

[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 200510086778. X

[51] Int. Cl.

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 1766619A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086778. X

[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 万宇平 冯才伟  
吴小平 冯才茂 汪善良 李军  
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞  
丁双阳 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

一种检测链霉素类药物的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种检测动物组织、蜂蜜和牛奶中链霉素类药物的酶联免疫试剂盒，该试剂盒包括：包被链霉素类药物特异性抗体的酶标板、酶标记的链霉素类药物抗原、链霉素标准品溶液、底物显色液、浓缩洗涤剂、终止液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测链霉素类药物的方法，它包括以下步骤：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链霉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、一种用于检测动物组织、蜂蜜和牛奶中链霉素类药物的试剂盒，其特征在于它包含以下组分：

- (1) 包被了链霉素类药物兔多克隆抗体的酶标板；
- 5 (2) 酶标抗原；
- (3) 链霉素标准品溶液；
- (4) 底物显色液；
- (5) 浓缩洗涤液；
- (6) 终止液；
- 10 (7) 浓缩复溶液。

2、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于链霉素类药物兔多克隆抗体是以新西兰大白兔作为免疫动物，以链霉素类药物半抗原与人血清白蛋白偶联物为免疫原进行免疫制得。

3、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于酶标抗原是将双氢链霉素用琥珀酸酐法合成链霉素类药物半抗原，通过混合酸酐法将链霉素类药物半抗原与甲状腺蛋白偶联得到链霉素抗原，再采用戊二醛法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与链霉素抗原进行偶联得到。

4、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于浓缩洗涤液为含有0.8~1.2%吐温80的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为0.01~0.05mol/L含有1%明胶的磷酸盐缓冲液；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。

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

6、一种检测样品中链霉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 1~5 之任一所述的试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

7、如权利要求 6 所述的方法,其中试剂盒检测为向包被有链霉素类药物抗体的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液,再加入酶标抗原,温育  
5 后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值。

## 一种检测链霉素类药物的酶联免疫试剂盒

### 技术领域

本发明涉及免疫学检测领域，具体地说，涉及一种检测动物组织、蜂蜜  
5 和牛奶中链霉素类药物的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

链霉素和双氢链霉素为一类重要的氨基糖苷类抗生素,对大多数革兰氏  
阴性杆菌和革兰氏阳性杆菌有效，特别是对磺胺药和青霉素所不能奏效的多  
种革兰氏阴性杆菌和结核菌都有极强的杀菌作用。链霉素类药物对鸡、羊、  
10 牛、猪的各类炎症也有很好的疗效。但使用过多链霉素类药物会引起动物过  
敏性休克和阻滞神经肌肉冲动传导，而且一定时期内在动物性食品中都有残  
留，在人体内产生积累，严重威胁着人体健康。2002年12月我国农业部公  
告第235号文规定在所有食品动物的肌肉、脂肪、肝中的最高残留量为  
600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，食品动物的奶中最高残留量为200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，并将检测兽药中链霉素  
15 类药物的残留量列为残留监控重点。

目前，主要采用高效液相色谱分析法、气谱、气质联机等单纯的仪器  
分析方法，虽然灵敏度高，但样本前处理及测定操作烦琐，费用高，不适宜  
于大量样本筛查，可以作为残留的确证分析。

### 发明内容

#### 20 (一) 要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的  
用于动物源性食品中链霉素类药物的酶联免疫试剂盒，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。

#### (二) 技术方案

25 本发明提供了一种酶联免疫试剂盒，由下列成分组成：

- (1) 包被了链霉素类药物兔多克隆抗体的酶标板；
- (2) 酶标抗原；

- (3) 链霉素标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- (5) 浓缩洗涤液;
- (6) 终止液;
- 5 (7) 浓缩复溶液。

其中所述试剂盒检测的链霉素类药物为链霉素和双氢链霉素, 或者为其它与链霉素结构相似、具有相同药理活性的链霉素类药物。

其中所述的制备链霉素类药物兔多克隆抗体的免疫原是采用水溶性碳化二亚胺法将链霉素类药物半抗原和人血清白蛋白进行偶联得到的。再以新西兰大白兔作为免疫动物进行免疫制得链霉素类药物特异性抗体。因双氢链霉  
10 素与链霉素的结构很相似, 当本发明以双氢链霉素为中间体制备半抗原时, 因其与链霉素类药物结构相似且比链霉素更加稳定, 使之制备出的抗体具有更好的特异性, 并且适用于所有结构相似、具有相同药理活性的链霉素类药物的检测; 包被过程中所用的封闭液为含有 3~10%胎牛血清的溶液。

其中所述的酶标抗原为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶标记的链霉素类药物抗原, 本发明优选为细菌提取碱性磷酸酯酶。细菌提取碱性磷酸酯酶可采用现有技术中的多种方法制备, 如戊二醛法。  
15

其中所述的链霉素标准品溶液的浓度为 0~40.5 $\mu\text{g/L}$ , 可选择 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 $\mu\text{g/L}$  和 40.5 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述的洗涤液为含有 0.8~1.2%吐温 80 的磷酸盐缓冲液。  
20

其中所述的底物显色液: 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。

其中所述的终止液为 1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液。

其中所述的复溶液为 0.01~0.05mol/L、含有 1%明胶的磷酸盐缓冲液。  
25 在磷酸盐缓冲液中加入一定量的明胶其优点为: 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。

本发明还提供了使用上述试剂盒定性、定量检测动物组织、蜂蜜和牛奶

中链霉素类药物残留量的方法，它包括以下步骤：

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

5 优选地，样品前处理方法为：

a、动物组织：去除脂肪的粉碎样品与磷酸盐缓冲液混合 5min，加入正己烷充分上下混合 10min，静置 1h。室温离心 15min，10000rpm。用移液器取中间层 1ml，加入 1ml 正己烷，充分振荡 5min，离心 15min，4000rpm。去除上层，取下层即可进行分析。

10 b、蜂蜜：用 2ml 无水甲醇洗柱子，流速为 60d/min。用 2ml 水洗柱子，流速为 60d/min。上样，取 2ml 样本以流速为 15d/min 过柱。用 3ml 水洗柱子，45d/min。用氮气或空气吹干柱子，3min。用 1ml 无水甲醇洗脱样品，流速为 15d/min。在 40 ~ 50℃，弱空气或氮气流下完全蒸发溶剂。用 4ml 复溶液溶解干燥的残留物，即可进行分析。

15 c、牛奶：取牛奶将其置 5000rpm 离心 10min，去除上层脂肪，取下层即可进行分析。

d、肝脏样品：5.0g 去除脂肪的粉碎样品与 20ml 磷酸盐缓冲液混合 30min，室温离心 10min，10000rpm，2ml 上清与 3ml 正己烷混合振荡 5min，室温离心 10min，4000rpm，去除上层脂肪层，用复溶液以 1: 10 稀释取水相即可  
20 进行分析。

优选地，用试剂盒检测是向包被有链霉素类药物抗体的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液，再加入酶标抗原，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

优选地，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<sub>0</sub>) 再乘以 100%，  
25 即百分吸光度值。计算公式为：

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

公式中  $B$  为标准溶液的平均吸光度值,  $B_0$  为  $0\mu\text{g/L}$  标准溶液的平均吸光度值。以链霉素类药物浓度的半对数值为  $X$  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中链霉素的百分吸光度值, 相对应每一个样品中链霉素的浓度则可从标准曲线上读出, 再根据样本中链霉素的残留量利用交叉反应率计算出其他链霉素类药物的含量。

优选地, 检测结果的分析也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液中链霉素类药物的浓度。

优选地, 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  $0.5\mu\text{g/L}$ 。

本发明中抗原的合成过程为:

#### (1) 半抗原的合成

将双氢链霉素用琥珀酸酐法合成链霉素类药物半抗原。

半抗原的制备原理: 由于双氢链霉素中含有胍基, 用琥珀酸酐法使其酰化, 生成带有羧基的半抗原衍生物, 从而在分子中引入羧基。

#### (2) 抗原合成

为了使小分子物质具有免疫原性且能够包被到酶联板上, 需将小分子与大分子载体蛋白偶联。

首先, 将链霉素类药物半抗原溶于水中, 用高锰酸钾氧化剂和水溶性碳化二亚胺法活化基团将链霉素半抗原上的醛基氧化为羧基。

其次, 载体蛋白溶于水中。

再次, 将氧化为羧基的半抗原逐滴加入到水溶性的载体蛋白中, 使其载体蛋白上的氨基残基与氧化的羧基结合, 从而使小分子半抗原与大分子结合, 制得具备了免疫原性的抗原。

#### (2) 酶标抗原的合成

将链霉素类药物半抗原与甲状腺蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到链霉素类药物抗原。

将链霉素类药物半抗原与细菌提取碱性磷酸酯酶采用活性酯法进行偶联,

得到细菌提取碱性磷酸酯酶标记的链霉素类药物抗原。

### (3) 链霉素类药物兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以链霉素类药物半抗原与人血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1mg/kg，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 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7~10d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

其中本发明试剂盒中所涉及试剂的配制方法为：

- 10 a. 链霉素标准品溶液：系列标准品溶液 6 瓶，0 $\mu$ g/L，0.5 $\mu$ g/L，1.5 $\mu$ g/L，4.5 $\mu$ g/L，13.5 $\mu$ g/L，40.5 $\mu$ g/L，1~3ml/瓶。
- b. 包被缓冲液：pH 9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。
- c. 封闭液：含有 3-10% 胎牛血清的溶液。
- d. 浓缩洗涤液：含 0.8~1.2% 吐温 80 的磷酸盐缓冲液（0.01mol/L，15 pH7.4），为正常使用浓度的 15~25 倍，30-50ml/瓶。
- e. 酶标记物工作液：细菌提取碱性磷酸酯酶或辣根过氧化物酶标记的链霉素类药物抗原工作液，7~12ml/瓶。
- f. 底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲。
- g. 底物显色液 B 液：邻苯二胺（OPD）或四甲基联苯胺（TMB）。
- 20 h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH 8.1、含有 MgCl<sub>2</sub> 0.01% 100mmol Tris-HCl。
- i. 终止液：1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液。
- j. 浓缩复溶液：0.01~0.05M、含有 1% 明胶的缓冲液，为正常使用浓度的 5~10 倍，30~50ml/瓶。

### 25 链霉素类药物特异性抗体包被的酶标板制备方法：

用包被缓冲液将链霉素类药物特异性抗体稀释成 0.1~1 $\mu$ g/ml，每孔加入 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，并 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 150~200 $\mu$ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1~2h，倾去孔内液

体，干燥后用铝膜真空密封保存。

本发明试剂盒的检测原理为：将链霉素类药物特异性抗体作为包被原吸附于固相载体上，加入链霉素标准品溶液或样本溶液，然后加酶标记物，待测样品中残留的链霉素与酶标抗原竞争固相载体上包被的链霉素类药物特异性抗体，显色，终止，测定样本的吸光度值。该值与样品中残留的链霉的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出链霉素的含量。同时根据酶标板上的样本上颜色的深浅，与系列浓度的链霉素标准品溶液颜色的比较可以判断出样本中链霉素的实际浓度，再根据样本中残留的链霉素实际浓度利用交叉反应率计算出其它链霉素类药物的实际浓度。

### 10 (三) 有益效果

本发明的检测链霉素类药物的试剂盒主要采用直接竞争 ELISA 方法定性或定量检测动物组织、蜂蜜、牛奶等样品中链霉素类药物的残留量；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样品。

本发明该试剂盒采用链霉素兔多克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，使用方便，具有高特异性、高灵敏度、高精度度、高准确度等特点，可在动物源性食品中链霉素类药物残留检测中发挥重要作用。

### 附图说明

图 1 链霉素类药物检测标准曲线图。

### 20 具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但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

##### 25 (1) 半抗原的合成

将双氢链霉素用琥珀酸酐法和戊二醛法合成链霉素类药物半抗原。

### (2) 免疫原的合成

将链霉素类药物半抗原和人血清白蛋白采用水溶性碳化二亚胺法进行偶联得到免疫原。

- 5 免疫原制备：取链霉素类药物半抗原 2g 溶于 20ml, 0.5M 的氢氧化钠溶液中，再取 1.5g 碳化二亚胺溶于 5ml 纯水并加到半抗原溶液中室温搅拌反应 2 小时，取载体蛋白 20g 溶于 75ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将人血清蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。将反应完的人工抗原对 0.1M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次。最后将抗原浓缩或冻干保存。

### 10 (3) 酶标抗原的合成

将链霉素类药物半抗原与甲状腺蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到链霉素类药物抗原。

将链霉素类药物抗原和细菌提取碱性磷酸酯酶采用戊二醛法进行偶联，得到细菌提取碱性磷酸酯酶标记的链霉素类药物抗原。

### 15 2、链霉素类药物兔多克隆抗体的制备

- 采用新西兰大白兔作为免疫动物，以链霉素类药物半抗原与人血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1mg/kg，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 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7d 后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

### 3、酶标板的制备

- 25 链霉素类药物特异性抗体包被的酶标板制备方法：用包被缓冲液将链霉素类药物特异性抗体稀释成 0.5 $\mu$ g/ml，每孔加入 100 $\mu$ l，37℃ 温育 2h，4℃ 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 150 $\mu$ l 封闭液，37℃ 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

### 实施例 2 检测链霉素类药物的试剂盒的组建

组建检测链霉素类药物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被了链霉素类药物兔多克隆抗体的酶标板；
- (2) 用细菌提取碱性磷酸酯酶标记的链霉素类药物抗原；
- 5 (3) 链霉素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 、 $40.5\mu\text{g/L}$ ；
- (4) 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液；
- (5) 浓缩洗涤液为含 0.8%吐温 80 的磷酸盐缓冲液；
- (6) 终止液为  $2\text{mol/L}$  的氢氧化钠溶液；
- 10 (7) 浓缩复溶液为  $0.01$  含有 1%明胶的磷酸盐缓冲液。

### 实施例 3 检测链霉素类药物的试剂盒的组建

组建检测链霉素类药物的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被了链霉素类药物兔多克隆抗体的酶标板；
- 15 (2) 用辣根过氧化物酶标记的链霉素类药物抗原；
- (3) 链霉素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1.5\mu\text{g/L}$ 、 $4.5\mu\text{g/L}$ 、 $13.5\mu\text{g/L}$ 、 $40.5\mu\text{g/L}$ ；
- (4) 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；
- (5) 浓缩洗涤液为含 1.2%吐温 80 的磷酸盐缓冲液；
- 20 (6) 终止液为  $2\text{mol/L}$  的硫酸溶液；
- (7) 浓缩复溶液为  $0.05\text{mol/L}$  含有 1%明胶的磷酸盐缓冲液。

### 实施例 4 样品中链霉素类药物残留的检测

#### 1、样品前处理

- 25 (1) 动物组织:  $2\text{g}$  去除脂肪的粉碎样品与  $8\text{ml}$  磷酸盐缓冲液混合  $5\text{min}$ 。加入正己烷  $5\text{ml}$  充分上下混合  $10\text{min}$  静置  $1\text{h}$ 。室温离心  $15\text{min}$ ， $10000\text{rpm}$ 。

用移液器取中间层 1ml, 加入 1ml 正己烷, 充分振荡 5min, 离心 15min, 4000rpm。去除上层, 取下层以 1: 10 倍稀释。

(2) 蜂蜜: 用 2ml 无水甲醇洗柱子, 流速为 60d/min。用 2ml 水洗柱子, 流速为 60d/min。上样, 取 2ml 样本以流速为 15d/min 过柱。用 3ml 水洗柱子, 45d/min。用氮气或空气吹干柱子, 3min。用 1ml 无水甲醇洗脱样品, 流速为 15d/min。在 40℃, 弱空气或氮气流下完全蒸发溶剂。用 4ml 复溶液溶解干燥的残留物, 取 50ul 进行分析。

(3) 牛奶: 取牛奶 2ml, 将其置 5000rpm 离心 10min, 去除上层脂肪。取下层, 试剂盒所提供的复溶液按 1:40 倍稀释, 取 50  $\mu$ l 进行检测。

(4) 肝脏样品: 5.0g 去除脂肪的粉碎样品与 20ml 磷酸盐缓冲液混合 30min, 室温离心 10min, 10000rpm, 2ml 上清与 3ml 正己烷混合振荡 5min, 室温离心 10min, 4000rpm, 去除上层脂肪层, 用复溶液以 1: 10 稀释, 取 50ul 水相进行分析。

## 2、用试剂盒检测

链霉素类药物特异性抗体的酶标板的微孔中加入链霉素系列标准溶液或样本溶液 50 $\mu$ l, 然后加入细菌提取碱性磷酸酯酶标记的链霉素类药物抗原工作液 50  $\mu$ l, 用盖板膜封板, 25℃ 恒温箱中反应 1h。倒出孔中液体, 每孔加入 250 $\mu$ l 稀释后的洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。加底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液 100 $\mu$ l, 轻轻振荡混匀, 25℃ 恒温箱避光显色 20min。每孔加入终止液 50 $\mu$ l, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值 (OD 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。以链霉素标准品浓度的自然对数值为 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中链霉素的百分吸光度值, 相对应每一个样品中其

它链霉素类药物的浓度则可从标准曲线上读出，再根据样本中链霉素的实际含量利用交叉反应率计算出其他链霉素类药物在样本中的残留量。

### 实验例1 可重复性试验

#### 5 标准品可重复性试验:

分别从三批试剂盒中抽取 10 个试剂盒，测定 4.5 $\mu\text{g/L}$  标准溶液的吸光度值，计算变异系数。

表 1 标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	4.5	4.7	6.8	8.3	3.9	9.3	9.1	5.6	8.7	4.0
	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

结果表明变异系数范围在 3.9%~9.4%之间。

#### 10 样本可重复性试验:

每个样本按 50  $\mu\text{g/kg}$  (L) 浓度的链霉素标准品进行添加，分别取三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数。结果表明牛奶样本变异系数均低于 20%，蜂蜜样本的变异系数均低于 20%，鸡肉样本的变异系数均小于 20%。

#### 15 表 2 牛奶样品中链霉素的准确度和精密度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
0507002	35.4	32.5	49.5	50.2	40.1	19.4
	44.6	40.2	36.5	31.2	35.8	13.3
	33.6	46.2	42.5	39.8	49.8	14.6
0507003	43.2	34.2	49.8	39.5	40.1	13.8
	43.6	33.9	44.8	49.6	39.9	13.9
	38.1	32.4	49.5	42.5	36.5	16.3
0508008	46.2	36.5	38.5	42.3	50.2	13.0
	53.2	58.3	44.3	49.2	61.2	12.7
	40.5	49.2	32.5	35.4	39.1	16.1

表3 蜂蜜样品中链霉素的准确度和精密度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
0507002	46.2	49.5	35.4	39.5	42.6	12.9
	28.4	27.5	28.1	30.5	28.5	8.9
	42.5	49.5	38.4	32.6	46.5	15.9
0507007	27.8	29.5	23.1	34.5	28.4	14.2
	46.2	43.2	34.5	39.1	48.5	13.2
	26.4	27.5	38.5	40.3	27.7	20.0
0508008	49.5	32.1	46.1	47.2	39.5	16.5
	28.4	29.5	28.2	37.5	35.1	13.4
	36.4	42.1	51.8	46.2	38.5	14.3

表4 鸡肉样品中链霉素的准确度和精密度试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/kg}$ )					变异系数 CV%
0507002	35.4	32.5	49.5	50.2	40.1	19.4
	44.6	40.2	36.5	31.2	35.8	13.3
	33.6	46.2	42.5	39.8	49.8	14.6
0507007	43.2	34.2	49.8	39.5	40.1	13.8
	43.6	33.9	44.8	49.6	39.9	13.9
	38.1	32.4	49.5	42.5	36.5	16.3
0508008	46.2	36.5	38.5	42.3	50.2	13.0
	43.2	35.9	44.3	42.1	52.1	12.7
	40.5	49.2	32.5	35.4	39.1	16.1

## 5 实验例2 准确度的试验

取两个浓度的链霉素标准品溶液, 分别为 $50\mu\text{g/kg(L)}$ 和 $100\mu\text{g/kg(L)}$ , 分别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5 试剂盒的准确度

样本	牛奶		蜂蜜		鸡肉		
添加浓度 ( $\mu\text{g/kg}$ )	50	100	50	100	50	100	
回收率%	1	94.2	76.2	120.4	102.4	100.8	84.5
	2	82.4	92.7	84.5	87.6	68.2	67.4
	3	102.5	97.4	93.5	92.1	87.3	92.5
	4	83.4	76.5	79.3	87.3	102.8	100.9

平均值	90.6	85.7	94.4	92.3	89.7	86.3
-----	------	------	------	------	------	------

结果表明牛奶添加的回收率在 76.2%~102.5%之间，蜂蜜添加回收率在 79.3%~120.4%之间，鸡肉中添加回收率在 68.2%~108.8%之间。

### 实验例 3 试剂盒特异性试验

- 5 选择与链霉素类似结构和类似功能的 2 种链霉素类药物测定交叉反应率。通过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。交叉反应率愈小，表明试剂盒的特异性愈高。

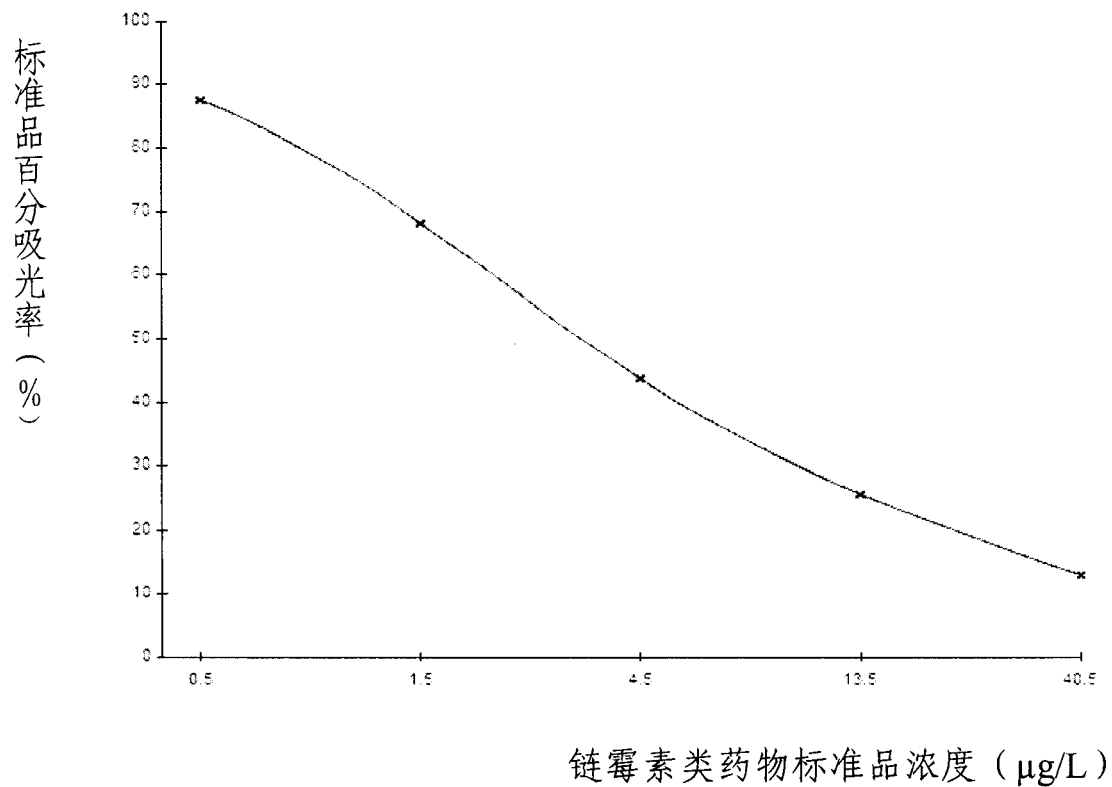
$$10 \quad \text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制链霉素的浓度}}{\text{引起 50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$

表 6 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
链霉素 (STM)	100.0
双氢链霉素	130.0

### 实验例 4 试剂盒保存期试验

- 15 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、链霉素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。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
- 20 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。



5

图 1

专利名称(译)	一种检测链霉素类药物的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1766619A</a>	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510086778.X	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		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种检测动物组织、蜂蜜和牛奶中链霉素类药物的酶联免疫试剂盒，该试剂盒包括：包被链霉素类药物特异性抗体的酶标板、酶标记的链霉素类药物抗原、链霉素标准品溶液、底物显色液、浓缩洗涤剂、终止液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测链霉素类药物的方法，它包括以下步骤：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链霉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。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\% 抑制链霉素的浓度}}{\text{引起 50\% 抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$