

[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 200910085947.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月4日

[11] 公开号 CN 101571541A

[22] 申请日 2009.6.1

[21] 申请号 200910085947.6

[71] 申请人 北京望尔康泰生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际信息产业基地高新四街8号

共同申请人 北京望尔生物技术有限公司

[72] 发明人 何方洋 张建军 万宇平 冯才伟  
冯才茂 冯 静 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

权利要求书2页 说明书20页 附图2页

[54] 发明名称

检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒及其方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测磺胺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，磺胺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），磺胺甲氧异噻唑标准品溶液，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磺胺类药物的方法，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）、蜂蜜、鸡蛋、牛奶、饲料等样品中磺胺类药物的残留量，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、一种检测磺胺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) 磺胺甲基异噁唑标准品溶液；
- (4) 底物显色液；
- (5) 终止液；
- (6) 浓缩洗涤液；
- (7) 浓缩复溶液，

所述包被原为磺胺类药物半抗原抗原、抗体或抗抗体，所述酶标记物为酶标记磺胺类药物半抗原、酶标记磺胺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磺胺类药物特异性抗体工作液。

2、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于所述磺胺类药物抗原是由磺胺类半抗原与载体蛋白偶联得到，所述药物抗体是由所述抗原制备获得。

3、如权利要求2所述的试剂盒，其特征在于所述磺胺类药物半抗原是通过下述步骤得到的：

a) 取 10g 对乙酰氨基苯磺酰氯置 100ml 圆底烧瓶中，加 25ml 吡啶溶解，剧烈搅拌下逐滴加入含有 0.52g 对氨基苯甲酸的吡啶溶液 55ml，加毕油浴升温，44℃ 反应 1h。反应停止后，冷却至室温，旋蒸，除去吡啶，用 0.01mol/L 氢氧化钠溶解，加乙酸乙酯萃取，分出有机相，水洗除去盐酸，蒸干得黄色固体物质 0.72g；

b) 取 6g 黄色产品溶解在 30ml 0.1mol/L 的 NaOH 水溶液中，油浴升温，回流反应 3h，反应结束后，冷却至室温，用 1mol/L 盐酸调节 PH 值到弱碱性，用 1mol/L 氢氧化钠调 PH 值至 9，用乙酸乙酯萃取两次，合并有机相，水洗，干燥，蒸干得黄色固体产品，乙酸乙酯：丙酮=3：2 体系中加热溶解，重结晶得磺胺类半抗原产品。

4、如权利要求1或2所述的试剂盒，其特征在于所述磺胺类药物抗体为单克隆抗体。

5、如权利要求3所述的试剂盒，其特征在于所述磺胺类药物抗体由杂交瘤细胞株 C-4-1CGMCC No.2717 分泌产生。

6、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。

7、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 pH 值 9.6 的 0.1mol/L 的碳酸盐冲液，所用封闭液为 pH 值为 9.2，含有 9-12% 马血清、0.2% 吐温-20，0.2mol/L 的碳酸盐缓冲液。所用浓缩洗涤液为 pH 值为 7.2、含有 0.7-1.0% 吐温-20、0.03% 叠氮化钠防腐剂、0.1-0.3mol/L 的碳酸盐缓冲液；所用浓缩复溶液为 pH 值为 7.6，含有 9-12% 卵清蛋白、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液，磺胺甲基异噁唑标准品溶液的浓度分别为 0 $\mu$ g/L，1 $\mu$ g/L，3 $\mu$ g/L，9 $\mu$ g/L，27 $\mu$ g/L，81 $\mu$ g/L，所述百分比为重量百分比。

8、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。

9、权利要求1~8任一项所述的试剂盒在检测磺胺类药物残留中的应用。

10、一种检测样品磺胺类药物残留的方法，包括步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用权利要求1-8任一项所述的试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

## 检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒及其方法

### 技术领域

本发明涉及酶联免疫检测技术，具体涉及一种用于检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒，其特别适于鸡肉、猪肉、鱼、虾组织和蜂蜜、鸡蛋、牛奶、饲料样本中磺胺类药物残留的检测。

### 技术背景

磺胺类药物是应用广泛的抗菌素，对畜禽疾病控制和治疗起到重要作用，但其同时存在严重副作用，人体中长期存在磺胺类药物会导致许多细菌对磺胺类药物产生耐药性，且有磺胺类药物具有潜在的致癌性。我国农业部第 235 号文件规定其残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前针对磺胺类兽药残留的检测方法主要有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、液质联用 (HPLC/MS)、气相色谱法 (GC)、酶联免疫吸附法 (ELISA) 和毛细管电泳法 (HPCE) 等。由于复杂的仪器设备和繁琐的前处理过程，仪器分析方法不适合现场监控和大量样本的筛选，其中 ELISA 方法作为一种新型的动物源食品中磺胺类药物残留筛选方法已经被使用，如中国专利申请 (200510086777.5) 和中国专利 (200710056432.4) 公开了两种 ELISA 法检测磺胺类药物残留的方法，但是这两个方法试剂盒对检测磺胺类药物的特异性不理想，均只能检测磺胺类药物其中的几种药物。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种能够用于多种磺胺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。

本发明试剂盒，它含有：

- (1) 包被有包被原的酶标板 (包被原为抗原、抗体或抗抗体)；
- (2) 酶标记物 (为酶标记半抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体)；
- (3) 磺胺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)；

- (4) 磺胺甲基异噁唑标准品溶液;
- (5) 底物显色液;
- (6) 终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 浓缩复溶液。

本发明所述磺胺类药物包括磺胺甲基异噁唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺多辛、磺胺甲噻二唑、磺胺喹噁啉、磺胺甲基嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺苯酰、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺(二甲基)异噁唑、酞酰磺噻唑具有共同分子骨架药理活性的药物。

本发明所提供的检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒,包括磺胺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,酶标记磺胺类药物半抗原或酶标记磺胺类药物特异性抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

所述磺胺类药物半抗原是将乙酰氨基苯磺酰氯(结构式如图1)与氨基苯甲酸通过反应得到的具有羧基官能团的半抗原。

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;酶标记磺胺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磺胺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。

所述磺胺类药物特异性抗体可为磺胺类药物单克隆抗体或磺胺类药物多克隆抗体;它们均是用磺胺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;所述磺胺类药物多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,所述磺胺类药物单克隆抗体优选为磺胺类药

物鼠单克隆抗体,所述磺胺类药物多克隆抗体优选为磺胺类药物兔多克隆抗体。

所述磺胺类药物单克隆抗体优选为磺胺类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-4-1CGMCC No.2717 分泌的单克隆抗体。

所述磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株 C-4-1CGMCC No.2717 (分类命名:对磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株)已于2008年10月20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)。

以上抗体均可以用磺胺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;所述磺胺类药物半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将磺胺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。

为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括磺胺甲基异噁唑标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

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。

所述浓缩洗涤液为pH值为7.2、含有0.7-1.0%吐温-20、0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1-0.3mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

所述浓缩复溶液为pH值为7.6,含有9-12%卵清蛋白、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液优选pH值9.6的0.1mol/L的碳酸盐缓冲液,所用封闭液为pH值为9.2,含有9-12%马血清、0.2%吐温-20,0.2mol/L的碳酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

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0.1~0.2 $\mu$ g/ml,每孔加入100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C温育2h或4 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l封闭液,37 $^{\circ}$ 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。

本发明中免疫原的合成过程为：

### 1、磺胺类药物半抗原合成（合成路线如图2）

a) 取 10g 对乙酰氨基苯磺酰氯置 100ml 圆底烧瓶中，加 25ml 吡啶溶解，剧烈搅拌下逐滴加入含有 0.52g 对氨基苯甲酸的吡啶溶液 55ml，加毕油浴升温，44℃反应 1h.反应停止后，冷却至室温，旋蒸，除去吡啶，用 0.01mol/L 氢氧化钠溶解，加乙酸乙酯萃取，分出有机相，水洗除去氢氧化钠，蒸干得黄色固体物质 0.72g；

b)取 6g 黄色产品溶解在 30ml 0.1mol/L 的 NaOH 水溶液中，油浴升温，回流反应 3h，反应结束后，冷却至室温，用 1mol/L 盐酸调节 PH 值到弱酸性，用乙酸乙酯萃取两次，合并有机相，水洗，干燥，蒸干得黄色固体产品，乙酸乙酯：丙酮=3：2 体系中加热溶解，重结晶得磺胺类半抗原产品。

### 2、免疫原的合成

将磺胺类药物半抗原与载体蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原。

免疫原的具体制备方法：

- (1) 磺胺类药物半抗原 2mg 溶于 1ml50%的 N,N-二甲基甲酰胺溶液，加入 2 $\mu$ l 氯甲酸异丁酯，10℃搅拌反应 30min；
- (2) 取牛血清白蛋白 20mg，溶于 1 ml 50mmol/L 的碳酸盐溶液；
- (3) 将载体蛋白溶液滴加到半抗原溶液中 4℃搅拌过夜，得到免疫原；
- (4) 将反应完的人工抗原在 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 7 天，每天换液 3-4 次，最后将抗原浓缩或冻干，备用。

磺胺类药物抗体的制备

#### 1、磺胺类药物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，以磺胺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。

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。

## 2、磺胺类药物兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以磺胺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。

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。

本发明所述试剂盒中磺胺甲基异噁唑标准品溶液：标准品溶液 6 瓶，0 $\mu$ g/L，1 $\mu$ g/L，3 $\mu$ g/L，9 $\mu$ g/L，27 $\mu$ g/L，81 $\mu$ g/L。

本发明的检测原理为：

当在微孔条上预包被磺胺类药物偶联抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入磺胺类药物特异性抗体溶液，样本中残留的磺胺类药物与酶标板上包被的磺胺类药物偶联抗原竞争磺胺类药物特异性抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与磺胺类药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中磺胺类药物的残留量。同时根据酶标板上颜色的深浅，与系列浓度的磺胺甲基异噁唑标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中磺胺类药物残留量的浓度范围。

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

当在微孔条上预包被磺胺类药物偶联抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记磺胺类药物特异性抗体溶液，样本中残留的磺胺类药物与酶标板上包被的磺胺类药物偶联抗原竞争磺胺类药物特异性抗体，用显色液显色，

样本吸光值与磺胺类药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中磺胺类药物的残留含量。同时根据酶标板上颜色的深浅，与系列浓度的磺胺甲基异噁唑标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中磺胺类药物残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被抗体时，加入磺胺类药物抗体孵育后，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记磺胺类药物偶联抗原溶液，样本中残留的磺胺类药物与酶标记磺胺类药物偶联抗原竞争抗磺胺类药物特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与磺胺类药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中磺胺类药物的残留含量。同时根据酶标板上颜色的深浅，与系列浓度的磺胺甲基异噁唑标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中磺胺类药物残留量的浓度范围。

本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒监测磺胺类药物的方法，它包括步骤：

- 1) 样品前处理；
- 2) 用试剂盒进行检测；
- 3) 分析检测结果。

样品的前处理主要是为了从样品中获得磺胺类药物溶液，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：

#### 1、鸡肉、猪肉、鱼、虾样本前处理方法

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 乙酸乙酯，立即用振荡器振荡 5min，3000g 以上离心 5min；取上清液 4ml 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 复溶液工作液，用涡旋仪涡动 30s 后转入 2ml 离心管中，3000g 以上，室温（ $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ）离心 5min；除去上层正己烷相，取下层水相  $50\mu\text{l}$  用于分析。

#### 2、蜂蜜样本前处理方法

称取  $1.0 \pm 0.05\text{g}$  蜂蜜样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中；加入 1ml 1 M 盐酸溶液，用振荡器振荡至蜂蜜全部溶解；放入  $37^\circ\text{C}$  培养箱中孵育 30min；

取出，加入 0.5ml 2M 氢氧化钠和 0.5ml 0.2MPB，涡动混匀，再加入 8ml 乙腈，震荡 10min，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；取上层有机相 2.5ml 至 10ml 干净的玻璃试管中，于 50~60℃ 水浴氮气流下吹干；加 0.5ml 复溶工作液，涡动 5min 溶解；取 50 $\mu$ l 用于分析。

### 3、饲料样本前处理方法

称取 2.0 $\pm$ 0.05g 均质物至 50ml 聚苯乙烯离心管中，加入 8ml 乙腈，用振荡器振荡 5min，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；移取 1ml 上层有机相至 10ml 干净的玻璃试管中，于 50~60℃ 水浴氮气流下吹干；加入 1ml 正己烷，用涡旋仪涡动 30s，再加 1ml 复溶工作液，用涡旋仪涡动 30s，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；除去上层有机相，取下层 100 $\mu$ l 加入到 900 $\mu$ l 复溶液工作液，混匀，取 50 $\mu$ l 用于分析。

### 4、牛奶样本前处理方法

移取 2ml 牛奶样本均质物至 50ml 聚苯乙烯离心管中，加入 8ml 乙酸乙酯，立即用振荡器振荡 5min，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；取上清液 1ml 至 10ml 干净的玻璃试管中，于 50~60℃ 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 复溶工作液混合，用涡旋仪涡动 30s，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；除去上层正己烷相，取下层水相 50 $\mu$ l 用于分析。

### 5、猪尿样本前处理：

将尿液于 3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min，直至尿液样本清亮；移取 200 $\mu$ l 清亮尿液加 600 $\mu$ l 复溶工作液混合；取 50 $\mu$ l 用于分析。

本发明中用试剂盒检测时：当包被原为磺胺类药物偶联抗原时，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；当包被原为磺胺类药物偶联抗原时，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；当包被原为磺胺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磺胺类药物半抗原，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定

吸光度值；当包被原为抗抗体时，向酶标板微孔中加入磺胺类药物抗体，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磺胺类药物半抗原，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

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<sub>0</sub>）再乘以 100%，即百分吸光度值。计算公式为：

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

以磺胺甲基异噁唑标准品溶液的浓度（μg/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磺胺类药物的残留量。

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 75 分钟可以完成。

本发明检测磺胺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磺胺类药物的残留量；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；采用高特异性的磺胺类药物单克隆抗体，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磺胺类药物的检测中发挥重要作用。

## 附图说明

图 1: 乙酰氨基苯磺酰氯结构图

图 2: 磺胺类药物半抗原合成图

图 3: 以磺胺类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

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 试剂盒组分的制备

### 1. 抗原的合成

#### a. 磺胺类药物半抗原合成（合成路线如图 2）

1)、取 10g 对乙酰氨基苯磺酰氯置 100ml 圆底烧瓶中，加 25ml 吡啶溶解，剧烈搅拌下逐滴加入含有 0.52g 对氨基苯甲酸的吡啶溶液 55ml，加毕油浴升温，44℃反应 1h.反应停止后，冷却至室温，旋蒸，除去吡啶，用 0.01mol/L 氢氧化钠溶解，加乙酸乙酯萃取，分出有机相，水洗除去氢氧化钠，蒸干得黄色固体物质 0.72g;

2)、取 6g 黄色产品溶解在 30ml 0.1mol/L 的 NaOH 水溶液中，油浴升温，回流反应 3h，反应结束后，冷却至室温，用 1mol/L 盐酸调节 PH 值到弱酸性，用乙酸乙酯萃取两次，合并有机相，水洗，干燥，蒸干得黄色固体产品，乙酸乙酯：丙酮=3：2 体系中加热溶解，重结晶得磺胺类半抗原产品。

#### b. 免疫原合成

将磺胺类药物半抗原与牛血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原。

免疫原的制备过程：

- 1) 磺胺类药物半抗原 2mg 溶于 1ml50%的 N,N-二甲基甲酰胺溶液，加入 2 $\mu$ l 氯甲酸异丁酯，10℃搅拌反应 30min;
- 2) 取牛血清白蛋白 20mg，溶于 1ml 50mmol/L 的碳酸盐溶液;
- 3) 将载体蛋白溶液滴加到半抗原溶液中 4℃搅拌过夜，得到免疫原;
- 4) 将反应完的人工抗原在 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中透析 7 天，每天换液 3-4 次，最后将抗原浓缩或冻干，备用。

#### b. 包被原磺胺类药物偶联抗原的制备

将磺胺类药物半抗原与卵清蛋白偶联得到包被原。

包被原的制备过程：

- 1) 取磺胺类半抗原 5mg 溶于 0.5ml DMF 中，得到 I 液，向其中加入 25mg

- EDC, 活化反应 30 min 得到 I 液;
- 2) 取卵清蛋白 20mg, 用 2.7ml pH 8.0 PBS 液溶解, 得到 II 液;
  - 3) 将 I 液加到 II 液后搅拌反应过夜, 得到免疫原。

### 单克隆抗体的制备

#### a. 动物免疫

将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 100 $\mu$ g/只, 使其产生多克隆抗体血清。

#### b. 细胞融合和克隆化

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。

经筛选得到对磺胺类药物单克隆杂交瘤细胞株 C-4-1CGMCC No.2717。磺胺类药物的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生磺胺类药物特异性抗体, 且该抗体特异性是针对磺胺类药物的, 灵敏度能达到 1 $\mu$ g/L。

#### c. 细胞冻存和复苏

将磺胺类药物的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成  $1 \times 10^6$  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 $^{\circ}$ C 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

#### d. 单克隆抗体的生产与纯化

将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只, 7 天后腹腔注射磺胺类药物的单克隆杂交瘤细胞株  $5 \times 10^7$  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 $^{\circ}$ C 保存。

## 2. 多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以磺胺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。

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。

#### 4. 酶标板的制备

用包被缓冲液将磺胺类药物偶联抗原、抗体或抗抗体稀释成  $0.1\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入  $100\mu\text{l}$ ， $37^\circ\text{C}$  2h，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， $37^\circ\text{C}$  温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

#### 5. 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

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：

- 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。
- 2) 降低了辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比率至 **2:1**，改良后的方法比传统的方法简便，对酶的活性的损失减少。

### 实施例 2 检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被磺胺类药物偶联抗原的酶标板；
- (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；
- (3) 磺胺类药物单克隆抗体工作液；
- (4) 磺胺甲基异噁唑标准品溶液 6 瓶，浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ ， $1\mu\text{g/L}$ ， $3\mu\text{g/L}$ ， $9\mu\text{g/L}$ ， $27\mu\text{g/L}$ ， $81\mu\text{g/L}$ ；

- (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；
- (6) 终止液为 2mol/L 盐酸；
- (7) 浓缩洗涤液为 pH 值为 7.2、含有 0.7-1.0%吐温-20、0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1-0.3mol/L 的碳酸盐缓冲液，所述百分比为重量百分比。
- (8) 浓缩复溶液为 pH 值为 7.6，含有 9-12%卵清蛋白、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量百分比。

### 实施例 3 样品中磺胺类药物的检测

#### 1. 样品前处理

##### (1)、鸡肉、猪肉、鱼、虾样本前处理方法

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 乙酸乙酯，立即用振荡器振荡 5min，3000g 以上离心 5min；取上清液 4ml 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 复溶液工作液，用涡旋仪涡动 30s 后转入 2ml 离心管中，3000g 以上，室温 ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ) 离心 5min；除去上层正己烷相，取下层水相  $50\mu\text{l}$  用于分析。

##### (2) 蜂蜜样本前处理方法

称取  $1.0 \pm 0.05\text{g}$  蜂蜜样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中；加入 1ml 1 M 盐酸溶液，用振荡器振荡至蜂蜜全部溶解；放入  $37^\circ\text{C}$  培养箱中孵育 30min；取出，加入 0.5ml 2M 氢氧化钠和 0.5ml 0.2MPB，涡动混匀，再加入 8ml 乙腈，震荡 10min，3000g 以上，室温 ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ) 离心 5min；取上层有机相 2.5ml 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 0.5ml 复溶工作液，涡动 5min 溶解；取  $50\mu\text{l}$  用于分析。

##### (3) 饲料样本前处理方法

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 乙腈，用振荡器振荡 5min，3000g 以上，室温 ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ) 离心 5min；移取 1ml 上层有机相至 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，再加 1ml 复溶工作液，用涡旋仪涡动 30s，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；除去上层有机相，取下层 100μl 加入到 900μl 复溶液工作液，混匀，取 50μl 用于分析。

#### （4）牛奶样本前处理方法

移取 2ml 牛奶样本均质物至 50ml 聚苯乙烯离心管中，加入 8ml 乙酸乙酯，立即用振荡器振荡 5min，3000g 上，室温（20-25℃）离心 5min；取上清液 1ml 至 10ml 干净的玻璃试管中，于 50~60℃ 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 复溶工作液混合，用涡旋仪涡动 30s，3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min；除去上层正己烷相，取下层水相 50μl 用于分析。

#### （5）猪尿样本前处理：

将尿液于 3000g 以上，室温（20-25℃）离心 5min，直至尿液样本清亮；移取 200ul 清亮尿液加 600ul 复溶工作液混合；取 50μl 用于分析。

## 2. 用试剂盒检测

向包被有磺胺类药物偶联抗原的酶标板微孔中加入磺胺甲基异噁唑标准品溶液或样品溶液 50μl，再加入磺胺类药物单克隆抗体工作液 50μl，用盖板模封板，25℃ 恒温箱中反应 30min，倒出孔内液体，每孔加入 250μl 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 100μl，25℃ 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℃ 恒温箱避光显色 15min，每孔加入 2mol/L 终止液盐酸 50μl，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）。

## 3. 检测结果分析

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<sub>0</sub>）再乘以 100%，得到百分吸光度值。以磺胺甲基异噁唑标准品浓度（μg/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磺胺类药物的残留量。

### 实验例 1 标准品精密度试验：

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  $9\mu\text{g/L}$  标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

表 1 标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	6.7	5.8	6.4	5.9	6.0	9.6	4.7	5.8	6.4	7.7
	02 批	5.3	8.5	9.2	6.4	8.2	8.9	7.4	7.0	6.5	5.8
	03 批	6.3	5.2	4.8	7.6	8.2	3.4	6.8	5.9	6.7	5.9

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。

### 实验例 2 样本精密度和准确度试验

#### 1. 样品精密度试验：

以  $10\mu\text{g/kg}$  (L) 浓度的磺胺甲基异噁唑对鸡肉、猪肉、鱼、虾，牛奶、蜂蜜、猪尿样本进行添加测定，以  $60\mu\text{g/kg}$  的磺胺甲基异噁唑对饲料样本进行添加测定，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。

表 2 鸡肉样本可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/kg}$ )					变异系数 CV%
01	9.8	7.9	8.5	8.6	7.2	11.4
	8.2	8.5	8.0	8.6	9.2	5.4
	7.9	8.6	8.7	9.0	7.3	8.3
02	9.4	9.3	8.9	8.0	8.2	7.2
	7.5	7.8	8.3	8.0	7.6	4.1
	8.7	8.5	9.1	9.5	8.4	5.2
03	9.2	8.6	9.2	9.6	8.1	6.6

9.3	9.0	8.4	8.6	7.7	7.1
8.7	8.2	8.9	9.0	7.8	6.0

表3 猪肉样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	9.0	8.6	9.1	7.8	8.4	6.1
	8.7	9.4	8.6	7.9	7.5	8.8
	8.5	7.9	8.4	8.9	9.3	6.2
02	9.0	7.6	8.5	8.4	9.7	9.0
	8.6	7.7	8.8	9.5	8.5	7.5
	8.5	8.3	7.9	9.2	8.4	5.6
03	9.2	7.8	7.5	8.7	9.7	10.8
	9.2	8.8	8.6	7.0	8.0	10.3
	7.9	8.4	9.6	9.7	8.7	8.8

表4 鱼样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	8.2	8.7	8.9	9.2	7.8	6.5
	8.0	9.1	7.3	8.6	8.4	8.2
	8.3	8.2	8.7	9.1	8.0	5.2
02	8.3	8.2	9.0	8.6	9.2	5.0
	8.5	8.7	9.0	8.3	7.6	6.3
	8.0	7.6	7.9	8.8	9.9	11.0
03	8.4	8.7	9.3	8.6	8.1	5.1
	8.6	7.4	8.5	8.3	7.4	7.4
	8.1	8.8	9.0	7.3	9.8	11.0

表5 虾样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	8.6	9.2	9.7	8.0	8.4	7.7
	9.0	9.3	8.3	7.5	7.8	9.1
	8.0	8.6	8.9	7.0	8.6	9.2

	7.9	8.1	8.3	8.7	9.5	7.4
02	8.2	8.9	9.1	9.0	8.4	4.5
	8.8	8.6	8.0	8.3	9.7	7.4
	9.7	8.2	8.7	8.4	9.2	6.9
03	7.4	8.5	9.4	8.7	8.6	8.4
	8.7	8.4	9.1	8.5	8.3	3.7

表6 牛奶样本可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
	8.7	9.4	9.9	8.4	9.0	6.5
01	8.0	8.9	9.7	10.0	8.2	9.9
	8.2	9.4	9.7	8.1	9.7	8.9
	9.4	9.6	8.0	8.1	8.6	8.4
02	9.3	8.7	8.2	8.3	8.4	5.2
	9.9	9.6	9.1	8.6	8.5	6.7
	10.0	8.6	8.3	9.7	9.6	8.0
03	9.7	9.6	9.7	8.2	8.5	8.0
	8.2	8.6	9.8	9.6	9.7	7.9

表7 蜂蜜样本可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
	7.5	8.3	9.1	9.5	9.8	10.6
01	9.3	8.9	8.4	7.5	8.2	8.1
	9.8	8.6	8.4	8.7	9.2	6.3
	9.0	7.7	7.8	8.6	9.0	7.5
02	9.4	9.5	7.7	7.4	8.2	11.4
	9.1	7.4	7.6	8.4	8.1	8.3
	8.6	7.8	8.3	9.8	9.9	10.5
03	8.4	8.9	7.3	8.7	8.6	7.5
	8.2	7.6	8.3	9.2	8.0	7.1

表8 猪尿样本可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
----	-------------------------	--	--	--	--	----------

	8.5	7.6	9.4	9.8	8.3	10.1
01	7.9	8.5	9.6	7.9	8.4	8.2
	9.8	9.0	8.6	7.5	8.3	9.8
	8.8	8.6	8.9	7.5	8.0	7.1
02	9.2	9.5	8.7	7.4	8.0	10.1
	8.6	8.2	9.4	9.5	8.6	6.4
	8.7	8.1	9.5	8.7	8.2	6.4
03	9.6	9.4	8.6	8.7	9.0	4.8
	8.8	9.2	9.7	9.3	9.1	3.5

表9 饲料样本可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
	7.2	8.6	8.5	8.0	8.1	6.9
01	7.4	7.7	7.6	8.5	9.0	8.5
	8.9	8.0	7.8	7.3	8.0	7.2
	7.5	8.5	8.4	7.2	8.5	7.8
02	9.2	8.3	8.0	8.4	8.8	5.5
	8.3	7.7	7.5	8.4	9.0	7.3
	8.5	9.1	7.4	8.9	8.6	7.8
03	8.4	7.7	7.4	8.8	8.7	7.6
	8.6	7.3	7.1	8.2	9.0	10.2

结果表明鸡肉、猪肉、鱼、虾、牛奶、蜂蜜、猪尿、饲料样本的变异系数均在3.5%-11.4%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。

#### b. 样本准确度试验

以  $10\mu\text{g/kg}$ 、 $20\mu\text{g/kg}$  磺胺甲基异噁唑分别对鸡肉、猪肉、鱼、虾、牛奶、蜂蜜、猪尿样本进行添加回收试验，以  $40\mu\text{g/kg}$ 、 $80\mu\text{g/kg}$  磺胺甲基异噁唑对饲料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。

表 10 试剂盒的准确度

样本		鸡肉		猪肉		鱼		虾	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L))		10	20	10	20	10	20	10	20
准确度%	1	85.9	90.6	82.9	72.3	98.1	86.0	89.3	93.4
	2	80.2	80.0	83.7	78.9	90.2	87.4	82.7	90.5
	3	76.8	78.6	79.3	82.6	76.3	95.3	77.6	86.5
	4	94.1	91.0	85.5	76.6	82.5	90.4	78.9	87.6
平均值%		84.3	85.1	82.9	77.6	86.8	89.8	82.1	89.5
样本		牛奶		蜂蜜		猪尿		饲料	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ (L))		10	20	10	20	10	20	40	80
准确度%	1	95.8	85.0	81.2	82.7	96.3	82.3	82.5	86.0
	2	86.7	95.1	89.0	86.9	84.1	80.6	76.8	70.5
	3	82.4	87.9	91.7	85.7	88.5	91.2	83.9	74.1
	4	93.7	99.5	95.8	97.3	86.8	90.0	88.4	86.3
平均值%		89.7	91.9	89.4	88.2	88.9	86.0	82.9	79.2

结果表明鸡肉、猪肉、鱼、虾样本添加回收率在 72.3%-98.1%之间，牛奶样本的添加回收率在 82.4%-99.5%之间，蜂蜜样本的添加回收率在 81.2%-97.3%之间，猪尿样本的添加回收率在 80.6%-96.3%之间，饲料样本的添加回收率在 70.5%-88.4%之间。

### 实验例 3 交叉反应率试验:

选择与具有类似结构和类似功能的 19 种磺胺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，那么此试剂盒对磺胺类药物检测的特异性就越好。

交叉反应率(%) = (引起 50%抑制磺胺甲基异噁唑的浓度/引起 50%抑制的类似物浓度) × 100%

表 11 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率 (%)
磺胺甲基异噁唑	100
磺胺嘧啶	150
磺胺二甲基嘧啶	340
磺胺间二甲氧嘧啶	140
磺胺多辛	131
磺胺甲噻二唑	78
磺胺喹噁啉	320
磺胺甲基嘧啶	326
磺胺甲氧哒嗪	213
磺胺氯哒嗪	306
磺胺间甲氧嘧啶	338
磺胺苯酰	129
磺胺对甲氧嘧啶	523
磺胺(二甲基)异噁唑	518
酞酰磺噻唑	208
磺胺噻唑	43
磺胺醋酰	25
磺胺吡啶	2
磺胺硝苯	1

#### 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、磺胺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。

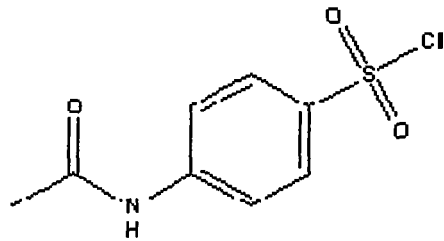


图 1

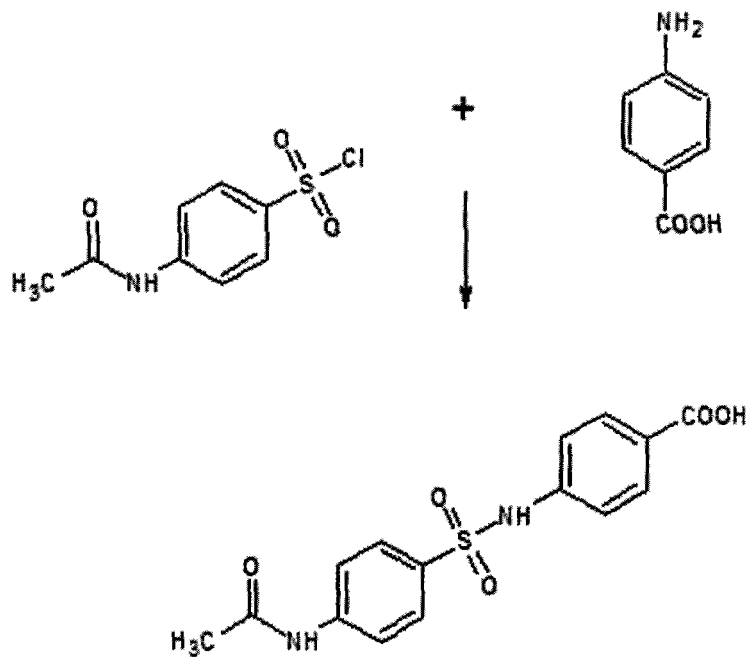


图 2

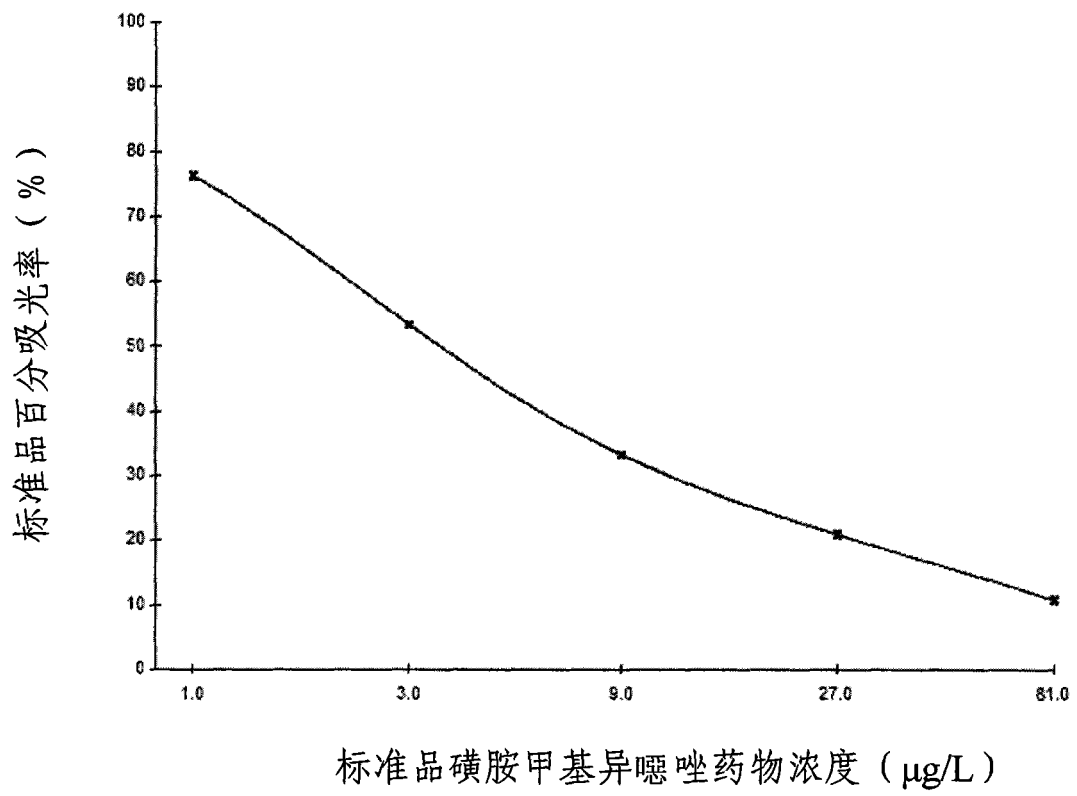


图 3

专利名称(译)	检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒及其方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101571541A</a>	公开(公告)日	2009-11-04
申请号	CN200910085947.6	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 万宇平 冯才伟 冯才茂 冯静 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 万宇平 冯才伟 冯才茂 冯静 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	CN101571541B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种检测磺胺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，磺胺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)，磺胺甲氧异噁唑标准品溶液，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磺胺类药物的方法，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)、蜂蜜、鸡蛋、牛奶、饲料等样品中磺胺类药物的残留量，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%	01批	6.7	5.8	6.4	5.9	6.0	9.6	4.7	5.8	6.4	7.7
	02批	5.3	8.5	9.2	6.4	8.2	8.9	7.4	7.0	6.5	5.8
	03批	6.3	5.2	4.8	7.6	8.2	3.4	6.8	5.9	6.7	5.9