

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810114821.2

[43] 公开日 2008年11月5日

[11] 公开号 CN 101299045A

[22] 申请日 2008.6.12

[21] 申请号 200810114821.2

[71] 申请人 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 骆鹏杰 万宇平 史为民
江海洋 曹兴元 冯才伟 李建成
王战辉

[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 任凤华

权利要求书2页 说明书19页 附图2页

[54] 发明名称

检测氟苯尼考及氟苯尼考胺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氟苯尼考和氟苯尼考胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒，包括氟苯尼考胺特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为氟苯尼考胺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氟苯尼考胺半抗原；当所述包被原为氟苯尼考胺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；当所述包被原抗抗体时，所述酶标记物为酶标氟苯尼考胺半抗原；所述氟苯尼考胺半抗原是将氟苯尼考胺和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的。本发明的检测方法，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1、一种检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒，包括氟苯尼考胺特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为氟苯尼考胺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氟苯尼考胺半抗原；当所述包被原为氟苯尼考胺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氟苯尼考胺半抗原；所述氟苯尼考胺半抗原是将氟苯尼考胺和对羧基苯甲醛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：所述试剂盒还包括氟苯尼考胺标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液、包被缓冲液、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：所述氟苯尼考胺特异性抗体为氟苯尼考胺多克隆抗体，是以氟苯尼考胺半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、兔血清白蛋白、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，其中优选为辣根过氧化物酶。

5、根据权利要求1-4中任一所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述抗体为羊抗兔抗体。

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、0.02M的含有0.05%叠氮钠防腐剂的磷酸盐缓冲液；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：当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液A液和显色液B液组成，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，终止液为1~2mol/L硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液），终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

8、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩复溶液为含有0.1%牛血清白蛋白的0.03-0.06mol/L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 9.6 的 0.01-0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；所述封闭液是含有 0.01%叠氮化钠和 10%牛血清白蛋白的磷酸盐溶液；所述百分含量为质量百分含量。

10、一种检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

称取 2g 动物组织匀浆物置离心管中，加入 10ml 三氯乙酸-PBS 缓冲液，混匀；室温以 3000g 以上的速度离心 5min；取上清液，加入与上清液等体积的 0.02M 的 PBS 缓冲液，混匀，取样进行分析；

2) 利用权利要求 1—9 中任一所述的检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒检测样品。

检测氟苯尼考及氟苯尼考胺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氟苯尼考及氟苯尼考胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

氟苯尼考(Florfenicol, FF, 化学结构式如图1)是一种新型氯霉素类广谱抗生素,主要用于治疗鱼、猪、牛及家禽的细菌性疾病。氟苯尼考在安全性和有效性方面比氯霉素和甲砒霉素有明显的优势,已在养殖业中大规模使用,在兽医临床上具有良好的应用前景。但是,氟苯尼考在畜禽生产上的大量应用也导致其在畜禽产品中残留,危害公众健康。

氟苯尼考在动物体内最终代谢为氟苯尼考胺,在检测氟苯尼考残留时将氟苯尼考和氟苯尼考胺作为残留标识物。我国、欧盟及美国均规定了动物组织中氟苯尼考和氟苯尼考胺的最大残留限量。

动物组织中氯霉素类药物的残留检测主要采用气相色谱法、气相色谱-质谱法、酶联免疫法等,大多数方法为单一药物的检测。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒,包括氟苯尼考胺特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为氟苯尼考胺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氟苯尼考胺半抗原;当所述包被原为氟苯尼考胺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;当所述包被原抗抗体时,所述酶标记物为酶标氟苯尼考胺半抗原;所述氟苯尼考胺半抗原是将氟苯尼考胺和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的。

所述氟苯尼考胺半抗原与载体蛋白的偶联物通过碳化二亚胺(EDC)法得到。

所述酶标记物的标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,其中优选为辣根过氧化物酶。辣根过氧化物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辣根过氧化物酶交联在抗抗体上;辣根过氧化物酶标记抗抗体可以通过戊二醛法将氟苯尼考胺半抗原与辣根过氧化物酶偶联得到。

所述氟苯尼考胺特异性抗体为氟苯尼考胺多克隆抗体，是以氟苯尼考胺半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白可为鼠血清白蛋白、兔血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括氟苯尼考胺标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液。

所述氟苯尼考胺标准品溶液含有六个浓度梯度；所用的氟苯尼考胺药物稀释液为 0.1%牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

所述浓缩洗涤液为 pH 7.4、0.02M 的含有 0.05%叠氮钠防腐剂的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成，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，终止液为 1~2mol/L 硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液），终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠溶液。

所述浓缩复溶液可为含有 0.1%牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

所述包被缓冲液可为 pH 值为 9.6 的 0.01-0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；

所述封闭液可为含有 0.01%叠氮化钠和 10%牛血清白蛋白的磷酸盐溶液；所述百分含量为质量百分含量。

本发明所提供的检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

称取 2g 动物组织匀浆物置离心管中，加入 10ml 三氯乙酸-PBS 缓冲液，混匀；室温以 3000g 以上的速度离心 5min；取上清液，加入与上清液等体积的 0.02M 的 PBS 缓冲液，混匀，取样进行分析。

2) 利用权利要求 1—9 中任一所述的检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒检测样品；

3) 检测数据分析。

本发明的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的残留量。本发明试剂盒的主要内容物采用了方便使用的工作液形式，工作液保存性及稳定性好；利用本发明试剂盒检测氟苯尼考及其代谢

物氟苯尼考胺的残留量的方法，可用于检测动物组织如鸡肉、猪肉、鸡肝、猪肝、鱼、虾等样品中氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的残留量，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。因此本发明检测方法及其专用试剂盒将在动物源性食品中氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的残留检测中发挥重要作用。

附图说明

图 1 为氟苯尼考化学结构式。

图 2 为氟苯尼考胺半抗原合成技术路线。

图 3 为以氟苯尼考胺半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的试剂盒的氟苯尼考胺标准曲线图。

图 4 为以羊抗兔抗抗体为包被原的试剂盒的氟苯尼考胺标准曲线图。

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。

下述实施例中各试剂盒的检测原理如下：

当在酶标板微孔条上预包被氟苯尼考胺半抗原与载体蛋白的偶联物时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入氟苯尼考胺抗体溶液，样本中残留的氟苯尼考及氟苯尼考胺或氟苯尼考胺标准品与酶标板上包被的氟苯尼考胺偶联抗原竞争氟苯尼考胺抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与样本中氟苯尼考及氟苯尼考胺的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中氟苯尼考及氟苯尼考胺的残留量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅，与系列浓度氟苯尼考胺标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量的浓度范围。

当在微孔条上预包被抗抗体时，加入氟苯尼考胺抗体孵育后，加入样本溶液或标准品溶液，再加入酶标记氟苯尼考胺抗原溶液，样本中残留的氟苯尼考及氟苯尼考胺或氟苯尼考胺标准品与酶标记氟苯尼考胺抗原竞争氟苯尼考胺特异性抗体，用显色液显色，样本吸光度值与样本中氟苯尼考及氟苯尼考胺的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中氟苯尼考及氟苯尼考胺的残留量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，与系列浓度氟苯尼考胺标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量的浓度范围。

实施例 1、以氟苯尼考胺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

一、以氟苯尼考胺半抗原与卵清蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

- (1) 包被有包被原（氟苯尼考胺半抗原与载体蛋白偶联物）的酶标板；
- (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液：酶标二抗稀释液为含有 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液，羊抗兔抗抗体稀释浓度为 1:500；所述百分含量为质量百分含量。
- (3) 氟苯尼考胺标准品溶液：共 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，22.5 μ g/L，112.5 μ g/L（溶剂为含有 0.1% 牛血清白蛋白的 0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液）。
- (4) 底物显色液：底物显色液由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲，8ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺，8ml/瓶，1 瓶。
- (5) 氟苯尼考胺抗体工作液：抗体稀释液为含有 2.5%（质量百分含量）酪蛋白和 0.03%（质量含量）的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液，抗体工作液稀释浓度为 1:1000。
- (6) 浓缩洗涤液：含有 0.05%（质量百分含量）叠氮钠防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.02M、pH 7.4）。50ml/瓶，1 瓶。
- (7) 终止液：2mol/L 硫酸，8ml/瓶，1 瓶。
- (8) 浓缩复溶液：含有 0.1%（质量百分含量）牛血清白蛋白的 0.03-0.06mol/L 磷酸盐缓冲液。400ml/瓶，1 瓶。
- (9) 包被缓冲液：pH 值为 9.6 的 0.01-0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。
- (10) 封闭液：含有 0.01%（质量百分含量）叠氮化钠和 10%（质量百分含量）牛血清白蛋白的磷酸盐溶液。

其中，包被有氟苯尼考胺半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板、氟苯尼考胺抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液的制备方法如下：

1、酶标板的制备：

(1) 氟苯尼考胺半抗原的合成：

将氟苯尼考胺通过对羧基苯甲醛法得到氟苯尼考胺半抗原。具体步骤为：将氟苯尼考胺和对羧基苯甲醛按 1: 1（摩尔比）比例混合搅拌反应，室温下反应过夜。

（图 2）。

(2) 包被原的制备：采用碳化二亚胺（EDC）法将氟苯尼考胺半抗原和卵清蛋白偶联得到包被原。

a、取氟苯尼考胺半抗原 5mg 溶于 0.5ml 水中，得到 I 液；

b、取卵清蛋白 20mg，用 2.7ml 水溶解；再向其中加入 25mg EDC，活化反应 30 min，得到 II 液；

c、将 I 液加到 II 液后搅拌反应过夜，得到包被原。

(3) 酶标板的制备：

用包被缓冲液将包被原（即氟苯尼考胺半抗原和卵清蛋白偶联物）稀释成 0.06-0.1 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150 μ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

2、氟苯尼考胺多克隆抗体的制备：

(1) 免疫原合成：

将氟苯尼考胺半抗原和血蓝蛋白通过碳化二亚胺法偶联得到免疫原。

免疫原的制备过程：取氟苯尼考胺半抗原 10mg 溶于 1ml 水中，得到 I 液；取血蓝蛋白 50mg 溶于 5ml 水中，再向其中加入 EDC 25mg 活化反应 30 min，得到 II 液；将 I 液加到 II 液后搅拌反应过夜，得到免疫原。

(2) 多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以氟苯尼考胺与血蓝蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1.0mg/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 周用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 10 天后采血，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。

3、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液的制备：

羊抗兔抗抗体的制备过程：以山羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

酶标羊抗兔抗抗体制备：采用戊二醛法或过碘酸钠法将辣根过氧化物酶交联在抗抗体上。

二、用步骤一所述试剂盒检测样品中残留的氟苯尼考胺和氟苯尼考方法如下：

（一）样品前处理

样品为鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾等组织样本。

称取除去脂肪的粉碎动物组织样本 2g，加入 10ml 三氯乙酸-PBS 缓冲液充分涡动混合，振荡 1min，以 3000g 以上的速度室温离心 5min，取上清液 200 μ l 加入 200 μ l 0.02M 的 PBS 缓冲液混匀后取 50 μ l 进行实验分析。

（二）检测

向包被有氟苯尼考胺半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板微孔中加入氟苯尼考胺标准品溶液或样本溶液 50 μ l，再加入氟苯尼考胺抗体工作液 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，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；每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min，倒出孔中液体，重复洗涤步骤；每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲，底物显色液 B 液四甲基联苯胺(TMB)，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min，每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪，测定每孔吸光度值。

（三）结果分析

所获得的每个浓度标准品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（B₀）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 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B₀ 为 0 μ g/L 标准品溶液的平均吸光度值。

以氟苯尼考胺标准品浓度（ μ g/L）值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，如图 3 所示。相对应每一个样品中氟苯尼考胺的浓度可以从标准曲线上读出。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品的浓度，则可从标准曲线上读出样本中氟苯尼考及氟苯尼考胺的残留量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需 1.5 小时可以完成。

实施例 2、以羊抗兔抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

一、以羊抗兔抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有羊抗兔抗抗体的酶标板；

(2) 辣根过氧化物酶标记的氟苯尼考胺半抗原工作液：用双蒸水将辣根过氧化物酶标记的氟苯尼考胺半抗原稀释为 0.1mol/L，12ml/瓶，1 瓶。

(3) 氟苯尼考胺标准品溶液：共 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，22.5 μ g/L，112.5 μ g/L（溶剂为含有 0.1%牛血清白蛋白的 0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液）。

(4) 底物显色液：底物显色液由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化氢，8ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为邻苯二胺，8ml/瓶，1 瓶。

(5) 氟苯尼考胺抗体工作液：抗体稀释液为含有 2.5%（质量百分含量）酪蛋白和 0.03%（质量含量）的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液，抗体稀释后的浓度为 1: 1000。

(6) 浓缩洗涤液：含有 0.05%（质量百分含量）叠氮钠防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.02M、pH 7.4）。50ml/瓶，1 瓶。

(7) 终止液：2mol/L 盐酸，8ml/瓶，1 瓶。

(8) 浓缩复溶液：含有 0.1%（质量百分含量）牛血清白蛋白的 0.03~0.06mol/L 磷酸盐缓冲液。400ml/瓶，1 瓶。

(9) 包被缓冲液：pH 值为 9.6 的 0.01-0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。

(10) 封闭液：含有 0.01%（质量百分含量）叠氮化钠和 10%（质量百分含量）牛血清白蛋白的磷酸盐溶液。

其中，包被有羊抗兔抗抗体的酶标板、氟苯尼考胺抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的氟苯尼考胺半抗原工作液的制备方法如下：

1、酶标板的制备：

(1) 羊抗兔抗抗体包被原的制备：以山羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

(2) 包被有羊抗兔抗抗体的酶标板制备方法：

用包被缓冲液将包被原（即羊抗兔抗抗体）稀释成 0.06-0.1 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150 μ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

2、氟苯尼考胺多克隆抗体的制备：

(1) 氟苯尼考胺半抗原的合成:

将氟苯尼考胺通过对羧基苯甲醛法得到氟苯尼考胺半抗原。具体步骤为:将氟苯尼考胺和对羧基苯甲醛按 1:1 (摩尔比) 比例混合搅拌反应, 室温下反应过夜。

(2) 免疫原合成:

将氟苯尼考胺半抗原和血蓝蛋白通过碳化二亚胺法偶联得到免疫原。

免疫原的制备过程: 取氟苯尼考胺半抗原 10mg 溶于 1ml 水中, 得到 I 液; 取血蓝蛋白 50mg 溶于 5ml 水中, 再向其中加入 EDC 25mg 活化反应 30 min, 得到 II 液; 将 I 液加到 II 液后搅拌反应过夜, 得到免疫原。

(3) 多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以氟苯尼考胺与血蓝蛋白偶联物为免疫原, 免疫剂量为 1.0mg/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 周用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 10 天后采血, 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。

3、辣根过氧化物酶标记的氟苯尼考胺半抗原工作液的制备: 将氟苯尼考胺半抗原与辣根过氧化物酶采用戊二醛法偶联得到的。

二、用步骤一所述试剂盒检测样品中残留的氟苯尼考胺和氟苯尼考方法如下:

(一) 样品前处理

样品前处理的具体步骤同实施例 1 中的样品前处理步骤。

(二) 检测

向包被有羊抗兔抗抗体的酶标板微孔中加入氟苯尼考胺特异性抗体工作液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入稀释后的洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。再加入系列标准品溶液 50 μ l 和 100 μ l 酶标记氟苯尼考胺抗原或样品溶液 50 μ l 和 100 μ l 酶标记氟苯尼考胺抗原到每个微孔中, 用盖板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 环境中反应 30min。取出酶标板, 将孔内液体甩干, 加入稀释后的洗涤液 250 μ l 到每个板孔中, 洗板 4—5 次, 每次间隔 10 秒, 用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液 A 液过氧化氢 50 μ l, 底物显色液 B 液邻苯二胺 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15~30min。每孔加入终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪波长设定在 450nm 处, 测定每孔吸光度值 (OD

值)。

(三) 结果分析:

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 4 所示。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件, 此法更便于大量样品的快速分析, 整个检测过程只需 1.5 小时可以完成。

实施例 3、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

(一) 试剂盒灵敏度实验

对零标准 (含有 0.1% 牛血清白蛋白的 0.06mol/L 的磷酸盐缓冲液) 进行 20 次检测, 测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

表1 零标准测定结果统计表 ($\mu\text{g/L}$)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.1	0.2	0.1
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.0	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.2	0.3	0.0	0.2	0.2	0.1	0.5	

由表 1 可知, 试剂盒的最低检测限为 $0.5\mu\text{g/L}$ 。

(二) 标准品精密度试验:

从实施例 1 中所述的 1 批试剂盒 (01 批)、实施例 2 中所述的 3、6 批试剂盒 (03、06 批) 三批试剂盒中每批抽取 10 个试剂盒, 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。结果如表 2 所示, 表明变异系数范围在 4.1%~15.2% 之间, 符合精密度小于或等于 20% 的规定。

表2 标准可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	10.5	6.2	7.8	4.1	11.6	14.8	13.8	8.4	7.2	5.1
CV% 03 批	5.8	12.9	13.7	4.8	5.6	11.4	10.7	13.1	5.6	9.3
06 批	15.2	10.8	7.9	5.7	10.5	8.9	9.7	12.2	6.7	8.4

(三) 样本精密度试验

1、样品精密度试验:

(1) 将不含氟苯尼考和氟苯尼考胺的鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾按照实施例1的方法进行样品前处理后,添加氟苯尼考胺,使其终浓度为20 $\mu\text{g/L}$ 。从实施例1中所述的1批试剂盒(01批)、实施例2中所述的3、6批试剂盒(03、06批)共三批试剂盒中每批抽取3个试剂盒,进行实验,每个实验重复5次,分别计算变异系数,结果如表3-8所示(各表中的数值为5次重复的平均值)。结果表明鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾样本的变异系数均小于20%,符合了《农业部文件》农医发【2005】17号附件2试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度和准确度的精密度标准。

表3 鸡肉样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	18.9	16.2	17.3	19.8	15.3	10.6
	16.7	15.4	17.7	16.0	19.4	9.2
	13.7	19.8	16.8	17.3	18.4	13.2
03	16.9	18.4	17.5	18.6	18.0	3.9
	18.2	17.9	20	19.7	16.4	7.9
	17.3	18.2	16.1	17.6	18.8	5.8
06	17.4	16.6	18.5	16.2	19.7	8.1
	19.6	15.8	19.2	15.7	18.8	10.7
	14.4	16.7	18.9	19.4	18.7	11.8

表4 鸡肝样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	16.8	15.9	16.4	17.1	18.6	6.0
	16.8	19.7	17.4	16.3	17.9	7.4
	15.5	19.4	16.3	17.2	14.7	10.9
03	18.4	19.7	14.6	19.3	14.7	14.4
	19.6	18.2	18.3	16.7	18.1	5.7
	17.5	16.3	19.7	15.3	17.6	9.5
06	16.6	18.3	17.4	19.7	15.9	8.5
	17.3	19.2	19.8	17.9	18.3	5.4

16.5	18.4	17.9	18.5	19.4	5.9
------	------	------	------	------	-----

表5 猪肉样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	18.2	17.4	15.3	17.9	19.1	8.1
	15.1	19.2	19.6	19.7	14.5	14.7
	19.7	18.1	18.4	16.9	15.3	9.4
03	18.6	17.2	19.9	17.4	15.6	9.1
	18.4	17.2	19.5	16.1	17.8	7.2
	15.7	14.9	18.3	17.6	19.4	10.8
06	16.0	19.4	19.7	18.4	15.3	11.3
	17.5	18.6	17.4	15.2	19.7	9.5
	14.2	19.6	17.0	17.7	18.4	11.6

表6 猪肝样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	15.9	16.3	18.7	19.2	19.8	9.8
	16.7	14.7	18.4	18.5	17.3	9.1
	18.9	18.9	18.4	16.3	17.5	6.2
03	17.2	17.9	18.6	15.9	16.8	6.0
	14.2	17.3	18.3	19.2	18.7	11.4
	18.2	19.4	18.9	17.5	17.4	4.8
06	18.9	19.8	18.6	15.2	17.4	9.9
	19.6	17.7	18.2	18.9	14.3	11.6
	17.8	17.5	16.9	17.4	18.8	4.0

表7 鱼样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数 CV%
01	17.9	18.4	16.3	15.5	19.8	9.7
	19.1	17.8	16.6	17.5	14.5	10.0
	18.6	17.5	19.5	19.3	17.2	5.6
03	18.3	14.8	17.2	19.5	18.6	10.2

	16.9	18.4	19.5	17.8	16.4	6.9
	18.7	19.3	17.2	16.6	14.5	11.0
	18.3	19.0	19.6	18.8	15.2	9.5
06	17.7	15.3	15.9	17.5	18.6	8.0
	16.5	18.9	17.4	16.2	15.1	8.5

表 8 虾样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	15.2	16.4	17.2	16.9	18.4	6.9
01	18.6	17.4	19.1	18.3	15.6	7.7
	16.3	18.9	19.2	17.8	19.0	6.7
	18.9	16.7	17.4	16.3	17.4	5.7
03	19.6	17.5	16.9	17.2	18.9	6.5
	18.4	17.5	19.6	17.1	14.8	10.2
	16.6	17.5	18.3	17.4	19.4	6.0
06	19.7	14.8	19.4	18.9	15.2	13.6
	15.7	16.4	18.8	19.4	18.4	9.0

(2) 将不含氟苯尼考和氟苯尼考胺的鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾按照实施例1的方法进行样品前处理后, 添加氟苯尼考(购于sigma公司, 产品目录号为F1427), 使其终浓度为 $20\mu\text{g}/\text{L}$ 。从实施例1中所述的1批试剂盒(01批)、实施例2中所述的3、6批试剂盒(03、06批)共三批试剂盒中每批抽取3个试剂盒, 进行实验, 每个实验重复5次, 分别计算变异系数, 结果如表9-14所示(各表中的数值为5次重复的平均值)。结果表明鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾样本的变异系数均小于20%, 符合了《农业部文件》农医发【2005】17号附件2试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度和准确度的精密度标准。

表 9 鸡肉样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	14.5	20.6	20.5	16.9	17.8	14.2
	16.3	17.9	18.6	19.9	20.5	8.9

	18.4	19.7	19.0	18.2	15.2	9.5
	19.6	18.4	17.6	14.2	19.6	12.4
03	18.5	19.7	21.3	16.4	14.8	14.3
	14.2	17.6	18.9	17.6	17.2	10.2
	18.9	18.3	19.6	17.4	16.3	7.1
06	16.2	17.4	18.5	19.5	17.3	7.1
	14.3	19.5	20.4	16.3	17.4	14.0

表 10 鸡肝样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	16.8	17.2	16.6	17.9	20.1	8.0
01	17.5	19.4	18.6	17.4	14.8	9.9
	19.6	18.4	14.6	18.7	19.4	11.2
	21.5	19.7	18.3	17.2	16.3	11.1
03	17.5	16.9	18.2	20.1	19.6	7.4
	14.3	17.8	19.6	19.5	17.5	12.1
	15.9	16.8	14.7	19.6	20.8	14.6
06	19.2	18.6	17.2	16.3	15.8	8.4
	19.6	18.5	20.8	15.7	18.4	10.2

表 11 猪肉样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	15.8	15.0	16.9	18.4	19.2	10.3
01	18.5	17.4	16.3	18.5	14.9	9.0
	14.6	15.4	19.8	20.6	20.7	16.3
	15.9	18.4	16.7	16.8	19.4	8.2
03	16.2	16.6	18.5	19.4	18.4	7.6
	17.4	16.9	14.9	17.8	15.4	7.7
	19.7	20.6	18.7	17.4	15.2	11.5
06	14.9	15.7	19.5	20.4	18.4	13.4
	15.5	18.2	16.9	20.2	17.4	9.8

表 12 猪肝样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	16.3	17.8	15.7	19.4	20.5	11.3
	14.9	15.6	17.3	18.4	15.9	8.6
	15.8	16.9	14.7	19.6	20.7	14.5
03	15.2	16.9	15.5	19.7	16.2	10.8
	19.5	15.2	16.7	18.5	20.6	12.0
	15.8	14.9	18.6	19.5	16.7	11.2
06	20.4	18.3	16.9	15.8	16.4	10.5
	16.7	19.5	16.4	18.7	19.6	8.4
	18.0	19.9	17.5	14.8	20.5	12.4

表 13 鱼样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	15.9	16.7	17.4	18.2	19.5	7.9
	16.5	17.3	14.2	19.6	20.2	13.8
	18.4	17.5	16.8	19.7	18.8	6.2
03	17.8	15.9	14.7	16.8	15.5	7.4
	16.4	17.3	17.5	14.6	19.3	10.1
	18.6	19.5	17.3	16.4	18.7	6.8
06	14.9	18.6	19.7	19.2	18.4	10.4
	21.3	19.4	18.7	16.4	17.5	10.0
	17.4	16.6	14.8	15.5	16.8	6.5

表 14 虾样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	19.5	18.4	16.2	17.4	16.3	8.0
	18.2	14.7	14.4	18.9	17.6	12.4
	15.9	14.2	16.3	19.4	20.5	15.1
03	19.7	14.6	18.5	16.3	14.7	13.6
	15.9	17.8	19.5	17.8	20.5	9.7
	16.9	15.6	19.8	20.6	16.9	11.9

	14.9	18.6	19.7	19.2	18.4	10.4
06	18.4	16.4	18.7	19.6	20.3	7.9
	15.2	16.9	14.2	19.4	17.5	12.2

(四) 样本准确度试验

1、检测氟苯尼考胺：将不含氟苯尼考和氟苯尼考胺的鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾组织按照实施例1中所述的样品前处理方法进行处理，然后向每种组织中加入氟苯尼考胺标准品溶液，使其终浓度分别为 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ (L) 和 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ (L)；然后用实施例1中所述的试剂盒检测鸡肉、鸡肝中氟苯尼考胺，用实施例2中所述的试剂盒检测猪肉、猪肝、鱼、虾中氟苯尼考胺，每个浓度做4个平行，分别计算准确度（准确度=实测值/添加值）。结果如表15所示，表明各样本以 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ (L)、 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ (L) 氟苯尼考胺添加回收率均在72.6%-99.7%之间。

表15 试剂盒的准确度

样本		鸡肉		鸡肝	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	97.5	86.1	96.7	99.7
	2	84.1	77.1	90.2	84.5
	3	75.6	93.2	81.2	86.3
	4	94.1	80.2	93.4	94.1
平均值%		87.8	84.2	90.4	91.2
样本		猪肉		猪肝	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	72.6	89.7	86.7	95.7
	2	85.4	96.4	86.3	78.9
	3	79.4	94.7	94.7	80.2
	4	94.6	78.4	78.2	95.7
平均值%		83.0	89.8	86.5	87.6
样本		鱼		虾	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	85.7	92.4	75.2	78.6
	2	86.3	97.4	83.4	83.4
	3	78.9	81.4	86.1	89.7
	4	90.2	96.3	74.1	96.7
平均值%		85.3	91.9	79.7	87.1

2、检测氟苯尼考：

将不含氟苯尼考和氟苯尼考胺的鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾组织按照实施例1中所述的样品前处理方法进行处理，然后向每种组织中加入氟苯尼考（购于sigma公司，产品目录号为F1427）标准品溶液，使其终浓度分别为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （L）和50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （L）；然后用实施例1中所述的试剂盒检测鸡肉、鸡肝中氟苯尼考胺，用实施例2中所述的试剂盒检测猪肉、猪肝、鱼、虾中氟苯尼考胺，每个浓度做4个平行，分别计算准确度（准确度=实测值/添加值），结果如表16所示，表明各样本以20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （L）、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （L）氟苯尼考添加回收率均在72.9%-108.6%之间。

表16 试剂盒的准确度

样本		鸡肉		鸡肝	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	84.6	86.3	98.4	105.7
	2	75.3	94.7	78.9	94.2
	3	98.4	80.6	69.4	78.3
	4	108.6	74.8	83.9	88.5
平均值%		91.7	84.1	82.7	91.7
样本		猪肉		猪肝	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	95.6	71.5	87.3	75.8
	2	84.2	96.3	106.7	94.7
	3	83.7	92.7	99.7	74.3
	4	72.9	78.4	90.3	85.2
平均值%		84.1	84.7	96.0	82.5
样本		鱼		虾	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	50	20	50
准确度%	1	85.2	90.2	84.1	75.3
	2	94.1	95.3	73.7	84.6
	3	104.3	73.6	88.9	105.2
	4	101.0	74.2	93.4	98.7
平均值%		96.2	83.3	85.0	91.0

(五) 交叉反应率试验:

选择与氟苯尼考胺有类似结构和类似功能的4种药物测定交叉反应率。通各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反

应率。交叉反应越大，那么此试剂盒对同类药物的检测的特异性就越好。

$$\text{交叉反应率}(\%) = (\text{抑制}50\% \text{氟苯尼考胺的浓度} / \text{抑制}50\% \text{的氟苯尼考胺类似物浓度}) \times 100\%$$

表17 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
氟苯尼考胺	100
氟苯尼考	150
甲砒霉素	<3
氯霉素	<1

(六) 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2-8℃，保存 6 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、氟苯尼考胺和氟苯尼考实际添加测定，结果表明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℃ 至少可以保存 6 个月以上。

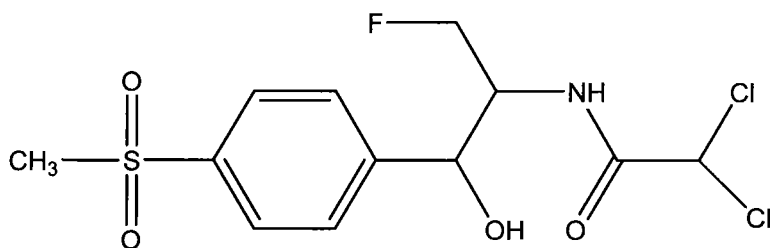


图 1

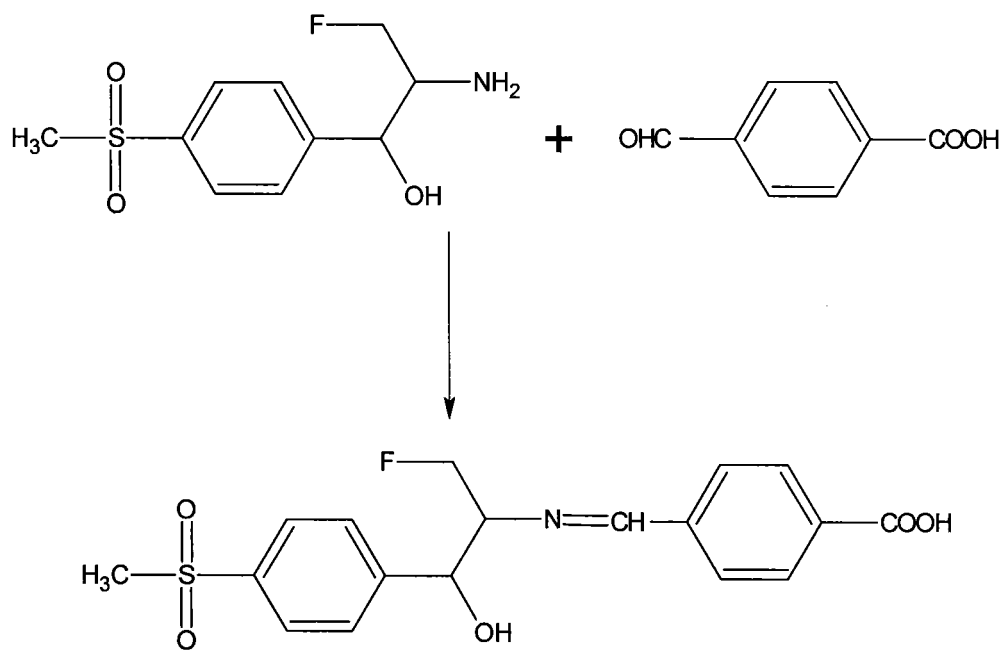


图 2

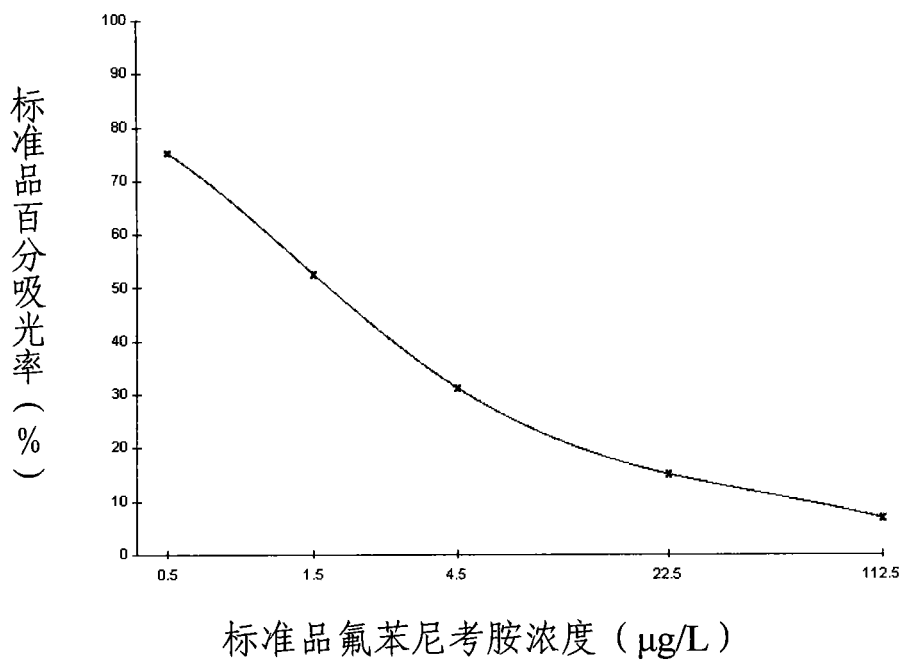


图 3

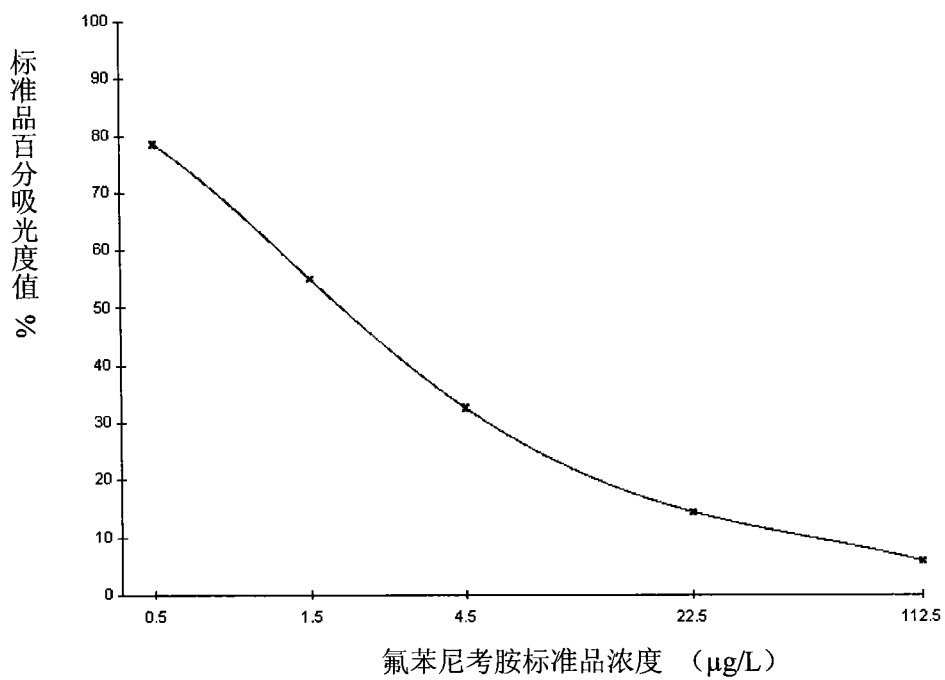


图 4

专利名称(译)	检测氟苯尼考及氟苯尼考胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101299045A	公开(公告)日	2008-11-05
申请号	CN200810114821.2	申请日	2008-06-12
[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 骆鹏杰 万宇平 史为民 江海洋 曹兴元 冯才伟 李建成 王战辉		
发明人	沈建忠 骆鹏杰 万宇平 史为民 江海洋 曹兴元 冯才伟 李建成 王战辉		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101299045B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫试剂盒，包括氟苯尼考胺特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为氟苯尼考胺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氟苯尼考胺半抗原；当所述包被原为氟苯尼考胺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氟苯尼考胺半抗原；所述氟苯尼考胺半抗原是将氟苯尼考胺和对羧基苯甲醛通过缩合反应得到的。本发明的检测方法，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。

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