

可视化蛋白芯片法同时检测饲料中多种抗生素

李周敏^{1*}, 王 颖², 韩宏特², 王志盛¹

(1. 南京大学金陵学院化学与生命科学学院, 南京 210089; 2. 南京晓庄学院环境科学学院, 南京 211171)

摘 要: **目的** 建立可视化蛋白芯片法同时检测饲料中的四环素、林可霉素、氟苯尼考等抗生素。**方法** 采用戊二醛法合成四环素人工抗原, 琥珀酸酐法合成林可霉素和氟苯尼考人工抗原, 并用紫外分光光度法进行鉴定。通过优化最佳的抗原抗体浓度, 计算 3 者相互之间的交叉反应率, 建立标准曲线, 分别考察饲料中四环素、林可霉素和氟苯尼考的加标回收率和重复性。**结果** 方法的加标回收率均在 70%~120%内, RSD 均小于 15%。用建立的方法应用于未知饲料样品的检测, 结果与液相色谱-质谱联用(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)的方法一致, 相关系数均大于 0.99。**结论** 可视化蛋白芯片法具有检测时间短、操作简单、可进行大量样本同时检测, 且一次可检测多个指标等优点, 可满足饲料样本中多种抗生素检测的需求。

关键词: 蛋白芯片; 可视化; 人工抗原; 抗生素; 饲料

Simultaneous determination of various antibiotics in feed by visual protein chip method

LI Zhou-Min^{1*}, WANG Ying², HAN Hong-Te², WANG Zhi-Sheng¹

(1. School of Chemistry & Life Science, Nanjing University Jinling College, Nanjing 210089, China; 2. School of Environmental Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of tetracycline, lincomycin, fluorophenicol and other antibiotics in feed by visual protein chip method. **Methods** Tetracycline artificial antigen was synthesized by glutaraldehyde method, and lincomycin as well as florfenicol artificial antigen was prepared by succinic anhydride approach, and products were verified by ultraviolet spectrophotometer. By optimizing antigen-antibody concentration and calculating cross-reaction rate among them, the standard curve was established, and the recovery and repeatability of spiked tetracycline, lincomycin and florfenicol in the feed were investigated respectively. **Results** The spike recoveries were within 70%–120%, and RSDs were less than 15%. At the same time, the established method was applied to detect unknown feed samples. The results were consistent with HPLC-MS method, and correlation coefficients were all greater than 0.99. **Conclusion** The visual protein chip method has the advantages of short detection time, simple operation, simultaneous detection of a large number of samples, and multiple indicators at a time, which can meet the detection of multiple antibiotics in feed samples.

KEY WORDS: protein chip; visualization; artificial antigen; antibiotic; feed

基金项目: 江苏省高校“青蓝工程”项目、南京大学金陵学院教改项目(0010522020)、江苏省大学生创新创业训练项目(202013646004Y)

Fund: Supported by Jiangsu University“Qinglan” Project, Educational Reform Project of Jinling College Nanjing University (0010522020), and Jiangsu Province University Student Innovation and Entrepreneurship Training Project (202013646004Y)

***通讯作者:** 李周敏, 博士, 讲师, 主要研究方向为生物芯片在食品安全检测中的应用。E-mail: lizhoumin@126.com

***Corresponding author:** LI Zhou-Min, Ph.D, Lecturer, Jinling College, Nanjing University, No.8, Xuefu Road, Pukou District, Nanjing 210089, China. E-mail: lizhoumin@126.com

1 引言

抗生素作为一种能够杀灭或抑制病原微生物的物质,广泛存在于人们的日常生活中。目前,饲料中常见的抗生素残留包括四环素、林可霉素、氟苯尼考等。四环素(tetracycline, TC)是一种广谱高效的抗菌药物,广泛应用于革兰阳性和阴性细菌、细胞内支原体、衣原体和立克次氏体引起的感染,还被大量用作生长促进剂投喂给动物^[1]。林可霉素(lincomycin, LCM),是林可链霉菌发酵产生的林可酰胺类抗生素。林可霉素抑制细菌的蛋白质合成,对大多数革兰阳性菌和某些厌氧的革兰阴性菌有抗菌作用。氟苯尼考(flurphenicol, FF)通过抑制肽酰基转移酶活性而产生广谱抑菌作用,包括各种革兰氏阳性、阴性菌和支原体等。研究证明如果在畜禽饲料中长期添加抗生素类促生长剂,可诱导某些菌群产生一定程度的耐药性^[2,3]。对于这些抗生素的检测方法有很多种,例如微生物法^[4]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[4-13]、免疫学法(免疫层析^[14,15],酶联免疫吸附法^[16-24],荧光免疫法^[25],化学发光免疫法^[26])等。

微生物法的测定原理是根据抗生素对微生物的生理机能、代谢等的抑制作用,来定性或定量确定样品中抗生素药物残留,如纸片法、试纸法等。这种方法的优点是费用低,一般实验室都能操作,缺点是时间长,显色状态判断通过肉眼判别易产生误差,对微量残留无法做出正确判断,特异性也不够。液相色谱-紫外检测法、液相色谱-质谱联用法等方法的优点是能进行定性、定量的检测,具有较高的灵敏度,缺点是需要较高的成本,且对于操作人员的技术要求也比较高,无法做到快速检测。酶联免疫分析法作为一种快速、便捷、低成本、高通量的筛选手段是近年来发展起来检测抗生素残留的一种方法,但是一次实验无法同时检测多种抗生素残留。

蛋白芯片法相比于传统的酶联免疫分析法具有多靶标、快速、高灵敏度等优点,但是大多采用的是荧光法和化学发光法,这些方法存在检测仪器价格昂贵、通量低等问题,不适合在基层检测机构和小型食品生产企业推广应用。Li 等^[27-31]建立的基于可视化蛋白芯片的检测方法,可同时检测多种药物及有害物残留和同时检测多种营养蛋白质的含量。与传统蛋白芯片相比,具有可视化,直接用肉眼观察芯片结果,无需使用昂贵的荧光或化学发光检测设备等优点,大大降低检测成本,提高检测效率,在抗生素含量的现场快速检测中有很好的发展前景。本研究通过偶联制备人工抗原,采用可视化蛋白芯片法对饲料中四环素、林可霉素、氟苯尼考进行含量测定,以期满足饲料样

本中多种抗生素检测的需求。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 药品与试剂

四环素(美国 Amresco 有限公司);牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司);丙酮(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)、林可霉素、氟苯尼考、碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺(上海阿拉丁试剂有限公司);二甲基亚砜、无水吡啶、25%戊二醛、氯化钠、氯化钾、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钾(分析纯,南京化学试剂股份有限公司);微量测试孔、四环素、林可霉素、氟苯尼考抗体,纳米材料标记的羊抗小鼠-IgG、显色液 A、显色液 B(南京祥中生物科技有限公司)。

2.1.2 仪器与设备

DT 系列电子天平(江苏省常熟市意欧仪器仪表有限公司);DMT-2500 多管漩渦混合仪(上海柯准仪器有限公司);摇床(海门市其林贝尔仪器制造公司);UV-2401PC 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);MT200 微孔板恒温振荡仪、AD100 洗板机、Qarray 2000 芯片分析仪(南京祥中生物科技有限公司);HX-4 拍打式均质器(上海沪析实业有限公司);Genex 单道可调移液器[芬兰百得实验室仪器(中国)有限公司]。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4):准确称取 4.0031 g 氯化钠,0.1006 g 氯化钾,0.7168 g 无水磷酸氢二钠,0.1225 g 无水磷酸二氢钾溶于一定量去离子水并定容至 500 mL,室温保存。

样本稀释液(0.2% PBST): 200 μ L Tween 20 加至 99.8 mL PBS 中。

2.2.2 制备人工抗原

参照文献采用戊二醛法合成四环素人工抗原(tetracycline artificial antigen, TC-BSA)^[32],琥珀酸酐法合成林可霉素人工抗原(lincomycin artificial antigen, LCM-BSA)^[33]和氟苯尼考人工抗原(flurphenicol artificial antigen, FF-BSA)^[34]。

2.2.3 检测方法

用生物芯片点样仪将各抗生素人工抗原以微阵列的形式固定于微孔板的底部,每样重复 3 个点。经固定,封闭后。在每孔中分别加入 25 μ L 混合标准品或样品和 25 μ L 混合抗体,置于 25 $^{\circ}$ C 恒温振荡仪中反应 30 min,待反应结束后进行洗板并拍干。接着在每个孔内加入 50 μ L 的纳米标记的羊抗鼠 IgG,置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温振荡仪中反应 30 min,待反应结束后进行洗板并拍干。最后在每个孔里加入

50 μL 的显色液(显色液 A 和 B 1:1 混合), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡仪中反应 12 min, 待反应结束后进行洗板并拍干。吹干后即可进行芯片扫描, 并利用芯片分析软件进行数据分析及处理。

2.2.4 样品前处理

将饲料研磨、均质后备用。称取 1.0 $\text{g}\pm 0.1\text{ g}$ 均质样本至 50 mL 聚苯乙烯离心管中。加入 10 mL 样本复溶液, 手动混匀后在振荡仪中以 2500 r/min 振荡 3 min。振荡后, 在离心机中以 5000 r/min 离心 10 min。离心后, 取上层清液 200 μL , 加入到 800 μL 样本复溶液 PBS 中, 涡旋后用于检测。

3 结果与分析

3.1 人工抗原鉴定

合成的人工抗原通过紫外分光光度法在 200~400 nm 波长范围内进行扫描。由图 1 可知, 在 PBS 缓冲液中, BSA 的最大吸收波长是 280 nm, 在 300~400 nm 之间几乎无吸收, TC 在 275 nm 和 365 nm 处有最大吸收, 偶联后的四环素人工抗原的紫外光谱图有明显叠加的特征, 并且相同浓度的四环素人工抗原和 BSA 的紫外光谱图相比, 吸光度明显增加, 推测其原因可能是四环素和 BSA 偶联从而使其吸光度增加。林可霉素的最大吸收波长在 210 nm, 230 nm 之后几乎无吸收, 林可霉素和 BSA 偶联后人工抗原的紫外光谱图与 BSA 和林可霉素相比发生了变化, 既有 BSA 的紫外吸收特征, 也具备林可霉素的紫外吸收特征, 表明林可霉素与 BSA 已经偶联成功。氟苯尼考的最大吸收波长在 265 nm, 与 BSA 偶联后的氟苯尼考最大吸收波长是

275 nm, 与 BSA 相比发生了蓝移。表明氟苯尼考与 BSA 已经偶联成功。

3.2 抗原抗体浓度优化

在免疫反应中, 方法的灵敏度和抗原抗体的浓度有很大的关系, 需要优化抗原抗体的浓度。四环素、林可霉素、氟苯尼考抗原的浓度分别为: 1:3、1:10、1:30; 抗体浓度分别为: 1:40000、1:80000、1:160000。综合考虑方法的灵敏度和检测范围, 最后检测的信号值希望达到 40000 左右。因此, 选择四环素抗原浓度为: 1:10, 抗体浓度为: 1:80000; 林可霉素抗原浓度为: 1:10, 抗体浓度为: 1:160000; 氟苯尼考抗原浓度为: 1:3, 抗体浓度为: 1:80000。

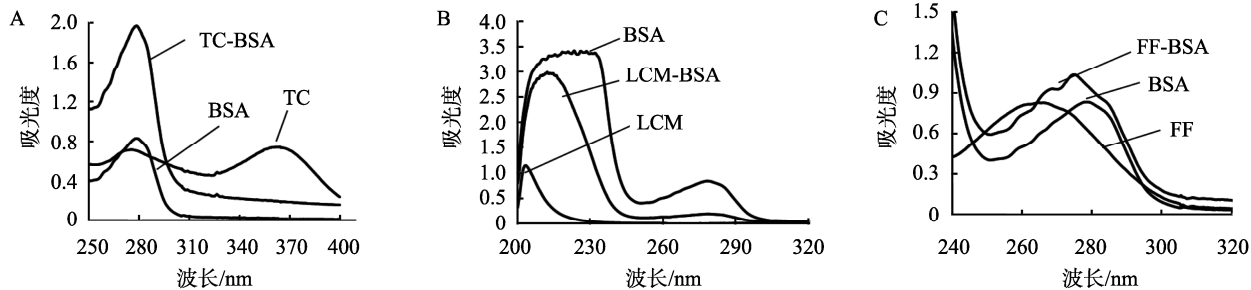
3.3 交叉反应率(特异性)

在免疫反应中, 主要利用抗原和抗体的特异性识别原理进行检测。因此在检测之前要考察方法的特异性。抗体的特异性通常使用竞争抑制曲线来判断交叉反应速率。使用不同浓度的被测物和干扰物作为竞争抑制曲线来计算它们各自的结合比(B/B_0), 并计算它们各自的 IC_{50} 。根据式 (1) 计算交叉反应率(cross-reactivity, CR)。

$$CR = [IC_{50}(\text{分析物}) / IC_{50}(\text{干扰物})] \times 100\% \quad (1)$$

IC_{50} 是分析物或干扰物诱导信号抑制(B/B_0)50% 所必需的浓度。

用间接竞争法分别考察四环素、林可霉素、氟苯尼考抗体与被测抗生素及其同类抗生素的交叉反应性, 计算交叉反应率。蛋白芯片法检测时各种药物交叉反应率, 见表 1。



注: A. 四环素; B. 林可霉素; C. 氟苯尼考。

图 1 人工抗原偶联前后的紫外光谱图

Fig.1 Ultraviolet spectra before and after artificial antigen coupling

表 1 各种药物交叉反应率
Table 1 Cross-reaction rate of various antibiotics

药物名称	交叉反应率/%		
	四环素类抗体	林可霉素抗体	氟苯尼考抗体
四环素	100	<1	<1
金霉素	85	<1	<1
土霉素	79	<1	<1
多西环素	58	<1	<1
喹诺酮类	<1	<1	<1
林可霉素	<1	100	<1
氟苯尼考	<1	<1	100
甲砒霉素	<1	<1	<3
氯霉素	<1	<1	<1

由表 1 可知, 四环素抗体与四环素类药物之间有交叉, 交叉反应率在 58%~100%之间, 说明四环素类抗体可以同时检测四环素、金霉素、土霉素、多西环素抗生素。与喹诺酮类、林可霉素、氟苯尼考、甲砒霉素、氯霉素之间的交叉反应率都小于 1%, 说明四环素的抗体特异性好, 与其他类抗生素无交叉反应。此外, 林可霉素、氟苯尼考抗体的特异性也很好, 与其他抗生素均无交叉反应。因此, 可以用蛋白芯片法同时进行检测, 特异性好。

3.4 线性关系

探索四环素、林可霉素、氟苯尼考的标准曲线采用间接竞争法。每个抗原点 3 个阵列点, 信号值取其平均值。在一定范围内, 随着竞争标准品浓度的增加, 固定的抗原结合的抗体含量会越少, 因而检测到的信号值就会越低, 超过一定的浓度范围后, 检测信号值不随竞争标准品浓度的增加而变化。用四环素、林可霉素、氟苯尼考的标准溶液进行竞争抑制实验, 四环素、林可霉素、氟苯尼考的标准曲线线性回归方程、相关系数、线性范围如表 2 所示。方法线性关系良好。

表 2 四环素、林可霉素、氟苯尼考的线性回归方程、相关系数、线性范围
Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients and linear ranges of tetracycline, lincomycin and florfenicol

分析物	回归方程	相关系数(r^2)	线性范围/(ng/mL)
四环素	$Y=-69.594X+50.127$	0.9914	0.3~4.8
林可霉素	$Y=-57.562X+22.015$	0.9912	0.12~1.92
氟苯尼考	$Y=-52.573X+22.851$	0.9926	0.1~1.6

3.5 加标回收率

从不同市场上买来不同来源的饲料, 挑选出 HPLC 检

测结果为阴性的 2 个样本进行加标。检测时每个样本做复孔检测。按照样本前处理方法处理后的样本相当于被稀释了 50 倍。加标浓度和检测结果如表 3~5 所示, 图 2 为可视化蛋白芯片检测结果扫描图。加样顺序从上到下, 从左往右依次为: 6 个不同浓度的标准品, 阴性样本 1 及加标浓度 1 和 2, 阴性样本 2 及加标浓度 1 和 2, 每个标准品和样本都进行复孔检测。

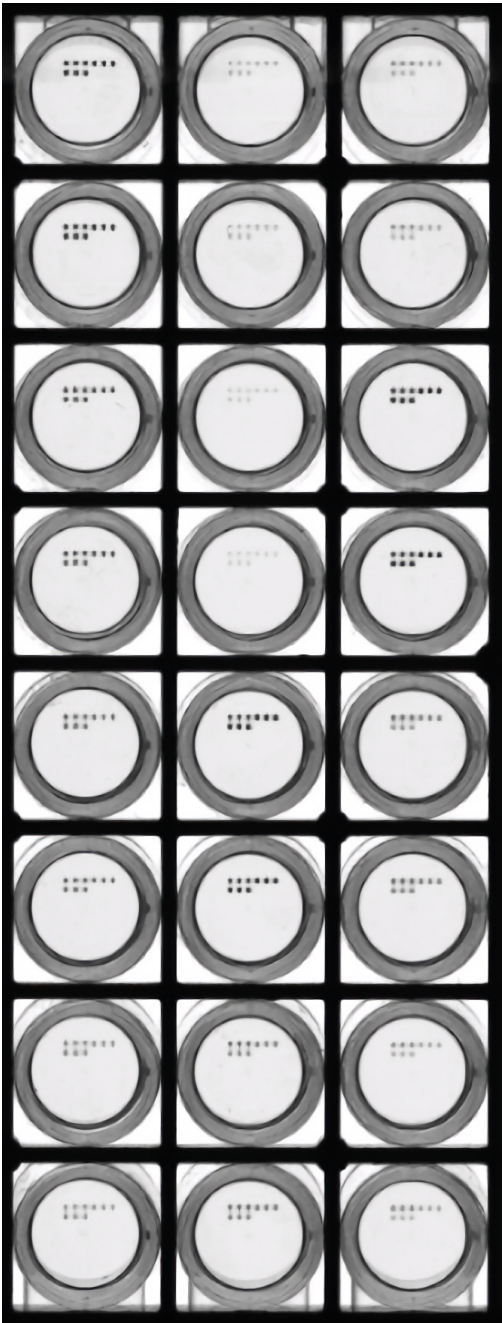


图 2 可视化蛋白芯片法检测饲料中四环素、林可霉素、氟苯尼考的结果扫描图
Fig.2 Scanning chart of visual protein chip detection of tetracycline, lincomycin and florfenicol in feed

四环素、林可霉素、氟苯尼考的样本加标回收率均在 70%~120%之间, 相对标准偏差均小于 15%。说明可视化蛋白芯片法的准确度较高, 可以应用于饲料中四环素、林可霉素、氟苯尼考的检测。

表 3 饲料中四环素的加标回收率 Table 3 The recovery of tetracycline spiked in feed					
名称	加标浓度 /(μg/mL)	样本浓度 /(μg/mL)	均值 /(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
样本 1	0	1.82	1.72	NA	8.7
		1.61			
	25	29.7	29.28	117.1	2.1
		28.85			
	50	59.15	57.66	115.3	5.7
		56.16			
样本 2	0	1.71	1.63	NA	7.4
		1.54			
	25	27.68	26.10	104.4	8.6
		24.52			
	50	55.47	53.38	106.8	5.6
		51.28			

表 4 饲料中林可霉素的加标回收率 Table 4 The recovery of lincomycin spiked in feed					
名称	加标 /(μg/mL)	样本浓度 /(μg/mL)	均值 /(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
样本 1	0	0.72	0.67	NA	10.6
		0.62			
	20	15.73	16.49	82.5	6.5
		17.25			
	40	35.58	36.92	92.3	5.1
		38.25			
样本 2	0	0.89	0.83	NA	11.1
		0.76			
	20	16.75	17.21	86.1	3.8
		17.67			
	40	35.23	33.47	83.7	7.4
		31.71			

表 5 饲料中氟苯尼考的加标回收率 Table 5 The recovery of florfenicol spiked in feed					
名称	加标 /(μg/mL)	样本浓度 /(μg/mL)	均值 /(μg/mL)	回收率/%	RSD/%
样本 1	0	0.43	0.41	NA	8.7
		0.38			
	20	20.43	20.23	101.1	1.4
		20.02			
	40	35.34	37.36	93.4	7.6
		39.37			
样本 2	0	0.53	0.49	NA	11.5
		0.45			
	20	20.57	19.13	95.7	10.6
		17.69			
	40	40.75	44.06	110.1	10.6
		47.36			

3.6 样本检测

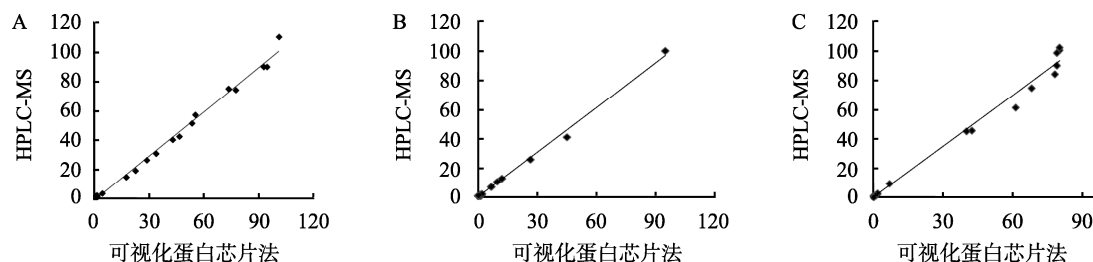
用可视化蛋白芯片法(protein chip)和高效液相色谱-质谱联用法(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)分别检测市场上采购的 24 种不同来源饲料样本中的四环素、林可霉素、氟苯尼考的含量, 检测结果如图 3 所示。

由对比结果可知, 可视化蛋白芯片法与 HPLC-MS 法的线性关系和相关系数分别为:

四环素: $Y=1.0057X-0.8194$, $r^2=0.9934$; 林可霉素: $Y=1.0201X+0.4012$, $r^2=0.9966$; 氟苯尼考: $Y=1.1657X+0.1606$, $r^2=0.9902$ 。说明可视化蛋白芯片法可以同时用来检测饲料中四环素、林可霉素、氟苯尼考的含量, 且结果准确。

4 结 论

本文同时检测了饲料中的四环素、林可霉素、氟苯尼考等抗生素。采用戊二醛法合成四环素人工抗原, 琥珀酸酐法合成林可霉素和氟苯尼考人工抗原, 并用紫外分光光度法进行鉴定。通过优化最佳的抗原抗体浓度, 计算三者相互之间的交叉反应率, 建立标准曲线, 分别对饲料中四环素、林可霉素和氟苯尼考的加标回收率和重复性进行考察, 加标回收率均在 70%~120%内, RSD 均小于 15%。用建立的方法应用于未知饲料样品的检测, 结果与 HPLC-MS 的方法一致, 相关系数均大于 0.99。可视化蛋白芯片法具有检测时间短、操作简单、可进行大量样本同时检测, 且一次可检测多个指标等优点, 对于降低抗生素检测成本以及促进分析检测行业的发展都有重要的意义。



注: A.四环素; B.林可霉素; C.氟苯尼考

图 3 可视化蛋白芯片法与 HPLC-MS 法结果对照图

Fig.3 Compared results of visual protein chip method and HPLC-MS method

参考文献

- Pastor-Navarro N, Maquieira Á, Puchades R. Review on immune analytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(4): 907–920.
- Tang Y, Fang L, Xu C, *et al.* Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter* [J]. *Anim Health Res Rev*, 2017, 18(2): 87–98.
- Chuah L, Effarizah ME, Goni AM, *et al.* Antibiotic application and emergence of multiple antibiotic resistance (MAR) in global catfish aquaculture [J]. *Curr Environ Health Rep*, 2016, 3(2): 118–127.
- Shahbazi Y, Ahmadi F, Karami N. Screening, determination and confirmation of tetracycline residues in chicken tissues using four-plate test, ELISA and HPLC–UV methods: Comparison between correlation results [J]. *Food Agric Immunol*, 2015, 26(6): 821–834.
- Guo L, Tian X, Shan S, *et al.* Simultaneous determination of florfenicol and diclazuril in compound powder by RP–HPLC–UV method [J]. *J Chem*, 2014, 2014: 1–5.
- Lv Y, Zhang J, Guo Z, *et al.* Determination of tetracyclines residues in egg, milk, and milk powder by online coupling of a precolumn packed with molecular imprinted hybrid composite materials to RP–HPLC–UV [J]. *J Liquid Chromatogr Relat Technol*, 2014, 38(1): 1–7.
- Nasim A, Aslam B, Javed I, *et al.* Determination of florfenicol residues in broiler meat and liver samples using RP–HPLC with UV–visible detection [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(4): 1284–1288.
- Chiesa L, Panseri S, Pasquale E, *et al.* Validated multiclass targeted determination of antibiotics in fish with high performance liquid chromatography–benchtop quadrupole orbitrap hybrid mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2018, 258: 222–230.
- Saxena SK, Rangasamy R, Krishnan AA, *et al.* Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC–MS/MS [J]. *Food Chem*, 2018, 260: 336–343.
- Granja RHMM, Lima AC, Patel RK, *et al.* Monitoring of florfenicol residues in fish muscle by HPLC–UV with confirmation of suspect results by LC–MS/MS [J]. *Drug Test Anal*, 2012, 4: 125–129.
- Pokrant E, Maddaleno A, Araya C, *et al.* In-house validation of HPLC–MS/MS methods for detection and quantification of tetracyclines in edible tissues and feathers of broiler chickens [J]. *J Braz Chem Soc*, 2018, 29(3): 659–668.
- Gavilán R, Nebot C, Miranda J, *et al.* Analysis of tetracyclines in medicated feed for food animal production by HPLC–MS/MS [J]. *Antibiotics*, 2016, 5(1): 1.
- Gavilán RE, Nebot C, Veiga-Gómez M, *et al.* A confirmatory method based on HPLC–MS/MS for the detection and quantification of residue of tetracyclines in nonmedicated feed [J]. *J Anal Methods Chem*, 2016, 2016: 1–8.
- Taranova NA, Kruhlik AS, Zvereva EA, *et al.* Highly sensitive immunochromatographic identification of tetracycline antibiotics in milk [J]. *Int J Anal Chem*, 2015, 2015: 1–10.
- Zhou J, Zhu K, Xu F, *et al.* Development of a microsphere-based fluorescence immunochromatographic assay for monitoring lincomycin in milk, honey, beef, and swine urine [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(49): 12061–12066.
- Pastor-Navarro N, Morais S, Maquieira Á, *et al.* Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 594(2): 211–218.
- Gao F, Zhao GX, Zhang HC, *et al.* Production of monoclonal antibody against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk [J]. *J Environ Sci Health B*, 2013, 48(2): 92–100.
- Zhang Y, Lu S, Liu W, *et al.* Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(2): 211–218.
- Jiao SN, Liu J, Zhang YF, *et al.* Preparation of a bi-hapten antigen and the broad-specific antibody for simultaneous immunoassay of penicillins and tetracyclines in milk [J]. *Food Agric Immunol*, 2012, 23(3): 273–287.
- Burkin MA, Galvidis IA. Improved group determination of tetracycline antibiotics in competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Agric Immunol*, 2009, 20(3): 245–252.
- He J, Wu N, Luo P, *et al.* Development of a heterologous enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of clindamycin and lincomycin residues in edible animal tissues [J]. *Meat Sci*, 2017, 125: 137–142.
- Burkin MA, Galvidis IA. Development of a competitive indirect ELISA for the determination of lincomycin in milk, eggs, and honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(18): 9893–9898.
- Korkmaz SD, Kuplulu O, Cil GI, *et al.* Detection of sulfonamide and tetracycline antibiotic residues in Turkish pine honey [J]. *Int J Food Prop*, 2017, 20: S50–S55.
- Fodey TL, George SE, Traynor IM, *et al.* Approaches for the simultaneous detection of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine using

- immunochemical techniques [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 393(1–2): 30–37.
- [25] García-Fernández J, Trapiella-Alfonso L, Costa-Fernández JM, *et al.* A quantum dot-based immunoassay for screening of tetracyclines in bovine muscle [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(7): 1733–1740.
- [26] Tao X, Jiang H, Yu X, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and florfenicol amine in ham sausage with a hybrid chemiluminescent immunoassay [J]. *Food Addit Contam: Part A*, 2013, 30(5): 804–812.
- [27] Zhoumin L, Zhonghui L, Dingyi Z, *et al.* Smartphone-based visualized microarray detection for multiplexed harmful substances in milk [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87(15): 874–880.
- [28] Li Z, Yao K, Lia X, Simultaneous detection of ofloxacin and lomefloxacin in milk by visualized microarray [J]. *J Food Meas Char*, 2019, 13: 2637–2643.
- [29] Li ZH, Li ZM, Xu DK. Simultaneous detection of four nitrofurantol metabolites in food by using a visualized microarray screen assay [J]. *Food Chem*, 2017, 221: 1813–1821.
- [30] Li ZH, Li ZM, Jiang JD, *et al.* Simultaneous detection of various harmful substances in milk based on visualized microarray [J]. *Food Control*, 2017, 73: 994–1001.
- [31] Li ZM, Wen F, Li ZH, *et al.* Simultaneous detection of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and lactoferrin in milk by visualized microarray [J]. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 7280.
- [32] 武玉香, 刘志国, 韩增飞, 等. 四环素与金霉素完全抗原的制备研究 [J]. *武汉工业学院学报*, 2007, 26(4): 48–52.
- Wu YX, Liu ZG, Han ZF, *et al.* Study on the preparation of tetracycline and chlortetracycline immunoantigens [J]. *J Wuhan Polytech Univ*, 2007, 26(4): 48–52.
- [33] 何方洋, 万宇平, 何丽霞, 等. 酶联免疫吸附法检测鸡肉中林可霉素 [J]. *湖北畜牧兽医*, 2020, 3: 7–9.
- He FY, Wang YP, He LX, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of lincomycin in chicken [J]. *Hubei Anim Husband Vet Med*, 2020, 3: 7–9.
- [34] 赵朋玲, 郑海涛, 姜盼盼, 等. 两种方法制备氟苯尼考人工抗原及其鉴定 [J]. *食品科学*, 2010, 31(15): 225–230.
- Zhao PL, Zheng HT, Jiang PP, *et al.* Preparation of haptens by two different methods for immunoassay determination of florfenicol and their identification [J]. *Food Sci*, 2010, 31(15): 225–230.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李周敏, 博士, 讲师, 主要研究方向为生物芯片在食品安全检测中的应用。

E-mail: lizhoumin@126.com