

[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 200510086773.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100501408C

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086773.7

[73] 专利权人 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

[56] 参考文献

US5660995A 1997.8.26

enzyme - linked immunosorbent assay - based
detection of freetrenbolone in bovine bile. Jane
Fitzpatrick 等. Journal of agricultural and food
chemistry, Vol. 52 . 2004

审查员 王丽华

[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 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

检测群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测动物源性食品中群勃龙的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有群勃龙抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板，酶标记物，群勃龙特异性抗体，群勃龙标准品溶液，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这种酶联免疫试剂盒检测群勃龙的方法，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。本发明提供的检测动物源性食品中群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法，灵敏度高，特异性强，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。

1、 一种检测动物源性食品中群勃龙残留的酶联免疫试剂盒，
其特征在于它含有：

- (1) 包被有群勃龙抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板；
- (2) 酶标记物；
- (3) 群勃龙特异性抗体；
- (4) 群勃龙标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液，

其中所述包被抗原是将群勃龙采用琥珀酸酐法合成群勃龙半抗原，将所述半抗原与牛血清白蛋白偶联得到；所述群勃龙特异性抗体是通过将所述半抗原与血蓝蛋白偶联作为免疫原制备获得；

其中，浓缩洗涤液为pH7.4、含有0.8%~1.2%吐温和1‰叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为含有5‰N,N'-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标记物或包被原所用抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标记物为酶标记羊抗鼠抗抗体或酶标记群勃龙抗原，所用标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶。

4、如权利要求 1-3 之任一所述的试剂盒，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。

5、如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于：群勃龙标准品溶液为六个浓度梯度的群勃龙溶液，群勃龙稀释液为含有 5‰N, N'-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

6、如权利要求 1~3 任一项所述的试剂盒，其特征在于：群勃龙特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔多克隆抗体，免疫原是采用水溶性碳化二亚胺法将群勃龙半抗原和血蓝蛋白进行偶联得到的。

7、一种检测动物源性食品中群勃龙的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1-6 之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

检测群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法

技术领域

本发明涉及一种检测动物源性食品中群勃龙的酶联免疫试剂盒及方法。

背景技术

群勃龙（Trenbolone, TRE）是应用广泛的甾类同化激素，曾对畜禽疾病控制和治疗起重要作用。但由于群勃龙存在严重的副作用，能使人引起疾病，欧美等发达国家已相继禁止或严格禁止使用。我国农业部第 235 号文件中规定，动物源性食品中群勃龙的残留限量为不得检出。

目前，用于群勃龙残留检测的方法主要有气相色谱（RPMC）分析法和酶联免疫吸附分析法。气相色谱（RPMC）分析法样本前处理及测定操作繁琐且费用高，酶联免疫吸附分析方法使用成本高、回收方法复杂、灵敏度不高，这些缺陷使其推广应用受到限制。

发明内容

（一）要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种灵敏度高、特异性强、操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的检测动物源性食品中群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法。

（二）技术方案

本发明的检测原理为：当包被原为群勃龙偶联抗原时是将群勃龙偶联抗原（TRE-BSA）吸附于固相载体上，加入样本或群勃龙标准品并加入群勃龙抗体，待测样品中残留的群勃龙和酶联板上包被的群勃龙抗原竞争群勃龙特异性抗体，再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中群勃龙残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中群勃龙的浓度，而与标准溶液颜色比较则可判断样品的浓度范围。

当包被原为抗抗体时是将抗抗体吸附于固相载体上，加入群勃龙特异性抗体，再加入酶标记群勃龙抗原及群勃龙系列标准品或样本，待测样本中残留的群勃龙药物和酶标记群勃龙抗原竞争结合在抗抗体上的群勃龙特异性抗体，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中群勃龙残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出群勃龙的浓度范围。

本发明提供了一种检测动物源性食品中群勃龙的酶联免疫试剂盒，它含有：

- (1) 包被有群勃龙抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板；
- (2) 酶标记物；
- (3) 群勃龙特异性抗体；
- (4) 群勃龙标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液。

本发明所述试剂盒中群勃龙包被抗原是采用水溶性碳化二亚胺法将群勃龙与牛血清白蛋白进行偶联得到；其中抗抗体可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体对无病原体山羊进行免疫得到的，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体对无病原体山羊进行免疫得到的。制备酶联板过程中所用的包被缓冲液为 pH 8.0、0.05mol/L 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液；包被群勃龙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；所用的洗涤液为含有 0.8~1.2% 吐温和 1% 叠氮化钠 (Na_3N) 防腐剂的磷酸盐缓冲液；所用的封闭液含有 3~10% 小牛血清、1% 惰性蛋白和 1% 叠氮化钠 (Na_3N) 防腐剂的溶液。

本发明所述试剂盒中包被有群勃龙抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板的制备步骤为：

(1) 用包被缓冲液将群勃龙与牛血清白蛋白(BSA)偶联物或抗抗体以 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ 浓度稀释成抗原稀释液或抗抗体稀释液；

(2) 向酶联板的每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 已经稀释好的抗原稀释液或抗抗体稀释液， 37°C 温育2h，并 4°C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤2次，每次15~30s，拍干；

(3) 向酶联板的每孔中加入 $150 \sim 200 \mu\text{l}$ 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。

以上方法制备的酶联板具有很好的稳定性，经过冷热稳定性试验，酶联板的相关技术参数均在正常范围，且包被原有良好的特异性。

本发明所述试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记群勃龙抗原；所用酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶；酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液；酶标记物工作液所用的稀释液为含有50%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）和1%的叠氮化钠防腐剂的溶液。

本发明标记酶优选辣根过氧化物酶。

本发明所述试剂盒中酶标记抗抗体的制备步骤为：

(1) 抗抗体的制备：以鼠源性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；或以兔源性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) 酶标记抗抗体的制备：采用过碘酸钠法将抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)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，且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，活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁，从而降低酶标记物的酶活性，使制备的偶联物中混有许多聚合体。为了解决这个问题，本发明将传统的方法进行改良，即：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；同时降低辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比至 2:1。改良的过碘酸钠法使得抗抗体与辣根过氧化物酶的结合率升高，比传统的方法简便，对酶活性的损失也减少。

本发明所述试剂盒中酶标记抗原是采用活性酯法将标记酶与群勃龙半抗原进行偶联得到。

本发明所述试剂盒中群勃龙特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔多克隆抗体，免疫原是采用水溶性碳化二亚胺法将群勃龙和血蓝蛋白进行偶联得到的；抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液；抗体稀释液为含有 5‰N,N'-二甲基甲酰胺（DMF）的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中群勃龙特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体，其制备方法如下：

（1）群勃龙单克隆抗体制备的步骤为：

a. 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，免疫原（群勃龙和血蓝蛋白的偶联物）免疫剂量为 80 ~ 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；

b. 细胞融合与克隆化：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，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；

c. 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 1 ~ 5 $\times 10^6$ 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；

d. 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 $\times 10^5$ ~ 10 6 个/只，7 ~ 10 天后采集腹水，用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20 $^{\circ}$ C 保存；

- e. 抗体冻干粉可将腹水在 37℃ 环境下烘干, 放入 -20℃ 保存;
- f. 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 0.02 ~ 0.08 μg/ml 浓度进行稀释。

(2) 群勃龙多克隆抗体制备的步骤为:

采用新西兰大白兔作为免疫动物, 免疫原(群勃龙和血蓝蛋白的偶联物)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多克隆抗体。

本发明所述试剂盒中底物显色液: 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 pH7.4、含有 0.8% ~ 1.2% 吐温和 1% 叠氮化钠 (NaN₃) 防腐剂的磷酸盐缓冲液; 浓缩复溶液为含有 5% N, N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中群勃龙标准品溶液为六个浓度梯度的群勃龙溶液, 群勃龙稀释液为含有 5% N, N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中试剂的配制具体为:

- a. 群勃龙标准溶液: 群勃龙系列标准溶液 6 瓶, 浓度为 0 μg/L, 0.05 μg/L, 0.15 μg/L, 0.45 μg/L, 1.35 μg/L, 4.05 μg/L;
- b. 包被缓冲液: pH 8.0, 0.05mol/L 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液;
- c. 封闭液: 含有 3 ~ 10% 小牛血清、1% 惰性蛋白和 1% 叠氮化钠 (NaN₃) 防腐剂的溶液;
- d. 浓缩洗涤液: 含有 0.8 ~ 1.2% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠 (NaN₃) 防腐剂的磷酸盐缓冲液 (0.01M, pH7.4), 为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍;
- e. 酶标记物: 酶标记抗抗体工作液或酶标记群勃龙抗原工作液;

- f. 底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲；
- g. 底物显色液 B 液：邻苯二胺（OPD）或四甲基联苯胺（TMB）；
- h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH 8.1、含有 MgCl_2 0.01% 100mmol Tris-HCl；
- i. 终止液：1 ~ 2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液；
- j. 浓缩复溶液：pH 8.0, 0.05mol/L Tris-缓冲液，为正常使用浓度的 5 ~ 10 倍。

本发明所述检测动物源性食品中群勃龙的方法，包括了以下步骤：

- （1）样品前处理；
- （2）用本发明所述的试剂盒进行检测；
- （3）分析检测结果。

本发明的样本前处理方法用来定量检测动物组织、饲料、尿液等样品中群勃龙的残留量。

本发明中样品前处理方法为：

- （1）动物组织、饲料

用均质器均质样品 $5 \pm 0.5\text{g}$ 动物组织或饲料，加入 8ml 乙腈和 2ml 1M 氢氧化钠，振荡 10min，室温、3000rpm 以上离心 10min，取上清液 1ml 移置离心管中，加入 1ml 1M 氢氧化钠和 2ml 乙腈，振荡 1min，加入 2.4ml 正己烷和 1.6ml 二氯甲烷，振荡 10min，室温、3000rpm 以上离心 10min，去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用 1ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物，取水相稀释 4 倍后，即可进行分析。

- （2）尿液

取 2ml 尿液到离心管中，室温、3000rpm 离心 10min，直至清亮，移取 1ml 尿液到离心管中，加入 2ml 乙腈，振荡 1min，加入 3ml 的正己烷/二氯甲烷（v/v = 4/1），振荡 10min，室温、3000rpm 以上离心 10min，去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用 1ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物，取水相进行分析。

用本发明所述包被群勃龙偶联抗原的试剂盒检测动物源性食品中群勃龙残留的方法步骤为:

(1) 向包被群勃龙偶联抗原的酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液(各2孔) 50 μ l, 再加入群勃龙抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min;

(2) 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液, 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;

(3) 每孔加入酶标记抗抗体 100 μ l, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min;

(4) 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液, 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;

(5) 加底物显色液 A 液 50 μ l, 再加显色液 B 液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15 min;

(6) 每孔加入终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值(OD 值);

(7) 用公式: 百分吸光度值(%) = (B/B₀) × 100% 计算出标准品和样品溶液的百分吸光度值。以标准品百分吸光值为纵坐标, 以群勃龙标准品浓度的半对数为横坐标, 绘制标准曲线图, 则样品中群勃龙的浓度直接从标准曲线图上读出。也可以采用计算机软件来分析检测结果。

用本发明所述包被抗抗体的试剂盒检测动物源性食品中群勃龙残留的方法步骤为:

(1) 向包被抗抗体的酶标板微孔中加入群勃龙抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min;

(2) 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液, 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;

(3) 加入系列标准品溶液或样品溶液(各2孔) 50 μ l 和辣根过氧化物酶标记抗抗体 100 μ l, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min;

(4) 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液, 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;

(5) 加底物显色液 A 液 50 μ l, 再加显色液 B 液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15 min;

(6) 每孔加入终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值 (OD 值);

(7) 用公式: 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$ 计算出标准品和样品溶液的百分吸光度值。以标准品百分吸光值为纵坐标, 以群勃龙标准品浓度的半对数为横坐标, 绘制标准曲线图, 则样品的浓度直接从标准曲线图上读出。也可以采用计算机软件来分析检测结果。

(三) 有益效果

本发明提供的检测动物源性食品中群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法, 灵敏度高, 特异性强, 样品前处理过程简单, 费用低廉, 且能同时检测大批样品。

附图说明

图1: 群勃龙的检测标准曲线图。

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 检测群勃龙的酶联免疫试剂盒的组分制备

1. 抗原的合成

a. 包被原的合成

将群勃龙采用琥珀酸酐法合成群勃龙半抗原。因群勃龙分子结构中有羟基, 所以可采用琥珀酸酐方法设计结构类似的半抗原, 制备出的抗原突出群勃龙分子的原有结构, 使得制备的群勃龙抗体的特异性较好。包被原是将半抗原和牛血清白蛋白 (BSA) 载体蛋白采用水溶性碳化二亚胺法 (EDC) 进

行偶联得到。

b. 免疫原的合成

将群勃龙采用琥珀酸酐法合成群勃龙半抗原。因群勃龙分子结构中有羟基，所以可采用琥珀酸酐方法设计结构类似的半抗原，制备出的抗原突出群勃龙分子的原有结构，使得制备的群勃龙抗体的特异性较好。免疫原是将半抗原和血蓝蛋白（KLH）载体蛋白采用水溶性碳化二亚胺法（EDC）进行偶联得到。

本发明合成的免疫原采用紫外吸收法测定其纯度为98.6%。

2. 群勃龙鼠单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以群勃龙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 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。

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，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。

c. 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 5×10^6 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。

d. 单克隆抗体的制备与纯化

采用体内诱生法，将8周龄的Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只，7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20 $^{\circ}$ C保存。

3. 群勃龙兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以群勃龙与兔血清白蛋白偶联物为免

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7d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。

4. 酶标板的制备

用包被缓冲液将群勃龙与牛血清白蛋白(BSA)偶联物稀释成0.03 µg/ml，每孔加入100µl，37℃温育2h，并4℃过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤2次，每次1min，拍干，然后在每孔中加入150µl封闭液，37℃温育1h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例2 检测群勃龙的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测群勃龙的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被有群勃龙抗原的酶联板；
- (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；
- (3) 群勃龙鼠单克隆抗体；
- (4) 群勃龙标准品溶液6瓶，浓度分别为0µg/L，0.05µg/L，0.15µg/L，0.45µg/L，1.35µg/L，4.05µg/L；
- (5) 显色液A液为过氧化氢，显色液B液为邻苯二胺；
- (6) 终止液为2 mol/L的硫酸缓冲液；
- (7) 浓缩洗涤液为PH7.4，含有0.8%吐温20和1%叠氮化钠(NaN₃)防腐剂的磷酸盐缓冲液；
- (8) 浓缩复溶液为含有5%N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液。

实施例3 检测群勃龙的酶联免疫试剂盒的的组建

组建检测群勃龙的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被有羊抗兔抗抗体的酶联板；
- (2) 用碱性磷酸酯酶标记的群勃龙抗原；
- (3) 群勃龙兔多克隆抗体；
- (4) 群勃龙标准品溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L，0.05 μ g/L，0.15 μ g/L，0.45 μ g/L，1.35 μ g/L，4.05 μ g/L；
- (5) 底物液为对硝基磷酸盐缓冲液；
- (6) 终止液为2mol/L的氢氧化钠缓冲液；
- (7) 浓缩洗涤液为pH7.4，含有1.2%吐温20和1%叠氮化钠（ NaN_3 ）防腐剂的磷酸盐缓冲液；
- (8) 浓缩复溶液为含有5% $\text{N}_2\text{N}'$ -二甲基甲酰胺（DMF）的磷酸盐缓冲液。

实施例4 样品中群勃龙残留的检测

1. 样品前处理

用均质器均质 $5 \pm 0.5\text{g}$ 饲料，加入 8ml 乙腈和 2ml 1M 氢氧化钠，振荡 10min，室温下 3000rpm 离心 10min，取上清液 1ml 移置离心管中，加入 1ml 1M 氢氧化钠和 2ml 乙腈，振荡 1min，加入 2.4ml 正己烷和 1.6ml 二氯甲烷，振荡 10min，室温下 3000rpm 离心 10min，去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用 1ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物，取水相稀释 4 倍后，取 50 μ l 进行分析。

2. 用试剂盒检测

向群勃龙偶联抗原包被的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品或样本溶液（各 2 孔）50 μ l，再加入群勃龙抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}\text{C}$ 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，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。每孔加入辣根过氧化物酶标记抗抗体 100 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min，重复洗涤步骤。加入底物显色液 A 液过氧化氢 50 μ l，再加 B 液邻苯二胺 50 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min。每孔加入终止液 2 mol/L 硫酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准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(B_0)再乘以100%，得到百分吸光度值。以群勃龙浓度(μ g/L)的半对数为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，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中群勃龙实际浓度。

实施例5 样品中群勃龙残留的检测

1. 样品前处理

取2ml尿液到离心管中，室温下3000rpm离心10min，直至清亮，移取1ml尿液到离心管中，加入2ml乙腈，振荡1min，加入3ml正己烷/二氯甲烷(=4/1)，振荡10min，室温下3000rpm离心10min，去除上层正己烷相，取中间层有机相在氮气流下完全干燥，用1ml稀释后的复溶液溶解干燥的残留物，取水相50 μ l进行分析。

2. 用试剂盒检测

向羊抗兔抗抗体包被的 96 孔酶标板微孔中加群勃龙多克隆抗体工作液 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，每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液，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群勃龙抗原 50 μ l 及群勃龙系列标准品或样本溶液 50 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。加入底物显色液对硝基磷酸盐 100 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min。每孔

加入终止液 2 mol/L 氢氧化钠溶液 50μl，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准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%，得到百分吸光度值。以群勃龙浓度(μg/L)的半对数为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，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中群勃龙实际浓度。

实验例1 标准品精密度试验

分别从三批试剂盒中抽取10个试剂盒，测定0.45μg/L标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

表1 标准品可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01批	5.4	8.1	4.7	7.4	6.1	8.2	8.4	7.4	8.6	9.1
	03批	6.1	7.4	8.1	9.5	6.3	4.8	7.1	9.2	5.4	6.1
	06批	5.7	4.1	6.2	8.7	7.2	5.6	4.8	5.6	9.2	7.3

结果表明变异系数范围在4.1%~9.5%之间。

实验例2 样本可重复性试验

每个样本按2.5 μg/kg (L)浓度的群勃龙标准品进行添加，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。

表2 动物组织样品可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)	变异系数
		CV%

	2.0	1.6	2.0	2.2	2.1	11.5
01	1.8	2.0	2.1	2.3	2.2	9.2
	2.0	2.1	1.9	1.8	2	5.8
	2.3	2.2	2.0	1.8	1.7	12.7
03	2.0	1.8	2.3	1.7	2.2	12.7
	1.8	1.8	1.7	1.9	2	6.9
	2.0	1.8	1.9	2.0	2.3	9.3
06	2.4	2.2	2.1	1.9	2.3	7.1
	1.8	1.9	2.1	2.0	1.7	8.3

表3 尿液样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数
						CV%
	2.1	1.8	1.6	1.7	1.9	10.6
01	2.0	1.9	2.3	1.8	2.1	9.5
	1.7	1.8	1.6	1.9	2.3	14.5
	1.8	1.9	1.6	1.8	2.2	11.8
03	2.0	1.5	2.2	1.8	1.7	14.7
	1.8	2.1	2.0	1.8	1.7	8.7
	1.9	2.1	1.7	2.3	2.2	11.8
06	1.6	1.8	1.7	1.5	1.8	7.7
	1.8	1.6	1.9	2.1	1.7	10.6

表4 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数
						CV%
01	1.8	1.7	1.6	1.9	2.3	14.5
	2.5	2.3	2.1	2	1.9	11.1
	2.3	2.1	2.2	1.7	2	11.2
03	1.7	1.6	1.8	1.9	1.7	6.5
	2.1	2.3	2.2	1.8	1.7	12.8
	1.7	1.9	2.1	2.3	1.6	14.9
06	2.3	2.2	2.1	1.8	1.9	10.1
	1.8	1.7	1.8	1.6	1.9	6.4
	2.1	2.2	1.8	1.7	1.9	10.7

结果表明动物组织样本变异系数均低于15%，尿液样本的变异系数均低于15%，饲料样本的变异系数均小于15%。

实验例3 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的群勃龙标准品溶液，分别为 $1\mu\text{g/L}$ 和 $2.5\mu\text{g/L}$ ，分别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。

表5 试剂盒的准确度试验

样本	动物组织		尿液		饲料	
	1	2.5	1	2.5	1	2.5
添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)						
回收 1	82.4	76.4	84.3	91.4	83.4	87.4
2	87.4	83.6	82.7	92.7	86.7	82.7

率%	3	79.8	84.6	81.6	89.7	84.6	84.6
	4	84.1	83.2	78.4	83.9	94.2	76.1
平均		83.4	82.0	81.3	89.4	87.2	82.7
值							

结果表明动物组织添加的回收率在76.4%~87.4%之间，尿液添加回收率在78.4%~92.7%之间，饲料中添加回收率在76.1%~94.2%之间。

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、群勃龙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℃保存6个月以上。

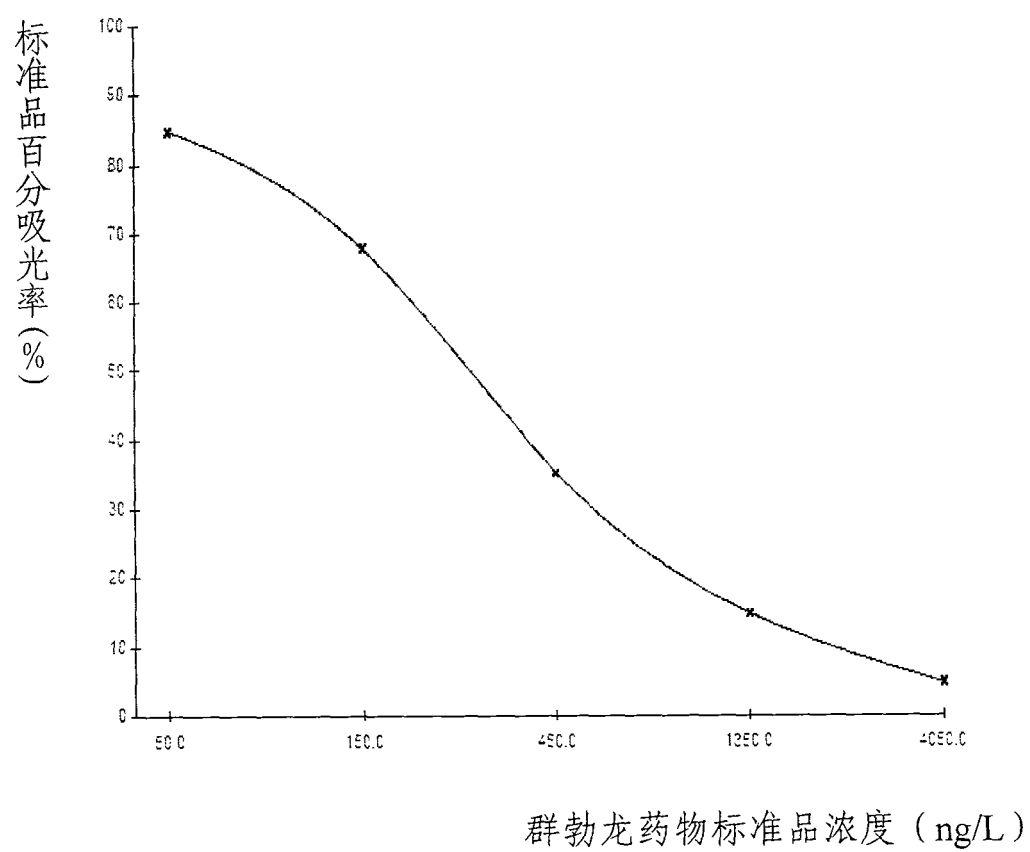


图 1

专利名称(译)	检测群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN100501408C	公开(公告)日	2009-06-17
申请号	CN200510086773.7	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	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN1766627A		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明提供了一种检测动物源性食品中群勃龙的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有群勃龙抗原的酶联板或包被有抗抗体的酶联板，酶标记物，群勃龙特异性抗体，群勃龙标准品溶液，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这种酶联免疫试剂盒检测群勃龙的方法，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。本发明提供的检测动物源性食品中群勃龙残留的酶联免疫试剂盒及方法，灵敏度高，特异性强，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01批	5.4	8.1	4.7	7.4	6.1	8.2	8.4	7.4	8.6	9.1
CV%03批	6.1	7.4	8.1	9.5	6.3	4.8	7.1	9.2	5.4	6.1
06批	5.7	4.1	6.2	8.7	7.2	5.6	4.8	5.6	9.2	7.3