

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610041453.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 21 日

[11] 公开号 CN 1916631A

[22] 申请日 2006.9.5

[21] 申请号 200610041453.4

[71] 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

[72] 发明人 王宗元 王捍东 杨春花 彭会建
唐 娜 刘学忠 卞建春 任建新

[74] 专利代理机构 扬州市锦江专利事务所
代理人 江 平

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 3 页

[54] 发明名称

磺胺-5-甲氧嘧啶含量的酶联免疫检测方法

[57] 摘要

磺胺-5-甲氧嘧啶含量的酶联免疫检测方法，涉及食品中兽药残留安全检测技术领域，特别是用于筛选、定量检测市场上奶、肉、蛋等动物类食品中残留 SMD 定性和定量。本发明用免疫方法把半抗原 SMD 变为全抗原，制备特异性抗体，由于酶的催化效率高，可极大地放大反应效果，从而使测定方法达很高的敏感度，使该法特异性强，灵敏度高，适合大批样品的筛选。

1、磺胺—5—甲氧嘧啶含量的酶联免疫检测方法，其特征在于：

1) 采用戊二醛法把磺胺—5—甲氧嘧啶连接到牛血清白蛋白或卵清白蛋白形成全抗原；

2) 采用细胞融合法制备筛选含有稳定分泌磺胺—5—甲氧嘧啶抗体的杂交瘤细胞株；小鼠腹水诱生法制备含有磺胺—5—甲氧嘧啶抗体的小鼠腹水；

3) 提取待测样品组织；

4) 先将全抗原包被酶标板，再向酶标板加入上述小鼠腹水和待测样品组织，最后加入底物显色液，显色后，与标准曲线对比，计算出所测样品中磺胺—5—甲氧嘧啶含量。

2、根据权利要求 1 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于所述底物显色液为由 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺和过氧化氢尿素组成的混合液。

3、根据权利要求 2 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于底物显色液由浓度为 0.2~0.5mg/ml 的 5, 5-四甲基联苯胺和浓度为 0.165~0.35mg/ml 的过氧化氢尿素组成。

4、根据权利要求 3 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺的浓度为 0.2~0.21mg/ml。

5、根据权利要求 3 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于过氧化氢尿素的浓度为 0.165~0.175mg/ml。

6、根据权利要求 1 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于所述待测样品的提取方法是：将待测动物源性食品，用乙腈水溶液提取组织，再用乙酸乙酯水溶液再提取，取有机层，吹干，再用碱性液溶解沉渣，并加入正己烷震荡，离心，进一步脱脂，用盐酸调节 pH7.2±0.2，稀释。

7、根据权利要求 6 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于所述稀释倍数为 5~20 倍。

8、根据权利要求 1 所述磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法，其特征在于所述含有磺胺—5—甲氧嘧啶抗体的小鼠腹水的制备步骤是：先制备杂交瘤细胞，并筛选出特异性强、分泌抗体稳定的细胞株 3E8-H5；然后将细胞株注入 BALB/C 小鼠腹腔，制备腹水。

磺胺—5—甲氧嘧啶含量的酶联免疫检测方法

技术领域

本发明涉及食品中兽药残留安全检测技术领域，特别是用于筛选、定量检测市场上奶、肉、蛋等动物类食品中残留 SMD 定性和定量。

背景技术

磺胺类药物被广泛用于兽医临床，用以治疗和预防某些疾病，但由于不合理的使用，易引起在动物源性食品中的残留。食用含有磺胺类药物残留的食品会引起一系列不良的后果，如过敏、诱发癌症和损害脑神经等。目前测定奶、肉、蛋等动物类食品中磺胺—5—甲氧嘧啶（即：SMD）方法有以下几种：

1、微生物检测法：SMD 对特定微生物抵制作用，可定性或半定量检测残留 SMD。

2、光谱法：紫外分光光度法，红外分光光度法，荧光光度法。

3、色谱法：薄层层析法（TLC），气相色谱法（GC），高效液相色谱法（HPLC），质谱法（MS）。

尤其是 HPLC 常作为法定检测方法，但因样品前处理繁琐、耗时、昂贵，还需有高效液相色谱仪，不适用于基层，不能作样品筛选用。

发明内容

本发明目的在于发明一种能高效、灵敏度高的、方便操作的磺胺—5—甲氧嘧啶含量的检测方法。

本发明方法是：

1）采用戊二醛法把磺胺-5-甲氧嘧啶连接到牛血清白蛋白或卵清白蛋白形成全抗原；

2）采用细胞融合法制备筛选含有稳定分泌磺胺—5—甲氧嘧啶抗体的杂交瘤细胞株；小鼠腹水诱生法制备含有磺胺—5—甲氧嘧啶抗体的小鼠腹水；

3）提取待测样品组织；

4) 先将全抗原包被酶标板, 再向酶标板加入上述小鼠腹水和待测样品组织, 最后加入底物显色液, 显色后, 与标准曲线对比, 计算出所测样品中磺胺—5—甲氧嘧啶含量。

本发明用免疫方法把半抗原 SMD 变为全抗原, 制备特异性抗体, 由于酶的催化效率高, 可极大地放大反应效果, 从而使测定方法达很高的敏感度, 使该法特异性强, 灵敏度高, 适合大批样品的筛选。其中的酶标板包被 SMD-BSA 抗原后, 用小牛血清封闭, 封存后于 4℃ 条件下可长期保存, 该方法市场前景好, 尤其是我国已实行食品安全法后, 其应用前景较好。

为了提高显色的稳定性, 本发明底物显色液为由 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺和过氧化氢尿素组成的混合液。

其中, 底物显色液由浓度为 0.2~0.5mg/ml 的 5, 5-四甲基联苯胺和浓度为 0.165~0.35mg/ml 的过氧化氢尿素组成; 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺的最佳浓度为 0.2~0.21mg/ml, 过氧化氢尿素的最佳浓度为 0.165~0.175mg/ml。

本发明所述待测样品的提取方法是: 将待测动物源性食品, 用乙腈水溶液提取组织, 再用乙酸乙酯水溶液再提取, 取有机层, 吹干, 再用碱性液溶解沉渣, 并加入正己烷振荡, 离心, 进一步脱脂, 用盐酸调节 pH7.2 ± 0.2, 稀释。待测样品的这种前处理方法适应了快速、简便的检测需要。

用正己烷排除脂溶性物质的干扰, 所述稀释倍数为 5 至 20 倍。

本发明所述含有稳定分泌磺胺—5—甲氧嘧啶抗体的小鼠腹水的制备步骤是: 先制备杂交瘤细胞, 并筛选出特异性强、分泌抗体稳定的细胞株; 然后将细胞株注入 BALB/C 小鼠腹腔, 制备腹水。

附图说明

图 1 为合成抗原 SMD-BSA 的 UV 吸收光谱图。

图 2 为注入杂交瘤细胞的小鼠与正常小鼠的腹腔对照图。

图 3 为 BSA-SMD 偶联物 Western 印迹图。

图 4 为间接竞争 ELISA 法制备的标准曲线图。

图 5 为间接竞争 ELISA 法制备的标准曲线图。

图 6 为空白样本标准曲线图。

具体实施方式

一、全抗原的合成与鉴定

(1)抗原的合成

称取 112mg 的磺胺—5—甲氧嘧啶 (SMD) 与 204mg 的牛血清白蛋白 (BSA) 或者 129mg 的卵清蛋白 (OVA), 溶于 25.5ml、pH7.2 的 PB (磷酸钠盐缓冲液) 和二氧六环的混和液中 (比例为 2: 1), 于磁力搅拌器上搅拌, 滴加 0.15ml, 25%戊二醛, 在室温下, 搅拌 3h, 装入透析袋, 于 4℃下, 用 PB (PH 7.0) 透析 6d, 每天换二次液, 分装冻存。

(2)合成抗原的鉴定

在 200 到 400nm 的波长下分别对 SMD、载体蛋白以及二者的偶联物用紫外分光光度计进行扫描, 来判定 SMD 是否与载体蛋白偶联。

SMD 在 253、244 以及 202.8nm 处有吸收峰, BSA 在 214 和 278nm 处有吸收峰, 偶联物在 207.8、259.4、265nm 处形成吸收峰, 可见偶联后吸收峰发生了漂移, 可判定偶联成功。结果见图 1, 图中, I 为 SMD-BSA 偶联物的扫描曲线; II 为 BSA 的扫描曲线; III 为 SMD 的扫描曲线。纵坐标为 OD 值, 横坐标为扫描的波长 (nm)。

二、单克隆抗体的制备

(1)实验动物

7 周龄的 BALB/c 小鼠。

(2)免疫程序

首免, 50μg 抗原溶于 100μl PBS, 与 100μl 完全福氏佐剂混匀, 皮下注射。其后, 每隔 2 周, 用 25μg 抗原溶于 100μl PBS, 与 100μl 不完全福氏佐剂混匀, 皮下注射, 作 4 次增强免疫后, 隔 2 周进行抗原冲击, 25μg 抗原溶于 200μl PBS, 腹腔注射, 3d 后, 取脾细胞。

(3)细胞准备

①骨髓瘤细胞的准备及脾淋巴细胞的准备

骨髓瘤细胞的准备:

取对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag14(7~8 个 25ml 培养瓶), 用弯头滴管将细胞轻轻吹下, 收集于 50ml 离心管, 1700r/min 离心 5min, 弃去上清, 同法用不完全培养基离心洗涤一次, 将细胞重新悬浮于 10ml 不完全培养基。

脾淋巴细胞的准备:

A. 取已经免疫的 BALB/c 小鼠, 摘除眼球采血, 并分离血清作为抗体检测时的阳性对照血清, 同时通过颈脱位致死小鼠。

B. 浸泡于 75%酒精中 5min, 于解剖台上固定后, 移入超净台。

C. 掀开左侧腹部皮肤，无菌手术取出脾脏，置于已盛有 10ml 不完全培养基的平皿中，洗涤并剥去周围组织。

D. 将脾脏移入另一盛有 10ml 不完全培养基的平皿中，用装在 1ml 注射器上的弯针头轻轻挤压脾脏，使脾细胞进入平皿中的不完全培养基中制成单细胞悬液。

E. 收获脾细胞悬液，1700r/min 离心 5~10min，用不完全培养基离心洗涤 1 次。

②饲养细胞的制备

按上述采小鼠脾细胞的方法致死小鼠、体表消毒和固定后，掀开皮肤后，用注射器注射 10ml 不完全培养基到腹腔，轻轻按摩腹部，随后吸出注入的培养液。离心，弃上清。用 5ml HAT 培养基将细胞悬浮。

③细胞融合

A. 将上述的脾细胞与骨髓瘤细胞混合于一支 50ml 的带盖离心管中，补加不完全培养基至 30ml，充分混匀。

B. 1700r/min 离心 5min，将上清尽量吸净。

C. 在手掌上轻击管底，使沉淀细胞松散均匀；置 40℃ 水浴中预热。

D. 用吸管在 45 s 左右加预热至 40℃ 的 50%PEG 1ml，边加边轻轻晃动。

E. 用吸管在 90 s 内加 25ml 预热至 37℃ 的不完全培养基；37℃ 静置 10min。

(要遵照先慢后快的原则)

F. 1700r/min 离心 5min；弃去上清。

G. 加入 5ml HAT 培养基，轻轻吹吸沉淀细胞，使其悬浮并混匀，补加含腹腔巨噬细胞的 HAT 培养基至 80ml。

H. 分装 96 孔细胞培养板，每孔两到三滴；然后将培养板置 37℃，6% CO₂ 培养箱内培养。

I. 5d 后用 HAT 培养基换出一半培养基。

J. 9d 后用 HT 培养基换出 HAT 培养基。

K. 经常观察杂交瘤细胞生长情况，待其长至孔底面积 1/10 以上时吸出上清供抗体检测。

④确定包被抗原的工作浓度以及阳性血清效价(方阵实验)

包被抗原(SMD-OVA)作系列稀释，每一行为一个稀释度，70μl/孔，37℃ 作用 2h，洗板 3 次，加入 200μl 含 1‰OVA 的 PBS 封闭，37℃ 2h，洗板 3 次；血清作系列稀释，每一列为一个稀释度，70μl/孔，37℃ 作用 1.5h，洗板 5 次，加入 1:800 稀释的羊抗鼠的酶标二抗，80μl/孔，37℃ 作用 1.5h，洗板 5 次，加入底物 OPD,70μl/孔，37℃ 避光显色 20min，用

2mol/L 的硫酸终止反应。在酶联免疫检测仪上读取 OD 值。

结果见表 1:

表 1: 方阵实验结果

包被抗原	阳性血清(1: 100 为底)									阴性血清
	空白	1: 2	1: 6	1: 18	1: 54	1:162	1:486	1: 1458	1: 5424	
1: 150	0.00	1.85	1.85	1.85	1.56	1.85	0.80	0.34	0.13	0.02
1: 450	0.00	1.82	1.82	1.82	1.64	1.43	0.78	0.30	0.09	0.01
1: 1350	0.00	1.82	1.82	1.91	1.74	1.62	0.69	0.33	0.17	0.14
1: 4050	0.00	1.82	1.82	1.82	1.35	0.96	0.43	0.50	0.04	0.00

由上表可知，包被原的工作浓度为 1: 4050，血清效价为 1: 16200。

⑤阳性孔的筛选

间接 ELISA 联合竞争 ELISA 筛选阳性孔：将每一孔杂交瘤细胞的培养上清分为等量的二份，一份加 80μl 洗液，另一份加 80μl 高浓度 SMD，分别做 ELISA，其他步骤同④。

阳性孔的判定：上一孔显色很明显，OD 值高，且下一孔显色不明显或不显色，OD 值明显比上一孔低，(即二孔颜色差异大)则判定为阳性孔；两孔显色都明显或都不显色者(即二孔颜色差异小)，则判为阴性。

⑥阳性孔的亚克隆

将 96 孔板上的阳性孔杂交瘤细胞吹下，作系列稀释(10 倍或 20 倍，可根据细胞的多少来决定)，分装到另一块 96 孔板上，37℃，6%CO₂ 培养，观察，标记有单个细胞的孔。培养 10d 左右，出现肉眼可见的克隆即可检测抗体。取阳性孔继续亚克隆。亚克隆三次。

经过三次亚克隆，筛选出三枚稳定分泌针对 SMD 抗体的杂交瘤细胞。分别命名为 3E8、4A7、2D2。其中以 3E8 分泌抗体效价最高，将一部分细胞做腹水，其余冻存在液氮中。

⑦腹水的制备

取 7 周龄的 BALB/c 小鼠，用降植烷注入小鼠腹腔，0.4ml/只，9d 后腹腔接种用无血清培养基稀释的处于对数生长期的杂交瘤细胞，每只小鼠 5×10⁵/0.2ml。间隔 5d 后，每天观察小鼠腹水产生情况，用 16 号针头采集腹水，将腹水离心，取上清，测定效价，分装，-70℃冻存备用。

如图 2 所示，为注入杂交瘤细胞的小鼠。其肠系膜以及腹腔布满红色的形状不一的肿瘤团块。中间为正常小鼠；两边为注入杂交瘤细胞的小鼠，

腹腔长满肿瘤。

⑧ Western 印迹法检验单克隆抗体

用 BSA 和 SMD-BSA 偶联物进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。胶的浓度为 10%。再将其转移到硝酸纤维素滤膜。用脱脂奶粉封闭，用 1: 100 小鼠的腹水作为一抗。加入酶标二抗经充分洗条后，加入 3,3'-二氨基联苯胺进行显色。

左侧的条带是标准蛋白，右边二条显色的是 BSA-SMD 偶联物，右侧还有二条没有作色的条带是 BSA，由此可知，产生的抗体可以与 BSA-SMD 偶联物反应，对载体蛋白不起反应。

结果见图 3，染色的地方为 BSA-SMD 偶联物，右方有二处为 BSA，没有着色。分子量 Marker 用考马斯亮蓝染。

⑨ 抗体特异性的鉴定

用系列稀释的磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺氯吡嗪钠、磺胺甲噁唑、磺胺、磺胺-6-甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶，做竞争 ELISA。用 BSA-SMD 包被，用含牛血清白蛋白的 PBS 封闭，在加入腹水的同时加入竞争药物，其它步骤同④。结果见表 2：交叉反应性=产生 50%抑制时 SMD 的浓度/产生 50%抑制时的其它药物的浓度。

表 2 与其它 8 种磺胺药的交叉性

药物	交叉反应(%)
磺胺嘧啶 (SD)	0.17
磺胺-6-甲氧嘧啶 (SMM)	< 0.02
磺胺喹噁啉 (SQ)	< 0.02
磺胺 (SN)	< 0.06
磺胺氯吡嗪钠	< 0.02
磺胺噻唑 (ST)	< 0.01
磺胺甲噁唑 (SMZ)	< 0.02
磺胺二甲嘧啶 (SM ₂)	< 0.02

由表 2 可知，三株细胞产生的抗体对几种磺胺药物基本无交叉性。

⑩ 标准曲线的制备

用标准系列浓度的磺胺对甲氧嘧啶，0、1、5、10、50、100、300、500、1000 ng/ml 做竞争 ELISA，具体步骤同⑨。

标准曲线及相关参数的计算

表 3、表 4 为制备标准曲线的一些数据，包括：间接竞争 ELISA 的结果，以及计算的一些相关参数，图 4 为作出的标准曲线(用 Microsoft Excel 软件处理)。

表 3: 竞争 ELISA 的结果

SMD 标准液浓度 (ng/ml)	OD 值, 重复六次(n=6)					
0	1.591	1.528	1.527	1.530	1.520	1.520
1	1.533	1.534	1.428	1.493	1.470	1.517
5	1.388	1.339	1.427	1.346	1.409	1.368
10	1.266	1.224	1.249	1.214	1.277	1.238
50	0.749	0.722	0.797	0.693	0.772	0.747
100	0.533	0.503	0.455	0.507	0.534	0.514
300	0.251	0.205	0.222	0.210	0.219	0.223
500	0.151	0.173	0.184	0.168	0.163	0.158
1000	0.092	0.075	0.082	0.089	0.088	0.089

表 4: 相关参数

SMD 标准液浓度	SMD 浓度的对数	OD 值的均值 (B)	抑制率	标准差 (SD)	标准偏差 (RSD)	回收率(%)
0		1.536	1	0.027	1.775%	
1	0	1.496	0.974	0.041	2.767%	101.0%
5	0.699	1.380	0.898	0.035	2.531%	83.1%
10	1	1.245	0.810	0.024	1.945%	128.0%
50	1.699	0.747	0.486	0.365	4.891%	100.6%
100	2	0.508	0.331	0.029	5.690%	74.3%
300	2.477	0.222	0.144	0.016	7.227%	114.5%
500	2.699	0.166	0.108	0.012	6.991%	116.0%
1000	3	0.086	0.056	0.006	7.273%	146.7%

按下式计算抑制率, 以抑制率为纵坐标, 以药物浓度的对数作为横坐标, 作图, 结果如图 4。

$$\text{抑制率} = \text{OD}_{\text{加入 SMD}} / \text{OD}_{\text{未加入 SMD}}$$

标准差 (SD) = $[\sum (X - \bar{X})^2 / (n - 1)]^{1/2}$; 标准偏差 (RSD) = SD/B
 检测下限 (LOD) 为 (B - 3SD) 相对应的值, 经计算为 1.766 ng/ml;
 定量限 (LOQ) 为 (B - 10SD) 相对应的值, 经计算为 11.274 ng/ml。

三、SMD 单克隆抗体 3E8 细胞株（于 2002 年 7 月制备冻存）的稳定性实验

（1）复苏冻存的 3E8 细胞株

将水浴恒温振荡器的温度调至 37℃，从液氮中取出抗 SMD 单抗 3E8 细胞株的冻存小管，立即投入 37℃温水中快速晃动，直至冻存液完全融解，要在 1—2min 内完成复温。将细胞悬液移入培养瓶内，加入培养液置 37℃、5%二氧化碳恒温培养箱中培养。4h 后，细胞换液。弃去培养瓶内的培养液，加入新的培养液进行培养。

经复苏冻存的 3E8 细胞株，得到系列细胞组，其中，以 H5 细胞组产生的抗体性能最好，故命名为 3E8-H5。

（2）单抗细胞株传代

当培养瓶壁铺满细胞时，用吸管将细胞从壁上吹下，制成细胞悬液，弃去一半的细胞悬液，余下的补足培养液继续培养。将细胞传代十几代后，扩增细胞。

一部分冻存，一部分进行细胞亚克隆，做成抗 SMD 腹水。

（3）阳性细胞亚克隆

用直接 ELISA 检测细胞培养上清液，检测结果呈阳性，将 3E8 细胞亚克隆。将细胞培养瓶中的阳性杂交瘤细胞吹下，在 24 孔细胞培养板上作系列稀释，有限稀释法亚克隆阳性细胞，分装到一块已经加上饲养细胞的 96 孔板上，37℃，5%CO₂ 培养，观察，三天后标记有单个细胞的孔。培养 10d 左右，出现肉眼可见的克隆即可检测抗体。

（4）腹水的制备

取 8 周的杂交小鼠，用降植烷注入小鼠腹腔，0.2ml/只，9d 后腹腔接种用无血清培养基稀释的处于对数生长期的杂交瘤细胞，每只小鼠 $5 \times 10^5/0.5\text{ml}$ 。间隔 7d 后，每天观察小鼠腹水产生情况，用 16 号针头采集腹水，将腹水离心，取上清，测定效价，分装，-34℃冻存备用。

（5）确定抗原、抗体的工作浓度

将 SMD-BSA 作 1: 2000、1: 4000、1: 6000、1: 8000、1: 10000、1: 20000、1: 50000、1: 100000 稀释，每一行作为一个稀释度，100μl 每孔，37℃温浴 2h，PBST 洗涤三次，每次间隔 3min。15%小牛血清封闭，每孔加 200μl，37℃作用 2h，同上洗涤，拍干。抗体纵向稀释，每一列为一个稀释度，100μl 每孔，37℃作用 1h，洗涤 5 次，拍干。加入 1: 1000 稀释的羊抗鼠酶标二抗 100μl，37℃作用 1h，洗板 5 次、拍干；每孔加入 TMB 底物显色液 100 μl，37℃避光显色 10min，2mol/LH₂SO₄ 中止反应。测定 OD₄₅₀ 值。选取 OD 值，确定抗原、抗体工作浓度，作为间接竞争 ELISA 工作浓度。结果见表 5：

表 5 方阵实验的结果

系列稀释的抗原 (1: 1000 为底)	系列稀释抗体(1: 10000 为底)					
	1: 4	1: 8	1: 10	1: 15	1: 20	1: 30
1: 2	1.926	1.453	1.245	0.925	0.746	0.583
1: 4	1.784	1.448	1.271	0.938	0.765	0.525
1: 6	1.66	1.325	1.185	0.929	0.782	0.545
1: 8	1.423	1.182	1.064	0.842	0.702	0.517
1: 10	1.485	1.191	1.075	0.834	0.693	0.506
1: 20	1.251	1.042	0.951	0.737	0.60	0.474
1: 50	0.793	0.65	0.642	0.482	0.321	0.327
1: 100	0.572	0.426	0.424	0.303	0.27	0.20

根据结果选择抗原工作浓度 1: 6000, 抗体工作浓度为 1: 100000。

(6) 标准曲线的制备

用标准系列浓度的 SMD, 0、1、10、50、100、500ng/ml 做竞争 ELISA, 具体步骤同 5。

用间接竞争 ELISA 制备 SMD 标准溶液的标准曲线及计算出的相关参数见表 6、表 7。

表 6 间接竞争 ELISA 的结果

SMD 标准液浓度 (ng/ml)	OD 值, 重复 4 次(n=4)			
0	1.463	1.469	1.314	1.418
1	1.418	1.397	1.324	1.340
10	1.318	1.270	1.223	1.175
50	0.914	0.852	0.814	0.864
100	0.690	0.655	0.587	0.579
500	0.239	0.214	0.229	0.289
1000	0.193	0.182	0.156	0.156

表 7 相关参数

SMD 标准液 浓度 (ng/ml)	SMD 浓度 的对数	OD 值的均 值 (B)	抑制率 (100%)	标准差 (SD)	标准偏差 (RSD) %
0		1.416	100	0.062	4.39
1	0	1.370	96.8	0.039	2.84
10	1	1.247	88.1	0.053	4.27
50	1.699	0.861	60.8	0.036	4.15
100	2	0.628	44.4	0.047	7.4
500	2.699	0.243	17.2	0.028	11.58
1000	3	0.172	12.2	0.016	9.43

标准差 (SD) = $[\sum (X - \bar{X})^2 / (n - 1)]^{1/2}$; 标准偏差 (RSD) = SD/B
按下式计算抑制率, 以抑制率为纵坐标, 以药物浓度的对数作为横坐标, 作图, 结果如图 5。

$$\text{抑制率} = \text{OD}_{\text{加入 SMD}} / \text{OD}_{\text{未加入 SMD}} \times 100\%$$

通过以上实验结果表明, 3E8 细胞株经过两年多的冻存, 重新复苏、克隆, 形成的新细胞株仍能稳定地分泌抗 SMD 单克隆抗体, 且效价较高。因此本实验室所保存的抗 SMD 单抗细胞株稳定性好, 能够长时间的保存。

抗体是试剂盒中核心试剂之一, 所以单克隆抗体性质的稳定, 是开发残留快速检测试剂盒的首要关键。

四、SMD 单克隆抗体的应用

1、动物组织样品中 SMD 的测定:

(1) 样品的前处理步骤:

- A. 取待测定的肌肉、肝脏或肾脏, 去脂肪备用。
- B. 称取剪碎的样品 2.5g 于离心管中, 加入乙腈水溶液 (乙腈: 蒸馏水 = 85: 15) 10ml, 以高速组织分散器分散后, 加盖, 不时振荡进行提取。
- C. 4000r/min 离心 10min, 吸取 3ml 上清液于一带盖试管中, 加 3ml 双蒸水和 4.5ml 乙酸乙酯, 加盖, 振荡提取。
- D. 3000r/min 离心 10min, 将上层有机相吸出, 用压缩空气吹干。
- E. 用 1.5ml 碱性 PBS 溶液 (NaOH 浓度为 0.025mol/L) 将残渣溶解, 加入 3ml 正己烷, 振荡。
- F. 离心, 移去上层的正己烷及脂肪层, 吸出下层液体。
- G. 用盐酸调节 pH 值至 7.2 ± 0.2 , 待测。

注: 若步骤 F 离心后脂肪分层不好, 可再加正己烷, 振荡, 重复步骤 F。

(2) SMD 的药物添加回收试验

配置 0、1、10、50、100、500、1000ng/ml 系列浓度的 SMD 溶液, 将 SMD 添加到肌肉和肝脏中, 按样品的前处理步骤处理添加药物的组织, 用间接竞争 ELISA 方法检测添加了 50ng/ml、100ng/ml SMD 的样品, 测定其回收率。

在 50ng/ml 时, 在肌肉中的回收率为 93.9%, 在肝脏中的回收率为 76.9%。在 100ng/ml 时, 在肌肉中的回收率为 88.5%, 在肝脏中的回收率为 91.4%。

（3）动物实验

将买回的肉鸡先适应饲养 3 天，提供饲料和饮水，适应环境后分组。

27 只体重 1kg 的鸡分为二组：I 组，3 只，为对照组，不喂药；II 组，24 只，为低剂量组，投药 200mg/只，用药 10d。

将要饲喂的药物称取规定的重量，然后包裹在面粉中，做成面丸饲喂。对照组饲喂不加 SMD 的面丸，使动物实验的条件一致。

（4）采集样本

采集鸡的肌肉、肝脏、肾脏，用作样品处理。

I 组，第 2、5、12d 各杀一只；取其肌肉、肝脏、肾脏作为待检样品。

II 组，于停药后第 1、2、3、4、5、6、9、12d 每天各杀 3 只；取其肌肉、肝脏、肾脏作为待检样品。

（5）样品处理

将采集的 I、II 组样品的肌肉、肝脏进行处理（方法如本节中 A 至 G）。

（6）操作步骤

先将全抗原（SMD-BSA）包被酶标板，再向酶标板加入上述小鼠腹水和待测样品组织，最后加入底物显色液，显色后，与标准曲线对比，计算出所测样品中磺胺—5—甲氧嘧啶含量。

（7）空白样品标准曲线制备

间接竞争 ELISA 检测方法制备肌肉、肝脏的空白样品标准曲线。用合成的全抗原（SMD-BSA）包被酶标板，抗原的工作浓度为 1:5000，SMD 抗体工作浓度为 1:100000。标准品浓度为 0、1、10、50、100、500ng/ml。样品作 5 倍稀释后进行检测，绘制标准曲线。

将肌肉、肝脏的空白样本处理后作本底做标准曲线，与 PBS 标准曲线作比较，结果如图 6：横坐标为 SMD 浓度对数，纵坐标为抑制率。

从图 6 中可以看出，肌肉、肝脏的组织空白样本的标准曲线与 PBS 制成的标准曲线在形状上基本相似，且各方面的符合率比较高，虽然可以用稀释的阴性样本来减少组织对抗原、抗体结合的影响。但在实际应用中用 PBS 标准曲线来代替阴性样本标准曲线。

（8）样品中的药物残留检测

将动物实验获得的分别停药 1、2、3、4、5、6、9、12 天时的多个样品，做样品处理后，用 PBS 稀释 5 倍，待测。用间接竞争 ELISA 检测方法测定组织样品中的 SMD 残留。

1—12 天样品（200mg/只）检测所得 SMD 残留量，结果见表 8：

表 8 样品检测所得 SMD 残留量

	天数							
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	9d	12d
肌肉	1291	93.56	48.23	16.74	0.595	8.413	1.029	12.04
肝脏	286.81	179.95	42.66	121.29	19.03	15.84	23.65	29.95

从表 8 可以看出，SMD 在停药第 5 天时，肌肉中的 SMD 残留已经基本清除，而肝脏中药物残留可持续到 12 天以上。

2、牛奶中的药物添加回收试验

(1) 牛奶的样品前处理步骤(本室另一研究结果)：

方法 1：取新鲜牛奶，室温下 4000r/min 离心 20min，弃去上层脂肪，取一份下层清液加四份 PBS 混匀后待测。

方法 2：新鲜牛奶，室温下 4000r/min 离心 20min，弃去上层脂肪，取下层清液 1ml，加入正己烷 1ml，充分振荡，静置 10min，取下层液体待测。

人工配置含有系列浓度的 SMZ（复方新诺明）新鲜牛奶，按照方法 1 进行样品处理，使处理后的药物含量分别为 0、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、0.9 $\mu\text{g/ml}$ ，并以此建立标准曲线。

(2) 用与测定肉质中相同的方法测定添加了高、中、低三种浓度 0.005、0.25、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 SMZ 的牛奶样品。按照建立的回归方程，计算药物的添加回收率。

(3) 牛奶中的药物添加回收率试验：

使用两种牛奶处理样品方法分别对添加标准浓度药物的新鲜牛奶进行处理。经比较发现，第一种方法，牛奶经离心脱脂后用 PBS 做 5 倍稀释，直接进行检测效果好，且处理方法简单快捷，故选择此法进行样品处理。

通过建立的标准抑制曲线，计算出该方法的检测下限 LOD 为 6.148 ng/ml，定量线 LOQ 为 25.4 ng/ml。

根据本发明方法测定的结果，通过回归方程计算出牛奶样品中添加三种浓度的 SMZ，回收率分别为 106%、71.6%和 76.6%，变异系数为 4.50%、7.40%和 10.27%，具有较高的准确性。

3、鸡蛋中的药物添加回收试验

(1) 鸡蛋的样品前处理步骤：

将新鲜的鸡蛋打碎后，一部分直接添加磺胺-5-甲氧嘧啶标准液，另一部分将蛋黄和蛋清分离后，分别添加磺胺-5-甲氧嘧啶标准液，于匀浆机上打散，使得磺胺-5-甲氧嘧啶在各样品中的终浓度为 2000ng/g、

1000ng/g 和 0ng/g(空白样), 再将上述样本分别进行以下处理:

称取匀浆物 5.0g, 置 50mL 塑料离心管中。加入乙腈水溶液(乙腈:蒸馏水=85:15) 10mL, 中速(200 次/分)振荡 20~30min, 4000r/min 离心 10min, 吸取 3mL 上清液于一带盖试管中, 加入 3mL 双蒸水和 4mL 乙酸乙酯, 加盖振荡提取 30min 后, 于离心机上 2000r/min 离心 10min, 将上层有机相吸出, 压缩空气下吹干。用 1.5mL 碱性 PBS 将残渣溶解, 然后加入 3mL 正己烷, 振荡。静置至分层, 弃去上层正己烷层, 重复 2 次。用 6mol/LHCl 调 pH 至 7.2 左右, 做 20 倍稀释后(使得药物的理论终浓度为 100ng/ml、50 ng/ml 和 0 ng/ml), 待测。

在已经确定的抗原抗体工作浓度的基础上, 以经过前处理, 得到从蛋清蛋黄混合物中未添加 SMD 的提取液做适当稀释后, 作为稀释液, 配置标准系列浓度的 SMD, 0、1、10、50、100、500、1000、2000ng/ml, 做间接竞争 ELISA, 绘制标准曲线。并将处理的样品回收液进行间接 ELISA 实验, 并通过标准曲线, 计算样品中 SMD 的药物的添加回收率。

(2) 鸡蛋中的药物添加回收率

通过建立的标准抑制曲线, 计算出该方法的检测下限 LOD 为 8.5ng/ml, 定量线 LOQ 为 31.6ng/m。

根据本发明方法测定的结果, 通过回归方程计算出蛋清、蛋黄、蛋清和蛋黄混合处理后的药物添加回收率分别为 84.7%、96.6%、91.1%, 变异系数为 3.30 %、3.38%、3.05%, 具有较高的准确性。

五、SMD 残留快速检测免疫分析试剂盒的研制

(1) 显色系统改进

TMB 显色系统为: 浓度为 0.5mg/ml 的 5, 5-四甲基联苯胺和浓度为 0.35mg/ml 的过氧化氢尿素组成, 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺和过氧化氢尿素的质量比为 1: 1。

先将 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺用无水乙醇配成 5 mg/ml 的母液, 再用蒸馏水配成 0.5 mg/ml 的应用液。

先将过氧化氢尿素用蒸馏水配成 35 mg/ml 的母液, 用时再用磷酸盐缓冲液配成 0.35 mg/ml 的应用液。

以上两种应用液 1: 1 比例混合, 作为底物显色液。

配系列稀释浓度的 5, 5-四甲基联苯胺、过氧化氢尿素, 进行浓度及显色稳定性测试。用终止液(2mol/L 浓硫酸)终止反应后, 在 450nm 波长下, 酶标仪上读取 OD 值。

不同浓度的 5, 5-四甲基联苯胺和过氧化氢尿素按比例混合, 37℃水浴中显色 10min 后, 终止 ELISA 反应, 读取 OD₄₅₀ 值。间隔 10min 后再次读取 OD 值, 重复两次。结果见表 9、10、11:

表 9 第一次读取的 OD 值

系列稀释的过氧化 氢尿素 0.35mg/ml	5,5-四甲基联苯胺浓度 (mg/ml)				
	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
1: 1	2.116	2.003	1.644	1.345	0.67
1: 2	2.003	1.801	1.664	1.348	0.738
1: 4	1.377	1.381	1.289	1.122	0.755
1: 8	0.915	0.946	1.014	0.911	0.617

10min 后再读取 OD 值如下表:

表 10 第二次读取的 OD 值

系列稀释的过氧化 氢尿素 0.35mg/ml	5,5-四甲基联苯胺浓度 (mg/ml)				
	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
1: 1	1.23	1.332	1.525	1.281	0.603
1: 2	1.294	1.435	1.47	1.306	0.653
1: 4	1.244	1.23	1.22	1.103	0.665
1: 8	0.873	0.89	0.909	0.831	0.531

20min 后读取的 OD 值如下表:

表 11 第三次读取的 OD 值

系列稀释的过氧化 氢尿素 0.35mg/ml	5,5-四甲基联苯胺浓度 (mg/ml)				
	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
1: 1	0.782	0.828	1.138	1.358	0.703
1: 2	0.796	0.909	1.156	1.36	0.76
1: 4	0.932	1.007	1.179	1.118	0.764
1: 8	0.915	0.939	0.975	0.908	0.618

由以上的实验得出结论: 显色系统的浓度越高, 酶标板褪色的时间越快。确定 5,5-四甲基联苯胺为 0.2mg/ml, 过氧化氢尿素浓度为 0.175 mg/ml。

经过实验条件的优化, 最终确定 5,5-四甲基联苯胺浓度为 0.21 mg/ml, 过氧化氢尿素浓度为 0.165 mg/ml。

(2) 酶标板保存

酶标板上抗原的结合比较牢固, 不易脱落, 因此, 置于 4℃冰箱内可长期保存。

(3) 抗体 (一抗) 的保存

将抗 SMD 抗体保存在高压灭菌的甘油中。最终稀释一抗后, 使甘油浓度低于 5%, 因此做了两个稀释倍数保存一抗, 分别为 2000 倍和 8000

倍稀释,甘油浓度为30%。使用时,2000倍稀释的一抗再稀释50倍,8000倍稀释的一抗再稀释12.5倍,使一抗工作浓度为1:100000。结果见表12、13:

表12 4℃放置一个月后的SMD曲线OD值

抗SMD抗体	SMD浓度 (ng/ml)					
	0	1	10	50	100	500
现配	1.401	1.242	1.15	0.828	0.566	0.189
2000倍	1.435	1.356	1.304	0.629	0.414	0.156
8000倍	1.355	1.228	0.932	0.567	0.371	0.103

表13 4℃、-20℃放置6个月后的药物曲线OD值

抗SMD抗体	SMD浓度 (ng/ml)					
	0	1	10	50	100	500
现配	2.466	2.39	2.045	1.349	0.963	0.26
4℃ (2000倍)	2.613	2.296	2.243	1.477	1.031	0.283
4℃ (8000倍)	2.296	2.153	2.0	1.362	0.941	0.236
-20℃ (2000倍)	2.268	2.195	2.062	1.444	1.061	0.304
-20℃ (8000倍)	2.268	2.195	1.836	1.257	0.993	0.293

从保存的抗体与现配的抗体之间的标准曲线上,可以得出结论:在30%甘油中保存的一抗工作曲线较好,效价几乎没有下降。稀释8000倍的抗SMD抗体在4℃放置6个月后,工作浓度几乎不变,标准曲线与现配的抗SMD抗体几乎一致,证明稀释8000倍的一抗在4℃能够很好地保存。

(4) 其它

配制SMD标准液的浓度为0、1、10、50、100,200ng/ml,配好后分装于EP管。置4℃保存。终止液为2mol/L的硫酸。

用标准品配制的标准液,其水溶液性质很稳定,终止液硫酸也非常稳定,它们两者在常温下都能放置很长时间,因此,在4℃能长期保存。

六、本发明方法与高效液相色谱法(HPLC)比较试验:

对喂给SMD药物的鸡停药后3d、6d、9d的鸡肉样品按照下述方法进行前处理,并用本发明方法和HPLC法作比较:

取2g样品,加入0.5ml 10%Na₂SO₄和1.5ml CH₃CN混合液,制成匀浆,再加入乙腈-氯仿(5:1)2ml,剧烈混合1min,3500r/min离心3min,上清液转移,残渣用2ml乙腈-氯仿重提一次,合并二次上清液,在<40℃条件下用氮气或空气吹干,再加入1ml 2%硫酸与2ml正己烷,混匀,离心3min,去掉正己烷层,再用2ml正己烷与上清液混合,洗水相一次,

同法去掉正己烷层，分别加入 3ml、2ml 乙腈-氯仿（1：2）混合离心 3min，取氯仿层在低温（<40℃）下蒸干，用 1ml 流动相溶解做 ELISA 或高效液相色谱法测定，结果比较：

方法	结果比较（ng/ml）			
	3 天	6 天	9 天	对照
HPLC	24.14	19.79	7.32	0
本发明	84.35	63.35	42.31	0

高效液相色谱法测定 SMD 时回收率明显较低，检测限相对较低，常有漏检之疑。

同一样品，用本发明方法测定，其检出率较高，不易出现漏检现象。高效液相色谱法对同一份样品中 SMD 测定值约为本发明方法的 1/3，因本发明法不仅可测 SMD 原药，而且可以同时检测其代谢产物，而高效液相色谱法测定时，不包含其代谢产物。

七、总结：

本发明有益效果体现在：

（1）特异性检测：用 3E8-H5 产生的抗体，对几种磺胺药作交叉反应，能产生 50%抑制浓度者为有效反应，特异。否则，为非特异。结果表明只对 SMD 特异。

（2）灵敏性检测：可检测样品中 SMD 含量最低达 15.84ng/g（肝脏）和 1.02ng/g（肌肉）。

（3）回收率测定：常规方法检测，在 100ng/ml 添加时 SMD 肌肉中回收率为 87.45%，肝脏中回收率为 97%，肾脏中为 87%，加入 50ng/ml 时，肌肉、肝、肾回收率分别为 92%，89%，108%；牛奶样品中添加三种浓度的 SMZ，回收率分别为 106%、71.6%和 76.6%；蛋清、蛋黄、蛋清和蛋黄混合处理后的药物添加回收率分别为 84.7%、96.6%、91.1%，具有较高的准确性。

（4）细胞株稳定，3E8 细胞株为本实验室于 2002 年 6 月获得，经多次传代、复苏后仍能产生特异性抗体，复苏后的新细胞株命名为 3E8-H5。

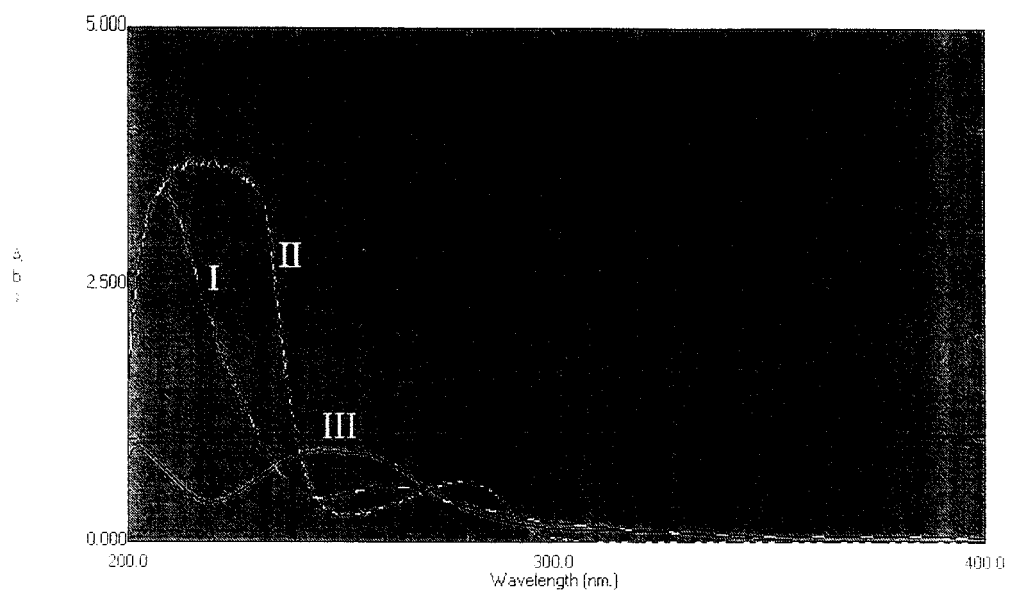


图 1



图 2

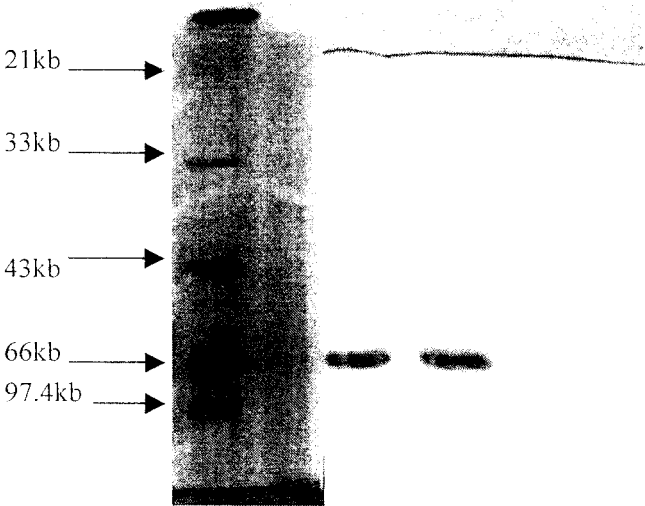


图 3

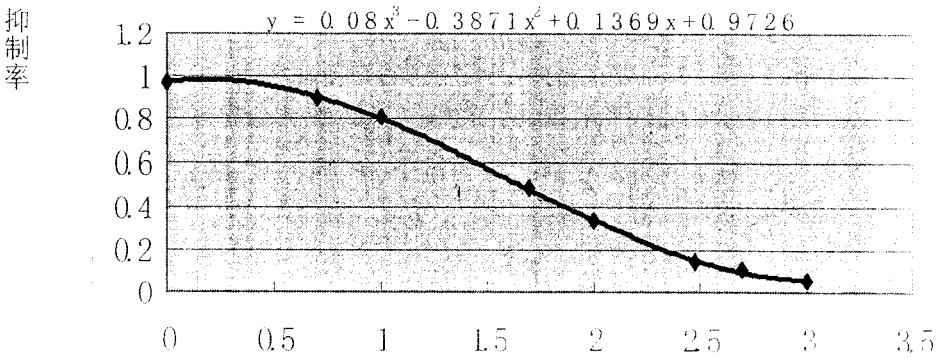


图 4

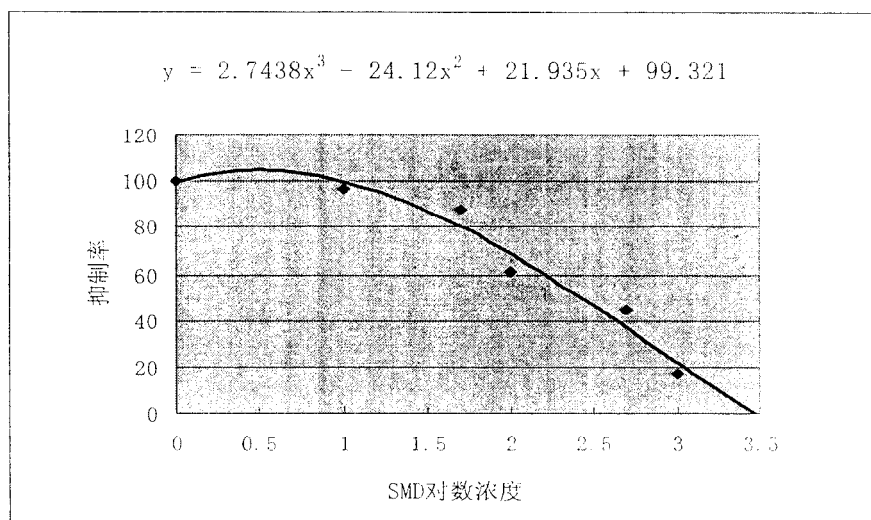


图 5

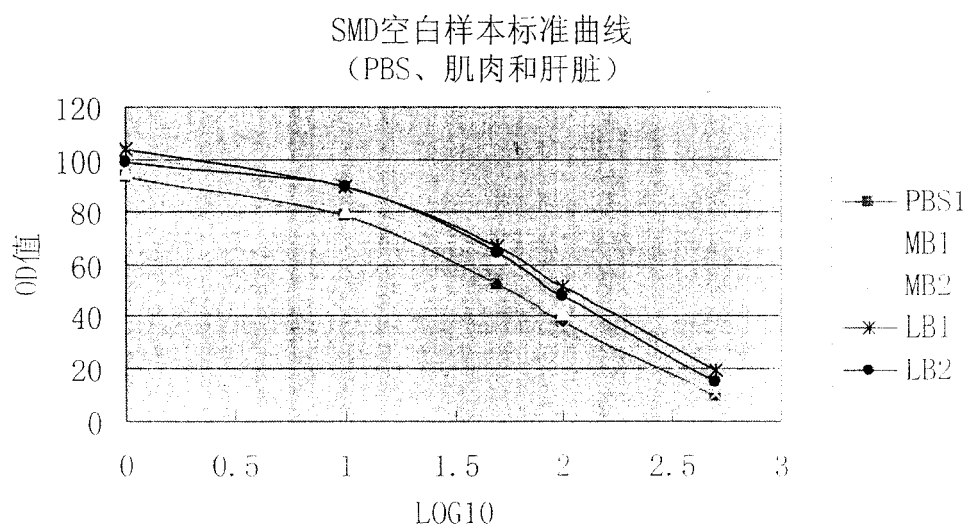


图 6

专利名称(译)	磺胺 - 5 - 甲氧嘧啶含量的酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN1916631A	公开(公告)日	2007-02-21
申请号	CN200610041453.4	申请日	2006-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	王宗元 王捍东 杨春花 彭会建 唐娜 刘学忠 卞建春 任建新		
发明人	王宗元 王捍东 杨春花 彭会建 唐娜 刘学忠 卞建春 任建新		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/52 G01N33/531		
代理人(译)	江平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

磺胺 - 5 - 甲氧嘧啶含量的酶联免疫检测方法，涉及食品中兽药残留安全检测技术领域，特别是用于筛选、定量检测市场上奶、肉、蛋等动物类食品中残留SMD定性和定量。本发明用免疫方法把半抗原SMD变为全抗原，制备特异性抗体，由于酶的催化效率高，可极大地放大反应效果，从而使测定方法达很高的敏感度，使该法特异性强，灵敏度高，适合大批样品的筛选。

