

# 胶体金免疫层析法快速检测动物源性食品中 土霉素残留

栗慧<sup>1,2,3</sup>, 于苗<sup>1,2,3</sup>, 刘培<sup>1,2,3</sup>, 尹会敏<sup>1,2,3</sup>, 孙丰梅<sup>1,2,3</sup>, 魏东<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 河北北方学院, 河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室, 张家口 075000; 2. 河北北方学院农林科技学院, 张家口 075000; 3. 河北北方学院, 张家口市特色农产品质量安全重点实验室, 张家口 075000)

**摘要:** **目的** 建立用于快速检测动物源性食品中土霉素残留的胶体金免疫层析试纸条。**方法** 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 胶体金粒径选用 20 nm, 将经鉴定制备成功的胶体金溶液与土霉素多克隆抗体结合得到金标抗体。优化金标抗体的制备条件, 将包被抗原(1.0 mg/mL)和羊抗鼠二抗(0.75 mg/mL)分别作为检测线和质控线包被在硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜上, 金标抗体按一定浓度包被在玻璃纤维垫上, 对样品垫和吸收垫进行裁剪处理, 通过上述预处理将每部分依次叠加粘贴至底板, 制成胶体金试纸条。**结果** 土霉素胶体金试纸条在实际样品中的检出限为 30 µg/L; 土霉素胶体金免疫层析试纸条与沙拉沙星、莱克多巴胺、氨苄青霉素、恩诺沙星(非本族兽药)无交叉反应。**结论** 该试纸条具有较强特异性、检测时间短、操作方便优点, 可作为土霉素残留现场检查的有效手段。

**关键词:** 土霉素; 胶体金; 试纸条; 快速检测

## Rapid detection of oxytetracycline residues in animal derived foods by colloidal gold immunochromatography

LI Hui<sup>1,2,3</sup>, YU Miao<sup>1,2,3</sup>, LIU Pei<sup>1,2,3</sup>, YIN Hui-Min<sup>1,2,3</sup>, SUN Feng-Mei<sup>1,2,3</sup>, WEI Dong<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Hebei Key Laboratory of Quality & Safety Analysis-testing for Agro-products and Food, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 3. Key Laboratory of Quality and Safety of Characteristic Agricultural Products of Zhangjiakou, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid determination of oxytetracycline residues in animal derived foods. **Methods** Colloidal gold was prepared by trisodium citrate reduction method, the particle size of colloidal gold was 20 nm, the gold labeled antibody was obtained by combining the colloidal gold solution successfully prepared by identification with oxytetracycline polyclonal antibody. The preparation conditions of gold labeled antibody were optimized, the coating antigen (1.0 mg/mL) and sheep anti-mouse secondary antibody (0.75 mg/mL) were coated on the nitrocellulose (NC) membrane as the detection line and quality control line, respectively, the gold labeled antibody was coated on the glass fiber pad according to a certain concentration, the sample pad and absorption pad were cut and pasted to the bottom plate through the above pretreatment to make colloidal gold test strip. **Results** The limit of detection of oxytetracycline colloidal gold test

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19225504D)

Fund: Supported by the Key Research and Development Project of Hebei Province (19225504D)

\*通信作者: 魏东, 博士, 研究员, 主要研究方向为药物残留检测。E-mail: qsataf@163.com

\*Corresponding author: WEI Dong, Ph.D, Professor, No.11, South Diamond Road, Economic Development Zone, Zhangjiakou 075000, China. E-mail: qsataf@163.com

strip in actual samples was 30  $\mu\text{g/L}$ ; there was no cross reaction between oxytetracycline colloidal gold immunochromatographic strip and sarafloxacin, ractopamine, ampicillin and enrofloxacin (non native veterinary drugs). **Conclusion** The test strip has the advantages of strong specificity, short detection time and convenient operation, it can be used as an effective means for on-site inspection of oxytetracycline residues.

**KEY WORDS:** oxytetracycline; colloidal gold; test strip; rapid detection

## 0 引言

土霉素(oxytetracycline, OTC)是一种常见的广谱抑菌剂,抗菌谱与四环素相似,但在肠道感染方面略强于四环素。随着畜牧业集约化、规模化养殖模式的发展,土霉素开始广泛应用于畜禽养殖业,不仅用于治疗 and 预防动物疾病,还以亚治疗剂量添加于畜禽饲料中用于刺激动物生长和增产<sup>[1-5]</sup>。近年来,研究发现,日常生活中通过动物源性食品等摄入过量的 OTC 残留会引起毒性反应,其危害主要表现为对胃、肠和肝的损害,以及牙釉质发育不良,还会造成菌群失调症、过敏反应、二重感染、致畸胎作用等<sup>[6-10]</sup>。根据我国相关标准,所有动物类食品中最低残留限量为 100  $\mu\text{g/kg}$ 。目前,仍能看到由于畜禽中 OTC 含量超标而导致消费者健康受到损害的报道<sup>[10]</sup>。为了减少动物源性食品中 OTC 残留,相关检测部门必须采取监测措施。

目前,用于 OTC 残留的检测方法主要用液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)<sup>[11-12]</sup>、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[13-14]</sup>以及毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)<sup>[15-17]</sup>等,然而,这些方法很复杂,需要操作员具有很高的专业知识,且仪器价格昂贵、不能进行现场抽检。因此,急需建立一种方便、快捷、可以现场即得结果的检测手段。

胶体金免疫层析试纸条在最近几年被广泛应用,主要应用于农药残留、兽药残留、环境监测等方面,具有体积小、携带方便、无需仪器设备辅助、操作简单、可用肉眼判断结果等优点<sup>[18]</sup>。在该技术中,胶体金的制备和抗体的标记是胶体金免疫层析法的关键,这直接关系到建立检测方法的性能,其中标记 pH 又是影响胶体金标记优劣的重要环节, pH 5.0~6.0 标记过程中胶体金变色凝聚沉淀,无法制成免疫金。pH 7.0~8.5 显色佳、灵敏度好。pH $\geq$ 9.0 显色减弱,且灵敏度降低<sup>[19]</sup>。本研究首先制备粒径为 20 nm 的胶体金;其次,将胶体金与土霉素多克隆抗体结合,最后组装土霉素试纸条并确定其检测限,并对抗体添加量、标记 pH 等条件进行优化,以期降低其检出限,使其能更好地服务于现场检查,为相关部门在对土霉素残留的监测提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

碳酸钾( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ )(分析纯,天津科密欧

有限公司);氯金酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);柠檬酸三钠(分析纯,阿拉丁化学品有限公司);辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(纯度 98%,美国 Sigma 公司);Tween-20 (纯度 96%,北京索莱宝科技有限公司);土霉素多克隆抗体(河北北方学院实验室自制)。

SB06 玻璃纤维垫(样品垫)、SMA31-25 PVC 底板(6 cm $\times$  30 cm)、VL78 聚酯纤维膜(金标结合垫)、密理博 M135 硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜、CH37(吸收垫)(上海金标生物科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

LE225D 电子天平(0.000001 g,北京赛多利斯仪器系列有限公司);JB-2 型恒温磁力搅拌器(上海雷磁新经仪器有限公司);Lambda365 紫外-可见分光光度计(铂金埃尔默仪器有限公司);7650 透射式电子显微镜[日立(中国)有限公司]。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 胶体金制备

配制浓度为 0.01%氯金酸溶液和浓度为 1%柠檬酸三钠溶液。将 100 mL 0.01%氯金酸溶液放入烧杯中,置于磁力搅拌器上搅拌,伴随加热,直到沸腾。溶液煮沸后,快速加入 1.8 mL 1%柠檬酸三钠,直到颜色呈现橙红色,并且维持不变,再持续加热 5 min。等待溶液冷却,用超纯水将冷却后的胶体金溶液体积还原至 100 mL。

#### 1.3.2 胶体金的鉴定

按照张佳宜<sup>[20]</sup>的方法,分别采用肉眼观察法和透射电镜法对胶体金进行鉴定。

##### (1)肉眼观察法

通过肉眼观察胶体金溶液的颜色是否为橙红色、是否清澈,以及存放一段时间后的是否有絮状物产生,对胶体金溶液是否制备成功进行初步鉴定。

##### (2)透射电镜法

将少量胶体金溶液放在覆有 Formvar 膜的铜网上,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min,而后用滤纸去除剩余溶液,干燥后,将制好的样品放入透射电镜中,观察其是否发生聚集现象,颗粒大小是否均一,从而对胶体金溶液是否制备成功进行最终鉴定。

#### 1.3.3 金标抗体的制备

配制 0.25 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液和 10% NaCl。将 1 mL 胶体

金溶液装入离心管中, 然后加入 0.25 mol/L  $K_2CO_3$  调节 pH, 维持 pH 在 7 左右, 获得溶液 A。将溶液 A 与 18  $\mu\text{g}$  土霉素多克隆抗体混合, 在 4  $^\circ\text{C}$  条件下静置 30 min, 而后加入 100  $\mu\text{L}$  10% NaCl, 继续在 4  $^\circ\text{C}$  条件下静置 30 min, 4  $^\circ\text{C}$  条件下备用。

根据王玮<sup>[21]</sup>的方法, 本研究对金标抗体的制备 pH、蛋白量进行优化。

#### (1) 标记最适 pH 的确定

将 1 mL 胶体金溶液放入离心管中, 使用 0.25 mol/L  $K_2CO_3$  调节 pH 分别为 5、6、7、8、9、10, 其他条件同上。加入 18  $\mu\text{g}$  土霉素多克隆抗体, 在 4  $^\circ\text{C}$  条件下静置 30 min, 而后加入 100  $\mu\text{L}$  10% NaCl, 继续在 4  $^\circ\text{C}$  条件下静置 30 min。金标抗体颜色未发生变化则为最适 pH。

#### (2) 标记最佳蛋白量的确定

将 1 mL 胶体金溶液放入离心管中, 使用 0.25 mol/L  $K_2CO_3$  调节 pH 为 7。加入土霉素多克隆抗体 3、6、9、12、15、18  $\mu\text{g}$  放置在 4  $^\circ\text{C}$  条件下 30 min, 其他条件均相同。再加入 100  $\mu\text{L}$  10% NaCl, 继续放置在 4  $^\circ\text{C}$  条件下 30 min。按照最终溶液的颜色选择最佳蛋白加入量。

### 1.3.4 金标抗体活性鉴定

#### (1) NC 膜鉴定

将 HRP 标记的羊抗鼠抗体稀释 50 倍, 与制备的金标抗体一起加入 NC 膜, 观察变化, 是否有产生明显的红色晕圈, 判断是否标记成功。

#### (2) 可见光谱法鉴定

用波长为 400~700 nm 的可见光扫描金标抗体, 观察其光谱, 是否为光滑曲线, 与胶体金抗体在最大吸收峰处是否出现位置偏移, 进一步确定金标抗体活性是否成功标记。

### 1.3.5 金标抗体的纯化

首先, 将 10 mL 金标抗体溶液以 1500 r/min 的速度离心 20 min, 并保留上清液。上清液在 4  $^\circ\text{C}$  条件下, 以 10000 r/min 的速度离心 30 min, 并保留沉淀。用贮存液(0.3814 g 硼酸钠、0.5 g BSA、0.5 g 叠氮钠和 500 mL 超纯水)将所得沉淀量减少至原始体积的 1/10, 并在 4  $^\circ\text{C}$  条件下储存备用。

### 1.3.6 试纸条预处理

#### (1) 样品垫预处理

首先按 4 mm×10 mm 裁剪样品垫, 将样品垫全部浸泡在处理液[1%蔗糖、1% Tween-20、1% BSA 和 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS 溶液)]中, 样品垫全部吸附完成后取出, 37  $^\circ\text{C}$  干燥待用。

#### (2) 金标结合垫的制备

首先按 4 mm×20 mm 裁剪金标结合垫, 先浸泡在前处理液中, 烘干后, 将金标抗体稀释 3 倍浸泡金标结合垫, 金标结合垫全部吸附完成后取出, 37  $^\circ\text{C}$  烘干 2 h 待用。金标结合垫前处理液的最佳配方为向 pH 7.4 的 PBS 溶液中加入 5%蔗糖、5%BSA、1% Tween-20。

#### (3) NC 膜的制备

首先按 4 mm×30 mm 裁剪 NC 膜, 包被抗原与二抗稀

释至质量浓度为 1.0、0.75 mg/mL, 将稀释完成的包被抗原与二抗分别包被于 NC 膜上, 形成检测线(T 线)与质控线(C 线), 两者之间相距 10 mm。置于 37  $^\circ\text{C}$  下烘干待用。

#### (4) 吸收垫的制备

首先按 4 mm×10 mm 裁剪吸收垫, 将裁剪好的吸收垫置于 37  $^\circ\text{C}$  下烘干, 干燥备用。

### 1.3.7 试纸条的组装

胶体金免疫层析试纸条根据图 1 依次层叠组成。在进行组装时可以分为 4 步:

(1) 在 PVC 底板上贴 NC 膜(层析膜), 位于中间偏后的位置;

(2) 将金标结合垫粘贴在 PVC 底板上; 边缘压在 NC 膜上方;

(3) 粘贴样品垫于 PVC 底板上, 同样有边缘压在金标结合垫上方;

(4) 粘贴吸收垫于 PVC 底板上, 同样有边缘压在 NC 膜上方; 在室温的条件下密封干燥保存已组装完成的试纸条。

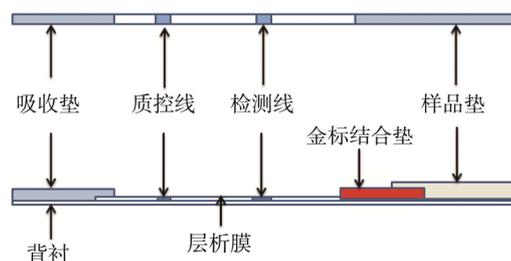


图 1 胶体金免疫层析试纸条结构图

Fig.1 Structure diagram of colloidal gold immunochromatographic test strip

### 1.3.8 免疫层析试纸条检测线的确定

土霉素标准品的配制: 称取 1 mg 的标准品, 然后加入到 1 mL 甲醇中, 使其充分溶解, 4  $^\circ\text{C}$  保存备用。

采用 PBS 溶液(其中含有 10%甲醇)将土霉素标准品分别稀释成 0、10、20、25、30  $\mu\text{g}/\text{L}$  样品溶液, 将上述配制好的样品溶液依次滴加于试纸条加样区(样品垫上), 5 min 后观察, 最低检出限为只出现质控线的最小浓度。

### 1.3.9 试纸条的交叉反应试验

选择非本族常见兽药(沙拉沙星、莱克多巴胺、氨苄青霉素、恩诺沙星)滴加在试纸条上, 观察试纸条上 T 线与 C 线的变化, 确定试纸条是否具有好的特异性。

### 1.3.10 实际样品的检测

实际样品选用从超市购买的新鲜猪肉, 经高相液相色谱法鉴定, 未检测出土霉素含量超标。称取 3 份 2 g 样品分别放入烧杯中, 分别加入 0、15、30、45  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的土霉素标准品溶液, 再加入 4 mL 甲醇, 均质混匀 5 min, 然后用滤纸过滤备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶体金的质量鉴定

#### 2.1.1 肉眼观察法

通过肉眼观察, 胶体金溶液颜色清澈、无杂质, 并且

经过一段时间存放未出现絮状物, 初步表明其内部结构稳定, 胶体金制备成功(如图 2)。



图 2 胶体金溶液  
Fig.2 Colloidal gold solution

### 2.1.2 透射电镜法

根据图 3 计算出胶体金的粒径为 20 nm 左右。通过透射电镜观察其结构可知, 所制备的胶体金颗粒大小均一, 未发生聚集现象, 未出现其他杂质, 最终表明胶体金制备成功。

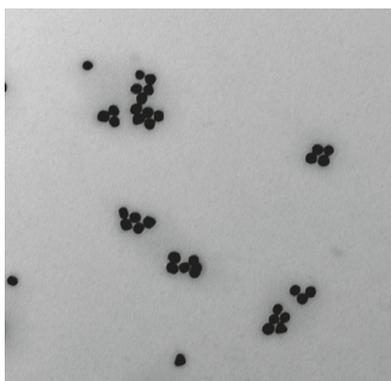


图 3 胶体金透射电镜图( $\times 50000$ )  
Fig.3 Transmission electron microscope of colloidal gold ( $\times 50000$ )

## 2.2 金标抗体制备条件的优化

### 2.2.1 标记最适 pH 的确定

影响胶体金在蛋白质上吸附的主要因素是 pH 变化。如图 4 所示, pH 从左向右增加, pH 的变化对制备金标抗体的结果有影响。

首先在 1~6 号管中加入相同量的胶体金溶液, 然后依次加入 0、4、8、12、16、20  $\mu\text{L}$  0.25 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 以保证 pH 依次为 5、6、7、8、9、10, 最后加入抗体, 观察其颜色变化。1 号管颜色变为白色, 2 号管颜色变为浅粉色, 3 号管颜色未发生变化, 4、5 号管颜色稍有加深, 6 号管颜色进一步加深。通过观察颜色变化可知, 根据金标抗体颜色发生变化可知, 金标抗体制备失败, 唯有 3 号管颜色未发生

变化, 的金标抗体制备成功。

### 2.2.2 标记最佳蛋白量的确定

如图 5 所示, 各离心管液体颜色发生变化, 在颜色为橙红色的基础上, 所添加抗体含量增加 20%, 最终在 3 号管的添加量基础上增加 20%, 故最终抗体添加量为 18  $\mu\text{g}$ 。

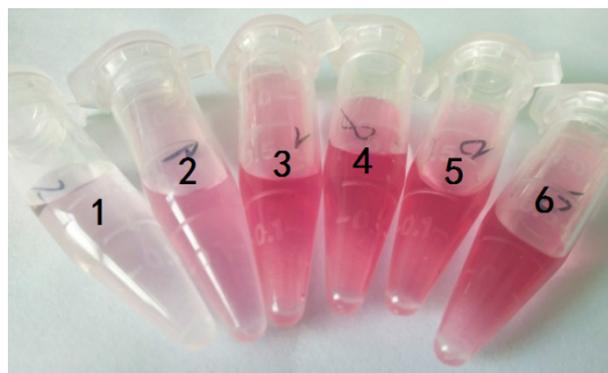


图 4 不同 pH 对金标抗体的影响  
Fig.4 Effects of different pH values on gold labeled antibodies



图 5 标记最佳蛋白量的选择  
Fig.5 Selection of optimal amount of labeled protein

## 2.3 金标抗体活性鉴定

### 2.3.1 NC 膜鉴定

如图 6 所示, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 与金标抗体共同滴加至 NC 膜, 产生明显的红色晕圈, 表明金标抗体制备成功<sup>[22]</sup>。



图 6 金标抗体活性的确定  
Fig.6 Determination of gold labeled antibody activity

### 2.3.2 可见光谱法鉴定

由图 7 可知, 胶体金溶液与金标抗体溶液的可见光光

谱均为光滑曲线,最大吸收峰分别出现在 524 和 529 nm 波长处,光密度(optical density, OD)值分别为 1.1186 和 1.162。最大吸收峰位置的变化说明了物质内部结构发生了变化,表明金标抗体制备成功。

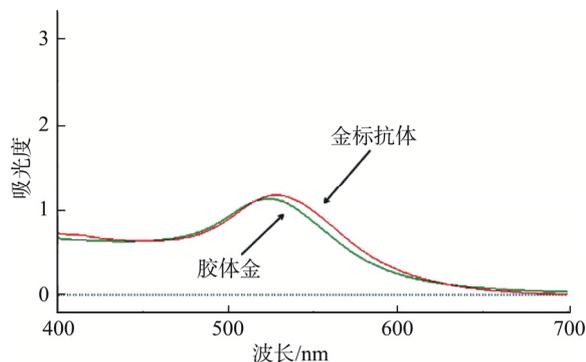
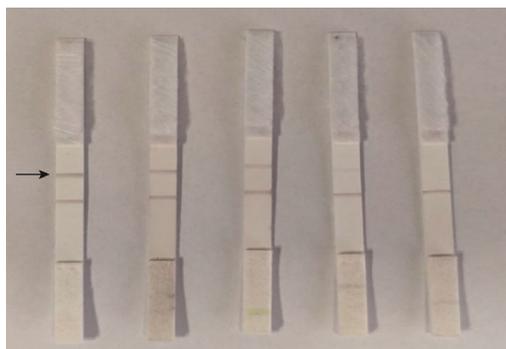


图 7 金标抗体紫外图

Fig.7 Ultraviolet diagram of gold labeled antibody

## 2.4 检出限的确定

如图 8 所示,随着土霉素浓度的升高,检测线(箭头所指)颜色会越来越浅,直至消失。当土霉素的质量浓度低于 25  $\mu\text{g/L}$  时,检测线的显色结果与不含土霉素的空白溶液的显色结果相比差别不大,只是颜色越来越浅;当土霉素质量浓度等于或高于 25  $\mu\text{g/L}$  时,检测线无颜色变化,与空白溶液的显色结果有明显区别。因此土霉素胶体金免疫层析试纸条的检出限为 25  $\mu\text{g/L}$ 。



注: 从左到右的土霉素质量浓度分别为 0、10、20、25、30  $\mu\text{g/L}$ 。

图 8 土霉素检出限的检测结果

Fig.8 Detection results of oxytetracycline detection limit

## 2.5 试纸条的特异性

选择其他非本族常见兽药(沙拉沙星、莱克多巴胺、氨苄青霉素、恩诺沙星)配制标准品溶液,质量浓度在 1000  $\mu\text{g/L}$ ,滴加至试纸条中,检测线仍无颜色变化。证明 3 种试纸条基本上与其他兽药无交叉反应,说明试纸条特异性强,结果如图 9 所示。



注: 从左到右的分别沙拉沙星、莱克多巴胺、氨苄青霉素、恩诺沙星。

图 9 与其他兽药的交叉反应结果

Fig.9 Cross reaction results with other veterinary drugs



注: 从左到右添加 OTC 浓度依次为 0、15、30、45  $\mu\text{g/kg}$ 。

图 10 添加 OTC 的样品检测结果

Fig.10 Test results of samples added with OTC

## 2.6 实际样品的检测结果

将按 1.3.10 方法得到的滤液滴加至已经组装完成的试纸条上,通过目测观察出检测带颜色发生变化,与未添加药物的样品有明显区别(如图 10 所示)。通过观察,确定土霉素胶体金免疫层析试纸条在实际样品中的检出限为 30  $\mu\text{g/kg}$ ,远远小于农业部公告第 235 号中规定的土霉素允许残留限量(100  $\mu\text{g/kg}$ )。

## 3 结论与讨论

制备胶体金过程中最关键的一步是玻璃容器的清洁<sup>[23-25]</sup>。如果玻璃容器中不慎落入灰尘或不干净都会影响胶体金的制备,形成的胶体金颗粒大小不均匀、颜色浑浊。因此在制备胶体金之前需要对所有的玻璃容器进行清洁。先用超声波清洗器清洗 30 min 去除容器内的灰尘,再将所有容器放入酸缸中浸泡 24 h。通过此方法处理后的玻璃容器无需再进行硅化处理,可直接进行胶体金的制备。

本试验采用的制备方法是柠檬酸钠还原法<sup>[26-29]</sup>。与其他方法相比,柠檬酸钠还原法原料廉价易得、安全无危险,

制备的胶体金颗粒稳定、易于保存、粒径范围大<sup>[30]</sup>。由于还原剂的添加量不同制备的胶体金粒径也各不相同<sup>[31]</sup>。胶体金颗粒的大小会影响胶体金与蛋白质的结合, LI 等<sup>[32]</sup>的研究表明胶体金粒径在 10~70 nm 最大吸收峰与粒径之间存在线性关系:  $Y=0.4271X+514.56$ , 公式中  $Y$  为最大吸收峰,  $X$  为胶体金粒径。由该公式可得胶体金粒径为 22.1 nm, 比较适合于抗体蛋白标记的粒径。其相比于其他粒径的胶体金溶液更易于保存且保存时间久、容易标记土霉素抗体、颜色适中、方便试纸条结果观测。

本研究所研制的土霉素胶体金免疫层析试纸条的检测限、特异性等均能达到国家标准的检测要求。试纸条无需借助仪器设备, 操作简单, 5~10 min 内即可出检测结果, 极大地缩短了原有的检测时间, 大大加快了现场检查的效率, 适用于相关部门在对土霉素残留的现场检测中使用。

### 参考文献

- [1] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243.  
ZHOU QX, LUO Y, WANG ME. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review [J]. Asian J Ecotoxicol, 2007, 2(3): 243.
- [2] 邓宇, 乌仁图雅, 李宝栋, 等. 固相萃取-超高效液相色谱法测定土壤中土霉素、四环素及金霉素[J]. 化学分析计量, 2021, 30(8): 15-18.  
DENG Y, WU RTY, LI BD, et al. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in soil by ultra performance liquid chromatography with solid phase extraction [J]. Chem Anal Meter, 2021, 30(8): 15-18.
- [3] CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(2): 232-260.
- [4] XIE X, ZHOU Q, HE Z, et al. Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Environ Toxicol Chem, 2010, 29(4): 922-928.
- [5] GU C, KARTHIKEYAN KG. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides [J]. Environ Sci Technol, 2005, 39(8): 2660-2667.
- [6] 杨芑, 宋金春, 蔡鸿生. 四环素类抗生素不良反应[J]. 医学导报, 1994, 13(1): 39-40.  
YANG J, SONG JC, CAI HS. Adverse reactions of tetracycline antibiotics [J]. Herald Med, 1994, 13 (1): 39-40.
- [7] COHLAN SQ. Tetracycline staining of teeth [J]. Teratology, 1977, 15(1): 127-129.
- [8] BURETTE A. A cute hepatic injury associated with minocycline [J]. Arch Intern Med, 1984, 144: 1449.
- [9] MULLER SR, SINGER HP, STOOB K, et al. Occurrence and fate of antibiotics in manure, soil and water [J]. Mitteil Lebensmitteluntersuchung Hyg, 2003, 94: 574-578.
- [10] 刘涛. 四环素酶联免疫检测方法的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.  
LIU JT. Study on an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of tetracycline [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012.
- [11] 王美丽, 李敦毅. QuEChERS 法提取-液相色谱-质谱法检测分析制药园区污水中青霉素、洁霉素、土霉素、四环素和庆大霉素残留方法的建立[J]. 分析仪器, 2021, (4): 150-154.  
WANG ML, LI DY. Establishment of QuEChERS extraction-HPLC/MS method for determination of antibiotics in sewage of pharmaceutical industrial park [J]. Anal Instrum, 2021, (4): 150-154.
- [12] 贾微, 孙璐, 史向国, 等. 液相色谱-质谱联用法测定牛奶中 4 种四环素类药物残留[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 16(12): 97-99.  
JIA W, SUN L, SHI XG, et al. Determination of tetracycline residues in milk by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2002, 16(12): 97-99.
- [13] VINAS P, BALSALOBRE N, CARMEN LE, et al. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey [J]. J Chromatogr A, 2004, 1022(1-2): 125-129.
- [14] 徐冬梅, 刘广深, 李青, 等. 高效液相色谱法同时测定动物组织中 3 种抗生素残留量[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(2): 233-234.  
XU DM, LIU GS, LI Q, et al. Simultaneous determination of three antibiotic residues in animal tissues by HPLC [J]. China Public Health, 2002, 18(2): 233-234.
- [15] 代婷婷. 毛细管区带电泳化学发光检测新方法在动物性食品兽药残留检测中的应用研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.  
DAI TT. Application of a new capillary zone electrophoresis-chemiluminescence method in the determination of veterinary drug residues in animal derived food [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2016.
- [16] 梁佳, 张琳婧, 卢日刚. 高效毛细管电泳法测定牛奶中四环素类抗生素含量[J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 309-311.  
LIANG J, ZHANG LJ, LU RG. Determination of tetracycline antibiotics in milk by high performance capillary electrophoresis [J]. J Guangxi Acad Sci, 2010, 26(3): 309-311.
- [17] 杜红鸽, 郭芙蓉, 陈蕾. 四环素类药物残留分析方法研究进展[J]. 河南畜牧兽医(综合版), 2008, 29(6): 13.  
DU HG, GUO FR, CHEN Q. Research progress of tetracycline residue analysis methods [J]. Henan Anim Husband Vet (Compr Ed), 2008, 29(6): 13.
- [18] 黄晓明. 莱克多巴胺胶体金试纸条生产工艺研究[D]. 广州: 暨南大学, 2011.  
HUANG XM. Optimization studies on the manufacturing process of colloidal gold-based detection for ractopamine [D]. Guangzhou: Jinan University, 2011.
- [19] 孙园园, 王云龙, 李玉林, 等. pH 对胶体金标记单克隆抗体性能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(11): 1170-1173.  
SUN YY, WANG YL, LI YL, et al. Effects of pH on the properties of colloidal gold labeling monoclonal antibody [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(11): 1170-1173.
- [20] 张佳宜. 磺胺类兽药免疫胶体金快速检测试纸条的研制[D]. 天津: 天津科技大学, 2009.  
ZHANG JY. Study on the colloidal gold immunochromatographic rapid test strip for the determination of sulfonamides residues [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2009.
- [21] 王玮. 氯霉素残留快速检测胶体金试纸条的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2007.  
WANG W. Study on the colloidal gold-based immunoassays for the rapid

- detection of chloramphenicol residues [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2007.
- [22] 孔繁德, 黄印尧, 赖清金. 免疫胶体金技术及其发展前景[J]. 福建畜牧兽医, 2002(增刊), 24(7): 42-45.  
KONG FD, HUANG YY, LAI QJ. Immunocolloidal gold technology and its development prospect [J]. Fujian J Anim Husb Vet Med, 2002(Suppl), 24(7): 42-45.
- [23] 王悦欣, 舒黎辉, 杨雨琦, 等. 鸡传染性支气管炎病毒抗体胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2021, 38(5): 122-128.  
WANG YX, SHU LH, YANG YQ, *et al.* Development of colloidal gold immunochromatographic test strip for chicken infectious bronchitis virus antibody [J]. J Chongqing Norm Univ (Nat Sci Ed), 2021, 38(5): 122-128.
- [24] 吴志强, 刘少蓉, 白民俊, 等. 1种布鲁菌抗体检测试纸条快速检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(7): 1310-1314, 1347.  
WU ZQ, LIU SR, BAI MJ, *et al.* Establishment of the rapid detection method of *Brucella* antibody test strip [J]. Chin J Vet Med, 2021, 41(7): 1310-1314, 1347.
- [25] 宁军, 李娜, 严雨倩, 等. 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, *et al.* Preparation of a highly sensitive test strip for chloramphenicol elimination [J]. China Food Saf Magaz, 2021, (20): 165-168.
- [26] 王莹, 白晶晶, 李玉芳, 等. 猫泛白细胞减少症病毒单克隆抗体的制备及其制备胶体金检测试纸条的应用[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(15): 99-103.  
WANG Y, BAI JJ, LI YF, *et al.* Development of monoclonal antibody-based colloidal gold immunochromatographic assay for detecting feline panleukopenia virus [J]. J Anhui Agric Sci, 2021, 49(15): 99-103.
- [27] 周华倩. 牛支原体抗体检测胶体金免疫层析试纸条的研制及初步应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.  
ZHOU HQ. The detection of antibody against of *Mycoplasma bovis* colloidal gold immunochromatographic strip development and preliminary application [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [28] 周华倩, 储岳峰, 耿尚景超, 等. 基于两个重组蛋白的牛支原体免疫胶体金抗体检测试纸条的研究[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(8): 939-946.  
ZHOU HQ, CHU YF, GENG SJC, *et al.* Development of an immunocolloidal gold strip for detection of *Mycoplasma bovis* antibodies based on two recombinant proteins [J]. Chin Vet Sci, 2021, 51(8): 939-946.
- [29] 王丽. 胶体金免疫层析法检测牛奶中的环丙沙星残留[J]. 现代食品, 2021, (6): 191-193.  
WANG L. Detection of ciprofloxacin residue in milk by colloidal gold immunochromatography [J]. Mod Food, 2021, (6): 191-193.
- [30] 李逢将. 胶体金免疫层析法检测念珠菌抗原对侵袭性念珠菌肺炎的诊断价值[D]. 北京: 军事科学院, 2020.  
LI FJ. The diagnostic value of gold immunochromatography method detecting *Candida* antigen in patients with invasive *Candida pneumonia* [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2020.
- [31] SLOT JW. Sizing of protein A-colloidal gold probes for immunoelectronmicroscopy [J]. Cell Biol, 1981, 90: 533-536.
- [32] LI JS, WU ZS, WANG H, *et al.* A reusable capacitive immunosensor with a novel immobilization procedure based on 1,6-hexanedithiol and nano-Au self-assembled layers [J]. Sens Actuators B Chem, 2005, (110): 327-333.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

## 作者简介

栗慧, 硕士, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: 784918295@qq.com

魏东, 博士, 研究员, 主要研究方向为药物残留检测。

E-mail: qsataf@163.com