

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.09.015

土霉素完全抗原的制备及 ELISA 检测方法的建立

Preparation of OTC complete antigen and establishment of ELISA detection method

曹金博^{1,2} 胡晓飞¹ 王耀² 李燕虹^{1,2} 曹夕丹²CAO Jin-bo^{1,2} HU Xiao-fei¹ WANG Yao² LI Yan-hong^{1,2} CAO Xi-dan²邢云瑞¹ 孙亚宁¹ 邓瑞广¹ 张改平^{1,3}XING Yun-rui¹ SUN Ya-ning¹ DENG Rui-guang¹ ZHANG Gai-ping^{1,3}

(1. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003; 3. 河南农业大学, 河南 郑州 450000)

(1. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 3. Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

摘要:为制备土霉素(Oxytetracycline, OTC)完全抗原,获得免疫学特性良好的土霉素鼠源多抗血清并建立 OTC 免疫学检测方法,采用重氮化法在 OTC 分子上引入羧基,进而利用改进碳二亚胺法将其与载体蛋白偶联制备完全抗原,通过红外扫描、紫外扫描和凝胶电泳鉴定其偶联效果,然后将完全抗原免疫 BLAB/c 小鼠获得多抗血清(pAb)并对其免疫学特性进行鉴定,通过优化条件建立 OTC 间接竞争 ELISA 检测方法。结果表明,偶联效果良好,免疫的 4 只小鼠多抗血清效价均达到 1:12 800; 4 只小鼠多抗血清均有抑制效果,其中 2 号小鼠产生的多抗血清效果最佳,基于该多抗血清建立的 OTC 间接竞争 ELISA 检测方法半数抑制浓度(IC_{50})为 32.92 ng/mL,检测限(LOD)为 1.3 ng/mL,牛奶样品中添加回收率在 84.70%~87.45%,与金霉素、四环素的交叉反应率分别为 5.27%, 4.10%,与其他竞争物交叉反应率<0.4%。该试验成功合成了 OTC 完全抗原,获得了免疫学特性良好

的 OTC 多抗血清,并建立了 OTC 免疫学检测方法。

关键词:土霉素;完全抗原;多抗血清;ELISA

Abstract: To prepare complete antigen of oxytetracycline (OTC) and obtain mouse polyclonal antiserum with good immunological characteristics and establish immunological detection method of OTC. In this study, carboxyl groups were introduced into OTC molecules by diazotization, and then complete antigens were prepared by coupling with carrier proteins using an improved carbodiimide method. The coupling effect of complete antigen was identified by IR, UV and SDS-PAGE. Then the BLAB/c mice were immunized with complete antigens to obtain antiserum (pAb) and identify the antiserum immunological characteristics. After optimizing the reaction conditions of ELISA, indirect competitive ELISA method of OTC was established. The results showed that complete antigen has good coupling effect, and the titer of antiserum of all four mouse were higher than 1:12 800, indicating that the serum of all four mouse had inhibitory effect. The antiserum produced by mouse number 2 was the best. The sensitivity (IC_{50}) of the indirect competitive ELISA to assay OTC was 32.92 ng/mL, and the limit of detection (LOD) was 1.3 ng/mL. The addition recovery rate of milk samples was between 84.70%~87.45%. The cross-reaction rates with Chlortetracycline and Tetracyclines were 5.27% and 4.10% respectively, and the cross-reaction rates with other competitors were less than 0.4%. This study successfully synthesized OTC complete antigens and prepared OTC antiserum with good immunological properties, and initially established immunological detection method of it.

Keywords: Oxytetracycline; complete antigen; antiserum; ELISA

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划课题(编号:2014BAD13B05);国家重点研发计划(编号:2018YFC1602903);国家自然科学基金(编号:31702218);河南省自然科学基金(编号:182300410038);河南省科技攻关项目(编号:182102110445,182102310230);河南省高等学校重点科研项目(编号:18B550001);河南省动物免疫学重点实验室开放课题(编号:PKLAI20170603)

作者简介:曹金博,男,河南科技大学在读硕士研究生。

通信作者:张改平(1960—),男,河南农业大学教授,中国工程院院士,博士。E-mail:zhanggaip@126.com

收稿日期:2019-07-03

土霉素(Oxytetracycline, OTC)属于四环素类抗生素中的一种,其化学结构式如图 1 所示^[1]。由于具有广谱抗菌性,且价格低廉,因此被广泛用于禽畜各种感染性疾病的治疗,适量添加在动物饲料或饮水中还可有助于禽畜生长和疾病预防^[2-3]。但由于禽畜养殖过程中长期、大量违规添加四环素类抗生素,导致其在动物源性食品以及环境中过量残留,对人类健康造成极大威胁^[4-5]。中国农业部 235 号公告明确规定:牛奶和肌肉中四环素类抗生素最高残留量不得超过 100 $\mu\text{g}/\text{g}$,肾脏、肝脏、蛋中分别不得超过 600, 300, 200 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

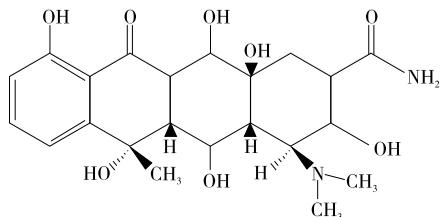


图 1 OTC 分子结构式

Figure 1 Molecular structure formula of OTC

目前,高效液相色谱法、气相色谱-质谱法等检测方法存在仪器昂贵、操作繁琐、检测不及时等局限,因而不适合样品的现场筛查^[6-8]。相比之下,酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫层析试纸(Immunochromatographic assay, ICA)等免疫学快速检测方法操作简单、迅速,同样具有良好的灵敏度和特异性,在大批量样品现场筛查方面具有显著优势^[9-11]。该类方法依赖高效抗体对抗原进行灵敏特异识别,但土霉素分子量小,无免疫原性,必需与载体蛋白偶联制备完全抗原才能刺激机体免疫应答产生抗体。目前,关于 OTC 完全抗原的制备虽有报道^[12],但所获得多抗血清的敏感性和特异性有待提高。试验拟采用重氮化法和碳二亚胺法合成 OTC 完全抗原,制备并鉴定 OTC 多抗血清,以期为后期制备 OTC 单克隆抗体及建立免疫学快速检测方法提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

土霉素(OTC)、金霉素(CTC)、四环素(TC)、沙拉沙星(SARA)、环丙氨嗪(CA)等标准品:纯度 $\geq 99\%$,美国 Sigma 公司;

1-(3-甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、对氨基苯甲酸:纯度 98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)、牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA):纯度 $\geq 99\%$,美国

Sigma 公司;

氯化钠、氯化钾、碳酸钠、碳酸氢钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子天平:ME204E 型,梅特勒-托利多仪器有限公司;

紫外-可见分光光度计:UV-5100H 型,美国 Thermo Fisher 公司;

电泳仪:DYY-6C 型,大连捷迈科贸有限公司;

凝胶成像仪:ChemiDoc™ XRS⁺ 型,美国 Bio-Rad 公司;

傅立叶变换红外光谱仪:Nicolet™ iS™ 5 型,日本岛津公司。

1.1.3 试验动物

BALB/c 小鼠:6 周龄 SPF 级,济南朋悦实验动物繁育有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 OTC 半抗原合成与鉴定 OTC 半抗原合成路线图见图 2。参照 Flecker 等^[13]的重氮化法,具体操作步骤为:称取 4.3 mg 对氨基苯甲酸溶于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 2 mL 0.2 mol/L 的稀盐酸溶液中,称取 4.0 mg NaNO_2 溶于 1 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的双蒸水后缓慢滴加到对氨基苯甲酸溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 1 h。称取 10 mg OTC 溶于 2 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的四硼酸钠缓冲液(pH 8.5),将上述反应液缓慢滴加到该溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光搅拌 2 h,反应液呈深红色,用 6 mol/L 的浓盐酸调节其 pH 至 1.5 以下,室温静置 10 min,产生沉淀,5 000 r/min 离心 3 min,去除上清,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的双蒸水洗 4 遍,真空冷冻干燥后取部分样品进行红外扫描鉴定。

1.2.2 OTC 完全抗原合成 采用同样的方法合成免疫原 OTC-BSA 和包被原 OTC-OVA,其合成路线(以 OTC-BSA 为例)见图 3。具体操作步骤为:称取 OTC 半抗原 5 mg 溶于 1 mL PBS 中,加入 1.8 mg NHS,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 2 h。称取 6.5 mg BSA 溶于 2 mL PBS 后慢滴加到上述反应液中,同时加入 3 mg EDC,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光搅拌 24 h。最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 PBS 搅拌透析 3 d,离心去除沉淀得 OTC 完全抗原。

1.2.3 OTC 完全抗原鉴定

(1) 紫外扫描鉴定:用 PBS 配制与完全抗原溶液浓度一致的 BSA 溶液和 OTC 标品溶液,用紫外-可见分光光度计分别扫描其在 220~350 nm 的吸收光谱,通过对比各溶液的特征吸收峰判断偶联效果^[14]。

(2) 红外扫描鉴定:将 OTC 完全抗原溶液真空冷冻干燥,对 OTC 完全抗原、BSA 和 OTC 进行红外扫描,以扫描波数为横坐标,透过率为纵坐标,得到红外扫描光谱并进行对比。

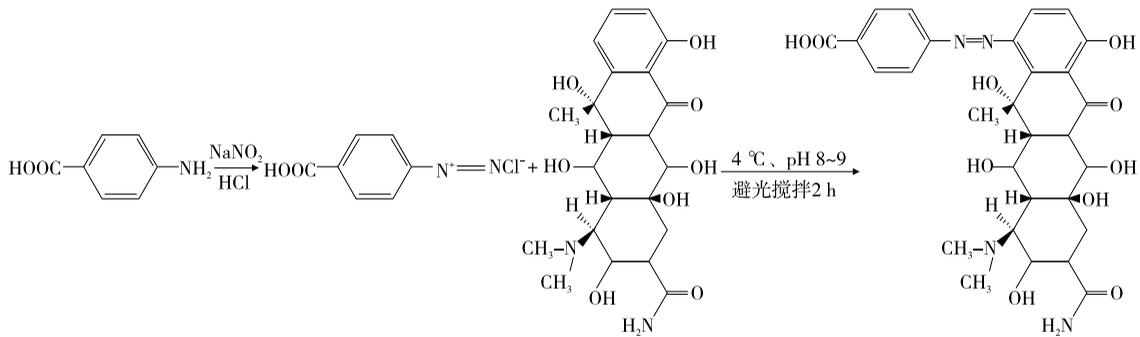


图 2 OTC 半抗原合成路线

Figure 2 The synthetic route of OTC hapten

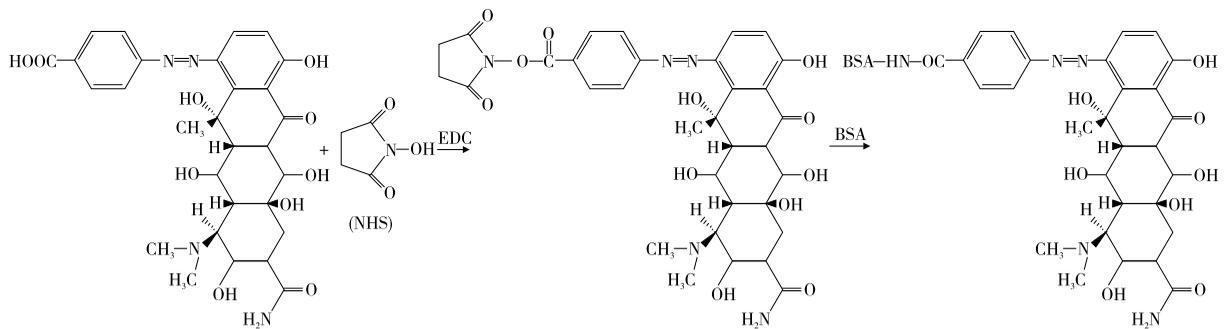


图 3 OTC-BSA 合成路线图

Figure 3 The synthetic route of immunogen OTC-BSA

(3) SDS-PAGE 鉴定:参照文献[15]制得 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,其电压分别为 60,90 V,样品加入量为 20 μL (含 OTC-BSA 5 μg),用考马斯亮蓝染液染色 6 h,乙酸脱色液脱色 6 h,通过凝胶成像系统拍照,对比 BSA 与 OTC-BSA 电泳条带的位置差异判断偶联效果。

1.2.4 OTC 多抗血清的制备与鉴定 选择 4 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠,以 30 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ /只的剂量背部皮下多点注射免疫 4 次,每次间隔 3 周。首次免疫将 OTC-BSA 与等量 FCA 混合,后 3 次为加强免疫,将 OTC-BSA 与等量 FIA 混合。免疫完成后 10 d 断尾取血,获得 OTC 多抗血清。

(1) OTC 多抗血清效价测定:采用间接 ELISA 法^[16]。用 CBS 将 OTC-OVA 稀释并包被于 96 孔聚苯乙烯板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗板后加封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。向已包被抗原的聚苯乙烯板中加入倍比稀释的抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,洗板后加入羊抗鼠酶标二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗板后加入显色液,10 min 后终止显色并读取 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值,当 $OD_{450 \text{ nm}}/\text{空白孔 } OD_{450 \text{ nm}} \geq 2.1$ 时,判定为阳性孔。

(2) OTC 多抗血清敏感性鉴定:采用间接竞争 ELISA 法^[17]。向已包被抗原的聚苯乙烯板中加入效价测定中 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值为 1.0 左右的血清稀释液和具有梯度浓度的 OTC 标品溶液,其他步骤同效价测定操作方法。

通过计算抑制率,以 B/B_0 为纵坐标(B 为 OTC 不同浓度的 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值, B_0 为 OTC 零浓度的 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值),OTC 浓度对数值为横坐标绘制抑制曲线,得到线性回归方程,并以半数抑制浓度(IC_{50})来评定多抗血清敏感性。

1.2.5 OTC ELISA 检测方法的建立

(1) 确定最佳包被浓度和工作浓度:将 OTC-OVA 分别稀释 500,1 000,2 000,4 000,8 000 倍进行包被,间接 ELISA 测定各包被浓度下抗体效价,选取效价测定中 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值 1.0 左右对应的稀释度作为多抗血清工作浓度,采用间接竞争 ELISA 测定各包被浓度下 IC_{50} ,选择 IC_{50} 最低一组所对应的包被浓度为最佳包被浓度,对应的多抗血清稀释度为最佳工作浓度。

(2) 建立标准曲线:配置不同浓度的 OTC 标品溶液,并根据已确定的最佳工作浓度,建立间接竞争 ELISA 方法。以 B/B_0 为纵坐标,以 OTC 浓度对数值为横坐标,绘制标准曲线。

(3) 检测限(LOD):取不含 OTC 标品的空白样品,通过建立的间接竞争 ELISA 方法重复测定 10 次,计算 10 次 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值的平均值(X)以及标准差(SD),然后计算 $X - 2SD$,将所得值代入标准曲线线性回归方程,计算出标准品浓度,即为检测限。

(4) 样品前处理:将新鲜牛奶样品,8 000 r/min 离心 10 min,除去上层脂肪,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(5) 回收率测定:将 OTC 标准品加入新鲜牛奶样品中,使其浓度分别为 10,50,100 ng/mL,将加标样品进行前处理后,对每个浓度重复测定 4 次,根据所建立方法的标准曲线得到测定值,并计算其回收率。

(6) 特异性鉴定:选择 CTC、TC、SARA、CA、BSA、OVA 作为竞争物,利用所建立的间接竞争 ELISA 法测定各竞争物对多抗血清的 IC_{50} 。以 OTC 的 IC_{50} 与各竞争物的 IC_{50} 的百分比作为交叉反应率,交叉反应率越低,则特异性越强^[18]。

1.3 数据处理

对所得的数据利用 Excel 2003 进行处理(包括回归分析和显著性检验),对分子结构式及合成路线图用 ChemDraw Pro 18.0 进行绘制。

2 结果与分析

2.1 OTC 半抗原鉴定

OTC 分子结构上含有一个酰胺基和一个活泼酚羟基。有研究^[19]从酰胺基考虑,采用戊二醛法和碳二亚胺法使其与载体蛋白偶联,前期试验同样采用过此方法,但合成的人工抗原免疫效果差,不能满足后续试验需求。采用戊二醛法若不严格控制反应物加入顺序和反应时间,极易发生分子之间的自联,从而影响小分子抗原决定簇充分暴露,进而影响免疫效果^[20]。因此试验从 OTC 分子上活泼的酚羟基考虑偶联,首先采用重氮化法合成 OTC 的半抗原,然后采用红外扫描(IR)法对 OTC 半抗原进行鉴定。图 4、5 分别为 OTC 和改造后 OTC 红外光谱图,改造后 OTC 除了含有 OTC 中原有化学基团外,在 $1\ 682.36\text{ cm}^{-1}$ 处出现羧基特征吸收峰,在 $2\ 360.46\text{ cm}^{-1}$ 处出现偶氮键特征吸收峰,证明 OTC 半抗原成功引入羧基基团。

2.2 OTC 完全抗原鉴定

2.2.1 紫外扫描 OTC 半抗原改造完成后,采用改进碳二亚胺法使其与载体蛋白偶联,合成完全抗原,首先利用紫外扫描(UV)法对完全抗原进行鉴定。OTC-BSA、BSA、OTC 的紫外扫描图如图 6 所示,BSA 在 278 nm 处出现特征吸收峰,而 OTC-BSA 的吸收光谱相比 BSA 发

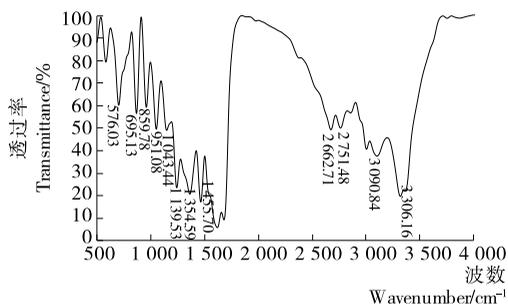


图 4 OTC 红外光谱图

Figure 4 The infrared spectrogram of OTC

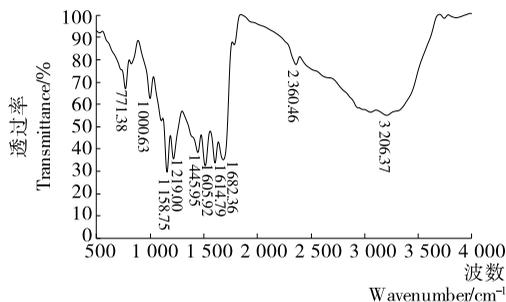


图 5 改造后 OTC 红外光谱图

Figure 5 The infrared spectrogram of OTC modification

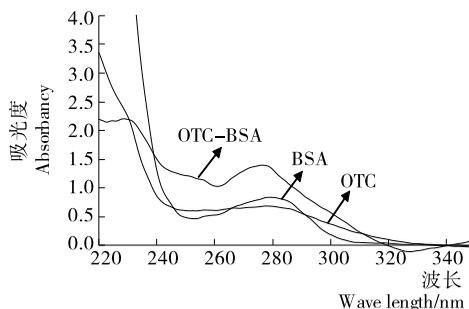


图 6 OTC-BSA、BSA、OTC 紫外扫描图

Figure 6 UV scanning spectrum of OTC-BSA, BSA, OTC

生了变化,特征吸收峰稍向左偏移,并未与 BSA 最大吸收峰重叠,初步说明 OTC 和 BSA 发生偶联。

2.2.2 红外扫描 采用红外扫描法对完全抗原进行进一步鉴定,图 7、8 分别为 BSA 和 OTC-BSA 红外光谱图,合成的完全抗原 OTC-BSA 在 $1\ 652.51\text{ cm}^{-1}$ 处出现蛋白质中氨基酸的特征峰,在 858.05,950.04,1 073.54,1 162.24,1 392.30 cm^{-1} 处,出现明显的 OTC 特征峰。结果进一步表明完全抗原偶联效果良好。

2.2.3 SDS-PAGE 鉴定 图 9 为完全抗原 OTC-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果,OTC-BSA 电泳条带出现明显拖尾现象,其迁移速率小于 BSA,说明 OTC-BSA 分子量大于 BSA,也能够表明 OTC 和 BSA 偶联产生了较好的效果。

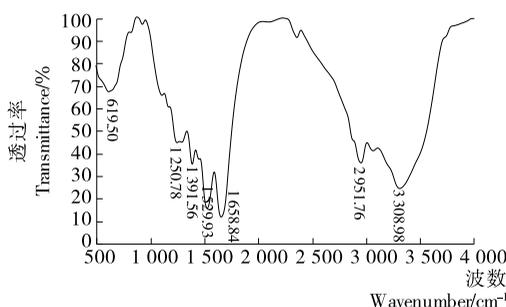


图 7 BSA 红外光谱图

Figure 7 The infrared spectrogram of BSA

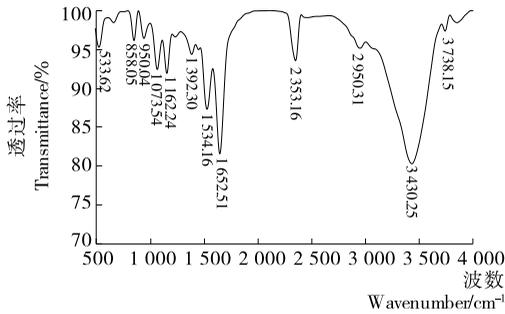


图 8 OTC-BSA 红外光谱图

Figure 8 The infrared spectrogram of OTC-BSA

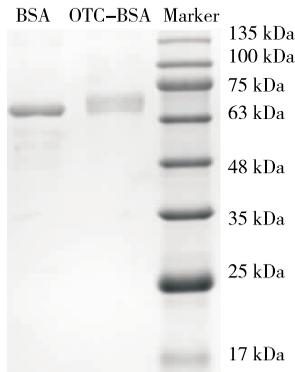


图 9 OTC-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

Figure 9 SDS-PAGE identification results of OTC-BSA

2.3 多抗血清鉴定

2.3.1 效价测定 表 1 为 OTC 多抗血清效价测定结果, 4 只免疫小鼠多抗血清效价均达到 1 : 12 800, 说明偶联的免疫原具有较好的免疫效果。

2.3.2 敏感性鉴定 表 2 为 OTC 多抗血清间接竞争 ELISA 测定结果, 可以看出 OTC 对 4 只小鼠多抗血清均起到抑制作用, 其中对 2 号小鼠血清抑制效果最好, 其抑制曲线如图 10 所示, IC_{50} 为 40.44 ng/mL, 说明多抗血清敏感性良好。

表 1 OTC 多抗血清效价测定结果

Table 1 The titers of OTC antiserum (n=3)

多抗稀释倍数	1 号小鼠	2 号小鼠	3 号小鼠	4 号小鼠
200	2.243	1.809	2.652	2.572
400	2.106	1.562	2.364	2.243
800	1.648	1.025	1.963	1.765
1 600	1.134	0.863	1.304	1.234
3 200	0.726	0.624	0.827	0.975
6 400	0.441	0.392	0.632	0.543
12 800	0.364	0.243	0.415	0.320
25 600	0.225	0.125	0.315	0.214
空白	0.085	0.074	0.093	0.082

表 2 OTC 多抗血清间接竞争 ELISA 测定结果

Table 2 Indirect competitive ELISA of OTC antiserum (n=3)

OTC 标品浓度/ (ng · mL ⁻¹)	1 号小鼠	2 号小鼠	3 号小鼠	4 号小鼠
500.000	0.324	0.321	0.278	0.302
250.000	0.385	0.342	0.980	0.324
125.000	0.426	0.370	0.384	0.379
62.500	0.594	0.412	0.403	0.458
31.250	0.698	0.479	0.445	0.536
15.625	0.746	0.536	0.512	0.578
7.813	0.786	0.652	0.568	0.612
3.906	0.799	0.812	0.632	0.696
1.953	0.853	0.871	0.871	0.786
0.000	0.870	1.012	0.896	0.876
空白	0.078	0.056	0.056	0.065

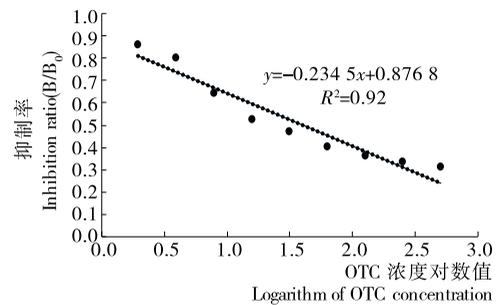


图 10 2 号小鼠多抗血清抑制曲线

Figure 10 The inhibitive curve of No.2 mouse antiserum

2.4 OTC ELISA 检测方法的建立

2.4.1 最佳包被浓度和工作浓度的确定 表 3 为 OTC-OVA 不同包被浓度下 2 号小鼠多抗血清效价结果, 图 11 为 OTC-OVA 不同包被浓度下抗体的 IC_{50} , 由表 3 测量结果选择不同包被浓度下抗体工作浓度分别为: 1 : 2 000, 1 : 2 000, 1 : 1 000, 1 : 1 000, 1 : 100, 并利用间接竞争 ELISA 测定 OTC-OVA 不同包被浓度下抗体的 IC_{50} , 如图 11 所示当包被原为 1 : 1 000 倍稀释, 抗体为 1 : 2 000 倍稀释时, 其 IC_{50} 最低, 敏感性最好。

2.4.2 标准曲线的建立 根据已确定的最佳包被浓度和抗体工作浓度, 建立间接竞争 ELISA 检测方法并绘制标准曲线, 如图 12 所示。根据线性回归方程计算 IC_{50} 为 32.92 ng/mL。

2.4.3 检测限 通过建立的间接竞争 ELISA 方法测定空白样品, 平行测定 10 次, $OD_{450\text{ nm}}$ 分别为 0.968, 1.003, 0.986, 1.015, 1.101, 0.987, 0.993, 1.031, 0.976, 1.003, 平均

表 3 不同包被浓度的效价测定结果

Table 3 The result of titer in different coating concentration

抗体稀释 倍数	包被抗原稀释倍数				
	500	1 000	2 000	4 000	8 000
200	2.836	2.230	1.765	1.425	0.625
400	2.146	1.763	1.489	1.326	0.563
800	1.798	1.652	1.358	1.281	0.423
1 600	1.536	1.132	1.105	0.962	0.323
3 200	0.865	0.762	0.632	0.526	0.213
6 400	0.541	0.324	0.211	0.102	0.098
12 800	0.312	0.263	0.124	0.087	0.032
空白	0.065	0.089	0.075	0.067	0.082

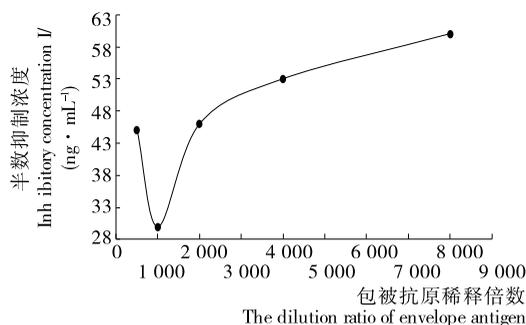


图 11 不同包被浓度所对应的抗体 IC₅₀

Figure 11 The IC₅₀ of different coating concentration

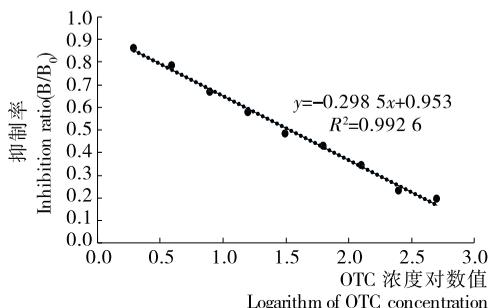


图 12 OTC 间接竞争 ELISA 检测试剂盒标准曲线

Figure 12 Indirect competitive ELISA test kit standard curve of OTC

值(X)为 1.006,标准差(SD)为 0.038,计算 $X - 2SD$ 值(0.93),再根据标准曲线求得 LOD 为 1.3 ng/mL。

2.4.4 回收率测定 间接竞争 ELISA 方法测定不同浓度 OTC 的牛奶样品结果如表 4 所示,回收率在 84.70%~87.45%,变异系数在 9.3%~11.5%,变异系数 < 15%,说明方法具有良好的准确度。

2.4.5 特异性鉴定 ELISA 方法的特异性鉴定结果如表 5 所示,与 CTC、TC 的交叉反应率分别为 5.27%,

表 4 回收率测定结果

Table 4 The results of recovery rate determination

OTC 添加量/ (ng · mL ⁻¹)	平均测定值/ (ng · mL ⁻¹)	平均回收率/ %	变异系数/ %
10	8.540	85.40	9.3
50	42.364	84.70	11.5
100	87.450	87.45	9.4

表 5 OTC 多抗血清与竞争物的交叉反应

Table 5 The cross-reactivity of OTC antiserum with other compounds

竞争物	IC ₅₀ /(ng · mL ⁻¹)	交叉反应率/%
CTC	625.20	5.27
TC	805.40	4.10
CA	>1.00 × 10 ⁴	<0.40
SARA	>1.00 × 10 ⁴	<0.40
BSA	>1.00 × 10 ⁴	<0.40
OVA	>1.00 × 10 ⁴	<0.40

4.10%,与其他竞争物交叉反应率 < 0.4%,说明所建立的 ELISA 方法与 CTC、TC 存在微弱交叉反应,但与其他兽药及载体蛋白均无交叉反应,具有较强的特异性。

3 结论

试验采用重氮化法和碳二亚胺法成功合成 OTC 的完全抗原,所制备的小鼠多抗血清具有良好的敏感性,在此基础上初步建立 OTC 间接竞争 ELISA 检测方法,IC₅₀ 为 32.92 ng/mL,LOD 为 1.3 ng/mL,牛奶样品中添加回收率在 84.70%~87.45%,与 CTC、TC 的交叉反应率分别为 6.46%,5.01%,与其他竞争物交叉反应率 < 0.4%,具有良好的检测效果,可为监控 OTC 残留提供一定的技术支持。

参考文献

[1] 王聪,钮正睿,曹进,等. 4 种四环素类抗生素的电喷雾质谱裂解规律研究[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(10): 1 211-1 216.

[2] WANG Hai-bo, LI Yang, BAI Hong-yu, et al. Development of rapid and label-free fluorescence sensing of tetracyclines in milk based on poly (Adenine) DNA-templated Au nanoclusters[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(11): 3 095-3 102.

[3] DEVIRGILIIS C, BARILE S, CARAVELLI A, et al. Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2017, 109(1): 313-323.

[4] 邵毅,李姝,黄柳娟,等. 市售鸡肉中四环素耐药菌污染特

- 征初探[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 250-256.
- [5] ALCOCK R E, SWEETMAN A, JONES K C. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: Selected compounds and physicochemical properties[J]. Chemosphere, 1999, 38(10): 2 247-2 262.
- [6] JING Tao, NIU Ji-wei, XIA Huan, et al. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples[J]. Journal of Separation Science, 2015, 34(12): 1 469-1 476.
- [7] SNIEGOCKI T, POSYNIK A, ZMUDZKI J. Improved gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of clenbuterol and salbutamol in animal urine[J]. Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy, 2005, 49(4): 443-447.
- [8] NEBOT C, GUARDDON M, SECO F, et al. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS[J]. Food Control, 2014, 46: 495-501.
- [9] ZVEREVA E A, SHPAKOVA N A, ZHERDEV A V, et al. Highly Sensitive immunochromatographic assay for qualitative and quantitative control of beta-agonist ractopamine in foods[J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2018, 54(4): 436-441.
- [10] QU Xue-li, LIN Hong, DU Shu-yuan, et al. Development of a nano-gold capillary immunochromatographic assay for rapid and semi-quantitative detection of clenbuterol residues[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(9): 1-10.
- [11] XING Chang-ru, LIU Li-qiang, SONG Shan-shan. et al. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 66: 445-453.
- [12] 徐桂连, 代翠红, 马莺. 土霉素完全抗原的制备与鉴定[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 192-196.
- [13] FLEEKER J R, LOVETT L J. Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood [J]. Journal - Association of Official Analytical Chemists, 1985, 68(2): 172-174.
- [14] 刑云端, 孙亚宁, 姚静静, 等. T-2 毒素完全抗原制备及免疫学检测方法的建立[J]. 河南农业科学, 2018, 47(4): 124-129.
- [15] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 56-60.
- [16] SUN Ya-ning, YANG Ji-fei, YANG Su-zhen, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow strip for the simultaneous detection of aminoglycoside residues in milk[J]. RSC Advances, 2018, 8(17): 9 580-9 586.
- [17] WANG Yao, LI Zhao-zhou, PEI Ya-feng, et al. Establishment of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of soybean allergen β -conglycinin[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(7): 2 429-2 435.
- [18] 肖治理, 曾文亮, 王弘, 等. 氯霉素胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 54-58, 62.
- [19] SASAKI K M, AOKI A, ICHINOSE S, et al. Scanning electron microscopy and Fourier transformed infrared spectroscopy analysis of bone removal using Er:YAG and CO₂ lasers[J]. Journal of Periodontology, 2017, 73(6): 643-652.
- [20] GAURAV A, GILL J P S, AULAKH R S, et al. ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues in cattle milk in various districts of Punjab [J]. Veterinary World, 2014, 7(1): 26-29.

(上接第 76 页)

3 结论

综合考虑生鲜牛奶基质的特点及 5 类抗生素的理化性质,对仪器条件和前处理方法进行了优化,建立了一套可用于快速检测生鲜牛奶中 72 种抗生素的快速前处理—超高效液相色谱—串联质谱方法,在低、中、高 3 个加标水平下的回收率为 40%~140%,且保留时间稳定,定性准确。该方法灵敏度高,检测时间较少,方法简便,对生鲜牛奶中抗生素的检测具有较高的参考价值。后续将增加可检测抗生素的类别及种类,尽量覆盖所有的有可能造成危害的抗生素。

参考文献

- [1] 李丹妮, 贡松松, 顾欣, 等. 生鲜牛乳中抗生素残留检测技术研究进展[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(5): 38-42.
- [2] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 12.
- [3] 宋博利. 动物性食品中抗生素残留及其控制对策[J]. 中国农业信息, 2014, 26(11): 82.
- [4] 王银钱. 畜产品中兽药残留的危害和控制[J]. 北方牧业, 2003(11): 23.
- [5] 侯薄, 王卫, 付智星, 等. 养禽业抗生素使用现状及无抗养殖研究进展[J]. 食品工业, 2017, 39(8): 216-220.
- [6] 王浩, 赵丽, 杨红梅, 等. 液相色谱—串联质谱法测定牛奶中 35 种四环素类、磺胺类、青霉素类、大环内酯类、氯霉素类抗生素残留[J]. 色谱, 2015, 33(9): 995-1 001.
- [7] 张小刚, 王霞, 戴春风, 等. QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱法测定牛奶中 6 种头孢菌素类抗生素残留[J]. 色谱, 2018, 36(4): 345-350.
- [8] 余佩瑶, 陈传胜, 刘寒冰, 等. 固相萃取—高效液相色谱法同时测定鸡粪中四环素类、喹诺酮类和磺胺类抗生素[J]. 色谱, 2019, 37(5): 518-524.
- [9] 章璐幸, 孙洁胤, 王延辉, 等. 免疫亲和固相萃取—超高效液相色谱—串联质谱法同时测定牛奶中 6 种玉米赤霉醇类化合物残留[J]. 色谱, 2018, 36(6): 566-572.