

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510086768.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766624A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086768.6

[71] 申请人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西区动医学院国家兽药
安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平
吴小平 冯才茂 汪善良 李军
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞
丁双阳

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 向华

权利要求书2页 说明书15页 附图1页

[54] 发明名称

检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒及方法

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板，酶标记物，呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体，呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液，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这种酶联免疫试剂盒检测呋喃唑酮代谢物的方法，它包括以下步骤：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。本发明提供的检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物残留的酶联免疫试剂盒及方法，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。

1、 一种检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒，其特征在于它含有：

- 5 (1) 包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板；
- (2) 酶标记物；
- (3) 呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体；
- (4) 呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- 10 (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液。

2、 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：呋喃唑酮代谢物衍生物包被抗原是采用混合酸酐法将呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与甲状腺蛋白进行偶联得到的；包被抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

15

3、 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记呋喃唑酮代谢物衍生物抗原，所用标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶。

4、 如权利要求 1-3 之任一所述的试剂盒，其特征在于：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 2mol/L 的氢氧化钠；浓缩洗涤液为含有 0.8%~1.2% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为含有 50% 甲醇和 1% 小牛血清的磷酸

20

25 盐缓冲液。

5、如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于：呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液为六个浓度梯度的呋喃唑酮代谢物衍生物溶液，呋喃唑酮代谢物衍生物稀释液为含有 50% 甲醇和 1% 小牛血清的磷酸盐缓冲液。

6、如权利要求 1 或 5 所述的试剂盒，其特征在于：呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体，免疫原是采用混合酸酐法将呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与卵清蛋白进行偶联得到的。

7、一种检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1-6 之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

10

检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒及方法

技术领域

本发明涉及一种检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒
5 及方法。

背景技术

呋喃唑酮 (Furazolidone) 是一种人工合成的广谱抗菌药, 药效稳定, 能抑制或杀灭多种革兰氏阳性和阴性细菌, 并对某些原虫、真菌有一定作用。由于高效廉价, 呋喃唑酮在畜牧、水产养殖中得到了广泛的应用。

10 但呋喃唑酮在动物源性食品中的残留可以通过食物链传递给人类, 长期摄入会引起各种疾病。根据联合国粮食及农业组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 食品添加剂联合专家委员会的报告, 呋喃唑酮及其代谢产物有致癌性, 且易产生抗药菌株, 容易引起畸胎。我国在 2002 年 3 月由农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中将呋喃唑酮列为禁用药, 呋喃
15 唑酮进入动物体内很快会代谢成为呋喃唑酮代谢物且呋喃唑酮代谢物对人体有着与呋喃唑酮同样的危害。

因此建立一种有效的呋喃唑酮代谢物 (AOZ) 的检测方法成为兽药残留分析领域中十分紧要的任务。目前, 水产和畜牧上检测呋喃唑酮残留常用的方法有液相色谱 (LC) 及高效液相色谱法 (HPLC) 等, 这些方法样品前处理
20 复杂, 仪器成本高, 操作烦琐, 只适用于样本的确证分析, 而不适用于大量样本的筛查。

发明内容

(一) 要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的
25 检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物残留量的酶联免疫试剂盒及方法。

(二) 技术方案

本发明的检测原理: 当包被原为呋喃唑酮代谢物衍生物偶联抗原时是将

5 呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与甲状腺蛋白偶联物(AOZ-BCG)吸附于固相载体上,加入样本或呋喃唑酮代谢物衍生物标准品,然后加呋喃唑酮代谢物特异性抗体,待测样品中残留的呋喃唑酮代谢物(经前处理衍生化以后)和酶标板上包被的呋喃唑酮代谢物衍生物抗原竞争呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体。再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用,显色后终止,测定样品的吸光度值,该值与样品中呋喃唑酮代谢物残留量呈负相关,与标准曲线比较即可得出呋喃唑酮代谢物的浓度。

10 包被原为抗抗体时是将抗抗体吸附于固相载体上,加入呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体,再加入呋喃唑酮代谢物衍生物酶标记抗原和样本或呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液,待测样本中残留的呋喃唑酮代谢物(经前处理衍生化以后)和酶标记呋喃唑酮代谢物衍生物抗原竞争呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体,显色后终止,测定样品的吸光度值,该值与样品中呋喃唑酮代谢物残留量呈负相关,与标准曲线比较即可得出呋喃唑酮代谢物的浓度,与标准溶液颜色比较则可判断样品中呋喃唑酮代谢物的浓度范围。

15 本发明提供了一种检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒,它含有:

- (1) 包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板;
- (2) 酶标记物;
- (3) 呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体;
- 20 (4) 呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液;
- (5) 底物显色液;
- (6) 终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 浓缩复溶液。

25 本发明所述试剂盒中呋喃唑酮代谢物衍生物包被抗原是采用混合酸酐法

将呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与甲状腺蛋白进行偶联得到的，抗抗体可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到。制备酶联板过程中所用的包被缓冲液为批 pH 值 9.6、
5 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原或抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等；载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；所用的洗涤液为含有 0.8% ~ 1.2% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠（NaN₃）防腐剂的磷酸盐缓冲液；所用的封闭液是含有 3% ~ 10% 的马血清和 1% 惰性蛋白的溶液。
10

本发明所述试剂盒中包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板的制备步骤为：

（1）用包被缓冲液将呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与甲状腺蛋白（BCG）偶联物或抗抗体以 0.02 ~ 0.08μg/ml 浓度稀释成抗原稀释液或抗抗体稀释液；

15 （2）向酶联板的每孔中加入 100μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗抗体稀释液，37℃ 温育 2h，并 4℃ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 2 次，每次 15 ~ 30s，拍干；

（3）向酶联板的每孔中加入 150 ~ 200μl 封闭液，37℃ 温育 1 ~ 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

20 以上方法制备的酶联板具有很好的稳定性，经过冷热稳定性试验，酶联板的相关技术参数均在正常范围，且包被原有良好的特异性。

本发明所述试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记呋喃唑酮代谢物衍生物抗原，所用酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶，本发明优选辣根过氧化物酶；酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液；酶标记物工作液所用的稀释液为含有 50% 甘油（可防止放入 -20℃ 环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1% 的叠氮化钠防腐剂（便于保存）的溶液。
25

本发明所述试剂盒中酶标记抗抗体的制备步骤为：

(1) 抗抗体的制备：以鼠源性抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体；或以兔源性抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

5 (2) 辣根过氧化物酶标记抗抗体的制备：将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联，采用的方法是过碘酸钠法，采用过碘酸钠法使得抗抗体与辣根过氧化物酶的结合率升高，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，制备的偶联物中混有许多聚合体，因为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，从而降低酶标记物的酶活性。为了解决这个问题，本发明将传统的方法进行了改良，即：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；同时降低辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比至 2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶活性的损失也减少。

15 本发明所述试剂盒中酶标记抗原是采用活性酯法将标记酶与呋喃唑酮代谢物半抗原进行偶联得到。

 本发明所述试剂盒中呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体，免疫原是采用混合酸酐法将呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与卵清蛋白进行偶联得到的；抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液；
20 抗体稀释液为 pH 值 8.2、0.05mol/L、含有 3% 小牛血清和 5% N, N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。

 本发明所述试剂盒中呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体，其制备方法如下：

(1) 呋喃唑酮代谢物衍生物单克隆抗体制备的步骤为：

25 a. 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，免疫原 (呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与卵清蛋白的偶联物) 免疫剂量为 80 ~ 100 μ g/只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2-3 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，四免后腹腔加强免疫一次，3天后取脾细胞；

b. 细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5~10: 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，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

c. 细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液，分装于冻存管，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；

d. 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 Balb/c 小鼠（8 周龄）腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ 个/只，7~10 天后采集腹水，用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存；

e. 抗体冻干粉可将腹水在 37℃ 环境下烘干，放入 -20℃ 保存；

f. 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 0.02~0.08μg/ml 浓度进行稀释。

(2) 呋喃唑酮代谢物衍生物多克隆抗体制备的步骤为：

采用新西兰大白兔作为免疫动物，免疫原（呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与卵清蛋白的偶联物）免疫剂量为 1mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，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 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

本发明所述试剂盒中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 2mol/L 的氢氧化钠；浓缩洗涤液为含有 0.8%~1.2% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠（NaN₃）防腐剂的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为含有 50% 甲醇和 1% 小牛血清的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液为六个浓度梯度

的呋喃唑酮代谢物衍生物溶液，呋喃唑酮代谢物衍生物稀释液为含有 50% 甲醇、1% 小牛血清 (BSA) 的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中试剂的配制具体为：

- a. 呋喃唑酮代谢物衍生物标准溶液：呋喃唑酮代谢物衍生物系列标准溶液 6 瓶，浓度为 0 μ g/L、0.05 μ g/L、0.15 μ g/L、0.45 μ g/L、1.35 μ g/L、4.05 μ g/L，1~3ml/瓶。
- b. 包被缓冲液：pH 值为 9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。
- c. 封闭液：含有 3%~10% 马血清和 1% 惰性蛋白的溶液。
- d. 浓缩洗涤液：含有 0.8%~1.2% 吐温 20，1% 叠氮化钠 (NaN₃) 防腐剂的磷酸盐缓冲液 (0.01M、pH7.4)，为正常使用浓度的 15~25 倍，30-50ml/瓶，1 瓶。
- e. 酶标记物：酶标记抗体工作液或酶标记呋喃唑酮代谢物衍生物抗原工作液，7~12ml/瓶，1 瓶。
- f. 底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲；
- g. 底物显色液 B 液：邻苯二胺 (OPD) 或四甲基联苯胺 (TMB)；
- h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH 8.1、含有 MgCl₂ 0.01% 100mmol Tris-HCl；
- i. 终止液：1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液，5~8ml/瓶，1 瓶。
- j. 抗体稀释液：pH8.2 的 0.05mol/L、含有 3% 小牛血清和 5% N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。
- k. 浓缩复溶液：含有 50% 甲醇、1% 小牛血清 (BSA) 的磷酸盐缓冲液，为正常使用浓度的 5~10 倍，30~50ml/瓶，1 瓶。

本发明所述检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的方法，包括了以下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用本发明所述的试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

本发明中样品前处理方法为：

(1) 鱼虾、肌肉（猪、牛）

取 1g 的均质物（鱼虾/肉样），依次加入 4ml 的蒸馏水，0.5ml 1M 的 HCL 和 100ul 10mM 的 2-硝基苯甲醛，充分振荡。超声振荡 1 小时后于 37℃ 孵育 3 小时，分别加入 5ml 0.1M K_2HPO_4 ，0.4ml 1M NaOH 和 5ml 的乙酸乙酯，剧烈振荡 30 秒钟后室温下（20-25℃）、3000rpm 离心，取出 2.5ml 的乙酸乙酯层蒸干。用 1ml 的正己烷或正庚烷溶解干燥物，用 1ml 的复溶液适当的混合。室温（20-25℃）、3000rpm 离心，取 50ul 的下层液体进行分析。

本方法的优点为：采用超声振荡并孵育可使加入的试剂与样本充分的接触，向样本加入 1M 的 HCL 加快呋喃唑酮代谢物与蛋白的分解，大大减少了样本处理的时间。

(2) 牛奶

取 2ml 牛奶，将其 5000rpm 离心 10min，除去上层脂肪，取下层进行分析。

本发明所述检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物残留的方法，包括了以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 检测方法：

a. 向包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶标板微孔中加标准品溶液或样品溶液并加入呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后加入酶标记抗抗体，温育洗板后显色，终止，用酶标仪测定吸光度值；

b. 向包被抗抗体的酶标板微孔中加入呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后加入酶标记呋喃唑酮代谢物衍生物抗原并加入呋喃唑酮代谢物衍生物系列标准品或样品溶液，温育洗板后显色，终止，用酶标仪测定吸光度值。

(3) 分析检测结果。

(三) 有益效果

本发明提供的检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物残留的酶联免疫试剂盒及方法，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。

附图说明

- 5 图1: 呋喃唑酮代谢物的检测标准曲线图。

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。

10 实施例1 检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒组分的制备

1. 抗原的合成

a. 包被原的合成

15 将呋喃唑酮代谢物采用衍生物法合成呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原，再将半抗原通过重氮化反应和甲状腺蛋白载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到。

b. 免疫原的合成

将呋喃唑酮代谢物采用衍生物法合成呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原，再将半抗原通过重氮化反应和卵清蛋白载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到。

2. 呋喃唑酮代谢物衍生物鼠单克隆抗体的制备

20 a. 动物免疫

采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 100 μ g/只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2 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，四免后腹腔加强免疫一
25 次，3 天后取脾细胞。

b. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5: 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，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

c. 细胞冻存和复苏

取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个/ml 的细胞悬液，分装于冻存管，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。

d. 单克隆抗体的制备与纯化

采用体内诱生法，将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

3. 呋喃唑酮代谢物衍生物兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以呋喃唑酮代谢物衍生物半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3 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 7d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

4. 酶标板的制备

用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 $0.06 \mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 100 μl ，37℃ 温育 2h，并 4℃ 环境过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 2 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 150 μl 封闭液，37℃ 温育 1 h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 2 检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶联板；
- (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；

- (3) 呋喃唑酮代谢物衍生物鼠单克隆抗体;
- (4) 呋喃唑酮代谢物标准品溶液6瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.05\mu\text{g/L}$ 、 $0.15\mu\text{g/L}$ 、 $0.45\mu\text{g/L}$ 、 $1.35\mu\text{g/L}$ 、 $4.05\mu\text{g/L}$;
- (5) 底物显色液A液为过氧化氢, 底物显色液B液为邻苯二胺;
- 5 (6) 终止液为 2 mol/L 的硫酸缓冲液;
- (7) 浓缩洗涤液为 $\text{pH } 7.4$, 含有 0.8% 吐温20和 1% 叠氮化钠(NaN_3)防腐剂的磷酸盐缓冲液;
- (8) 抗体稀释液为 pH 值 8.2 、 0.05mol/L 、含有 3% 小牛血清和 5% $\text{N, N}'$ -二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液;
- 10 (9) 浓缩复溶液为含有 50% 甲醇、 1% 小牛血清(BSA)的磷酸盐缓冲液。

实施例3 检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒的的组建

组建检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- 15 (1) 包被羊抗兔抗抗体的酶联板;
- (2) 用碱性磷酸酯酶标记的呋喃唑酮代谢物衍生物抗原;
- (3) 呋喃唑酮代谢物衍生物兔多克隆抗体;
- (4) 呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液6瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.05\mu\text{g/L}$ 、 $0.15\mu\text{g/L}$ 、 $0.45\mu\text{g/L}$ 、 $1.35\mu\text{g/L}$ 、 $4.05\mu\text{g/L}$;
- 20 (5) 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液;
- (6) 终止液为 2mol/L 的氢氧化钠缓冲液;
- (7) 浓缩洗涤液为 $\text{PH } 7.4$, 含有 0.8% 吐温20和 1% 叠氮化钠(NaN_3)防腐剂的磷酸盐缓冲液;
- (8) 浓缩复溶液为含有 50% 甲醇、 1% 小牛血清(BSA)的磷酸盐缓冲

液。

实施例4 样品中呋喃唑酮代谢物残留的检测

1. 样品前处理

5 取 1g 鱼虾的均质物,依次加入 4ml 的蒸馏水, 0.5ml 1M 的 HCL 和 100 μ l 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡。超声振荡 1 小时后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时, 分别加入 5ml 0.1M K_2HPO_4 , 0.4ml 1M NaOH 和 5ml 的乙酸乙酯, 剧烈振荡 30 秒钟在室温下 (20-25 $^{\circ}$ C) 离心, 转速为 3000rpm。取出 2.5ml 的乙酸乙酯层蒸干, 用 1ml 的正己烷溶解干燥物, 用 1ml 的复溶液适当的混合。在室温
10 (20-25 $^{\circ}$ C)、3000rpm 离心。用 50 μ l 的下层液体进行分析。

2. 用试剂盒检测

向呋喃唑酮代谢物衍生物偶联抗原包被的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品或样本溶液 (各 2 孔) 50 μ l, 再加入呋喃唑酮代谢物衍生物抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 20~25 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 60min。倒出孔中液体, 每孔
15 加入 250 μ l 浓缩洗涤液, 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体 100 μ l, 用盖板膜封板, 20~25 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 重复洗涤工作。加入底物显色液 A 液过氧化氢 50 μ l, 再加 B 液邻苯二胺 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 20~25 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 2 mol/L 硫酸 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标
20 仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准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%, 得到百分吸光度值。以呋喃唑酮代谢物浓度的半对数为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图。用同
25 样的办法计算样品溶液的百分吸光度值, 将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样品溶液中呋喃唑酮代谢物所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中呋喃唑酮代谢物的实际浓度。

实施例5 样品中呋喃唑酮代谢物残留的检测

1. 样品前处理

取2ml牛奶，将其置5000rpm离心10min，除去上层脂肪，取下层50 μ l，试剂盒所提供的复溶液按1:40倍稀释。

5 2. 用试剂盒检测

向羊抗兔抗抗体包被的 96 孔酶标板微孔中加入呋喃唑酮代谢物衍生物兔多克隆抗体工作液 100 μ l，用盖板膜封板，20~25℃恒温箱中反应 60min，倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 浓缩洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入细菌提取碱性磷酸酯酶标记的
10 呋喃唑酮代谢物衍生物抗原 50 μ l，再加入系列标准品或样本溶液 50 μ l，用盖板膜封板，20~25℃恒温箱中反应 30min，重复洗涤过程。加入对硝基磷酸盐缓冲液 100 μ l，轻轻振荡混匀，20~25℃恒温箱避光显色 30min。每孔加入
20 终止液 2 mol/L 氢氧化钠 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

15 用所获得的每个浓度的标准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%，得到百分吸光度值。以呋喃唑酮代谢物衍生物浓度 (μ g/L) 的半对数为 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，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液所对应的浓度，乘以
20 其对应的稀释倍数即为样品溶液中呋喃唑酮代谢物实际浓度。

实验例1 标准品精密度试验

从每批按照实施例 1 (4) 中的方法制备的酶联板中，各抽出 10 个微孔，测定 0.45 μ g/L 标准溶液的吸光度值 (OD 值)，重复 3 次，计算变异系数 CV%，
25 结果见表 1。

表1 标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	3.7	5.4	7.1	8.6	6.2	7.1	8.4	9.4	5.2	4.6

03批	5.4	7.3	6.4	4.1	3.5	5.9	7.4	7.6	3.7	4.9
06批	5.4	6.1	7.2	4.8	3.6	7.5	5.2	9.3	7.4	5.2

结果表明变异系数范围在3.5%~9.4%之间，符合了变异系数小于20%的规定，说明本试剂盒标准品精密度达到了标准。

实验例2 样本可重复性试验

- 5 以0.5 $\mu\text{g/L}$ 浓度的呋喃唑酮代谢物对鱼虾、肌肉和牛奶，添加到样品中，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2~3。

表2 鱼虾、肌肉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数
						CV%
01	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	16.1
	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	15.2
	0.3	0.4	0.4	0.5	0.4	17.7
03	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	15.2
	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4	17.7
	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	16.1
06	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4	17.7
	0.4	0.4	0.5	0.4	0.3	17.7
	0.4	0.3	0.5	0.4	0.5	19.9

10

表3 牛奶样品可重复性试验

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

						CV%
	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	19.9
01	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	19.2
	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	15.2
	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	16.1
03	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4	17.3
	0.4	0.5	0.4	0.3	0.4	17.6
	0.4	0.4	0.5	0.4	0.3	17.7
06	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	16.1
	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	17.7

结果表明鱼虾、肌肉样本变异系数均低于20%，牛奶样本的变异系数均低于20%，符合了变异系数小于25%的规定，说明本试剂盒测定样本的精密程度达到了标准。

5 实验例3 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的呋喃唑酮代谢标准品溶液，分别为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ 和1 $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ ，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做4个平行，分别计算回收率。

表4 试剂盒的准确度

样本	鱼虾、肌肉		牛奶		
	0.5	1	0.5	1	
添加浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$					
回收率	1	82.4	87.4	81.6	82.6
	2	84.6	72.6	74.1	73.5

%	3	73.4	82.3	87.4	86.1
	4	84.6	92.8	76.5	93.5
平均值		81.3	83.8	79.9	83.9

结果表明鱼虾、肌肉添加的回收率在73.4%~92.8%之间，牛奶添加回收率在73.5%~86.1%之间。

实验例4

- 5 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、呋喃唑酮代谢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℃保存的条件下放置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
- 10 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在2-8℃可以保存6个月以上。

15

20

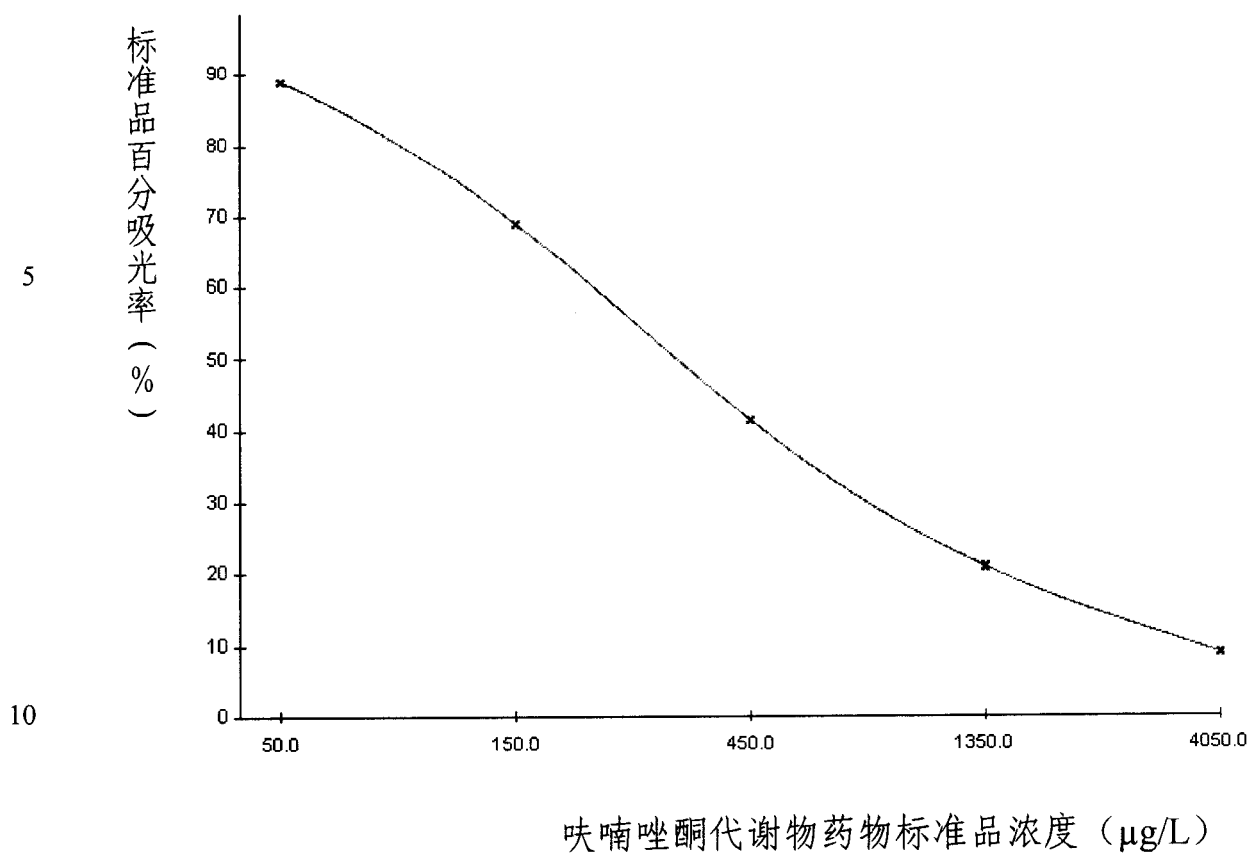
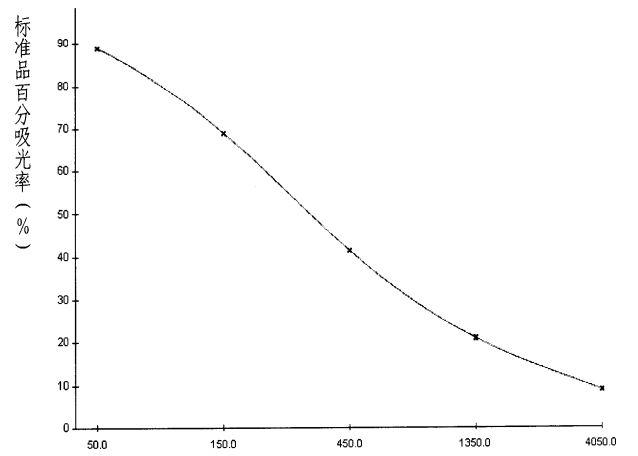


图 1

专利名称(译)	检测呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN1766624A	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510086768.6	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	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	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳		
发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/52 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	向华		
其他公开文献	CN100397083C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被呋喃唑酮代谢物衍生物抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板，酶标记物，呋喃唑酮代谢物衍生物特异性抗体，呋喃唑酮代谢物衍生物标准品溶液，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这种酶联免疫试剂盒检测呋喃唑酮代谢物的方法，它包括以下步骤：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。本发明提供的检测动物源性食品中呋喃唑酮代谢物残留的酶联免疫试剂盒及方法，样品前处理过程简单，费用低廉，且能同时检测大批样品。



呋喃唑酮代谢物标准品浓度 (μg/L)