

# 恩诺沙星单克隆抗体的制备及 酶联免疫分析方法的建立

冯婷婷, 刘一兵, 李子颖, 贾娟娟, 袁志刚, 韩世泉

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

**摘要:** 采用抗恩诺沙星单克隆抗体建立酶联免疫吸附法(ELISA)用以检测恩诺沙星在动物源性食品中的残留。经方法学鉴定,本方法的检测范围为 0.5~50  $\mu\text{g/L}$ ,灵敏度为 0.2  $\mu\text{g/L}$ ,批内变异系数 $<10\%$ ,批间变异系数 $<20\%$ 。鸡肉、鱼肉、虾和蜂蜜样品的回收率分别为 95.5%~107.5%、80.0%~101.3%、105.7%~122.7%和 93.3%~111.3%。方法学鉴定结果符合免疫分析的基本要求。

**关键词:** 恩诺沙星(ENR);单克隆抗体;酶联免疫分析

中图分类号: R446.61 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2009)01-0005-05

## Production of Monoclonal Antibodies Against Enrofloxacin and the Establishment of Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FENG Ting-ting, LIU Yi-bing, LI Zi-ying, JIA Juan-juan, YUAN Zhi-gang, HAN Shi-quan  
(*Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China*)

**Abstract:** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies against enrofloxacin (ENR) was developed to analyzed ENR residues in animal-based food products. The standard line of the assay was in the rang of 0.5-50  $\mu\text{g/L}$ . The sensitivity was 0.2  $\mu\text{g/L}$ . The intra- and inter-assay CVs of 3 samples were lower than 10% and 20% respectively. The recoveries of chicken muscle tissues, fish, shrimp and honey were in the range of 95.5%-107.5%, 80.0%-101.3%, 105.7%-122.7% and 93.3%-111.3% respectively.

**Key words:** enrofloxacin; monoclonal antibody; ELISA

恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)属于氟喹诺酮类抗菌药,具有广谱抗菌的特性,在体内对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和支原体均有高抗菌活性,主要用于治疗猪、鸡、水产养殖中的细菌及

支原体感染<sup>[1-2]</sup>。有文献<sup>[3-4]</sup>报道恩诺沙星可引起幼畜轻度软组织损伤和关节炎等毒副作用,长期大量使用会使病菌产生耐药性,且有潜在的致癌作用。因此其在动物源性食品中的残留直接

威胁到人类身体健康。欧盟 2377/90 号条例规定恩诺沙星(恩诺沙星+环丙沙星)最大残留限量为 30  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 美国 FDA 禁止恩诺沙星用于家禽, 我国农业部颁布 235 号公告规定恩诺沙星(恩诺沙星+环丙沙星)在肌肉和脂肪组织的最大残留限量是 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[5-6]</sup>。目前检测动物源性食品中恩诺沙星残留的主要方法有微生物法<sup>[7]</sup>、荧光法<sup>[8]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[9-10]</sup>、液质联用法(LC-MS)<sup>[11]</sup>、毛细管电泳法<sup>[12]</sup>和酶联免疫吸附法(ELISA)<sup>[3,5]</sup>等。应用最广泛的主要是 HPLC 法和 ELISA 法。HPLC 检测灵敏、准确, 但操作费时费力。ELISA 具有快速、灵敏、准确, 分析成本低, 样品前处理过程简单等优点。因此, 建立恩诺沙星酶联免疫分析方法适用于现场快速检测。

## 1 实验材料

恩诺沙星(ENR)、辣根过氧化物酶(HRP)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)、四甲基联苯胺(TMB)、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、乙二胺(EDA)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF); 均为美国 Sigma 公司产品; 环丙沙星、洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星: 中国兽医药品监察所产品, 其余试剂为北京化学试剂公司产品; 细胞培养板和 96 孔微量滴定板: 美国 Corning 公司产品; 蛋白 G 亲和层析柱: 美国 GE 公司产品; Spectra 酶标仪: 奥地利 SLT 公司产品; Balb/c 小鼠: 中国医学科学院实验动物研究所提供; 羊抗鼠二抗: 原子高科股份有限公司医学二部提供; 氮气吹干仪: 北京八方世纪科技有限公司产品; 均质机: 德国 IKA 公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 恩诺沙星免疫原的偶联<sup>[13-14]</sup>

**2.1.1 载体蛋白的活化** 将 100  $\mu\text{L}$  10% 的 EDA、5 mg 的 NHS 和 5 mg 的 EDC 加入 2 mL 溶有 10 mg 载体蛋白的 0.02 mol/L pH 7.4 的 PB, 室温搅拌 6 h。对 0.02 mol/L pH 7.4 的 PB 完全透析。

**2.1.2 ENR 与载体蛋白的偶联** 取 5 mg ENR、10 mg NHS 和 10 mg EDC 加入 3 mL 溶有 5 mg 上述活化载体蛋白的 0.02 mol/L pH

7.4 的 PB(含 76% DMF)中, 4  $^{\circ}\text{C}$  搅拌过夜, 并用 0.02 mol/L pH 7.4 的 PB 完全透析。分别制得 ENR 与牛血清白蛋白和卵清蛋白的偶联物, 以下分别用 cBSA-ENR 和 cOVA-ENR 表示, 其中“c”表示用 EDA 阳离子化的蛋白。计算偶联比。

### 2.2 免疫小鼠<sup>[15]</sup>

将 cBSA-ENR 采用常规方法免疫 5 只 6~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 初次免疫剂量为每只 40  $\mu\text{g}$ , 加强免疫剂量减半。初次免疫后第 15 周用 ELISA 法测定抗血清滴度, 考察 ENR 对抗血清的抑制情况, 选择抑制较好的小鼠用于融合。

### 2.3 ENR 单抗的制备

用常规方法进行细胞融合<sup>[15-16]</sup>。融合 7~8 d 后, 取上清液用 ELISA 法进行筛选,  $\text{OD}_{450} \geq 1.0$  的孔判定为阳性孔。并同时观察 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  ENR 标准品的抑制情况。用有限稀释法对该孔中的杂交瘤细胞进行多次克隆化, 直至所有细胞生长孔的上清均为阳性为止。将杂交瘤细胞注入经降植烷处理的 Balb/c 小鼠腹腔中并收集腹水。采用 Protein-G 亲和层析柱对小鼠腹水进行纯化, 并用紫外分光光度法测定抗体浓度。

### 2.4 酶标抗体及标准品的制备

参考郭春祥等<sup>[17]</sup>的高碘酸钠法制备酶标抗体。用标准品稀释液(0.2% BSA 溶于 0.02 mol/L pH 7.4 PB 溶液)将 ENR 配制成 0、0.5、1.5、5、15、50  $\mu\text{g}/\text{L}$  的标准品。4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 2.5 酶联免疫分析程序

经过条件优化, 确定了分析程序: 向已包被 1 mg/L cOVA-ENR 的微量滴定板加入 50  $\mu\text{L}$  标准品或样品, 再加入 50  $\mu\text{L}$  1:4000 倍稀释的酶标抗体, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h。倾去反应液, 加入洗涤液每孔 150  $\mu\text{L}$  洗 4 次, 加入显色液每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 15 min, 按每孔 50  $\mu\text{L}$  加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 终止反应。读取  $\text{OD}_{450}$ 。以  $\lg(\text{标准品浓度})$  为横坐标,  $\ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0}$  为纵坐标, 绘制标准曲线并拟合线性方程, 根据  $\text{OD}_{450}$  计算 ENR 的浓度。

### 2.6 样品的前处理

肉类、水产品及蜂蜜样品的前处理参考文献[18]方法进行。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 免疫原偶联比的确定

本实验中共联结了两批 cBSA-ENR,用紫外分光光度法测得的偶联比分别是 1:18 和 1:10,用 MALDI-TOF-MS 法测得的偶联比分别是 1:22 和 1:20。采用偶联比为 1:18 的免疫原免疫小鼠。MALDI-TOF-MS 法测定的偶联比高于紫外分光光度法测定的结果。可能是由于 MALDI-TOF-MS 法是通过比较免疫原和载体蛋白的相对分子质量计算偶联比。从免疫原偶联步骤来看,载体蛋白上先联结了过量的乙二胺,从而使偶联物的平均相对分子质量中还包含了过量乙二胺的质量,因此用 MALDI-TOF-MS 法测得的偶联比偏高。如果用 MALDI-TOF-MS 法先测定活化的载体蛋白的质量,用其代替载体蛋白的质量,可能所计算出的偶联比更准确。

#### 3.2 小鼠抗血清效价测定

采用 ELISA 法测定小鼠抗血清效价。以结合率为 5% 时所对应的抗血清稀释倍数为抗血清效价,5 只小鼠的效价均大于 1:10 000,ENR 对 5 只小鼠的抗血清均有一定抑制。

#### 3.3 单克隆抗体的鉴定

**3.3.1 单克隆抗体效价测定** 经过两次融合共获得 7 株可分泌抗 ENR 抗体的单克隆细胞株,用测定小鼠抗血清效价相同方法测定了这 7 株细胞株的腹水中 ENR 单抗的效价,分别是 1:124 000、1:572 000、1:210 000、1:310 000、1:223 000、1:478 000、1:4 000。

**3.3.2 单克隆抗体的抑制曲线** 7 株细胞株的腹水中单抗的抑制曲线示于图 1。由图 1 可见,ENR18H6, ENR19B10, ENR19H1 这 3 支单抗均有较好的抑制,其中 ENR19B10 抑制最好。

#### 3.3.3 恩诺沙星单克隆抗体的交叉反应<sup>[20]</sup>

采用 ELISA 方法测 ENR18H6、ENR19B10、ENR19H1 与 6 种 ENR 类似物的交叉反应,结果列于表 1。根据 Holtzapple 等报道<sup>[14]</sup>,抗体对喹诺酮类药物的特异性主要是由 1 位的氟苯环决定的,这一结构的改变可能使抗体与之失去结合。而 7 位的哌嗪环的作用较小,即使哌嗪环结构略有改变也会有交叉反应。恩诺沙星、培氟沙星和氧氟沙星都具有相同的氟苯环,恩诺沙星和氧氟沙星的 7 位取代基是 4-乙基-哌嗪,培氟沙星 7 位的取代基是 4-甲基-哌嗪,结构较为接

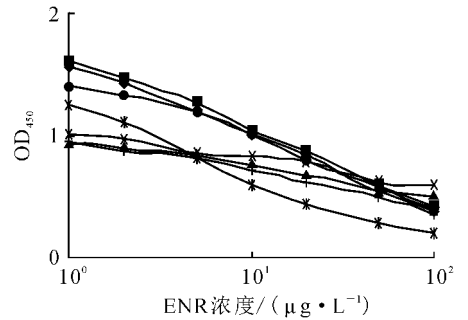


图 1 恩诺沙星单克隆抗体的抑制曲线

- ◆ — ENR18H6 1:20 000;
- — ENR17G5 1:100 000;
- ▲ — ENR19C7 1:100 000;
- × — ENR19B4 1:10 000;
- \* — ENR19B10 1:100 000;
- — ENR19H1 1:100 000;
- | — ENR19D4 1:1 000

近,所以培氟沙星和氧氟沙星交叉反应率较高。其余 4 种化合物也具有氟苯环这一结构,但哌嗪环结构差别更大,所以交叉反应率较小。但这一结论还有待进一步研究。

表 1 恩诺沙星单克隆抗体交叉反应

类似物	交叉率/%		
	ENR19B10	ENR18H6	ENR19H1
环丙沙星	<0.1	<0.1	<0.1
洛美沙星	<0.1	<0.1	<0.1
培氟沙星	93.29	1.60	1.20
氧氟沙星	1.59	0.40	0.24
诺氟沙星	<0.1	<0.1	<0.1
达氟沙星	<0.1	<0.1	<0.1

#### 3.4 方法学鉴定

**3.4.1 标准曲线** 用抑制率最好的 ENR19B10 制备酶标抗体 ENR19B10-HRP,并建立了直接竞争 ELISA 用于检测 ENR,得到的标准曲线示于图 2。曲线方程为  $y = -1.798 4x + 1.364 4$ ,  $r = 0.999$ 。

**3.4.2 灵敏度** 同时测定 20 个零标准的 OD<sub>450</sub>,每两孔取平均,以  $\bar{x} - 2s$  代入标准曲线方程,计算出对应的浓度,即为方法的灵敏度。得到 ENR 最小检出量为 0.2 μg/L。

**3.4.3 精密度** 用标准品稀释液配制 3 份不同浓度的样品,观察批内和批间变异(CV),结果列于表 2。由表 2 可知,批内变异 <10%,批间变异 <20%,该结果符合免疫分析要求。

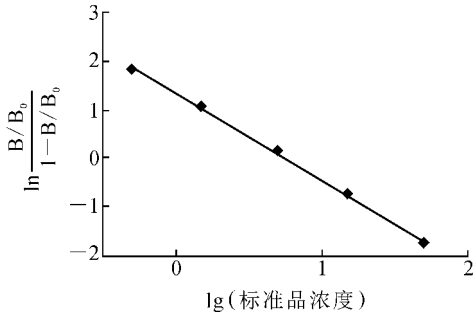


图 2 标准曲线

表 2 批内、批间变异系数

样品浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	批内(n=10)		批间(n=10)	
	$\bar{x} \pm s/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	CV/%	$\bar{x} \pm s/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	CV/%
2	2.30±0.19	8.3	1.79±0.20	11.2
7.5	8.22±0.40	4.8	8.34±0.76	9.1
20	19.81±0.73	3.7	20.19±2.32	11.5

**3.4.4 样品检测** 向空白鸡肉、鱼肉、虾和蜂蜜样品中添加 ENR,按样品前处理方法各制备 3 份不同浓度的样品,测定 ENR 的回收率,结果列于表 3。表 3 结果显示,鸡肉、鱼肉、虾和蜂蜜样品的回收率分别为 95.5%~107.5%、80.0%~101.3%、105.7%~122.7% 和 93.3%~111.3%。以上结果表明该方法可以满足鸡肉、鱼肉、虾和蜂蜜样品中残留 ENR 的检测。

表 3 样品中 ENR 的回收率

	添加浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	实测浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	回收率/%	CV/%
鸡肉	5.0	4.8±0.7	107.5±14.5	13.5
	10.0	9.6±0.6	95.5±6.4	6.7
	20.0	19.4±2.7	96.8±13.3	13.7
鱼肉	5.0	4.0±0.5	80.0±10.6	13.2
	10.0	10.1±2.5	101.3±25.0	24.6
	20.0	18.4±2.0	92.3±10.1	10.9
虾	5.0	5.5±1.0	109.3±19.7	18.0
	10.0	12.3±0.6	122.7±6.1	5.0
	20.0	21.1±2.0	105.7±13.3	9.6
蜂蜜	5.0	4.8±0.8	96.0±16.0	16.7
	10.0	9.3±1.0	93.3±10.1	10.8
	20.0	22.3±2.4	111.3±12.2	11.0

## 4 小 结

从实验结果可以看出本方法可以快速、准确地检测鸡肉、鱼肉、虾和蜂蜜样品中恩诺沙星的残留量。

致谢:本工作得到中国原子能科学研究院同位素研究所许文革、官国英等同志的帮助,在此表示感谢。

## 参考文献:

- [1] 刘国卿. 药理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [2] BROWN SA. Fluoroquinolones in animal health [J]. J Vet Pharmacol Ther, 1996, 19(1):1-14.
- [3] 蔡勤仁, 曾振灵, 杨桂香, 等. 恩诺沙星单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国农业科学, 2004, 37(7):1 060-1 064.
- [4] 郑晶, 黄晓蓉, 李耀平, 等. 鳊鱼中恩诺沙星残留的酶联免疫检测方法[J]. 食品科学, 2004, 10: 247-250.
- [5] WATANABE H, SATAKE A, KIDO Y, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices[J]. Analyst, 2002, 127(1):98-103.
- [6] 农业部公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[Z]. 2002.
- [7] OKERMAN L, DE WASCH K, VAN HOOF J. Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix [J]. Analyst, 1998, 123(11):2 361-2 365.
- [8] CHEN G, SCHNEIDER MJ. A Rapid spectrofluorometric screening method for enrofloxacin in chicken muscle[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(11):3 249-3 253.
- [9] TYCZKOWSKA K, HEDEEN KM, AUCCOIN D P, et al. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue[J]. J Chromatogr, 1989, 493(2):337-346.
- [10] GARCIA MA, SOLANS C, ARAMAYONA JJ, et al. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in plasma by HPLC with fluorescence detection[J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13(5):350-353.
- [11] TURNIPSEED SB, WALKER CC, ROYBAL JE,

et al. Confirmation of fluoroquinolones in catfish muscle by electrospray liquid chromatography/mass spectrometry[J]. J AOAC Int, 1998, 81 (3):554-562.

[12] HORSTKTTTER C, JIMNEZ-LOZANO E, BARRND, et al. Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection[J]. Electrophoresis, 2002, 23(17):3 078-3 083.

[13] HOLTZAPPLE CK, BUCKLEY SA, STANKER LH. Development of antibodies against the fluoroquinolone sarafloxacin and molecular modeling studies of cross-reactive compounds[J]. Food and Agricultural Immunology, 1997, 9:13-26.

[14] HOLTZAPPLE CK, BUCKLEY SA, STANKER LH, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against sarafloxacin and cross-reactivity studies of related fluoroquinolones [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1 984-1 990.

[15] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 陕西: 陕西科学技术出版社, 1992.

[16] KHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256:495-497.

[17] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 免疫学杂志, 1983, 33:97-100.

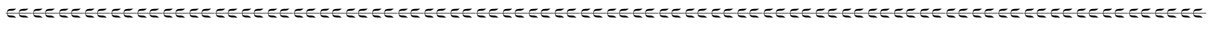
[18] 北京望尔生物技术有限公司. 恩诺沙星快速检测试剂盒说明书[Z]. 2006-7 版.

[19] 宋朝锦. 用基质辅助激光解吸-离子质谱测定吗啡-3 琥珀酸脂-BSA 结合物[J]. 分析测试学报, 2001, 20(z1): 301-302.

[20] 李振甲, 王仁之. 激素的放射免疫分析[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1985.

[21] BEATTY JD, BEATTY BG, VLAHOS WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1-2):173-179.

[22] MUCKERHEIDE A, APPLE RJ, PESCE AJ, et al. Cationization of protein antigens:I. Alteration of immunogenic properties[J]. J Immunol, 1987, 138(3):833-837.



## 2008 年第 4 期《开启核科学技术时代的钷和镅》一文勘误表

页 数	原 文	正 文
244 页图 1	$^{209}\text{Bi} \xrightarrow{\alpha(\sim 10^5\%)} ^{206}\text{Tl}$	$^{209}\text{Bi} \xrightarrow{\alpha(\sim 10^{-4}\%)} ^{206}\text{Tl}$
244 页左文第 3 行	其化学反应式如下	其核反应式如下
244 页左文第 15 行	其化学反应式如下	其核学反应式如下
245 页左文第 4 行	种种奇异现象	上述种种奇异现象
245 页左文第 23 行	得 $^{210}\text{Po}$	使 $^{210}\text{Po}$
245 页左文第 10 行	$2\text{aCi/cm}^3$	$2 \times 10^{-17} \text{ Ci/cm}^3$
247 页左文第 13 行	$^{241}\text{Am-Po}$ 源	$^{241}\text{Am-Be}$ 源
247 页左文第 8 行	放射性同位素发电机 (TIG)	放射性同位素发电机 (RTG)