

冯才伟,冯月君,崔海峰,等. 呋喃它酮代谢物化学发光试剂盒的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):277-279.

呋喃它酮代谢物化学发光试剂盒的建立

冯才伟,冯月君,崔海峰,韩京朋,李海静

(北京勤邦生物技术有限公司,北京 102206)

摘要:首先合成呋喃它酮代谢物(AMTZ)半抗原,再与载体蛋白偶联得到免疫原和包被原。采用间接竞争酶联免疫吸附法,以鲁米诺作为发光底物,利用获得的抗 AMTZ 单克隆抗体研制出 AMTZ 化学发光试剂盒,试剂盒的检测范围在 $0.05 \sim 4.05 \mu\text{g/L}$, IC_{50} 值达 $0.161 \mu\text{g/L}$, $r = 0.9998$ 。试验表明,试剂盒对呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃妥因代谢物(AHD)、呋喃西林代谢物(SEM)、呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因及呋喃西林的交叉反应率均很低,对 AMTZ 则有很高的检测特异性;对猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼肉以及虾肉样品在 $0.1, 0.5 \mu\text{g/kg}$ 2 个添加水平的平均回收率在 $76.9\% \sim 92.8\%$,检测结果的变异系数均不大于 12.8% 。结果表明,化学发光试剂盒检测所需时间少、所需仪器量少、检测结果准确,因此适合现场大批量样品的筛选。

关键词:呋喃它酮代谢物;化学发光法;检测

中图分类号: R155.5⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0277-02

呋喃它酮属于硝基呋喃类抗菌药,在临床上主要用于鸡的各种肠道感染性疾病的治理,并且可以用作猪、禽类和水产行业中促生长的添加剂^[1]。但是呋喃它酮及其代谢物具有相当大的毒性和副作用,能诱导有机体发生基因突变甚至导致畸胎,并且能诱发癌症^[2]。中国农业部在 2002 年 2 月发布的《食品动物禁用的兽药及其他化合物清单》中,明文禁止在所有食品动物的所有用途中使用硝基呋喃类药物,但是由于其价格低、药效好,很多国家还在继续违规使用^[3-4]。为了保障人民健康并继续扩大我国与世界各国动物源性食品的贸易往来,必须对动物源性食品中硝基呋喃类药物进行检测。

由于呋喃它酮对光敏感,在动物体内或体外会迅速被代谢和分解,因此对原药的检测难度很大,而其代谢物 AMTZ 以蛋白结合物的形式长期、稳定存在于组织内,并且在适当的酸性条件下这些结合残留物可以从蛋白质中释放出来,因此可以通过检测组织中的 AMTZ 水平达到检测呋喃它酮残留的目的^[5-6]。目前 AMTZ 的检测方法主要有微生物法、色谱法、酶联免疫吸附分析法等^[7]。化学发光法作为 20 世纪末兴起的一种新型的检测手段,由于灵敏度高、不存在放射性污染等特点而被誉为最有前途的实验室诊断方法之一^[8]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、邻苯二甲酸酐、吡啶、二甲基甲酰胺,上海华美动物药业有限公司;AMTZ 标准品、鲁米诺、辣根过氧化物酶(HRP)、过氧化氢脲、碳二亚胺、*N*-羟基琥珀酰亚胺及其他化学试剂, Sigma 公司。化学发光板,丹麦 NUNC 公司;化学发光仪,奥地利 Anthos 仪器公司。

1.2 试验方法

1.2.1 AMTZ 半抗原的制备

取 0.5 g AMTZ、 0.50 g 邻苯二甲酸酐、 2 mL 吡啶溶于 20 mL 二甲基亚砜中,在 60°C 下搅拌反应 4 h ,反应完成后加热蒸除溶剂,经柱层析纯化即得邻苯二甲酸单 AMTZ 酯。

1.2.2 呋喃它酮代谢物-牛血清白蛋白偶联物(AMTZ-BSA)的制备 取 6 mg AMTZ 半抗原溶解于 1 mL 二甲基甲酰胺中;取 30 mg 碳二亚胺、 30 mg *N*-羟基琥珀酰亚胺,用 0.2 mL 水充分溶解后加入半抗原溶解液中,室温下搅拌 24 h 即得反应液 A;称取 50 mg BSA,使之充分溶解在 3.8 mL PBS (pH 值 7.2)中,将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌 24 h ;用 0.01 mol/L PBS 于 4°C 透析 3 d ,每天换 3 次透析液以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20°C 保存备用。

1.2.3 呋喃它酮代谢物-卵清蛋白偶联物(AMTZ-OVA)的制备 称取 6 mg 半抗原、 50 mg OVA,按照“1.2.2”的反应步骤制备包被抗原,供包被用。

1.2.4 抗呋喃它酮代谢物单克隆抗体(AMTZ McAb)的制备 按 $100 \mu\text{g/只}$ 的用量,用生理盐水溶解 AMTZ-BSA,并与弗氏完全佐剂等体积混匀,免疫 $6 \sim 8$ 周龄的 Balb/c 雌鼠。4 次免疫后,取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)融合,进行杂交瘤细胞的筛选,立即用有限稀释法对阳性孔中的细胞进行亚克隆化。用扩大培养后的杂交瘤细胞对 $8 \sim 10$ 周龄的 Balb/c 小鼠进行腹腔注射, $7 \sim 10 \text{ d}$ 后抽取小鼠腹水,离心取上清液,检测效价后冻存备用。

1.2.5 酶标抗体的制备 采用改良过的碘酸钠法制备得到 HRP-AMTZ McAb。

1.2.6 化学发光板包被 用 0.05 mol/L pH 值 9.6 的碳酸盐包被溶液将 AMTZ-OVA 配制成 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 的溶液,在每个聚苯乙烯化学发光板反应孔中加 $100 \mu\text{L}$, 37°C 恒温箱中放置 2 h 。弃去孔内的溶液,拍干。用封闭溶液封闭已包被的化学发光板, $150 \mu\text{L/孔}$,于 37°C 恒温箱放置 2 h 后洗板 1 次,拍干。

1.2.7 标准品溶液的配制 按常规方法将 AMTZ 纯品用 0.05 mol/L pH 值 7.4 的 PBS 缓冲液配制成浓度分别为 0、

收稿日期:2013-02-20

作者简介:冯才伟(1978—),男,贵州开阳人,研究方向为食品安全快速检测技术。E-mail: hjp5233@126.com。

0.05、0.15、0.45、1.35、4.05 μg/L 的 AMOZ 标准溶液。

1.2.8 发光底物的配制 将鲁米诺溶于对甲苯酚含量为 0.001 mol/L、pH 值 8.8 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液中,使其浓度为 0.01 mol/L;将 0.64 mL 浓度为 0.75% 的过氧化氢脲溶于含 21 g/L 柠檬酸、28.2 g/L 无水 Na₂HPO₄ 的水溶液中,使用时将二者按等比例混合,在辣根过氧化物酶(HRP)的催化下可稳定发光。

1.2.9 试剂盒的相关检测 分别对试剂盒进行检测限检测、特异性检测、回收率检测、重复性检测、稳定性试验。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

用标准品溶液的发光度(RLU)除以浓度为 0 的标准品溶液的发光度(RLU₀),再乘以 100%,即可得到百分发光度(%)。以 AMOZ 标准品浓度的对数为 x 轴、百分发光度为 y 轴绘制标准曲线(图 1),确定线性范围和 IC₅₀ 值。所绘制的标准曲线回归方程为 $y = -2.1048x + 4.6141$, $r = 0.9998$,计算得到曲线的 IC₅₀ 为 0.161 μg/L,线性检测范围为 0.05 ~ 4.05 μg/L。

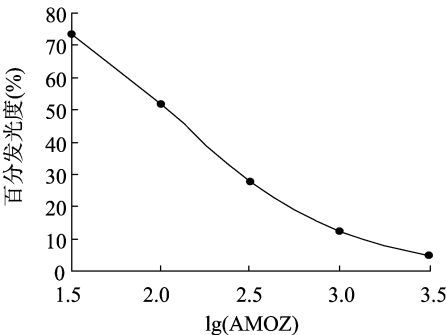


图1 AMOZ化学发光试剂盒的标准曲线

2.2 检测限

检测标准曲线的同时检测 20 份阴性样品,并通过标准曲线计算阴性样品的平均浓度值(\bar{x})和标准差(s)。根据公式:检测限 = $\bar{x} + 3s$,计算样品的最低检测限,结果见表 1。可以看出本方法对猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼肉以及虾肉中 AMOZ 的检测限均 ≤ 0.1 μg/L。

表1 AMOZ 化学发光试剂盒的检测限

样品	平均值 (μg/L)	标准差 (μg/L)	检测限 (μg/L)
猪肉	0.029	0.020	0.090
猪肝	0.033	0.018	0.086
鸡肉	0.036	0.021	0.098
鸡肝	0.026	0.021	0.090
鱼肉	0.031	0.019	0.087
虾肉	0.041	0.018	0.094

2.3 特异性检测

检测 AMOZ、呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃妥因代谢物(AHD)、呋喃西林代谢物(SEM)、呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因及呋喃西林 50% 的抑制浓度,计算交叉反应率,结果见表 2。结果显示,试剂盒对呋喃类其他药物及其代谢物的交叉反应率均不大,表明该试剂盒具有良好的特异性。

表2 AMOZ 化学发光试剂盒特异性

药物	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率(%)
AMOZ	0.165	100.0
AOZ	167.0	0.1
AHD	169.0	0.1
SEM	158.0	0.1
呋喃唑酮	14.9	1.1
呋喃它酮	1.47	11.2
呋喃妥因	15.6	1.1
呋喃西林	15.2	1.1

2.4 回收率和重复性检测

在检测为阴性的猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼肉以及虾肉中分别添加不同剂量的 AMOZ 标准品,用试剂盒检测并计算回收率。表 3 结果表明,猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼肉以及虾肉样品在 0.1、0.5 μg/kg 2 个添加水平的平均回收率在 76.9% ~ 92.8% 之间,检测结果的变异系数均 ≤ 12.8%。

表3 AMOZ 化学发光试剂盒的回收率和重复性

样品种类	AMOZ 添加水平 (μg/kg)	检测结果 (μg/kg)	平均回 变异系 收率(%) 数(%)
猪肉	0.1	0.080,0.094,0.083,0.082,0.094	86.6 7.6
	0.5	0.421,0.452,0.383,0.488,0.486	89.2 9.9
猪肝	0.1	0.079,0.074,0.087,0.099,0.089	85.6 10.7
	0.5	0.391,0.450,0.452,0.399,0.495	87.5 9.7
鸡肉	0.1	0.086,0.099,0.098,0.095,0.086	92.8 7.1
	0.5	0.499,0.469,0.416,0.403,0.421	88.3 9.2
鸡肝	0.1	0.085,0.088,0.098,0.095,0.074	88.0 10.5
	0.5	0.496,0.448,0.441,0.412,0.491	91.5 7.7
鱼肉	0.1	0.076,0.099,0.088,0.074,0.097	86.8 12.8
	0.5	0.496,0.403,0.401,0.413,0.357	82.8 12.4
虾肉	0.1	0.081,0.081,0.078,0.092,0.080	82.4 6.9
	0.5	0.358,0.434,0.388,0.381,0.361	76.9 8.0

2.5 试剂盒的稳定性试验

将试剂盒在 37℃ 条件下存放不同时间,定时制作标准曲线并检测实际样品,依据各线性相关系数、IC₅₀ 浓度值、抑制率及样品回收率判断试剂盒的稳定性。表 4 结果显示,将试剂盒置于 37℃ 进行加速试验,试验前 7 d 检测,各项指标均正常;试验超过 9 d 后,标准曲线的相关系数均已不符合产品的质量要求。通过以上试验结果可知,试剂盒的保存期可达 10 个月以上。

表4 稳定性检测结果

37℃下保存 时间(d)	相关系数	IC ₅₀	抑制率 (%)	样品回 收率(%)
1	0.9937	0.19	77.6	97.8
3	0.9972	0.24	82.8	88.7
5	0.9907	0.22	90.1	74.5
7	0.9916	0.26	87.9	81.3
9	0.9716	0.34	96.1	68.2
11	0.9715	0.46	100.0	54.8

3 讨论

本研究利用 AMOZ 半抗原与载体蛋白偶联得到免疫原和包被原,并通过免疫小鼠获得针对 AMOZ 的单克隆抗体

李晓文,李萍萍,袁俊杰. 基于可见/近红外光谱的鸡腿菇总糖含量测定方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):279-281.

基于可见/近红外光谱的鸡腿菇总糖含量测定方法

李晓文¹, 李萍萍^{1,2}, 袁俊杰¹

(1. 江苏大学现代农业装备与技术省部共建教育部重点实验室, 江苏镇江 212013; 2. 南京林业大学, 江苏南京 210037)

摘要: 基于可见/近红外光谱技术, 研究了一种快速无损测量鸡腿菇鲜样总糖含量的检测方法, 建立了鸡腿菇鲜样总糖含量预测模型。以鸡腿菇为研究对象, 在一个生长周期内共选取 80 个不同成熟度的样品, 其中 60 个作为校正集, 20 个作为预测集, 使用便携式光谱仪采集样品漫反射光谱信息。通过对比发现, 将总糖含量化学实测值与光谱值分析比较发现, 采用归一化 + 二阶微分 + MAF 相结合的预处理方式, 并以 7 个主成分建立的偏最小二乘(PLS)模型效果最佳, 校正集的相关系数为 0.998 9, 内部交叉均方根误差为 0.008 2; 预测集的相关系数为 0.982 3, 预测均方根误差为 0.082 9。结果表明, 利用可见/近红外光谱技术建立的预测模型精度较高, 可以实现鸡腿菇总糖含量的快速准确检测。

关键词: 鸡腿菇; 可见-近红外光谱; 偏最小二乘回归; 总糖含量

中图分类号: O656 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0279-03

鸡腿菇是近年来开发起来的具有商业潜力的珍稀菌种, 因外形像鸡腿, 口味像鸡丝而得名^[1]。鸡腿菇总糖是鸡腿菇中重要的生物活性成分。研究表明, 鸡腿菇总糖含量与鸡腿菇抗肿瘤、增加免疫力等药用功能有直接关系^[2], 对鸡腿菇总糖含量的检测具有重要意义。目前, 鸡腿菇总糖含量检测的常规方法是采用费林试剂法或苯酚-硫酸法等化学方法^[3-4], 该方法存在试验周期长、操作繁杂、易污染环境等, 难以实现样品的在线实时检测。

可见/近红外光谱(visible and near-infrared spectroscopy, VIS/NIR)分析技术是一种具有分析速度快、处理样品简

单、分析结果准确客观、无损无污染等特点的快速检测手段。近年来, 在农产品糖分浓度检测中得到了广泛的应用^[5-7]。但在食用菌总糖检测方面的报道不多。现有的研究多集中于利用光谱图像对不同菌种的子实体进行鉴定^[8-9]或通过近红外光谱检测菌丝体对菌种进行鉴别^[10]。常静等使用傅里叶变换光谱仪对灵芝的多糖含量与光谱吸光度的相关性进行分析, 建立了多糖含量的预测模型^[11]。本研究以鸡腿菇为对象, 对整个生长期内的样品总糖含量进行可见/近红外光谱定量分析, 选取与总糖高相关的特征谱区建立预测模型, 并对预测集进行了预测。

1 材料与方法

1.1 样品准备

试验样品为江苏大学农业工程研究院食用菌栽培控制室内栽培的鸡腿菇, 采用袋式栽培, 于 2012 年 6 月 7 日覆土, 6 月 17 日菌丝布满培养床, 6 月 23 日鸡腿菇子实体开始长出, 到 6 月 30 日子实体生长结束, 生长期 8 d。每天选取长势接

收稿日期: 2013-01-10

基金项目: 江苏省博士生创新基金(编号: CX08B_136Z); 江苏高校优势学科建设工程项目(编号: 苏财教[2011]8号)。

作者简介: 李晓文(1988—), 男, 内蒙古四子王旗人, 硕士研究生, 主要从事农产品品质检测研究。E-mail: vin2010@163.com。

通信作者: 袁俊杰, 助理研究员, 主要从事现代设施农业和作物可视化研究。E-mail: yuanjunjie@ujs.edu.cn。

McAb。采用间接竞争酶联免疫吸附法, 同时利用鲁米诺作为发光底物, 研制出 AMOZ 化学发光试剂盒, 检测范围在 0.05~4.05 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 值达 0.161 $\mu\text{g/L}$, $r = 0.999\ 8$ 。试剂盒对 AOX、AHD、SEM、咪唑唑酮、咪唑它酮、咪唑妥因及咪唑西林的交叉反应率均很低, 对 AMOZ 有很高的检测特异性, 对猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝、鱼肉以及虾肉样品在 0.1、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 2 个添加水平的平均回收率在 76.9%~92.8%, 检测结果变异系数均不大于 12.8%。结果表明, 化学发光试剂盒检测所需时间少, 仅需少量仪器, 检测结果准确, 适合现场大批量样品的筛选。

参考文献:

[1] 耿金培, 曹鹏, 尹大路, 等. 高效液相色谱法同时测定饲料中的咪唑唑酮、咪唑西林、咪唑妥因、咪唑它酮药物残留量[C]//中国畜牧兽医学学会 2009 学术年会论文集: 下册, 2009: 52-56.

[2] 徐一平, 胥传来. 动物源食品中硝基咪唑类物质及其代谢物残留的检测技术研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 590-593.

[3] 李桂伟, 花丽茹. 食品动物禁用兽药的危害[J]. 黑龙江水产, 2010(3): 32-34.

[4] 王习达, 陈辉, 左健忠, 等. 水产品中硝基咪唑类药物残留的检测与控制[J]. 现代农业科技, 2007(18): 152-153, 155.

[5] 彭涛, 邱月明, 李淑娟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉中硝基咪唑类抗生素代谢物[J]. 检验检疫科学, 2003, 13(6): 23-25, 28.

[6] 宋珊珊, 张辉, 张海琪, 等. 酶联免疫法快速测定水产品中咪唑唑酮、咪唑它酮代谢物[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 296-299.

[7] 李秀婷, 孙宝国, 吕跃钢, 等. 动物源性食品中药物残留的快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 346-350.

[8] 李旭姓, 韩松涛, 杨春玫. 化学发光酶免疫分析法测定血清前列腺特异性抗原的研究[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2008, 9(2): 125-127.