



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106610433 B

(45)授权公告日 2018.08.10

(21)申请号 201611112276.4

(22)申请日 2016.12.07

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106610433 A

(43)申请公布日 2017.05.03

(73)专利权人 北京勤邦生物技术有限公司  
地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信  
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 何方洋 万宇平 吴小胜 杨昌松  
刘莹 赵正苗 王佩月 龙光宗  
曹东山

(51)Int.Cl.  
G01N 33/577(2006.01)  
G01N 33/535(2006.01)  
G01N 21/31(2006.01)

(56)对比文件

CN 104745538 A,2015.07.01,  
US 6506885 B1,2003.01.14,  
CN 101105492 A,2008.01.16,  
Dapeng Peng et al.Development and  
Validation of an Indirect Competitive  
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the  
Screening of Tylosin and Tilmicosin in  
Muscle,Liver,Milk,Honey and Eggs.《Journal  
of Agricultural and Food Chemistry》.2011,  
第60卷第44-51页.

韩青 等.牛奶中替米考星间接竞争酶联免  
疫吸附检测法的建立.《中国畜牧兽医》.2015,第  
42卷(第10期),第2625-2630页.

审查员 刘迎鸣

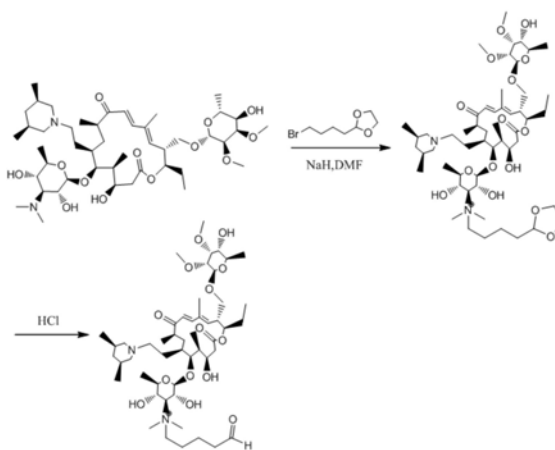
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

检测替米考星的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

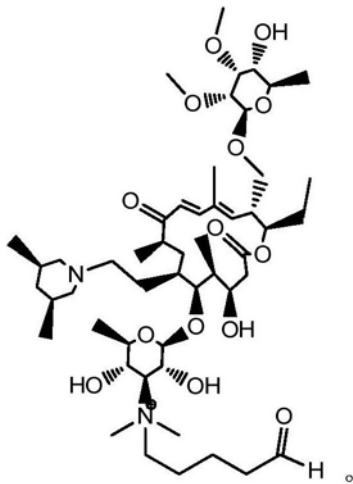
本发明提供了一种检测替米考星的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、替米考星特异性抗体、酶标记物、替米考星标准溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测替米考星的方法,主要包括:先进行样本前处理,再用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明的检测试剂盒可应用于动物组织、蜂蜜、鸡蛋和牛奶样本中替米考星的残留量的检测,其操作简便、快速、准确、灵敏度高、费用低廉等,适合大量样本的筛查和现场监控。



1. 一种替米考星酶联免疫检测试剂盒,其包括包被有替米考星药物抗原的酶标板、替米考星特异性抗体、酶标记物、替米考星标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液,其特征在于:所述酶标记物为酶标记抗体,所述替米考星特异性抗体是用替米考星药物抗原免疫动物得到的,所述替米考星药物抗原为替米考星半抗原与载体蛋白的偶联物,所述替米考星半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

(1) 取1.0g替米考星,加DMF溶解,加氢化钠0.138g,加2-(4-溴丁基)-1,3-二氧戊环0.72g,60℃搅拌5h,停止反应,冷却到室温,加水稀释,加适量稀盐酸调节pH值到7,1,2-二氯乙烷萃取,分去水相,水洗,无水硫酸钠干燥,使用体积比为5:1的正己烷/乙醚重结晶,得到中间产物缩醛替米考星0.95g,收率83.33%,

(2) 取0.95g中间产物缩醛替米考星加20ml乙醇溶解,加1mol/L稀盐酸10ml,50℃搅拌反应4h,停止反应,加碳酸氢钠水溶液,调节pH值到7,加乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,上硅胶柱,使用体积比为5:1的二氯甲烷/甲醇洗脱分离,得到戊醛替米考星半抗原产物0.8g,收率88.9%;所述替米考星半抗原的分子结构式为:



## 检测替米考星的酶联免疫试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测替米考星的酶联免疫试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 替米考星(Tilmicosin)属大环内酯类抗生素,其主要作用机理是干扰菌体蛋白质的合成,主要用于防治家畜肺炎(由胸膜肺炎放线杆菌、巴氏杆菌、支原体等感染引起)、禽支原体病及泌乳动物的乳腺炎,低剂量时亦可作猪的饲料添加剂以促进增重和提高饲料转换率。虽然该药物具有良好的药理作用,但在体内蓄积达到一定浓度,可引起过敏反应、耳蜗神经损害、听力减退,严重者造成肝肾的严重损害,同时导致携带耐药因子的菌株扩散。

[0003] 农业部第235号文件中规定,替米考星在肌肉、脂肪中的最高残留限量为75~100 $\mu$ g/kg;在肝脏、肾脏中的最高残留限量为250~1000 $\mu$ g/kg;在奶中的最高残留限量为50 $\mu$ g/L。

[0004] 目前替米考星的检测方法主要是仪器检测方法和免疫分析检测方法。高效液相色谱法,也是我国测定食品中替米考星的标准方法,但是由于仪器设备昂贵,技术水平要求较高,样品还需要进行纯化处理,不利于现场筛查。文献报道替米考星残留检测的免疫学方法相对较少,且主要集中在奶制品的检测。本发明应用酶联免疫法,测定动物组织、蜂蜜、鸡蛋、牛奶和水质中替米考星药物的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广等优点。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种替米考星酶联免疫试剂盒及其应用。

[0006] 一种替米考星酶联免疫检测试剂盒,其包括包被有包被原的酶标板、替米考星特异性抗体、酶标记物、替米考星标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液,所述包被原为替米考星药物抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。

[0007] 本发明所提供的替米考星酶联免疫试剂盒,所述替米考星药物抗原为替米考星半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0008] 所述替米考星特异性抗体为替米考星单克隆抗体,是用替米考星免疫原免疫动物得到的。所述替米考星单克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,所述替米考星单克隆抗体优选为替米考星鼠单克隆抗体。

[0009] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶,酶标记抗体是采用过碘酸钠法将标记酶与羊抗鼠抗体偶联得到。

[0010] 为了更方便的进行大量样本筛查和现场监控,所述试剂盒还包括:替米考星标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。

[0011] 所述标准品溶液为系列替米考星标准品溶液,1mL/瓶,浓度分别为0 $\mu$ g/L、0.5 $\mu$ g/L

L、1.5 $\mu$ g/L、4.5 $\mu$ g/L、13.5 $\mu$ g/L、40.5 $\mu$ g/L。所述底物液A液为过氧化脲溶液,底物液B液为四甲基联苯胺溶液,所述的终止液为1~2mol/L的硫酸溶液,所述浓缩洗涤液为含1%吐温-20的0.15~0.2mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液,所述的样本稀释液为pH为7.4的0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中吐温-20的含量为0.5%混合溶液配制而成的稀释液进行稀释。

[0012] 其中所述酶标板在制备过程中所用到的包被缓冲液为pH 9.6的0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为10%的小牛血清溶液。

[0013] 发明酶标板的制备主要为:用包被缓冲液将包被原稀释成0.2~0.3 $\mu$ g/ml,每孔加入100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C环境中避光孵育2h或4 $^{\circ}$ C过夜,倾去孔中液体,洗涤液洗涤1~2次,拍干,每孔中加入150 $\mu$ l封闭液,37 $^{\circ}$ C避光孵育2h,倾去孔中液体拍干,用铝膜真空密闭保存。

[0014] 本发明中包被原和免疫原的合成过程为:

[0015] 1. 半抗原合成(合成路线如图1)

[0016] (1) 取1.0g替米考星,加DMF溶解,加氢化钠0.138g,加2-(4-溴丁基)-1,3-二氧戊环0.72g,60 $^{\circ}$ C搅拌5h。停止反应,冷却到室温,加水稀释,加适量稀盐酸调节PH值到7,1,2-二氯乙烷萃取,分去水相,水洗,无水硫酸钠干燥,正己烷/乙醚(5/1,v/v)重结晶,得到中间产物缩醛替米考星0.95g,收率83.33%。

[0017] (2) 取0.95g中间产物缩醛替米考星加20ml乙醇溶解,加1mol/L稀盐酸10ml,50 $^{\circ}$ C搅拌反应4h。停止反应,加碳酸氢钠水溶液,调节PH值到7,加乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/甲醇(5/1,v/v),洗脱分离,得到戊醛替米考星半抗原产物0.8g,收率88.9%。

[0018] 2. 免疫原的合成

[0019] (1) 取戊醛-替米考星半抗原36mg,加乙醇0.4ml溶解,得到A液

[0020] (2) 取牛血清白蛋白(BSA)50mg,加6ml PH 9.6碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液溶解,将A液缓慢滴加到蛋白溶液中,室温下,避光搅拌6h。

[0021] (3) 将得到抗原溶液用0.02M PBS透析3天,每天换液3次,封装,得到免疫原。

[0022] 3. 包被原的合成

[0023] (1) 取16mg戊醛-替米考星半抗原,溶解于0.3ml乙醇,得到A液。

[0024] (2) 称取OVA50mg,使之充分溶解在5mlCB(PH 9.5)中,将A液逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌4h;

[0025] (3) 用0.02mol/l PBS4 $^{\circ}$ C透析3d,每天换3次透析液,得到包被抗原。

[0026] 4. 单克隆抗体的制备

[0027] 动物免疫:替米考星半抗原与载体蛋白偶联物免疫8-10周龄Balb/c小鼠。

[0028] 细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇(PEG)4000的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0029] 细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^9$ 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。

[0030] 本发明还提供了一种用替米考星酶联免疫试剂盒检测样本中替米考星残留的方法,采用本方法对动物组织、蜂蜜、鸡蛋、牛奶和水质样本中的替米考星进行定性或定量检测,样本前处理过程简单,能同时快速检测大批量样本,试剂盒具有很高的精确度和灵敏

度,较低的操作技术要求和短暂的检测时间,检测样本量大等特点,主要步骤包括:

- [0031] 1) 将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液;
- [0032] 2) 用酶联免疫试剂盒检测待测样本溶液;
- [0033] 3) 分析检测结果。

#### 附图说明

- [0034] 图1:替米考星半抗原合成图
- [0035] 图2:替米考星标准曲线

#### 具体实施方式

[0036] 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。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。

[0037] 实施例一:抗原、抗体及酶标记物的制备

[0038] 1. 替米考星半抗原的制备

[0039] (1) 取1.0g替米考星,加DMF溶解,加氢氧化钠0.138g,加2-(4-溴丁基)-1,3-二氧戊环0.72g,60℃搅拌5h。停止反应,冷却到室温,加水稀释,加适量稀盐酸调节PH值到7,1,2-二氯乙烷萃取,分去水相,水洗,无水硫酸钠干燥,正己烷/乙醚(5/1,v/v)重结晶,得到中间产物缩醛替米考星0.95g,收率83.33%。

[0040] (2) 取0.95g中间产物缩醛替米考星加20ml乙醇溶解,加1mol/L稀盐酸10ml,50℃搅拌反应4h。停止反应,加碳酸氢钠水溶液,调节PH值到7,加乙酸乙酯萃取,水洗,无水硫酸钠干燥,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/甲醇(5/1,v/v),洗脱分离,得到戊醛替米考星半抗原产物0.8g,收率88.9%。

[0041] 2. 免疫原的制备

[0042] (1) 取戊醛-替米考星半抗原36mg,加乙醇0.4ml溶解,得到A液

[0043] (2) 取牛血清白蛋白(BSA)50mg,加6ml PH 9.6碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液溶解,将A液缓慢滴加到蛋白溶液中,室温下,避光搅拌6h。

[0044] (3) 将得到抗原溶液用0.02M PBS透析3天,每天换液3次,封装,得到免疫原。

[0045] 3. 包被原的制备

[0046] (1) 取16mg戊醛-替米考星半抗原,溶解于0.3mL乙醇,得到A液。

[0047] (2) 称取OVA 50mg,使之充分溶解在5mL CB(PH 9.5)中,将A液逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌4h;

[0048] (3) 用0.02mol/l PBS 4℃透析3d,每天换3次透析液,得到包被抗原。

[0049] 4. 酶标板的制备

[0050] 所述酶标板在制备过程中所用到的包被缓冲液为pH9.6的0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为10%的小牛血清溶液。

[0051] 本发明酶标板的制备主要为:用包被缓冲液将包被原稀释成0.2~0.3μg/ml,每孔加入100μl,37℃环境中避光孵育2h或4℃过夜,倾去孔中液体,洗涤液洗涤1~2次,拍干,每孔中加入150μl封闭液,37℃避光孵育2h,倾去孔中液体拍干,用铝膜真空密闭保存。

[0052] 5. 羊抗鼠抗抗体的制备

[0053] 以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0054] 6. 酶标记羊抗鼠抗抗体(酶标记抗抗体)的制备

[0055] 将辣根过氧化物酶与抗抗体采用改良后的过碘酸钠法进行偶联,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;辣根过氧化物酶:抗抗体的摩尔浓度比率为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。

[0056] 7. 单克隆抗体的制备方法

[0057] 动物免疫:替米考星半抗原与载体蛋白偶联物免疫8-10周龄Balb/c小鼠。

[0058] 细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇(PEG) 4000的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0059] 经筛选得到替米考星单克隆杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株可以无限量的产生替米考星特异性抗体,该抗体特异性是针对替米考星的,灵敏度达到0.5 $\mu\text{g/L}$ 。

[0060] 细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^9$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0061] 实施例二:替米考星酶联免疫试剂盒各组分的组建

[0062] 组建替米考星酶联免疫试剂盒,包含下述各组分:

[0063] (1) 包被有包被原的酶标板。

[0064] (2) 酶标记抗抗体:辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体。

[0065] (3) 替米考星单克隆抗体工作液。

[0066] (4) 标准溶液:采用梯度稀释法配制标准品溶液,得到系列标准品6瓶,浓度分别为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 $\mu\text{g/L}$ ,以及高浓度标准品1mg/L,1mL/瓶。

[0067] (5) 底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺溶液。

[0068] (6) 终止液为1~2mol/L的硫酸溶液。

[0069] (7) 浓缩洗涤液为含1%吐温-20的0.15~0.2mol/LpH7.4磷酸盐缓冲液。

[0070] (8) 样本稀释液为pH为7.4的0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中吐温-20的含量为0.5%混合溶液配制而成的稀释液进行稀释。

[0071] 实施例三:检测样本中残留的替米考星

[0072] 1. 样本的前处理

[0073] (1) 组织(猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉、鱼、虾)前处理方法

[0074] 称取 $2.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质后的组织样本至50ml聚苯乙烯离心管中,分别加入2ml 0.1M (PH=10.6) CB(称取0.932g无水碳酸钠和0.1g碳酸氢钠加入100ml去离子水溶解混匀)和8ml乙酸乙酯,用涡动仪涡动3min,3000g室温(20-25 $^{\circ}\text{C}$ /68-77 $^{\circ}\text{F}$ )离心5min;取4ml上层有机相至10ml洁净干燥玻璃管中,于50-60 $^{\circ}\text{C}$ (122-140 $^{\circ}\text{F}$ )水浴氮气流下吹干;加入1ml正己烷,用涡旋仪涡动30s,再加入1ml样本稀释液,用涡旋仪涡动30s,3000g室温(20-25 $^{\circ}\text{C}$ /68-77 $^{\circ}\text{F}$ )离心5min;除去上层,取下层50 $\mu\text{l}$ 用于分析。

[0075] (2) 肝脏(鸡肝、猪肝)的前处理方法

[0076] 称取 $1.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质后的样本至50ml聚苯乙烯离心管中,分别加入2ml 0.5M (PH=10.6) CB(称取4.66g无水碳酸钠和0.5g碳酸氢钠加入100ml去离子水溶解混匀)和8ml乙

酸乙酯,用涡动仪涡动3min,3000g室温(20-25℃/68-77°F)离心5min;取2ml上层有机相至10ml洁净干燥玻璃管中,于50-60℃(122-140°F)水浴氮气流下吹干;加入1ml正己烷,用涡旋仪涡动30s,再加入1ml样本稀释液,用涡旋仪涡动30s,3000g室温(20-25℃/68-77°F)离心5min;除去上层,取100μl下层加400μl样本稀释液,用涡旋仪涡动30s,混匀;取50μl用于分析。

[0077] (3) 蜂蜜的前处理方法

[0078] 称取 $2.0 \pm 0.05$ g蜂蜜样本至50ml聚苯乙烯离心管中,分别加入2ml 0.1M(PH=10.6)CB,和8ml乙酸乙酯,用涡动仪涡动3min,3000g室温(20-25℃/68-77°F)离心5min;取2ml上层有机相至10ml洁净干燥玻璃管中,于50-60℃(122-140°F)水浴氮气流下吹干;加入1ml样本稀释液,用涡旋仪涡动30s,混匀;取50μl用于分析。

[0079] (4) 鸡蛋的前处理方法

[0080] 用均质器低速均质鸡蛋样本;取100μl均质后的鸡蛋样本加900μl鸡蛋稀释液(取样本稀释液与甲醇按19:1体积比混合),用涡旋仪涡动30s,混匀;取50μl用于分析。

[0081] (5) 牛奶的前处理方法

[0082] 取100μl鲜牛奶样本;加入900μl牛奶稀释液(取样本稀释液与甲醇按19:1体积比混合),用涡旋仪涡动30s,混匀;取50μl用于分析。

[0083] (6) 水质的前处理方法

[0084] 取100μl水质样本;加入900μl样本稀释液,混匀,取50μl用于分析。

[0085] 2. 检测方法

[0086] (1) 准备:使用之前将所有试剂和需用板条从冷藏环境中取出,使温度回升至室温(20-25℃),使用之后立即将所有试剂放回2-8℃。

[0087] (2) 加标准品/样本:加标准品/样本50μl到对应的微孔中。

[0088] (3) 抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合:将抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液按10:1体积比混合并混匀。(注:此混合液不能保存,混合均匀后立刻进行加样)

[0089] (4) 加抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合液:加抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合液50μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。

[0090] (5) 洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水将20×浓缩洗涤液按1:19体积比进行稀释)250μl/孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。

[0091] (6) 显色:加入底物液A液50μl/孔,再加底物液B液50μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中显色15min,加入终止液50μl/孔,轻轻振荡混匀。

[0092] (7) 测定:酶标仪测定每孔的吸光度值,设定酶标仪于450nm处(建议用双波长450/630nm检测,在5min内读完数据)。

[0093] 3. 检测结果分析

[0094] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0标准)的吸光度值,再乘以100%,即得到百分吸光率。以替米考星标准品百分吸光率为纵坐标,以替米考星标准品浓度(μg/L)的对数为横坐标,绘制标准曲线图(如图2)。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中替米考星实际浓度。

[0095] 实施例四：替米考星试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度、保存期实验

[0096] 1. 试剂盒灵敏度测定

[0097] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验, 试剂盒标准曲线最低点为 $0.5\mu\text{g/L}$ , 标准曲线的范围为 $0.5\mu\text{g/L}\sim 40.5\mu\text{g/L}$ , 在组织(猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉、鱼、虾)中替米考星检测限为 $0.5\mu\text{g/kg}$ , 肝脏(鸡肝、猪肝)中检测限为 $10\mu\text{g/kg}$ , 蜂蜜中检测限为 $1\mu\text{g/kg}$ , 鸡蛋、牛奶、水质中检测限为 $5\mu\text{g/L}$ 。

[0098] 2. 试剂盒准确度和精密度

[0099] 准确度是指测定值与真值间的符合程度, 试剂盒的准确度常用回收率表示; 精密度是反应测定方法对某一特定样本多次测定所得结果的重复程度, 常用变异系数表示。分别向空白猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉、鱼、虾、鸡肝、猪肝、蜂蜜、鸡蛋、牛奶、水质中添加替米考星至终浓度为 $2\mu\text{g/kg}$ ,  $2\mu\text{g/kg}$ ,  $2\mu\text{g/kg}$ ,  $2\mu\text{g/kg}$ ,  $2\mu\text{g/kg}$ ,  $2\mu\text{g/kg}$ ,  $20\mu\text{g/kg}$ ,  $20\mu\text{g/kg}$ ,  $2\mu\text{g/kg}$ ,  $10\mu\text{g/L}$ ,  $10\mu\text{g/L}$ ,  $10\mu\text{g/L}$ , 重复5次, 分别取三个批次的试剂盒计算变异系数, 结果见下表。

[0100] 表1试剂盒的准确度和精密度测定

[0101]

样本	猪肉			鸡肉			牛肉		
批次	1	2	3	1	2	3	1	2	3
测定结果 (μg/kg)	1.87	1.78	1.56	1.57	1.65	2.06	2.07	1.63	1.88
	1.95	1.54	1.65	1.94	1.82	1.65	1.7	1.85	1.79
	1.53	2.01	1.86	1.87	2.00	1.72	1.8	2.02	1.62
	1.98	1.94	1.93	1.68	1.56	1.86	1.65	1.59	1.96
	2.06	1.62	1.86	1.87	1.96	1.62	1.88	1.92	1.56
变异系数 cv%	11.0	11.3	8.9	8.7	10.6	10.2	9.1	10.3	9.6
样本	羊肉			鱼			虾		
批次	1	2	3	1	2	3	1	2	3
测定结果 (μg/kg)	1.73	1.96	1.88	1.63	2.03	1.85	1.65	1.65	2.04
	1.6	1.52	1.54	1.82	1.57	1.63	2.01	1.81	1.58
	1.56	1.58	1.82	1.95	1.70	2.02	1.84	1.94	1.71
	1.68	1.63	1.96	1.54	1.88	1.92	1.67	1.56	1.88
	1.89	1.45	2.01	2.00	1.60	1.59	1.86	1.99	1.63
变异系数 cv%	7.6	12.1	10.0	11.1	11.1	10.3	8.2	10.3	10.7
样本	鸡肝			猪肝			蜂蜜		
批次	1	2	3	1	2	3	1	2	3
测定结果 (μg/kg)	14.5	13.2	13.5	16.4	13.1	16.8	1.69	2.06	1.98
	16.4	15.6	12.9	13.2	12.8	12.9	2.03	2.03	1.68
	13.5	16.4	16.8	12.9	13.9	13.8	1.68	1.98	1.87
	16.8	15.8	13.8	15.9	16.5	16.2	1.98	1.68	2.08
	15.7	13.1	16.1	16.2	13.8	16.1	2.11	1.72	2.12
变异系数 cv%	8.9	10.5	11.8	11.5	10.4	10.2	10.5	9.5	9.1
样本	鸡蛋			牛奶			水质		
批次	1	2	3	1	2	3	1	2	3
测定结果 (μg/L)	10.8	9.68	9.26	9.56	9.62	10.12	9.79	9.28	9.65
	9.85	10.65	10.15	10.25	8.56	9.56	8.60	8.39	9.04
	8.95	10.23	9.23	9.89	9.23	8.46	8.72	10.13	8.08

[0102]

	8.02	8.75	8.06	7.89	10.15	7.99	10.75	8.62	9.60
	10.2	8.95	8.15	8.62	8.23	8.02	8.60	8.02	9.24
变异系数 cv%	11.4	8.4	9.7	10.5	8.5	10.9	10.3	9.3	7.0

[0103] 结果表明,向猪肉中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为76.5%~103.0%,向鸡肉中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为78.0%~103.0%,向牛肉中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为78.0%~103.5%,向羊肉中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为72.5%~100.5%,向鱼中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为77.0%~101.5%,向虾中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为78.0%~102.0%,向鸡肝中添加至终浓度为20 $\mu$ g/kg,回收率范围为64.5%~84.0%,向猪肝中添加至终浓度为20 $\mu$ g/kg,回收率范围为64.0%~84.0%,向蜂蜜中添加至终浓度为2 $\mu$ g/kg,回收率范围为84.0%~106.0%,向鸡蛋中添加至终浓度为10 $\mu$ g/L,回收率范围为80.2%~108.0%,向牛奶中添加至终浓度为10 $\mu$ g/L,回收率范围为78.9%~102.5%,向水质中添加至终浓度为10 $\mu$ g/L,回收率范围为80.2%~107.5%,批内批间变异系数小于20%,符合《农业部文件》农医发[2005]17号附件2试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度和准确度的规定。

[0104] 3. 交叉反应率试验

[0105] 选择如下所示的替米考星、泰乐菌素2种药物按照常规方法分别测定交叉反应率,结果如表2所示。

$$[0106] \quad \text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的替米考星的浓度}}{\text{引起 50\%抑制的替米考星类似物的浓度}} \times 100\%$$

[0107] 表2试剂盒的特异性

[0108]

药物名称	交叉反应率 (%)
替米考星	100
泰乐菌素	<0.1

[0109] 4. 保存期实验

[0110] 试剂盒保存条件为2-8 $^{\circ}$ C,经过12个月测定,试剂盒的最大吸光度值、IC50值、替米考星添加实际测定值均在正常范围之内。同时做加速老化和冷冻试验,将试剂盒放在37 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C中7天,测定结果也表明试剂盒的各项指标正常。从以上结果得到替米考星试剂盒可以在2-8 $^{\circ}$ C保存12个月。

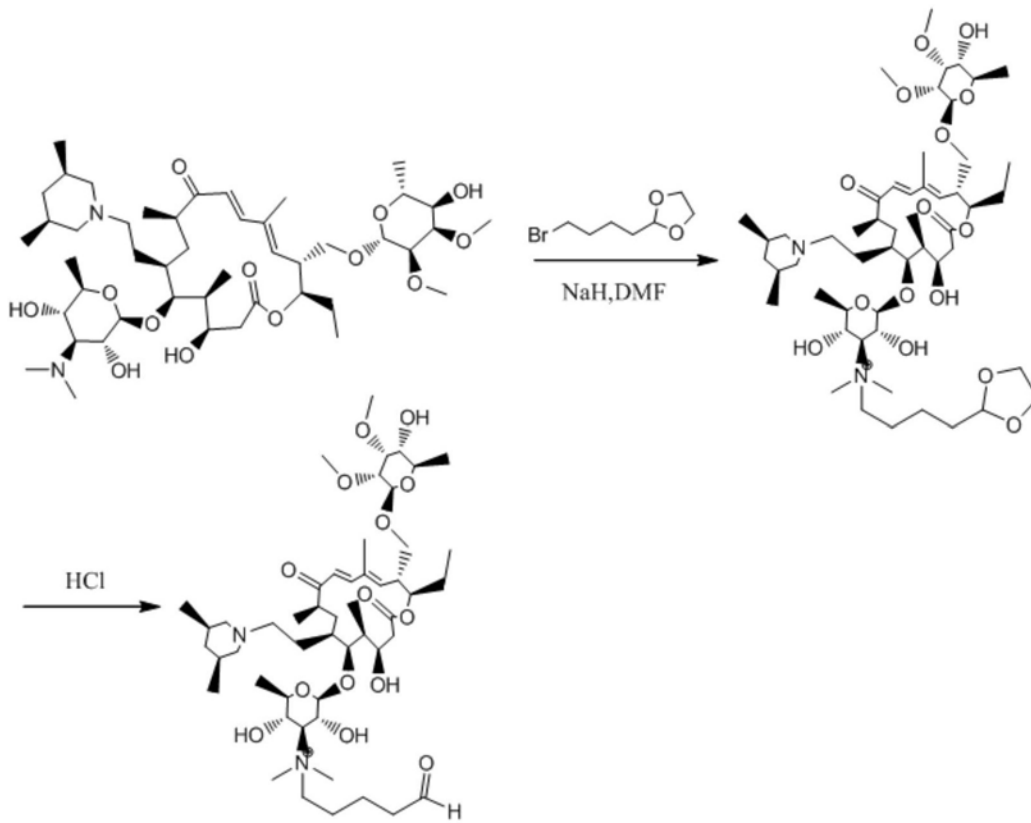


图1

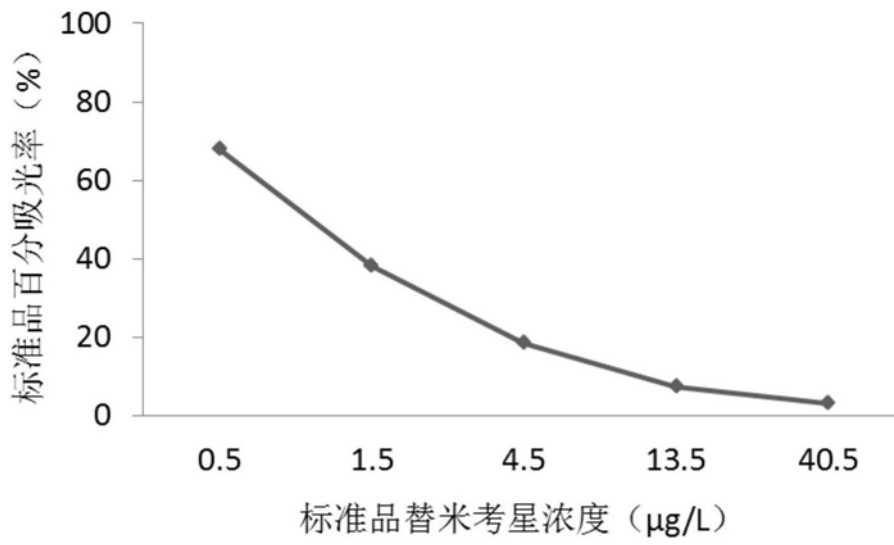


图2

专利名称(译)	检测替米考星的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106610433B</a>	公开(公告)日	2018-08-10
申请号	CN201611112276.4	申请日	2016-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 吴小胜 杨昌松 刘莹 赵正苗 王佩月 龙光宗 曹东山		
发明人	何方洋 万宇平 吴小胜 杨昌松 刘莹 赵正苗 王佩月 龙光宗 曹东山		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/535 G01N33/577 G01N2021/3129		
其他公开文献	CN106610433A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种检测替米考星的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、替米考星特异性抗体、酶标记物、替米考星标准溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测替米考星的方法，主要包括：先进行样本前处理，再用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明的检测试剂盒可应用于动物组织、蜂蜜、鸡蛋和牛奶样本中替米考星的残留量的检测，其操作简便、快速、准确、灵敏度高、费用低廉等，适合大量样本的筛查和现场监控。

