



酶联免疫吸附法 在肉制品中抗生素检测中的应用

于 颖, 徐桂花

(宁夏大学 农学院食品系 宁夏 银川 750021)

摘 要: 本文介绍了酶联免疫吸附法(ELISA)的基本原理和肉制品检测所面临的问题, 综述了ELISA在肉制品中抗生素检测中的研究进展。

关键词: ELISA; 肉制品; 抗生素; 检测

Enzyme-linked Immunosorbent Assay of Antibiotics in Meat Products Detection

YU Ying, XU Guihua

(Food Department of Agriculture College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: This paper reviews the principle of enzyme-linked immunosorbent assay, problems in meat products, and the application of ELISA in the detection of antibiotic in meat products analysis.

Key words: ELISA; meat products; antibiotic; detecting

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-8123(2009)01-0048-04

1 酶联免疫吸附法的定义和发展进程

1.1 酶联免疫吸附法的定义

酶免疫分析(EIA)是二十世纪70年代发展起来的一项新的免疫学技术,它将抗原、抗体的特异性免疫反应和酶的催化放大作用有机的结合起来。在酶免疫分析中,酶联免疫分析法(ELISA)即非均相酶免疫测定法是将抗原或抗体结合到固相载体表面,将抗原或抗体相关物质与酶交联成酶结合物,一方面保持了与相应抗原或抗体结合的免疫特性,另一方面还具有酶活性。ELISA在实际应用中有直接法、间接法、抗体夹心法、竞争法、抑制法等方法,研究者根据自身的条件和要求,灵活的设计方法。ELISA具有灵敏度高、特异性强、操作方便、仪器简单的优点。广泛应用于医学、生物

学等领域,也应用于微量小分子如农药、兽药、激素等的定性或定量检测。

1.2 酶联免疫吸附法的发展进程

1971年瑞典学者 Engvall 和 Perlmann 首次发表了酶联免疫吸附剂用于IgG定量测定的文章,荷兰学者 Van Weeman 和 Schuurs 也报道了将免疫技术发展为检测体液中微量物质的固相免疫测定方法,使得1966年开始用于抗原定位的酶标抗体技术与抗体连接起来提高其特异性和灵敏度变得十分流行。1977年Clark和Adams提出的双抗体夹心法用于目的抗原的测定。1990年西班牙等一些发现有非洲猪瘟的国家将ELISA结合Western blot技术广泛应用于非洲猪瘟病毒(ASFV)抗体的检测,以帮助实施ASFV扑灭计划。1995年,等应用基因工程技术成功建立了特异性更为理想的重组West-

收稿日期:2008-11-13

作者简介:于颖(1983-),女,辽宁阜新人,宁夏大学在读研究生。研究方向:食品安全检测及功效成份提取。E-mail:yuy_y2007@nxu.edu.cn

ern blot 技术。2006 年,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,用基因方法成功制备出 WHO 认可的新一代诊断试剂“非典型肺炎冠状病毒抗体酶联免疫试剂盒。”随着克伦特罗检测试剂盒、磺胺二甲嘧啶及磺胺二甲氧嘧啶检测试剂盒等的商品化,为快速检测带来了方便。

2 酶联免疫吸附法的基本原理

ELISA 方法有三个必要的试剂:①固相的抗原或抗体,即免疫吸附剂;②酶标记的抗原或抗体,称为复合物;③酶反应的底物。其基本原理为:将抗原或抗体固定于合适的载体上,并保持其生物活性;使抗原或抗体与某种酶连接,这种酶标抗原或抗体同时具有免疫活性和酶的活性;待测样品和酶标抗原或抗体与包被的抗原或抗体经过一系列反应;用洗涤的方法将固相载体上的复合物与其他物质分离;加入酶反应的底物,复合物上的酶催化底物使其水解,氧化或还原成有色产物,一定条件下,产物的色泽与待测物的含量直接相关,因而可以根据颜色反应的深浅对待测物进行定性或定量分析。由于酶的催化效率非常高,比化学催化剂高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍,每个酶分子每分钟催化底物转化的分子数一般为成千到上百万个,故可以极大地放大反应信号,具有很高的灵敏度。

3 影响酶联免疫吸附分析的因素

3.1 酶标记物

酶联反应分析具有高灵敏度的关键性是选用有生物放大作用的酶作为标记物。有许多酶可以作为免疫分析的标记物,非均相 EIA 中如过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶和尿素酶等。尽管实验中很难达到酶与抗原(抗体)的标记比为 1:1 的理想状态,但由于酶的放大效应,即使低的标记率也能达到较高的灵敏度。

酶标反应是 ELISA 中非常重要的一部分,酶标记的抗体或抗原是 ELISA 中最关键的试剂,良好的结合物既要保持酶的催化活性,还要保持抗原或抗体的免疫活性。可反应的功能基如氨基、醛基、巯基和羧基等。最为常见的偶联反应有戊二醛法和过碘酸盐法。交联的反应的选择需根据交联反应的产率、重复性、对酶和抗体生物活性的影响等方面来考虑。

3.2 酶结合物的存化

偶联反应之后一般要经过存化步骤来除去未被标记的分子,以提高 ELISA 的灵敏度。最常用的

存化方法有:凝胶过滤法、透析、电泳、离子交换色谱、亲和色谱等。另外游离标记物和与抗体结合物的标记物的分离要保证免疫反应的平衡状态且酶标记物的活性不受损伤,主要方法有:聚乙二醇沉淀、双抗体沉淀、固定化一抗和固定化二抗等。其中应用最广泛的是免疫沉淀反应。

3.3 酶的底物系统

催化底物要易于配制、保存,且催化底物产生的信号易于观察和检测,安全且价廉、易得。常用的底物为无色的化合物,当参与酶催化反应时产生深色产物,终止显色反应后不再继续自发变性。当以 HRP 作为标记酶时,常用的底物系统有邻苯二胺、5-氨基水杨酸、邻氨基酚、邻联甲苯胺等。邻苯二胺灵敏度高、比色方便,在 ELISA 中应用较多。影响酶免疫分析的因素还有抗血清的质量、免疫反应的条件和酶的活性等多方面的因素,在实际应用中需加以注意。

4 肉制品检测所面临的问题

随着人民生活水平的提高,人们对肉制品的需求量大幅度上升,对肉制品的质量要求也越来越高,由于在食用动物饲养过程中广泛使用药物或不合理用药,以及畜产品加工过程中违规使用抗生素药物来抑制微生物的繁殖,导致肉制品中抗生素等有害物质的残留,动物性食品中的药物残留对人类健康影响是一个众说纷纭的问题,但普遍可接受的观点是在食品中由于药物本身的副作用或耐药性细菌种群的增长,将会增加潜在的问题,给人类健康和生存发展带来了各种隐患。肉在加工过程中致病菌灭杀不彻底导致食物中毒,不法商家掺杂使假,转基因食品和疯牛病等诸多问题,传统的检测方法已不能满足要求,缺乏专一性,灵敏度也不高。要确定食品中药物残留量为多大时才可能被接受,不但要考虑到化合物本身固有的剂量和毒性,还要考虑到接触此化合物后的潜在的、可能的危害,甚至要考虑到药物代谢过程中某些毒性问题。所以对含有这类残留物的肉制品进行监测是一项重要、而且具有挑战性的分析工作。因此人们需要灵敏度高、特异性强、简便快速的检测方法。目前,具有灵敏度高、特异性强、操作方便、仪器简单等优点的 ELISA 法已被较多的应用于肉制品中抗生素的检测。

5 抗生素的概述

抗生素是某些微生物在代谢过程中产生的能

抑制或杀灭病原微生物的化学物质。抗生素除广泛应用于动物疾病防治外,还作为饲料添加剂以刺激生长,改善饲料利用率。

5.1 抗生素的分类

(1) β -内酰胺类抗生素

β -内酰胺类抗生素是破坏细菌细胞壁的繁殖期杀菌性抗生素。包括青霉素类、头孢菌素类、头霉素类和碳青霉烯类等。由于它们对细菌的选择性作用强,而对人几乎没有毒性,所以是一类高效低毒的抗生素。

(2) 四环族抗生素

四环族抗生素属快效抑菌剂。其作用机制主要为抑制细菌肽链的增长和蛋白质的合成,并可引起细菌细胞膜通透性改变,从而抑制DNA复制。四环族抗生素的抗菌谱很广,除对金黄色葡萄菌、链球菌、肺炎球菌等革兰阳性菌及肠球菌、淋球菌等革兰氏阴性菌敏感外,对立克次体、支原体属、衣原体属等非典型致病菌也有较好的抑菌作用。

(3) 细菌耐药性:细菌耐药性是指某些细菌菌株对通常能抑制其生长繁殖的某种浓度的抗生素类药物产生了耐药性。据报道,大肠杆菌的氨苄青霉素、四环素、土霉素的单重耐药性高达91%—100%,多重耐药性也达50%以上。耐药菌株还可以通过质粒将耐药基因传给其他敏感菌株,使其变为耐药菌株。耐药菌的最大威胁是通过各种途径感染人,从而给人类带来更大的危害。抗生素类药物的滥用还会造成动物与人肠道菌群的微生态改变,容易发生条件性致病菌感染。特别是长期应用低浓度抗生素,可导致细菌产生包括R因子转移的耐药性,由于耐药菌能将R因子转移给人的肠道,从而使治疗人类的一些疾病成了困难。

(4) 大环内酯类抗生素

大环内酯类药物包括红霉素、泰乐菌素、林可霉素等。此类物质是从链霉菌中分离出来的,对革兰氏阳性菌及李斯特菌和支原体的某些菌株效果较好。

(5) 氨基糖苷类抗生素

此类药物包括链霉素、二氢链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素等。它们有着相似的抗菌特性,抑制细菌30S核糖体亚基的蛋白质合成,是对革兰氏阳性菌和阴性菌均有毒性的广谱抗生素。用于治疗牲畜的各种感染。

5.2 抗生素药物残留的危害

(1) 过敏与变态反应:过敏和变态反应是一种药物有关的抗原抗体反应,与个体的免疫学特性

有关,与药物剂量的多少无关。其中青霉素、链霉素、新生霉素四环素类药物的致敏威胁较大,特别是青霉素最为严重。轻度过敏是出现皮疹,严重的会导致休克,甚至死亡。1969年WHO和FDA就规定食品中不允许残留青霉素。

(2) 毒性作用:链霉素、卡那霉素对听神经有明显毒性作用,造成耳聋,对婴幼儿尤其严重。氯霉素可抑制骨髓造血系统,发生急性溶血性贫血、粒细胞缺乏症、再生障碍性贫血等。四环素类阻抑幼儿牙齿发育和骨骼生长。

(3) 细菌耐药性:细菌耐药性是指某些细菌菌株对通常能抑制其生长繁殖的某种浓度的抗生素类药物产生了耐药性。据报道,大肠杆菌的氨苄青霉素、四环素、土霉素的单重耐药性高达91%—100%,多重耐药性也达50%以上。耐药菌株还可以通过质粒将耐药基因传给其他敏感菌株,使其变为耐药菌株。耐药菌的最大威胁是通过各种途径感染人,从而给人类带来更大的危害。抗生素类药物的滥用还会造成动物与人肠道菌群的微生态改变,容易发生条件性致病菌感染。特别是长期应用低浓度抗生素,可导致细菌产生包括R因子转移的耐药性,由于耐药菌能将R因子转移给人的肠道,从而使治疗人类的一些疾病成了困难。

(4) 致癌、致畸和致突变作用:某些抗生素类药物可引起癌症、胚胎畸变、基因突变,对人体产生危害。四环素类、氨基糖苷类和 β -内酯酰胺类等抗生素被怀疑具有“三致”作用。许多国家不允许畜产品中有任何已知的“三致”药物残留。这些药物在肉中残留,会通过食物链在人体内富集,从而产生严重后果。

6 ELISA在肉制品中抗生素检测中的研究进展

鉴于抗生素残留给人体带来的以上危害,必须建立有效的抗生素检测方法。本文综述了近年来国内外ELISA在肉制品中抗生素检测中的研究进展。

Duan (2001)建立了间接竞争ELISA检测肉中残留抗生素环丙沙星(CPFX),通过活性酯酶将CPFX分别与牛血清白蛋白(BSA)和人血清白蛋白(HSA)偶联,两者均能产生特异的CPFX兔抗血清,结果表明抗血清与青霉素、庆大霉素、新霉素、磺胺嘧啶和氯四环素类无交叉反应,检测灵敏度达0.32ng/ml,变异系数为3.7-9.2%,线性检测范围是1.6-1000ng/ml,该法可准确方便的检测出肉中残留的CPFX。

Spinks (2001) 建立了肉中磺胺氯哒嗪 (SCP) 残留的 ELISA 检测法, 用甲醇和磷酸盐缓冲液分别抽提牛、羊、肉鸡、火鸡和猪的肌肉、猪肾和肝脏, 该方法有很高的特异性, SCP 在缓冲液中的检测限为 0.65 ng/ml, 对不同样品中 SCP 的检测限不同。

Draisci (2001) 建立了一种检测牛肉中大环内酯类抗生素、红霉素和泰乐菌素的 ELISA 方法, 红霉素的检出限为 0.4 ng/ml, 抗红霉素和抗泰乐菌素单克隆抗体除了与一种由红霉素衍生而成的大环内酯类抗生素交叉反应外, 不与其他大环内酯类抗生素发生交叉反应, 该方法简便易行, 结果可靠。

岳学民等 (广东出入境检验检疫局) 2003 年建立了一种检测牛肉中磺胺二甲嘧啶的残留的 ELISA 方法, 用乙腈水溶液和 buffer1 缓冲液分别提取牛肉及肾脏, 该方法的变异系数为 13.84%, 检测限为 2 ng/g。本方法在 20 ng/g 添加浓度的水平上的回收率为 95.5%。

7 结束语

目前, 食品安全问题已引起各国政府和广大消费者的高度关注, 肉制品的安全问题显得尤为突出。ELISA 方法具有特异性强、灵敏度高、操作简单和样品处理量大等优点, 在肉制品安全检测方面有着广泛的用途, 随着单克隆抗体制备等技术的应用, 交叉反应得到有效克服, ELISA 必将在肉制品检测中得到广泛应用, 特别是在抗生素类的检测中。

参考文献

- [1] Spinks C.A., Schut C.G., Wyan G.M. et al. Development of an ELISA for sulfachlorpyridazine and investigation of matrix effect from different sample extraction procedures. Food Additives and Contaminants. 2001, 18(1): 11~18.
- [2] Haedrich J., Jarvers J., Podestat U. Detection of medroxyprogesterone EUTSCHE acetate residues in fatty tissue using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Deutsche Lebensmittel-rundschau. 20001.
- [3] Jihua Duan, Zonghui Yuan. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001, 49(3).
- [4] 张晓东, 刘永杰等. 畜产品质量安全及其检测技术. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [5] 仲德昌, 吕志平等. 进出口食品农药兽药残留实用检测方法. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [6] 刘光明, 徐庆盐等. 食品科学, 2003, 24 (1): 101~105.
- [7] 江世益, 张鲁雁. 免疫化学. 上海: 上海医科大学出版社, 1996, 176.
- [8] 刘曙照, 冯大和等. 分析科学学报, 2000, 16 (5).
- [9] 尹光东等. 标记免疫分析与临床, 2003, 10 (1).
- [10] 文其乙, 焦新安等. 应用直接 ELISA 快速检测肉制品中沙门氏菌, 肉品卫生, 1994, (9): 1~3.
- [11] 焦新安, 范红洁等. 单抗夹心 ELISA 快速检测李斯特氏菌方法的建立及其初步应用, 肉品卫生, 1996, (6): 1~2.
- [12] 陈继明, 韩正康等. 两种 $\beta-2$ 受体激动剂快速免疫检测方法, 中国兽医科技, 1998, 28 (9): 4~7.
- [13] 王大宁, 董益阳等. 免疫分析法在农药残留检测上的应用, 农药残留检测与控制技术. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [14] 陈家华. 免疫学检测方法, 现代食品分析新技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [15] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析系统技术应用. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [16] 刘育颖, 刘晓华. 酶联免疫吸附法在肉制品检测中的应用, 江西食品工业, 2007 (3).
- [17] 高玲美, 田夫林等. 中国动物检疫, 2004, 21 (8): 22.