



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101315378 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200810115758. 4

C07K 16/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 06. 27

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2545 2008. 06. 04

(73) 专利权人 北京望尔康泰生物技术有限公司

地址 100085 北京市昌平区西三旗龙兴园中
区 10 楼 2 层

专利权人 北京望尔生物技术有限公司

(72) 发明人 沈建忠 何方洋 丁双阳 冯才伟
万宇平 冯静 汪善良 朱亮
罗晓琴

(56) 对比文件

赵静等. 氯霉素酶联免疫检测方法的测定. 《生物技术》. 2005, 第 15 卷 (第 1 期), 56-59.

张存政等. 对硫磷半抗原改造及其免疫抗体. 《南京农业大学学报》. 2002, 第 25 卷 (第 4 期), 37-40.

沈建忠等. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱检测法研究. 《中国农业科学》. 2003, 第 36 卷 (第 6 期), 700-703.

审查员 刘苗

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

C12N 5/12 (2006. 01)

C07D 233/00 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测硝基咪唑类药物的方法及其专用酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

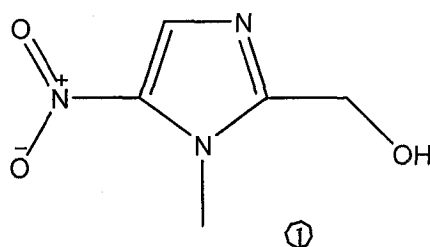
本发明公开了一种检测硝基咪唑类药物的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该试剂盒, 包括硝基咪唑类特异性抗体及包被原和酶标记物; 所述硝基咪唑为下述四种中的至少一种: 甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑和洛硝哒唑。本发明方法, 具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性好、灵敏度高、精确度强等特点, 能够现场监控且适合大量样本的筛查。因此本发明检测方法及其专用试剂盒将在动物源性食品中硝基咪唑类药物的残留检测中发挥重要作用。

1. 一种检测硝基咪唑类的酶联免疫试剂盒,包括硝基咪唑类特异性抗体及包被原和酶标记物;所述包被原为硝基咪唑类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硝基咪唑类半抗原;当所述包被原为硝基咪唑类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硝基咪唑类半抗原;所述硝基咪唑类为下述四种中的至少一种:甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑和洛硝哒唑;

所述硝基咪唑类特异性抗体为洛硝哒唑单克隆抗体;所述洛硝哒唑单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2545 的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-2 分泌的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括硝基咪唑标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液;所述硝基咪唑标准溶液为甲硝唑标准溶液;所述浓缩洗涤液为含有 0.8% -1.3% 吐温 -20 和 0.03-0.07% 叠氮化钠、pH 值为 7.0-7.4、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.0-7.4、0.1-0.3M 的磷酸盐缓冲液;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 1-2M 硫酸或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色液为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为 1-2M 氢氧化钠溶液;所述百分含量为质量百分含量。

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:所述硝基咪唑类半抗原为洛硝哒唑半抗原;所述洛硝哒唑半抗原是将如下化合物①和戊二酸酐通过缩合反应得到的。



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:所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

5. 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。

6. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为含有 1.0% 吐温 -20 和 0.05% 叠氮化钠、pH 值为 7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 pH 值为 7.2、0.2M 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 1-2M 硫酸或盐酸溶液。

8. 一种检测硝基咪唑类药物的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

取 2.0g 动物组织匀浆物,向其中加入 50ml 聚苯乙烯,加入 2ml 0.15-0.25M 的氢氧化钠溶液和 6-10ml 乙酸乙酯,混匀,室温以 3000g 以上的速度离心至少 5min,取上层液体,每

4ml 上层液体中,加入 0.5-1.5ml 正己烷和 400-600 μ l 浓缩复溶液,混匀,室温以 3000g 以上的速度离心,收集下层液;

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测步骤 1) 中的下层液。

9. 由保藏号为 CGMCC No. 2545 的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-2 分泌的洛硝哒唑单克隆抗体。

10. 保藏号为 CGMCC No. 2545 的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-2。

检测硝基咪唑类药物的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及检测硝基咪唑类药物的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 硝基咪唑类药物有甲硝唑、甲硝磺唑、氯甲硝哒唑、洛硝哒唑和二甲硝咪唑等，其化学结构通式如图 1 所示（图中，当 R1 和 R2 均为甲基时，药物为二甲硝咪唑，当 R1 为 H，R2 为乙醇基时，药物为甲硝唑）。本类药物常被用于预防和治疗特定病菌和原生动物疾病，其原理是本类药物抑制原虫氧化还原反应，使病原体氮链断裂，在体外有明显的杀灭阿米巴原虫和抗厌氧菌作用，对各部位的阿米巴均有效，口服后迅速吸收，广泛分布于体内各器官和大多数体液中。但因其具有潜在的致癌性、诱导有机体突变性，欧盟和我国已禁止在任何食品动物中使用该类物质。

[0003] 目前测定硝基咪唑类药物方法主要有高效液相色谱法、液相色谱串联质谱等等，其操作繁琐复杂且费用高，推广应用受到限制。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测硝基咪唑类的酶联免疫试剂盒。

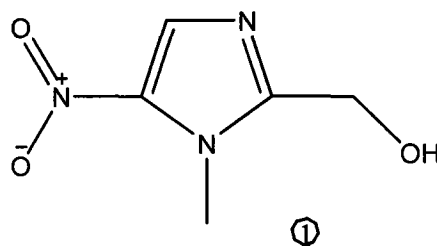
[0005] 本发明所提供的检测硝基咪唑类的酶联免疫试剂盒，包括硝基咪唑类特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为硝基咪唑类半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标硝基咪唑类半抗原；当所述包被原为硝基咪唑类半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标硝基咪唑类半抗原；所述硝基咪唑类为下述四种中的至少一种：甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑和洛硝哒唑。

[0006] 为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括硝基咪唑标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液；所述硝基咪唑标准溶液为甲硝唑标准溶液。

[0007] 所述浓缩洗涤液可以为含有 0.8% - 1.3%（质量百分含量）吐温-20 和 0.03-0.07%（质量百分含量）叠氮化钠、pH 值为 7.0-7.4、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液可以为 pH 值为 7.0-7.4、0.1-0.3M 的磷酸盐缓冲液；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 液可以为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液可以为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液可以为 1 ~ 2M 硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色液可以为硝基磷酸盐缓冲液，终止液可以为 1 ~ 2M 氢氧化钠溶液；所述百分含量为质量百分含量。

[0008] 所述硝基咪唑类半抗原为洛硝哒唑半抗原；所述洛硝哒唑半抗原是将如下所示化合物①和戊二酸酐通过缩合反应得到的。

[0009]



[0010] 上述硝基咪唑类半抗原是小分子物质,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。本发明采用碳化二亚胺法将前述半抗原与载体蛋白偶联,突出了硝基咪唑药物的共有特征结构,同时也增加了该半抗原的免疫原性和特异性。其中,洛硝哒唑半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利,半抗原与载体蛋白(如血蓝蛋白)的结合摩尔比为(8-10):1。

[0011] 所述硝基咪唑类特异性抗体为洛硝哒唑单克隆抗体;所述单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 2545的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-2分泌的抗体;所述抗体为羊抗鼠抗抗体。

[0012] 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。

[0013] 所述浓缩洗涤液具体可以为含有1.0%(质量百分含量)吐温-20和0.05%(质量百分含量)叠氮化钠、pH值为7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液可以为pH值为7.2、0.2M的磷酸盐缓冲液。

[0014] 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液可以为过氧化氢或过氧化脲,显色液B液可以为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液可以为1-2M硫酸或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色液可以为硝基磷酸盐缓冲液,终止液可以为1-2M氢氧化钠溶液;所述百分含量为质量百分含量。

[0015] 在洗涤液中加入一定量吐温-20和叠氮化钠的作用在于:缓冲液中吐温-20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。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测硝基咪唑类药物的方法。

[0017] 本发明所提供的检测硝基咪唑类药物的方法,包括以下步骤:

[0018] 1) 样品前处理:样品的前处理主要是为了从样品中获得硝基咪唑类溶液,从而用于后续的检测。

[0019] 取2.0g动物组织匀浆物,向其中加入50ml聚苯乙烯,加入3ml 0.15-0.25M的氢氧化钠溶液和6-10ml乙酸乙酯,混匀,室温以3000g以上的速度离心至少5min,取上层液体,每4ml上层液体中,加入0.5-1.5ml正己烷和400-600μl浓缩复溶液,混匀,室温以3000g以上的速度离心,收集下层液;所述乙酸乙酯优选为8ml;所述正己烷优选为1ml;所述浓缩复溶液优选为500μl;所述氢氧化钠溶液的浓度优选为0.2M,体积优选为2ml;

[0020] 2) 利用权利要求1-7中任一所述的酶联免疫试剂盒检测步骤1)中的下层液。

[0021] 3) 分析检测结果。

[0022] 由保藏号为CGMCC No. 2545的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-2分泌的洛硝哒唑单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0023] 保藏号为CGMCC No. 2545的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-2也属

于本发明的保护范围。

[0024] 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硝基咪唑类药物的残留量。试剂盒主要内容物采用了方便使用的工作液形式,其保存性及稳定性好;利用本发明试剂盒检测硝基咪唑类药物残留量的方法,可用于检测动物组织如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾等样品中硝基咪唑类药物的残留量,具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性好、灵敏度高、精确度强等特点,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硝基咪唑类药物的残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0025] 图 1 为硝基咪唑类药物的化学结构通式。

[0026] 图 2 为洛硝哒唑水解产物。

[0027] 图 3 为硝基咪唑类半抗原的合成。

[0028] 图 4 为以硝基咪唑类半抗原和载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒的标准曲线。

[0029] 图 5 为以抗抗体为包被原的试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0030] 下述实施例的方法如无特别说明,均为常规方法。

[0031] 下述实施例中各试剂盒的检测原理如下:

[0032] 当在酶标板微孔条上预包被硝基咪唑类药物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,再加入硝基咪唑类药物抗体溶液,样本中残留的硝基咪唑类药物或甲硝唑标准品与酶标板上包被的硝基咪唑类药物偶联抗原竞争硝基咪唑类药物抗体,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硝基咪唑类药物的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中硝基咪唑类药物的残留量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中硝基咪唑类药物残留量的浓度范围。

[0033] 当在酶标板微孔条上预包被抗抗体时,加入硝基咪唑类药物抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标记硝基咪唑类药物抗原溶液,样本中残留的硝基咪唑类药物或甲硝唑标准品与酶标记甲硝唑抗原竞争抗体,用显色液显色,样本吸光度值与样本中硝基咪唑类药物的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中硝基咪唑类药物的残留量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,与系列浓度标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中硝基咪唑类药物的残留量的浓度范围。

[0034] 实施例 1、以硝基咪唑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

[0035] 一、以硝基咪唑类药物半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒一般包括:

[0036] (1) 包被有包被原(硝基咪唑半抗原与载体蛋白偶联物)的酶标板;包被原的浓度可以为 0.05-0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0037] (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液: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,羊抗鼠抗抗体稀释浓度为 1 : 1000 ;所述百分含量为质量百分含量。

[0038] (3) 甲硝唑标准品溶液(购自德国 Dr, 商品编号:RBDR-C15201000):共 6 瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.1\mu\text{g/L}$, $0.3\mu\text{g/L}$, $0.9\mu\text{g/L}$, $2.7\mu\text{g/L}$, $8.1\mu\text{g/L}$;稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0039] (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 液为过氧化脲或过氧化氢,7ml/瓶,1 瓶;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺,7ml/瓶,1 瓶。

[0040] (5) 硝基咪唑类药物单克隆抗体工作液;

[0041] (6) 浓缩洗涤液:含有 0.8%–1.3% (质量百分含量) 吐温 20 和 0.03–0.07% (质量百分含量) 叠氮化钠、pH 值为 7.0–7.4、0.02–0.05M 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶,1 瓶。

[0042] (7) 终止液:1–2M 盐酸或硫酸溶液,7ml/瓶,1 瓶。

[0043] (8) 浓缩复溶液:pH 值为 7.0–7.4、0.1–0.3M 的磷酸盐缓冲液。200ml/瓶,1 瓶。

[0044] 二、本实验的以洛硝哒唑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:

[0045] (1) 包被有包被原(洛硝哒唑半抗原与载体蛋白偶联物)的酶标板;包被原的浓度可以为 $0.75\mu\text{g/ml}$ 。

[0046] (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液: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,羊抗鼠抗抗体稀释浓度为 1 : 1000 ;所述百分含量为质量百分含量。

[0047] (3) 甲硝唑标准品(购自德国 Dr, 商品编号:C15201000) 溶液:共 6 瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.1\mu\text{g/L}$, $0.3\mu\text{g/L}$, $0.9\mu\text{g/L}$, $2.7\mu\text{g/L}$, $8.1\mu\text{g/L}$;稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0048] (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,7ml/瓶,1 瓶;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺,7ml/瓶,1 瓶。

[0049] (5) 洛硝哒唑单克隆抗体工作液是按照如下方法制备的:用稀释液将抗体稀释 3000 倍,得到洛硝哒唑单克隆抗体工作液;所述抗体稀释液为含有 0.05% (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 : 3000。

[0050] (6) 浓缩洗涤液:含有 1.0% (质量百分含量) 吐温 20 和 0.05% (质量百分含量) 叠氮化钠、pH 值为 7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶,1 瓶。

[0051] (7) 终止液:2M 盐酸,7ml/瓶,1 瓶。

[0052] (8) 浓缩复溶液:pH 值为 7.2、0.2M 的磷酸盐缓冲液。200ml/瓶,1 瓶。

[0053] 其中,包被有洛硝哒唑半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板、洛硝哒唑抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液的制备方法如下:

[0054] 所用包被缓冲液和封闭液如下:

[0055] 包被缓冲液:pH 值为 9.4–9.8、0.05–0.15M 的碳酸盐缓冲液。

[0056] 封闭液:含有 8–12% 卵清蛋白和 0.3–0.7% 硫柳汞防腐剂(ALEXIS, 商品编号 ALX-400-013-G005)、pH 值为 7.2–7.4、0.05M 的 Tris- 缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

[0057] 1、酶标板的制备:

[0058] (1) 洛硝哒唑半抗原的合成：

[0059] 称取洛硝哒唑（购自德国 Dr 公司，商品编号：C 16815500）0.9g 放在 50ml 的圆底烧瓶中；加入 1M 的 NaOH 溶液 20ml 充分溶解后，放在恒温磁力加热搅拌反应器上，回流反应 15h；向反应液中加入 1M HCl 使 pH 值呈中性，此时有沉淀析出，离心，取沉淀，烘干，得到洛硝哒唑水解产物①（图 2）。

[0060] 称取化合物① 0.6g、戊二酸酐 0.5g 放在 50ml 的圆底烧瓶中；加入 20ml 无水吡啶充分溶解后，放在恒温磁力加热搅拌反应器上，回流反应 24h；用旋转蒸发仪旋蒸，除去吡啶，然后添加 30ml 蒸馏水，用乙酸乙酯进行萃取，取有机层；旋转蒸干有机层得黄色油状物，加入乙酸乙酯和石油醚析出晶体，即洛硝哒唑半抗原。

[0061] (2) 包被原的制备：采用混合酸酐法将前述半抗原和卵清蛋白偶联得到包被原。

[0062] a) 将 10mg 步骤 (1) 得到的半抗原用 0.5mL 甲酰胺 (DMF) 溶解，冷却至 10℃，加入氯甲酸异丁酯 5 μ l，10℃搅拌反应 30min，即可得到反应液 I 液；

[0063] b) 称取卵清蛋白 (OVA) 36mg，使之充分溶解在 2mL 50mM 碳酸钠溶液中，即可得到反应液 II 液；其中洛硝哒唑半抗原与所述卵清蛋白的摩尔配比为 (12-18) : 1。

[0064] c) 将反应液 I 逐滴缓慢滴加到该反应 II 溶液中，10℃反应 4h，4℃过夜。取最终反应物于 pH7.4、0.02M 磷酸盐缓冲液中透析纯化 24 小时后，3000g 以上离心 30min，收集上清液，即得到包被原。

[0065] (3) 酶标板的制备：

[0066] 用包被缓冲液将包被原（即半抗原和卵清蛋白偶联物）稀释成 0.75 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，37℃温育 2h 或 4℃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℃温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0067] 2、洛硝哒唑特异性单克隆抗体的制备：

[0068] (1) 免疫原合成：

[0069] 将前述洛硝哒唑半抗原和血蓝蛋白通过碳化二亚胺法偶联得到免疫原。

[0070] 具体制备过程如下：

[0071] a) 将 10mg 洛硝哒唑半抗原、10mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，以及 12.5mg 碳化二亚胺 (EDC) 充分溶解于 1mL DMF 中，于室温下搅拌 24h，即可得到反应液 I 液；

[0072] b) 称取血蓝蛋白 50mg，使之充分溶解在 3mL 40mM Na₂CO₃ 中，即得到反应液 II 液，其中洛硝哒唑半抗原与所述血蓝蛋白的摩尔配比为 (8~10) : 1。

[0073] c) 将反应液 I 液逐滴缓慢滴加到反应液 II 液中，并于室温下搅拌 3h，然后 4℃过夜，过柱，用缓冲液平衡和洗脱，进一步纯化后得到免疫原。

[0074] (2) 洛硝哒唑半抗原单克隆抗体的制备

[0075] a) 动物免疫

[0076] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 100 μ g/只，使其产生抗血清。

[0077] b) 细胞融合和克隆化

[0078] 小鼠血清测定结果较高后，取其脾细胞，按 7 : 1 比例（数量配比）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，直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0079] 经筛选得到能稳定分泌洛硝哒唑单克隆抗体的对硝基咪唑类药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-2, 该细胞株已于 2008 年 6 月 4 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, 地址: 北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC No. 2545。

[0080] c) 细胞冻存和复苏

[0081] 将前述单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个 / ml 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 立即放入 37°C 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0082] d) 单克隆抗体的生产与纯化

[0083] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml / 只, 7 天后腹腔注射林可霉素的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^7 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 得到单克隆抗体, 于 -20°C 保存。

[0084] 3、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液的制备:

[0085] 羊抗鼠抗抗体的制备过程: 以山羊作为免疫动物, 以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫, 得到羊抗鼠抗抗体。

[0086] 酶标羊抗鼠抗抗体制备: 将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

[0087] 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; 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, 这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁, 降低了酶标记物的酶活性, 使制备的偶联物中混有许多聚合体。

[0088] 本发明采用改良的过碘酸钠法进行了抗体标记, 其操作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。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, 对酶的活性的损失减少。

[0089] 三、用步骤二所述试剂盒检测样品中残留的硝基咪唑类药物

[0090] 方法如下:

[0091] (一) 样品前处理

[0092] 样品为鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾等组织样本。

[0093] 称取去除脂肪的 2.0g 样本, 置于 50ml 聚苯乙烯的离心管中, 加入 0.2M 氢氧化钠溶液 2ml 溶解, 再加入 8ml 乙酸乙酯, 振荡 5min, 3000g 离心 5min, 取 4ml 上层吹干, 加入 1ml 正己烷涡动 30s, 加入 500 μl 浓缩复溶液涡动 30s, 倒入 2ml 离心管中, 3000g 离心 15s; 取下层 50 μl 用于分析。

[0094] (二) 检测

[0095] 向包被有洛硝哒唑半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板微孔中加入甲硝唑标准品溶液或样本溶液 50 μl , 再加入洛硝哒唑单克隆抗体工作液 50 μl , 用盖板膜封板, 25°C 恒温箱中反应 30min; 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μl 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鼠抗抗体工作液 100 μl , 25°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, 25°C 恒温箱避光

显色 15min, 每孔加入 2M 终止液盐酸 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值 (450nm)。

[0096] (三) 结果分析

[0097] 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 (B_0) 再乘以 100%, 即百分吸光度值。

[0098]

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

[0099] 公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为 0 μ g/L 标准品溶液的平均吸光度值。

[0100] 以甲硝唑标准品浓度 (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。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硝基咪唑类药物的残留量。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。

[0101] 实施例 2、以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

[0102] 一、以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒一般包括：

[0103] (1) 包被有抗抗体的酶标板；抗抗体的浓度为 0.05-0.1 μ g/ml；

[0104] (2) 辣根过氧化物酶标记的硝基咪唑类药物抗原工作液浓度为 0.15M；是按照如下方法制备的：用磷酸盐缓冲液将辣根过氧化物酶标记的洛硝哒唑半抗原稀释至其浓度为 0.15M, 12ml/瓶, 1 瓶。

[0105] (3) 甲硝唑标准品（购自德国 Dr, 商品编号：RBDR-C15201000）溶液：共 6 瓶, 浓度分别为 0 μ g/L, 0.1 μ g/L, 0.3 μ g/L, 0.9 μ g/L, 2.7 μ g/L, 8.1 μ g/L。稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0106] (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, 7ml/瓶, 1 瓶；底物显色液 B 液为邻苯二胺, 7ml/瓶, 1 瓶。

[0107] (5) 硝基咪唑类药物特异性抗体工作液；

[0108] (6) 浓缩洗涤液：含有 0.8%-1.3%（质量百分含量）吐温 20 和 0.03-0.07%（质量百分含量）叠氮化钠、pH 值为 7.0-7.4、0.02-0.05M 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶, 1 瓶。

[0109] (7) 终止液：1-2M 盐酸或硫酸溶液, 7ml/瓶, 1 瓶。

[0110] (8) 浓缩复溶液：pH 值为 7.0-7.4、0.1-0.3M 的磷酸盐缓冲液。200ml/瓶, 1 瓶。

[0111] 二、本实验的以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

[0112] (1) 包被有抗抗体的酶标板；抗抗体的浓度为 0.75 μ g/ml；

[0113] (2) 辣根过氧化物酶标记的洛硝哒唑半抗原工作液浓度为 0.15M；是按照如下方法制备的：用磷酸盐缓冲液将辣根过氧化物酶标记的洛硝哒唑半抗原稀释至其浓度为 0.15M, 12ml/瓶, 1 瓶。

[0114] (3) 甲硝唑标准品（购自德国 Dr, 商品编号：C15201000）溶液：共 6 瓶, 浓度分别为 0 μ g/L, 0.1 μ g/L, 0.3 μ g/L, 0.9 μ g/L, 2.7 μ g/L, 8.1 μ g/L, 稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0115] (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, 7ml/瓶, 1 瓶 ; 底物显色液 B 液为邻苯二胺, 7ml/瓶, 1 瓶。

[0116] (5) 洛硝哒唑单克隆抗体工作液是按照如下方法制备的 : 用抗体稀释液将单抗稀释 3000 倍, 得到洛硝哒唑单克隆抗体工作液 ; 所述稀释液为含有 0.05% (质量百分含量) 的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液。

[0117] (6) 浓缩洗涤液 : 含有 1.0% (质量百分含量) 吐温 20 和 0.05% (质量百分含量) 叠氮化钠、pH 值为 7.3、0.04M 的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶, 1 瓶。

[0118] (7) 终止液 : 2M 盐酸, 7ml/瓶, 1 瓶。

[0119] (8) 浓缩复溶液 : pH 值为 7.2、0.2M 的磷酸盐缓冲液。200ml/瓶, 1 瓶。

[0120] 其中, 包被有抗抗体的酶标板、洛硝哒唑单克隆抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的洛硝哒唑半抗原工作液的制备方法如下 :

[0121] 所用包被缓冲液和封闭液如下 :

[0122] 包被缓冲液 : pH 值为 9.6、0.1M 的碳酸盐缓冲液。

[0123] 封闭液 : 含有 10 % 卵清蛋白和 0.5 % 硫柳汞防腐剂 (ALEXIS, 商品编号 ALX-400-013-G005)、pH 值为 7.3、0.05M 的 Tris- 缓冲液 ; 所述百分含量为质量百分含量。

[0124] 1、酶标板的制备 :

[0125] (1) 抗抗体包被原的制备 :

[0126] 以山羊作为免疫动物, 以鼠源单克隆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。

[0127] (2) 包被有抗抗体的酶标板制备方法 :

[0128] 用包被缓冲液将包被原 (即抗抗体) 稀释成 $0.75 \mu\text{g/ml}$, 每孔加入 $100 \mu\text{l}$, 37°C 温育 2h 或 4°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 $150 \mu\text{l}$ 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。

[0129] 2、洛硝哒唑单克隆抗体的制备 :

[0130] 同实施例 1 中所述一致。

[0131] 3、辣根过氧化物酶标记的洛硝哒唑半抗原工作液的制备 : 将洛硝哒唑半抗原与辣根过氧化物酶采用戊二醛法偶联得到酶标半抗原, 并用磷酸盐缓冲液将酶标记半抗原稀释至其浓度为 0.15M 。

[0132] 三、用步骤二所述试剂盒检测样品中残留的硝基咪唑类药物

[0133] 方法如下 :

[0134] (一) 样品前处理

[0135] 样品前处理的具体步骤同实施例 1 中的样品前处理步骤。

[0136] (二) 检测

[0137] 向包被有抗抗体的酶标板微孔中加入洛硝哒唑单克隆抗体工作液 $50 \mu\text{l}$, 25°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 $50 \mu\text{l}$ 和 $100 \mu\text{l}$ 酶标抗原或样品溶液 $50 \mu\text{l}$ 和 $100 \mu\text{l}$ 酶标抗原到每个微孔中, 用盖板膜封板后置 25°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 $250 \mu\text{l}$ 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 $50 \mu\text{l}$, 底物显色液 B 液邻苯二

胺 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 25℃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)。

[0138] (三) 结果分析:

[0139] 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。

[0140] 实施例 3、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

[0141] (一) 试剂盒灵敏度实验

[0142] 取不含硝基咪唑类药物的阴性鸡肉样本用本发明所制试剂盒分别进行 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。

[0143] 表 1-1 阴性鸡肉样本测定结果统计表 μ g/kg

[0144] (包被原为硝基咪唑类半抗原与载体蛋白的偶联物)

[0145]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.06	0.02	0.00	0.04	0.00	0.05	0.00	0.04
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.02	0.00	0.05	0.03	0.00	0.02	0.06	0.00
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.04	0.03	0.00	0.04	0.03	0.02	0.1	

[0146] 表 1-2 阴性鸡肉样本测定结果统计表 μ g/kg

[0147] (包被原为抗抗体)

[0148]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.03	0.04	0.09	0.03	0.01	0.06	0.02	0.04
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.08	0.07	0.02	0.02	0.04	0.06	0.02	0.04
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.02	0.07	0.03	0.04	0.04	0.02	0.1	

[0149] 由表 1-1、1-2 可知, 试剂盒的最低检测限为 0.1 μ g/kg。

[0150] (二) 标准品精密度试验:

[0151] 从实施例 1 二中所述的 1 批试剂盒 (01 批)、实施例 2 二中所述的 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 0.9 μ 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%~12.9%之间,符合精密度小于或等于 20%的规定。

[0152] 表 2、标准可重复性试验 (CV%)

[0153]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	01 批	8.2	6.7	7.2	8.4	9.6	11.3	5.3	6.7	10.4	6.8
	CV% 03 批	11.6	5.9	4.1	8.7	9.5	6.7	10.3	6.2	9.7	10.7
	06 批	5.4	6.8	9.7	8.5	6.1	6.0	11.8	12.9	5.6	6.3

[0154] (三) 样本精密度和准确度试验

[0155] 1、样品精密度试验:

[0156] 向不含硝基咪唑类药物的鸡的肌肉、鸡肝脏、虾组织中,分别添加甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑、洛硝哒唑,使其终浓度均为 5 μ g/L,然后按照实施例 1 的方法进行样品前处理。从实施例 1 二中所述的 1 批试剂盒 (01 批)、实施例 2 二中所述的 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 3-5 所示 (各表中的数值为 5 次重复的平均值)。结果表明肌肉、肝脏、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。

[0157] 表 3-1 肌肉样本可重复性试验:添加 5 μ g/L 甲硝唑标准品

[0158]

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
01	3.9	4.1	4.2	3.8	4.6	7.6
	4.1	3.9	4.8	4.2	4.5	8.2
	3.5	4.7	4.3	3.6	4.5	13.1
03	3.6	4.6	4.2	4.8	3.7	12.7
	4.8	4.2	4.6	4.7	4.0	7.7
	3.9	3.8	4.1	4.8	3.6	11.4
06	3.8	3.9	4.0	4.7	4.2	8.6
	3.9	3.8	4.5	4.5	4.9	10.7
	4.6	4.2	3.8	4.4	3.7	9.3

[0159] 表 3-2 肌肉样本可重复性试验:添加 5 μ g/L 替硝唑标准品

[0160]

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
01	3.7	4.3	3.9	4.5	3.6	8.2
	4.3	4.8	3.7	4.5	4.1	7.6

[0161]

	3.4	4.3	4.1	4.5	3.9	12.7
	3.8	4.1	4.7	4.2	4.2	12.5
03	4.3	4.8	4.3	4.1	4.2	7.7
	3.9	4.3	4.2	4.6	4.0	10.9
	4.1	4.3	3.8	3.9	4.3	9.9
06	3.9	4.2	4.1	4.7	3.9	8.5
	4.3	3.9	4.2	4.4	4.5	9.3

[0162] 表 3-3 肌肉样本可重复性试验 :添加 5 μ g/L 二甲硝咪唑标准品

[0163]

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
	3.8	3.9	4.2	4.8	4.3	9.4
01	4.2	4.3	3.7	3.6	4.6	10.3
	3.9	4.1	4.5	4.7	4.2	7.5
	3.8	4.6	4.2	3.8	4.4	8.6
03	4.5	4.2	4.6	4.4	3.9	6.4
	4.7	3.8	3.9	3.7	4.2	9.9
	4.2	3.9	4.3	4.6	3.7	8.5
06	3.7	4.8	4.5	4.5	4.2	9.6
	4.6	4.2	3.9	4.5	3.5	10.9

[0164] 表 3-4 肌肉样本可重复性试验 :添加 5 μ g/L 洛硝哒唑标准品

[0165]

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
	4.6	4.1	4.9	3.9	3.8	11.1
01	3.9	4.4	4.2	4.3	3.7	7.1
	4.3	4	3.8	4.2	4.6	7.3
	4.1	3.9	4.8	4.4	4.1	8.2
03	3.8	4.1	4.6	4.7	3.6	11.6
	4.2	3.8	3.9	3.7	4.2	5.8
06	4.3	3.6	4.2	4.6	3.6	11.0
	3.9	4.7	4.8	4.3	4.1	8.8

[0166]

4.4	4.6	3.9	4.8	3.6	11.7
-----	-----	-----	-----	-----	------

[0167] 表 4-1 肝脏样本可重复性试验 :添加 5 μ g/L 甲硝唑标准品

[0168]

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
01	4.6	4.1	4.9	3.9	3.8	11.1
	3.9	4.4	4.2	4.3	3.7	7.1
	3.9	4.2	3.8	3.7	4.6	9.0
03	3.7	4.6	4.3	3.6	4.9	13.3
	4.2	3.7	4.8	3.9	4.2	10.0
	4.3	3.8	3.5	4.3	4.7	11.4
06	3.9	4.1	4.7	4.5	4.2	7.5
	3.6	4.5	4.2	3.8	3.6	10.1
	4.7	3.9	4.5	4.2	4.1	7.5

[0169] 表 4-2 肝脏样本可重复性试验 :添加 5 μ g/L 替硝唑标准品

[0170]

批号	实测值 (μ g/kg)					变异系数 CV%
01	3.9	4.7	4.8	4.9	4.7	8.8
	4.6	4.4	4.0	4.3	4.1	5.9
	3.7	4.9	3.9	4.2	4.3	10.7
03	3.8	3.7	4.4	3.8	3.6	8.2
	3.6	4.1	4.1	4.2	4.1	6.1
	4.7	4.3	3.8	4.0	4.2	7.8
06	3.8	3.7	4.1	4.9	3.8	12.7
	4.6	4.9	4.3	4.2	3.9	8.9
	4.7	4.6	4.4	4.7	4.3	4.3

[0171] 表 4-3 肝脏样本可重复性试验 :添加 5 μ g/L 二甲硝咪唑标准品

[0172]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	4.4	3.7	3.5	4.0	3.7	8.8
	3.7	3.8	3.7	4.5	4.3	9.3
	3.7	4.6	4.4	4.4	3.6	10.8
03	4.0	4.9	3.7	4.7	3.6	13.8
	4.1	4.7	4.3	4.2	4.2	5.8
	4.2	3.5	3.6	4.5	4.4	11.2
06	4.1	3.7	3.6	4.2	4.1	7.3
	4.5	4.6	4.6	3.5	4.5	10.4
	4.3	4.3	4.8	4.5	4.6	5.1

[0173] 表 4-4 肝脏样本可重复性试验 :添加 $5 \mu\text{g/L}$ 洛硝哒唑标准品

[0174]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	4.9	3.8	4.9	4.8	4.0	12.0
	4.7	3.7	4.5	4.9	4.9	10.6
	4.9	4.9	4.6	4.4	4.4	5.5
03	4.8	4.6	4.6	3.7	3.6	13.3
	5.0	4.4	3.8	4.2	3.9	10.9
	3.6	4.4	3.6	4.8	3.7	13.4
06	4.6	4.5	3.9	4.6	3.7	10.0
	4.9	4.0	4.6	4.5	4.9	8.0
	4.4	4.8	4.9	4.1	3.9	9.7

[0175] 表 5-1 虾样本可重复性试验 :添加 $5 \mu\text{g/L}$ 甲硝唑标准品

[0176]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	3.7	4.1	4.5	4.1	4.2	7.2
	4.4	4.8	4.4	4.0	4.4	6.8
	3.7	3.7	4.1	4.6	3.6	10.8
03	3.8	4.5	4.9	4.9	4.4	9.4
	4.7	3.8	4.1	4.2	3.6	10.2
	4.3	3.7	4.8	3.8	4.8	11.7
06	4.7	4.2	3.6	4.1	3.8	9.9
	4.8	3.9	4.5	4.0	4.3	8.1
	3.6	4.1	3.7	4.5	4.5	10.3

[0177] 表 5-2 虾样本可重复性试验 :添加 $5 \mu\text{g/L}$ 替硝唑标准品

[0178]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	4.0	3.7	4.9	3.7	4.6	13.0
	4.8	4.5	4.7	4.1	4.0	8.3
	3.8	3.7	4.8	4.7	4.4	11.3
03	4.9	3.7	4.4	3.6	4.4	13.9
	4.0	4.5	3.8	4.2	4.2	6.2
	5.0	4.1	4.5	4.1	4.2	8.6
06	3.6	3.9	4.0	3.8	4.0	4.4
	4.3	4.3	4.6	3.8	4.9	9.1
	4.1	4.6	4.6	3.8	4.9	9.9

[0179] 表 5-3 虾样本可重复性试验 :添加 $5 \mu\text{g/L}$ 二甲硝咪唑标准品

[0180]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	4.2	3.7	3.8	4.6	4.7	10.4
	4.0	3.9	4.3	4.7	4.2	7.6
	4.4	4.3	3.7	3.5	3.8	10.0
03	4.3	4.3	4.0	3.8	3.9	5.0
	4.3	4.5	4.7	4.2	4.4	4.1
	4.5	3.5	4.8	3.6	4.6	14.1
06	4.3	4.2	4.0	3.9	4.5	5.5
	3.6	4.2	3.9	4.1	3.9	6.1
	4.0	4.0	3.9	4.3	3.9	4.4

[0181] 表 5-4 虾样本可重复性试验 :添加 $5 \mu\text{g/L}$ 洛硝哒唑标准品

[0182]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	4.1	5.0	3.9	4.9	3.8	12.8
	3.7	4.0	4.9	3.8	4.1	11.2
	3.6	4.5	5.0	4.8	4.7	12.4
03	4.3	4.4	3.7	4.6	4.9	10.1
	4.9	4.4	4.3	4.2	4.4	6.2
	3.8	4.0	3.8	4.3	3.7	6.5
06	4.5	3.4	4.7	4.8	4.4	12.4
	4.7	4.1	3.6	4.7	3.7	12.7
	4.8	3.5	3.8	3.9	4.9	15.0

[0183] (二) 样本准确度试验

[0184] 向不含硝基咪唑类药物的鸡的肌肉、鸡肝脏、虾组织中,分别加入甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑和洛硝哒唑,使其终浓度分别为 $5 \mu\text{g/kg}$ 和 $10 \mu\text{g/kg}$,按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理,然后向每种组织中然后用实施例 1 二中所述的试剂盒检测肌肉样本中硝基咪唑类药物,用实施例 2 二中所述的试剂盒检测肝脏、虾中甲硝唑,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 6 所示,表明各样本以 $5 \mu\text{g/kg}$ 、 $10 \mu\text{g/kg}$ 甲硝唑添加回收率均在 70.2% -99.5% 之间。

[0185] 表 6-1 试剂盒的准确度 :添加甲硝唑标准品

样本		肌肉		肝脏		虾		
添加浓度 (μg/kg)		5	10	5	10	5	10	
[0186]	准确度%	1	82.4	76.1	76.6	85.2	87.1	91.9
		2	78.2	93.8	90.6	80.8	79.0	87.0
		3	90.9	70.6	65.4	76.3	77.2	75.1
		4	78.0	80.7	94.9	91.1	86.3	88.0
	平均值%		82.4	80.3	81.9	83.4	82.4	85.5

[0187] 表 6-2 试剂盒的准确度 :添加替硝唑标准品

样本		肌肉		肝脏		虾		
添加浓度 (μg/kg)		5	10	5	10	5	10	
[0188]	准确度%	1	72.6	86.3	70.2	80.5	74.7	75.1
		2	80.3	94.3	89.4	86.8	75.1	82.9
		3	71.1	91.2	76.9	74.5	82.8	79.7
		4	71.8	79.4	73.0	78.8	93.6	81.0
	平均值%		74.0	90.6	77.1	78.9	79.3	82.3

[0189] 表 6-3 试剂盒的准确度 :添加二甲硝咪唑标准品

样本		肌肉		肝脏		虾		
添加浓度 (μg/kg)		5	10	5	10	5	10	
[0190]	准确度%	1	99.5	88.9	92.1	88.3	94.1	83.7
		2	96.4	73.7	85.7	90.5	81.9	72.7
		3	94.7	97.0	95.7	98.4	77.8	82.6
		4	87.5	75.1	73.0	87.4	94.8	75.1
	平均值%		94.5	85.2	81.6	83.3	85.3	79.4

[0191] 表 6-4 试剂盒的准确度 :添加洛硝哒唑标准品

样本		肌肉		肝脏		虾		
添加浓度 (μg/kg)		5	10	5	10	5	10	
[0192]	准确度%	1	77.4	90.0	85.4	75.9	81.8	77.4
		2	94.3	96.6	77.1	89.4	87.4	94.3
		3	89.6	84.5	76.6	95.3	94.2	89.6
		4	99.5	92.7	97.9	87.0	97.9	99.5
	平均值%		80.8	84.7	79.0	79.6	80.3	90.2

[0193] (三) 交叉反应率试验 :

[0194] 根据硝基咪唑类药物的应用情况,选取 6 种常用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。用下式分别计算实施例 1 二中试剂盒和实施例 2 二中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。重复测定 3 次,结果取平均值。

[0195]

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{抑制50\%甲硝唑标准品的浓度}}{\text{抑制50\%的硝基咪唑类药物浓度}} \times 100\%$$

[0196] 表 7、试剂盒的特异性

[0197]

药物名称	交叉反应率(%)
甲硝唑	100%
替硝唑	106%
二甲硝咪唑	98%
洛硝哒唑	80%
奥硝唑	25%
噻克硝唑	6%

[0198] 实验结果表明,本发明所研制的试剂盒对甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑、洛硝哒唑的特异性好,可以用于硝基咪唑类药物的测定。

[0199] (四) 试剂盒保存期试验

[0200] 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、硝基咪唑类药物实际添加测定,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。

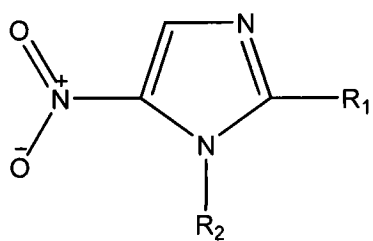


图 1

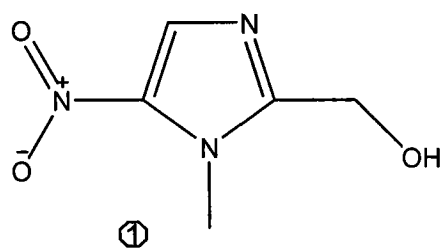


图 2

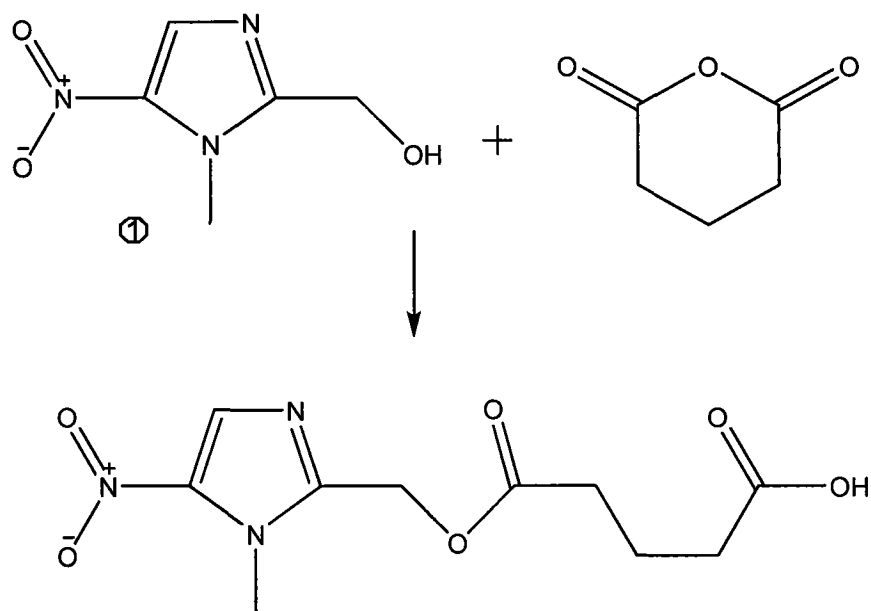


图 3

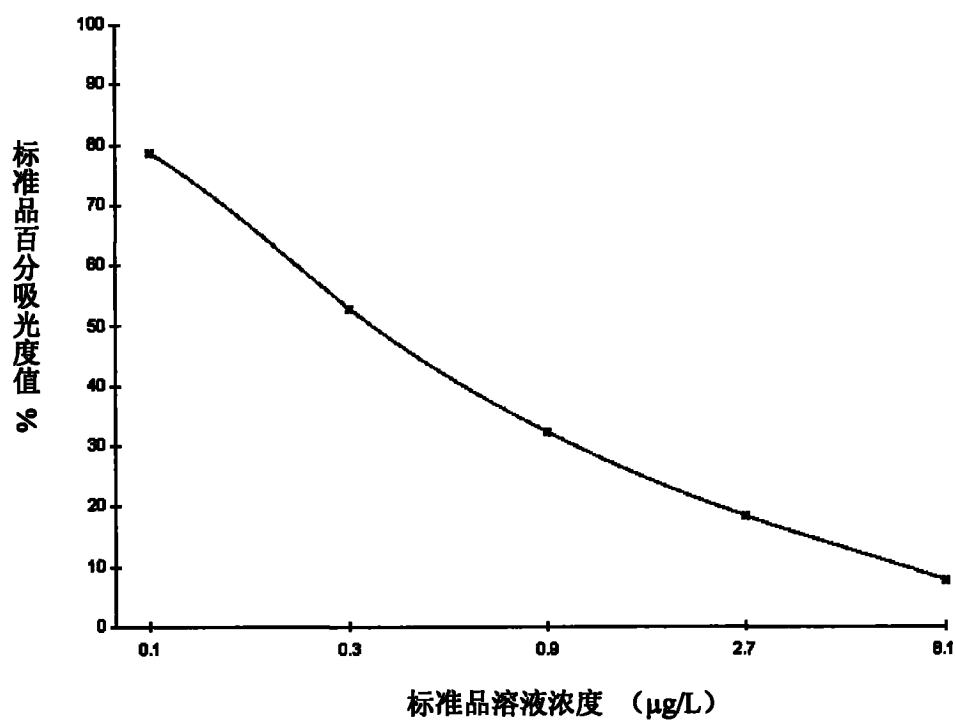


图 4

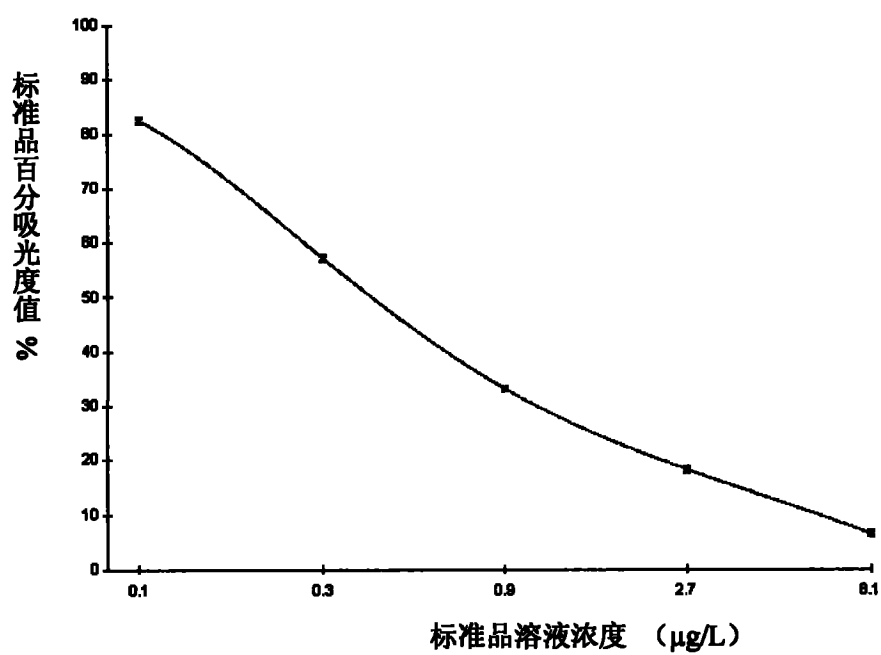


图 5

专利名称(译)	检测硝基咪唑类药物的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101315378B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200810115758.4	申请日	2008-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 丁双阳 冯才伟 万宇平 冯静 汪善良 朱亮 罗晓琴		
发明人	沈建忠 何方洋 丁双阳 冯才伟 万宇平 冯静 汪善良 朱亮 罗晓琴		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535 C12N5/12 C07D233/00 C07K16/00		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	刘苗		
其他公开文献	CN101315378A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测硝基咪唑类药物的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该试剂盒，包括硝基咪唑类特异性抗体及包被原和酶标记物；所述硝基咪唑为下述四种中的至少一种：甲硝唑、替硝唑、二甲硝咪唑和洛硝哒唑。本发明方法，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性好、灵敏度高、精确度强等特点，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硝基咪唑类药物的残留检测中发挥重要作用。

