



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101241132 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 30

(21) 申请号 200810025904. 4

(22) 申请日 2008. 01. 18

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山

(72) 发明人 沈玉栋 杨金易 孙远明 肖治理

雷红涛 王弘

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限

公司 44102

代理人 林丽明 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101013129 A, 2007. 08. 08, 全文.

WO 2005/103698 A2, 2005. 11. 03, 全文.

生威等. 动物性产品中硝基呋喃类抗生素残留检测方法研究进展. 《农业环境科学学报》. 2006, 第 25 卷 429 - 434.

审查员 苗荻

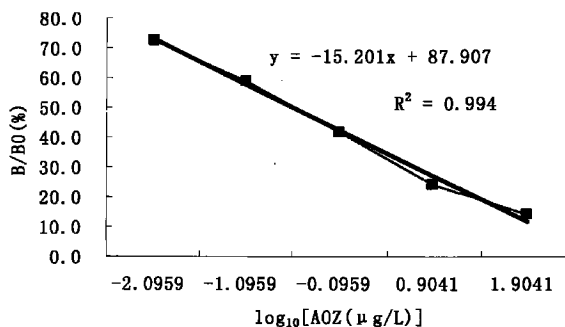
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 1 页

(54) 发明名称

硝基呋喃类药物代谢物残留的酶联免疫检测试剂盒及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测硝基呋喃类药物代谢物残留的酶联免疫试剂盒,包括:包被多种硝基呋喃代谢物抗原的酶标板、酶标记抗体工作液、标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液和样品稀释浓缩液。本发明同时公开了所述试剂盒进行检测的使用方法,包括样品的前处理,使用试剂盒检测和结果处理与分析等步骤。本发明提供的试剂盒采用直接竞争酶联免疫吸附分析技术,既可同时检测多种硝基呋喃代谢物总残留,又可检测单一硝基呋喃代谢物残留,避免了同一样品需多次检测,降低了漏检率,灵敏度高、稳定性好、步骤少、成本低,非常适合大量样品的筛查,具有重要的现实意义。



1. 一种硝基呋喃类药物代谢物残留的酶联免疫初筛检测试剂盒,其特征在于包含下列成分:

- (1) 包被了多种硝基呋喃代谢物偶联抗原的酶标板;
- (2) 酶标记抗体工作液;
- (3) 硝基呋喃代谢物标准溶液;
- (4) 底物液;
- (5) 底物缓冲液;
- (6) 反应终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 样品稀释浓缩液;

其中,所述酶标板采用 96 孔或 40 孔酶标板,包被有能与硝基呋喃代谢物抗体特异结合的硝基呋喃代谢物偶联抗原,并封闭微孔表面未吸附硝基呋喃代谢物偶联抗原的位点;

所述多种硝基呋喃代谢物为 3-氨基-2-恶唑烷酮、3-氨基-5-吗琳代甲基-2-恶唑烷酮、氨基脲和 1-氨基-乙内酰脲;

所述酶标记硝基呋喃代谢物抗体工作液为采用戊二醛法或过碘酸盐氧化法将标记酶与代谢物抗体进行分别偶联后按一定比例混合得到;所述标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取的碱性磷酸酯酶;所述硝基呋喃代谢物抗体为鼠单克隆抗体、兔多克隆抗体或基因工程抗体任意一种;

当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物液为含有 3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液;

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫初筛检测试剂盒,其特征在于所述硝基呋喃代谢物抗原是采用碳二亚胺法、活泼酯法或混合酸酐法将硝基呋喃代谢物半抗原与载体蛋白进行偶联得到。

3. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫初筛检测试剂盒,其特征在于所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L。

4. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫初筛检测试剂盒,其特征在于所述样品稀释浓缩液为 pH7.4、0.1~0.25mol/L 的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫初筛检测试剂盒,其特征在于所述硝基呋喃代谢物标准溶液分别为 AOZ 标准溶液、AMOZ 标准溶液、SC 标准溶液或 AH 标准溶液,所述代谢物标准溶液的浓度均为:8.1 $\mu$ g/L、2.7 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L 和 0 $\mu$ g/L。

6. 一种权利要求 1 所述酶联免疫初筛检测试剂盒的使用方法,其特征在于包括以下步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 使用试剂盒进行初筛检测;
- (3) 结果处理与分析。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于步骤(2)包括以下步骤:
- (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温平衡;
  - (2) 将标准品或待测样品加入已经包被有硝基呋喃代谢物混合抗原的酶标板孔内,然后每孔加入酶标抗体工作液,轻拍混匀,孵育;
  - (3) 洗涤;
  - (4) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液,轻拍混匀,避光孵育;
  - (5) 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,酶标仪测定各孔吸光值。

## 硝基呋喃类药物代谢物残留的酶联免疫检测试剂盒及使用 方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域,具体涉及一种检测动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留的酶联免疫检测试剂盒及其方法。背景技术

[0002] 硝基呋喃类药物 (Nitrofurans) 是人工合成的具有 5-硝基呋喃基本结构的广谱抗菌药物,硝基呋喃类抗生素主要包括呋喃唑酮 (Furazolidone)、呋喃它酮 (Furaltadone)、呋喃西林 (Nitrofurazone)、呋喃妥因 (Nitrofurantoin) 等,这类抗生素因其具有抑菌性和杀菌性而广泛用于家禽、家畜、水产、蜂等动物传染病的预防与治疗,部分品种具有促生长的作用,可用作饲料添加剂。

[0003] 硝基呋喃类药物是一类具有潜在致癌和诱导有机体产生突变的物质。由于呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因等硝基呋喃类抗生素在体内代谢迅速,其代谢产物 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ)、3-氨基-5-吗琳代甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ)、氨基脲 (SC) 和 1-氨基-乙内酰脲 (AH) 能与蛋白质结合,形成比原药化合物更稳定的蛋白结合物。这些代谢物可以在弱酸性条件下(如人类胃液的酸性条件)从蛋白质中释放出来,因此当人类吃了含有硝基呋喃类抗生素残留的食品,这些代谢物就可以在人类胃液的酸性条件下从蛋白质中释放出来被人体吸收而对人类健康造成危害。

[0004] 欧盟委员会于 2003 年通过了 2003/181/EC 委员会决议,建立了用于检测禽肉产品和水产品中硝基呋喃类药物的代谢物的各种方法的最小要求性能限值 (Minimum Required Performance Limits, MRPL) 为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,也就是说欧盟实验室检测硝基呋喃类药物的代谢物的各种方法的灵敏度都要达到  $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,欧盟从第三国进口的动物性产品中硝基呋喃类药物的代谢物的含量不得超过  $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因此,为确保动物源性食品的安全和对外出口贸易的发展,建立准确可靠,灵敏度高的定性定量方法是十分必要的。

[0005] 在国内外已经发表有关硝基呋喃类抗生素的残留检测方法的文献中,早期的文献报道大多数是检测原药化合物。然而由于硝基呋喃类抗生素对光敏感,具有代谢快速的特点,在动物体内的半衰期不过数小时,通常不太可能检出原药的残留,例如呋喃唑酮在停药后 12h 内从组织中消失,而其代谢物 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ) 在动物体内则以组织蛋白结合物的形式存在,在体内可残留数周,在停药后至少 6 周内 AOZ 在猪肌肉组织中继续存在,因此当原药浓度降至检测限以下时,检测其代谢物浓度是可能的。其他硝基呋喃类抗生素也有类似特性。

[0006] 目前,检测 AMOZ, AOZ、SC 和 AH 等残留的方法主要有电喷雾-串联质谱 (ESI-MS-MS)、液相色谱-质谱联用法 (LS-MS) 以及液相色谱-串联质谱法 (LS-MS-MS) 等。尽管仪器分析方法灵敏、准确,但通常需要对样品进行繁琐的预处理,耗时、成本高,而且所用仪器比较昂贵且庞大笨重,需要专业技术人员维护,不适于现场检测。免疫测定技术的应用弥补了上述技术的缺陷,具有简单、快速并且灵敏的特点,可达痕量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 水平,是目前世界各国推行并实施的一种高通量初筛方法。

[0007] 目前已有应用于硝基呋喃类抗生素代谢物检测的免疫测定技术及试剂盒,但均只

能进行单一药物代谢物残留的检测,例如目前市售国内外试剂盒均为单一药物残留检测试剂盒,且查找国内相关专利也均为单一药物代谢物残留检测试剂盒及方法,如专利《检测呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒及其应用》,申请号:200710063871.8;专利《呋喃妥因代谢物酶联免疫分析试剂盒及其应用》,申请号:200710063837.7;专利《检测呋喃它酮代谢物的酶联免疫试剂盒及其应用》,申请号:200710063872.2;专利《一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒及应用》,申请号:200510086346.9等。然而,免疫测定技术作为一种高通量初筛的方法,如果只能检测单一代谢物,尤其对硝基呋喃类抗生素代谢物残留检测的意义就不大了,因为硝基呋喃类抗生素包括几种,如呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因等,其代谢产物又分别为3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)、3-氨基-5-吗琳代甲基-2-恶唑烷酮(AMOZ)、氨基脲(SC)和1-氨基-乙内酰脲(AH),所以检测单位在实际检测中需要对这几类代谢物均进行检测,如果免疫试剂盒只能检测一种代谢物,因为有4种代谢物,一个样品就必须检测4次,这样就会延长了检测时间、增加了检测工作量、而且增加了检测成本,失去了初筛方法的意义了。

[0008] 总之,国内外现有硝基呋喃免疫检测方法检测对象单一,很难应用于实践,且现有产品由于普遍存在稳定性差、样品前处理及检测步骤复杂、设备条件要求较高、价格昂贵等不足,严重影响了硝基呋喃类抗生素的检测与监控,因此研制多残留检测、操作简单、设备要求低、廉价的硝基呋喃类抗生素代谢物多残留 ELISA 试剂盒具有非常重要的经济和社会意义。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的是针对现有硝基呋喃检测技术的不足,提供一种既能同时检测多种硝基呋喃类抗生素代谢物总残留,又可检测单一硝基呋喃抗生素代谢物残留,高灵敏度、价格低廉、操作简单,能大批量快速检测硝基呋喃类抗生素代谢物的酶联免疫检测试剂盒。

[0010] 本发明的另一目的是提供所述酶联免疫试剂盒检测硝基呋喃类抗生素代谢物残留的使用方法。

[0011] 为了实现上述目的,本发明采用如下测定原理:首先将多种代谢物偶联抗原包被于固相载体例如酶标板上,然后加入标样或待测样品,再加入多种酶标记代谢物抗体的混合液,包被抗原与待测样品中的代谢物竞争酶标抗体,待测样品代谢物含量高时,则与固相抗原结合的酶标抗体就少,反之结合在固相抗原上的酶标抗体就多,反应后加入底物进行显色加以测定,当酶标抗体量一定时,加入的待测样品含代谢物越多,与固相抗原结合酶标抗体就越少,发色反应减弱,百分吸光度值低,反之,则发色反应增强,百分吸光度增高,因而根据百分吸光度值与代谢物浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,再根据标准曲线和待检样品的百分吸光度值,即可推算出待测样品中代谢物的浓度。

[0012] 本发明的技术方案是提供一种检测硝基呋喃类药物代谢物残留的酶联免疫试剂盒,包括:

[0013] (1) 包被多种硝基呋喃代谢物偶联抗原的酶标板;

[0014] (2) 酶标记抗体工作液;

[0015] (3) 硝基呋喃代谢物标准溶液;

[0016] (4) 底物液;

[0017] (5) 底物缓冲液；

[0018] (6) 反应终止液；

[0019] (7) 浓缩洗涤液；

[0020] (8) 样品稀释浓缩液。

[0021] 所述酶标板是 96 孔或 40 孔酶标板,酶标板孔内包被有能与抗硝基呋喃代谢物抗体特异结合的多种硝基呋喃代谢物偶联抗原,其是使用碳二亚胺法 (EDC)、活泼酯法 (DCC、NHS)、混合酸酐法 (氯甲酸异丁酯) 将 AOZ、AMoz、SC 和 AH 等代谢物半抗原与载体蛋白偶联得到的,所用的包被液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,碳酸盐缓冲溶液含 1 ~ 2g 碳酸钠和 2 ~ 4g 碳酸氢钠以及双蒸水 1L,封闭液为 1 ~ 5%脱脂奶粉溶液。

[0022] 所述硝基呋喃代谢物抗体的制备过程中,所用的免疫原为采用活泼酯法 (DCC、NHS) 或混合酸酐法 (氯甲酸异丁酯) 将代谢物半抗原与载体蛋白共价偶联合成得到的,以免疫抗原免疫兔子或小鼠,制备硝基呋喃代谢物多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备硝基呋喃代谢物单克隆抗体或利用基因工程方法制备基因工程抗体。收集抗血清、腹水、发酵液等,用辛酸硫酸铵沉淀纯化或过亲和层析柱进行纯化。

[0023] 所述酶标记硝基呋喃代谢物抗体工作液为采用戊二醛法或过碘酸盐氧化法将酶与代谢物 (AOZ、AMoz、SC 和 AH 等) 抗体进行分别偶联后按一定比例混合得到的。所用标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,本发明优选为辣根过氧化物酶,且采用改良后的过碘酸盐氧化法进行标记,提高了标记效率,节省了酶与抗体的用量,保证标记后酶与抗体具有良好的活性。

[0024] 所述硝基呋喃代谢物标准溶液分别为 AOZ 标准溶液、AMoz 标准溶液、SC 标准溶液和 AH 标准溶液等,不同代谢物标准溶液的浓度均为:8.1  $\mu$ g/L、2.7  $\mu$ g/L、0.9  $\mu$ g/L、0.3  $\mu$ g/L、0.1  $\mu$ g/L 和 0  $\mu$ g/L。

[0025] 所述底物显色液当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物液为含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD) 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液；

[0026] 当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

[0027] 所述浓缩洗涤液为含 0.5 ~ 1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍。

[0028] 所述样品稀释浓缩液为 pH7.4、0.1 ~ 0.25mol/L 的磷酸盐缓冲液,为正常使用浓度的 5 ~ 15 倍。

[0029] 可以作为固定硝基呋喃代谢物抗原的载体的物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

[0030] 本发明所述抗原抗体的制备方法具体陈述如下：

[0031] (1) 抗原的合成

[0032] 半抗原的合成：

[0033] a. 代谢物 AOZ 半抗原的合成

[0034] 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ) 与对醛基苯甲酸反应生成带有羧基的半抗原。

[0035] b. 代谢物 AMOZ 半抗原的合成

[0036] 3-氨基-5-吗琳代甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ) 与对醛基苯甲酸在水中反应生成带有羧基的半抗原。

[0037] c. 代谢物 SC 半抗原的合成

[0038] 将氨基脒 (SC) 的硝基还原为氨基,生成带有氨基的半抗原。

[0039] d. 代谢物 AH 半抗原的合成

[0040] 1-氨基-乙内酰脲 (AH) 与间醛基苯甲酸在水中反应生成带有羧基的半抗原。

[0041] 包被原和免疫原的合成:

[0042] 将硝基咪喃代谢物半抗原和牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、钥孔血蓝蛋白 (KLH) 等载体蛋白,通过碳二亚胺法 (EDC)、活泼酯法 (DCC、NHS)、混合酸酐法 (氯甲酸异丁酯) 进行偶联得到包被抗原与免疫原。免疫原与包被原通过柱层析进行纯化,纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0043] (2) 硝基咪喃代谢物单克隆抗体的制备

[0044] 动物免疫:以代谢物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对 Balb/c 小鼠进行间隔免疫,间接 ELISA 检测并得到血液里含有代谢物特异性抗体的小鼠脾脏。

[0045] 细胞融合与克隆:取产生特异性抗体的 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 融合,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0046] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,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。

[0047] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠 (8 周龄) 腹腔注入灭菌石蜡油,7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7 ~ 10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化,纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定,小瓶分装,-20℃ 保存。

[0048] (3) 硝基咪喃代谢物兔多克隆抗体的制备

[0049] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以硝基咪喃代谢物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫,多次免疫后测定血清抗体效价,心脏采血,经硫酸胺分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0050] (4) 硝基咪喃基因工程抗体的制备

[0051] 基因工程抗体主要指小分子抗体,包括:Fab (由完整的轻链和 Fd 构成),Fv (由 VH 和 VL 构成),ScFv (单链抗体,VH 和 VL 之间由一条连接肽连接而成),单域抗体 (仅由 VH 组成),或多特异性抗体 (将不同特异性的单链抗体通过连接肽连接在一起,同时具有多种单链抗体的特异性) 等经基因工程技术改造后的抗体。

[0052] 制备方法为:提取硝基咪喃代谢物单克隆细胞或经硝基咪喃代谢物免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA,反转录为 cDNA,设计抗体轻重链扩增引物,利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因,将轻重链基因进行连接制备单链抗体,或再将不同单链抗体进行连接制备多特异性单链抗体,然后插入适当的表达质粒,在大肠杆菌中表达,利用免疫亲和方法进行

纯化,纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0053] 其中,酶标记硝基呋喃代谢物抗体的制备:

[0054] 将硝基呋喃代谢物抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为:

[0055] ①溶解 5mg HRP 于 1mL 超纯水中,加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75  $\mu$ L,置室温或 4℃冰箱反应 20min 或 30min。

[0056] ②反应完后装入透析袋,0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液 4℃透析过夜,期间需更换透析液几次。

[0057] ③将抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL,另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4℃冰箱反应 2h。

[0058] ④加入 100  $\mu$ L 4mg/mL 硼氢化钠,4℃冰箱反应 2h。

[0059] ⑤对 0.01mol/L PBS 透析过夜,加入保存液 -20℃保藏备用。

[0060] 将不同的酶标记硝基呋喃代谢物抗体按照一定比例进行混合,即得酶标记物溶液。

[0061] 其中,酶标板的制备方法为:

[0062] 用包被缓冲液将不同的硝基呋喃代谢物抗原按需要稀释,向酶联板微孔中加入抗原稀释液,放入 37℃环境进行孵育,再放入 4℃环境中过夜孵育,得到的酶联板的稳定性好,倾去包被液,用洗涤液洗涤,然后在每孔中加入封闭液,37℃孵育,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0063] 本发明同时提供了利用上述酶联免疫试剂盒进行动物源性食品中硝基呋喃检测的方法,包括以下步骤:

[0064] (1) 样品前处理;

[0065] (2) 使用试剂盒检测;

[0066] (3) 结果处理与分析。

[0067] 本发明提供待测样品前处理方法为:

[0068] 将组织样品用组织匀浆机高速匀浆;牛奶样本离心去除脂肪层;蜂蜜样本加蒸馏水溶解均匀;将鸡蛋样本破壳后取出蛋清蛋黄,轻轻搅匀防止泡沫产生。

[0069] (1) 动物组织例如鸡肉、猪肉或鱼虾

[0070] 取  $2 \pm 0.05$ g 的组织样品的均质物,加入 8mL 的蒸馏水,1mL 1M HCL 和 200  $\mu$ L 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡;在 37℃过夜孵育大约 12h;加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,0.8mL 1M NaOH 和 10mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min;在室温 20 ~ 25℃下 3000g 以上离心 10min;取出 5mL 乙酸乙酯到另一个容器中 50℃下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,用 2mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温 20 ~ 25℃下 3000g 以上离心 10min;取 50  $\mu$ L 下层液体用于分析。

[0071] (2) 牛奶

[0072] 取出 10mL 牛奶样本到玻璃离心管中;分别加入 0.36M 亚硝基铁氰化钠缓冲液和 1M 硫酸锌缓冲液各 200  $\mu$ L;充分混合样本后,在 4 ~ 10℃用恒温离心机 3000g 以上离心 10min。取牛奶的离心上清液 2mL,加入 16mL 的蒸馏水,2mL 1M HCL 和 200  $\mu$ L 10mM 的 2-硝

基苯甲醛,充分振荡;在 37℃ 过夜孵育大约 12h;加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,0.8mL 1M NaOH 和 10mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min;在室温 20 ~ 25℃ 下 3000g 以上离心 10min;取出 5mL 乙酸乙酯到另一个容器中 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,用 2mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温 20 ~ 25℃ 下 3000g 以上离心 10min;取 50  $\mu$ L 下层液体用于分析。

[0073] (3) 蜂蜜

[0074] 取出 2g 蜂蜜样本到离心管中;加入 16mL 的蒸馏水振荡溶解,2mL 1M HCL 和 200  $\mu$ L 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡;在 37℃ 过夜孵育大约 12h;加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,2mL 1M NaOH 和 10mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min;在 20 ~ 25℃ 下 3000g 以上离心 10min;取出 12mL 乙酸乙酯到另一个容器中 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,用 4mL 已稀释好的复溶液充分混合;在 20 ~ 25℃ 下 3000g 以上离心 10min;取 50  $\mu$ L 下层液体用于分析。

[0075] (4) 鸡蛋

[0076] 取出 4g 已制备好的鸡蛋样本到 100mL 离心管中;分别加入 16mL 水,2mL 1M HCL,400  $\mu$ L 0.36M 的亚硝基铁氰化钠缓冲液,振荡混匀;加入 400  $\mu$ L 1M 硫酸锌缓冲液,充分振荡 8min,室温 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min,取出全部上清液,加入 400  $\mu$ L 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡,50℃ 水浴 2h,每半个小时剧烈振荡 1 ~ 2 分钟;分别加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,1mL 1M NaOH 和 8mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min,在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;取出 6mL 上层有机相于 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,加入 4mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;去除上层有机相;取下层水相 50  $\mu$ L 用于分析。

[0077] 使用试剂盒检测的步骤为:

[0078] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温平衡;

[0079] (2) 将标准品或待测样品加入已经包被有硝基呋喃代谢物抗原的酶标板孔内,然后每孔加入酶标记物,轻拍混匀,孵育;

[0080] (3) 洗涤;

[0081] (4) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液,轻拍混匀,避光孵育;

[0082] (5) 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,酶标仪测定各孔吸光值;

[0083] 本发明提供的检测结果处理与分析方法为:

[0084] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值,以百分吸光度值为纵坐标,硝基呋喃代谢物标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值,根据方程式求出对应样品的硝基呋喃代谢物浓度。所述百分吸光度值的计算式为:

[0085] 百分吸光度值 (%) =  $(B/B_0) \times 100$

[0086] 其中,B 为标准溶液或样品的平均吸光值, $B_0$  为 0  $\mu$ g/L 标准溶液的平均吸光度值。

[0087] 检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析,对硝基呋喃代谢物线性检测范围为 0.1 ~ 8.1  $\mu$ g/L,检测限为 0.1  $\mu$ g/L,整个检测过程只需 35min 就可以完成。

[0088] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0089] (1) 本发明的试剂盒既可同时检测多种硝基呋喃抗生素代谢物总残留,又可检测

单一硝基呋喃代谢物残留,避免了同一样品需要检测多次的问题,节省了检测时间与成本,同时降低了漏检的机率;

[0090] (2) 本发明的试剂盒采用直接竞争 ELISA 检测模式,减少了操作步骤,提高了检测的灵敏度、准确度;

[0091] (3) 本发明的试剂盒采用不同包被抗原混合进行酶标板的包被,相对于抗体包被,更有利于达到较好的包被效果与较长的保存时间,从而提高了试剂盒检测的精密度与稳定性;

[0092] (4) 本发明的试剂盒利用酶标记抗体技术,将酶直接标记于不同的硝基呋喃代谢物特异性抗体上,将硝基呋喃代谢物特异性抗体与酶两种最重要的反应物合二为一,不仅大大简化了操作步骤和反应时间,减少了因操作复杂引起的误差,而且无需在试剂盒内再配置抗体,同时也节约了硝基呋喃代谢物特异性抗体与酶的用量,从而大大降低了试剂盒的成本。

[0093] 基于以上优点本试剂盒非常适用于硝基呋喃代谢物残留的痕量分析与批量检测,具有重要的现实意义。

#### 附图说明

[0094] 图 1 为标准曲线。

#### 具体实施方式

[0095] 下面结合附图和具体实施例来进一步详细说明本发明。

[0096] 实施例 1 抗原的制备

[0097] (1) 硝基呋喃代谢物半抗原的制备:

[0098] a. 代谢物 AOZ 半抗原的合成

[0099] 3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)与对醛基苯甲酸反应生成带有羧基的半抗原。

[0100] b. 代谢物 AMOZ 半抗原的合成

[0101] 3-氨基-5-吗琳代甲基-2-恶唑烷酮(AMOZ)与对醛基苯甲酸在水中反应生成带有羧基的半抗原。

[0102] c. 代谢物 SC 半抗原的合成

[0103] 将氨基脒(SC)的硝基还原为氨基,生成带有氨基的半抗原。

[0104] d. 代谢物 AH 半抗原的合成

[0105] 氨基-乙内酰脲(AH)与间醛基苯甲酸在水中反应生成带有羧基的半抗原。

[0106] (2) 硝基呋喃代谢物抗原的制备:

[0107] a. 将 50  $\mu$ mol/L 硝基呋喃代谢物半抗原溶解在 1mL 的 DMF 中,然后在该溶液中加入等摩尔的 DCC 和 NHS,让其在室温下反应过夜;

[0108] b. 离心,取上清液 800  $\mu$ L,缓慢加入到 4mL 15mg/mL 的 BSA 或 OVA 载体蛋白碳酸缓冲溶液中,然后在磁力搅拌下反应 4h;

[0109] c. 待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析 2 次,然后用 0.8%生理盐水透析,得产物;

[0110] d. 采用 1998 年陈新建等公开的紫外扫描测定结合比方法测定结合比,最后将抗

原浓缩保存或冻干保存得到硝基呋喃免疫原和包被原,分装保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。

[0111] 实施例 2 抗体的制备

[0112] 硝基呋喃代谢物鼠单克隆抗体制备:

[0113] 动物免疫程序:采用 Ba1b/c 小鼠作为免疫动物,以硝基呋喃代谢物半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为  $60\mu\text{g}$ /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,腹腔注射,间隔 3 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,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞。

[0114] 细胞融合与克隆化:取免疫 Ba1b/c 小鼠脾细胞,按 4:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用显微克隆法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0115] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成  $5\times 10^6$  个/mL 的细胞悬液,分装于冻存管,在  $-70^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入  $37^{\circ}\text{C}$  水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0116] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Ba1b/c 小鼠(8 周龄)腹腔注射杂交瘤细胞  $5\times 10^6$  个/只,14 天后采集腹水。用免疫层析法进行腹水纯化,小瓶分装, $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

[0117] 实施例 3 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的提取

[0118] 1、辣根过氧化物酶的提取

[0119] a. 水提取:称取 20 千克已洗干净的鲜辣根或辣根皮,切成小块,在粉碎机中绞碎。碎渣浆加 10 千克水在低温下搅拌浸提 8 小时,以 3000 转/分速度离心 10 分钟,收集上清液。

[0120] b. 硫酸铵分级分离:每升滤液加 226 克硫酸铵粉末,边加边搅拌,置室温下过夜。次日吸取上清液,再按每升上清液加 258 克硫酸铵粉末,随加随搅拌,待硫酸铵完全溶解后,置冷室过夜。次日吸去上清液,沉淀部分在冷冻离心机中以 13000 转/分离心 20 分钟,弃去上清液,收集沉淀。将沉淀溶于 200~300 毫升蒸馏水中,分装于透析袋中,在流动水中透析 1~2 天,直至透出的水加入氯化钡溶液无沉淀生成为止。然后再在蒸馏水中透析 8 小时。合并透析液,在冷冻离心机中以 4000 转/分离心 15 分钟,收集上清液。

[0121] c. 丙酮分级分离:将上清液倒入烧杯并置冰盐浴中,在不断搅拌下,用滴管沿杯壁加入等体积预冷至  $-15^{\circ}\text{C}$  的丙酮,在冷冻离心机中以 4000 转/分离心 15 分钟,收集上清液,再加入原上清液体积 0.8 倍的  $-15^{\circ}\text{C}$  丙酮,离心(条件同上)收集沉淀。将沉淀溶于少量蒸馏水中,透析(方法同上)除去丙酮,即得粗 HRP。

[0122] d. 精制:每升粗酶液加入 1 毫升 1 摩尔硫酸锌溶液,在冷冻离心机中以 5000 转/分离心 10 分钟,收集上清液,分装于透析袋内,于流水中透析除硫酸锌,约需 1 天,然后在蒸馏水中透析 8 小时。将透析液合并,进行真空干燥即得精制 HRP。产品呈米黄色纤维状松软物。

[0123] 2、碱性磷酸酶

[0124] 利用产生碱性磷酸酯酶的 E. Coli 1,317 菌株发酵培养,发酵液经离心(8000r/min,10min)后,沉淀的菌体经  $5\times 10^{-4}\text{M}$  EDTA-0.03M pH8.0 Tris-0.5M 蔗糖高渗液处理后用溶菌酶破壁,上清酶液经 DEAE 纤维素搅拌吸附和洗脱,热处理和 Sephadex G-100 分子筛层

析纯化。

[0125] 实施例 4 酶标记硝基呋喃代谢物抗体的制备

[0126] 辣根过氧化物酶 HRP 标记硝基呋喃代谢物抗体的制备采用过碘酸盐氧化法,具体方法为:

[0127] a. 溶解 5mg HRP 于 1mL 超纯水中,加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75  $\mu$ L,置室温或 4℃冰箱反应 20min 或 30min。

[0128] b. 反应完后装入透析袋,0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液 4℃透析过夜,期间需更换透析液几次。

[0129] c. 将硝基呋喃代谢物抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL,另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4℃冰箱反应 2h。

[0130] d. 加入 100  $\mu$ L 4mg/mL 硼氢化钠,4℃冰箱反应 2h。

[0131] e. 对 0.01mol/L PBS 透析过夜,加入保存液 -20℃保藏备用。

[0132] 实施例 5 酶联免疫试剂盒组分的配制

[0133] (1) 浓缩洗涤缓冲液的配制:含 0.5 ~ 1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍。

[0134] (2) 样品稀释浓缩液的配制:pH7.4、0.1 ~ 0.25mol/L 的磷酸盐缓冲液,为正常使用浓度的 5 ~ 15 倍。

[0135] (3) 封闭液的配制:脱脂奶粉 1.0 ~ 5.0g 溶于 100mL 蒸馏水。

[0136] (4) 底物缓冲液的配制:30%过氧化氢 30  $\mu$ L 溶于 19mL 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中,4℃保存。磷酸-柠檬酸缓冲液的配制:0.2MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>25.7mL,0.1M 柠檬酸 24.3mL,加蒸馏水 50mL。

[0137] (5) 底物液的配制:将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)80mg 溶于 10mL pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中,4℃保存。磷酸-柠檬酸缓冲液的配制:0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>25.7mL,0.1M 柠檬酸 24.3mL,加蒸馏水 50mL。

[0138] (6) 酶标板微孔板的包被:4 种硝基呋喃代谢产物 AOZ、AMOZ、SC 和 AH 的偶联抗原用 pH9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 0.1 ~ 5 $\mu$ g/mL 然后按 4 : 4 : 1 : 1 的比例混合,其中碳酸盐缓冲溶液含 1 ~ 2g 碳酸钠和 2 ~ 4g 碳酸氢钠,双蒸水 1L。在酶标板的每孔加 100 $\mu$ L,37℃包被 1h 后 4℃下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,拍干,然后在每孔中加入 200 $\mu$ L1.0 ~ 5.0%脱脂奶粉,放入 37℃温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次,干燥后封入铝箔袋中 4℃保存。

[0139] (7) 将标记好的 4 种代谢产物 AOZ、AMOZ、SC 和 AH 的不同酶标抗体按照 4 : 4 : 1 : 1 的比例混合配制酶标记抗体工作液。

[0140] (8) 硝基呋喃代谢物标准溶液的配制:准确称取硝基呋喃代谢物 AOZ 标样 8.1  $\mu$ g,溶于 0.01L 缓冲液中,然后用缓冲液稀释分别配制 8.1  $\mu$ g/L、2.7  $\mu$ g/L、0.9  $\mu$ g/L、0.3  $\mu$ g/L、0.1  $\mu$ g/L 硝基呋喃代谢物 AOZ 标准溶液,另外缓冲液配制 0  $\mu$ g/L 对照样,4℃保存;其他 3 种代谢产物 AMOZ、SC 和 AH 的标准溶液的配制同上。

[0141] (9) 试剂分装:各种试剂按要求配制,测定合格后无菌分装。酶标记抗体工作液 7mL/瓶,硝基呋喃代谢物标准样品 1mL/瓶,底物液 7mL/瓶,底物缓冲液 7mL/瓶,终止液

7mL/瓶,浓缩洗液 50mL/瓶,浓缩样品稀释液 50mL/瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4℃保存。

[0142] (10) 试剂盒的组装:分别将可拆卸包被好多种硝基呋喃代谢物偶联抗原的微孔板 1 块,酶标记抗体工作液、底物液、底物缓冲液、终止液、浓缩洗液、浓缩样品稀释液各 1 瓶,硝基呋喃代谢物标准溶液 24 瓶,4 种不同代谢物各 6 个,使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装,4℃保存。

[0143] 实施例 6 酶联免疫试剂盒组分的配制

[0144] 实验步骤同实施例 5,不同的是采用细菌提取的碱性磷酸酯酶为标记酶,所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液,按照实验室常规方法配制。

[0145] 实施例 7 组建检测硝基呋喃的酶联免疫试剂盒,包含下述组分:

[0146] (1) 包被了多种硝基呋喃代谢物偶联抗原的 96 孔酶标板;或者根据需要选择 40 孔酶标板;

[0147] (2) 酶标记抗体工作液,7mL/瓶;

[0148] (3) 硝基呋喃代谢物标准品溶液 24 瓶,AOZ、AMAZ、SC 和 AH 每个代谢物标准溶液的浓度均为 0 μg/L、0.1 μg/L、0.3 μg/L、0.9 μg/L、2.7 μg/L、8.1 μg/L,1mL/瓶;

[0149] (4) 底物缓冲液,7mL/瓶;

[0150] (5) 底物液,7mL/瓶;

[0151] (6) 终止液,7mL/瓶;

[0152] (7) 浓缩洗涤液,50mL/瓶;

[0153] (8) 浓缩样品稀释液,50mL/瓶;

[0154] (9) 使用说明书,1 份;

[0155] (10) 盖板膜,2 张;

[0156] (11) 自封袋(含干燥剂),1 个。

[0157] 实施例 8 待测样品前处理

[0158] 将组织样品用组织匀浆机高速匀浆;牛奶样本离心去除脂肪层;蜂蜜样本加蒸馏水溶解均匀;将鸡蛋样本破壳后取出蛋清蛋黄,轻轻搅匀防止泡沫产生。

[0159] (1) 动物组织例如鸡肉、猪肉或鱼虾

[0160] 取 2±0.05g 的组织样品的均质物,加入 8mL 的蒸馏水,1mL 1MHCL 和 200 μL 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡;在 37℃ 过夜孵育大约 12h;加入 10mL 0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.8mL 1M NaOH 和 10mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min;在室温下(20~25℃)3000g 以上离心 10min;取出 5mL 乙酸乙酯到另一个容器中 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,用 2mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温下(20~25℃)3000g 以上离心 10min;取 50 μL 下层液体用于分析。

[0161] (2) 牛奶

[0162] 取出 10mL 牛奶样本到玻璃离心管中;分别加入 0.36M 亚硝基铁氰化钠缓冲液和 1M 硫酸锌缓冲液各 200 μL;充分混合样本后,在 4~10℃ 用恒温离心机 3000g 以上离心 10min。取牛奶的离心上清液 2mL,加入 16mL 的蒸馏水,2mL 1M HCL 和 200 μL 10mM 的 2-硝

基苯甲醛,充分振荡;在 37℃ 过夜孵育大约 12h;加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,0.8mL 1M NaOH 和 10mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min;在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;取出 5mL 乙酸乙酯到另一个容器中 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,用 2mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;取 50  $\mu$ L 下层液体用于分析。

### [0163] (3) 蜂蜜

[0164] 取出 2g 蜂蜜样本到离心管中;加入 16mL 的蒸馏水振荡溶解,2mL 1M HCL 和 200  $\mu$ L 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡;在 37℃ 过夜孵育大约 12h;加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,2mL 1M NaOH 和 10mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min;在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;取出 12mL 乙酸乙酯到另一个容器中 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,用 4mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;取 50  $\mu$ L 下层液体用于分析。

### [0165] (4) 鸡蛋

[0166] 取出 4g 已制备好的鸡蛋样本到 100mL 离心管中;分别加入 16mL 水,2mL 1M HCL,400  $\mu$ L 0.36M 的亚硝基铁氰化钠缓冲液,振荡混匀;加入 400  $\mu$ L 1M 硫酸锌缓冲液,充分振荡 8min,室温 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min,取出全部上清液,加入 400  $\mu$ L 10mM 的 2-硝基苯甲醛,充分振荡,50℃ 水浴 2h,每半个小时剧烈振荡 1 ~ 2 分钟;分别加入 10mL 0.1M  $K_2HPO_4$ ,1mL 1M NaOH 和 8mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 1min,在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;取出 6mL 上层有机相于 50℃ 下氮气吹干;用 2mL 正己烷溶解干燥物,加入 4mL 已稀释好的复溶液充分混合;在室温下 (20 ~ 25℃) 3000g 以上离心 10min;去除上层有机相;取下层水相 50  $\mu$ L 用于分析。

### [0167] 实施例 9 试剂盒的检测方法

[0168] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温 (20 ~ 24℃) 平衡 30min 以上,将足够标准和样品所用数量的条板固定于支架,标准和样品做两个平行实验,按顺序编号;

[0169] (2) 在标准品孔加入 50  $\mu$ L 标准品,样品孔加入 50  $\mu$ L 待测样品。然后每孔加入 50  $\mu$ L 酶标记物,轻拍混匀。盖上盖板膜,在室温孵育 20min;

[0170] (3) 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打,每轮洗板拍打 3 次,以保证完全除去孔中的液体。用 250  $\mu$ L 蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中的液体,再重复操作 3 遍;

[0171] (4) 每孔加入 100  $\mu$ L 显色液 (将底物缓冲液与底物液等体积混合),轻拍混匀,盖上盖板膜,暗处室温孵育 15min;

[0172] (5) 加入 50  $\mu$ L 反应终止液到微孔中。混合好在波长 450nm 或 492nm,以空气为空白,测定各孔吸光值,必须在加入终止液后 60min 内读取吸光值。

### [0173] 检测结果计算与分析:

[0174] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值,以百分吸光度值为纵坐标,硝基咪喃标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。见附图 1。  $Y = -15.201X + 87.907$ ;  $R^2 = 0.994$ 。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值,根据方程式求出对应样品的硝基咪喃代谢物浓度。所述百分吸光度值的计算式为:

[0175] 百分吸光度值 (%) =  $(B/B_0) \times 100$

[0176] 其中, B 为标准溶液或样品的平均吸光值,  $B_0$  为 0  $\mu$ g/L 标准溶液的平均吸光度值。

[0177] 检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析,对硝基呋喃代谢物线性检测范围为 0.1 ~ 8.1  $\mu\text{g/L}$ ,检测限为 0.1  $\mu\text{g/L}$ ,整个检测过程只需 35min 就可以完成。

[0178] 实施例 10 试剂盒精密度与准确度试验

[0179] 1、标准品溶液重复性试验

[0180] 从 3 批按照实施例 4(6) 中的方法制备的酶标板中,各抽出 20 个微孔,测定 0.9  $\mu\text{g/L}$  标准溶液的吸光度值 (OD 值),重复 20 次,计算变异系数 CV%,结果见表 1。

[0181] 表 1 标准品溶液重复性试验

样品	浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.9	4.7	4.9	4.3	8.1

[0183] 结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 4.3 ~ 4.9% 之间,批间变异系数为 8.1%。

[0184] 2、样本重复性与准确度试验

[0185] 准确度是指测得值与真值的符合程度,在 ELISA 测定中,准确度常以回收率表示,精密度常以变异系数来表示。在空白鱼虾、牛奶、蜂蜜中,将硝基呋喃添加至终浓度为 1  $\mu\text{g/L}$  ( $\mu\text{g/kg}$ )、5  $\mu\text{g/L}$  ( $\mu\text{g/kg}$ ),每个浓度各 10 个平行,测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

[0186] 表 2 样本重复性与准确度试验结果

[0187]

样品	添加浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批		第 2 批		第 3 批		批间			
		回收含量 %	回收率 %	回收含量 %	回收率 %	回收含量 %	回收率 %	CV%	CV%		
鱼虾	1	0.83	83.0	6.7	0.85	85.0	8.4	0.81	81.0	9.3	14.9

[0188]

牛奶	5	4.205	84.1	5.7	4.09	81.8	7.9	4.18	83.6	8.9	13.4
	1	0.913	91.3	4.4	0.835	83.5	5.1	0.889	88.9	4.3	16.8
	5	4.565	91.3	7.1	4.435	88.7	6.1	4.18	83.6	5.8	13.1

蜂蜜	1	0.813	81.3	8.2	0.853	85.3	5.2	0.813	81.3	6.3	15.6
	5	4.76	95.2	8.1	4.155	83.1	9.8	4.06	81.2	8.9	13.9

[0189] 结果表明鱼虾、牛奶、蜂蜜样本的添加回收率在 81.0 ~ 95.2% 之间,批内变异系数在 4.3 ~ 9.8% 之间,批间变异系数在 13.1 ~ 16.8% 之间。

[0190] 实施例 11 保存期试验

[0191] (1) 将试剂盒放置于 2 ~ 8℃,分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒,对硝基呋喃代谢物标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0192] (2) 将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 12 天,每天对硝基呋喃代谢物标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0193] (3) 将试剂盒在 -20℃ 冰箱保存 12 天,每天对硝基呋喃代谢物标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0194] 从结果可看出,经过三种条件保存试验,硝基呋喃代谢物标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值下降小于 5%,且 OD 不低于 1.6;50% 抑制率在 0.5 ~ 1.0 μg/L 之间;添加回收率在 75 ~ 105% 之间;批内变异系数小于 10%;各项指标均符合质量要求,因此,试剂盒可以在 2 ~ 8℃ 保存 12 个月。

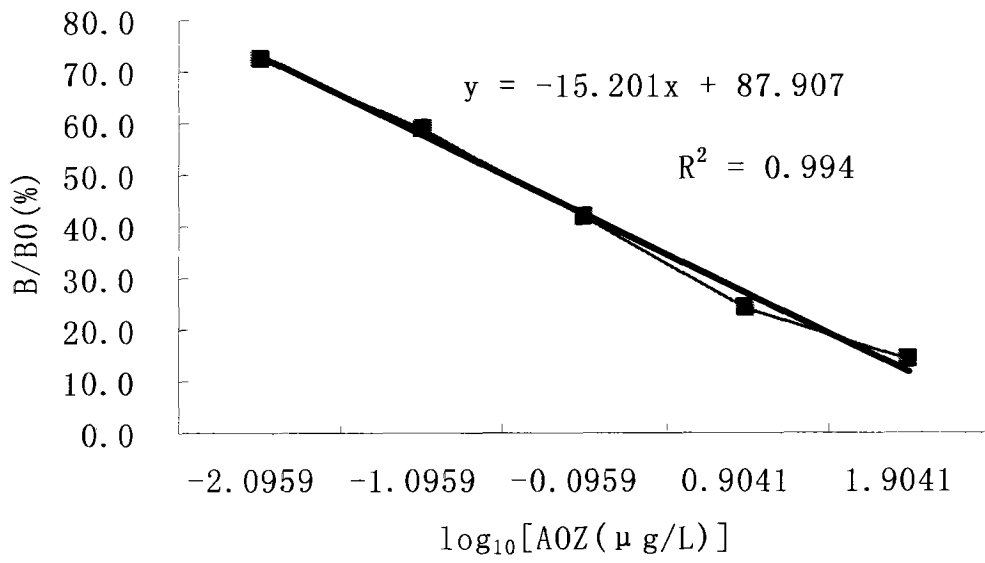


图 1

专利名称(译)	硝基咪唑类药物代谢物残留的酶联免疫检测试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101241132B</a>	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN200810025904.4	申请日	2008-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	沈玉栋 杨金易 孙远明 肖治理 雷红涛 王弘		
发明人	沈玉栋 杨金易 孙远明 肖治理 雷红涛 王弘		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	林丽明 任重		
审查员(译)	苗荻		
其他公开文献	CN101241132A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测硝基咪唑类药物代谢物残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被多种硝基咪唑代谢物抗原的酶标板、酶标记抗体工作液、标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液和样品稀释浓缩液。本发明同时公开了所述试剂盒进行检测的使用方法，包括样品的前处理，使用试剂盒检测和结果处理与分析等步骤。本发明提供的试剂盒采用直接竞争酶联免疫吸附分析技术，既可同时检测多种硝基咪唑代谢物总残留，又可检测单一硝基咪唑代谢物残留，避免了同一样品需多次检测，降低了漏检率，灵敏度高、稳定性好、步骤少、成本低，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。

