

[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 200710064347.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2007年8月22日

[11] 公开号 CN 101021536A

[22] 申请日 2007.3.12

[21] 申请号 200710064347.2

[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 何方洋 吴小平 冯才伟 万宇平

郭勇 赵正苗 冯才茂 朱亮

汪善良 刘平 陈炜琳 蒲小容

冯月君 余厚美 罗贵昆 屈晓丽

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 王朋飞

权利要求书2页 说明书16页 附图1页

[54] 发明名称

检测新霉素药物的酶联免疫试剂盒及方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测新霉素药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，新霉素特异性抗体，新霉素标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测新霉素的方法，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中如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、奶粉、鸡蛋和饲料等样品中新霉素的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、一种检测新霉素药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；
- (2) 酶标记物；
- (3) 新霉素特异性抗体工作液；
- (4) 新霉素标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标板中包被的包被原为新霉素与载体蛋白的偶联物、新霉素特异性抗体或抗抗体；新霉素与载体蛋白的偶联物是将新霉素与载体蛋白通过直接活化蛋白法偶联得到；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；新霉素特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体，是用新霉素偶联免疫抗原进行免疫得到的；抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体对无病原体羊进行免疫得到的，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的；所用包被缓冲液为 pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液，所用的封闭液为 5%胎牛血清的溶液。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标记物为酶标记抗抗体、酶标记新霉素抗原或酶标记特异性抗体；抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶；酶标记抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将抗抗体与标记酶偶联得到；酶标记新霉素抗原是将新霉素与标记酶采用混合酸酐法或碳化二亚氨法偶联得到的；酶标记特异性抗体是将新霉素特异性抗

体与标记酶通过戊二醛法或过碘酸钠法偶联得到。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：新霉素特异性抗体在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。

5、如任一权利要求 1-4 所述的试剂盒，其特征在于：当标记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 1~2mol/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 2mol/L 的氢氧化钠；浓缩洗涤液为 0.01M，pH7.4，含有 0.8~1.2%吐温 20 和 0.5%叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为 0.01~0.05mol/L、含有 1%甲醇的磷酸盐缓冲液。

6、如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于：制备新霉素抗体所需要的免疫抗原是采用混合酸酐法或直接活化蛋白法将新霉素与载体蛋白偶联得到。

7、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：新霉素标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L，0.5 μ g/L，1.5 μ g/L，4.5 μ g/L，13.5 μ g/L 和 40.5 μ g/L。

8、一种检测动物源性食品中新霉素药物残留的方法，包括步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用任一权利要求 1-7 所述的试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

检测新霉素药物的酶联免疫试剂盒及方法

技术领域

本发明涉及免疫学检测领域，具体地说，涉及一种检测动物源性食品中如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、奶粉、鸡蛋和饲料新霉素类药物的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

背景技术

新霉素抗菌谱广，对革兰氏阳性菌和结核杆菌均有良好的抑制作用。作为一种常用兽药在畜牧业生产中得到广泛使用。兽医临床上，新霉素主要用于治疗畜禽细菌性肠炎。在畜禽养殖上，可提高饲料利用率，促进动物生长，但因其毒性较大，在动物性食品中的残留可对消费者产生较大的潜在危害，对食品卫生和公共健康产生了威胁。

检测新霉素残留量的化学方法主要有薄层色谱法（TLC）、高效液相色谱法（HPLC）、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

（一）要解决的技术问题

本发明的目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于动物源性食品中新霉素药物的酶联免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

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提供了多种样本的回收方法，可用于多种样本的检测。

（二）技术方案

本发明的检测原理为：

当在酶标板微孔条上预包被新霉素偶联包被抗原时，加入样本溶液或标准

品溶液后，再加入新霉素特异性抗体溶液，样本中残留的新霉素药物或新霉素标准品与酶标板上包被的新霉素偶联抗原竞争新霉素特异性抗体，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新霉素药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中新霉素的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的新霉素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中新霉素残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被新霉素特异性抗体时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记新霉素抗原溶液，样本中残留的新霉素药物或新霉素标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的新霉素特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中的新霉素药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中新霉素的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的新霉素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中新霉素残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被新霉素偶联抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记新霉素特异性抗体溶液，样本中残留的新霉素药物或新霉素标准品与酶标板上包被的新霉素抗原竞争新霉素特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中的新霉素药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中新霉素的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的新霉素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中新霉素残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被抗抗体时，加入新霉素抗体孵育后，加入样本溶液或标准品溶液，再加入酶标记新霉素抗原溶液，样本中残留的新霉素药物或新霉素标准品与酶标记新霉素抗原竞争新霉素特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与新霉素药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中新霉素的残留含量。同时也可根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的新霉素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中新霉素残留量的浓度范围。

本发明提供了一种用于检测新霉素药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时或酶标板上包被的抗抗体，酶标记物为酶标记抗原）；
- (2) 酶标记物（为酶标记抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体）；

- (3) 新霉素特异性抗体（酶标板上包被抗原，酶标记物为酶标记抗抗体时或酶标板上包被的抗抗体，酶标记物为酶标记抗原）；
- (4) 新霉素标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液。

本发明所提供的检测新霉素的酶联免疫试剂盒，包括新霉素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，酶标记新霉素抗原或酶标记新霉素特异性抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

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，其中优选辣根过氧化物酶；酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠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，过碘酸钠法等，本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良，使其省时、降低辣根过氧化物酶（HRP）与抗抗体的浓度比率，节省了原材料。

所述新霉素特异性抗体可为新霉素单克隆抗体或新霉素多克隆抗体；它们均是用新霉素与载体蛋白采用直接活化蛋白法得到的偶联物作为免疫原得到的；所述新霉素多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述新霉素单克隆抗体优选为新霉素鼠单克隆抗体，所述新霉素多克隆抗体优选为新霉素兔多克隆抗体。

以上抗体均可以用新霉素与载体蛋白的偶联物作为免疫原按直接活化蛋白法制备。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；所述新霉素与载体蛋白的偶联物可通过将新霉素和载体蛋白用直接活化蛋白法进行偶联得到。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括新霉素标准品溶

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 20 和 0.5%叠氮化钠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，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 ~ 2mol/L 硫酸；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显示液为对硝基苯磷酸酯缓冲液，终止液为 2mol/L 氢氧化钠溶液。

所述浓缩复溶液为含 0.01 ~ 0.05mol/L、含有 1%甲醇的磷酸盐缓冲液。

其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为 pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；所用的封闭液含有 5%胎牛血清的溶液。

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 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，再 4 $^{\circ}$ 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 μ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h，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.新霉素抗体的制备

新霉素是小分子物质，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。

将新霉素与载体蛋白采用直接活化蛋白法进行偶联得到免疫原。

将新霉素与载体蛋白采用直接活化蛋白法进行偶联得到包被原。

2.新霉素鼠单克隆抗体的制备

动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以新霉素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。

3.新霉素兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以新霉素与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价得到多克隆抗体。

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。

本发明所述试剂盒中新霉素标准品溶液：标准品溶液 6 瓶， $0\mu\text{g/L}$ ， $0.5\mu\text{g/L}$ ， $1.5\mu\text{g/L}$ ， $4.5\mu\text{g/L}$ ， $13.5\mu\text{g/L}$ ， $40.5\mu\text{g/L}$ 和 3ml/瓶。

本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测新霉素药物的方法，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。

本发明提供新霉素在动物源性食品如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、奶粉、鸡蛋和饲料等样本中的处理方法。

称取去除脂肪的粉碎动物组织样本于离心管中，加入 PB 缓冲液上下混合后，置水浴中加热，室温离心，取上清液复溶，取样分析；将奶粉样本置于离心管中，加入 PB 和正己烷，离心后取下层液体复溶，取样分析；将鸡蛋样本打碎，用玻璃棒搅匀防止泡沫的产生；将饲料样本置于离心管中，加入 PBS_1 ，离心后复溶，取样分析。

本发明中用试剂盒检测是：当包被原为新霉素偶联抗原时，向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值；当包被原为新霉素偶联抗原时，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。

当包被原为新霉素特异性抗体时，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新霉素抗原，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，向酶标板微孔中加入新霉素抗体，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新霉素抗原，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（B₀）再乘以100%，即百分吸光度值。计算公式为：

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

以新霉素标准品溶液的浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）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样本中新霉素的残留量。

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小时可以完成，最低检测限为0.5 $\mu\text{g/L}$ 。

（三）有益效果

本发明检测新霉素的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中新霉素的残留量；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；采用高特异性的新霉素单克隆抗体，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。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利，检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。本发明的试剂盒将在新霉素的检测中发挥重要作用。本发明的方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测。

附图说明

图1：新霉素的检测标准曲线图。

具体实施方式

下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明，而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
 - a. 新霉素免疫抗原的合成

将新霉素与牛血清白蛋白采用直接活化蛋白法进行偶联得到免疫原。

免疫原的制备过程：取牛血清白蛋白 18mg 用 1ml 水溶解（I 液）；取 EDC20mg 用 0.5ml 水溶解后加入溶液（I 液）中，搅拌反应 30min；取硫酸新霉素 5mg 用 1.5ml 水溶解后加入溶液（II 液）中，搅拌反应过夜，得到免疫原。

b. 包被原新霉素偶联抗原的制备

将新霉素与甲状腺蛋白采用直接活化蛋白法进行偶联得到包被原。

包被原的制备过程：取 BCG 蛋白 18mg 用 1ml 水溶解（I 液）；取 EDC20mg 用 0.5ml 水溶解后加入溶液（I 液）中，搅拌反应 30min；取硫酸新霉素 5mg 用 1.5ml 水溶解后加入溶液（II 液）中，搅拌反应过夜，得到包被原。

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 μ g/只，使其产生多克隆抗体。

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 $^{\circ}$ C 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

将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4ml/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 $^{\circ}$ C 保存。

3. 多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以新霉素与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1.5mg/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。

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

用包被缓冲液将新霉素偶联抗原、抗体或抗抗体稀释成 0.1-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加入 100 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

6. 酶标记羊抗鼠抗抗体的置备

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体，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。

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 检测新霉素的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测新霉素的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

(1) 包被抗新霉素抗体的酶标板；

(2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；

(3) 新霉素单抗体工作液；

(4) 新霉素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、

4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L;

(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2mol/L盐酸;

(7) 浓缩洗涤液为0.01M, pH 7.4, 含有0.8~1.2%吐温20和0.5%叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液;

(8) 浓缩复溶液为0.01~0.05mol/L、含有1%甲醇的磷酸盐缓冲液。

实施例3 样品中新霉素残留的检测

1. 样品前处理

动物组织(鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝)

称取 2.0g 均质过的组织样本于 50ml 离心管中, 加入 6ml 0.1M PBS(PH=10~11)缓冲液,充分上下混合 10min, 放入 60℃水浴环境中 60min, 取出冷却至室温并摇匀, 6000g 以上, 室温离心 10min, 取上清液, 以 1: 9 的体积比进行稀释, 取 20 μ l 进行分析。

2. 用试剂盒检测

向包被有抗新霉素抗体的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液 20 μ l, 再加入酶标抗原 80 μ l, 25℃反应 30min。倒出孔中液体, 每孔加入稀释后的洗涤液, 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。每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲, 底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB), 各 50 μ l 轻轻振荡混匀, 25℃恒温箱避光显色 15~30min。每孔加入终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪波长设定在 450nm 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。以新霉素标准品浓度 (μ 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新霉素的残留量。

实施例4 样品中新霉素残留的检测

1. 样品前处理

鸡蛋样本

称取 $1\text{g}\pm 0.05\text{g}$ 匀质好的鸡蛋样本，加入 $8\text{ml} 0.1\text{M PBS}_1$ ($\text{pH} = 10$) 80°C 孵育30分钟， 3000g 以上离心，吸取上清液 $100\mu\text{l}$ 加入 $900\mu\text{l}$ 稀释后的复溶液，混合均匀，取 $50\mu\text{l}$ 用于分析。

2. 用试剂盒检测

向包被有抗新霉素抗体的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液 $20\mu\text{l}$ ，再加入酶标抗原 $80\mu\text{l}$ ， 25°C 反应30min。倒出孔中液体，每孔加入稀释后的洗涤液，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。每孔加入底物显色液A液过氧化脲，底物显色液B液四甲基联苯胺(TMB)，各 $50\mu\text{l}$ 轻轻振荡混匀， 25°C 恒温箱避光显色15~30min。每孔加入终止液 $50\mu\text{l}$ ，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在450nm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。以新霉素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)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新霉素的残留量。

实施例5 样品中庆大霉素残留的检测

1. 样品前处理

奶粉样本

称取 $1\text{g}\pm 0.05\text{g}$ 奶粉样本，加入 $4\text{ml} 0.02\text{M PB}$ ，加入 5ml 正己烷， 3000g 以上离心，吸取下层液体 $40\mu\text{l}$ 加入 $960\mu\text{l}$ 稀释后的复溶液，混合均匀，取 $50\mu\text{l}$ 用于分析。

2. 用试剂盒检测

向包被有抗新霉素抗体的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液 $20\mu\text{l}$ ，再加入酶标抗原 $80\mu\text{l}$ ， 25°C 反应30min。倒出孔中液体，每孔加入稀释后的洗涤液，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。

每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲，底物显色液 B 液四甲基联苯胺（TMB），各 50 μ l 轻轻振荡混匀，25 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15 ~ 30min。每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在 450nm 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。以新霉素标准品浓度（ μ 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新霉素的残留量。

实施例6 样品中庆大霉素残留的检测

1. 样品前处理

饲料样本

称取1g \pm 0.05g饲料样本，加入10ml 0.02M PBS₁充分振荡混匀，3000g以上离心5min，吸取100 μ l加入900 μ l稀释后的复溶液，混合均匀，取50 μ l用于分析。

2. 用试剂盒检测

向包被有抗新霉素抗体的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液 20 μ l，再加入酶标抗原 80 μ l，25 $^{\circ}$ C 反应 30min。倒出孔中液体，每孔加入稀释后的洗涤液，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。每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲，底物显色液 B 液四甲基联苯胺（TMB），各 50 μ l 轻轻振荡混匀，25 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15 ~ 30min。每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在 450nm 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。以新霉素标准品浓度（ μ 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新霉素的残留量。

实验例1

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4.5 $\mu\text{g/L}$ 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	10.5	4.6	8.7	15.9	16.3	14.2	5.9	9.8	7.2	8.1	
CV%	03批	9.6	6.5	12.5	16.8	12.3	15.7	11.3	5.9	8.2	10.3
	06批	12.3	15.8	14.2	10.9	14.7	6.5	7.8	13.4	11.5	12.8

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4.6%-16.8%之间, 符合精密度小于或等于25%的规定。

实验例2

样本精密度和准确度试验

a. 样品精密度试验:

以50 $\mu\text{g/L}$ 浓度的新霉素对动物组织、奶粉、鸡蛋和饲料, 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。

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%
	27.8	29.4	39.5	29.8	35.4	15.2
0508003	26.5	32.4	31.5	39.8	24.6	19.2
	25.8	27.3	35.6	38.4	42.9	21.5
	26.7	25.8	31.5	34.7	33.2	13
0508006	32.5	24.1	25.8	23.6	35.9	19.4
	28.8	25.8	38.1	33.2	31.7	14.7
	32.6	25.8	26.9	42.8	35.1	21.1
0509001	29.5	24.3	34.1	36.2	28.4	15.5
	25.6	24.8	26.8	36.8	37.1	20.5

表3 奶粉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)	变异系数
----	--------------------------	------

						CV%
	41.5	42.5	35.5	42.5	47.5	10.2
0508003	41.0	46.5	42.5	36.0	42.5	9.1
	39.5	42.0	44.5	44.5	32.5	12.3
	42.0	43.5	46.5	37	33.5	12.9
0508006	44.5	48.0	44.5	35.5	42.0	10.9
	40.5	37.5	37.0	43.0	46.0	9.3
	37.5	48.5	42.5	41	35.5	12.3
0509001	36.0	49.0	37.5	36.5	48.5	16.0
	40.5	46.5	48.5	42.5	39.0	9.2

表4 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%
	42.5	48.0	43.5	35.5	40.5	10.8
0508003	48.0	42.5	43.0	41.0	39.5	7.5
	37.5	37.0	47.0	35.5	42.0	11.8
	31.5	34.5	36.0	41.0	37.5	9.8
0508006	41.0	42.5	43.0	34.0	43.0	9.5
	44.0	46.5	36.0	49.0	46.0	11.2
	42.0	41.0	34.0	37.5	40.5	8.4
0509001	37.5	44.0	42.3	44.5	41.5	6.6
	38.0	39.5	48.5	41.0	37.0	11.2

表5 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数
						CV%
	36.5	44.5	32.5	44.0	41.5	13.0
0508003	41.0	36.0	48.0	41.5	47.0	11.5
	42.0	34.0	41.0	42.5	42.5	8.9
	41.0	34.5	37.5	37.0	43.5	9.2
0508006	47.5	41.0	42.0	35.5	41.0	10.3
	41.0	37.5	42.5	49.0	41.5	10.0
0509001	44.5	47.0	48.0	34.0	48.5	13.5

36.5	41.5	39.5	52.5	42.5	14.2
43.0	42.0	48.5	42.0	34.0	12.4

结果表明，动物组织、奶粉、鸡蛋和饲料样本中的变异系数均低于25%。

b. 样本准确度试验

取两个浓度的新霉素标准品溶液分别为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L)、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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		奶粉		鸡蛋		饲料	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50	20	50	20	50	20	50
准确度%	1	76.9	74.1	95.6	88.4	98.5	79.8	78.3	89.4	80.6	94.7
	2	85.3	78.9	84.2	79.8	74.3	64.2	78.9	75.2	75.6	85.2
	3	89.4	84.2	75.6	86.9	69.4	85.4	85.9	81.9	81.9	74.6
	4	95.1	86.3	81.6	84.5	78.4	86.9	93.2	83.7	83.6	95.4
平均值%		86.7	80.9	84.3	84.9	80.2	79.1	84.1	83.0	80.4	87.5

样本		肌肉		鱼虾		奶粉		鸡蛋		饲料	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50	20	50	20	50	20	50
准确度%	1	73.4	85.6	91.4	78.6	83.5	86.9	78.4	89.5	96.4	82.3
	2	85.3	82.1	75.6	92.3	94.5	86.3	95.3	94.2	85.2	75.6
	3	95.6	82.3	75.6	98.1	78.6	73.6	82.1	78.9	82.1	76.6
	4	81.3	88.5	89.3	94.6	75.2	78.6	75.9	74.3	85.2	74.9
平均值%		83.9	84.6	83.0	90.9	83.0	81.4	82.9	84.0	87.2	77.4

样本		肌肉		鱼虾		奶粉		鸡蛋		饲料	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50	20	50	20	50	20	50
准确度%	1	73.4	85.6	91.4	78.6	83.5	86.9	78.4	89.5	96.4	82.3
	2	85.3	82.1	75.6	92.3	94.5	86.3	95.3	94.2	85.2	75.6
	3	95.6	82.3	75.6	98.1	78.6	73.6	82.1	78.9	82.1	76.6
	4	81.3	88.5	89.3	94.6	75.2	78.6	75.9	74.3	85.2	74.9

平均值%	83.9	84.6	83.0	90.9	83.0	81.4	82.9	84.0	87.2	77.4	
样本	肌肉		鱼虾		奶粉		鸡蛋		饲料		
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20	50	20	50	20	50	20	50	20	50	
准确度%	1	73.4	85.6	91.4	78.6	83.5	86.9	78.4	89.5	96.4	82.3
	2	85.3	82.1	75.6	92.3	94.5	86.3	95.3	94.2	85.2	75.6
	3	95.6	82.3	75.6	98.1	78.6	73.6	82.1	78.9	82.1	76.6
	4	81.3	88.5	89.3	94.6	75.2	78.6	75.9	74.3	85.2	74.9
平均值%	83.9	84.6	83.0	90.9	83.0	81.4	82.9	84.0	87.2	77.4	

结果表明肌肉、鱼虾、奶粉、鸡蛋和饲料样品添加准确度在64.2%-98.5%之间。

实验例3

交叉反应率试验:

选择与新霉素有类似结构和类似功能的5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,那么此试剂盒对新霉素的检测的特异性就越好。

$$\text{交叉反应率}(\%) = (\text{引起50\%抑制新霉素的浓度} / \text{引起50\%抑制的类似物浓度}) \times 100\%$$

表7 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
新霉素	100
链霉素	<0.1
卡那霉素	<0.1
安普霉素	<0.1
庆大霉素	<0.7
托普霉素	<0.1

实验例4

试剂盒保存条件为2-8℃,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、新霉素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℃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℃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可以在 2-8℃至少可以保存 6 个月以上。

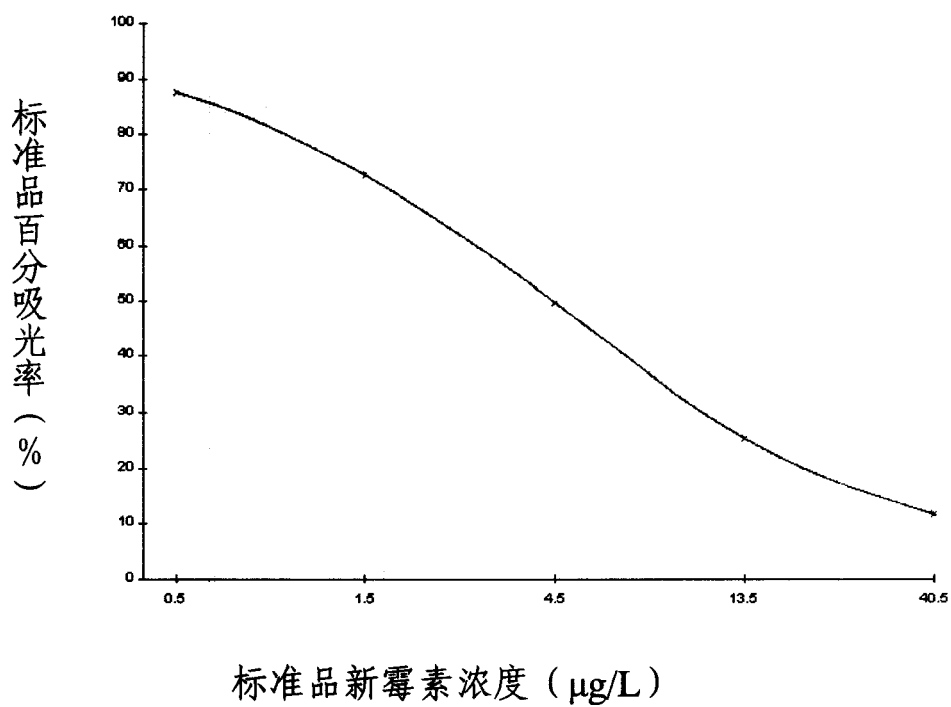


图 1

专利名称(译)	检测新霉素药物的酶联免疫试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN101021536A	公开(公告)日	2007-08-22
申请号	CN200710064347.2	申请日	2007-03-12
[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	何方洋 吴小平 冯才伟 万宇平 郭勇 赵正苗 冯才茂 朱亮 汪善良 刘平 陈炜琳 蒲小容 冯月君 余厚美 罗贵昆 屈晓丽		
发明人	何方洋 吴小平 冯才伟 万宇平 郭勇 赵正苗 冯才茂 朱亮 汪善良 刘平 陈炜琳 蒲小容 冯月君 余厚美 罗贵昆 屈晓丽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	王朋飞		
其他公开文献	CN101021536B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测新霉素药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，新霉素特异性抗体，新霉素标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测新霉素的方法，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中如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、奶粉、鸡蛋和饲料等样品中新霉素的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。

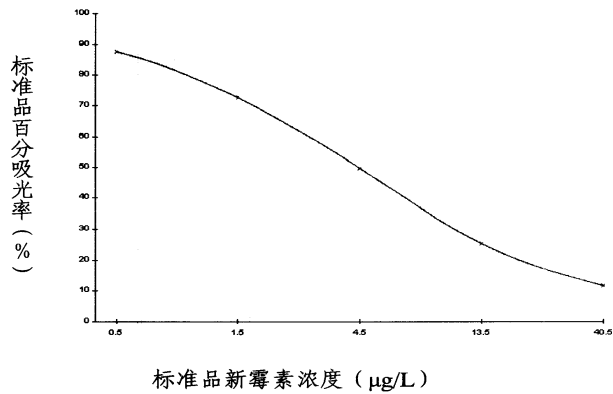


图 1