



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103197069 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310078523. 3

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 12

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3393 2009. 11. 03

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 沈建忠 王战辉 蒋文晓 史为民

江海洋 张素霞 丁双阳 曹兴元

李建成

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

用于检测磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用。本发明所提供试剂盒包括抗体 1、抗体 2、包被原 1、包被原 2、酶标记物 1 和酶标记物 2 ; 所述抗体 1 为抗磺胺二甲基嘧啶的抗体, 所述抗体 2 为抗恩诺沙星的抗体, 所述包被原 1 为磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白的偶联物, 所述包被原 2 为恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物, 所述酶标记物 1 为抗所述抗体 1 的酶标二抗, 所述酶标记物 2 为抗所述抗体 2 的酶标二抗。本发明所提供试剂盒可定性或定量检测待测样品中磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星残留, 样品前处理过程简单 ; 本发明检验方法简便易行, 特异性高、灵敏度高、精确度高。

1. 一种检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒, 包括抗体 1、抗体 2、包被原 1、包被原 2、酶标记物 1 和酶标记物 2 ; 所述抗体 1 为抗磺胺二甲基嘧啶的抗体, 所述抗体 2 为抗恩诺沙星的抗体, 所述包被原 1 为磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白的偶联物, 所述包被原 2 为恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物, 所述酶标记物 1 为抗所述抗体 1 的酶标二抗, 所述酶标记物 2 为抗所述抗体 2 的酶标二抗。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于 : 所述酶联免疫试剂盒还包括如下中的至少一种 : 磺胺二甲基嘧啶标准溶液、恩诺沙星标准溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、包被缓冲液、封闭液和样品稀释液。

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 : 所述抗磺胺二甲基嘧啶的抗体为抗磺胺二甲基嘧啶的单克隆抗体, 由磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 产生 ; 或

所述抗恩诺沙星的抗体为抗恩诺沙星的多克隆抗体。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于 : 所述载体蛋白为人血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白、牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白或兔血清蛋白。

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 : 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶 ; 或

所述底物显色液由 A 液和 B 液组成 ; 所述 A 液为过氧化脲或过氧化氢, 所述 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺 ; 所述终止液为硫酸 ; 或

所述底物显色液为对硝基苯磷酸酯溶液。

6. 根据权利要求 2-5 中任一所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于 : 所述洗涤液为 pH7. 4、含有吐温 20 的 0. 02M 的磷酸盐缓冲液 ; 所述吐温 20 在所述洗涤液中的体积含量为 0. 05% ; 或

所述包被缓冲液为 pH9. 6、0. 05mol/L 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液 ;

所述封闭液为 pH7. 4, 含小牛血清、蔗糖和酪蛋白的磷酸盐缓冲液 ; 所述小牛血清在所述封闭液中的体积含量为 0. 5%, 所述蔗糖在所述封闭液中的含量为每 100ml 所述封闭液中含有 5g 所述叠氮化钠, 所述酪蛋白在所述封闭液中的含量为每 100ml 所述封闭液中含有 1g 所述酪蛋白 ;

所述样品稀释液为 0. 02mol/L 的磷酸盐缓冲液。

7. 权利要求 1-6 中任一所述的酶联免疫试剂盒的制备方法, 包括如下 (1) 或 (2) 的步骤 :

(1) 将所述抗体 1、所述抗体 2、所述包被原 1、所述包被原 2、所述酶标记物 1 和所述酶标记物 2 分别单独包装的步骤 ;

(2) 将所述抗体 1、所述抗体 2、所述包被原 1、所述包被原 2、所述酶标记物 1、所述酶标记物 2、所述磺胺二甲基嘧啶标准溶液、所述恩诺沙星标准溶液、所述底物显色液、所述终止液、所述洗涤液、所述包被缓冲液和所述封闭液分别单独包装的步骤。

8. 检测或辅助检测待测样品中是否含有磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的方法, 是利用权利要求 1-6 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测或辅助检测待测样品中是否含有磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于:所述方法中,所述酶联免疫试剂盒中的包被原为权利要求 1-6 中任一中所述的包被原 1 和所述包被原 2 的混合物;所述酶联免疫试剂盒中的抗体为权利要求 1-6 中任一中所述的抗体 1 和所述抗体 2 的混合物;所述酶联免疫试剂盒中的酶标记物为权利要求 1-6 中任一中所述的酶标记物 1 和所述酶标记物 2 的混合物。

10. 磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs,它在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 3393 ;或

由所述磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 产生的单克隆抗体。

用于检测磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 磺胺二甲基嘧啶是通过人工合成的氨基磺胺衍生物,主要用于预防和治疗细菌感染性疾病。磺胺二甲基嘧啶能抑制革兰氏阳性菌及一些阴性菌,可以治疗多种细菌感染,在兽医临床上广泛应用于治疗由敏感细菌感染的各种畜禽疾病。

[0003] 由于磺胺二甲基嘧啶在体内的作用和代谢时间较长,通过任何途径摄入的磺胺都有可能蓄积在人体内。蓄积浓度超过一定值时,就会对人体造成损害。短时间大剂量或长时间小剂量的刺激可分别引起急性或慢性中毒,影响机体的泌尿、免疫系统,破坏肌肉、肾脏和甲状腺等组织,如诱发人的甲状腺癌等。另外,人体内长期存在磺胺会导致许多细菌对磺胺类药物产生抗药性。因此,国际食品法典委员会(CAC)和许多国家规定,食品中磺胺类总量的最大残留限量(MRL)为 0.1mg/kg。

[0004] 恩诺沙星,是氟喹酮类抗菌药,因其抗菌广谱、抗菌作用强、口服吸收好、体内分布广,现已成为畜禽业和水产养殖业中最重要的抗菌类药物之一,被大量用于治疗、预防和促生长。本品为广谱杀菌药,对支原体有特效。对大肠杆菌、克雷白杆菌、沙门氏菌、变形杆菌、绿脓杆菌、嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌、溶血性巴氏杆菌、金葡菌、链球菌等都有杀菌效用。恩诺沙星可作为动物用药品,在动物体内的半衰期长,有良好的组织分布性,属于广效性抑菌剂,对于革兰氏阳性菌、阴性菌及霉菌体具有抑菌作用,曾被使用于养殖鱼类之弧菌症及大肠杆菌症疾病之控制。由于其耐药性和潜在的致癌性,欧盟及我国均制定了在组织中的最高残留限量(100 μg/kg)。

[0005] 目前,检测磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的化学方法有高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法,但由于复杂的仪器设备和繁琐的过程,不适合现场监控和大量样本筛查。

[0006] 目前尚未有商品化的用于同时检测磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的酶联免疫试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用。

[0008] 本发明所提供的检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,具体可包括抗体 1、抗体 2、包被原 1、包被原 2、酶标记物 1 和酶标记物 2;所述抗体 1 为抗磺胺二甲基嘧啶的抗体,所述抗体 2 为抗恩诺沙星的抗体,所述包被原 1 为磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白的偶联物,所述包被原 2 为恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物,所述酶标记物 1 为抗所述抗体 1 的酶标二抗,所述酶标记物 2 为抗所述抗体 2 的酶标二抗。

[0009] 在本发明中,所述磺胺二甲基嘧啶半抗原具体为磺胺二甲基嘧啶;所述恩诺沙星半抗原具体为恩诺沙星。

[0010] 所述酶联免疫试剂盒还包括如下中的至少一种:磺胺二甲基嘧啶标准溶液、恩诺沙星标准溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、包被缓冲液、封闭液和样品稀释液。

[0011] 在本发明的一个实施例中,所述酶联免疫试剂盒具体由所述抗体 1、所述抗体 2、所述包被原 1、所述包被原 2、所述酶标记物 1、所述酶标记物 2、所述磺胺二甲基嘧啶标准溶液、所述恩诺沙星标准溶液、所述底物显色液、所述终止液、所述洗涤液、所述包被缓冲液、所述封闭液和所述样品稀释液组成。

[0012] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述抗磺胺二甲基嘧啶的抗体可为抗磺胺二甲基嘧啶的单克隆抗体,也可为抗磺胺二甲基嘧啶的多克隆抗体。在本发明的一个实施例中,所述抗磺胺二甲基嘧啶的抗体为抗磺胺二甲基嘧啶的单克隆抗体,具体由磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 产生。所述抗恩诺沙星的抗体可为抗恩诺沙星的多克隆抗体,也可为抗恩诺沙星单克隆抗体。在本发明的一个实施例中,所述抗恩诺沙星的抗体为抗恩诺沙星的多克隆抗体,具体是用恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原免疫脊椎动物(如新西兰大白兔)得到的。

[0013] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述磺胺二甲基嘧啶标准溶液和所述恩诺沙星标准溶液可以是一定浓度范围内的多种浓度的标准溶液,例如可以在 $0 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 之间,如浓度分别为 $0.01 \mu\text{g/L}$ 、 $0.05 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $0.3 \mu\text{g/L}$ 、 $0.9 \mu\text{g/L}$ 、 $2.7 \mu\text{g/L}$ 、 $8.1 \mu\text{g/L}$ 、 $24.3 \mu\text{g/L}$ 和 $72.9 \mu\text{g/L}$ 。

[0014] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述载体蛋白可为人血清白蛋白(HSA)、卵清白蛋白(OVA)、血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、鼠血清蛋白(MSA)、甲状腺蛋白(BCG)或兔血清蛋白(RSA)。在本发明中,与所述磺胺二甲基嘧啶半抗原偶联的载体蛋白具体为人血清白蛋白(HSA),与所述恩诺沙星半抗原偶联的载体蛋白具体为卵清白蛋白(OVA)。

[0015] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述酶标记物的标记酶可为辣根过氧化物酶,也可为碱性磷酸酯酶;辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与二抗进行偶联,如戊二醛法,过碘酸钠法等。

[0016] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由 A 液和 B 液组成,所述 A 液可为过氧化脲溶液或过氧化氢溶液(具体如体积百分含量为 2% 的过氧化脲溶液),所述 B 液可为四甲基联苯胺溶液或邻苯二胺溶液(如体积百分含量为 1% 的四甲基联苯胺溶液);所述终止液可为硫酸溶液,其浓度可为 $1 \sim 2\text{mol/L}$ (如 2M)。当标记酶为碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基苯磷酸酯缓冲液(具体如浓度为 0.1mg/mL 的对硝基苯磷酸酯溶液)。显色液和终止液也可以是本领域常用的其它底物显色液和终止液。

[0017] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述洗涤液为 pH7.4、含有吐温 20 的 0.02M 的磷酸盐缓冲液;所述吐温 20 在所述洗涤液中的体积含量为 0.05%。

[0018] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述包被缓冲液可为碳酸盐缓冲液,具体如为 pH9.6、 0.05mol/L 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液;所述 0.05mol/L 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液的溶剂为水,溶质及其浓度如下: $\text{Na}_2\text{CO}_3 1.59\text{g/L}$ 和 $\text{NaHCO}_3 2.93\text{g/L}$ 。

[0019] 在所述酶联免疫试剂盒中,所述封闭液为磷酸盐缓冲液;在本发明的一个实施例中,所述封闭液具体为 pH7.4,含小牛血清、蔗糖和酪蛋白的磷酸盐缓冲液;所述小牛血清

在所述封闭液中的体积含量为 0.5%，所述蔗糖在所述封闭液中的含量为每 100ml 所述封闭液中含有 5g 所述蔗糖，所述酪蛋白在所述封闭液中的含量为每 100ml 所述封闭液中含有 1g 所述酪蛋白。

[0020] 当然所述包被缓冲液和所述封闭液也可以是本领域常用的其它包被缓冲液和封闭液。

[0021] 在所述酶联免疫试剂盒中，所述样品稀释液具体为 0.02M 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4)。

[0022] 以上所有的所述 0.02M 的磷酸盐缓冲液的溶剂均为水，溶质及其浓度均如下：NaCl 16.00g/L、KCl 0.40g/L、 Na_2HPO_4 2.30g/L 和 KH_2PO_4 0.40g/L。

[0023] 本发明的另一个目的是提供所述酶联免疫试剂盒的制备方法。

[0024] 本发明所提供的所述酶联免疫试剂盒的制备方法具体包括如下(1)或(2)的步骤：

[0025] (1) 将所述抗体 1、所述抗体 2、所述包被原 1、所述包被原 2、所述酶标记物 1 和所述酶标记物 2 分别单独包装的步骤；

[0026] (2) 将所述抗体 1、所述抗体 2、所述包被原 1、所述包被原 2、所述酶标记物 1、所述酶标记物 2、所述磺胺二甲嘧啶标准溶液、所述恩诺沙星标准溶液、所述底物显色液、所述终止液、所述洗涤液、所述包被缓冲液和所述封闭液分别单独包装的步骤。

[0027] 本发明的还一个目的是提供一种检测或辅助检测待测样品中是否含有磺胺二甲嘧啶和 / 或恩诺沙星的方法。

[0028] 本发明所提供的检测或辅助检测待测样品中是否含有磺胺二甲嘧啶和 / 或恩诺沙星的方法，具体是利用所述酶联免疫试剂盒检测或辅助检测待测样品中是否含有磺胺二甲嘧啶和 / 或恩诺沙星。

[0029] 在所述方法中，所述酶联免疫试剂盒中的包被原为所述包被原 1 和所述包被原 2 的混合物；所述酶联免疫试剂盒中的抗体为所述抗体 1 和所述抗体 2 的混合物；所述酶联免疫试剂盒中的酶标记物为所述酶标记物 1 和所述酶标记物 2 的混合物。

[0030] 更加具体的，所述方法用于定量检测时，可包括如下步骤：

[0031] (1) 待测样品的前处理：所述待测样品为牛奶样品；用样品稀释液 (0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液) 对所述牛奶样品按照体积比 1:10 (1+9) 稀释，例如 100 μL 牛奶样品加入 900 μL 的样品稀释液，获得处理后样品。

[0032] (2) 用所述酶联免疫试剂盒对步骤(1)的处理后样品进行检测；

[0033] (3) 分析检测结果：

[0034] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(标准品浓度为 0 $\mu\text{g/L}$)的吸光度值(B_0)再乘以 100%，即百分吸光度值。计算公式为：

[0035] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0036] 分别以所述磺胺二甲嘧啶标准溶液和所述恩诺沙星标准溶液的浓度 ($\mu\text{g/L}$) 为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算步骤(1)的处理后样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个处理后样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中所述磺胺二甲嘧啶和所述恩诺沙星的含量。也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。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，整个检测过程只需较短时间，1.5h

内即可以完成。

[0037] 本发明的还一个目的是提供一种杂交瘤细胞株。

[0038] 本发明所提供的杂交瘤细胞株具体为磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs, 它在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 3393。

[0039] 由所述磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 产生的单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0040] 与现有技术相比, 本发明具有如下有益效果:

[0041] 本发明方法简便、易行, 免疫效果良好。本发明提供酶联免疫检测模式, 可以定性或定量检测牛奶中磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的残留, 样品前处理过程简单。另外, 本发明所用试剂采用独立包装, 检验方法简便易行, 具有特异性高、灵敏度高、精确度高等特点, 将在磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的检测中发挥重要作用。

[0042] 保藏说明

[0043] 参据的生物材料(株): SAs

[0044] 科学描述: 磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株

[0045] 保藏机构: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0046] 保藏机构简称: CGMCC

[0047] 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号

[0048] 保藏日期: 2009 年 11 月 3 日

[0049] 保藏中心登记入册编号: CGMCC No. 3393

附图说明

[0050] 图 1 为磺胺二甲嘧啶和恩诺沙星的标准曲线图。其中, SM2 是采用辣根过氧化酶显色测定的结果的标准曲线, ENR 是碱性磷酸酶测定的结果的标准曲线。

具体实施方式

[0051] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0052] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0053] 磺胺二甲基嘧啶标准品: 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 产品目录号 C16990580;

[0054] 恩诺沙星标准品: 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 产品目录号 C13170000;

[0055] 磺胺二甲基嘧啶类似物(磺胺间甲氧嘧啶、磺胺索嘧啶、磺胺喹恶琳、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺吡啶、磺胺地索辛、磺胺甲氧哒嗪、磺胺多辛、磺胺醋酰、磺胺甲基嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺硝苯、磺胺甲噁唑、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺噁唑、磺胺甲噻二唑和磺胺苯酰)的标准品、恩诺沙星类似物(噁喹酸、依诺沙星、氟甲喹、洛美沙星、达氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、恩诺沙星、奥比沙星、氧氟沙星、麻保沙星和司帕沙星)的标准品: 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;

[0056] Balb/c 小鼠: 北京维通利华实验动物技术有限公司

[0057] 新西兰大白兔: 北京维通利华实验动物技术有限公司

[0058] 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂: 美国 Sigma 公司, 产品目录号分别为 F-5881 和

F-5506。

[0059] SP2/0 骨髓瘤细胞 :北京欣兴唐生物科技有限公司。

[0060] 下述实施例中所涉及的酶联免疫试剂盒的检测原理为间接竞争法 :当在微孔条上预包被磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星半抗原 - 载体蛋白偶联抗原后,加入待测样品溶液或磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星标准品溶液后,再加入磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星特异性抗体溶液,待测样品中残留的药物(磺胺二甲基嘧啶或恩诺沙星)或磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星标准品与酶标板上包被的偶联抗原竞争特异性抗体,加入酶标二抗进行放大作用,用显色液显色,样本吸光值与样本中药物(磺胺二甲基嘧啶或恩诺沙星)的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中药物(磺胺二甲基嘧啶或恩诺沙星)的含量。同时也可以根据酶标板上颜色深浅,与系列浓度的标准品溶液颜色进行比较,从而粗略的判断待测样品中药物(磺胺二甲基嘧啶或恩诺沙星)的浓度范围。

[0061] 实施例 1、检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒的制备及其应用

[0062] 一、检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒的制备

[0063] 检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒包括 :

[0064] (1) 预包被酶标板 :包被有包被原(磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白的偶联物,及恩诺沙星与载体蛋白的偶联物)的酶标板 ;

[0065] (2) 一抗 :抗磺胺二甲基嘧啶的抗体工作液,以及抗恩诺沙星的抗体工作液,即将抗磺胺二甲基嘧啶的抗体和抗恩诺沙星的抗体分别用抗体稀释液(含有 0.05% 的 Triton X-100 和 0.02% 的 Proclin300 的 0.02M 磷酸盐缓冲液)稀释至其蛋白浓度为 0.1 μ g/mL。

[0066] (3) 酶标二抗 :用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗工作液,以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗工作液,即将碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗分别用酶标抗体稀释液(含有 0.02% 的 Proclin300 和 5% 的胎牛血清的 0.02M 磷酸盐缓冲液)稀释至其蛋白浓度为 0.06 μ g/mL。

[0067] (4) 磺胺二甲基嘧啶标准溶液,以及恩诺沙星标准溶液 :用 0.02M 磷酸盐缓冲液分别将磺胺二甲基嘧啶标准品和恩诺沙星标准品各稀释成标准溶液 10 瓶,浓度分别为 0 μ g/L、0.01 μ g/L、0.05 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、24.3 μ g/L 和 72.9 μ g/L ;

[0068] (5) 碱性磷酸酶底物显色液 :0.1mg/mL 的对硝基苯磷酸酯(PNPP)溶液。

[0069] (6) 辣根过氧化物酶底物显色液 :由 A 液和 B 液组成,A 液为 2% (体积百分含量)过氧化脲水溶液,B 液为 1% (体积百分含量)四甲基联苯胺水溶液 ;

[0070] (7) HRP 显色终止液 :2mol/L 硫酸 ;(2mol/L 硫酸是对应 HRP 的终止液,对应碱性磷酸酶不需要终止液)

[0071] (8) 洗涤液 :pH7.4、含有 0.05% (体积百分含量)吐温 20 的 0.02M 磷酸盐缓冲液 ;

[0072] (9) 样品稀释液 :0.02M 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4)。

[0073] 以上 0.02M 的磷酸盐缓冲液的溶剂均为水,溶质及其浓度均如下 :NaCl 16.00g/L、KCl 0.40g/L、Na₂HPO₄ 2.30g/L 和 KH₂PO₄0.40g/L。

[0074] 其中,预包被酶标板、一抗、酶标二抗的制备方法具体如下 :

[0075] (一) 预包被酶标板的制备

[0076] 1、磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白的偶联物的制备

[0077] 采用重氮化法制备磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白的偶联物,具体如下:

[0078] (1)104mg 磺胺二甲基嘧啶(SM_2),加入 8mL0.25mol L⁻¹ 的硫酸中,置于 4℃ 冰箱,形成溶液 I;

[0079] (2)200mg 的人血清白蛋白(HSA)溶于 8mL 的 Na₂CO₃ 水溶液(pH=10)中,置于 4℃ 冰箱,形成溶液 II;

[0080] (3)38mg NaNO₂,加入 2mL 纯水,形成 NaNO₂ 水溶液;

[0081] (4)将 NaNO₂ 水溶液缓慢加入到溶液 I 中,在此过程中,将 SM_2 置于碎冰中,大概 15min,形成 SM_2 -NaNO₂;

[0082] (5)将 SM_2 -NaNO₂ 缓慢加入到溶液 II 中,并摇动,此时有红色生成;6min 后,进行磁力搅拌(室温慢速搅拌),继续缓慢加入 SM_2 -NaNO₂;在搅拌过程中,检测 pH 值,使之保持在 9-10 之间(用 1M NaOH 调节),最终溶液变成暗红色液体;室温继续搅拌 4h;将反应后的溶液装入透析袋中,生理盐水透析,每隔 12 小时更换一次透析液,连续透析三天,得到磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白的偶联物(SM_2 -HAS)。

[0083] 2、恩诺沙星与载体蛋白的偶联物的制备

[0084] 采用活化酯法制备恩诺沙星与载体蛋白的偶联物,具体如下:

[0085] (1)15mg 恩诺沙星(ENR)溶解于 5mL N,N 二甲基甲酰胺(DMF)中,超声使之完全溶解,并在预冷的乙醇中冷却,得到 ENR 溶液;

[0086] (2)20mg 碳化二亚胺(EDC)和 20mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入到上述 ENR 溶液中,室温反应过夜;

[0087] (3)15mg 卵清白蛋白(OVA)溶解于 5mL 碳酸溶液中(pH8.0),逐滴加入到上述步骤(2)所得溶液中,继续搅拌 4h;然后将反应液装入透析袋,在 4℃ 用生理盐水溶液透析 48 小时,换水 6 次。将透析液在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜,得到纯化的恩诺沙星与载体蛋白的偶联物(ENR-OVA),分装于安培瓶中,-20℃ 保存。

[0088] 3、包被酶标板

[0089] 包被缓冲液:0.05mol/L 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH9.6),溶剂为水,溶质及其浓度如下:Na₂CO₃1.59g/L 和 NaHCO₃2.93g/L。

[0090] 洗涤液:含有 0.05% (体积百分含量)吐温 20 的 0.02M 磷酸盐缓冲液,pH7.4。

[0091] 封闭液:含有 0.5% (体积百分含量)小牛血清、5% (5g/100ml) 的蔗糖、1% (1g/100ml) 酪蛋白的 0.02M 的磷酸盐缓冲液,pH7.4。其中,0.02M 的磷酸盐缓冲液的溶剂均为水,溶质及其浓度均如下:NaCl 16.00g/L、KCl 0.40g/L、Na₂HPO₄2.30g/L 和 KH₂PO₄ 0.40g/L。

[0092] 用包被缓冲液分别将步骤 1 和步骤 2 制备得到的偶联物 SM_2 -HAS 和 ENR-OVA 稀释成 1 μg/mL,每孔各加入 100 μL,37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜,倾去包被缓冲液,将酶标板用洗涤液后洗涤 3 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 200 μL 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。

[0093] (二)一抗的制备

[0094] 1、磺胺二甲基嘧啶特异性抗体(单抗)的制备

[0095] (1)磺胺二甲基嘧啶免疫原的制备

[0096] 制备过程同上述磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白的偶联物的制备过程,最终获得的纯化后的 SM₂-HAS 即为磺胺二甲基嘧啶免疫原。

[0097] (2) 动物免疫

[0098] 将步骤(1)获得的磺胺二甲基嘧啶免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 75 μg/只/次。免疫方式为背部皮下多点注射;免疫时间间隔为 15 天;免疫次数为 7-8 次。

[0099] (3) 细胞融合与克隆化

[0100] 末次免疫后 10 天,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 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,直到得到一株稳定分泌磺胺二甲基嘧啶单克隆抗体的杂交瘤细胞株—磺胺类单克隆杂交瘤细胞株,命名为 SAs。该杂交瘤细胞株已于 2009 年 11 月 3 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:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏编号为 CGMCCNo. 3393。

[0101] 其中,间接 ELISA 法操作步骤具体如下:

[0102] 1)包被:在 96 孔酶标板中加入 100 μL 的 1 μg/mL 的 SM₂-HAS 溶液(用配方同上的包被稀释液进行稀释),同时设置不包被抗原的对照,4℃包被过夜,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。

[0103] 2)封闭:加入 150 μL/孔的封闭液(配方同上所述),在 37℃孵育 2h,弃封闭液,洗涤 3 次,拍干。置于 4℃冰箱保存备用。

[0104] 3)加待测样品:吸取细胞上清 100 μL,加入对应的酶标板中,37℃孵育 30min,洗板 4 次,拍干。

[0105] 同时设置未经免疫的小鼠细胞上清的对照;以 PBS 代替待检测样品的对照(阴性对照孔)。

[0106] 4)加酶标二抗:取 HRP 标羊抗小鼠 IgG 抗体(Jackson Immunosearch 公司,产品目录:号 115-475-003),按体积比 1:5000 倍稀释后,100 μL/孔,37℃孵育 30min,洗涤 4 次,拍干。

[0107] 5)显色:将辣根过氧化物酶底物显色液按 100 μL/孔加入(A 液和 B 液各 50 μL,混匀后使用),37℃显色 15-30min。

[0108] 6)终止:加入终止液(2M H₂SO₄) 50 μL/孔。

[0109] 7)读数:以 450nm 单波长测定各孔 OD 值,以与阴性对照孔(以 PBS 代替待测样品的对照) OD 值的比值(P/N)大于 2.1 为限,作为判断为阳性的临界点。

[0110] ELISA 结果判定方法:若 P/N>2.1,则判别为阳性细胞;若 1<P/N<2.1,则加大包被浓度后再次检测,P/N>2.1 的仍判为阳性。

[0111] (4) 细胞冻存和复苏

[0112] 将步骤(3)获得的磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 用冻存液制成 1×10⁶ 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℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0113] (5) 磺胺二甲基嘧啶单克隆抗体的制备与纯化

[0114] 制备方法可为如下两种:

[0115] A 增量培养法

[0116] 将磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 置于 DEME 培养基中,37℃

培养 3 天,收集细胞上清。

[0117] B 腹水制备

[0118] 将 Ba1b/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4mL/只,7 天后腹腔注射杂磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 细胞 5×10^5 个/只,7 天后采集腹水。

[0119] 收集细胞上清或腹水,采用间接 ELISA 法测定其效价(测定方法同上所述,测定效价时以 P/N>2.1 的细胞上清或腹水最大稀释倍数表示),结果表明细胞上清的效价为 1:10000,腹水的效价为 1:50000。接着,用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行纯化,纯化后放入 -20°C 环境保存。

[0120] 2、抗恩诺沙星的抗体(多抗)的制备

[0121] (1) 恩诺沙星免疫原的制备

[0122] 制备过程同上述恩诺沙星与载体蛋白的偶联物的制备过程,最终获得的纯化后的 ENR-OVA 即为恩诺沙星免疫原。

[0123] (2) 动物免疫

[0124] 用步骤(1)获得的恩诺沙星免疫原免疫新西兰大白兔,免疫剂量为 1.5mg/kg 体重/次,免疫方式为颈背部皮下多点注射。首免时将免疫原与等体积的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,每间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化后加强免疫一次,采用此方式共加免 3 次后,间隔 3~4 周再取相同剂量免疫原不加佐剂进行末次免疫。末次免疫 10 天后心脏采血,采用间接 ELISA 法测定血清抗体效价(测定方法同上所述),结果表明血清效价为 1:10000。接着,用硫酸铵分级沉淀得到纯化的恩诺沙星多克隆抗体。

[0125] (三) 酶标二抗的制备

[0126] 1、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗的制备

[0127] 羊抗鼠二抗的获得:采用无病原体山羊作为免疫动物,将作为免疫原的鼠源性抗体(北京维德维康生物技术有限公司)按照免疫剂量为 1mg/kg 进行免疫,首免时将免疫原与等体积的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,每间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化后加强免疫一次,采用此方式共加免 3 次后,间隔 3~4 周再取相同剂量免疫原不加佐剂进行末次免疫。末次免疫 10 天后心脏采血,采用间接 ELISA 法测定血清抗体效价(测定方法同上所述,包被原为非免疫用鼠源抗体),用硫酸铵分级沉淀得到纯化的山羊抗小鼠抗体。

[0128] 羊抗鼠二抗与碱性磷酸酶的偶联:将 10mg 的碱性磷酸酶(Sigma 公司,产品目录号 SIGMA-P7640)溶解在 2mL 的 pH 为 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(30.5ml 的 0.2M 醋酸+19.5ml 的 0.2M 醋酸钠,使用前用水稀释 200 倍使用)中,向该溶液中加入 1.0% 的戊二醛水溶液 0.1mL;按照酶:抗体的质量比为 1:2 的比例加入待标记的羊抗鼠二抗,室温搅拌反应 4 小时。按照 NaBH_4 :碱性磷酸酶质量比为 1:10 的比例加入 NaBH_4 ,室温搅拌反应 4 小时。纯化保存所得碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗。

[0129] 2、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗的制备

[0130] 羊抗兔二抗:制备方法同步骤 1 中羊抗鼠二抗的制备,区别在于采用兔源性抗体(北京维德维康生物技术有限公司)作为免疫原。

[0131] 采用改良的过碘酸钠法将羊抗兔二抗与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联,具体如下:8mg 辣根过氧化物酶(Sigma 公司,产品目录号:SU3472)溶解于 2mL 蒸馏水中。加入现

配制的 100mmol/L NaIO_4 水溶液 0.4mL, 室温搅拌反应 20min。用 1mmol/L pH=5.0 醋酸-醋酸钠缓冲溶液(30.5ml 的 0.2M 醋酸+19.5ml 的 0.2M 醋酸钠, 使用前用水稀释 200 倍使用) 于 4℃ 透析过夜, 除去多余的 NaIO_4 , 同时使自身偶联的酶还原。加入磷酸盐缓冲液(pH8.6、0.5mol/L) 40 μL 和含有羊抗兔二抗 IgG16mg 的磷酸盐缓冲液(pH8.6、5mol/L) 2.0mL, 室温搅拌反应 4h。加入现配制的 NaBH_4 水溶液(1mol/L) 0.1mL, 在 4℃ 反应 4h, 以还原 Schiff 碱。纯化保存所得辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗。

[0132] 二、利用步骤一的试剂盒检测磺胺二甲基嘧啶和 / 或恩诺沙星

[0133] 1、样品前处理

[0134] 牛奶样品 : 用样品稀释液(0.02M 的磷酸盐缓冲液) 对牛奶样品按照体积比 1 : 10 (1+9) 进行稀释 ; 例如, 100 μL 牛奶样品加入 900 μL 的样品稀释液。取 50 μL 上样。

[0135] 2、用步骤一的试剂盒进行检测

[0136] (1) 向包被有磺胺二甲基嘧啶与载体蛋白的偶联物和恩诺沙星与载体蛋白的偶联物混合物的预包被酶标板的微孔中加入标准品溶液(磺胺二甲基嘧啶标准溶液或恩诺沙星标准溶液) 或处理后样品溶液 50 μL , 再加入两种一抗(步骤一(二) 中制备的磺胺二甲基嘧啶单克隆抗体和恩诺沙星多克隆抗体) 工作液各 50 μL , 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min ;

[0137] (2) 洗涤 : 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μL 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 ;

[0138] (3) 加入酶标二抗(步骤一(三) 中制备的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗) 工作液 100 μL , 37℃ 恒温箱中反应 30min ;

[0139] (4) 倒出孔中液体, 重复如步骤(2) 所述的洗涤步骤 ;

[0140] (5) 碱性磷酸酶显色 : 每孔加入碱性磷酸酶底物显色液 100 μL , 轻轻振荡混匀, 37℃ 恒温箱避光显色 15min, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值(OD 值), 检测波长为 405nm。

[0141] (6) 洗涤 : 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μL 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 ;

[0142] (7) 每孔加入 HRP 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), 其中 A 液和 B 液的体积比为 1 : 1 (各 50 μL) ; 轻轻振荡混匀, 37℃ 恒温箱避光显色 15min, 每孔加入终止液 2mol/L 硫酸 50 μL , 轻轻振荡混匀, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值(OD 值), 检测波长为 450nm。

[0143] 3、检测结果分析

[0144] 所得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B) 除以第一个标准品溶液(0 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液) 的吸光度平均值(B_0) 再乘以 100%, 得到百分吸光度值。

[0145] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0146] 分别以所述磺胺二甲嘧啶标准溶液和所述恩诺沙星标准溶液的浓度($\mu\text{g/L}$) 为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图, 如图 1 所示。用同样的办法计算步骤 1 的处理后样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个处理后样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中所述磺胺二甲嘧啶和所述恩诺沙星的含量。也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液浓度。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, 整个检测过程只需较短时间, 1.5h 内即可以完成。

[0147] 实施例 2、实施例 1 制备的酶联免疫试剂盒精密度、准确度、特异性及保存期实验

[0148] 本实施例将对实施例 1 制备的酶联免疫试剂盒进行精密度、准确度、特异性及保存期的检测,其间所涉及的试剂盒的使用方法、结果分析等参见实施例 1 步骤二相关步骤。

[0149] 一、试剂盒精密度实验

[0150] 1、标准品精密度试验

[0151] 从实施例 1 制备的酶联免疫试剂盒中取三批进行精密度检测,每批各抽取 10 个试剂盒,每板各抽出 20 个微孔,测定 20 μ g/L 标准溶液(磺胺二甲嘧啶标准品和恩诺沙星标准品的混合溶液,两者浓度均为 20 μ g/L)的吸光度值,计算变异系数(CV%),结果见表 1。

[0152] 表 1 标准品精密度试验结果(CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0153]	CV%	NO.1	8.9	8.2	13.2	16.3	9.4	10.8	10.1	14.2	13.2	14.2
		NO.2	7.5	12.9	5.5	8.2	13.8	7.2	15.6	9.0	12.4	8.4
		NO.3	9.8	6.2	10.5	9.6	10.2	9.4	13.6	10.8	13.1	10.6

[0154] 通过表 1 中的试验结果可以得出,每批试剂盒,各测定 10 次标准品变异系数在 5.5% ~ 16.3% 之间,符合精密度小于 20%,符合《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中规定的精密度标准。

[0155] (2) 待测样品精密度试验

[0156] 分别取磺胺二甲嘧啶标准品和恩诺沙星标准品,添加至牛奶样品中,至两标准品的终浓度均为 10 μ g/L。分别取实施例 1 制备的三个不同批次的试剂盒各三个,每个试剂盒重复 5 次,分别计算变异系数。三批试剂盒的检测结果见表 2。

[0157] 表 2 牛奶样品的精密度试验结果

[0158]

批号	实测值 (μ g/kg)					板内 CV%	批内 CV%	批间 CV%
KIT001	7.9	8.4	8.9	9.5	8.8	7.5	8.1	14.6
	9.3	8.1	8.4	9.6	9.1	8.4		
	8.9	8.8	9.1	8.4	8.1	6.2		
KIT002	8.9	8.2	7.9	9.5	7.2	9.4	11.5	
	9.2	8.4	8.5	6.8	8.2	7.7		
	8.3	7.5	9.4	7.2	8.5	8.8		
KIT003	7.5	8.4	7.6	8.4	8.9	9.6	8.8	
	8.4	7.9	8.9	7.6	8.2	7.8		
	9.6	8.9	9.2	8.3	7.2	8.3		

[0159] 结果表明,三批试剂盒对牛奶添加样品,板内变异系数小于 10%,批内变异系数小于 15%,批间变异系数小于 20%,符合《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中规定的精密度标准。

[0160] 二、试剂盒准确度实验

[0161] 取磺胺二甲嘧啶标准品和恩诺沙星标准品,分别对不含磺胺二甲嘧啶和恩诺沙星的牛奶样品进行添加回收试验,两标准品均各设两个添加浓度(10 μg/L 和 20 μg/L),每个浓度做 5 次重复,分别计算准确度,结果见表 3。

[0162] 表 3 试剂盒的样本准确度测定

[0163]

样品		磺胺二甲基嘧啶 (μg/L)		恩诺沙星 (μg/L)	
添加浓度		10.0	20.0	10.0	20.0
回收率%	1	81.5	76.1	86.4	84.3
	2	92.3	85.5	90.2	88.9
	3	89.1	96.4	97.9	79.6
	4	90.6	92.8	76.5	78.2
	5	88.7	83.9	80.6	90.7
平均值		88.4	86.9	86.3	84.3

[0164] 从表 3 中可看出,牛奶样品的添加回收率在 76.1% ~ 97.9% 之间;符合准确度的测定标准。

[0165] 三、试剂盒灵敏度实验

[0166] 关于 ELISA 的灵敏度的指标有多种,一般采用由 50% 抑制浓度(IC_{50}) 值来评价所建立的 ELISA 的灵敏度,其中 IC_{50} 值一般由四参数方程计算得出。一般程序如下:以无检测物标准品抑制时的零浓度的标准品溶液的 OD 值为 B_0 值,相应浓度标准品溶液抑制反应时的 OD 值为 B 值。以 OD 值为纵坐标,以系列梯度浓度的标准品溶液浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线,同时可以得出标准曲线的线性方程。通过描绘吸收率对分析物浓度的对数得到竞争曲线,符合 logistic 四参数方程:

$$[0167] \quad Y = \frac{A - D}{1 + (X/C)^B} + D$$

[0168] 这里 A 在没有分析物时的最大光吸收值, B 是曲线变形点的斜率, C 是抑制分析物 50% 的浓度 (IC_{50}), D 是在分析物无穷大时的最小光吸收值。

[0169] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(标准品浓度为 0 μg/L)的吸光度值(B_0)再乘以 100%,即百分吸光度值。计算公式为:

$$[0170] \quad \text{百分吸光度值} (\%) = (B/B_0) \times 100\%$$

[0171] 试剂盒的灵敏度采用以磺胺二甲嘧啶、恩诺沙星以及各类似物的标准品溶液通过标准曲线测定各自 50% 抑制浓度 IC_{50} 来评价。在上述最佳条件下,将标准品配成浓度为一系列的梯度浓度,按间接竞争 ELISA 方法测定曲线的灵敏度。分别以所述磺胺二甲嘧啶标准溶液和所述恩诺沙星标准溶液的浓度(μg/L)为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算步骤(1)的处理后样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个处理后样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中所述磺胺二甲嘧啶和所述恩诺沙星的含量。

也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。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,整个检测过程只需较短时间,1.5h 内即可以完成。

[0172] 根据图 1 中的标准曲线,按照上述方法计算出磺胺二甲基嘧啶的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.48ng/mL,环丙沙星的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.72ng/mL。

[0173] 四、试剂盒特异性实验

[0174] 选择与磺胺二甲基嘧啶有类似结构和类似功能的 20 种药物,以及与恩诺沙星有类似结构和类似功能的 12 种药物测定试剂盒的交叉反应率。以磺胺二甲基嘧啶、恩诺沙星以及各类似物的标准品溶液通过标准曲线测定各自 50% 抑制浓度 (IC_{50}),用下式计算试剂盒对各类似物的交叉反应率。类似物的交叉反应率越小,说明试剂盒对磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星检测的特异性越高。

[0175] 其中,通过标准曲线测定 50% 抑制浓度的方法如下:

[0176] (1) 标准曲线绘制:按照实施例 1 步骤二所述方法操作,分别以磺胺二甲基嘧啶、恩诺沙星以及各类似物的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以各自相应第一个标准品溶液 ($0 \mu\text{g/L}$ 标准品溶液)的吸光度平均值(B_0)再乘以 100%,得到百分吸光度值。以百分吸光度值为纵坐标,以各个标准品溶液中的标准品浓度 (ng/mL) 作为横坐标绘制标准曲线,绘制标准曲线。

[0177] (2) 50% 抑制浓度的确定:通过标准曲线,得到纵坐标数值等于 50% 对应的各物质浓度 (ng/mL),即 IC_{50} 值。

[0178]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的 SM}_2 \text{ (或 ENR) 浓度}}{\text{引起 50\%抑制的 SM}_2 \text{ 类似物 (或 ENR 类似物) 浓度}} \times 100\%$$

[0179] 检测结果如表 4 所示。从表 4 中可以看出,实施例 1 制备的试剂盒对磺胺二甲基嘧啶类似物以及恩诺沙星类似物的交叉反应率均小于 1%,这说明实施例 1 制备的试剂盒对磺胺二甲基嘧啶以及恩诺沙星具有极高的特异性,满足本领域技术人员所公认的交叉反应率小于 10% 则认为具有较高特异性这一说法(中华人民共和国农业部兽药残留分析技术标准的通知-2003),可有效的排除类似物的干扰,可专门用于磺胺二甲基嘧啶以及恩诺沙星这两种物质的检测。

[0180] 表 4 试剂盒的特异性

[0181]

磺胺类药物名称	交叉反应率 (%)	喹诺酮类药物名称	交叉反应率 (%)
磺胺二甲基嘧啶	100	环丙沙星	100
磺胺间甲氧嘧啶	<1	噁喹酸	<1
磺胺索嘧啶	<1	依诺沙星	<1
磺胺喹恶琳	<1	氟甲喹	<1
磺胺二甲氧嘧啶	<1	洛美沙星	<1

磺胺氯哒嗪	<1	达氟沙星	<1
磺胺对甲氧嘧啶	<1	诺氟沙星	<1
磺胺吡啶	<1	培氟沙星	<1
磺胺地索辛	<1	恩诺沙星	<1
磺胺甲氧哒嗪	<1	奥比沙星	<1
磺胺多辛	<1	氧氟沙星	<1
磺胺醋酰	<1	麻保沙星	<1
磺胺甲基嘧啶	<1	司帕沙星	<1
磺胺异噁唑	<1		
磺胺硝苯	<1		
磺胺甲噁唑	<1		
磺胺嘧啶	<1		
磺胺噻唑	<1		
磺胺噁唑	<1		
磺胺甲噻二唑	<1		
磺胺苯酰	<1		

[0182] 五、检测限的确定

[0183] 测定 20 份空白牛奶样品,将 20 份空白牛奶的测定结果的平均值加 3 倍标准偏差计算该试剂盒的检测限。其中恩诺沙星的检测限为 4.6ng/mL,磺胺二甲基嘧啶的检测限为 5.2ng/mL。

[0184] 六、试剂盒保存期实验

[0185] 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、磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中,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,结果表明该试剂盒的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。

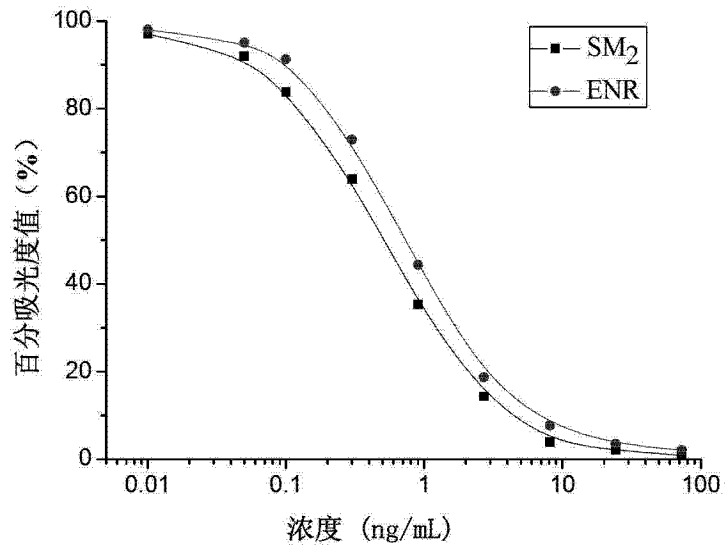


图 1

专利名称(译)	用于检测磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN103197069A	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN201310078523.3	申请日	2013-03-12
[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 王战辉 蒋文晓 史为民 江海洋 张素霞 丁双阳 曹兴元 李建成		
发明人	沈建忠 王战辉 蒋文晓 史为民 江海洋 张素霞 丁双阳 曹兴元 李建成		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN103197069B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测磺胺二甲基嘧啶和/或恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其应用。本发明所提供试剂盒包括抗体1、抗体2、包被原1、包被原2、酶标记物1和酶标记物2；所述抗体1为抗磺胺二甲基嘧啶的抗体，所述抗体2为抗恩诺沙星的抗体，所述包被原1为磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白的偶联物，所述包被原2为恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物，所述酶标记物1为抗所述抗体1的酶标二抗，所述酶标记物2为抗所述抗体2的酶标二抗。本发明所提供试剂盒可定性或定量检测待测样品中磺胺二甲基嘧啶和恩诺沙星残留，样品前处理过程简单；本发明检验方法简便易行，特异性高、灵敏度高、精确度高。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	NO.1	8.9	8.2	13.2	16.3	9.4	10.8	10.1	14.2	13.2	14.2
	NO.2	7.5	12.9	5.5	8.2	13.8	7.2	15.6	9.0	12.4	8.4
	NO.3	9.8	6.2	10.5	9.6	10.2	9.4	13.6	10.8	13.1	10.6