

由回归线及回归方程可知, 电导与 TVBN 有很好的线性相关性, 可以用电导率作为检测鱼肉新鲜度的指标。

#### 4 结论

鱼肉样品在保存过程中, 电导率与新鲜度指标 TVBN 之间有良好的相关性, 相关系数 = 0.99。可用电导率作为判断淡水鱼(白鲢)新鲜度的指标。本文初步得出的判断白鲢新鲜度的电导率值见表 3(鱼肉样品与浸渍液比例为 1:10)。

表 3 白鲢新鲜度的判断指标比较

新鲜度	国家指标		电导率( $1/\Omega \cdot m$ )
	菌落总数(个/g)	TVBN(mg/100g)	
一级鲜度	$<10^4$	$<15$	$<0.092$
二级鲜度	$10^4 < \text{菌落} < 10^6$	$15 < \text{TVBN} < 25$	$0.092 < \text{电导率} < 0.102$
腐败	$>10^6$	$>25$	$>0.102$

本实验仅用电导率测定白鲢新鲜度的方法作了研究。要使电导率作为检测淡水鱼新鲜度的指标, 还要进行大批量的不同鱼种的实验。要使电导率真正成为水产品的规范化检测指标, 还需对取样标准、温度、试剂等测

定过程中的各种操作条件作规范化处理。

#### 参考文献

- 1 刘熙. 应用电导仪测定鸡蛋新鲜度. 食品科学, 1991, 10, 45~47.
- 2 沈莲清. 电化学法快速检测肉的新鲜度之研究. 食品科学, 1996, 17(3): 55~58.
- 3 乔庆林. 关于水产品质量评定方法及其应用的讨论. 现代渔业信息, 1991, 2(2): 6.
- 4 王槌. 几种淡水鱼新鲜度变化的特点. 水产学报, 1994, 18(4).
- 5 黄志勇. 水产品的四个质量指标. 福建水产, 1993, 3(1).
- 6 食品感官鉴定方法及实践. 上海科学技术文献出版社.
- 7 Determination of freshness of hake (*Merhuia gayi*) by electrical conductivity measurement Alimintos. 1986, 11(1): 27~32.
- 8 Fleischwirtschaft. 1992, 72(4): 493~497.
- 9 中华人民共和国国家标准.
- 10 食品卫生微生物检验标准手册. 中国标准出版社.
- 11 杨文治. 电化学基础. 北京大学出版社.
- 12 邓勃. 数理统计方法在分析测试中的应用. 化学工业出版社, 156.

## 乳中磺胺甲基嘧啶残留酶联免疫测定

吴 定 张羽航 姚汝华 安徽农业技术师范学院动科系 凤阳 233100

**摘 要** 以 BSA 为载体合成两种不同摩尔比值(1:13 和 1:42)磺胺甲基嘧啶抗原, 并比较其免疫原性; 以 OA 为载体合成一种包被抗原; 用过氧化物酶标以鼠抗兔 IgG; 建立乳中磺胺甲基嘧啶残留酶联免疫测定。抗体亲和常数分别为  $1.28 \times 10^7$  (1:42) 和  $3.21 \times 10^7$  (1:13)。ELISA 测定磺胺甲基嘧啶工作浓度  $5 \sim 220 \text{ ng/ml}$  ( $1.87 \times 10^{-8} \sim 8.2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ), 检测限为  $2.4 \text{ ng/ml}$ , 回收率为  $88 \sim 118\%$ , 与磺胺二甲嘧啶和磺胺噻唑交叉反应率分别为  $6.0\%$  和  $0.84\%$ , 与磺胺二甲氧嘧啶和磺胺咪无交叉反应。

**关键词** 磺胺甲基嘧啶 酶联免疫吸附测定

磺胺甲基嘧啶是奶牛常用广谱抗菌药。当奶牛使用后一般在停药后 72h 就挤乳出售<sup>[1]</sup>。

但由于磺胺甲基嘧啶半衰期较长, 因此 72h 后鲜乳中仍有残留<sup>[2, 3]</sup>。含磺胺甲基嘧啶牛乳,

国家自然科学基金资助项目

能导致过敏反应,破坏机体正常菌群生态平衡,引起致病菌产生耐药性<sup>[4]</sup>。目前乳中抗生素测定一般采用 TTC 法和微生物抑制圈法,但不适合乳中的磺胺药残留测定<sup>[5-7]</sup>。

酶联免疫吸附测定(ELISA)灵敏度高、特异性强、设备简单、操作简便及对人无害等优点,作为一项基本免疫测定技术近来迅速发展,并在多领域推广运用<sup>[8-10]</sup>。但动物性食品中磺胺甲基嘧啶残留 ELISA 的测定尚未见报道。

本研究目的:1)合成牛血清白蛋白—磺胺甲基嘧啶抗原和卵白蛋白—磺胺甲基嘧啶抗原;2)合成酶标记鼠抗兔 IgG;3)比较两种不同摩尔结合比偶合抗原免疫性;4)建立磺胺甲基嘧啶 ELISA 测定。

## 1 主要试剂与仪器

1.1 试剂 磺胺甲基嘧啶(SMD)、磺胺噻唑(ST)(上海第三制药厂);磺胺二甲基嘧啶(SDD)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM)(山东第四制药厂);磺胺咪(SG)(大同第二制药厂);丁二酸酐(SA)、二甲基甲酰胺(上海化学试剂厂);碳化二亚胺(EDC)(MERCK 公司);牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OA)、辣根过氧化物酶(HRP)(上海生物化学研究所);鼠抗兔 IgG(天津生物制品研究所)。

1.2 仪器 UV-754 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);DG-3022A 型酶联免疫检测仪(华东电子管厂)。

## 2 实验方法

### 2.1 磺胺甲基嘧啶—蛋白质抗原合成

#### 2.1.1 SMD-SA 制备

取 5.05mmol/L SMD 和 26.7mmol/L SA 溶于无水吡啶中,室温静置反应 24h。反应液移至蒸馏水中,用二氯甲烷萃取 3 次,合并萃取液用 0.1mol/L HCl 洗 3 次,然后用蒸馏水洗 1 次,经无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 脱水,再加甲苯置真空干燥箱(50℃)烘干,得 SMD-SA 粉末,再置蒸馏水重结晶,得纯品 SMD-SA。

#### 2.1.2 SMD-BSA(或 OA)抗原偶联

0.0285mmol/L SMD-SA 和 0.0573mol/L EDC 于 1.0ml 二甲基甲酰胺中,然后搅拌滴入 1.0ml 含 BSA 或 OA 水溶液,再加 20μl 6.0mol/L NaOH 液。搅拌反应 6h 后,再加 0.057mmol/L EDC,室温搅拌过夜。透析,过 Sephadex G 25 柱,收集冻干。

#### 2.1.3 合成抗原鉴定

合成 SMD-BSA 和 SMD-OA 抗原进行光谱扫描鉴定和聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定<sup>[11]</sup>。

### 2.2 抗血清制备与纯化

取 100μg SMD-BSA 抗原与同等体积福氏完全佐剂乳化后进行兔背部皮内散点注射,每隔 4 周强化注射 1 次。抗血清达要求后采用,获抗血清加等体积缓冲液用饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 法纯化<sup>[12]</sup>。

#### 2.3 酶标鼠抗兔 IgG

采用改良高碘酸钠法用 HRP 标记鼠抗兔 IgG<sup>[12]</sup>。

#### 2.4 HRP 标记鼠抗兔 IgG 质量鉴定

$$[\text{HRP}](\text{mg/ml}) = A_{403} \times 0.40$$

$$[\text{IgG}](\text{mg/ml}) = (A_{280} - A_{403} \times 0.34) \times 0.62$$

$$\text{摩尔比值} = ([\text{HRP}]/[\text{IgG}]) \times 4$$

#### 2.5 HRP 标记鼠抗兔 IgG 工作浓度

用 ELISA 测定 HRP 标记鼠抗兔 IgG 工作浓度<sup>[12]</sup>。

#### 2.6 ELISA 测定乳中 SMD

每孔加 50μl SMD-OA 抗原于 4℃ 过夜包被,用 PBS-0.05% TWEEN 洗板 3 次(下同)。每孔加 200μl 2% OA 缓冲液封闭 1h,洗板。取 50μl SMD 标准液或牛乳样液和 50μl 抗体于小试管中混匀温育 1h,每孔取 50μl,温育 30min,洗板。加 HRP 标记鼠抗兔 IgG 50μl,温育 1h,洗板。加酶底物液 100μl,暗处显色 30min,用 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,酶标仪读吸光值。

## 3 结果与分析讨论

### 3.1 合成抗原光谱扫描

在 300~500nm 范围内,BSA 和 OA 呈水

平递减, 而 SMD-BSA 和 SMD-OA 在 430nm 处有大吸收峰(图 1)。

### 3.2 合成抗原凝胶电泳鉴定

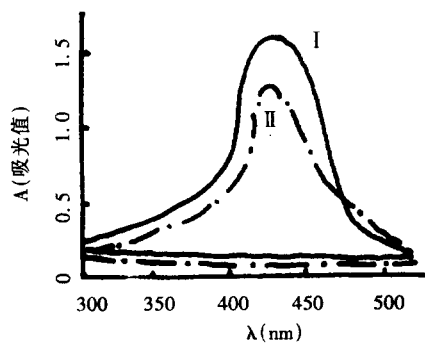


图 1 合成抗原扫描光谱

I: BSA-SMD —: BSA  
II: OA-SMD - - -: OA

BSA、BSA-SMD<sub>1</sub> 和 BSA-SMD<sub>2</sub> 的比值分别为 0.47、0.261 和 0.291。即 BSA-SMD<sub>1</sub> 和 BSA-SMD<sub>2</sub> 中载体蛋白与半抗原分子摩尔比分别约为 1:13 和 1:42。

### 3.3 不同分子摩尔比值抗原特性

用 1:13 BSA-SMD<sub>1</sub> 免疫兔子, 最高效价可达 1:2560, 而 1:42 BSA-SMD<sub>2</sub> 产生最大效价仅为 1:640。一般认为载体偶联半抗原摩尔比为 1:10~25<sup>[13]</sup>。实际上, 每个载体分子接上一个半抗原分子就足以产生抗体, 这已在单价二硝基苯酚(DNP)衍生物等研究中证实<sup>[14]</sup>。Sawai 等把 2'~5'三磷酸腺苷接到 BSA (1:5)上也获得抗体。但仍有人认为连接到蛋白质分子上半抗原数目以 5~15 为宜。本文 1:13 的偶联抗原刺激机体产生抗体效果比 1:42 好。即一个载体联半抗原过多反而不利抗体产生, 因为载体上覆盖半抗原过多, 可能不利载体与淋巴细胞或吞噬细胞表面受体结合, 影响免疫应答。

### 3.4 HRP 标记鼠抗兔 IgG 质量鉴定

酶标物中 HRP 为 0.49mg/ml, IgG 为 1.13mg/ml, 摩尔比值为 1.73,  $A_{403}/A_{280}$  为 0.57。据报道<sup>[13]</sup>, 较好酶标物其  $A_{403}/A_{280}$  在 0.30~0.60, 同时认为结合物中酶量 0.40mg/ml 效果一般, 0.50mg/ml 效果较

好, 达 1.0mg/ml 时效果最佳。因此可以认为本文合成酶标鼠抗兔 IgG 效果较好。

### 3.5 HRP 标记鼠抗兔 IgG 工作浓度

当结合物稀释浓度为 1:1000 时, 其吸光值为 1.0, 即 HRP 标记鼠抗兔 IgG 工作浓度为 1:1000。

### 3.6 抗 SMD 抗体亲和力

得抗 BSA-SMD<sub>1</sub> 和抗 BSA-SMD<sub>2</sub> 抗体解离平衡常数分别为  $K_{D1} = 3.12 \times 10^{-8}$  和  $K_{D2} = 7.82 \times 10^{-8}$ , 其亲和常数分别为  $3.21 \times 10^7$  和  $1.28 \times 10^7$ (图 2)。

### 3.7 抗体特异性

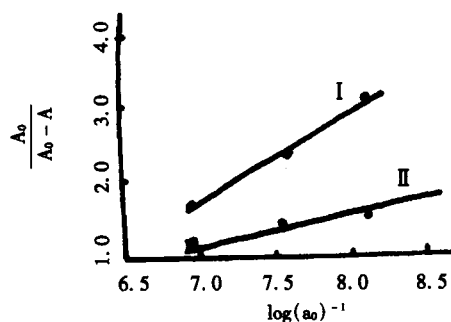


图 2 SMD 和抗体结合 KLOTZ 图

I: 抗 BSA-SMD<sub>2</sub> 抗体  
II: 抗 BSA-SMD<sub>1</sub> 抗体

抗 BSA-SMD<sub>1</sub> 抗体与磺胺二甲基嘧啶和磺胺噻唑交叉反应率分别为 6.0% 和 0.84% (表 1)

### 3.8 标准曲线

表 1 抗体与 SMD 类似物交叉反应率

化合物	抑制 50% 所需浓度	交叉率 (%)
磺胺甲基嘧啶	80ng/ml	100
磺胺二甲基嘧啶	1.34μg/ml	6.0
磺胺噻唑	9.52μg/ml	0.84
磺胺二甲氧基嘧啶	710mg/ml	<0.001
磺胺咪	>10mg/ml	<0.001

SMD 检测浓度范围 5~220ng/ml ( $1.87 \times 10^{-8} \sim 8.2 \times 10^{-7}$ mol/L), 最小检测限 2.4ng/ml(图 3)。

### 3.9 回收率

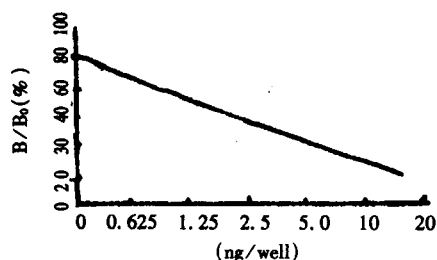


图3 抗SMD抗体测定标准曲线

抗SMD抗体测定乳中SMD含量回收率为89%~118%(表2)。

### 3.10 SMD于乳中残留时间

表2 ELISA测定乳中SMD回收率

牛乳 (ml)	SMD加入量 (ng)	n	均值±SD (ng)	回收率 (%)
1.0	10	5	8.91±0.004	89.1
1.0	50	5	47.32±0.02	94.6
1.0	100	5	117.83±0.09	117.8

人工奶牛注射SMD,经ELISA测定,发现停药5d后仍可检出2.51μl/L SMD残留。因此病奶牛用SMD治疗后,牛奶停售时间应在1周以上。

#### 参考文献

- 1 张献礼,蒋立民.实用奶牛技术.南京:南京大学出版社,1990.
- 2 Brady, MS, Katz SE. Antibiotic and antimicrobial residues in milk. J. Food Prot., 1988, 51: 8~11.
- 3 Larocque L, Carignan G. Sulfamethazine residues in Canadian consumer milk. J. Assoc. Of. Anal. Chem.,

1990, 73: 365~367.

- 4 张家铨.药理学.第2版.北京:人民卫生出版社,1994.
- 5 黄伟坤.食品检验与分析.北京:轻工业出版社,1989.
- 6 中华人民共和国卫生部.食品卫生检验方法——理化部分.北京:中国标准出版社,1987.
- 7 Tyler J W, Cullor J S. Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1992, 201: 1378~1384.
- 8 Bernal C S. Development of a sensitive and quantitative enzyme-linked immunofilter assay for whole bacterial cells. J. Micro. Methods, 1994, 19(2): 135~143.
- 9 Johnson B D, Hall J C. Fluroxypyr- and triclopyr-specific enzyme-linked immunosorbent assays: development and quantitation in soil and water. J. Agric. Food chem. 1996, 44(2): 488~496.
- 10 胡昌勤.酶联免疫吸附法新进展.生物化学与生物物理进展,1993, 20(2): 85~88.
- 11 吴定,江汉湖.竞争酶联免疫吸附法测定丹贝中大豆甙元.分析化学,1996, 24(7): 782~785.
- 12 吴定.硕士学位论文.南京:南京农业大学图书馆,1995.
- 13 徐宜为.免疫检测技术.第二版.北京:科学技术出版社,1991.
- 14 李成文.现代免疫化学技术.上海:上海科学技术出版社,1992.

## 湿法玉米加工中的输送问题研究

刘长海 齐齐哈尔大学工学院 161006

**摘 要** 分析了湿法玉米加工中的物料特点,运用流体力学原理,结合生产实践讨论了输送问题。指出了在水力输送整粒玉米时,玉米与水以1:3为宜;采用开式或半开式叶轮离心泵,物料在管内的流