

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510086771.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766618A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086771.8

[71] 申请人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号  
中国农业大学西区动医学院国家兽药  
安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟  
吴小平 冯才茂 汪善良 李军  
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞  
丁双阳 罗晓琴 孙倩

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司  
代理人 向华

权利要求书2页 说明书18页 附图1页

## [54] 发明名称

检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒及其方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒，它包括：包被了青霉素 G 抗原或抗抗体的酶标板、酶标记物、青霉素 G 标准品溶液、底物显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液和抗体工作液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测青霉素 G 的方法，它包括以下步骤：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。本发明提供的检测青霉素 G 酶联免疫试剂盒能同时快速检测大量样品，检验方法方便易行、费用低廉，具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。

- 1、一种检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒，其特征在于它包括：  
    (1) 包被了青霉素 G 抗原的酶标板或包被了抗抗体的酶标板；  
    (2) 酶标记物；  
5      (3) 青霉素 G 标准品溶液；  
    (4) 底物显色液；  
    (5) 浓缩洗涤液；  
    (6) 终止液；  
    (7) 浓缩复溶液；  
10     (8) 抗体工作液。
- 2、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其中所述的包被有青霉素 G 抗原的酶标板在制备过程中，所用的包被原是采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯）将青霉素 G 半抗原与载体蛋白进行偶联得到的，载体蛋白可为卵清蛋白、兔血清白蛋白、鼠血清白蛋白；包被抗抗体的酶标板所用的抗抗体可为羊抗  
15 鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。
- 3、如权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其中所述的羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到。
- 4、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：当标记酶为辣根  
20 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 pH 7.4，0.01~0.05M，含有 0.8-1.2% 吐温 20 和 0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为 0.01-0.05M 含有  
25 1% 明胶的磷酸盐缓冲液。
- 5、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的青霉素 G 标准品溶液有 6 瓶，浓度分别为 0 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、2.7 $\mu$ g/L、

8.1 $\mu$ g/L。

6、如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的抗体工作液是浓度为0.5-5.0 $\mu$ g/L的青霉素G抗体。

7、如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的酶标记物为酶标记青霉素G抗原或酶标记抗抗体，酶标记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，酶标记青霉素G抗原是采用活性酯法或混合酸酐法将标记酶与青霉素G半抗原进行偶联得到。

8、如权利要求7所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶。

9、一种检测青霉素G残留的方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求1-8之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

10、如权利要求9所述的方法，其中当酶标板包被的是青霉素G抗原时，试剂盒检测方法为向酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液和抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后再加酶标抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值；当酶标板包被的是抗抗体时，试剂盒检测方法为向酶标板微孔中加入青霉素G抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后加入酶标抗原和系列标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

## 检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒及其方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测青霉素G的酶联免疫试剂盒及方法。

### 5 背景技术

青霉素 G (Benzyl penicillin, BPG) 是应用广泛的抗生素, 用于预防、治疗、诊断动物疾病或者有目的的调节动物生理机能, 合理使用可以有效控制动物疾病, 提高动物的成活率, 保证养殖业的健康发展。但动物摄入过量的青霉素 G 会导致在动物性食品中高残留。当人食用含青霉素 G 残留超标的食品后, 会引起过敏反应和产生耐药性。因此欧美等国家和我国已相继要求  
10 限量使用。

目前使用的检测分析法及检测操作繁琐且费用较高, 不适合现场监控和大量样本筛选, 使推广应用受到限制。

### 发明内容

#### 15 (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、便于携带的用于检测动物源性食品中青霉素 G 的酶联免疫试剂盒及方法。

#### (二) 技术方案

本发明为一种检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒, 其特征在于包括以下物  
20 质:

- (1) 包被了青霉素 G 抗原的酶标板或包被了抗抗体的酶标板;
- (2) 酶标记物;
- (3) 青霉素 G 标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- 25 (5) 浓缩洗涤液;
- (6) 终止液;
- (7) 浓缩复溶液;

(8) 抗体工作液。

本发明所述的酶联免疫试剂盒，其中包被了青霉素 G 抗原的酶标板在制备过程中，所用的包被原是采用活性酯法将青霉素 G 半抗原与载体蛋白进行偶联得到的，载体蛋白可为卵清蛋白、兔血清白蛋白、鼠血清白蛋白；包被  
5 抗抗体的酶标板所用的抗抗体可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

本发明所述的酶联免疫试剂盒，其中羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到。

本发明所述的酶联免疫试剂盒中，当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物  
10 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 pH 7.4, 0.01~0.05M, 含有 0.8-1.2% 吐温 20 和 0.1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为 0.01-0.05M 含有 1% 明胶的磷酸盐缓冲  
15 液。

本发明在浓缩洗涤液磷酸盐缓冲液中加入一定量的吐温 20 和叠氮化钠 (Na<sub>3</sub>N) 其作用在于：磷酸盐缓冲液中的吐温 20 能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，加入叠氮化钠后，叠氮化钠可以抑制细菌的生长，对溶液的稳定性起到保护作用。

20 本发明在浓缩复溶液磷酸盐缓冲液中加入一定量的明胶，其优点为：减少蛋白非特异性吸附，增加特异性抗体与酶标抗原的结合率，同时起到保护蛋白的作用。

本发明所述的酶联免疫试剂盒中，所述的青霉素 G 标准品溶液有 6 瓶，浓度分别为 0μg/L、0.1μg/L、0.3μg/L、0.9μg/L、2.7μg/L、8.1μg/L。

25 本发明所述的酶联免疫试剂盒中，抗体工作液是浓度为 0.5-5.0μg/L 的青霉素 G 抗体。

本发明所述的酶联免疫试剂盒中，酶标记物为酶标记青霉素 G 抗原或酶标记抗抗体，酶标记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，酶标记青霉素 G 抗原是采用活性酯法或混合酸酐法将标记酶与青霉素 G 半抗原进行偶联得到。

本发明所述的酶联免疫试剂盒中，标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

- 5 本发明还提供一种检测青霉素 G 残留的方法，其特征在于包括以下步骤：
- (1) 样品前处理；
  - (2) 用试剂盒进行检测；
  - (3) 分析检测结果。

其中当酶标板包被的是青霉素 G 抗原时，其试剂盒检测方法为向酶标板  
10 微孔中加入标准品溶液或样品溶液和抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后加酶标抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值；当酶标板包被的是抗抗体时，其试剂盒检测方法为向酶标板微孔中加入青霉素 G 抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后加入酶标抗原和系列标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

15 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 ( $B_0$ ) 再乘以 100%，即百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值， $B_0$  为  $0\mu\text{g/L}$  标准溶液的平均吸光度值。以青霉素 G 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。相对应每一个样品中青霉素 G 的浓度可以从标准曲线上读出。  
20 检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品中青霉素 G 的浓度。

本发明所述试剂盒中的免疫原、包被原制备如下：

半抗原：将青霉素 G 和 2-氨基乙酸合成青霉素 G 半抗原。

免疫原：将青霉素 G 半抗原和人血清白蛋白 (HSA)、牛血清白蛋白  
25 (BSA)、血蓝蛋白 (KLH) 等载体蛋白，分别采用活性酯法 (DCC、NHS) 进行偶联得到。

酶标板微孔包被的青霉素 G 抗原是将青霉素 G 半抗原和卵清蛋白 (OVA)、兔血清白蛋白 (RSA) 或鼠血清白蛋白 (MSA) 等载体蛋白，采用

活性酯法（DCC、NHS）或混合酸酐法偶联得到；酶标板微孔包被的抗抗体是以鼠源抗体或兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

本发明所述试剂盒的抗体制备过程如下：

5 a. 青霉素G单克隆抗体的制备

1、动物免疫 以青霉素 G 半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原对 Balb/c 小鼠进行免疫，免疫剂量为 80-100  $\mu$ g/只，使其产生多克隆抗体。

2、细胞融合和克隆化 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5-10: 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。

10 3、细胞冻存和复苏 将杂交瘤细胞用冻存液制成  $1-5 \times 10^6$  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。

4、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 0.4-0.7mL/只，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞  $5 \times 10^5-10^6$  个/只，7-10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，-20℃ 保存。

15 b. 青霉素 G 兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以青霉素 G 半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1mg/kg，首次免疫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 7-10 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。

c. 抗抗体的制备

25 以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到羊抗鼠抗抗体，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。

酶标板有两种，一种是包被青霉素 G 半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板，另一种是包被抗抗体的酶标板，其制备方法如下：

a. 包被青霉素 G 半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板制备方法

用包被缓冲液将青霉素 G 半抗原与载体蛋白偶联物稀释成 0.1-1 $\mu$ g/mL，每孔加入 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 并 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150-200 $\mu$ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

5        b. 包被抗抗体的酶标板制备方法

用包被缓冲液将抗抗体稀释成 0.1-1 $\mu$ g/mL，每孔加入 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 并 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150-200 $\mu$ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

10        酶标抗原或酶标抗抗体的制备：其中所述的标记酶可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；酶标记青霉素 G 抗原是采用活性酯法或混合酸酐法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与青霉素 G 半抗原偶联得到；酶标记抗抗体可采用戊二醛法或过碘酸钠法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与抗抗体进行偶联得到。其中细菌提  
15 取碱性磷酸酯酶标记抗抗体时，是将抗抗体与细菌提取碱性磷酸酯酶进行偶联，采用的方法优选戊二醛法，用细菌提取碱性磷酸酯酶以 2: 1 的比例与抗抗体偶联时，约有 60% ~ 70% 的酶与 8% 的抗抗体偶联。

过碘酸钠法标记抗抗体的原理：传统的过碘酸钠法中需采用二硝基氟苯封闭辣根过氧化物酶(HRP)上残留的  $\alpha$ -和  $\epsilon$ -氨基以避免酶分子之间的交联。  
20 本发明改用在低 pH 值下使 NaIO<sub>4</sub> 氧化辣根过氧化物酶 (HRP)，从而省去了二硝基氟苯封闭辣根过氧化物酶步骤。辣根过氧化物酶经 NaIO<sub>4</sub> 氧化后形成的醛化酶可与抗体分子的氨基相连，形成斯夫氏硷，后者可进一步用 NaBH<sub>4</sub> (或乙醇胺) 还原生成稳定的酶标记抗体。

用改良的过碘酸钠法优点在于：(1) 省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身连接的氨基实际很少；(2) 降低酶/抗体的摩尔浓度比至 2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶活性的损失也减少。

本发明的检测原理为：本试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附分析 96 (ELISA) 方法，当微孔条上预包被偶联抗原时，样本中残留的青霉素 G 将

和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗青霉素 G 抗体，加入酶标抗抗体进行酶活性放大作用后，底物显色；当微孔条上预包被抗抗体时，加入青霉素 G 抗体后，再加入酶标记青霉素 G 抗原和标准品或样本溶液，标准品或样本中残留的青霉素 G 将和青霉素 G 酶标记物竞争抗青霉素 G 抗体，底物显色；样本吸光值与其所含残留物青霉素 G 的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出

5 相应残留物青霉素 G 的含量。也可以用回归方程法，计算出样本溶液浓度。

本发明中样品前处理方法：

### 1、动物组织（肌肉、肝脏等）

用均质器均质组织样品，称 2g 均质后的样品于离心管中，加入 8mL 乙腈-0.1M NaOH (V/V=84:16)，涡旋 2min，振荡 20min。室温 3000g~8000g 离心 10min。取出 1mL 上层液体在氮气流下 50~60℃干燥，加入 1mL 正己烷溶解干燥的残留物，再加 1mL 稀释后的复溶液充分混匀，室温 3000g 以上离心 5min。去除上层正己烷相，下层水相按 1:5 稀释，取 50 μL 进行分析。

10

### 2、蜂蜜

准确称取 4±0.1g 蜂蜜样本于离心管中。加入 0.5mL 1M NaOH，震荡，静止 20min。加入 0.5mL 1M HCL，震荡。调节 pH 在 3 左右，加入 8mL 酸化乙腈，充分震荡 10min，室温 3000rpm 以上离心 10min。取上层液体 3mL 于 60℃下氮气吹干。加 1mL 稀释后的复溶液溶解干燥残留物，取 50μL 进行分析。

15

### 3、牛奶

方法 a: 取 2mL 鲜牛奶于 5mL 离心管加入 50μL 0.36M 亚硝基铁氰化钠 ( $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5 \cdot \text{NO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 短暂振荡后再加入 50 μL 1M 硫酸锌 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 振荡 1min，10℃ 3000~10000g 离心 10min，取 50μL 中间层按 1:19 稀释后取 50μL 进行分析。

20

方法 b: 取 2mL 去除脂肪奶样至离心管中，加入 8mL 乙腈-NaOH 充分振荡 10min，15℃ 3000g 以上离心 10min，取 1mL 上层液在 60℃氮气流下完全干燥，用 1mL 正己烷溶解干燥的残留物。再加入 1mL 0.1M 复溶液反萃取混合 1min，离心去除正己烷相，取 50 μL 下层相按 1:4 稀释后进行分析。

25

(三) 有益效果

本发明的检测青霉素 G 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动物组织（肌肉、肝脏等）、蜂蜜、牛奶等样品中青霉素 G 的残留量。

5 使用本发明的试剂盒进行检测，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；采用特异性高的青霉素 G 抗体工作液，主要试剂以工作液形式提供，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。

### 附图说明

图 1 青霉素 G 检测标准曲线图。

### 10 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、抗原制备

- 15 a. 半抗原：将青霉素 G 和 2-氨基乙酸合成青霉素 G 半抗原。  
b. 免疫原：将青霉素 G 半抗原和血蓝蛋白（KLH）采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯）进行偶联得到免疫原。

取青霉素 G 半抗原 2 g 溶于 30ml，50% 的 N,N'-二甲基甲酰胺溶液中，再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中加到半抗原溶液中室温搅拌  
20 反应 4 小时，取血蓝蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将血蓝蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。将反应完的人工抗原对 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、冻干保存。

c. 包被原：将青霉素 G 半抗原和兔血清白蛋白（RSA）载体蛋白采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯）进行偶联得到包被原。

##### 25 2、抗体制备

a. 动物免疫 将免疫原青霉素 G 半抗原和血蓝蛋白注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 80μg/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  $1 \times 10^6$  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  $37^\circ\text{C}$  水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

5 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  $5 \times 10^5$  个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化， $-20^\circ\text{C}$  保存。

抗抗体的制备 以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到羊抗鼠抗抗体。

10 酶标抗抗体的制备 羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶采用过碘酸钠法进行偶联，得到辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体。

酶标抗抗体的制备步骤：

- (1) 称取 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶解于 1ml 蒸馏水中。
- (2) 加入 0.2ml 新配的 0.1M  $\text{NaIO}_4$  溶液，室温下避光搅拌 20 分钟。
- 15 (3) 溶液装入透析袋，对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析， $4^\circ\text{C}$  过夜。
- (4) 加 20 $\mu\text{l}$  0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液，使 pH 升高到 9.0，然后立即加入 10mg 鼠 IgG 抗体，在 1ml 0.01M 碳酸盐缓冲液中，室温避光轻轻搅拌 2 小时。
- (5) 加 0.1ml 新配的 4mg / ml  $\text{NaBH}_4$  液，混匀，再置  $4^\circ\text{C}$  2 小时。
- (6) 溶液装入透析袋，对 0.15M pH 7.4 磷酸盐缓冲液透析， $4^\circ\text{C}$  过夜。
- 20 (7) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置  $4^\circ\text{C}$  1h。
- (8) 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 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中。
- (9) 溶液装入透析袋中，对 0.15M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析，去除铵离子后(用茌氏试剂检测)，10 000rpm 离心 30 分钟去除沉淀，上清液即为酶结合
- 25 物，分装后，冰冻保存。

### 3、酶标板的制备

用包被缓冲液 (pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液) 将青霉素 G 与血蓝蛋白偶联物稀释成  $1\mu\text{g/mL}$ ，每孔加入 100 $\mu\text{L}$ ， $37^\circ\text{C}$  温育 2h 并  $4^\circ\text{C}$  过夜，倾去

包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 200 $\mu$ L 封闭液（pH7.4，0.01mol/L 磷酸二氢钠含有 20% 新生牛血清，0.05% 吐温 20 的溶液），37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

## 5 实施例2 试剂盒组分的制备

### 1、包被原和抗体的制备

(1) 包被原的制备：以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到羊抗鼠抗抗体。

### (2) 抗体制备

10 a. 动物免疫 将免疫原青霉素 G 半抗原和血蓝蛋白注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 80 $\mu$ 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。

15 c. 细胞冻存和复苏 将杂交瘤细胞用冻存液制成  $1 \times 10^6$  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  $5 \times 10^5$  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。

20 (3) 酶标抗原：将青霉素 G 半抗原和辣根过氧化物酶(HRP)采用活性酯法进行偶联，得到辣根过氧化物酶标记的青霉素 G。

酶标抗原的制备：取青霉素 G 半抗原 2g 溶于 20ml,0.5M 的氢氧化钠溶液中，再取 2g 羧琥珀酰亚胺 (NHS) 活性酯溶于 8ml 纯水中加到半抗原溶液中室温搅拌反应 2.5 小时，取辣根过氧化物酶 22g 溶于 75ml pH9 碳酸盐缓冲液  
25 中，将半抗原对 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3 次，最后得到酶标抗原。

### 2、酶标板的制备

用包被缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释成 1 $\mu$ g/mL，每孔加入 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 温

育 2h 并 4℃ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150-200 $\mu$ L 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。

### 5 实施例 3 检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测青霉素G的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被了青霉素 G 半抗原与血蓝蛋白偶联的酶标板；
- (2) 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体；
- (3) 青霉素 G 标准品溶液，浓度分别为 0 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、  
10 2.7 $\mu$ g/L、8.1 $\mu$ g/L；
- (4) 底物显色液由 A 液和 B 液组成，显色液 A 液为过氧化氢，显色液 B 液为邻苯二胺；
- (5) 浓缩洗涤液为含 0.01M，pH 7.4，含有 0.8% 吐温 20 和 0.1% 叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) 的磷酸盐缓冲液。
- 15 (6) 终止液为 2mol/L 硫酸；
- (7) 浓缩复溶液为 0.01M 含有 1% 明胶的磷酸盐缓冲液。
- (8) 青霉素G鼠单克隆抗体工作液浓度为0.5 $\mu$ g/L。

### 实施例 4 检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒的组建

20 组建检测青霉素G的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被了青霉素 G 与血蓝蛋白偶联物的酶标板；
- (2) 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗抗体；
- (3) 青霉素 G 标准品溶液，浓度分别为 0 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、  
2.7 $\mu$ g/L、8.1 $\mu$ g/L；
- 25 (4) 显色液由 A 液和 B 液组成，显色液 A 液为过氧化脲，显色液 B 液为四甲基联苯胺；
- (5) 浓缩洗涤液为 pH 7.4、0.05M、含有 1.2% 吐温 80 和 0.1% 叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) 的磷酸盐缓冲液；

- (6) 终止液为 2mol/L 盐酸;
- (7) 浓缩复溶液为 0.05M 含有 1% 明胶的磷酸盐缓冲液;
- (8) 青霉素G兔多克隆抗体工作液浓度为5.0 $\mu$ g/L。

#### 5 实施例 5 检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测青霉素G的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被了青霉素 G 羊抗鼠抗抗体的酶标板;
- (2) 辣根过氧化物酶标记青霉素 G 抗原;
- (3) 青霉素 G 标准品溶液，浓度分别为 0 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、  
10 2.7 $\mu$ g/L、8.1 $\mu$ g/L;
- (4) 底物显色液由 A 液和 B 液组成，显色液 A 液为过氧化氢，显色液 B 液为邻苯二胺;
- (5) 浓缩洗涤液为含 0.02M，pH 7.4，含有 0.8% 吐温 20 和 0.1% 叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) 的磷酸盐缓冲液;
- 15 (6) 终止液为 1mol/L 硫酸;
- (7) 浓缩复溶液为 0.05M 含有 1% 明胶的磷酸盐缓冲液;
- (8) 青霉素G单克隆抗体工作液浓度为0.5 $\mu$ g/L。

#### 实施例 6 检测青霉素 G 的酶联免疫试剂盒的组建

20 组建检测青霉素G的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被了青霉素 G 羊抗兔抗抗体的酶标板;
- (2) 碱性磷酸酯酶标记青霉素 G;
- (3) 青霉素 G 标准品溶液，浓度分别为 0 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、  
2.7 $\mu$ g/L、8.1 $\mu$ g/L;
- 25 (4) 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液;
- (5) 浓缩洗涤液为含 0.05M，pH 7.4，含有 1.2% 吐温 20 和 0.1% 叠氮化钠 (Na<sub>3</sub>N) 的磷酸盐缓冲液;
- (6) 终止液为 2mol/L NaOH 缓冲液;

(7) 浓缩复溶液为 0.05M 含有 1% 明胶的磷酸盐缓冲液;

(8) 青霉素G兔多克隆抗体工作液浓度为 5.0 $\mu\text{g/L}$ 。

### 实施例7 检测鸡肉中青霉素G

5 (1) 样品前处理: 用均质器均质鸡肉, 称 2g 均质后的鸡肉于离心管中, 加入 8mL 乙腈-0.1M NaOH( V/V =84:16), 涡旋 2min, 振荡 20min。室温 3000g 离心 10min。取出 1mL 上层液体在氮气流下 50 $^{\circ}\text{C}$  干燥, 加入 1mL 正己烷溶解干燥的残留物, 再加 1mL 稀释后的复溶液充分混匀, 室温 3000g 离心 5min。去除上层正己烷相, 下层水相按 1:5 (50 $\mu\text{L}$ +200 $\mu\text{L}$  稀释后的复溶液) 稀释, 10 取 50  $\mu\text{L}$  进行分析。

(2) 用试剂盒检测

向包被羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入青霉素 G 单克隆抗体 100 $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴或恒温箱反应 30min。取出按每孔 250 $\mu\text{L}$  洗涤液洗板 5 次, 每次浸泡 10 秒, 拍干。再加入辣根过氧化物酶标记的青霉素 G 工作液和系列标准 15 品或样品溶液各 50  $\mu\text{L}$ /孔, 用盖板膜盖板, 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴或恒温箱反应 30min。取出按每孔 250 $\mu\text{L}$  洗涤液洗板 5 次, 每次浸泡 10 秒, 拍干。然后每孔加入底物显色 A 液 50 $\mu\text{L}$ , 再加 B 液 50 $\mu\text{L}$ , 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴或恒温箱避光显色 15min。加入终止液 50 $\mu\text{L}$ , 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处, 测定吸光度值 (OD 值)。

20 (3) 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 ( $B_0$ ) 再乘以 100%, 即百分吸光度值。

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

25 公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,  $B_0$  为 0 $\mu\text{g/L}$  标准溶液的平均吸光度值。以青霉素 G 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, 如图 1 所示。相对应每一个样品中青霉素 G 的浓度可以从标准曲线上读出。

**实施例 8 检测蜂蜜中的青霉素 G**

蜂蜜前处理方法：准确称取 4g 蜂蜜样本于离心管中。加入 0.5mL 1M NaOH 震荡，静止 20min；加入 0.5mL 1M HCL，震荡。调节 PH 到 3，加入 8mL 酸化乙腈（PH4.0），充分震荡 10min，室温 3000rpm 离心 10min。取上层液体 3mL 于 60℃ 下氮气吹干。加 1mL 稀释后的复溶液溶解干燥残留物，取 50μL 进行分析。

用试剂盒检测及结果分析同实施例 7。

**实施例 9 检测牛奶中的青霉素 G**

前处理方法：取 2mL 鲜牛奶于 5mL 离心管加入 50μL 0.36M 亚硝基铁氰化钠（ $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5 \cdot \text{NO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）短暂振荡后再加入 50 μL 1M 硫酸锌（ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）振荡 1min，10℃ 3000g 离心 10min，取 50μL 中间层按 1:19 稀释后取 50μL 进行分析。

用试剂盒检测及结果分析同实施例 7。

**实施例 10 检测牛奶中青霉素 G**

前处理方法：取 2mL 去除脂肪奶样至离心管中，加入 8mL 乙腈-NaOH 充分振荡 10min，15℃ 3000g 以上离心 10min，取 1mL 上层液在 60℃ 氮气流下完全干燥，用 1mL 正己烷溶解干燥的残留物。再加入 1mL 0.1M 浓缩复溶液反萃取混合 1min，离心去除正己烷相，取 50 μL 下层相按 1:4 稀释后进行分析。

用试剂盒检测及结果分析同实施例 7。

**实施例 11 检测鸡肉中青霉素 G**

（1）样品前处理：用均质器均质鸡肉，称 2g 均质后的鸡肉于离心管中，加入 8mL 乙腈-0.1M NaOH（V/V =84:16），涡旋 2min，振荡 20min。室温 3000g 离心 10min。取出 1mL 上层液体在氮气流下 50℃ 干燥，加入 1mL 正己烷溶解干燥的残留物，再加 1mL 稀释后的复溶液充分混匀，室温 3000g 离心 5min。

去除上层正己烷相，下层水相按 1:5 (50 $\mu$ L+200 $\mu$ L 稀释后的复溶液) 稀释，取 50  $\mu$ L 进行分析。

### (2) 用试剂盒检测

向包被青霉素 G 半抗原与血蓝蛋白偶联物的酶标板微孔中加入系列标准品溶液或样品溶液 50 $\mu$ L，同时加入青霉素 G 鼠单克隆抗体工作液 50  $\mu$ L，用盖板膜盖板，37 $^{\circ}$ C 水浴或恒温箱反应 30min。取出按每孔 250 $\mu$ L 洗涤液洗板 5 次，每次浸泡 10s，拍干。再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 50 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 水浴或恒温箱反应 30min。取出按每孔 250 $\mu$ L 洗涤液洗板 4 次，每次浸泡 10 秒，拍干。然后每孔加入底物显色 A 液 50 $\mu$ L，再加 B 液 50 $\mu$ L，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴或恒温箱避光显色 15min。加入终止液 50 $\mu$ L，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm 处，测定吸光度值 (OD 值)。

### (3) 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 ( $B_0$ ) 再乘以 100%，即百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值， $B_0$  为 0 $\mu$ g/L 标准溶液的平均吸光度值。以青霉素 G 浓度的半对数值为 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青霉素 G 的浓度可以从标准曲线上读出。

20

## 实施例 12 检测蜂蜜、牛奶中青霉素 G

蜂蜜的前处理同实施例 8，牛奶的前处理分别同实施例 9、10，用试剂盒检测及结果分析同实施例 11。

## 25 实施例 13 试剂盒精密度、准确度和保存期试验

### (1) 试剂盒精密度试验

#### 标准可重复性试验

从三批试剂盒中各取 10 个试剂盒，每块酶联板中抽出 20 个微孔，测定 0.9 $\mu$ g/L

标准溶液的吸光度值 (OD 值), 计算变异系数。测定结果见表 1。

表 1 标准品可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	8.5	9.6	7.2	5.6	4.8	9.2	8.6	7.6	8.8	10.3
CV% 03 批	5.4	5.9	7.9	7.2	5.6	8.9	5.6	6.4	7.2	4.9
06 批	7.5	4.9	7.8	6.4	8.4	5.2	6.6	7.3	8.2	6.1

试验结果可以得出, 每批试剂盒各 10 次标准品变异系数为在 4.9% ~ 10.3% 之间, 因此符合精密度小于或等于 20% 的规定, 说明本试剂盒标准品精密度达到了《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 4 点精密度和准确度的精密度标准。

#### 样品可重复性

取青霉素 G 标样, 添加到样品中, 分别取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, 结果见表。

10

表 2 鸡肉样品精密度和准确度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
0507008	10.2	11.0	9.5	8.8	9.2	8.9
	8.3	7.2	8.6	7.1	6.1	13.4
	7.3	6.5	6.0	7.6	8.9	15.3
0507009	8.9	9.4	9.8	8.8	6.2	16.3
	7.7	7.2	6.8	6.0	7.9	10.6
	10.2	7.9	9.8	11.0	9.9	12.2
0508005	6.3	6.5	7.8	8.5	9.8	18.6
	8.9	8.6	9.7	6.5	9.8	15.3
	10.5	10.9	9.0	8.7	10.0	9.6

表 3 鸡肝样品精密度和准确度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
0506008	6.9	6.2	7.2	8.2	7.5	10.2
	11.2	9.2	7.7	8.2	7.4	17.5
	6.9	8.1	8.5	7.4	11.1	19.4
0507003	9.8	10.1	9.9	7.3	7.1	16.9

	6.2	7.2	6.9	7.8	6.9	8.2
	10.2	10.9	9.2	11	9.3	8.4
	9.3	7.9	7.6	8.9	6.8	12.4
0507009	6.4	6.7	7.6	8.8	6.2	15.0
	8.8	9.5	10.5	7.3	6.3	19.8

表4 牛奶样品精密度和准确度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
	6.3	8.5	9.4	8.9	6.2	19.1
0506008	11.1	10.3	7.1	9.0	10.6	16.7
	9.4	9.3	6.6	9.8	9.5	14.6
	6.7	7.5	6.4	6.5	8.2	10.9
0507003	9.2	8.7	6.1	8.4	7.1	16.0
	8.5	9.2	7.3	7.5	6.1	15.3
	8	7.2	9.2	6.3	6.8	15.1
0507009	7.4	6.4	6.3	8.5	6.8	12.7
	9.9	9.4	9.8	8.5	6.2	17.5

表5 蜂蜜样品精密度和准确度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
	8.1	6.9	7.2	9.0	8.2	10.6 <sup>5</sup>
0506008	9.2	9.6	8.3	8.6	9.9	7.3
	6.3	6.4	6.8	7.2	7.1	5.9
	7.3	9.8	7.6	10.1	6.8	18.2
0507003	9.6	10.3	9.2	11.2	8.5	10.6
	6.8	8.5	6.0	8.4	6.1	17.0
	7.2	6.3	6.7	5.2	7.2	12.7 <sup>10</sup>
0507009	8.9	9.3	9.8	10.2	7.9	9.6
	6.4	7.6	8.2	7.8	6.3	11.8

结果表明鸡肉样品的变异系数均小于 20%，鸡肝样品的变异系数均小于 20%，牛奶品的变异系数均小于 20%，蜂蜜品的变异系数均小于 20%，符合了  
15 变异系数小于 35%的规定，说明本试剂盒样本测定的精密度达到了《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 4 点精密度和准确

度的精密度标准。

### (2) 试剂盒的准确度

取两个浓度的青霉素 G 标样，对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，分别计算回收率。

5

表 6 准确度试验

样本	鸡肉		鸡肝	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	10	20	10	20
1	83.4	97.4	87.4	70.1
回收	2	97.4	72.4	104.9
率%	3	102.8	69.8	92.7
	4	86.4	93.4	84.6
平均 值		92.5	83.2	92.4
84.1				
样本	牛奶		蜂蜜	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	10	20	10	20
1	83.4	121.7	74.6	107.4
回收	2	72.4	84.5	92.5
率%	3	93.5	93.5	69.8
	4	81.6	86.2	97.4
平均 值		82.7	96.4	83.5
92.5				

结果表明鸡肉、鸡肝样本的添加回收率为 70.1%~104.9%；鸡蛋样本添加回收率 72.4%~121.7%；尿液样本的添加回收率为 69.8%~107.4%。

### (3) 试剂盒保存期试验

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、青霉素 G 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。

- 5 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℃ 保存 6 个月以上。

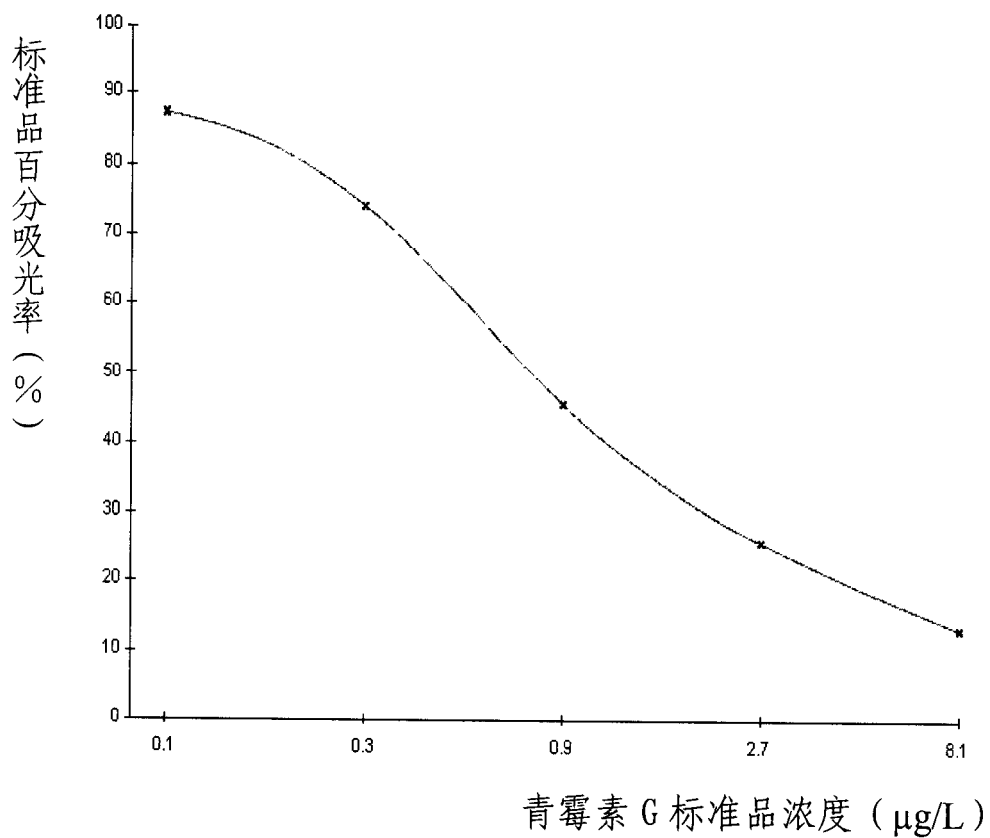


图 1

专利名称(译)	检测青霉素G的酶联免疫试剂盒及其方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1766618A</a>	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510086771.8	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
其他公开文献	CN100501405C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种检测青霉素G的酶联免疫试剂盒，它包括：包被了青霉素G抗原或抗抗体的酶标板、酶标记物、青霉素G标准品溶液、底物显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液和抗体工作液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测青霉素G的

方法，它包括以下步骤：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。本发明提供的检测青霉素G酶联免疫试剂盒能同时快速检测大量样品，检验方法方便易行、费用低廉，具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。

