

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710052663.8

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月16日

[11] 公开号 CN 101105492A

[22] 申请日 2007.7.9

[21] 申请号 200710052663.8

[71] 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 袁宗辉 叶胜强 彭大鹏 王玉莲
黄玲利 陈冬梅 陶燕飞 戴梦红
刘振利 谢长清 刘宇 杨波
赵春保 胡晓芬 王小清

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

[54] 发明名称

泰乐菌素和替米考星残留检测用单克隆抗体及酶联免疫方法与试剂盒

[57] 摘要

本发明属于兽药残留分析和免疫分析技术领域，具体涉及一种能同时识别泰乐菌素和替米考星的特异性单克隆抗体、同时检测泰乐菌素和替米考星残留的酶联免疫方法及其试剂盒。本发明的单克隆抗体是由申请人建立的杂交瘤细胞株 P3C4 所分泌。该杂交瘤细胞株保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏号为 CCTCCNO: C200719。本发明公开了特异性单克隆抗体、包被原、免疫原的制备方法和酶联免疫检测方法。与现有技术相比，本发明制备的单抗可以同时识别泰乐菌素和替米考星，拓宽了现有技术的检测对象，本发明的试剂盒和方法具有简便、快速、灵敏、准确等优点，能同时检测动物可食性组织中泰乐菌素和替米考星的残留量。

1、一种能同时识别泰乐菌素和替米考星的单克隆抗体，其特征在于，它是由保藏号为 CCTCC NO: C200719 的杂交瘤细胞株 P3C4 所分泌的。

2、权利要求 1 所述的杂交瘤细胞株 P3C4，保藏在中国典型培养物保藏中心，其保藏号为 CCTCC NO: C200719。

3、根据权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于，它是由半抗原去碳霉糖泰乐菌素与对胨基苯甲酸或己二酰二胨或 O-羧甲基羟胺再与牛血清白蛋白偶联的偶联物作为免疫原制备得到的。

4、包含权利要求 1 所述的单克隆抗体的试剂盒。

5、根据权利要求 4 所述的试剂盒，该试剂盒是同时检测泰乐菌素和替米考星的酶联免疫试剂盒。

6、一种同时检测泰乐菌素和替米考星残留的酶联免疫方法，包括免疫原、包被原和抗体的制备以及样品的前处理，其步骤如下：

(1) 将半抗原去碳霉糖泰乐菌素与对胨基苯甲酸或己二酰二胨或 O-羧甲基羟胺再与牛血清白蛋白偶联得到免疫原；

(2) 将半抗原去碳霉糖泰乐菌素与对胨基苯甲酸或己二酰二胨或 O-羧甲基羟胺再与卵清蛋白偶联得到包被原；

(3) 用步骤 (1) 的免疫原制备得到保藏号为 CCTCC NO: C200719 细胞株 P3C4 所分泌的单克隆抗体；

(4) 用步骤 (2) 的包被原包被固相载体；

(5) 将待测样品用体积百分比为 20-30%乙腈溶液提取、乙酸乙酯萃取、氮气吹干和样品稀释液重新溶解得到待测物；

(6) 对步骤 (5) 的待测物进行检测；

其中：

样品稀释液的组分及配比为：NaCl 8.0g，KH₂PO₄ 0.2g，Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g，KCl 0.2g，硫柳汞 0.01g，加双蒸水至 1000mL。

7、权利要求 1 所述的单克隆抗体在制备同时检测泰乐菌素和替米考星的酶联免疫试剂盒中的应用。

8、权利要求 4 或 5 所述的试剂盒在泰乐菌素和替米考星残留检测中的应用。

泰乐菌素和替米考星残留检测用单克隆抗体及酶联免疫方法与试剂盒

技术领域

本发明属于兽药残留分析和免疫学技术领域。具体涉及一种能同时识别泰乐菌素和替米考星的单克隆抗体的制备、同时检测泰乐菌素和替米考星多残留酶联免疫分析方法的建立及试剂盒研制。

背景技术

泰乐菌素和替米考星属于大环内酯类动物专用抗生素，在兽医临床上广泛用于治疗革兰氏阳性菌引起的肺炎、乳房炎、全身性败血症，特别是用于治疗畜禽支原体感染。此外泰乐菌素还广泛用作饲料添加剂。

泰乐菌素和替米考星在动物组织中的残留，会威胁到食品安全，对人类健康造成危害。泰乐菌素和替米考星易诱导细菌产生耐药性，且耐药性可在细菌之间转移。鉴于此，欧盟在1999年禁止将泰乐菌素用作饲料添加剂(Council Regulation 2821/98, 1998)，中华人民共和国农业部235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》对泰乐菌素和替米考星在动物性食品中残留也制定了最高残留限量。

现有的检测泰乐菌素和替米考星残留量的方法主要包括微生物方法、仪器分析方法和免疫化学分析方法等。微生物法虽在残留筛选高通量上表现出良好的性能，但检测耗时长，缺乏特异性，且所用细菌对不同种类的抗菌药物敏感性存在差异，易导致假阴性和假阳性产生。仪器分析方法的样品前处理复杂，成本高，操作繁琐，适用于样品的确证分析，而不适用于大批量样品的筛选及现场检测。免疫化学分析法特别是酶联免疫吸附分析(ELISA)技术具有快速、灵敏度高、操作简单、适应性强等优点，适合高通量样品筛选。因此对于快速检测泰乐菌素和替米考星在动物组织中的残留，ELISA方法更具优势。

对于小分子化合物ELISA检测方法的建立，小分子化合物的抗体制备是核心部分，而合理设计半抗原又是关键。半抗原的化学结构的细小差异，连接到载体蛋白上的化学位点的不同，交联臂化学性质的不同均是影响小分子化合物抗体性质的决定性因素。因此对小分子化合物进行化学结构改造，合理设计半抗原，从不同的位点以及采用不同的交联臂将半抗原连接到载体蛋白上，构成了该类发明的核心。

申请人检索到与本发明主题相关的专利文献有两篇，其一是美国公开专利，专利号为6,506,885，发明的名称为 Monoclonal antibodies to the drug tilmicosin and a method for detecting the same。其二为中国发明专利公开说明书，申请号为200610007286.1，发明的名称为：一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒，上述两件专利文献都只涉及对单一药物的检测。专利号为6,506,885的美国专利公开了一种以替米考星的衍生物作为半抗原制备的免疫原，获得了一种专门识别替米考星的单克隆抗体。该文献未提供任何关于其创造性的生物试验数据，以至本领域的技术人员难以达到该发明所述的效果。申请号为200610007286.1中国发明专利申请，公开了将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成泰乐菌素半抗原，然后将泰乐菌素半抗原和卵清蛋白采用混合酸酐法偶联制备免疫原。所制备的单克隆抗体仅能识别泰乐菌素，同时该申请并未具体公开其发明的核心技术，即作为试剂盒的主要核心试剂如免疫原和包被原的详细制备步骤，使本领域的技术人员难以实施该发明并达到该发明所称的效果。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术存在的缺陷，制备一种能同时识别泰乐菌素和替米考星的单克隆抗体。本发明的第二个目的是利用该单克隆抗体，建立一种能同时检测泰乐菌素和替米考星残留的ELISA方法。本发明的第三个目的是该单克隆抗体在制备泰乐菌素和替米考星残留检测试剂盒中的应用。本发明的第四个目的是本发明制备的试剂盒在泰乐菌素和替米考星残留检测中的应用。本发明通过以下技术方案实现：

为了实现本发明的任务，发明人制备了一种能同时识别泰乐菌素和替米考星的单克隆抗体，它是由保藏号

为 CCTCC NO: C200719 的杂交瘤细胞株 P3C4 所分泌的。

上述杂交瘤细胞株 P3C4, 保藏在中国典型培养物保藏中心, 其保藏号为 CCTCC NO: C200719。

所用的免疫原是通过半抗原去碳霉糖泰乐菌素 (Desmycosin, DES) 与对胍基苯甲酸或己二酰二胍或 O-羧甲基羟胺再与牛血清白蛋白偶联的复合物制备的。

进一步, 本发明提供了一种同时检测泰乐菌素和替米考星残留的酶联免疫 (ELISA) 方法, 该方法包括免疫原、包被原和抗体的制备以及样品的前处理的步骤, 它还包括如下的具体步骤:

- (1) 将半抗原去碳霉糖泰乐菌素与对胍基苯甲酸或己二酰二胍或 O-羧甲基羟胺再与牛血清白蛋白偶联得到免疫原;
- (2) 将半抗原去碳霉糖泰乐菌素与对胍基苯甲酸或己二酰二胍或 O-羧甲基羟胺再与卵清蛋白偶联得到包被原;
- (3) 用步骤 (1) 的免疫原制备得到保藏号为 CCTCC NO: C200719 杂交瘤细胞株 P3C4 所分泌的单克隆抗体;
- (4) 用步骤 (2) 的包被原包被固相载体 (例如酶标板);
- (5) 将待测样品用体积百分比为 20-30%乙腈溶液提取 (适用于从动物肝脏和动物组织的样品处理)、乙酸乙酯萃取、氮气吹干和样品稀释液重新溶解得到待测物;
- (6) 对步骤 (5) 的待测物进行检测。

其中: 步骤 (5) 中的样品稀释液的组分及配比为: NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, 硫柳汞 0.01g, 加双蒸水至 1000mL。

发明人以上述单克隆抗体和包被原作为核心试剂与常规的其他试剂组装成能同时检测泰乐菌素和替米考星的 ELISA 试剂盒, 对 ELISA 方法进行了验证, 实现了本发明的任务, 从而完成了本发明。

更详细的技术方案如实施例所述。

本发明的主要优点是:

1、本发明制备的单克隆抗体能同时识别泰乐菌素和替米考星, 而现有专利文献的抗体仅能单一识别泰乐菌素或替米考星。

2、本发明在抗体制备时, 采用去碳霉糖泰乐菌素作为半抗原, 该半抗原保留了泰乐菌素和替米考星所共有的化学结构, 由该半抗原制备的抗体可同时识别泰乐菌素和替米考星。

3、本发明建立的 ELISA 方法和试剂盒能同时检测泰乐菌素和替米考星, 一次测定即可检出泰乐菌素和替米考星在可食性动物组织中的残留, 而 200610007286.1 专利申请仅能检测泰乐菌素, 对于组织中替米考星是否残留无法分辨, 需要采用其它方法进行检测, 因此本发明 ELISA 试剂盒在检测药物的种类上具有明显的改进, 可以节省对样品的分析次数, 具有更好的经济价值。

4、本发明试剂盒适用的检测组织包括动物肌肉和肝脏, 本发明涉及的组织样品处理方法简单, 易操作, 样品处理所用的主要有机试剂为乙腈和乙酸乙酯, 相对于 200610007286.1 专利申请样品处理所采用的三氯甲烷来说, 对操作者身体健康危害较小。

附图说明

图 1 为本发明的技术路线图。

图 2 为本发明其中一个实施例的免疫原紫外扫描图谱, 显示了作为半抗原去碳霉糖泰乐菌素 (Desmycosin, DES)、牛血清白蛋白 (BSA) 和去碳霉糖泰乐菌素-对胍基苯甲酸-牛血清白蛋白 (DES-HBA-BSA) 偶联物的紫外吸收特征。

图 3 为本发明其中一个实施例的免疫原紫外扫描图谱, 显示了作为半抗原的去碳霉糖泰乐菌素 (DES)、牛血清白蛋白 (BSA) 和去碳霉糖泰乐菌素-己二酰二胍-牛血清白蛋白 (DES-ADH-BSA) 偶联物的紫外吸收特征。

图4为本发明其中一个实施例的免疫原紫外扫描图谱,显示了作为半抗原的去碳霉糖泰乐菌素(DES)、牛血清白蛋白(BSA)和去碳霉糖泰乐菌素-O-羧甲基羟胺-牛血清白蛋白(DES-AOAA-BSA)偶联物的紫外吸收特征。

图5为本发明的单克隆抗体与泰乐菌素标准品的间接竞争ELISA反应曲线,X轴为泰乐菌素(TYL)标准溶液浓度对数值,Y轴为泰乐菌素标准品溶液的光密度值除以“零”孔光密度值(B/B₀)。

图6为本发明的单克隆抗体与替米考星标准品的间接竞争ELISA反应曲线,X轴为替米考星(TIL)标准溶液浓度对数值,Y轴为替米考星标准品溶液的光密度值除以“零”孔光密度值(B/B₀)。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步说明,但不限制本发明。

实施例1 免疫原和包被原的制备

1.1 半抗原去碳霉糖泰乐菌素(DES)的合成

称取酒石酸泰乐菌素10g,溶解于200mL硫酸溶液(pH2)中,回流2h。反应完毕后用饱和碳酸钠溶液调节pH至8.8,转入分液漏斗中,加入二氯甲烷60mL萃取,重复以上操作1次。合并二氯甲烷层,加入无水硫酸钠5g振摇后静置过夜。过滤后,取二氯甲烷层60℃减压旋转蒸干,得到产物去碳霉糖泰乐菌素。

1.2 去碳霉糖泰乐菌素-对胍基苯甲酸-牛血清白蛋白/卵清蛋白偶联物(DES-HBA-BSA/OVA)的制备

称取去碳霉糖泰乐菌素(DES)770mg、对胍基苯甲酸(HBA)150mg加入到12mL无水乙醇中,室温下磁力搅拌反应5h。60℃减压旋转蒸干,得到产物DES-HBA。称取DES-HBA46.2mg、N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)12.4mg、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)6.9mg溶解于2mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温下磁力搅拌反应12h,反应完毕后称为A液。称取牛血清白蛋白(BSA)165.5mg,溶解于18mL 0.1mol/L磷酸盐缓冲液(称取磷酸氢二钠13.45g,磷酸二氢钠0.64g定容至1000mL)中,称为B液。将A液逐滴加入到B液中,边加边搅拌,置冰水浴中磁力搅拌反应10h。离心后取上清,4℃生理盐水中透析3d,每天更换透析液2次,即得偶联物DES-HBA-BSA。离心后取上清液冷冻干燥,置-20℃保存,作为免疫原用。

在上述步骤中,将BSA换成OVA,即得偶联物DES-HBA-OVA,该偶联物作为包被原用。

1.3 去碳霉糖泰乐菌素-己二酰二胍-牛血清白蛋白/卵清蛋白偶联物(DES-ADH-BSA/OVA)的制备

称取己二酰二胍(ADH)334mg、牛血清白蛋白(BSA)80mg和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)80mg溶解于16mLMES缓冲液[0.1mol/L的2-(N-吗啡啉)乙磺酸]中,室温磁力搅拌反应1.5h。2000rpm离心后取上清,4℃生理盐水中透析3d,每天更换透析液2次。透析后2000rpm离心,取上清,加入DMF2mL和去碳霉糖泰乐菌素(DES)8mg,冰水浴中反应12h。反应完毕后,用4℃生理盐水透析3d,每天更换透析液2次,即得偶联物DES-ADH-BSA。离心后取上清液冷冻干燥,置-20℃保存,作为免疫原用。

在上述步骤中,将牛血清白蛋白换成卵清蛋白(OVA),即得偶联物DES-ADH-OVA,该偶联物作为包被原用。

1.4 去碳霉糖泰乐菌素-O-羧甲基羟胺-牛血清白蛋白/卵清蛋白偶联物(DES-AOAA-BSA/OVA)的制备

称取去碳霉糖泰乐菌素(DES)150mg溶解于4mL甲醇,称为A液。称取O-羧甲基羟胺半盐酸盐(AOAA)22mg、碳酸氢钠8.4mg溶解于4mL水中,称为B液。将B液逐滴加入到A液,室温磁力搅拌反应2.5h。反应完毕后,60℃减压旋转蒸干,得到生成物DES-AOAA。

称取DES-AOAA44mg、DCC12.4mg、NHS6.9mg溶解于3mLDMF中,室温下磁力搅拌反应12h,反应完毕后称为A液。称取BSA110mg,溶解于17mL 0.1mol/L磷酸钠缓冲液(称取磷酸氢二钠13.45g,磷酸二氢钠0.64g定容至1000mL)中,称为B液。将A液逐滴加入到B液中,边加边搅拌,置室温下磁力搅拌反应12h。离心后取上清,4℃生理盐水中透析3d,每天更换透析液2次,即得偶联物DES-AOAA-BSA。2000rpm离心后取上清液冷冻干燥,置-20℃保存,供免疫用。

在上述步骤中,将BSA换成OVA,即得偶联物DES-AOAA-OVA,该偶联物作为包被原用。

实施例2 单克隆抗体的制备

2.1 抗泰乐菌素和替米考星单克隆抗体的制备:

参照薛庆善《体外培养的原理与技术》科学出版社 2001 年版中的方法: 利用发明人所在的兽医药理实验室制备的去碳霉糖泰乐菌素-O-羧甲基羟胺-牛血清白蛋白(DES-AOAA-BSA) 偶联物免疫 Balb/C 小鼠(购自湖北省医学科学院实验动物中心)。免疫程序是取含 DES-AOAA-BSA 偶联物 50~100 μ g 的蛋白溶液与等体积的弗氏完全佐剂(购自 sigma 公司) 乳化后, 于小鼠背部皮下多点注射。以后每间隔 2 周加强一次, 换用不完全佐剂(购自 sigma 公司) 乳化。最后于融合前三天(最好与上次免疫相隔 4 周以上), 腹腔注射, 强化免疫, 抗原量加倍, 不加佐剂。融合时, 取经最后强化免疫的 Balb/C 鼠一只, 眼眶放血处死(收集血清, 即为阳性血清), 在 75%酒精中浸泡 5min 消毒。无菌取出小鼠脾脏, 分离出脾细胞, 与新鲜制备的 SP2/0 骨髓瘤细胞(SP2/0 骨髓瘤细胞购自卫生部武汉生物制品所) 按 1~2 $\times 10^7$ 个 SP2/0 与 10⁸ 个免疫细胞(1:10~1:15) 的比例于 50mL 离心管中混匀, 1500 r/m, 离心 10 min。倒净上清(可用灭菌的滤纸吸干), 轻轻敲击管底, 使细胞沉淀略加松动。将装有细胞混合物的离心管放于 37 $^{\circ}$ C 水浴中。然后在 1 min 内慢慢滴入预温至 37 $^{\circ}$ C 的 50% 聚乙二醇(PEG)0.8mL (购自 sigma 公司产品), 边加边轻轻用吸管尖搅拌, 继续搅拌 1 min。然后慢慢加入 37 $^{\circ}$ C 预温的 1640 (购自 Hyclone 公司商业培养基) 基础液 10mL。具体方法为: 第一分钟逐滴滴入 1mL, 第二分钟加 1mL, 第 3~4 分钟加 3mL, 第 5 分钟加其余的 5mL, 每次加时需缓慢加入, 并不断轻轻地搅拌。最后加入 30mL 1640 液, 也需慢慢加入。800r/m 离心 5min, 去上清, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 5~8 min。用 HAT (购自 Sigma 公司) 培养基悬浮, 同时也用 HAT 培养基悬浮制备好的饲养脾细胞并与融合后的细胞混合, 根据需要补加适量的 HAT 培养基, 分种于 96 孔培养板中, 约 250 μ L/孔。一次融合可接种 4~8 块 96 孔板。根据需要也可少种, 一般按 SP2/0 的细胞数计算, 每孔接种量约含 10⁴ 左右个 SP2/0 细胞。于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。融合后第二天开始观察有无污染, 于第 4 天补加 1 滴 HAT 培养基, 第 8~10 天吸去 100 μ L 培养基换 HT (购自 sigma 公司) 培养基 100 μ L。待融合细胞集落长至培养孔 1/4, 培养基略变黄时, 进行抗体检测。采用发明人所在的兽医药理实验室制备的去碳霉糖泰乐菌素-O-羧甲基羟胺-卵清蛋白作为筛选抗原, 利用 ELISA 方法筛选出分泌抗泰乐菌素抗体的阳性孔。对筛选出来的阳性孔立刻用有限稀释法(参照薛庆善《体外培养的原理与技术》科学出版社 2001 年版) 进行克隆、筛选。经过 3~4 次克隆, 最终筛选出分泌抗泰乐菌素抗体的单克隆杂交瘤细胞株。对筛选出的该单克隆杂交瘤细胞株, 申请人将其命名为 P3C4, 并于 2007 年 3 月 28 日送中国典型培养物保藏中心(CCTCC) 保藏, 保藏编号为 CCTCC NO: C200719。对该细胞系进行了染色体计数, 结果显示, SP2/0 的染色体的平均数为 58, 脾细胞染色体为 40 条, 而杂交瘤细胞的染色体数目在 90~95 之间, 均高于两亲本细胞的染色体数目。杂交瘤细胞的染色体数目明显多于骨髓瘤细胞 SP2/0 的染色体, 说明融合细胞的确是 SP2/0 细胞与脾细胞的杂交产物。将该细胞株经腹腔注射 Balb/C 小鼠, 生产单克隆抗体。采用购自 ROCKLAND 公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒(Mouse Mab Isotyping Test Kit) 对本发明所得到的单克隆抗体进行亚型鉴定, 结果为小鼠 IgG2a 亚型。

2.2 单克隆抗体的纯化

按照文献方法(朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000), 采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化单克隆抗体。步骤如下: 向 2mL 腹水中加入 0.06mol/L 乙酸缓冲液(取乙酸钠 3.44g、冰醋酸 1.03mL 定容于 1000mL, pH 5.0) 4mL, 用 0.1mol/L 的盐酸调节 pH 值至 4.5。室温搅拌, 并在 30min 内逐滴加入辛酸 66 μ L。4 $^{\circ}$ C 静置 2h, 15000r/min 离心 30min, 取上清, 加入 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(取 Na₂HPO₄ 11.50g、NaH₂PO₄ 2.28g、NaCl 8.5g 定容至 1000mL, pH 7.4) 0.6mL。在冰浴下于 30min 内加入 0.227g/mL 的硫酸铵溶液, 使成 45%饱和度, 静置 1h 以上, 4 $^{\circ}$ C 下 12000r/min 离心 30min, 弃上清, 将沉淀物溶于适量的 PBS(取 Na₂HPO₄ 2.2g、NaH₂PO₄ 0.2g、NaCl 8.5g 定容至 1000mL, pH 7.4) 中, 并用 PBS 在 4 $^{\circ}$ C 透析。透析后 4 $^{\circ}$ C 下 12000r/min 离心 30min, 弃沉淀, 上清即为纯化的单克隆抗体。纯化后的单克隆抗体分装后, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

实施例3 泰乐菌素间接竞争 ELISA 检测方法的建立

3.1 试剂的配制(本实施例使用的试剂除另注明外均采用以下方法配制)

磷酸盐缓冲液: NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, 加三蒸水至 1000mL, 调节 pH 至 7.4;

包被液: 取 Na_2CO_3 1.5g, NaHCO_3 2.9g, 加三蒸水至 1000mL, 调节 pH 值至 9.6;

洗涤液: NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, Tween 20 0.5mL, 硫柳汞 0.1g, 加双蒸水至 1000mL, 调节 pH 至 7.4;

封闭液: 卵清蛋白 0.1g 溶于 100mL 磷酸盐缓冲液中;

底物液 A: 3, 3', 5', 5'-四甲基联苯二胺 (TMB) 200mg, 无水乙醇 100mL, 加双蒸水至 1000mL;

底物液 B: Na_2HPO_4 14.6g, 柠檬酸 9.3g, 0.75%过氧化氢脲 6.4mL, 加双蒸水至 1000mL;

底物混合液: 将 A 液和 B 液按体积比 1:1 混合即得, 现配现用;

终止液: 2mol/L 硫酸溶液。

3.2 包被原浓度和抗体工作浓度的初步确定

选择上述合成的去碳霉糖泰乐菌素-O-羧甲基羟胺-卵清蛋白 (DES-AOAA-OVA) 作为包被原, 用包被液稀释成 4mg/L、2mg/L、1mg/L、0.5mg/L、0.25mg/L、0.125mg/L 6 个浓度, 在 96 孔酶标板, 从第一至第六列依次加入, 4℃过夜; 洗涤 3 次, 拍干, 加入封闭液 200 μ L, 37℃封闭 1h; 洗涤 3 次, 拍干, 在酶标板的第一行至第八行依次加入 100 μ L 磷酸盐缓冲液稀释的稀释倍数为 4000、8000、16000、32000、64000、128000、256000、512000 的单克隆抗体, 37℃孵育 1h, 洗涤 3 次, 拍干; 各孔加入 1:5000 倍磷酸盐缓冲液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (简称二抗, 以下所指二抗均为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 购自武汉三鹰生物技术有限公司) 100 μ L, 37℃孵育 1h, 洗涤 5 次, 拍干; 各孔加入 100 μ L 底物混合液, 避光显色 15min, 加入 50 μ L 终止液, 用自动酶标仪在 450nm 波长处测定光密度值 (OD 值), 结果见表 1。

结果表明, 初步确定包被原 DES-AOAA-OVA 的包被浓度为 0.5mg/L, 抗体工作浓度为 1:64000。

表 1 包被原浓度和抗体工作浓度的初步确定

腹水稀释度 (1:X)	TYL-HBA-OVA 包被浓度 (mg/L)					
	4	2	1	0.5	0.25	0.125
4000	2.465	2.699	2.625	2.386	2.142	1.495
8000	2.642	2.618	2.56	2.318	2.084	1.353
16000	2.494	2.515	2.452	2.195	1.883	1.104
32000	2.143	1.123	2.064	1.876	1.574	0.91
64000	1.646	1.653	1.61	1.447	1.223	0.747
128000	1.065	1.118	1.091	1.02	0.897	0.51
256000	0.607	0.693	0.712	0.671	0.576	0.356
512000	0.368	0.392	0.415	0.376	0.334	0.228

3.3 最佳包被原浓度和抗体工作浓度的确定

以初步确定的包被原 DES-AOAA-OVA 包被浓度作为中心浓度, 等差设置 0.6mg/L、0.5mg/L、0.4mg/L、0.3mg/L 4 个浓度包被酶标板。将泰乐菌素 (TYL) 用磷酸盐缓冲液稀释成 320 μ g/L、160 μ g/L、80 μ g/L、40 μ g/L、20 μ g/L、10 μ g/L、5 μ g/L、0 μ g/L 8 个浓度, 将 1:32000 磷酸盐缓冲液稀释的单克隆抗体 (因为作间接竞争 ELISA 时, 单克隆抗体的加样体积减小了一半, 相应地单克隆抗体稀释度减小一半) 和上述泰乐菌素溶液各加 50 μ L 进行间接竞争 ELISA。以 TYL 浓度对数值作为横坐标, 以 TYL 标准溶液的 OD 值与“零”孔 OD 值的比值 (B/B₀) 作为纵坐标绘制抑制曲线, 选择线性较佳、产生 50%抑制时 TYL 浓度 (IC₅₀) 较低者作为包被浓度。以最佳包被原浓度包被酶标板, 将 TYL 稀释成 320 μ g/L、160 μ g/L、80 μ g/L、40 μ g/L、20 μ g/L、10 μ g/L、5 μ g/L、0 μ g/L 8

个浓度，将抗体以中心浓度 1:32000 等差设置 4 个稀释度，单克隆抗体和系列浓度 TYL 标准溶液各加 50 μ L 进行间接竞争 ELISA，绘制抑制曲线，选择线性较佳、IC₅₀ 值较低者作为最佳抗体工作浓度。结果见表 2。

表 2 最佳包被原浓度和抗体工作浓度的确定

包被原浓度 (mg/L)	IC ₅₀ (μ g/L)	抗体稀释度 (1:X)	IC ₅₀ (μ g/L)
0.6	42.7	24000	39.6
0.5	38.4	32000	34.7
0.4	27.8	40000	26.3
0.3	25.2	48000	26.1

结果表明，随着包被原浓度降低，IC₅₀ 逐渐降低，但考虑到包被原过低时，“零”孔 OD 值偏低，因此采用 0.4mg/L 作为最佳包被浓度。随着单克隆抗体稀释度的增加，IC₅₀ 逐渐降低，但考虑抗体稀释度过大时，“零”孔 OD 值偏低，因此采用 1:40000 作为最佳抗体工作浓度。

3.4 最佳竞争时间及二抗孵育时间的确定

将 TYL 用磷酸盐缓冲液稀释成 0、5、10、20、40、80、160、320 μ g/L，本发明的单克隆抗体用磷酸盐缓冲液按 1:40000 稀释。固定二抗孵育时间为 1h，设置竞争时间为 30、40、50、60min，每个时间点 3 个复孔，作间接竞争 ELISA，绘制标准曲线，计算 IC₅₀ 值。在获得了最佳竞争时间后，设置二抗的孵育时间为 30、40、50、60min，每个时间点 3 个复孔，作间接竞争 ELISA，绘制标准曲线，计算 IC₅₀ 值。以“零”孔 OD 值和 IC₅₀ 值作为考察指标判定最佳竞争时间和二抗孵育时间。结果见表 3。

表 3 最佳竞争时间和二抗孵育时间的确定

竞争时间 (min)	“零”孔 OD 值	IC ₅₀ (μ g/L)	二抗孵育时间 (min)	“零”孔 OD 值	IC ₅₀ (μ g/L)
30	1.50	27.2	30	1.12	54.0
40	1.52	36.5	40	1.32	38.3
50	1.64	43.9	50	1.38	32.4
60	1.54	45.0	60	1.44	36.4

结果表明，随着竞争时间的增加，“零”孔 OD 值变化不大，IC₅₀ 值增加较大。抗原抗体竞争反应 30min 后，IC₅₀ 值最低，因此选择 30min 作为最佳竞争时间。二抗孵育 50min，“零”孔 OD 值满足要求，且 IC₅₀ 值最低，因此选择 50min 作为最佳二抗孵育时间。

3.5 标准曲线的建立

将泰乐菌素用磷酸盐缓冲液配制成 0 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L、80 μ g/L 6 个系列浓度，每个浓度重复 3 孔，按照间接竞争 ELISA 方法测定，重复测定 5 次。以泰乐菌素溶液浓度的对数值为横坐标，B/B₀ 为纵坐标绘制标准曲线，求出 IC₅₀。本试剂盒的 IC₅₀ 值为 19.14 \pm 2.4 μ g/L。

3.6 交叉反应试验

将大环内酯类药物用磷酸盐缓冲液配制成适当浓度，用建立的 ELISA 方法测定各药物的 IC₅₀ 值，每个药物 3 个复孔，以单克隆抗体对泰乐菌素的交叉反应率为 100%，利用公式 1 计算单克隆抗体对各药物的交叉反应率，结果见表 4。

$$\text{公式 1: 交叉反应率 (\%)} = \frac{50\% \text{抑制率 (TYL)}}{50\% \text{抑制率 (其他药物)}} \times 100\%$$

表 4 本发明试剂盒对各种大环内酯类药物的交叉反应率

药物	IC ₅₀ (μ g/L)	交叉反应率 (%)
泰乐菌素	17.2	100

替米考星	24.7	69.6
螺旋霉素	>10000	<0.2
红霉素	>10000	<0.2
吉他霉素	>10000	<0.2
阿齐霉素	>10000	<0.2
交沙霉素	>10000	<0.2
竹桃霉素	>10000	<0.2
罗红霉素	>10000	<0.2
阿维菌素	>10000	<0.2
伊维菌素	>10000	<0.2

结果表明，单克隆抗体对泰乐菌素和替米考星有较高的交叉反应率，可用于动物组织中泰乐菌素和替米考星残留 ELISA 检测方法的建立。

实施例 4 本发明泰乐菌素和替米考星多残留检测 ELISA 试剂盒的组装

4.1 本发明 ELISA 试剂盒由下述部分组成：

- 1) 包被有包被原 DES-AOAA-OVA 的固相载体（酶标板）；
- 2) 泰乐菌素标准溶液 6 瓶，浓度分别为 0 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L、80 μ g/L；
- 3) 保藏号为 CCTCC NO: C200719 的泰乐菌素单克隆抗体工作液；
- 4) 辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠 IgG 抗体工作液；
- 5) 浓缩磷酸盐缓冲液：NaCl 80.0g, KH₂PO₄ 2.0g, Na₂HPO₄·12H₂O 29.0g, KCl 2.0g, 硫柳汞 0.1g, 加双蒸水至 1000mL；
- 6) 浓缩洗涤液：NaCl 80.0g, KH₂PO₄ 2.0g, Na₂HPO₄·12H₂O 29.0g, KCl 2.0g, Tween20 5mL, 硫柳汞 0.1g, 加双蒸水至 1000mL；
- 7) 底物液 A：3, 3', 5', 5'-四甲基联苯二胺（TMB）200mg, 无水乙醇 100mL, 加双蒸水至 1000mL；
- 8) 底物液 B：Na₂HPO₄ 14.6g, 柠檬酸 9.3g, 0.75%过氧化氢尿素 6.4mL, 加双蒸水至 1000mL, 调节 pH 至 5.0~5.4；
- 9) 终止液：2mol/L 硫酸溶液。

4.2 酶标板的制备

用包被液将 DES-AOAA-OVA 稀释成 0.4mg/L，每孔加入 100 μ L，4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，每孔加入 210 μ L 洗涤液洗涤 3 次，拍干，然后每孔加入封闭液 200 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，倾去孔内液体，洗涤液洗涤 3 次，拍干，用锡箔纸真空密封保存。

实施例 5 本发明的酶联免疫试剂盒的测定程序

5.1 试剂的配制

- 1) 样品稀释液：根据将试剂盒中提供的浓缩磷酸盐缓冲液用三蒸水稀释 10 倍后使用。
- 2) 洗涤液：将试剂盒中提供的洗涤液用三蒸水稀释 10 倍后使用。
- 3) 底物混合液：根据每次所需用量，将配制的底物液 A 和底物液 B 按体积 1:1 混匀，现配现用。

5.2 组织样品前处理

1、猪肌肉组织的前处理：

- 1) 称取组织均质物 2.0g 于 50mL 离心管中，加入 20%乙腈水溶液 10mL，剧烈振荡 5min 后，室温 4800rpm 离心 5min；

2) 取上清液 3mL, 加入 1mol/L NaOH 溶液 30 μ L, 混匀后, 加入乙酸乙酯 5mL, 剧烈振荡 2min 后, 室温 6000rpm 离心 5min;

3) 吸取乙酸乙酯层, 45 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加入样本稀释液 1.2mL, 充分溶解后供试剂盒测定, 本处理对组织样品的稀释系数为 2。

2、猪肝脏组织的前处理:

1) 称取组织均质物 1.0g 于 50mL 离心管中, 加入 30% 乙腈水溶液 11mL, 剧烈振荡 5min 后, 4 $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 10min;

2) 取上清液 3mL 到另一容器中, 加入 1mol/L NaOH 溶液 30 μ L, 混匀后, 加入乙酸乙酯 4mL, 剧烈振荡 2min 后, 室温 6000rpm 离心 5min;

3) 吸取乙酸乙酯层, 45 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 加入样本稀释液 1mL, 充分溶解后供试剂盒测定, 本处理对组织样品的稀释系数为 4。

5.3 测定步骤

1) 加样: 向酶标板微孔中加入泰乐菌素系列浓度标准溶液或样品溶液 50 μ L, 然后加入人环内酯类单克隆抗体工作液 50 μ L, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1h;

2) 洗涤: 倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液 210 μ L 洗涤 3 次并拍干;

3) 加酶标二抗: 每孔中加入酶标二抗工作液 100 μ L, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1h;

4) 洗涤: 倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液 210 μ L 洗涤 5 次并拍干;

5) 加底物: 每孔中加入底物混合液 100 μ L, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 15min;

6) 加终止液: 每孔中加入终止液 50 μ L;

7) 测定: 用酶标仪在 450nm 处测定每孔的光密度值 (OD 值)。

5.4 结果判断

标准曲线:

以所测定的标准品 OD 值除以“零”孔 OD 值 (B/B₀) 为纵坐标, 泰乐菌素浓度的对数值为横坐标作标准曲线, 并进行线性回归, 给出回归方程。

肌肉中泰乐菌素或替米考星浓度计算:

计算样品的抑制率 (所获得的样品的 OD 值除以“零”孔 OD 值), 代入标准曲线的回归方程中, 并乘以稀释系数 2, 计算出肌肉中 TYL 浓度 (C_{TYL}, μ g/kg), 按照公式 2 折算成替米考星浓度 (C_{TIL}, μ g/kg)。

肝脏中泰乐菌素或替米考星浓度计算:

计算样品的抑制率 (所获得的样品的 OD 值除以“零”孔 OD 值), 代入标准曲线的回归方程中, 并乘以稀释系数 4, 计算出肝脏中泰乐菌素浓度 (C_{TYL}, μ g/kg), 按照公式 2 折算成替米考星浓度 (C_{TIL}, μ g/kg)。

$$\text{公式 2: } C_{TIL} = \frac{C_{TYL}}{\text{交叉反应率}}$$

实施例 6 本发明试剂盒的灵敏度、精密度、准确度、重复性试验

6.1 本发明试剂盒的灵敏度试验

以标准曲线的 IC₅₀ 值和组织最低检测限 (LOD) 作为本发明检测试剂盒的灵敏度指标。将泰乐菌素标准品稀释成 0 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L、80 μ g/L 6 个浓度, 每个浓度 3 个复孔, 按照间接竞争 ELISA 方法重复测定 5 次, 取 5 次测定的 IC₅₀ 的平均值。LOD 通过以下步骤决定, 测定 20 份空白肝脏和肌肉组织的 OD 值, 根据标准曲线的回归方程计算出相应的泰乐菌素浓度, 然后计算出泰乐菌素浓度的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD), 根据公式 LOD = $\bar{X} + 3SD$ 计算出组织中的最低检测限。本发明的 IC₅₀ 值为 19.14 \pm 2.4 μ g/L, 泰乐菌素在肌肉中和肝脏中的最低检测限分别为 4.3 μ g/L、6.1 μ g/L。

6.2 本发明试剂盒的精密度试验

将泰乐菌素标准品稀释成 0 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 、80 $\mu\text{g/L}$ 6 个浓度，每浓度 3 个复孔，按照间接竞争 ELISA 方法重复测定 5 次，应用标准曲线的回归方程计算出各浓度泰乐菌素标准溶液的测定值，计算板内和板间变异系数，结果见表 5。

表 5 标准曲线的板内及板间误差

TYL 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}, \mu\text{g/L}$)	板内变异系数 (CV %, n=3)	平均测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}, \mu\text{g/L}$)	板间变异系数 (CV %, n=15)
5	5.11 \pm 0.34	6.61	5.22 \pm 0.41	7.77
	4.95 \pm 0.34	6.92		
	4.93 \pm 0.41	8.27		
	5.63 \pm 0.34	6.06		
	5.48 \pm 0.20	3.65		
10	9.03 \pm 0.70	7.78	9.29 \pm 0.87	9.34
	10.09 \pm 0.85	8.44		
	9.95 \pm 0.74	7.40		
	8.37 \pm 0.56	6.72		
	9.04 \pm 0.33	3.64		
20	17.34 \pm 0.14	0.825	18.88 \pm 1.27	6.75
	19.61 \pm 0.81	4.14		
	19.72 \pm 1.03	5.21		
	19.23 \pm 1.41	7.31		
	18.48 \pm 1.34	7.23		
40	42.20 \pm 1.61	3.82	43.31 \pm 2.84	6.56
	42.95 \pm 1.80	4.19		
	41.71 \pm 2.47	5.92		
	46.63 \pm 2.41	5.17		
	43.08 \pm 4.02	9.32		
80	79.60 \pm 2.05	2.57	77.72 \pm 4.01	5.16
	76.61 \pm 4.30	5.61		
	77.06 \pm 5.58	7.23		
	76.24 \pm 4.39	5.76		
	79.09 \pm 5.05	6.39		

6.3 本发明试剂盒的准确度、重复性试验

在 2g 的匀浆肌肉组织中加入泰乐菌素标准溶液，使其终浓度分别为 20 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 、200 $\mu\text{g/kg}$ 、400 $\mu\text{g/kg}$ ，加入替米考星标准溶液，使其终浓度分别为 30 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 、200 $\mu\text{g/kg}$ ；在 1g 肝脏匀浆组织中加入泰乐菌素标准溶液，使其终浓度分别为 30 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ 、200 $\mu\text{g/kg}$ 、400 $\mu\text{g/kg}$ ；加入替米考星标准溶液，使其终浓度分别为 30 $\mu\text{g/kg}$ 、750 $\mu\text{g/kg}$ 、1500 $\mu\text{g/kg}$ 、3000 $\mu\text{g/kg}$ 。每个浓度 5 个重复，重复测定 3 次。测定添加组织中的泰乐菌素和替米考星的浓度，按照公式 3 计算回收率，考核试剂盒的准确度；计算批内和批间变异系数，考核试剂盒的重复性。准确度和重复性结果见表 6、表 7、表 8、表 9，表明该试剂盒具有可靠的准确度，批内和批间变异系数小，重复性好。

$$\text{公式 3: 回收率 (\%)} = \frac{\text{实测浓度}}{\text{添加浓度}} \times 100\%$$

表 6 泰乐菌素在肌肉中添加回收率及变异系数

TYL 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV %, n=15)
20	104.15 \pm 2.65	2.55	103.01 \pm 9.31	9.04
	105.94 \pm 10.69	10.09		
	106.16 \pm 11.83	12.08		
100	88.32 \pm 6.58	7.45	84.86 \pm 6.53	7.69
	78.50 \pm 2.63	3.35		
	87.41 \pm 4.82	5.51		
200	96.56 \pm 9.15	9.48	92.85 \pm 7.06	7.60
	93.25 \pm 3.98	4.26		
	88.19 \pm 5.34	6.05		
400	101.10 \pm 8.76	8.66	90.79 \pm 10.16	11.19
	86.87 \pm 5.14	5.91		
	83.75 \pm 6.38	7.61		

表 7 替米考星在肌肉中添加回收率及变异系数

TIL 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV %, n=15)
30	97.79 \pm 14.43	14.75	102.09 \pm 10.95	10.73
	105.15 \pm 12.77	12.14		
	103.33 \pm 3.43	3.32		
50	107.05 \pm 11.65	10.88	100.07 \pm 14.56	14.55
	108.75 \pm 7.63	7.02		
	84.42 \pm 9.31	11.03		
100	98.24 \pm 2.62	2.67	100.08 \pm 7.51	7.50
	108.23 \pm 2.61	2.42		
	93.78 \pm 6.84	7.30		
200	103.32 \pm 3.28	3.27	98.19 \pm 8.50	8.66
	104.24 \pm 8.90	8.63		
	90.00 \pm 5.10	5.66		

表 8 泰乐菌素在肝脏中添加回收率及变异系数

TYL 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV %, n=15)
-----------------------------------------	----------------------------------------	-----------------------	------------------------------------------	------------------------

30	89.74±7.40	8.92	91.78±10.09	10.99
	96.67±7.14	7.39		
	95.74±10.17	10.62		
100	91.66±5.50	5.96	92.86±8.28	8.92
	98.92±7.72	7.80		
	88.04±8.58	9.74		
200	91.32±11.41	12.50	88.58±10.93	12.34
	93.65±12.15	12.98		
	80.77±4.74	5.87		
400	80.77±4.74	5.87	81.48±4.13	5.07
	80.49±2.28	2.83		
	83.19±5.14	6.18		

表9 替米考星在肝脏中添加回收率及变异系数

TIL 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV %, n=15)
30	104.64±10.46	9.99	102.15±9.13	8.94
	102.02±8.08	7.92		
	99.80±10.13	10.15		
750	93.42±13.70	14.66	100.42±11.87	11.82
	104.59±12.60	12.05		
	103.25±7.31	7.08		
1500	88.70±13.60	15.34	92.62±12.30	13.27
	91.17±8.52	9.35		
	98.00±14.61	14.91		
3000	79.79±11.37	14.24	86.21±10.62	12.32
	86.89±9.86	11.35		
	91.97±8.65	9.40		

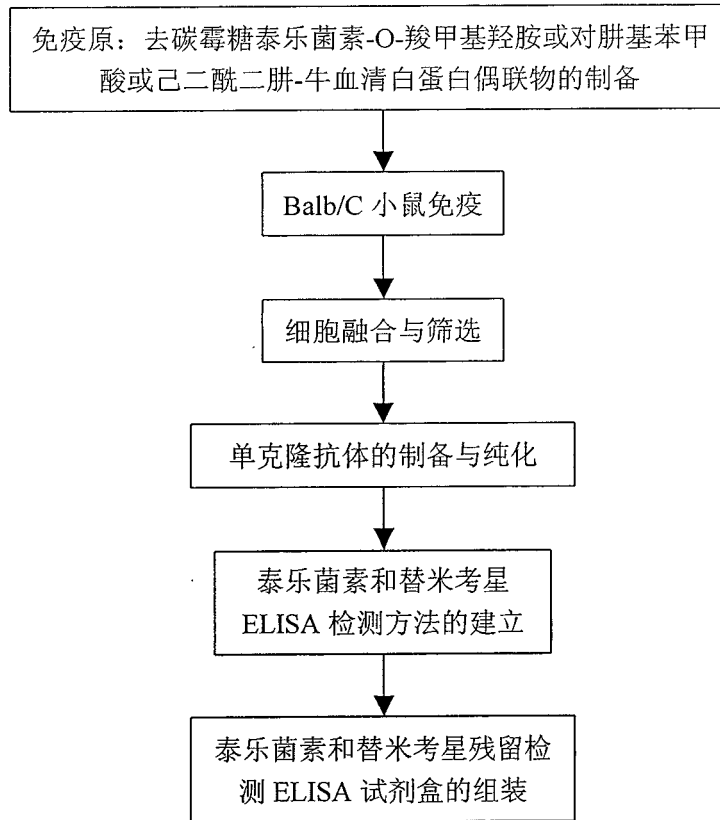


图 1

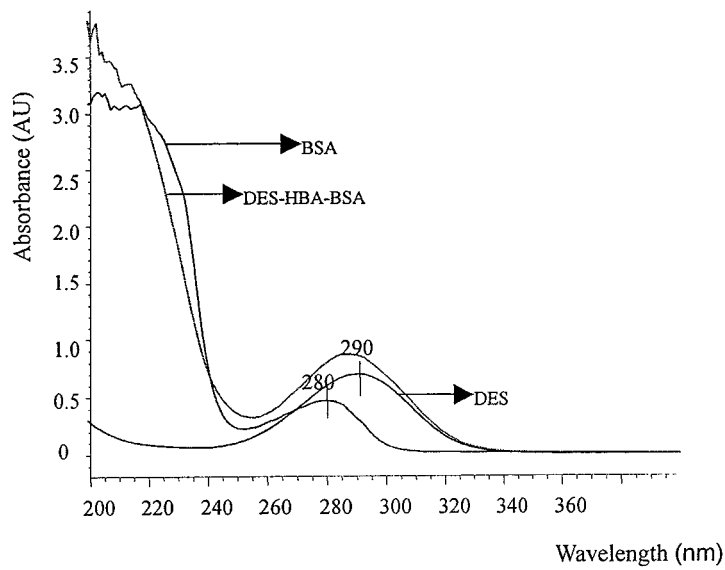


图 2

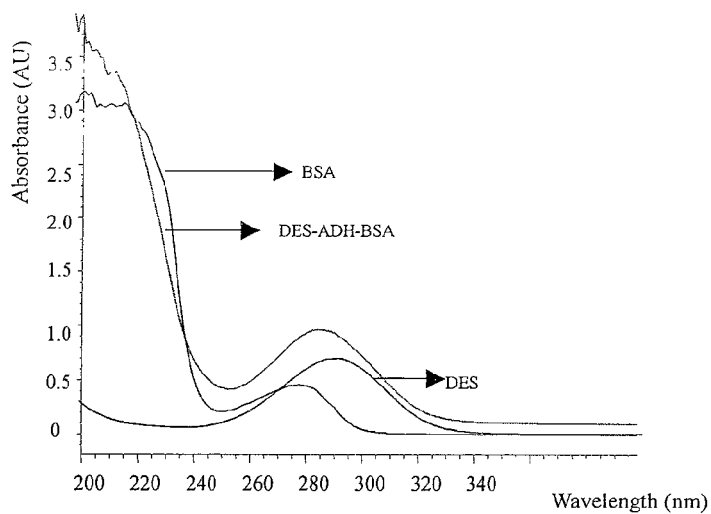


图 3

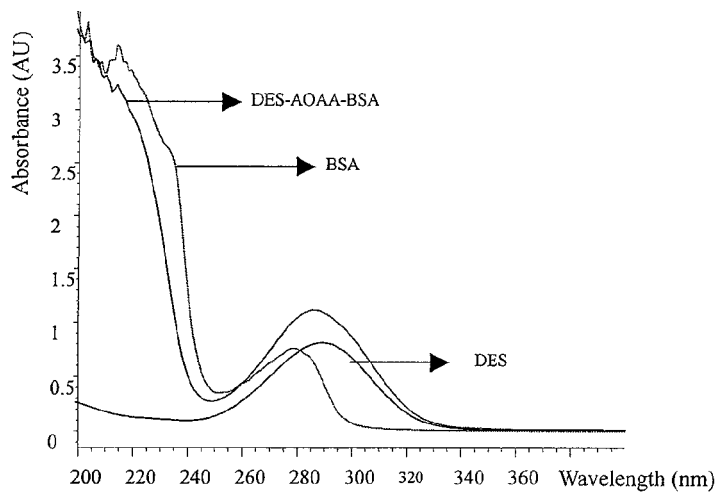


图 4

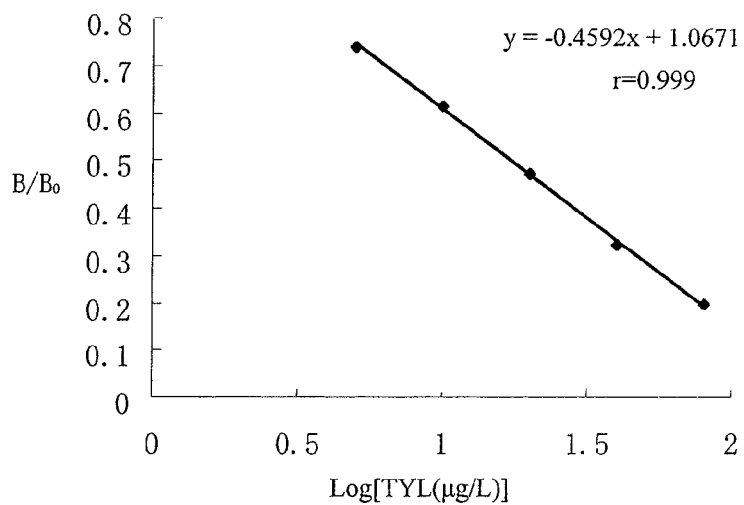


图 5

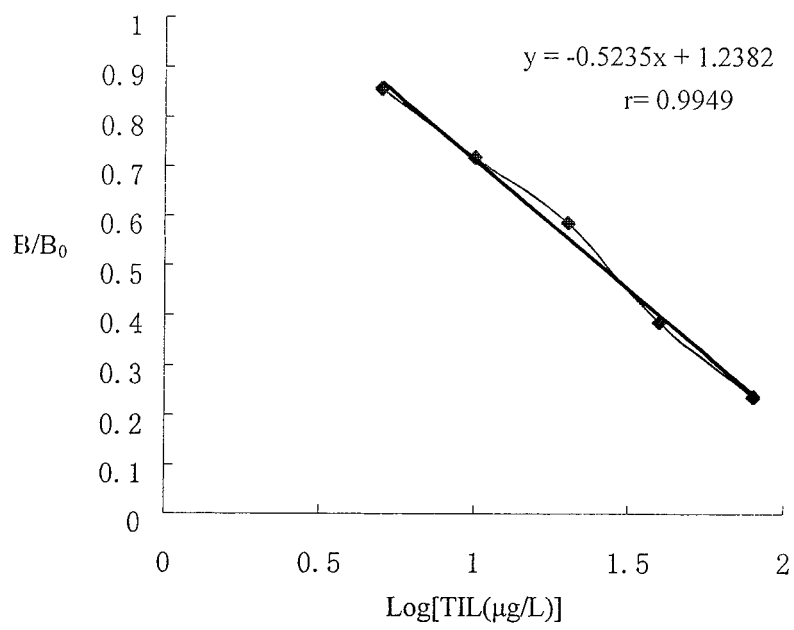


图 6

专利名称(译)	泰乐菌素和替米考星残留检测用单克隆抗体及酶联免疫方法与试剂盒		
公开(公告)号	CN101105492A	公开(公告)日	2008-01-16
申请号	CN200710052663.8	申请日	2007-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	袁宗辉 叶胜强 彭大鹏 王玉莲 黄玲利 陈冬梅 陶燕飞 戴梦红 刘振利 谢长清 刘宇 杨波 赵春保 胡晓芬 王小清		
发明人	袁宗辉 叶胜强 彭大鹏 王玉莲 黄玲利 陈冬梅 陶燕飞 戴梦红 刘振利 谢长清 刘宇 杨波 赵春保 胡晓芬 王小清		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 C12N5/12		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN101105492B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于兽药残留分析和免疫分析技术领域，具体涉及一种能同时识别泰乐菌素和替米考星的特异性单克隆抗体、同时检测泰乐菌素和替米考星残留的酶联免疫方法及其试剂盒。本发明的单克隆抗体是由申请人建立的杂交瘤细胞株P3C4所分泌。该杂交瘤细

胞株保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏号为CCTCCNO：C200719。本发明公开了特异性单克隆抗体、包被原、免疫原的制备方法和酶联免疫检测方法。与现有技术相比，本发明制备的单抗可以同时识别泰乐菌素和替米考星，拓宽了现有技术的检测对象，本发明的试剂盒和方法具有简便、快速、灵敏、准确等优点，能同时检测动物可食性组织中泰乐菌素和替米考星的残留量。

