



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103018448 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201110278976. 1

(22) 申请日 2011. 09. 20

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

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 万宇平 冯才茂 冯静 余厚美
朱亮亮 杜亚菲 刘琳 付军权

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒及其方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒及其方法, 酶联免疫试剂盒包括: 包被有包被原的酶标板、呋喃西林代谢物特异性抗体、酶标记物、呋喃西林代谢物标准溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液, 2- 硝基苯甲醛。本发明还提供了一种呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒检测方法, 主要包括: 先进行样本前处理, 再用试剂盒进行检测, 最后分析检测结果。本发明的检测试剂盒能够同时快速检测动物组织、水产品中呋喃西林代谢物药物, 具有操作简便、快速、准确、灵敏度高、费用低廉等特点, 适合大量样本的筛查和现场监控。

1. 一种呋喃西林代谢物酶联免疫检测试剂盒,其包括包被有包被原的酶标板、呋喃西林代谢物特异性抗体、酶标记物、标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、2-硝基苯甲醛,所述包被原为呋喃西林代谢物抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述呋喃西林代谢物抗原为呋喃西林代谢物半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

3. 如权利要求1-2所述的试剂盒,其特征在于:所述呋喃西林代谢物半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

0. 75g 呋喃西林代谢物 (SEM) 和 20ml DMF 的混合液,室温下缓慢滴加入 2.68-5.36g 对苯二甲醛的 50-100ml DMF 溶液中,滴加完毕后室温至 60℃ 反应 2-4 小时,除去溶剂,柱层析纯化,得到淡黄色 SEM 衍生物。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的呋喃西林代谢物特异性抗体为呋喃西林代谢物单克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述抗体为羊抗鼠抗体。

6. 如权利要求1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;酶标记抗体是采用过碘酸钠法将标记酶与抗体偶联得到。

7. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的终止液为 2mol/L 的硫酸溶液,所述底物显色液 A 液为过氧化脲溶液,底物显色液 B 液为四甲基联苯胺溶液。

8. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为 0.8%~1.2% 吐温-20 和 0.01%~0.02% 的叠氮化钠防腐剂的 0.2~0.4mol/L pH7.6 磷酸盐缓冲液,所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.6,含有 9%~12% 卵清蛋白、0.1~0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液。

9. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述标准品溶液浓度分别为 0 μg/L、0.05 μg/L、0.15 μg/L、0.45 μg/L、1.35 μg/L、4.05 μg/L。

10. 用权利要求1-9所述的呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒检测样品中呋喃西林代谢物的方法,主要步骤包括:

1) 将待测样品进行前处理,得到待测样品溶液;

2) 用权利要求1-9任一项所述的酶联免疫试剂盒检测待测样品溶液;

3) 分析检测结果。

检测呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒及其方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种检测动物组织(肌肉、肝脏)、水产品中呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 硝基呋喃类药物因有非常好的抗菌作用和药动力学的特性,曾经被广泛应用,作为禽类、水产和猪促生长的添加剂。但在长时间的实验研究过程中发现,硝基呋喃类药物和代谢物均可以使实验动物发生癌变和基因突变,正因为如此才导致此类药物禁止在治疗和饲料中使用。

[0003] 由于硝基呋喃类原型药在生物体内代谢迅速,无法检测,但其代谢产物因和蛋白质结合而相当稳定,所以在分析此类药物的残留时经常要分析其代谢后的产物,管理部门就以检测代谢产物为手段达到检测硝基呋喃类残留的目的。呋喃西林作为硝基呋喃类药物的一种,代谢产物为 SEM。目前用来检测硝基呋喃类代谢物的最常用方法是 LC-UV、LC-MS 和 LC-MS/MS,与之相比,酶联免疫方法具有高精度度和灵敏度、较低的操作技术要求、短暂的检测时间、较大的检测样本量等特点,能够更好地满足我国畜禽养殖户、屠宰场、食品企业、政府职能监管部门等开展检测工作。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适用于进行大批量样品筛查的定性、定量检测方法。

[0005] 本发明提供的呋喃西林代谢物酶联免疫检测试剂盒,包括包被有包被原的酶标板、呋喃西林代谢物特异性抗体、酶标记物、标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、2-硝基苯甲醛,所述包被原为呋喃西林代谢物抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。

[0006] 本发明所提供的呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒,所述呋喃西林代谢物抗原为呋喃西林代谢物半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0007] 所述呋喃西林代谢物特异性抗体为呋喃西林代谢物单克隆抗体,是用呋喃西林代谢物免疫原免疫动物得到的。所述呋喃西林代谢物单克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,所述呋喃西林代谢物单克隆抗体优选为呋喃西林代谢物鼠单克隆抗体。

[0008] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶,酶标记抗体是采用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶与羊抗鼠抗体偶联得到。

[0009] 为了更方便的进行大量样本筛查和现场监控,所述试剂盒还包括:标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、2-硝基苯甲醛。

[0010] 所述标准品溶液为系列呋喃西林代谢物标准品溶液,浓度分别为 $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.05\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.15\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.45\ \mu\text{g/L}$ 、 $1.35\ \mu\text{g/L}$ 、 $4.05\ \mu\text{g/L}$, 1mL/瓶 。所述的终止液为 2mol/

L 的硫酸溶液,所述底物显色液 A 液为过氧化脲溶液,底物显色液 B 液为四甲基联苯胺溶液,所述浓缩洗涤液为 0.8%~1.2%吐温-20 和 0.01%~0.02%的叠氮化钠防腐剂的 0.2~0.4mol/LpH7.6 磷酸盐缓冲液,所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.6,含有 9%~12%卵清蛋白、0.1~0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0011] 其中所述酶标板在制备过程中所用到的包被缓冲液为 pH9.4~9.6 的 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为 pH7.4~7.6 的 0.05%~1%的牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲液。

[0012] 本发明酶标板的制备主要为:用包被缓冲液将包被原稀释成 0.1~0.3 μ g/ml,每孔加入 150 μ l,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2h,倾去孔中液体,洗涤液洗涤 1 次,拍干,每孔中加入 150 μ l 封闭液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2h,倾去孔中液体拍干,用铝膜真空密闭保存。

[0013] 本发明中包被原和免疫原的合成过程为:

[0014] 1. 半抗原合成(合成路线如图 1)

[0015] 0.75g 呋喃西林代谢物 (SEM) 和 20ml DMF 的混合液,室温下缓慢滴加入 2.68-5.36g 对苯二甲醛的 50-100ml DMF 溶液中,滴加完毕后室温至 60 $^{\circ}$ C 反应 2-4 小时,除去溶剂,柱层析纯化,得到淡黄色 SEM 衍生物。

[0016] 2. 免疫原的合成

[0017] (1) 取呋喃西林代谢物半抗原 10mg 用 1mlDMF 溶解,得到溶液 1。

[0018] (2) 取 BSA40mg 用 6ml 水溶解,得到溶液 2。

[0019] (3) 将溶液 1 滴加入溶液 2 中,得到溶液 3,室温反应 24h。

[0020] (4) 取 NaBH₄ 14mg 用 0.2ml0.1M NaOH 溶解后中入溶液 3 中,4 $^{\circ}$ C 反应 2h。

[0021] (5) 用 0.01mol/lPBS 4 $^{\circ}$ C 透析 3d 每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质。

[0022] (6) 分装,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0023] 3. 包被原的合成

[0024] (1) 取呋喃西林代谢物半抗原 14mg 用 1mlDMF 溶解,得到溶液 1。

[0025] (2) 取 OVA 50mg 用 4ml 水溶解,得到溶液 2。

[0026] (3) 将溶液 1 滴加入溶液 2 中,得到溶液 3,室温反应 24h。

[0027] (4) 取 NaBH₄ 10mg 用 0.2ml0.1M NaOH 溶解后中入溶液 3 中,4 $^{\circ}$ C 反应 2h。

[0028] (5) 用 0.01mol/lPBS 4 $^{\circ}$ C 透析 3d 每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质。

[0029] (6) 分装,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0030] 4. 单克隆抗体的制备

[0031] 动物免疫:呋喃西林代谢物半抗原与载体蛋白偶联物免疫 8-10 周龄 Balb/c 小鼠。

[0032] 细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇 (PEG) 4000 的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0033] 细胞冻存和复苏: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 $^{\circ}$ C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0034] 本发明还提供了一种用呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒检测样品中呋喃西林代谢物残留的方法,采用本方法对动物组织、水产中的呋喃西林代谢物进行定性或定量检测,样本前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品,试剂盒具有很高的精确度和灵敏度,较低的操作技术要求和短暂的检测时间,检测样本量大等特点,主要步骤包括:

[0035] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样品溶液;

[0036] 2) 用酶联免疫试剂盒检测待测样品溶液;

[0037] 3) 分析检测结果。

附图说明

[0038] 图 1 :呋喃西林代谢物半抗原合成图

[0039] 图 2 :呋喃西林代谢物标准曲线

具体实施方式

[0040] 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。

[0041] 实施例一:抗原、抗体及酶标记物的合成

[0042] 1. 呋喃西林代谢物半抗原的合成

[0043] 0.75g 呋喃西林代谢物 (SEM) 和 20ml DMF 的混合液,室温下缓慢滴加入 2.68-5.36g 对苯二甲醛的 50-100ml DMF 溶液中,滴加完毕后室温至 60℃ 反应 2-4 小时,除去溶剂,柱层析纯化,得到淡黄色 SEM 衍生物。

[0044] 2. 免疫原的合成

[0045] (1) 取呋喃西林代谢物半抗原 10mg 用 1ml DMF 溶解,得到溶液 1。

[0046] (2) 取 BSA 40mg 用 6ml 水溶解,得到溶液 2。

[0047] (3) 将溶液 1 滴加入溶液 2 中,得到溶液 3,室温反应 24h。

[0048] (4) 取 NaBH_4 14mg 用 0.2ml 0.1M NaOH 溶解后加入溶液 3 中,4℃ 反应 2h。

[0049] (5) 用 0.01mol/l PBS 4℃ 透析 3d 每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质。

[0050] (6) 分装,于 -20℃ 保存备用。

[0051] 3. 包被原的合成

[0052] (1) 取呋喃西林代谢物半抗原 14mg 用 1ml DMF 溶解,得到溶液 1。

[0053] (2) 取 OVA 50mg 用 4ml 水溶解,得到溶液 2。

[0054] (3) 将溶液 1 滴加入溶液 2 中,得到溶液 3,室温反应 24h。

[0055] (4) 取 NaBH_4 10mg 用 0.2ml 0.1M NaOH 溶解后加入溶液 3 中,4℃ 反应 2h。

[0056] (5) 用 0.01mol/l PBS 4℃ 透析 3d 每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质。

[0057] (6) 分装,于 -20℃ 保存备用。

[0058] 4. 酶标板的制备

[0059] 酶标板在制备过程中所用到的包被缓冲液为 pH9.4 ~ 9.6 的 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为 pH7.4 ~ 7.6 的 0.05% ~ 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸盐缓冲

液。

[0060] 本发明酶标板的制备主要为：用包被缓冲液将包被原稀释成 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 $150 \mu\text{l}$ ， 37°C 避光孵育 2h，倾去孔中液体，洗涤液洗涤 1 次，拍干，每孔中加入 $150 \mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 避光孵育 2h，倾去孔中液体拍干，用铝膜真空密闭保存。

[0061] 5. 羊抗鼠抗抗体的制备

[0062] 以羊为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊，得到羊抗鼠抗抗体。

[0063] 6. 酶标记羊抗鼠抗抗体（酶标记抗抗体）的制备

[0064] 将辣根过氧化物酶与抗抗体采用改良后的过碘酸钠法进行偶联，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；辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比率为 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。

[0065] 7. 单克隆抗体的制备方法

[0066] 动物免疫：呋喃西林代谢物半抗原与载体蛋白偶联物免疫 8-10 周龄 Balb/c 小鼠。

[0067] 细胞融合与克隆化：取免疫后的鼠脾细胞，与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇 (PEG) 4000 的作用下融合，筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0068] 经筛选得到呋喃西林代谢物的单克隆杂交瘤细胞株。呋喃西林代谢物的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生呋喃西林代谢物特异性抗体，该抗体特异性是针对呋喃西林代谢物的，灵敏度达到 $0.05 \mu\text{g/L}$ 。

[0069] 细胞冻存和复苏：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°C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0070] 实施例二：呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒各组分的组建

[0071] 组建呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒，包含下述各组分：

[0072] (1) 包被有包被原的酶标板。

[0073] (2) 酶标记抗抗体：辣根过氧化物酶 - 羊抗鼠抗抗体。

[0074] (3) 呋喃西林代谢物单克隆抗体工作液。

[0075] (4) 标准溶液：采用梯度稀释法配制标准品溶液，得到系列标准品 6 瓶，浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.05 \mu\text{g/L}$ 、 $0.15 \mu\text{g/L}$ 、 $0.45 \mu\text{g/L}$ 、 $1.35 \mu\text{g/L}$ 、 $4.05 \mu\text{g/L}$ ，以及高浓度标准品 $100 \mu\text{g/L}$ ， 1mL/瓶 。

[0076] (5) 底物显色液 A 液为过氧化脲溶液，底物显色液 B 液为四甲基联苯胺溶液。

[0077] (6) 终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0078] (7) 浓缩洗涤液为 $0.8\% \sim 1.2\%$ 吐温 -20 和 $0.01\% \sim 0.02\%$ 的叠氮化钠防腐剂的 $0.2 \sim 0.4\text{mol/L}$ pH7.6 磷酸盐缓冲液。

[0079] (8) 浓缩复溶液为 pH 值为 7.6，含有 $9\% \sim 12\%$ 卵清蛋白、 $0.1 \sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液。

[0080] (9) 2-硝基苯甲醛。

[0081] 实施例三：检测样本中呋喃西林代谢物

[0082] 1. 样本的前处理

[0083] 组织、水产样本前处理方法

[0084] 称取 1.0g 均质后的样本,加入 4ml 去离子水、0.5ml 1M 盐酸溶液(量取 8.3ml 浓盐酸加入去离子水定容至 100ml)和 100 μ l 衍生化试剂(向装有 2-硝基苯甲醛的试剂瓶中加 10ml 甲醇溶解混匀(浓度为 10mM)),用振荡器充分振荡 2min;在 37℃ 过夜孵育(大约 16h);分别加入 5ml 0.1M 磷酸氢二钾溶液(称取 22.8g 三水合磷酸氢二钾加 1L 去离子水溶解混匀)、0.4ml 1M 氢氧化钠溶液(称取 4.0g 氢氧化钠加 100ml 去离子水溶解混匀)和 5ml 乙酸乙酯,用振荡器剧烈振荡 30s;3000g 以上,室温(20-25℃/68-77°F)离心 10min。

[0085] 取 2.5ml 乙酸乙酯相至 10ml 干燥玻璃试管中,于 50 ~ 60℃ 水浴氮气流下吹干;加入 1ml 正己烷(或正庚烷),用涡旋仪涡动 30s,再加入 1ml 复溶工作液(用去离子水将 2 $\times$ 浓缩复溶液按 1 : 1 体积比进行稀释),用涡旋仪涡动 1min 充分混匀;3000g 以上,室温(20-25℃/68-77°F)离心 10min;除去上层有机相,取下层水相 50 μ l 用于分析。

[0086] 2. 检测方法

[0087] (1) 将所需试剂从冷藏环境中取出,不回温直接加样,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0088] (2) 取出需要数量的微孔板,将不用的微孔板放入自封袋,保存于 2-8℃。

[0089] (3) 编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做 2 孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0090] (4) 抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合:将抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液按 10 : 1 体积比混合并混匀,在 4℃ 预先平衡 30min(操作过程中控制该步反应时间,即该步平衡 30min 开始加混合液)

[0091] (5) 加标准品/样本和抗体工作液与酶标记抗抗体浓缩液的混合液:加标准品/样本 50 μ l 到对应的微孔中。然后加入抗体工作液与酶标记抗抗体浓缩液的混合液 50 μ l/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 4℃ 避光环境中反应 30min。

[0092] (6) 洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水将 20 $\times$ 浓缩洗涤液按 1 : 19 体积比进行稀释)250 μ l/孔,充分洗涤 4-5 次,每次间隔 10s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。

[0093] (7) 显色:加入底物液 A 液 50 μ l/孔,再加底物液 B 液 50 μ l/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃ 避光环境中反应 15min。

[0094] (8) 测定:加入终止液 50 μ l/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450nm 处(建议用双波长 450/630nm 检测,请在 5min 内读完数据),测定每孔 OD 值。

[0095] 3. 检测结果分析

[0096] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0 标准)的吸光度值,再乘以 100%,即得到百分吸光率。以标准品百分吸光率为纵坐标,以呋喃西林代谢物标准品浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线图(如图 2)。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中呋喃西林代谢物实际浓度。

[0097] 实施例四:呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度、保存期实验

[0098] 1. 试剂盒灵敏度测定

[0099] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验,试剂盒标准曲线最低点为 0.05 μ g/L,标准

曲线的范围为 $0.05 \mu\text{g/L} \sim 4.05 \mu\text{g/L}$, 在鸡肉、猪肉、鸡肝、虾、鱼样本中呋喃西林代谢物检测限为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 。

[0100] 2. 试剂盒准确度和精密度

[0101] 准确度是指测定值与真值间的符合程度, 试剂盒的准确度常用回收率表示; 精密度是反应测定方法对某一特定样品多次测定所得结果的重复程度, 常用变异系数表示。分别向空白鸡肉、猪肉、鸡肝、虾、鱼样本中添加呋喃西林代谢物至终浓度为 $0.2 \mu\text{g/kg}$ 、 $0.4 \mu\text{g/kg}$, 重复 5 次, 分别取三个批次的试剂盒计算变异系数, 结果见下表。

[0102] 表 1 试剂盒的准确度和精密度测定

[0103]

鸡肉													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数CV%
1	0.215	0.215	0.218	0.186	0.193	7.2	1	0.368	0.396	0.385	0.332	0.405	7.6
	0.202	0.189	0.199	0.195	0.171	6.4		0.396	0.413	0.385	0.337	0.365	7.7
2	0.195	0.206	0.214	0.181	0.200	6.2	2	0.396	0.351	0.302	0.361	0.337	9.8
	0.168	0.179	0.161	0.196	0.157	9.1		0.386	0.296	0.338	0.376	0.357	10.2
3	0.158	0.178	0.158	0.190	0.140	11.8	3	0.385	0.375	0.312	0.406	0.381	9.5
	0.153	0.204	0.185	0.170	0.201	11.7		0.396	0.385	0.321	0.401	0.381	8.6
猪肉													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数CV%
1	0.163	0.176	0.187	0.207	0.181	8.8	1	0.336	0.325	0.343	0.396	0.352	7.8
	0.173	0.158	0.169	0.196	0.163	8.5		0.386	0.352	0.293	0.346	0.358	9.8
2	0.158	0.190	0.150	0.181	0.174	9.6	2	0.336	0.328	0.403	0.376	0.358	8.5
	0.176	0.141	0.163	0.146	0.173	9.8		0.337	0.369	0.328	0.357	0.415	9.5
3	0.163	0.192	0.177	0.188	0.196	7.3	3	0.335	0.369	0.327	0.365	0.296	8.8
	0.156	0.166	0.153	0.174	0.198	10.6		0.413	0.358	0.376	0.335	0.367	7.7
鸡肝													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数CV%
1	0.151	0.176	0.158	0.188	0.161	9.0	1	0.366	0.328	0.415	0.386	0.357	8.8
	0.185	0.161	0.159	0.177	0.160	7.0		0.336	0.357	0.406	0.413	0.386	8.6
2	0.169	0.202	0.196	0.185	0.172	7.8	2	0.326	0.299	0.347	0.358	0.386	9.6
	0.155	0.145	0.159	0.166	0.188	9.9		0.286	0.378	0.391	0.336	0.355	11.8
3	0.161	0.195	0.156	0.172	0.168	8.8	3	0.305	0.368	0.407	0.365	0.379	10.2
	0.171	0.182	0.172	0.178	0.215	9.9		0.338	0.369	0.375	0.289	0.361	10.1

[0104]

虾													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数CV%
1	0.202	0.190	0.185	0.202	0.165	8.1	1	0.396	0.337	0.369	0.328	0.351	7.6
	0.143	0.174	0.155	0.148	0.174	9.1		0.378	0.395	0.358	0.361	0.325	7.2
2	0.202	0.154	0.199	0.186	0.175	10.7	2	0.376	0.358	0.315	0.339	0.388	8.2
	0.156	0.166	0.159	0.169	0.200	10.3		0.356	0.289	0.338	0.361	0.357	8.8
3	0.151	0.203	0.185	0.196	0.213	12.6	3	0.386	0.375	0.332	0.396	0.315	9.8
	0.155	0.168	0.199	0.169	0.176	9.3		0.368	0.299	0.337	0.385	0.366	9.6
鱼													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数CV%
1	0.163	0.158	0.196	0.186	0.173	9.0	1	0.386	0.308	0.376	0.358	0.315	10.2
	0.165	0.206	0.195	0.185	0.206	9.0		0.368	0.376	0.306	0.358	0.336	8.1
2	0.186	0.173	0.158	0.166	0.195	8.5	2	0.321	0.369	0.386	0.377	0.403	8.3
	0.185	0.167	0.195	0.155	0.188	9.3		0.326	0.386	0.359	0.376	0.413	8.7
3	0.162	0.185	0.196	0.176	0.203	8.8	3	0.296	0.321	0.356	0.373	0.338	8.9
	0.163	0.185	0.196	0.176	0.199	8.0		0.361	0.359	0.326	0.335	0.391	7.2

[0105] 结果表明,以 0.2 μg/kg 呋喃西林代谢物添加空白鸡肉、猪肉、鸡肝、虾、鱼时,样本添加回收率范围为 70.0%~109.0%,以 0.4 μg/kg 呋喃西林代谢物添加空白鸡肉、猪肉、鸡肝、虾、鱼时,样本添加回收率范围为 71.5%~103.8%;批内批间变异系数均小于 20%,符合《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和准确度的规定。

[0106] 3. 交叉反应率试验

[0107] 选择如下所示的呋喃西林代谢物、呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物、呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因 8 种药物按照常规方法分别测定交叉反应率,结果如表 2 所示。

[0108]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的呋喃西林代谢物浓度}}{\text{引起 50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$

[0109] 表 2 试剂盒的特异性

[0110]

药物名称	交叉反应率 (%)
呋喃西林代谢物	100
呋喃西林	25

[0111]

呋喃唑酮代谢物	<0.1
呋喃它酮代谢物	<0.1
呋喃妥因代谢物	<0.1
呋喃唑酮	<1
呋喃它酮	<1
呋喃妥因	<1

[0112] 4. 保存期实验

[0113] 试剂盒保存条件为 2-8℃, 经过 12 个月测定, 试剂盒的最大吸光度值、IC50 值、呋喃西林代谢物添加实际测定值均在正常范围之内。同时做加速老化和冷冻试验, 将试剂盒放在 37℃、-20℃中 6 天, 测定结果也表明试剂盒的各项指标正常。从以上结果得到呋喃西林代谢物试剂盒可以在 2-8℃保存 12 个月。

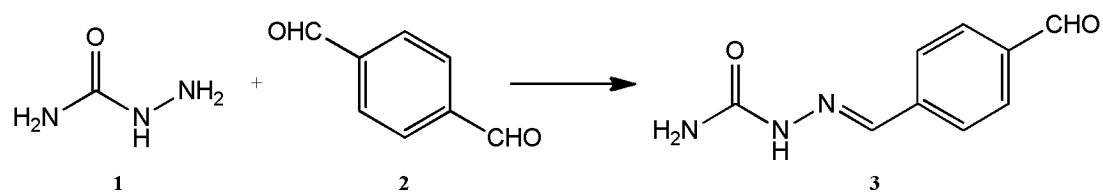


图 1

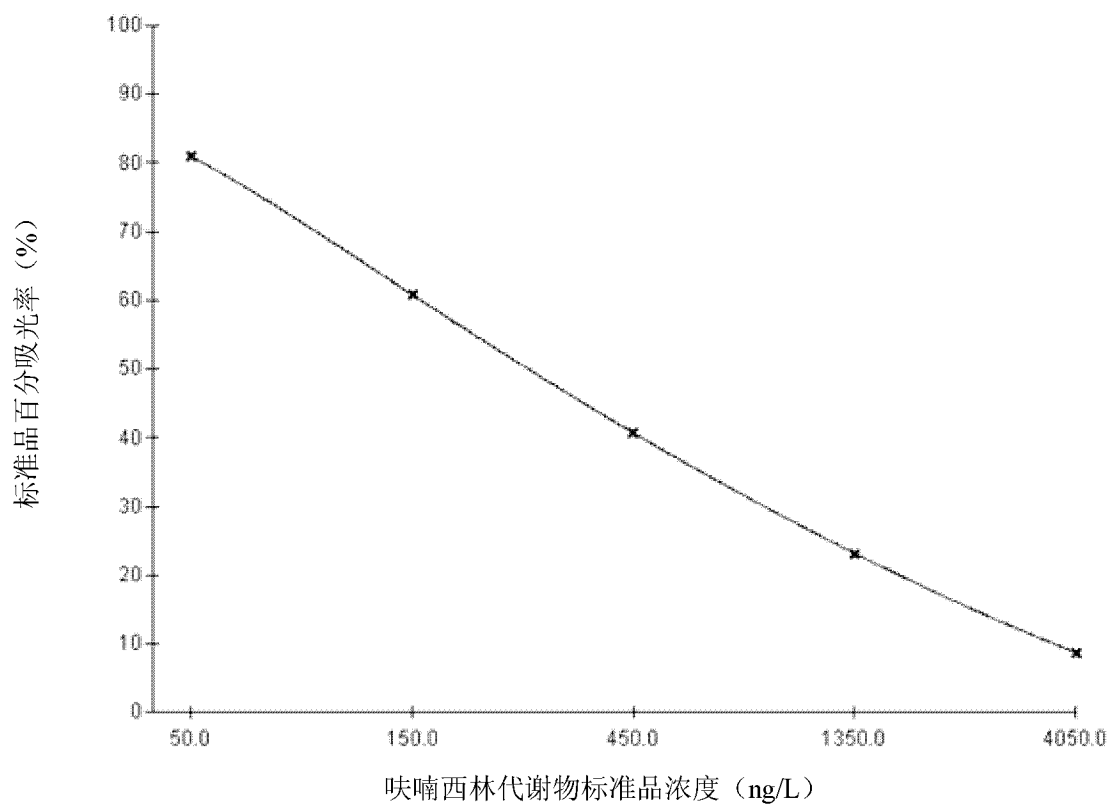


图 2

专利名称(译)	检测呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒及其方法		
公开(公告)号	CN103018448A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201110278976.1	申请日	2011-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 冯才茂 冯静 余厚美 朱亮亮 杜亚菲 刘琳 付军权		
发明人	万宇平 冯才茂 冯静 余厚美 朱亮亮 杜亚菲 刘琳 付军权		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN103018448B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒及其方法，酶联免疫试剂盒包括：包被有包被原的酶标板、呋喃西林代谢物特异性抗体、酶标记物、呋喃西林代谢物标准溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液，2-硝基苯甲醛。本发明还提供了一种呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒检测方法，主要包括：先进行样本前处理，再用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明的检测试剂盒能够同时快速检测动物组织、水产品中呋喃西林代谢物药物，具有操作简便、快速、准确、灵敏度高、费用低廉等特点，适合大量样本的筛查和现场监控。

鸡肉													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 数CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数 数CV%
1	0.215	0.215	0.218	0.186	0.193	7.2	1	0.368	0.396	0.385	0.332	0.405	7.6
	0.202	0.189	0.199	0.195	0.171	6.4		0.396	0.413	0.385	0.337	0.365	7.7
2	0.195	0.206	0.214	0.181	0.200	6.2	2	0.396	0.351	0.302	0.361	0.337	9.8
	0.168	0.179	0.161	0.196	0.157	9.1		0.386	0.296	0.338	0.376	0.357	10.2
3	0.158	0.178	0.158	0.190	0.140	11.8	3	0.385	0.375	0.312	0.406	0.381	9.5
	0.153	0.204	0.185	0.170	0.201	11.7		0.396	0.385	0.321	0.401	0.381	8.6
猪肉													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 数CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数 数CV%
1	0.163	0.176	0.187	0.207	0.181	8.8	1	0.336	0.325	0.343	0.396	0.352	7.8
	0.173	0.158	0.169	0.196	0.163	8.5		0.386	0.352	0.293	0.346	0.358	9.8
2	0.158	0.190	0.150	0.181	0.174	9.6	2	0.336	0.328	0.403	0.376	0.358	8.5
	0.176	0.141	0.163	0.146	0.173	9.8		0.337	0.369	0.328	0.357	0.415	9.5
3	0.163	0.192	0.177	0.188	0.196	7.3	3	0.335	0.369	0.327	0.365	0.296	8.8
	0.156	0.166	0.153	0.174	0.198	10.6		0.413	0.358	0.376	0.335	0.367	7.7
鸡肝													
批次	添加0.2μg/kg实测值					变异系数 数CV%	批次	添加0.4μg/kg实测值					变异系数 数CV%
1	0.151	0.176	0.158	0.188	0.161	9.0	1	0.366	0.328	0.415	0.386	0.357	8.8
	0.185	0.161	0.159	0.177	0.160	7.0		0.336	0.357	0.406	0.413	0.386	8.6
2	0.169	0.202	0.196	0.185	0.172	7.8	2	0.326	0.299	0.347	0.358	0.386	9.6
	0.155	0.145	0.159	0.166	0.188	9.9		0.286	0.378	0.391	0.336	0.355	11.8
3	0.161	0.195	0.156	0.172	0.168	8.8	3	0.305	0.368	0.407	0.265	0.379	10.2
	0.171	0.182	0.172	0.178	0.215	9.9		0.338	0.369	0.375	0.289	0.361	10.1