

基于碳纳米管信号放大的卡那霉素 高灵敏分析方法的建立

韦达理^{1,2}, 曾 昆^{*1,2}, 康启鑫², 黄 哲², 张旭芸²

(1. 农业农村部 农产品质量安全环境因子控制重点实验室, 天津 300191; 2. 江苏大学 环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 卡那霉素是一种氨基糖苷类抗生素, 具有广谱抗菌性, 在动物医疗中应用广泛, 从而导致了其在动物源性食品中广泛残留, 因此检测食品中卡那霉素的残留很有必要。作者以多壁碳纳米管 (Multiwalled Carbon Nanotubes, MWCNTs) 作为载体, 通过 EDC/NHS 方法偶联抗体与信号分子辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP), 合成多酶复合颗粒 MWCNTs-Abs-HRP; 建立基于 MWCNTs-Abs-HRP 多酶复合颗粒的检测方法, 相比于已建立的传统竞争 ELISA, 灵敏度提高约 5 倍; 并成功将此方法应用于牛奶样本中卡那霉素的检测。

关键词: 卡那霉素; 单克隆抗体; 碳纳米管; 信号放大

中图分类号: R 978.12 文章编号: 1673-1689(2020)07-0028-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.07.005

High Sensitivity Analysis of Kanamycin Based on Signal Amplification of Carbon Nanotubes

WEI Dali^{1,2}, ZENG Kun^{*1,2}, KANG Qixin², HUANG Zhe², ZHANG Xuyun²

(1. Key Laboratory for Environmental Factors Control of Agro-Product Quality Safety, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: As one of aminoglycoside antibiotics, kanamycin has been widely used in clinical treatment and animal health because of broad spectrum antimicrobial activity, which leads to its widespread residues in animal-derived foods. Therefore, it is necessary to detect kanamycin residues in food. In this study, using multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) as carriers, monoclonal antibody against kanamycin and horseradish peroxidase (HRP) were conjugated with MWCNT by EDC/NHS methods. A direct competitive ELISA based on MWCNT-Abs-HRP was constructed and its sensitivity was 5 times higher than that of the conventional competitive ELISA. The concentrations of kanamycin in six bovine milk from local market were evaluated.

Keywords: kanamycin, monoclonal antibody, carbon nanotubes, signal amplification

收稿日期: 2019-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31502118); 农业农村部污染防控重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点实验室开放课题项目 (17nybcdhj-9)。

* 通信作者: 曾 昆 (1980—), 女, 博士, 副教授, 主要从事农产品污染物快速检测研究。E-mail: kjj80116@ujs.edu.cn

氨基糖苷类抗生素主要包括卡那霉素、链霉素、庆大霉素等^[1],其中卡那霉素具有良好的抗菌性^[2],被广泛应用于农业、畜牧业、水产业以及医药行业^[3]。然而卡那霉素对耳、肾等比较敏感和脆弱的部位有明显的毒性,易引起过敏反应,还会导致耐药菌的出现,加大治疗难度^[4]。欧盟规定牛奶中卡那霉素最高残留限量(Maximum Residue Limit,MRL)为150 ng/mL^[5],因此检测食品中卡那霉素的残留很有必要。

目前,在抗生素和卡那霉素的检测方法方面,主要集中为高效液相色谱法(High-Performance liquid Chromatography,HPLC)^[6-7]、液相色谱法(Liquid Chromatography,LC)^[8-10]、毛细管电泳法(Capillary Electrophoresis,CE)^[11-13]、微生物抑制法^[14-16]和免疫分析方法^[17-18]等。然而这些方法存在仪器昂贵,操作复杂,灵敏度较低等不足,无法满足检测要求^[19]。而免疫分析方法因其具备快速、简便、高通量等优势被广泛应用于检测领域^[20]。目前,电化学分析方法发展迅速,已有基于电化学方法检测卡那霉素的报道^[21-24]。

近年来,许多新型纳米材料以及其特性被不断发掘,并成功应用于物理、化学和材料等领域。纳米材料因其具有尺寸较小,比表面大等优势被广泛应用于免疫分析方法中。如胶体金、碳纳米管、磁性微球、乳胶微球等在检测领域得到了广泛应用^[25-28]。作者经过小鼠免疫,血清测定,细胞融合和杂交瘤细胞筛选等步骤成功制备得到卡那霉素单克隆抗体,并引入碳纳米管(Carbon Nanotube)多酶探针,建立了检测食品中卡那霉素残留的分析方法,并成功应用于牛奶样本的检测中,为开发简便快速、高灵敏的食品检测免疫分析方法提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

硫酸卡那霉素(Kanamycin)、庆大霉素(Gentamicin)、链霉素(Streptomycin):购自中国药检所;羊抗鼠酶标二抗:购自美国Jacket公司;EDC·HCl、明胶和3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine,TMB)购自美国Sigma公司;NaHCO₃、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、NaCl、KCl、Tween-20、H₂SO₄、DMSO、H₂O₂:购自国药集团;卡那霉素单克隆抗体:作者所在实验室制备^[31]。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪 Infinite M1000 PRO:奥地利Infinite公司产品;磁力搅拌器 C-MAG HS4:德国IKA公司产品;低温高速离心机 5415D:德国Eppendorf公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 卡那霉素间接竞争性ELISA方法的建立

1) 抗原和抗体的最适工作浓度的优化 首先在96孔板中进行包被操作,用包被液将包被原稀释成4个质量浓度梯度,分别为1、0.5、0.25、0.125 μg/mL,4℃过夜;第二天倒去酶标板中液体,用PBST进行洗涤操作,备用;然后进行封闭操作(2%质量分数的明胶加入包被液中),在37℃培养箱中反应1.5 h后备用;随后加入抗体,用抗稀将抗体也稀释成4个质量浓度梯度,分别为0.4、0.2、0.1、0.05 μg/mL并加入酶标板中,加入体积为50 mL,同时加入50 mL的PBS缓冲液,并进行两次重复实验,在37℃培养箱中反应1 h;去除反应液,用PBST进行洗涤操作,备用;随后用抗稀将酶标二抗稀释5 000倍后加入酶标板中,体积为100 mL,在37℃培养箱中反应30 min;随后倒去反应后的二抗溶液,用PBST洗涤备用;然后加入TMB显色液,在37℃培养箱中反应10~15 min;最后加入体积为50 mL的硫酸终止液进行终止,孔板中的溶液由蓝色变成黄色,同时在450 nm处测其吸光度值。

2) 间接竞争性ELISA标准曲线的建立 用包被液将KAN-OVA稀释至优化后的质量浓度,100 mL体积加入酶标板中,4℃过夜;随后用PBST进行洗涤操作,备用;然后进行封闭操作(2%质量分数的明胶加入包被液中),在37℃培养箱中反应1.5 h,倒去封闭液后备用;加入稀释后的抗体,同时加入稀释成不同质量浓度梯度的卡那霉素标准品,进行3次重复实验,在37℃培养箱中反应1 h;倒去反应液,用PBST进行洗涤备用;随后用抗稀将酶标二抗稀释5 000倍后加入酶标板中,100 mL,在37℃培养箱中反应30 min;随后去掉反应后的二抗溶液,用PBST进行洗涤备用;然后加入TMB显色液,在37℃培养箱中反应10~15 min;最后加入体积为50 mL的硫酸终止液进行终止,孔板中的溶液由蓝色变成黄色,同时在450 nm处测其吸光度值;使用Origin绘图软件绘制卡那霉素的间接竞争抑制曲线。

1.3.2 卡那霉素单克隆抗体的纯化 采用试剂盒对制备所得的抗体进行纯化,步骤如下:首先将平衡缓冲液(20 mmol/L PBS, pH 7.4)加入层析柱中,等待其自由流出,当之后的流出液和之前所加入的PBS平衡液一致时则停止;然后用平衡缓冲液将腹水样品按体积比 1:1 进行稀释后,将混合溶液慢慢滴加到纯化柱中,等待上样完毕后,继续用平衡缓冲液进行洗涤,待之后的流出液和之前所加入的PBS平衡液一致时则停止;用洗脱缓冲液(CH_3COONa , pH 2.0)洗脱,同时收集洗脱液,并用配置好的碳酸钠溶液(1 mol/L)调节所收集到液体的pH值,保持抗体的活性(pH值为中性),最后测定纯化后抗体的质量浓度。

1.3.3 MWCNTs-Abs-HRP 多酶探针的合成 称取羧基化后的 MWCNTs 0.25 mg 至离心管中,加入 250 μL 的双蒸水,随后使用超声波清洗器将 MWCNTs 成功分散于水溶液中,备用;随后加入 150 μL EDC, 150 μL NHS, 450 μL MES, 混合搅拌 30 min;然后 13 000 r/min 离心 10 min,洗去多余的 EDC 和 NHS;随后加入 1 mL MES 溶液并超声使其重悬,加入 3.1 mg EDC, 1.8 mg NHS, 0.5 mg $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$, 混合搅拌 2 h 13 000 r/min, 离心 10 min, 洗去多余的 EDC, NHS 和 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$;随后加入 1 mL MES 溶液并超声使其重悬,加入卡那霉素抗体(1 mg/mL)和 HRP(1 mg/mL), 4 $^\circ\text{C}$ 混合搅拌 2 h; 13 000 r/min 状态下进行离心操作,去上清取沉淀,随后将沉淀重悬于 1 mL 2% 质量分数 BSA 的 PBS 溶液,并且 4 $^\circ\text{C}$ 保存。并通过 ELISA 方法对其进行表征。

1.3.4 基于 MWCNTs-Abs-HRP 卡那霉素直接竞争性 ELISA 方法的建立

1) 基于 MWCNTs-Abs-HRP 直接竞争性 ELISA 方法的检测流程 首先进行包被, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜;随后用 PBST 洗涤备用;然后进行封闭操作(质量分数 2% 的明胶加入包被液中),在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中反应 1.5 h, 去除封闭液后备用;随后加入稀释后的 MWCNTs-Abs-HRP 多酶探针(50 μL),以及不同质量浓度的卡那霉素标准品(50 μL),每个质量浓度设置 3 个平行,在 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中反应 1 h;倒去反应液,用 PBST 洗涤备用;每孔加入 100 μL 的 TMB 显色液,在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min;每孔加入 50 μL 2 mol/L 的硫酸

溶液;450 nm 吸光度条件下测其 OD 值;使用 Origin 绘图软件绘制卡那霉素的间接竞争抑制曲线。

2) 反应条件的优化 浓度:分别配制 0、0.8、2、5 mol/L 的 PBS 缓冲液,用其稀释卡那霉素标准溶液,依照 1.3.4.1 节的步骤进行重新测定,并选择出最佳离子浓度;pH 值:分别配制 pH 为 5.5、7.4、8.6、10.0 的 PBS 缓冲液,用其稀释卡那霉素标准溶液,依照 1.3.4.1 节的步骤进行重新测定,并选择出最佳 pH 值;Tween-20 的质量分数:分别配制 Tween-20 质量分数为 0、0.05 %、0.1 %、0.2 % 的 PBS 缓冲液,用其稀释卡那霉素标准溶液,依照 1.3.4 的步骤进行重新测定,并选择出最佳 Tween-20 的质量分数。

蛋白质质量分数:分别配制蛋白质质量分数为 0、0.1 %、0.5 %、1 % 的 PBS 缓冲液,用其稀释卡那霉素标准溶液,依照 1.3.4 的步骤进行重新测定,并选择出最佳蛋白质质量分数。

3) 直接竞争性标准曲线 基于 1.3.4 中优化后的条件,按照 1.3.4 中的操作流程,卡那霉素标准品质量浓度为 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3 ng/mL,建立吸光度值随标准品质量浓度变化的抑制趋势,并进行曲线拟合,最终得到半数抑制浓度(IC_{50}),最低检测限(IC_{90})和检测范围($\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$)。

4) 方法的特异性分析 将卡那霉素及其结构类似物用 PBS 稀释成系列浓度,随后进行交叉反应率的测定。根据测定结果测定不同物质的 IC_{50} 值。根据公式 (1) 计算各结构类似物的交叉反应率(CR)。

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{IC}_{50}(\text{目标物})}{\text{IC}_{50}(\text{类似物})} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.5 牛奶样品中卡那霉素残留的检测 将纯牛奶样本用 PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)稀释为不同比例,按照 1.3.4 构建标准曲线,评估牛奶的基质效应。将纯牛奶样本用 PBS 稀释到方法 1.3.5 所测得的合适质量浓度,然后添加 4 中不同质量浓度的卡那霉素标准品,分别为 0、0.5、2 和 10 ng/mL。用已经建立好的检测方法进行卡那霉素质量浓度的检测,计算加标回收率。从本地选购了 6 种不同品牌的纯牛奶样本,并用新建立的检测方法对牛奶中的卡那霉素质量浓度进行测定。采用 UPLC-MS/MS 方法对牛奶样本中卡那霉素进行测定^[33]。

2 结果与讨论

2.1 卡那霉素间接竞争性 ELISA 的建立

为获得最好灵敏度的检测方法,首先对抗原和抗体的最适质量浓度进行了优化。结果如表 1 所示。当 $OD_{450\text{ nm}}$ 值在 1.0~1.5 左右时,能够使实验具有

更高的灵敏度;同时发现包被原和抗体的质量浓度较高都会对 ELISA 体系的灵敏度产生影响,但是包被原对灵敏度的影响更大,所以作者选择抗体的最适质量浓度为 $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$,KAN-OVA 的最适质量浓度为 $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$,此时的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 1.385。

根据以上获得的最适的工作质量浓度,绘制检

表 1 方阵滴定法确定质量浓度

Table 1 Checkerboard for the optimal concentration of antibody and antigen

抗体/ $(\mu\text{g/mL})$	包被原/ $(\mu\text{g/mL})$							
	1		0.5		0.25		0.125	
0.4	3.146	3.091	2.321	2.380	1.685	1.617	1.033	1.102
	3.132	2.123	2.431	2.432	1.654	1.653	1.086	1.103
0.2	2.790	2.790	1.917	1.888	1.408	1.358	0.768	0.692
	2.782	2.732	1.942	1.903	1.410	1.363	0.722	0.782
0.1	2.064	2.036	1.475	1.345	0.764	0.797	0.438	0.499
	2.031	2.043	1.424	1.432	0.789	0.784	0.453	0.447
0.05	1.325	1.214	0.855	0.783	0.432	0.426	0.293	0.297
	1.342	1.287	0.813	0.796	0.421	0.442	0.281	0.295

测卡那霉素的 ELISA 检测标准曲线,结果见图 1。根据拟合的最终结果所得 LOD 为 0.295 ng/mL , IC_{50} 为 4.826 ng/mL , $IC_{20}\sim IC_{80}$ 为 $0.946\sim 24.627\text{ ng/mL}$ 。

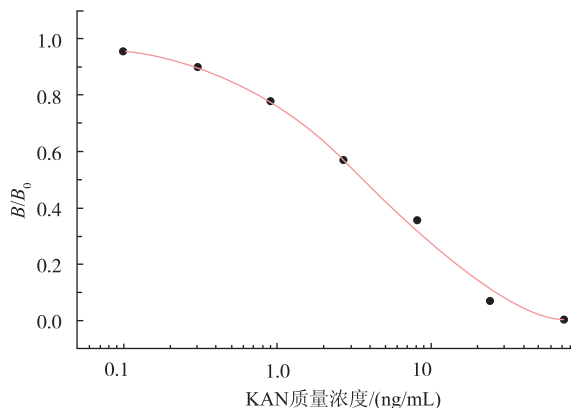


图 1 卡那霉素 ELISA 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of ELISA for kanamycin

2.2 MWCNTs-Abs-HRP 的表征

为了表明多酶探针的成功合成,需要对 MWCNTs-Abs-HRP 多酶探针上的 Ab 和 HRP 进行验证。首先用显色法验证多酶探针上的信号分子 HRP,如图 2 和图 3 所示,未修饰的碳纳米管和 TMB- H_2O_2 并未发生显色反应,而 MWCNTs-Abs-HRP 多酶探针和 TMB- H_2O_2 能够发生显色反应,则

表明信号分子成功偶连到碳纳米管上。具体的操作步骤参考 1.3.4.1 节中的操作流程,卡那霉素的标准品质量浓度设置 4 个梯度 100 、 10 、 1 、 0 ng/mL ,由于多酶探针上 Ab 的存在,导致显色结果的不同,出现抑制趋势。由此可以判定多酶探针 MWCNTs-Abs-HRP 的成功合成。

在免疫分析实验中,抗体作为结合分子,而 HRP 作为信号分子,两者都与检测的灵敏度紧密联系。为了能够得到最好的检测灵敏度,所以需要对探针上抗体和 HRP 的量进行优化,寻找到最好的比例。如表 3 所示。当 $C_{(Ab)}:C_{(HRP)}=1:4$, $A_{450\text{ nm}}$ 值最高,并且此时的 IC_{50} 也是最低的,具有最高的灵敏度。

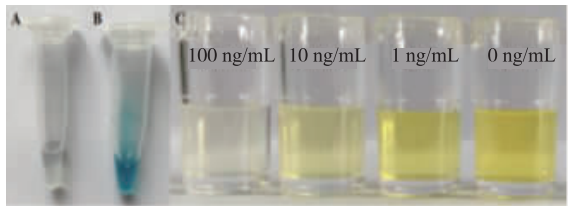


图 2 MWCNTs-Abs-HRP 多酶探针的验证

Fig. 2 Identification of latex MWCNTs-Abs-HRP with centrifugation method

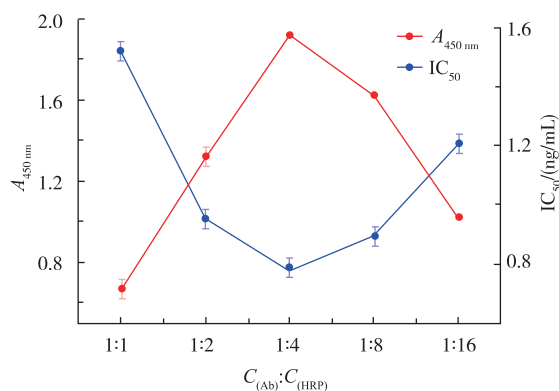


图3 最适抗体和 HRP 比例的优化

Fig. 3 Optimization of the ratio of antibody and HRP

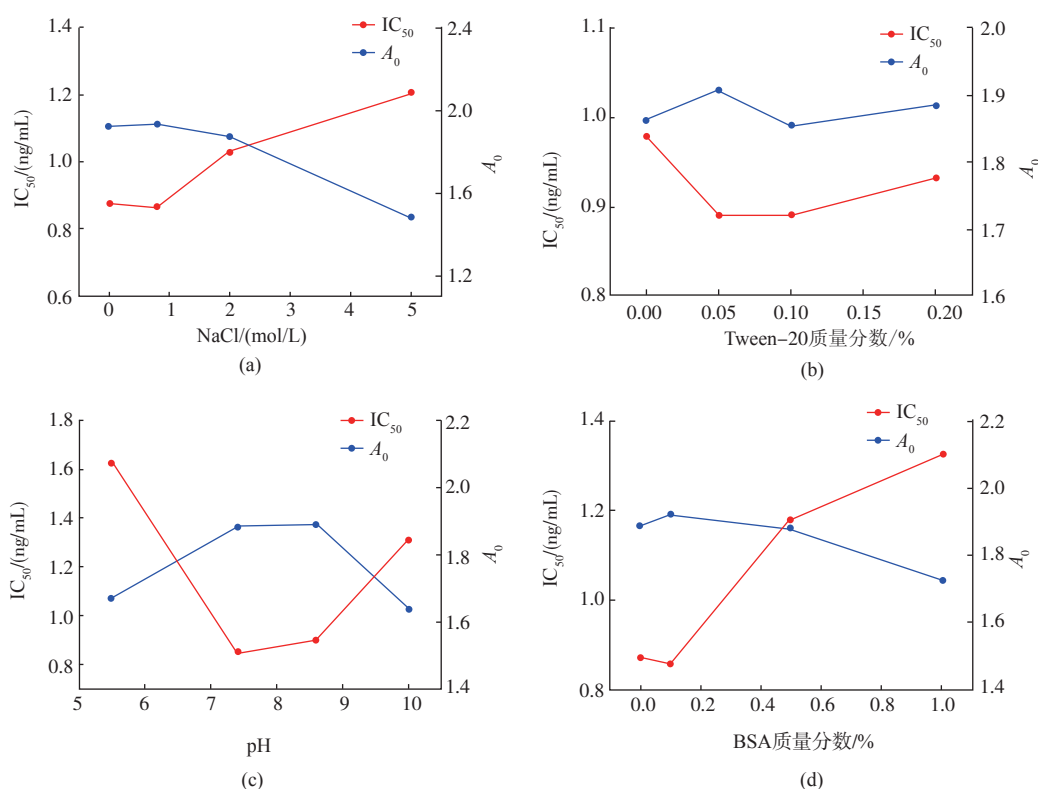


图4 基于 MWCNTs-Abs-HRP 直接竞争性 ELISA 的条件优化

Fig. 4 Optimization of direct competitive ELISA based on MWCNTs-Abs-HRP

2.4 基于 MWCNTs-Abs-HRP 直接竞争性 ELISA 标准曲线

为提高免疫分析方法的灵敏度,许多研究集中于探索不同的信号放大模式,其中可以纳米材料为载体构建多酶纳米颗粒作为信号分子。借助纳米材料的高比表面积特性,结合更多的信号分子,达到信号放大进而提高方法灵敏度的效果。江羚^[31]等以纳米金颗粒为载体,合成 AuNPs/HRP-Kan,建立了

2.3 基于 MWCNTs-Abs-HRP 直接竞争性 ELISA 方法条件优化

抗原抗体的结合容易受到溶液理化条件的影响,包括离子强度、pH 以及蛋白质含量。同时,在实验中发现,合成后 MWCNTs 容易沉淀,为使其更好的悬浮于溶液中参与抗原抗体反应,需要添加一定的表面活性剂。如图 4 所示,基于灵敏度高和 A_0/IC_{50} 高的选择要求,最终确定的最优的缓冲液条件为 0.8 mol/L PBS, pH 7.4, 含有质量分数 0.05% Tween-20 和 1% BSA。

增强型直接竞争性 ELISA 方法,其最低检测限从 0.13 ng/mL 提高到 0.022 ng/mL。Zhang^[34]等采用 CNTs 连接 HRP,构建检测 Ataxia Telangiectasia Mutated(ATM)的免疫分析方法,检测限从 1 ng/mL 提高到 0.2 pg/mL。

根据以上所得的最适条件,得到新检测方法的标准曲线,结果见图 5。相较于之前所建立的卡那霉素 ELISA 方法,灵敏度提高了约 5 倍,该方法操作

流程简单,缩减了反应时间,更加便捷、方便。

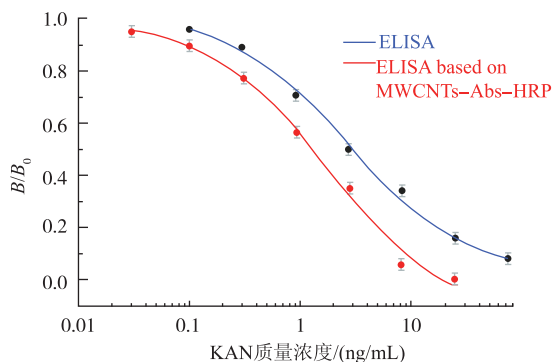


图5 基于碳纳米管高灵敏免疫新方法的标准曲线

Fig. 5 Standard curve of high sensitivity ELISA based on carbon nanotubes

2.5 基于 MWCNTs-Abs-HRP 直接竞争性新方法的重复性

为了验证此方法的重复性,进行了批内差和批间差的测定。首先进行批内差测定,进行6个平行实验,并计算标准偏差(SD)和变异系数(CV)。由表2批内差数据可得,基于碳纳米管信号放大的新方法的变异系数介于0.47%~4.69%之间,变异系数小于15%。随后进行了批间差的测定,在不同的时间进行标准曲线的建立,并计算标准偏差(SD)和变异系数(CV)。新方法的变异系数介于4.10%~9.98%。实验结果表明该方法的批内差和批间差都小于15%,此方法可用于环境样本中卡那霉素的残留检测。

表2 基于 MWCNTs-Abs-HRP 新方法的重复性验证

Table 2 Repeatability verification of the new method based on MWCNTs-Abs-HRP

KAN/(ng/mL)	1	2	3	4	5	6	SD	CV/%	1 d	2 d	3 d	SD	CV/%
24.3	0.188 2	0.196 1	0.202 4	0.195 2	0.189 7	0.191 3	0.003 1	1.58	0.193 8	0.204 2	0.186 5	0.008 9	4.57
8.1	0.375 2	0.354 5	0.363 8	0.347 2	0.351 2	0.339 8	0.005 8	1.63	0.355 3	0.412 3	0.432 2	0.039 9	9.98
2.7	0.695 6	0.749 5	0.717 2	0.751 2	0.702 4	0.697 5	0.003 5	0.48	0.718 9	0.612 3	0.722 1	0.062 5	9.13
0.9	1.113 3	1.026 4	1.244 1	0.942 4	1.281 1	1.042 3	0.011 2	1.01	1.108 3	1.128 3	1.012 1	0.062 1	5.74
0.3	1.424 1	1.453 2	1.413 2	1.397 2	1.424 1	1.387 2	0.023 3	1.64	1.416 5	1.523 4	1.389 7	0.070 7	4.90
0.1	1.803 8	1.794 1	1.816 1	1.812 1	1.809 8	1.812 3	0.008 6	0.47	1.808 1	1.912 3	1.765 2	0.075 6	4.14
0.03	1.850 3	1.943 2	1.923 1	1.893 2	1.911 2	1.864 1	0.014 2	0.75	1.917 5	1.865 3	2.021 2	0.079 4	4.10
0	1.937 1	2.073 2	2.118 9	1.972 1	1.981 2	2.014 1	0.094 6	4.69	2.016 1	2.141 2	2.241 1	0.112 7	5.29

2.6 交叉反应率的测定

选择了5种氨基糖苷类抗生素,通过ELISA方法测定其交叉反应率。结果如表3所示。从表中的计算结果可知:卡那霉素单克隆抗体能够特异性地识别卡那霉素,但是与妥布霉素具有很高的交叉反应率(82.82%),与其他氨基糖苷类抗生素的交叉反应可忽略不计(<0.01%)。Chen^[35]等也报道了类似的结果,其中与Tob的交叉反应率为90%。根据Chen等的分子模型,Kan和Tob的结构几乎相同,包含3个环结构。一个环中只有两个不同取代基可以区分这两种抗生素,这两个取代基分别是Kan的羟基和Tob的氨基和氢。卡那霉素抗体主要与另外两个环结合,这两个环代表了Kan和Tob的共同结构,因此卡那霉素单克隆抗体与妥布霉素具有很高的交叉反应率。

表3 交叉反应率测定

Table 3 Determination of the cross-reactivity

抗生素	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
卡那霉素	3.418	100
妥布霉素	4.127	82.82
链霉素	>20 000	<0.01
新霉素	>20 000	<0.01
庆大霉素	>20 000	<0.01

2.7 牛奶的基质效应的测定

由于纯牛奶样本中蛋白质含量很高且成分较为复杂,因此会影响抗原和抗体的特异性结合,同时也会影响整个检测方法的灵敏度。所以在将此方法应用于牛奶检测之前,先测定其基质效应对此方法的影响。如图6所示,未稀释的牛奶以及稀释2倍的牛奶样本在构建标准曲线时,吸光度值与在

PBS 缓冲液反应中的有很大差异, 所以导致灵敏度降低。当牛奶样本稀释到 4 倍或者 8 倍时, 吸光度值与对照组基本保持一致, 同时抑制趋势也基本一致。因此, 在检测牛奶样本时用 PBS 稀释 4 倍以后进行测定。

测定添加回收率的目的就是为了验证作者所建立的检测方法的可行性和准确性。由表 4 的结果可得, 牛奶中加标回收率为 99.6%~114.8%, 可见回收率在 80%~120% 之间, 表明实验的可行性和准确性都很好。

从本地超市中购买 6 种不同品牌的纯牛奶, 并用建立的 ELISA 分析方法对卡那霉素含量进行测定, 并用 UPLC-MS/MS 对方法进行校正。从表 5 可以看出, 采用建立的 ELISA 方法检测出有两种牛奶中含有卡那霉素, 最高为 0.124 ng/mL, 但远低于欧盟规定的 MRL(150 ng/mL)。与此同时, 也采用了仪

器方法(UPLC-MS/MS)对相同的样本进行测定, 并比较两者的检测结果。由表 4 中的数据可得, 两种分析方法(ELISA 方法和 UPLC-MS/MS 法)的检测结果具有良好的相关性, 可认为此方法是可行的。

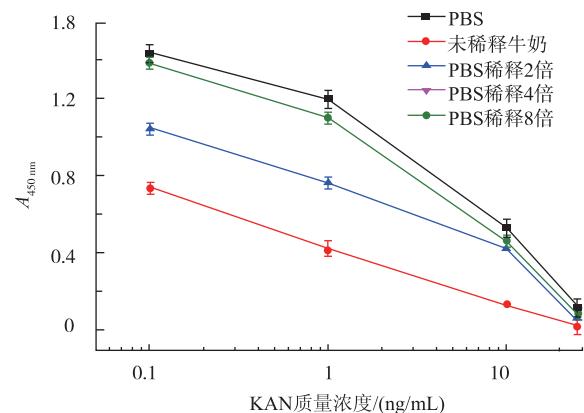


图 6 牛奶样本基质效应的测定

Fig. 6 Matrix effect in milk samples

表 4 样品加标回收率及变异系数测定

Table 4 Recovery and CV of Kanamycin in milk samples

样品	卡那霉素添加量/ (ng/mL)	样品中卡那霉素质量浓度/(ng/mL)			回收率/%
		1	2	3	
牛奶	0	0.127 7	0.142 0	0.108 8	—
	0.5	0.582 2	0.567 9	0.572 3	114.8
	2	2.221 4	2.176 3	2.094 1	108.2
	10	10.137 5	9.938 1	9.812 3	99.6

表 5 实际牛奶样品中卡那霉素的残留检测

Table 5 Determination of Kanamycin in milk samples

牛奶样本	质量浓度/(ng/mL)	
	ELISA	UPLC-MS/MS
1	ND	ND
2	0.081	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	0.124	ND
6	ND	ND

3 结 语

该方法应用于牛奶样本中卡那霉素的检测, 6 种本地牛奶样本中检测到 2 种含有卡那霉素, 但含量远低于 MRL。

作者以 MWCNTs 为载体, 成功合成多酶纳米颗粒 MWCNTs-Abs-HRP。构建基于 MWCNTs-Abs-HRP 的直接竞争 ELISA 方法, 其质量浓度线性范围为 0.151~5.161 ng/mL, 其最低检测限为 0.061 ng/mL, 相比常规间接竞争性 ELISA, 灵敏度提高约 5 倍。

参考文献:

- [1] 顾觉奋. 抗生素[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
- [2] FLEMING A. On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2001, 79(8): 780-790.
- [3] 徐积恩, 朱明珍. 抗生素[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [4] 陈玲, 万宇平, 邵兵, 等. 牛奶中 β -内酰胺和四环素类抗生素二联检测试纸条的初步研究 [J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(7): 776-783.

- [5] 林维宣. 各国食品中农药兽药残留限量规定[M]. 大连:大连海事大学出版社,2002.
- [6] VOSOUGH M, RASHVAND M, ESFAHANI H M, et al. Direct analysis of six antibiotics in wastewater samples using rapid high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector: a chemometric study towards green analytical chemistry [J]. *Talanta*, 2015, 135: 7-17.
- [7] 刘雪红, 张秀芹, 侯颖, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中7种氨基糖苷类药物残留[J]. 中国兽药杂志, 2015, (3): 48-52.
- [8] SORAN M L, LUNG I, OPRIS O, et al. Determination of antibiotics in surface water by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection[J]. *Analytical Letters*, 2016, 50(7): 1209-1218.
- [9] 韦晓群, 黄维龙, 黎海超, 等. 奶粉中20种磺胺类抗生素含量的外标测定法开发[J]. 检验检疫学刊, 2016, (6): 7-12.
- [10] GBYLIK-SIKORSKA M, POSYNIK A, SNIEGOCKI T, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms [J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 8-15.
- [11] 李经纬, 丁紫荣, 余乐洵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测水中17种抗生素[J]. 分析科学学报, 2016, (6): 851-856
- [12] BOL'SHAKOV D S, AMELIN V G, NIKESHINA T B. Determination of antibiotics in drugs and biological fluids using capillary electrophoresis[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 71(3): 215-233.
- [13] SIERRA-RODERO M, FERNÁNDEZ-ROMERO J M, GÓMEZ-HENS A. Determination of fluoroquinolone antibiotics by microchip capillary electrophoresis along with time-resolved sensitized luminescence of their terbium (III) complexes [J]. *Microchimica Acta*, 2014, 181(15): 1897-1904.
- [14] 田一方. 毛细管电泳和分子印迹固相萃取方法检测氨基糖苷类残留[D]. 镇江: 江苏大学, 2015.
- [15] 王志强, 胡国媛, 李志勇, 等. 微生物抑制法快速检测鲜奶中多种抗生素残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(2): 139-141.
- [16] 尹情胜, 任翠丽, 陈殿良, 等. 微生物法测定兔血清中低浓度的庆大霉素[J]. 药物分析杂志, 2006, (12): 1811-1813.
- [17] VIROLAINEN N E, PIKKEMAAT M G, ELFERINK J W A, et al. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(23): 11065-11070.
- [18] SONG E, YU M, WANG Y, et al. Multi-color quantum dot-based fluorescence immunoassay array for simultaneous visual detection of multiple antibiotic residues in milk[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 72: 320-325.
- [19] MI R J, SON K T, JI Y K, et al. A lateral flow immunoassay kit for detecting residues of four groups of antibiotics in farmed fish [J]. *Korean Journal of Veterinary Service*, 2015, 48(2): 158-167.
- [20] 王明华, 叶尊忠, 王剑平, 等. β -内酰胺抗生素残留检测的生物传感器研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(6): 801-808.
- [21] WEI Q, ZHAO Y, DU B, et al. Ultrasensitive detection of kanamycin in animal derived foods by label-free electrochemical immunosensor[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(3): 1601-1606.
- [22] HAN S, LI B, SONG Z, et al. A kanamycin sensor based on an electrosynthesized molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine film on a single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode[J]. *Analyst*, 2017, 142(1): 218-223.
- [23] QIN X, YIN Y, YU H, et al. A novel signal amplification strategy of an electrochemical aptasensor for kanamycin, based on thionine functionalized graphene and hierarchical nanoporous PtCu[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 77: 752-758.
- [24] WANG C, LIU C, LUO J, et al. Direct electrochemical detection of kanamycin based on peroxidase-like activity of gold nanoparticles[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 936: 75-82.
- [25] 贾向阳, 尤慧艳, 付秀丽. 鱼精蛋白-核酸适配体-金纳米技术快速检测牛奶中的卡那霉素[J]. 色谱, 2017, 35(3): 269-273.
- [26] SHARMA T K, RAMANATHAN R, WEERATHUNGE P, et al. Aptamer-mediated 'turn-off/turn-on' nanozyme activity of gold nanoparticles for kanamycin detection[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(100): 15856-15859.
- [27] CHEN J, LI Z, GE J, et al. An aptamer-based signal-on bio-assay for sensitive and selective detection of Kanamycin A by using gold nanoparticles[J]. *Talanta*, 2015, 139: 226-232.
- [28] NAGAOKA F, ITOH M, SAMAD M S, et al. Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine using red-colored high density latex beads[J]. *Parasitology International*, 2013, 62(1): 32-35.