



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111060690 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201910948273.1

(22)申请日 2019.10.08

(71)申请人 杭州佰昕科技有限公司

地址 310016 浙江省杭州市经济技术开发区
宝龙商业中心1幢1016室

申请人 浙江工商大学

(72)发明人 王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军

(74)专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33283

代理人 向庆宁

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书4页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

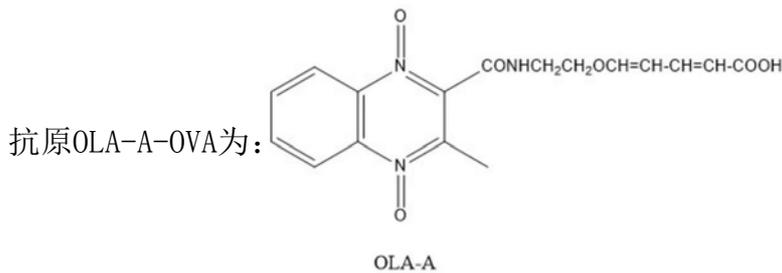
一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析
试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测喹乙醇的时间分辨
荧光免疫分析试剂盒及其应用,本发明的试剂盒
具有较高的精密度和准确度,而且该试剂盒对喹
乙醇有高度的特异性;该试剂盒能够对水、饲料
和鱼肉组织中的喹乙醇进行定性和定量检测,样
品预处理过程简单,方便快捷,检测准确度高。

1. 一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于,包括以下组成:

(1) 包被有 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗原OLA-A-OVA的反应板;-A-表示 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-$;



(2) 铕标记的喹乙醇单克隆抗体溶液:含 $0.5\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Eu^{3+} -OLA-mAb,质量百分含量为1%BSA,质量百分含量为0.2%叠氮化钠,基础缓冲体系为 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液与等体积的甘油混合而成;

(3) 喹乙醇标准品母液 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;

(4) 反应增强液:含 $0.27\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a-噻吩甲酰三氟丙酮, $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三辛基氧化膦,体积分数为0.05%无水乙醇,体积分数为5.9%冰乙酸,体积分数为0.25%的TritonX-100, $6.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二甲酸氢钾, pH 为3.0,余量为去离子水;

(5) 浓缩洗液: $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 pH 值为7.4的磷酸盐缓冲液,且该缓冲液中含有体积百分比浓度为0.5%的吐温20。

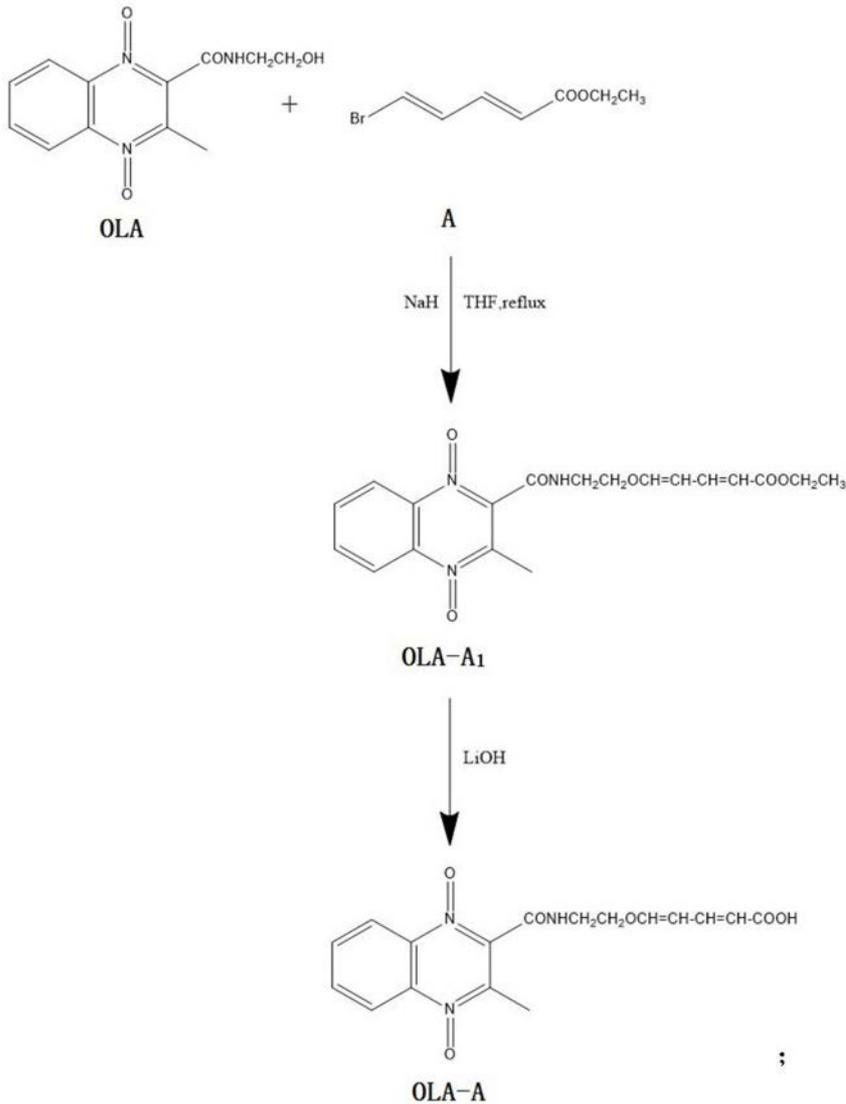
2. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于,反应板为96孔板,材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

3. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于,铕标记的喹乙醇单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 喹乙醇半抗原的合成

(1.1) 将 1mmol 喹乙醇溶于2-5mLTHF中, 0°C 下加入 $1.0-1.2\text{mmol}$ NaH,搅拌0.5-2小时,后加入 1mmol 的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯, 65°C 下反应6-8小时,待反应完全后,加入30-50mL H_2O ,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋干溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$;

(1.2) 将 1mmol OLA-A₁溶于8-12mL甲醇与水的混合液中,其中,甲醇与水的体积比为1:1,加入氢氧化锂1-1.5mmol,搅拌,室温下反应1-3h;反应完全后,用1mol/L的盐酸溶液调节 pH 等于5-6,乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$;具体的合成路线如下:

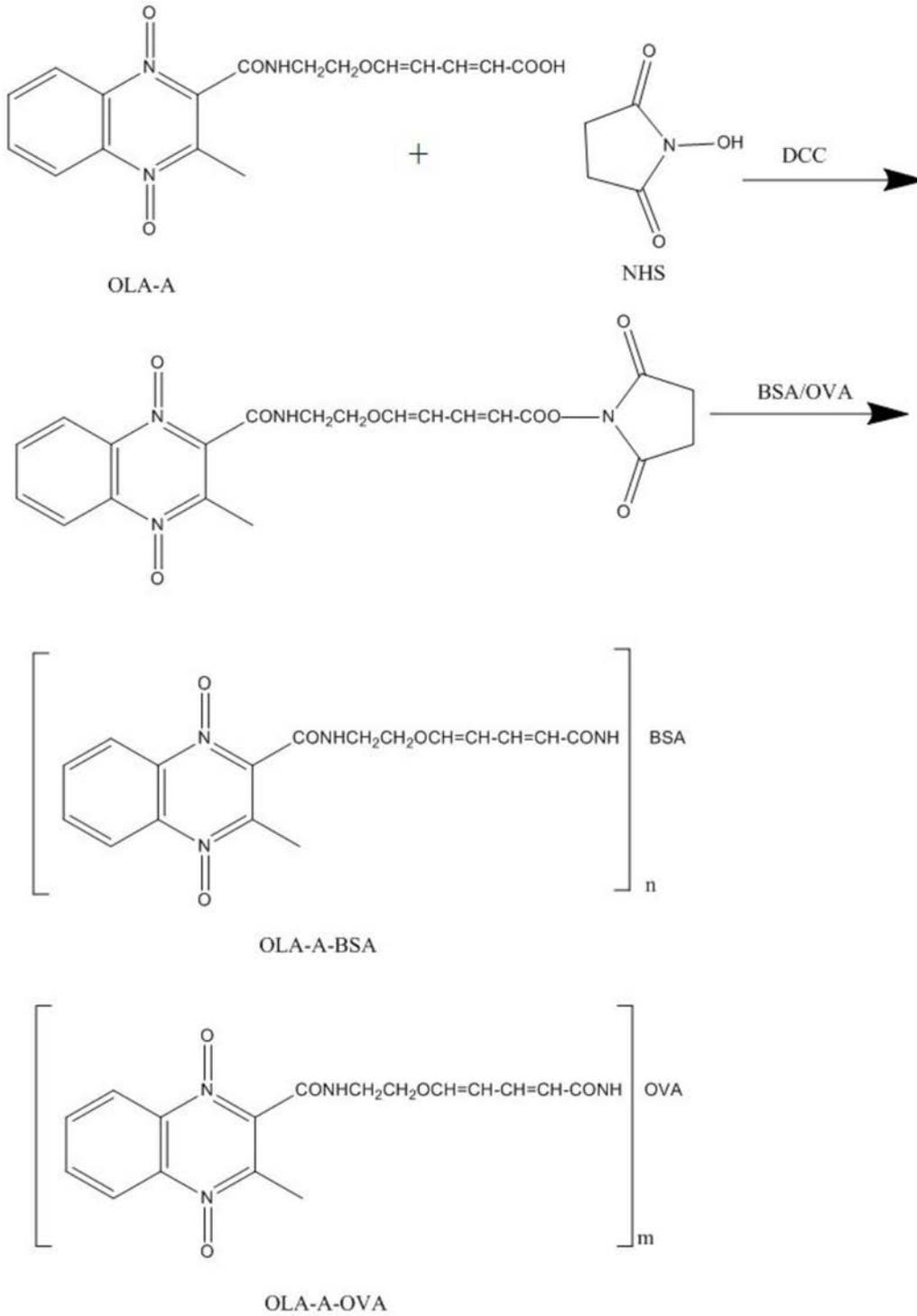


(2) 喹乙醇人工抗原的合成

取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10-12h后2000r/min离心10min,离心后上清液为a液;

称取20mg OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

4℃下将0.6mLa液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA, -A-表示-CH=CH-CH=CH-COO-;具体的合成路线如下:



(3) 小鼠免疫：

选择6-8周龄BALB/C雌性小鼠，将制备的免疫原OLA-A-BSA与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后，腹部和腋下多点注射，后每间隔21天进行加强免疫，3次加强免疫后采血测定效价，效价采用间接ELISA方法测定，当效价不再明显升高时进行末免，末免3天后进行细胞融合，免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂，加强免疫采用弗氏不完全佐剂，末免不使用佐剂，直接免疫原注射免疫；

(4) 细胞融合与细胞株筛选：

在末免3天后，按照常规PEG方法进行细胞融合，将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0

按照5~10:1的比例进行融合,间接ELISA筛选阳性孔,并对阳性孔进一步利用间接竞争ELISA测定阳性孔的抑制效果,对抑制效果好的杂交瘤细胞用有限稀释法进行3~4次克隆,筛选获得杂交瘤细胞株;

向BALB/C小鼠腹腔注射降植烷,0.3mL/只,7~10天后同法注射杂交瘤细胞株细胞,待小鼠腹腔明显胀大后抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水;

腹水纯化后,得到抗喹乙醇单克隆抗体;

(5) Eu^{3+} -OLA-mAb的制备

A. 5mL纯化好的喹乙醇单克隆抗体与0.5mL $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH为7.4的磷酸盐缓冲液1:1混合;

B. 称取3.0mg环化二乙烯三胺五醋酸酐,加入90 μL DMSO溶解;

C. 将90 μL 步骤B中的溶液缓慢滴加到步骤A中溶液,用 $0.125\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH调pH至9.0,室温避光放置2h;

D. 将步骤C最终的反应液转移至透析袋中, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7.4磷酸盐缓冲液透析过夜;

E. 准确称取0.242g $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 于20mL水中配成 $3.3 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EuCl_3 溶液;

F. 取100 μL 步骤E中的溶液加入步骤D中,室温避光反应3h后置于透析袋中透析24h~36h,分装保存于 -20°C ,即得到铕标记喹乙醇单克隆抗体(Eu^{3+} -OLA-mAb)。

4. 一种试剂盒在检测喹乙醇中的应用,其特征在于,所述试剂盒为权利要求1-3中任一所述的试剂盒,该试剂盒的使用方法为:

(1) 配置喹乙醇系列标准品溶液;

(2) 将待测样品进行预处理,得到样品溶液;

(3) 将喹乙醇系列标准品溶液和样品溶液先后分别加入反应板的不同孔中,随后所有孔均加入铕标记的喹乙醇单克隆抗体溶液50 μL /孔,震荡30s,37 $^\circ\text{C}$ 孵育1h;

(4) 将浓缩洗液用去离子水稀释10倍后得到洗液,用洗板机洗板或者手工洗板;

(5) 拍干后每孔加入反应增强液200 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 避光振荡孵育10min后,使用时间分辨荧光分析仪检测荧光强度cps;

(6) 分析数据并计算检测结果。

5. 根据权利要求4所述的一种试剂盒在检测喹乙醇中的应用,其特征在于,步骤(1)具体为:喹乙醇标准品母液浓度 $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中,溶剂为甲醇,先用 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4的磷酸盐缓冲液将喹乙醇标准品母液稀释20倍至浓度为 $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,然后用稀释液进行系列稀释,稀释最终浓度介于 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~ $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,制备获得喹乙醇系列标准品溶液,浓度分别为: $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ng}/\text{mL}$ 、 $1\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

6. 根据权利要求5所述的一种试剂盒在检测喹乙醇中的应用,其特征在于,所述稀释液为包含体积分数为5%甲醇的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术中的时间分辨荧光免疫分析技术领域,具体涉及一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 喹乙醇(Olaquinox,OLA)是一种抗菌促生长剂,曾广泛应用于水产养殖,一度被称为“水产瘦肉精”。喹乙醇的毒副作用不容小觑,存在明显的遗传毒性和蓄积毒性,因此国内外相继制定了严格的使用规范和残留限量标准。如美国和欧盟禁止使用喹乙醇,日本规定喹乙醇在动物组织和内脏中的最大残留限量(MRL)为 $300\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,我国农业部在2001年发布的第168号公告《饲料药物添加剂使用规范》中规定饲料中的添加量不得高于 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,同时规定禁止在鱼、禽及体重超过35kg猪的养殖过程中使用。尽管如此,抗菌促生长效果好且廉价的喹乙醇目前仍存在违规添加使用的现象。因此,加强喹乙醇的检测监督,特别是加强喹乙醇检测技术的研究极为必要。

[0003] 喹乙醇的残留检测方法,主要包括传统的仪器分析和免疫分析两大类。其中仪器法主要包括光谱法、色谱法以及液质联用技术等,仪器分析准确度高、精密度强,但其样品前处理过程复杂繁琐、耗时长、需要专业技术人员操作、仪器试剂等价格昂贵,无法在基层得到极大推广。免疫分析技术凭借着其高效、快速、高灵敏度以及高特异性等优势广泛应用于小分子药物残留检测中。

[0004] 时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)是近年来发展迅速的一种高灵敏度检测手段。TRFIA的原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂,其一端与镧系元素结合,另一端则与抗体(或抗原)上的自由氨基连接,制成镧系元素 Eu^{3+} 标记抗体(或抗原),它与待测样品中的抗原(或抗体)结合生成抗原抗体复合物。此时免疫复合物的荧光强度非常弱,需加入一种增强液,使 Eu^{3+} 从复合物中解离下来,在增强液中TOPO、Triton X-100等的协同作用下可与另一种螯合剂TTA形成新的复合物,该复合物可发射出很强的荧光,使荧光效果增强上百万倍。最后用时间分辨仪测定其荧光强度cps,即可确定样品中抗原的含量。因此,研究一种配置简单、性状稳定、成本低廉、效果明显的喹乙醇TRFIA检测试剂盒是非常必要和有意义的。

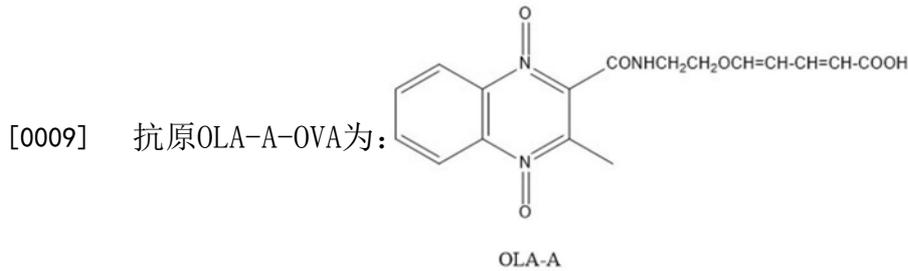
发明内容

[0005] 为了解决上述存在的问题,本发明提供了一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,包括以下组成:

[0008] (1) 包被有 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗原OLA-A-OVA的反应板;-A-表示 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-$;



[0010] (2) 铕标记的喹乙醇单克隆抗体溶液:含 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Eu^{3+} -OLA-mAb,质量百分含量为1%BSA,质量百分含量为0.2%叠氮化钠,基础缓冲体系为 $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液与等体积的甘油混合而成;

[0011] (3) 喹乙醇标准品母液 $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

[0012] (4) 反应增强液:含 $0.27\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α-噻吩甲酰三氟丙酮, $0.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三辛基氧化膦,体积分数为0.05%无水乙醇,体积分数为5.9%冰乙酸,体积分数为0.25%的TritonX-100, $6.8\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯二甲酸氢钾, pH 为3.0,余量为去离子水;

[0013] (5) 浓缩洗液: $100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 pH 值为7.4的磷酸盐缓冲液,且该缓冲液中含有体积百分比浓度为0.5%的吐温20。

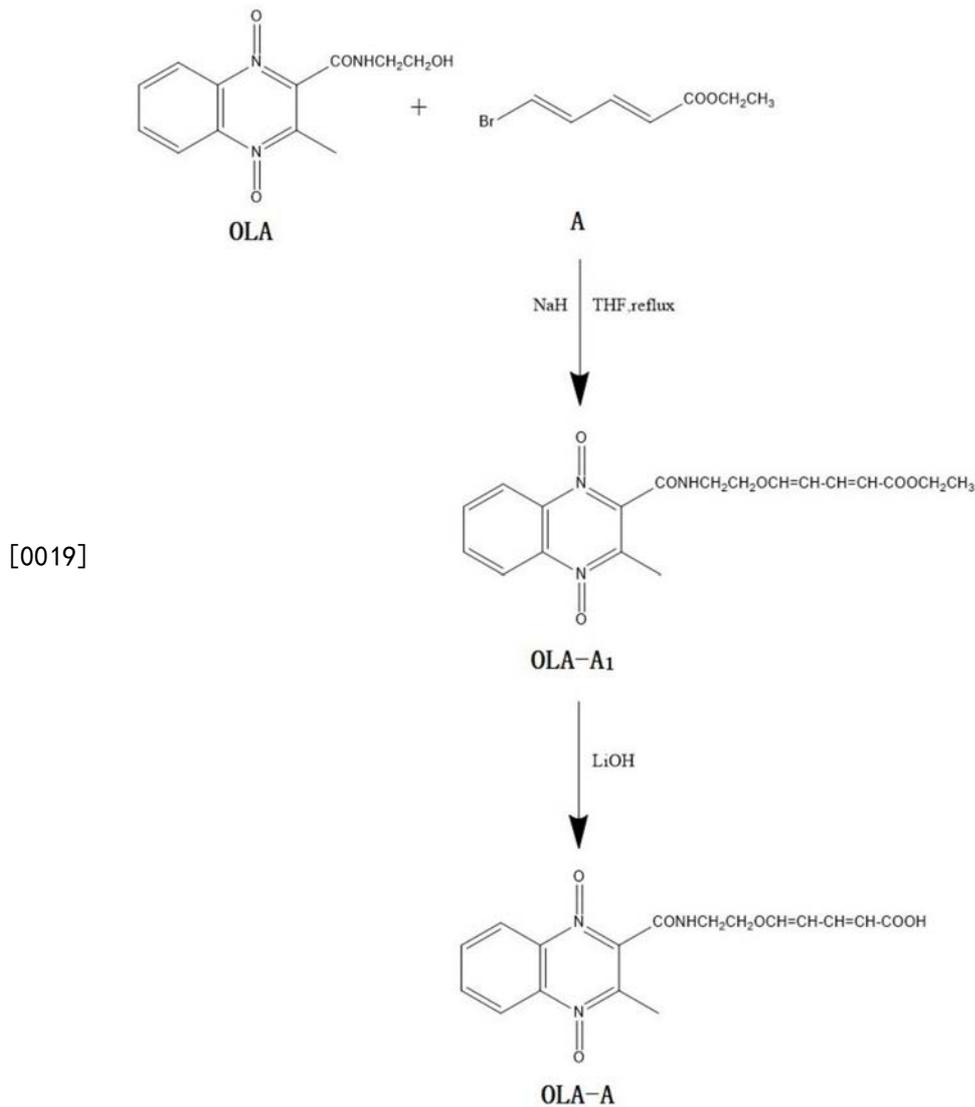
[0014] 进一步地,反应板为96孔板,材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

[0015] 进一步地,铕标记的喹乙醇单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0017] (1.1) 将 1mmol 喹乙醇溶于2-5mLTHF中, 0°C 下加入 1.0 - 1.2mmol NaH,搅拌0.5-2小时,后加入 1mmol 的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯, 65°C 下反应6-8小时,待反应完全后,加入30-50mL H_2O ,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋干溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$;

[0018] (1.2) 将 1mmol OLA-A₁溶于8-12mL甲醇与水的混合液中,其中,甲醇与水的体积比为1:1,加入氢氧化锂 1 - 1.5mmol ,搅拌,室温下反应1-3h;反应完全后,用 1mol/L 的盐酸溶液调节 pH 等于5-6,乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$;具体的合成路线如下:

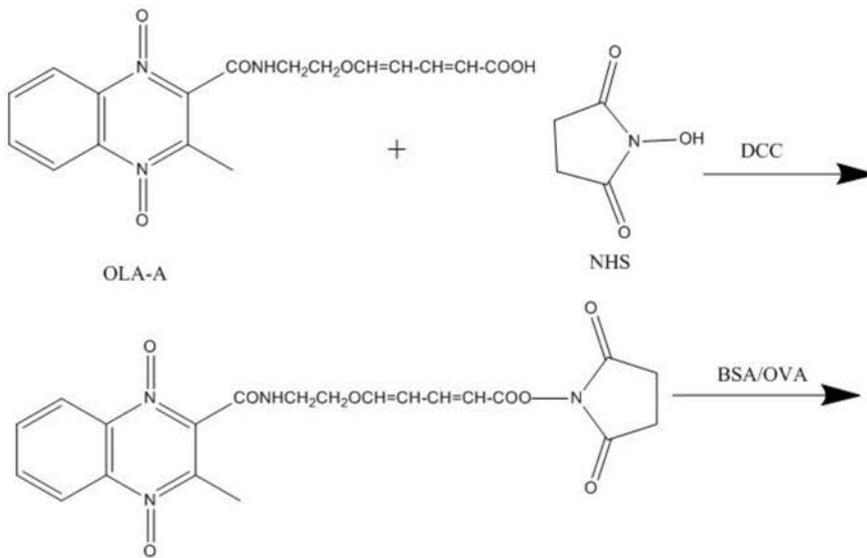


[0020] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

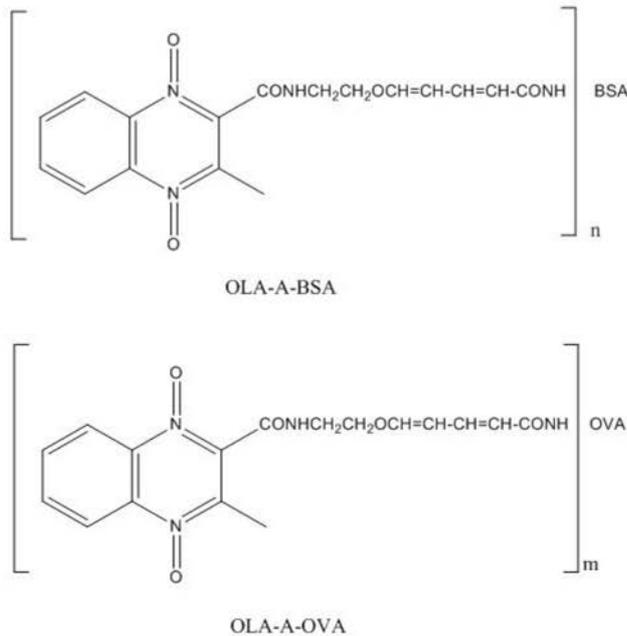
[0021] 取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10-12h后2000 r/min离心10min,离心后上清液为a液;

[0022] 称取20mg OVA (或BSA) 溶于5mL 0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

[0023] 4℃下将0.6mL a液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA, -A-表示-CH=CH-CH=CH-COO-;具体的合成路线如下:



[0024]



[0025] (3) 小鼠免疫:

[0026] 选择6-8周龄BALB/C雌性小鼠,将制备的免疫原OLA-A-BSA与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后,腹部和腋下多点注射,后每间隔21天进行加强免疫,3次加强免疫后采血测定效价,效价采用间接ELISA方法测定,当效价不再明显升高时进行末免,末免3天后进行细胞融合,免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫采用弗氏不完全佐剂,末免不使用佐剂,直接免疫原注射免疫;

[0027] (4) 细胞融合与细胞株筛选:

[0028] 在末免3天后,按照常规PEG方法进行细胞融合,将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按照5~10:1的比例进行融合,间接ELISA筛选阳性孔,并对阳性孔进一步利用间接竞争ELISA测定阳性孔的抑制效果,对抑制效果好的杂交瘤细胞用有限稀释法进行3~4次克隆,筛选获得杂交瘤细胞株;

[0029] 向BALB/C小鼠腹腔注射降植烷,0.3mL/只,7~10天后同法注射杂交瘤细胞株细

胞,待小鼠腹腔明显胀大后抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水;

[0030] 腹水纯化后,得到抗喹乙醇单克隆抗体;

[0031] (5) Eu^{3+} -OLA-mAb的制备

[0032] A. 5mL纯化好的喹乙醇单克隆抗体与0.5mL $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH为7.4的磷酸盐缓冲液1:1混合;

[0033] B. 称取3.0mg环化二乙烯三胺五醋酸酐,加入90 μL DMSO溶解;

[0034] C. 将90 μL 步骤B中的溶液缓慢滴加到步骤A中溶液,用 $0.125\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH调pH至9.0,室温避光放置2h;

[0035] D. 将步骤C最终的反应液转移至透析袋中, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7.4磷酸盐缓冲液透析过夜;

[0036] E. 准确称取0.242g $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 于20mL水中配成 $3.3 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EuCl_3 溶液;

[0037] F. 取100 μL 步骤E中的溶液加入步骤D中,室温避光反应3h后置于透析袋中透析24h~36h,分装保存于 -20°C ,即得到铕标记喹乙醇单克隆抗体 (Eu^{3+} -OLA-mAb)。

[0038] 一种试剂盒在检测喹乙醇中的应用,所述试剂盒为以上所述的试剂盒,该试剂盒的使用方法为:

[0039] (1) 配置喹乙醇系列标准品溶液;

[0040] (2) 将待测样品进行预处理,得到样品溶液;

[0041] (3) 将喹乙醇系列标准品溶液和样品溶液先后分别加入反应板的不同孔中,随后所有孔均加入铕标记的喹乙醇单克隆抗体溶液50 μL /孔,震荡30s, 37°C 孵育1h;

[0042] (4) 将浓缩洗液用去离子水稀释10倍后得到洗液,用洗板机洗板或者手工洗板;

[0043] (5) 拍干后每孔加入反应增强液200 μL , 37°C 避光振荡孵育10min后,使用时间分辨荧光分析仪检测荧光强度cps;

[0044] (6) 分析数据并计算检测结果。

[0045] 进一步地,步骤(1)具体为:喹乙醇标准品母液浓度 $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中,溶剂为甲醇,先用 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4的磷酸盐缓冲液将其稀释20倍至浓度为 $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,然后用稀释液进行系列稀释,稀释最终浓度介于 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~ $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,制备获得喹乙醇系列标准品溶液,浓度分别为: $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0046] 进一步地,所述稀释液为包含体积百分含量5%甲醇的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0047] 本发明的有益效果是:

[0048] (1) 本发明的试剂盒具有较高的精密度和准确度,而且该试剂盒对喹乙醇有高度的特异性;该试剂盒能够对水、饲料和鱼肉组织中的喹乙醇进行定性和定量检测,样品预处理过程简单,方便快捷,检测准确度高。

附图说明

[0049] 图1为喹乙醇半抗原合成路线。

[0050] 图2为喹乙醇人工抗原合成路线。

具体实施方式

[0051] 以下结合附图对本发明的技术方案做进一步详细说明,应当指出的是,具体实施方式只是对本发明的详细说明,不应视为对本发明的限定。

[0052] 以下实施例中所采用的物质及检测仪器等均可以通过商业途径购得。

[0053] 以下实施例中所用的PBS缓冲液,如无特殊说明,均为 $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液;实施例中所用的CBS缓冲液均为 $\text{pH}=9.6, 0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液;牛血清白蛋白简称BSA;卵清白蛋白简称OVA,钥孔血蓝蛋白简称 KLH;喹乙醇简称OLA。

[0054] 以下实施例中所用的相关溶液配制:

[0055] PBST洗液:取500mL $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液,加入0.25mL 吐温20,混匀备用。

[0056] 封闭液:1g脱脂奶粉溶解于50mL $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液。

[0057] $\text{pH}=9.6, 0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液(CBS):称取 Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g,加入纯水至990mL,调 pH 至9.6,再用纯水定容至1000mL,4℃贮存备用。

[0058] $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}, \text{pH}=7.4$ 的磷酸缓冲液(PBS):8.5g NaCl , 2.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$,溶于900mL纯水中,调 pH 至7.4,定容至1000mL。

[0059] 实施例1

[0060] 喹乙醇人工抗原的合成

[0061] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0062] (1.1) 将1mmol喹乙醇溶于2-5mLTHF中,冰浴(0℃)下加入1.1-1.2mmol NaH,搅拌1小时,后加入1mmol的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯(A),65℃下回流反应6小时,待反应完全后,加入30mL H_2O ,后用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋蒸除去溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$;洗脱剂为:石油醚:乙酸乙酯=1:1;

[0063] (1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于10mL甲醇与水的混合液中(甲醇与水的体积均为5mL),加入氢氧化锂1.5mmol,室温下反应2h;反应完全后,用1mol/L 的盐酸溶液调节 pH 等于5-6,乙酸乙酯50ml萃取两次,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$;具体的合成路线如图1所示;

[0064] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0065] 取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10h后2000r/min 离心10min,离心后上清液为a液;

[0066] 称取20mg载体蛋白OVA(或BSA)溶于5mL $0.01\text{mol}/\text{L}, \text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

[0067] 4℃下将0.6mL a液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内, $0.01\text{mol}/\text{L}, \text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA,-A-表示 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-$;具体的合成路线如图2所示;m、n分别表示一个载体蛋白OVA、BSA上偶联的喹乙醇半抗原的个数;每次制备得到的喹乙醇人工抗原中,m或者n的数值不是唯一的,会有一些变化。

[0068] 载体蛋白可以为牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)或者其他载体蛋白。

[0069] (3) 人工抗原的鉴定:

[0070] 采取紫外扫描与SDS-PAGE鉴定得到:偶联成功。

[0071] 紫外扫描方案:BSA (OVA)、OLA-A和OLA-A-BSA (OVA) 分别配制成浓度为 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定 $200\sim 400\text{nm}$ 波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0072] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量 $10\mu\text{L}$ 每孔,浓缩胶电压 75V ,分离胶电压 100V ,考马斯亮蓝染色 1h ,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0073] 紫外扫描图谱中,OLA-A-BSA (OVA) 溶液与BSA (OVA) 溶液相比,最大吸收波长有变化,而且经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0074] 对比例1

[0075] 采用常规方法合成喹乙醇人工抗原,具体步骤如下:

[0076] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0077] 向三口圆底烧瓶中准确加入 2.106g 喹乙醇和 1.6g 琥珀酸酐,加入 80mL 吡啶, 115°C 下回流反应 4h 后减压蒸除吡啶,向剩余混合物中加入 60mL 冰蒸馏水, $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 调pH至 $2.0\sim 3.0$, 4°C 下放置过夜。减压抽滤并用冰蒸馏水洗涤3次后抽干,淡黄色粉状物质即为OLA-HS;

[0078] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0079] 取 14.528mg OLA-HS溶于 0.8mL DMF中,加入 4.603mg NHS和 8.253mg DCC,室温下避光搅拌反应 10h 后 $2000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min ,离心后上清液为c液。

[0080] 称取 20mg OVA(或BSA)溶于 5mL $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,此为b液。 4°C 下将 0.6mL c液逐滴加入到缓慢搅拌的b液中, 4°C 搅拌反应过夜。次日转入透析袋内, $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS)透析 2d ,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-HS-OVA或OLA-HS-BSA。

[0081] (2) 人工抗原的鉴定:

[0082] 采取紫外扫描与SDS-PAGE电泳鉴定其偶联效果。

[0083] 紫外扫描方案:BSA (OVA)、OLA-HS和OLA-HS-BSA (OVA) 配制成浓度为 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定 $200\sim 400\text{nm}$ 波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0084] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量 $10\mu\text{L}$ 每孔,浓缩胶电压 75V ,分离胶电压 100V ,考马斯亮蓝染色 1h ,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0085] 紫外扫描图谱中,OLA-HS-BSA (OVA) 溶液与BSA (OVA) 溶液相比,最大吸收波长有变化,而且经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0086] 实施例2

[0087] 抗血清效价的测定:

[0088] 将实施例1、对比例1制备的人工抗原分别对BALB/C小鼠进行免疫,初次免疫采用

弗氏完全佐剂乳化人工抗原,乳化后,注射,计量为250 μg /小鼠,后每间隔21天加强免疫,共加强免疫3次,加强免疫采用不完全佐剂进行乳化,免疫计量为150 μg /小鼠,加强免疫14d(天)后小鼠断尾采血进行多抗血清的效价测定,血清用封闭液倍比稀释后ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清OD_{450nm}值比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价,结果如表1所示。最后进行末免,末免采用人工抗原直接腹腔注射的方式进行,免疫计量为300 μg /小鼠。

[0089] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0090] a. 包被:分别以实施例1中的人工抗原OLA-A-OVA或者对比例1中的人工抗原OLA-HS-OVA为包被原,pH 9.6,0.05mol $\cdot\text{L}^{-1}$ CBS为包被缓冲液,包被原浓度为10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,包被量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 中包被2h,后PBST洗液洗板4次;

[0091] b. 封闭:加入封闭液250 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后,PBST洗液洗板4次;

[0092] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清10000r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取10 μL 加入到2mL封闭液,(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照,100 μL /孔,每个梯度4个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后采用PBST洗液洗板4次;

[0093] d. 加酶标二抗:反应结束后PBST洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0094] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min;

[0095] f. 终止读数:加入2mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸50 μL /孔,用酶标仪读取OD_{450nm}值。

[0096] 表1实施例1与对比例1中的抗血清效价测定结果

[0097]

免疫抗原	检测抗原	抗血清效价
OLA-A-BSA实施例1	OLA-A-OVA实施例1	614400
OLA-HS-BSA对比例1	OLA-HS-OVA对比例1	102400

[0098] 由表1的抗血清效价测定结果表明,实施例1的抗血清效价比较高,实施例1制备的人工抗原中存在共轭效应,使得人工抗原更加稳定,而且能更好地把噻乙醇的特征结构暴露出来,抗原特异性较强,有利于制备特异性强的单克隆抗体。

[0099] 实施例3噻乙醇单克隆抗体的制备

[0100] (1) 小鼠免疫:

[0101] 选择6-8周龄、体重18~20g BALB/C雌性小鼠。将制备的免疫原(OLA-A-BSA)与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后,腹部和腋下多点注射,剂量为100-200 μg /只,后每间隔21天进行加强免疫,3次加强免疫后采血测定效价,效价采用间接ELISA方法测定,血清用封闭液倍比稀释后,采用ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价。当效价不再明显升高时加倍剂量进行末免,末免3d后进行细胞融合。免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫采用弗氏不完全佐剂,末免不使用佐剂,直接免疫原注射免疫。

[0102] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0103] a. 包被:以OLA-A-OVA为包被原,pH9.6,0.05mol $\cdot\text{L}^{-1}$ CBS为包被缓冲液,包被原浓度为10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,包被量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 中包被2h后,PBST洗液洗板4次;

[0104] b. 封闭:加入封闭液250 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后,PBST洗板4次,每孔加 PBST 300 μL ;

[0105] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清 $10000r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取 $10\mu\text{L}$ 加入到 2mL 封闭液(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照, $100\mu\text{L}/\text{孔}$,每个梯度4个重复, 37°C 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0106] d. 加酶标二抗:反应结束后洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0107] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育15min;

[0108] f. 终止读数:加入 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 $50\mu\text{L}/\text{孔}$,用酶标仪读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

[0109] (2) 细胞融合及培养:

[0110] 在末免3天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量1500)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0111] a. 末免后的小鼠眼球放血,血清收集后离心吸上清备用,拉颈处死后置于70%酒精中3~5min,无菌条件下取小鼠脾脏,用无菌手术剪剪碎后置入无菌碾钵中碾磨,用RPMI-1640基础培养基吹悬细胞后,过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

[0112] b. 收集SP2/0细胞(骨髓瘤细胞),要求细胞生长状态佳,细胞活性大于90%,吸去细胞上清后加入新的RPMI-1640基础培养基并将细胞吹打悬浮,后进行细胞计数;

[0113] c. 根据细胞计数结果,将脾细胞与SP2/0细胞按照5-10:1的比例混合后, $1800 r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5分钟后吸去上清,向剩余细胞中加入 0.6mL PEG,在1分钟内边加边轻轻搅拌均匀,加完后静置1min后,由慢到快再加入RPMI-1640基础培养基 45mL ,后 $1500r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5分钟后去上清,加入选择性HAT培养基后,铺板于96孔细胞培养板,每孔 $250\mu\text{L}$,置于 37°C ,5% CO_2 的培养箱中培养。

[0114] d. 培养3~5天后,用HAT培养基换液1次,第10天换为HT培养基培养。

[0115] (3) 细胞筛选与细胞株建立:

[0116] 待融合细胞生长到覆盖培养孔10%~30%孔底面积时,取上清用间接ELISA 筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为OLA-A-OVA交联物,并以OVA、BSA作阴性对照。筛选出的阳性反应孔进一步用竞争ELISA分析抗体的检测灵敏度。灵敏度好的杂交瘤细胞用有限稀释法连续克隆3~4次,获得杂交瘤细胞株。

[0117] 杂交瘤细胞株经扩大培养后,一方面可以将该细胞株用于腹水制备、单克隆抗体的纯化和应用;另一方面可以将建立的杂交瘤细胞株移入细胞冻存管并放入液氮中长期保存。

[0118] (4) 单克隆抗体的制备、纯化和鉴定

[0119] 采用动物体内诱生法制备单克隆抗体。

[0120] 选择6~8周龄健康BALB/C小鼠,在BALB/C小鼠腹腔注射降植烷, $0.3\text{mL}/\text{只}$,7~10d后同法注射筛选到的杂交瘤细胞株细胞($0.4\text{mL}/\text{只}$,每 mL 细胞株数量在 $2.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 之间),5~7d待小鼠腹腔明显胀大后无菌操作抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水。

[0121] 腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化后过protein A蛋白亲和层析柱纯化,用紫外分光光度计分别测定纯化抗体的紫外260nm和280nm的光密度,用Lowry-kalokar公式计算蛋白质浓度为 $6.4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其余纯化的单抗 -70°C 保存备用。

[0122] 实施例4 Eu^{3+} -OLA-mAb的制备

[0123] A. 5mL纯化好的喹乙醇单克隆抗体 (OLA-mAb) 与0.5mL $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 为7.4的磷酸盐缓冲液1:1混合;

[0124] B. 称取3.0mg环化二乙烯三胺五醋酸酐,加入90 μL DMSO溶解;

[0125] C. 将90 μL 步骤B中的溶液缓慢滴加到步骤A中溶液,用 $0.125\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH调pH至9.0,室温避光放置2h;

[0126] D. 将步骤C最终的反应液转移至透析袋中, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH=7.4磷酸盐缓冲液透析过夜;

[0127] E. 准确称取0.242g $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 于20mL水中配成 $3.3 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EuCl_3 溶液;

[0128] F. 取100 μL 步骤E中的溶液加入步骤D中,室温避光反应3h后置于透析袋中透析24h~36h,分装保存于 -20°C ,即得到铕标记喹乙醇单克隆抗体 (Eu^{3+} -OLA-mAb)。

[0129] 实施例5喹乙醇时间分辨荧光免疫分析技术试剂盒

[0130] 试剂盒包含以下部分:

[0131] (1) 包被有抗原的反应板1块;

[0132] (2) 铕标记的喹乙醇单克隆抗体溶液1瓶,10mL/瓶;

[0133] (3) 喹乙醇标准品母液 $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (100%甲醇) 1瓶,2mL/瓶;

[0134] (4) 反应增强液1瓶40mL/瓶;

[0135] (5) 浓缩洗液2瓶50mL/瓶。

[0136] 其中,反应板为96孔板,材料为透明聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯;反应板由抗原OLA-A-OVA预先包被,包被浓度 $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在此浓度下具有较佳的检测灵敏度。

[0137] 反应板的制备:用pH为9.6的 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠缓冲液(CBS)将OLA-A-OVA稀释至浓度为 $1.0\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔100 μL 上述溶液加入到微孔板中, 37°C 包被2h后PBST洗板4次;在微孔板中加入300 μL 含质量百分含量为1%BSA的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4磷酸盐缓冲液, 37°C 封闭30min;PBST洗板4次,拍干,加1包干燥剂后用铝膜真空密封包装即得抗原包被的反应板,密封于 -4°C 下保存备用。

[0138] 铕标记的喹乙醇单克隆抗体 (Eu^{3+} -OLA-mAb) 溶液的组分为:含0.5ng/mL 的 Eu^{3+} -OLA-mAb,质量百分含量为1%BSA,质量百分含量为0.2%叠氮化钠,基础缓冲体系为 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4的磷酸盐缓冲液与等体积的甘油混合而成。

[0139] 喹乙醇系列标准品溶液配置方法如下:喹乙醇标准品母液浓度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,其中,溶剂为甲醇,直接先用磷酸盐缓冲液PBS ($0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4) 将其稀释20倍至浓度为 $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,然后用稀释液(含体积百分含量5%甲醇的 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4的磷酸盐缓冲液)进行系列稀释,稀释最终浓度介于 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ~ $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间,制备获得喹乙醇系列标准品溶液,浓度分别为: $50\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0140] 反应增强液的组分为:含 $0.27\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ a-噻吩甲酰三氟丙酮(TTA), $0.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三辛基氧化膦(TOPO), 0.05%无水乙醇(v/v), 5.9%冰乙酸(v/v), 0.25%的TritonX-100(v/v), $6.8\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯二甲酸氢钾, pH为3.0,用去离子水配置。

[0141] 浓缩洗液为: $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,且该缓冲液中含有体积百分比浓度为0.5%的吐温20。

[0142] PBST洗液:取500mL pH=7.4, $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS,加入0.25mL吐温20,混匀备用。

[0143] 封闭液:1g脱脂奶粉溶解于50mL pH 7.4,0.01mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液。

[0144] 实施例6

[0145] 利用喹乙醇时间分辨荧光免疫分析试剂盒检测样品中喹乙醇残留

[0146] 本发明还提供了一种利用喹乙醇时间分辨荧光免疫分析试剂盒检测样品中喹乙醇残留的方法,主要包括以下步骤:

[0147] 1) 配置喹乙醇系列标准品溶液,用试剂盒中的喹乙醇标准品母液1μg/mL (其中,溶剂为甲醇)进行配置,现配现用,具体的配置方法如上所述;

[0148] 2) 将待测样品进行预处理,得到样品溶液;

[0149] 3) 将喹乙醇系列标准品溶液和步骤2) 处理好的样品溶液各50μL先后加入反应板的不同孔中,随后所有孔中均加入钕标记的喹乙醇单克隆抗体溶液50 μL/孔,微量振荡器上震荡30s,37℃孵育1h;

[0150] 4) 将浓缩洗液用去离子水稀释10倍后得到洗液,用洗板机洗板4次或者手工洗板,手工洗板时,先甩去板中反应液,在吸水纸上拍干后每孔加入300μL 洗液,浸泡1min后甩去洗液,吸水纸上拍干后再加入洗液,如此重复4次;

[0151] 5) 拍干后每孔加入反应增强液200μL,37℃避光振荡孵育10min后,使用时间分辨荧光分析仪检测;

[0152] 6) 分析数据并计算检测结果,通过对不同浓度喹乙醇标准品荧光强度数值分析,建立基于喹乙醇浓度对数和荧光强度数值抑制率之间的标准曲线,计算回归方程,后续根据样品荧光强度数值根据回归方程计算出样品中喹乙醇浓度。

[0153] 7) 待测样品预处理方法

[0154] (1) 池塘水样预处理

[0155] 将池塘水样用定性滤纸过滤后,准确吸取1mL过滤后的池塘水,加入1mL 样品稀释液(样品稀释液包括体积百分含量5%甲醇的0.01mol·L⁻¹,pH 7.4的磷酸盐缓冲液),混匀后吸取50μL混合液加入反应板中进行检测,实际含量为检测计算含量的2倍。

[0156] (2) 饲料样品预处理

[0157] 市场上购买的饲料用粉碎机粉碎后过60目筛,称取筛好的饲料样品1g放入 5mL离心管中,加入3mL含体积百分含量为5%甲醇的0.01mol·L⁻¹,pH=7.4 的磷酸盐缓冲液,在漩涡振荡器上振荡2min,后5000r·min⁻¹离心10min,小心吸取上清液后转入1.5mL离心管并在10000r·min⁻¹下离心10min,吸取50μL 上清液加入反应板中进行检测。

[0158] (3) 鱼肉样品预处理

[0159] 鱼肉去鳞后洗净,选取鱼背部肌肉,将肌肉先剪成不大于0.5cm×0.5 cm×0.5cm的小块。准确称取5g鱼肉放入50mL离心管中,加入10mL乙腈后匀质机匀质2min,5000r·min⁻¹离心10min,上清液转移入新的1.5mL离心管中10000r·min⁻¹离心10min,吸取上清液到新的离心管中;剩余样品再次加入 10mL乙腈,漩涡振荡1min,后5000r·min⁻¹离心10min,上清液转移入新的1.5 mL离心管中10000r·min⁻¹离心10min,吸取上清液并入前次收集的乙腈提取上清液,在通风橱中,将离心管放入60℃水浴中,氮气吹干,后用5mL含体积百分含量为5%甲醇的0.01mol·L⁻¹,pH=7.4磷酸盐缓冲液溶解剩余物,漩涡振荡2min后,吸取50μL溶液加入反应板中进行检测。

[0160] 实施例7试剂盒精密度、特异性和稳定性等质量参数的评价

[0161] 7.1 试剂盒精密度和准确度试验

[0162] 回收率为试剂盒准确度的重要评价指标,通过添加一定量的标准样品到样品中,采用实施例6中所述的样品预处理方法进行处理,然后加入反应板中,其他步骤与实施例6所述检测过程一致,根据标准样品检测数据建立标准曲线,根据建立的标准曲线计算得到喹乙醇含量,并与实际添加量进行比较得到回收率数值。回收率越接近实际100%说明试剂盒检测的准确度较高,结果可信。

[0163] 回收率(%) = 实际测定值/理论添加值 × 100%; 相对标准偏差 RSD% = SD/X × 100%, 其中SD为标准偏差, X为测定数值的平均值。

[0164] 对于水样,添加喹乙醇标准样品后,水样中喹乙醇标准样品的浓度分别为2 ng · mL⁻¹和5ng · mL⁻¹;对于饲料,添加喹乙醇标准样品后,饲料样品中喹乙醇标准样品的浓度分别为5ng · mL⁻¹和10ng · mL⁻¹,对于鱼肉,添加喹乙醇标准样品后,鱼肉样品中喹乙醇标准样品的浓度分别为10ng · mL⁻¹和20ng · mL⁻¹,每个浓度样品做4个平行。用三个不同批次试剂盒进行检测,结果见表2。

[0165] 表2精密度及准确度试验

样品	添加后喹乙醇标准样品的浓度 (ng/mL)	回收率的平均值 (n=4)%	批内 RSD (n=4)%	批间 RSD (n=3)%
水样	2	101.2	5.7	8.3
	5	97.4	6.3	7.6
饲料	5	96.1	6.9	8.4
	10	86.2	7.8	9.0
鱼肉	10	104.3	7.1	7.9
	20	115.5	8.0	8.7

[0166] 从结果来看,样品添加回收率介于80%-120%之间,同时试剂盒批内和批间相对标准偏差均小于10%,说明试剂盒检测精密度与准确度均较高。

[0167] 7.2 试剂盒特异性试验

[0168] 选择喹乙醇结构类似物分别进行交叉反应率测定,测定过程和步骤与建立标准曲线方法一致,只是将喹乙醇标准品更换为系列浓度的喹乙醇结构类似物,建立基于喹乙醇结构类似物浓度对数和荧光强度数值抑制率之间的标准曲线,后根据结果计算获得交叉反应率,交叉反应率计算公式如下:

[0169] 交叉反应率(%) = (喹乙醇IC₅₀) / (结构类似物IC₅₀) × 100%

[0170] 交叉反应率越高,说明喹乙醇单克隆抗体特异性越好,检测结果见表3。

[0171] 表3试剂盒的特异性

	化合物 Compounds	抑制中浓度 IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 Cross reactivity (%)
	喹乙醇 Olaquinox	9.21	100
	3-甲基喹啉林-2-羧酸 4-3-Methylquinoline-2-carboxylic acid	>1000	<0.93
[0173]	卡巴氧 Carbadox	>3×10 ⁴	<0.02
	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	>3×10 ⁴	<0.02
	莱克多巴胺 Ractopamine	>3×10 ⁴	<0.02
	青霉素 Penicillin	>3×10 ⁴	<0.02
	氯霉素 Chloroamphenicol	>3×10 ⁴	<0.02
	四环素 Tetracycline	>3×10 ⁴	<0.02

[0174] 从交叉反应率结果来看,喹乙醇与其他结构类似物的反应率均小于1%,说明此试剂盒对喹乙醇有高度的特异性。

[0175] 7.3试剂盒保存期试验

[0176] 试剂盒保存条件为2-8℃,经过12个月保存后测定,试剂盒最大吸光度值, IC₅₀值,喹乙醇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℃保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标正常。从以上结果得到喹乙醇时间分辨荧光免疫分析试剂盒可以在2-8℃保存12个月以上。

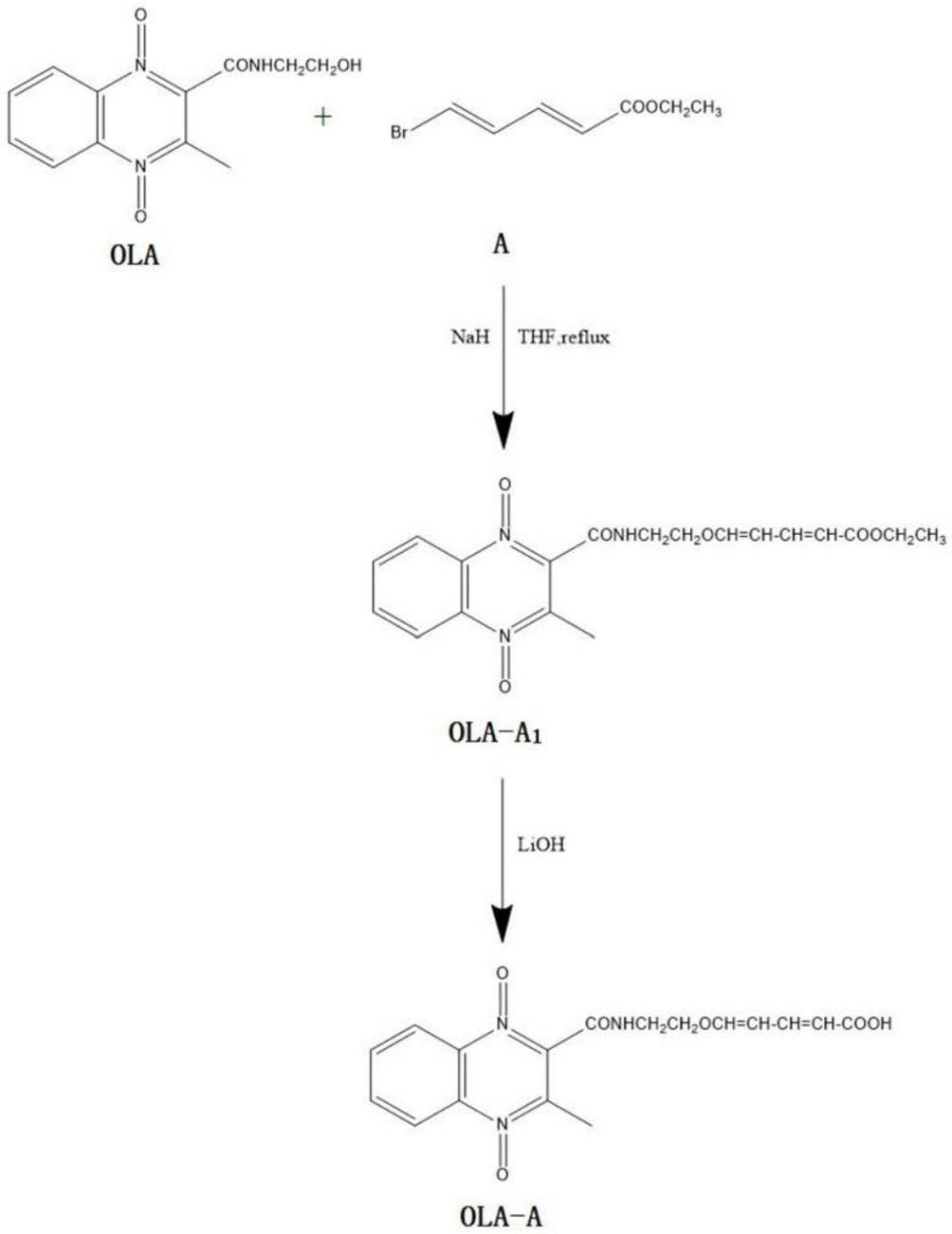


图1

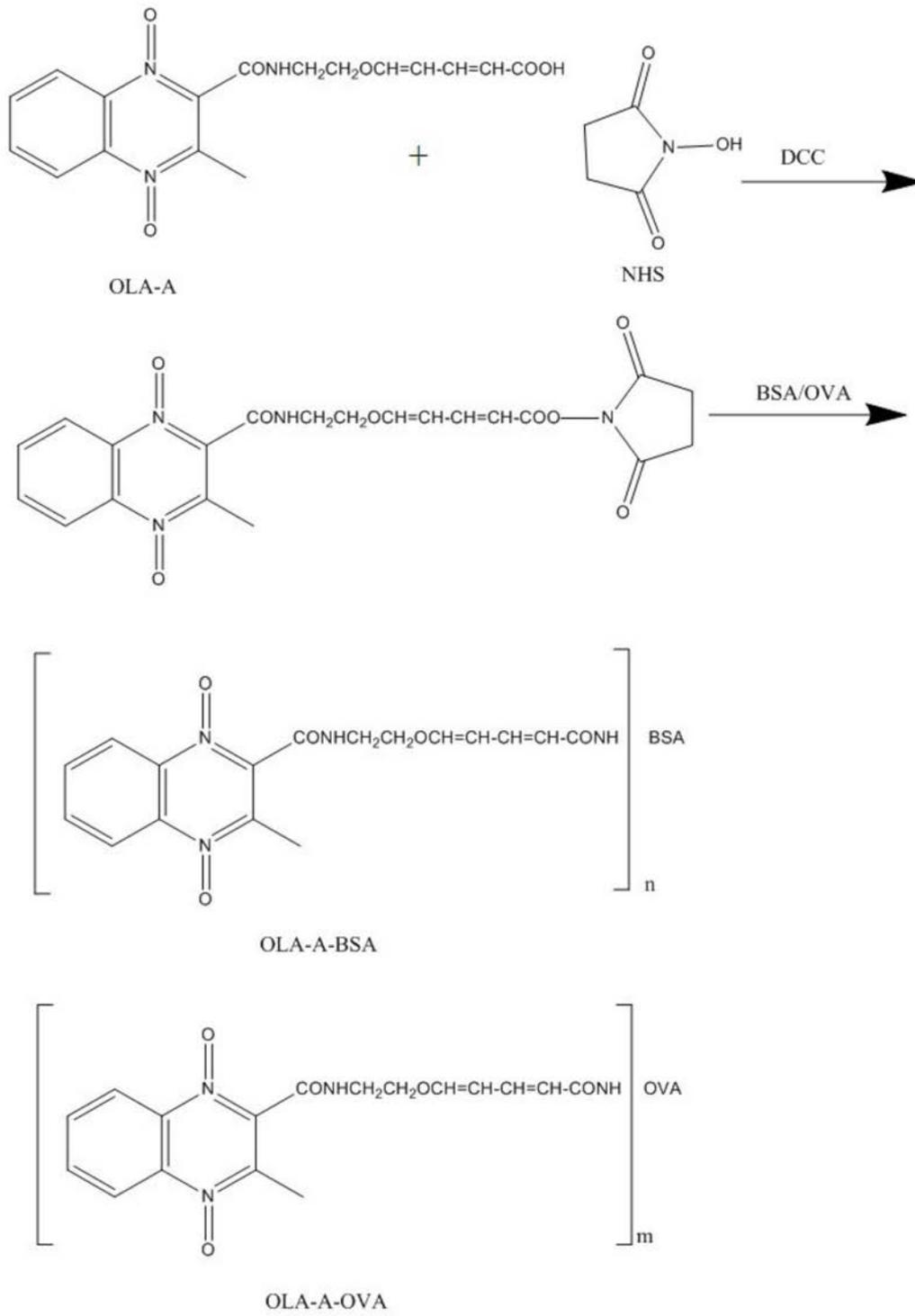


图2

专利名称(译)	一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN111060690A	公开(公告)日	2020-04-24
申请号	CN201910948273.1	申请日	2019-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
[标]发明人	王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军		
发明人	王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/577 C07K16/44 G01N33/533		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/582 G01N33/94 G01N33/9446		
代理人(译)	向庆宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测喹乙醇的时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其应用，本发明的试剂盒具有较高的精密度和准确度，而且该试剂盒对喹乙醇有高度的特异性；该试剂盒能够对水、饲料和鱼肉组织中的喹乙醇进行定性和定量检测，样品预处理过程简单，方便快捷，检测准确度高。

