

文章编号: 1673-1689(2011)02-0224-04

Elispot assay 检测牛奶中庆大霉素

王丹, 许杨*, 何庆华, 黄志兵, 康敏
(食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘要: 为了建立快速检测牛奶中庆大霉素的 Elispot assay, 采用制备 GM 免疫抗原获得抗 GM 多克隆抗体。将检测抗原点阵在 PVDF 膜上, 通过检测抗原和样品中 GM 竞争结合抗 GM 多克隆抗体, 酶标结合物催化底物显色, 根据颜色的有无及深浅判读结果, 从而建立了检测牛奶中 GM 的 Elispot assay。该方法的检测阈值为 10 ng/mL, 检测时间为 40 min, 可对样品实现半定量检测。该方法制备的试纸条于 4 °C 密封保存 90 d 仍可用于检测; 与多种结构类似物未见交叉反应; 其结果与酶联免疫方法一致。

关键词: 庆大霉素; Elispot assay; PVDF 膜

中图分类号: R 978.1

文献标识码: A

Establishment of Elispot Assay for Detection of Gentamicin in Milk

WANG Dan, XU Yang*, HE Qing-hua, HUANG Zhi-bing, KANG Min
(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: This manuscript develop a rapid detection method Elispot assay for Gentamicin sulfate, for this, Anti GM polyclonal antibody through GM immunogen was obtained; Establishing milk GM-Elispot assay method by spotting coating antigen on PVDF membrane, and the coating antigen and GM in samples competitive binding the site of anti GM polyclonal, then the HRP catalyzed chromogenic substrate, according to presence or absence of color and depth for interpretation of results. Results: The detection threshold of this method was 10 ng/mL, detection time was within 40 minutes and it can achieve semiquantitative detection. The strip of which was stored at 4 °C for 90 days could be used and no cross-reaction was found with several structural analogues. The results of samples analysis obtained from the Elispot assay were in a good agreement with that of ELISA method.

Key words: gentamicin, Elispot assay, PVDF membrane

庆大霉素(Gentamicin, GM)是由放线菌科小单孢子属产生的氨基糖甙类抗生素,是一种结构相似的多组分混合物,至少含有 C₁、C_{1a}、C₂、C_{2a} 4 种组分^[1],常用于治疗动物的消化道和呼吸道疾病,因

其廉价易得因而滥用的情况比较普遍,所以庆大霉素在动物体内的残留问题愈来愈严重^[2]。中国农业部 2002 年 12 月 14 日发布了 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》,其中规定庆大霉素在

收稿日期: 2010-04-05

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA10Z427); 江西省科技厅重大专项项目(2007BS12501)。

* 通信作者: 许杨(1951-),女,安徽安庆人,德国博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物及食品生物技术方面的研究。Email: xuyang1951@163.com

牛和猪的脂肪和肌肉里以及鸡和火鸡的可食组织中的最高残留量为 0.1 mg/kg, 在牛奶中为 0.2 mg/kg, 在牛和猪的肝脏和肾脏中最高残留量分别为 2 mg/kg 和 5 mg/kg。

目前, 庆大霉素的检测方法主要有微生物法^[3]、仪器分析法^[4]和免疫学检测法^[5-6]。微生物法周期较长; 仪器分析法不仅样品前处理复杂, 而且需要昂贵的分析仪器; 酶联免疫法需要酶标仪等设备和专业的操作人员, 也不适合现场快速检测。Elispot assay 是基于 ELISA 发展起来的一种细胞免疫学检测技术^[7], 具有较高的灵敏度^[8]和简单、快速、可目测结果等特点, 该方法在兽药残留检测中的应用国内尚未见报道。作者制备了抗 GM 多克隆抗体, 以 PVDF 膜为反应基质, 建立了 Elispot assay, 可以快速检测牛奶中的庆大霉素残留。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 材料及试剂 庆大霉素: Gentamicin sulfate GM, 中国兽医药品监察所; 链霉素: Streptomycin sulfate SM 中国兽医药品监察所; 磺胺嘧啶: Sulfadiazine SD, 中国兽医药品监察所; 卡那霉素: Kanamycin sulfate, KM, 上海生工; 新霉素: Neomycin sulfate NM, 上海生工; 牛血清白蛋白: Albumin Bovine BSA, 上海生工; 卵清蛋白: Ovalbumin OVA, 上海生工; 水溶性碳化二亚胺: EDC, 上海生工; 辣根过氧化物酶标二抗: IgG HRP, Gene Tex; 弗氏完全佐剂: Complete Freund's adjuvant, Sigma; 弗氏不完全佐剂: Incomplete Freund's adjuvant, Sigma; polyvinylidene fluoride(PVDF) microporous membrane: Millipore; 单组份 TMB 显色液(沉淀型): 湖州英创生物科技有限公司; Balb/c 小鼠: 南昌大学医学院实验动物中心; 庆大霉素 ELISA 试剂盒: 作者所在实验室研发; 其它试剂: 均为市售分析纯。

1.1.2 仪器与设备 酶标仪(Thermo); 扫描仪—UniscanB780(清华紫光); 图像分析软件 Quantity one(Bio-Rad)。

1.2 方 法

1.2.1 庆大霉素多克隆抗体的制备与鉴定 分别采用 EDC 法和戊二醛法合成庆大霉素的免疫抗原(GM-BSA)和检测抗原(GM-OVA), 方法见文献^[6]。将制备的免疫抗原 GM-BSA 用于免疫 Balb/c 小鼠, 按照常规的免疫程序制备多克隆抗血清^[9]。第五次加强免疫后, 将小鼠断颈取血, 收集抗血清,

间接 ELISA 测试抗体效价, 间接竞争 ELISA 测试其特异性。

1.2.2 Elispot assay 实验

1) 抗原布阵: 将 PVDF 膜裁剪成(36 mm × 6 mm) × 7 大小, 用甲醇浸泡 1 min, 取出用 PBS 浸泡 10 min, 甩干表面液体, 用微量移液器按照 4 × 7 方式点阵 GM-OVA 抗原, 每点 3 μL, 37 °C 湿育 60 min, 然后用 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, 取出甩干牛奶, 将表面吹干, 干燥保存。待用时将其剪成每条 36 mm × 6 mm 大小。

2) 样品溶液的配制: 配置 2% 的阴性脱脂牛奶, 添加 GM 标准品使其在牛奶中的质量浓度分别为 400、200、100、50、10、0 ng/mL, 分别取 1 mL 用 PBS 稀释 10 倍后, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为待测液。

3) Elispot assay 试验: 将干燥保存的 PVDF 膜取出, 用 PBST 漂洗 2 min, 洗掉表面的牛奶, 甩干表面的液体后, 将 PVDF 膜裁剪成 36 mm × 6 mm 大小, 将 7 条裁剪好的膜分别置于大小合适的塑料格子中, 按顺序分别加入 500 μL 待测液于每个格子中, 每格再加入 500 μL 用 PBS 稀释的抗血清, 并设置空白对照(加入 1 000 μL PBS), 置于水平摇床反应 10 min。将膜取出置于清洗盒中加入 PBST 20 mL, 漂洗 2 次, 每次 3 min。取出膜, 甩干表面液体, 将其分别置于洁净的塑料格子中, 每格加入 1000 μL 1:1000 稀释的鼠抗兔 IgG-HRP, 水平摇床上反应 10 min。将膜再置于清洗盒中洗涤, 漂洗 3 次, 每次 3 min。加入底物(沉淀型 TMB)显色, 1 min 后用自来水终止^[10]。肉眼判读结果, 并用扫描仪扫描保存数据。

1.2.3 检测阈值的确定 配置 10 倍稀释后 GM 质量浓度为 20、18、16、14、12 ng/mL 的牛奶样品 5 mL, 并设阴性对照和空白。其余步骤同上, 重复 6 次, 根据显色结果判断检测阈值。

1.2.4 Elispot assay 试纸条的稳定性和特异性 每个庆大霉素质量浓度设置 6 个重复, 取同一批次和不同批次的 Elispot assay 试纸条在不同庆大霉素质量浓度下测试, 考察其重复性。将试纸条置于 4 °C 密封保存, 同时将抗血清添加防腐剂并于 4 °C 保存。每半个月取出一批 Elispot assay 试纸条, 考察其稳定性。与此同时, 检测 SM、KM、NM 和 SD 在不同质量浓度(1、5、10、20、50 ng/mL)下与庆大霉素多抗血清是否存在特异性反应。

1.2.5 Elispot assay 与酶联免疫分析结果比较 取庆大霉素标准品添加到牛奶中, 配制成一系列质

量浓度梯度(0、20、100、200、400 ng/mL)的测试液,每个质量浓度设置3次重复,分别进行Elispot assay和酶联免疫分析,以考察Elispot assay与酶联免疫分析的一致性。

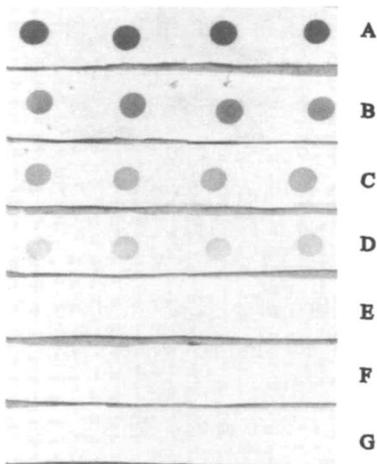
2 结果与分析

2.1 多克隆抗体鉴定

经间接ELISA检测,第五次加强免疫后多克隆抗血清效价达到 5.12×10^5 以上,特异性良好。

2.2 Elispot assay 结果与分析

不同的GM质量浓度对抗GM多克隆抗体有较明显的抑制作用见图1。图1表明,随着样品中GM质量浓度的增加(每一标准品浓度设置4个重复),显色斑点的颜色越来越浅,当样品中GM质量浓度达到10 ng/mL时,GM标准品可以竞争固相抗原完全结合反应体系中的抗GM多克隆抗体,从而不再显色。故本方法检测阈值为10 ng/mL,换算成牛奶样品为200 ng/mL,符合我国对牛奶中庆大霉素的限量标准。



注: A、B、C、D、E、F分别是0、1、2.5、5、10、20 ng/mL的GM标准品; G为空白

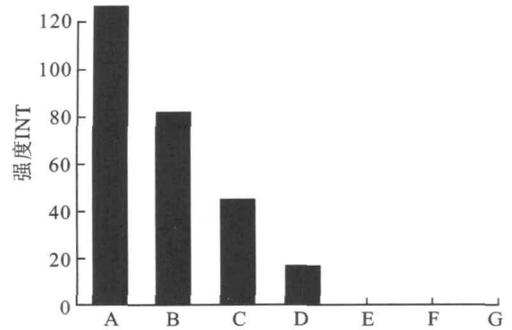
图1 Elispot assay 结果

Fig.1 Elispot assay results

用Quantity one软件分析图像,有较明显的梯度,见图2。

2.3 检测阈值的测定

不同批次、不同重复试验的结果基本一致。由表1可知,GM质量浓度在接近10 ng/mL时,斑点有微微的显色,在8 ng/mL和9 ng/mL时,不同的试验结果可能会存在有微蓝色或不显色的情况,考虑到实际检测中会存在些许误差,于是将检测阈值设定为10 ng/mL。



A~G依次对应图1中的A、B、C、D、E、F、G

图2 Elispot assay 实验定量分析

Fig.2 Quantitative analysis of Elispot assay

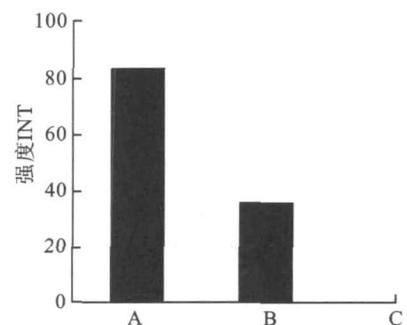
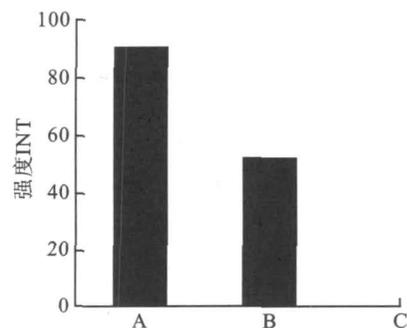
表1 Elispot assay 试纸条检测阈值

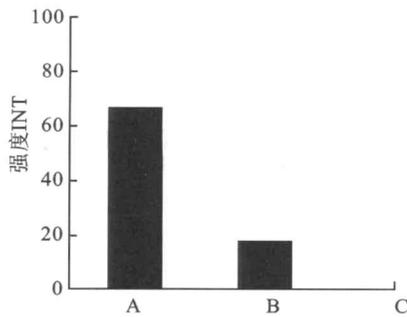
Tab.1 Detection threshold of Elispot assay strip

GM 质量浓度/(ng/mL)	结果
6	-
7	-
8	+/-
9	+/-
10	+

2.4 Elispot assay 稳定性和交叉反应

同一批次和不同批次的Elispot assay试纸条对相同牛奶样品测试结果差异不明显,说明其重复性较好。在对其稳定性考察中发现,第90天时活性有较明显下降趋势,但对检测结果基本没有影响,见图3。





注: A、B、C 分别是 GM 质量浓度为 0、2.5、10 ng/mL 的牛奶样品

图 3 Elispot assay 试纸条稳定性

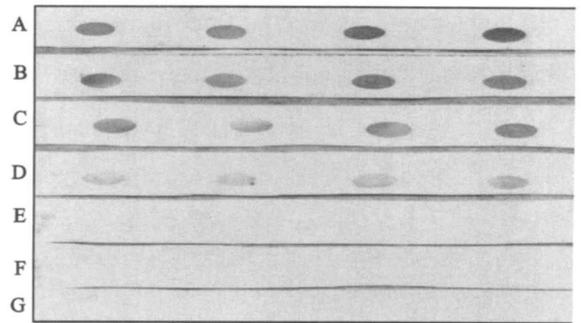
Fig. 3 Stability of Elispot assay strip

另外, 根据 1.2.4, 未见 Elispot assay 试纸条与 SM、KM、NM 和 SD 有明显交叉反应。

2.5 加标样品分析

由图 4 和表 2 可知, 本研究建立的方法针对加

标样品的检测结果合乎实际, 基本上可以满足对样品的定性检测, 并且可以通过斑点显色的深浅来判断 GM 质量浓度的高低, 从而可以实现对检测结果的半定量分析。



注: A 为阴性对照; B、C、D、E、F 分别为样品 1、2、3、4、5; G 为空白

图 4 加标样品分析

Fig. 4 Spiked sample analysis

表 2 Elispot assay 与 ELISA 分析比较

Tab. 2 Comparison of Elispot assay and ELISA

样品	添加水平/(ng/mL)	重复数	Elispot assay 试纸条检测结果	ELISA 检测	
				实测值/(ng/mL)	回收率/%
1	0	3	-	0	100
2	20	3	-	18.7	93.5
3	100	3	-	110.2	110.2
4	200	3	+	213.7	106.9
5	400	3	+	389.9	97.5

注:“-”为未超出限量标准,“+”为超过限量标准。

3 结 语

作者建立了检测牛奶中 GM 的 Elispot assay, 具有快速、准确、灵敏和可目测结果等特点。检测

阈值为 10 ng/mL, 牛奶稀释 20 倍后可直接用于样品分析, 符合我国对牛奶的限量标准; 背景较低; 检测时间为 40 min; 与多种结构类似物未见明显交叉, 稳定性良好; 与传统 ELISA 比较结果相一致。

参考文献(References):

[1] 顾觉奋. 抗生素[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 209.

[2] Riviere J E, Spoo J W. Aminoglycoside antibiotics[M]IA: Low a State University Press, 2001: 841- 867.

[3] 范盛先, 袁宗辉, 孔科, 等. 庆大霉素在猪肉和鸡肉组织中残留的微生物学检测方法研究[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 557- 560.

FAN Sheng xian, YU AN Zong hui, KONG Ke, et al. Research of a Microbiological inhibition method for determination of gentamicin residues in muscles of swine and chicken[J]. **Journal of Huazhong Agricultural University**, 2001, 20(6): 557 - 560. (in Chinese)

[4] Vicky Manyanga, Olga Grishina, Erwin Adams, et al. Comparison of liquid chromatographic methods with direct detection for the analysis of gentamicin[J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2007, 45: 257- 262.

[5] Huang Hao Yang, Qing Zhi Zhu, Jir Gou Xu, et al. Flow injection fluorescence immunoassay for gentamicin using soft gel derived mesoporous biomaterial[J]. **Analytical Biochemistry**, 2002, 308: 71- 76.

[6] Yiqiang Chen, Yanhong Shang, Xilong Xiao, et al. Development of an enzyme linked immunoassay for the detection of gentamicin in swine tissues[J]. **Food Chemistry**, 2008, 108:304- 309.

[7] Josephine H Cox, Guido Ferrari, Sylvia Janetzi. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay[J]. **Methods**, 2006, 38, 274- 282.

[8] Shirai A, Holmes K, Klinman D. Detection and quantitation of cells secreting IL-6 under physiologic conditions in BALB/c mice[J]. **J Immunol**, 1993, 150(3): 793- 9.

[9] 邓舜州. DON 无毒 phage ELISA 检测方法的建立及展青霉素免疫学检测初探[D]. 南昌: 南昌大学, 2006.

[10] Debjani Saha, Debopam Acharya, Tarun K Dhar, et al. Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxin B1 and ochratoxin A in chili samples[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2007, 584: 343- 349.