

基于 SPR 技术的磺胺二甲氧嘧啶高灵敏检测

赵媛, 徐丽广, 吴晓玲, 刘丽强, 胥传来*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:磺胺类药物的过量使用会对人体造成过敏性反应,并可能具有致癌性,而磺胺二甲氧嘧啶(Sulfadimethoxine,SDM)在食品中磺胺类药物的使用中占有很大的比例,因此基于表面等离子体共振(Surface plasmon resonance,SPR)技术建立了奶粉样品中SDM的快速、高灵敏检测方法。通过待测样品与SPR芯片表面修饰的SDM抗体分子特异性识别引起金膜表面折射率变化,进而导致SPR角的变化以实现检测。建立SPR响应信号和SDM浓度间的标准曲线,最低检测限达到0.19 ng/mL,奶粉样品添加回收率在94.0%~98.3%。和传统方法相比,SPR技术具有较高的灵敏度、准确性且操作简便,SPR传感芯片完整性好且可重复用于实际样品检测中。

关键词:表面等离子体共振;生物传感器;共振信号;磺胺二甲氧嘧啶

中图分类号:TS 207.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2015)07—0699—05

High Sensitive Detection of Sulfadimethoxine Based on SPR Technique

ZHAO Yuan, XU Liguang, WU Xiaoling, LIU Liqiang, XU Chuanlai*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The overdose of sulfa drugs will cause allergic reactions and possibly carcinogenic. Among the all sulfa drugs used in food, sulfadimethoxine (SDM) takes up a large proportion. In this research, a new method based on surface plasmon resonance (SPR) was proposed for the rapid and high sensitive detection of SDM in milk powder. The detection was based on the changes of SPR angles, which was subsequently caused by the changes in the refractive index of gold film induced by the specific recognition of samples by the SDM antibody modified on the surface of SPR chips. A standard curve represented the relationship between SPR response signal and SDM concentration. The limit of detection (LOD) for SDM was as low as 0.19 ng/mL, and the milk powder recovery was in the range of 94.0%~98.3%. Compared with the traditional methods, SPR technique has high sensitivity, high accuracy and easy operation. SPR sensor chips can be repeatedly used for sample detection in practical application with good integrity.

Keywords: surface plasmon resonance, biosensor, resonance signal, sulfadimethoxine

收稿日期: 2014-08-25

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项项目。

作者简介: 赵媛(1986—),女,江苏徐州人,工学博士,副教授,主要从事食品安全检测研究。E-mail:zhaoyuan0731@126.com

* 通信作者: 胥传来(1965—),男,江苏盐城人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品安全研究。E-mail:xcl@jiangnan.edu.cn

SDM 是一种磺胺类药,具有较强的抗细菌及原虫感染的作用,常被用作饲料添加剂及畜禽疾病的治疗和预防,同时 SDM 也具有的一定毒性,引起过敏、造血系统障碍、急性溶血性贫血等^[1],因此磺胺二甲氧嘧啶在肉类、乳类、禽蛋等食品性动物组织中的残留问题备受关注^[2-6]。中国农业部 2002 年发布的动物性食品中兽药最高残留量,严格规定了动物性食品中磺胺类药物最大残留量为 25 ng/mL。目前针对磺胺二甲氧嘧啶大致分为以下几种,TTC 法是中国制定的抗生素残留量的检验标准 (GB5409-85),但耗时长、要求操作人员具有一定的专业知识并且实验过程中菌液的制备和水浴过程的控制都要求严格遵守操作规程,否则易出现假阳性,以致出现检验结果的不稳定性^[6-7]。高效液相色谱检测法属于一种理化检测方法,检测程序复杂,费用相对较高,需购买色谱仪等检测设备,不适合小型检验室使用^[2-5]。酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种结合了酶化学反应的敏感性和抗原抗体免疫反应的特异性相结合的方法^[8-9],但操作繁琐,耗时长,检测灵敏度不高,有时容易出现假阳性结果^[6-7]。

SPR 技术利用了金属薄膜光学耦合产生的物理光学现象,是一种具有高灵敏度的光学分析手段^[10-15]。在传感芯片表面固定一层生物分子识别膜,然后将待测样品流过芯片表面,若样品中有能够与芯片表面的生物分子识别膜相互作用的分子,会引起金膜表面折射率变化,最终导致 SPR 角变化,通过检测 SPR 角度变化,获得被分析物的浓度、亲和力、动力学常数和特异性等信息,SPR 检测器追踪溶液中分子与芯片表面分子的结合、解离整个过程的变化,目前已广泛应用于生命科学、食品安全、环境检测、生物医学等领域^[14,16]。作者基于表面等离子体共振原理建立针对磺胺二甲氧嘧啶的高灵敏检测。和传统方法相比^[17-18],SPR 技术无需标记步骤、所需样品量极少、检测过程简单,可以实现磺胺二甲氧嘧啶的实时、快速、无损伤检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

磺胺二甲氧嘧啶抗体:质量浓度 1 mg/mL,作者所在实验室自制,半抑制率 (IC_{50}) 为 0.8 ng/mL,LOD 为 0.31 ng/mL;磺胺二甲氧嘧啶:纯度大于 90%,干

粉,购自 Sigma (上海) 贸易有限公司;碳二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾及其他分析试剂:购自阿拉丁试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

梅特勒-托利多分析电子天平:上海仪器有限公司产品;Milli-Q Integral Cabinet 3 型超纯水制备仪:美国 Millipore 公司产品;XW-80A 旋涡混合器:上海精科实业有限公司产品;可调移液器:美国 Eppendorf 公司产品。

1.3 芯片表面修饰磺胺二甲氧嘧啶抗体

首先将磺胺二甲氧嘧啶抗体溶解在 10 mmol/L pH 5.0 的乙酸钠溶液中,控制其终浓度为 0.05 mg/mL。其次向传感器内通入 pH 为 7.4 PBS 缓冲溶液 (包括 137 mmol/L 氯化钠,2.7 mmol/L 氯化钾,4.3 mmol/L 磷酸氢二钠,1.4 mmol/L 磷酸二氢钾和 1/1 000 甲醇),控制流量为 10 μ L/min,观察基线,待其稳定后加入相同体积的 4.2 mg/mL EDC 和 5.0 mg/mL NHS 溶液,反应 5~10 min,活化羧基纤维素,从而形成有活性的 NHS-纤维素层。第三,通入 PBS 缓冲溶液进行冲洗,待基线稳定后加入已配制好的磺胺二甲氧嘧啶抗体溶液,抗体上的羧基和纤维素上的氨基形成共价键偶联。随后,通入 1 mol/L 的乙醇胺溶液以封闭为参与反应的 NHS-纤维素位点。

1.4 基于 SPR 技术的磺胺二甲氧嘧啶检测

将磺胺二甲氧嘧啶溶液按照二倍浓度进行梯度稀释,分散在 pH 7.4 PBS 缓冲液中,浓度变化包括 5、2.5、1.25、0.63、0.32 ng/mL。将不同浓度的磺胺二甲氧嘧啶溶液依次通入 SPR 仪,优化流入流速和反应结合时间,观察 SPR 信号随时间的变化趋势。反应结束,用 pH 7.4 的 PBST 缓冲液 (包括 6.7 mmol/L 的磷酸氢二钠、1.25 mmol/L 的磷酸二氢钾、150 mmol/L 的氯化钠和 0.005% 的 Tween-20) 进行洗脱,以去除结合上的磺胺二甲氧嘧啶,便于下一个样品的测试。

2 结果与分析

2.1 实验原理

实验主要原理如图 1 所示,基片的表面镀有一层金膜,构成传感芯片的核心部分。在金膜表面修饰一种生物分子如磺胺二甲氧嘧啶抗体,当待测溶液流过芯片表面时,待测分子与芯片表面的磺胺二甲氧嘧啶抗体发生结合,导致金膜表面介质折射率

的改变,得到不同角度的反射光的光强,其中使反射光完全消失的入射角即为共振角,金膜表面自由电子受入射光激发而产生电子震荡,入射光的能量被转移,形成表面等离子体。记录角度和反射光强之间变化曲线图,曲线图中对应波谷处为该曲线的共振角,对应的角度即为共振信号,记录时间和共振信号间的变化曲线即为 SPR 传感曲线,分析不同浓度待测溶液下体系共振信号的变化达到对目标物的检测。

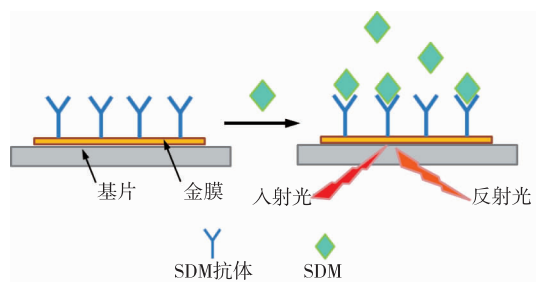


图 1 基于 SPR 技术的 SDM 检测原理图

Fig. 1 Schematic illustration of SPR-based SDM detection

2.2 SPR 芯片再生测试

在进行实际样品测定中,由于要接触不同浓度的待测样品,SPR 芯片在反复吸附、洗涤等多个循环过程后使得表面偶联分子失去活性或脱落,因此传感芯片的完整性和重复性是完成待测样品高灵敏检测的关键。其中金属膜的化学稳定性是一个需要考虑的重要因素,和其他金属膜相比如银膜或铜膜相比,金膜的稳定性最好,不易被空气氧化且不易与其他物质发生反应,具有化学惰性,适合长期使用。如图 2 所示,结合不同质量浓度的磺胺二甲氧嘧啶 (0.32、0.63、1.25、2.50、5.0 ng/mL) 后的 SPR 芯片,经过多次洗涤和再生之后,测得的响应信号较弱,且彼此间并没有太大的差别,不存在非特异性吸附和交叉感染,SPR 可以实时观测到分子结合、薄膜形成等表面现象,并能给出高灵敏度、高选择性同时最小的非特异结合的信号。再生后的芯片中金膜尚且完整,可重复利用。

2.3 基于 SPR 技术的磺胺二甲氧嘧啶检测

将不同质量浓度的磺胺二甲氧嘧啶溶液通入芯片表面,待测的磺胺二甲氧嘧啶会与修饰在 SPR 传感芯片表面的磺胺二甲氧嘧啶抗体直接发生特异性亲和和识别反应,待测分子和芯片表面的抗体结合引起金膜和溶液界面折射率的上升,从而导致共振角发生变化,共振角对应的角度为共振信号,从

而得到时间与对应共振信号的传感曲线。如图 3 所示,当待测溶液浓度大,结合产物多,引起传感器的响应大;当待测溶液浓度小,结合产物少,引起传感器的响应小。因此,待测溶液浓度与传感器响应信号之间存在正比关系(图 4),当在 300 s 时,响应信号达到最大,建立样品浓度和 300 s 处响应信号间的标准曲线,显示出较好的线性 (R^2 为 0.99),计算出针对磺胺二甲氧嘧啶的 LOD 为 0.19 ng/mL。基于 SPR 技术的检测方法比传统 ELISA 方法具有更高的灵敏度,且稳定性好,检测时间短,操作简单,可以作为 ELISA 的一种替代技术,应用于待测样品的测定。

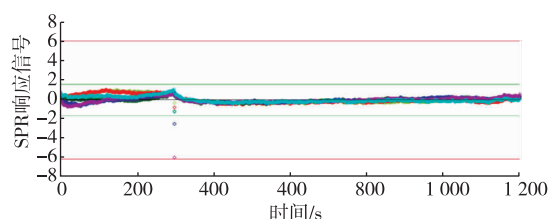


图 2 SPR 芯片的再生鉴定

Fig. 2 Renewable identification of SPR chips

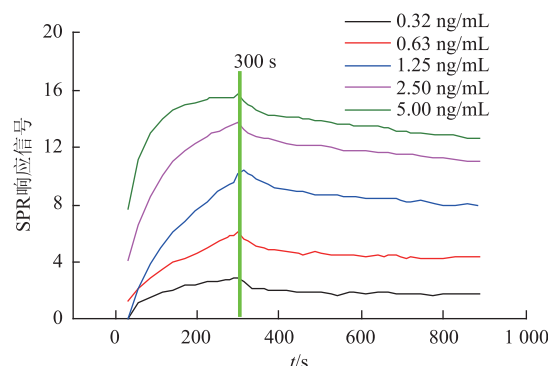


图 3 不同质量浓度 SDM 随时间变化的 SPR 响应信号

Fig. 3 Time-variant changes of SPR response signal f SDM with different concentrations

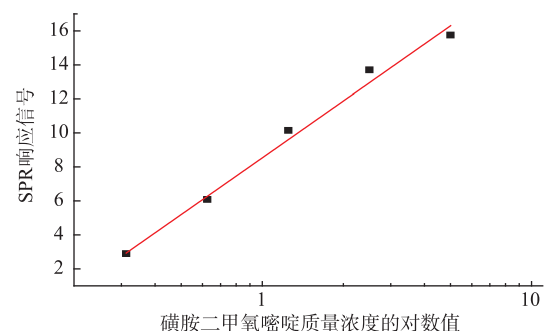


图 4 SDM 浓度和 SPR 响应信号的标准曲线

Fig. 4 Standard curve represented the relationship between SDM concentration and SPR response signal

2.4 添加回收试验

取已采用理化方法确认为阴性的奶粉样品 1.0 g 共 4 份,充分溶解于 1 mL 的超纯水中,分别添加不同剂量的 SDM,使其终质量浓度为 0.5、1.0、2.0 和 4.0 ng/mL。分别加入 5 mL 乙腈溶液,混合均匀后离心,取上清液真空抽干,分散在 1 mL pH 7.4 PBS 缓冲液中,加入 1 mL 正己烷去脂,离心去上层,重复 3 次,取下层水相用 0.22 μm 滤膜进行过滤。将不同含有不同浓度 SDM 的滤液依次通入 SPR 仪中,记录不同 SDM 浓度下 SPR 响应信号,分析检测浓度并计算样品回收率在 94.0%~98.3%,结果见表1。

表 1 奶粉样品中 SDM 添加回收率

Table 1 Recovery of SDM spiked in milk powder

样品 编号	添加质量浓度/ (ng/mL)	检测质量浓度/ (ng/mL)	回收率/%
1	0.5	0.47	94.0 $\pm$ 2.6
2	1.0	0.96	96.0 $\pm$ 2.1
3	2.0	1.89	94.5 $\pm$ 2.0
4	4.0	3.93	98.3 $\pm$ 1.7

参考文献:

- [1] 徐慧敏,蔡宏文,李天元,等.磺胺类药物过敏和交叉过敏的研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2012,26(6):897-901.
XU Huimin, CAI Hongwen, LI Tianyuan, et al. Progress in sulfonamide hypersensitivity and cross-hypersensitivity [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2012, 26(6): 897-901. (in Chinese)
- [2] ZOU Qionghui, XIE Mengxia, WANG Xiangfeng, et al. Determination of sulphonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate [J]. *Journal of Separation Science*, 2007, 30: 2647-2655.
- [3] Ibarra I, Miranda J, Rodriguez J, et al. Magnetic solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of sulphonamides in milk samples[J]. *Food Chemistry*, 2014, 157: 511-517.
- [4] Gamba V, Terzano C, Fioroni L, et al. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 637: 18-23.
- [5] Forti A, Scortichini G. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 637: 214-219.
- [6] 赵旭壮,李明元.动物性食品中磺胺类药物残留检测研究进展[J].中国食品卫生杂志,2012,24(3):292-296.
ZHAO Xuzhuang, LI Mingyuan. Development of sulfonamides residues detection in edible animal products[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2012, 24(3): 292-296. (in Chinese)
- [7] 黄华,陈君慧,冯楠,等.动物源性食品中磺胺类药物残留前处理和检测方法研究进展 [J].食品工业科技,2013,34(4):378-381.
HUAG Hua, CHEN Junhui, FENG Nan, et al. Research progress in the pre-processing and detection method of sulfonamides drugs residues in animal derived foods[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(4): 378-381. (in Chinese)
- [8] 张勋,匡华,徐丽广,等.绿色无毒黄曲霉毒素 B1 免疫检测方法[J].食品与生物技术学报,2013,32(12):1293-1297.
ZHANG Xun, KUANG Hua, XU Liguang, et al. Green and Nontoxic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Aflatoxin B1 Detection[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(12): 1293-1297. (in Chinese)
- [9] 匡华,勇倩倩,刘丽强,等.食品中苏丹红 I 酶联免疫检测方法的建立及酶学性质研究[J].食品与生物技术学报,2013,32(10):1049-1056.

3 结语

通过在 SPR 芯片表面修饰针对磺胺二甲氧嘧啶的抗体,鉴于待测抗原和抗体间的特异性亲和原理,采用表面等离子共振技术实现了针对磺胺二甲氧嘧啶浓度的高灵敏检测,其 LOD 达到 0.19 ng/mL,奶粉样品添加回收率在 94.0%~98.3%。和传统 ELISA 方法相比,表面等离子共振技术操作简单、样品用量少、检测时间快且灵敏度较高,可以沿向小型化、自动化、多样化和高通量应用目标,推广到食品安全和环境监测应用中。

- KUANG Hua, YONG Qianqian, LIU Liqiang, et al. Establishment of ELISA for Sudan I Residues in Food [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(10): 1049-1056. (in Chinese)
- [10] Valera E, Muriano A, Pividori M, et al. Development of a Coulombimetric immunosensor based on specific antibodies labeled with CdS nanoparticles for sulfonamide antibiotic residues analysis and its application to honey samples [J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2013, 43, 211-217.
- [11] 王莉, 魏万贵, 蔡勤, 等. 酶联免疫法检测动物源性食品中磺胺间二甲氧嘧啶残留 [J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(3): 196-199.
- WANG Li, WEI Wangui, CAI Qin, et al. Enzyme linked immunosorbent assay for Sulfadimethoxine residues detection in animal derived food[J]. **Chinese Journal of Preventive Medicine**, 2006, 40(3): 196-199. (in Chinese)
- [12] Ermini M, Mariani S, Scarano S, et al. Bioanalytical approaches for the detection of single nucleotide polymorphisms by Surface Plasmon Resonance biosensors[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2014, 61: 28-37.
- [13] JIANG Zhongxiu, QIN Yun, Peng Zhen, et al. The simultaneous detection of free and total prostate antigen in serum samples with high sensitivity and specificity by using the dual-channel surface plasmon resonance [J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2014, 62: 268-273.
- [14] SHI Dachuan, HUANG Junfu, CHUAI Zhengran, et al. Isothermal and rapid detection of pathogenic microorganisms using a nano-rolling circle amplification-surface plasmon resonance biosensor[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2014, 62: 280-287.
- [15] Verma R, Gupta B. Detection of heavy metal ions in contaminated water by surface plasmon resonance based optical fibre sensor using conducting polymer and chitosan[J]. **Food Chemistry**, 2015, 166: 568-575.
- [16] 肖桂娜, 蔡继业. 基于局域表面等离子体共振效应的光学生物传感器[J]. 化学进展, 2010, 22(1): 194-200.
- XIAO Guina, CAI Jiye. Optical biosensors based on localized surface plasmon resonance effect [J]. **Progress in Chemistry**, 2010, 22(1): 194-200. (in Chinese)
- [17] Wiltschi B, Knoll W, Sinner E. Binding assays with artificial tethered membranes using surface plasmon resonance [J]. **Methods**, 2006, 39: 134-146. (in Chinese)
- [18] 郑荣升, 鲁拥华, 林开群, 等. 表面等离子体共振传感器研究的新进展[J]. 量子电子学报, 2008, 25(6): 657-664.
- ZHENG Rongsheng, LU Yonghua, LIN Kaiqun, et al. Recent progress of research on surface plasmon resonance sensors [J]. **Chinese Journal of Quantum Electronics**, 2008, 25(6): 657-664. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 第 61 届国际肉类科技大会

会议名称(英文): 61st International Congress of Meat Science & Technology

所属学科: 兽医学, 动物食品科学

开始日期: 2015-08-23

结束日期: 2015-08-28

所在国家: 法国

所在城市: 法国

具体地点: Clermont-Ferrand

主办单位: 芬兰赫尔辛基大学

E-MAIL: inra_icomst-2015@orange.fr

会议网站: <https://colloque.inra.fr/icomst2015/Home/ICOMST-2015>

会议背景介绍:

国际肉类科技大会(International Congress of Meat Science and Technology, 简称 ICoMST)1954 年起源于欧共体国家, 大会常务秘书处设在芬兰赫尔辛基大学。随着全球肉类工业与科学技术的迅速发展, 1988 年这一地区性的科技会议已拓展为面向世界的全球性国际会议, 这是世界肉类科技领域最具权威性的会议。

第 61 届国际肉类科技大会(ICoMST)将于 2015 年 8 月 23-28 日在法国举办, 届时来自世界各地的肉类领域专家、科技工作者、企业家、管理人员及技术人员将齐聚一堂, 共谋世界肉类工业与科学技术的发展和未来。