

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510086346.9

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月10日

[11] 授权公告号 CN 100498337C

[22] 申请日 2005.9.2

[21] 申请号 200510086346.9

[73] 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 袁宗辉 常超 王玉莲 赵春保
王帅兵 高爱中 陈冬梅 陶燕飞
伍金娥 彭大鹏

[56] 参考文献

. F. M. Cooper Detection of 3. amino. 2. ox. azolidinone (AOZ), a tissue. bound metabolite of the nitrofurans furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay. Food Additives and Contaminants, Vol. 21 No. 9. 2004

动物可食性组织中呋喃唑酮残留标示物 ELISA 检测方法及其试剂盒研制. 常超. 华中农业大学. 2005

审查员 陈中伟

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 张红兵

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒及其应用,属于免疫化学分析技术领域。本发明所提供的试剂盒主要由3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)特异性抗体、AOZ标准溶液、包被有AOZ与卵清蛋白复合物的酶标板组成。样品处理经盐酸水解,释放AOZ,苯甲醛衍生过夜,MAX柱净化,采用间接竞争ELISA方法检测动物可食性组织如肝脏、肌肉中AOZ残留。本发明的核心技术包括人工抗原的合成、抗体的制备、ELISA方法的建立、ELISA试剂盒的组装等。本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、准确、廉价的优点,能同时快速检测大批样品,最低检测限0.1 μg/kg。

1、一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，它包括盒体、设在盒体内的酶标板、试剂，所述的试剂包含洗涤液、样品稀释液、辣根过氧化酶标记羊抗兔抗体、底物显色 A 液、底物显色 B 液和终止液，其中所述的显色 A 液是过氧化氢或过氧化脲，所述的底物显色 B 液是四甲基联苯胺或邻苯二胺，其特征在于，酶标板的每孔内包被有能与呋喃唑酮残留标示物 3-氨基-2-恶唑烷酮特异性抗体结合的包被抗原，所述的包被抗原是由 3-氨基-2-恶唑烷酮与对醛基苯甲酸反应，再与卵清蛋白偶联的复合物，试剂还包含 3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液和 3-氨基-2-恶唑烷酮抗体液，该抗体液是由人工免疫原免疫家兔得到的血清，其中的人工免疫原是由 3-氨基-2-恶唑烷酮与对醛基苯甲酸反应，再与牛血清蛋白偶联的复合物。

2、权利要求 1 所述的试剂盒在呋喃唑酮残留分析中的应用。

一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用

技术领域

本发明涉及一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，适用于测定动物性食品中呋喃唑酮残留标示物3-氨基-2-恶唑烷酮（简称AOZ，下同）的残留量，属于免疫化学分析技术领域。

背景技术

呋喃唑酮又名痢特灵，属于硝基呋喃类药物，为人工合成的广谱抗菌药，曾作为促生长剂广泛应用于畜、禽、水产养殖中。毒理学研究发现，呋喃唑酮具有致癌和致突变性。欧盟于1995年将呋喃唑酮列为禁用药，随后美国、日本、澳大利亚等国均取消呋喃唑酮在畜禽生产上的使用，中国农业部2002年3月发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中将呋喃唑酮列为禁用药。由于呋喃唑酮确实具有很好的预防和治疗效果，价格便宜，目前仍在畜、禽、水产养殖中非法使用。因此为了保障动物性食品食用者的健康和扩大动物性食品的贸易往来，加强对动物性食品中呋喃唑酮残留的检测是非常必要的。

呋喃唑酮在动物体内很快代谢成AOZ，与组织蛋白结合的AOZ在体内滞留时间长，被视为呋喃唑酮的残留标示物，所以分析呋喃唑酮残留通常分析其代谢产物AOZ。目前检测AOZ残留的方法有高效液相色谱法（HPLC），液质联用（LC-MS），液质串联质谱法（LC-MS-MS）和免疫化学分析法（IA）。

常用的仪器法（HPLC、LC-MS、LC-MS-MS）所需仪器价格昂贵，对操作人员的要求较高，难于推广，不适合高通量的样品筛选。免疫化学分析法特别是酶联免疫吸附分析技术（ELISA）具有快速、灵敏度高、操作简单、专一性好等优点，适合高通量的样品筛选。近年来国外已开展呋喃唑酮ELISA方法的研究（Cooper K M, Elliott C T, Kennedy D G. Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissue-bound metabolite of the nitrofurans furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay. Food Additives and Contaminants, 2004, 21(9): 841-848），但国内外均未见呋喃唑酮ELISA试剂盒专利报道。因此研制呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，具有重要的经济效益和社会效益。

发明内容

本发明目的在于克服现有技术的缺陷，提供一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒。本试剂盒具有灵敏度高，结构简单，使用和携带方便，可用于动物检验检疫单位对动物源食品中呋喃唑酮残留的分析检测。

本发明通过以下技术方案实现：

一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，它包括箱体、设在箱体內的酶标板、试剂，其中的试剂包含洗涤液、样品稀释液、辣根过氧化酶（HRP）标记羊抗兔抗体、底物显色A液、底物显色B液、终止液、3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液和3-氨基-2-恶唑烷酮抗体，在酶标板的每孔內，有包被液包被的能与呋喃

唑酮残留标示物3-氨基-2-恶唑烷酮特异性抗体结合的包被抗原，所说的3-氨基-2-恶唑烷酮抗体是由人工免疫原免疫家兔得到的血清。

所说的包被抗原是由3-氨基-2-恶唑烷酮与对醛基苯甲酸反应，再与卵清蛋白偶联的复合物。

所说的人工免疫原是由3-氨基-2-恶唑烷酮与对醛基苯甲酸反应，再与牛血清蛋白偶联的复合物。

所说的3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液为3-氨基-2-恶唑烷酮与苯甲醛衍生物N-苯亚甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮（简称PAOZ，下同）。

在本发明的试剂盒中，所述的酶标板由塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成，酶标板用聚苯乙烯制成。

试剂盒中的试剂按照常规配制（朱立平，陈学清，免疫学常用实验方法，北京：人民军医出版社，2000.），其中底物显色A液为过氧化氢或过氧化脲，底物显色B液为四甲基联苯胺（TMB）或邻苯二胺（OPD），终止液为硫酸溶液或盐酸溶液，洗涤液为含0.05~0.1%吐温20的磷酸盐缓冲液，样品稀释液为pH 7.4的磷酸盐缓冲液。

本发明还包括动物可食性组织如肝脏、肌肉样品预处理方法，将待检测动物组织经盐酸水解释放AOZ，苯甲醛衍生过夜（16h），最后过MAX柱净化。

本发明试剂盒采用间接竞争ELISA法，用于检测动物可食性组织如肝脏、肌肉中AOZ的残留。其优点是样品处理简单，适合高通量的样品筛选，具有高特异性、高灵敏度、高精度等特点，最低检测限达0.1 μ g/kg。

附图说明

图1 是本发明的检测试剂盒直观示意图，图中：1--盒体；3--AOZ标准溶液；4--辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗兔抗体；5--AOZ抗体液；6--底物显色A液；7--底物显色B液；8--终止液；9--洗涤液；10--样品稀释液；11--泡沫托架；

图2 是本发明的检测试剂盒中的酶标板直观示意图，图中：2--酶标板；

图3 是本发明的人工抗原合成路线；

图4 是本发明人工抗原紫外扫描图谱，图4显示BSA最大吸收波长为278nm，CPAOZ-BSA最大吸收波长为292nm，BSA偶联半抗原后最大吸收波长发生明显改变；

图5 是本发明3-氨基-2-恶唑烷酮抗体与3-氨基-2-恶唑烷酮标准品的间接竞争反应曲线，图中：X轴为3-氨基-2-恶唑烷酮标准品的浓度对数值，Y轴为3-氨基-2-恶唑烷酮标准品对光密度值的抑制百分率。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步说明，但不限制本发明。

实施例1、抗原、抗体的制备

1.1 人工抗原（免疫原、包被原）的合成

在有磁力搅拌器装置的100mL烧杯中加入蒸馏水10mL，对醛基苯甲酸3.0g，缓慢滴加N, N-二甲基甲酰胺（DMF）至对醛基苯甲酸完全溶解，搅拌中加入AOZ 1.0g，反应2h后过滤，水洗3次得到AOZ与对醛基苯甲酸的反应物3-（4羧基苯亚甲基）-氨基-2-恶唑烷酮（简称CPAOZ，下同）。取CPAOZ 23.4mg溶于DMF 2mL中，

搅拌中加入二环己基碳二亚胺(DCC) 27.5mg和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 14.4mg, 4℃下磁力搅拌反应过夜。离心后, 上清液为A液。称取牛血清蛋白(BSA) 170mg溶于0.1mol/L PBS (pH 8.0) 10mL中, 加入DMF 1mL, 搅拌溶解制备B液。磁力搅拌下, A液逐滴加入到B液中, 密封烧杯, 4℃下搅拌反应4h。离心后, 取上清液, 4℃下用PBS (pH7.4) 透析3d, 每天更换2次PBS, 以除去未反应的DMF、DCC、NHS和CPAOZ小分子物质。最后得到无色CPAOZ-BSA (CPAOZ与牛血清蛋白偶联复合物) 溶液, 分装保存于-20℃冰箱中, 供免疫用。

在上述步骤中, 称取卵清蛋白(OVA) 150mg与CPAOZ 23.4mg反应即得CPAOZ-OVA (CPAOZ与卵清蛋白偶联复合物), 供包被用。

1.2 抗体的制备

采用健康雄性体重1.5kg左右的家兔作为免疫动物, 以CPAOZ-BSA为免疫原, 免疫剂量为0.5~1mg/只。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2~4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, 共免疫6次, 免疫期间监测血清抗体效价及特异性。最后一次免疫不加佐剂。在最后一次免疫7~10天后颈动脉放血, 收集兔血清, 经硫酸铵分级沉淀得到纯化的AOZ多克隆抗体。

实施例2、咪唑啉酮间接竞争检测方法的建立

2.1 抗原最佳包被浓度和抗体最佳工作浓度的确定

通过方阵滴定试验确定, 以吸光度值约1.0且左右相邻吸光度差值最大的点为参照点。操作步骤: 在96孔酶标板上的第1行包被2000 μ g/L的包被原, 第2至第8行依次包被1000、500、250、120、60、30、15 μ g/L的包被原。4℃过夜, 1%卵清白蛋白37℃封闭1小时, 洗涤2次, 拍干, 在酶标板的第1列至第9列依次加入100 μ L稀释倍数为10000、20000、40000、80000、160000、320000、640000、1280000、25600003-氨基-2-咪唑啉酮抗体, 第10列加入样本稀释液做空白对照, 37℃孵育1h, 洗涤3次, 拍干, 各孔加入100 μ L底物显色液, 避光显色15min, 加入50 μ L终止液, 用自动酶标仪于450nm波长下测定光密度值(OD值), 结果见表1。

表1 本发明试剂盒中抗原最佳包被浓度和抗体最佳工作浓度的确定

包被浓度	血清稀释倍数(1:X)									空白
	10000	20000	40000	80000	160000	320000	640000	1280000	2560000	对照
2000	2.942	2.864	2.634	2.137	1.938	1.639	1.134	0.764	0.327	0.124
1000	2.964	2.834	2.613	2.134	1.915	1.523	0.864	0.531	0.326	0.128
500	2.834	2.736	2.546	2.039	1.634	1.375	0.734	0.493	0.316	0.121
250	2.762	2.546	2.043	1.867	1.543	1.042	0.624	0.345	0.254	0.078
120	2.537	2.165	1.867	1.657	1.368	0.876	0.539	0.229	0.219	0.068
60	1.964	1.735	1.573	1.367	1.164	0.823	0.346	0.216	0.211	0.056
30	1.834	1.535	1.372	1.137	0.927	0.676	0.311	0.207	0.198	0.053
15	1.738	1.239	1.126	0.957	0.867	0.543	0.227	0.197	0.193	0.054

结果表明, 抗原最佳包被浓度为250 μ g/L, 抗体最佳工作浓度为1:320000。

2.2 抗体最佳反应体积的确定

设置4个抗体与药物的反应体积比(60 μ L:40 μ L、50 μ L:50 μ L、40 μ L:60 μ L、30 μ L:70 μ L),作间接竞争ELISA,结果见表2。

表2 本发明试剂盒中抗体最佳反应体积的确定

抗体与药物的反应体积比	竞争曲线斜率	IC ₅₀ (μ g/L)
60 μ L:40 μ L	-15.1	2.15
50 μ L:50 μ L	-18.6	1.68
40 μ L:60 μ L	-20.5	1.06
30 μ L:70 μ L	-17.6	1.37

结果表明,抗体与药物的反应体积比为40 μ L:60 μ L时,抗体反应最灵敏。

2.3 最佳竞争时间的确定

间接竞争ELISA法确定最佳竞争时间。设置0.5 μ g/L、5 μ g/L、50 μ g/L 3个药物浓度,竞争反应这一步中,将5块板置于37 $^{\circ}$ C下孵育,经0.5、1、1.5、2、3h分别各取出1块板,测其OD值,结果见表3。

表3 本发明试剂盒最佳竞争时间的确定 (n=5)

药物浓度 (μ g/L)	时间 (h)				
	0.5	1	1.5	2	3
0.5	0.35	0.47	0.48	0.50	0.51
5	0.51	0.72	0.71	0.73	0.74
50	0.80	1.08	1.09	1.11	1.14

结果表明,不同浓度的药物经过1h的竞争反应后,OD值不再上升,说明经过1h竞争反应达到平衡状态,因此最佳竞争时间为1h。

实施例3、本发明咪唑啉酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒的制备

3.1 本发明酶联免疫检测试剂盒的组成

本发明的试剂盒主要由盒体(1)、酶标板(2)、6瓶AOZ标准溶液(3)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体(4)、AOZ抗体液(5)、底物显色A液(6)、底物显色B液(7)、终止液(8)、洗涤液(9)、样品稀释液(10)和泡沫托架(11)组成。

3.2 试剂的配制

按常规方法制备:其中包被稀释液:Na₂CO₃ 1.5g, NaHCO₃ 2.9g, Na₂N₃ 0.2g, 加双蒸水至1000mL, 调至pH9.6; 封闭液:卵清蛋白0.1g溶于pH7.4 PBS 100mL; 洗涤液:NaCl 8.0g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, 吐温20 0.5mL, 硫柳汞0.1g, 加双蒸水至1000mL, 调至pH 7.4; 样本稀释液:NaCl 8.0g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, 硫柳汞0.1g, 加双蒸水至1000mL, 调至pH 7.4; 底物显色液(TMB-过氧化氢尿素溶液):其中①底物液A:四甲基联苯胺(TMB) 200mg, 无水乙醇或二甲亚砜100mL, 加双蒸水至1000mL; ②底物液B缓冲液:Na₂HPO₄ 14.60g, 柠檬酸9.33g, 0.75%过氧化氢尿素6.4mL, 加双蒸水至1000mL, 调至pH 5.0~5.4; ③将底物液A和底物液B按1:1混合即成TMB-过氧化氢尿素溶液; 终止液:18mol/L浓硫酸100mL,

缓慢滴加到双蒸水至900mL。

3.3 酶标板的制备

用包被缓冲液将CPAOZ-OVA稀释成0.5 μ g/mL，每孔加入100 μ L，室温过夜或37 $^{\circ}$ C孵育4h，倾去包被液，洗涤液洗涤3次，拍干，然后每孔加入200 μ L封闭液，37 $^{\circ}$ C孵育1h，倾去孔内液体，洗涤液洗涤3次，拍干，用铝膜真空密封保存、备用。

实施例4、本发明的酶联免疫检测试剂盒的测定程序

4.1 测定之前注意事项

- ① 使用之前将所有试剂回升至室温20~24 $^{\circ}$ C；
- ② 使用之后立即将所有试剂放回4 $^{\circ}$ C冰箱；
- ③ 在使用中不要让微孔干燥；
- ④ 在免疫分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性，仔细按照推荐的洗板顺序操作是免疫测定操作程序的要点；

- ⑤ 在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，用盖子盖住微孔板。

4.2 样品提取净化

- ① 取组织均质物1g，分别加入蒸馏水5mL，1mol/L HCl 0.5mL和10mmol/L苯甲醛（甲醇溶液）100 μ L，充分振荡；
- ② 置37 $^{\circ}$ C水浴孵育（大约16小时）
- ③ 分别加入0.1mol/L K₂HPO₄ 5mL，高氯酸200 μ L，剧烈振荡30s，室温4000 r/min离心10min；
- ④ 取出上清液到另一容器，用5mol/L NaOH调节pH至7.0，准备过MAX柱，分别用甲醇3mL和蒸馏水3mL活化MAX柱，流速控制在1滴/秒，加入上述样品；
- ⑤ 用2%的氨水溶液3mL洗涤MAX柱，正压吹干，用甲醇溶液3mL洗脱并收集洗脱液，正压吹干以便收集完全；
- ⑥ 40 $^{\circ}$ C氮气吹干，向吹干后的收集瓶中加入样本稀释液1mL，涡动30s，作为试样溶液，供ELISA方法测定。

4.3 试剂配制

- ① 酶标二抗工作液配制：根据每次所需用量，辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔抗体（4）和样品稀释溶液（10）按1:10的比例稀释，混匀；
- ② AOZ抗体工作液配制：根据每次所需用量，AOZ抗体液（5）和样品稀释液（10）按1:10的比例稀释，混匀；
- ③ 底物混合液配制：根据每次所需用量，显色液A液（6）和显色液B液（7）按1:1的比例稀释，混匀，现配现用；
- ④ 洗涤液配制：洗涤液（9）和蒸馏水按1:10的比例稀释，混匀，置4 $^{\circ}$ C冰箱可保存1月。

4.4 测定步骤

- ① 取微孔条：将足够标准品和样品所用数量的孔条插入微孔架，标准品和样品做两个平行试验，记下标

准品和样品的位置；

② 加标准液或待测样品：加入标准品或处理好的样品液60 μ L到微孔中，每孔加入样品或标准品时注意更换移液器的吸头；

③ 加抗体：加入AOZ抗体工作液40 μ L到每一个微孔中充分混合，在培养箱孵育1.5小时（37 $^{\circ}$ C），覆盖上薄膜（防止蒸发）；

④ 洗涤：倒出孔中的液体，洗涤3次并拍干；

⑤ 加酶标二抗：加入酶标二抗工作液100 μ L到每一微孔中充分混合，在培养箱孵育1小时（37 $^{\circ}$ C），覆盖上薄膜（防止蒸发）；

⑥ 洗涤：倒出孔中的液体，洗涤4次并拍干；

⑦ 加底物：加入底物混合液100 μ L到每一微孔中，充分混合并在室温暗处孵育15分钟；

⑧ 终止：加入反应终止液50 μ L到每一微孔中；

⑨ 测定：在450nm处测量吸光度值，以空气为空白，必须在加入终止液后60分钟内读取吸光值。

4.5 结果判断

所获得的标准品和样品吸光值的平均值除以第一个标准（0标准）的吸光值再乘以100，以抑制率为纵坐标，AOZ浓度的对数为横坐标作标准曲线，曲线在0.1~25 μ g/L范围内趋近直线，每一个样品的浓度（ μ g/kg）可以从校正曲线上读出。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{标准品吸光值(或样品)}}{\text{0标准的吸光值}} \times 100$$

实施例5、本发明试剂盒的灵敏度、特异性、准确度、精密度、稳定性试验

5.1 本发明试剂盒的灵敏度试验

以IC₅₀（抑制率为50%对应的药物浓度）作为本发明检测试剂盒的灵敏度指标。测定20次标准曲线的IC₅₀值，本发明试剂盒的IC₅₀值为1.26 μ g/L（表4）。计算20个0 μ g/L标准液OD值的平均值（ \bar{X} ）和标准差（SD），根据最低检测限公式 $Z = \bar{X} - 3SD$ ，在标准曲线上查出标准品最低检测限为0.1 μ g/L。

表4 本发明试剂盒的灵敏度试验

测定值（ μ g/L）	0.89	0.97	1.28	1.08	1.27	1.02	1.04	1.24	2.48	1.47
	2.67	0.76	0.87	0.89	1.05	1.18	2.48	1.07	0.91	0.78
IC ₅₀ 均值（ μ g/L）	1.26									

5.2 本发明试剂盒的特异性试验

以交叉反应率为指标判定试剂盒的特异性。将AOZ与邻硝基苯甲醛衍生物3-（2-硝基苯亚甲基）-氨基-2-恶唑烷酮（简称NPAOZ，下同）、AOZ、呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林、苯甲醛、四环素、磺胺二甲嘧啶、青霉素、链霉素、红霉素、恩诺沙星、克伦特罗等药物配成不同的浓度，用试剂盒测定各药物的IC₅₀值，每个药物3个复孔，计算其交叉反应率（表5）。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{50\%抑制浓度 (PAOZ)}}{\text{50\%抑制浓度 (其他药物)}} \times 100\%$$

表5 本发明试剂盒的特异性试验

竞争药物	交叉反应率(%)
PAOZ	100
NPAOZ	5.73
呋喃唑酮	6.15
AOZ	<0.01
呋喃它酮	<0.01
呋喃妥因	<0.01
呋喃西林	<0.01
苯甲醛	<0.01
四环素	<0.01
磺胺二甲嘧啶	<0.01
青霉素	<0.01
链霉素	<0.01
红霉素	<0.01
恩诺沙星	<0.01

本发明试剂盒除与NPAOZ (5.73%)、呋喃唑酮 (6.13%) 有交叉反应, 与其他药物无交叉反应, 说明本发明试剂盒对PAOZ特异性高, 专一性好。

5.3 本发明试剂盒的准确度试验

将配制好的AOZ母液 (1mg/mL) 稀释成100 μ g/L, 添加到1g组织 (猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝) 中使其终浓度为0.4 μ g/kg、1 μ g/kg、5 μ g/kg, 每个浓度3个重复, 重复5天, 按照试剂盒的测定程序, 测定各组织中AOZ浓度, 并计算回收率和变异系数 (表6)。

$$\text{回收率 (\%)} = \frac{\text{实测浓度}}{\text{添加浓度}} \times 100\%$$

表6 本发明试剂盒的准确度和重复性试验

组织	平均回收率 (%)			批间变异系数 (%)		
	0.4 μ g/kg	1 μ g/kg	5 μ g/kg	0.4 μ g/kg	1 μ g/kg	5 μ g/kg
猪肝脏	96.6 \pm 18.4	79.9 \pm 14.3	64.1 \pm 11.9	19.1	17.9	18.6
猪肌肉	93.8 \pm 12.4	79.6 \pm 14.8	57.4 \pm 6.6	13.2	18.6	11.5
鸡肝脏	92.1 \pm 10.9	76.0 \pm 13.1	56.5 \pm 8.2	11.9	17.2	14.5
鸡肌肉	91.1 \pm 10.9	70.6 \pm 12.3	55.8 \pm 9.1	12.1	17.4	16.2

猪肝、猪肉、鸡肝、鸡肉组织中回收率均在55.8%~96.6%, 批间变异系数<20%, 表明本发明试剂盒测定结果准确、可靠, 重复性好。

5.4 本发明试剂盒的精密度试验

按照本试剂盒的操作说明测定标准溶液，每个标准溶液5个复孔，以浓度的抑制率计算变异系数，结果见表7。

表7 本发明试剂盒精密度试验

标准溶液 ($\mu\text{g/L}$)	重复次数	抑制率 (%)	变异系数 (%)
0	5	100	-
0.1	5	88.09	3.62
0.4	5	75.92	4.96
1.6	5	60.40	2.84
6.4	8	41.67	3.78
25.6	8	24.33	4.76

结果表明，本发明试剂盒的板内变异系数 $<5\%$ ，板内测定结果稳定，精密度高。

5.5 本发明试剂盒的稳定性试验

将本发明试剂盒放置 4°C 和 20°C 条件下保存，于0、1、2、3、4、5、6、7、8、9月后分别取试剂盒，测定 IC_{50} 值和最大吸光值，结果见表8。

表8 本发明试剂盒的稳定性试验

时间 (月)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
最大吸光值	4°C	2.15	1.87	1.78	1.82	1.54	1.34	1.27	1.25	1.30	1.25
	20°C	1.97	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-
IC_{50} 值	4°C	1.68	1.94	2.14	1.75	2.04	2.14	2.57	2.48	2.61	2.41
($\mu\text{g/L}$)	20°C	1.64	1.73	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“-”表示未测定

表8结果显示，本发明试剂盒在 4°C 保存下，最大吸光值和 IC_{50} 值均在正常波动范围内。 20°C 保存下，1个月月后，最大吸光值下降到0.6，说明试剂盒中的部分试剂已变质。稳定性试验表明本发明试剂盒在 4°C 条件下可保存6个月以上。

实施例5、动物喂养试验

取15头，45日龄，体重为 $15.0\pm 2.0\text{kg}$ 的品种为“长大”的二元杂交去势健康仔猪，随机分为5组。第1组为空白对照组，其余4组饲喂含 100mg/kg 的呋喃唑酮7天，于停药0天、7天、14天、28天分别屠宰3头，空白对照组分别在停药0天、7天、28天屠宰1头，取肝脏、肌肉组织。同一份样品分别采用本发明试剂盒和高效液相色谱法 (HPLC) 测定，结果见表9。

表9 本发明试剂盒的适用性试验

组织	停药时间 (天)	方法	测定值 ($\mu\text{g/kg}$)			均值 ($\mu\text{g/kg}$)	变异系数 (%)
			猪1	猪2	猪3		
肌肉	0	ELISA	100.7	156.6	93.4	116.9	29.6

		HPLC	129.3	135.7	112.4	125.8	9.6
	7	ELISA	87.6	62.7	70.6	73.6	17.2
		HPLC	97.6	84.3	100.7	94.2	9.2
	14	ELISA	21.6	18.6	24.2	21.5	13.1
		HPLC	38.6	37.4	43.7	39.9	8.4
	28	ELISA	3.5	2.4	4.9	3.6	34.8
空白肌肉		HPLC	0	0	0	0	-
		ELISA	0.11	0.32	0.21	0.21	-
肝脏	0	HPLC	0	0	0	0	-
		ELISA	391.5	423.2	391.8	402.2	4.5
		HPLC	386.4	505.1	354.8	415.4	19.1
	7	ELISA	202.3	225.6	268.8	232.2	14.5
		HPLC	227.6	276.4	300.4	268.1	13.8
	14	ELISA	84.7	59.2	82.7	75.5	18.8
		HPLC	106.5	97.5	87.4	97.1	9.8
	28	ELISA	34.4	24.6	28.7	29.2	16.8
		HPLC	25.6	15.7	19.7	20.3	24.5
空白肝脏		ELISA	0.07	0.26	0.15	0.16	-
		HPLC	0	0	0	0	-

停药0天，肌肉和肝脏中AOZ含量为116.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、402.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，28天后，肌肉和肝脏中AOZ含量为3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、29.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，空白肌肉和肝脏的测定值为0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，与仪器方法测定结果一致。测定结果证明了AOZ在体内滞留时间长（超过28天），并且随时间的变化AOZ浓度逐渐下降。本发明试剂盒能区分加药组和空白对照组，说明本发明试剂盒具有测定实际样品的能力，适用性强，满足呋喃唑酮零残留检测的要求。

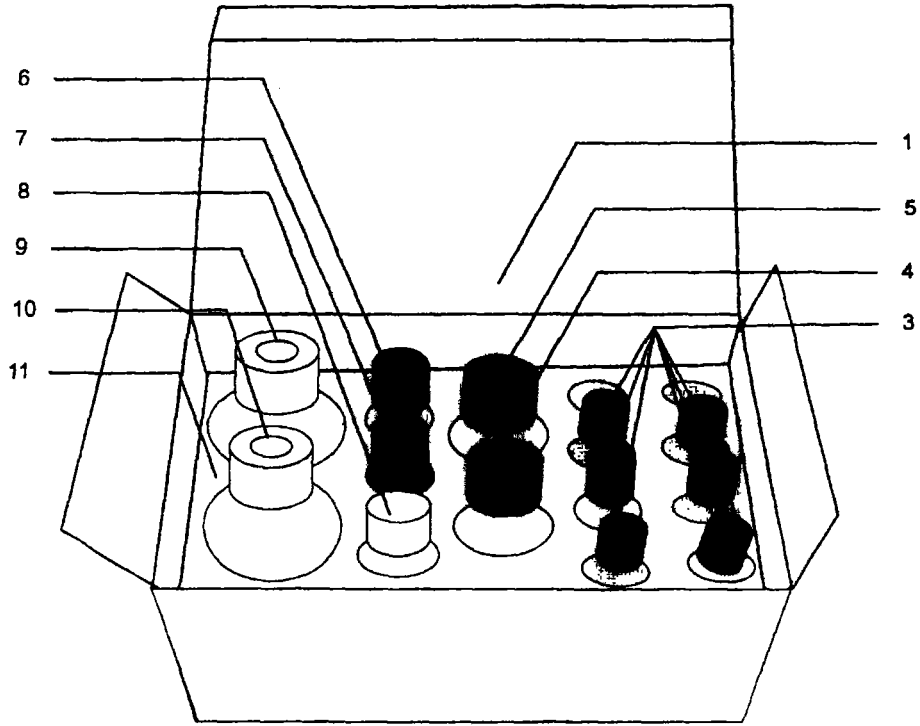


图 1

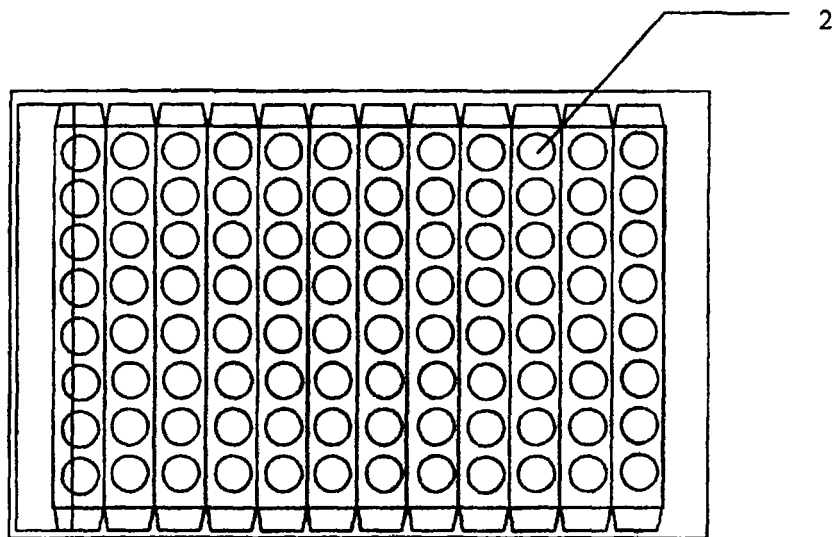


图 2

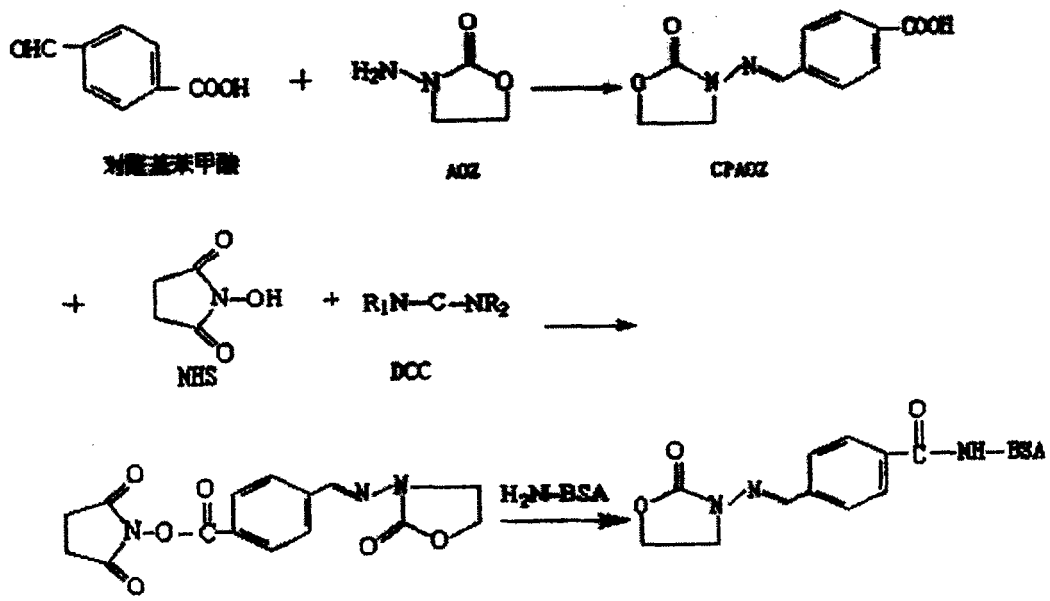


图 3

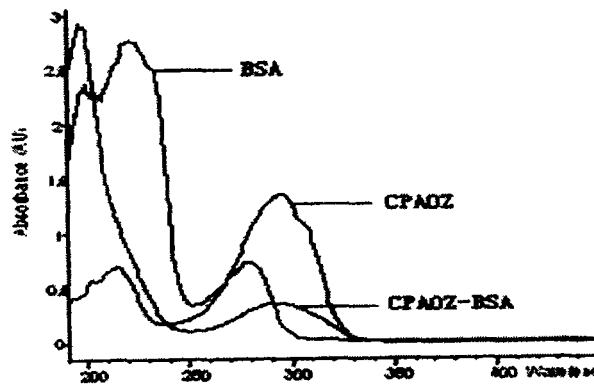


图 4

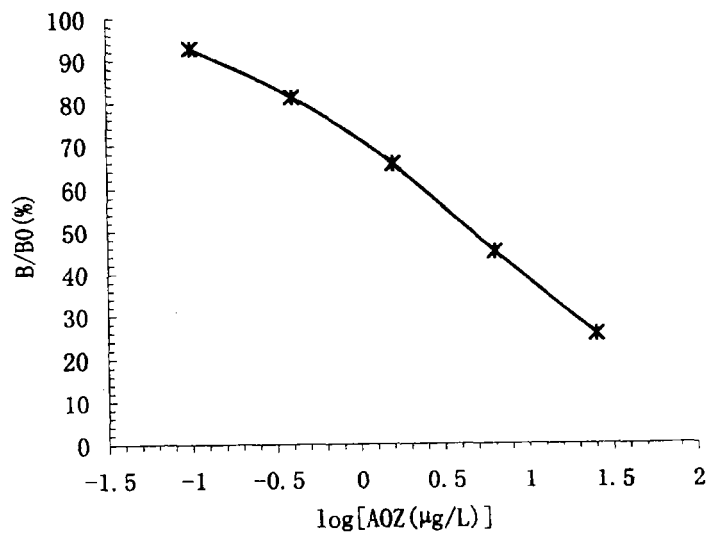


图 5

专利名称(译)	一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN100498337C	公开(公告)日	2009-06-10
申请号	CN200510086346.9	申请日	2005-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	袁宗辉 常超 王玉莲 赵春保 王帅兵 高爱中 陈冬梅 陶燕飞 伍金娥 彭大鹏		
发明人	袁宗辉 常超 王玉莲 赵春保 王帅兵 高爱中 陈冬梅 陶燕飞 伍金娥 彭大鹏		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	张红兵		
审查员(译)	陈中伟		
其他公开文献	CN1731185A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒及其应用，属于免疫化学分析技术领域。本发明所提供的试剂盒主要由3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)特异性抗体、AOZ标准溶液、包被有AOZ与卵清蛋白复合物的酶标板组成。样品处理经盐酸水解，释放AOZ，苯甲醛衍生过夜，MAX柱净化，采用间接竞争ELISA方法检测动物可食性组织如肝脏、肌肉中AOZ残留。本发明的核心技术包括人工抗原的合成、抗体的制备、ELISA方法的建立、ELISA试剂盒的组装等。本发明的试剂盒具有简便、快速、灵敏、准确、廉价的优点，能同时快速检测大批样品，最低检测限0.1µg/kg。

包被浓度	血清稀释倍数(1:X)									空白
	10000	20000	40000	80000	160000	320000	640000	1280000	2560000	对照
2000	2.942	2.864	2.634	2.137	1.938	1.639	1.134	0.764	0.327	0.124
1000	2.964	2.834	2.613	2.134	1.915	1.523	0.864	0.531	0.326	0.128
500	2.834	2.736	2.546	2.039	1.634	1.375	0.734	0.493	0.316	0.121
250	2.762	2.546	2.043	1.867	1.543	1.042	0.624	0.345	0.254	0.078
120	2.537	2.165	1.867	1.657	1.368	0.876	0.539	0.229	0.219	0.068
60	1.964	1.735	1.573	1.367	1.164	0.823	0.346	0.216	0.211	0.056
30	1.834	1.535	1.372	1.137	0.927	0.676	0.311	0.207	0.198	0.053
15	1.738	1.239	1.126	0.957	0.867	0.543	0.227	0.197	0.193	0.054