

蓝色乳胶微球标记喹诺酮免疫层析试纸条的研制

刘冰, 孙晓, 高进, 杨艳玲, 吴秋月, 生威, 张燕, 王硕

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 喹诺酮类药物作为广谱抗菌药被广泛应用在畜牧养殖业, 但如果用药过程使用不规范就会导致兽药残留于动物源性食品中, 对于消费者的食用安全造成潜在的隐患。因此, 建立一种检测喹诺酮类药物快速、简便的检测方法成为必然。本实验采用蓝色乳胶微球作为标记材料, 标记诺氟沙星单克隆抗体, 优化建立蓝色乳胶微球标记的喹诺酮类免疫层析试纸条方法, 为快速高通量检测食品中兽药残留提供理论支持。通过优化试纸条的各项条件, 方法检出限为 $1 \mu\text{g/L}$ 。选取可能存在兽药残留的猪肉、虾、鸡肉样品, 进行添加回收实验, 样品检出限均为 $10 \mu\text{g/kg}$ 。建立的方法可检测环丙沙星, 恩氟沙星, 氟罗沙星, 麻保沙星, 依诺沙星, 罗氟哌酸 6 种喹诺酮类兽药残留, 试纸条稳定性良好, 有效期至少为三个月。

关键词: 蓝色乳胶微球; 喹诺酮; 免疫层析试纸条

文章编号: 1673-9078(2018)05-204-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.029

Development on Quinolone Immunochromatographic Test Strips Labelled with Blue Latex Microspheres

LIU Bing, SUN Xiao, GAO Jin, YANG Yan-ling, WU Qiu-yue, SHENG Wei, ZHANG Yan, WANG Shuo

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety Ministry of Education of China, The School of Food Engineering and Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Quinolones were widely used in livestock breeding industry as the broad-spectrum antimicrobial drugs. However, veterinary drugs would remain in animal-derived foods if the use of quinolones was not standardized, causing the potential risks to consumers' safety. Therefore, it was inevitable to establish a rapid and simple detection method for quinolones. In this study, blue latex microspheres were used as a marker material to mark norfloxacin monoclonal, and the established method of blue latex microsphere-labeled quinolone immunochromatographic test strips was optimized to provide theoretical support for rapid detection of veterinary drug residues in foods. The detection limit of this method was $1 \mu\text{g/L}$ under optimized the conditions, and samples of pork, shrimp and chicken that might have veterinary drug residues were selected for the recovery test, the detection limits of the samples were all $10 \mu\text{g/kg}$. The established method could detect 6 quinolone residues, including ciprofloxacin, enrofloxacin, fleroxacin, marbofloxacin, enoxacin and norfloxacin, and the test trips have good stability with an effective period of at least three months.

Key words: blue latex microspheres; quinolones; immunochromatographic strip

喹诺酮类药物是通过抑制 DNA 回旋酶和拓扑异构酶, 阻断 DNA 的复制而产生抗菌作用^[1]。诺氟沙星是第三代喹诺酮类抗菌药, 会阻碍消化道内致病细菌的 DNA 旋转酶的作用, 阻碍细菌 DNA 复制, 对细菌有抑制作用。由于分子结构中引入了疏水性的氟原子及亲水性的吡嗪环, 诺氟沙星的抗菌活性得到提高, 并且具有抗菌谱广、高效、不良反应少等优点, 在水产养殖及畜牧养殖上广泛应用于细菌性疾病的预防与治疗^[2,3]。但由于半衰期长, 容易在动物食品中的富集,

收稿日期: 2017-12-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31301462)

作者简介: 刘冰 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 王硕 (1969-), 男, 教授, 研究方向: 食品安全检测

通过食物链到达人体, 对人体代谢有干扰作用, 而且还破坏和减少体内红细胞、白细胞^[4], 还会导致细菌耐药性增强以及危害生态环境, 因而残留问题已引起极大的关注^[5]。许多研究人员先后建立多种针对诺氟沙星残留的检测方法, 微生物法^[6], 超高效液相色谱-串联质谱法^[7], 高效液相法^[8], 毛细管电泳-化学发光法^[9]。上述方法虽灵敏度高, 但仪器昂贵, 对操作人员有较高要求, 耗时间长等问题, 并不适合进行大量样品筛查以及现场快速检测^[10]。

免疫层析技术是近几年兴起的快速检测技术, 最常见的形式是免疫层析试纸条技术, 利用半抗原和抗体的特异性反应, 反应灵敏且迅速, 成本低廉, 适合现场大量样品同时检测^[11-13], 它结合了层析技术和免

疫技术的特点, 简单, 快速, 结果可直接观察。现有试纸条的标记材料虽然很多, 但各自缺陷也较明显, 例如上转换材料其合成过程复杂且不能裸视^[14]; 量子点具有一定毒性, 观察结果时需要仪器, 不能裸眼可视, 制约了量子点免疫层析试纸条的推广及商业化^[15]; 胶体金是目前商品化试纸条中使用最多的标记材料^[16], 胶体金的制备简单, 颜色鲜艳, 稳定性极佳, 但其信号放大成本高, 灵敏度低且颜色单一; 胶体碳标记抗体耗时较长^[17], 高质量商业化碳纳米颗粒较少。

乳胶微球是由高聚材料合成的纳米级球形的标记材料, 根据表面官能团的不同可分为羧基化、氨基化、巯基化乳胶微球^[18], 可以包裹不同颜色染料, 使其颜色丰富, 可满足多种实验的要求, 大小均匀, 与胶体金相比, 颗粒较大, 用它作为标记材料, 可以节省抗体或抗原用量, 成本更低, 稳定性更好, 灵敏度更好, 现已被广泛应用于免疫技术、临床诊断、细胞学等生物医药等领域^[19], 在食品检测领域应用较少。本实验采用蓝色乳胶微球作为材料, 建立喹诺酮类免疫层析试纸条方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、黏性 PVC 底板、吸水纸, 上海金标生物科技有限公司; 玻璃纤维、聚酯纤维, 上海金标公司; 硝酸纤维素膜, 美国 Millipore 公司; 诺氟沙星标准品, 中国兽医药品检查所; 诺氟沙星单克隆抗体和诺氟沙星半抗原 H₃, 实验室自制; 羧基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、碳化二亚胺 (1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide, EDC)、卵白蛋白 (OVA)、牛血清白蛋白 (BSA), 美国 Sigma 公司; 氢氧化钠 (分析纯)、碳酸氢钠、氯化钠, 天津市化学试剂一厂; 乙腈 (分析纯), 德国 Merck 公司; 诺氟沙星试剂盒, 美国 REAGEN 化学试剂有限责任公司; ZK315B-1 真空干燥箱, 天津三水仪器有限公司; HM3035 三维往复划膜仪、ZQ2000 全自动斩切机, 上海金标生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体的纯化

采用正辛酸-硫酸铵沉淀法纯化小鼠腹水, 具体纯化操作步骤如下: 取 2 mL 小鼠腹水, 用 0.06 M、pH 4.0 的醋酸钠-醋酸缓冲液进行 3 倍稀释, 然后用 1

mol/L NaOH 溶液调节溶液 pH 值为 4.8; 向上述混合溶液中逐滴加正辛酸, 滴加过程要不断低速搅拌, 0.5 h 内加完, 静止放置于 4 °C 冰箱 2 h, 以除去腹水中的杂蛋白和脂肪; 取出后, 4 °C, 14000 r/min 离心 30 min, 取上清, 弃沉淀; 向上清液中加入约其体积 1/10 PB 后用 NaOH 溶液将 pH 调至 7.4 左右; 将上述溶液置于 4 °C 条件, 加入饱和硫酸铵继续搅拌 30 min; 4 °C, 5000 r/min 离心 15 min, 弃上清留沉淀; 用适量 pH 7.4 PB 缓冲液溶解沉淀, 但要少于纯化前的体积, 4 °C PB 透析过夜; 4 °C, 5000 r/min 离心 10 min, 去除不溶性沉淀, 稀释一定的倍数。

1.2.2 包被原的制备

将 4 mg 诺氟沙星溶于 200 μL DMF 中, 待全溶解后, 准确称取 6 mg NHS 和 20 mg EDC 加入上述溶液中, 在室温避光条件下连续搅拌反应 24 h, 冰浴条件下将上述溶液缓慢逐滴加入到含有 11 mg OVA 的 2 mL PBS (pH 7.4) 中, 室温继续搅拌 3 h 后透析三天取出并添加一定剂量的防腐剂后置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 蓝色乳胶微球标记抗体的方法

用 pH 5.5 mes 缓冲液洗涤 50 mg/mL 的蓝色乳胶微球, 重复 2 次, 于 14000 r/min, 4 °C, 离心 15 min; 将沉淀用 mes 缓冲液稀释至 1 mg/mL, 4 °C 保存备用; 取 200 μL、1 mg/mL 蓝色乳胶微球, 加入 4 μL、0.5 mg/mL 的 EDC 与 NHS, 在摇床反应 15 min; 用磷酸盐缓冲液洗涤已活化乳胶微球, 重复 2 次, 于 14000 r/min, 4 °C, 离心 15 min, 将沉淀用磷酸盐缓冲液稀释至 1 mg/mL, 4 °C 保存备用; 在搅拌速度 150 r/min 条件下将诺氟沙星抗体加入到上述蓝色乳胶微球溶液中, 在室温下, 于摇床反应 1 h, 得蓝色乳胶微球标记抗体; 加入 4 μL 20%BSA 封闭 15 min; 于 14000 r/min, 4 °C, 离心 15 min; 将最终沉淀用工作液重悬至 40 μL, 4 °C 保存备用。

1.2.4 试纸条组装

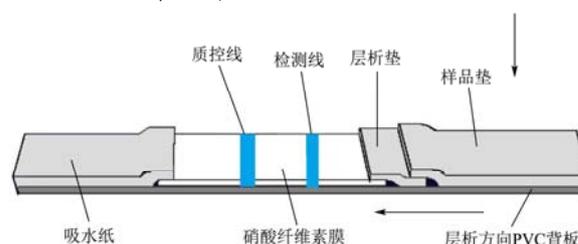


图1 免疫层析试纸条组装图

Fig.1 Diagram of the immunochromatographic test strip

吸水纸、PVC 背板、硝酸纤维素膜、样品垫、层析垫共同构成了免疫层析试纸条 (如图 1), 将硝酸纤维素膜贴在 PVC 背板上, 将二抗和包被原喷涂在硝酸

纤维素膜上, 37 °C 干燥 12 h 后, 一端与层析垫重叠相连, 另一端与吸水纸重叠相连; 层析垫与样品垫重叠相连, 组装好试纸条, 用斩条机将组装好的试纸条进行切割, 置于干燥箱里保存备用。

1.2.5 检测方法

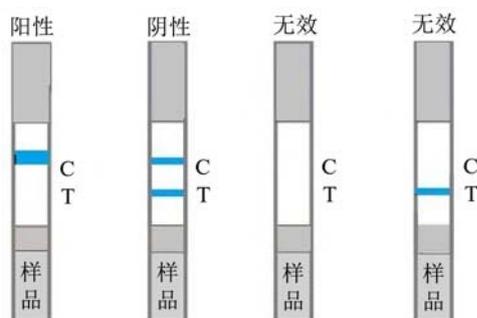


图2 试纸条结果示意图

Fig.2 Results of immunochromatographic test strip

将用蓝色乳胶微球标记好的抗体置于微孔中, 添加一定量标品稀释液, 混合均匀, 将试纸条插入微孔中, 10 min 后即可读取结果。试纸条的原理是间接竞争, 所以, 如果两条线都出现且颜色一致, 即是阴性样; 如果 T 线颜色明显变浅或消失, 即是阳性样; 如果 C 线不出现, 此条无效。

1.2.6 检出限的确定

配制一系列的梯度标品溶液, 浓度分别为 0 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL; 将试纸条插入微孔中, 10 min 后读取结果。当 C、T 线有明显差别时, 最低标品浓度即为检出限。

1.2.7 试纸条特异性的确定

本实验选取 12 种喹诺酮类药物用标品稀释液将其稀释至 0.1 mg/mL, 用制备好的试纸条进行检测, 每种药物两组平行, 观察试纸条的特异性, 若在试纸条的检测带区域 C、T 均有蓝色条带, 表明试纸条无交叉反应; 若只有 C 线显色而 T 线无色则定为有交叉反应; 若 C 线无色则试纸条无效。

1.2.8 实际样品的检测

1.2.8.1 样品前处理

取 1 g 样品, 加入 0.2 mL 1 M NaOH, 0.8 mL 乙腈, 高速漩涡 10 min, 14000 r/min 高速离心 10 min, 用 PBS 稀释 10 倍。

1.2.8.2 蓝色乳胶微球标记免疫层析试纸条检测实际样品

对阴性基质通过添加不同浓度的标准品后采用上述前处理方法处理样品, 得到提取液, 采用试纸条检测并确定实际样品的检出限。

1.2.9 稳定性试验

将优化好的试纸条密封保存, 一个月, 两个月,

三个月后, 分别拿出密封干燥试纸条, 浓度为 0 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL 诺氟沙星标准品溶液, 稀释标记后的抗体, 观察显色情况及灵敏度。

1.2.10 商业化试剂盒验证试纸条方法的有效性

购买市售喹诺酮 Elisa 试剂盒, 按照说明对样品进行前处理, 并根据检测步骤, 对其中喹诺酮含量情况进行检测, 同时, 另取同样的样品, 进行试纸条前处理方法, 进行试纸条方法检测, 两种方法得到检测结果进行比较, 一致性好, 说明试纸条方法有效性较好, 若有较大差异, 分析产生原因, 对试纸条方法进行改进。

2 结果与讨论

2.1 检测限的确定

活化乳胶微球的最佳 pH 值为 6.5, 标记抗体时的最佳 pH 值为 5.7, 最适抗体量为 50 μg/mL, 硝酸纤维素膜为 Millipore HF90s, 二抗的稀释倍数为 1:60, 包被原的稀释倍数 1:40, 微球标记抗体的稀释液为 PBS 缓冲液。制备标记抗体和免疫层析试纸条, 配制一系列梯度标品溶液, 将试纸条插入一定量的标品溶液中, 层析结束后观察试纸条, 如图 3 所示。

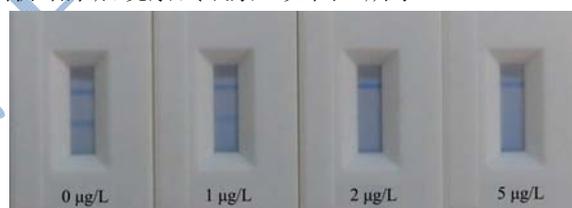


图3 蓝色乳胶微球标记免疫层析试纸条检测限的确定

Fig.3 Detection limit of immunochromatographic test strip labelled with blue latex microspheres

随着诺氟沙星标品浓度的升高, 检测线的颜色越来越浅, 当诺氟沙星标品浓度为 0 μg/L 时, 质控线与检测线出线且颜色基本一致; 当诺氟沙星标品的浓度为 1 μg/L 时, 质控线与检测线有明显差别; 当诺氟沙星标品的浓度为 2 μg/L 时, 检测线完全消失。所以, 该试纸条的检出限为 1 μg/L。

2.2 特异性的确定

选择喹诺酮类药物, 萘啶酸, 环丙沙星, 西诺沙星, 恩氟沙星, 氟罗沙星, 奥林酸, 吡哌酸, 斯帕沙星, 麻保沙星, 依诺沙星, 罗氟哌酸进行交叉反应实验, 结果如图 4 所示, 可以看出, 有交叉的药物是环丙沙星, 恩氟沙星, 氟罗沙星, 麻保沙星, 依诺沙星, 罗氟哌酸; 因此试纸条可检测 6 种喹诺酮类药物残留。

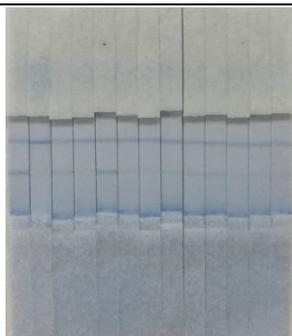


图4 交叉反应实验结果

Fig.4 Cross-reaction with other quinolones drugs

注: 从左到右依次是 PBS, 诺氟沙星, 萘啶酸, 环丙沙星, 西诺沙星, 恩氟沙星, 氟罗沙星, 奥林酸, 吡哌酸, 斯帕沙星, 麻保沙星, 依诺沙星, 罗氟派酸。

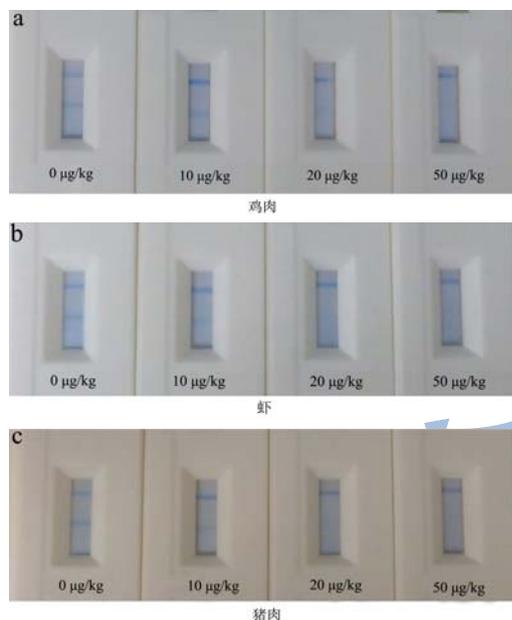


图5 实际样品添加回收实验结果

Fig.5 Recovery experimental results of the practical samples

表2 试剂盒方法验证试纸条的有效性

Table 2 Effectiveness of the strips validated by kits

样品	添加浓度/(µg/kg)	测定值/(µg/kg)	免疫层析试纸条检测结果(n=3)
虾	0	-	- , - , -
	10	9.31	+ , + , +
	20	18.54	+ , + , +
	50	47.60	+ , + , +
	猪肉	0	-
猪肉	10	8.63	+ , + , +
	20	17.68	+ , + , +
	50	43.79	+ , + , +
	鸡肉	0	-
鸡肉	10	8.53	+ , + , +
	20	19.02	+ , + , +
	50	47.65	+ , + , +

2.3 实际样品检测

将提取液用标品稀释液进行稀释, 当稀释 10 倍后, 使其显色情况和灵敏度与优化后一致, 说明消除了基质的影响。如图 5 所示, 在鸡肉、虾、猪肉三种样品中, 当诺氟沙星的浓度为 10 µg/kg 时, 质控线与检测线有明显差异, 随着诺氟沙星浓度的升高, 检测线的颜色越来越浅, 所以在实际样品中的检出限为 10 µg/kg。

2.4 试纸条稳定性

将保存一个月、两个月、三个月的试纸条取出, 分别检测不同浓度的标品。

结果显示, 保存三个月的试纸条 C 线条带仍然清晰可见, T 线颜色有所变浅; 因此有效性良好, 灵敏度有所下降。综合上所述, 试纸条的有效期至少两个月。

表1 稳定性实验结果

Table 1 Stability of strips labelled with microspheres

保存时间	目测结果		
一个月	C++	T++	A++
两个月	C++	T++	A++
三个月	C++	T+	A++

注: C 质控线, T 检测线, A 灵敏度, “+++”过深, “++”适中、灵敏度较好, “+”稍浅。

2.5 试纸条准确性

试剂盒结果与试纸条结果进行比较, 如表 2 所示, 可见两种方法检测结果基本一致, 表明本研究中建立的免疫层析试纸条方法检测结果有效。

3 结论

本研究中,将蓝色乳胶微球作为标记物,应用于免疫层析试纸条中,通过优化微球的活化条件、蓝色乳胶微球标记抗体条件及免疫层析条件,建立了检测喹诺酮药物的蓝色乳胶微球免疫层析试纸条方法,试纸条的检出限为 1 $\mu\text{g/L}$;检测时间为 10 min;特异性良好,可以检测环丙沙星,恩氟沙星,氟罗沙星,麻保沙星,依诺沙星,罗氟哌酸六种喹诺酮类药物;鸡肉、虾和猪肉等实际样品中的检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$;稳定性较好,有效期至少为 3 个月。

参考文献

- [1] 王俊平,芮玉奎.氟喹诺酮类药物在动物性食品中的残留及检测[C].北京市食品学会 2004 年年会,2004:5
WANG Jun-ping, RUI Yu-kui. Residues and determination of fluoroquinolones in animal food [C]. Annual Meeting of Food Society of Beijing 2004, 2004: 5
- [2] Chen J, Xu F, Jiang H, et al. A novel quantum dot-based fluoroimmunoassay method for detection of Enrofloxacin residue in chicken muscle tissue [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1197-1201
- [3] 林钦.鳗鱼中恩诺沙星、环丙沙星和诺氟沙星残留的测定方法[J].福建分析测试,2004,13(3):2045-2046
LIN Qin. Determination of enrofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in eel [J]. Journal of Fujian Analytical Test, 2004, 13(3): 2045-2046
- [4] 蒋兴东,祁克宗,涂健,等.动物性食品中氟喹诺酮兽药残留分析方法的研究进展[J].上海畜牧兽医通讯,2008,1:10-12
JIANG Xing-dong, QI Ke-zong, TU Jian, et al. Research progress on methods for analysis of fluoroquinolone veterinary drug residue in animal food [J]. Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Medicine Press, 2008, 1: 10-12
- [5] Olcay E, Beytemur O, Kalegasioglu F, et al. Oral toxicity of pefloxacin, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin: comparison of biomechanical and histopathological effects on Achilles tendon in rats [J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2011, 36(3): 339-345
- [6] 张家禾,孟婷,周作红,等.动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测方法的研究进展[J].中国畜牧兽医,2014,41(5): 262-266
ZHANG Jia-he, MENG Ting, ZHOU Zuo-hong, et al. Research progress on detection methods of fluoroquinolones in animal food [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary, 2014, 41(5): 262-266
- [7] 王金秋,马建民,夏曦,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肌肉中 13 种喹诺酮药物残留[J].质谱学报,2014,35(2):185-192
WANG Jin-qiu, MA Jian-min, XIA Xi, et al. Simultaneous determination of 13 quinolone residues in swine muscle by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Mass Spectrometry, 2014, 35(2): 185-192
- [8] Aufartová J, Brabcová I, Torres-Pradrón M E, et al. Determination of fluoroquinolones in fishes using microwave-assisted extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography and fluorescence detection [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 56(Supplement C): 140-146
- [9] Yang Z, Wang X, Qin W, et al. Capillary electrophoresis-chemiluminescence determination of norfloxacin and prulifloxacin [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 623(2): 231-237
- [10] 胡高爽,张燕,生威,等.上转换荧光猝灭试纸条检测牛奶中磺胺噻唑啉[J].食品科学,2017,38(24):218-223
HU Gao-shuang, ZHANG Yan, SHENG Wei, et al. Detection of sulfamethoxazole in milk by up-conversion fluorescence quenching test strips [J]. Food Science, 2017, 38(24): 218-223
- [11] Hu L, Zuo P, Ye B-C. Multicomponent mesofluidic system for the detection of veterinary drug residues based on competitive immunoassay [J]. Analytical Biochemistry, 2010, 405(1): 89-95
- [12] Xu F, Ren K, Yang Y-Z, et al. Immunoassay of chemical contaminants in milk: A review [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(11): 2282-2295
- [13] Han S, Zhou T, Yin B, et al. A sensitive and semi-quantitative method for determination of multi-drug residues in animal body fluids using multiplex dipstick immunoassay [J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 927(Supplement C): 64-71
- [14] 王瑜,任舒悦,姜会聪,等.上转换发光免疫层析试纸条快速定量检测己烯雌酚[J].分析化学,2017,45(1):35-41
WANG Yu, REN Shu-yue, JIANG Hui-cong, et al. Rapid quantitative determination of diethylstilbestrol by upconversion luminescent immunochromatographic test strips [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(1): 35-41
- [15] Wang C, Hou F, Ma Y. Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immunochromatographic test strip [J].

- Biosensors and Bioelectronics, 2015, 68(Supplement C): 156-162
- [16] Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 385(8): 1414-1420
- [17] 刘冰,王玲玲,童贝,等.沙丁胺醇免疫层析试纸条的应用研究[J].食品研究与开发,2016,37(18):124-128
LIU Bing, WANG Ling-ling, TONG Bei, et al. Application of albuterol immunochromatographic test strips [J]. Food Research and Development, 2016, 37(18): 124-128
- [18] Zhang J, Chen Z, Wang Z, et al. Preparation of monodisperse polystyrene spheres in aqueous alcohol system [J]. Materials Letters, 2003, 57(28): 4466-4470
- [19] 逯超亮.单分散羧基化聚苯乙烯微球的制备及生物医学应用[D].天津:天津大学,2010
LU Chao-liang. Monodisperse carboxylated polystyrene microspheres Preparation and biomedical applications [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010

现代食品科技