

# 磺胺类药物多克隆抗体的制备与 ELISA 检测方法的初步研究

孙俊颖<sup>1,2</sup>, 于洪意<sup>1</sup>, 黄显会<sup>1</sup>, 高海<sup>1</sup>, 杨桂香<sup>1</sup>, 曾振灵<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广州 510640)

**摘要:** 模拟磺胺母核结构合成了 3 种人工免疫原, 免疫新西兰白兔, 用间接竞争 ELISA 方法监测免疫效果。选择抑制效果较好的 2 组多抗血清建立磺胺类药的 ELISA 检测方法, 绘制竞争标准曲线, 并进行添加回收试验。结果表明: A 组多克隆抗体对 6 种常用磺胺药 SMD, SMM, SMZ, SDM, SDM', SD 的 IC<sub>10</sub> 分别为 0.010, 0.046, 0.010, 0.100, 0.067, 0.019 μg/mL, 低于最高残留限量(0.10 μg/mL); C 组多克隆抗体对 SMD, SMM, SMZ, SDM, SQ, SD, 磺胺氯吡嗪、磺胺氯吡嗪的 IC<sub>10</sub> 分别为 0.009 1, 0.051, 0.058, 0.088, 0.020, 0.010, 0.014, 0.011 μg/mL, 亦低于最高残留限量。2 组多克隆抗体对磺胺药的回收率为 54.5%~111.8% 和 54.2%~130.3%, 变异系数为 3.6%~10.9% 和 3.7%~5.9%。

**关键词:** 磺胺类药物; 多残留检测; 多克隆抗体; ELISA

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)11-1594-05

## Preparation of Polyclonal Antibody against Sulfonamide and Preliminary Study on ELISA Method

SUN Jun-ying<sup>1,2</sup>, YU Hong-yi<sup>1</sup>, HUANG Xian-hui<sup>1</sup>, GAO Hai<sup>1</sup>,  
YANG Gui-xiang<sup>1</sup>, ZENG Zhen-ling<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University,  
Guangzhou 510642, China; 2. Veterinary Medicine Institute,  
Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** New Zealand White rabbits were immunized with three artificial immunizing antigens that modeling the common structure of sulfonamides, and the immune effect were detected by ELISA. A new Ci-ELISA method against sulfonamides and standard curves were established using two polyclonal antisera because of their good inhibitory effect. The IC<sub>10</sub> of polyclonal antisera from group A against SMD, SMM, SMZ, SDM, SDM' and SD was 0.010, 0.046, 0.010, 0.067, 0.019 μg/mL respectively, which was less than the MRLs(0.1 μg/mL). The IC<sub>10</sub> of polyclonal antisera from group C against SMD, SMM, SMZ, SDM, SQ, SD, sulfachloropyridazine and sulfachloropyrazine were 0.009 1, 0.051, 0.058, 0.088, 0.020, 0.010, 0.014, 0.011 μg/mL respectively, less than the MRLs. The recoveries of two polyclonal antibodies ranged 54.5%-111.8%, 54.2%-130.3% with CV of 3.6%-10.9% and 3.7%-5.9%, respectively.

**Key words:** sulfonamide; multi-residues detection; polyclonal antibody; ELISA

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)是一类人工合成的广谱抗菌药, 兽医临床上广泛用于细菌性疾病、

球虫病等, 其中某些 SAs 作为药物添加剂使用, 但长期应用会导致细菌产生耐药性, 且动物组织中残

收稿日期: 2007-12-19

基金项目: 广州市科技攻关重点项目(2004Z2-E0031)

作者简介: 孙俊颖(1982-), 女, 实习研究员, 硕士, 主要从事兽医药理学与毒理学研究, E-mail: junyingsun2003@163.com

\* 通讯作者: 曾振灵(1963-), 教授, 博士生导师, E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

留的 SAs 对人体有潜在的致癌性。因此,畜牧生产中亟需建立快速、准确、简便的 SAs 残留检测方法。

酶联免疫吸附试验(ELISA)敏感性、特异性高,是 SAs 检测的研究热点<sup>[1-2]</sup>。目前有关 ELISA 法检测某一种 SAs 的报道较多,但对多种 SAs 残留的同步检测,还处于实验室阶段,且检出限较高<sup>[3-4]</sup>。多克隆抗体是 SAs 多残留同步 ELISA 检测的核心,而半抗原的结构改造是抗体制备的关键。本试验模拟 SAs 母核结构人工合成 2 种半抗原,制备 3 种多克隆抗体,初步建立了 9 种 SAs 残留的 ELISA 检测方法。

## 1 材料与与方法

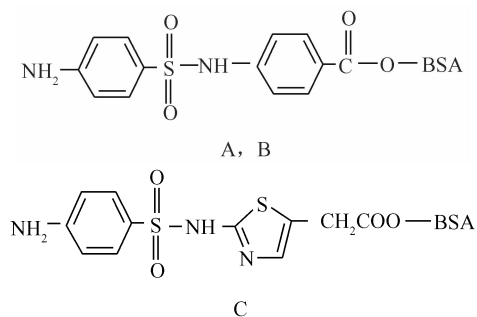
### 1.1 材料

雌性新西兰大白兔,购自南方医科大学实验动物中心。

磺胺对甲氧嘧啶(SMD)、磺胺甲噁唑(SMZ)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺喹噁啉(SQ)对照品均购自中国兽医药品监察所;磺胺间甲氧嘧啶钠(SMM)标准品,购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺二甲基嘧啶(SM<sub>2</sub>)、磺胺邻二甲氧嘧啶(SDM'),购自 Sigma 公司;磺胺氯吡嗪、磺胺氯吡嗪钠、氨苄西林、卡那霉素、链霉素、氟苯尼考纯品均为国产。

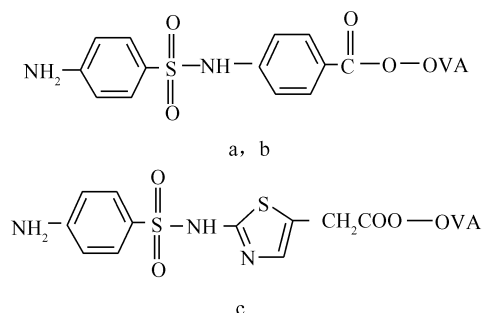
弗氏完全及不完全佐剂、邻苯二胺(OPD)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA),Sigma 公司产品;明胶、吐温-20 为 Amresco 进口分装;HRP 标记的羊抗兔 IgG,购自武汉博士德生物工程有限公司;其他试剂为国产分析纯。

合成免疫原(A、B 为相同半抗原分别以 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯法、氯甲酸异丁酯法与 BSA 偶联;C 为 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯法合成),并通过色谱、质谱及紫外扫描鉴定,其结构式如下:



合成包被原(a、b 为相同半抗原分别以 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯法、氯甲酸异丁酯法与 OVA 偶

联;c 为 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯法合成),并通过色谱、质谱及紫外扫描鉴定,其结构式如下:



### 1.2 方法

1.2.1 多抗血清的制备<sup>[5]</sup> 3 种免疫原分别免疫 3 组新西兰白兔,每组 2 只,剂量(以载体蛋白计)为 0.1 mg/kg。每隔 4 周加强免疫 1 次。三免开始,每次免疫后第 10 天采血,常规 ELISA 法监测抗血清<sup>[6]</sup>。待效价稳定,冲击免疫(六免)1 周后,心脏采血致死,收集抗血清,饱和硫酸铵三步盐析法纯化,SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.2 间接竞争 ELISA (Ci-ELISA) 方法的建立<sup>[7]</sup> 方阵法确定包被原和纯化抗体的最适工作浓度。建立 Ci-ELISA 标准曲线。以 SAs 浓度的对数为横坐标,相应 SAs 浓度的吸光度值(B)对无 SAs 的吸光度值(B<sub>0</sub>)的比值(B/B<sub>0</sub>)为纵坐标,绘制 SMD、SMM、SMZ、SDM、SDM'、SQ、SM<sub>2</sub> 的标准曲线,建立回归方程。检测限按(B<sub>0</sub>+3SD)/B<sub>0</sub> 的值所对应的标准曲线的 SAs 浓度来表示。IC<sub>50</sub>、IC<sub>10</sub> 分别表示抑制率为 50%、10% 的药物浓度。

1.2.3 抗体特异性分析 系列浓度的 SD、磺胺氯吡嗪钠、磺胺氯吡嗪钠、氨苄西林、卡那霉素、链霉素、氟苯尼考等用 Ci-ELISA 法测定各竞争物与抗体的交叉反应。

1.2.4 血清样品添加混合磺胺药的标准曲线及回收率测定 等浓度混合的 SMD、SMZ、SQ、SMM 和等浓度混合的 SMD、SMM、SMZ、SQ、SDM、SDM'、SM<sub>2</sub> 分别添加于血清样品中,PBS 稀释 5 倍,使处理后样品中药物浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0 μg/mL,建立 Ci-ELISA 标准曲线。

混合 SAs 分别添加于空白鸡血清,PBS 稀释 5 倍,使前 4 种 SAs 终浓度为 0.05、0.1、0.5 μg/mL,后 7 种 SAs 终浓度为 0.1、0.5、1.0 μg/mL,进行回收率测定。根据以下公式计算回收率:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测定值}(\mu\text{g})}{\text{添加值}(\mu\text{g})} \times 100\%$$

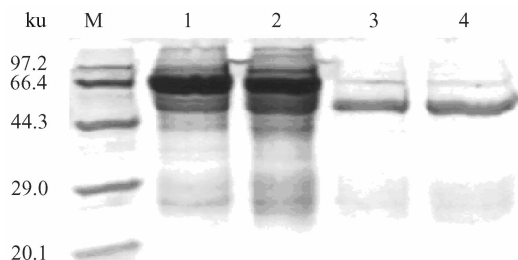
## 2 结果与分析

### 2.1 多抗血清的制备

六免后3组家兔抗血清效价均达到1:300 000以上。用5 μg/mL混合药液进行Ci-ELISA,抑制率分别为66.9%、44.6%、81.1%。因此,后面的试验选用A、C组的纯化抗血清(图1)。

### 2.2 ELISA 检测方法的建立

2.2.1 ELISA 检测体系选择 比较不同包被原对纯化抗血清的Ci-ELISA结果的影响,发现最灵敏的ELISA检测体系为A组抗体和包被原c、C组抗体和包被原a(表1)。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1,2. 未纯化的多抗血清;3,4. 纯化的多抗血清

M. Protein marker;1,2. Crude antisera;3,4. Purified antisera

图1 抗血清的SDS-PAGE图谱

Fig.1 SDS-PAGE graph of antisera

表1 不同包被原对Ci-ELISA结果的影响

Table 1 Effects of different coating antigens on Ci-ELISA results

	A组抗体 Antisera of group A				C组抗体 Antisera of group C			
	包被原 b		包被原 c		包被原 a		包被原 b	
	Coating antigen b		Coating antigen c		Coating antigen a		Coating antigen b	
	+	-	+	-	+	-	+	-
抑制效果 Inhibitory effect	1.434	0.852	1.041	0.158	1.281	0.242	1.146	0.715
阴性对照 Control	0.016	0.017	0.019	0.017	0.017	0.014	0.019	0.015

+、0药抑制时吸光值;-、.5 μg/mL 7种SAs混药抑制吸光值,下表同

+. Means the absorbance with no sulfonamides; -. Means the absorbance with 7 kinds of sulfonamides. The same as follows

2.2.2 抗原、抗体工作条件确定 选择吸光值为1.0左右时的抗原抗体浓度为最适工作浓度,通过系列稀释的抗血清与包被原Ci-ELISA,筛选出最佳

抗原、抗体工作条件:A组抗血清稀释倍数为1:5000,包被原c稀释倍数为1:8000;C组抗血清为1:25000,包被原a为1:2400(表2、3)。

表2 A组抗血清Ci-ELISA方阵试验结果

Table 2 Ci-ELISA phalanx experiment of Group A antisera

抗血清稀释倍数 Dilution of antisera	包被原 c Coating antigen c					
	1:2000		1:5000		1:8000	
	+	-	+	-	+	-
1:25000	OUT	1.279	2.936	1.092	2.164	0.471
1:50000	2.299	0.765	2.134	0.638	1.483	0.268
1:100000	1.333	0.405	1.250	0.346	0.836	0.127
1:200000	0.685	0.207	0.652	0.180	0.441	0.069

### 2.3 ELISA 标准曲线的相关参数

7种SAs的检测限和相关参数见表4、5。2组多克隆抗体对SAs的灵敏度都比较高,相关系数大于0.99,C组多克隆抗体的检测限略低于A组。

### 2.4 抗体特异性分析结果

氨苄西林、卡那霉素、链霉素、氟苯尼考对2组抗原抗体反应均无抑制;磺胺氯吡嗪、磺胺氯吡嗪、SD对A组抗体的IC<sub>10</sub>分别是0.23、0.22、0.019

μg/mL,对C组抗体的IC<sub>10</sub>分别是0.014、0.011、0.010 μg/mL。表明抗体对磺胺类药物存在交叉反应性,具有较高的簇特异性,常用抗生素不影响对SAs的测定(图2、3)。

### 2.5 血清添加混合磺胺药的Ci-ELISA标准曲线及回收率

2组抗体检测限均低于0.1 μg/mL,相关参数见表6。2组抗体在添加0.05~1.00 μg/mL4种

表 3 C 组抗血清 Ci-ELISA 方阵试验结果

Table 3 Ci-ELISA phalanx experiment of Group C antisera

抗血清稀释倍数 Dilution of antisera	包被原 a Coating antigen a					
	1 : 600		1 : 1 200		1 : 2 400	
	+	-	+	-	+	-
1 : 25 000	1.947	0.503	2.012	0.834	0.887	0.117
1 : 50 000	1.404	0.325	1.658	0.567	0.580	0.116
1 : 100 000	1.297	0.271	1.217	0.511	0.471	0.065
1 : 200 000	0.312	0.067	0.302	0.118	0.117	0.016

表 4 A 组抗体 Ci-ELISA 标准曲线相关参数

Table 4 Parameters of Ci-ELISA standard curve of group A antibody

药物 Drug	回归方程 Regression equation	相关系数 r <sup>2</sup> Correlation coefficient	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	IC <sub>10</sub> /(μg/mL)	检测限/(μg/mL) Detection limit
SMD	y = -0.333 9x + 0.245 6	0.995 5	0.17	0.010	0.007
SMM	y = -0.326 8x + 0.462 9	0.993 7	0.77	0.046	0.028
SMZ	y = -0.217 6x + 0.471 0	0.999 4	0.73	0.010	0.005
SDM	y = -0.213x + 0.689 5	0.998 7	7.75	0.100	0.047
SM <sub>2</sub>	y = -0.211 4x + 0.757 3	0.992 1	16.48	0.210	0.097
SDM'	y = -0.235 6x + 0.670 0	0.995 8	11.83	0.067	0.051
SQ	y = -0.308 4x + 0.705 5	0.996 9	4.64	0.230	0.140

表 5 C 组抗体 Ci-ELISA 标准曲线相关参数

Table 5 Parameters of Ci-ELISA standard curve of group C antibody

药物 Drug	回归方程 Regression equation	相关系数 r <sup>2</sup> Correlation coefficient	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	IC <sub>10</sub> /(μg/mL)	检测限/(μg/mL) Detection limit
SMD	y = -0.334 3x + 0.218 2	0.998 2	0.14	0.009	0.005
SMM	y = -0.314 8x + 0.493 0	0.990 7	0.95	0.051	0.029
SMZ	y = -0.310 5x + 0.516 8	0.998 0	1.13	0.058	0.034
SDM	y = -0.272 4x + 0.613 2	0.991 7	2.60	0.088	0.047
SM <sub>2</sub>	y = -0.350 5x + 0.583 1	0.993 8	1.72	0.120	0.075
SDM'	y = -0.308 2x + 0.687 8	0.999 4	4.07	0.200	0.120
SQ	y = -0.266 0x + 0.448 1	0.996 6	0.64	0.020	0.010

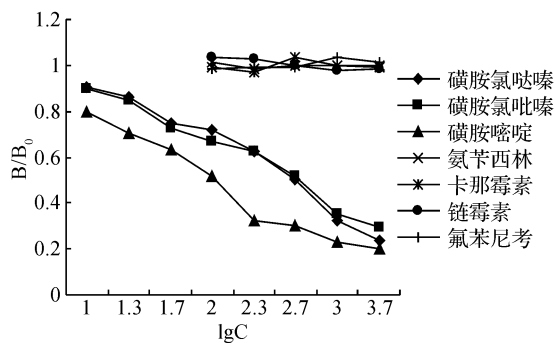


图 2 A 组抗体交叉 Ci-ELISA 曲线  
Fig. 2 Crossing Ci-ELISA curve of group A antibody

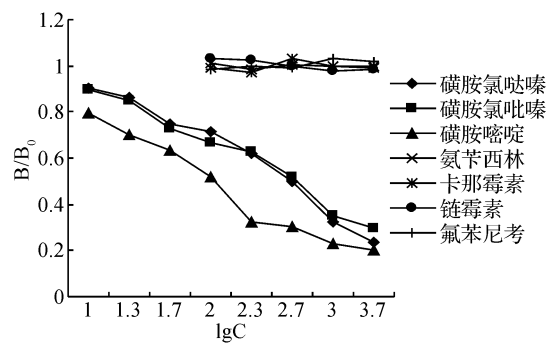


图 3 C 组抗体交叉 Ci-ELISA 曲线  
Fig. 3 Crossing Ci-ELISA curve of group C antibody

SAs 和 7 种 SAs 的回收率分别为 54.2%~130.3% 和 54.5%~111.8%，变异系数 3.7%~5.9% 和 3.6%~10.9%。

### 3 讨论

#### 3.1 SAs 多克隆抗体优选

ELISA 试验结果显示 A、C 组抗血清抑制率高于 B 组,表明其特异性较好,可能是因为不同的合成路径、不同的半抗原导致全抗原的分子空间结构不同,影响抗原抗体的结合。C 组免疫原制备的多克隆抗体灵敏度及对 SAs 药物的交叉反应优于 A 组。因此,建议 C 组免疫原制备的多克隆抗体作为

表 6 血清添加 SAs 的 Ci-ELISA 标准曲线相关参数

Table 6 Parameters of Ci-ELISA standard curve of spiked serum with SAs

组别 Group	回归方程 Regression equation	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	检测限/(μg/mL) Detection limit
A 组抗体对 4 种 SAs	$y = -0.2915x + 1.2325$	0.33	0.007
A 组抗体对 7 种 SAs	$y = -0.2396x + 1.0283$	0.16	0.015
C 组抗体对 4 种 SAs	$y = -0.2784x + 1.2544$	0.51	0.010
C 组抗体对 7 种 SAs	$y = -0.3248x + 1.3792$	0.51	0.018

SAs 多残留检测的基础。

### 3.2 ELISA 检测方法的建立

ELISA 方法于 20 世纪 70 年代初建立,经过几十年的发展,目前,已成为免疫分析中常用的技术。ELISA 根据反应介质分为均相和非均相;根据反应状态分为平衡态和非平衡态;根据抗原-抗体反应动力学分类,可分为竞争性和非竞争性 2 种。小分子的免疫测定一般采用间接竞争 ELISA,标记和检测方便。

ELISA 检测的影响因素包括包被原的种类及其浓度、抗体浓度、反应时间、温度、pH 值等。Ci-ELISA 检测小分子抗原方法简便,易标记。本试验采用 2 种不同的大分子蛋白和合成路线,避免了相同的合成路线在交联反应中生成相同的交联副产物而干扰特异性抗体的筛选。通过筛选包被原、包被原及抗体的工作浓度确立了最灵敏的检测体系及最佳抗原、抗体工作条件。并参考本实验室方法对 pH 值、反应时间、温度等进行了研究。优化了反应时间:包被时间为 37 ℃ 1 h,后 4 ℃ 过夜或直接 37 ℃ 2 h;封闭时间为 37 ℃ 2 h,小于此时间则非特异性反应增强;竞争反应时间 1 h;显色时间 37 ℃ 10 min。全部反应过程均在 37 ℃ 水浴中进行。且对 96 孔酶标板进行了使用前筛选;用等量抗原包被,在同一试验条件下进行反应,其显色反应均一性良好,判明其吸附性能良好。

### 3.3 多克隆抗体灵敏度的评价

灵敏度是评价 ELISA 检测方法的一个重要指标。通常用 LOD 值和 IC<sub>50</sub> 值来衡量,国外一些文献也常用 IC<sub>10</sub> 值。本研究制备的 C 组抗体对测定的 10 种 SAs 的 IC<sub>50</sub> 均小于 5 μg/mL,且对 SMD、SMM、SMZ、SDM、SM<sub>2</sub>、SQ、SD、磺胺氯哒嗪、磺胺氯吡嗪 9 种 SAs 的 IC<sub>50</sub> 值为 0.11~2.60 μg/mL,检测限也低于 SAs 的最高残留限量。交叉反应性好于国内此前的研究报道<sup>[8-9]</sup>,检测限、IC<sub>50</sub> 值低于相关报道,与 Sheth 等<sup>[10]</sup>的报道相近。

通过改进半抗原的合成方法、抗原的合成路径

(不同路径合成包被原与免疫原),调整免疫方案(如减小剂量,增加免疫间隔期)可以获得更高亲和力的抗体;建立异源 ELISA 检测系统,优化基本条件(如抗原抗体最佳工作浓度等),改变酶反应系统等方法可以提高灵敏度。

### 参考文献:

- [1] DING S, CHEN J, JIANG H, et al. Application of quantum dot-antibody conjugates for detection of sulfamethazine residue in chicken muscle tissue [J]. *Agric Food Chem*, 2006, 54 (17): 6 139-6 142.
- [2] 蔡勤仁,曾振灵,杨桂香. 兽药残留免疫检测技术应用进展[J]. *动物医学进展*, 2002, 23(2): 25-28.
- [3] CLIQUET P, COX E, HAASNOOT W, et al. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494: 21-28.
- [4] LEE N, HOLTZAPPLE C K, MULDOON M T, et al. Immunochemical approaches to the detection of sulfathiazole in animal tissues [J]. *Food Agric Immun*, 2001, 13: 5-7.
- [5] MARTLBAUER E, USLEBER E, SCHNEIDER E, et al. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides [J]. *Analyst*, 1994, 119 (12): 2 543-2 548.
- [6] GOSLING J P. *Immunoassay-A Practical Approach* [M]. Oxford University Press, 2000: 168-182.
- [7] ASSIL H I, SPORNS P. An ELISA for sulfonamide detection using affinity-purified polyclonal antibodies [J]. *Food Res*, 1992, 25: 343-353.
- [8] 郑志高,江红星,吕芳,等. 磺胺类药物多残留酶联免疫法检测[J]. *检验检疫科学*, 2006, 16(1): 19-22.
- [9] 李喜旺,李俊锁,朱蓓蕾. 抗磺胺类药物抗体的研制[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(4): 79-84.
- [10] SHETH H B, SPORNS P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides [J]. *Agric Food Chem*, 1991, 39: 1 696-1 700.