



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108558718 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201711489726.6

(22) 申请日 2017.12.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108558718 A

(43) 申请公布日 2018.09.21

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72) 发明人 沈玉栋 李然 王弘 杨金易

徐振林 韦晓群 孙远明

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司

公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

C07C 317/40 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101349693 A, 2009.01.21

曾华金等. 氟甲砜霉素人工抗原的合成与鉴定.《郑州大学学报(医学版)》.2009,第44卷(第06期),1166-1168.

赵朋玲等.两种方法制备氟苯尼考人工抗原及其鉴定.《食品科学》.2010,第31卷(第15期),225-230.

Lingling An等. Development and Validation of a Sensitive Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Screening of Florfenicol and Thiamphenicol in Edible Animal Tissue and Feed.《Food Anal. Methods》.2016,第9卷2434-2443.

骆鹏杰等. 氟苯尼考人工抗原的合成与鉴定.《中国兽医杂志》.2009,第45卷(第9期),87-89.

P. J. Luo等. Technical note: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of florfenicol and thiamphenicol in swine feed.《J. Anim. Sci.》.2011,第89卷3612-3616.

审查员 刘红彦

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

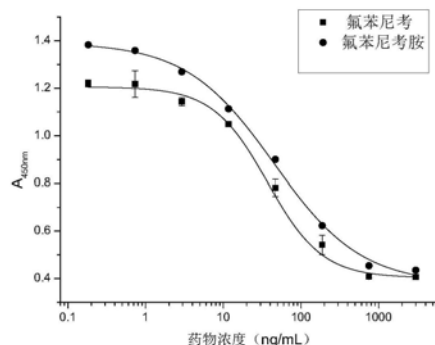
(54) 发明名称

氟苯尼考及氟苯尼考胺抗原、抗体及其同时检测酶联免疫分析方法

(57) 摘要

本发明公开了氟苯尼考及氟苯尼考胺抗原、抗体及其同时检测酶联免疫分析方法。本发明利用氟苯尼考作为半抗原与载体蛋白偶联获得人工抗原,作为包被原;同时在氟苯尼考分子苄羟基上衍生丁二酸半酯偶联手臂得到氟苯尼考半抗原,与载体蛋白偶联得到氟苯尼考人工抗原,作为免疫原;制备了检测抗体,并建立了酶联免疫检测方法,对于氟苯尼考的 $IC_{50}=37.10$ ng/mL,线性检测范围为12.03~114.49 ng/mL,对于氟苯尼考胺 $IC_{50}=45.3$ ng/mL,线性检测范围为

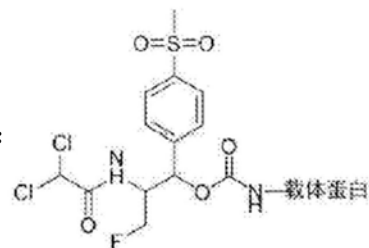
10.76~190.69 ng/mL,具有灵敏度高,特异性好等显著优势,可用于快速检测食品中残留的氟苯尼考及氟苯尼考胺,具有广阔的应用前景。



1. 一种氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 包被:将1mg/mL的包被原用包被缓冲液稀释1000倍,加入酶标板孔中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C水浴箱中过夜;

所述包被原为氟苯尼考与载体蛋白的偶联物,其结构如下:



所述载体蛋白为卵清蛋白,所述包被原制备方法如下:将10.67mg氟苯尼考半抗原溶于0.25mL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入8.11mg的N,N'-羰基二咪唑,37 $^{\circ}$ C搅拌2h,记为A液;将13.41mg载体蛋白OVA溶于3mL 0.01mol/L PBS中,记为B液,搅拌下将A液缓慢滴入B液中,滴加时间控制在10min左右,4 $^{\circ}$ C搅拌反应72h;4 $^{\circ}$ C下PBS溶液透析3天,得到氟苯尼考人工包被原,分装于1mL离心管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中备用;

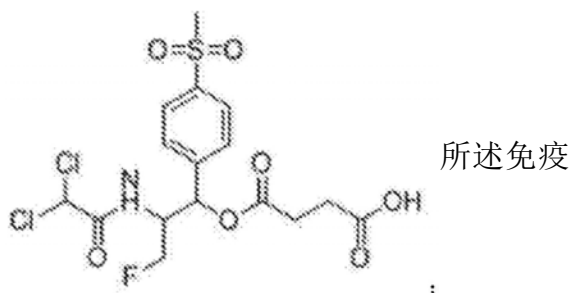
S2. 洗涤:倾去孔内液体,洗板2次,每孔加洗涤液300 μ L,甩干;

S3. 封闭:每孔加入120 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C封闭3h,甩干,倒置于37 $^{\circ}$ C烘箱中1h备用;

S4. 加样及孵育:每孔加入50 μ L稀释一定倍数的抗体和50 μ L药物稀释液;震荡混匀,37 $^{\circ}$ C水浴箱中反应40min后,洗板机洗板5次,每孔加入洗涤液300 μ L,甩干;抗体稀释倍数为1:8000;

所述抗体是以半抗原FFD偶联钥孔血蓝蛋白得到的人工抗原FFD-KLH作为免疫原,通过

动物免疫而获得的,所述半抗原FFD的结构如下:



原的制备方法为:将5mg FFD半抗原溶于0.2mL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入4.78mg N,N'-二环己基碳二亚胺和2.65mg N-羟基琥珀酰亚胺,4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜,离心后取上清液记为A液,将14.6mg载体蛋白KLH溶于4mL 0.01mol/L PBS中,记为B液,搅拌下将A液滴入B液中,4 $^{\circ}$ C反应12h,反应完离心取上清,4 $^{\circ}$ C下PBS溶液透析3天,得到氟苯尼考人工免疫原,以1mg/mL的浓度分装于1mL离心管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中备用;

S5. 加入二抗:每孔加入100 μ L稀释5000倍的HRP-羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C水浴箱中反应30min,洗板5次,甩干;

S6. 显色:每孔加入显色液100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C水浴箱中显色10min后,每孔加入50 μ L终止液10% H_2SO_4 ;

S7. 测定:用酶联免疫检测仪测定各孔A450nm的吸光值;

S8. 计算:用Origin8.6的四参数拟合模块计算抑制曲线的IC50值。

氟苯尼考及氟苯尼考胺抗原、抗体及其同时检测酶联免疫分析 方法

技术领域

[0001] 本发明涉及氟苯尼考及氟苯尼考胺检测技术领域,更具体地,涉及一种氟苯尼考及氟苯尼考胺抗原、抗体及其同时检测酶联免疫分析方法。

背景技术

[0002] 氟苯尼考(Florfenicol, $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$)属于氯霉素类广谱抗生素,广泛应用在水产养殖、畜牧、家禽疾病的治疗等领域。相对于氯霉素会给人体健康造成严重危害而被许多国家列为禁用药物,甲砒霉素会引起动物再生障碍性贫血等,氟苯尼考与氯霉素和甲砒霉素抗菌活性相似且用起来更安全。但是已有报道表明氟苯尼考具有一定的免疫毒性和胚胎毒性,目前已有许多国家对其在动物组织中的最大残留限量做了规定。氟苯尼考的不当使用及残留会危害到人类的健康,因此加强对动物产品中氟苯尼考的检测监控十分重要。

[0003] 氟苯尼考在动物体内的最终代谢物主要是氟苯尼考胺,规定在检测氟苯尼考残留时将氟苯尼考胺作为残留标识物同时检测。目前氟苯尼考及氟苯尼考胺的分析方法主要是仪器检测方法,该方法准确可靠,常作为确证方法,但存在设备昂贵、需要专业人员、样品通量低等不足。免疫检测技术是基于抗原抗体特异性反应的分析方法,具有灵敏、快速、高通量等特点,可与仪器确证技术搭配应对食品安全快速筛查需求,近年来已成为研究热点。研究氟苯尼考及氟苯尼考胺的酶联免疫检测方法,对于氟苯尼考及氟苯尼考胺规模化样品快筛和检测具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

[0004] 本发明的第一个目的是提供氟苯尼考作为氟苯尼考和/或氟苯尼考胺半抗原的应用。

[0005] 本发明的第二个目的是提供氟苯尼考在制备氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的人工抗原中的应用。

[0006] 本发明的第三个目的是提供一种氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的人工抗原,。

[0007] 本发明的第四个目的是提供氟苯尼考或所述人工抗原在检测氟苯尼考和/或氟苯尼考胺,或者在制备氟苯尼考和/或氟苯尼考胺测试试剂盒中的应用。本发明的第五个目的是提供一种检测氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的免疫原与包被原组合。

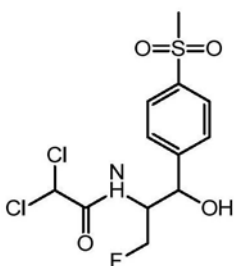
[0008] 本发明的第六个目的是提供一种检测氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的酶联免疫检测方法

[0009] 本发明的第七个目的是一种氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的酶联免疫检测试剂盒。

[0010] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

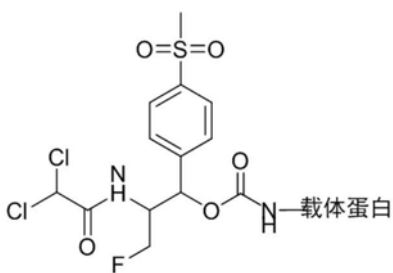
[0011] 氟苯尼考(FF)作为氟苯尼考和/或氟苯尼考胺半抗原的应用,氟苯尼考的结构如下:

[0012]



[0013] 一种氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的人工抗原,所述人工抗原为所述氟苯尼考与载体蛋白的偶联物,其结构如下:

[0014]



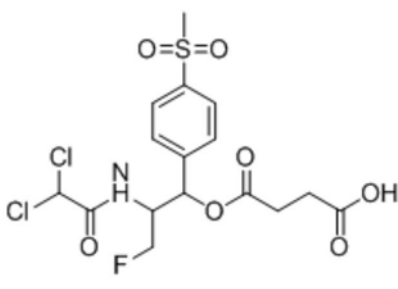
[0015] 优选地,所述载体蛋白为钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0016] 所述氟苯尼考在制备氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的人工抗原中的应用。

[0017] 所述氟苯尼考或所述人工抗原在检测氟苯尼考和/或氟苯尼考胺,或者制备氟苯尼考和/或氟苯尼考胺测试试剂盒中的应用。

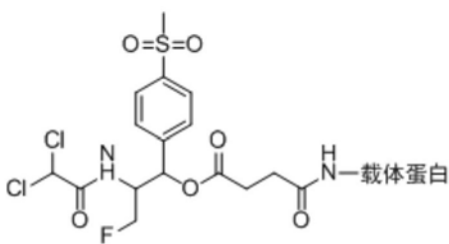
[0018] 另一种氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的半抗原FFD是通过氟苯尼考分子苯羟基上衍生丁二酸半酯偶联手臂的羧基型半抗原,其结构如下:

[0019]



[0020] FFD与载体蛋白偶联得到氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的人工抗原,其结构如下:

[0021]



[0022] 一种检测氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的免疫原与包被原组合,包被原为氟苯尼考与载体蛋白偶联得到的人工抗原,所述免疫原为氟苯尼考半抗原FFD与钥孔血蓝蛋白的偶联物。

[0023] 一种氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的酶联免疫检测试剂盒,包含有所述免疫原与包被原组合。

[0024] 优选地,所述包被原为氟苯尼考与卵清蛋白的偶联物。

[0025] 另外,所述半抗原FFD的制备方法,氟苯尼考FF与丁二酸酐置于有机溶剂中搅拌反应。

[0026] 优选地,包括以下步骤:

[0027] S1.将氟苯尼考与丁二酸酐按1:1.5~2的摩尔比加入到适量二氯甲烷中,氟苯尼考与丁二酸酐的摩尔比优选为1:2;

[0028] S2.向上述混合液中滴加适量三乙胺,水浴加热反应2~4小时,氟苯尼考、丁二酸酐及三乙胺的摩尔比优选为1:2:4,水浴温度优选为50℃,反应时间优选为3小时;

[0029] S3.反应结束后,产物混合液用乙酸乙酯萃取3次,优选地,每次萃取混合液与乙酸乙酯的体积比为1:2;

[0030] S4.将S3中萃取液旋干并过硅胶柱纯化,蒸干后得到淡黄色粉末即为半抗原FFD。

[0031] 所述由FFD制备的人工抗原的制备方法,将所述氟苯尼考溶于N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌加入N,N-羰基二咪唑,然后再加入溶有载体蛋白的PBS溶液,4℃下搅拌反应72h;偶联混合物于4℃下PBS透析3天得到目标产物;所述半抗原与载体蛋白的摩尔比为25~100:1。

[0032] 所述由FF制备的人工抗原的制备方法,将所述半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌加入N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),然后再加入溶有载体蛋白的PBS溶液,4℃下搅拌反应过夜;偶联混合物于4℃下PBS透析3天得到目标产物,所述半抗原与载体蛋白的摩尔比为25~100:1。

[0033] 一种检测氟苯尼考的酶联免疫检测方法,该方法包括以下步骤:

[0034] S1.将氟苯尼考半抗原FFD与载体蛋白的偶联物作为人工抗原免疫动物制备检测氟苯尼考的抗体;

[0035] S2.将FF与载体蛋白偶联得到的人工抗原作为包被原包被在微孔板上,将步骤S1制备得到的检测氟苯尼考的抗体加入微孔板中;

[0036] S3.加入待测样品,采用间接竞争酶联免疫方法测定待测样品中氟苯尼考和/或氟苯尼考胺的含量。

[0037] 优选地,所述酶联免疫检测方法,包括以下步骤:

[0038] S1.包被:将包被原用包被缓冲液稀释一定倍数,并做空白对照组,每孔100μL,37℃孵育过夜;

[0039] S2.洗涤:倾去孔内液体,洗涤液洗涤2次,甩干;

[0040] S3.封闭:每孔加120μL封闭液,37℃封闭3h,甩干,倒置于37℃烘箱中1h;

[0041] S4.加样及孵育:将标准品氟苯尼考溶于DMF配制成1.0mg/mL的溶液。先用0.01mol/L的PBS缓冲液将其稀释成一定浓度的标准品溶液,再5倍梯度稀释,共计7个浓度梯度;酶标板每孔加入50μL梯度稀释的标准品溶液和50μL特定浓度的抗血清,震荡混匀,37℃反应40min后,洗涤5次,甩干;

[0042] S5.加二抗:每孔加入100μL以PBS稀释5000倍的HRP-羊抗兔IgG,37℃反应30min,洗涤5次;

[0043] S6.显色:每孔加入100μL显色液,37℃显色10min,然后每孔加入50μL的10% H_2SO_4 终止反应;

[0044] S7.读数测定:450nm波长下测吸光值;选择吸光度值在1.0~1.5区间内的抗血清

稀释倍数为抗血清效价,抗血清的效果由其抑制率得出;

[0045] S8.计算:用Origin8.6的四参数拟合模块计算抑制曲线的 IC_{50} 值。

[0046] 一种抗氟苯尼考及氟苯尼考胺的高灵敏度抗体,是以所述半抗原FFD偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)得到的人工抗原FFD-KLH作为免疫原,通过动物免疫而获得的。

[0047] 优选地,所述免疫原是由以下步骤制备得到:

[0048] S1.将所述半抗原FFD溶于mL N,N-二甲基甲酰胺中;

[0049] S2.在S1得到的溶液中分别加入倍于半抗原摩尔质量的N,N-二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,4℃下搅拌反应过夜,离心后取上清液记为A液;

[0050] S3.将载体蛋白KLH溶于0.01mol/L PBS中,记为B液,搅拌下将A液滴入B液中,4℃反应12h,优选地,滴加时间控制在30min左右;

[0051] S4.反应完离心取上清,4℃下PBS溶液透析3天,得到氟苯尼考人工免疫原,以1mg/mL的浓度分装于1mL离心管中,冻存于-20℃冰箱中备用。

[0052] 其中,半抗原FFD,DCC和NHS的摩尔比为1:1.5:1.5。

[0053] 所述人工抗原制备得到的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体或基因工程抗体。

[0054] 将所述氟苯尼考人工免疫抗原FFD-KLH免疫动物制备抗氟苯尼考及氟苯尼考胺的抗体。

[0055] 优选地,所述包被原FF-OVA是由以下步骤制备得到:

[0056] S1.将所述FF半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中;

[0057] S2.在S1得到的溶液中加入的N'-N-羰基二咪唑,37℃搅拌2h,记为A液;

[0058] S3.将载体蛋白OVA溶于0.01mol/L PBS中,记为B液,搅拌下将A液缓慢滴入B液中,4℃搅拌反应72h,优选地,滴加时间控制在10min左右;

[0059] S4.4℃下PBS溶液透析3天,得到氟苯尼考人工包被原,分装于1mL离心管中,冻存于-20℃冰箱中备用。

[0060] 其中,半抗原FF,DCC和NHS的摩尔比为1:1.5:1.5。

[0061] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0062] (1)针对氟苯尼考及氟苯尼考胺,将通过氟苯尼考分子苄羟基上衍生丁二酸半酯偶联手臂的羧基型半抗原FFD和原药半抗原FF偶联不同载体蛋白分别作为人工免疫原和包被原。

[0063] (2)本发明制备的抗氟苯尼考及氟苯尼考胺的多克隆抗体,对结构类似物甲砒霉素及氯霉素无明显交叉反应,建立的酶联免疫检测方法可以实现直接检测,方便快捷,为检测食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺的含量提供了快速高效的检测手段。

[0064] (3)本发明的抗体及免疫检测方法可用于氟苯尼考与氟苯尼考胺残留的特异性检测,该方法对于氟苯尼考的 $IC_{50}=37.10\text{ng/mL}$,线性检测范围为12.03~114.49ng/mL,对于氟苯尼考胺 $IC_{50}=45.3\text{ng/mL}$,线性检测范围为10.76~190.69ng/mL。所述抗体具有灵敏度高,准确性好等显著优势,因此本发明提供的抗原和抗体,可用于建立氟苯尼考和氟苯尼考胺的酶联免疫检测方法,从而用于快速检测食品中残留的氟苯尼考和氟苯尼考胺,具有广阔的应用前景。

附图说明

- [0065] 图1为半抗原FFD质谱鉴定图。
- [0066] 图2为载体蛋白KLH、半抗原FFD和免疫原FFD-KLH的紫外吸收光谱图。
- [0067] 图3为载体蛋白OVA、半抗原FF和包被原FF-OVA的紫外吸收光谱图。
- [0068] 图4为氟苯尼考及氟苯尼考胺抑制曲线。

具体实施方式

[0069] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0070] 实施例1半抗原的制备方法

[0071] 半抗原FFD的制备,按照如下方法:

[0072] 将氟苯尼考580mg与丁二酸酐240mg加入到5ml二氯甲烷中,再向上述混合液中滴加680 μ L三乙胺,50 $^{\circ}$ C水浴加热反应3小时,反应结束后,产物混合液用乙酸乙酯萃取3次,每次萃取混合液与乙酸乙酯的体积比为1:2;将萃取液旋干并过硅胶柱纯化,蒸干后得到淡黄色粉末即为半抗原FFD,图1为FFD质谱鉴定图。

[0073] 实施例2人工抗原的制备方法

[0074] 1,免疫原FFD-KLH的制备

[0075] 活泼脂法:将5mg FFD半抗原溶于0.2mL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入4.78mg N,N-二环己基碳二亚胺和2.65mg N-羟基琥珀酰亚胺,4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜,离心后取上清液记为A液。将载体蛋白(14.6mg KLH)溶于4mL 0.01mol/L PBS中,记为B液,搅拌下将A液滴入B液中,4 $^{\circ}$ C反应12h,反应完离心取上清,4 $^{\circ}$ C下PBS溶液透析3天,得到氟苯尼考人工免疫原,以1mg/mL的浓度分装于1mL离心管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0076] 2,包被原FF-OVA的制备

[0077] N,N-羰基二咪唑法:将10.67mg FF半抗原溶于0.25mL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入8.11mg的N,N-羰基二咪唑,37 $^{\circ}$ C搅拌2h,记为A液;将载体蛋白(13.41mg OVA)溶于3mL 0.01mol/L PBS中,记为B液,搅拌下将A液缓慢滴入B液中,滴加时间控制在10min左右,4 $^{\circ}$ C搅拌反应72h;4 $^{\circ}$ C下PBS溶液透析3天,得到氟苯尼考人工包被原,分装于1mL离心管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0078] 3、氟苯尼考免疫原和包被原的表征

[0079] (1) 免疫原与包被原的鉴定采用紫外扫描的方法,在200~400nm波长范围内测定免疫原和包被原的紫外吸收光谱,比较不同物质的扫描曲线,鉴定半抗原与载体蛋白是否偶联成功。由于载体蛋白和半抗原在紫外光谱条件下都具有最大吸收峰,如果偶联成功,特征吸收峰会相互叠加,从而导致最大吸收峰的蓝移。

[0080] (2) 如图2、图3所示,在280nm左右有载体蛋白特征吸收峰,免疫原的特征吸收峰都出现了明显的蓝移,所以从紫外光谱扫描结果可以证明氟苯尼考免疫原与包被原偶联成功。

[0081] 实施例3抗体制备及鉴定

[0082] 2.5kg左右的雌性新西兰大白兔首次免疫时,注射免疫原的量为0.5mL/只,取0.5mL 1mg/mL的免疫原加等体积的弗氏完全佐剂,乳化充分后在兔子背部皮下多点注射,每点约200 μ L;四周后进行第2次免疫,注射免疫原的量为0.5mL/只,用等体积弗氏不完全佐剂乳化;三周后进行第3次免疫,第4次免疫与第3次之间也是间隔3周,共免疫4次。4免后一周心脏采血取抗体血清,抗血清采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,置于-20℃保存备用。

[0083] 第3次加强免疫后第七天,耳缘静脉采血200 μ L,37℃温育30min,4000r/min离心10min,取上清,-20℃保存。

[0084] 采用间接ELISA法测定抗血清的效价和特异性,其步骤如下:

[0085] S1.包被:将1mg/mL的包被抗原用包被缓冲液稀释1000倍,并做空白对照组,100 μ L/孔加入到96孔酶标板中,置于37℃水浴箱中孵育过夜。

[0086] S2.洗涤:倾去孔内液体,设定洗板机参数每孔加洗涤液300 μ L,洗板2次,然后甩干洗涤液。

[0087] S3.封闭:每孔加120 μ L封闭液,37℃封闭3h,甩干孔内液体,置于37℃烘箱1h至烘干。

[0088] S4.加样及孵育:效价列加入50 μ L梯度稀释的抗血清和50 μ L稀释液,震荡混匀,37℃水浴箱中反应40min后,300 μ L/孔洗涤5次,甩干孔中液体。

[0089] S5.加二抗:每孔加入100 μ L HRP-羊抗兔IgG(PBS稀释5000倍),37℃恒温水浴箱反应30min,300 μ L/孔洗涤5次,甩干孔中液体。

[0090] S6.显色:每孔加入显色液100 μ L,置于37℃水浴箱中显色10min后,每孔加入50 μ L终止液(10% H_2SO_4)。

[0091] S7.读数测定:在波长450nm条件下用酶标仪读取吸光值(OD)。

[0092] (3)选择吸光度值在1.0~1.5区间内的抗血清稀释倍数为抗血清效价,结果表明抗血清的效价为1:8000。

[0093] 实施例4间接竞争酶联免疫测定氟苯尼考和氟苯尼考胺方法的建立

[0094] 1、间接竞争酶联免疫(icELISA)反应具体包括以下步骤:

[0095] S1.包被:用包被液将包被原稀释至合适浓度,加入酶标板孔中,100 μ L/孔,37℃水浴箱中过夜。

[0096] S2.洗涤:倾去孔内液体,洗板2次,每孔加洗涤液300 μ L,甩干。

[0097] S3.封闭:每孔加入120 μ L封闭液,37℃封闭3h,甩干,倒置于37℃烘箱中1h备用。

[0098] S4.加样及孵育:每孔加入50 μ L稀释一定倍数的抗体和50 μ L药物稀释液;震荡混匀,37℃水浴箱中反应40min后,洗板机洗板5次,每孔加入洗涤液300 μ L,甩干。

[0099] S5.加入二抗:每孔加入100 μ L稀释5000倍的HRP-羊抗兔IgG,37℃水浴箱中反应30min,洗板5次,甩干。

[0100] S6.显色:每孔加入显色液100 μ L,置于37℃水浴箱中显色10min后,每孔加入50 μ L终止液(10% H_2SO_4)。

[0101] S7.测定:用酶联免疫检测仪测定各孔 A_{450nm} 的吸光值。

[0102] S8.计算:用Origin8.6的四参数拟合模块计算抑制曲线的 IC_{50} 值。

[0103] 2、配制3000ng/mL、750ng/mL、187.5ng/mL、46.88ng/mL、11.72ng/mL、2.93ng/mL、

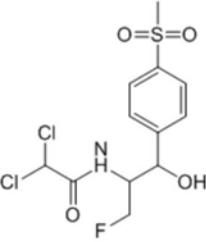
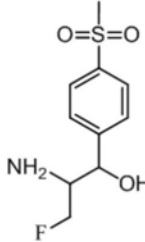
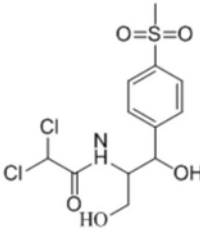
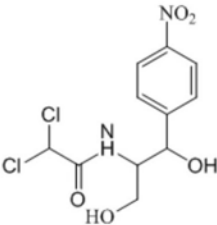
0.73ng/mL的氟苯尼考/氟苯尼考胺标准品溶液,建立间接酶联免疫检测方法的标准曲线。

[0104] 图4所示为氟苯尼考及氟苯尼考胺的抑制曲线。该方法针对氟苯尼考 $IC_{50}=37.10\text{ng/mL}$,线性检测范围为12.03~114.49ng/mL。针对氟苯尼考胺 $IC_{50}=45.3\text{ng/mL}$,线性检测范围为10.76~190.69ng/mL。

[0105] 实施例5抗体交叉反应率的测定

[0106] 1、按实施例4中所得最佳包被抗原浓度和最佳抗血清稀释倍数,以氟苯尼考、氟苯尼考胺、甲砒霉素及氯霉素等结构类似物为竞争标准品,进行间接竞争ELISA实验,检测氟苯尼考多克隆抗体的特异性,其半数抑制浓度(IC_{50})和交叉反应率(CR)数值在表1中列出。

[0107] 表1

化合物	化学结构	$IC_{50}(\text{ng/mL})$	CR
氟苯尼考		37.10	100%
氟苯尼考胺		45.3	82%
甲砒霉素		>1000	<5%
氯霉素		>1000	<5%

[0110] 实验结果表明,氟苯尼考多克隆抗体与氟苯尼考胺有82%的交叉,与结构类似物甲砒霉素及氯霉素几乎无交叉,说明本发明的氟苯尼考多克隆抗体特异性好,建立的间接酶联免疫检测方法特异性也非常好。

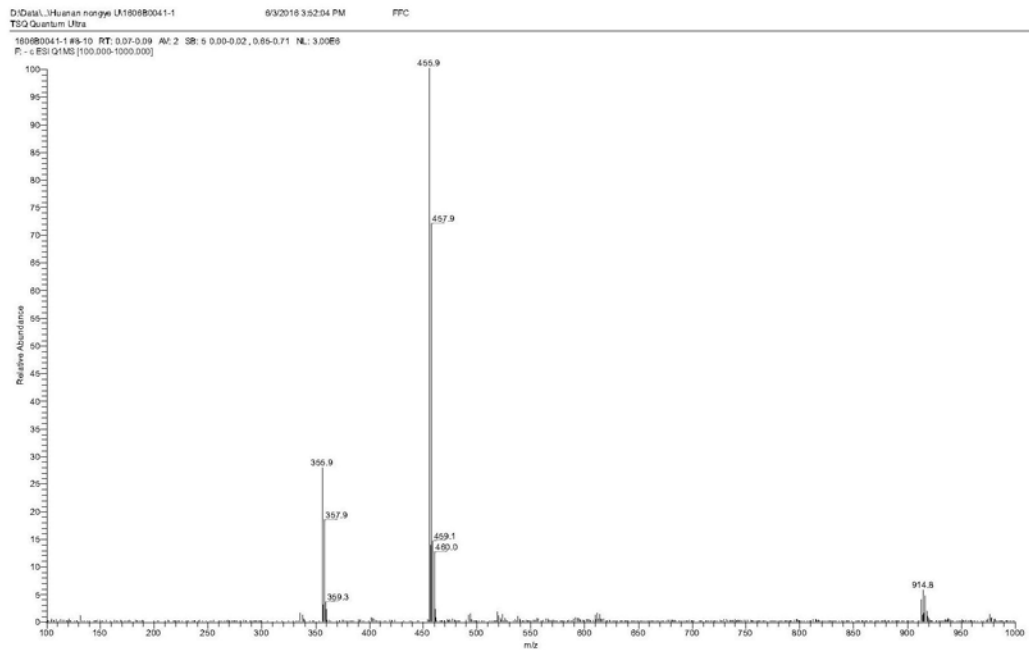


图1

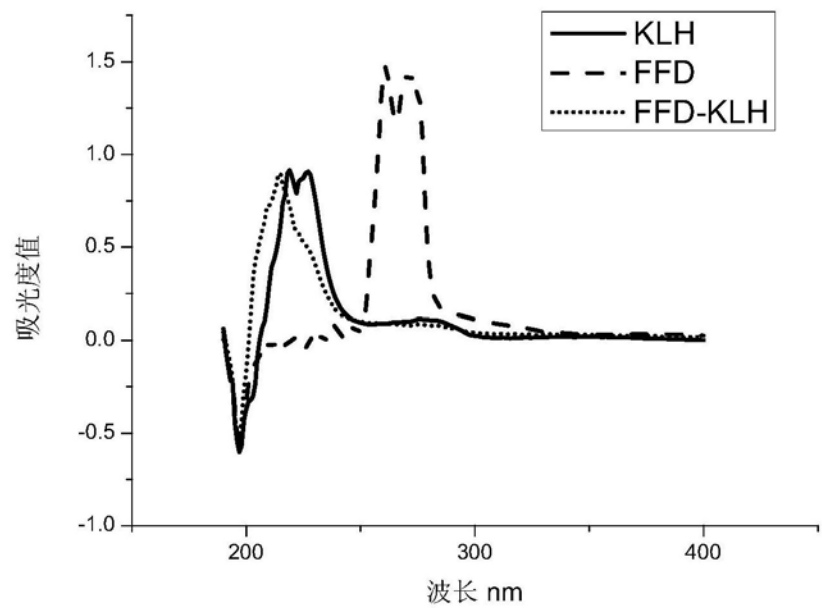


图2

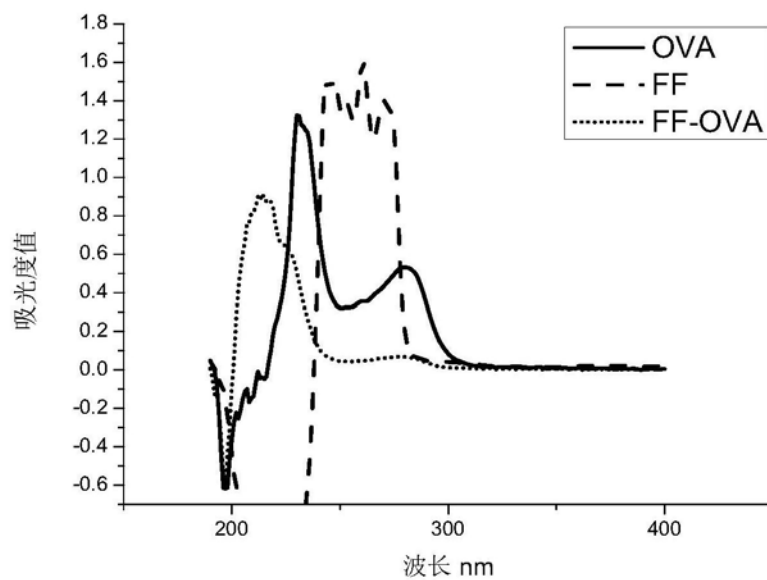


图3

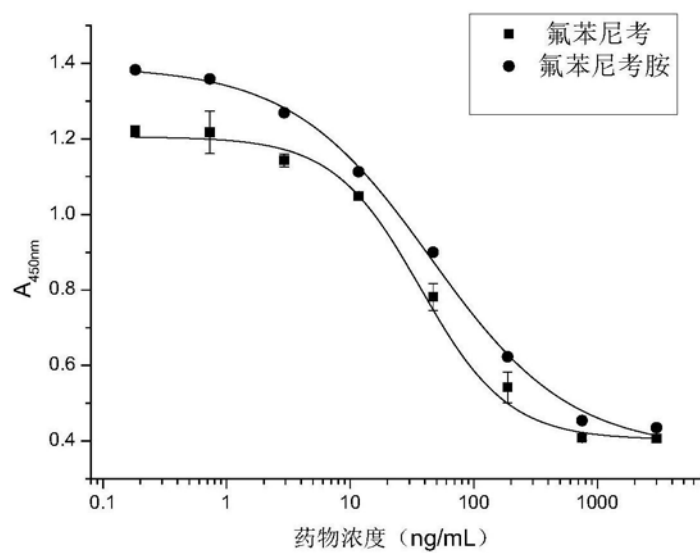


图4