

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510026487.1

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月22日

[11] 授权公告号 CN 100516880C

[22] 申请日 2005.6.6

[21] 申请号 200510026487.1

[73] 专利权人 台州金芯生物工程有限公司

地址 317602 浙江省玉环县珠港镇坎门里
澳中兴路

[72] 发明人 王华全 林荣业

[56] 参考文献

CN1415759A 2005.5.7

CN1588075A 2005.3.2

WO03048770A2 2003.6.1

US2004115728 A1 2004.6.17

审查员 王 奕

[74] 专利代理机构 台州市方圆专利事务所

代理人 张智平

权利要求书 3 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测农副产品、食品中兽药残留物的检测方法，属有毒物质检测的技术领域。本快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法包括以下步骤：将多种兽药偶联抗原按照微阵列点在固相载体上并对其进行包被；其中固相基质上固定着兽药抗原；将经过稀释液稀释的生物素化抗体和待测样品混合，与固相载体上固定的多种兽药包被抗原的进行竞争免疫反应，洗涤液洗涤；加入亲和素标记的胶体金进行放大和染色，通过扫描仪获得灰度结果。本发明采用免疫竞争法检测与现有技术的检测相比，主要具有灵敏度高、特异性强、操作简便的特点。免疫竞争法检测所需试剂品种少，加样程序简单、反应时间短；同时，测量和数据处理易于实现自动化。

1、一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，包括以下步骤：

(1)、将多种兽药偶联抗原按照微阵列点在固相载体上并对其进行包被；其中固相基质上固定着兽药抗原；

(2)、将经过稀释液稀释的生物素化抗体和待测样品混合，与固相载体上固定的多种兽药包被抗原进行竞争免疫反应，洗涤液洗涤；反应过程中如果待测样品不含兽药，则抗体和固相载体上固定的多种兽药包被抗原结合；如果待测样品含兽药，则生物素标记的抗体会与待测样品中的兽药结合，而被洗脱，所述的经过稀释液稀释的生物素化抗体与样本的混合比例为 2：5~1：6；

(3)、加入亲和素标记的胶体金进行放大和染色，通过扫描仪获得灰度结果，其中所述的亲和素标记方法为：

①用 0.08~0.12mol/L 碳酸盐调节金溶胶的 pH 为 8.5~9.5；

②于金溶胶中加入按体积百分比为 1%~4% 蛋白质溶液，搅拌 1~4 分钟，其中所述的蛋白质溶液中蛋白质含量为 5~40 μ g；

③加入按体积百分比为 4.5%~5.5% 的浓度为 0.8~1.2% PEG20000 溶液；

④于转速为 10000g~100000g 的超速离心机中离心 30~60 分钟，吸去上清液；

⑤将沉淀悬浮于含 0.2~0.5mg/ml PEG20000 的缓冲液中，转速为 10000g~100000g 的超速离心机离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，浓度以 $A_{1cm/540nm}=1.5$ ，以 0.2~0.8mg/ml 叠氮钠防腐，置 4℃ 保存。

2、根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，经过稀释液稀释的生物素化抗体与样本混合后反应的时间为 5~20min，反应的温度为 30℃~38℃。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种快速检测食品、农副产品

中兽药残留物的检测方法，其特征在于，所述的经过稀释液稀释的生物素化抗体的标记方法为：用 DMF 将 BNHS 配成 0.8~1.2mg/mL 溶液，用 0.08~0.12mol/L, pH8.2~9.2NaHCO₃ 将纯化的抗体稀释为 1~3mg/mL，按 BNHS:IgG 的容积比为 1:8~1:15 混合，室温搅拌下反应 1~5h，装入透析袋，加入 0.01 mol/L~1mol/L, pH7.0~7.6PBS 溶液，4℃透析过夜。

4、根据权利要求 3 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，所述的生物素化抗体的标记方法为：用 DMF 将 BNHS 配成 1mg/mL 溶液，用 0.1mol/L, pH9.0 的 NaHCO₃ 将纯化的抗体稀释为 2mg/mL，按 BNHS:IgG 的容积比为 1:10，室温搅拌下反应 2~4h，装入透析袋，加入 0.05mol/L, pH7.2PBS 溶液，4℃透析过夜。

5、根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，所述的亲和素标记方法步骤 1 中碳酸盐为碳酸钾。

6、根据权利要求 5 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，所述的亲和素标记方法步骤 1 为：用 0.08mol/L~0.12 mol/L K₂CO₃ 调节金溶胶 pH 至 8.8~9.2。

7、根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，在金溶胶中加入标记量的蛋白质溶液按体积百分比为 2%~3%，搅拌 2~3 分钟。

8、根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，加入的 PEG20000 溶液为总体积的 4.8%~5.2%，其浓度为 1%。

9、根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，其特征在于，将沉淀悬浮于一定体积含 0.2~0.3mg/ml PEG20000 的缓冲液中，转速为 10000g~100000g 的

超速离心机离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，以 0.3~0.6mg/ml 叠氮钠防腐，置 4℃ 保存。

一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法

技术领域

本发明属有毒物质检测的技术领域，尤其涉及一种检测农副产品、食品中兽药残留物的检测方法。

背景技术

我国是农产品生产和消费大国，农产品中兽药残留物的检测直接关系到我国农产品生产、出口和居民食品消费安全。特别是我国农产品出口因兽药残留物近年连续遭遇国外技术性贸易壁垒，仅浙江省农产品一年出口被禁上亿美元。近年来，食品安全问题已成为国家关注的重点内容之一，因有毒残留物质超标造成的食品污染事件以及出口受阻频频发生，已引起了国家有关部门的高度重视，并连续启动了无公害农产品及食品安全等行动计划以及农产品市场准入制度，研制开发食品中各种有害物质的快速检测技术及产品成为很重要的需求。

检测食品中兽药残留的方法，主要有微生物学方法，理化分析法（色谱法，色质联用、气质联用法），免疫学方法（放射免疫法、酶联免疫法）等。微生物检测方法费用低廉，但是操作复杂费时，结果容易误判，特异性差。免疫学方法（酶免法）近年来有较多的应用，基本符合操作简便、高灵敏度的特点，且已经有相关的试剂盒商品使用。理化分析方法主要用来确证实验，需要昂贵的仪器配套。如中国专利申请（01105023.3）该专利申请涉及一种多指标并行检测蛋白的方法，包括：将结合了多个可与体内指标特异性结合的蛋白 B 的固相载体与含目标蛋白 A 的待测液接触，形成稳定复合物 B-A；进一步与多蛋白混合液中对应标记

的 A 的特异结合蛋白 C-labelled 反应，形成稳定 B-A-C-labelled，标记是化学发光法的标记物；产生化学发光反应及信号检测。该专利申请还提供了一种蛋白芯片的制备方法，及用于多指标并行检测的蛋白芯片、试剂盒。该专利申请主要是沿用酶联免疫吸附测定（ELISA）的原理，存在着特异性弱、灵敏度低、应用范围窄、操作复杂的缺点。

又如中国专利申请（02137940.8）涉及一种氯霉素（CAP）酶免疫检测试剂盒及其检测方法，属于酶免疫分析技术领域。该发明配制的试剂盒，采取酶免疫吸附（ELISA）竞争法检测 CAP，利用 CAP 和牛血清白蛋白（BSA）偶连物作为 CAP 抗原免疫小鼠，获得含有 CAP 抗体的单克隆 CAP 抗血清，经分离、提纯、稀释后包被在酶标板上，温育、洗涤，加入样品稀释液及酶标抗原，使两者进行反应、洗涤，加酶底物显色。虽然该专利对样品前处理简单，是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法，但是由于本身的局限性必然造成其检测分析过程不能实现连续化、集成化、微型化、高通量的要求。

发明内容

本发明针对现有技术所用的检测方法存在特异性差、灵敏度低、应用范围窄、操作复杂的缺点，提供一种样品前处理简单，检测简便、快速、灵敏、准确的检测兽药残留的方法。

本发明的技术问题是通过以下技术方案来解决的：一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法，包括以下步骤：

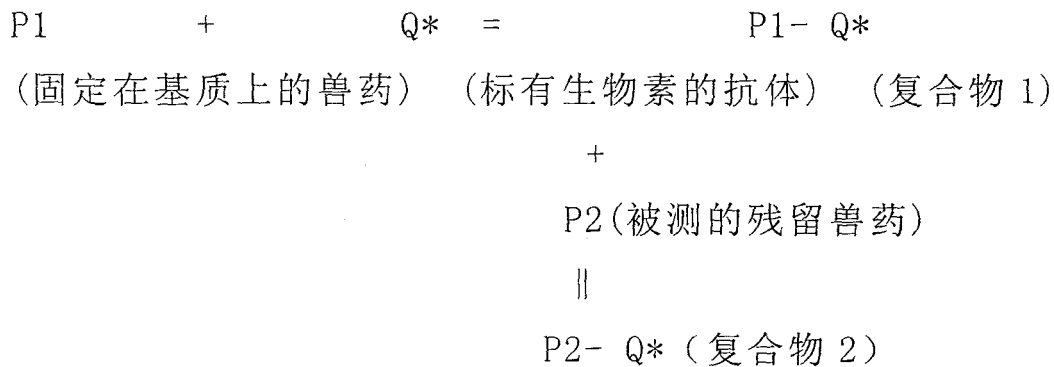
(1)、将多种兽药偶联抗原按照微阵列点在固相载体上并对其进行包被；其中固相基质上固定着兽药抗原；

(2)、将经过稀释液稀释的生物素化抗体和待测样品混合，与固相载体上固定的多种兽药包被抗原的进行竞争免疫反应，洗涤液洗涤；反应过程中如果待测样品不含兽药，则抗体和固相载体

上固定的多种兽药包被抗原结合；如果待测样品含兽药，则生物素标记的抗体会与待测样品中的兽药结合，而被洗脱；

(3)、加入亲和素标记的胶体金进行放大和染色，通过扫描仪获得灰度结果。

本发明采用免疫竞争法的原理：采用免疫竞争法检测多种兽药残留，其工作原理是利用样品中的残留兽药与固定在载体上的兽药偶联抗原针对抗体进行竞争免疫反应，通过生物素-亲和素放大系统并通过纳米金染色对极微量的残留兽药作定量分析，其中被测的残留兽药与固定在基质上的抗生素对标有生物素的抗体均具有相同的结合能力，所以在标有生物素的抗体有限时，这种结合就会出现相互竞争，彼此制约。具体反应式如下：



在标有生物素的抗体量一定时，固定在基质上的兽药和被测的残留兽药与标有生物素的抗体结合的量取决于二者浓度比，P1结合量，将随着P2的增加而减少，这说明了被测的残留兽药抑制了固定在基质上的兽药与标有生物素的抗体的结合。由于抗体上标记有生物素，可与亲和素结合，亲和素上有胶体金，通过扫描仪(CCD)获得灰度结果。图像越黑则待测样品的抗生素含量越低，反之，则越高！

此外，还可以得到定量检测的效果，其中通过标准样本来考察三个指标的剂量-反应曲线，并采用合适的数学模型拟合。浓度与灰度值之间的关系符合 $y=a(x)^b+c$ 或者其他函数的模式，其中 y 和 x 分别表示指标输出浓度和检测灰度， a 和 b ， c 是常数，不

同指标有各自的 a、b 值。剂量-反应曲线的相关系数 g_2 应不低于 0.97，将上述剂量-反应曲线方程、种类、指标数量、指标信息等基本参数，设置在软件的数据库文件中，用光盘刻录机将该文件刻录在光盘上。检测时，数据通过光盘由软件自动调用，通过灰度即可知道浓度值，定量检测抗生素浓度，实现了检测分析过程连续化、集成化、微型化、高通量的优点，而且检测操作只需要 10 分钟，胶体金结果比较荧光稳定，减少环境污染。

在上述的检测方法中，所述的经过稀释液稀释的生物素化抗体与样本的混合比例为 2:5~1:6，其中经过稀释液稀释的生物素化抗体与样本混合后反应的时间为 5~20min，反应的温度为 30℃~38℃。

表 1: 生物素化抗体与样本混合比例的优化

生物素化抗体与样本的混合比例	通过质谱分析抗生素标准液的含量 (ppb)	固相载体中包被抗原浓度 (mg/ml)		
		0.2	0.4	0.6
1:1	0	1.191	1.313	1.444
		1.207	1.33	1.429
	平均	1.199	1.322	1.437
	6.25	1.367	1.611	1.752
		1.286	1.5	1.701
	平均	1.327	1.556	1.727
2:5	0	1.246	1.437	1.435
		1.302	1.484	1.496
	平均	1.274	1.461	1.465
	6.25	1.12	1.33	1.536
		1.189	1.322	1.634
	平均	1.154	1.326	1.585
1:3	0	1.265	1.567	1.678
		1.325	1.532	1.693
	平均	1.345	1.550	1.686
	6.25	1.158	1.274	1.387
		1.124	1.212	1.313

	平均	1.141	1.243	1.350
1:4	0	1.403	1.62	1.686
		1.303	1.555	1.659
	平均	1.303	1.555	1.673
	6.25	1.097	1.179	1.234
		1.058	1.136	1.193
	平均	1.078	1.158	1.214
1:5	0	1.413	1.664	1.718
		1.314	1.51	1.628
	平均	1.364	1.587	1.673
	6.25	1.078	1.137	1.187
		1.029	1.06	1.131
	平均	1.054	1.099	1.159
1:6	0	1.301	1.471	1.625
		1.286	1.437	1.551
	平均	1.294	1.454	1.588
	6.25	1.034	1.004	1.101
		1.05	1.08	1.146
	平均	1.042	1.062	1.124

由以上结果表明, 0ppb 和 6.25ppb 的反应结果灰度差异明显的为生物素化抗体与样本混合比例为 2: 5~1:6。

表 2: 生物素化抗体与样本混合后的反应时间对灰度的影响

37 度 反应时间 (min)	通 过 质 谱 分 析 抗 生 素 标 准 液 的 含 量 (ppb)	固相载体中包被抗原浓度 (mg/ml)		
		0.2	0.4	0.6
0	0	1.23	1.453	1.518
		1.265	1.47	1.619
	平均	1.248	1.462	1.569
	3	1.175	1.311	1.439
		1.193	1.342	1.437
	平均	1.184	1.327	1.438
5	0	1.37	1.661	1.779
		1.379	1.52	1.713
	平均	1.375	1.591	1.746

	3	1.267	1.431	1.571
		1.191	1.407	1.537
	平均	1.229	1.419	1.554
10	0	1.332	1.624	1.746
		1.397	1.638	1.876
	平均	1.365	1.631	1.811
	3	1.262	1.447	1.587
		1.206	1.387	1.567
	平均	1.234	1.417	1.577
20	0	1.45	1.663	1.817
		1.454	1.726	1.761
	平均	1.452	1.695	1.789
	3	1.261	1.478	1.617
		1.22	1.427	1.608
	平均	1.241	1.453	1.613

以上结果表明：在 5~20min 之间整体的灰度值差异不太大，所以采用的温育 5~20min，采用的温育温度一般为 37℃。但是在 30℃~38℃ 之间处理整体的灰度值差异也不大。

其中所述的经过稀释液稀释的生物素化抗体的标记方法为：用 DMF 将 BNHS 配成 0.8~1.2mg/mL 溶液，用 0.08~0.12mol/L, pH8.2~9.2NaHCO₃ 将纯化的抗体稀释为 1~3mg/mL，按 BNHS:IgG 的容积比为 1:8~1:15 混合，室温搅拌下反应 1~5h，装入透析袋，加入 0.01 mol/L~1mol/L, pH7.0~7.6PBS 溶液，4℃ 透析过夜。结合物内加等体积甘油，小量分装，-30℃ 冻存储备用。

在上述的检测方法中，所述的生物素化抗体的标记方法优化配方为：用 DMF 将 BNHS 配成 1mg/mL 溶液，用 0.1mol/L, pH9.0NaHCO₃ 将纯化的抗体稀释为 2mg/mL，按 BNHS:IgG 的容积比为 1:10，室温搅拌下反应 2~4h，装入透析袋，加入 0.05mol/L, pH7.2PBS 溶液，4℃ 透析过夜。

其中亲和素标记方法（样品洗涤液配方）为：

- ①用 0.08~0.12mol/L 碳酸盐调节金溶胶的 pH 为 8.5~9.5;
- ②于金溶胶中加入(按体积百分比)为 1%~4% 蛋白质溶液, 搅拌 1~4 分钟;
- ③加入(按体积百分比) 4.5%~5.5% 的浓度为 0.8~1.2 %PEG20000 溶液;
- ④于转速为 10000g~100000g 的超速离心机中离心 30~60 分钟, 吸去上清液;
- ⑤将沉淀悬浮于含 0.2~0.5mg/ml PEG20000 的缓冲液中, 转速为 10000g~100000g 的超速离心机离心沉淀后, 再用同一缓冲液恢复, 浓度以 $A_{1\text{cm}/540\text{nm}}=1.5$ 左右为宜, 以 0.2~0.8mg/ml 叠氮钠防腐, 置 4℃ 保存。

在上述的检测方法中, 所述的亲和素标记方法步骤一中碳酸盐为碳酸钾。

在上述的检测方法中, 所述的亲和素标记方法步骤一为: 用 0.08mol/L~0.12 mol/L K_2CO_3 调节金溶胶 pH 至 8.8~9.2。

在上述的检测方法中, 在金溶胶中加入最佳标记量的蛋白质溶液按体积百分比为 2%~3%, 搅拌 2~3 分钟。

在上述的检测方法中, 加入的 PEG20000 溶液为总体积的 4.8%~5.2%, 其浓度为 1%。

在上述的检测方法中, 将沉淀悬浮于一定体积分含 0.2~0.3mg/ml PEG20000 的缓冲液中, 转速为 10000g~100000g 的超速离心机离心沉淀后, 再用同一缓冲液恢复, 浓度以 $A_{1\text{cm}/540\text{nm}}=1.5$ 为宜, 以 0.3~0.6mg/ml 叠氮钠防腐, 置 4℃ 保存。

本发明采用免疫竞争法检测与现有技术的检测相比, 主要有以下优点: (1) 灵敏度高, 现有技术检出极限为 mg, μg 水平, 而采用免疫竞争法检测分析通常为 ng, pg, 甚至可达到 ag 水平; (2) 特异性强, 能分辨出化学结构上非常相似的物质, 甚至能识别立

体结构；(3) 操作简便，免疫竞争法检测所需试剂品种少，加样程序简单，反应时间短，测量和数据处理易于实现自动化。

具体实施方式

实施例 1

蜂蜜样品的前处理：取 1g 蜂蜜，放入离心管中，加入 2mL 蒸馏水溶解；加 2mL 乙酸乙酯振荡 10min；室温 3000g 离心 10min；移取 1mL 上层乙酸乙酯（相当于 0.5g 样品）至另一试管中，60℃下 N₂ 吹干；残留物用 0.5mL 缓冲液 1 溶解；取 50uL 分析。

虾样的前处理：虾样去外壳，用均质器均质样品；取 3g 均质过的样品，放入离心管中，加入 6mL 乙酸乙酯振荡 10min；室温 3000g 离心 10min；取出 2mL 上层乙酸乙酯（相当于 1g 样品）60℃下 N₂ 吹干。

洗涤液的配制：Tris54g，硼酸 27.5g，用少量 DD-H₂O 溶解，加入 20ml 0.5mol/L EDTA-Na₂(PH 8.0)，加 DD-H₂O 定容至 1000ml。加入 200ml 饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液，40ml Tween-20 及 480ml DD-H₂O，混匀。

试剂生物素化抗体的制备：取生物素 1g，混悬于 12ml N,N 二甲基甲酰胺 DMF，加入 0.6g N-羟基丁二酰亚胺 HOSU 和 0.8g 的二环己基炭二亚胺 DCC，置于密闭容器中，室温磁力搅拌作用过夜。过滤液经过过旋转蒸干。加 10ml 乙醚洗涤，继而加入 200ml 异丙醇结晶，获得白色粉末状活化生物素晶体。用 DMF 将 BNHS 配成 0.8mg/mL 溶液；将待标记抗体用 0.08mol/L, PH 值为 8.2 的碳酸氢钠溶液稀释至 1mg/ml，透析后，以 1mg/ml BNHS：待标记抗体 =1：8 的比例混合，不时振摇 1 小时。置透析袋中加入 0.01mol/L, pH7.0PBS 溶液，4℃透析过夜，使用时稀释至工作浓度。

试剂亲和素胶体金制备：①用 0.08mol/L 碳酸钾调节 1ml 胶

体金溶液的 pH 为 8.5; ②将待标记的蛋白质储存液作系列稀释后, 分别取 0.1ml (含蛋白质 5~40ug) 加到 1ml 胶体金溶液中, 搅拌 1 分钟; ③加入 (按体积百分比) 4.5% 的浓度为 0.8% PEG20000 溶液; ④在转速为 10000g 的超速离心机中离心 60 分钟, 吸去上清液; ⑤将沉淀悬浮于含 0.2mg/ml PEG20000 的缓冲液中, 转速为 10000g 的超速离心机离心沉淀后, 再用同一缓冲液恢复, 以 0.2mg/ml 叠氮钠防腐, 置 4℃ 保存。使用时另设一管不加蛋白质的对照管, 5 分钟后加入 0.1ml 10% NaCl 溶液, 混匀后静置 2 小时, 不稳定的金溶胶将发生聚沉, 能使胶体金稳定的最适蛋白量再加 10% 即为最佳标记蛋白量。

取抗体浓度为 5.94mg/ml, 将抗体生物素化, 生物素化抗体原浓度为 1.67mg/ml, 用 PBS 稀释液至 0.02mg/ml,

取 100ul 生物素化抗体 (0.02mg/ml) 与 500ul 待测样品充分混匀后于 30 度温育 20min, 加入洗涤液 4 滴于上述包被有多种兽药偶联抗原按照微列阵排列的固相载体上, 加入亲和素标记的胶体金溶液 500ml, 充分反应后, 加入洗涤液六滴, 通过扫描仪上读取结果, 其中灰度值和兽药残留量的换算关系见表 3

表 3: 灰度值和兽药残留量的换算关系

通过质谱 分析抗生素标 准液的浓度 (ng/ml)	固相载体中包被抗原浓度 (mg/ml)		
	0.2	0.4	0.6
0			
0.3	0.27ng/ml	0.49 ng/ml	0.98 ng/ml
0.625	0.36 ng/ml	0.61 ng/ml	0.86 ng/ml
1.25	2.17 ng/ml	2.21 ng/ml	2.65 ng/ml
2.5	5.46 ng/ml	6.02	5.81

		ng/ml	ng/ml
5	8.80 ng/ml	8.70	9.58
		ng/ml	ng/ml
10	12.49	13.58	13.41
	ng/ml	ng/ml	ng/ml

以上是本发明人通过长期研究而自制的灰度值和兽药残留量的换算关系，其中通过质谱分析抗生素标准液的浓度 (ng/ml) 与现有技术提供的标准液抗生素的含量相差无几。

实施例 2:

样品的前处理和洗涤液的配制同实施例 1

试剂生物素化抗体的制备：取生物素 1g，混悬于 12ml N,N-二甲基甲酰胺 DMF，加入 0.6g N-羟基丁二酰亚胺 HOSU 和 0.8g 的二环己基炭二亚胺 DCC，置于密闭容器中，室温磁力搅拌作用过夜。过滤液经过旋转蒸干。加 10ml 乙醚洗涤，继而加入 200ml 异丙醇结晶，获得白色粉末状活化生物素晶体。用 DMF 将 BNHS 配成 1mg/mL 溶液；将待标记抗体用 0.10mol/L, PH 值为 9.0 的碳酸氢钠溶液稀释至 2mg/ml，透析后，以 1mg/ml BNHS：待标记抗体=1：10 的比例混合，不时振摇 3 小时。置透析袋中加入 0.05mol/L, pH7.4 PBS 溶液，4°C 透析过夜，使用时稀释至工作浓度。

试剂亲和素胶体金制备：①用 0.10mol/L 碳酸钾调节 1ml 胶体金溶液的 pH 为 9.0②将待标记的蛋白质储存液作系列稀释后，分别取 0.2ml (含蛋白质 5~40ug) 加到 1ml 胶体金溶液中搅拌 2 分钟③加入 (按体积百分比) 5.0% 的浓度为 1% PEG20000 溶液。④在转速为 50000g 的超速离心机中离心 45 分钟，吸去上清液。⑤将沉淀悬浮于含 0.4mg/ml PEG20000 的缓冲液中，转速为 50000g 的超速离心机离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，以 0.4mg/ml 叠氮钠防腐，置 4°C 保存。使用时另设一管不加蛋白质的对照管，5 分钟后加入 0.1ml 10% NaCl 溶液，混匀后静置 2 小

时，不稳定的金溶胶将发生聚沉，能使胶体金稳定的最适蛋白量再加 10% 即为最佳标记蛋白量。

取抗体浓度为 6.54mg/ml，将抗体生物素化，生物素化抗体原浓度为 1.76mg/ml，用 PBS 稀释液至 0.04mg/ml，

取 100ul 生物素化抗体 (0.02mg/ml) 与 600ul 待测样品充分混匀后于 37 度温育 10min，加入洗涤液 4 滴于上述包被有多种兽药偶联抗原按照微列阵排列的固相载体上，加入亲和素标记的胶体金溶液 500ml，充分反应后，加入洗涤液六滴，通过扫描仪上读取结果。

实施例 3

样品的前处理和洗涤液的配制同实施例 1

试剂生物素化抗体的制备：取生物素 1g，混悬于 12ml N,N 二甲基甲酰胺 DMF，加入 0.6g N-羟基丁二酰亚胺 HOSU 和 0.8g 的二环己基炭二亚胺 DCC，置于密闭容器中，室温磁力搅拌作用过夜。过滤液经过旋转蒸干。加 10ml 乙醚洗涤，继而加入 200ml 异丙醇结晶，获得白色粉末状活化生物素晶体。用 DMF 将 BNHS 配成 1.2mg/mL 溶液；将待标记抗体用 0.12mol/L, PH 值为 9.2 的碳酸氢钠溶液稀释至 32mg/ml，透析后，以 1mg/ml BNHS：待标记抗体 =1：15 的比例混合，不时振摇 5 小时。置透析袋中加入 0.1mol/L, pH7.6 PBS 溶液，4°C 透析过夜，使用时稀释至工作浓度。

试剂亲和素胶体金制备：①用 0.12mol/L 碳酸钾调节 1ml 胶体金溶液的 pH 为 9.5；②将待标记的蛋白质储存液作系列稀释后，分别取 0.4ml (含蛋白质 5~40ug) 加到 1ml 胶体金溶液中搅拌 4 分钟；③加入 (按体积百分比) 5.5% 的浓度为 1.2% PEG20000 溶液；④在转速为 100000g 的超速离心机中离心 30 分钟，吸去上清液；⑤将沉淀悬浮于含 0.5mg/ml PEG20000 的缓冲液中，转速为 100000g 的超速离心机离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，以 0.8mg/ml 叠氮钠防腐，置 4°C 保存。使用时另设一管不加蛋白质

的对照管，5分钟后加入0.1ml 10%NaCl溶液，混匀后静置2小时，不稳定的金溶胶将发生聚沉，能使胶体金稳定的最适蛋白量再加10%即为最佳标记蛋白量。

取抗体浓度为6.74mg/ml，将抗体生物素化，生物素化抗体原浓度为1.78mg/ml，用PBS稀释液至0.03mg/ml，

取200ul生物素化抗体(0.02mg/ml)与500ul待测样品充分混匀后于38度温育5min，加入洗涤液4滴于上述包被有多种兽药偶联抗原按照微列阵排列的固相载体上，加入亲和素标记的胶体金溶液500ml，充分反应后，加入洗涤液六滴，通过扫描仪上读取结果。

本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代，但并不会偏离本发明的精神或者超越权利要求书所定义的范围。

专利名称(译)	一种快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法		
公开(公告)号	CN100516880C	公开(公告)日	2009-07-22
申请号	CN200510026487.1	申请日	2005-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	台州金芯生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	台州金芯生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江金壳生物化学有限公司		
[标]发明人	王华全 林荣业		
发明人	王华全 林荣业		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N1/28		
代理人(译)	张智平		
审查员(译)	王奕		
其他公开文献	CN1715922A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测农副产品、食品中兽药残留物的检测方法，属有毒物质检测的技术领域。本快速检测食品、农副产品中兽药残留物的检测方法包括以下步骤：将多种兽药偶联抗原按照微阵列点在固相载体上并对其进行包被；其中固相基质上固定着兽药抗原；将经过稀释液稀释的生物素化抗体和待测样品混合，与固相载体上固定的多种兽药包被抗原的进行竞争免疫反应，洗涤液洗涤；加入亲和素标记的胶体金进行放大和染色，通过扫描仪获得灰度结果。本发明采用免疫竞争法检测与现有技术的检测相比，主要具有灵敏度高、特异性强、操作简便的特点。免疫竞争法检测所需试剂品种少，加样程序简单、反应时间短；同时，测量和数据处理易于实现自动化。

生物素化抗体与样品的混合比例	通过质谱分析抗生素标准液的含量 (ppb)	固相载体中包被抗原浓度 (mg/ml)		
		0.2	0.4	0.6
1:1	0	1.191	1.313	1.444
		1.207	1.33	1.429
	平均	1.199	1.322	1.437
	6.25	1.367	1.611	1.752
	平均	1.286	1.5	1.701
2:5	0	1.246	1.437	1.435
		1.302	1.484	1.496
	平均	1.274	1.461	1.465
	6.25	1.12	1.33	1.536
	平均	1.189	1.322	1.634
1:3	0	1.154	1.326	1.585
		1.265	1.567	1.678
		1.325	1.532	1.693
	平均	1.345	1.550	1.686
	6.25	1.158	1.274	1.387
	1.124	1.212	1.313	