

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410046566.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/547 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年9月19日

[11] 授权公告号 CN 100338467C

[22] 申请日 2004.6.11

[21] 申请号 200410046566.4

[73] 专利权人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
乙8号

[72] 发明人 刘智宏 叶妮 黄耀凌 黄齐颐
郭筱华 张纯萍 郭文林

[56] 参考文献

CN1403820A 2003.3.19

CN1389729A 2003.1.8

CN1456894A 2003.11.19

酶联免疫检测试剂盒应用于牛奶中四环素
残留的测定 李利东,等,乳业科学与技术,第2
期 2004

审查员 辜学英

[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1页 说明书6页

[54] 发明名称

一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒,包括包被的四环素类药物与载体蛋白的偶联物,所述四环素类药物的特异性抗体和酶标二抗。本发明的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒,可以同时测定四环素,米诺环素,金霉素和多西环素等四环素类药物残留;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;最低检测限达 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在动物性食品四环素类药物残留检测中发挥重要作用。

1、一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的四环素类药物与载体蛋白的偶联物，蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的四环素类药物单克隆抗体或多克隆抗体，蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的酶标二抗，浓度分别为 0、3、10、30、100 和 300 μ g/L 的四环素类药物系列浓度标准溶液，四甲基联苯胺溶液，含 0.1-10%BSA 的磷酸盐缓冲液，含 0.05%吐温的磷酸盐缓冲液，柠檬酸缓冲液和终止液。

2、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述四环素类药物为四环素、土霉素、金霉素、多西环素、米诺环素、去甲金霉素或吡甲四环素。

3、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述四环素类药物单克隆抗体或多克隆抗体为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源或豚鼠源抗体。

4、根据权利要求 3 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述四环素类药物单克隆抗体为四环素类药物鼠单克隆抗体。

5、根据权利要求 3 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述四环素类药物多克隆抗体为四环素类药物兔多克隆抗体。

6、根据权利要求 1-5 任意一项所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白或血兰蛋白。

7、根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的四环素与载体蛋白的偶联物，蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的四环素单克隆抗体或多克隆抗体，蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的酶标二抗，四环素系列浓度标准溶液，四甲基联苯胺溶液，含 0.1-10%BSA 的磷酸盐缓冲液，含 0.05%吐温的磷酸盐缓冲液，柠檬酸缓冲液和终止液。

一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及酶联免疫和兽药残留检测分析技术领域中的一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒。

背景技术

四环素类药物（Tetracyclines TCs）是以四并苯为母核的一族抗生素，其中四环素、土霉素、金霉素和多西环素因其优良的抗菌性、稳定的药性及低廉的价格，常在畜禽生产中作为治疗药物和药物添加剂而广泛使用，作为商品，四环素类药物是使用最广泛的抗生素之一。四环素类药物用于防治肠道感染和促生长，在奶牛业中四环素类抗生素用来治疗乳腺炎等疾病。但四环素类药物过量使用容易诱导耐药菌株生长，并导致高药物残留，直接或间接影响消费者身体健康。我国《动物性食品中兽药最高残留限量》中规定牛奶中四环素、土霉素及金霉素单体或复合物最高残留限量为 100 $\mu\text{g/L}$ ，肌肉、肝和肾中的最高残留限量分别为 100、300 和 600 $\mu\text{g/kg}$ 。

现已报道的四环素类药物残留量的分析方法有微生物法、高效液相色谱法和高效液相色谱—串联质谱法等。四环素类药物稳定性差，对样品处理方法要求严格，回收率较低。微生物法为筛选方法，基本能达到最高残留限量的检测要求，但该方法操作繁琐费时，最快 2 天才能得出结果，而且特异性差，与其它类抗生素存在交叉反应。高效液相色谱法目前是分析四环素类药物残留量的主要方法，但需要一系列繁琐的提取和净化处理步骤，而且存在回收率低，灵敏度低，杂质干扰大等问题。高效液相色谱—串联质谱法为新研制的方法，需要昂贵的仪器设备，很难普及。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的四环素类药物与载体蛋白的偶联物，所述四环素类药物的特异性抗体和酶标二抗。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括 A，B，C，D，E，F 试剂液、G 试剂液、H 试剂液、I 试剂液、J 试剂液、K 试剂液、L 试剂液和 M 试剂液。

所述 A，B，C，D，E，F 试剂液为四环素类药物系列浓度标准溶液。

所述 G 试剂液为蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的酶标二抗。

所述 H 试剂液为蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的四环素类药物单克隆抗体或多克隆抗

体。

所述 I 试剂液为四甲基联苯胺。

所述 J 试剂液为含 0.1-10%BSA 的磷酸盐缓冲液。

所述 K 试剂液为含 0.05%吐温的磷酸盐缓冲液。

所述 L 试剂液为柠檬酸缓冲液。

所述 M 试剂液为终止液。

其中，所述四环素类药物为四环素、土霉素、金霉素、强力霉素、米诺环素、吡甲四环素或去甲金霉素。

所述四环素类药物的特异性抗体可为四环素类药物单克隆抗体或四环素类药物多克隆抗体；所述四环素类药物单克隆抗体或多克隆抗体可为鼠源、马源、猪源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述四环素类药物单克隆抗体优选为四环素类药物鼠单克隆抗体，所述四环素类药物多克隆抗体优选为四环素类药物兔多克隆抗体。

以上抗体均可用四环素类药物与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。

所述载体蛋白可为牛血清白蛋白（BSA）、人血清白蛋白（HSA）、兔血清白蛋白（RSA）、甲状腺球蛋白（TG）、卵清蛋白（OVA）或血兰蛋白（KLH）等常用载体蛋白；所述四环素类药物与载体蛋白的偶联物可采用甲醛法、联氨法、重氮化法或 EDC 法合成。

所述标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶，优选为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或高碘酸钠法交联在二抗体上；所述二抗可为抗鼠或抗兔抗抗体。

可作为固定四环素类药物与载体蛋白的偶联物的载体的物质很多，如聚苯乙烯、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。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

在优选的条件下，本发明的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的四环素与载体蛋白的偶联物，四环素的特异性抗体和酶标二抗。

本发明的检测原理为将四环素类药物与载体蛋白的偶联物作为包被原吸附于固相载体上，加入样品和四环素类药物特异性抗体，再加入酶标二抗，待测样品中残留的四环素类药物和固相载体上包被的四环素类药物与载体蛋白的偶联物竞争结合特异性抗体，显色后终止，测定样品吸光值，该值与样品中四环素类药物残留物含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出四环素类药物的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的四环素类药物标准溶液颜色的比较可判断样品的浓

度范围。

本发明的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，可以同时测定四环素，土霉素，金霉素和强力霉素等四环素类药物残留；主要采用间接竞争ELISA方法定性或定量检测动物组织(猪、鸡、牛、羊、鱼虾的肌肉组织及肝脏、肾脏等)、蜂蜜、牛奶等样品中四环素类药物的残留量；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；测定方法简单，同一条曲线可以同时测定牛奶和肌肉样品，省时，牛奶样品在两小时之内可得出测定结果；最低检测限达 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下，可直接判断样品是否超标，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在动物性食品四环素类药物残留检测中发挥重要作用。

具体实施方式

实施例 1、抗原及抗体的制备

(1) 包被抗原的合成

将四环素类药物和兔血清白蛋白(RSA)采用甲醛法、联氨法、EDC法或重氮化法进行偶联得到包被抗原。

(2) 免疫(抗)原的合成

将四环素类药物和人血清白蛋白采用甲醛法、联氨法、EDC法或重氮化法进行偶联得到免疫(抗)原。

(3) 四环素类药物兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以四环素类药物与人血清白蛋白偶联物为免疫原，首次免疫用 $2\text{mg}/\text{mL}$ 免疫抗原 2mL 加完全福氏佐剂 2mL 乳化，加强免疫用免疫抗原 1mL 加 1mL 不完全福氏佐剂乳化。在白兔背部两侧各取5-10点，每点皮下注射抗原 $0.2-0.3\text{mL}$ ，四周后加强免疫，共加强免疫5-10次，每次加强免疫间隔2周，最后一次免疫7天后采血，测定血清抗体效价，颈动脉放血，提取血清，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

(4) 四环素类药物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，以四环素类药物与人血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 $50\mu\text{g}$ (0.1mL)免疫原加等体积完全福氏佐剂乳化，进行首次皮下注射免疫。一月后，取同样量免疫抗原加等量不完全福氏佐剂，乳化，进行加强免疫，再过一月后，取同样量免疫抗原不加佐剂腹腔注射进行加强免疫，之后5天采血，测定抗体效价，取脾细胞。

细胞融合与克隆化 取免疫BALB/c小鼠脾细胞，按4:1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。利用有限稀释或软

琼脂平板法对阳性孔进行克隆化，得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

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 1×10^6 – 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°C 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 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 – 10^6 个/只，7-10 天后采集腹水。经辛酸—硫酸铵沉淀法进行腹水纯化，小瓶分装， -20°C 保存。

（5）二抗的制备

以羊作为免疫动物，以鼠或兔 IgG 为免疫原进行免疫，得到羊抗鼠或羊抗兔抗体。

用高碘酸钠法或戊二醛法合成辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 或辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG 标记物。

实施例 2、检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒

（1）检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒的结构

该试剂盒主要由盒体、铝膜真空包装 96 孔/40 孔酶标板、A, B, C, D, E, F 试剂液（四环素系列浓度标准溶液）、G 试剂液（酶结合二抗）、H 试剂液（四环素类药物抗体）、J 试剂液（含 BSA 磷酸盐缓冲液）；K 试剂液（含吐温—20 磷酸盐缓冲液）；I 试剂液（四甲基联苯胺）；L 试剂液（柠檬酸缓冲液）；M 试剂液（终止液）；盖板膜和托架组成。上述试剂液存放在试剂瓶中。托架内装有上述 A, B, C, D, E, F, G, H, I 试剂瓶。托架，酶标板，J 试剂瓶，K 试剂瓶，L 试剂瓶，M 试剂瓶和盖板膜均安装在盒体内。酶标板由塑料支架和各自分开的带孔的塑料条组成。

（2）所用试剂的配制

A, B, C, D, E, F 试剂液：四环素类药物系列浓度标准溶液，其浓度分别为 0、3、10、30、100、300 $\mu\text{g/L}$ 。

G 试剂液：蛋白浓度为 0.1–10mg/L 的辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 标记物或辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG 标记物。

H 试剂液：蛋白浓度为 0.1–10mg/L 的四环素类药物鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

I 试剂液：1–10mg/ml 四甲基联苯胺溶液。

J 试剂液：含 0.1–10%BSA 的磷酸盐缓冲液（0.01M pH7.2）。

K 试剂液：含 0.5%吐温的磷酸盐缓冲液（0.5M pH7.2）。

L 试剂液：0.1M pH5.0 柠檬酸缓冲液。

M 试剂液：1-2mol/L 硫酸或盐酸。

（3）酶标板的制备

用包被缓冲液（0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液）将四环素类药物包被抗原释成 0.1-1 μ g/ml，每孔加入100 μ l，37 $^{\circ}$ C温育2h，4 $^{\circ}$ C过夜，倾去包被缓冲液，用10倍稀释的K试剂液洗涤3次，每次30秒，拍干，然后在每孔中加入5%脱脂牛奶0.05M 磷酸盐缓冲液250 μ l，37 $^{\circ}$ C温育1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 3、样品的前处理及检测

1、奶样：直接取新鲜的牛奶或冻融的牛奶，用J试剂液稀释后作为试样溶液供测定。

2、组织样品：分别取鸡、猪的肌肉、肝脏，肾脏各组织样品各称取2g，加MCI 缓冲液（0.1M 柠檬酸缓冲液，0.1M EDTA，pH3.8）8mL，振荡30min，离心10min，取上清液备用。C₁₈固相萃取柱依次用无水甲醇3mL、水2mL预洗。取备用液5.0mL过柱，用水2mL淋洗，挤干。用20mmol/L草酸甲醇溶液1.0mL洗脱，挤干，收集洗脱液。将收集的洗脱液摇匀，用J试剂液10倍或10倍以上稀释后作为试样溶液供测定。

3、检测

检测前将试剂盒恢复室温（18 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C），再用A, B, C, D, E, F试剂液与J试剂液配制四环素类药物系列浓度标准溶液0、0.3、1、3、10、30 μ g/L，在K试剂液加水配制成洗液（0.05%吐温的磷酸盐缓冲液），用H试剂液与洗液配制抗体溶液（0.1mg/L），在酶标板小孔中加入50 μ l样品溶液或配制好的四环素系列浓度标准溶液，加入50 μ l抗体溶液，覆上盖板膜于18 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C放置1h，用洗液洗酶标板3次，用吸水纸拍干，之后用G试剂与洗液配置酶标抗体溶液（0.1mg/L）并加入酶标板小孔中，18 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C放置30min，再用洗液洗酶标板3次，拍干，用I试剂液与L试剂液配制酶底物混合液（0.1%四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液），取100 μ l加入酶标板小孔后混匀，避光显色约15min，最后每孔加入M终止液（1mol/L硫酸）100 μ l，用酶标仪测定450nm处A₄₅₀值。按下式计算百分吸光度值：

（B—为标准溶液或样品的平均吸光度值；B₀—为0浓度的标准溶液平均吸光度值）

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

以标准溶液中四环素浓度的对数为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线，从标准曲线上计算出试样溶液中四环素类药物浓度。

实施例 5、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度

该试剂盒的抗原为四环素与 RSA 的偶联物，四环素的特异性抗体为四环素兔多克隆抗体，酶标二抗为辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 标记物，其中，标准溶液为四环素系列浓度标准溶液。

1、试剂盒灵敏度试验

按常规方法进行了试剂盒灵敏度试验，结果表明该试剂盒的标准曲线最低点为 0.3μg/L，标准曲线范围为 0.3μg/L -30μg/L；在牛奶和鸡肉样品中检测限为 7μg/L 左右。

2、试剂盒特异性试验

选择如表 1 所示的常用的 7 种四环素族药物，按照常规方法分别测定交叉反应率，结果如表 1 所示。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制四环素的浓度}}{\text{引起 50\%抑制的类似物浓度}} \times 100$$

表 1. 交叉反应

药物名称	交叉反应率%
四环素	100
金霉素	100
土霉素	54
多西环素	100
米诺环素	100
去甲金霉素	100
吡甲四环素	100

3、准确度、精密度测定

分别在空白牛奶、鸡肉样品中添加四环素族药物（四环素、土霉素、多西环素或金霉素）标准液至终浓度为 50μg/L、100μg/L 和 200μg/L。各浓度分别制备样品 5 份，然后分别测定其含量，重复 3 次。分别计算回收率、板内变异系数和板间变异系数。结果表明在牛奶中，100μg/L 添加浓度的回收率为 45%-120%；在鸡肌肉中，100μg/kg 添加浓度的回收率为 40%-120%；在空白添加牛奶和鸡肉样品中，批内变异系数 CV≤20%，批间变异系数 CV≤25%。

专利名称(译)	一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100338467C	公开(公告)日	2007-09-19
申请号	CN200410046566.4	申请日	2004-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	刘智宏 叶妮 黄耀凌 黄齐颐 郭筱华		
发明人	刘智宏 叶妮 黄耀凌 黄齐颐 郭筱华 张纯萍 郭文林		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/535 G01N21/31		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1707265A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的四环素类药物与载体蛋白的偶联物，所述四环素类药物的特异性抗体和酶标二抗。本发明的检测四环素类药物的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，可以同时测定四环素，米诺环素，金霉素和多西环素等四环素类药物残留；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；最低检测限达10µg/kg以下，可直接判断样品是否超标，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在动物性食品四环素类药物残留检测中发挥重要作用。

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