



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106596921 A

(43) 申请公布日 2017. 04. 26

(21) 申请号 201510660153. 3

(22) 申请日 2015. 10. 14

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 刘静 立雯馨

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

检测头孢噻呋的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测猪肉组织中残留的头孢噻呋的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、头孢噻呋标准品溶液、酶标二抗、头孢噻呋特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液、样本提取剂,所述包被原为头孢噻呋偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测头孢噻呋的方法,它包括:首先进行样品前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测猪肉中头孢噻呋的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测头孢噻呋的酶联免疫试剂盒,其特征在于包括:包被有包被原的酶标板、头孢噻呋标准品溶液、酶标二抗、头孢噻呋特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液、样本提取剂,所述包被原为头孢噻呋偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述头孢噻呋偶联抗原是由头孢噻呋半抗原与载体蛋白偶联得到,所述头孢噻呋半抗原是由头孢噻呋和邻苯二甲酸酐反应得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于所述头孢噻呋半抗原是由头孢噻呋和邻苯二甲酸酐反应得到。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述头孢噻呋特异性抗体是以头孢噻呋偶联抗原作为免疫原制备获得,所述头孢噻呋特异性抗体可为头孢噻呋单克隆抗体或头孢噻呋多克隆抗体。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述洗涤液为 pH 值为 7.4, 含有 0.5%~1.0% 吐温-20, 0.01%~0.03% 叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L 的磷酸盐缓冲液;所述复溶液为 pH 值为 7.0, 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;所述样本提取剂为 0.1mol/L 的盐酸。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述头孢噻呋标准品溶液的浓度分别为 0 μg/L, 0.75 μg/L, 3 μg/L, 9 μg/L, 27 μg/L。

8. 一种检测样品中头孢噻呋含量的方法,包括步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 用权利要求 1~7 任一项所述的试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

检测头孢噻呋的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测头孢噻呋的酶联免疫试剂盒,可定性、定量检测猪肉组织样本中头孢噻呋药物的残留量。

背景技术

[0002] 头孢噻呋(ceftiofur)又名赛得福,是第1个动物专用的第3代头孢菌素类抗生素。1988年,FDA批准了头孢噻呋钠用于治疗牛呼吸道细菌性疾病,此时该药在美国首次上市。此后FDA又陆续批准了头孢噻呋钠、盐酸头孢噻呋及头孢噻呋晶体自由酸用于1日龄鸡、火鸡,猪、肉牛、奶牛、马、山羊及绵羊等的呼吸道疾病的治疗。加拿大、日本及欧洲一些国家也相继正式批准用于猪、肉牛、奶牛、羊的呼吸道疾病的治疗。头孢噻呋抗菌谱广,抗菌活性强,对革兰阳性菌、阴性菌及厌氧菌都有很强的抗菌活性,而且对胃酸和 β 内酰胺酶较稳定,过敏反应少,体内残留非常低,在世界范围内得到广泛应用。目前,国内有多家公司相继研制出头孢噻呋注射液,但制剂的溶剂体系均为植物油、大豆油等油性介质。华南农业大学联合洛阳惠中兽药有限公司在国内首先研制出水性头孢噻呋注射液,由于其溶剂体系为水性,流动性好,易于吸收,肌注时不容易堵塞针头,对动物的刺激性小,具有广阔的市场应用前景。

[0003] 目前,在肉类组织中,对于头孢噻呋的检测方法有许多,液制连用(LC—MS)、气质连用(GC—MS)、ELISA等等。但常用的理化分析方法需要昂贵的仪器设备、熟练的专业人员等条件,而且操作过程复杂,检测时间较长,故限制了其应用范围,难以在生产实际中推广应用。

[0004] 本发明应用酶联免疫法,测定猪肉中头孢噻呋药物的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广等优点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种能够检测猪肉组织中头孢噻呋药物残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0006] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、头孢噻呋标准品溶液、酶标二抗、头孢噻呋特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液、样本提取剂,所述包被原为头孢噻呋偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。

[0007] 所述头孢噻呋偶联抗原是由头孢噻呋半抗原与载体蛋白偶联得到,所述头孢噻呋半抗原是由头孢噻呋和邻苯二甲酸酐反应得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0008] 所述头孢噻呋特异性抗体是以头孢噻呋偶联抗原作为免疫原制备获得,所述头孢噻呋特异性抗体可为头孢噻呋单克隆抗体或头孢噻呋多克隆抗体,其中优选头孢噻呋单克隆抗体。

[0009] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣

根过氧化物酶；酶标二抗是采用改良后的过碘酸钠法进行偶联得到的。

[0010] 为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括头孢噻呋标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液、样本提取剂。

[0011] 所述头孢噻呋标准品溶液 5 瓶，浓度分别为 $0\ \mu\text{g/L}$ ， $0.75\ \mu\text{g/L}$ ， $3\ \mu\text{g/L}$ ， $9\ \mu\text{g/L}$ ， $27\ \mu\text{g/L}$ 。

[0012] 当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述底物显色液由底物液 A 液和底物液 B 液组成，A 液为过氧化氢或过氧化脲，B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，所述终止液为 $1\sim 2\text{mol/L}$ 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述终止液为 $1\sim 2\text{mol/L}$ 氢氧化钠溶液。

[0013] 所述洗涤液优选为 pH 值为 7.4，含有 0.5%~1.0% 吐温-20，0.01%~0.03% 叠氮化钠防腐剂、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比。

[0014] 所述复溶液优选为 pH 值为 7.0， 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比。

[0015] 所述样本提取剂为 0.1mol/L 的盐酸。

[0016] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为 pH 值为 9.6， 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液，封闭液为 pH 值为 7.1~7.5，含有 1%~3% 酪蛋白、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比。

[0017] 本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将包被原稀释成 $20\ \mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ ， 25°C 避光孵育 2h 或 4°C 过夜，倾去孔中液体，用洗涤液洗涤 2 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 $150\sim 200\ \mu\text{L}$ 封闭液， 25°C 避光孵育 1~2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0018] 本发明的检测原理为：

本试剂盒采用竞争 ELISA 方法，在酶标板微孔条上预包被偶联抗原，样本中残留的头孢噻呋和微孔条上预包被的偶联抗原竞争头孢噻呋抗体，加入酶标二抗后，用底物显色，样本吸光度值与其所含残留物头孢噻呋的含量成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样本中头孢噻呋的残留量。

[0019] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测头孢噻呋的方法，它包括步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

[0020] 本发明检测头孢噻呋的酶联免疫试剂盒主要采用 Elisa 方法定性或定量检测样品中头孢噻呋的含量；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；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、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0021] 图 1 头孢噻呋半抗原核磁共振氢谱图。

[0022] 图 2 试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0024] 实施例 1 试剂盒组分的制备

1、头孢噻呋半抗原的制备

440mg 头孢噻呋, 360mg 邻苯二甲酸酐和 2mL A 比咤在 25mL DMSO 中的混合液, 在 80℃ 下搅拌反应 15h, 蒸除溶剂, 柱层析纯化得到邻苯二甲酸单头孢噻呋酞胺。

[0025] 取上述产物经核磁共振氢谱测定, 如图 2 所示, 7.8 和 8.3ppm 附近增加的两组芳环信号峰, 以及 13.3ppm 左右增加的梭基信号峰, 说明半抗原合成成功。

[0026] 2、抗原的制备

免疫原制备—头孢噻呋半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联得到免疫原。

[0027] 取 15mg 按上述方法制备的头孢噻呋半抗原, 溶解于 1mL DMF 中, 得到溶液 (1); 取 30mg EDC 和 NHS 用 0.2mL 水充分溶解后加入 (1) 中, 室温下搅拌 24h, 即可得到反应液 A; 称取 BSA 100mg, 使之充分溶解在 3.8mL PBS (PH7.2) 中, 将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中, 并于室温下搅拌 24h; 用 0.01mol/L PBS, 40℃ 透析 3d, 每天换 3 次透析液, 即得免疫原。

[0028] 包被原制备—头孢噻呋半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联得到免疫原。

[0029] 取 15mg 按上述方法制备的头孢噻呋半抗原, 溶解于 1mL DMF 中, 得到溶液 (1); 取 30mg EDC 和 NHS 用 0.2mL 水充分溶解后加入 (1) 中, 室温下搅拌 24h, 即可得到反应液 A; 称取 OVA 100mg, 使之充分溶解在 3.8mL PBS (PH7.2) 中, 将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中, 并于室温下搅拌 24h; 用 0.01mol/L PBS, 40℃ 透析 3d, 每天换 3 次透析液, 即得免疫原。

[0030] 3、头孢噻呋单克隆抗体的制备

动物免疫: 将上述步骤得到的免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 150 μ g/只, 使其产生抗血清。

[0031] 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 8:1 (数量配比) 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, 直到得到分泌头孢噻呋单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] 细胞冻存和复苏: 将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 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℃ 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0033] 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 天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸—饱和硫酸按法进行腹水纯化, -20℃ 保存。

[0034] 4、酶标二体的制备

将羊抗鼠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。

[0035] 5、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成 $20 \mu\text{g/ml}$, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 25°C 避光孵育 2h, 倾去孔中液体, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 封闭液, 25°C 避光孵育 2h, 倾去孔内液体拍干, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0036] 实施例 2 检测头孢噻吩的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测头孢噻吩的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被头孢噻吩偶联抗原的酶标板;
- (2) 头孢噻吩标准品溶液 5 瓶, 浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$, $0.75 \mu\text{g/L}$, $3 \mu\text{g/L}$, $9 \mu\text{g/L}$, $27 \mu\text{g/L}$;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (4) 头孢噻吩特异性抗体;
- (5) 底物显色液由 A 液和 B 液组成, A 液为过氧化脲, B 液为四甲基联
- (6) 终止液为 2mol/L 硫酸;
- (7) 洗涤液为 pH 值为 7.4, 含有 0.5%~1.0% 吐温-20, 0.01%~0.03% 叠氮化钠防腐剂、 $0.1\sim 0.3\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液, 所述百分比为重量体积百分比;
- (8) 复溶液为 pH 值为 7.0, 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液, 所述百分比为重量体积百分比;
- (9) 样本提取剂为 0.1mol/L 的盐酸。

[0037] 实施例 3 猪肉组织中头孢噻吩的检测

1、样品前处理

用均质器均质样本; 称取 $3.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质后的组织样本至 50ml 聚苯乙烯离心管中, 加入 $100 \mu\text{L}$ 样本提取剂和 $900 \mu\text{L}$ 去离子水, 涡动混匀, 再加入 5ml 乙腈, 用涡旋仪涡动 2min, 混匀, 3000g 室温 ($20\sim 25^\circ\text{C}$) 离心 5min; 移取 3ml 上清液至 50ml 聚苯乙烯离心管中, 加入 1ml 2M 氢氧化钠溶液混匀, 再加入 6ml 正己烷, 用涡旋仪涡动 3min, 3000g 室温 ($20\sim 25^\circ\text{C}$) 离心 5min; 移取 2ml 上清液至 10ml 洁净干燥玻璃试管中, 于 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 氮气或气流下吹干, 加入 1ml 复溶工作液用涡旋仪涡动 2min; 取 $50 \mu\text{L}$ 用于分析。

[0038] 2、用试剂盒检测

加标准品工作液 / 样本 $50 \mu\text{L}$ 到对应的微孔中, 再加入抗体工作液 $50 \mu\text{L}$ / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中反应 30min。小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 加入洗涤工作液 $250 \mu\text{L}$ / 孔, 充分洗涤 4~5 次, 每次间隔 10s, 用吸水纸拍干。加入酶标二抗 $100 \mu\text{L}$ / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中反应 30min, 取出洗板。加入底物液 A 液 $50 \mu\text{L}$ / 孔, 再加入底物液 B 液 $50 \mu\text{L}$ / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中显色 15min。加入终止液 $50 \mu\text{L}$ / 孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处, 测定每孔吸光度值 (OD)。

[0039] 3、检测结果分析

标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准品 (0 标准) 的吸光度值的平均值, 再乘以 100%, 得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标, 以头孢噻吩标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的对数为横坐标, 绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样本所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中头孢噻吩的实际浓度。

[0040] 实施例 4 头孢噻呋技术参数的确定试验

1、试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为 0.75~27 $\mu\text{g/L}$, $1C_{50}$ (50% 抑制浓度)浮动范围为 1.8~2.5 $\mu\text{g/L}$;对 20 份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以 20 份样本浓度的平均值加上 3 倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对猪肉组织的检测限均为 2.25 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0041] 2、样本精密度和准确度试验

以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差 (RSD%) 作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%) = 实际测定值 / 理论值 $\times 100\%$,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差 $RSD\% = SD/X \times 100\%$,其中 SD 为标准偏差, X 为测定数据的平均值。

[0042] 按 2.25 $\mu\text{g/kg}$, 4.50 $\mu\text{g/kg}$, 9.00 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度头孢噻呋分别对猪肉样品进行添加回收测定,每个样品做 4 个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0043] 表 1 猪肉组织样本 1 精密度及准确度试验

头孢噻呋	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 ($n=4$) %	批内 RSD ($n=4$) %	批间 RSD ($n=3$) %
猪肉组织 1	2.25	80.5	8.9	9.6
	4.50	82.9	9.5	9.8
	9.00	98.2	8.4	8.9

猪肉组织样本 2 精密度及准确度试验

头孢噻呋	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 ($n=4$) %	批内 RSD ($n=4$) %	批间 RSD ($n=3$) %
猪肉组织 2	2.25	88.1	9.2	9.9
	4.50	99.4	8.3	9.0
	9.00	90.1	9.7	9.8

以 2.25 $\mu\text{g/kg}$, 4.50 $\mu\text{g/kg}$, 9.00 $\mu\text{g/kg}$ 三个浓度的头孢噻呋分别对猪肉样品进行添加,平均回收率在 80.5%~99.4% 之间;批内、批间相对标准偏差均小于 10%。

[0044] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为 2~8℃, 经过 12 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值(零标准), 50% 抑制浓度、头孢噻呋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 7 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 7 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℃ 至少保存 12 个月以上。

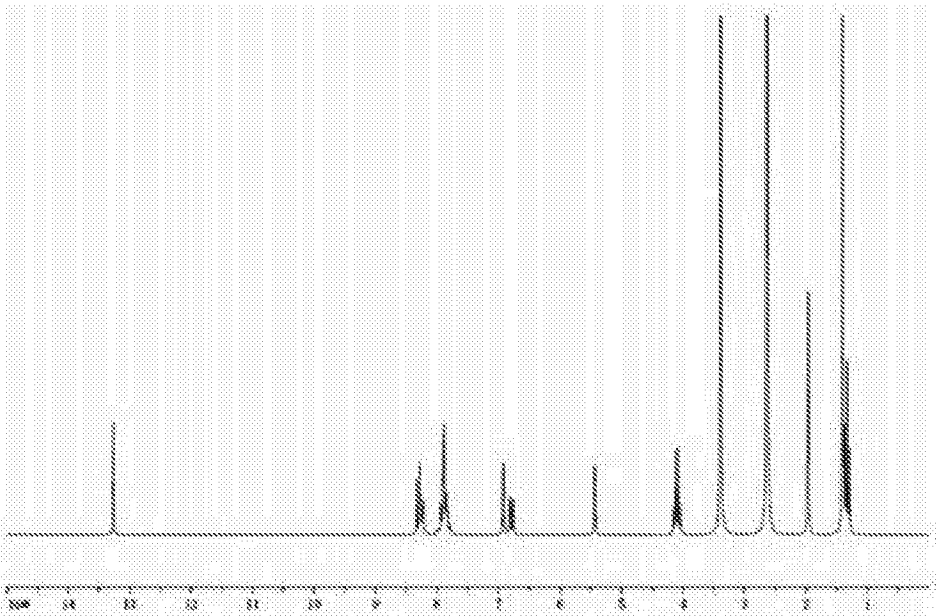


图 1

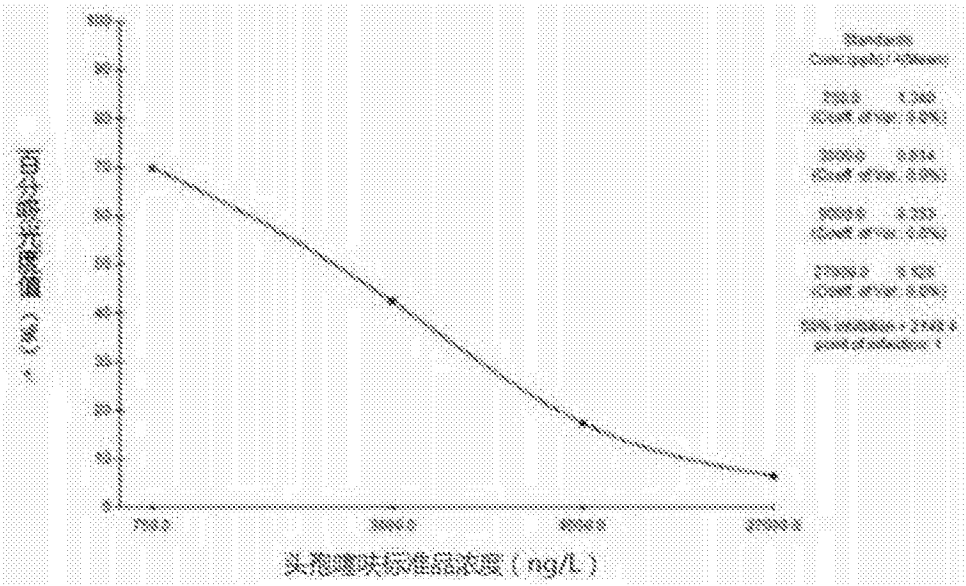


图 2

专利名称(译)	检测头孢噻味的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106596921A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201510660153.3	申请日	2015-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 刘静 立雯馨		
发明人	洪霞 刘静 立雯馨		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测猪肉组织中残留的头孢噻味的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、头孢噻味标准品溶液、酶标二抗、头孢噻味特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液、样本提取剂，所述包被原为头孢噻味偶联抗原，所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测头孢噻味的方法，它包括：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测猪肉中头孢噻味的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

头孢噻味	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 ($n=4$) %	批内 RSD ($n=4$) %	批间 RSD ($n=3$) %
猪肉组织 2	2.25	88.1	9.2	9.9
	4.50	99.4	8.3	9.0
	9.00	90.1	9.7	9.8