

[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 200510086347.3

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年8月5日

[11] 授权公告号 CN 100523813C

[22] 申请日 2005.9.2

[21] 申请号 200510086347.3

[73] 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 袁宗辉 赵春保 王玉莲 常超
陈冬梅 陶燕飞 彭大鹏 王帅兵

[56] 参考文献

动物组织中四环素类抗生素残留的 ELISA 检测研究——土霉素抗体的制备. 安清聪等. 畜牧与兽医, 第36卷第9期. 2004

酶联免疫检测试剂盒应用于牛奶中四环素残留的测定. 李利东等. 乳业科学与技术, 第2期. 2004

猪肉中四环素类抗生素残留的 ELISA 检测. 安清聪等. 畜牧与兽医, 第37卷第6期. 2005
审查员 唐莉

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 张红兵

权利要求书1页 说明书12页 附图5页

[54] 发明名称

一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫检测试剂盒及其应用。本发明所提供的试剂盒包括盒体, 设在盒体内的酶标板和试剂, 其中的试剂包含洗涤液、样品稀释液、辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体、底物液、显色液和终止液。本发明的核心在于有包被液包被的能与金霉素抗体特异性反应的包被抗原, 金霉素标准溶液和金霉素抗体, 该抗体是由人工免疫原免疫家兔得到的血清。包被抗原为金霉素乙酸和卵清白蛋白的复合物。人工免疫原是由金霉素乙酸与牛血清白蛋白的复合物。本发明的试剂盒特异性强、灵敏度高。

1、一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，它包括盒体、设在盒体内的酶标板，设在盒体内的试剂，该试剂包含金霉素标准溶液，洗涤液、样品稀释液，辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体，底物液，显色液和终止液，其特征在于，盒体内的试剂还包含金霉素抗体液，所述的金霉素抗体液是金霉素乙酸和牛血清白蛋白的复合物作为人工免疫原免疫家兔得到的血清；酶标板的每孔内，有由包被液包被的能与金霉素抗体特异性反应的包被抗原，该包被抗原是金霉素乙酸和卵清白蛋白的复合物。

一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用

技术领域

本发明属于对动物源食品中金霉素进行残留分析的酶联免疫检测技术领域。具体地说，属于一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫检测试剂盒及其应用。

背景技术

金霉素是四环素类药物主要成员之一，为多环并四苯羧基酰胺母核的衍生物，具有抗菌作用，其同类药物主要有四环素、土霉素和去甲基金霉素、强力霉素等。

由于金霉素对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、螺旋体、立克次氏体、支原体、衣原体、原虫等具有抑制作用，因此其应用极为广泛。但是，不合理用药可导致金霉素在动物可食性组织中蓄积残留，继而危害人体健康。鉴于此，对肉、蛋、奶等动物源食品中金霉素药物残留量的监测势在必行。

现有的检测动物源食品中兽药残留鉴别和判定方法主要包括微生物方法、高效液相色谱法和酶联免疫分析法等。

应用微生物方法的主要缺点是：检测时间长(2~3天)，缺乏专一性，甚至无法对某一类药物定性(Nikolaos A. Botsoglou, Dimitrios J. Fletouris. Drug residues in foods pharmacology, food safety and analysis[M]. New York, 2001)。

应用高效液相色谱法(HPLC)法的主要缺点是：检测时间较长、灵敏度较低、设备昂贵、难以在基层推广应用。

目前，国内外专门针对动物源食品中金霉素残留量分析的酶联免疫检测试剂盒及其检测方法尚未见报道和推广应用。

酶联免疫分析方法所用的核心试剂主要是生物试剂，例如抗体、酶标记抗体，检测原理是生物化学反应，其检测结果极易受到各种因素的干扰，因此，排除干扰是关键。

现有的检测某种兽药残留的ELISA方法，由于所制备的抗体的特异性存在差异，在处理组织样品时，都要求过柱净化以排除干扰，这样势必增加操作步骤，加大检测成本，延长检测时间(一般延长2小时左右)，不利于提高工作效率。

本发明的试剂盒用于对金霉素残留的检测具有良好的应用前景，可以在较短时间内检测大量样品，排除大量阴性样品，同时样品处理既简单、省时、省力，又无需昂贵的仪器设备，所以比较适合在基层检验检疫单位推广使用。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的缺陷，研制一种对金霉素有特异性的残留分析检测试剂盒并建立一种基于金霉素残留检测的ELISA方法。本发明是通过对金霉素的分子改造，制备出可以固定到酶标板上的包被

抗原和能够免疫动物的人工免疫原，进一步制备金霉素抗体，适用于对动物源食品中金霉素残留的测定。

本发明是这样实现的：

一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，它包括盒体、设在盒体内的 96 或 48 酶标板、设在盒体内的试剂，其中的试剂包含洗涤液、样品稀释液、辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体、底物液、显色液和终止液，在所述的酶标板的每孔内有包被液包被的能与金霉素抗体特异性反应的包被抗原、金霉素标准溶液和金霉素抗体，所说的金霉素抗体是由人工免疫原免疫家兔得到的血清。

所说的包被抗原为金霉素乙酸和卵清白蛋白的复合物（CTC-OVA）。

所说的人工免疫原是由金霉素乙酸与牛血清白蛋白的复合物（CTC-BSA）。

在本发明的试剂盒中还包含下列试剂：

洗涤液：含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾和氯化钠,pH7.4)；

样品稀释液：磷酸盐缓冲液(磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾和氯化钠,pH7.4)；

底物液：含有 20%四甲基联苯胺的无水乙醇溶液；

显色液：含有过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液，pH5~5.4；

终止液：硫酸或盐酸溶液（2mol/L）。

一种应用酶联免疫吸附反应（ELISA）检测样品中金霉素残留的分析方法，其步骤包括合成人工免疫抗原、制备抗体和样品处理，其中的金霉素分子改造是将盐酸金霉素与氯乙酸钠反应得到金霉素乙酸，再将金霉素乙酸与卵清白蛋白反应得到包被抗原；将金霉素乙酸与牛血清白蛋白反应得到人工免疫原；在本发明中所说的样品处理不需要过柱净化。由于本发明制备的抗体特异性强，能够有效排除组织样品中杂蛋白的干扰，因此，处理样品时，不需要过柱净化，因而减少了操作步骤，降低了检测成本，缩短了检测时间，提高了工作效率。

本发明的试剂盒和建立的检测方法可以方便快速地应用于判定食品，特别是判定动物源食品中金霉素残留量是否超标。

本发明的试剂盒及其检测方法经过灵敏度、精密度、特异性等质控项目测定，表明该试剂盒特异性强、灵敏度高，样品处理简单、实用，性能稳定，既适合专业检测部门应用，也适合于在基层单位推广应用。

本发明的试剂盒最低检测限可达 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，样品处理方法较仪器检测法简单，板内变异系数在 20% 以内，100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度猪肌肉添加回收率在 70%~110%，牛奶 60%~120%，鸡蛋 60%~120%。

本发明的试剂盒具有以下特点：1、所制备的金霉素抗体对金霉素具有很高的特异性，可对动物源食品中金霉素的残留量进行专一检测和判定。2、样品处理不需要过柱净化，处理步骤简单、实用，特别适合基层检验检疫单位使用。3、样品处理较现有仪器简单、灵敏、省时。

本发明技术细节将在以下的描述中进一步阐明。

附图说明

图 1: 是本发明的金霉素酶联免疫快速检测试剂盒和检测方法技术路线图。

图 2 试剂盒的直观示意图

图 3 酶标板的直观示意图

图 4: 是本发明涉及的金霉素标准品的紫外图谱, 显示了该金霉素标准品三个吸收峰: 即 218nm、277nm、368nm。

图 5: 是本发明涉及的氯乙酸钠标准品的紫外图谱, 显示了一个吸收峰: 208nm。

图 6: 是本发明改造的金霉素乙酸的紫外图谱, 显示了金霉素乙酸的 4 个吸收峰: 217nm、245nm、255nm、287nm。

揭示了金霉素乙酸紫外图谱不同于金霉素和氯乙酸钠的紫外图谱。

图 7: 是本发明涉及的牛血清白蛋白(BSA)标准品的紫外图谱, 显示了牛血清白蛋白标准品两个吸收峰: 279nm、215nm。

图 8: 是本发明的蛋白金霉素复合物的紫外图谱, 显示了牛血清白蛋白金霉素复合物的三个吸收峰: 209nm、291nm、309nm。揭示了牛血清白蛋白金霉素复合物紫外图谱不同于金霉素乙酸和牛血清白蛋白的紫外图谱。

图 9: 是本发明的金霉素抗体与盐酸金霉素标准品的间接竞争反应曲线, X 轴为盐酸金霉素标准品的浓度对数值, Y 轴为盐酸金霉素对光密度值的抑制百分率。随着盐酸金霉素标准品浓度的增高, 光密度值抑制百分率迅速下降, 形成典型的“S”形曲线, 揭示了金霉素抗体与金霉素药物具有特异、敏感的免疫反应性。

具体实施方式

实施例 1 制备金霉素乙酸、人工免疫原、包被抗原、抗金霉素抗体

1.1 制备金霉素乙酸

称取 300mg 盐酸金霉素(在另外的实施例中可以用金霉素、金霉素碱代替, 其使用量与盐酸金霉素相同), 用 25ml pH10 的磷酸盐缓冲液溶解, 加入 58.5mg 氯乙酸钠, 室温下充分反应 10 小时后过滤、稀盐酸调 pH 值至 4.0, 静置 2 小时, 抽滤后 50℃烘干, 得到金霉素乙酸。

1.2 制备人工免疫原

用 2ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解 118.8mg 金霉素乙酸, 搅拌中加入 N,N-二环己基碳酰亚胺(DCC)55mg, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)28.8mg, 4℃搅拌反应 10 小时以上, 4℃离心(10000r/min), 将上清液加入 680mg BSA 溶液中(pH8.0 PBS10ml, DMF1ml), 4℃搅拌过夜, 4℃离心(10000r/min), 透析 72 小时, 得到牛血清白蛋白金霉素复合物即人工免疫原(CTC-BSA)。

1.3 制备包被抗原

用 2ml DMF 溶解 118.8mg 金霉素乙酸, 搅拌中加入 DCC 55mg, NHS 28.8mg, 4℃搅拌反应 10 小时以上, 4℃离心(10000r/min), 将上清液加入 125mg OVA 溶液中(pH8.0 PBS10ml, DMF1ml), 4℃搅拌过夜, 4℃离心(10000r/min), 透析 72 小时, 得到卵清白蛋白金霉素复合物即包被抗原(CTC-OVA)。

1.4 制备金霉素抗体

选健康雄性体重 1.5kg 的家兔 4 只, 按 2 只一组分为两组, 其中一组按 0.8mg/只的免疫剂量实施免疫, 另一

组按1.6mg/只的免疫剂量实施免疫。方法是：首次用弗氏完全佐剂（购自Sigma公司）、第二次以后用弗氏不完全佐剂（购自Sigma公司），按1：1比例乳化后皮下多点注射，每间隔4周免疫一次。四免后双扩检测血清抗体效价达1:64。

1.5 金霉素抗体稳定性考核

设计温度：-20℃、4℃、20℃

设计时间：10天、20天、30天、2个月、4个月、6个月、1年

保存方法：按1：1的比例添加甘油

考核指标：光密度值 OD450nm

操作步骤同实施例 6.2。结果见表 1。

表 1 本发明制备的金霉素抗体稳定性测试

	0天	10天	20天	30天	2月	4月	6月	1年
-20℃	1.68	1.65	1.64	1.6	1.6	1.58	1.55	1.50
4℃	1.65	1.6	1.58	1.5	1.4	1.2	1.0	0.60
20℃	1.60	0.59	失效					

结果表明，金霉素抗体在-20℃和4℃低温条件下较稳定。

1.6 金霉素抗体特异性考核

取包被、封闭好的96孔酶标板，其中12孔每两孔分别加入0、0.1、1、10、100、1000 μg/kg 金霉素标准溶液，每孔50 μl。另取12孔，每两孔分别加入0、0.1、1、10、100、1000 μg/kg 去甲基金霉素标准溶液，每孔50 μl。再取12孔，每两孔分别加入0、0.1、1、10、100、1000 μg/kg 四环素标准溶液，每孔50 μl。各孔加入金霉素抗体50 μl，以下操作同2.7中的测定程序。从标准曲线中查出各标准溶液的50%百分抑制率所分别对应的各标准品的浓度值并计算交叉反应率（金霉素对某药物的交叉反应率=金霉素标准溶液50%百分抑制率所对应的浓度÷某药物标准溶液50%百分抑制率所对应的浓度×100%）。同法测定强力霉素、土霉素、咪诺四环素、吡咯烷甲四环素的交叉反应率。其结果见表2。

表 2 本发明金霉素抗体的交叉反应测定结果

	金霉素 μg/kg	去甲基金 霉素 μg/kg	四环素 μg/kg	强力霉素 μg/kg	土霉素 μg/kg	咪诺四环 素 μg/kg	吡甲四环 素 μg/kg
IC ₅₀ 浓度	50	5500	5500	6000	6000	7000	7000
交叉反应率 (%)	100	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7

结果表明，金霉素与去甲基金霉素、四环素、强力霉素、土霉素、咪诺四环素、吡咯烷甲四环素的交叉反应率均小于1%。

实施例 2 建立金霉素酶联免疫间接竞争检测方法（ELISA）

2.1 包被原包被浓度和金霉素抗体工作浓度（稀释倍数）的确定

通过方阵滴定试验确定高、中、低三个参照点：以吸光度值约1.0且左右相邻吸光度差值最大的点为参照点。操作步骤：在96孔酶标板上的第一行包被8 μg/kg的包被原，第二至第七行依次包被4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/kg的包被原。4℃过夜，1%卵清白蛋白37℃封闭1小时，洗涤2次，拍干，在酶标板的第

一列至第七列依次加入 100 μ l 稀释倍数为 1000、2000、4000、8000、16000、32000、64000 的金霉素抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，洗涤 3 次，拍干，各孔加入 100 μ l 底物液和显色液的等比混合液，避光显色 15 分钟，加入 50 μ l 终止液，2 分钟后用自动酶标仪在 450nm 波长处测定光密度值 (OD_{450nm} 值)。结果见表 3。

表 3 本发明试剂盒的包被抗原浓度和金霉素抗体工作浓度的测定

吸光度 \ 稀释	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
包被浓度	倍	倍	倍	倍	倍	倍	倍
8 μ g/kg	2.844	2.639	2.06	1.303	0.797	0.416	0.277
4 μ g/kg	2.699	2.347	1.945	1.272	0.688	0.437	0.306
2 μ g/kg	2.37	2.055	1.445	0.952	0.554	0.335	0.26
1 μ g/kg	2.107	1.587	1.057	0.627	0.44	0.277	0.246
0.5 μ g/kg	1.49	1.242	0.778	0.595	0.33	0.209	0.179
0.25 μ g/kg	1.227	1.049	0.709	0.425	0.346	0.199	0.158
0.125 μ g/kg	1.194	0.964	0.586	0.369	0.248	0.182	0.158

结果表明，三个参照点为：4 μ g/kg、8000 倍，2 μ g/kg、8000 倍，1 μ g/kg、4000 倍。

2.2 HRP 标记羊抗兔抗体工作浓度的确定 (间接竞争法, 三因素三水平)

以实施例 2 的步骤 2.1 确定的包被原浓度和金霉素抗体浓度做为参照，并以商品 HRP 标记羊抗兔抗体(购自 Sigma 公司)推荐的工作浓度为参照，设计稀释倍数为 15000、10000、5000 三个水平进行试验。操作步骤：查正交设计表，安排 9 次平行试验，每次试验设重复孔 10 个，另设空白对照孔(只用卵清白蛋白包被) 10 个。操作步骤：根据正交试验表的试验组合，从 96 孔酶标板第 1 行到第 7 行依次进行试验 1 至试验 7，第 8 行作为空白对照，另两排进行试验 8 和 9。4 $^{\circ}$ C 过夜，1% 卵清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时，洗涤 2 次，拍干，加金霉素标准液，浓度分别为 0、0.1、1、10、100、1000 μ g/kg，每孔 50 μ l，按设计表加入不同稀释倍数的金霉素抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗涤 3 次，每次 2 分钟，拍干，按设计表加入不同稀释倍数的 HRP 标记羊抗兔抗体，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。洗涤 5 次，每次 2 分钟，拍干，各孔加入 100 μ l 底物液和显色液的等比混合液，避光显色 15 分钟，加入 50 μ l 终止液，2 分钟后用自动酶标仪在 450nm 波长处测定光密度值 (OD_{450nm} 值)。结果见表 4。

表 4 本发明试剂盒的 HRP 标记羊抗兔抗体工作浓度正交试验测定

试验号	包被浓度 (μ g/kg)	金霉素抗体 稀释倍数	HRP 羊抗兔抗 体稀释倍数	最低检测浓 度(μ g/kg)	最大光密度 (OD _{450nm})
1	4	8000	15000	5	2.7
2	4	4000	10000	5	2.4
3	4	10000	5000	5	2.2
4	2	4000	15000	1	1.8
5	2	10000	10000	1	1.5
6	2	8000	5000	5	2.0
7	1	10000	15000	0.1	1.0
8	1	8000	10000	0.1	1.5
9	1	4000	5000	1	1.8

结果表明, 试验 7 号和 8 号的检测限最低且 OD450nm 值适中, 由此可确定 HRP 标记羊抗兔抗体最佳工作浓度为 10000~15000 倍稀释, 最佳包被浓度为 1 μ g/kg, 金霉素抗体最佳工作浓度为 8000~10000 倍稀释。

2.3 最佳竞争反应时间的确定

以 2.2 试验结果做参考。以 1 μ g/kg 浓度的包被原包被酶标板三块, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 1% 卵清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时, 洗涤 2 次, 拍干, 第 1 至 6 行加金霉素标准液, 浓度分别为 0、0.1、1、10、100、1000 μ g/kg, 每个浓度重复 10 次, 每孔 50 μ l, 各孔加入稀释 10000 倍的金霉素抗体, 孵育时间分别为 30、60、90 分钟。洗涤 3 次, 每次 2 分钟, 拍干, 加入稀释 10000 倍的 HRP 羊抗兔抗体, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。洗涤 5 次, 每次 2 分钟, 拍干, 各孔加入 100 μ l 底物液和显色液的等比混合液, 避光显色 15 分钟, 加入 50 μ l 终止液, 2 分钟后测 OD450nm。结果见表 5。

表 5 本发明试剂盒的竞争反应时间试验

反应时间 (min)	最低检测浓度 (μ g/kg)	最大吸光度平均值 (n=10)	标准曲线形状
30	1	1.05	变形
60	0.1	1.59	正常
90	0.1	1.50	变形

结果表明最佳竞争反应时间为 60 分钟。

2.4 金霉素竞争反应体积的确定

以 2.3 试验结果作为参照, 设金霉素标准品与金霉素抗体的比例为 20:80, 40:60, 50:50。操作步骤同 2.3。结果见表 6。

表 6 本发明试剂盒金霉素竞争反应体积测定(金霉素:金霉素抗体)

反应体积 (μ l)	最低检测浓度 (μ g/kg)	最大吸光度平均值 (n=10)	标准曲线形状
20:80	5	2.09	变形
40:60	1	1.60	正常
50:50	0.1	1.53	正常

结果表明金霉素最佳竞争反应体积比为 50 μ l:50 μ l。

2.5 HRP 羊抗兔抗体反应时间的确定

参考 2.2、2.3、2.4 步骤的结果, 设 HRP 羊抗兔抗体孵育时间为 15、30、60 分钟。其他操作步骤同 2.3, 结果见表 7。

表 7 本发明试剂盒 HRP 标记羊抗兔抗体反应时间试验

反应时间 (min)	最低检测浓度 (μ g/kg)	最大吸光度平均值 (n=10)	标准曲线形状
15	3.2	1.15	变形
30	0.59	1.60	正常
60	4.8	2.18	变形

结果表明 HRP 羊抗兔抗体最佳反应时间为 30 分钟。

2.6 显色时间的确定

参考步骤 2.2、2.3、2.4、2.5 的结果, 考察 5、10、15 分钟三个显色时间。其他操作步骤同 2.3, 结果

见表8。

表8 本发明试剂盒底物反应时间测定

反应时间 (分钟)	最低检测浓度 (ppb)	最大吸光度平均 值(n=10)	标准曲线形状
5	1	0.85	变形
10	0.1	1.06	正常
15	0.1	1.55	正常

结果表明底物系统的最佳反应时间为10~15分钟。

2.7 最低检测限测定及线性范围

本发明用不含金霉素标准品的孔即“零”标准孔的(96孔酶标板或48孔酶标板)光密度值来确定最低检测限。测定10个“零”标准孔,求出光密度值的平均数,再减去三倍标准差,从标准曲线上查出对应的浓度,即最低检测限。标准曲线绘制方法:另取10个孔每两孔分别加入浓度为0.1、1、10、100、1000 μ g/kg的金霉素标准品,每孔50 μ l。每个孔另加金霉素抗体工作液50 μ l,温育1h,洗涤三次,加HRP标记的羊抗兔抗体工作液,以下步骤同实施例2.3的检测程序。抑制率按实施例6.2的公式计算。以金霉素浓度(μ g/kg)的对数值为X轴,抑制率为Y轴,在坐标纸上绘制标准曲线图。结果见表9和表10。

表9 不含金霉素标准品的酶标孔光密度值测定结果

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	SD
1.49	1.51	1.38	1.59	1.40	1.35	1.51	1.45	1.47	1.58	1.46	0.08

$X-3SD = 1.22$, 标准曲线相应吸光度值的浓度为0.59 μ g/kg。见表10。

表10 本发明试剂盒的最低检测限测定结果

吸光度值	1.46	1.31	1.26	0.98	0.68	0.41
A/A ₀ (%)	100	90	86	67	46	28
浓度 μ g/kg	0	0.1	1	10	100	1000

结果表明最低检测浓度为0.59 μ g/kg。线性范围0.6~1000 μ g/kg。

实施例3 本发明准确度和精密度试验

3.1 现以猪肌肉为例说明肉组织样品处理方法和结果(同样的试验可采用鸡或鸭或牛、或羊等动物肌肉组织)。

将浓度为100 μ g/kg的金霉素标准品添加入待测的猪肌肉组织中,另设不含金霉素的猪肌肉组织作为空白作对照,每个浓度各重复5次。操作步骤:每个试样称取5克经过匀浆的猪肌肉组织,按照前述方法和剂量制备待测样品和空白样品,然后加5毫升pH4.0 McIlvain缓冲液,震荡均匀,4 $^{\circ}$ C、4000转/分钟离心,取上清,加入20%三氯乙酸0.3ml,摇匀后再离心,4 $^{\circ}$ C、8000转/分钟,取上清,10倍稀释后调pH值至7.4(加1N NaOH约100微升即可),取50微升检测、步骤同实施例6.2,结果见表11。

表 11 本发明试剂盒对猪肌肉回收率测定结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测浓度	回收率 (%)	变异系数 (%)
0	0.06		10
100	9.4	94	5

肌肉空白样品测定值应在 $0.59\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下, $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 组织样品的测定值应在 $9.4\mu\text{g}/\text{kg}$ 左右。乘以稀释系数 10, 其测定值应分别为 $5.9\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下和 $94\mu\text{g}/\text{kg}$ 左右。

3.2 以鸡蛋为例说明蛋样品处理的方法和结果。

将浓度为 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 的金霉素标准品添加入待测的蛋清中, 另设不含金霉素的蛋清作为空白作对照, 每个浓度各重复 5 次。操作步骤: 每个试样吸取 5ml 蛋清, 按照前述方法和剂量制备待测样品和空白样品, 然后 4°C 、4000 转/分钟离心, 取上清, 加入 0.3 毫升 20% 三氯乙酸, 摇匀后再离心, 4°C 、8000 转/分钟, 取上清, 10 倍稀释后调 pH 值至 7.4, 取 50 微升检测、步骤同实施例 6.2。结果见表 12。

表 12 本发明试剂盒对鸡蛋回收率测定结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测浓度	回收率 (%)	变异系数 (%)
0	0		
200	180	90	8

结果表明空白样品测定值为 $0\mu\text{g}/\text{kg}$, $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 组织样品的测定值为 $9.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 。乘以稀释系数 10, 其测定值分别为 0 和 $90\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.3 以牛奶为例说明奶组织样品预处理的方法和结果。

将浓度为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 的金霉素标准品添加入待测的牛奶中, 空白作对照, 每个浓度各重复 5 次。操作步骤: 每个试样吸取 5ml 牛奶, 按照前述方法和剂量制备待测样品和空白样品, 然后 4°C 、4000 转/分钟离心, 取上清, 加入 0.3 毫升 20% 三氯乙酸, 摇匀后再离心, 4°C 、8000 转/分钟, 取上清, 10 倍稀释后调 pH 值至 7.4, 取 50 微升检测、步骤同实施例 6.2。结果见表 13。

表 13 本发明试剂盒对牛奶回收率测定结果

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测浓度	回收率 (%)	变异系数 (%)
0	0		
100	9	90	5

结果表明空白样品测定值为 $0\mu\text{g}/\text{kg}$, $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 组织样品的测定值为 $9.4\mu\text{g}/\text{kg}$ 左右。乘以稀释系数 10, 其测定值分别为 $0\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $94\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

实施例 4 稳定性考核

4.1 方法稳定性考核: 每批 5 块酶标板, 三天一批, 共进行 5 批试验。方法: 取包被、封闭好的 96 孔酶标板, 其中 12 孔每两孔分别加入 0、0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 金霉素标准溶液, 每孔 $50\mu\text{l}$ 。另取 10 孔加入 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 的标准溶液 $50\mu\text{l}$ 。各孔加入金霉素抗体 $50\mu\text{l}$ /孔, 以下步骤同实施例 6.2。从标准曲线中查出空白组织样品和 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 组织样品的测定浓度, 计算其平均值、标准差和变异系数。结果见表 14、15、16。

表 14 本发明试剂盒酶标板内变异系数测定结果

测定浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	94	86	91	94	96	90	95	95	100	85
平均值	93									
标准差	4.6									
变异系数 (%)	5									

表 15 本发明试剂盒酶标板间 (批内) 变异系数测定结果

测定浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	93	86	80	95	90
平均值	89.				
标准差	5.9				
变异系数 (%)	7				

表 16 本发明试剂盒不同批次之间的变异系数测定结果

测定浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	89	75	95	90	105
平均值	91				
标准差	11				
变异系数 (%)	12				

结果表明板内变异系数不大于 10% (n=10)。板间 (批内) 变异系数不大于 15% (n=5)，批间变异系数不大于 20% (n=5)。

4.2 发明试剂盒稳定性考核：

4.2.1 条件化酶标板 (包被金霉素卵清白蛋白复合物的酶标板) 的稳定性试验

设计温度：20℃、4℃

设计时间：0 天、10 天、20 天、30 天、2 月、4 月、6 月

保存方法：真空干燥 (在冻干机中冻干，并贮存在 4℃ 的冰箱内或 20℃ 室温中)

考核指标：光密度值 OD

操作步骤同实施例 6.2。结果见表 17。

表 17 本发明试剂盒酶标板稳定性测试结果

	0 天	10 天	20 天	30 天	2 月	4 月	6 月
4℃	1.66	1.65	1.65	1.5	1.3	1.2	1.1
20℃	1.70	0.80	失效				

结果表明，条件化酶标板可以在 4℃ 条件下较长时间贮藏。

4.2.2 底物显色系统 (底物液和显色液的等比混合液) 稳定性试验

设计温度：4℃、20℃

设计时间：0 天、10 天、20 天、30 天、2 月、4 月、6 月

考核指标：光密度值 OD

操作步骤同实施例 2.7 的检测程序。结果见表 18。

表 18 本发明试剂盒中底物显色系统稳定性测定

	0天	10天	20天	30天	2月	4月	6月
4℃	1.66	1.66	1.60	1.60	1.55	1.35	1.0
20℃	1.73	0.62	失效				

结果表明，底物显色系统在 4℃ 条件下较稳定。

实施例 5 发明试剂盒的实用性和定量检测效果考核

5.1 实际样品的制备: 15 千克左右的仔猪 12 头, 随机分为 4 组, 每组 3 头。第一、二、三组饲喂含金霉素的饲料, 连续饲喂 7 天, 其中第一组停药后 0 天宰杀, 第二组停药后 2 天宰杀, 第三组停药后 4 天宰杀。第四组饲喂不含金霉素的饲料, 分别于停药后 0、2、4 天各宰杀一头, 做为空白对照。饲料中金霉素浓度为 100 毫克/千克。检测组织为肌肉、肝脏和肾脏。

5.2 实际样品的检测: 检测步骤同 2.7 和 4.1 所述方法。其结果见表 19~22。

表 19 本发明试剂盒与 HPLC 方法的比较 (第一组试验 单位: ppb)

仔猪编号	检测组织	发明试剂盒	高效液相色谱仪 (HPLC)
1	肌肉	234	252
	肝脏	1075	1127
	肾脏	3114	3291
2	肌肉	305	327
	肝脏	1578	1680
	肾脏	3496	3506
3	肌肉	214	300
	肝脏	848	862
	肾脏	2300	2423

表 20 本发明试剂盒与 HPLC 方法的比较 (第二组试验 单位: ppb)

仔猪编号	检测组织	发明试剂盒	高效液相色谱仪 (HPLC)
4	肌肉	5	不能检出
	肝脏	25	不能检出
	肾脏	43	不能检出
5	肌肉	7	不能检出
	肝脏	27	不能检出
	肾脏	38	不能检出
6	肌肉	0	0
	肝脏	5	不能检出
	肾脏	10	不能检出

表 21 本发明试剂盒与 HPLC 方法的比较 (第二组试验 单位: ppb)

仔猪编号	检测组织	发明试剂盒	高效液相色谱仪 (HPLC)
7	肌肉	0	0
	肝脏	0	0
	肾脏	3	不能检出
8	肌肉	0	0
	肝脏	0	0
	肾脏	5	不能检出
9	肌肉	0	0
	肝脏	0	0
	肾脏	2	不能检出

表 22 本发明试剂盒与 HPLC 方法的比较 (空白对照组 单位: ppb)

仔猪编号	检测组织	发明试剂盒	高效液相色谱仪 (HPLC)
10	肌肉	0	0
	肝脏	0	0
	肾脏	0	0
11	肌肉	0	0
	肝脏	0	0
	肾脏	0	0
12	肌肉	0	0
	肝脏	0	0
	肾脏	0	0

由以上结果可见, 发明试剂盒可检出实际样品中高、中、低各种浓度的金霉素残留量, 检测结果与金霉素的代谢规律一致, 且与高效液相色谱仪 (HPLC) 检测结果相符合, 表明发明试剂盒具有实用性并能够定量检测。

实施例 6 试剂盒的组装及检测方法的应用

6.1 试剂盒子的组装:

本发明试剂盒主要构造: (1) 箱体、(2) 酶标板、(3) 6 瓶金霉素系列浓度标准品、(4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔抗体、(5) 金霉素抗体溶液、(6) 底物显色 A 液、(7) 底物显色 B 液、(8) 终止液、(9) 浓缩洗涤液、(10) 样品稀释液、(11) 泡沫托架。泡沫托架上制有凹孔, 试剂瓶 (3) ~ (10) 安放在泡沫托架的凹孔内, 泡沫托架和酶标板安放在盒体内。

其中所述酶标板由 96 孔或 48 孔聚苯乙烯塑料支架和可拆分的塑料条组成, 包被原为金霉素与卵清蛋白偶联物。所述金霉素系列浓度标准品为盐酸金霉素溶液。所述金霉素抗体浓缩液为金霉素特异性多克隆抗体。所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲。所述显色液 B 液为四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD)。所述终止液为硫酸溶液或盐酸溶液。所述浓缩洗涤液为含有 0.1% 吐温-20 磷酸盐缓冲液; 所述样品稀释液为 pH7.4 磷酸盐缓冲液。

6.2 试剂盒及其检测方法的应用

根据 2.1~2.6 的测定结果，试剂盒应用方法如下：

(1) 选12个孔分别按0、0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度加入金霉素标准液，每孔50 μl ；

另选适当数目的孔加待检样品，每孔50 μl ；

另加金霉素抗体50 μl ；37℃孵育1小时；

(2) 洗涤3次，每次2分钟；

(3) 加HRP羊抗兔抗体，每孔100 μl ，37℃孵育30min；

(4) 洗涤5次，每次2分钟；

(5) 将底物等量混合后加入酶标板，每孔100 μl ，显色15min；

(6) 加终止液50 μl /孔；

(7) 测光密度值 ($\text{OD}_{450\text{nm}}$)；

(8) 结果判定：定性检测时，用样品的光密度值和金霉素标准品的光密度值相比较，如果样品的光密度值高于金霉素标准品的光密度值时为阴性，反之为阳性。定量检测时，以金霉素标准品浓度的对数值为横坐标、以金霉素标准品光密度值 ($\text{OD}_{450\text{nm}}$) 百分抑制率为纵坐标作图得到标准曲线。根据标准曲线即可查出待检样品中金霉素的对应浓度。

$$\text{计算公式：抑制率 (\%)} = \frac{\text{标准品吸光值 (或样品)}}{\text{0标准的吸光值}} \times 100$$

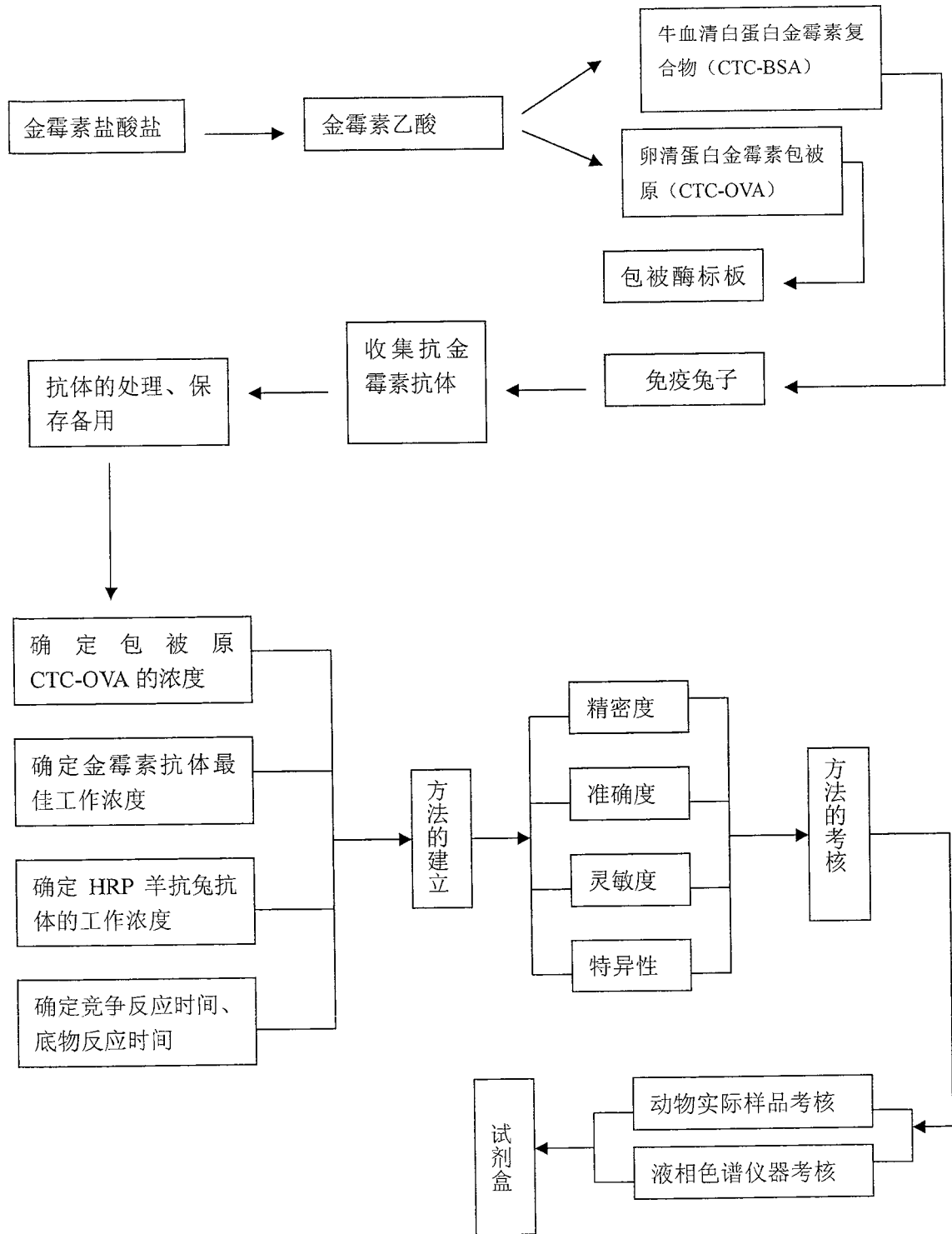


图 1

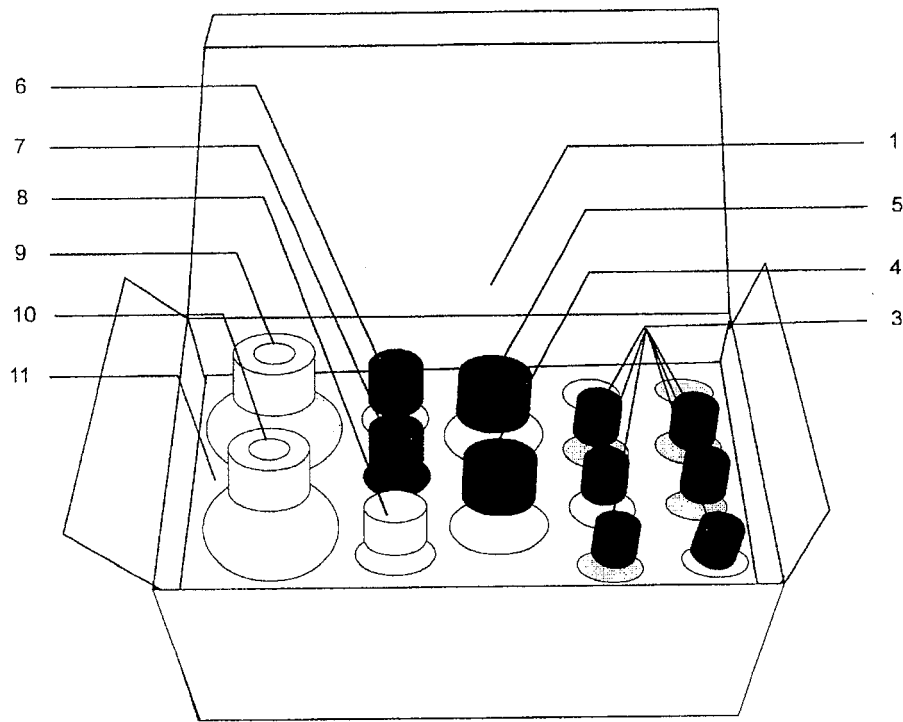


图 2

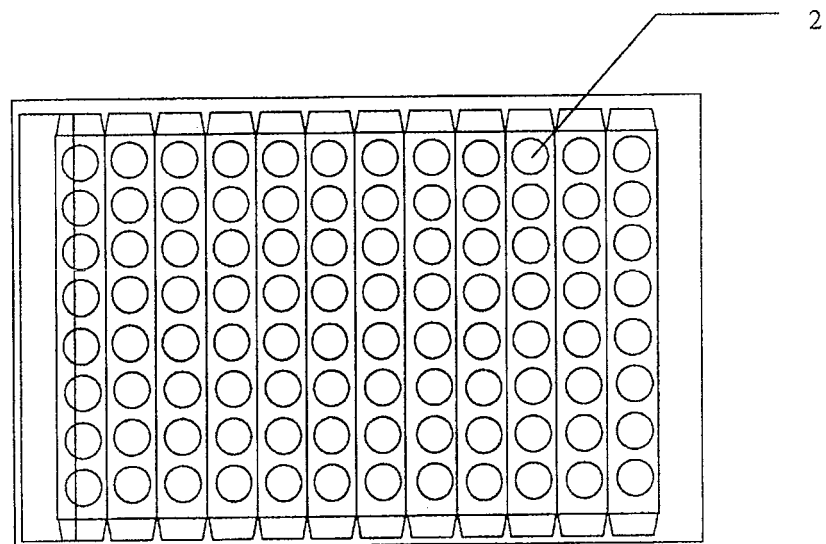


图 3

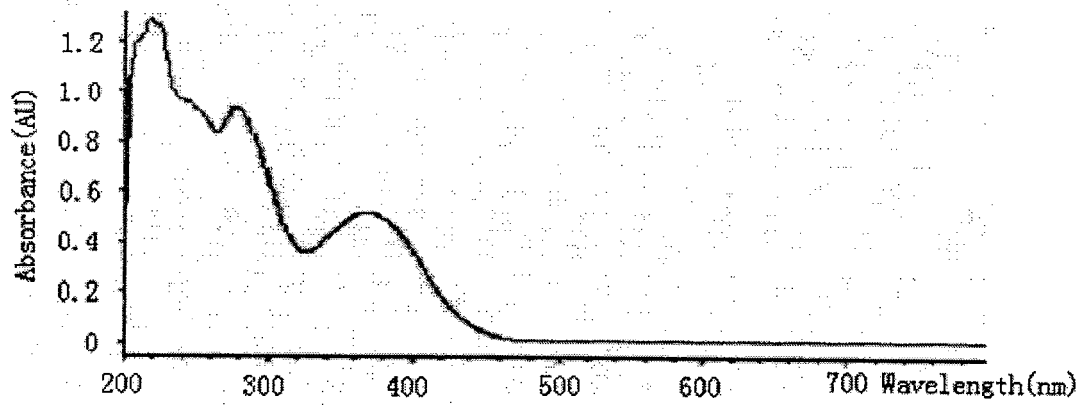


图 4

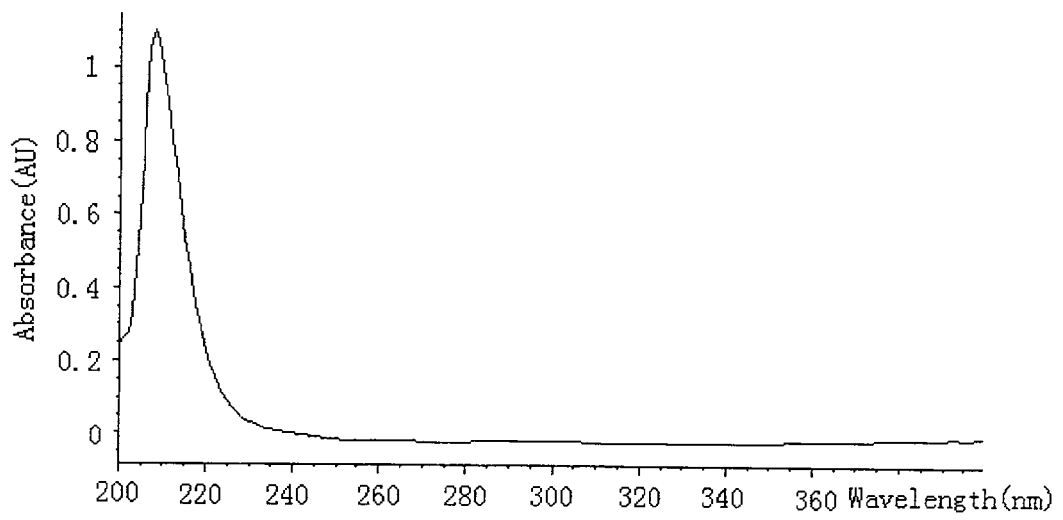


图 5

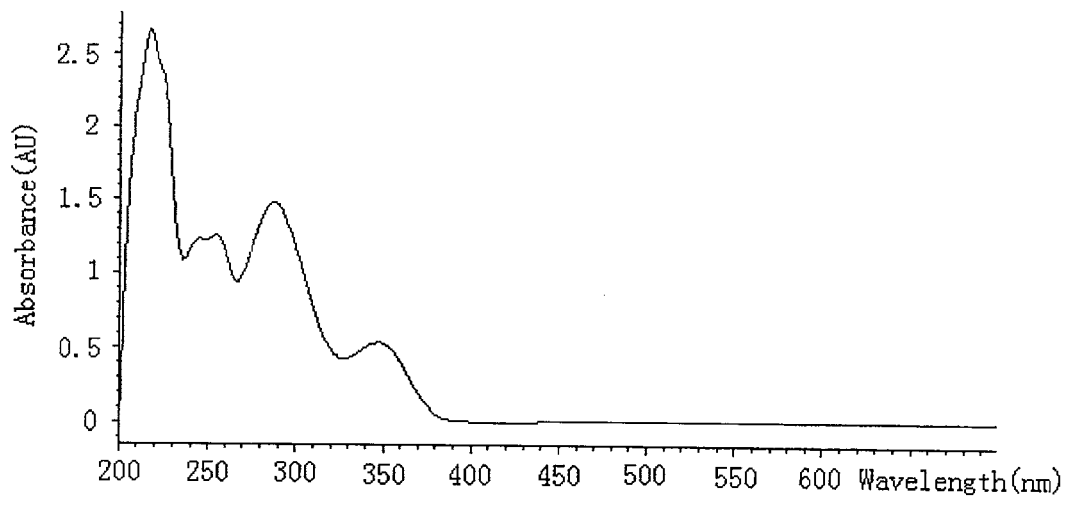


图 6

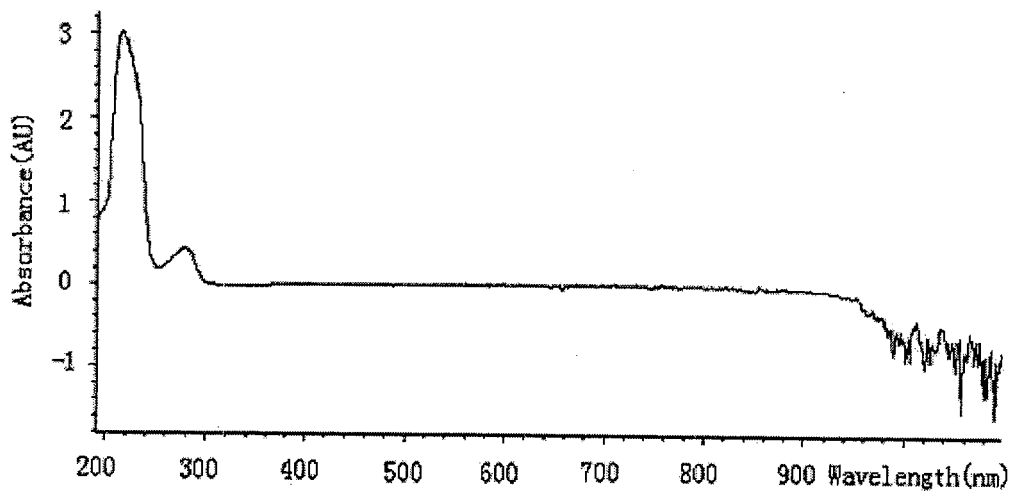


图 7

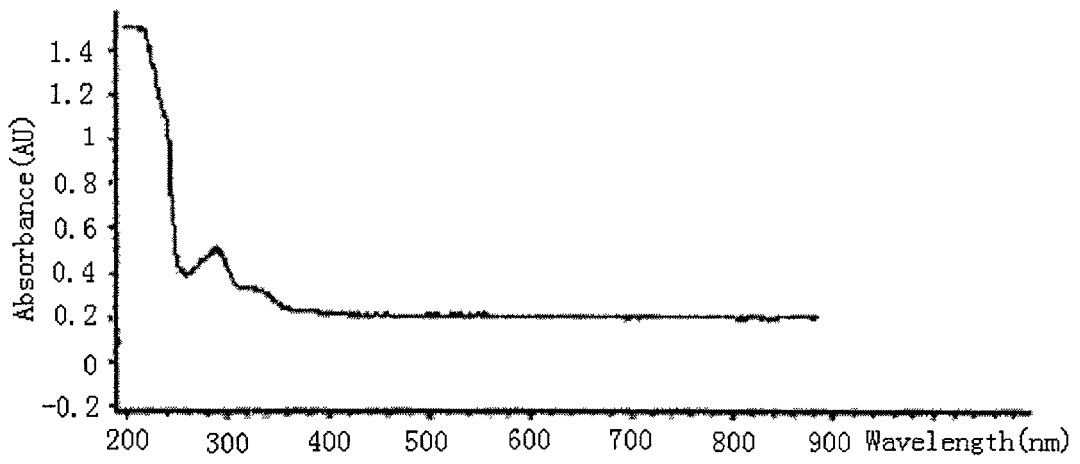


图 8

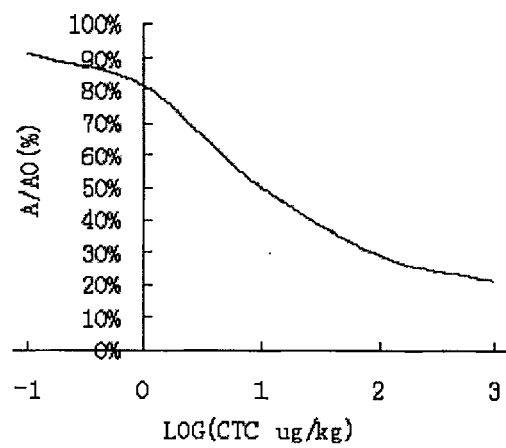


图 9

专利名称(译)	一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN100523813C	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	CN200510086347.3	申请日	2005-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	袁宗辉 赵春保 王玉莲 常超 陈冬梅 陶燕飞 彭大鹏 王帅兵		
发明人	袁宗辉 赵春保 王玉莲 常超 陈冬梅 陶燕飞 彭大鹏 王帅兵		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	张红兵		
审查员(译)	唐莉		
其他公开文献	CN1811435A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于金霉素残留分析的酶联免疫检测试剂盒及其应用。本发明所提供的试剂盒包括盒体，设在盒体内的酶标板和试剂，其中的试剂包含洗涤液、样品稀释液、辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体、底物液、显色液和终止液。本发明的核心在于有包被液包被的能与金霉素抗体特异性反应的包被抗原，金霉素标准溶液和金霉素抗体，该抗体是由人工免疫原免疫家兔得到的血清。包被抗原为金霉素乙酸和卵清白蛋白的复合物。人工免疫原是由金霉素乙酸与牛血清白蛋白的复合物。本发明的试剂盒特异性强、灵敏度高。

吸光度	稀释	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
包被浓度	倍	倍	倍	倍	倍	倍	倍	倍
8 μg/kg	2.844	2.639	2.06	1.303	0.797	0.416	0.277	
4 μg/kg	2.699	2.347	1.945	1.272	0.688	0.437	0.306	
2 μg/kg	2.37	2.055	1.445	0.952	0.554	0.335	0.26	
1 μg/kg	2.107	1.587	1.057	0.627	0.44	0.277	0.246	
0.5 μg/kg	1.49	1.242	0.778	0.595	0.33	0.209	0.179	
0.25 μg/kg	1.227	1.049	0.709	0.425	0.346	0.199	0.158	
0.125 μg/kg	1.194	0.964	0.586	0.369	0.248	0.182	0.158	