



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109180760 B

(45) 授权公告日 2021.09.17

(21) 申请号 201811003347.6

(22) 申请日 2018.08.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109180760 A

(43) 申请公布日 2019.01.11

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: C2018143 2018.06.12

(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 彭大鹏 陶燕飞 袁宗辉 倪腾腾

王延新 王玉莲 潘源虎 谢书宇

陈冬梅 王旭 黄玲利 郝海红

戴梦红 程古月 瞿伟 谢长清

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司

公司 42104

代理人 徐绍新

(51) Int.Cl.

C07H 17/08 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101105492 A, 2008.01.16

CN 106046083 A, 2016.10.26

CN 1733910 A, 2006.02.15

CN 101762706 A, 2010.06.30

CN 1766625 A, 2006.05.03

CN 1830547 A, 2006.09.13

CN 1811440 A, 2006.08.02

陆江. 伊维菌素单克隆抗体的研制与应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》. 2007, (第6期), 第D050-424页.

审查员 杜姣

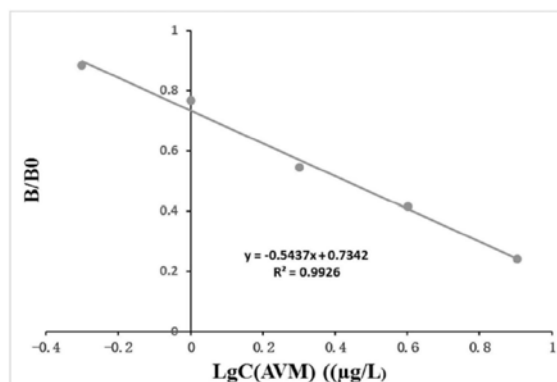
权利要求书1页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

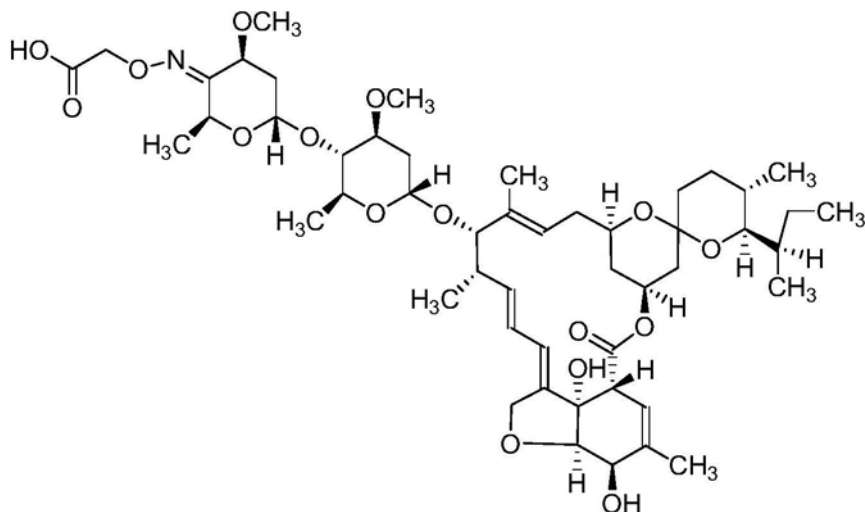
一种伊维菌素衍生物和抗阿维菌素类药物的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种新型伊维菌素半抗原,它是在伊维菌素C₄-OH位置,与羧甲基羟胺半盐酸盐反应,将C₄上的羟基取代为羧甲基羟胺基,该衍生物与载体蛋白偶联后作为免疫原,可用于制备抗阿维菌素类药物的单克隆抗体。本发明还公开了一种广谱的抗阿维菌素类药物的单克隆抗体,该单克隆抗体能同时特异性识别阿维菌素、伊维菌素、埃普利诺菌素和埃玛菌素,用该单克隆抗体建立的酶联免疫方法和试剂盒适用于检测动物组织中阿维菌素类药物残留,具有检测灵敏,准确度高,精密度好等优点。



1. 一种抗阿维菌素类药物的单克隆抗体,它是将结构式如下的伊维菌素衍生物用作半抗原,将其与载体蛋白偶联后作为免疫原,免疫动物后经细胞融合,得到杂交瘤细胞株,用该杂交瘤细胞株制备得到的,所述阿维菌素类药物是阿维菌素、伊维菌素、埃普利诺菌素和埃玛菌素,所述的杂交瘤细胞株,命名为IVM/6D4,保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2018143,



2. 权利要求1所述的单克隆抗体在制备检测阿维菌素类药物的试剂盒中的应用。
3. 包含权利要求1所述单克隆抗体的试剂盒。
4. 如权利要求3所述的试剂盒,该试剂盒是检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒。
5. 一种非诊断目的检测动物组织中阿维菌素类药物残留的酶联免疫方法,其特征在于包括以下步骤:
 - (1) 将权利要求1中所述的伊维菌素衍生物与载体蛋白偶联得到包被原;
 - (2) 用保藏号为CCTCC NO:C2018143的杂交瘤细胞株IVM/6D4制备单克隆抗体;
 - (3) 用步骤(1)得到的包被原包被固相载体;
 - (4) 动物组织样品的处理和检测。

一种伊维菌素衍生物和抗阿维菌素类药物的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的伊维菌素衍生物及其在制备抗阿维菌素类药物的单克隆抗体中的应用,本发明还涉及一种抗阿维菌素类药物的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 阿维菌素类药物包括阿维菌素 (AVM)、伊维菌素 (IVM)、埃普利诺菌素 (EPR)、塞拉菌素 (SEL)、莫西菌素 (MOX)、多拉菌素 (DOR) 和埃玛菌素 (EMA) 等,属于大环内酯类药物,广泛用于治疗和预防动物寄生虫病及农产品中的昆虫和螨虫防治。阿维菌素类药物脂溶性极高,残留在动物机体内的药物很难降解。研究表明阿维菌素类药物具有神经毒性、肝毒性及免疫毒性且可能具有生态毒性。鉴于这类药物对人类健康及生态环境的危害,世界各国都严格规定了它们在动物可食性组织中的最大残留限量 (MRLs)。

[0003] 残留检测方法是准确判断药物残留是否超标的重要手段,必须具有较高的精确度和准确度。目前用于阿维菌素类检测的方法主要有仪器分析法和免疫学检测方法。仪器分析法主要有液相色谱-荧光 (HPLC-FLD)、液相色谱法-紫外 (HPLC-UV) 和超液相色谱法-质谱法 (LC/MS) 等。这些仪器分析方法灵敏度高,能够多残留检测。但是检测时间长、成本高、样品前处理繁杂,需要使用大量有机试剂,且对操作人员要求较高,很难做到现场、低成本、快速、大批量的检测。

[0004] 免疫学检测方法,尤其是ELISA方法具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点,能够克服仪器分析的缺陷,许多经典的分析方法在灵敏度和特异性方面都不能与之相比,是一种有效的大批量残留筛选方法,但是现有的免疫学方法存在检测种类少,特异性不高,灵敏度差等缺点。

[0005] 如CN 1811440A公开了一种伊维菌素半抗原,它是在伊维菌素的分子结构上直接把突出的4-羟基酯化成羧基,该半抗原制备的抗体仅用于伊维菌素的检测,最低检测限为 $0.5\mu\text{g L}^{-1}$ 。

[0006] CN 103675287A公开了一种伊维菌素的检测试剂盒,它以伊维菌素代谢物为半抗原制备单克隆抗体,但没有公开是何种代谢物,且只能检测伊维菌素,最低检测限为 0.01ng mL^{-1} 。

[0007] CN 104280557 A公开了一种检测阿维菌素的酶联免疫试剂盒,半抗原是阿维菌素,所制备的抗体 IC_{50} 平均值为 $2.3\mu\text{g L}^{-1}$,对埃比菌素和伊维菌素有一定交叉反应;该试剂盒对鸡肉样品的最低检测限为 $1.6\mu\text{g kg}^{-1}$,对鸡肝样品的最低检测限为 $1.8\mu\text{g kg}^{-1}$,

[0008] CN 102928407 A公开了检测阿维菌素类药物的磁颗粒化学发光试剂盒,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,对阿维菌素的检测灵敏度为 0.02ng mL^{-1} ,对埃普菌素、依维菌素有交叉反应。

[0009] 可见,现有技术中针对阿维菌素类药物的免疫检测,大多数半抗原的设计都在AVM或IVM的 C_4 -OH位置连接琥珀酸酐或戊二酸酐得到含有4或5个C的间接臂的半抗原,再与载

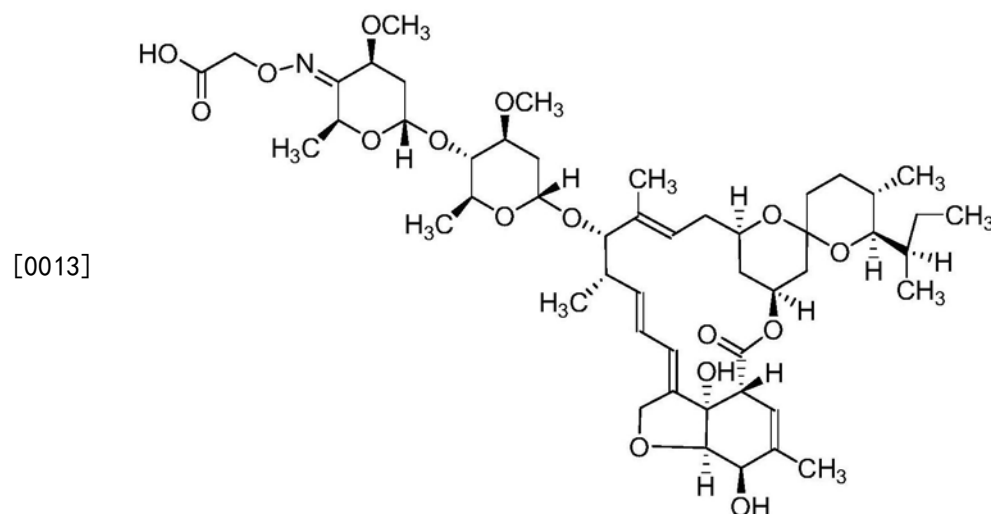
体蛋白偶联作为免疫原,获得的抗体广谱性差,且检测样品种类单一,使得该类方法的应用受到一定局限。

发明内容

[0010] 本发明为了解决上述现有技术存在的缺陷,首次在伊维菌素 C_4 -OH位置,与羧甲基羟胺半盐酸盐(CMO)反应, C_4 上的羟基取代为羧甲基羟胺基,从而得到含3个C间接臂的半抗原4"-CMO-IVM,由此获得的抗体灵敏度高、广谱性好,并基于该抗体发明了一种灵敏度高、广谱性好、操作简便快速、无毒无污染且所用仪器简单经济的检测阿维菌素类药物的酶联免疫方法及试剂盒。

[0011] 上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0012] 一种伊维菌素半抗原,其结构式如下:



[0014] 该衍生物可用于制备抗阿维菌素类药物的单克隆抗体。

[0015] 一种抗阿维菌素类药物的单克隆抗体,它是将所述的伊维菌素衍生物与载体蛋白偶联后作为免疫原,免疫动物后经细胞融合,所得到的杂交瘤细胞株,用该杂交瘤细胞株制备得到的。

[0016] 所述阿维菌素类药物是阿维菌素、伊维菌素、埃普利诺菌素和埃玛菌素。

[0017] 所述的杂交瘤细胞株,命名为IVM/6D4,保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2018143。

[0018] 所述的单克隆抗体可用于制备检测阿维菌素类药物的试剂盒。

[0019] 包含所述单克隆抗体的试剂盒,该试剂盒是检测阿维菌素类药物的酶联免疫试剂盒。

[0020] 一种非诊断目的检测动物组织中阿维菌素类药物残留的酶联免疫方法,包括以下步骤:

[0021] (1) 将权利要求1所述的伊维菌素衍生物与载体蛋白偶联得到包被原;

[0022] (2) 用保藏号为CCTCC NO:C2018143的杂交瘤细胞株IVM/6D4制备单克隆抗体;

[0023] (3) 用步骤(1)得到的包被原包被固相载体;

[0024] (4) 动物组织样品的处理和检测。

[0025] 所述动物组织包括猪肉、猪肝、猪肾和牛肉、牛奶。

[0026] 本发明的有益效果是：

[0027] (1) 本发明在制备单克隆抗体时，以4''-CMO-IVM为半抗原，将半抗原与载体蛋白偶联作为免疫原，由该免疫原制备的单克隆抗体能同时特异性识别阿维菌素、伊维菌素、埃普利诺菌素和埃玛菌素，识别交叉反应率分别达到了245%、100%、50%和37.5%；而对其它的同类药物如塞拉菌素、莫西菌素、多拉菌素没有交叉反应率。

[0028] (2) 本发明建立的酶联免疫方法和试剂盒适用于检测猪肉、猪肝、猪肾、牛肉和牛奶中阿维菌素类药物残留，检测灵敏，准确度高，精密度好，其中对阿维菌素、伊维菌素、埃普利诺菌素和埃玛菌素的 IC_{50} 值分别为1.1、2.7、7.2和5.4 $\mu g L^{-1}$ 。

[0029] (3) 本发明所涉及的检测方法简单，易操作，检测成本低，对操作者要求低，身体健康危害相对较小。

附图说明

[0030] 图1为本发明的单克隆抗体与阿维菌素标准品的间接竞争ELISA反应曲线，X轴为阿维菌素标准溶液浓度对数值，Y轴为伊维菌素标准品溶液的光密度值除以“零”孔光密度值(B/B_0)。

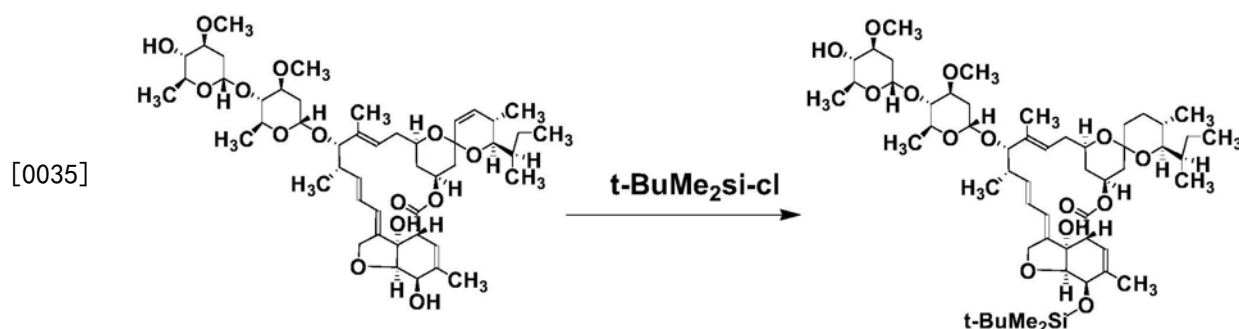
具体实施方式

[0031] 下面通过实施例对本发明作进一步说明，但不限制本发明。

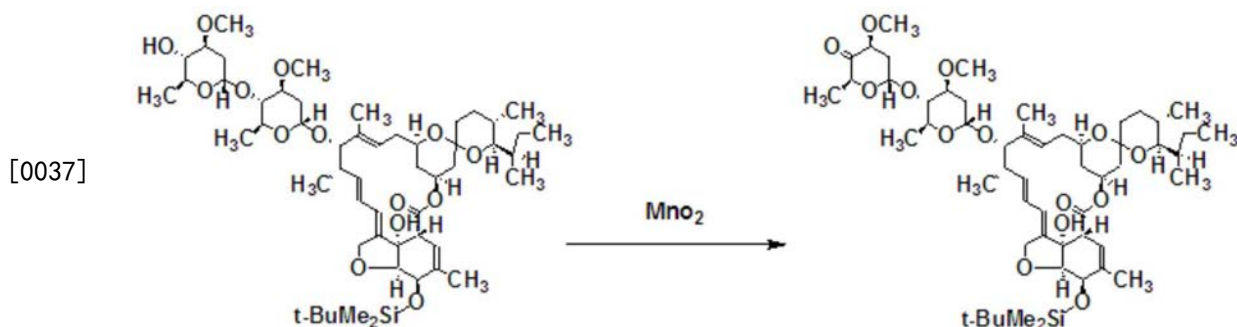
[0032] 实施例1免疫原和包被原的制备

[0033] 1.1 半抗原4''-CMO-IVM的制备

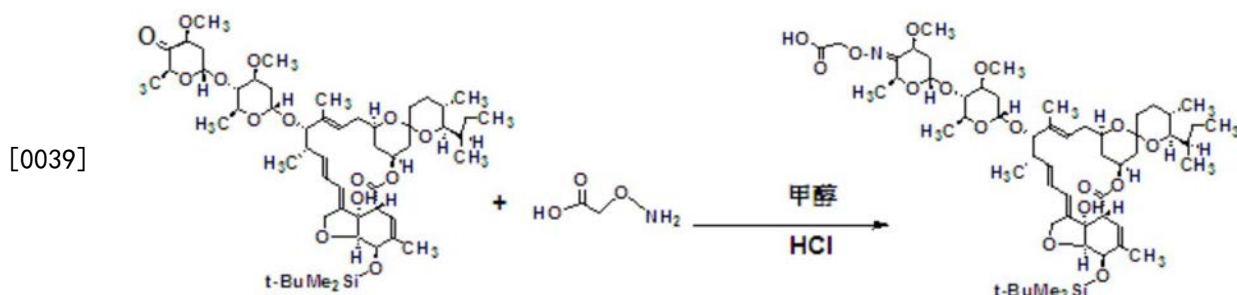
[0034] (1) 5'-O-t-BuMe₂Si-IVM的合成：将4.0g IVM置于50mL圆底烧瓶，加入20mL四氢呋喃使其溶解，再加入1.8g咪唑，混合。机械搅拌下，将10mL四氢呋喃溶解的2.0gt-BuMe₂SiCl逐滴加入，30℃反应4h。TLC监控反应，反应完全后，向反应液中加入100mL乙酸乙酯混合，混合液用水洗涤3次分离乙酸乙酯层，收集有机层，无水MgSO₄干燥，减压浓缩得微黄色粘稠物。残留物用适量乙酸乙酯溶解，硅胶柱层析分离产物(洗脱剂乙酸乙酯：正己烷=1:1, v/v)收集第二个组，分减压浓缩，真空干燥，IT-TOF质谱鉴定分子量。



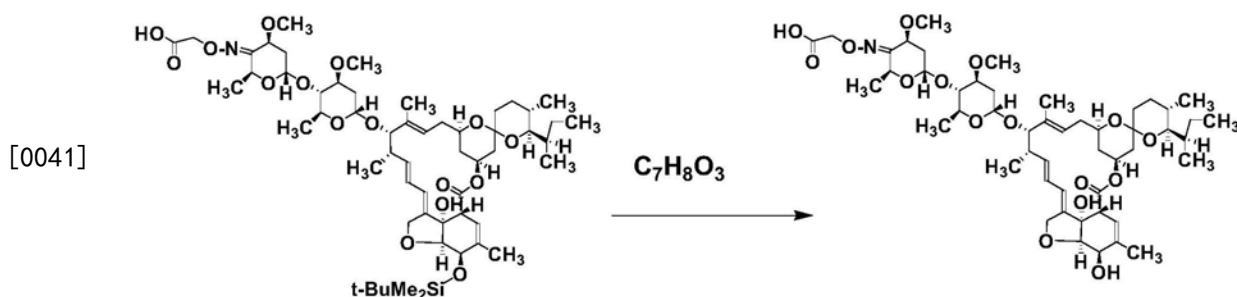
[0036] (2) 5'-O-t-BuMe₂Si-R-4''-oxime-IVM的合成：将7.5g二氧化锰(MnO₂)加入到溶于60mL二氯甲烷的5'-O-t-BuMe₂Si IVM(2.0g)中，在室温下反应5小时，过滤除去不溶物，将有机试剂蒸干，残留物用适量乙酸乙酯溶解，TLC分离纯化。展开剂(四氢呋喃：三氯甲烷=1:5, v/v)。真空干燥，IT-TOF质谱鉴定分子量。



[0038] (3) 5'-O-t-BuMe₂Si-R-4''-CMO-IVM的合成: 分别称取醋酸钠(70mg)、5'-O-t-BuMe₂Si-R-4''-oxime-IVM(1g)和羧甲基羟胺半盐酸盐(180mg)加入100mL甲醇水(9:1)溶解, 室温下搅拌过夜, 真空除去有机试剂, 加入三氯甲烷复溶, 有机层水洗3次, 弃去水相, 合并有机相, 减压浓缩得微黄色粘稠物, IT-TOF质谱鉴定分子量。



[0040] (4) 4''-CMO-IVM的合成: 将0.5g 5'-O-(t-BuMe₂Si)-R-4''-CMO-IVM置于250mL圆底烧瓶中, 加20mL甲醇溶解, 室温搅拌下, 将含1%对甲苯磺酸的甲醇溶液逐滴加入后, 继续搅拌30min, 乙酸乙酯将反应液洗涤并转入250mL分液漏斗中。2%NaHCO₃溶液洗涤, 再水洗涤3次, Mg₂SO₄干燥, 减压浓缩。残留物用适量乙酸乙酯溶解, TLC分离纯化。展开剂(乙酸乙酯: 己烷=3:2, v/v, 每2.5mL洗脱剂加入一滴冰乙酸), 收集第三个组分, 减压浓缩, 即得到半抗原。



[0042] 1.2包被原和免疫原的制备

[0043] 称取15mg半抗原4''-CMO-IVM置于棕色小瓶子中, 加入0.5mL二甲基甲酰胺(DMF)使其溶解。再依次加入3.0mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和5.2mg EDC·HCL, 混合后, 室温避光搅拌12h, 为A液。分别将10mg血蓝蛋白(KLH)、35mg鸡卵清白蛋白(OVA)溶于6mL硼酸盐缓冲溶液(含12%的DMF, pH=9.0)中, 为B液。然后将活化的A液缓慢加入到B液中, 在室温下反应1h后, 再转移到冰浴条件下反应10-12h。

[0044] 实施例2单克隆抗体的制备

[0045] 2.1动物免疫

[0046] 利用发明人所在的国家兽药残留基准实验室制备的免疫原4''-CMO-IVM-KLH免疫

雌性Balb/C小鼠(购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心)。免疫程序是取免疫原4"-CMO-IVM-KLH以蛋白含量50 μ g与弗氏佐剂等量混合后注入小鼠体内,使其产生特异性血清。

[0047] 免疫程序为:基础免疫将免疫原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠背部皮下多点注射,以后每间隔2周加强免疫一次,换用弗氏不完全佐剂乳化。最后于融合前三天(最好于免疫结束后休整1月)腹腔注射,强化免疫,抗原量加倍,不加佐剂。

[0048] 2.2细胞融合和克隆化

[0049] 细胞融合:脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按照1:10的比例进行融合。

[0050] 杂交瘤细胞的克隆化:采用不同梯度的有限稀释法进行亚克隆,直到阳性率为100%。经过4次亚克隆,最终筛选出分泌抗阿维菌素类药物单克隆抗体的杂交瘤细胞株,申请人将其命名为IVM/6D4,并于2018年6月12日送交位于湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏编号为CCTCC N0:C2018143。对该细胞系进行了染色体计数,结果显示,杂交瘤细胞的染色体数目平均值为100.25条,满足SP2/0的染色体数为62~68条,脾细胞染色体为40条,说明融合细胞的确是SP2/0细胞与脾细胞的杂交产物。将该细胞株经腹腔注射Balb/C小鼠,生产单克隆抗体。采用购自Thermo Scientific公司的鼠单克隆抗体快速ELISA同型试剂盒对单克隆抗体的亚型和轻链进行鉴定,结果为小鼠IgG₁亚型。

[0051] 实施例3IVM间接竞争ELISA检测方法的建立

[0052] 3.1试剂的配制(本实施例使用的试剂除另注明外均采用以下方法配制)

[0053] AVM标准储备液:称取5mg的AVM标准品一瓶,加入甲醇5mL溶解,涡旋2min,即为1mg/mL的母液。

[0054] 磷酸盐缓冲液(pH 7.4):准确称取NaCl 8.00g, KH₂PO₄ 0.20g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.90g, KCl 0.20g, 少量去离子水溶解,定容至1000mL。

[0055] 磷酸盐缓冲液(pH 8):准确称取KH₂PO₄ 0.41g, K₂HPO₄ 5.59g, 少量去离子水溶解,定容至1000mL。

[0056] 碳酸盐缓冲液(pH 9.6):准确称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g, 少量去离子水溶解,定容至1000mL。

[0057] 包被液:取Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, 加三蒸水至1000mL, 调节pH值至9.6;

[0058] 洗涤液:NaCl 8.0g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, Tween 20 0.5mL, 加三蒸水至1000mL, 调节pH至7.4;

[0059] 封闭液:卵清蛋白10.00g溶于1000mL磷酸盐缓冲液中;

[0060] 底物液A:3,3',5',5'-四甲基联苯二胺(TMB)160mg,四丁基硼氢化氨21mg,加入10mL二甲基乙酰胺溶解混匀;

[0061] 底物液B:柠檬酸13.70g,柠檬酸三钠10.14g,过氧化氢脲282.00mg,加三蒸水至1000mL;

[0062] 底物混合液:将A液和B液按体积比1:100混合即得,现配现用;

[0063] 终止液:2mol L⁻¹硫酸溶液。

[0064] 3.2包被原浓度和抗体工作浓度的初步确定

[0065] 根据方阵滴定法初步确定包被原浓度和抗体工作浓度。选择上述合成的4"-CMO-IVM-OVA作为包被原,用包被液稀释成4 μ g mL⁻¹、2 μ g mL⁻¹、1 μ g mL⁻¹、0.5 μ g mL⁻¹、0.25 μ g mL⁻¹

$^{-1}$ 、 $0.125\mu\text{g mL}^{-1}$ 和 $0.0625\mu\text{g mL}^{-1}$ 7个浓度,在96孔酶标板,从第1至第7行依次加入,4℃过夜;洗涤3次,拍干,加入封闭液250 μL ,37℃封闭60min;洗涤3次,拍干,在酶标板的第1列至第8列依次加入100 μL 用磷酸盐缓冲液稀释的稀释倍数为8000、16000、32000、64000、128000、256000和512000的单克隆抗体,37℃孵育30min,洗涤3次,拍干;各孔加入1:5000倍磷酸盐缓冲液稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(简称二抗,以下所指二抗均为HRP标记的羊抗鼠IgG抗体,购自武汉飞远科技有限公司)100 μL ,37℃孵育30min,洗涤5次,拍干;各孔加入100 μL 底物混合液,避光显色15min,加入50 μL 终止液,用自动酶标仪在450nm波长处测定光密度值(OD值),选择OD值接近2.0,与相邻孔OD值差异较显著的孔对应的抗原包被浓度和抗体稀释度组合,结果见表1。

[0066] 结果表明,初步确定包被原4"-CMO-IVM-OVA的包被浓度为 $0.125\mu\text{g mL}^{-1}$ 或 $0.25\mu\text{g mL}^{-1}$,抗体工作浓度为1:32000或1:64000。

[0067] 表1 IVM/6D4单克隆抗体方阵滴定

	抗体稀释度	包被浓度 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	(1: X)	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
[0068]	8000	3.402	3.293	3.242	3.501	3.215	2.703	2.256
	16000	3.045	2.968	3.059	3.147	2.952	2.435	1.683
	32000	3.349	3.259	3.286	3.129	2.904	1.957	1.303
	64000	2.962	2.89	2.718	2.497	1.946	0.936	0.833
	128000	2.033	2.072	1.768	1.690	1.161	1.028	0.597
	256000	1.306	1.300	1.148	1.088	0.814	0.597	0.472
	512000	0.632	0.705	0.701	0.460	0.348	0.370	0.206

[0069] 3.3最佳包被原浓度和抗体工作浓度的确定

[0070] 最佳包被浓度确定:以方阵滴定选择的包被浓度和抗体稀释度组合分别作抑制曲线,AVM标准品浓度设置为0、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$,其"0"孔与 IC_{50} 值见表2。由数据可知,最佳包被浓度为 $0.25\mu\text{g mL}^{-1}$,抗体稀释度初步确定为1:64000。

[0071] 表2最佳包被浓度优化

[0072]	包被原浓度	抗体稀释倍数	0孔OD值	IC_{50} 值
	0.250	64000	2.102	1.2
	0.125	32000	2.013	1.8

[0073] 最佳抗体稀释度确定:以最佳包被浓度 $0.25\mu\text{g mL}^{-1}$ 包被酶标板,将抗体以1:64000为中心浓度等差设计几个抗体稀释梯度,其0孔与 IC_{50} 值见表3。选择1:64000为最佳抗体稀释度。

[0074] 表3最佳抗体稀释度优化

[0075]	抗体稀释倍数 (1:X)	0孔OD值	IC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	60000	2.22	1.9

62000	2.107	1.9
64000	2.088	1.0
68000	1.991	1.5
70000	1.873	1.6

[0076] 有机溶剂的确定:阿维菌素类药物为脂溶性药物,不易溶于ELISA反应体系中的水溶液。在ELISA反应体系中加入适量有机试剂,可增加阿维菌素类药物的溶解度,从而可以提高方法的灵敏度。ELISA反应体系中如果有机试剂含量过高,则会干扰抗原抗体的结合。所以比较不同甲醇浓度对反应体系的影响很有必要。本研究选择5%、10%、20%和30%的甲醇-PBS溶液进行比较。

[0077] 表4不同甲醇浓度的评价

[0078]	有机试剂	浓度	OD 值	IC ₅₀ (μg L ⁻¹)
	甲醇	5%	1.87	1.7
		10%	1.91	1.8
		20%	2.09	1.2
		30%	2.27	1.5

[0079] 从表4可以看出,随着甲醇浓度的升高,IC₅₀逐渐降低,零孔OD值逐渐升高。由此可见抗体对甲醇比较敏感,所以选择20%的甲醇-PBS缓冲溶液作为标准品稀释液。

[0080] 3.4标准曲线的建立

[0081] 将1mg mL⁻¹的AVM母液用甲醇稀释到100ng L⁻¹,最后一步用20%的甲醇-PBS将其依次稀释至0、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2μg L⁻¹ 6个浓度,进行ic-ELISA。如图1所示,标准曲线的回归方程为方程: $y = -0.5437x + 0.7342$, $R^2 = 0.9926$, $IC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \mu g L^{-1}$ (n=5), 线性范围0.2-3.2μg L⁻¹。

[0082] 3.5交叉反应试验

[0083] 分别将阿维菌素类其他药物伊维菌素、埃玛菌素和埃普利诺菌素倍比稀释成浓度梯度进行ic-ELISA并建立标准曲线,计算各个药物的IC₅₀,通过公式1计算交叉反应率,如表5所示。

[0084] 交叉反应率=50%抑制(IVM)/50%抑制(竞争物)×100% (公式1)

[0085] 表5单克隆抗体对阿维菌素类药物的交叉反应率

[0086]	药物	IC ₅₀ (μg L ⁻¹)	交叉反应率 (%)
	IVM	2.7	100
	AVM	1.1	245
	EMA	5.4	50
	EPR	7.2	37.5
	SEL	>500	<0.1
	DOR	>500	<0.1
	MOX	>500	<0.1

[0087] 结果表明,单克隆抗体对阿维菌素类、伊维菌素、埃普利诺菌素和埃玛菌素有交叉反应,能同时检测这4种阿维菌素类药物。

[0088] 实施例4ELISA试剂盒的组装

[0089] 4.1本发明ELISA试剂盒由下述部分组成:

[0090] 1) 包被有包被原4"-CMO-IVM-OVA的固相载体(酶标板);

[0091] 2) AVM标准溶液6瓶,浓度分别为0、0.2、0.4、0.8、1.6、和 $3.2\mu\text{g L}^{-1}$;

[0092] 3) 杂交瘤细胞IVM/6D4分泌的单克隆抗体;

[0093] 4) 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠IgG抗体工作液;

[0094] 5) 浓缩磷酸盐缓冲液:NaCl 80.0g, KH_2PO_4 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.0g, KCl 2.0g, 加双蒸水至1000mL;

[0095] 6) 浓缩洗涤液:NaCl 80.0g, KH_2PO_4 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.0g, KCl 2.0g, Tween 20 5mL, 加三蒸水至1000mL;

[0096] 7) 底物液A:3,3',5',5'-四甲基联苯二胺(TMB) 160mg, 四丁基硼氢化氨21mg, 加入10mL二甲基乙酰胺溶解混匀;

[0097] 8) 底物液B:柠檬酸13.70g, 柠檬酸三钠10.14g, 过氧化氢脲282.00mg, 加三蒸水至1000mL;

[0098] 9) 终止液: 2mol L^{-1} 硫酸溶液。

[0099] 4.2酶标板的制备

[0100] 用包被液将4"-CMO-AVM-OVA稀释成 $1\mu\text{g mL}^{-1}$, 每孔加入100 μL , 37℃孵育2h, 倾去包被液, 每孔加入250 μL 洗涤液洗涤3次, 拍干, 然后每孔加入封闭液250 μL , 37℃孵育120min, 倾去孔内液体, 洗涤液洗涤3次, 拍干, 用锡箔纸真空密封保存。

[0101] 实施例5酶联免疫试剂盒的测定程序

[0102] 5.1试剂的配制

[0103] 1) 样品稀释液:将试剂盒中提供的浓缩磷酸盐缓冲液用三蒸水稀释10倍后使用。

[0104] 2) 洗涤液:将试剂盒中提供的洗涤液用三蒸水稀释10倍后使用。

[0105] 3) 底物混合液:根据每次所需用量, 将配制的底物液A和底物液B按体积1:100混匀, 现配现用。

[0106] 5.2样品前处理

[0107] 牛奶样品的前处理:取牛乳10mL于50mL离心管中, 5000r/min离心10min, 去除上层脂肪层, 取中间层乳浊液用20%甲醇-PBS稀释10倍后用于ELISA检测。

[0108] 动物可食性组织的样品前处理:将组织(猪肉、猪肾、猪肝、牛肉) 匀浆后, 取 $2.00 \pm 0.02\text{g}$ 于50mL离心管中, 加入20mL 20%甲醇-PBS, 涡旋震荡5min, 5000rpm离心10min, 取上清液用于ELISA检测。

[0109] 5.3测定步骤

[0110] 1) 加样:向酶标板微孔中加入伊维菌素列浓度标准溶液或样品提取液50 μL , 然后加入单克隆抗体工作液50 μL , 置于湿盒中, 37℃恒温孵育30min;

[0111] 2) 洗涤:倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液250 μL 洗涤3次并拍干;

[0112] 3) 加辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠IgG抗体工作液:每孔中加入辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠IgG抗体工作液100 μL , 置于湿盒中, 37℃恒温孵育30min;

[0113] 4) 洗涤:倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液250 μL , 洗涤3次并拍干;

[0114] 5) 加底物:每孔中加入底物混合液100 μL , 置于湿盒中, 37℃恒温孵育15min;

[0115] 6) 加终止液:每孔中加入终止液50μL;

[0116] 7) 测定:用酶标仪在450nm处测定每孔的光密度值(OD值)。

[0117] 5.4结果判断

[0118] 标准曲线:以所测定的标准品OD值除以“零”孔OD值(B/B_0)为纵坐标,AVM浓度的对数值为横坐标作标准曲线,并进行线性回归,给出回归方程。

[0119] 动物可食性组织和牛奶中AVM浓度计算:

[0120] 计算样品的抑制率(所获得的样品的OD值除以“零”孔OD值),代入标准曲线的回归方程中,按照公式2计算出AVM浓度。

[0121] $C_{\text{竞争物}} = (C_{\text{AVM}} / \text{交叉反应率}) \times \text{稀释倍数}$ (公式2)

[0122] 实施例6本发明ELISA方法的灵敏度、精密度、准确度试验

[0123] 6.1本发明试剂盒的灵敏度试验

[0124] 将20份 $0\mu\text{g L}^{-1}$ 标准溶液的检测OD值代入标准曲线,计算20份空白测定浓度,求出平均值和标准差,根据公式 $Z = C + 3SD$ 计算Z值(见表6)。该ELISA方法的灵敏度为 $0.163\mu\text{g L}^{-1}$ 。最低检测限(LOD)通过以下步骤决定:测定20份空白组织样品的OD值,根据标准曲线的回归方程计算出相应的IVM浓度,然后计算出IVM浓度的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),根据公式 $\text{LOD} = \bar{X} + 3SD$ 计算出样品中的LOD;定量限(LOQ) = $\bar{X} + 10SD$ 。阿维菌素类药物在不同样品中的LOD和LOQ详见表7。

[0125] 表6间接竞争ELISA方法的灵敏度

	20 份 $0\mu\text{g L}^{-1}$ 标准溶液测定值				平均值	标准差	LOD
	$(\mu\text{g L}^{-1})$				$(\mu\text{g L}^{-1})$	(SD)	$(\mu\text{g L}^{-1})$
[0126]	0.084	0.092	0.112	0.098	0.114	0.016	0.163
	0.123	0.101	0.117	0.108			
	0.101	0.139	0.104	0.128			
	0.11	0.131	0.116	0.153			
	0.105	0.134	0.119	0.107			

[0127] 表7不同样品中阿维菌素类药物的检测限和定量限

[0128]

药物	基质	20 份空白样品的平均 测定值($\mu\text{g kg}^{-1}$)	标准差 SD	LOD($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AVM	猪肉	0.32	0.04	0.43	0.68
	猪肝	0.30	0.04	0.41	0.67
	猪肾	0.15	0.03	0.25	0.48
	牛肉	0.23	0.04	0.36	0.67
	牛奶	0.33	0.03	0.42	0.62
IVM	猪肉	0.69	0.09	0.94	1.55
	猪肝	0.63	0.09	0.90	1.52
	猪肾	0.190	0.05	0.35	0.72
	牛肉	0.47	0.10	0.78	1.48
	牛奶	0.71	0.07	0.92	1.39
EMA	猪肉	1.44	0.18	1.97	3.21
	猪肝	1.33	0.18	1.88	3.15
	猪肾	0.64	0.15	1.10	2.16
	牛肉	1.01	0.21	1.63	3.09
	牛奶	1.50	0.14	1.92	2.89
EPR	猪肉	1.75	0.21	2.37	3.81
	猪肝	1.62	0.21	2.26	3.74
	猪肾	0.80	0.18	1.35	2.61
	牛肉	1.23	0.25	1.97	3.70
	牛奶	1.82	0.16	2.30	3.44

[0129] 6.2本发明试剂盒的精密度试验

[0130] 将IVM标准品稀释成0、0.2、0.4、0.8、1.6和3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 6个浓度,每浓度5个重复,按照间接竞争ELISA方法重复测定5次,应用标准曲线的回归方程计算出各浓度IVM标准溶液的测定值,计算板内和板间变异系数,结果见表8。

[0131] 表8 IVM标准曲线的板内与板间变异系数

IVM ($\mu\text{g/L}$)	测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}, \mu\text{g L}^{-1}$)	板内变异系数 (CV %, n=5)	平均测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}, \mu\text{g L}^{-1}$)	板间变异系数 (CV %, n=25)
0.2	0.213 $\pm$ 0.007	4.4	0.196 $\pm$ 0.013	6.8
	0.181 $\pm$ 0.091	3.2		
	0.207 $\pm$ 0.013	2.8		
	0.197 $\pm$ 0.010	6.4		
	0.176 $\pm$ 0.001	5.2		
0.4	0.371 $\pm$ 0.01	2.7	0.378 $\pm$ 0.020	5.7
	0.354 $\pm$ 0.01	2.6		
	0.415 $\pm$ 0.02	4.9		
	0.362 $\pm$ 0.01	2.6		
	0.386 $\pm$ 0.01	2.6		
0.8	0.746 $\pm$ 0.034	4.0	0.753 $\pm$ 0.035	4.6
	0.757 $\pm$ 0.021	2.3		
	0.741 $\pm$ 0.046	3.2		
	0.708 $\pm$ 0.059	2.7		
	0.814 $\pm$ 0.073	3.2		
1.6	1.657 $\pm$ 0.022	1.3	1.554 $\pm$ 0.074	4.7
	1.577 $\pm$ 0.064	2.6		
	1.590 $\pm$ 0.032	3.1		
	1.588 $\pm$ 0.027	1.9		
	1.411 $\pm$ 0.081	2.0		
3.2	3.280 $\pm$ 0.079	2.5	3.142 $\pm$ 0.112	3.6
	3.122 $\pm$ 0.182	1.3		
	3.075 $\pm$ 0.108	3.3		
	3.254 $\pm$ 0.121	1.3		
	2.980 $\pm$ 0.116	1.2		

[0133] 6.3本发明试剂盒准确度、重复性试验

[0134] 本研究分别将三个浓度的阿维菌素类4种标准品添加到5种样品中,其添加回收率在78.1%-110.5%之间,批内与批间变异系数<15%;具体测定结果见表9-13。

[0135] 回收率 (%) = $\frac{\text{实测浓度}}{\text{添加浓度}} \times 100\%$ (公式 3)

[0136] 表9猪肉中阿维菌素类药物的添加回收率

[0137]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	回收率(%) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%)($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批间变异系数 (CV%, n=15)
AVM	1	93.6 $\pm$ 3.9	3.5	96.4 $\pm$ 3.8	5.1
		95.1 $\pm$ 4.1	6.5		
		98.3 $\pm$ 5.7	4.3		
	2	86.1 $\pm$ 3.5	5.1	91.9 $\pm$ 7.9	8.5
		100.0 $\pm$ 6.1	5.9		
		87.9 $\pm$ 6.6	7.7		
	4	80.1 $\pm$ 5.8	7.1	76.2 $\pm$ 6.5	7.1
		78.8 $\pm$ 6.1	5.8		
		75.6 $\pm$ 4.8	7.4		
IVM	2	92.2 $\pm$ 6.5	7.6	98.0 $\pm$ 5.9	7.8
		95.7 $\pm$ 5.1	6.2		
		102.5 $\pm$ 4.2	6.7		
	4	104.2 $\pm$ 4.6	4.4	100.8 $\pm$ 6.2	6.1
		102.0 $\pm$ 4.3	3.7		
		99.8 $\pm$ 8.0	8.0		
	8	88.3 $\pm$ 5.8	6.6	88.6 $\pm$ 8.1	9.1
		87.1 $\pm$ 8.5	9.8		
		90.4 $\pm$ 9.2	10.2		
EMA	4	90.9 $\pm$ 7.9	8.7	89.7 $\pm$ 6.8	7.5
		90.6 $\pm$ 5.9	6.6		
		87.6 $\pm$ 5.7	6.5		
	8	97.6 $\pm$ 9.5	9.8	95.5 $\pm$ 6.6	6.9
		95.3 $\pm$ 3.9	4.1		
		93.5 $\pm$ 4.2	4.5		
	16	89.4 $\pm$ 3.9	4.3	83.0 $\pm$ 9.0	10.9
		83.0 $\pm$ 11.0	13.2		

[0138]

		76.6±5.1	6.7		
EPR	4	99.2±4.6	4.6	90.7±9.4	10.4
		79.6±5.6	7.0		
		93.2±3.5	3.7		
	8	82.4±7.2	8.7	87.2±7.7	8.8
		90.4±6.0	6.6		
		88.6±7.4	8.3		
	16	90.8±5.7	6.3	94.0±7.4	7.8
		91.5±6.7	7.4		
		99.7±5.9	6.0		

[0139] 表10猪肝中阿维菌素类药物的添加回收率

[0140]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	回收率(%) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%)($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批间变异系数 (CV%, n=15)
AVM	1	103.1±6.2	6.0	99.3±7.5	7.6
		102.1±5.3	5.1		
		92.9±6.3	6.8		
	2	100.2±6.6	6.6	98.6±5.7	5.8
		96.6±6.4	6.7		
		99.0±2.4	2.5		
	4	102.4±5.0	4.9	100.8±6.7	6.7
		103.8±7.5	7.2		
		96.1±4.6	4.7		
IVM	2	99.2±5.5	5.6	90.2±7.8	8.7
		86.3±2.8	5.8		
		85.1±5.0	5.8		
	4	98.2±6.1	6.2	97.9±5.4	5.5
		97.9±4.4	4.5		
		97.6±5.4	5.6		
	8	92.4±7.4	8.0	99.2±7.6	7.7
		104.8±5.1	4.9		
		100.4±3.8	3.8		
EMA	4	99.5±5.2	5.2	96.0±5.8	6.0

[0141]

		97.8±5.0	5.1		
		90.7±2.0	2.3		
	8	87.9±5.1	5.8	94.56±6.83	7.2
		96.2±4.4	4.5		
		99.5±4.8	4.8		
	16	97.8±6.1	6.2	100.7±5.6	5.6
		101.8±5.3	5.2		
		98.4±5.5	5.6		
	EPR	99.2±7.5	7.5	96.0±6.5	6.7
		93.7±4.1	4.4		
		95.1±6.1	6.4		
		103.4±6.5	6.3	103.5±6.2	6.0
		100.8±5.5	5.5		
		106.3±5.4	5.1		
		104.4±6.0	5.8	106.4±5.9	5.5
		104.4±5.4	5.2		
		110.4±3.8	3.5		

[0142] 11猪肾中阿维菌素类药物的添加回收率

[0143]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	回收率(%) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%)($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批间变异系数 (CV%, n=15)
AVM	0.5	100.8±2.9	2.8	100.5±5.5	5.5
		102.3±4.1	4.0		
		98.3±7.6	7.7		
	1	84.2±6.9	8.2	88.5±7.9	8.9
		94.8±6.0	6.4		
		86.5±6.4	7.3		
	2	89.0±1.8	2.1	88.7±9.4	10.2
		80.9±7.4	9.1		
		96.2±8.5	8.8		
IVM	0.8	109.6±4.0	3.7	103.7±5.8	5.6
		101.6±3.4	3.3		

[0144]

EMA	1.6	99.9±4.4	4.4	95.6±6.7	7.0
		94.1±8.8	9.3		
		98.8±4.2	4.3		
		94.0±5.1	5.4		
	3.2	91.1±7.6	8.4	90.0±6.3	6.9
		90.0±2.2	2.5		
		89.0±7.1	8.1		
	2	105.5±4.4	4.2	106.2±6.5	6.1
		110.0±4.6	4.2		
		103.0±7.8	7.6		
EPR	4	96.6±5.0	5.2	98.7±6.6	6.7
		100.2±5.3	5.3		
		99.5±8.5	8.5		
	8	88.2±8.5	9.7	91.5±7.7	8.4
		89.7±6.2	6.9		
		96.6±5.2	5.4		
	2.5	100.7±6.9	6.8	98.8±6.3	6.4
		97.7±3.5	3.6		
		98.1±7.4	7.6		
	5	85.1±6.7	7.9	86.6±8.3	9.6
		83.0±10.2	12.3		
		91.9±3.9	4.3		
EMA	10	76.6±2.8	3.6	83.5±7.5	9.0
		87.9±7.2	8.2		
		86.0±6.1	7.0		

[0145] 表12牛肉中阿维菌素类药物的添加回收率

[0146]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	回收率(%) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%)($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批间变异系数 (CV%, n=15)
AVM	1	104.2±6.1	5.8	102.5±5.9	5.8
		102.2±5.9	5.8		

[0147]

IVM	2	101.0±5.3	5.3	89.5±9.2	10.3
		84.2±7.6	9.0		
		90.1±8.8	9.8		
		94.3±8.2	8.7		
	4	92.1±5.4	5.8	89.2±9.6	10.8
		77.1±1.8	2.3		
		98.5±2.0	2.1		
	1.5	102.0±6.6	6.4	103.7±6.2	6.0
		104.2±3.1	3.0		
		105.0±7.7	7.3		
EMA	3	95.0±7.6	8.0	90.0±8.8	9.8
		83.2±8.5	10.2		
		91.3±5.8	6.4		
	6	90.3±6.1	6.8	86.1±6.7	7.8
		84.7±5.5	6.5		
		83.3±6.3	7.6		
	4	96.2±5.1	5.3	100.4±7.7	7.6
		100.4±8.4	8.4		
		103.9±7.0	6.8		
	8	96.0±6.2	6.5	99.1±7.5	7.5
		96.9±5.9	6.1		
		104.5±7.0	6.7		
	16	85.5±7.6	8.8	89.7±7.7	8.5
		89.1±5.4	6.1		
		94.5±7.0	7.4		
EPR	4	113.4±2.4	2.1	110.5±4.9	4.4
		109.6±4.7	4.3		
		108.5±5.4	5.0		
	8	93.0±7.9	8.5	93.0±7.8	8.4
		95.9±6.2	6.4		
		90.1±8.2	9.1		
	16	90.6±6.8	7.5	91.2±7.0	7.7
		91.4±7.8	8.7		

[0148]

		91.5±6.1	6.7		
--	--	----------	-----	--	--

[0149] 表13牛奶中阿维菌素类药物的添加回收率

[0150]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	回收率(%) ($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%)($\bar{X}\pm\text{SD}$)	批间变异系数 (CV%, n=15)
AVM	0.5	98.4 $\pm$ 7.4	7.5	107.6 $\pm$ 7.4	6.9
		91.1 $\pm$ 4.7	4.8		
		91.3 $\pm$ 1.5	1.3		
	1	89.2 $\pm$ 8.7	9.8	87.5 $\pm$ 12.1	13.8
		89.9 $\pm$ 9.9	7.1		
		71.0 $\pm$ 2.4	11.0		
	2	88.1 $\pm$ 6.5	7.4	85.3 $\pm$ 3.5	4.1
		86.8 $\pm$ 8.2	9.4		
		81.1 $\pm$ 2.4	2.0		
IVM	1	92.2 $\pm$ 4.1	4.4	95.2 $\pm$ 10.4	10.9
		99.4 $\pm$ 8.4	8.4		
		89.7 $\pm$ 8.4	9.3		
	2	81.2 $\pm$ 2.7	3.3	88.5 $\pm$ 6.8	7.6
		92.7 $\pm$ 4.3	4.7		
		91.5 $\pm$ 5.6	6.2		
	4	87.6 $\pm$ 6.9	7.9	94.0 $\pm$ 8.1	8.6
		99.3 $\pm$ 5.3	5.4		
		95.2 $\pm$ 6.9	7.3		
EMA	2.5	93.6 $\pm$ 7.2	7.7	94.0 $\pm$ 8.7	9.2
		96.1 $\pm$ 8.7	9.0		
		89.7 $\pm$ 10.1	10.3		
	5	84.0 $\pm$ 6.6	7.8	86.6 $\pm$ 6.9	7.9
		85.9 $\pm$ 5.9	6.9		
		89.8 $\pm$ 6.7	7.5		
	10	100.7 $\pm$ 8.2	8.2	97.4 $\pm$ 7.8	8.1
		100.6 $\pm$ 3.3	3.3		

[0151]

		89.8±6.2	6.9		
EPR	4	102.3±4.9	4.7	93.3±9.3	10.0
		92.2±3.8	4.1		
		86.5±4.9	5.2		
	8	98.0±7.7	7.9	101.2±6.5	6.4
		101.3±4.8	4.7		
		104.3±4.9	4.7		
	16	97.8±5.5	5.6	96.8±9.0	9.4
		105.2±4.9	4.6		
		87.4±5.6	6.4		

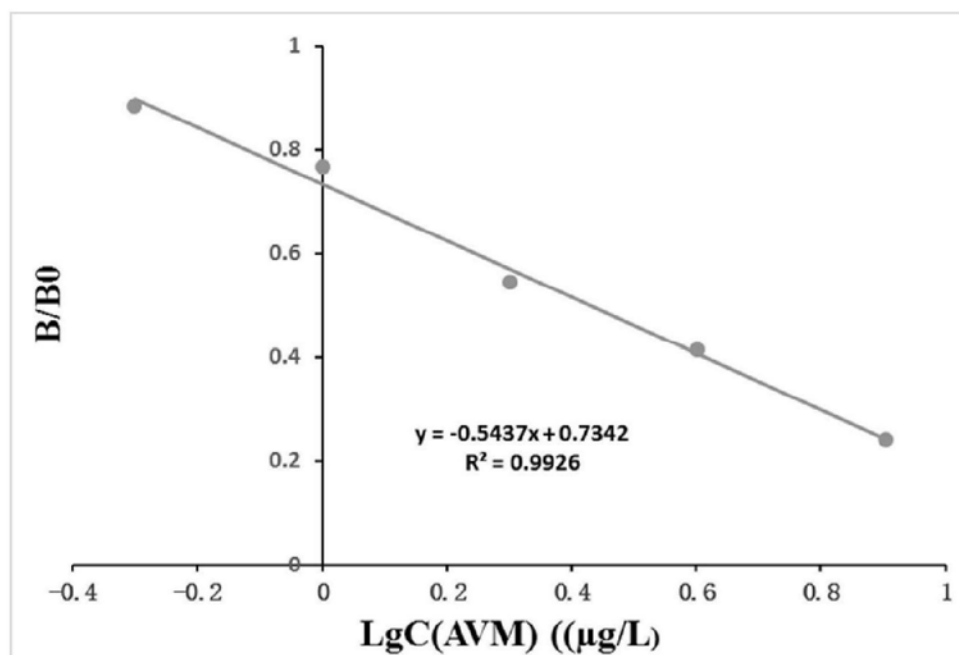


图1