

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610007257.5

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月20日

[11] 授权公告号 CN 100489531C

[22] 申请日 2006.2.16

[21] 申请号 200610007257.5

[73] 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

[72] 发明人 沈建忠 史为民 何继红 何方洋
丁双阳 江海洋 万宇平 张素霞
冯才伟

[56] 参考文献

CN1733910A 2006.2.15

JP4222595A 1992.8.12

. S. R. H. Crooks, P. Ross et al. Luminescence, Vol. 15 . 2000

Detection of ivermectin residues in bovine liver using an enzyme immunoassay. Steven R. H. Crooks, Andrew G. Baxter et al. Analyst, Vol. 123 . 1998

抗阿维菌素抗体的研制. 李俊锁, 钱传范. 畜牧兽医学报, 第27卷第6期. 1996

牛组织中阿维菌素残留的ELISA研究. 李俊锁, 钱传范. 畜牧兽医学报, 第28卷第1期. 1997

审查员 李冰

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒，包括多拉菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或多拉菌素抗体；所述酶标记物为酶标多拉菌素抗体或酶标多拉菌素半抗原；当所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标多拉菌素抗体；当所述包被原为多拉菌素抗体时，所述酶标记物为酶标多拉菌素半抗原；所述多拉菌素半抗原是将多拉菌素的5位羟基用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原。本发明的方法操作简便、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织、血清、牛奶及饲料中多拉菌素药物残留量。

1、一种检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒，包括多拉菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述多拉菌素特异性抗体为多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611 分泌的单克隆抗体；所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗体；所述酶标记物为酶标抗体或酶标多拉菌素半抗原；当所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗体；当所述包被原为多拉菌素抗体时，所述酶标记物为酶标多拉菌素半抗原；所述多拉菌素半抗原是将多拉菌素的 5 位羟基用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括多拉菌素标准品溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、兔血清蛋白或卵清蛋白。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗体。

5、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为 0.01M，pH 7.4，含有 0.8%~1.2%吐温 80 和 0.5%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

6、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：当标记酶为辣根过氧化物酶时显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

7、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为 0.01 mol/L 含有 1%酪蛋白和 1%明胶的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

8、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述封闭液为 pH 7.4，0.01mol/L 含有 20%新生牛血清，0.05%酪蛋白的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

9、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：制备酶标板所用的包被缓冲液为 pH 8.2、0.05 mol/L 含有 0.5%卵清蛋白的硼砂-硼酸缓冲液；终止液为 1-2mol/L 硫酸、盐酸或氢氧化钠。

10、一种检测多拉菌素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

当样品为动物组织时，称取 5g 均质样本，加入 10ml 无水甲醇混合，涡动 1min 后于振荡器上振荡，3000g 以上，15℃离心 10min，取上清液 20 μ l，用稀释 2 倍的浓缩复溶液稀释 5 倍后，取 20 μ l 进行分析；当样品为血液样本时，将血样静置半小时，在 3000g 以上，15℃离心 10min，取上清液加入 2ml 稀释 2 倍的浓缩复溶液；

2) 利用权利要求 1—9 中任一所述的检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

多拉菌素 (Doramectin) 又称都林霉素, 是一种新大环内酯类抗生素——阿维菌素的第三代衍生物。由于其优异的驱虫活性和较高的安全性, 被认为是目前最优良、应用最广泛、销量最大的一类新型、广谱、高效、安全和用量小的兽用抗内、外寄生虫药, 已广泛应用于兽医临床, 但所用多拉菌素的剂量过大, 将引起畜禽中毒, 从而影响人类的身体健康。2002年12月我国农业部公告第235号文规定在动物的脂肪中最高残留量为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肝中最高残留量为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肾中最高残留量为 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、肌肉中的最高残留量为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此加强对动物性食品中多拉菌素的残留检测是非常必要的。

检测多拉菌素残留量的化学方法主要有薄层色谱法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气-质联机 (GC/MS)、液-质联机 (HPLC/MS)、毛细管电泳 (CE) 等, 由于复杂的仪器设备和繁琐的过程, 不适合现场监控和大量样本筛查。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒, 包括多拉菌素特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体; 所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标多拉菌素半抗原; 当所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时, 所述酶标记物为酶标抗抗体; 当所述包被原为抗抗体时, 所述酶标记物为酶标多拉菌素半抗原。

所述多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将多拉菌素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或活性酯法进行偶联得到; 所述多拉菌素半抗原是将多拉菌素的5位羟基用琥珀酰酐酰化, 从而在分子中引入羧基, 合成多拉菌素半抗原; 所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、兔血清蛋白或卵清蛋白等常用载体蛋白。

所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 其中标记酶优选碱性磷酸酯酶; 碱性磷酸酯酶标记抗抗体可采用现有技术中的多种方法如戊二醛法或过碘酸钠法将酶交联在抗抗体上; 碱性磷酸酯酶标记的多拉菌素半抗原可采用混合

酸酐法将碱性磷酸酯酶与多拉菌素半抗原偶联得到。所述多拉菌素半抗原是将多拉菌素的5位羟基用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原。

所述多拉菌素特异性抗体可为多拉菌素单克隆抗体或多拉菌素多克隆抗体；它们均是用多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述多拉菌素单克隆抗体优选为多拉菌素鼠单克隆抗体，所述多拉菌素多克隆抗体优选为多拉菌素兔多克隆抗体。所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体。

所述多拉菌素鼠单克隆抗体优选为多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611 分泌的抗体。

多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611 已于 2006 年 2 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC）。

以上抗体均可以用多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血兰蛋白等常用载体蛋白；所述多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将多拉菌素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到；所述多拉菌素半抗原是将多拉菌素的5位羟基用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括多拉菌素标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述浓缩洗涤液为 0.01M，pH 7.4，含有 0.8%~1.2%吐温 80 和 0.5%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液。

所述当标记酶为辣根过氧化物酶时显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

所述浓缩复溶液为 0.01 mol/L 含有 1%酪蛋白和 1%明胶的磷酸盐缓冲液。

所述封闭液为 pH 7.4，0.01mol/L 含有 20%新生牛血清，0.05%酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

所述包被缓冲液为 pH 8.2、0.05 mol/L 含有 0.5%卵清蛋白的硼砂-硼酸缓冲液。

所述终止液为 1-2mol/L 硫酸、盐酸或氢氧化钠。

可作为固定所述抗抗体的载体的物质很多，如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以

是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；其中优选为聚苯乙烯制成的微量反应板凹孔。聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能，抗原吸附其上后还是保留原来的免疫活性，空白值低，孔底透明度高，各板之间、同一板各孔之间性能相近，所以固相载体优选为聚苯乙烯。

本发明所提供的检测多拉菌素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

当样品为动物组织时，用均质器均质样本，称取 5g 样本，加入 10ml 无水甲醇混合，涡动 1min 后于振荡器上振荡，3000g 以上，15℃ 离心 10min，取上清液 20 μ l，用稀释了的上述浓缩复溶液（按 $V_{\text{浓缩复溶液}}:V_{\text{水}}=1:2$ 稀释）稀释 5 倍后，取 20 μ l 进行分析；当样品为血液样本时，将血样静置半小时，在 3000g 以上，15℃ 离心 10min，取上清液加入 2ml 稀释了的浓缩复溶液（按 $V_{\text{浓缩复溶液}}:V_{\text{水}}=1:2$ 稀释）；

2) 利用上述检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒检测样品。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物组织、血清中多拉菌素药物残留量。本发明的检测原理是当以多拉菌素与载体蛋白偶联物为包被原时，将多拉菌素与载体蛋白的偶联物为包被原吸附于固相载体上，加入样品或多拉菌素标准品溶液和多拉菌素特异性抗体，再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用，待测样本中残留的多拉菌素与酶标板上包被的偶联抗原竞争多拉菌素抗体；当以抗抗体为包被原时，加入多拉菌素抗体工作液，孵育洗涤拍干，加入样品或标准品溶液，同时加入酶标多拉菌素半抗原，孵育洗涤拍干，待测样品中残留的多拉菌素和酶标记多拉菌素半抗原竞争多拉菌素特异性抗体，显色后终止，测定样品吸光值，该值与样品中多拉菌素残留物含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中多拉菌素的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的多拉菌素的标准品溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

本发明试剂盒中包被有包被原的酶标板所用的封闭液含有的酪蛋白会减少抗体的非特异性吸附，还能对蛋白起到一定的保护作用；浓缩洗涤液中含有的硫柳汞在溶液中抑制细菌的生长，对溶液的稳定性起到一个保护作用。本发明试剂盒的浓缩复溶液中的明胶能减少抗原、抗体的非特异性吸附，从而增加了抗原、抗体的结合率。

多拉菌素是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明将多拉菌素的 5-0-(单)琥珀酰部分用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原，有助于制出针对多拉菌素抗原特异性较强的多克隆抗体。再将多拉菌素半抗原

采用混合酸酐法与载体蛋白偶联得到免疫原。半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利,半抗原与 KLH、RSA 和 MSA 的结合摩尔比分别为 16:1、20:1、18:1。

本发明的检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品;主要试剂以工作液形式提供,检验方法方便易行,经过对试剂盒的精密度和准确度测试实验表明,本发明的酶联免疫试剂盒具有高特异性、高灵敏度、高精度度、高准确度等特点,将在食品和饲料多拉菌素残留量的检测中发挥重要作用。本发明的试剂盒结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带,可用于动物源性食品中多拉菌素的检测;本发明的检测多拉菌素的方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测。将在食品和饲料多拉菌素残留量的检测中发挥重要作用。

附图说明

图 1 为以多拉菌素抗原为包被原的酶联免疫试剂盒多拉菌素标准曲线图

图 2 为以多拉菌素抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒多拉菌素标准曲线图

具体实施方式

下述实施例的方法如无特别说明,均为常规方法。

下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

实施例 1、以多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

以多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括:

- (1) 包被有多拉菌素半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板;
- (2) 碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液:用含有 0.5% (质量浓度) 甘油, 2% 新生牛血清的溶液将碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体稀释成蛋白浓度为 $1\mu\text{g/L}$, 12ml/瓶, 1 瓶;
- (3) 多拉菌素标准品溶液:多拉菌素系列标准溶液 6 瓶, $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 、 $40.5\mu\text{g/L}$, 1-3ml/瓶。标准品溶液的稀释液为:含有 5% (质量浓度) N' N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。
- (4) 显色液:显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液, 7ml/瓶。
- (5) 多拉菌素鼠单克隆抗体工作液:将多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611 分泌的抗体稀释成蛋白浓度为 $5.0\mu\text{g/L}$ 使用, 12ml/瓶, 1 瓶。
- (6) 浓缩洗涤液: 0.01M , pH 7.4, 含有 0.8%~1.2% 吐温 80 和 0.5% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液, 50ml/瓶, 1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。
- (7) 终止液: 2mol/L 氢氧化钠溶液, 8ml/瓶, 1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：0.01mol/L 含有 1%酪蛋白和 1%明胶的的磷酸盐缓冲液，分装 50ml/瓶，1 瓶，此浓度为正常使用浓度的 3 倍。

(9) 包被缓冲液：pH8.2 0.05 mol/L 含有 0.5%卵清蛋白的硼砂-硼酸缓冲液。

(10) 封闭液：pH 7.4, 0.01mol/L 含有 20%新生牛血清，0.05%酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

其中，多拉菌素半抗原与载体蛋白偶联物、多拉菌素特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、多拉菌素半抗原的合成方法：

半抗原合成：将多拉菌素的 5 位羟基用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原。

其半抗原的制备的过程为：

(1) 取多拉菌素 500mg 和琥珀酰酐 200mg 溶于 5ml 吡啶中；

(2) 60 摄氏度回流反应 8 小时，用氯仿萃取后干燥即可。

2、包被原：将多拉菌素半抗原和兔血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到包被原。

包被原的具体制备方法如下：

(1) 取多拉菌素半抗原 2 g 溶于 30ml, 50%的 N, N-二甲基甲酰胺溶液中；

(2) 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，加到步骤 (1) 的溶液中，室温搅拌反应 4 小时；

(3) 取兔血清白蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将兔血清白蛋白滴加到步骤 (2) 的溶液中 4℃搅拌过夜，用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 4 次，最后将抗原浓缩或冻干保存。

3、酶标板的制备：

用包被缓冲液将多拉菌素半抗原与兔血清白蛋白偶联物稀释成 0.1-1 μg/ml，每孔加入 100 μl，37℃温育 2h 或 4℃过夜，倾去包被液，用稀释 19 倍的浓缩洗涤液洗涤 3 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 200 μl 封闭液，37℃温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、多拉菌素兔多克隆抗体的制备

1、免疫原：由于血兰蛋白与被免疫动物之间蛋白关系较远，且结构复杂，故免疫原性好，能诱导较强的免疫应答，使其产生的抗体较好，用血兰蛋白作为免疫原的载体。将多拉菌素半抗原和血兰蛋白 (KLH) 采用混合酸酐法，进行偶联得到免疫

原。免疫原制备的具体步骤为：1) 取多拉菌素半抗原 2g 溶于 30ml 50%的 N,N' - 二甲基甲酰胺溶液中；2) 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，加入步骤 1) 的溶液中室温搅拌反应 4 小时；3) 将血蓝蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，然后滴加到步骤 2) 得到反应后的溶液中，在 4℃ 搅拌 12 小时；4) 反应完毕后，用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次，得到含有免疫原的溶液，然后将含有免疫原的溶液浓缩保存或冻干保存。

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以上述多拉菌素半抗原与血蓝蛋白偶联物为免疫原为，免疫剂量为 1mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

2、多拉菌素鼠单克隆抗体制备

动物免疫程序：采用 BALB/c 小鼠作为免疫动物，以上述多拉菌素半抗原与血蓝蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 80-100 μ g/只，首免时将抗原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化：取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞，按 5: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株—多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611。

细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611 用冻存液制成 1×10^6 - 5×10^6 个/mL 的细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 BALB/c 小鼠（8 周龄）腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7-14 天后腹腔注射多拉菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-1 CGMCC No. 1611 5×10^5 - 10^6 个/只，7-10 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

三、酶标抗抗体的制备

以鼠源抗体对无病原体山羊进行免疫接种，得到羊抗鼠抗抗体。

戊二醛为一种双功能试剂，通过其醛基分别与酶和免疫球蛋白上的氨基共价结合，形成酶-戊二醛-免疫球蛋白结合物。采用戊二醛法将碱性磷酸酯酶与羊抗鼠抗抗体偶联并纯化提取，得到酶标羊抗鼠抗抗体。

酶标羊抗鼠抗抗体具体步骤如下：

- 1) 称取碱性磷酸酯酶 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，于室温静置过夜。
- 2) 反应后的酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / 1min，收集棕色流出液。如体积大于 5ml，则以聚乙二醇浓缩至 5ml。放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌。
- 3) 取羊抗鼠抗抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。
- 4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml，继续搅拌 3h。
- 5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml，混匀后，置室温 2h。
- 6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃ 1h。
- 7) 3000rpm 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液中。
- 8) 将上述溶液装入透析袋中，用 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析，去除铵离子后(用蔡氏试剂检测)，10,000rpm 离心 30min 去除沉淀，上清液即为酶结合物，分装后，冰冻保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的多拉菌素的方法如下：

一、样品前处理

动物组织：用均质器均质样本，称取 5g 样本，加入 10ml 无水甲醇混合，涡动 1min 后于振荡器上振荡，3000g 以上，15℃ 离心 10min，取上清液 20 μ l，用上述稀释了的浓缩复溶液（按 $V_{\text{浓缩复溶液}}:V_{\text{水}}=1:2$ 稀释）稀释 5 倍后，取 50 μ l 进行分析。

血浆：将血样静置半小时，在 3000g 以上，15℃ 离心 10min，取上清液加入 2ml 稀释了的复溶液（按 $V_{\text{浓缩复溶液}}:V_{\text{水}}=1:2$ 稀释），取 50 μ l 进行分析。

二、检测方法

a、向多拉菌素半抗原与兔血清白蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液（各 2 孔）50 μ l，然后加入多拉菌素鼠单克隆抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，37℃ 恒温箱中反应 30min。

b、倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 稀释了的浓缩洗涤液（按 $V_{\text{浓缩洗涤液}}:V_{\text{水}}=1:19$ 稀释），30s 后倒出孔中液体，用吸水纸拍干，如此重复操作共洗板 5 次。加入碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100 μ l，用盖板膜封板，37℃ 恒温箱中反应 30min。

c、取出酶标板，如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 100 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15-30min。

d、每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪将波长范围设定在 400nm 波长处，测定每孔吸光度值（OD 值）。

三、结果分析

所获得的每个浓度标准品溶液或样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标准（0 标准）的吸光度值（B₀）再乘以 100%，即百分吸光度值。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B₀ 为 0 μ g/L 标准溶液的平均吸光度值。以多拉菌素浓度的自然对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，如图 1 所示。相对应每一个样品中多拉菌素的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液中多拉菌素的浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 0.5 μ g/L。

实施例 2、以抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒及其制备方法

以抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有抗抗体的酶标板；

(2) 碱性磷酸酯酶标记的多拉菌素半抗原工作液：用含有 0.5% 甘油，2% 新生牛血清的溶液将碱性磷酸酯酶标记的多拉菌素半抗原稀释成蛋白浓度为 2 μ g/L 的溶液，12ml/瓶。

(3) 多拉菌素标准品溶液：多拉菌素系列标准溶液 6 瓶，0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L，1-3ml/瓶。多拉菌素标准品溶液的稀释液为：0.1M pH 值为 8.0 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色液：显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液，7ml/瓶。

(5) 多拉菌素兔多克隆抗体工作液：含有 5%（质量浓度）DMF，2% 卵清蛋白的磷酸盐缓冲液将多拉菌素兔多克隆抗体稀释成蛋白浓度为 5.0 μ g/L，12ml/瓶，1 瓶。

(6) 浓缩洗涤液：0.01M，pH 7.4，含有 0.8%~1.2% 吐温 80 和 0.5% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液，50ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液：2mol/L 氢氧化钠溶液，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液: 0.05mol/L 含有 1%酪蛋白和 1%明胶的的磷酸盐缓冲液, 分装 50ml/瓶, 1 瓶, 为正常使用浓度的 3 倍。

(9) 包被缓冲液: pH 8.2 0.05 mol/L 含有 0.5%卵清蛋白的硼砂-硼酸缓冲液。

(10) 封闭液: pH 7.4, 0.01mol/L 含有 20%新生牛血清, 0.05%吐温 20 的磷酸盐缓冲液。

其中, 多拉菌素抗抗体包被原、多拉菌素特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的多拉菌素半抗原的制备方法如下:

一、酶标板的制备

1、包被原的制备: 以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到羊抗兔抗抗体。

2、包被有羊抗兔抗抗体的酶标板制备方法: 酶标板的材料为聚苯乙烯, 用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 $1\mu\text{g/ml}$, 每孔加入 $100\mu\text{l}$, 37°C 温育 2h 或 4°C 过夜, 倾去包被液, 每孔加稀释了的浓缩洗涤液 $250\mu\text{l}$ (按 $V_{\text{浓缩洗涤液}}:V_{\text{水}}=1:19$ 稀释) 洗涤 3 次, 每次 30s, 拍干, 然后在酶标板的每孔中加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 温育 2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

二、多拉菌素兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以多拉菌素半抗原与兔血清白蛋白偶联物为免疫原, 免疫剂量为 1mg/kg , 将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 共免疫 5 次, 最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血, 测定血清抗体效价, 心脏采血, 经硫酸铵分级沉淀得到纯化的兔多克隆抗体。

三、酶标半抗原的制备

碱性磷酸酯酶标记半抗原的制备: 将多拉菌素半抗原和碱性磷酸酯酶采用混合酸酐法进行偶联, 得到碱性磷酸酯酶标记的多拉菌素。

具体方法如下:

(1) 取 5.8g 合成的多拉菌素的半抗原, 用 0.1ml 二甲基甲酰胺溶解, 冷却至 10°C , 加 $2\mu\text{l}$ 氯甲酸异丁酯, 10°C 搅拌反应 30 分钟。

(2) 1.5g 碱性磷酸酯酶 $2\text{ml}50\text{mmol/LNa}_2\text{CO}_3$ 溶解。

(3) 10°C 反应 4 小时 (维持 pH 值为 9.0), 然后 4°C 过夜。

(4) 过 Sephadex G-25 层析柱, 柱中含 $\text{NaCl}100\text{mmol/L}$ 、 $\text{MgCl}_210\text{mmol/L}$ 、2-巯基乙醇 10mmol/L 的 50mmol/L Tris-醋酸缓冲液 (pH7.5) 平衡和洗脱, 合并含碱性

磷酸酯酶的洗脱管内液体，进一步纯化后，保存于含 0.1%BSA、0.02%NaN₃的缓冲液中。

利用该试剂盒检测样品中残留的多拉菌素的方法如下：

样品前处理的具体步骤同实施例 1 中的样品前处理步骤

检测方法：

1) 向包被有羊抗兔抗体的酶标板微孔中加入多拉菌素兔多克隆抗体工作液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 30min；

2) 倒出孔中液体，每孔加入洗涤液，30s 后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。加入系列标准品溶液或样品溶液 50 μ l，同时加入碱性磷酸酯酶标记的多拉菌素半抗原工作液 50 μ l，然后，37 $^{\circ}$ C 反应 30min。

3) 重复上述洗板步骤，每孔加入显色液 50 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15~30min。

4) 每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪，测定每孔吸光度值（OD 值）。

结果分析的方法同实施例 1 中的结果分析方法，该试剂盒的标准曲线图，如图 2 所示。结果表明，制备的试剂盒整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 0.5 μ g/L。

实施例 3、试剂盒精密度、准确度和保存期试验

1、试剂盒精密度试验

(1) 标准品精密度试验

将实施例 1 和实施例 2 中制备的试剂盒分别取三批进行精密度实验，每批试剂盒抽取 10 个试剂盒，再从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔，测定 4.5 μ g/L 标准品溶液的吸光度值（OD 值），计算变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 1 所示，结果表明变异系数范围在 5.6%~10.9%之间。均小于 25%，此标准为农业部《农办医[2005]3 号文件》关于试剂盒备案标准。

表1 标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	6.9	8.9	7.6	7.9	10.2	9.8	7.6	5.6	8.9	7.6
	03 批	7.3	6.9	6.8	6.1	8.9	7.8	9.4	9.6	10.6	10.7
	06 批	8.8	9.4	6.8	7.3	7.9	8.1	8.6	10.9	10.1	9.5

实施例 2 中的三批试剂盒的测定结果如表 2 所示,结果表明变异系数范围在 5.1%~14.9%之间。

表 2 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	04 批	13.4	10.8	9.6	7.5	6.3	11.6	14.9	10.1	10.5	5.7
	07 批	10.5	6.4	7.2	8.4	5.1	9.3	11.5	6.5	8.7	7.2
	09 批	9.4	6.3	8.6	11.7	10.6	9.5	7.3	8.5	11.6	6.8

(2) 样本可重复性试验

每个样本按 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度添加多拉菌素标准品,分别取实施例 1 和实施例 2 中制备的三个不同批次的试剂盒各三个,每个浓度重复 5 次,分别计算变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 3—表 6 所示,结果表明鸡肉样本变异系数均低于 20%,鸡血样本的变异系数均低于 25%。

表 3 鸡肉样品可重复性试验

	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	7009 批	12.3	15.6	15.5	19.2	18.9
	18.9	21.3	16.9	14.6	18.9	13.8
	15.9	12.9	12.3	18.7	14.2	17.4
8003 批	20.3	21.8	16.9	17.2	18.7	10.9
	19.2	17.3	15.6	14.5	16.5	10.7
	20.9	21.3	18.9	17.6	12.6	19.1
9009 批	19.9	18.6	17.5	16.5	15.4	9.9
	20.3	21.3	18.6	12.6	18.6	18.4
	14.6	16.5	20.6	18.4	15.7	9.8

表 4 鸡血样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{L}$)					变异系数 CV%
	7009 批	12.6	12.4	12.8	16.9	17.8
	19.7	18.6	16.4	15.3	12.6	16.9
	12.4	15.6	17.5	18.9	12.8	18.4
8003 批	15.6	14.5	18.7	16.3	15.4	9.8
	19.8	17.8	18.9	14.6	19.3	11.5
	12.4	19.8	17.8	19.3	19.4	19.6

9009 批	19.7	19.2	12.6	17.8	19.2	16.5
	15.6	14.7	16.2	14.3	19.2	12.1
	12.4	12.6	18.37	19.7	19.3	22.2

实施例 2 中的三批试剂盒的测定结果如表 5—表 6 所示。结果表明鸡肉样本变异系数均小于 25%，鸡血样本的变异系数均小于 20%。

表 5 鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
6004 批	15.4	13.4	20.6	11.6	12.7	24.1
	11.7	14.6	13.8	15.2	19.5	19.1
	17.4	13.4	15.2	12.8	14.6	12.2
8003 批	18.4	14.6	12.9	15.8	13.7	14.2
	13.3	17.4	16.2	14.4	20.7	17.6
	21.7	16.4	15.4	13.8	19.0	18.1
9007 批	14.2	13.8	11.9	17.5	19.5	19.9
	20.7	16.4	17.3	12.9	11.4	23.4
	11.8	16.4	17.4	15.9	14.6	14.2

表 6 鸡血样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{L}$)					变异系数 CV%
6004 批	13.5	20.4	16.8	17.4	19.3	15.2
	16.7	18.4	21.3	12.7	15.6	18.9
	13.8	17.4	20.7	14.7	15.9	16.4
8003 批	11.6	18.4	16.7	15.3	17.2	16.5
	13.7	20.6	15.7	17.3	19.4	16.0
	17.4	11.4	19.4	13.7	15.8	19.8
9007 批	21.8	18.4	16.4	14.7	13.2	19.9
	11.2	16.8	15.9	13.7	18.7	19.0
	12.0	16.4	18.5	19.3	17.4	17.1

2、试剂盒的准确度测定

实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 7、表 8 所示，结果表明鸡肉样本的回收率在 66%~92.5%，鸡血样本的回收率在 64%~104%。

表 7 鸡肉添加样品的准确度

批号	添加 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 实测值					平均回收率%
7009 批	14.8	15.6	13.2	18.0	17.9	79.5

	13.4	18.6	17.2	16.4	15.8	81.4
	17.4	16.5	14.5	18.2	13.4	80.0
8003 批	13.9	15.6	18.2	17.4	14.0	79.1
	13.5	15.9	17.2	16.5	14.6	77.7
	17.2	16.4	15.9	13.6	18.0	81.1
9009 批	14.3	18.0	14.6	17.4	15.2	79.5
	16.2	14.9	13.5	17.5	15.2	77.3
	13.4	18.5	17.4	15.2	16.1	80.6

表8 鸡血添加样本的准确度

批号	添加 20 μ g/kg 实测值					平均回收率%
6004 批	12.8	14.5	16.5	18.5	19.8	82.1
	12.8	13.8	14.2	13.5	13.7	68.0
	15.6	14.9	16.2	15.9	17.4	80.0
8003 批	14.9	15.2	14.8	16.2	14.9	76.0
	16.5	15.2	17.4	14.9	16.8	80.8
	20.8	18.5	17.4	16.5	17.9	91.1
9007 批	18.5	17.4	16.5	17.9	18.2	88.5
	15.6	14.8	12.5	17.4	19.5	79.8
	15.4	17.4	16.2	15.4	19.5	83.9

实施例2中的三批试剂盒的测定结果如表9、表10所示，结果表明鸡肉样本的回收率在62%~103.5%，鸡血样本的回收率在60%~97.5%。

表9 鸡肉添加样本的准确度

批号	添加 20 μ g/kg 实测值					平均回收率%
7009 批	12.9	13.5	12.6	14.0	13.8	66.8
	12.4	13.0	13.7	13.6	14.1	66.8
	15.2	16.2	14.9	17.8	18.5	82.6
8003 批	20.5	18.4	17.6	19.5	18.2	94.2
	16.5	20.7	17.9	18.4	16.9	90.4
	20.4	17.4	16.2	18.5	19.5	92.0
9009 批	15.6	14.5	16.8	17.5	15.2	79.6
	16.5	17.4	15.4	16.2	18.5	84.0
	16.5	17.4	18.5	19.3	15.9	87.6

表10 鸡血添加样本的准确度

批号	添加 20 μ g/kg 实测值					平均回收率%
6004 批	13.5	14.9	12.0	17.8	14.6	72.6
	15.6	17.4	13.4	14.2	15.2	75.8
	15.2	13.4	18.5	17.4	16.2	80.7
8003 批	15.4	16.2	13.2	17.4	14.3	76.5
	14.2	12.8	17.4	16.3	14.2	74.9
	16.2	14.2	13.5	15.2	14.3	73.4
9007 批	13.4	14.2	16.2	15.3	17.4	76.5
	17.4	19.5	13.2	15.4	12.3	77.8
	16.2	14.2	13.5	15.3	14.2	73.4

3、试剂盒保存期试验

将实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒分别保存在 2-8 $^{\circ}$ C，6 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、多拉菌素添加实际测定值，结果表明实施例 1 的试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度；实施例 2 的试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度，均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将上述试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生，将试剂盒放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 5 天，测定结果也表明实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8 $^{\circ}$ C 至少可以保存 6 个月以上。

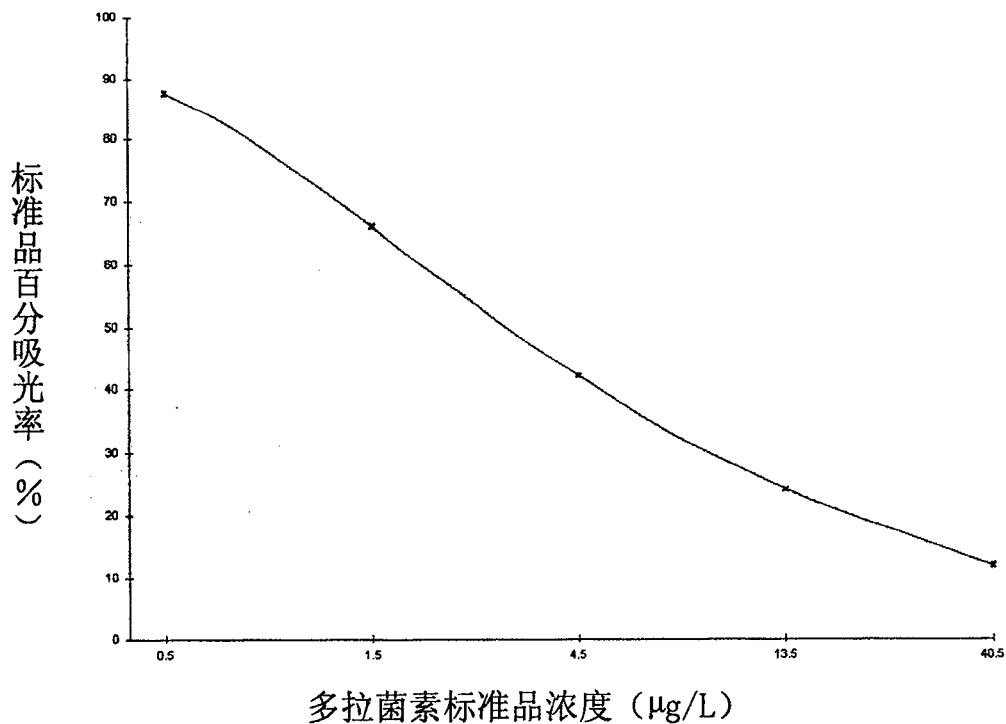


图 1

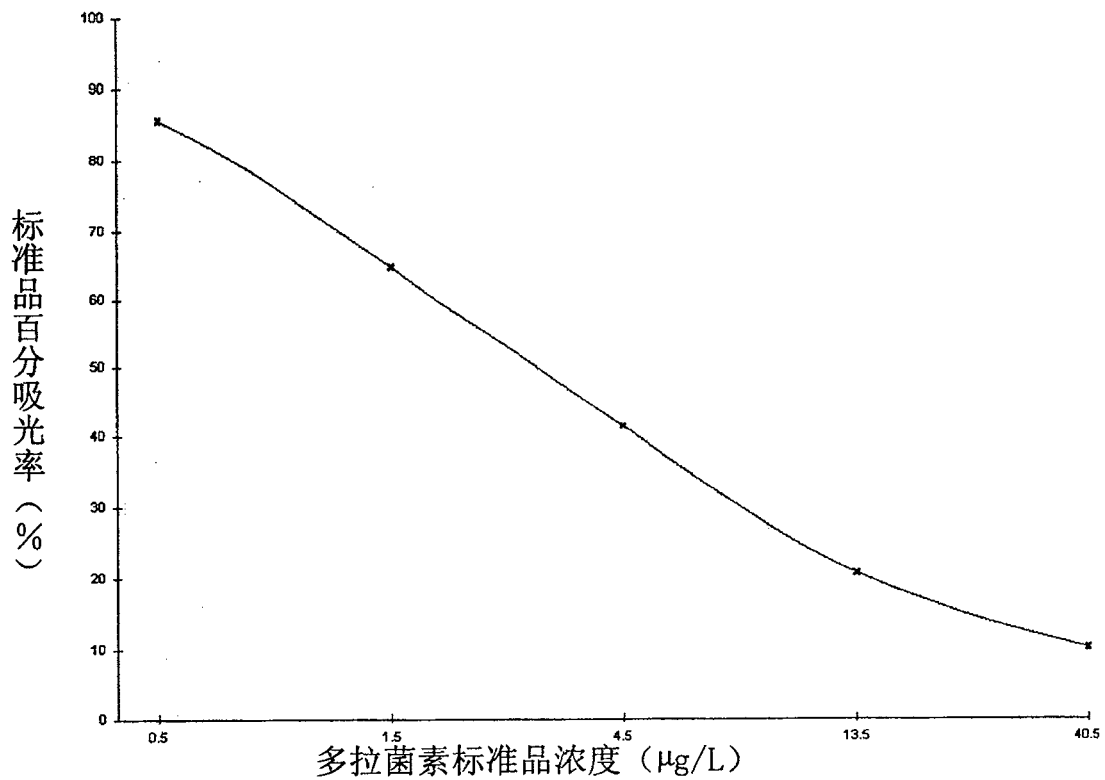


图 2

专利名称(译)	一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100489531C	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200610007257.5	申请日	2006-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 史为民 何继红 何方洋 丁双阳 江海洋 万宇平 张素霞 冯才伟		
发明人	沈建忠 史为民 何继红 何方洋 丁双阳 江海洋 万宇平 张素霞 冯才伟		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1811438A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测多拉菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测多拉菌素的酶联免疫试剂盒，包括多拉菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或多拉菌素抗体；所述酶标记物为酶标多拉菌素抗体或酶标多拉菌素半抗原；当所述包被原为多拉菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标多拉菌素抗体；当所述包被原为多拉菌素抗体时，所述酶标记物为酶标多拉菌素半抗原；所述多拉菌素半抗原是将多拉菌素的5位羟基用琥珀酰酐酰化，从而在分子中引入羧基，合成多拉菌素半抗原。本发明的方法操作简便、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织、血清、牛奶及饲料中多拉菌素药物残留量。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$