

## 鸡肉中氟苯尼考 ELISA 检测方法的建立及应用

孙法良, 刁有祥, 孙宁, 马艳芳, 纪巍

(山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

**摘要:** 【目的】制备抗氟苯尼考 (FFC) 的高亲和力特异性抗体, 建立检测氟苯尼考的间接竞争 ELISA 新方法。【方法】氟苯尼考分别与牛血清白蛋白 (BSA) 和人血清白蛋白 (HSA) 经混合酸酐法偶联, 得到免疫抗原和包被抗原, 其偶联比分别为 14.4 和 14.7。用免疫原 FFC-HS-BSA 免疫新西兰大白兔获得了效价较高的特异性抗体。建立并优化了间接竞争 ELISA 检测方法。【结果】抗血清效价为 1 : 102 400。最佳包被抗原浓度为  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 最佳抗体工作浓度为 1 : 6 400, 酶标二抗的工作浓度为 1 : 20 000。回归方程  $Y = -0.1516X + 0.788$  ( $R^2 = 0.9859$ ), 检测范围为  $0.18 \sim 500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 检出限为  $0.18 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 批内和批间平均变异系数分别为 4.86% 和 7.77%。交叉反应试验中, 抗血清与 FFC 结构相似的氯霉素和甲矾霉素交叉反应率分别为 0.094% 和 0.098%, 与其它药物交叉反应率均小于 0.01%, 表明该方法具有很强的特异性。FFC 以浓度  $0.18 \sim 500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  在鸡肉中添加, 回收率为 84.14% ~ 106.1%, 变异系数为 2.1% ~ 5.6%。【结论】成功获得了高效价、高特异性的抗 FFC 抗体, 建立了鸡肉中氟苯尼考残留检测的 ELISA 方法。结果表明, 所建立的检测方法具有灵敏、准确、简便、快速的特点。

**关键词:** 氟苯尼考; 残留检测; 间接竞争 ELISA

## Establishment and Application of Detecting the Residues of Florfenicol in Chicken Muscle by Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

SUN Fa-liang, DIAO You-xiang, SUN Ning, MA Yan-fang, JI Wei

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong)

**Abstract:** 【Objective】 The purpose of the study is to obtain special antibody and develop competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ciELISA) for florfenicol. 【Method】 Florfenicol hapten was conjugated with the carrier proteins bovine serum albumin (BSA) as immunogen and with human serum albumin (HSA) as coating antigen, respectively, and the coupling ratio of FFC-HS-BSA was 14.4 and the coupling ratio of FFC-HS-HSA was 14.7. Polyclonal antibody against florfenicol was generated by immunizing rabbits with FFC-HS-BSA. 【Result】 The antiserum with high titer was 1 : 102 400. The indirect competitive ELISA revealed that the optimal concentration of rabbit serum was 1 : 6 400, the optimal concentration of coated antigen was  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , and the optimal concentration of sheep anti-rabbit IgG was 1 : 20 000. The regression equation was  $Y = -0.1516X + 0.788$  ( $R^2 = 0.9859$ ), the lowest detection limit was  $0.18 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , the linear range was from  $0.18 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  to  $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , and the coefficients of variation of intra-assay and inter-assay were respectively 4.86% and 7.77%. The antiserum had cross reactivity of 0.094% and 0.098% with chloramphenicol and thiamphenicol, respectively, but had cross reactivity of less than 0.01% with others. The recoveries in chicken ranged from 84.14% to 106.1%. 【Conclusion】 The antibodies with high titer and specificity were produced successfully and a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ciELISA) was developed for the detection of florfenicol residue in chicken. The results showed that the method is sensitive, accurate, convenient, and quick.

**Key words:** florfenicol; residue detection; indirect competitive ELISA

收稿日期: 2008-07-14; 接受日期: 2009-02-25

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2007D32)

作者简介: 孙法良 (1980—), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生, 研究方向为动物疫病病原分离鉴定与控制。Tel: 13581191824; E-mail: faliang2000@163.com。通信作者刁有祥 (1962—), 男, 山东胶州人, 教授, 研究方向为动物疫病病原分离鉴定与控制。Tel: 0538-8249222 转 8009; E-mail: yxdiao@sdau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】氟苯尼考 (florfenicol, FFC) 是一种新型的氯霉素类广谱抗生素, 主要用于治疗鱼、猪、牛及家禽的细菌性疾病。氟苯尼考在安全性和有效性方面比氯霉素和甲砒霉素有明显的优势, 已在养殖业中大规模使用, 在兽医临床上具有良好的应用前景。但是最近研究表明氟苯尼考具有胚胎毒性和耐药性, 在畜禽生产上大量的应用也导致其在畜禽产品中残留, 危害公众健康。中国、欧盟及美国均规定了动物组织中氟苯尼考最大残留限量。因此为了人类的健康, 有必要建立一种简便、快速、准确的检测方法来检测动物组织中氟苯尼考的残留。【前人研究进展】目前的检测方法主要有理化方法、免疫学方法和微生物学方法。微生物学方法简便、成本低, 但特异性较差, 灵敏度也较低。放射免疫学方法具有应用的同位素的半衰期短、存在放射污染和需要特殊仪器等缺点。理化方法研究较多, 主要有高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[1-2]</sup>、气相色谱法 (GC)<sup>[3]</sup>、液相色谱-质谱法 (LC-MS)<sup>[4-5]</sup> 和气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)<sup>[6-7]</sup> 等。这些方法对待测样品的前处理要求高且操作烦琐, 仪器化程度高且价格昂贵, 分析速度慢, 不适合在基层推广使用及大量筛选。【本研究切入点】以免疫抗体为基础的免疫检测技术, 克服了仪器分析方法的缺点。氟苯尼考是小分子物质, 本身没有免疫活性, 只有通过偶联合成人工抗原, 制备出高质量的抗体是酶联免疫检测方法建立的关键。【拟解决的关键问题】合成高质量的人工抗原, 免疫家兔制备高效价、高特异性的抗体, 建立并优化 ELISA 检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

HI9321 酸度计, 美国 HANNA 公司; 磁力搅拌器 (CJJ-781C 型), 上海浦江分析仪器厂; 透析袋 (27DM), 进口分装; U-3000 紫外扫描仪, 日本岛津; 722 光栅分光光度计, 日本岛津; 氟苯尼考、氯霉素等, 纯度 $\geq 99.0\%$ , Sigma 产品; 牛血清白蛋白 (BSA), 含量 $\geq 98\%$ , Pierce 分装; Sephadex G-200, Pharmacia 产品; 氯甲酸乙酯, AR 级, 江苏嘉隆化工有限公司; N, N-二甲基甲酰胺, AR 级, 天津市博迪化工有限公司; 三正丁胺, AR 级, 国药集团化学试剂有限公司; 丁二酸酐, AR 级, 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 人工抗原的合成与鉴定

采用混合酸酐法<sup>[8-9]</sup>制备 FFC-HS-BSA 免疫原和 FFC-HS-HSA 包被抗原, 用 SDS-PAGE 凝胶电泳和紫外扫描进行鉴定。

### 1.3 抗血清的制备

按参考文献 [10] 进行抗血清的制备。以 FFC-HS-BSA 作为免疫原, 先进行基础免疫, 免疫剂量为每千克兔子体重注射 0.8~1.0 mg 免疫原。3 周后加强免疫, 以后每隔 2 周加强免疫 1 次, 效价达到要求后, 心脏采血分离抗血清。用辛酸-硫酸铵法<sup>[11]</sup>和 DEAE 纤维素法<sup>[12]</sup>纯化抗血清, 加入终浓度为 0.01% 的叠氮钠, 分装 -70℃ 保存。

### 1.4 间接 ELISA 的建立

1.4.1 间接 ELISA 基本程序 参考文献 [13] 介绍的方法进行 ELISA 操作, 测定 OD<sub>490</sub> 值, 每个步骤之间均用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min; 在 OD<sub>490</sub> 值接近 1.0 时, P/N 值在 2.0 以上并呈现最大者的反应条件为确定 ELISA 反应条件的参考依据。

1.4.2 包被抗原和抗血清工作浓度的确定 用方阵法进行测定, 选择 OD<sub>490nm</sub> 值在 1.0 左右且与阴性血清 OD<sub>490nm</sub> 值相差最大的包被抗原和抗血清的浓度, 为 ELISA 反应的理想工作浓度。

1.4.3 抗原最佳包被时间的选择 以包被抗原最佳工作浓度包被, 分别按 4℃ 过夜、1、2、3 和 4 h (37℃), 以最佳抗血清稀释度进行 ELISA 测定, 根据其 OD<sub>490nm</sub> 值选择最佳包被时间。

1.4.4 封闭液和封闭时间的选择 不封闭, 1% 明胶、1% HSA、2% 明胶、5% 羊血清、5% 脱脂奶作为封闭液, 37℃ 分别封闭 1、2、3 和 4 h, 测其 OD<sub>490nm</sub> 值选择最佳封闭液和封闭时间。

1.4.5 酶标二抗稀释度和作用时间的选择 选择 1:10 000、1:15 000、1:20 000、1:25 000 稀释度, 37℃ 分别作用 0.5、1、1.5 和 2 h, 测其 OD<sub>490nm</sub> 值选择酶标二抗最适稀释度和作用时间。

1.4.6 抗原抗体最适竞争反应温度和时间的选择 选择温度 37℃ 和 40℃, 分别以 0.5、1、1.5 和 2 h, 进行竞争反应, 测其 OD<sub>490nm</sub> 值选择最佳的反应时间和温度。

1.4.7 底物显色时间和终止液浓度的选择 加底物后 5、15 和 25 min 分别用 0.5、1 和 2 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 测其 OD<sub>490nm</sub> 值选择最适底物显色时间和终止液浓度。

### 1.5 标准曲线的制作

根据上述优化的最佳条件, 进行间接竞争 ELISA

测定, 制备标准曲线。以系列稀释度 (1 000、500、200、100、10、1、0.1、0 ng·ml<sup>-1</sup>) 的 FFC 标准液建立测定梯度, 以各浓度 FFC(包括 0 ng·ml<sup>-1</sup>) 的 OD<sub>490nm</sub> 值转换 B/B<sub>0</sub> 值, 其中无 FFC 抑制时的 OD<sub>490nm</sub> 值为 B<sub>0</sub>, 各相应浓度的 FFC 抑制时的 OD<sub>490nm</sub> 值为 B, 以结合率 Y=B/B<sub>0</sub> 为纵坐标, 以 FFC 的对数为横坐标, 绘制标准曲线, 建立回归方程。最低检测限 (LOD) 为在标准曲线上 B<sub>0</sub>-2SD 所对应的 FFC 浓度 (SD 为 FFC 浓度为 0 时的标准误)。

### 1.6 精密度的测定

以批内误差和批间误差来表示该方法的精密度。FFC 的每一标准样品浓度在同一块板内作 4 次重复, 计算孔间变异系数表示批内误差; 用同等质量的不同酶标板重复操作 3 次, 计算批间变异系数表示批间误差。

### 1.7 交叉反应率的测定

选择与氟苯尼考结构和功能相近的氯霉素、甲砒霉素、磺胺二甲嘧啶、萘诺沙星、硫酸链霉素、庆大霉素、四环素、红霉素、卡那霉素、青霉素、诺氟沙星作为抗体交叉反应的竞争物。用竞争 ELISA 法测定抗血清对 FFC 的 50% 抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 和竞争物的 IC<sub>50</sub>, 交叉反应率 (%) = IC<sub>50</sub> (FFC) / IC<sub>50</sub> (竞争物) × 100%。

### 1.8 回收率的测定

取 7 份 5 g 匀浆的鸡肉, 加入 FFC 使终浓度为 500、200、100、10、1、0.18 ng·g<sup>-1</sup>。每份样品中加入 15 ml 乙胍水溶液 (84 : 16, v/v) 涡动 1 min, 摇床震动 10 min; 5 000 r/min 离心 10 min, 取 3 ml 上清液与 1 ml 0.5 mol·ml<sup>-1</sup> NaCl 溶液于玻璃管中混匀, 加入 3 ml 乙酸乙酯, 涡动 1 min, 静置至分层清晰, 吸弃下层水相, 将上层吹干; 残留物溶于 1 ml 正己烷, 再加入 1 ml PBS, 旋涡振荡 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 完全弃上层有机相, 取下层水相进行检测。按 1.4 的方法进行试验, 计算组织样本的添加回收率。

### 1.9 LC-MS 法与 ELISA 法比较

与国家标准 (GB/T 20756-2006) 规定的可食动物鸡肉、肝脏、鱼和虾中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的液相色谱-串联质谱测定方法相比。测定平行提取的标准添加肉样中氟苯尼考含量, 氟苯尼考标样浓度设置为 1、2、4 ng·g<sup>-1</sup>, 按工作曲线法计算标准添加回收率; 与平行进行的 LC-MS 法测定结果进行比较验证。

### 1.10 鸡肉样品的测定

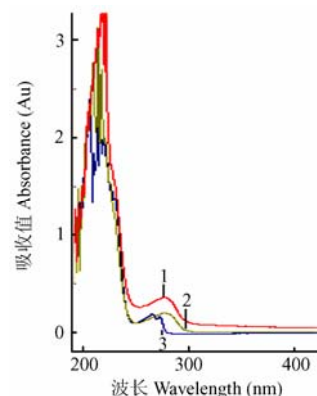
山东某肉联厂和山东某肉食品加工厂分别取 10

份不同批次的鸡肉, 按 1.8 的方法进行处理, 根据标准曲线计算样品中药物残留量。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工抗原的合成与鉴定

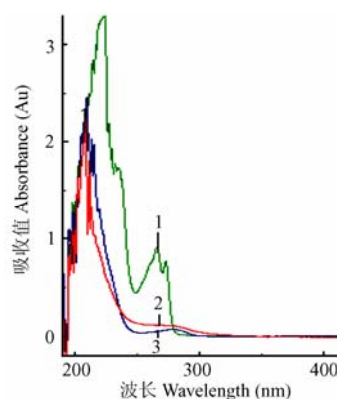
紫外扫描图谱 (图 1、图 2) 显示人工抗原的最大吸收峰既不同于载体, 也不同于半抗原, 另外人工抗原的紫外扫描图谱还显示有半抗原的特征性吸收峰出现, 说明交联反应成功。SDS-PAGE 电泳图 (图 3、图 4) 显示人工抗原泳动速度慢于 BSA, 说明人工抗原的分子量大于牛血清白蛋白, 进一步证明交联成功。用紫外光谱法<sup>[14]</sup>计算 FFC-HS-BSA 和 FFC-HS-HSA 的半抗原结合比分别是 14.4 和 14.7。



1: FFC-HS-BSA; 2: BSA ; 3: FFC

图 1 免疫原紫外扫描光谱图

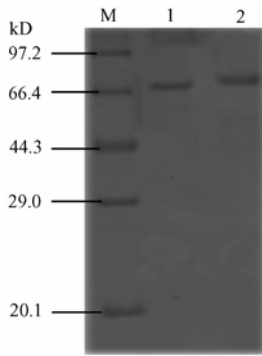
Fig. 1 UV scanning spectrum of the immunity antigen



1: FFC; 2: FFC-HS-HSA; 3: HSA

图 2 包被抗原紫外扫描光谱图

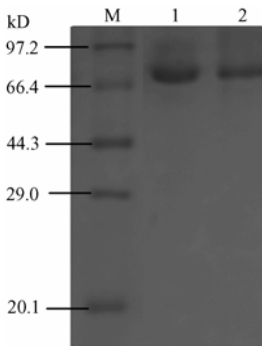
Fig. 2 UV scanning spectrum of the coating antigen



M: Maker; 1: BSA; 2: FFC-HS-BSA

图 3 免疫原 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE of the immunity antigen



M: Maker; 1: HSA; 2: FFC-HS-HSA

图 4 包被抗原 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of the coating antigen

## 2.2 ELISA 竞争条件优化

**2.2.1 抗血清效价、包被抗原和抗血清工作浓度** 通过 5 次加强免疫获得高效价的抗血清，包被抗原浓度为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  时，抗 FFC 血清效价为  $1:102\ 400$ 。包被抗原最佳包被浓度为  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，抗血清最适工作浓度为  $1:6\ 400$ 。

**2.2.2 包被抗原最佳包被时间的选择** 结果表明， $37^\circ\text{C}$  湿盒内包被 2 h 所得  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  为 1.02，且 P/N 的值最大，故选择  $37^\circ\text{C}$  包被 2 h 作为抗原最佳包被时间。

**2.2.3 封闭液和封闭时间的选择** 1% 明胶、1% HSA、2% 明胶封闭时使其阳性  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值低于不封闭，没有起到封闭作用；5% 羊血清、5% 脱脂奶封闭时  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值无明显差异，阳性值高于不封闭，阴性、空白对照值低于不封闭，起到较好的封闭效果，因为

脱脂奶比较廉价易得，故选择 5% 脱脂奶作为封闭液。5% 脱脂奶在封闭 2 h 时 P/N 值最高，故选择封闭时间为 2 h。

**2.2.4 酶标二抗稀释度和作用时间的选择** 酶标二抗稀释  $1:20\ 000$ ， $37^\circ\text{C}$  作用 1 h 时，阳性  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值最接近 1，空白、阴性对照  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值最低，P/N 值最大，故选择酶标二抗稀释度为  $1:20\ 000$ ，作用时间为 1 h。

**2.2.5 抗原抗体最适竞争反应温度和时间** 当  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值在 1.0 左右时，所对应的是  $37^\circ\text{C}$  1 h 和  $40^\circ\text{C}$  0.5 h，为了节约时间，故选择  $40^\circ\text{C}$  0.5 h 作为抗原抗体最适竞争反应温度和时间。

**2.2.6 底物显色时间和终止液浓度的选择** 结果表明显色 15 min 后加入  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$  的  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值最大，且 P/N 也最大，故选择底物显色时间为 15 min，终止液浓度为  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 。

## 2.3 标准曲线

试验数据（表 1），绘制标准曲线（图略）得到线性回归方程为  $Y = -0.1516X + 0.788$  ( $R^2 = 0.9859$ )， $\text{IC}_{50} = 79.3 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，最低检测限 (LOD) =  $0.18 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，线性范围为  $0.18 \sim 500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

表 1 FFC ci-ELISA 检测

Table 1 The results of ci-ELISA of FFC

FFC ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$\text{OD}_{490\text{nm}}$	B/B <sub>0</sub>	Ig[FFC]
1000	0.293	0.285	3.0
500	0.412	0.400	2.7
200	0.460	0.447	2.3
100	0.520	0.505	2
10	0.659	0.640	1
1	0.832	0.809	0
0.1	0.941	0.914	-1
0	1.029	1	1

## 2.4 精密度的确定

由抗血清建立的标准曲线批内、批间变异系数见表 2。可见，在线形范围内各个标准浓度 B/B<sub>0</sub> 的批内变异系数在 2.61%~7.08%，批间变异系数在 4.60%~10.5%。

## 2.5 交叉反应率的测定

测定结果表明，抗 FFC 抗体与氟苯尼考类似物如氯霉素、甲砒霉素的交叉反应率分别为 0.094% 和 0.098%，与其它药物的交叉反应率  $<0.01\%$ （表 3）。由

表 2 各标准浓度下的结合率及变异系数

Table 2 B/B<sub>0</sub> and intra-assay and inter-assay CV

FFC 浓度 Concentration (ng·ml <sup>-1</sup> )	批内误差 Intra-assay			批间误差 Inter-assay		
	均值 B/B <sub>0</sub>	SD	CV%	均值 B/B <sub>0</sub>	SD	CV%
500	0.401	0.026	6.48	0.411	0.043	10.5
200	0.452	0.032	7.08	0.450	0.038	8.44
100	0.508	0.027	5.31	0.503	0.032	6.36
10	0.642	0.024	3.74	0.638	0.062	9.72
1	0.804	0.021	2.61	0.813	0.057	7.01
0.18	0.912	0.036	3.95	0.914	0.042	4.60
平均值 Mean			4.86			7.77

表 3 抗菌药物与氟苯尼考的交叉反应率

Table 3 Cross reactivity of florfenicol and antibiotics

抗菌药物 Antibiotics	抑制中浓度 IC <sub>50</sub> (ng·ml <sup>-1</sup> )	交叉反应率 Cross reactivity (%)
氟苯尼考 Florfenicol	79.3	100
氯霉素 Chloramphenicol	84620	0.094
甲砜霉素 Thiamphenicol	80929	0.098
磺胺二甲嘧啶 Sulfadimidine	>10 <sup>6</sup>	<0.01
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	>10 <sup>6</sup>	<0.01
庆大霉素 Gentamicin	>10 <sup>6</sup>	<0.01
卡那霉素 Kanamycin	>10 <sup>6</sup>	<0.01
四环素 Tetracycline	>10 <sup>6</sup>	<0.01
红霉素 Erythromycin	>10 <sup>6</sup>	<0.01
青霉素 Penicillin G	>10 <sup>6</sup>	<0.01
诺氟沙星 Norfloxacin	>10 <sup>6</sup>	<0.01
恩诺沙星 Enrofloxacin	>10 <sup>6</sup>	<0.01

此可知, 该抗体的特异性强。

## 2.6 回收率的测定

从表 4 可知当鸡肉中添加的 FFC 浓度在 0.18~500 ng·g<sup>-1</sup> 范围内时, 药物能较好地回收, 回收率为 84.14%~106.1%, 变异系数为 2.1%~5.6%。

表 5 鸡肉中氟苯尼考含量 LC-MS 法与 ELISA 法测定的比较

Table 5 Comparison between LC-MS and ELISA of florfenicol in chicken muscle

添加 FFC 浓度 Added FFC (ng·g <sup>-1</sup> )	ELISA 法测定 ELISA method		LC-MS 法测定 LC-MS method	
	平均回收率 Recovery (%)	CV%(n=3)	平均回收率 Recovery (%)	CV%(n=3)
1	93.7	2.5	99.0	5.3
2	98.4	2.1	100.0	4.3
4	88.5	3.4	108.0	7.4

表 4 FFC 在鸡肉中的添加回收率 (n=6)

Table 4 Recovery rates of FFC added in chicken muscle

添加浓度 Added FFC (ng·g <sup>-1</sup> )	检测浓度 FFC detected (ng·g <sup>-1</sup> )	回收率 Recovery (%)	变异系数 CV (%)
0	<0.18	0	0
0.18	0.191	106.1	5.6
1	1.032	103.2	5.2
10	9.374	93.74	2.5
100	98.45	98.45	2.1
200	177.0	88.50	3.4
500	420.7	84.14	4.2

## 2.7 鸡肉中氟苯尼考含量 ELISA 与 LC-MS 分析结果的比较

ELISA 法与 LC-MS 法测定标准添加回收率结果见表 5。上述表明: ELISA 法测定氟苯尼考的标准添加回收率 >84%, 与 LC-MS 法分析结果相吻合, 方法的准确和精密度符合残留分析的要求。

## 2.8 样品测定结果

20 份鸡肉中氟苯尼考残留的检测结果见表 6。由表 6 数据可知氟苯尼考最大检测含量为 305 ng·g<sup>-1</sup>, 山东某肉食品加工厂鸡肉合格率较高, 而山东某肉联厂鸡肉合格率较低。

表 6 20 份鸡肉中 FFC 检测

Table 6 The result of FFC detection in chicken muscle

鸡肉的来源 Source of chicken muscle	氟苯尼考的残留量 Value of FFC residues (ng·g <sup>-1</sup> )									
山东某肉联厂 A shandong meat product factory	305	236	186	102	84	37	1.2	0	0	0
山东某肉食品加工厂 A shandong meat processing factory	246	102	73	21	0.4	0	0	0	0	0

### 3 讨论

对于制备小分子物质抗体来说,人工抗原的合成是关键的一步,抗原的质量直接决定着抗体的效价和特异性。氟苯尼考是一种半抗原,本身并不具备免疫原性,必须将其与载体蛋白偶联生成人工抗原才具有免疫原性。由于氟苯尼考分子结构上既无羧基又无氨基,不能直接与蛋白相联,必须先进行结构改造。本试验采用混合酸酐法,先将 FFC 与琥珀酸酐反应,接上羧基臂,制得中间体 FFC-HS,然后将 FFC-HS 与 BSA (HSA) 通过酰胺键相连,生成 FFC-HS-BSA (FFC-HS-HSA) 偶联物。此法的优点是中间体合成条件比较温和,产物易得。采用混合酸酐法形成酰胺键,反应的专一性高,而且在 4℃ 条件下合成,避免了蛋白质发生变性反应。在制备人工抗原后经免疫兔子获得了高效价的抗氟苯尼考抗体。

氟苯尼考免疫学检测方法中,预想所得抗体与氟苯尼考结构类似物可能存在不同程度的交叉反应<sup>[15]</sup>,会对阳性结果的判断带来干扰。但交叉反应试验结果表明,本研究制备的抗体对其它的结构类似物没有明显的交叉反应,反应率小于 0.1%,表明所获得抗体特异性强。该抗体对氟苯尼考有较宽的检测范围,其最低检测浓度可达 0.18 ng·ml<sup>-1</sup>,优于目前国家标准使用液相色谱-质谱法 (LC-MS) 测定肌肉中氟苯尼考的最低检测限度 (LOD = 1.0 ng·g<sup>-1</sup>)。而且免疫学检测方法具有分析时间短、灵敏度高、特异性强、样品预处理简单等优点<sup>[16-17]</sup>,适宜对现场及实验室大批量样品进行快速筛选。目前尚没有报道氟苯尼考的 ELISA 检测方法,而氯霉素的 ELISA 检测方法报道较多,与郭逸蓉建立的氯霉素 ELISA 检测试剂盒(检测的线性范围为 0.24~250 ng·ml<sup>-1</sup>,检测限(LOD)为 0.47 ng·ml<sup>-1</sup>,样品的添加回收率为 70%~130%)相比,本研究建立的氟苯尼考 ELISA 检测方法具有较高的准确度、精密性、灵敏度。为下一步研制自主知识产权的试剂盒打下了基础。

### 4 结论

本研究建立的氟苯尼考残留 ELISA 检测方法最

低检测限 (LOD) = 0.18 ng·ml<sup>-1</sup>, 中值 (IC<sub>50</sub>) = 79.3 ng·ml<sup>-1</sup>, 低于目前常规检测方法的检测限,并且远远低于中国规定的氟苯尼考在食品中的最高残留限量<sup>[18]</sup>

(MRL) = 100 μg·kg<sup>-1</sup>; 在 0.18~500 ng·ml<sup>-1</sup> 范围内,线性关系良好 ( $R^2 = 0.9859$ ), 检测范围宽; 平均批内 CV 为 4.86%, 平均批间 CV 为 7.77%; 在鸡肉中添加 FFC 浓度为 0.18~500 ng·g<sup>-1</sup> 时,回收率为 84.14%~106.1%, 变异系数为 2.1%~5.6%。这些数据表明本试验建立氟苯尼考残留检测 ci-ELISA 方法的准确度、精密性、灵敏度较高,符合现行兽药残留分析的要求。

### References

- [1] Vue C, Schmidt L J, Stehly G R, Gingerich W H. Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. *Journal of Chromatography B*, 2002, 780: 111-117.
- [2] Intorre L, Castells G, Cristofol C, Bertini S, Soldani G, Arboix M. Residue depletion of thiamphenicol in the sea-bass. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 25(1): 59-63.
- [3] Githiga I M, Muchohi S N, Ogutu B R. Determination of paraldehyde by gas chromatography in whole blood from children. *Journal of Chromatography B*, 2004, 805: 365-369.
- [4] 彭涛, 李淑娟, 储晓刚, 蔡云霞, 李重九. 高效液相色谱/串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量. *分析化学*, 2005, 33(4): 463-466.  
Peng T, Li S J, Chu X G, Cai Y X, Li C J. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in shrimp by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33(4): 463-466. (in Chinese)
- [5] Zhang S X, Liu Z W, Guo X, Cheng L L, Wang Z H, Shen J Z. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2008, 875: 399-404.
- [6] 贺利民, 曾振灵, 黄显会, 刘文字, 刘戎. 气相色谱-质谱联用法测定猪肉组织中氟苯尼考残留. *华南农业大学学报*, 2005, 26(3): 100-102.

- He L M, Zeng Z L, Huang X H, Liu W Z, Liu R. Determination of florfenicol residues in pork by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of South China Agricultural University*, 2005, 26(3): 100-102. (in Chinese)
- [7] Li P, Qiu Y M, Cai H X, Kong Y, Tang Y Z, Wang D N, Xie M X. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, 24(1): 14-18.
- [8] 郝凯, 过世东, 胥传来. 水产中甲砒霉素的 CELISA 检测方法研究. *食品工业科技*, 2006, 27(2): 186-189.
- Hao K, Guo S D, Xu C L. A CELISA method for the determination of thiamphenicol residues in aquatic products. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(2): 186-189. (in Chinese)
- [9] 郭逸蓉, 桂文君, 王姝婷, 朱国念. 氯霉素 ELISA 检测试剂盒的研制及其性能测试. *中国食品学报*, 2007, 7(6): 118-123.
- Guo Y R, Gui W J, Wang S T, Zhu G N. Development and performance measurement of chloramphenicol ELISA test kit. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, 7(6): 118-123. (in Chinese)
- [10] 李方实, 孙峰, 刘贤进, 崔恒华. 抗异丙隆多克隆抗体的研制. *中国农业科学*, 2007, 40(2): 298-303.
- Li F S, Sun F, Liu X J, Cui H H. Development of anti-isoproturon polyclonal antibody. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(2): 298-303. (in Chinese)
- [11] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. *现代生物学实验*. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- Lin J H, Wei W L, Peng X X. *Modern Biological Experiment*. Beijing: China Higher Education Press, 2001. (in Chinese)
- [12] 滑静, 徐修远, 于同泉, 孙英健. 氯霉素人工抗原的合成及多克隆抗体的制备. *动物科学与动物医学*, 2004, 21(4): 30-31.
- Hua J, Xu X Y, Yu T Q, Sun Y J. Hapten and antiserum for chloramphenicol immunoassay. *Animal Science and Veterinary Medicine*, 2004, 21(4): 30-31. (in Chinese)
- [13] 岳磊, 单国强, 刘雅红, 贺利民, 张琴. 乙烯雌酚特异性抗体的制备. *中国农业科学*, 2008, 41(5): 1524-1529.
- Yue L, Shan G Q, Liu Y H, He L M, Zhang Q. Development of antibodies against diethylstilbestrol. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(5): 1524-1529. (in Chinese)
- [14] 袁利鹏, 孙远明, 雷红涛, 沈玉栋, 黄晓钰, 潘科, 黄杰. 沙丁胺醇人工抗原合成及鉴定研究. *食品科学*, 2006, 27(12): 276-280.
- Yuan L P, Sun Y M, Lei H T, Shen Y D, Huang X Y, Pan J, Huang J. Synthesis and identification for salbutamol artificial antigen. *Food Science*, 2006, 27(12): 276-280. (in Chinese)
- [15] Peng C F, Chen Y W, Chen W, Xu C L, Kim J M, Jin Z Y. Development of a sensitive heterologous ELISA method for analysis of acetylgestagen residues in animal fat. *Food Chemistry*, 2008, 109: 647-653.
- [16] Gaudin V, Cadieu N, Sanders P. Results of a European proficiency test for the detection of streptomycin/ dihydrostreptomycin, gentamicin and neomycin in milk by ELISA and biosensor methods. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529: 273-283.
- [17] Wang X L, Li K, Shi D S, Jin X E, Xiong N, Peng F H, Peng D P, Bi D R. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid detection of sulfadiazine in eggs and chickens. *Journal of Chromatography B*, 2007, 847: 289-295.
- [18] 吴永宁, 邵兵, 沈建忠. *兽药残留检测与监控技术*. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- Wu Y N, Shao B, Shen J Z. *Inspection and Monitoring Technology of Veterinary Drug Residues*. Beijing: Chemical Industry Press, 2007. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)