



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572359 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410533543.X

(22) 申请日 2014.10.11

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 戴蔚蔚 杜霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

### (54) 发明名称

一种痕量甲苯咪唑残留检测时间分辨荧光免疫试剂盒

### (57) 摘要

本发明提供了一种检测痕量甲苯咪唑残留的时间分辨免疫试剂盒,涉及时间分辨荧光技术和酶联免疫分析技术,该试剂盒包括:包被了甲苯咪唑药物抗原的酶标板、Eu<sup>3+</sup>标记的甲苯咪唑单抗、甲苯咪唑标准品、洗涤缓冲液、标准品稀释液、荧光增强液。本发明综合采用时间分辨荧光技术、蛋白质偶联和生物化学制备等技术制备了用于痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒。其关键技术是将抗甲苯咪唑单克隆抗体与Eu<sup>3+</sup>耦联制备荧光抗体,再用酶联免疫吸附剂竞争法检测痕量甲苯咪唑残留。本发明所提供的时间分辨荧光免疫试剂盒具有结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带、灵敏度更高、适合现场大量筛选等优点。本发明与ELISA方法相比,更加灵敏、高效,可以避免一些基质物质的干扰。

1. 一种用于痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒,其特征在于它包含下列成分:

- (1) 包被了甲苯咪唑药物抗原的酶标板
- (2)  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗
- (3) 甲苯咪唑标准品
- (4) 洗涤缓冲液
- (5) 标准品稀释液
- (6) 荧光增强液

其中,所用酶标板的包被和试剂的配制如下:

(1) 甲苯咪唑标准溶液配制:准确称取标准甲苯咪唑 1 mg,精确到 0.00001 g,配成 1  $\mu\text{g/mL}$  标准品溶液母液;使用时,用标准品稀释液稀释成所需的浓度(10-1000  $\text{ng/mL}$ );

(2) 标准品稀释液为 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9% NaCl 的缓冲液;

(3) 包被缓冲液为 0.1 mol/L 碳酸缓冲液, pH7.8, 含 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 0.9% NaCl;

(4) 封闭液为 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液, pH8.0, 含 0.5% BSA, 0.9% NaCl, 0.04%  $\text{NaN}_3$ ;

(5) 洗涤缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9% NaCl, 0.04% Tween20;

(6) 荧光增强液为 0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾-乙酸缓冲液, 含 15  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -NTA, 0.1% Triton X-100;

(7) 酶标板的包被:包被抗原以合适浓度与包被缓冲液混合,添加于酶标板中且置于室温下反应 14 h,用洗涤缓冲液洗涤 3 次后,用封闭缓冲液在 37 $^{\circ}\text{C}$  进行封闭(约 1 h),去除孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存;

(8)  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗制备:甲苯咪唑抗体用包被缓冲液透析 2 次,每次 24 h,然后与 1 mg DTTA-  $\text{Eu}^{3+}$  混合于棕色小瓶中进行反应;反应所得的  $\text{Eu}^{3+}$  标记甲苯咪唑抗体以凝胶 Sephadex 6B/G-50 纯化,并以洗涤缓冲液进行洗脱;纯化的  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗加入 0.1% BSA 和 0.04%  $\text{NaN}_3$ 。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于包被抗原的制备:将甲苯咪唑药物分子结构中的醇羟基采用戊二酸酐酰化,再与卵清蛋白(OVA)和牛血清白蛋白(BSA)等载体蛋白采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)在不同的溶剂中进行偶联得到免疫原。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗制备:甲苯咪唑抗体用包被缓冲液透析 2 次,每次 24 h,然后与 1 mg DTTA-  $\text{Eu}^{3+}$  混合于棕色小瓶中进行反应,反应所得的  $\text{Eu}^{3+}$  标记甲苯咪唑抗体以凝胶 Sephadex 6B/G-50 纯化,并以洗涤缓冲液进行洗脱,纯化的  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗加入 0.1% BSA 和 0.04%  $\text{NaN}_3$ 。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于荧光增强液为 0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾-乙酸缓冲液,含 15  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -NTA, 0.1% Triton X-100。

## 一种痕量甲苯咪唑残留检测时间分辨荧光免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体来说,涉及到一种用于痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒及其制备方法。应用于对动物源食品,尤其是肉类产品中痕量甲苯咪唑残留的检测。

### 背景技术

[0002] 甲苯咪唑为一个广谱驱肠虫药,体内或体外试验均证明能直接抑制线虫对葡萄糖的摄入,导致糖原耗竭,使它无法生存,具有显著的杀灭幼虫、抑制虫卵发育的作用,可用于防治钩虫、蛔虫、蛲虫、鞭虫、粪类回线虫等肠道寄生虫病,动物试验表明本品可致畸,因此动物食品中的甲苯咪唑残留对人类的健康构成了巨大威胁。

[0003] 现有检测方法中最常用的为 GC/MS 方法,由于这种化合物含量低,且样品基质大多比较复杂,因此在进行仪器定量分析之前,通常需要一定的分离富集净化程序(固相萃取, SPE),但是缺点明显:分析时间较长、检测所需样品量较大、及繁琐的前处理步骤等缺点,不适宜于大量样品的快速测定。与此相比,免疫学方法具有快速、无需样品前处理等特点,可以作为一种高效的筛选方法。普通 ELISA 方法灵敏度较低,而且一些复杂基质对方法本身有较大干扰,而时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)方法具有极其独特的优点,不需样品前处理,且灵敏度高,可以满足测定动物源性食品中痕量甲苯咪唑残留的要求。

[0004] 时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)是以稀土络合物作为标记物的新型免疫分析技术,它根据镧系元素螯合物的发光特点,用时间分辨技术测量荧光以排除非特异荧光的干扰。其发光机理为:配体分子吸收激发光后由基态跃迁至激发单线态,然后通过系间窜跃至配体的激发三线态。此时三线态的激发能高于稀土离子所处能级时,能量就传递给稀土离子。当稀土离子接受传递来的能量后被激发至共振能级,并在由共振能级跃迁回基态过程中发出荧光,表现为稀土离子的特征荧光。这种发光是基于配合物内由配体到中心离子的能量转移所产生的。因此,与普通有机荧光标记物具比具有以下优势:

1) 激发光谱带较宽。有利于增加激发能,提高标记物的比活性。

[0005] 2) 发射光谱带甚窄。半峰宽小于 15nm,有利于降低本底荧光强度,提高分辨率。

[0006] 3) Stokes 位移(最大激发光波长与最大发射光波长之差)大。稀土络合物的最大激发光波长通常在 250-380 nm 的紫外区,最大发射光波长在 500nm 以上。Stokes 位移有 250-350 nm,十分有利于排除非特异荧光的干扰,增强荧光信号测量的特异性。

[0007] 4) 激发波长具有络合剂的性质,即随络合剂的变化而变化;而发射波长具有镧系元素的性质,即不随络合剂的变化而变化。铕(europium, Eu)、铽(terbium, Tb)和钐(samarium, Sm)这三种镧系元素的最大发射波长分别约为 615 nm、545 nm 和 643 nm。

[0008] 因为背景荧光的寿命都在 1-10 ns 之间。稀土配合物与普通有机荧光标记物相比的一个最突出的特征是它极长的荧光寿命(100  $\mu$ s 以上),所以采用时间分辨荧光测定技术,只测定长寿命荧光物质发出的荧光,而不测定短寿命荧光物质发出的荧光,就可以很好地消除背景,极大地提高测定灵敏度。

[0009] 时间分辨荧光免疫包括 Cyber Fluor 体系和 DELFIA 体系两种系统：

Cyber Fluor 体系是 1986 年由 Evangelista 等建立的以配基为标记物的非均相 TRFIA 体系。这类化合物含有菲咯琳环，能高效地向  $\text{Eu}^{3+}$  传递激发能；又有类似多胺多羧基的结构，能与  $\text{Eu}^{3+}$  形成稳定的络合物；还有活性基团可以与蛋白质偶联，所以有较广的应用范围。这种方法的主要优点是对污染不敏感，使用通用免疫试剂即可适用于各种免疫分析，此法也可以给出空间定位信息；此方法的缺点是灵敏度较低。这是因为一般要求配基过量才能获得镧系螯合物的高强度荧光，而在本方法中是镧系离子过量而配基不足。当然，该体系可以在生物素-亲和素信号放大的基础上，通过采用 SBMC 作为信号生成试剂使荧光信号得以成万倍的放大，以有效弥补体系检测灵敏度不足的问题。

[0010] DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) 体系主要是芬兰 Wallac 生化实验室(现 Perkin-Elmer Life Sciences 公司)研究并开发出来的。此系统是利用具有双功能基团的螯合剂将镧系元素标记到抗原或抗体上，经免疫反应与抗体或抗原形成免疫复合物，即稀土离子-螯合剂-抗原(抗体)螯合物。它采用螯合剂为多胺多羧基类络合剂，常用的如乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙三胺四乙酸(DTTA)和二乙三胺五乙酸(DTPA)等化合物的衍生物。

[0011] DTPA、EDTA、DTTA 等化合物为双功能螯合剂，一端螯合  $\text{Eu}^{3+}$ ，另一端与蛋白质的氨基连接。在中性或接近中性 pH 值的条件下，对  $\text{Eu}^{3+}$  具有足够高的络合稳定性，而在酸性条件下，又能将螯合的  $\text{Eu}^{3+}$  释放出来。由于这种结合物本身在水中荧光极弱，因此加入一种增强剂(Fluorescence enhancement solution, FES)，使  $\text{Eu}^{3+}$  完全从络合物上解离下来，并迅速与增强液中的配体络合并进入胶束的疏水内核，这种分子团在紫外光的激发下能发出很强的荧光，信号增强了百万倍，实现了从配位体到镧系元素离子高效率能量传递。此系统的特点是把实现抗体稳定标记和提高荧光强度分开处理。

[0012] 本发明基于这种时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)，研制了高灵敏的 CAP 单抗，并对增强液进行了改进，在此基础之上，形成了用于检测动物源食品甲苯咪唑残留的试剂盒产品，并建立了可快速、灵敏、高通量测定动物源性食品中痕量甲苯咪唑残留的分析方法。

[0013]

## 发明内容

[0014] (一) 本发明要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带、灵敏度更高的用于动物源食品中痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、灵敏、适合大量筛选的定量检测方法。本发明与 ELISA 方法相比，更加灵敏、高效，可以避免一些基质物质的干扰。

[0015] (二) 本发明的技术方案

为解决所述问题，本发明综合采用时间分辨荧光技术、蛋白质偶联和生物化学制备等技术制备了用于痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒。将甲苯咪唑与载体蛋白偶联制备成人工免疫抗原和包被抗原；用人工免疫抗原免疫动物制备抗甲苯咪唑的单克隆抗体；将甲苯咪唑包被抗原包被吸附于固相载体上；将检测用的试剂配置成可直接使用

的试剂。使用时,将甲苯咪唑标准品或待测样品和  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗混合后与固相载体上的抗原竞争结合,洗涤去除游离的抗原抗体复合物,加入增强液,于 ARCUS-1230 时间分辨荧光仪中,设定好相关参数,测定荧光强度。

[0016] 本时间分辨荧光免疫试剂盒,由下列成分组成:

- (1) 包被了甲苯咪唑药物抗原的酶标板,
- (2)  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗,
- (3) 甲苯咪唑标准品,
- (4) 洗涤缓冲液,
- (5) 标准品稀释液,
- (6) 荧光增强液,

其中包被了甲苯咪唑药物抗原的酶标板有 24 孔、或 48 孔、或 96 孔。

[0017] 其中(1)所述的包被了甲苯咪唑药物抗原的酶标板,按照下述方法制备得到:

a、甲苯咪唑药物抗原的合成

将甲苯咪唑药物分子结构中的醇羟基采用戊二酸酐酰化,再与卵清蛋白(OVA)和牛血清白蛋白(BSA)等载体蛋白采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)在不同的溶剂中进行偶联得到免疫原。本发明合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 98.8%。

[0018] b、酶标板的包被

包被抗原以合适浓度与包被缓冲液混合,添加于酶标板中且置于室温下反应 14 h。用洗涤缓冲液洗涤 3 次后,用封闭缓冲液在 37°C 进行封闭(约 1 h),去除孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0019] c、所用缓冲液配方为:

包被缓冲液为 0.1 mol/L 碳酸缓冲液, pH7.8, 含 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 0.9%  $\text{NaCl}$ 。

[0020] 封闭液为 0.05 mol/L Tris-HCl 溶液, pH8.0, 含 0.5% BSA, 0.9%  $\text{NaCl}$ , 0.04%  $\text{NaN}_3$ 。

[0021] 洗涤缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9%  $\text{NaCl}$ , 0.04% Tween20。

[0022] 其中(2)所述的  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗,按照下述方法制备得到:

a、甲苯咪唑单克隆抗体制备

动物免疫程序:采用甲苯咪唑人工抗原为免疫原,免疫 BALB/C 小鼠,免疫剂量为 50  $\mu\text{g}$ ,首次免疫为含弗氏完全佐剂的免疫原,以后每隔四周,用含弗氏不完全佐剂的免疫原加强免疫,前后共四次,可以得到血液里含有甲苯咪唑药物特异性抗体的小鼠;最后一次免疫后 10 天,采血,取脾细胞。

[0023] 细胞融合与克隆化:取免疫 BALB/C 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,筛选能稳定分泌甲苯咪唑单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0024] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 BALB/C 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油,7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7-10 天后采集腹水,经硫酸铵盐析纯化,分装待用, -20°C 保存。

[0025] b、 $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗制备

甲苯咪唑抗体用包被缓冲液透析 2 次,每次 24 h,然后与 1 mg DTTA-  $\text{Eu}^{3+}$  混合于棕色小瓶中进行反应。反应所得的  $\text{Eu}^{3+}$  标记甲苯咪唑抗体以凝胶 Sephadex 6B/G-50 纯化,并以

洗涤缓冲液进行洗脱。纯化的  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗加入 0.1% BSA 和 0.04%  $\text{NaN}_3$ 。

[0026] 其中(3)所述的甲苯咪唑标准品,按照下述方法制备得到:

甲苯咪唑标准溶液配制:准确称取标准甲苯咪唑 1 mg,精确到 0.00001 g,配成 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准品溶液母液;使用时,用标准品稀释液稀释成所需的浓度(10-1000 ng/mL)。

[0027] 其中(4)所述的洗涤缓冲液,按照下述方法制备得到:

洗涤缓冲液为 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9% NaCl, 0.04% Tween20。

[0028] 其中(5)所述的标准品稀释液,按照下述方法制备得到:

标准品稀释液为 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9%NaCl 的缓冲液。

[0029] 其中(6)所述的荧光增强液,按照下述方法制备得到:

荧光增强液为 0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾-乙酸缓冲液,含 15  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\beta$ -NTA, 0.1% Triton X-100。

[0030] 本发明试剂盒的检测原理和检测方法:

将甲苯咪唑药物抗原偶联物包被吸附于固相载体上,加入甲苯咪唑药物标准品或待测样品,并加入  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗,待测样品中残留的甲苯咪唑药物与固相载体上包被的甲苯咪唑药物抗原竞争  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗,洗涤去除游离的抗原抗体复合物,加入增强液,于 ARCUS-1230 时间分辨荧光仪中,设定好相关参数,测定荧光强度。该值与样品中甲苯咪唑残留含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样品中甲苯咪唑的含量。

[0031] (三)本发明的有益效果

本发明所制备的痕量甲苯咪唑时间分辨荧光免疫试剂盒,具有简便、快速、灵敏、准确等特点,可用于定性或定量检测动物组织、尿液等样品中甲苯咪唑药物的残留量;其最低检测限为 0.03 ng/g,检测时间仅需 3 小时。本方法平均回收率为 102-121%,批内误差小于 9%,批间误差小于 12%。其灵敏度远高于目前市场上的酶联免疫试剂盒。

[0032] 本发明的试剂盒采用高特异性的甲苯咪唑药物单克隆抗体,主要试剂以工作液形式提供,可以减少操作步骤,节省时间;同时,我们采用时间分辨荧光技术,使得产品具有灵敏度高、特异性强、精确度高、准确度高等优点,产品性能远高于酶联免疫试剂盒。

## 附图说明

[0033] 图 1 TRFIA 法测定甲苯咪唑的标准曲线

## 具体实施方式

[0034] 实施例 1 试剂盒组分的制备

### 1、抗原的合成

a、将甲苯咪唑分子结构中的醇羟基采用戊二醛酞酰化得到甲苯咪唑半抗原

b、取甲苯咪唑药物半抗原 1 g 溶于 10 ml 0.5 M 的氢氧化钠溶液中。

[0035] c、取 1 g 碳化二亚胺溶于 5 ml 纯水,然后加到半抗原溶液中室温搅拌反应 3 小时。

[0036] d、取载体蛋白卵清蛋白(OVA)或牛血清白蛋白(BSA) 10 g 溶于 35 mL pH9.6 碳酸盐缓冲液中,并将载体蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌反应过夜。

[0037] e、将反应完所获得的人工抗原对 0.1 M 的 PBS 缓冲液透析 5 天,每天更换缓冲液 4 次;将获得的纯化的人工抗原经超滤浓缩或冻干保存。

**[0038] 2、甲苯咪唑单克隆抗体制备**

a、动物免疫程序：采用甲苯咪唑人工抗原为免疫原，免疫 BALB/C 小鼠，免疫剂量为 50  $\mu\text{g}$ ，首次免疫为含弗氏完全佐剂的免疫原，颈背部皮下多点注射，以后每隔四周，用含弗氏不完全佐剂的免疫原加强免疫，前后共四次，可以得到血液里含有甲苯咪唑药物特异性抗体的小鼠；最后一次免疫后 10 天，采血，取脾细胞。

**[0039] b、细胞融合与克隆化：**取免疫 BALB/C 小鼠脾细胞，按照 5:1 的比例与小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞杂交融合，制备杂交瘤细胞，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，筛选能稳定分泌甲苯咪唑单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

**[0040] c、单克隆抗体的制备与纯化：**采用体内诱生法，将 BALB/C 小鼠腹腔注入 0.5 mL 灭菌石蜡油，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7-10 天后采集腹水，经硫酸铵盐析纯化，分装待用， $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**[0041] 3、Eu<sup>3+</sup> 标记的甲苯咪唑单抗制备**

a、甲苯咪唑抗体用包被缓冲液透析 2 次，每次 24 h。

**[0042] b、**透析完的甲苯咪唑抗体与 1 mg DTTA- Eu<sup>3+</sup> 混合于棕色小瓶中进行反应。

**[0043] c、**反应所得的 Eu<sup>3+</sup> 标记甲苯咪唑抗体以凝胶 Sephadex 6B/G-50 纯化，并以洗涤缓冲液进行洗脱。

**[0044] d、**纯化的 Eu<sup>3+</sup> 标记的甲苯咪唑单抗加入 0.1% BSA 和 0.04% NaN<sub>3</sub>，分装待用， $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**[0045] 4、酶标板的制备**

a、用包被缓冲液将包被抗原稀释至 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**[0046] b、**于酶标板中每孔加入 150  $\mu\text{l}$ ，且置于室温下反应 14 h。

**[0047] c、**去除包被液，用洗涤缓冲液洗涤 3 次后，用封闭缓冲液 150  $\mu\text{l}$  在 37 $^{\circ}\text{C}$  进行封闭（约 1 h），去除孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

**[0048] 实施例 2 用于痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒的组建**  
组建检测甲苯咪唑的时间分辨免疫试剂盒，使其包含下列组分：

(1) 包被甲苯咪唑药物抗原的酶标板

(2) Eu<sup>3+</sup> 标记的甲苯咪唑单抗工作液

(3) 浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的甲苯咪唑标准品

(4) 洗涤缓冲液：0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9% NaCl, 0.04% Tween20。

**[0049] (5) 标准品稀释液：**0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.9%NaCl 的缓冲液。

**[0050] (6) 荧光增强液：**0.1 mol/L 邻苯二甲酸氢钾—乙酸缓冲液，含 15  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\beta$ -NTA, 0.1% Triton X-100。

**[0051] 实施例 3 样品中甲苯咪唑药物残留的检测****1、样品前处理**

a、组织样本：用匀浆器将精肉或内脏组织样本匀浆，准确称量 4 g 样品，加入 4 mL 乙酸乙酯，振荡 10 分钟，室温 4000 rpm/min 离心 15 分钟，取出 2 mL 上层液体，在氮气流下 50-60 $^{\circ}\text{C}$  干燥，加入 1 mL 正己烷溶解干燥的残留物，再加 1 mL 标准品稀释液强烈振荡 1 min，室温 4000 rpm/min 离心 5 分钟，去除上层油相，取下层水相 50  $\mu\text{l}$  进行测定。

[0052] b、尿液：取2 mL尿液至离心管中，加入4 mL乙酸乙酯，振荡5分钟，室温4000 rpm/min离心5分钟，取出2 mL上层液体，在氮气流下50-60℃干燥，加1 mL标准品稀释液振荡溶解1 min，取50  $\mu$ l进行测定。

[0053] 2、用试剂盒进行检测

配制浓度为1000 ng/mL 甲苯咪唑母液，进行倍比稀释，分别稀释为0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 ng/mL 11个浓度的标准品，按照160  $\mu$ L标准品或待测样品和40  $\mu$ L  $\text{Eu}^{3+}$  标记的甲苯咪唑单抗共200  $\mu$ L添加于包被有甲苯咪唑抗原的酶标板微孔中，进行竞争反应。竞争反应结束后，加入增强液，每孔加入200 $\mu$ L增强液，置于振荡器中轻柔振荡约5分钟。将酶标板置于ARCUS-1230时间分辨荧光仪中，设定好相关参数（激发波长340nm，发射波长615，延迟时间0.40ms，循环周期1.0ms），测定荧光强度。

[0054] 结果分析：

测量荧光值并绘制标准曲线，所测标准品的荧光值对应甲苯咪唑浓度作标准曲线图，相对应每一个样品中甲苯咪唑的浓度可以从标准曲线上读出，从而得到所测样品的甲苯咪唑含量。

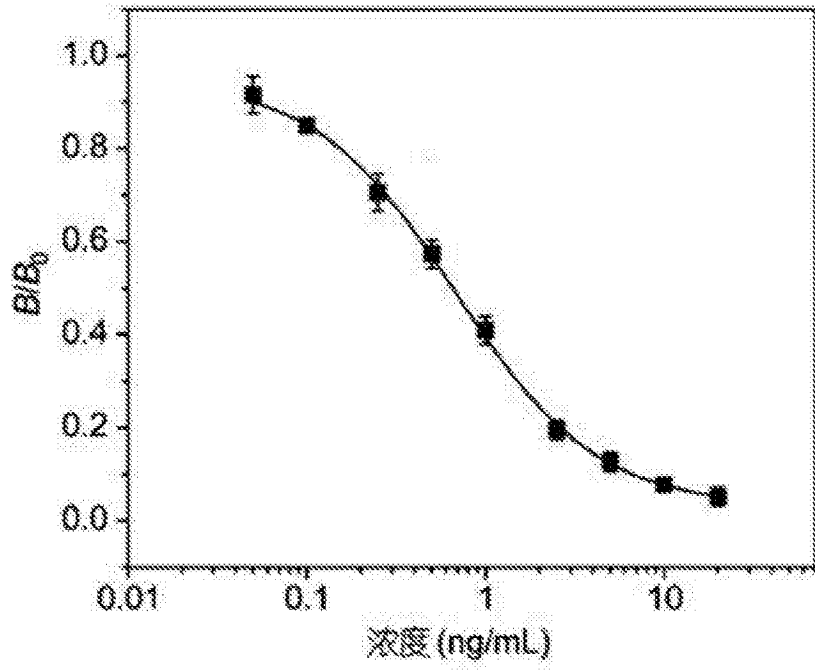


图 1

专利名称(译)	一种痕量甲苯咪唑残留检测时间分辨荧光免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN105572359A</a>	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410533543.X	申请日	2014-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 戴蔚蔚 杜霞		
发明人	洪霞 戴蔚蔚 杜霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/64		
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痕量甲苯咪唑残留的时间分辨免疫试剂盒，涉及时间分辨荧光技术和酶联免疫分析技术，该试剂盒包括：包被了甲苯咪唑药物抗原的酶标板、Eu3+标记的甲苯咪唑单抗、甲苯咪唑标准品、洗涤缓冲液、标准品稀释液、荧光增强液。本发明综合采用时间分辨荧光技术、蛋白质偶联和生物化学制备等技术制备了用于痕量甲苯咪唑残留检测的时间分辨荧光免疫试剂盒。其关键技术是将抗甲苯咪唑单克隆抗体与Eu3+耦联制备荧光抗体，再用酶联免疫吸附剂竞争法检测痕量甲苯咪唑残留。本发明所提供的时间分辨荧光免疫试剂盒具有结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带、灵敏度更高、适合现场大量筛选等优点。本发明与ELISA方法相比，更加灵敏、高效，可以避免一些基质物质的干扰。

