|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号： | S853.74 | 学校代码： 10758 | |
| 密 级： | 公开 | 学 号： | 1036020241 |



**硕士学位论文**

**磺胺类药物多残留 ELISA 快速检测试剂盒与胶体金免疫层析试纸条的初探**

**Development of ELISA Mehods and Kits for Rapid Detection and a Colloidal Gold Immunochromategraphic Srip for Detection of Sulfonamides**

|  |  |
| --- | --- |
| **研 究 生 姓 名** | **杜玉玲** |
| **导师姓名及职称** | **岳城 教授** |
| **合作导师姓名及职称** | **吴国娟 教授** |
| **学 位 门 类 级 别** | **兽医学硕士** |
| **专** 业 名 **称** | **预防兽医学** |
| **研** 究 方 **向** | **兽药残留检测** |
| **所** 在 学 **院** | **动物医学学院** |

新疆·乌鲁木齐二○一三年六月

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得北京农学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 时间： 年 月 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解新疆农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意新疆农大可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| (保密的学位论文在解密后应遵守此协议) |  | | | | |
| 研究生签名：  导师签名： | 时间：  时间： | 年 | 年  月 | 月  日 | 日 |

**本研究受北京市教委项目、北京市然科学基金 及国家自然科学基金资助**

**北京市教委项目：编号：201010020008**

**北京市自然科学基金： 编号：5102014**

**国家自然科学基金：**

**编号：31172362，30972215**

**磺胺类药物多残留ELISA快速检测试剂盒与胶体金免疫层析试纸条的初探**

摘要

实验中采用4-氨基苯甲酸甲酯(PBPA)和对乙酰氨基苯磺酰氯(ASC)为原料，经过亲和取代，酯的水解反应合成磺胺药物共有的母核结构苯甲酸对氨基苯磺酰胺(SH)，应用质谱法(ESI-MS)与核磁共振氢谱法(1H-NMR)鉴定SH。质谱结果显示[*M-*] *=*291.03766，与理论值[*M*] =292相符，表明SH合成成功；核磁共振氢谱(1H-NMR)的数据与SH化合物的结构相符。磺胺母核人工半抗原合成成功。

实验采用混合酸酐法将本实验室合成的磺胺类药物母核结构物(SH)与卵清蛋白(OVA)和牛血清白蛋白（BSA）相偶联，进而合成包被原OVA-SH和免疫原BSA-SH。紫外扫描(UV)与SDS-PAGE法进行确证。利用BSA-SH免疫Balb/C小鼠，间接ELISA和间接竞争ELISA法筛选细胞融合备用鼠；利用细胞融合杂交瘤技术建立了SH Mab细胞株，后体内诱生腹水法制备SH

Mab。对SH Mab的效价、特异性和敏感性等免疫学特性进行鉴定。结果显示BSA-SH人工抗原合成成功，SH与BSA的分子结合比约为11.6: 1.5G1、5G2和8D2 3株敏感特异性的杂交瘤细胞株被成功筛选。其细胞上清液效价分别为：1: 6.40×10 2、1: 1.28×10 3和1: 3.20×10 2，腹水效价分别为：1: 2.56×10 5、1: 5.12×10 5和1: 1.28×10 5.5G2株所产腹水纯化后所得Mab对SH的半数抑制浓度(*IC50*)为82ng/mL。纯化后Mab对磺胺间甲氧嘧啶（SMM）、磺胺对甲氧嘧啶（SMD）、磺胺甲基嘧啶（SM）、磺胺间二甲氧嘧啶（SDM）、磺胺醋 酰

（SCT）、磺胺氯吡嗪钠（SCZ）、磺胺噻唑（ST）、磺胺甲噁唑（SMZ）、磺胺苯吡唑（SPH）、磺胺二甲嘧啶（SM2）、氨苯磺胺（SSF）和磺胺喹噁（SQ）的交叉反应率分别为：108%、86% 105%、85.6%、72%、26%、32%、54.6%、43%、4.6%、0.5%和76%。

获得了抗磺胺母核SH高效价、敏感、特异的Mab。

实验将卵清白蛋白（OVA）与磺胺母核人工半抗原（SH）采用混合酸酐法，按投料比1: 2连接制备了包被原（SH-OVA），后将辣根过氧化物酶（HRP）与SH-OVA采用过碘酸钠法，按投料比2: 1连接制备了酶标抗原（SH-OVA-HRP）。直接竞争ELISA方法通过药物竞争试验被确定，在0-1000 ng/mL浓度范围直接竞争ELISA建立标准曲线方程程为：y=-0.4016x+1.2187，相关系数*R2*=0.97，半数抑制浓度(IC50)为61.60ng/mL. SH酶联免疫检测试剂盒雏形初步研制成功。每2个月随机抽检其稳定性，4个月后稳定性良好。

利用得到的Mab研制出了检测磺胺类药物多残留胶体金免疫层析试纸条雏形。试纸条用间接竞争法，选用20 nm的胶体金，在pH 7.8，单抗17μg/mL条件下制备金标抗体。检测线为SH-OVA，质控线用羊抗鼠IgM抗体，两条线都包被在硝酸纤维素膜上。随后对试纸条的使用材料、溶液和各种工艺进行了优化。

**关键词**：磺胺类药物；多残留；半抗原；单克隆抗体； ELISA 试剂盒；胶体金试纸条；检测

**Development of ELISA Mehods and Kits for Rapid Detection and an Colloidal Gold Immunochromategraphic Srip for Detection of Sulfonamides**

**Abstract**

4-aminobenzoate (PBPA) acetylamino-benzenesulfonyl chloride(ASC) as raw material, after nucleophilic substitution, ester hydrolysis reaction synthetic sulfa drugs mother nucleus structure benzoic aminobenzene sulfonamide (SH), he application of mass spectrometry(ESI-MS) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (1H-NMR) identification of SH. Mass spectrometry results show that the [*M-*] = 291.03766 with the theoretical value of the [*M*] = 292 match, indicating the success of SH synthesis; NMR (1H-NMR) data match the structure of SH compound.

Using the mixed anhydride method, the laboratory synthesis of sulphur amine medicine mother nucleus structure (SH) was conneted with ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA), synthetic coating antigen OVA-SH and immunogen BSA-SH. Ultraviolet scanning (UV) and SDS-PAGE methods were established. Immune Balb/C mice by BSA-SH, indirect ELISA and indirect competitive ELISA method for screening of cell fusion rat by cell fusion standby; hybridoma technology to establish the SH cell line. In Balb/C mice' vivo induced ascites prepared SH Mab. The results showed that BSA-SH artificial antigen was synthesized successfully, SH and BSA conjugation

Ratio of about 11.6:1. 5G1, 5G2 and 8D2 3 strains sensitive to specific hybridoma cell line was successfully screened. Their cell titer of the supernatant solution were 1:6.40×102, 1:1.28×10 3 and 1:3.20×10 2, ascites titer were 1:2.56×10 5, 1:5.12×10 5 and 1.28×10 5. The Mab of 5G2 showed good sensitivity with an IC50 of 82ng/mL to SH. The crossreactive rates of the Mab after purified to Sulfamonomethoxine (SMM), Sulfametoxydiazine(SMD), Sulfamerazine(SM), Sulfadimethoxine

( SDM), Sulfacetamide (SCT), Sulfaclozine sodium monohydrate(SCZ), Sulfathiazole(ST), Sulfamethoxazole(SMZ), Sulfaphenazole(SPH), Sulfamethazine(SM2), Sulfasulfonamide(SN) and Sulfaquinoxaline (SQ) were 108%, 86%, 105%, 85.6%, 72%, 26%, 32%, 54.6%, 43%, 4.6%, 0.5% and

76%. SH Mab of high-titer, sensitivity and specificity has been generated.

The egg albumin (OVA) and the nucleus of sulfanilamide artificial hapten (SH) by mixed anhydride method, connecting the feed ratio of 1:2 of the package prepared by the former (SH-OVA), after horseradish peroxidase ( HRP) and SH-OVA using sodium iodide method by connecting the feed ratio of 2:1, that was prepared Enzyme labeled antigen (SH-OVA-HRP). Direct competitive ELISA method is determined by the drug competition test and establish the standard curve of Fang Chengcheng in 0-1000 ng/mL concentration range of direct competitive ELISA was y=-0.4016x+1.2187, correlation

Coefficient R2=0.97, half inhibitory concentration (*IC50*) of 61.60ng/mL. SH ELISA Kit preliminarily

Developed prototype. Every 2 months the stability of random sampling, 4 months after the stability is good.

A step strip test descirbed in this study was developed by means of a competitive immunoassay in which the detector reagent consisted of colloidal gold particles coated with purified monoclonal antibodies. Colloidal gold partical with a diameter of 20 nm was used in production of colloidal gold probe under a pH value of 7.8. The capture reagent in the assay was a SH-OVA conjugate which was immobilised on the lateral flow membrane of the strip. The control line reagent was Goat anti-mouse IgM. Then the materials and methods were optimized to obtain the testing strip.

**Key words:** Sulfonamides; multi-residues; hapten; Monoclonal antibody; ELISA Kit; One step stirp; Detection

目 录

[摘要](#_Toc686997081) 3

**[Abstract](#_Toc686997082)** 3

[第1章 绪论](#_Toc686997083) 11

**[1.1](#_Toc686997084)** [磺胺类药物的化学结构](#_Toc686997084) 11

**[1.2](#_Toc686997085)** [磺胺类药物的作用机理](#_Toc686997085) 11

**[1.3](#_Toc686997086)** [磺胺类药物的残留及危害](#_Toc686997086) 11

**[1.4](#_Toc686997087)** [磺胺类药物多残留检测现状](#_Toc686997087) 11

**[1.5](#_Toc686997088)** [载体的选择](#_Toc686997088) 12

**[1.6](#_Toc686997089)** [半抗原与载体的偶联方法](#_Toc686997089) 12

**[1.7](#_Toc686997090)** [抗体的制备](#_Toc686997090) 12

**[1.8](#_Toc686997091)** [酶联免疫技术](#_Toc686997091) 12

**[1.9](#_Toc686997092)** [免疫胶体金技术](#_Toc686997092) 12

[第2章 磺胺母核人工半抗原的合成及其鉴定](#_Toc686997093) 13

**[2.1](#_Toc686997094)** [实验材料](#_Toc686997094) 13

**[2.2](#_Toc686997095)** [实验方法](#_Toc686997095) 14

**[2.3](#_Toc686997096)** [结果与分析](#_Toc686997096) 14

**[2.4](#_Toc686997097)** [讨论](#_Toc686997097) 15

**[2.5](#_Toc686997098)** [小结](#_Toc686997098) 15

[第](#_Toc686997099)**[3](#_Toc686997099)**[章 磺胺母核多抗及单抗的制备](#_Toc686997099) 15

**[3.1](#_Toc686997100)** [实验材料](#_Toc686997100) 15

**[3.2](#_Toc686997101)** [实验方法](#_Toc686997101) 17

**[3.3](#_Toc686997102)** [结果与分析](#_Toc686997102) 23

**[3.4](#_Toc686997103)** [讨论](#_Toc686997103) 35

**[3.5](#_Toc686997104)** [小结](#_Toc686997104) 35

[第4章 磺胺类药物多残留ELISA快速检测试剂盒的初探](#_Toc686997105) 35

**[4.1](#_Toc686997106)** [实验材料](#_Toc686997106) 36

**[4.2](#_Toc686997107)** [实验方法：](#_Toc686997107) 36

**[4.3](#_Toc686997108)** [结果与分析](#_Toc686997108) 38

**[4.4](#_Toc686997109)** [讨论](#_Toc686997109) 53

**[4.5](#_Toc686997110)** [小结](#_Toc686997110) 54

[第5章 磺胺类药物多残留免疫胶体金试纸条的初探](#_Toc686997111) 54

**[5.1](#_Toc686997112)** [实验材料](#_Toc686997112) 54

**[5.2](#_Toc686997113)** [实验方法](#_Toc686997113) 55

**[5.3](#_Toc686997114)** [结果与分析](#_Toc686997114) 58

**[5.4](#_Toc686997115)** [讨论](#_Toc686997115) 66

**[5.5](#_Toc686997116)** [小结](#_Toc686997116) 66

[第6章 结论](#_Toc686997117) 67

[第7章 实验经验总结与展望](#_Toc686997118) 67

[参考文献](#_Toc686997119) 67

[附录](#_Toc686997120) 69

**图表目录**

[图 1-1 磺胺类药物骨架结构 1](#_bookmark2)

[图2-1磺胺母核结构半抗原SH的合成路线12](#_bookmark12)

[图 2-2 SH 的质谱鉴定图 13](#_bookmark14)

[图 2-3 磺胺母核半抗原 SH 的核磁图 14](#_bookmark15)

[表3-1新西兰大耳兔的免疫程序21](#_bookmark20)

[表 3-2 BALB/C 小鼠的免疫程序 22](#_bookmark21)

[图 3-1 BSA 及 SH-BSA 的 UV 吸收光谱 32](#_bookmark23)

[图 3-2 OVA 及 SH-OVA 的 UV 吸收 32](#_bookmark24)

[图 3-3 BSA-SD 的 SDS-PAGE 鉴定 33](#_bookmark25)

[表 3-3 合成抗原的 ELISA 结果比较 33](#_bookmark26)

[表 3-4 大耳兔抗血清效价测定结果 33](#_bookmark27)

[图 3-4 BSA-SH 的 SDS-PAGE 鉴定 34](#_bookmark28)

[表 3-5 核酸蛋白微定量仪检测纯化后的多克隆抗体浓度 34](#_bookmark29)

[图 3-5 五只小鼠血清抗体效价变化动态 35](#_bookmark30)

[图 3-6 小鼠血清 SH pAb 对 SH 的抑制曲线 35](#_bookmark31)

[表 3-6 用方阵滴定法确定包被原工作浓度 32](#_bookmark23)

[表 3-7 建立 SH-BSA 鼠抗血清 ELISA 检测系统的包被时间选择 32](#_bookmark24)

[表 3-8 封闭试验结果 40](#_bookmark32)

[表 3-9 建立建立 SH-BSA 鼠抗血清 ELISA 检测系统的封闭时间选择 40](#_bookmark33)

[表 3-10 建立 SH-BSA 鼠抗血清 ELISA 检测系统的一抗孵育时间选择 40](#_bookmark34)

[表 3-11 建立 SH-BSA 鼠抗 ELISA 检测系统的二抗浓度选择 41](#_bookmark35)

[表 3-12 建立 SH-BSA 鼠抗血清 ELISA 检测系统的二抗孵育时间选择 41](#_bookmark36)

[表 3-13 细胞融合与筛选结果 41](#_bookmark37)

[图 3-7 杂交瘤细胞株 42](#_bookmark38)

[图 3-8 杂交瘤细胞染色体分析 40](#_bookmark39)

[图 3-9 阳性细胞株上清液亚型鉴定 40](#_bookmark40)

[表 3-14 SH Mab 的间接 ELISA 效价 40](#_bookmark41)

[图 3-10 单克隆抗体亲和常数测定 41](#_bookmark42)

[图 3-11 间接竞争 ELISA 检测 SH IC50 41](#_bookmark43)

[表 3-15 SH Mab 与磺胺类药物物的交叉反应率 42](#_bookmark44)

[图 3-12 SDS-PAGE 优球蛋白法纯化单抗的结果 43](#_bookmark45)

[表 4-1 建立 SH Mab ELISA 检测系统最佳包被原浓度的选择 53](#_bookmark51)

[表 4-2 建立 SH Mab ELISA 检测系统的包被时间与包被条件的选择 54](#_bookmark52)

[表 4-3 建立 SH Mab ELISA 检测系统的封闭液的选择 54](#_bookmark53)

[表 4-4 建立 SH Mab ELISA 检测系统的封闭时间的选择 54](#_bookmark54)

[表4-5建立建立SH mAbELISA检测系统酶标抗原的最佳孵育时间时间选择55](#_bookmark55)

[图 4-1 SH 标准曲线 55](#_bookmark56)

[图 4-2 重复试验 SH 标准曲线 56](#_bookmark57)

[表 4-6 SH Mab ELISA 检测系统与 SAs 的交叉反应率 56](#_bookmark58)

[表 4-7 猪肉、鸡肉、鸡肝、牛奶中提取 SH 回收率和变异系数（*n*=13） 60](#_bookmark59)

[图 4-3 SH Mab SAs 多残留 ELISA 快速检测试剂盒的组装 62](#_bookmark60)

[图 4-4 试剂盒操作说明 59](#_bookmark61)

[表 4-8 4℃保存的 SH Mab SAs 多残留 ELISA 快速检测试剂盒在第 2 个月稳定性检测 60](#_bookmark62)

[表 4-9 4℃保存的 SH Mab SAs 多残留 ELISA 快速检测试剂盒在第 4 个月稳定性检测 60](#_bookmark63)

[表 5-1 最适蛋白标记量测定步骤 71](#_bookmark68)

[图 5-1 快速检测试纸条结构示意图 70](#_bookmark69)

[图 5-2 检测试纸条结果判定示意图 71](#_bookmark70)

[图 5-3 微波炉烧制的胶体金与成品胶体金的比较 72](#_bookmark72)

[图 5-4 磁力搅拌器法和微波炉法烧制的胶体金溶液颜色的比较 72](#_bookmark73)

[图 5-5 紫外扫描（400*nm*-600*nm*）改良磁力搅拌器烧制的胶体金 73](#_bookmark74)

[图 5-6 胶体金电镜扫描图片(电压：40.0*kV*，放大倍数：40.0*k*) 73](#_bookmark75)

[表 5-2 最适蛋白标记量测定步骤 73](#_bookmark76)

[图 5-7 静置 1*h* 后目测法确定蛋白最佳标记量 74](#_bookmark77)

[图 5-8 过夜后目测法确定蛋白最佳标记量 74](#_bookmark78)

[图 5-9 胶体金标记抗体蛋白的最佳 pH 值选择 75](#_bookmark79)

[表5-3金标抗体稀释液筛选结果75](#_bookmark80)

[表 5-4 不同 NC 膜测试结果表 80](#_bookmark81)

[图 5-10 不同 NC 膜测试结果 80](#_bookmark82)

[表 5-5 不同样品垫的比较结果 80](#_bookmark83)

[表 5-6 不同吸收垫的比较结果 80](#_bookmark84)

[表 5-7 金标抗体稀释倍数选择结果 81](#_bookmark85)

[图 5-11 NC 膜上包被二抗浓度选择结果 81](#_bookmark86)

[表 5-8 Tween-20 表面活性剂浓度的选择 82](#_bookmark87)

[表 5-9 金标抗体干燥时间的选择 78](#_bookmark88)

[图 5-12 试纸条雏形的初步组装 83](#_bookmark89)

英文缩略表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
| A | Absorbance | 吸光值 |
| Ab | Antibody | 抗体 |
| Ag | Antigen | 抗原 |
| ASC | N-acetylsulianilyl chloride | 对乙酰氨基苯磺酰氯 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| C | Concentration | 浓度 |
| CA | Caprylic acid | 辛酸 |
| CV | Coefficient of variation | 变异系数 |
| DMEM | Dulbecco's modification of Eagle's minimum essential medium | 一种含各种氨基酸和葡萄糖的培养基 |
| DMF | N-N Dimethyl Foramide | N-N ' 二甲基甲酰胺 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| EIA | Enzyme immunoassay | 酶免疫测定技术 |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbentassay | 酶联免疫吸附实验 |
| FCA | Freund's complete adjuvant | 弗氏完全佐剂 |
| FIA | Freund's incomplete adjuvant | 弗氏不完全佐剂 |
| h | Hour | 小时 |
| HAT | Hypoxanthine, aminpteionand and peroxidase | 含有次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤  （A）、胸苷(T)和甘氨酸的完全培养基 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| HT | Hypoxanthine and thymidine | 含有次黄嘌呤(H)、胸苷(T) 和甘氨酸的完全培养基 |
| HPLC | High performance liquid chromatography | 高效液相色谱 |
| HSA | Human serum albumin | 人血清白蛋白 |
| IgG | ImmunoglobulinG | 免疫球蛋白 G |
| g | Gram | 克 |
| Gly | Glycine | 甘氨酸 |
| KD | Kilodalton | 千道尔顿 |
| Kg | Kilogram | 千克 |
| McAb | Monoclonal antibody | 单克隆抗体 |
| mmol/L | Millimole/liter | 毫摩尔/升 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| mg | Milligram | 毫克 |
| min | Minute | 分钟 |
| mL | Milliliter | 毫升 |
| mol/L | Mole/liter | 摩尔/升 |
| MS | Mass spectum | 质谱 |
| NC | Nitrocellulose filter | 硝酸纤维素膜 |
| ng | Nanogram | 纳克 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| PAPB | Para-amino benzoic acid | 对氨基苯甲酸甲酯 |
| S | Second | 秒 |
| S.D. | Standard deviation | 标准差 |
| SD | Sulfadiazine | 磺胺嘧啶 |
| SDM | Sulfadimethoxine | 磺胺二甲氧嘧啶 |
| SMD  SM2 | Sulphamethoxydiazine Sulfamethaize | 磺胺对甲氧嘧啶  磺胺二甲嘧啶 |
| SMM | Sulfamonomethoxine | 磺胺-6-甲氧嘧啶 |
| SMP | Sulfamethoxypyridazine | 磺胺甲氧嗪 |
| SMZ | Sulfamethoxazole | 磺胺甲噁唑 |
| SCT | Sulfacetamide | 磺胺醋酰 |
| SCZ | Sulfaclozine sodium monohydrate | 磺胺氯吡嗪钠 |
| SQ | Sulfaquinoxaline | 磺胺噻唑 |
| ST | Sulfathiazole | 磺胺噻唑 |
| SPH | Sulfaphenazole | 磺胺苯吡唑 |
| SSF | Sulfasulfonamide | 氨苯磺胺 |
| TLC | Thin layer chromatography | 薄层层析 |
| TMB | Tetramethyl benzidine | 四甲基联苯胺 |

# 第1章 绪论

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)种类繁多，它们是一类具有对氨基苯磺酰胺结构的药物。SAs广泛使用于动物细菌性疾病的治疗和预防。但不当的使用，易造成SAs在动物性食品中残留而对人类的健康产生潜在的危险[1]。SAs某些药物有“三致”作用[2]，可引起耐药菌株增加[3]、过敏反应[4]、菌群失衡及二重感染[5]，同时也会对生态环境和我国进出口贸易造成影响[6-8]。中国、美国、加拿大、欧盟规定动物源性食品中SAs总量不得超过100μg/kg [9]。因此，近年来SAs成为我国兽药残留监控的重点之一。

目前，国内对SAs残留检测的研究多以单个磺胺药为主，而实现SAs多残留免检测的研究较少，且多数处于实验室阶段。因此，制备检测多种SAs的族特异性抗体成为了SAs残留免疫分析研究的热点和重要研究方向。SAs多残留传统的检测方法主要有毛细管电泳法[10]、液相色谱法[11-13]、气相色谱-串联质谱(GC-MS)和高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)[14]等，这些方法虽然具较高的特性和灵敏度，但所需仪器精贵，样品前处理复杂，难以普及。现在，在众多基层实验室中，应用最多的残留检测方法是

ELISA法和胶体金免疫层析试纸条法。

## **1.1** 磺胺类药物的化学结构

百浪息是I·G・法本公司生产并被最早使用的SAs之一，SAs是三十年代发现的能有效防治全身性细菌性感染的第一类化疗药物。

SAs属于化学合成抗菌药，均含有氨苯磺胺的骨架结构（图1-1），大部分SAs都含有该核构，只是-R取代基不同。

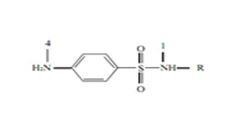


图 1-1 磺胺类药物骨架结构

Fig. 1-1 Sulfonamides skeleton structure

## **1.2** 磺胺类药物的作用机理

SAs是通过干扰敏感菌的叶酸代谢而抑制其生长繁殖的。当SAs存在并达到一定量时，敏感菌就不能直接从生长环境中利用外源性的叶酸，而是利用氨基苯甲酸、喋啶与谷氨酸，在二氢叶酸合成酶的催化下合成二氢叶酸，再经二氢叶酸还原酶还原成四氢叶酸。四氢叶酸是一碳基团转移酶的辅酶，参与嘌呤、嘧啶、氨基酸的合成。SAs的化学结构与对氨基苯甲酸的结构极为相似，能与对氨基苯甲酸竞争二氢叶酸合成酶，抑制二氢叶酸的合成，或者形成以磺胺替代对氨基苯甲酸的伪叶酸，最终使核酸合成受阻，结果细菌生长繁殖被阻止[15]。

## **1.3** 磺胺类药物的残留及危害

SAs因具有广谱、经济、稳定、易用以及联合抗菌增效剂效果可提高数十倍的特点，常以准治疗浓度的药物做为饲料添加剂来预防疾病的发生，提高饲料的转化率和促进动物生长。但不合理的使用很容易造成耐药菌增加，再加上在利益的驱使下，某些肉奶供应者们，往往不遵守休药期的行为，造成动物性食品中SAs的残留，从而对人们的健康造成危害，如磺胺二甲嘧啶是动物性食品中主要的残留药物，可诱发癌症[16, 17]；人在内服大剂量磺胺药后，会出现中枢神经兴奋、感觉过敏、痉挛性麻痹、昏迷、呕吐、厌食和腹泻、癫痫惊厥等急性中毒症状；由于SAs在肝脏代谢，故对肝脏的毒性作用较大，可致肝细胞性炎症、肝细胞型伴有胆汁淤积的混合型肝及慢性进展性肝炎可伴有肝硬化[18]；磺胺类药物在体内乙酰化率高，在体内主要经肝脏代谢为乙酰化磺胺，后者无抗菌活力却保持其毒性作用，在泌尿道析出结晶，损害肾脏。出现结晶尿、血尿、管型尿、尿痛以至尿闭等症状。磺胺异噁唑和甲氧苄啶均有抗叶酸的作用，可引起巨幼红细胞性贫血和再生障碍性贫血，造成凝血障碍；有的还可以引起过敏反应，导致耐药菌株产生导致菌群失调等症状[19]。

## **1.4** 磺胺类药物多残留检测现状

### **1.4.1** 检测方法概述

目前，针对SAs多残留传统的检测方法主要有毛细管电泳法、荧光光度法、薄层色谱法、气相色谱-串联质谱(GC-MS)和高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)等，这些方法所需仪器精贵，样品前处理复杂，但都具有较高的特异性和灵敏度。

现在，基于磺胺母核半抗原而制备的单抗用于SAs多残留检测，较为快速简便的检测方法有SAs多残留ELISA快速检测试剂盒与胶体金免疫层析试纸条。

### **1.4.2** 传统的**SAs**多残留检测复杂的样品前处理

样品前处理主要包括提取与净化。组织样品中脂肪含量较高，SAs属于水溶性物质，具有较高的极性。对于多残留检测，提取剂的pH可能使些药物的溶解性能产生差异，因而，对样品前处理采用极性溶剂提取，常用提取液有乙酸乙酯[20] 、乙腈

[21,22]、丙酮[23]、二氯甲烷[24]、三氯甲烷[25]、乙醇[26]、高氯酸[27]单溶剂或混合溶剂

[28]. 样品的净化，SAs是两性化合物，我们常常采用液-液分配的净化手段。现代样品前处理净化技术有固相萃取（SPE）、超临界流体萃取（SFE）、免疫亲合色谱

（IAC）、微波辅助提取（MAE）等[29]。

### **1.4.3** **SAs**多残留毛细管电泳法检测

Ming等建立了肉中8种常用磺胺类药物的快速毛细管电泳检测方法，最低检测限为5-10ng/kg[30]. Lamba等[31]建立了胶束电泳法检测牛奶中磺胺类药物多残留，5种磺胺类药物在7min内得到分离，且最低检测限为1.59-7.68nmol/L。

### **1.4.4** **SAs**多残留荧光光度法检测

将磺胺类化合物与邻苯二醛偶合成一种荧光衍生物，其激发波长为365nm，在422－434nm测定其发光强度，对磺胺间二甲氧嘧啶的检测限是0.25μg/kg[32]。

### **1.4.5** **SAs**多残留薄层色谱法检测

薄层色谱法是美国农业薄层色谱分析方法，美国又将其称为定位SAs检测(sulfa-on-sit, SOS)，可以定性或半定量地检测猪的尿、血清及饲料的水提取液或甲醇提取液中磺胺药的残留，检测限达0.4ppm。也有报道在鲑鱼中的5种磺胺药检测限可达

0.136μg/kg[33]。

### **1.4.6** **SAs**多残留气相色谱**-**串联质谱**(GC-MS)**检测

Reeves等[34]建立了牛奶中磺胺类药物多残留的气质联用检测方法，样品净化后经甲基-氨基-3-氟代烷衍生化，离子阱检测器检测，可同时检测ST等9种磺胺类物，最低检测限为10ng/mL。

### **1.4.7** **SAs**多残留高效液相色谱**-**串联质谱**(HPLC-MS)**检测

Chinchilla等[35]首次采用HPLC -化学发光检测器来检测牛奶中7种磺胺类药物，最低检测限为5ng/mL。

### **1.4.8** 基于磺胺母核单抗制备的多残留检测的研究现状

1991年，TS、CS、NS三种具有磺胺母核结构的半抗原被Sheth等[36]用化学方法合成，并且以磺胺噻唑衍生物TS偶联蛋白作为免疫原，制备了族特异性抗体。2000年，Muldoon制备单抗，对N-4硝基-苯磺酰胺、磺胺吡啶、磺胺噻唑的*IC50*值可达

1.41、22.8、322 ng/mL[37]. Haasnoot用合成的母核衍生物TS、PS结合物免疫动物获得了四株单克隆抗体[38, 39]，单抗细胞株27G3对18种SAs在小于10μg/mL的浓度呈现50%抑制[40, 41]。2005年，熊宁[42]合成了N-磺胺-4-氨基苯甲酸（SDL）结构，并且，制备出的单抗体对磺胺间氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺喹恶啉、磺胺二甲嘧啶的*IC50*值均在300 ng/mL以下。2006年，Nuria Pastor-N等建立了高特异性ELISA法，可同时测定磺胺噻唑等六种磺胺类药物，检测限1.5～4.5 ng/mL，回收率106%[43]。

## **1.5** 载体的选择

将半抗原与载体大分子偶联后得到的完全抗原，具有免疫原性，可以用来制备抗体。常用的载体有牛血清白蛋白（BSA）、人血清白蛋白（HSA）、卵清蛋白（OVA）、钥孔血蓝蛋白（KLH）、兔血清白蛋白（RSA）、结核菌素蛋白（TT）等。最常用的是

BSA，因为其化学性质稳定、价廉易得，且赖氨酸含量高，自由氨基多，在不同pH和离子强度下均有较大溶解度，在含有机溶剂情况下均可和半抗原进行偶联[44]。近年来，有报道用人工合成的多聚肽（常用多聚赖氨酸PLL）作为载体[45, 46]，在获得的抗体中抗

载体的部分较少，对半抗原的特异性高，能增加半抗原的免疫原性。此外，余若祯[47]等用多聚赖氨酸与2,4-二氯苯氧乙酸偶联合成完全抗原作为包被原，避免完全抗原载体BSA的特异性抗体对ELISA试验结果的干扰，有效降低阴性血清的非特异性吸附作用，提高了检测的灵敏度。

## **1.6** 半抗原与载体的偶联方法

偶联方法主要取决于半抗原的活性基团种类、溶解度和稳定性。一般半抗原含有羧基的常用载体连接方法有混合酸酐法、碳二亚胺法、N-羟基丁二酰亚胺活性酯法等；含有氨基的常用戊二醛法、重氮化法、二异氰酸酯法、卤代硝基苯法等；含有羟基的常用琥珀酸酐法、光气法、卤代羧酸法等。大多数单个磺胺药物主要在N4端的-NH2上进行偶联，故常用重氮化法、戊二醛法合成；对于磺胺类药物完全抗原的偶联，则需要根据引入的基团选择相应的方法。蛋白与半抗原的结合反应一般在温和的条件下进行，以防蛋白的变性。脂溶性半抗原可用一定比例的有机溶剂先溶解再进行反应，如N，N'-二甲基甲酰胺，二氧六环等。一般认为半抗原与载体蛋白的结合比以10: 1～20:1为宜，可以通过调节半抗原与载体的摩尔比例、反应pH值、温度、离子强度等在一定程度上控制结合比[48]。偶联结果可通过紫外扫描、红外光谱、凝胶电泳以及免疫学方法来鉴定[49]。

## **1.7** 抗体的制备

抗体作为免疫分析中最关键的试剂，可以通过免疫不同动物来制备多克隆抗体或单克隆抗体。为提高抗体亲和力，要保证一定的免疫次数，小分子兽药大多数都需要免疫3-4次以上[50]。在抗血清制备过程中，免疫原的纯度、载体种类、间隔臂等对于多抗的特异性及效价等指标具有重要的意义。与多抗相比，单抗纯度高，专一性强，重复性好，并且能持续地无限量供应。采用单克隆抗体技术制备抗体过程中，免疫次数、骨髓瘤细胞活性、PEG、融合过程、筛选方法等因素都会影响到单抗的生成及性质。此外，重组单链抗体（scFv）近年来也有较多报道[51]。这种抗体有比常规单克隆和多克隆抗体更加明显的优势，如抗体生产的速度快，能够制备新颖、罕见的功能团，甚至可改变其亲和性及特异性。

## **1.8** 酶联免疫技术

酶联免疫吸附法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，受检标本（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，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。

ELISA可用于测定抗原，也可用于测定抗体。在这种测定方法中有三个必要的试剂：免疫吸附剂（immunosorbent）、结合物（conjugate）、酶反应的底物。根据试剂的来源和标本的情况以及检测的具体条件，可设计出各种不同类型的检测方法。

通常可用于SAs定量检测，有间接竞争法、抗体包被直接竞争法（酶标抗原法）、抗原包被直接竞争法（酶标抗体法）。直接竞争法检测快速、简便。间接竞争法反应时间虽稍长，但其检测灵敏度较高，而且酶 标二抗的获得方便。

用于酶免疫分析的样品需要进行一定的前处理，通常可通过稀释样本或样本提取来降低或消除基质干扰，固体样品可选择如匀浆或萃取等处理步骤来提高药物的回收率。但这些处理过程与用于理化分析的前处理方法比起来要简便得多。

## **1.9** 免疫胶体金技术

### **1.9.1** 基本原理

胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体反应的一种新型的免疫标记技术。胶体金是由氯金酸（HAuCl4）在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、

鞣酸等作用下，聚合成为特定大小的金颗粒，形成带负电的疏水胶溶液，并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态，称为胶体金。胶体金颗粒由一个基础金核（原子金Au）及包围在外的双离子层构成，紧连在金核表面的是内层负离子（AuCL2-），外层离子层H+则分散在胶体间溶液中，以维持胶体金游离于溶胶间的悬液状态。由于这种结合是静电结合，所以不影响蛋白质的生物特性[52]。**1.9.2免疫胶体金技术的应用**

免疫胶体金技术主要应用方面包括：电镜水平的应用，光镜水平的应用，斑点金免疫渗滤法的应用和胶体金免疫层析法(colloid gold immunochroma-tographic a ssay, CIA)的应用。

本研究采用胶体金免疫层析法。胶体金免疫层析技术是20世纪90年代出现的一种快速免疫检测技术。其原理是将配体（抗体或抗原）先固定于硝酸纤维素膜等微孔滤膜的某一区带，胶体金标记另一配体，吸附于玻璃纤维上，然后固定于硝酸纤维素膜的某一特定位置，当干燥的硝酸纤维素膜一端浸到样品后，由于毛细作用，样品将沿着膜向上移动，当移动至胶体金标记物处时，如样品中含有带检受体，则发生第一步高度特异性的免疫反应，形成的免疫复合物继续移动至线状包被区时，发生第二步高度特异性的免疫反应，形成的免疫复合物被截留在包被的线状区，通过标记的胶体金而显红色（检测带），而游离标记物则越过检测带，与结合标记物自动分离。

### **1.9.3** 胶体金的制备

胶体金的制备方法很多，应用较为普遍的就是还原法，利用还原剂还原氯金酸制备出不同直径的胶体金颗粒。常用的还原法有柠檬酸三钠还原法[53]、鞣酸-柠檬酸三钠还原法[54]、抗坏血酸还原法、白磷还原法、硼氢化钠还原法[55]、乙醇超声波还原法[56]等。根据还原剂不同及还原作用的强弱，可以制备直径5-150 nm的胶体金颗粒。胶体金烧制时可以用微波炉加热法和电炉加热法。粒径的大小决定的胶体金溶液的用途和质量。

### **1.9.4** 胶体金标记蛋白的制备

胶体金标记蛋白的制备，实质上是蛋白质等生物大分子物质被吸附到胶体金颗粒表

面的包被过程。在免疫组织化学中，将胶体金结合蛋白质的复合物称为金探针，用于免疫测定时多简称为免疫胶体金( immunogold)。胶体金对蛋白质的吸附主要取决于标记体系的pH值、电解质浓度、被标记蛋白质用量等因素。在接近于被标记蛋白质的等电点或略偏碱(pH≥pI)时胶体金颗粒的吸附力最强，制成的胶体金蛋白质复合物也最稳定，胶体金的酸碱度可用0.1mol/L K2CO3或0.1 mol/L HCl调节。金溶胶的pH值可能会损害

pH测定计的探头，因此，一般采用精密pH试纸测定其pH值。待标记蛋白质的离子浓度应尽可能小，标记前可用0.005%的氯化钠或双蒸水透析以除去多余的离子。测定待标记蛋白质实际用量时，最好在标记前测定形成稳定胶体金蛋白质复合物的最小蛋白质需要量，然后按计算结果增加10~20%，即为待标记蛋白质的实际用量。制备好的胶体金蛋白质复合物需进一步纯化，以除去未结合的蛋白质或胶体金颗粒，一般采用超速离心法和凝胶过滤法。

### **1.9.5** 试纸条的组装

胶体金试纸条可选用尼龙膜、PVDF膜、聚醋膜、硝酸纤维素(NC)膜和玻璃纤维膜等作为层析材料，但大多试纸条都是以玻璃纤维薄膜、NC膜和吸水纸复合而成，而很少采用单一的膜。NC膜和玻璃纤维膜在使用前应根据具体情况确定是否需要活化或处理。周文达等人[57]采用二乙烯砜和乙二胺在硝酸纤维膜上形成手臂和氨基，然后再加入戊二醛在手臂上形成自由醛基，结果证明活化过的NC膜检测稳定性和灵敏度均大大提高。在NC膜上确定检测线和质控线的位置，在线上喷涂一定量的捕获试剂，一段时间后根据具体情况确定是否需要封闭。封闭材料可以选择蛋白类溶液（明胶、BSA、脱脂牛奶等），也可采用高分子物质（如PVC等），然后在37℃温箱烘干或室温下阴干。以玻璃纤维膜作结合释放垫，将一定量的金标抗原（金标抗体）均匀喷涂在结合释放垫上。最后将吸水纸、包被有捕获试剂的NC膜、喷涂有检测试剂的结合释放垫从上到下依次固定于不干胶底板上，即成试纸条。试纸条与干燥剂一起装入铝箔袋内。密封贮存。室温下密封的试纸条一般可保存6~18个月。

### **1.9.6** 胶体金免疫层析试纸条的应用

Beggs等最先用于人绒毛膜促性腺激素(HCG)的测定[58]，做妇女的早孕诊断研

究[59]，近年来经过不断完善，已有大量商品化试剂条，得到广泛应用，它是在单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的[60]。目前，主要集中在一些临床疾病和传染病的检测，如乙型肝炎表面抗原（抗体）、梅毒抗体血清、癌症相关蛋白、衣原体感染、甲型肝炎表面抗原（抗体）、溶血性链球菌感染以及艾滋病感染、梅毒抗体全血等的检测上；另外，也常用于寄生虫感染和细菌的快速检测，如血吸虫、幽门螺旋杆菌、旋毛虫病、唾液中肺炎足衣虫属病原、腺病毒、尿液中淋病双球菌、利什曼原虫等。且市场上也已经有相应的测试条

/板等产品。吴英松等利用胶体金标记技术对抗恶性疟原虫乳酸脱氢酶单抗进行标记，制成诊断恶性疟原虫的免疫层析条，可检测重组恶性疟原虫乳酸脱氢酶，最低检测量为l ng[61]。

胶体金快速诊断技术与其他方法（如ELISA, RIA等）比较，虽然在许多方面具有无可比拟的优势，可是在实际研究和应用中也暴露了一些不足：相关文献报道了其方法在检测中出现假阳性和假阴性问题；检测的灵敏度和可重复性程度也不够高，检测范围有待进一步拓宽。因此，胶体金技术将围绕以上技术的不足，向几个方向发展。

杨挺等根据竞争式胶体金免疫层析试验原理，研制了氯霉素检测免疫试纸条[62]。研究结果表明，该单克隆抗体对氯霉素的亲合性好，特异性高；该金标试纸条适用于动物源食品中氯霉素残留的快速检测，对虾肉、蜂蜜样品的最低检出限为1.5μg/kg，对鲜奶的最低检出限为3μg/kg，检测时间只需5-8min。李余动等建立用于快速检测样品中氯霉素残留含量的胶体金免疫层析试纸条，采用免疫竞争法，将抗氯霉素单克隆抗体-胶体金复合物包被在胶体金结合垫上，并将人工合成的氯霉素抗原包被在硝酸纤维素薄膜表面作为检测线（T线），其与待测样品中氯霉素竞争结合胶体金标记的氯霉素单克隆抗体，并能以颜色直观显示检测的定性结果[63]。检测虾肉等组织试样时，灵敏度最低值可达到1 ng/mL，只需5-10 min,与类似物无交叉反应。试纸条具有较高的灵敏度及特异性，操作便捷，稳定可靠，可作为氯霉素残留现场监控的有效筛检手段。

R. Verheijen, I. K. Osswald等研制的链霉素快速检测试纸条，该试纸条检测牛奶中的链霉素和二氢链霉素，检测限分别是160ng/mL和190 ng/mL [64]. David R. Legg、Annie

B等报道将检测牛奶中兽药残留的试纸条用于检测蜂蜜，方法是把蜂蜜用稀释液作四倍稀释后加入专用的小杯中，插入试纸条，8min后即可判读结果，95%可信度、90%阳性率的蜂蜜中磺胺二甲嘧啶含量是15.7 ng/ mL [65]。

胶体金免疫层析技术作为最为敏感的免疫学技术之一，不仅操作简便、快速、特异，更为重要的是特别适用于广大基层单位并能在现场作检测和诊断，这些特点都是其他方法所无法比拟的。因此，可以说该技术不仅具有巨大的发展潜力，而且还具有广阔的市场和应用前景。

### **2.0** 本研究的目的与意义

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)种类繁多，它们是一类具有对氨基苯磺酰胺结构的药物。SAs广泛使用于动物细菌性疾病的治疗和预防。但不当的使用，易造成SAs在动物性食品中残留而对人类的健康产生潜在的危险。各国对SAs在食品中的残留作了严格的限量规定, SAs在食品中残留对我国进出口贸易造成影响。因此，近年来SAs成为我国兽药残留监控的重点之一。

目前，国内对SAs残留检测的研究多以单个磺胺药为主，而实现SAs多残留免疫检测的研究较少，且多数处于实验室阶段。以仪器为主的SAs多残留检测方法，虽然具有较高的特异性和灵敏度，但所需仪器精贵，样品前处理复杂，难以普及。

因而，为了达到快速检测多种SAs残留的目的，制备出具有SAs族特异性抗体成为了SAs多残留免疫分析研究成为本研究的重要研究方向。为研制和开发高效、实用的尤其用于食品动物及其产品生产现场的监测的试剂盒与试纸条成为磺胺类药物残留检测的主要目的与意义所在。本文采用4-氨基苯甲酸甲酯（PBPA）和对乙酰氨基苯磺酰氯（ASC）为原料，经过亲和取代，酯的水解反应合成磺胺药物共有的母核结构苯甲酸对氨基苯磺酰胺（SH）。利用杂交瘤技术制备针对SH的单克隆抗体，并运用已获得的

SH单抗初步制备SAs多残留ELISA快速检测试剂盒与胶体金免疫层析试纸条。为磺胺类药物多残留检测奠定基础。

# 第2章 磺胺母核人工半抗原的合成及其鉴定

1999年，李喜旺等[66, 67]合成了四种具有母核结构的半抗原，其中的三种多克隆抗体被制备。抗体与具有不同“间隔臂”结构的包被原之间的反应关系和

ELISA最佳反应条件被测定，实验结果表明，7种药物间接竞争ELISA抑制曲线的*IC50*为0.2～2.2μg/mL，检测限低于0.01μg/mL，且部分抗体对参试的9种磺胺药具有显示高度的选择性和亲合性。Haasnoot用合成的母核衍生物TS、PS结合物免疫动物获得了四株单克隆抗体。2004年，房超[68, 69]将两种母核结构的半抗原H1、H2用化学方法合成，并将它们与蛋白偶联成功合成完全抗原，对多种磺胺类药物具有敏感性的多克隆抗体进行制备，以H1-HSA免疫家兔获得的多抗抗血清可识别氨苯磺胺及7种磺胺药，有5种低于0.1μg/mL，并且与四种常用抗生素和三种结构类似物无交叉反应；在牛奶基质中，药物的检测限均低于80 ng/mL。

本实验合成磺胺母核人工半抗原(SH)，采用4-氨基苯甲酸甲酯(PBPA)和对乙酰氨基苯磺酰氯(ASC)为原料，经过亲和取代，酯的水解反应合成磺胺药物共有的母核结构苯甲酸对氨基苯磺酰胺(SH)，应用质谱法(ESI-MS)与核磁共振氢谱法(1H-NMR)鉴定SH。质谱结果显示[*M*-] =291.03766，与理论值[*M*] =292相符，表明SH合成成功；核磁共振氢谱(1H-NMR)的数据与SH化合物的结构相符。磺胺母核人工半抗原合成成功，为研制SAs多残留检测试剂盒和胶体金免疫层析试纸条奠定基础。

## **2.1** 实验材料

### **2.1.1** 合成抗原所用试剂

4-氨基苯甲酸甲酯(PBPA) Sigma 公司对乙酰氨基苯磺酰氯(ASC) Sigma 公司无水吡啶 Sigma 公司

DMSO Sigma 公司

甲醇 北京化工厂

甲基硅油北京化工厂

盐酸 北京化工厂

氢氧化钠北京化工厂

乙醚 北京化工厂

乙醇 北京化工厂

乙酸乙酯北京化工厂

### **2.1.2** 合成抗原所用主要仪器

UV-4802紫外分光光度计UNICO公司

旋转蒸发仪Heidolph

真空泵上海亚荣生化仪器厂

质谱仪Themo

Bruker 400MHZ Advance核磁共振仪布鲁克(BRUKER)公司回流装置自制

## **2.2** 实验方法

苯甲酸对氨基苯磺酰胺(SH)的合成参照Haasnoot等[70]与Cliquet等[71]的方法并加以改进，经过亲和取代反应和酯解反应合成SH。

### **2.2.1** 磺胺母核人工半抗原**(SH)**的合成路线

磺胺母核人工半抗原苯甲酸对氨基苯磺酰胺(SH)的合成路线如图2-1所示：



图 2-1 磺胺母核结构半抗原SH的合成路线

Fig. 2-1 Sulfonamides mother nucleus structure of the synthetic route of the hapten SH

### **2.2.2** 亲核取代反应：

称取15g 4-乙酰胺基苯磺酰氯(ASC)置于50mL锥形瓶中，在通风橱中，磁力搅拌下加入15 mL无水吡啶溶解；再称取5g 4-氨基苯甲酸甲酯(PBPA) 置于另一

50L锥形瓶中，磁力搅拌下加入15 mL无水吡啶溶解；将含有无水吡啶的PBPA溶液在磁力搅拌下缓缓加入到无水吡啶溶解的ASC溶液中；加完后，反应液在甲基硅油油浴上回流1.5 h，此时，溶液呈棕红色。

### **2.2.3** 酯解反应**:**

待上述液体冷却至室温后，将液体转移至1L烧杯中，再加入200mL 2 mol/L

NaOH溶液；煮沸蒸去吡啶至无味，随时补加适量水，继续回流1.5 h；冷却至室温，在磁力搅拌下向反应液中滴加3 mol/L盐酸调pH至4.5，此时溶液出现大量小米粥样的混浊沉淀；向上述产物中加入2倍体积的乙酸乙酯，收集乙酸乙酯层，加压蒸去溶剂，将残留物真空干燥72 h，得白色粉末。

### **2.2.4** 磺胺母核人工半抗原**(SH)**的鉴定

采用质谱法(ESI-MS)与核磁共振氢谱法(1H-NMR)鉴定SH。

## **2.3** 结果与分析

### **2.3.1** 质谱法**(ESI-MS)**鉴定

经计算，SH分子量[*M*] =292.00。采用负离子对合成的物质进行轰击，结果如图2-2所示，[*M-*] =291.03 766，与SH分子量相符，由此可知，合成的产物为SH。



图 2-2 SH的质谱鉴定图

Fig. 2-2 The graph of SH mass spectrometric identification

### **2.3.2** 核磁共振氢谱法**(1H-NMR)**鉴定

磺胺母核人工半抗原SH的熔点：195. 6～195.9℃（两次平均值）。核磁图谱见图2-3, 1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6)δ7. 812(d, 2H, J = 8.0Hz, CHar), 7. 481(d, 2H, J = 8.0 Hz, CHar), 7. 163(d, 2H, J = 8.0 Hz, CHar), 6. 577(d, 2H, J = 8.4 Hz, CHar), 6.069(s, 2H, NH2). IR(KBr, cm-1):3 495, 3 465, 3 392, 3 375, 3 163, 2 933, 1 699, 1 634, 1 606, 1 594, 1 505,

1 462, 1 408, 1 325, 1 292, 1 149, 1 093, 1 015, 913, 835, 679. 数据与产物SH结构相符，

可以确定SH合成成功。



图 2-3 磺胺母核半抗原SH的核磁图

Fig. 2-3 1H-NMR spectrum of sulfonamide nucleus hapten SH

## **2.4** 讨论

制备SAs族特异性抗体的关键是SH的合成，。目前，对SAs母核结构的研究中多以极性较低的-(CH2) n作为间隔臂合成半抗原，但是，在得到的抗体中并没有表现出较好的敏感性[72]，这表明SAs N1端R取代基的电子云分布、空间位阻、和电荷的密度是决定抗体识别的重要因素，且磺酰胺基团中的N原子被认为可能是分子的极性中心。若R基团结构一发生变化，电荷密度或电子云的改变必然影响抗体对药物的识别。因而，考虑到绝大多数SAs的R取代基为各种杂环，

希望能在降低抗体对间隔臂识别的前提下最大程度地模拟靶化合物的立体结构和电子云分布，本试验采用苯环做间隔臂而达到检测多种磺胺药的目的。

导致活泼的COOH 和SO2NH 两种氢的峰没出现的主要原因可能是SH在δ3.384处的氢谱中有一宽且钝的峰，这就说明DMSO-d6或样品中含少量水。产生大量的分子离子和准分子离子碎片是由于ESI-MS是一种软电离质谱导致，由此类碎片峰，可推断出SH的分子质量。

本实验中，在质谱测定SH的分子量时，应该同时平行做个合成物SH的纯度测定，应能更好的确证合成SH的唯一性。

本节实验以ASC和PBPA为原料，在甲基硅油油浴下，先以吡啶为溶剂，回流

1.5 h后换NaOH为溶剂，煮沸蒸发除去吡啶，再回流2 h，最后用浓盐酸酸化，合成了磺胺母核结构半抗原SH。本方法省时、操作简便且产率较高，为磺胺母核结构人工半抗原的合成提供了一种简便通用的合成方法，同时也为研制磺胺药多残留检测试剂盒和胶体金免疫层析试纸条奠定基础。

## **2.5** 小结

经质谱法（ESI-MS）与核磁共振氢谱(1H-NMR)鉴定磺胺母核人工半抗原SH合成成功。

# 第**3**章 磺胺母核多抗及单抗的制备

磺胺母核多抗及单抗的制备实验中，采用混合酸酐法将本实验室合成的磺胺类药物母核结构物(SH)偶联于牛血清白蛋白（BSA）和卵清蛋白(OVA)上，合成免疫原BSA-SH和包被原OVA-SH，并用紫外扫描(UV)、SDS-PAGE法进行鉴定。用BSA-SH免疫新西兰大耳兔与Balb/C小鼠，间接ELISA 和间接竞争

ELISA法检测多抗，并筛选细胞融合备用鼠；应用杂交瘤技术建立SH Mab细胞株，用体内诱生腹水法制备SH Mab，对SH Mab的效价、敏感性和特异性等免疫学特性进行鉴定。最终BSA-SH人工抗原制备成功，SH与BSA的分子结合比约为11.6∶1。筛选出5G1、5G2和8D2 3株敏感特异性的杂交瘤细胞株，其细胞培养上清液效价分别为1∶6.40×10 2、1∶1.28×10 3和1∶3.20×10 2，腹水效价分别为1∶2.56×10 5、1∶5.12×10 5和1.28×10 5. 5G2株对SH的半数抑制浓度(*IC50*)为

82ng/mL。纯化后抗体对磺胺间甲氧嘧啶（SMM）、磺胺对甲氧嘧啶（SMD）、磺胺甲基嘧啶（SM）、磺胺间二甲氧嘧啶（SDM）、磺胺醋酰（SCT）、磺胺氯吡嗪钠（SCZ）、磺胺噻唑（ST）、磺胺甲噁唑（SMZ）、磺胺苯吡唑（SPH）、磺胺二甲嘧啶（SM2）、氨苯磺胺（SSF）和磺胺喹噁啉（SQ）的交叉反应率分别为：108%、86% 105%、85.6%、72% 、26%、32%、54.6%、43%、4.6%、

0.5%和76%。获得了抗磺胺母核SH高效价、敏感、特异的Mab，从而为研制磺胺药多残留检测试剂盒和胶体金免疫层析试纸条奠定基础。

## **3.1** 实验材料

### **3.1.1** 实验动物

新西兰大耳兔（雌性，两月龄）北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司清洁级Balb/C小鼠（雌性，SPF级，六周龄）中国人民解放军军事医

学科学院实验动物中心

昆明小鼠（18-22g）中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心

### **3.1.2** 试剂

#### **3.1.2.1** 合成抗原所用试剂**:**

对乙酰氨基苯磺酰氯（ASC）上海嘉辰化工有限公司

对氨基苯甲酸甲酯（PBPA）北京恒业中远化工有限公司牛血清白蛋白(BSA) Sigma公司

卵清蛋白(OVA) Sigma公司

乙酸乙酯北京化学试剂公司

吡啶北京化学试剂公司

DMF Sigma公司

三丁胺北京化学试剂公司

氯甲酸异丁脂Sigma公司

盐酸北京化工厂

#### **3.1.2.2** 免疫使用试剂

SH本实验室合成（经质谱与核磁共振确认合成成功，可以用于后续试验）

SH-BSA本实验室合成（经紫外图谱确认合成成功）

弗氏完全佐剂（FCA）Sigma公司弗氏不完全佐剂（FICA）Sigma公司

ELISA检测用试剂

辣根过氧化酶标记的羊抗兔IgG北京康为世纪科技有限公司

辣根过氧化酶标记的羊抗鼠 IgG 北京康为世纪科技有限公司单组份 TMB 显色液 北京索莱宝科技有限公司

牛血清白蛋白（BSA）Sigma公司

脱脂奶粉 美国 KH 公司

蔗糖等其他试剂北京化工厂

#### **3.1.2.3** 单克隆抗体制备用试剂

DMEM（低糖）GIBCO公司

胎牛血清Hyclone公司

二甲基亚砜(DMSO) Sigma公司

HAT Sigma 公司

HT Sigma 公司

PEG2000 Sigma公司

8-氮杂鸟嘌呤储存液（100×）Sigma公司

小鼠单克隆抗体亚型试剂盒洛阳赛尔维实验器材有限公司

小鼠SP2/0细胞本实验室保存蛋白纯化及电泳用试剂

低分子量蛋白标准（LMW）北京康为世纪科技有限公司

十二烷基硫酸钠(SDS)溶液北京康为世纪科技有限公司

N, N, N, N-四甲基乙二胺(TEMED) Sigma公司

DAB显色试剂盒北京康为世纪科技有限公司其他所需试剂均购自北京化工厂

### **3.1.3** 实验主要仪器

96孔聚苯乙烯酶标板JET BIOFIL公司

96孔、24孔、6孔细胞培养板JET BIOFIL公司

Motic AE31光学显微镜上海麦克奥迪有限公司

洁净工作台上海博迅实业有限公司医疗设备

厂

MCO-15AC CO2培养箱日本SANYO公司

Accμlab电子天平（0.0001g）北京赛多利斯仪器系统有限公司

MILLI-Q超纯水仪Millipore公司

紫外分光光度计UNICO公司

低温超速离心BECKMAN公司

恒温磁力搅拌器北京北德科学器材有限公司

核酸蛋白测定仪Thermon公司

透析袋(36DM、27DM)北京欣经科生物技术有限公司

电泳仪BIO-RAD公司

转印仪BIO-RAD公司

垂直电泳槽BIO-RAD公司

凝胶成像仪BIO-RAD公司

680型酶联免疫检测仪BIO-RAD公司

1575 Immuno Wash BIO-RAD公司

超低温冰箱日本SANYO公司

移液器Eppendorf、Gilson、Dragon公司

### **3.1.4** 所用溶液配方：见附录

## **3.2** 实验方法

### **3.2.1** 磺胺母核完全抗原合成与鉴定

#### **3.2.1.1** 混合酸酐法制备完全抗原

SH-BSA的制备SH(*M*=292), BSA(*M*=66.4K)：

（1）称取SH 17.4mg (0.06mmol)，加入1mL DMF，（澄清）搅拌下加入三丁胺6.8µL，用2M的NaOH调pH至7.2混匀后，加入氯甲酸异丁酯3.8µL，4℃磁力搅拌30min。

（2）称取BSA 106g(0.002)溶于3 mL DMF，冰浴搅拌下，加入7mL生理盐

水的充分溶解。

（3）将（2）中溶液缓缓滴加（1）中（出现浑浊），用2M NaOH调pH至8.0，

4℃搅拌8h。

（4）将溶液装入经预处理（用超纯水煮沸火化3次的）透析袋，用0.01*mol/L*

PBS透析3天，每6h，换液一次。将每次的透析液用紫外扫描，直至完全透。

（5）最后将溶液分成两部分，一部分用于紫外检测，一部分-20℃保存用于免疫小鼠。

SH-OVA (10:1, 2:1)包被原的制备SH(*M*=292)，OVA(*M*=45000)：

（1）称取OVA 0.045g(0.001mmol)溶于生理盐水10m L，冰浴搅拌下，分别加入等体积的DMF，充分溶解。

（2）称取SH(*M*=292) 2.92mg(0.01mmoL)、分别向（1）中加入1m L DMF,（澄清）搅拌下加入三丁胺6.8µL, 用2M的NaOH调pH至7.2混匀后，加入氯甲酸异丁酯3.8µL，4℃磁力搅拌30min。

（3）将（1）中溶液缓缓滴加（2）中（出现浑浊），用2*M* NaOH 调

pH至8.0，4℃搅拌8 h。

（4）将溶液装入经预处理（用超纯水煮沸火化3次的）透析袋，用0.01mol/L

PBS透析3天，每6小时，换液一次。直至完全透析。

（5）分装溶液-20℃保存备用，冻干备用。

用同样方法将（2）中SH(*M*=292)的量换为0.584mg(0.002mmoL)合成

SH-OVA(2: 1)。

#### **3.2.1.2** 完全抗原的鉴定

##### 3.2.1.2.1 紫外扫描鉴定法

SH-BSA、SH-OVA和SH-HSA偶合物在紫外区能产生明显的吸收光谱。把半抗原SH、载体蛋白溶液及透析好的偶合物溶液分别在250～300 nm波长下进行扫描，得到紫外扫描图。根据吸收曲线在偶联前后波形及吸收峰的变化，来判断偶联成功与否。

##### 3.2.1.2.2 免疫学鉴定法

用SH-OVA作为包被原，用SH-BSA来免疫新西兰大耳兔和Balb/C小鼠，用得到的抗血清做方阵ELISA和间接竞争ELISA，测定合成的人工抗原的免疫效果，并比较人工抗原的抗原工作浓度、抗血清工作浓度等相关参数。

人工抗原蛋白质浓度的测定及偶联结合比的计算：

将透析好的偶合物，适当稀释，分别测其在260 nm、280 nm处的紫外吸光值。按下面公式计算其蛋白浓度：蛋白质浓度(mg/mL) = 1.45×*OD280 nm*－0.74×*OD260* nm。

根据公式[73]计算偶合物中载体蛋白与半抗原SH的偶联比（每分钟载体蛋白质连接的半抗原数目）。

### **3.2.2** 多克隆抗体与单克隆抗体的制备

#### **3.2.2.1** 动物免疫程序的制定

（1）新西兰大耳兔免疫方案

用SH-BSA免疫原对三只新西兰大耳兔进行免疫。取SH-BSA用0.1M pH7.0的Tris-HCL调整至1mg/mL*,*每只免疫1mL。首次免疫时与等体积的弗氏完全佐剂混合，充分乳化后于兔子背部皮下和两侧腹股沟多点注射。以后的加强免疫均使用同剂量免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化，于背部皮下多点注射，每次免疫间隔两周。自三免起，每次免疫3天后，兔子耳缘静脉采血，分离血清，检测免疫效果。五免直接免疫0.5mg/mL*，*每只1mL，三天心脏采血，分

离血清[74]。免疫方案如表3-1所示。

表 3-1 新西兰大耳兔的免疫程序

Table 3-1 New Zealand rabbits immunization program

| 免疫次数 | 抗原类型 | SH-BSA 剂量  (1 mL /只) | 免疫部位 |
| --- | --- | --- | --- |
| 首免 | SH-BSA+弗氏完全佐剂 | 1 mg/mL | 背部皮下和两侧腹股沟多点  注射 |
| 二免 | SH-BSA +弗氏不完全佐剂 | 1 mg/mL | 背部皮下多点注射 |
| 三免 | SH-BSA +弗氏不完全佐剂 | 1 mg/mL | 背部皮下多点注射 |
| 四免 | SH-BSA +弗氏不完全佐剂 | 1 mg/mL | 背部皮下多点注射 |
| 五免 | SH-BSA | 0.5mg/mL | 耳缘静脉注射 |

（2）Balb/C小鼠免疫方案

将15只雌性Balb/C小鼠分为三组，高、中和低三个剂量组每次免疫分别为

200µg/只、100µg/只和50µg/只，且0.1mL/只。首次免疫取相应剂量的人工抗原SH-BSA 0.1M pH=7的Tris-HCL中，于等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后小鼠后颈背部多点注射。两周后使用同剂量免疫原与弗氏不完全佐剂乳化，于腹腔皮下注射，作第二次免疫。第三、四、五免与第二次免方法相同，每次免疫之间的时间间隔为两周。第四免后，ELISA法检测小鼠抗血清的效价，在三组中选取效价最高的小鼠做融合，融合前3天腹腔注射相同剂量的人工抗原液（不加入弗

氏佐剂进行乳化）作加强免疫。免疫方案如表3-2所示。

表 3-2 BaLb/C小鼠的免疫程序

Table 3-2 BaLb / C mice immunization program

|  |  | SH-BSA 剂量（µg /只）且 0.1mL/只 | | |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 免疫时间 | 免疫原类型 | 高 剂 量  组 | 中剂量组 | 低剂量组 | 免疫部位 |
| 首免 | SH-BSA＋ 弗氏完全佐剂  （FCA） | 200 | 100 | 50 | 颈背部多点皮下注射 |
| 二免（两周后） | SH-BSA＋ 弗氏不完全佐  剂（FICA） | 200 | 100 | 50 | 腹腔注射 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 三免（两周后） | SH-BSA＋FICA | 200 | 100 | 50 | 腹腔注射 |
| 四免（两周后） 五免（两周后）  六免 | SH-BSA＋FICA SH-BSA＋FICA  SH-BSA＋生理盐水 | 200  200  100 | 100  100  50 | 50  50  25 | 腹腔注射 腹腔注射 尾静脉注射 |
|  | 3 d 后，无菌取效价最高的小鼠脾脏 | |  |  |  |

#### **3.2.2.2** **SH-BSA**的多抗血清效价测

SH-BSA兔抗血清的获得及兔抗血清效价的ELISA检测：三免后三天，新西兰大耳兔耳缘静脉采血50μL*/*只，室温静置3 h，3 000 r/min离心15 min，收集血清，采用间接ELISA方阵法确定各种试剂的最佳工作条件，检测其效价。

#### 3.2.2.3 血清多克隆抗体的纯化：（辛酸-饱和硫酸铵法与硫酸铵沉淀法两种方法比较）

（1）采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化血清多克隆抗体

1）待抗血清解冻后，4℃12000r/min离心15min，弃去沉淀。

2)取抗血清5mL，加入0.06M pH4.8NaAc-HAc缓冲液10mL，搅拌均匀。

3）用1M NaOH溶液将上述混合液的pH值调至4.8。

4）在室温下边搅拌边逐滴加入165μL正辛酸，加完后继续搅拌30min。

5) 4℃6000r/min离心30min，弃沉淀，用1M NaOH溶液将上清pH值调至

7.2.

6）向上清液中边搅拌边缓慢滴加等量饱和(NH4) 2SO4溶液，此操作在4℃条件下完成，此时(NH4) 2SO4终浓度为50%，搅拌30min后，4℃6000r/min离心30min，弃上清液，将沉淀溶于5.5mL 0.01M pH7.2PBS中。

7）向沉淀悬浮液中边搅拌边缓慢滴加4.5mL饱和(NH4) 2SO4溶液，此操作在

4℃条件下完成，此时(NH4) 2SO4终浓度为45%，搅拌30min后，4℃6000r/min离心30min，弃上清液，将沉淀溶于少量0.01M pH7.2 PBS中。

8）将沉淀悬浮液移入透析袋，用0.01M pH7.2 PBS透析，4~6 h换液一次，换液4~5次，除去NH4+离子和SO4 离子。

2-

9）对透析外液进行光谱测量，并用透析前的PBS作空白对照，判断是否已透析完全。

利用紫外分析法测定蛋白浓度。将透析好的抗血清适当稀释，分别测其在

260nm、280nm处的紫外吸光值。

10）冻干机冻干，分装，即时使用时4℃保存，冻干粉-20℃保存备用。

（2）硫酸铵法纯化血清多克隆抗体

1）取抗血清4 mL。

2）加生理盐水（0.85％NaCl）6 mL，混匀。

3）逐滴加入饱和(NH4) 2SO4 10mL，充分振荡混匀，4℃静置1 h。

4) 10000 r/min离心20 min，弃上清。

5）加10 mL生理盐水重悬浮，混匀。

6）逐滴加5 mL饱和(NH4) 2SO4，充分振荡混匀，4℃静置1 h。

7) 10000 r/min离心20 min，弃上清。8）重复5～8步骤一次。

9）加生理盐水10 mL重悬浮，混匀。

10) 3M KCNS缓冲液中透析12～24 h。

11)在0.2 M pH 9.0硼酸缓冲液透析12～24 h。

12）冻干机冻干，分装，即时使用时4℃保存，冻干粉-20℃保存备用。用SDS-PAGE分析纯化后的多克隆抗体并用核酸蛋白微定量仪检测多克隆

抗体的浓度。

#### **3.2.2.4** **SH-BSA**小鼠抗血清的获得及**ELISA**检测方法的建立及对细胞融合所用小鼠的确定

六免后三天，Balb/C小鼠尾脉采血20μL/只，室温静置3 h，3 000 r/min离心15 min，收集血清，采用间接ELISA方阵法确定各种试剂的最佳工作条件，方法如下：

（1）包被原工作浓度的确定及血清效价的测定

1）包被：用包被原稀释液（CBS）将包被原SH-OVA依次稀释为6μg/mL、

3μg/mL、1.5μg/mL、0.75μg/mL，包4块板，每孔加入100μL，4℃包被过夜。

2）洗涤：第二日取出，倾倒孔内液体，每孔用250μL的PBST洗三遍，每遍间隔3 min，在吸水纸上拍干。

3）封闭：每孔加入5%脱脂奶粉封闭液200μL，37 ℃温育2 h；弃去孔内

液体，同上洗涤3遍。

4）加样：每孔加入100μL的2倍倍比稀释的小鼠单抗血清，37 ℃温育2h。

5）洗涤：弃去孔内液体，同上洗涤3遍。

6)加酶：每孔加入1: 5 000稀释的羊抗鼠IgG-HRP 100μL，37℃温育1 h。

7）洗涤：弃去孔内液体，同上洗涤5遍。

8）显色：每孔加入TMB显色液100μL，避光反应5～10 min。

9）终止：每孔加2M硫酸溶液50μL终止反应，用酶标仪测*OD450*值。

判定标准：每块板同时设空白和阴性血清对照孔，以待测孔的*OD450* 值≧

2.1倍阴性对照孔*OD450*值者判为阳性，以判为阳性的最高稀释倍数为血清效价。

（2）包被条件的选择

选择4℃过夜、微波小伙1min、37℃2h三种不同时间、不同温度进行包被，以确定最佳包被条件。

（3）封闭液的确定

由确定下来的最佳包被原浓度，每孔分别加入200μL的5%脱脂奶粉、5%

脱脂奶粉+0.05% Tween-20+3%蔗糖、5% Gly进行封闭，确定最佳封闭液及浓度。

（4）封闭时间的优化

由确定的封闭液种类，封闭时间选择0.5h、1h、2h，间接ELISA确定最佳封闭时间。

（5）一抗孵育时间的确定

选择37℃1h、37℃2h两种不同时间进行孵育，以确定最佳一抗孵育条件。

（6）二抗浓度的确定

将羊抗鼠IgG-HRP进行4000、5000、6000倍稀释，选择最佳二抗浓度。

（7）二抗孵育时间的确定

选择37℃1h、37℃2h两种不同时间进行孵育，以确定最佳二抗孵育条件。

（8）SH-BSA小鼠血清效价及敏感性的测定

使用已经建立的SH-BSA多克隆抗体ELISA方法分别检测六免后获取的小鼠抗血清的效价，确定做细胞融合所选的小鼠。小鼠效价间接ELISA法测定小鼠血清pAb的效价，间接竞争ELISA法测定其对SH的敏感性，具体操作参照文献[75]的方法进行。

#### **3.2.2.5** 杂交瘤细胞株的建立

（1）细胞融合

用8-氮杂鸟嘌呤（20µg/mL）处理三代体外培养的SP2/0骨髓瘤细胞。融合前1d，用Balb/c小鼠制备饲养层细胞于96孔培养板中，在37℃、体积分数5.0%

CO2培养箱中培养。小鼠加强免疫后3d，摘除眼球，眶下窦采血，分离血清。脱颈致死小鼠，无菌操作取脾脏制备脾细胞，在50% PEG-2000作用下与处于对数生长期的SP2/0 细胞融合。将融合后的细胞悬液，加到已铺有饲养层细胞的

96孔细胞培养板中，用HAT选择培养基于37℃、体积分数5.0% CO2培养箱中培养。

（2）融合细胞的培养及阳性杂交瘤的筛选与克隆

融合细胞于第7天用HAT培养液半量换液，第14天换用HT培养液培养；用间接ELISA和间接竞争ELISA进行阳性孔筛选，选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化，而后扩大培养、冻存、鉴定和建株。

#### **3.2.2.6** 阳性杂交瘤细胞株的鉴定

（1）阳性细胞株染色体分析[76]

选择生长状态良好的杂交瘤细胞，进行传代培养，36-48h后加入秋水仙素，使其终浓度为0.1μg/mL并继续培养4~6 h，将细胞吹打下来，1000 r/min离心10 min，弃上清，沉淀中加上已预温到37℃的0.075 mol/L氯化钾5 mL，混匀，37℃水浴20 min；再加入固定液必须是新配制的（甲醇：冰醋酸= 3: 1）1 mL混匀，能够使细胞表面轻微的固定，之后1000 r/min进行离心10 min，然后弃上清；加入新配置的固定液5 mL将细胞悬浮合并混匀，在室温下，静止30 min, 1000 r/min进行离心10 min，然后弃上清；再重复固定两次，1000 r/min进行离心5 min，弃上清，将0.5-1.0 mL的细胞混合液保留，将细胞悬浮合并混匀后，滴管吸取细胞悬液1-2滴，滴在载玻片上，载玻片须是刚从冰浴中取出的，使细胞平铺于载玻片，自然干燥。

染色：采用新鲜配制的10%Giemsa染液染色10 min，蒸馏水洗去染液，自然干燥。

镜检：选择染色体分散良好，无重叠，无失散的细胞进行观察。计数

100个完整的分裂中期细胞，记录染色体数目。

（2）阳性细胞株亚型测定

按照试剂盒说明测定，将1μg/mL的羊抗鼠亚型抗体IgG1、IgG2a、IgG2b、

IgG3、IgA和IgM以每孔100μL，包被酶标板，37℃封闭2 h，取出，PBST洗三遍，每遍间隔3 min，每孔加入100μL系列稀释的细胞培养上清，37℃温育1h，取出，PBST洗三遍，每遍间隔3 min，加酶标二抗反应后，PBST洗五

遍，每遍间隔3 min，显色，最后在450 nm测定，根据吸光度值与抗体稀释度的关系确定抗体的亚型。

#### **3.2.2.7** **SH-BSA**腹水单抗的制备

采用体内诱生法制备腹水。取Balb/C小鼠腹腔注射灭菌石蜡油0.5mL*/*只，两周后注射抗SH-BSA的杂交瘤细胞5×10 5个/只，7-10天后收集小鼠腹腔液。用辛酸-饱和硫酸铵盐析法纯化Mab，并用Thermo超微量核酸蛋白检测仪检测蛋白含量。

#### **3.2.2.8** 腹水单抗的纯化

（1）腹水预处理

二氧化硅吸附法：将得到的新鲜腹水4℃离心，2000r/min，15min，小心吸取上层脂肪与石蜡层，弃去沉淀，除去细胞成分（或冻存过程中形成的固体物质）等；取清亮的腹水，等量加入pH 7.2巴比妥缓冲盐水（VBS: 0.004mol/L巴比妥, 0.15mol/L NaCl, 0.8mmol/L Mg2+, 0.3mmol/L Ca2+）稀释；然后以每10m L稀释腹水中加150mg二氧化硅粉末，混匀，悬液在室温孵育30min，不时摇动；4℃离心，2000r/min，20min，脂质等通过该法除去，即可得澄清的腹水，再加入

CaCl2(使终浓度达到25mmol/L)，除纤维蛋白，4℃离心2000r/min, 10min弃去沉淀。

（2）优球蛋白沉淀法（针对所得的IgM型抗体）

1）取2mL预处理过的腹水，先后加入NaCl和CaCl2，使各自的浓度分别达0.2mol/L和25mmol/L，随之可见纤维蛋白的产生。

2）经滤纸过滤后，滤液用100倍体积的去离子水透析，4℃8-15 h，其间换

水1-2次。

3）取出后22000r/min离心30min，弃上清。

4）将沉淀溶于pH8.0 1mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris-HCl溶液中，重复上述的透析与离心。

5）将沉淀的优球蛋白浓度调至5-10mg/m L，冻干机冻干，-20℃分装冻存备用。

#### **3.2.2.9** **Mab**免疫学特性鉴定

（1）效价测定间接ELISA测定其效价。

（2）亲和性鉴定将包被原H-OVA稀释成三个梯度（9.0、4.5、2.25μg/mL）包被酶标板，测定相应的*OD450*值为纵坐标，抗体不同稀释浓度的负对数值为横坐标，绘制不同浓度的包被原反应曲线在曲线上算出50% *OD450*值时对应的mAb浓度，按照公式：*Kaff*=(*n*-1) /2(*n*[*Ab*'] *t*-[*Ab*] *t*)计算亲和常数，其中n=[*Ag*] *t*/[*Ag*'] *t*，

[*Ag*] *t*、[*Ag*'] *t*为2个不同的包被原浓度，[*Ab*] *t*、[*Ab*'] *t*为包被原浓度对应的抗体浓度。

（3）敏感性鉴定用间接竞争ELISA测定5G2 Mab对不同浓度SH的抑制率，以吸光值比值B/B0 （B是SH不同标准浓度的*OD450*值，*B0*是不含SH时的

*OD450*值）为纵坐标，不同浓度SH的对数值为横坐标，绘制标准抑制曲线，进行相关回归分析，计算Mab对SH的*IC50*。

（4）特异性鉴定用间接竞争ELISA测定各抑制物（SH及磺胺类药物）的

*IC50*，以Mab对SH的*IC50*与各抑制物的*IC50*之比的百分数为其交叉反应率

(*CR*%) 。

（5）Mab分子量大小的确定

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 10％分离胶 | 4％浓缩胶 |
| ddH2O 40％Acr/Bic（37.5：1） 1.5mol/L Tris•HCl（pH8.8） 0.5mol/L Tris•HCl（pH6.8） 10％SDS  10%AP（过硫酸胺）  TEMED | 4.85mL  2.5 mL  2.5 mL  －  0.1 mL  0. 050 mL  5µL  加 TEMED 后，立即混匀即可灌胶。 | 3.16 mL  0.5 mL  －  1.26 mL  0.05 mL  0.025 mL 5µL |

SDS－PAGE电泳法确定Mab分子量配置10％分离胶和4％浓缩校：

SDS－PAGE电泳[77]:

1）清洗玻璃板：

一只手扣紧玻璃板，另一只手蘸点洗衣粉轻轻擦洗。两面都擦洗过后用自来水冲，再用蒸馏水冲洗干净后立在筐里晾干。

2）灌胶与上样 ：

a玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。（操作时要使两玻璃对齐，以免漏胶。）

b按前面方法配10%分离胶，加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。灌胶时，可用1mL枪吸取1mL胶沿玻璃放出，待胶面升到绿带中间线高度时即可。然后胶上加一层水，液封后的胶凝的更快。（灌胶时开始可快一些，胶面快到所需高度时要放慢速度。操作时胶一定要沿玻璃板流下，这样胶中才不会有气泡。加水液封时要很慢，否则，胶会被冲变型。）若有气泡用1mL注射器对着气泡吹可以将气泡吹破，也可以将细密的微小气泡，吹置一侧不影响整体胶面。

c当水和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝了。再等3min使胶充分凝固就可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。

d按前面方法配4%的浓缩胶，加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。灌胶时也要使胶沿玻璃板流下以免胶中有气泡产生。插梳子时要使梳子保持水平。由于胶凝固时体积会收缩减小，从而使加样孔的上样体积减小，所以在浓缩胶凝固的过程中要经常在两边补胶。待到浓缩胶凝固后，两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。

e用水冲洗一下浓缩胶，将其放入电泳槽中。（小玻璃板面向内，大玻璃板面向外。若只跑一块胶，那槽另一边要垫一块塑料板且有字的一面面向外。）

f测完蛋白含量后，计算含50μg蛋白的溶液体积即为上样量。取出上样样品至

0.5mL离心管中，加入5×SDS上样缓冲液至终浓度为1×。（上样总体积一般不超过15μL，加样孔的最大限度可加20μL样品。）上样前要将样品于TECHNE的TCI512PCR仪中94℃煮10min使蛋白变性。

2个样品做5个重复。

样品1为SH-OVA 包被原浓度为3mg/mL，共计蛋白总量为250μg 0.25mg=3mg/mLx V1 .

*V1*=0.083mL即83μL上样总量为100μL，则5x蛋白上样缓冲液需要约20μL

变为终浓度为1x。

样品2为IgM单抗，其浓度为8.74mg/mL，共计蛋白总量为250μg 0.25mg=8.78mg/mL x *V2* .

*V2*=0.028mL即28μL上样总量为100μL则5x蛋白上样缓冲液需要20μL再加超纯水52μL使5x蛋白上样缓冲液终浓度变为1x。

g加足够的电泳液后开始准备上样。（电泳液至少要漫过内测的小玻璃板。）用微量进样器贴壁吸取样品，将样品吸出不要吸进气泡。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。（加样太快可使样品冲出加样孔，若有气泡也可能使样品溢出。加入下一个样品时，进样器需在外槽电泳缓冲液中洗涤3次，以免交叉污染。3）电泳 ：

Bio-Rad电泳仪电泳时间一般4-5 h，电压为40V较好，也可用60V。电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳，进行转膜。

4）转膜（转SH-OVA包被原的那块胶）：

a转一张膜需准备6张7.0-8.3cm的滤纸和1张7.3-8.6cm的硝酸纤维素膜。切滤纸和膜时一定要戴手套，因为手上的蛋白会污染膜。将切好的硝酸纤维素膜置于水上浸2 h才可使用。（用镊子捏住膜的一边轻轻置于有超纯水的平皿里，要使膜浮于水上，只有下层才与水接触。这样由于毛细管作用可使整个膜浸湿。若膜沉入水里，膜与水之间形成一层空气膜，这样会阻止膜吸水。

b在加有转移液的搪瓷盘里放入转膜用的夹子、两块海绵垫、一支玻棒、滤纸和浸过的膜。

c将夹子打开使黑的一面保持水平。在上面垫一张海绵垫，用玻棒来回擀几遍以擀走里面的气泡。（一手擀另一手要压住垫子使其不能随便移动。）在垫子上垫三层滤纸（可三张纸先叠在一起在垫于垫子上），一手固定滤纸一手用玻棒擀去其中的气泡。

d要先将玻璃板撬掉才可剥胶，撬的时候动作要轻，要在两个边上轻轻的反复撬。撬一会儿玻璃板便开始松动，直到撬去玻板。（撬时一定要小心，玻板很易裂。）除去小玻璃板后，将浓缩胶轻轻刮去（浓缩胶影响操作），要避免把分离胶刮破。小心剥下分离胶盖于滤纸上，用手调整使其与滤纸对齐，轻轻用玻

棒擀去气泡。将膜盖于胶上，要盖满整个胶（膜盖下后不可再移动）并除气泡。在膜上盖3张滤纸并除去气泡。最后盖上另一个海绵垫，擀几下就可合起夹子。整个操作在转移液中进行，要不断的擀去气泡。膜两边的滤纸不能相互接触，接触后会发生短路。（转移液含甲醇，操作时要戴手套，实验室要开门以使空气流通。）

e将夹子放入转移槽槽中，要使夹的黑面对槽的黑面，夹的白面对槽的红面。电转移时会产热，在槽的一边放一块冰来降温。一般用60V转移2h或40V转移3h。

5）考马斯亮兰染色IgM单抗 ：

将IgM单抗的那块胶剥离放入200mL平皿中，倒入已经配置好的考马斯亮兰，没过胶面，置于摇床上染色30min，将考马斯亮兰染色液倒入回收瓶中，向平皿中倒入已配置好的脱色液，置于摇床脱色30min后，弃去脱色液，继续再倒入脱色液没过胶面，继续脱色60min后，弃去脱色液，置于成像仪中成像，保存结果。

6）免疫反应：

a将膜用TBS从下向上浸湿后，移至含有封闭液5%脱脂奶粉的平皿中，4℃过夜。

b将一抗用TBST稀释至适当浓度（在1.5mL离心管中）；撕下适当大小的一块儿保鲜膜铺于实验台面上，四角用水浸湿以使保鲜膜保持平整；将抗体溶液加到保鲜膜上；从封闭液中取出膜，用滤纸吸去残留液后，将膜蛋白面朝下放于抗体液面上，掀动膜四角以赶出残留气泡；室温下孵育1-2*h*后，用TBST在室温下脱色摇床上洗两次，每次10min；再用TBS洗一次，10min。

c同上方法准备二抗稀释液并与膜接触，用Western二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗，

室温下孵育1-2h后，用TBST在室温下脱色摇床上洗两次，每次10min；再用

TBS洗一次，10min，进行显色。

## **3.3** 结果与分析

### **3.3.1** **SH–BSA**和**SH-OVA**的确认

#### **3.3.1.1** 紫外扫描法鉴定及**SDS-PAGE**鉴定结果

紫外扫描法鉴定结果，结果见图3-1、图3-2。通过紫外分光光度计对BSA、SH-BSA、OVA和SH-OVA进行紫外扫描，吸收峰分别是278nm，268nm；280nm，

266nm。反应产物的最大吸收峰波长及吸光度值与载体蛋白、半抗原改造物比较都有所改变。可以定性说明反应产物是不同于载体蛋白和半抗原改造物的物质，也就是载体蛋白和半抗原SH的偶联物，依据朗伯-比尔定律，可推算出SH 与

BSA的分子结合比约为11.6: 1，SH与OVA的分子结合比约为10: 1。SDS-PAGE鉴定结果见图3-3，表明BSA的泳动速度大于BSA-SH，说明BSA-SH的分子质量大于BSA，表明BSA与SH偶联成功。



图 3-1 BSA及SH-BSA的UV吸收光谱

Fig. 3-1 Ul traviolet spectrum of BSA and SH-BSA Fig.



图 3-2 OVA及SH-OVA的UV吸收

Fig.3-2 Ultraviolet spectrum of OVA and SH-OVA

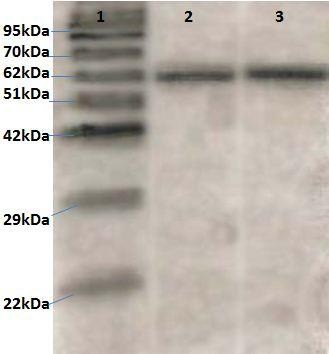


图 3-3 BSA-SH的SDS-PAGE鉴定

1.蛋白Marker; 2. BSA; 3. SH-BSA

Fig. 3-3 Identification of BSA-SH conjugation by SDS-PAGE 1. Protein Marker; 2. BSA; 3. SH-BSA

#### **3.3.1.2** 免疫学法鉴定

以合成抗原SH-OVA包被酶标板，分别以SH-BSA免疫Balb/C小鼠，三免后第7d采小鼠血清作ELISA，检测合成的完全抗原的免疫原性及产生抗体的特异性。试验结果见表3-3，表明3种抗原均合成成功。三免后，小鼠血清效价均在104左右，用半抗原SH、ASC、和SD（均为50μg/mL）做间接竞争ELISA，求得抑制率分别为100%和70%左右，且ASC对该抗体无结合作用。通过表可看出H-BSA的免疫效果较好。

表 3-3 合成抗原的ELISA结果比较

Tab. 3-3 comparison of three antigens by ELISA

| 包被抗原 | 免疫抗原 | 最佳工作浓度  （稀释倍数） 抗原 抗体 | SH 抑 制 率  （%）  （50 μg/mL） | SD 抑制率（%）  （50 μg/mL） | ASC 抑 制 率  （%）  （50 μg/mL） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SH-OVA | SH-BSA | 2 万 1 万 | 100 | 83 | 无 |
| SH-OVA | SH-HSA | 2 万 1 万 | 100 | 65 | 15 |

### **3.3.2** 多抗血清效价检测

三免后，对新西兰大耳兔耳缘静脉采血，间接ELISA法测定其血清抗体效价，1号和2号兔的阳性血清抗体效价均达到1×10 5，在三只新西兰大耳兔免疫

效果较为理想，加强免疫后采血，检测其效价达到2×10 5，如表3-4所示。

表3-4 大耳兔抗血清效价测定结果

Table 3-4. The result of rabbit antiserum titration

| 免疫兔 |  |  | 血清稀释倍数 / OD450 值 | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 6400× | 12800× | 25600× | 51200× | 102400× | 204800× | 阴性 |

### **3.3.3**

多抗纯化结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 续表 3-4 |  |  |  |  |  |  |  |
| 1 | 1.292 | 1.144 | 0.913 | 0.593 | 0.361 | 0.179 | 0.056 |
| 2 | 1.602 | 1.158 | 0.821 | 0.547 | 0.345 | 0.221 | 0.057 |
| 3 | 0.505 | 0.306 | 0.215 | 0.172 | 0.124 | 0.050 | 0.052 |

对比了两种纯化方法最终辛酸-饱和硫酸铵法纯化兔多抗效果较好，条带清晰且量多。如图3-4所示，使用BandScan软件分析纯化后的多克隆抗体纯度可达80%以上。目的蛋白处位置出现清晰的条带。



图 3-4 BSA-SH Pab的SDS-PAGE鉴定

M：蛋白Marker; 1. 辛酸-饱和硫酸铵法纯化兔多抗；2。饱和硫酸铵法纯化兔多抗

Fig. 3-4 Identification of BSA-SH Pab conjugation by SDS-PAGE

M: Protein Marker; 1. Bitterness - saturated ammonium sulfate purified rabbit polyclonal antibody;

2. Saturated ammonium sulfate purified rabbit polyclonal antibody.

### **3.3.4** 核酸蛋白微定量仪检测多克隆抗体的浓度

纯化后的多克隆抗体经过核酸蛋白微定量仪检测浓度平均为14.359mg/mL。

表3-5 核酸蛋白微定量仪检测纯化后的多克隆抗体浓度

Table 3-5 nucleic acid protein micro- quantitative cytometry purified polyclonal antibody

concentration

|  | Protein Conc. | Unit | A280 | 260/280 | Sample Type |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 13.552 | mg/mL | 13.552 | 0.68 | 1 Abs = 1 mg / mL |
| 2 | 14.677 | mg/mL | 14.677 | 0.68 | 1 Abs = 1 mg / mL |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 续表 3-5 | | | | | |
| 3 | 14.848 | mg/mL | 14.848 | 0.68 | 1 *Abs* = 1 mg / mL |
| avg | 14.359 | mg/mL |  |  |  |

### **3.3.5** **Balb/C**小鼠免疫效果

从免疫结果中可以看出，低剂量组（50μg/只）的Balb/C小鼠产生抗体的效价最高，达1: 2×10 5。同时比较Balb/C小鼠的精神状态，低剂量组较中、高剂量组的Balb/C小鼠体态活跃被毛光亮。所以使用低剂量组的Balb/C小鼠脾脏进行融合。采用SH-BSA免疫后的低剂量组小鼠用间接ELISA法测定其血清抗体效价，五免后五只小鼠中，1号和4号小鼠的阳性血清抗体效价均达到1×10 5，在五只同剂量免疫小鼠中免疫效果最为理想，加强免疫后采血，检测其效价达到2×10 5，如图3-5所示。同时由图3-6可知，4号小鼠的线性回归直线方程为：y=-0.3391x+1.1823，相关系数*R2*=0.9562，从方程可以计算出4号小鼠多抗的*IC5*0为102.8ng/mL，均低于其他小鼠。4号小鼠的效价最高且*IC50*最低，选作细胞融合备用鼠。



图 3-5 五只小鼠血清抗体效价变化动态

Fig. 3-5 Serum antibody titers changes of five mice



图 3-6 小鼠血清SH Pab对SH的抑制曲线

Fig. 3-6 Inhibition curve of mice sera to SH by indirect ELISA

### **3.3.6** 方阵法确定最佳包被原浓度及最佳封闭液

#### **3.3.6.1** 包被原浓度的确定

将SH-OVA包被原做四个浓度的稀释，将小鼠阳性血清分别作梯度稀释，再做ELISA方阵实验确定包被原浓度结果见表3-6。根据待测孔的*OD450*值大于或等于阴性对照孔*OD450*值的2.1倍者判为阳性的标准，判断抗血清的效价为1: 2048 000，最适工作浓度为1: 256 000。从*OD450*及节约原料考虑，选1.5μg/mL为最佳包被浓度。

表 3-6 用方阵滴定法确定包被原工作浓度

Table 3-6 to definite the concentration of coating antigen using square matrix titration

| 血清  稀释度 | 不同包被浓度下测定的 OD450  6 μg/ mL 3μg/ mL 1.5μg/ mL 0.75μg/ mL ＋ ―  ＋ ― ＋ ― ＋ ― |
| --- | --- |
| 1:16 000 | 1.393 0.073 1.463 0.079 1.520 0.074 1.264 0.074 |

|  |  |
| --- | --- |
| 1:64 000 | 1.159 0.073 1.220 0.066 1.298 0.072 1.203 0.065 |
| 1:128 000 | 1.052 0.064 1.119 0.075 1.207 0.074 1.092 0.054 |
| 1:256 000 | 0.882 0.075 0.921 0.074 1.148 0.064 0.903 0.062 |
| 1:512 000 | 0.672 0.073 0.696 0.073 0.739 0.054 0.651 0.064 |
| 1:1024 000 | 0.506 0.062 0.577 0.072 0.590 0.062 0.568 0.072 |
| 1:2048 000 | 0.192 0.062 0.218 0.062 0.239 0.065 0.202 0.062 |

“―”为未免疫鼠阴性血清，“＋”为免疫鼠阳性血清

#### **3.3.6.2** 包被条件的确定

选择最大吸光值最大，空白本底较低，*P/N*值较高的作为ELISA系统的包被时间条件。4℃过夜和37℃2h两种差异不显著，微波小火3min较前两者差异略显著，从时间成本上考虑，选择4℃过夜进行包被。结果如表3-7。

表3-7 建立SH-BSA鼠抗血清ELISA检测系统的包被时间选择

Table 3-7 establishing SH-BSA mouse anti- serum ELISA detection system packets are time selection

| 不同包被时间下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 封闭时间 | 最大吸光值 | 1:1 000 阴性血  清 | P/N |
| 4℃过夜 | 1.763 | 0.067 | 26.313 |
| 微波小伙 3min | 1.206 | 0.066 | 18.272 |
| 37℃ 2h | 1.443 | 0.067 | 21.537 |

#### **3.3.6.3** 封闭液的确定

由确定下来的最佳包被原浓度，每孔分别加入200μL的5%脱脂奶粉、5%脱脂奶粉+0.05% Tween-20+3%蔗糖、5% Gly进行封闭，结果见表3-8，从表中可以得到，5%Gly为最佳封闭液，封闭效果较好，阴性值在0.1以内。由*OD*450值采用含5%Gly的水溶液为封闭液。

表3-8 封闭试验结果

Table 3-8 determination of optimal blocking solution

|  |  |
| --- | --- |
| 封闭液  浓度% | 不同封闭液及不同浓度下测定的 OD450（μg/mL）  6 3 1.5 0.75  ＋ ― ＋ ― ＋ ― ＋ ― |
| 5%脱脂奶粉 | 0.933 0.139 0. 963 0.089 0.992 0.098 0.944 0.0871 |
| 5%脱脂奶粉+0.05%  Tween-20+3%蔗糖 | 0.868 0.265 0.898 0.364 0.913 0.274 0.871 0.361 |
| 5%Gly | 0.956 0.053 0.982 0.054 1.123 0.038 0.974 0.045 |

“＋”为免疫鼠阳性血清，“―”为未免疫鼠阴性血清

#### **3.3.6.3** 最佳封闭时间的确定

使用5% Gly封闭液进行封闭后，封闭时间选择0.5h、1h、2h，间接ELISA

确定最佳封闭时间。当封闭时间为2h时（表3-9），阴性值较低，*P/N*比值为最大，封闭效果最佳。最佳封闭时间定为2h。

表3-9 建立SH-BSA鼠抗血清ELISA检测系统的封闭时间选择

Table 3-9 set up SH - BSA mouse antiserum ELISA detection system of the closed time to choose

| 不同封闭时间下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 封闭时间 | 0.5h | 1h | 2h |
| 1:256 000 阳性血清 | 1.108 | 1.125 | 1.143 |
| 1:800 阴性血清 | 0.071 | 0.066 | 0.062 |
| P/N | 15.605 | 17.045 | 18.435 |

#### **3.3.6.4** 一抗孵育时间的确定

选择37℃1h、37℃2h两种不同时间进行孵育，最终选择以选择37℃，1h

定为最佳一抗孵育条件，结果见表3-10所示。

表 3-10 建立SH-BSA鼠抗血清ELISA检测系统的一抗孵育时间选择

Table 3-10 set up SH - BSA mouse antiserum ELISA detection system of the incubation time to choose

| 不同一抗孵育时间下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 一抗孵育时间 | 最大吸光值 | 1:1 000 阴性血清 | P/N |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 续表 3-10 |  |  |  |
| 37℃ 1h | 1.106 | 0.066 | 16.757 |
| 37℃ 2h | 1.103 | 0.067 | 16.462 |

#### **3.3.6.5** 二抗浓度的确定

将酶标二抗进行2000、5000、10000倍稀释，三种稀释浓度差异不大，从考虑到节省试剂的原则出发，选择将二抗进行5000 倍稀释最为最佳二抗浓

度，结果见表3-11所示。

表 3-11 建立SH-BSA鼠抗ELISA检测系统的二抗浓度选择

Table 3-11 set up SH - BSA rat resistance against ELISA detection system of the concentration

| 不同 二 抗 浓度下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 二 抗 稀释倍数（倍） | 最大吸光值 | 1:1 000 阴性血清 | P/N |
| 2000 | 1.820 | 0.079 | 23.037 |
| 5000 | 1.750 | 0.076 | 23.026 |
| 10000 | 1.449 | 0.064 | 22.64 |

#### **3.3.6.6** 二抗孵育时间的确定

选择37℃1h、37℃2h两种不同时间进行孵育，*P/N*值差异不大，但是选择37℃2h时本底*OD450*值较高，所以确定37℃1h为最佳二抗孵育条件结果见表3-12所示。

表 3-12 建立SH-BSA鼠抗血清ELISA检测系统的二抗孵育时间选择

Table 3-12 set up SH - BSA mouse antiserum ELISA detection system of the incubation time to choose

| 不同 二 抗 浓度下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 二 抗 孵育时间 | 最大吸光值 | 1:1 000 阴性血  清 | P/N |
| 37℃ 1h | 1.672 | 0.082 | 20.390 |
| 37℃ 2h | 1.731 | 0.093 | 18.613 |

### **3.3.7** 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合后10 d，观察融合效果，10块细胞培养板960孔中，有725孔有杂交瘤细胞形成，融合率为75.5%，间接ELISA检测结果显示，阳性孔有79孔，阳性率为8.22%，结果见表3-13.5次亚克隆后获得了11株杂交瘤细胞，分别测定其半数抑制浓度（*IC50*），筛选出3株杂交瘤细胞，分别命名5G1、5G2和8D2

经多次传代、冻存及复苏，3株杂交瘤细胞均能稳定分泌SH Mab。

表 3-13 细胞融合与筛选结果

Table 3-13 the results of hybridoma fusion

|  | 续表 3-13 |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 融合指标 | 融合结果 |  |
|  | 接种孔数 | 960 |  |
|  | 融合细胞孔数 | 725 |  |
|  | 融合率（%） | 75.5% |  |
|  | 阳性孔数 | 79 |  |
|  | 阳性率（%） | 8.22% |  |

5次亚克隆后获得了11株杂交瘤细胞，分别测定其半数抑制浓度（*IC50*），筛选出3株杂交瘤细胞，分别命名5G1、5G2和8D2经多次传代、冻存及复苏，3株杂交瘤细胞均能稳定分泌SH Mab。图3-7 为杂交瘤细胞株。



1：第一次亚克隆细胞株2：第二次亚克隆细胞株

3：第三次亚克隆细胞株4：第四次亚克隆细胞株图3-7杂交瘤细胞株

1: the first subclone cell strains 2: the second subclone cell strains 3: the third subclone cell strains 4: the fourth subcloned cell lines Fig. 3-7 hybridoma cell lines

### **3.3.8** 阳性细胞株染色体分析与阳性细胞株亚型测定

#### **3.3.8.1** 阳性细胞株染色体分析

杂交瘤细胞染色体测定结果见图3-8，由图可知杂交瘤细胞的染色体结构反映两种亲本细胞的特点，即多数为脾细胞的端着丝点染色体，少数为骨髓瘤细胞的中着丝点染色体，证明杂交瘤细胞的染色体来自免疫的BALB/c小鼠的脾细胞和SP2/0骨髓瘤细胞。计数100个完整的中期核细胞，得到5G2阳性杂交瘤细胞染色体数目为98～105，而已知骨髓瘤细胞的染色体数目为62~68 条，

BALB/c小鼠脾细胞的染色体数目为40条。可见本实验所得到的单克隆抗体细胞株的染色体数目与骨髓瘤细胞及脾细胞的染色体数目总和基本相似，证明此细

胞为两个亲本细胞融合的产物。



图 3-8 杂交瘤细胞染色体分析

Fig. 3-8 the somatic chromosomes photo of hybridomas

#### **3.3.8.1** 阳性细胞株亚型测定

按照试剂盒说明测定，选用ELISA方法确定抗体的亚型，得到的抗体为IgM

亚型。结果见图3-9。



图 3-9 阳性细胞株上清液亚型鉴定

Fig. 3-9 Positive cell lines the supernatant subtypes identified

### **3.3.9** **mAb**免疫学特性的鉴定结果

#### **3.3.9.1** **mAb**效价测定的结果

由表3-14可知，5G1、5G2、8D2三株杂交瘤分泌的抗SH Mab具有较高的效价，其中5G2株效价最高，细胞培养上清和腹水效价分别达到了1: 1.28×10 3，

1:5.12×10 5.

表 3-14 SH Mab的间接ELISA效价

Table 3-14 the indirect ELISA titer of anti-SH Mab

| 单克隆抗体  (mAb) | 细胞培养上清液  （supernatant） | 腹水  （astices） |
| --- | --- | --- |
| 5G1  5G2  8D2 | 1∶6.40×10 2  1∶1.28×10 3  1∶3.20×10 2 | 1∶2.56×10 5  1∶5.12×10 5  1: 1.28×10 5 |

#### **3.3.9.2** 亲和力鉴定结果

将包被原H-OVA稀释成三个梯度（9.0、4.5、2.25μg/mL）包被酶标板，微量核酸蛋白检测仪测得5G2单抗的浓度为6.64 mg/mL，稀释后的浓度为1×10 -3，5×10 -4，2.5×10 -4，1×10 -4，5×10 -5，2.5×10 -5，1×10 -5，5×10 -6 mg/mL，以测定相应

的*OD450*值为纵坐标，抗体不同稀释浓度的负对数值为横坐标，绘制不同浓度的包被原反应曲线见图3-10，根据公式求得：*Kaff1* = 1.88×10 8 L/mol, *Kaff2* = 1.92×10 8

L/mol, *Kaff3* = 2.21×10 8 L/mol，平均值得到抗体的亲和常数为2.0×10 8 L/mol，满足免疫分析的要求。

1.6

1.4

1.2

1

0.8

OD

0.6

0.4

0.2

0

H-OVA= 9.0 μg/mL

H-OVA= 4.5 μg/mL

H-OVA= 2.25 μg/mL

0 0.3 0.6 0.9 1.2 1.5 1.8 2.1 2.4 2.7

lg(Cb/C)

图 3-10 单克隆抗体亲和常数测定

Fig. 3-10 Mab dilution curves at different coated antigen concentrations

#### **3.3.9.3** 敏感性鉴定

由图3-15可知，5G2株SH Mab标准抑制曲线的线性回归方程为：y=-0.3369x+1.0994，相关系数R2=0.9784，根据回归方程计算5G2株对SH的半数抑制浓度(IC50)为82ng/mL表明本试验所获SH Mab对SH具有较高的敏感性。



图 3-11 间接竞争ELISA检测SH *IC50*

Fig. 3-11 *IC50* of SH Mab by indirect competitive ELISA

#### **3.3.9.4** 交叉反应试验结果

SH的*IC50*为82*ng/L*, Mab对SH结合反应的特异性较强；纯化后SH Mab对磺胺间甲氧嘧啶（SMM）、磺胺对甲氧嘧啶（SMD）、磺胺甲基嘧啶（SM）、磺胺间二甲氧嘧啶（SDM）、磺胺醋酰（SCT）、磺胺氯吡嗪钠（SCZ）、磺胺噻唑（ST）、磺胺甲噁唑（SMZ）、磺胺苯吡唑（SPH）、磺胺二甲嘧啶（SM2）、氨苯磺胺（SSF）和磺胺喹噁啉（SQ）的交叉反应率如表3-15所示：

表 3-15 SH Mab与磺胺类药物物的交叉反应率

Table 3-15 the cross-reactivity of SH Mab with SAs analogous

| 磺胺类药物  Sulfonamides | 半数抑制浓度 （ng/mL）  *IC50*（ng/mL） | 交叉反应率/(%) Crossreactive rates/(%) |
| --- | --- | --- |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 磺胺母核  Sulfanilamides(SH)  磺胺 间 甲氧嘧啶Sulfamonomethoxine（SMM） 磺胺对甲氧嘧啶Sulfametoxydiazine（SMD） 磺胺甲基嘧啶Sulfamerazine（SM）  磺胺间二甲氧嘧啶Sulfadimethoxine（SDM） 磺胺醋酰Sulfacetamide（SCT）  磺胺氯吡嗪钠  Sulfaclozine sodium monohydrate（SCZ）  磺胺噻唑Sulfathiazole（ST） 磺胺甲噁唑  Sulfamethoxazole（SMZ） 磺胺苯吡唑Sulfaphenazole（SPH） 磺胺二甲嘧啶Sulfamethazine（ SM2 ） 氨苯磺胺Sulfasulfonamide（SSF） 磺胺喹噁啉  Sulfaquinoxaline（SQ） | 82  75.90  95.34  78.09  95.79  113.89  315.38  256.25  150.18  190.69  1782.61  16400  107.89 | 100.0  108  86  105.0  85.6  72  26  32  54.6  43  4.6  0.5  76 |

### **3.3.10** 腹水的制备、纯化及抗体蛋白分子量的确定

#### **3.3.10.1** 腹水的制备

用处于对数生长期的5G2阳性细胞腹腔注射25只Babl/C小鼠，约10d后可

观察到小鼠腹部明显肿大，小鼠行动迟缓，用12号针头从小鼠一侧腹股沟处刺入，得到黄色的腹水。3-5d后可再次收取腹水。共收取腹水约125mL。

#### **3.3.10.2** 测定纯化腹水

通过对每次透析外液的紫外扫描，监测腹水是否纯化完全，结果表明当透析第三天时在透析外液的紫外扫描图与PBS溶液的紫外扫描图相似，无其他的杂峰，表明透析完全。根据测出的*OD260*、*OD280*和计算公式，得出纯化腹水的浓度为2.86 mg/mL。

#### **3.3.10.3** 单克隆抗体分子量的确定

经SDS-PAGE分析，单克隆抗体在66～70ku处有大量表达，结果见图3-12。

M：蛋白标准1：纯化的单抗



图 3-12 SDS-PAGE优球蛋白法纯化单抗的结果

M: protein standard 1: purified monoclonal antibody

Fig. 3-12 SDS-PAGE the purified monoclonal antibody results

## **3.4** 讨论

### **3.4.1** 完全抗原合成

本节实验采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯法）合成磺胺类药物母核结构的人工抗原。磺胺类药物拥有共同的母核结构SH，SH结构的两端分别为氨基和羧基，为了使氨基端充分暴露，故选用易于与羧基基团反应来延长碳链结构的混合酸酐法合成完全抗原。偶联时，半抗原SH中的羧基可与氯甲酸异丁酯在有机溶剂中形成混合酸酐，然后与蛋白质分子中的氨基形成肽键，从而使半抗原与蛋白质连接起来。选择合适的免疫原用载体非常重要。目前用作载蛋白

的物质主要有牛血清白蛋白(BSA)、禽卵血清白蛋白(OVA)、人血清蛋白

（HSA）、血蓝蛋白(KLH)等。本实验采用的BSA和OVA，因其价廉易得，不易变性，理化性质稳定，且高含量的赖氨酸，自由氨基较多，不同的

pH和离子强度下，溶解度均较大，在含有机溶剂（如DMSO、DMF、吡啶等）的情况下都可以与半抗原进行偶联，并且，可溶状态即使在偶联后人能保持[78]。合成抗原的结合比与其诱导免疫应答能力有较大关系。因此，可以通过药物与蛋白投料比例来控制结合比。过多的半抗原并不能得到预期的结果。这是因为载体上覆盖的半抗原分子过多时，可能不利于载体与淋巴细胞表面结合，不能使载体引起免疫反应。一般来说载体与半抗原的分子的最佳偶联率为5~15为宜[79]。

有文章报道包被原的偶联比例越低，抗原反应越灵敏，绘制的标准曲线*IC50*值越低[80]，有可能包被原偶联比如过高，标准品难以形成与包被抗原的有效竞争。因此尝试通过降低包被原的偶联比来提高抗原灵敏度。本次实验中，免疫原SH-BSA结合比为11.6: 1，包被原SH-OVA的结合比为10: 1。BSA-SH和OVA-SH，紫外扫描鉴定结果发现，BSA-SH的吸收峰发生明显改变，与蛋白质典型的吸收峰值相比产生峰值漂移；SDS-PAGE鉴定发现，BSA-SH的分子质量大于其载体蛋白BSA的分子质量；BSA-SH免疫小鼠后，得到了特异性抗体。结果表明获得了具有良好免疫原性的BSA-SH人工抗原。

### **3.4.2** 细胞融合

细胞融合是本实验的关键步骤，使用细胞融合剂（PEG2000）造成细胞膜一定程度的损伤，使细胞易于相互粘连而融合在一起。正常的脾细胞在培养基中存活仅5-7d，无需特别筛选，细胞的多聚体形式也容易死去，而未融合的瘤细胞则需用HAT和HT培养基进行筛选。影响细胞融合的条件有很多，如培养基，新生胎牛血清的质量，PEG的分子量、浓度及其与细胞作用的时间，加入饲养细胞的量和时间，SP2/0与脾细胞的比例，更换HAT及HT培养基的时间，适宜的培养条件等。因而，在细胞融合之前，应做好充分的准备工作。SP2/0在融合时

应处于对数增长期，生长状态要好，并要用含20% 8-氮杂鸟嘌呤的完全培养基

培养7-14 d，清除那些细胞异质化、大小不一，或返祖等现象的细胞；饲养细胞应提前1 d铺于板中；培养基及PEG在融合前在37℃温箱中进行预热。

### **3.4.3** 阳性细胞株的帅选

由于本研究需要制备针对具有磺胺类药物母核的簇特异性抗体，所以在细胞的筛选中，首先用间接ELISA法挑选出阳性的细胞克隆，还需要用磺胺类药物进行间接竞争ELISA实验，工作量很大，因此在免疫过程中就要确定好最佳的包被浓度，以便迅速地筛选阳性细胞，并排除假阳性孔，将阳性孔尽早进行克隆、冻存，以防筛选过程中污染，筛丢等情况发生导致阳性孔细胞株的丢失。

### **3.4.4** 腹水的制备

在制备腹水抗体前，应提前10 d给小鼠注射液体石蜡50µL/只，有效抑制小鼠巨噬细胞和淋巴细胞的免疫功能，为杂交瘤细胞更好的生长创造良好的条件，注射杂交瘤细胞数量为105个/只较适宜，用DMEM无血清培养基调整杂交瘤细胞的数量至最适量注射小鼠腹腔，可以有效降低小鼠长瘤的几率，并且很大程度上能够提高腹水产量。注射后7-10d收集腹水。腹水产量较高。

### **3.4.5** 纯化得到单抗**IgM**的特点

IgM是免疫球蛋白的一种亚型，主要由脾脏和淋巴结中浆细胞分泌合成，是免疫球蛋白巾相对分子质量最大的，分子量190, 000道尔顿。其分子的基本结构是由四肽链组成的，即由二条相同的分子量较小的轻链（L链）和二条相同的分子量较大的重链（H 链）组成的。H链有一个可变区（VH）和四个恒定区（CHl、

CH2、CH3和CH4）共五个功能区。五聚体由J链和二硫键连接五个单体，五聚体IgM理论上应为10个与抗原结合的位点，但实际上由于立体构型的空间位阻，—般，只有5个结合点可结合。IgM没有铰链区，但实际上它们还有相对的弯曲性。B淋巴细胞表面缺乏Fc受体，但大多数静止的B细胞表面具有表面IgM，这些表面分子是与膜结合的。它的功能是作为抗原受体，提供使淋巴细

胞转化成分泌抗体的浆细胞所需要的信号的—部分（此信号的另一部分是通过T细胞所提供）。此浆细胞产生分泌抗体的特异性于表面IgM相同。在B淋巴细胞的成熟过程中，首先在细胞浆内出现IgM，然后出现在细胞膜上，当膜上同时表达IgD时，B细胞完全成熟。当受抗原刺激时，它可以产生分泌型的IgM。实验中所得到的是IgM型抗体，希望得到的是IgG型，但从几亿个细胞中融合筛选出想要得到的能分泌IgG的细胞，也存在着一定的运气成分在里面，但IgM也可以用做为后续试剂盒与胶体金试纸条也可以，只是相较于IgG型抗体稳定性上差一些。

## **3.5** 小结

SH-BSA与SH-OVA抗原合成成功；用BSA-SH免疫新西兰大耳兔与Balb/C小鼠，成功获得多抗与单抗。

# 第4章 磺胺类药物多残留ELISA快速检测试剂盒的初探

本节实验采用已经获得的SH单抗作为包被原包被酶标板，用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶（HRP）与SH-OVA联接作为酶标记物即载体酶标记抗原，对ELISA各条件进行摸索优化建立直接竞争ELISA方法，研制磺胺药物多残留

ELISA快速检测试剂盒雏形。

## **4.1** 实验材料

### **4.1.1** 实验试剂

#### **4.1.1.1** 酶标记物合成所用试剂：

SH-OVA本实验室合成（经鉴定合成成功）

NaOH北京化工厂

HCl 北京化工厂

NaIO4 Sigma公司

乙二醇 北京化工厂

HAC 北京化工厂

NaAC•3H2O北京化工厂

HRP Sigma 公司

NaBH4北京博友科技有限公司

1）包被液（碳酸盐缓冲液CBS）：Na2CO3 1.59 g, NaHCO3 2.93 g，加蒸馏水定容至1000 mL，调pH值到9.6.

2)磷酸盐缓冲液（0.01M PBS）：NaCl 8.00 g, KCl 0.2 g, KH2PO4 0.2 g， Na2HPO4·12H 2O 2.9 g，加蒸馏水定容至 1000 mL，调 PH 值到 7.4.

3）封闭液：

A 5%脱脂奶粉：1 g脱脂奶粉溶于磷酸盐缓冲液20 mL. B 5%Gly: 1 g甘氨酸溶于磷酸盐缓冲液20 mL。

C 5%脱脂奶粉+0.05%Tween-20+3%蔗糖：1 g脱脂奶粉、10µL Tween -20和0.6 g

蔗糖溶于磷酸盐缓冲液20 mL。

4）洗涤液：含有0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液。

5）稀释液：

A 0.01 M，pH 7.4磷酸盐缓冲液；

B 0.1M, pH 7.0 Tris-HCL溶液。

6)底物缓冲液：0.2 mol/L NaAc: 取NaAc 16.4g加蒸馏水200mL，完全溶解后，定容至1L。

7）TMB底物显色液：北京索莱宝科技有限公司

8)终止液(2 M H2SO4): 22.2 mL浓硫酸缓慢加入177.8 mL蒸馏水中

### **4.1.2** 实验所用主要仪器：

96孔聚苯乙烯酶标板JET BIOFIL公司

MILLI-Q超纯水仪Millipore公司

Accμlab电子天平（0.0001g）北京赛多利斯仪器系统有限公司移液器Eppendorf、Gilson、Dragon公司

680型酶联免疫检测仪BIO-RAD公司

1575 Immuno Wash BIO-RAD公司

## **4.2** 实验方法：

### **4.2.1** 载体酶标记物（**SH-OVA-HRP**）合成

#### **4.2.1.1** 试剂准备

0.1 M pH7.2 PB溶液：

Na2HPO4·12H 2O 1.4507 g

NaH2PO4·2H 2O 0.1482 g

加蒸馏水定容至500 mL，调pH值到7.2。包被液（碳酸盐缓冲液CBS）：

Na2CO3 1.59 g

NaHCO3 2.93 g

加蒸馏水定容至1000 mL，调pH值到9.6.0.1mol/L NaIO4: 42.8mg NaIO4溶于2mL超纯水。

0.2 mol/L乙二醇：22.5µL乙二醇溶于2mL超纯水。

0.001 mol/L pH4.4醋酸钠缓冲液：NaAC·3H 2O 100mg, HAC 96µL溶于2000mL

超纯水。

#### **4.2.1.2** 合成过程

（1）将8.0mg HRP溶于2mL超纯水，加入0.4mL新配制的0.1 mol/L，在室温下轻轻搅拌20min。

（2）加入0.4*mL*新配置的0.2 mol/L乙二醇，在室温下轻轻搅拌30min。

（3）4℃下，用0.001 mol/L pH4.4醋酸钠缓冲液透析6h，换液3次。

（4）室温下轻轻搅拌下，将活化的HRP溶液逐滴加到用2mL包被液溶解的3.2.1

中合成的SH-OVA(2: 1) 溶液中（含SH-OVA约4.5mg）。

（5）室温下轻轻搅拌下反应2h，用1 mol/L NaOH调pH值到9.5（用100µL移液器加3滴），继续搅拌1h。

（6）加入0.2mL用超纯水新配置的4mg/mL NaBH4，4℃静置2h。

（7）用0.01 mol/L pH 7.4PB透析48h，加等量甘油后，于-26℃保存备用。

### **4.2.2** **SH**单克隆抗体包被直接竞争**ELISA**方法的建立

#### **4.2.2.1** 最佳包被原的稀释度与酶标记物工作浓度的确定

（1）包被：SH单克隆抗体用包被液梯度稀释（1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3200）后，用微量加样器吸取稀释好的样品加入孔内，100µL/孔。置4℃冰箱过夜。

（2）洗涤：从4℃冰箱中取出酶标板，用Immuno Wash洗涤3次后在吸水纸上拍干。

（3）封闭：用5%Gly 37℃恒温箱封闭2h。

（4）酶标记抗原工作浓度的选择

用磷酸缓冲液将酶标抗原SH-OVA-HRP 梯度稀释（1:100，1 ：

200,1:400,1:800,1:1600,1:3200,1:6400,1:12800）用微量加样器吸取稀释好的样品

加入孔内，100µL/孔，置37℃恒温箱1h。

（5）洗涤：与（2）相同洗涤3次。

（6）显色：加TBM显色液，每孔100µL，37℃恒温箱避光静置10min。

（7）终止反应：加2mol/L H2SO4终止显色反应，每孔50µL。

（8）测*OD450*值：酶标仪测定450nm波长下的*OD450*值。

#### **4.2.2.2** 包被条件的选择

由确定下来的SH单克隆抗体包被浓度分别包被三板，一板置4℃冰箱过夜，另一板微波炉小火3min，最后一板置于37℃选择4℃过夜、微波小伙3min、37℃

2h三种不同时间、不同温度进行包被，以确定最佳包被条件。

#### **4.2.2.3** 封闭液的确定

由确定下来的最佳包被原浓度，每孔分别加入200μL的5%脱脂奶粉、5%

脱脂奶粉+0.05%Tween-20+3%蔗糖、5%Gly进行封闭，确定最佳封闭液及浓度。

#### **4.2.2.4** 封闭时间的优化

由确定的封闭液种类，封闭时间选择0.5h、1h、2h，直接ELISA确定最佳封闭时间。

#### **4.2.2.5** 酶标记抗原孵育时间的确定

选择37℃1h、37℃2h两种不同时间进行孵育，以确定最佳酶标记抗原孵育条件。

### **4.2.3** **ELISA**标准曲线的建立

在上述最佳条件下，将SH 配成0ng/mL ，10ng/mL，30ng/mL，90ng/mL，

270ng/mL, 810ng/mL系列浓度，按直接竞争ELISA法测定。以SH溶液浓度的对数为横坐标，抑制率为纵坐标，绘制标准曲线。

### **4.2.4** 重复性和交叉反应性特性试验

按照4.2.3方法，SH每个浓度重复3次，以SH抑制率的变异系数为指标来评

价该方法的重复性，用SH和12种磺胺药物交叉反应来评价该方法的交叉反应特性。

### **4.2.5** 样品处理

#### **4.2.5.1** 组织样品（猪肉、鸡肉、鸡肝）的处理

预先剔除组织样品中脂肪后用剪刀剪碎，并进行匀浆，称取2.0±0.05 *g*样本至50 mL离心管中，加入8 mL乙腈上下振荡20 min, 4000 r/min离心10 min；取上清液2.5 mL至10 mL处理干净的玻璃试管中，于50-60℃水浴约1h，再在氮气流下吹干；加入1mL正己烷，充分震荡溶解干燥残留物，再加入1 mL 0.01M PBS溶液，震荡3-5 min, 3000 r/min离心10 min；除去上层正己烷相，取下层水相ELISA分析。

#### **4.2.5.2** 牛奶样品的处理方法：

牛奶样品经3500 r/min 离心10 min 脱脂后，吸取中层牛奶2.0±0.05 mL ，

加入8 mL乙腈上下振荡20 min, 4000 r/min离心10 min；取上清液2.5 mL 至

10 mL处理干净的玻璃试管中，于50-60℃水浴约1h，再在氮气流下吹干；加入1 mL正己烷，充分震荡溶解干燥残留物，再加入1 mL 0.01M PBS溶液，震荡3-5 min, 3000 r/min离心10 min；除去上层正己烷相，取下层水相ELISA分析。

### **4.2.6** 空白样品添加回收实验

取试纸条检测的交叉反应好的磺胺类药物，分别取鸡肉、鸡肝脏、猪肉和牛奶四种样品，做空白对照和0μg/kg、50μg/kg、100μg/kg 3个添加浓度的添加回收实验，用ELISA测试。每个浓度、每份样本共3个批次，均作3次重复。

### **4.2.7** 试剂盒组装说明

#### **4.2.7.1** 酶标板

包被SH mAb于酶标板后11列，每板第1列不包被SH Mab但与后11

列相同进行5%Gly封闭，将封闭好的酶标板装在装有干燥剂的锡箔袋中，并用

抽真空机抽真空后，保存期内放置在4℃冰箱内。每2个月检测一次其稳定性。

#### **4.2.7.2** 试剂盒中所配备试剂

样品稀释液：5倍浓缩样品稀释液（5XPBS）洗涤液：10倍浓缩的洗涤液（10XPBS）

酶标记物：酶标抗原稀释（1:800）（SH-OVA-HRP）显色液：TMB显色液

终止液：2M硫酸

标准品：100ng/mLSH溶液

#### **4.2.7.3** 试剂盒操作：

（1）将酶标板放置试验台10min,拆除外包装。

（2）酶标板第1列每孔分别加入酶标记物各100μL。（假阳性检测）

（3）酶标板第2列每孔分别加入酶标记物各100μL。

（4）第3列每孔分别加入100μL样品稀释液（用之前先稀释至1X即1mL 5X

样品稀释液+4mL超纯水1mL枪搅匀）。（空白对照）

（5）第4列每孔先分别加入50μL样品稀释液（用之前先稀释至1X即1M*l* 5X样品稀释液+4mL超纯水1mL枪搅匀）再向第4列每孔加入50μL酶标记物。（阴性对照）

（6）第5列每孔先分别加入50μL标准品，再向第5列每孔加入50μL酶标记物。（阳性对照）

（7）其余7列按被测样品检测的需要做不少于6个孔的重复检测（即剩余孔 每

6孔可检测一个样品）。

（8）将酶标板讨好手套放入37°C 湿盒中孵育1h。

（9）提前将10X浓缩洗涤液稀释至1X(10mL浓缩液+90mL超纯水1mL枪搅匀)，将酶标板里的液体用排枪吸出（每次都换枪头）洗涤5遍，每次间隔10s, 最后一次拍干。

（10）所用酶标板中的板条每孔都加入100μL显色液，避光静置10min后，每孔加入50μL终止液，终止。

（11）酶标仪读数，波长选450nm。

（12）导出数据。

（13）根据所做标准曲线和被测样品读数平均值计算样品中磺胺药所含浓度。

## **4.3** 结果与分析

### **4.3.1** 最佳包被原稀释度与酶标记物工作浓度的确定

分别将SH Mab用包被液梯度稀释（1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3200），用磷酸缓冲液将酶标抗原SH-OVA-HRP稀释梯度稀释：1: 100, 1: 200, 1:400，1:800，

1:1600, 1:3200，1:6400，1:12800），ELISA检测得到结果如表4-1所示，确定

SH Mab包被最佳工稀释度为1: 1600，酶标抗原SH-OVA-HRP最佳稀释稀释度确定为1: 1600。

表 4-1 建立SH Mab ELISA检测系统包被原浓度的选择

Table 4-1 establish the original concentration of SH Mab ELISA detection system package

select

| SH-OVA-HRP  稀释度 | 不同SH Mab包被浓度下测定的OD450 1:400 1:800 1:1 600 1:3200  ― + ― + ― + ― + |
| --- | --- |
| 1:100 | 1.393 0.776 1.463 0.756 1.520 0.869 1.264 0.723 |
| 1:200 | 1.238 0.765 1.258 0.674 1.363 0.775 1.201 0.665 |
| 1:400 | 1.159 0.654 1.220 0.612 1.298 0.674 1.203 0.543 |
| 1:800 | 1.052 0.543 1.119 0.523 1.207 0.553 1.092 0.512 |
| 1:1600 | 0.882 0.432 0.921 0.543 1.148 0.455 0.903 0.463 |
| 1:3200 | 0.672 0.412 0.696 0.356 0.739 0.393 0.651 0.342 |
| 1:16400 | 0.506 0.259 0.577 0.235 0.590 0.345 0.568 0.254 |
| 1:12800 | 0.192 0.123 0.218 0.131 0.239 0.115 0.202 0.166 |

“―”为50*µL* SH+50*µL* PBS阴性对照，“+”为100*µL* SH的抑制试验

### **4.3.2** 包被条件的确定

选择最大吸光值最大，抑制率较高的作为ELISA系统的包被时间条件。4℃过夜和37℃

2h两种差异不显著，微波小火3min较前两者差异略显著，从时间成本上考虑，选择4℃过夜进行包被。

表 4-2 建立SH Mab ELISA检测系统的包被时间与包被条件的选择

Table 4-2 create package SH Mab ELISA detection system is the time and package condition

selection

| 不同条件不同包被时间下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
|  | — | + | 抑制  （率%） |
| 包被条件 |  |  |
| 4℃过夜 | 1.543 | 0.653 | 57.679 |
| 微波小伙 3min | 1.206 | 0.664 | 44.942 |
| 37℃ 2h | 1.443 | 0.642 | 55.509 |

“―”为50*µL* SH+50*µL* PBS阴性对照，“+”为100*µL* SH的抑制试验

### **4.3.3** 封闭液的确定

封闭液确定为5%Gly进行封闭，结果见表4-3，从表中可以得到，5%Gly为最佳封闭液，封闭效果较好，抑制率较高。

表 4-3 建立SH Mab ELISA检测系统的封闭液的选择

Table 4-3 SH Mab ELISA detection system closed liquid selection

| 封闭液浓度% | 不同封闭液及不同SH浓度下做抑制测定的OD450(ng./mL)  120 300 500 800  ― + ― + ― + ― + |
| --- | --- |
| 5%脱脂奶粉 | 0.933 0.432 0. 963 0.456 0.992 0.455 0.944 0.543 |
| 5%脱脂奶粉  +0.05%Tween-20+3%  蔗糖 | 0.868 0.452 0.898 0.543 0.913 0.652 0.871 0.675 |
| 5%Gly | 0.956 0.405 0.982 0.345 1.123 0.287 0.974 0.212 |

“―”为50µLSH+50µL PBS阴性对照，“+”为100µLSH的抑制试验

### **4.3.4** 封闭时间的确定

使用5% Gly封闭液进行封闭后，封闭时间选择0.5h、1h、2h，间接ELISA确定最佳封闭时间。当封闭时间为2h时（表4-4），抑制率最大，封闭效果最佳。最佳封闭时间定为2h。

表 4-4 建立SH Mab ELISA检测系统的封闭时间的选择

Table 4-4 SH Mab ELISA detection system closed time selection

| 不同封闭时间下测定的 OD450 | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| 封闭时间 | 0.5h | 1h | 2h |
| — + | | — + | — + |
| 0.956 0.405 | | 0.986 0.489 | 0.998 0.375 |
| 抑制率(%) | 57.636 | 50.406 | 62.424 |

“―”为50µLSH+50µL PBS阴性对照，“+”为100µLSH的抑制试验

### **4.3.5** 酶标抗原的孵育时间的确定

选择37℃1h、37℃2h两种不同时间进行孵育，孵育时间对结果的影响差异不大，结果如表4-5，从操作节省时间上考虑选则37℃1h为最佳酶标记抗原孵育条件。

表 4-5 建立建立SH mAbELISA检测系统酶标抗原的最佳孵育时间时间选择

Table 4-5 to establish the optimal incubation time time to establish the SH mAbELISA detection

System HRP antigen selection

| 不同酶标抗原孵育时间下测定的 OD450 | | |
| --- | --- | --- |
| 孵育时间 | 1h | 2h |
|  | — + | — + |
|  | 0.966 0.365 | 0.958 0.361 |
| 抑制率(%) | 62.215 | 62.317 |

“―”为50µLSH+50µL PBS阴性对照，“+”为100µLSH的抑制试验

### **4.3.6** **ELISA**标准曲线的建立

将SH配成0ng/mL，10ng/mL，30ng/mL，90ng/mL，270ng/mL，810ng/mL系列浓度，按直接竞争ELISA法测定。以SH溶液浓度的对数为横坐标，抑制率为纵坐标，绘制标准曲线，y=-0.4016x+1.2187，R2=0.97，SH *IC50*为61.60ng/mL. 结果如图4-1 .



图 4-1 SH标准曲线

Fig. 4-1 SH standard curve

### **4.3.7** 重复性结果

标准曲线3次重复结果见图4-2，曲线基本重叠，表明方法的重复性好。



图4-2 重复试验SH标准曲线

Fig. 4-2 repeated trials SH standard curve

### **4.3.8** 交叉反应特性试验

交叉反应试验结果：SH的*IC50*为61.60ng/mL, Mab对SH结合反应的特异性较强；纯化后SH Mab对磺间甲氧嘧啶（SMM）、磺胺对甲氧嘧啶（SMD）、磺胺甲基嘧啶（SM）、磺胺间二甲氧嘧啶（SDM）、磺胺醋酰（SCT）、磺胺氯吡嗪钠（SCZ）、磺胺噻唑（ST）、磺胺甲噁唑（SMZ）、磺胺苯吡唑（SPH）、磺胺二甲嘧啶（SM2）、氨苯磺胺（SSF）和磺胺喹噁啉（SQ）的交叉反 应

率如表4-6所示：

表 4-6 SH Mab ELISA检测系统与SAs的交叉反应率

Table 4-6 SH Mab ELISA detection system SAs cross- reaction rate

| 磺胺类药物  Sulfonamides | 半数抑制浓度/（ng/mL）  *IC50/*（ng/mL） | 交叉反应率/(%) Crossreactive rates/(%) |
| --- | --- | --- |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 磺胺母核  Sulfanilamides(SH)  磺胺间 甲氧嘧啶Sulfamonomethoxine（SMM） 磺胺对甲氧嘧啶Sulfametoxydiazine（SMD） 磺胺甲基嘧啶Sulfamerazine（SM）  磺胺间二甲氧嘧啶Sulfadimethoxine（SDM） 磺胺醋酰Sulfacetamide（SCT）  磺胺氯吡嗪钠  Sulfaclozine sodium monohydrate（SCZ） 磺胺噻唑  Sulfathiazole（ST） | 61.60  73.20  105.34  72.09  93.54  103.89  335.38  266.25 | 100.00  109.12  82.04  104.04  82.12  69.97  26.68  35.45 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 续表 4-6 |  |  |
| 磺胺甲噁唑  Sulfamethoxazole（SMZ） 磺胺苯吡唑Sulfaphenazole（SPH） 磺胺二甲嘧啶Sulfamethazine（ SM2 ） 氨苯磺胺Sulfasulfonamide（SSF） 磺胺喹噁啉Sulfaquinoxaline(SQ) | 164.58  195.78  1763.41  16760.00  108.69 | 57.61  44.23  4.75  0.48  75.32 |

### **4.3.9** 回收率

SH 在组织（猪肉、鸡肉、鸡肝），牛奶中的添加浓度为分别为0μg/kg、50

μg/kg、100μg/kg 3个添加浓度的添加回收实验，用ELISA测试其回收率和变异系数测定结果见表4-7。结果表明，猪肉、鸡肉、鸡肝、牛奶中的SH，回收率均在73%-122%之间，批间变异系数均<25%，符合兽药残留分析的要求。

表4-7 猪肉、鸡肉、鸡肝、牛奶中提取SH回收率和变异系数（*n*=13）

Table4-7 the recoveries and coefficient of SH in swine muscle tissue, chicken muscle tissue, chicken liver tissue and egg, milk (*n*=13)

| 组织 SH 添加浓度（μg/kg）回收率（%）平均回收率（%）批内变异系数 （%）批间变异系数（%） |
| --- |
| 猪肉 50 110.52+5.65 98.47+10.68 5.13 21.56  114.03+16.82 13.84  70.87+9.57 13.52  100 101.92+6.15 98.07+12.32 6.03 8.23  92.23+8.62 5.12  100.06+3.23 5.32  鸡肉 50 120.02+7.65 95.62+10.34 6.28 18.63  95.03+13.82 11.84  71.82+9.57 16.52  100 98.92+7.86 98.40+5.733 5.76 9.76  96.23+3.67 7.42  100.06+5.67 6.32 |

|  |
| --- |
| 续表 4-7 |
| 鸡肝 50 94.52+5.62 101.70+11.33 7.13 12.56  124.03+18.81 15.84  86.56+9.56 14.52  100 98.92+5.95 96.73+7.63 9.76 19.76  91.23+9.68 12.43  100.06+7.27 10.32  牛奶 50 116.52+8.65 98.14+10.24 6.78 14.78  104.03+13.52 7.65  73.87+8.57 9.83  100 102.91+8.96 99.20+10.65 12.32 16.34  84.63+9.76 10.12  110.06+13.24 11.32 |

### **4.3.10** 试剂盒组装及其稳定性试验检测结果

#### **4.3.10.1** 试剂盒中所配备试剂

样品稀释液：5倍浓缩样品稀释液（5XPBS）；洗涤液：10倍浓缩的洗涤液

（10XPBS）；酶标记物：酶标抗原稀释（1:800）（SH-OVA-HRP）；显色液：

TMB显色液；终止液：2M硫酸；标准品：100ng/mLSH溶液；酶标板：包被SH Mab于酶标板后11列，每板第1列不包被SH Mab但与后11列相同进行5%Gly封闭，将封闭好的酶标板装在装有干燥剂的锡箔袋中，并用抽真空机抽真空后，保存期内放置在4℃冰箱。

*新疆农业大学硕士学位论文*



图4-3 SH Mab SAs多残留ELISA快速检测试剂盒的组装

Fig. 4-3 SH the Mab of SAs multi residues ELISA rapid detection kit assembly

#### 4.3.10.2 试剂盒操作说明试剂盒操作说明如图4-4



图 4-4 试剂盒操作说明

Fig. 4-4 kit instructions

#### **4.3.10.3** 稳定性试验结果如表

按试剂盒操作说明操作，置于4℃冰箱保存2个月后的试剂盒稳定性检测结果如表4-8。结果表明试剂盒第1列未封闭与第2列做封闭的检测结果显示封闭效果较好，排除由封闭不全引起的假阳性。试剂盒稳定性良好。

表 4-8 4℃保存的SH Mab SAs多残留ELISA快速检测试剂盒在第2个月稳定性检测

Table 4-8 4℃saved SH Mab SAs multiresidue ELISA rapid test kit in the first two months

Stability testing

对照空白阴性阳性

|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B | 0.036 | 2.253 | 0.030 | 1.883 | 0.782 | 0.045 | 0.042 | 0.030 | 0.045 | 0.042 | 0.030 | 0.036 |
| C | 0.042 | 2.246 | 0.048 | 2.234 | 1.002 | 0.034 | 0.048 | 0.048 | 0.034 | 0.048 | 0.048 | 0.042 |
| D | 0.048 | 2.329 | 0.040 | 2.003 | 0.980 | 0.044 | 0.048 | 0.040 | 0.044 | 0.048 | 0.040 | 0.048 |
| E | 0.042 | 2.544 | 0.040 | 2.320 | 1.071 | 0.045 | 0.035 | 0.040 | 0.045 | 0.035 | 0.040 | 0.042 |
| F | 0.055 | 2.321 | 0.053 | 1.562 | 0.684 | 0.034 | 0.035 | 0.053 | 0.034 | 0.035 | 0.053 | 0.055 |
| G | 0.052 | 2.437 | 0.047 | 2.233 | 0.895 | 0.048 | 0.040 | 0.047 | 0.048 | 0.040 | 0.047 | 0.052 |

方法同上，4℃冰箱保存4个月后的试剂盒稳定性检测结果如表4-9。结果表明试剂盒第1列未封闭与第2列做封闭的检测结果显示封闭效果任较好，排除由封闭不全引起的假阳性，结果表明试剂盒未出现假阳性，虽然总体效价有所降低，但在国家检测限范围内，可用于检测，稳定性好。

表 4-9 4℃保存的SH Mab SAs多残留ELISA快速检测试剂盒在第4个月稳定性检测

Table 4-9 4 ℃saved SH Mab SAs multiresidue ELISA rapid test kit in the first two months stability testing

对照空白阴性阳性

|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B | 0.036 | 2.123 | 0.038 | 1.783 | 0.882 | 0.030 | 0.042 | 0.030 | 0.045 | 0.045 | 0.030 | 0.036 |
| C | 0.042 | 2.136 | 0.046 | 2.144 | 1.202 | 0.048 | 0.048 | 0.048 | 0.034 | 0.034 | 0.048 | 0.042 |
| D | 0.048 | 2.119 | 0.042 | 1.896 | 0.993 | 0.040 | 0.048 | 0.040 | 0.044 | 0.044 | 0.040 | 0.048 |
| E | 0.042 | 1.987 | 0.043 | 2.189 | 1.171 | 0.040 | 0.035 | 0.040 | 0.045 | 0.045 | 0.040 | 0.042 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **F** | 0.055 | 2.121 | 0.054 | 1.682 | 0.784 | 0.053 | 0.035 | 0.053 | 0.034 | 0.034 | 0.053 | 0.055 |
| **G** | 0.052 | 2.027 | 0.045 | 2.134 | 0.895 | 0.047 | 0.040 | 0.047 | 0.048 | 0.048 | 0.047 | 0.052 |
| **H** | 0.051 | 1.976 | 0.052 | 1.702 | 0.893 | 0.050 | 0.046 | 0.050 | 0.047 | 0.047 | 0.050 | 0.051 |

## **4.4** 讨论

### **4.4.1** 酶标抗原的合成

辣根过氧化物酶（HRP）标记抗原常用方法是过碘酸钠法。其原理是

HRP的糖基用过碘酸钠氧化成醛基，在加入SH-OVA后，该醛基与OVA氨基结合，进而形成Schiff氏碱。在反应中，为了防止HRP中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合，前先用二硝基氟苯阻断氨基再用过碘酸钠氧化。氧化反应末了，用硼氢化钠稳定Schiff氏碱。

标记的关键一个是SH-OVA与HRP的比例，一般情况下为1: 1；再者就是过碘酸钠的终浓度及作用时间，以及所标记的总时间和温度都有很大影响。

### **4.4.2** 试剂盒交叉反应率

从试剂盒的交叉反应率的实验结果看，该试盒对12种SAs的交叉反应率在

60%以上的有6种，其余6种交叉反应率均低于60%。这与试剂盒中直接包被的抗体特异性有关，交叉反应率在60%以上的6种SAs可能是由于这些药的除与

SH拥有共同的母核结构外，它们的-R集团结构也与SH的-R集团结构相似度高。因而，与以SH所做抗原产生的特异性的mAb能有较好的空间识别位点。交叉反应率在60%以下的6种SAs可能是由于它们的-R集团在结构上存在较大的差异所致。

### **4.4.3** 与国内外多检**ELISA**试剂盒的比较**[81]**

国外ELISA试剂盒中美国的BIOO公司生产的磺胺类药物残留ELISA试剂盒可以达到四联检，对SM2、SD、SMR、磺胺氯哒酮的交叉反应率均大于60%，

保质期在年；荷兰EURO-Diagnostica B. V公司生产的磺胺类药物残留ELISA试剂盒可以达到六联检，对磺胺嘧啶、SMR、SCP、磺胺异戊唑、SD、磺胺氯吡啶的交叉反应率均大于66%；这两个公司均以间接竞争ELISA法研制成试剂盒。意大利SUL03A公司则利用直接竞争ELISA法研制成的磺胺类药物残留ELISA试剂盒可以达到四联检，对磺胺地索辛、磺胺甲嘧啶、SMR、SMM的交叉反应率均大于100%，稳定期在6个月。目前，国内只有北京望尔生物技术有限公司一家利用间接竞争ELISA所研制的磺胺“四合一”ELISA检测试剂盒市售，对SMM、SD、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑的交叉反应率均大于65%，稳定期在6个月。相比较国内外的试剂盒在所检测的多联检测上应用了直接竞争ELISA法研制试剂盒，所检测药物的交叉反应率在60%以上的有6种，能够达到多检测的目的。但稳定性实验由于实验时间原因只检测到4个月均稳定。

### **4.4.4** **HRP**抗体结合物的保存

加入等量甘油后，小量分装于冻存管内，-20*℃*存放，且注意防止反复冻融；或是加入等量60%甘油，4℃保存；但不适宜加入NaN3或酚做防腐。否则，会影响酶活性。必要时，将其冻干保存，并用BSA或脱脂牛奶作为保护剂。

### **4.4.5** 本研究试剂盒的特点

选择直接包被抗体，酶标抗原，建立ELISA直接竞争检测方法，是基于整个试剂盒市场化省时快速的出发点考虑，整个操作时间约1.5h，达到快速检测要求。

## **4.5** 小结

用已经获得的SH单抗作为包被原包被酶标板，用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶（HRP）与SH-OVA联接作为酶标记物成功合成载体酶标记抗原。

对ELISA各条件进行摸索优化建立直接竞争ELISA方法，研制磺胺药物多残留ELISA快速检测试剂盒。

# 第5章 磺胺类药物多残留免疫胶体金试纸条的初探

本节实验采用柠檬酸三钠还原法，制备胶体金溶液，在此基础上摸索胶体金标记抗磺胺母核单克隆抗体，制备检测磺胺类药物多残留免疫胶体金试纸条的各项条件，试纸条雏形组装为成功制备试纸条奠定基础。

## **5.1** 实验材料

### **5.1.1** 主要试剂

氯金酸Sigma公司

柠檬酸三钠北京化工厂

牛血清白蛋白(BSA) Sigma公司

聚乙二醇20000 (PEG20000)北京欣经科公司N，N-二甲基甲酰胺北京化学试剂公司HRP标记羊抗鼠IgG北京康维试剂公司二甲基亚砜(DMSO)北京欣经科公司无水碳酸钾（K2CO3）北京化学试剂公司海藻糖北京化学试剂公司

聚乙烯醇（PVA）北京化学试剂公司

### **5.1.2** 试纸条材料

硝酸纤维素膜（NC膜）:

Immunopore RP Whatman S& S公司

Immunopore FP Whatman S& S公司

Millipore 35美国Millipore公司

Prima 60 Whatman S& S公司

Prima 85 Whatman S& S公司

玻璃纤维素膜：

Glass 33 德国 Schleicher& Schuell 公司

Ahlstron8964美国Ahlstron公司

CB-SB06上海金标公司样品垫：

GF-06上海捷宁生物技术有限公司

CB-SB06上海金标公司其他耗材：

PVC底板上海捷宁生物技术有限公司

铝箔袋上海捷宁生物技术有限公司

干燥剂上海捷宁生物技术有限公司

### **5.1.3** 仪器设备

超速冷冻离心机BECKMAN公司

XYZ3000型三维喷点平台美国BIO-DOT公司

CM4000 型切条机 美国 BIO-DOT 公司紫外分光光度计（UV-2100 型） 上海尤尼科公司 Milli-Q 纯水系统 Millipore 公司

KQ-600B超声波清洗器江苏省昆ft市超声波仪器厂

GHP-9160隔水式恒温培养箱上海一恒科技有限公司

可调微量加样器系列 Eppendort, Finnpipette Digital 公司电子天平（精确度 0.001*g*） 江苏省常熟市衡器厂

Accμlab 电子天平（0.0001*g*） 北京赛多利斯仪器系统有限公司微波炉 WD900SL23-2 格兰仕微波电器有限公司

90-1型恒温磁力搅拌器上海沪西分析仪器厂

DGG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱上海森信实验仪器公司

加热磁力搅拌器infrared hotplate stirrer (CR302) Biocote公司

### **5.1.4** 溶液的制备

#### **5.1.4.1** 样品稀释用溶液

（1）0.01M PH 7.4 PBS 溶液：

NaCL 8.00g

KCl 0.20g

KH2PO4 0.20g

Na2HPO4·12H 2O 2.90 g

加蒸馏水，定容至1000mL，调pH值到7.4。

（2）0.01M PH7.2 PB溶液：

Na2HPO4·12H 2O 1.4507 g

NaH2PO4·2H 2O 0.1482 g

加蒸馏水定容至500 mL，调PH值到7.2。

#### **5.1.4.2** 试纸条用溶液

（1）金标抗体稀释液：

A 0.01M pH 7.4 PBS (含0.1% BSA)

B 0.01M pH 7.2 PBS (含0.1%PEG、0.25%BSA) C 0.01M pH 7.2 PB (含0.1% BSA)

D 0.01M pH 7.2 PB (含0.05%PEG、0.1% BSA)

（2）封闭液：

A 0.01M pH 7.2 PB (含0.05%tween-20、1% BSA) B 0.01M pH 7.2 PB (含0.05%tween-20、2% BSA)

## **5.2** 实验方法

### **5.2.1** 胶体金的制备及质量鉴定

#### **5.2.1.1** 器皿的清洁

将专用玻璃器皿先用洗洁精洗涤，烘干后用酸液浸泡48 h，取出，大量自来

水冲洗，再用蒸馏水浸泡24 h，最后用去离子三蒸水冲洗三次，烘干后备用。

#### **5.2.1.2** 微波炉法制备胶体金溶液

取新制去离子水稀释成的0.01%氯金酸水溶液200 mL置于锥形瓶中，放于微波炉内高火加热至沸腾，移液器准确吸取5 mL 1%的柠檬酸三钠溶液，迅速一次性地加入锥形瓶中，立即摇晃均匀后，放入微波炉中以中档火力继续加热约3 min，可观察溶液由浅黄色变为淡灰色，直至溶液成酒红色后取出，避光冷

却至室温后补水至200 mL，4℃保存备用。

#### **5.2.1.3** 比较微波炉烧制的胶体金与成品胶体金

通过肉眼观察两种胶体金的颜色。使用紫外扫描金标颗粒，观察两种胶体金的最大吸收峰值及最大吸收波长。

#### **5.2.1.4** 改良磁力加热搅拌器法制备胶体金溶液

取新制去离子水稀释成的0.01%氯金酸水溶液200 mL置于锥形瓶中，与磁力搅拌器上中速旋转，于中高火加热至沸腾，移液器准确吸取4.5 mL 1%的柠檬酸三钠溶液，将磁力搅拌的速度迅速调为快速，将柠檬酸三钠迅速一次性地加入锥形瓶中，待搅拌均匀后，中档火力转为中速搅拌继续加热约15 min，可观察溶液由浅黄色变为淡灰色，到变为红色，直至溶液成酒红色后取出，避光冷却至室温后补水至200 mL，4℃保存备用。

#### **5.2.1.5** 比较微波炉法和改良磁力加热搅拌器法制备的胶体金溶液

通过肉眼观察颜色及紫外扫描金标颗粒，观察最大吸收峰值及最大吸收波长。

#### **5.2.1.6** 利用透射电镜进行鉴定

将胶体金滴于预先覆有Formvar 并经多聚氨酸处理的镍网上，孵育10

min，用滤纸吸去多余的试剂，室温干燥，然后在透射电镜下观察胶体金颗粒的外型，颗粒有无椭圆形及多角形及颗粒大小的均匀一致性作为观察的主要方面。拍片放大后，测量胶体金颗粒直径大小，且取多个点来计算胶体金颗粒的平均直径。

### **5.2.2** 抗体蛋白胶体金的标记

#### **5.2.2.1** 待标记单抗的处理及胶体金溶液的准备

将待标记的SH Mab单克隆抗体加入到透析袋中，用0.01 mol/L的PB（PH

7.2）4℃透析24 h，除去多余的盐离子，4℃10 000 r/min离心1h，去除聚合物，留上清，并重新测定抗体蛋白浓度，分装保存。

将胶体金溶液用3500 r/min离心30 min，去除凝集了的金颗粒沉淀。

#### **5.2.2.2** 胶体金最适抗体蛋白用量的测定

将胶体金溶液分装到7支EP管中，每管1mL,见表5-1，将待标记的SH Mab溶液用0.01 mol/L的PB（PH7.2）作系列稀释至5µg/mL、8µg/mL、11µg/mL、14µg/mL、17µg/mL、20µg/mL、26µg/mL，分别取1 mL加入对应管的胶体金溶液中。对照管加1 mL稀释液，混匀。静置10～20min后，在上述各管中加入

0.1 mL 10％的NaCl 溶液，混匀后静置2 h，观察结果，取颜色没有发生改变的

最小抗体浓度为单抗最适标记量。在此基础上再加30%即为最佳标记量。

表5-1 最适蛋白标记量测定步骤

Table 5-1 the optimal amount of protein markers measurement procedure

| 试剂 管 号 |
| --- |
| 1 2 3 4 5 6 7 |
| 胶体金（mL） 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0  SH mAb（µg ） 5 8 11 14 17 20 26  摇匀，静置 10min  10% NaCl（µL ） 100 100 100 100 100 100 100  摇匀，静置 2 h 后，测定 520nm 处的 OD 值 |

目测法通过颜色的变化观察胶体金的凝集状态。

紫外分光光度计测定法使用紫外扫描最大吸收波长520nm处（517-522nm均扫描）的*OD520*值，观察期*OD520*值的变化。

将其静置一夜后，观察其稳定性，并使用紫外扫描最大吸收波长520nm 处

（517-522nm均扫描）的最大*OD520*值，观察期*OD520*的变化。

#### **5.2.2.3** 选择最适标记的**pH** 值

取8管胶体金溶液，每管体积均为1mL，用0.1 mol/L K2CO3或0.1 mol/L HCL调节8管胶体金溶液的PH值分别为：6.5、7.0、7.5、7.8、8.0、8.2、8.5、9.0，在每管胶体金溶液中各加入最佳标记量的单抗，混匀，静置10min。再分别加入

100µL 10%的NaCl，测定上清在520nm处的*OD520*值，将结果绘制成图。

#### **5.2.2.4** 抗体蛋白的胶体金标记

取20 mL胶体金溶液，用0.1 mol/L K2CO3调pH值到最适pH值。

电磁搅拌下，按上述最佳标记量取所需量单抗溶液逐滴缓慢加入胶体金溶液中，持续搅拌30 min。

电磁搅拌下，逐滴加入金标抗体稳定剂，持续搅拌30 min，4 ℃静置过夜。

#### **5.2.2.5** 金标抗体稀释液的选择

在其他条件相同的情况下，比较四种金标抗体稀释液，观察金释放情况和颜色变化。

### **5.2.3** 纯化金标抗体

低温超速离心法纯化金标抗体，步骤如下：

(1)金标抗体溶液，3500 r/min，4℃离心20 min，弃去金颗粒形成的沉淀。

(2)将上清溶液10 000 r/min, 4℃离心1 h。

(3)弃上清，沉淀用含0.1％BSA, 0.05% PEG20 000的0.01 mol/L PB重悬至原体积。

(4)将溶液10 000 r/min, 4℃离心1h。

(5)用含0.1％BSA, 0.05 % PEG 20 000的0.01 mol/L PB将沉淀重悬为原体积的1/20，4℃保存备用。

### **5.2.4** 鉴定金标抗体的质量

抗原性：观察收集到的浓缩金标抗体和稀释后金标抗体的颜色、透明度以及有无杂质。羊抗鼠IgM点样于NC膜上，制成雏条，点加PBS溶液，观察金标SH mAb与IgM作用后显色情况。

### **5.2.5** 选择试纸条组成的材料

#### **5.2.5.1** 选择最适的硝酸纤维素（**NC**）膜

在Prima 60、Immunopore RP、Immunopore FP、Prima 85、Millipore 35五种NC膜上分别点上包被抗原，干燥以后进行封闭，再分别组装试纸条，比

较不同膜的显色情况，层析速度，检测线的显色情况。

#### **5.2.5.2** 选择金标垫

将稀释好的金标抗体分别喷点在Ahlstron8964、CB-SB06上，37℃烘干后，组装试纸条。对不同玻璃纤维素膜上金标抗体的释放情况进行比较，同时对NC膜上检测线的显色情况也进行比较。

#### **5.2.5.3** 选择样品垫

分别用GF-06、CB-SB06、Ahlstron8964三种样品垫组装试纸条，各滴加100μL纯水，样品垫对样品的吸收情况、吸收时间长短、NC膜上检测线的显色情况等，进行比较。

#### **5.2.5.4** 选择吸收垫

分别用Cotton linters 300、AP080、国产高级棉芯滤纸做吸收垫组装试纸条，层析反应后对样品溶液的吸收情况进行比较。

### **5.2.6** 确定试纸条各项条件指标

#### **5.2.6.1** 确定金标抗体最佳稀释倍数

使用金标抗体稀释液将金标抗体进行1: 2、1: 4、1: 8、1: 16、1: 32五个稀释度进行稀释，对比不同浓度下的显色情况和灵敏度，确定最佳的金标抗体稀释倍数。

#### **5.2.6.2** 选择**NC**膜上包被抗体的最适浓度

对羊抗鼠IgM溶液进行系列稀释到1: 2、1:4、1: 6、1: 8、1:10，分别在NC膜上划线，干燥后分别组装试纸条。在其它条件不变的情况下，分别用PB溶液或纯水溶液做检测。根据检测线的显色程度，确定最适抗体包被浓度。

#### **5.2.6.3** 选择**NC**膜最适宜的封闭条件

划线包被IgM于NC膜上，干燥后，分别用A、B两种不同配方的封闭液以不同的封闭时间10 s、30 s、1 min分别进行封闭，并设不封闭的对照组。组装试纸条后用空白和标准溶液测试，观察金释放情况、显色深度、液体上行速度、显色时间以及背景色。

#### **5.2.6.4** 表面活性剂的选择

向含少许海藻糖的金标抗体稀释液中分别加入0.2%、0.4%、0.6%的Tween-20，来稀释金标抗体，点4*μL*于金标垫上，组装试纸条，观察液体上行的速度、试纸条的背景颜色、显色的深度以及测试灵敏度。

#### **5.2.6.5** 金标抗体干燥时间的选择

将金标垫和NC膜置于37℃条件中干燥，时间设置为10 min、20 min、30 min、45 min、60 min，观察结合垫及NC膜的干燥度，组装试纸条检测阴性样品，观察金标抗体的释放及检测线的显色情况。

#### **5.2.6.6** 金标抗体稳定剂的选择

向金标抗体中分别加入BSA（终浓度为3%）和PEG20 000 (终浓度为10%)

做为稳定剂，放置4℃保存，比较两种稳定剂的保存效果。

### **5.2.7** 试纸条的组装和各项性能测试

#### **5.2.7.1** 试纸条的组装

按图5-1所示，依次将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素（NC）膜和吸水垫粘附在PVC膜上，切成4 mm宽的条带，将其放到塑料板内，置于铝箔袋中，加干燥剂密闭包装。



图 5-1 快速检测试纸条结构示意图

Fig. 5-1 rapid detection test strip structure diagram

#### **5.2.7.2** 试纸条的初探

样本测试方法：阴性标准品（0.01M pH7.2的磷酸缓冲液）及待检样品各取

100μL滴加到试纸条样品垫下方，5-10min后观察结果。阴阳性判断标准：如图5-2所示：

若待测样品试纸条检测线颜色等于或深于阴性标准品试纸条检测线颜色，同时质控线出现红色条带，则判断为阴性样品，即磺胺药的浓度小于检测限。

若待检样品试纸条检测线颜色明显浅于阴性标准品试纸条检测线颜色，同时质控线出现红色条带则判定为阳性样品，即待测样品中磺胺类药物的浓度在检测范围内；若待测样品试纸条检测线无颜色出现，同时质控线出现红色条带也判断为阳性样品，即待测样品中磺胺药的浓度高于检测范围。



若仅在检测线上出现红色条带或者试纸条两条线均无红色条带出现，则该试纸条无效。

阴性：－弱阳性：±阳性：+无效无效图5-2检测试纸条结果判定示意图

Fig. 5-2 Test results of the diagram paper diagram.

## **5.3** 结果与分析

### **5.3.1** 胶体金的质量鉴定

#### **5.3.1.1** 微波炉法制备胶体金溶液的质量鉴定

肉眼观察，可见，胶体金溶液呈酒红色，光下透明，在4℃和室温下均一稳定，色泽鲜艳。

#### **5.3.1.2** 比较微波炉烧制的胶体金与成品胶体金

通过肉眼观察颜色及紫外扫描金标颗粒，观察最大吸收峰值及最大吸收波长。紫外（400nm-600nm）扫描微波炉法烧制的金标颗粒（图中下方的曲线），

最大吸收峰为0.6，最大吸收波长在520nm左右。而购买的胶体金成品（20nm）的最大吸收波长也在520nm左右（图5-3中上方的曲线），而最大吸收峰为0.8。说明所购的胶体金成品胶体金浓度高于微波炉法自制的胶体金溶液，微波炉法制备胶体金溶液损失较大。



图 5-3 微波炉烧制的胶体金与成品胶体金的比较

Fig. 5-3 Microwave firing of colloidal gold finished colloidal gold comparison

#### **5.3.1.3** 改良磁力搅拌器法制备胶体金溶液的质量鉴定

肉眼观察，可见胶体金溶液外观呈紫红色，光下透明，在4℃和室温下均一稳定，色泽鲜艳。与微波炉烧制的胶体金溶液相比，颜色明显加深，而且补水量明显减少。





A磁力搅拌器法烧制的胶体金溶液B微波炉法烧制的胶体金溶液图5-4磁力搅拌器法和微波炉法烧制的胶体金溶液颜色的比较

A magnetic stirrer Method fired gold colloid solution B Microwave method fired gold colloid solution

Fig. 5-4 Magnetic stirrer method and the the microwave method firing of colloidal gold solution color comparison

紫外扫描磁力搅拌器烧制的胶体金最大吸收波长也在520nm左右，最大吸收峰接近0.8。与购买的胶体金溶液成品相差无几，结果见图5-5。



图 5-5 紫外扫描（400nm-600nm）改良磁力搅拌器烧制的胶体金

Fig. 5-5 UV scanning (400nm-600nm) the improved magnetic stirrer fired colloidal gold

#### **5.3.1.4** 透射电镜鉴定磁力搅拌器法制备的胶体金溶液

胶体金颗粒的透射电镜扫描图见图5-6。在透射电镜下观察到胶体金颗粒的没有椭圆形、多角形的金颗粒且大小基本一致。



图 5-6 胶体金电镜扫描图片(电压：40.0*kV*，放大倍数：40.0*k*)

Fig. 5-6 Colloidal gold scanning electron microscope pictures (voltage: 40.0kV magnification: 40.0*k )*

### **5.3.2** 最适胶体金标记抗体蛋白量的确定

结果见表5-2和图5-7。由图可知，1号管未加抗体蛋白和加入抗体蛋白的量不足以稳定胶体金的2-4管，出现红变蓝或黑的聚沉现象，而加入足够蛋白量

的5-7管则是保持红色不变。其中第5号管所含的蛋白量（17μg）的最小蛋白用量为所需稳定1mL胶体金。使用紫外扫描最大吸收波长520nm处（517-522nm

均扫描）的最大*OD520*值，观察到蛋白标记量在大于17μg时，*OD520*值趋于稳定。

表5-2 最适蛋白标记量测定步骤

Table 5-2 the optimal amount of protein markers determination steps

| 试剂 管号 |
| --- |
| 1 2 3 4 5 6 7 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 续表：5-3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 胶体金（mL） | 1.0 |  | 1.0 |  | 1.0 |  | 1.0 |  | 1.0 |  | 1.0 |  | 1.0 |  |
|  | SH Mab（µg ） | 5 |  | 8 |  | 11 |  | 14 | 17 |  | 20 |  | 26 |  |  |
|  | 10% NaCl（µL） | 100 | 100 |  | 100 |  | 100 | 100 |  | 100 |  | 100 |  |  |  |

显示结果深蓝深蓝深蓝蓝红酒红酒红酒红胶体金稳定性差差差一般好好好



图 5-7 静置1*h*后目测法确定蛋白最佳标记量

Fig. 5-7 Stillness 1*h* visual way to determine protein best mark

静置一夜后，1-4号管有明显的深蓝色沉淀析出，5-7号管相对趋于稳定。使用紫外扫描最大吸收波长520nm处（520-530nm均扫描）的*OD520*值，观察到蛋白标记量在大于17μg（5号）时，*OD520*值趋于稳定。



图5-8 过夜后目测法确定蛋白最佳标记量

Fig. 5-8 after a night visual method to determine protein best mark

由于未加稳定剂，过夜离心后各个管中均有沉淀析出，所以同浓度的蛋白标记量在同一波长不同时间内检测*OD520*值有差别，综合静置1h和静置过夜后的结果，选择最适蛋白标记表为17µg。在此基础上再增加30％即为待标记抗体蛋白的实际用量，即稳定胶体金的实际蛋白用量为每1mL胶体金溶液中添加22.1

µg 抗体蛋白。

### **5.3.3** 最适胶体金标记抗体蛋白**PH**的确定

结果见图5-9。当pH值为7.8时，胶体金颗粒和抗体蛋白吸附较好，由胶体金蛋白结合物的*OD520*值最高可以说明。所以确定胶体金标价抗体蛋白的最适宜

PH值为7.8.



0.50

0.45

0.40

OD520

0.35

0.30

7.0 7.5 7.8 8.0 8.2 8.5 9.0

PH值

图 5-9 胶体金标记抗体蛋白的最佳pH值选择

Fig. 5-9 Colloidal gold labeled antibody protein optimal pH value choice

### **5.3.4** 金标抗体稀释液的选择

金标抗体稀释液筛选结果见表5-3。由表可知，在其他条件相同的情况下，经稀释液D稀释后的金标抗体滴加到NC膜上，金释放最完全，NC膜上得到的

条带颜色最深，最清晰。

表5-4 金标抗体稀释液筛选结果

Table 5-3 gold standard antibody dilutions filter results

| 金标抗体稀释液 | A | B | C | D |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 显色情况 | ＋ | ＋＋ | ＋ | ＋＋＋ |

### **5.3.5** 鉴定金标抗体质量

收集到的浓缩金标抗体外观呈深红色，为可流动的松散沉淀，稀释后透明无沉淀，无可见杂质。金标抗体经适度稀释通过羊抗鼠IgM抗体包被的NC膜可以显色，说明金标抗体标记成功。

### **5.3.6** 试纸条组成材料的选择

#### **5.3.6.1** 选择**NC** 膜

如表5-4和图5-10，五种膜的层析速度相差不大，显色效果Immunopore RP较好，背景清晰，不存在金水分离和晕染的现象，所以选定ImmunoporeRP作为层析材料。

表5-5 不同NC膜测试结果表



Table 5-4 NC membrane test results table

|  | Prima 60  （A） | Millipore 35 (B) | Immunopore FP(C) | Immunopore RP(D) | Prima 85 (E) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 层析效果 | 晕染 | 金水分离 | 晕染 | 良好 | 晕染 |
| 显色等级 | ++ | ++ | + | +++ | + |

图 5-10 不同NC膜测试结果

Fig. 5-10 The different NC membrane test results

#### **5.3.6.2** 选择金标垫

进口Ahlstron8964释放完全且均匀，CB-SB06金释放有少量的残留，且释放不均匀有点黑边，所以最终选定Ahlstron8964作为金标垫。

#### **5.3.6.3** 选择样品垫

结果见表5-5所示，3种样品垫都能完全吸收100µL样品，且5min后，检测线均出现红色条带，其中CB-SB06显色较另外两种浅些，所以选择GF-06 和

Ahlstron8964均可作为样品垫。

表 5-6 不同样品垫的比较结果

Table 5-5 different sample pad of the comparison results

| 样品垫型号 | GF-06 | CB-SB06 | Ahlstron8964 |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品吸收情况 | 吸收完全 | 吸收完全 | 吸收完全 |
| 检测线显色情况 | +++ | ++ | +++ |

#### **5.3.6.4** 选择吸收垫

结果见表5-6，三种吸收垫均能将由NC膜层析过去的样品溶液完全吸收。

Cotton linters 300和AP080吸收时间均为5min，所以选择Cotton linters 300 和

AP080作为层析材料均可。

表 5-7 不同吸收垫的比较结果

Table 5-6 different absorption pad of the comparison results

| 吸收垫型号 | AP080 | Cotton linters 300 | 国产滤纸 |
| --- | --- | --- | --- |
| 层析后溶液吸收情况 | 吸收完全 | 吸收完全 | 吸收完全 |
| 吸收时间（min） | 5 | 5 | 11 |

#### **5.3.6.5** 确定试纸条各项条件指标

（1）确定金标抗体的稀释倍数

结果如表5-7，将金标抗体进行1: 3、1: 4、1:5系列稀释，三种稀释浓度效果差异不大，从节省金标抗体考虑，进行5倍稀释的时候，试纸条检测效果良好，故

选择5倍稀释。

表 5-8 金标抗体稀释倍数选择结果

Table 5-7 gold standard antibody dilution factor selection results

| 金标抗体 | 羊 抗 鼠 IgM 稀释倍数 | |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1: 2 | 1: 4 | 1: 8 | 1: 16 | 1: 32 |
| 1: 3 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| 1: 4 | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| 1: 5 | +++ | +++ | +++ | ++ | + |

（2）选择NC膜上所包被羊抗鼠IgM抗体浓度

结果见图5-11所示，在二抗浓度稀释至1: 2、1:4、1: 6、1: 8、1:10组装的试纸条检测效果差异不大，故选择二抗稀释倍数为1: 10稀释。



图 5-11 NC膜上包被二抗浓度选择结果

Fig. 5-11 NC membrane coated secondary antibody concentration selection results

注：从左至右，羊抗鼠IgM抗体稀释浓度分别为：1: 2、1:4、1: 6、1: 8、1:10

（3）NC膜封闭条件的选择

A、B、C、D四种不同配方的封闭液以不同的封闭时间10s、30s、1 min分别进行封闭后的测试，另设不封闭的对照组。结果显示，封闭过的膜没有提高试纸条灵敏度和其他优势，所以本实验不进行膜封闭。

（4）选择表面活性剂

见表5-8在稀释液中使用0.4%TWEEN-20作为表面活性剂的敏感度要好，最终选0.4% Tween-20为表面活性剂。

表5-9 Tween-20表面活性剂浓度的选择

Table 5-8 urfactant concentration of Tween - 20 selected

|  | 浓度 | 层析时间（s） | 显色 |
| --- | --- | --- | --- |
| Tween-20 | 0.2% | 45 | +++ |
|  | 0.4% | 70 | +++ |
|  | 0.6% | 70 | +++ |

（5）选择金标抗体干燥时间

结果如表5-9，在37℃条件下，干燥30min后效果不发生改变，所以选定干燥时间在30min以上。

表5-10 金标抗体干燥时间的选择

Table the 5-9 gold standard antibody drying time selection

| 时间（min） | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 显色情况 | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |

（6）选择金标抗体稳定剂

比较保存两个月后的金标抗体溶液，保护剂分别为3% BSA 和10%

PEG20000.10% PEG20000作为保护剂的金标抗体溶液出现略微沉淀，3% BSA作为保护剂的金标抗体溶液肉眼观察不到沉淀。所以选择3%BSA作为金标抗体稳定剂。

### **5.3.7** 试纸条的初探

在进行试纸条的组装中，将SH 进行800ng/mL、600ng/mL、500ng/mL、

400ng/mL、300ng/mL、200ng/mL不同浓度的稀释，分别向试纸条依次加入50µL金标抗体与50µL上述浓度的SH溶液，最后一条加50µL金标抗体与50µL PBS做阴性对照，但结果显示高浓度处200ng/mL有明显T线显色，检测限效果不佳，高出国家检测限100ng/mL的要求，因此在试纸条的组装条件上仍需进一步摸索。试纸条组装的雏形图见5-12。



图 5-12 试纸条雏形的初步组装

Figure 5-12 test strip prototype of the initial assembly

## **5.4** 讨论

### **5.4.1** 胶体金的制备

制备胶体金的过程对所有容器的清洁度要求较高，所有玻璃器皿应先用自来水冲洗干净，强酸液中浸泡24h，自来水反复冲洗5遍，再用超纯水冲洗3～4遍，本实验中采用第一次生成的直径为20nm胶体金稳定其表面，弃去后以双蒸水淋洗。本实验采用柠檬酸三钠还原法制备20nm的胶体金颗粒，对本实验室常用的微波炉法和购置的成品胶体金溶液比较后，发现沿用的微波炉法烧金中存在不足，水面突升快速沸腾，易造成受热的不均导致金颗粒大小不统一。通过用紫外扫描后数据对比，发现胶体金损失严重，而且静置恢复室温后，一般烧制

200mL的胶体金溶液需补水50mL。但用加热磁力搅拌器烧金，掌握最佳火候的调整和最佳转速的选择，使得胶体金溶液搅拌均匀，颗粒一致，易于观察颜色的变化以随时进行加液调整。在磁力搅拌器下烧制200mL的胶体金静置室温后一半仅需补水5mL，损失很少。肉眼观察颜色即可发现磁力搅拌器烧制的胶体金颜色较深，紫外扫描后比较发现胶体金浓度明显高于微波炉法烧制的胶体金。

### **5.4.2** 金颗粒直径大小的选择

胶体金颗粒吸附蛋白并显示检测结果，其中影响试纸条质量的重要因素之一是胶体金颗粒大小。胶体金颗粒一般常用的在20-40nm之间。胶体金颗粒过小则引起结合蛋白量少，反应结合率低。金颗粒太小会难以显示明亮清晰的颜色，影响显色效果，因为，在20-120nm范围内的胶体金可以散发绿光因而可以出现鲜红色。引起降低检测时的灵敏度是蛋白结合到胶体金表面产生空间位阻，结合其上的蛋白也不稳定，从而促使使硝酸纤维素膜的孔径增加所致。金颗粒最适于层析检测是40nm大小，这种大小的尺寸既能够大到易于识别又足够小到不会对蛋白结合到胶体金表面产生空间位阻从而优化标记原材料的性能。20nm胶体金颗粒更适合用于标记结合物，20nm左右的胶体金粒子即能够保证其在硝酸纤维素膜上合适的泳动速度，又是肉眼观察最敏感的颜色。因而本实验选择制备直径为20nm的胶体金。

### **5.4.3** 胶体金与蛋白结合的最佳**pH** 值

pH值在胶体金标记抗体过程中起到至关重要的作用，酸碱度的差别会导致蛋白与胶体金的解离，所以要选择最佳的标记pH值。对于理化性质不确定的蛋白这一步尤为重要。不同蛋白的适宜pH范围的宽窄大不相同。一般只有在蛋白质等电点略偏碱的条件下二者能够牢固地结合。常用集中蛋白质：γ球蛋白、亲和层析的IgG、McAb、葡萄球菌蛋白标记时胶体金所用的pH值分别为：9.0、

7.6、8.2、6.0，本实验标记时选择胶体金pH值为7.8，标记效果好且稳定。

### **5.4.4** 最佳标记量

最佳蛋白标记量的确定也是至关重要的，如果在标记时加入太多的蛋白，不仅造成浪费，也不能增加金标抗体的产率，而且更为严重的是增加了金标抗体中游离抗体的量，容易造成探针凝集，并严重影响标记活性，影响金标抗体的敏感性。反之，如果加入的抗体量少，则会造成胶体金聚集形成沉淀，造成标记失败。本研究通过实验确定出最佳的标记抗体量为17μg，标记后纯化金标抗体，可见聚集的金颗粒沉淀极少，说明标记效果良好。

### **5.4.5** 试纸条的各指标确定

在试纸条的条件摸索时，先是选pH为中性的PB，将单抗蛋白做一系列浓度来选定，后又将确定的标记蛋白量做为定量来确定pH。虽然，都是选定的最佳量，但组合起整个试纸条时，这两个指标不一定是最优条件，应该将标记蛋白与pH分别做系列梯度，做正交实验来确定最佳的蛋白标记量与最适的pH。试纸条检测线较高，达200ng/mL，检测效果不好原因应该与蛋白纯化的方法有很大关系，本研究中抗体蛋白由于条件限制选用优球蛋白粗提纯化的，若换用亲和层析住纯化，单抗的纯度会很纯，后续所做的试剂盒与试纸条检测线应该还能再低。当然也与试纸条的各项条件优化也有关系，应有待进一步优化来提高试纸条灵敏度。

## **5.5** 小结

优化了烧金工艺，换用改良的磁力搅拌器加热烧金法；确定了金标抗体标记的最佳浓度和最适pH值；对试纸条各个结构的最佳材料进行比较选择；初步摸索了试纸条的其它条件；（金标蛋白稀释度、表面活性剂、最佳羊抗鼠IgM浓度、金标抗体干燥时间、金标抗体稳定剂）在进行试纸条的组装中，检测限到200µg/kg，低于国家对SAs的检测限，因此条件上仍需进一步摸索，尤其在单抗蛋白纯化上需要改进。

# 第6章 结论

1. 本研究成功合成了磺胺母核人工半抗原SH。

2. 用获得的SH单抗经初步研制得到SAs多残留ELISA快速检测试剂盒，完成

4个月的稳定性试验的测试，显示其稳定性较好。

3. 用获得的SH单抗经初步研制得到SAs多残留检测胶体金免疫层析试纸条的初步研究。

# 第7章 实验经验总结与展望

在实验过程中遇到很多困难，但通过努力基本都得到解决，最终顺利完成实验。现将试验中存在的问题总结如下，并对问题提出自己的看法，与师弟师妹们分享。

药物合成过程中，对于非药物合成专业的同学来说是个很大的挑战，如何很好的把握反应的温度、压力和间，除了查看文献外还要根据实验室的情况做相应的调整。目前，本实验已经合成SH且确认其合成成功，但未对SH产物的纯度进行测定。如果，后面还需要做这个合成的，考虑把产物纯度进行测定，保证免疫原与包被原的唯一性，为后期筛选特异性好，灵敏度高的单抗打好基础。

饲养实验动物及筛选单抗细胞株的过程占据整个实验时间的50%左右。还有大量的实验前准备工作，例如玻璃器皿的清洗、泡酸、再次清洗、过纯水、高压和烘干；移液器枪头的装盒、高压与烘干；培养液的无菌配置前3L铁质滤器的清洗和高压等占据整个实验时间的35%左右。总之，过程枯燥，一定要调整好心态，合理安排好实验时间，否则，想要实验如期结束，时间会非常紧张。

实验过程中，操作要规范，尤其细胞间的实验，无菌意识一定要强，该快要快，该慢时则要细心。

在整个实验中用到的昆明鼠数量很多，我们自己应根据实验的需求提前去配对，繁殖。每天早晨给老鼠添料、换水是必修功课，三天换一次垫料是必须的，尤其到制备腹水时期要跑勤，一方面，给予产腹水的老鼠提供清洁的环境和充足的水食，另一方面，能及时确定，是否有老鼠该采集腹水。在细胞培养过程中可以选择用一次性细胞培养瓶，省点清洗器皿的时间。在SP2/0细胞复苏培养时，切记，一定用公司的基础培养基。否则，用本实验室配置的培养基，细胞一旦适应这种培养基，就会导致再换用公司的成品基础培养基很难将细胞养活，同时也将导致以后每用培养基就必须配置，配置基础培养基即费力又费时，还存在污染的风险。

在制备腹水单抗后，纯化腹水单抗的过程，建议本过程不要省钱，能过亲和层析柱的一定要过柱。过不了柱的，用高效液相色谱纯化，没有合适的柱子，建议先买柱子。一定要有高纯度的单抗才能做出灵敏度高、检测限高的试剂盒与试纸条。本实验

制得的腹水单抗，由于实验条件的限制，只用优球蛋白沉淀法纯化，所以用于试纸条，检测限很低，不符合国家检测标准的要求。

传统的制备单抗都要进行动物免疫、单抗细胞株筛选、腹水制备或规模化的转瓶培养制备细胞上清液与腹水或细胞上清液的纯化。腹水纯化得到的单抗具有鼠源性的限制，而细胞上清液纯化得到的单抗则表现为抗体蛋白收益低、效价低的问题。单抗的可变（V）区是用以识别抗原和决定抗体特异性的部位，试想，能否利用已得到的单抗的V区进行序列测定，设计合适的引物，扩增DNA，转染到大肠杆菌，进行单抗V区的蛋白表达，如果可以成功，即可规模化生产，这样生产出的肽段理论上应对抗原小分子很高的特异性。是否还可以将该肽段进行荧光标记，做成试纸条检测

SAs多残留，从而解决传统的制备抗体的局限性。

参考文献

[1]张宏伟，刘伟，王喆，等．动物产品中兽药残留的原因及控制对策[J].中国畜牧兽医，2004，

31(7): 47-48．

[2]蒋德阳，田淑琴，黄雅杰等．动物性药物残留对人体的危害及控制措施[J].四川畜牧兽医，2003，

30(152):31~32．

[3]刘健华，陈杖榴．动物性食品中抗菌药残留对人体肠道菌群影响的安全性评价[J].中国兽药杂志，2003, 37(2):33~37．

[4]刘长春，李志．动物性食品中兽药残留的危害及控制对策[J].畜牧与饲料科学，2004, 6:87~88．

[5]周黎明，杜芳．抗生素与益生素[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2002, 6(21):28.

[6]胡先春．兽药残留的危害及原因和控制[J].中国动物保健，2004, 11:14~16．

[7]古丽曼，史梅．试论兽药残留的危害及对策[J].中国兽药杂志，2003，37(7):4~7．

[8]于家良．试论兽药残留的危害及对策[J].中国动物检疫，2007，24(3):23~24．

[9]农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量（续）[J].中国兽药杂志，2003，37(4):15-20．

[10]赵书景，贺绍君，罗国琦，等．动物性食品中磺胺类药物残留检测方法的研究进展[J]．中国畜牧兽医，2009, 36(8)：60-63．

[11]吴平谷，冯靓，王强，等．固相萃取结合高效液相色谱测定鸡肉中10 种磺胺类药物残留

[J]．中国卫生检验杂志，2008，18(11)：2201-2203．

[12]陈振桂，占春瑞，郭平，等．高效液相色谱法同时测定水产品中13种磺胺类药物残留的研究[J]．食品科学，2007, 28(10)：448-451．

[13] Lin C Y, Huang S D. Application of Liquid–liquid–liquidmicroextraction and High-performance Liquid-chromatography for the Determination of Sulfonamides in Water [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 612: 37-43.

[14] Pusyniak A, Sniegohi T. Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Analysis of Sulfonamide Residlies in Honey [J]. Buil Vet inst Pulawy, 2002, 46: 111-117.

[15]周顺伍主编．动物生物化学[M].第三版．北京：中国农业出版社，1999, 64．

[16] Littefield NA. Gaylor DW. Blackwell BN. Allen RR. Chionic toxicity carcinogenicity studies of sulphamethazine in B6C3FA mice [J]. Food Chem. Toxicol Jul 1989. 27(7):455-63.

[17] Sternesjo A. Mellgren, C and Bjorck [M]. L 1995. Anial biochem. 226. 175-181.

[18]贾公孚，李涛，许莉主编．药物毒副反应防治手册[M].北京：中国协和医科大学出版社，

2004，226~231．

[19]廖理克，屈裕华，吴孔兴．几种兽药残留对人体的危害[J].广东畜牧兽医科技，2004, 29．

[20] Salisburk C D C, Sweet J C, Munro R Determination of Sulfonamide Residues in the Tissues of Food Animals Using Automated Precolum Derivatization and Liquid Chromatography withFluorescence Detection [J]. AOAC Int, 2004, 87(5):1264~1268.

[21] Gering T A. Determination of Sulphonamide in Edible Salmon Tissue by High-performance Liquid Chromatography with Postcolum Derivation and Flourescebce Detection [J]. AOAC, 1997, 11(4):751~755.

[22] Hela W, Brandtnerm, Widek R, et al. Determination of Sulfonamides in Animal Tissues Using Cation Exchange Reversed Phase Sorbent for sample Cleanup and HPLC-DAD for Detection [J]. Food Chemistry, 2003, 83:601~608.

[23] Salisburk C D C, Sweet J C, Munro R Determination of Sulfonamide Residues in the Tissues of Food Animals Using Automated Precolum Derivatization and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [J]. AOAC Int, 2004, 87(5):1264~1268.

[24] Tam Sagatl, Nindi M Multiresidue Determination of Sulfonamides in aVariety of Bological Matrices by Supported Liquid Membrane with High Pressure Liquid Chromatography electrospray Mass Spectrometry Detection [J]. Talanta, 2004, 64(1):87~100.

[25]林海丹，谢守新，吴映漩．高效液相色谱法同时测定鳗鱼及制品中八种磺胺类药物[J].食

品科学，2005, 26(1):176~179．

[26] Michael D S, John D W. Liquid Chromatographic Determination of Multiple Sulfonamide Residues in Bovine Milk [J]. Assoc Anal Chem, 1990, 73(6):875~879.

[27] Furusawa N. Determination of Sulfonamide Residues in Eggs by Liquid Chromatography [J]. AOAC Int, 2002, 85(4):848~851.

[28] Furusawa N. Rapid High-performance Liquid Chromatographic Determining Tecnique of Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine, and Sulfaquinoxaline in Eggs without Use of Organic Solvents [J]. Analytica Chimaica Acta, 2003, 481(22):225~259.

[29] Pere N, Gutierrez R, Escobar I, et al. Stability of Sulfonamides, Nitrofurans and Chloramphenicol residues in Preserved Raw Milk Samples Measured by Liquid Chromatography [J]. Journal of AOAC international, 2002, 85(6):1415~1419.

[30] Fu M, Chu S Y. Quantitative Determination of Sμlfonamide in Meat by Solidphase Extraction and Capillary Electrophoresis [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 499. 215-221.

[31] Lamba S, Sanghi S K, Asthana A, et al Rapid Determination of Sμlfonamides In Milk Using Micellar Electrokinetic Chromatography with Fluorescence Detection [J]. Analytica Chimica

Acta, 2005, 552:110-115

[32] Andrew Cannavan et al. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Sulfamethazine in Animal Tissues Using a Methy Trimethy *s*ily Derivative [J]. The Analyst, 1996. 121(10):1457-1461.

[33] Gerry J. Reimen and Aagripina Suarel. Development of a screening method for five sμlfonamides in salmon muscle tissue using thin-layer chromatography [J]. Chromtography, 1991.

555:315, 320.

[34] Reeves V B. Confirmation of Mμltiple Sμlfonamide Residues in Bovine Milk by Gas Chromatography positive Chemical Ionization Mass Spectrometry [J]. Journal of Chromatography B. 1999. 723(1/2):127-137.

[35] Chinchilla J J, Camiz-Gracia I, Garcia-Campana A M, etal High performance Liquid Chromatography Postcolumn Chemilumine scence Determination of Sulfonamide Residues in Milk at Low Concentration Levels Using bis [4-nitro-2-(3, 6, 9-trioxadecyloxy carbony) pheny] Oxalate as Chemilum inescent Reagent [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1095(1/2):60-67.

[36] Hasmukh. B, Sheth, Peter sporns. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides [J]. Agric Food. Chem. 1991, 39:1696~1700.

[37] Mark T Muldoon, Ivan A Font, Ross C Beier. Development of a cross reactive monoclonal antibody to sulfonamides antibiotics: evidence for structural conformation-selective hapten recognition [J]. Food and agricultural Immunology, 1999, 11:117~134.

[38] Willem Haasnoot, Jolanda Du Pre, Geert cazemier, et al. Monoclonal antibodies against a sulfathiazole derivative for the immunochemical detection of sulfonamides [J]. Food and agricultural Immunology, 2000, 12:127~138.

[39] Willem Haasnoot, Geert Cazemier, Jolanda Du Pre, et al. Sulphanamide antibodies from specific polyclonals to Generic monoclonal [J]. Food and agricultural Immnology, 2002, 12:15~30.

[40] Willem Haasnoot, Monique Bienenmann Ploum, Urpo Lamminmaki, Manon Swanenburg, Hansvan Rhijn. Application of a multi-sulfonamide biosensor immunoassay for the detectionof sulfadiazine and sulfamethoxazole residues in broiler serum and its use as a predictor of the levels in edible tissue [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 552:87~95.

[41] Willem Haasnoot, Monique Bienenmann-Ploum, Fortüne Kohen. Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 483:171~180.

[42]熊宁．抗磺胺嘧啶及磺胺类药母核结构单克隆抗体的制备与鉴定[D].华中农业大学硕士学

位论文，2005, 5．

[43] Nuria Paster N, Ester Gallego-I, Angel M, et al. Development of a Groupspecific Immunoassay for Sulfonamides Application to Bee Honey Analysis [J]. Talanta, 2006, 73(2):923~933.

[44]陈新建，陈梅英，赵会杰．免疫学技术在植物科学中的应用[M].北京：中国农业大学出版

社,1998,5:57~58.

[45] James PT．Fidel Z J. Multiple antigen peptide [J]. Immunol Meth, 1989, 124:53~56.

[46] Tam J P．Recent advances in multiple antigen peptides [J]. Immunol Meth, 1996, 196:17~32.

[47]余若祯，施汉昌，何苗等．2, 4-二氯苯氧乙酸完全抗原和抗体的制备[J].中国环境科学，2005, 25(3):288~292.

[48] 周思祥，刘福成．农药人工抗原饿合成研究进展[J]. 农药，2005，44(8):337~341.

[49]洪孝庄，孙曼霁主编．蛋白质连接技术[M].北京：中国医药科技出版社，1993.

[50]唐娜．牛乳中链霉素残留检测ELISA试剂盒的研制[D].扬州大学硕士学位论文，2006.5.

[51]李俊锁，邱月明，王超．兽药残留分析[M].上海：上海科学技术出版社，2002.

[52]许保疆，王川庆，彭志峰，等．免疫胶体金技术及其在兽医快速检测上的应用[J].上海畜牧兽医通讯，2009，1: 55-58．

[53] Frens G. ．Controlled nucleation for the regulation of the particle size in mono disperse gold suspensions [J]. Nature Physical Science, 1976, 241(105): 20-23.

[54] Bendayan M. Protein-A gold electron microscopic immunocy to chemistry: methods, applicati

Ons, and limitations [J]. Journal of Electron Microscope Technique, 1984, 1: 243.

[55] Horisberger M, Rosset J．Colloidal gold, a usefμl marker for transmission and scanning electron microscopy. Histochemistry, 1977, 25 (4): 295.

[56] Muhlpfordti A．The preparation of colloidal gold particles using tannic acid as an additional

Reducing agent. Experientia, 1982, 38: 1127.

[57]周文达，俞炳耀，甄子刚等．活化的硝酸纤维膜用于HIV抗体滴金免疫法测定[J].临床检验杂志，199 9, 17(3):161.

[58] Beggs M, Novotny M, Samoedro S. A self performing ehm. Mato graphic immunoassay for the qualitative determination of hamanehorionic gonadotrophin in urine [J]. Clin Chem. 1990,

36:1084～1085.

[59] Yoko Kameda, Masaaki Miura, Sae Ohno, eta1. Localization and development of chromogranin A and luteinizing hormone immunoreactivities in the secretory-specific cells of the hypophyseal pars tuberalis of the chicken [J]. Histochem Cell Biol, 1998, 109: 211-222.

[60]严华，申厚凤．胶体金免疫层析技术的应用与展望[J].微生物学免疫学进展，2005（3）：

56-58．

[61]吴英松，李明，毕惠祥，等．自制免疫胶体金层析条检测恶性疟原虫的初步研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2002, 22(2): 229-232.

[62]杨挺，王姝婷，郭逸蓉等．动物源食品中氯霉素残留速测金标试纸条的研制[J].中国农学通报第2007, 23（11）.

[63]李余动，张少恩，吴志刚等．胶体金免疫层析法快速检测氯霉素残留[J].中国食品卫生杂志.200, 17（5）.

[64] R. Ve rheijen, I．K．Osswald, R. Dietrich, W．Haasnoot．Development of a one step test for the detection of (Dihydro) streptomycin residues in raw milk [J]. Food and Agricμltural Immunology, 2000, 12 (1):31-40.

[65] David R. Legg, Annie B, et al. Rose (rapid one step assay) for antibiotics in honey [J]. Apiacta 2003, 38, 207-217.

[66]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．

[67]李俊锁，李喜旺，王明安．磺胺类药物半抗原的合成及结构表征[J].中国农业大学学报，

1999, 4(1):109~113．

[68]房超．磺胺类药物残留酶免疫分析的研究[D].扬州大学硕士学位论文，2004, 5．

[69]房超，王宗元，王捍东等．磺胺类药物残留及酶免疫法检测的研究[J].上海畜牧兽医通讯，

2004，2:16~17．

[70] Haasnoot W, Cazemier G, Du P, et al. Sulfonamide antibodies: from specific polyclonals to generic monoclonals [J]. Food Agric Immunol, 2000, 12: 15—30.

[71] Cliquet P, Cox E, Haasnoot W, et al. Generation of group-specific antibodies against sulfonamides [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(20): 5835-5842.

[72] Korpimaki T, Rosenberg J, Virtanen P, et al. Fu rther improvement of broad specificity hapten

Recognition with protein engineering [J]. Prot ein Engeering, 2003, 16( 1): 37-46.

[73]杨利国．酶免疫测定技术[M].南京：南京大学出版社，1998: 279-286．

[74]张红星，朱本忠，张文，等．番茄乙烯信号转录因子LeERF1多克隆抗体制备及应用．中国食品学报，2008, 8(1): 55-58．

[75] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay [M]. Amsterdam: Elsever, 1985.

[76]王冬艳．大豆蛋白酶抑制因子单克隆抗体试剂盒的研制[D].中国农业大学硕士论文，2003．

[77]刘静．乳酸抑制LPS激活大鼠肠黏膜微血管内皮细胞NF-κB通路的研究[J].北京农学院学报．2011, 0601.

[78]谷珉珉．有机化学实验[M].上海-复旦大学出版社，1991．

[79]陈新建，陈梅英，赵会杰．免疫学技术在植物科学中的应用[M].北京：中国农业大学出版社，

1998，5:57~58．

[80] 李俊锁, 邱月明, 王超． 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002, 169．

[81]刘百红．磺胺类药物残留ELISA快速检测试剂盒的研制[J].华中农业大学硕士论文，2006，

0601.

附**录**

*∑*偶合物－*∑*载体

1. 偶联比 = （*∑*为摩尔吸光系数）

*∑*半抗原

*A*

2. ∑=（*A*为吸光度值、*C*为蛋白浓度、*M*为分子量、*L*为比色皿厚度）

*C/M*×*L*

3. 蛋白浓度(*mg/mL*) =（1.45×*OD280nm*－0.74×*OD260nm*）×稀释倍数

4. 抑制率*IC50*(%) = B（有SH抑制时的*OD*值）/B0（无SH抑制时的*OD*值）

×100%

5. CV＝σ/μ( CV为变异系数、σ为标准差、μ为均值)

6. SD=SQRT [各观察值的离均差平方和/(df-1)]（SQRT代表开平方，而df

代表自由度，degree of freedom)。

SH *IC50(ng/mL)*

7.交叉反应率（%）×100

竞争物*IC50*(*ng/mL)*

**3.1.4所用溶液配方**

**3.1.4.1 ELISA检测用溶液:**

(1) 包被液（碳酸盐缓冲液 CBS）：Na2CO3 1.59 g, NaHCO3 2.93 g，加蒸馏水定容至 1000 mL，调 pH 到 9.6.

(2) 磷酸盐缓冲液（0.01M PBS）：NaCl 8.00 g, KCl 0.2 g, KH2PO4 0.2 g， Na2HPO4•12H2O 2.9 g，加蒸馏水定容至 1000mL，调 PH 值到 7.4.

(3) 封闭液：

A 5%脱脂奶粉：1g脱脂奶粉溶于磷酸盐缓冲液20mL. B 5%Gly: 1g甘氨酸溶于磷酸盐缓冲液20mL。

*C* 5%脱脂奶粉+0.05% Tween-20+3%蔗糖：1g脱脂奶粉、10µL Tween-20和0.6g

蔗糖溶于磷酸盐缓冲液20mL。

(4)洗涤液含有0.05% Tween -20的磷酸盐缓冲液。

(5)稀释液：

A 0.01 M，PH 7.4磷酸盐缓冲液；

B 0.1M, PH 7.0 Tris-HCL溶液。

(6)底物缓冲液：0.2 mol/L NaAc: 取NaAc 16.4g加蒸馏水200mL，完全溶解后，定容至1L。

(7)底物显色液：0.2 mol/L NaAc4.5 mL、2.5 mg/mL TMB 0.5 mL、0.06% H2O2 5.0 mL，按顺序加。

(8)终止液(2M H2SO4): 22.2 mL浓硫酸缓慢加入177.8 mL蒸馏水中。

**3.1.4.2单克隆抗体制备所用溶液**

(1) DMEM基础液：按说明书配制后，负压过滤灭菌，4℃保存备用。

(2) 10% 胎牛血清 DMEM 培养液

DMEM 基础液 90 mL

新生牛血清10 mL，混匀，4℃保存备用。

(3) 20% 胎牛血清 DMEM 培养液

DMEM基础液80 mL

新生牛血清20 mL，混匀，4℃保存备用。

(4) HAT培养液

HAT(50×) 2 mL

20%新生牛血清DMEM培养液98 mL，混匀，4℃保存备用。

（5）HT培养液

HT(50×) 2 mL

20%新生牛血清DMEM培养液98 mL，混匀，4℃保存备用。

(6)细胞冻存液

DMEM基础液70 mL

新生牛血清20 mL

DMSO 10 mL，混匀，4℃保存备用。

(7) 8-氮杂鸟嘌呤储存液(10×)

无菌操作，用注射器取10mL DMEM基础培养基注入sigma 8-氮杂鸟嘌呤粉末，溶解混匀后，分装，-20℃冻存备用。

**3.1.4.3电泳所用溶液**

(1) 30%储备胶溶液：丙烯酰胺（Acr）29.0 g，亚甲双丙烯酰胺（Bis）1.0 g，混匀后加ddH2O，37℃溶解，定容至100 mL， 棕色瓶存于室温。

(2) 1.5M Tris-HCL(pH 8.0)：Tris 18.17 g加ddH2O溶解， 浓盐酸调pH至8.0，定容至100*mL*。

(3) 1M Tris-HCL(pH 6.8)：Tris 12.11 g加ddH2O溶解， 浓盐酸调pH至6.8，定容至100mL。

(4) 10% SDS: 电泳级SDS 10.0 g加ddH2O 68℃助溶，浓盐酸调至pH 7.2，定容至

100mL。

(5) 10X电泳缓冲液（pH 8.3）：Tris 3.02 g, Gly 18.8 g, 10% SDS 10mL加ddH2O

溶解， 定容至100mL。

(6) 10%过硫酸铵（AP）：0.1g AP加ddH2O至1mL。

(7) 2X SDS电泳上样缓冲液：1M Tris-HCl(pH 6.8) 2.5 mL，b*-*巯基乙醇1.0mL, SDS 0.6g，甘油2.0mL，0.1%溴酚兰1.0 mL, *dd*H2O 3.5 mL，充分混匀。

(8)考马斯亮兰染色液：考马斯亮兰0.25g，甲醇225 mL，冰醋酸46mL, ddH2O

225mL。

(9)脱色液：甲醇、冰醋酸、ddH2O以3∶1∶6配制而成。

**3.1.4.4抗体纯化所用溶液**

(1)饱和硫酸铵：称取硫酸铵40～42.5g，加入50～80℃蒸馏水50mL溶解，搅拌

20 min，趁热过滤。冷却后用浓氨水调pH值至7.4，室温保存备用。

（2）0.01 M pH 7.4磷酸缓冲液：Na2HPO4•12H2O 28.94 g，KH2PO4 2.61 g，加水定

容至1000 mL。

（3）0.06 M pH 4.8醋酸缓冲液：

A液（0.06 M NaAC）：无水NaAC 0.49218 g溶于双蒸水，定容至100mL。

B液（0.06 M HAC）：冰醋酸0.344mL加入双蒸水，混匀，定容至100mL. 将59 mL A液与41 mL B液混合后，用5 M NaOH调pH值到4.8.

致 **谢**

岁月如歌，光阴似箭，三年的研究生生活即将结束。经历了找工作的喧嚣和坎坷，我深深体会到了写作论文时的那份宁静与思考。回首三年的求学之路，对那些引导我、帮助我、激励我的人，我心中充满了感激。

首先感谢导师吴国娟教授，整个实验，倾注了吴老师大量的心血。在我攻读硕士研究生期间，深深受益于吴老师的关心、爱护和谆谆教导。她作为老师，点拨迷津，让人如沐春风；作为长辈，关怀备至，让人感念至深。能师从吴老师，我为自己感到庆幸。在此谨向吴老师表示我最诚挚的敬意和感谢！

感谢岳城教授对我实验的鼓励，感谢岳老师成就我做自己喜欢的方向，感谢岳老师在生活中对我的关心。同时也要感谢白丽老师对我的帮助，在实验期间，是她帮助我完成很多学校对在读研究生的考察真诚的向二位老师致敬！

感谢大连化物所马小军研究员，感谢马老师对我不断的鼓励及对我的论文提出宝贵的建议，得到他的点拨，才有了论文的展望部分。向平易近人，和蔼可亲，幽默智慧的马老师致敬！

感谢陆彦老师，他在紧张而又忙碌的工作中抽出时间来对我的实验、论文及工作进行指导，不仅为我提供了诸多便利和帮助，而且提出了许多宝贵的意见和建议。

感谢詹作勇老师，我大学本科老师，我的良师益友，在我最困难时，是他鼓励我要坚强，要该怎么做，不该怎么做，是他教会我如何去面对一些事，如何去看淡一些事。相识10年，有很多的快乐的时光、感动的时刻，诸如N多次被他老人家批评过，也被批评哭过，但回想起来，除了暖暖的幸福别无它感。

感谢新疆农大的赵森同学，是他在我试验不在校期间，帮助我完成多项学校的任务。

一年半的时光，如同白驹过隙，往事不断浮现在眼前。我将北京农学院药理实验室1-21当成家，在那里有常有自己彻夜奋斗的辛酸与感动；在那里，也有王晶、高磊、祝文琪、田雅慧、吴金栋、徐卫康兄弟姐妹们对我的支持与帮助，是他们才使我在一个团结友爱、积极向上的集体中顺利完成我的硕士论文。在此，向他们表示深深的感谢！向1-21致敬，向细胞间致敬！向与我有感情的Balb/c小鼠致敬！

感谢我的父亲，是他一直推着我、鼓励我，要在学业的这条路上一直向前走。“坚持就好，坚持就会有变化！”这是他常对我说的，我将这句话用在生活中、学习中、试验中。感谢我的母亲、姐姐、哥哥、弟弟，是他们对我的学业上给予了极大地支持与关爱，正是他们无私的奉献，才有了我今天的成绩！

至此论文完成之际，再次向所有老师、同学、亲人和朋友，表达我最诚挚的谢意！

杜玉玲

2013年2月27

### 作者简介

杜玉玲，女，1983年12月出生，新疆乌鲁木齐人。在读硕士研究生。研究方向：兽药残留及食品安全检测方向。

教育背景：

2004.9-2008.6新疆农业大学---动物医学专业（生物工程方向）本科

2010.9-2012.6新疆农业大学与北京农学院联合培养--预防兽医硕士

（2010.9-2011.6在新疆农业大学完成理论课，2011.7-2012.10在北京农学院药理实验室完成硕士论文实验）

硕士期间发表的文章：

1. **杜玉玲，**陆彦，高磊，等. 磺胺母核单克隆抗体的制备及其免疫学特性研究. 中国食品学报. 已接收，待刊。

2. **杜玉玲**，陆彦，高磊，等. 磺胺母核人工半抗原的合成与鉴定. 中国兽医学报.已接收，待刊