

实验技术与方法

基于酪胺信号放大技术的新型 ELISA 法高灵敏检测达氟沙星

鲍欢欢¹,刘成伟²,刘道峰²,赖卫华¹

(1. 南昌大学食品学院,江西南昌 330029;2. 江西省疾病预防控制中心/江西省食源性疾病预防溯源重点实验室,江西南昌 330029)

摘要:目的 建立一种结果可视的新型 ELISA 法高灵敏检测达氟沙星。方法 基于酪胺信号放大原理,设计一种高灵敏检测达氟沙星的新型 ELISA 法;通过灵敏度、特异性实验评估本方法的有效性;将本方法应用于鸡肉和猪肉加标样本的检测进行方法验证。结果 本方法裸眼检测灵敏度为 0.4 ng/mL,相较于传统 ELISA 方法(10 ng/mL)的裸眼检测灵敏度提高了 25 倍;在缓冲液中与其他几种常用药物无明显交叉反应;对鸡肉和猪肉样本中加标的达氟沙星可有效检出。结论 本方法灵敏度高,特异性好,可用于实际样本中达氟沙星的现场裸眼定性检测。

关键词:酪胺信号放大技术;胶体金;抗坏血酸;达氟沙星

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)03-0517-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.03.019

Development of novel ELISA based on tyramine signal amplification for sensitive detection of danofloxacin

BAO Huanhuan¹, LIU Chengwei², LIU Daofeng², LAI Weihua¹

(1. College of Food Science and Technology, Nanchang University, Jiangxi Nanchang 330029, China;

2. Jiangxi Province Key Laboratory of Diagnosing and Tracing of Foodborne Disease, Jiangxi Province Centre for Disease Control and Prevention, Jiangxi Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective To develop a novel ELISA for sensitive and naked-eye detection of danofloxacin (DAN). **Methods** Based on TYR signal amplification, a novel ELISA was developed for sensitive detection of DAN. Analytical performance of the method was conducted by sensitivity and specificity experiments. The method was used for detecting DAN-spiked chicken and pork samples to verify. **Results** This method could be used to qualitatively detect DAN with naked eyes at a cut-off value of 0.4 ng/mL, which was 25-fold lower than that of the traditional ELISA (10 ng/mL). The method exhibited no cross-reaction of DAN with six other drugs in buffer. The method was successfully used for detecting DAN-spiked chicken and pork samples. **Conclusion** The developed novel ELISA exhibits high sensitivity and specificity, and can be used for the danofloxacin detection in actual samples by naked eye.

Key words: Tyramine signal amplification; AuNPs; ascorbic acid; danofloxacin

达氟沙星(Danofloxacin, DAN)又名单诺沙星,是第三代氟喹诺酮类药物,具有广谱抗菌活性^[1]。DAN 可以通过抑制革兰氏阳性菌中的 DNA 旋回酶和革兰氏阴性菌中的拓扑异构酶 IV 阻止细菌进行 DNA 复制,从而杀灭细菌^[2]。因此在我国畜牧养殖业得到了广泛的应用,主要用于治疗肺组织感染^[2]。然而长期或大剂量使用 DAN 会在动物体内残留,

人体摄入过量的 DAN 会产生包括头痛、恶心、腹泻、肝损伤、关节病和过敏等症状^[3]。因此,急需开发一种快速灵敏的分析方法用于动物产品中 DAN 的残留检测。

传统酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)常用来检测兽药残留,具有操作简单、成本低、高通量等优点^[4]。传统 ELISA 以辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)为标记酶,酶催化显色底物四甲基联苯胺(Tetramethyl benzidine, TMB)后溶液呈黄色,但由于不同深浅的黄色很难被肉眼区分,导致其裸眼检测灵敏度偏低。

酪胺信号放大系统(Tyramine signal amplification, TSA)常被用于细菌^[5]、病毒^[6]和细胞^[7]的检测,其原

收稿日期:2022-01-28

基金项目:国家重点研发计划(2019YFC1605502)

作者简介:鲍欢欢 女 硕士研究生 研究方向为食品质量与安全
Email: 2293575491@qq.com

通信作者:赖卫华 男 教授 研究方向为食品质量与安全
Email: talktolaiwh@163.com

理是:HRP 催化 H_2O_2 产生的羟基自由基(Hydroxyl radical, $\cdot OH$),能够使酪胺(Tyramine, TYR)以及蛋白质的酪氨酸残基的苯酚基团均转化成自由基中间体,自由基中间体相互共价结合,使得酪胺之间相互交联或与蛋白质连接,将 TYR 与荧光素等信号物质偶联,触发苯酚聚合反应后可引起信号放大^[8]。胶体金(AuNPs)作为一种良好的信号指示器,在不同的聚集状态下,可以呈现较大的颜色差异,有利于肉眼检测^[9-10]。近年来,胶体金被引入 TSA 系统,开发新型 ELISA 法,将 TYR 偶联在胶体金表面形成 TYR-AuNPs,利用 HRP 催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$ 使 TYR 相互交联从而导致胶体金聚集,产生颜色变化^[11]。在传统竞争 ELISA 中,结合在酶标板孔上的 HRP 含量一般在 ng/mL 到 pg/mL 之间,如此低含量的 HRP 催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$ 不足以诱导 TYR-AuNPs 聚集^[12],故限制了本信号放大技术在痕量物质检测领域的应用。

抗坏血酸(Ascorbic acid, AA)具有较强的还原性^[10],其化学结构的 2 号位碳原子上的羟基不稳定,容易被氧化失去生物学活性,磷酸化处理制成抗坏血酸 2-磷酸盐(Ascorbic acid -2-phosphate, AAP),稳定性大大提高^[13]。本研究在传统酪胺信号放大系统的基础上,将碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)作为标记酶引入酪胺信号放大技术中,巧妙地利用 ALP 催化 AAP 生成 AA,AA 争夺 $\cdot OH$ 的能力大于酪胺,酪胺交联反应所需的 $\cdot OH$ 被 AA 还原后导致 TYR-AuNPs 的聚集被阻断,胶体金溶液保持红色。本方法灵敏度高、特异性好,可用于实际样本中 DAN 的肉眼定性检测,在快检领域未见报道。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

HRP(上海索莱宝生物科技有限公司),TYR、过氧化氢酶(Catalase, CAT)(上海阿拉丁生化科技有限公司), H_2O_2 (国药集团化学试剂有限公司),AA、AAP、氯金酸、柠檬酸三钠(美国 Sigma 公司),ALP 标记的羊抗鼠二抗(ALP-IgG)(索莱宝公司),HRP 标记的羊抗鼠二抗(HRP-IgG)(优宁维生物科技有限公司),DAN、金刚烷胺(Amantadine, AMD)、泰乐菌素(Tylosin, TYL)、磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SMZ)、诺氟沙星(Norfloxacin, NOR)、加替沙星(Gatifloxacin, GAT)、莫西沙星(Moxifloxacin, MOX)标准品(上海百灵威有限公司),达氟沙星单克隆抗体(Anti-DAN-monoantibody, mAb)、达氟沙星全抗原(DAN-Bovine serum albumin, DAN-BSA)均为实验室自制,阴性鸡肉样本(本地超市)。

全自动酶标仪(北京普朗新技术有限公司),冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),JEM-2100 型透射电镜(日本 JEOL 公司)。

1.2 方法

1.2.1 检测方法的设计

方法的设计原理如图 1 所示,HRP 催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$ 能够使 TYR 相互交联,偶联在 AuNPs 表面的 TYR 相互交联导致胶体金聚集从而产生颜色变化,由红色转变为蓝色。样本中无 DAN 时, mAb 可与固定在酶标板上的 DAN-BSA 结合,ALP 标记的羊抗鼠二抗可与 mAb 结合从而固定在酶标板上。ALP 催化 AAP 产生 AA,由于 AA 具有较强的还原性,且 AA 的还原性强于苯酚,当 AA 与 TYR 同时存在时,AA 优先还原 HRP 催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$

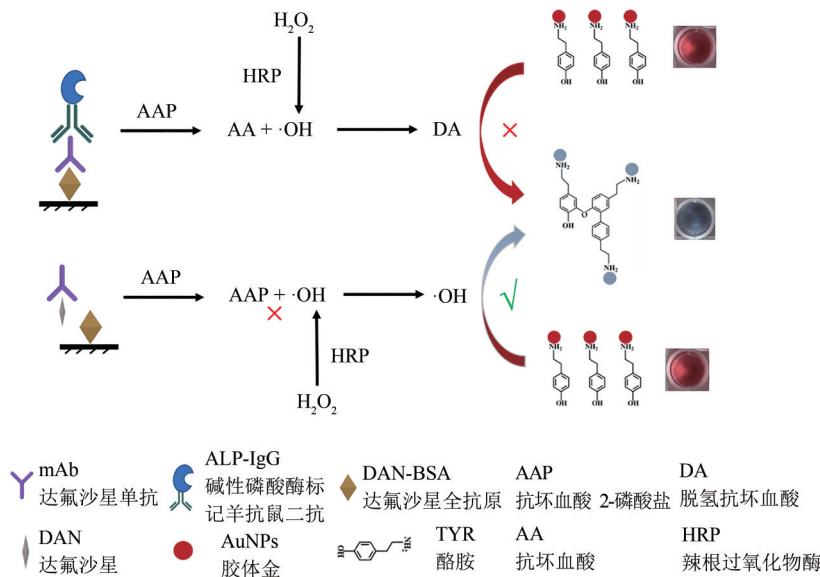


图 1 新型 ELISA 法检测达氟沙星原理图

Figure 1 Schematic diagram of novel ELISA for detection of DAN

OH,阻碍苯酚聚合反应产生,从而阻断胶体金聚集使得胶体金颜色不发生变化。当样本中 DAN 浓度高于肉眼检测灵敏度时,mAb 与游离的 DAN 大量结合,从而固定在板上的 ALP 量较少,催化产生的 AA 不能完全消耗 HRP 催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$,从而无法阻止胶体金聚集,胶体金颜色从红色转变为蓝色。

1.2.2 新型 ELISA 法的操作步骤

将 $1\ \mu g/mL$ 的 DAN-BSA 按每孔 $100\ \mu L$ 加入酶标板中, $37\ ^\circ C$ 孵育 2 h,用 PBST 溶液洗板 3 次,拍干;再加入 $100\ \mu L\ 1\ mg/mL$ 的 BSA 封闭液, $37\ ^\circ C$ 孵育 2 h,用 PBST 溶液洗板 4 次,拍干;加入 $50\ \mu L$ DAN 标准品或待检样本,再加入 $50\ \mu L$ mAb, $37\ ^\circ C$ 孵育 30 min,用 PBST 溶液洗板 5 次,拍干;加入 $100\ \mu L$ ALP-IgG, $37\ ^\circ C$ 孵育 30 min,用 PBST 溶液洗板 5 次,拍干;加入 $30\ \mu L$ AAP 溶液, $37\ ^\circ C$ 孵育 1 h,再向每孔中加入 $20\ \mu L\ 0.1\ mg/mL$ 的 HRP,将 $150\ \mu L$ 的 AuNPs、 $20\ \mu L$ 的 TYR 和 $20\ \mu L$ 的 H_2O_2 混匀后加入孔中,观察颜色变化。

1.2.3 胶体金的制备及表征

将 $100\ mL\ 0.01\%$ HAuCl₄ 溶液(w/v)加热至沸腾后,快速加入 $2\ mL\ 1\%$ 柠檬酸三钠溶液(w/v)。在持续的加热和搅拌下,溶液的颜色在 2 min 内变为紫红色。继续加热 15 min 后,停止加热,继续搅拌 15 min。冷却至室温后 $12000\ r/min$ 离心 20 min,将沉淀复溶至二分之一体系并于 $4\ ^\circ C$ 保存。取 $150\ \mu L$ AuNPs,加入 $20\ \mu L$ HRP($0.1\ mg/mL$)、 $20\ \mu L$ TYR($0.5\ mg/mL$)和 $20\ \mu L\ H_2O_2$ ($0.4\ mmol/L$),制得聚集态胶体金。

将分散和聚集状态的胶体金用超纯水分别稀释 20 倍,分别取 $7\ \mu L$ 滴在铜网上并烘干,重复滴加和烘干操作 3 次,拍摄 TEM 电镜图片。

1.2.4 概念验证

本检测方案的设计环节较多,影响因素复杂,为充分验证本方案的有效性,ALP、AAP、HRP 和 H_2O_2 对最终检测信号的影响,故需对 TYR-AuNPs 聚集与聚集阻断行为进行分环节验证,具体方法如下:将 ALP、AAP、HRP 和 H_2O_2 的几种不同组合与 TYR-AuNPs 混合,分别为:TYR-AuNPs、HRP+TYR-AuNPs、 H_2O_2 +TYR-AuNPs、HRP+ H_2O_2 +TYR-AuNPs、AAP+HRP+ H_2O_2 +TYR-AuNPs 和 ALP+AAP+HRP+ H_2O_2 +TYR-AuNPs。加样顺序为:向酶标孔中加入 $10\ \mu L$ ALP($1\ mg/mL$)和 $30\ \mu L$ AAP($2.5\ mmol/L$),孵育 2 min,再将 HRP($0.1\ mg/mL$)按每孔 $20\ \mu L$ 加入孔中,向 $200\ \mu L$ 离心管中加入 $20\ \mu L\ H_2O_2$ ($0.4\ mmol/L$)、 $20\ \mu L$ TYR($0.5\ mg/mL$)和 $150\ \mu L$ AuNPs 并混

匀,将离心管中的混合溶液移入酶标孔中,观察颜色变化。用超纯水调节控制溶液体积,使其保持一致。记录 $450\sim 800\ nm$ 的紫外吸收光谱及酶标板照片。

设置 TYR 的浓度为 0.01 、 0.025 、 0.05 、 0.1 、 0.25 和 $0.5\ mg\cdot mL^{-1}$,向酶标孔中加入 $10\ \mu L\ 0.1\ mg/mL$ 的 HRP,将 $150\ \mu L$ 的 AuNPs、 $20\ \mu L$ 的 TYR 和 $20\ \mu L$ 的 H_2O_2 ($0.4\ mmol/L$)混匀后加入孔中,观察颜色变化。

设置 AAP 的浓度为 0.0125 、 0.25 、 0.5 、 1 、 2 和 $3\ mmol/L$,向酶标孔中加入 $10\ \mu L$ ALP($1\ mg/mL$),再加入 $30\ \mu L$ AAP($2.5\ mmol/L$),孵育 2 min,将 HRP($0.1\ mg/mL$)按每孔 $20\ \mu L$ 加入孔中,向 $200\ \mu L$ 离心管中加入 $20\ \mu L\ H_2O_2$ ($0.4\ mmol/L$)、 $20\ \mu L$ TYR($0.5\ mg/mL$)和 $150\ \mu L$ AuNPs 并混匀,将离心管中的混合溶液移入酶标孔中,观察颜色变化。测 524 和 $660\ nm$ 处的吸光度并拍照记录。

1.2.5 实验条件的优化

1.2.5.1 mAb 浓度的优化

mAb 的浓度采用传统竞争型 ELISA 方法进行优化。设置 mAb 的浓度为 0.05 、 0.1 、 0.2 和 $0.4\ \mu g/mL$ 。将 $1\ \mu g/mL$ 的 DAN-BSA 按每孔 $100\ \mu L$ 加入酶标板中, $37\ ^\circ C$ 孵育 2 h,用 PBST 溶液洗板 3 次,拍干;再加入 $100\ \mu L\ 1\ mg/mL$ 的 BSA 封闭液, $37\ ^\circ C$ 孵育 2 h,用 PBST 溶液洗板 4 次,拍干;加入 $50\ \mu L$ 的 PBS 缓冲液或 DAN($5\ ng/mL$)和 $50\ \mu L$ 的 mAb, $37\ ^\circ C$ 孵育 30 min,用 PBST 溶液洗板 5 次,拍干;加入 $100\ \mu L$ 的 HRP-IgG, $37\ ^\circ C$ 孵育 30 min,用 PBST 溶液洗板 5 次,拍干;加入 $100\ \mu L$ TMB 显色液, $37\ ^\circ C$ 孵育 15 min 后加入 $50\ \mu L$ 硫酸终止液。测 $450\ nm$ 处的吸光度,并计算抑制率。抑制率(Inhibition rate)= 1 -阳性值/阴性值。

1.2.5.2 ALP-IgG 浓度的优化

设置 ALP-IgG 的浓度为 0.6 、 0.75 、 1.0 、 1.5 和 $3.0\ \mu g/mL$,按 1.2.2 的操作步骤进行实验,测 524 和 $660\ nm$ 处的吸光度,并记录酶标板照片。

1.2.5.3 H_2O_2 浓度的优化

设置 H_2O_2 的浓度为 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 和 $0.7\ mmol/L$,按 1.2.2 的操作步骤进行实验,测 524 和 $660\ nm$ 处的吸光度,并记录酶标板照片。

1.2.5.4 时间优化

设置 ALP 催化 AAP 的时间分别为 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 和 $70\ min$,按 1.2.2 的操作步骤进行实验,测 524 和 $660\ nm$ 处的吸光度,并记录酶标板照片。

1.2.6 新型ELISA法性能评价

1.2.6.1 确定新型ELISA法及传统ELISA的裸眼检测灵敏度

用新型ELISA法检测DAN,设置DAN标准品浓度分别为0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、2、5、10和20 ng/mL,测524和660 nm处的吸光度,以524和660 nm处的吸光度的比值(A_{524}/A_{660})作为纵坐标,以DAN浓度为横坐标绘制柱状图,并记录酶标板照片。按照1.2.5.1用传统ELISA检测DAN,设置DAN标准品浓度分别为0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、2、5、10和20 ng/mL,测450 nm处的吸光度,以DAN浓度为横坐标绘制柱状图,并记录酶标板照片。

1.2.6.2 特异性

DAN和六种小分子药物被用于本方法的特异性分析实验。DAN、AMD、TYL、SMZ、NOR、GAT和MOX标准品的浓度均为5 ng/mL,以PBS为空白对照。测524和660 nm处的吸光度,并记录酶标板照片。

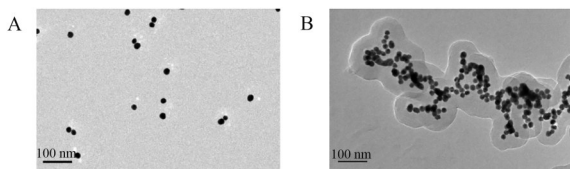
1.2.6.3 实际样本检测

根据农业部1025号公告(高效液相色谱法)^[14]制备3份鸡肉样本和3份猪肉样本提取液,取2.5 g已绞碎的鸡肉样品或猪肉样品于离心管中,加入10 mL 0.01 mol/L的PBS缓冲溶液,涡旋混匀,10 000 r/min离心5 min,上清中分别添加DAN标准品,制备6个浓度的待测样品,分别为0、0.1、0.4、1、5和10 ng/mL,观察颜色变化并记录酶标板照片。

2 结果与分析

2.1 TEM表征结果

如图2A,原胶体金溶液分散性良好,粒径均一,约为20 nm。如图2B,加入了HRP、 H_2O_2 和TYR的胶体金聚集状态明显。



注:A:分散状态下胶体金;B:聚集状态下胶体金

图2 透射电镜图

Figure 2 TEM images of AuNPs

2.2 概念验证结果

如图3A,HRP和 H_2O_2 均不能单独使TYR-AuNPs聚集,只有HRP和 H_2O_2 同时存在时,TYR-AuNPs才能发生聚集,颜色从红色变为蓝色。AAP不能阻止TYR-AuNPs聚集,但在添加了ALP时,ALP催化AAP产生

的AA能够消耗HRP催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$,从而阻止TYR-AuNPs聚集,溶液呈红色。如图3B,测定AuNPs与TYR-AuNPs、HRP+ H_2O_2 +TYR-AuNPs和ALP+AAP+HRP+ H_2O_2 +TYR-AuNPs三种组合在450~800 nm处的紫外吸收光谱,游离状态下胶体金的紫外特征吸收峰在524 nm处,聚集状态下胶体金在524 nm处的吸收峰降低,而在660 nm处出现新的吸收峰,胶体金的聚集程度可以用524与660 nm处的吸光度比值(A_{524}/A_{660})表示。如图3C,随着TYR浓度升高,胶体金溶液颜色逐渐由红色过渡为紫色后转变为蓝色, A_{524}/A_{660} 逐渐降低,表明TYR浓度是使得胶体金聚集的关键。如图3D,随着AAP浓度的升高,不同程度地阻断了胶体金的聚集,当AAP浓度达到1 mmol/L时,胶体金不再聚集,呈现原本的红色,表明当AAP浓度足够高时,其催化产物能够完全阻断胶体金聚集。概念验证实验结果表明,HRP催化 H_2O_2 能够使得TYR-AuNPs聚集;TYR-AuNPs聚集与分散状态颜色差别明显,可被肉眼有效区别;只有当ALP和底物AAP同时存在时,才能够阻断HRP酶催化诱导的胶体金聚集反应。

2.3 条件优化

2.3.1 mAb浓度的优化

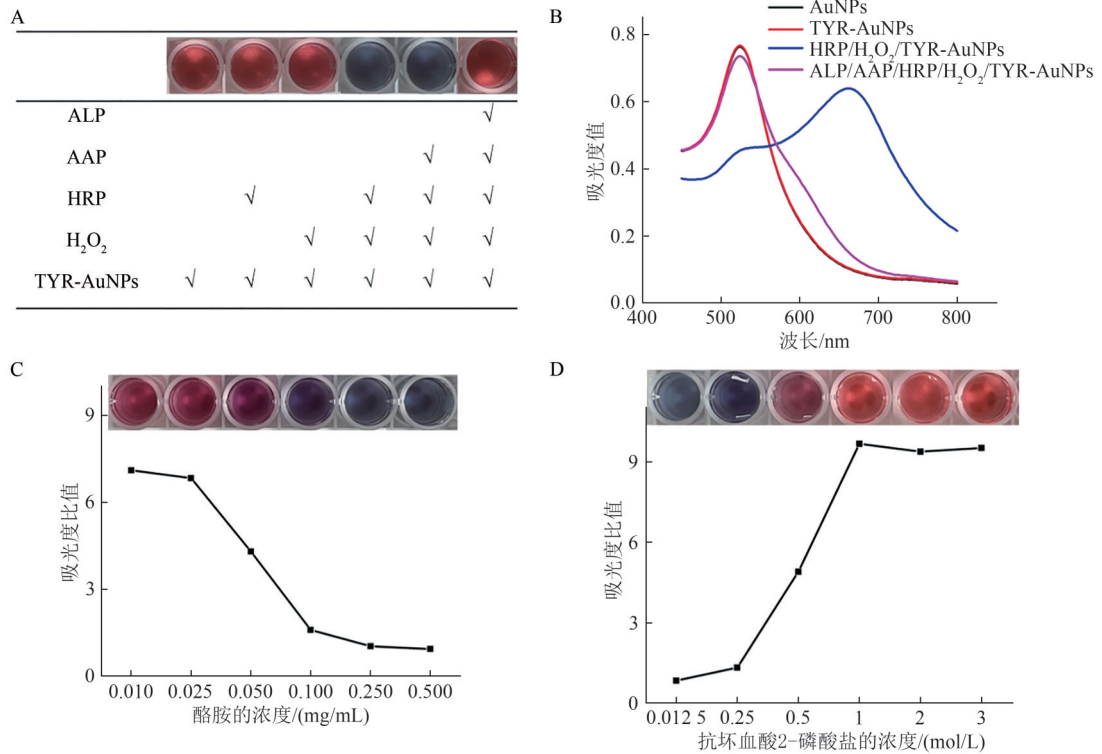
如图4A,mAb的浓度采用传统竞争型ELISA方法进行优化。随着mAb的浓度从0.05 $\mu g/mL$ 增加至0.4 $\mu g/mL$,阴性值逐渐增大,但当mAb的浓度从0.2 $\mu g/mL$ 增加至0.4 $\mu g/mL$ 时,抑制率降低,通过保证高的阴性值和抑制率,从而保证方法灵敏度,故选择0.2 $\mu g/mL$ 为最佳mAb的浓度。

2.3.2 ALP-IgG浓度的优化

如图4B,随着ALP-IgG的浓度从0.6 $\mu g/mL$ 增加至1.0 $\mu g/mL$ 时,胶体金颜色从蓝色转为红色,胶体金聚集被阻断,当ALP-IgG浓度继续升高时,胶体金保持红色不变,故选择1.0 $\mu g/mL$ 为最佳ALP-IgG的浓度。

2.3.3 H_2O_2 浓度的优化

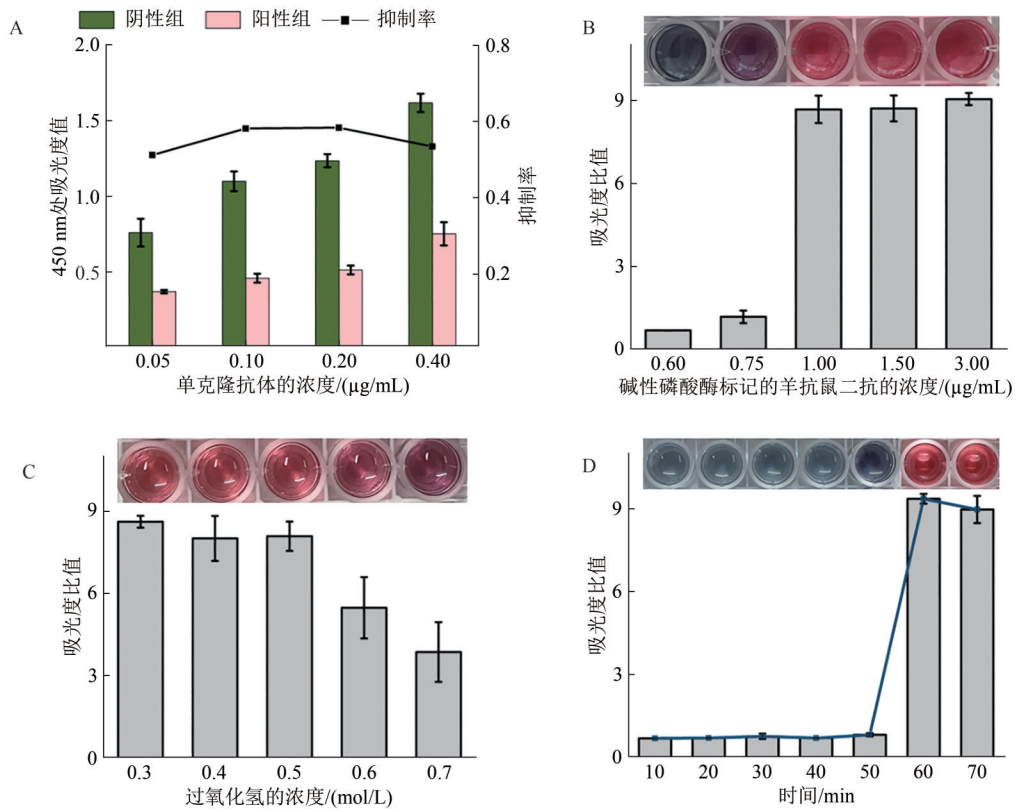
如图4C, H_2O_2 的浓度为0.3~0.5 mmol/L时,胶体金溶液呈红色,随着 H_2O_2 浓度的继续增加,胶体金溶液的颜色由红色转为紫色,此时由于ALP催化AAP产生AA的量不足以消耗HRP催化 H_2O_2 产生的 $\cdot OH$,无法阻断胶体金聚集,过量的 H_2O_2 会导致阴性条件下溶液无法呈现胶体金的原有红色,则不易与阳性条件下的胶体金颜色区分,不利于肉眼判读。而 H_2O_2 浓度偏低时,低浓度AA即可阻断胶体金聚集,从而导致方法灵敏度偏低。为保证准确的肉眼判读和高灵敏度,选择0.5 mmol/L为最佳



注:A:利用碱性磷酸酶、抗坏血酸2-磷酸盐、辣根过氧化物酶、H₂O₂与酪胺-胶体金复合物的几种不同组合对方法进行可行性分析;B:四种组合下胶体金溶液的紫外可见吸收光谱;C:酪胺对羟基自由基触发的胶体金聚集反应的影响;D:抗坏血酸2-磷酸盐对羟基自由基触发的胶体金聚集反应的影响

图3 概念验证

Figure 3 Verification of the dual-color response



注:A:达氟沙星单抗浓度的优化;B:碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗浓度的优化;C:过氧化氢浓度的优化;D:碱性磷酸酶催化抗坏血酸的时间优化

图4 实验条件的优化

Figure 4 Optimization of experimental conditions

H₂O₂ 浓度。

2.3.4 时间优化

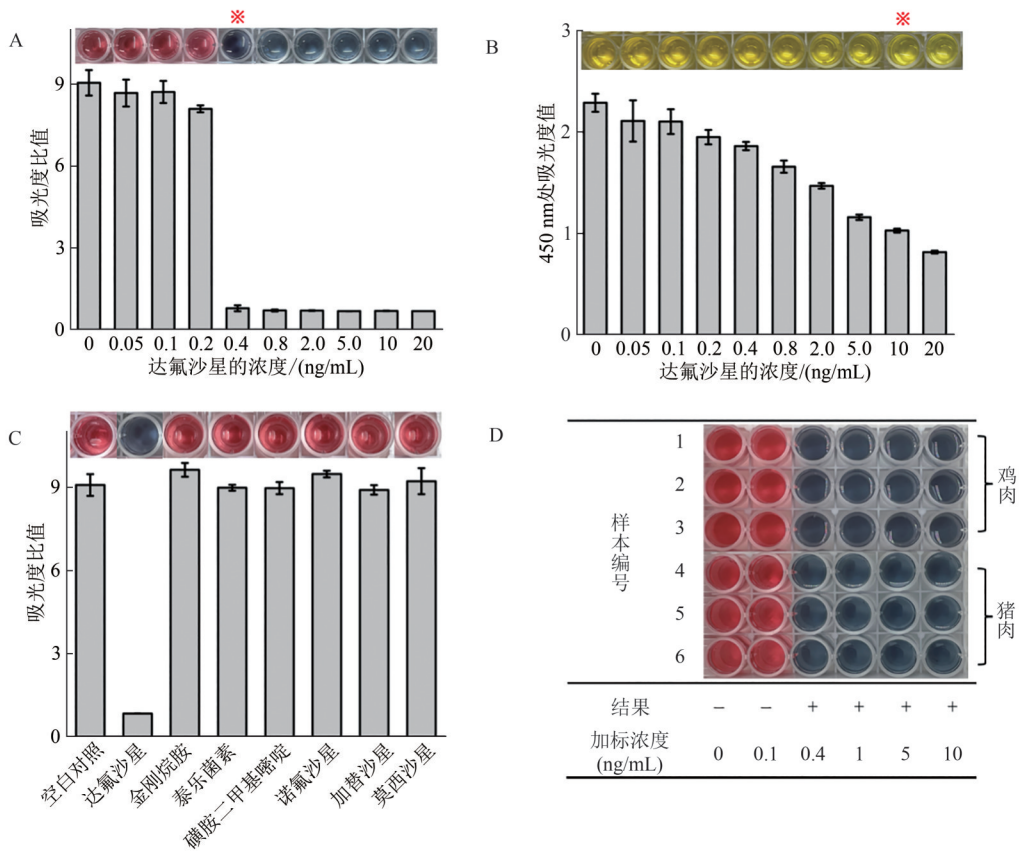
如图 4D,当催化 60 min 后,胶体金聚集恰好被阻断且颜色不再发生变化,故选择 60 min 作为 ALP 催化 AAP 的最佳反应时间。

2.4 新型 ELISA 法性能评价

2.4.1 确定新型 ELISA 法及传统 ELISA 的裸眼检测灵敏度

如图 5A,用新型 ELISA 法检测不同浓度的 DAN,当目标物 DAN 浓度等于或低于 0.2 ng/mL 时,胶体金聚集完全被阻断,溶液呈红色,当目标物

DAN 浓度 ≥0.4 ng/mL 时,胶体金聚集,溶液呈蓝色。表明本方法最低裸眼检测值为 0.4 ng/mL。如图 5B,用传统 ELISA 方法检测 DAN,当目标物浓度为 10 ng/mL,溶液肉眼可见黄色变浅,即传统 ELISA 方法检测 DAN 的裸眼检测灵敏度为 10 ng/mL。相对于传统 ELISA 方法,新型 ELISA 法通过引入酪胺信号放大技术,并结合 ALP 的催化放大体系,大大提高了检测灵敏度,其裸眼检测灵敏度提高了 25 倍。且相较于传统 ELISA 而言,本方法的阴阳性结果有明显的颜色差异(红色转变为蓝色),更利于裸眼判读和定性检测。



注:A:新型 ELISA 法检测达氟沙星;B:传统 ELISA 法检测达氟沙星;红色“※”代表裸眼检测灵敏度;C:特异性分析,用新型 ELISA 法同时检测达氟沙星和其他六种小分子药物(达氟沙星、金刚烷胺、泰乐菌素、磺胺二甲基噻唑、诺氟沙星、加替沙星和莫西沙星,浓度均为 5 ng/mL);D:实际样本检测,向 3 个鸡肉样本和 3 个猪肉样本提取液中添加达氟沙星标准品,加标浓度均为 0、0.1、0.4、1、5 和 10 ng/mL。

图 5 新型 ELISA 法性能评价

Figure 5 Analytical performance of novel ELISA

2.4.2 特异性

用本方法分别检测 DAN 与 AMD、TYL、SMZ、NOR、GAT 和 MOX(5 ng/mL)六种小分子药物,如图 5C,仅当目标物 DAN 存在时,胶体金聚集溶液呈现蓝色,故本方法特异性高。

2.4.3 实际样本检测

对加标水平为 0、0.1、0.4、1、5 和 10 ng/mL 的阴性鸡肉样本和猪肉样本提取液进行检测,结果如图 5 D 所示。当加标浓度低于裸眼检测灵敏度时,

溶液呈红色,结果显示阴性;当加标浓度等于或高于裸眼检测灵敏度时,溶液呈蓝色,结果显示阳性。结果显示对 3 个鸡肉加标样本和 3 个猪肉加标样本均未出现假阳性或假阴性结果,表明本方法可用于鸡肉和猪肉实际样本中 DAN 的裸眼定性测定。

3 讨论

DAN 作为第三代氟喹诺酮类药物,其抗菌谱广,可以有效抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、衣

原体、支原体及螺旋体^[15]。然而,DAN 的滥用会导致一系列副作用,威胁人类健康^[16]。因此,急需开发一种快速灵敏的分析方法用于动物产品中 DAN 的残留检测。传统竞争抑制型 ELISA 方法,利用酶催化底物显黄色,通过与阴性孔颜色对比,根据颜色变化程度判断是否有目标物的存在,而颜色深浅程度往往不易判别,导致传统竞争抑制型 ELISA 的裸眼检测灵敏度较低^[17]。本方法利用“分散”和“聚集”两种状态下的胶体金分别呈现的红色和蓝色,颜色差异较大的特点,建立了可裸眼检测的 ELISA 法。利用碱性磷酸酶作为标记酶催化底物抗坏血酸 2-磷酸盐,生成的抗坏血酸还原羟基自由基从而抑制酪胺相互交联,进而阻断胶体金聚集,实现信号的灵敏变化,从而提高方法的检测灵敏度。本方法的裸眼检测灵敏度为 0.4 ng/mL,与其他几种常用药物无交叉反应,并且成功应用于鸡肉和猪肉加标样品中 DAN 的检测。本方法灵敏度高、特异性好、操作简便,无需复杂的实验室设备,仅靠裸眼判读即可完成输出信号采集,可以满足日益增加的食品安全现场快速检测的需求。

参考文献

- [1] FANG B L, XU S L, HUANG Z, et al. Glucose oxidase-induced colorimetric immunoassay for qualitative detection of danofloxacin based on iron (II) chelation reaction with phenanthroline[J]. Food Chemistry, 2020, 328: 127099.
- [2] 王莹. 达氟沙星在健康与多杀性巴氏杆菌感染鸭的药动学比较[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
WANG Y. Comparison of pharmacokinetics of danofloxacin in healthy and *Pasteurella multocida* infected ducks [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.
- [3] 袁美芳. 达氟沙星单克隆抗体的制备及 PELISA 方法的建立 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
YUAN M F. The preparation of anti-danofloxacin monoclonal antibodies and the establishment of a pELISA method [D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [4] SUGIYAMA T, ICHIKAWA-SEKI M, SATO H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant *Fasciola cathepsin* L1 for the diagnosis of human fasciolosis caused by *Fasciola hepatica/gigantica* hybrid type[J]. Parasitology International, 2021, 82: 102311.
- [5] HERZIG G P D, AYDIN M, DUNIGAN S, et al. Magnetic bead-based immunoassay coupled with tyramide signal amplification for detection of *S. almonella* in foods[J]. Journal of Food Safety, 2016, 36(3): 383-391.
- [6] CHEN R P, SUN Y F, HUO B Y, et al. Highly sensitive detection of ochratoxin A based on bio-barcode immunoassay and catalytic hairpin assembly signal amplification[J]. Talanta, 2020, 208: 120405.
- [7] ROY S, AXELROD H D, VALKENBURG K C, et al. Optimization of prostate cancer cell detection using multiplex tyramide signal amplification[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(4): 4804-4812.
- [8] 逢萌雯. 酪胺盐信号放大的荧光原位杂交技术在特定类群微型鞭毛虫研究中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
PANG M W. The application of tyramide signal amplification fluorescent in situ hybridization in the study of specific nanoflagellate groups [D]. Xiamen: Xiamen University, 2019.
- [9] YANG T, LUO Z W, TIAN Y H, et al. Design strategies of AuNPs-based nucleic acid colorimetric biosensors [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 124: 115795.
- [10] YU Y, LI Y S, ZHANG Q, et al. Colorimetric immunoassay via smartphone based on Mn²⁺-Mediated aggregation of AuNPs for convenient detection of fumonisin B1[J]. Food Control, 2022, 132: 108481.
- [11] ZHENG L Y, CAI G Z, WANG S Y, et al. A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 124-125: 143-149.
- [12] CHEN X R, LIANG Y, ZHANG W J, et al. A colorimetric immunoassay based on glucose oxidase-induced AuNP aggregation for the detection of fumonisin B1[J]. Talanta, 2018, 186: 29-35.
- [13] SU B C, XU H, XIE G F, et al. Generation of a nanobody-alkaline phosphatase fusion and its application in an enzyme cascade-amplified immunoassay for colorimetric detection of alpha fetoprotein in human serum[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 262: 120088.
- [14] 农业标准出版研究中心. 农业部 1025 号公告-14-2008 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
Agricultural Standards Publishing Research Center. Ministry of Agriculture Announcement No. 1025-14-2008, Determination of fluoroquinolones residues in animal derived food by high performance liquid chromatography [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2008.
- [15] RODRÍGUEZ CÁCERES M I, GUIBERTEAU CABANILLAS A, BOHOYO GIL D, et al. Quantification of danofloxacin and difloxacin in chicken tissues in the presence of sarafloxacin as interference [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(17): 7627-7633.
- [16] CHE Y, SONG Q F, YANG T C, et al. Fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* independent of fluoroquinolone use [J]. European Respiratory Journal, 2017, 50(6): 1701633.
- [17] XIONG Y, PEI K, WU Y Q, et al. Plasmonic ELISA based on enzyme-assisted etching of Au nanorods for the highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn samples [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 267: 320-327.