

鸡肝中链霉素残留的 2 种免疫分析法

秦 燕¹, 鲍伦军, 朱柳明

(广州出入境检验检疫局 食品检验中心, 广东 广州 510623)

摘要: 研究对比了鸡肝中链霉素残留的酶联免疫分析(ELISA)和 Charm II 放射免疫分析(RIA)。ELISA 分析中, 链霉素标准在 0.5~128.0 μg/L 的范围内呈良好线性, 定量检测限为 30 μg/kg。RIA 分析中, 链霉素标准在 25~500 μg/L 的分析浓度范围内相关性较好, 筛选水平为 200 μg/kg。2 种方法的检测限、精密度、回收率等指标符合鸡肝链霉素残留监控的最大允许限量要求。ELISA 方法对二氢链霉素的交叉反应率为 155%。

关键词: 链霉素; 酶联免疫; 放射免疫; 交叉反应

中图分类号: TQ460

文献标识码: A

文章编号: 1001—411X (2003) 04—0088—04

链霉素是最常用于食用性动物的氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside antibiotics, AGs)之一。美国、加拿大等国官方机构调查发现其是仅次于青霉素的最常在动物中残留超标的药物。由于已发现氨基糖苷类抗生素损害脑神经, 引起失聪和损害肾脏, 欧盟等国对它们在食品中的残留限量规定不断降低。我国的残留监控计划样品基质已经从牛奶扩大到各种动物的肌肉、肝脏和活体动物的血清、尿液等。链霉素是极性、非挥发性高分子量化合物, 仪器分析一般采用液相色谱法。大致分为 2 类, 即先用柱前衍生方法形成非极性荧光邻苯二甲醛衍生物然后进行反相色谱分析; 或用离子对色谱法将极性组分分离后联机进行柱后衍生^[1], 前处理复杂, 费用高。免疫初筛法则前处理相对简单、仪器成本低且能实现分析的高通量筛选, 目前对检测方法的报道尚不多^[2]。为此, 本文研究了鸡肝中链霉素残留的 ELISA 和 RIA 分析方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

标准品链霉素(Streptomycin)购自 Sigma 公司, 双氢链霉素(Dihydrostreptomycin), 质量分数>99%, 购自 Fluka 公司; 德国 r-Biopharm 公司链霉素酶联免疫试剂盒(包被羊抗抗体的微孔条、链霉素标准、酶标抗原、抗体、酶反应底物和发色剂、反应终止液及缓冲液); 美国 Charm 公司链霉素放射免疫试剂盒 STMSU011A[细菌受体药片、³H 标记链霉素抗原、组织阴性对照干粉, 多种抗生素浓缩标准品(以下简称多抗标准)、萃取缓冲液(MSU 缓冲液)和 pH 调节缓冲液(M2 组成); Optifluor[®] 闪烁液(Canberra 公司); 正己烷等]。

PBS-Tween 缓冲液: 0.55 g NaH₂PO₄·H₂O, 2.85 g

Na₂HPO₄·2H₂O, 9 g NaCl, 1 mL Tween, 定容到 1 000 mL。Carrez I: 0.36 mol/L 亚铁氰化钾; CarrezII: 1.04 mol/L 硫酸锌。

测试样品来源于全国动物源性食品中药物残留监控计划送样。

主要仪器: 自动洗板机和酶标仪(Biosystem 公司); Charm II 6600/7600 系统(Charm 公司, 由旋涡混匀器、孵育箱、IEC 离心机和液体闪烁仪组成); MilliQ 纯水发生器(Millipore, Bedford 公司, USA); 微量移液器 20~200 μL, 100~1 000 μL(Biohit 公司, Finland); 均质机(IKA T18 basic, 10 mm 均质刀); Beckman 离心机; 旋涡振荡器等。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫法 称 5 g 去脂肪绞碎后的鸡肝, 用 20 mL PBS-Tween 缓冲液混合提取 30 min, 4 200 r/min, 离心 10 min, 转移 4 mL 上清液并加入 Carrez I 及 Carrez II 溶液各 0.1 mL、水 0.8 mL 旋涡混合 30 s, 4 200 r/min、10 min 离心, 取 2 mL 上清液分别用正己烷 3 mL 2 次脱脂, 4 000 r/min, 离心 10 min 后下层清液用 PBS-Tween 缓冲液以 1:8 比例稀释。样品进行 ELISA 分析程序。

1.2.2 放射免疫法 称取去除脂肪的 10 g 鸡肝溶于 30 mL MSU 缓冲液, 均质 30~60 s, 在 (80±2) °C 孵育 30 min, 然后置于冰浴中 10 min, 在 1 800 r/min、离心 10 min, 小心地弃去表层脂肪, 上清液用 M2 缓冲液或 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 7.5。样品进行竞争性 RIA 分析程序。

1.2.3 特异性测定 以交叉反应率来表示。交叉反应率用竞争抑制曲线判断, 以不同浓度抗原和近似抗原分别作竞争抑制曲线, 以零浓度标准对应的 $D_{450 \text{ nm}}$ 为 100, 计算各自的相对 $D_{450 \text{ nm}}$ 值(即相对结合

率 B/B_0), 求出各自产生 50% 抑制率的 I_{50} 浓度, 交叉反应率为 I_{50} 的比值^[3].

1.2.4 放射免疫分析性能监测 采用 MSU 缓冲液为阴性对照, 将多抗标准溶液(含链霉素 10 000 $\mu\text{g/L}$) 加水稀释至一定浓度作为阳性对照液代替样品前处理液, 进行竞争性 RIA 测试.

1.2.5 细菌受体放射免疫法筛选浓度和相应控制点的确定 根据竞争性放射免疫工作曲线选取 $B/B_0 < 0.7$, 且位于曲线斜率变化较陡的中间段的点作为分析浓度, 乘以前处理的稀释倍数即是筛选浓度. 相应控制点为 6 次空白样品对应的筛选水平加标的每分钟放射性计数(count per minute)平均值乘上系数 1.3.

2 结果与分析

2.1 酶联免疫法

2.1.1 标准工作曲线 以链霉素标准浓度的对数为横坐标, 对应 $D_{450\text{ nm}}$ 与零标准 $D_{450\text{ nm}}$ 的比值(B/B_0)百分数为纵坐标绘制标准曲线, 线性回归方程为 $Y = -13.62X + 171.18$, 相关系数 $R = 0.997$, 如图 1.

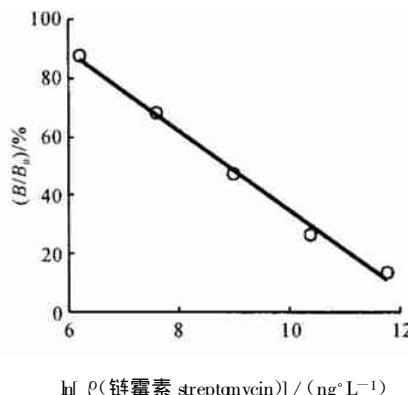


图 1 链霉素 ELISA 标准工作曲线

Fig. 1 The calibration curve of streptomycin ELISA

以测得样品的 $D_{450\text{ nm}}$ 除以零标准 $D_{450\text{ nm}}$ 的比值百分数为 Y 值, 由回归曲线可以求出相应的 X , 反对数计算出样品液的浓度, 乘以相应的前处理稀释倍数即是鸡肝中链霉素含量.

2.1.2 反应特异性 将图 2 中的二氢链霉素工作曲线进行半对数线性回归, 方程为 $Y = -12.79X + 158.17$, $R = 0.999$. 由此可以算出此免疫反应系统链霉素和二氢链霉素的 I_{50} 分别为 7.32 和 4.71, 即以链霉素为基准抗原, 试剂盒对二氢链霉素的交叉反应率为 155%. 即若采取 1.2.1 的前处理方法, 链霉素稀释倍数为 50, 则相应二氢链霉素的稀释倍数为 32.

这是因为链霉素免疫半抗原和结合抗原的合成过程常采用成脂反应, 发生在链霉糖的 3-C 处. 而

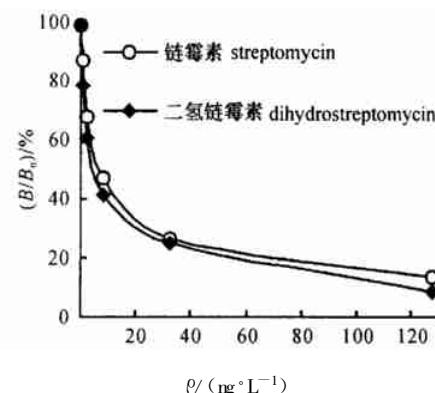


图 2 链霉素和二氢链霉素的 ELISA 标准工作曲线

Fig. 2 The standard ELISA curve of two varieties of AGs

二氢链霉素与链霉素唯一的结构差异就在于前者的 3-C 处有一 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 官能团, 而后者是 $-\text{CHO}$, 因此在成脂反应连接上蛋白后, 它们的结构差异被屏蔽, 免疫半抗原的抗原决定簇非常相似, 由其制备的抗体对二者都有很好的选择性.

2.1.3 检测限和定量检测限 检测灵敏度取决于曲线的斜率和零标准点 $D_{450\text{ nm}}$ 的变异. 有关 ELISA 方法的检测限(limit of detection, LOD)和定量检测限(limit of quantitation, LOQ)的定义, 文献报导不尽相同: Stephen^[4] 采用样品试剂空白的 3 倍标准偏差对应的浓度作为 LOD, 10 倍标准偏差对应的浓度值作为 LOQ; Willem^[5] 采用空白背景加 3 倍标准偏差作为 LOD. Parnell 等^[6] 采用 B/B_0 为 90% 对应的浓度作为 LOD, 零标准的 10 倍标准偏差对应浓度作为 LOQ. 本文以 B_0 的 3 倍标准偏差作为 LOD, 10 倍标准偏差作为 LOQ, 如表 1.

表 1 鸡肝中链霉素残留 ELISA 分析的检测限和定量检测限

Tab. 1 The limit of detection and limit of quantitation of the streptomycin ELISA determination in chicken liver

零标准对应的空白浓度 zero standard blank concentration / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	检测限 standard deviation SD / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量检测限 (limit of quantitation) $/ (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
186.2 263.3 208.0	61.3	0.184 0.613
288.1 140.2 142.6		

前处理过程中样品稀释了 50 倍, 因此对肝脏中链霉素的实际定量检测限约为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 需要指出的是, 对某些高脂肪含量的基质如鱼, 还需考虑基质的影响, 相应的检测限和定量检测限应加上阴性样品背景值.

2.1.4 精密度试验 测定了 R-Biopharm 的 ELISA 试剂盒的工作曲线变异系数, 如表 2 所示.

表2 ELISA试剂盒的批间变异系数

Tab. 2 The precision profile for streptomycin ELISA kit

ρ 标准(链霉素) streptomycin standard concentration/(ng·L ⁻¹)	(B/B ₀) /%						平均值 average / %	标准偏差 SD	变异系数 CV / %
500	87.6	91.8	89.0	93.0	83.4	84.0	88.0	3.94	4.47
2 000	68.1	76.7	69.6	74.1	68.6	66.0	70.5	4.05	5.74
8 000	47.6	50.1	48.4	48.8	51.1	45.5	48.6	1.96	4.03
32 000	26.9	34.3	25.9	29.2	32.3	24.3	28.8	3.87	13.4
128 000	13.8	21.4	15.3	15.6	16.5	12.8	15.9	3.00	18.9

免疫测定的标准曲线比较复杂,一般要求高端和低端的变异系数 $\leq 25\%$,由表2可知工作曲线满足此要求。

2.1.5 回收率试验 取空白鸡肝样品,添加不同水平的链霉素标准,计算回收率,结果见表3.

表3 空白鸡肝的ELISA加标试验测定

Tab. 3 The recovery rate test on fortified chicken liver

空白鸡肝加标水平 blank chicken liver fortified level (w)/(μg·kg ⁻¹)	测得浓度 concentration detected (w) / (μg·kg ⁻¹)						平均回收率 average recovery rate / %	变异系数 CV / %
50	15.4	17.5	19.6	22.1	26.8	28.2	43.2	23.6
100	42.3	44.2	32.7	42.0	47.3	59.4	44.7	19.5
200	107.5	133.6	117.0	145.2	136.4	105.9	62.1	13.2
500	274.0	331.6	354.1	309.2	337.4	364.2	65.4	10.0

从表3可以看出,由于肝脏的基质干扰成分多,前处理相对复杂,稀释了近50倍,且在低浓度添加水平时,分析浓度处在标准曲线的 $D_{450\text{ nm}}$ 读数高端,变异系数较大,因此回收不是很理想,随添加水平增加,平均回收率增加,变异系数也随之降低。在200 μg/kg时,回收率约有60%左右。

2.2 放射免疫法

2.2.1 筛选浓度的调节 将多抗生素标准用MSU缓冲液依次稀释到0、25、50、125、250、500 μg/L,由每分钟放射性计数计算 B/B_0 ,结果如图3。回归方程为 $Y = -22.72X + 143.52$,Charm II体系是以细菌受体作为抗原结合位点的竞争放射免疫分析,其抗体性质决定了当采取回归方程中最为简单的线性回归,其相关系数不会太高, $R = 0.965$ 。方法推荐的组织筛选浓度是500 μg/kg,而规定的最大残留限量是300 μg/kg,不能满足初筛要求。从图3可看出在不改变前处理稀释倍数的条件下,分析浓度为50 μg/L时,恰接近竞争反应体系灵敏度最高的 I_{50} (约为60 μg/L)处,此时筛选浓度为200 μg/kg。因此选择50 μg/L为样品筛选分析浓度。

2.2.2 基质的影响 将空白鸡肝样品进行加标试验,加标水平分别为100、200、500、1 000和2 000 μg/kg,前处理稀释倍数为4,与相应分析浓度的阳性控制比较,见图4。从图中可看出,鸡肝基质的干扰使曲线的斜率绝对值变小, B_0 减少,灵敏度有所下降。因此选择空白样品加标的办法来确定控制点以尽量减除基质的影响。

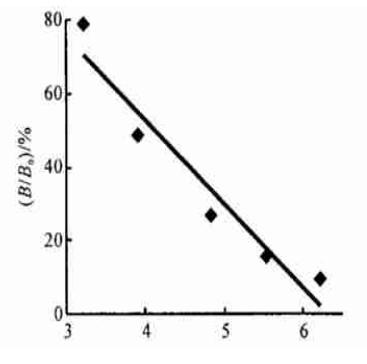


图3 链霉素RIA分析的工作曲线
Fig. 3 The calibration curve for streptomycin RIA

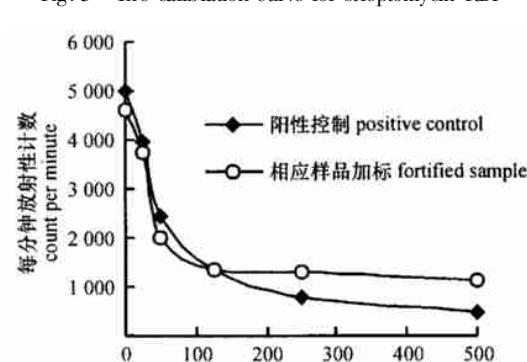


图4 样品基质对 RIA 分析的影响
Fig. 4 The effect of matrix on streptomycin RIA

2.2.3 反应特异性 二氢链霉素的交叉试验表明,此细菌受体药片与二氢链霉素的竞争结合力很低,

交叉反应率<1.0%. 即此 Charm II 放免体系对链霉素特异性较高.

2.2.4 精密度试验和样品加标试验 将组织阴性对照液用 MSU 缓冲液稀释后配成阴性对照, 多抗标准稀释成 50、125 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性对照, 空白样品及其 2 个添加水平 200、500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的样品按 1.2.2 前处理, 每个做 6 次平行样, RIA 分析测试每分钟放射性计数, 结果如表 4.

表 4 系统性能监测和样品测定的精密度试验

Tab. 4 The performance monitoring and precision test for sample testing

测试种类 kind of test	阴性 控制 negative control		阳性控制 positive control		空白 样品 blank sample	样品加标 fortified level $\mu\text{g}/\text{kg}$
	50 $\mu\text{g}/\text{L}$	125 $\mu\text{g}/\text{L}$	200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
每分钟 放射性 计数	5015 4876 5327	2429 2138 2007	1340 1716 1423	4615 4923 4678	2011 1900 2375	1467 1594 1437
count per minute	4630 4925 5180	2536 2249 2613	1348 1452 1660	5106 4228 4009	1844 2237 2156	1340 1211 1508
平均值 average	4992	2329	1490	4593	2087	1426
标准偏差 SD	243.8	236.7	160.4	413.3	204.9	134
变异系数 CV/%	4.9	10.2	10.8	9.0	9.8	9.4

从表 4 可以看出, 作为性能监测的阴性对照和阳性对照其标准偏差和变异系数均能满足有关免疫分析的精密度要求^[7]. 空白样品加标后, 变异系数小于 10%, 且其每分钟放射性计数对应的标准曲线的浓度与加标水平相当. 因此此体系可以进行鸡肝样品链霉素测试的筛选, 筛选水平为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 控制点的确定应按 1.2.4, 样品读数大于控制点判为阴性, 小于控制点判为怀疑阳性, 需复作分析, 仍为阳性则可判定为初筛阳性.

3 结论

欧盟等国对肝脏中链霉素残留的最大允许限量(MRL)为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 2 种免疫分析法的检测限、精密度、回收率等指标都能符合检测要求. ELISA 分析中, 链霉素标准在 0.5~128.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的范围内呈良好线性, 定量检测限为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. RIA 分析中, 链霉素标准在 25~500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的分析浓度范围内相关性较好, 筛选水平为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

ELISA 方法虽然检测限量低, 但前处理复杂, 回收率只有 60% 作用. 相比下, RIA 虽然筛选水平较高, 但前处理简单, 分析速度快. 而且 2 种方法对二氢链霉素的交叉反应是不同的, Charm II RIA 对二氢链霉素交叉反应率不到 1%, 而 ELISA 的交叉反应达 155%. 因此, 可根据实际情况, 选择适合测定链霉素和二氢链霉素总量的 ELISA 方法或对链霉素特异性强的 RIA 方法.

参考文献:

- [1] SHERRI B T, AUSTIN R L. 动物源性食品中的药物残留分析[M]. 福建省进口食品行业协会译. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1998. 257—283.
- [2] JULIE F, ANDREW B. The measurement of streptomycin concentration in food products[J]. Biacore, 2001, (2): 8—10.
- [3] 吴健民. 临床化学自动化免疫分析[M]. 上海: 科学出版社, 2000. 18—21.
- [4] STEPHEN B C. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of glyphosate[J]. Agric Food Chem, 1999, 47(12): 5 031—5 037.
- [5] WILLEM H. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney[J]. Analyst, 1999, 124(3): 301—305.
- [6] PARNELL J S, CHRISTOPHER J H. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of metosulfuron[J]. Agric Food Chem, 1998, 46(12): 152—156.
- [7] 李俊锁, 邱月明, 王 锁. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 219—220.

The Determination of Streptomycin Residue in Chicken Liver with Two Immunoassay Methods

QIN Yan, BAO Lun-jun, ZHU Liu-ming

(The Food Inspection Center of Guangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: This paper reports the determination of streptomycin residue in chicken liver with two immunoassay methods, ELISA and RIA. For ELISA method, the standard curve was rectilinear in the range of 0.5—128.0 $\mu\text{g}/\text{L}$, and the limit of quantification was 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$; For RIA method, the standard curve was also relatively rectilinear, the screening level was 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The detection limit, the precision and the recovery rate of the two methods all met the EU's Maximum residue limit (MRL) requirement for streptomycin residue monitoring. The paper also discussed the cross reaction of dihydrostreptomycin, and compared the difference between the two immunoassay methods.

Key words: streptomycin; ELISA; RIA; cross reaction

【责任编辑 柴 焰】

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>