

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510086770.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766625A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086770.3

[71] 申请人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西区动医学院国家兽药
安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 史为民 丁双阳
张素霞 万宇平 冯才伟 吴小平
冯才茂 汪善良 李 军 赵正苗
张照亮 罗晓琴 孙 倩

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 向 华

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称

检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒及方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被羊抗鼠抗抗体的酶标板，酶标抗原，阿维菌素类药物抗体，依维菌素标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩稀释液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测阿维菌素类药物的方法，它包括步骤：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。本发明提供的检测动物组织中阿维菌素类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

1、一种检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒，其特征在于它含有：

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板；
- (2) 酶标抗原；
- 5 (3) 阿维菌素类药物抗体；
- (4) 依维菌素标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- 10 (8) 浓缩稀释液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标板中包被的羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体对无病原体羊进行免疫得到的，所用包被缓冲液为 0.02~0.05mol/L 碳酸盐缓冲液，所用的封闭液为含有 1% 小牛血清、1‰叠氮化钠和 2% 酪蛋白的溶液。

15 3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标抗原是通过将阿维菌素用二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成阿维菌素类药物半抗原，再将阿维菌素类药物半抗原和辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶采用戊二醛法进行偶联得到的。

20 4、如权利要求 1-3 之任一所述的试剂盒，其特征在于：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 2mol/L 的氢氧化钠；浓缩洗涤液为含有 0.01M~0.05M 磷酸盐和 1‰叠氮化钠的缓冲液；浓缩稀释液为 0.1M 含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

25 5、如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于：制备抗体所需要的免疫原

采用混合酸酐法将阿维菌素类药物半抗原与人血清白蛋白偶联得到，抗体稀释液为含有 3‰ N,N'-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

6、如权利要求 1 或 5 所述的试剂盒，其特征在于：依维菌素标准品溶液的浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 、 $40.5\mu\text{g/L}$ 。

5 7、一种检测样品中阿维菌素类药物残留的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1-6 之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒及方法

技术领域

5 本发明涉及一种检测动物组织中阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒及方法。

背景技术

阿维菌素类药物 (Avermectins, AVMS) 属于大环内酯类抗生素, 商品化的阿维菌素为八个化学结构十分相近的化合物中活性最强的两个同体系的混合物, 阿维菌素的二氢还原产物即为依维菌素, 为另一种重要的抗寄生虫药。
10 阿维菌素对绝大多数有重要经济价值的寄生线虫和节肢动物均有很强的抑杀作用, 其杀虫活性和杀虫谱都称划时代的, 且作用机制独特, 使用方便, 被誉为近十几年来抗寄生虫药物研究的重大突破。目前, 阿维菌素类药物开始大规模的生产和推广应用。

但阿维菌素类药物的过量使用使其在动物源性食品中高残留, 使人体产生抗药性, 给人体造成一定的危害, 因此我国已限量使用。2002年12月我国农业部公告第235号文规定在所用食品牛的脂肪、肝中的最高残留量为
15 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 肾的最高残留量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 所用食品羊的肌肉、肝的最高残留限量为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 脂肪的最高残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 肾的最高残留限量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 并将检测兽药中阿维菌素类药物的残留量列为残留监控重点。

20 目前, 检测阿维菌素类药物残留量的方法主要有薄层色谱法 (TLC), 气相色谱法 (GC), 高效液相色谱法 (HPLC), 气-质联机 (GC/MS), 液-质联机 (HPLC/MS), 毛细管电泳 (CE) 等。用上述方法检测存在着仪器设备复杂、样本前处理和测定操作烦琐的缺陷, 不适合现场监控和大量样本筛查, 而且费用高昂, 使其推广使用受到限制。

25 发明内容

(一) 要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查的检测动物组织（羊、牛、猪肌肉、肝脏等）中阿维菌素类药物残留的酶联免疫试剂盒及方法。

（二）技术方案

- 5 本发明的检测原理为：在微孔条上预包被羊抗鼠抗抗体，加入阿维菌素类药物抗体后，再加入酶标记阿维菌素类药物抗原和样本或系列标准品溶液，样本中残留的依维菌素与酶标抗原竞争抗阿维菌素类药物抗体，用显色液显色，样本吸光值与依维菌素的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出相应的依维菌素的残留含量。同时根据酶标板上的颜色的深浅，与系列浓度的依维菌素标准溶液颜色的比较可判断样品中依维菌素残留量的浓度范围，根据
10 依维菌素残留量利用交叉反应计算出样本中其它阿维菌素类药物的残留量。

本发明中所指的阿维菌素类药物包括阿维菌素、依维菌素、埃比菌素三种药物。

本发明提供了一种用于检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒，它含有：

- 15 （1）包被羊抗鼠抗抗体的酶标板；
（2）酶标抗原；
（3）阿维菌素类药物抗体；
（4）依维菌素标准品溶液；
（5）底物显色液；
20 （6）终止液；
（7）浓缩洗涤液；
（8）浓缩稀释液。

本发明所述试剂盒中制备抗体所需免疫原是采用混合酸酐法将阿维菌素类药物半抗原和人血清白蛋白进行偶联得到的。用人血清白蛋白作为免疫原

载体蛋白的优点为：人血清白蛋白与被免疫动物之间蛋白关系较远，且结构复杂，故免疫原性好，并能诱导较强的免疫应答，使其产生特异性强的抗体。

本发明所述试剂盒中羊抗鼠抗抗体是以无病原体山羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原进行免疫得到的。

- 5 本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释成0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入100 μl ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2h，再4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤3次，每次30秒，拍干，然后在每孔中加入150-200 μl 封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1-2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

- 10 本发明所述试剂盒中酶标抗原是将阿维菌素用二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成阿维菌素类药物半抗原，采用戊二醛法将阿维菌素类药物半抗原与辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶偶联得到酶标记抗原。

本发明中抗原的合成过程为：

1.半抗原的合成

将阿维菌素用二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成阿维菌素类药物半抗原。

- 15 2.免疫原合成

将阿维菌素类药物半抗原与人血清白蛋白（HSA）采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯）进行偶联得到免疫原。

- 20 本发明抗抗体的制备过程：以羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体，所述稀释包被原抗抗体为0.02~0.05mol/L碳酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中显色剂：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；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。

本发明所述试剂盒中终止液为1~2mol/L的硫酸、盐酸或2mol/L氢氧化钠。

- 25 本发明所述试剂盒中浓缩洗涤液中加入一定量的吐温20和叠氮化钠，其作用在于：洗涤液中的吐温20能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，叠氮化钠在溶液中抑制细菌的生长，对

溶液的稳定性起到保护作用。

本发明所述试剂盒中浓缩稀释液为0.1M含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液，在浓缩稀释液中加入一定量的酪蛋白的优点为：减少蛋白非特异性吸附，增加特异性抗体与酶标抗原的结合率，同时起到保护蛋白的作用。

- 5 本发明所述试剂盒中标准品为依维菌素药物溶液，其稀释液为0.1M含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中依维菌素系列标准溶液有 6 瓶，浓度分别为 0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L。

- 10 本发明所述试剂盒中阿维菌素类药物抗体用含有 3‰N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液将抗体稀释液稀释成蛋白浓度为 0.5-5.0 μ g/L 的工作液。

本发明中单克隆抗体的制备过程为：

1. 动物免疫

- 15 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 80-100 μ g/只，使其产生多克隆抗体。

2. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5-10: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

3. 细胞冻存和复苏

- 20 将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1-5 \times 10^6$ 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 $^{\circ}$ C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

4. 单克隆抗体的制备与纯化

- 25 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4-0.7ml/只，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5-10^6$ 个/只，7-10 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，-20 $^{\circ}$ C 保存。

本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测阿维菌素类药物的方

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。

5 本发明中样品前处理采用均质器均质样本，加入无水甲醇、乙醇或乙腈、丙酮混合，涡动、振荡，然后离心，取上清液，稀释，取样分析。

本发明中用试剂盒检测是向酶标板微孔中加入阿维菌素类药物抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标抗原及标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

10 本发明中检测结果分析过程为：用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值（ B ）除以第一个标准溶液（0标准）的吸光度值（ B_0 ）再乘以100%，即百分吸光度值。计算公式为：

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

15 以依维菌素标准品的浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）的半对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。用同样的办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依维菌素的残留量，根据依维菌素残留量利用交叉反应计算出样本中其它阿维菌素类药物的残留量。

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。

20 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1.5小时可以完成，最低检测限为 $0.5\mu\text{g/L}$ 。

（三）有益效果

25 本发明中检测阿维菌素类药物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动物组织（牛、羊、猪肌肉、肝脏等）样品中阿维菌素类药物的残留量，样品前处理过程简单，能同时检测大批样品。

本发明采用高特异性的阿维菌素类药物单克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，检验方法简便易行，具有特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，

将在食品和饲料的阿维菌素类药物残留检测中发挥重要作用。

附图说明

图1: 阿维菌素类药物的检测标准曲线图。

具体实施方式

- 5 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。

实施例1 试剂盒组分的制备

1. 抗原的合成

10 a. 半抗原的合成

将阿维菌素用二溴丁二酸法和戊二酸酐法合成阿维菌素类药物半抗原。

b. 免疫原合成

将阿维菌素类药物半抗原和人血清白蛋白，采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原。

- 15 免疫原的制备过程：取阿维菌素类药物半抗原 2g 溶于 30ml, 50% 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中，再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，加到半抗原溶液中室温搅拌反应 4 小时，取载体蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将人血清白蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。将反应完的人工抗原对 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次。最后将抗原冻干保存。

2. 单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 80μg/只，使其产生多克隆抗体。

25 b. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

c. 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞用冻存液制成 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°C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

5 d. 单克隆抗体的制备与纯化

将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4ml/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化， -20°C 保存。

抗抗体的制备过程：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。
10

3. 酶标板的制备

用包被缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释成 $0.1\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 温育 2h， 4°C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 $150\mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 温育 1h，倾去孔内液体，拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。
15

实施例2 检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板；
- 20 (2) 用辣根过氧化物酶标记的阿维菌素类药物抗原；
- (3) 蛋白浓度为 $0.5\mu\text{g/L}$ 的阿维菌素类药物抗体；
- (4) 依维菌素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 、 $40.5\mu\text{g/L}$ ；
- (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，底物显色液 B 液为四甲基联苯胺；
25
- (6) 终止液为 2mol/L 盐酸；

(7) 浓缩洗涤液为含有0.01M~0.05M磷酸盐和1‰叠氮化钠 (NaN₃) 的缓冲液;

(8) 浓缩稀释液为0.1M含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

5 实施例3 检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

(1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板;

(2) 用细菌提取碱性磷酸酶标记的阿维菌素抗原;

(3) 蛋白浓度为5.0μg/L的阿维菌素抗体;

10 (4) 依维菌素标准品溶液6瓶, 浓度分别为0μg/L、0.5μg/L、1.5μg/L、4.5μg/L、13.5μg/L、40.5μg/L;

(5) 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液;

(6) 终止液为2mol/L氢氧化钠;

15 (7) 浓缩洗涤液为含有0.01M~0.05M磷酸盐和1‰叠氮化钠 (NaN₃) 的缓冲液;

(8) 浓缩稀释液为0.1M含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

实施例4 样品中阿维菌素类药物残留的检测

1. 样品前处理

20 用均质器均质样本, 称取 5g 样本于 50ml 离心管中, 加入 10ml 无水甲醇混合, 涡动 1min 后于振荡器上振荡 10min, 接着 3000 rpm、15℃ 离心 10min, 取上清液 20μl, 用复溶液稀释 10 倍, 取 20μl 进行分析。

2. 用试剂盒检测

25 向羊抗鼠抗抗体包被的酶标板微孔中加入阿维菌素类药物抗体工作液 100 μl, 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入

250 μ l 洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的阿维菌素类药物工作液 50 μ l 和依维菌素系列标准品或样本溶液 50 μ l，重复洗涤步骤，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 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min，每孔加入 2mol/L 终止液盐酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪，测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%，得到百分吸光度值。以依维菌素标准品浓度 (μ g/L) 的半对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图。用同样的办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依维菌素的残留量，根据依维菌素残留量利用交叉反应计算出样本中其它阿维菌素类药物的残留量。

15 实验例1

标准品精密度试验:

分别从三个不同的时间段制备的酶标板中各抽出一批酶标板，每批各抽取 10 个试剂盒，每板各抽出 20 个微孔，测定 4.5 μ g/L 标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

20

表1 标准可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	4.5	4.7	6.8	8.3	3.9	9.3	9.1	5.6	8.7	4.0
CV% 03 批	5.8	4.2	6.1	6.8	6.3	7.4	5.9	8.2	5.3	6.9
06 批	6.8	4.8	8.5	7.3	6.7	4.1	9.4	5.6	7.5	4.9

通过上述试验结果可以得出，每批试剂盒各 10 次标准品变异系数在 3.9%~9.4% 之间，符合精密度小于或等于 20% 的规定。

实验例2

样本精密度和准确度试验

a. 样品精密度试验:

取伊维菌素标样, 添加到样品中, 分别取三个不同批次的试剂盒各三个,
5 每个浓度重复5次, 分别计算变异系数, 结果见表。

表2 牛肉样本的精密度试验

批号	实测值($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数
						CV%
0506005	4.6	3.4	4.9	5	4.1	14.9
	4.6	4.1	4.9	5.1	3.7	12.8
	3.6	3.7	4.2	3.9	4.6	10.1
0506010	4.1	4.9	3.5	4.7	3.2	18.0
	3.6	3.7	4.8	3.2	4.5	16.8
	4.1	4.9	3.2	4.7	3.5	18.0
0507009	3.4	4.8	3.2	3.7	5	19.5
	4.5	4.2	4.8	4.3	3.9	7.7
	4.9	4.7	3.9	4.7	4.6	8.4

表3 牛肝样本的精密度试验

批号	实测值($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数
						CV%
0506005	3.4	4.6	5.1	4.9	3.7	17.2
	3.6	4.7	4.2	5	3.2	18.0

	4.6	3.7	4.1	4.6	3.4	13.1
	3.7	3.1	3.4	4.6	4.9	19.7
0506010	3.6	4.6	4.1	4.9	3.2	17.1
	3.6	3.8	3.1	4.2	4.6	14.8
	3.6	3.7	4.2	4.6	4.8	12.7
0507009	3.2	3.8	4.2	4.9	4.5	15.8
	3.6	4.6	3.8	4.1	4.2	9.4

结果表明牛肉样品的变异系数均小于20%，牛肝样品的变异系数均小于20%，符合了变异系数小于35%的规定。

b. 样本准确度试验

- 5 取两个浓度的依维菌素标样，对样品进行添加回收试验，每个浓度做4个平行，分别计算回收率。

表4 准确度试验

样本	牛肉		牛肝	
	5	10	5	10
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
1	93.4	97.2	86.3	83.2
回收率	2	108.4	87.3	94.2
%	3	83.7	104.6	81.6
	4	86.4	97.8	108.4
平均值		92.9	96.7	92.6
				81.3

结果表明牛肉、牛肝样本的添加回收率为68.1%~108.4%

实验例3

- 10 交叉反应率试验：

选择与阿维菌素类药物有类似结构和类似功能的3种阿维菌素类药物测

定交叉反应率。通各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应越大，那么此试剂盒对阿维菌素类药物检测的特异性就越好。

$$5 \quad \text{交叉反应率}(\%) = (\text{引起50\%抑制依维菌素的浓度} / \text{引起50\%抑制的类似物浓度}) \times 100\%$$

表5 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
阿维菌素	32.3
依维菌素	100.0
埃比菌素	134.8

实验例4

10 试剂盒保存条件为 2-8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、阿维菌素类药物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℃ 保存的条件下放置 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。

15 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℃ 保存 6 个月以上。

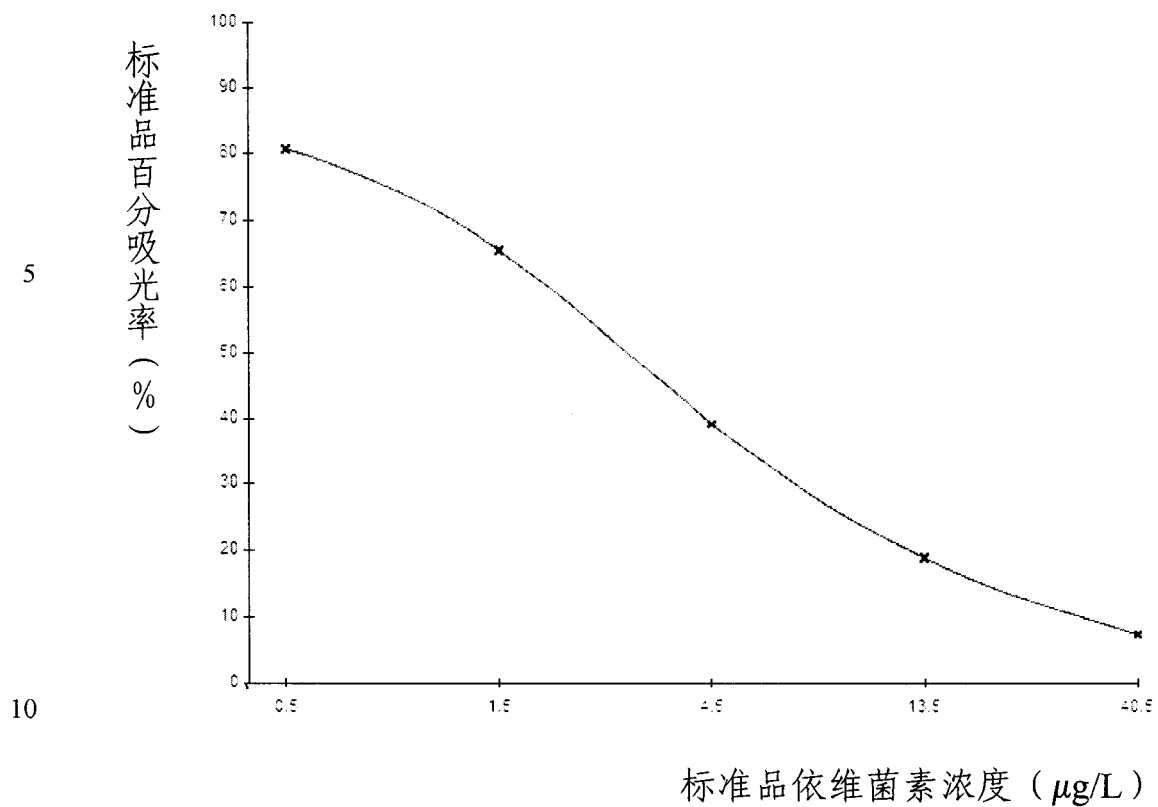


图 1

专利名称(译)	检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN1766625A	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510086770.3	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 史为民 丁双阳 张素霞 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 史为民 丁双阳 张素霞 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/52 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	向华		
其他公开文献	CN100501407C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒，它含有：包被羊抗鼠抗体的酶标板，酶标抗原，阿维菌素类药物抗体，依维菌素标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩稀释液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测阿

维菌素类药物的方法，它包括步骤：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。本发明提供的检测动物组织中阿维菌素类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

