

牛奶及水样中泰乐菌素酶联免疫检测方法研究

姚婵媛¹ 杨金易¹ 徐振林¹ 王弘^{*1} 雷红涛¹
孙远明¹ 田元新² 沈玉栋^{*1}

¹(华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广州 510642)

²(南方医科大学药学院, 广州 510515)

摘 要 针对环境及食品中泰乐菌素残留问题,本研究将泰乐菌素分子结构侧链醛基一步直接氧化为羧基,并将其作为新的半抗原,通过免疫新西兰大白兔制备了特异性的抗泰乐菌素多克隆抗体,优化的反应条件为:包被原稀释6000倍,抗体稀释2000倍,反应缓冲液为pH 7.4、吐温含量0.1%、离子浓度0.01 mol/L的PBST,二抗稀释倍数为4000倍,二抗反应时间30 min。在此优化条件下,建立了检测泰乐菌素的间接竞争酶联免疫分析法(icELISA),半数抑制浓度(IC₅₀)为1.39 ng/mL,线性范围(IC₂₀ ~ IC₈₀)为0.17 ~ 11.0 ng/mL,检出限(IC₁₀)为0.07 ng/mL,与结构功能类似物交叉反应率均小于0.1%。对纯牛奶、自来水、鱼塘水中泰乐菌素的添加回收率在78.4% ~ 105.6%之间,RSD<15%,检测结果与HPLC-MS/MS方法具有良好的相关性(R²=0.97)。本研究建立的icELISA方法适用于牛奶及水样中泰乐菌素残留的特异性快速筛查。

关键词 间接竞争酶联免疫吸附分析; 泰乐菌素; 牛奶; 水样

1 引言

泰乐菌素(Tylosin, TYL)是 Hamill 等^[1]于1959年从弗氏链霉菌的培养液中获得的一种大环内酯类抗生素,对革兰氏菌有明显抑制效果,对畜禽支原体疾病有很好的治疗作用,是治疗支原体疾病的首选药物^[2,3],同时具有促进动物生长、改善饲料效率作用,广泛应用于畜牧水产养殖业^[4,5]。但泰乐菌素对肠道中正常的敏感菌群的生长具有明显抑制作用,从而使致病菌大量增殖,与其它抗生素的交叉耐药性会导致人体对抗生素产生抗药性,给临床治疗带来很大危害^[6,7]。欧盟委员会于1999年禁止泰乐菌素作为增长促进剂使用^[8]。我国农业部在2002年发布的第235号文件《动物性食品中兽药最高残留量》中规定牛奶中泰乐菌素限量为50 μg/kg^[9]。研究发现,在环境水中也存在泰乐菌素残留,容易迁移污染环境水源而导致通过饮用水途径进入人体,危害人类健康^[10,11]。因此,建立牛奶及水样品中泰乐菌素污染残留的快速筛查方法,对食品安全及环境监测具有重要的实际意义。

目前,环境及食品样品中泰乐菌素残留量确证检测方法主要为高效液相色谱法^[12~14]、色谱-质谱联用法^[15~19]等实验室大型仪器方法,具有准确及灵敏度高、重复性好优点,但成本高,前处理繁杂耗时,难以适应大量样品高通量筛查。基于抗原抗体特异性反应的免疫检测方法以其样品通量高、灵敏准确、操作简单、适合样品筛查等优点,成为大型仪器法的互补方法,广泛应用于有害物质快速筛查^[20~22]等。现有泰乐菌素免疫检测方法的抗体主要通过亚胺基羧酸手臂衍生半抗原免疫获得^[23,24]。本研究组采用文献报道的半抗原策略制备抗体,发现免疫应答非常不稳定,抗体质量不同,批次差异较大,可能是由于半抗原含有化学稳定性较差的希夫碱结构,造成其在免疫吸收与递呈过程中容易降解转化,导致特异性免疫应答稳定性不佳。因此,本研究拟将泰乐菌素分子侧链醛基一步直接氧化为羧基,并将其作为新的半抗原,结构简单稳定,且最大程度保留了泰乐菌素分子骨架结构与分子性质,可进一步偶联蛋白免疫动物,稳定诱导特异性免疫应答,产生抗泰乐菌素多克隆抗体,据此建立了适用于检测牛奶及水样中泰乐菌素的酶联免疫分析方法(Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, icELISA)。

2018-04-10 收稿; 2018-05-06 接受

本文系广州市科技计划项目(No. 201704020082)、国家重点研发计划国际合作项目(No. 2016YFE0106000)、广西省科技计划项目(No. 2017AB47020)、国家自然科学基金项目(No. 31371769)和广东省高等学校珠江学者岗位计划(2017)项目资助

* E-mail: gzwhongd@163.com; shenyudong@scau.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Multiskan MK3 酶标仪、Nano Drop 2000C 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司); DEM-3 型自动洗板机(北京拓普分析仪器公司); AB SCIEX 5500 三重四极杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

酒石酸泰洛星、泰乐菌素、替米考星、螺旋霉素、罗红霉素、阿维菌素、呋喃西林、培氟沙星标准品(阿拉丁试剂(上海)有限公司); 红霉素、阿奇霉素、呋喃唑酮、诺氟沙星标准品(麦考林试剂(上海)有限公司); 乙酰螺旋霉素、呋喃妥因、恩诺沙星、克林沙星标准品(思域试剂(上海)有限公司); 牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(Sigma 公司); 96 孔酶标板(深圳金灿华实业有限公司); 其它化学试剂购自广州化学试剂公司。

0.01 mol/L 磷酸盐溶液(PBST, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 2.9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g/L NaCl, 0.05% Tween-20), 包被液(pH 9.6, 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液), 封闭液(0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 2.9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g/L NaCl, 0.05% Tween-20, 5% 脱脂奶粉), 洗涤液(2.9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g/L NaCl, 0.05% Tween-20), 稀释液(0.1% Tween-20, 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐溶液), 终止液(10% H_2SO_4 , 1.8 mol/L)。

2.2 实验方法

2.2.1 半抗原的合成与鉴定 半抗原的合成路线见图 1。在 250 mL 圆底烧瓶中, 将 1 g 酒石酸泰洛星溶于 80 mL 叔丁醇-水(5:3, V/V)混合液中, 在 0℃ 下依次加入 0.62 g NaH_2PO_4 、1 mL DMSO (Dimethyl sulfoxide)、0.2 g NaClO_2 , 反应 30 min, 反应过程中进行 TLC 监测。反应结束后, 加入 10 mL 水后采用乙酸乙酯(50 mL)萃取 3 次, 再用水和盐水洗涤有机相, 无水 MgSO_4 干燥后减压蒸除溶剂, 经硅胶柱层析纯化(甲醇-氯仿, 1:10, V/V)得到白色固体状半抗原 TYL-O, 经 ESI-MS 质谱鉴定合成成功(ESI-MS: m/z 932.5 $[\text{M}]^+$)。

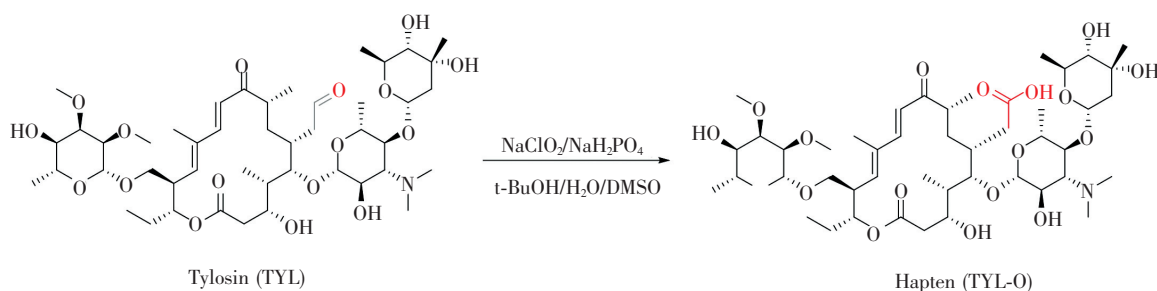


图 1 半抗原合成路线

Fig. 1 Synthesis route of hapten

2.2.2 人工抗原的制备及鉴定 采用活泼酯法^[25]将半抗原与载体蛋白偶联得到的人工抗原(免疫原 TYL-O-BSA 和包被原 TYL-O-OVA), 采用紫外扫描法进行纯度鉴定^[26], 以 1 mg/mL 的浓度分装于 1 mL 离心管中, 于 -20℃ 冻存备用。

2.2.3 抗体制备与纯化 采用文献 [27] 的方法, 用免疫原 TYL-O-BSA 免疫 2 ~ 2.5 kg 雌性新西兰大白兔 3 只, 得到兔多克隆抗体, 采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体^[28], -20℃ 保存备用。

2.3 icELISA 方法

2.3.1 icELISA 方法建立 用包被液将 TYL-O-OVA 稀释到一定浓度, 100 μL /孔, 37℃ 包被过夜。用洗涤液洗涤 2 次, 加入封闭液 120 μL /孔, 振荡混匀, 37℃ 孵育 3 h; 甩干孔中液体, 37℃ 烘干备用。将适量泰乐菌素标准品溶于甲醇中浓度为 1 mg/mL, 梯度稀释成不同浓度, 通过在药物稀释液中加入适量甲醇保证每个浓度梯度的药物中甲醇含量一致(0.1%), 空白对照孔中加入含 0.1% 甲醇的 PBST。将药物按 50 μL /孔 加入板孔, 再加入稀释后的抗体 50 μL /孔, 37℃ 孵育 40 min, 洗板 5 次, 加入 100 μL /孔 HRP 标记的羊抗兔抗体; 37℃ 孵育 50 min; 洗板 5 次, 加入新鲜配制的 TMB 溶液 100 μL /孔, 37℃ 显色

10 min, 加入终止液, 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 终止反应, 用酶标仪测定各孔 $A_{450\text{nm}}$ 值。

2.3.2 icELISA 方法优化 采用棋盘滴定法确定包被原浓度及抗体浓度。将包被原浓度分别稀释 2000、4000、6000、8000、10000、12000 倍包被酶标板, 抗体稀释 1000、2000、4000、80000、16000、32000、64000 倍, 按照 icELISA 操作方法测定效价列各孔 $A_{450\text{nm}}$ 值。选取 $A_{450\text{nm}}$ 在 1.0 ~ 1.5 之间的包被原浓度及抗体稀释倍数组合进行下一步抑制曲线的绘制。用最大吸光值 (A_{max})、半抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) 和 $A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 这 3 个参数进行评价, $A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 越高, IC_{50} 越低, 表示灵敏度越高。最终 A_{max} 选择在 1.0 ~ 1.5 之间, $A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 尽量高、 IC_{50} 尽量低的条件为最佳包被浓度及抗体浓度。其它反应条件如反应体系、反应时间、二抗浓度等也以上述 3 个参数为评价标准进行优化。

2.3.3 icELISA 标准曲线 在最优条件下, 以 $1-B/B_0$ 为纵坐标 (其中, B_0 为不加药物时的吸光值 $A_{450\text{nm}}$, B 为药物浓度为 x 时的 $A_{450\text{nm}}$) 为纵坐标, 标准品浓度对数值为横坐标, 用 Origin 9.0 软件进行四参数拟合绘制标准曲线, 计算泰乐菌素的半抑制浓度 (IC_{50}), 线性范围 ($\text{IC}_{20} \sim \text{IC}_{80}$) 及检出限 (Limit of detection, LOD, IC_{10})。

2.4 样品前处理 (1) 牛奶 取 1 mL 纯牛奶样品于 2 mL 离心管中, 加入 20 μL H_2SO_4 (2 mol/L) 混匀, 4000 r/min 离心 5 min。去除上层脂肪层, 取上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 用 0.01 mol/L PBST (pH 7.4) 稀释 10 倍后用于测定。(2) 水样 分别取 1 mL 自来水样和鱼塘水于 2 mL 离心管, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 分别用 0.01 和 0.02 mol/L PBST (pH 7.4) 稀释 2 倍后用于测定。

3 结果与讨论

3.1 半抗原设计与合成

免疫检测分析方法的灵敏性和稳定性主要取决于抗原抗体间的特异性结合反应, 而抗体的效价和特异性取决于人工抗原的结构及其与半抗原/靶标药物的特异性亲和识别活性。因此半抗原的设计及合成对于免疫检测至关重要。研究表明, 稳定的半抗原结构更能有效诱导免疫应答反应^[29]。为克服现有席夫碱型半抗原特异性免疫诱导稳定性不足问题, 本研究将泰乐菌素分子大环内酯侧链的乙醛基直接一步氧化成羧基作为半抗原, 此半抗原结构稳定。另外, 采用 Sybyl 7.3 分子模拟平台 Tripos 力场优化结构后进行分子叠合, 发现半抗原与泰乐菌素分子骨架与侧链结构高度重叠, 最大限度保持了泰乐菌素立体结构 (图 2), 与载体蛋白偶联后泰乐菌素分子特征结构可有效暴露于动物免疫系统, 便于特异性抗体的稳定诱导产生, 为建立免疫检测方法奠定了基础。

3.2 人工抗原的合成与鉴定

采用紫外扫描法^[26], 以半抗原及载体蛋白为参照测定人工抗原的 UV-Vis 吸收光谱 (图 3), 发现人工抗原特征峰位于半抗原特征吸收峰和载体蛋白特征吸收峰之间, 吸收峰的位置和强度均明显不同于载体蛋白和半抗原, 应为半抗原成功偶联于载体蛋白后二者吸收峰的复合所致。

3.3 抗体鉴定

以间接酶联免疫吸附分析 (icELISA) 法测定纯化后的抗体, 其效价为 1:16000。以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TYL 作为竞争药物, 采用 icELISA 方法测定, 抗体抑制率达到 89%, 表明此多克隆抗体具有高亲和力。

3.4 icELISA 方法优化

棋盘滴定实验结果表明, 当包被原稀释倍数增加, 抗体稀释倍数减小时, A_{max} 才能稳定在 1.0 ~ 1.5 之间, 因此初步确定包被原稀释倍数范围为 2000 ~ 10000, 包被抗原稀释倍数为 2000 ~ 5000。在不同包被原稀释倍数条件下绘制抑制曲线, 以 A_{max} , IC_{50} 和 $A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 为判别依据, 随着包被原稀释倍数的增加,

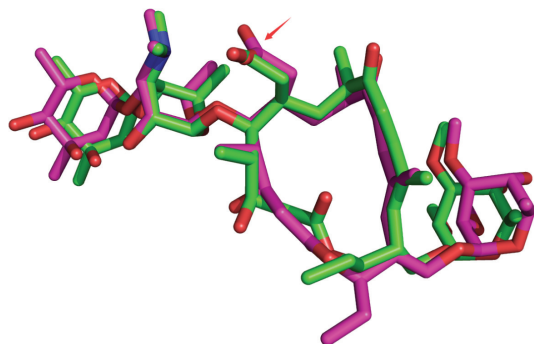


图2 泰乐菌素与半抗原分子叠合图, 绿色环为泰乐菌素, 红色环为半抗原, 红色箭头处为衍生羧基

Fig.2 Overlay of TYL and hapten. The green ring is tylosin, the red ring is hapten, the red arrow point to the derivatized carboxyl group

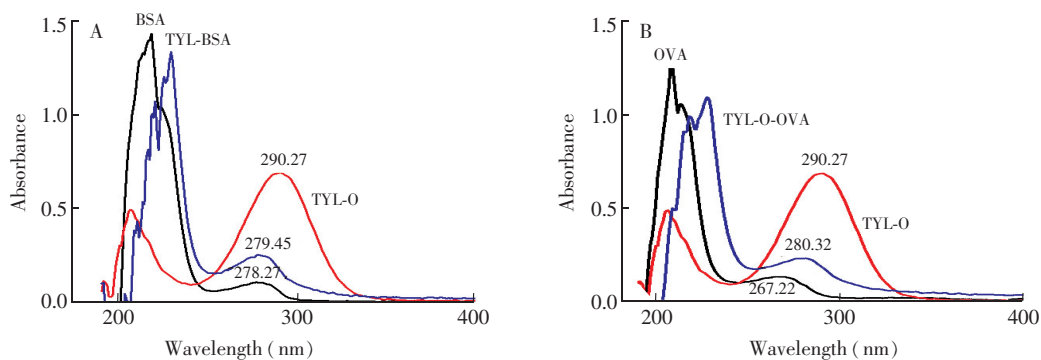


图3 紫外-可见吸收光谱图:(A) TYL-O-BSA; (B) TYL-O-OVA

Fig. 3 UV-visible absorption spectra of (A) TYL-O-bovine (BSA) and (B) TYL-O-ovalbumin (OVA)

IC₅₀呈先下降后上升趋势,在包被原稀释 6000 倍(包被原浓度 0.16 μg/mL)时最低,同时 A_{max}/IC₅₀ 最大,且 A_{max} 在 1.0 ~ 1.5 之间,此时 ELISA 实验条件达到最佳,因而最佳包被原稀释倍数为 6000 倍(抗原浓度为 0.16 μg/mL)。固定包被原浓度,进一步考察不同抗体稀释倍数时抑制曲线效果,当抗体稀释 2000 倍时,IC₅₀ 最低,A_{max}/IC₅₀ 最大,方法稳定性最好,因此,选择 2000 倍为最佳的抗体稀释倍数,即效价为 2000(抗体浓度 0.5 μg/mL)。采用相同的方法确定了最佳 ELISA 条件为:包被原稀释 6000 倍,抗体稀释 2000 倍,反应缓冲液为 pH 7.4、吐温含量 0.1%、0.01 mol/L PBST,二抗稀释倍数为 4000 倍,二抗反应时间 30 min。

3.5 标准曲线的建立

在最佳条件下,以泰乐菌素质量浓度为横坐标,1-B/B₀ 值为纵坐标,采用 Origin 9.0 进行四参数曲线拟合,建立泰乐菌素的 icELISA 标准曲线(图 4),本方法的 IC₅₀ 为 1.39 ng/mL,线性范围(IC₂₀ ~ IC₈₀) 为 0.17 ~ 11.0 ng/mL,线性方程为 y=0.37+0.23x, R²=0.98,方法检出限(IC₁₀) 为 0.07 ng/mL。

3.6 方法的精密度

采用相对标准偏差(RSD)来评价方法精密度。批间 RSD 通过比较用不同批次包被的酶标板建立的标准曲线得出;批内 RSD 则比较同一批次包被的酶标板得出。当各标准曲线 IC₅₀ 和 A_{450 nm} 的 RSD<15%

时,认为方法精密度比较高。采用本方法分别考察了同批次和不同批次的试剂盒的精密度(表 1),结果表明,批内和批间灵敏度的 RSD<15%,表明方法精密度良好。

表 1 批内和批间测定精密度
Table 1 Intra- and inter-assay precision (n=3)

批内精密度 Intra-assay (n=3)			批间精密度 Inter-assay (n=3)		
Batch No.	IC ₅₀ (μg/L)	A _{max}	Batch No.	IC ₅₀ (μg/L)	A _{max}
1	1.27	0.95	1	1.15	1.08
2	1.26	1.05	2	1.4	1.24
3	1.35	1.06	3	1.43	1.37
4	1.44	1.25	4	1.39	1.29
平均值 Average	1.33	1.08	平均值 Average	1.34	1.24
RSD (%)	8.34	12.5	RSD (%)	12.9	12.2

3.7 方法的特异性

采用反应交叉率(CR)评价方法的特异性,CR 越大,表明方法的特异性越差^[30]。按照 2.3.3 节的

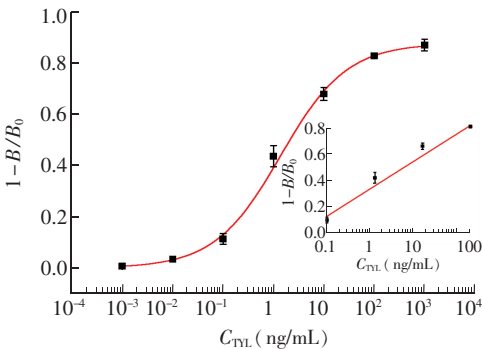


图4 icELISA 法测定泰乐菌素的标准曲线
Fig.4 Standard curve for indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) of TYL

方法分别绘制泰乐菌素类似物的抑制曲线,并根据式(1)计算出的 CR 值。

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}(\text{标准品})}{IC_{50}(\text{类似物})} \times 100$$

(1)

选取功能结构类似物替米考星、红霉素、罗红霉素、螺旋霉素、乙酰螺旋霉素、阿维菌素、阿奇霉素、恩诺沙星、培氟沙星、诺氟沙星、克林沙星、呋喃妥因、呋喃唑酮及呋喃西林等药物,考察了方法的特异性,与其它功能结构类似物均无明显交叉反应(CR<0.1%),说明所建立的 icELISA 方法特异性良好。

3.8 样品基质效应消除

以纯牛奶、自来水和渔塘水作为检测样品,考察基质效应。牛奶中含有十分复杂的基质成分,如蛋白质、脂肪等。水样中含有肉眼可见和不可见的杂质,且缺少缓冲体系中的 Na⁺、K⁺等离子。这些基质成分会干扰免疫检测方法中抗原抗体反应,影响检测结果。考虑到检测结果的准确性及 icELISA 作为筛查方法所需的简便操作,对样品进行简单的除脂、过滤等前处理后,采用稀释法消除基质干扰。将样品按照 2.4 节的方法进行处理,将其标准曲线与 PBST 中的标准曲线进行比较,结果表明,两条曲线基本吻合,说明牛奶和水样经过简单处理及稀释后均能消除基质的影响(图 5)。因此,最终确定基质消除方案为:采用 0.01 mol/L PBST(pH 7.4),牛奶样稀释 10 倍,自来水稀释 2 倍;采用 0.02 mol/L PBST(pH 7.4),渔塘水稀释 2 倍。

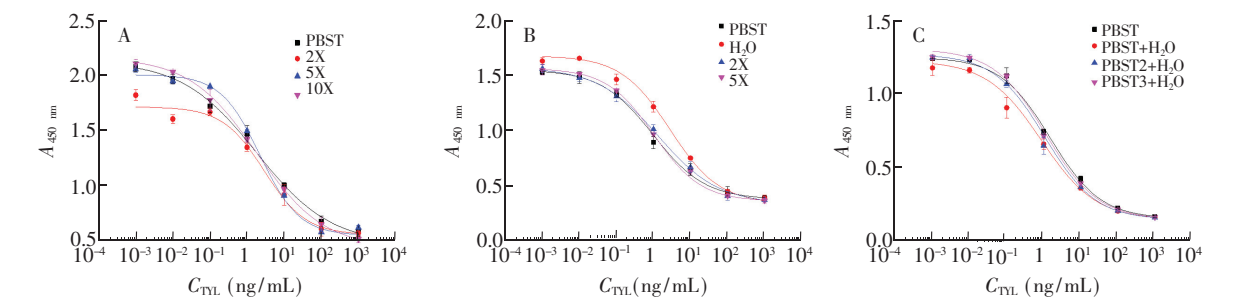


图 5 样品基质效应:(A)纯牛奶;(B)自来水;(C)渔塘水
Fig.5 Matrix effect of test samples: (A) Milk; (B) Tap-water; (C) Fishery water

3.9 样品添加回收实验

纯牛奶购自广州某超市,自来水取自实验室自来水,水样取自广州市南沙区某养殖基地鱼塘水,参考国标方法^[31],经 HPLC-MS/MS 验证为阴性样品。

向阴性牛奶样品中添加 25、50 和 100 ng/mL 的 TYL 标准品,向阴性水样(自来水、渔塘水)添加 5、10 和 20 ng/mL 的 TYL 标准品,分别采用所建立的 icELISA 方法和 HPLC-MS/MS 方法检测并计算平均回收率及变异系数。如表 2 所示,icELISA 方法样品平均回收率为 78.4%~105.6%,RSD<15%,与 HPLC-MS/MS 方法相关系数达 0.97,表明所建立的 icELISA 方法准确可靠。

表 2 样品添加回收实验
Table 2 Recoveries of spiked samples (n=3)

样品 Samples	添加量 Spiked level (ng/mL)	icELISA			HPLC-MS/MS		
		检测值 Found (ng/mL)	回收率 Recovery (%)	精密度 RSD (%, n=3)	检测值 Found (ng/mL)	回收率 Recovery (%)	精密度 RSD (%, n=3)
牛奶 Milk	25	21.9±2.2	87.6	9.9	28.7±0.2	114.7	0.6
	50	41.0±5.6	82.1	13.7	55.1±0.7	110.1	1.3
	100	95.1±11.3	95.1	11.9	114.4±2.7	114.4	2.3
自来水 Tap-water	5	3.9±0.1	78.4	1.3	3.2±0.1	64.3	4.3
	10	8.1±0.5	81.4	6.3	6.7±0.2	66.5	3.2
	20	21.1±1.4	105.6	6.6	14.7±0.5	73.3	3.1
渔塘水 Fishery water	5	4.2±0.4	84.9	8.6	3.2±0.1	65.0	4.1
	10	8.9±0.7	89.3	7.3	8.1±0.3	81.0	3.7
	20	17.4±1.2	87.2	6.8	15.2±1.1	76.0	7.1

4 结论

本研究建立了牛奶和水样中 TYL 残留的 icELISA 检测方法,方法检出限达 0.07 ng/mL,线性范围为 0.17 ~ 11.00 ng/mL,批内批间 RSD<15%,样品添加回收率为 78.4% ~ 105.6%,与 HPLC 方法相关性好。本方法灵敏度高,稳定性好,适用于牛奶和水样中 TYL 残留的检测。

References

- 1 Hamill R L, Haney M E J, Stamper M, Willey P F. *Antibiot. Chemother.*, **1961**, 11: 328–334
- 2 Stephens T P, Stanford K, Mcallister T A. *Can. J. Anim. Sci.*, **2009**, 89(1): 167–167
- 3 SHEN Xiang-Rong, SU Ya-Nan, LIU Cai, YANG Di, ZHANG Xiao-Hui, ZONG Xin-Ru, WANG Wen-Chao, ZHANG Miao, ZHANG Xu, BAO En-Dong. *Journal of Nanjing Agricultural University*, **2013**, 5: 120–124
沈向荣, 苏亚楠, 刘彩, 杨迪, 张晓辉, 宗欣茹, 王文超, 张森, 张栩, 鲍恩东. 南京农业大学, **2013**, 5: 120–124
- 4 LI Hong-Sheng, ZHANG Ji-Yu, ZHOU Xu-Zheng, LI Jian-Yong, LI Jin-Shan, MIAO Xiao-Lou, ZHANG Zhan-Feng. *Progress In Veterinary Medicine*, **2006**, 27(2): 94–96
李宏胜, 张继瑜, 周绪正, 李剑勇, 李金善, 苗小楼, 张占峰. 动物医学进展, **2006**, 27(2): 94–96
- 5 Hume M E, Donskey C J. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2017**, 14(4): 231–237
- 6 Gautierbouchardon A V, Reinhardt A K, Kobisch M, Kempf I. *Vet. Microbiol.*, **2002**, 88(1): 47–58
- 7 CHEN Zhang-Liu, WU Cong-Ming, JIANG Hong-Xia, LIAO Xiao-Ping, WEI Xiu-Li, DING Huan-Zhong, ZENG Zhen-Ling. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, **2003**, 25(3): 120–123
陈杖榴, 吴聪明, 蒋红霞, 廖晓萍, 魏秀丽, 丁焕中, 曾振灵. 四川生理科学杂志, **2003**, 25(3): 120–123
- 8 Council Regulation (EC) No. 37/2010. *Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin*. European Commission
- 9 *Animal Origin Food Veterinary Drug Maximum Residue Limit*. Ministry of Agriculture Bulletin [2002] No. 235
动物源食品中兽药最高残留限量. 农业部公告[2002]第235号
- 10 Garder J L, Moorman T B, Soupier M L. *J. Environ. Qual.*, **2014**, 43(4): 1484–1493
- 11 Luby E M, Moorman T B, Soupier M L. *Sci. Total Environ.*, **2016**, 550: 1126–1133
- 12 HUANG Chen, CHEN Ben-Long, WANG Nai-Fu, LI Wei-Hua. *China Animal Health Inspection*, **2016**, 33(2): 29–33
黄晨, 陈本龙, 王乃福, 李卫华. 中国动物检疫, **2016**, 33(2): 29–33
- 13 Chebira B, Boulitif L, Agabou A, Mekroud A. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, **2015**, 3(5): 295–301
- 14 BAO Jie-Hua, ZHANG Jin-Xia, GUO Qiang-Gong, ZHANG Ping. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, **2015**, 49(2): 35–39
包洁华, 张金霞, 郭强功, 张萍. 中国兽药杂志, **2015**, 49(2): 35–39
- 15 CAO Ai-Ying, ZHANG Yuan, ZHAO Chun-Hui, WANG Xiu-Lin, PAN Yong, LI Ying, ZONG Chao, CAO Jie. *Chinese Fishery Quality and Standards*, **2013**, 3(4): 21–24
曹爱英, 张园, 赵春晖, 王秀林, 潘勇, 李英, 宗超, 曹洁. 中国渔业质量与标准, **2013**, 3(4): 21–24
- 16 Jank L, Martins M T, Arsand J B, Motta M C, Hoff R B, Barreto F, Pizzolato T M. *Talanta*, **2015**, 144: 686–695
- 17 XU Jie, DENG Chao, XIAN Qi-Ming. *China Measurement and Test*, **2017**, 43(3): 58–62
徐洁, 邓超, 鲜啟鸣. 中国测试, **2017**, 43(3): 58–62
- 18 Molognoni L, Valesse A C, Lorenzetti A, Daguer H, Lindner J D D. *Food Chem.*, **2016**, 211: 748–756
- 19 van den Meersche T, van Pamel E, van Poucke C, Herman L, Heyndrickx M, Rasschaert G, Daeseleire E. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1429: 248–257
- 20 Zhang J K, Qi Y H, Liu J X, Wang J P. *Food Agric. Immunol.*, **2013**, 24(4): 419–431
- 21 Le T, He H, Niu X, Chen Y Xu J. *Food Agric. Immunol.*, **2013**, 24(4): 467–480
- 22 Li X, Shen J, Wang Q, Gao S, Pei X, Jiang H, Wen K. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407(30): 9125–9133
- 23 Zhang J, Liu J, Wang L, LinChai, Wang J. *J. Environ. Sci. Heal. B*, **2012**, 47(9): 876–882
- 24 Song Y, Song S, Liu L, Kuang H, Guo L, Xu C. *Food Agric. Immunol.*, **2015**, 27(3): 314–328
- 25 Chen Z J, Fu H J, Luo L, Sun Y M, Yang J Y, Zeng D P, Shen Y D, Xu Z L. *Anal. Methods*, **2017**, 9(10): 1617–1626
- 26 Zhang Y Q, Wang L T, Shen X, Wei X Q, Huang X A, Liu Y J, Sun X L, Wang Z H, Sun Y M, Xu Z L, Eremin S A, Lei H T. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65(23): 4830–4838

- 27 Wu J, Shen Y D, Lei H T, Sun Y M, Yang J Y, Xiao Z L, Wang H, Xu Z L. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62(29): 7078–7084
- 28 Luo L, Xu Z L, Yang J Y, Xiao Z L, Li Y J, Beier R C, Sun Y M, Lei H T, Wang H, Shen Y D. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62(51): 12299–12308
- 29 Cai X, Whitfield T, Moreno A Y, Grant Y, Hixon M S, Koob G F, Janda K D. *Mol. Pharm.*, **2013**, 10(11): 4176–4184
- 30 Zhang W, He L, Zhang R, Guo S, Yue H, Ning X, Tan G, Li Q X, Wang B. *Food Chem.*, **2016**, 207: 233–238
- 31 GB/T 22988-2003, *Determination of Spiramycin, Pyrimidin, Oleandomycin, Tilmicosin, Erythromycin, and Tylosin in Milk and Milk Powder by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. National Standards of the People's Republic of China 牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米考星、红霉素、泰乐菌素残留量的测定——液相色谱-串联质谱法. 中华人民共和国国家标准. GB/T 22988-2003

Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Tylosin in Milk and Water Samples

YAO Chan-Yuan¹, YANG Jin-Yi¹, XU Zhen-Lin¹, WANG Hong^{*1}, LEI Hong-Tao¹

SUN Yuan-Ming¹, TIAN Yuan-Xin², SHEN Yu-Dong^{*1}

¹(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

²(School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract To address the issues of tylosin residues in food and environment, a good specific polyclonal antibody was prepared by animal immunization based on a new hapten achieved by oxidizing the aldehyde group on the side chain of tylosin to carboxyl. Further, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) was established. The main experimental conditions were as follows: the coating antigen and the antibody were respectively diluted by 6000 times and 2000 times, the reaction buffer was PBST (pH 7.4), and the Tween concentration and ionic concentration were 0.1% and 0.01 mol/L, respectively. The dilution ratio of the secondary antibody was 4000 times and the secondary reaction time was 30 min. Under the optimized conditions, the IC₅₀ and the linear range of this method were 1.39 ng/mL and 0.17–11.0 ng/mL, respectively. The detection limit was 0.07 ng/mL, and the cross-reactivity with analogues was less than 0.1%. The recoveries of spiked raw milk and water samples were 78.4%–105.6% with relative standard deviation less than 15%. Besides, the detection results had good correlation with HPLC method ($R^2=0.97$). This method is suitable for rapid and specific screening of tylosin residues in milk and water samples.

Keywords Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay; Tylosin; Milk; Water

(Received 10 April 2018; accepted 6 May 2018)

This work was supported by the Science and Technology Planning Project of Guangzhou (No. 201704020082), the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFE0106000), the Science and Technology Planning Project of the Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. 2017AB47020), the National Natural Science Foundation of China (No. 31371769) and Guangdong Province Universities and Colleges Pearl River Scholar Funded Scheme (2017).