

杨兴东, 魏慧雅, 曲扬. 间接竞争 ELISA 检测蜂蜜中氧氟沙星残留 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(23): 240–247. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120006

YANG Xingdong, WEI Huiya, QU Yang. Determination of Ofloxacin Residues in Honey by Indirect Competition ELISA[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(23): 240–247. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120006

· 分析检测 ·

间接竞争 ELISA 检测蜂蜜中氧氟沙星残留

杨兴东^{1,*}, 魏慧雅², 曲扬¹

(1. 周口师范学院食品药品检验检测中心, 生命科学与农学院, 河南周口 466001;

2. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471000)

摘要: 为了建立间接竞争 ELISA 法检测氧氟沙星 (Ofloxacin, OFLX) 在蜂蜜中的残留, 本研究采用活性酯法将 OFLX 与载体蛋白偶联, 得到抗 OFLX 完全抗原 (OFLX-BSA) 和检测抗原 (OFLX-OVA)。采用 OFLX-BSA 免疫 BALB/c 小鼠, 之后用杂交瘤等技术制备抗 OFLX 单克隆抗体。通过优化反应条件, 建立间接竞争 ELISA 方法, 并对该法的准确度、精密度和特异性进行判定。结果显示 OFLX 与载体蛋白偶联成功; 得到一株抗 OFLX 的杂交瘤细胞株 (3D7), 单克隆抗体的 IC_{50} 值为 1.17 ng/mL; 该法在蜂蜜中的 OFLX 平均添加回收率为 84.1%, 其批间变异系数均大于批内的变异系数, 与马波沙星的交叉反应率为 52.9%, 与其他竞争反应物没有交叉反应。本研究建立的间接竞争 ELISA 方法能够满足 OFLX 在蜂蜜中残留的测定需求。

关键词: 氧氟沙星, 免疫原, 单克隆抗体, 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 蜂蜜

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)23-0240-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120006

本文网刊:



Determination of Ofloxacin Residues in Honey by Indirect Competition ELISA

YANG Xingdong^{1,*}, WEI Huiya², QU Yang¹

(1. College of Life Science and Agronomy, Institute of Food and Drug Inspection, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China;

2. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract: In order to establish an indirect competitive ELISA for the detection of ofloxacin (OFLX) residues in honey, in this study, OFLX was coupled to carrier proteins using the active ester method to obtain anti-OFLX complete antigen (OFLX-BSA) and detection antigen (OFLX-OVA). BALB/c mice were immunized with OFLX-BSA, after which anti-OFLX monoclonal antibodies were prepared by hybridoma and other techniques. An indirect competitive ELISA method was developed by optimizing the reaction conditions and the accuracy, precision and specificity of the method were determined. The results showed that OFLX was successfully coupled to the carrier protein, a hybridoma cell line (3D7) against OFLX was obtained. And the IC_{50} value of the monoclonal antibody was 1.17 ng/mL. The average recovery rate of OFLX spiked in honey by this method was 84.1%, and its intra-batch coefficients of variation were greater than inter-batch ones in all batches. The cross-reaction rate with marbofloxacin was 52.9%, and no cross-reaction with the other competing reactants. The indirect competitive ELISA method developed in this study is able to fulfill the requirements for determination of OFLX residues in honey.

Key words: ofloxacin; immunogen; monoclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); honey

氧氟沙星 (Ofloxacin, OFLX) 属于氟喹诺酮类 (Fluoroquinolones, FQs) 合成抗菌药物, 具有抗菌谱

广、抗菌活性强、组织渗透性好等优势, 对多种致病菌均有良好的抗菌效果, 在兽医行业被广泛用于治疗

收稿日期: 2023-12-04

基金项目: 河南省科技攻关项目 (212102110094); 周口师范学院 2022 年中青年骨干教师资助。

作者简介/通信作者*: 杨兴东 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品免疫学检测, E-mail: zkskyyxd@163.com。

和预防各种传染病,还能促进动物生长,减少成本,为此被作为兽医药物和饲料添加剂在动物养殖中过度使用^[1-4]。随着我国蜂蜜的出口量逐年增加,其质量问题受到越来越多的关注,在蜂蜜的实际生产流程中,OFLX 可以防治蜜蜂的腐臭病和麻痹症等,并能提升蜂蜜的产能^[5-6]。而随着 OFLX 在动物生产中的滥用,经食物链和环境进入人体,对人类健康构成各种潜在危险,如菌群失调、直接的毒性反应(恶心、呕吐、眩晕、心悸和心血管系统问题)、过敏反应(皮肤损伤和光降解产物的毒性)、某些酶活性抑制等^[7-10],世界卫生组织(World health organization, WHO)称抗菌药耐药性(Antimicrobial resistance, AMR)已成为一个全球健康问题,到 2050 年,多重 AMR 导致的死亡人数预计将超过 1000 万^[11]。因此,应对 OFLX 进行严格的监测和控制,2023 年我国农业农村部发布了“食品中 41 种兽药最大残留限量(Maximum residue limits, MRLs)”(GB 31650.1-2022),其中规定所有食品动物(包含鱼)靶组织(肌肉、肝、肾、脂肪、蛋和奶)中 OFLX 的 MRLs 均为 2 ng/mL,蜂蜜为 5 ng/mL。因此,发展检测 OFLX 残留的分析方法尤为重要。

目前,传统的检测 OFLX 残留方法包括高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)^[12-15]、超高液相色谱串联质谱法(Ultra HPLC-MS/MS, UHPLC-MS/MS)^[16-19]、化学发光法(Chemiluminescence, CL)^[20]、毛细管电泳法(Capillary electrophoresis)^[21]、微生物检测法(Microbiological assay)^[22]等。虽然这些方法都是经过验证并被广泛接受的方法,但这些方法通常费时、费力,且需要繁杂的样品预处理、大量的设备投资等,并不适用 OFLX 大规模的现场筛查^[23-24]。酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)在动物源性食品检测中具有灵敏、特异、简便的特点,适用于大量样品的现场分析检测。鉴于今年我国关于 OFLX 在动物源性食品中的 MRLs 更加严格的规定,目前国内尚无关于 OFLX 免疫分析方法检测蜂蜜中残留的报道,本研究建立了一种灵敏、特异的蜂蜜中检测 OFLX 的间接竞争 ELISA 法,将为此提供更有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

OFLX、水溶性碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxy succinimide, NHS)、弗氏佐剂、牛血清白蛋白(Bovine albumin, BSA) Sigma 公司;鸡卵白蛋白(Ovalbumin, OVA) 上海源叶生物科技有限公司;羊抗鼠酶标二抗 洛阳华美生物工程有限公司;马波沙星(Marbofloxacin, MAR)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)、洛美沙星(Lomefloxacin, LOM)、沙拉沙星(Sarafloxacin, SAR) 上海阿拉丁生化科技股份有

限公司;替马沙星(Temafloxacin, TEM) 上海麦克林生化科技股份有限公司;蜂蜜 周口市川汇区当地某大型超市;SPF 级 BALB/c 小鼠(许可证号:SCX-K(豫)2021-0009,动物伦理审批号:ZKNU2023041)

郑州大学医学院实验动物中心;SP2/0 细胞 河南省动物免疫学重点实验室提供。

Thermo Scientific NanoDrop 2000c 紫外分光光度计、Multiskan 酶标仪 美国 Thermo Electron 公司;Tanon-1600 凝胶成像仪、VE-180A 电泳仪 上海 Tanon 科技有限公司;N-1000 核酸蛋白分析仪 德国 BECKMAN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫原的制备与鉴定

1.2.1.1 OFLX 免疫原的合成 利用活性酯法合成 OFLX-BSA^[25]。36.5 mg OFLX 溶解在 3 mL N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF)中,再加入 15.6 mg EDC 与 11.6 mg NHS,待完全溶解后,添加双蒸水 2 mL,在暗环境中,混合液作用 18 h,得到 OFLX 中间反应产物(A 液)。55.0 mg BSA 充分溶解在 1.8 mL PBS 溶液中(B 液),在冰浴条件下,将 A 液逐滴添加到 B 液中,继续反应 12 h。将上述混合液放入透析袋中,用 PBS 缓冲液(pH7.4)透析 72 h,每天更换透析液 2 次,收获免疫原(OFLX-BSA),以此方法制备检测原(OFLX-OVA),3900 r/min 离心 5 min, -20 °C 保存备用。具体的反应路线见图 1。

1.2.1.2 OFLX 免疫原的鉴定 紫外扫描鉴定:将 OFLX、BSA、OFLX-BSA 统一调整到 0.8 mg/mL,在波长 220~350 nm 范围内,用核酸蛋白分析仪分别对这 3 种物质进行测定,比较 BSA 和抗 OFLX-BSA 免疫原的特征峰,判断 OFLX 与载体蛋白(BSA)是否偶联成功^[26]。SDS-PAGE 鉴定:制备 5% 浓缩胶和 12% 分离胶,在浓缩胶的样孔中依次加入 Marker、BSA 和 OFLX-BSA,浓缩胶和分离胶的电压分别为 70、82 V,电泳完毕后,进一步染色及脱色。通过对比 BSA 与 OFLX-BSA 的泳动速率判定 OFLX 与 BSA 是否偶联成功。

1.2.1.3 OFLX 多克隆抗体的鉴定 间接 ELISA 测定 OFLX 多克隆抗体的效价:将检测抗原(OFLX-OVA)用 5 µg/mL 碳酸盐缓冲液(Carbonate buffer solution, CBS)稀释浓度至 2.0 µg/mL,包被量 50 µL/孔,37 °C 孵育 2 h, PBST(含 0.5 mL/L 吐温-20 的 PBS 溶液)洗板 4 次,5% 猪血清以 220 µL/孔加入,4 °C 反应 12 h,洗板 4 次,自然晾干,待测;每孔均加入一系列倍比稀释(200、400、800、1600、3200、6400、12800)的 OFLX 多克隆抗体 50 µL,并设阴性对照和空白对照,37 °C 分别孵育 15 min, PBST 洗板 4 次;1:1000 稀释的羊抗鼠酶标二抗以 50 µL/孔加入,37 °C 孵育 30 min 后, PBST 洗板 6 次;加入显色液,6 min 后,加入终止液,立即把 ELISA 板放入酶标仪进行测定。间接竞争 ELISA

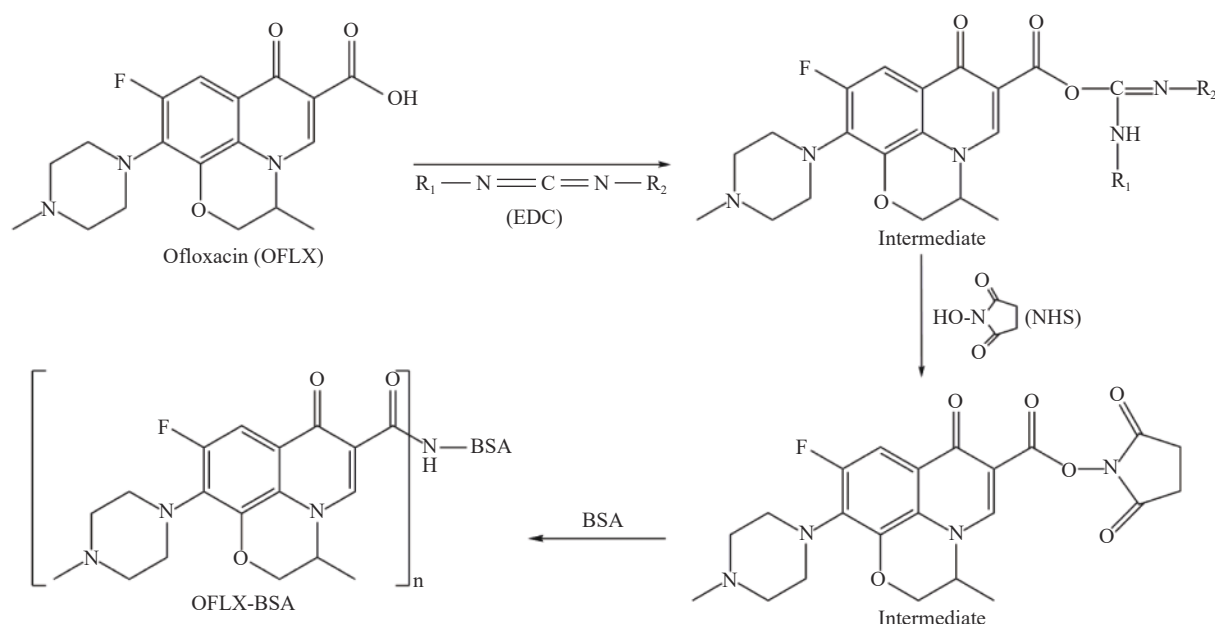


图1 OFLX-BSA的合成路线

Fig.1 Synthesis route of OFLX-BSA

测定 OFLX 多克隆抗体的敏感性: 用 OFLX 多克隆抗体对 OFLX 的半数抑制浓度 (50% Concentration of inhibition, IC_{50}) 判定其敏感性。操作步骤同间接 ELISA, 区别在于对 ELISA 板包被完成后, 分别加入 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 1.0 的 OFLX 的多克隆抗体和浓度分别为 2、4、8、16、32、64、128 ng/mL 的 OFLX 标准品。

1.2.2 OFLX 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb) 制备

1.2.2.1 免疫动物 使用 300 μL PBS (含 240 μg OFLX-BSA) 和 300 μL 的弗氏完全佐剂 (Complete Freund's Adjuvant, FCA) 充分乳化后, 免疫 3 只 BALB/c 小鼠, 注射途径为背部皮下多点注射 (注射剂量为 150 μL /只)。间隔 21 d 之后, 将 OFLX-BSA 用相同的剂量与弗氏不完全佐剂 (Incomplete Freund's Adjuvant, FIA) 乳化后, 用同样的免疫途径进行免疫, 每次间隔时间为 18 d, 4 次免疫程序完成后, 对小鼠行尾静脉采血, 用 PBS 溶液稀释离心后, 获得 OFLX 多抗血清 (Polyclonal antibody serum, pAbs), 用间接 ELISA、间接竞争 ELISA 分别检测 OFLX pAbs 的效价及敏感性^[27], 选择效价和抑制率最好的小鼠腹腔注射 100 μg OFLX-BSA, 3 d 后处死小鼠。

1.2.2.2 OFLX mAb 的制备 无菌条件下制备免疫小鼠的脾细胞, 用 PEG 2000 对 SP2/0 细胞和脾脏细胞进行融合, 产生杂交瘤细胞。通过有限稀释筛选和克隆阳性杂交瘤, 筛选出具有抗 OFLX 的单克隆杂交瘤株, 给预先用液体石蜡处理的 BALB/c 小鼠进行腹腔注射, 注射剂量为 0.55 mL/只, 10 d 后获得腹水。用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进一步沉淀纯化, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待检^[27]。

1.2.3 间接竞争 ELISA 检测方法的建立 间接竞争 ELISA 的反应步骤与方法 1.2.1.3 的间接 ELISA 操作过程相同, 主要区别在于 ELISA 板包被完毕后, 每孔均加入一系列倍比稀释的 OFLX 标准品 (0、100、200、400、800、1600、3200、6400 pg/mL) 和 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 1.0 左右的 mAbs 50 μL ^[28]。

1.2.4 间接竞争 ELISA 检测 OFLX 实验条件的优化

1.2.4.1 方阵滴定试验确定 OFLX-OVA 和 OFLX mAb 最佳工作浓度 将 OFLX-OVA、OFLX mAb 进行一系列稀释, 分别于横向、纵向加入到 96 孔酶标板中, 测定各个反应孔的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值, 选取数值为 1.0 左右, 且与相邻数值变化较大的孔所对应的 OFLX-OVA 浓度和 OFLX mAb 稀释倍数为最佳的 OFLX-OVA 包被浓度和 OFLX mAb 工作浓度。

1.2.4.2 其他实验条件的优化 按照 1.2.4.1 步骤确定的最优包被浓度将 OFLX-OVA 包被在酶标板, 设定 OFLX-OVA 的包被时间 (37 $^\circ\text{C}$ 1 h、37 $^\circ\text{C}$ 2 h、4 $^\circ\text{C}$ 8 h)、酶标二抗的稀释度 (1:500、1:1000、1:2000、1:4000)、封闭条件 [聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PCG)、5% 脱脂奶粉、5% 猪血清、无封闭] 及 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 显色时间 (2、4、6、8 min) 等实验条件, 间接 ELISA 测定 $OD_{450\text{ nm}}$ 值, 根据确定的两者反应浓度, 计算 P/N 值 (P 为阳性孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值, N 为阴性孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值), 选择 P/N 值最高的工作条件为最佳^[29]。

1.2.5 方法的性能测定

1.2.5.1 准确度测定 用添加回收试验来判定方法的准确度。首先对蜂蜜样品进行预处理: 蜂蜜样品 5 g, 用 5 mL 碱性双蒸水 (pH11.0) 进行溶解, 加入 10 mL 乙酸乙酯后振荡 12 min, 5500 r/min 离心

8 min。抽取上清液 4 mL,在 45 ℃ 条件下旋转蒸干,加入 2 mL 正己烷进行溶解蒸干存留物,再加入 2 mL PBS 溶液,去除上层的正己烷,保留下清液待测。分别将 2、5、15 ng/mL OFLX 加入蜂蜜样品中,检测时用 0.5% 乙酸乙腈提取 OFLX。准确度根据回收率及变异系数(Coefficient of variation, CV)进行判定^[30]。

1.2.5.2 精密度测定 测定批内、批间误差来判定方法的精密度。OFLX 标准品的浓度分别设为 4、8、24 ng/mL,在同一批次作 6 次重复,重复操作 6 个批次。

1.2.5.3 OFLX mAb 特异性测定 应用交叉反应(Cross reaction, CR)来表示,用间接竞争 ELISA 分别测定其类似物(马波杀星、环丙沙星、恩诺沙星、洛美沙星、沙拉沙星和替马沙星)的 IC₅₀ 值,其计算公式如下:

$$CR(\%) = \frac{\text{OFLX } IC_{50}\text{值}}{\text{其他化合物}IC_{50}\text{值}} \times 100$$

1.3 数据处理

本实验中的所有未标明数据均为 3 次重复的平均值±标准差,并采用 Microsoft Excel 软件进行数据统计,运用 GraphPad Prism 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 OFLX-BSA 的鉴定结果

2.1.1 OFLX-BSA 的紫外扫描结果 BSA、OFLX 的吸收峰分别在 278、287 nm 的位置,与 BSA、OFLX 的紫外吸收曲线相比,OFLX-BSA 的吸收峰同时具备 BSA 和 OFLX 的紫外吸收特征,并向长波长段生了偏移(图 2),表明 OFLX 与 BSA 成功偶联。

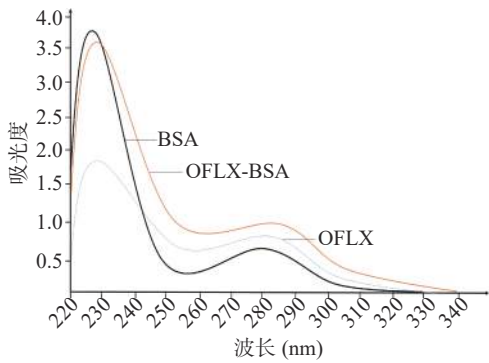


图 2 OFLX、BSA 和 OFLX-BSA 的紫外扫描图谱
Fig.2 UV scan of OFLX, BSA and OFLX-BSA

2.1.2 SDS-PAGE 鉴定结果 图 3 显示,BSA 的向下泳动速率略大于 OFLX-BSA。分析物分子质量的大小与电泳条带泳动速率呈反比,据此进一步证实 BSA 与 OFLX 偶联成功。

2.2 OFLX 多克隆抗体的制备与鉴定

2.2.1 OFLX pAbs 的效价鉴定结果 OFLX-BSA

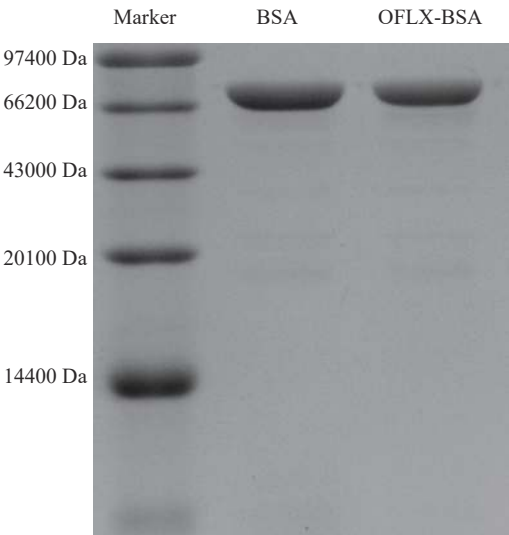


图 3 BSA、OFLX-BSA 的凝胶电泳图
Fig.3 Gel electrophoresis map of BSA and OFLX-BSA

免疫 BALB/c 小鼠的免疫程序完成后,使用间接 ELISA 检测 OFLX pAbs 的效价,表 1 显示,1 号和 3 号小鼠的 pAbs 效价都在 6.4×10³ 以上,2 号小鼠达到 1.28×10⁴,表明偶联物(OFLX-BSA)的免疫原性较好。

表 1 免疫小鼠的 pAbs 效价检测
Table 1 pAbs potency assay in immunized mice

稀释倍数	pAbs效价		
	No.1	No.2	No.3
2.0×10 ²	2.261	3.011	2.063
4.0×10 ²	1.872	2.324	1.621
8.0×10 ²	1.435	1.718	1.128
1.6×10 ³	1.031	1.332	0.746
3.2×10 ³	0.637	0.880	0.335
6.4×10 ³	0.235	0.439	0.189
1.28×10 ⁴	0.122	0.198	0.092
阴性	0.082	0.084	0.081
空白	0.71	0.069	0.066
IC ₅₀ (ng/mL)	17.52	12.42	19.74

2.2.2 OFLX 多抗血清的敏感性鉴定结果 表 1 显示 2 号被免小鼠的抑制最优,根据横坐标:OFLX 的稀释浓度的对数值,纵坐标: B/B₀ 值(B、B₀ 分别为 OFLX 各浓度、0 ng/mL 浓度对应的 OD_{450 nm} 值),得到线性回归方程: y=-0.393x+0.930, R²=0.990,当 y 值等于 0.5 时,所对应的 x 数值即为 IC₅₀,推算出抗 OFLX pAbs 的 IC₅₀ 为 12.42 ng/mL。

2.3 OFLX 单克隆抗体的制备

将免疫 OFLX-BSA 小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合,在 HAT 培养基培养 12 d 时,分别取各个孔细胞上清,用间接 ELISA 筛选出强阳性孔(OD_{450 nm} 值>2.0),用间接竞争 ELISA 对强阳性孔进一步筛选,使用有限稀释法对筛选出抑制好的强阳性孔进行亚克隆,最终收获了杂交瘤细胞株 3D7,经诱生腹水法获得了 OFLX mAb,其效价为 2.4×10⁵。

2.4 间接竞争 ELISA 检测 OFLX 方法反应条件的优化及建立

选取 $OD_{450\text{ nm}}$ 数值在 1.0 左右, 且与相邻的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值变化较大的孔所对应包被抗原浓度和单克隆抗体稀释度。表 2 显示, 用方阵滴定法测定的数值 1.013 符合上述要求, 其所对应的 OFLX-OVA 包被浓度和 OFLX mAb 工作浓度为最优反应条件, 最终确定 ELISA 包被 OFLX-OVA 的最佳包被浓度为 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、OFLX mAb 的稀释度为 1.6×10^4 倍。

表 2 方阵滴定法确定 OFLX-OVA 包被浓度和 OFLX mAb 稀释倍数

Table 2 Square-array titration to determine coating concentration of OFLX-OVA and dilution factor of OFLX mAb

OFLX mAb 稀释度	包被原浓度($\mu\text{g/mL}$)					
	8	6	4	2	1	0.5
1.0×10^3	3.313	2.853	2.587	2.208	1.791	1.112
2.0×10^3	2.885	2.474	2.393	2.137	1.532	0.826
4.0×10^3	2.619	2.319	2.226	1.859	1.163	0.684
8.0×10^3	2.526	2.188	1.821	1.511	0.944	0.378
1.6×10^4	2.196	1.786	1.440	1.013	0.723	0.245
3.2×10^4	1.838	1.275	1.128	0.740	0.505	0.189
6.4×10^4	1.682	1.036	0.782	0.539	0.286	0.150
空白对照(BC)	0.079	0.073	0.077	0.059	0.067	0.070
阴性对照(NC)	0.064	0.069	0.066	0.068	0.074	0.065

结合步骤 1.2.3 筛选确定的反应条件, 选择 P/N 值最高的包被条件为最优 OFLX-OVA 包被条

件。图 4a 显示, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 8 h 的 P/N 值差异不显著($P>0.05$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 的 P/N 值最大, 确定作为最优 OFLX-OVA 包被条件; 选择不同稀释度的羊抗鼠酶标二抗做对比实验, 稀释浓度为 1:1000 时的 P/N 值最大, 与稀释浓度为 1:2000 的 P/N 值差异不明显, 但与 1:500、1:4000 对应的 P/N 值差异极显著($P<0.01$), 确定羊抗鼠酶标二抗浓度稀释 1:1000 时作为最优条件(图 4b); 图 4c 显示, 3 种封闭液的 P/N 值间差异不显著($P>0.05$), 但 5% 猪血清与无封闭条件存在极显著差异($P<0.01$)且 P/N 值最大, 因此将 5% 猪血清作为最佳封闭液; 室温条件下, 加入显色液后, 随着显色时间的延长, P 和 N 值均在不断的增加, 当作用时间为 6 min 时, P/N 值最大(图 4d), 与作用时间为 4 min 的 P/N 值无显著差异($P>0.05$), 但与作用时间为 2、8 min 的 P/N 值间有显著差异($P<0.05$), 最终确定显色液作用时间为 6 min。

依据实验数据绘制 OFLX 的标准曲线, 得到标准曲线的回归方程: $y=-0.301x+1.424$, $R^2=0.993$ (图 5), IC_{50} 为 1.17 ng/mL , 线性范围为 $0.12\sim 11.65\text{ ng/mL}$ 。

2.5 间接竞争 ELISA 方法的鉴定结果

2.5.1 方法准确度鉴定结果 阴性蜂蜜样的回收率在 78.0%~89.9% 之间, 平均为 84.1%, CV 为 5.3%~9.7%, 平均 CV 为 7.3%(表 3)。

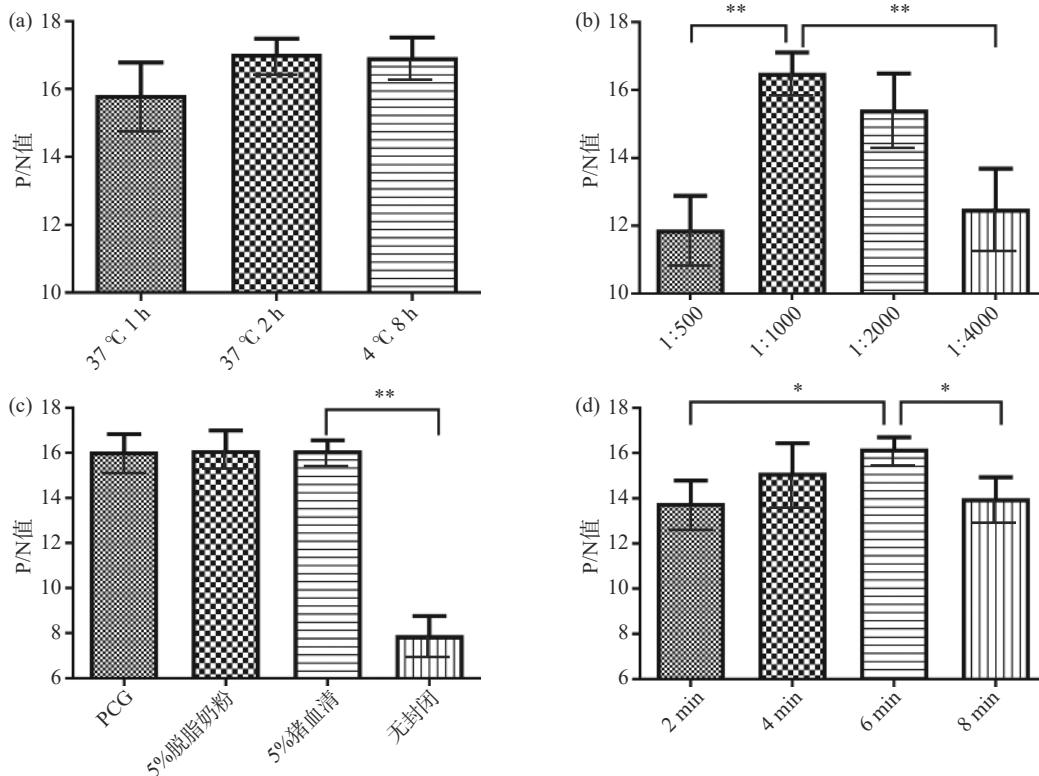


图 4 间接竞争 ELISA 实验条件的优化

Fig.4 Optimization of experimental conditions for indirect competition ELISA

注: (a)OFLX-OVA 包被条件的筛选; (b)酶标二抗稀释度的筛选; (c)包被封闭液的筛选; (d)显色液作用时间的筛选; *表示 $P<0.05$, 差异显著; **表示 $P<0.01$, 差异极显著。

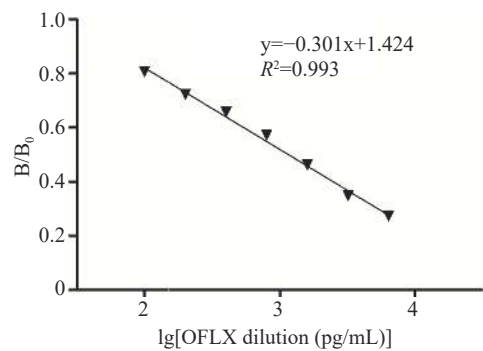


图 5 间接竞争 ELISA 的标准曲线

Fig.5 Standard curve for indirect competition ELISA

表 3 OFLX 不同添加浓度在蜂蜜中的回收率

Table 3 Recovery of OFLX different spiked concentrations in honey			
OFLX添加量(ng/mL)	测定值(ng/mL)	回收率(%)	变异系数(%)
2	1.56±0.15	78.0±7.5	9.7
5	4.22±0.29	84.4±5.8	6.9
15	13.49±0.71	89.9±4.7	5.3

2.5.2 方法精密度鉴定结果 阳性蜂蜜样的批内 CV 在 4.1%~7.6% 之间, 平均批内 CV 为 5.9%; 批间 CV 在 4.6%~8.8% 之间, 平均批间 CV 为 6.8%, 且批间 CV 均大于批内 CV, 且均不超过 10%(表 4), 表明该法的精密度较好。

表 4 间接竞争 ELISA 检测蜂蜜样品的精密度

Table 4 Precision of the indirect competition ELISA for the detection of honey samples					
OFLX添加量 (ng/mL)	批次	测定值 (ng/mL)	批内变异系数 (%)	测定值 (ng/mL)	批间变异系数 (%)
4	6	3.29	7.6	3.22±0.28	8.8
8	6	6.82	6.0	6.69±0.47	7.1
24	6	22.52	4.1	21.99±1.01	4.6

2.5.3 方法特异性鉴定结果 该法与 MAR 的 CR 为 52.9%, 与 CIP、ENR、LOM、SAR 和 TEM 等竞争物没有 CR(表 5), 进一步表明该法的特异性较好。

表 5 OFLX 单克隆抗体与 OFLX 类似物的交叉反应率

Table 5 Cross-reactivity rate of OFLX mAb and its analogue		
竞争物	IC ₅₀ (ng/mL)	CR(%)
氧氟沙星(Ofloxacin, OFLX)	1.17	100.0
马波沙星(Marbofloxacin, MAR)	2.21	52.9
环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)	>1.5×10 ³	<0.01
恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)	>1.5×10 ³	<0.01
洛美沙星(Lomefloxacin, LOM)	>1.5×10 ³	<0.01
沙拉沙星(Sarafloxacin, SAR)	>1.5×10 ³	<0.01
替马沙星(Temafloxacin, TEM)	>1.5×10 ³	<0.01

3 讨论与结论

OFLX 作为半抗原(Hapten)没有免疫原性, 需与 大分子载体结合才能刺激动物机体产生针对 OFLX 的多抗血清, 而多抗血清的敏感性是判定该研究成败的核心^[31-32]。PINACHO 等^[33]用 NHS 法将 OFLX

与 BSA 进行偶联, 获得的完全抗原免疫新西兰白兔, 得到最优抗血清的 IC₅₀ 值为 1.84 ng/mL; 李彬彬等^[34]、潘孝成^[35]均用碳二亚胺法使 OFLX 与载体蛋白发生偶联, 分别免疫小鼠、长耳白兔后, 制备所得的抗 OFLX 血清 IC₅₀ 值为 19.97、180.32 ng/mL。而本研究得到的多抗血清、OFLX mAb 的 IC₅₀ 分别为 12.42、1.17 ng/mL, 与他们相比, 本研究多抗血清鉴定核心的敏感性相对较好。栗慧等^[24]先后用碳二亚胺法合成 OFLX-BSA, 免疫原免疫小鼠, 细胞融合技术等得到 OFLX mAb, 其 IC₅₀ 为 14.58 ng/mL; 张运尚等^[36]基于 OFLX 单链抗体的间接竞争 ELISA 检测方法中 IC₅₀ 达到 1.66 ng/mL, 低于本研究所得单克隆抗体的敏感性。此外, 为提高检测 OFLX 的灵敏度, 一些免疫传感器的纳米材料被引入到其残留检测中, 如 UCNPs^[37]、APTMS^[38]、MWCNTs^[39]等。这些免疫传感器的引入均相对于传统 ELISA 方法提高了灵敏度, 但也增加了额外的免疫探针制备过程和检测步骤。

本研究对检测 OFLX 间接竞争 ELISA 方法的 6 个单因素反应条件进行优化, 建立了最佳 OFLX 间接竞争 ELISA 方法, 优化后的反应条件分别为: OFLX mAb 的稀释倍数 1:1.6×10⁴, OFLX-OVA 的包被浓度 2 μg/mL、包被条件 37 ℃ 作用 2 h, 酶标二抗的稀释倍数 1:1000, 封闭液用 5% 猪血清, TMB 显色时间 6 min。在此反应条件优化的基础上, 建立的 ELISA 方法 IC₅₀ 为 1.17 ng/mL, 检测范围为 0.12~11.65 ng/mL, 检测反应时间大约需要 50 min。有鉴于此, 本研究所建立的间接竞争 ELISA 方法具有较高的准确度、精密度和灵敏度, 且性能很稳定, 可用于蜂蜜中 OFLX 残留检测, 能够满足国内最新规定的相关测定要求。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] AHADI H, SHOKRZADEH M, HOSSEINI-KHAH Z, et al. Conversion of antibacterial quinolone drug levofloxacin to potent cytotoxic agents[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2023, 37(6): e23334.

[2] LI Y F, ZHOU J H, GU J X, et al. Enhanced antibacterial activity of levofloxacin/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex; *In vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2022, 215: 112514.

[3] EZELARAB H A A, ABBAS S H, HASSAN H A, et al. Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents[J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2018, 351(9): e1800141.

[4] ZHANG Z H, LIU X N, LI N, et al. Effect of ofloxacin levels on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence kinetics in tomato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 194: 374-382.

[5] 马永强, 张丝瑶, 遇世友, 等. 蜂蜜中抗生素残留的检测方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(20): 454-463. [MA Y Q,

- ZHANG S Y, YU S Y, et al. Advances in the detection methods of antibiotic residues in honey[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(20): 454–463.]
- [6] 贾英杰. 液质联用技术在蜂蜜兽药残留检测中的应用[J]. *食品工业*, 2019, 40(7): 284–286. [JIA Y J. Application of liquid chromatography-mass spectrometry detection technology in veterinary drug residues in honey[J]. *The Food Industry*, 2019, 40(7): 284–286.]
- [7] BHATT S, CHATTERJEE S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation-A comprehensive review[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 315: 120440.
- [8] MAJALEKAR P P, SHIROTE P J. Fluoroquinolones: Blessings or curses[J]. *Current Drug Targets*, 2020, 21(13): 1354–1370.
- [9] BERTINO J J R, FISH D. The safety profile of the fluoroquinolones[J]. *Clinical Therapeutics*, 2000, 22(7): 798–817.
- [10] DE SARRO A, DE SARRO G. Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, 8(4): 371–384.
- [11] ZHANG D D, CUI Y W, ZHANG X P. Estimating factors related to fluoroquinolone resistance based on one health perspective: Static and dynamic panel data analyses from Europe[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1145.
- [12] TIMOFEEVA I, TIMOFEEV S, MOSKVIN L, et al. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 949: 35–42.
- [13] LIU Y F, CAI D, LI X, et al. Occurrence, fate, and risk assessment of antibiotics in typical pharmaceutical manufactories and receiving water bodies from different regions[J]. *PLoS One*, 2023, 18(1): e0270945.
- [14] QIN Y Q, REN X Y, JU H Y, et al. Occurrence and distribution of antibiotics in a tropical mariculture area of Hainan, China: Implications for risk assessment and management[J]. *Toxics*, 2023, 11(5): 421.
- [15] 范广宇, 唐秀, 张琳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鲟鲈类水产品中喹诺酮的不确定度评定[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(20): 248–254. [FANG G Y, TANG X, ZHANG L, et al. Uncertainty evaluation of determination of quinolones in flatfish by high performance liquid chromatography-tandem[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(20): 248–254.]
- [16] HE L X, HE L Y, GAO F Z, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes and microbial community in grouper mariculture[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 808: 152042.
- [17] WANG X L, JIAO Y N, WANG G L, et al. Occurrence of quinolones in cultured fish from Shandong Province, China and their health risk assessment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2022, 180: 113777.
- [18] WANG R, ZHANG C X, LI Z Y, et al. Detection of fluoroquinolone and sulfonamide residues in poultry eggs in Kunming city, southwest China[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(6): 101892.
- [19] FANG L F, YE P P, FANG B, et al. Pollution characteristics and ecological risk assessment of antibiotics in vegetable field in Kaizhou, Chongqing[J]. *Huan Jing Ke Xue*, 2022, 43(11): 5244–5252.
- [20] KACZMAREK M, STANINSKI K, STODOLNY M. New chemiluminescent method of levofloxacin and ofloxacin determination based on terbium (III)-sensitized fluoroquinolone-KBrO₃ reaction[J]. *Luminescence*, 2021, 36(8): 1945–1952.
- [21] URBANIAK B, MILANOWSKI B, LULEK J, et al. Study of ofloxacin enantiomers dissolution from selected solid dosage forms selected solid dosage forms using high performance capillary electrophoresis method[J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2017, 74(3): 955–968.
- [22] EV LDA S, SCHAPOVA L E E. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 27(1–2): 91–96.
- [23] LIU Y Z, ZHAO G X, WANG P, et al. Production of the broad specific monoclonal antibody against sarafloxacin for rapid immunoscreening of 12 fluoroquinolones in meat[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2013, 48(2): 139–146.
- [24] 栗慧, 薛瑛辉, 冯亚宁, 等. 氧氟沙星单克隆抗体的制备及生物条形码检测技术的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(9): 169–176. [LI H, XUE Y H, FENG Y N, et al. Preparation of ofloxacin monoclonal antibody and study on bio-bar codes technology[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(9): 169–176.]
- [25] BYZOVA N A, SMIRNOVA N I, ZHERDEV A V, et al. Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original food stuffs using native antisera labeled by colloidal gold[J]. *Talanta*, 2014, 119: 125–32.
- [26] 谢倩, 李庆, 李佳楠. 日落黄酶联免疫试剂盒的制备及应用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 326–332. [XIE Q, LI Q, LI J N. Preparation and application of ELISA kit for detection of sunset yellow[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(6): 326–332.]
- [27] 刘河冰, 秦誉, 邢维维, 等. 蘑菇中鹅膏毒肽间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 294–301. [LIU H B, QIN Y, XING W W, et al. Establishment of indirect competitive ELISA method for detecting amanitin in mushroom[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(5): 294–301.]
- [28] 司艳芳, 李鹏, 郭东光, 等. 西马特罗多克隆抗体的制备及其免疫学检测方法的建立[J]. *河南农业科学*, 2020, 49(6): 157–164. [SI Y F, LI P, GUO D G, et al. Development of cimaterol polyclonal antibody and establishment of immunological detection method[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2020, 49(6): 157–164.]
- [29] YANG X D, WANG Y B, SONG C M, et al. Hapten synthesis and the development of an ultrasensitive indirect competitive ELISA for the determination of diethylstilbestrol in food samples[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3270.
- [30] 孙亚宁, 李青梅, 杨苏珍, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法建立[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(4): 689–696. [SUN Y N, LI Q M, YANG S Z, et al. Preparation of monoclonal antibody against deoxynivalenol and establishment of indirect competitive ELISA[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(4): 689–696.]
- [31] 蔡陈芳, 周常义, 曾磊, 等. 杀草丹半抗原及其人工抗原的制备与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(14): 284–291. [CAI C F, ZHOU C Y, ZENG L, et al. Synthesis and identification of thiobencarb hapten and artificial antigen[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(14): 284–291.]
- [32] 郭东光, 陈明艳, 冯春花, 等. 齐帕特罗人工抗原合成及其多克隆抗体制备[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(5): 6–12. [GUO D G, CHEN M Y, FENG C H, et al. Synthesis of zilpaterol complete antigen and preparation of polyclonal antibody[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(5): 6–12.]
- [33] PINACHO D G, SANCHEZ-BAEZA F, MARCO M P.

Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(10): 4527–4534.

[34] 李彬彬, 侯玉泽, 邓瑞广, 等. 氧氟沙星人工抗原的合成与多克隆抗体的制备[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 6–10. [LI B B, HOU Y Z, DENG R G, et al. Research on Synthesis and identification of Ofloxacin artificial antigen[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(9): 6–10.]

[35] 潘孝成. 氧氟沙星与二氟沙星的抗体制备及 ELISA 方法建立[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007. [PAN X C. Preparation of antibodies and establishment of ELISA methods for ofloxacin and difloxacin[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2007.]

[36] 张运尚, 王方雨, 胡曼, 等. 氧氟沙星单链抗体的制备及间接竞争 ELISA 的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, 616(4): 116–123. [ZHANG Y S, WANG F Y, HU M, et al. Preparation of anti-ofloxacin single chain antibody fragment and establishment of indi-

rect competitive ELISA method[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 616(4): 116–123.]

[37] NAMPI P P, VAKUROV A, SAHA S, et al. Surface modified hexagonal up conversion nano-particles for the development of competitive assay for biodetection[J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 136: 212763.

[38] SULLIVAN M V, HENDERSON A, HAND R A, et al. A molecularly imprinted polymer nano-particle-based surface plasmon resonance sensor platform for antibiotic detection in river water and milk[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(12): 3687–3696.

[39] SHINKO E I, FARAFONOVA O V, SHANIN I A, et al. Determination of the fluoroquinolones levofloxacin and ciprofloxacin by a piezoelectric immunosensor modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs)[J]. *Analytical Letters*, 2022, 55(7): 1164–1177.