

[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 200610007284.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010年1月20日

[11] 授权公告号 CN 100582778C

[22] 申请日 2006.2.17

[21] 申请号 200610007284.2

[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 史为民 何继红 何方洋  
丁双阳 万宇平

[56] 参考文献

US6790621B2 2004.9.14

Pharmacokinetics of ivermectin in sea bream,  
Sparus aurata using a direct competitive ELISA.  
P. Katharios 等. Fish Physiology and Biochemistry,  
Vol. 26 . 2002

检测伊维菌素的简捷灵敏的酶联免疫吸附  
试验. 蒋健敏. 国外医学. 寄生虫病分册, 第  
24卷第3期. 1997

审查员 王璟

[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

一种检测伊维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伊维菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测伊维菌素的酶联免疫试剂盒,包括伊维菌素特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为伊维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伊维菌素半抗原;当所述包被原为伊维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伊维菌素半抗原。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等中伊维菌素药物残留量。

1、一种检测伊维菌素的酶联免疫试剂盒，包括伊维菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为伊维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伊维菌素半抗原；当所述包被原为伊维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标伊维菌素抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标伊维菌素半抗原；所述伊维菌素半抗原是将伊维菌素经二溴丁二酸法或戊二酸酐法合成得到的；

所述伊维菌素特异性抗体为伊维菌素单克隆抗体或伊维菌素多克隆抗体；它们均是用伊维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述伊维菌素半抗原是将伊维菌素经二溴丁二酸法或戊二酸酐法合成得到的；所述载体蛋白为鼠血清蛋白、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。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括伊维菌素标准溶液、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：所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

4、根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体；所述伊维菌素单克隆抗体为伊维菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-2 CGMCC No. 1612 所分泌的抗体。

5、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，含有 0.8~1.2%吐温 80，0.3%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

6、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。

7、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为 pH 8.3、0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

8、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述包被缓冲液为 pH8.2，0.5mol/L 硼砂-硼酸缓冲液；所述封闭液为含有 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、氢氧化钠或盐酸缓冲液；所述百分含量为质量百分

含量。

9、一种检测伊维菌素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

当样品为动物组织时，称取 5g 动物组织匀浆物，加入 10ml 无水甲醇混合，混匀，3000g 以上，15℃，离心 10-15 分钟，取上清液，用稀释 1 倍的权利要求 8 所述的浓缩复溶液稀释 10 倍；

2) 利用权利要求 1-8 中任一所述的检测伊维菌素的酶联免疫试剂盒检测样品。

## 一种检测伊维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伊维菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

伊维菌素 (Ivermectin) 是一个大环内酯类抗生素, 它能使氯离子穿过细胞膜汇集起来, 从而造成多种线虫及节肢动物麻痹, 在兽医领域中有多种用途, 伊维菌素对节肢动物及线虫具有毒性。但高剂量的使用伊维菌素能使宿主对血液中的线虫或节肢动物产生快速清除炎症应答, 产生治疗的不良反应。2002年12月我国农业部公告第235号文规定在所有食品动物的肌肉中最高残留量为  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 在脂肪中的最高残留量为  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此, 在兽药中检测伊维菌素的残留量非常重要。

目前, 常用于伊维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、气质联机法等单纯的仪器分析方法, 虽然灵敏度高, 但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动物组织中伊维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伊维菌素的酶联免疫试剂盒, 包括伊维菌素特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述包被原为伊维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或伊维菌素抗抗体; 所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标伊维菌素半抗原; 当所述包被原为伊维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伊维菌素半抗原。

所述伊维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过混合酸酐法或活性酯法将伊维菌素半抗原和载体蛋白进行偶联得到; 所述伊维菌素半抗原是将伊维菌素经二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成得到的。

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伊维菌素半抗原可采用混合酸酐法将碱性磷酸酯酶与伊维菌素半抗原偶联得到。所述伊维菌素半抗原是将伊维菌素

经二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成得到的。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液为含有 0.1%（质量浓度）甘油（可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1%的硫柳汞防腐剂（便于保存）溶液。

所述伊维菌素特异性抗体可为伊维菌素单克隆抗体或伊维菌素多克隆抗体；它们均是用伊维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，所述伊维菌素单克隆抗体为伊维菌素鼠单克隆抗体，所述伊维菌素多克隆抗体优选为伊维菌素兔多克隆抗体。所述抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗体，优选为羊抗兔抗体。抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液；抗体工作液所用的抗体稀释液为 pH7.9 的 0.2mol/L，含有 3%（质量浓度）的 N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液。

所述伊维菌素单克隆抗体优选为伊维菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-2 CGMCC No. 1612 分泌的抗体。

伊维菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-2 CGMCC No. 1612 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）。

以上抗体均可以用伊维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、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；所述伊维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将伊维菌素半抗原和载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到；所述伊维菌素半抗原是将伊维菌素经二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成得到的。

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

所述标准品溶液为含有伊维菌素药物六个浓度梯度的溶液，所用的伊维菌素药物稀释液为 pH 8.3，0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

所述浓缩洗涤液为 20 倍浓缩，pH 7.4，0.01~0.05 mol/L 含有 0.8%~1.2% 吐温 80，3%（质量浓度）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。

所述浓缩复溶液可为 pH 8.3，0.03 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

所述终止液为 1~2mol/L 的硫酸、氢氧化钠或盐酸缓冲液。

所述包被缓冲液为 pH8.2, 0.5mol/L 硼砂-硼酸缓冲液;

所述封闭液含有 3-10% 马血清, 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲溶液。

所用的包被伊维菌素抗原或抗抗体的固相载体物质可为聚苯乙烯、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伊维菌素的方法, 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  $5\text{g} \pm 0.1\text{g}$  样本, 加入 10ml 无水甲醇混合, 混匀, 3000g 以上,  $15^{\circ}\text{C}$  离心 10-15 分钟, 取上清液, 用稀释 1 倍的浓缩复溶液 (浓缩复溶液用去离子水按 1:1 稀释) 稀释 10 倍;

#### 2) 利用上述检测伊维菌素的酶联免疫试剂盒检测样品。

伊维菌素是小分子物质, 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。本发明半抗原的合成如下: 将伊维菌素经二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成伊维菌素半抗原, 就是在伊维菌素的分子结构上直接突出的 4-羟基酯化成羧基, 将伊维菌素药物的主体结构暴露, 这样就突出了伊维菌素类药物的簇特征结构, 设计出的抗原制备的抗体是针对伊维菌素类药物的簇抗体。再将伊维菌素采用混合酸酐法与载体蛋白偶联得到免疫原。本发明的检测伊维菌素的酶联免疫试剂盒可定性、定量检测肝脏, 肌肉等样品中伊维菌素药物的残留量。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。

本发明的检测原理是: 当微孔条上预包被伊维菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时, 加入标准品或样品溶液和伊维菌素抗体工作液后, 样本中残留的伊维菌素和微孔条上预包被的偶联抗原竞争结合伊维菌素的抗体, 加入酶标记物进行酶活性放大作用, 显色后终止; 当微孔条上包被羊抗鼠抗抗体时, 加入伊维菌素抗体工作液后, 再加入系列标准品或样品溶液和酶标抗原, 样品残留的伊维菌素和酶标抗原竞争结合伊维菌素抗体, 显色; 显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值 (OD 值), 样本吸光度值与其残留物伊维菌素的含量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出相应残留物伊维菌素的含量。也可根据酶标板上的样品溶液颜色的深浅, 与系列浓度的伊维菌素标准液颜色比较判断样品中伊维菌素的浓度范围。

本发明的检测伊维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; 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、高精度度、高准确度等特点，将在食品和饲料伊维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，可用于动物源性食品中伊维菌素的检测；本发明的检测伊维菌素的方法高效、准确、简便、适于进行现场监控及大量的样本筛查，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 为以伊维菌素抗原为包被原的酶联免疫试剂盒伊维菌素标准曲线图

图 2 为以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒伊维菌素标准曲线图

### 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 以伊维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

以伊维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) 包被有伊维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：用稀释液（含有 0.1%（质量浓度）甘油（可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1%小牛血清，1%的硫柳汞防腐剂（便于保存）溶液）将碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体稀释成蛋白浓度为 0.1~1 μg/L 的酶标记抗抗体工作液，12ml/瓶，1 瓶。

(3) 伊维菌素标准溶液：用稀释液将伊维菌素稀释为系列标准溶液 6 瓶，0 μg/L，0.5 μg/L，1.5 μg/L，4.5 μg/L，13.5 μg/L，40.5 μg/L，1~3ml/瓶。所用的伊维菌素稀释液为 pH 8.3，0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色剂：4-硝基酚磷酸盐缓冲液。均为 8ml/瓶。

(5) 伊维菌素鼠单克隆抗体工作液：用抗体工作液将伊维菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-2 CGMCC No. 1612 分泌的抗体稀释成蛋白浓度为 0.5~5.0 μg/L 抗体工作液，12ml/瓶，1 瓶。抗体工作液所用的抗体稀释液为 pH 7.9 的 0.2mol/L，含有 3%（质量浓度）的 N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：pH 7.4，0.01~0.05mol/L，含有 0.8~1.2%吐温 80，3%（质量浓度）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：1mol/L 氢氧化钠， 8ml/瓶， 1 瓶。

(8) 浓缩复溶液： pH8.3， 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液， 为正常使用浓度的 2 倍， 30ml/瓶， 1 瓶。

制备酶标板时所需试剂：

(1) 包被缓冲液： pH8.2， 0.5mol/L 硼砂-硼酸缓冲液。

(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， 伊维菌素与载体蛋白偶联物、 伊维菌素特异性抗体、 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、 伊维菌素半抗原的合成方法：

伊维菌素半抗原的制备原理： 将伊维菌素经二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成伊维菌素半抗原， 就是在伊维菌素的分子结构上直接把突出的 4-羟基酯化成羧基， 将伊维菌素药物的主体结构暴露， 这样就突出了伊维菌素类药物的簇特征结构， 设计出的抗原制备的抗体是针对伊维菌素类药物的簇抗体。

2、 包被原： 将伊维菌素半抗原和兔血清白蛋白（RSA）载体蛋白， 采用混合酸酐法进行偶联得到。

包被原合成的具体方法如下：

取伊维菌素药物半抗原 2g 溶于 30ml， 5‰（质量浓度）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中， 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中， 加到半抗原溶液中室温搅拌反应 4 小时， 取兔血清白蛋白（RSA） 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中， 再将兔血清白蛋白（RSA） 滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。 将反应完的人工抗原对 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天， 每天换液 3~4 次。 最后将抗原冻干保存。

#### 3、 酶标板的制备：

用包被缓冲液将伊维菌素半抗原与兔血清白蛋白偶联物稀释成 0.07 μg/ml， 每孔加入 100 μl， 37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜， 倾去包被液， 用去离子水稀释 19 倍的浓缩洗涤液， 洗涤 2 次， 每次 30s， 拍干， 然后在每孔中加入 150 μl 封闭液， 37℃ 温育 1-2h， 倾去孔内液体， 干燥后用铝膜真空密封保存。

### 二、 伊维菌素鼠单克隆抗体的制备

免疫原的制备过程： 取伊维菌素药物半抗原 2g 溶于 30ml， 5‰（质量浓度）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中， 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中， 加到半抗原溶液中室温搅拌反应 4 小时， 取卵清蛋白（OVA） 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐

缓冲液中，再将卵清蛋白（OVA）滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。将反应完的人工抗原对 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次。最后将抗原冻干保存。

**动物免疫程序** 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以伊维菌素半抗原与卵清蛋白（OVA）偶联物为免疫原，免疫原免疫剂量为 100μg/只，首免时将免疫原与等量的弗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弗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—伊维菌素的单克隆杂交瘤细胞株 A-3-2 CGMCC No. 1612。

**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  $5 \times 10^6$  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。

**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  $5 \times 10^6$  个/只，7~10 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

### 三、酶标抗体的制备

**抗抗体的制备：**以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗体。

**酶标记抗抗体的制备步骤如下：**将羊抗鼠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 的比例与抗体偶联时，约有 60%~70% 的酶与 8% 的抗体偶联，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(用萘氏试剂检测)，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伊维菌素的方法如下：

### 一、样品前处理

a. 动物组织 用均质器均质样本，称取  $5g \pm 0.1g$  样本于 50ml 离心管中，加入 10ml 无水甲醇混合，涡动 1min 后于振荡器上振荡 10min。3000g 以上，15℃，离心 10min。取上清液 20 $\mu$ l，用稀释 1 倍的浓缩复溶液（浓缩复溶液用去离子水按 1:1 稀释）稀释 10 倍；取 20 $\mu$ l 样本与 180 $\mu$ l 稀释 1 倍的浓缩复溶液混合即可进行分析。

### 二、检测方法

伊维菌素半抗原与兔血清白蛋白偶联物的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品溶液或样品溶液 50 $\mu$ l，再加入伊维菌素鼠单克隆抗体工作液 50 $\mu$ l，用盖板膜封板，37℃ 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体，拍干。每孔加入 250 $\mu$ l 洗涤液 0.8%~1.2% 吐温，1%（质量浓度）硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.01M PH7.4，将浓缩洗涤液用去离子水 20 倍稀释），30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100 $\mu$ l 用盖板膜封板，37℃ 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体，重复洗涤步骤。加入底物显色液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液）100 $\mu$ l，轻轻振荡混匀，37℃ 恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液（1mol/L 硫酸）50 $\mu$ 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<sub>0</sub>）再乘以 100%，即百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值，B<sub>0</sub> 为 0 $\mu$ g/L 标准溶液的平均吸光度值。以伊维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伊维菌素的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液中伊维菌素的浓度。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 2.0 小时就可以完成，最低检测限

为 0.5 $\mu$ 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

以伊维菌素抗抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有抗抗体的酶标板；

(2) 碱性磷酸酯酶标记的伊维菌素半抗原工作液：将碱性磷酸酯酶标记的伊维菌素半抗原稀释为 0.1~1 $\mu$ g/L 的酶标记抗抗体工作液，12ml/瓶，1 瓶。所用的稀释液为含有 0.1%（质量浓度）甘油（可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性）、1%的硫柳汞防腐剂（便于保存）溶液。

3) 伊维菌素标准溶液：用稀释液将伊维菌素稀释为系列标准溶液 6 瓶，0 $\mu$ g/L，0.5 $\mu$ g/L，1.5 $\mu$ g/L，4.5 $\mu$ g/L，13.5 $\mu$ g/L，40.5 $\mu$ g/L，1~3ml/瓶。所用的伊维菌素药物稀释液为 pH 值为 8.3，0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液。

(4) 显色剂：4-硝基酚磷酸盐缓冲液。均为 8ml/瓶。

(5) 伊维菌素兔多克隆抗体工作液：用抗体工作液将兔多克隆抗体稀释成蛋白浓度为 0.01~0.1 $\mu$ g/L 抗体工作液，12ml/瓶，1 瓶。抗体工作液所用的抗体稀释液为 pH 值 7.9 的 0.2mol/L，含有 3%的 N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液。

(6) 浓缩洗涤液：pH 7.4，0.01~0.05mol/L，含有 0.8~1.2%吐温 80，3%（质量浓度）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：1mol/L 氢氧化钠，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：pH8.3，0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液，为正常使用浓度的 2 倍，30ml/瓶，1 瓶。

制备酶标板时所需试剂：

(1) 包被缓冲液：pH8.2，0.5mol/L 硼砂-硼酸缓冲液。

(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、伊维菌素特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的伊维菌素半抗原的制备方法如下：

### 一、酶标板的制备

1、羊抗兔抗抗体包被原的制备：以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体。

2、包被有羊抗兔抗抗体的酶标板制备方法：酶标板的材料为聚氯乙烯，用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 0.07 $\mu$ g/ml，酶标板每孔加入 100 $\mu$ l，37℃温育 2h，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 30s，

拍干，然后在每孔中加入 150 $\mu$ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h，倾去孔内液体，拍干后用铝膜真空密封保存。

## 二、伊维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，以实施例 1 制备的伊维菌素半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联物为免疫原，免疫原免疫剂量为 1mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗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弗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，用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

酶标记伊维菌素抗原的制备：将二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成伊维菌素半抗原，将伊维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伊维菌素抗原。

具体制备方法如下：取伊维菌素半抗原 2g 溶于 30ml，5%（质量浓度）的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中，再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，加到半抗原溶液中室温搅拌反应 4 小时，取碱性磷酸酯酶 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将碱性磷酸酯酶滴加到半抗原中 4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜。将反应完的酶标记半抗原对 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次。最后将酶标记半抗原冻干保存。

利用该试剂盒检测样品中残留的伊维菌素的方法如下：

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：

向包被有羊抗兔抗抗体的 96 孔酶标板微孔中加伊维菌素兔多克隆抗体工作液 50 $\mu$ 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 $\mu$ l 洗涤液（0.8%~1.2%吐温，1%（质量浓度）硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.01M PH7.4，浓缩洗涤液用去离子水稀释 19 倍），30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入系列标准品溶液或样品溶液 50 $\mu$ l，再加入酶标记半抗原 100 $\mu$ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体，重复洗涤步骤。加入底物显色液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液）100 $\mu$ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液（1mol/L 硫酸）50 $\mu$ 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 2.0 小时就可以完成，最低检测限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。

### 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 4.5 $\mu\text{g/L}$  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 4.3%-10.4%之间。

表1 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	6.4	7.1	10.4	4.5	8.2	9.5	8.6	4.1	5.3	7.2
	03 批	6.2	7.4	8.1	9.2	5.4	6.3	6.5	7.2	6.8	9.3
	06 批	6.4	5.2	4.3	4.7	5.1	7.8	6.3	8.7	4.5	9.2

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 4.3%~9.8%之间。

表 2 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	4.5	4.3	5.1	5.7	6.8	4.7	9.2	8.1	5.2	7.8
	03 批	5.2	4.9	5.0	6.8	6.1	9.8	7.3	4.3	5.7	8.5
	06 批	4.6	5.2	8.6	7.2	5.1	6.9	7.2	4.5	4.9	8.1

##### (2) 样本可重复性试验

每个样本按 15 $\mu\text{g/kg}$  浓度的伊维菌素标准品进行添加，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，结果表明牛肉、牛肝样本变异系数均低于 20%。

表3 牛肉样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/kg}$ )					板内 CV%
01	12.5	11.8	10.9	15.2	13.7	13.0

	10.8	13.2	14.2	13.8	10.9	12.8
	9.8	10.8	13.7	15.4	14.9	19.3
03	15.2	14.9	12.8	9.7	10.5	19.7
	10.8	12.8	14.5	16.5	13.7	15.3
	10.8	14.8	8.7	13.9	12.8	19.4
06	13.2	14.0	15.2	10.2	9.7	19.3
	8.9	12.4	10.8	13.4	11.8	14.9
	10.8	16.4	13.5	13.4	10.8	17.9

表4 牛肝样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					板内 CV%
01	13.4	15.0	12.4	10.6	13.8	12.7
	14.7	12.4	15.9	13.6	15.4	9.8
	14.5	12.6	13.5	12.8	13.5	5.5
03	14.8	15.6	13.7	17.4	14.2	9.5
	10.5	12.4	14.9	13.8	15.0	14.2
	12.5	15.3	14.9	13.6	15.7	9.1
06	12.5	16.5	14.3	10.5	11.6	18.1
	15.4	12.4	16.3	18.2	15.4	13.5
	16.3	14.2	12.5	15.9	14.8	10.2

实施例 2 中的三批试剂盒的结果如表 5、表 6 所示, 结果表明牛肉样本变异系数均低于 20%, 牛肝样本的变异系数均低于 20%。

表5 牛肉样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
01	4.1	4.5	4.3	5	4.2	8.1
	3.7	4.2	4.5	4.8	5.1	12.1
	3.2	4.2	4.8	3.6	4.6	16.4
03	4.7	4.2	3.8	4.5	3.6	11.1
	5.1	4.2	4.1	4.9	3.2	17.4
	5.2	4.5	4.9	4.1	4.3	9.7
06	4.1	4.5	4.9	5.2	3.9	11.9

	4.5	3.6	4.9	5.3	4.1	14.8
	3.2	4.1	5.2	4.9	4.5	17.8

表6 牛肝样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数CV%
01	3.5	4.5	5.8	4.3	4.6	18.2
	4.5	4.8	3.2	5.0	4.6	16.0
	5.2	4.8	4.0	5.1	4.5	10.3
03	5.4	4.8	4.2	3.8	4.1	14.3
	5.0	4.2	4.8	4.5	5.3	9.0
	3.6	5.1	4.6	4.1	3.6	15.2
06	4.5	5.2	4.9	3.8	4.6	11.4
	5	3.2	4.7	4	3.5	18.8
	3.7	4.5	4.8	3.9	4.3	10.5

## 2、试剂盒的准确度测定

每个牛肉样本和牛肝样本分别按  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  (L) 和  $50\mu\text{g}/\text{kg}$  (L) 浓度添加伊维菌素标准品, 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 的方法检测伊维菌素, 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, 结果表明牛肉添加回收率在 72.5%~120.3%之间, 牛肝添加回收率在 72.5%~90.5%之间。

表 7 准确度测定试验  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 

样本	牛肉		牛肝		
	20	50	20	50	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
准确度%	1	72.5	86.5	83.4	79.5
	2	87.5	91.2	72.5	90.5
	3	76.5	89.5	86.5	84.1
	4	94.5	120.3	73.4	86.5
平均值		82.8	96.9	78.9	85.1

实施例 2 的试剂盒测定结果如表 8 所示, 结果表明牛肉添加回收率在 64.5%~101.5%之间, 牛肝添加回收率在 68.5%~110.5%之间。

表 8 准确度测定试验  $\mu\text{g}/\text{kg}$

样本		牛肉		牛肝	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		20	50	20	50
准确度%	1	94.5	69.8	89.3	73.2
	2	75.2	75.3	85.2	89.6
	3	85.3	95.4	99.6	110.5
	4	64.5	101.5	68.5	87.5
平均值		79.9	85.5	85.7	90.2

### 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、伊维菌素添加实际测定值，结果表明所测得的结果均在正常检测范围之内。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。

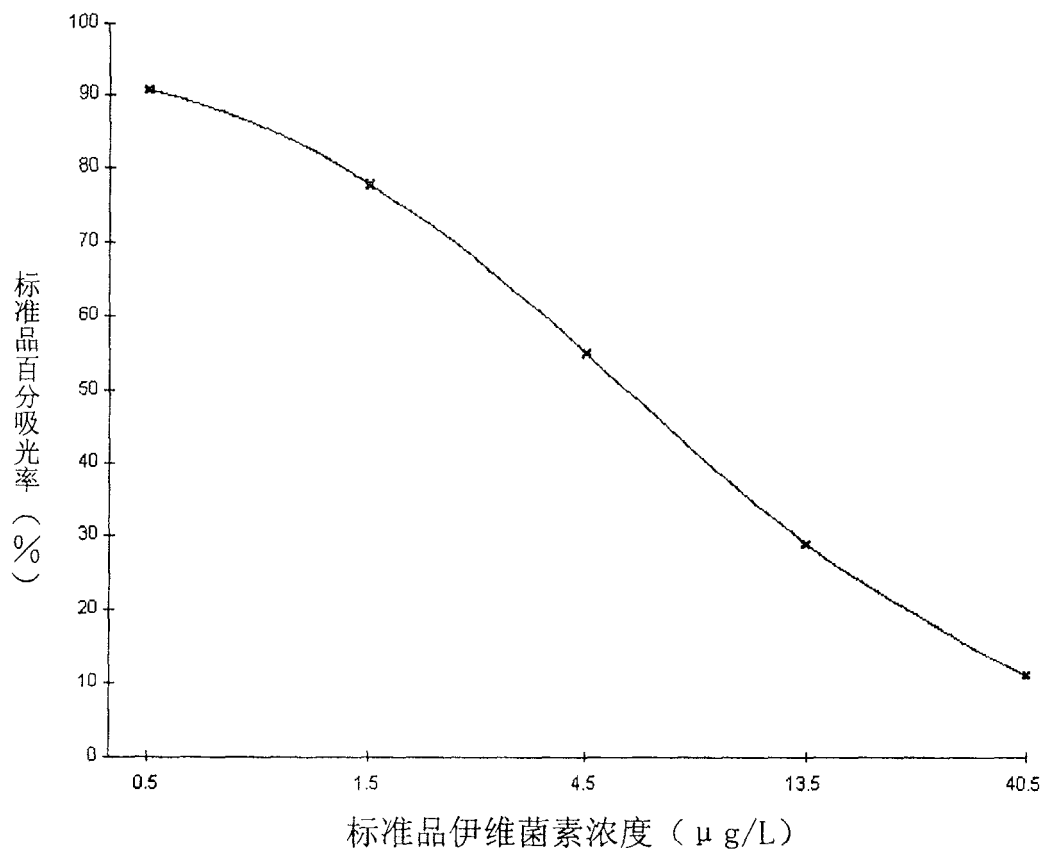


图 1

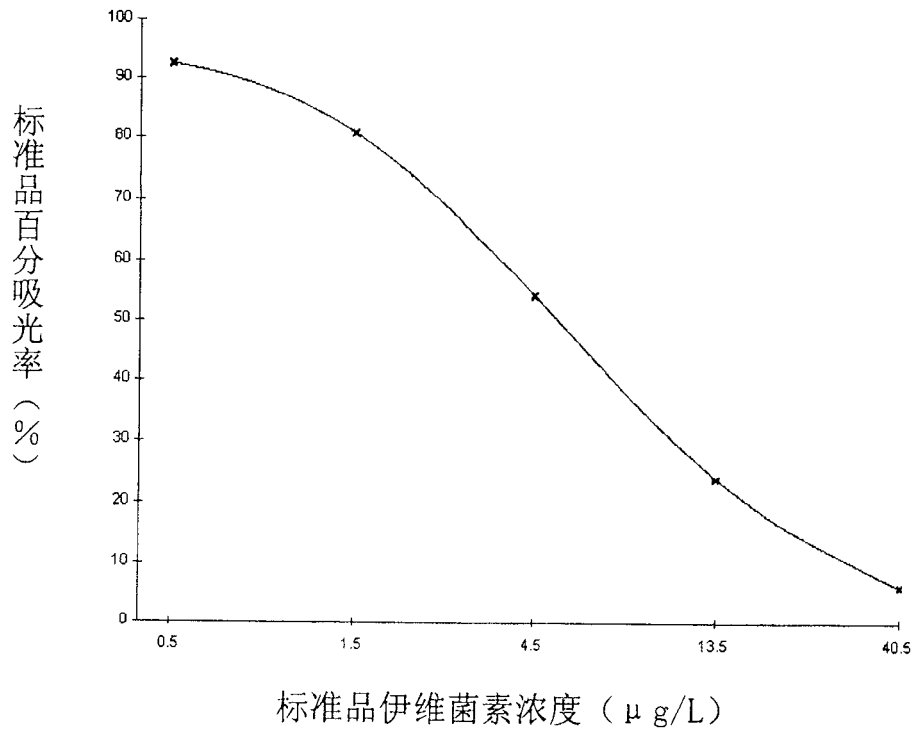


图 2

专利名称(译)	一种检测伊维菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN100582778C</a>	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200610007284.2	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 史为民 何继红 何方洋 丁双阳 万宇平		
发明人	沈建忠 史为民 何继红 何方洋 丁双阳 万宇平		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	王璟		
其他公开文献	CN1811440A		
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伊维菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测伊维菌素的酶联免疫试剂盒，包括伊维菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为伊维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伊维菌素半抗原；当所述包被原为伊维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伊维菌素半抗原。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等中伊维菌素药物残留量。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CV%	01批	6.4	7.1	10.4	4.5	8.2	9.5	8.6	4.1	5.3	7.2
	03批	6.2	7.4	8.1	9.2	5.4	6.3	6.5	7.2	6.8	9.3
	06批	6.4	5.2	4.3	4.7	5.1	7.8	6.3	8.7	4.5	9.2