

兽药残留的免疫学快速检测技术概述

张改平, 职爱民, 邓瑞广, 杨艳艳, 邢光旭, 杨继飞, 刘庆堂

(河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 简要阐释了免疫学快速检测技术在兽药残留检测中的应用, 并对此领域中的研究进展进行了简单介绍。

关键词: 兽药残留; 免疫学快速检测; 半抗原; 成就; 展望

中图分类号: S851.34⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)09-0193-04

改革开放以来, 随着我国畜牧业的发展, 兽药和药物添加剂在畜牧业中应用日益广泛, 其在降低动物发病率及死亡率、促生长、提高饲料报酬和改善畜产品品质方面展现出来的巨大效益, 已成为畜牧业发展的重要动力之一。然而, 兽药和药物添加剂的广泛使用, 对人类健康和环境造成了危害。对兽药残留的监测与控制已经是目前国内外兽药研究、开发和使用管理的重要内容, 各个国家和国际组织对其休药期和最高残留限量(maximum residue limits, MRLs)做出了规定, 我国也做出了严格的限制^[1]。为了实现监管的目标, 有效的检测方法必不可少。20世纪80年代以后出现的免疫学分析方法, 除了敏感特异以外, 以其特有的方便、快速和经济性在兽药残留分析上发挥着越来越重要的作用。在此, 就兽药残留的免疫学快速检测技术和本实验室在此领域取得的成就进行综述, 旨在进一步推动兽药残留免疫学快速检测技术的研发, 促进畜牧业又快又好发展, 切实保障我国食品安全水平的不断提高。

1 免疫学快速检测在兽药残留检测中的应用

免疫学快速检测是基于抗原—抗体特异性反应的检测方法。其分类方法不一而足, 一般可分为放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析、发光免疫分析、胶体金免疫分析、仪器免疫分析和无标记免疫分析等。1959年建立的放射免疫分析被认为是免疫分析的建立标志^[2], 并获得了1977年的诺贝尔生理学或医学奖。放射免疫分析在兽药残留的分析中

应用广泛^[3], 但因其需要放射性标记, 需要做相应的防护处理, 试验要求比较高, 限制了其在兽药残留分析上的广泛应用。近年来没有显著毒害作用的酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和胶体金免疫分析(gold immunochromatography assay, GICA)应用日益广泛^[4~12], 特别是GICA以其方便、敏感、特异、无污染的特性, 非常适合于兽药残留的现场检测, 代表着兽药残留免疫分析的发展方向。

2 兽药残留的免疫学快速检测技术方法的建立

兽药残留免疫分析方法的建立主要包括以下内容: 检测对象的选择、检测对象结构分析和免疫半抗原的合成鉴定、人工结合抗原的制备与鉴定、抗体的制备、检测方法的确立与方法评价等。检测对象结构分析和免疫半抗原的合成、人工结合抗原的制备与鉴定通常情况下是免疫学方法建立的关键和技术难点。

2.1 药物结构分析和半抗原的合成

兽药多为小分子化合物(分子量小于5000 Da), 在免疫学上属于半抗原的范畴, 不具备免疫原性, 无法直接刺激动物机体产生抗体, 需要先和大分子载体(如蛋白质)偶联以后方可用于抗体的生产。半抗原的免疫学特性决定了其抗体的免疫特异性, 一般来说, 结构越复杂, 其抗体的特异性和亲和力越高, 不同的化学基团、取代位置和旋光性均影响抗体的特异性^[13]。在多数情况下, 检测对象的结构不适合用于直接和蛋白质等载体直接偶联, 需要根据分析的

收稿日期: 2009-06-10

作者简介: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事动物免疫学及动物病毒分子致病机制研究。

E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

目的和免疫学理论进行抗原改造,通过合成化学的方法获得有活性基团的半抗原。半抗原改造的原则是和载体偶联以后可以最大限度地暴露原药物的结构特征,要注意避免免疫原性强的抗原决定簇,通过间隔臂的选择,使苯环、杂环等基团充分暴露。

2.2 人工结合抗原的制备

通过选择小分子半抗原中的活性基团或者改造后加入的活性基团,选择适当的偶联试剂、载体蛋白和连接条件进行人工结合抗原的制备。一般说来,半抗原中可以用于交联的活性基团有氨基、羧基、苯基、酚基、巯基和羟基等,根据不同的活性基团选择适当的偶联试剂。如氨基,可选择重氮化法、戊二醛法或者 EDC 法等,具体可参照此方面的专著文献^[14]。载体蛋白可以选择牛血清白蛋白(BSA)、兔血清白蛋白(RSA)、人血清白蛋白(HAS)、卵清蛋白(OVA)和血蓝蛋白(KLH)等,选择的主要原则是蛋白质载体对于受免动物的异源性,异源性越好,免疫原性越强;其次考虑其易得性和经济性。为了避免蛋白质变性及其生物活性的损失,药物或半抗原等与蛋白的交联应采用具有中等反应活性的试剂,在温和的条件(如接近中性的 pH、室温、水溶液)中进行。

2.3 抗体的制备

多克隆抗体和单克隆抗体都可以用于兽药残留的免疫学检测。多克隆抗体的制备包括动物免疫(免疫程序、免疫剂量的选择)、抗体纯化和鉴定等;单克隆抗体在免疫动物以后还要经过细胞融合、杂交瘤细胞株的建立、抗体的生产和鉴定等程序。多克隆抗体具有高度的异质性。不同个体产生的抗体成分不同,即使同一个体不同时间采集的抗血清的亲合性和选择性也可能存在很大差异。单抗以其永续性和高度均一性等特点,更加适合建立兽药残留的免疫学检测方法。

2.4 检测方法的确立与方法评价

2.4.1 酶联免疫吸附测定法的建立 ELISA 的建立首先要求把兽药小分子和载体蛋白偶连,用作抗体生产的免疫原和检测的包被原。结合在固相载体表面的兽药小分子或酶标记抗体仍保持其抗体抗原结合活性,酶标记抗体同时也保留酶的活性。竞争 ELISA 采用的是非均相竞争模式,可分为直接竞争模式和间接竞争模式,由于标记酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

2.4.2 胶体金免疫层析试验测定法的建立 胶体

金免疫层析试验的原理是采用柠檬酸三钠还原 HAuCl₄ 聚合成金颗粒,由于金颗粒之间的静电作用和布朗运动,使其保持水溶胶状态,胶体金富含电子和强大的给电子能力。在胶体溶液 pH8.2 条件下,胶体金以非共价键与兽药小分子抗体结合形成金标抗体(Ab—Au),将金标抗吸附于玻璃纤维棉上,一端与固定有兽药小分子蛋白质偶连物(检测线)和二抗(质控线)的硝酸纤维素膜(NC)膜相连,另一端与样品垫相连。而后连同其他所需的吸水纤维、支撑材料、覆盖材料等按照设计工艺进行制作和组装,制成快速检测试纸(图 1)。检测样品中不含兽药小分子,金标抗体就会与兽药小分子蛋白质偶连物反应而被部分截获,金颗粒富积而出现明显直观红色条带,未完全结合的金标抗体至质控线时同样会出现红色条带;检测样品中含有兽药小分子,兽药小分子与兽药小分子蛋白质偶连物竞争性结合金标抗体,检测线不出现或出现很弱的红色条带(图 2)。快速检测试纸检测小分子物质残留,检测时间仅需数分钟。

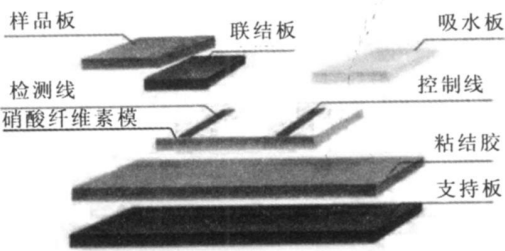


图 1 胶体金快速检测试纸条组装结构

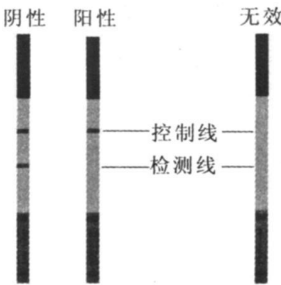


图 2 兽药残留试纸条检测小分子兽药抗原

2.4.3 方法评价 检测方法建立后要通过灵敏度、准确度、精密度、特异性、基质效应性和时间稳定性的系列研究去做综合评价,并且需要和色谱方法比较后方可定型。

3 取得的成就

河南省动物免疫学重点实验室就抗生素类药物、化学抗菌药物、兴奋剂类、镇静剂类、激素类等兽

药的快速检测开展了一系列研究工作,并取得了显著的成就。

3.1 已开展的研究

根据畜牧业中主要兽药使用现状、代谢消除规律、危害程度、安全评价和国家颁布的有关政策法规,选择危害畜产品质量安全的30多种兽药为研究对象,通过半抗原分子设计、偶联位点选择、间隔臂引入、偶联率确定、载体筛选等技术解决了半抗原药物免疫原性问题并成功制备了人工抗原;通过免疫剂量、免疫途径、免疫佐剂、免疫间隔、检测方法筛选以及抗体亲和力、类型和特异性鉴定,筛选亲和力高、特异性强的抗体,目前已建立了针对32种药物的标准化抗体库,为后续快速免疫检测试剂的研发奠定了基础。研制出了硫酸链霉素等18种兽药残留快速检测试剂盒,并研制出了莱克多巴胺等18种兽药残留快速检测测试纸条。用测试纸条检测样品中这些兽药残留,根据显色程度或是否显色用肉眼即可进行判定,检测过程可在1~15min内完成。目前正在完善各项技术参数,为进一步转化应用奠定了良好基础。

3.2 获得的成果

盐酸克伦特罗(瘦肉精)快速检测测试纸条,是国内首个获得国家专利授权的试纸技术和产品,被业界称作检测瘦肉精的“傻瓜”技术,对开展瘦肉精的群防群治工作起到了不可替代的推动作用。该研究获得2007年度河南省科技进步一等奖。“生猪主要违禁药物残留免疫试纸快速检测技术”建立了半抗原免疫试纸快速检测技术体系,研制出五大类15种违禁药物的快速检测试纸系列产品,实现了药物残留的简便、低成本快速检测,为动物源性食品安全监控提供了技术保障,该研究获得2008年度国家科技进步二等奖。目前本实验室在该研究领域申请专利16项,已获授权9项^[15~24]。盐酸克伦特罗快速检测试纸通过了农业部兽药残留检测试剂备案;磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺二甲嘧啶快速检测测试纸条分别通过中国兽医监察所、河南兽医监察所和农业部检测中心复核试验。

4 展望

畜牧业生产处在大自然食物链的后半部分,基本上贯穿于“农田到餐桌”的全过程。由于国内外市场、资源、环境、消费观念、营养理念等因素在不断地改变,人们对食品安全性的要求将会越来越高、越来越具体。控制兽药的超量超范围添加,是保证畜产品安全的一个重要方面,免疫学快速检测方法以其

有效、实用、简便和经济的诸多优点,适合于大规模的监督筛查,必将在今后的食品安全保障方面建立新的功绩。

参考文献:

- [1] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(4): 15—20.
- [2] Yalow R S, Berson S A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods[J]. Nature, 1959, 184(4699): 1648—1649.
- [3] Skelley D S, Brown L P, Besch P K. Radioimmunoassay[J]. Clin Chem, 1973, 19(2): 146—186.
- [4] 范国英, 王建华, 王自良, 等. 链霉素残留快速检测阻断ELISA试剂盒的研制及其性能测定[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(1): 82—84.
- [5] 范国英, 王建华, 朱金凤, 等. 抗链霉素杂交瘤细胞株的建立与竞争试剂盒的研制[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 46—50.
- [6] 王选年, 杨艳艳, 邢广旭, 等. 盐酸克伦特罗单抗快速检测试剂盒的研制[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 75—78.
- [7] 王自良, 王建华, 杨艳艳, 等. 苯巴比妥残留快速检测阻断ELISA试剂盒的研制及性能测定[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(4): 62—64.
- [8] 张改平, 刘庆堂, 邓瑞广, 等. 磺胺二甲基嘧啶快速阻断ELISA试剂盒的研制及其性能测定[J]. 中国预防兽医学报, 2009(1): 51—55.
- [9] Zhao Y, Zhang G, Liu Q, *et al.* Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(24): 12138—12142.
- [10] Zhang G P, Wang X N, Yang J F, *et al.* Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of beta-adrenergic agonist clenbuterol residues[J]. J Immunol Methods, 2006, 312(1—2): 27—33.
- [11] Zhang G, Wang X, Zhi A, *et al.* Development of a lateral flow immunoassay strip for screening of sulfamonomethoxine residues[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2008, 25(4): 413—423.
- [12] Li X, Zhang G, Liu Q, *et al.* Development of immunoassays for the detection of sulfamethazine in swine urine[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2009, 26(3): 314—325.
- [13] Landsteiner K. The specificity of serological reactions[M]. 2nd ed. New York: Courier Dover Publications, 1990.

用现代动物营养技术保障饲料安全高效生产

——河南省农科院动物营养学科发展纪实

李绍钰, 魏凤仙, 祁凌云
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 简要概述了河南省农业科学院动物营养学科在环境营养与品质调控、饲料安全、饲料生物技术等方面取得的成就, 并对学科的发展历程作了回顾。
关键词: 动物营养学; 微量元素; 可消化氨基酸; 畜产品调控; 饲料安全; 生物技术
中图分类号: S816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)09-0196-04

河南省农业科学院动物营养学科是院传统的优势学科, 动物营养学实验室是院首批成立的重点实验室之一。学科集结了一批精干的科研人员, 拥有较先进的实验室条件, 形成了环境营养与品质调控、饲料安全、饲料生物技术与饲料资源开发等主要研究方向。在河南省农科院建院 100 周年之际, 特对学科的发展历程作一回顾。

1 配合饲料资源调查奠定河南省饲料工业的基础

我国饲料工业的发展起步于 20 世纪 80 年代。为了打好基础, 在国家经济委员会的协调下, 由商业部牵头, 实施国家“六五”科技攻关项目《配合饲料资源调查研究》。1983 年, 河南省组织了“河南省配合饲料资源调查协作组”, 由河南省饲料公司和河南省农科院畜牧兽医研究所主持, 畜牧兽医研究所祁凌云为技术带头人。通过一年半的工作, 对河南省饲料资源的种类、数量、分布及利用情况进行了系统的

调查、采样、分析, 编制出全省第 1 份《河南省配合饲料资源营养成分表》, 为发展科学饲养, 研制高效配合饲料, 提供了科学依据。通过调查研究, 提出了河南省饲料资源开发利用的可行性建议。在调查的同时, 开展了利用酒精糟生产单细胞蛋白、利用生产胱氨酸废液生产半胱氨酸和精氨酸、沸石粉利用技术等研究。项目的开展为河南省饲料工业的发展奠定了良好的基础。

2 棉菜籽饼(粕)合理利用技术研究广辟了饲料资源

蛋白质饲料是配合饲料中最昂贵, 也是对配合饲料质量影响最大的部分。我国优质蛋白饲料资源如鱼粉、豆粕等对进口产品的依赖程度高, 而大量的棉、菜籽饼(粕)资源由于存在抗营养物质等因素而未能合理饲用。在“七五”后期和“八五”初期, 饲料室针对棉、菜籽饼(粕)的脱毒及合理利用技术开展了系统研究, 取得了显著的经济和社会效益。祁凌

收稿日期: 2009-06-10
作者简介: 李绍钰(1965-), 男, 湖北麻城人, 研究员, 博士, 主要从事动物营养与饲料科学方面的研究。

[14] Hermanson G T. Bioconjugate techniques[M] . Academic Press, 2008.

[15] 张改平, 李学伍, 杨艳艳, 等. 动物体及其产品中药物残留快速检测试纸条: 中国, ZL02115429. 5[P] . 2004.

[16] 张改平, 李学伍, 王选年, 等. 盐酸克伦特罗快速检测试纸条: 中国, ZL02101928. 2[P] . 2004.

[17] 张改平, 李学伍, 杨艳艳, 等. 动物体及其产品中药物残留快速检测试纸条: 中国, ZL02228103. 7[P] . 2002.

[18] 张改平, 李学伍, 王选年, 等. 盐酸克伦特罗快速检测试纸条: 中国, ZL02202033. 0[P] . 2002.

[19] 张改平, 李学伍, 王选年, 等. 盐酸克伦特罗快速检测试纸条(II): 中国, ZL02228104. 5[P] . 2002.

[20] 邓瑞广, 张改平, 李学伍, 等. 磺胺药多残留快速检测试纸盒: 中国, ZL200620030461. 4[P] . 2007.

[21] 张改平, 赵东, 邓瑞广, 等. 泰乐菌素残留快速检测试纸条: 中国, ZL200620135124. 1[P] . 2007.

[22] 李学伍, 张改平, 王自良, 等. 莱克多巴胺残留快速检测试纸条: 中国, ZL200620031416. 0[P] . 2008.

[23] 张改平, 杨艳艳, 邓瑞广, 等. 呋喃唑酮代谢物快速检测试纸条和试纸卡: 中国, ZL200620032382. 7[P] . 2008.