

诺氟沙星免疫学检测方法的建立及优化

姜金庆^{1,2}, 李广领², 王自良^{2,*}, 刘兴友², 杨雪峰¹, 黄华国¹

(1. 河南科技学院动物科学学院, 河南 新乡 453003;

2. 动物疫病和残留物防控河南省高校工程技术研究中心, 河南 新乡 453003)

摘要: 采用优化的碳二亚胺法制备诺氟沙星(NOR)人工抗原, 免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, 建立间接竞争 ELISA 标准曲线。对 NOR 的线性检测范围为 0.07~31.8 ng/mL, 半数抑制质量浓度(IC₅₀)和最低检测限(LOD)分别为 1.5 ng/mL 和 0.04 ng/mL。检测缓冲液中 pH 值和磷酸根离子浓度的最佳参数分别为 7.4 和 10 mmol/L; 对甲醇和 NaOH 溶液(30 mmol/L)的最佳调整体积分数分别为 30% 和 10%。抗体具有广谱特异性, 与环丙沙星(83.3%)、培氟沙星(78.9%)、依诺沙星(68.2%)、恩诺沙星(51.7%)和洛美沙星(41.7%)有较高的交叉反应率, 可用于氟喹诺酮类药物(FQs)多残留检测方法研究。

关键词: 诺氟沙星; 氟喹诺酮; 间接竞争 ELISA; 多残留检测

Development and Optimization of Immunoassay Method for Detection of Norfloxacin Residues

JIANG Jin-qing^{1,2}, LI Guang-ling², WANG Zi-liang^{2,*}, LIU Xing-you², YANG Xue-feng¹, HUANG Hua-guo¹

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 2. Henan Higher Education Engineering Technology Research Center for Animal Diseases Control and Residues Supervision, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Modified EDC method was employed to synthesize norfloxacin (NOR) artificial antigen and New Zealand rabbits were immunized for anti-NOR polyclonal antibody (pAb) production. An indirect competitive ELISA standard curve was established. The developed assay was sensitive and had a linear range from 0.07 to 31.8 ng/mL ($R^2 = 0.9627$), with IC₅₀ and LOD of respectively 1.5 ng/mL and 0.04 ng/mL. The optimal pH and phosphate ion concentration in assay buffer were determined to be 7.4 mmol/L and 10 mmol/L, respectively, and the concentration adjustments for methanol and NaOH (30 mmol/L) in dilute solutions did not exceed 30% and 10%, respectively. The produced pAb had broad-spectrum specificity and exhibited a high cross-reactivity with ciprofloxacin (83.3%), pefloxacin (78.9%), enoxacin (68.2%), enrofloxacin (51.7%) and lomefloxacin (41.7%). The results obtained suggest that the established icELISA method be used for the multi-determination of fluoroquinolone residues.

Key words: norfloxacin (NOR); fluoroquinolone (FQs); indirect competitive ELISA; multi-residue detection

中图分类号: TS207.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0148-04

氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQs)是重要的合成类抗生素, 它通过抑制 DNA 解旋酶, 进而影响细菌的生长和复制, 发挥抗菌效力, 具有抗菌谱广、吸收好和组织穿透力强等特点, 在畜牧、水产行业被广泛应用于治疗和预防细菌感染, 并作为饲料添加剂促进动物的生长^[1-2]。FQs 的广泛使用对人类健康造成了潜在的威胁, 若长期食用被此类药物污染的食品, 人类会产生耐药性和抗药性, 严重时可引起神经中毒、肾功能衰竭及潜在的致癌性等毒副作用。因此, 欧盟制定

了 FQs 在动物源食品中的最高残留标准^[3], 中国农业部也对此类药物的适用范围、剂量和停药期等进行了严格限定^[4]。

FQs 残留检测的传统方法有高效液相色谱(HPLC)^[2,5], 液相色谱-质谱(LC-MS)^[6-8]和液相色谱-串联质谱(LC-MS-MS)^[9-12]等方法。这些方法灵敏度高、特异性强, 但样品前处理繁琐, 不适合大批量的市场监测要求。兽药残留检测最有效的途径是建立同类药品具备多残留检测能力的 ELISA 筛选方法, 然后再用 LC-MS-MS 等理化方

收稿日期: 2011-01-29

基金项目: 河南省高校科技创新人才支持计划资助项目(2010HASTIT026)

作者简介: 姜金庆(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为动物性食品安全免疫学检测方法。E-mail: jjq5678@126.com

* 通信作者: 王自良(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为动物性食品安全、生物技术。E-mail: wangzl_2008@yahoo.com.cn

法进行确证。鉴于此,本研究选用具备 FQs 共同结构特征的诺氟沙星(norfloxacin, NOR)制备人工抗原,通过免疫动物获得抗 NOR 多克隆抗体,建立 FQs 多残留免疫学检测方法,并对影响检测性能的理化因素进行探讨。本研究为建立 FQs 多残留检测试剂盒和试纸条打下基础,并为其他免疫学检测方法的优化提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、培氟沙星 瑞士 Fluka 公司;其他 FQs 标准品 中国兽医药品监察所;牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA) 美国 Sigma 公司;碳化二亚胺(EDC)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA) 美国 Pierce 公司;*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 日本 MSDS 公司;羊抗兔酶标二抗(GaRiGg-HRP) 华美生物工程公司;透析袋(8000~14000D) 美国 Solarbio 公司;96孔聚乙烯酶标板 美国 Costar 公司;MULTISKAN MK3 酶标仪 美国 Thermo 公司。

1.2 人工抗原的合成

参照文献[13],采用优化的 EDC 两步法合成 NOR 人工抗原(图 1)。将 36mg NOR 用 3mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶解后,加入 12mg NHS 和 38mg EDC,37℃条件下避光反应 24h。3000r/min 离心 5min 后取上清液逐滴加入到 4mL 含 66mg BSA(或 40mg OVA)的 PBS 缓冲液中,37℃条件下避光振荡反应 4h。反应完成后先用蒸馏水透析 3d,再用 PBS 透析 3d,紫外扫描透析液无小分子吸收峰时分装于安瓿瓶中,−20℃冻干保存。

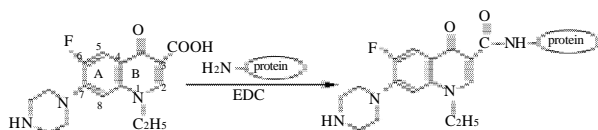


图 1 EDC 法制备 NOR 人工抗原路线图

Fig.1 Synthesis procedure for NOR artificial antigen by EDC method

1.3 抗体制备

用雌性新西兰大白兔两只,背皮下多点免疫法制备抗 NOR 多克隆抗体。首免用 PBS 稀释的免疫原与等体积 FCA 完全乳化,以后每隔 3 周加强免疫一次,换用 FIA 乳化,免疫剂量为 500 μg/次,体积为 2.0mL。每次免疫后 8d 耳缘静脉采血监测抗体效价,5 免后 10d 心脏驱血收集抗血清,4℃过夜后离心(8000r/min,10min)。抗体用饱和硫酸铵盐析法纯化,分装后于−70℃冻存。

1.4 免疫学检测方法的建立

间接 ELISA 和间接竞争 ELISA(icELISA)操作程序参考文献[14]。方阵滴定法优化检测抗原(NOR-OVA)浓度和多克隆抗体(pAb)稀释倍数,以 B/B_0 值(B 是不同浓度标准品 A_{450nm} 值, B_0 是不加标准品时 A_{450nm} 值)为纵坐标,以不同浓度标准品的对数值为横坐标,四参数曲线拟合建立 icELISA 标准曲线,进行相关分析。灵敏度用 IC_{50} 值表示,代表标准品与检测抗原偶联时的半数抑制质量浓度;线性范围表示最大信号值 20%~80% 的抑制率(IC_{20} ~ IC_{80});最低检测限(LOD)以 IC_{15} 值计算[15]。抗体特异性以交叉反应率(CR)表示[16],CR 越低,抗体特异性越强。

$$CR/\% = \frac{\text{诺氟沙星的 } IC_{50} \text{ 值}}{\text{结构类似物的 } IC_{50} \text{ 值}} \times 100$$

1.5 理化因素对检测性能的影响

标准溶液和样品基质中离子强度、pH 值和有机溶剂的体积分数对试剂盒的检测性能产生关键性影响,可使 A_{max} (最大吸光度)下降, IC_{50} 值上升。为优化检测性能,将不同影响因子下的标准曲线进行比较,筛选 A_{max}/IC_{50} 值最大的最佳检测条件[17]。

2 结果与分析

2.1 间接竞争 ELISA 标准曲线

依据检测抗原和抗血清用量少的原则,选择 A_{450nm} 值为 1.0 左右时,检测抗原和抗血清的最大稀释倍数为理想工作浓度(数据未显示),因此确定本实验体系 NOR-OVA 最佳包被质量浓度为 2 μg/mL,抗 NOR 多抗的最佳工作浓度为 1:10 000 倍稀释。优化的间接竞争 ELISA(icELISA)标准曲线如图 2 所示,该曲线的回归方程式为 $y = -9.825 \ln x + 46.049$ ($R^2 = 0.9627$), IC_{50} 值为 1.5ng/mL,表明 NOR 多抗具有较高的灵敏度。根据公式计算出标准曲线在 PBS 中的线性检测范围为 0.07~31.8ng/mL,最低检测限为 0.04ng/mL,远低于国家检测标准。

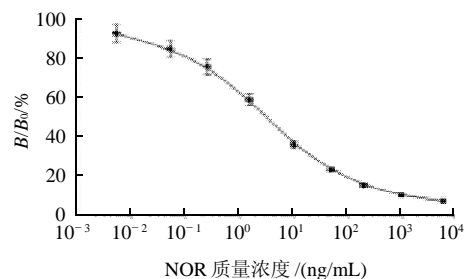


图 2 NOR 多克隆抗体间接竞争 ELISA 标准抑制曲线

Fig.2 NOR pAb icELISA standard curve

2.2 抗体特异性

NOR 多抗的交叉反应率决定了抗体的特异性, 以 FQs 同类药物代替 NOR 标准溶液, 进行交叉反应实验, 以 NOR 的 IC_{50} 值与各竞争物 IC_{50} 值的百分比作为其交叉反应率, 结果见表 1。

表 1 NOR 多抗与 FQs 功能类似化合物的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity of NOR pAb with FQs functional analogues

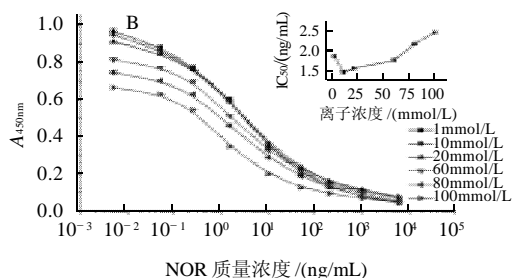
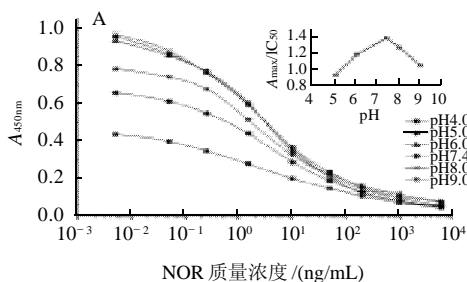
化合物	$IC_{50}/(ng/mL)$	交叉反应率/%
诺氟沙星	1.5	100
环丙沙星	1.8	83.3
培氟沙星	1.9	78.9
依诺沙星	2.2	68.2
恩诺沙星	2.9	51.7
洛美沙星	3.6	41.7
沙拉沙星	19.6	7.6
氧氟沙星	36.2	4.1
丹诺沙星	128.6	1.2

由表 1 可知, NOR 多抗与环丙沙星(83.3%)、培氟沙星(78.9%)、依诺沙星(68.2%)、恩诺沙星(51.7%)和洛美沙星(41.7%)有较高的交叉反应率, 这说明使用该多抗的免疫学方法可同时检测 6 种 FQs 兽药残留。

2.3 理化因素对标准曲线的影响

2.3.1 pH 值和离子强度的影响

配制 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.4、8.0 和 9.0 的检测缓冲液, 研究不同 pH 值条件下的性能参数, 结果见图 3A。尽管 $pH < 5$ 或 > 8 时 A_{max} 值显著下降, 但中性的 pH 值有利于抗原抗体的结合反应, 可检测到较高的吸光度 A_{max} 和较好的灵敏度 IC_{50} 值。在 pH7.4 时, 调整检测缓冲液中磷酸根离子强度(1~100mmol/L), 影响结果见图 3B。当离子浓度从 1mmol/L 上升至 10mmol/L 时, 灵敏度显著上升, 说明其减少了抗原抗体间的非特异性结合; 当离子浓度超过 20mmol/L 时, A_{max} 和灵敏度显著下降, 说明其削弱了抗原抗体间的结合反应, 因此 10mmol/L 的 PBS(含 137mmol/L NaCl 和 2.68mmol/L KCl)为最佳缓冲溶液。



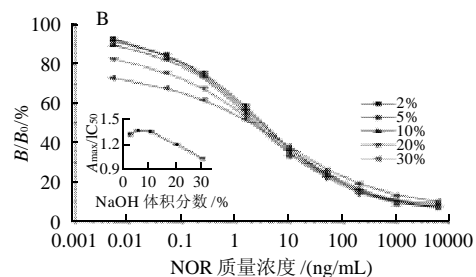
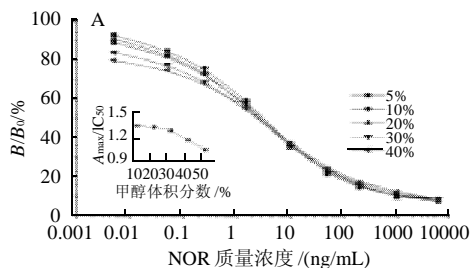
内嵌图分别显示 A_{max}/IC_{50} (A)和 IC_{50} (B)值的波动。

图 3 缓冲液中 pH 值(A)和离子强度(B)对标准曲线的影响

Fig.3 Effect of assay buffer pH and phosphate ion concentration on NOR pAb icELISA standard curve

2.3.2 甲醇和 NaOH 的影响

甲醇和 NaOH 可增加被检测物的溶解性, 是标准品配制、样品前处理过程中的常用溶剂, 因此稀释液中甲醇和 NaOH 的含量对标准曲线有重要影响。调整稀释液中甲醇(10%、20%、30%、40%、50%)和 30mmol/L NaOH 溶液(2%、5%、10%、20%、30%)的体积分数, 研究其对最大吸光度 A_{max} 和 IC_{50} 值的影响, 以 A_{max}/IC_{50} 最大时计算最佳体积分数。图 4A 显示, 当甲醇体积分数低于 20% 时, IC_{50} 值变化不大; 当甲醇超过 30% 时, IC_{50} 值开始上升, 但灵敏度的变化在可接受范围之内。图 4B 显示, 随着 NaOH 溶液(30mmol/L)体积分数的增加, A_{max}/IC_{50} 值显著下降, 这说明 NaOH 不仅抑制了抗原抗体间的相互作用, 也减弱了 HRP 酶的活性, 因此稀释液中 NaOH 溶液的体积分数不应超过 10%。



内嵌图显示 A_{max}/IC_{50} (y 轴)随着溶剂体积分数(x 轴)的变化。

图 4 甲醇(A)和 NaOH(B)在稀释液中体积分数对检测性能的影响

Fig.4 Effect of methanol and NaOH concentrations in diluted solutions on NOR determination by the developed assay

3 讨论与结论

3.1 NOR 人工抗原的筛选

兽药残留检测最有效的途径是建立同类药品具备多残留检测能力的免疫学筛选方法,然后再用 LC-MS-MS 等理化方法进行确证。为了建立 FQs 多残留检测方法,筛选具有共同结构特征的人工抗原,制备广谱特异性抗体是关键。由于 FQs 化合物在 A 环的 6 号位有一个氟原子,7 号位有一个哌嗪环;在 B 环(杂环芳香环)的 1 号位有一个 N 原子,3 号位有一个羧基,4 号位有一个酮基,因此 FQs 所共有的特征性基团非常明显。NOR 半抗原具备最基本的羧基、酮基和哌嗪环,而且哌嗪环上没有取代基团,是制备人工抗原的首选。

3.2 FQs 多残留免疫学检测方法的比较

兽药多残留免疫学检测方法建立过程中,FQs 多残留检测发展较为成熟。蔡勤仁等^[18]利用 EDC 法制备的恩诺沙星单克隆抗体可同时检测 5 种 FQs 兽药残留;魏东等^[19]采用 NHS 活泼酯法合成沙拉沙星人工抗原,建立的 icELISA 标准曲线可同时检测 6 种 FQs;郭杰标等^[20]利用戊二醛作为双功能偶联剂,使蛋白质上的氨基和环丙沙星哌嗪环上的亚氨基反应,制备人工抗原,可同时检测恩诺沙星和环丙沙星;Wang 等^[21]和 Zhu 等^[22]分别建立了能同时检测 12 种 FQs 兽药残留的 ELISA 试剂盒和胶体金试纸条。本实验利用 NOR 人工抗原制备的广谱特异性抗体,可同时检测 6 种 FQs 化合物,具有十分广阔的应用前景。

综上所述,本实验以 NOR 多克隆抗体为基础建立的多残留免疫学检测方法,可用于诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星、恩诺沙星和洛美沙星等 6 种 FQs 化合物的定性、定量检测,同时为多残留检测试剂盒和试纸条的研制奠定了基础。

参考文献:

[1] ASHWIN H, STEAD S, CALDOW M, et al. A rapid microbial inhibition-based screening strategy for uoroquinolone and quinolone residues in foods of animal origin[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 637(1/2): 241-246.
[2] 钱卓真, 苏秀华, 魏博娟, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品 6 种喹诺酮药物的残留[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 185-189.
[3] HUET A C, CHARLIER C, TITTELMIER S A, et al. Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8): 2822-2827.
[4] LU Shengxin, ZHANG Yulan, LIU Jingting, et al. Preparation of anti-pefloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pefloxacin residue in

chicken liver[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(19): 6995-7000.
[5] CHRISTODOULOU E A, SAMANIDOU V F, PAPADOYANNIS I N. Development of an HPLC multi-residue method for the determination of ten quinolones in bovine liver and porcine kidney according to the European Union Decision 2002/657/EC[J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(1): 119-127.
[6] SAN MARTIN B, CORNEJO J, IRAGUEN D, et al. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *J Food Prot*, 2007, 70(8): 1952-1957.
[7] DUFRESNE G, FOUQUET A, FORSYTH D, et al. Multiresidue determination of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in fish and shrimp by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J AOAC Int*, 2007, 90(2): 604-612.
[8] 饶勇, 曾振灵, 杨桂香, 等. 液相色谱-质谱联用检测牛奶中氟喹诺酮类药物残留的确证方法[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(5): 1033-1041.
[9] HERMO M P, NEMUTLU E, KIR S, et al. Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC-UV, LC-FD, LC-MS and LC-MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 613(1): 98-107.
[10] 李雅丽, 郝晓蕾, 冀宝庆, 等. HPLC-ESI-MS/MS 测定动物性食品中 19 种喹诺酮类药物残留的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 502-506.
[11] 包晓丽, 任一平, 张虹. 超高效液相色谱电喷雾串联四极杆质谱法检测牛奶中 22 种喹诺酮类抗菌素[J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 389-394.
[12] 祝颖, 张虹. UPLC-MS/MS 法同时检测水产品中喹诺酮类药物残留[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(2): 206-213.
[13] HUANG Bin, YIN Yun, LU Lei, et al. Preparation of high-affinity rabbit monoclonal antibodies for ciprofloxacin and development of an indirect competitive ELISA for residues in milk[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(10): 812-818.
[14] 姜金庆, 张海棠, 王自良, 等. 19-去甲萘酮异源性 icELISA 试剂盒的研制及应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(9): 68-74.
[15] WANG Li, ZHANG Yan, GAO Xiang, et al. Determination of chloramphenicol residues in milk by enzyme-linked immunosorbent assay: improvement by biotin-streptavidin-amplified system[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(6): 3265-3270.
[16] 姜金庆, 张海棠, 李广领, 等. 19-去甲萘酮人工抗原及免疫学特性[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(5): 725-731.
[17] HAO X L, KUANG H, LI Y L, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the alpha-cyano pyrethroids multiresidue in Tai lake water[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(8): 3033-3039.
[18] 蔡勤仁, 曾振灵, 杨桂香, 等. 恩诺沙星单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(7): 1060-1064.
[19] 魏东, 杨正涛, 李颖, 等. 氟喹诺酮类药物残留免疫学检测方法的研究[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(12): 1593-1598.
[20] 郭杰标, 许杨, 刘师文. 同时检测恩诺沙星和环丙沙星单克隆抗体的制备[J]. *食品科学*, 2010, 31(13): 205-208.
[21] WANG Zhanhui, ZHU Yan, DING Shuangyang, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(12): 4471-4483.
[22] ZHU Yan, LI Lin, WANG Zhanhui, et al. Development of an immunochromatography strip for the rapid detection of 12 fluoroquinolones in chicken muscle and liver[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(14): 5469-5474.