



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655847 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310587540. X

(22) 申请日 2013. 11. 20

(71) 申请人 南京亿特生物科技有限公司

地址 211122 江苏省南京市江宁区江宁科学
园芝兰路 18 号

(72) 发明人 洪霞 其他发明人请求不公开姓名

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

权利要求书2页 说明书4页

(54) 发明名称

检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明为检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括:包被阿德呋啉抗原的酶标板、阿德呋啉标准品、阿德呋啉抗体工作液、阿德呋啉酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标板微孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液 A、底物液 B,在酶的作用下显色剂呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中阿德呋啉的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测鸡肉组织中阿德呋啉的残留量。

1. 检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,包括酶标板、阿德呋啉标准品、阿德呋啉抗体工作液、阿德呋啉酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

2. 检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、阿德呋啉标准品的制备、阿德呋啉抗体工作液的制备、阿德呋啉酶标二抗工作液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述的检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:所述的酶标板制备方法为将阿德呋啉半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA) 偶联得到阿德呋啉包被抗原,用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS) 缓冲液作为包被液,将包被抗原稀释成 1:40000 比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,加入稀释后的浓缩洗涤液 300 μ L/孔,洗板 2 次,30 s/次,然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) 封闭,150 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液直接拍干,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C) 晾干,抽检合格后将酶标板真空密封于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。

4. 根据权利要求 2 所述的检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:阿德呋啉标准品的浓度分别为 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述的检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:所述的阿德呋啉抗体工作液是采用阿德呋啉人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成 1:60000 比例制备。

6. 根据权利要求 2 所述的一种检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其特征在于:所述的阿德呋啉酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成 1:2000 比例,所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液,所述终止液为 2 mol/L 的硫酸,所述浓缩稀释液是 10 倍浓缩稀释液,其为 0.1 mol/L 的 PBS, pH 值范围 7.0-7.5 之间,所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其为含 0.5% 吐温-20, 0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法,基于抗原抗体的间接竞争酶联免疫反应原理,该方法的特征在于:预处理待测样品,取包被有阿德呋啉抗原的酶标板,按序分别加入标准品/样本、阿德呋啉酶标二抗工作液、阿德呋啉抗体工作液各 50 μ L/孔到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min,将孔内液体甩干,用洗涤工作液充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,拍干后加入底物液 A 50 μ L/孔,底物液 B 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 15~20 min,加入终止液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据),以的标准品浓度(ppb) 的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中阿德呋啉的含量。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述待测样品用以下方法进行预处理:a. 准确称取 5.0 $\pm$ 0.05g 匀浆样品至 50 mL 离心管中;

b. 先加入有机溶剂 10mL 和 1g 无水硫酸钠,用涡旋仪充分振荡涡动 10min;

c. 5000 r/min 离心 10 min;

- d. 取上清液 3 mL 于 50~60℃氮气流下吹干；
- e. 加入 1 mL 正己烷（脂肪含量高的样品可加入 2mL 正己烷），充分涡动 10 s，再加入 1 mL 样品稀释液，低速涡动 10 s；4000 r/min，离心 5 min，完全弃去上层正己烷及中间层杂质；
- f. 取下层 50 μ L 用于分析。

检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及兽药残留检测技术领域,特别是检测鸡肉组织中阿德呋啉的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 当前由艾美耳属球虫引起鸡球虫病的危害程度非常高,严重影响家禽生长发育并造成环境污染。阿德呋啉属核苷酸类化合物,在国外已经有很多研究,属于一种新型的高效抗球虫药物,它通过干扰球虫的嘌呤代谢而发挥抗球虫作用,其抗球虫作用峰期为球虫的无性生殖期,即在球虫感染后 1 ~ 3 d 作用最强。阿德呋啉是由安徽农业大学药理学实验室和南京农业大学药理学实验室共同研发的新一代抗球虫药物,具有抗球虫谱广、高效、低毒等优点,对柔嫩艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫和毒害艾美耳球虫都有效。近年来,由于家禽养殖规模的不断扩大,全国范围内球虫病的频繁爆发致使各种抗球虫药大量使用。另外,有些养殖户为了经济利益,不合理使用抗球虫药且不遵照休药期规定。由于阿德呋啉在鸡体内代谢主要以原药形式存在,并以原药形式排泄,因此造成该药在鸡肉组织中的残留及对环境的污染。如果人体经常摄入低剂量的同样残留物,会导致体内耐药性细菌的增加及对临床上治疗感染性疾病造成困难;同时,由于残留物在体内蓄积,导致各种器官病变,甚至癌变,这将对我国动物产品质量安全和消费者健康造成严重威胁。国内尚没有鸡肉中阿德呋啉残留检测的相关报道,因此,有必要建立一种鸡肉组织中阿德呋啉残留的检测技术。。

[0003] 酶联免疫吸附法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用于食品安全检测行业。本发明旨在建立一种检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

发明内容

[0004] 为了克服色谱法的不足,本发明提供一种检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法。该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

[0005] 本发明检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒,包括酶标板、阿德呋啉标准品、阿德呋啉抗体工作液、阿德呋啉酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

[0006] 本发明检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、阿德呋啉标准品的制备、阿德呋啉抗体工作液的制备、阿德呋啉酶标二抗工作液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

[0007] 其进一步特征在于:所述的酶标板经由阿德呋啉抗原包被制备,具体步骤是将阿德呋啉半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联得到包被抗原,用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将阿德呋啉包被抗原稀释成 1:40000 比例,100 μ L/孔,37℃避光孵育 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,加入经稀释的浓缩洗涤液 300 μ L/孔,洗

板 2 次, 30 s/ 次, 然后加入 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液, 150 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h, 甩掉封闭液直接拍干, 拍干后的酶标板放置恒温间 (25 $^{\circ}$ C) 晾干, 抽检合格后将酶标板真空密封于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。

[0008] 阿德呋啉标准品浓度分别为 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL。

[0009] 所述阿德呋啉抗体工作液是采用阿德呋啉人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体, 用抗体稀释液稀释成 1:60000 比例制备。

[0010] 所述阿德呋啉酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成 1:2000 比例, 所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液, 所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液, 所述终止液为 2 mol/L 的硫酸, 所述浓缩稀释液是 10 倍浓缩稀释液, 为 0.1 mol/L 的 PBS, pH 值范围 7.0-7.5 之间, 所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液, 为含 0.5% 吐温-20, 0.1 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0011] 检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法, 基于抗原抗体的间接竞争酶联免疫反应原理, 该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品, 即将待测试的样品处理为液体样品, 或者用有机溶剂提取待测样品, 并将其复溶于样品稀释液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出, 置于室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) 平衡 30 min 以上, 注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有阿德呋啉抗原的酶标板, 加标准品 / 样本 50 μ L/ 孔到对应的微孔中, 加入阿德呋啉酶标二抗工作液, 50 μ L/ 孔, 然后加入阿德呋啉抗体工作液, 50 μ L/ 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;

(4) 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用洗涤工作液 260 μ L/ 孔, 充分洗涤 4~5 次, 每次间隔 10 s, 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);

(5) 加入底物液 A 50 μ L/ 孔, 底物液 B 50 μ L/ 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 15 ~ 20 min;

(6) 加入终止液 50 μ L/ 孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测, 测定每孔吸光度值 (请在 5 min 内读完数据);

(7) 以的标准品浓度 (ppb) 的对数为横坐标, 标准品百分吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 对照标准曲线计算样品中阿德呋啉的含量。

[0012] 其中, 所述待测样品用以下方法进行预处理:

- a. 准确称取 5.0 ± 0.05 g 匀浆样品至 50 mL 离心管中;
- b. 先加入有机溶剂 10mL 和 1g 无水硫酸钠, 用涡旋仪充分振荡涡动 10min;
- c. 5000 r/min 离心 10 min;
- d. 取上清液 3 mL 于 50~60 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干;
- e. 加入 1 mL 正己烷 (脂肪含量高的样品可加入 2mL 正己烷), 充分涡动 10 s, 再加入 1 mL 样品稀释液, 低速涡动 10 s; 4000 r/min, 离心 5 min, 完全弃去上层正己烷及中间层杂质;
- f. 取下层 50 μ L 用于分析。

[0013] 本发明检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法的测定原理: 样品中的阿德

呋啉与酶标板上固定的抗原特异性竞争抗体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中阿德呋啉的含量。如果样品中的阿德呋啉含量少,显色深;反之,则显色浅。本发明的试剂盒检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的快速检测。

具体实施方式

[0014] 阿德呋啉蛋白质偶联物的制备:

采用琥珀酸酐法得到带羧基的阿德呋啉半抗原衍生物,之后取 0.05 mmol 与载体蛋白 BSA 按 10:1 的结合比混合在 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 (CBS) 中,然后加入 0.15 mmol 碳二亚胺,搅拌置室温反应 24 h,最后于 0.2 mol/L pH 7.6 的 PBS 缓冲液中透析两天,除去未反应的半抗原,将得到的蛋白质偶联物溶液于 -20℃ 保存备用。

[0015] 阿德呋啉抗体的制备:

选用健康成年纯种 BALB/C 小鼠,取与蛋白质偶联制备的免疫抗原 50 μg 与等量完全弗氏佐剂混合采用腹腔注射进行初次免疫,之后每隔 3 周用相同剂量免疫抗原加等量不完全弗氏佐剂采用腹腔注射进行二次、三次免疫,每次免疫 6 天后尾静脉采血测定抗血清效价至一定滴度后,用相同剂量不加佐剂进行末次免疫,3 天后取脾制备脾细胞悬浮液与骨髓瘤细胞进行细胞融合,筛选出所需要的杂交瘤细胞系进行克隆化,选择处于对数生长期的杂交瘤细胞进行冻存,用于腹水制备,先腹腔注射 0.5 ml 液体石蜡于 BALB/C 鼠致敏,2 周后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞,接种细胞 7-10 天后可产生腹水,待腹水尽可能多时用注射器抽取腹水,反复收集数次,4000 rpm 离心 15 min,收集上清,采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水对单克隆抗体进行纯化,冷冻干燥得冻干粉后于 -20℃ 保存备用。

[0016] 制备包被有阿德呋啉包被抗原的酶标板:

包被抗原是将阿德呋啉半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 偶联得到的,用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液,将阿德呋啉抗原稀释成 1:40000 比例,100 μL/孔,37℃ 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300 μL/孔,洗板 2 次,30 s/次,然后加入 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭,150 μL/孔,37℃ 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间 (25℃) 晾干,抽检合格后将酶标板真空密封后置 4℃ 下保存。

[0017] 阿德呋啉标准品配制浓度分别为 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL。

[0018] 阿德呋啉抗体工作液的制备:采用阿德呋啉人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成 1:60000 比例制备。

[0019] 阿德呋啉酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成 1:2000 比例,底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液,底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液,终止液为 2 mol/L 的硫酸,浓缩稀释液是 10 倍浓缩稀释液,为 0.1 mol/L 的 PBS, pH 值范围 7.0-7.5 之间,浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,为含 0.5% 吐温-20, 0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0020] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒包括如下材料:

- (1) 96 孔酶标板 ×1 块；
- (2) 标准液 ×6 瓶：(1mL/ 瓶) 0 ng/mL、0.1ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL；
- (3) 抗体工作液 7 mL；
- (4) 酶标二抗工作液 7 mL；
- (5) 底物液 A 7 mL；
- (6) 底物液 B 7 mL；
- (7) 终止液 7 mL；
- (8) 10× 浓缩稀释液 40 mL；
- (9) 10× 浓缩洗涤液 40 mL；

本发明的试剂盒用于检测鸡肉样本中阿德呋啉残留量时,通过以下步骤实施:样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0021] (1) 样品预处理

- 准确称取 5.0 ± 0.05 g 匀浆样品至 50 mL 离心管中；
- 先加入有机溶剂 10mL 和 1g 无水硫酸钠,用涡旋仪充分振荡涡动 10min；
- 5000 r/min 离心 10 min；
- 取上清液 3 mL 于 50~60℃氮气流下吹干；
- 加入 1 mL 正己烷(脂肪含量高的样品可加入 2mL 正己烷),充分涡动 10 s,再加入 1 mL 样品稀释液,低速涡动 10 s;4000 r/min,离心 5 min,完全弃去上层正己烷及中间层杂质；
- 取下层 50 μ L 用于分析。

[0022] (2) 用本发明试剂盒检测待测样品中阿德呋啉残留量

取包被有阿德呋啉抗原的酶标板,加标准品 / 样本 50 μ L/ 孔到对应的微孔中;加入酶标二抗工作液,50 μ L/ 孔,然后加入阿德呋啉抗体工作液,50 μ L/ 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25℃避光环境中反应 30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 300 μ L/ 孔,充分洗涤 4 次,浸泡 15-30 s,用吸水纸拍干;加入底物液 A 50 μ L/ 孔,底物液 B 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 15 min;加入终止液 50 μ L/ 孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中阿德呋啉残留量。

[0023] (3) 分析结果

百分吸光度值的计算,标准品或样本的百分吸光度值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

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

其中 B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 —0 ppb 标准溶液的平均吸光度值。

[0024] 以阿德呋啉的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,求出直线方程。将样本的百分吸光度值代入标准曲线中,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阿德呋啉的实际浓度。

专利名称(译)	检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN104655847A	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201310587540.X	申请日	2013-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
[标]发明人	洪霞 其他发明人请求不公开姓名		
发明人	洪霞 其他发明人请求不公开姓名		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/54306		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒及其检测方法，其检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括：包被阿德呋啉抗原的酶标板、阿德呋啉标准品、阿德呋啉抗体工作液、阿德呋啉酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。检测阿德呋啉的酶联免疫试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应，把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标板微孔中，孵育一段时间后，洗板加入底物液A、底物液B，在酶的作用下显色剂呈现蓝色，加入终止液，颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中阿德呋啉的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测鸡肉组织中阿德呋啉的残留量。