



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107014993 B

(45)授权公告日 2019.05.21

(21)申请号 201710225400.6

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.04.07

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107014993 A

CN 104558189 A, 2015.04.29,
CN 101354401 A, 2009.01.28,
CN 104558187 A, 2015.04.29,
CN 101571539 A, 2009.11.04,
CN 101315372 A, 2008.12.03,

(43)申请公布日 2017.08.04

(73)专利权人 河北农业大学
地址 071000 河北省保定市乐凯南大街
2596号河北农业大学食品科技学院

审查员 李倩

(72)发明人 王向红 桑亚新 刘卫华 张雪娇
张晶

(74)专利代理机构 北京风雅颂专利代理有限公司 11403
代理人 王安娜 李翔

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

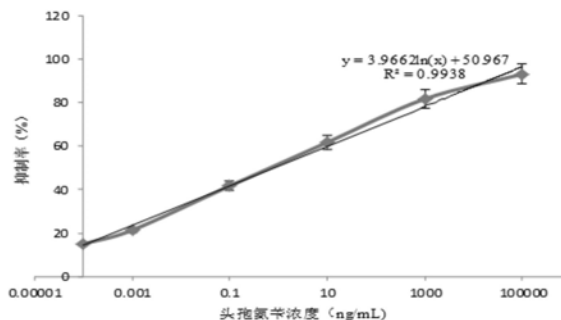
权利要求书2页 说明书18页 附图2页

(54)发明名称

一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用,包括包被有包被原的酶标板、头孢类抗生素标准品、头孢类抗生素通用抗体、酶标记二抗、稀释缓冲液、洗涤缓冲液、底物显色液和反应终止液;头孢类抗生素通用抗体能特异性识别头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉或头孢噻肟,不能识别青霉素钠。本发明制备出一种头孢类抗生素通用抗体,该通用抗体和大部分头孢类抗生素均有较高的交叉反应率,而对于同含有β-内酰胺环的结构类似物青霉素钠却几乎没有交叉反应,表明该通用抗体具有较高的特异性。采用该通用抗体制备的试剂盒具有敏感度高、检测药物种类多、成本低、操作简单、检测时间短的优点。



1. 一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,其特征在于,包括包被有包被原的酶标板、头孢类抗生素标准品、头孢类抗生素通用抗体、酶标记二抗、稀释缓冲液、洗涤缓冲液、底物显色液和反应终止液;

其中,所述头孢类抗生素通用抗体能特异性识别头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉或头孢噻肟,不能识别青霉素钠;

其中,所述头孢类抗生素的人工抗原制备方法如下:

采用头孢氨苄,利用活泼酯法合成头孢氨苄-牛血清白蛋白偶联物(CEX-BSA);

(1) 称取头孢氨苄、N-羟基琥珀酰亚胺和N,N'-二环己基碳二亚胺,溶解于二甲基甲酰胺中,混匀得反应混合液,并将所述反应混合液于室温下孵育3h;

(2) 将提前准备好的冰块或冰水混合物置于水平振动仪上,将牛血清白蛋白溶液置于所述冰块或所述冰水混合物中;将所述反应混合液滴加到所述牛血清白蛋白溶液中,保持低温反应2h以上,并在4℃冰箱中反应过夜,获得所述头孢氨苄-牛血清白蛋白偶联物;

其中,所述头孢类抗生素通用抗体的制备方法如下:

所述头孢类抗生素通用抗体是以所述头孢氨苄-牛血清白蛋白偶联物为免疫原免疫动物后经全血分离血清获得;所述免疫剂量为每只所述免疫动物注射50μg所述免疫原;

(1) 首次免疫,用无菌磷酸盐缓冲液溶解所述头孢氨苄-牛血清白蛋白偶联物,与等量弗氏完全佐剂混合,充分乳化;

(2) 加强免疫,首次免疫后4周进行,用无菌磷酸盐缓冲液溶解所述头孢氨苄-牛血清白蛋白偶联物,与等量弗氏不完全佐剂混合,充分乳化;经过6次所述加强免疫,每次间隔2周;

(3) 最后一次免疫后取全血分离获得血清,采用凝胶柱纯化所述血清,获得所述头孢类抗生素通用抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,其特征在于,所述头孢类抗生素通用抗体为头孢类抗生素特异性多克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,其特征在于,所述包被原为头孢类抗生素-载体蛋白偶联物,由头孢类抗生素与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白;所述酶标记二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体。

4. 根据权利要求1所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,其特征在于,所述稀释缓冲液为pH 7.4的1×PBS缓冲液;所述洗涤缓冲液为PBST缓冲液,PBST缓冲液为含0.05% Tween 20的1×PBS缓冲液;所述底物显色液包括A液和B液,A液为pH 5.0的过氧化氢脲溶液,B液为TMB溶液,使用时,将A液与B液按照体积比31~33:1进行混合;所述反应终止液为1.25M的H₂SO₄溶液。

5. 根据权利要求1所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,其特征在于,包被有包被原的酶标板的制备方法为:

(i) 包被:用稀释后的包被原包被酶标板,每孔100μL,4℃包被过夜;

(ii) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

(iii) 封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200μL,37℃孵育1h,洗涤步骤同步步骤(ii),即得。

6. 根据权利要求5所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,

其特征在于,用包被缓冲液稀释包被原,包被缓冲液为pH 9.6的碳酸盐缓冲液,包被原的浓度为10ug/mL;所述封闭液为含1%明胶的1×PBS缓冲液。

7.一种如权利要求1-6任一项所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒在检测动物源性食品中头孢类抗生素中的应用。

8.根据权利要求7所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒在检测动物源性食品中头孢类抗生素中的应用,其特征在于,包括以下步骤:

(1)加入待测样品和头孢类抗生素通用抗体:取出包被有包被原的酶标板加入待测样品和头孢类抗生素通用抗体,各50μL/孔,同时设空白对照和阴性对照,37℃孵育1h;

(2)洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

(3)加入酶标记二抗:将酶标记二抗用洗涤缓冲液稀释后,每孔加入100μL,37℃孵育30min;

(4)显色:按照步骤(2)洗涤后,加入底物显色液,每孔加入150μL,37℃孵育30min;

(5)终止:加入反应终止液,每孔加入50μL,使反应终止;

(6)测定:将酶标板置于酶标仪中,测定各孔OD_{450nm}值。

9.一种如权利要求8所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒在检测动物源性食品中头孢类抗生素中的应用,其特征在于,头孢类抗生素通用抗体的稀释度为1:3200;酶标记二抗的稀释度为1:2500,酶标记二抗的反应pH为7.5;所述空白对照为1×PBS缓冲液;所述阴性对照为加入头孢类抗生素通用抗体的1×PBS缓冲液。

10.一种如权利要求8所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒在检测动物源性食品中头孢类抗生素中的应用,其特征在于,所述待测样品中的甲醇浓度为0~20%,待测样品的制备方法为:将动物源性食品提取后,离心取上清液,用1×PBS缓冲液稀释20~40倍即可。

一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全快速检测技术领域,具体涉及一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 我国是抗生素生产和使用的大国,头孢类抗生素的生产和使用量增长趋势明显。在给人类带来了健康的同时,食物中残留的抗生素也带来了安全隐患。为了降低危害程度,各国纷纷开展探究检测方法。由于头孢类抗生素有几十种,单一一种物质的检测满足不了这一类抗生素的检测需求,因此开发高通量多残留的快速检测技术和方法是食品安全监管的必要手段。

[0003] 目前,国内外针对动物源性食品中头孢类抗生素残留的检测方法,主要有微生物分析法、理化分析法和免疫分析法等。其中,微生物检测法的优点显著,成本低,操作简单,适合于大量样品的筛选,但是其缺点同样明显,只能测定总量,不具有特异性,往往达不到检测的要求;理化分析法具有较高的灵敏度和选择性,但因其仪器设备昂贵,操作繁琐,成本较高,前处理复杂,同样难以推广和扩大应用;而免疫分析方法是一种分析成本低,操作简便,节省时间,样品分析通量大,前处理简单(或不需要前处理)的测定方法,它不需要昂贵的仪器设备,且灵敏度和准确性均较高,近年来逐渐被广泛的应用在世界各国,成为动物源性食品中药物残留最理想的检测技术之一。

[0004] 本发明采用的是免疫分析法,免疫分析方法是一种利用抗原抗体在体外特异性结合后出现的各种现象,对样品中的抗原或者抗体进行定性、定量和定位检测的方法。主要包括酶联免疫技术(ELI)、放射免疫技术(RIA)、胶体金免疫层析技术和生物传感技术(BS)等检测方法。目前国内外通常都是以酶联免疫吸附测定法(ELISA)作为现场取样快速筛选检测方法,而ELISA试纸条、ELISA试剂盒因仪器化程度低、样品前处理简单、操作方便等优点,在近几年来受到了广泛的关注和推广应用。

[0005] Shirazid等采用间接竞争ELISA法检测牛奶和畜产品中 β -内酰胺类抗生素的残留,最低检测限为2.5~5ng/mL。Rose等筛选出了2株抗头孢噻唑单克隆抗体,并建立了头孢噻唑的间接竞争ELISA检测方法,两个克隆株的检测限分别是32 μ g/kg和0.3 μ g/kg。赵启法等人制备了抗头孢氨苄的单克隆抗体(CEXmAb),为建立CEX残留的免疫学快速检测技术手段奠定基础。2013年,卞素敏等应用头孢氨苄单克隆抗体,建立了牛奶中CEX残留的ELISA检测方法,线性范围为1.0~50.0ng/mL,检测限为1.0ng/mL,IC₅₀为4.1ng/mL,并用超高效液相色谱-串联质谱进行验证,两种方法之间具有很好的相关性($R^2=0.9988$)。2014年,胡佳丽等以Eu-SiO₂荧光纳米颗粒作为标记物,共价偶联于头孢氨苄单克隆抗体,制备了头孢氨苄残留荧光免疫层析试纸条,检测限为26ng/mL,可在30min内判读结果。2009年,谢会玲以头孢氨苄-BSA为免疫原获得多克隆抗体,研制了可以实现多残留检测的ELISA试剂盒和ICA试纸条,为更好的监测头孢类抗生素的残留提供有效的技术支持。2012年,孙志文等应用胶体

金免疫层析法对牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留进行检测,假阳性率不大于5%,假阴性率为0;该方法特异性较好,与牛奶中常见的其他抗生素无交叉反应,结果准确可靠,对实际样本的检测方法与液相色谱-质谱/质谱法基本一致。2012年,王学立在前人研制的基础上充分利用胶体金的工作原理,建立了一种能同步检测头孢类药物和链霉素类药物的胶体金免疫层析方法。

[0006] 何方洋等人公开了一种检测 β -内酰胺类和四环素类抗生素的试剂盒及方法(专利号CN103105491 B)以及公开了一种检测 β -内酰胺类抗生素的试剂盒及方法(发明号CN102455361 B),该专利文献中采用了冻干的胶体金标记的头孢类和四环素类药物特异性抗体,所述头孢类药物特异性抗体可为头孢类药物单克隆抗体或头孢类药物多克隆抗体。该发明主要针对于乳品检测,未涉及本发明中动物源性食品,例如:生鲜猪肉、牛肉、虾肉、生猪肝以及熟猪肝等,且未提供具备特异性的多克隆抗体制备方法。

[0007] 纵观以上研究现状可以看出,国内外关于头孢类抗生素快速检测的方法只针对单一药物进行,但是头孢类抗生素种类很多,而在国家标准限量中也只是针对一类物质的限量要求,这就导致单一型药物检测方法难以达到检测要求,因此开发通用抗体,建立高通量多残留检测体系能够提高检测的时效性。而且在这些分析方法的实际应用中,现有的研究还缺乏基质对抗原抗体反应影响的深层次研究。因此,尽快建立快速、简便、实用的头孢类抗生素高通量多残留检测体系,对于加快我国的快速检测技术的发展和提高食品的安全性有至关重要的意义。

发明内容

[0008] 有鉴于此,本发明的目的在于提出一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用,该试剂盒具有简单、快速、准确以及高通量的优点,满足动物源性食品中头孢类抗生素残留的检测需求,解决了现有技术中缺乏可检测多种头孢类抗生素的通用抗体及可靠方法的问题。

[0009] 基于上述目的,本发明提供的一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒,包括包被有包被原的酶标板、头孢类抗生素标准品、头孢类抗生素通用抗体、酶标记二抗、稀释缓冲液、洗涤缓冲液、底物显色液和反应终止液;

[0010] 其中,所述头孢类抗生素通用抗体能特异性识别头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉或头孢噻肟,不能识别青霉素钠。

[0011] 本发明制备出一种头孢类抗生素的通用抗体,其对头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢噻肟等均有较好的识别效果,其交叉反应率分别为:100%、85.25%、82.20%、43.28%、31.21%、23.31%。而对于同含有 β -内酰胺环的结构类似物青霉素钠却没有交叉反应,表明该抗体对于检测头孢类抗生素具有较高的特异性,可以作为检测动物源性食品中头孢类抗生素的通用抗体。

[0012] 在本发明中,优选的,所述头孢类抗生素通用抗体为头孢类抗生素特异性多克隆抗体。

[0013] 在本发明中,头孢类抗生素通用抗体是以CEX-BSA为免疫原制备获得的,具体方法为:

[0014] 采用背部皮下六点及大腿肌肉两点注射,免疫新西兰大耳白,免疫剂量为每只

0.2mL(内含50 μ g免疫原);首兔,用无菌PBS溶解CEX-BSA,与等量FCA混合,充分乳化;加强免疫,用无菌PBS溶解CEX-BSA,与等量FIA混合,充分乳化,首兔后4周进行,经过6次加强免疫,每次间隔2周,在第三次免疫后10天,通过耳缘静脉取血,之后每次免疫后均要进行耳缘静脉取血,对不同时期免疫后所得的抗血清进行效价和亲和力的考察,最后一次免疫后则心脏取全血分离血清;采用ProteinA-Sepharose 4B凝胶柱纯化心脏血清后获得多克隆抗体。

[0015] 在本发明中,优选的,所述包被原为头孢类抗生素—载体蛋白偶联物,由头孢类抗生素与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白;所述酶标记二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体。

[0016] 在本发明中,进一步优选的,所述包被原为头孢氨苄—卵清白蛋白偶联物。

[0017] 在本发明中,优选的,所述稀释缓冲液为pH 7.4的1 \times PBS缓冲液;所述洗涤缓冲液为PBST缓冲液,PBST缓冲液为含0.05%Tween 20的1 \times PBS缓冲液;所述底物显色液包括A液和B液,A液为pH 5.0的过氧化氢脲溶液,B液为TMB溶液,使用时,将A液与B液按照体积比31~33:1进行混合;所述反应终止液为1.25M的H₂SO₄溶液。

[0018] 在本发明中,优选的,包被有包被原的酶标板的制备方法为:

[0019] (i) 包被:用稀释后的包被原包被酶标板,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0020] (ii) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

[0021] (iii) 封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,洗涤步骤同步骤(ii),即得。

[0022] 在本发明中,优选的,用包被缓冲液稀释包被原,包被缓冲液为pH 9.6的碳酸盐缓冲液,包被原的浓度为10 μ g/mL;所述封闭液为含1%明胶的1 \times PBS缓冲液。

[0023] 进一步的,本发明还提供了所述的检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒在检测动物源性食品中头孢类抗生素中的应用。

[0024] 在本发明中,优选的,包括以下步骤:

[0025] (1) 加入待测样品和头孢类抗生素通用抗体:取出包被有包被原的酶标板加入待测样品和头孢类抗生素通用抗体,各50 μ L/孔,同时设空白对照和阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0026] (2) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

[0027] (3) 加入酶标记二抗:将酶标记二抗用洗涤缓冲液稀释后,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0028] (4) 显色:按照步骤(2)洗涤后,加入底物显色液,每孔加入150 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0029] (5) 终止:加入反应终止液,每孔加入50 μ L,使反应终止;

[0030] (6) 测定:将酶标板置于酶标仪中,测定各孔OD_{450nm}值。

[0031] 在本发明中,优选的,头孢类抗生素通用抗体的稀释度为1:3200;酶标记二抗的稀释度为1:2500,酶标记二抗的反应pH为7.5;所述空白对照为1 \times PBS缓冲液;所述阴性对照为加入头孢类抗生素通用抗体的1 \times PBS缓冲液。

[0032] 为了确定出最佳反应条件,本发明对ci-ELISA反应体系的各个条件,如:包被原的最适浓度和头孢类抗生素通用抗体的最佳稀释度、封闭液、酶标记二抗稀释度、pH值、离子强度及甲醇浓度的影响,进行了优化。首先,选择矩阵法对包被原的最适浓度和头孢类抗生素通用抗体的稀释度进行了初步确定,选择在450nm下OD值为1.0左右的包被原和头孢类抗生素通用抗体浓度的组合,然后进行竞争试验,最终确定亲和力高的组合作为最佳的包被

原浓度和头孢类抗生素通用抗体稀释度,最适的包被原浓度和头孢类抗生素通用抗体稀释度组合为10ug/mL和1:3200。然后在此前提下,对封闭液、酶标记二抗稀释度、pH值、离子强度以及甲醇浓度的影响分别进行了优化,并绘制相应的抑制率曲线,将每组灵敏度高的条件作为最优条件,最优条件为:含1%明胶的1×PBS缓冲液为最优的封闭液,最佳的酶标记二抗的稀释度为1:2500,最优的酶标记二抗反应条件为pH=7.5,离子强度最优的条件为1×PBS,甲醇浓度在0~20%。在已确定的最优条件下建立间接竞争ELISA分析法,其对头孢氨苄检测IC₅₀为0.78ng/mL,最低检出限IC₁₅可达 0.15×10^{-4} ng/mL。

[0033] 在本发明中,优选的,所述待测样品中的甲醇浓度为0~20%,待测样品的制备方法为:将动物源性食品提取后,离心取上清液,用1×PBS缓冲液稀释20~40倍即可。

[0034] 本发明选择了生鲜猪肉、牛肉、虾肉、牛奶、生猪肝以及熟猪肝等6种动物性食品组织,考察其基质影响的消除方法,结果表明对于肌肉和牛奶样本,经简单提取离心后,上清液用1×PBS缓冲液20倍稀释,即可消除基质的影响;对于肝脏样本的基质,上清液用1×PBS缓冲液40倍稀释,即可降低色素的影响,消除基质的干扰。

[0035] 本发明建立并优化了动物源性食品中头孢类抗生素的高通量多残留检测方法,该方法对头孢氨苄的IC₅₀为0.78ng/mL,最低检出限IC₁₅可达 0.15×10^{-4} ng/mL。同时该方法下对头孢拉定的IC₅₀为0.843ng/mL,对头孢羟氨苄的IC₅₀为0.875ng/mL,对头孢哌酮的IC₅₀为1.661ng/mL,对头孢唑啉钠的IC₅₀为2.587ng/mL,对头孢唑啉的IC₅₀为2.304ng/mL,说明该方法同样适用于对头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢噻肟、头孢唑啉和头孢哌酮等其他头孢类抗生素的检测。通过常规检测方法HPLC法对ELISA法的检测结果进行验证,结果显示,该方法在检测头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮等6种头孢类抗生素的检出限均可达到10μg/kg,两种方法的检测结果拟合程度很高,相关系数R²均大于0.96,证明了方法的可靠性。

[0036] 本发明试剂盒的分析原理为:

[0037] 当酶标板包被有包被原时,加入待测样品和头孢类抗生素通用抗体,固相包被原和待测样品相互竞争与头孢类抗生素通用抗体反应,由于每个孔中的固相包被原和加入的头孢类抗生素通用抗体含量一致,所以当待测样品中头孢类抗生素浓度高时,则被结合在固相包被原上的头孢类抗生素通用抗体少,加入的酶标记二抗与被固定抗体结合量少,最后加入底物液和显色液,显色反应浅,用酶标仪检测的OD值低,表明抑制率高;反之,当待测样品中头孢类抗生素浓度低时,则所测的OD值高,抑制率低。根据用已知的头孢类抗生素浓度检测所作的标准曲线,则可以推算出待测样品中头孢类抗生素的浓度。

[0038] 与现有技术相比,本发明的间接竞争ELISA试剂盒具有以下有益效果:

[0039] (1) 本发明制备出一种头孢类抗生素通用抗体,该通用抗体和大部分头孢类抗生素均有较高的交叉反应率,而对于同含有β-内酰胺环的结构类似物青霉素钠却几乎没有交叉反应,表明该通用抗体对于检测头孢类抗生素具有较高的特异性。同时采用该高特异性的通用抗体制备试剂盒,保证了检测结果的可靠性。本发明的试剂盒具有敏感度高、检测药物种类多、成本低、操作简单、便于携带、检测时间短、储存简单、保质期长的优点。

[0040] (2) 本发明的试剂盒能准确灵敏地检测动物源性食品中头孢类抗生素残留,样本的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的检测方法。

附图说明

- [0041] 附图是结合具体的工艺实施方式,详细的说明了工艺走向。
- [0042] 图1为载体蛋白与抗原偶联的紫外光谱图;
- [0043] 图2为偶联物与载体蛋白的SDS-PAGE电泳图;其中,①:BSA,②:CEX-BSA,③:OVA,④:CEX-OVA;
- [0044] 图3为甲醇含量的影响图;
- [0045] 图4为本发明的头孢氨苄标准曲线图。

具体实施方式

[0046] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明进一步详细说明。

[0047] 本发明涉及一种动物源性食品中头孢类抗生素的通用型多克隆抗体制备及间接竞争ELISA法(c_i-ELISA法)。本发明主要通过对头孢类抗生素人工抗原的设计与合成,多克隆抗体的制备与纯化等的研究,建立了头孢类抗生素的免疫快速分析方法,并通过常规的高效液相色谱(HPLC)检测方法对所建立的c_i-ELISA法进行了验证分析。

[0048] 实施例1头孢类抗生素人工抗原的合成与鉴定

[0049] 1.1头孢类抗生素人工抗原的合成

[0050] 选取头孢氨苄利用活泼酯法合成了免疫原CEX-BSA(头孢氨苄—牛血清白蛋白偶联物)和包被原CEX-OVA(头孢氨苄—卵清白蛋白偶联物),具体步骤为:

[0051] (1)准确称取20.3mg CEX(头孢氨苄)、17.7mg NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和23.7mg DCC(N,N'-二环己基碳二亚胺),溶于600μL DMF(二甲基甲酰胺)中,充分混匀得反应混合液,并于室温下孵育3h;

[0052] (2)将提前准备好的冰块或冰水混合物置于水平振动仪上,将现配的BSA溶液(10mg BSA溶于2mL 0.1mol/L NaHCO₃溶液中)置于冰块中,取上述反应混合液360μL,缓慢滴加到BSA(牛血清白蛋白)溶液中,保持低温反应2h以上,并在4℃冰箱中反应过夜,获得偶联物;

[0053] (3)将所得偶联物溶液分别转入透析袋中,在4℃冰箱里用pH7.4、0.01M磷酸盐缓冲液搅拌透析3d,每天换3次透析液;透析完成后将透析物在4℃4000rpm下离心10min,除去沉淀物,上清液保存于-20℃。交联产物命名为CEX-BSA。同理合成包被原CEX-OVA。

[0054] 1.2头孢类抗生素人工抗原的鉴定

[0055] 将合成的CEX人工抗原通过紫外光谱扫描和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析法进行鉴定。

[0056] 1.2.1UV鉴定CEX人工抗原

[0057] 用PBS配制CEX-BSA和CEX-OVA的标准溶液,进行紫外扫描,波长为220~500nm,见图1。由图1可知,CEX的最大吸收峰为261nm,BSA的最大吸收峰为279nm,而偶联物CEX-BSA的最大吸收峰为268nm。CEX与载体蛋白BSA偶联后,其产物CEX-BSA的紫外扫描光谱图与载体蛋白BSA相比,曲线发生了一定的改变,吸收曲线波峰位置有所增加,说明一定数量的半抗原CEX与载体蛋白偶联成功。同理分析可知CEX与OVA的偶联也基本成功。根据朗伯-比尔定律,经过理论计算最终得出,CEX-BSA和CEX-OVA两种偶联物中分子结合比分别为42.6:1和

24.1:1。

[0058] 1.2.2SDS-PAGE法鉴定CEX人工抗原

[0059] 在SDS-PAGE试验中,蛋白质分子量的大小在无外界因素干扰的情况下,将直接影响到电泳的迁移率,分子量越大的样品其迁移率越小,反正则越大。载体蛋白和半抗原偶联的电泳图如图2所示,通过①、②条带可以看出,条带②(CEX-BSA)略滞后于条带①(BSA),这说明偶合物的迁移率大于载体蛋白的迁移率,通过③、④条带同理可得出此结论,由此可推断出人工抗原的分子量大于载体蛋白的分子量,因此,可认为半抗原CEX与载体蛋白BSA和OVA的偶联基本成功。

[0060] 根据紫外光谱扫描法和SDS-PAGE法两种方法的鉴定结果可初步认定本发明人工抗原的合成已成功。

[0061] 实施例2头孢类抗生素通用抗体的制备及鉴定

[0062] 1.1头孢类抗生素通用抗体的制备

[0063] 选择实施例1成功合成的偶联物CEX-BSA作为免疫原,采用背部皮下六点及大腿肌肉两点注射,免疫新西兰大耳白,免疫剂量为每只0.2mL(内含50 μ g免疫原)。首免,用无菌PBS溶解CEX-BSA,与等量FCA混合,充分乳化;加强免疫,用无菌PBS溶解CEX-BSA,与等量FIA混合,充分乳化,首免后4周进行,经过6次加强免疫,每次间隔2周,在第三次免疫后10天,通过耳缘静脉取血,之后每次免疫后均要进行耳缘静脉取血,对不同时免疫后所得的抗血清用ci-ELISA法进行效价和亲和力的考察,最后一次免疫后则心脏取全血分离血清。采用ProteinA-Sepharose 4B凝胶柱纯化心脏血清后获得多克隆抗体。

[0064] 1.2头孢类抗生素通用抗体的鉴定

[0065] 1.2.1ELISA用缓冲溶液体系

[0066] (1)包被液缓冲溶液:(CBS 0.05mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH=9.6)

[0067] 称取Na₂CO₃ 1.6g和NaHCO₃ 2.9g于1000mL容量瓶中,用双蒸水溶解,HCl调节pH值到9.6,再用双蒸水定容至1000mL,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0068] (2)稀释缓冲液:(1 \times PBS pH=7.4)

[0069] 称取Na₂HPO₄·12H₂O 13.76g、NaH₂PO₄·2H₂O 1.794g和NaCl 9g于1000mL容量瓶中,用双蒸水溶解,HCl调节pH值到7.4,再用双蒸水定容至1000mL,过0.45 μ m滤膜,室温下可保存3~4周。

[0070] (3)洗涤缓冲液:(PBST缓冲液,pH=7.4含0.05%Tween20的1 \times PBS缓冲液)

[0071] 量取1 \times PBS缓冲液1000mL容量瓶中,加入5mL 10%的吐温20(Tween-20),混合均匀,室温保存。

[0072] (4)底物显色液:(TMB—过氧化氢脲溶解液)

[0073] 底物A的配置:称取无水醋酸钠8.2g、 β -糊精2.5g和过氧化氢脲0.4286g于1000mL容量瓶中,用双蒸水溶解,柠檬酸钠调节pH值到5.0,再用双蒸水定容至1000mL,4 $^{\circ}$ C保存备用,使用时恢复室温。

[0074] 底物B的配置:称取TMB 0.1g并量取10mL DMSO混合于深棕色玻璃瓶中,常温状态下置于暗处保存。

[0075] 在加底物前15min时将A、B溶液以14.6mL:0.45mL的比例混合均匀,常温状态下静置待用。

- [0076] (5) 封闭液: (1%明胶/1×PBS溶液)
- [0077] 称取明胶1.0g,溶于100mL 1×PBS溶液中。必要时可进行热水浴加速溶解。
- [0078] (6) 反应终止液: (1.25M H₂SO₄)
- [0079] 用量筒准确称取34mL H₂SO₄和466mL双蒸水,混匀,棕色瓶避光保存。
- [0080] 1.2.2ci-ELISA法测定抗血清效价
- [0081] 具体步骤如下:
- [0082] (i) 包被:包被缓冲液将包被原 (CEX-OVA, 实施例1合成) 稀释成10μg/mL,用稀释后的包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,4℃包被过夜;
- [0083] (ii) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;
- [0084] (iii) 封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200μL,于37℃温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);
- [0085] (iv) 加样:除第一行加入1×PBS作为空白对照外,将抗血清用1×PBS倍比稀释到不同浓度,分别加入到其余七行,每孔100μL,于37℃温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);
- [0086] (v) 加辣根过氧化物酶标二抗:用1×PBS将辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体稀释2500倍,每孔100μL,于37℃温箱孵育30min,洗涤步骤同(ii);
- [0087] (vi) 显色:在显色前15min将底物A、B混合,每孔150μL,于37℃温箱孵育30min;
- [0088] (vii) 终止:加入反应终止液,每孔50μL,使反应终止;
- [0089] (viii) 测定:5min内置于酶标仪测定OD值,选择波长为450nm处OD值为1.0左右的对应抗血清稀释度,即为抗血清的效价。
- [0090] 将心脏血清通过ci-ELISA法测定,效价为1:25600。
- [0091] 1.2.3ci-ELISA法测定抗血清亲和力
- [0092] 具体步骤如下:
- [0093] (i) 包被:包被缓冲液将包被原 (CEX-OVA, 实施例1合成) 稀释成10μg/mL,用稀释后的包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,4℃包被过夜;
- [0094] (ii) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;
- [0095] (iii) 封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200μL,于37℃温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);
- [0096] (iv) 加样:第一行每孔加入100μL 1×PBS作为空白对照,第二行加入50μL 1×PBS作为阴性对照;将CEX标准品用1×PBS倍比稀释到不同浓度(100μg/mL、1μg/mL、10ng/mL、0.1ng/mL、0.001ng/mL、0.0001ng/mL),加入到其余六行,每孔50μL;再将抗血清用1×PBS稀释到效价浓度,分别加入到后七行,每孔50μL,于37℃温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);
- [0097] (v) 加辣根过氧化物酶标二抗:用1×PBS将辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体稀释2500倍,每孔100μL,于37℃温箱孵育30min,洗涤步骤同(ii);
- [0098] (vi) 显色:在显色前15min将底物A、B混合,每孔150μL,于37℃温箱孵育30min;
- [0099] (vii) 终止:加入反应终止液,每孔50μL,使反应终止;
- [0100] (viii) 测定:5min内将酶标板置于酶标仪中测定OD_{450nm}值。
- [0101] 本实施例利用ci-ELISA法测定通用抗体与CEX的亲和力。利用能够产生50%的抑制率时包被原的浓度来表示抗血清的亲和力。抑制率计算方法如下:
- [0102] 以CEX浓度为X轴,对应抑制率为Y轴,建立直角坐标系,作抑制率曲线。抑制率计算

公式如下：

[0103] 抑制率(I) % = $[1 - (OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})] \times 100$

[0104] 其中, $OD_{\text{标准}}$ 为CEX标准品孔的OD值, $OD_{\text{对照}}$ 为阴性对照孔的OD值, $OD_{\text{空白}}$ 为空白对照孔的OD值。

[0105] 将心脏血清通过ci-ELISA法测定, IC_{50} 为1.75ng/mL,对CEX具有很强的亲和性。

[0106] 实施例3ci-ELISA反应体系条件优化

[0107] 1. 试验方法

[0108] 1.1ci-ELISA方法的基本步骤

[0109] 在本实施例中使用的缓冲溶液同实施例2。

[0110] (i) 包被:包被缓冲液将包被原(CEX-OVA,实施例1合成)稀释成10 μ g/mL,用稀释后的包被原包被96孔酶标板,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0111] (ii) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

[0112] (iii) 封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200 μ L,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);

[0113] (iv) 加样:第一行每孔加入100 μ L 1 \times PBS作为空白对照,第二行加入50 μ L 1 \times PBS作为阴性对照;将CEX标准品用1 \times PBS倍比稀释到不同浓度(100 μ g/mL、1 μ g/mL、10ng/mL、0.1ng/mL、0.001ng/mL、0.0001ng/mL),加入到其余六行,每孔50 μ L;再将实施例2制备的通用抗体用1 \times PBS稀释到效价浓度,分别加入到后七行,每孔50 μ L,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);

[0114] (v) 加辣根过氧化物酶标二抗:用1 \times PBS将辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体稀释2500倍,每孔100 μ L,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min,洗涤步骤同(ii);

[0115] (vi) 显色:在显色前15min将底物A、B混合,每孔150 μ L,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min;

[0116] (vii) 终止:加入反应终止液,每孔50 μ L,使反应终止;

[0117] (viii) 测定:5min内将酶标板置于酶标仪中测定 $OD_{450\text{nm}}$ 值。

[0118] 本实施例利用ci-ELISA法测定通用抗体与CEX的亲和力。利用能够产生50%的抑制率时包被原的浓度来表示抗血清的亲和力。抑制率计算方法如下:

[0119] 以CEX浓度为X轴,对应抑制率为Y轴,建立直角坐标系,作抑制率曲线。抑制率计算公式如下:

[0120] 抑制率(I) % = $[1 - (OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})] \times 100$

[0121] 其中, $OD_{\text{标准}}$ 为CEX标准品孔的OD值, $OD_{\text{对照}}$ 为阴性对照孔的OD值, $OD_{\text{空白}}$ 为空白对照孔的OD值。

[0122] 1.2ci-ELISA反应体系的各个条件优化

[0123] 对ELISA反应体系的各个条件,如:包被原(CEX-OVA)的最适浓度和通用抗体的最佳稀释度、封闭液、酶标记二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体)稀释度、pH值、离子强度及甲醇浓度的影响,进行了优化,在已确定的最优条件下建立间接竞争ELISA(ci-ELISA)分析法。

[0124] 本发明在制备待测样品时需要用到甲醇,在样品提取的步骤中,先通过甲醇水的混合液(8:2,V/V)把CEX从样品中提取,之后再稀释检测,加入甲醇是为了提高CEX提取率,但是甲醇浓度高了会影响抗原抗体的结合反应,所以要考察一下甲醇浓度对间接竞争

ELISA的影响。

[0125] 1.2.1ci-ELISA法确定包被原的最适浓度和通用抗体的稀释度

[0126] 在建立ELISA时,包被原和通用抗体浓度的选择是关键。本发明选择矩阵法对包被原(CEX-OVA)的最适浓度和通用抗体的稀释度进行了初步确定,选择在450nm下OD值为1.0左右的包被原和通用抗体浓度的组合,然后进行竞争试验,最终确定亲和力高的组合作为最佳的包被原浓度和通用抗体稀释度。当包被原(CEX-OVA)浓度和通用抗体稀释度组合为10ug/mL和1:3200时,在450nm下OD值为1.0左右,表明在此稀释度下,抗原与通用抗体可进行充分的反应。稀释度过小或过大均会对方法的灵敏度产生影响。综合各种因素,确定最适的包被原(CEX-OVA)浓度和通用抗体稀释度组合为10ug/mL和1:3200。

[0127] 1.2.2反应条件的选择

[0128] 在以上确定的包被原(CEX-OVA)和通用抗体浓度组合的前提下,对封闭液、酶标记二抗稀释度、pH值以及离子强度的影响分别进行了优化,并绘制相应的抑制率曲线,比较每组灵敏度高的条件作为最优条件。

[0129] 最终确定了最优条件为:含1%明胶的1×PBS溶液为最优的封闭液,最佳的酶标记二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体)的稀释度为1:2500,最优的酶标记二抗反应条件为pH=7.5,离子强度最优的条件为1×PBS。

[0130] 1.2.3甲醇浓度的选择

[0131] CEX微溶于水,因此常用有机试剂(如:甲醇)作为提取溶剂。本实施例选择6种不同的甲醇含量的提取液,根据图3试验结果可知,当甲醇浓度(体积分数)<20%时,OD₄₅₀值和IC₅₀几乎不受甲醇含量的影响,而当甲醇浓度>20%时,OD₄₅₀值和IC₅₀值则随之增大而增大,说明高浓度甲醇浓度对分析结果有很大的影响。由此推断,甲醇浓度在0%~20%范围内,对反应体系几乎没有影响。

[0132] 1.3ci-ELISA法标准曲线的建立

[0133] 在以上已经确定的ci-ELISA最佳反应体系下,采用ci-ELISA法进行竞争反应,以不同梯度浓度(100μg/mL、1μg/mL、10ng/mL、0.1ng/mL、0.001ng/mL、0.0001ng/mL)的CEX标准品为横坐标,以对应抑制率为纵坐标,绘制CEX的标准曲线,如图1所示。对图1中的曲线进行直线方程拟合,得到线性回归方程为 $y=3.9662\ln(x)+50.967$ ($R^2=0.9938$),经计算可得IC₅₀=0.78ng/mL,最低检出限IC₁₅= 0.15×10^{-4} ng/mL,充分说明了免疫抗血清中含有较高纯度的抗CEX抗体。

[0134] 实施例4本发明间接竞争ELISA试剂盒的组成

[0135] 在本实施例中,试剂盒包括如下部分:

[0136] (1)包被有包被原的酶标板:包被有CEX-OVA的酶标板;包被有CEX-OVA的酶标板的制备方法为:

[0137] (i)包被:包被缓冲液将包被原(CEX-OVA,由实施例1制备)稀释成10μg/mL,用稀释后的包被原包被96孔酶标板,每孔100μL,4℃包被过夜;

[0138] (ii)洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

[0139] (iii)封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200μL,于37℃温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii),即得。

[0140] (2)头孢类抗生素标准品:头孢氨苄(CEX)标准品,标准品的浓度范围为0.0001ng/

mL~100 μ g/mL;

[0141] (3) 头孢类抗生素通用抗体:头孢类抗生素多克隆抗体,由实施例2制备;

[0142] (4) 酶标记二抗:辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体;

[0143] (5) 稀释缓冲液:pH 7.4的1 \times PBS缓冲液;

[0144] (6) 洗涤缓冲液:PBST缓冲液(含0.05%Tween20的1 \times PBS缓冲液);

[0145] (7) 底物显色液:A液为pH 5.0的过氧化氢脲溶液,B液为TMB溶液,显色前15min,将A液与B液按照体积比31~33:1进行混合;

[0146] (8) 反应终止液:1.25M的H₂SO₄溶液。

[0147] 实施例5本发明间接竞争ELISA试剂盒在动物源性食品检测中的应用

[0148] 1. 样品的测定

[0149] 1.1 样品基质的影响及消除

[0150] 在酶联免疫分析方法的建立过程中,待检样品基质的影响是检测过程中常常遇到的问题,样品基质中常常会含有一些蛋白质和脂肪,这些物质会影响抗原与抗体的结合进而降低检测过程的灵敏度和可靠性。因此,在实际样品检测时,必须消除基质的影响。常用的基质消除的方法是稀释法,除此之外还有加入基质掩蔽剂来消除基质的影响,但是加入掩蔽剂的方法会使样品前处理复杂从而影响ELISA检测的精确度。

[0151] 本实施例将空白样本的提取液稀释一定倍数后,配制CEX系列标准液,绘制CEX抑制率曲线,比较该曲线与CEX标准曲线的吻合程度。吻合程度越高,说明基质的影响越小,反之则说明基质影响大,会干扰试验结果的准确性。

[0152] 1.2 ci-ELISA法样品前处理

[0153] 本实施例选择了生鲜猪肉、牛肉、虾肉、牛奶、生猪肝以及熟猪肝等6种动物性食品组织,考察其基质影响的消除方法,

[0154] 直接稀释法样品前处理操作程序如下:

[0155] 对于肌肉样品:取适量组织样本充分搅碎,将样品匀浆后,按1:1(w:v)加入甲醇/水(8:2)室温超声提取15min,4000rpm离心15min,上清液过0.45 μ m的有机滤膜。

[0156] 对于牛奶样品:牛奶于4 $^{\circ}$ C、9000rpm离心脱脂15min后,去除上层脂肪,将下层清液转移到干净的离心管中备用。

[0157] 对于肝脏样品:将样品充分搅碎后,按1:3(w:v)加入甲醇/水(8:2)室温超声提取15min,4000rpm离心15min,上清液过0.45 μ m的有机滤膜。

[0158] 结果表明,对于肌肉和牛奶样本,经简单提取离心后,上清液用1 \times PBS缓冲液20倍稀释,即可消除基质的影响;对于肝脏样本的基质,上清液用1 \times PBS缓冲液40倍稀释,即可降低色素的影响,消除基质的干扰。

[0159] 1.3 ci-ELISA法检测动物源性食品中残留的抗生素

[0160] 具体步骤如下:

[0161] (i) 包被:包被缓冲液将包被原(CEX-OVA,实施例1合成)稀释成10 μ g/mL,用稀释后的包被原包被96孔酶标板,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0162] (ii) 洗涤:将酶标板内溶液甩干,用洗涤缓冲液洗板3次,每次3min,拍干待用;

[0163] (iii) 封闭:用封闭液封闭酶标板,每孔200 μ L,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h,洗涤步骤同(ii);

[0164] (iv) 加样: 第一行每孔加入100 μ L 1 \times PBS作为空白对照, 第二行加入50 μ L 1 \times PBS作为阴性对照; 将本实施例1.2中的待测样品加入到其余六行, 每孔50 μ L; 再将实施例2制备的通用抗体用1 \times PBS稀释到效价浓度, 分别加入到后七行, 每孔50 μ L, 于37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h, 洗涤步骤同(ii);

[0165] (v) 加辣根过氧化物酶标二抗: 用1 \times PBS将辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体稀释2500倍, 每孔100 μ L, 于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min, 洗涤步骤同(ii);

[0166] (vi) 显色: 在显色前15min将底物A、B混合, 每孔150 μ L, 于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min;

[0167] (vii) 终止: 加入反应终止液, 每孔50 μ L, 使反应终止;

[0168] (viii) 测定: 5min内将酶标板置于酶标仪中测定OD_{450nm}值。

[0169] 抑制率计算公式如下:

[0170] 抑制率(I) % = $[1 - (OD_{\text{待测样品}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})] \times 100$

[0171] 其中, OD_{待测样品}为待测样品孔的OD值, OD_{对照}为阴性对照孔的OD值, OD_{空白}为空白对照孔的OD值。根据CEX标准品的标准曲线, 可计算出待测样品中残留的抗生素浓度。

[0172] 1.4添加回收试验

[0173] 分别以10、20和40 μ g/kg 3个浓度的头孢类抗生素标准品溶液(头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢噻肟)分别添加空白猪肉、空白牛肉、空白虾肉和空白牛奶, 同时分别以20、40和80 μ g/kg 3个浓度的头孢类抗生素标准品溶液(头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢噻肟)分别添加空白生猪肝和空白熟猪肝, 按照本实施例1.3中的方法进行测定, 每个浓度水平重复3次, 进行回收率考察, 计算各水平的添加回收率, 见表1-3。添加回收率计算公式为:

[0174] 添加回收率(100%) = 实测值/添加值 \times 100%

[0175] 表1ELISA法测定猪肉和牛肉样品的加标回收率(n=3)

[0176]

分析物	加标水平 (ug/kg)	猪肉		牛肉	
		回收率 (%)	变异系 数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)
头孢氨苄	10	74.8	7.8	78.2	14.4
	20	91.8	14.2	91.6	11.9
	40	83.5	11.4	80.1	22.6
头孢拉定	10	91.2	14.1	85.7	13.1
	20	83.1	5.6	74.5	11.0
	40	84.1	9.9	72.4	10.9
头孢羟氨苄	10	87.2	4.6	79.6	5.0
	20	81.1	4.1	85.2	4.5
	40	94.5	9.4	70.8	6.3
头孢哌酮	10	83.7	4.6	77.8	11.2
	20	86.0	5.4	89.0	8.5
	40	70.23	8.0	87.8	8.6
头孢唑啉	10	74.7	10.6	88.8	5.1
	20	74.6	10.8	81.6	5.418
	40	87.7	9.2	73.6	7.8
头孢噻肟	10	78.6	6.8	82.7	7.3
	20	70.4	13.3	82.4	12.4
	40	89.5	8.1	80.6	7.0

[0177] 表2ELISA法测定虾肉和牛奶样品的加标回收率 (n=3)

[0178]

分析物	加标水平 (ug/kg)	虾肉		牛奶	
		回收率(%)	变异系 数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)
头孢氨苄	10	77.6	8.9	87.5	17.7
	20	90.6	13.2	76.9	10.8
	40	92.8	6.4	90.4	9.5
头孢拉定	10	86.1	11.1	90.7	11.7
	20	75.3	8.0	82.2	14.1
	40	81.1	5.9	90.4	15.7

[0179]

头孢羟氨苄	10	76.7	5.3	78.1	8.8
	20	74.5	8.8	75.1	7.4
	40	94.5	13.7	90.4	5.4
头孢哌酮	10	91.9	6.4	76.8	7.0
	20	70.9	6.1	77.4	8.1
	40	88.2	12.8	90.0	11.4
头孢唑啉	10	83.3	4.7	70.1	7.8
	20	84.8	11.5	86.4	6.8
	40	89.2	10.7	80.9	14.8
头孢噻肟	10	75.4	7.0	76.2	6.0
	20	89.7	7.9	83.4	13.4
	40	84.0	7.7	86.5	8.6

[0180] 表3ELISA法测定生猪肝和熟猪肝样品的加标回收率 (n=3)

[0181]

分析物	加标水平 (ug/kg)	生猪肝		熟猪肝	
		回收率 (%)	变异系 数 (%)	回收率 (%)	变异系数 (%)
头孢氨苄	20	75.1	11.2	72.3	9.9
	40	95.6	5.7	81.9	12.0
	80	87.6	10.9	91.7	9.3
头孢拉定	20	85.4	6.4	77.1	5.8
	40	89.6	9.5	73.9	8.9
	80	83.1	12.8	93.8	7.3
头孢羟氨苄	20	88.1	4.7	89.6	5.3
	40	74.8	5.1	79.6	6.0
	80	91.2	6.7	92.3	7.5
头孢哌酮	20	78.1	13.5	80.3	8.0
	40	75.1	11.2	89.8	9.0
	80	81.0	14.8	75.9	12.9
头孢唑啉	20	75.0	11.6	81.7	8.1
	40	73.6	7.9	88.3	6.3
	80	80.6	9.1	91	8.3
头孢噻肟	20	90.9	9.2	79.3	8.4
	40	70.3	12.7	82.4	8.3
	80	86.3	9.5	79.1	11.5

[0182] 结果表明,三个加标水平的回收率均在70.23%~95.63%之间,说明样品前处理方法可行,该法满足对样品检测的需求;并且该方法的准确度满足分析要求。

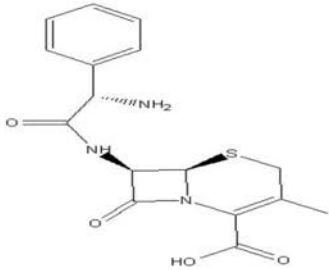
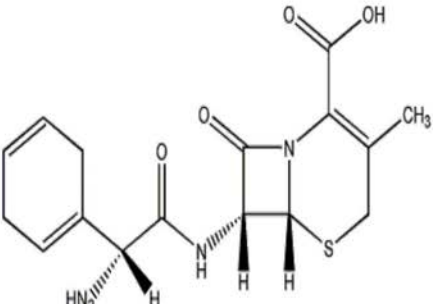
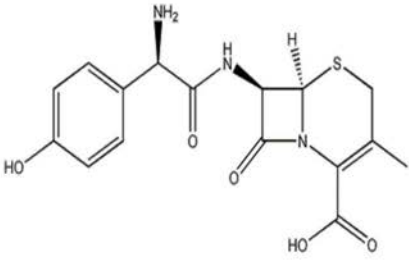
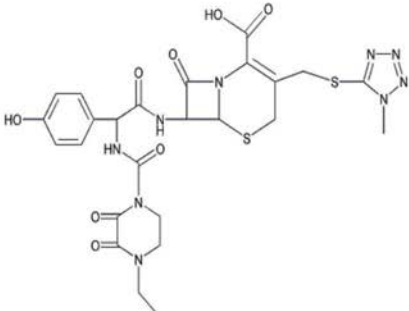
[0183] 实施例6本发明间接竞争ELISA试剂盒的特异性

[0184] 在已确定的优化条件下,对其他几种头孢类抗生素(7-ACA、CER、RAD、TAX、CFX、PER、ZOL)及其结构类似物青霉素钠进行相同的梯度稀释,然后分别进行间接竞争ELISA检测,并绘制标准曲线,求其半抑制浓度 IC_{50} ,见表4。以头孢类抗生素通用抗体对CEX的 IC_{50} 与

各竞争物的IC₅₀之比的百分数为其交叉反应率(CR%)。

[0185] 表4各分析物的交叉反应率

[0186]

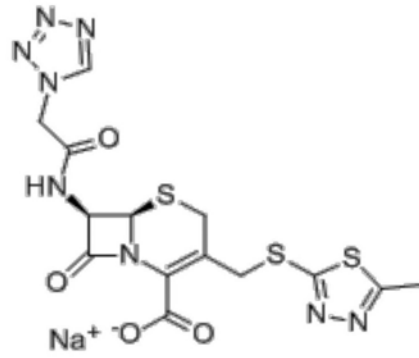
Analyte	Structure	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
头孢氨苄(Cephalexin)		0.780	100
头孢拉定(Cefradine)		0.843	85.25
头孢羟氨苄 (Cefadroxil)		0.875	82.20
头孢哌酮(Cefoperazone)		1.661	43.28

[0187]

头孢唑啉钠(Cefazolin sodium)

2.587

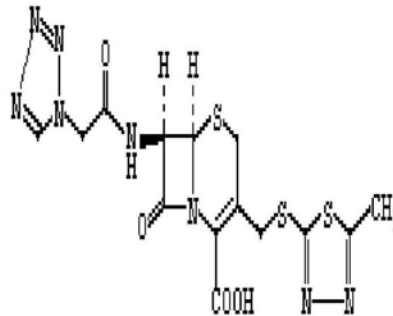
36.07



头孢唑啉(Cefazol)

2.304

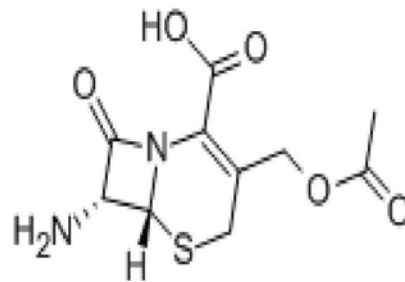
31.21



头孢噻肟(Cefotaxime)

3.085

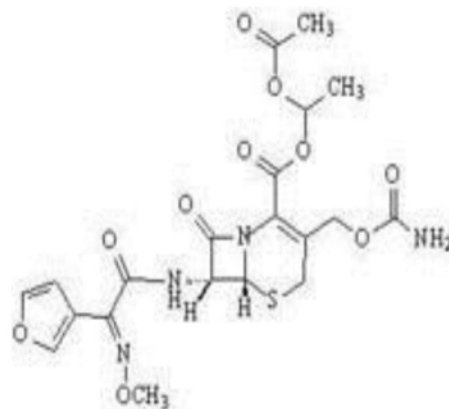
23.31



头孢呋辛(Cefuroxime)

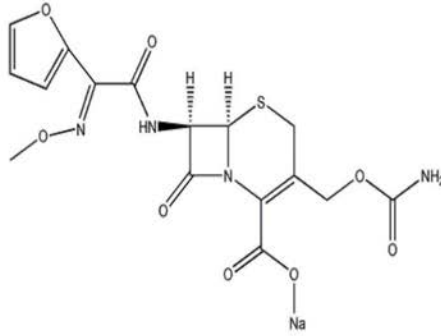
292.7

0.173



[0188]

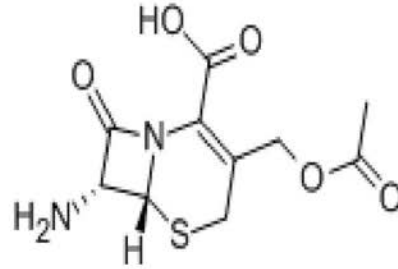
头孢呋辛钠(Cefuroxime Sodium)



363.3

0.139

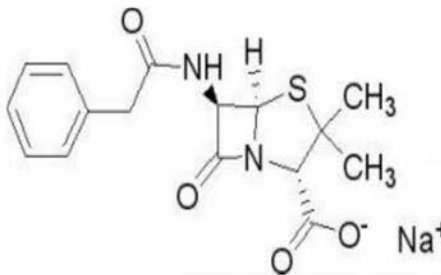
7-氨基头孢烷酸(7 - amino silane cephalosporin)



570.6

0.126

青霉素钠(Penicillin G Sodium salt)



1089.4

0.066

[0189] 由表4结果显示,本发明的ci-ELISA法对头孢氨苄的 IC_{50} 为0.78ng/mL,最低检出限 IC_{15} 可达 0.15×10^{-4} ng/mL。同时该方法下对头孢拉定的 IC_{50} 为0.843ng/mL,对头孢羟氨苄的 IC_{50} 为0.875ng/mL,对头孢哌酮的 IC_{50} 为1.661ng/mL,对头孢唑啉钠的 IC_{50} 为2.587ng/mL,对头孢唑啉的 IC_{50} 为2.304ng/mL,对头孢噻肟的 IC_{50} 为3.085ng/mL,说明该方法同样适用于头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢噻肟、头孢唑啉和头孢哌酮等其他头孢类抗生素的检测。

[0190] 本发明的ci-ELISA法对头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢噻肟等均有较好的识别效果,其交叉反应率分别为:100%、85.25%、82.20%、43.28%、31.21%、23.31%。而对于同含有 β -内酰胺环的结构类似物青霉素钠却没有交叉反应,表明本发明的通用抗体对于检测头孢类抗生素具有较高的特异性,可以作为检测食品中头孢类抗生素的通用抗体。

[0191] 结果显示,本发明的通用抗体与头孢氨苄和大部分头孢类抗生素均有较高的交叉反应率,而对于同含有 β -内酰胺环的结构类似物青霉素钠却没有交叉反应率,表明发明获得的通用抗体对于检测头孢类抗生素具有较高的特异性。

[0192] 实施例7本发明间接竞争ELISA试剂盒的符合性试验

[0193] 本实施例采用HPLC法对ci-ELISA分析方法进行验证,常规的HPLC检测方法的条件:色谱柱:Agilent extend C18色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m);流动相:A:011% $NH_3 \cdot H_2O$ 溶液,B:ACN;流动相流速:1.0mL/min;柱温:35 $^{\circ}C$;进样量:20 μ L;梯度条件:0min V($NH_3 \cdot H_2O$):

V (ACN) = 95:5, 10min V (NH₃ · H₂O) : V (ACN) = 70:30, 16min V (NH₃ · H₂O) : V (ACN) = 40:60。选择210nm作为检测波长。

[0194] 将ELISA法和HPLC法测定动物性食品组织加标回收结果进行线性回归分析,拟合方程如表5所示。

[0195] 表5ELISA和HPLC法测定样品加标回收结果的拟合方程

	头孢菌素名称	线性方程	R ²
	头孢羟氨苄	Y=0.9691X+0.805	0.9811
	头孢氨苄	Y=0.8813X+1.7503	0.9762
[0196]	头孢噻肟	Y=0.9744X+1.301	0.96
	头孢拉定	Y=0.8984X+2.0679	0.9637
	头孢唑啉	Y=0.9714X+0.6279	0.9786
	头孢哌酮	Y=1.1384X-1.7512	0.9626

[0197] 由表5可知,ci-ELISA法测定的样品加标回收结果与HPLC法测定的样品加标回收结果呈现出良好的线性关系(R²>0.96),说明本发明所建立的ci-ELISA法检测动物源性食品中头孢类抗生素的结果是准确可靠的,可以应用于动物源性食品中头孢类抗生素的快速定量分析,同时可以满足现场大批量样品的快速筛选工作,方法快速简便。通过常规检测方法HPLC法对ELISA法的检测结果进行验证,结果显示,该方法在检测头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮等6种头孢类抗生素的检出限均可达到10μg/kg,证明了方法的可靠性。

[0198] 实施例8本发明间接竞争ELISA试剂盒的重复稳定性试验

[0199] 重复性亦即实验室内的变异程度,同一动物源性食品用同样的样品前处理方法2进行6次实验,测定数值的变异系数为4.3%~5.6%,小于10%,说明该ci-ELISA法测定动物源性食品中头孢类抗生素残留具有重复稳定性和准确性,可用于动物源性食品中头孢类抗生素残留测定。

[0200] 由上述实施例1-8可知,本发明制备出一种头孢类抗生素的通用抗体,其对头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢噻肟等均有较好的识别效果,其交叉反应率分别为:100%、85.25%、82.20%、43.28%、31.21%、23.31%。而对于同含有β-内酰胺环的结构类似物青霉素钠却没有交叉反应,表明该抗体对于检测头孢类抗生素具有较高的特异性,可以作为检测动物源性食品中头孢类抗生素的通用抗体。本发明建立并优化了动物源性食品中头孢类抗生素的高通量多残留检测方法,该方法对头孢氨苄的IC₅₀为0.78ng/mL,最低检出限IC₁₅可达0.15×10⁻⁴ng/mL。同时该方法下对头孢拉定的IC₅₀为0.843ng/mL,对头孢羟氨苄的IC₅₀为0.875ng/mL,对头孢哌酮的IC₅₀为1.661ng/mL,对头孢唑啉钠的IC₅₀为2.587ng/mL,对头孢唑啉的IC₅₀为2.304ng/mL,说明该方法同样适用于对头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢噻肟、头孢唑啉和头孢哌酮等其他头孢类抗生素的检测。通过常规检测方法HPLC法对ELISA法的检测结果进行验证,结果显示,该方法在检测头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮等6种头孢类抗生素的检出限均可达到10μg/kg,证明了方法的可靠性。

[0201] 综上所述,本发明的间接竞争ELISA试剂盒具有以下有益效果:

[0202] (1) 本发明制备出一种头孢类抗生素通用抗体,该通用抗体和大部分头孢类抗生

素均有较高的交叉反应率,而对于同含有 β -内酰胺环的结构类似物青霉素钠却几乎没有交叉反应,表明该通用抗体对于检测头孢类抗生素具有较高的特异性。同时采用该高特异性的通用抗体制备试剂盒,保证了检测结果的可靠性。本发明的试剂盒具有敏感度高、检测药物种类多、成本低、操作简单、便于携带、检测时间短、储存简单、保质期长的优点。

[0203] (2) 本发明的试剂盒能准确灵敏地检测动物源性食品中头孢类抗生素残留,样本的前处理过程简单,耗时少,能同时检测大量的样品,样品检测成本远低于传统的检测方法。

[0204] 所属领域的普通技术人员应当理解:以上任何实施例的讨论仅为示例性的,并非旨在暗示本公开的范围(包括权利要求)被限于这些例子;在本发明的思路下,以上实施例或者不同实施例中的技术特征之间也可以进行组合,并存在如上所述的本发明的不同方面的许多其它变化,为了简明它们没有在细节中提供。因此,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何省略、修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

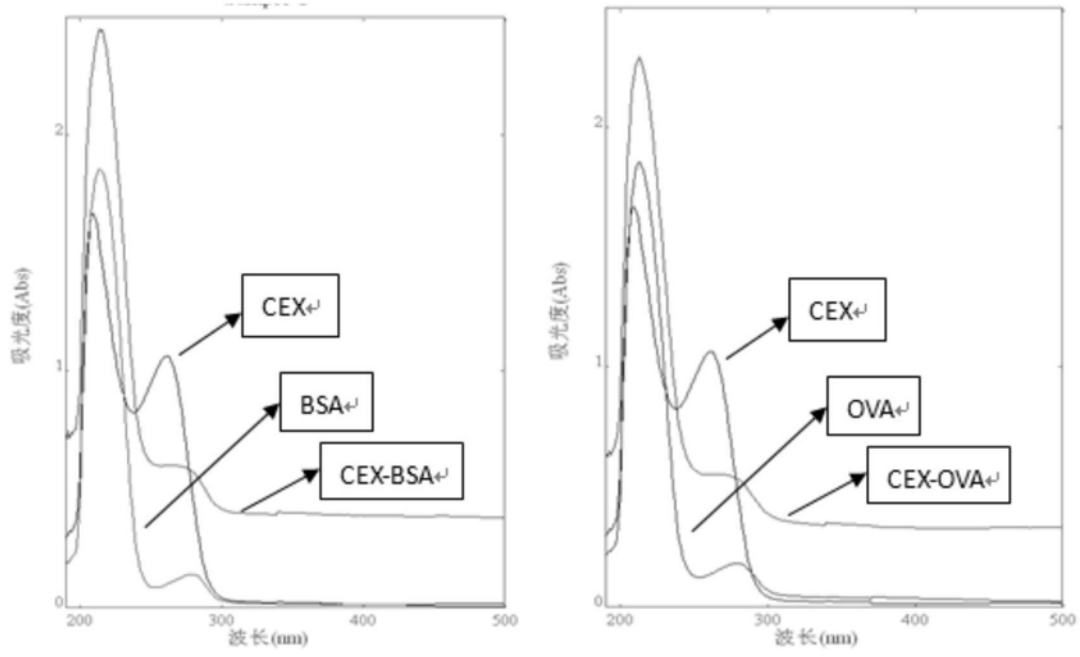


图1

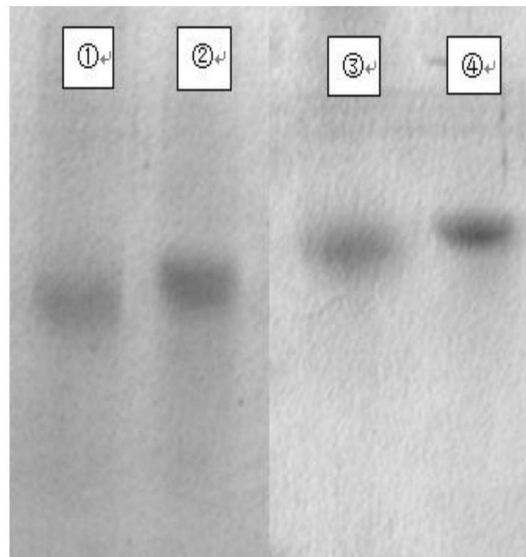


图2

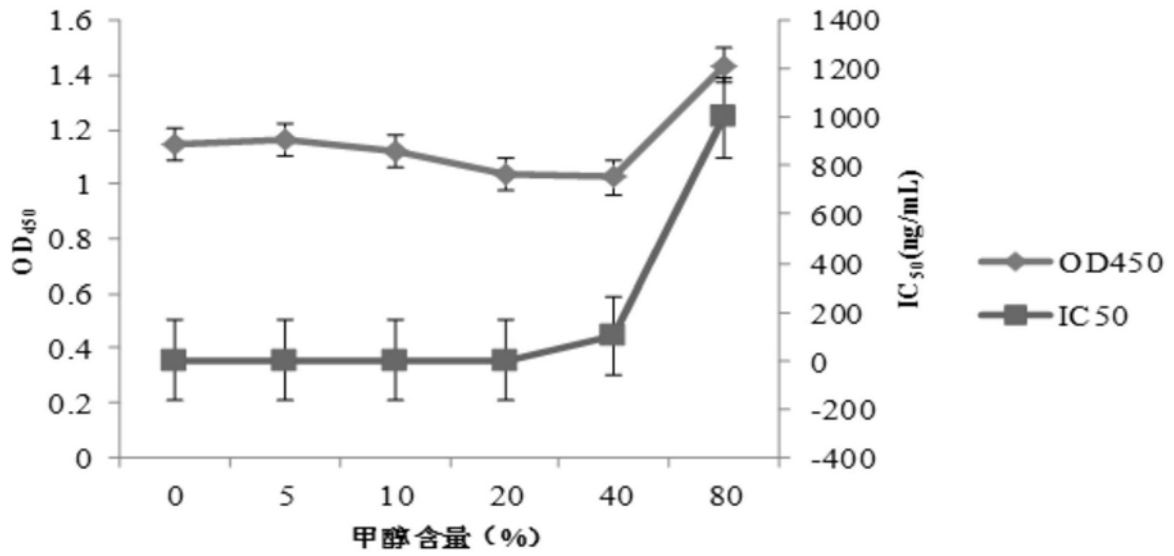


图3

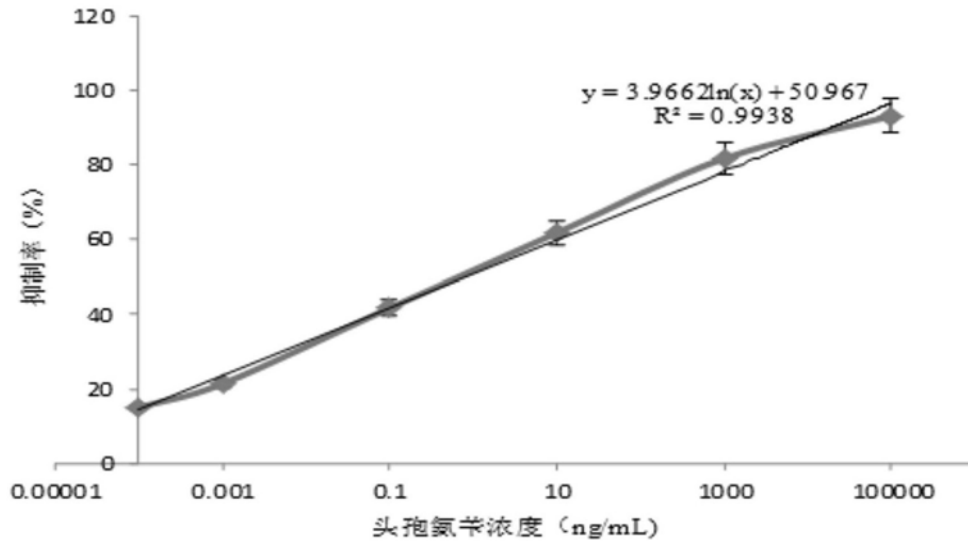


图4

专利名称(译)	一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN107014993B	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201710225400.6	申请日	2017-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	河北农业大学		
申请(专利权)人(译)	河北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	河北农业大学		
[标]发明人	王向红 桑亚新 刘卫华 张雪娇 张晶		
发明人	王向红 桑亚新 刘卫华 张雪娇 张晶		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	王安娜 李翔		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN107014993A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测动物源性食品中头孢类抗生素的间接竞争ELISA试剂盒及其应用,包括包被有包被原的酶标板、头孢类抗生素标准品、头孢类抗生素通用抗体、酶标记二抗、稀释缓冲液、洗涤缓冲液、底物显色液和反应终止液;头孢类抗生素通用抗体能特异性识别头孢氨苄、头孢拉定、头孢羟氨苄、头孢哌酮、头孢唑啉或头孢噻肟,不能识别青霉素钠。本发明制备出一种头孢类抗生素通用抗体,该通用抗体和大部分头孢类抗生素均有较高的交叉反应率,而对于同含有β-内酰胺环的结构类似物青霉素钠却几乎没有交叉反应,表明该通用抗体具有较高的特异性。采用该通用抗体制备的试剂盒具有敏感度高、检测药物种类多、成本低、操作简单、检测时间短的优点。

