

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610007285.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月20日

[11] 授权公告号 CN 100489532C

[22] 申请日 2006.2.17

[21] 申请号 200610007285.7

[73] 专利权人 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
冯才伟 江海洋 吴小平 汪善良

[56] 参考文献

US5466784A 1995.11.14

审查员 邢维玲

[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11页 附图2页

[54] 发明名称

一种检测盐霉素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盐霉素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测盐霉素的酶联免疫试剂盒，包括盐霉素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗体；所述酶标记物为酶标抗体或酶标盐霉素半抗原；当所述包被原为盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗体；当所述包被原为抗体时，所述酶标记物为酶标盐霉素半抗原。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如动物肝脏、肌肉等盐霉素药物残留量。

1、一种检测盐霉素的酶联免疫试剂盒，包括盐霉素特异性抗体、包被原、酶标记物、盐霉素标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液和浓缩复溶液；所述包被原为盐霉素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盐霉素半抗原；当所述包被原为盐霉素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；当所述包被原抗抗体时，所述酶标记物为酶标盐霉素半抗原；所述盐霉素半抗原是将盐霉素和对氨基苯甲酸按 1:1 比例混合，搅拌反应，室温下反应过夜得到的；所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体；所述浓缩复溶液为含有质量百分含量 0.5% N,N'-二甲基甲酰胺，1% 小牛血清的 0.01~0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述盐霉素特异性抗体为盐霉素单克隆抗体或盐霉素多克隆抗体；它们均是用盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述盐霉素半抗原是将盐霉素和对氨基苯甲酸按 1:1 比例混合，搅拌反应，室温下反应过夜得到的；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、卵清蛋白或血蓝蛋白。

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：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

4、根据权利要求 4 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碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述盐霉素单克隆抗体为盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-3 CGMCC No. 1609 分泌的抗体。

6、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为 pH 值 7.4，0.01mol/L 的含有 0.8%~1.2% 吐温 20、0.1% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

7、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色剂由显色液 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，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、盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液，终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠溶液。

8、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：包被酶标板所用的包被缓冲液为 pH 值 9.6，0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；所用的封闭液是含有 3~10% 马血清、1% 惰性蛋白的水溶液；所述百分含量为质量百分含量。

9、一种检测盐霉素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：称取 2g 动物组织匀浆物置离心管中，加入 10ml 体积比为 4：1 的甲醇和 5%生理盐水的混合液，混匀；于 15℃，5000g 以上速度离心 10min；将上清液于 15℃，3000g 离心 5min；取 5ml 上清液，加入 10ml 四氯化碳，振荡混匀，5000g 以上速度离心 10min；将上层液用氮气吹干，用 1ml 稀释 4 倍的权利要求 1 所述的浓缩复溶液溶解干燥的残留物，取水相进行分析；

2) 利用权利要求 1—8 中任一所述的检测盐霉素的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测盐霉素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盐霉素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

盐霉素 (Salinomycin Sodium Premix) 属一种聚醚类兽用抗生素, 对大多数革兰氏阳性菌和部分霉菌起抗菌作用, 单独使用对鸡球虫病能发挥良好的预防效果。但使用盐霉素不可过量, 过量使用将会在动物体内大量蓄积, 并会使所食用动物中毒死亡, 通过食物链而危及人类健康。2002年12月我国农业部公告第235号文规定盐霉素在所食用动物的肌肉中最高残留量为 $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ 在皮肤、脂肪中的最高残留量为 $1200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 在肝中的最高残留量为 $1800 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此, 检测盐霉素在动物性食品中的最高残留量是非常重要的。

目前, 常用于盐霉素残留检测的方法主要有微生物法和仪器分析法。微生物检测法虽然经济、操作简便, 但在样本中有其他微生物抑制剂存在时, 其灵敏度和特异性受到限制; 高效液相色谱分析法、气谱、气质联机法等单纯的仪器分析方法, 虽然灵敏度高, 但是样本前处理及测定操作烦琐, 费用高, 不适宜于大量样本筛查, 可以作为残留的确证分析。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测盐霉素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测盐霉素的酶联免疫试剂盒, 包括盐霉素特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述包被原为盐霉素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盐霉素半抗原; 当所述包被原为盐霉素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; 当所述包被原为盐霉素抗抗体时, 所述酶标记物为酶标盐霉素半抗原。

所述盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将盐霉素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或活性酯法进行偶联得到; 所述盐霉素半抗原是将盐霉素和对氨基苯甲酸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盐霉素半抗原可采用混合酸酐法将碱性磷酸酯酶与盐霉素半抗原偶联得到。所述盐霉素半抗原是将盐霉素和对氨基苯

甲酸通过缩合反应得到的。

所述盐霉素特异性抗体可为盐霉素单克隆抗体或盐霉素多克隆抗体；它们均是用盐霉素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，所述盐霉素单克隆抗体为盐霉素鼠单克隆抗体，所述盐霉素多克隆抗体优选为盐霉素兔多克隆抗体。所述抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗体。抗体工作液所用的抗体稀释液为 pH 值 8.2 的 0.05mol/L，含有 5% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

所述盐霉素鼠单克隆抗体优选为盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-3 CGMCC No. 1609 分泌的抗体。

盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-3 CGMCC No. 1609 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）。

以上抗体均可以用盐霉素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等常用载体蛋白；所述盐霉素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将盐霉素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到；所述盐霉素半抗原是将盐霉素和对氨基苯甲酸通过缩合反应得到的。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括盐霉素标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述标准品溶液为六个浓度梯度含有盐霉素药物的溶液，所用的盐霉素药物稀释液为含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1% 小牛血清（BSA）的磷酸盐缓冲液。

所述浓缩洗涤液为 pH7.4，0.01mol/L 的含有 0.8%~1.2% 吐温 20、1% 硫柳汞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，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为 1~2mol/L 硫酸或盐酸；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液，终止液为氢氧化钠缓冲液。

所述浓缩复溶液可为含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1% 小牛血清（BSA）的 0.01mol/L~0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

所述包被缓冲液为 pH9.6，0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液。

所述封闭液是含有 3~10% 马血清、1% 惰性蛋白的水溶液。

所用的包被盐霉素抗原或抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、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。

本发明所提供的检测盐霉素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

样品前处理：称取 2g 动物组织匀浆物置离心管中，加入 10ml 体积比为 4: 1 的甲醇和 5% 生理盐水的混合液，剧烈振荡混匀；于 15℃，5000g 以上速度离心 10min；将上清液移入另一离心管中，于 15℃，3000g 离心 5min；取 5ml 上清液，加入 10ml 四氯化碳，振荡混匀，5000g 以上速度离心 10min；将上层液移入另一管中用氮气吹干，用 1ml 稀释 4 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物，取水相进行分析。

2) 利用上述检测盐霉素的酶联免疫试剂盒检测样品。

3) 检测数据分析。

盐霉素是小分子物质，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。将盐霉素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成盐霉素半抗原，有助于制出针对盐霉素抗原特异性较强的多克隆抗体。再将盐霉素采用混合酸酐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、RSA 和 KLH 的结合摩尔比分别为 11: 1、17: 1、17: 1。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物组织样品中盐霉素的残留量。本发明的检测原理是当微孔条上预包被盐霉素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盐霉素抗体工作液后，样本中残留的盐霉素和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗盐霉素的抗体，加入酶标记物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，加入盐霉素抗体工作液后，再加入系列标准品或样品溶液和酶标抗原，样品残留的盐霉素和酶标抗原竞争抗盐霉素抗体，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盐霉素的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出相应残留物盐霉素的含量。也可根据酶标板上的样品溶液颜色的深浅，与系列浓度的盐霉素标准液颜色比较判断样品中盐霉素的浓度范围。

本发明的检测盐霉素的酶联免疫试剂盒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；主要试剂以工作液、浓缩液或冻干粉等形式提供，检验方法方便易行，经过对试剂盒的精密度和准确度测试实验表明，本发明的酶联免疫试剂盒具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在食品和饲料盐霉素残留量的检测中发挥重要作用。本发明的试剂盒结构简单、使用方便、

价格便宜、便于携带，可用于动物源性食品中盐霉素的检测；本发明的检测盐霉素的方法高效、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 为以盐霉素抗原为包被原的酶联免疫试剂盒盐霉素标准曲线图

图 2 为以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒盐霉素标准曲线图

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、以盐霉素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

以盐霉素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) 包被有盐霉素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：用抗体稀释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 $0.1 \mu\text{g/L}$ ， 12ml/瓶 ， 1 瓶。酶标记物稀释液为 pH 值 8.2，含有 $1.2 \mu\text{g/L}$ 抗体蛋白，含有 5% 甲醇的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(3) 盐霉素标准品溶液：用稀释液将盐霉素稀释成系列标准品溶液 6 瓶， $0 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $3 \mu\text{g/L}$ 、 $9 \mu\text{g/L}$ 、 $27 \mu\text{g/L}$ 、 $81 \mu\text{g/L}$ ， 3ml/瓶 。所用的盐霉素药物稀释液为含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1% 小牛血清（BSA）， 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液， 8ml/瓶 ， 1 瓶。

(5) 盐霉素鼠单克隆抗体工作液：用抗体稀释液将盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-3 CGMCC No. 1609 分泌的抗体稀释为蛋白浓度 $0.1 \mu\text{g/L}$ ， 12ml/瓶 ， 1 瓶。抗体稀释液是 pH 值 8.2，含有 $1.2 \mu\text{g/L}$ 抗体蛋白，含有 5% 甲醇的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：含 0.9% 吐温、1%（质量浓度）硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液（ 0.01M ，pH 值 7.4）， 50ml/瓶 ， 1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液： 2mol/L 氢氧化钠溶液， 8ml/瓶 ， 1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：含有 5% N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1% 小牛血清（BSA）的 $0.01\sim 0.05\text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液， 400ml/瓶 ， 1 瓶。为正常使用浓度的 5 倍。

(9) 包被缓冲液：pH 9.6， 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：5% 马血清、1% 惰性蛋白的水溶液。

其中，包被盐霉素与载体蛋白偶联物的酶标板、盐霉素特异性抗体、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、盐霉素半抗原的合成方法：

半抗原的合成：将盐霉素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成盐霉素半抗原。具体步骤为：将盐霉素和对氨基苯甲酸按 1：1 比例混合搅拌反应，室温下反应过夜。

2、包被原：采用混合酸酐法将盐霉素半抗原与卵清蛋白（OVA）偶联得到包被原。

包被原的具体制备方法如下：

（1）取盐霉素半抗原 2 g 溶于 30ml, 50%的 N, N' -二甲基甲酰胺溶液中；

（2）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反应 4 小时；

（3）取卵清 22g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中；

（4）将卵清蛋白滴加到半抗原中 4℃搅拌过夜；

（5）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 3~4 次。

3、酶标板的制备：

用包被缓冲液将盐霉素半抗原与卵清蛋白偶联物稀释成 0.06μg/ml，每孔加入 100μl，37℃温育 2h，倾去包被液，用稀释 19 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 150μl 封闭液，37℃温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、盐霉素鼠单克隆抗体的制备

1、免疫原的合成：将盐霉素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成盐霉素半抗原。再采用混合酸酐法将盐霉素半抗原与血蓝蛋白（KLH）偶联得到免疫原。合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 97.3%。

免疫原合成的具体步骤：

（1）取盐霉素半抗原 2g 溶于 30ml, 50%的 N, N' -二甲基甲酰胺溶液中；

（2）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反应 4 小时；

（3）取血蓝蛋白（KLH）32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中；

（4）再将血蓝蛋白滴加到半抗原中 4℃搅拌过夜；

（5）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 3~4 次。

2、盐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，以盐霉素半抗原与血蓝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—盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-3 CGMCC No. 1609。

细胞冻存和复苏 取处于对数生长期的盐霉素的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-3 CGMCC No. 1609 用冻存液制成 5×10^6 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 天后腹腔注射杂交瘤细胞 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，小瓶分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。

三、酶标抗体的制备

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。

酶标抗抗体制备：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，约有 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。

碱性磷酸酯酶标记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 $^{\circ}$ C 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盐霉素的方法如下:

一、样品前处理

肌肉、肝脏:取肌肉、肝脏样品用匀浆机10000r/min匀浆1min,称取 2 ± 0.05 g匀浆物置离心管中,加入10ml甲醇-5%生理盐水溶液(甲醇:生理盐水=4:1(体积比))混合,剧烈振荡10min。于15℃,5000g以上速度离心10min。上清液移入另一离心管中再次离心15℃,3000g,5min。取5ml上清液,加入10ml四氯化碳,混合振荡10min,5000g以上速度离心10min。将上层液移另一管中用氮气吹干(或鸡心瓶中,50℃减压蒸干),用1ml稀释4倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物。取水相进行分析。

二、检测方法

向盐霉素半抗原与卵清蛋白偶联物包被的96孔酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液50 μ l,再加入盐霉素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19倍的浓缩洗涤液(含0.8%~1.2%吐温,1%硫柳汞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。每孔加入碱性磷酸酯酶标记羊抗鼠抗抗体工作液100 μ l用盖板膜封板,37℃恒温箱中反应30min。倒出孔中液体,重复洗涤步骤。加入底物显色液100 μ l,轻轻振荡混匀,37℃恒温箱避光显色30min。每孔加入终止液(1mol/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。

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

公式中B为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为0 μ g/L标准品溶液的平均吸光度值。以盐霉素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盐霉素的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法,计算出样本溶液中盐霉素的浓度。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 1.4 小时就可以完成，最低检测限为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 。

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) 包被有盐霉素抗抗体的酶标板；

(2) 碱性磷酸酯酶标记的盐霉素半抗原工作液：用双蒸水将碱性磷酸酯酶标记的盐霉素半抗原稀释为 0.1mol/L，12ml/瓶，1 瓶。

盐霉素标准品溶液：用稀释液将盐霉素稀释成系列标准品溶液 6 瓶，0 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、9 $\mu\text{g/L}$ 、27 $\mu\text{g/L}$ 、81 $\mu\text{g/L}$ ，3ml/瓶。所用的盐霉素药物稀释液为含有 5% N,N' - 二甲基甲酰胺 (DMF)，1% 小牛血清 (BSA) 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液

(4) 显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液，8ml/瓶，1 瓶。

(5) 盐霉素兔多克隆抗体工作液：用抗体稀释液将盐霉素兔多克隆抗体稀释为蛋白浓度 0.1 $\mu\text{g/L}$ ，12ml/瓶，1 瓶。抗体稀释液是含有 pH 值 8.2 的 0.05mol/L，1.2 $\mu\text{g/L}$ 抗体蛋白，含有 5% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：含 0.9% 吐温、1% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液 (0.01M pH7.4)，50ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液：2mol/L 氢氧化钠缓冲液，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：含有 5% N,N' - 二甲基甲酰胺 (DMF)，1% 小牛血清 (BSA) 的 0.01~0.05mol/L 磷酸盐缓冲液，400ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 5 倍。

(9) 包被缓冲液：pH 9.6，0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：5% 马血清、1% 惰性蛋白的水溶液。

其中，包被羊抗兔抗抗体的酶标板、盐霉素特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的盐霉素半抗原的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、羊抗兔抗抗体包被原的制备：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 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，酶标板每孔加入 100 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h，倾去包被液，用稀释 19 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 150 μl 封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、盐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，以盐霉素半抗原与血蓝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，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的兔多克隆抗体。

三、酶标记盐霉素抗原的制备：将盐霉素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成盐霉素半抗原，将盐霉素半抗原与碱性磷酸酯酶采用混合酸酐法进行偶联得到酶标记盐霉素抗原。

酶标记盐霉素抗原的具体制备方法如下：

取盐霉素半抗原 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反应 4 小时，取碱性磷酸酯酶 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将碱性磷酸酯酶滴加到半抗原中 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 3~4 次。

利用该试剂盒检测样品中残留的盐霉素的方法如下：

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：

向包被有羊抗兔抗抗体的 96 孔酶标板微孔中加入盐霉素多克隆抗体工作液 100 μ l，37℃ 恒温箱中反应 30min，每孔加入 250 μ l 稀释 19 倍的浓缩洗涤液（含 0.8%~1.2% 吐温，1% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.01M，PH 值 7.4）），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。每孔加入系列标准品溶液或样品溶液和碱性磷酸酯酶标记的盐霉素工作液各 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 浓缩洗涤液（含 0.8%~1.2% 吐温，1% 硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.01M，PH 值 7.4）），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。加入底物显色液 4-硝基酚磷酸盐缓冲液 100 μ l，轻轻振荡混匀，37℃ 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 1.4 小时就可以完成，最低检测限为 1.0 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

从三批试剂盒中每批抽取 10 个试剂盒，从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔，测定 9 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液的吸光度值 (OD 值)，计算变异系数。结果如表 1 所示，表明变异系数范围在 4.8%-16.2%之间，符合精密度小于或等于 20%的规定。

表1标准精密度试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01批	6.2	7.4	9.5	10.5	16.2	4.9	8.2	9.2	7.5	6.4
	03批	11.5	8.5	7.4	9.5	16.2	7.6	8.4	7.5	9.2	4.8
	06批	8.5	6.4	7.2	9.5	10.8	11.9	6.8	9.5	7.2	14.2

(2) 样本可重复性试验

每个样本按 10 $\mu\text{g/kg}$ 浓度添加盐霉素标准品，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。测定结果如表 3、表 4 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 25%。

表2 鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数CV%
01	8.5	7.4	6.2	8.5	7.3	12.7
	9.5	7.4	8.2	8.6	7.4	10.8
	5.6	7.4	9.5	8.4	6.2	19.4
03	8.5	7.4	9.5	7.4	5.9	17.4
	8.5	7.4	9.5	8.4	7.6	10.1
	9.5	7.5	8.4	9.6	6.8	14.7
06	9.5	7.5	8.4	9.5	6.9	14.0
	10.6	8.5	9.4	6.7	8.4	16.4
	9.5	7.5	8.4	9.6	8.2	10.4

表3鸡肝样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数CV%
02	10.8	9.5	7.5	8.5	9.2	13.4
	10.2	9.4	8.5	7.2	6.8	17.1
	10.8	5.4	7.6	9.5	8.4	24.4

05	6.5	7.2	9.4	8.2	7.6	14.0
	9.5	7.4	8.2	6.7	8.2	13.1
	9.5	7.4	6.8	9.5	8.3	14.7
09	6.5	7.4	10.2	9.5	7.4	19.1
	9.5	8.4	7.2	9.5	6.4	16.9
	8.2	7.6	9.4	8.2	6.4	13.7

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%。

2、试剂盒的准确度测定

取两个浓度的盐霉素标准品溶液分别为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L) 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L)，分别用试剂盒按照实施例 1 或实施例 2 的方法检测盐霉素，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度。试剂盒准确度检测结果如表 4 所示，结果表明鸡肉添加的准确度在 62.4%~80.3%之间，鸡肝添加准确度在 71.6%~89.8%之间。

表4 准确度测定试验

样本		鸡肉		鸡肝	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		5	10	5	10
准确度%	1	76.5	65.8	89.8	82.9
	2	80.3	73.2	87.2	78.5
	3	75.6	79.5	71.6	72.6
	4	68.9	62.4	80.4	86.5
平均值		75.3	70.2	79.9	80.1
CV%		6.3	10.9	9.4	7.5

3、试剂盒保存期试验

将试剂盒分别保存在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ ，6 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、盐霉素添加实际测定值，结果表明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 $^{\circ}\text{C}$ 保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明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 $^{\circ}\text{C}$ 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可以在 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存 6 个月以上。

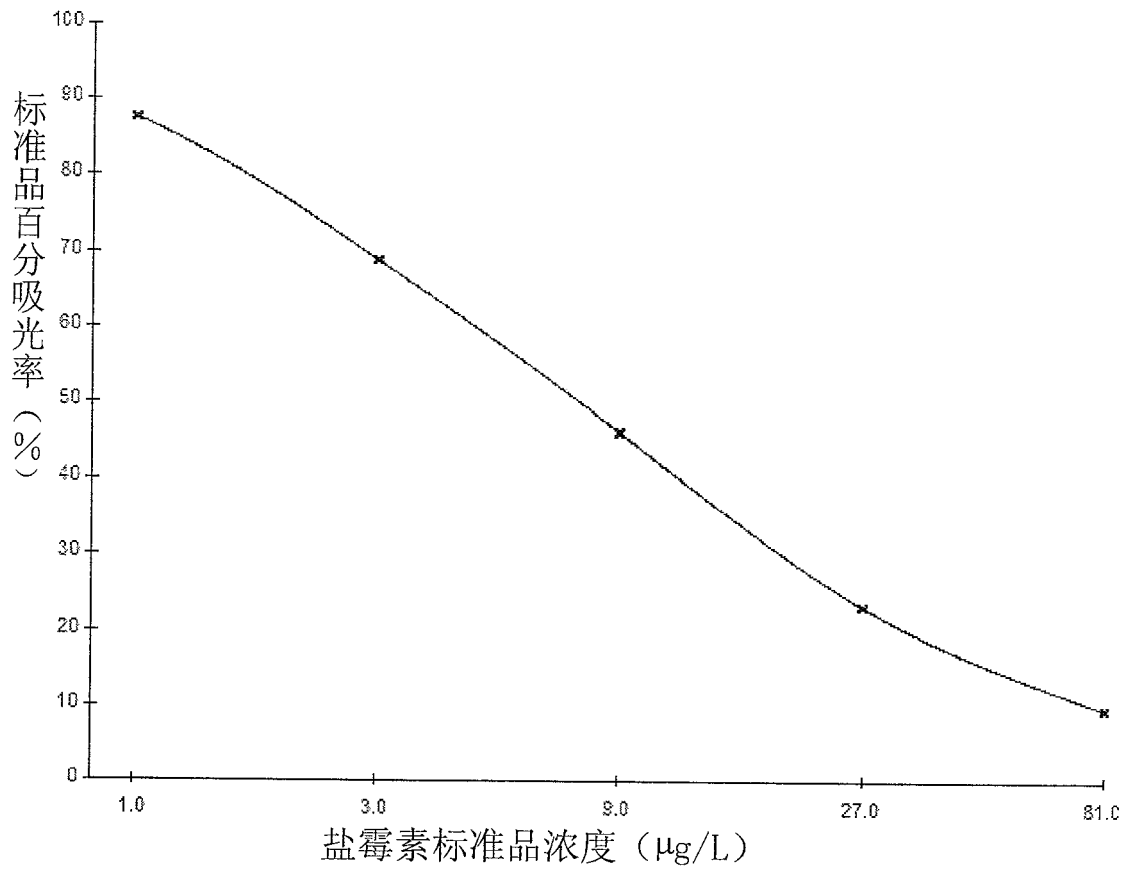


图 1

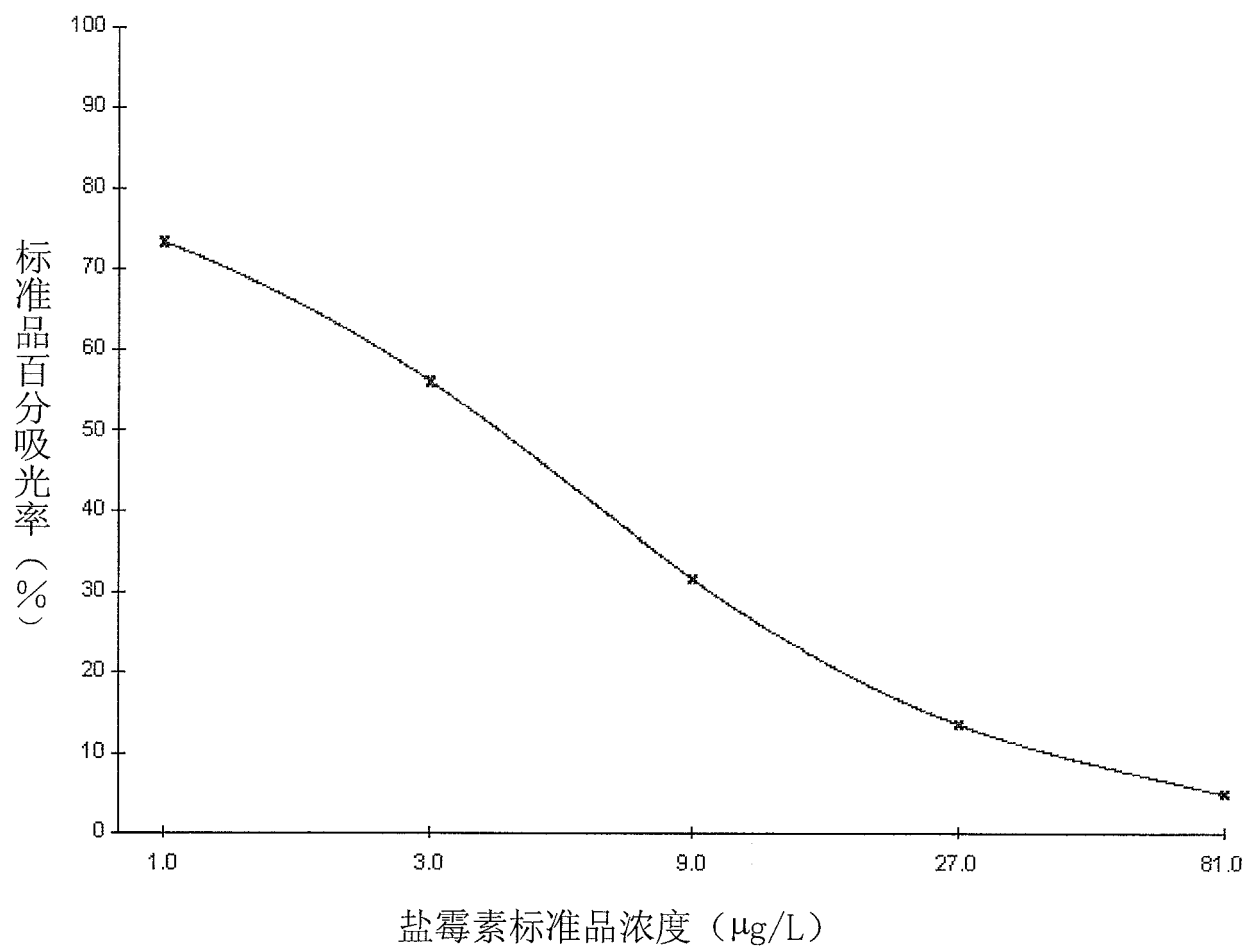


图 2

专利名称(译)	一种检测盐霉素的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100489532C	公开(公告)日	2009-05-20
申请号	CN200610007285.7	申请日	2006-02-17
[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 冯才伟 江海洋 吴小平 汪善良		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 史为民 冯才伟 江海洋 吴小平 汪善良		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1811441A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测盐霉素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测盐霉素的酶联免疫试剂盒，包括盐霉素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为盐霉素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盐霉素半抗原；当所述包被原为盐霉素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盐霉素半抗原。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如动物肝脏、肌肉等盐霉素药物残留量。

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