来判断。按梯度稀释 CAP - BSA 偶联物,后由 CAP - BSA 与 CAP 标准品竞争结合氯霉素抗体。所得结果见图 2。

图 2 表明氯霉素标准品对不同浓度 CAP - BSA 的抑制率,随着 CAP - BSA 稀释倍数的升高(CAP - BSA 含量减少)酶标氯霉素标准品对其的抑制率升高。即 CAP - BSA 与酶标氯霉素竞争结合氯霉素抗体,表明抗原偶联是成功的。

表 1 氯霉素 - BSA 偶联物的结合比与最大吸光值			
合成抗原	合成方法	偶联比	$\lambda_{\max}$ (nm)
CAP - BSA 1	活性酯法	1 15.1	218
CAP - BSA 2	活性酯法	1 20.1	217
CAP - BSA 3	活性酯法	1 32.2	214
CAP - BSA 4	叠氮法	1 9.0	207

本实验还对 CAP 抗原的合成方法采用了活性酯法与叠氮法,并比较其对 T 线的影响。由于叠氮法合成的叠氮化合物为淡黄色物质,干扰 T 线显色,因此不适用作为检测线的包被抗原。而活性酯法合成的偶联物 CAP - BSA 1 ~ 3,以相同的 BSA 浓度包被 T 线,控制线都能与金标记的 CAP 抗体反应出现明显的红色线条,适合做包被抗原。并发现其不同结合比对检测的灵敏度有一定影响,见试纸条的调试部分。

2.3 试纸条的调试 将不同半抗原结合比、不同浓

度的 CAP - BSA 和不同 A 值的氯霉素单克隆抗体 - 胶体金复合物分别包被在硝酸纤维素膜和胶体金结合垫上,反复调试,使最终的灵敏度达到所需的要求。其用量如下:氯霉素单克隆抗体 - 胶体金复合物采用 A 值为 40 (喷量 2 μ l/cm) 的包被量,检测线 CAP - BSA 用量为 0.1 mg/ml (喷量 0.75 μ l/cm),控制线羊抗鼠 IgG 用量为 1 mg/ml (喷量 0.75 μ l/cm)。

调试结果表明采用不同 pH 值 5、6、7、8、9、10 的样品垫对试剂条的灵敏度没有产生明显影响。将硝酸纤维素膜用各种不同配比的溶液做封闭,发现试剂条的 C、T 线显色都变浅,但对灵敏度和特异性没有明显影响,所以最终制备试剂条时没有采用封闭的方案。经过比较发现,用同样的 C、T 线浓度、抗体 - 胶体金复合物 A 值和同样的包被量,采用 12 μ m 和 5 μ m 这两种不同孔径的硝酸纤维素膜,后者做成的试剂条灵敏度更高一些。在制备好的抗体 - 胶体金复合物中加入不同比例的蔗糖和海藻糖,会对胶体金复合物从胶体金结合垫上的释放能力产生影响,在一定范围内,加入的蔗糖和海藻糖的比例越高,胶体金复合物释放得越快。

采用半抗原偶联率比较高的 CAP - BSA 做成的试剂条灵敏度更高,这可能同偶联比率高的 CAP - BSA 与氯霉素单克隆抗体 - 胶体金复合物发生反应的能力更强有关。但过高的半抗原结合比并不符合 C、T 线颜色对比这种判断,反而使灵敏度下降。

2.4 检测的灵敏度 将氯霉素标准品配置成不同浓度的分析试样溶液:0、1、2、5、10 ng/ml,用试纸条进行测定,每个试样做 3 个重复,5 min 后观察结果,检测线颜色呈梯度递减,结果显示如图 3 所示:

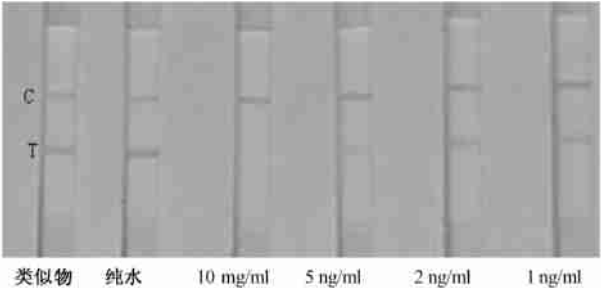


图 3 胶体金层析试纸条的检测结果

本试纸条氯霉素的最低检测水平 (LDL) 的判断标准是当检测线比控制线的颜色明显淡时,试样中氯霉素的含量为 1 mg/ml。当试样中的 CAP 浓度大于 5 ng/ml 时,检测线完全消失;当 CAP 浓度小于 0.5 ng/ml 时,检测线与控制线在肉眼下没有明显区别。由上图可知,本试纸条的 LDL 可达到 1 ng/ml。检测限如再降低,容易出现假阴(阳)性的结果。由于其使用主要是在生产场所现场大批量初筛时定性

检测,此灵敏度可以满足实际的筛选需要,如需可靠的定量结果还需在实验室里做 ELISA、HPLC 等进一步检测。

2.5 检测的特异性 将氯霉素琥珀酸钠,甲矾霉素,磺胺二甲基嘧啶,四环素,青霉素,链霉素 6 种抗菌素溶于 PBS(pH 7.4,0.01 mol/L),配成不同浓度,然后用试纸条检测。结果如图 3 所示,氯霉素琥珀酸钠及氯霉素在低浓度下即不出现红色 T 线。而后 5 者(类似物)即使在浓度大于 100 ng/ml 时,也能见明显的 T 线,可见与不同抗菌素的交叉反应很低(因定性检测不能给出交叉率的确切数值)。由于 T 线包被抗原是以琥珀氯霉素钠盐偶联 BSA 而成,因此氯霉素琥珀酸钠与氯霉素的这种交叉反应是在意料之中的。因此免疫层析试纸条可以通过观察试纸条上检测线的有无及颜色变化进行定性检测,对氯霉素具有较高的特异性。

2.6 稳定性试验 用同一批次不同试纸条检测同一样品,及用不同批次试纸条测定同一样品,其质控线、测试线的显色时间及颜色深浅和最终结果判读基本相同。

利用该试纸条对含不同浓度氯霉素残留的虾肉提取液试样进行检测并与 ELISA 的检测结果比较,总共检测 50 份(阳性 30 份,阴性 20),部分阳性样本数据见表 2。由表 2 可见,试纸条以 1 ng/ml 为判断限值,没有出现假阳性及假阴性,检测结果与 ELISA 结果完全相符。如把检测限值再降低则易出现假阳性的结果,不能达到试纸条检测稳定性的要求。

表 2 部分含氯霉素残留试样的试纸条法与 ELISA 检测比较		
试样(虾肉提取液)	氯霉素浓度(ng/ml)	
	Strip test	ELISA
1	-	0.0362
2	-	0.0570
3	-	0.1758
4	+	1.0288
5	+	2.3365
6	+	3.6350
7	+	5.7132

注:+:阳性,-:阴性,ELISA 结果为 2 次重复检测的平均值。

免疫胶体金技术是 20 世纪 70 年代初期由 Faulk 和 Taylor 始创,最初用于免疫电镜技术。目前金标记技术常与膜载体配合,形成特定的免疫检测方式,如免疫渗滤试验和免疫层析试验等。免疫层析试纸条就是此技术用于体外快速诊断的一个重要发展方向,是在现代单克隆抗体技术、胶体金免疫层

析技术和新材料技术基础上发展起来的新型检测技术。近年来该技术发展迅速,已经在临床诊断特别是床边检测(POCT)中得到了广泛应用,如传染病、早孕、癌症等的检测。目前已有些非临床检测的应用,如毒素、药残留、环境监测等^[5,9]。我们研制的氯霉素胶体金免疫层析检测试纸条可用于饲料、水产类、牛奶等的检测,最低检测含量(LDL)达到 1 ng/ml。相对于目前使用 ELISA 方法检测氯霉素样品至少需要 24 h,费用约为 300 元/个,试纸条只需 10 min 就可出结果,费用低廉,而且不需要附加实验设备,能满足养殖场所和加工企业对原辅材料、人员用药及产品初筛等的检测需要。但由于实际样品来源有限,检测试纸条的各种参数,需在扩大样品范围与数量条件下做进一步的验证。

参考文献

[1] 蒋定国、杨大进、方从容,等. 高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素残留量的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003,15(1):36-38.

[2] Verheijen R, Stouten P, Cazemier G,et al. Development of a one step strip test for the detection of sulfadimidine residues [J]. Analyst, 1998, 123:2437-2441.

[3] Frens G. Particle size and sol stability in metal colloids[J]. Kolloid ZZ Polym, 1975, 250:736-741.

[4] Anna Yu Kolosova, Jeanne V Samsonova, Alexey M. Competitive ELISA of chloramphenicol: Influence of immunoreagent structure and application of the method for the inspection of food of animal origin[J]. Food and Agricultural immunology, 2000, 12:115-125.

[5] R Verheijen, I K Osswald, R Dietrich, et al. Development of a one step strip test for the detection of (Dihydro) streptomycin residues in raw milk[J]. Food and Agricultural Immunology, 2000,12:31-40.

[6] 王桂枝,石德石,毕丁仁,等,氯霉素免疫原的合成与鉴定[J]. 中国兽医学报,1998,18(2):163-167.

[7] 何方洋,冯才伟,张航. 氯霉素全抗原合成及多克隆抗体的制备[J]. 中国兽医科技,2003,33(3):51-53.

[8] 杨利国,酶免疫测定技术[M],南京:南京大学出版社, 1998,279-281.

[9] Pei Zhou, YiTong Lu, Jiang Zhu,et al. Nanocolloidal gold-based immunoassay for the detection of the N-methylcarbamate pesticide carbofuran [J]. J Agric Food Chem, 2004,52:4335-4359.

[收稿日期:2005-01-30]

中图分类号:R15;S481.8 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)05-0416-04