

# 基于量子点二抗偶联物的荧光免疫分析法测定牛奶中的氨苄青霉素

尹致丹, 肖志明, 李 阳, 刘晓露, 王 石, 樊 霞\*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

**摘 要:** **目的** 建立基于量子点二抗偶联物的荧光免疫分析法测定牛奶中的氨苄青霉素。**方法** 采用共价偶联的方法将 Qdot 655 红色荧光量子点(quantum dots, QDs)与二抗偶联, 利用制备好的 QDs-二抗偶联物代替传统酶标二抗应用到检测牛奶中氨苄青霉素残留检测的荧光免疫分析方法中, 并将该方法与酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行比较。**结果** 该方法 50%抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 8.3 μg/L; 检测限为 2.5 μg/L。空白牛奶加标回收率为 94.0%~106.2%, 变异系数为 2.1%~9.2%。在实际样品的检测中, 该方法与 ELISA 方法和 HPLC 方法测定的结果相比无显著差异( $P>0.05$ )。**结论** 该方法准确、灵敏, 适用于牛奶中氨苄青霉素残留的检测。

**关键词:** 量子点; 氨苄青霉素; 牛奶; 残留检测

## Determination of ampicillin in milk by fluorescence immunoassay based on quantum dot secondary antibody conjugates

YIN Zhi-Dan, XIAO Zhi-Ming, LI Yang, LIU Xiao-Lu, WANG Shi, FAN Xia\*

(Key Laboratory of Agricultural Product Quality and Safety Research of Ministry of Agriculture, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a fluorescence immunoassay for the determination of ampicillin in milk based on quantum dot secondary antibody conjugates. **Methods** The red fluorescent quantum dots (QDs) of Qdot 655 were coupled with the secondary reactance by covalent coupling, the prepared QDs- secondary antibody conjugate was used to detect ampicillin residue in milk instead of the traditional enzyme standard secondary antibody by fluorescence immunoassay. The method was compared with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the method was 8.3 g/L, the limit of detection was 2.5 g/L. The blank milk spiked recoveries were 94.0%–106.2%, and the coefficients of variation were 2.1%–9.2%. In the detection of actual samples, the method has no significant difference compared with the results determined by ELISA and HPLC ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The method is accurate, sensitive, and suitable for the detection of ampicillin residues in milk.

**KEY WORDS:** quantum dots; ampicillin; milk; residue detection

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502116)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2019PT01)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31502116), Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Level Public Welfare Scientific Research Institutes (Y2019PT01)

\*通讯作者: 樊霞, 研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及其检测技术。E-mail: fanxia@caas.cn

\*Corresponding author: FAN Xia, Professor, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products of CAAS, 12 Zhongguancun South st, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: fanxia@caas.cn

## 1 引言

随着我国养殖业的快速发展, 抗生素使用问题越来越突出, 主要表现为抗生素滥用导致动物源食品中的残留问题日益严重<sup>[1]</sup>, 不仅会影响发酵乳制品如酸奶、黄油及干酪的发酵和后期风味的形成, 人体如果长期摄入含有其残留的牛奶也会使体内肠道正常菌群受到抑制, 导致致病菌的大量繁殖, 危害身体健康。同时抗生素在环境中的残留还会造成环境污染<sup>[2,3]</sup>。氨苄青霉素作为一种常用抗生素类药物, 在牛奶中的残留问题也日益突出<sup>[4,5]</sup>。大部分国家和地区均制定了严格的残留标准, 欧盟规定牛奶中氨苄青霉素的最高残留限量(maximum residue limit, MRL)为 4  $\mu\text{g/L}$ , 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)规定牛奶中氨苄青霉素的 MRL 为 10  $\mu\text{g/L}$ <sup>[6]</sup>, 我国农业农村部 235 公告规定奶中氨苄青霉素的 MRL 为 10  $\mu\text{g/L}$ <sup>[7]</sup>。

目前, 对畜产品中氨苄青霉素残留的测定主要有仪器分析法、微生物学分析方法和免疫学分析方法<sup>[8,9]</sup>。仪器分析法具有高灵敏度, 但仪器价格昂贵, 操作费时。微生物法作为传统检测方法, 成本低, 对实验室条件要求不高, 广泛应用于基层检测, 但是检测周期长, 结果误差大。而免疫检测技术检测速度较快、操作简单同时可以进行大批量样品的检测<sup>[10]</sup>, 已经成为目前最普遍使用的快速筛选方法<sup>[11-13]</sup>。同时一些新型的免疫检测方法也陆续出现, QDs(quantum dots, QDs)的出现为新方法的建立带来了一个有效的工具。QDs 是一种半导体纳米晶, 与传统有机染料相比, 其具有发光稳定、荧光强度高、表面集团易修饰等特点<sup>[14]</sup>, 在细胞生物学、分子生物学蛋白组学和医学诊断等领域都得到了很好的研究和应用<sup>[15,16]</sup>, 其在建立快速、简便的多残留检测方面具有很大的发展前景<sup>[17]</sup>。例如王云云<sup>[18]</sup>采用碳二亚胺缩合法将 3 种不同荧光发射波长的量子点与 3 种抗体进行共价偶联, 分别得到了 OD610-抗青霉素 G 抗体、OD565-抗四环素抗体和 OD520-抗链霉素抗体 3 种探针, 建立直接竞争荧光免疫分析法, 在酶标板上通过阵列分析实现对牛奶中 3 种抗生素残留的同时检测, 结果比传统 ELISA 方法更准确更灵敏。但是目前关于量子点与二抗偶联物结合物在检测牛奶中氨苄青霉素的研究相对较少。

本研究采用共价偶联的方法将 Qdot 655 红色荧光量子点与二抗偶联, 利用制备好的 QDs-二抗偶联物代替传统酶标二抗应用到牛奶中氨苄青霉素(ampicillin, AMP)残留检测的荧光免疫分析方法中, 并将该方法与酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行比较, 从而评估 QDs-二抗偶联物用于牛奶中 AMP 残留检测的可行性, 为多残留检测方法的前期研究提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 试验材料

#### 2.1.1 仪器与设备

Sunrise 荧光酶标仪(美国 Sunrise 公司); Unicam UV 300 分光光度计(美国 Thermo Spectronic 公司); Malvern Nano zs90 纳米粒径分析电位仪(英国马尔文仪器公司); DNP 型恒温培养箱(上海精密试验设备有限公司); Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); MGS-2200 氮吹仪(日本 Eylea 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); LD5-10B 离心机(北京医用离心机厂); TS-100 调速多角振荡器(国华分析仪器厂); WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); BSA224S 分析天平(美国 Sartorius Analytic 公司)。

#### 2.1.2 试剂与耗材

包被抗原 AMP-OVA、单克隆抗体(北京维德维康生物技术有限公司); 羊抗兔二抗(美国 KPL 公司); Qdot 655(北京纳晶生物科技有限公司); 氨苄青霉素及同系物标准品(美国 Sigma 公司); 酪蛋白(北京索莱宝科技有限公司); 96 孔白色不透明化学发光板、96 孔酶标板(美国 Costar 公司); (N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 [(N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester, SMCC]、三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP)(德国 Merck-Millipore 公司)。

牛奶样品由中国农业大学动物医学院提供。

### 2.2 实验设计与方法

#### 2.2.1 QDs-二抗偶联物制备的原理

QDs 和羊抗兔二抗发生共价反应的原理图如图 1 所示。SMCC 是一种异源性交联剂, 分子结构上一端是氨基偶联基团琥珀酰亚胺, 另一端是巯基偶联基团马来酰亚胺, 中间由环己烷相连起到稳定作用。在偶联过程中, 利用 SMCC 的琥珀酰亚胺基团活化含氨基配体的 QDs, 然后用 TCEP 还原处理抗体, 断开二硫键, 暴露出的巯基与 SMCC 的马来酰亚胺基团反应生成硫醚键, 从而实现共价偶联。

#### 2.2.2 QDs-二抗偶联物制备

量子点活化: 1000  $\mu\text{L}$  量子点溶液(1  $\mu\text{mol/L}$ )中加入 20  $\mu\text{L}$  500 mmol/L pH 7.2 的磷酸钠缓冲溶液和 16.7  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 的 SMCC 溶液(现配现用), 迅速混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h。25000 r/min 离心 15 min, 弃去上清, 用 10 mmol/L pH 7.2 的磷酸钠缓冲溶液重悬, 反复 1 次, 去除多余 SMCC, 量子点恢复到原始体积, 低温保存备用。

二抗活化: 200  $\mu\text{L}$  待标记二抗溶液(2 mg/mL)中加入 15.3  $\mu\text{L}$  TCEP 溶液(1 mg/mL), 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1.5 h。

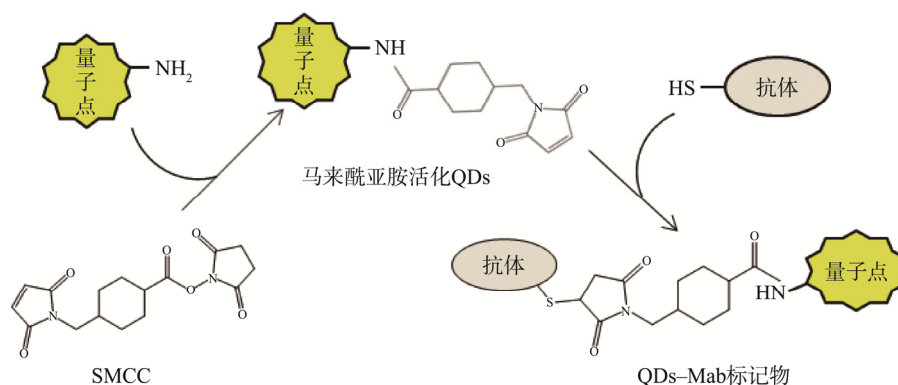


图 1 QDs 和二抗发生共价反应的原理

Fig.1 Covalent coupling reaction pattern diagram of QDs and antibodies

量子点-二抗偶联: 活化后的量子点与活化后的抗体混合, 37 °C 反应 4 h。25000 r/min 离心 20 min, 弃去上清, 除去游离抗体, 用 10 mmol/L pH 7.2 的磷酸钠缓冲溶液复溶, 即得偶联产物。

### 2.2.3 QDs-二抗偶联物鉴定

使用荧光分光光度计检测荧光光谱, 用 pH 7.2 (10 mmol/L) 磷酸盐缓冲溶液分别稀释偶联前后的 QDs 655, 激发波长为 360 nm。使用 Malvern Nano ZS90 测定样品偶联前后的水合粒径及表面电势, 将偶联前后的 10 μL QDs 样品用纯水稀释至 1 mL, 按标准测试方法。采用 FLISA 方法来检测标记后二抗的生物活性。用碳酸盐缓冲溶液比单克隆抗体按照 1000: 1 (V:V) 稀释, 每孔加入 100 μL, 37 °C 包被 2 h。冲掉未吸附的溶液, 加 1% 明胶溶液来封闭 150 μL/孔。室温 2 h 后加入稀释 200 倍、400 倍、800 倍的偶联产物 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 5 次拍干, 光密度值通过酶标仪检测读取。

### 2.2.4 不同温度条件对偶联物稳定性的影响

将偶联物分别于 25 °C 和 37 °C 的条件下放置一段时间, 在 0、10、20、30、40、60 min 的时间点测定其荧光强度, 从而选择温度对其影响小的作为反应温度。

### 2.2.5 不同溶液系统对偶联物稳定性的影响

将偶联物分别置于磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和 0.25% 酪蛋白稀释液中一段时间, 在 0、10、20、30、40、60 min 的时间点测定其荧光强度, 通过结果分析不同溶液体系对偶联物荧光稳定性的影响。

### 2.2.6 基于 QDs-二抗偶联物的 FLISA 原理

如图 2 所示。将 96 孔白色不透明免疫反应板包被抗原, 加入待测药物, 待测药物与包被抗原来竞争结合一抗, 反应达平衡后倾去反应液, 洗涤, 再加入过量 QDs-二抗偶联物孵育, 偶联物与抗体结合, 量子点二抗接受激发光产生荧光, 通过测定荧光强度从而进行定量分析。荧光强度的大小与包被抗原结合的一抗成正比, 与待测药物的含量成反比。

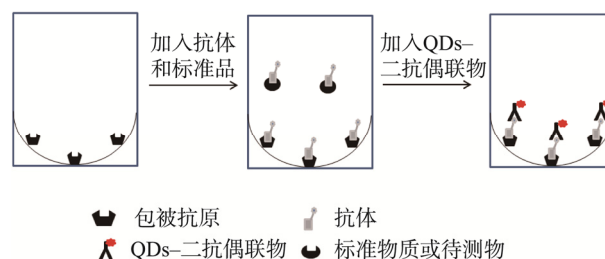


图 2 荧光免疫反应模式图

Fig.2 Fluorescence immune response pattern

### 2.2.7 FLISA 方法反应程序

试验中测定的荧光强度值扣除空白对照的值, 以消除非特异性吸附的影响。空白对照孔用 100 μL PBS 缓冲液代替包被原进行包被, 50 μL 的 0.25% 酪蛋白稀释液来代替 50 μL 的 QDs-二抗偶联物。具体步骤如下所示: (1) 包被: 将包被抗原 AMP-OVA 用包被缓冲液稀释成最适包被浓度加至酶标板, 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h, 然后 4 °C 过夜; (2) 洗涤: 倾去孔内液体, 每孔加洗涤液 250 μL, 洗涤 1 次, 然后在吸水纸上拍干; (3) 封闭: 每孔加入封闭液 150 μL, 37 °C 恒温封闭 1 h, 拍干; (4) 加样: 加入系列稀释的 AMP 标准品 50 μL/孔再加入适当稀释的抗体 50 μL/孔, 37 °C 反应 1 h; (5) 洗涤: 用 PBS 溶液洗涤 4 遍, 250 μL/孔, 每次间隔 1 min, 在吸水纸上拍干; (6) 加 QDs-二抗偶联物: 每孔加入 100 μL QDs-二抗偶联物, 37 °C 反应 1 h, 洗涤同上, 拍干; (7) 测定: 拍干后经荧光酶标仪(激发波长, 360 nm; 发射波长, 655 nm)测定荧光强度值。

### 2.2.8 3 种方法的标准曲线

分别制作荧光免疫吸附测定 (fluorescence immunosorbent assay, FLISA) 方法、ELISA 方法和 HPLC 方法的标准曲线。FLISA 中以荧光强度值设为纵坐标, 以 AMP 标准品浓度的对数为横坐标, 通过 Origin 8.5 软件绘制标准曲线, 并求出 IC<sub>50</sub> 值, 以 10% 的抑制作为该方法的检测限。ELISA 方法中以相应浓度 AMP 抑制时的 OD 值为纵坐标, 以 AMP 浓度的对数为横坐标, 用 Origin 8.5 软

件绘制标准曲线,并求出  $IC_{50}$ ,以 10%抑制作为该方法的检测限。HPLC 方法测定的值由 AMP 标准曲线求得。

### 2.2.9 交叉反应率的测定

分别测定 FLISA 方法和 ELISA 方法的交叉反应率,选择 AMP 同系物阿莫西林、青霉素 G、氯霉素、庆大霉素、阿维菌素,将各药配成系列稀释浓度,代替 AMP 标准品溶液测定,计算交叉反应率。

### 2.2.10 样品提取方法

准确量取 10 mL 巴氏杀菌脱脂奶到 50 mL 离心管中。按 10、25、50、100 ng/mL 添加 AMP,未添加样品作为空白对照。涡动 20 s,室温静置 15 min。每管中加入铁氰化钠溶液 1 mL 和硫酸锌溶液 0.5 mL,涡动至少 2 min,7000 r/min 离心 5 min。取上清 5 mL 用 PBS 稀释 10 倍,备用。

### 2.2.11 回收率及变异系数测定

按 10、25、50、100  $\mu\text{g/L}$  4 个浓度添加空白牛奶样品,每个浓度作 5 个平行样,测定荧光强度值。利用 Origin 8.5 软件绘制曲线,根据曲线情况来计算 AMP 含量。

### 2.2.12 实际样品测定

试验采用所建 FLISA 方法与 ELISA 方法和 HPLC 方法同时检测 50 份实际牛奶样品中氨苄青霉素残留情况,以此来对 QDs-二抗偶联物应用在检测牛奶中氨苄青霉素残留的可行性进行评估。

## 3 结果与分析

### 3.1 偶联鉴定

荧光光谱比较:标记前后稀释同样倍数的 QDs 和 QDs-二抗偶联物的荧光光谱如图 3 所示。其中蓝线所示光谱峰为 QDs-二抗偶联物的荧光光谱图,相对于单纯 QDs 的光谱峰来说,它的发射波长依然没有改变,在 655 nm 处,同时结合二抗之后的 QDs 荧光强度有所下降,主要是由于在 QDs 活化和最后的标记物纯化时损失了一部分 QDs 造成的。

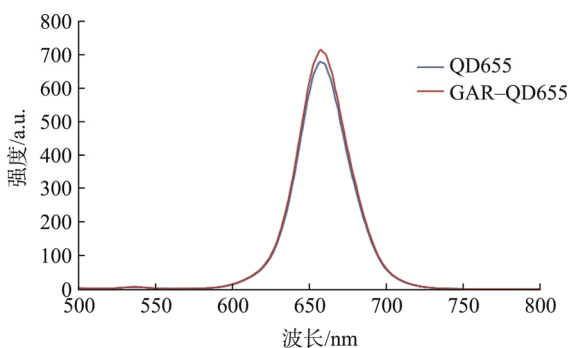


图 3 偶联前后 QDs 的荧光光谱图比较

Fig.3 Comparison of fluorescence spectra of QDs before and after coupling

水合粒径分析:使用 Malvern Nano ZS90 测定水合粒

径,结果按响应信号强度得到的粒径分布图如图 4 所示。偶联前后样品的平均水合粒径分别为 31.54 nm 和 63.44 nm,偶联产物粒径相比偶联前有明显增加,表明量子点表面连接了目标抗体。

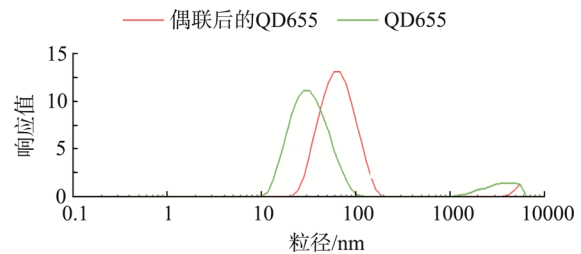


图 4 量子点 QDs 655 偶联前后的纳米粒径

Fig.4 Nanoparticle size of quantum dots before and after QDs 655 coupling

偶联物活性评价:实验利用棋盘法进行 FLISA 反应来评估量子点和二抗偶联是否成功。不同稀释度偶联物与不同稀释度抗体反应荧光强度值如表 1 所示。结果说明,抗体与偶联物反应后荧光强度增强,表明抗体与偶联物发生特异性结合反应,偶联后的二抗具有生物活性,可以做进一步应用。

表 1 FLISA 反应结果  
Table 1 FLISA reaction results

稀释倍数	空白	抗体稀释 800 倍	抗体稀释 1600 倍
偶联物稀释 200 倍	3.136	963	561
偶联物稀释 400 倍	2.905	413	238
偶联物稀释 800 倍	3.15	225	93

### 3.2 QDs-二抗偶联物荧光稳定性研究

温度条件的影响:25  $^{\circ}\text{C}$ 和 37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下 QDs-二抗偶联物稳定性变化情况如图 5 所示。37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下,标记物的荧光性较 25  $^{\circ}\text{C}$ 条件下的略有降低,但是差异不是很明显,37  $^{\circ}\text{C}$ 反应可以加快免疫反应的速度,缩短方法检测时间,所以在后续实验中采用 37  $^{\circ}\text{C}$ 作为反应条件。

溶液体系的影响:利用 3 种不同的溶液体系来稀释 QDs-二抗偶联物,在 1 h 内不同的时间测定其荧光强度值如图 6 所示。结果发现,用中性磷酸盐缓冲溶液稀释和用硼酸盐溶液稀释, QDs-二抗偶联物的初始荧光强度较低,同时下降幅度比较明显,用含 0.25%酪蛋白的稀释液的 QDs-二抗偶联物,初始荧光强度较高,和理论研究正好相符。因此,我们选择 0.25%的酪蛋白溶液作为反应体系中 QDs-二抗偶联物的稀释溶液。

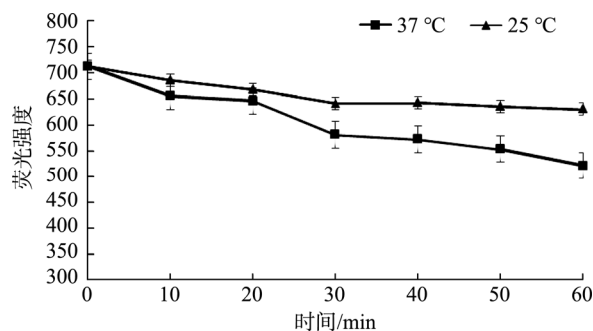


图 5 不同温度对 QDs-二抗偶联物的荧光性影响(n=3)

Fig.5 Fluorescence changes of QDs-bis-anticonjugates at different temperatures (n=3)

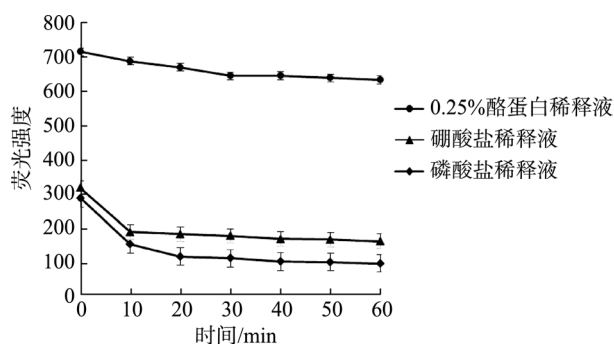


图 6 不同溶液条件对 QDs-二抗偶联物的荧光性影响(n=3)

Fig.6 Fluorescence changes of QDs-bis-anticonjugates in different solutions (n=3)

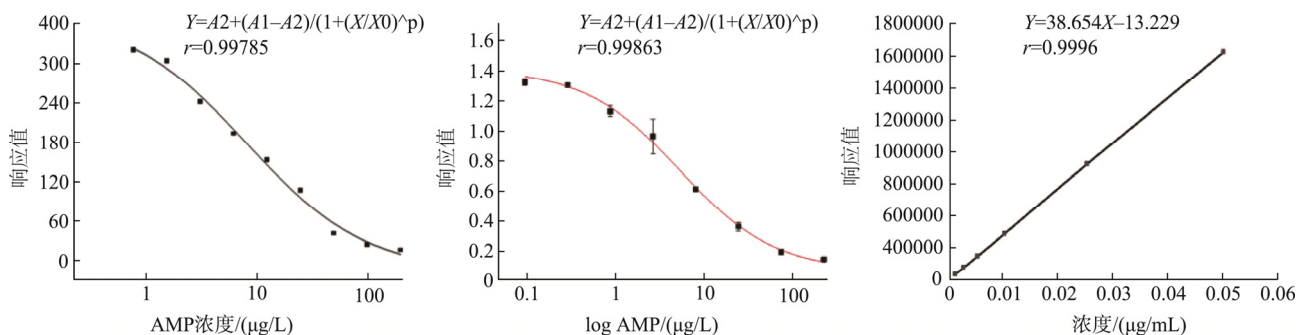


图 7 3 种方法的标准曲线

Fig.7 Standard curves of the 3 methods

表 2 抗 AMP 的单克隆抗体的交叉反应率

Table 2 Cross-reactivity of monoclonal antibodies against AMP

竞争物	FLISA 交叉反应率/%	ELISA 交叉反应率/%
氨苄青霉素	100	100
阿莫西林	100	100
青霉素 G	< 0.1	< 0.1
氯霉素	< 0.1	< 0.1
庆大霉素	< 0.1	< 0.1
阿维菌素	< 0.1	< 0.1

### 3.3 标准曲线

基于 QDs-二抗偶联物建立的 FLISA 方法确立包被原的稀释倍数为 1:1000 倍, 单抗溶液的最适稀释倍数为 1:1000 倍, 量子二抗偶联物作 1:400 倍稀释。该检测方法 50%抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 8.3 µg/L, 以抑制率为 10%时对应的浓度作为该方法对 AMP 的检测限, 其值为 2.5 µg/L。3 种方法标准曲线如图 7 所示。

### 3.4 交叉反应率

经荧光免疫吸附测定方法测定, 该单抗与 AMP、阿莫西林的交叉反应率是 100%, 与青霉素 G、氯霉素、庆大霉素、阿维菌素的交叉反应率均小于 0.1%, 几乎没有交叉反应, 说明该抗体的特异性良好。氨苄青霉素结构与阿莫西林结构相似, 阿莫西林化学结构仅比 AMP 多一个羟基, 因此, 在样品检测中, 所以不能很好的分别样品中 AMP 的残留和阿莫西林的残留。与 ELISA 方法测定的交叉反应率的结果相同, 结果见表 2。

### 3.5 添加回收率和变异系数

对实际样品的测定结果进行了方法之间相关性的分析, 并且进行了配对 t 检验分析。FLISA 试验回收率为 94.0%~106.2%, 变异系数为 2.1%~9.2%, ELISA 方法的回收率为 95.0%~105.3%, 变异系数为 2.2%~9.3%, HPLC 方法的回收率为 81.5%~92.8%, 变异系数为 0.9%~2.8%, 如表 3。

### 3.6 实际样品检测

利用 3 种方法检测 50 份牛奶样品, 结果发现, 检出超过 MRL 样品 5 份, 检出残留量小于 MRL 样品 1 份, 未检出 AMP 的牛奶样品 44 份。其中 FLISA 检测的浓度为 4.40~63.68 µg/L, ELISA 检测的浓度为 5.20~65.73 µg/L, HPLC 检测的浓度为 7.50~68.93 µg/L。具体结果如表 4 所示。

### 3.7 相关性分析

对实际样品的测定结果进行了方法之间相关性的分析, 并且进行了配对 t 检验分析。结果如图 8 图 9 所示。

FLISA 与 ELISA 之间相关性计算发现, 相关系数  $r^2=0.9974$ , 相关方程为  $Y=1.0252X+1.61$ 。t 检验结果,  $|t|=0.894$ ,  $t_{0.05}(5)=2.571$ ,  $P=0.412$ , 所以  $P>0.05$ , 差异不显著。FLISA

与 HPLC 之间相关性计算发现, 相关系数  $r^2=0.9968$ , 相关方程为  $Y=1.0333X+3.89$ 。t 检验结果,  $|t|=0.904$ ,  $t_{0.05}(5)=2.571$ ,  $P=0.407$ , 所以  $P>0.05$ , 差异不显著。

表 3 牛奶中 AMP 的添加回收率试验及变异系数结果( $n=5$ )  
Table 3 Result of recovery rate and coefficient of variation of AMP in milk ( $n=5$ )

添加浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	FLISA 方法		ELISA 方法		HPLC 方法	
	平均回收/ $\% \pm \text{SD}/\%$	CV /%	平均回收/ $\% \pm \text{SD}/\%$	CV /%	平均回收/ $\% \pm \text{SD}/\%$	变异系数 /%
100	106.2 $\pm$ 6.9	6.5	105.2 $\pm$ 5.9	6.5	82.8 $\pm$ 2.1	2.5
50	104.5 $\pm$ 8.6	8.3	103.5 $\pm$ 7.6	7.8	92.1 $\pm$ 0.8	0.9
525	94.0 $\pm$ 1.9	2.1	95.0 $\pm$ 1.9	2.2	81.5 $\pm$ 1.5	1.9
10	104.3 $\pm$ 9.6	9.2	105.3 $\pm$ 9.6	9.3	89.3 $\pm$ 2.5	2.8

表 4 实际样品中 AMP 的残留浓度检测结果( $n=3$ )  
Table 4 Residual concentration detection results in actual samples of AMP ( $n=3$ )

样品编号	FLISA/ $(\mu\text{g/L})$	ELISA/ $(\mu\text{g/L})$	HPLC/ $(\mu\text{g/L})$
003	4.40	5.20	7.50
004	32.52	36.69	39.52
019	63.68	65.73	68.93
020	43.09	46.02	48.97
021	44.2	46.40	48.41
022	55.10	58.61	60.91

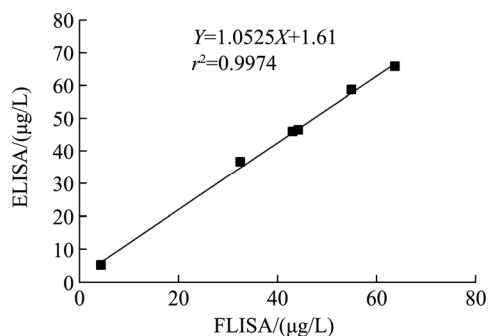


图 8 FLISA 与 ELISA 法检测实际牛奶样品中 AMP 残留量比较  
Fig.8 Comparison of FLISA and ELISA for determination of AMP residues in milk

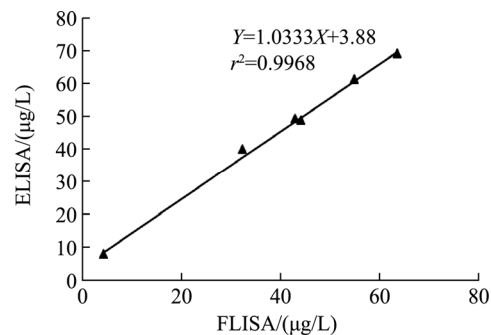


图 9 FLISA 与 HPLC 法检测实际牛奶样品中 AMP 残留量比较  
Fig.9 Comparison of FLISA and HPLC for determination of AMP residues in milk

## 4 讨论

### 4.1 QDs-二抗偶联物的制备

QDs 与生物分子连接方式主要通过静电吸附和共价偶联 2 种方式<sup>[19,20]</sup>。共价结合的形式是比较普遍采用的方式, 主要是表面修饰的时候在 QDs 表面包覆一层分子, 从而使 QDs 表面提供一些功能化基团(-COOH, NH<sub>3</sub>), 再将抗体、链霉亲和素、或其他蛋白共价偶联到 QDs 上。当表面的基团是-COOH 时, 一般采用的交联剂为碳二亚胺盐酸盐(carbodiimine hydrochloride, EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS), Wang 等<sup>[21]</sup>用 NHS 将 QDs 活化, 再用蛋白将其取代。当表面基团是 NH<sub>3</sub> 时, 一般采用的交联剂为二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT)、SMCC。本实验采用 SMCC 活化试剂, 相比 EDC 共价偶联方法, SMCC 活化试剂的稳定性更好, 偶联批间差较小, 同时利用抗体上的巯基偶联, 而抗体的抗原结合区几乎没有巯基,

因此偶联具有定向性, 避免抗体因量子点偶联失活。相比 DTT、2-巯基乙醇等巯基还原剂, TCEP 还原更温和, 在合适的比例条件下仅还原抗体重链恒定区的二硫键, 产生半抗体, 不影响抗体活性。同时不与 SMCC 反应, 因此还原处理抗体后不需要进行纯化去除, 不损失抗体同时简化步骤。由于纯化效果和产率还有待提高, 因此以后的试验中可以尝试通过除去多余的反应试剂, 进行多步纯化, 来提高 QDs 与二抗的偶联效果。

## 4.2 实际样品的检测

牛奶是一种比较复杂的基质, 含有很高浓度的脂类、糖类和蛋白类等成分而对免疫反应造成影响, 同时荧光反应很容易因为外界溶液的原因而造成测定结果的不准, 因此, 必须对牛奶样品进行前处理以降低基质干扰来达到应有的灵敏度。本试验中采取铁氰化钠-硫酸锌沉淀蛋白方式进行样品提取。但是实际检测中, 由于基质的复杂和量子点二抗偶联物生物活性较低, 该方法的灵敏度较 ELISA 方法还有差距, 还需要对前处理方法和实验条件进一步优化, 提高该方法的检测限; 同时还需要对该法的准确度、精密密度等相关参数进行研究, 并扩展样品的范围和数量。

## 5 结 论

综上所述, 本研究将 QDs 与二抗通过共价结合的方式偶联在一起, 成功制备了 QDs-二抗偶联物, 同时对影响量子点偶联物稳定性的条件进行了优化, 最终确定了反应温度为 37 °C, QDs-二抗偶联物的稀释液为 0.25% 酪蛋白稀释溶液。初步探索了 QDs-二抗偶联物在量子点荧光免疫分析法检测牛奶中 AMP 残留中的应用, 确立了该方法的检测限为 2.5 μg/L (10% 的抑制率), 牛奶中添加浓度的平均回收为 94.0%~106.2%, 变异系数为 2.1%~9.2%, 符合残留检测的要求。在实际牛奶样品检测中, 该法与 ELISA 方法和 HPLC 方法均有良好的相关性, 检测结果没有显著性差异。在实际应用中, 可以同 ELISA 方法一样, 用于样品的快速筛选, 再用 HPLC 等仪器方法做进一步定性定量分析。

## 参考文献

- [1] 韦炳瑞. 饲料与养殖产品安全的关系[J]. 广西畜牧兽医, 2008, 24(1): 14-15.
- [2] Wei BR. Relationship between feed and aquaculture product safety [J]. Guangxi J Anim Husband, 2008, 24(1): 14-15.
- [3] 陈杖榴. 兽医药理学, 2 版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [4] Chen ZL. Veterinary pharmacology, 2 edition [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.
- [5] Grunwald L, Petz M. Food processing effects on residues: Penicillins in milk and yoghurt [J]. Anal Chim Acta, 2003, 483(1): 73-79.
- [6] 阮祥春, 曾明华. 氨苄青霉素残留检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(8): 91-96.
- [7] Ruan XC, Zeng MH. Advances in the detection of ampicillin residues [J]. Prog Veter Med, 2008, 29(8): 91-96.
- [8] Elmolla ES, Chaudhuri M. The feasibility of using combined TiO<sub>2</sub> photocatalysis-SBR process for antibiotic wastewater treatment [J]. Desalination, 2011, 272(1-3): 218-224.
- [9] 陈碧. 青霉素类抗生素快速检测方法的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2010.
- [10] Chen B. Study on the rapid detection method of penicillin antibiotics [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2010.
- [11] 中华人民共和国农业部公告第 235 号 [EB/OL]. [2002-12-24]. [http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/nybz/200803/t20080304\\_1028649.htm](http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/nybz/200803/t20080304_1028649.htm).
- [12] Announcement No. 235 by the ministry of agriculture of the People's Republic of China [EB/OL]. [2002-12-24]. [http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/nybz/200803/t20080304\\_1028649.htm](http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/nybz/200803/t20080304_1028649.htm).
- [13] Wang S, Zhang H, Wang L, *et al.* Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review [J]. Food Addit Contam, 2006, 23(4): 362-384.
- [14] Andreu V, Blasco C, Pico Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment [J]. Trac-Trend Anal Chem, 2007, 26(6): 534-556.
- [15] 陆彦. 氨苄青霉素单克隆抗体制备及其残留检测试剂盒的初步研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005.
- [16] Lu Y. Preparation of ampicillin monoclonal antibody and its residue detection kit [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2005.
- [17] Broto M, Matas S, Babington R, *et al.* Immunochemical detection of penicillins by using biohybrid magnetic particles [J]. Food Control, 2015, 51: 381-389.
- [18] Merola G, Martini E, Tomassetti M, *et al.* Simple and suitable immunosensor for β-lactam antibiotics analysis in real matrixes: milk, serum, urine [J]. J Pharm Biomed, 2014, 106: 186-196.
- [19] Conzuelo F, Ruizvaldepenas MV, Campuzano S, *et al.* Rapid screening of multiple antibiotic residues in milk using disposable amperometric magnetosensors [J]. Anal Chim Acta, 2014, 820: 32-38.
- [20] 李建龙, 潘道东, 朱浩嘉, 等. 基于纳米金电化学免疫传感器测定牛奶中的青霉素 G [J]. 食品科学, 2014, 35(8): 111-114.
- [21] Li JL, Pan DD, Zhu HJ, *et al.* Determination of penicillin G in milk by electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 111-114.
- [22] Zhu CN, Chen G, Tian ZQ, *et al.* Near-infrared fluorescent ag<sub>2</sub> se-cetuximab nanoprobes for targeted imaging and therapy of cancer [J]. Small, 2016, 13(3). doi: 10.1002/smll.201602309.
- [23] Luo J, Bai H, Yang P, *et al.* One-pot aqueous synthesis of germanium-doped cadmium sulfide quantum dots as fluorescent probes for cell imaging [J]. Mat Sci Semicon Proc, 2015, 34: 1-7.
- [24] Adrian J, Pasche S, Voirin G, *et al.* Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, β-lactam and tetracycline antibiotics in milk [J]. Trac-Trend Anal Chem, 2009, 28(6): 769-777.
- [25] 王云云. 多色量子点荧光免疫法同时快速检测牛奶中多抗生素残留的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [26] Wang YY. Multi-color quantum dot fluorescence immunoassay for simultaneous detection of multiple antibiotic residues in milk [D]. Chongqing: Southwest University, 2013.

- [19] Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, *et al.* Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 47–51.
- [20] Goldman ER, Balighian ED, Mattoussi H, *et al.* Avidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(22): 6378–6382.
- [21] Wang LY, Kan XW, Zhang MC, *et al.* Fluorescence for the determination of protein with functionalized nano-ZnS [J]. *Analyst*, 2002, 127(11): 1531–1534.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介

尹致丹, 硕士, 主要研究方向为饲料质量安全及其检测技术。  
E-mail: 137411606@qq.com

樊霞, 研究员, 主要主要研究方向为饲料质量安全及其检测技术。  
E-mail: fanxia@caas.cn

---

## 食品微生物质量控制技术专题征稿函

病原微生物引起的食源性疾病已成为影响食品安全的头号问题, 是食品安全的重大隐患。如何有效控制微生物污染已成为把控行业健康发展的重要因素, 如何提高实验室检测能力, 并科学运用食品微生物控制技术减少食品在生产加工等过程中的微生物危害, 以先进的微生物检验控制技术预防微生物污染, 已成为政府监管部门及食品企业关注的焦点问题之一。

鉴于此, 本刊特别策划“食品微生物质量控制技术”专题。由福建农林大学方婷教授担任专题主编。专题将围绕食品全链条微生物污染、食品微生物快速检测、食品微生物高效控制、食品微生物标准法规、食品微生物耐药性等问题展开讨论, 计划在 2020 年 5 月出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁研究员及专题主编方婷教授特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 **2020 年 2 月 20 日前**通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题)

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

E-mail: [jfoodsq@126.com](mailto:jfoodsq@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部