

• 生物技术与方法 •

应用胶体金免疫层析法检测饲料中恩拉霉素残留的方法建立

王康, 余璞, 陈孔, 陈敏*, 蔡永辉, 王冰清

浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

王康, 余璞, 陈孔, 陈敏, 蔡永辉, 王冰清. 应用胶体金免疫层析法检测饲料中恩拉霉素残留的方法建立[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2346-2356.

WANG Kang, YU Pu, CHEN Kong, CHEN Min, CAI Yonghui, WANG Bingqing. A colloidal gold immunochromatography-based method for detecting enramycin residues in feed[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2346-2356.

摘要: 为了实现饲料中恩拉霉素的快速检测, 本研究开发了基于抗恩拉霉素 A 单克隆抗体 (anti-enramycin A monoclonal antibody, anti-Er.A-mAb) 的竞争抑制胶体金免疫层析试纸条。以实验室制备的高纯度抗恩拉霉素 A 单克隆抗体制备胶体金探针, 并考察了标记 pH、抗体标记量、检测线浓度对恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条的影响。在碳酸钾添加量为 8 μL 、抗体标记量为 4 $\mu\text{g/mL}$ 、检测线划膜浓度为 1.0 mg/mL 、金标抗体使用量为 3 μL 的条件下制备得到的胶体金试纸条特异性好、检出限低。经胶体金读数仪测定, 恩拉霉素 A 检出限为 25 ng/mL 、线性范围为 25–300 ng/mL 。选用畜禽饲料进行阳性样本添加实验, 结果显示检测结果重复性好, 比高效液相色谱法更为灵敏, 适合大批量饲料样本的恩拉霉素快速检测。

关键词: 恩拉霉素; 胶体金技术; 单克隆抗体; 竞争抑制法

资助项目: 浙江省重中之重一级学科(2017SIAR201); 校企合作研发项目(2018330101002573); 浙江省“十四五”省级大学生校外实践教育基地建设项目(浙教办函[2023]41号); 国家一流专业平台项目(1110XJ0520120), 浙江工商大学校级精品在线开放课程建设项目(1110XJ2922015)

This work was supported by the Most Important First-class Discipline in Zhejiang Province (2017SIAR201), the School-Enterprise Cooperation Research and Development Project (2018330101002573) the Zhejiang Province “14th Five-year Plan” Provincial University Students’ Off-campus Practical Education Base Construction Project (Zhejiang Education Department Letter [2023] 41), the National First-class Professional Platform Project (1110XJ0520120), and the Zhejiang Gongshang University School-level High-quality Online Open Course Construction Project (1110XJ2922015).

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008970; E-mail: chenmin@mail.zjgsu.edu.cn

Received: 2023-12-11; Accepted: 2024-03-05; Published online: 2024-03-07

A colloidal gold immunochromatography-based method for detecting enramycin residues in feed

WANG Kang, YU Pu, CHEN Kong, CHEN Min*, CAI Yonghui, WANG Bingqing

School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: To achieve rapid detection of enramycin in feed, we employed the competitive inhibition method to develop a colloidal gold immunochromatographic test strip based on the anti-enramycin A monoclonal antibody (anti-Er.A-mAb). Colloidal gold probes were prepared with a laboratory-prepared high-purity anti-Er.A-mAb. The effects of pH, antibody titer, and antigen concentration (test line) on the test strip performance were investigated. The colloidal gold test strip prepared with 8 μL potassium carbonate addition, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antibody, 1.0 mg/mL antigen (test line), and 3 μL gold-labeled antibody showed acceptable specificity and a low limit of detection. The test strip showed the detection limit of 25 ng/mL for enramycin A, with a linear range of 25–300 ng/mL . The experiments on the feed with positive sample addition proved that the test strip had good repeatability and was more sensitive than high-performance liquid chromatography, being applicable for the rapid detection of enramycin in large batches of feed samples.

Keywords: enramycin; colloidal gold technique; monoclonal antibody; competitive inhibition method

恩拉霉素(enramycin)是一种由链霉菌(*Streptomyces fungicidius*)分泌并由17种有机氨基酸和13种氨基脂肪酸构成的、属于多肽结合类型的有机化合物^[1],它对于链球菌、肺炎双球菌等革兰氏阳性菌具有强烈的抗菌活性,能够有效调节各类动物的胃肠道菌群。1974年,恩拉霉素在美国、日本正式登记注册,因其能够有效促进动物健康生长并能够改善饲料综合利用率^[2],在美国、日本等全球40多个国家广泛使用,并于1993年在我国首次允许使用^[3]。近年来,由于畜禽饲养量的增加,部分养殖户为取得最大经济效益滥用恩拉霉素,导致肉源性食品中恩拉霉素的过量残留。这不仅会增加食用者的患病风险,对各国的进出口贸易也可能产生很大的负面影响。2020年,我国禁止将恩拉霉素作为饲料添加剂^[4],因此,规范恩拉霉素的使用对于

保障公共健康具有重要的现实意义。

当前,恩拉霉素的测定技术主要有两种,分别是微生物法^[2]和色谱分析法^[5-6]。其中,色谱分析法还可与其他方法联用来提高检测的灵敏度。但是这些测定方法样本的前处理时间较长,并且需要特定的人员进行操作及结果判定,具有较强的专业性。胶体金免疫层析分析技术(gold immunochromatographic assay, GICA)因具有方便、快捷和成本低等优点^[7],被广泛用于现场检测。它是一种在免疫理论基础之上进一步发展而来的新型免疫层析测定技术,能够很好地弥补仪器检测方法检测时间长、成本高昂以及样本处理难度较大的缺点。此法在对动物源性食品质量控制^[8]、食品病原微生物检测^[9]、食品谷物真菌毒素^[10]的检测领域表现出极大的优势,并且发展快速,在特异性和灵敏度方面明显优于传统

检测技术,降低了检测工作的强度,同时提升了检测的质量。目前,对于恩拉霉素含量的免疫检测方法^[1]报道不多,其中关于胶体金试纸条的残留检测方法尚未见报道。因此,建立恩拉霉素的胶体金免疫层析法具有较高的应用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料

恩拉霉素 A 组分(enramycin A, Er.A)、恩拉霉素 B 组分(enramycin B, Er.B)、抗恩拉霉素 A 单克隆抗体(anti-enramycin A monoclonal antibody, anti-Er.A-mAb)、恩拉霉素 A 人工抗原(Er.A-BSA)由实验室自制,牛血清蛋白(bovine serum protein, BSA)购自 Sigma 公司,多黏菌素 B (polymyxin B, Pol.B)、杆菌肽 A (bacitracin A, Bac.A)、维吉尼亚霉素 M1 (virginiamycin M1, Vir.M1)、万古霉素(vancomycin, Van)均购自南京都莱生物技术公司,恩拉霉素预混剂(enramycin premix, Er.Pre)购自上海莫息生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (horseradish peroxidase-IgG, HRP-IgG)、羊抗鼠 IgG (goat anti-mouse IgG)购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories,纯度 98%的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)购自萨恩化学技术(上海)有限公司,0.01 mol/L 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)购自上海碧云天生物技术股份有限公司,碳酸钾、甲醇、氯化钠、吐温-20、酪蛋白和明胶购自国药集团,蔗糖、去离子水购自本地超市,猪饲料、鸡饲料购自本地农贸超市,玻璃纤维滤膜、硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC)、吸水纸、Polyvinyl chloride (PVC)底板、50 nm 粒径胶体金溶液购自杭州布陆斯贸易有限公司。

1.2 主要仪器

万分之一天平、pH 计购自梅特勒托利多科

技(上海)有限公司,数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司,高速冷冻离心机购自 Sorvall 公司,酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司,紫外分光光度计购自上海美谱达仪器,旋涡振荡仪购自海门市其林贝尔仪器公司,高效液相色谱仪购自 Waters 公司,XYZ-3000 型试纸条三维喷膜仪、胶体金读数仪由杭州都林生物科技有限公司提供。

1.3 金标抗体的制备及表征

1.3.1 金标抗体最佳标记 pH 的确定^[7]

取 10 个 1.5 mL 离心管分别编号后加入胶体金溶液 1 mL,向每个离心管中加入相应编号的 0-9 μL 0.2 mol/L K_2CO_3 混匀。在每管中加入 5 μg anti-Er.A-mAb 反应 20 min,然后分别加入 100 μL 10% NaCl 溶液,静置 60 min。最后从各管中取 200 μL 溶液和 200 μL 胶体金原溶液在 400-600 nm 处进行波段扫描,重复 3 次,选取与胶体金原溶液相比最大吸光值变化最小的实验组 pH 值为最佳标记 pH。

1.3.2 金标抗体最佳抗体标记量的确定^[7]

取 10 个 1.5 mL 离心管分别加入胶体金溶液 1 mL,用 1.3.1 中确定的最佳 K_2CO_3 添加量调节溶液 pH。随后在各离心管中加入适量 anti-Er.A-mAb 使其终浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。反应 20 min 后,在溶液中添加 100 μL 10% NaCl 并摇匀,静置 60 min。从各管中取 200 μL 溶液和 200 μL 胶体金原溶液在 400-600 nm 处进行波段扫描,重复 3 次,选取与胶体金原溶液相比最大吸光值变化最小的实验组抗体添加量作为最佳的抗体添加量。

1.3.3 金标抗体的制备

吸取适量胶体金溶液于一个烧杯中,用 K_2CO_3 将溶液调至合适的 pH,加入一定量抗体,充分混匀后慢速振荡标记 40 min。取 10% BSA 进行封闭,继续反应 40 min。将溶液转移到洁净的离心管中,4 $^\circ\text{C}$ 、1 400 r/min 离心 10 min,去

除较大的聚集物后, 8 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 加入胶体金复溶液进行复溶, 将适量的金标抗体加入到可拆卸的 96 孔板内^[12-13], 冻干后密封避光保存备用。

1.3.4 金标抗体偶联率的测定及表征

通过紫外-可见光测定法测定样本中游离的 anti-Er.A-mAb, 以此计算得到抗体偶联率。首先, 以不同浓度游离的 anti-Er.A-mAb 为横坐标, 以 OD_{450} 的吸光度值为纵坐标建立标准曲线。然后通过间接酶联免疫分析法测定 1.3.3 中离心的上清液, 计算得到游离的 anti-Er.A-mAb 含量^[14]。偶联率(coupling rate)的计算方法:

$$Cr(\%) = [(mAb_{tot} - mAb_{SN}) / mAb_{tot}] \times 100$$

式中, Cr 表示偶联率, mAb_{tot} 表示抗体标记前的抗体总量, mAb_{SN} 表示上清液中的抗体量。

此外, 通过紫外分光光度计扫描标记前后的胶体金以及金标抗体溶液, 观察最大吸收峰是否偏移。

1.4 饲料样本浸提方法

称取待测的猪、鸡饲料 50 g 置于 250 mL 锥形瓶中, 按 1:1 (质量体积比) 加入甲醇浓度为 50% (体积比) 的 PBS 溶液。在漩涡振荡仪振荡 15 min, 再在室温下超声 10 min。在 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集上清液备用。用同样的方式对离心后的沉淀物进行二次浸提处理, 完成后将两次上清液进行混合, 并用 45 nm 滤膜对上清液进行过滤, 获得样本浸提液, 采用间接竞争酶联免疫吸附法(indirect competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay, icElisa)^[11]检测确定样本提取液中不含恩拉霉素, 用于外标添加实验。

1.5 胶体金免疫层析试纸条的组装

试纸条的组装如图 1 所示, 它由 PVC 底板、样本垫、NC 膜和吸水垫组成, 检测线和质控线喷涂在 NC 膜上适当位置。

1.6 反应条件的优化

为了筛选出免疫层析试纸条的重要参数, 应用胶体金读数仪对试纸条进行扫描读数。检测结果以 T/C 值和抑制率(inhibition rate)进行判定^[15-16], 当 $T/C < 1$ (即 T 线比 C 线浅) 时为阳性; 当 $T/C \geq 1$ (即 T 线比 C 线深或一样深) 时为阴性; 当 C 线未显色时, 则检测无效(图 2)。

抑制率的计算公式:

$$I(\%) = (1 - B_x / B_0) \times 100$$

式中, I 表示抑制率, B_x 表示阴性样本的 T/C 值, B_0 表示阳性样本的 T/C 值。

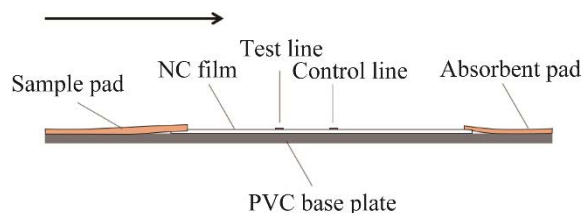


图 1 胶体金免疫层析试纸条组装示意图

Figure 1 The assembly diagram of colloidal gold immunochromatographic test strip.

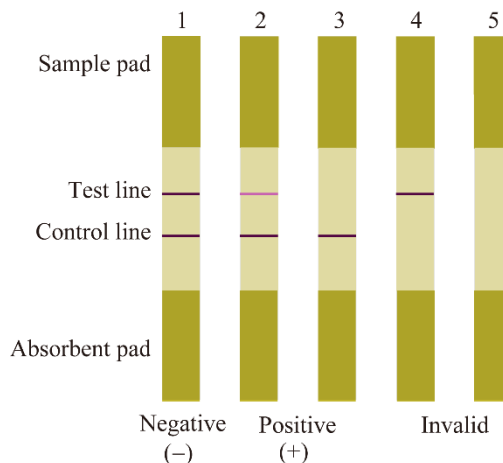


图 2 胶体金免疫层析试纸条判定结果示意图

Figure 2 Schematic diagram of the determination results of colloidal gold immunochromatographic test strips.

1.6.1 T 线包被浓度的优化

C 线羊抗鼠 IgG 浓度选用常规浓度 0.4 mg/ml, 考察 T 线浓度为 0.5、1.0、1.5 mg/mL 时对试纸条显色的影响, 用甲醇浓度为 50% (体积比) 的 PBS 溶液(阴性样本)和含 250 ng/mL 的 Er.A 标准品(阳性样本)进行测定, 试纸条反应 15 min 后, 用胶体金读数仪进行判定。

1.6.2 金标抗体用量的优化

考察金标抗体用量为 2、3、4、5、6 μ L 时对胶体金试纸条显色的影响, 用阴性样本和阳性样本进行测定, 选取 T/C 值最接近 1 且抑制率最低的作为最佳抗体使用量。

1.7 检测限测试

用甲醇浓度为 50% (体积比) 的 PBS 溶液将 1 mg/mL Er.A 标准品分别稀释成 5、25、50、75、100、200、300、400、500 和 600 ng/mL, 测试时取 20 μ L 不同浓度标准品与阴性样本加入含有金标抗体的微孔中, 再加入 80 μ L 样本稀释液振荡均匀。将试纸条样本垫一端插入微孔, 15 min 后用胶体金读数仪判定结果。

1.8 特异性测试^[11]

用甲醇浓度为 50% (体积比) 的 PBS 溶液分别配制浓度为 1 mg/mL 的 Er.A、Er.B、Er.Pre、Van、Bac.A、Pol.B 和 Vir.M1 标准溶液, 分别稀释到 1 μ g/mL 后进行特异性测试^[11], 同时设阴性对照。

1.9 重复性测试

从 3 个批次制备的恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条中分别随机抽取 15 条试纸条, 用于检测阴性样本、250 ng/mL Er.A 标准品溶液和 500 ng/mL Er.A 标准品溶液, 每组重复 5 次。

1.10 阳性添加实验

作为促生长类饲料添加剂 (anti-growth promoter, AGP), 恩拉霉素在饲料中的添加量为猪饲料 2.5–20.0 mg/kg, 鸡饲料 1–5 mg/kg^[17]。

因此向阴性饲料样本中添加适量 10 mg/mL Er.A 标准品溶液, 分别制备 Er.A 浓度为 2.5、20、30 mg/kg 的猪饲料样本和 Er.A 浓度为 1、5、10 mg/kg 的鸡饲料样本, 按 1.4 中的方法取样浸提, 与阴性样本一同进行测试。

恩拉霉素的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测方法参照金萍^[18]报道的色谱条件: C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相为 0.01 mol/L 乙腈-磷酸二氢钾体系(30:70, 体积比), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 267 nm。

2 结果与分析

2.1 金标抗体制备条件的优化及表征

2.1.1 金标抗体标记条件的优化

胶体金溶液的 pH 和抗体的标记量会影响抗体与胶体金颗粒的结合效率以及金标抗体的稳定性^[19-20]。如图 3 所示, 当体系中用于 pH 调节的碳酸钾添加量达到 8 μ L 时, 胶体金最大吸收值变化较小, 说明该条件下金标抗体的稳定

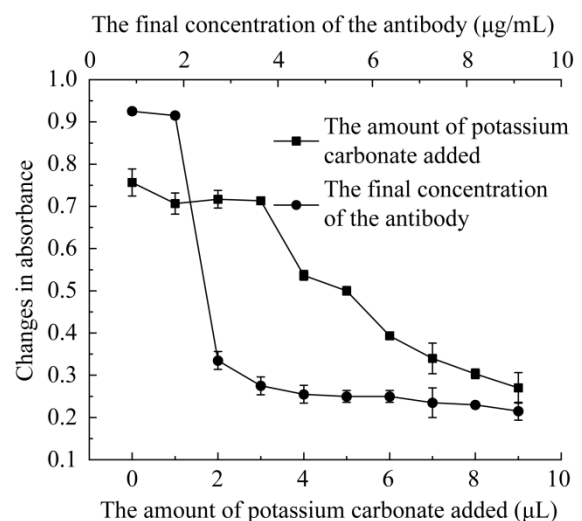


图 3 金标抗体最佳标记条件

Figure 3 The best labeling conditions of anti-Er.A-mAb-GICA.

性最好,能够在高盐环境中保持胶体金颗粒呈分散状态而不聚沉,因此选取 K_2CO_3 添加量为 $8 \mu\text{L}$ 。考察标记体系中 anti-Er.A-mAb 的最适用量,结果表明当抗体终浓度达到 $4 \mu\text{g/mL}$ 时,溶液的 OD_{450} 值与胶体金原溶液的差异最小,金标抗体最稳定,并且浓度升高后变化不显著,因此选择 $4 \mu\text{g}$ anti-Er.A-mAb 为每毫升胶体金溶液的最佳标记量。

2.1.2 金标抗体质量鉴定

通过肉眼观察,标记后的金标抗体溶液呈紫红色,较标记前胶体金溶液偏紫一些,色泽鲜亮,其 $400\text{--}600 \text{ nm}$ 紫外扫描图谱见图 4。由图 4 可知,标记前胶体金溶液的最大吸收波峰在 524 nm 处,而标记后同浓度金标抗体溶液的最大吸收峰在 529 nm 处,发生了偏移,这表明 anti-Er.A-mAb 成功结合在胶体金颗粒上。

2.1.3 抗体偶联率的测定

将 1 mg/mL 的 anti-Er.A-mAb 标准溶液稀释至浓度为 0.02 、 0.04 、 0.06 、 0.08 、 $0.10 \mu\text{g/mL}$,通过 icElisa 方法测定其在 450 nm 处的吸光值并建立标准曲线(图 5),曲线方程为 $y=0.203 68+$

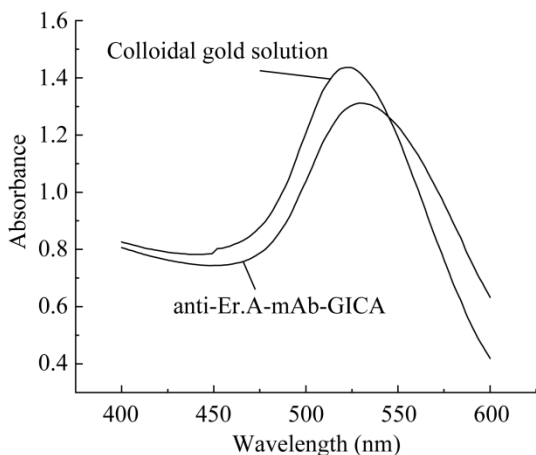


图 4 胶体金溶液和金标抗体溶液在 $400\text{--}600 \text{ nm}$ 紫外扫描图谱

Figure 4 The UV scanning spectra of colloidal gold solution and anti-Er.A-mAb-GICA at $400\text{--}600 \text{ nm}$.

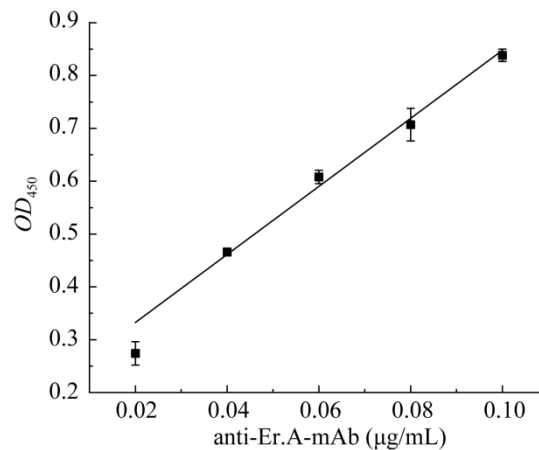


图 5 抗体偶联率标准曲线

Figure 5 Standard curve of antibody coupling rate.

$6.439 69 x$ ($R^2=0.989 17$)。图 5 表明,anti-Er.A-mAb 在 $0.02\text{--}0.10 \mu\text{g/mL}$ 之间时, OD_{450} 值与 anti-Er.A-mAb 浓度具有良好的线性关系。经测定,离心后的上清液 OD_{450} 为 0.11 ,表明游离 anti-Er.A-mAb 抗体的浓度小于 $0.02 \mu\text{g/mL}$,抗体偶联率高于 99% 。

2.2 试纸条层析条件的优化

2.2.1 最佳 T 线包被浓度

由于 T 线的显色是判定结果的主要依据,在 C 线浓度 0.4 mg/mL 的条件下,对 T 线包被浓度进行优化,确保 T 线在阴性条件下有明显的显色并且在阳性条件下具有足够灵敏的竞争性。如图 6 所示,采用阴性样本检测时,随 T 线浓度增加, T/C 值逐渐增大,当 T 线浓度为 1.0 mg/mL 时, T/C 值最接近 1。当采用阳性样本检测时, T/C 值虽随 T 线浓度增加而增加,但变化幅度较小;同时,当 T 线浓度为 1.0 mg/mL 时抑制率最大,表明该浓度时试纸条的竞争性最好,因此选择 1.0 mg/mL 作为最佳 T 线包被浓度。

2.2.2 最佳金标抗体用量

金标抗体用量对试纸条灵敏性有很大的影响,竞争性胶体金免疫层析法的灵敏度与金标抗体的用量成反比,过多的金标抗体会降低其灵敏度^[21],因此需要对金标抗体用量进行考察。如图 7

所示,随着金标抗体用量增加,阴性样本检测时各实验组的 T/C 值均接近 1,但是金标抗体用量为 2 μL 时, T、C 线的显色较浅,其他金标抗体用量的 T、C 线显色清晰。当采用阳性样本检测时, 2 μL 金标抗体用量时虽抑制率最高,但 C 线显色较浅;之后随金标抗体用量增加,虽 T/C 值略有增加,但试纸条灵敏度下降,抑制率呈下降趋势。考虑成本等因素,最终选择 3 μL 为最佳金标抗体使用量。

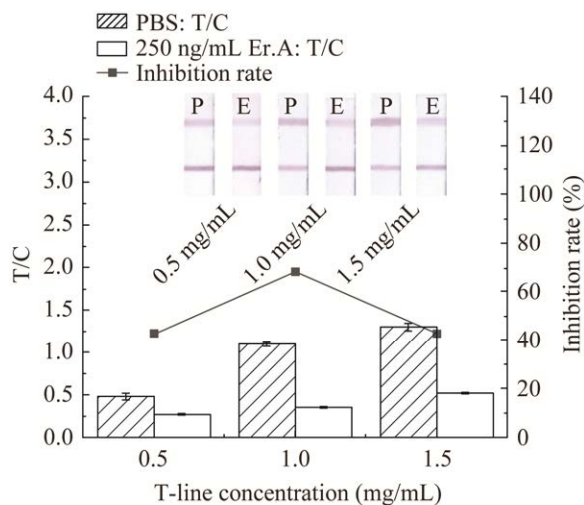


图 6 T 线包被浓度对 GICA 的影响

Figure 6 Effect of T line coating concentration on GICA.

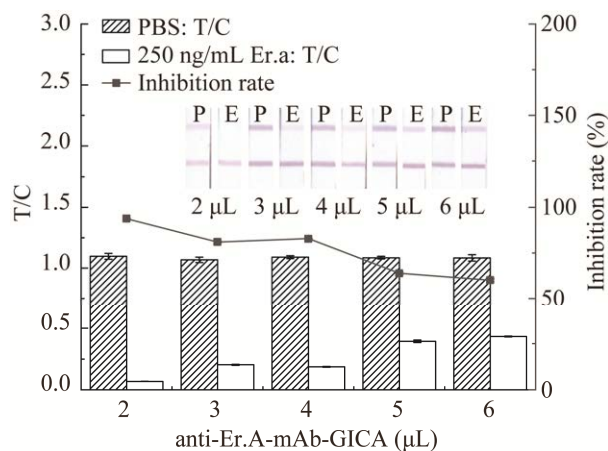


图 7 金标抗体用量对 GICA 的影响

Figure 7 Effect of the amount of anti-Er.A-mAb-GICA on GICA.

2.3 试纸条灵敏度测试

取阴性样本以及不同浓度 Er.A 标准品溶液,按 1.7 加入到含 3 μL 金标抗体的微孔中,插入试纸条,反应 15 min 后用胶体金读数仪进行结果判定,重复 3 次,结果见图 8。当 Er.A 含量达到 25 ng/mL 时, T/C 值小于 1 即可被检出,并且 Er.A 在 25–300 ng/mL 范围内,试纸条的 T/C 值与 Er.A 的含量具有良好的线性关系,其方程为 $y=0.998\ 03-0.002\ 97\ x$ ($R^2=0.99$),可实现样品中 Er.A 的定量检测。

2.4 试纸条特异性测试

取阴性样本以及 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Er.A、Er.B、Er.Pre、Van、Bac.A、Pol.B 和 Vir.M1 标准品溶液,按 1.7 加入到含 3 μL 金标抗体的微孔中,插入试纸条,反应 15 min 后用胶体金读数仪进行结果判定,重复 3 次,结果见图 9。恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条对 1 $\mu\text{g/mL}$ Er.A、Er.B 以及 Er.Pre 检测结果为阳性,对其他的恩拉霉素结构类似物及阴性样本检测结果为阴性。这表明本试验所研制的恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条具有高度的特异性,可以用于样品中恩拉霉素的快速检测。

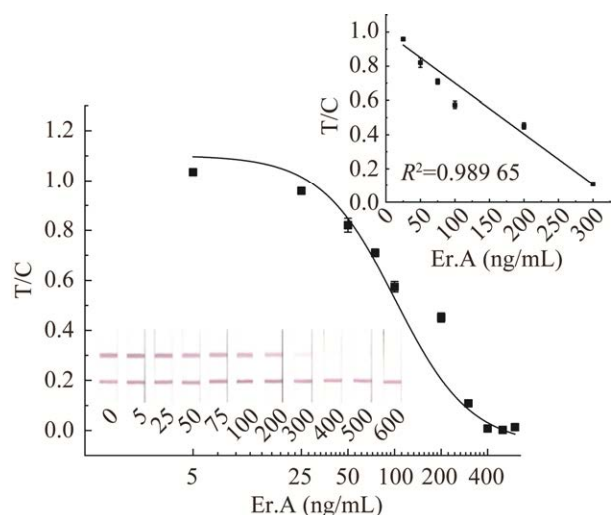


图 8 恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条灵敏度结果

Figure 8 Sensitivity results of Er-GICA.

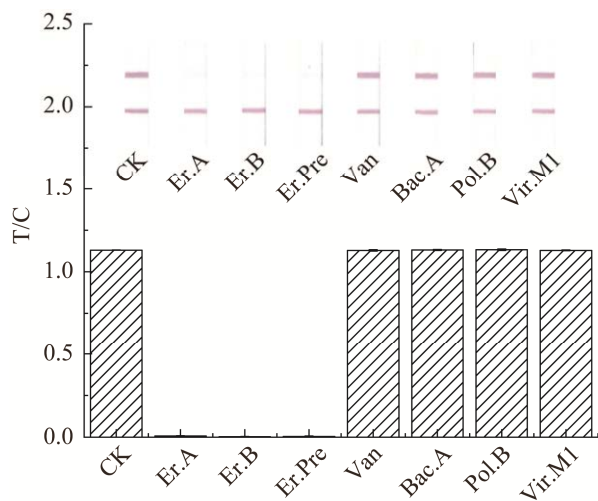


图9 恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条特异性结果
Figure 9 Specificity results of Er-GICA.

2.5 试纸条重复性测试

在3批次制备的恩拉霉素胶体金免疫层析试纸条中,分别随机抽取15条用于检测阴性样本、250 ng/mL Er.A标准品溶液和500 ng/mL Er.A标准品溶液,每组重复5次,检测结果并未出现任何假阳性、假阴性的情况,说明不同批次制备的恩拉霉素检测用试纸条重复性好。

2.6 阳性样本添加实验

根据1.4方法,选用猪饲料和鸡饲料两种样品进行阳性添加实验,猪饲料中Er.A添加量分别为2.5、20、30 mg/kg,鸡饲料中Er.A添加量分别为1、5、10 mg/kg,检测时按需稀释。上述每个添加量设3次重复,采用1.4方法对样品进行处理后进行检测,结果见表1。经GICA法测试阳性样本浸提液,猪饲料、鸡饲料中Er.A的添加回收率在87.0%–99.5%之间,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)<5.46%。采用HPLC法测试阳性样本浸提液,当猪饲料中Er.A添加量为2.5 mg/kg、鸡饲料样品中Er.A添加量为1、5 mg/kg时,HPLC无法检出,其他各添加水平阳性样本的Er.A添加回收率在87.40%–91.33%

之间, RSD<6.57%,说明本研究建立的免疫层析方法具有良好的灵敏性和准确性,能有效检出饲料样本中按规添加的恩拉霉素。

3 讨论与结论

恩拉霉素能够阻止细菌细胞壁的合成,导致细菌失去保护,特别对肠内有害梭状芽孢杆菌等革兰氏阳性菌具有很强的活性^[22]。在动物饲料中添加适量恩拉霉素预混剂可以预防动物疾病,同时显著提高饲料转化率^[23]。但若养殖户不顾停药期规定滥用恩拉霉素,会造成它在动物体内残留,进而由食物链富集到人体,对人体产生危害。日本2023年通报的第G/SPS/N/JPN/1137号文件中规定猪鸡可食用性组织(鸡肉、肾脏、肝脏以及脂肪)中恩拉霉素的残留量为30 μg/kg^[24]。因此,开发一种快速、准确、可用于现场检测的恩拉霉素检测方法具有重要意义。GICA因其灵敏度高、操作简便、结果可视化等优点,在抗生素快速检测领域发挥着重要的作用^[25-27],它还可以通过包被不同的检测线实现对几种不同抗生素的同时检测^[28]。Li等^[29]研发了一种用于检测样本中恩诺沙星含量的胶体金免疫层析试纸条,肉眼定性检出限为0.125 ng/mL;借助光学扫描仪可实现超灵敏定量,检出限为0.001 95 ng/mL,适合于现场快速检测。

本研究构建了基于胶体金的恩拉霉素免疫层析试纸条,对金标抗体标记方法、T线包被浓度以及金标抗体使用量等参数进行了优化,配合胶体金读数仪可实现饲料中恩拉霉素含量的定量检测。在金标抗体标记过程中,当K₂CO₃添加量为8 μL/mL、抗体添加量为4 μg/mL时,anti-Er.A-mAb抗体偶联率高于99%。通过研究Van、Bac.A、Pol.B、Vir.M1等结构类似物以及Er.A、Er.B、Er.Pre对检测结果的影响证明该试

表 1 GICA 法和 HPLC 法检测阳性样本添加实验结果

Table 1 The results of positive samples detected by GICA and HPLC

	Er.A addition amount (mg/kg)	GICA		HPLC	
		Er.A detection amount (mg/kg)	RSD/%	Er.A detection amount (mg/kg)	RSD/%
Pig feed	2.5	2.36±0.03	2.11	ND	—
	20.0	18.17±0.07	0.69	8.93±0.09	1.83
	30.0	28.10±0.12	0.77	27.40±0.22	1.37
Chicken feed	1.0	0.87±0.02	3.28	ND	—
	5.0	4.57±0.14	5.46	ND	—
	10.0	9.95±0.07	1.28	9.07±0.10	1.87

ND represents not detected.

纸条特异性良好。本研究制备的恩拉霉素免疫试纸条在 15 min 内可得到结果, 采用胶体金读数仪读取试纸条, Er.A 检出限为 25 ng/mL, 线性范围为 25–300 ng/mL。对猪、鸡饲料样品进行阳性样本添加试验, 结果表明添加回收率在 87.0%–99.5% 之间, RSD<5.46%。与恩拉霉素的其他检测方法相比, 微生物法虽检测成本低, 但测定时间长, 灵敏度和特异性不高。陈敏等^[30]建立的以枯草芽孢杆菌为检定菌的双碟法检测恩拉霉素的定量范围为 0.56–35.79 U/mL, 许铭玉等^[31]建立的干燥滤纸片法检测恩拉霉素的定量范围为 150–500 U/mL。恩拉霉素色谱分析法主要有两类: 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)。HPLC 方法灵敏度较高、重复性好, 常被用于分析发酵液和预混剂样品中恩拉霉素的含量, 其定量范围为 200–1 000 mg/mL^[32]。然而, 单独使用 HPLC 法测定畜禽产品及饲料中恩拉霉素存在灵敏度的问题。杜鑫^[33]将超高效液相色谱法与质谱法联用, 建立了猪肉、鸡肉样本中恩拉霉素含量的检测方法, 检出限达 4 µg/kg, 定量下限为 10 µg/kg, 灵敏度优于 HPLC。TLC 检测成本低, 若单一使用只能用于定性检测^[34]。周鹏飞等^[5]通过将 TLC 与紫外分光光度法联用, 结果表明恩拉霉素点样量在 20–166 µg 范围内线性良好, 可用于恩拉霉

素预混剂含量的检测。目前, 基于恩拉霉素单克隆抗体的检测方法只有 Lu 等^[11]建立的双抗原竞争 ELISA: 他们建立了猪肌肉和鸡肌肉样本中恩拉霉素含量的 icELISA 检测方法, 检出限分别为 144.8 µg/kg 和 98.0 µg/kg; 证明了通过特异性抗体检测恩拉霉素方法的可行性, 但 ELISA 方法操作过程烦琐、对操作人员及操作条件要求高。本研究制备了高纯度的恩拉霉素 A 单克隆抗体, 建立了胶体金免疫层析法检测样品中恩拉霉素, 检测限低至 ng/mL 水平。相较于其他恩拉霉素检测方法, 具有简便快捷、节约成本、无需使用大型仪器等优点, 可应用于饲料样品中恩拉霉素的实时现场筛查, 具有良好的发展前景。

REFERENCES

- [1] 刘蕊, 陈敏, 王宏. 氧载体对恩拉霉素发酵合成的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 35-39.
LIU R, CHEN M, WANG H. Influence of oxygen vector on fermentation production of enramycin[J]. Food & Machinery, 2014, 30(3): 35-39 (in Chinese).
- [2] 顾欣, 蔡金华, 刘雅妮, 金陵艳. 饲料中恩拉霉素的微生物学含量测定方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(9): 17-21.
GU X, CAI JH, LIU YN, JIN LY. Research of microbiological method for the determination of enramycin in feeds[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2008, 42(9): 17-21 (in Chinese).
- [3] FANG X, TIYANONT K, ZHANG Y, WANNER J, BOGER D, WALKER S. The mechanism of action of

- ramoplanin and enduracidin[J]. *Molecular BioSystems*, 2006, 2(1): 69-76.
- [4] 中华人民共和国农业农村部公告第 246 号[EB/OL]. [2023-12-11]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/201912/t20191226_6333971.htm
- [5] 周鹏飞, 陈敏, 方中. 薄层层析-紫外分光光度法测定预混剂中的恩拉霉素[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(4): 125-128.
- ZHOU PF, CHEN M, FANG Z. Determination of enramycin in premix by TLC-UV spectrophotometry[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(4): 125-128 (in Chinese).
- [6] HORIE M, HOSHINO Y, NOSE N, NAKAZAWA H, FUIITA M, TAKABATAKE E. Determination of enramycin in chicken and swine muscles by high performance liquid chromatography[J]. *Food Hygiene and Safety Science*, 1985, 26(4): 337-342.
- [7] 许俊丽, 刘贝贝, 王玉龙, 李盼, 杨康, 吴勤, 蒋岚, 张皓然, 杨立飞, 张存政. 胶体金免疫层析试纸法检测农产品中戊唑醇残留[J]. *分析化学*, 47(11): 1823-1831.
- XU JL, LIU BB, WANG YL, LI P, YANG K, WU Q, JIANG L, ZHANG HR, YANG LF, ZHANG CZ. Determination of tebuconazole residues in agricultural products by colloidal gold immunochromatographic test paper[J]. *Analytical Chemistry*, 47(11): 1823-1831.
- [8] 刘书余, 郭亚文, 汤亚云, 高鹏飞, 管凡苟, 朱雅丽, 谢恺舟. 禽组织和禽蛋中兽药残留快速检测技术研究进展. *食品工业科技*, 44(15): 482-491.
- LIU SY, GUO YW, TANG YY, GAO PF, GUAN FX, ZHU YL, XIE KZ. Research Progress on Rapid Detection Technology of Veterinary Drug Residues in Poultry Tissues and Eggs. *Food Industry Science and Technology*, 44(15): 482-491.
- [9] 甄思慧, 李磊, 王真. 免疫层析技术在食源性细菌检测中的应用及优化[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(23): 38-41.
- ZHEN SH, LI L, WANG Z. Application and optimization of immunochromatography in the detection of foodborne bacteria[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(23): 38-41 (in Chinese).
- [10] 路敏. 胶体金和菊花金免疫层析法快速检测小麦和大米中呕吐毒素[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2022.
- LU M. Colloidal gold and *Chrysanthemum*-like gold @ polydopamine immunochromatography assay for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and rice[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2022 (in Chinese).
- [11] LU XY, CHEN GF, QIAN Y, FANG J, ZHANG MG, MAO SN, LI HM, CHEN M. Development of a new monoclonal antibody by more active enramycin A and indirect competitive ELISA for the detection of enramycin in edible animal tissues[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(8): 1895-1904.
- [12] 宁军, 李娜, 严雨倩, 付麟, 周兴华. 一种氯霉素高灵敏消线法检测试纸条的制备[J]. *食品安全导刊*, 2021(20): 165-168.
- NING J, LI N, YAN YQ, FU L, ZHOU XH. Preparation of a highly sensitive test strip for chloramphenicol detection by elimination line method[J]. *China Food Safety Magazine*, 2021(20): 165-168 (in Chinese).
- [13] 徐子健, 汪腊云, 董振华, 裴华, 朱晓薇, 杨鲁琼, 张玉换. 基于胶体金免疫层析试剂卡的水果中三唑磷残留检测方法优化[J]. *农产品质量与安全*, 2023(2): 52-57.
- XU ZJ, WANG (L/X)Y, DONG ZH, PEI H, ZHU XW, YANG LQ, ZHANG YH. Optimization of detection method of triazophos residues in fruits based on colloidal gold immunochromatographic reagent card[J]. *Quality and Safety of Agro-Products*, 2023(2): 52-57 (in Chinese).
- [14] PANG YM, ZHAO SJ, LIU ZW, CHEN JY, YANG ZH, HE ZX, SHEN X, LEI HT, LI XM. An enhanced immunochromatography assay based on colloidal gold-decorated polydopamine for rapid and sensitive determination of gentamicin in animal-derived food[J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132916.
- [15] 叶茂, 沈晓玲, 陈青舟, 夏武强, 张敏, 张少恩. 胶体金免疫层析法同时检测果蔬中四种农药残留[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 300-308.
- YE M, SHEN XL, CHEN QZ, XIA WQ, ZHANG M, ZHANG SE. Simultaneous determination of four pesticide residues in fruits and vegetables by colloidal gold immunochromatography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(6): 300-308 (in Chinese).
- [16] 曹雪铭, 徐振林, 苏燕瑜, 王宇, 雷红涛, 肖剑. 胶体金免疫层析法快速检测食品中的米酵菌酸[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(2): 309-318.
- CAO XM, XU ZL, SU YY, WANG Y, LEI HT, XIAO J. The rapid detection of bongkrekcic acid in foods using colloidal gold immunochromatographic assay[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(2): 309-318 (in Chinese).
- [17] 中华人民共和国农业农村部公告第 2271 号[EB/OL]. [2023-12-11]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201507/t20150708_4737596.htm
- [18] 金萍. 恩拉霉素生产菌的选育及其发酵条件优化[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2011.
- JIN P. Breeding of enramycin-producing strain and

- optimization of its fermentation conditions[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2011 (in Chinese).
- [19] HU J, ZHOU S, ZENG LF, CHEN Q, DUAN H, CHEN XR, LI XM, XIONG YH. Hydrazide mediated oriented coupling of antibodies on quantum dot beads for enhancing detection performance of immunochromatographic assay[J]. *Talanta*, 2021, 223(Pt 1): 121723.
- [20] MENG LL, SONG TT, MAO X. Novel immunochromatographic assay on cotton thread based on carbon nanotubes reporter probe[J]. *Talanta*, 167(2017): 379-384.
- [21] 何晓婷, 陈子键, 黄松, 肖泽苗, 刘佳, 钟敏, 王弘, 沈玉栋, 徐振林. 基于纳米抗体的胶体金免疫层析法快速检测蔬菜中腐霉利[J]. *食品科学*, 2023, 44(8): 307-316.
- HE XT, CHEN ZJ, HUANG S, XIAO ZM, LIU J, ZHONG M, WANG H, SHEN YD, XU ZL. Rapid detection of procymidone in vegetables by nanobody-based colloidal gold immunochromatography assay[J]. *Food Science*, 2023, 44(8): 307-316 (in Chinese).
- [22] 祖玉东. 恩拉霉素的简介[J]. *养殖技术顾问*, 2012(5): 228.
- ZU YD. Brief introduction of enramycin[J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2012(5): 228 (in Chinese).
- [23] 刘海燕. 恩拉霉素的抑菌效果及在动物生产中的应用[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2016.
- LIU HY. Antibacterial effect of enramycin and its application in animal production[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [24] 世界贸易组织第 G/SPS/N/JPN/1137 号文件[EB/OL]. [2023-12-11]. https://members.wto.org/crnattachments/2023/SPS/JPN/23_09776_00_e.pdf.
- [25] 杜连启, 朱凤妹, 李楠. 胶体金免疫层析法检测猪肉中 3 种磺胺类药物残留[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(3): 151-160.
- DU LQ, ZHU FM, LI N. Colloidal gold immunochromatography assay for simultaneous detection of sulphonamides residue in pork[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(3): 151-160 (in Chinese).
- [26] 张瑜, 惠光朋, 王志恒, 谭晨, 刘冰, 崔廷婷. 胶体金免疫层析法快速检测禽蛋中甲硝唑残留分析研究[J]. *山东畜牧兽医*, 2022, 43(11): 18-21.
- ZHANG Y, HUI GP, WANG ZH, TAN C, LIU B, CUI TT. Analysis of metronidazole residues in poultry eggs by colloidal gold immunochromatography for rapid detection[J]. *Shandong Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022, 43(11): 18-21.
- [27] LI HP, MENG FP, LI AF. Colloidal gold immunochromatographic assay for rapid on-site detection of tetracycline in seawater[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2023, 22(4): 1129-1138.
- [28] 袁晓春. 多重胶体金免疫层析法检测乳品中 β -内酰胺类、四环素类、头孢氨苄抗生素残留[J]. *饲料博览*, 2019(7): 41-47.
- YUAN XC. Detection of β -lactams, tetracyclines, and cephalosporin antibiotics residues in dairy products by multiple colloidal gold immunochromatography[J]. *Feed Review*, 2019(7): 41-47 (in Chinese).
- [29] LI DQ, HUANG M, SHI ZY, HUANG L, JIN JN, JIANG CX, YU WB, GUO ZY, WANG J. Ultrasensitive competitive lateral flow immunoassay with visual semiquantitative inspection and flexible quantification capabilities[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(6): 2996-3004.
- [30] 陈敏, 金萍, 方中. 恩拉霉素微生物检定法的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(1): 56-60.
- CHEN M, JIN P, FANG Z. The research of microbiological assay for the enramycin[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(1): 56-60 (in Chinese).
- [31] 许铭玉, 宋淑婷, 张莹, 张会图. 恩拉霉素生物检测方法的改进[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(2): 384-390.
- XU MY, SONG ST, ZHANG Y, ZHANG HT. Improved biotin detection method of enduracidin mold[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(2): 384-390 (in Chinese).
- [32] 郭晓梅, 郭雷. 高效液相色谱法测定恩拉霉素的含量[J]. *商品与质量*, 2019(33): 166.
- GUO XM, GUO L. Determination of enramycin content by high performance liquid chromatography[J]. *Commodities and Quality*, 2019(33): 166.
- [33] 杜鑫. 超高效液相色谱-串联质谱测定鸡肉中恩拉霉素残留量[J]. *云南师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1): 51-56.
- DU X. Determination of enramycin residues in chicken by UPLC-MS/MS[J]. *Journal of Yunnan Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2019, 39(1): 51-56 (in Chinese).
- [34] 王小莺, 杨海翠. 薄层色谱法检测饲料中的恩拉霉素[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(17): 208-209.
- WANG XY, YANG HC. Determination of enramycin in feed by TLC[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(17): 208-209 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)