

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810115757.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2008年12月3日

[11] 公开号 CN 101315377A

[22] 申请日 2008.6.27

[21] 申请号 200810115757.X

[71] 申请人 北京望尔康泰生物技术有限公司

地址 100085 北京市昌平区西三旗龙兴园中
区10楼2层

共同申请人 北京望尔生物技术有限公司

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 肖希龙 冯才伟
万宇平 马孝斌 赵正苗 罗晓琴
冯月君

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任凤华

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测莫能菌素的方法及其专用酶联免疫
试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测莫能菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该酶联免疫试剂盒，包括莫能菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标莫能菌素半抗原；当所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标莫能菌素半抗原。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于现场大批量样品的筛选。本发明的试剂盒将在莫能菌素的检测中发挥重要作用。

1、一种检测莫能菌素的酶联免疫试剂盒，包括莫能菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标莫能菌素半抗原；当所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标莫能菌素半抗原。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括莫能菌素标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液；所述浓缩洗涤液为pH值为7.3-7.9、含有0.8-1.3%吐温-20的0.1-0.3M的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液为pH值为7.6-8.0、0.3-0.7M的醋酸缓冲液；所述显色液由显色液A液和显色液B液组成，显色液A液为过氧化氢或过氧化脲，显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；所述终止液为1~2M硫酸或盐酸溶液；所述百分含量为质量百分含量。

3、根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述莫能菌素特异性抗体为莫能菌素多克隆抗体或莫能菌素单克隆抗体；它们均是以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、兔血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

4、根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述莫能菌素单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 2543的对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株B-1-4分泌产生的抗体。

5、根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述酶标抗抗体是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到的；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为2:1；所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，优选为辣根过氧化物酶。

6、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为pH值为7.6、含有1.0%吐温-20的0.2M的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液为pH值为7.8、0.5M的醋酸缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

7、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述显色液A液为过氧化脲，显色液B液为四甲基联苯胺；所述终止液为2M硫酸。

8、一种检测莫能菌素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

取 3g 动物组织匀浆物，向其中加入 50ml 聚苯乙烯，加入 3-8ml 甲醇、1-2ml 去离子水，混匀；室温以 3000g 以上的速度离心 5min；取上清液，每 2ml 上清液中，加入 1-3ml 0.5-1.5M 的 NaOH 溶液、2-8ml 正己烷，混匀，室温以 3000g 以上的速度离心 5min；取上清液，干燥，再加入权利要求 6 所述试剂盒中的所述浓缩复溶液，混匀，取样进行分析；所述甲醇优选为 5ml；所述正己烷优选为 6ml；所述去离子水优选为 1ml；所述 NaOH 溶液体积优选为 2ml、浓度优选为 0.1M；

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述样品。

9、由保藏号为 CGMCC No. 2543 的对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-4 分泌产生的莫能菌素单克隆抗体。

10、保藏号为 CGMCC No. 2543 的对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 B-1-4。

一种检测莫能菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测莫能菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

莫能菌素（Monensin）是聚醚类抗生素，被广范应用于动物疾病的治疗，其主要作用机理是干扰球虫细胞内钠钾离子的正常交换，使大量的钠离子进入细胞内，造成钠离子在胞内浓度高，渗透压上升，更多的水分进入球虫内，为了排除细胞内多余的钠，球虫必须动用能量将多余的钠外泵排出，最终造成有限的能量被用完；而后钠钾离子交换中断停止，细胞膨胀、变形、破裂、崩解。莫能菌素还可以影响反刍动物瘤胃内能量代谢，改善瘤胃发酵，提高丙酸与乙酸的产出比例，降低挥发性脂肪酸，减少甲烷生成，提高蛋白质利用效率。因此能够显著提高反刍动物的饲料利用率和促进生长的作用。但是莫能菌素在动物食品中的残留会影响人类健康，因此，欧美国家及我国均规定了莫能菌素在动物组织中的最大残留限量。

目前，动物组织中莫能菌素药物的残留检测主要采用高效液相色谱法、气相色谱一质谱法等仪器方法，但是仪器方法样本前处理及测定操作繁琐且费用高，使推广应用受到限制。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种检测莫能菌素的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测莫能菌素的酶联免疫试剂盒，包括莫能菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标莫能菌素半抗原；当所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标莫能菌素半抗原。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括莫能菌素标准溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液。

所述浓缩洗涤液可以为 pH 值为 7.3-7.9、含有 0.8-1.3%吐温-20 的 0.1-0.3M 的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液可以为 pH 值为 7.6-8.0、0.3-0.7M 的醋酸缓冲液；所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 液可以为过氧化氢或过

氧化脲，显色液 B 液可以为邻苯二胺或四甲基联苯胺；所述终止液可以为 1-2M 硫酸或盐酸溶液；所述含量为质量含量。

所述莫能菌素特异性抗体为莫能菌素多克隆抗体或莫能菌素单克隆抗体；它们均是以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、兔血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

莫能菌素是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明采用碳化二亚胺法将莫能菌素与载体蛋白偶联，突出了莫能菌素的特征结构，同时也增加了莫能菌素半抗原的免疫源性和特异性。其中，莫能菌素半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与牛血清白蛋白的结合摩尔比为 (10-12) : 1。

所述莫能菌素多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

所述莫能菌素单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2543 的对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞 B-1-4 分泌产生的抗体。

所述酶标抗抗体是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到的；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2: 1；所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶，优选为辣根过氧化物酶。

所述浓缩洗涤液具体可以为 pH 值为 7.6、含有 1.0%吐温-20 的 0.2M 的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液具体可以为 pH 值为 7.8、0.5M 的醋酸缓冲液所述百分含量为质量百分含量。

所述显色液 A 液具体可以为过氧化脲，显色液 B 液具体可以为四甲基联苯胺；所述终止液具体可以为 2M 硫酸。

在洗涤液中加入一定量吐温 20 和叠氮化钠的作用在于：缓冲液中吐温 20 会减少抗体的非特异性吸附，还能对蛋白起到一定的保护作用，加入叠氮化钠后，则叠氮化钠在溶液中抑制细菌的生长，对溶液的稳定性其到一个保护作用。

本发明的另一个目的是提供一种检测莫能菌素的方法。

本发明所提供的检测莫能菌素的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理：

取 3g 动物组织匀浆物，向其中加入 50ml 聚苯乙烯，加入 3-8ml 甲醇、1-2ml 去离子水，混匀；室温以 3000g 以上的速度离心 5min；取上清液，每 2ml 上清液中，加入 1-3ml 0.5-1.5M 的 NaOH 溶液、2-8ml 正己烷，混匀，室温以 3000g 以上的速度离心 5min；取上清液，干燥，再加入浓缩复溶液，混匀，取样进行分析；所述甲醇优选为 5ml；所述正己烷优选为 6ml；所述去离子水优选为 1ml；所述 NaOH 溶液体积优选为 2ml、浓度优选为 0.1M；样品的前处理主要是为了从样品中获得红霉素溶液，从而用于后续的检测。

2) 利用上述任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述样品。

3) 分析检测结果。

由保藏号为 CGMCC No. 2543 的对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞 B-1-4 分泌产生的莫能菌素单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

保藏号为 CGMCC No. 2543 的对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞 B-1-4 也属于本发明的保护范围。

本发明检测莫能菌素的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中莫能菌素的残留量；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批量样品；采用高特异性的莫能菌素单克隆抗体，主要试剂以工作液的形式提供，检验方法方便易行，具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于现场大批量样品的筛选。本发明的试剂盒将在莫能菌素的检测中发挥重要作用。

附图说明

图 1 为以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。

实施例 1、以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒的制备及检测

一、以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒的检测原理如下：

当在微孔条上预包被莫能菌素偶联抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，随

即加入酶标二抗，再加入莫能菌素特异性抗体溶液，样本中残留的莫能菌素药物与酶标板上包被的莫能菌素偶联抗原竞争莫能菌素特异性抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与莫能菌素药物的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中莫能菌素的残留量。同时根据酶标板上颜色的深浅，与系列浓度的莫能菌素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中莫能菌素残留量的浓度范围。

二、以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒一般可以包括如下组成：

- 1、包被莫能菌素偶联抗原的酶标板；包被原的浓度可以为 0.06-0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；
- 2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；酶标二抗稀释液为含有 0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液，抗抗体稀释浓度为 1:500；所述百分含量为质量百分含量；
- 3、莫能菌素特异性抗体工作液：可以为莫能菌素单克隆抗体工作液或多克隆抗体工作液；抗体稀释液为含有 2.5%（质量百分含量）酪蛋白和 0.003%（质量百分含量）的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液，抗体工作液稀释度为 1:1000；
- 4、莫能菌素标准品（购自德国 Dr 公司，商品编号：15291000）溶液 6 瓶，浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、27 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、81 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；稀释溶液为 0.3-0.7M、pH 值 7.6-8.0 的醋酸缓冲液；
- 5、底物显色液由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢，8ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺；8ml/瓶，1 瓶；
- 6、终止液为 1-2M 硫酸或盐酸；7ml/瓶，1 瓶；
- 7、浓缩洗涤液为 pH 值为 7.3-7.9、含有 0.8-1.3%（请指明吐温-20 的百分含量）吐温-20 的 0.1-0.3M 的磷酸盐缓冲液；50ml/瓶，1 瓶；
- 8、浓缩复溶液为 0.3-0.7M、pH 值 7.6-8.0 的醋酸缓冲液；400ml/瓶，1 瓶。

三、本实验的以莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原的试剂盒具体组成如下：

- 1、包被莫能菌素偶联抗原的酶标板；包被原的浓度可以为 0.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；
- 2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；酶标二抗稀释液为含有 0.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液，羊抗鼠抗抗体稀释浓度为 1:500；所述百分含量为质量百分含量；

3、莫能菌素单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的：用稀释液将抗体稀释1000倍，得到莫能菌素单克隆抗体工作液；所述稀释液为含有2.5%（质量百分含量）酪蛋白和0.003%（质量百分含量）的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；

4、莫能菌素标准品（购自德国Dr公司，商品编号：15291000）溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L；稀释溶液为0.3-0.7M、pH值7.6-8.0的醋酸缓冲液；

5、底物显色液由A液和B液组成，底物显色液A液为过氧化脲，8ml/瓶，1瓶；底物显色液B液为四甲基联苯胺；8ml/瓶，1瓶；

6、终止液为2M硫酸；7ml/瓶，1瓶；

7、浓缩洗涤液为pH值为7.6、含有1.0%吐温-20的0.2M的磷酸盐缓冲液；50ml/瓶，1瓶；

8、浓缩复溶液为0.5M、pH值7.8的醋酸缓冲液；400ml/瓶，1瓶。

其中，包被有莫能菌素半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板、莫能菌素抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液的制备方法如下：

所用的包被缓冲液和封闭液如下：

包被缓冲液：pH值为8.6-9.0、0.1-0.3M的硼酸缓冲液。

含有8-12%小牛血清和0.003-0.007%叠氮化钠、pH值7.2-7.4、0.05M的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

1、酶标板的制备：

a、包被原的制备：将莫能菌素半抗原与卵清蛋白偶联得到包被原，具体步骤如下：其中莫能菌素半抗原与所述卵清蛋白的摩尔配比为（35~45）：1。

(1)、将10mg莫能菌素（购自德国Dr公司，商品编号：15291000）用1ml甲酰胺（DMF）溶解，冷却至10 $^{\circ}$ C，加入氯甲酸异丁酯5 μ l，10 $^{\circ}$ C搅拌反应30min，即可得到反应液I液。

2)、称取卵清蛋白30mg，使之充分溶解在3mL 50mM碳酸钠溶液中，即得到反应液II液。

3)、将反应液I逐滴缓慢滴加到II溶液中，10 $^{\circ}$ C反应4h，然后4 $^{\circ}$ C过夜。

4)、用0.01MPBS透析3天，每天换2次透析液，以除去未反应的小分子物质。以12000rpm离心30min，收集上清，即得到莫能菌素抗原与卵清蛋白偶联物，分装，于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

b、酶标板的制备

用包被缓冲液将莫能菌素偶联抗原稀释成 $0.09\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 温育 2h 或 4°C 过夜，倾去包被液，用浓缩洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后再每孔中加入 $150\mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

2、莫能菌素单克隆抗体的制备

(1) 免疫原合成

莫能菌素是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

1) 将 20mg 莫能菌素，10mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，12.5mg 碳化二亚胺(EDC) 充分溶解于 1ml DMF 中，于室温下搅拌 24 h，即可得到反应液 I；

2) 称取牛血清白蛋白(BSA) 50mg，使之充分溶解在 3mL 磷酸盐缓冲液(PH 7.2) 中，即得到反应液 II；其中莫能菌素半抗原与所述牛血清白蛋白的摩尔配比为 (10-12): 1。

3) 将反应液 I 逐滴缓慢滴加到 II 溶液中，并于室温下搅拌 3 h；

4) 用 0.01M 的 PBS 缓冲液透析 3 天，每天换 2 次透析液，以除去未反应的小分子物质。以 12000 rpm 离心 30min，收集上清，即得到免疫原，分装，于 -20°C 保存备用。

(2) 制备单克隆抗体

a. 动物免疫

将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 $100\mu\text{g}/\text{只}$ ，使其产生多克隆抗体血清。

b. 细胞融合和克隆化

小鼠血清测定结果较高后，取其脾细胞，按 7: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到能稳定分泌莫能菌素单克隆抗体的杂交瘤细胞株，将该对莫能菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株命名为 B-1-4，该细胞株已于 2008 年 06 月 04 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编 100101），保藏编号为 CGMCC No. 2543。

c. 细胞冻存和复苏

将莫能菌素的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^9 个/ml 的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37°C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

d. 单克隆抗体的生产与纯化

将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7 天后腹腔注射莫能菌素的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^7 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，得到单克隆抗体， -20°C 保存。

3、多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以莫能菌素抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1.5mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

4、辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备过程：

(1) 抗抗体的制备：

羊抗鼠抗抗体的制备：以羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体。

羊抗兔抗抗体的制备：以羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

(2) 辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

将抗抗体与辣根过氧化物酶（HRP）采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1；由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点，这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁，降低了酶标记物的酶活性，使制备的偶联物中混有许多聚合体。

本发明利用改良的过碘酸钠法进行了抗体的酶标，其省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。降低了辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比率至 2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶的活性的损失减少。

三、样品中莫能菌素的检测

1、样品前处理

样品可为动物组织，具体如猪肉、猪肝等。

称取除去脂肪的粉碎动物组织均质物 $3.0 \pm 0.05\text{g}$ ，将其置于装有 50ml 聚苯乙烯的离心管中，加入 5ml 甲醇，再加入 1ml 去离子水，振荡 5min，以 3000g 以上速度室温 (20-25℃) 离心 5min；取 2ml 上清液至 50ml 塑料离心管中，加入 2ml 1M NaOH 溶液，混匀，再加入 6ml 正己烷，涡动 3min，3000g 以上，室温离心 5min；取 3ml 上清液至 10ml 玻璃试管中，于 50~60℃ 氮气流下吹干，加入 1ml 浓缩复溶工作液涡动 2~3min；取 50 μl 用于分析。

2、用试剂盒检测

向包被有莫能菌素偶联抗原的酶标板微孔中加入莫能菌素标准品溶液或样品溶液 50 μl ，随即加入酶标二抗工作液 50 μl ，再加入莫能菌素单克隆抗体工作液 50 μl ，用盖板模封板，37℃ 恒温箱中反应 30min，倒出孔内液体，每孔加入 150 μl 洗涤液，30s 后倒出孔内液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲，底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB)，轻轻振荡混匀，37℃ 恒温箱避光显色 15min，每孔加入 2M 终止液硫酸 50 μl ，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在 450nm 处，测定每孔吸光度值 (OD 值)。

3、检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%，得到百分吸光度值。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值， B_0 为 0 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液的平均吸光度值。

以莫能菌素标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图 (图 1)。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品的浓度，则可从标准曲线上读出莫能菌素的残留量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需 1 小时可以完成。

实施例 2、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

一、标准品精密度试验：

从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次（01 批、03 批、06 批）的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒，从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔，测定 9 $\mu\text{g/L}$ 莫能菌素标准品溶液的吸光度值（OD 值），计算变异系数。结果如表 1 所示，表明每批试剂盒各 10 次标准品变异系数均在 5.4%-13.1%之间，符合精密度小于或等于 25%的规定。

表 1、标准可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
01 批	5.9	9.6	10.6	8.7	9.4	11.6	12.8	10.3	13.1	5.9	
CV%	03 批	8.6	5.4	6.7	8.8	9.1	10.2	11.3	5.8	7.9	6.8
	06 批	10.5	11.2	6.5	7.4	7.3	5.8	9.4	10.6	5.7	9.5

二、样本精密度和准确度试验

1、样品精密度试验：

向不含莫能菌素的猪肌肉、猪肝脏组织中添加莫能菌素，使其终浓度为 10 $\mu\text{g/kg}$ (L)，按照实施例 1 的方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次（01 批、03 批、06 批）的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒，进行实验，每个实验重复 5 次，分别计算变异系数，结果如表 2-3 所示（各表中的数值为 5 次重复的平均值）。结果表明肌肉、肝脏样本的变异系数均在 5.1%-14.2%之间，符合了《农业部文件》农医发【2005】17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度标准。

表 2、猪肌肉样本可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数 CV%
	6.9	7.8	8.1	6.4	8.6	11.9
01	7.5	8.6	8.4	8.0	7.6	6.0
	6.4	6.1	7.9	7.7	8.4	13.7
03	8.2	8.8	6.7	7.3	8.4	10.9

	7.5	8.6	8.1	8.3	7.9	5.1
	8.9	8.7	6.9	7.6	8.2	10.2
	6.8	8.7	8.2	6.7	6.5	13.5
06	7.0	7.5	8.6	8.8	8.0	9.4
	6.9	8.6	7.8	6.2	8.7	14.2

表 3、猪肝脏样本可重复性试验

批号	实测值 (μg/L)					变异系数 CV%
	6.3	8.4	7.1	6.8	7.5	11.0
01	7.9	8.2	8.7	6.7	7.7	9.4
	8.5	8.6	7.8	8.5	6.7	10.0
	7.2	6.3	8.4	7.0	6.1	13.0
03	7.8	8.6	7.2	7.4	6.5	10.3
	6.6	7.5	7.4	8.6	8.8	11.7
	7.3	7.5	6.8	6.4	7.9	8.2
06	8.6	7.4	7.2	6.7	6.8	10.4
	8.6	8.5	7.3	8.5	8.3	6.5

2、样本准确度试验

向不含莫能菌素的猪的肌肉、猪肝脏组织中添加莫能菌素，使其终浓度分别为 10μg/kg (L) 和 20μg/kg (L)，再按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理；然后用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒检测猪的肌肉、猪肝脏组织中莫能菌素，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度（准确度=实测值/添加值）。结果如表 4 所示，结果表明肌肉样本添加回收率在 67.5%-87.4%之间，肝脏样本的添加回收率在 64.7%-86.7%之间。

表 4、试剂盒的准确度

样本		肌肉		肝脏	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	20	10	20
准确度%	1	69.8	87.4	80.3	72.8
	2	75.2	80.6	86.7	64.7
	3	85.0	84.7	84.1	76.5
	4	76.3	67.5	72.5	84.0
平均值%		76.6	80.1	80.9	74.5

三、交叉反应率试验：

选择与莫能菌素有类似结构和类似功能的3种药物测定交叉反应率，通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算步骤三中试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应率越大，那么此试剂盒对莫能菌素的检测的特异性就越好。

交叉反应率(%) = (引起50%抑制莫能菌素的浓度/引起50%抑制莫能菌素的类似物浓度) × 100%。重复测定3次，结果取平均值。

表5、试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率 (%)
莫能菌素	100%
盐霉素	<1
马杜霉素	<1

实验表明，本发明试剂盒对莫能菌素的特异性好，即本发明试剂盒可以检测莫能菌素。

四、试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为2~8℃，经过6个月的测定，步骤三中试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、莫能菌素添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在37℃保存条件下放置6天，进行加速老化实验，结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生，将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻5天，测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2-8℃至少可以保存6个月以上。

五、试剂盒的灵敏度

取不含莫能菌素药物的阴性猪肉样本用本发明所制试剂盒分别进行20次检测，测定结果的平均值加上3倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

表6、阴性猪肉样本测定结果统计表 $\mu\text{g}/\text{kg}$

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.31	0.09	0.44	0.11	0.34	0.66	0.61	0.05
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.72	0.19	0.40	0.25	0.06	0.00	0.02	0.02
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.00	0.50	0.05	0.48	0.26	0.24	1	

由表 6 可知，本发明所研制的试剂盒最低检测限为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

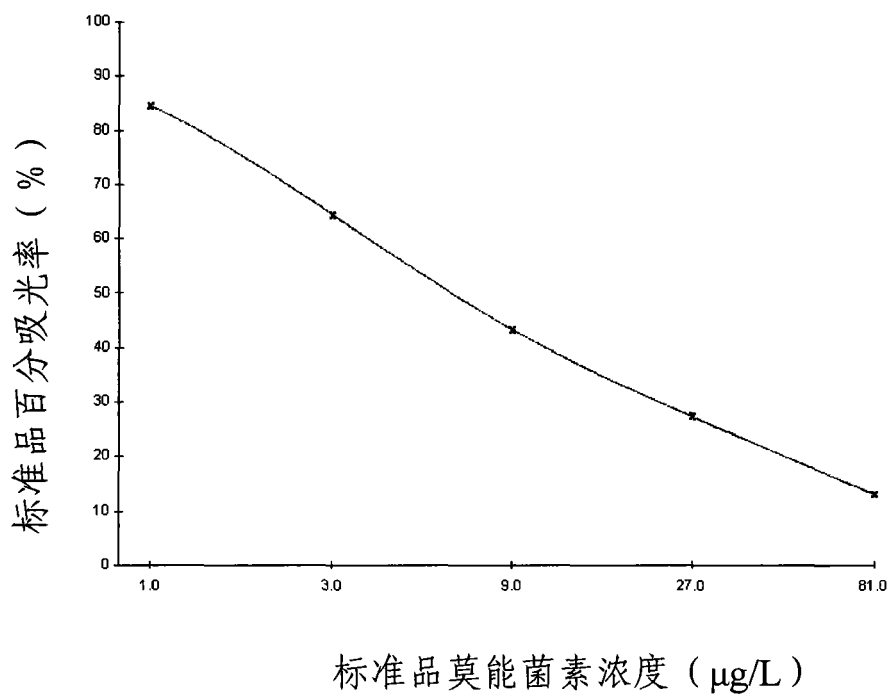


图 1

专利名称(译)	一种检测莫能菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101315377A	公开(公告)日	2008-12-03
申请号	CN200810115757.X	申请日	2008-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 肖希龙 冯才伟 万宇平 马孝斌 赵正苗 罗晓琴 冯月君		
发明人	沈建忠 何方洋 肖希龙 冯才伟 万宇平 马孝斌 赵正苗 罗晓琴 冯月君		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535 C12N5/12		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101315377B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测莫能菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该酶联免疫试剂盒，包括莫能菌素特异性抗体及包被原和酶标记物；所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物或抗抗体；所述酶标记物为酶标抗抗体或酶标莫能菌素半抗原；当所述包被原为莫能菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时，所述酶标记物为酶标抗抗体；当所述包被原为抗抗体时，所述酶标记物为酶标莫能菌素半抗原。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于现场大批量样品的筛选。本发明的试剂盒将在莫能菌素的检测中发挥重要作用。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$