



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104374910 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 25

(21) 申请号 201410660354. 9

(22) 申请日 2014. 11. 19

(71) 申请人 无锡中德伯尔生物技术有限公司
地址 214174 江苏省无锡市惠山区惠山经济
开发区惠山大道 1608 号 1301-1310

(72) 发明人 徐波 周丽 李艳 张勇攀
梁如中 卞禹卜

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332
代理人 巩克栋 杨晞

(51) Int. Cl.
G01N 33/558(2006. 01)
G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒及
检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒,该试剂盒由胶体金检测卡(含酶标孔)和前处理试剂组装而成,所述的检测卡在现有的免疫竞争法胶体金卡基础上进行改进,将硝基呋喃类药物单克隆抗体胶体金标记物直接冻干在酶标孔中,提高了灵敏度、稳定性和适用范围;该试剂盒可用于硝基呋喃类药物例如呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物或呋喃西林代谢物的快速检测,适用于鱼、虾等水产品,鸡肉、猪肉等畜禽产品。本发明简化了样本前处理方法,省去了传统方法中萃取和复溶的步骤,大大缩短了检测时间,并可根据不同需求同时检测一种或多种药物。



1. 一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒,包括检测卡和试剂,其特征在于,所述检测卡的酶标孔中含有冻干的硝基呋喃类药物代谢物的单克隆抗体胶体金标记物。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的硝基呋喃类药物代谢物为呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物或呋喃西林代谢物中的任意一种或至少两种的混合物。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂包括1M盐酸、衍生化试剂、提取剂和1M氢氧化钠。

4. 如权利要求1-3任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述检测卡为胶体金试纸条。

5. 一种硝基呋喃类药物代谢物的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 前处理待测样品;

(2) 用权利要求1-4任一项所述的试剂盒检测样品;

(3) 分析检测结果。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

(1) 取一定的动物组织去除脂肪后,用剪刀剪碎或者用绞肉机搅碎;

(2) 取1-3g待测样品于50mL离心管中,依次加入3-5mL去离子水,0.3-0.6mL 1M盐酸,0.1-0.3mL衍生化试剂,震荡混匀3-5min,55-60℃水浴条件下孵育30min;

(3) 取出后,依次加入3-6mL提取剂,0.3-0.5mL 1M氢氧化钠,震荡混匀1-3min;4000转离心2-10min,取上层清液待测;

(4) 吸取50-150 μ L待测液于酶标孔中,反复吹打至孔内红色物质完全溶解,等待反应2-6min,吸取孔内所有溶液滴加到检测卡的加样孔中,加样后开始计时,反应5-8min判读结果。

7. 如权利要求5或6所述的方法,其特征在于,所述的硝基呋喃类药物代谢物为呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物或呋喃西林代谢物中的任意一种或至少两种的混合物。

一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种药物代谢物的检测试剂盒及检测方法,尤其涉及一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 硝基呋喃类药物是一种常见的合成抗生素,因其极好的抗菌性和药物动力学特性,常被用于动物饲养、流通等环节。这类物质也常被当作催长剂或肥育剂用于猪、家禽和鱼类的饲养中。长期的动物实验显示,硝基呋喃类药物及其代谢产物均具有致癌性和致诱变性。因此,硝基呋喃类物质被禁止在食用性饲养动物上使用。自 1993 年起,欧盟范围内便禁止在动物饲养中使用硝基呋喃类药物盐酸呋喃它酮、呋喃妥因和呋喃西林,而呋喃唑酮也从 1995 年起被禁用。

[0003] 对硝基呋喃类药物的检测须建立在对其系列代谢产物的检测的基础之上。在施用了硝基呋喃类药物短时间后便很难检测到其原药的存在,因为它很快地被代谢掉了。而其系列代谢产物则在用药后的很长时间都能被发现和被检测到。所以,这些代谢物被作为滥用硝基呋喃类药物的检测目标物。在摄入了呋喃唑酮(代谢物为 AOZ :3-氨基-2-唑烷基酮),盐酸呋喃它酮(代谢物为 AMOZ :5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮),呋喃妥因(代谢物为 AHD :1-氨基-2-内酰胺)和呋喃西林(代谢物为 SEM :氨基脲)后均可检出其硝基呋喃类系列代谢物。

[0004] 目前硝基呋喃类药物代谢物的测定方法主要有液相色谱/紫外(LC/UV)分析和液相色谱/质谱联用分析法、液相色谱串联质谱法,但这些方法所需仪器价格昂贵,实验过程繁琐,不适用于现场快速检测。目前,在药物残留快速检测中得到广泛应用的有微生物法和酶联免疫法,但是,微生物方法在灵敏度上常常达不到要求,酶联免疫法对于操作人员技术要求较高。

[0005] 因此,寻找一种具有灵敏度高、稳定性好和适用范围广的检测方法是目前硝基呋喃类药物代谢物检测中亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种药物代谢物的检测试剂盒及检测方法,特别是一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒及检测方法。

[0007] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供了一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒,包括检测卡和试剂,所述检测卡的酶标孔中含有冻干的硝基呋喃类药物代谢物的单克隆抗体胶体金标记物。

[0009] 本发明是在现有的免疫竞争法胶体金卡基础上进行的改进,将硝基呋喃类药物单克隆抗体胶体金标记物直接冻干在酶标孔中,提高了灵敏度、稳定性和适用范围。

[0010] 本发明中,所述的硝基呋喃类药物代谢物为呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃它酮代谢

物 (AMOZ)、呋喃妥因代谢物 (AHD) 或呋喃西林代谢物 (SEM) 中的任意一种或至少两种的混合物。

[0011] 本发明中,所述试剂包括 1M 盐酸、衍生化试剂、提取剂和 1M 氢氧化钠。

[0012] 本发明中,所述检测卡为胶体金试纸条。

[0013] 第二方面,本发明还提供了一种硝基呋喃类药物代谢物的检测方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 前处理待测样品;

[0015] (2) 用本发明第一方面所述的试剂盒检测样品;

[0016] (3) 分析检测结果。

[0017] 本发明的检测方法简化了样本前处理方法,省去了传统方法中的萃取和复溶步骤,大大缩短了检测时间,并可根据不同需求同时检测一种或多种药物。该方法灵活性高、操作简单、检测速度快、特异性高、准确性好、能够进行现场大量筛查。

[0018] 作为优选的具体实施方案,本发明中硝基呋喃类药物代谢物的检测方法具体包括以下步骤:

[0019] (1) 取一定的动物组织去除脂肪后,用剪刀剪碎或者用绞肉机搅碎;

[0020] (2) 取 1-3g 待测样品于 50mL 离心管中,依次加入 3-5mL 去离子水,0.3-0.6mL 1M 盐酸,0.1-0.3mL 衍生化试剂,震荡混匀 3-5min,55-60℃水浴条件下孵育 30min;

[0021] (3) 取出后,依次加入 3-6mL 提取剂,0.3-0.5mL 1M 氢氧化钠,震荡混匀 1-3min;4000 转离心 2-10min,取上层清液待测;

[0022] (4) 吸取 50-150 μ L 待测液于酶标孔中,反复吹打至孔内红色物质完全溶解,等待反应 2-6min,吸取孔内所有溶液滴加到检测卡的加样孔中,加样后开始计时,反应 5-8min 判读结果。

[0023] 作为进一步优选的具体实施方案,本发明中硝基呋喃类药物代谢物的检测方法具体包括以下步骤:

[0024] (1) 取一定的组织(鱼、虾、蟹、鸡肉、猪肉等)去除脂肪后,用剪刀剪碎或者用绞肉机搅碎,若不及时检测,分装保存于 -20℃;

[0025] (2) 取 2g 待测样品于 50mL 离心管中,依次加入 4mL 去离子水,0.4mL 1M 盐酸,0.2mL 衍生化试剂,震荡混匀 3min,60℃水浴条件下孵育 30min;

[0026] (3) 取出后,依次加入 5mL 提取剂,0.4mL 1M 氢氧化钠,震荡混匀 1min;4000 转离心 5min,取上层清液待测;

[0027] (4) 吸取 100 μ L 待测液于酶标孔中,反复吹打至孔内红色物质完全溶解,等待反应 5min,吸取孔内所有溶液滴加到检测卡的加样孔中,加样后开始计时,反应 5-8min 判读结果,其他时间判读无效。

[0028] 本发明的检测方法中,所述的硝基呋喃类药物代谢物为呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物或呋喃西林代谢物中的任意一种或至少两种的混合物。

[0029] 本发明的试剂盒及检测方法可广泛适用于鱼、虾等水产品 and 鸡肉、猪肉等畜禽产品。

[0030] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0031] (1) 本发明的试剂盒灵敏度高,稳定性强和适用范围广,该试剂盒可用于硝基呋喃

类药物例如呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物或呋喃西林代谢物的快速检测,适用于鱼、虾等水产品,鸡肉、猪肉等畜禽产品;利用该试剂盒进行检测时,对于所有样品,灵敏度均可达 1ppb;

[0032] (2) 本发明的试剂盒操作简单,读取结果时间短,该试剂盒无需另配其它试剂,样品无需无菌处理,按试剂盒说明在 5-8min 内即可判定检测结果;

[0033] (3) 本发明简化了样本前处理方法,省去了传统方法中萃取和复溶的步骤,大大缩短了检测时间,并可根据不同需求同时检测一种或多种药物;

[0034] (4) 本发明的试剂盒可批量检测,一步到位,成本低廉,投资少,见效快。

附图说明

[0035] 图 1 为本发明实施例 1 检测样品的结果判定示意组合图;

[0036] 其中,图 1a 表示检测结果为阴性,图 1b 表示检测结果为阳性,图 1c 表示检测结果失效。

具体实施方式

[0037] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0038] 实施例 1:检测卡的制备

[0039] 1. 抗原制备

[0040] 称取 40mg 呋喃唑酮代谢物(AOZ)溶于 16mL 无水乙醇,18mg HS 酶溶于 2mL 甲苯,常温下磁力搅拌 2h,8000rpm,离心 15min,弃除上清,残留物用无水乙醇洗三次,烘干,得呋喃唑酮代谢物衍生物;用 2mL 水将衍生物溶解,加入活化剂 1EDC. HAOZ 114mg,活化剂 2NHS 34mg,室温活化 2h,即得呋喃唑酮代谢物活泼酯。按照 n(呋喃唑酮代谢物活泼酯产物):m(牛血清白蛋白)=60:1,合成检测抗原呋喃唑酮代谢物-牛血清白蛋白,用 0.01M PBS 缓冲液透析 3 天,采用 BCA 法测定蛋白浓度,采用紫外分光光度计法测定偶联比率;制备好的检测抗原,冷冻干燥后,于 -20℃ 保存。

[0041] 2. 抗原喷膜

[0042] 用纯水把偶联抗原稀释至 1mg/mL,二抗稀释至 1mg/mL,2h 内用完。喷膜选用参数为 0.74 μL/cm,气压为 8psi,喷完后于 37℃ 烘箱中干燥过夜,用塑料薄膜包好,放入干燥器中待用。

[0043] 3. 单克隆抗体的制备

[0044] 从液氮罐中取出呋喃唑酮代谢物 1G10-H5-C7 细胞株进行复苏,将呋喃唑酮代谢物 1G10-H5-C7 细胞培养至对数生长期,离心收集后用 RPMI 1640 将其重悬,腹腔注射入 BALB/C 小鼠体内(该小鼠已于一周前腹腔注射液体石蜡,0.5mL/只),剂量为 100 万细胞/0.5mL/只小鼠,各 5 只。7-10 天后小鼠腹腔胀大,收集其腹水。37℃,静置 30min。4℃,5000r/min 离心 15min,取中央透明层进行腹水纯化。纯化后腹水浓度测定:用紫外分光光度计测定蛋白质的含量。将得到的抗体加入等体积甘油后,分别贴上标签,-20℃ 保存备用。

[0045] 4. 胶体金的制备

[0046] 取 1980mL 超纯水,置于干净的 5L 玻璃反应器中,加入 20mL 1% H₂AuCl₄ 溶液(终

浓度 0.01%)。混匀,搭好回流装置。100℃水浴加热至 HAuCl_4 溶液沸腾(转速 160RPM,约 60min),调整转速至 270rpm 后,加入 17.6mL 1%柠檬酸三钠溶液。当溶液的颜色完全变为透明的红色时(约 2min),调整转速至 160rpm,温度调节至 80℃,继续回流约 30min 后停止加热。放入冰箱,冷藏保存,二周内用完。采用紫外可见分光光度计和电镜检测胶体金粒径大小,以监控胶体金的质量。

[0047] 5. 金标抗体的制备

[0048] 调节胶体金溶液 pH 值至 8.2,用恒速搅拌器均匀搅拌,同时按正交分析结果逐滴加入相应的单克隆抗体量,并加入其它保护剂,全部加完后,继续搅拌 15 分钟。加入 10% BSA 进行封闭,1000r/min 离心半小时除去杂质,6000r/min 离心半小时获得均一性金标抗体沉淀。再加入重悬液重悬,混匀后移至干净烧杯中备用。在 50 μL 的金标抗体中加入 PNPB 溶液 200 μL ,以超纯水为空白对照,扫描 400-700nm 之间的吸收值并精确测定 OD 值。

[0049] 6. 喷金操作

[0050] 室内相对湿度为低于 40%,气压为 8psi,将金标抗体加入酶标孔中,37℃烘箱中干燥 1.5 个小时,用塑料薄膜包好,放入干燥器中待用。

[0051] 7. 订购 NC 膜、样品垫、吸水纸等材料及相关试剂,并进行切割和干燥。

[0052] 8. 检测卡的组装小试

[0053] 按胶体金免疫层析快速检测卡结构图组装为卡,进行小试试验。小试试验的卡主要检测阴性显色强度,1 $\mu\text{g/L}$ A0Z 是否完全抑制。如有问题,需进一步调试至获得满意小试(主要调金标抗体量)结果后,再规模生产。

[0054] 9. 放大生产

[0055] 按照既定条件生产,在相对湿度 25% -35%,温度 20-25℃的条件下,进行装卡封袋工序,并按一定的比例进行抽检。

[0056] 10. 包装

[0057] 试剂盒组分:检测卡(含酶标孔)、1M 盐酸、衍生化试剂、提取剂、1M 氢氧化钠、一次性吸管。

[0058] 实施例 2:试剂盒的应用

[0059] 本发明的试剂盒可用于鱼、虾等水产品、鸡肉、猪肉等畜禽产品中四种药物的检测。以鱼肉中呋喃唑酮代谢物的检测为例,具体操作如下:

[0060] 取草鱼背部样本于绞肉机中绞碎,取 2g 样品于 50mL 离心管中,依次加入 4mL 去离子水,0.4mL 1M 盐酸,0.2mL 衍生化试剂,振荡混匀 3min,60℃下水浴孵育半小时;取出后,依次加入 5mL 提取剂,0.4mL 1M 氢氧化钠,1 瓶萃取剂,振荡混匀 1min,4000 转离心 5min,取上层清液待测,吸取 100 μL 待测液于酶标孔中,反复吹打至孔内红色物质完全溶解,等待反应 5min,吸取孔内所有溶液滴加到呋喃唑酮代谢物检测卡的加样孔中,加样后开始计时,反应 5min 后判读结果,结果检测线(T 线)比质控线(C 线)深,为阴性结果。

[0061] 通过上述实施例可以看出,本发明的试剂盒操作简单,读取结果时间短,该试剂盒无需另配其它试剂,样品无需无菌处理,按试剂盒说明在 5-8min 内即可判定检测结果;另外,本发明简化了样本前处理方法,省去了传统方法中萃取和复溶的步骤,大大缩短了检测时间,并可根据不同需求同时检测一种或多种药物,具有重要的应用价值。

[0062] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的工艺方法,但本发明并不局

限于上述工艺步骤,即不意味着本发明必须依赖上述工艺步骤才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

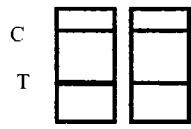


图1a

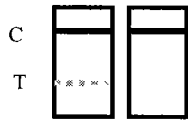


图1b

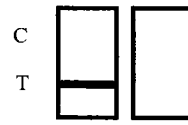


图1c

图 1

专利名称(译)	一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN104374910A	公开(公告)日	2015-02-25
申请号	CN201410660354.9	申请日	2014-11-19
[标]发明人	徐波 周丽 李艳 张勇攀 梁如中 卞禹卜		
发明人	徐波 周丽 李艳 张勇攀 梁如中 卞禹卜		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	杨晞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种硝基呋喃类药物代谢物的检测试剂盒，该试剂盒由胶体金检测卡(含酶标孔)和前处理试剂组装而成，所述的检测卡在现有的免疫竞争法胶体金卡基础上进行改进，将硝基呋喃类药物单克隆抗体胶体金标记物直接冻干在酶标孔中，提高了灵敏度、稳定性和适用范围；该试剂盒可用于硝基呋喃类药物例如呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃妥因代谢物或呋喃西林代谢物的快速检测，适用于鱼、虾等水产品，鸡肉、猪肉等畜禽产品。本发明简化了样本前处理方法，省去了传统方法中萃取和复溶的步骤，大大缩短了检测时间，并可根据不同需求同时检测一种或多种药物。

