



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106680485 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201611046359.8

(22)申请日 2016.11.22

(71)申请人 云南辉瑞贝尔生物科技有限公司

地址 653100 云南省玉溪市高新区抚仙路
86号科技创业园孵化楼(C座)二楼

(72)发明人 杨绍元 杨少琼

(74)专利代理机构 江苏爱信律师事务所 32241

代理人 唐小红

(51)Int.Cl.

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

大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒及其
应用

(57)摘要

本发明提供了一种大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒,包括酶标板、酶标记的抗抗体、大观霉素标准品、底物显色液、终止液、洗涤液、大观霉素抗体,所述酶标板上包被有大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物。本发明还公开了一种用上述酶联免疫检测试剂盒检测牛奶中大观霉素的方法,首先处理待测牛奶样品,然后用酶联免疫检测试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫检测试剂盒,结构简单、使用方便、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品定性、定量的检测。

1. 一种大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒,包括酶标板、酶标记抗抗体、大观霉素标准品、底物显色液、终止液、洗涤液、大观霉素抗体,所述酶标板上包被有大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物。

2. 如权利要求1所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物由大观霉素半抗原与卵清蛋白偶联得到。

3. 如权利要求1或2所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述大观霉素半抗原由大观霉素与羧甲基羟胺反应得到。

4. 如权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述大观霉素抗体为大观霉素单克隆抗体或大观霉素多克隆抗体。

5. 如权利要求4所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述大观霉素抗体由大观霉素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白,所述大观霉素半抗原为大观霉素-羧甲基羟胺。

6. 如权利要求1或2所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述大观霉素标准品溶液的浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.05\mu\text{g/L}$, $0.15\mu\text{g/L}$, $0.45\mu\text{g/L}$, $1.5\mu\text{g/L}$, $4.5\mu\text{g/L}$ 。

7. 如权利要求1或2所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶,所述显色底物液为显色底物A液和显色底物B液,所述显色底物A液为过氧化脲,显色底物B液为四甲基联苯胺,终止液为 2mol/L 盐酸。

8. 如权利要求1或2所述的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于所述洗涤液为含有 $1.0\text{--}1.5\%$ 吐温20和 0.5% Proclin300防腐剂的Tris缓冲液,所述百分比、千分比均为体积比。

9. 一种用权利要求1-8任一项所述的酶联免疫检测试剂盒检测牛奶样品中大观霉素残留的方法,主要包括以下步骤:首先处理待测牛奶样品;然后用权利要求1-8任一项所述的酶联免疫检测试剂盒进行检测;最后分析检测结果。

大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒,其特别适于牛奶中大观霉素药物残留的检测。

技术背景

[0002] 大观霉素为链霉菌所产生的一种氨基环醇类抗生素,是一新型特效专治淋病的抗生素。大观霉素能阻止细菌细胞壁蛋白质的合成并能阻碍已合成蛋白质的释放,被广泛应用于兽医学领域。由于大观霉素具有强大的抑菌杀菌作用和能促进动物生长等作用,一些厂家在饲料中非法添加,同时养殖用户又不遵守休药期,导致牛奶中大观霉素的残留超标的现象越来越多,对人民的健康造成了极其严重的影响。鉴于此种状况,各国政府和国际组织都开始对兽药残留实施愈来愈严格的监控措施。大观霉素传统的检测方法有微生物检定法,薄层色谱法,高效液相色谱法,气相色谱法,超高效液相色谱-串联质谱技术等,这些方法用于牛奶中的大观霉素检测,前处理繁琐序复杂,测定周期长,甚至需要昂贵的仪器,成本较高,不能满足牛奶样品中大观霉素的实时快速检测。

发明内容

[0003] 针对上述现有技术的不足,本发明提供了一种大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒,其包括酶标板、酶标记抗抗体、大观霉素标准品、底物显色液、终止液、洗涤液、大观霉素抗体,所述酶标板上包被有大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物。

[0004] 所述大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物由大观霉素半抗原与卵清蛋白偶联得到。

[0005] 所述大观霉素半抗原由大观霉素与羧甲基羟胺反应得到。

[0006] 所述大观霉素抗体为大观霉素单克隆抗体或大观霉素多克隆抗体。

[0007] 所述大观霉素抗体由大观霉素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白或血蓝蛋白,所述大观霉素半抗原为大观霉素-羧甲基羟胺。

[0008] 所述大观霉素标准品溶液的浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.05\mu\text{g/L}$, $0.15\mu\text{g/L}$, $0.45\mu\text{g/L}$, $1.5\mu\text{g/L}$, $4.5\mu\text{g/L}$ 。

[0009] 所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶,所述显色底物液为显色底物A液和显色底物B液,所述显色底物A液为过氧化脲,显色底物B液为四甲基联苯胺,终止液为 2mol/L 盐酸。

[0010] 所述洗涤液为含有 $1.0\text{--}1.5\%$ 吐温20和 0.5% Proclin300防腐剂的Tris缓冲液,所述百分比、千分比均为体积比。

[0011] 本发明的另一个目的还提供了一种应用上述大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒检测牛奶样品中大观霉素残留的方法,其主要包括:首先处理待测牛奶样品;然后用上述大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒进行检测;最后分析检测结果。

[0012] 本发明大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒主要采用间接竞争ELISA方法定性或

定量检测样品中大观霉素药物的残留量;对牛奶样品的前处理要求不高,样品前处理过程比较简单,能同时快速检测大批量牛奶样品。本发明的酶联免疫检测试剂盒,本身结构简单、使用方便、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品定性、定量的检测。本发明的酶联免疫检测试剂盒可以在大观霉素残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0013] 图1:大观霉素半抗原合成技术路线;

[0014] 图2:大观霉素标准品抑制曲线。

具体实施方式

[0015] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0016] 实施例1大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒

[0017] 大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒,其包括:

[0018] 1) 96孔或48孔酶标板,其上包被大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物;

[0019] 2) 酶标记抗抗体,为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0020] 3) 大观霉素标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μ g/L,0.05 μ g/L,0.15 μ g/L,0.45 μ g/L,1.5 μ g/L,4.5 μ g/L;

[0021] 4) 底物显色液由底物显色A液和底物显色B液组成,底物显色液A液为过氧化脲,底物显色液B液四甲基联苯胺;

[0022] 5) 终止液为2mol/L盐酸;

[0023] 6) 洗涤液为含有1.0%~1.5%吐温20(百分比为体积比)和0.5%Proclin300的Tris缓冲液(千分比为体积比);

[0024] 7) 大观霉素抗体,为大观霉素单克隆抗体。

[0025] 实施例2酶联免疫检测试剂盒主要成分的制备

[0026] 1、免疫原和包被原合成

[0027] 免疫原合成包括两步,第一步将大观霉素与羧甲基羟胺反应合成大观霉素半抗原,第二步将大观霉素半抗原与牛血清白蛋白偶联得到免疫原。

[0028] 1) 大观霉素半抗原的合成,路线图见图1

[0029] 称取100mg大观霉素和140mg羧甲基羟胺溶于3mL吡啶中,室温搅拌24小时,吹干,加水10mL,用0.2mol/L NaOH调至pH 9左右,用CH₂Cl₂提取3次,每次20mL,弃CH₂Cl₂,水层用HCl调至pH 3,再用CH₂Cl₂提取3次,每次20mL,用无水硫酸钠脱水,过滤,将滤液在45℃下吹干,60℃烘干3小时,得白色晶体,即为大观霉素半抗原。

[0030] 2) 免疫原合成

[0031] 称取50mg大观霉素半抗原,加2mL二氧六环,30 μ L三正丁胺,30 μ L氯甲酸异丁酯,在10℃搅拌1h,将反应液倒入牛血清白蛋白(160mg牛血清白蛋白溶于5mL H₂O和5mL二氧六环),用NaOH调至pH 8.5,再在10℃下搅拌6h。以流动的蒸馏水在4℃下透析24h,透析液经冷冻干燥,得到免疫原。

[0032] 3) 包被原合成

[0033] 用大观霉素半抗原与卵清蛋白偶联得到,方法同免疫原合成。

[0034] 2、单克隆抗体的制备

[0035] 1) 动物免疫

[0036] 挑选8周龄的Balb/c小鼠,用含有氟氏完全佐剂的免疫原及大观霉素半抗原-牛血清白蛋白偶联物进行皮下注射,免疫剂量为150 μ g/只,每2周加强免疫一次,第4次加强免疫后一周,得到效价为1:1000的抗体血清。

[0037] 2) 骨髓瘤细胞和脾细胞的制备

[0038] SP2/0骨髓瘤细胞采用常规的RPM1-1640培养液培养,使细胞处于对数生长期,制成SP2/0骨髓瘤细胞细胞悬液;取经免疫的小鼠脾脏,破碎,过400目的不锈钢纱布过滤制成脾细胞悬液,计数后备用。

[0039] 3) 细胞融合和单克隆化

[0040] 将 1×10^8 SP2/0骨髓瘤细胞和 5×10^8 脾细胞在PEG作用下进行融合,对于分泌抗体培养孔,采用间接竞争ELISA测定以筛选阳性孔。采用有限稀释法对阳性孔进行单克隆化,直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。该抗体特异性是针对大观霉素的,灵敏度能达到0.05 μ g/L。

[0041] 4) 细胞冻存和复苏

[0042] 将大观霉素的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 $(1-2) \times 10^6$ 个/mL的细胞悬液,每个冻存管1mL,采用逐渐降温法保存在液氮中。复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融,然后移至冰上5min,再转入锥形瓶中,加入10mL温热的完全培养液中,移入CO₂培养箱中培养。

[0043] 5) 单克隆抗体的大量生产与纯化

[0044] 取健康的Balb/c雌鼠,腹腔注入降植烷0.5mL/只,7天后腹腔注射大观霉素的单克隆杂交瘤细胞株 3×10^5 个/只,隔天观察,10-20天后采集腹水。先用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水初步纯化,后采用装有Protein-A柱子的AKTA purifier100纯化仪进行纯化,纯化后抗体-20 $^{\circ}$ C保存。

[0045] 3、羊抗鼠抗抗体制备:是以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0046] 4、酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

[0047] 将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用马来酰亚胺基类活泼酯法进行偶联。

[0048] 1) 采用4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)活化辣根过氧化物酶,取100 μ L约10mg/mL的HRP溶液,按SMCC:ALP摩尔投料比(3~5):1加入SMCC,25 $^{\circ}$ C反应30min后,用G25脱盐柱纯化得到溶液I。

[0049] 2) 采用Traut's试剂(2-亚氨基硫烷盐酸盐)活化羊抗鼠抗抗体,与带有氨基的物质通过开环反应引入末端巯基。取100 μ L约10mg/mL的羊抗鼠抗抗体溶液,按2-亚氨基硫烷盐酸盐:羊抗鼠抗抗体为(5~10):1加入2-亚氨基硫烷盐酸盐,25 $^{\circ}$ C反应30min后,用G25脱盐柱纯化得到溶液II。

[0050] 3) 将上述溶液I和II混合,将25 $^{\circ}$ C反应1h,加10 μ L 1mol/L的2-巯基乙醇,25 $^{\circ}$ C反应30min后,用Superdex 200在AKTA purifier 100上进行分离,洗脱缓冲液为磷酸盐缓冲液,

流速为1mL/min收集洗脱液。

[0051] 传统的过碘酸钠氧化法偶联,辣根过氧化物酶在氧化的作用下会产生许多与抗体结合的位点,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合体,本发明方法为抗体与酶的定向偶联,未降低辣根过氧化物酶的活性且多聚体较少,偶联物的批间差较小,实时稳定性较好,延长了产品的货架期,保证了产品的质量。该方法不仅可用于抗体与辣根过氧化物酶,还可用于其他一般性抗体的偶联,制备酶标抗体,用于直接ELISA。

[0052] 5、酶标板的制备

[0053] 用0.05mol/L, pH8.0磷酸盐包被液或0.05mol/L pH9.6碳酸盐包被液将大观霉素半抗原-卵清蛋白稀释成0.05~0.15μg/ml,每孔加入100μL,37℃温育2h或4℃过夜,用洗涤液洗涤2次,拍干,然后再每孔中加入200μL的3%脱脂奶粉进行封闭,37℃温育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0054] 实施例3牛奶样品中大观霉素的检测

[0055] 1、酶联免疫检测试剂盒检测原理:

[0056] 向酶标板微孔内加入样品溶液或标准品溶液后,再加入酶标记抗体,大观霉素抗体工作液,样品中残留的大观霉素药物与酶标板上包被的大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物竞争大观霉素抗体,酶标记抗体进行放大作用,用底物显色液显色,样品吸光值与大观霉素药物的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样品中大观霉素的残留量。根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的大观霉素标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中大观霉素残留量的浓度范围。

[0057] 2、酶联免疫检测试剂盒检测步骤:

[0058] 1) 取出需要数量的包被有大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物的酶标板,每个样品和标准品做2孔平行。

[0059] 2) 加入标准品/样品50μL到对应的微孔中,然后加入酶标记羊抗鼠抗体50μL/孔,再加入大观霉素单克隆抗体工作液50μL/孔,振荡混匀,盖板后置25℃避光环境中反应20min。

[0060] 3) 揭开盖板膜,甩干孔内液体,加入洗涤液250μL/孔,洗涤4~5次,倒掉洗涤液,用吸水纸拍干。洗涤液为含有1.0%~1.5%吐温20(百分比为体积比)和0.5%Proclin300的Tris缓冲液(千分比为体积比)。

[0061] 4) 加入底物显色A液过氧化脲50μL/孔,再加入底物显色B液四甲基联苯胺50μL/孔,混匀,盖板后置25℃避光环境中反应10min。

[0062] 5) 加入终止液2mol/L盐酸50μL/孔,混匀,设定酶标仪于450nm处,测定OD值。

[0063] 3、检测结果分析

[0064] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B₀)再乘以100%,得到百分吸光度值。以大观霉素标准品浓度(μg/L)的对数值为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的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出大观霉素的残留量。

[0065] 实验例1标准曲线试验

[0066] 标准曲线由6个浓度组成(0μg/L,0.05μg/L,0.15μg/L,0.45μg/L,1.5μg/L,4.5μg/L),对6个标准点各测定次数5次,以确定工作浓度范围和1C₅₀。以标准浓度点取对数,抑制率

(B/B₀)为纵坐标绘制标准曲线,1C₅₀为0.2955μg/L,见图2,回归方程为:Y=B/B₀=-0.3621log(X)+0.3083;推出浓度值X的方程为:

[0067] 浓度值 $X=10^{-(B/B_0-0.3083)/0.3621}$ 。

[0068] 实验例2样品精密度和准确度试验

[0069] 1、样品精密度试验:

[0070] 精密度以变异系数表示。以0.45μg/L浓度的大观霉素对牛奶样品进行添加测定,分别取三个不同批次的试剂盒,每个浓度重复3次,分别计算变异系数,结果见表1。

[0071] 表1牛奶样品变异系数测定

[0072]

批次	实测值 (μg/L)					变异系数 CV%
第 1 批	0.41	0.47	0.43	0.46	0.40	7.03
第 2 批	0.44	0.43	0.47	0.45	0.43	3.77
第 3 批	0.45	0.47	0.48	0.41	0.42	6.84

[0073] 结果表明,牛奶中样品的变异系数为3.77-7.03%。

[0074] 2.样品准确度试验

[0075] 准确度以回收率表示。取浓度为0.1μg/L的大观霉素标准品溶液,分别对5个牛奶样品进行添加回收试验,每个浓度做3个平行,分别计算回收率,计算结果见表2。

[0076] 表2添加回收率测定

[0077]

牛奶样品	添加回收率测定 (%)			平均值 (%)
样品 1	90.0%	89.6%	101.0%	93.5%
样品 2	94.2%	86.0%	97.0%	92.4%
样品 3	105.0%	112.0%	110.0%	109.0%
样品 4	86.9%	89.7%	99.4%	92.0%
样品 5	103.0%	112.0%	95.0%	103.3%
平均值	95.8%	97.9%	100.5%	98.1%

[0078] 结果显示牛奶样品添加回收率在86.0%-112%之间,表明本发明酶联免疫检测试剂盒测定牛奶的准确率较高。

[0079] 实验例3交叉反应率试验

[0080] 选择与大观霉素有类似结构和类似功能的4种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(即1C₅₀)。用下式计算本发明试剂盒对其它药物的交叉反应率。类似物交叉反应率越小,那么此试剂盒对大观霉素的检测的特异性就越好。交叉反应率(%)=(大观霉素1C₅₀/大观霉素类似物1C₅₀)×100%,结果见表3。

[0081] 表3交叉反应率测定

[0082]

药物名称	交叉反应率(%)
大观霉素	100%
新霉素	<0.1%
红霉素	<0.5%
链霉素	<0.1%
卡那霉素	<1%

[0083] 实验例4试剂盒保存性试验

[0084] 试剂盒保存条件为2~8℃,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、大观霉素添加实际测定值均在正常范围之内。

[0085] 实施例4大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒

[0086] 与实施例1的区别在于抗体工作液位大观霉素多克隆抗体工作液,酶标记抗抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体。

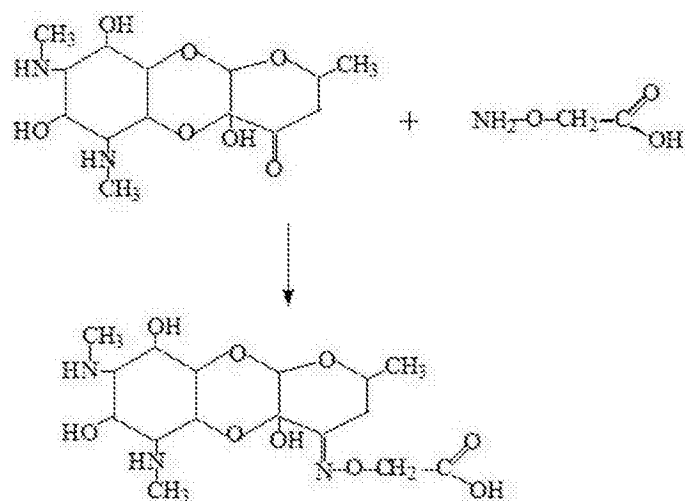


图1

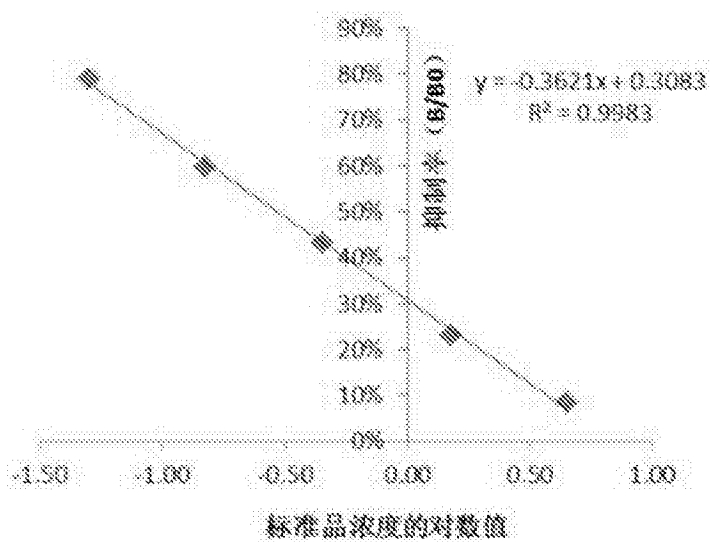


图2

专利名称(译)	大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106680485A	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201611046359.8	申请日	2016-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	云南辉瑞贝尔生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	云南辉瑞贝尔生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	云南辉瑞贝尔生物科技有限公司		
[标]发明人	杨绍元 杨少琼		
发明人	杨绍元 杨少琼		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	唐小红		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种大观霉素药物的酶联免疫检测试剂盒，包括酶标板、酶标记的抗抗体、大观霉素标准品、底物显色液、终止液、洗涤液、大观霉素抗体，所述酶标板上包被有大观霉素半抗原-卵清蛋白偶联物。本发明还公开了一种用上述酶联免疫检测试剂盒检测牛奶中大观霉素的方法，首先处理待测牛奶样品，然后用酶联免疫检测试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫检测试剂盒，结构简单、使用方便、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品定性、定量的检测。

批次	实测值 (μg/L)					变异系数 CV%
第1批	0.41	0.47	0.43	0.46	0.40	7.03
第2批	0.44	0.43	0.47	0.45	0.43	3.77
第3批	0.45	0.47	0.48	0.41	0.42	6.84