

磺胺甲噁唑残留检测阻断 ELISA 试剂盒的研制

刘宣兵^{1,2},张改平¹,王 斌³,滕 曼¹,邓瑞广¹,侯玉泽²,邢广旭¹,杨继飞¹

(1. 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002;2. 河南科技大学 食品与生物工程学院,河南 洛阳 471003;3. 山东诸城城市供排水管理处,山东 诸城 262200)

摘要:在建立磺胺甲噁唑单克隆抗体(SMZmAb)杂交瘤细胞株和阻断 ELISA 方法的基础上,研制出 SMZ 残留快速检测试剂盒(SMZ- Kit),并对其性能进行了测定。结果表明,SMZ- Kit 的标准曲线呈典型的 S 型,符合 4 参数 logit 曲线拟合,相关系数 $R^2 = 0.9901$,检测范围为 $1.0 \sim 128.0 \mu\text{g/L}$,灵敏度为 $0.73 \mu\text{g/L}$,半数抑制浓度(IC_{50})为 $11.5 \mu\text{g/L}$,检测限为 $1.0 \mu\text{g/L}$;饲料样、牛奶样的平均添加回收率为 83.9%,83.3%,平均批内和批间变异系数均 $< 15\%$;SMZ- Kit 与磺胺嘧啶的交叉反应(CR%)为 2.88%,与其他磺胺类药物无交叉反应;试剂盒在 4℃ 可保存 6 个月。

关键词:磺胺甲 噁;单克隆抗体;阻断 ELISA;快速检测试剂盒

中图分类号:S859.84 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2009)02-0001-04

Development of Rapid Test Blocking ELISA Kit for Sulfamethoxazole Residues

LIU Xuan - bing^{1,2},ZHANG Gai - ping¹,WANG Bin³,TENG Man¹,
DENG Rui - guang¹,HOU Yu - ze²,XING Guang - xu¹,YANG Ji - fei¹

(1. Henan Key Laboratory for Animal Immunology, Agriculture Academy of Henan Province, Zhengzhou 450002, China;
2. Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;
3. Zhucheng City Administrative Office of Supply - discharge Water, Zhucheng 262200, China)

Abstract: A ELISA kit for detection of Sulfamethoxazole (SMZ - Kit) was developed with generating hybridoma lines that secrete SMZ monoclonal antibodies (SMZmAb) and the method of blocking ELISA, its traits were identified. The calibration curve of SMZ - Kit was typical sigmoid curve fitted to the four parameter logistic equation with the linear detection of 1.0 to $128.0 \mu\text{g/L}$ ($R^2 = 0.9901$), the sensitivity of $0.73 \mu\text{g/L}$, the IC_{50} of $11.5 \mu\text{g/L}$ and the detection limit of $1.0 \mu\text{g/L}$. The recoveries of SMZ spiked in feed were 83.9% and in milk were 83.3%. The precision and accuracy of the assay as determined by inter - assay and intra - assay coefficient variation were below 15%. The SMZ - Kit had 2.88% cross - reactivity towards Sulfadiazine (SD) and little or no cross - reactivity towards other Sulfonamides. The validity of SMZ - Kit in 4℃ was above six months.

Key words: Sulfamethoxazole; Monoclonal antibody; Blocking ELISA; Rapid test kit

磺胺甲噁唑(Sulfamethoxazole, SMZ)是一种中效磺胺类药物,在兽药临床中用于呼吸道和泌尿系统疾病的治疗,现多与甲氧苄啶合用,称为复方磺胺甲噁唑(又名复方新诺明),在畜禽疾病的控制和治疗中发挥着重要的作用^[1]。然而,近年来磺胺类药物的不合理使用带来许多不良后果,动物源性食品中的药物残留对人类身体健康具有潜在危害性,这已引起国内外的高度重视。我国农业部 2002 年发布的《动物性食品中兽药最高残留量》中规定了动物性食品中磺胺药最大残留量为 $0.1 \mu\text{g/g}$ ^[2]。免疫学分

析方法不仅灵敏、快速、特异、简便,同时还具有操作检测成本低,可用于大批量样品检测等特点,近年来国内外在兽药残留检测领域已被广泛应用^[3]。为了建立快速、敏感、特异的 SMZ 免疫检测方法,本试验应用 SMZ 单克隆抗体,研制成功了 SMZ 快速检测试剂盒。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与溶液 磺胺甲噁唑,磺胺嘧啶、磺胺

收稿日期:2008-12-11

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A21)

作者简介:刘宣兵(1982-),男,山东诸城人,硕士,主要从事兽药残留检测与食品安全研究。

通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士生导师,主要从事动物免疫学和兽药残留研究。

喹啉、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、Sigma 产品,人工免疫原(BSA-SMZ)、包被抗原(OVA-SMZ)、羊抗鼠酶标二抗(GaMIgG-HRP)、抗 SMZmAb3C6 株,河南省农科院动物免疫学重点实验室制备、鉴定并冻存;其他试剂市售所得,AR 级。试验用水为超纯水。

SMZ 标准液,用 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)进行稀释配制 SMZ 标准品,浓度分别为 0,1,2,4,8,16,32,64,128 $\mu\text{g/L}$ 共 9 个;洗液(PBST)为 PBS 含 0.05% Tween-20;包被液(CBS)为 0.1 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液;阻断 ELISA 的封闭液、稀释液为含 5% 猪血清的 PBST;酶底物为 TMB 的醋酸-柠檬酸缓冲液;终止液为 2 mol/L 硫酸。

1.1.2 主要仪器 DU-600 核酸蛋白分析仪,德国 BECKMAN 公司;550 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;AE260 电子天平,德国 METTLER 公司;HI9321 酸度计,美国 HANNA 公司;3K-18 高速冷冻离心机,德国 SIGMA 公司;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 SMZ-Kit 的研制

1.2.1.1 SMZmAb 与 GaMIgG-HRP 最佳工作浓度的确定 用方阵滴定法^[4]测定阻断 ELISA 试剂盒中 SMZmAb 和 GaMIgG-HRP 的工作浓度。先将 OVA-SMZ 用 CBS 稀释包被于酶标板,用封闭液将 mAb 和 GaMIgG-HRP 分别稀释成不同浓度,每个 mAb 浓度均与不同浓度的 GaMIgG-HRP 进行结合反应,酶标仪读取各孔 OD_{450} 值,选择 OD_{450} 值为 1.0 左右时 mAb 与 GaMIgG-HRP 的浓度为最佳工作浓度。

1.2.1.2 阻断 ELISA 方法的建立 在确定了最优化的 SMZmAb 与 GaMIgG-HRP 工作浓度的基础上,用阻断 ELISA 测定 SMZ mAb 对 SMZ 的抑制效价,基本程序参照 Tijssen^[5]的方法。

1.2.1.3 标准曲线的绘制与曲线拟合 用阻断 ELISA 测定 mAb 对不同浓度 SMZ 标准品的抑制率,以吸光率 B/B_0 (B 是 SMZ 不同标准浓度的 OD_{450} 值, B_0 是 SMZ 标准浓度的 OD_{450} 值)为纵坐标,以不同标准品浓度的对数值为横坐标 Q ,在半对数坐标纸上绘制标准曲线,推导出回归方程,进行相关回归分析。

1.2.1.4 SMZ-Kit 的配置 SMZ-Kit 的主要组成为 OVA-SMZ 包被并封闭好的 8×12 孔酶标板, C1 号液(最佳工作浓度的 mAb), C2 号液(最佳工作浓度的 GaMIgG-HRP), C3 号液(底物缓冲液 A), C4 号液(底物缓冲液 B), C5 号液(终止液), SMZ 标准

品 1~9, PBST 等。

1.2.2 样品预处理及 SMZ-Kit 的操作方法与结果判断

1.2.2.1 样品预处理 待测样品的预处理 饲料样:用研钵研碎饲料样品,称取 10.0 g,加入 40 mL PBS 和 5 mL 1 mol/L NaOH 溶液,充分搅拌 30 min, 4 000 r/min 离心或双层滤纸过滤,上清液或滤液用 1 mol/L HCl 调 pH 值 7.2~7.4, 70~80 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌加热 5 min,冷却至室温后用于检测,处理后的样品已稀释 5 倍,测定结果相应扩大 5 倍。牛奶样:鲜牛奶 4 5 000 r/min 离心 10 min 脱脂后可直接用于检测。

1.2.2.2 SMZ-Kit 的操作方法 第一步,根据待测样品数量取出所需酶标板并标记对照孔和样品孔,样品孔加入 C1 号液和待测样品各 50 μL (对照孔加 PBST),室温孵育 25 min, PBST 洗 6 次;第二步,每个样品孔加入 C2 号液 50 μL ,室温孵育 35 min, PBST 洗 6 次;第三步,每孔加入 C3、C4 号混合液 50 μL ,室温反应 10 min,加入 C5 号液 50 μL 终止反应;第四步,用酶标仪读取各孔 OD_{450} 值。

1.2.2.3 结果判定 根据各样品的 B/B_0 值在标准曲线上求出其对应的质量浓度,或代入回归方程计算样品质量浓度的对数值 x ,求其反对数,即为样品中所含 SMZ 的质量浓度。

1.2.3 SMZ-Kit 的性能测定

1.2.3.1 灵敏度 阻断 ELISA 测定 8 个不同批次的空白标准品,计算 OD_{450} 值的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD),按照公式 $\text{LOD} \% = (\bar{X} - 2\text{SD}) / \bar{X} \times 100 \%$ ^[6] 进行计算,在标准曲线上查出对应的 SMZ 的质量浓度为该试剂盒理论上的检测下限 (LOD),该浓度即为灵敏度。

1.2.3.2 准确度 准确度是指测定值与真实值的符合程度,用添加回收试验进行测定。将 SMZ 标准品添加到饲料样、牛奶中,使终浓度分别为 2, 8, 32, 128 $\mu\text{g/L}$,每个浓度设 5 个重复,以回收率和变异系数确定其准确度。

1.2.3.3 精密度 精密度是指同一样品多次测定结果的变化程度,反映测定结果的可重复性,以批内误差和批间误差来表示。取不同批次的 5 批试剂盒,分别在 5 d 测定 SMZ 浓度为 2, 8, 32, 128 $\mu\text{g/L}$ 的饲料样、牛奶样,每个浓度设 5 个重复,以批内和批间变异系数确定其精密度。

1.2.3.4 特异性 mAb 的特异性决定了 SMZ-Kit 的交叉反应性,选择 SMZ 及其他磺胺类药物作为抑制物,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 mAb 对 SMZ 的 IC_{50} 与各抑制物的 IC_{50} 之比的百分数为其交

叉反应率(CR %)。

1.2.3.5 时间稳定性 取同一批次的试剂盒,保存于4℃,观察保存6个月中各月份的检测结果,应用4参数logit法计算曲线的相关系数,确定试剂盒的时间稳定性。

2 结果与分析

2.1 阻断 ELISA 方法的建立

方阵法确定 SMZ mAb 与 GaMlgG- HRP 的工作浓度分别为 10⁴、10³。SMZ- Kit 标准曲线见图 1,曲线呈典型的 S 型,符合 4 参数 logit 曲线拟合,回归方程为 $y = -0.2952x + 0.8132$,相关系数为 $R^2 = 0.9901$,IC₅₀为 11.5 μg/L。

2.2 灵敏度测定

8 个空白标准品平均值 $\bar{X} = \sum Xi / n = 1.038$,标准方差 $S = \{[n \times \sum X^2 - (\sum X)^2] / [n \times (n - 1)]\}^{1/2} = 0.076$,LOD = $(\bar{X} - 2S) / X = 0.854$,代入曲线回归方程计算出 LOD = 0.73 μg/L,即灵敏度为 0.73 μg/L,根据实际工作需要,SMZ- Kit 的检测限确定为

1.0 μg/L。

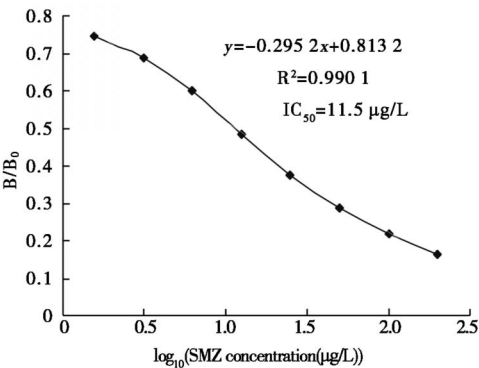


图 1 阻断 ELISA 检测 SMZ IC₅₀

Fig. 1 IC₅₀ inhibitive curve of SMZ mAb by blocking ELISA

2.3 准确度测定

结果见表 1,饲料样的回收率在 82.0 % ~ 85.5 %,平均 83.9 %,变异系数在 8.6 % ~ 10.8 %,平均 9.85 %;牛奶样的回收率在 80.4 % ~ 88.8 %,平均 83.3 %,变异系数在 7.9 % ~ 12.3 %,平均 9.43 %;平均变异系数均小于 15 %,表明 SMZ- Kit 具有较高的准确度。

表 1 SMZ- Kit 添加不同样品回收试验

Tab.1 Recovery test of SMZ added to different samples by SMZ- Kit(n = 5)

样品 Sample	SMZ 添加量/ (μg/L) Amount of SMZ	测定值/ (μg/L) Measured value	回收率/ % Recovery	变异系数/ % CV
饲料样 Feed	2	1.71 ±0.18	85.5 ±9.0	10.3
	8	6.56 ±0.87	82.0 ±10.9	10.8
	32	26.78 ±3.12	83.7 ±9.8	9.7
	128	107.85 ±11.34	84.3 ±8.9	8.6
牛奶样 Milk	2	1.63 ±0.23	81.5 ±11.5	12.3
	8	6.43 ±0.67	80.4 ±8.4	7.9
	32	26.4 ±3.05	82.5 ±9.3	9.3
	128	113.6 ±10.12	88.8 ±7.9	8.2

2.4 精密度测定

结果见表 2,饲料样、牛奶样的平均批内变异系数分别为 10.8 %,9.95 %,平均批间变异系数分别为

6.85 %,7.4 %,平均批间变异系数均小于平均批内变异系数,且不超过 15 %,表明 SMZ- Kit 具有较高的精密度。

表 2 SMZ- Kit 检测不同样品的精密度

Tab.2 Precision of SMZ measurement from different samples by SMZ- Kit(n = 5)

样品 Sample	SMZ 添加量/ (μg/L) Amount of SMZ	批次 Batch	测定值/ (μg/L) Measured value	变异系数/ %CV	
				批内 Inner batch	批间 Among batch
饲料样 Feed	2	5	1.67 ±0.28	9.4	7.2
	8	5	6.37 ±1.06	11.6	6.6
	32	5	25.7 ±2.98	8.8	6.4
	128	5	103.8 ±10.83	13.1	7.8
牛奶样 Milk	2	5	1.75 ±0.19	10.4	8.5
	8	5	6.62 ±0.76	9.7	6.4
	32	5	24.9 ±3.45	11.2	7.2
	128	5	115.3 ±11.47	9.3	8.3

2.5 特异性测定

测定结果表明(表 3),SMZ- Kit 对 SMZ 的 IC₅₀为

11.5 μg/L,说明 SMZ- Kit 与 SMZ 可特异性结合;除与磺胺嘧啶交叉反应率为 2.88 %外,与其他磺胺类

交叉反应率均小于 0.5 %。

2.6 保存期测定

结果见表 4 ,随着 SMZ - Kit 保存期延长 ,各标准品

的 OD₄₅₀ 值有所减小 ,但其 IC₅₀、R² 变化不大 ,曲线拟合良好 ,说明 SMZ - Kit 在 4 - 6 个月保存期内质量稳定。

表 3 SMZ mAb 与 SMZ 类似化合物的交叉反应

Tab.3 The cross - reactivity of SMZ mAb with SMZ analogous		
化合物 Compounds	半数抑制浓度/ (μg/L) IC ₅₀	交叉反应性/ % Cross - reactivity
磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole (SMZ)	11.5	100
磺胺嘧啶 Sulfadiazine (SD)	400	2.88
磺胺喹噁啉 Sulfaquinoxaline (SQ)	>8 ×10 ³	<0.5
磺胺一甲基嘧啶 Sulfamerazine (SM1)	>8 ×10 ³	<0.5
磺胺二甲基嘧啶 Sulfamethazine (SM2)	>8 ×10 ³	<0.5
磺胺二甲氧嘧啶 Sulfadimethoxine (SDM)	>8 ×10 ³	<0.5
磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine (SMM)	>8 ×10 ³	<0.5

表 4 SMZ - Kit 的时间稳定性

Tab.4 Validity of SMZ - Kit(n = 5)			
保存时间 Conservation time	半数抑制 浓度/ (μg/L) IC ₅₀	相关系数 R ²	最大吸 光值 A _{max}
1 d	11.5	0.990 1	1.068
1 个月	11.9	0.985 6	0.986
2 个月	10.9	0.989 1	0.915
3 个月	12.9	0.991 2	0.893
4 个月	12.5	0.978 9	0.814
5 个月	13.1	0.992 1	0.748
6 个月	12.3	0.987 5	0.675

测游离抗原 ,Ag * 为包被抗原 ,mAb 为半抗原的特异性单克隆抗体 ,AgmAb 为游离抗原与特异性抗体复合物 ,Ag * mAb 为包被抗原与特异性抗体复合物。将 Ag * 包被于固相载体 ,Ag * 与 Ag 共同竞争 mAb 上的有限位点 ,反应达到平衡后洗脱多余的 Ag 与 Ag * ,用 HRP 及其底物显色系统显示 AgmAb、Ag * mAb 的结合情况 ,进而定量检测。经反复试验证实 ,本试验系统准确度高、重复性好、特异性强 ,可用于 SMZ 残留检测。

3 讨论

3.1 关于 SMZmAb 的免疫学特性

高价、敏感、特异的 mAb 是建立免疫学分析方法的关键 ,本试验应用重氮化法制备了分子结合比为 1 19.1 的免疫原 BSA - SMZ ,4 次免疫 BALB/ C 小鼠后应用细胞融合技术筛选出 3 株杂交瘤 ,选择其中最好的 3G6 株制备 SMZmAb ,经鉴定 ,SMZmAb 间接 ELISA 效价细胞上清为 1 8.1 ×10² ,腹水为 1 6.4 ×10⁵ ,K_a 为 3.25 ×10⁹ L/ mol ,IC₅₀ 为 11.5 μg/ L ,与磺胺嘧啶交叉反应率为 2.88 % ,与其他磺胺类无叉反应 ,本试验制备出了高价、敏感、特异 SMZ mAb。

3.2 关于阻断 ELISA 方法的建立

ELISA 法具有快速、特异、敏感等优点^[7,8] ,小分子免疫分析一般采用 ELISA 法 ,根据抗原抗体反应动力学原理 ,ELISA 分为竞争和非竞争两种 ,每种又可分为均相与非均相两种模式 ,本试验采用非均相间接竞争 ELISA 模式 ,可表示为 :Ag + Ag * + mAb = AgmAb + Ag * mAb + Ag + Ag * + mAb ,式中 Ag 为待

参考文献 :

[1] 陈新谦 ,金有豫.新编药理学[M].北京 :人民卫生出版社 ,1999.

[2] 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量[J].中国兽药杂志 ,2003 ,37(4) :15 - 20.

[3] Sherma J. Current status of pesticide residue analysis[J].J AOAC Int ,1997 ,80(4) :283 - 287.

[4] 朱立平 ,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京 :人民军医出版社 ,2000 :356 - 357.

[5] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay[M]. Amsterdam :Elsever ,1985 :173 - 210.

[6] 沈建忠 ,何方洋 ,何继红 ,等.动物组织中磺胺二甲嘧啶残留检测 ELISA 试剂盒的研制[J].中国兽医杂志 ,2003 ,39(6) :6 - 8.

[7] Conaway J E. New trends in analytical technology and methods for pesticide residue analysis[J].J AOAC Int ,1991 ,74 (5) :715 - 717.

[8] 席俊 ,张改平 ,王选年 ,等.1BDV 地方野毒株 (XX 株) VP₂ 基因高变区的克隆与序列分析[J].河南农业科学 ,2008(4) :104 - 107.