(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104280557 B
(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201410516158.4

(22)申请日 2014.09.29

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104280557 A

(43)申请公布日 2015.01.14

(73)专利权人 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司
地址 550009 贵州省贵阳市小河区小孟工业园标准厂房二期1#楼1-2楼
专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

(72)发明人 罗贵昆 谢体波 蒲小容 易重任 金帮明 刘天雷 何方洋

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 谷庆红

(51)Int.Cl.
G01N 33/94(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)

审查员 舒霏霏

权利要求书2页 说明书21页

(54)发明名称

一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒及其制备方法和检测方法

(57)摘要

本发明涉及阿维菌素检测技术领域，尤其是一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒及其制备方法和检测方法，包括免疫原、包被原、单克隆抗体、酶标二抗、TMB底物显色液；其中免疫原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为24:1；包被原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为21:1；单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG_1，分子量为165.7KDa，染色体数目为89～94条，亲和常数为$1.80\times10^{10}M^{-1}$；TMB底物显色液由A液和B液构成；具有稳定性高、特异性优异，保存期限长，制备工艺简单，灵敏度较高，检测阿维菌素的准确性较高、使用简单的优点。

CN 104280557 B

1.一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒，其特征在于，包括免疫原、包被原、单克隆抗体、酶标二抗、TMB底物显色液；其中免疫原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为24:1；包被原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为21:1；单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG_1，分子量为165.7KDa，染色体数目为89～94条，亲和常数为$1.80\times10^{10}M^{-1}$；TMB底物显色液由A液和B液构成，A液将过氧化氢用蒸馏水按1:10000倍稀释成的过氧化氢缓冲液，B液是将四甲基联苯胺(TMB)200mg，溶于体积为100mI、摩尔浓度为100mmoI/L、pH为5.0的柠檬酸一磷酸盐缓冲液中，获得的溶液；

制备方法，包括以下步骤：

(1)免疫原制备：将阿维菌素和牛血清蛋白按照重量比为24:1结合后偶联获得，待用；

(2)包被原制备：将阿维菌素和牛血清蛋白按照重量比为21:1结合后偶联获得，待用；

(3)单克隆抗体制备：取步骤(1)获得的免疫原免疫雌性BALB/c小鼠，该小鼠为8-12周龄；具体的免疫方法为：首免时，每只小鼠用100μg的AVM-BSA与等量FCA混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射；再进行二次免疫时，每只小鼠用100μg的AVM-BSA与等量FICA混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射；三次免疫和四次免疫均按照二次免疫的方法和药剂量进行；每次免疫间隔时间为2周；在四次免疫后三天内，每只小鼠每天腹腔注入50μg AVM-BSA进行加强免疫，连续加强免疫3天后，待第三天加强免疫结束后，在无菌环境下，取小鼠的脾细胞与SP2/0细胞按照比例个数为10:1融合，其中融合剂为50％的PEG2000，融合作用时间为2min后，在5min时间，加入25mI无血清的DMEM营养液；再将其置于离心机中，采用转速为1000-2000r/min的离心处理30-40s后，再用20mI无血清的DMEM营养液混合均匀，获得混合液；再取两块96孔细胞培养板，每孔注入混合液100μI，进行常规方法的细胞培养，待细胞长至孔底的1/2～1/3时，用ELISA方法筛选出阳性细胞，并将阳性细胞进行扩大培养，并采用无限稀释法进行亚克隆3次，即可获得阳性率达到100％的稳定的细胞株；再将BALB/C小鼠，其中小鼠为8周龄，腹腔注入灭菌石蜡油，注入量为0.5mI/只，培养7天后，再取阳性率达到100％的稳定的细胞株注入腹腔内，每只注入1×10^6个，继续培养10天后抽取腹水，每只小鼠抽取腹水2～3mI；并将腹水混合后置于离心分离机中，采用1000-2000r/min的离心速度离心，去除脂肪层和细胞层后，获得离心残留液，再采用占离心残留液0.1-0.3倍的饱和硫酸铵加入其中进行纯化处理，最后分装冻存即可获得单克隆抗体，待用；

(4)底物显色液制备：将过氧化氢用蒸馏水按1:10000倍稀释成过氧化氢缓冲液作为A液后，盛装待用；将四甲基联苯胺(TMB)200mg，溶于体积为100mI、摩尔浓度为100mmoI/L、pH为5.0的柠檬酸一磷酸盐缓冲液中，获得B液盛装待用；再在使用时，将A液和B液依次加入试剂盒中，即可获得底物显色液；

(5)试剂盒制备：根据间接竞争ELISA试剂盒的原理，在微孔条上预包被上包被原，再向其中加入单克隆抗体，再加入酶标二抗后，采用TMB底物显色液，即可获得试剂盒。

2.如权利要求1所述的检测阿维菌素酶联免疫试剂盒对阿维菌素检测的方法，其特征在于，取样品液与包被原进行混合，再与单克隆抗体溶液按照体积比为20:80混合后，待其反应30-60min后，调整温度为35-38℃后，再向其中加入酶标二抗，反应30min后，再恒温加入TMB底物显色液，待其反应15min后，再将其与间接竞争ELISA试剂盒的标准曲线进行对比，即可获得阿维菌素的含量。

3.如权利要求2所述的检测阿维菌素酶联免疫试剂盒对阿维菌素检测的方法，其特征

在于，所述的包被原的稀释倍数为1:3000，采用蒸馏水稀释。

4.如权利要求2所述的检测阿维菌素酶联免疫试剂盒对阿维菌素检测的方法，其特征在于，所述的酶标二抗的稀释倍数为1:1000，采用蒸馏水稀释。

5.如权利要求2所述的检测阿维菌素酶联免疫试剂盒对阿维菌素检测的方法，其特征在于，所述的单克隆抗体的稀释倍数为1:40000，采用蒸馏水稀释。

一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒及其制备方法和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及阿维菌素检测技术领域，尤其是一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒及其制备方法和检测方法。

背景技术

[0002] 阿维菌素类药物属大环内酯类抗生素，商品化的阿维菌素为八个化学结构十分相近的化合物种，活性最强的两个同体系的混合物，阿维菌素的二氢还原产物为伊维菌素，为另一种重要的抗寄生虫药。阿维菌素对绝大多数由重要经济价值的寄生线虫和节肢动物均有很强的抑杀作用，其杀虫活性和杀虫谱都堪称划时代的，且作用机制独特，使用方便，被誉为近十几年来抗寄生虫药物研究的重大突破。目前，阿维菌素类药物开始大规模的生产和推广应用。

[0003] 但是，阿维菌素药物的过量使用使其在动物源性食品和植物源性食品中的残留度较高，进而使得人体产生抗药性，给人体疾病治疗造成一定的危害。因此，再现阶段，对于食品中的阿维菌素的检测成为健康饮食中的必要环节。

[0004] 在现有技术中，对于阿维菌素的检测已经做出了大量的研究，包括有检测阿维菌素的试剂盒、试剂盒的制备方法以及采用试剂盒进行检测阿维菌素的方法。但是，在现有技术中，普遍采用的阿维菌素的检测方法有：薄层色谱法(TLC)，气相色谱法(GC)，高效液相色谱法(HPLC)，气-质联机(GC/MS)，液-质联机(HPLC/MS)，毛细管电泳(CE)等。用上述方法检测存在着仪器设备复杂、样本前处理和测定操作烦琐的缺陷，不适合现场监控和大量样本筛查，而且费用高昂，使其推广使用受到限制。

[0005] 为此，有研究人员做出了酶联免疫法研究，采用免疫技术来对阿维菌素进行检测；如专利号为CN200510086770.3的《检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒及方法》公开了含有：包被羊抗鼠抗抗体的酶标板，酶标抗原，阿维菌素类药物抗体，依维菌素标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩稀释液的试剂盒；并且公开了一种采用含有上述组分的试剂盒通过以下步骤：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；又如专利号为CN201110226900.4的《检测阿维菌素类药物的磁颗粒化学发光试剂盒及其应用》公开了包括的试剂有：发光标记物、荧光素标记物、标准品、质控品、分离试剂；发光标记物是异鲁米诺发光标记物标记的阿维菌素类药物半抗原，荧光标记物是指荧光素或其衍生物标记的阿维菌素类药物单克隆抗体，分离试剂是指包被有羊抗FITC单克隆抗体的顺磁性纳米微珠，以及上述试剂盒对阿维菌素的检测方法。

[0006] 由此可见，酶联免疫法在对阿维菌素的检测上已经得到了较大程度的应用，也使得低浓度的阿维菌素药物能够从食物中被检测出来，进而确保食品的安全性；但是，尽管如此，上述现有技术中的酶联免疫法依然不能够较为理想对食品中的阿维菌素进行检测，并且公开的也都是肉食品领域的检测，使得对食品中的阿维菌素的含量的检测结果不准确，因此给人类生活带来了威胁；这主要原因是，现有技术中的酶联免疫法检测阿维菌素的灵敏度以及试剂盒的特异性较高；进而不能够检测出其中的阿维菌素的含量，而是检测出了

食品中阿维菌素还原产物以及其他类似的菌素。

[0007] 于是，本研究人员经过长期的研究与探索，为食品中检测阿维菌素药物的含量，进而降低饮食风险提供了一种新型酶联免疫试剂盒以及酶联免疫检测法，为促进健康饮食提供了一定的保障。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种检测阿维菌素用酶联免疫试剂盒。

[0009] 本发明的第二个目的是提供一种制备检测阿维菌素用酶联免疫试剂盒的方法。

[0010] 本发明的第三个目的是提供一种采用酶联免疫试剂盒检测阿维菌素的方法。

[0011] 具体的酶联免疫试剂盒的技术方案是：

[0012] 一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒，包括免疫原、包被原、单克隆抗体、酶标二抗、TMB底物显色液；其中免疫原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为24:1；包被原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为21:1；单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG1，分子量为165.7KDa，染色体数目为89～94条，亲和常数为1.80×1010M-1；TMB底物显色液由A液和B液构成，A液将过氧化氢用蒸馏水按1:10000倍稀释成的过氧化氢缓冲液，B液是将四甲基联苯胺(TMB)200mg，溶于体积为100mI、摩尔浓度为100mmoI/L、pH为5.0的柠檬酸－磷酸盐缓冲液中，获得的溶液。

[0013] 该检测阿维菌素酶联免疫试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0014] (1)免疫原制备：将阿维菌素和牛血清蛋白按照重量比为24:1结合后偶联获得，待用；

[0015] (2)包被原制备：将阿维菌素和牛血清蛋白按照重量比为21:1结合后偶联获得，待用；

[0016] (3)单克隆抗体制备：取步骤1)获得的免疫原免疫雌性BALB/c小鼠，该小鼠为8-12周龄；具体的免疫方法为：首免时，每只小鼠用100μg的AVM-BSA与等量FCA混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射；再进行二次免疫时，每只小鼠用100μg的AVM-BSA与等量FICA混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射；三次免疫和四次免疫均按照二次免疫的方法和药剂量进行；每次免疫间隔时间为2周；在四次免疫后三天内，每只小鼠每天腹腔注入50μg AVM-BSA进行加强免疫，连续加强免疫3天后，待第三天加强免疫结束后，在无菌环境下，取小鼠的脾细胞与SP2/0细胞按照比例个数为10:1融合，其中融合剂为50％的PEG2000，融合作用时间为2min后，在5min时间，加入25mI无血清的DMEM营养液；再将其置于离心机中，采用转速为1000-2000r/min的离心处理30-40s后，再用20mI无血清的DMEM营养液混合均匀，获得混合液；再取两块96孔细胞培养板，每孔注入混合液100μI，进行常规方法的细胞培养，待细胞长至孔底的1/2～1/3时，用ELISA方法筛选出阳性细胞，并将阳性细胞进行扩大培养，并采用无限稀释法进行亚克隆3次，即可获得阳性率达到100％的稳定的细胞株；再将BALB/C小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油，注入量为0.5mI/只，培养7天后，再取阳性率达到100％的稳定的细胞株注入腹腔内，每只注入1×106个，继续培养10天后抽取腹水，每只小鼠抽取腹水2～3mI；并将腹水混合后置于离心分离机中，采用1000-2000r/min的离心速度离心，去除脂肪层和细胞层后，获得离心残留液，再采用占离心残留液0.1-0.3倍的饱和硫酸铵加入其中进行纯化处理，最后分装冻存即可获得单克隆抗体，待用；

[0017] (4)底物显色液制备:将过氧化氢用蒸馏水按1:10000倍稀释成过氧化氢缓冲液作为A液后,盛装待用;将四甲基联苯胺(TMB)200mg,溶于体积为100mI、摩尔浓度为100mmoI/L、pH为5.0的柠檬酸一磷酸盐缓冲液中,获得B液盛装待用;再在使用时,将A液和B液依次加入试剂盒中,即可获得底物显色液;

[0018] (5)试剂盒制备:根据间接竞争ELISA试剂盒的原理,在微孔条上预包被上包被原,再向其中加入单克隆抗体,再加入酶标二抗后,采用TMB底物显色液,即可获得试剂盒。

[0019] 该检测阿维菌素酶联免疫试剂盒对阿维菌素检测的方法,取样品液与包被原进行混合,再与单克隆抗体溶液按照体积比为20:80混合后,待其反应30-60min后,调整温度为35-38℃后,再向其中加入酶标二抗,反应30min后,再恒温加入TMB底物显色液,待其反应15min后,再将其与间接竞争ELISA试剂盒的标准曲线进行对比,即可获得阿维菌素的含量。

[0020] 所述的包被原,其稀释倍数为1:3000,采用蒸馏水稀释。

[0021] 所述的酶标二抗,其稀释倍数为1:1000,采用蒸馏水稀释。

[0022] 所述的单克隆抗体,其稀释倍数为1::40000,采用蒸馏水稀释。

[0023] 本发明在进行单克隆抗体的制备过程中,采用了现有技术中,将单克隆抗体经过琼脂扩散沉淀试验、间接ELISA检测、染色体计数和SDS-PAGE电泳检测,进而表明该单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG_1,分子量为165.7KDa,染色体数目为89～94条,亲和常数为$1.80\times1010M^{-1}$。

[0024] 并根据阿维菌素类药物为小分子药物,并且为半抗原,需要与大分子偶联才具有免疫原性,以此为基础将阿维菌素与牛血清蛋白进行偶联获得免疫原和包被原,再将免疫原作为小鼠免疫原剂皮下多点注入小鼠体内,并经过四次免疫和三天的加强免疫,进而获得一定的细胞液,并将细胞液进行融合离心后,再经过筛选培养获得阳性细胞,并将阳性细胞扩大培养,再将阳性细胞注入小鼠体内进行抗体培养,进而获得单克隆抗体;并且在底物显色液中,还将A液与B液单独配制,单独储存,最后依次加入检测试剂液中,进而达到显色的目的,并根据显色结果与标准曲线对比,获得阿维菌素浓度含量。

[0025] 本发明通过对零标准的吸光度值、IC50抑制浓度的比较来摸索这几种稀释液在本试剂盒中的具体配方。在筛选其中任何一种稀释液的试验中,其余的均以A组做对照,以最终选定每种稀释液中较为理想的一种来进行综合试验评定。本试验中所用抗原、抗体、酶标二抗浓度分别为:3000、40000、1000,测定结果见表1:

[0026] 表1:

[0027]

分类	不同的稀释液、缓冲液对比					
包被液	A（碳缓）		B（磷缓）		C（柠缓）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	1.668	2.8	1.238	4.3	0.872	5.4
封闭液	A(缓冲液＋血清)		B（缓冲液＋血清＋蛋白）		C(缓冲液＋血清＋蛋白＋防)	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	0.956	3.9	1.126	4.0	1.729	2.9
抗体稀释液	A（PBS）		B（PBS+保）		C（PBS＋保+稳）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	1.156	4.2	1.360	1.9	1.715	2.4
酶标二抗稀释液	A（PBS1）		B(PBS1＋保）		C（PBS1+保+稳）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	0.902	3.8	1.242	2.7	1.550	2.3
底物显色液	A（中等浓度）		B（高浓度）		C（低浓度）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	1.356	1.8	2.389	4.4	1.654	2.6

[0028] 由表1可知，在包被液的选定中，用碳缓包被吸光度值、IC50均较好，可纳入试剂盒调试试验中；封闭液配方C中加有血清、蛋白、防腐剂得到的OD值和IC50均较好；抗体稀释液和酶标二抗稀释液我们均用了含有保护剂和稳定剂的抗体稀释液C和酶标二抗稀释液C，发现两种稀释液中加入保护剂和稳定剂后对延长保存时间有很大作用；底物液浓度低导致最大吸光度值很低不利于试剂盒的长期保存，底物液浓度越高本底相对较高，综合较好的方案组进行评定试验。

[0029] 结合表1数据，再进一步的确定各个原料中的技术参数，详见表2：

[0030] 表2

[0031]

综合试验	包被液	封闭液	抗体稀释液	酶标二抗稀释液	底物显色液	结果	
						OD 值	IC_{50}

[0032]

碳缓	C	C	C	中等浓度	1.703	2.7

[0033] 从表2可以看出，试剂盒的吸光度值、IC50抑制浓度均达到了较好水平，因此确定综合试验中的碳酸盐缓冲液为制备包被有偶联抗原酶联板的包被液，封闭液C为制备包被有偶联抗原酶联板的封闭液，抗体稀释液C为试剂盒中阿维菌素类药物特异性抗体的稀释液，酶标二抗稀释液C为试剂盒中酶标记物稀释液，底物显色液为中等浓度溶液。

[0034] 不仅如此，本发明还通过大量的实验，一步一步确定包被原、单克隆抗体、酶标二抗、底物显色液的具体浓度参数，具体的实验见下述阐述：

[0035] 包被原浓度确定：

[0036] 通过对其IC50抑制浓度、添加样品回收率和最大吸光度值的比较确定AVM-OVA的包被浓度。抗体和酶标记物的浓度分别为40000、1000比较结果见表3。

[0037] 表3：

[0038]

抗原浓度	IC_{50}（μg/L）	10μg/kg 鸡肉添加回收率（%）	最大吸光度值
500	–	–	2.647
1000	4.0	85.5	2.015
3000	2.5	90.2	1.602
6000	2.3	78.4	1.020

[0039] “–”曲线扭曲变形，不能计算

[0040] 由表3中可见，随着包被浓度的降低，曲线的IC50值也在下降(即灵敏度在提高)，AVM-OVA包被抗原3000倍稀释时，试剂盒IC50和最大吸光度值等技术指标均较好，6000倍稀释时试剂盒的吸光度值较低，因此选择3000倍的AVM-OVA稀释浓度进行包被。

[0041] 包被原加入条件确定：

[0042] 用包被液将AVM-OVA稀释至最适工作浓度，每孔100μI，分成3组。第一组：37℃温育1小时；第二组：37℃温育2小时；第三组：25℃温育2小时。结果见表4，综合3组数据结果，选择最大吸光值较大，IC50较低，添加回收率较高的包被条件作为试剂盒的包被条件；37℃温育2小时最大吸光值和IC50都比较好。具体实验结果见表4所示：

[0043] 表4：

[0044]

包被条件	IC_{50}（μg/L）	10μg/kg 鸡肉添加回收率%	最大吸光度值
37℃温育 1 小时	4.0	80.1	1.420
37℃温育 2 小时	2.6	79.4	1.806
25℃温育 2 小时	2.0	69.2	1.230

[0045] 单克隆抗体和酶标二抗浓度的确定：

[0046] 具体的实验结果为表5所示：

[0047]

单抗：酶标二抗	IC_{50}（μg/L）	最大吸光度值	10μg/kg 鸡肉添加样品回收率%	阴性鸡肉样品（μg/kg）
1×10^3:500	–	2.842	–	–
1×10^3:1000	–	2.761	–	–
1×10^3:2000	–	2.690	–	–
1×10^4:500	8.6	2.730	115.6	3.6
1×10^4:1000	7.8	2.523	108.7	3.1
1×10^4:2000	7.0	2.373	98.3	1.3
4×10^4:500	3.7	2.270	78.9	1.5
4×10^4:1000	2.6	1.826	80.2	0.9
4×10^4:2000	3.1	1.201	90.0	1.1
8×10^4:500	2.1	1.448	78.5	0.0

[0048]

8×10^4:1000	4.6	0.724	61.8	0.6
8×10^4:2000	7.5	0.336	50.2	1.0

[0049] 备注：带“—”的是因曲线扭曲变形，无法用于计算。

[0050] 以上结果表明，抗体浓度为1×103时标准曲线扭曲变形相关参数无法计算，可以看出抗体浓度在4×104:1000倍稀释时，最大吸光值、回收率和50%抑制浓度均处于最佳状态。

[0051] 样品液与单抗溶液体积比的确定，其结果见表6所示：

[0052] 表6：

[0053]

体积配比（μl）	IC_{50}（μg/L）	阴性鸡肉（μg/kg）	10μg/kg 添加鸡肉样品回收率%	最大吸光度值
20:80	2.6	0.0	86.3	1.750
50:50	2.0	0.0	74.3	1.062

[0054] 从表6看出，结果表明，样品液与单抗溶液体积比为20:80时，灵敏度、最大吸光度值及回收率数值均较好；而样品液与单抗溶液体积比为50:50时，测定结果最大吸光度值偏低。此确定样品液与单抗溶液体积比为20:80为最佳。

[0055] 单抗反应时间的确定，

[0056] 加入标准品溶液和单抗溶液后分别作用15分钟，30分钟，60分钟，结果见表7。

[0057] 表7：

[0058]

时间(分钟)	IC_{50} (μg/L)	空白鸡肉 (μg/kg)	鸡肉(10μg/kg) 回收率%	最大吸光度值 (OD 值)
15	3.8	0.0	66.3	0.763
30	1.9	0.8	86.0	1.682
60	3.3	1.0	78.4	2.214

[0059] 由表7所示,样品与单抗反应时间为15分钟,再加入酶标二抗,吸光值较低,易出现样品测定结果不准确现象。加入单抗溶液,反应30分钟,使样品中的阿维菌素类残留物能充分与酶标板上阿维菌素竞争结合抗体的有效位点,再加入酶标二抗,可以提高反应的灵敏度并且最大吸光度值也比较好。加入单抗溶液,反应60分钟,最大吸光度值高。

[0060] 反应时间的确定:

[0061] 37℃反应条件下,加入酶标二抗后,反应30分钟,10分钟,5分钟,结果见表8。

[0062] 表8:

[0063]

时间 (min)	最大吸光度值	10μg/kg 鸡肉添加回收率%	IC_{50} (μg/L)
0	0.352	38.2	8.5
15	0.935	66.8	3.0
30	1.742	86.9	2.8

[0064] 表8结果显示,加入酶标二抗工作液反应0、15分钟,最大吸光度值较低,反应30分钟最大吸光度值和IC50值均较好。

[0065] 底物显色时间的确定

[0066] 加入底物溶液后,37℃条件下显色5分钟,15分钟和30分钟。结果见表9。

[0067] 表9:

[0068]

时间 (min)	最大吸光度值	10μg/kg 鸡肉添加回收率%	IC_{50} (μg/L)
5	0.826	92.5	5.1
15	1.553	84.3	1.8
30	2.341	84.0	3.2

[0069] 由表9结果所示:底物显色液显色时间若较短(5min),则吸光度值较低,对加终止液的时间要求更短,否则会出现由于操作时差而引起的测定值与真实值之间的误差。显色15min,吸光度值较好,显色30min,最大吸光度值偏大,因此综上所述终止时间选择15min。

[0070] 综合上述的实验步骤以及实验得出的结果,将试剂盒的具体原料以及各原料之间的浓度和在进行检测时的处理时间以及其他理化条件进行实验,得出:酶联免疫检测试剂盒的基本操作模式:以AVM-OVA作为包被原,包被抗原稀释倍数为1:3000,抗体最佳稀释倍数为1:40000,酶结合物的浓度为1:1000,样品与抗体以20μl:80μl的体积加入,反应30分钟后加入酶结合物,再反应30分钟,加入底物液15分钟后终止反应。

[0071] 与现有技术相比，本发明的技术效果体现在：

[0072] ①本发明的酶联免疫试剂盒具有稳定性高、特异性优异，保存期限长，使用简单的优点。

[0073] ②本发明的酶联免疫试剂盒还具有制备工艺简单，灵敏度较高，检测阿维菌素的准确性较高的特征。

具体实施方式

[0074] 下面结合具体的实施方式来对本发明的技术方案做进一步的限定，但要求保护的范围不仅局限于所作的描述。

[0075] 实施例1

[0076] 一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0077] (1)免疫原制备：将阿维菌素和牛血清蛋白按照重量比为24:1结合后偶联获得，待用；

[0078] (2)包被原制备：将阿维菌素和牛血清蛋白按照重量比为21:1结合后偶联获得，待用；

[0079] (3)单克隆抗体制备：取步骤1)获得的免疫原免疫雌性BALB/c小鼠，该小鼠为8-12周龄；具体的免疫方法为：首免时，每只小鼠用100μg的AVM-BSA与等量FCA混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射；再进行二次免疫时，每只小鼠用100μg的AVM-BSA与等量FICA混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射；三次免疫和四次免疫均按照二次免疫的方法和药剂量进行；每次免疫间隔时间为2周；在四次免疫后三天内，每只小鼠每天腹腔注入50μg AVM-BSA进行加强免疫，连续加强免疫3天后，待第三天加强免疫结束后，在无菌环境下，取小鼠的脾细胞与SP2/0细胞按照比例个数为10:1融合，其中融合剂为50％的PEG2000，融合作用时间为2min后，在5min时间，加入25mI无血清的DMEM营养液；再将其置于离心机中，采用转速为1000-2000r/min的离心处理30-40s后，再用20mI无血清的DMEM营养液混合均匀，获得混合液；再取两块96孔细胞培养板，每孔注入混合液100μI，进行常规方法的细胞培养，待细胞长至孔底的1/2～1/3时，用ELISA方法筛选出阳性细胞，并将阳性细胞进行扩大培养，并采用无限稀释法进行亚克隆3次，即可获得阳性率达到100％的稳定的细胞株；再将BALB/C小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油，注入量为0.5mI/只，培养7天后，再取阳性率达到100％的稳定的细胞株注入腹腔内，每只注入1×106个，继续培养10天后抽取腹水，每只小鼠抽取腹水2～3mI；并将腹水混合后置于离心分离机中，采用1000-2000r/min的离心速度离心，去除脂肪层和细胞层后，获得离心残留液，再采用占离心残留液0.1-0.3倍的饱和硫酸铵加入其中进行纯化处理，最后分装冻存即可获得单克隆抗体，待用；

[0080] (4)底物显色液制备：将过氧化氢用蒸馏水按1:10000倍稀释成过氧化氢缓冲液作为A液后，盛装待用；将四甲基联苯胺(TMB)200mg，溶于体积为100mI、摩尔浓度为100mmoI/L、pH为5.0的柠檬酸一磷酸盐缓冲液中，获得B液盛装待用；再在使用时，将A液和B液依次加入试剂盒中，即可获得底物显色液；

[0081] (5)试剂盒制备：根据间接竞争ELISA试剂盒的原理，在微孔条上预包被上包被原，再向其中加入单克隆抗体，再加入酶标二抗后，采用TMB底物显色液，即可获得试剂盒。

[0082] 所述的包被原，其稀释倍数为1:3000，采用蒸馏水稀释。

[0083] 所述的酶标二抗，其稀释倍数为1:1000，采用蒸馏水稀释。

[0084] 所述的单克隆抗体，其稀释倍数为1::40000，采用蒸馏水稀释。

[0085] 实施例2

[0086] 一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒，包括免疫原、包被原、单克隆抗体、酶标二抗、TMB底物显色液；其中免疫原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为24:1；包被原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为21:1；单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG1，分子量为165.7KDa，染色体数目为89～94条，亲和常数为1.80×1010M-1；TMB底物显色液由A液和B液构成，A液将过氧化氢用蒸馏水按1:10000倍稀释成的过氧化氢缓冲液，B液是将四甲基联苯胺(TMB)200mg，溶于体积为100mI、摩尔浓度为100mmoI/L、pH为5.0的柠檬酸－磷酸盐缓冲液中，获得的溶液；

[0087] 所述的包被原，其稀释倍数为1:3000，采用蒸馏水稀释。

[0088] 所述的酶标二抗，其稀释倍数为1:1000，采用蒸馏水稀释。

[0089] 所述的单克隆抗体，其稀释倍数为1::40000，采用蒸馏水稀释。

[0090] 实施例3

[0091] 一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒对阿维菌素检测的方法，取样品液与包被原进行混合，再与单克隆抗体溶液按照体积比为20:80混合后，待其反应30-60min后，调整温度为35-38℃后，再向其中加入酶标二抗，反应30min后，再恒温加入TMB底物显色液，待其反应15min后，再将其与间接竞争ELISA试剂盒的标准曲线进行对比，即可获得阿维菌素的含量。

[0092] 所述的包被原，其稀释倍数为1:3000，采用蒸馏水稀释。

[0093] 所述的酶标二抗，其稀释倍数为1:1000，采用蒸馏水稀释。

[0094] 所述的单克隆抗体，其稀释倍数为1::40000，采用蒸馏水稀释。

[0095] 试验例：

[0096] 1试剂盒灵敏度实验

[0097] 本实验采用实施例1试剂盒按照实施例2的制备方法和实施例3检测方法对阴性鸡肉、鸡肝、白菜、土豆、干菜、虾、饲料样品进行20次检测，测定结果的平均值加上3倍标准差为试剂盒的实际样品的最低检测限，另外，分别测定20次标准曲线的IC50抑制浓度，确定该值浮动范围，结果见表10至表17。

[0098] 表10 空白鸡肉测定结果统计表 μg/kg

[0099]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.0	0.0	0.8	0.0	0.2	0.0	1.0	1.2
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.0	0.5	0.0	0.0	0.3	0.4	1.6	

[0100] 表11 空白鸡肝测定结果统计表 μg/kg

[0101]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	1.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.2	0.6	0.0
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.8	0.6
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	1.3	0.0	0.8	0.0	0.4	0.5	1.8	

[0102] 表12 空白白菜测定结果统计表 μg/kg

[0103]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8

[0104]

测定值	1.5	0.0	1.0	0.6	0.8	0.0	1.0	0.3
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	1.4	0.0	0.0	0.6	0.8	1.0	1.2
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.0	0.9	1.0	0.0	0.6	0.5	2.2	

[0105] 表13 空白土豆测定结果统计表 μg/kg

[0106]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.9	0.0	0.0	0.6	1.0	0.0	0.0	1.2
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	1.2
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.0	1.0	0.0	0.8	0.5	0.6	2.3	

[0107] 表14 空白干菜测定结果统计表 μg/kg

[0108]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.0	0.7	0.0	0.0	0.5	1.7	2.0	0.0
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	0.0	0.0	0.8	2.0	0.0	1.3	0.0
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.9	0.7	0.0	0.0	0.5	0.7	2.7	

[0109] 表15 空白虾测定结果统计表 μg/kg

[0110]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.0	0.6	1.0	0.8	0.0	0.0	0.0	1.1
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.4	0.6
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.8	0.0	0.7	0.0	0.4	0.4	1.7	

[0111] 表16 空白饲料测定结果统计表 μg/kg

[0112]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8

[0113]

测定值	0.5	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	0.8	0.0	0.6	0.0	1.3	0.0	0.0
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	1.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	1.6	

[0114] 表17 IC50统计表 μg/kg

[0115]

次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
IC_{50}	2.6	1.8	2.9	2.4	2.3	2.4	1.9	2.0	2.2	2.4	
次数	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	2.3
IC_{50}	2.0	2.6	2.5	2.2	1.8	2.3	1.6	2.7	2.4	2.1	

[0116] 由表10-17的实验结果显示，可以得出，空白鸡肉样品的最低检测限为1.6μg/kg，空白鸡肝样品的最低检测限为1.8μg/kg，空白白菜样品的最低检测限为2.2μg/kg，空白土豆样品的最低检测限为2.3μg/kg，空白干菜样品的最低检测限为2.7μg/kg，空白虾样品的最低检测限为1.7μg/kg，空白饲料样品的最低检测限为1.6μg/kg。IC50平均值为2.3μg/L，浮动范围在1.6μg/L～2.9μg/L之间。

[0117] 2试剂盒特异性的测定

[0118] 特异性用交叉反应率来表示，交叉反应率是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。交叉反应率小，可证明抗体的特异性高。

[0119] 选择与阿维菌素类似结构和类似功能的4种药物，将不同浓度的阿维菌素类似物，替代阿维菌素标准溶液，测定其标准曲线，并计算IC50抑制浓度，计算交叉反应率。

[0120] $$交叉反应率（\%）=\frac{引起50\%阿维菌素浓度}{引起50\%阿维菌素类药物浓度}\times 100\%$$

[0121] 具体的检测结果见表18所示：

[0122]

药物名称	交叉反应率（%）
阿维菌素	100.0
伊维菌素	33
埃比菌素	130
多拉菌素	<10

[0123] 由表18的数据显示，阿维菌素组的特异性较低。

[0124] 3试剂盒精密度和准确度的测定

[0125] 精密度又称可重复性，反应测定方法对某一特定样品多次测定所得结果的重复程度，这是评定酶联免疫试剂盒(ELISA)质量最基本的参数。

[0126] 准确度是指测定值与真值间的符合程度，试剂盒的准确度常用回收率表示。

[0127] 3.1可重复性试验

[0128] 以实施例1、实施例2、实施例3的试剂盒、试剂盒制备方法以及检测的方法作为原材料和操作方法，并将得出的结果从每块酶联板中，各随机抽出20个微孔，测定4.5μg/L标准溶液的吸光度值(OD值)，计算变异系数。用该方法考察板内精密度。从三批中各取10个试剂盒，测定结果见表19。

[0129] 表19：

[0130]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	I080511B01批	3.9	4.5	2.9	5.8	6.9	7.4	8.0	6.1	4.8	5.0
	I080524B02批	5.8	4.3	9.0	7.6	6.8	4.5	3.9	6.0	4.4	3.2
	I080605B03批	8.3	7.6	4.9	5.2	3.7	4.9	6.4	3.5	6.2	4.8

[0131] 由表19显示的数据结果可以看出，三批试剂盒10次标准变异系数测定范围在2.9%～9.0%之间，因此确定精密度的变异系数范围为≤10%。

[0132] 3.2精密度和准确度的试验

[0133] 取空白鸡肉、鸡肝、白菜、土豆、干菜、虾、饲料样品以5μg/kg、10μg/kg和20μg/kg阿维菌素、埃普菌素，以15μg/kg、30μg/kg和60μg/kg伊维菌素进行添加，每种样品、每个浓度各4个平行，用试剂盒提供的操作方法提取测定。抽取三批试剂盒，每批试剂盒测定同一份样品3次，分别计算测定样品的回收率、批内、批间变异系数，结果见表20～表22。

[0134] 表20 阿维菌素准确度和精密度

[0135]

样品	添加浓度	1批			2批			3批			批间CV%
		平均值	回收率%	CV%	平均值	回收率%	CV%	平均值	回收率%	CV%	
鸡肉μg/kg	5	4.6	92.6	9.5	4.1	81.4	8.5	3.4	68.5	13.1	14.2
	10	8.5	84.5	10.6	6.9	69.0	10.2	7.1	70.9	10.5	11.0
	20	15.2	75.8	8.5	15.1	75.3	11.6	16.8	84.2	11.6	10.9
鸡肝μg/kg	5	3.5	70.2	7.9	4.1	82.8	10.8	4.5	90.5	5.9	9.4
	10	6.8	68.4	11.6	9.3	92.7	9.5	8.6	86.4	7.4	11.9
	20	16.1	80.3	12.3	12.9	64.6	11.7	15.6	78.2	10.5	13.6
白菜μg/kg	5	3.7	74.3	10.2	4.2	83.5	13.0	4.5	90.6	11.8	13.5
	10	6.9	68.9	10.6	8.9	89.4	10.2	8.0	80.3	12.3	13.5
	20	18.3	91.4	12.5	15.3	76.5	11.5	18.4	92.0	10.5	14.7
土豆μg/kg	5	4.2	83.5	12.2	4.4	88.4	9.6	4.4	88.5	11.7	13.5
	10	6.4	64.3	6.7	9.0	90.3	10.7	8.4	83.6	12.0	15.6
	20	16.5	82.5	11.9	16.6	83.0	6.5	14.8	74.0	11.6	14.2
干菜μg/kg	5	3.5	70.5	12.0	4.0	79.5	8.7	3.4	68.0	13.0	10.8
	10	8.0	80.0	6.4	6.6	66.2	11.9	8.2	81.6	10.7	11.0
	20	16.7	83.4	9.7	15.2	76.0	10.4	13.7	68.4	11.9	12.8

[0136]

虾 μg/kg	5	3.6	72.1	11.4	4.0	79.3	12.4	3.3	66.3	12.4	13.6
	10	6.6	65.8	12.5	8.2	81.7	9.0	8.6	86.4	9.5	9.8
	20	16.4	82.0	10.3	17.9	89.4	11.6	17.6	88.1	11.6	11.4
饲料 μg/kg	5	3.4	67.8	11.4	4.6	92.8	12.2	4.3	85.0	12.0	12.2
	10	8.2	82.3	9.8	6.9	69.2	10.4	6.4	64.2	8.9	10.2
	20	13.4	67.0	11.0	14.0	70.0	10.5	17.1	85.5	11.6	12.7

[0137] 表21 埃比菌素准确度和精密度

[0138]

样品	添加浓度	1批			2批			3批			批间
		平均值	回收率%	CV%	平均值	回收率%	CV%	平均值	回收率%	CV%	CV%
鸡肉 μg/kg	5	4.6	92.0	9.5	3.9	77.6	11.8	4.0	80.0	12.6	13.2
	10	8.6	85.6	8.6	8.3	82.8	10.2	8.0	79.5	8.5	9.8
	20	15.7	78.4	10.2	17.0	85.0	9.4	16.7	83.5	12.4	13.0
鸡肝 μg/kg	5	4.3	86.3	11.3	4.1	81.6	11.6	3.9	77.4	10.5	12.4
	10	7.2	72.0	8.1	7.6	75.9	10.7	8.2	81.7	8.7	10.1
	20	16.3	81.5	7.5	14.6	72.8	13.6	18.0	90.2	6.2	14.7
白菜 μg/kg	5	3.4	67.0	12.5	3.2	64.5	11.8	3.6	71.6	11.5	13.6
	10	8.0	80.3	6.9	7.7	76.5	9.4	8.5	85.2	6.7	10.2
	20	17.3	86.4	5.8	13.6	68.0	9.5	18.2	91.0	10.5	13.8
土豆 μg/kg	5	4.6	92.5	10.2	4.5	90.0	11.6	3.9	77.5	13.0	16.7
	10	7.9	78.5	11.6	7.8	78.3	10.0	7.7	76.8	12.0	14.1
	20	13.2	66.2	13.0	14.3	71.5	12.8	16.1	80.5	10.4	15.8
干菜 μg/kg	5	4.2	83.5	10.2	3.9	77.4	9.1	4.3	86.3	12.4	16.0
	10	7.8	78.4	9.8	6.9	69.0	6.7	8.2	81.7	11.6	15.0
	20	16.2	80.9	9.0	17.0	84.8	10.5	15.4	76.8	9.5	11.7
虾 μg/kg	5	4.2	84.6	10.7	4.0	79.0	4.9	4.1	81.4	8.1	9.7
	10	8.0	80.2	12.2	8.3	83.0	12.6	8.1	80.5	11.7	13.4
	20	13.4	67.2	13.0	12.9	64.7	10.5	13.6	68.0	12.5	14.9
饲料	5	4.3	86.5	10.7	3.8	75.2	9.8	4.3	85.6	10.3	11.7
[0139] μg/kg	10	9.0	90.2	9.6	7.8	78.4	11.3	7.2	72.4	9.0	9.5
	20	16.9	84.5	8.1	17.3	86.4	12.9	16.0	80.0	10.4	13.2

[0140] 表22 伊维菌素准确度和精密度

[0141]

样品	添加浓度	1批			2批			3批			批间CV%
		平均值	回收率%	CV%	平均值	回收率%	CV%	平均值	回收率%	CV%	
鸡肉 μg/kg	15	12.7	84.5	12.5	11.3	75.0	10.8	12.8	85.0	7.7	
	30	27.1	90.2	10.1	20.9	69.8	9.6	22.8	75.9	12.4	
	60	40.5	67.5	5.7	46.4	77.4	11.7	41.1	68.5	6.7	
鸡肝 μg/kg	15	12.3	82.3	11.2	12.0	80.2	10.4	11.2	74.5	13.0	15.0
	30	22.8	75.9	10.6	20.6	68.5	13.0	19.9	66.3	10.5	14.2
	60	41.1	68.5	8.9	43.7	72.8	9.8	53.0	88.4	11.7	12.3
白菜 μg/kg	15	13.5	90.0	7.6	11.7	77.9	10.4	12.2	81.0	5.9	13.9
	30	23.9	79.6	10.8	24.6	82.0	11.8	22.4	74.5	12.3	15.3
	60	49.6	82.7	11.7	45.7	76.2	8.5	41.1	68.5	6.8	10.4
土豆 μg/kg	15	12.6	84.3	12.6	11.4	75.8	12.1	12.6	84.1	8.4	12.9
	30	23.9	79.5	9.7	20.4	68.0	13.2	23.8	79.3	10.3	14.0
	60	48.1	80.2	11.3	43.0	71.6	6.9	46.3	77.1	12.4	11.7
干菜 μg/kg	15	12.5	83.0	12.5	10.9	72.8	10.2	12.1	80.5	10.5	12.7
	30	21.5	71.7	10.4	26.6	88.5	11.9	25.1	83.7	9.7	12.0
	60	45.5	75.8	9.7	48.2	80.4	12.4	51.8	86.4	11.3	13.2
虾 μg/kg	15	12.0	80.2	6.5	10.5	69.7	9.5	12.2	81.0	12.0	14.3
	30	25.4	84.7	11.8	23.3	77.5	11.3	24.2	80.5	10.9	12.0
	60	46.1	76.9	9.7	48.2	80.4	12.9	50.5	84.2	11.6	12.4
饲料 μg/kg	15	12.4	82.7	11.9	12.1	80.7	7.8	13.2	88.2	12.3	13.5
	30	24.9	83.0	12.7	23.8	79.3	10.5	22.4	74.6	10.7	11.9
	60	41.6	69.4	10.1	43.6	72.7	11.3	42.5	70.8	11.5	11.6

[0142] 从表20-22中显示的结果可以看出，阿维菌素在鸡肉、鸡肝、白菜、土豆、干菜、虾、饲料样品的添加平均回收率在64.2%～92.8%之间，批内、批间变异系数均小于25%；埃比菌素在鸡肉、鸡肝、白菜、土豆、干菜、虾、饲料样品中的添加平均回收率在64.5%～92.5%

之间，批内、批间变异系数均小于25%；伊维菌素在鸡肉、鸡肝、白菜、土豆、干菜、虾、饲料样品中的添加平均回收率在66.3%～90.2%之间，批内、批间变异系数均小于25%。

[0143] 4试剂盒的保存试验

[0144] (1)选三批试剂盒用于稳定性试验的测定，包括冷热稳定性测定、4℃保存性测定、批内、批间、板内、板间的测定。

[0145] ①试剂盒冷热稳定性试剂检测：随机取6盒试剂盒，分别置于37℃恒温箱中1、3、6天和-20℃1、3、6天后检测相关技术指标。

[0146] ②试剂盒4℃稳定性试验：从三批试剂盒中各抽出6个试剂盒，每盒均做4℃6个时间段(第0、1、3、6、9、12月)的保存试验。

[0147] ③冷热和4℃稳定性实验内容包括：灵敏度测定，精密度测定，内控样本的测定(阴性5份、阳性4份含阿维菌素分别为5μg/kg、10μg/kg、30μg/kg、50μg/kg)。

[0148] (2)稳定性试验具体内容

[0149] ①三批试剂盒：I080511B01批、I080524B02批、I080605B03批

[0150] ②三批试剂盒的生产数量：100盒/批

[0151] ③生产日期分别为：2008年05月12日、2008年05月26日、2008年06月08日

[0152] ④冷热稳定性实验：从I080511B01批阿维菌素类药物多残留试剂盒中随机各取出6盒，分别置于37℃恒温箱中1天、3天、6天和-20℃1天、3天、6天后测定其最大吸光度值，试剂盒IC50，标准品板内变异系数，阴阳性内控参比品，结果见表23、表24。

[0153] 表23 I080511B01批试剂盒冷热稳定性试验

[0154]

批号		保存条件	最大吸光度值	IC_{50} (μg/L)
I080511B01批	1天	37℃	1.896	2.4
		-20℃	1.982	2.3
	3天	37℃	1.393	2.3
		-20℃	1.458	1.7
	6天	37℃	0.921	2.7
		-20℃	0.846	2.9

[0155] 表24 I080511B01批试剂盒稳定性试验

[0156]

批号		保存条件	板内变异系数（CV%）	阴性内控样本 (μg/kg)	阳性内控样本回收率（%）
I080511B01批	1天	37℃	6.9	0.6	86.0~97.3
		-20℃	7.6	0.8	78.9~90.6
	3天	37℃	4.3	1.0	73.4~81.1
		-20℃	7.6	0.7	74.2~91.2
	6天	37℃	4.5	0.6	73.4~93.2
		-20℃	8.1	0.7	59.6~78.5

[0157] 冷热稳定性实验结果显示：该试剂盒在37℃经6天的保存试验，OD值有所下降，但零标准吸光度值仍在0.9以上。回收率在73.4%-97.3%；标准品板内变异系数在10%以下。

[0158] 将试剂盒在37℃保存的条件下放置6天（据唐伟国著《医学验诊断试剂的制备与应用》介绍，试剂盒在37℃每稳定一天，可相当于4～10℃保存一个半月）进行老化试验，结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。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。但在试验中发现-20℃条件下保存，不能反复冻融，这样对试剂有破坏作用。

[0159] ⑤三批试剂盒放在4℃冰箱冷藏保存。在第0、1、3、6、9、12个月时分别取出1个试剂盒，每个试剂盒做5条曲线、5个样本重复，测定其最大吸光度值、IC50抑制浓度（灵敏度）、精密度、阴性内控样本、阳性内控样本。结果见下表25、表26、表27。

[0160] 表25 I080511B01批试剂盒2-8℃稳定性试验

[0161]

01批		最大吸光度值	IC_{50}（μg/L）	阴性内控样本 μg/L	阳性内控样本回收率（%）
4℃	0月	1.989	2.4	0.9	77.4~96.4
	1月	1.645	1.9	1.0	75.1~80.6
	3月	1.321	1.8	0.8	63.4~91.1
	6月	1.132.	2.3	0.6	72.6~85.3
	9月	0.765	3.2	0.4	53.4~69.1
	12月	0.489	6.8	0.5	34.5~55.2

[0162] 表26 I080524B02批试剂盒2-8℃稳定性试验

[0163]

02 批		最大吸光度值	IC_{50}（μg/L）	阴性内控样本 μg/L	阳性内控样本回收率（%）
4℃	0 月	2.031	2.7	0.6	77.1~86.1
	1 月	1.899	2.4	0.7	65.9~84.5
	3 月	1.564	2.2	0.5	73.4~90.9
	6 月	1.211	2.3	0.9	74.2~99.3
	9 月	0.821	2.8	0.8	53.4~63.0
	12 月	0.535	5.8	0.7	24.5~56.2

[0164] 表27 I080605B03批试剂盒2-8℃稳定性试验

[0165]

[0166]

03 批		最大吸光度值	IC_{50}（μg/L）	阴性内控样本 μg/L	阳性内控样本回收率（%）
4℃	0 月	1.779	1.8	1.3	67.1~96.2
	1 月	1.456	2.0	0.7	65.1~92.6
	3 月	1.321	2.5	1.2	70.7~97.6
	6 月	1.056	2.1	1.0	76.8~94.6
	9 月	0.883	4.7	0.5	53.4~80.2
	12 月	0.522	7.2	0.1	39.5~66.1

[0167] 试剂盒保存条件为2～8℃，经过近12个月的测定，发现试剂盒从生产之日起到第九个月，各项指标均在正常范围内。到第12个月时检测结果发现0标准吸光度值在0.6以下，试剂盒灵敏度有一定程度的下降，阳性样本回收率也有下降趋势。

[0168] ⑥精密度试验

[0169] 三批盒子中，每批抽取三个试剂盒，分别测定4.5μg/L的标准浓度，重复测定10次，计算其板内、板间、批内、批间变异系数，见表28。

[0170] 表28 精密度试验结果

[0171]

	(%)	I080511B01 批	I080524B02 批	I080605B03 批
4℃	板内	9.2	4.6	5.8
	板间	11.0	10.2	9.7
	批内	12.5	10.1	11.2
	批间		13.6	

[0172] 从精密度试验结果中可以看出，该试剂盒板内、板间、批内、批间变异系数均在20％以内。符合ELISA检测要求。从上述结果中得出阿维菌素类药物多残留试剂盒在2～8℃条件下可以保存6个月。

[0173] 5与HPLC检测方法的比对

[0174] 5.1灵敏度

[0175] 用望尔试剂盒和仪器方法(农业部781号公告-5-2006动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定高效液相色谱法)分别测定了随机鸡肉样品共10份样品，结果如表29。

[0176] 表29 望尔试剂盒与仪器方法灵敏度比较 μg/kg

[0177]

ELISA	01	02	03	04	05
	–	–	–	3.5	–
	06	07	08	09	10
	–	4.8	–	–	–
HPLC	01	02	03	04	05
	–	–	–	2.9	–
	06	07	08	09	10
	–	4.2	–	–	–

[0178] 由于仪器方法的最低检测限为1μg/kg，低于1μg/kg的样品不能检出；用试剂盒方法检测鸡肉样品的最低检测限为2μg/kg，按照试剂盒最低检测限2μg/kg判定，低于2μg/kg的，表示符号为“–”，高于2μg/kg的，按照实际检测结果报告。从表可知，望尔试剂盒的准确度与仪器检测结果相同，阴阳性符合率为100％。

[0179] 5.2精密度和准确度比较

[0180] 同等条件下，分别按照高效液相色谱和自制试剂盒检测提供的方法，以5μg/kg浓度对空白鸡肉进行阿维菌素添加回收试验，比较仪器检测方法和自制试剂盒检测方法的平均回收率和变异系数。自制试剂盒检测方法中，将添加样品在3块不同酶标板上测定，做4个平行，计算变异系数。结果见表30。

[0181] 表30：

[0182]

添加浓度（μg/kg）	分类	平均回收率%（n=4）	批内变异系数(n=4) CV%	批间变异系数 (n=3) CV%
5	ELISA	76.8	11.2	12.4
		73.4	9.6	
		78.0	10.2	
	仪器	82.0	7.0	—

[0183] 由表30可见，高效液相色谱检测方法以5μg/kg浓度添加，平均回收率为82.0％，变异系数为7.0％。自制试剂盒以5μg/kg浓度添加时，平均回收率在73.4％～78.0％之间，批内、批间变异系数均小于15％，自研试剂盒适于实际样品的检测。

[0184] 在此有必要指出的是，以上实施例和试验例仅限于对本发明的技术方案作进一步的阐述和说明，本领域技术人员在此基础上做出的非突出的实质性特征和非显著进步的改进，均属于本发明的保护范畴。

专利名称(译)	一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	CN104280557B	公开(公告)日	2016-09-21
申请号	CN201410516158.4	申请日	2014-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司 北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	罗贵昆 谢体波 蒲小容 易重任 金帮明 刘天雷 何方洋		
发明人	罗贵昆 谢体波 蒲小容 易重任 金帮明 刘天雷 何方洋		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
其他公开文献	CN104280557A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及阿维菌素检测技术领域，尤其是一种检测阿维菌素酶联免疫试剂盒及其制备方法和检测方法，包括免疫原、包被原、单克隆抗体、酶标二抗、TMB底物显色液；其中免疫原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为24:1；包被原由阿维菌素与BSA偶联而得，其结合比为21:1；单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为IgG1，分子量为165.7KDa，染色体数目为89～94条，亲和常数为1.80×1010M-1；TMB底物显色液由A液和B液构成；具有稳定性高、特异性优异，保存期限长，制备工艺简单，灵敏度较高，检测阿维菌素的准确性较高、使用简单的优点。

分类	不同的稀释液、缓冲液对比					
包被液	A（碳缓）		B（磷缓）		C（柠缓）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	1.668	2.8	1.238	4.3	0.872	5.4
封闭液	A(缓冲液＋血清)		B（缓冲液＋血清＋蛋白）		C(缓冲液＋血清＋蛋白＋防)	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	0.956	3.9	1.126	4.0	1.729	2.9
抗体稀释液	A（PBS）		B（PBS+保）		C（PBS＋保+稳）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	1.156	4.2	1.360	1.9	1.715	2.4
酶标二抗稀释液	A（PBS1）		B(PBS1＋保）		C（PBS1+保+稳）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	0.902	3.8	1.242	2.7	1.550	2.3
底物显色液	A（中等浓度）		B（高浓度）		C（低浓度）	
	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}	OD 值	IC_{50}
	1.356	1.8	2.389	4.4	1.654	2.6