

[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 200610007258. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1811439A

[22] 申请日 2006.2.16

[21] 申请号 200610007258. X

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

[72] 发明人 沈建忠 丁双阳 史为民 何方洋
张素霞 万宇平 江海洋 刘金凤

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测常山酮的酶联免疫试剂盒，包括常山酮特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗体；所述酶标记物为酶标抗体或酶标常山酮半抗原；当所述包被原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗体；当所述包被原为抗体时，所述酶标记物为酶标常山酮半抗原；所述常山酮半抗原是常山酮的酮基与羧甲基羟基反应所生成的带有羧基的常山酮衍生物。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织及饲料中常山酮药物残留量。

1、一种检测常山酮的酶联免疫试剂盒，包括常山酮特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标常山酮半抗原；当包被原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，酶标记物为酶标抗抗体；当包被原为抗抗体时，酶标记物为酶标常山酮半抗原；所述常山酮半抗原是常山酮的酮基与羧甲基羟基反应，生成的带有羧基的常山酮衍生物。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括常山酮标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液。

3、根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述常山酮特异性抗体为常山酮单克隆抗体或常山酮多克隆抗体；它们均是用常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述常山酮半抗原是常山酮的酮基与羧甲基羟基反应所生成的带有羧基的常山酮衍生物；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。

4、根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体；所述常山酮单克隆抗体为常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体。

6、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为 pH 值 7.4，0.05M，含有 0.8~1.2%吐温 20 和 0.1~0.5%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；所述百分含量均为质量百分含量

7、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述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，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；所述标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

8、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为 0.01~0.05mol/L、含 1%明胶和 0.5%DMF 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量均为质量百分含量

9、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述包被缓冲液为 pH 值 9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；所述终止液为 1-2mol/L 硫酸、盐酸或氢氧化钠溶液；所述封闭液为含 20%山羊血清和 1%吐温 80 的水溶液；所述百分含量均为质

量百分含量

10、一种检测常山酮的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

动物组织：在动物组织匀浆物中加入无水乙腈溶液混合，15℃，3000g 以上离心 10-15 分钟，取上清液，加入水和乙酸乙酯静置分层；上层液用氮气吹干或 50℃减压蒸干，用稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物，加入异辛烷振荡，离心，除去上层液，取下层液进行分析；

饲料：在饲料中加入体积比为 1:1 的甲醇和乙醇混合液，充分振荡 10min，4000rpm 离心 10min，取上清，氮气吹干，加入二氯甲烷，溶解残留物，再加入稀释 1 倍的浓缩复溶液，充分混合 5min，10000rpm 离心 10min，取上层液用试剂盒提供的稀释 1 倍的浓缩复溶液根据饲料的种类来进行不同倍数的稀释；

2) 利用权利要求 1-9 中任一所述的检测常山酮的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

常山酮 (Halofuginone) 商品名叫速丹 (Stenorol), 为氢溴酸常山酮 0.6 % 预混剂, 是常山碱甲、乙、丙三种的混合物, 对疟疾和球虫均有特效, 且与其它抗球虫药无交叉耐药性, 因此常被添加于饲料中以控制球虫引起的动物疾病, 是目前饲料中广泛应用的药物添加剂。但常山酮对水生动物 (如鱼、虾) 有很强的毒性, 且可以通过食物链危害人类。人如果食用常山酮残留浓度很高的禽肉组织, 会出现身体不适等中毒现象。中华人民共和国农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》规定了常山酮在鸡肝组织中的最高残留限量为 $130 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前, 常用于常山酮残留检测的方法主要有微生物法和仪器分析法。微生物检测法虽然经济、操作简便, 但在样本中有其他微生物抑制剂存在时, 其灵敏度和特异性受到限制; 高效液相色谱分析法、气谱、气质联机等单纯的仪器分析方法, 虽然灵敏度高, 但是样本前处理及测定操作烦琐, 费用高, 不适宜于大量样本筛查, 可以作为残留的确证分析。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测常山酮的酶联免疫试剂盒, 包括常山酮特异性抗体及包被抗原和酶标记物; 所述包被抗原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体; 所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标常山酮半抗原; 当包被抗原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物时, 酶标记物为酶标抗抗体; 当包被抗原为抗抗体时, 酶标记物为酶标常山酮半抗原。

所述常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将常山酮半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或活性酯法进行偶联得到; 所述常山酮半抗原是常山酮的酮基与羧甲基羟基反应, 生成的带有羧基的衍生物。

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, 其中优选碱性磷酸酯酶; 碱性磷酸酯酶标记抗抗体可采用现有技术中的多种方法如戊二醛法或过碘酸钠法将酶交联在抗抗体上; 碱性磷酸酯酶标记的常山酮半抗原可采用活性酯法将碱性磷酸酯酶与常山酮半抗原偶联得到。

所述常山酮特异性抗体可为常山酮单克隆抗体或常山酮多克隆抗体；它们均是用常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述常山酮单克隆抗体为常山酮鼠单克隆抗体，所述常山酮多克隆抗体优选为常山酮兔多克隆抗体。所述抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗体，优选为羊抗兔抗体。

所述常山酮单克隆抗体优选为常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体。

所述常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 已于 2006 年 2 月 9 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）。

以上抗体均可以用常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括常山酮标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述浓缩洗涤液为 pH 值 7.4，0.01~0.05M，含有 0.8~1.2%吐温 20 和 0.1~0.5%叠氮化钠（ Na_3N ）防腐剂的磷酸盐缓冲液。

本发明试剂盒的浓缩洗涤液含有的吐温 20 会减少抗体的非特异性吸附，还能对蛋白起到一定的保护作用；含有的叠氮钠在溶液中抑制细菌的生长，对溶液的稳定性起到一个保护作用。

所述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，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

所述浓缩复溶液为 0.01-0.05 mol/L、含 1%明胶和 0.5%DMF（N,N'-二甲基甲酰胺）的磷酸盐缓冲液。

本发明试剂盒的浓缩复溶液中的明胶能减少抗原、抗体的非特异性吸附，从而增加了抗原、抗体的结合率。

所述包被缓冲液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

所述终止液为 1-2mol/L 硫酸、盐酸或氢氧化钠。

所述封闭液为含 20%山羊血清和 1%吐温 80 的水溶液。

本发明所提供的检测常山酮的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

当样品为动物组织时，在动物组织匀浆物中加入无水乙醇溶液混合，15℃，3000g

以上离心 10-15 分钟，取上清液，加入水和乙酸乙酯静置分层；上层液用氮气吹干或 50℃减压蒸干，用稀释 1 倍的上述浓缩复溶液溶解干燥的残留物，加入异辛烷振荡，离心，除去上层液，取下层液进行分析；

当样品为饲料时，在饲料中加入甲醇:乙醇(1:1;V/V)，充分振荡 10min，4000rpm 离心 10min。取上清，氮气吹干。加入二氯甲烷，溶解残留物，再加入稀释 1 倍的浓缩复溶液，充分混合 5min，10000rpm 离心 10min，取上层液用试剂盒提供的稀释 1 倍的浓缩复溶液根据饲料的种类来进行不同倍数的稀释。

2) 利用上述检测常山酮的酶联免疫试剂盒检测样品。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物组织（肌肉、肝脏）和饲料等样品中常山酮残留量。本发明的检测原理是当微孔条上预包被常山酮半抗原和载体蛋白的偶联物时，加入样品溶液和常山酮抗体，样品中残留的常山酮将和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗常山酮抗体，加入酶标抗体进行酶放大作用后，显色；当微孔条上预包被抗体时，加入常山酮抗体后再加入样本溶液或标准品溶液及酶标记常山酮抗原，样本中残留物常山酮将和酶标抗原竞争抗常山酮抗体，显色；显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值（OD 值），样本吸光度值与其所含残留物常山酮药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中残留的常山酮药物含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的常山酮药物的标准液颜色的比较可判断样品中常山酮的浓度范围。

常山酮是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明将常山酮用丁二酸酐酰化，接出了一个间隔臂形成半抗原，这样突出了常山酮半抗原决定簇的特征结构，有助于制出针对常山酮抗原特异性较强的多克隆抗体。再将常山酮采用混合酸酐法或活性酯法与载体蛋白偶联得到免疫原。半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与 OVA、RSA 和 MSA 的结合摩尔比分别为 1: 11，1: 17 和 1: 17。

本发明的检测常山酮的酶联免疫试剂盒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样品；主要试剂以工作液、浓缩液或冻干粉等形式提供，检验方法方便易行，经过对试剂盒的精密度和准确度测试实验表明，本发明的酶联免疫试剂盒具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在食品和饲料常山酮残留量的检测中发挥重要作用。本发明的试剂盒结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带，可用于动物源性食品中常山酮的检测；本发明的检测常山酮的方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测。

附图说明

图 1 为以常山酮半抗原为包被原的酶联免疫试剂盒常山酮标准曲线图

图 2 为以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒常山酮标准曲线图

具体实施方式

下述实施例的方法如无特别说明，均为常规方法。

下述实施例中的百分含量，如无特别说明，均为质量百分含量。

实施例 1、以常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

以常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有常山酮与载体蛋白偶联物的酶标板；

(2) 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗抗体工作液：用抗体稀释液将碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗抗体稀释成蛋白浓度为 $5.0 \mu\text{g/L}$ ， 12ml/瓶 ， 1 瓶。抗体稀释液是 pH 值 8.2，含有 $1.2 \mu\text{g/L}$ 抗体蛋白，含有 5% 甲醇的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(3) 常山酮标准品溶液：常山酮系列标准品溶液 6 瓶， $0 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \mu\text{g/L}$ 、 $6 \mu\text{g/L}$ 、 $18 \mu\text{g/L}$ 、 $54 \mu\text{g/L}$ 、 $162 \mu\text{g/L}$ ， 1ml/瓶 。所用的常山酮药物稀释液为含有 5%（质量浓度） $\text{N,N}'$ -二甲基甲酰胺（DMF），1% 小牛血清（BSA）， 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液， 7ml/瓶 ， 1 瓶。

(5) 常山酮兔多克隆抗体工作液：用 pH 值 8.2，含有 $1.2 \mu\text{g/L}$ 抗体蛋白，含有 5% 甲醇的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液将常山酮兔多克隆抗体稀释成蛋白浓度为 $5.0 \mu\text{g/L}$ ， 12ml/瓶 ， 1 瓶。

(6) 浓缩洗涤液：pH 值 7.4， 0.01M ，含有 0.8% 吐温 20 和 0.5% 叠氮化钠（ Na_3N ）的磷酸盐缓冲液， 50ml/瓶 ， 1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液： 2mol/L 氢氧化钠缓冲液， 7ml/瓶 ， 1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：为 0.01mol/L 、含 1% 明胶和 0.5% DMF（ $\text{N,N}'$ -二甲基甲酰胺）的磷酸盐缓冲液， $30\text{--}50\text{ml/瓶}$ ， 1 瓶。为正常使用浓度的 2 倍。

(9) 包被缓冲液：pH 9.6， 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：含 20% 山羊血清和 1% 吐温 80 的水溶液。

其中，包被常山酮半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板、常山酮特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗抗体的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、常山酮半抗原的合成方法：

常山酮半抗原的制备原理：由于常山酮中含有酮基，使酮基与羧甲基羟胺反应，生成带有羧基的半抗原衍生物，从而在分子中引入羧基。其优点为将常山酮用羧甲基羟胺，接出了一个间隔臂，这样突出了常山酮半抗原决定簇的特征结构。有助于制出针对常山酮抗原特异性较强的兔多克隆抗体。其半抗原的制备的过程为：

(1) 将常山酮和羧甲基羟胺按 1: 10 比例混匀，用力振荡后反应 1-2 小时。

(2) 在 70% 200mL 乙醇中，加入羧甲基羟胺和常山酮的混合物，使其浓度分别为 10mmol/L 和 4mmol/L。加热回流 90min。旋转蒸发，减少容积，然后加水至 50mL，二氯甲烷提取。用水洗涤二氯甲烷提取物，用 Na_2SO_4 干燥，得到的白色粉末为常山酮半抗原。

2、包被原：将常山酮半抗原和卵清蛋白混合酸酐法进行偶联得到包被原。

包被原的具体制备方法如下：

(1) 取常山酮半抗原 2 g 溶于 30ml, 50% 的 N, N' -二甲基甲酰胺溶液中；

(2) 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，加到步骤 (1) 的溶液中，室温搅拌反应 4 小时；

(3) 取卵清蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将卵清蛋白滴加到步骤 (2) 的溶液中 4℃ 搅拌过夜，用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次，最后将抗原浓缩或冻干保存。

3、酶标板的制备：

用包被缓冲液将常山酮半抗原与卵血清白蛋白偶联物稀释成 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ，37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜，倾去包被液，用 20 倍稀释的浓缩洗涤液洗涤 3 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 $200\mu\text{l}$ 封闭液，37℃ 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、常山酮兔多克隆抗体的制备

1、免疫原：将常山酮半抗原和人血清白蛋白载体蛋白采用活性酯法进行偶联得到。

具体方法如下：

取常山酮半抗原 2 g 溶于 20ml, 0.5M 的氢氧化钠溶液中，再取 2 g 氮羟基琥珀酰亚胺溶于 8ml 纯水中加到半抗原溶液中室温搅拌反应 2.5 小时，取载体蛋白 22g 溶于 75ml pH9 碳酸盐缓冲液中，再将载体蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。将反应完的人工抗原对 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次。最后将抗原浓缩或冻干保存。

人血清与被免疫动物之间蛋白关系较远，且结构复杂，故免疫原性好，能诱导较强的免疫应答，使其产生的抗体较好，因此用人血清白蛋白作为免疫原的载体。

2、常山酮兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以常山酮半抗原与人血清白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 3-4 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，颈动脉放血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

三、酶标抗体的制备

以羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

将羊抗兔抗抗体与碱性磷酸酯酶进行偶联，采用的方法优选戊二醛法，用碱性磷酸酯酶以 2:1 的比例与羊抗兔抗抗体偶联，有 60%~70% 的酶与 8% 的抗抗体偶联，酶标记物的产量比使用辣根过氧化物酶高。

酶标羊抗兔抗抗体具体步骤如下：

- 1) 称取碱性磷酸酯酶 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，于室温静置过夜。
- 2) 反应后的酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / 1min，收集棕色流出液。如体积大于 5ml，则以聚乙二醇浓缩至 5ml。放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌。
- 3) 取羊抗兔抗抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。
- 4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml，继续搅拌 3h。
- 5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml，混匀后，置室温 2h。
- 6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃ 1h。
- 7) 3000rpm 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液中。
- 8) 将上述溶液装入透析袋中，用 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析，去除铵离子后用蔡氏试剂检测，10,000rpm 离心 30min 去除沉淀，上清液即为酶结合物，分装后，冰冻保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的常山酮的方法如下：

一、样品前处理

动物组织：在动物组织匀浆物中加入无水乙醇溶液混合，15℃，3000g 以上离心 10-15 分钟，取上清液，加入水和乙酸乙酯静置分层；上层液用氮气吹干或 50℃ 减压蒸干，用上述 1 倍稀释的浓缩复溶液溶解干燥的残留物，加入异辛烷振荡，离心，

除去上层液，取下层液进行分析；

饲料：在饲料中加入甲醇:乙醇（1:1；V/V），充分振荡 10min，4000rpm 离心 10min。取上清，氮气吹干。加入二氯甲烷，溶解残留物，再加入稀释 1 倍的浓缩复溶液，充分混合 5min，10000rpm 离心 10min，取上层液用试剂盒提供的稀释 1 倍的浓缩复溶液根据饲料的种类来进行不同倍数的稀释。

二、检测方法

a、向常山酮半抗原与卵血清白蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准溶液或样品溶液 50 μ l，然后加入常山酮多克隆抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。

b、倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 稀释 19 倍的浓缩洗涤液，30s 后倒出孔中液体，用吸水纸拍干，如此重复操作共洗板 5 次。加入碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗体工作液 100 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。

c、取出酶标板，如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 100 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15-30min。

d、每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪将波长设定在 400nm 处，测定每孔吸光度值（OD 值）。

三、结果分析

所获得的每个浓度标准品溶液或样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标准（0 标准）的吸光度值（B₀）再乘以 100%，即百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B₀ 为 0 μ g/L 标准品溶液的平均吸光度值。以常山酮浓度的自然对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，如图 1 所示。相对应每一个样品中常山酮的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液中常山酮的浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 2 μ g/L。

实施例 2、以羊抗鼠抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒及其制备方法

以羊抗鼠抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

- （1）包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板；
- （2）辣根过氧化物酶标记的常山酮工作液：用双蒸水将辣根过氧化物酶标记的

常山酮半抗原稀释为 0.1mol/L。

(3) 常山酮标准品溶液：常山酮系列标准溶液 6 瓶，0 μ g/L、2 μ g/L、6 μ g/L、18 μ g/L、54 μ g/L、162 μ g/L，1ml/瓶。所用的常山酮药物稀释液为含有 5% N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF)，1% 小牛血清 (BSA)，0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色液 A 液为过氧化氢，显色液 B 液为四甲基联苯胺，7ml/瓶。

(5) 常山酮鼠单克隆抗体工作液：用抗体稀释液将常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 分泌的单克隆抗体稀释成蛋白浓度为 5.0 μ g/L，12ml/瓶，1 瓶。抗体稀释液是 pH 值 8.2，含有 1.2 μ g/L 抗体蛋白，含有 5% 甲醇的 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：pH 值 7.4，0.05M，含有 1.2% 吐温 20 和 0.1% 叠氮化钠 (Na_3N) 的磷酸盐缓冲液。50ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液：2mol/L 盐酸，7ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：为 0.05mol/L、含 1% 明胶和 0.5% DMF 的磷酸盐缓冲液，30-50ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 2 倍。

(9) 包被缓冲液：pH 9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：含 20% 山羊血清和 1% 吐温 80 的水溶液。

其中，包被羊抗鼠抗抗体的酶标板、常山酮特异性抗体、辣根过氧化物酶标记的常山酮半抗原的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、包被原的制备：羊作为免疫动物，以鼠 IgG 为免疫原进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体。

2、包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板制备方法：用包被缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释成 1 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用稀释 19 倍的浓缩洗涤液洗涤 3 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 200 μ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、常山酮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，以上述常山酮半抗原与人血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 80-100 μ g/只，首免时将抗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。

细胞融合与克隆化：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—常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608。

细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 用冻存液制成 1×10^6 – 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。

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 天后腹腔注射常山酮的单克隆杂交瘤细胞株 A-2--2 CGMCC No. 1608 5×10^5 – 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。

三、酶标半抗原的制备

辣根过氧化物酶标记半抗原的制备：常山酮半抗原的制备同实施例 1 中的常山酮半抗原制备方法。

(1) 取常山酮半抗原 2 g 溶于 20ml, 0.5M 的氢氧化钠溶液中；

(2) 再取 2 g NHS 活性酯溶于 8ml 纯水中，加到步骤 (1) 的溶液中室温搅拌反应 2.5 小时；

(3) 取辣根过氧化物酶 20g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将辣根过氧化物酶滴加到步骤 (2) 的溶液中 4℃ 搅拌过夜。用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次，最后将抗原浓缩或冻干保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的常山酮的方法如下：

样品前处理的具体步骤同实施例 1 中的样品前处理步骤

检测方法：

1) 向包被有羊抗鼠抗体的酶标板微孔中加入常山酮鼠单克隆抗体工作液 80 μ l，加入系列标准品溶液或样品溶液 20 μ l，同时加入辣根过氧化物酶标记的常山酮工作液 50 μ l，然后，37℃ 反应 30min。

2) 倒出孔中液体，每孔加入洗涤液，30s 后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液 A 液 50 μ l，再加 B 液 50 μ l，轻轻振荡混匀，37℃ 恒温箱避光显色 15~30min。

3) 每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪，测定每孔吸光度值 (OD 值)。

结果分析的方法同实施例 1 中的结果分析方法，该试剂盒的标准曲线图，如图 1

所示。结果分析表明，制备的试剂盒整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 2 $\mu\text{g/L}$ 。

实施例 3、试剂盒精密度、准确度和保存期试验

1、试剂盒精密度试验

(1) 标准品精密度试验

从实施例 2 的试剂盒中分别取三批进行精密度实验，每批试剂盒抽取 10 个试剂盒，再从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔，测定 18 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液的吸光度值(OD 值)，计算变异系数。测定结果如表 1 所示，结果表明变异系数范围在 5.3%~10.6%之间。

表 1 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	8.5	9.2	10.3	6.5	9.8	7.3	6.5	5.3	8.2	9.6
	03 批	7.5	7.9	9.4	6.8	10.6	12.3	7.7	8.2	9.6	8.4
	06 批	5.9	7.6	8.3	9.4	10.2	7.8	9.5	6.4	5.6	10.1

(2) 样本可重复性试验

每个牛肉样本按 25 $\mu\text{g/kg}$ 浓度、饲料样本按 50 $\mu\text{g/kg}$ 浓度添加常山酮标准品，分别取实施例 2 的三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数。测定结果如表 2、表 3 所示，结果表明牛肉样本变异系数均低于 20%，饲料样本的变异系数均低于 20%。

表 2 牛肉样品可重复性试验

		实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
8012 批		16.3	18.9	17.6	25.6	21.6	18.4
		27.3	20.3	17.8	20.6	19.8	17.0
		16.9	18.7	19.6	20.9	27.1	18.8
9004 批		18.9	17.7	20.3	25.6	26.7	18.5
		16.7	19.8	24.1	23.6	20.8	14.3
		20.3	16.5	17.3	18.7	19.2	8.2
9010 批		20.3	25.1	24.8	26.5	16.4	18.4
		17.8	18.9	16.5	17.5	24.9	17.5

	19.9	17.3	18.9	22.3	19.2	9.3
--	------	------	------	------	------	-----

表3 饲料样品可重复性试验

	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	8012 批	30.2	45.6	48.7	36.9	34.6
	54.8	41.3	48.9	40.6	39.4	14.7
	46.3	40.3	47.9	44.5	46.3	6.4
9004 批	48.2	45.2	48.7	32.9	36.2	17.1
	50.3	51.9	50.6	39.8	36.4	15.6
	50.9	36.5	34.2	36.9	34.1	18.2
9010 批	34.2	33.6	45.6	50.6	44.8	17.9
	46.6	47.9	54.2	54.1	40.6	11.7
	47.8	39.8	40.9	46.6	54.4	12.8

2、试剂盒的准确度测定

每个牛肉样本和饲料样本分别按 $25\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度、按 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度添加常山酮标准品，分别利用实施例 2 的试剂盒检测常山酮，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度。检测结果如表 4 所示，结果表明牛肉样本测量的准确度在 76.8%~107.5%之间，饲料样本测量的准确度在 72.6%~106.5%之间。

表4 实施例2的试剂盒准确度测定试验

样本		牛肉		饲料	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		25	50	25	50
准确度%	1	83.6	81.7	86.7	94.8
	2	94.1	89.4	94.1	72.6
	3	102.8	69.7	87.2	83.4
	4	76.8	107.5	106.5	91.5
平均值		89.3	87.0	93.6	85.5

3、试剂盒保存期试验

将实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒分别保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，6 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、常山酮添加实际测定值，结果表明试剂

盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度，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，将上述试剂盒在 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。

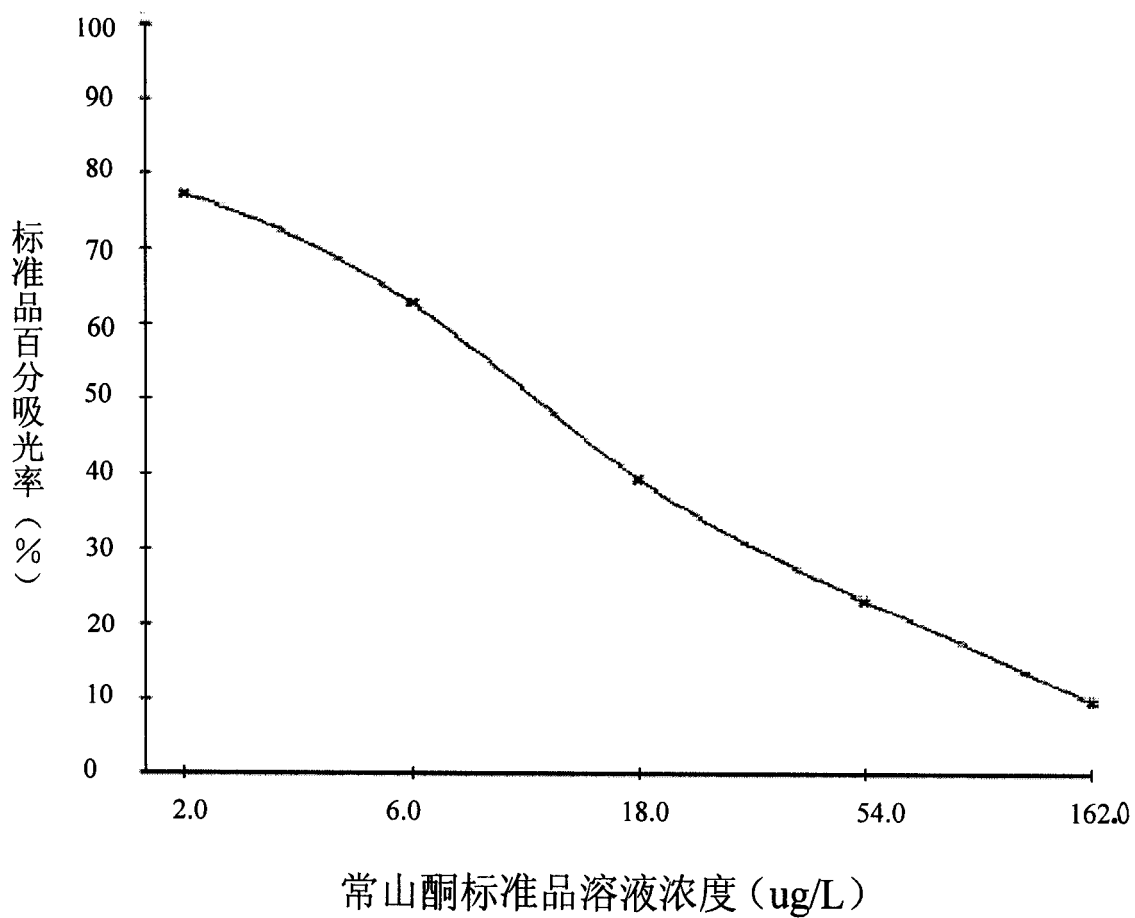


图 1

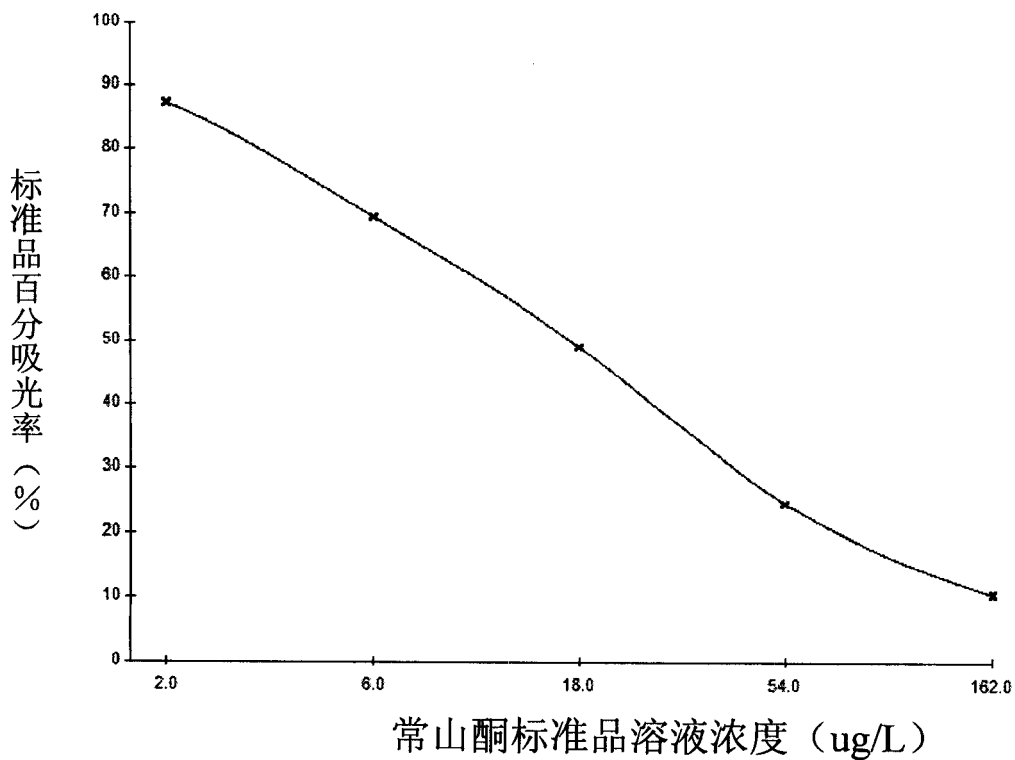


图 2

专利名称(译)	一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN1811439A	公开(公告)日	2006-08-02
申请号	CN200610007258.X	申请日	2006-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 丁双阳 史为民 何方洋 张素霞 万宇平 江海洋 刘金凤		
发明人	沈建忠 丁双阳 史为民 何方洋 张素霞 万宇平 江海洋 刘金凤		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN100487457C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测常山酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测常山酮的酶联免疫试剂盒，包括常山酮特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标常山酮半抗原；当所述包被原为常山酮半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标常山酮半抗原；所述常山酮半抗原是常山酮的酮基与羧甲基羟基反应所生成的带有羧基的常山酮衍生物。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织及饲料中常山酮药物残留量。

