

氯霉素毛细管电泳免疫分析方法研究

张 灿^{1,2}, 马海乐², 王 辉², 周凡琨², 王 硕^{1,*}

(1.天津科技大学食品与生物技术学院, 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457;

2.江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 针对目前食品安全领域中氯霉素的检测, 建立一种快速灵敏的氯霉素毛细管电泳免疫分析方法。该方法对氯霉素检测的线性范围和最低检测限分别为 $0.008 \sim 5 \mu\text{g/L}$ 和 $0.0016 \mu\text{g/L}$ 。与相应固相酶联免疫分析 ELISA 相比, 对氯霉素的检测灵敏提高了约 20 倍且有效缩短了分析时间。建立的氯霉素毛细管电泳免疫分析方法对动物源性食物(牛奶、鸡肉和鱼肉)进行分析, 得到氯霉素在实际样品中的检测限为 $0.035 \mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 氯霉素; 毛细管电泳免疫分析; 固相酶联免疫分析; 快速灵敏; 检测限

Capillary Electrophoresis Based Competitive Immunoassay for Chloramphenicol in Animal-derived Food

ZHANG Can^{1,2}, MA Hai-le², WANG Hui², ZHOU Fan-kun², WANG Shuo^{1,*}

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: A rapid and sensitive approach to performing competitive immunoassay for chloramphenicol in animal-derived food using capillary electrophoresis (CE) with laser-induced fluorescence (LIF) detection was presented. The assay exhibited a linear range of $0.008 \sim 5 \mu\text{g/L}$ and a limit of detection of $0.0016 \mu\text{g/L}$. The sensitivity of this assay was almost 20 times higher than that of the solid-phase ELISA assay and the time consumption was shortened. In the real sample analysis, a detectable level of $0.035 \mu\text{g/kg}$ was obtained.

Key words: chloramphenicol; competitive immunoassay based capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence detector (CEIA-LIF); solid-phase ELISA assay; rapidity; sensitivity; limit of detection

中图分类号: TS201.6; R978.13

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)08-0146-04

氯霉素是一种有效的广谱抗生素, 已广泛应用于动物各种传染性疾病的治疗。氯霉素在被治疗动物中易造成残留, 食用含氯霉素的动物源性食品后会引机体再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症等疾病, 对人体健康构成潜在威胁。包括中国在内的许多国家已经明确禁止氯霉素作为兽药用于食用动物的饲养和治疗, 动物源性食品中氯霉素含量不得检出。但由于氯霉素的抗菌效果好而且价格低廉, 仍被许多生产企业违规使用。对于氯霉素残留, 存在多种检测方法, 各种方法的检出限问题作为国际贸易合作中新的技术壁垒已成为关注的焦点^[1-2]。因此, 建立检测动物性食品中痕量氯霉素残留的高灵敏分析方法具有重要意义。目前已

有的氯霉素残留的检测方法有微生物法^[3]、传感器^[4]、免疫分析法^[5-7]和色谱法^[8-10], 其中免疫分析方法和色谱法较为常用。

毛细管电泳免疫分析方法结合了免疫分析的特异性和毛细管电泳快速高效分离分析的优势, 并具有检测结果直观的优点。本实验旨在建立氯霉素毛细管电泳免疫分析方法, 该方法较常规的酶联免疫分析具有更高的灵敏度, 而且与色谱分析相比无需耗时繁琐的样品处理和痕量预富集过程。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2009-07-13

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100404); 江苏大学 2009 年“百项本科生创新计划”项目(2009071); 江苏大学基金项目(09JG052)

作者简介: 张灿(1979—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: canzhang2006@yahoo.com.cn

* 通信作者: 王硕(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全和免疫学检测。E-mail: s.wang@tust.edu.cn

氯霉素 瑞士 Fluka 公司; 甲砒霉素、氟甲砒霉素、氨卞西林、聚异丙基丙烯酰胺(pNIPA) 美国 Sigma 公司; 氯霉素荧光标记半抗原(CAP hapten-FITC)、氯霉素抗体 天津科技大学食品营养与安全实验室; pH7.4、0.01mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS); 其他试剂均为分析纯。

电泳缓冲液: 1.52g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.31g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用双蒸水定容至 200mL, pH 值调节通过硼酸或是氢氧化钠。

P/ACE5500 毛细管电泳仪、激光诱导荧光检测器(E_{exc} 488nm, E_{em} 520nm) 美国 Beckman Instruments 公司。

1.2 方法

1.2.1 毛细管的活化

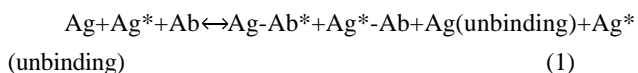
毛细管在使用前须先经过活化, 先用 1mol/L NaOH 溶液冲洗 3h, 随后采用 0.1mol/L HCl 溶液冲洗 30min, 再用双蒸水洗至中性。

1.2.2 毛细管电泳免疫分析(CEIA-LIF)

100 μL 荧光标记氯霉素半抗原(1/800000 稀释)与 100 μL 氯霉素标样或样品提取液混合后, 再加入 1 μg 氯霉素抗体, 待反应达到平衡后进行毛细管电泳分离分析。毛细管电泳分离条件: 样品采用气动进样: 0.5psi, 5s; 毛细管分离柱温: 20 $^{\circ}\text{C}$, 分离电压: 20kV。缓冲液用之前必须过 0.45 μm 滤膜, 并经过超声脱气处理。每次进样分离完成后, 再用 0.1mol/L NaOH 溶液和电泳缓冲液分别冲洗 1min 和 2min。

1.2.3 标准工作曲线的建立

采用直接竞争毛细管电泳免疫分析方式, 如式(1)所示, 经过毛细管分离后, 激光诱导荧光检测器仅对未结合抗体的游离荧光标记抗原(unbinding Ag^*)和与抗体结合的荧光标记抗原抗体的复合物($\text{Ag}^*\text{-Ab}$)产生检测信号。



随着氯霉素质量浓度的增加, 游离的 Ag^* 峰面积信号逐渐增大而随之对应的 $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ 产生的峰信号逐渐减小。 $\frac{[\text{Ag}^*\text{-Ab}]}{[\text{Ag}^*]}$ 表示加入氯霉素后的两个峰面积比值; $\frac{[\text{Ag}^*\text{-Ab}]_0}{[\text{Ag}^*]_0}$ 表示不含有氯霉素的两个峰面积比值(control), 以相对峰面积比 $\frac{[\text{Ag}^*\text{-Ab}]_0}{[\text{Ag}^*]_0} \cdot \frac{[\text{Ag}^*]}{[\text{Ag}^*\text{-Ab}]}$ 为纵坐标, 以氯霉素质量浓度常用对数为横坐标、建立相关的标准工作曲线。

1.2.4 样品的处理

样品鸡肉、鱼肉和牛奶进行氯霉素的标准添加后, 经过一定的处理方法, 样品提取液进行毛细管电泳免疫分析。鸡肉和鱼肉处理方法参见文献[7]。

牛奶的处理方法: 5mL 牛奶样品于 3500r/min 离心 10min, 离心后若液体上层有脂肪薄膜则应先弃去, 再往试管里加入 10mL 乙酸乙酯, 迷你振荡混匀器上振荡提取 5min。待振荡提取完后, 静置 10min 达到相分配

平衡, 取上层乙酸乙酯液体用氮气吹干后加入 1mL PBS, 再进行分析。

2 结果与分析

为抑制抗体蛋白在毛细管内壁的吸附, 在电泳缓冲液中加入水凝胶聚异丙基丙烯酰胺(pNIPA)(1.0mg/mL)进行动态修饰。

2.1 分离缓冲液 pH 值的影响

由于本实验使用的是多克隆抗体蛋白, 其等电点不是某个确定的 pH 值, 而是特定的范围。对于分离缓冲液改变其 pH 条件($\text{pH} < 3$ 或 $\text{pH} > 9$)或是达到极端 pH 条件, 均能有效地抑制毛细管壁的吸附作用。但对于毛细管电泳免疫分析, 在极端 pH 下, 抗体容易失活, 导致反应无法进行。研究 pH9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、10.0 的硼酸盐缓冲液在电泳中对 $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ 峰面积、峰形以及迁移时间的影响(图 1)。

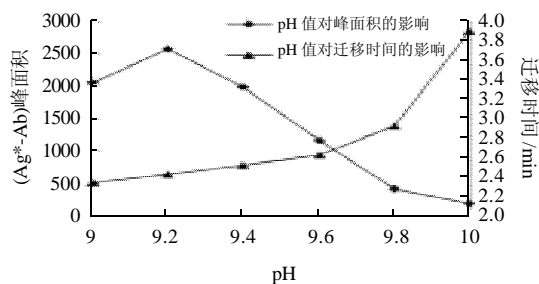


图1 不同 pH 值分离缓冲液的影响

Fig.1 Effect of pH of running buffer on separation in CEIA-LIF

结果表明, 随着 pH 值的增加, 分离物的迁移时间增加, 这有可能是 pH 值的变化导致电渗流逐渐减小。当 pH 值大于 9.2 时, $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ 峰面积逐渐减小而且峰宽增加, 当 pH 值达到 9.8 时, $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ 几乎消失, 原因可能是有部分抗体失活导致形成的 $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ 峰产生信号减小。最终选定分离缓冲液的最佳 pH 条件为 9.2。

2.2 平衡反应时间的影响

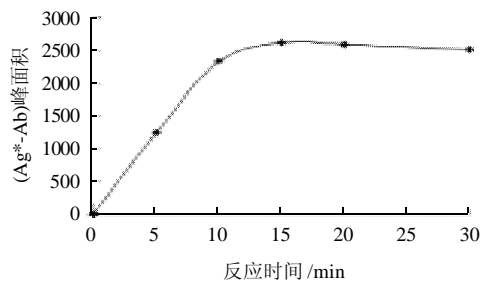


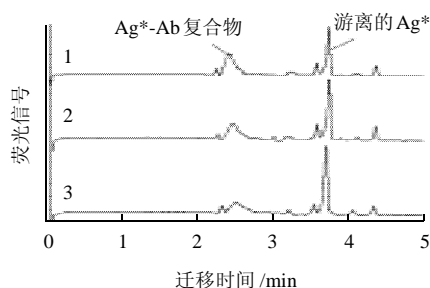
图2 平衡反应时间的影响

Fig.2 Effect of incubation time on immunoreaction in CEIA-LIF

对于毛细管电泳免疫分析, 抗原抗体的反应是在液相体系中进行的, 研究抗原抗体在不同时间(0、5、10、15、20、30min)的动态结合反应情况通过毛细管电泳进行分离, 结果直观可视。如图2所示, 随着反应时间的延长, 形成的Ag*-Ab峰信号逐渐增加, 当反应时间达到15min后, Ag*-Ab峰信号几乎不再有明显的变化, 此时反应达到了平衡。

2.3 氯霉素毛细管电泳免疫分析

用氯霉素荧光标记示踪物 and 不同质量浓度的氯霉素标样与氯霉素抗体竞争结合反应达到平衡后通过毛细管进行分离。随着反应中氯霉素质量浓度的增加, 形成的Ag*-Ab峰信号逐渐减小而与之对应游离未结合的Ag*峰信号逐渐增加, 结果见图3。



1.空白; 2.0.01ng/mL 氯霉素; 3. 0.1ng/mL 氯霉素。

图3 氯霉素毛细管电泳免疫分析

Fig.3 Output signals of LIF detector corresponding to different concentrations of chloramphenicol detected by CEIA-LIF

从图3得到相关标准工作曲线为 $y=0.3038\ln x+2.761$, $R^2=0.9954$, 线性范围为 $0.008\sim 5.0\mu\text{g/L}$, 最低检测限为 $0.0016\mu\text{g/L}$ 。

2.4 毛细管电泳免疫分析测定交叉反应率

同样以氟甲砜霉素(FF)、甲砜霉素(TAP)、氨卞西林为交叉反应物, 通过毛细管电泳免疫分析对氯霉素抗体的交叉反应率, 结果表明交叉反应率均小于0.01%。

2.5 毛细管电泳免疫分析技术测定实际样品的添加回收率

表1 氯霉素毛细管电泳免疫分析测定样品的添加回收率($n=5$)

Table 1 Mean recoveries of 5 replicates for chloramphenicol in chicken, fish meat and milk spiked at 3 levels ($n=5$)

样品	添加水平/($\mu\text{g/kg}$)	检测值/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%
鸡肉	0.1	0.079 ± 0.004	79.0 ± 5.1
	0.5	0.487 ± 0.023	97.4 ± 4.7
	1.0	0.961 ± 0.025	96.1 ± 2.6
鱼肉	0.1	0.074 ± 0.002	74.0 ± 2.7
	0.5	0.397 ± 0.014	79.4 ± 3.5
	1.0	0.849 ± 0.036	84.9 ± 4.2
牛奶	0.1	0.073 ± 0.003	73.0 ± 4.1
	0.5	0.353 ± 0.005	70.6 ± 1.4
	1.0	0.679 ± 0.014	67.9 ± 2.1

以未添加氯霉素的空白样品为参照, 通过对样品添加不同水平的氯霉素并进行提取分析, 得到氯霉素在实际样品中的最低检测限为 $0.035\mu\text{g/kg}$ 。通过对空白样品添加0.1、0.5、 $1.0\mu\text{g/kg}$ 三个不同的水平, 提取后通过毛细管电泳免疫分析测定其回收率, 结果如表1所示, 回收率均在60%以上, 结果较为满意。

2.6 氯霉素毛细管电泳免疫分析(CEIA-LIF)和固相酶联免疫分析(ELISA)^[7]的比较

毛细管电泳免疫分析是在液相基质中反应达到平衡并通过具有高效分离能力的毛细管电泳进行分离, 抗原抗体的动态结合和解离通过电泳图结果直观可视。由于抗体和抗原分子以自由形式在液相体系中, 分子间自由随机结合, 加上液体溶液中分子的热动力学原理, 该反应达到平衡时间快。对于用荧光标记的毛细管电泳免疫分析对氯霉素的检测, 其灵敏度较已建立相应的酶标记的免疫分析^[7]提高了将近20倍, 其分析时间也大大缩短, 5min内Ag*-Ab和Ag*相对应的峰就能通过电泳进行分离测定。氯霉素的两种检测方法的比较见表2。

表2 氯霉素 ELISA 和 CEIA-LIF 两种检测方法的比较

Table 2 Comparison between CEIA-LIF and ELISA determinations of chloramphenicol

比较项目	CEIA-LIF	ELISA
反应形式	液相基质(抗体游离)	固相基质(抗体固定)
标记物	FITC	HRP
平衡时间/min	15	60
灵敏度/($\mu\text{g/L}$)	0.0016	0.03
总检测时间/min	20	150
交叉反应	氟甲砜霉素 < 0.01%	氟甲砜霉素, 0.07%
	甲砜霉素 < 0.01%	甲砜霉素, 0.01%
	氨卞西林 < 0.01%	氨卞西林, 0.01%

3 结 论

针对目前食品安全检测中氯霉素的检测, 以荧光标记氯霉素半抗原为竞争结合物, 建立一种快速灵敏的氯霉素毛细管电泳免疫分析方法。该方法与常规的固相酶联免疫分析 ELISA 相比, 有效缩短达到平衡的时间, 对氯霉素的检测灵敏有了明显的提高。由于本实验中采用的是生物抗体为识别元件建立的毛细管电泳免疫分析方法, 有效抑制抗体蛋白在毛细管内壁的吸附是本实验的必要前提条件。随着分子印迹技术的发展, 可通过制备仿生抗体逐步替代生物抗体建立相关的仿生免疫毛细管电泳技术以及相应的仿生传感器检测。

参考文献:

- [1] 检测技术阻碍我国农产品出口[EB/OL]. 三农在线. [2004-11-29]. <http://www.instrument.com.cn/news/20041129/004742.shtml>.

- [2] 朱坚, 汪国权, 陈正夫, 等. 食品中危害残留物的现代分析技术[M]. 上海: 同济大学出版社, 2003: 129-132.
- [3] SINGER C J, KATZ S E. Microbiological assay for chloramphenicol residues[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68: 1037-1041.
- [4] FERGUSON J, BAXTER A, YOUNG P, et al. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex kit chloramphenicol[J]. Anal Chim Acta, 2005, 529: 109-113.
- [5] SCORTICHINI G, ANNUNZIATA L, HAOUET M N, et al. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria[J]. Anal Chim Acta, 2005, 535: 43-48.
- [6] ZHANG Suxia, ZHANG Zhen, SHI Weimin, et al. Development of a chemiluminescent ELISA for determining chloramphenicol in chicken muscle[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 5718-5722.
- [7] 何佳琪, 段振捐, 张燕, 等. 氯霉素残留 ELISA 检测方法[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44: 88-89.
- [8] RAMOS M, MUOZ P, ARANDA A, et al. Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2003, 791: 31-38.
- [9] GANTVERG A, SHISHANI I, HOFFMAN M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2003, 483: 125-135.
- [10] PEZZA L, RIOS A, NOZAL L, et al. Simultaneous determination of chloroamphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in bovine milk by micellar electrokinetic chromatography[J]. Quim Nova, 2006, 29: 926-931.