

[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 200610007286.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100533148C

[22] 申请日 2006.2.17

[21] 申请号 200610007286.1

[73] 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 史为民
冯才伟 张素霞 吴小平 汪善良

[56] 参考文献

JP7-188009A 1995.7.25

CN1547024A 2004.11.17

高效液相色谱法检测泰乐菌素在肉鸡组织中的残留. 孔科等. 中国兽医学报, 第 19 卷第 5 期. 1999

审查员 安玉苹

[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 2 页 说明书 13 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒,包括泰乐菌素特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体;所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标泰乐菌素半抗原;当所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时,所述酶标记物为酶标抗抗体;当所述包被原为抗抗体时,所述酶标记物为酶标泰乐菌素半抗原;本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织(肌肉、肝脏)等样品中泰乐菌素药物残留量。

1、一种检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒，包括泰乐菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标泰乐菌素半抗原；当所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标泰乐菌素半抗原；所述泰乐菌素半抗原是将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应得到的。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括泰乐菌素标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液、包被缓冲液和封闭液。

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：所述泰乐菌素特异性抗体为泰乐菌素单克隆抗体或泰乐菌素多克隆抗体；它们均是用泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述泰乐菌素半抗原是将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应得到的；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。

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：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

5、根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体；所述泰乐菌素单克隆抗体为泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614 分泌的抗体。

6、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为 pH 7.4、0.01—0.05mol/L 的含有 0.8%~1.2%吐温 80，0.1%的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

7、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：当酶标记物的标记酶是辣根过氧化物酶时，所述显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当酶标记物的标记酶是碱性磷酸酯酶时，所述显色剂为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

8、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为 0.02mol/L 含有 0.5% N,N'-二甲基甲酰胺，1%卵清蛋白的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

9、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述包被缓冲液为 pH 值为 8.0，0.1mol/L 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液；所述封闭液是含有 3~10% 的马血清、1% 酪蛋白的溶液；所述终止液为 1~2mol/L 的硫酸、盐酸或氢氧化钠缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

10、一种检测泰乐菌素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

称取 3g 动物组织匀浆物样本，加入 10ml 体积比为 84:16 乙腈和水溶液涡动 1min 后于振荡器上振荡 5min，混匀，3000g 以上，15℃，离心后取上清液 4ml，加入蒸馏水 3ml，再加入 2mol/L NaOH 100 μ l，混合后立刻加入三氯甲烷 5ml 萃取，于振荡器上振荡 10min，3000g 以上，15℃离心 10-15 分钟，去除上层相，取下层有机相用氮气吹干，用 1ml 稀释 3 倍的权利要求 8 所述浓缩复溶液溶解干燥后的残留物；

2) 利用权利要求 1—9 中任一所述的检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

泰乐菌素 (Halofuginone) 商品名叫速丹 (Stenorol), 为氢溴酸泰乐菌素0.6 % 预混剂, 是常山碱甲、乙、丙三种的混合物, 对疟疾和球虫均有特效, 且与其它抗球虫药无交叉耐药性, 因此常被添加于饲料中以控制球虫引起的动物疾病, 是目前饲料中广泛应用的药物添加剂。但泰乐菌素对水生动物 (如鱼、虾) 有很强的毒性, 且可以通过食物链危害人类。人如果食用泰乐菌素残留浓度很高的禽肉组织, 会出现身体不适等中毒现象。中华人民共和国农业部公告第235号《动物性食品中兽药最高残留限量》规定了泰乐菌素在鸡肝组织中的最高残留限量为130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前, 常用于泰乐菌素残留检测的方法主要有微生物法和仪器分析法。微生物检测法虽然经济、操作简便, 但在样本中有其他微生物抑制剂存在时, 其灵敏度和特异性受到限制; 高效液相色谱分析法、气谱、气质联机等单纯的仪器分析方法, 虽然灵敏度高, 但是样本前处理及测定操作烦琐, 费用高, 不适宜于大量样本筛查, 可以作为残留的确证分析。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒, 包括泰乐菌素特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体; 所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标泰乐菌素半抗原; 当所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时, 所述酶标记物为酶标抗抗体; 当所述包被原为抗抗体时, 所述酶标记物为酶标泰乐菌素半抗原。

所述泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将泰乐菌素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法或活性酯法进行偶联得到; 所述泰乐菌素半抗原是将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应得到的。

所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 其中优选碱性磷酸酯酶; 碱性磷酸酯酶标记抗抗体可采用现有技术中的多种方法如戊二醛法或过碘酸钠法将酶交联在抗抗体上; 碱性磷酸酯酶标记的泰乐菌素半抗原可采用活性酯法将碱性磷酸酯酶与泰乐菌素半抗原偶联得到。所述泰乐菌素半抗原是将泰乐菌素和对

氨基苯甲酸通过缩合反应得到的。

所述泰乐菌素特异性抗体可为泰乐菌素单克隆抗体或泰乐菌素多克隆抗体；它们均是用泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述泰乐菌素单克隆抗体为泰乐菌素鼠单克隆抗体，所述泰乐菌素多克隆抗体优选为泰乐菌素兔多克隆抗体。所述抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗体，优选为羊抗兔抗体。

所述泰乐菌素单克隆抗体优选为泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614 分泌的抗体。

泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614 已于 2006 年 2 月 9 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC）。

以上抗体均可以用泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白；所述泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将泰乐菌素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到；所述泰乐菌素半抗原是将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应得到的。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括泰乐菌素标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

所述浓缩洗涤液为 pH7.4，0.01~0.05mol/L 的含有 0.8%~1.2% 吐温 80，1%（质量浓度）的叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液；

当酶标记物的标记酶是辣根过氧化物酶时，所述显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当酶标记物的标记酶是碱性磷酸酯酶时，所述显色剂为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液。

所述浓缩复溶液为含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1% 卵清蛋白（OVA）的磷酸盐缓冲液。

所述终止液为 1~2mol/L 的硫酸、盐酸或氢氧化钠缓冲液。

所述泰乐菌素标准品溶液为含有泰乐菌素药物六个浓度梯度的溶液，用含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1% 卵清蛋白（OVA）的磷酸盐缓冲液稀释。

制备酶标板所需试剂为：

包被缓冲液为 pH 8.0，0.1mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液；

封闭液是含有 3~10% 的马血清、1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液；

泰乐菌素特异性抗体可以抗体工作液形式存在,所用的稀释抗体的溶液可为 pH 值 8.2 的 0.1mol/L, 含有 3% 的牛血清, 20% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液; 所述酶标记物工作液所用的稀释溶液可为含有 0.1% (质量浓度) 甘油、1% 的硫柳汞防腐剂的溶液。

所用的包被泰乐菌素抗原或抗抗体的载体的物质可为聚苯乙烯、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, 载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

本发明所提供的检测泰乐菌素的方法, 包括以下步骤:

1) 样品前处理

当样品为动物组织时, 用均质器均质样本, 称取 $3\text{g} \pm 0.1\text{g}$ 样本, 加入 10ml 乙腈-水溶液 (84: 16, V:V), 混匀, 涡动 10 分钟后于振荡器上振荡 10 分钟, 3000g 以上, 15°C , 离心 10 分钟, 取上清液 4ml, 加入蒸馏水 3ml, 再加入 2mol/L NaOH 100 μl , 混合后立刻加入三氯甲烷 5ml 萃取, 于振荡器上振荡 10min, 3000g 以上, 15°C , 离心 10-15 分钟, 去除上层相, 取下层有机相用氮气吹干, 用 1ml 稀释 3 倍的上述浓缩复溶液 (用去离子水稀释) 溶解干燥后的残留物。

2) 利用上述检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒检测样品。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物源食品样品中动物组织 (肌肉、肝脏) 中的泰乐菌素含量。本发明的方法中, 当微孔条上预包被泰乐菌素半抗原和载体蛋白的偶联物时, 加入样品溶液和泰乐菌素抗体, 样品中残留的泰乐菌素将和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗泰乐菌素抗体, 加入酶标抗抗体进行酶放大作用后, 显色; 当微孔条上预包被抗抗体时, 加入泰乐菌素抗体后再加入样本溶液或标准品溶液及酶标记泰乐菌素抗原, 样本中残留物泰乐菌素将和酶标抗原竞争抗泰乐菌素抗体, 显色; 显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值 (OD 值), 样本吸光度值与其所含残留物泰乐菌素药物的含量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中残留的泰乐菌素药物含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅, 与系列浓度的泰乐菌素药物的标准液颜色的比较可判断样品中泰乐菌素的浓度范围。在洗涤液中加入一定量吐温 80 和叠氮化钠的作用在于: 缓冲液中吐温 80 会减少抗体的非特异性吸附, 还能对蛋白起到一定的保护作用, 加入叠氮化钠后, 则叠氮钠在溶液中抑制细菌的生长, 对溶液的稳定性起到一个保护作用。

泰乐菌素是小分子物质, 只有免疫反应性, 没有免疫原性, 不能诱发机体产生免疫应答, 必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成泰乐菌素半抗原, 给泰乐菌素接出了一个含苯环的间

隔臂,这样突出了泰乐菌素的特征结构,同时也增加了半抗原的免疫源性和特异性。再将泰乐菌素采用混合酸酐法与载体蛋白偶联得到免疫原。本发明的检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒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;半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利,半抗原与OVA、RSA和MSA的结合摩尔比分别为12:1、17:1和17:1。主要试剂以工作液、浓缩液或冻干粉等形式提供,检验方法方便易行,经过对试剂盒的精密度和准确度测试实验表明,本发明的酶联免疫试剂盒具有高特异性、高灵敏度、高精确度、高准确度等特点,将在食品和饲料泰乐菌素残留量的检测中发挥重要作用。本发明的试剂盒结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带,可实现现场监控及大量的样本筛查。本发明的检测泰乐菌素的方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测。本发明简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测的时间,具有可观的社会效益和经济效益。

附图说明

图1为以泰乐菌素抗原为包被原的酶联免疫试剂盒泰乐菌素标准曲线图

图2为以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒泰乐菌素标准曲线图

具体实施方式

下述实施例的方法如无特别说明,均为常规方法。

下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

实施例1、以泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

以泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括:

- (1) 包被有泰乐菌素与载体蛋白偶联物的酶标板;
- (2) 碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液:用酶标抗体稀释液将碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体稀释成蛋白浓度为 $0.1\sim 1\mu\text{g/L}$ 。上述碱性磷酸酯酶标记抗体,所述酶标抗体稀释液为含有0.1% (质量浓度) 甘油、1%的硫柳汞防腐剂的溶液。12ml/瓶,1瓶。
- (3) 泰乐菌素标准品溶液:泰乐菌素系列标准溶液6瓶, $0\mu\text{g/L}$, $1.5\mu\text{g/L}$, $4.5\mu\text{g/L}$, $13.5\mu\text{g/L}$, $40.5\mu\text{g/L}$, $121.5\mu\text{g/L}$,1~3ml/瓶。所用的泰乐菌素药物稀释液为含有5% (质量浓度) N,N'-二甲基甲酰胺(DMF),1%卵清蛋白(OVA)的磷酸盐缓冲液。
- (4) 显色剂为:4-硝基酚磷酸盐缓冲液。均为8ml/瓶。

(5) 泰乐菌素鼠单克隆抗体工作液：用抗体稀释液将泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614 分泌的单克隆抗体稀释成蛋白浓度为 $0.02 \mu\text{g/ml}$ ，12ml/瓶，1 瓶。稀释抗体的溶液为 pH 值 8.2 的 0.1mol/L ，含有 3% 的牛血清，20% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：pH 7.4、 $0.01-0.05\text{mol/L}$ 的含有 1.0% 吐温 80，1%（质量浓度）的叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液，40ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液： 2mol/L 氢氧化钠，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液： 0.02mol/L 含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)，1% 卵清蛋白(OVA) 的磷酸盐缓冲液，20ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 4 倍。

制备酶标板所需试剂：

(1) 包被缓冲液：pH 值为 8.0， 0.1mol/L 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液。

(2) 封闭液：含有 3~10% 的马血清、1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲溶液。

其中，泰乐菌素与载体蛋白偶联物、泰乐菌素特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗抗体的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、泰乐菌素半抗原的合成方法：

泰乐菌素半抗原的制备：将泰乐菌素和对氨基苯甲酸通过缩合反应合成泰乐菌素半抗原，给泰乐菌素接出了一个含苯环的间隔臂，这样突出了泰乐菌素的特征结构，同时也增加了半抗原的免疫源性和特异性。

2、包被原的制备：是将泰乐菌素半抗原与甲状腺蛋白采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)偶联得到。

3、酶标板的制备：

用包被缓冲液将泰乐菌素与甲状腺蛋白偶联物稀释成 $0.06\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 温育 2h，并 4°C 环境过夜，倾去包被液，用洗涤液（浓缩洗涤液用去离子水稀释 20 倍）洗涤 2 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 $150\mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

二、泰乐菌素鼠单克隆抗体的制备

1、免疫原的制备：是将泰乐菌素半抗原与卵清蛋白采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)偶联得到。通常免疫原的纯度要求较高，免疫原的纯度越高，制备的抗体特异性越强，至少要达到 90% 以上，上述合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 93.2%。

2、泰乐菌素鼠单克隆抗体的制备⁴⁴

动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以泰乐菌素与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 100 μ g/只，首免时将免疫原与等量的福氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量福氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化：取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞，按 5: 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。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株—泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614。

细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614 用冻存液制成 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 $^{\circ}$ 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 天后腹腔注射泰乐菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-4 CGMCC No. 1614 5×10^6 个/只，7~10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20 $^{\circ}$ C 保存。

四、酶标抗体的制备

抗抗体的制备：采用无病原体山羊做为免疫动物，将鼠源性抗体按照免疫剂量为 150~300 μ g /只进行免疫，首免时将免疫原与等量的福氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量福氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的羊抗鼠抗抗体。

酶标记抗抗体的制备：将抗抗体与碱性磷酸酯酶进行偶联，采用的方法优选戊二醛法，用碱性磷酸酯酶以 2: 1 的比例与抗抗体偶联时，约有 60%~70% 的酶与 8% 的抗抗体偶联，酶标记物的产量比使用辣根过氧化物酶高。

酶标羊抗鼠抗抗体具体步骤如下：

1) 称取碱性磷酸酯酶 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，于室温静置过夜。

2) 反应后的酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / 1min，收集棕色流出液。如体积大于 5ml，则以聚乙二醇浓缩至 5ml。放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌。

3) 取羊抗鼠抗抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。

4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml, 继续搅拌 3h。

5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25ml, 混匀后, 置室温 2h。

6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵, 置 4℃ 1h。

7) 3000rpm 离心半小时, 弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次, 最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液中。

8) 将上述溶液装入透析袋中, 用 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析, 去除铵离子后(用茚氏试剂检测), 10,000rpm 离心 30min 去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 分装后, 冰冻保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的泰乐菌素的方法如下:

一、样品前处理

肌肉、肝脏: 用均质器均质样本, 称取 $3g \pm 0.1g$ 样本于 50ml 离心管中, 加入 10ml 乙腈-水溶液 (84: 16, V: V), 涡动 1min 后于振荡器上振荡 5min。3000g 以上, 15℃, 离心 10min。取上清液 4ml, 加入蒸馏水 3ml, 再加入 2M NaOH 100 μ l, 混合后立刻加入三氯甲烷 5ml 萃取, 于振荡器上振荡 10min, 3000g 以上, 15℃, 离心 10min。去除上层相, 取下层有机相用氮气吹干。用 1ml 稀释 3 倍的浓缩复溶液 (浓缩复溶液用去离子水稀释 3 倍) 溶解干燥后的残留物。即可进行分析。

二、检测方法

向包被有泰乐菌素与甲状腺蛋白偶联物的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液 50 μ l, 加入泰乐菌素鼠单克隆抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 洗涤液 (浓缩洗涤液用去离子水稀释 19 倍), 30 秒后倒出孔中液体, 用吸水纸拍干, 如此重复操作共洗板 5 次。每孔加入碱性磷酸酯酶标记羊抗鼠抗抗体工作液 100 μ l 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min。底物显色液 4-硝基酚磷酸盐缓冲液 100 μ l, 轻轻振荡混匀, 37℃ 恒温箱避光显色 15min。每孔加入终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪 (波长为 400nm) 测定每孔吸光度值 (OD 值)。

三、结果分析

所获得的每个浓度标准溶液或样本吸光度值的平均值 (B) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%, 即百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为 0 μ g/L 标准溶液的平均

吸光度值。以泰乐菌素浓度的自然对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，如图 1 所示。相对应每一个样品中泰乐菌素的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液中泰乐菌素的浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 1.5 $\mu\text{g/L}$ 。

实施例 2、以抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒及其制备方法

以泰乐菌素抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有泰乐菌素抗抗体的酶标板；

(2) 碱性磷酸酯酶标记的泰乐菌素半抗原工作液：用酶标半抗原稀释液将碱性磷酸酯酶标记的泰乐菌素半抗原稀释成蛋白浓度为 0.1~1 $\mu\text{g/L}$ 。所述酶标半抗原稀释液为含有 50%甘油、1%的硫柳汞防腐剂的溶液。12ml/瓶，1 瓶。

(3) 泰乐菌素标准品溶液：泰乐菌素系列标准溶液 6 瓶，0 $\mu\text{g/L}$ ，1.5 $\mu\text{g/L}$ ，4.5 $\mu\text{g/L}$ ，13.5 $\mu\text{g/L}$ ，40.5 $\mu\text{g/L}$ ，121.5 $\mu\text{g/L}$ ，1~3ml/瓶。所用的泰乐菌素药物稀释液为含有 5%（质量浓度）N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1%卵清蛋白（OVA）的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色剂为：4-硝基酚磷酸盐缓冲液。均为 8ml/瓶。

(5) 泰乐菌素兔多克隆抗体工作液：用抗体稀释液将泰乐菌素兔多克隆抗体稀释成蛋白浓度为 0.05 $\mu\text{g/ml}$ ，12ml/瓶，1 瓶。稀释抗体的溶液为 pH 值 8.2 的 0.1mol/L，含有 3%的牛血清，20%甲醇的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：pH 7.4、0.01—0.05mol/L，含有 1.0%吐温 80，1%的叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液，40ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 20 倍。

(7) 终止液：2mol/L 氢氧化钠，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：0.02mol/L 含有 5% N,N'-二甲基甲酰胺（DMF），1%卵清蛋白（OVA）的磷酸盐缓冲液，20ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 4 倍。

制备酶标板所需试剂：

(1) 包被缓冲液：pH 值为 8.0，0.1mol/L 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液。

(2) 封闭液：含有 3~10%的马血清、1%酪蛋白的磷酸盐缓冲溶液。

其中，抗抗体包被原、泰乐菌素特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的泰乐菌素半抗原的制备方法如下：

一、酶标板的制备

1、包被原的制备：采用无病原体山羊做为免疫动物，将兔源抗体按照免疫剂量为 150~300 μg /只进行免疫，首免时将免疫原与等量的福氏完全佐剂混合制成乳化

剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量福氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的羊抗兔抗抗体。

2、包被有羊抗兔抗抗体的酶标板制备方法：用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 0.06 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，并 4 $^{\circ}$ C 环境过夜，倾去包被液，用洗涤液（浓缩洗涤液用去离子水稀释 19 倍）洗涤 2 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 150 μ l 封闭液，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。

二、泰乐菌素兔多克隆抗体的制备方法

免疫原的制备：是将泰乐菌素半抗原与卵清蛋白采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯）偶联得到。

通常免疫原的纯度要求较高，免疫原的纯度越高，制备的抗体特异性越强，至少要达到 90% 以上，上述合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 93.2%。

泰乐菌素兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以泰乐菌素半抗原与卵清蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1mg/kg，首免时将免疫原与等量的福氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量福氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

三、酶标半抗原的制备

碱性磷酸酯酶标记半抗原：泰乐菌素半抗原的制备同实施例 1 中的泰乐菌素半抗原制备方法。再将泰乐菌素半抗原与碱性磷酸酯酶采用活性酯法进行偶联得到酶标记泰乐菌素抗原。

利用该试剂盒检测样品中残留的泰乐菌素的方法如下：

样品前处理的具体步骤同实施例 1 中的样品前处理步骤

检测方法：

向包被有抗抗体的 96 孔酶标板微孔中加泰乐菌素兔多克隆抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 洗涤液（浓缩洗涤液用去离子水稀释 19 倍），30 秒后倒出孔中液体，用吸水纸拍干，如此重复操作共洗板 5 次。每孔加入系列标准品溶液或样品溶液 50 μ l，再加入碱性磷酸酯酶标记的泰乐菌素半抗原工作液 100 μ l 用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。底物显色液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液）100 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min。每孔加入终止液 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪（波长为 400nm）测定每孔

吸光度值（OD 值）。

结果分析的方法同实施例 1 中的结果分析方法，该试剂盒的标准曲线图，如图 2 所示。结果分析表明，制备的试剂盒整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成，最低检测限为 1.5 μ g/L。

实施例 3、试剂盒精密度、准确度和保存期试验

1、试剂盒精密度试验

(1) 标准品精密度试验

将实施例 1 和实施例 2 中制备的试剂盒分别取三批进行精密度实验，每批试剂盒抽取 10 个试剂盒，再从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔，测定 13.5 μ g/L 标准品溶液的吸光度值（OD 值），计算变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 1 所示，结果表明变异系数范围在 4.2%-10.2%之间。

表1 实施例1的试剂盒标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01批	6.1	7.2	5.4	8.2	5.3	7.2	6.4	8.3	9.4	5.4
	03批	5.4	6.1	7.2	8.3	4.2	9.5	9.3	10.4	12.4	4.6
	06批	6.4	7.4	8.5	9.3	9.8	7.9	7.5	8.3	9.4	10.2

实施例 2 中的三批试剂盒的测定结果如表 2 所示，结果表明变异系数范围在 3.7%~8.6%之间。

表 2. 实施例 2 的试剂盒标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	5.8	5.6	4.1	3.7	7.8	6.5	4.8	5.2	5.9	7.6
	03 批	6.4	5.1	4.9	8.5	7.6	3.9	8.6	7.8	4.6	5.9
	06 批	5.9	8.6	4.6	6.5	6.9	4.5	8.3	7.6	8.9	8.1

(2) 样本可重复性试验

分别取鸡的肌肉、鸡的肝脏作为样本，在每个样本中，添加 50 μ g/kg 浓度的泰乐霉素标准品，分别取实施例 1 和实施例 2 中制备的三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数。实施例 1 中的三批试剂盒的测定结果如表 3、表 4 所示，结果表明肌肉样本变异系数均低于 20%，肝脏样本的变异系数均低于 16 %。

表3 肌肉样品可重复性试验

批号	实测值（ μ g/kg）	变异系数CV%
----	------------------	---------

01	36.5	42.5	48.3	32.5	36.9	15.6
	41.6	32.4	38.5	49.5	50.2	17.8
	46.5	48.1	32.8	35.1	39.7	16.7
03	45.1	34.7	33.9	46.8	49.2	17
	38.1	49.5	42.8	36.5	37.1	13.4
	40.5	31.8	38.4	45.1	47.3	14.9
06	49.1	41.7	47.3	38.2	35.6	13.6
	32.1	37.4	44.9	48.2	47.0	16.5
	42.7	34.6	47.8	40.7	49.5	13.8

表4 肝脏样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	50.7	43.8	38.1	47.5	34.5	15.5
	46.2	31.5	34.7	36.7	41.7	15.3
	38.1	32.8	41.5	35.1	31.4	11.4
03	49	42.8	40.8	42.1	37.4	9.96
	37.1	35.1	32.5	39.5	37.1	7.22
	42.1	46.5	40.8	36.5	34.9	11.5
06	48.2	42.6	37.8	34.6	46.4	13.6
	31.4	38.2	34.2	36.7	40.1	9.44
	48.1	44.6	46.1	48.7	39.4	8.19

实施例 2 中的三批试剂盒的测定结果如表 5、表 6 所示,结果表明肌肉样本变异系数均低于 20%,肝脏样本的变异系数均低于 20%。

表5 肌肉样品可重复性试验

	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	35.3	46.3	41.6	51.6	45.3	13.7
	41.6	41.3	52.3	46.5	39.8	11.6
	51.6	42.3	41.3	52.7	35.6	16.2
03	35.6	32.7	45.6	45.8	32.1	17.8
	38.9	42.6	42.3	49.2	50.4	11.0
	41.5	51.0	42.7	46.9	35.2	13.7
06	50.3	54.6	46.4	45.2	36.7	14.3
	39.2	45.3	45.9	36.1	50.8	13.4
	41.6	37.5	41.2	35.4	49.6	13.2

表6 肝脏样品可重复性试验

	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数CV%
01	41.5	38.5	45.2	50.1	37.5	12.7
	45.3	45.6	46.7	48.7	34.4	12.7
	36.7	50.6	35.9	46.2	45.8	14.0
03	35.8	41.3	45.3	39.5	42.3	8.6
	45.3	46.7	35.2	45.9	45.9	11.0
	51.6	50.6	42.5	46.2	51.3	8.2
06	45.9	49.6	46.7	51.2	36.8	12.1
	51.2	47.8	43.9	39.5	38.7	12.0
	51.2	39.5	41.2	45.9	48.9	10.9

2、试剂盒的准确度测定

鸡的肌肉样本和肝脏样本分别按 $20\mu\text{g/kg}$ 浓度、按 $50\mu\text{g/kg}$ 浓度添加泰乐菌素标准品，分别利用实施例 1 或实施例 2 的试剂盒按照实施例 1 或实施例 2 的方法检测泰乐菌素，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度。实施例 1 的试剂盒测定结果如表 7 所示，结果表明肌肉添加的准确度在 61.5%~91.5%之间，肝脏添加准确度在 72.6%~95.5%之间。

表7. 实施例1的试剂盒准确度

样本		肌肉		肝脏	
添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	81.4	91.5	95.5	94.5
	2	61.5	82.6	81.4	82.1
	3	72.8	83.4	72.6	82.4
	4	89.5	76.5	82.4	94.5
平均值		76.3	83.5	83.0	88.4

实施例 2 的试剂盒测定结果如表 8 所示，结果表明肌肉添加的准确度在 65.2%~95.6%之间，肝脏添加准确度在 64.3%~95.7%之间。

表8. 实施例2的试剂盒准确度

样本		肌肉		肝脏	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	75.3	67.8	78.3	89.5
	2	85.2	85.1	88.8	84.3
	3	95.6	74.3	64.3	85.5
	4	65.2	85.6	79.8	95.7
平均值		80.3	78.2	77.8	88.8

3、试剂盒保存期试验

将实施例 1 和实施例 2 制备的试剂盒分别保存在 2-8℃，6 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、泰乐菌素添加实际测定值，结果表明实施例 1 的试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度，实施例 2 的试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度，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，将上述试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明实施例 1 和实施例 2 制备的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，测定结果也表明实施例 1 和实施例 2 制备的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℃ 至少可以保存 6 个月以上。

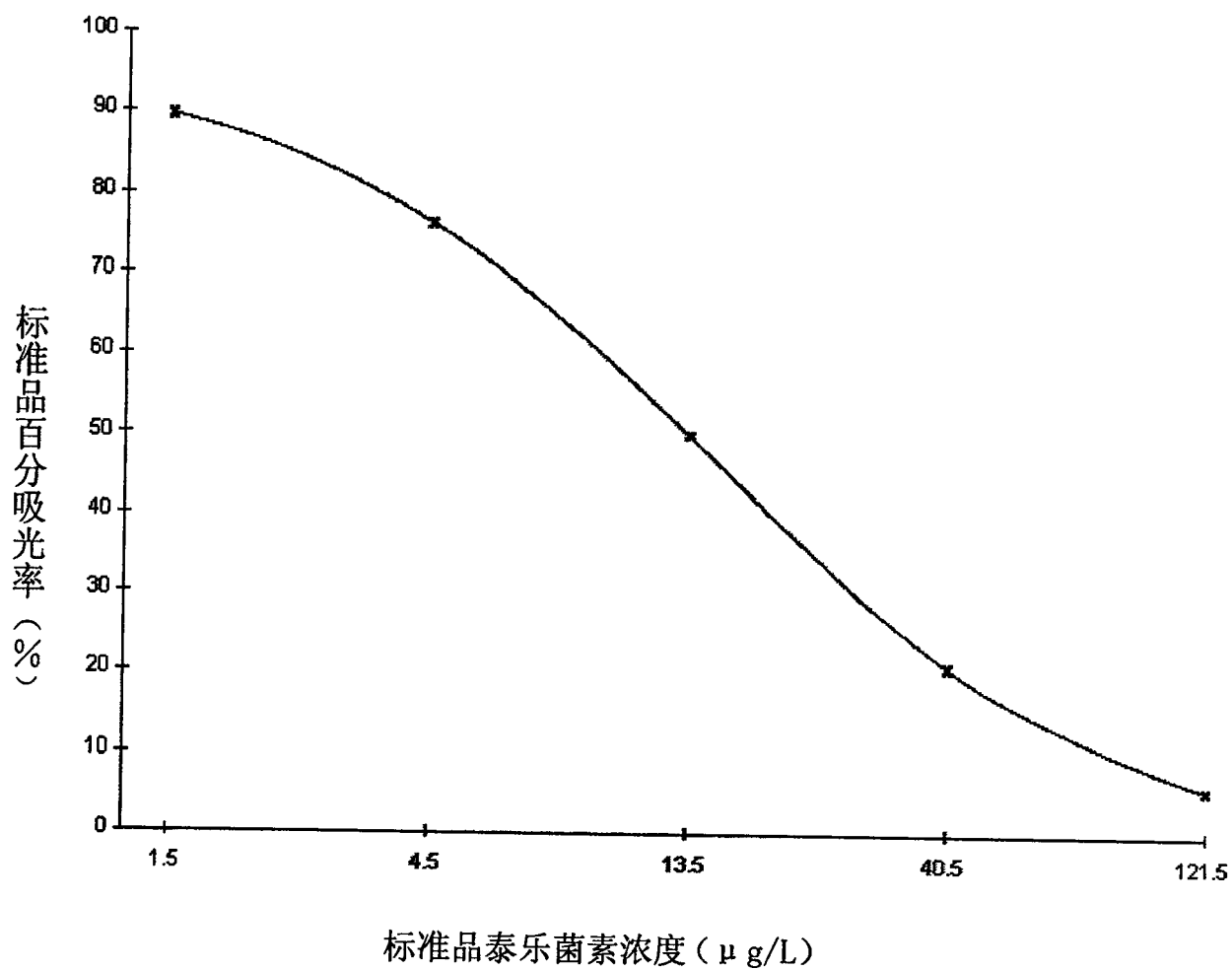


图 1

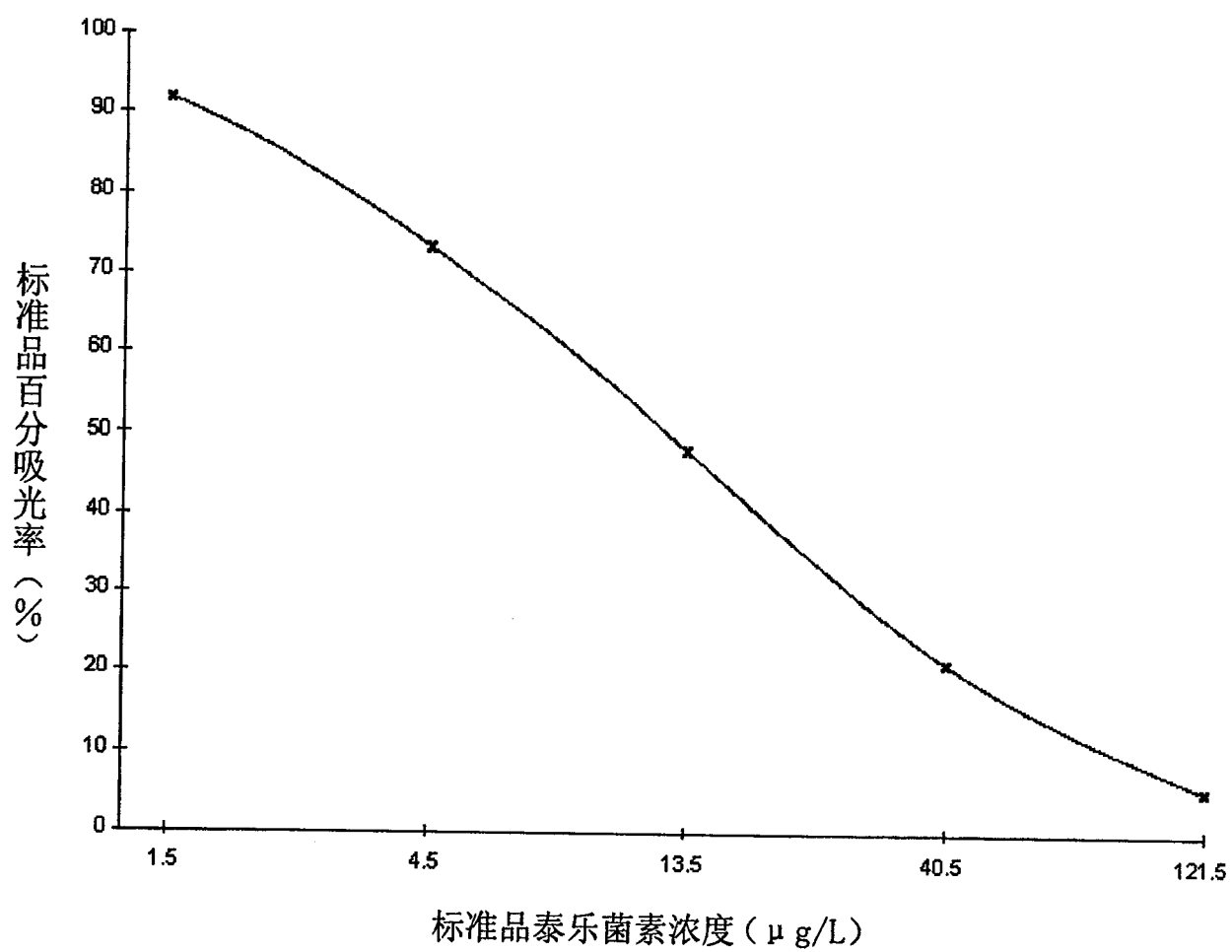


图 2

专利名称(译)	一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100533148C	公开(公告)日	2009-08-26
申请号	CN200610007286.1	申请日	2006-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 史为民 冯才伟 张素霞 吴小平 汪善良		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 史为民 冯才伟 张素霞 吴小平 汪善良		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1811442A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测泰乐菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测泰乐菌素的酶联免疫试剂盒，包括泰乐菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗体；所述酶标记物为酶标抗体或酶标泰乐菌素半抗原；当所述包被原为泰乐菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗体；当所述包被原为抗体时，所述酶标记物为酶标泰乐菌素半抗原；本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织(肌肉、肝脏)等样品中泰乐菌素药物残留量。

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