

[3] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京:科学出版社,2002.

[4] 唐俊妮,龙飞,史贤明,等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1467-1469.

[5] MEAD P S, DUNNE E F, GRAVES L, et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat[J]. *Epidemiol Infect*, 2006, 134: 744-751.

[6] 骆玲飞,王小光,刘继倩,等. 部分市售农副产品李斯特菌污染情况调查及毒力基因检测[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3):275-277.

[7] BUBERT A, KÖHLER S, GOEBEL W. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2625-2632.

[8] 吕添,武海涛,曹正茂,等. 单核细胞增多性李斯特菌 *iap* 基因的克隆、表达与 p60 蛋白的纯化[J]. 食品科学, 2010, 31(11):157-161.

[9] 谭炳乾,何启盖,肖军,等. 单核细胞增多性李斯特菌 *hlyA* 基因序列及溶血素活性测定[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(2): 161-165.

[10] JUNG H J, PARK S H, HA S D, et al. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the *prfA* virulence gene cluster [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73:1412-1415.

论著

化学发光酶免疫分析法快速测定牛奶中恩诺沙星的含量

张慧丽^{1,2}, 于斐¹, 张静², 吴拥军¹, 屈凌波²

(1. 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学化学系, 河南 郑州 450001)

摘要:目的 建立快速测定牛奶中恩诺沙星的化学发光酶免疫检测方法。方法 采用竞争法,即将牛奶样品中的恩诺沙星与标记有碱性磷酸酶的恩诺沙星同时与限量的特异性固相恩诺沙星抗体进行竞争结合反应,通过分离未结合的标记抗原,测定标记抗原与抗体复合物化学发光强度,经相应的数学函数计算出待测抗原的含量。根据这一基本原理,利用金刚烷类体系作为化学发光底物,快速地测定牛奶中恩诺沙星残留量。结果 检出限可达 239.9 pg/ml,检测范围为 350~1 000 pg/ml,批内与批间相对标准偏差均小于 15%。结论 本方法在抗生素恩诺沙星残留检测及监控等领域有很好的应用前景。

关键词:化学发光酶免疫法;恩诺沙星;药物残留;食品;牛奶

中图分类号:O657.39 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0398-04

Chemiluminescence enzyme immunoassay for detecting enrofloxacin in milk

Zhang Huili, Yu Fei, Zhang Jing, Wu Yongjun, Qu Lingbo

(Department of College of Public Health, Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Objective To develop a rapid chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for detecting enrofloxacin (ENR) in milk. **Methods** Anti-ENR antibody was passively adsorbed onto the walls of polypropylene plates. ENR conjugated with labeled alkaline phosphatase (ALP) was used to compete with the ENR in milk for the limited specific capability of ENR antibody on plates by solid-phase antibody binding reaction. Through separating unbounded labeled antigen and determining of chemiluminescence, the content of the test antigen was calculated. According to the basic theory, AMPPD was used as the substrate of ALP for rapid determination of ENR residues in milk. **Results** The linear range was 350-1 000 pg/ml and the detection limit was 239.9 pg/ml provided by the proposed method. The relative standard deviation was less than 15% both in intra-assay and inter-assay. **Conclusion** There are good prospects of this method in the surveillance and analysis of ENR and other antibiotics residues.

Key words: Enrofloxacin; chemiluminescence enzyme immunoassay; drug residues; food; milk

收稿日期:2011-02-23

基金项目:河南省重大公益性科研招标项目

作者简介:张慧丽 女 硕士 研究方向为药物分析

通信作者:吴拥军 男 教授 研究方向为药物与食品分析 E-mail:wuyongjun@zzu.edu.cn

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)又名乙基环丙沙星,是一种属于氟喹诺酮类的广谱抗菌药。目前该药被国家指定为动物专用药,广泛用于禽畜水产养殖业中的疾病治疗与预防。常用于检测 ENR 的方法有色谱法^[1,2],紫外分光光度法^[3,4],免疫分析法^[5,6]等,这些方法由于样品前处理繁琐、仪器昂贵等问题而不易推广,因此需要建立一种简便、快速、灵敏且能批量测定 ENR 残留的方法。化学发光酶免疫分析法灵敏度高、特异性强,且无需进行复杂的样品前处理,已经广泛用于环境^[7]、医学^[8-9]、食品^[10]分析等各个领域。本研究将高灵敏度的化学发光体系和高特异性的免疫反应结合,建立了一种以碱性磷酸酶为标记物,金刚烷为发光底物的化学发光酶免疫分析方法用于检测牛奶中的 ENR 残留。该方法检测限低,可满足兽药的检测及监控,同时分析体系稳定可靠,可用于商品化诊断试剂盒的开发,实现分析的自动化。

1 材料与方法

1.1 仪器

MP280 型化学发光免疫分析仪(北京泰格科信生物科技有限公司);96 孔聚苯乙烯板;紫外可见分光光谱仪;电热恒温培养箱;78-1 型电子磁力加热搅拌器;酸度计;精密电子天平;透析袋(允许透过分子量 10 000D, USA)。

1.2 试剂

恩诺沙星单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology)、恩诺沙星(中国生物制品检定所);碱性磷酸酶(ALP,日本旭化成制药株式会社);吐温-20;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠;N,N-二甲基甲酰胺(DMF);乙基碳二亚胺(EDC, BBI);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Alfa Aesar);三乙胺;ALP-AMPPD 体系发光剂 A 和发光剂 B(华美生物工程有限公司)。试剂均为分析纯,水均为 MillQ 纯水。

包被液:0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(CB, pH 9.6);封闭液:0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2,含 1% BSA 和 4% 蔗糖);洗涤液或样品稀释液:0.05 mol/L PBS(含 0.05% 吐温-20)。

1.3 恩诺沙星标准溶液配制

用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液配制 350、400、500、600、850、1 000 pg/ml ENR 标准溶液。

1.4 方法

1.4.1 包被方法

取 2 μg/ml 的 ENR 单克隆抗体加到 96 孔微孔板上,每孔 100 μl,于 37 °C 恒温培养箱中孵育 2 h

后取出用洗涤液洗板 5 次,并将其倒置在吸水纸上拍干。然后每孔再加入 100 μl 的封闭液,放入 37 °C 恒温箱中 1h,取出后再次洗板 5 次,倒置在吸水纸上拍干。

1.4.2 酶标记 ENR 抗原的方法及鉴定

选用碳化二亚胺缩合法和混合酸酐法对酶和药物抗原进行偶联,以最终体系的发光值大小判别偶联方法的优劣。采用与 FeCl₃ 的显色反应来鉴定恩诺沙星与碱性磷酸酶的偶联物(ENR-ALP),将显色后的溶液置于透析袋内透析几天后,透析内液呈红色且略显浑浊,而透析外液则显示浅黄色,可初步确认 ENR 与碱性磷酸酶(ALP)偶联成功。并在紫外光谱区(200 ~ 400nm)对透析后的偶联物进行扫描。

1.4.3 ENR 单克隆抗体浓度的优选

选用 0.5、1、2、3、5 μg/ml 的 ENR 单克隆抗体来包被微孔板,通过比较不同浓度 ENR(0、100、300、500、700、1 000 pg/ml)的相对发光值,选择最佳包被浓度。

1.4.4 最优包被时间的优选

将加入 ENR 单克隆抗体的 96 孔微孔板置于恒温箱中,于 37 °C 下,分别温育 60、90、120、150、180 min,通过比较不同浓度 ENR(0、100、300、500、700、1 000 pg/ml)随时间变化的相对发光值,确定最佳包被时间。

1.4.5 发光剂最佳量的选择

选择不同的稀释比(1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6),同时每孔加入等量的发光剂 A 液与发光剂 B 液,设置 25 与 50 μl/孔两个不同条件,通过比较相对发光值选择最佳发光剂量。

1.4.6 样品处理

见参考文献[11]。

1.4.7 样品测定

在包被抗体的微孔板中,每行前两孔加空白溶液(0.01 mol/L PBS, pH 7.2),余下每孔分别加入不同浓度的 ENR 标准溶液(或预处理的样品溶液)和 ENR-ALP 偶联物各 50 μl。电热恒温培养箱中孵育 1 h,取出后洗板 5 次并倒置在吸水纸上拍干。然后每孔依次各加入等量的发光剂 A 和 B,常温避光 8 min 后,于化学发光免疫分析仪上测定各孔发光值。

1.4.8 精密度测定

配制 350、650、1 000 pg/ml 不同浓度的标准溶液,每一浓度分别测定 5 次,并计算其批间相对标准偏差和批内相对标准偏差。

1.5 标准曲线

优化的实验条件下,测定了 350、400、500、600、

850、1 000 pg/ml ENR 标准溶液的相对发光强度,得出标准品浓度(C)-相对发光强度(RLU)、标准品浓度对数(lgC)-相对发光强度(RLU)、标准品浓度对数(lgC)-相对发光强度对数(lgRLU)、标准品浓度对数(lgC)-标准品相对发光强度/零标准品相对发光强度(A/A₀)4 条拟合曲线(表 1),比较决定系数(R²),选择最佳的拟合曲线。

表 1 4 种方法拟合出的标准曲线及绝对系数

Table 1 Regression equations and determination coefficient of four methods

拟合曲线	回归方程	决定系数 R ²
C-RLU	$y = -13.789x + 18068$	0.9565
lgC-RLU	$y = -20180x + 65236$	0.9945
lgC-lgRLU	$y = -0.9961x + 6.6992$	0.9955
lgC-A/A ₀	$y = -0.8839x + 2.8577$	0.9946

2 结果与分析

2.1 恩诺沙星单克隆抗体包被浓度对发光值的影响

免疫反应之前优化包被抗体的浓度是极其重要的一步。将不同浓度的抗体包被到 96 孔微孔板上,于 37 ℃ 下温育不同的时间,结果显示 400 ~ 1 000 pg/ml 浓度范围内,发光值随着包被抗体浓度的增加而依次增加。当包被量为 2 μg/ml 时,ENR 浓度与发光值的线性关系最好,且考虑到成本,最终选用 2 μg/ml 作为包被浓度。

2.2 包被时间对发光值的影响

比较不同包被时间下的发光值,结果显示,随着时间的延长,各浓度 ENR 发光值的总体趋势是在升高。相比之下 150 和 180 min 的发光值相对其他时间的数值要好一些,由于 150 min 的规律性较 180 min 的好,最终确定包被时间为 150 min。

2.3 酶标记的 ENR 抗原方法的影响

将碳化二亚胺缩合法和混合酞酐法制备出的偶联物用于化学发光免疫分析,发现前者的相对发光值要明显优于后者,故选用碳化二亚胺缩合法为本实验的酶标记 ENR 抗原方法。

2.4 偶联物的鉴定

ALP 在 280 nm 附近波长处有紫外吸收,ENR 不仅在 280 nm 附近有紫外吸收,而且在 316 和 328 nm 附近也有吸收,ENR 和 ALP 偶联后,偶联物的吸收峰较 ENR 的吸收峰红移至 322 和 334 nm 附近,并且在 266 nm 附近也有吸收峰,推测 ENR 和 ALP 偶联成功,见图 1。

2.5 化学发光时间的影响

室温下,选定 0.1 s 为发射光子积分的时间段^[12],测定不同浓度 ENR 的相对发光值,在一段时

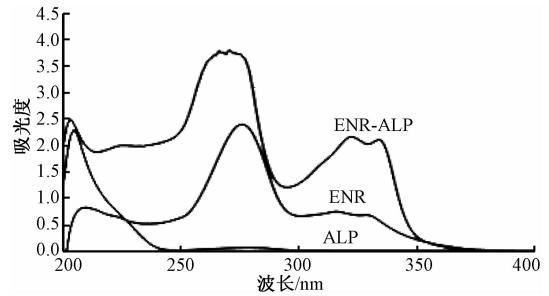


图 1 ENR, ALP, ENR-ALP 的紫外吸收图谱

Figure 1 UV spectrum of ENR, ALP and ENR-ALP

间内绘制酶促动力学曲线,并对其进行分析,最终确定化学发光最佳时间为 8 min。因为只有在这个时间段,各浓度的发光值才能正确体现与自身浓度的实际关系,且考虑到实验效率,也不适宜选用过长的时间进行检测。

2.6 发光剂量的影响

发光剂量直接影响到相对发光强度,参考相关文献设置不同的发光剂量,测定不同条件下的相对发光值,当 CB 缓冲液 1:4 (V_{发光剂}:V_{CB}) 稀释发光剂,25 μl/孔作为发光时,发光值强度满足实验要求并且相对标准偏差也最小。

2.7 线性范围及相关系数

采用酶联免疫吸附(ELISA)测定的线性范围为 1 ~ 1 000 ng/ml,而本实验的检测范围为 350 ~ 1 000 pg/ml。

比较表 1 中不同拟合曲线的决定系数,其中曲线 lgC-RLU 和 lgC-A/A₀ 很接近,C-RLU 最差,而 lgC-lgRLU 接近于 1。

2.8 检测限

做标准曲线的同时,随机选择 5 个孔做零标准品的 CLEIA 检测。发光值 RLU 的平均值 S₀ 及标准差 SD,依据 LOD = S₀ - 2SD 求出检测限为 239.9 pg/ml。

2.9 精密度

选择同一微孔板不同板孔以及不同的微孔板,平行测定不同浓度水平的相对发光值,根据结果计算批间、批内相对标准偏差(RSD),结果列于表 2。从表中数据可以看出批内 RSD 小于 10%,批间 RSD 小于 14%,说明本实验所建立的 CLEIA 方法的准确性在实验误差范围之内。

表 2 精密度的测定

Table 2 The determination of precision with three concentrations of ENR (n = 5)

ENR 浓度 (pg/ml)	批内测定值 RSD (%)	批间测定值 RSD (%)
350	9.1	13.3
600	8.1	12.2
1000	7.3	9.5

2.10 加标回收率

在牛奶基质中分别加入 350、600、1 000 pg/ml 的标准溶液,对每个浓度及空白样品平行测定 3 次,结果见表 3。平均回收率在 99.0% ~ 101.4% 之间,表明此方法的准确度较高,能够用于恩诺沙星残留量的检测。

表 3 回收率的测定

Table 3 The determination of recoveries added with three concentrations of ENR ($n=3$)

加标浓度 (pg/ml)	平均相对发光强 度对数(lg RLU)	实测平均浓度 (pg/ml)	平均回 收率(%)	相对标准 偏差(%)
350	4.152	350.5	100.1	2.1
600	3.948	594.1	99.0	2.3
1000	3.697	1013.8	101.4	1.5

3 结论

采用化学发光酶免疫分析方法对牛奶中恩诺沙星的含量进行了测定,样品前处理简单、检测时间短、仪器费用低廉、携带方便,可实现现场快速批量检测和大规模筛查。由于牛奶中成分复杂,特异性的吸附以及包被体的脱落可能会影响本方法的测定,因此其重现性还有待于进一步提高。

参考文献

[1] 何云亚,陈晓红. 高效液相色谱荧光检测法测定全血中环丙

沙星和恩诺沙星的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7):1261-1262.

- [2] 商军,王蓓,华贤辉,等. 高效液相色谱法测定赛鸽用复方恩诺沙星胶囊中恩诺沙星和甲氧苄啶的含量[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(8):7-10.
- [3] 仲晓宁,张璇,巩相莲. 双波长紫外分光光度法测定复方恩诺沙星可溶性粉中恩诺沙星和盐酸多西环素的含量[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(9):26-28.
- [4] 韩业超,张文光,赵彤波,等. 紫外吸收系数法测定恩诺沙星的含量[J]. 吉林畜牧兽医, 2002, 9:1-2.
- [5] 蒋兴东,陈玉飞,涂健,等. 恩诺沙星在鸡肉组织中残留的 ELISA 检测方法研究[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(8):30-33.
- [6] 李宗妍,曹立民,林洪,等. 水产品中恩诺沙星残留的一步法酶联免疫检测研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10):231-235.
- [7] 王克珍. 雌二醇化学发光免疫测定法的建立[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(4):252-254.
- [8] LIN S, HAN S Q, LIU Y B, et al. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(5):1250-1255.
- [9] ZHOU M X, WANG C Y, CHEN G, et al. Determination of theophylline concentration in serum by chemiluminescent immunoassay [J]. Zhejiang Univ Sci B, 2005, 6:1148-1152.
- [10] 胥传来,彭池方,郝凯,等. 化学发光酶免疫法测定水产品中残留氯霉素[J]. 分析化学, 2005, 33(12):1809.
- [11] 吴玲玲,姜楠. ELISA 法检测牛奶中氯霉素残留的前处理方法[J]. 职业与健康, 2008, 24(5):428-429.
- [12] MATSUMOTO M, KAWAHARA M, WATANABE N. Synthesis and chemiluminescent decomposition of spiro [1, 2-dioxetane-3, 6'-benzo(c) chromene]s [J]. Luminescence, 1999, 14:341-344.

[上接第IV页]

举例 [10] 肖钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

专利文献:[序号]专利申请者. 题名:专利国别,专利号[P]. 公告或公开日期.

3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库,本刊所付稿酬包括这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改,若涉及内容修改会与作者商榷。本刊概不退稿,编辑部收到稿件后,于3个月内通知处理意见。投稿6个月后如未收到修稿或录用通知,作者可自行处理稿件。来稿一经刊登,即按规定支付稿酬,并赠送杂志。

4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>,并同时邮寄稿件纸版1份和单位介绍信。

来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和 E-mail 地址。

编辑部地址:北京市宣武区南纬路 29 号 462 室 营养与食品安全所《中国食品卫生杂志》编辑部

邮政编码:100050 电话和传真:010-83132658 E-mail:spws462@163.com