



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101639477 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 26

(21) 申请号 200910063662. 2

页.

(22) 申请日 2009. 08. 20

李利东 等. 酶联免疫检测试剂盒应用于牛奶中四环素残留的测定. 《乳业科学与技术》. 2004, (第 2 期), 第 52-54 页.

(73) 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街 1 号

审查员 孙谦

(72) 发明人 毕丁仁 乐涛 王喜亮 石德时
郭延成 巴巴卡 肖运才 沈亚安
李自力

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 1/113 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1707265 A, 2005. 12. 14, 说明书第 3-5

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

多西环素残留的 ELISA 检测方法及其试剂盒与应用

(57) 摘要

本发明属于免疫分析技术领域。具体涉及一种用于多西环素 (DOX) 残留检测的酶联免疫方法及试剂盒。本发明的方法主要包括免疫原、包被原、抗体的制备以及样品前处理和 ELISA 检测方法的建立。本发明的试剂盒主要由抗 DOX 特异性抗体, DOX 标准品、包被有 DOX-OVA 偶联物的酶标板组成。本发明的试剂盒和方法具有简便、快速、灵敏、准确等优点, 适合用于动物可食性组织中 DOX 残留的检测。

1. 一种多西环素药物残留的 ELISA 检测方法,包括制备免疫原、包被原、抗体、酶标板和样品前处理,还包括制备试剂盒中的包被液,浓缩洗涤液,封闭液,底物缓冲液,底物 A 储存液,底物 B 储存液,底物显色液,终止液和样品稀释液,其具体步骤如下:

(1) 将半抗原多西环素用对氨基苯甲酸作连接臂,再与牛血清白蛋白偶联得到免疫原;

(2) 将半抗原多西环素采用赫夫曼消除反应后,再与鸡卵清白蛋白偶联得到包被原;

(3) 将步骤 (1) 合成的多西环素免疫原免疫得到特异性兔多克隆抗体;

(4) 将步骤 (2) 合成的多西环素包被原包被所述的酶标板;

(5) 制备包被液,浓缩洗涤液,样品稀释液,封闭液,底物缓冲液,底物 A 储存液,底物 B 储存液,底物显色液和终止液;

(6) 将待检可食性动物组织进行处理,用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液稀释处理得到待测样品;

(7) 对步骤 (6) 待测样品进行 ELISA 测定;

其中:

步骤步骤 (1) 所述的免疫原的制备方法如下:

称取对氨基苯甲酸 27.4mg 溶于 4mL1mol/L 的 HCl 中,在冰水浴中,边搅拌边逐滴加入现配的 1mol/L NaNO_2 0.4mL,4℃避光反应 10min,边反应边搅拌;取少量与苯胺反应,若反应体系变成深黄色,表明重氮化反应成功,得溶液 A,备用;称取多西环素 0.088g,溶解在 3mL 三蒸水中,制成多西环素溶液,将溶液 A 逐滴加入多西环素溶液中,调节 pH8-9,磁力搅拌反应 2h,离心取上清液,加入三丁胺 6.8 μL 到离心上清液中,混合后再加氯甲酸异丁酯 3.8 μL ,于 4℃磁力搅拌反应 25min,得溶液 B;称取 340mg 牛血清白蛋白先溶于 5mL 磷酸盐缓冲液 (PBS),在冰水浴且磁力搅拌下加入 5mL 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液,得溶液 C;在磁力搅拌下将溶液 B 加入到溶液 C 中,置 4℃冰箱反应过夜,离心去沉淀,取上清液用 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液透析 3 天,冻干,于 -20℃保存,备用;

步骤 (3) 所述的特异性兔多克隆抗体的制备方法如下:

用步骤 (1) 所述的免疫原免疫新西兰大白兔,基础免疫时是将步骤 (1) 所述的免疫原用灭菌的 PBS 缓冲液溶解稀释,加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,采用颈背部多点皮下注射;再用前述方法进行加强免疫,其佐剂为不完全佐剂;从第 3 次加强免疫开始,免疫后第 8d,耳静脉采血,测定抗体效价和特异性后,再采血,分离抗血清,经饱和硫酸铵分级沉淀得到纯化后的抗多西环素多克隆抗体;

步骤 (5) 所述的包被液,浓缩洗涤液,样品稀释液,封闭液,底物缓冲液,底物 A 储存液,底物 B 储存液,底物显色液和终止液的组分及其配比如下:

包被液:1.59g Na_2CO_3 ,2.93g NaHCO_3 ,加蒸馏水定容至 1000mL;

浓缩洗涤液:8.0g NaCl,0.2g KCl,2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.2g KH_2PO_4 ,0.5mL 吐温 -20,加蒸馏水至 100mL;

封闭液:鸡卵清白蛋白 1g,将该鸡卵清白蛋白溶于 100mL pH7.4 磷酸缓冲液中;

底物缓冲液:4.91g 柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$,19.38g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,加三蒸水至 1000mL;

底物 A 储存液:100mg 四甲基联苯胺,50mL 无水乙醇;

底物 B 储存液:75mg 过氧化氢脲,10mL 三蒸水;

底物显色液:在体积为 10mL 的底物显色液中含有 9.5mL 底物缓冲液,32 μ L 底物 B 储存液,0.5mL 底物 A 储存液;

终止液:2mol/L H_2SO_4 溶液,和

样品稀释液:0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液。

2. 一种多西环素药物残留的 ELISA 检测试剂盒,其包括:盒体,设在盒体内的酶标板,多西环素标准品,抗多西环素抗体,浓缩洗涤液,浓缩样品稀释液,辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体,底物缓冲液,底物 A 储存液,底物 B 储存液和终止液;

其中:

所述的酶标板上包被有包被原多西环素-卵清蛋白偶联物(DOX-OVA),其制备方法如下:

准确称取多西环素 0.088g 溶解在 3mL 超纯水中,然后将 4mL 溴水碱液加入多西环素溶液中,加热反应 2h,4 $^{\circ}C$ 预冷;在 4 $^{\circ}C$ 避光条件下向上述反应体系中缓慢滴加 1mol/L 的盐酸 0.6mL,调 pH 至 2,在冰水浴中,边搅拌边逐滴加入现配的 1mol/L $NaNO_2$ 0.3mL,加完后置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱阴暗处孵育 6h;按照 20:1 摩尔比,将 220mg 鸡卵清白蛋白溶于 5ml PBS,将偶氮化 DOX 慢慢滴入 OVA 溶液中,加完后在 4 $^{\circ}C$ 冰箱阴暗处孵育过夜;离心除去沉淀,取上清液用磷酸缓冲液(PBS)透析 3d,每 6h 更换透析液,将所得产物低压冻干,于 -20 $^{\circ}C$ 保存备用;

抗多西环素抗体的制备方法如下:

用权利要求 1 步骤 (1) 所述的免疫原免疫新西兰大白兔,基础免疫时是将权利要求 1 步骤 (1) 所述的免疫原用灭菌的 PBS 溶液溶解稀释,加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,采用颈背部多点皮下注射;再用前述方法进行加强免疫,其佐剂为不完全佐剂;从第 3 次加强免疫开始,免疫后第 8d,耳静脉采血测定抗体效价和特异性,采血,分离抗血清,经饱和硫酸铵分级沉淀得到纯化后的抗多西环素多克隆抗体;

所述的多西环素标准品的浓度分别为 0 μ g/L、2.5 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L 和 80 μ g/L;

所述的浓缩洗涤液,浓缩样品稀释液,底物缓冲液,底物 A 储存液,底物 B 储存液和终止液的组分及其配比如下:

浓缩洗涤液:8.0g NaCl,0.2g KCl,2.9g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,0.2g KH_2PO_4 ,0.5mL 吐温-20,加蒸馏水至 100mL;

浓缩样品稀释液:8.0g NaCl,0.2g KCl,2.9g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,0.2g KH_2PO_4 ,加蒸馏水至 100mL;

底物缓冲液:4.91g 柠檬酸 $\cdot H_2O$,19.38g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,加三蒸水至 1000mL;

底物 A 储存液:100mg 四甲基联苯胺,50mL 无水乙醇;

底物 B 储存液:75mg 过氧化氢脲,10mL 三蒸水;和

终止液:2mol/L H_2SO_4 溶液。

3. 权利要求 2 所述的试剂盒在多西环素残留 ELISA 检测中的应用。

多西环素残留的 ELISA 检测方法及其试剂盒与应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学分析技术领域。具体涉及多西环素残留酶联免疫 (ELISA) 检测方法及其试剂盒与应用,适用于可食性动物组织中(肌肉、肝脏等)多西环素药物的残留快速检测。

背景技术

[0002] 多西环素是一种广谱抗生素,对许多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抑制或杀灭作用,如:链球菌、炭疽杆菌、某些葡萄球菌、破伤风杆菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、布氏杆菌、克雷伯氏菌和嗜血杆菌等。除此之外多西环素还对一些衣原体、支原体、立克次氏体、螺旋体等有一定的抑制作用。但多西环素也有很多的副作用,如:诱发低血糖、引起颅内高压、致光敏反应、致肝损伤。多西环素在动物组织中残留会威胁食品安全,对人体健康造成危害。为此,欧盟在 2003 年 7 月对多西环素在猪体内的最高残留量作了规定,肌肉、脂肪、肝脏和肾脏的最高残留量分别为 100ug/kg、300ug/kg、300ug/kg 和 600ug/kg;中华人民共和国农业部 235 号公告《动物食品中兽药最高残留限量》,对多西环素在动物组织中残留也制定了最高残留限量。

[0003] 目前在动物性食品中多西环素的分析检测方法有很多,包括高效液相色谱法、薄层色谱法、液相色谱-质谱联用法、微生物法、酶联免疫法。但微生物方法存在检测时间长、缺乏特异性,容易导致假阳性和假阴性产生。仪器检测主要存在仪器购置费用昂贵、样品前处理复杂、程序繁琐费时、检测费用高、不能现场操作等缺陷,所以在生产中应用受到限制。近年来,ELISA 法以其灵敏、快速、特异、简便等优点,在兽药、农药残留检测领域已被广泛应用。目前还没有针对多西环素 ELISA 检测方法及其试剂盒报道。

[0004] 本发明应用免疫学技术筛选出抗多西环素 (DOX) 的多克隆抗体 (DOX pAb),研制针对多西环素药物残留快速检测试剂盒,并对其性能进行测定。试剂盒检测范围较宽,假阳性低,检测灵敏、准确、可靠,适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏中多西环素检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足,制备一种抗多西环素多克隆抗体。利用该多克隆抗体,建立一种特异性强、灵敏度高、且操作简单,对样品简单处理即可检测多西环素残留的 ELISA 检测方法。同时组装一种多西环素药物残留的 ELISA 试剂盒,作为对可食性动物组织中多西环素药物残留的 ELISA 检测试剂盒中的应用。

[0006] 本发明的技术方案是:

[0007] 一种多西环素药物残留的 ELISA 检测方法,包括制备免疫原、包被原、抗体、酶标板和样品前处理,其步骤如下:

[0008] (1) 将半抗原多西环素用对氨基苯甲酸作连接臂,再与牛血清白蛋白 (BSA) 或鸡卵清白蛋白 (OVA) 偶联合成免疫原 (DOX-PABA-BSA);

[0009] (2) 将半抗原多西环素采用赫夫曼消除反应后,再与牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋

白偶联合成包被原 (DOX-OVA) ;

[0010] (3) 将步骤 (1) 合成的多西环素免疫原免疫兔, 得到特异性兔多克隆抗体 ;

[0011] (4) 将步骤 (2) 合成的多西环素包被原包被固相载体 (酶标板) ;

[0012] (5) 将待检可食性动物组织进行处理, 用样品稀释液得到检测样品 ;

[0013] (6) 对步骤 (5) 的待测样品进行 ELISA 测定。

[0014] 其中 (5) 所述样品稀释液 0.01M pH7.4 PBS 的组分及配比为 :8.0g NaCl, 0.2g KCl, 2.9gNa₂HP04 · 12H₂O, 0.2g KH₂P04, 加蒸馏水至 1000mL。

[0015] 一种多西环素药物残留的 ELISA 检测试剂盒, 其包括 :盒体 (1), 设在盒体内的酶标板 (2), 多西环素标准品 (3), 抗多西环素抗体 (4), 洗涤液 (5), 样品稀释液 (6), 辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体 (7), 底物液 (8), 底物 A 储存液 (9), 底物 B 储存液 (10) 和终止液 (11) ;

[0016] 其中 :

[0017] 所述的试剂组分及其配比如下 :

[0018] 包被液为 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液 :1.59g Na₂CO₃, 2.93g NaHCO₃, 加蒸馏水定容至 1000mL ;

[0019] 浓缩洗涤液为 0.05%吐温-20 的 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液 :8.0g NaCl, 0.2g KCl, 2.9gNa₂HP04 · 12H₂O, 0.2g KH₂P04, 0.5mL 吐温-20, 加蒸馏水至 100mL ;

[0020] 封闭液 :鸡卵清白蛋白 1g, 将该鸡卵清白蛋白溶于 100mLpH7.4 磷酸缓冲液中 ;

[0021] 底物缓冲液 :4.91g 柠檬酸 · H₂O, 19.38g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 加三蒸水至 1000mL ;

[0022] 底物 A 储存液 :100mg 四甲基联苯胺, 50mL 无水乙醇 ;

[0023] 底物 B 储存液 :75mg 过氧化氢脲, 10mL 三蒸水 ;

[0024] 底物显色液 (10mL) :9.5mL 底物缓冲液, 32 μ L 底物 B 储存液, 0.5mL 底物 A 储存液 ;

[0025] 终止液 :2mol/L H₂SO₄ 溶液。

[0026] 其中多西环素标准品 (3) 的浓度分别为 0 μ g/L、2.5 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、40 μ g/L 和 80 μ g/L (分 7 瓶分装, 以建立多西环素残留 ELISA 检测方法的标准曲线)。

附图说明

[0027] 图 1 :本发明免疫原合成路线图 ;

[0028] 图 2 :本发明免疫原紫外扫描图 ;

[0029] 图 3 :本发明包被原合成路线图 ;

[0030] 图 4 :本发明多西环素 ELISA 试剂盒检测的标准曲线图。

具体实施方式

[0031] 下面通过实施例对本发明作进一步说明, 但不限制本发明。

[0032] 实施例 1 抗原制备

[0033] 1.1 免疫原的合成

[0034] 本发明免疫原 (DOX-PABA-BSA) 合成按照附图 1 所示技术合成路线。具体方法

为：称取对氨基苯甲酸 27.4mg (0.2mmol) 溶于 4mL 1mol/L 的 HCl 中。在冰水浴中，边搅拌边逐滴加入现配的 1mol/L NaNO_2 0.4mL, 4℃ 避光反应 10min, 边反应边搅拌；取少量与苯胺反应，若反应体系变成深黄色，表明重氮化反应成功，得溶液 A，备用。称取多西环素 0.088g (0.2mmol)，溶解在 3mL 三蒸水中，将 A 液逐滴加入多西环素溶液中，调节 PH 8-9，磁力搅拌反应 2h，离心取上清液，加入三丁胺 6.8uL 到反应液中，混合后再加氯甲酸异丁酯 3.8uL，于 4℃ 磁力搅拌反应 25min，得 B 液。称取 340mg BSA (5×10^{-6} mol) 先溶于 5mLPBS，在冰水浴且磁力搅拌下加入 5mL 的 DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 溶液，得 C 液。在磁力搅拌下将 B 溶液加入到 C 液中，置 4℃ 冰箱反应过夜，离心去沉淀，取上清液用 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 3 天，冻干，于 -20℃ 保存备用。其紫外图谱如图 2 所示。

[0035] 1.2 包被原合成

[0036] 本发明包被原 (DOX-OVA) 合成按照附图 3 所示技术合成路线。准确称取多西环素 0.088g (0.2mmol) 溶解在 3mL 超纯水中，然后将 4mL 溴水碱液加入多西环素溶液中，加热反应 2h, 4℃ 预冷。在 4℃ 避光条件下向上述反应体系中缓慢滴加 1mol/L 的盐酸 0.6mL (调 pH 至 2)，在冰水浴中，边搅拌边逐滴加入现配的 1mol/L NaNO_2 0.3mL，加完后置于 4℃ 冰箱阴暗处孵育 6h。按照 20 : 1 摩尔比，将 220mg OVA (5×10^{-6} mol) 溶于 5mLPBS，将偶氮化 DOX 慢慢滴入 OVA 溶液中，加完后在 4℃ 冰箱阴暗处孵育过夜。离心除去沉淀，取上清液用磷酸缓冲液 (PBS) 透析 3d，每 6h 更换透析液，将所得产物低压冻干，于 -20℃ 保存备用。

[0037] 实施例 2 兔抗多克隆抗体制备

[0038] 2.1 动物免疫

[0039] 将新西兰大白兔用免疫原 (DOX-PABA-BSA) 进行免疫。基础免疫时将免疫原用灭菌 PBS 溶解稀释，加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化，注射时采用颈背部多点皮下注射，加强免疫方法同基础免疫，佐剂为不完全佐剂。从第 3 次加强免疫开始，免疫后第 8d，耳静脉采血测定抗体效价和特异性。达到一定效价后，采心脏全血，分离抗血清（先于室温静置 1h，再置于 4℃ 冰箱数小时后，4000r/min 冷冻离心 10min）。经饱和硫酸铵分级沉淀得到纯化后的抗 DOX 多克隆抗体。

[0040] 2.2 DOXpAb 的纯化

[0041] 按照常规方法，取步骤 2.1 制备的兔抗血清，5000r/min 4℃ 离心 30min；取上清液加入等量 PBS，对 0.01mol/L pH 5.4PB 液透析 24h 沉淀优球蛋白，3000r/min 4℃ 离心 30min；取上清加入浓度为 50% 的 SAS，37℃ 搅拌下作用 2h，3000r/min 离心 30min，弃去上清液；沉淀用双蒸水溶解，加入浓度为 35% 的饱和硫酸铵 (SAS)，37℃ 搅拌下作用 2h，3000r/min 离心 30min；沉淀用双蒸水溶解，再加入浓度为 33% 的 SAS，使终浓度达 33%，37℃ 搅拌下作用 2h，3000r/min 离心 30min，弃去上清；加入与原血清量等体积的双蒸水溶解沉淀，4℃ 对 PBS 透析 72h，期间换液 4 ~ 6 次；收集透析后的蛋白液即为 DOX pAb，测定蛋白含量后分装 -20℃ 保存备用。

[0042] 实施例 3 间接 ELISA 方法建立

[0043] 3.1 包被浓度和抗体效价试验

[0044] 采用方正滴定初步得到包被浓度和相应抗体效价作为建立方法工作浓度。根据 ELISA 方法建立确定的最佳包被原包被浓度为 0.8ug/ml，抗体效价为 1 : 32000。

[0045] 3.2 标准曲线的建立和最低检测线

[0046] 准确量取 DOX 适量标准品储备液,将 DOX 用 PBS 释成 0、2.5、5、10、20、40 和 80 $\mu\text{g/L}$ 系列浓度,每个实验重复 5 孔,用间接竞争 ELISA 测定 DOX mAb 对不同浓度 DOX 标准品的抑制吸光值,重复测定 3 次。所获得的标准品吸光值的平均值除以 B0 标准的吸光值(抑制率),以 DOX 溶液浓度的对数为横坐标,以抑制率为纵坐标,绘制标准曲线,建立回归方程,计算 IC_{50} 值(抑制率为 50% 所对应药物浓度)。本试剂盒 IC_{50} 值为:10.65 $\mu\text{g/L}$ 。

[0047] 标准曲线最低检测限:制作标准曲线,测定 20 个 0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液,计算 OD 值的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD),根据最低检测限公式 $B=\bar{X}-3SD$ 计算抑制率 B/B_0 ,在标准曲线上查出 B/B_0 所对应的浓度,即为标准品最低检测限,结果见表 1。最低检测线 (LOD) 为 1.79 $\mu\text{g/L}$,检测范围为 1.79 ~ 80.0 $\mu\text{g/L}$ 。

[0048] 表 1 标准曲线的最低检测限测定

[0049]

DOX 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	OD 值 (n=5)					平均 OD 值	B/B_0
80	0.131	0.134	0.137	0.131	0.144	0.135	11.51
40	0.304	0.315	0.301	0.303	0.314	0.307	26.17
20	0.437	0.434	0.442	0.425	0.419	0.431	36.74
10	0.589	0.583	0.571	0.596	0.604	0.589	50.12
5	0.774	0.769	0.772	0.791	0.789	0.779	65.73
2.5	0.912	0.903	0.906	0.907	0.914	0.908	77.32
	1.272	1.179	1.166	1.174	1.014		
0	1.185	1.158	1.176	1.258	1.192		
(n=20)	1.176	1.071	1.298	1.187	1.189	1.173	1
	1.174	1.176	1.105	1.133	1.176		

[0050] 3.3 抗体特异性

[0051] 采用间接竞争 ELISA 程序进行检测,测定各抑制物的 IC_{50} 值,计算交叉反应率 (CR%),以交叉反应率为指标判定抗体特异性。交叉反应结果见表 2。结果表明,随着 DOX 药物浓度的增加,抑制率明显下降,药物浓度在 2.5 ~ 80 $\mu\text{g/L}$,抑制率由 77.32% 下降至 11.51%, IC_{50} 为 10.65 $\mu\text{g/L}$;间接竞争 ELISA 对四环素类药物在系列浓度 (10、25、50、100、250、500、1000 $\mu\text{g/L}$) 有较低交叉反应,交叉反应结果为:OTC 为 5.07%、TC 为 2.34%、CTC 为 1.46%、EM 小于 0.1%。

[0052] 表 2 本发明抗体特异性

[0053]

抑制物	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 CR (%)
多西环素(DOX)	10.65	100
四环素(TC)	455.11	2.34
土霉素(OTC)	210.26	5.07
金霉素(CTC)	731.27	1.46
红霉素(EM)	>10,000	<0.1

[0054] 实施例 4 样品处理方法

[0055] 样品处理方法:选取任何不含抗菌药物的健康的可食性动物组织,将经筛选后的空白组织剪碎,用匀浆机 4000r/min 均质 5min,称取组织均质物 1.0g 于 50mL 离心管中,加入 3%三氯乙酸(肉 4mL,肝 9ml),旋涡混匀,颠倒振荡 20min,室温 10000rpm 离心 10min。取上清液 200 μL 于 1.5mL 离心管中,加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 20 μL,旋涡混匀,加入样品缓冲液(肉 180 μL,肝 380 μL)混匀,以 10000r/min 离心 5min,上清液作为试样溶液。肌肉稀释因子为 10,肝脏稀释因子为 30。

[0056] 实施例 5 本发明试剂盒在动物可食性组织检测线、精密度、准确性、重复性

[0057] 5.1 本发明试剂盒组织最低检测限

[0058] 组织最低检测限(LOD)计算方法为:用间接竞争 ELISA 检测方法,制作 ELISA 标准曲线。分别测定 20 份空白组织(猪肌肉和肝脏)的 OD_{450nm} 值,计算 OD 值的平均值(\bar{X})和标准差(SD),根据最低检测限公式 $B = \bar{X} - 3SD$ 计算抑制率 B/B₀,在标准曲线上查出 B/B₀ 所对应的浓度,即为标准品最低检测限,结果见表 3。DOX 在鱼肉、猪肌肉和猪肝脏中的最低检测限 LOD 分别为 2.65ug/kg、2.96ug/kg、2.55ug/kg。

[0059] 表 3 空白组织测定结果及最低检测限 (n = 20)

[0060]

样品	空白组织测定值 (B/B ₀ %)										标准差	$\bar{X} -$	检测限 (ng/g)
											SD	3SD	
肌肉	100.77	108.05	102.43	82.045	100.22	102.28	102.20	102.12	97.22	94.22	5.86	82.41	2.65
	102.04	100.7	101.33	92.16	95.16	103.62	109.63	102.20	101.41	100.14			
肝脏	104.73	106.04	106.78	95.10	101.27	102.59	104.97	101.52	99.22	107.69	5.64	83.06	2.96
	97.65	99.79	93.62	91.155	92.31	103.74	104.81	91.24	103.91	91.81			
鱼肉	97.43	95.46	101.77	99.64	101.61	98.93	109.51	101.61	97.27	100.98	5.62	83.14	2.55
	99.32	95.22	107.78	84.40	97.19	107.86	100.51	99.17	107.54	96.79			

[0061] 5.2 本发明试剂盒精密度试验

[0062] 将 DOX 标准品稀释成 0、2.5、5、10、20、40 和 80 μg/L 系列浓度,每个标准品溶液重复 3 孔测试,在不同酶标板之见重复 5 次测试,按照 2.2.1.4 标准曲线建立的方法,计算板内系数和板间变异系数(CV),以板内变异系数和板间变异系数来评价 ELISA 方法的精密度。结果见表 4。结果表明,所建立的 ELISA 方法重复性好,板内和板间变异系数均 < 15%。

[0063] 表 4 标准曲线的板内板间误差

[0064]

DOX 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $\mu\text{g/L}$)	板内变异系数 (CV %, n=3)	平均测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $\mu\text{g/L}$)	板间变异系数 (CV %, n=5)
80	78.52 \pm 1.62	2.06	77.54 \pm 1.23	1.59
	78.16 \pm 3.87	4.95		
	76.77 \pm 1.83	2.38		
	78.52 \pm 3.27	4.16		
40	75.75 \pm 2.55	3.37	37.47 \pm 0.87	2.32
	37.80 \pm 1.23	3.24		
	37.96 \pm 1.56	4.11		
	38.13 \pm 1.11	2.91		
	35.98 \pm 2.20	6.11		
	37.46 \pm 1.14	3.04		
20	19.90 \pm 0.75	3.76	18.80 \pm 0.67	3.56
	18.36 \pm 0.65	3.55		
	18.86 \pm 0.82	4.32		
	18.19 \pm 0.81	4.46		
	18.69 \pm 0.71	3.08		
10	9.24 \pm 0.42	4.54	9.20 \pm 0.90	9.75
	9.32 \pm 0.36	3.88		
	8.04 \pm 0.36	4.45		
	8.88 \pm 0.35	3.99		
	10.52 \pm 1.11	10.50		
5	4.59 \pm 0.19	4.04	4.34 \pm 0.33	7.75
	3.80 \pm 0.16	4.45		
	4.61 \pm 0.18	2.79		
	4.47 \pm 0.22	3.60		
	4.24 \pm 0.23	2.85		
2.5	2.47 \pm 0.17	4.72	2.41 \pm 0.21	8.51
	2.51 \pm 0.07	2.69		
	2.46 \pm 0.18	7.36		
	2.05 \pm 0.22	10.76		
	2.57 \pm 0.23	8.90		

[0065]

[0066] 5.3 本发明试剂盒组织添加准确性和重复性

[0067] 根据中华人民共和国农业部第 235 号公报 (www.agri.gov.cn), 多西环素在动物性食品中的最高残留限量: 在所有食品动物的肌肉中为 100 $\mu\text{g/kg}$, 肝脏中为 300 $\mu\text{g/kg}$,

肾脏中为 $600 \mu\text{g}/\text{kg}$;在猪、羊奶中为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$;在禽蛋中为 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$;在鱼 / 虾肉中为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。按此规定,根据农业部文件(农医发【2005】17号,参见:www.agri.gov.cn),将 $1\text{mg}/\text{mL}$ DOX 标准品稀释成适当浓度,取空白组织,准确量取 DOX 适量标准品储备液添加到组织(猪肉、鱼肉和猪肝等组织)中,使其终浓度为 $0.5\times\text{MRL}$ 、 MRL 、 $2\times\text{MRL}$ (即:猪肝为 600 、 300 、 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$,猪肉和鱼肉为 200 、 100 、 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$)。然后进行样品处理,采用间接竞争 ELISA 测定样品中 DOX 浓度。同一天内每一浓度重复 5 个样,每种样品重复 3 天。计算回收率,并计算日间平均回收率和批间变异系数。结果见表 5。由批内批间误差和回收率的结果看,本发明试剂盒的重复性、精确度、准确度是比较好。

[0068] 表 5 多西环素在可食性动物组织中添加回收率及变异系数

[0069]

样品	DOX 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%, ($\bar{X} \pm \text{SD}$))	批内变异系数 (CV %, $n=5$)	平均回收率 (%, ($\bar{X} \pm \text{SD}$))	批间变异系数 (CV%, $n=3$)
猪肝脏	150	86.58 \pm 6.50	7.50	85.54 \pm 7.65	8.93
		92.61 \pm 4.37	4.72		
		77.43 \pm 9.16	11.84		
	300	78.06 \pm 10.28	13.17	84.83 \pm 7.30	8.61
		92.56 \pm 3.66	3.96		
		83.86 \pm 4.33	5.16		
	600	85.45 \pm 10.02	11.73	84.61 \pm 7.91	9.35
		92.07 \pm 5.99	6.50		
		76.31 \pm 4.88	6.40		
猪肉	50	79.36 \pm 4.28	5.39	88.24 \pm 7.84	8.88
		94.22 \pm 4.22	4.48		
		91.13 \pm 7.19	7.89		
	100	78.42 \pm 7.10	9.05	89.19 \pm 9.36	10.50
		93.70 \pm 4.37	4.66		
		95.43 \pm 2.48	2.60		
	200	77.38 \pm 7.60	9.82	88.72 \pm 10.09	11.38
		92.07 \pm 3.47	3.77		
		96.71 \pm 4.36	4.51		
鱼肉	50	81.20 \pm 5.06	6.23	88.40 \pm 7.56	8.55
		87.74 \pm 7.20	8.21		
		96.27 \pm 9.64	10.01		
	100	84.67 \pm 7.05	8.32	84.83 \pm 8.37	9.86
		93.27 \pm 5.00	5.36		
		76.54 \pm 5.72	7.48		
	200	83.25 \pm 9.02	10.84	89.35 \pm 8.08	9.05
		98.52 \pm 6.81	6.91		
		86.28 \pm 4.13	4.78		

[0070] 实施例 6 ELISA 试剂盒制备

[0071] 6.1 ELISA 试剂盒组成

[0072] (1) 96 孔酶标板, 包被有 DOX-OVA ;

[0073] (2) DOX 标准液 7 瓶, 浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40 和 80 $\mu\text{g}/\text{L}$, 0.5mL/ 瓶 \times 7 瓶

[0074] (3) DOX 抗体液, 0.2mL/ 瓶 \times 1 瓶 ;

[0075] (4) 酶标二抗, 0.4mL/ 瓶 \times 1 瓶 ;

[0076] (5) 洗涤液 (10 \times 浓缩), 50mL/ 瓶 \times 1 瓶 ;

[0077] (6) 磷酸盐缓冲液 (10 \times 浓缩), 50mL/ 瓶 \times 1 瓶 ;

- [0078] (7) 底物液 A(TMB, 10mg/mL), 1.2mL/瓶 ×1 瓶;
- [0079] (8) 底物液 B(过氧化氢脲, 0.75%), 0.2mL/瓶 ×1 瓶; 柠檬酸缓冲液, 15mL;
- [0080] (8) 终止液, 15mL/瓶 ×1 瓶; 三氯乙酸(10%), 15mL/瓶 ×1 瓶;
- [0081] (9) 氢氧化钠溶液(5mol/L), 5mL/瓶 ×1 瓶;
- [0082] (10) 3%三氯乙酸(50×浓缩), 40mL/瓶 ×1 组成。
- [0083] 6.2 所用试剂配制
- [0084] (1). 包被液: 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液(1.59g Na₂CO₃, 2.93g NaHCO₃, 加蒸馏水定容至 1000mL);
- [0085] (2) 浓缩洗涤液: 含 0.05%吐温-20 的 0.01M pH7.4PBS(8.0g NaCl, 0.2g KCl, 2.9g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2g KH₂PO₄, 0.5mL 吐温-20, 加蒸馏水至 100mL);
- [0086] (3). 封闭液: 1g OVA, 溶于 100mL pH7.4PBS;
- [0087] (4). 底物缓冲液: 4.91g 柠檬酸·H₂O, 19.38g Na₂HPO₄·12H₂O, 加三蒸水至 1000mL;
- [0088] (5). (5) 底物 A 储存液: 100mg 四甲基联苯胺(TMB), 50mL 无水乙醇, 避光, 4℃保存;
- [0088] (6). 底物 B 储存液: 75mg 过氧化氢脲, 10mL 三蒸水, 4℃避光保存。
- [0089] (7). 底物显色液(10mL): 9.5mL 底物缓冲液, 32μL 底物 B 储存液, 0.5mL 底物 A 储存液, 混匀即可, 现配现用。
- [0090] (8). 终止液(2mol/L H₂SO₄): 量取浓 H₂SO₄ 55.5mL, 加入到 400mL 蒸馏水中, 冷却后, 定容至 500mL。
- [0091] (9) 浓缩样品稀释液: 0.01M pH7.4PBS(8.0g NaCl, 0.2g KCl, 2.9g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2g KH₂PO₄, 加蒸馏水至 100mL)。
- [0092] 6.3 酶标板制备
- [0093] 将包被原 DOX-OVA 用包被液稀释为 1μg/mL, 每孔加 100μL, 4℃过夜, 倾去孔内包被液, 用洗涤液洗 3 次, 拍干, 然后用封闭液封闭, 37℃孵育 1 小时, 倾去孔内封闭液, 洗涤液洗涤 3 次, 拍干, 用铝膜真空封闭保存、备用。
- [0094] 实施例 7 本试剂盒检测程序
- [0095] 7.1 工作液配制
- [0096] 样品稀释液: 根据将试剂盒中提供的磷酸盐缓冲液用三蒸水 10 倍稀释。
- [0097] DOX 系列浓度标准溶液: 取 DOX 标准母液(1mg/mL) 80μL 加入到样品稀释液 1mL 中, 即得 80μg/L 的标准溶液; 然后倍比稀释, 配制 40μg/L、20μg/L、10μg/L、5、2.5μg/L、0μg/L 的标准溶液。
- [0098] DOX 抗体工作液: 根据每次所需用量, 将 DOX 抗体液用稀释后的磷酸盐缓冲液 200 倍稀释后使用。
- [0099] 酶标二抗工作液: 根据每次所需用量, 酶标二抗用稀释后的磷酸盐缓冲液 100 倍稀释后使用。
- [0100] 洗涤液: 将试剂盒中提供的洗涤液用三蒸水 10 倍稀释后使用。
- [0101] 底物混合液: 取底物液 A 0.5mL, 底物液 B 32μL, 三蒸水 4.5mL, 柠檬酸缓冲液 5mL 混匀, 现配现用。
- [0102] 7.2 ELISA 操作步骤
- [0103] 剪开密封袋, 取出酶标板回温至室温 10min。每孔加 230μL 洗涤液洗 2 次, 拍干。加

入各浓度的 DOX 标准品或处理好的样品液 50 μ L 到各自微孔中,每个标准品和样品必须使用新的枪头。加 DOX 抗体:加入 DOX 抗体工作液 50 μ L 到每一个微孔中充分混合,枪头不要接触到孔的液体,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30min 后,倒出孔中的反应液,洗涤液洗涤 3 次并拍干。加酶标二抗:每孔加入酶标二抗工作液 100 μ L 到每一微孔中充分混合,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 40min,倒出孔中的液体,洗涤 3 次并拍干。加底物:每孔中加入底物混合液 100 μ L,充分混合后,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 15 ~ 20min。终止:每孔中加入终止液 50 μ L。测定:加入终止液后 30min 内,在 450nm 处测量光密度 (OD) 值。从标准曲线计算样品中的 DOX 含量。

[0104] 7.3 结果判定

[0105] 所获得的标准品的吸光度值 (B) 除以“0”标准的吸光值 (B_0),即为抑制率 (B/B_0)。以 DOX 浓度的对数为横坐标,抑制率为纵坐标作标准曲线,进行线性回归,给出回归方程,曲线在 2.5 μ g/L ~ 80 μ g/L 范围内趋近直线。相对应每个样品浓度可以从标准曲线读出。

[0106] 实施例 8 本发明试剂盒考核

[0107] 本发明试剂盒与 HPLC 方法进行比较,结果见表 6。结果表明 ELISA 和 HPLC 具有较好的相关性。

[0108] 表 6 ELISA 和 HPLC 测定 DOX 添加回收率和变异系数比较

[0109]

样品	DOX 添加量 (μ g/kg)	ELISA 方法		HPLC 方法	
		回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数 (CVs %, n=5)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数 (CVs %, n=5)
猪肝	300	78.06 \pm 10.28	13.17	75.38 \pm 6.35	8.42
		92.56 \pm 3.66	3.96	87.34 \pm 5.43	6.22
		83.86 \pm 4.33	5.16	80.64 \pm 7.82	9.70
猪肉	100	78.42 \pm 7.10	9.05	76.23 \pm 4.36	5.72
		93.70 \pm 4.37	4.66	86.86 \pm 3.21	3.70
		95.43 \pm 2.48	2.60	87.27 \pm 4.52	5.18
鱼肉	100	84.67 \pm 7.05	8.32	81.68 \pm 3.74	4.58
		93.27 \pm 5.00	5.36	90.42 \pm 5.38	5.95
		76.54 \pm 5.72	7.48	78.76 \pm 3.86	4.90

[0110] 实施例 8 本发明试剂盒的应用

[0111] 选择 12 头 15Kg 左右的长大二元杂交去势健康仔猪,随机分为 6 组,第一组为对照组,其它 5 组为试验组。试验前隔离预饲 7 天,饲喂不含其他任何抗菌物质的饲料,自由饮水。对照组饲喂不含任何抗菌药物的饲料,试验组以 2.5mg/kg 体重剂量的多西环素注射液在仔猪颈部肌内注射,一日 1 次,连用 4 天。停药后 0d、3d、6d、10d、16d 分别屠宰试验组猪 2 头,对照组分别在停药 0d、10d 屠宰 1 头,采肌肉和肝脏,同时用 ELISA 法和 HPLC 法测定,其中 ELISA 检测值在肝脏、肌肉最低检测线以下时作为未检出处理。测定结果 (见表 7) 显示

停药 0d 肝脏和肌肉中的 DOX 残留量最高, 停药 3d 残留量急剧下降, 停药 16d 则检测不出。两种方法测定结果都能反映出 DOX 在动物组织中的残留量随时间的延长逐渐降低; 相关性分析结果表明 ELISA 和 HPLC 方法对于实际样品猪肝脏和肌肉中 DOX 的检出量具有较好的相关性, 相关系数分别为 $R^2 = 0.999$, 符合残留酶联免疫分析要求。本发明 ELISA 试剂盒具有高的灵敏度, 可用于定量检测动物性食品中的 DOX 残留。

[0112] 表 7 本发明试剂盒与 HPLC 检测注射用药后各组织中的 DOX 残留量比较
[0113]

停药时间 (d)	组织	试剂盒测定值 ($\bar{X} \pm SD$, n=5, $\mu\text{g}/\text{kg}$)		HPLC 测定值 ($\bar{X} \pm SD$, n=5, $\mu\text{g}/\text{kg}$)	
		猪 1	猪 2	猪 1	猪 2
		0	肌肉	1306.7 \pm 133.31	1309.32 \pm 123.87
	肝脏	4303.22 \pm 419.17	5317.18 \pm 474.60	4211.14 \pm 292.05	5211.86 \pm 258.49
3	肌肉	265.58 \pm 33.83	321.54 \pm 35.62	241.10 \pm 21.81	302.86 \pm 24.98
	肝脏	751.24 \pm 77.13	821.08 \pm 77.46	754.88 \pm 38.50	793.96 \pm 59.14
6	肌肉	219.38 \pm 30.99	257.1 \pm 28.29	205.12 \pm 19.28	248.32 \pm 28.53
	肝脏	453.78 \pm 67.54	532.04 \pm 55.47	480.96 \pm 57.40	512.36 \pm 38.01
10	肌肉	115.2 \pm 16.41	164.46 \pm 15.15	116.24 \pm 12.49	152.08 \pm 16.38
	肝脏	442.28 \pm 57.36	501.22 \pm 50.82	422.36 \pm 45.80	476.18 \pm 38.38
16	肌肉	71.50 \pm 10.81	77.92 \pm 8.34	66.88 \pm 7.28	75.46 \pm 7.34
	肝脏	67.70 \pm 9.27	75.06 \pm 8.13	65.06 \pm 5.04	73.16 \pm 5.68
空白对照	肌肉	ND	ND	ND	ND
	肝脏	ND	ND	ND	ND

[0114] 注: (“ND”为未检出药物)。

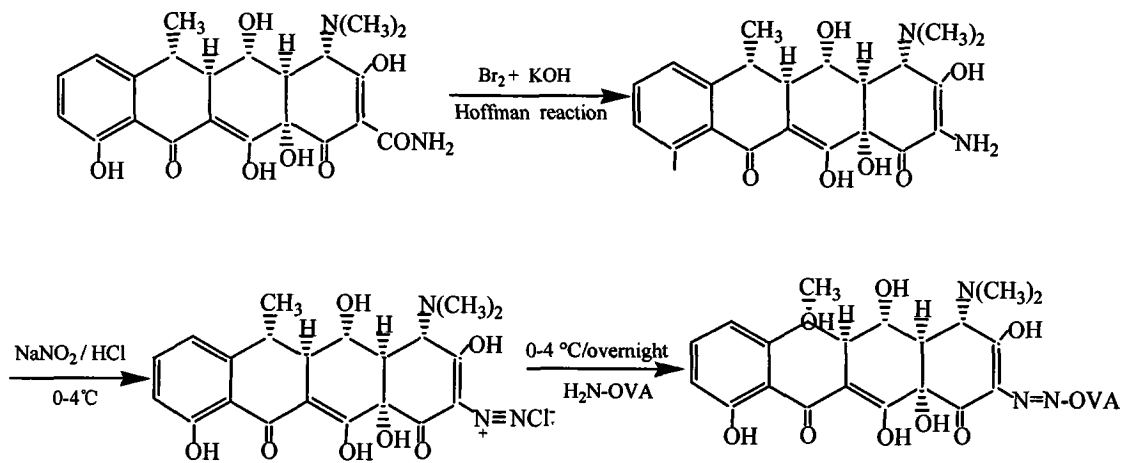


图 3

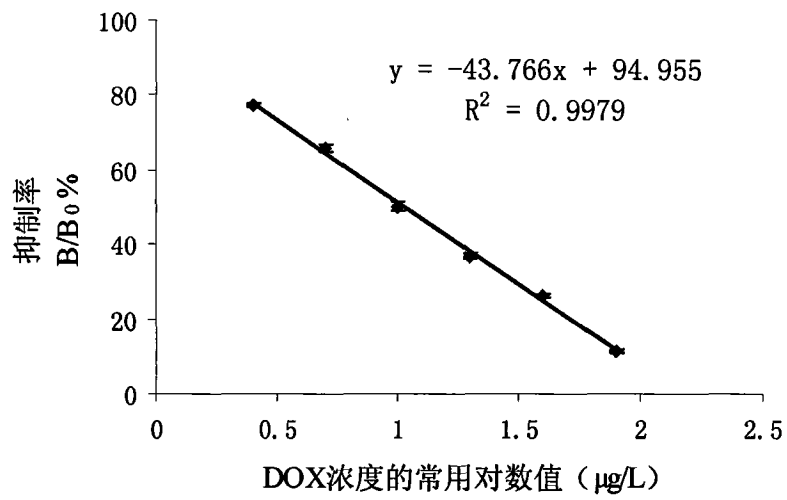


图 4

专利名称(译)	多西环素残留的ELISA检测方法及其试剂盒与应用		
公开(公告)号	CN101639477B	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN200910063662.2	申请日	2009-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	毕丁仁 乐涛 王喜亮 石德时 郭延成 巴巴卡 肖运才 沈亚安 李自力		
发明人	毕丁仁 乐涛 王喜亮 石德时 郭延成 巴巴卡 肖运才 沈亚安 李自力		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K14/765 C07K1/113 C07K16/44		
代理人(译)	王敏锋		
审查员(译)	孙谦		
其他公开文献	CN101639477A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析技术领域。具体涉及一种用于多西环素(DOX)残留检测的酶联免疫方法及试剂盒。本发明的方法主要包括免疫原、包被原、抗体的制备以及样品前处理和ELISA检测方法的建立。本发明的试剂盒主要由抗DOX特异性抗体，DOX标准品、包被有DOX-OVA偶联物的酶标板组成。本发明的试剂盒和方法具有简便、快速、灵敏、准确等优点，适用于动物可食性组织中DOX残留的检测。

DOX 浓度 (μg/L)	OD 值 (n=5)					平均 OD 值	B/B ₀
80	0.131	0.134	0.137	0.131	0.144	0.135	11.51
40	0.304	0.315	0.301	0.303	0.314	0.307	26.17
20	0.437	0.434	0.442	0.425	0.419	0.431	36.74
10	0.589	0.583	0.571	0.596	0.604	0.589	50.12
5	0.774	0.769	0.772	0.791	0.789	0.779	65.73
2.5	0.912	0.903	0.906	0.907	0.914	0.908	77.32
0 (n=20)	1.272	1.179	1.166	1.174	1.014	1.173	1
	1.185	1.158	1.176	1.258	1.192		
	1.176	1.071	1.298	1.187	1.189		
	1.174	1.176	1.105	1.133	1.176		