

# 基于桥接DNA的实时荧光定量PCR高灵敏检测沙丁胺醇

赵领娣<sup>1,2</sup>, 孙铁强<sup>2</sup>, 刘文涛<sup>2</sup>, 贺鸿伟<sup>2</sup>, 董博伟<sup>2</sup>, 张迎春<sup>2</sup>, 秦天悦<sup>2</sup>, 宁保安<sup>2</sup>,  
李双<sup>2</sup>, 彭媛<sup>2</sup>, 韩殿鹏<sup>2</sup>, 崔建升<sup>1,\*</sup>, 高志贤<sup>2,\*</sup>

(1. 河北科技大学 环境科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 军事科学院 军事医学研究院 环境医学与作业医学研究所, 天津 300050)

**摘要:** 建立一种基于免疫磁珠、桥接 DNA 与实时荧光定量聚合酶链式反应技术(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)相结合的高灵敏、特异性检测沙丁胺醇(salbutamol, SAL)的方法, 通过抗体特异性识别两个邻位连接探针, 在桥接 DNA 的桥接作用下将两个邻位探针连接形成长扩增子, 以此为模板进行 qPCR 实现信号放大。结果表明, 方法检测 SAL 的线性范围为  $1.0 \times 10^{-2}$  ng/mL~ $1.0 \times 10^3$  ng/mL, 检出限为  $1.2 \times 10^{-2}$  ng/mL, 测定自来水及人工尿液样品中 SAL 的加标回收率在 87.1%~111.7%之间。通过免疫磁珠提高检测的效率, 通过桥联 DNA 提高特异性, 通过变温扩增提高检测方法的灵敏度以及适用性, 搭建高特异性、通用的检测平台, 实现对沙丁胺醇的高灵敏检测。

**关键词:** 沙丁胺醇; 桥接DNA; 实时荧光定量聚合酶链式反应技术; 免疫磁珠; 邻位连接技术

## Highly Sensitive Detection of Salbutamol Based on Bridged DNA-based Real-time Fluorescent Quantitative PCR

ZHAO Ling-di<sup>1,2</sup>, SUN Tie-qiang<sup>2</sup>, LIU Wen-tao<sup>2</sup>, HE Hong-wei<sup>2</sup>, DONG Bo-wei<sup>2</sup>,  
ZHANG Ying-chun<sup>2</sup>, QIN Tian-yue<sup>2</sup>, NING Bao-an<sup>2</sup>, LI Shuang<sup>2</sup>, PENG Yuan<sup>2</sup>,  
HAN Dian-peng<sup>2</sup>, CUI Jian-sheng<sup>1,\*</sup>, GAO Zhi-xian<sup>2,\*</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science & Technology, Shijiazhuang 050018, Hebei, China; 2. Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Tianjin 300050, China)

**Abstract:** A highly sensitive and specific method for the detection of salbutamol (SAL) based on immunomagnetic beads, bridged DNA and real-time quantitative PCR (qPCR) was established. Two proximity ligation assay probes were specifically identified by antibodies. Under the bridged DNA, two proximity ligation assay probes were ligated to form a full-length amplicon, and the products of the ligation reaction were quantified by using a quantitative real-time polymerase chain reaction. The results showed that the linear range of SAL detected by this method was  $1.0 \times 10^{-2}$  ng/mL~ $1.0 \times 10^3$  ng/mL, the detection limit was  $1.2 \times 10^{-2}$  ng/mL, and the spiked recovery of SAL in tap water and artificial urine samples was determined. The recovery rate was between 87.1% and 111.7%. The efficiency of detection was improved by immunomagnetic beads, the specificity of the bridged DNA was increased and the sensitivity and applicability of the detection method were improved by constant temperature amplification. A highly specific and universal detection platform was constructed to realize highly sensitive detection of salbutamol.

基金项目: 国家重点研究发展计划(2017YFC1200903、2018YFC1602903); 国家自然科学基金(81773482、81703229); 天津市科技计划项目(18YFZCNC01260)

作者简介: 赵领娣(1994—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 环境安全检测及相关工作。

\* 通信作者: 高志贤(1963—), 男(汉), 研究员, 博士生导师; 崔建升(1966—), 男(汉), 教授, 硕士生导师。

**Key words:** salbutamol; bridged DNA; real-time PCR; immunomagnetic beads; proximity ligation assay  
proximity ligation assay

引文格式:

赵领娣,孙铁强,刘文涛,等.基于桥接DNA的实时荧光定量PCR高灵敏检测沙丁胺醇[J].食品研究与开发,2020,41(14):158-163

ZHAO Lingdi, SUN Tieqiang, LIU Wentao, et al. Highly Sensitive Detection of Salbutamol Based on Bridged DNA-based Real-time Fluorescent Quantitative PCR[J]. Food Research and Development, 2020, 41(14): 158-163

沙丁胺醇(salbutamol, SAL),是一种短效 $\beta$ -2肾上腺素能受体激动剂,最初用于缓解哮喘和慢性阻塞性肺病等疾病中的支气管痉挛。然而,当使用剂量为治疗剂量的5倍~10倍时,沙丁胺醇可以通过减少脂肪沉积和增强蛋白质含量来提高生长速率和提高饲养效率;因此,它在养殖业和其他相关农业中被许多商人非法使用以增加瘦肉产量,并且在动物体内富集<sup>[1-3]</sup>。研究发现 $\beta$ -2-肾上腺素能受体激动剂如沙丁胺醇的摄入,会增加自闭症的风险<sup>[4]</sup>;导致肌纤维肥大,甚至在一定剂量下导致肌肉细胞死亡<sup>[5]</sup>;沙丁胺醇的微量吸入会降低血氧饱和度<sup>[6]</sup>等。农业部公告明确指出沙丁胺醇是一种禁用药物,不应该在食物或水中检出<sup>[7]</sup>。因此建立对沙丁胺醇的超灵敏检测技术尤为重要。

针对沙丁胺醇的检测,目前已发展多种基于免疫学的检测方法。基于CdSe量子点(quantum dot, QD)电化学发光(electro-chemiluminescence, ECL)竞争性免疫测定法<sup>[8]</sup>,基于免疫磁珠和氧化石墨烯/金纳米粒子混合基质的表面增强拉曼技术<sup>[9]</sup>,基于三聚氰胺探针功能化的金纳米粒子比色检测方法<sup>[10]</sup>,基于碳纳米管的电化学检测方法,并通过差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)测量评估该沙丁胺醇的电化学传感性能<sup>[11]</sup>。基于局部表面等离子体共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)传感的无标记无试剂免疫法<sup>[12]</sup>等等。然而,这些检测方法灵敏度不足或设计复杂,限制了它们的开发和广泛应用。

DNA分子由于其强大的序列可编程性和准确的分子识别能力而被广泛用于生物传感<sup>[13]</sup>。目前有许多信号放大策略来开发基于DNA的敏感生物传感器<sup>[14]</sup>。其中20世纪90年代发展起来的实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)已成为一种成熟的扩增技术,广泛应用于基因检测。在传统PCR的基础上,同步实现DNA的扩增和定量,具有高灵敏性,特异性<sup>[15-16]</sup>。在DNA walker

和折纸技术等不同的生物传感策略中,必须设计独特的DNA分子序列以产生独特的分子结构<sup>[17]</sup>。在本研究中,利用基于桥接DNA的邻近连接技术的普通ssDNA实现信号放大。

Cheng-ting Tsai等<sup>[18]</sup>利用抗体的双价识别抗原的能力,设计基于抗原抗体特异性识别和连接酶特异性识别的原理,从而构建低背景值的高效DNA信号放大传感器。这些传感器利用两个DNA连接的抗原分子与同一抗体分子结合,诱导短DNA结构域的互补杂交,形成全长扩增子,通过扩增反应进行信号放大。在性质上与邻近连接实验类似,通过抗体的多价结合驱动抗原DNA偶联物的凝集,抗原可以是小分子<sup>[19]</sup>、蛋白质<sup>[18]</sup>、外泌体<sup>[20]</sup>等任何可以与DNA做连接的物质。该方法不需要复杂的DNA设计,在显著降低其背景值的同时具有较高的灵敏度。

本研究结合免疫磁珠、桥接DNA-DNA连接酶介导的DNA融合技术构建了一种高灵敏检测沙丁胺醇的方法,该检测方法有效的降低背景值,提高了灵敏度,在环境、医学等领域具有良好的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要仪器

TGL-16C离心机:上海安亭科学仪器厂;DYY-11型电泳仪:北京六一仪器厂;IQ350凝胶成像系统:美国GE公司;OSE-96干式恒温金属浴:北京天根生化科技有限公司;MS3 Basic涡旋振荡器:德国IKA公司;GNP-9050BS恒温培养箱:上海新苗医疗器械制造有限公司;MyGo Pro实时荧光定量PCR仪:IT-IS Life Science Ltd。

#### 1.1.2 主要试剂

沙丁胺醇标准品(SAL)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA):美国Sigma-Aldrich公司;沙丁胺醇多克隆抗体(B180517):北京博尔西科技有限公

司;Dynabeads 抗体偶联试剂盒:美国 Thermo Fisher Scientific 公司;磁珠封闭液:百迈格生物公司;PBST 缓冲液(含 0.05% Tween 20):北京索莱宝生物科技有限公司;DNA 连接酶(A8101):美国 Epicentre 生物技术公司;qPCR kit:上海星汉生物科技有限公司;超纯水(>18.0 MΩcm)。所有 DNA 样品均由上海生工生物工程股份有限公司合成(经 HPLC 纯化),核酸序列见表 1。

表 1 试验所用核酸序列

Table 1 DNA sequences used in this study

DNA 名称	序列
DNA1	5'-HS-CAG GTA GTA CGT CTG TTT CAC GAT GAG ACT GGA TGA G-3'
DNA2	5'-TCA CGG TAG CAT AAG GTG CAA GAT AAT ACT CTC GCA GCA C-SH-3'
dperf	CAG GTA GTA GTA CGT CTG TT
dpcrr	GTG CTG CGA GAG TAT TAT CT
桥接 DNA	20 nt 5'-G CTA CCG TGA CTC ATC CAG T-P-3'
	18 nt 5'-CTA CCG TGA CTC ATC CAG -P-3'
	16 nt 5'-TA CCG TGA CTC ATC CA-P-3'
	14 nt 5'-A CCG TGA CTC ATC C-P-3'
	12 nt 5'-CCG TGA CTC ATC-P-3'

## 1.2 方法

该方法首先将磁珠偶联抗体形成免疫磁珠 IAb。同时设计了一对寡核苷酸探针 DNA1、DNA2, 每个寡核苷酸链由 40 nt 碱基组成。使用 SMCC 连接方法, 将 SAL-BSA 与 3'SH 游离末端 DNA 寡核苷酸(DNA 1)偶联以制备 SAL 探针 1 与 5'SH 游离末端 DNA 寡核苷酸(DNA 2)偶联制备 SAL 探针 2, 两个寡核苷酸探针同时与同一抗体分子结合, 使两个探针进入相同的复合物分子, 显著增加探针两个短序列的局部有效浓度。然后, 这两个短序列经过与桥接 DNA(bridge)碱基互补配对、在特异性 DNA 连接酶的作用下形成 80 nt 全长扩增子, 即 AbD 的桥联结构。通过磁分离将 AbD 结构分离, 进一步降低背景值。之后采用实时荧光定量 PCR 实现信号放大并进行检测。

### 1.2.1 免疫磁珠的制备。

准确称取 5 mg 的 M270 磁珠粉末(磁珠直径 2.8 μm)放入 1.5 mL 离心管内, 使用 C1 溶液洗涤后加入 20 μL(2.3 mg/mL)的兔多抗, 再加入 230 μL 的 C1 溶液和 C2 溶液 250 μL 至总体积 500 μL。置于垂直混旋仪中 37 °C 孵育 20 h。加入缓冲液多次洗脱后加入 500 磁珠封闭液室温(25 °C)4 h 后重悬在 500 μL 缓冲体系中, 在 4 °C 下储存供下一步使用。

### 1.2.2 DM 探针的制备

取 60 μL sulfo-SMCC 的 HEPES 缓冲液稀释

(7.5 nmol/L), 加入 20 μL 沙丁胺醇-OVA(10 mg/mL 约 222 nmol/L), 避光反应 30 min。加 20 μL HS-DNA (10 μmol/L)溶液, 4 °C 过夜。使用 30 kDa 超滤管 10 000 r/min 离心 1 次, 2 min/次。

### 1.2.3 检测方法的建立

取免疫磁珠储备溶液、探针 1、2 各 5 μL 体积加入一个 1.5 mL 离心管中, 加入 PBST 至 50 μL, 其中探针浓度为 10 nmol/L, 将混合物在 37 °C 孵育 30 min, 并用 100 μL 0.05% PBST 洗涤两次。重悬到 120 μL 含有连接酶、桥接 DNA 的连接缓冲体系中(20 mmol/L Tris, 25 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 7.5 mmol/L DTT, 0.5 μmol/L NAD, 0.021 U/μL ligase, 100 nmol/L bridge oligo, 0.01% Triton<sup>®</sup> X-100, pH 8.0), 在 30 °C 下孵育 15 min。并用 130 μL 0.05% PBST 洗涤两次。磁分离, PBST 洗涤 2 次 3 min/次, 磁分离 1 min。重悬在 50 μL 体系中作为模板。在 10 μL qPCR Master mix 中加入上下游引物(5 μmol/L)各 0.5 μL, 同时加入 5 μL 模板, 加入 ddH<sub>2</sub>O 制备 20 μL 体系。qPCR 系统程序设置(95 °C: 300 s; 95 °C: 10 s; 60 °C: 30 s; 72 °C: 30 s; 45 T)。

### 1.2.4 特异性

应用浓度为 1 ng/mL 的沙丁胺醇、莱克多巴胺、特布他林、苯氧丙酰胺、克仑特罗对 1.2.3 建立的方法进行特异性检验。

### 1.2.5 模拟实际样品检测

将沙丁胺醇按 500、5 000、10 000 pg/mL 依次分别加入到自来水、人工尿液中, 应用 1.2.3 建立的方法进行回收检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 可行性分析

成功偶联抗体与磁珠、抗原与 DNA 之后首先对试验的可行性进行了验证, 加入免疫磁珠与只加入磁珠的对照组相比, 前者具有更低的 Ct 值, 与对照组差异明显, 证明该方案可以通过加入不同浓度的沙丁胺醇竞争结合免疫磁珠而产生不同的 Ct 值实现对沙丁胺醇的定量检测。

### 2.2 条件优化

为了实现用于小分子检测的生物传感器的最佳性能, 优化了免疫磁珠浓度及桥接长度。两条连接小分子的寡核苷酸链在免疫磁珠的作用下与 bridge 杂交是 AbD 的独特之处。首先对 bridge 的连接作用进行了测试。设计了 20、18、16、14、12 nt bridge 5 个优化长度, 见图 1。

选用不同长度 bridge, 在高浓度 DNA 探针存在并

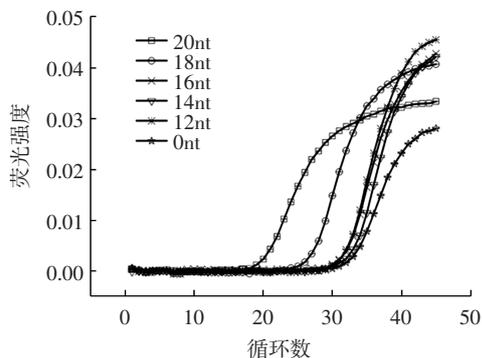


图1 不同桥接长度 DNA 自诱导连接的能力测定

Fig.1 Determination of the ability of DNA to self-induced ligation of different bridging lengths

且不加 IAb 时,可以通过自身高碰撞率,分子间亲和力结合在一起,bridge 序列越长,连接作用越大,进行 qPCR 的模板越多,产生的 Ct 值越小。16、14、12nt 的长度下产生的 Ct 值接近 0nt(背景对照)产生的 Ct 值,表明 bridge 长度在 16nt 时进入平台期,连接能力几乎为零。我们使用 20、18、16nt 序列长度做进一步优化,将免疫磁珠调整为能形成 AbD 的桥联结构的最适比例,防止 DNA 高浓度后的自连接。一个抗体可能同时连接两个 5' 端修饰小分子 DNA、或两个 3' 端修饰小分子 DNA,这都是不希望出现的结合,不能形成 AbD 结构。优化抗体浓度及反应体系的大小避免这种潜在问题的出现。

免疫磁珠浓度梯度依次为 6、60、600、6 000 ng/mL 及控制组。同一抗体浓度下加入不同长度的 bridge,观察 Ct 值变化,见如图 2。

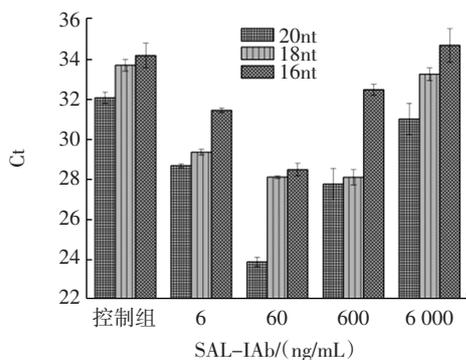


图2 在不同桥接长度下不同免疫磁珠浓度的 Ct 值响应

Fig.2 The Ct value response for different immunomagnetic bead concentrations at different bridge lengths

更长的 bridge 有更高的结合效率,Ct 值越小,表明增加 bridge 长度增强了所需 AbD 的形成。如果茎序列太长,它们可以在不存在与靶标结合的抗体的情况下自发地杂交在一起,这种分子间杂交会降低检测灵敏度。抗原抗体之间存在一个最佳结合浓度,抗原抗

体任何一个浓度增大,都会抑制二者之间的结合。抗体浓度为 60 ng/mL 时,产生的 Ct 值最小,效果最佳。综上,该体系的最佳反应条件:抗体浓度 60 ng/mL、bridge 长度 20nt。

### 2.3 方法性能

利用本方法检测不同浓度的沙丁胺醇标准品。将具有不同浓度的 SAL 添加到反应系统中以确定在优化条件下的检测范围和灵敏度,结果如图 3 所示。

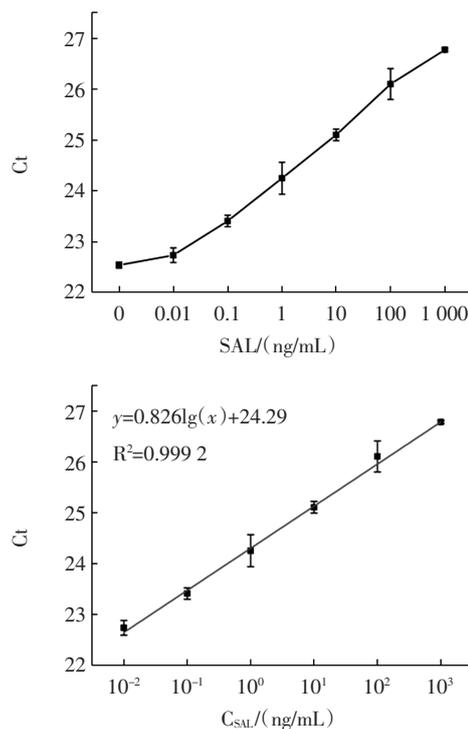


图3 检测不同浓度沙丁胺醇工作曲线

Fig.3 Linear calibration curves for detection of RT in different concentration

随着小分子浓度的增加,传感器的 Ct 值逐渐增大。基于 Ct 值的响应,获得具有在  $1.0 \times 10^{-2}$  ng/mL~ $1.0 \times 10^3$  ng/mL 范围内的良好线性关系的校准曲线,线性方程为  $y=0.826\lg(x)+24.29$ ,相关系数( $R^2$ )为 0.999 2。在与分析实际样品完全相同的条件下,做不加入被测组分的重复测定即空白试验。根据空白值的平均值加 3 倍标准偏差计算 SAL 的检出限(LOD)为  $1.2 \times 10^{-2}$  ng/mL。该方法具有检测范围宽、操作简单、灵敏度高优点。

### 2.4 特异性检测

为了测试该方法的特异性,选择沙丁胺醇的结构、功能类似物莱克多巴胺、特布他林、苯氧丙酚胺、克仑特罗作为对照物。其特异性检测结果见图 4。

### 2.5 样品加标模拟检测

采用本方法检测自来水及人工尿液样品中的沙

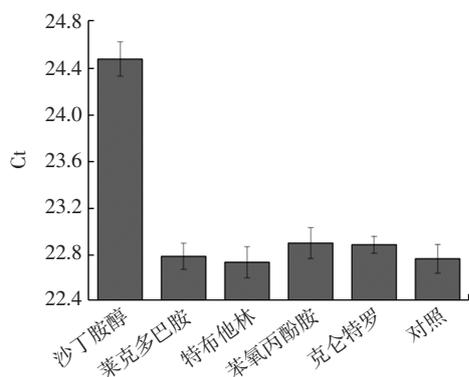


图4 方法的选择性

Fig.4 Specificity test of this method

丁胺醇。自来水及人工尿液分别首先在 10 000 r/min 下离心 5 min,取上清液,然后加入一定浓度的沙丁胺醇进行检测,结果见表 2。

表 2 自来水和人工尿液中沙丁胺醇加标回收测定结果(n=3)

Table 2 Recoveries of RT in tap water and artificial urine samples (n=3)

加入量/ (pg/mL)	自来水		人工尿液	
	检出量/ (pg/mL)	回收率/%	检出量/ (pg/mL)	回收率/%
0	/	/	/	/
500	435.7	87.1	558.3	111.7
5 000	4 479.2	89.6	4 775.3	95.5
10 000	10 881.8	108.8	10 313.4	103.1

注:/表示在空白试验的对比中均未检出沙丁胺醇。

加标回收率在 87.1 %~111.7 %之间,根据标准偏差/计算结果的算术平均值得到相对标准偏差 RSD<5.1 %,表明本方法灵敏度较高,准确性较好,可用于自来水和尿液实际中沙丁胺醇的检测。

### 3 结论

构建了一种基于免疫磁珠、桥接 DNA-DNA 连接酶介导的 DNA 融合技术构建了一种高灵敏检测沙丁胺醇的方法,通过抗体特异性识别两个邻位连接探针在桥接 DNA 的作用下,形成长扩增产子,以此为模板扩增实现信号放大,沙丁胺醇的检出限为  $1.2 \times 10^{-2} \text{ ng/mL}$ ,用于自来水及尿液中沙丁胺醇的检测,效果良好。本方法操作简单,不需要复杂的 DNA 设计;线性范围宽、灵敏度高。本方法适用于任何可以与 DNA 连接的抗原物质,对于其它目标物的检测具有一定的借鉴和参考价值。

### 参考文献:

[1] 刘宣兵,庞玉芳,侯玉泽,等.沙丁胺醇的毒副作用及其残留检

测[J].上海畜牧兽医通讯,2008(4):83-85

- [2] 白玉惠,刘智宏,徐士新.沙丁胺醇残留检测技术研究[J].农产品质量与安全,2016,79(1):52-56
- [3] 王国民,李应国,郝存显,等.动物组织中沙丁胺醇残留检测的样品前处理方法研究进展[J].食品工业科技,2011(4):400-404
- [4] Gidaya N B, Lee B K, Burstyn I, et al. In utero Exposure to  $\beta$ -2-Adrenergic Receptor Agonist Drugs and Risk for Autism Spectrum Disorders[J]. Pediatrics, 2016, 137(2): e20151316
- [5] Burniston J G, Clark W A, Tan L B, et al. Dose dependent separation of the hypertrophic and myotoxic effects of the  $\beta$ 2 agonist clenbuterol in rat striated muscles[J]. Muscle & Nerve, 2006, 33(5): 655-663
- [6] Ho L, Collis G, Landau L I, et al. Effect of Salbutamol on oxygen saturation in bronchiolitis[J]. Archives of Disease in Childhood, 1991, 66(9): 1061-1064
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 193 号[J].中国禽业导刊,2002(24):37
- [8] Jing Z, Cai F, Deng A, et al. CdSe Quantum Dots Based Electrochemiluminescence Immunosensor with Simple Structure for Ultrasensitive Detection of Salbutamol[J]. Electroanalysis, 2014, 26(4): 873-881
- [9] Cheng J, Su X O, Han C, et al. Ultrasensitive Detection of Salbutamol in Animal Urine by Immunomagnetic Bead Treatment Coupling with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 2329-2338
- [10] Zhou Y, Wang P, Su X, et al. Colorimetric detection of ractopamine and salbutamol using gold nanoparticles functionalized with melamine as a probe[J]. Talanta, 2013, 112(15): 20-25
- [11] Phokharatku D, Wisitsoraat A, Karuwan C, et al. High sensitivity electrochemical detection of salbutamol using carbon nanotubes in anodized alumina nanopores[C]. 2010 3rd International Nanoelectronics Conference (INEC). Piscataway: IEEE, 2010: 724-725
- [12] Yan Z, Hu T, Guo W, et al. A label-free immunosensor for determination of salbutamol based on localized surface plasmon resonance biosensing[J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2014, 37(4): 651-657
- [13] Lu W, Chen Y, Liu Z, et al. Quantitative Detection of MicroRNA in One Step via Next Generation Magnetic Relaxation Switch Sensing[J]. ACS Nano, 2016, 10(7): 6685-6692
- [14] Xianyu Y, Wang Q, Chen Y. Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2018, 106: 213-224
- [15] 杨凤秋,朱正歌.实时定量 PCR 技术及应用[J].生物学杂志,2006,23(3):44-46
- [16] Postollec F, Hélène Falentin, Pavan S, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 848-861
- [17] Wang D, Vietz C, Schroder T, et al. A DNA walker as fluorescence signal amplifier[J]. Nano Letters, 2017, 17(9): 5368-5374
- [18] Tsai C T, Robinson P V, Cortez F D J, et al. Antibody detection by

# 食用菌中硫酸链霉素残留的免疫快速检测

柳双<sup>1</sup>, 王敏思<sup>1</sup>, 谢春花<sup>1</sup>, 周永斌<sup>2</sup>, 柳桃<sup>3</sup>, 宋洋<sup>1,\*</sup>

(1. 天津师范大学 生命科学学院 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387; 2. 天津市林业果树研究所, 天津 300384; 3. 中延菌菇业(天津)有限公司, 天津 301600)

**摘要:** 研究基于间接竞争酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法, 建立一种快捷、灵敏、准确的检测食用菌中硫酸链霉素残留的方法。以杏鲍菇、双孢菇、香菇等食用菌为样品原材料, 采用磷酸钠缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)提取和5%三氯乙酸净化的简单前处理方法即可基本消除基质影响。得到的校正曲线检测限为:( $0.2 \pm 0.05$ )  $\mu\text{g/L}$ , 灵敏度为:( $0.87 \pm 0.15$ )  $\mu\text{g/L}$ ; 5种食用菌样品中的硫酸链霉素的添加回收率为: 88.5%~99.5%, 变异系数小于7.7%, 其结果与高效液相色谱串联质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)一致。

**关键词:** 食用菌; 硫酸链霉素(STR); 酶联免疫吸附测定(ELISA); 抗生素; 快速检测

## Rapid Immunological Detection of Streptomycin Sulfate Residues in Edible Fungi

LIU Shuang<sup>1</sup>, WANG Min-si<sup>1</sup>, XIE Chun-hua<sup>1</sup>, ZHOU Yong-bin<sup>2</sup>, LIU Tao<sup>3</sup>, SONG Yang<sup>1,\*</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. Tianjin Forestry Fruit Research Institute, Tianjin 300384, China; 3. Zhongyan Mushroom Industry (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 301600, China)

**Abstract:** A rapid, sensitive and accurate method for the detection of streptomycin sulfate residues in edible fungi was established based on the application of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (indirect competitive, ELISA) method. The edible fungi such as pleurotus eryngii, agaricus bisporus and lentinus edodes were used as sample raw materials, and the matrix pretreatment method can be basically eliminated by phosphate buffer sodium (PBS) extraction and 5% trichloroacetic acid purification. The obtained detection limit of the calibration curve was ( $0.2 \pm 0.05$ )  $\mu\text{g/L}$ , the sensitivity was ( $0.87 \pm 0.15$ )  $\mu\text{g/L}$ ; the recovery of streptomycin sulfate in the five edible fungi samples was 88.5%–99.5%, and the coefficient of variation was less than 7.7%, the results were consistent with high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS).

**Key words:** edible fungi; streptomycin sulfate (STR); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); antibiotics; rapid detection

基金项目: 天津市自然科学基金(18JCQNJC84400); 天津市“131”创新型人才团队(20180337)

作者简介: 柳双(1995—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品安全。

\* 通信作者: 宋洋(1983—), 女(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 食品安全。

agglutination-PCR (ADAP) enables early diagnosis of HIV infection by oral fluid analysis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(6): 1250–1255

[19] Yan X W, Chris L X, Zhang H Q. Antibody-bridged Beacon for Homogeneous Detection of Small Molecules [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(16): 9667–9672

[20] Liu W, Li J, Wu Y, et al. Target-induced proximity ligation triggers recombinase polymerase amplification and transcription-mediated amplification to detect tumor-derived exosomes in nasopharyngeal carcinoma with high sensitivity [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 102: 204–210

收稿日期: 2019-08-08