



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108205062 A

(43)申请公布日 2018.06.26

(21)申请号 201611164440.6

(22)申请日 2016.12.16

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家
科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 杜霞 刘静

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

旋毛虫的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

(57)摘要

本发明公开一种检测猪肉中旋毛虫的酶联免疫试剂盒,包括盒体,盒体内设有旋毛虫特异性抗体、旋毛虫与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被旋毛虫抗原或特异性抗体的酶标板、旋毛虫标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液;旋毛虫特异性抗体为旋毛虫的单克隆抗体。本发明的旋毛虫酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便、价格低廉;检测时对样品的前处理要求低且处理过程简单,能同时快速用于大批样品的筛查;与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

1. 一种检测旋毛虫的酶联免疫试剂盒, 包括盒体, 其特征在于: 盒体内设有旋毛虫特异性抗体、旋毛虫与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被旋毛虫抗原或特异性抗体的酶标板、旋毛虫标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液; 所述旋毛虫特异性抗体为旋毛虫的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征是: 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔铜蓝蛋白; 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶或羊抗鼠IgG抗体。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征是: 所述的洗涤液为含有0.05%-0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液, 所述终止液为2mol/L的盐酸。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征是: 所述的底物显色液由显色剂A和显色剂B组成, 显色剂A为过氧化氢或过氧化脲, 显色剂B为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的酶联免疫试剂盒, 其特征是: 所述试剂盒还包括浓缩样品稀释液, 浓缩样品稀释液为含0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液; 用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

6. 根据权利要求1-4任一项所述的酶联免疫试剂盒, 其特征是: 所述旋毛虫与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的:

(1) 称取3mg的旋毛虫、3mg的N-羟基琥珀酰亚胺和3mg的N, N-二环己基碳二亚胺溶于1mL DMF溶剂中, 室温下反应3小时, 得到A液;

(2) 称取5.1mg的牛血清白蛋白溶于2mL, 0.01mol/L pH 7.4的PBS缓冲液中, 得到B液;

(3) 在室温磁力搅拌下, 将A液逐滴加入B液中, 4℃反应过夜;

(4) 反应液用PBS透析3天, 换液3次/天; 透析完成后, 4000r/min离心5min, 取上清液, 得到旋毛虫与载体蛋白的偶联物, 贮藏与-20℃, 备用。

7. 根据权利要求1-4任一项所述的酶联免疫试剂盒, 其特征是: 所述旋毛虫的单克隆抗体是由以下方法制备的:

(1) 免疫以SPFX-BSA为免疫原, 取SPF级6-7周龄BALB/c雌性小鼠进行免疫, 每只200μL, 初次每只免疫剂量为30μg, 其后3次的免疫剂量均为50μg/只; 采用背部皮下4-6点注射, 初免用SPFX-BSA的PBS溶液与等体积FCA混合乳化后免疫; 20d后用SPFX-BSA的PBS溶液与等体积FIA混合乳化后加强免疫, 免疫间隔3周, 第五次免疫后进行细胞融合;

(2) 细胞融合将NS0骨髓瘤细胞与脾细胞按1:5的比例在PEG的作用下融合, 然后置于37℃, 5%的CO₂培养箱中培养, 5天后用HT培养基半量换液, 8天后检测细胞上清, 筛选阳性孔;

(3) 杂交瘤细胞的筛选细胞融合后, 取各孔细胞上清, 用PBS稀释5倍后用间接ELISA测定效价, 用小鼠血清作阳性对照, 挑选阳性孔, 使用间接竞争ELISA法测定敏感性, 选取效价高于或等于对照孔的细胞孔, 转入24孔细胞板中进行扩大培养, 待细胞长至底部一半以上时, 再次测定效价和敏感性, 进行敏感性测定, 选取敏感性最高的孔进行亚克隆;

(4) 单克隆抗体的制备将BALB/C小腹腔内接种液体石蜡, 每只小鼠接种量300~500μL, 将筛选出的单克隆细胞株转入细胞培养瓶中进行扩大培养, 待细胞保持对数增长的时候用无血清培养基稀释, 将 $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^7$ 个克隆化的阳性细胞注入小鼠体内, 观察小鼠腹水生产情况, 当小鼠腹部出现明显肿大且腹部皮肤紧绷时即可采集腹水, 然后3000r/min离心5min, 吸取上清除去细胞及杂质, 得到旋毛虫的单克隆抗体。

8. 一种权利要求1的检测旋毛虫酶联免疫试剂盒的组建方法, 其特征在于: 该方法包括

盒体内的旋毛虫单克隆抗体的制备;旋毛虫与载体蛋白偶联物的制备;

所述旋毛虫与载体蛋白偶联物的制备方法如下:

(1) 称取2mg的旋毛虫、2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和2mg的N, N-二环己基碳二亚胺溶于1mL DMF溶剂中,室温下反应3小时,得到A液;

(2) 称取5.1mg的牛血清白蛋白溶于2mL,0.01 mol/L pH 7.4的PBS缓冲液中,得到B液;

(3) 在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

(4) 反应液用PBS透析3天,换液3次/天;透析完成后,4000r/min离心5min,取上清液,得到旋毛虫与载体蛋白的偶联物,贮藏于-20℃,备用。

9. 一种检测样品中旋毛虫含量的方法,包括步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 用权利要求1-7任一项所述的试剂盒进行检测,向包被有旋毛虫抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入旋毛虫单克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测吸光度值;

(3) 分析检测结果。

旋毛虫的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及到酶联免疫和兽药残留检测领域。特别是涉及一种用于饲料中旋毛虫残留检测的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法。

背景技术

[0002] 旋毛形线虫 [*Trichinella spiralis* (Owen, 1835) Railliet, 1895] 简称旋毛虫, 其成虫和幼虫分别寄生于同一宿主的小肠和肌细胞内, 由其引起的疾病称为旋毛虫病 ((trichinellosis), 是一种呈全球性分布的、危害严重的食源性人兽共患寄生虫病^[1]。目前旋毛虫病在阿根廷、希腊、越南、波兰、韩国、匈牙利、罗马尼亚等国家依然严重流行^[2-7]。在西班牙, 平均每年暴发5次旋毛虫病, 主要因食用含旋毛虫的野猪肉而感染^[8]。从1986年到2009年间, 有来自41个国家的261次旋毛虫病暴发其中发病65818例死亡42例其中世界卫生组织 (WorldHealth Organization WHO) 欧洲区占总病例的87%, 而50%病例在罗马尼亚, 主要发生在1990年至1999年间, 在这些地区, 旋毛虫病的发病率已由每年的1.1/10万增加至8.5/10万。在中国, 自2004年至2009年间, 共报道有15次人体旋毛虫病的暴发, 发病1 387例, 其中死亡4例。因此, 旋毛虫病不仅严重危害社会公共健康还对猪肉生产和食品安全方面的经济问题产生了巨大的影响。

[0003] 由于旋毛虫病无特异性的症状和体征, 因此, 临床上对本病不易进行及时、正确的诊断。虽然从患者肌肉组织中查出幼虫是该病最准确的诊断方法, 但前者取决于所取肌肉样本的大小及感染程度, 对于轻度和早期感染者往往不易检出, 对于轻度和早期感染者却往往不易检出, 即使在感染晚期, 由于取样范围及数量的限制, 肌肉活检的检出率也只有50%左右, 故其阴性结果亦不能排除该病, 且该方法不易被患者接受。目前, 该病的确诊主要依靠肌肉活检和高特异性的免疫学诊断方法。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题: 克服背景技术中的问题, 提供一种特异、灵敏、快速、简便的快速检测旋毛虫的酶联免疫试剂盒;

还提供了旋毛虫的酶联免疫试剂盒的组建方法和检测方法。

[0005] 本发明的技术方案:

一种检测旋毛虫的酶联免疫试剂盒, 包括盒体, 盒体内设有旋毛虫特异性抗体、旋毛虫与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被旋毛虫抗原或特异性抗体的酶标板、旋毛虫标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液; 所述旋毛虫特异性抗体为旋毛虫的单克隆抗体。

[0006] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔铜蓝蛋白; 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶或羊抗鼠IgG抗体。

[0007] 所述的洗涤液为含有0.05%-0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液, 所述终止液为2mol/L的盐酸。

[0008] 所述的底物显色液由显色剂A和显色剂B组成, 显色剂A为过氧化氢或过氧化脲, 显

色剂B为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

[0009] 所述试剂盒还包括浓缩样品稀释液,浓缩样品稀释液为含0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液;用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

[0010] 所述旋毛虫与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的:

(1) 称取3mg的旋毛虫、3mg的N-羟基琥珀酰亚胺和3mg的N, N-二环己基碳二亚胺溶于1mL DMF溶剂中,室温下反应3小时,得到A液;

(2) 称取5.1 mg的牛血清白蛋白溶于2mL,0.01 mol/L pH 7.4的PBS缓冲液中,得到B液;

(3) 在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

(4) 反应液用PBS透析3天,换液3次/天;透析完成后,4000r/min离心5min,取上清液,得到旋毛虫与载体蛋白的偶联物,贮藏于-20℃,备用。

[0011] 所述旋毛虫的单克隆抗体是由以下方法制备的:

(1) 免疫以SPFX-BSA为免疫原,取SPF级6-7周龄BALB/c雌性小鼠进行免疫,每只200μL,初次每只免疫剂量为30μg,其后3次的免疫剂量均为50μg/只;采用背部皮下4-6点注射,初免用SPFX-BSA的PBS溶液与等体积FCA混合乳化后免疫;20d后用SPFX-BSA的PBS溶液与等体积FIIA混合乳化后加强免疫,免疫间隔3周,第五次免疫后进行细胞融合;

(2) 细胞融合将NSO骨髓瘤细胞与脾细胞按1:5的比例在PEG的作用下融合,然后置于37℃,5%的CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半量换液,8天后检测细胞上清,筛选阳性孔;

(3) 杂交瘤细胞的筛选细胞融合后,取各孔细胞上清,用PBS稀释5倍后用间接ELISA测定效价,用小鼠血清作阳性对照,挑选阳性孔,使用间接竞争ELISA法测定敏感性,选取效价高于或等于对照孔的细胞孔,转入24孔细胞板中进行扩大培养,待细胞长至底部一半以上时,再次测定效价和敏感性,进行敏感性测定,选取敏感性最高的孔进行亚克隆;

(4) 单克隆抗体的制备将BALB/C小鼠腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量300~500μL,将筛选出的单克隆细胞株转入细胞培养瓶中进行扩大培养,待细胞保持对数增长的时候用无血清培养基稀释,将 $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^7$ 个克隆化的阳性细胞注入小鼠体内,观察小鼠腹水生产情况,当小鼠腹部出现明显肿大且腹部皮肤紧绷时即可采集腹水,然后3000r/min离心5min,吸取上清除去细胞及杂质,得到旋毛虫的单克隆抗体。

[0012] 一种检测旋毛虫酶联免疫试剂盒的组建方法,包括盒体内的旋毛虫单克隆抗体的制备;旋毛虫与载体蛋白偶联物的制备;

所述旋毛虫与载体蛋白偶联物的制备方法如下:

(1) 称取2mg的旋毛虫、2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和2mg的N, N-二环己基碳二亚胺溶于1mL DMF溶剂中,室温下反应3小时,得到A液;

(2) 称取5.1mg的牛血清白蛋白溶于2mL,0.01 mol/L pH 7.4的PBS缓冲液中,得到B液;

(3) 在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

(4) 反应液用PBS透析3天,换液3次/天;透析完成后,4000r/min离心5min,取上清液,得到旋毛虫与载体蛋白的偶联物,贮藏于-20℃,备用。

[0013] 一种检测样品中旋毛虫含量的方法,包括步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 用所述的试剂盒进行检测,向包被有旋毛虫抗原的酶标板孔中加入标准品或样品

溶液,再加入旋毛虫单克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测吸光度值;

(3) 分析检测结果。

[0014] 本发明试剂盒的检测原理:

本发明采用DCC法合成旋毛虫人工抗原,制备的旋毛虫抗体能与旋毛虫发生特异性结合,从而达到检测食品中旋毛虫残留的目的。

[0015] 将旋毛虫抗原吸附于固相载体上,加入样本或旋毛虫标准品溶液,并加入抗旋毛虫的旋毛虫单克隆抗体工作液,待测样品中旋毛虫与固相载体上包被的旋毛虫抗原竞争旋毛虫抗体,再加入酶标记抗体进行酶活性的放大作用,显色后终止,测定样品吸光度值,该值与样品中旋毛虫的量呈负相关,通过标准曲线比较即可得出旋毛虫的浓度范围。

[0016] 本发明的积极有益效果:

(1) 本发明的旋毛虫酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便、价格低廉;与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

[0017] (2) 本发明的试剂盒采用间接竞争酶联免疫测定法定性或定量样品中旋毛虫的含量,对样品的前处理要求低且处理过程简单,能同时快速用于大批样品的筛查。

[0018] (3) 本发明的试剂盒检测操作步骤较少,节省检测时间,降低操作误差。

[0019] (4) 本发明基于抗原抗体免疫反应的免疫学快速检测技术进行检测,为旋毛虫残留检测提供一个新途径,该方法稳定性好,可在违禁食品成分旋毛虫的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0020] 图1旋毛虫标准品的抑制浓度曲线($\mu\text{g/L}$)。

[0021] 该图说明抗旋毛虫抗体进行标准品抑制的线性关系良好($R^2=0.9827$),其半数抑制浓度为 $31\mu\text{g/L}$ 。

具体实施方式

[0022] 为进一步理解本发明提供了以下实施例,但并不表示对本发明内容的任何限制。如没有特别说明,其中的百分含量均为重量含量。

[0023] 实施例1免疫原的合成及单克隆抗体的制备

1.1试剂与仪器

旋毛虫购自Sigma公司,N,N-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺购自上海化学试剂公司,牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂来自Pierce产品。

[0024] Bio-Rad imark 680型酶标仪、AE260电子天平,购自德国METTLER公司;HI9321酸度计,美国HANNA公司;手持式匀浆器,购自德国IKA公司;93-3定时恒温双向磁力搅拌器,购自上海亚荣生化仪器厂。

[0025] 1.2旋毛虫人工抗原的合成

(1) 称取3mg的旋毛虫、3mg的N-羟基琥珀酰亚胺和3mg的N,N-二环己基碳二亚胺溶于1mL DMF溶剂中,室温下反应3小时,得到A液;

(2) 称取5.1mg的牛血清白蛋白溶于2mL,0.01 mol/L pH 7.4的PBS缓冲液中,得到B液。

[0026] (3) 在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

(4) 反应液用PBS透析3天,换液3次/天;透析完成后,4000r/min离心5min,取上清液,得到旋毛虫与载体蛋白的偶联物,贮藏于-20℃,备用。

[0027] 通过紫外扫描鉴定偶联物。具体操作:将旋毛虫和牛血清白蛋白溶于PBS缓冲液(0.01M, pH7.4)中,浓度为1mg/mL;将偶联物同样用PBS缓冲液(0.01M, pH7.4)稀释,使其浓度与牛血清白蛋白浓度接近。在200-400nm间扫描这三种溶液,得出各物质的紫外扫描波谱。通过紫外扫描波谱鉴定人工合成抗原是否偶联成功。

[0028] 1.3免疫及特异性抗体的制备

(1) 免疫以SPFX-BSA为免疫原,取SPF级6-7周龄BALB/c雌性小鼠进行免疫,每只200μL,初次每只免疫剂量为30μg,其后3次免疫剂量均为50μg/只;采用背部皮下4-6点注射,初免用SPFX-BSA的PBS溶液与等体积FCA混合乳化后免疫;20d后用SPFX-BSA的PBS溶液与等体积FIA混合乳化后加强免疫,免疫间隔3周,第五次免疫后进行细胞融合;

(2) 细胞融合将NS0骨髓瘤细胞与脾细胞按1:5的比例在PEG的作用下融合,然后置于37℃,5%的CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半量换液,8天后检测细胞上清,筛选阳性孔;

(3) 杂交瘤细胞的筛选细胞融合后,待其长势良好时取各孔细胞上清,PBS稀释5倍后用间接ELISA测定效价,用小鼠血清作阳性对照,挑选效价较好的阳性孔,使用间接竞争ELISA测定敏感性,综合考虑选取效价高而且敏感性又好的细胞孔(效价高于或等于对照

孔),转入24孔细胞板中进行扩大培养,待细胞长至底部一半以上时,再次测定效价和敏感性,选择敏感性较好细胞进行亚克隆。

[0029] (4) 单克隆抗体的制备

单克隆抗体的大量制备采用体内诱生法生产:将BALE/C小腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量300~500μL,将筛选出的单克隆细胞株转入细胞培养瓶中进行扩大培养,待细胞保持对数增长的时候用无血清培养基稀释,将大约 $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^7$ 个克隆化的阳性细胞注入小鼠体内。几天后观察小鼠腹水生产情况,当小鼠腹部出现明显肿大且腹部皮肤紧绷时即可采集腹水,然后3000r/min离心5min,吸取上清除去细胞及杂质,将腹水存放于-20℃,备用。

[0030] 实施例2免疫检测方法的建立

2.1 ELISA方法确定最佳包被浓度

将10μg/mL,5μg/mL,2μg/mL,1μg/mL,0.5μg/mL,0.25μg/mL系列浓度的卵清蛋白-旋毛虫偶联物,以每孔50μL的用量包被酶标板,4℃包被2h,洗涤4次,拍干,加入封闭液,4℃封闭24h,再洗涤4次,拍干。加入 $1:8 \times 10^4$ 稀释的抗血清50μL/孔,室温孵育30min,洗涤4次,立即加入50μL/孔的酶标羊抗鼠抗体。室温作用30min,洗涤4次,加显色液,50μL/孔,室温显色反应15min,加50μL/孔终止液终止反应,用酶标仪(450nm)检测A值。同时设置空白对照孔(不加抗体,只加其稀释液)和平行重复孔,取OD值为1.0左右的包被浓度为最佳浓度,实验数据见表1。由表1可确定,最佳包被浓度为1μg/mL。

[0031] 表1不同包被浓度的OD值

包被浓度μg/mL	10	5	3	1	0.5	0.25	空白
OD值	2.624	2.366	1.677	1.036	0.723	0.347	0.031

2.2间接ELISA检测抗体效价

稀释倍数	8×10^4	16×10^4	32×10^4	64×10^4	128×10^4	256×10^4	阴性血清	空白
OD值	1.978	1.623	1.208	0.832	0.535	0.256	0.104	0.037

以 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被酶标板,从 8×10^4 倍开始倍比稀释抗体,按上述2.1的ELISA步骤操作。检查抗体OD值等于两倍于阴性血清OD值的孔,其对应的抗体稀释度为抗体效价,其效价检测结果见表2。从表2可以确定本发明制备的抗血清的效价在 2.56×10^6 以上。

[0032] 表2抗血清效价检测结果

2. 3间接竞争ELISA检测抗体特异性

ELISA操作方法同2.1。区别是每孔加入50u1不同浓度的旋毛虫与卵清蛋白一旋毛虫偶联物竞争抗体,随后加入抗体,得出不同的OD值。根据2.1的结果,所用抗体的最佳浓度为 8×10^4 ,同时设置平行重复孔和空白对照孔。以0抑制孔的OD值为最大值 B_0 ,其他抑制浓度孔OD值为B, $B/B_0=50\%$ 时对应的旋毛虫浓度为此抗体 IC_{50} 值。抗体特异性检测结果见表3,用所得数据绘制旋毛虫抑制曲线(图1)。

[0033] 表3抗体特异性检测结果

旋毛虫抑制浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)	7.5	15	30	60	90	180
OD值	1.623	1.260	0.543	0.220	0.140	0.092

由表3可得,旋毛虫抗体 IC_{50} 值在30ug/L左右,表明旋毛虫抗体具有良好的特异性。

[0034] 实施例3检测旋毛虫的酶联免疫试剂盒的组建

组建旋毛虫的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被旋毛虫人工合成抗原的酶标板;
- (2) 2mL, 8×10^4 倍的抗旋毛虫的单克隆抗体;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (4) 旋毛虫标准品溶液6瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g}/\text{L}$, $10\mu\text{g}/\text{L}$, $20\mu\text{g}/\text{L}$, $30\mu\text{g}/\text{L}$, $50\mu\text{g}/\text{L}$, $100\mu\text{g}/\text{L}$;
- (5) 底物显色液A为过氧化脲,底物显色液B为四甲基联苯胺;显色剂A要与显色剂B进行等比量混匀。

[0035] (6) 洗涤液为含0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

(7) 浓缩样品稀释液为0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

(8) 终止液为2mol/L的盐酸溶液。

[0036] 实施例4检测旋毛虫的酶联免疫试剂盒的组建

组建旋毛虫的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板;
- (2) 2mL, 8×10^4 倍的的抗旋毛虫的单克隆抗体;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的旋毛虫;
- (4) 旋毛虫标准品溶液6瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g}/\text{L}$, $10\mu\text{g}/\text{L}$, $20\mu\text{g}/\text{L}$, $30\mu\text{g}/\text{L}$, $50\mu\text{g}/\text{L}$, $100\mu\text{g}/\text{L}$;
- (5) 底物显色液A为过氧化脲,底物显色液B为邻苯二胺;
- (6) 洗涤液为含0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液;
- (7) 浓缩样品稀释液为0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液;
- (g) 终止液为2mol/L的盐酸溶液。

[0037] 实施例5旋毛虫酶联免疫试剂盒的检测方法

样品前处理:称取5g猪肉溶于40mL离心管中,加入20mL样品稀释液(0.01%吐温-20的磷酸盐缓冲液),充分震荡30min,5000r/min离心10min,取上清5mL。

[0038] 检测方法:向旋毛虫一卵清蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品或样品溶液50 μ L,再加入抗体工作液50 μ L,室温反应30min,倒出孔中液体,每孔加入250 μ L经10倍稀释的洗涤液,30s后倒出孔中液体,共洗板4次,拍干。每孔加入酶标记抗体50 μ L,避光室温孵育30min,加底物过氧化脲(显色液A) 50 μ L、底物四甲基联苯胺(显色液B) 50 μ L,混匀,避光室温显色15min,加入50 μ L/孔的终止液,用酶标仪测定吸光度值。

[0039] 结果分析:计算百分比吸光度值并绘制标准曲线,相对应每一个样品的旋毛虫浓度可以从标准曲线上读出,也可以用回归方程法计算出样品中旋毛虫的含量。

[0040] 利用专业电脑软件便于大量样品的快速分析,根据酶标板上样本显色深浅和系列浓度标准溶液颜色的比较,可以判断样本中旋毛虫的浓度范围。

[0041] 实施例6试剂盒的精密度试验

本实验为标准可复性试验。从制备的酶标板中各取10个孔,测定50 μ g/L的标准溶液的OD值,重复3次,计算变异系数CV%。结果表明,变异系数范围在4.5-7.1之间,符合变异系数小于20%的规定,说明本试剂盒标准品的精密度达到要求。

[0042] 实施例7试剂盒的回收率试验

取两个浓度的旋毛虫标样,对样品进行添加回收实验,每个浓度做3个平行,分别计算回收率。结果表明其回收率为79%-88%。

[0043] 实施例8试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为2-8 $^{\circ}$ C,经过6个月的测定,试剂盒的最大吸光度值、50%抑制浓度、旋毛虫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 $^{\circ}$ C和-20 $^{\circ}$ C保存条件下分别放置5天,进行加速老化试验,结果表明各项指标符合要求。从以上结果可以得出试剂盒可以在2-8 $^{\circ}$ C条件下保存6个月以上。

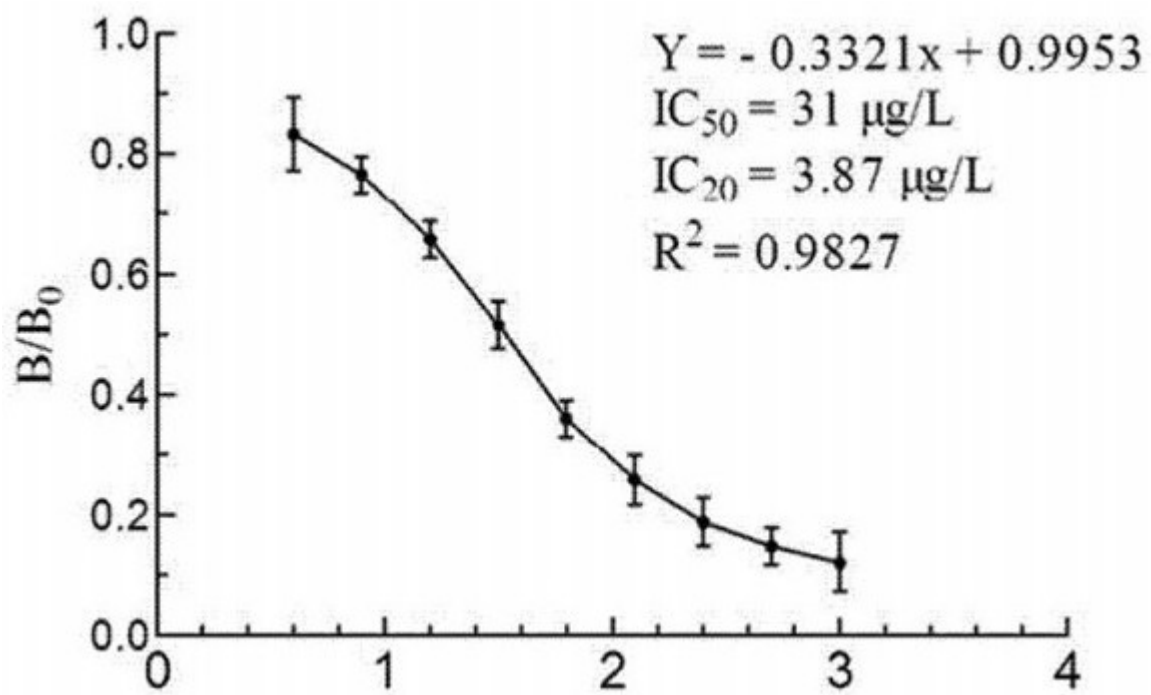


图1

专利名称(译)	旋毛虫的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法		
公开(公告)号	CN108205062A	公开(公告)日	2018-06-26
申请号	CN201611164440.6	申请日	2016-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞 刘静		
发明人	洪霞 杜霞 刘静		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/31 G01N33/535 G01N2333/4353		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种检测猪肉中旋毛虫的酶联免疫试剂盒，包括盒体，盒体内设有旋毛虫特异性抗体、旋毛虫与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被旋毛虫抗原或特异性抗体的酶标板、旋毛虫标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液；旋毛虫特异性抗体为旋毛虫的单克隆抗体。本发明的旋毛虫酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便、价格低廉；检测时对样品的前处理要求低且处理过程简单，能同时快速用于大批样品的筛查；与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

