

三聚氰胺免疫亲和柱的制备和测试

徐丽广, 刘丽强, 匡华, 彭池方, 宋珊珊, 欧阳华, 胥传来

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 制备高容量的三聚氰胺免疫亲和层析柱, 以识别三聚氰胺的单克隆抗体为配体, 采用硅烷化方法, 对抗体进行包埋, 装填小柱。采用三聚氰胺系列标准溶液进行富集试验, 通过紫外光谱 (三聚氰胺最大紫外吸收波长 240 nm) 和液相色谱-质谱测试流出液和洗脱液中三聚氰胺的浓度, 确定了免疫亲和柱的柱容量为 16.47 μg 。试验中对亲和小柱的润洗溶液、上样溶液、洗脱溶液和再生溶液进行了优化, 结果表明, 该免疫亲和层析柱的富集效率可达 66 倍。以回收率高于 60% 计, 该柱的再生次数至少为 5 次。

关键词: 三聚氰胺; 免疫亲和层析柱; 抗体; 富集

中图分类号: TS 207.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)07—0749—05

Preparation and Evaluation of Melamine Immunoaffinity Column

XU Li-guang, LIU Li-qiang, KUANG Hua, PENG Chi-fang,
SONG Shan-shan, OUYANG Hua, XU Chuan-lai

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

Abstract: An immunoaffinity column (IAC) for melamine with high column capacity was prepared in this study. Based on a monoclonal antibody against melamine, a silanization approach was used to coat antibody as ligands. The resulting products were packed in columns. Series concentration of melamine was loaded on the columns to evaluate column's performances. UV spectrum and liquid chromatography tandem mass spectrum (LC-MS) were used to test the melamine level of eluents from columns. The mean load capacity of the prepared columns was 16.47 μg per column. Under the optimized conditions (washing condition, loading buffer, eluent condition and regeneration buffer), the proposed IAC has a condensation coefficient of 66 folds and it could be used over 5 times with the recovery higher than 60%.

Keywords: melamine, immunoaffinity column, antibody, condensation

2008 年的“三鹿”奶粉事件导致 30 多万婴儿住院, 是我国近年来出现的最严重的食品安全事件, 严重损害了我国食品制造的国际声誉, 给我国乳制

品产业造成了前所未有的重大损失^[1-3]。不法分子利用传统凯氏定氮检测方法的漏洞, 在生乳中添加工业原料三聚氰胺来获得较高的“表观蛋白质”水平,

收稿日期: 2013-03-27

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210036, 201310135)。

通讯作者: 徐丽广(1984—), 男, 山东济宁人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品安全研究。E-mail: xuliuguang2006@126.com

导致劣质有害奶粉的大量生产^[4]。三聚氰胺已被证实可引起婴儿肾结石,各个国家和政府组织均制订了乳制品中该物质的最大残留限量。我国规定,乳制品中三聚氰胺的质量分数不得高于 2.5 mg/kg,婴幼儿乳品中的最大质量分数不得高于 1 mg/kg。相应地,我国出台了三聚氰胺的标准检测方法(GB/T 22388)。目前报道的检测方法也多基于色谱和质谱的检测方法。这些方法需要复杂的前处理,从提取到净化耗费大量的有机溶剂和固相萃取小柱^[5-9]。

快速高效的样品前处理技术可以大大简化和加快检测流程。免疫亲和层析柱,是基于抗体或抗原大分子的绿色前处理手段,可以集提取和净化于一身,无需大量有毒有害溶剂,而且可以多次重复使用,因而越来越受到分析人员的青睐^[10-13]。作者以三聚氰胺单克隆抗体做为识别体,装填了具有高柱容量的亲和层析小柱。目前对于三聚氰胺分离富集免疫层析小柱的报道尚未看到,将为食品中三聚氰胺的检测提供了新的前处理手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三聚氰胺抗体,作者所在实验室自制,半数抑制率(IC_{50})为 6 ng/g,与三聚氰胺亲和常数为 2.67×10^9 L/mol,与除了与灭蝇胺的交叉反应为 132%外,与其他三聚氰胺类似物无交叉反应。四甲氧基硅烷(TMOS)和 PEG400:购自 Sigma(上海)贸易有限公司;三聚氰胺及其他试剂:购自中国医药集团上海化学试剂总公司。

1.2 仪器与设备

电子天平 AB104-N 型:购自上海 Mettler Toledo Group;精密酸度计 PHS-3TC 型:购自上海天达仪器有限公司;紫外扫描仪 U-3000 型:购自日本岛津公司;可见分光光度计 722 型:购自上海分析仪器厂;高效液相色谱-质谱联用仪(LC/MS) LCQDECA 型:美国非尼根公司产品;WH-2 微型旋涡混合仪和 HPD-25D 真空泵:购自上海沪西分析仪器厂;可调式移液器:购自美国热电公司。

1.3 溶液配制

磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)配制参考文献方法^[14]。淋洗液为含质量分数 0.05% Tween-20 的 0.02 mol/L PBS 溶液;上样溶液为含体积分数 10% 甲醇的 0.02 mol/L PBS 溶液;洗脱溶液为含有体

积分数 50% 甲醇的 0.01 mol/L pH 3.5 甘氨酸-盐酸溶液(称取甘氨酸 7.5 g,加入 12 mol/L HCl 10 mL,甲醇 500 mL,纯水定容至 1 000 mL)。再生液为含质量分数 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L 的 PBS 溶液。

三聚氰胺标准溶液配制:称量 0.1 g 的三聚氰胺药品,用磷酸盐缓冲液溶解定容至 1 000 mL,即为 100 μ g/mL 的标准溶液。用上样缓冲液将 100 g/mL 的标准溶液分别稀释配成质量浓度为 50、25、10、5、2.5、1 μ g/mL,500、250、100、50、25、10、5、2.5、1、0 ng/mL。每个质量浓度配成 100 mL,置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 IAC 柱制备

量取抗体溶液,用 PBS(0.01 mol/L pH 7.4)缓冲液稀释至 1 mg/mL,4 $^{\circ}$ C 保存备用。取 0.2 mL HCl(0.04 mol/L),0.75 mL 去离子水,0.2 mL PEG400 和 3.4 mL TMOS 混匀,在 4 $^{\circ}$ C 放置 2~3 min 预冷却。然后将其放入冰水中,超声混匀 30 min,量取该溶液,按照体积比 1:2 的比例将其加入预冷的抗体溶液中,期间缓慢搅拌,待凝胶形成后,称取容器质量,将凝胶置于 37 $^{\circ}$ C 恒温烘箱凝胶老化。待凝胶失去初重的 50% 时,老化过程结束。将老化后的凝胶(约 1 g)研磨碎,能过 30~40 目筛即可,然后进行装柱。每个柱中装填体积为 1 mL;待柱中凝胶沉积稳定后,用 5 mL PBS 预淋洗,洗去未包埋的抗体 IgG 和其他干扰杂质,最后用 5 mL PBS 平衡。制备好的 IAC 柱中保留 1 mL 的 PBS 溶液,加上塞子和盖子,在 4 $^{\circ}$ C 环境中保存备用,长期保存需加质量分数 0.02% 叠氮化钠作为防腐剂。

1.5 IAC 柱的评价

1.5.1 柱容量测试 取制备好的亲和层析小柱,回复至室温后,取下柱子上下端的塞子,将柱子与真空泵连接,调节流速,使柱子里面的液体以 2 d/s 的速度流出(流量不大于 1 mL/min)。待液体排干后,将 10 mL 10 μ g/mL 处理后的三聚氰胺溶液(溶解于上样缓冲液中)上样,流量同上。收集流出液,测定 $A_{240\text{nm}}$ 值。待液体排干后,分别用 10 mL 0.01 mol/L pH 7.4 PBST,10 mL 纯水淋洗小柱,流速同上。分别收集淋洗液,并测定 $A_{240\text{nm}}$ 值。然后,加洗脱液 2 mL 到小柱中,调节流量 1 d/s(不超过 0.5 mL/min),收集洗脱液,测定 $A_{240\text{nm}}$ 值。分别用 10 mL 0.01 mol/L pH 7.4 PBST,10 mL 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 清洗再生小柱,收集所有滤液,测定 $A_{240\text{nm}}$ 值。漓干后,将

柱子下端用塞子密封,然后加入 3 mL 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 平衡保存液,上端用塞子密封,置于 4 °C 保存。

1.5.2 三聚氰胺紫外吸收标准曲线建立 采用紫外光谱仪,测定配制的三聚氰胺标准溶液,在 240 nm 下的光密度值(OD),以标准品的浓度为横坐标,不同标准品的 $A_{240\text{ nm}}$ 值为纵坐标,建立三聚氰胺微克级($\mu\text{g/mL}$)标准曲线。采用液相色谱质谱,以三聚氰胺的质量浓度为横坐标,以三聚氰胺峰面积为纵坐标,建立纳克级(ng/mL)标准曲线。根据建立的标准曲线,分别计算柱容量测试中收集的滤液中三聚氰胺的质量浓度。

1.5.3 三聚氰胺小柱回收率测试 分别上样 1、10、100、1 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的三聚氰胺溶液 10 mL。按照上述方法操作小柱,收集洗脱液,分别采用紫外光谱仪和液相色谱质谱进行测定洗脱溶液,根据相应的紫外吸收标准曲线和计算洗脱液中三聚氰胺的含量,计算回收率(公式如下所示)。

$$\text{回收率} = \frac{V_2 \cdot C_2}{V_1 \cdot C_1} \times 100\%$$

其中 V_1 为上样体积 (mL); C_1 为上样质量浓度 (ng/mL); V_2 为洗脱液体积 (mL); C_2 为洗脱液质量浓度 (ng/mL)

1.5.4 三聚氰胺小柱富集系数测试 上样 10 ng/mL 浓度水平的三聚氰胺溶液 100 mL; 用 0.5 mL 的洗脱液洗脱 4 次,分别进行洗脱液接收,然后测定每管洗脱液的 $A_{240\text{ nm}}$,根据紫外吸收标准曲线计算三聚氰胺的含量。计算当回收率大于 70% 时,所需要的洗脱液总体积。

$$\text{富集系数} = \frac{V_1}{V_2}$$

其中: V_1 : 上样体积(mL); V_2 : 洗脱液体积(mL)

1.5.5 三聚氰胺小柱再生次数测试 选取 3 支小柱,采用 500 ng/mL 质量浓度的三聚氰胺溶液 3 mL 上样测试,收集洗脱液,测定洗脱液的 $A_{240\text{ nm}}$,根据紫外吸收标准曲线计算三聚氰胺的含量。测定小柱的平均回收率。每天测试一次,连续测试 12 d。

2 结果与分析

2.1 三聚氰胺标准曲线

2.1.1 微克级标准曲线确定 用紫外扫描仪测得微克级标准溶液(1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)的 $A_{240\text{ nm}}$ 值,建立标准曲线,如图 1 所示。 $y=0.0145x +$

0.0232 , 线性度(R^2)为 0.9979,其中 x 为三聚氰胺的质量浓度, y 为溶液的 $A_{240\text{ nm}}$ 值。

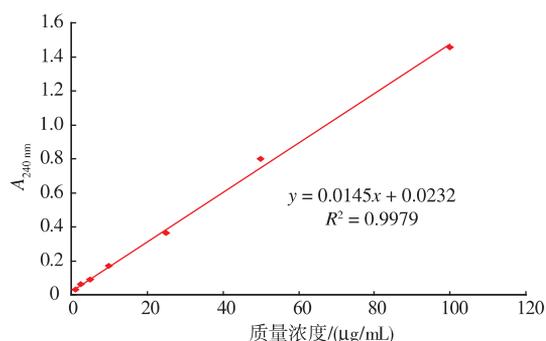


图 1 三聚氰胺微克级标准曲线

Fig. 1 Standard curve of melamine

2.1.2 纳克级标准曲线的确定 利用液相质谱测得 ng 级三聚氰胺标准溶液的浓度(10, 25, 50, 100, 250, 500 ng/mL)的质谱图,方法参考国家标准 GB/T 22388,谱突如图 2 所示。

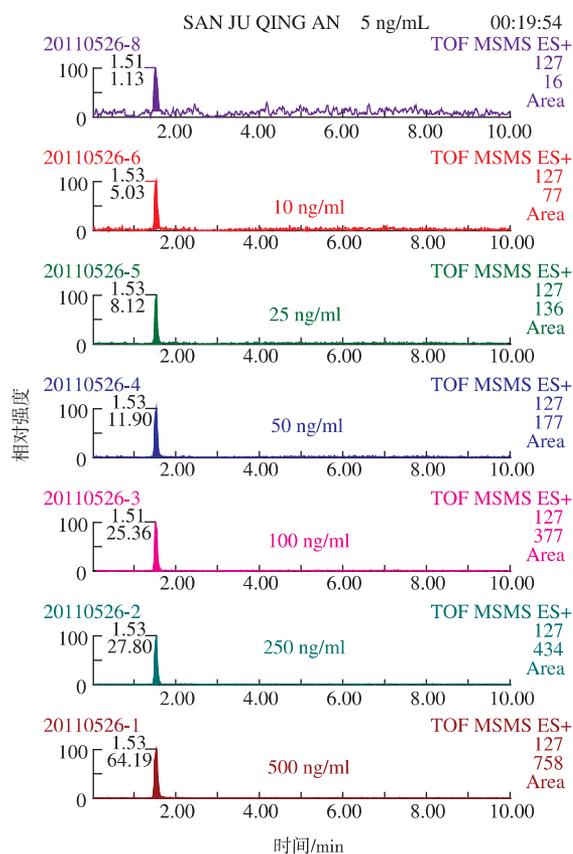


图 2 纳克级标准溶液液相色谱-质谱图

Fig. 2 LC-MS spectrum for melamine detection

以标准品的质量浓度为横坐标,不同质量浓度标准品的面积为纵坐标,绘制出三聚氰胺的标准曲线如图3所示:标准曲线方程为 $y=0.1154x+4.1316$,线性度(R^2)为0.9842;其中 x 为质量浓度, y 为质谱峰相对峰面积。

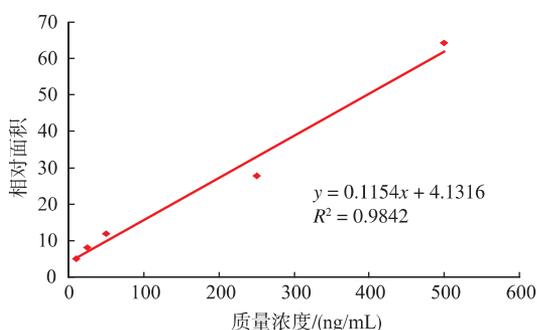


图3 三聚氰胺纳克级标准曲线
Fig. 3 Standard curve of melamine

2.2 免疫亲和柱的柱容量

柱容量测试中,上样溶液滤液收集体积 10 mL,淋洗液收集体积 10 mL,收集洗脱液 2 mL,洗涤液和再生溶液体积 20 mL,根据滤液的吸光度值,采用标准曲线方程,计算各个滤液中三聚氰胺的质量浓度,将各含量用下面公式计算出柱容量:柱容量=洗脱液体积×洗脱液;计算得到柱容量为 16.47 μg 。

2.3 回收率

将 1, 10 ng/mL, 100 ng/mL 的上样质量浓度的三聚氰胺洗脱液进行色谱-质谱测试,根据峰面积采用 ng 级标准曲线 $y=0.1154x+4.1316$,测定得出三聚氰胺质量浓度,根据回收率公式计算出回收率。将 1 $\mu\text{g/mL}$ 质量水平的洗脱液,测定出 $A_{240\text{nm}}$ 值,根据三聚氰胺紫外吸收标准曲线计算三聚氰胺浓度,根据回收率公式计算出回收率如表 1 所示。

表1 不同质量浓度三聚氰胺样品的回收率

Table 1 Recovery of melamine in different concentrations

样品质量浓度/(ng/mL)	回收率/%
1	82.03
10	75.02
100	74.48
1 000	74.20

2.4 富集系数

分别测定了 4 份洗脱液在 240 nm 下的紫外吸收值,结果如下表 2 所示,根据标准曲线 $y=0.0145x+0.0232$ 计算出三聚氰胺的质量浓度水平,并计

算出回收率。从表 2 可知,当使用 1.5 mL 洗脱液时,回收率即可达到 70.34%,当使用 2.0 mL 洗脱液时,回收率达到 80%以上,根据富集系数计算公式,得出富集系数为 66。在免疫亲和柱的使用过程中,研究发现适当控制滤液流速,可以保证包埋抗体对目标物质的捕获,流量控制在 1 mL/min 以下较好。

表2 洗脱液中三聚氰胺质量浓度测定和回收率结果

Table 2 Results of melamine level and recovery in eluent solutions

洗脱次数	洗脱总体积/mL	洗脱液质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%
第一次	0.5	0.54	26.90
第二次	1.0	0.61	60.70
第三次	1.5	0.47	70.34
第四次	2.0	0.42	87.65

2.5 再生次数

测定结果见表 3。在本试验中,小柱的测试是每天使用一次,当小柱累计使用次数为 5 时,IAC 小柱的回收率为 63%,当累计使用次数为 4 时,回收率均高于 70%。使用次数为 8 时,回收率均高于 40%,之后再重复使用,小柱的回收率则大幅下降,10 次使用后则下降至 12%左右。由于抗体属于生物大分子,容易受到离子浓度、溶液 pH 及有机溶剂的破坏,通过再生缓冲液的使用,延长了小柱的使用寿命。

表3 IAC 小柱重复使用次数测定

Table 3 Detection for possible reuse of IAC columns

使用次数	$A_{240\text{nm}}$	洗脱液质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%
1	0.041	1.228	81.84
2	0.041	1.228	81.84
3	0.040	1.158	77.20
4	0.039	1.090	72.64
5	0.037	0.952	63.44
6	0.036	0.883	58.85
7	0.033	0.676	45.05
8	0.032	0.607	40.46
9	0.030	0.469	31.26
10	0.029	0.400	26.67
11	0.026	0.193	12.87
12	0.026	0.193	12.87

3 结 语

采用硅烷化包埋的方法制备了三聚氰胺的免疫亲和层析柱,并对三聚氰胺免疫亲和小柱的使用性能进行了测定,小柱的柱容量为16.47 μg/柱,富集系数为66,小柱连续使用12次后,发现,使用5次后小

柱的平均回收率仍然在60%以上,使用4次后平均回收率在70%以上。试验中采用淋洗液减少了潜在的非特异性吸附效应。免疫亲和小柱在样本处理时具有高度特异性,且可重复使用以及其在使用过程中不涉及大量有毒有害溶剂的使用,有望成为样本前处理手段的发展方向。

参考文献:

- [1] 李书国,陈辉,李雪梅. 我国食品安全问题的现状与对策[J]. 中国食物与营养,2002(6):28-32.
LI Shu-guo, CHEN Hui, LI Xue-mei, Current status and strategy of Chinese food safety[J]. **Food and Nutrition in China**, 2002(6):28-32. (in Chinese)
- [2] 郭家宏. 欧盟食品安全政策述评[J]. 欧洲研究,2004(2):111-121.
GUO Jia-hong. Comments on European politics of food safety[J]. **Chinese Journal of European Studies**, 2004(2):111-121. (in Chinese)
- [3] 迟玉聚,盛宏高,范六一. 国内外食品安全形势[J]. 中国食物与营养,2004(6):11-12.
CHI Yu-ju, SHENG Hong-gao, FAN Liu-yi. Food safety status at home and abroad [J]. **Food and Nutrition in China**, 2004(6):11-12. (in Chinese)
- [4] 柴玮杰,王明秋,赵博,等. 三聚氰胺安全性毒理学评价[J]. 医学动物防治,2010,35(13):1003-6245.
CHAI Wei-jie, WANG Ming-qiu, ZHAO Bo, et al. Toxicological assessment of melamine [J]. **Journal of Medical Pest Control**, 2010,35(13):1003-6245. (in Chinese)
- [5] Margit Cichna, Peter Markl, Dietmar Kno, et al. Optimization of the selectivity of pyrene immunoaffinity columns prepared by the Sol-Gel method[J]. **Chemical Material**, 1997,9(11),2640-2646.
- [6] Horie Masakazu, Kobayashi Harumi, Ishii Rie. Sensitive microbiological assay of residual antibacterials in meat by microbiological method[J]. **Japan Analyst**, 2007,56(12):1097-1103.
- [7] Daniel G, Mascher, Christian P. Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC-MS/MS [J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2007,43:691-700.
- [8] Yong Jin, Jang Jin-Wook, Han, Chang-Hoon. Development of immunoassay for the detection of kanamycin in veterinary fields[J]. **Journal of Veterinary Science**, 2006,7(2):111-117.
- [9] 马良,李培武,张文,等. 花生及其制品中黄曲霉毒素B1免疫亲和柱净化-荧光快速检测技术 [J]. 中国油料作物学报,2007,29(2):93-97.
MA Liang, LI Pei-wu, ZHANG Wen, et al. Study on the fluorescence fast detection of aflatoxin B1 in peanut and related products purified by immuno-affinity column[J]. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, 2007,29(2):93-97. (in Chinese)
- [10] 王伟,葛宝坤,苏毅,等. 免疫亲和柱净化、高效液相色谱法结合荧光检测器检测进出口芝麻中的黄曲霉毒素B1[J]. 口岸卫生控制,2007,12(1):20-21.
WANG Wei, GE Bao-kun, SU Yi, LIU Yang, et al. Immunoaffinity chromatography together with the HPLC to test aflatoxin B1 among imported sesame[J]. **Port Health Control**, 2007,12(1):20-21. (in Chinese)
- [11] 乔好,赵丽杰,张岩,等. 氯霉素免疫亲和柱的制备及在牛奶中痕量氯霉素残留分析的应用[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):141-145.
QIAO Hao, ZHAO Li-jie, ZHANG Yan, et al. Preparation of immunoaffinity column of chloramphenicol for trace analysis of chloramphenicol in milk[J]. **Food Research and Development**, 2008,29(4):141-145. (in Chinese)
- [12] 曹旭,王智亮,李智瑾. 免疫亲和柱净化高效液相色谱法测定饲料中黄曲霉毒素[J]. 饲料工业 2007(28):52-54.
CAO Xu, WANG Zhi-liang, LI Zhi-jin. Determination of aflatoxin in feed by immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography[J]. **Feed Industry**, 2007(28):52-54. (in Chinese)
- [13] 孙林超,黄亚东. 免疫亲和柱-HPLC在食醋AFB1含量测定中的应用研究[J]. 中国酿造,2008(20):81-83.
SUN Lin-chao, HUANG Ya-dong. Studies on the application of immunoaffinity column-HPLC in detection of aflatoxin B1 in vinegar[J]. **China Brewing**, 2008(20):81-83. (in Chinese)
- [14] 甘金华,邓薇,李进平,等. 强力霉素人工抗原的合成和抗体的制备[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(2):316-320.
GAN Jin-hua, DENG Wei, LI Jin-pin, et al. Artificial antigen synthesis and antibody preparation of doxycycline [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011,30(2):316-320. (in Chinese)