

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610103899.5

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月3日

[11] 公开号 CN 1888903A

[22] 申请日 2006.8.8

[21] 申请号 200610103899.5

[71] 申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测
技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 12
号

[72] 发明人 杨曙明 于洪侠

[74] 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司
代理人 李浩成

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的喹乙醇的酶联免疫试剂盒包括喹乙醇特异性抗体、喹乙醇与载体蛋白的偶联物、和酶标二抗。本发明的检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒灵敏、快速、准确，主要用于大批样品的筛查；盒中的主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便，具有高特异性、高灵敏性、高精确性、高准确性等特点，可快速检测饲料及畜产品中残留的喹乙醇。

1. 一种检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒，其中包括：喹乙醇特异性抗体、喹乙醇-载体蛋白偶联物和酶标二抗。
2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括包被了喹乙醇抗原或抗喹乙醇特异性抗体的酶标板、喹乙醇标准溶液、底物显色剂、洗涤液、终止液和浓缩样品稀释液。
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：所述喹乙醇特异性抗体为多克隆抗体。
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：所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白或钥孔铜兰蛋白（KLH）。
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：所述的酶标二抗的酶为辣根过氧化物酶。
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述的酶标二抗为羊抗兔 IgG 抗体。
7. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述的洗涤液为含有 0.05%—0.5% 吐温—20 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：所述的显色剂由显色剂 A 和显色剂 B 组成，显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲，显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺。
9. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述的浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温—20 的磷酸盐缓冲液。
10. 一种检测样品中喹乙醇含量的方法，包括步骤：
 - (1)样品前处理；
 - (2)用权利要求 1—9 任一所述的试剂盒进行检测，向包被有喹乙醇抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液，再加入抗喹乙醇多克隆抗体，孵育后洗涤拍干，加入酶标记二抗，孵育后洗涤拍干，显色、终上，用酶标仪测定吸光度值；
 - (3)分析检测结果。

一种检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及酶联免疫和兽药残留检测领域。具体而言，本发明涉及一种用于检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒。

技术背景

喹乙醇(Olaquinox)，又名：快育灵、倍育诺(Bayonox)、奥拉金、喹酰胺醇、Fedan。分子式： $C_{12}H_{13}N_3O_4$ 。由2-甲基喹噁啉-1、4-二氧化物与乙醇胺缩合而成的淡黄色结晶性粉末，微溶于水。

喹乙醇抗菌效力好，促进生长发育，增加瘦肉率，价格便宜。因此曾经被作为抗菌促生长作用的饲料添加剂大量使用。

然而，喹乙醇在被大量使用后，人们也发现了许多问题，如鸡等禽类对喹乙醇敏感。人们对使用喹乙醇添加剂的鸡进行病理解剖时，发现鸡的脏器有药物致损的现象。喹乙醇在动物体内的残留时间长，蓄积毒性大，不仅能使动物中毒或死亡，而且残留在肉中对人体也有较大危害。由于喹乙醇是由2-甲酸甲酯-3-甲基喹噁啉-1、4-二氧化物与乙醇胺缩合而成的，有人认为喹乙醇在动物体内代谢后会生成甲基喹噁啉-1、4-二氧化物，这种物质能抑制脱氧核糖核酸的合成，对染色体畸变有影响，是一种致癌物。

鉴于喹乙醇的毒性和存在的潜在危害，因而人们重新对喹乙醇的安全性进行评价，对喹乙醇的使用也做出了新的规定。美国没有批准使用；欧盟也从1999年开起始全面禁止使用喹乙醇；我国对喹乙醇使用的限制也更加严格。我国农业部颁布的《动物性食品兽药最高残留限量》中也列入了喹乙醇。国家进出口检验检疫局制定了肉中喹乙醇残留量的检验方法《：中华人民共和国进出口商品检验行业标准——出口肉中喹乙醇饲料添加剂质量监督检测实施细则》也把鸡饲料、饮水及鱼饲料中的喹乙醇作为违禁药物进行监督检验。

现有的喹乙醇检测方法多为色谱法，但是这些方法的灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响较大；再者这些方法需要复杂的仪器，且过程繁琐，不适应现场大量样本的筛查。基于抗原抗体免疫反应的免疫学检测技术为小分子残留物的分析检测提供了一个新的途径。该技术研究的关键是半抗原分子的设计、合成和人工全抗原及抗体的制备。

因为喹乙醇是小分子化合物，本身没有免疫原性，必须将其与大分子载体蛋白偶联得到具有免疫原性的人工抗原。喹乙醇人工抗原和特异性抗体以及在此基础上建立

免疫分析方法尚未见报道。并且本发明首次用固体光气作为连接剂用于制备喹乙醇的人工抗原。

发明内容

本发明的目的在于提供一种快速检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒。

本发明提供了一种快速检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒，该试剂盒包括：喹乙醇特异性抗体、喹乙醇-载体蛋白偶联物和酶标二抗。其中喹乙醇特异性抗体为兔抗喹乙醇的多克隆抗体，可用喹乙醇与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物（例如兔）制得。所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或钥孔铜兰蛋白(KLH)。所述的喹乙醇-载体蛋白偶联物采用化学方法偶联得到。所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶，所述酶标二抗可以用商品化的辣根过氧化物酶酶标二抗，也可以通过过碘酸钠法或戊二醛法将辣根过氧化物酶与二抗偶联制得。在本发明的一个优选实施方案中，所述酶标二抗为羊抗兔 IgG 抗体。

用于制备所述酶标板的固相材料，包括但不限于，例如，聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯。载体的形式是微量反应板凹孔。

为方便现场检测和大量样本筛查，所述试剂盒还可以进一步包括喹乙醇抗原或抗喹乙醇特异性抗体的酶标板、喹乙醇标准溶液、底物显色剂、洗涤液、终止液和浓缩样品稀释液。

所述的洗涤液为 0.05%—0.5%吐温-20 磷酸盐缓冲液。所述的显色剂由显色剂 A 液和显色剂 B 液组成（例如，体积比为 1:1），显色剂 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色剂 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺或四甲基联苯胺。所述的浓缩样品稀释液为含 0.1%吐温-20 的磷酸盐缓冲液。

另一方面，本发明还提供了一种检测样品中喹乙醇含量的方法，包括步骤：

(1)样品前处理；

(2)用权利要求 1—9 任一所述的试剂盒进行检测，向包被有喹乙醇抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液，再加入抗喹乙醇多克隆抗体，孵育后洗涤拍干，加入酶标记二抗，孵育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值；

(3)分析检测结果。

本发明试剂盒的检测原理为：

将喹乙醇抗原吸附于固相载体上，加入样本或喹乙醇标准品溶液并加入喹乙醇抗体

工作液，待测样品中喹乙醇和固相载体上包被的喹乙醇抗原竞争喹乙醇抗体，再加入酶标记抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中喹乙醇的量呈负相关，与标准曲线比较即可得出喹乙醇浓度范围。

有益效果：

本发明检测喹乙醇的试剂盒主要采用间接竞争酶联免疫测定法定性或定量样品中喹乙醇含量；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。

本发明该试剂盒采用高特异性的喹乙醇多克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，可以减少试剂盒的操作步骤，为使用者节省时间并降低因操作步骤冗繁造成的误差，本发明具有灵敏度高、特异性强、高精度度、高准确度、对仪器设备要求低、试剂保存时间长、自动化程度高、无放射性同位素污染的等优点，可在饲料及动物源性产品检测中发挥重要作用。

附图说明

图 1 为喹乙醇酶联免疫检测试剂盒结构图。其中 1 为试剂盒盒体，2 为包被了喹乙醇抗原或抗喹乙醇特异性抗体的酶标板，3 为系列标准溶液，4 为显色剂 A，5 为显色剂 B，6 为抗体溶液，7 为酶标二抗溶液，8 为酶标二抗稀释液，9 为浓缩洗涤液，10 为浓缩样品稀释液，11 为试剂瓶架。

图 2 为喹乙醇抑制曲线。

提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明，而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

实施例 2

实施例 1 免疫原的合成及免疫血清的制备

1.1 试剂与仪器

喹乙醇（湖北中牧安达药业有限公司生产），固体光气（BTC）（购自北京耀北生物技术有限公司），吡啶（Pyridine, AR. WM=79.10, 含量>99.5%, 天津市科密欧化学试剂开发中心），N, N-二甲基甲酰胺(Dimethylformamide, DMF, 美国新泽西州 ACROSORGANICS 公司生产，购自百灵威化学试剂公司)，正三丁胺（Tributylamine, 美国新泽西州 ACROSORGANICS 公司生产，购自百灵威化学试剂公司），牛血清白蛋白（BSA），二氯甲烷（北京世纪红星化工有限责任公司生产）

双光束紫外可见分光光度仪 (TU-1909, 北京普析通用仪器有限公司), 层析装置 (3057 型便携式记录仪, 重庆川仪四厂; SBS 系列数控计滴器, 恒流泵, 自动部分收集器, 层析柱, 上海沪西分析仪器厂), 磁力搅拌器 (上海东荣丰科学仪器有限公司), 台式离心机 (Minispin 最大转速 13400 rpm 最大离心力 12100 rcf, 2ml×12),

1.2 噻乙醇人工抗原的合成

称取 26.3mg 噻乙醇溶于 3ml 的吡啶和 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)混合 (1:1) 溶液中, 称取固体光气 (BTC) 9.9mg 溶于 1 ml 二氯甲烷中。

将上述噻乙醇和固体光气两溶液混合。具体方法为: 在冰浴条件下先将少许 BTC 溶液滴加入噻乙醇溶液中, 反应几分钟后将剩余的 BTC 溶液全部加入, 转入室温搅拌反应 1 小时, 得到混合溶液 A。

称取 50mg 载体蛋白 BSA 或 KLH 分别溶于 0.1mol/L pH 8.4 的 5 ml 硼酸钠缓冲液中, 向其中加入 1 ml DMF 得到载体蛋白溶液 B。

将溶液 A 逐滴加于载体蛋白溶液 B 中, 缓慢滴加, 半小时内加完, 室温下反应 4 小时。

然后, 将偶联物过 SephadexG-25M 凝胶层析纯化, 用 0.01M pH 7.4 PBS 三倍柱床体积平衡, 调节流速至 3ml/min, 样品浓缩至 5ml 加入到平衡好的层析柱中层析提纯偶联物, 洗脱液用 pH 7.4 0.01M PBS。

通过紫外线扫描鉴定偶联物。具体操作为: 将噻乙醇溶于 PBS(0.01M pH 7.4), 浓度为 15 μ g/ml; BSA 溶于 PBS(0.01M pH 7.4), 浓度为 1.03mg/ml; 将纯化后的偶联物同样用 PBS(0.01M pH 7.4)作适当稀释, 使其浓度与 BSA 浓度接近。将这三种溶液在 200 nm—400 nm 之间进行紫外扫描, 得出各物质的紫外扫描波谱, 如图 1-3 所示。从图 1-3 中可以看出噻乙醇与载体蛋白 BSA 偶联成功。

免疫及特异性抗体的制备

将上述噻乙醇-BSA 偶联物用生理盐水稀释成 1mg/ml 溶液备用。

选取 6 只体重 2~2.5Kg 健康雄性新西兰大白兔。将偶联物与等量弗氏完全佐剂通过注射器对抽法混合成油包水的乳浊液, 按 1mg / Kg 体重的量进行首次免疫, 采取背部皮下多点注射。每隔两周加强免疫一次, 用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂, 剂量及方法同首次免疫。从第三次免疫开始, 每次免疫后 10 天, 耳缘静脉取血 1ml, 进行抗体效价检测, 当抗体效价不再升高时, 不加佐剂进行最后一次(第 7 次)免疫, 大腿肌肉注射, 7 天后颈动脉放血, 室温凝固 2 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜, 8000 r/min 离心 10 分钟,

除去血块，血清部分用 50%饱和硫酸铵溶液沉淀，离心去上清液，沉淀用磷酸盐缓冲液重悬，再用 33%饱和硫酸铵溶液沉淀两次，沉淀物用尽可能少的磷酸缓冲液溶解，经透析后用 SephadexG-25M 层析，即得多克隆抗体。

实施例 2 免疫检测方法的建立

2.1 ELISA 方法确定最佳包被浓度

将 1000 μ g/ml、100 μ g/ml、10 μ g/ml、5 μ g/ml、1 μ g/ml、0.25 μ g/ml 系列浓度的卵清蛋白 (OVA)-喹乙醇偶联物按每孔 100 μ l 包被酶标板，4 $^{\circ}$ C 包被 24 h，洗涤 5 次，拍干，按每孔 200 μ l 封闭液 4 $^{\circ}$ C 下封闭 12 h，洗涤 3 次，拍干。加入 1:500 稀释的抗血清 100 μ l，室温作用 2h，洗涤三次，立即加入 100 μ l 酶标羊抗兔抗体，室温作用 30 min，洗涤三次，加 100 μ l 底物液，室温避光作用 15min,50 μ l 终止液终止反应，酶标仪检测 A 值 (450nm)。同时设置空白对照孔 (不加抗血清，只加其稀释液) 和平行重复孔，取 OD 值为 1.0 左右时的包被浓度为最佳浓度。试验数据列于表 3。

表 1 不同包被浓度的 OD 值

包被浓度 μ g/ml	1000	100	10	5	2.5	1	0.25	空白
OD 值	1.945	1.726	1.726	1.525	1.221	1.074	0.760	0.052

由表 3 的数据中可以确定，最佳包被浓度为 1 μ g/ml。

2.2 间接 ELISA 检测抗体效价

以 1 μ g/ml 浓度包被酶标板，从 400 倍开始倍比稀释抗血清，按 2.1 的 ELISA 步骤操作。以两倍于阴性血清 OD 值的抗血清 OD 值对应的抗血清稀释度为抗血清效价。抗血清效价检测结果见表 4。

表 2 抗血清效价检测结果

稀释倍数	400	800	1600	3200	6400	12800	阴性血清	空白
OD 值	1.184	0.908	0.694	0.475	0.339	0.149	0.157	0.048

从表 4 的数据可以确定本发明制备的抗血清的效价在 6000 以上。

2.3 间接竞争 ELISA 检测抗体特异性

ELISA 操作方法同 2.1。不同的是每孔加入 50 μ l 不同浓度的游离喹乙醇与卵清蛋白 (OVA)-喹乙醇偶联物竞争抗体，随后加入抗血清，得出不同的 OD 值。根据 2.1 的结果，所用抗血清最佳浓度为 1:500。喹乙醇系列浓度和试验孔的排列顺序见表 3，

同时设置平行重复孔和空白对照孔。以 0 抑制孔的 OD 值为最大值 B_0 ，其它抑制浓度孔 OD 值为 B， $B/B_0=50\%$ 时对应的喹乙醇浓度为此抗体的 IC_{50} 值。抗体的特异性检测结果的数据列于表 3。然后，用所得数据绘制出喹乙醇抑制曲线（图 2）。

表 3 抗血清特异性检测结果

喹乙醇的抑制浓度 (ng/ml)	0	0.3	1.25	5	25	100
OD 值	1.21	1.153	0.976	0.536	0.223	0.154

由表 3 中数据可知，喹乙醇抗血清 IC_{50} 值在 5 ng/ml 左右，表明本发明制备的抗血清是具有良好的特异性的抗喹乙醇多克隆抗体。

实施例 3 检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被喹乙醇抗原的酶标板；
- (2) 蛋白浓度为 1 mg / L 的抗喹乙醇多克隆抗体；
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体；
- (4) 喹乙醇标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0 μ g / L、0.5 μ g / L、1.5 μ g / L、4.5 μ g / L、13.5 μ g / L、40.5 μ g / L；
- (5) 底物显色液 A 液为过氧化脲，底物显色液 B 液为四甲基联苯胺；
- (6) 洗涤液为含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液；
- (7) 浓缩样品稀释液为 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液；
- (8) 终止液为 2mol / L 的盐酸溶液。

实施例 3 检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被羊抗兔抗抗体的酶标板；
- (2) 蛋白浓度为 5mg / L 的抗喹乙醇多克隆抗体；
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的喹乙醇；
- (4) 喹乙醇标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0 μ g / L、0.5 μ g / L、1.5 μ g / L、4.5 μ g / L、13.5 μ g / L、40.5 μ g / L；
- (5) 底物显色液 A 液为过氧化脲，底物显色液 B 液为邻苯二胺；

- [6] 洗涤液为 0.5%吐温-20 磷酸盐缓冲液;
- (7) 浓缩样品稀释液为 0.1%吐温-20 的磷酸盐缓冲液;
- (8) 终止液为 2mol / L 的盐酸溶液。

实施例 4 样品中莱克多巴胺残留的检测

1、样品前处理

准确称取 5g 饲料于 40ml 离心管中。加入 20ml 样品稀释液 (0.01%吐温-20 的磷酸盐缓冲液), 加热至 60℃, 充分振荡 10 分钟, 4000rpm 离心 10min, 取上清 5ml。

2、用试剂盒进行检测

向噻乙醇-OVA 偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品或样品溶液 50 μl, 再加入抗体工作液(1mg / L 的抗噻乙醇多克隆抗体)50 μl, 室温反应 1 小时。倒出孔中液体, 每孔加入 250 μl 经 10 倍稀释了的洗涤液, 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 3 次, 用吸水纸拍干。每孔加入酶标记抗抗体 100 μl, 避光室温孵育 30min。底物显色液 A 液(过氧化脲)50 μl, 再加 B 液(四甲基联苯胺)50 μl, 轻轻振荡混匀, 室温避光显色 15min, 每孔加入终止液(2mol / L 盐酸)50 μl, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值(OD 值)。

结果分析:

计算百分吸光度值并绘制标准曲线, 相对应每一个样品中噻乙醇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在样本中噻乙醇的含量。利用专业电脑软件更便于大量的样本的快速分析。根据酶标板上的样本颜色的深浅与系列浓度标准溶液颜色的比较, 可以判断出样本中噻乙醇的浓度范围。

实验例 1 试剂盒精密度试验

本实验例为标准可重复性试验。具体操作为:

从每批实施例 2 或 3 中的方法制备的酶标板中, 各抽取 10 个孔, 测定 4.5 μg / L 的标准溶液的吸光度值 (OD), 重复 3 次, 计算变异系数 CV%。

结果表明变异系数范围在 4.8—7.6%之间, 符合了变异系数小于 20%的规定, 说明本试剂盒标准品精密度达到了要求。

实验例 2 试剂盒的回收率试验

取两个浓度的喹乙醇标样，对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，分别计算回收率。结果表明饲料中的添加回收率为 60%—85%。

实验例 3 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2—8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值(零添加)、50%抑制浓度、喹乙醇添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 37℃保存条件下放置 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℃保存 6 个月以上。

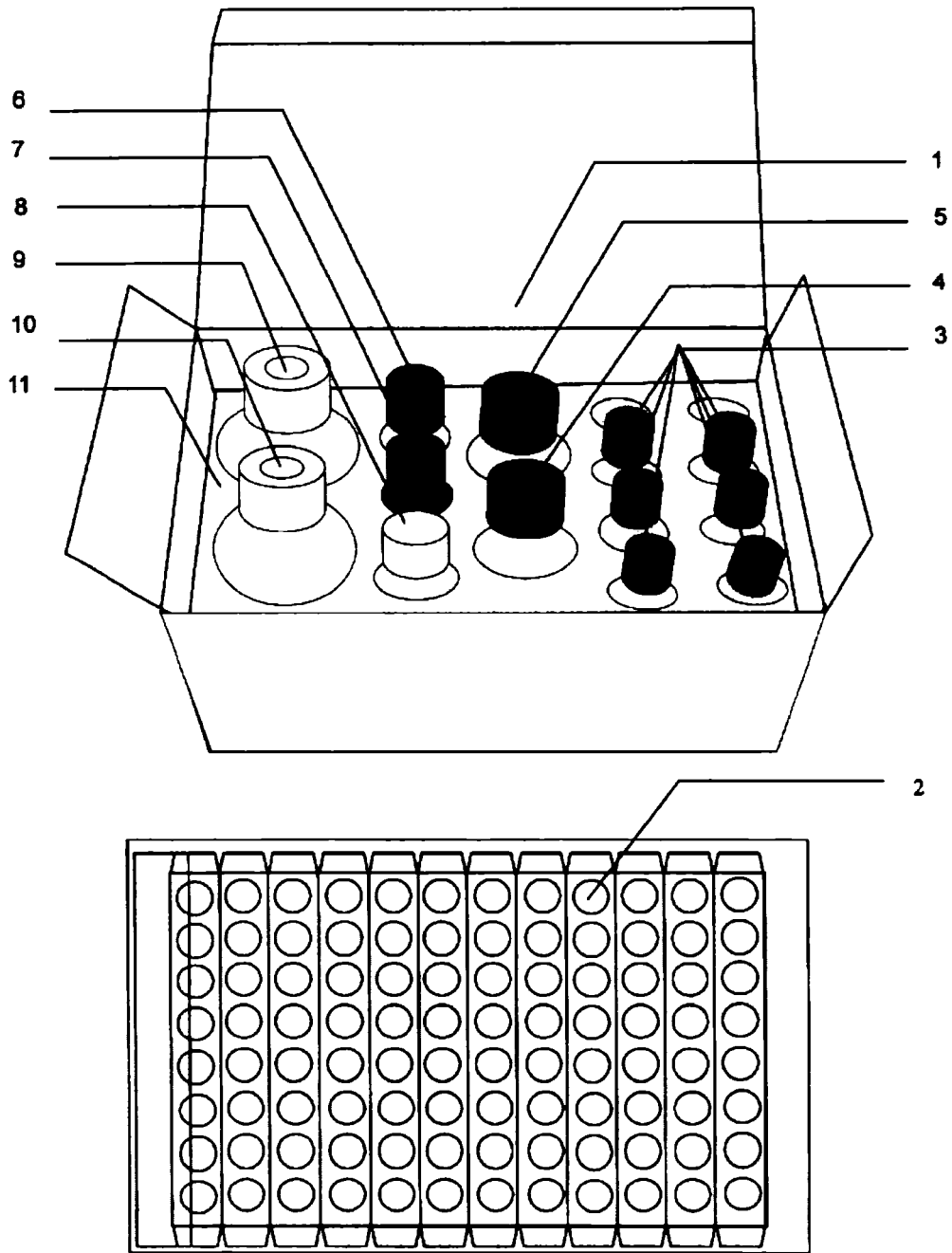


图 1

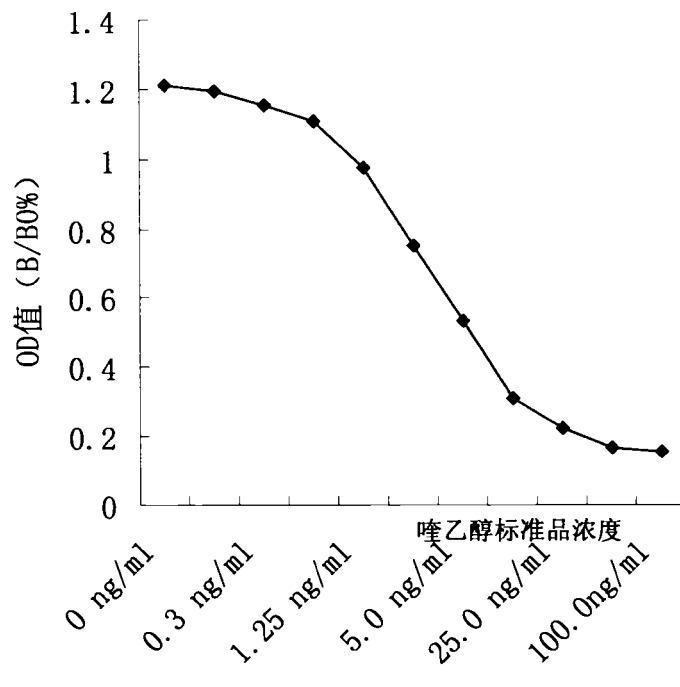


图 2

专利名称(译)	一种检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN1888903A	公开(公告)日	2007-01-03
申请号	CN200610103899.5	申请日	2006-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	杨曙明 于洪侠		
发明人	杨曙明 于洪侠		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/547		
代理人(译)	李浩成		
其他公开文献	CN1888903B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的喹乙醇的酶联免疫试剂盒包括喹乙醇特异性抗体、喹乙醇与载体蛋白的偶联物、和酶标二抗。本发明的检测喹乙醇的酶联免疫试剂盒灵敏、快速、准确，主要用于大批样品的筛查；盒中的主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便，具有高特异性、高灵敏性、高精确性、高准确性等特点，可快速检测饲料及畜产品中残留的喹乙醇。

