



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101299046 B

(45) 授权公告日 2012.05.30

(21) 申请号 200810115756.5

C12N 5/12(2006.01)

(22) 申请日 2008.06.27

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2542 2008.06.04

张部昌等. 红霉素基因工程研究进展.《中国生物工程杂志》.2002,第22卷(第3期),40-44.

张存政等. 对硫磷半抗原改造及其免疫抗体.《南京农业大学学报》.2002,第25卷(第4期),37-40.

赵静等. 氯霉素酶联免疫检测方法的测定.《生物技术》.2005,第15卷(第1期),56-59.

(73) 专利权人 北京望尔康泰生物技术有限公司
地址 100085 北京市昌平区西三旗龙兴园中
区10楼2层

专利权人 北京望尔生物技术有限公司

(72) 发明人 沈建忠 何方洋 万字平 冯才伟
冯才茂 汪善良 赵正苗 刘玉梅
罗晓琴

审查员 刘苗

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测红霉素类化合物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红霉素类化合物的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明的酶联免疫试剂盒,包括红霉素特异性抗体及包被原和酶标记物;所述红霉素特异性抗体为红霉素的单克隆抗体或红霉素的多克隆抗体;所述红霉素类化合物为红霉素、硫氢酸红霉素和琥乙红霉素中的至少一种;所述红霉素为红霉素A。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,能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查,将在红霉素的检测中发挥重要作用。

1. 一种检测红霉素类化合物的酶联免疫试剂盒,包括红霉素特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为红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红霉素半抗原;当所述包被原为红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红霉素半抗原;所述红霉素特异性抗体为红霉素的单克隆抗体;所述红霉素类化合物为红霉素、硫氢酸红霉素和琥乙红霉素中的至少一种;所述红霉素为红霉素 A;

所述红霉素单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 2542 的对红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-3 分泌的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括红霉素标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液;所述浓缩洗涤液为含有 1.0% -1.5% 吐温-20、0.001-0.004% 叠氮化钠防腐剂、pH 值为 7.0-7.4、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有 4-6% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.2-7.6、0.01-0.03M 的磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量;所述显色液由显色液 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;所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

3. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为含有 1.25% 吐温-20、0.003% 叠氮化钠防腐剂、pH 值为 7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有 5% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量;所述显色液由显色液 A 液和显色液 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;所述终止液为 2mol/L 盐酸溶液。

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:所述红霉素半抗原是按照如下方法得到的:将红霉素溶于无水乙醇中,与盐酸羟胺水溶液混合,0°C 条件下反应 2.5 小时,过滤,收集沉淀;将所述沉淀溶于二甲基甲酰胺水溶液中,加入琥珀酸酐,室温反应 2h,得到红霉素半抗原。

5. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述红霉素特异性抗体是用所述红霉素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的;所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

6. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标抗抗体是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到的;所述过碘酸钠方法中,所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2 : 1;所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

7. 一种检测红霉素类化合物的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

每 2.0g 动物组织匀浆物中,加入 6-10ml 乙腈,混匀,3000g 以上室温离心 10min,收集上清液;将每 2ml 所述上清液吹干,加入权利要求 6 所述试剂盒中的浓缩复溶液 1-4ml,混匀,取样进行分析;

2) 利用权利要求 1-6 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述样品。

8. 由保藏号为 CGMCC No. 2542 的对红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-3 分泌的红霉素单克隆抗体。

9. 保藏号为 CGMCC No. 2542 的对红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-3。

一种检测红霉素类化合物的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测红霉素类化合物的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 红霉素类化合物属大环内酯类抗生素,主要用于抗畜禽细菌及支原体感染,亦可作猪的饲料添加剂以促进增重和提高饲料转换率。但是红霉素类化合物能对机体产生一些副作用,如胃肠道反应、胆汁郁积性黄疸以及静滴时引起静脉炎等,还能引起坏死性肝病、精神障碍和关节炎综合征等,因此,红霉素类化合物在畜禽生产上的大量应用会导致其在畜禽产品中残留,危害公众健康。目前农业部第 235 号文件中已规定,该药物的最高残留限量为 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 检测红霉素残留量的化学方法主要为气相色谱法、气相色谱-质谱法等仪器方法,由于仪器设备的复杂和操作过程的繁琐,仪器方法不适合现场监控和大量样本筛查。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测红霉素类化合物的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测红霉素类化合物的酶联免疫试剂盒,包括红霉素特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为红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红霉素半抗原;当所述包被原为红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红霉素半抗原;所述红霉素特异性抗体为红霉素的单克隆抗体或红霉素的多克隆抗体;所述红霉素类化合物为红霉素、硫氢酸红霉素和琥乙红霉素中的至少一种;所述红霉素为红霉素 A。

[0006] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还可包括红霉素标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液。

[0007] 所述浓缩洗涤液可以为含有 1.0% -1.5% 吐温-20、0.001-0.004% 叠氮化钠防腐剂、pH 值为 7.0-7.4、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液可以为含有 4-6% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.2-7.6、0.01-0.03M 的磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量;所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液可以为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液可以为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述终止液可以为 1 ~ 2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

[0008] 所述浓缩洗涤液具体可以为含有 1.25% 吐温-20、0.003% 叠氮化钠防腐剂、pH 值为 7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液具体可以为含有 5% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液;所述包被缓冲液具体可以为 pH 值为 9.4 的 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述封闭液是含有 0.5% 人血清白蛋白、0.15% 吐温-20 和 0.1% 维生素 C 的 pH 值为 9.0 的 0.02M 的硼酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量;所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液具体可以为过氧化脲,显色液 B 液具体可以为四甲基联苯胺;所述终止液具体可以为 2mol/L 盐酸溶液。

[0009] 在洗涤液中加入一定量吐温 20 和叠氮化钠的作用在于：缓冲液中吐温 20 会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，则叠氮化钠在溶液中抑制细菌的生长，对溶液的稳定性起到一个保护作用。

[0010] 所述红霉素半抗原可以按照如下方法得到：将红霉素溶于无水乙醇中，与盐酸羟胺水溶液混合，0℃条件下反应 2.5 小时，过滤，收集沉淀；将所述沉淀溶于二甲基甲酰胺水溶液中，加入琥珀酸酐，室温反应 2h；得到红霉素半抗原。

[0011] 所述红霉素特异性抗体是用所述红霉素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

[0012] 红霉素是小分子物质，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。本发明采用碳化二亚胺法将红霉素与载体蛋白偶联，突出了红霉素的特征结构，同时也增加了红霉素半抗原的免疫源性和特异性。其中，红霉素半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与载体蛋白（如血蓝蛋白）的结合摩尔比为 (10-12) : 1。

[0013] 所述红霉素多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0014] 所述红霉素单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 2542 的对红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-3 分泌的抗体。

[0015] 所述酶标抗体是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗体进行偶联得到的；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗体的摩尔浓度比为 2 : 1；所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，优选为辣根过氧化物酶。该改良的过碘酸钠法省略了封闭酶上氨基的步骤，节省了时间，又降低了辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗体的浓度比率，节省了原材料。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测红霉素类化合物的方法。

[0017] 本发明所提供的检测红霉素类化合物的方法，包括以下步骤：

[0018] 1) 样品前处理：

[0019] 每 2.0g 动物组织匀浆物中，加入 6-10ml 乙腈，混匀，3000g 以上室温离心 10min，收集上清液；将每 2ml 所述上清液吹干，加入权利要求 7 所述试剂盒中的浓缩复溶液 1-4ml，混匀，取样进行分析；所述乙腈的体积优选为 8ml；所述浓缩复溶液的体积优选为 2ml。样品的前处理主要是为了从样品中获得红霉素溶液，从而用于后续的检测。

[0020] 2) 用上述任一种酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述样品。

[0021] 3) 分析检测结果。

[0022] 由保藏号为 CGMCC No. 2542 的对红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-3 分泌的红霉素单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0023] 保藏号为 CGMCC No. 2542 的红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-3 也属于本发明的保护范围。

[0024] 本发明检测红霉素类化合物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样品中红霉素类化合物的残留量；本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量样品；本试剂盒采用高特异性的红霉素单克隆抗体，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,能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查,将在红霉素的检测中发挥重要作用。本发明简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测的时间,具有可观的社会效益和经济效益。

附图说明

[0025] 图 1 为以红霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0026] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。以下实施例中所使用的红霉素药物如无特殊说明均为红霉素 A。

[0027] 实施例 1、以红霉素半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的试剂盒及其检测方法

[0028] 一、以红霉素半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的试剂盒的检测原理如下：

[0029] 当在酶标板微孔条上预包被红霉素偶联抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,随即加入酶标二抗,再加入红霉素特异性抗体溶液,样本中残留的红霉素药物与酶标板上包被的红霉素偶联抗原竞争红霉素特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与红霉素药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中红霉素的残留量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的红霉素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中红霉素残留量的浓度范围。

[0030] 二、以红霉素半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒一般可以包括如下组成：

[0031] 1、包被有包被原（包被原为红霉素半抗原与载体蛋白偶联物）的酶标板：包被原的浓度可以为 0.05-0.1 $\mu\text{g/ml}$ ；

[0032] 2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；酶标二抗的稀释液为含有 0.5% 牛血清白蛋白的 pH 值为 7.2-7.6、0.02M 磷酸盐缓冲液,酶标抗抗体工作液稀释度为 1 : 500,所述百分含量为质量百分含量。

[0033] 3、红霉素特异性抗体工作液：可以为红霉素多克隆抗体或红霉素单克隆抗体工作液；

[0034] 4、红霉素标准品（上海安普,货号 114-07-8）溶液：6 瓶,浓度分别为 0 $\mu\text{g/L}$, 0.2 $\mu\text{g/L}$, 0.6 $\mu\text{g/L}$, 1.8 $\mu\text{g/L}$, 5.4 $\mu\text{g/L}$, 16.2 $\mu\text{g/L}$, 稀释溶液为含有 5% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液。

[0035] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成,底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢,7ml/瓶,1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺,7ml/瓶,1 瓶。

[0036] 6、终止液：1-2mol/L 盐酸或硫酸；

[0037] 7、浓缩洗涤液：含有 1.0% -1.5%（质量百分含量）吐温 20 和 0.01-0.04% 叠氮化钠防腐剂,pH 值为 7.0-7.4、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液；40ml/瓶,1 瓶。

[0038] 8、浓缩复溶液：含有 4-6%（质量百分含量）牛血清白蛋白、pH 值为 7.2-7.6、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液；200ml/瓶,1 瓶。

[0039] 三、本实验中以红霉素半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒具体

包括：

[0040] 1、包被有包被原（包被原为红霉素半抗原与载体蛋白偶联物）的酶标板；

[0041] 2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；酶标二抗的稀释液为含有 0.5% 牛血清白蛋白的 pH 值为 7.2-7.6、0.02M 磷酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释度为 1：500，所述百分含量为质量百分含量。

[0042] 3、红霉素单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的：用稀释液将红霉素单克隆抗体稀释 1000 倍，得到单抗工作液，所述稀释液为含有 2.5%（质量百分含量）酪蛋白和 0.03%（质量含量）的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液。

[0043] 4、红霉素标准品（上海安普，货号 114-07-8）溶液：6 瓶，浓度分别为 0 μg/L，0.2 μg/L，0.6 μg/L，1.8 μg/L，5.4 μg/L，16.2 μg/L，稀释溶液为含有 5% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液。

[0044] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺，7ml/瓶，1 瓶。

[0045] 6、终止液：2mol/L 盐酸；

[0046] 7、浓缩洗涤液：含有 1.25%（质量百分含量）吐温 20 和 0.03% 叠氮化钠防腐剂、pH 值为 7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

[0047] 8、浓缩复溶液：含有 5% 牛血清白蛋白、pH 值为 7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

[0048] 其中，包被有红霉素半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板、红霉素单克隆抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液的制备方法如下：

[0049] 所用的包被缓冲液和封闭液如下：

[0050] 包被缓冲液：pH 值为 9.4 的 0.1mol/L 的碳酸盐冲液。

[0051] 封闭液：含有 0.5% 人血清白蛋白、0.15% 吐温 -20 和 0.1% 维生素 C 的 pH 值为 9.0 的 0.02M 的硼酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

[0052] 1、包被有红霉素半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板的制备

[0053] (1) 红霉素半抗原的制备

[0054] 称取 20mg 红霉素（上海安普，货号 114-07-8）溶于 2.5ml 无水乙醇，与溶于 1ml 双蒸水的 5mg 盐酸羟胺混合，在冰浴条件下反应 2.5h，其间滴入 0.05mol/L 的 NaOH 溶液约 1ml。反应后滴入 0.2mol/L、pH4 的醋酸盐缓冲液约 1ml，并加入碎冰约 4mg，出现白色沉淀，在 4℃ 下静置 1 天。将反应液离心 10min，弃去上清液，收集白色沉淀。白色沉淀用 2.5ml 二甲基甲酰胺溶解后，加入 6mg 琥珀酸酐，室温反应 2h。得到红霉素半抗原。

[0055] (2) 包被原的制备

[0056] 将红霉素半抗原和卵清蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到包被抗原，具体步骤如下：

[0057] 取红霉素半抗原 1.3ml，冷却至 10℃，加入氯甲酸异丁酯 5ul，10℃ 搅拌反应 30min，得到反应液 I 液；称取卵清蛋白 36mg 溶解在 2mL 50mmol/L 碳酸钠溶液中得 II 液，其中红霉素半抗原与所述卵清蛋白的摩尔配比为 60：1；将反应液 I 逐滴缓慢滴加到反应液 II 液中，10℃ 反应 4h，然后 4℃ 过夜，得到包被原。

[0058] (3) 包被有包被原的酶标板的制备

[0059] 用包被缓冲液将红霉素半抗原与卵清蛋白的偶联物稀释成 0.05-0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30 秒, 拍干, 然后在每孔中加入 150-200 μl 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0060] 2、红霉素单克隆抗体的制备

[0061] (1) 免疫原的制备

[0062] 红霉素是小分子物质, 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, 这样突出了红霉素分子结构中的特征基团, 使制备的红霉素抗体对红霉素的特异性很高。

[0063] 将红霉素半抗原和血蓝蛋白, 采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原, 具体步骤如下:

[0064] 称取 60mg 血蓝蛋白溶于 10ml 0.01mol/L 的磷酸盐溶液中, 加入 12.5mg EDC, 然后加入红霉素半抗原 1.3ml, 室温搅拌反应 1h, 再加 6mg 碳化二亚胺 (EDC), 暗处搅拌反应并过夜, 即可得到红霉素免疫原。其中, 红霉素半抗原与血蓝蛋白的摩尔配比为 11 : 1。

[0065] (2) 制备单抗

[0066] a. 动物免疫

[0067] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/$ 只, 使其产生多克隆抗体。

[0068] b. 细胞融合和克隆化

[0069] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 8 : 1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选得到稳定分泌红霉素单克隆抗体的对红霉素药物的单克隆杂交瘤细胞株, 将此细胞株命名为 B-1-3, 该细胞株已于 2008 年 06 月 04 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, 地址: 北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC No. 2542。

[0070] c. 细胞冻存和复苏

[0071] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 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。

[0072] d. 单克隆抗体的制备与纯化

[0073] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.9ml/ 只, 7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^9 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行纯化, 纯化后的腹水放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 环境保存。

[0074] 3、红霉素多克隆抗体的制备

[0075] 采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以红霉素与血蓝蛋白偶联物为免疫原, 免疫剂量为 1.5mg/kg 体重, 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐混合制成乳化剂, 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 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。

[0076] 4、辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备:

[0077] (1) 抗抗体的制备:

[0078] 羊抗鼠抗抗体的制备: 以羊作为免疫动物, 以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进

行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0079] 羊抗兔抗抗体的制备:以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0080] (2) 辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

[0081] 将抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

[0082] 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;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,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚集体。

[0083] 本发明采用改良的过碘酸钠法进行抗体的标记,其操作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。降低了辣根过氧化物酶:抗抗体的摩尔浓度比率至2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0084] 四、用步骤三所述试剂盒检测样品中残留的红霉素

[0085] 1、组织(肌肉、肝脏)样品前处理

[0086] 称取 $2.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质物,加入8ml乙腈,振荡10min,3000g以上室温离心10min,取上清液2ml,将其置于10ml干净的玻璃试管中,于 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 水浴氮气流下吹干,用2ml复溶工作液溶解干燥的残留物,取 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0087] 2、检测

[0088] 向包被有红霉素半抗原与卵清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 $50 \mu\text{l}$,随即加入酶标二抗工作液 $50 \mu\text{l}$,再加入单克隆抗体工作液 $50 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜封板, 37°C 避光环境中反应40min。倒出孔中液体,每孔加入稀释后的洗涤液,10s后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板5次,用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液A液过氧化脲 $50 \mu\text{l}$,底物显色液B液四甲基联苯胺(TMB) $50 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用盖板膜封板, 37°C 避光环境中反应15min。每孔加入终止液 $50 \mu\text{l}$,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在450nm处,测定每孔吸光度值(OD值)。

[0089] 3、检测结果分析

[0090] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,得到百分吸光度值。

[0091]

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

[0092] 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 $0 \mu\text{g/L}$ 标准品溶液的平均吸光度值。

[0093] 以红霉素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图(图1)。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出样本中红霉素的残留量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析,整个检测过程只需1.0小时可以完成。

[0094] 实施例2、试剂盒精确度、准确度和保存期试验

[0095] 一、标准品精密度试验：

[0096] 从实施例 1 中步骤三中三个不同的时间段制备的三个不同批次的试剂盒中各抽取 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 $1.8 \mu\text{g/L}$ 红霉素标准溶液的吸光度值，计算变异系数。结果如表 1 所示。

[0097] 表 1、标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0098]	CV%	01 批	6.9	9.6	3.5	4.8	5.0	7.4	4.4	11.3	6.9	7.4
		03 批	8.5	9.7	6.9	10.5	4.8	9.1	5.8	6.7	8.7	9.1
		06 批	9.0	4.5	4.1	3.8	7.4	8.5	6.9	5.5	12.6	7.0

[0099] 实验表明，每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数均在 3.5% -12.6% 之间，符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0100] 二、样本精密度和准确度试验

[0101] (一) 样品精密度试验：

[0102] 向不含红霉素的鸡肉、鸡肝、猪肉或猪肝中添加终浓度为 $40 \mu\text{g/L}$ 的红霉素，然后按照实施例 1 的方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中所述的不同时间段制备的三个批次的试剂盒 (01 批、03、06 批) 中各抽取 3 个试剂盒，进行实验，每个实验重复 5 次，分别计算变异系数，结果如表 2-5 所示 (各表中的数值为 5 次重复的平均值)。结果表明，猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝样本中的变异系数在 5.4% -15.4% 之间，均低于 20%，符合规定。

[0103] 表 2、猪肉可重复性试验

[0104]

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数
						CV%
01	31.2	39.8	29.9	36.5	38.4	12.5
	38.4	28.8	33.8	29.1	29.6	13.0
	36.3	32.8	31.8	29.7	28.6	9.4
03	28.7	31.6	30.9	27.8	30.7	5.4
	31.5	33.7	30.2	39.1	37.4	11.0
	30.5	36.5	31.7	32.8	29.7	8.2
06	29.8	34.3	34.7	28.7	29.6	9.1
	38.6	34.7	39.9	34.7	30.9	10.0
	31.6	33.7	29.6	34.1	30.4	6.2

[0105] 表 3、猪肝样品可重复性试验

[0106]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数
						CV%
01	34.9	28.9	37.2	29.5	30.3	11.4
	27	28.9	29.5	34.7	33.7	10.7
	34.4	28.7	30.4	33.6	31.9	7.3
03	29.6	28.8	26.3	37.7	30.6	14.0
	31.5	31.7	28.5	36.9	33.7	9.5
	32.4	29.8	37.0	28.2	31.5	10.5
06	28.5	29.6	31.5	36.6	29.6	10.4
	33.7	31.5	34.7	36.9	28.4	9.8
	29.8	30.6	33.8	39.4	33.2	11.3

[0107] 表 4、鸡肉样品可重复性试验

[0108]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数
						CV%
01	30.5	29.5	31.6	28.5	39.7	14.0
	36.5	28.7	31.5	35.2	27.4	12.4
	33.6	35.6	32.9	26.7	38.1	12.7
03	36.7	35.6	32.9	31.9	31.3	7.0
	36.4	29.6	31.4	27.5	30.7	10.6
	35.6	37.5	30.7	34.7	30.9	8.8
06	34.8	36.9	29.8	30.4	31.1	9.5
	36.9	27.6	35.6	33.9	38.7	12.3
	31.4	39.4	28.5	29.8	29.0	14.2

[0109] 表 5、鸡肝样品可重复性试验

[0110]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数
						CV%
01	29.6	35.6	33.5	36.7	31.8	8.6
	28.5	29.6	37.2	32.6	35.7	11.5
	36.6	29.3	39.6	27.7	37.2	15.4
	37.2	31.2	36.6	34.7	35.7	6.7
03	26	31.1	30.4	29.3	35.2	10.9
	31.5	29.6	28.5	36.9	29.1	11.0
	38.5	33.6	31.5	28.8	29.8	11.9
06	31.7	29.5	28.8	29.3	34.7	7.9
	30.4	28.6	28.9	33.6	29.6	6.7

[0111] (二) 样本准确度试验

[0112] 向不含红霉素的鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼或虾组织中分别添加红霉素,使红霉素的终浓度分别为 $40 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ 和 $80 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$,然后按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理;再用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒检测组织中的红霉素,每个浓度做 4 个平行,分别计算准确度(准确度=实测值/添加值)。结果如表 6 所示。结果表明猪肉、鸡肉、猪肝、鸡肝样品添加准确度均在 70.9% -98.7% 之间。

[0113] 表 6、试剂盒的准确度

[0114]

样本	猪肉		鸡肉		猪肝		鸡肝		
	40	80	40	80	40	80	40	80	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)									
准确度%	1	75.6	95.6	75.6	98.7	95.6	90.2	89.6	85.6
	2	81.5	88.5	92.3	85.5	87.5	74.5	91.5	80.2
	3	71.5	74.5	90.5	96.3	70.9	85.5	75.8	74.9
	4	84.6	78.9	96.6	80.7	86.9	98.3	85.3	85.6
平均值%	78.3	84.3	88.8	90.3	85.2	87.1	85.6	81.6	

[0115] 三、交叉反应率试验:

[0116] 选择与红霉素有类似结构和类似功能的 6 种药物测定交叉反应率。通各种药物的标准曲线分别得到其 50% 抑制浓度。用下式计算步骤三中试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应越大,那么此试剂盒对红霉素的检测的特异性就越好。重复测定 3 次,结果取平均值。

[0117] 交叉反应率 (%) = (引起 50% 抑制红霉素的浓度 / 引起 50% 抑制的红霉素类似
[0118] 物浓度) × 100%

[0119] 表 7、试剂盒的特异性

[0120]

药物名称	交叉反应率 (%)
红霉素 A	100
硫氢酸红霉素	114
琥乙红霉素	67.4
泰乐菌素	< 1
替米考星	< 1
螺旋霉素	< 1
北里卡星	< 1

[0121] 实验表明,本发明试剂盒对红霉素 A、硫氢酸红霉素和琥乙红霉素的特异性好,即本发明试剂盒可以检测红霉素类化合物。

[0122] 四、试剂盒保存期试验

[0123] 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、红霉素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℃ 至少可以保存 6 个月以上。

[0124] 五、试剂盒的最低检测限

[0125] 取不含红霉素类药物的阴性动物组织样本用本发明所制试剂盒分别进行 20 次检测,测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0126] 表 8、阴性组织样本测定结果统计表 $\mu\text{g}/\text{kg}$

[0127]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.41	0.01	0.18	0.32	0.08	0.19	0.39	0.43
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.43	0.27	0.22	0.31	0.39	0.29	0.12	0.46
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.27	0.21	0.22	0.02	0.26	0.13	0.66	

[0128] 由表 8 可知,试剂盒的最低检测限为 $0.66 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

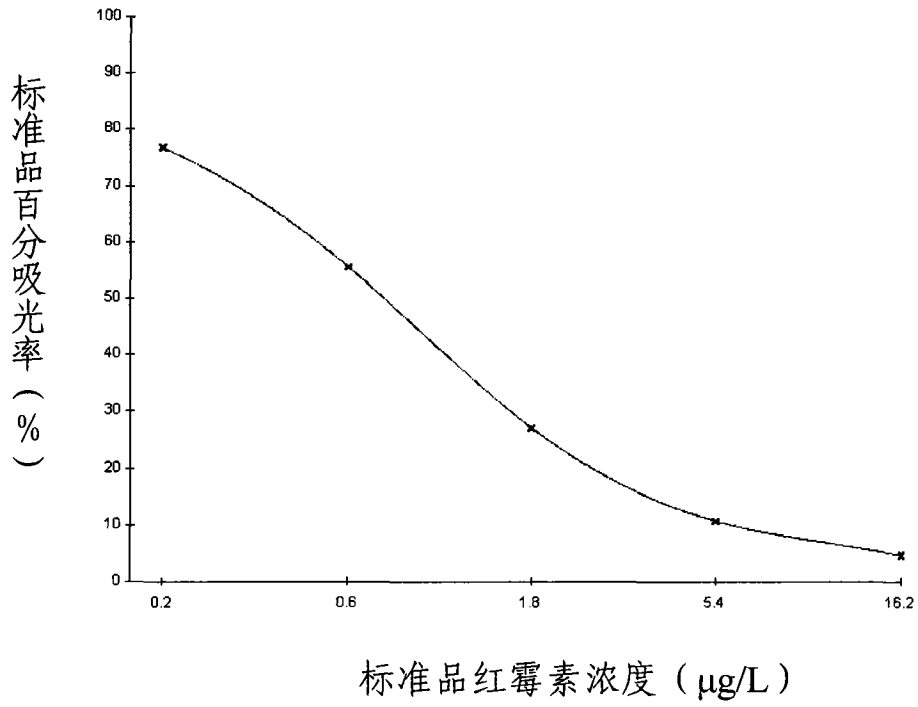


图 1

专利名称(译)	一种检测红霉素类化合物的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101299046B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200810115756.5	申请日	2008-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 冯才茂 汪善良 赵正苗 刘玉梅 罗晓琴		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 冯才茂 汪善良 赵正苗 刘玉梅 罗晓琴		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 C12N5/12		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	刘苗		
其他公开文献	CN101299046A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测红霉素类化合物的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明的酶联免疫试剂盒，包括红霉素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述红霉素特异性抗体为红霉素的单克隆抗体或红霉素的多克隆抗体；所述红霉素类化合物为红霉素、硫氨酸红霉素和琥乙红霉素中的至少一种；所述红霉素为红霉素A。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，能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查，将在红霉素的检测中发挥重要作用。

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