



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103364553 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 23

(21) 申请号 201210096409. 9

(22) 申请日 2012. 04. 01

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

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

(72) 发明人 万宇平 吴鹏 罗晓琴 孙震  
冯静 余厚美 赵正苗 段盈盈  
何丽霞 李晓芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

C07D 233/94(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒及其  
应用

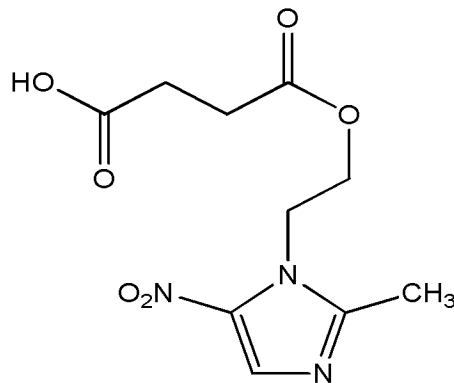
(57) 摘要

本发明提供了一种检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有甲硝唑偶联抗原的酶标板,酶标抗抗体工作液,硝基咪唑类药物特异性抗体工作液,甲硝唑标准品溶液,底物显色液,终止液,浓缩洗涤液,复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测硝基咪唑类药物的方法,它包括: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。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测蜂蜜样品中硝基咪唑类药物的含量,其操作简便、费用低廉能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒,其特征在于它含有:

- (1) 包被有甲硝唑偶联抗原的酶标板;
- (2) 酶标记抗抗体;
- (3) 硝基咪唑类药物特异性抗体;
- (4) 甲硝唑标准品溶液;
- (5) 底物显色液;
- (6) 终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 复溶液。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述甲硝唑偶联抗原是由甲硝唑半抗原与载体蛋白偶联得到,所述甲硝唑半抗原结构如下:



3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,所述甲硝唑半抗原通过以下步骤得到:0.85g 甲硝唑和 1.0g 琥珀酸酐,加入 10ml 吡啶,室温下搅拌 12-20 小时,蒸干溶剂,乙酸乙酯溶解,饱和氯化铵溶液洗涤,水洗,干燥,除去溶剂后在环己烷-乙酸乙酯中重结晶得到白色固体,为甲硝唑半抗原。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述硝基咪唑类药物特异性抗体为硝基咪唑类药物单克隆抗体。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,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 1~2mol/L 氢氧化钠。

6. 如权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征在于所用包被缓冲液为 pH9.0-9.6, 0.1-0.2mol/L 碳酸盐缓冲液,所用封闭液为 pH7.2-7.6,含有 0.5-0.8% 脱脂奶粉,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:浓缩洗涤液为 pH7.2-7.6,含有 0.5-1.0% 吐温 20,0.01-0.04% 叠氮化钠的 0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液;复溶液为含有 pH 6.5-6.8 含有 5-10% 酪蛋白的 0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:甲硝唑标准品溶液的浓度为 0 μg/L、0.05 μg/L、0.15 μg/L、0.6 μg/L、2.4 μg/L、9.6 μg/L。

9. 一种检测样品中硝基咪唑类药物含量的方法,包括步骤:
- (1) 样品前处理;
  - (2) 用权利要求 1-8 任一项所述的试剂盒进行检测;
  - (3) 分析检测结果。

## 检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒,其适用于蜂蜜中硝基咪唑类药物测定。

### 技术背景

[0002] 硝基咪唑类药物是畜禽饲料中常用的抗原虫感染及抗菌药,主要用于防治家禽组织滴虫和寄生虫、牛的滴虫,猪的出血性肠炎、鱼的寄生虫感染、蜂的微孢子虫病等,并具有促生长作用,但是该类物质及其某些代谢物对哺乳动物具有致癌、致畸、致突变作用和遗传毒性,因此硝基咪唑类药物的不合理使用造成可食性动物组织中药物残留问题危害到人类的食品安全,我国已经禁止甲硝唑、地美硝唑、洛硝唑在肉食食品中使用,替硝唑禁止在兽药中使用,因此,需要一种既灵敏又精确的方法同时测定蜂蜜中的硝基咪唑类药物。

[0003] 目前检测硝基咪唑类药物的方法主要有:高效液相色谱-紫外色谱、高效液相色谱-二极管阵列检测器法,气相色谱氮磷检测器法、高效液相色谱-电喷雾质谱法,气相色谱法等,仪器检测方法操作繁琐且费用较高,推广应用受到限制。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对上述不足提供一种用于硝基咪唑类药物含量测定的酶联免疫试剂盒,其操作简单适合现场大批量样品的筛选。

[0005] 本发明试剂盒,它包括:

[0006] (1) 包被有甲硝唑偶联抗原的酶标板;

[0007] (2) 酶标记抗抗体;

[0008] (3) 硝基咪唑类药物特异性抗体;

[0009] (4) 甲硝唑标准品溶液;

[0010] (5) 底物显色液;

[0011] (6) 终止液;

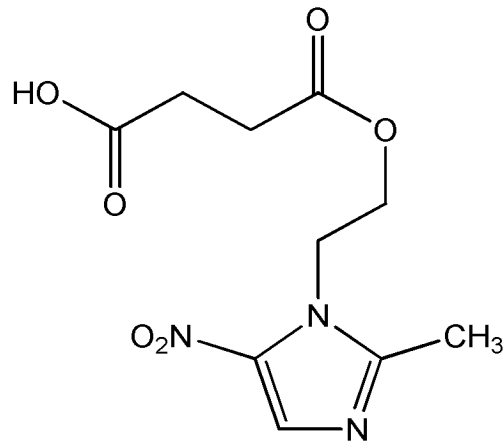
[0012] (7) 浓缩洗涤液;

[0013] (8) 复溶液。

[0014] 所述甲硝唑偶联抗原为甲硝唑半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白可为卵清蛋白、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白。

[0015] 所述甲硝唑半抗原的结构如下:

[0016]



[0017] 所述甲硝唑半抗原制备过程:0.85g 甲硝唑和 1.0g 琥珀酸酐,加入 10ml 吡啶,室温下搅拌 12-20 小时,蒸干溶剂,乙酸乙酯溶解,饱和氯化铵溶液洗涤,水洗,干燥,除去溶剂后在环己烷-乙酸乙酯中重结晶得到白色固体,为甲硝唑半抗原。

[0018] 所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶标记抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与羊抗鼠抗抗体进行偶联得到的,优选过碘酸钠法。所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

[0019] 所述硝基咪唑类药物特异性抗体可为硝基咪唑类药物单克隆抗体或硝基咪唑类药物多克隆抗体;它们均是用甲硝唑偶联抗原为免疫原得到的;所述硝基咪唑类药物特异性抗体可为鼠源、马源、羊源或兔源抗体,所述硝基咪唑类药物单克隆抗体优选为硝基咪唑类药物鼠单克隆抗体,所述硝基咪唑类药物多克隆抗体优选为硝基咪唑类药物兔多克隆抗体。

[0020] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括甲硝唑标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、复溶液。

[0021] 所述浓缩洗涤液为 pH7.2-7.6,含有 0.5-1.0%吐温 20,0.01-0.04%叠氮化钠的 0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0022] 所述复溶液为 pH6.5-6.8 含有 5-10%酪蛋白的 0.1-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0023] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成,所述显色液 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 的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0024] 其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为 pH9.0-9.6,0.1-0.2mol/L 碳酸盐缓冲液,所用封闭液为 pH7.2-7.6,含有 0.5-0.8%脱脂奶粉,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0025] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被抗原稀释成 0.1~0.2 $\mu$ g/ml,每孔加入 100 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 温育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤 2 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 150~200 $\mu$ l 封闭液,37 $^{\circ}$ 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。

[0026] 本发明的检测原理为:

[0027] 当在微孔条上预包被甲硝唑偶联抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入

硝基咪唑类药物特异性抗体溶液,样本中的硝基咪唑类药物与酶标板上包被的甲硝唑偶联抗原竞争硝基咪唑类药物特异性抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光值与硝基咪唑类药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中硝基咪唑类药物的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的甲硝唑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浓度范围。

[0028] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测硝基咪唑类药物的方法,它包括步骤:

[0029] (1) 样品前处理;

[0030] (2) 用试剂盒进行检测;

[0031] (3) 分析检测结果。

[0032] 本发明检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法检测样品中硝基咪唑类药物的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;采用高特异性的硝基咪唑类药物单克隆抗体,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

#### 附图说明

[0033] 图 1:甲硝唑偶联抗原为包被原、酶标抗抗体为酶标记物的试剂盒的标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0034] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0035] 实施例 1 试剂盒组分的制备及试剂盒组建

[0036] 包被抗原制备

[0037] 甲硝唑半抗原制备

[0038] 0.85g 甲硝唑和 1.0g 琥珀酸酐,加入 10ml 吡啶,室温下搅拌 12-20 小时,蒸干溶剂,乙酸乙酯溶解,饱和氯化铵溶液洗涤,水洗,干燥,除去溶剂后在环己烷-乙酸乙酯中重结晶得到白色固体,为甲硝唑半抗原。

[0039] 甲硝唑半抗原与卵清蛋白偶联得到包被抗原

[0040] 1) 取 15mg 甲硝唑半抗原用 1.5ml DMF 溶解,冷却至 10℃;

[0041] 2) 取氯甲酸异丁酯 10 μl 加入 1) 中,10℃搅拌反应 30min;

[0042] 3) 取 25mg 卵清蛋白用 2.2ml 50mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶解 10℃反应 4h,然后 4℃过夜;

[0043] 4) 0.01mol/lPBS 4℃透析 3 天,每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质,分装,于 -20℃保存备用。

[0044] 免疫抗原制备

[0045] 甲硝唑半抗原与牛血清白蛋白偶联得到免疫抗原。

[0046] 1) 取 12mg 甲硝唑半抗原,溶解于 1ml DMF 中;

[0047] 2) 取 15mg EDC 用 0.2ml 水充分溶解后于加入 1) 中,室温下搅拌 24h;

[0048] 3) 称取 BSA 40mg, 使之充分溶解在 3ml 水中, 将步骤 2) 得到的反应液逐滴缓慢滴加到牛血清白蛋白溶液中, 并于室温下搅拌 24h;

[0049] 4) 用 0.01mol/l/PBS 4℃透析 3d 每天换 3 次透析液, 以除去未反应的小分子物质, 分装, 于 -20℃保存备用。

[0050] 硝基咪唑类药物单克隆抗体的制备

[0051] a. 动物免疫

[0052] 将上述步骤得到的免疫抗原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 150 μg/ 只, 使其产生抗血清。

[0053] b. 细胞融合和克隆化

[0054] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 9 : 1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选得到稳定硝基咪唑类药物单克隆抗体的硝基咪唑类药物单克隆杂交瘤细胞株。

[0055] c. 细胞冻存和复苏

[0056] 将杂交瘤细胞用冻存液制成  $1 \times 10^9$  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℃水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0057] d. 单克隆抗体的制备与纯化

[0058] 增量培养法: 将杂交瘤细胞置于细胞培养基中, 在 37℃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℃保存。

[0059] 硝基咪唑类药物多克隆抗体的制备

[0060] 采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以为甲硝唑偶联抗原为免疫原, 免疫剂量为 1.5mg/kg, 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐混合制成乳化剂, 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。

[0061] 羊抗鼠抗抗体的制备过程: 以羊作为免疫动物, 以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫, 得到羊抗鼠抗抗体。

[0062] 羊抗兔抗抗体的制备过程: 以羊作为免疫动物, 以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫, 得到羊抗兔抗抗体。

[0063] 酶标板的制备

[0064] 用包被缓冲液将包被抗原稀释成 0.1-0.2 μg/ml, 每孔加入 100 μl, 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 30s, 拍干, 然后再每孔中加入 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。

[0065] 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

[0066] 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。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, 为了解决这个问题, 我们将传统的方法进行了改良, 即:

[0067] 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。

[0068] 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,对酶的活性的损失减少。

[0069] 检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒的组建

[0070] 组建检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0071] (1) 包被甲硝唑偶联抗原的酶标板;

[0072] (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0073] (3) 硝基咪唑类药物单克隆抗体工作液;

[0074] (4) 甲硝唑标准品溶液 6 瓶,浓度分别为  $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.05 \mu\text{g/L}$ 、 $0.15 \mu\text{g/L}$ 、 $0.6 \mu\text{g/L}$ 、 $2.4 \mu\text{g/L}$ 、 $9.6 \mu\text{g/L}$ ;

[0075] (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,底物显色液 B 液四甲基联苯胺;

[0076] (6) 终止液为  $2\text{mol/L}$  盐酸;

[0077] (7) 浓缩洗涤液为  $\text{pH}7.2-7.6$ ,含有  $0.5-1.0\%$  吐温 20, $0.01-0.04\%$  叠氮化钠的  $0.1-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0078] (8) 复溶液为  $\text{pH}6.5-6.8$ ,含有  $5-10\%$  酪蛋白的  $0.1-0.2\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0079] 实施例 2 样品中硝基咪唑类药物的检测

[0080] 1. 样品前处理

[0081] 样品的前处理主要是为了从样品中获得硝基咪唑类药物溶液,从而用于后续的检测。下面是样品的前处理方法:

[0082] 称取  $3.0 \pm 0.05\text{g}$  蜂蜜至  $50\text{ml}$  聚苯乙烯离心管中;加入  $3\text{ml}$   $0.1\text{M}$  碳酸盐缓冲液充分溶解蜂蜜;加入  $9\text{ml}$  乙酸乙酯,振荡  $5\text{min}$ , $3000\text{g}$  以上,室温离心  $5\text{min}$ ;取  $6\text{ml}$  上层有机相至  $50\text{ml}$  聚苯乙烯离心管中,分别加入  $1\text{ml}$  乙酸乙酯, $1\text{ml}$  甲醇, $1\text{ml}$  正己烷,再加入  $2\text{ml}$   $2\text{M}$  氢氧化钠溶液,涡动  $5\text{min}$ ; $3000\text{g}$  以上,室温离心  $5\text{min}$ ;移取  $4\text{ml}$  上层有机相至  $10\text{ml}$  干净玻璃试管中,于  $50 \sim 60^\circ\text{C}$  水浴氮气流下吹干;加入  $1\text{ml}$  正己烷,涡动  $30\text{s}$ ,加入  $0.5\text{ml}$  复溶工作液,涡动  $1\text{min}$ , $3000\text{g}$  以上,室温离心  $5\text{min}$ ;除去上层有机相,取下层水相  $50 \mu\text{l}$  用于分析。

[0083] 2. 用试剂盒检测

[0084] 向包被有甲硝唑偶联抗原的酶标板微孔中加入甲硝唑标准品溶液或样品溶液  $50 \mu\text{l}$ ,再加入硝基咪唑类药物单克隆抗体工作液  $50 \mu\text{l}$ ,用盖板模封板, $0-4^\circ\text{C}$  避光反应  $60\text{min}$ ,每孔加入  $250 \mu\text{l}$  洗涤液, $30\text{s}$  后倒出孔内液体,如此重复操作共洗板  $4-5$  次,用吸水纸拍干,加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体工作液  $100 \mu\text{l}$ ,用盖板模封板, $25^\circ\text{C}$  恒温箱中反应  $30\text{min}$ ,倒出孔内液体,每孔加入  $250 \mu\text{l}$  洗涤液, $30\text{s}$  后倒出孔内液体,如此重复操作共洗板  $4-5$  次,用吸水纸拍干,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, $25^\circ\text{C}$  恒温箱避光显色  $30\text{min}$ ,每孔加入  $2\text{mol/L}$  终止液盐酸  $50 \mu\text{l}$ ,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在  $450\text{nm}$  处,测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0085] 3. 检测结果分析

[0086] 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 ( $B_0$ ) 再乘以  $100\%$ ,得到百分吸光度值。以甲硝唑标准品浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) 的半对数值为 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,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出硝基咪唑类药物的含量。

[0087] 实验例 1 标准品精密度试验：

[0088] 分别从三个不同的时间段制备的酶标板中各抽出一批酶标板，每批各抽取 5 个试剂盒，每板各抽出 20 个微孔，测定 0.6 μg/L 标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

[0089] 表 1 标准可重复性试验 (CV%)

	酶标板编号	1	2	3	4	5	
[0090]	CV%	01	5.3	4.6	9.2	7.1	5.8
		02	2.4	3.6	4.8	5.0	4.1
		03	6.7	5.0	4.6	3.9	4.3

[0091] 通过上述试验结果可以得出，每批试剂盒各 5 次标准品变异系数在 2.4% -9.2% 之间。

[0092] 实验例 2 样本精密度和准确度试验

[0093] 以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数 (CV%) 作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。变异系数 CV% 计算公式为： $CV(\%) = SD/X \times 100\%$ ；其中 SD 为标准偏差，X 为测定数据的平均值。回收率计算公式为：回收率 (%) = 实际测定值 / 理论值  $\times 100\%$ 。其中理论值为模拟样品的添加浓度。

[0094] 按 0.2、0.4 μg/L 两个浓度甲硝唑、洛硝唑、二甲硝咪唑对蜂蜜样品进行添加回收测定，每个样品做 4 个平行，用三批不同试剂进行测定，计算样品的平均回收率及精密度，见表 2。

[0095] 表 2 精密度及准确度试验

[0096]

药物名称	添加浓度 (μg/L)	回收率 (n=4)%	批内变异系数 (n=4)%	批间变异系数 (n=3)%
甲硝唑	0.2	94.6	8.2	10.3
	0.4	105.6	7.6	8.9
二甲硝咪唑	0.2	106.2	10.5	12.4
	0.4	109.0	9.6	10.5
洛硝唑	0.2	92.4	11.7	12.5
	0.4	98.6	9.2	9.9

[0097] 以 0.2、0.4 μg/L 两个浓度的甲硝唑对蜂蜜样品进行添加，平均回收率为 94.6 ~ 105.6%，批内变异系数在 7.6 ~ 8.2% 之间，批间变异系数在 8.9 ~ 10.3% 之间；以 0.2、0.4 μg/L 两个浓度的二甲硝咪唑对蜂蜜样品进行添加，平均回收率为 106.2 ~ 109.0%，批内变异系数在 9.6 ~ 10.5% 之间，批间变异系数在 10.5 ~ 12.4% 之间；以 0.2、0.4 μg/L 两个浓度的洛硝唑对蜂蜜样品进行添加，平均回收率为 92.4 ~ 95.6%，批内变异系数在 9.2 ~ 11.7% 之间，批间变异系数在 9.9 ~ 12.5% 之间。检测结果的精密度和准确度均符

合相关标准要求。

[0098] 实验例 3 交叉反应率试验：

[0099] 选择硝基咪唑类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。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应率越大,那么此试剂盒对硝基咪唑类药物的检测的特异性就越好。

[0100] 交叉反应率(%) = (引起 50%抑制甲硝唑的浓度 / 引起 50%抑制的类似物浓度) × 100%

[0101] 表 3 试剂盒的特异性

[0102]

竞争物	交叉反应率(%)
甲硝唑	100
二甲硝咪唑	216
洛硝唑	82

[0103]

塞克硝唑	20
奥硝唑	18
替硝唑	6

[0104] 实验例 4

[0105] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8℃,经过 12 个月的测定,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 9 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℃可以保存 12 个月以上。

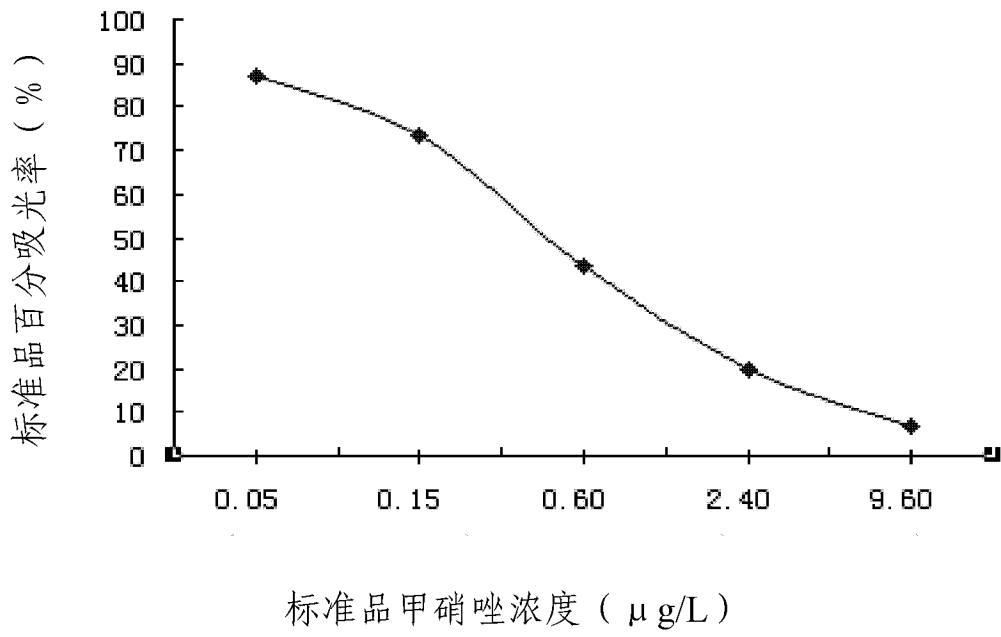


图 1

专利名称(译)	检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103364553A</a>	公开(公告)日	2013-10-23
申请号	CN201210096409.9	申请日	2012-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 吴鹏 罗晓琴 孙震 冯静 余厚美 赵正苗 段盈盈 何丽霞 李晓芳		
发明人	万宇平 吴鹏 罗晓琴 孙震 冯静 余厚美 赵正苗 段盈盈 何丽霞 李晓芳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 C07D233/94		
其他公开文献	CN103364553B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种检测硝基咪唑类药物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有甲硝唑偶联抗原的酶标板，酶标抗体工作液，硝基咪唑类药物特异性抗体工作液，甲硝唑标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测硝基咪唑类药物的方法，它包括：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。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测蜂蜜样品中硝基咪唑类药物的含量，其操作简便、费用低廉能够现场监控且适合大量样本的筛查。

