

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810219297.5

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101408544A

[22] 申请日 2008.11.21

[21] 申请号 200810219297.5

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

[72] 发明人 沈玉栋 张世伟 孙远明 雷红涛
王弘 肖治理 杨金易

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司
代理人 林丽明 任重

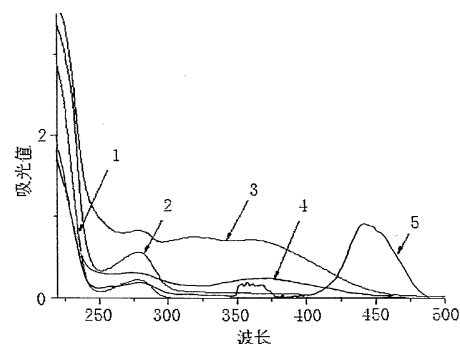
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

[54] 发明名称

3,5-二硝基水杨酸脲酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

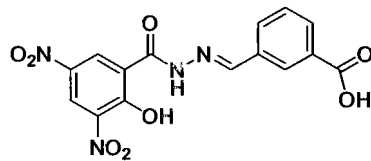
[57] 摘要

本发明公开了一种3,5-二硝基水杨酸脲酶联免疫检测试剂盒,包括盒体、特异性抗体溶液、3,5-二硝基水杨酸脲标准溶液、酶标板、样品稀释液、洗涤液、二抗溶液、显色液A液、显色液B液和终止液,所述特异性抗体为兔抗3,5-二硝基水杨酸脲抗体,所述酶标板为孔内包被有半抗原与卵清蛋白偶联物的ELISA板条,所述二抗溶液为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体稀释液。待测样品经过盐酸水解、邻硝基苯甲醛衍生、乙酸乙酯提取、样品稀释液复溶和正己烷脱脂等样品前处理步骤后,使用本试剂盒进行检测分析。本发明所述试剂盒特异性强、最低检测限为74.8ppt,适合于卫生、质检、海关、肉品加工厂、家畜养殖场对饲料、肉



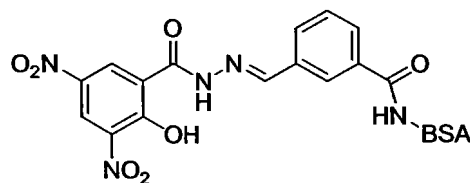
1、一种 3,5-二硝基水杨酸肼酶联免疫检测试剂盒，包括箱体、特异性抗体溶液、3,5-二硝基水杨酸肼标准溶液、酶标板、样品稀释液、洗涤液、二抗溶液、显色液 A 液、显色液 B 液和终止液，其特征在于所述特异性抗体为兔抗 3,5-二硝基水杨酸肼抗体，所述酶标板为孔内包被有半抗原与卵清蛋白偶联物的 ELISA 板条，所述二抗溶液为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体稀释液。

2、根据权利要求 1 所述 3,5-二硝基水杨酸肼酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述的半抗原为 3,5-二硝基水杨酸肼和对羧基苯甲醛反应，通过氨醛缩合所得化合物，具有式（I）所示的结构：



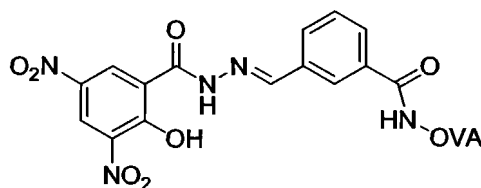
(I)

3、根据权利要求 1 所述 3,5-二硝基水杨酸肼酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述的特异性抗体溶液是由化合物（I）偶连牛血清蛋白得到的偶联物，经透析纯化，免疫实验用兔，纯化兔血清，调配浓度得到的抗体溶液；所述偶联物具有式（II）所示结构：



(II)

4、根据权利要求1所述3,5-二硝基水杨酸脲酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述的半抗原与卵清蛋白偶联物是由化合物（I）与卵清蛋白通过活泼酯法交联后，透析纯化的产物，具有式（III）所示结构：



(III)

5、一种权利要求1所述3,5-二硝基水杨酸脲酶联免疫检测试剂盒的使用方法，其特征在于包括以下步骤：

- (1) 样品衍生化前处理；
- (2) 在试剂盒的酶标板孔中加入 50 μ L 溶解有样品的抗体稀释液和 50 μ L 特异性抗体溶液，室温反应 30min，洗涤液洗涤，拍干；
- (3) 在（2）所述酶标板孔中加入二抗稀释液 100 μ L，室温反应 20min，洗涤液洗涤，拍干；
- (4) 在（3）所述酶标板孔中加入现配的显色液 100 μ L，室温蔽光显色 10min；
- (5) 在（4）所述酶标板孔中加入终止液体 50 μ L，测定 OD₄₅₀ 值。

6、根据权利要求5所述3,5-二硝基水杨酸脲酶联免疫检测试剂盒的使用方法，其特征在于步骤（1）所述样品衍生化前处理包括盐

酸水解、邻硝基苯甲醛衍生、乙酸乙酯提取、样品稀释液复溶和正己烷脱脂步骤。

7、根据权利要求6所述3,5-二硝基水杨酸脲酶联免疫检测试剂盒的使用方法，其特征在于步骤（4）所述现配的显色液是由显色A液体：显色B液按照1：1的体积比配制。

3,5-二硝基水杨酸肼酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

技术领域

本发明属于免疫化学技术领域，具体涉及一种 3,5-二硝基水杨酸肼酶联免疫检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

3,5-二硝基水杨酸肼作为硝呋索尔的代谢物，能够标示违禁兽药硝呋索尔的使用情况。我国出口欧盟的鸡肉等产品多次被检出 3,5-二硝基水杨酸肼残留，严重制约了我国动物源性食品的出口，损害了我国畜牧业的良好形象。因此，为了保障人民身体健康，保证进出口肉产品的质量，有利于大力发展我国畜牧业，有必要寻求一种快速、灵敏、方便的方法来检测动物肌肉组织的 3,5-二硝基水杨酸肼残留。

目前报道的 3,5-二硝基水杨酸肼残留量的检测方法主要有液-质联用(LC-MS)法、高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)，但这些方法样品前处理很复杂，仪器成本高，耗时费力。酶联免疫检测方法(ELISA)能弥补这些不足，因而可被用于农兽药残留的快速检测，但目前尚未有 3,5-二硝基水杨酸肼的酶联免疫检测方法的报道，要采用酶联免疫方法进行快速、灵敏、方便的检测，关键需要找到针对 3,5-二硝基水杨酸肼残留检测的样品的前处理简单方法以及合适的抗体、包被原等，但目前尚未有 3,5-二硝基水杨酸肼的酶联免疫检测方法的相关技术报道。

发明内容

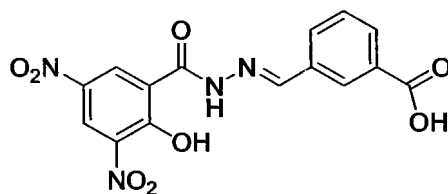
本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种可用于动物源性食品中 3,5-二硝基水杨酸肼残留的快速检测试剂盒。

本发明的另一个目的是提供所述试剂盒的使用方法，通过简单、特殊设计的样品衍生化前处理，极大地提高了试剂盒检测的特异性和灵敏度。

本发明的发明目的通过以下技术方案来予以实现：

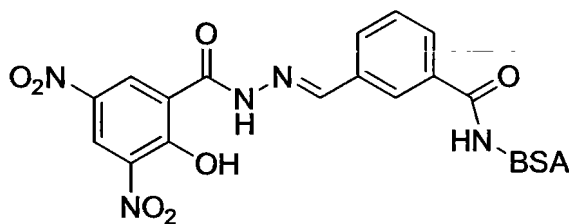
提供一种 3,5-二硝基水杨酸肼酶联免疫检测试剂盒，包括盒体、特异性抗体溶液、3,5-二硝基水杨酸肼标准溶液、酶标板、样品稀释液、洗涤液、二抗溶液、显色液 A 液、显色液 B 液和终止液，所述特异性抗体为兔抗 3,5-二硝基水杨酸肼抗体，所述酶标板为孔内包被有半抗原与卵清蛋白偶联物的 ELISA 板条，所述二抗溶液为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体稀释液。

所述的半抗原为 3,5-二硝基水杨酸肼和对羧基苯甲醛反应，通过氨醛缩合所得化合物，具有式（I）所示的结构：



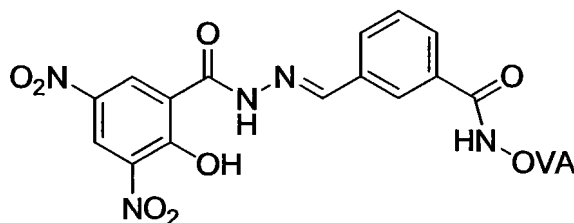
(I)

所述的特异性抗体溶液是由化合物（I）偶连牛血清蛋白得到的偶联物，经透析纯化，免疫实验用兔，纯化兔血清，调配浓度得到的抗体溶液；所述偶联物具有式（II）所示结构：



(II)

所述的半抗原与卵清蛋白偶联物是由化合物 (I) 与卵清蛋白通过活泼酯法交联后, 透析纯化的产物, 具有式 (III) 所示结构:



(III)

本发明同时提供了所述试剂盒的使用方法, 包括以下步骤:

- (1) 样品衍生化前处理;
- (2) 在试剂盒的酶标板孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 溶解有样品的抗体稀释液和 $50 \mu\text{L}$ 特异性抗体溶液, 室温反应 30min, 洗涤液洗涤, 拍干;
- (3) 在 (2) 所述酶标板孔中加入二抗稀释液 $100 \mu\text{L}$, 室温反应 20min, 洗涤液洗涤, 拍干;
- (4) 在 (3) 所述酶标板孔中加入现配的显色液 $100 \mu\text{L}$, 室温蔽光显色 10min;
- (5) 在 (4) 所述酶标板孔中加入终止液体 $50 \mu\text{L}$, 测定 OD_{450} 值。

步骤(1)所述样品衍生化前处理包括盐酸水解、邻硝基苯甲醛衍生、乙酸乙酯提取、样品稀释液复溶和正己烷脱脂步骤。例如可取1g的鱼肉或虾肉样分别加入4mL的蒸馏水,0.5 mL 1 mol/L的HCL和100 μ L 10 mmol/L的2-硝基苯甲醛,充分振荡;在37°C过夜孵育(大约16小时);分别加入5 ml 0.1 mol/L K_2HPO_4 ,0.4 mL 1mol/L NaOH和5 mL的乙酸乙酯,剧烈振荡30秒钟,在室温下离心,5000 r/min,10分钟;取出乙酸乙酯层置另一个容器中蒸干,用0.5 mL的正己烷溶解干燥物,用0.5 mL的PBST适当的混合,在室温下离心,5000 r/min,10分钟,取用50 μ L的下层液体进行试剂盒检测分析。

步骤(4)所述现配的显色液是由显色A液体:显色B液按照1:1的体积比配制。

本发明的有益效果是:本发明采用间接竞争ELISA法,通过半抗原合成,偶连载体蛋白,免疫实验动物,抗体纯化等技术手段,制备了高灵敏度,高特异性的抗体;通过合成包被原,并将其按一定浓度包被在ELISA板上,使用甘氨酸封闭,制备可以直接应用于酶联免疫分析的ELISA板条;制定了测定3,5-二硝基水杨酸胍残留的试剂盒使用步骤,通过简单、特殊设计的衍生化前处理,极大地提高了试剂盒检测的特异性和灵敏度,简化了试剂盒检测的操作;本发明可用于动物肌肉、肝脏中3,5-二硝基水杨酸胍的检测,具有前处理简单、检测快速、高通量和廉价等优点,并且最低检测限为0.1ng/mL。

附图说明

图1 抗原、蛋白和半抗原紫外扫描图谱

图 2 试剂盒的标准曲线

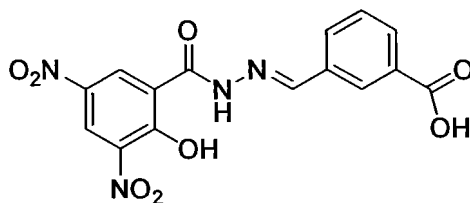
具体实施方式

下面结合附图和具体实施历来进一步详细说明本发明。

实施例 1 半抗原的合成

在 50ml 圆底烧瓶中加入间羧基苯甲醛 10mmol，缓慢加入甲醇直至间羧基苯甲醛至完全溶解，搅拌中加入 8mmol 3,5-二硝基水杨酸肼，室温搅拌过夜；反应结束过滤，20mL 甲醇分两次洗涤沉淀，干燥，黄色粉末状固体即为 CPDNSH：APCI-MS (negative) m/z : 374[M-H]. ^1H NMR(600MHz, d_6 -DMSO, TMS): δ 14.05 (s, 1H); 8.82 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H); 8.58 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H); 8.48(s, 1H); 8.35(s, 1H); 7.97 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H); 7.59(t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H)。

其结构如式 (I) 所示：

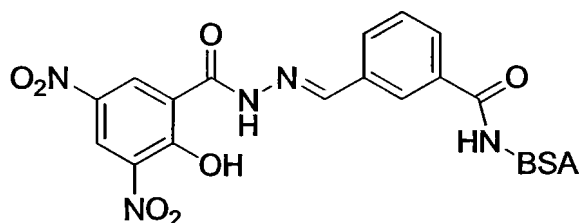


(I)

实施例 2 抗原的合成

取半抗原 CPDNSH 0.1mmol 溶于 2 mL DMF 中，搅拌加入 DCC 27.5 mg 和 NHS 14.4 mg，4 °C 下磁力搅拌反应过夜，离心后上清液为 A 液；称取 BSA 140 mg 溶于 10 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS (PH 8.0) 中，加入 DMF 1 mL，搅拌溶解制备 B 液；磁力搅拌下，A 液逐渐滴入 B 液中，

4 °C下反应 12 h；离心后，取上清液，4 °C下用生理盐水透析 3 d，每天更换 3 次透析液，得到的全抗原 CPDNSH-BSA。以 1 g/L 浓度分装。冻存于-20 °C冰箱中，供免疫用。CPDNSH-BSA 的结构如式（II）所示：

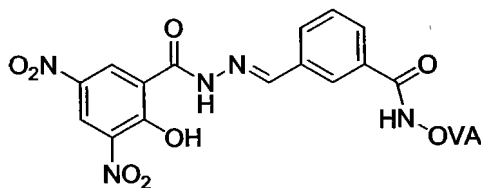


(II)

实施例 3 包被原的合成

取半抗原 CPDNSH 0.1mmol 溶于 2 mLDMF 中，搅拌加入 DCC 27.5 mg 和 NHS14.4 mg，4 °C下磁力搅拌反应过夜，离心后上清液为 A 液；称取牛血清蛋白 BSA 140 mg 溶于 10 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS (PH8.0) 中，加入 DMF1 mL，搅拌溶解制备 B 液；磁力搅拌下，A 液逐渐滴入 B 液中，4 °C下反应 12 h；离心后，取上清液，4 °C下用生理盐水透析 3 d，每天更换 3 次透析液，得到的包被原 CPDNSH-OVA。以 1 g/L 浓度分装。冻存于-20°C冰箱中，供包被用。

制备的包被原 CPDNSH-OVA 具有式（III）所示结构：



(III)

实施例 4 抗原及包被原的鉴定

经紫外扫描 220nm~500nm 处的吸光值,和同等浓度的 OVA 及 BSA, 进行对比,结果如附图 1,图中,曲线 1 为 BSA,曲线 2 为 OVA,曲线 3 为 CPDNSH-BSA,曲线 4 为 CPDNSH-OVA,曲线 5 为 CPDNSH-OVA。BSA、OVA 在 305nm 后无吸收,而 CPDNSH-BSA、CPDNSH-OVA 在 370nm 后吸收减弱,在 450nm 后停止吸收,说明免疫抗原和包被原制备成功。

实施例 5 抗体的制备

多克隆抗体的制备:人工免疫抗原免疫新西兰大白兔,采用背部多点免疫法,首次用弗氏完全佐剂乳化,间隔 4 周,以后免疫每隔两周免疫,用弗氏不完全佐剂乳化,免疫三次。最后一次免疫后 7 天心脏采血,离心保留血清。用辛酸-硫酸铵法纯化。抗体经冷冻干燥,存放于-20℃冰箱中。间接竞争 ELISA 法测定抗体阳性滴度以 2.1 倍于阴性血清的测定值为准,测得抗体的阳性滴度为 1:2560000。

实施例 6 本发明方法灵敏度的测定

采用方阵滴定法确定抗体及各包被原工作浓度。使用最佳浓度包被的酶标板,加入 50 μL 200ng/L、500ng/L、1000ng/L、2000ng/L 和 5000ng/L 的代谢物,50 μL 最佳工作浓度的抗体,37℃水浴温育 1 h,洗涤三次后拍干,加入稀释一万倍的羊抗兔 IgG-HRP,每孔 100 μL,37℃水浴中温育 1 h,洗涤三次拍干,加入四甲基联苯胺(TMB)底物溶液,每孔 100 μL,室温避光显色 15 min,向每孔中加入 50 μL 止液,测读各孔 450 nm 处吸光值。试剂盒的间接竞争 ELISA 标准曲线见附图 2,其 IC₅₀ 为 510.5ng/L,最低检测限为 74.8ng/L。

实施例7 本发明方法特异性测定

将呋喃唑酮，呋喃它酮，呋喃西林，呋喃妥因配成 200ng/L、500ng/L, 1000ng/L、2000ng/L 和 5000ng/L 溶液，测定其交叉反应率，结果发现与同类药物无交叉反应，见表 1。

表 1 交叉反应试验结果

竞争药物	交叉反应率(%)
呋喃唑酮	<0.01
呋喃它酮	<0.01
呋喃西林	<0.01
呋喃妥因	<0.01

以上实验结果说明由所设计半抗原制备的免疫原免疫产生的抗体具有灵敏度高，特异性好等优点。

实施例8 样品前处理

取 1g 的鱼肉或虾肉样分别加入 4mL 的蒸馏水，0.5 mL 1 mol/L 的 HCL 和 100 μ L 10 mmol/L 的 2-硝基苯甲醛，充分振荡，在 37°C 过夜孵育(大约 16 小时)；分别加入 5 ml 0.1 mol/L K_2HPO_4 ，0.4 mL 1 mol/L NaOH 和 5 mL 的乙酸乙酯，剧烈振荡 30 秒钟，在室温下离心，5000 r/min，10 分钟；取出乙酸乙酯层置另一个容器中蒸干，用 0.5 mL 的正己烷溶解干燥物，用 0.5 mL 的 PBST 适当的混合。在室温下离心，5000 r/min，10 分钟，用 50 μ L 的下层液体进行本发明试剂盒检测分析。

实施例 9 本发明试剂盒精密度的检测

按照本发明试剂盒的操作测定标准溶液，做 6 个重复，以吸光值计算变异系数，结果见表 2。

表 2 icELISA 方法的批内和批间误差 (n=6)

DNSH浓度 (ng/L)	批内误差			批间误差		
	吸光值	SD	CV (%)	吸光值	SD	CV (%)
5000	0.27	0.02	7.35	0.28	0.03	10.71
2000	0.38	0.02	5.30	0.37	0.04	10.81
1000	0.52	0.03	5.79	0.59	0.05	8.47
500	0.70	0.03	4.27	0.72	0.06	8.33
200	0.94	0.03	3.21	0.96	0.07	7.29
0	1.21	0.04	3.31	1.18	0.07	5.93
平均值			4.87			8.59

实施例 10 试剂盒对实际样品的检测

表 3 icELISA 方法检测加标鱼肉，虾肉样品的检测结果和回收率 (n=6)

样品	添加量 (ng/Kg)	回收量. (ng/Kg)	添加回收 率 (%)	SD	CV (%)	测得阳性样品数
鱼肉	200	179.2	89.6	43.4	24.2	6
	500	456	91.2	100.3	22	6
	1000	932	93.2	176.1	18.9	6
	2000	1882	94.1	329.4	17.5	6
	5000	4610	92.2	910	19.7	6
	0	—	—	—	—	0
虾肉	200	179.2	89.6	43.4	24.2	6
	500	456	91.2	100.3	22	6
	1000	932	93.2	176.1	18.9	6

2000	1882	94.1	329.4	17.5	6
5000	4640	92.8	880	19	6
0	—	—	—	—	0
平均值		92.1		20.5	

本发明试剂盒选用不含 3,5-二硝基水杨酸胼的鱼、虾肉，添加 3,5-二硝基水杨酸胼标样，评价试剂盒对实际样品检测能力。表 3 显示其平均添加回收率为 89.6~94.1%之间。本发明试剂盒检测方法在所有低药物浓度样品均能检出阳性，阴性样品无假阳性，说明本方法具有初步筛选所要求的稳定性，能够准确筛选出阳性样品。

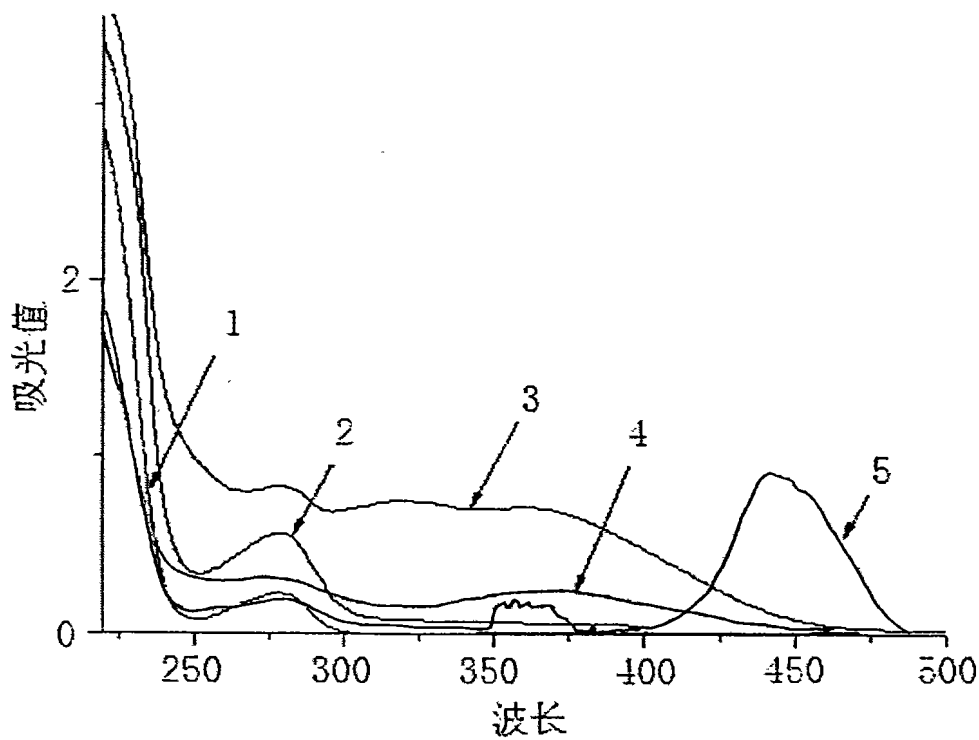


图 1

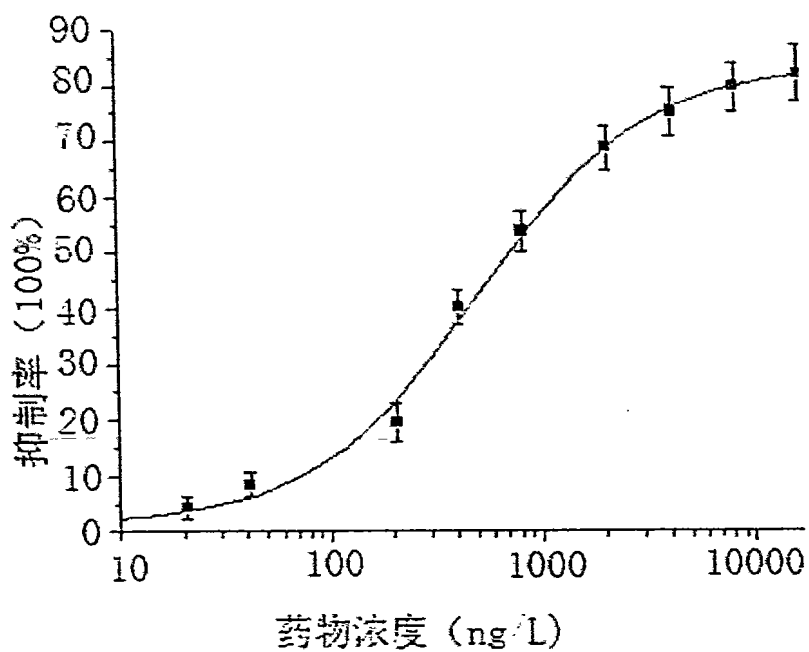


图 2

专利名称(译)	3,5 - 二硝基水杨酸胍酶联免疫检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN101408544A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200810219297.5	申请日	2008-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	沈玉栋 张世伟 孙远明 雷红涛 王弘 肖治理 杨金易		
发明人	沈玉栋 张世伟 孙远明 雷红涛 王弘 肖治理 杨金易		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	林丽明 任重		
其他公开文献	CN101408544B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种3,5 - 二硝基水杨酸胍酶联免疫检测试剂盒,包括盒体、特异性抗体溶液、3,5 - 二硝基水杨酸胍标准溶液、酶标板、样品稀释液、洗涤液、二抗溶液、显色液A液、显色液B液和终止液,所述特异性抗体为兔抗3,5 - 二硝基水杨酸胍抗体,所述酶标板为孔内包被有半抗原与卵清蛋白偶联物的ELISA板条,所述二抗溶液为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体稀释液。待测样品经过盐酸水解、邻硝基苯甲醛衍生、乙酸乙酯提取、样品稀释液复溶和正己烷脱脂等样品前处理步骤后,使用本试剂盒进行检测分析。本发明所述试剂盒特异性强、最低检测限为74.8ppt,适合于卫生、质检、海关、肉品加工厂、家畜养殖场对饲料、肉类、尿液、乳品等样品中的3,5 - 二硝基水杨酸胍进行快速检测。

