

可视化凝胶酶联免疫吸附分析法检测牛奶中庆大霉素和卡那霉素

徐飞¹ 栗静雅² 周洁² 刘茂林¹ 刘义明¹
王建芬³ 丁双阳^{* 2} 李秀波^{* 1}

¹(中国农业科学院饲料研究所, 国家饲料药物基准实验室, 北京 100081)

²(中国农业大学动物医学院, 国家兽药残留基准实验室, 北京 100094)

³(北京市延庆县畜牧技术推广站, 北京 102100)

摘 要 建立了牛奶中同步测定庆大霉素和卡那霉素的可视化凝胶 ELISA 方法。在凝胶检测柱的两个检测层中填充 CN-Br 活化的 Sephrose 4B 凝胶-羊抗鼠 IgG 作为固相载体, 加入药物的单克隆抗体与载体结合, 酶标抗原和待测样本中的药物共同竞争有限的单克隆抗体, 通过 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色定性判断药物的存在。本方法采用一步法, 检测时间仅为 15 min, 对庆大霉素和卡那霉素的灵敏度为 2.0 μg/L, 对牛奶中的两种药物检出限 (Cut-off 值) 均为 5 μg/L。牛奶盲样比对实验表明, 本方法与超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法测定结果相符。

关键词 凝胶酶联免疫分析; 庆大霉素; 卡那霉素; 同步测定; 牛奶

1 引言

庆大霉素和卡那霉素是兽医临床上常用的氨基糖苷类药物, 特别是在奶牛隐形乳房炎和结核性乳房炎的治疗上广泛使用^[1]。该类药品进入动物机体后与动物组织有很强的亲和力, 残留时间较长, 且具有严重的耳毒性和肾毒性, 可能影响神经传导、损害肠道的吸收, 引发菌群失调, 直接食用残留超标的动物食品, 会带来潜在的危害^[2]。因此, 建立牛奶中这两种药物的残留可靠有效的分析方法非常必要。

由于氨基糖苷类药物缺乏相同母环结构, 很难通过单克隆抗体技术筛选出广谱抗体, 因此, 采用传统的酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 无法实现多个氨基糖苷类药物的同步检测。可视化凝胶 ELISA 方法是近年来出现的一种新型检测模式, 主要在免疫层析柱中完成, 不同于传统的免疫亲和色谱用于样品净化的目的^[3, 4], 该方法是一种定性检测方法, 经 CN-Br 活化的 Sephrose 4B 凝胶作为固相载体, 偶联羊抗鼠 IgG。加入单克隆抗体与固定的 IgG 特异性的发生反应, 过量的单克隆抗体受重力作用直接流出小柱。再从柱口处加入药物和酶标抗原, 共同竞争有限的单克隆抗体, 最后加入 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色。呈现蓝色为阴性样本, 呈现无色为阳性样本。通过在单一层析柱中设置多个凝胶检测层, 本方法可实现同步检测。可视化凝胶 ELISA 最早的文献报道始于 2008 年^[5], 已有关于 2, 4, 6-三氯苯酚^[6]、赭曲霉毒素 A^[7]、苯并芘^[8]、玉米赤霉烯酮-4-葡萄糖苷^[9] 检测的报道, 主要侧重在液体样本的检测, 检测项目偏重于毒素和有机物^[10]。对于组织样品中药物残留检测的报道较少。Yuan 等^[11] 报道了奶、蜂蜜、鱼肉和虾肉样品中氯霉素的可视化凝胶 ELISA 方法。本实验室建立了牛奶、肌肉和肝脏等组织中安普霉素的可视化凝胶 ELISA 方法, 并与传统的直接竞争 ELISA 方法进行了比较^[12]。

本研究在实验室前期基础上, 开展了同步测定庆大霉素和卡那霉素凝胶 ELISA 方法的研究, 实现了牛奶中这两种药物的快速筛选, 为食品安全监控提供了有效的技术手段。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

多用途旋转摇床 (海门市其林贝尔公司) , HQ-60 涡动仪 (北方同正公司) 。

庆大霉素 (GEN , G) 和卡那霉素 (KANA , K) 标准品 (中国兽药监察所) ; 羊抗鼠 IgG (美国 Jackson 公

2014-12-05 收稿; 2015-03-11 接受

本文系农业部公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (No. 201203069-2) 及奶牛产业技术体系北京市创新团队项目资助

* E-mail: dingsy@cau.edu.cn; lixiubo@caas.cn

司); 酶标抗原和单克隆抗体(中国农业大学实验室自制^[12]); 冰醋酸(分析纯)、TMB 底物溶液(A 液为 TMB、B 液为过氧化氢尿素) 等购于国药集团化学试剂北京有限公司, 甘氨酸(含量>99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); CNBr 活化的 Sephrose 4B(美国 GE 公司); 免疫层析空柱及筛板(美国 Agilent 公司) 等。

2.2 抗鼠偶联胶和封闭胶的制备

根据文献^[12]制备抗鼠偶联胶及封闭胶: 将 CNBr 活化的 sephrose 4B 凝胶颗粒利用盐酸活化, 过滤后, 加入羊抗鼠 IgG, 室温条件下将抗体偶联到凝胶表面。用封闭缓冲液进行多余位点的封闭, 3 次淋洗后, PBS 重悬浮制成抗鼠偶联胶备用。用甘氨酸代替羊抗鼠 IgG, 制备封闭胶。

2.3 药物抗体偶联胶制备

取 2 mL 聚苯乙烯离心管, 将偶联胶和封闭胶在室温条件下回温, 然后按照体积比 1:6 进行混合, 涡旋 5 s 至混匀; 按与偶联胶体积比 1:1, 在混合胶中加入 10^5 倍稀释的抗 GEN 单克隆抗体或 2×10^4 倍稀释的抗 KANA 单克隆抗体, 涡旋混合后在旋转摇床上反应 5 min(400 r/min) 后, 即制成抗 GEN 抗体偶联胶或抗 KANA 抗体偶联胶。

2.4 检测柱的制备

三层凝胶检测柱主要含有 K-检测层、空气层和 G-检测层(图 1)。取出 1 mL 凝胶检测空柱, 加入底部筛板 a, 垂直置于柱架上, 将 200 μ L 抗 GEN 凝胶快速加入柱中, 待自然沉积形成柱床后, 加入上层筛板 b, 形成 G-检测层; 加入筛板 c, 其中筛板 b 和 c 之间留有 0.5 ~ 1.0 cm 左右的间隔, 形成空气层; 将 200 μ L 抗 KANA 凝胶快速加入柱中, 待自然沉积后, 加入上层筛板 d, 压实, 形成 K-检测层。

2.5 牛奶样品处理及分析

取 1 mL 的新鲜原奶于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL PBST 样本稀释液, 涡旋混合 10 s, 全部上样测定。

取出凝胶检测柱垂直置于柱架上, 待温度稳定至室温; 取 5 mL 聚苯乙烯离心管, 加入 1 mL 不同浓度的标准品或 1 mL 检测样品, 两种药物的酶标抗原(4×10^4 倍稀释的 GEN-HRP、 10^4 倍稀释的 KANA-HRP) 各 70 μ L, 再加入 0.05 mol/L PBS(pH 7.4) 至 3 mL, 涡旋混合 10 s 至均匀分散; 将混合溶液小心垂直加入到凝胶检测柱中, 控制流速不得超过 1 滴/s; 待溶液自然流干后, 用 5 ~ 7 倍柱床体积的 PBST 缓冲溶液进行彻底淋洗并挤干柱床; 加入 150 μ L 底物溶液(A 液: B 液 = 1:1, V/V), 并迅速用洗耳球将底物溶液挤入并充满整个反应柱床进行显色反应; 在加入底物溶液 6 min 时, 观察显色情况, 进行拍照, 判定阴阳性。根据文献[6]报道, 利用 Adobe Photoshop 7.0.1 软件对照片中凝胶试验柱内颜色进行分析, 记录 HSB 模式下的参数 S(%) 的饱和度值。

取 10 个空白奶样, 编号 1# ~ 10#, 随机添加卡那霉素或庆大霉素标准品, 室温下静置 15 min 后, 制备成 10 个盲样, 分别采用本研究建立的凝胶 ELISA 方法和 UPLC-MS/MS 方法进行测定, 比较测定结果。

3 结果与讨论

3.1 方法原理

经 CN-Br 活化的 Sephrose 4B 凝胶作为固相载体, 偶联羊抗鼠 IgG。加入单克隆抗体与固定的 IgG 特异性地发生反应, 过量的单克隆抗体受重力作用直接流出小柱。再从柱口处加入药物和酶标抗原, 共同竞争有限的单克隆抗体, 最后加入 TMB 底物显色。呈现蓝色为阴性样本, 呈现无色为阳性样本。通过在单一层析柱中设置多个凝胶检测层, 本方法可实现同步检测。反应原理示意图如图 1 所示。

3.2 方法灵敏度

考察方法对两种药物标准品检测的能力。设置 GEN 标准品的浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 和 20.0 μ g/L, KANA 标准品的浓度分别为 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 μ g/L, 加入底物后观察显色情况, 如图 2 所示。结果表明, 对于检测柱上层的 KANA 检测层和下层的 GEN 检测层, 在零标空白柱中, 两个药物的检测层均显色良好, 随着药物浓度的增加, 药物占据了越来越多的抗体结合位点, 导致参与反应的酶标抗原越来越少, 所以检测层的颜色逐渐变浅直至消退。对 KANA 而言, 在 2.0 μ g/L 浓度水平时, 颜色基本抑制完全; 对 GEN 而言, 在 2.0 μ g/L 浓度水平时, 颜色也基本抑制完全。因此, 可以将本研究建立的 GEN-KANA 凝胶 ELISA 方法的灵敏度定为 2.0 μ g/L。

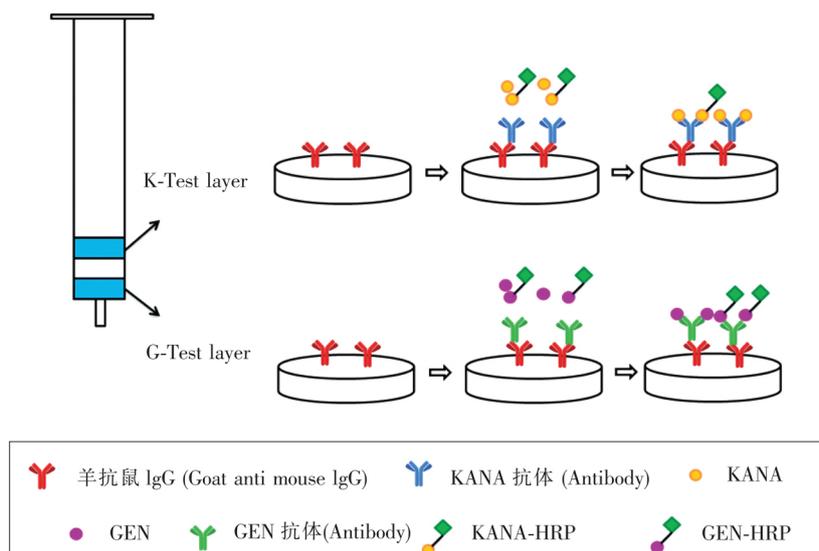


图 1 检测庆大霉素和卡那霉素的可视化凝胶 ELISA 方法原理

Fig.1 Schematic diagram of the detection of gentamicin (GEN) and kanamycin (KANA) with visual Gel-ELISA method

3.3 牛奶样品分析

考察本方法对牛奶样品中两种药物残留的检测能力。取牛奶空白样品,添加 3 个浓度梯度的 GEN 和 KANA 标准品,涡旋混合均匀。按前处理方法进行处理,进行凝胶柱测定,判定方法对牛奶样品的检测限,结果如表 1 所示。

表 1 牛奶样品中 GEN-KANA 凝胶 ELISA 方法测定 (n = 3)
Table 1 Detection results of GEN-KANA in spiked milk samples by Gel-ELISA (n = 3)

药物 Drug	添加浓度 Spiked level (μg/L)	检测层显色 Color of detection layer	饱和度 $\bar{X}_s \pm SD$ (% , n = 3)	结果判定 Result
庆大霉素 GEN	0	浅蓝色 Light blue	55.0 ± 2.0	-
	5	无色 No color	7.7 ± 1.2	+
	10	无色 No color	5.0 ± 1.0	+
卡那霉素 KANA	0	浅蓝色 Light blue	53.3 ± 2.5	-
	5	无色 No color	5.3 ± 1.5	+
	10	无色 No color	3.0 ± 1.0	+

+: Positive; -: Negative.

实验结果表明,在空白牛奶样品中,GEN 检测层和 KANA 检测层显色良好,饱和度平均值分别为 55.0% 和 53.3%,呈阴性结果;在牛奶添加浓度为 5 和 10 μg/L 时,GEN 检测层和 KANA 检测层基本不显色,饱和度平均均值在 7.7% ~ 3.0% 之间,均呈阳性结果。因此,本方法对牛奶中 GEN 和 KANA 的检测限,即 Cut-off 值均为 5.0 μg/L。

3.4 方法的特异性

依据观察高浓度类似化合物的交叉反应情况评估方法特异性。取 4 支凝胶检测柱,结果如图 3 所示,从左到右依次添加药物情况如下: (a) 添加 5 μg/L KANA、5 μg/L GEN; (b) 添加 500 μg/L 链霉素 (STR); (c) 添加 500 μg/L 新霉素 (NEO); (d) 添加 500 μg/L 妥布霉素 (TOB)。按 2.7 节方法步骤操作,加入底物后观察显色情况。结果表明,本方法对 5 μg/L 的 GEN 和 KANA 表现了很好的检测效果,而对其它 3 种氨基糖苷类药物,在 10 倍浓度时,未呈现抑制效果,说明本研究建立的 GEN-KANA 可视

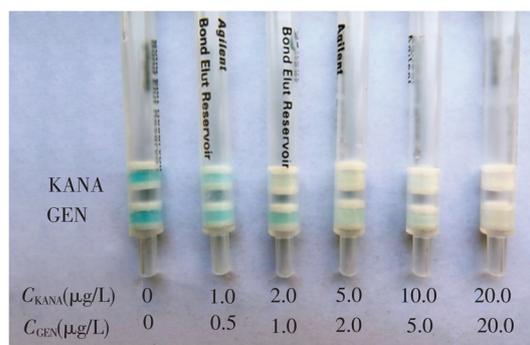


图 2 GEN-KANA 凝胶 ELISA 方法标准溶液中灵敏度确定

Fig.2 Detection results of GEN-KANA Gel-ELISA in standard solutions

化凝胶 ELISA 的特异性良好,根据文献[13]所述公示计算,交叉反应率 $<1.0\%$ 。

3.5 实际样品分析

采用本方法测定 10 个牛奶盲样,以初步评价方法的有效性,结果见表 2。结果表明,采用本方法可以测到 4 个庆大霉素阳性样本,3 个卡那霉素阳性样本,与 UPLC-MS/MS 测定结果完全相符。



图 3 GEN-KANA 凝胶 ELISA 方法特异性测定

Fig. 3 Specificity of GEN-KANA Gel-ELISA assay
STR 为链霉素,NEO 为新霉素,TOB 为妥布霉素。

STR: Streptomycin, NEO: Neomycin, TOB: Tobramycin.

表 2 牛奶盲样中庆大霉素和卡那霉素的检测结果比较($n=3$)

Table 2 Comparison of detection results of blind milk samples by Gel-ELISA and UPLC-MS/MS($n=3$)

编号 Number		1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
Gel-ELISA	GEN	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	KANA	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UPLC-MS/MS	GEN	ND	45.2± 2.5	ND	ND	ND	ND	23.6± 2.0	94.5± 4.2	65.5± 3.6	ND
	KANA	ND	ND	103.6± 5.5	ND	25.8± 1.5	55.3± 3.2	ND	ND	ND	ND

ND: 未检出; GEN: 庆大霉素; KANA: 卡那霉素。

ND: Not detectable; GEN: Gentamicin; KANA: Kanamycin.

4 结 论

本研究建立了牛奶中可同步检测庆大霉素和卡那霉素的可视化凝胶 ELISA 方法,对庆大霉素和卡那霉素的灵敏度为 $2.0 \mu\text{g/L}$,对牛奶中的庆大霉素和卡那霉素的检测限均为 $5 \mu\text{g/L}$ 。本方法采用一步法进行检测,简单快速,无需其它仪器设备,检测时间仅为 15 min,特异性好。

References

- 1 CHEN Zhang-Liu. *Veterinary Pharmacology*. Beijing: Chinese Agriculture Press, **2005**: 210-212
陈仗榴. 兽医药理学(第 2 版). 北京: 中国农业出版社, **2005**, 210-212
- 2 WU Ling-Zhi, HU Dong, QIN Meng. *Acta Bioph. Sin.*, **2013**, (1): 15-25
武灵芝, 胡栋, 秦猛. 生物物理学报, **2013**, (1): 15-25
- 3 LI Xian-Liang, YOU Li-Na, XI Cun-Xian, TANG Bai-Bing, WANG Guo-Min, ZHANG Lei, ZHAO Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(08): 1147-1152
李贤良, 游丽娜, 郗存显, 唐彬彬, 王国民, 张雷, 赵华. 分析化学, **2013**, 41(08): 1147-1152
- 4 YAN Zhong-Yong, ZHANG Xiao-Jun, LI Qi-Fu, WANG Ying, LIU Jia-Peng, LONG Ju, ZHU Yin, YANG Hui-Cheng. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(02): 277-281
严忠雍, 张小军, 李奇富, 王莹, 柳家鹏, 龙举, 祝银, 杨会成. 分析化学, **2015**, 43(02): 277-281
- 5 Goryacheva I Y, Beloglazova N V, Eremin S A, Mikhirev D A, Niessner R, Knopp D. *Talanta*, **2008**, 75(2): 517-522
- 6 Beloglazova N V, Goryacheva I Y, Rusanova T Y, Yurasov N A, Galve R, Marco M P, De Saeger S. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 672(1-2): 3-8
- 7 Rusanova T Y, Beloglazova N V, Goryacheva I Y, Lobeau M, Peteghem C V, Saeger S D. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 653(1): 97-102
- 8 Beloglazova N V, Goryacheva I Y, de Saeger S, Scippo M L, Niessner R, Knopp D. *Talanta*, **2011**, 85(1): 151-156

- 9 Beloglazova N V , De Boevre M , Goryacheva I Y , Werbrouck S , Guo Y , Saeger S D. *Talanta* , **2013** , 106: 422–430
- 10 Speranskaya E S , Beloglazova N V , Lenain P , Saeger S D , Wang Z H , Zhang S X , Hens Z , Knopp D , Niessner R , Potapkin D V , Goryacheva I Y. *Biosens. Bioelectron.* **2014** , 53: 225–231
- 11 Yuan M , Sheng W , Zhang Y , Wang J P , Yang Y J , Zhang S G , Goryacheva I Y , Wang S. *Anal. Chim. Acta.* **2012** , 751: 128–134
- 12 Xu F , Jiang W X , Zhou J , Wen K , Wang Z H , Jiang H Y , Ding S Y. *J. Agri. Food Chem.* **2014** , 62(14) : 3108–3113
- 13 YANG Li-Guo. *Enzyme immunoassay technique*. Nanjing: Nanjing University Press , **1998**
杨利国. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社 , **1998**

A Visual Gel-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Simultaneous Detection of Gentamicin and Kanamycin in Milk

XU Fei¹ , LI Jing-Ya² , ZHOU Jie² , LIU Mao-Lin¹ , LIU Yi-Ming¹ , WANG Jian-Fen³ , DING Shuang-Yang^{* 2} , LI Xiu-Bo^{* 1}

¹(National Feed Drug Reference Laboratories , Feed Research Institute ,
Chinese academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China)

²(National Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs , China Agricultural University , Beijing 100193 , China)

³(Yanqing County Animal Husbandry Technical Advice Station of Beijing , Beijing 102100 , China)

Abstract A visual gel-enzyme-linked immunosorbent assay (Gel-ELISA) assay for simultaneous detection of gentamicin (GEN) and kanamycin (KANA) in milk was described. In the gel detection column , two detection layers were filled with CN-Br activated Sephrose 4B gel as solid phase carrier , which was coupled with goat anti-mouse IgG. The anti-GEN and anti-KANA monoclonal antibodies were added to combine with the carrier respectively in each layer. Gentamicin and kanamycin drugs in sample competed with corresponding enzyme-labeled antigens for the immobilized antibody on the column , and the drugs could be detected by the chromogenic reaction of substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. This approach was a yes/no method after color detection by naked eyes with the detection time of 15 min. The sensitivity of the Gel-ELISA method was 2 μg/L , and the detection limit (Cut-off value) for gentamicin and kanamycin in raw milk was 5 μg/L. The detection results of the ten blind milk samples by the proposed Gel-ELISA method were consistent with those obtained by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MS-MS) .

Keywords Gel-enzyme-linked immunosorbent assay; Gentamicin; Kanamycin; Simultaneous detection; Milk

(Received 5 December 2014; accepted 11 March 2015)