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

栗 慧^{1,2,3},薛瑛辉⁴,冯亚宁⁴,金艳丹⁵,周沫茏^{1,3,4},魏 东^{1,2,3*}

(1.河北北方学院河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室,张家口 075000;2.河北北方学院张家口 特色农产品质量安全重点实验室,张家口 075000;3.河北北方学院农林科技学院,张家口 075000;
 4.河北北方学院附属第一医院,张家口 075000;5.承德市疾病预防控制中心,承德 067000)

摘 要:目的 制备氧氟沙星单克隆抗体,采用生物条形码技术测定氧氟沙星残留量。**方法** 采用碳二亚胺 法合成氧氟沙星完全抗原后,用免疫原免疫小鼠,将特异性强的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合。通过杂交瘤细 胞的多次"筛选-亚克隆"过程,制备氧氟沙星单克隆抗体。其次,制备纳米金复合探针、磁性纳米探针,建立基 于荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的生物条形码检测方法,在最优条件下采用荧光 定量 PCR 生物条形码检测方法间接测定动物源性食品中氧氟沙星残留量。**结果** 氧氟沙星线性回归方程为 *Y*=14.4263log*X*+0.09184, *r*²=0.96。在 0.1~128.0 ng/mL 范围内,检出限为 1.14 ng/mL,添加回收实验结果显示,氧 氟沙星平均回收率和相对标准偏差分别为 85.8%~102.6%、1.8%~2.6%。**结论** 基于荧光定量 PCR 生物条形码免 疫分析方法检测氧氟沙星的结果可靠,能够应用于实际样品的检测,为氧氟沙星的检测技术提供新的方向。 **关键词:** 氧氟沙星;单克隆抗体;纳米金复合探针;磁性纳米探针;生物条形码

Preparation of ofloxacin monoclonal antibody and study on bio-bar codes technology

LI Hui^{1,2,3}, XUE Ying-Hui⁴, FENG Ya-Ning⁴, JIN Yan-Dan⁵, ZHOU Mo-Long^{1,3,4}, WEI Dong^{1,2,3*}

(1. Hebei Key Laboratory of Quality & Safety Analysis-Testing for Agro-Products and Food, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Zhang Jiakou Key Laboratory of Quality & Safety for Charactenistics Agro-Products, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 3. College of Agriculture and Forestry Science and Technology of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 4. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 5. Chengde City Center for Disease Control and Prevention, Chengde 067000, China)

ABSTRACT: Objective To prepare of loxacin monoclonal antibody, and determine the residue of of loxacin by biological bio-bar codes technology. **Methods** After the complete antigen of of loxacin was synthesized by carbodiimide method, the splenocytes of mice with strong specificity were fused with myeloma cells. Monoclonal antibodies to of loxacin were prepared by multiple "screening-subclonal" processes of hybridoma cells. Secondly, gold nano-composite probes and magnetic nanoprobes were prepared, and then a bio-bar codes assay based on

*Corresponding author: WEI Dong, Ph.D, Professor, Hebei Key Laboratory of Quality & Safety Analysis-Testing for Agro-Products and Food, Hebei North University, No.11, South Diamond Road, Economic Development Zone, Zhangjiakou 075000, China. E-mail: qsataf@163.com

基金项目:河北省重点研发计划项目(19225504D)、河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室绩效补助经费项目(22567613H)、河 北北方学院省属高校基本科研业务费项目(JYT2022010)

Fund: Supported by the Hebei Province Key Research and Development Plan Project (19225504D), the Hebei Province Key Laboratory for Quality and Safety Analysis and Testing of Agricultural Products and Food Performance Subsidy Fund Project (22567613H), and the Hebei North University Provincial University Basic Research Business Fee Project (JYT2022010)

^{*}通信作者:魏东,博士,研究员,主要研究方向为药物残留检测。E-mail: qsataf@163.com

fluorogenic quantitative polymerase chain reaction (PCR) was established, and the bio-bar codes assay based on fluorogenic quantitative PCR was used to indirectly determine the residue of ofloxacin in animal-derived foods under optimal conditions. **Results** The linear regression equation of ofloxacin was $Y=14.4263\log X+0.09184$, $r^2=0.96$. When the concentration range was within the mass concentration range of 0.1-128.0 ng/mL, the limit of detection was 1.14 ng/mL, and the adding recovery experiments results showed that the mean recoveries and relative standard deviations of ofloxacin were 85.8%-102.6%, 1.8%-2.6%, respectively. **Conclusion** The results of the detection of ofloxacin based on the quantitative PCR biological barcode immunoassay method are reliable, which can be applied to the detection of actual samples, which provides a new direction for the detection technology of ofloxacin. **KEY WORDS:** ofloxacin; monoclonal antibody; gold nanocomposite probe; magnetic nanoprobes; bio-bar codes

0 引 言

氧氟沙星(ofloxacin, OFLX)是一种人工合成的氟喹诺 酮类药物,具有广谱抗菌作用,这类药物已被广泛应用于 医学领域,用于治疗由革兰阴性菌所致的急、慢性感染^[1-2], 后被人们应用于陆生和水生食用动物的疾病治疗中,其中 陆生动物主要包括猪、牛、羊、鸡,水生动物包括鲑科鱼 类和其他鱼类,以及虾类^[3-6]。研究发现,OFLX 的过度使 用导致其在动物源食品中的残留超标,消费者长期食用氧 氟沙星残留超标的食物,轻者会引起腹部不适、恶心或呕 吐,并伴有头昏、头痛、嗜睡或失眠症状,严重者会出现 精神异常、烦躁不安、意识混乱、幻觉、震颤等症状。因 此,国内外对于 OFLX 在动物中的使用有严格的控制,农 业部 2292 号公告显示,以OFLX 为原料的各类酯、盐及各 种制剂必须停止经营、使用,禁止在食品用动物中使用洛 美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 类兽药,随之 取消了与之相对应的兽药批准文号^[7-10]。

用于 OFLX 残留检测的仪器法包括高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)、高效液相 色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatographytandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)、分子荧光分析法 (molecular fluorescence analysis, MFA)等^[11-14];免疫法包括酶 联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、 胶体金免疫层析法、生物条形码免疫分析法等^[15-19]。仪器分 析方法因操作烦琐、设备庞大、对检测人员专业度有一定 的要求和检测时间较长等增加了检测成本。而免疫分析方 法则具有快速、灵敏度高、特异性强、对仪器要求不高等 优点,如今免疫分析方法更容易应用于现场的快速检测中, 最常用到胶体金免疫层析试纸条,但其极易出现假阳性, 造成检测结果不准确^[20-23]。

目前单克隆抗体与生物条形码检测技术的结合有广 泛的应用前景,为探索环境、食品和卫生领域小分子物质 的检测提供了新的思路与技术平台。生物条形码免疫分析 方法比传统 ELISA 方法灵敏度高两个数量级,具有操作较 简便,检测结果准确等优点^[24-25]。本研究首先制备 OFLX 的单克隆抗体细胞株,通过间接竞争 ELISA (indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA) 测定单克隆抗体的特异性。其次,制备 OFLX 纳米金复合 探针、磁性纳米探针,建立"纳米金复合探针-标准品-磁性 纳米探针"的竞争免疫反应体系,基于荧光定量 PCR 生物 条形码技术快速检测 OFLX 药物残留(原理及检测过程如 图 1),为氧氟沙星的检测技术提供新的方向。





1 材料与方法

1.1 材料与试剂

OFLX标准品(纯度99.5%,中国兽医药品监察所);牛 血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白 (ovalbumin, OVA)(纯度 98%)、特级胎牛血清(纯度 99.99%)(美国 Sigma 公司); 二甲基甲酰胺(dimethyl formamide, DMF)(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 25%戊二醛(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司); 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗 鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); N-羟基丁二酰亚 胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、碳二亚胺(carbodiimide, EDC)、双组分 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色液、青链霉素混合液、TE 缓冲液(北京索莱宝科 技有限公司); Tween-20(纯度 96%, 阿拉丁化学品有限公 司); DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、HAT 补充剂、 HT 添加剂(美国 Gibco 公司); PEG-20000、骨髓瘤细胞 sp2/0(北京梅科万德生物科技有限公司); Corning Costar 96 孔酶标板(北京诺博莱德科技有限公司); 5 周龄雌性 Balb/c 小鼠[斯贝福(北京)生物技术有限公司]。

1.2 仪器与设备

TGL-16A 高速离心机(金坛市仪都仪器有限公司); Lambda365 紫外-可见分光光度计(铂金埃尔默仪器有限公 司); JJ323BC万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司); infinite-F50 全自动酶标仪(上海帝肯贸易有限公司); C-MAG HS4 加热磁力搅拌器(德国 IKA公司); CKX53 培养用显微镜 (奥林巴斯公司); 3111 型水套式二氧化碳培养箱(美国赛默 飞世尔科技有限公司); 1-16K 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); 7650 透射式电子显微镜(日本日立公司)。

1.3 方法

1.3.1 寡核苷酸链的合成 DNA 链的设计与合成参见表 1。

表 1 DNA 链的设计与合成 Table 1 Design and synthesis of DNA strands				
DNA 链	序列			
А	TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCA ATCATGCAATCCTGAATGCG-A10-(CH2)6-SH			
В	CGCATTCAGGATTGCATGATTGCCTCG			

1.3.2 完全抗原的制备

称取 OFLX 4 mg 置于烧杯中, 加入 1.2 mL DMF、15.4 mg EDC 和 9.2 mg NHS 涡旋混匀, 然后加入蒸馏水至 1.5 mL, 避光, 搅拌反应 24 h, 上述为 A 液。用 1 mL 磷酸盐缓冲 溶液(phosphate buffered solution, PBS) (pH 8.0)将 6.6 mg BSA 或 4.3 mg OVA 充分溶解。然后在磁力搅拌器的作用 下将 A 液逐滴缓慢加入,室温条件下反应 3 h。3 h后,用 0.01 mol/L 的 PBS 透析 3 d,每 8 h换一次透析液,3 d 后, 5000 r/min 离心 10 min,取上清液,放置于-4 ℃条件下保存。 1.3.3 动物免疫及效价测定

将 7 只 5 周龄的雌性 BALB/c 小鼠进行免疫, 共免疫 5 次, 每次间隔时间为 2 周。首次注射将弗氏完全佐剂与 OFLX-BSA 相混合, 待乳化均匀后, 以 100 μg/只免疫原注 射量进行腹腔注射。后 3 次免疫试剂由弗氏完全佐剂替换 为弗氏不完全佐剂, 与 OFLX-BSA 相混合。第 4 次免疫后 7 d, 可从小鼠尾部断尾取血, 用 ic-ELISA 测定血清效价。 若效价未达到要求可再次进行免疫, 若效价达到要求可进 行冲击免疫, 用 OFLX-BSA 免疫原注射小鼠。

1.3.4 细胞融合与杂交瘤细胞株的筛选

参考文献[15-17],首先复苏骨髓瘤细胞和制备饲养 细胞,备用。其次制备小鼠脾细胞,计数。然后将其与骨 髓瘤细胞融合,观察其生长情况。融合7d后对96孔细胞 板中的细胞上清进行检测。阳性检测时,按照ic-ELISA评 价,根据测定结果筛选出能产生目标单克隆抗体的细胞进 行亚克隆。亚克隆采用有限稀释法,首先将选好的孔中母 细胞取出,2%台盼蓝计数,再依次选择4个细胞数量梯度 进行稀释,分别为4.0、2.0、1.0、0.5,铺板。7d后,对细 胞株进行阳性筛选。继续亚克隆2~3次直到挑选出强阳性 以及细胞孔中为单个的细胞。然后将强阳性的杂交瘤细胞 转移到24孔细胞板中扩大培养,待细胞在24孔板中生长 3~5 d,需对细胞株再次进行筛选,检测出强阳性且细胞孔 中为单个细胞,此时可放到培养瓶中培养。当细胞占培养 瓶底部 80%且呈对数生长时,就可以进行腹水的制备。

1.3.5 单克隆抗体制备与纯化

选用雌性 8 周龄健康的 BALB/c 小鼠注射液体石蜡, 采用腹腔注射 0.5 mL/只。注射细胞后的 7 d, 小鼠腹腔慢 慢肿胀,随后观察小鼠状态将其处死,用注射器缓慢吸出 腹水,离心,取上清液,装入冻存管中保存。采用辛酸-饱 和硫酸铵法^[16]对腹水进行纯化处理,然后采用紫外-可见 分光光谱法测定抗体浓度,分装于无菌管中,-20°C 保存。 1.3.6 纳米金的制备

采用柠檬酸钠还原法制备纳米金,首先将实验中所用到的玻璃器皿用超声波清洗机清洗,再放入酸缸中浸泡 48 h, 用超纯水清洗后烘干。把量取好的 99 mL 超纯水和 1 mL 的 1%氯金酸混合,并放在磁力搅拌器上加热搅拌。溶液沸腾 后,快速加入 1.5 mL 的 1%柠檬酸钠。此溶液 2 min 后逐 渐变蓝,变黑,直至变成酒红色。继续加热搅拌 10 min。 室温下冷却,重新定容到 100 mL。4℃冰箱保存。

1.3.7 纳米金复合探针的制备

将制备好的1 mL 纳米金用 K₂CO₃ 调节 pH 至 8.5, 以 达到与抗体的等电点,实现特异性基团的识别。然后将 12 μL (16 μg/L) OFLX 单克隆抗体加入到1 mL 纳米金中, 室温条件下搅拌反应1h,使其充分反应。

首先取 0.3 OD/mL 的巯基修饰的捕捉链(A)按 1:200 的 比例与三(2-羧乙基)膦[Tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP)] 混合,振荡过夜。然后加入制备好的金标抗体,使其混合,放 入4°C条件下静置 18 h后,加入 20 μL 的 PEG-20000,用移液 枪吹打均匀使其稳定反应。然后在 40 h内加入 0.01 mol/L 的 PBS 2 μL,共加入 4 次。40 h 后加入 150 μL 含 2% BSA 的 0.01 mol/L PBS,吹打均匀,继续反应 2 h,以封闭未结 合的位点。4°C条件下 10000 r/min 离心 15 min,弃上清。 再加入含 2% BSA 的 PBS 250 μL,使其复溶。复溶后加入 互补探针生物条形码 B链 0.3 OD/mL,室温下杂交反应 4 h, 反应结束后在 4°C条件下 10000 r/min 继续离心 15 min, 弃去上清液中未结合的 DNA 链,最后将沉淀物重悬于 250 μL 含 2% BSA 的 PBS 中复溶,于4°C冰箱中保存。 1.3.8 磁性纳米探针的制备

将磁性微球置于振荡器中振荡反应 30 min,保证其呈现 均匀悬浮状态。吸取1mL的磁性微球于离心管中,在磁力架 上磁性分离, 2 min 后弃掉上清液。再加入1 mL 15 mmol/L MES 缓冲液,先涡旋 10 s,再将其置于磁力架上,弃掉上 清液,再用 15 mmol/L MES 缓冲液反复洗涤两次。磁分 离后,分别加入 500 µL EDC (10 mg/mL)和 500 µL NHS (10 mg/mL)到离心管中,吹打均匀,室温下振荡 30 min, 振荡后再用 PBST 洗涤 3 次。随后把 500 µg OFLX-OVA 添 加至上述溶液中,室温振荡过夜,使得 OFLX-OVA 能够标 记到磁性微球上。振荡反应结束后,继续磁分离,弃上清, 以除去未结合的 OFLX-OVA。再加入 2% BSA 的 PBS 封闭 1 h,离心去上清后,将磁性纳米探针重悬于 500 µL 含有 0.1%吐温和 0.1% BSA 的 PBS 中复溶,4℃冰箱保存^[26-28]。 1.3.9 基于荧光定量 PCR 建立生物条形码免疫反应体系

竞争免疫体系的建立首先用含有 2% BSA, 0.1% PEG-20000 的 PBS 将纳米金复合探针稀释到 100 倍, 磁性 纳米探针稀释到 10 倍, 涡旋 15 min 混匀。再将标准品用 0.01 mol/L PBS 稀释到 1.25 μg/mL。将纳米金复合探针取 50 μL 到离心管中,再加入标准品和磁性纳米探针各 20 μL。 手动搅拌 15 min 使溶液充分混匀,于磁力架上磁性分离, 用 PBST 清洗 3 次,清洗结束后再加入 100 μL 超纯水,并 在 60°C下剧烈振荡 50 min,振荡结束后磁分离收集上清检 测。将收集的上清通过荧光定量 PCR 扩增进行 DNA 含量 的检测,从而实现对兽药的定量检测。

配制 25 µL 的反应体系于 qPCR 八连管中,其中空白对 照孔添加量为 12.5 µL 的 2×qPCR Mix、2 µL 的 7.5 µmol/L 基因引物、2.5 µL 的反转录产物、8 µL 的去离子水;试验 孔添加量为 12.5 µL 的 2×qPCR Mix、2 µL 的 7.5 µmol/L 内参引物、2.5 µL 的反转录产物、8 µL 的去离子水。PCR 扩增过程依次为 95℃预变性 3 min; 55℃循环(30 次)30 s; 72℃延伸 10 s;溶解曲线,65℃→95℃,每 5 s 升温 0.5℃。 1.3.10 样品前处理

将牛奶样品取1mL分别置于离心管中,然后把0.5mg/L的标准品溶液150、300、450 μL依次添加到1mL样品中, 其中一份作为空白对照组,不作添加,充分振荡混匀后静置 30 min。然后将100 μL的磷酸和4mL的乙腈加入到各离心 管中,水平振荡30 min混匀,静置5~10 min,4000 r/min离心 9 min,取上清,再将剩余的残渣继续重复提取步骤,收集 两次上清,加入4 mL的正己烷涡旋3 min,静置,直至 分层弃去上清。然后将沉淀物在 50℃条件下蒸发,并 用1mL的乙腈复溶,12000 r/min离心6 min,取上清,最 后用 0.22 μmol/L 滤膜过滤,4℃条件下保存备用。

1.4 数据处理

每组试验重复 3 组,试验数据处理与绘图采用 Origin 2019 软件,采用 WPS 2020 进行统计和分析。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的鉴定

如图2所示,紫外-可见分光光谱法鉴定OFLX的最大 吸收峰在287 nm 处, BSA 的最大吸收峰在278 nm 处, OVA



图 2 免疫原 OFLX-BSA (A)、OFLX-OVA (B)紫外表征图谱 Fig.2 Ultraviolet characterization maps of immunogen OFLX-BSA (A) and OFLX-OVA (B)

说明 OFLX 和 BSA (OVA)偶联反应后,两者的吸收峰产生 了叠加效应,导致偶联物的最大吸收峰与 OFLX 和 BSA 的 最大吸收峰在 280 nm,偶联物 OFLX-BSA 的最大吸收峰 在 278.5 nm 处,OFLX-OVA 的最大吸收峰在 295 nm 处, (OVA)相比产生了位移。据此可以推断 OFLX 与载体蛋白 BSA (OVA)产生了偶联反应,获得了完全抗原 OFLX-BSA 和 OFLX-OVA^[29]。

2.2 阳性杂交瘤细胞株的筛选

小鼠脾脏细胞与杂交瘤细胞融合成功,7d 后在细胞 显微镜下观察到成团的细胞,采用 ic-ELISA 对细胞培养孔 中的上清液进行检测, OFLX 有 6 孔显示出强阳性。将这 6 孔中的细胞进行细胞计数, 计数结束后把细胞数量稀释成 4.0、2.0、1.0、0.5、再将其按稀释细胞数铺板、共铺6板。 亚克隆 7d 后, 再采用 ic-ELISA 检测细胞上清液, OFLX 有 2 板经检测呈阳性。在这 2 块细胞培养板中, OD 值高于 1.0 的共有39孔,选择其中5孔细胞进行第二次亚克隆,培养 7d后进行细胞上清检测,经检测 OD 值高于 1.0 的有 8 孔, OD 值高于的 2.0 有 19 孔。经 3 次亚克隆后培养出效价高、 抑制率好及每孔单株细胞的杂交瘤细胞3株。随后将其扩 大培养至 24 孔板, 经扩大培养最终筛选出阳性高且每孔 单株的细胞,继续于24孔板中扩大培养7d,待细胞铺满 孔底的 70%, 转移到培养瓶中, 待细胞长到占瓶底的 80% 即可制备腹水。如图3所示,杂交瘤细胞株分布较均匀,并 且已长至瓶底的80%左右,可以用来制备腹水。



注:细胞生长到可制备腹水时期的生长情况。 图 3 杂交瘤细胞生长情况 Fig.3 Growth situation of hybridoma cell

2.3 抗体质量浓度的测定

将收集的腹水进行辛酸-硫酸铵法纯化,然后得到单 克隆抗体,对该抗体的浓度进行测定。通过紫外-可见分光 光谱法测定环丙沙星单克隆抗体在 260、280 nm 处的 OD 值,根据 Lowry-Kalokar 公式[C/(mg/mL)=1.45×OD₂₈₀-0.74×OD₂₆₀]计算单克隆抗体质量浓度(C),结果显示,OFLX单克隆抗体质量浓度是 2.25 mg/mL。

2.4 单克隆抗体灵敏度评价

以抑制率为纵坐标(*Y*), 以 OFLX 质量浓度(*X*, ng/mL) 为横坐标绘制抑制曲线, 结果显示, OFLX 抑制曲线方程为 *Y*=0.29291log*X*+0.1589, r^2 =0.98, 测得其半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为 14.58 ng/mL, 检 出限(concentration at 10% inhibition, IC₁₀)为 1.59 ng/mL, 表明 OFLX 单克隆抗体具有较高的灵敏度。

2.5 单克隆抗体特异性评价

由表 2 显示, OFLX 单克隆抗体对于其分子结构相似的药物交叉反应率均<0.01%, 无交叉反应, 表明 OFLX 单 克隆抗体具有较高的特异性。

antibody and other drugs				
Table 2	Cross reaction rates between OFLX monoclonal			
表	2 OFLX单抗与其他药物的交叉反应率			

药物	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
OFLX	14.58	100
达氟沙星	>10000	< 0.01
恩诺沙星	>10000	< 0.01
环丙沙星	>10000	< 0.01
沙拉沙星	>10000	< 0.01

2.6 纳米金、纳米金复合探针及磁性纳米金探针的 鉴定

2.6.1 纳米金的鉴定

通过目测法观察到的纳米金颜色,呈酒红色,且在 4℃静置后无沉淀现象(图 4A)。经透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)鉴定纳米金形态, 如图 4B 所示,颗粒呈球状大小均匀,直径大约 15 nm,且 没有出现重叠堆积现象。通过紫外-可见分光光谱法测定纳 米金的最大吸光度所对应的波长为 520 nm,如图 4C,并且 曲线光滑。综上所述,纳米金颜色澄清,分散均匀,紫外光 谱平滑,表明纳米金制备成功^[30]。

2.6.2 纳米金复合探针的鉴定

如图 5 所示,通过紫外-可见分光光谱法测定表明纳 米金的最大吸光度所对应的波长为 520 nm,而纳米金复合 探针,最大吸光度所对应的波长从 520 nm 移至 522 nm,吸 收峰的峰位呈现向长波段红移的趋势说明纳米金标记完成 后粒径增大,表明标记物分子标记到纳米金颗粒的表面, 使纳米金粒子尺寸和形状有所改变,从而改变了纳米金颗 粒的光谱特征,推断纳米金标记成功^[24]。



注: A 为自然光条件下的纳米金; B 为纳米金透射电镜图; C 为纳米金紫外光谱图。

图 4 纳米金鉴定图

Fig.4 Nanogold identification maps



Fig.5 Ultraviolet diagram of nano-gold composite probe

2.6.3 磁性纳米探针的表征

采用衰减全反射(attenuated total reflection, ATR)模 式进行红外光谱分析,设定条件为光谱扫描 256次,分辨 率 4 cm⁻¹,结果见图 6。磁性纳米探针在 584.39 cm⁻¹处的 吸收峰为 Fe_3O_4 探针的特征吸收峰,表明 Fe_3O_4 探针制备成 功。其次在 1649.00、1455.05、1326.40 cm⁻¹处都有吸收峰, 表明可能有酰胺键存在^[24],这可能有与磁性纳米探针不含





有蛋白,而 OFLX-OVA 中包含蛋白有关。综上分析,说明 OFLX 磁性纳米探针制备成功。

2.7 标准曲线的建立

采用 0.01 mol/L PBS 将 OFLX 稀释到一定范围内, 以 Ct 值为纵坐标(Y), 以 OFLX 质量浓度为横坐标(X, ng/mL), 在 0.1~128.0 ng/mL 范围内, OFLX 质量浓度的对数值与 Ct 值呈现良好的线性关系, 线性回归方程为 Y=14.4263logX+ 0.09184, r²=0.96, OFLX 检出限为 1.14 ng/mL。结果表明, 基于实时荧光定量 PCR 生物条形码技术可以实现对 OFLX 的定量检测, 且具有较高的灵敏度。

2.8 添加回收实验

为了验证基于实时荧光定量 PCR 生物条形码免疫分 析方法在实际应用中的准确度,将 OFLX 标准溶液加入到 牛奶样品中来模拟被其污染的样品,通过添加 150、300、 450 μL 的标准品溶液(0.5 mg/L), OFLX 平均回收率和相对 标准偏差分别为 85.8%~102.6%、1.8%~2.6%。结果表明,基 于荧光定量 PCR 的生物条形码免疫分析方法检测样品中 OFLX 结果可靠,说明该检测方法的准确度较好,可以应 用到实际样品的兽药残留检测中。

3 结 论

鉴定完全抗原效果的方法有很多种,半抗原偶联到 载体蛋白上数目的多少常被认为会影响抗体的优劣,一般 认为至少 20 个以上的半抗原偶联到一个载体蛋白分子上 才能刺激免疫动物产生抗体,但是现在还没有定论^[31]。目 前,对半抗原与载体蛋白间的鉴定方法还没有标准,因此 最佳的验证方法仍是通过动物免疫实验来确定人工抗原合 成的优劣。本研究采用了紫外扫描来证明了人工抗原的成 功合成,并采用荧光定量 PCR 生物条形码检测方法实现 OFLX 残留量的间接测定,在 0.1~128.0 ng/mL 时,检出限 为 1.14 ng/mL。OFLX 平均回收率和相对标准偏差分别为 85.8%~102.6%、1.8%~2.6%。证明基于荧光定量 PCR 的生 物条形码免疫分析方法检测样品中 OFLX 结果可靠, 能够 应用于实际样品中的检测。

参考文献

- [1] IBRAHIM M, AHMAD F, YAQUB B, et al. Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture [J]. Antibiot Antimicrob Resist Genes Environ, 2020. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00004-8
- [2] GOUVÊA R, SANTOS FD, AQUINO MD, et al. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: A review [J]. Braz J Poultry Sci, 2015, 17(1): 1–10.
- [3] ZHANG QQ, YING GG, PAN CG, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. Environ Sci Technol, 2015, 49(11): 6772–6782.
- [4] 疏文慧. 氧氟沙星厌氧降解菌的富集筛选和降解特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.

SHU WH. Enrichment and isolation of anaerobic ofloxacin degradation bacteria and their degradation characteristics [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.

- [5] HEAL RD, HASANNA, HAQUE MM, Increasing disease burden and use of drugs and chemicals in Bangladesh shrimp aquaculture: A potential menace to human health [J]. Mar Pollut Bull, 2021, 172(112796): 1–13.
- [6] 秦宇, 葛宇. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中
 12 种禁用兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7):
 2258–2266.

QIN Y, GE Y. Simultaneous determination of 12 kinds of banned veterinary drugs residues in poultry eggs by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J. Food Saf Qual, 2022, 13(7): 2258–2266.

- [7] NAWAZ M, SUNG K, KWEON O, et al. Characterisation of novel mutations involved in quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from imported shrimp [J]. Int J Antimicrob Ag, 2015, 45(5): 471–476.
- [8] 甄建辉,田浩,艾连峰,等.液相色谱-串联质谱法测定水体中 8 种典型 喹诺酮类抗生素[J]. 食品安全质量检测学报,2022,13(7):2230-2235. ZHEN JH, TIAN H, AI LF, *et al.* Determination of 8 kinds of typical quinolones antibiotics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in water [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(7): 2230-2235.
- [9] MILLANAO AR, MORA AY, VILLAGRA NA, et al. Biological effects of quinolones: A family of broad-spectrum antimicrobial agents [J]. Molecules, 2021, 26(23): 7153–7195.
- [10] 宋怡欣. 基于介电传感器的稻田水中盐酸强力霉素与氧氟沙星含量检 测研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2022.
 SONG YX. Determination of doxycycline hydrochloride and ofloxacin in paddy water based on dielectric sensor [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2022.
- [11] 丑亚琴,唐巍,卢艳芬,等.高效液相色谱法同时测定水产品中四种氟 喹诺酮类药物残留前处理条件的优化[J].水产养殖,2013,34(1): 21-27.

CHOU YQ, TANG W, LU YF, *et al.* Optimization of pretreatmet for determination of fourfluoroquinolones in aquatic product by high performanceliquid chromatography [J]. J Aquacult, 2013, 34(1): 21–27.

- [12] ORSO D, FLORIANO L, RIBEIRO LC, et al. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Anal Method, 2016, 9(6): 1638–1653.
- [13] 郭伟伟,孙志洪.固相萃取-液相色谱-质谱法检测水产养殖水中的孔 雀石绿及其代谢物、氧氟沙星、恩诺沙星和土霉素微量残留[J].中国 测试,2022,48(1): 80-84.

GUO WW, SUN ZH. SPE-HPLC-MS/MS method for determination of malachite green and its metabolites, ofloxacin, enrofloxacin and oxytetracycline residues in aquaculture water [J]. China Meas Test, 2022, 48(1): 80–84.

[14] 刘约权. 现代仪器分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015.

LIU YQ. Modern instrumental analysis [M]. Beijing: Higher Education Press, 2015.

[15] 李娜. 三种氟喹诺酮类抗生素免疫快速检测方法的研究[D]. 镇江: 江 苏大学, 2022.

LI N. Study of rapid immunoassay for detecting three fluoroquinolone antibiotics [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.

[16] 刘劲涛. 氧氟沙星单克隆抗体的制备及免疫层析法的建立[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.

LIU JT. Preparation of monoclonal antibody against ofloxacin and establishment of immunochromatography [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.

[17] 于海峰. 氧氟沙星单克隆抗体制备及 ELISA 方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2007.

YU HF. Prepartion of monoclonal antibody against ofloxacin and establishing of ELISA [D]. Changchun: Jilin University, 2007.

- [18] HE H, SUN T, LIU W, et al. Highly sensitive detection of salbutamol by ALP-mediated plasmonic ELISA based on controlled growth of AgNPs [J]. Microchem J, 2020, 156(104804): 1–7.
- [19] TUFA RA, PINACHO DG, PASCUAL N, et al. Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for fluoroquinolones in animal feeds [J]. Food Control, 2015, 57: 195–201.
- [20] HUANG X, XU Z, MAO Y, et al. Gold nanoparticle-based dynamic light scattering immunoassay for ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in lettuces [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 66: 184–190.
- [21] 宗婧婧,张小军,严忠雍,等. 胶体金免疫层析法检测水产品中 15 种 喹诺酮类药物[J]. 理化检验-化学分册, 2018, 54(5): 101-105.
 ZONG JJ, ZHANG XJ, YAN ZY, *et al.* Detection of 15 quinolones in aquatic products by colloidal gold immunochromatography assay [J]. Mater Test, 2018, 54(5): 101-105.
- [22] TANG Y, WANG H, XIANG JJ, et al. A sensitive immunosorbent bio-barcode assay combining PCR with icELISA for detection of gonyautoxin 2/3 [J]. Anal Chim Acta, 2010, 657(2): 210–214.
- [23] ZHANG C, DU P, JIANG Z, et al. A simple and sensitive competitive bio-barcode immunoassay for triazophos based on multi-modified gold

nanoparticles and fluorescent signal amplification [J]. Anal Chim Acta, 2018, 999: 123-131.

[24] 杜鹏飞. 三唑磷农药生物条形码免疫分析方法研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.

DU PF. Study on the biobio-bar code immunoassay for detection of triazophospesticide [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.

[25] 梁赤周. 抗三唑磷基因工程抗体的研制及同源建模[D]. 杭州: 浙江大 学, 2009.

LIANG CZ. Preparation and homology modeling of anti-triazophos engineering antibody [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009

[26] 张静,吕运开,于丽青.磁性微球表面光引发聚合制备金属配位印迹 层及选择性富集奶样中氟喹诺酮类药物残留[J].食品安全质量检测学 报,2016,7(1):276-284.

ZHANG J, LV YK, YU LQ. Metal complex imprinted layer synthesized by photo-polymerization on surfaceof magnetic microspheres for selective enrichment offluoroquinolones residues from milk [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(1): 276–284.

[27] 刘畅. 磁性免疫层析试纸的制备及其在喹诺酮快速检测中的应用[D]. 天津:天津农学院, 2021.

LIU C. Preparation of magnetic immunochromatogr-aphic test strip and the application in rapiddetection of fluoroquinolones [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2021.

[28] 骆智训, 方炎. 表面增强拉曼散射光谱的应用进展[J]. 光谱学与光谱 分析, 2006, (2): 358-364.

LUO ZX, FANG Y. Progress in application of surface enhanced ramanscattering spectrum technique [J]. Spectrosc Spectr Anal, 2006, (2): 358–364.

[29] 陈艺宏, 张琛卿, 贺延志, 等. 盐酸克伦特罗完全抗原的鉴定[J]. 生物 化工, 2017, 3(1): 5-9.

CHEN YH, ZHANG CQ, HE YZ, *et al.* Identification of complete antigen for antibody production against clenbuterol hydrochloride [J]. Biol Chem Eng, 2017, 3(1): 5–9.

[30] 金寿瑞, 王东敏, 马婧, 等. 柠檬酸钠还原法提取纳米金的改良与优化[J]. 甘肃科技, 2020, 36(1): 16–19, 38.

JIN SR, WANG DM, MA J, *et al.* Improvement and optimization of gold nano extraction by sodium citrate reduction [J]. Gansu Sci Technol, 2020, 36(1): 16–19, 38.

[31] 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 BB, HOU YZ, DENG RG, *et al.* Synthesis and identification of ofloxacin artificial antigen [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(9): 6–10.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

作者简介



栗 慧,硕士,主要研究方向为食品 安全与检测。 E-mail: 784918295@qq.com



魏 东,博士,研究员,主要研究方向 为药物残留检测。 E-mail: qsataf@163.com