



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101358965 B

(45) 授权公告日 2012.09.05

(21) 申请号 200810118442.0

(22) 申请日 2008.08.22

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2546 2008.06.04

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平回龙观镇国际信息  
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟

赵正苗 冯才茂 汪善良 罗晓琴  
陈炜玲

(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 任凤华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C12N 5/12(2006.01)

C07J 1/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1766632 A, 2006.05.03, 全文.

CN 1766631 A, 2006.05.03, 全文.

US 20030064389 A1, 2003.04.03, 全文.

吴亚飞等. 间接酶联免疫吸附分析法对环境  
水样中左旋 18-甲基炔诺酮含量的测定.《化学研  
究与应用》.2007, 第 19 卷(第 6 期), 第 645-648  
页.

审查员 王航

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 2 页

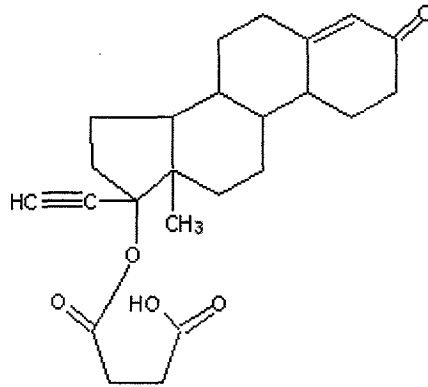
(54) 发明名称

一种检测炔诺酮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炔诺酮的方法及其专  
用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测炔诺  
酮的酶联免疫试剂盒,包括炔诺酮半抗原和炔  
诺酮的特异性抗体;所述特异性抗体为所述炔  
诺酮的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒  
中采用高特异性的炔诺酮单克隆抗体,保证  
了检测结果的可靠性,实验结果表明,本试  
剂盒具有特异性高、灵敏度高、精密度高、  
准确度高等特点;本试剂盒的主要试剂都  
采用工作液形式,使用方便,成本低廉。

1. 一种检测炔诺酮的酶联免疫试剂盒,包括炔诺酮半抗原和炔诺酮的特异性抗体;所述特异性抗体为所述炔诺酮的单克隆抗体;所述炔诺酮半抗原的结构式如下:



所述单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述炔诺酮半抗原和炔诺酮的特异性抗体以下述任一种形式存在:

1) 将所述炔诺酮半抗原与载体蛋白进行偶联,得到炔诺酮半抗原与载体蛋白的偶联物,将其作为包被原,所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物;

2) 所述特异性抗体为包被原,所述炔诺酮半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括抗抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;

所述炔诺酮半抗原和抗抗体以下述任一种形式存在:

1) 将所述炔诺酮半抗原与载体蛋白进行偶联,得到炔诺酮半抗原与载体蛋白的偶联物,将其作为包被原,所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

2) 所述抗抗体为包被原,所述炔诺酮半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括炔诺酮标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液;所述浓缩洗涤液为含有 0.7% -1.4% 吐温-80、0.02-0.05% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 6.4-6.8、0.05-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶;当标记酶为辣根过氧化物酶时,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,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为含有 1.0% 吐温-80、0.03% 硫柳汞防腐剂, pH 值为 6.8、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有 4% 卵清蛋白、pH 值为 6.8、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述底物显色液 A 液为过氧化脲,所述底物显色液 B 液为四甲基联苯胺;所述终止液为 2mol/L 的盐酸。

7. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:所述抗抗体进行酶标记的方法是采用

过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗体进行偶联得到酶标抗体；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗体的摩尔浓度比为 2 : 1。

8. 一种检测炔诺酮的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

当所述样品为动物组织时，样品前处理方法如下：向每 2.0g 动物组织匀浆物，加入 6-9ml 0.05-0.15M 乙腈的氢氧化钠溶液，再加入 0.5-1.0ml 含有 0.3-0.4M 二水合亚硝基铁氰化钠和 0.9-1.2M 硫酸锌的溶液，混匀，再以 3000g 以上的速度室温离心 5-15min，取上清液，干燥，再用 0.8-1.2ml 权利要求 5-7 中任一所述浓缩复溶液充分混匀，再进行 3-5 倍稀释，取稀释液进行分析；

当所述样品为饲料时，样品前处理方法如下：向每 1.0g 饲料样品匀浆物中，加入 8-11ml 0.05-0.15M 乙腈的氢氧化钠溶液，混匀，以 3000g 以上的速度室温离心 5-15min，取上层清液 0.3-0.8ml，加入 0.4-0.6ml 0.05-0.15M 氢氧化钠溶液，混匀，加入 4.5-5.5ml 氯仿，混匀，再以 3000g 以上的速度室温离心 5-15min，取下层清液 1-2ml，干燥，再用 1-2ml 权利要求 5-7 中任一所述浓缩复溶液充分混匀，再进行 3-5 倍稀释，取稀释液进行分析；

2) 利用权利要求 1-8 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述稀释液。

9. 由保藏号为 CGMCC No. 2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生的炔诺酮的单克隆抗体。

10. 保藏号为 CGMCC No. 2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3。

## 一种检测炔诺酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测炔诺酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 炔诺酮是一种甾类同化激素,其结构式如图 1 所示,被大量用于促进反刍动物的生长。但是,研究表明炔诺酮有明显的致癌性,人食用了含有这类药物的畜禽产品也容易被致癌。欧美等国家已相继禁止或严格禁止使用炔诺酮。我国农业部第 235 号文件中规定,动物源性食品中炔诺酮的残留量为不得检出。因此,在实践中,需要一种精确度、灵敏度高的检测炔诺酮方法。

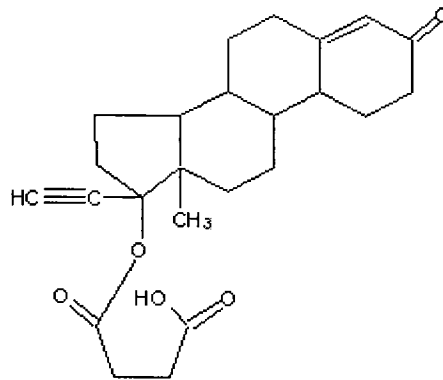
[0003] 目前,动物组织中炔诺酮残留量的常规检测方法主要有液相色谱 / 质谱法 (LC/MS)、高效液相色谱 (HPLC) 等,但是这些方法存在着仪器设备复杂、检测过程繁琐和对检验人员的技能要求高的缺点,不适合现场监控和大量样本的筛查,推广应用受到限制。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测炔诺酮的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测炔诺酮的酶联免疫试剂盒,包括炔诺酮半抗原和炔诺酮的特异性抗体;所述特异性抗体为所述炔诺酮的多克隆抗体或单克隆抗体;所述炔诺酮半抗原的结构式如下:

[0006]



[0007] 其中,所述炔诺酮半抗原和炔诺酮的特异性抗体可以以下述任一种形式存在:

[0008] 1) 将所述炔诺酮半抗原与载体蛋白进行偶联,得到炔诺酮半抗原与载体蛋白的偶联物,将其作为包被原,所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0009] 2) 所述特异性抗体为包被原,所述炔诺酮半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

[0010] 所述试剂盒还可以既包括炔诺酮半抗原和炔诺酮的特异性抗体又包括抗抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;

[0011] 其中,所述炔诺酮半抗原和抗抗体可以以下述任一种形式存在:

[0012] 1) 将所述炔诺酮半抗原与载体蛋白进行偶联,得到炔诺酮半抗原与载体蛋白的偶联物,将其作为包被原,所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0013] 2) 所述抗抗体为包被原,所述炔诺酮半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

[0014] 所述炔诺酮多克隆抗体或炔诺酮单克隆抗体,均是以炔诺酮半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的;所述载体蛋白可为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、兔血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白等。

[0015] 所述单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生的抗体。

[0016] 所述炔诺酮多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0017] 为了更方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还可包括炔诺酮标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

[0018] 其中,所述浓缩洗涤液可为含有 0.7% -1.4% 吐温 -80、0.02-0.05% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 6.4-6.8、0.05-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液可为含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

[0019] 所述酶标记中所用的标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶;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 液可为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液可为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液可为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色剂可为硝基磷酸盐缓冲液,终止液可为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0020] 所述浓缩洗涤液具体可为含有 1.0% 吐温 -80、0.03% 硫柳汞防腐剂, pH 值为 6.8、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液具体可为含有 4% 卵清蛋白、pH 值为 6.8、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述底物显色液 A 液为过氧化脲,所述底物显色液 B 液为四甲基联苯胺;所述终止液为 2mol/L 的盐酸;所述百分含量为质量百分含量。

[0021] 本发明中,在洗涤液中加入一定量吐温 -80 和硫柳汞的作用在于:吐温 -80 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;则硫柳汞在溶液中能抑制细菌的生长,对溶液的稳定性起到一个保护作用。

[0022] 所述抗抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到酶标抗抗体;所述过碘酸钠方法中,所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2:1。本发明的该改良的过碘酸钠法省略了封闭酶上氨基的步骤,节省了时间,又降低了辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗抗体的浓度比率,节省了原材料。

[0023] 炔诺酮是小分子物质,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。因此将炔诺酮通过琥珀酸酐法合成炔诺酮半抗原,这样突出了炔诺酮分子结构中的特征基团,使制备的炔诺酮抗体对炔诺酮的特异性很高。将炔诺酮半抗原与人血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原,其中,炔诺酮半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利,炔诺酮半抗原与人血清白蛋白的结合摩尔比为 14-16:1 比较合适。在制备包被原时,炔诺酮半抗原与所述载体蛋白的摩尔配比为 15:1 比较合适。

[0024] 制作包被有包被原的酶标板时,所用的包被缓冲液可以为 pH 值为 6.2-6.6、0.1mol/L 柠檬酸缓冲液;所用的封闭液可以为含有 5-10% 马血清、10% 酪蛋白、0.1-0.2% 的明胶和 pH 值为 6.2-7.4、0.2mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0025] 本发明的另一个目的是提供一种检测炔诺酮的方法。

[0026] 本发明所提供的检测快诺酮的方法,包括以下步骤:

[0027] 1) 样品前处理,样品的前处理主要是为了更精密的提取样品中的目标物,从而用于后续的检测。

[0028] 当所述样品为动物组织时,样品前处理方法如下:向每 2.0g 动物组织匀浆物,加入 6-9ml 乙腈 -0.05-0.15M 氢氧化钠溶液,再加入 0.5-1.0ml 含有 0.3-0.4M 二水合亚硝基铁氰化钠和 0.9-1.2M 硫酸锌的溶液,混匀,再以 3000g 以上的速度室温离心 5-15min,取上清液,干燥,再用 0.8-1.2ml 上述任一所述浓缩复溶液充分混匀,再进行 3-5 倍稀释,取稀释液进行分析;

[0029] 当所述样品为饲料时,样品前处理方法如下:向每 1.0g 饲料样品匀浆物中,加入 8-11ml 乙腈 -0.05-0.15M 氢氧化钠溶液,混匀,以 3000g 以上的速度室温离心 5-15min,取上层清液 0.3-0.8ml,加入 0.4-0.6ml 0.05-0.15M 氢氧化钠溶液,混匀,加入 4.5-5.5ml 氯仿,混匀,再以 3000g 以上的速度室温离心 5-15min,取下层清液 1-2ml,干燥,再用 1-2ml 上述任一所述浓缩复溶液充分混匀,再进行 3-5 倍稀释,取稀释液进行分析;

[0030] 2) 利用上述任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述稀释液。

[0031] 由保藏号为 CGMCC2546 的对快诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生的快诺酮的单克隆抗体属于本发明的保护范围。

[0032] 保藏号为 CGMCC2546 的对快诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 也属于本发明的保护范围。

[0033] 本发明的检测快诺酮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样品中快诺酮的残留量。本试剂盒中采用高特异性的快诺酮单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性,实验结果表明,本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精密度高、准确度高等特点;本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式,使用方便,成本低廉。用本发明试剂盒检测快诺酮的方法,操作简便,简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测的时间,对样品的前处理要求低,能同时快速检测大批量样品。因此,利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法,能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查,将在快诺酮的检测中发挥重要作用。

#### 附图说明

[0034] 图 1 为快诺酮的化学结构式。

[0035] 图 2 为快诺酮半抗原的合成图。

[0036] 图 3 为以快诺酮半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的标准品曲线图。

#### 具体实施方式

[0037] 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。

[0038] 实施例 1、以快诺酮半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备及使用

[0039] 一、以快诺酮半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的检测原理如下:

[0040] 当在酶标板微孔条上的包被原为炔诺酮半抗原与载体蛋白偶联物抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液,再加入炔诺酮特异性抗体,样本中残留的炔诺酮药物与酶标板上炔诺酮偶联抗原竞争炔诺酮特异性抗体,再加入酶标抗抗体,用显色液显色,样本吸光值与炔诺酮药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中炔诺酮的残留含量。

[0041] 二、以炔诺酮半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的酶联免疫试剂盒一般可以包括如下:

[0042] 1、包被有包被原(包被原为炔诺酮半抗原与载体蛋白偶联物)的酶标板:包被原的浓度可以为  $0.08-0.12 \mu\text{g/ml}$ ;

[0043] 2、酶标抗抗体工作液:酶标二抗为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;酶标二抗的稀释液为含 3-5% (质量百分含量) 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、 $0.1-0.2\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液;酶标抗抗体工作液稀释度为 1:500。

[0044] 3、炔诺酮特异性抗体工作液:可以为炔诺酮多克隆抗体工作液或炔诺酮单克隆抗体工作液;用稀释液将炔诺酮特异性抗体稀释 3000 倍,得到特异性抗体工作液,所述稀释液为含有 2.5% (质量百分含量) 人血清白蛋白和 0.004% (质量百分含量) 叠氮化钠、pH 值为 7.2、 $1.0\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液。

[0045] 4、炔诺酮标准品(北京赛福莱博科技有限公司)溶液:6 瓶,浓度分别为  $0 \mu\text{g/L}$ ,  $0.1 \mu\text{g/L}$ ,  $0.3 \mu\text{g/L}$ ,  $0.9 \mu\text{g/L}$ ,  $2.7 \mu\text{g/L}$ ,  $8.1 \mu\text{g/L}$ ;配制标准品的溶液为含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、 $0.1-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液。

[0046] 5、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。

[0047] 6、终止液: $1-2\text{mol/L}$  盐酸或硫酸;

[0048] 7、浓缩洗涤液:含有 0.7% -1.4% 吐温 -80、0.02-0.05% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 6.4-6.8、 $0.05-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液;40ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0049] 8、浓缩复溶液:含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、 $0.1-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液;50ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0050] 三、以炔诺酮半抗原与牛血清白蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的酶联免疫试剂盒的具体组成及其制备:

[0051] (一) 组成

[0052] 1、包被有包被原(包被原为炔诺酮半抗原与牛血清白蛋白偶联物)的酶标板;包被原的浓度为  $0.10 \mu\text{g/ml}$ ;

[0053] 2、酶标抗抗体工作液:用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;酶标二抗的稀释液为含有 4% 卵清蛋白、pH 值为 6.8、 $0.1\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液,酶标抗抗体工作液稀释度为 1:500,所述百分含量为质量百分含量。

[0054] 3、炔诺酮单克隆抗体工作液:炔诺酮单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生的;炔诺酮单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的:用稀释液将炔诺酮单克隆抗体稀释 3000 倍,得到单抗工作液,所述稀释液为含有 2.5% (质量百分含量) 人血清白蛋白和 0.004% (质量百分含量) 叠氮化钠、pH 值为 7.2、 $1.0\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液。

[0055] 4、炔诺酮标准品（北京赛福莱博科技有限公司）溶液：6 瓶，浓度分别为  $0 \mu\text{g/L}$ ， $0.1 \mu\text{g/L}$ ， $0.3 \mu\text{g/L}$ ， $0.9 \mu\text{g/L}$ ， $2.7 \mu\text{g/L}$ ， $8.1 \mu\text{g/L}$ ；配制标准品的溶液为含有 4% 卵清蛋白、pH 值为 6.8、 $0.1\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液。

[0056] 5、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， $7\text{ml/瓶}$ ，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺， $7\text{ml/瓶}$ ，1 瓶。

[0057] 6、终止液： $2\text{mol/L}$  盐酸。

[0058] 7、浓缩洗涤液：含有 1.0% 吐温-80、0.03% 硫柳汞防腐剂，pH 值为 6.8、 $0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液； $40\text{ml/瓶}$ ，1 瓶；所述百分含量为质量百分含量。

[0059] 8、浓缩复溶液：含有 4% 卵清蛋白、pH 值为 6.8、 $0.1\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液； $50\text{ml/瓶}$ ，1 瓶。

[0060] （二）制备

[0061] 1、包被有炔诺酮半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板的制备

[0062] （1）炔诺酮半抗原的制备

[0063] 称取 10g 炔诺酮和 2.5g 琥珀酸酐放入 50ml 圆底烧瓶中，向其中加无水吡啶至完全溶解， $70^\circ\text{C}$  加热搅拌反应 24h；反应结束后，减压蒸馏去溶剂，残余物用丙酮洗涤 5 次，用乙酸乙酯-正己烷使其结晶，得到炔诺酮半抗原（图 2）。

[0064] （2）包被原的制备

[0065] 将炔诺酮半抗原与牛血清白蛋白偶联得到包被原。

[0066] 包被原的制备过程：取 6mg 步骤（1）得到的炔诺酮半抗原，用 0.1ml DMF 溶解，冷却至  $10^\circ\text{C}$ ，加 2ml 氯甲酸异丁酯， $10^\circ\text{C}$  搅拌反应 30 分钟，得到溶液 I；将 30mg 牛血清白蛋白用  $2\text{ml } 150\text{mmol/L}$  的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液溶解，得到溶液 II；将溶液 I 与溶液 II 混合， $10^\circ\text{C}$  反应 4 小时，然后  $4^\circ\text{C}$  过夜，用  $0.01\text{mol/L}$  磷酸缓冲液透析 2 天，得到炔诺酮包被原。

[0067] （3）包被有包被原的酶标板的制备

[0068] 用包被缓冲液将包被原稀释成  $0.08\text{--}0.12 \mu\text{g/ml}$ ，每孔加入  $100 \mu\text{l}$ ， $37^\circ\text{C}$  温育 2h，再  $4^\circ\text{C}$  过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入  $150\text{--}200 \mu\text{l}$  封闭液， $37^\circ\text{C}$  温育 1-2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0069] 包被缓冲液为 pH 值为 6.4 的  $0.1\text{mol/L}$  柠檬酸缓冲液。

[0070] 封闭液为含有 8% 马血清、10% 酪蛋白、0.2% 明胶，pH 值为 7.1、 $0.2\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

[0071] 2、炔诺酮单克隆抗体的制备

[0072] （1）免疫原合成

[0073] 炔诺酮是小分子物质，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。

[0074] 免疫原的制备过程：取 6mg 炔诺酮半抗原用 0.1ml DMF 溶解，冷却至  $10^\circ\text{C}$ ，加 2ml 氯甲酸异丁酯， $10^\circ\text{C}$  搅拌反应 30 分钟，得到溶液 I；将 60mg 人血清白蛋白用  $2\text{ml } 150\text{mmol/L}$  的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液溶解，得到溶液 II；将溶液 I 与溶液 II 混合， $10^\circ\text{C}$  反应 4 小时，然后  $4^\circ\text{C}$  过夜，用  $0.01\text{mol/L}$  磷酸缓冲液透析 2 天。

[0075] （2）制备单克隆抗体

[0076] a. 动物免疫

[0077] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 100  $\mu$ g/只,使其产生多克隆抗体血清。

[0078] b. 细胞融合和克隆化

[0079] 小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按 7:1(数量配比)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,直到得到能稳定分泌炔诺酮单克隆抗体的杂交瘤细胞株,将该细胞株命名为对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C2-3,该细胞株已于 2008 年 06 月 04 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),保藏编号为 CGMCC No. 2546。

[0080] c. 细胞冻存和复苏

[0081] 将炔诺酮的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 用冻存液制成  $1 \times 10^9$  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. 单克隆抗体的制备与纯化

[0083] 可以通过如下两种方法制备单抗:

[0084] 方法 1:将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只,7 天后腹腔注射炔诺酮的单克隆杂交瘤细胞株  $5 \times 10^7$  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,-20°C 保存。

[0085] 方法 2:增量培养法:将杂交瘤细胞 CGMCC No. 2546 置于 pH 为 7.4、0.2% 碳酸氢钠、1640+20% 小牛血清培养基中,在 37°C 条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20°C 保存。

[0086] 3、多克隆抗体的制备

[0087] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以炔诺酮抗原与人血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5mg/kg 体重,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 3-4 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,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。

[0088] 4、辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备过程:

[0089] 羊抗鼠抗抗体购自北京博奥森公司,货号 bse-0296G。

[0090] 羊抗兔抗抗体购自北京博奥森公司,货号 bse-0295G。

[0091] (2) 辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

[0092] 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。

[0093] 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物。

[0094] 本发明利用改良的过碘酸钠法进行了抗体的酶标,其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。

## [0095] 四、样品中呋诺酮的检测

[0096] 本发明试剂盒可以用于检测动物组织（如猪肌肉、鸡肝脏、鱼、虾）和饲料中的呋诺酮。

## [0097] 1、样品前处理

[0098] (1) 动物组织样品的前处理方法：每 2.0g 动物组织匀浆物中，加入 7ml 乙腈-0.1M 氢氧化钠溶液，再加入 0.5ml 含有 0.36M 二水合亚硝基铁氰化钠和 1M 硫酸锌的水溶液，用振荡器振荡 10min，再以 3000g 以上的速度室温离心 10min，取上清液，于 50℃-60℃ 氮气流下吹干，加入 1ml 上述复溶液充分混匀，再进行 5 倍稀释，取样进行分析；

[0099] (2) 饲料样品前处理方法：每 1.0g 饲料样品匀浆物中，加入 10ml 乙腈-0.1M 氢氧化钠溶液，振荡器振荡 5min，3000g 以上，室温离心 5min，取上层清液 0.5ml，加入 0.5ml 0.1M 氢氧化钠溶液，涡动 20s，加入 5ml 氯仿，振荡 5min，3000g 以上，室温离心 5min，取下层清液 1ml 至洁净的容器中，于 50℃~60℃ 氮气流下吹干，取 1ml 复溶液复溶干燥残留物，把得到的样本液与复溶液按 1:4 体积比进行稀释，涡动混匀，取样分析。

## [0100] 2、用试剂盒检测

[0101] 向包被有呋诺酮半抗原与牛血清白蛋白偶联物的酶标板微孔中加入呋诺酮标准品溶液或样品溶液 50 μl，再加入呋诺酮单克隆抗体工作液 50 μl，用盖板模封板，37℃ 恒温箱中反应 30min，倒出孔内液体，每孔加入 250 μl 洗涤液，30s 后倒出孔内液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100 μl，37℃ 恒温箱中反应 30min，倒出孔内液体，重复洗板步骤，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℃ 恒温箱避光显色 15min，每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 50 μl，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)。

## [0102] 3、检测结果分析

[0103] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B<sub>0</sub>) 再乘以 100%，得到百分吸光度值。

[0104]

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

[0105] 公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B<sub>0</sub> 为 0 μg/L 标准品溶液的平均吸光度值。

[0106] 以呋诺酮标准品浓度 (μg/L) 值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图 (图 3)。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呋诺酮的残留量。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。

## [0107] 五、试剂盒灵敏度、精密度、准确度和保存期检测

## [0108] (一) 标准品精密度检测：

[0109] 从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次 (01 批、02 批、03 批) 的试剂

盒中各抽取 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  $0.9 \mu\text{g/L}$  呋诺酮标准品溶液的吸光度值 (OD 值),计算变异系数。实验结果如表 1 所示,表明,所有检测中标准品吸光度值的变异系数在 5.7% -12.7%之间,符合精密度小于或等于 20%的规定。

[0110] 表 1、标准品可重复性试验 (CV%)

[0111]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	8.5	10.6	7.3	6.8	11.4	7.2	6.4	5.8	10.0	6.7
	02 批	9.4	11.3	5.7	9.8	11.6	10.4	5.8	9.4	11.5	12.7
	03 批	8.7	8.6	5.9	8.4	7.3	6.9	6.6	8.3	5.7	10.3

[0112] (二) 样本精密度和准确度试验

[0113] 1、样品精密度检测:

[0114] 分别向不含呋诺酮的肌肉、肝脏、鱼、虾样本中添加终浓度为  $4 \mu\text{g/kg}$  的呋诺酮,向不含呋诺酮的饲料中添加终浓度为  $100 \mu\text{g/kg}$  的呋诺酮,再分别按照实施例 1 中所述方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中所述的不同时间段制备的三个批次的试剂盒 (01 批、03、06 批) 中各抽取 3 个试剂盒,进行检测实验,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数,结果如表 2-6 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、鱼、虾、饲料样本的变异系数均在 5.9% -16.0%之间,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标准。

[0115] 表 2、肌肉样本可重复性试验

[0116]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	2.9	3.3	3.2	3.7	3.5	9.1
	3.5	3.0	2.7	2.6	3.4	13.3
	3.8	3.6	2.8	2.9	3.5	13.4
02	3.8	3.0	3.4	3.3	3.8	9.9
	2.8	2.7	2.6	3.2	3.3	10.7
	3.5	3.2	2.9	3.0	3.7	10.3
03	3.6	3.4	3.1	2.8	3.5	10.0
	2.8	3.4	3.6	3.9	3.1	12.7
	3.6	3.7	2.6	3.7	3.0	15.0

[0117] 表 3、肝脏样本可重复性试验

[0118]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	2.8	2.9	3.4	3.6	3.5	11.3
	3.4	2.8	3.9	2.9	2.7	16.0
	3.3	3.5	3.4	3.7	3.8	5.9
02	2.7	3.0	3.6	3.5	3.9	14.5
	3.4	3.8	3.9	2.9	3.0	13.3
	3.1	3.3	3.4	2.9	2.7	9.3
03	3.8	3.1	2.8	3.6	3.7	12.7
	2.8	3.5	3.9	3.4	3.6	11.7
	3.3	2.8	2.9	3.4	3.6	10.6

[0119] 表 4、鱼样本可重复性试验

[0120]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	3.2	3.5	3.9	3.1	2.8	12.7
	3.8	3.5	3.3	3.1	2.9	10.5
	3.5	2.8	3.7	3.4	3.3	10.1
02	3.1	3.4	3.6	3.8	3.6	7.6
	3.5	3.4	3.2	2.7	3.9	13.2
	3.3	3.8	3.7	3.0	3.6	9.4
03	3.3	3.8	3.9	3.1	3.2	10.5
	3.5	3.9	3.7	2.9	2.7	15.5
	3.6	3.5	3.9	3.1	2.7	13.9

[0121] 表 5、虾样本可重复性试验

[0122]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	3.6	3.2	3.8	3.0	2.7	13.6
	2.9	3.6	3.4	3.3	3.6	8.6
	3.3	3.1	2.9	3.0	3.8	11.1
02	3.9	3.5	3.4	2.8	3.6	11.7
	3.5	3.6	3.7	3.8	3.0	8.8
	2.8	3.3	3.4	3.7	3.4	9.9
03	3.6	3.5	3.0	2.8	3.7	11.9
	3.6	3.5	3.8	2.9	2.8	13.4
	3.5	3.4	3.1	3.9	3.0	10.5

[0123] 表 6、饲料样本可重复性试验

[0124]

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	78.9	86.4	81.2	97.5	105.6	12.6
	105.9	104.7	94.8	78.9	86.2	12.4
	88.6	97.0	95.6	76.3	98.7	10.1
02	94.5	98.7	86.4	76.3	90.0	9.6
	92.7	106.3	72.8	94.7	82.5	14.2
	86.3	87.5	94.2	86.6	78.3	6.5
03	97.8	86.0	99.6	80.5	86.3	9.2
	87.4	98.5	85.4	77.5	94.6	9.2
	76.9	94.7	89.1	97.0	102.8	10.7

[0125] 2、样本准确度试验

[0126] 向不含有快诺酮的肌肉、肝脏、鱼、虾组织中分别添加快诺酮,使快诺酮的终浓度分别为  $5\mu\text{g/kg}$ 、 $10\mu\text{g/kg}$ ,向不含有快诺酮的饲料组织中添加快诺酮,使快诺酮的终浓度分别为  $100\mu\text{g/kg}$ 、 $200\mu\text{g/kg}$ ,然后按照实施例 1 中所述的样本前处理方法进行处理;再用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒检测组织或饲料中的快诺酮,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 7 所示。

[0127] 结果表明肌肉样本添加回收率在 68.9% -94.7% 之间,肝脏样本的添加回收率在 76.9% -98.6% 之间,鱼样本添加回收率在 80.6% -94.7% 之间,虾样本添加回收率在

68.7% -98.6%之间,饲料样本的添加回收率在 81.6% -105.9%之间。

[0128] 表 7、试剂盒的准确度检测结果

[0129]

样本		肌肉		肝脏		鱼	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		5	10	5	10	5	10
准确度%	1	80.5	68.9	98.6	76.9	85.2	94.0
	2	75.6	94.7	90.5	80.5	94.7	85.3
	3	84.7	92.6	84.7	86.3	80.6	86.7
	4	86.4	85.2	80.5	78.6	90.2	82.3

[0130]

平均值%	81.8	85.4	88.6	80.6	87.7	87.1
样本	虾		饲料			
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	5	10	100	200		
准确度%	1	81.5	98.6	105.9	99.7	
	2	68.7	92.5	94.7	103.3	
	3	90.5	87.2	85.6	81.6	
	4	97.8	86.3	95.3	98.7	
平均值%	84.6	91.2	95.4	95.8		

[0131] (三) 交叉反应率试验:

[0132] 选择与快诺酮有类似结构和类似功能的 9 种药物测定交叉反应率。通过各种药物的标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算步骤三中试剂盒对其它药物的交叉反应率。试剂盒对于快诺酮交叉反应率越大,则其对该药物检测的特异性就越好。重复测定 3 次,结果取平均值。

[0133] 交叉反应率(%) = (引起 50%抑制快诺酮的浓度 / 引起 50%抑制的快诺酮类似物浓度)  $\times$  100%

[0135] 表 8、试剂盒的特异性

[0136]

药物名称	交叉反应率(%)
快诺酮	100%
快诺孕酮	100%
左快诺酮	2%

甲地孕酮	0.1%
甲羟孕酮	0.25%
黄体酮(孕酮)	<0.1%
醋酸甲羟孕酮	0.2%
群勃龙	0.3%
己烯雌酚	<0.1%
雌二醇	0.3%

[0137] 结果如表 8 所示,表明,本发明试剂盒对炔诺酮和炔诺孕酮的特异性好,即本发明试剂盒可以检测炔诺酮、炔诺孕酮。

[0138] (四) 试剂盒保存期试验

[0139] 试剂盒保存条件为 2-8℃,经过 6 个月的测定,步骤三中试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、炔诺酮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 37℃保存条件下放置 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。因此,本发明试剂盒可以在 2-8℃至少可以保存 6 个月以上。

[0140] (五) 试剂盒的最低检测限

[0141] 取不含炔诺酮的阴性动物组织样本,用实施例 1 步骤三中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。

[0142] 表 9、阴性猪肉样本测定结果统计表  $\mu\text{g}/\text{kg}$

[0143]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.12	0.52	0.15	0.23	0.09	0.46	0.34	0.37
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.74	0.26	0.16	0.5	0.14	0.4	0.61	0.77
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.35	0.41	0.02	0.33	0.34	0.21	0.97	

[0144] 由表 9 可知,本发明所研制的试剂盒最低检测限为 0.97  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0145] 实施例 2、用于检测炔诺酮的试剂盒还可以有如下几种:

[0146] 一、包被原为特异性抗体,酶标记物为酶标炔诺酮半抗原的试剂盒

[0147] (一) 本试剂盒的工作原理为:

[0148] 当在微孔条上预包被炔诺酮特异性抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记炔诺酮半抗原溶液。样本中的炔诺酮或炔诺酮标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的炔诺酮特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与样本中炔诺酮的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中炔诺酮的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度的炔诺酮标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中炔诺酮的浓度范围。

[0149] (二) 本试剂盒的组成为:

[0150] (1) 包被有包被原的酶标板:包被原为炔诺酮单克隆抗体,由保藏号为

CGMCCNo. 2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生 ; 包被原的浓度可以为 0.08-0.12  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0151] (2) 酶标记物 : 酶标炔诺酮半抗原工作液 ; 标记酶为辣根过氧化物酶。

[0152] (3) 炔诺酮标准品 ( 北京赛福莱博科技有限公司 ) 溶液 : 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  $\mu\text{g/L}$  ; 配制标准品的溶液为含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0153] (4) 底物显色液 : 由显色液 A 液和显色液 B 液组成 , 显色液 A 液为过氧化氢 , 显色液 B 液为邻苯二胺。

[0154] (5) 终止液为 1-2mol/L 硫酸溶液。

[0155] (6) 浓缩洗涤液 : 含有 0.7% -1.4% 吐温 -80、0.02-0.05% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 6.4-6.8、0.05-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 ; 40ml/ 瓶 , 1 瓶 ; 所述百分含量为质量百分含量。

[0156] (7) 浓缩复溶液 : 含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 ; 50ml/ 瓶 , 1 瓶 ; 所述百分含量为质量百分含量。

[0157] 二、包被原为炔诺酮半抗原与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标炔诺酮特异性抗体的试剂盒

[0158] (一) 工作原理

[0159] 当在微孔条上预包被炔诺酮半抗原与载体蛋白偶联物时 , 加入样本溶液或标准品溶液后 , 再加入酶标炔诺酮特异性抗体溶液。样本中的炔诺酮或炔诺酮标准品与酶标板上包被的炔诺酮半抗原竞争炔诺酮特异性抗体 , 用显色液显色 , 样本吸光值与样本中炔诺酮的含量成负相关 , 与标准曲线比较即可得出样本中炔诺酮的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅 , 通过与系列浓度炔诺酮标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中炔诺酮的浓度范围。

[0160] (二) 本试剂盒的组成

[0161] (1) 包被有包被原的酶标板 : 包被原为炔诺酮半抗原与牛血清白蛋白偶联物。

[0162] (2) 酶标记物 : 酶标特异性抗体工作液 , 标记酶为碱性磷酸酶 ; 特异性抗体是单克隆抗体 , 由保藏号为 CGMCC No. 2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生。

[0163] (3) 炔诺酮标准品 ( 北京赛福莱博科技有限公司 ) 溶液 : 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  $\mu\text{g/L}$  ; 配制标准品的溶液为含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0164] (4) 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液 (4- 硝基酚磷酸盐缓冲液)。

[0165] (5) 终止液为 1 ~ 2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0166] (6) 浓缩洗涤液 : 含有 0.7% -1.4% 吐温 -80、0.02-0.05% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 6.4-6.8、0.05-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 ; 40ml/ 瓶 , 1 瓶 ; 所述百分含量为质量百分含量。

[0167] (7) 浓缩复溶液 : 含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 ; 50ml/ 瓶 , 1 瓶 ; 所述百分含量为质量百分含量。

[0168] 三、包被原为抗抗体 , 酶标记物为酶标炔诺酮半抗原

[0169] (一) 工作原理

[0170] 当在微孔条上预包被抗抗体时 , 加入炔诺酮特异性抗体孵育后 , 加入样本溶液或

标准品溶液,再加入酶标炔诺酮半抗原溶液。样本中的炔诺酮或炔诺酮标准品与酶标炔诺酮半抗原竞争炔诺酮特异性抗体,用显色液显色,样本吸光度值与样本中炔诺酮的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中炔诺酮的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度炔诺酮标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中炔诺酮的浓度范围。

[0171] (二) 试剂盒组成如下:

[0172] (1) 包被有包被原的酶标板:包被原为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;包被原的浓度可以为  $0.08-0.12 \mu\text{g/ml}$ 。

[0173] (2) 酶标记物:辣根过氧化物酶标记的炔诺酮半抗原;

[0174] (3) 特异性抗体工作液:单克隆抗体:由保藏号为 CGMCC No. 2546 的对炔诺酮药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-3 分泌产生。

[0175] (4) 炔诺酮标准品(北京赛福莱博科技有限公司)溶液:6 瓶,浓度分别为  $0 \mu\text{g/L}$ ,  $0.1 \mu\text{g/L}$ ,  $0.3 \mu\text{g/L}$ ,  $0.9 \mu\text{g/L}$ ,  $2.7 \mu\text{g/L}$ ,  $8.1 \mu\text{g/L}$ ;配制标准品的溶液为含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、 $0.1-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液。

[0176] (5) 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,  $7\text{ml/瓶}$ , 1 瓶;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺,  $7\text{ml/瓶}$ , 1 瓶。

[0177] (6) 浓缩洗涤液:含有 0.7% -1.4% 吐温-80、0.02-0.05% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 6.4-6.8、 $0.05-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液;  $40\text{ml/瓶}$ , 1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0178] (7) 浓缩复溶液:含有 3-5% 卵清蛋白、pH 值为 6.5-7.2、 $0.1-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液;  $50\text{ml/瓶}$ , 1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0179] (8) 终止液:终止液为  $1 \sim 2\text{mol/L}$  硫酸或盐酸溶液。

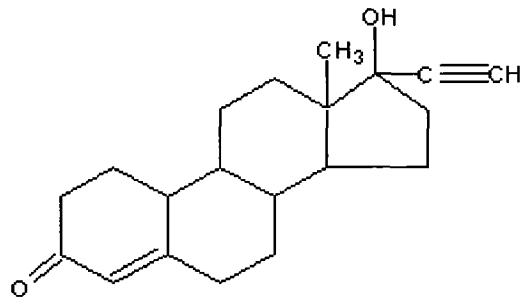


图 1

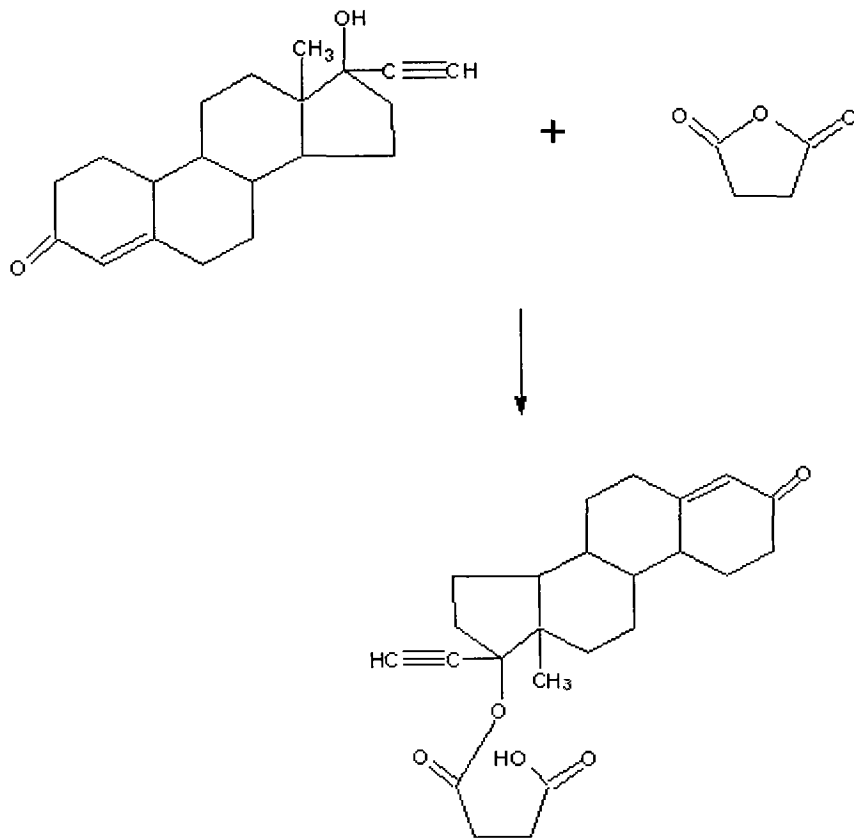


图 2

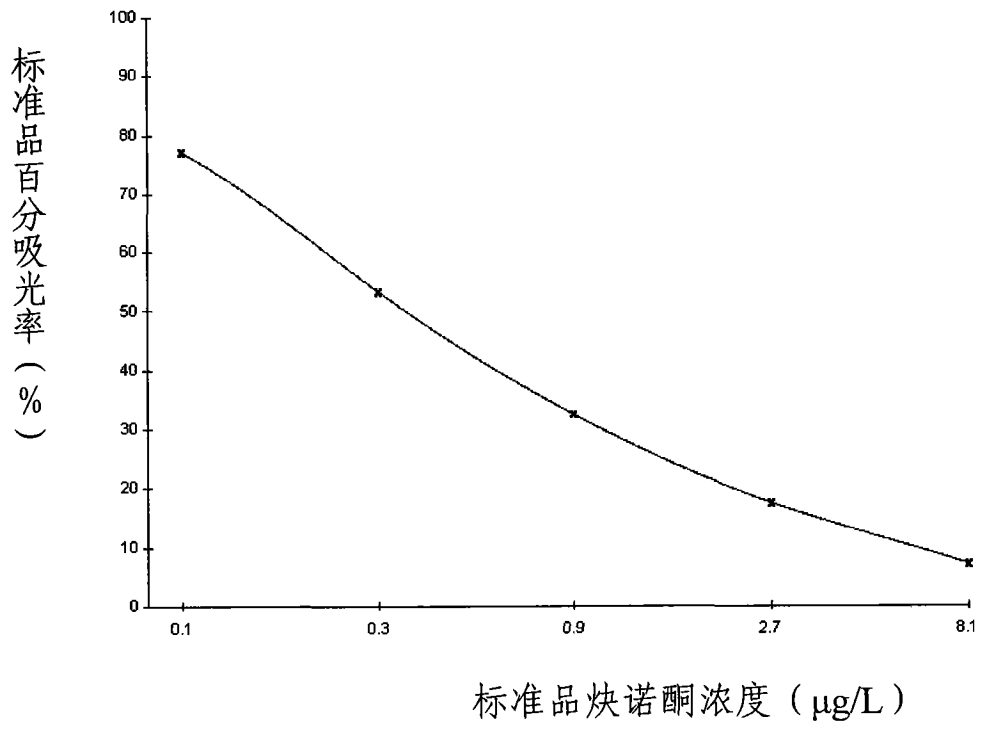
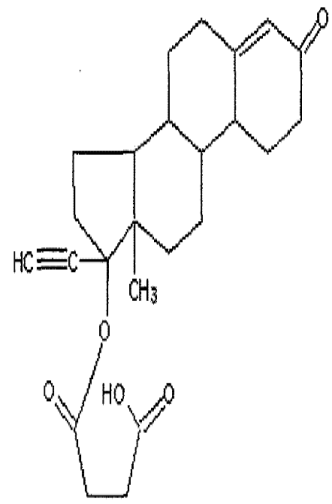


图 3

专利名称(译)	一种检测炔诺酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101358965B</a>	公开(公告)日	2012-09-05
申请号	CN200810118442.0	申请日	2008-08-22
[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)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗 冯才茂 汪善良 罗晓琴 陈炜玲		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗 冯才茂 汪善良 罗晓琴 陈炜玲		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/535 C12N5/12 C07J1/00		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	王航		
其他公开文献	CN101358965A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测炔诺酮的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测炔诺酮的酶联免疫试剂盒，包括炔诺酮半抗原和炔诺酮的特异性抗体；所述特异性抗体为所述炔诺酮的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的炔诺酮单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精密度高、准确度高等特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。



;