

[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 200410046568.3

[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 11 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100348979C

[22] 申请日 2004.6.11

[21] 申请号 200410046568.3

[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 黄耀凌 刘智宏 叶 妮

[56] 参考文献

WO9520159A1 1995.7.27

CN1389729A 2003.1.8

CN1153908A 1997.7.9

ELISA 测定乳品中氨苄西林钠残留量. 吴  
定. 中国卫生检验杂志, 第 10 卷第 1 期. 2000  
审查员 张秀丽

[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 7 页

[54] 发明名称

一种检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒,包括包被的二抗、链霉素或双氢链霉素的特异性抗体及酶标链霉素或双氢链霉素。本发明的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒,链霉素和双氢链霉素的交叉率为 100%;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,牛奶样品用水稀释后可直接测定,猪肉和肾脏经磷酸缓冲液抽提后调 pH 即可上样,并且能同时快速检测大批样品;测定方法简单,省时,牛奶样品在 1 小时之内可得出测定结果;最低检测限达 11.2  $\mu$ g/L,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在动物性食品链霉素药物残留检测中发挥重要作用。

1、一种检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗，蛋白浓度为0.1-100mg/L的链霉素或双氢链霉素的单克隆或多克隆抗体，浓度分别为0、0.4、2、6、20、80  $\mu$ g/L的链霉素或双氢链霉素系列浓度标准溶液，0.1-100mg/L的辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的链霉素或双氢链霉素，0.1-10mg/ml的四甲基联苯胺溶液，0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液，0.1M pH5.0的柠檬酸缓冲液，1-2mol/L的硫酸或盐酸终止液。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述链霉素或双氢链霉素的单克隆或多克隆抗体是用链霉素或双氢链霉素与载体蛋白的偶联物作为免疫原制备得到的。

3、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述链霉素或双氢链霉素单克隆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：所述链霉素或双氢链霉素单克隆抗体为链霉素或双氢链霉素鼠单克隆抗体。

5、根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述链霉素或双氢链霉素多克隆抗体为链霉素或双氢链霉素兔多克隆抗体。

6、根据权利要求2-5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、卵清蛋白、兔血清白蛋白、甲状腺球蛋白或血兰蛋白。

7、根据权利要求2-5任意一项所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述二抗为抗鼠或抗兔抗体。

8、根据权利要求7所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述二抗为羊抗兔IgG或羊抗鼠IgG。

9、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗，蛋白浓度为0.1-100mg/L的链霉素的单克隆或多克隆抗体，浓度分别为0、0.4、2、6、20、80  $\mu$ g/L的链霉素系列浓度标准溶液，0.1-100mg/L的辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的链霉素，0.1-10mg/ml的四甲基联苯胺溶液，0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液，0.1M pH5.0的柠檬酸缓冲液，1-2mol/L的硫酸或盐酸终止液。

## 一种检测链霉素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链霉素药物的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

在牛奶生产中，兽药使用不当将导致奶或奶制品中兽药残留超标。而牛奶是我们日常食品的重要组成和婴幼儿的主要食品，高浓度残留可损害健康。链霉素作为氨基糖甙类抗生素，可用于预防和治疗革兰氏阴性菌和结核杆菌等感染，在奶牛的常见病乳房炎，结核病等都需要链霉素配合治疗，但如果不正确使用，可造成链霉素残留超标。许多研究证明，链霉素可对肾脏和听神经造成不可逆转的损害，长期饮用链霉素残留牛奶，无疑是等于长期服用小剂量的链霉素，有过敏体质的人服用残留链霉素的奶后会发生过敏反应。即使是正常饮用者，体内的某些条件性致病菌易产生耐药性，一旦患病再用同种抗生素治疗很难奏效。链霉素是奶牛场治疗乳房炎的常规药物，由于长期大量使用，使耐药菌株增加，一些乳房炎病例变得难以用常规方法治愈。因此我国制定的链霉素最高残留限量，在牛奶中为 200 $\mu$ g/L。

目前链霉素的传统检验方法采用微生物法和高效液相色谱法。微生物检测法是应用较广泛的方法，常用的有纸片法（PD）和 TTC 法，但微生物法检验周期长，特异性差，操作复杂，并且 PD 法和 TTC 法检测牛奶中链霉素残留的最低检出量仅为 1mg/L 和 0.5mg/L，这远远满足不了我国制定的链霉素最高残留限量要求。高效液相色谱法也是残留检测的重要方法，由于奶样处理中操作比较繁琐，而且奶中链霉素药物残留量少，背景干扰往往很严重，还都需要通过柱前衍生或柱后衍生反应来提高紫外检测器检测残留的灵敏度。

### 发明创造内容

本发明的目的是提供一种检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗、链霉素或双氢链霉素的特异性抗体及酶标链霉素或双氢链霉素。

其中，所述链霉素药物为链霉素或双氢链霉素。

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。

所述 A，B，C，D，E，F 试剂液为链霉素或双氢链霉素系列浓度标准溶液。

所述 G 试剂液为酶结合物浓缩液，含有 0.1-100mg/L 的酶标链霉素或双氢链霉素。

所述 H 试剂液为抗体浓缩液，含有蛋白浓度为 0.1-100mg/L 的链霉素或双氢链霉素的特异性抗体。

所述 I 试剂液为四甲基联苯胺。

所述 J 试剂液为磷酸盐缓冲液。

所述 K 试剂液为柠檬酸缓冲液。

所述 L 试剂液为终止液。

所述链霉素或双氢链霉素的特异性抗体可为链霉素或双氢链霉素单克隆抗体或多克隆抗体；所述链霉素或双氢链霉素单克隆抗体或多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源或豚鼠源抗体，所述链霉素或双氢链霉素单克隆抗体优选为链霉素或双氢链霉素鼠单克隆抗体，所述链霉素或双氢链霉素多克隆抗体优选为链霉素或双氢链霉素兔多克隆抗体。

以上抗体均可用链霉素或双氢链霉素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)、卵清蛋白(OVA)、兔血清白蛋白(RSA)、甲状腺球蛋白(TG)或血兰蛋白(KLH)等常用载体蛋白；所述链霉素或双氢链霉素与载体蛋白的偶联物可采用甲醛法、戊二醛法、重氮化法、碳二亚胺法、羧甲基羟胺-碳二亚胺法或多元酸酐法合成。

所述二抗可为抗鼠或抗兔抗体，优选为羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG。

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、高碘酸钠法或羧甲基羟胺法标记于链霉素或双氢链霉素。

可作为固定所述二抗的特异性抗体的载体物质很多，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，本发明的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗、链霉素特异性抗体及酶标链霉素。

本发明的检测原理为将二抗吸附于固相载体上，加入样品、链霉素或双氢链霉素特异性抗体和酶标链霉素或双氢链霉素，待测样品中残留的链霉素或双氢链霉素和酶标链霉素或双氢链霉素竞争链霉素或双氢链霉素特异性抗体，显色后终止，测定样品吸光值，该值与样品中链霉素或双氢链霉素残留量呈负相关，与标准曲线比

较即可得出链霉素或双氢链霉素的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的链霉素或双氢链霉素标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

本发明的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，链霉素和双氢链霉素的交叉率为100%；主要采用ELISA竞争方法定性或定量检测动物组织(猪、鸡、牛、羊的肌肉组织及肝脏、肾脏等)、牛奶等样品中链霉素药物的残留量；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，牛奶样品用水稀释后可直接测定，猪肉和肾脏经磷酸缓冲液抽提后调pH即可上样，并且能同时快速检测大批样品；测定方法简单，省时，牛奶样品在1小时之内可得出测定结果；最低检测限达11.2 $\mu$ g/L，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在动物性食品链霉素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) 链霉素或双氢链霉素抗原的合成

以卵清白蛋白或牛血清白蛋白、或人血清白蛋白为载体，链霉素或双氢链霉素为半抗原，用甲醛法或戊二醛法、或重氮化法、或碳二亚胺法、或羧甲基羟胺-碳二亚胺法、或多元酸酐法，将链霉素或双氢链霉素偶联在卵清白蛋白或牛血清白蛋白、或人血清白蛋白上，得到链霉素或双氢链霉素抗原。

##### (2) 链霉素或双氢链霉素兔多克隆抗体的制备

采用日本大耳兔作为免疫动物，以步骤(1)中合成的抗原为免疫原，免疫剂量每次为2mg/mL免疫抗原，首次免疫用2mL完全福氏佐剂乳化，加强免疫用2mL不完全福氏佐剂乳化。每次免疫间隔2周，共免疫5-10次，最后一次不加免疫佐剂直接肌肉注射，7天后采血检测，测定血清抗体效价后，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。

##### (3) 链霉素或双氢链霉素鼠单克隆抗体制备

采用BALB/C小鼠作为免疫动物，以步骤(1)中合成的抗原为免疫原，剂量为50 $\mu$ g(0.1mL)加等体积完全福氏佐剂乳化，进行首次皮下多点注射免疫。一月后，取同样量免疫抗原加不完全福氏佐剂，乳化，进行加强免疫，再过一月后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。取脾细胞按4:1比例与骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合。采用有限稀释或软琼脂平板法筛选杂交瘤细胞，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 $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$ 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。定期检查细胞的活性和分泌抗体的稳定性。

#### 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  $5 \times 10^5 - 10^6$  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℃ 保存。

#### (4) 酶标记链霉素或双氢链霉素的合成

用戊二醛法或高碘酸钠法、或羧甲基羟胺法将链霉素或双氢链霉素标记于辣根过氧化物酶上，合成酶标记链霉素。

#### (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。具体方法如下：将经硫酸铵沉淀法纯化的兔或鼠免疫球蛋白用等量福氏完全佐剂乳化后，肌肉、皮下、皮内多点免疫成年绵羊，免疫剂量为 10mg 蛋白/只，一月后，用半量的兔或鼠免疫球蛋白加入福氏不完全佐剂肌肉、皮下或皮内注射绵羊，之后，每两周加强免疫一次。琼扩效价达 1:32 以上时，采血，分离血清，用硫酸铵沉淀法粗提后，用免疫亲和柱层析法提取羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG，得到纯化的羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG。

#### 实施例 2、检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒

##### 1、检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒的结构

该试剂盒主要由盒体，酶标板，A 试剂瓶（标准溶液 1），B 试剂瓶（标准溶液 2），C 试剂瓶（标准溶液 3），D 试剂瓶（标准溶液 4），E 试剂瓶（标准溶液 5），F 试剂瓶（标准溶液 6），G 试剂瓶（酶结合物浓缩液），H 试剂瓶（抗体浓缩液），I 试剂瓶（四甲基联苯胺），J 试剂瓶（磷酸盐缓冲液），K 试剂瓶（柠檬酸缓冲液），L 试剂瓶（终止液），盖板膜，托架所组成。托架内装有上述 A, B, C, D, E, F, G, H, I 试剂瓶。泡沫托架，酶标板，J 试剂瓶（磷酸盐缓冲液），K 试剂瓶（柠檬酸缓冲液），L 试剂瓶（终止液）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 试剂液为链霉素或双氢链霉素系列浓度标准溶液，其浓度分别为 0、0.4、2、6、20、80  $\mu\text{g/L}$ 。

G 试剂液为酶结合物浓缩液，含有 0.1-100mg/L 的辣根过氧化物酶-链霉素或双氢链霉素标记物。

H 试剂液为抗体浓缩液,含有蛋白浓度为 0.1-100mg/L 的链霉素或双氢链霉素的鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

I 试剂液为 0.1-10mg/ml 四甲基联苯胺溶液。

J 试剂液为磷酸盐缓冲液 (0.01M pH7.2)。

K 试剂液为柠檬酸缓冲液 (0.1M pH5.0)。

L 试剂液为终止液, 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) 将羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG 稀释成 0.1-5 μg/ml, 每孔加入 100 μl, 4℃ 过夜, 倾去包被缓冲液, 用 0.05% 吐温的 0.05M pH7.2 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 每次 30 秒, 拍干, 然后在每孔中加 5% 脱脂牛奶 0.05M 磷酸盐缓冲液 250 μl, 室温温育 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: 取新鲜或冻融的牛奶, 用水稀释后直接作为供试样品;

2、组织样品: 取猪肉、肾脏组织各 1g, 加 0.2M 磷酸缓冲液 (pH9.2) 9mL, 混匀后, 振荡 30min, 5000rpm, 10min, 取上清 0.5 mL 用 0.2M 磷酸缓冲液 (pH6) 0.5 mL 稀释, 作为供试样品。

### 3、检测

检测链霉素药物前将试剂盒恢复室温 (18℃-30℃), 用 G 试剂液和 J 试剂液配制酶标链霉素或双氢链霉素溶液 (0.01-10mg/L), 用 H 试剂液与 J 试剂液配制抗体溶液 (0.01-10mg/L)。在酶标板小孔中加入 20 μl 试样溶液或标准溶液, 20 μl 酶标链霉素或双氢链霉素溶液和 100 μl 抗体溶液, 覆上盖板膜于 19℃-30℃ 放置 30min, 用水洗酶标板 3 次, 吸水纸拍干, 用 I 试剂液和 K 试剂液配制酶底物混合液 (0.1-1% 四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液), 取 100 μl 加入酶标板小孔后混匀, 避光显色约 30min, 最后加入 100 μl L 终止液, 用酶标仪测定  $A_{450}$  值。按下式计算百分吸光度值:

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

(B—为标准溶液或样品的平均吸光度值;  $B_0$ —为 0 浓度的标准溶液平均吸光度值。)

以标准溶液中链霉素或双氢链霉素浓度的对数为 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 C (试样溶液中链霉素或双氢链霉素的浓度)。

实施例 5、试剂盒灵敏度、特异性、精密度、准确度和临界值 (cut-off) 试验

该试剂盒的酶标抗原为辣根过氧化物酶标链霉素，特异性抗体为链霉素兔多克隆抗体。

根据动物源食品中兽药残留检测标准编制规则的有关规定，分别对该试剂盒的灵敏度、特异性、准确度、精密度和临界值（cut-off）进行了测定，具体结果如下。

### 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 0.4μg/L，标准曲线范围为 0.4μg/L -80μg/L；在牛奶样品中检测限为 11.2μg/L 左右。

### 2、特异性测定

选择与链霉素结构和功能类似的 7 种药物，链霉素 50%抑制浓度与各药物 50%抑制浓度相比，得出一系列交叉反应率，结果如表 1 所示，试验表明双氢链霉素与链霉素在酶联免疫吸附测定中与酶作用基团结构相近，交叉率接近，而另外 6 种药物与链霉素几乎没有交叉反应。

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

表 1. 链霉素 ELISA 检测方法的交叉反应

药物名称	交叉反应率%
双氢链霉素	100.7
庆大霉素	<0.1
卡那霉素	<0.1
丁胺卡那	<0.1
新霉素	<0.1
西梭霉素	<0.1
妥布霉素	<0.1

### 3、准确度、精密度测定

分别在空白奶样中添加链霉素或双氢链霉素标准溶液，使其浓度为 100μg/L，200μg/L 和 400μg/L，各浓度分别制备样品 5 份，然后用链霉素标准曲线测定其含量，重复测定 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 链霉素添加浓度的回收率为 70%-120%，200μg/L 链霉素添加浓度的回收率为 60%-110%，400μg/L 链霉素添加浓度的回收率为 45%-110%；批内变异系数 CV ≤

20%，批间变异系数  $CV \leq 25\%$ 。100 $\mu\text{g/L}$ ，200 $\mu\text{g/L}$  和 400 $\mu\text{g/L}$  双氢链霉素的添加回收率为 40%-120%，批内变异系数  $CV \leq 20\%$ ，批间变异系数  $CV \leq 25\%$ 。

#### 4、临界值 (cut-off 值) 的测定

通过在牛奶中添加链霉素至最高残留限量 200 $\mu\text{g/L}$ ，测定 20 次，重复 3 次，计算 cut-off 值。结果表明该试剂盒的 cut-off 平均值为 116.1 $\mu\text{g/L}$ 。

#### 5、实际样品测定

应用试剂盒对牛奶样品进行检测，结果如下表 2，表明该牛奶样品是符合饮用标准的。

表 2.

样品名称	总数量	阳性数	阳性检出率
牛奶	20	0	0%

专利名称(译)	一种检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN100348979C</a>	公开(公告)日	2007-11-14
申请号	CN200410046568.3	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	黄耀凌 刘智宏 叶妮		
发明人	黄耀凌 刘智宏 叶妮		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/535 G01N21/31		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	张秀丽		
其他公开文献	CN1707267A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗、链霉素或双氢链霉素的特异性抗体及酶标链霉素或双氢链霉素。本发明的检测链霉素药物的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，链霉素和双氢链霉素的交叉率为100%；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，牛奶样品用水稀释后可直接测定，猪肉和肾脏经磷酸缓冲液抽提后调pH即可上样，并且能同时快速检测大批样品；测定方法简单，省时，牛奶样品在1小时之内可得出测定结果；最低检测限达11.2μg/L，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在动物性食品链霉素药物残留检测中发挥重要作用。

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