

[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 200610007256.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1811437A

[22] 申请日 2006.2.16

[21] 申请号 200610007256.0

[71] 申请人 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 何方洋 万宇平 史为民

李建成 冯才伟 吴小平

[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16页 附图2页

[54] 发明名称

一种检测磺胺喹噁啉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磺胺喹噁啉的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测磺胺喹噁啉的酶联免疫试剂盒，包括磺胺喹噁啉特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物或磺胺喹噁啉抗体；所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉抗体或酶标磺胺喹噁啉半抗原；当所述包被原为磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉抗体；当所述包被原为磺胺喹噁啉抗体时，所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉半抗原。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织、血清血浆、尿样、蜂蜜中磺胺喹噁啉药物残留量。

1、一种检测磺胺喹噁啉的酶联免疫试剂盒，包括磺胺喹噁啉特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物或磺胺喹噁啉抗抗体；所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉抗抗体或酶标磺胺喹噁啉半抗原；当所述包被原为磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉抗抗体；当所述包被原为磺胺喹噁啉抗抗体时，所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉半抗原；所述磺胺喹噁啉半抗原是将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括磺胺喹噁啉标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液、包被缓冲液和封闭液。

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：所述磺胺喹噁啉特异性抗体为磺胺喹噁啉单克隆抗体或磺胺喹噁啉多克隆抗体；它们均是用磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述磺胺喹噁啉半抗原是将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、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。

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：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体；所述磺胺喹噁啉单克隆抗体为磺胺喹噁啉的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-1 CGMCC No. 1615 分泌的单克隆抗体。

6、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 pH7.4，含有 0.8%~1.2%吐温-80，0.1%的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；所述终止液为 1~2mol/L 的氢氧化钠、盐酸或氢氧化钠溶液；所述封闭液含有 3-10%的牛血清，1%酪蛋白的 pH 值为 7.2，0.02 mol/L 磷酸缓冲溶液；所述百分含量均为质量百分含量。

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 4-硝基酚磷酸盐。

8、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为 pH 7.2、0.02 mol/L 含 0.1-0.5%N 'N-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

9、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述包被缓冲液为 pH

值为 6.4、0.1mol/L 的柠檬酸缓冲液。

10、一种检测磺胺喹噁啉的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

当样品为动物组织时，将样品匀浆，称取 3 ± 0.1 g 匀浆物，加入 9ml 体积比为 85:15 的乙腈-水溶液混合均匀，3000rpm 离心，取 4ml 上清液，加入 2mol/L 氯化钠溶液 2ml 和 7ml 乙酸乙酯，混合均匀，3000rpm 离心 5—10 分钟，取上层液，用氮气吹干，加入正己烷 1ml 振荡均匀，再用稀释 1 倍的浓缩复溶液 1ml 混合 2min，3000rpm 离心 5-10 分钟，除去上层液，取下层液进行分析；当样品为尿样时，用 3ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液与 1ml 经离心得到的尿样上清液体混合均匀，即可进行分析；当样品为血清血浆时，3000rpm 离心 5min，取上层液即可进行分析；

蜂蜜：取 2ml 蜂蜜，加入 4ml 重蒸馏水，再加乙酸乙酯振荡均匀，3000rpm 离心 10 分钟，取 1ml 上层液用氮气吹干，残留物用稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解，即可进行分析；

2) 利用权利要求 1—9 中任一所述的检测磺胺喹噁啉的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测磺胺喹噁啉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磺胺喹噁啉的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

磺胺喹噁啉 (Sulfaquinoxaline SQX) 属磺胺类抗生素兼有抗球虫作用, 广泛用于养禽业, 其口服后吸收迅速, 但排泄缓慢, 残留在组织器官及鸡蛋中时间长, 人食用后, 对人体产生耐药性等副作用。世界卫生组织 (WHO) 规定动物组织、奶的最高残留限量 (MRL) 值为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。日本等国规定肉鸡中不得检出。因此, 为保证产品的安全及对外贸易畅通, 加强对动物性食品中磺胺喹噁啉的残留检测是非常必要的。

检测磺胺喹噁啉残留量的化学方法主要有薄层色谱法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高压液相色谱法 (HPLC)、气-质联机 (GC-MS)、液-质联机 (HPLC/MS)、毛细管电泳 (CE) 等、由于复杂的一起设备和繁琐的过程, 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磺胺喹噁啉的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测磺胺喹噁啉的酶联免疫试剂盒, 包括磺胺喹噁啉特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述包被原为磺胺喹噁啉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磺胺喹噁啉半抗原; 当所述包被原为磺胺喹噁啉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磺胺喹噁啉半抗原。

所述磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将磺胺喹噁啉半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或水溶性碳化二亚胺法进行偶联得到; 所述磺胺喹噁啉半抗原是将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的。

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磺胺喹噁啉半抗原可采用活性酯法或水溶性碳化二亚胺法将碱性磷酸酯酶与磺胺喹噁啉半抗原偶联得到。所述磺胺喹噁啉半抗原是将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的。酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液; 所述酶标记物工作液所用的稀释液为含有 0.05% 甘油

(可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结,亦可长时间保持酶标记物的生物活性)、1%的硫柳汞防腐剂(便于保存)溶液。

所述磺胺喹噁啉特异性抗体可为磺胺喹噁啉单克隆抗体或磺胺喹噁啉多克隆抗体;它们均是用磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的;多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,所述磺胺喹噁啉单克隆抗体为磺胺喹噁啉鼠单克隆抗体,所述磺胺喹噁啉多克隆抗体优选为磺胺喹噁啉兔多克隆抗体。所述抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗体,优选为羊抗兔抗体。抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液;抗体工作液所用的抗体稀释液为含有0.5%BSA的磷酸盐缓冲液。

所述磺胺喹噁啉单克隆抗体优选为磺胺喹噁啉的单克隆杂交瘤细胞株A-4-1 CGMCC No. 1615分泌的单克隆抗体。

所述磺胺喹噁啉的单克隆杂交瘤细胞株A-4-1 CGMCC No. 1615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)。

以上抗体均可以用磺胺喹噁啉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、卵清蛋白或血蓝蛋白常用载体蛋白;所述磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将磺胺喹噁啉半抗原和载体蛋白用水溶性碳化二亚胺法进行偶联得到。

为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括磺胺喹噁啉标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述标准品溶液为六个浓度梯度含有磺胺喹噁啉药物的溶液,所用的磺胺喹噁啉药物稀释液为含0.1-0.5%N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的去离子水。

所述浓缩洗涤液为pH7.4,含有0.8%~1.2%吐温-80,0.1%的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,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pH值为7.2,0.02 mol/L含0.1-0.5%N,N-二甲基甲酰胺(DMF)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pH值为6.4,0.1mol/L的柠檬酸缓冲液;

所述封闭液是含有3-10%的牛血清,1%酪蛋白的pH值为7.2,0.02 mol/L磷酸缓冲液;所述终止液为1~2mol/L的氢氧化钠、盐酸或氢氧化钠溶液。

所用的包被磺胺喹噁啉抗原或抗抗体的载体的物质可为聚苯乙烯、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，载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

本发明提供的检测磺胺喹噁啉的方法，是利用所述酶联免疫试剂盒检测磺胺喹噁啉。

所述检测磺胺喹噁啉的方法还可包括样品的前处理，所述方法还包括对样品的前处理：

本发明所提供的检测磺胺喹噁啉的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

当样品为动物组织时，将样品匀浆，称取 3 ± 0.1 g 匀浆物，加入 9ml 乙腈-水溶液(乙腈和水的体积比是 85:15)混合均匀，3000rpm 离心，取 4ml 上清液，加入 2mol/L 氯化钠溶液 2ml 和 7ml 乙酸乙酯，混合均匀，3000rpm 离心 5-10 分钟，取上层液，用氮气吹干，加入正己烷 1ml 振荡均匀，再用稀释 1 倍的上述浓缩复溶液 1ml 混合 2min，3000rpm 离心 5-10 分钟，除去上层液，取下层液进行分析；当样品为尿样时，用 3ml 稀释 1 倍的上述浓缩复溶液与 1ml 经离心得到尿样上清液体混合均匀，即可进行分析；当样品为血清血浆时，3000rpm 离心 5min，取上层液即可进行分析；

蜂蜜：取 2ml 蜂蜜，加入 4ml 重蒸馏水，再加乙酸乙酯振荡均匀，3000rpm 离心 10 分钟。取 1ml 上层液用氮气吹干，残留物用稀释 1 倍的上述浓缩复溶液 1ml 溶解，即可进行分析。

2) 利用上述检测磺胺喹噁啉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、血清血浆、尿样、蜂蜜等样品中磺胺喹噁啉残留量。

本发明的检测磺胺喹噁啉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等样品中磺胺喹噁啉的含量；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。

磺胺喹噁啉是小分子物质，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。将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛通过缩合反应方法合成磺胺喹噁啉半抗原，给磺胺喹噁啉接出了一个含苯环的间隔臂，这样突出了磺胺喹噁啉分子结构中的特征基团——喹噁啉。同时也增加了半抗原的抗原性。再将磺胺喹噁啉采用水溶性碳化二亚胺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 OVA、HSA 和 MSA 的结合摩尔比分别为 9:1；7:1 和 13:1。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物组织、血清、尿样、蜂蜜、牛奶及饲料等样品中磺胺喹噁啉的残留量。本发明的检测原理是当微孔条上预包被磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物时，加入系列标准品或样品溶液和磺胺喹噁啉抗体工作液后，样本中残留的磺胺喹噁啉和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗磺胺喹噁啉的抗体，加入酶标记二抗进行酶活性放大作用，显色后终止；当微孔条上包被抗抗体时，加入磺胺喹噁啉抗体工作液后，再加入系列标准品或样品溶液和酶标抗原，样品残留的磺胺喹噁啉和酶标抗原竞争抗磺胺喹噁啉抗体，显色；显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值（OD 值），样本吸光度值与其残留物磺胺喹噁啉的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出相应残留物磺胺喹噁啉的含量。也可根据酶标板上的样品溶液颜色的深浅，与系列浓度的磺胺喹噁啉标准液颜色比较判断样品中磺胺喹噁啉的浓度范围。

本发明的检测磺胺喹噁啉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、饲料及尿液等样品中磺胺喹噁啉的残留量；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；采用高特异性的磺胺喹噁啉单克隆抗体，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。

附图说明

图 1 为以磺胺喹噁啉抗原为包被原的酶联免疫试剂盒磺胺喹噁啉标准曲线图

图 2 为以磺胺喹噁啉抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒磺胺喹噁啉标准曲线图

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、以磺胺喹噁啉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。

以磺胺喹噁啉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) 包被有磺胺喹噁啉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：将碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体稀释成蛋白浓度为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。酶标记物工作液所用的稀释液为含有 0.05% 甘油（可防止放入 -20°C 环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1% 的硫柳汞防腐剂（便于保存）溶液。

(3) 磺胺喹噁啉标准品溶液：用 pH 值为 7.2，0.01mol/L 含 0.1-0.5%N ‘N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液将磺胺喹噁啉标准品稀释成标准溶液 6 瓶，0 μ g/L，1 μ g/L，3 μ g/L，9 μ g/L，27 μ g/L，81 μ g/L，3ml/瓶。

(4) 显色液：4-硝基酚磷酸盐缓冲液，8ml/瓶，1 瓶。

(5) 磺胺喹噁啉鼠单克隆抗体工作液：用抗体稀释液将磺胺喹噁啉的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-1 CGMCC No. 1615 分泌的单克隆抗体稀释成蛋白浓度为 0.3 μ g/L 的抗体，8ml/瓶，1 瓶。抗体工作液所用的抗体稀释液为含有 0.5%BSA 的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：pH7.4，含有 0.8%~1.2%吐温-80，0.1%的叠氮化钠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，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液为 pH 值为 7.2，0.02 mol/L 含 0.1-0.5%N ‘N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 2 倍。

(9) 包被缓冲液：pH6.4，0.1mol/L 的柠檬酸缓冲液。

(10) 封闭液：封闭液含有 3-10%的牛血清，1%酪蛋白的 pH 值为 7.2，0.02 mol/L 磷酸缓冲溶液。

其中，磺胺喹噁啉与载体蛋白偶联物、磺胺喹噁啉特异性抗体、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、磺胺喹噁啉半抗原的合成方法：

磺胺喹噁啉半抗原的制备原理：将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛通过缩合反应合成磺胺喹噁啉半抗原，给磺胺喹噁啉接出了一个含苯环的间隔臂，这样突出了磺胺喹噁啉分子结构中的特征基团——喹噁啉。同时也增加了半抗原的抗原性。

其半抗原的制备的过程为：

将磺胺喹噁啉 1g 和对羧基苯甲醛 1g 通过缩合反应合成磺胺喹噁啉半抗原。

2、包被原：将磺胺喹噁啉半抗原和人血清白蛋白 (HSA) 水溶性碳化二亚胺法进行偶联得到。

包被原的具体制备方法如下：取磺胺喹噁啉半抗原 300mg 和人血清白蛋白 (HSA) 500mg 混合溶于 50ml 水，加入 EDC 100 μ l 室温搅拌过夜即可。

3、酶标板的制备：

用包被缓冲液将磺胺喹噁啉半抗原与人血清白蛋白偶联物稀释成 0.03 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，并 4 $^{\circ}$ C 环境过夜，倾去包被液，用稀释 20 倍的浓缩洗

漆液洗涤 2 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 150 μ 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。

二、磺胺喹噁啉鼠单克隆抗体的制备

1、免疫原的合成：将磺胺喹噁啉半抗原和卵清蛋白（OVA）载体蛋白采用水溶性碳化二亚胺法进行偶联得到。

具体方法如下：取磺胺喹噁啉半抗原 300mg 和人血清白蛋白（HSA）500mg 混合溶于 50ml 水，加入 EDC 100 μ l 室温搅拌过夜即可。

通常免疫原的纯度要求较高，免疫原的纯度越高，制备的抗体特异性越强，至少要达到 90% 以上，上述所合成的免疫原采用紫外吸收法测定其纯度为 94.3%。

2、磺胺喹噁啉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，以磺胺喹噁啉半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 100 μ g/只，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 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—磺胺喹噁啉的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-1 CGMCC No. 1615。

细胞冻存和复苏 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5 \times 10⁶ 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 $^{\circ}$ C 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 天后腹腔注射磺胺喹噁啉的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-1 CGMCC No. 1615 5 \times 10⁶ 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，小瓶分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。

三、酶标抗体的制备

羊抗鼠抗抗体的制备：采用无病原体山羊做为免疫动物，将鼠源性抗体按照免疫剂量为 150~300 μ g /只进行免疫，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，测定抗血清效价（包被原为非免疫用鼠源抗体），心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的羊抗鼠抗抗体。

酶标记抗抗体的制备：将羊抗鼠抗抗体与碱性磷酸酯酶进行偶联，采用的方法优选戊二醛法，用碱性磷酸酯酶以 2:1 的比例与抗抗体偶联时，有 60%~70% 的酶与 8% 的抗抗体偶联，酶标记物的产量比使用辣根过氧化物酶高。

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(用萘氏试剂检测)，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磺胺嘧啶的方法如下：

一、样品前处理

a. 动物组织：取肌肉用匀浆机 10000r/min 匀浆 1 min，称取 3 ± 0.1 g 匀浆物置离心管中，加入 9ml 乙腈-水溶液（乙腈和水的体积比是 85:15）混合，剧烈振荡 10min。于 15℃，3000g 以上速度离心 10min。取 4ml 上清液，加入 2M 氯化钠溶液 2ml 和 7ml 乙酸乙酯，混合振荡 10min，15℃，3000g 速度离心 5min。将上层液移另到离心管中用氮气吹干。加入正己烷 1ml 振荡 1min，再用稀释 1 倍的浓缩复溶液 1ml 混合 2min。15℃，3000g，离心 5min，除去上层液。取下层相 50 μ l 进行分析。

b. 尿样：取 1ml 尿液到离心管中，3000rpm 离心 10-15 分钟直至清亮，移取 1ml 尿液到离心管中，再加入 3ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液混合。取 50 μ l 进行分析。

c. 血清血浆：3000g 离心 5 分钟，取上层液 50 μ l 进行分析。

d. 蜂蜜：取 2ml 蜂蜜，加入 4ml 重蒸馏水，再加乙酸乙酯振荡 10min，离心 10 分钟。取 1ml 上层液用氮气吹干，残留物用稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解，取 50 μ l 进行分析。

二、检测方法

向磺胺喹噁啉偶联抗原包被的96孔酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液50 μ l，再加入磺胺喹噁啉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。倒出孔中液体，每孔加入250 μ l稀释了19倍的浓缩洗涤液（含1.0%吐温80、1%的叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.01M pH7.4）），30秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板5次，用吸水纸拍干。每孔加入酶标记抗抗体100 μ l用盖板膜封板，37℃恒温箱中反应30min。每孔加入底物4-硝基酚磷酸盐50 μ l，轻轻振荡混匀，37℃恒温箱避光显色15min。每孔加入终止液（2mol/L氢氧化钠）50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值（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。以磺胺喹噁啉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磺胺喹噁啉的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液中磺胺喹噁啉的浓度。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1 μ g/L。

实施例2、以羊抗兔抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒及其制备方法

以羊抗兔抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

（1）包被有羊抗兔抗抗体的酶标板；

（2）碱性磷酸酯酶标记的磺胺喹噁啉半抗原工作液：将碱性磷酸酯酶标记的磺胺喹噁啉半抗原稀释成蛋白浓度为0.5 μ g/L。酶标记物工作液所用的稀释液为含有0.05%甘油（可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1%的硫柳汞防腐剂（便于保存）溶液。

（3）磺胺喹噁啉标准品溶液：磺胺喹噁啉系列标准溶液6瓶，0 μ g/L，1 μ g/L，3 μ g/L，9 μ g/L，27 μ g/L，81 μ g/L，3ml/瓶。

（4）显色液：4-硝基酚磷酸盐缓冲液，8ml/瓶，1瓶。

（5）磺胺喹噁啉兔多克隆抗体工作液：用抗体稀释液将兔多克隆抗体稀释成蛋

白浓度为 $0.3 \mu\text{g/L}$ 的抗体, 8ml/瓶, 1 瓶。抗体工作液所用的抗体稀释液为含有 0.5%BSA 的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液: pH7.4, 含有 0.8%~1.2%吐温-80, 1‰的叠氮化钠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, 8ml/瓶, 1 瓶。

(8) 浓缩复溶液: pH 值为 7.2, 0.02 mol/L 含 0.1-0.5%N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 的磷酸盐缓冲液, 40ml/瓶, 1 瓶。为正常使用浓度的 2 倍。

(9) 包被缓冲液: pH6.4, 0.1mol/L 的柠檬酸缓冲液。

(10) 封闭液: 封闭液: 封闭液含有 3-10%的牛血清, 1%酪蛋白的 pH 值为 7.2, 0.02 mol/L 磷酸缓冲溶液。

其中, 羊抗兔抗抗体包被原、磺胺喹噁啉特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的磺胺喹噁啉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: 酶标板的材料为聚氯乙烯, 用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 $0.03 \mu\text{g/ml}$, 酶标板每孔加入 $100 \mu\text{l}$, 37°C 温育 2h, 并 4°C 环境过夜, 倾去包被液, 用稀释了 19 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次, 每次 1min, 拍干, 然后在每孔中加入 $150 \mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 温育 1-2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

二、磺胺喹噁啉兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以磺胺喹噁啉半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原, 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, 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。

三、酶标半抗原的制备

酶标记半抗原的制备: 磺胺喹噁啉半抗原的制备同实施例 1 中的磺胺喹噁啉半抗原制备方法。

酶标记半抗原的制备方法: 将磺胺喹噁啉和对羧基苯甲醛合成磺胺喹噁啉半抗原, 将磺胺喹噁啉半抗原与碱性磷酸酯酶采用碳化二亚胺法进行偶联得到酶标记磺胺喹噁啉抗原。

具体方法为：取磺胺喹噁啉半抗原 300mg 和碱性磷酸酯酶 500mg 混合溶于 50ml 水, 加入 EDC 100 μ l 室温搅拌过夜即可。

利用该试剂盒检测样品中残留的磺胺喹噁啉的方法如下：

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：

向羊抗兔抗抗体包被的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液 50 μ l, 再加入磺胺喹噁啉兔多克隆抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 稀释 19 倍的浓缩洗涤液 (pH7.4, 含有 0.8%~1.2%吐温-80, 0.1%的叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液), 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。每孔加入碱性磷酸酯酶标记的磺胺喹噁啉半抗原工作液 100 μ l 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体, 重复洗涤步骤。加入底物 4-硝基酚磷酸盐 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 (2mol/L 氢氧化钠) 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。结果分析表明, 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 1 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 9 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 5.1%~11.9%之间。

表1标准可重复性试验

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----|-----|------|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|------|
| CV% | 01批 | 6.5 | 7.4 | 9.1 | 10.8 | 5.1 | 8.4 | 7.5 | 6.4 | 6.2 | 10.9 |
| | 03批 | 11.9 | 8.5 | 6.4 | 7.5 | 9.4 | 10.8 | 7.4 | 9.5 | 8.4 | 7.1 |
| | 06批 | 12.4 | 8.5 | 7.4 | 9.2 | 10.8 | 6.4 | 8.2 | 9.2 | 7.1 | 9.8 |

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 2.9%~14.6%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 | 10.6 | 6.7 | 4.9 | 12.8 | 14.6 | 11.7 | 3.4 | 5.6 | 8.2 | 10.7 |
| | 07批 | 8.5 | 6.7 | 10.6 | 13.7 | 11.6 | 10.4 | 7.4 | 3.6 | 9.4 | 8.6 |
| | 09批 | 6.7 | 4.1 | 2.9 | 6.7 | 10.7 | 13.5 | 8.6 | 6.6 | 7.9 | 8.8 |

(2) 样本可重复性试验

每个样本按 10 μ g/kg 浓度添加磺胺喹噁啉标准品，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 7 所示，结果表明鸡肉样本变异系数均低于 15%，鸡肝样本的变异系数均低于 16%，血清样本的变异系数均小于 15%，蜂蜜样本的变异系数均小于 20%，尿液样本的变异系数均小于 20%。

表3 鸡肉样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 (μ g/kg) | | | | | 板内CV% |
|----|-------------------|-----|-----|-----|------|-------|
| 01 | 7.9 | 7.5 | 9.4 | 8.2 | 8.5 | 8.6 |
| | 8.5 | 7.4 | 9.4 | 7.2 | 8.4 | 10.9 |
| | 10.2 | 9.4 | 8.7 | 7.9 | 9.5 | 9.5 |
| 03 | 9.5 | 7.4 | 8.5 | 8.4 | 7.5 | 10.4 |
| | 8.5 | 7.4 | 9.5 | 9.7 | 8.3 | 10.8 |
| | 7.4 | 9.5 | 6.4 | 8.4 | 7.6 | 14.8 |
| 06 | 9.5 | 7.4 | 8.5 | 9.4 | 10.2 | 12.0 |
| | 8.4 | 7.5 | 7.4 | 7.4 | 9.7 | 12.4 |
| | 8.6 | 8.5 | 9.5 | 7.5 | 6.4 | 14.6 |

表4 鸡肝样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 (μ g/kg) | | | | | 板内CV% |
|----|-------------------|-----|-----|-----|-----|-------|
| 01 | 8.5 | 9.5 | 8.7 | 7.5 | 9.4 | 9.2 |
| | 8.5 | 7.4 | 9.6 | 7.6 | 9.5 | 12.1 |
| | 8.5 | 7.5 | 8.7 | 8.5 | 8.1 | 5.7 |
| 03 | 9.5 | 7.4 | 8.5 | 9.6 | 7.4 | 12.7 |
| | 11.2 | 7.4 | 9.5 | 8.4 | 8.6 | 15.8 |

| | | | | | | |
|----|------|-----|-----|-----|------|------|
| | 8.7 | 8.6 | 9.4 | 9.3 | 6.7 | 12.7 |
| 06 | 8.5 | 7.5 | 8.7 | 9.3 | 10.7 | 13.2 |
| | 9.5 | 7.3 | 8.5 | 7.4 | 9.2 | 12.0 |
| | 10.5 | 8.6 | 9.5 | 8.6 | 8.6 | 9.2 |

表5 血清样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 板内CV% |
|----|---------------------------------|-----|-----|------|------|-------|
| 01 | 8.5 | 7.3 | 6.9 | 7.5 | 9.8 | 14.6 |
| | 8.1 | 7.4 | 9.5 | 8.5 | 9.5 | 10.6 |
| | 9.3 | 7.4 | 8.7 | 8.3 | 7.4 | 10.1 |
| 03 | 9.5 | 8.4 | 9.2 | 7.8 | 7.6 | 9.8 |
| | 8.5 | 7.4 | 6.2 | 7.4 | 9.5 | 16.0 |
| | 9.5 | 7.4 | 10 | 8.6 | 9.4 | 11.3 |
| 06 | 9.5 | 7.4 | 8.6 | 8.5 | 10.2 | 12.0 |
| | 9.5 | 7.7 | 8.4 | 7.4 | 9.3 | 11.0 |
| | 7.6 | 9.4 | 7.5 | 10.2 | 8.5 | 13.5 |

表6 蜂蜜样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 板内CV% |
|----|---------------------------------|-----|-----|------|------|-------|
| 01 | 8.2 | 7.4 | 9.5 | 9.2 | 8.3 | 9.87 |
| | 9.5 | 7.5 | 7.0 | 10.2 | 8.6 | 15.6 |
| | 6.8 | 8.8 | 7.9 | 7.4 | 9.2 | 12.3 |
| 03 | 7.5 | 9.5 | 8.4 | 9.3 | 7.0 | 13.1 |
| | 7.5 | 9.5 | 8.6 | 6.4 | 8.6 | 14.7 |
| | 9.5 | 7.5 | 8.6 | 9.5 | 10.9 | 13.7 |
| 06 | 5.8 | 6.7 | 8.6 | 9.4 | 7.5 | 19.0 |
| | 9.5 | 8.7 | 6.7 | 8.7 | 9.5 | 13.3 |
| | 9.5 | 7.5 | 8.6 | 7.4 | 9.6 | 12.3 |

表7 尿液样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 板内CV% |
|----|---------------------------------|--|--|--|--|-------|
|----|---------------------------------|--|--|--|--|-------|

| | | | | | | |
|----|------|------|-----|------|------|------|
| | 8.2 | 8.5 | 7.5 | 10.9 | 8.4 | 14.8 |
| 01 | 9.5 | 6.8 | 9.3 | 9.4 | 7.5 | 14.3 |
| | 8.3 | 7.4 | 9.5 | 6.1 | 8.5 | 16.1 |
| | 9.5 | 7.4 | 8.2 | 6.7 | 9.4 | 14.9 |
| 03 | 6.2 | 7.4 | 9.5 | 8.2 | 6.2 | 18.7 |
| | 10.8 | 10.2 | 8.3 | 7.2 | 9.5 | 15.8 |
| | 7.4 | 8.3 | 9.5 | 8.7 | 10.2 | 12.2 |
| 06 | 6.5 | 7.5 | 6.9 | 6.9 | 8.6 | 11.3 |
| | 10.8 | 8.5 | 7.4 | 9.4 | 7.6 | 16.0 |

实施例 2 中的三批试剂盒的测定结果结果如表 8—表 12 所示，结果表明鸡肉样本变异系数均低于 20%，鸡肝样本的变异系数均低于 20%，血清样本的变异系数均小于 25%，蜂蜜样本的变异系数均小于 30%，尿液样本的变异系数均小于 15%。

表8 鸡肉样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 (µg/kg) | | | | | 板内CV% |
|----|-------------|-----|------|-----|------|-------|
| 05 | 6.8 | 9.5 | 10.2 | 7.6 | 8.3 | 16.3 |
| | 7.5 | 6.7 | 8.2 | 9.5 | 10.4 | 17.7 |
| | 6.8 | 8.5 | 9.4 | 8.2 | 8.7 | 11.5 |
| 07 | 10 | 7.4 | 6.1 | 8.4 | 7.6 | 18.2 |
| | 6.7 | 7.8 | 8.2 | 9.1 | 8.4 | 11.0 |
| | 8.4 | 7.9 | 6.6 | 7.9 | 11 | 19.4 |
| 09 | 8.4 | 9.6 | 7.3 | 5.9 | 6.9 | 18.7 |
| | 8.4 | 7.1 | 9.6 | 8.5 | 5.6 | 19.6 |
| | 10.4 | 9.5 | 8.4 | 6.8 | 7.4 | 17.4 |

表9 鸡肝样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 (µg/kg) | | | | | 板内CV% |
|----|-------------|------|-----|-----|-----|-------|
| 05 | 6.4 | 8.7 | 9.4 | 6.2 | 7.4 | 18.4 |
| | 5.9 | 7.4 | 8.4 | 9.6 | 8.4 | 17.4 |
| | 7.9 | 10.8 | 9.0 | 9.5 | 7.3 | 15.4 |
| 07 | 7.4 | 6.2 | 5.9 | 8.6 | 9.4 | 19.4 |

| | | | | | | |
|----|------|------|-----|-----|-----|------|
| | 9.9 | 10.7 | 7.8 | 8.0 | 9.1 | 13.6 |
| | 8.4 | 9.5 | 7.3 | 8.2 | 8.8 | 9.6 |
| 09 | 9.5 | 8.7 | 6.4 | 7.8 | 5.9 | 19.8 |
| | 10.8 | 7.6 | 9.6 | 8.2 | 8.7 | 14.0 |
| | 11.0 | 8.4 | 9.7 | 9.2 | 8.4 | 11.6 |

表10 血清样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 板内CV% |
|----|---------------------------------|-----|------|------|------|-------|
| 05 | 6.7 | 8.4 | 10.9 | 8.5 | 9.7 | 17.8 |
| | 5.7 | 5.9 | 8.3 | 8.4 | 9.7 | 22.8 |
| | 9.5 | 7.4 | 8.3 | 10.6 | 7.8 | 15.1 |
| 07 | 6.4 | 8.7 | 9.2 | 8.3 | 7.6 | 13.5 |
| | 10.8 | 9.5 | 7.8 | 8.6 | 9.4 | 12.1 |
| | 6.4 | 8.7 | 9.5 | 10.2 | 10.0 | 17.2 |
| 09 | 9.4 | 8.5 | 8.6 | 8.5 | 11.0 | 11.7 |
| | 7.4 | 9.6 | 6.8 | 5.9 | 6.7 | 19.3 |
| | 10.0 | 5.7 | 6.4 | 9.9 | 7.6 | 24.9 |

表11 蜂蜜样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 板内CV% |
|----|---------------------------------|------|-----|------|------|-------|
| 05 | 5.7 | 10.8 | 8.7 | 7.4 | 9.6 | 23.4 |
| | 6.8 | 5.7 | 9.4 | 10.6 | 7.6 | 24.6 |
| | 11.0 | 6.7 | 8.4 | 9.5 | 7.2 | 20.4 |
| 07 | 7.4 | 9.5 | 8.2 | 10.8 | 11.2 | 17.3 |
| | 5.8 | 6.7 | 8.4 | 9.5 | 10.3 | 23.1 |
| | 7.4 | 9.5 | 8.6 | 6.7 | 10.6 | 18.3 |
| 09 | 8.4 | 6.5 | 6.1 | 6.7 | 11.8 | 29.8 |
| | 7.4 | 6.7 | 9.5 | 7.0 | 10.7 | 21.2 |
| | 8.6 | 7.4 | 9.5 | 5.3 | 10.0 | 23.0 |

表12 尿液样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 板内CV% |
|----|---------------------------------|-----|-----|------|------|-------|
| 05 | 8.4 | 7.6 | 9.4 | 8.3 | 7.6 | 9.0 |
| | 9.5 | 7.1 | 8.6 | 10.5 | 8.7 | 14.1 |
| | 7.2 | 9.5 | 8.6 | 9.5 | 8.1 | 11.4 |
| 07 | 8.0 | 7.0 | 9.5 | 8.1 | 7.9 | 11.1 |
| | 6.8 | 8.4 | 8.5 | 9.4 | 8.9 | 11.6 |
| | 8.4 | 7.5 | 7.9 | 9.5 | 10.2 | 12.9 |
| 09 | 10.7 | 9.6 | 8.5 | 7.3 | 9.6 | 14.1 |
| | 8.4 | 8.6 | 7.2 | 9.3 | 8.7 | 9.1 |
| | 11.0 | 8.4 | 9.7 | 9.2 | 8.4 | 11.6 |

2、试剂盒的准确度测定

取两个浓度的磺胺喹噁啉标准品溶液分别为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ (L) 和 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ (L) , 分别利用实施例 1 或实施例 2 的试剂盒按照实施例 1 或实施例 2 的方法检测磺胺喹噁啉, 每个浓度做 4 个平行, 分别计算准确度。结果如表 13 所示, 表明鸡肉样品添加准确度在 82.6%–96.5%之间, 鸡肝样品添加准确度在 75.3%–94.5%之间, 血清样品添加准确度在 69.7%–89.3%之间, 尿液样品添加准确度在 62.4%–95.6%之间。

表13 实施例1的试剂盒的准确度

| 样本 | | 鸡肉 | | 鸡肝 | |
|----------------------------------|---|------|------|------|------|
| 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | 10 | 20 | 10 | 20 |
| 准确度% | 1 | 86.9 | 88.0 | 89.2 | 75.3 |
| | 2 | 96.5 | 82.6 | 83.7 | 82.4 |
| | 3 | 82.6 | 95.4 | 90.4 | 93.2 |
| | 4 | 94.3 | 85.6 | 94.5 | 87.1 |
| 平均值% | | 90.0 | 87.9 | 89.5 | 84.5 |
| 样本 | | 血清 | | 尿液 | |
| 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) | | 10 | 20 | 10 | 20 |
| 准确度% | 1 | 75.6 | 82.6 | 83.7 | 81.0 |
| | 2 | 77.8 | 79.5 | 80.2 | 72.3 |
| | 3 | 76.4 | 69.7 | 62.4 | 95.6 |

| | | | | | |
|------|---|------|------|------|------|
| | 4 | 76.9 | 89.3 | 85.1 | 86.7 |
| 平均值% | | 76.7 | 80.3 | 77.8 | 83.9 |

实施例 2 的试剂盒测定结果如表 14 所示,表明鸡肉样品添加准确度在 73.5%—94.8%之间,鸡肝样品添加准确度在 72.9%—92.5%之间,血清样品添加准确度在 56.4%—94.7%之间,尿液样品添加准确度在 84.5%—100.5%之间。

表13 实施例2 试剂盒的准确度

| 样本 | | 鸡肉 | | 鸡肝 | |
|----------------------------------|---|------|------|------|-------|
| 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | 10 | 20 | 10 | 20 |
| 准确度% | 1 | 84.5 | 73.5 | 84.7 | 89.5 |
| | 2 | 79.4 | 94.8 | 92.5 | 90.7 |
| | 3 | 92.7 | 78.5 | 84.7 | 76.5 |
| | 4 | 86.4 | 73.5 | 72.9 | 88.4 |
| 平均值% | | 85.8 | 80.1 | 83.7 | 86.3 |
| 样本 | | 血清 | | 尿液 | |
| 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) | | 10 | 20 | 10 | 20 |
| 准确度% | 1 | 56.4 | 94.7 | 84.5 | 100.5 |
| | 2 | 68.7 | 62.5 | 92.3 | 94.1 |
| | 3 | 82.4 | 73.1 | 76.0 | 82.5 |
| | 4 | 92.5 | 82.4 | 86.4 | 86.8 |
| 平均值% | | 75.0 | 78.2 | 84.8 | 91.0 |

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℃, 6 个月后, 测定试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、磺胺喹噁啉添加实际测定值, 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℃ 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℃ 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℃ 至少可以保存 6 个月以上。

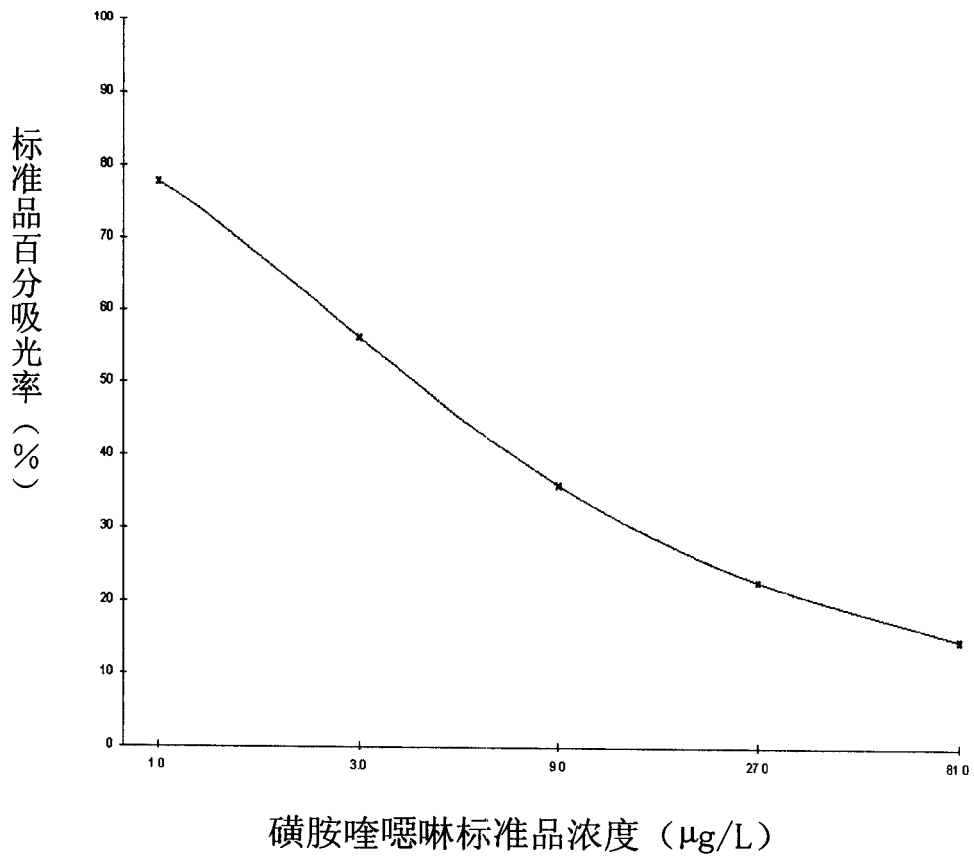


图 1

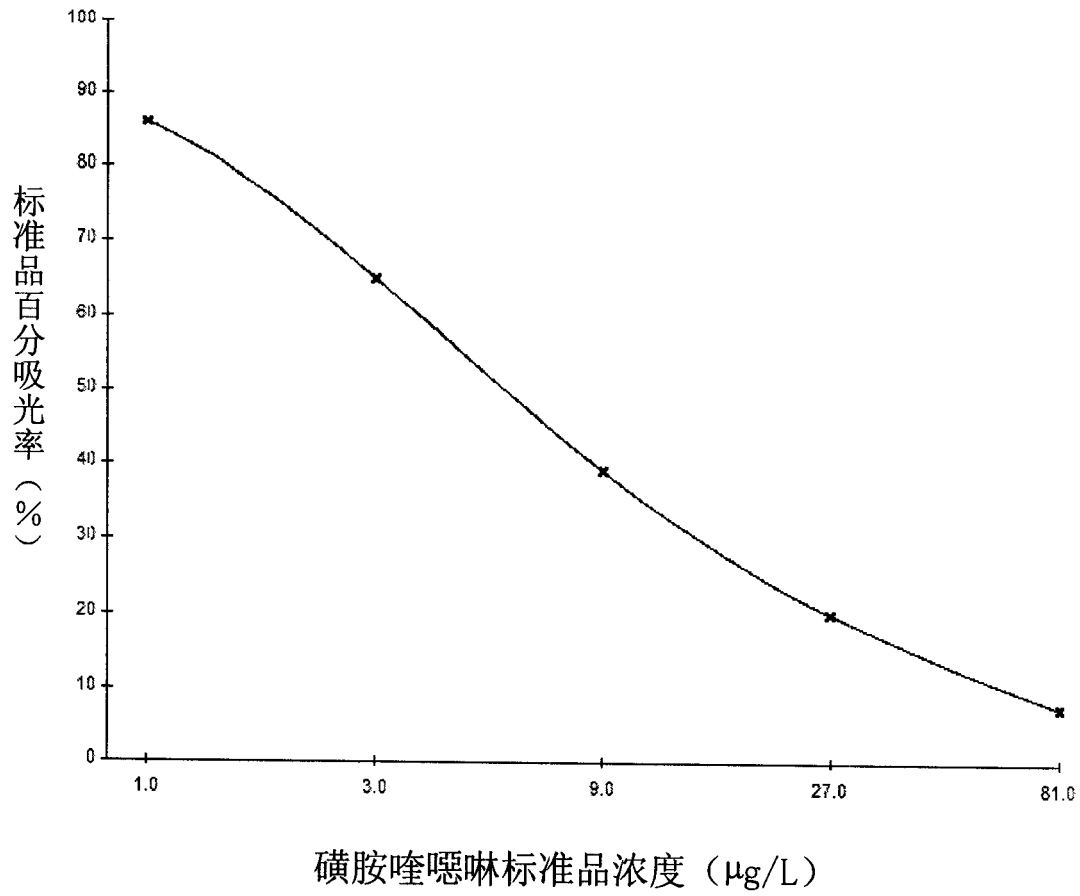


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测磺胺喹噁啉的方法及其专用酶联免疫试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN1811437A | 公开(公告)日 | 2006-08-02 |
| 申请号 | CN200610007256.0 | 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 何方洋 万宇平 史为民 李建成 冯才伟 吴小平 | | |
| 发明人 | 沈建忠 何方洋 万宇平 史为民 李建成 冯才伟 吴小平 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535 | | |
| 代理人(译) | 关畅 | | |
| 其他公开文献 | CN100489530C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种检测磺胺喹噁啉的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测磺胺喹噁啉的酶联免疫试剂盒，包括磺胺喹噁啉特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物或磺胺喹噁啉抗体；所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉抗体或酶标磺胺喹噁啉半抗原；当所述包被原为磺胺喹噁啉半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉抗体；当所述包被原为磺胺喹噁啉抗体时，所述酶标记物为酶标磺胺喹噁啉半抗原。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织、血清血浆、尿样、蜂蜜中磺胺喹噁啉药物残留量。

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