



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101571539 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 200910085945. 7

(22) 申请日 2009. 06. 01

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3111 2009. 05. 26

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 何方洋 张建军 冯才伟 万宇平

冯静 冯才茂 崔海峰 徐念琴

赵正苗 李勇 刘福林 刘平

朱亮亮 陈炜琳 罗贵昆

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/566 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101354401 A, 2009. 01. 28, 摘要、权利要求书、说明书第 2-5 页.

CN 101315372 A, 2008. 12. 03, 摘要、权利要求书、说明书第 2-5 页.

EP 0037932 A1, 1981. 10. 21, 全文.

CN 101153871 A, 2008. 04. 02, 全文.

EP 0157629 A2, 1985. 10. 09, 全文.

EP 0593112 A1, 1994. 04. 20, 全文.

US 2002164639 A1, 2002. 11. 07, 全文.

郝志慧. 头孢噻呋单克隆抗体的制备及其 ELISA、HPLC 检测方法的初步研究.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)农业科技辑》. 2006, (第 6 期), 8-39 页.

李铁柱 等. 受体分析结合酶联免疫检测牛乳中的头孢噻呋残留.《受体分析结合酶联免疫检测牛乳中的头孢噻呋残留》. 2008, 第 29 卷 (第 3 期), 473-476.

审查员 石剑平

权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有包被原的酶标板,酶标记物,头孢类药物特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或酶标板上包被抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有),头孢噻呋标准品溶液,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上述酶联免疫试剂盒检测头孢类药物的方法,它包括: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。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测动物组织(鸡肉、猪肉、鱼、虾)和牛奶等样品中头孢类药物的残留量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒,其特征在于它含有:

- (1) 包被有包被原的酶标板;
- (2) 酶标记物;
- (3) 头孢噻呋标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- (5) 终止液;
- (6) 浓缩洗涤液;
- (7) 浓缩复溶液,

所述包被原为头孢类药物抗原、抗体或抗抗体,所述酶标记物为酶标记头孢类药物抗原、酶标记头孢类药物抗体或酶标记抗抗体,

当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记抗原时还含有头孢类药物特异性抗体工作液,

所述头孢类药物抗体为单克隆抗体,由杂交瘤细胞株 C-4-3CGMCC No. 3111 分泌产生。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述头孢类药物抗原是由头孢类药物半抗原与载体蛋白偶联得到,所述头孢类药物抗体是由所述抗原制备获得,所述头孢类药物半抗原是通过头孢噻呋和 6-氨基正己酸反应得到的头孢噻呋正己酸酯半抗原。

3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

4. 如权利要求书 1 或 2 所述的试剂盒,其特征在于所用包被缓冲液为 pH9.4-9.7, 0.1-0.3mol/L 碳酸盐缓冲液,所用封闭液为含有 8-10% 卵清蛋白、0.1-0.3% 吐温-20 和 4-7% 蔗糖的 pH 值为 8.9-9.4 的 0.02-0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,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 1~2mol/L 氢氧化钠。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒,其特征在于:浓缩洗涤液为含有 pH 值为 7.5-8.2、0.8-1.2% 吐温-20、0.01-0.02% 硫柳汞防腐剂、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液;浓缩复溶液为含有 8-12% 酪蛋白、pH 值为 7.3-7.8、0.1-0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液,头孢噻呋标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L, 0.5 μ g/L, 1.5 μ g/L, 4.5 μ g/L, 13.5 μ g/L, 40.5 μ g/L, 所述百分比为重量百分比。

7. 权利要求 1~6 任一项所述的试剂盒在检测头孢类药物残留中的应用。

8. 一种检测样品头孢类药物残留的方法,包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用权利要求 1~6 任一项所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒,其特别适于鸡肉、猪肉、鱼、虾组织和牛奶样本中头孢类药物残留的检测。

技术背景

[0002] 头孢类药物是一种广谱的抗生素,具有优良的抗菌活性和药动学特点,对许多革兰氏阳性和革兰氏阴性及产 β -内酰胺酶的细菌有效。头孢类药物是采用破坏细菌细胞壁的方式杀死细菌。由于目前使用的检测分析法样本前处理及测定操作繁琐且费用较高,使推广应用受到限制。

[0003] 头孢类药物残留量的常规检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)、纸色谱等,由于复杂的仪器设备和繁琐的过程以及对检验人员的高技能要求,不适合现场监控和大量样本的筛查。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对上述不足提供一种用于头孢类药物检测的酶联免疫试剂盒,其操作简单,适合现场大批量样品的筛选。

[0005] 本发明试剂盒,它含有:

[0006] (1) 包被有包被原的酶标板(包被原为抗原、抗体或抗抗体);

[0007] (2) 酶标记物(为酶标记半抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体);

[0008] (3) 头孢类药物特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记半抗原时含有);

[0009] (4) 头孢噻呋标准品溶液;

[0010] (5) 底物显色液;

[0011] (6) 终止液;

[0012] (7) 浓缩洗涤液;

[0013] (8) 浓缩复溶液。

[0014] 本发明所述头孢类药物包括头孢噻呋、头孢曲松、头孢噻肟等具有共同分子骨架药理活性的药物。

[0015] 本发明所提供的检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒,包括头孢类药物特异性抗体工作液及预包被包被原的酶标板和酶标记物工作液;所述酶标记物为酶标记的抗抗体,酶标记头孢类药物半抗原或酶标记头孢类药物特异性抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

[0016] 所述头孢类药物半抗原是通过头孢噻呋和6-氨基正己酸反应得到的头孢噻呋正己酸酯半抗原。

[0017] 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,其中优选辣根过氧化物酶;酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗

抗体进行偶联得到的 ;酶标记头孢类药物半抗原是采用混合酸酐或碳化二亚胺法将标记酶与头孢类药物半抗原偶联得到的 ;酶标记特异性抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与特异性抗体偶联得到的,辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与抗抗体进行偶联,如戊二醛法,过碘酸钠法等,本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良,使其省时、降低辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗抗体的浓度比率,节省了原材料。

[0018] 所述头孢类药物特异性抗体可为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体 ;它们均是用头孢类药物半抗原与载体蛋白采用混合酸酐法或碳化二亚胺法得到的偶联物作为免疫原得到的 ;所述头孢类药物多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,所述头孢类药物单克隆抗体优选为头孢类药物鼠单克隆抗体,所述头孢类药物多克隆抗体优选为头孢类药物兔多克隆抗体。

[0019] 所述头孢类药物单克隆抗体优选为头孢类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-4-3CGMCC No. 3111 分泌的单克隆抗体。

[0020] 所述头孢类药物单克隆杂交瘤细胞株 C-4-3CGMCC No. 3111 (分类命名 :头孢类药物的单克隆抗体杂交瘤细胞株) 已于 2009 年 05 月 26 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)。

[0021] 以上抗体均可以用头孢类药物半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原制备。所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白 (BCG)、牛血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白和纤维蛋白原等常用载体蛋白 ;所述头孢类药物半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将头孢类药物半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或碳化二亚胺法进行偶联得到。

[0022] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括头孢噻呋标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

[0023] 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,所述显色液 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 ;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 1 ~ 2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0024] 所述浓缩洗涤液为含有 pH 值为 7.5-8.2、0.8-1.2% 吐温 -20、0.01-0.02% 硫柳汞防腐剂、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0025] 所述浓缩复溶液为含有 8-12% 酪蛋白、pH 值为 7.3-7.8、0.1-0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0026] 其中在酶标板制备中所用的包被缓冲液优选 pH 9.4-9.7、0.1-0.3mol/L 碳酸盐缓冲液,所用封闭液为含有 8-10% 卵清蛋白、0.1-0.3% 吐温 -20 和 4-7% 蔗糖的 pH 值为 8.9-9.4 的 0.02-0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0027] 本发明中酶标板的制备过程为 :用包被缓冲液将包被原稀释成 0.2 ~ 0.3 μ g/ml, 每孔加入 100 μ l, 37°C 温育 2h 或 4°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 μ l 封闭液,37°C 温育 1 ~ 2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0028] 本发明中免疫原的合成过程为 :

[0029] 头孢类药物半抗原合成 (合成路线如图 2)

[0030] 头孢类药物半抗原是通过头孢噻呋（结构式如图 1）和 6-氨基正己酸反应得到的头孢噻呋正己酸酯半抗原，具体反应步骤如下：

[0031] （1）取头孢噻呋 10g 溶于 50ml DMSO 中，加入 1ml 氯甲酸异丁酯室温搅拌反应过夜。再加入 6-氨基正己酸调 PH 值到 8.5，升温至 45℃，反应 12h。

[0032] （2）将反应产物用旋转蒸发仪蒸干，用 100ml 1mol/L 的氢氧化钠溶解，再用 2mol/L 盐酸调 PH 值到 3，离心。

[0033] （3）取沉淀，用 0.1mol/L 的盐酸，洗涤 4～5 次，用少量乙酸乙酯溶解，再加入 2ml 丙酮。

[0034] （4）再过层析硅胶柱纯化，用乙酸乙酯和丙酮、甲醇 = 7 : 2 : 1，洗脱，再在氮气流下吹干，得到的固体粉末，即为头孢噻呋正己酸酯半抗原。

[0035] 将头孢噻呋正己酸酯半抗原与载体蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原。

[0036] 免疫原的具体制备方法：

[0037] （1）取头孢类药物半抗原 16.2mg 加入 1ml DMF 完全溶解，取 30.5mg 的 EDC，1ml 的水完全溶解后在搅拌条件下加入头孢类药物半抗原溶液中，室温反应 24h 得到 A 液；

[0038] 2、取 39.6mg BSA 加入 5ml pH7.40.01mmol/L 的 PBS 中，振荡溶解，制备得到 B 液；

[0039] 3、在磁力搅拌下，将反应液 A 逐滴加入到反应液 B 中，重新密封烧杯，室温下搅拌反应 6h；

[0040] 4、将反应液装入透析袋里，4℃透析三天，每天更换三次透析液，透析完毕，分装，于 -20℃保存备用。

[0041] 头孢类药物抗体的制备

[0042] 1、头孢类药物鼠单克隆抗体的制备

[0043] 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以头孢类药物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原，得到较好的多抗血清后，取出脾脏进行细胞融合。

[0044] 细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，筛选细胞株，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0045] 2、头孢类药物兔多克隆抗体的制备

[0046] 采用新西兰大白兔作为免疫动物，以头孢类药物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价得到多克隆抗体。

[0047] 本发明抗抗体的制备过程：羊抗鼠抗抗体是以羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体；羊抗兔抗抗体是以羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

[0048] 本发明所述试剂盒中头孢噻呋标准品溶液：标准品溶液 6 瓶，0 μg/L，0.5 μg/L，1.5 μg/L，4.5 μg/L，13.5 μg/L，40.5 μg/L。

[0049] 本发明的检测原理为：

[0050] 当在微孔条上预包被头孢类药物偶联抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入头孢类药物特异性抗体溶液，样本中残留的头孢类药物与酶标板上包被的头孢类药物偶联抗原竞争头孢类药物特异性抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与头孢类药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中头孢类药物的残留量。同时根据酶标板上颜色的深浅，与系列浓度的头孢噻呋标准品溶液颜色的比较可粗

略判断样品中头孢类药物残留量的浓度范围。

[0051] 当在微孔条上预包被头孢类药物特异性抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记头孢类药物半抗原溶液,样本中残留的头孢类药物与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的头孢类药物特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与头孢类药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中头孢类药物的残留含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的头孢噻呋标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中头孢类药物残留量的浓度范围。

[0052] 当在微孔条上预包被头孢类药物偶联抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记头孢类药物特异性抗体溶液,样本中残留的头孢类药物与酶标板上包被的头孢类药物偶联抗原竞争头孢类药物特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与头孢类药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中头孢类药物的残留含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的头孢噻呋标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中头孢类药物残留量的浓度范围。

[0053] 当在微孔条上预包被抗体时,加入头孢类药物抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记头孢类药物偶联抗原溶液,样本中残留的头孢类药物与酶标记头孢类药物偶联抗原竞争抗头孢类药物特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与头孢类药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中头孢类药物的残留含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的头孢噻呋标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中头孢类药物残留量的浓度范围。

[0054] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒监测头孢类药物的方法,它包括步骤:

[0055] (1) 样品前处理;

[0056] (2) 用试剂盒进行检测;

[0057] (3) 分析检测结果。

[0058] 样品的前处理主要是为了从样品中获得头孢类药物溶液,从而用于后续的检测。下面是常见的几种样品的前处理方法:

[0059] 1、鸡肉、猪肉、鱼、虾样本前处理方法

[0060] 称取 $2.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质物至 50ml 聚苯乙烯离心管中,加入 8ml 提取工作液,振荡 5min, 3000g 以上,离心 5min;取 1ml 上清至 10ml 干净的玻璃试管中,于 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气流下吹干;加入 1ml 正己烷,用涡旋仪涡动 30s 溶解干燥残留物,再加入 1ml 复溶液,用涡旋仪涡动 30s, 3000g 以上离心 5min;除去上层正己烷相,取下层水相 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0061] 2、牛奶样本前处理方法

[0062] 取 $100 \mu\text{l}$ 鲜牛奶于 2ml 离心管,加入 $900 \mu\text{l}$ 复溶工作液,混匀,取 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0063] 本发明中用试剂盒检测时:当包被原为头孢类药物偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为头孢类药物偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为头孢类药物特异性抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液

或样本溶液再加入酶标记头孢类药物半抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为抗体时,向酶标板微孔中加入头孢类药物抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标头孢类药物半抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值。

[0064] 本发明中检测结果分析过程为:用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%,即百分吸光度值。计算公式为:

[0065] 百分吸光度值(%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0066] 以头孢噻呋标准品溶液的浓度($\mu\text{g/L}$)的半对数值为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,相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中头孢类药物的残留量。

[0067] 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。

[0068] 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75分钟可以完成。

[0069] 本发明检测头孢类药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头孢类药物的残留量;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量样品;采用高特异性的头孢类药物单克隆抗体,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。本发明的试剂盒将在头孢类药物的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0070] 图1:头孢噻呋药物结构图

[0071] 图2:头孢类药物半抗原合成路线图

[0072] 图3:以头孢类药物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

[0073] 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。

[0074] 实施例1 试剂盒组分的制备

[0075] 1. 抗原的合成

[0076] a、免疫原合成

[0077] 头孢类药物半抗原合成(合成路线如图2)

[0078] 是通过头孢噻呋(结构式如图1)和6-氨基正己酸反应得到的头孢噻呋正己酸酯半抗原,具体反应步骤如下:

[0079] (1) 取头孢噻呋10g溶于50ml DMSO中,加入1ml 氯甲酸异丁酯室温搅拌反应过夜,再加入6-氨基正己酸调PH值到8.5,升温到45℃反应12个小时。

[0080] (2) 将反应产物用旋转蒸发仪蒸干,用 100ml 1mol/L 的氢氧化钠溶解,再用 2mol/L 盐酸调 PH 值到 3,离心。

[0081] (3) 取沉淀,用 0.1mol/L 的盐酸,洗涤 4~5 次,用少量乙酸乙酯溶解,再加入 2ml 丙酮。

[0082] (4) 再过层析硅胶柱纯化,用乙酸乙酯和丙酮、甲醇=7:2:1,洗脱,再在氮气流下吹干,得到的固体粉末,即为头孢噻呋正己酸酯半抗原。

[0083] 将头孢类药物半抗原与牛血清白蛋白采用碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原。

[0084] 免疫原的制备过程:

[0085] (1) 取头孢类药物半抗原 16.2mg 加入 1mlDMF 完全溶解,取 30.5mg 的 EDC,1ml 的水完全溶解后,在搅拌条件下加入头孢类药物半抗原溶液中,室温反应 24h 得到 A 液;

[0086] 2、取 39.6mgBSA 加入 5ml pH7.40.01mmol/L 的 PBS 中,振荡溶解,制备得到 B 液;

[0087] 3、在磁力搅拌下,将反应液 A 逐滴加入到反应液 B 中,重新密封烧杯,室温下搅拌反应 6h;

[0088] 4、将反应液装入透析袋里,4℃透析三天,每天更换三次透析液,透析完毕,分装,于 -20℃保存备用。

[0089] b. 包被原头孢类药物偶联抗原的制备

[0090] 将头孢类药物半抗原与卵清蛋白偶联得到包被原。

[0091] 包被原的制备过程:

[0092] 1、称取头孢类药物半抗原 11.9mg 溶于 1mlDMF 中,搅拌充分溶解后得 A 液;

[0093] 2、取 50mgOVA 加入 2ml pH7.50.1mol/L 磷酸盐缓冲液,振荡溶解得 B 液;

[0094] 3、置恒温磁力搅拌器上,将 A 液滴加入 B 液后,立即向混合液中缓慢加入 2.5%戊二醛 50ul,继续搅拌,室温下搅拌反应 1h;

[0095] 4、反应液用 pH7.50.1mol/L 磷酸盐缓冲液透析三天,每天更换三次透析液。透析完毕,分装,于 -20℃保存备用。

[0096] 单克隆抗体的制备

[0097] a. 动物免疫

[0098] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 100 μg/只,使其产生多克隆抗体血清。

[0099] b. 细胞融合和克隆化

[0100] 小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按 9:1 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,直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0101] 经筛选得到头孢类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-4-3CGMCC No. 3111。头孢类药物的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生头孢类药物特异性抗体,且该抗体特异性是针对头孢类药物的,灵敏度能达到 0.5 μg/L。

[0102] c. 细胞冻存和复苏

[0103] 将头孢类药物的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 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℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0104] d. 单克隆抗体的生产与纯化

[0105] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只,7 天后腹腔注射头孢类药物的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^7 个/只,7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, -20°C 保存。

[0106] 2. 多克隆抗体的制备

[0107] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以头孢类药物半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5mg/kg,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。

[0108] 3. 羊抗鼠抗抗体的制备过程: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;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。

[0109] 4. 酶标板的制备

[0110] 用包被缓冲液将头孢类药物偶联抗原、抗体或抗抗体稀释成 $0.2 \mu\text{g/ml}$,每孔加入 $100 \mu\text{l}$, 4°C 过夜,倾去包被液,用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后再每孔中加入 $200 \mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0111] 5. 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

[0112] 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。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合体,为了解决这个问题,我们将传统的方法进行了改良,即:

[0113] 1) 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。

[0114] 2) 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

[0115] 比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0116] 实施例 2 检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒的组建

[0117] 组建检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0118] (1) 包被头孢类药物偶联抗原的酶标板;

[0119] (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0120] (3) 头孢类药物单克隆抗体工作液;

[0121] (4) 头孢噻呋标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$, $0.5 \mu\text{g/L}$, $1.5 \mu\text{g/L}$, $4.5 \mu\text{g/L}$, $13.5 \mu\text{g/L}$, $40.5 \mu\text{g/L}$;

[0122] (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,底物显色液 B 液四甲基联苯胺;

[0123] (6) 终止液为 2mol/L 盐酸;

[0124] (7) 浓缩洗涤液为 pH 值为 7.5-8.2、0.8-1.2%吐温-20、0.01-0.02%硫柳汞防腐剂、0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0125] (8) 浓缩复溶液为含有 8-12%酪蛋白、pH 值为 7.3-7.8、0.1-0.3mol/L 的磷酸盐

缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0126] 实施例 3 样品中头孢类药物的检测

[0127] 1. 样品前处理

[0128] a) 动物组织(鸡肉、猪肉、鱼、虾等)

[0129] 称取 $2.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质物至 50ml 聚苯乙烯离心管中,加入 8ml 提取工作液,振荡 5min,3000g 以上,离心 5min;取 1ml 上清至 10ml 干净的玻璃试管中,于 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 水浴氮气流下吹干;加入 1ml 正己烷,用涡旋仪涡动 30s 溶解干燥残留物,再加入 1ml 复溶液,用涡旋仪涡动 30s,3000g 以上离心 5min;除去上层正己烷相,取下层水相 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0130] b) 牛奶样本

[0131] 取 $100 \mu\text{l}$ 鲜牛奶于 2ml 离心管,加入 $900 \mu\text{l}$ 复溶工作液,混匀,取 $50 \mu\text{l}$ 用于分析。

[0132] 2. 用试剂盒检测

[0133] 向包被有头孢类药物偶联抗原的酶标板微孔中加入头孢噻呋标准品溶液或样品溶液 $50 \mu\text{l}$,再加入头孢类药物单克隆抗体工作液 $50 \mu\text{l}$,用盖板模封板, $4\sim 8^\circ\text{C}$ 恒温箱中反应 30min,倒出孔内液体,每孔加入 $250 \mu\text{l}$ 洗涤液,30s 后倒出孔内液体,如此重复操作洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 $100 \mu\text{l}$, 25°C 恒温箱中反应 30min,倒出孔内液体,重复洗板步骤,每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲,底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB),轻轻振荡混匀, 25°C 恒温箱避光显色 15min,每孔加入 2mol/L 终止液盐酸 $50 \mu\text{l}$,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)。

[0134] 3. 检测结果分析

[0135] 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。以头孢噻呋标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的半对数值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图,如图 3 所示。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头孢类药物的残留量。

[0136] 实验例 1 标准品精密度试验:

[0137] 分别从三个不同的时间段制备的酶标板中各抽出一批酶标板,每批各抽取 10 个试剂盒,每板各抽出 20 个微孔,测定 $4.5 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值,计算变异系数。

[0138] 表 1 标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0139]	1 批	6.7	5.8	6.4	5.9	6.0	9.6	4.7	5.8	6.4	7.7
	2 批	5.3	8.5	9.2	6.4	8.2	8.9	7.4	7.0	6.5	5.8
	3 批	6.3	5.2	4.8	7.6	8.2	3.4	6.8	5.9	6.7	5.9

[0140] 通过上述试验结果可以得出,每批试剂盒各 10 次标准品变异系数在 3.4% -9.6% 之间,符合精密度小于或等于 25% 的规定。

[0141] 实验例 2 样本精密度和准确度试验

[0142] 1. 样品精密度试验：

[0143] 以 $10 \mu\text{g/L}$ 浓度的头孢噻呋对鸡肉、猪肉、鱼、虾， $20 \mu\text{g/L}$ 浓度的头孢噻呋对牛奶分别进行添加测定，分别取三个不同批次的试剂盒各五个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数，结果见表 2 ~ 6。

[0144] 表 2 鸡肉样本可重复性试验

[0145]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	7.5	8.6	6.9	7.9	8.8	9.9
	9.2	8.5	7.6	9.0	8.0	7.9
	8.6	8.3	7.5	8.0	8.2	5.0
02	7.9	8.0	8.5	9.2	9.0	6.8
	9.2	7.9	8.8	7.5	6.8	12.1
	9.0	7.5	7.8	6.9	7.3	10.3
03	7.7	9.1	8.3	8.8	8.4	6.3
	8.6	9.0	8.3	8.4	7.5	6.6
	9.2	9.5	8.5	8.6	7.6	8.4

[0146] 表 3 猪肉样本可重复性试验

[0147]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	8.5	7.6	7.9	8.2	8.4	4.6
	8.4	7.9	7.4	7.2	8.1	6.3
	8.0	8.6	7.5	8.3	6.9	8.6
02	8.2	8.1	7.8	7.4	6.7	8.0
	6.7	8.9	9.0	8.4	7.6	11.9
	7.3	7.2	8.9	8.3	8.2	9.0
03	8.5	8.9	9.6	9.8	8.9	5.9
	8.3	8.7	9.5	8.9	9.6	6.1
	7.5	7.6	6.8	8.4	8.9	10.5

[0148] 表 4 鱼样本可重复性试验

[0149]

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	8.2	9.0	8.7	9.2	8.4	4.7
	8.4	7.6	8.1	9.0	9.5	8.8
	6.8	7.9	8.5	8.0	8.8	9.6
02	8.9	8.5	8.0	7.5	7.7	7.1
	7.5	8.3	9.5	8.4	8.2	8.6
	8.1	7.5	9.0	7.8	8.6	7.4
03	8.5	8.0	9.2	8.6	7.5	7.7
	8.9	6.7	8.6	8.2	6.9	12.7
	8.3	8.6	9.0	8.4	8.0	4.4

[0150] 表 5 虾样本可重复性试验

[0151]

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	7.6	7.9	8.0	8.6	7.5	5.5
	8.6	9.0	8.6	8.2	6.7	10.9
	8.5	8.6	9.1	8.6	7.6	6.4
02	8.1	6.8	8.2	7.9	8.4	8.0
	9.3	9.6	8.4	8.7	8.5	5.9
	8.2	8.5	8.6	8.2	7.9	3.4
03	9.1	8.3	8.6	8.4	7.0	9.4
	7.9	8.0	9.2	8.0	7.1	9.3
	8.0	7.5	8.2	8.5	9.8	10.3

[0152] 表 6 牛奶样本可重复性试验

[0153]

批号	实测值 (μg/L)					变异系数 CV%
01	16.8	18.6	18.9	18.0	17.5	4.7
	16.1	17.2	18.0	21.4	18.4	10.9
	18.6	16.0	19.5	16.3	17.8	8.5
02	17.5	18.6	17.9	16.4	20.8	9.0
	18.4	18.7	19.4	18.5	21.0	5.6
	19.4	18.3	16.7	18.2	16.4	7.0
03	16.9	18.5	19.3	17.5	18.2	5.1
	16.4	17.8	20.2	16.6	19.6	9.5
	17.8	18.8	18.4	16.9	18.8	4.4

[0154] 结果表明鸡肉、猪肉、鱼、虾、牛奶样本的变异系数均在 3.1% -12.7% 之间,符合了《农业部文件》农医发【2005】17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度标准。

[0155] b. 样本准确度试验

[0156] 以 10 μg/kg、20 μg/kg 头孢噻吩分别对鸡肉、猪肉、鱼、虾样本进行添加回收试验,以 20 μg/kg、40 μg/kg、头孢噻吩对牛奶样本进行添加回收试验,每个浓度做 4 个平行,分别计算准确度。

[0157] 表 7 试剂盒的准确度

[0158]

样本		鸡肉		猪肉		鱼		虾		牛奶	
添加浓度 (μg/kg (L))		10	20	10	20	10	20	10	20	20	40
准确度%	1	91.4	87.3	78.6	89.0	81.5	83.5	83.5	91.5	90.2	102.5
	2	86.3	90.2	85.2	91.4	86.2	91.4	90.5	80.6	88.9	94.6
	3	88.7	81.4	90.3	80.6	90.6	92.7	86.7	71.6	96.5	87.2
	4	76.4	75.8	81.4	77.6	79.5	78.6	95.2	68.7	90.2	88.3
平均值%		85.7	83.7	84.7	84.7	84.5	86.6	89.0	78.1	91.5	93.2

[0159] 结果表明鸡肉、猪肉、鱼、虾样本添加回收率在 68.7% -95.2% 之间,牛奶样本的添加回收率在 87.2% -107.5% 之间。

[0160] 实验例 3 交叉反应率试验:

[0161] 选择具有类似结构和类似功能的 3 种头孢类药物测定交叉反应率,通过各种药物的标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应率越大,那么此试剂盒对头孢类的检测的特异性就越好。

[0162] 交叉反应率(%) = (引起 50%抑制头孢噻吩的浓度 / 引起 50%抑制的类似物浓

度)×100%

[0163] 表 8 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
[0164]	头孢噻呋	100%
	头孢曲松	169%
	头孢噻肟	63%
	头孢唑啉	<0.1%

[0165] 实验例 4

[0166] 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、头孢类药物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。

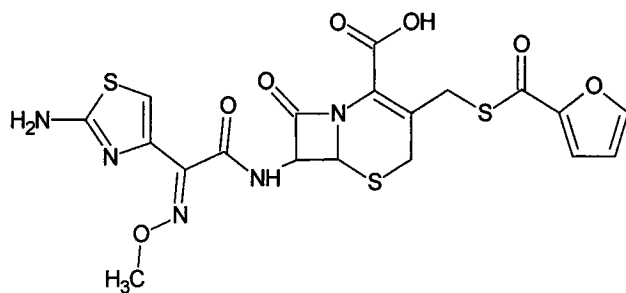


图 1

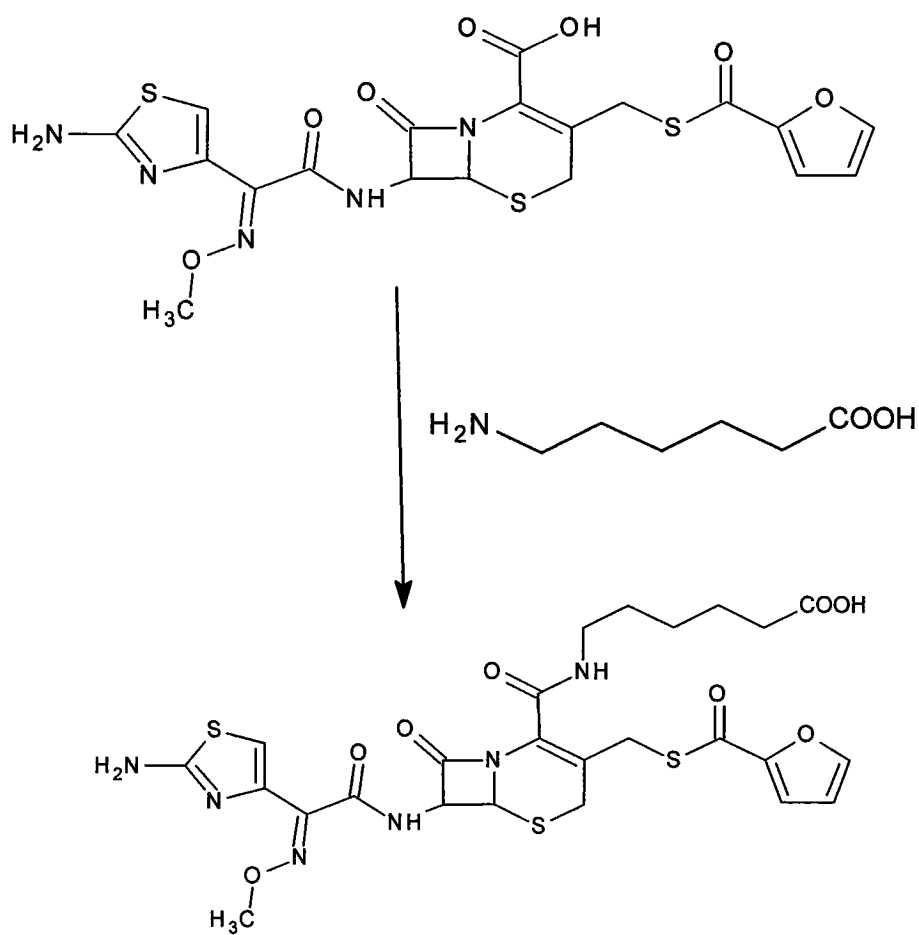


图 2

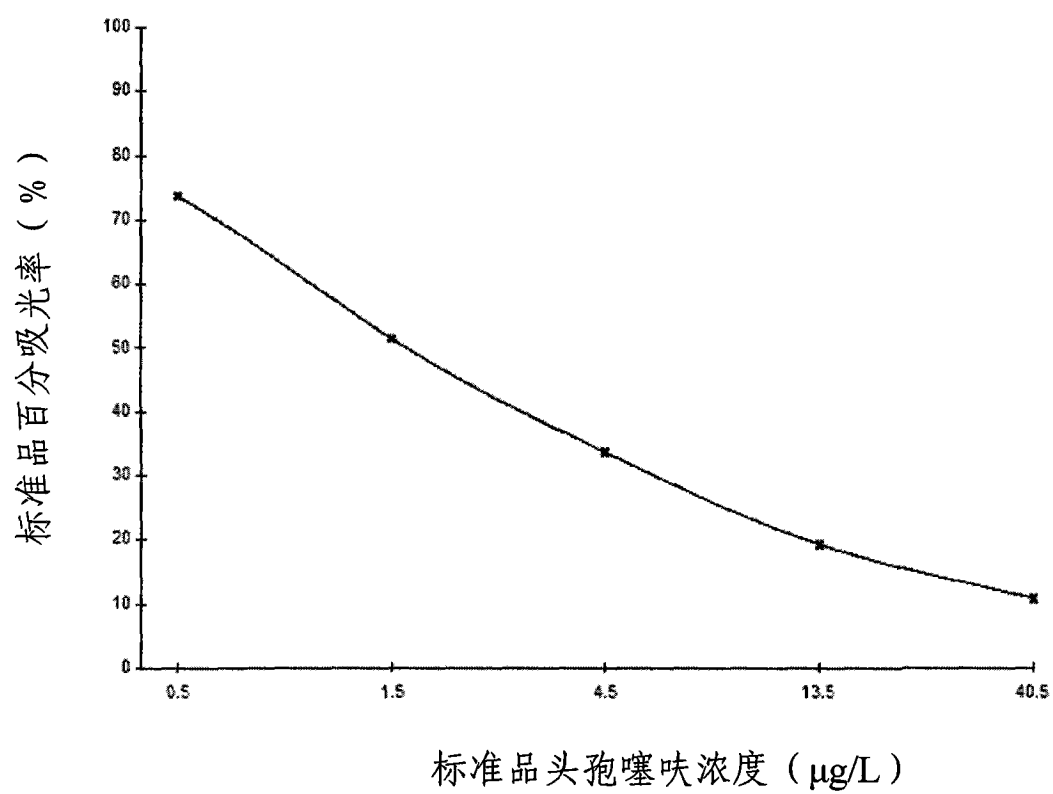


图 3

专利名称(译)	检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN101571539B	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN200910085945.7	申请日	2009-06-01
[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)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 张建军 冯才伟 万宇平 冯静 冯才茂 崔海峰 徐念琴 赵正苗 李勇 刘福林 刘平 朱亮亮 陈炜琳 罗贵昆		
发明人	何方洋 张建军 冯才伟 万宇平 冯静 冯才茂 崔海峰 徐念琴 赵正苗 李勇 刘福林 刘平 朱亮亮 陈炜琳 罗贵昆		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/566 G01N33/531 G01N33/577		
其他公开文献	CN101571539A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测头孢类药物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶标板，酶标记物，头孢类药物特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或酶标板上包被抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有)，头孢噻唑标准品溶液，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上述酶联免疫试剂盒检测头孢类药物的方法，它包括：

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。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测动物组织(鸡肉、猪肉、鱼、虾)和牛奶等样品中头孢类药物的残留量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	1批	6.7	5.8	6.4	5.9	6.0	9.6	4.7	5.8	6.4	7.7
	2批	5.3	8.5	9.2	6.4	8.2	8.9	7.4	7.0	6.5	5.8
	3批	6.3	5.2	4.8	7.6	8.2	3.4	6.8	5.9	6.7	5.9