

磁敏传感器竞争免疫法检测牛奶中的氯霉素残留量

史晶晶^{1,3} 廉洁¹ 周稳稳¹ 石西增² 高云华^{*1}

¹(中国科学院理化技术研究所光化学转换和功能材料重点实验室,北京 100190)

²(北京慈欣生物科技有限公司,北京 100086) ³(中国科学院研究生院,北京 100049)

摘要 利用直接竞争免疫原理和巨磁致电阻效应,建立了磁敏生物传感器检测氯霉素的方法。制备氯霉素半抗原芯片,依次加入待测样品、生物素化抗体、链霉亲和素磁颗粒偶联物,使之发生竞争免疫反应,再利用传感器检测芯片上结合的磁颗粒数目。通过对检测条件的优化,建立了氯霉素浓度与磁颗粒数目的标准工作曲线。本方法的检测范围为 0.05 ~ 100.0 $\mu\text{g/L}$; 检出限为 50 ng/L ; 用于牛奶检测,回收率为 95.97% ~ 99.36%; 批内相对标准偏差为 0.8% ~ 3.9%, 批间相对标准偏差为 1.1% ~ 1.7%; 与 ELISA 方法的一致相关系数达到 0.98。本方法可在 30 min 内快速完成定量检测,为快速多靶标磁敏竞争免疫检测体系的建立提供了可行性。

关键词 磁敏竞争免疫检测; 磁敏传感器; 氯霉素; 磁颗粒数目

1 引言

目前,食品安全已成为全社会共同关注的公共卫生问题。氯霉素(Chloramphenicol, CAP)作为抗生素,曾广泛应用于养殖业,但其有较强的副作用和毒性,可导致再生障碍性贫血、粒细胞缺乏症及二重感染; 婴儿长期食用含有微量 CAP 的食品,会引起“灰婴综合症”^[1,2]。我国农业部第 235 号文件公告《动物性食品中兽药最高残留限量》文件规定了 CAP 等多种抗生素不得在动物源性食品中使用^[3]。但在利益驱动下,违规滥用抗生素类药物及其它非法食品添加剂的情况屡见不鲜。为保障食品安全,建立同时检测 CAP 及其它违禁药物残留量的方法研究具有重要意义^[4]。

目前,检测 CAP 较灵敏的方法有气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、酶联免疫吸附法(ELISA)及胶体金试纸条。GC-MS 和 LC-MS 方法的检出限可达到 0.1 $\mu\text{g/L}$,但对实验室要求条件高、检测方法复杂,仪器昂贵^[5~7]; ELISA 方法的检出限可达到 50 ng/L ,但检测时间过长,需要 2 h,且每次只能检测一种靶标,无法同时检测多种兽药^[8]; 胶体金试纸条的定量准确性差^[9]。因此建立一种快速、灵敏、多靶标的检测违禁药物的技术迫在眉睫。磁敏传感器技术具有干扰低、体积小、生产成本低、对磁信号响应灵敏等特点,作为新型生物分子检测技术,近年来在国际上广受关注。磁隧道结(Magnetic tunnel junction, MTJ)传感器是一种新型的利用巨磁阻效应的磁敏传感器,每个传感器是由 0.3 μm \times 0.6 μm 的微小传感器单元组成,在 1 mm^2 内有上百万个微小传感器单元,每个微小单元对磁信号的响应都可以通过微处理器控制,因此每个 MTJ 传感器可以根据检测需要划分成若干个检测区^[10~12],从而实现多靶标检测。

本实验以磁隧道结传感器为平台,以氯霉素为模拟靶标,建立基于磁敏传感器的竞争免疫定量检测体系。本方法检测速度快、灵敏度高,可以在室温下操作,且具有通用性,因而可以推广至其它兽药残留或非法食品添加剂检测,如瘦肉精、苏丹红、催熟剂等; 而且利用其高通量特点,可以进行多靶标检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

磁敏传感器磁信号检测仪样机及配套测试卡(图 1 北京慈欣生物科技有限公司与中国科学院理化技术研究所联合研制); 硅片(10.7 mm \times 6.6 mm \times 0.75 mm , 二氧化硅膜厚 200 nm , 北京大学微电子

2012-01-13 收稿; 2012-04-18 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20975106)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KJCX2-YW-M15)及广东省中国科学院全面战略合作项目(No. 2011A090100036)资助

* E-mail: yhgao@mail.ipc.ac.cn

系); 3K15 冷冻离心机(德国 Sigma 公司); RT-2100C 酶标仪(雷杜公司); L0107-4A 注射泵(保定兰格恒流泵有限公司); 超滤管(北京欣经科生物公司); BX51 荧光显微镜(Olympus 公司)。

氯霉素(Sigma 公司); 牛血清白蛋白(BSA, 北京欣经科生物技术公司); 氯霉素-牛血清白蛋白偶联物(CAP-BSA), CAP 抗体(北京博迈生物技术公司); *N*-生物素羟基琥珀酰亚胺酯(NHS-Biotin, Alfa-Aesar 公司); 红霉素标准品(中国药品生物制品检定所); 链霉亲和素-超顺磁颗粒(SA-beads, 法国 Ademtech 公司); 链霉素标准品, 氯霉素 ELISA 检测试剂盒(北京华安麦科生物技术有限公司); $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (分析纯, 北京化学试剂公司); $ZnSO_4$ (分析纯, 汕头市西陇化工厂); 牛奶(购自超市); 实验用水均为超纯水。

2.2 实验步骤

2.2.1 CAP 抗体的生物素化

用二甲基甲酰胺(DMF)将 NHS-Biotin 配成 10 mmol/L 的溶液, 将 NHS-Biotin 与抗 CAP 抗体按 20:1(摩尔比)混合, 在 4 °C 反应 12 h, 获得生物素化单抗(Biotin-Ab)。转移至超滤管中, 在 4 °C, 以 9000 r/min 离心 3 次, 每次 10 min, 除去未反应 NHS-Biotin, 分装, 于 -20 °C 保存。

2.2.2 缓冲溶液及稀释液的配制

碳酸盐缓冲液(pH 9.6)的配制: 称取 0.159 g Na_2CO_3 和 0.293 g $NaHCO_3$, 使用超纯水溶解并定容至 100 mL, 用作包被缓冲液。磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4)的配制: 称取 1.439 g KH_2PO_4 和 0.24 g Na_2HPO_4 , 使用超纯水溶解并定容至 1 L。0.2% 吐温 20-磷酸盐缓冲溶液(PBST)的配制: 量取 500 mL PBS 溶液, 向其中加入 1 mL 吐温 20, 摇匀, 作为清洗液。0.1% BSA-PBST 溶液的配制: 称取 0.1 g BSA, 加入 100 mL PBST 溶液中, 摇匀, 用于稀释 Biotin-Ab 及 SA-beads。1% BSA-PBST 溶液的配制: 称取 1 g BSA, 加入 100 mL PBST 溶液中, 摇匀, 作为封闭液。以上所有溶液均加入 0.04% NaN_3 , 于 4 °C 保存。

2.2.3 样品的采集和处理

随机选取 2 个品牌的鲜牛奶, 参照文献[13]的方法进行样品前处理。在 4 °C 下, 将牛奶以 3500 r/min 离心 10 min, 去除脂肪及沉淀; 取 1 mL 脱脂后的牛奶, 加入 30 μ L 17.2% $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 出现沉淀, 漩涡混合振荡 5 min, 再加入 30 μ L 53.5% $ZnSO_4$, 漩涡混合振荡 5 min, 在 4 °C, 以 3500 r/min, 离心 10 min; 取上清液用 PBS 按体积比 1:1 稀释, 4 °C 保存, 待测。

2.2.4 氯霉素分析过程

全部反应过程在室温下进行。取 CAP-BSA 包被液, 滴加在芯片测试区域, 在湿度为 90% 的环境中温育 10 min; 加入封闭液, 温育 5 min; 移除封闭液, 将芯片装入测试卡, 向测试卡中注入 40 μ L Biotin-Ab 与 40 μ L CAP 标准溶液(样品), 室温下反应, 此时样品或标准溶液中 CAP 与固定抗原竞争结合 Biotin-Ab, 用 PBST 清洗, 除去游离的 CAP 及其与 Biotin-Ab 形成的复合物; 再注入 40 μ L SA-beads, 室温下反应, 用 PBST 清洗未反应的 SA-beads; 将测试卡载入传感器中, 读出磁颗粒(Beads)数目, Beads 数目与样品中 CAP 含量呈负相关。实验流程见图 2。

3 结果与讨论

3.1 分析条件的优化

3.1.1 优化反应时间

为节省成本, 用硅片代替芯片进行优化反应时间实验, 反应流程相同。硅片上包被 35 mg/L CAP-BSA 溶液, 室温温育 10 min, 封闭; 向硅片上加入等体积的 Biotin-Ab 与空白标准溶



图 1 磁敏传感器检测仪(A)及配套磁敏传感器测试卡(B)(50 mm × 40 mm)

Fig. 1 Photographs of tester(A) and test cartridge(B) of magnetic tunnel junction(MTJ) array magnetic biosensor

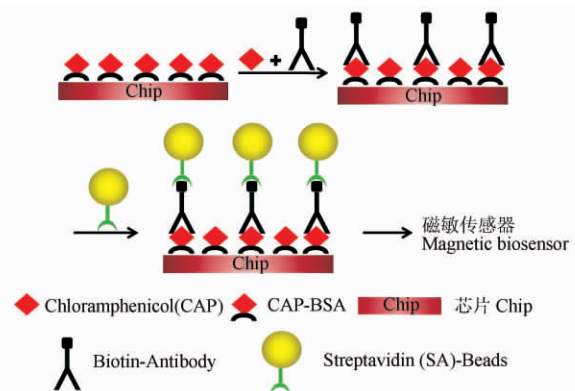


图 2 磁敏传感器竞争免疫检测流程图

Fig. 2 Working principle of magnetic biosensor with competitive immunoassay

液 室温下分别反应 5, 10, 15 和 20 min 清洗; 再加入 SA-beads 室温反应 20 min 后 清洗; 显微镜下观察(如图 3) 抗原与抗体反应时间越长 磁颗粒密度越大。考虑到 15 min 的结果已满足检测需要, 因而选择 15 min 为竞争免疫最佳反应时间。

在此基础上, 考察 SA-beads 与 Biotin-Ab 反应不同时间的实验结果。如图 4 所示, Beads 与 Biotin 反应时间越长 磁颗粒密度越大, 15 min 之后磁颗粒密度没有明显变化, 说明反应已达到饱和。本实验中 Beads 与 Biotin 反应时间选为 15 min。

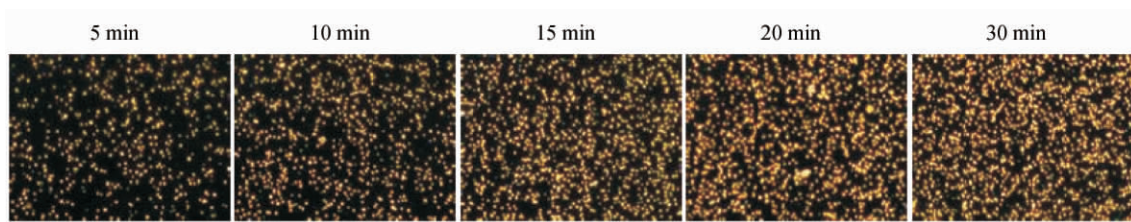


图 3 抗原与 Biotin-Ab 不同反应时间的磁颗粒密度图 (Beads 与 Biotin-Ab 反应 20 min)

Fig. 3 Beads densities of groups of different reaction time between antigen and Biotin-Ab (beads reacted with Biotin-Ab for 20 minutes)

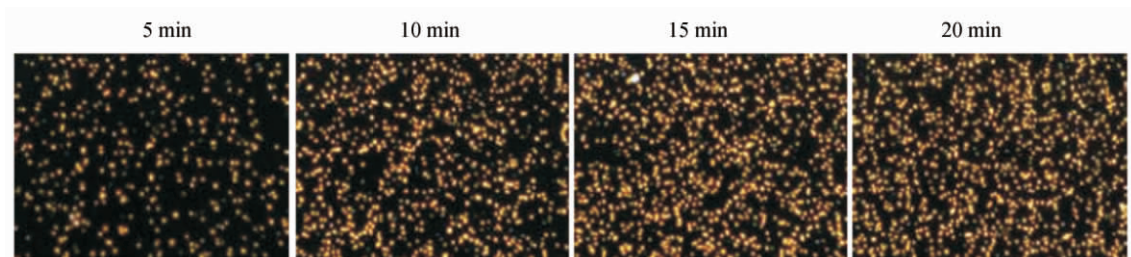


图 4 Beads 与 Biotin-Ab 不同反应时间的磁颗粒密度图

Fig. 4 Beads densities of groups of different reaction time between SA-beads and biotin-chloramphenicol (CAP) antibody

3.1.2 CAP-BSA 在芯片上的固定条件优化 考察了 CAP-BSA 在 1 ~ 100 mg/L 范围内, 加入过量 Biotin-Ab 空白标准溶液的反应结果。随着芯片上 CAP-BSA 固定浓度的增加 磁颗粒数目变化如图 5。当 CAP-BSA 浓度从 5 mg/L 到 20 mg/L, 磁颗粒数呈缓慢增加趋势; 增加到约 50 mg/L 时 磁颗粒数目趋于稳定。通过比较 选磁颗粒数目增加速度较快的浓度为最适固定量^[14] 确定最佳固定浓度为 35 mg/L。

3.1.3 CAP 抗体加入量的优化 固定 CAP-BSA 浓度为 35 mg/L, 考察 Biotin-Ab 浓度对磁颗粒数目的影响。如图 6 所示, Biotin-Ab 浓度在 2.5 ~ 5.0 mg/L 范围内, 磁颗粒数目随 Biotin-CAP 抗体浓度增加而快速增加; 而在 Biotin-Ab 浓度为 5.0 ~ 40.0 mg/L 磁颗粒数目缓慢增加。因此 Biotin-Ab 的最佳反应浓度为 10 mg/L。

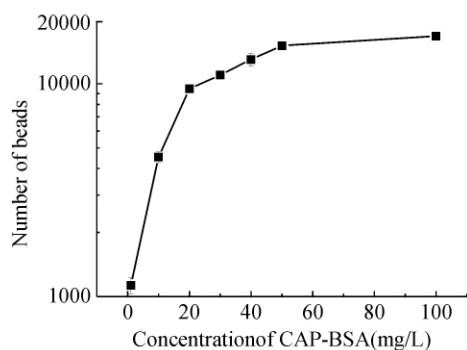


图 5 磁颗粒数目与 CAP-BSA 包被浓度的关系曲线

Fig. 5 Relation curve between concentrations of CAP-BSA and number of beads

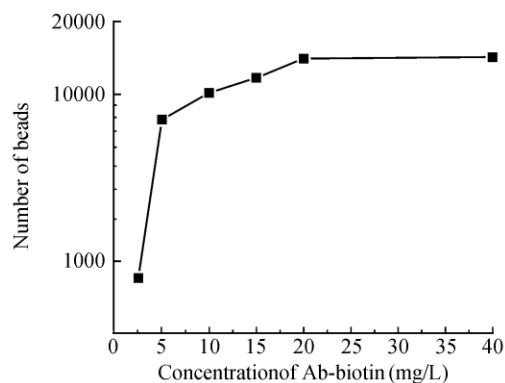


图 6 磁颗粒数目与 Biotin-Ab 浓度的关系曲线

Fig. 6 Relation curve between concentrations of Biotin-Ab and number of beads

3.2 CAP 检测标准工作曲线

在优化实验条件基础上 绘制标准工作曲线 如图 7。用 SPSS17.0 进行 t 检验 结果显示 置信水平为 0.05 时 ,CAP 标准溶液浓度为 50 ng/L 时的结果与空白值有显著差异 ,因此检出限至少可达到 50 ng/L^[15]。图 7A 表明 ,CAP 标准溶液在低浓度范围(0.05 ~ 10 $\mu\text{g/L}$) 时 ,磁颗粒数随 CAP 浓度呈指数变化;图 7B 表明 ,在高浓度范围(10 ~ 100 $\mu\text{g/L}$) 时 ,磁颗粒数随 CAP 浓度呈线性变化;两个浓度范围的标准曲线相关系数均大于 0.99 表明标准工作曲线拟合良好 ,可用于样品检测。

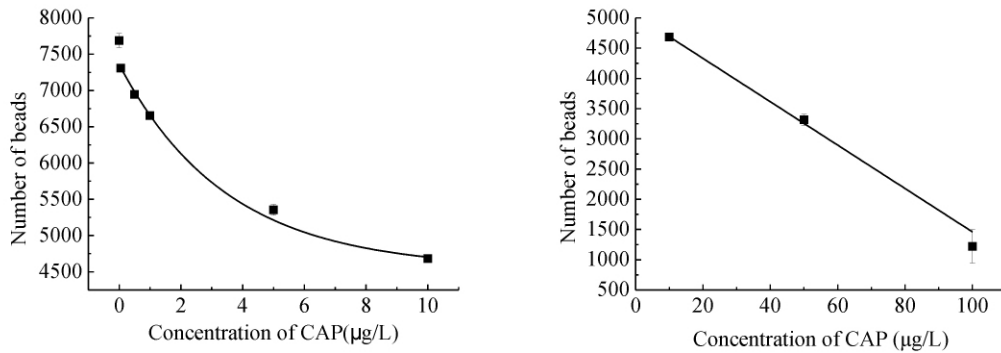


图 7 磁敏传感器检测低浓度 CAP 时的标准工作曲线(A) 和磁敏传感器检测高浓度 CAP 时的标准工作曲线(B)

Fig. 7 Standard curve for low-concentration chloramphenicol testing by magnetic biosensor (A) and standard curve for high-concentration chloramphenicol testing by magnetic biosensor (B)

3.3 方法的回收率和精密度

采用添加法测定方法回收率及精密度 检测样品为牛奶。由表 1 和表 2 可见 ,采用磁免疫法检测牛奶中氯霉素的平均加标回收率为 95.97% ~ 99.36% ,批内相对标准偏差为 0.80% ~ 3.87% ($n = 6$) ,批间相对标准偏差为 1.11% ~ 1.73% ($n = 4$) ,说明此方法检测牛奶具有良好的精密度和重现性。

表 1 添加法检测回收率、批内和批间精密度结果

Table 1 Recovery and precision in CAP-fortified milk by magnetic biosensor

添加浓度 Added ($\mu\text{g/L}$)	平均回收率 Average recovery	批内相对标准偏差 Intra-assay RSD (% , $n = 6$)	批间相对标准偏差 Inter-assay RSD (% , $n = 4$)
0.05	99.36	0.80	1.11
5	95.97	3.87	1.73

表 2 加入干扰物(链霉素和红霉素) 的检测结果

Table 2 Testing results of interferents (streptomycin and erythromycin) by magnetic biosensor

干扰物 Interferents	浓度 Concentration ($\mu\text{g/L}$)	磁颗粒数目 Number of beads ($\bar{x} \pm s$)	干扰物 Interferents	浓度 Concentration ($\mu\text{g/L}$)	磁颗粒数目 Number of beads ($\bar{x} \pm s$)
链霉素 Streptomycin	0	7700 \pm 130	红霉素 Erythromycin	0	7726 \pm 92
	5	7670 \pm 97		5	7693 \pm 84
	10	7647 \pm 94		10	7668 \pm 97

3.4 与 ELISA 试剂盒对照

分别用磁敏传感器和 ELISA 试剂盒对 10 个样品进行检测。对两种方法的检测结果进行线性相关分析^[13]。如图 8 所示 ,其中三角形点对应的样品超出 ELISA 试剂盒的检测范围 ,因而出现异常。将其余样品检测结果作相关分析 结果显示 磁敏传感器与 ELISA 检测牛奶的一致相关系数为 0.98 ,这说明磁敏传感器竞争免疫检测方法准确度高 突出了磁敏传感器检测范围宽的优势。

3.5 磁敏传感器检测氯霉素的特异性测试

分别配制不同浓度的链霉素和红霉素标准品 浓度为 5 和 10 $\mu\text{g/L}$,同时设阴性对照组 ,阳性实验组和阴性对照组作比较。采用 SPSS17.0 软件统计 ,进行双样本 t 检验。 $p \leq 0.05$ 为差异有统计学意

义^[14]。结果发现,不同浓度下的结果与阳性对照组没有显著差异($p > 0.05$),认为链霉素和红霉素不会干扰 CAP 的检测,即该方法特异性良好。

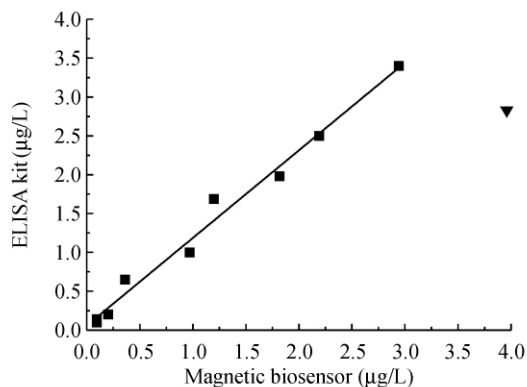


图 8 磁敏传感器与 ELISA 试剂盒检测牛奶中 CAP 残留的结果相关图

Fig. 8 Correlation between CAP concentrations in milk measured by magnetic biosensor and ELISA kit

■代表样品浓度在两种方法的检测范围内, ▼代表样品浓度超出 ELISA 试剂盒最高检出限。

■ was in the detection range of both methods, and ▼ was beyond maximum detection limit of ELISA kit.

References

- Maciej J B, Huda H, Eid A E, Zuhour I, Mohammed A T. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 807(2): 343–356
- Vivekanandan K, Guru S M, Prasad S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, 19(21): 3025–3030
- Maximum Residue Limit of Veterinary Drug in Animal-Source Food. *Attachment of Announcement No. 235, Ministry of Agriculture of the People's Republic of China.*
动物源性食品中兽药最高残留限量. 中华人民共和国农业部第 235 号公告附件
- WANG Shi-Cheng, LI Guo-Chen, WANG Yan-Hong, HU Xiao-Yan, ZHANG Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(8): 1199–1202
王世成, 李国琛, 王颜红, 胡小燕, 张红. 分析化学, **2010**, 38(8): 1199–1202
- Epstein R L, Henry C, Holland K P, Dreas J. *J. AOAC Int.*, **1994**, 77: 570–576
- Börner S, Fry H, Balizs G, Kroker R. *J. AOAC Int.*, **1995**, 78: 1153–1160
- van Ginkel L A, van Rossum H J, Zootjes P W, van Blitterswijk H, Ellen G, Vander Heft E, Zomer G. *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 237: 61–69
- Shen H Y, Jiang H L. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 535(1-2): 33–41
- Byzova N A, Zvereva E A, Zherdeva A V, Ereminb S A, Dzantiev B B. *Talanta*, **2010**, 81(3): 843–848
- Kima D M, Rahmanb M A, Doa M H, Banc C, Shima Y B. *Biosen. Bioelectron.*, **2010**, 25(7): 1781–1788
- Xu L, Yu H, Akhras M S, Han S J, Osterfeld S, White R L, Pourmand N, Wang S X. *Biosen. Bioelectron.*, **2008**, 24(1): 99–103
- GasterR S, Hall D A, Wang S X. *Lab Chip*, **2011**, 11(5): 950–956
- WU Ling-Ling, JIANG Nan. *Occupation and Health*, **2008**, 24(5): 428–429
吴玲玲, 姜楠. 职业与健康, **2008**, 24(5): 428–429
- LIU Nan, GAO Zhi-Xian, SU Pu, CHAO Fu-Huan, ZHU Mao-Xiang, YANG Zhi-Hua, PAN Xiu-Jie. *Bull Acad. Mil. Med. Sci.*, **2009**, 33(1): 41–44, 65
刘楠, 高志贤, 苏璞, 晁福寰, 朱茂祥, 杨陟华, 潘秀颀. 军事医学科学院院刊, **2009**, 33(1): 41–44, 65
- WU Hui-Juan, WEI Ling, LIU Qing-Jun, LE Jia-Chang, LI Bao-Ming, ZHANG Xiao-Li, GAO Li-Juan, KANG Zi-Jia, ZHAO Long, QIAN Jia-Lin. *Food Science*, **2010**, 31(8): 167–170
武会娟, 魏玲, 刘清珺, 乐加昌, 李宝明, 张小莉, 高丽娟, 亢子佳, 赵龙, 钱嘉林. 食品科学, **2010**, 31(8): 167–170

Magneto-resistive Biosensor for Detection of Chloramphenicol Residue in Milk

SHI Jing-Jing^{1,3}, LIAN Jie¹, ZHOU Wen-Wen¹, SHI Xi-Zeng², GAO Yun-Hua^{*1}

¹(Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

²(Beijing Magnetic Chip Biotech Co., Ltd., Beijing 100086, China)

³(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 10004, China)

Abstract Based on direct competitive immunoassay principle and giant magnetoresistance (GMR) effect, a novel method for detecting chloramphenicol (CAP) by magnetic biosensor has been developed. The sample, biotinylated anti-CAP monoclonal antibody, and streptavidin-beads conjugate were added onto the prepared CAP hapten chips one by one. Subsequently, competitive immune reaction happened and the number of beads bonded on chips was detected by magnetic biosensor. The standard curve was established by optimizing the detection condition. This method can be used to detect CAP in a range of 0.05 – 100.0 µg/L, detection limit of 50 ng/L. The analyte recoveries in milk samples ranged from 95.97% to 99.36%. The relative standard deviations ranged from 0.8% to 3.9% for intra-assay and 1.1% to 1.7% for inter-assay. The correlation coefficient between this method and ELISA was 0.98. Rapid quantitative detection could be accomplished within 30 minutes using this method. It provides feasibility for the establishment of rapid multi-target magnetic competitive immunoassay system.

Keywords Magnetic competitive immunoassay; Magnetic biosensor; Chloramphenicol; Number of beads

(Received 13 January 2012; accepted 18 April 2012)

《分析化学》(2013 年)

邮发代号 12-6 本刊承办广告业务

《分析化学》(ISSN 0253-3820, CODEN FHHHDT, CN 22-4125/06) 是中国科学院和中国化学会共同主办的专业学术期刊, 主要报道我国分析化学创新性研究成果, 反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有研究快报、特约来稿、研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 1999 年荣获首届国家期刊奖, 2000 年获中国科学院优秀期刊特别奖, 2001 年入选“中国期刊方阵”高知名度、高学术水平的“双高”期刊, 2002 年又荣获第二届国家期刊奖和第三届中国科协优秀科技期刊奖。论文已被包括美、英、日、俄的国内外 30 余种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所 2010 年发布的“中国科技期刊引证报告”获悉, 本刊影响因子 1.290, 总被引频次 4042, 均居中国科技期刊化学类第二。本刊连续多年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA) 摘引量最大的 1000 种期刊(简称“CA 千种表”)中, 并居我国入选“CA 千种表”期刊的前列。从 1999 年第 27 卷第 1 期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information) 正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index Expanded, SCIE, also known as SciSearch), 同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等 ISI 系列。2011 年 SCI 影响因子为 0.94。

本刊为月刊, 160 页(大 16 开), 由科学出版社出版。国内单价 30.00 元, 全年 360.00 元。邮发代号 12-6, 全国各地邮局订阅, 国外代号 M336, 中国国际书店订购, 漏订读者, 可与编辑部联系。

编辑部地址: 长春市人民大街 5625 号 邮政编码: 130022

电话: (0431) 85262017/85262018 传真: (0431) 85262018 E-mail: fxhx@ciac.jl.cn 网址: http://www.

analchem.cn

广告代理: 北京行胜言广告有限公司 电话: (010) 51289220 52086537 广告经营许可证号: 第 2200004000094

号