

# 磺胺间甲氧嘧啶残留阻断 ELISA 试剂盒的 研制及其初步应用

职爱民,李青梅,刘庆堂,邢广旭,杨继飞,柴书军,邓瑞广,张改平

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

**[摘要]** **【目的】**研制磺胺间甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine,SMM)残留快速检测阻断 ELISA 试剂盒(SMM-Kit),为有效治理磺胺间甲氧嘧啶的滥用,保障动物源性食品安全提供技术支撑。**【方法】**在成功研制 SMM 单克隆抗体(Monoclonal antibody,mAb)的基础上,应用阻断 ELISA 试验原理研制 SMM-Kit,并对其特性进行了系统测定。**【结果】**SMM-Kit 标准曲线呈典型的 S 型,相关系数  $R^2=0.992\ 8$ ,符合 4 参数 logit 曲线拟合,线性检测范围为  $1.33\sim 389.9\ \mu\text{g/L}$ ,灵敏度为  $3.57\ \mu\text{g/L}$ ,半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为  $17.07\ \mu\text{g/L}$ 。牛奶样和猪尿样的平均添加回收率分别为  $91.5\%$  和  $92.0\%$ ,平均批内和批间变异系数均低于  $15\%$ ;基质对 SMM-Kit 检测结果的影响不大;SMM-Kit 与其他磺胺类药物的交叉反应性  $<1.7\%$ ,表明其与其他药物几乎无交叉反应性;试剂盒在  $4\ ^\circ\text{C}$  可保存 6 个月。**【结论】**成功地研制出了 SMM-Kit,在牛奶和猪尿液样品中的初步应用证明,该试剂盒灵敏度、准确度高,特异性强,可低温保存 6 个月。

**[关键词]** 磺胺间甲氧嘧啶;单克隆抗体;阻断 ELISA;快速检测试剂盒

**[中图分类号]** S859.84

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2009)10-0037-06

## Develpment and trait identification of rapid test blocking ELISA Kit for sulfamonomethoxine residues

ZHI Ai-min,LI Qing-mei,LIU Qing-tang,XING Guang-xu,YANG Ji-fei,  
CHAI Shu-jun,DENG Rui-guang,ZHANG Gai-ping

(Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of  
Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract:** **【Objective】** A blocking ELISA test Kit for detection of Sulfamonomethoxine(SMM) was developed to offer technological support for effective governance of the abuse of sulfamonomethoxine and protection of animal derived food safety. **【Method】** Based on a high sensitivity monoclonal antibody of SMM, a rapid test ELISA Kit was established and identified by blocking ELISA. **【Result】** The calibration curve of the SMM-Kit with standard SMM inhibitor was typical sigmoid curve fitted to the four parameter logistic equation with the linear detection of  $1.33 - 389.9\ \mu\text{g/L}$  ( $R^2 = 0.992\ 8$ ), the sensitivity of  $3.57\ \mu\text{g/L}$ , the  $\text{IC}_{50}$  of  $17.07\ \mu\text{g/L}$ . The recoveries of SMM spiked in milk were  $91.5\%$ , in pig urine  $92.0\%$ . The precision and accuracy of the assay as determined by inter-assay and intra-assay coefficient variation was both below  $15\%$ . The SMM-Kit generally had  $1.7\%$  cross-reactivity towards sulfamerazine and had little or no cross-reactivity towards other compounds. The dilution solution of SMM had no effect on results of SMM-Kit. The validity of SMM-Kit in  $4\ ^\circ\text{C}$  was above six months. **【Conclusion】** A blocking

\* [收稿日期] 2009-02-11

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAK02A21)

[作者简介] 职爱民(1976—),男,河南获嘉人,副研究员,博士,主要从事食品安全与营养免疫研究。E-mail:aiminzh@126.com

[通信作者] 张改平(1960—),男,河南内黄人,研究员,博士生导师,主要从事动物免疫学和兽药残留研究。

E-mail:zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

SMM-Kit was established and identified. The successful preliminary application in detection for SMM residues of milk and Urine showed that the SMM-Kit had a high sensitivity, accuracy, specificity and the validity at low temperature was above six months.

**Key words:** sulfamonomethoxine; monoclonal antibody; blocking ELISA; rapid test Kit

磺胺类药物 (Sulfonamides, SAs) 由于经常作为饲料添加剂使用, 故已成为动物源性食品中最常见的残留药品之一, 因被怀疑有致癌性而受到越来越多的重视。磺胺间甲氧嘧啶 (Sulfamonomethoxine, SMM) 是一种长效的磺胺类药物, 由于其具有较强的抗菌作用, 故常被用作饲料添加剂而广泛地添加到畜禽饲料中, 但它会引起人体的过敏反应, 并可能具有一定程度的致癌性和致畸作用<sup>[1]</sup>, 其残留对人们的身体健康和生命安全具有严重危害<sup>[2-3]</sup>。因此, 磺胺间甲氧嘧啶的残留问题倍受关注。中国、美国、日本等国家以及欧盟规定, 动物性食品和饲料中总磺胺类药物的最高残留限量 (Maximum residue limit, MRL) 为  $100 \mu\text{g/L}$ <sup>[4-6]</sup>。根据国家农业部无公害食品行动计划和动物源性食品药物残留监控计划的有关部署, 从 2005 年起将把畜产品中磺胺类药物的残留情况作为重点监控对象。目前, 常用的 SMM 物理化学测定法主要采用色谱法<sup>[7-10]</sup>, 但该方法存在设备昂贵、技术复杂、检测周期长和费用高等缺点, 不适合于 SMM 的现场快速检测。为此, 本研究在已研制成功磺胺间甲氧嘧啶单克隆抗体的基础上<sup>[11]</sup>, 对阻断酶联免疫测定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (SMM-Kit) 进行了研制, 并对其性能进行了测定, 以期为有效控制磺胺间甲氧嘧啶滥用, 保障动物源性食品的食用安全提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 SMM, Sigma 产品, 纯度  $\geq 99.0\%$ ; 羊抗鼠酶标二抗 (Goat Anti Mouse IgG-Horseradish Peroxidase, GaMIgG-HRP), 华美公司; SMM 单克隆抗体 4B9, 河南省农业科学院农业部动物免疫学重点开放实验室生产保存; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 上海五联化工厂; 其他试剂为市售, 均为 AR 级; 试验用水为超纯水。

1.1.2 仪器 550 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; ELx-50 型洗板机, Bio-TEK 公司; AE260 电子天平, 德国 METTLER 公司; SZ-93 自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂; HI9321 酸度计, 美国

HANNA 公司。

### 1.2 SMM-Kit 的研制

1.2.1 SMM 单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 与 GaMIgG-HRP 最佳工作质量浓度的确定 用方阵滴定法<sup>[12]</sup>, 分别确定阻断 ELISA 试剂盒中 SMM mAb 和 GaMIgG-HRP 的工作质量浓度。

1.2.2 阻断 ELISA 方法的建立 用磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 配制 SMM 标准品, 质量浓度分别为 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 和  $256 \mu\text{g/L}$ , 共 9 个梯度水平, 阻断 ELISA 基本程序参照 Tijssen<sup>[13]</sup> 的方法进行, 用以测定不同质量浓度 SMM 标准品的抑制效价。

1.2.3 标准曲线的绘制与曲线拟合 用阻断 ELISA 法, 测定 SMM mAb 对不同质量浓度 SMM 标准品的抑制率, 以吸光率  $B/B_0$  (其中  $B$  是 SMM 不同标准浓度时的  $\text{OD}_{450}$  值,  $B_0$  是 SMM 标准质量浓度为  $0 \mu\text{g/L}$  时的  $\text{OD}_{450}$  值) 为纵坐标, 以不同标准品质量浓度的对数值为横坐标, 在半对数坐标纸上绘制标准曲线, 推导出回归方程, 进行相关回归分析。

1.2.4 SMM-Kit 的配置 SMM-Kit 的主要组成为 OVA-SMM 包被并封闭好的  $8 \times 12$  孔酶标板、C1 号液 (最佳工作质量浓度的 SMM mAb)、C2 号液 (最佳工作质量浓度的 GaMIgG-HRP)、C3 号液 (底物缓冲液 A)、C4 号液 (底物缓冲液 B)、C5 号液 (终止液) 和 SMM 标准品 1~9 (质量浓度分别为 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 和  $256 \mu\text{g/L}$ ), 洗液为 PBST (PBS 加  $0.5 \text{ g/L}$  的吐温-20)。

### 1.3 样品预处理和 SMM-Kit 的操作方法

1.3.1 检测样品的预处理 (1) 牛奶样。鲜牛奶  $15\ 000 \text{ r/min}$  离心 10 min, 去除上层脂肪层及沉淀, 剩余液体用于检测。(2) 猪尿样。尿样不需要进行特殊处理, 一般可直接用于检测, 若尿样浑浊不清, 可于  $4\ 000 \sim 6\ 000 \text{ r/min}$  离心 10 min 或过滤后, 取上清液或滤液用于检测。

1.3.2 操作方法 操作步骤为: (1) 根据待测样品数量取出所需酶标板, 并标记对照孔 (只加 PBST 不加 mAb) 和样品孔; 每孔加入 C1 号液和待测样品各  $50 \mu\text{L}$ , 室温孵育 30 min, PBST 洗涤 6 次。(2) 每个

样品孔中加入 C2 号液 50  $\mu\text{L}$  (空白孔只加 C2 号液),室温孵育 30 min, PBST 洗板 6 次。(3)每孔加入 C3、C4 号混合液 50  $\mu\text{L}$ , 室温显色反应 15 min, 加入 C5 号液 50  $\mu\text{L}$  终止反应。(4)用酶标仪读取各孔 OD<sub>450</sub> 值, 记录备用。

1.3.3 结果判定 根据各样品的  $B/B_0$  值, 在标准曲线上求出其对应的质量浓度, 或代入回归方程, 计算样品质量浓度的对数值  $x$ , 再求其反对数, 即为样品中所含的 SMM 质量浓度。

#### 1.4 SMM-Kit 性能的测定

1.4.1 灵敏度 采用阻断 ELISA 法测定 20 个不同批次的空白标准品, 计算 OD<sub>450</sub> 值的平均值 ( $\bar{X}$ ) 和标准差 (Standard deviation, SD), 按照公式  $\text{LOD} = \bar{X} - 2SD$  计算该试剂盒理论上的检测下限 (Limits of detection, LOD)<sup>[14]</sup>, 并在标准曲线上查出对应的 SMM 质量浓度, 该质量浓度即为灵敏度。

1.4.2 准确度 准确度是指测定值与真实值的符合程度, 可用添加回收试验进行测定。即将 SMM 标准品添加到牛奶样及猪尿样中, 使其终质量浓度分别为 0.5, 2.0, 8.0 和 20  $\mu\text{g/L}$ , 每个浓度设 6 个重复, 以回收率和变异系数 (Coefficient of variance, CV) 确定其准确度。

1.4.3 精密度 取不同批次的 6 批试剂盒, 分别在第 6 天测定 SMM 质量浓度为 0.5, 2.0, 8.0 和 20  $\mu\text{g/L}$  的牛奶样和猪尿样, 每个质量浓度设 6 个重复, 以批内和批间变异系数确定其精密度。

1.4.4 特异性 SMM mAb 的特异性决定了 SMM-Kit 的交叉反应性, 以 SMM 及与 SMM 结构相似的磺胺类药物作为抑制物, 用阻断 ELISA 测定各竞争物质量浓度为 0~10 000  $\mu\text{g/L}$  时的 OD<sub>450</sub> 值, 应用 4 参数 logit 法拟合抑制曲线, 根据 Shver 等<sup>[15]</sup>推导的公式:  $B/B_0 = (A - D) / [1 + (x/B)^C] + D$  计算 mAb 对 SMM 与各抑制物的 IC<sub>50</sub>, 式中  $A$  为曲线最高渐进值,  $B$  为 IC<sub>50</sub>,  $C$  为 IC<sub>50</sub> 处的曲线斜率,  $D$  为曲线最低渐进值,  $x$  为样品质量浓度的对数值。根据 mAb 对 SMM 与各抑制物的 IC<sub>50</sub>, 按照公式 “ $\text{CR}/\% = (\text{SMM 的 IC}_{50} / \text{抑制物的 IC}_{50}) \times 100\%$ ” 计算交叉反应率 (CR)。

1.4.5 时间稳定性 取同一批次的试剂盒, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 观察保存 1, 30, 60, 90, 120, 150 和 180 d 后的检测结果, 应用 4 参数 logit 法拟合曲线, 并计算曲线的相关系数, 确定试剂盒的时间稳定性。

1.4.6 基质效应性 以 PBS、牛奶和猪尿样品处理液为基质, 将 SMM 分别溶于 3 种基质中, 配制成质

量浓度分别为 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 和 256  $\mu\text{g/L}$  的标准溶液, 按照 SMM-Kit 的操作方法进行测定, 绘制趋势曲线, 分析不同基质对测定结果的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 SMM mAb 与 GaMIgG-HRP 最佳工作质量浓度的确定

方阵滴定法试验结果表明, OVA-SMM 的最适包被质量浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , SMM mAb 的工作质量浓度为 1 : 40 000, GaMIgG-HRP 的工作质量浓度为 1 : 1 000。

### 2.2 SMM-Kit 标准曲线的绘制

绘制的 SMM-Kit 标准曲线如图 1 所示。由图 1 可见, SMM-Kit 标准曲线呈典型的 S 型, 可用 4 参数 logit 法拟合曲线, 拟合曲线的回归方程为  $y = -36.802x + 95.354$ , 相关系数为  $R^2 = 0.9928$ 。根据回归方程计算出 SMM mAb 对 SMM 的 IC<sub>50</sub> 为 17.07  $\mu\text{g/L}$ , 试剂盒的线性检测范围为 1.33 ~ 389.9  $\mu\text{g/L}$ 。

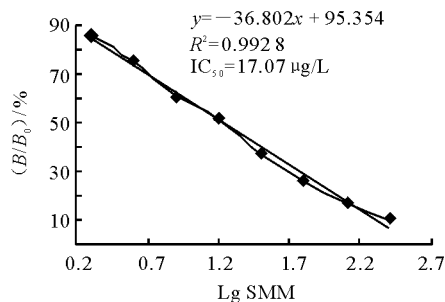


图 1 SMM-Kit 标准曲线的绘制

Fig. 1 Drawing of calibration curve of SMM-Kit

### 2.3 SMM-Kit 性能的测定

2.3.1 灵敏度 用阻断 ELISA 检测 20 个不同批次的空白标准品, 所得平均值  $\bar{X} = 0.932$ , 标准差  $SD = 0.091$ ,  $\text{LOD} = \bar{X} - 2SD = 0.75$ , 代入曲线回归方程计算出对应的 SMM 质量浓度为 3.57  $\mu\text{g/L}$ , 即该试剂盒的灵敏度为 3.57  $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.2 准确度 由表 1 可知, 对已知 SMM 质量浓度为 0.5, 2.0, 8.0 和 20.0  $\mu\text{g/L}$  的样品进行检测, 牛奶样品的回收率为 82.0% ~ 97.0%, 平均为 91.5%; 变异系数为 2.9% ~ 9.0%, 平均为 5.4%。猪尿样品的回收率为 88.0% ~ 95.0%, 平均为 92.0%; 变异系数为 3.4% ~ 10.0%, 平均为 5.2%。两种样品的平均变异系数均小于 15%, 表明该检测方法具有较高的准确度。

表 1 SMM-Kit 检测不同样品的添加回收试验结果

Table 1 Recovery test of SMM added to different samples by SMM-Kit

| 样品<br>Sample      | SMM 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$<br>Amount of SMM | 阻断 ELISA 检测 Blocking ELISA                                               |                       |              |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------|
|                   |                                                              | SMM 平均值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$<br>Measured mean value of SMM | SMM 回收率/%<br>Recovery | 变异系数/%<br>CV |
| 牛奶<br>Milk        | 0.5                                                          | $0.41\pm0.037$                                                           | $82.0\pm7.4$          | 9.0          |
|                   | 2.0                                                          | $1.92\pm0.076$                                                           | $96.0\pm3.8$          | 4.0          |
|                   | 8.0                                                          | $7.30\pm0.210$                                                           | $91.0\pm2.6$          | 2.9          |
|                   | 20.0                                                         | $19.40\pm0.960$                                                          | $97.0\pm4.8$          | 4.9          |
| 猪尿<br>Swine urine | 0.5                                                          | $0.46\pm0.046$                                                           | $92.0\pm9.2$          | 10.0         |
|                   | 2.0                                                          | $1.750\pm0.06$                                                           | $88.0\pm3.0$          | 3.4          |
|                   | 8.0                                                          | $7.60\pm0.280$                                                           | $95.0\pm3.5$          | 3.7          |
|                   | 20.0                                                         | $18.72\pm0.88$                                                           | $94.0\pm4.4$          | 4.7          |

2.3.3 精密度 由表 2 可知,牛奶样品、猪尿样品的批内变异系数分别为 5.35%和 5.4%,平均批间变异系数分别为 5.57%和 5.95%,平均批内变异系数均小于平均批间变异系数,且均不超过 15%,表明 SMM-Kit 具有较高的精密度。

表 2 SMM-Kit 检测不同样品的精密度

Table 2 Precision of SMM measurement from different samples by SMM-Kit

| 样品<br>Sample      | SMM 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$<br>Amount of SMM | 批次<br>Batch | SMM 平均值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$<br>Measured mean value of SMM | 变异系数/% CV         |                   |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                   |                                                              |             |                                                                          | 批间<br>Inner batch | 批内<br>Among batch |
| 牛奶<br>Milk        | 0.5                                                          | 080322      | $0.39\pm0.07$                                                            | 8.7               | 9.0               |
|                   | 2.0                                                          | 080326      | $1.82\pm0.03$                                                            | 5.4               | 3.7               |
|                   | 8.0                                                          | 080328      | $7.6\pm0.04$                                                             | 3.8               | 4.0               |
|                   | 20.0                                                         | 080416      | $18.8\pm0.04$                                                            | 4.4               | 4.7               |
| 猪尿<br>Swine urine | 0.5                                                          | 080322      | $0.45\pm0.09$                                                            | 8.3               | 9.6               |
|                   | 2.0                                                          | 080326      | $1.85\pm0.04$                                                            | 4.2               | 3.8               |
|                   | 8.0                                                          | 080328      | $7.7\pm0.04$                                                             | 5.1               | 4.0               |
|                   | 20.0                                                         | 080416      | $18.92\pm0.04$                                                           | 6.2               | 4.2               |

2.3.4 特异性 由表 3 可见,SMM-Kit 与磺胺类药物略有交叉,但交叉反应率均<1.7%;与抗生素、激动剂等其他药物交叉反应的 IC<sub>50</sub>均>10 mg/mL,交叉反应率均<0.02%。表明 SMM-Kit 与其他药物几乎没有交叉反应性。

表 3 SMM 试剂盒与其他药物的交叉反应性

Table 3 Percent cross-reactivity of SMM-Kit with other compounds

| 药物<br>Compound                   | 半数抑制浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$<br>IC <sub>50</sub> | 交叉反应率/%<br>Cross-reactivity |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Sulfamonomethoxine 磺胺间甲氧嘧啶       | 17.07                                                         | 100                         |
| Sulfachlorpyrazin 磺胺氯吡嗪          | $>1\times10^3$                                                | <1.7                        |
| Sulfadiazine 磺胺嘧啶                | $>1\times10^4$                                                | <0.2                        |
| Sulfaquinoxaline 磺胺喹噁啉           | $>1\times10^4$                                                | <0.2                        |
| Sulfametoxydiazine 磺胺对甲氧嘧啶       | $>1\times10^3$                                                | <1.7                        |
| Clenbuterol hydrochloride 盐酸克伦特罗 | $>1\times10^4$                                                | <0.02                       |
| Streptomycin 链霉素                 | $>1\times10^4$                                                | <0.02                       |
| Ractopamine 莱克多巴胺                | $>1\times10^4$                                                | <0.02                       |
| Ampicillin 氨苄西林                  | $>1\times10^4$                                                | <0.02                       |

2.3.5 时间稳定性 由表 4 可知,随着试剂盒保存时间的延长,各标准品的 OD<sub>450</sub> 值有所减小,但其 IC<sub>50</sub>、R<sup>2</sup> 变化不大,曲线拟合良好,说明试剂盒在 4℃下保存 6 个月对 SMM-Kit 检测敏感度无明显影响。

2.3.6 基质效应性 由图 2 可知,不同生物基质的 SMM 标准品的吸光值不同,PBS、牛奶和猪尿 3 种基质所测定标准曲线的 IC<sub>50</sub> 分别为 17.02,18.36 和 18.74 μg/L。从该结果可以看出,不同的生物基质对试剂盒的检测有一定影响,但其 IC<sub>50</sub> 差异不大。因此可以认为,不同生物基质对该试剂盒的敏感性和检测结果影响不大。

表 4 SMM-Kit 于 4 ℃ 保存不同时间时的稳定性

Table 4 Validity of SMM-Kit at 4 ℃

| 保存时间/d<br>Conservation time | IC <sub>50</sub> /<br>(μg · L <sup>-1</sup> ) | 相关系数<br>R <sup>2</sup> | 最大吸光值<br>OD <sub>max</sub> |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| 1                           | 17.02                                         | 0.992 8                | 1.126                      |
| 30                          | 17.09                                         | 0.992 1                | 1.132                      |
| 60                          | 17.75                                         | 0.993 2                | 1.062                      |
| 90                          | 18.93                                         | 0.994 7                | 0.916                      |
| 120                         | 19.19                                         | 0.993 5                | 0.868                      |
| 150                         | 19.30                                         | 0.991 1                | 0.792                      |
| 180                         | 19.14                                         | 0.992 7                | 0.779                      |

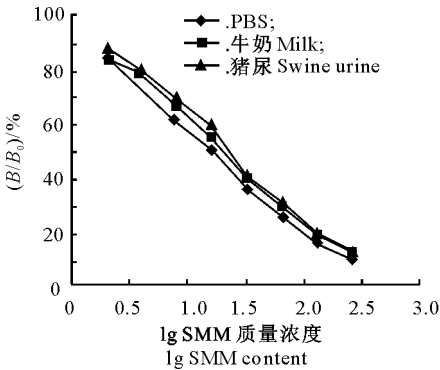


图 2 不同基质对 SMM-Kit 敏感性 & 检测结果的影响  
Fig. 2 Effect of different sample diluted solutions on the sensitivity and detection results of SMM-Kit

3 讨论与结论

免疫分析方法(Immunoanalysis)包括放射免疫测定法(Radioimmunoassay,RIA)、ELISA 法、荧光免疫测定法(Fluorescence immunoassay,FIA)、固相免疫传感器(Soindphase immunosensor,SIS)等,由于 ELISA 法具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、分析容量大、分析成本低、安全可靠等优点,故其在国内外得到了快速发展,药物残留的 ELISA 检测更是成为一个研究热点<sup>[16-19]</sup>。本研究选用阻断 ELISA 试验方法,初步成功地研制了 SMM 的快速检测试剂盒。

ELISA 试剂盒的性能评估包括灵敏度、精密度、准确度和特异性等指标。灵敏度指应用本试剂盒可以检出的最低抗原量,最小检出量越高,灵敏度就越高。本研究组装的 SMM-Kit,检测 SMM 的 IC<sub>50</sub> 为 17.07 μg/L,试剂盒的线性检测范围为 1.33~389.9 μg/L,具有较高的灵敏度。精密度又称可重复性,反映了试剂盒对样本多次测定所得结果的重复程度,这是评价试剂盒的一个最基本参数。精密度的表示方法有 3 种,即变异系数法、反应误差法和精密度-剂量图示法。本试验采用变异系数法测定了 SMM-Kit 的精密度,可知其平均变异系数值

小于 15%,表明 SMM-Kit 具有较好的精密度。准确度是衡量测定值和真实值之间差异大小的一个指标,本试验通过添加回收试验测定了 SMM-Kit 在牛奶和猪尿样品中的添加回收率,结果发现牛奶样品的平均回收率为 91.5%,猪尿样品的平均回收率为 92.0%,添加回收率为 90%~105%,表明本试剂盒的准确度较好。特异性是衡量试剂盒性能的另一个重要指标,反映了试剂盒测定被测物质时的专一程度。本试验结果表明,SMM-Kit 与磺胺类药物的交叉反应率均小于 1.7%,与抗生素、激动剂等其他药物的交叉反应率均<0.02%,特异性较好。

综上所述,本研究组装的 SMM-Kit 具有检测快速、敏感、特异性好的特点,对牛奶和猪尿液样品的初步检测应用结果表明,整个检测操作过程可于 60~90 min 内完成。本研究研制的试剂盒适合 SMM 的现场快速筛查,可以为有效控制磺胺间甲氧嘧啶的滥用,保障动物源性食品的食用安全提供技术支持。

[参考文献]

[1] Uche-Nwachi E O. Effect of intramuscular sulfadoxine-pyrimethamine on pregnant Wistar rats [J]. The Anatomical Record, 1998,250(4):426-429.

[2] Wollenberger L,Halling-Sensen B,Kusk K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna* [J]. Chemosphere,2000,40(7):723-730.

[3] Chirgwin K,Hafner R,Leport C,et al. Randomized phase II trial of atovaquone with pyrimethamine or sulfadiazine for treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: ACTG 237/ANRS 039 study [J]. Clinical Infectious Diseases,2002,34(9):1243-1250.

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

Bureau of Husbandry and Veterinary. Ministry of Agriculture. The maximum residue limit of veterinary drug in animal food [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2003,37(4):15-20. (in Chinese)

[5] Berezcki A,Horváth V,Horvai G. Immunoassay-based deter-

- mination of phenobarbital using size-exclusion chromatography [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 749(2): 215-223.
- [6] 冯忠武. 欧盟的兽药残留管理 [J]. *中国兽药杂志*, 2003, 37(10): 1-5.  
Feng Z W. Management of veterinary drug residues in European Union [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2003, 37(10): 1-5. (in Chinese)
- [7] Kishida K, Furusawa N. Application of shielded column liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl metabolites in milk [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1028(1): 175-177.
- [8] Furusawa N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 481(2): 255-259.
- [9] Ueno R, Aoki T. High-performance liquid chromatographic method for the rapid and simultaneous determination of sulfamonomethoxine, miloxacin and oxolinic acid in serum and muscle of cultured fish [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1996, 682(1): 179-181.
- [10] Kishida K. Restricted-access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl metabolites in eggs [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(1): 281-285.
- [11] 职爱民, 瞿明仁, 李青梅, 等. 磺胺间甲氧嘧啶单克隆抗体的制备 [J]. *饲料工业*, 2006, 27(8): 51-53.  
Zhi A M, Qu M R, Li Q M, et al. Development of monoclonal antibody against sulfamonomethoxine [J]. *Feed Industry*, 2006, 27(8): 51-53. (in Chinese)
- [12] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 356-357.
- Zhu L Q, Chen X Q. Conventional immunology experiment methods [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2000: 356-357. (in Chinese)
- [13] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- [14] 沈建忠, 何方洋, 何继红, 等. 动物组织中磺胺二甲嘧啶残留检测 ELISA 试剂盒的研制 [J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(6): 6-8.  
Shen J Z, He F X, He J H, et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay kit for sulfamethazine in animal tissues [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(6): 6-8. (in Chinese)
- [15] Shelver W L, Smith D J. Development of an Immunoassay for the  $\beta$ -adrenergic agonist ractopamine [J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2000, 21(1): 1-23.
- [16] Kaw C H, Hefle S L, Taylor S L. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of lupine residues in foods [J]. *J Food Sci*, 2008, 73(8): 135-140.
- [17] Kondo M, Yamashita H, Uchigashima M, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for residue analysis of the insecticide emamectin benzoate in agricultural products [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(2): 359-364.
- [18] Lifrani A, Dos Santos J, Dubarry M, et al. Development of animal models and sandwich-ELISA tests to detect the allergenicity and antigenicity of fining agent residues in wines [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(2): 525-534.
- [19] Spinks C, Schut C, Wyatt G, et al. Development of an ELISA for sulfachlorpyridazine and investigation of matrix effects from different sample extraction procedures [J]. *Food Addit Contam*, 2001, 18(1): 11-18.