

牛组织中阿维菌素残留的 ELISA 研究

李俊锁 钱传范

(北京农业大学, 北京 100094)

摘要 本文探讨了检测牛组织(血浆、肌肉和肝)中阿维菌素(AVM)残留的间接竞争 ELISA 反应条件和样本前处理方法, 并对添加样本进行了测定。竞争反应可耐受 20% (v/v) 的甲醇。使用 4'-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA 和 5-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA 作包被原, AVM 标准液的 $I_{50} = 1.8 \sim 4.0 \text{ ng/mL}$, 检测极限为 $0.02 \sim 0.2 \text{ ng/mL}$ 。样本经甲醇一次提取和稀释后直接进行检测, 各样本介质中 AVM 的 $I_{50} = 3.6 \sim 30.2 \text{ ng/mL}$, 样本检测极限为 $0.1 \sim 0.6 \mu\text{g/kg}$ 。在 $6.0 \sim 60.0 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内, 回收率 (%) = $87.9 \sim 108.8 (95.0 \pm 8.0)$, 变异系数 (CV, %) = $2.8 \sim 16.9 (10.0 \pm 5.2)$ 。本方法适宜对大批量样本进行快速检测。

关键词 阿维菌素, 牛组织, 酶联免疫吸附测定 (ELISA), 残留分析

阿维菌素 (Avermectin B₁, AVM) 作为一种新高效广谱抗寄生虫药正在国内广泛应用。传统的阿维菌素残留分析方法十分繁琐^[1-4], 目前在国内难以推广使用。免疫分析技术具有常规理化方法无可比拟的选择性, 亦有极高的灵敏性, 因而非常适于残留分析。免疫学分析技术仪器化程度低, 操作简便, 特别是对样本前处理要求简单, 易于推广, 国际上许多权威机构将其列为九十年代优先发展的分析技术之一^[5,6]。Karu 等 (1990) 曾试图用免疫分析法检测动物组织中的伊维菌素 (Ivermectin)^[7]。本试验拟使用本室制备的抗阿维菌素抗体 (另文发表) 研究建立检测牛组织中阿维菌素残留的间接竞争酶联免疫吸附测定法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与溶液: 阿维菌素 (B₁ 含量 > 97%, B_{1a} ≈ 80%, B_{1b} ≈ 20%, 本校微生物工厂提供, 配制 100 μg/mL 的甲醇贮备液, -20℃ 存放, 用于配制工作标准液), 抗 AVM 血清和包被原 (本室制备), 过氧化氢酶标记羊抗兔抗体 (HRP-IgG, 工作浓度 1: 1000, 中国军事医科院五所), ELISA 所用溶液 (按常规方法配制)。其他试剂均为 AR 级。

1.1.2 试验器材: 聚苯乙烯酶联反应板 (40 孔, 浙江), 微量移液器 (20~200 μL, 北京), 酶联免疫检测仪 (DG-1 型, 南京), 组织捣碎机 (YQ-3 型, 江苏), 涡动混合器 (SH861, 江苏), 超声波振荡器 (CX-100 型, 北京)。

1.2 试验方法

1.2.1 ELISA 竞争反应条件的选择: 间接竞争 ELISA 基本操作程序参照 Tijssen (1985) 的方

法^[8]。反应的基本介质为 PBST (0.01mol/L, pH7.4—0.15mol/L NaCl—0.5% Tween-20), 以 PBST 为基础配制系列反应液, 用以稀释 AVM 标准液和抗血清。

1.2.1.1 包被原(C_{Ag})和抗血清稀释度(工作浓度)根据方阵滴定结果(见另文), C_{Ag} 浓度和抗血清稀释度为: C_{Ag} 1.25 μ g/mL 4"-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA, 1:3200 抗血清;或 C_{Ag} 1.25 μ g/mL 5-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA, 1:1600 抗血清。

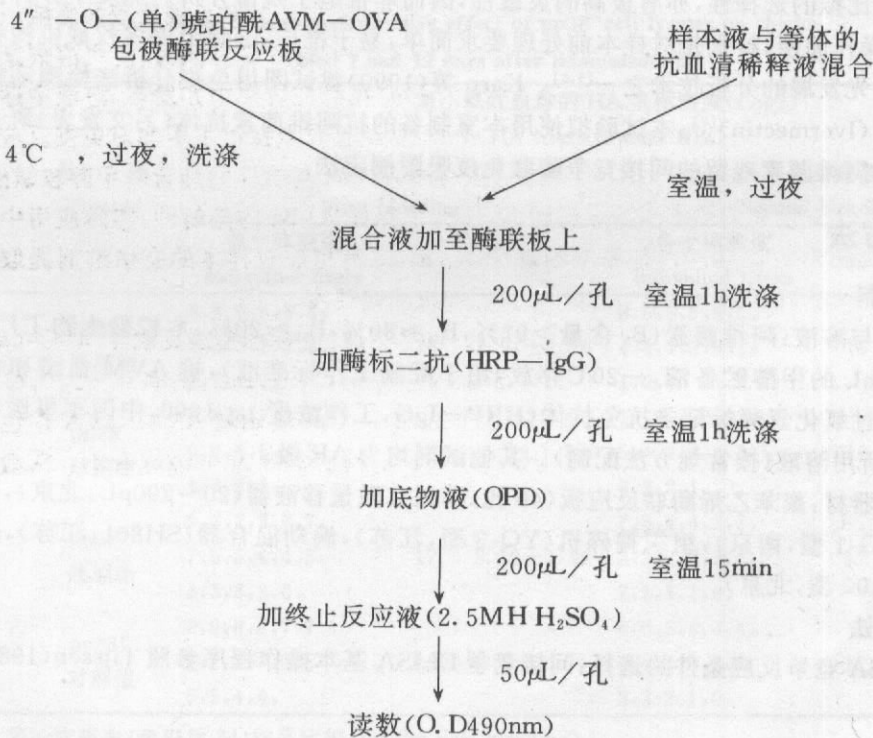
1.2.1.2 竞争反应 pH 值:用 2.0mol/L NaOH 或 2.0mol/L HCl 调节 PBST, 配制如下 pH 值的反应液:pH5.4、pH6.4、pH7.4 和 pH8.4。

1.2.1.3 离子强度:配制含 0.05、0.10、0.50 和 1.5mol/L NaCl 的一定 pH 值的 PBST。

1.2.1.4 有机溶剂:配制含 5%、10%、20% 和 30%(v/v) 甲醇的 PBST。

1.2.2 样本处理方法:研究不同提取溶剂对免疫反应的影响, 样本包括空白牛血浆、肌肉和肝组, 溶剂包括甲醇、乙醇、乙腈和丙酮。提取方法:取 5.00g 样本置捣碎杯中与 10.0mL 溶剂混合, 高速捣碎 2min(血浆在具塞聚丙烯离心管中与有机溶剂涡动混合 2min), 样品转至 50mL 聚丙烯管中, 捣碎杯和刀片以适量溶剂洗涤并定容至 15.0mL。超声波振荡 30min, -20℃ 冷冻 2~3h, 取出后立即以 2000g 离心 5min, 取上清液适量与等体积的 PBST 混合(有机溶剂含量约 33%, v/v), 直接用 ELISA 检测。

1.2.3 样本介质的标准曲线:以选定的有机溶剂提取空白样本, 提取液用 PBST 做 1:1(v/v) 稀释, 以此配制 AVM 系列浓度:0.0、0.01、0.1、1.0、10.0、100 和 1000ng/mL。按已优化的 ELISA 竞争反应条件操作, 绘制各样本介质的标准曲线 $B/B_0 \sim \text{Log}C$ (B , 加样孔的 O.D 值; B_0 , 空白孔的 O.D 值)。基本操作过程如下:



1.2.4 样本添加回收率测定:取 5.0g 解冻的空白样(预绞碎),加入一定量 AVM 标准液,混合后放置数分钟,按上述方法提取和稀释后,取 1.0mL 样本液与 1.0mL 1:3200 稀释的抗血清混合,室温反应过夜,将 200 μ L 反应液加至 1.25 μ g/mL 4"-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA 包被的酶联反应板上,进行 ELISA 测定。根据相应样本介质的标准曲线计算 AVM 浓度和回收率。

2 结果与讨论

2.1 ELISA 竞争反应条件优化 1971 年 Engvall 和 Perlman 首次建立 ELISA 方法^[9],此后经过许多改进和发展,已成为免疫分析中最重要的技术之一。ELISA 以简便、灵敏著称,近年来有取代放射免疫测定法(RIA)的趋势。本文采用的间接竞争 ELISA 法测定半抗原或兽药具有许多优点:"二步(two-step)"竞争法使反应的灵敏度和重复性得到提高,因为大多数游离半抗原与抗体的亲合性不如包被原载体上的抗原决定簇,将抗体预先同样品中的待测半抗原反应,然后再与包被原在反应板上进行竞争,可使抑制反应更加完全;间接法虽使操作步骤增加,但避免了样本基质对酶活性的影响;大多数酶标二抗有商品出售,省去了待测物或抗体的标记程序。另外,选择非免疫原做包被原,可避免针对载体的部分抗体的结合,提高反应的灵敏度。

试验结果表明,pH 值(5.4~8.4)和离子强度(0.05~1.5mol/L NaCl)对竞争反应无明显影响,为方便起见,选择 pH7.4,离子强度水平为 0.15mol/L NaCl。AVM 与抗体的结合反应在 5~10%(v/v)甲醇中不受影响(I_{50} =6.3ng/mL),20%甲醇对反应有轻微抑制(I_{50} =10.0),30%甲醇则明显抑制竞争反应(I_{50} =39.8ng/mL)。AVM 属脂溶性化合物,水中溶解度仅为 7~10 μ g/L(21 $^{\circ}$ C)^[4],这给以水溶液为基本反应介质的免疫分析造成一定困难。向溶液中加入一定量有机溶剂可提高此类化合物在其中的溶解性。探讨非水介质对免疫反应的影响一直是设计低水溶性化合物免疫方法所关注的问题。Russell 等(1989)的研究认为,有机溶剂亲脂性越强,对半抗原与抗体间的结合反应影响越大^[10]。另外,我们在研究中亦发现,溶液中适量的甲醇存在能显著降低 AVM 在容器壁上的吸附。所以,本试验重点探讨了甲醇对免疫反应的影响。这一试验结果有二方面意义。其一,在上述条件中,AVM 与抗体的结合对甲醇较敏感,推测 AVM 免疫反应中疏水交互作用的成份较大,但为了保证 AVM 的溶解性,实际应用中介质的甲醇含量宜控制在 10%(v/v),最高不超过 20%;其二,有可能对样本的有机溶剂提取液经适当稀释后直接测定,避免了样本的浓缩步骤,可加快测定速度。

优化的 ELISA 方法检测 AVM(介质为 PBST-10%甲醇)的标准曲线见图 1。4"-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA 作包被原的 ELISA 方法标准曲线的 I_{50} =4.0ng/mL,斜率=-2.0,检测极限为 0.2ng/mL[(B_0 -2SD)/ B_0 对应的 AVM 水平]。5-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA 作包被原的 ELISA 方法标准曲线的 I_{50} =1.8ng/mL,斜率=-2.4,检测极限为 0.02ng/mL。前者的灵敏虽低于后者,但测定范围较大。

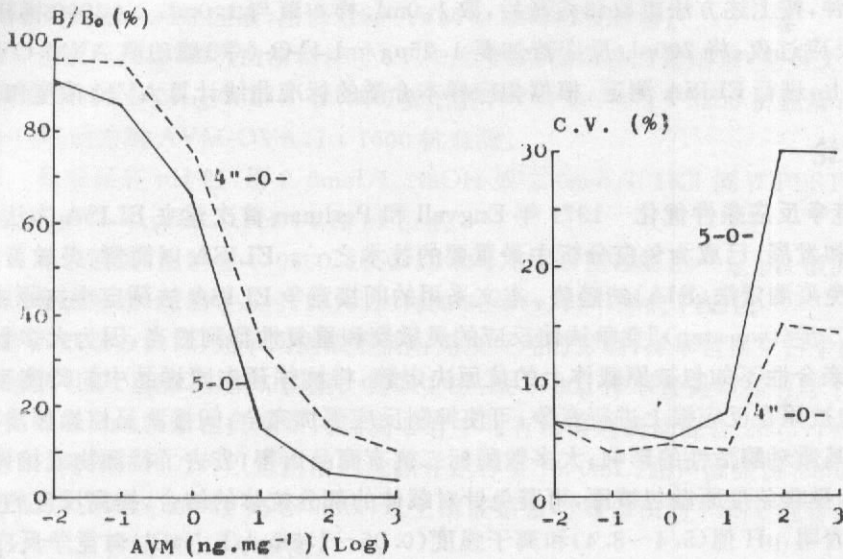


图 1 ELISA 标准曲线(介质为 PBST-10% 甲醇, v/v)。包被原 4''-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA (1.25 μ g/mL), 1 : 3200 抗血清; 包被原 5-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA (1.25 μ g/mL), 1 : 1600 抗血清。B₀, n=10; B, n=4。

Fig. 1 ELISA standard curves for AVM prepared using PBST-10% MeOH(v/v) C_{Ag} 1.25 μ g/mL 4''-O-succinoyl AVM-OVA and 1 : 3200 antiserum; C_{Ag} 1.25 μ g/mL 5-O-succinoyl AVM-OVA (1 : 1600 antiserum). B₀, n=10; B, n=4.

2.2 样本前处理 免疫反应的高特异性和亲合性(K_d=10⁻⁶—10⁻¹²M)赋予了 ELISA 极高的选择性和灵敏性。高选择性使样本前处理十分简单, 仅需提取可能就足够了; 高灵敏性使得对样品的稀释不会影响对样本的检测。事实上, 稀释样本或提取液已成为 ELISA 降低基质干扰的重要方法^[10]。

AVM 组织结合性弱, 易为有机溶剂提取^[3]。表 1 为各种有机溶剂的牛血浆提取液(PBST 作 1 : 1 稀释)对免疫反应的影响。显然, 甲醇和丙酮对反应抑制最小。试验中主要选用甲醇作提取溶剂。

表 1 溶剂提取液对免疫反应的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of extracts

提取液*	甲醇	乙醇	乙腈	丙酮	
Medium/Extract*	PBST-10%CH ₃ OH	Methanol	Ethanol	Acetonitrile	Acetone
B ₀ (x \pm SD, n=4)	1.23 \pm 0.04	1.20 \pm 0.02	0.81 \pm 0.04	0.89 \pm 0.01	1.19 \pm 0.03
Inhibitor (%)	—	2.4 \pm 1.80	34.0 \pm 3.30	28.1 \pm 1.10	3.0 \pm 2.30

* Bovine plasma

将甲醇提取液作 1:1 稀释(样本被稀释 6 倍),反应介质中甲醇含量约 16.7%(v/v),不会对竞争反应有严重影响。另外,通常样本中 AVM 浓度为 10~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,稀释 6 倍后,AVM 浓度基本上在 I_{50} 附近,测定结果重复性高。

2.3 样本标准曲线和添加回收率 甲醇作提取溶剂的各样本标准曲线及一些重要参数见图 2 和表 2。添加回收率试验结果列于表 3。添加回收率为 2 周内的测定结果。各样本及不同添加水平(6.0 和 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的回收率结果较为一致,即 87.9~108.8%(95.0 \pm 8.0%),变异系数(CV)为 2.8~16.9%(10.0 \pm 5.2%)。上述试验结果得益于简便的测定过程,样本仅需一步提取和稀释即可直接测定,较目前应用的 HPLC 荧光衍生化检测法的几十步操作大大简化。各样本 ELISA 的检测极限为 0.1~0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,亦为常规理化方法(1~3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)所不及。

综上所述,本试验所建立的间接竞争 ELISA 方法的测定牛组织中 AVM,与常规理化方法相比具有简便、灵敏和快速的特点,可用于组织中 AVM 残留的快速检测。

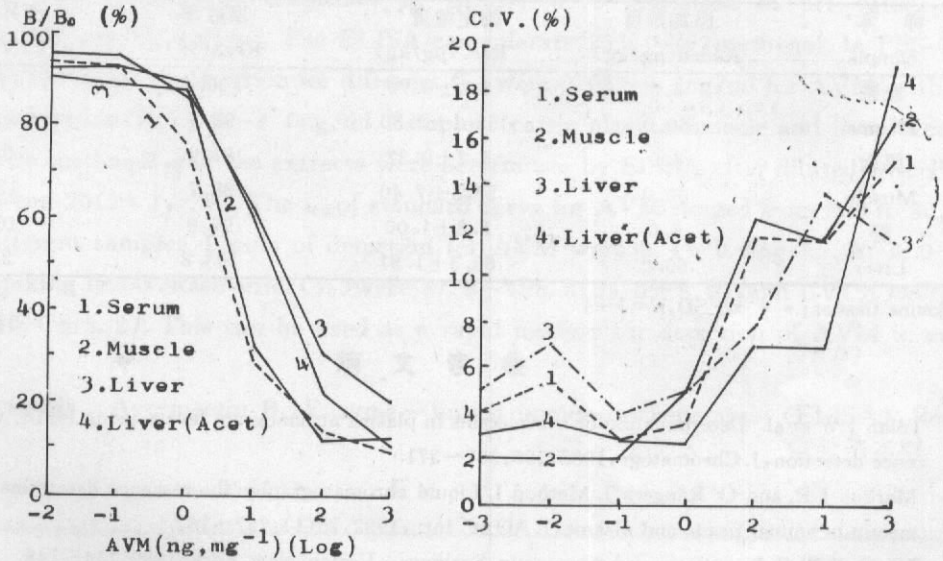


图 2 样本介质的 ELISA 标准曲线。包被原 4'-O-(单)琥珀酰 AVM-OVA(1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1:3200 抗血清。B₀, n=10; B, n=4。

Fig. 2 ELISA standard curves (semi-log) for AVM prepared by adding AVM to diluted MeOH extracts (1:1 dilution). CAg, 4'-O-succinoyl AVM-OVA (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Antiserum 1:3200. Symbols represent the extracts from 1. Bovine plasma, 2. Bovine muscle, 3. Bovine liver, 4. Bovine liver (acetone extract). (B₀, n=10; B, n=4).

表2 样本标准曲线的若干参数(n=4)

Table 2 Sensitivity of ELISA for avermectin B₁ in samples (n=4)

样本 Sample	I ₅₀ (ng/mL)	斜率 Slope	检测极限(μg/kg) Limit of detection
血浆 Plasma	3.6	-2.2	0.6
肌肉 Muscle	4.6	-2.6	0.6
肝 Liver	30.2	-1.6	0.1
肝* Liver	17.2	-1.9	0.1

* 丙酮提取物 Acetone extract

表3 样本添加回收率

Table 3 Recoveries of Avermectin B₁ from spiked samples

样本 Sample	添加浓度 Added(μg/kg)	测定浓度** Rec.(μg/kg)	回收率 Rec.(%)	变异系数 C.V(%)
血浆 Plasma	6.0	6.0±0.70	100.4	11.6
肌肉 Muscle	6.0	5.2±0.32	87.9	9.1
肝 Liver	6.0	5.8±1.00	97.0	16.9
肝 Liver	60.0	65.3±1.91	108.8	2.8

* Bovine tissues; ** $\bar{x} \pm SD, n=3 \sim 4$

参 考 文 献

- [1] Tolan J W et al. Determination of avermectins in plasma at nanogram levels, using HPLC with fluorescence detection, J. Chromatogr, 1980, 190: 367~371.
- [2] Markus J R. and O' Rangers J. Method I. Liquid chromatography/fluorescence determination of ivermectin in animal tissue and plasma, J. AOAC Int., 1992, 75(4): 757~767.
- [3] Campbell W C. Ivermectin and Abamectin, Springer-Verlag, New York, 1989, 144~148.
- [4] Wehner T et al. Abamectin, in Comprehensive Analytical Profiles of Important Pesticides, CRC Press, Inc, 1993, 73~105.
- [5] Vanderlann M. Immunoassays for Trace Chemical Analysis; Monitoring Toxic Chemicals in Humans, Food, and the Environment, ACS Washington, D. C., 1991: 2~13.
- [6] Conaway J E. New trends in analytical technology and methods for pesticide residue analysis, J. AOAC Int, 1991, 74(5): 715~717.
- [7] Karu A E et al. Avermectins, in Immunochemical Methods for Environmental Analysis, ACS. Washington, D. C., 1990, 96~109.
- [8] Tijssen P. Practice and Theory of enzyme immunoassays, Elsevier, Amsterdam, 1985, 330~347.
- [9] Engvall E and Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochem, 1971, 8: 871~874.
- [10] Russell A J et al. Antibody-antigen binding in organic solvents, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1989, 158(1): 80~85.
- [11] Chan D W. Immunoassay, A Practical Guide, Academic Press, Inc., California, 1987.

STUDIES ON ELISA FOR AVERMECTIN B₁ RESIDUE IN CATTLE TISSUESLi Junsuo¹, Qian Chuanfan²

¹*Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Vet. Med.,
Beijing Agricultural University, Beijing 100094*

²*Department of Applied Chemistry, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*

Abstract

A rapid and sensitive indirect competitive ELISA for avermectin B₁ (AVM) residue was developed. The competitive conditions of ELISA were optimized in pH values, ionic strengths, and organic solvent. The ELISA can tolerate 20% (v/v) methanol. In PBS-0.5% Tween-20, the limits of detection for different C_{Ag} were 0.02~0.2ng/ml for AVM, with half-maximal inhibition (I₅₀) 1.8~4.0ng/ml. Samples (cattle plasma, muscle and liver) were extracted with methanol, and the extracts were determined by ELISA after diluted with PBS-0.5% Tween-20 (1:1, v/v). The I₅₀ of standard curve for AVM ranged from 3.6 to 30.2ng/ml for different samples. Limits of detection for AVM were 0.1~0.6μg/kg. At 6.0~60.0μg/kg spiking levels, Recoveries (%) were 87.9~108.8 (95.0±8.0), and CV (%) were 2.8~16.9 (10.0±5.2). This can be used as a rapid method for detection of AVM in animal tissues.

Key words Avermectin B₁, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Residue analysis

庆祝中国畜牧兽医学学会成立六十周年同庆单位(补充单位)

扬州大学农学院, 苏州太湖猪育种中心, 佛山市畜牧总公司,
吉林省农业科学院畜牧科学分院, 河南郑州种畜场,
河南省国营正阳种猪场, 内蒙古农牧科学院,
辽宁省畜牧兽医研究所, 沈阳农业大学畜牧兽医学院,
东北养猪研究会, 鞍山天意畜牧实业有限公司种猪场,
南海水牛奶品研究中心, 玛氏公司爱芬食品(北京)有限公司。

(全部同庆单位已在 1996 年第 5 期刊出)