

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710063872.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月8日

[11] 公开号 CN 101013130A

[22] 申请日 2007.2.13

[21] 申请号 200710063872.2

[71] 申请人 北京望尔康泰生物技术有限公司

地址 100085 北京市昌平区西三旗龙兴园中
区10号楼东侧二层

共同申请人 北京望尔生物技术有限公司

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 冯才茂 吴小平
万宇平 冯才伟 汪善良 赵正苗
余厚美 刘玉梅 罗贵昆 刘平
陈炜琳 丁双阳 张素霞 江海洋

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 张庆敏

权利要求书3页 说明书20页 附图1页

[54] 发明名称

检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒及其
应用

[57] 摘要

本发明提供了一种检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶标板，酶标记物，呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体，呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还提供一种应用上述酶联免疫试剂盒检测呋喃它酮代谢物的方法，它包括步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的是检测动物源性食品如鸡肉、猪肉、鱼虾、牛奶、蜂蜜和鸡蛋等样品中呋喃它酮代谢物残留量的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

1. 一种检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒，其特征在于它含有：

- (1) 包被有包被原的酶标板；
- 5 (2) 酶标记物；
- (3) 呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体；
- (4) 呋喃它酮代谢物标准品溶液或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液；
- 10 (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于所述酶标板中包被的包被原为呋喃它酮代谢物包被抗原、呋喃它酮代谢物衍生物包被抗原、呋喃它酮代谢物特异性抗体、呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体或抗抗体。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于所述呋喃它酮代谢物包被抗原为呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白的偶联物，呋喃它酮代谢物衍生物包被抗原为呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白的偶联物；呋喃它酮代谢物衍生物包被抗原是将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白通过NHS活性酯法偶联得到；呋喃它酮代谢物包被抗原是将呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白通过NHS活性酯法偶联得到的；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白；所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体，所述多克隆抗体是用呋喃它酮代谢物或呋喃它酮代谢物衍生物免疫抗原进行免疫得到，所述单克隆抗体是采用

细胞融合和克隆细胞的方法得到；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；所述羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体对无病原体羊进行免疫得到，所述羊抗兔抗抗体是将兔源抗体对无病原体山羊进行免疫得到。

4. 根据权利要求1-3任意一项所述的试剂盒，其特征在于所述酶
5 标记物为酶标记抗抗体、酶标记呋喃它酮代谢物抗原、酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原、酶标记呋喃它酮代谢物特异性抗体或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于所述酶标记抗抗体
10 是采用戊二醛法或碳化二亚氨法将抗抗体与标记酶偶联得到；所述酶标记呋喃它酮代谢物抗原是将呋喃它酮代谢物半抗原与标记酶采用混合酸酐法或过碘酸钠法偶联得到，酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原是将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与标记酶采用混合酸酐法或过碘酸钠法偶联得到；所述酶标记呋喃它酮代谢物特异性抗体是将呋喃它酮代谢物特异性抗体与标记酶通过戊二醛法或碳化二亚氨法偶联
15 得到，酶标记呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体是将呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体与标记酶通过戊二醛法或碳化二亚氨法偶联得到；所述标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶。

6. 根据权利要求1-5任意一项所述的试剂盒，其特征在于所述呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体为在
20 酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体，或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有；所述呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体为工作液、浓缩液或冻干粉的形式。

7. 根据权利要求1-6任意一项所述的试剂盒，其特征在于当标记
25 酶为辣根过氧化物酶时底物显色液A液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为1~2 mol/L的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为2 mol/L的氢氧化钠；浓缩洗涤液为

0.01M, pH7.6, 含有0.8 ~ 1.2%吐温20和1‰叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液; 浓缩复溶液为0.02 ~ 0.08 mol/L、含有0.1%明胶的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求1-7任意一项所述的试剂盒, 其特征在于制备呋喃它酮代谢物特异性抗体所需要的免疫抗原为所述呋喃它酮代谢物免疫抗原或所述呋喃它酮代谢物衍生物免疫抗原, 所述呋喃它酮代谢物免疫抗原是采用混合酸酐法或NHS活性酯法将呋喃它酮代谢物抗原与载体蛋白偶联得到; 所述呋喃它酮代谢物衍生物免疫抗原是采用混合酸酐法或NHS活性酯法将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白偶联得到。

9. 根据权利要求1-8任意一项所述的试剂盒, 其特征在于呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液的浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$, 0.1 $\mu\text{g/L}$, 0.3 $\mu\text{g/L}$, 0.9 $\mu\text{g/L}$, 2.7 $\mu\text{g/L}$, 8.1 $\mu\text{g/L}$ 。

10. 一种检测动物源性食品中呋喃它酮代谢物残留量的方法, 包括如下步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用任一权利要求 1-9 所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

本发明涉及一种检测动物源性食品中如鸡肉、猪肉、鱼虾、牛奶、
5 蜂蜜和鸡蛋等样品中呋喃它酮代谢物残留量的酶联免疫试剂盒及其
使用该试剂盒进行检测的方法。

背景技术

硝基呋喃类药物因有非常好的抗菌作用和药动力学的特性，曾经
被广泛应用，并作为禽类、水产和猪的促生长添加剂。但在长时间的
10 实验研究过程中发现，硝基呋喃类药物和代谢物均可以使实验动物发
生癌变和基因突变，因此此类药物禁止在治疗和饲料中使用。呋喃它
酮在1995年被禁用。

用来检测呋喃它酮代谢物的最常用方法是LC-UV，LC-MS和
LC-MS/MS，由于复杂的仪器设备和繁琐的过程，不适合现场监控和
15 大量样本筛查。

发明内容

本发明的目的是提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于
携带的用于动物源性食品中呋喃它酮代谢物检测的酶联免疫试剂盒，
并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检
20 测方法。

本发明的另一目的在于提供所述酶联免疫试剂盒在检测呋喃它
酮代谢物残留量中的应用。

本检测试剂盒的主要内容物采用了方便使用的工作液形式，工作
液保存性及稳定性好，克服了大多数本领域产品的技术问题；本试剂
25 盒采用的检测方法降低了样本检测下限，提高的检测灵敏度，高于本
领域仪器检测方法的灵敏度。

本发明的检测原理为：

当在酶标板微孔条上预包被呋喃它酮代谢物偶联包被抗原或呋喃它酮代谢物衍生物偶联包被抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入呋喃它酮代谢物特异性抗体溶液或呋喃西林它酮代谢物衍生物特异性抗体溶液，样本中残留的呋喃它酮代谢物或呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品与酶标板上包被的呋喃它酮代谢物偶联包被抗原或呋喃它酮代谢物衍生物偶联包被抗原竞争呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与样本中的呋喃它酮代谢物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中呋喃它酮代谢物的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中呋喃它酮代谢物残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记呋喃它酮代谢物抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原溶液，样本中残留的呋喃它酮代谢物或呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品与酶标记呋喃它酮代谢物抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原竞争包被在酶标板上的呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中的呋喃它酮代谢物含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中呋喃它酮代谢物的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中呋喃它酮代谢物残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被呋喃它酮代谢物偶联包被抗原或呋喃它酮

代谢物衍生物偶联包被抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记呋喃它酮代谢物特异性抗体或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体溶液，样本中残留的呋喃它酮代谢物或呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品与酶标板上包被的呋喃它酮代谢物包被抗原或酶标板上包被的呋喃它酮代谢物衍生物包被抗原竞争呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中的呋喃它酮代谢物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中呋喃它酮代谢物的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中呋喃它酮代谢物残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被抗抗体时，加入呋喃它酮抗体孵育后，加入样本溶液或标准品溶液，再加入酶标记呋喃它酮代谢物偶联抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物偶联抗原溶液，样本中残留的呋喃它酮代谢物或呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品与酶标记呋喃它酮代谢物偶联抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物偶联抗原竞争呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与呋喃它酮代谢物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中呋喃它酮代谢物的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中呋喃它酮代谢物残留量的浓度范围。

本发明提供了一种用于检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒，它含有：

(1) 包被有包被原的酶标板（酶标板上包被抗原，酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记呋喃它酮代谢物特异性抗体或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体；酶标板上包被的抗抗体，酶标记物为酶

标记呋喃它酮代谢物抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原；酶标板上包被抗体，酶标记物为酶标记呋喃它酮代谢物抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原）；

(2) 酶标记物（可为酶标记抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体）；

5 (3) 呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体（酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体时，或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记抗原时存在）；

(4) 呋喃它酮代谢物标准品溶液或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液；

10 (5) 底物显色液；

(6) 终止液；

(7) 浓缩洗涤液；

(8) 浓缩复溶液。

15 本发明所提供的检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒，包括呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体及包被有包被原的酶联板和酶标记物；所述酶标记物为酶标记的抗抗体、酶标记呋喃它酮代谢物抗原或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物抗原或酶标记呋喃它酮代谢物特异性抗体或酶标记呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

20 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶，其中优选辣根过氧化物酶；酶标记羊抗鼠抗抗体或酶标记羊抗兔抗抗体是采用戊二醛法或碳化二亚氨法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的，辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与抗抗体进行偶联，如戊二醛法，碳化二亚氨法等，本发明经过长期的劳动
25 创造将碳化二亚氨法进行了改良，使其降低辣根过氧化物酶与抗抗体的浓度比率，节省了原材料并节省时间。

所述呋喃它酮代谢物特异性抗体可为呋喃它酮代谢物单克隆抗体或呋喃它酮代谢物多克隆抗体，呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体

可为呋喃它酮代谢物衍生物单克隆抗体或呋喃它酮代谢物衍生物多克隆抗体；呋喃它酮代谢物多克隆抗体是用呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法偶联得到的偶联物作为免疫原进行免疫得到的，呋喃它酮代谢物衍生物多克隆抗体是用呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法得到的偶联物作为免疫原进行免疫得到的；呋喃它酮代谢物单克隆抗体是通过呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法偶联得到的偶联物作为免疫原进行免疫得到脾细胞，再经过细胞融合和细胞克隆得到的单克隆抗体，呋喃它酮代谢物衍生物单克隆抗体是通过 NHS 活性酯法将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白偶联得到的偶联物作为免疫原进行免疫得到的脾细胞，再经过细胞融合和细胞克隆得到的单克隆抗体；所述呋喃它酮代谢物多克隆抗体或呋喃它酮代谢物衍生物多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述呋喃它酮代谢物单克隆抗体优选为呋喃它酮代谢物鼠单克隆抗体，呋喃它酮代谢物衍生物单克隆抗体优选为呋喃它酮代谢物衍生物鼠单克隆抗体，所述呋喃它酮代谢物多克隆抗体优选为呋喃它酮代谢物兔多克隆抗体，呋喃它酮代谢物衍生物多克隆抗体优选为呋喃它酮代谢物衍生物兔多克隆抗体。

所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白 (BCG)、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白；所述呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白的偶联物可通过 NHS 活性酯法将呋喃它酮代谢物半抗原和载体蛋白偶联得到；所述呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白的偶联物可通过 NHS 活性酯法将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原和载体蛋白偶联得到。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述浓缩洗涤液为 0.01 M, pH7.6, 含有 0.8 ~ 1.2 % 吐温 20 和 1 % 叠氮化钠 (NaN₃) 防腐剂的磷酸盐缓冲液。

所述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，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，终止液为 1~2 mol/L 硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，显示液为对硝基苯磷酸酯缓冲液，终止液为 2 mol/L 氢氧化钠溶液。

所述浓缩复溶液为 0.02~0.08 mol/L、含有 0.1% 明胶的磷酸盐缓冲液。

其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为 pH9.6, 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液；所用的封闭液为含有 10% 马血清和 1% 惰性蛋白的溶液。

本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将包被原稀释成 0.1~1 $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 100 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h，再 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150~200 μl 封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1~2 h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

本发明中抗原的合成过程为：

1. 呋喃它酮代谢物衍生物半抗原的制备

将呋喃它酮代谢物和间羧基苯甲醛在水中反应进行衍生化得到呋喃它酮代谢物衍生物半抗原。

2. 呋喃它酮代谢物抗原的制备

呋喃它酮是小分子物质，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。

将呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法进行偶联得到免疫原。

将呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法进行偶联得到包被原。

3. 呋喃它酮代谢物衍生物抗原的制备

呋喃它酮是小分子物质，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。

将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法进行偶联得到免疫原。

- 5 将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白采用 NHS 活性酯法进行偶联得到包被原。

4.呋喃它酮代谢物或代谢物衍生物鼠单克隆抗体的制备

- 10 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白偶联物或呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原，得到较好的多克隆抗体，取出肝脏进行细胞融合。

细胞融合与克隆化：取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，筛选细胞株，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

- 15 5.呋喃它酮代谢物或代谢物衍生物兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以呋喃它酮代谢物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，采用大剂量长程免疫方案多次免疫后测定血清抗体效价得到多克隆抗体。

- 20 本发明抗抗体的制备过程：羊抗鼠抗抗体是以羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体；羊抗兔抗抗体是以羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

- 25 本发明所述试剂盒中呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物标准品溶液：标准品溶液 6 瓶，0 $\mu\text{g/L}$ ，0.1 $\mu\text{g/L}$ ，0.3 $\mu\text{g/L}$ ，0.9 $\mu\text{g/L}$ ，2.7 $\mu\text{g/L}$ ，8.1 $\mu\text{g/L}$ ，3 ml/瓶。

本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测呋喃它酮代谢物的方法，它包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

本发明提供呋喃它酮代谢物在动物源性食品如鸡肉、猪肉、鱼虾、牛奶、蜂蜜和鸡蛋等样本中的处理方法。

5 将组织样品解冻，剪碎，置于组织匀浆机中高速匀浆；牛奶样本离心除去脂肪层；蜂蜜样本加蒸馏水溶解均匀；将鸡蛋样本打碎，用玻璃棒搅匀防止泡沫的产生。

本发明中用试剂盒检测方法是：当包被原为呋喃它酮代谢物偶联包被抗原或呋喃它酮代谢物衍生物偶联包被抗原时，向酶标板微孔中
10 加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值；当包被原为呋喃它酮代谢物偶联包被抗原或呋喃它酮代谢物衍生物偶联包被抗原时，向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入
酶标记抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

15 当包被原为呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体时，向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记呋喃它酮代谢物抗原或呋喃它酮代谢物衍生物抗原，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值；当包被原为抗抗体时，
20 向酶标板微孔中加入呋喃它酮代谢物抗体或酶标呋喃它酮代谢物抗体，温育后洗涤拍干，再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标呋喃它酮代谢物抗原，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

本发明中检测结果分析过程为：用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准溶液（0标准）的吸光度值
25 （B₀）再乘以100%，即百分吸光度值。计算公式为：

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

以呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液的浓度（μg/L）的半对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标

准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中呋喃它酮代谢物的残留量。

5 本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。

本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需 1.5 小时可以完成，最低检测限为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

10 本发明检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 法定性或定量检测样品中呋喃它酮代谢物的残留量；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；采用高特异性的呋喃它酮代谢物衍生物单克隆抗体或呋喃它酮代谢物衍生物单克隆抗体，主要试剂以工作液的形式提供，检验方法方便易行，具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。

15 本检测试剂盒的主要内容物采用了方便使用的工作液形式，工作液保存性及稳定性好，克服了大多数本领域产品的技术问题；本试剂盒采用的检测方法降低了样本检测下限，提高了检测灵敏度，使其高于本领域仪器检测方法的敏度。

附图说明

20 图1为本发明呋喃它酮代谢物的检测标准曲线图。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1 试剂盒组分的制备

1. 抗原的合成

25 a. 呋喃它酮代谢物衍生物半抗原的合成

将呋喃它酮代谢物和间羧基苯甲醛在水中反应进行衍生化得到呋喃它酮代谢物衍生物半抗原。

呋喃它酮代谢物衍生物半抗原的制备过程：

取呋喃它酮代谢物2000 mg溶于20 ml纯水中，将1500 mg间羧基苯甲醛溶解于30 ml水中，加入到呋喃它酮代谢物溶液中室温反应48小时，得到淡黄色沉淀即为呋喃它酮代谢物衍生物半抗原。用50 ml水反复清洗5~6次，经烘干得到呋喃它酮代谢物衍生物半抗原。

5 b. 免疫原呋喃它酮代谢物衍生物偶联抗原的制备

将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与血蓝蛋白采用 NHS 活性酯法进行偶联得到免疫原。

免疫原的制备过程：取呋喃它酮代谢物衍生物半抗原 300 mg 溶于 15 ml 水中，加入 2 ml NHS 活性酯 4 °C 反应 10 小时，取血蓝蛋白 10 2000 mg 溶于 30 ml 纯水中，加入到活化的呋喃它酮代谢物衍生物半抗原中 4 °C 反应过夜（16 小时），再用纯水透析 5 天，浓缩得到呋喃它酮代谢物衍生物免疫原，分装冻存。

c. 包被原呋喃它酮代谢物衍生物偶联抗原的制备

15 将呋喃它酮代谢物衍生物半抗原与甲状腺蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到包被原。

包被原的制备过程：取呋喃它酮代谢物衍生物半抗原 300 mg 溶于 15 ml 水中，加入 2 ml NHS 活性酯 4 °C 反应 10 小时，取甲状腺蛋白 20 2000 mg 溶于 30 ml 纯水中，加入到活化的呋喃它酮代谢物衍生物半抗原中 4 °C 反应过夜（16 小时），再用纯水透析 5 天，浓缩得到呋喃它酮代谢物衍生物包被原，分装冻存。

2. 单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 100 µg/只，使其产生多克隆抗体。

25 b. 细胞融合和克隆化

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，得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

c. 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/ml 的细胞悬液，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。

d. 单克隆抗体的制备与纯化

5 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4 ml/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，-20℃ 保存。

3. 多克隆抗体的制备

10 采用新西兰大白兔作为免疫动物，以呋喃它酮代谢物半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1.5 mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐混合制成乳化剂，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 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

15 4. 羊抗鼠抗抗体的制备过程：以羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体；羊抗兔抗抗体的制备：以羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

5. 酶标板的制备

20 用包被缓冲液将呋喃它酮代谢物偶联抗原、抗体或抗抗体稀释成 0.1~1 μg/ml，每孔加入 100 μl，37℃ 温育 2 h 或 4℃ 过夜，倾去包被液，用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 200 μl 封闭液，37℃ 温育 2 h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

25 6. 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1；由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点，这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥

梁，降低了酶标记物的酶活性，使制备的偶联物中混有许多聚合物，为了解决这个问题，我们将传统的方法进行了改良，即：

1) 省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。

- 5 2) 降低了辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比率至2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶的活性的损失减少。

实施例2 检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- 10 (1) 包被抗呋喃它酮代谢物抗原的酶标板；
 (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；
 (3) 呋喃它酮代谢物单克隆抗体；
 (4) 呋喃它酮标准品溶液6瓶，浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.9 $\mu\text{g/L}$ 、2.7 $\mu\text{g/L}$ 、8.1 $\mu\text{g/L}$ ；
15 (5) 底物显色液由A液和B液组成，底物显色液A液为过氧化脲，底物显色液B液为四甲基联苯胺；
 (6) 终止液为2 mol/L盐酸；
 (7) 浓缩洗涤液为0.01 M, pH7.6, 含有0.8 %吐温20和1 %叠氮化钠 (NaN_3) 防腐剂的磷酸盐缓冲液；
20 (8) 浓缩复溶液为0.06mol/L、含有0.1 %明胶的碳酸盐缓冲液。

实施例3 样品中呋喃它酮代谢物残留的检测

1. 样品前处理

动物组织（鸡肉、猪肉、鱼虾）

- 取 1 ± 0.05 g 的组织样本的均质物，加入 4 ml 的蒸馏水，0.5 ml 1M
25 HCl 和 100 μl 10 mM 的 2-硝基苯甲醛，充分振荡；在 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育（大约 16 h）；加入 5 ml 0.1 M K_2HPO_4 ，0.4 ml 1 M NaOH 和 5 ml 乙酸乙酯，剧烈振荡 30 s；在室温下（20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ /68 ~ 77 $^{\circ}\text{F}$ ）3000 g 以上离心 10 min；取出 2.5 ml 乙酸乙酯到另一个容器中 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干或旋转蒸发仪蒸干；用 1 ml 正己烷溶解干燥物，用 1 ml 已稀释好的

复溶液充分混合；在室温下（20~25℃/68~77°F）3000 g 以上离心10 min；用50 μl 下层液体用于分析。

2. 用试剂盒检测

向包被有抗呋喃它酮代谢物抗体的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液50 μl, 再加入呋喃它酮代谢物单抗体工作液50 μl, 25℃反应30 min。倒出孔中液体, 每孔加入稀释后的洗涤液, 30 s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100 μl 酶标记抗抗体到每个微孔中, 盖板膜盖板后置25℃环境中反应30 min。取出酶标板, 将孔内液体甩干, 加入稀释后的洗涤液250 μl 到每个板孔中, 洗板4~5次, 每次间隔10秒, 用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液A液过氧化脲50 μl, 底物显色液B液四甲基联苯胺(TMB)50 μl, 轻轻振荡混匀, 25℃恒温箱避光显色15~30 min。每孔加入终止液50 μl, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪波长设定在450 nm处, 测定每孔吸光度值(OD值)。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%, 得到百分吸光度值。以呋喃它酮代谢物标准品浓度(μg/L)的半对数值为X轴, 百分吸光度值为Y轴, 绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样品的浓度, 则可从标准曲线上读出呋喃它酮代谢物的残留量。

实施例4 样品中呋喃它酮代谢物残留的检测

1. 样品前处理(牛奶)

取出5ml的牛奶样本到玻璃离心管中; 分别加入0.36 M亚硝基铁氰化钠缓冲液和1 M硫酸锌缓冲液各100 μl; 用振荡器充分混合样本后, 用恒温离心机3000 g以上离心10 min, 4~12℃(39-54°F)。取牛奶的离心上清液1.1 ml, 加入8 ml的蒸馏水, 1 ml 1 M HCl和100 μl 10 mM的2-硝基苯甲醛, 充分振荡; 在37℃过夜孵育(大约16 h); 加入5 ml 0.1 M K_2HPO_4 , 0.4 ml 1 M NaOH和5 ml 乙酸乙酯, 剧烈振荡

30 s; 在室温下 (20 ~ 25 °C / 68 ~ 77 °F) 3000 g以上离心10 min; 取出2.5 ml乙酸乙酯到另一个容器中50 °C下氮气吹干; 用1 ml正己烷溶解干燥物, 用1 ml已稀释好的复溶液充分混合; 在室温下(20 ~ 25 °C / 68 ~ 77 °F) 3000 g以上离心10 min; 用50 µl下层液体用于分析。

5 2. 用试剂盒检测

向包被有抗呋喃它酮代谢物抗体的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液50 µl, 再加入酶标记呋喃它酮代谢物抗原50 µl, 25 °C反应30 min。倒出孔中液体, 每孔加入稀释后的洗涤液, 30 s后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板5次, 用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液A液过氧化脲50 µl, 底物显色液B液四甲基联苯胺 (TMB) 50 µl, 轻轻振荡混匀, 25 °C恒温箱避光显色15 ~ 30 min。每孔加入终止液50 µl, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪波长设定在450 nm处, 测定每孔吸光度值 (OD值)。

3. 检测结果分析

15 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以100%, 得到百分吸光度值。以呋喃它酮代谢物标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的半对数值为X轴, 百分吸光度值为Y轴, 绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样品的浓度, 则可从标准曲线上读出
20 呋喃它酮代谢物的残留量。

实施例5 样品中呋喃它酮代谢物残留的检测

1. 样品前处理 (蜂蜜)

取1 g蜂蜜样本到离心管中; 加入8 ml的蒸馏水振荡溶解, 1 ml 1 M HCl和100 µl 10 mM的2-硝基苯甲醛, 充分振荡; 在37 °C过夜孵育
25 (大约16 h); 分别加入5 ml 0.1 M K_2HPO_4 , 0.9 ml 1 M NaOH和5 ml乙酸乙酯, 剧烈振荡30 s; 在室温下 (20 ~ 25 °C / 68 ~ 77 °F) 3000 g以上离心10 min; 取出3 ml乙酸乙酯到另一个容器中50 °C下氮气吹干或旋转蒸发仪蒸干; 用1 ml正己烷溶解干燥物, 用2 ml已稀释好的复溶液充分混合; 在室温下 (20 ~ 25 °C / 68 ~ 77 °F) 3000 g以上离心10 min;

用50 μl 下层液体用于分析。

2. 用试剂盒检测

向包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入呋喃它酮代谢物单克隆抗体工作液50 μl ，25 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min，倒出孔中液体，每孔加入
5 稀释后的洗涤液，30 s后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板5次，用吸水纸拍干。再加入系列标准品溶液或样品溶液50 μl 及100 μl 酶标记呋喃它酮代谢物抗原到每个微孔中，盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 环境中反应30 min。取出酶标板，将孔内液体甩干，加入稀释后的洗涤液250 μl 到每个板孔中，洗板4~5次，每次间隔10秒，用吸水纸拍干。每孔加入
10 底物显色液A液过氧化脲50 μl ，底物显色液B液四甲基联苯胺（TMB）50 μl ，轻轻振荡混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱避光显色15~30 min。每孔加入终止液50 μl ，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在450 nm处，测定每孔吸光度值（OD值）。

3. 检测结果分析

15 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准品溶液（0标准）的吸光度值（ B_0 ）再乘以100%，得到百分吸光度值。以呋喃它酮代谢物标准品浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）的半对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品的浓度，则可从标准曲线上读出
20 呋喃它酮代谢物的残留量。

实施例6 样品中呋喃它酮代谢物残留的检测

1. 样品前处理（鸡蛋）

称取制备好的鸡蛋样本2 g，加入到50 ml离心管中，分别加入8 ml水，1 ml 1 M HCl，200 μl 0.36 M亚硝基铁氰化钠缓冲液，振荡混匀；
25 加入200 μl 1 M 硫酸锌缓，充分振荡5 min，室温（20~25 $^{\circ}\text{C}$ ）3000 g以上离心10 min；取全部上清液，加入200 μl 10 mM的2-硝基苯甲醛，充分振荡，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 h（中间每半个小时剧烈振荡1-2分钟）；分别加入5 ml 0.1 M K_2HPO_4 ，0.7 ml 1 M NaOH 4 ml乙酸乙酯，剧烈振荡30s，室温（20~25 $^{\circ}\text{C}$ ）3000 g以上离心10 min；取3 ml上层有机相

于50 °C下氮气吹干；1 ml正己烷溶解干燥物，加入2 ml稀释后的复溶液，振荡10 s，3000 g以上离心10 min；除去上层有机相；取下层水相50 µl用于分析。

2. 用试剂盒检测

- 5 向包被有呋喃它酮代谢物包被抗原的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液50 µl，再加入呋喃它酮代谢物单克隆抗体工作液50 µl，25 °C反应30 min。倒出孔中液体，每孔加入稀释后的洗涤液，30 s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100 µl酶标记抗抗体到每个微孔中，盖板膜盖板后置25 °C环境中反应
- 10 30 min。取出酶标板，将孔内液体甩干，加入稀释后的洗涤液250 µl到每个板孔中，洗板4~5次，每次间隔10秒，用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液A液过氧化脲50 µl，底物显色液B液四甲基联苯胺（TMB）50 µl，轻轻振荡混匀，25 °C恒温箱避光显色15~30 min。每孔加入终止液50 µl，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在450 nm
- 15 处，测定每孔吸光度值（OD值）。

3. 检测结果分析

- 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准品溶液（0标准）的吸光度值（B₀）再乘以100%，得到百分吸光度值。以呋喃它酮代谢物标准品浓度（µg/L）的半对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品的浓度，则可从标准曲线上读出呋喃它酮代谢物的残留量。
- 20

实验例1

- 25 标准品精密度试验：

分别从三个不同的时间段制备的酶标板中各抽出一批酶标板，每批各抽取10个试剂盒，每板各抽出20个微孔，测定0.9 µg/L标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

表1 标准可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01批	5.3	4.1	3.1	6.7	7.2	2.4	3.4	4.8	5.6	3.7
CV% 03批	5.4	4.2	3.1	6.2	7.5	2.5	4.2	2.1	3.5	4.7
09批	4.2	3.2	3.7	4.9	6.1	5.9	3.7	4.6	7.2	3.8

通过上述试验结果可以得出, 每批试剂盒各10次标准品变异系数在2.1~7.5%之间, 符合精密度小于或等于25%的规定。

实验例2

5 样本精密度和准确度试验

a. 样品精密度试验:

以1.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度的吠喃它酮代谢物对动物组织、牛奶、蜂蜜和鸡蛋, 添加到样品中, 分别取三个不同批次的试剂盒各五个, 每个浓度重复5次, 分别计算变异系数, 结果见表2~5。

10

表2 动物组织样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
	0.8	0.6	0.8	0.7	0.5	19.2
0604013	0.9	0.7	0.5	0.8	0.6	22.6
	0.5	0.8	0.7	0.6	0.8	19.2
	0.8	0.7	0.6	0.8	0.5	19.2
0607005	0.6	0.7	0.8	0.7	0.9	15.4
	0.8	0.7	0.6	0.8	0.6	14.3
	0.6	0.5	0.7	0.6	0.8	17.8
0609010	0.8	0.5	0.9	0.7	0.6	22.6
	0.5	0.8	0.6	0.7	0.7	17.3

表3 牛奶样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
	0.6	0.7	0.6	0.7	0.8	12.3
0604013	0.6	0.8	0.7	0.8	0.9	15.0
	0.8	0.7	0.6	0.8	0.5	19.2

	0.7	0.7	0.6	0.8	0.8	11.6
0607005	0.5	0.8	0.6	0.7	0.9	22.6
	0.8	0.7	0.5	0.9	0.7	20.6
	0.6	0.7	0.8	0.9	0.8	15.4
0609010	0.6	0.5	0.5	0.8	0.7	21
	0.8	0.7	0.6	0.8	0.9	15.3

表4 蜂蜜样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	0.9	0.7	0.7	0.8	0.9	12.5
0604013	1.0	0.8	0.8	0.8	0.9	13.6
	0.9	0.8	0.7	0.6	0.8	15
	0.5	0.8	0.8	0.9	0.7	20.5
0607005	0.6	0.8	0.6	0.8	0.7	14.3
	0.9	0.8	0.7	0.8	0.6	15.0
	0.8	0.7	0.8	0.6	0.8	12.1
0609010	0.8	0.9	1.0	0.7	0.9	13.3
	0.8	0.7	0.6	0.8	0.9	15.0

表5 鸡蛋样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	1.0	0.8	0.9	0.7	1.1	17.6
0604013	0.8	0.7	0.6	0.9	0.7	15.4
	0.6	0.8	0.5	0.9	0.7	22.6
	1.1	0.8	0.9	0.7	0.9	16.9
0607005	0.8	0.9	0.7	0.7	0.8	10.7
	0.8	0.9	0.7	0.8	0.7	10.7
	1.0	0.6	0.7	0.7	0.9	21.1
0609010	0.6	0.8	0.9	0.7	0.8	15.0
	0.9	0.8	0.7	0.6	0.8	15.0

结果表明，动物组织、牛奶、蜂蜜和鸡蛋样本变异系数均低于25%。

b. 样本准确度试验

取两个浓度的呋喃它酮代谢物标准品溶液分别为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L)和1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L)，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做4个平行，具体方法如实施例1中样品前处理步骤，分别计算准确度。

表6 试剂盒的准确度

样本	肌肉		鱼虾		牛奶		蜂蜜		鸡蛋		
	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)											
准确度%	1	85.2	83.4	79.5	89.4	92.3	95.4	86.2	78.5	91.5	88.1
	2	81.3	86.2	78.9	75.6	89.2	84.3	85.2	97.6	82.3	76.3
	3	71.3	82.3	84.6	92.3	95.4	78.6	85.2	86.2	76.3	79.4
	4	78.6	75.3	89.6	74.2	85.3	89.3	94.5	98.6	85.4	79.5
平均值%	79.1	81.8	83.2	82.9	90.6	86.9	87.8	90.0	83.9	80.8	

结果表明肌肉、鱼虾、牛奶、蜂蜜和鸡蛋样品添加准确度在71.3~98.6%之间。

10 实验例3

交叉反应率试验：

选择与呋喃它酮代谢物有类似结构和类似功能的3种药物测定交叉反应率。通各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应越大，那么此试剂盒对呋喃它酮代谢物的检测的特异性就越好。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \left(\frac{\text{引起50\%抑制呋喃它酮代谢物的浓度}}{\text{引起50\%抑制的类似物浓度}} \right) \times 100\%$$

表7 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
呋喃它酮代谢物	100

呋喃唑酮代谢物	<0.01
呋喃妥因代谢物	<0.01
硝基糠脞（呋喃西林）代谢物	<0.01

实验例4

试剂盒保存条件为 2~8 °C，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、呋喃它酮代谢物添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 37 °C 保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明该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 °C 冰箱冷冻 5 天，测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒在 2~8 °C 至少可以保存 6 个月以上。

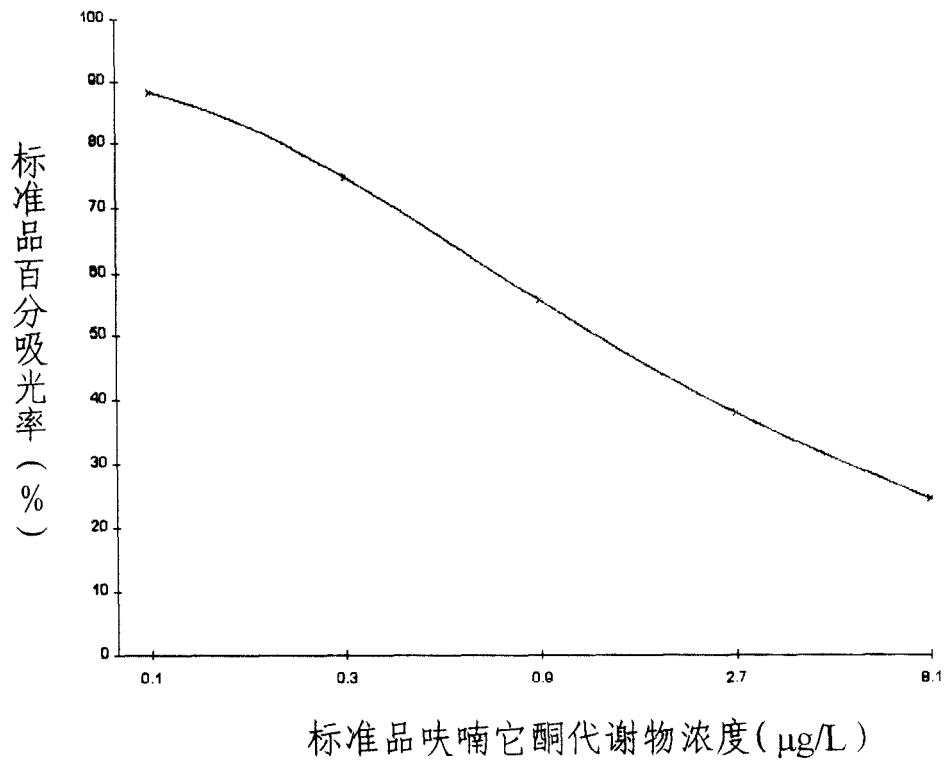


图 1

专利名称(译)	检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN101013130A	公开(公告)日	2007-08-08
申请号	CN200710063872.2	申请日	2007-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 冯才茂 吴小平 万宇平 冯才伟 汪善良 赵正苗 余厚美 刘玉梅 罗贵昆 刘平 陈炜琳 丁双阳 张素霞 江海洋		
发明人	沈建忠 何方洋 冯才茂 吴小平 万宇平 冯才伟 汪善良 赵正苗 余厚美 刘玉梅 罗贵昆 刘平 陈炜琳 丁双阳 张素霞 江海洋		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/566 G01N33/535		
代理人(译)	张庆敏		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明提供了一种检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶标板，酶标记物，呋喃它酮代谢物特异性抗体或呋喃它酮代谢物衍生物特异性抗体，呋喃它酮代谢物标准品或呋喃它酮代谢物衍生物标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还提供一种应用上述酶联免疫试剂盒检测呋喃它酮代谢物的方法，它包括步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的是检测动物源性食品如鸡肉、猪肉、鱼虾、牛奶、蜂蜜和鸡蛋等样品中呋喃它酮代谢物残留量的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

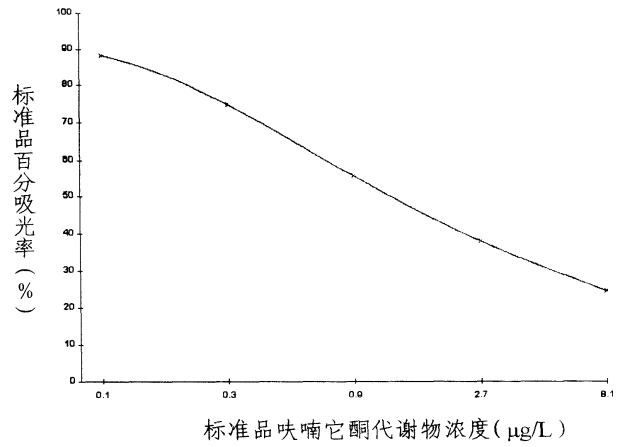


图 1