

# 应用免疫学技术测定植酸酶活性的设想与展望

胡晓飞<sup>1</sup>, 魏凤仙<sup>2</sup>, 杨继飞<sup>1</sup>, 邓瑞广<sup>1</sup>, 张改平<sup>1,3\*</sup>

(1. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450002;  
3. 河南农业大学, 郑州 450002)

**摘要:** 植酸广泛存在于粮食、饲料中, 与磷及其他养分结合形成不溶性的络合物, 降低磷和其他养分利用率。植酸酶能够分解植酸及其盐类, 释放出磷元素及其他养分, 因而可以在饲料中添加植酸酶来减少磷酸氢钙用量。但如果饲料中降低了磷酸氢钙添加量, 而忘记添加植酸酶会造成动物缺磷, 导致饲料产品质量降低, 动物生产性能及产品品质下降, 因而, 监控检测饲料中植酸酶活性对保证饲料产品质量至关重要。目前, 植酸酶常用的检测方法不适合饲料生产及畜禽养殖企业现场实时检测。本文提出了用免疫学检测技术检测植酸酶活性的设想, 并展望了免疫学技术在植酸酶活性检测中应用前景。

**关键词:** 植酸; 植酸酶; 饲料品质; 免疫学检测

中图分类号: S816.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)10-1697-09

## The Conception and Prospect of Detecting Phytase Activity by Immunological Techniques

HU Xiao-fei<sup>1</sup>, WEI Feng-xian<sup>2</sup>, YANG Ji-fei<sup>1</sup>, DENG Rui-guang<sup>1</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>1,3\*</sup>

(1. Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;  
3. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Phytic acid exists in food and feed widely, which can be combined with phosphorus and other nutrients to form insoluble complexes and subsequently reduce the phosphorus and other nutrient utilization rate. Phytase can decompose phytic acid and its salts to release of phosphorus and other nutrients, thus, phytase can be added in feed to replace part of dicalcium phosphate. However, if we reduce the amount of calcium hydrogen phosphate and forget to add phytase in feed in the same time, which will decline the feed quality, and subsequently lead to poor growth performance and production quality of animals. The measurement of phytase activity in feed is very important to ensure the quality of feed products. At present, the commonly detection methods are cumbersome and unsuitable for on-site detection of phytase activity for feed and animal husbandry enterprises. In this paper, a conception of detecting phytase activity with immunological techniques is proposed. Furthermore, we prospect the application of immunological techniques in the detection of phytase activity.

**Key words:** phytic acid; phytase; feed quality; immunoassay

收稿日期: 2015-01-27

基金项目: 科技支撑计划项目(2014BAD13B05)

作者简介: 胡晓飞(1972-), 男, 河南汝南人, 副研究员, 博士, 主要从事饲料食品免疫学快速检测技术研究, Tel: 0371-65723528, E-mail: huxf1972@126.com

\* 通信作者: 张改平, 男, 中国工程院院士, E-mail: zhanggaiping2003@163.com

植酸是植物性饲料原料中一种常见抗营养因子。植酸中的磷利用率极低,同时,植酸还降低了蛋白质等其他养分的利用率<sup>[1]</sup>。植酸酶可以分解植酸,提高植酸磷及蛋白质利用率。植物性饲料中植酸酶含量极少,因此,在饲料生产中经常添加植酸酶以提高饲料养分利用率,减少氮、磷排放,缓解我国蛋白质和磷资源的缺乏。为了防止饲料生产加工过程中由于漏加植酸酶而造成饲料的质量下降,必须对饲料产品中植酸酶含量进行实时检测,简便、快捷的植酸酶检测技术是目前各饲料生产企业及畜禽养殖企业所亟需的。

## 1 植酸对动物生产的危害

### 1.1 植酸概述

植酸(phytic acid)又名肌醇六磷酸,以植酸盐(植酸钙、镁、钾)形式广泛存在于植物种子内,植酸盐又称为菲丁。据估算,全球每年生产的作物所含有的植酸盐大概为 5 100 万 t,其中含磷约为 990 万 t,这个数量相当于每年所消耗的矿物肥料中磷资源的 65%<sup>[2]</sup>。植酸是种子休眠发芽的重要养分之一,主要为种子发芽时提供充足的磷源<sup>[2]</sup>。植酸对动物或人体是有益的,具有抗氧化及防止癌症发生,降低糖尿病发病率等功效<sup>[3-4]</sup>,还可以抑制  $\alpha$ -淀粉酶及  $\alpha$ -葡糖苷酶活性,从而降低 II 型糖尿病的发生<sup>[5]</sup>。但粮食、饲料中的植酸对动物养殖是有害的。

### 1.2 饲料中植酸对动物生产的危害

植酸含有 6 个带负电荷的磷酸根,因此具有很强的螯合能力,能够与农作物中的常量及微量矿物元素钙、钾、镁、铜、铁、锰、钴等结合,形成不溶性的植酸盐,难以被单胃动物消化,影响养分的吸收利用,从而降低饲料的营养价值,甚至引起动物产生矿物质缺乏症状,且容易引起环境污染,因此,植酸被认为是饲料中的抗营养因子<sup>[6]</sup>。除与矿物质元素结合影响其消化吸收外,植酸还能够与农作物中的蛋白质、氨基酸、淀粉等养分结合形成不溶性的络合物。动物体内的消化酶作为一种蛋白质也可以被植酸结合,使消化道中消化酶含量减少,活性降低;同时,植酸和钙结合,降低了消化道中钙离子浓度,而动物体内消化酶(如胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶等)需要钙离子激活,钙离子浓度的降低也会导致这些消化酶的活性下降,从而使蛋白质、淀粉等养分的消化利用率降低;植酸还导致动物内源氨基酸和矿物质损失增加;这些因素最终导致动物的生长性能下

降<sup>[7-9]</sup>。目前,消除饲料原料中植酸对养分消化率影响的最有效措施就是在日粮中添加植酸酶。

## 2 植酸酶及其功能

### 2.1 植酸酶概述

植酸酶是将植酸及其盐类分解释放出磷元素及其他养分的酶类,该酶属于由蛋白质和糖组成的结合酶<sup>[10]</sup>。植酸酶的来源主要有三种,分别是植物源性植酸酶<sup>[11]</sup>、动物(内)源性植酸酶<sup>[12]</sup>以及微生物(细菌和真菌)源性植酸酶<sup>[13]</sup>,目前市场销售使用的几乎全部为微生物植酸酶。植酸酶由于其显著地分解饲料中植酸(盐)的功能而被广泛地应用在猪<sup>[14]</sup>、蛋鸡<sup>[15]</sup>及肉鸡<sup>[16]</sup>饲料中,是目前动物营养领域应用最为成功的饲料用酶添加剂。

### 2.2 植酸酶的功能

大量的研究表明,在蛋鸡、猪及肉鸡日粮中添加植酸酶可以增加动物消化道内消化酶活性<sup>[17]</sup>,提高养分转运载体蛋白的基因表达<sup>[18]</sup>,从而提高日粮中干物质、蛋白质、脂肪、碳水化合物、能量及钙、磷、微量元素等养分的消化利用率及沉积率<sup>[17,19-20]</sup>;提高动物日增重、日采食量,降低料肉比<sup>[14,18]</sup>;提高动物骨骼强度<sup>[14]</sup>;增加禽蛋蛋壳的硬度和韧度,降低破蛋率及软壳蛋比例<sup>[21]</sup>;减少畜禽粪便中氮、磷含量<sup>[22,23]</sup>,降低畜牧养殖业对环境的污染。

由于在饲料中添加植酸酶替代一部分无机磷源的经济效果显著,且有利于降低环境污染,因此,饲料生产、养殖企业把其作为一种必需的饲料添加剂,在动物日粮中添加植酸酶,同时减少无机磷源的添加。但是,在生产实践当中,可能会存在饲料生产过程由于疏忽而漏加或少加植酸酶的情况,由于饲料中已经减少了无机磷源的添加,会造成日粮中可利用磷含量不能满足动物需求,导致动物采食量下降、料肉比升高、生产性能降低<sup>[24]</sup>;动物骨骼中矿物元素含量及密度显著降低、骨质疏松、骨骼脆弱甚至瘫痪<sup>[25-27]</sup>;蛋鸡产蛋率、蛋重量、蛋壳质量下降<sup>[27-28]</sup>。因此,对饲料中植酸酶含量进行实时监控检测,有效防止植酸酶漏加,对保证饲料产品质量稳定,防止饲料安全事故发生,保持养殖效益至关重要。

## 3 植酸酶检测方法

植酸酶活性是以测定磷元素浓度来确定的,因此,植酸酶活性测定方法也即无机磷元素浓度测定方法,定义为在一定温度下(37 °C),一定 pH(5.5)

条件下,每分钟从一定浓度( $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )植酸钠溶液中释放出  $1 \text{ mol}$  无机磷,即为一个植酸酶单位。世界范围内植酸酶活性测定并没有统一的标准方法。目前最常用的检测方法主要是比色法,包括钼蓝法和钼黄法。

钼蓝法又叫钼酸铵法,主要是为了测定样品中磷含量<sup>[29]</sup>。样品中磷在酸性溶液中和钼酸铵结合为黄色磷钼酸铵,在还原剂作用下变成蓝色成为钼蓝,一定的波长下比色,根据蓝色深浅计算磷含量。而利用钼蓝法测定植酸酶活性时,植酸酶活性定义为,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 溶液  $\text{pH}5.5$  条件下,每分钟分解释放  $1 \mu\text{mmol}$  无机磷所需的酶量<sup>[30]</sup>。由于要使用还原剂及缓冲剂,操作相对复杂。另外,还原剂种类繁多,如氯化亚锡、碘化钾、碘化氢、金属钼等,但没有一种还原剂能很好地把灵敏性、准确性、检测范围完美地体现出来,例如在利用氯化亚锡作还原剂时,测定方法灵敏度高,但检测范围比较窄<sup>[29]</sup>;而且使用的还原剂不同时,比色时使用的光线波长也不一样,如使用硫酸亚铁作还原剂,选取的波长大于  $720 \text{ nm}$ ,而使用维生素 C 作还原剂,则波长为  $620 \sim 660 \text{ nm}$  最适宜<sup>[31]</sup>。

1981 年, J. K. Heinonen 和 R. J. Lahti 改进了钼蓝法。在此方法中,磷钼酸盐溶液直接溶解到丙酮溶液中,在丙酮中磷钼酸盐呈现亮黄色,直接用比色法进行测定,而不需要再用还原剂把磷钼酸盐还原成蓝色。亮黄色形成后,由于多余的钼酸盐立即被反应液中的柠檬酸盐络合,因此,磷酸盐水解产生的磷,不会对测定溶液的色泽再产生影响,这也是该方法的最大优点。另外,该方法不需要用还原剂,降低了还原剂种类对测定敏感度和测定范围干扰<sup>[32]</sup>。这种方法测定时的最适宜的波长为  $400 \sim 420 \text{ nm}$ <sup>[31]</sup>。

钼酸铵-离心柱法也是钼蓝法的一种改进方法<sup>[33]</sup>。这种方法就是把样品用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH}5.5$  的柠檬酸缓冲液室温提取  $30 \text{ min}$ , 然后用  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜过滤去除溶液的油层,然后再把过滤液通过离心柱分子筛(截留相对分子质量  $30\ 000 \text{ u}$ ),以去除游离的磷酸盐,植酸酶相对分子质量在  $50\ 000 \text{ u}$  以上,因此不能被分子筛过滤掉。和直接测定样品方法相比,离心柱可以降低原料或饲料中游离磷造成的比较高的空白背景值,保证植酸酶分解的植酸磷成为比色反应中的最主要因素,使测定的准确性和可重复性得到改善。当动物日粮或原料中植酸酶含量在  $0 \sim 1\ 500 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  的范围时,其变

异系数为  $1\% \sim 6\%$ , 而直接测定方法变异系数为  $28\% \sim 39\%$ 。如果测定添加于饲料中的植酸酶活性时,相关系数  $R^2 = 0.99$ , 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。但这种方法处理相对比较复杂,分子筛大小会影响到测定结果,样品提取时间也将影响测定结果。通过过滤去除植酸盐水解释放的结合蛋白或脂肪,这些物质在比色测定时,会引起植酸酶活性测定时吸光度值的波动,引起测定误差。

钼黄法(又称为钒-钼酸铵或偏钒酸铵)法。该法原理是,在酸性条件下(如硝酸或盐酸),植酸酶分解植酸(盐)产生正磷酸盐,然后加入硝酸化的酸性钒钼酸铵终止反应,正磷酸盐和钒钼酸结合形成黄色的络合物, $415 \text{ nm}$  波长比色,无机磷浓度越高,黄色越深,把酶活性定义为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}5.5$  条件下,每分钟从浓度  $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的植酸钠溶液中释放出  $1 \text{ mol}$  无机磷,即为一个植酸酶单位,以  $U$  表示<sup>[34-35]</sup>。钼黄法比钼蓝法操作相对方便,由于不需加入还原剂,因此检测耗费时间相对较短,而且显色稳定性比钼蓝法好,干扰相对较少。1994 年,该法成为美国的标准植酸酶活性检测方法。我国也在 2002 年将其确定为我国植酸酶活性测定标准方法,并于 2009 年进行了修订<sup>[36-37]</sup>,该法主要用于饲料添加剂植酸酶产品及添加植酸酶的配合饲料中植酸酶活性鉴定。钼黄法是无机磷与钒钼酸铵形成有色络合物,通过比色进行定量,而且要求是在酸性条件下,因此植酸盐水解释放的结合蛋白或脂肪等物质在比色测定时,可能引起吸光度值的波动,造成测定误差,同时原料或饲料中游离磷造成的比较高的空白背景值而使检测值偏高。

固体琼脂鉴别平板培养基法,这种方法用于定性测定植酸酶,主要用在区分筛选分泌植酸酶的细菌微生物时使用。该方法在琼脂平板培养基中加入植酸钙作为唯一的磷源,植酸钙是不溶性的,所以琼脂培养基显示为白色混浊状。当含有分泌植酸酶的细菌微生物种植到这种平板培养基中后,由于微生物分泌出植酸酶而使培养基中的植酸盐分解,从而在分泌植酸酶的微生物周围的培养基形成一个透明带,一旦培养基有透明带形成,就定性认为有植酸酶存在<sup>[38]</sup>。由于强酸也可以分解植酸钙,因此在采用这种方法鉴别产植酸酶细菌时,如果遇到产强酸(如盐酸)的细菌(如厌氧菌种链球菌)时,也会在白色浑浊的琼脂培养基上形成一条透明带,使人误认为是含有产植酸酶的细菌,产生假阳性结果。为了克服

假阳性结果产生的可能性,研究人员利用两步复染法来进行植酸酶活性测定,把上述的琼脂糖平板培养基室温下浸入到二氯化钴溶液中孵育 5 min,然后用新配制的钼酸铵/钒酸铵溶液替代二氯化钴溶液再孵育 5 min。由于二氯化钴和植酸盐螯合时对 pH 不敏感,所以产酸的细菌所形成的透明带,经复染后先显示为紫色,而加入钼酸铵/钒酸铵后,螯合物又由紫色变成黄色,而透明带消失。而产植酸酶的细菌微生物周围形成的透明带还正常存在,这样可以消除由于产酸细菌微生物形成的植酸酶假阳性<sup>[39]</sup>。经过这个步骤,虽然降低了假阳性,但由于增加了复染步骤,必定造成测定耗时增加。

不论是定量还是定性检测植酸酶活性的方法,都是以酶分解植酸盐释放磷酸根的出现为基础。而能够产生植酸酶的微生物(如细菌、真菌),本身可以产生磷酸酶(如外源磷酸酶,是一种非特异性酸性磷酸酶),同时还可以产生多聚磷酸盐复合物<sup>[40]</sup>,磷酸酶分解多聚磷酸盐复合物也可以产生大量的磷酸根。因此,在测定这些微生物的植酸酶活性时,常常会受到磷酸酶分解多聚磷酸盐复合物产生的磷酸根浓度的干扰,定量测定会导致测定的植酸酶活性值过高,定性测定则会出现假阳性结果。为了克服这些不利影响,2005 年, D. F. Berry 等<sup>[41]</sup>建立了一种新型植酸酶测定方法,反相色谱-紫外(HPLC-UV)法。使用植酸的能生色的底物类似物 5-O-(6-苯甲酰氨基己基)D-肌醇-1,2,3,4,6-戊磷酸(T-IP5)作为探针,该探针作为测定植酸酶活性时的生色底物,使用 HPLC 和 UV 测定法进行定量测定,植酸酶作用于 T-IP5 时,可以脱掉磷酸根,形成一系列的部分脱磷酸的肌醇磷酸盐 T-IP<sub>x</sub> ( $x=5,4,3,2,1$ )。利用分析型的 HPLC 系统分析相应的 T-IP<sub>x</sub> 浓度,在这个 HPLC 系统中,利用一个反相柱,洗脱缓冲液为四丁基氢氧化铵,T-IP<sub>x</sub> 定量测定采用外标法,通过测定一定时间内 T-IP<sub>x</sub> 浓度降低的量,即可得到植酸酶的活性。而产生的磷酸根浓度则用紫外比色法进行定量,通过与 T-IP<sub>x</sub> 减少量的对比,可以推断出反应液中的磷酸根是由微生物植酸酶作用于 T-IP<sub>x</sub> 脱磷酸形成,还是由微生物磷酸酶作用于磷酸盐复合物脱磷酸形成。这种方法相对比较准确,排除了磷酸酶作用的影响,因此结果比较可靠。但过程相对比较复杂,因此耗时相对比较长。

2008 年,近红外光谱快速检测技术(NIRS)被应用于植酸酶活性检测<sup>[42]</sup>。尽管这种技术缩短了

检测时间,但检测准确性并没有增加,且该技术需要对光谱进行预处理,需要建立校正模型,因此熟练应用该技术需要专业技术人员。

上述这些植酸酶检测技术由于存在着种种的不足之处,难以在我国的饲料生产及畜禽养殖企业推广应用。而随着植酸酶在饲料生产及畜禽养殖企业中广泛普及使用,饲料生产及畜禽养殖企业迫切需要经济、简便、快捷的植酸酶检测技术,用以监控检测饲料原料及饲料中植酸酶含量,来确保饲料产品质量。

## 4 免疫学检测技术

免疫学检测技术是依据抗原抗体特异性反应原理,结合酶标记技术、同位素标记、胶体金标记技术等其他技术建立起来的一类灵敏度高、特异性强、检测限低、检测步骤简便、快捷的检测技术。

最经典的免疫学检测方法是酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),其具体步骤如下:①固化抗原(或抗体),即把抗原(或抗体)吸附固化到酶标板或其他材料上,②加入酶[如辣根过氧化物酶(HRP)及碱性磷酸酶(ALP)等]标记的抗体(或抗原),③加入所标记酶的底物(HRP 的底物一般为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺,ALP 的底物一般为对-硝基苯磷酸酯),④根据底物显色的深浅计算样品中靶标物质的含量<sup>[43]</sup>。常用的 ELISA 检测方法,根据检测样品的相对分子质量又可以分为 2 类;夹心 ELISA,一般用于检测大分子物质,如病毒抗原、抗体及其他大分子物质等,这类物质本身含有多个抗原决定簇,可以和不同的抗体(或抗原)结合;间接竞争 ELISA,又称阻断 ELISA,一般用于检测相对分子质量小于 10 ku 的物质,如农药、兽药、霉菌毒素等小分子化合物检测,这类物质属于不完全抗原或半抗原,只有一个抗体结合位点,不能够用夹心法进行检测。

其他免疫学检测方法有放射免疫分析(radio-immunoassay, RIA)、化学发光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay, CLIA)、荧光偏振免疫分析(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)、时间分辨荧光分析法(time-resolved fluorimmunoassay, TRFIA)、免疫测流层析分析技术(lateral flow immunoassay, LFIA)以及由上述方法衍生、改进的各种技术等<sup>[44-45]</sup>。免疫学检测技术由于其快速、灵敏、可以现场实时监测等优点已广泛应用于食品、饲料中霉菌毒素、药物残留、违禁添加物监控检

测<sup>[46-49]</sup>,以及致病性病原微生物(如传染性法氏囊病毒、猪旋毛虫等)的监控检测<sup>[50-51]</sup>。

## 5 应用免疫检测技术检测植酸酶活性的设想

到目前为止,国内外均很少见到利用免疫学方法检测饲料中植酸酶含量的相关文献报道。但有关抗植酸酶的多克隆抗体和单克隆抗体的制备已有报道<sup>[52-53]</sup>,多克隆抗体及单克隆抗体的制备成功,为植酸酶免疫学检测方法的建立奠定了基础。

植酸酶为大分子蛋白质,相对分子质量为 50~55 ku<sup>[54]</sup>,具有多个抗原决定簇,因此可以用双抗体夹心法来建立其免疫学检测方法,具体操作步骤如下:1)将抗植酸酶单克隆抗体(如鼠源单克隆抗体)包被在聚苯乙烯酶标板上,洗涤除去未结合的抗体,用封闭液将聚苯乙烯酶标板孔中未结合植酸酶抗体的位点进行封闭,洗涤除去封闭液;2)加入受检的植酸酶样本,室温反应一定的时间,洗涤除去未结合的样品;3)加入与包被的植酸酶单克隆抗体异源的抗体(如兔源植酸酶多克隆抗体),室温反应一定的时间,洗涤除去未结合的多克隆抗体;4)加入一定稀释倍数的酶标二抗(如辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, GaRIgG-HRP),室温反应一定的时间,洗涤除去未结合的酶标抗体;5)加入显色液,室温显色一定

时间;6)加入终止液(一般用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸),终止反应;7)用酶标仪在 450 nm 波长处读值。

根据反应的标准曲线可以计算出检测样品中的植酸酶蛋白含量,然后根据单位蛋白质中植酸酶活性最终确定饲料中植酸酶活性。这种方法不但灵敏度高,而且特异性强。如果研制成检测 ELISA 试剂盒,则检测样品耗时 2~3 h。

除了 ELISA 检测方法,也可以基于免疫侧流层析原理,利用胶体金标记植酸酶单克隆抗体,植酸酶多克隆抗体进行拦截,建立植酸酶的免疫侧流层析快速检测试纸条。胶体金试纸有以下几种核心组件构成,主要包括支撑底板、层析膜(主要是硝酸纤维素膜,也称 NC 膜)、吸水纸、玻璃棉等。NC 膜上喷涂有异源多克隆抗体(也即多克隆抗体和单克隆抗体来源不同,比如单克隆抗体来源于小鼠,则多抗隆抗体可以来源于兔或其他动物)形成检测线,另外还喷涂有二抗(也可以是金黄色葡萄球菌 A 蛋白 SPA)形成质控线,两条线是平行的;NC 膜上检测线外侧粘附的玻璃棉喷涂有胶体金标记的植酸酶单克隆抗体,称为胶金垫;胶金垫的外侧粘附有空白的玻璃棉用于吸收样品溶液,称为样品垫;NC 膜的质控线外侧粘附有吸水纸,也称吸水垫,它保证样品溶液向吸水垫的方向移动。试纸条的结构见图 1 和图 2。用



图 1 试纸结构示意图

Fig. 1 The structure chart of test strip

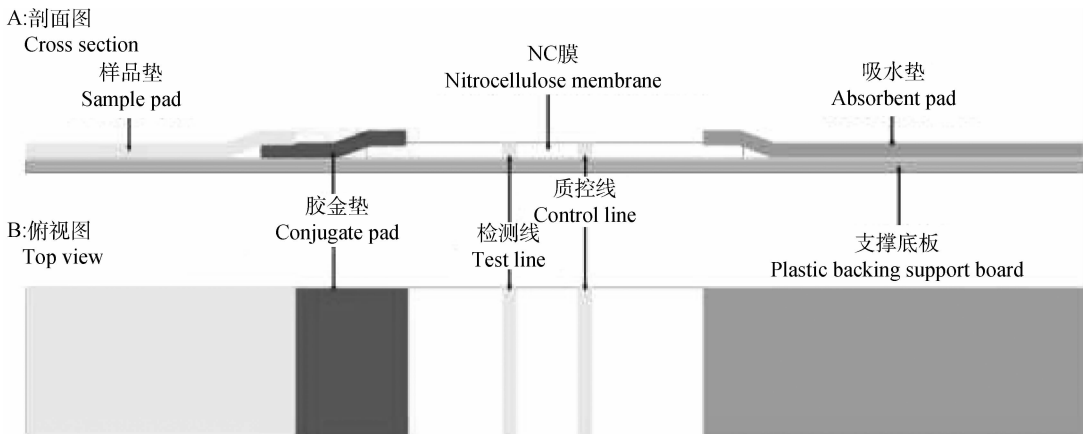


图 2 试纸平面示意

Fig. 2 The plan of test strip

试纸条检测样品时,如果样品中含有植酸酶蛋白,则其与金标单克隆抗体结合,然后再与检测线上的异源多克隆抗体结合形成“三明治”样的复合物,则检测线显示红色;如果样品中不含植酸酶蛋白,则金标单克隆抗体不能和检测线上的异源多克隆抗体结合,不能形成“三明治”样的复合物,则检测线不显色;无论样品溶液中是否含有植酸酶蛋白,金标抗体均可以和质控线上的二抗(或 SPA)结合,显示红色,一旦质控线不显色,说明该试纸条已经失效。这种试纸只需 5~10 min 就可以定性确定饲料中是否含有植酸酶。试纸检测,不需要使用检测仪器,使用比较简单,因此,特别适合饲料企业、养殖单位现场实时监控所生产的饲料品质,所以植酸酶免疫学检测技术产品,市场前景比较广阔。

尽管上述的免疫学检测方法具有灵敏度高、特异性强、检测速度快等优点,但免疫学检测方法本身也存在一定的不足之处。免疫学检测方法以抗原抗体特异性结合为基础,抗体本身的性质、影响抗原和抗体特性结合的各种因素都会对免疫学检测方法产生不利影响。如果所制备的抗体特异性不强,则容易产生假阳性结果;而抗体灵敏度不够时,则会降低免疫学检测方法的敏感性。抗原抗体结合反应受到整个反应体系中的离子强度、溶液 pH 等各种不同基质影响<sup>[55]</sup>。畜禽饲料种类繁多,不同的饲料中饲料原料、添加剂及矿物质元素添加量不同,因此制备出的检测样品溶液的离子强度、溶液 pH 都不一样,如果对不同的样品用同样的处理方法将会严重影响免疫学检测方法的灵敏度,导致测定值不准确;而对不同的样品,建立不同的处理方法,这样需要消耗很多的时间,体现不出免疫学检测方法的快速性。尽管试纸条对保存条件要求不高,但在寒冷的冬季,特别是冷冻天气会导致金标抗体溶解较慢,延长检测时间,甚至导致试纸条失效。

## 6 小结与展望

尽管植酸酶理化检测方法能够相对准确地测定植酸酶的活性,但饲料养殖企业急切需要的是能够简便、快速地定性饲料中是否含有植酸酶,这种矛盾可以用免疫学技术来很好的解决。一旦优质的植酸酶抗体能够制备出来,除了建立常规的酶联免疫吸附检测技术(ELISA 试剂盒)外,还会与其他分析技术(如化学发光分析技术)结合,衍生出更灵敏的植酸酶定量检测技术。化学发光免疫分析,是将化学

发光检测的高灵敏与免疫反应的高特异性相结合建立的分析技术,主要用于检测各种(半)抗原、抗体、农兽药、霉菌毒素、激素、酶及各种营养成分等的分析技术,该技术比常规 ELISA 灵敏度可以高出 1~2 个数量级<sup>[56]</sup>。

纳米材料是目前各个领域研究热点,被冠以“21 世纪最有前途的材料”的美誉,已经在生物医学、化学、机械、食品安全等各领域得到广泛的应用。除了上面已经谈到的直接用肉眼观察测定结果的植酸酶金标试纸条外,也可以用新型的纳米材料(如纳米荧光量子点)作为标记材料,研发出新型的植酸酶快速检测试纸条。目前纳米荧光量子点作为标记材料生产的快速检测试纸也已经在食品安全免疫检测领域得到应用,纳米荧光量子点标记的试纸检测灵敏度比胶体金试纸提高 1 倍<sup>[57]</sup>。纳米荧光量子点标记试纸需要有紫外光源,该要求可能会限制此类试纸的适用范围,但已经有科研工作者提出用手机作为发光源的设想,一旦这种设想实现,则纳米荧光量子点标记试纸则会得到广泛的应用。由于这些免疫学检测技术使用简单、方便,特别适合饲料养殖企业使用,而这些免疫学技术的广泛应用,对于进一步保证饲料产品质量、提高养殖效益将会有显著的技术支撑作用。

## 参考文献(References):

- [1] 付雪梅. 植酸酶对植物性饲料植酸磷利用率影响的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2007.  
FU X M. Study on the effect of phytase on availability of phytate phosphorus in plant feed[D]. Ya'an; Sichuan Agricultural University,2007. (in Chinese)
- [2] LOTT J N A, OCKENDEN I, RABOY V, et al. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate[J]. *Seed Sci Res*, 2000, 10(1): 11-33.
- [3] NORAZALINA S, NORHAIZAN M E, HAI-RUSZAH I, et al. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2010, 62(3): 259-268.
- [4] ZHANG H W, BAI X L. Optimization of extraction conditions for phytic acid from rice bran using response surface methodology and its antioxidant effects [J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(2): 371-376.
- [5] KUNYANGA C N, IMUNGI J K, OKOTH M W, et al. Antioxidant and type 2 diabetes related functional properties of phytic acid extract from Kenyan local

- food ingredients: effects of traditional processing methods[J]. *Ecol Food Nutr*, 2011, 50(5): 452-471.
- [6] LANDONI M, CERINO B F, HAMAN N, et al. Low phytic acid 1 mutation in maize modifies density, starch properties, cations, and fiber contents in the seed[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(19): 4622-4630.
- [7] WOYENGO T A, WEIHRAUCH D, NYACHOTI C M. Effect of dietary phytic acid on performance and nutrient uptake in the small intestine of piglets[J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(2): 543-549.
- [8] HILL B E, SUTTON A L, RICHERT B T. Effects of low-phytic acid corn, low-phytic acid soybean meal, and phytase on nutrient digestibility and excretion in growing pigs [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(4): 1518-1527.
- [9] ONYANGO E M, ASEM E K, ADEOLA O. Phytic acid increases mucin and endogenous amino acid losses from the gastrointestinal tract of chickens[J]. *Br J Nutr*, 2009, 101(6): 836-842.
- [10] COSTA P S, NASCIMENTO A M, CLÁUDIA I L B, et al. Chromobacterium sp. from the tropics: detection and diversity of phytase activity[J]. *Braz J Microbiol*, 2011, 42(1): 84-88.
- [11] OU K, CHENG Y, XING Y, et al. Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting[J]. *J Food Sci Technol*, 2011, 48(5): 598-603.
- [12] LOPEZ H W, VALLERY F, LEVRAT-VERNY M A, et al. Dietary phytic acid and wheat bran enhance mucosal phytase activity in rat small intestine[J]. *J Nutr*, 2000, 130(8): 2020-2025.
- [13] WU T H, CHEN C C, CHENG Y S, et al. Improving specific activity and thermostability of *Escherichia coli* phytase by structure-based rational design[J]. *J Biotechnol*, 2014, 175: 1-6.
- [14] ZENG Z K, WANG D, PIAO X S, et al. Effects of adding super dose phytase to the phosphorus-deficient diets of young pigs on growth performance, bone quality, minerals and amino acids digestibilities [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2014, 27(2): 237-246.
- [15] GAO C, MA Q, ZHAO L, et al. Effect of dietary phytase transgenic corn on physiological characteristics and the fate of recombinant plant DNA in laying hens[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2014, 27(1): 77-82.
- [16] WALK C L, SANTOS T T, BEDFORD M R. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers[J]. *Poult Sci*, 2014, 93(5): 1172-1177.
- [17] MURUGESAN G R, ROMERO L F, PERSIA M E. Effects of protease, phytase and a *Bacillus* sp. directed microbial on nutrient and energy digestibility, ileal brush border digestive enzyme activity and cecal short-chain fatty acid concentration in broiler chickens [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101888.
- [18] VIGORS S, SWEENEY T, O'SHEA C J, et al. Improvements in growth performance, bone mineral status and nutrient digestibility in pigs following the dietary inclusion of phytase are accompanied by modifications in intestinal nutrient transporter gene expression[J]. *Br J Nutr*, 2014, 112(5): 688-697.
- [19] ZAEFARIAN F, ROMERO L F, RAVINDRAN V. Influence of a microbial phytase on the performance and the utilisation of energy, crude protein and fatty acids of young broilers fed on phosphorus-adequate maize-and wheat-based diets[J]. *Br Poult Sci*, 2013, 54(5): 653-660.
- [20] BENTO M H, PEDERSEN C, PLUMSTEAD P W, et al. Dose response of a new phytase on dry matter, calcium, and phosphorus digestibility in weaned piglets [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(Suppl 4): 245-247.
- [21] UM J S, PAIK I K. Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus[J]. *Poult Sci*, 1999, 78(1): 75-79.
- [22] BAXTER C A, JOERN B C, RAGLAND D, et al. Phytase, high-available-phosphorus corn, and storage effects on phosphorus levels in pig excreta[J]. *J Environ Qual*, 2003, 32(4): 1481-1489.
- [23] RUTHERFURD S M, CHUNG T K, THOMAS D V, et al. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers [J]. *Poult Sci*, 2012, 91(5): 1118-1127.
- [24] CAREW L B J, GESTONE T A, ALSTER F A, et al. Effect of phosphorus deficiency on thyroid function and growth hormone in the white Leghorn male[J]. *Poult Sci*, 1985, 64(10): 2010-2012.
- [25] BRAUN U, OHLERTH S, LIESEGANG A, et al. Osteoporosis in goats associated with phosphorus and calcium deficiency [J]. *Vet Rec*, 2009, 164(7): 211-213.

- [26] LIESEGANG A, URSPRUNG R, GASSER J, et al. Influence of dietary phosphorus deficiency with or without addition of fumaric acid to a diet in pigs on bone parameters [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2002, 86(1-2): 1-16.
- [27] BAR A, HURWITZ S. Egg shell quality, medullary bone ash, intestinal calcium and phosphorus absorption, and calcium-binding protein in phosphorus-deficient hens [J]. *Poult Sci*, 1984, 63(10): 1975-1979.
- [28] ADEMOSUN A A, KALANGO I O. Effect of calcium and phosphorus levels on the performance of layers in Nigeria. 1. Egg production, egg shell quality, feed intake and body weight [J]. *Poult Sci*, 1973, 52(4): 1383-1392.
- [29] HOLMAN W I. A new technique for the determination of phosphorus by the molybdenum blue method [J]. *Biochem J*, 1943, 37(2): 256-259.
- [30] YOON S J, CHOI Y J, MINT H K, et al. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18: 449-454.
- [31] 彭益强, 贺淹才. 几种植酸酶活测定方法的修正与差异比较 [J]. 福建分析测试, 2002, 11(2): 1564-1567.  
PENG Y Q, HE Y C. Modify and differentia analysis of several phytase activity measure methods [J]. *Fujian Analysis and Testing*, 2002, 11(2): 1564-1567. (in Chinese)
- [32] HEINONEN J K, LAHTI R J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase [J]. *Anal Biochem*, 1981, 113(2): 313-317.
- [33] KIM T W, LEI X G. An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(5): 1062-1067.
- [34] ENGELEN A J, VAN DER HEEFT F C, RANDSDORP P H, et al. Simple and rapid determination of phytase activity [J]. *J AOAC Int*, 1994, 77(3): 760-764.
- [35] ENGELEN A J, VAN DER HEEFT F C, RANDSDORP P H, et al. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method; collaborative interlaboratory study [J]. *J AOAC Int*, 2001, 84(3): 629-633.
- [36] 饲用植酸酶活性的测定 [S]. GB/T18634-2002. Determination of phytase activity in feed [S]. GB/T18634-2002. (in Chinese)
- [37] 饲用植酸酶活性的测定 [S]. GB/T18634-2009. Determination of phytase activity in feed [S]. GB/T18634-2009. (in Chinese)
- [38] SHIEH T R, WARE J H. Survey of microorganism for the production of extracellular phytase [J]. *Appl Microbiol*, 1968, 16(9): 1348-1351.
- [39] BAE H D, YANKE L J, CHENG K J, et al. A novel staining method for detecting phytase activity [J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 39(1): 17-22.
- [40] KORNBERG A, RAO N N, AULT-RICHÉ D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 89-125.
- [41] BERRY D F, BERRY D A. Tethered phytic acid as a probe for measuring phytase activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(12): 3157-3161.
- [42] 杨海锋, 赵志辉, 秦玉昌. 植酸酶酶活的近红外光谱快速检测研究 [J]. 中国饲料, 2008(7): 36-38.  
YANG H F, ZHAO Z H, QIN Y C. The study of near infrared spectroscopy for rapid detection of phytase activity [J]. *China Feed*, 2008(7): 36-38. (in Chinese)
- [43] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 467.  
ZHU L P, CHEN X Q. Experimental methods in immunology [M]. Beijing: People's Military Surgeon Press, 2000: 467. (in Chinese)
- [44] HECKEL K, KIEFMANN R, DÖRGER M, et al. Colloidal gold particles as a new *in vivo* marker of early acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(4): L867-L878.
- [45] CHEN Y, WANG Z, WANG Z, et al. Rapid enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for kanamycin and tobramycin in swine tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(9): 2944-2952.
- [46] PEI S C, LEE W J, ZHANG G P, et al. Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA [J]. *Food Control*, 2013, 31(1): 65-70.
- [47] ZHAO Y, ZHANG G, LIU Q, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(24): 12138-12142.
- [48] SONG C, LIU Q, ZHI A, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of olaquinox residues [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(17): 9319-9326.



- [49] ZHANG G P, WANG X N, YANG J F, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of beta-adrenergic agonist Clenbuterol residues[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1-2):27-33.
- [50] ZHANG G P, LI Q M, YANG Y Y, et al. Development of a one-step strip test for the diagnosis of chicken infectious bursal disease[J]. *Avian Dis*, 2005, 49(2):177-181.
- [51] ZHANG G P, GUO J Q, WANG X N, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection[J]. *Vet Parasitol*, 2006, 137(3-4):286-293.
- [52] 胡晓飞, 魏凤仙, 邢广旭, 等. 植酸酶鼠源多克隆抗血清的制备[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(3):613-619.  
HU X F, WEI F X, XING G X, et al. Preparation of phytase mouse polyclonal antiserum[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(3):613-619. (in Chinese)
- [53] 胡晓飞, 魏凤仙, 李青梅, 等. 植酸酶单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *华北农学报*, 2012, 27(5):44-48.  
HU X F, WEI F X, LI Q M, et al. Preparation and characteristic of monoclonal antibody against phytase[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(5):44-48. (in Chinese)
- [54] RODRIGUEZ E, HAN Y, LEI X G. Cloning, sequencing, and expression of an Escherichia coli acid phosphatase/phytase gene(appA2) isolated from pig colon[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257(1):117-123.
- [55] 王爱萍, 李发弟, 胡晓飞, 等. 新霉素阻断 ELISA 试剂盒的研制与应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(6):857-864.  
WANG A P, LI F D, HU X F, et al. Development and evaluation of blocking ELISA kit for Neomycin detection[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(6):857-864. (in Chinese)
- [56] YANG M, KOSTOV Y, BRUCK H A, et al. Carbon nanotubes with enhanced chemiluminescence immunoassay for CCD-based detection of Staphylococcal enterotoxin B in food[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(22):8532-8537.
- [57] SONG C, ZHI A, LIU Q, et al. Rapid and sensitive detection of  $\beta$ -agonists using a portable fluorescence biosensor based on fluorescent nanosilica and a lateral flow test strip[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 50:62-65.

(编辑 白永平)