

[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 200510086777.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100344971C

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086777.5

[73] 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学西区动医学院国家兽药安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平
吴小平 冯才茂 汪善良 李军
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞
丁双阳 孙倩 罗晓琴

[56] 参考文献

CN1547013A 2004.11.17

WO03010543A 2003.2.6

动物组织中磺胺二甲嘧啶残留检测 ELISA 试剂盒的研制 沈建忠, 何方洋, 何继红等, 《中国兽医杂志》, 第 39 卷第 6 期 2003

磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的研制 何继红, 沈建忠, 《中国兽医杂志》, 第 39 卷第 1 期 2003

抗磺胺嘧啶单克隆抗体的制备及其 ELISA 检测试剂盒的建立 赵丕成, 袁大为, 祝润等, 《细胞与分子免疫学杂志》, 第 20 卷第 2 期 2004

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 向华

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测动物源性食品中磺胺类药物残留的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了用于检测动物组织中磺胺类药物的试剂盒, 是用酶联免疫方法对预处理的动物组织、蜂蜜、尿液、牛奶进行检测。该酶联免疫试剂盒包括: 包被了磺胺类药物抗原或抗抗体的酶标板、磺胺类药物鼠单克隆抗体工作液、磺胺类药物标准品溶液、酶标记的抗抗体或磺胺类药物抗原溶液、底物显色液、浓缩洗涤液、浓缩提取液、终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测磺胺类药物的方法, 它包括以下步骤: 首先进行样品前处理, 然后用试剂盒进行检测, 最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中磺胺类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本

1、一种用于检测动物源性食品中磺胺类药物的试剂盒，其特征在于它包含下列成分：

(1) 包被了磺胺类药物抗原或羊抗鼠抗抗体的酶标板，所述抗原是通过在磺胺类药物的母核上连接一个含苯环的间隔臂作为半抗原与载体蛋白偶联形成的偶联复合物；

(2) 磺胺类药物抗体，其是通过(1)中所述抗原作为免疫原免疫动物制备获得；

(3) 磺胺二甲基嘧啶标准品溶液；

(4) 酶标记物；

(5) 底物显色液；

(6) 浓缩洗涤液；

(7) 终止液；

(8) 浓缩提取液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于酶标记物是酶标记羊抗鼠抗抗体或酶标记磺胺类药物抗原，酶标记羊抗鼠抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与抗抗体偶联得到的；酶标记磺胺类药物抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将标记酶与磺胺类药物半抗原偶联得到。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于浓缩洗涤液为含有 0.8~1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液；浓缩提取液为 0.01~0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液；当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于磺胺类药物抗体的

蛋白浓度为 0.5~5.0 $\mu\text{g/L}$ 。

5、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于磺胺二甲基嘧啶标准品溶液的浓度分别为 0ppb，1ppb，3ppb，9ppb，27ppb 和 81ppb。

6、一种检测样品中磺胺类药物残留的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1~5 之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

7、如权利要求 6 所述的方法，其中试剂盒检测为向包被有磺胺类药物抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液，再加入磺胺类药物抗体，温育后洗涤拍干，加入酶标记羊抗鼠抗抗体，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

8、如权利要求 6 所述的方法，其中试剂盒检测为向包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入磺胺类药物抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标记磺胺类药物抗原及标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

一种检测动物源性食品中磺胺类药物残留的酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫学检测领域，具体地说，涉及一种检测动物源性食品中磺胺类药物的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

背景技术

磺胺类药物是应用广泛的抗菌素，曾对畜禽疾病控制和治疗起到了重要作用。但由于磺胺类药物残留存在严重副作用，人体中长期存在的磺胺药物会导致许多细菌对磺胺药产生抗性，且有潜在的致癌性，欧美等发达国家已相继禁止或严格禁止使用。我国农业部第 235 号文件规定其残留限量为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ，由于高效液相色谱分析法和气相色谱等仪器分析方法样本前处理及测定操作烦琐和费用高，推广使用受到限制。

发明内容

(一) 要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于动物源性食品中磺胺类药物的酶联免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

(二) 技术方案

为解决上述问题，本发明提供了一种检测动物源性食品中磺胺类药物的酶联免疫试剂盒，该试剂盒由下述组分组成：

- (1) 包被了磺胺类药物抗原或羊抗鼠抗抗体的酶标板；
- (2) 磺胺类药物抗体；
- (3) 磺胺二甲基嘧啶标准品溶液；
- (4) 酶标记物；
- (5) 底物显色液；
- (6) 浓缩洗涤液；
- (7) 终止液；

(8) 浓缩提取液。

本发明中所述的磺胺类药物并不限于某一种药物，而是指本发明合成的具有公共官能团、具有相同的药理活性和酶联反应机理的磺胺类药物。

其中所述包被了磺胺类药物抗原的酶标板在制备的过程中，所用的包被原是将磺胺类药物的母核对乙酰氨基苯磺酸和对氨基苯甲酸合成两种磺胺类药物半抗原，给磺胺药物母核接出了一个含苯环的间隔臂，这样突出了磺胺类药物公共部分，即分子结构中的特征基团——对乙酰氨基苯磺酰基，使制备的磺胺类药物母核抗体对磺胺类药物均有很高的识别能力。将磺胺类药物半抗原和血蓝蛋白(KLH)采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到包被原。所用的包被液是 pH 值为 9.6、0.05 ~ 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液，所用的封闭液是含有 3 ~ 10% 马血清的溶液。

其中所述羊抗鼠抗抗体是将以羊为免疫动物，以鼠源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到的。

其中所述磺胺类药物抗体优选为鼠单克隆抗体，在制备过程中的免疫原是将磺胺类药物半抗原与兔血清白蛋白(RSA)采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到的，所用的抗体稀释液是 pH 值为 8.2、0.05 ~ 0.1mol/L、含有 3% 的小牛血清的柠檬酸盐缓冲液。所得磺胺类药物抗体的蛋白浓度为 0.5~5.0 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述磺胺二甲基嘧啶标准品溶液浓度为 0~81ppb，可选择为 0ppb, 1ppb, 3ppb, 9ppb, 27ppb 和 81ppb。

其中所述酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记磺胺类药物抗原，酶标记的抗抗体为羊抗鼠抗抗体，标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶，本发明优选为辣根过氧化物酶。可采用现有技术中的多种方法将辣根过氧化物酶与抗抗体进行偶联，如戊二醛法，过碘酸钠法等，本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法改良，省时、降低辣根过氧化物酶(HRP)与抗抗体的浓度比率，节省了原材料。

其中所述底物显色液：当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标

记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液。

其中所述浓缩洗涤液为含有 0.8 ~ 1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液。

其中所述终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液。

其中所述浓缩提取液为 0.01 ~ 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液。

其中可作为固定磺胺类药物抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、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、微量反应板凹孔等。

本发明还提供了使用上述试剂盒定性、定量检测动物源性食品中磺胺类药物残留的方法，它包括以下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

优选地，样品前处理方法为：

a、动物组织、鸡蛋

取适量肌肉或鸡蛋匀浆，称取匀浆物置离心管中，加入乙腈水溶液混合，剧烈振荡，离心。取上清液，加入水和乙酸乙酯，混合振荡，离心。将上层液移另一管中用氮气吹干，用稀释了的提取液溶解干燥的残留物，加入异辛烷振荡，离心，除去上层液，取水相进行分析。

b、血清

将血清样本离心，分离出血清。或过滤血清。取血清，加入稀释后的提取液，混合，即可进行分析。

c、尿液

用稀释了的提取液与经离心后的清亮尿样本混合，即可进行分析。

d、牛奶

取牛奶样本离心，轻吸中间层，用磷酸盐缓冲液稀释即可进行分析。

e、蜂蜜

用磷酸盐缓冲液溶解蜂蜜样本，加乙酸乙酯萃取，震荡，离心，用氮气

吹干上层液体，磷酸盐缓冲液复溶即可分析。

优选地，其中试剂盒检测是向包被了磺胺类药物抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液，再加入磺胺类药物抗体及酶标抗原或酶标抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。或者，是向包被了羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入磺胺类药物抗体，再加入酶标抗原或酶标抗抗体及标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

优选地，检测结果分析过程为：用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准溶液（0标准）的吸光度值（ B_0 ）再乘以100%，即百分吸光度值。计算公式为：

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

公式中B为标准溶液的平均吸光度值， B_0 为 $0\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。以磺胺二甲基嘧啶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。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品中磺胺二甲基嘧啶的浓度则可从标准曲线上读出，根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中磺胺二甲基嘧啶的浓度范围。

优选地，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。

优选地，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，最低检测下限为 $0.5\mu\text{g/L}$ 。

其中，抗原及抗体的制备方法为：

（1）抗原的合成

将磺胺类药物的母核对乙酰氨基苯磺酸和对氨基苯甲酸合成两种磺胺类半抗原，给磺胺药物母核接出了一个含苯环的间隔臂，这样突出了磺胺药物公共部分，即分子结构中的特征基团——对乙酰氨基苯磺酰基，使制备的磺胺类药物母核抗体对磺胺类药物均有很高的识别能力。用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)将半抗原分别与血蓝蛋白(KLH)、兔血清白蛋白(RSA)载体蛋白

进行偶联得到包被原和免疫原。

(2) 酶标记抗抗体的制备

将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联, 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4: 1; 且由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点, 活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁, 从而降低酶标记物的酶活性, 使制备的偶联物中混有许多聚合物。为了解决这个问题, 我们将传统的方法进行改良, 即:

1) 省去了氨基的封闭过程, 因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。

2) 降低了辣根过氧化物酶: 抗抗体的摩尔浓度比率至 2: 1, 改良后的方法比传统的方法简便, 对酶活性的损失减少。

(3) 酶标记磺胺类药物抗原的制备

采用混合酸酐法或活性酯法将标记酶与磺胺类药物半抗原进行偶联得到酶标记磺胺类药物抗原。

(4) 磺胺类药物鼠单克隆抗体制备

动物免疫程序: 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 以磺胺类药物半抗原与兔血清白蛋白偶联物为免疫原对小鼠进行免疫, 可以得到血液里含有磺胺类药物特异性抗体的小鼠脾脏。

细胞融合与克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 得单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

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, 7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞, 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℃ 保存。

其中所用试剂的配制方法为:

- a. 磺胺二甲基嘧啶标准溶液: 磺胺二甲基嘧啶系列标准溶液 6 瓶, $0\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 $3\mu\text{g/L}$ 、 $9\mu\text{g/L}$ 、 $27\mu\text{g/L}$ 、 $81\mu\text{g/L}$, 1~3ml/瓶。
- b. 包被缓冲液: pH9.6、0.05~0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液。
- c. 封闭液: 含 3~10% 马血清的溶液。
- d. 浓缩洗涤液: 含 0.8~1.2% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4、0.01mol/L), 为正常使用浓度的 15~25 倍, 30~50ml/瓶, 1 瓶。
- e. 磺胺类药物抗体工作液: 用 pH 值 8.2、0.05~0.1mol/L、含有 3% 小牛血清的柠檬酸盐缓冲液将抗体稀释至蛋白浓度为 $0.5\sim 5.0\mu\text{g/L}$, 7~12ml/瓶, 1 瓶。
- f. 酶标记物工作液: 酶标记羊抗鼠抗抗体稀释液, 7~12ml/瓶, 1 瓶; 或酶标记抗原稀释液, 5~8ml/瓶, 1 瓶。
- g. 底物显色液 A 液: 过氧化氢或过氧化脲;
- h. 底物显色液 B 液: 邻苯二胺 (OPD) 或四甲基联苯胺 (TMB);
- i. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液: pH 8.1、含有 MgCl_2 0.01% 100mmol Tris-HCl;
- j. 终止液: 1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液;
- k. 浓缩提取液: 0.01~0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液, 30~50ml/瓶, 1 瓶, 为正常使用浓度的 2~5 倍。

其中酶标板的制备方法为:

(1) 用包被缓冲液将磺胺类药物半抗原与血蓝蛋白偶联物稀释, 向酶联板微孔中加入抗原稀释液, 放入 37°C 环境进行孵育, 放入 4°C 环境过夜 (得到的酶联板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37°C 孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

(2) 用包被缓冲液将抗抗体稀释, 向酶联板微孔中加入抗抗体稀释液, 放入 37°C 环境进行孵育, 放入 4°C 环境过夜 (得到的酶联板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37°C 孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

本发明试剂盒的检测原理为:

(1) 采用间接竞争酶联免疫测定方法的一步法，将磺胺类药物抗原作为包被原吸附于固相载体上，加入样品或系列标准品溶液，再加入酶标记抗体和磺胺类药物抗体工作液，待测样品中残留的磺胺类药物和固相载体上包被的磺胺类药物抗原竞争磺胺类药物抗体，酶标记抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测的样品的吸光度值，该值与样品中磺胺类药物残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出磺胺类药物的含量。

(2) 采用间接竞争 ELISA 的方法，将抗体作为包被原吸附于固相载体上，加入磺胺类药物抗体工作液，再加入酶标记磺胺类药物抗原和样品或系列标准品溶液，待测样品中残留的磺胺类药物和酶标记磺胺类药物抗原竞争结合在固相载体抗体上的磺胺类药物抗体，显色后终止，测得样品的吸光度值，该值与样品中磺胺类药物残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出磺胺类药物的含量。

采用间接竞争一步法的优点为：操作时间短，减少因为操作步骤冗繁引起的误差，提高了检测样本的灵敏度。

(三) 有益效果

本发明的检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 法定性或定量检测动物组织、血清、尿液、牛奶、蜂蜜和鸡蛋等样品中磺胺类药物的残留量；对样品的前处理要求低，处理过程简单，能同时快速检测大批样品。

本发明的试剂盒采用高特异性的磺胺类药物单克隆抗体或多克隆抗体，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、精确度高、准确度高、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等优点，可在食品和饲料磺胺类药物残留的检测中发挥重要作用。

附图说明

图 1 为磺胺类药物检测标准曲线图。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例 1 试剂盒组分的制备

1、包被原的合成

(1) 取磺胺类药物半抗原 2 g 溶于 30ml 50%的 N,N'-二甲基甲酰胺溶液中。

(2) 取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷并加到半抗原溶液中，室温搅拌反应 4 小时。

(3) 取载体蛋白血蓝蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 的碳酸盐缓冲液。

(4) 将载体蛋白溶液滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。

(5) 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。最后将抗原浓缩或冻干。

(6) 纯化保存。

2、磺胺类药物鼠单克隆抗体制备

动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以磺胺类药物半抗原与兔血清白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 10: 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。

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 3 \times 10⁶ 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 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5 \times 10⁵ 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°C 保存。

3、羊抗鼠抗抗体的制备

以羊为免疫动物，以鼠源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体。

4、酶标记抗抗体的制备

(1) 8mg 辣根过氧化物酶溶解于 2mL 蒸馏水中。

(2) 加入现配制的 100mmol/L NaIO_4 溶液 0.4mL，室温搅拌反应 20 分钟。

(3) 用 1mmol/L 醋酸盐缓冲液于 4°C 透析过夜，除去多余的 NaIO_4 ，同时使自身偶联的酶还原。

(4) 加入磷酸盐缓冲液 (pH8.6、0.5mol/L) 40 μl 和含有 IgG16mg 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.6、5mol/L) 2.0mL，室温搅拌反应 4 小时。

(5) 加入现配制的 NaBH_4 水溶液 (1mol/L) 0.1mL 4°C 反应 4 小时，以还原 Schiff 碱。

5、酶标板的制备

用包被缓冲液将磺胺类药物半抗原与血蓝蛋白偶联物稀释成 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加入 100 μl ， 37°C 温育 2h，并 4°C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150 μl 封闭液， 37°C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 2 检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被磺胺类药物抗原的酶标板；
- (2) 蛋白浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磺胺类药物抗体；
- (3) 磺胺二甲基嘧啶标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0ppb, 1ppb, 3ppb, 9ppb, 27ppb 和 81ppb；
- (4) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；

- (5) 底物显色液A液为过氧化氢, 底物显色液B液为邻苯二胺;
- (6) 浓缩洗涤液为含0.8%吐温20的磷酸盐缓冲液;
- (7) 终止液为2mol/L的硫酸溶液;
- (8) 浓缩提取液为0.01 ~ 0.05mol/L的磷酸盐缓冲液。

实施例 3 检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测磺胺类药物的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板;
- (2) 蛋白浓度为5.0 μ g/L的磺胺类药物抗体;
- (3) 磺胺二甲基嘧啶标准品溶液6瓶, 浓度分别为0ppb, 1ppb, 3ppb, 9ppb, 27ppb和81ppb;
- (4) 用细菌提取碱性磷酸酯酶标记的磺胺类药物;
- (5) 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液;
- (6) 浓缩洗涤液为含1.2%吐温20的磷酸盐缓冲液;
- (7) 终止液为2mol/L的氢氧化钠缓冲液;
- (8) 浓缩提取液为0.01 ~ 0.05mol/L的磷酸盐缓冲液。

实施例 4 样品中磺胺类药物残留的检测

1、样品前处理

(1) 动物组织、鸡蛋

取适量样品用匀浆机 10000r/min 匀浆 1 min, 称取 5 ± 0.05 g 匀浆物置离心管中, 加入 15ml 乙腈水溶液 ($v_{乙腈}/v_{水}=84:16$) 混合, 剧烈振荡 10min。于 15 $^{\circ}$ C、3000rpm 以上速度离心 10min。取 3ml 上清液, 加入 2ml 水和 5ml 乙酸乙酯, 混合振荡 10min, 15 $^{\circ}$ C、3000rpm 以上速度离心 5min。将上层液移另一管中用氮气吹干, 用 1ml 稀释了的提取液溶解干燥的残留物, 加入异辛烷 1ml 振荡 2min。15 $^{\circ}$ C、3000rpm, 离心 5min, 除去上层液, 取 20ul 水相进行分析。

(2) 血清

将血样本于 10℃、3000g 以上离心 10min，分离出血清；或过滤血清。取 1ml 血清，加入稀释后的提取液 3ml，混合，取 20 μ l 进行分析。

(3) 尿液

用 3ml 稀释了的提取液与 1ml 经离心后的清亮尿样本混合。取 20 μ l 进行分析。

(4) 牛奶

取牛奶样本 3000g 以上离心 10min，轻吸中间层，用 0.02 M 磷酸盐缓冲液按 1:4 ($v_{\text{样本溶液}}/v_{\text{缓冲液}}$) 稀释，取 20 μ l 进行分析。

(5) 蜂蜜

称取 1g 蜂蜜样本于 50ml 离心管中，加入 2ml 0.02 M 的磷酸盐缓冲液溶解。加入 8ml 乙酸乙酯萃取，震荡 10min，3000g 以上离心 10min。取上层液体于 50℃ 下氮气吹干，加 1ml 0.02 M 磷酸盐缓冲液复溶，取 20 μ l 进行分析。

2、用试剂盒进行检测

向磺胺类药物半抗原与血蓝蛋白 (KLH) 偶联物包被的酶标板微孔中加入标准品或样本 20 μ l，然后加酶标记物 50 μ l，再加入 80 μ l 的抗体工作液，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板，25℃ 环境反应 1h。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。每孔加入底物显色液 A 液 50 μ l，再加 B 液 50 μ l，轻轻振荡混匀，25℃ 环境中避光显色 20-30min。每孔加入终止液 50 μ l，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，相对应每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法来计算出样本溶液浓度。根据样本中残留的磺胺二甲基嘧啶的浓度，利用交叉反应率计算出其它磺胺类药物在样本的残留量。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。

根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

实验例 1 试剂盒精密度试验

标准可重复性试验:

从每批按照实施例 2 中的方法制备的酶联板中, 各抽出 10 个微孔, 测定 9 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值 (OD 值), 重复 3 次, 计算变异系数, 结果见表 1。

表 1 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	5.3	5.6	6.7	6.6	6.5	5.8	7.0	6.1	6.3	6.6
	03 批	6.4	6.7	5.9	6.0	6.1	6.3	6.4	7.2	5.9	6.2
	06 批	6.7	6.3	6.2	6.9	7.4	7.1	7.2	5.6	6.6	6.5

结果表明变异系数范围在 5.3~7.4%, 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《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 4 点精密度和准确度的精密度标准。

样品可重复性试验:

取磺胺二甲基嘧啶标样, 添加到样品中, 分别取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。

表 2 鸡肝样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	9.6	7.5	8.9	8.0	7.9	10.0
	8.1	7.8	8.5	9.9	8.9	9.3
	8.9	7.7	7.9	7.4	8.4	7.4
03	8.4	8.5	8.2	9.0	8.9	4.0
	9.4	9.5	8.5	9.4	9.8	5.3
	6.4	6.8	7.1	6.9	6.4	4.5
06	7.5	8.1	7.8	6.9	7.9	5.5
	8.6	8.2	8.2	9.2	8.8	4.9
	7.9	8.5	7.5	7.1	7.6	6.5

表 3 鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	7.8	9.6	8.9	9.2	7.5	10.5
	8.0	8.6	8.5	8.1	7.0	7.8
	7.4	8.6	8.9	7.9	7.5	8.1
03	7.6	8.6	8.2	8.9	8.2	5.7

	7.5	7.9	8.6	8.2	7.5	5.8
	9.4	9.9	9.0	8.9	9.0	7.5
06	7.5	9.1	8.4	8.2	9.2	8.0
	7.6	8.5	7.2	9.1	7.4	9.9
	9.2	8.5	7.6	9.5	8.5	8.4

表4 蜂蜜样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	6.3	5.3	6.2	7.0	7.0	11.0
	6.5	6.9	7.0	7.9	6.3	8.6
	7.0	6.9	8.1	7.6	7.3	9.5
03	7.0	6.9	7.5	8.3	7.3	7.5
	6.5	8.0	7.4	7.2	6.9	9.2
	6.8	7.2	7.9	6.8	6.9	10.5
06	6.9	7.5	7.1	6.9	6.4	12.3
	6.9	7.2	7.1	7.3	7.1	9.5
	6.9	6.8	7.2	7.5	6.9	11.5

表5 尿液样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{L}$)					板内CV%
01	8.6	7.9	7.2	9.1	8.6	12.3
	8.6	8.4	7.9	8.9	7.2	15.2
	8.6	7.9	7.6	8.3	7.2	11.4
03	8.1	7.5	9.1	8.6	8.4	12.3
	8.6	8.4	8.2	7.5	9.0	15.2
	7.9	8.2	7.2	8.5	8.6	14.2
06	8.3	7.5	7.2	8.6	8.9	13.6
	7.5	7.3	8.6	8.4	9.0	10.2
	8.6	7.2	7.5	8.4	8.9	15.2

表6 鸡蛋样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					板内CV%
01	8.3	8.2	8.4	8.9	7.2	7.5
	8.6	8.4	7.5	8.9	9.0	9.5
	8.6	8.4	8.7	9.2	9.0	10.2
03	7.9	7.8	7.6	8.4	9.5	12.5
	7.5	7.6	7.9	8.3	8.9	14.6
	8.2	8.1	8.6	8.9	7.4	16.5
06	7.6	7.1	7.5	8.6	8.9	9.8
	7.5	7.1	7.6	8.9	8.4	7.5
	7.6	8.4	8.9	7.0	7.5	8.6

结果表明鸡肝样品的变异系数均小于15%，鸡肉样品的变异系数均小于15%，蜂蜜样品的变异系数均小于15%，尿液样品的变异系数均小于20%，鸡蛋样品的变异系数均小于20%，符合了变异系数小于20%的规定，说明本试剂盒样本测定的精密度达到了《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4点精密度和准确度的精密度标准。

实验例2 试剂盒的准确度

取两个浓度的磺胺二甲基嘧啶标样，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。

表7 准确度试验

样本		鸡肉		鸡肝	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	50	10	50
回收率%	1	79.2	105.0	84.5	75.2
	2	93.1	87.2	94.4	88.9
	3	81.1	75.3	71.2	93.7
	4	98.5	98.3	102.4	87.1
平均值		88.0	91.5	88.1	86.2
样本		尿液		鸡蛋	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	50	10	50
回收率%	1	82.6	92.1	76.6	76.5
	2	96.5	82.1	82.1	83.4
	3	71.1	70.4	76.2	79.5

	4	86.5	84.2	88.7	82.5
平均值		84.2	82.2	80.7	80.5

结果表明鸡肉、鸡肝样本的添加回收率为 65.5%~94.5%；鸡蛋样本添加回收率 76.2%~88.7%；尿液样本的添加回收率为 66.8%~94.5%。

实验例 3 试剂盒特异性试验

特异性用交叉反应率来表示，交叉反应率是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。

选择与磺胺二甲基嘧啶同类似结构和类似功能的三种药物，将不同浓度的磺胺二甲基嘧啶类似物，替代磺胺二甲基嘧啶标准溶液，测定其标准曲线，并计算 IC₅₀ 抑制浓度，计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制磺胺二甲基嘧啶药物浓度}}{\text{引起 50\%抑制磺胺类药物浓度}} \times 100\%$$

表 8 交叉反应率

药物名称	交叉反应率 (%)
磺胺二甲基嘧啶 (SM ₂)	100
磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)	87
磺胺甲基嘧啶 (SM ₁)	69

根据上面交叉反应率在得知样本中磺胺二甲基嘧啶残留量的情况下计算其它药物的残留量。

实验例 4 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（零标准）、50%抑制浓度、磺胺类药物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 25℃ 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℃保存6个月以上。

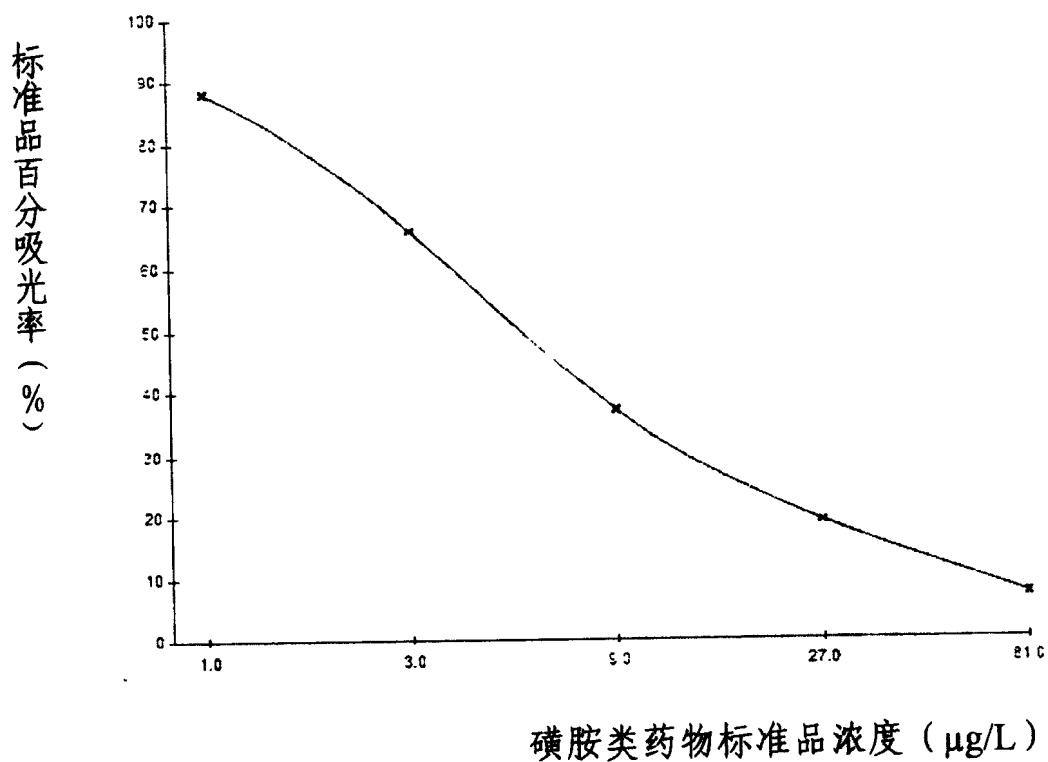


图 1

专利名称(译)	一种检测动物源性食品中磺胺类药物残留的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100344971C	公开(公告)日	2007-10-24
申请号	CN200510086777.5	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 孙倩 罗晓琴		
发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 孙倩 罗晓琴		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
审查员(译)	吴江明		
其他公开文献	CN1766631A		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明提供了用于检测动物组织中磺胺类药物的试剂盒，是用酶联免疫方法对预处理的动物组织、蜂蜜、尿液、牛奶进行检测。该酶联免疫试剂盒包括：包被了磺胺类药物抗原或抗抗体的酶标板、磺胺类药物鼠单克隆抗体工作液、磺胺类药物标准品溶液、酶标记的抗抗体或磺胺类药物抗原溶液、底物显色液、浓缩洗涤液、浓缩提取液、终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测磺胺类药物的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中磺胺类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制磺胺二甲基嘧啶类药物浓度}}{\text{引起50\%抑制磺胺类药物浓度}} \times 100\%$$