

快速检测食品中四环素类抗生素残留的 胶体金免疫层析方法

刘波¹, 华彦涛¹, 赵炫¹, 梁诗华¹, 张少霞¹, 李斌², 袁利鹏^{1*}

(1. 广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广东广州 511365)(2. 广州万联生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 为了更快速、灵敏、准确快速检测食品中四环素类抗生素残留, 该研究利用四环素类(Tetracyclines, TCs) 抗生素共同的结构特点制备了识别 TCs 的广谱单克隆抗体, 建立了一种应用于食品中四环素类抗生素残留快速检测的胶体金免疫层析法(Colloidal Gold Immuno-chromatography Assay, GICA)。通过半抗原设计、单克隆抗体制备以及优化抗体标记浓度、人工抗原包被浓度等一系列 GICA 方法关键因素, 实现食品中四环素类抗生素残留的快速检测。结果表明, 所制备的广谱单克隆抗体对四环素、金霉素、土霉素、多西环素的半数抑制浓度(IC₅₀) 值分别为 1.29、1.04、1.34、2.33 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在最优条件下所建立的 GICA 方法对四环素、金霉素、土霉素检测限为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对多西环素检测限为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 检测时间约 15 min。该研究建立的 GICA 方法具有灵敏、准确、快速等特点, 可应用于鸡肉、猪肉、草鱼等动物性食品中四环素类抗生素残留的大批量快速筛选。该研究结果为四环素类抗生素广谱单克隆抗体的研究和食品中四环素类抗生素残留检测提供一定理论依据和有效的技术支持。

关键词: 四环素类抗生素; 半抗原设计; 广谱单克隆抗体; 胶体金免疫层析法

文章编号: 1673-9078(2026)2-331-340

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1635

Colloidal Gold-based Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of Tetracycline Antibiotic Residues in Food

LIU Bo¹, HUA Yantao¹, ZHAO Xuan¹, LIANG Shihua¹, ZHANG Shaoxia¹, LI Bin², YUAN Lipeng^{1*}

(1. Tropical Agriculture and Forestry College, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 511365, China)

(2. Guangzhou Wanlian Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: A rapid, sensitive, and accurate detection method for tetracycline (TC) antibiotic residues in food was developed. Shared structural characteristics of TC antibiotics were exploited for the preparation of a broad-spectrum TC-targeting monoclonal antibody (mAb), and a colloidal gold-based immunochromatographic assay (GICA) was established for rapid detection of TC antibiotic residues in food. Through hapten design, mAb preparation, and optimization of key GICA parameters, such as the antibody labeling and artificial antigen coating concentrations, rapid TC antibiotic residue detection in food was achieved. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of the broad-spectrum mAb towards TC, chlortetracycline, oxytetracycline, and doxycycline were 1.29, 1.04, 1.34, and 2.33 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Under optimal conditions, the limit of detection of GICA was 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for TC,

引文格式:

刘波, 华彦涛, 赵炫, 等. 快速检测食品中四环素类抗生素残留的胶体金免疫层析方法[J]. 现代食品科技, 2026, 42(2): 331-340.

LIU Bo, HUA Yantao, ZHAO Xuan, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of tetracycline antibiotic residues in food [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(2): 331-340.

收稿日期: 2024-11-04; 修回日期: 2025-02-15; 接受日期: 2025-02-26

基金项目: 广东省教育厅普通高校重点科研平台项目创新团队项目(2024KCXTD082); 广东省攀登计划项目(pdjh2022b0914); 广州市增城高层次人才项目[人才办 201807]; 广东省普通高校青年创新人才类项目(2022KQNCX211)

作者简介: 刘波(1980-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 农产品安全、食品加工与贮藏, E-mail: 471270952@qq.com

通讯作者: 袁利鹏(1979-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 农产品、食品的快速检测与综合加工利用, E-mail: 543753927@qq.com

chlortetracycline, and oxytetracycline and $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for doxycycline, with a reaction time of approximately 15 min. Therefore, the GICA developed in this study achieved highly sensitive, accurate, and rapid detection, making it suitable for rapid batch screening of TC antibiotic residues in animal food products, such as chicken, pork, and grass carp. The results of this study provide a theoretical basis and effective technical support for future research on broad-spectrum mAbs against TC antibiotics and the detection of TC antibiotic residues in food.

Key words: tetracycline; hapten design; broad-spectrum monoclonal antibody; colloidal gold-based immunochromatographic assay

四环素类 (Tetracyclines, TCs) 抗生素是一类由放线菌产生的广谱抗生素, 常见的四环素类抗生素主要包括天然的四环素 (Tetracycline, TC)、金霉素 (Chlortetracycline, CTC)、土霉素 (Oxytetracycline, OTC) 等半合成的强力霉素 (Doxycycline, DC)、米诺环素 (Minocycline, MNC) 等^[1,2]。TCs 在化学结构上均含有氢化萘四苯基本结构, 主要区别是 TCs 的四苯基本结构上取代基的差异, 图 1 为常见的四种 TCs 的化学结构式^[3,4]。

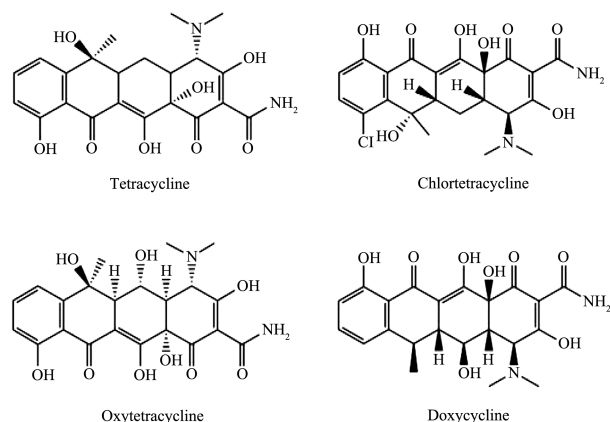


图 1 常见四环素类抗生素化学结构式

Fig.1 Chemical structure of common TCs

TCs 作为一种广谱抗生素, 具有价格低廉、抗菌效果优异的优点, 被广泛应用于临床和兽医上的各种细菌性感染疾病的治疗与预防^[5,6]。目前, TCs 在禽畜养殖中常被加入饲料或饮用水中用于动物各种疾病的预防与治疗以及促进动物生长, 使用占比达到了 40.5%^[7-9]。研究表明, 畜牧业和农业活动是 TCs 污染的主要来源, TCs 在动物和人类体内难以被代谢, 一部分会以原药或者代谢物的形式随着排泄物进入到环境中, 给生态环境安全带来严重威胁^[10-12]; 一部分会蓄积在人体的各种器官, 给人体健康带来严重威胁^[13-16]。目前, 食品安全问题中常检出的四环素类抗生素为 TC、CTC、OTC 以及 DC。为了保障人体健康, 欧盟、联合国粮食及农业组织和世界卫生组织规定了 TC、OTC 和 CTC 在食品中无论是单独存在还是同时存在的最大残留限量均不得超过 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration,

FDA) 规定了 TC、OTC 和 CTC 的最大残留限量为 $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[17]。我国国标规定食品中 TC、OTC 和 CTC 无论是单独存在还是同时存在的最大残留限量为 $100\sim 1\,200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

目前, 对于食品中 TCs 残留检测的技术为仪器分析法^[18,19]、毛细管电泳法^[20]、荧光法^[21,22]、适配体传感器法^[23,24]、免疫分析技术^[25]等。大型仪器分析方法具有高灵敏度以及良好的准确性, 但昂贵的仪器和操作要求高限制了在现场快速检测中的应用, 毛细管电泳法耗时繁琐、分离效率低也限制了它的应用。荧光法灵敏度高、响应快, 但其探针合成复杂以及容易受到干扰, 适配体传感器操作步骤较为复杂。而 GICA 因其灵敏、易操作、高通量等优点被广泛应用。目前, 针对 TCs 的胶体金免疫层析法中, 由于肉制品和水产品样品基质的影响, 导致检测灵敏度不佳, 例如: 高楠^[26]建立的免疫层析法方法, 在牛奶和肉制品、水产品的视觉检出限分别为 $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $80 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; Taranova 等^[27]建立的 GICA 对牛奶中 TCs 残留的检出限为 $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 檀尊社等^[28]建立的 GICA 方法灵敏度受到水产品样品基质的干扰, 检出限为 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 郭然^[29]建立的 GICA 方法检测灵敏度与其他研究者结果大致相当, 虾肉样品检测灵敏度检测为 $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对此, 本研究设计合成了 TCs 新型半抗原, 制备了四环素类抗生素的广谱单克隆抗体, 并建立一种快速检测动物性食品中四环素类抗生素的胶体金免疫层析法。对所建立的方法进行了一系列检测条件优化, 旨在实现现场大批量快速检测食品中四环素类抗生素的残留。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样本垫、硝酸纤维素 (Nitrocellulose Filter Membrane, NC) 膜、吸水垫和聚氯乙烯 (Polyvinyl Chloride, PVC) 板, 均购自上海金标生物技术有限公司; 氯金酸、柠檬酸三钠、四环素、金霉素、土霉素、多西环素标准品 (纯度 99.9%), 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 羊抗鼠 IgG, 购自北京全式金生物有限公司; 其他试剂均为分析纯。

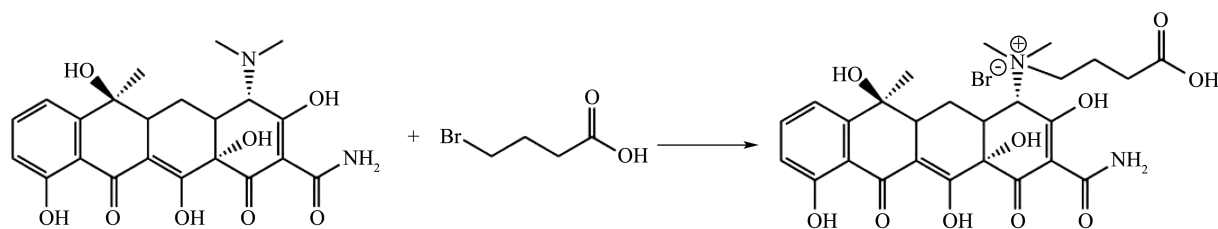


图 2 四环素类半抗原合成路线

Fig.2 Synthetic routes of TCs hapten

1.2 仪器与设备

HM330 三维平面点膜喷金仪、ZQ2000 微电脑自动斩切机、GIC-Q 金标读数仪, 上海金标生物科技有限公司; RS-NSY-1 便携式样品浓缩仪, 广州瑞森生物科技股份有限公司; MX-S 涡旋混匀器, 大龙兴创实验仪器(北京)有限公司; 5424R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Waters 2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 四环素类半抗原的合成

四环素类半抗原合成路线如图 2 所示, 步骤如下:

首先, 称取 500 mg (1.13 mmol) 四环素于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 mL 超纯水充分搅拌溶解后, 再加入 375 mg 4-溴丁酸 (2.26 mmol), 于 60 °C 下反应 5~8 h。反应完毕, 旋蒸除去溶剂, 所得固体用乙酸乙酯洗两遍, 烘干后得到 117 mg 四环素类半抗原。

1.3.2 人工抗原的制备

将四环素类半抗原采用活泼酯法偶联乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 和牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 得到四环素类人工抗原。取 10 mg 四环素类半抗原溶于 0.1 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 加入 10 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺和 5 mg N-羟基丁二酰亚胺, 室温下充分搅拌活化 4 h 得到活化液; 称取 20 mg BSA/LF 溶于 2.0 mL 浓度为 0.05 mol·L⁻¹、pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液 (Carbonate Buffer, CB) 中得到载体蛋白溶液, 将得到的活化液缓慢滴入室温下充分搅拌的载体蛋白溶液, 室温搅拌偶联过夜后用 0.01 mol·L⁻¹、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Saline, PBS) 溶液室温透析 3 d, 每天换 2 次透析液, 制备得到四环素类人工抗原。

1.3.3 四环素类单克隆抗体的制备及鉴定

将载体蛋白为乳铁蛋白的四环素类人工抗原为免疫原免疫 Balb/c 小鼠, 小鼠免疫策略为 100 μg/2 周, 免疫次数达到 3 次后采用间接竞争酶联免疫分析方法

(ic-ELISA) 测定小鼠血清效价及抑制率。当血清抗体效价达到 10 K 和理想的抑制率后, 采用 100 μg 全抗原进行加强免疫, 5 d 后取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞 (小鼠骨髓瘤细胞) 按比例融合。采用 HAT 培养基进行选择培养, 通过 ic-ELISA 法对细胞上清进行检测, 挑选强阳性孔的细胞进行有限稀释法克隆培养。经 3 次克隆培养及检测后得到杂交瘤细胞株。采用腹水模式, 将杂交瘤细胞接种至小鼠腹腔, 产生含抗体的腹水。用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水后进行浓缩即可得到高纯度的单克隆抗体。

将载体蛋白为 BSA 的四环素类人工抗原作为包被抗原用 CB (0.05 mol·L⁻¹, pH 值 9.6) 稀释至质量浓度 0.1 μg·mL⁻¹ 后进行聚苯乙烯微孔板包被, 将四环素、金霉素、土霉素和多西环素标准储备液用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 稀释成质量浓度分别为 0、0.2、0.6、1.8、5.4 和 16.2 μg·L⁻¹ 的标准溶液, 通过 ic-ELISA 法进行抗体性能鉴定, 用酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值, 采用 ELISA Calc 软件进行四参数 Logistic 曲线拟合, 以 OD₄₅₀ 值为纵坐标, 药物质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 计算得到四环素类抗体对四环素、金霉素、土霉素和多西环素的 IC₅₀ 值。

1.3.4 胶体金免疫层析方法的建立

1.3.4.1 金标抗体的制备

用 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 调节胶体金溶液至合适的 pH 值, 将一定量的四环素类单克隆抗体加入胶体金溶液中, 室温反应 5 min, 加入 10 μL 的 10% 质量分数的 BSA 水溶液进行封闭, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃去全部清液, 加入 1 mL 金子稀释液复溶, 按照 12 μL/孔分装于微孔中, 37 °C 干燥处理 16 h 后置于 4 °C 保存备用。通过对照胶体金比色卡判断阴性和阳性 T、C 线颜色的深浅与梯度, 筛选出最佳的标记条件与抗体标记质量浓度。

1.3.4.2 包被原质量浓度、羊抗鼠 IgG 质量浓度的优化

将包被抗原用 PBS (0.1 mol·L⁻¹, pH 值 7.4) 稀释成 0.1、0.2、0.4 mg·mL⁻¹ 质量浓度后喷涂于 NC 膜 T 线上, 将羊抗鼠 IgG 用 PBS (0.1 mol·L⁻¹, pH 值 7.4)

稀释成 0.05、0.1、0.2 mg·mL⁻¹ 质量浓度后喷涂于 NC 膜 C 线上, 对试纸条进行阴性、阳性对照实验, 通过对照胶体金比色卡判断阴性和阳性 T、C 线颜色的深浅与梯度和采用金标读数仪读取试纸条 T 线和 C 线的信号值, 对比试纸条的显色程度与 T/C 值筛选出最佳的包被抗原质量浓度和羊抗鼠 IgG 包被质量浓度。

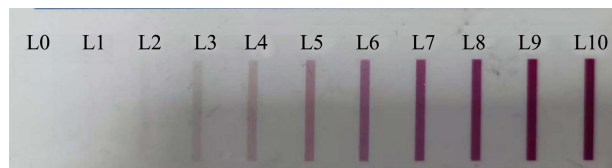


图 3 胶体金比色卡

Fig.3 The colloidal gold color card

1.3.4.3 四环素类检测卡的组装及检测

免疫层析试纸条由 NC 膜、吸收垫、样品垫和 PVC 板组成。NC 膜贴于 PVC 板上, 将四环素类包被原和羊抗鼠 IgG 分别作为 T 线和 C 线划于 NC 膜上, 置于 45 °C 烘箱中烘干 24 h。取吸水纸和样品辅料垫粘贴于 NC 膜的两端, 吸水纸贴于靠近 C 线的一端, 样品辅料垫贴于靠近 T 线的一端, 吸水纸和样品辅料垫重叠于 NC 膜上 1~2 mm, 裁切成宽度为 3.00 mm 的卡条, 放入塑料卡槽, 盖上卡盖即可使用。采用上述优化中最佳条件标记四环素类单克隆抗体, 最后将金标抗体以每孔 12 μL 分装到微孔中, 45 °C 烘干备用。将组装完毕的检测卡和微孔放入铝箔袋, 加入干燥剂密封避光常温保存。

样品检测时, 取 100 μL 待测液于金标微孔中, 反复吹打 3~5 次后室温孵育 3 min 后, 滴加液体至试纸条加样孔中, 室温反应 8 min 后观察结果。对于不含有待测物的阴性样本, 检测线 T 线上的四环素类包被原会捕获金标抗体, 形成一条红色的 T 线, 同时, C 线上的羊抗鼠 IgG 会捕获剩余的金标抗体, 形成另一条红色的 C 线, 并且 T 线显色深于或相近于 C 线显色。对于含有待测物的阳性样本, 当金标抗体与样本接触时, 它们会优先与四环素类药物结合, 形成抗原-抗体复合物。由于金标抗体会优先与待测物结合, 导致 T 线的显色强度随着待测物浓度的增加而逐渐变浅, T 线不显色或颜色稍浅于 C 线。当试纸条的 C 线无色, 无论试纸条的 T 线是否显色, 结果无效。

1.3.5 试纸条性能测试

1.3.5.1 灵敏度

根据上述优化所得的最佳检测条件, 分别配制一系列质量浓度为 2、5、10、20 μg·L⁻¹ 的四环素类药物标准品溶液, 分别取 100 μL 用于试纸条检测, 各浓度重复 3 次, 根据实验结果确定试纸条的标准品检测限。

1.3.5.2 实际样品检测

取四环素、金霉素、土霉素和多西环素标准溶液分别对猪肉、鸡肉、鸭肉、草鱼、罗非、大头鱼和鲈鱼的 7 份空白样本进行梯度加标, 加标质量浓度为 0、5、20、40、80 μg·kg⁻¹, 称取 2 g 去除脂肪并均质的动物组织样本于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 质量分数为 3% 的对甲苯磺酸水溶液, 充分振荡或摇匀 3 min, 混匀后室温下以 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取 100 μL 上清液加入到 200 μL 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer, PB) 中, 充分混匀后得到梯度加标待测液, 对上述梯度加标待测液进行定性检测, 根据实验结果确定试纸条的样本检测限。

市场上随机购买猪肉、鸡肉、鸭肉、草鱼、罗非、大头鱼和鲈鱼样品, 用试纸条进行快速检测, 并与液相色谱-串联质谱联用 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer, LC-MS/MS) 比较, 对比试纸条快速检测的准确性。

1.3.5.3 稳定性

将同一批次的试纸条及金标微孔置于 45 °C 烘箱中进行加速老化实验, 分别隔 0、5、10、20、30、40、50、60 d 进行阴性与阳性检测, 通过比较试纸条显色及灵敏度的变化对试纸条的稳定性进行评价。

1.3.6 数据分析

利用 Excel 2021 软件对试验数据进行整理与分析, 实验数据均以平均值 ± 标准差表示, 使用 ELISA Calc 软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 四环素类半抗原及单克隆抗体性能鉴定

小分子半抗原的设计策略通常主要考虑保留待测物分子特征、活性基团的引入以及适宜长度的连接臂。小分子的刚性结构、吡啶环等基团有利于刺激实验动物产生相对应的抗体, 四环素类药物结构相似, 都具有共同的氢化萘四苯基本结构, 这是四环素类抗生素的标志性特征。因此为了获得广谱性抗体, 本研究在半抗原设计上完整保留了四环素中与六元环相连的所有羟基、羰基和酰胺基这三种特征基团, 且偶联手臂为带活性基团的直链, 使得制备的人工抗原上的小分子结构完好的保留了原有的特性, 更有利于呈现四环素类药物的结构特征, 提高了抗原的免疫原性。采用质谱法鉴定四环素类半抗原, 由图 4 可知, 四环素类半抗原的分子离子峰为 m/z 530[M-1], 且为最高峰, 与该四环素类半抗原的分子量 531 相符, 表明成功合成了四环素类半抗原。

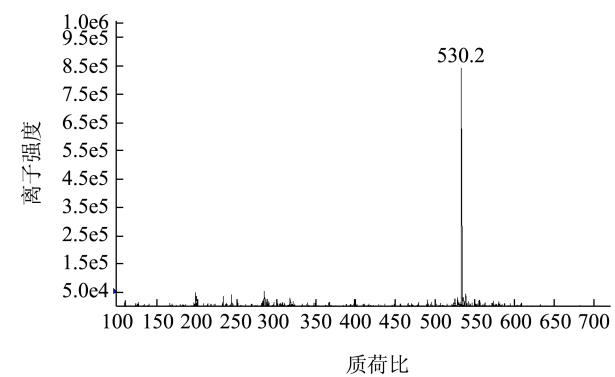


图 4 四环素类半抗原负离子质谱图

Fig.4 The negative MS of TCs hapten

将载体蛋白为 BSA 的四环素类人工抗原为包被原，用 0.05 mol·L⁻¹、pH 值 9.6 的 CB 缓冲液稀释至 0.1 μg·mL⁻¹ 包被，加入不同浓度的四环素标准溶液，再相应加入四环素类单克隆抗体溶液，得到 ic-ELISA 数据绘制标准曲线，标准曲线如图 5 所示，通过计算得到四环素类单克隆抗体对四环素的 IC₅₀ 值为 1.29 μg·L⁻¹，在四环素质量浓度为 0.2~16.2 μg·L⁻¹ 范围内呈线性关系。通过加入不同浓度的金霉素、土霉素、多西环素标准溶液，同样计算得到四环素类单克隆抗体对金霉素、土霉素、多西环素的 IC₅₀ 值分别为 1.04、1.34、2.33 μg·L⁻¹。金霉素、土霉素、多西环素的交叉反应率分别为 124.04%、96.27% 和 55.36%，说明制备的四环素类单克隆抗体可以对四环素、金霉素、土霉素和多西环素进行广谱检测，将所制备的四环素类单克隆抗体和抗原应用到 GICA 中，能够实现食品中四环素类抗生素残留的快速检测。

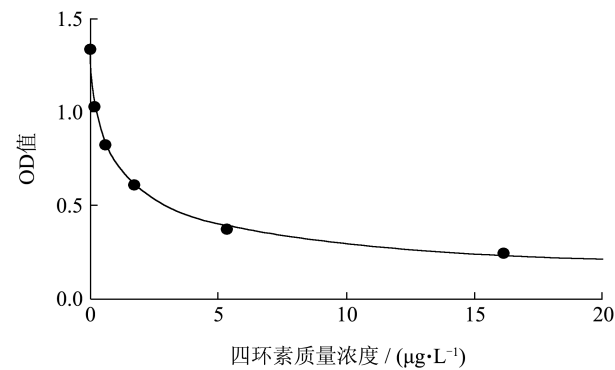


图 5 四环素 ic-ELISA 曲线

Fig.5 Ic-ELISA curve of TC

2.2 试纸条检测条件优化

2.2.1 标记pH值的优化

胶体金标记抗体是通过静电吸附作用将抗体结合包裹在胶体金颗粒表面，标记体系的 pH 值的变化会

直接影响胶体金颗粒和抗体分子表面的电荷分布和电荷密度，从而影响它们之间的静电吸附作用^[30]。通过添加 4、6、8、10 μL（体积分数 0.4%、0.6%、0.8%、1%）的 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 溶液到 1mL 胶体金溶液中调节标记体系 pH 值，由图 6 可知，随着 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 溶液添加量（体积分数）的增加，胶体金溶液的颜色从聚沉的深紫色变化为鲜红色，当 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 溶液添加量（体积分数）增加到 0.8% 时，胶体金溶液的颜色鲜红，没有聚沉现象产生，因此 1 mL 胶体金溶液中 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 溶液的最适添加量（体积分数）为 0.8%。

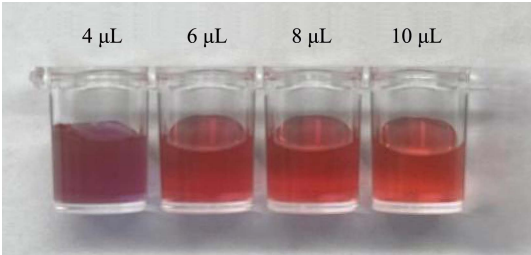


图 6 不同 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 溶液添加量（体积分数）的胶体金探针颜色

Fig.6 Probe color with different 0.1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ solution addition amount

2.2.2 抗体标记质量浓度的优化

抗体标记质量浓度的高低直接影响试影响试纸条的显色强度和灵敏度，因此在最适的 pH 值条件下，通过添加 2.5、5、10 μg·mL⁻¹ 抗体质量浓度来探究其对试纸条检测性能的影响，由表 1 和图 7 可知，随着抗体标记质量浓度的升高，试纸条阴性条件下的 T、C 线颜色随之加深，T/C 值呈现下降的趋势，而试纸条阳性条件下的 T 线颜色与 T/C 值在抗体标记质量浓度大于 5 μg·mL⁻¹ 后上升幅度增大，表明抗体标记质量浓度此时已经过量，试纸条的灵敏度开始下降。而当抗体标记质量浓度为 5 μg·mL⁻¹ 时，试纸条阴性时 T 线颜色 ≥ L6 且与阳性时显色梯度 ≥ 2.5，符合对胶体金的判读要求，因此选择 5 μg·mL⁻¹ 为最佳标记质量浓度。

表 1 四环素类抗体标记质量浓度优化结果

Table 1 Optimization of TCs antibody label mass concentration				
抗体标记质量 浓度/(μg·mL ⁻¹)	空白对照（稀释液）		四环素质量浓度/(5 μg·L ⁻¹)	
	T、C 线颜色	T/C 值	T、C 线颜色	T/C 值
2.5	L4, L2	2.52	L1, L2	0.38
5	L6, L3	2.22	L2, L5	0.30
10	L7（单边）， L4	2.13	L4, L4	1.02

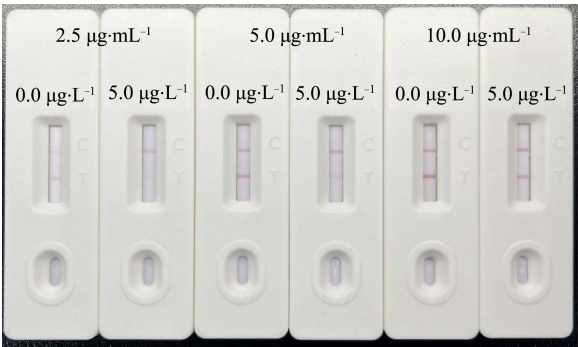


图 7 不同抗体标记质量浓度的胶体金试纸条检测结果

Fig.7 Experimental results of different TCs antibody label mass concentration on GICA

2.2.3 抗原包被质量浓度、羊抗鼠IgG包被质量浓度的优化

试纸条中 T 线上抗原的包被质量浓度以及羊抗鼠 IgG 的包被质量浓度，是影响试纸条结果判定准确性与灵敏度的两个关键因素。由表 2 和图 8 可知，试纸条阴性条件下的 T 线显色强度随着抗原包被质量浓度的升高而加深，当 T 线抗原包被质量浓度达到 0.4 mg·mL⁻¹ 时，T 线颜色出现了单边现象，表明 T 线抗原包被质量浓度已经过量。当 T 线抗原包被质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 时，T 线显色强度仅达到 L4，在 C 线羊抗鼠 IgG 包被质量浓度为 0.05 mg·mL⁻¹ 时 T、C 线显色梯度≤2，不利于结果的判定，而将 C 线羊抗鼠 IgG 包被质量浓度升高到 0.1 mg·mL⁻¹ 后出现了假阳现象。只有当 T 线抗原包被质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹，且 C 线羊抗鼠 IgG 包被质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 时，试纸条阴性和阳性条件下的 T、C 线之间显色梯度都≥2.5，能很好的对结果进行判读，读出的 T/C 值也

满足要求，因此 T 线抗原、C 线羊抗鼠 IgG 最佳包被质量浓度分别为 0.2 mg·mL⁻¹ 和 0.1 mg·mL⁻¹。

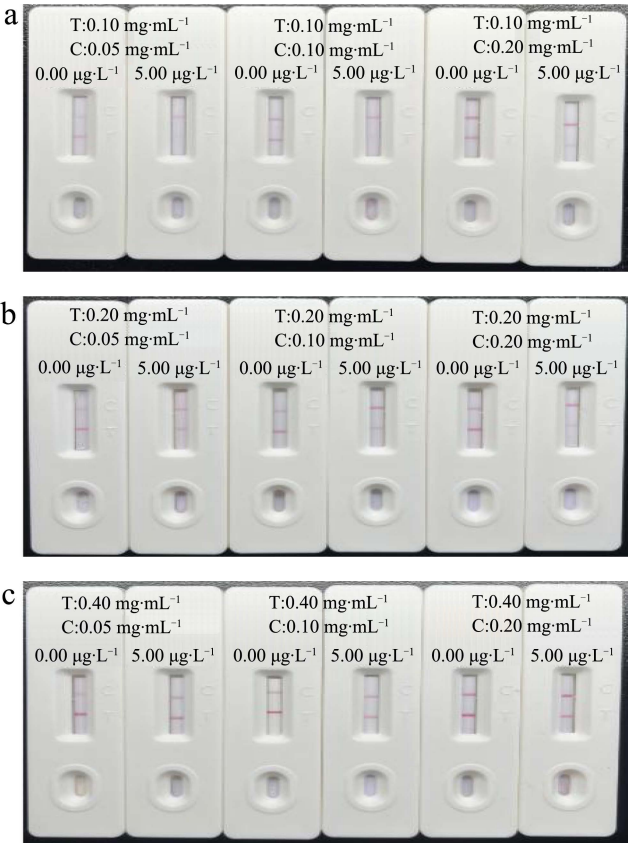


图 8 不同 T、C 线包被质量浓度的胶体金试纸条检测结果

Fig.8 Experimental results of different T、C-line coating mass concentration on GICA

注：(a) T : 0.1 mg·mL⁻¹、C : 0.05、0.1、0.2 mg·mL⁻¹；(b) T : 0.2 mg·mL⁻¹、C : 0.05、0.1、0.2 mg·mL⁻¹；(c) T : 0.4 mg·mL⁻¹、C : 0.05、0.1、0.2 mg·mL⁻¹。

表 2 T、C线包被质量浓度优化结果

Table 2 Optimization of T、C-line coating mass concentration					
T 线包被 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	C 线包被 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	空白对照（稀释液）		四环素质量浓度 (5 µg·L ⁻¹)	
		T、C 线颜色	T/C 值	T、C 线颜色	T/C 值
0.1	0.05	L4, L2	2.22	L1, L3	0.30
	0.1	L4, L4	0.90	L1, L4	0.19
	0.2	L4, L5	0.64	L1, L6	0.09
0.2	0.05	L6, L1	9.29	L2, L4	0.49
	0.1	L6, L3	2.22	L2, L5	0.30
	0.2	L6, L6	1.08	L2, L6	0.29
0.4	0.05	L7（单边），L1	13.56	L4, L3	1.74
	0.1	L7（单边），L3	3.80	L4, L4	1.00
	0.2	L7（单边），L5	1.69	L4, L5	0.81

2.3 试纸条性能评价

2.3.1 灵敏度

按照上述所优化的最优条件下，分别配置质量浓度为 2、5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的四环素、金霉素、土霉素和多西环素标准溶液进行试纸条灵敏度测试，由表 3 和图 9 可知，当四环素、金霉素、土霉素标准溶液质量浓度达到 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，试纸条结果为阳性，当多西环素标准溶液质量浓度达到 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，试纸条结果为阳性，因此，本研究所建立的方法对四环素类药物检测具有较高灵敏度，对四环素、金霉素、土霉素的检出限为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，对多西环素的检出限为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 3 不同质量浓度四环素类药物的试纸条检测结果
Table 3 Experimental results of different TCs standard solution on GICA

标准液质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	四环素	金霉素	土霉素	多西环素
0	—	—	—	—
2	—	—	—	—
5	+	+	+	—
10	+	+	+	+
20	+	+	+	+

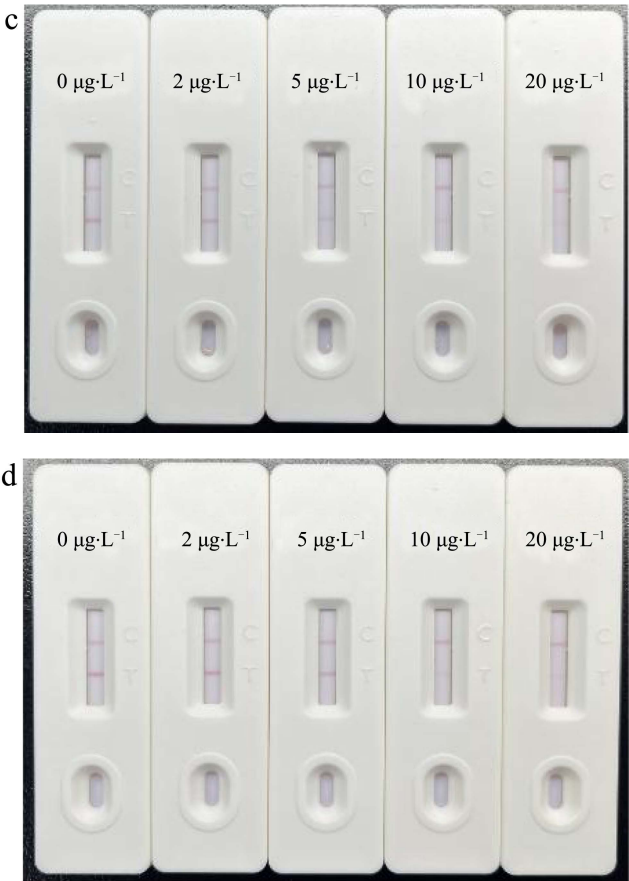
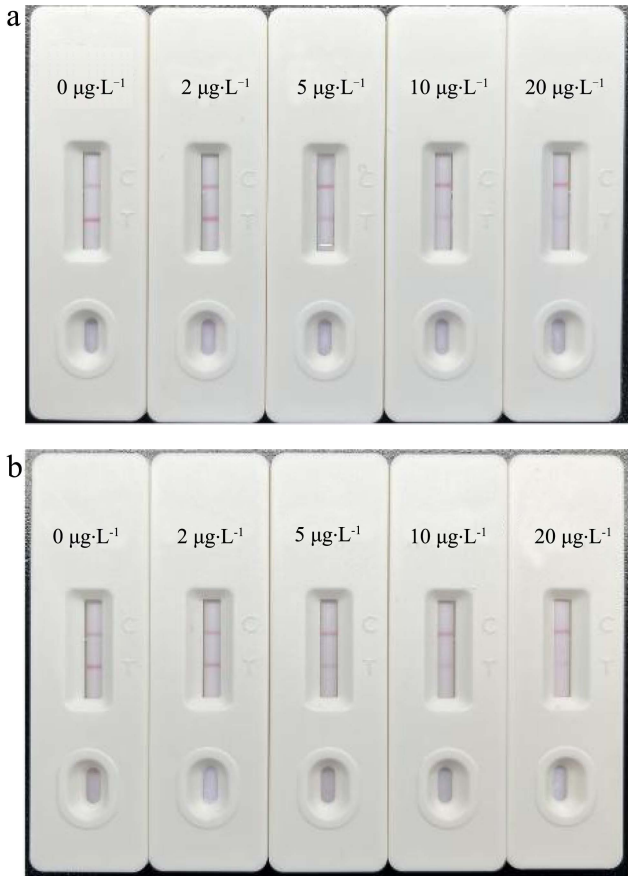


图 9 不同质量浓度四环素类药物的试纸条检测结果

Fig.9 Experimental results of different TCs standard solution

注：(a) 四环素，(b) 金霉素，(c) 土霉素，(d) 多西环素。

2.3.2 实际样品检测

由表 4 和表 5 可知，本研究所建立的方法在 7 种样本中的检测结果重复性好，当样本中的四环素、金霉素、土霉素质量浓度低于 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，多西环素质量浓度低于 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时，检测结果均为阴性；相反，当样本中四环素、金霉素、土霉素和多西环素的质量浓度分别达到或者超过上述阈值，则检测结果均为阳性。因此本研究所建立的方法对样本中四环素、金霉素、土霉素的检测限为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，对样本中多西环素检测限为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，相较于目前所报道的 GICA 方法，其在肉制品和水产品的检测灵敏度最低为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，本研究所建立的方法将检测灵敏度提升到了 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，显著提升了检测灵敏度。

市场上随机购买猪肉、鸡肉、鸭肉、草鱼、罗非、大头鱼和鲈鱼样品共 14 份，采用本研究建立的 GICA 方法和 LC-MS/MS 同时进行检测，对比快速检测和定量检测的结果。由表 6 可知，GICA 测试结果与 LC-MS/MS 的结果一致，表明本研究所建立的 GICA 方法

具有良好的准确性，能够应用于肉制品和水产品的实际样品的检测。

表 4 四环素、金霉素及土霉素梯度加标的试纸条检测
Table 4 Experimental results of TC、CTC、OTC grade spiked on GICA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

样品	0	5	20	40	80
鸡肉	-	-	+	+	+
猪肉	-	-	+	+	+
鸭肉	-	-	+	+	+
草鱼	-	-	+	+	+
罗非鱼	-	-	+	+	+
大头鱼	-	-	+	+	+
鲈鱼	-	-	+	+	+

表 5 多西环素梯度加标的试纸条定性检测结果
Table 5 Experimental results of DOTC grade spiked on GICA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

样品	0	5	20	40	80
鸡肉	-	-	-	+	+
猪肉	-	-	-	+	+
鸭肉	-	-	-	+	+
草鱼	-	-	-	+	+
罗非鱼	-	-	-	+	+
大头鱼	-	-	-	+	+
鲈鱼	-	-	-	+	+

表 6 试纸条与LC-MS/MS检测结果比较
Table 6 Comparison of GICA and LC-MS/MS detection results ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

样品	试纸条检测结果	LC-MS/MS 检测结果	样品	试纸条检测结果	LC-MS/MS 检测结果
鸡肉	-	ND	鸡肉	-	ND
猪肉	+	TC: 25.5	猪肉	-	ND
鸭肉	-	ND	鸭肉	-	ND
草鱼	-	ND	草鱼	+	CTC:22.9
罗非鱼	-	ND	罗非鱼	-	ND
大头鱼	-	ND	大头鱼	-	ND
鲈鱼	-	ND	鲈鱼	-	ND

2.3.3 稳定性

为了验证试纸条的稳定性，在 45 ℃干燥箱的条件下对试纸条进行 60 d 的加速老化实验，由表 7 可知，在经过不同时间的加速老化实验，试纸条的显色以及灵敏度无明显变化，稳定性良好。

表 7 稳定性检测结果

Table 7 Stability results ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
时间/d	0	2	5	10
0	-	-	+	+
5	-	-	+	+
10	-	-	+	+
20	-	-	+	+
30	-	-	+	+
40	-	-	+	+
50	-	-	+	+
60	-	-	+	+

2.3.4 不同分析方法性能比较

目前各种文献报道的应用于食品中 TCs 残留检测的不同方法如表 8 所示。由表 8 可知，Moreno 等^[18]建立的盐析辅助液液萃取（SALLE）- 超高效液相色谱 / 串联质谱（UPLC-MS/MS）方法对肉类样品中 TCs 检出限为 0.09~ 0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，Fatma 等^[19]建立的高效液相色谱 / 二极管阵列检测器（HPLC/DAD）方法对鸡肉样品中 TCs 检出限为 0.6~2.7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，大型仪器分析方法拥有较高的灵敏度和良好的准确性，但昂贵的仪器和耗时长的检测时间限制了在现场快速检测中的应用。而在目前所报道的快速、便捷的免疫层析法方法中，对于水样的检测灵敏度较好，但由于水产品 and 肉制品样品基质的干扰，导致检测灵敏度有所下降，实际样品检测灵敏度均为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，只在水产品中实现了针对 TCs 的广谱性检测，还缺乏针对 DC 这一特定四环素类抗生素的检测能力。为了进一步提高检测灵敏度，Li 等^[21]采用发光镧系元素金属框架作为探针构建免疫层析试纸条，但由于水产品 and 肉制品样品基质干扰，无法应用于食品实际样品检测，只适用于水样的检测，检出限为 1.95~2.77 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究所构建的免疫层析法方法，提升了检测灵敏度，并且在水产品和肉制品实际样品中实现了 TC、CTC、OTC 和 DC 的广谱检测，检测限为 20~ 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，检测时间只需 15 min，能够满足水产品 and 肉制品的实际样品中四环素类抗生素残留的大批量快速筛选。

表 8 不同分析方法性能比较

Table 8 Comparation of different measurement methods for TCs detection

分析方法	样品	检测对象	检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	检测时长/min	参考文献
SALLE-UPLC-MS/MS	肉制品	TC	0.09~0.14	>60	[18]
HPLC/DAD	鸡肉	TC、OTC、CTC	0.6~2.7	>60	[19]
铜系元素 MOF 试纸条	水	TC、OTC	1.95~2.77 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	30	[21]
GICA	肉制品、水产品	TC	80	30	[26]
GICA	水产品	TC、CTC、OTC	80	30	[29]
GICA	肉制品、水产品	TC、CTC、OTC、DC	20~40	15	本研究

3 结论

本研究根据四环素类抗生素共同的结构特点设计合成了半抗原，保留了其共同的基本母核（氢化骈四苯），制备了四环素类抗生素的广谱单克隆抗体，所制备的广谱单克隆抗体对四环素、金霉素、土霉素、多西环素的半数抑制浓度（IC₅₀）值分别为 1.29、1.04、1.34、2.33 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。基于所制备的广谱单克隆抗体，建立了一种快速检测动物性食品中四环素类抗生素的胶体金免疫层析法，该方法对四环素、金霉素、土霉素检测限为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，对多西环素检测限为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，检测时间约 15 min，具有灵敏、准确、快速等特点，可应用于鸡肉、猪肉、草鱼等食品中四环素类抗生素残留的大批量快速筛选，为动物性食品中四环素类抗生素残留的快速检测提供了一种有效手段。同时也将关注新型四环素类抗生素的应用，不断更新和优化广谱单克隆抗体的制备，应对日益复杂的食品安全挑战，以实现更高效、更准确的四环素类抗生素残留检测。

参考文献

[1] RUSU A, BUTA E L. The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives [J]. *Pharmaceutics*, 2021,13(12): 2085.

[2] KOUNATIDISOUNATIDIS D, DALAMAGA M, GRIVAKOU E, et al. Third-generation tetracyclines: current knowledge and therapeutic potential [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(7): 783.

[3] 高家政,尹营,霍思宇,等.牛奶中四环素类药物残留检测技术研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2024,8:19-25.

[4] Fuoco D. Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs [J]. *Antibiotics*, 2012, 1(1): 1-13.

[5] ZHUANG M, Yigal Achmon, CAO Y, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 285: 117402.

[6] GROSSMAN T H. Tetracycline antibiotics and resistance [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6(4): a025387.

[7] KENYON C, MANOHARAN-BASIL S S. Cultural drivers of antibiotic consumption in high-income countries: A global ecological analysis [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2020, 26(9): 1063-1070.

[8] 赵琪,李霆,姜子楠,等.2019年我国兽用抗菌药物使用情况分析研究[J].中国兽药杂志,2022,56(1):71-76.

[9] ROBLES AGUILAR G, ALTAY U, GIANNAKIS K, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: A systematic analysis with forecasts to 2050 [J]. *The Lancet*, 2024, 404(10459): 1199-1226.

[10] SCARIA J, ANUPAMA K V, NIDHEESH P V. Tetracyclines in the environment: An overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 771: 145291.

[11] CHEN X, YANG Y, KE Y, et al. A comprehensive review on biodegradation of tetracyclines: Current research progress and prospect [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 814: 152852.

[12] 程兆康,杨金山,吕敏,等.我国畜禽养殖业抗生素的使用特征及其环境与健康风险[J].农业资源与环境学报,2022,39(6):1253-1262.

[13] WARNER A J, HATHAWAY-SCHRADER J D, LUBKER R, et al. Tetracyclines and bone: Unclear actions with potentially lasting effects [J]. *Bone*, 2022, 159: 116377.

[14] HALLING-SORENSEN B, SENGELOV G, TJORNELUND J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected Tetracycline-resistant bacteria [J]. *Archives of Environmental Contamination and Ttoxicology*, 2002, 42(3): 263-271.

[15] LEICHTWEIS J, VIEIRA Y, WELTER N, et al. A review of the occurrence, disposal, determination, toxicity and remediation technologies of the tetracycline antibiotic [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 160: 25-40.

[16] 苏霞,王绪根,李云,等.畜禽产品中四环素类抗生素残留检测方法研究进展[J].今日畜牧兽医,2022,38(7):8-9.

[17] AALIPOUR F, MIRLOHI M, JALALI M, et al. Dietary exposure to tetracycline residues through milk consumption in Iran [J]. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2015,13(1): 80.

[18] MORENO-GONZÁLEZ D, GARCÍA-CAMPAÑA A M. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods [J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1763-1769.

[19] FATMA DOYUK, KENAN DOST. Simultaneous determination of six antibiotics belonging to four different classes in chicken meat by HPLC/DAD and verification by LC-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2023, 426: 136549.

- [20] MORENO-GONZÁLEZ D, HAMED A M, GILBERT-LÓPEZ B, et al. Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1510: 100-107.
- [21] LI C, ZENG C, CHEN Z, et al. Luminescent lanthanide metal-organic framework test strip for immediate detection of tetracycline antibiotics in water [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121498.
- [22] ZHANG L, WANG Y, JIA L, et al. Ultrasensitive and visual detection of tetracycline based on dual-recognition units constructed multicolor fluorescent nano-probe [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 409: 124935.
- [23] TICKNER Z J, ZHONG G, SHEPTACK K R, et al. Selection of high-affinity RNA aptamers that distinguish between doxycycline and tetracycline [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(37): 3473-3486.
- [24] 甄建辉,孙鹏远,巩文雯,等.核酸适配体生物传感器应用于食品抗生素残留检测的研究进展[J].*食品安全质量检测学报*,2021, 12(14):5577-5585.
- [25] 吴玉晗,陈伟.侧向免疫层析快速检测牛乳中四环素和青霉素[J].*食品科学*,2020,41(24):281-286.
- [26] 高楠.四环素免疫层析试纸条检测方法的研究[D].天津:天津科技大学,2014.
- [27] TARANOVA N A, KRUHLIK A S, ZVEREVA E A, et al. Highly sensitive immunochromatographic identification of tetracycline antibiotics in milk [J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 2015: 1-10.
- [28] 檀尊社,陆恒,邵伟,等.胶体金免疫层析法快速检测水产品中四环素类药物残留[J].*西北农业学报*,2010,19(8):32-37.
- [29] 郭然.水产品中四环素类药物胶体金免疫层析试纸条的研制[D].厦门:集美大学,2015.
- [30] CVAK B, PUM D, MOLINELLI A, et al. Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices [J]. *Analyst*, 2012, 137(8): 1882-1887.