



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101793893 A

(43) 申请公布日 2010.08.04

(21) 申请号 200910045732.1

(22) 申请日 2009.02.03

(71) 申请人 王武康

地址 200060 上海市普陀区梅川路 1333 弄  
55 号 504 室

(72) 发明人 王武康 徐基芳 王文卓

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

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

一种检测庆大霉素的直接竞争酶联免疫测定试剂盒

(57) 摘要

本发明属生物医药领域。公开一种检测庆大霉素的直接竞争酶联免疫测定试剂盒。本发明提供庆大霉素抗原合成方案,用水溶性碳二亚胺活化载体蛋白分子中游离羧基,再与庆大霉素分子中的游离氨基相连,合成免疫原。用过碘酸法,氧化辣根过氧化物酶分子上的糖链,生成游离的巯基,与庆大霉素分子中的氨基相连,合成酶标抗原。用免疫原,免疫新西兰大白兔,获得庆大霉素多抗。测定时,用羊抗兔多抗(二抗)包被酶标板,二抗与庆大霉素多抗结合,洗涤后加入样品或标准和酶标抗原,显色测定,就可得出结果。本发明试剂盒中配制的各试剂,使用方便。为食品中庆大霉素残留和临床医学中,用庆大霉素治疗时,血药浓度监测,提供一个快速,特异,灵敏的检测方法。

1. 本发明公开一种测定庆大霉素的直接竞争酶联免疫测定试剂盒。

其特征包括：免疫原的制备，酶标抗原的制备，抗体制备和试剂盒各组份的配制及酶标板的包被。

2. 根据权利 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于，合成庆大霉素免疫原的方法。主要是用 2-(N-吗啉基)乙磺酸 (MES) 缓冲溶液为溶剂，用水溶性碳二亚胺 {1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (EDAC)；或 1-环己-3-(2-吗啉-4-乙基)碳二亚胺对甲基苯亚磺酸盐 (CMEC)，为交联剂，首先活化载体蛋白分子中游离羧基，再与庆大霉素分子中的游离氨基相连，生成免疫原。载体蛋白如：牛血清白蛋白，卵清蛋白，甲状腺球蛋白，大钥匙孔状槭血蓝蛋白。

3. 根据权利 1,2 所述，本发明公开庆大霉素与酶交联的方法。交联的酶包括：辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶， $\beta$ -半乳糖苷酶等。这几种酶与庆大霉素交联都可以采取 2. 所述的庆大霉素与载体蛋白相交联的方法，即用水溶性碳二亚胺活化酶分子中的游离羧基，再与庆大霉素分子中的游离氨基相连，生成酶标抗原。此外，分子表面含糖链的酶，如辣根过氧化物酶，尚可用过碘酸氧化法合成酶标抗原。此交联方法的特征在于，用过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶分子表面的糖链，生成游离醛基，与庆大霉素分子上的氨基相连，以制备的酶标抗原。首先用过碘酸钠氧化辣根过氧化物酶，在冰浴中，避光搅拌 15 ~ 30 分钟。加入乙二醇后。立即过 Sephadex G 25 柱，用 0.01M PBS 液洗脱，以除去过量的氧化剂。庆大霉素溶于蒸馏水中，滴入上收集的过碘酸氧化的 HRP 中。用 1M NaOH 调 PH 至 9 ~ 10，室温轻柔搅拌 3 小时。加入新配制的 0.1M 四氢硼钠 ( $\text{NaBH}_4$ )。室温搅拌 30 分钟。用 1.0M  $\text{NaH}_2\text{P}_04$  调 PH 至 6，再加入 0.1M 四氢硼钠 ( $\text{NaBH}_4$ )。室温搅拌 30 分钟。过 Sephadex G-25 柱收集有色峰。为庆大霉素-HRP。

4. 根据权利 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于，试剂盒溶液的优化配制：标准溶液和样品的配制，是用含 0.05% ~ 0.1% 吐温-20 的 0.1 ~ 0.01M 的磷酸盐缓冲溶液。抗体稀释液用含 0.1 ~ 0.5% 明胶的 0.1 ~ 0.01M 磷酸盐缓冲溶液。显色液为二组份，其中，一组份为显色缓冲液，由磷酸氢二钠和柠檬酸组成，每毫升含 0.2 ~ 0.5  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ；另一组份为四甲基联苯胺 (TMB) 液。TMB 液用 95% 乙醇或二甲亚砜配制成 1mg/ml 浓度。

5. 根据权利 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于，用采用羊抗兔抗体 (二抗) 包被 96 或 48 孔酶标板。用 2% 卵清蛋白液封闭孔中未吸附二抗的部位。

6. 根据权利 1 ~ 5 所述的酶联免疫试剂盒，是一种用直接竞争酶联免疫测定方法，测定各种样品中庆大霉素。其特征在于：

(1) 样品的前处理方法。用加热法去蛋白，用有机溶剂去脂，水相稀释就可测定。大大简化了前处理过程。

(2) 用权利 1-5 所述工艺组装的试剂盒测定，检测过程为：

用包被有羊抗兔抗体的酶标板，加入庆大霉素抗体，孵育后洗涤甩干，加入标准或样品溶液和酶标抗原 (庆大霉素-辣根过氧化物酶)，孵育后洗涤甩干，加显色剂显色，终止，测定。标准或样品庆大霉素浓度的对数值与  $\text{OD}_{450}$  值呈反比。以此达到定量测定庆大霉素的目的。此直接竞争酶联免疫测定试剂盒，检测范围为 1 ~ 80ng/ml，灵敏度可达 0.5ng/ml。

## 一种检测庆大霉素的直接竞争酶联免疫测定试剂盒

[0001] 技术领域 本发明属生物医药技术领域,为食品安全,药物检测试剂。具体而言,本发明利用免疫反应的高灵敏性和特异性,以及酶促反应的放大效应和易检测性,建立起来的一种检测庆大霉素的酶联免疫测定试剂盒。

[0002] 背景技术 庆大霉素 (Gentamicin) 属氨基糖甙类抗生素,被广范应用于医学临床和兽医,以治疗人及动物的多种感染性疾病。但该药对神经系统和肾脏具有毒性作用,有引起听力障碍和肾功能损坏的潜在危险。因此,在食品中的残留会影响人类健康,欧美国家及我国均要求其限量使用。在动物性食品中,欧盟的限量标准为不得超过 50ng/g。在医学临床治疗时,庆大霉素在血中的有效浓度为 5 ~ 10  $\mu$ g/ml,潜在中毒浓度为 > 12  $\mu$ g/ml,由于人类对药物治疗的反应性不同,中毒剂量也不同。每个病人都需要自己的用药方案,这就是临床医学的个性化治疗。因此,对诸如庆大霉素一类有毒性剂量信赖性的药物,在用药过程中,必须进行血药浓度的监测。本试剂盒为食品中庆大霉素残留检测和临床庆大霉素血药浓度监测,提供了一种高效,快速,特异的检测方法。

[0003] 氨基糖甙类抗菌素常用的检测方法有:薄层色谱、离子交换色谱、气相色谱、液相色谱、质谱或气-质、液-质联用技术等。

[0004] 薄层色谱灵敏度低,仅能检测出微克 ( $\mu$ g) 级以上的样品。不能满足食品中残留庆大霉素的检测要求。离子交换色谱受诸多因素(如 PH,温度,离子强度等)影响,难以实际运用。

[0005] 气相色谱法 (GC):由于氨基糖甙类抗菌素中含有多个极性基团、不挥发、因此不适宜直接进行 GC 分析。必须对氨基糖甙类抗菌素结构中基团进行衍生化处理,才能测定,故步骤繁多。

[0006] 液相色谱法 (LC):液相色谱对氨基糖甙类抗菌素的检测,包括反相色谱和正相色谱,用来检测血浆中的氨基糖甙类抗菌素。虽然该方法的灵敏度可以基本达到兽药残留检测要求,但不能进行定性确认。

[0007] 液相色谱-质谱联用法 (LC-MS):液相色谱-质谱联用法 (LC-MS),其检测灵敏度高,能对各氨基糖甙类抗菌素微量残留进行检测,是目前检测食品中氨基糖甙类抗菌素残留确证检测的最佳方法之一。

[0008] 以上仪器分析法其设备要求高,技术难度大,对技术人员要求高。本发明利用酶联免疫测定原理,定量检测血清,动物组织,,胆汁,尿液中的庆大霉素残留,不需要昂贵的仪器投入,一般中等文化水平的人员,经过短期培训,就可掌握其检测方法。该试剂盒检测多种样品中的庆大霉素,可满足食品中庆大霉素残留的快速监测,也为临床医学中,庆大霉素血药浓度监测,提供了一种高效,快速,特异的检测方法

[0009] 发明内容 本发明提供一种快速检测庆大霉素的酶联免疫试剂盒。其生产的庆大霉素试剂盒,线性范围为 1ng/ml ~ 80ng/ml,  $IC_{50}$  为 20ng/ml 左右,灵敏度为 0.5ng/ml。稳定期在 6 个月以上 (4 $^{\circ}$ C 冰箱保存)。

[0010] 本发明公开免疫原的合成,动物的免疫,特异性抗体的制备,酶标抗原的制备,试剂盒的调试和装配,试剂盒各种参数的确定及样品的前处理和测定。

[0011] 庆大霉素,是由小单孢菌产生的抗生素。包括庆大霉素  $C_1$ 、 $C_{1a}$ 、 $C_2$ , 分子量为 449-477, 属小分子物质, 不具有免疫原性而仅具有免疫反应性, 要制备庆大霉素酶联免疫测定试剂盒, 必须要制备对庆大霉素有高度特异性的抗体。要获得对庆大霉素有高度特异性的抗体, 首要条件是要有一个能激发动物产生抗体的免疫原。其解决方案是庆大霉素共价连接上一个大分子物质, 通常是与一种蛋白质交联。常用的有牛血清白蛋白, 卵清蛋白, 甲状腺球蛋白, 大钥匙孔状槭血蓝蛋白等, 本发明公开一种制备庆大霉素免疫原的方法。主要是用 2-(N- 吗啉基) 乙磺酸 (MES) 缓冲溶液为溶剂, 用水溶性碳二亚胺 {1- 乙基-3-(3- 二甲氨基丙基)- 碳二亚胺 (EDAC); 或 1- 环己-3-(2- 吗啉-4- 乙基) 碳二亚胺对甲基苯亚磺酸盐 (CMEC), 为交联剂, 首先活化载体蛋白分子中游离羧基, 再与庆大霉素分子中的游离氨基相连, 生成免疫原。

[0012] 有了免疫原, 第二步就是用免疫原免疫动物, 本发明是免疫 1.5 ~ 2kg 大小的新西兰雌性家兔, 获得对庆大霉素有特异性反应的多克隆抗体。本发明提供一种能产生高滴度抗体的免疫方案。

[0013] 为了检测特异性抗体, 建立直接竞争酶联免疫测定, 必须合成庆大霉素与一种酶交联的抗原-酶交联物(酶标抗原), 交联的酶包括: 辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶,  $\beta$ -半乳糖苷酶等。这几种酶与庆大霉素交联都可以采取上述的庆大霉素与载体蛋白相交联的方法, 即用水溶性碳二亚胺活化酶分子中的游离羧基, 再与庆大霉素分子中的游离氨基相连, 生成酶标抗原。此外, 分子表面含糖链的酶, 如辣根过氧化物酶, 尚可用过碘酸氧化法合成酶标抗原。本发明同时公开一种庆大霉素与辣根过氧化物酶交联的过碘酸法, 用过碘酸氧化辣根过氧化物酶分子表面的糖链, 生成游离醛基, 然后与庆大霉素分子上的氨基相连, 以制备的酶标抗原。此方法的关键在于辣根过氧化物酶氧化的时间和条件, 使之能保持较高的酶活性。

[0014] 在以上基础上, 组装检测试剂盒。用聚苯乙烯 96 孔或 48 孔酶标板, 包被二抗。(选用羊抗兔抗体, 有商品供给。一般选用效价高, 效价在 1 : 1000 ~ 2000, 以上, 稳定性好的二抗。)

[0015] 优化包被浓度, 抗体浓度, 酶标抗原浓度, 使之达到检测要求。

[0016] 本发明提供组成试剂盒相关试剂的配制和组装流程:

[0017] (1) 用选购的二抗包被酶标板。(2) 孵育后洗涤去未吸附上的多余二抗。(3) 用另一种蛋白封闭板上未吸附二抗的多余位点, 以减少测定时的非特异性吸附。(4) 提供庆大霉素抗体和酶标抗原浓缩液。(5) 提供抗体和酶标抗原应用稀释液。(6) 提供浓缩洗涤液(7) 提供庆大霉素的标准液, 用样品制备液配制 7 个标准: 0ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 40ng/ml, 80ng/ml。(8) 提供酶显色缓冲溶液和酶反应底物液, 本试剂盒所用的酶反应底物为  $H_2O_2$  和四甲基联苯胺 (TMP),  $H_2O_2$  配于显色缓冲溶液中, 四甲基联苯胺 (TMP) 单独配制。(8) 提供酶反应终止液, 终止液为 2M 硫酸。(9) 提供样品制备液。为配制庆大霉素标准和测定时样品的制备。

[0018] 以上试剂均放 4℃ 冰箱保存。

[0019] 应用本试剂盒检测庆大霉素的检测步骤:

[0020] (1) 按照测定样品数和制作标准曲线所需孔数(每样品和标准均作二个孔), 从冰箱取出所需用的孔条, 放置使温度平衡至室温 (25℃)。

[0021] (2) 将庆大霉素抗体浓缩液用抗体稀释液按 1 : 100 稀释后, 每孔加 100  $\mu$  l, 加盖, 室温放置 30 分钟。

[0022] (3) 将浓缩洗涤液用双蒸馏水按 1 : 9 稀释后, 作为洗涤液, 倒去孔中抗液体, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次每孔 250  $\mu$  l, 每次加洗涤液后, 静置 3 分钟, 倒掉, 甩干, 再进行下一次洗涤。最后一次洗涤, 尽量甩干。

[0023] (4) 各孔加入标准或样品, 各标准和样品各加 2 孔, 每孔加 50  $\mu$  l, 将酶标抗原浓缩液, 用抗体稀释液按 1 : 100 稀释后, 每孔加 50  $\mu$  l, 另取 2 孔, 加 0 标准 50  $\mu$  l 和抗体稀释液 50  $\mu$  l 作为空白孔, 稍平行振荡酶标板, 混匀各孔中液体。加盖, 室温放置 30 分钟。

[0024] (5) 同 (3) 洗涤各孔, 最后甩干。

[0025] (6) 各孔加显色液 100  $\mu$  l, 显色液由显色缓冲液与 TMB 液, 以 10 : 1 配制。加入后, 加盖, 室温暗处避光放置 15 分钟。

[0026] (7) 每孔加终止液 50  $\mu$  l, 混匀, 于 30 分钟内, 用酶标仪, 在波长 450nm 下, 测定其光密度。

[0027] 用各孔的  $OD_{450}$  减去空白孔的  $OD_{450}$ , 得各孔的实际测定值。求出二平行孔的平均值, 得各标准或样品的测定值。按照下式求出各标准和样品的抑制率 :

[0028] 各标准或样品的抑制率 % =

[0029] (各标准或样品的测定值 / 0 标准的测定值)  $\times$  100 %

[0030] 用各标准浓度的对数值为 X, 其相应的抑制率为 Y, 在坐标轴上作图, 得庆大霉素浓度的半对数坐标标准曲线, 在标准曲线上, 找出样品抑制率相对应的 X 轴上的点, 就可计算出样品中庆大霉素的浓度。或利用 ELISA 计算的相关软件, 只需输入测定值, 立即就可得出结果。

[0031] 本试剂盒所用的检测方法, 属直接竞争酶联免疫测定方法。96 孔酶标板已预先包被了二抗, 加入庆大霉素的特异性抗体, 此抗体与二抗结合后, 固定在酶标板上。然后, 加入标准抗原 (庆大霉素, Gen) 或含有庆大霉素的样品, 和酶标 - 庆大霉素, 标准或样品中庆大霉素与酶标 - 庆大霉素, 共同竞争与庆大霉素抗体结合, 经孵育后, 洗涤去未结合的酶标 - 庆大霉素, 显色测定。测定值与标准或样品中庆大霉素量的对数值呈反比, 以此达到定量测定庆大霉素的目的。

[0032] 图例说明 :

[0033] 图 1 用制备的试剂盒测定, 所得的庆大霉素标准曲线图

[0034] 以下具体实施例子, 可进一步了解本发明。此处仅提供一种优选方法, 但对本发明的内容和权利要求不构成任何限制。

[0035] 实施例 1 庆大霉素免疫原的合成

[0036] 称取 300mg 牛血清白蛋白 (BSA), 加 6ml 0.1M 2-(N-吗啉基) 乙磺酸 (MES) 缓冲溶液 (pH 4 ~ 5) 溶解, 加入 50mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺, (EDAC); 室温下搅拌 15 分钟。

[0037] 另称取庆大霉素 102mg (约 0.2mmol), 溶解于 PH8 的水中, 在 30 分钟内, 分次加入上搅拌的 BSA 反应液中。加完后, 再加入 25mg EDAC, 室温搅拌过夜, 置冰箱放置 24 小时后, 用 0.01M PBS 液透析 3 日, 每日换 2 次透析液。透析后液定蛋白浓度, 此为免疫原。

[0038] 实施例 2 庆大霉素 - 辣根过氧化物酶 (Gen-HRP) 的合成

[0039] 称取 HRP 10mg, 用 2ml 0.1M 柠檬酸缓冲溶液溶解, 4℃ 搅拌下, 加入 0.5ml 0.5M 过碘酸钠溶液. 冰浴中, 避光搅拌 30 分钟. 加入 0.25ml 0.1M 乙二醇. 立即过 Sephadex G 25 柱, 用 0.01M PBS 液洗脱, 收集有色峰约 5ml. 为过碘酸氧化的 HRP.

[0040] 称 8mg 庆大霉素溶于 0.5ml 水中, 滴入上收集的过碘酸氧化的 HRP 中. 用 1M NaOH 调 PH 至 9 ~ 10, 室温轻柔搅拌 3 小时. 加入新配制的 0.1M 四氢硼钠 ( $\text{NaBH}_4$ ) 0.25ml. 室温搅拌 30 分钟. 用 1.0M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  调 PH 至 6, 再加入 0.1M 四氢硼钠 ( $\text{NaBH}_4$ ) 0.25ml. 室温搅拌 30 分钟. 过 Sephadex G-25 柱收集有色峰. 为庆大霉素-HRP.

[0041] 实施例 3 庆大霉素多克隆抗体的生产

[0042] 用 3 只新西兰长耳雌兔, 每只免疫 4 次. 首次用 Gen-BSA 配成 1mg/ml 浓度, 取 3ml, 加 3ml 弗氏完全佐剂, 充分乳化后. 每只兔用 2ml (即 1mg 免疫原) 背部, 多点皮下注射为首次免疫. 以后分别在第 21 天, 51 天, 91 天再免疫 3 次. 第 21 天, 51 天, 用 3ml 1mg/ml 浓度的免疫原, 加 3ml 弗氏不完全佐剂乳化, 每只兔用 1ml, 于臀部肌肉二侧注射. 第 51 天免疫后 10 天, 采血检查抗体产生情况. 第 91 天, 免疫原用 0.9% 氯化钠液配成 0.5mg/ml 溶液, 每只兔从耳静脉注射 1ml 免疫原. 此次后, 第 10 天, 就可从兔耳静脉或心脏收获血液. 收集血液让其自然凝结. 离心收集血清, 此为抗 Gen 的抗血清.

[0043] 按照此免疫方案, 一般都能收获高滴度的抗血清.

[0044] 用二抗包被酶标板, 利用合成的 Gen-HRP, 测定抗血清效价. 下为测定结果:

[0045]

| 稀释倍数          | 1 : 4000 | 1 : 8000 | 1 : 16000 | 1 : 32000 | 1 : 64000 | 1 : 128000 | 1 : 236000 | 1 : 472000 |
|---------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| 抗血清<br>OD450  | 2.908    | 2.684    | 2.012     | 1.689     | 1.031     | 0.587      | 0.220      | 0.113      |
| 阴性血清<br>OD450 | 0.121    | 0.103    | 0.053     | 0.022     | 0.012     | 0.005      | 0.005      | 0.005      |

[0046] 可见, 生产抗血清效价达 10 ~ 20 万. 用则可按 1 : 10000 ~ 1 : 15000 稀释用.

[0047] 实施例 4 优化试剂盒组成, 确定各试剂最终浓度

[0048] 用方阵法确定包被二抗, Gen 多抗, Gen-HRP 三者的最佳浓度.

[0049] 4.1 包被酶标板: 二抗配成 2mg/ml 浓度, 用 0.01M 碳酸盐缓冲溶液 (pH9.6) 按 1 : 1000 (1000  $\mu$ l 缓冲液加 1  $\mu$ l 二抗) 稀释后, 每孔加 100  $\mu$ l, 加盖, 放入 4℃ 冰箱过夜. 次日用洗涤液洗 3 次, 最后一次甩干后, 每孔加 200  $\mu$ l 封闭液, 封闭液为含 2% 卵清蛋白的 0.01M 碳酸盐缓冲溶液 (pH9.6). 加入后, 加盖, 放入 4℃ 冰箱过夜. 次日用洗涤液洗 3 次, 最后一次甩干后, 将酶标板放入 37℃ 烘箱 30 分钟, 烘干. 取出后用铝箔真空包装.

[0050] 4.2 配抗体浓缩液: 以制备 Gen 多抗, 1 : 100 稀释 (用抗体保存液). 测定时用抗体稀释液按 1 : 100 稀释应用.

[0051] 4.3 配 Gen-HRP 浓缩液: 合成的 Gen-HRP, 用酶保存液, 按 1 : 5 稀释. 测定时用抗体稀释液按 1 : 100 稀释应用.

[0052] 4.4 配浓缩洗涤液: 0.5M PBS 液 (pH7.2) + 0.5% 体积的 Tween-20 为洗涤液. 用时

用蒸馏水或去离子水按 1 : 9 稀释用。

[0053] 4.5 配抗体稀释液 :为 0.01M PBS(pH7.2) 加 0.1%明胶。

[0054] 4.6 配样品配制液 :为 0.1MPBS(pH7.2) 加 0.05%吐温 -20。

[0055] 4.7 配制 Gen 标准 :用样品配制液配。共配制 7 个标准 :0ng/ml,1ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,20ng/ml,40ng/ml,80ng/ml。

[0056] 4.8 配制显色液 :显色液由二部份组成,一是“显色缓冲液”,另一是“TMB”液。显色缓冲液 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1.84g+ 柠檬酸 0.47g+ $\text{H}_2\text{O}$  100ml+30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 50  $\mu\text{l}$ ,

[0057] TMB 液 :用 95%的乙醇或用二甲亚砜配成 1mg/ml 浓度。

[0058] 4.9 配终止液 :2M 硫酸。浓硫酸按 1 : 8 用水稀释则可。

[0059] 4.10 试剂盒组成 :

[0060] (1) 已包被二抗的 96 孔或 48 孔酶标板 (真空铝箔包装)

[0061] (2) 庆大霉素 (Gen) 标准 (共 7 个) :0ng/ml,1ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,20ng/ml,40ng/ml,80ng/ml。

[0062] (3)Gen 抗体浓缩液 (用时按 1 : 100 稀释应用)

[0063] (4)Gen-HRP 浓缩液 (用时按 1 : 100 稀释应用)

[0064] (5) 抗体稀释液

[0065] (6) 显色缓冲液

[0066] (7)TMB 液

[0067] (8) 终止液。

[0068] (9)10X 洗涤液

[0069] (10) 样品制备液。

[0070] 实施 5 样品处理和测定

[0071] 5.1 测定样品的处理 :

[0072] 尿样品 :尿样品需澄清,浑浊的需要先离心。取 2ml 清尿液,沸水浴 5 分钟,(注意 :若体积减少,加蒸馏水达原体积。)离心,10000rpm/分,5 分钟。取上清 100  $\mu\text{l}$  加 100  $\mu\text{l}$  样品制备液,为样品测定液。

[0073] 牛奶样品 :取牛奶 2-3ml 沸水浴 5 分钟,,放至室温,取下层 1ml 去脂奶加 1ml 三氯甲烷,1ml 环己烷,振荡 3 分钟。离心,10000rpm/,5 分钟。取中间水相 20  $\mu\text{l}$  加样品制备液 180  $\mu\text{l}$ ,,为样品测定液

[0074] 奶粉 :5g 加 5ml。溶解均质。沸水浴 5 分钟,放至室温,取下层 1ml 去脂奶加 1ml 三氯甲烷,1ml 环己烷,振荡 3 分钟。离心,10000rpm/分,5 分钟。取中间水相 20  $\mu\text{l}$  加样品制备液 180  $\mu\text{l}$ ,,为样品测定液。

[0075] 组织样品 (包括鱼,虾,肌肉,肝等组织) 称取 2g 组织,加 2ml 生理盐水,均浆。沸水浴 5 分钟,(注意 :若体积减少,加蒸馏水达原体积)。放至室温,取下层 1ml 加 1ml 三氯甲烷,1ml 环己烷,振荡 3 分钟。离心,10000rpm/分,5 分钟。取中间水相 20  $\mu\text{l}$  加样品制备液 180  $\mu\text{l}$ ,,为样品测定液。

[0076] 血清 10  $\mu\text{l}$  血清加 990  $\mu\text{l}$  样品制备液,为样品测定液

[0077] (血清测定,自设空白血清为对照。可增加准确性)

[0078] 以上,血清的稀释倍数为 100,其余的为 10。

[0079] 5.2 样品和标准液的测定：

[0080] 按照说明书第 4,5 页所述的检测步骤,用组装好的试剂盒进行测定。测定所得标准品数据如下：

[0081]

| 庆大霉素标准(ng/ml) | 0     | 1      | 5     | 10    | 20    | 40    | 80     | B     |
|---------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| A450          | 2.306 | 2.19   | 1.831 | 1.511 | 1.18  | 0.805 | 0.588  | 0.01  |
|               | 2.31  | 2.201  | 1.809 | 1.531 | 1.172 | 0.811 | 0.565  | 0.02  |
| 平均值           | 2.308 | 2.1955 | 1.82  | 1.521 | 1.176 | 0.808 | 0.5765 | 0.015 |
| 测定值           | 2.293 | 2.1805 | 1.805 | 1.506 | 1.161 | 0.793 | 0.5615 |       |
| 抑制率           |       | 0.950  | 0.787 | 0.656 | 0.506 | 0.345 | 0.244  |       |

[0082] 所绘的标准曲线如图 1 所示。 $IC_{50} = 19.958ng/ml$

[0083] 实施 6 试剂盒各参数的测定

[0084] 试剂盒的特异性及交叉反应：

[0085] 庆大霉素 100%

[0086] 卡那霉素 < 10%

[0087] 阿米卡星 < 10%

[0088] 双氢链霉素 < 1%

[0089] 四环素 < 0.1%

[0090] 用 20ng/ml 标准做 24 个孔,重复测定。计算“板内变异” $CV = 2.9\%$

[0091] “板间变异” < 15%。“灵敏度”为 0.5ng/ml。

[0092] 精确度：用肝组织做添加试验,分别添加 1ng/ml, 10ng/ml, 40ng/ml, 其回收率分别是：80%, 89%, 及 102%

[0093] 试剂盒稳定性：

[0094] 热稳定性试验,37 度 3 周保存,0 标的光密度在 1.75 左右。标准曲线的趋势不变。这相当于 4 度保存 7.4 个月。可见试剂盒的稳定期在半年以上。

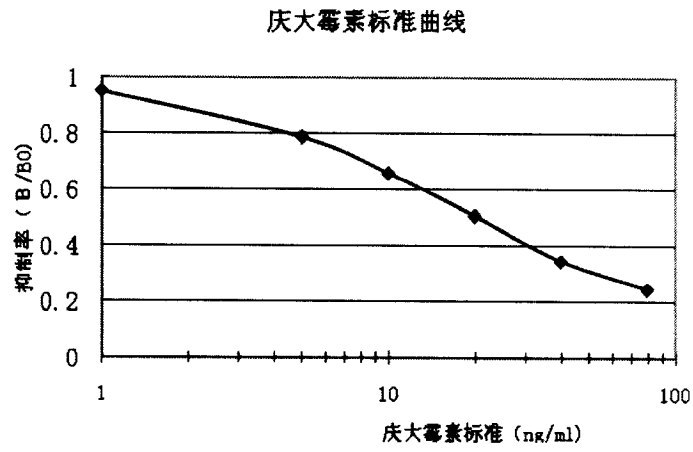


图 1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种检测庆大霉素的直接竞争酶联免疫测定试剂盒                         |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101793893A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-08-04 |
| 申请号            | CN200910045732.1                               | 申请日     | 2009-02-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 王武康  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 王武康  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 王武康  |         |            |
| [标]发明人         | 王武康<br>徐基芳<br>王文卓                              |         |            |
| 发明人            | 王武康<br>徐基芳<br>王文卓                              |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/531 G01N33/543 G01N33/535               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明属生物医药领域。公开一种检测庆大霉素的直接竞争酶联免疫测定试剂盒。本发明提供庆大霉素抗原合成方案，用水溶性碳二亚胺活化载体蛋白分子中游离羧基，再与庆大霉素分子中的游离氨基相连，合成免疫原。用过碘酸法，氧化辣根过氧化物酶分子上的糖链，生成游离的巯基，与庆大霉素分子中的氨基相连，合成酶标抗原。用免疫原，免疫新西兰大白兔，获得庆大霉素多抗。测定时，用羊抗兔多抗(二抗)包被酶标板，二抗与庆大霉素多抗结合，洗涤后加入样品或标准和酶标抗原，显色测定，就可得出结果。本发明试剂盒中配制的各试剂，使用方便。为食品中庆大霉素残留和临床医学中，用庆大霉素治疗时，血药浓度监测，提供一个快速，特异，灵敏的检测方法。

| 庆大霉素标准<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0     | 1      | 5     | 10    | 20    | 40    | 80     | B     |
|--------------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| A450                           | 2.306 | 2.19   | 1.831 | 1.511 | 1.18  | 0.805 | 0.588  | 0.01  |
|                                | 2.31  | 2.201  | 1.809 | 1.531 | 1.172 | 0.811 | 0.565  | 0.02  |
| 平均值                            | 2.308 | 2.1955 | 1.82  | 1.521 | 1.176 | 0.808 | 0.5765 | 0.015 |
| 测定值                            | 2.293 | 2.1805 | 1.805 | 1.506 | 1.161 | 0.793 | 0.5615 |       |
| 抑制率                            |       | 0.950  | 0.787 | 0.656 | 0.506 | 0.345 | 0.244  |       |