

恩诺沙星单克隆抗体的制备及 ciELISA 试剂盒的研制

赵银丽^{1,2}, 王建华¹, 王自良^{3,4}, 滕 蔓³, 刘庆堂³, 邓瑞广³, 范国英⁴, 张改平³

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001;

3 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 4 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

【摘要】【目的】研制快速、灵敏、特异的恩诺沙星残留检测 ciELISA 试剂盒(ENR-Kit), 为动物源性食品中恩诺沙星(ENR)残留的快速免疫学检测奠定基础。【方法】通过细胞融合技术制备恩诺沙星单克隆抗体(ENR mAb)杂交瘤细胞株, 体内诱生腹水法生产 ENR 单抗, 应用 ENR mAb 研制 ENR 残留间接竞争 ELISA (ciELISA)快速检测试剂盒, 并对其灵敏度、半数抑制浓度(IC_{50})、特异性、准确度和基质效应性进行检测。【结果】筛选出 2 株杂交瘤细胞, 其单抗亚类均为 IgG1 亚型。4G1-B3 杂交瘤细胞株的 ENR mAb 间接 ELISA 效价为 $1:1.024 \times 10^6$, 亲和常数(K_a)为 9×10^{10} L/mol。ENR-Kit 的线性检测范围为 $0.05 \sim 48.75 \mu\text{g/L}$, 灵敏度 $0.05 \mu\text{g/L}$, 半数抑制浓度(IC_{50})为 $1.31 \mu\text{g/L}$, 与环丙沙星的交叉反应率(CR)为 0.02% , 与其他化合物的交叉反应率(CR)均 $<0.01\%$ 。ENR-Kit 对牛奶样、鱼肉样和鸡肉样中 ENR 的平均添加回收率分别为 96.49% , 86.95% 和 84.13% , 平均变异系数均 $<10\%$, 不同基质对 ENR-Kit 检测结果影响小。【结论】研制的 ENR-Kit 具有快速、敏感、特异、简便等特点, 适合 ENR 残留快速检测的推广应用。

【关键词】 恩诺沙星; 杂交瘤细胞; 单克隆抗体; ciELISA; 快速检测试剂盒

【中图分类号】 S859.84

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)02-0033-07

Preparation of monoclonal antibody and development of ciELISA kit for rapid detection of enrofloxacin

ZHAO Yin-li^{1,2}, WANG Jian-hua¹, WANG Zi-liang^{3,4}, TENG Man³,
LIU Qing-tang³, DENG Rui-guang³, FAN Guo-ying⁴, ZHANG Gai-ping³

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, He'nan 450001, China;

3 The Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, He'nan 450002, China;

4 College of Animal Sciences, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, He'nan 453003, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to develop a ciELISA kit to detect enrofloxacin residue. 【Method】Balb/c mice were immunized with BSA-ENR. Hybridoma lines secreted monoclonal antibody against ENR were generated with cell fusion. ENR mAb was generated by inducing ascites in mice. A ciELISA kiting for detect ENR (ENR -Kit) was developed with ENR mAb and its sensitivity, IC_{50} , veracity, specificity and stability were tested respectively. 【Result】Two hybridoma lines were filtered and the best one was 4G1-B3, which secreted ENR mAb with indirect ELISA titers of $1:1.024 \times 10^6$ in ascites. I-

* [收稿日期] 2008-03-26

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAK02A21)

[作者简介] 赵银丽(1973—), 女, 山东莘县人, 讲师, 在读博士, 主要从事兽药残留免疫学检测方法研究。

E-mail: zhaoyinli73@yahoo.com.cn

[通信作者] 张改平(1960—), 男, 河南内黄人, 研究员, 主要从事动物免疫学与生物技术研究。

E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

sotype of the two mAb was IgG1. ENR mAb had a high affinity constant (K_a) of 9×10^{10} L/mol. The ENR-Kit had a linear detection ranging from 0.05 to 48.75 $\mu\text{g/L}$, the sensitivity of 0.05 $\mu\text{g/L}$ and a good sensitivity with an IC_{50} of 1.31 $\mu\text{g/L}$ to ENR, 0.02% cross-reactivity to Ciprofloxacin and less than 0.01% cross-reactivity to other compounds. The recoveries of ENR spiked in milk, fish and chicken were 96.49%, 86.95% and 84.13% respectively. The coefficient variation was below 10%. **【Conclusion】** The ENR-Kit is characterized with rapidity, sensitivity, specificity and briefness, and can be used for the rapid detection of ENR residues in animal food.

Key words: enrofloxacin; hybridoma line; monoclonal antibody; ciELISA; rapid detection kit

恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)是动物专用氟喹诺酮类抗生素,该药广谱抗菌,在畜牧生产和水产养殖中应用广泛。但残留于食品中的恩诺沙星,在高温下不易分解^[1],人类长期食用低残留的恩诺沙星食品,会对健康造成危害,发生食源性疾病^[2-3]。欧盟对恩诺沙星在牛奶和肌肉组织中的最大残留限量(MRL)要求分别不高于 100 $\mu\text{g/L}$ 和 30 $\mu\text{g/kg}$ ^[4-5]。2002 年,我国颁布《动物性食品中兽药最高残留限量》(中华人民共和国农业部公告第 235 号),对动物性食品中恩诺沙星的 MRL 作出明确规定,要求肌肉组织和牛奶中恩诺沙星的 MRL 分别不高于 100 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 。因此,建立和研究食品中恩诺沙星高效、特异、灵敏的检测方法是非常必要的。目前,常用的恩诺沙星检测方法是色谱检测法^[6-7]和免疫学检测法^[8]。色谱检测法需要昂贵的仪器和专门的工作人员,而且样品处理较烦琐,其应用受到一定的限制,尤其是在基层大规模筛选和现场检测中更加突出。免疫学检测法灵敏、特异、快速、简便,克服了以上的不足,适合大规模筛选。但目前国内对恩诺沙星 ELISA 试剂盒的研究报道甚少,刘红等^[9]报道了恩诺沙星 ELISA 的检测方法,但不够完善,缺少样品添加回收试验。Watanabe 等^[5]建立了动物组织样品中恩诺沙星残留的 ELISA 检测方法,对鸡肉等样品作了添加回收试验,但是对鸡肉样品的最低检测限偏高。为此,本研究应用细胞融合技术,建立分泌恩诺沙星单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并利用制备的 ENR 单克隆抗体(ENR mAb)建立了 ENR 残留快速检测 ciELISA 试剂盒(ENR-Kit),期为动物源性食品中恩诺沙星残留的快速免疫学检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、二氟沙星、达氟沙星、磺胺嘧啶、氯霉素、链霉素、庆

大霉素、氨苄青霉素,均购自中国兽医药品监察所,纯度 $\geq 99\%$;牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA),PIERCE 公司产品;完全弗氏佐剂(FCA)、不完全弗氏佐剂(FIA)、RPMI-1640 细胞培养基、HAT、HT 培养基、PEG1500,均为 Gibco 公司产品;鼠单克隆抗体分类试剂盒, Sigma 公司产品。

1.1.2 仪器设备 倒置生物显微镜,德国 LEICA 公司生产;CO₂ 细胞培养箱,美国 Precision 公司生产;离心机,Beckman 公司生产;550 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司生产。

1.1.3 细胞 小鼠骨髓瘤细胞株 NS0 细胞,由英国国家动物健康研究院惠赠。

1.1.4 实验动物 SPF 级 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 12 只,平均体质量 $15.6 \pm 0.3 \text{ g}$,购自郑州大学医学院实验动物中心。

1.1.5 ENR 人工抗原 ENR 人工抗原,本研究室采用活性酯法和氯甲酸异丁酯法制备的一组不同偶联比(1:28, 1:16, 1:9, 1:5)的 BSA-ENR。

1.2 动物免疫和 BSA-ENR 适宜偶联比的筛选试验

参考王自良等^[10]的方法并稍作修改。试验共分 4 组,每组 3 只 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠。用不同偶联比的 BSA-ENR(1:28, 1:16, 1:9, 1:5)分别免疫注射各组小鼠,连续免疫 4 次,每次间隔时间 3 周。4 次免疫均采用背部皮下分点注射方式,免疫剂量均为 50 $\mu\text{g/只}$ (按 BSA-ENR 中 BSA 的量计算),其中首免采用 BSA-ENR 与等量完全弗氏佐剂(CFA)混合乳化注射,其余 3 次免疫采用 BSA-ENR 与等量不完全弗氏佐剂(IFA)混合乳化注射。分别于 3 免和 4 免后 10 d 取各组免疫小鼠,断尾采血,分离血清,采用间接 ELISA 检测 ENR 多克隆抗体(ENR pAb)的效价,间接竞争 ELISA(ciELISA)检测 ENR pAb 对 ENR 的半数抑制浓度(IC_{50}),选择效价高而 IC_{50} 低的偶联比备用。

1.3 细胞融合与杂交瘤细胞株的筛选

1.3.1 细胞融合 细胞融合前 2 d,用 RPMI-1640

传代培养 NS0 细胞,前 1 d 用 HAT 选择培养基培养滋养层细胞。对细胞融合备用小鼠进行超免,每只小鼠腹腔注射 50 μg 的 BSA-ENR(不加佐剂)。第 3 天眶下窦采血,分离血清,脱颈致死小鼠,无菌取脾脏制备脾细胞,在 PEG1500 作用下与 NS0 细胞融合,将融合后的细胞悬液加到铺有滋养细胞层的 96 孔细胞培养板中,用 HAT 选择培养基培养。

1.3.2 杂交瘤细胞株的筛选 将融合后的细胞置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中,以 HAT 选择培养基进行培养,7~10 d 后用间接 ELISA 和 ciELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔,用有限稀释法进行亚克隆。经过 3 次有限稀释克隆化,筛选出 2 株(4G1-B3 和 4G1-G1)杂交瘤细胞,而后扩大培养,冻存。并通过间接 ELISA 方法对 ENR mAb 进行效价、亲和力和 Ig 亚类鉴定。

1.4 ENR mAb 的制备及其免疫学特性检测

1.4.1 ENR mAb 的制备和纯化 将克隆化的杂交瘤细胞株扩大培养,待细胞浓度达 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 时停止换液,继续培养直至细胞全部死亡,收集培养液,离心除去细胞碎片。向经液体石蜡处理 7 d 后的小鼠腹腔注射克隆化杂交瘤细胞 10^7 个/只,10 d 后抽取腹水,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,采用饱和硫酸铵盐析法纯化 ENR mAb。

1.4.2 ENR mAb 效价的测定 采用间接 ELISA 分别测定细胞培养上清和小鼠腹水中 ENR mAb 的效价。

1.4.3 ENR mAb 亲和力的测定 采用间接 ELISA 测定亲和常数(K_a)^[11-12],在抗原浓度不变的情况下,将已知浓度的抗体进行梯度稀释。设抗体浓度很高时与抗原的结合率为 100%,则结合率为 50%时所对应的抗体浓度的倒数即为亲和力,即 $K_a = 1/\alpha$ (α 是结合率为 50%时所对应的 ENR mAb 的浓度,单位为 mol/L)。

1.4.4 ENR mAb Ig 亚类的鉴定 采用间接 ELISA,按 Sigma 公司鼠单克隆抗体分类试剂盒(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM)说明书进行。

1.5 ENR 检测试剂盒(ENR-Kit)的研制

根据对筛选得到的 2 株(4G1-B3 和 4G1-G1)杂交瘤细胞免疫学检测,确定以 4G1-B3 为材料制备试剂盒。

1.5.1 ENR mAb 与 OVA-ENR 工作浓度的确定 用方阵滴定法^[13]确定 ENR-Kit 中 ENR mAb 与 OVA-ENR 的最佳工作浓度。将 OD_{450} 值为 1.0 左

右单抗的稀释浓度确定为 ciELISA 的工作浓度。

1.5.2 ciELISA 方法的建立 参考 Duan 等^[14]和沈建忠等^[15]的方法并稍作修改。首先,以 0.03 mol/L 盐酸为溶剂,配制质量浓度分别为 0,0.125,0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0,32.0 $\mu\text{g/L}$ 的 ENR 标准品。然后,按照以下程序进行 ciELISA 操作:(1)包板。用包被液(CBS)将 OVA-ENR 稀释至最佳工作浓度,每孔 50 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,弃去孔内液体,用含 0.05%吐温-20 的 PBS(PBST)洗液冲洗 3 遍,每次 3 min。(2)封闭。每孔加封闭液(含体积分数 5%猪血清的 PBST)200 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 1 h。(3)阻断和酶联反应。按标准品质量浓度依次向每孔加 ENR 标准品 50 μL ,以及最佳工作浓度的 ENR mAb 50 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min,洗涤后向每孔加入 50 μL gamIgG-HRP(1:1 000),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中再孵育 30 min。(4)显色和终止反应。向每孔加新配制的含 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的底物液 50 μL ,室温反应 10 min 后再加 2 mol/L 硫酸终止液 50 μL ,最后用酶标仪测 A_{450} 值。同时,每块板设阴性对照孔(骨髓瘤细胞培养上清)和空白对照孔(PBST)。以上试验重复 3 次,计算平均值。

1.5.3 ENR-Kit 标准曲线的绘制和半数抑制浓度(IC_{50})的计算 进行 ciELISA 测定,以 ENR mAb 对不同质量浓度 ENR 标准品的抑制率 B/B_0 (B 为 ENR 不同标准品质量浓度的 A_{450} 值, B_0 为 ENR 0 浓度的 A_{450} 值)为纵坐标,不同标准品质量浓度的对数值为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线,推导回归方程,并计算半数抑制浓度(IC_{50})。

1.5.4 待测样品的处理 精确称取 1 mg ENR,溶于 1 mL 0.03 mol/L 盐酸溶液中,配制成 1 mg/mL 母液,然后用 pH 7.4 PBS 稀释母液,得 40,160,640,1 280 $\mu\text{g/L}$ 的 ENR 溶液,用于样品添加回收试验。牛奶样品的处理:向 1 mL 牛奶中分别加入 100 μL 以上各溶液,分别得到 ENR 质量浓度为 4,16,64,128 $\mu\text{g/L}$ 的牛奶样品。鸡肉和鱼肉样品的处理:向 1 g 匀浆的肉样组织中分别加入 100 μL 以上各溶液,分别得到 ENR 质量浓度为 4,16,64,128 $\mu\text{g/kg}$ 的鸡肉和鱼肉样品。

1.6 ENR-Kit 性能的测定

1.6.1 灵敏度 灵敏度通常用检测限(LOD)来表示。用 ciELISA 测定 20 个不同批次的空白标准品,计算 A_{450} 值的平均值(X)和标准差(SD),在标准曲线上查出 $(X - 2SD)/X$ 对应的 ENR 质量浓

度,即为 ENR-Kit 理论上的检测限。

1.6.2 特异性 以 ENR 及与 ENR 结构相似的喹诺酮类、氯霉素等抗生素为抑制物,ciELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 ENR mAb 对 ENR 的 IC_{50} 与各抑制物 IC_{50} 的百分比为其交叉反应率(CR)。交叉反应率越低,特异性越强。

1.6.3 准确度 用添加回收试验进行测定。牛奶样品的处理参考 Els 等^[4]的方法,制备 ENR 终质量浓度分别为 2,8,32,64 $\mu\text{g/L}$ 的牛奶样品,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,12 000 r/min 离心 20 min,除脂备用。鸡肉和鱼肉样品的处理参考 Duan 等^[14]的方法,制备 ENR 终质量浓度分别为 2,8,32,64 $\mu\text{g/kg}$ 的肉样,84 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 min,冷却到室温后,12 000 r/min 离心 20 min,分离上清备用。按照本研究建立的 ciELISA 方法,测定每个待测添加样品的 A_{450} ,根据 ENR-Kit 标准曲线和回归方程,求出对应的待测样品中的 ENR 质量浓度(即实测值),计算实测值与添加值比值(即样品添加回收率)。每样品设 6 个重复,以回收率和变异系数(CV)确定其准确度。

1.6.4 基质效应性 牛奶、鸡肉和鱼肉样品的处理与 1.6.3 中添加回收试验的处理方法相同,以 PBS 和牛奶、鸡肉、鱼肉样品处理液为基质,将 ENR 分别溶于 4 种基质中,配制成质量浓度分别为 0,

0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16 和 32 $\mu\text{g/L}$ 的溶液,按照 ENR-Kit 的操作方法测定 A_{450} ,以不同 ENR 质量浓度的对数值为横坐标,ENR mAb 对不同质量浓度 ENR 的抑制率 B/B0 为纵坐标,绘制标准曲线并进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 BSA-ENR 适宜偶联比的筛选结果

3 免和 4 免后 10 d,分别对各组小鼠的血清抗体进行了检测,结果是一致的。BSA-ENR 偶联比为 1 : 16 的一组小鼠血清抗体表现出较高的效价和最低的 IC_{50} ,其他各组抑制效果由高到低依次为 1 : 9,1 : 5 和 1 : 28。图 1 和图 2 所示为偶联比为 1 : 16 的 3 只小鼠的检测结果。由图 1 可见,3 只小鼠的 ENR pAb 效价均超过了 1 : 10^3 ,说明获得了较好的免疫效果,其中 2 号小鼠的 ENR pAb 效价最高,小于 1 : (6.4 $\times 10^4$)。由图 2 可见,3 只小鼠的 ENR pAb 对 ENR 均有抑制,其中 2 号小鼠的 IC_{50} 最低,根据 2 号小鼠的标准曲线回归方程($y = -0.306 1x + 0.823 7, R^2 = 0.985 5$)计算出半数抑制浓度 IC_{50} 为 11.4 $\mu\text{g/L}$ 。因此,选择偶联比为 1 : 16 组的小鼠作为细胞融合备用小鼠。

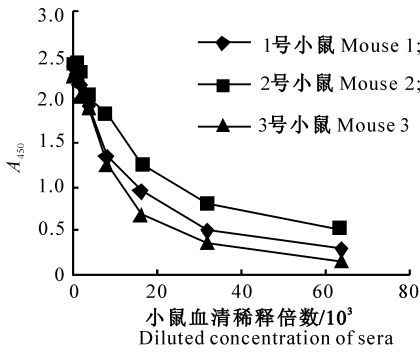


图 1 ENR pAb 效价的测定结果

Fig.1 The titers of ENR pAb by indirect ELISA

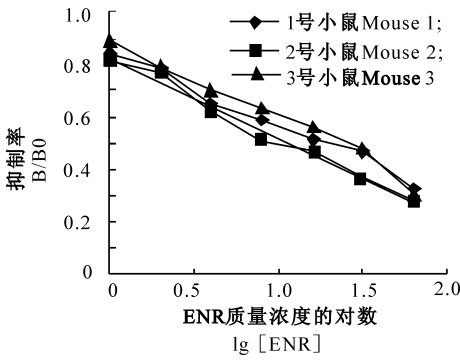


图 2 ENR pAb 对 ENR 的抑制曲线

Fig.2 Inhibitive curve of ENR pAb against ENR by ciELISA

细胞分泌的 ENR mAb 的效价均较高,其中 4G1-B3 株最高,细胞培养上清和小鼠腹水分别达到了 1 : 1 280 和 1 : 1.024 $\times 10^6$ 。

2.2 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合后 10 d,计算融合率为 92%,间接 ELISA 检测,阳性孔占 20%。用间接 ELISA 和 ciELISA 进行筛选,选取效价高、抑制效果最好、生长旺盛的 2 孔进行克隆化,经 3 次有限稀释克隆化,筛选到 2 株效果最佳的杂交瘤细胞,分别为 4G1-B3、4G1-G1。经多次传代、冻存和复苏,杂交瘤抗体分泌稳定。

2.3 ENR mAb 的免疫学特性

2.3.1 效价的测定结果 由表 1 可知,2 株杂交瘤

表 1 ENR 单克隆抗体的间接 ELISA 效价

Table 1 Indirect ELISA titer of ENR mAb

杂交瘤细胞株 Hybridoma line	细胞培养上清 Supernatant	小鼠腹水 Astices
4G1-B3	1 : 1 280	1 : 1.024 $\times 10^6$
4G1-G1	1 : 640	1 : 5.12 $\times 10^5$

2.3.2 亲和力的测定结果 4G1-B3 和 4G1-G1 的亲 和常数分别为 9 $\times 10^{10}$ 和 4.5 $\times 10^{10}$ L/mol,依据

抗体亲和力理论^[16]可知,本试验筛选出的 2 株杂交瘤细胞所分泌的 ENR mAb 亲和力均较高。

2.3.3 Ig 亚类的鉴定结果 按照试剂盒说明,经间接 ELISA 检测,4G1-B3 和 4G1-G1 2 株单抗均为 IgG1 亚型。

2.4 ENR-Kit 性能的测定

2.4.1 ENR mAb 与 OVA-ENR 工作浓度的确定 方阵滴定结果显示,ENR mAb 的最佳工作浓度为 1:128 000;OVA-ENR 的最佳工作浓度为 0.5 μg/mL。

2.4.2 标准曲线和半数抑制浓度(IC₅₀)的计算 ENR mAb 对 ENR 的抑制曲线如图 3 所示。回归方程 $Y = -0.3184X + 0.5375$,相关系数 $R^2 = 0.9922$,根据回归方程计算出 ENR mAb 对 ENR 的半数抑制浓度 IC₅₀ 为 1.31 μg/L,ENR-Kit 的线性检测范围为 0.05~48.75 μg/L。

2.4.3 灵敏度 ciELISA 检测 20 个不同批次的空

白标准品,所得平均值为 1.02,标准差为 0.055,LOD 为 0.05 μg/L,即 ENR-Kit 的灵敏度为 0.05 μg/L。

2.4.4 特异性 由表 2 可知,恩诺沙星与环丙沙星的交叉反应率为 0.02%,与其他沙星类化合物以及常用抗生素类化合物的交叉反应率均小于 0.01%,说明恩诺沙星单抗特异性较好。

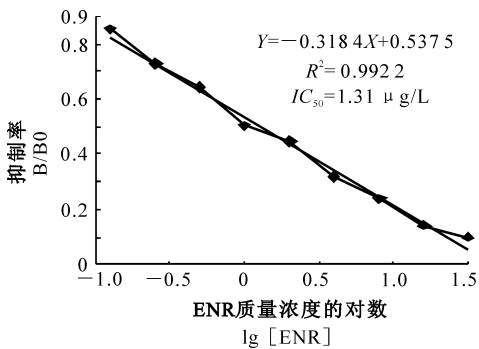


图 3 4G1-B3 单克隆抗体抑制曲线
Fig. 3 Inhibitory curve of 4G1-B3 mAb

表 2 4G1-B3 单克隆抗体与多种抗生素的交叉反应性

Table 2 Cross reactivity of 4G1-B3 mAb and multi antibiotics

抑制物 Inhibitor	半数抑制浓度/ (μg · L ⁻¹) IC ₅₀	交叉反应率/% Cross-reactivity	抑制物 Inhibitor	半数抑制浓度/ (μg · L ⁻¹) IC ₅₀	交叉反应率/% Cross-reactivity
恩诺沙星 Enrofloxacin	1.31	100	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	>1.25×10 ⁴	<0.01
环丙沙星 Ciprofloxacin	6 250	0.02	氯霉素 Chloramphenicol	>1.25×10 ⁴	<0.01
达氟沙星 Danofloxacin	>1.25×10 ⁴	<0.01	链霉素 Streptomycin	>1.25×10 ⁴	<0.01
二氟沙星 Difloxacin	>1.25×10 ⁴	<0.01	庆大霉素 Gentamycin	>1.25×10	<0.01
诺氟沙星 Norfloxacin	>1.25×10 ⁴	<0.01	氨苄青霉素 Ampicillin	>1.25×10 ⁴	<0.01

2.4.5 准确度 表 3 表明,牛奶样的添加回收率在 90.37%~102.25%,平均 96.49%,变异系数(CV)为 5.6%~10.7%,平均 8.27%;鸡肉样的添加回收率在 77.0%~90.5%,平均 84.13%,CV 为

8.41%~12.7%,平均 9.85%;鱼肉样的添加回收率在 82.8%~91.4%,平均 86.95%,CV 为 7.7~10.5%,平均 8.88%。各样品平均变异系数 CV 均小于 10%,表明 ENR-Kit 具有较高的准确度。

表 3 ENR-Kit 检测不同样品的添加回收试验结果 (n=6)

Table 3 Recovery test of ENR added to different samples by ENR-Kit (n=6)

样品 Sample	ENR 添加量 Amount of ENR	实测值 Measured value	回收率/% Recovery	变异系数/% CV
奶样 Milk	2	2.05±0.177	102.25±8.85	8.63
	8	7.85±0.84	98.08±10.49	10.7
	32	30.49±1.71	95.26±5.33	5.6
	64	57.83±4.73	90.37±7.39	8.18
鸡肉 Chick	2	1.81±0.15	90.5±7.61	8.41
	8	6.93±0.66	86.6±8.20	9.5
	32	26.37±2.31	82.4±7.23	8.8
	64	49.28±6.25	77±9.77	12.7
鱼肉 Fish	2	1.83±0.17	91.4±9.35	9.14
	8	7.09±0.75	88.6±9.34	10.5
	32	27.2±2.23	85±6.96	8.19
	64	52.9±4.08	82.8±6.38	7.7

注:表中奶样的 ENR 单位为 μg/L,肉样为 μg/kg。
Note:ENR concentration unit in milk was μg/L,and in meat was μg/kg.

2.4.6 基质效应性 由图 4 可知,4 种基质标准曲线的 IC₅₀ 分别为:PBS 1.31 μg/L,牛奶样 1.63

$\mu\text{g/L}$,鸡肉样 $2.6\ \mu\text{g/L}$,鱼肉样 $2.01\ \mu\text{g/L}$ 。说明尽管不同生物基质对标准品的吸光值有一定影响,但其 IC_{50} 变化不明显,对 ENR-Kit 的敏感性和检测结果影响小,证明上述样品的处理方法是可行的。

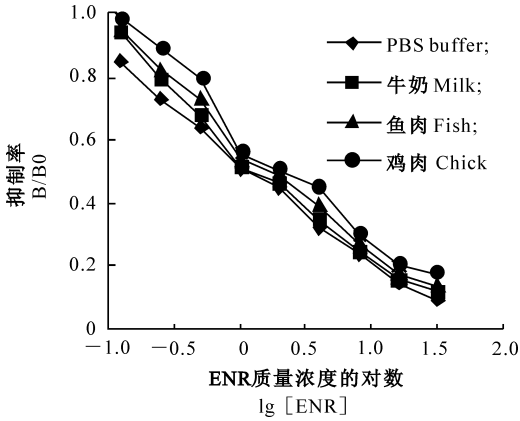


图 4 不同基质对 ENR-Kit 的影响

Fig. 4 Effect of different sample solutions on ENR-Kit

3 讨论

关于恩诺沙星 ELISA 检测方法的研究已有报道,但均存在某些方面的不完善。刘红等^[9]建立了恩诺沙星 ELISA 检测方法,该法以 PBS 为基质的最低检测限 (LOD) 为 $0.423\ \mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.423\sim1\ 000\ \mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 $33.76\ \mu\text{g/L}$,但缺少样品添加回收试验。Watanabe 等^[5]制备了恩诺沙星单抗,并建立了恩诺沙星残留的 ELISA 检测方法,其以 PBS 为基质的 LOD 为 $0.1\ \mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.1\sim50\ \mu\text{g/L}$;对牛奶样品的 LOD 为 $1\ \mu\text{g/L}$,线性范围为 $1\sim500\ \mu\text{g/L}$,但对鸡肉样品的最低检测限相对偏高,为 $10\ \mu\text{g/L}$ 。Bucknall 等^[17]采用氯甲酸异丁酯法合成恩诺沙星的完全抗原,免疫绵羊得到恩诺沙星的多克隆抗体,并建立了 ELISA 检测方法,其 IC_{50} 为 $13.9\ \mu\text{g/L}$ 。与以上研究相比,本试验所建立的恩诺沙星 ciELISA 检测方法灵敏性更高,其以 PBS 为基质的 LOD 为 $0.05\ \mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.05\sim48.75\ \mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 $1.31\ \mu\text{g/L}$ 。按照添加回收试验时对样品做 2 倍稀释的标准推算,本试剂盒对牛奶和肉样组织样品的 LOD 为 $0.1\ \mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.1\sim97.5\ \mu\text{g/L}$ 。所以,本研究通过恩诺沙星单克隆抗体的制备和样品添加回收试验等的研究,提高了试剂盒检测的灵敏性,增加了其检测的准确性,从而更能满足实际应用的要求。

好的恩诺沙星 ELISA 检测试剂盒应具有相对较高的检测灵敏性和实际应用的准确性。提高恩诺

沙星 ELISA 检测的灵敏性,关键是制备高灵敏性和特异性的恩诺沙星抗体。由于恩诺沙星本身属于半抗原,自身不能产生抗体,所以必须先与大分子载体蛋白偶联合成完全抗原后,再免疫小鼠才能产生抗恩诺沙星的抗体。而要得到效价高和阻断效果好的抗体,最重要的是完全抗原的偶联,适宜的偶联比对特异性抗体的产生具有重要影响,有助于提高免疫应答能力和抗体的亲和力。但目前对最佳偶联比说法不一,Schneider 等^[18]认为最佳偶联比为 $1:10\sim1:20$,Eilange^[19]提出以 $1:5\sim1:25$ 为好。本试验通过活性酯法和氯甲酸异丁酯法制备了一组不同偶联比 ($1:28,1:16,1:9,1:5$) 的恩诺沙星完全抗原,将其分别免疫小鼠,定期检测血清抗体效价,发现偶联比为 $1:16$ 的一组小鼠抑制效果最好,其次为 $1:9,1:5,1:28$ 。可见,偶联比过大,载体上覆盖半抗原过多,不利于载体与淋巴细胞表面受体结合,从而影响免疫应答。本研究按照 $1:16$ 的偶联比合成恩诺沙星完全抗原,通过细胞融合筛选到 1 株杂交瘤细胞(命名为 4G1-B3),其分泌的 ENR mAb 效价达 $1:1\ 280$ (细胞培养上清) 或 $1:1.024\times10^6$ (小鼠腹水)、亲和常数为 $9\times10^{10}\ \text{L/mol}$ 。所以,该高灵敏性、特异性恩诺沙星抗体是提高本试剂盒检测灵敏性的基础,也为后续试纸条的研制奠定了基础。

另外,试剂盒的准确性需要通过样品添加回收试验来确定,但样品添加后的处理方式对检测的灵敏性有很大影响。Watanabe 等^[5]在进行鸡肉样品的添加回收试验时,采用甲醇溶解恩诺沙星,检测时需对鸡肉样品作 100 倍稀释才可使用。而本研究对肉样的添加回收试验采用 $0.03\ \text{mol/L}$ 盐酸溶液作溶剂,检测时只需对样品作 2 倍稀释,再配合高温水浴和离心即可满足检测要求,大大提高了试剂盒的检测灵敏性。这说明甲醇等有机溶剂对添加恩诺沙星回收样品溶液体系的理化性质存在影响,从而影响恩诺沙星的回收和 ELISA 的检测结果;而稀酸对回收样品体系的影响较小。因此,为提高试剂盒检测的灵敏性,增加准确性,应根据对象优化样品处理方法。

[参考文献]

[1] Lolo M, Pedreira S, Miranda J M, et al. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue [J]. Food Addit Contam, 2006, 23(10): 988-993.
[2] Hong J, Kim J M, Jung W K, et al. Prevalence and antibiotic resistance of Campylobacter spp. isolated from chicken meat,

- pork, and beef in Korea, from 2001 to 2006 [J]. *J Food Prot*, 2007, 70(4): 860-866.
- [3] Nelson J M, Chiller T M, Powers J H, et al. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(7): 977-980.
- [4] Els V C, Jan D B, Wim R. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 4975-4978.
- [5] Watanabe H, Satake A, Kido Y, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assays and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices [J]. *Analyt*, 2002, 127: 98-103.
- [6] Durden D A, MacPherson T. Quantitation and validation of fluoroquinolones in eggs using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2007, 90(2): 613-625.
- [7] Zhao S, Jiang H, Li X, et al. Simultaneous determination of trace levels of 10 quinolones in swine, chicken, and shrimp muscle tissues using HPLC with programmable fluorescence detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(10): 3829-3834.
- [8] Huet A C, Charlier C, Tittlemier 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: 2822-2827.
- [9] 刘红, 曾振灵, 杨桂香, 等. 恩诺沙星 ELISA 快速检测方法的建立 [J]. *中国兽药杂志*, 2006, 40(11): 13-15.
- Liu H, Zeng Z L, Yang G X, et al. To establish the ELISA method for detecting enrofloxacin residues [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2006, 40(11): 13-15. (in Chinese)
- [10] 王自良, 张改平, 张海棠, 等. 抗苯巴比妥单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选及 ciELISA 试剂盒的研制 [J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(5): 711-715.
- Wang Z L, Zhang G P, Zhang H T, et al. Screening of hybridoma lines of monoclonal antibody and development of ciELISA kit for rapid detection of phenobarbital [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(5): 711-715. (in Chinese)
- [11] Batty J D, Beatty B G, Wlanos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. *Journal of Immunology Methods*, 1987(100): 173-179.
- [12] 杨利国, 胡少旭, 魏平华, 等. 酶联免疫测定技术 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- Yang L G, Hu S X, Wei P H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1998. (in Chinese)
- [13] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 北京人民军医出版社, 2000.
- Zhu L P, Chen X Q. Experimental methods of immunology [M]. Beijing: Beijing People's Military Medicine Press, 2000. (in Chinese)
- [14] Duan J H, Yuan Z H. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1087-1089.
- [15] 沈建忠, 何方洋, 何继红, 等. 动物组织中磺胺二甲嘧啶残留检测 ELISA 试剂盒的研制 [J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(6): 6-8.
- Shen J Z, He F Y, He J H, et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay kit for sulfamethazine in animal tissues [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(6): 6-8. (in Chinese)
- [16] James W G. Monoclonal antibodies: Principles and practice [M]. New York: Academic Press, 1983: 142-147.
- [17] Bucknall S, Silverlight J, Coldham N, et al. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products [J]. *Food Addit and Contam*, 2003, 20(3): 221-228.
- [18] Schneider P, Hammock B D. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for S-triazine herbicides using monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(3): 525-530.
- [19] Eilange B F. The preparation of antigenic hapten carrier conjugates [J]. *A Survey, Methods in Enzymology*, 1980, 70: 85-104.