

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810118444. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 33/535 (2006.01)  
C12N 5/12 (2006.01)  
C07D 279/36 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月4日

[11] 公开号 CN 101358967A

[22] 申请日 2008.8.22

[21] 申请号 200810118444. X

[71] 申请人 北京望尔康泰生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平回龙观镇国际信息  
产业基地高新四街8号

共同申请人 北京望尔生物技术有限公司

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平  
冯才茂 汪善良 刘福林 赵正苗  
李 勇

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅 任凤华

权利要求书2页 说明书17页 附图2页

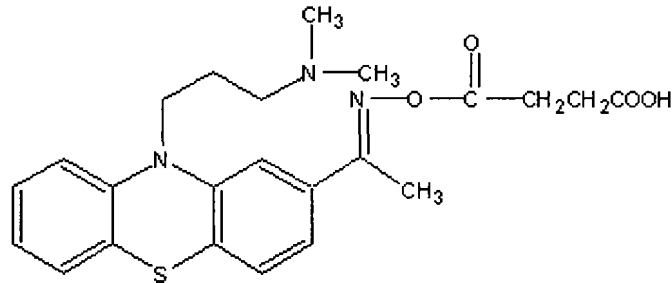
[54] 发明名称

一种检测氯丙嗪的方法及其专用酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测氯丙嗪的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和氯丙嗪的特异性抗体；所述特异性抗体为所述氯丙嗪的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的氯丙嗪单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测氯丙嗪的方法，操作简便，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法，能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查。

1、一种检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和氯丙嗪的特异性抗体；所述特异性抗体为所述氯丙嗪的多克隆抗体或单克隆抗体；所述半抗原的结构式如下：



2、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述半抗原和氯丙嗪的特异性抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

3、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括抗抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；

所述半抗原和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

4、根据权利要求1、2或3所述的试剂盒，其特征在于：所述单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2544 的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-1 分泌产生的抗体。

5、根据权利要求1-4中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括氯丙嗪标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液；所述浓缩洗涤液为含有0.6-1.3%卵清蛋白和0.001-0.002%硫柳汞、pH值为7.6-8.2、0.05-0.2mol/L的硼砂-硼酸缓冲液；所述浓缩复溶液为含有2-5%的羊血清、pH为9.1-9.9、0.05-0.1mol/L的碳酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

6、根据权利要求1-5中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液A液和显色液B液组成，显色液A液为过氧化氢或过氧化脲，显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为1-2mol/L硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为1-2mol/L氢氧化钠溶液。

7、根据权利要求5或6所述的试剂盒，其特征在于：所述浓缩洗涤液为含有1.0%卵清蛋白、0.002%硫柳汞防腐剂、pH值为7.6、0.2mol/L硼砂-硼酸缓冲液；所述浓缩复溶液为含有4%羊血清、pH为9.7、0.1mol/L碳酸盐缓冲液；所述底物显色液A液为过氧化脲，所述底物显色液B液为四甲基联苯胺；所述终止液为2mol/L的盐酸。

8、根据权利要求1-7中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗体进行偶联得到酶标抗体；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗体的摩尔浓度比为2:1。

9、一种检测氯丙嗪的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

向每2.0g动物组织匀浆中，加入3-6ml乙腈和1-4ml 0.05-0.15M盐酸溶液，混匀，在10-20℃条件下以3000g以上的速度离心5-10min，取上清液体；向所述上清液体中加入0.5-1.0ml 4-8M氢氧化钠溶液，再加入3-8ml三氯甲烷，混匀，再在10-20℃条件下以3000g以上的速度离心5-10min，取下层液体，氮气吹干，加入0.5-2ml权利要求5-7中任一所述浓缩复溶液，溶解混匀，取样进行分析；

2) 利用权利要求1-8中任一所述的酶联免疫试剂盒检测1)中所得到的样品。

10、由保藏号为CGMCC No. 2544的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-1分泌产生的氯丙嗪的单克隆抗体，或保藏号为CGMCC No. 2544的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-1。

## 一种检测氯丙嗪的方法及其专用酶联免疫试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种检测氯丙嗪的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

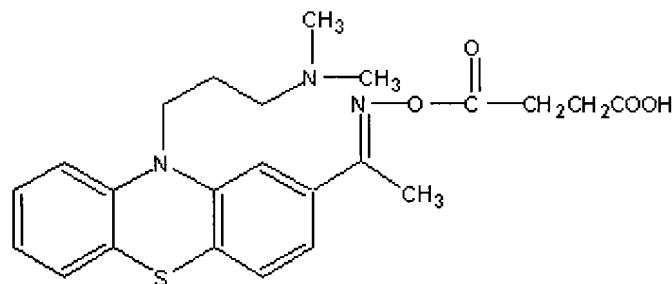
氯丙嗪是吩噻嗪类药物，其结构式如图 1 所示，为中枢多巴胺聚体阻断剂。此类药物添加在饲料中畜禽吃了就睡，减少饲料消耗，增重快。人食用了含有这类药物的畜禽产品也会产生同样效果，造成人嗜睡、肥胖、思维迟钝。欧美等国家已相继禁止或严格禁止使用氯丙嗪。我国农业部第 235 号文件中规定，动物源性食品中氯丙嗪的残留限量为不得检出，因此，在实践中，需要一种精确度高、灵敏度高的检测氯丙嗪的方法。

目前，氯丙嗪残留量的常规检测方法主要有液相色谱/质谱法（LC/MS）、高效液相色谱（HPLC）等，但是这些方法存在着仪器设备复杂、检测过程繁琐和对检验人员的技能要求高的缺点，不适合现场监控和大量样本的筛查。

### 发明内容

本发明的一个目的是提供一种用于检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和氯丙嗪的特异性抗体；所述特异性抗体为所述氯丙嗪的多克隆抗体或单克隆抗体；所述半抗原的结构式如下：



其中，所述半抗原和氯丙嗪的特异性抗体可以以下述任一种形式存在：

- 1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；
- 2) 所述特异性抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

所述试剂盒还可以既包括半抗原和氯丙嗪的特异性抗体又包括抗抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；其中，所述半抗原和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 将所述半抗原与载体蛋白进行偶联，得到半抗原与载体蛋白的偶联物，将其作为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述半抗原进行酶标记后作为酶标记物。

所述氯丙嗪多克隆抗体或氯丙嗪单克隆抗体，均是用所述半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述载体蛋白可为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白等。

所述单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2544 的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-1 分泌产生的抗体。

所述氯丙嗪多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还可包括氯丙嗪标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

其中，所述浓缩洗涤液可为含有 0.6-1.3% 卵清蛋白和 0.001-0.002% 硫柳汞、pH 值为 7.6-8.2、0.05-0.2mol/L 的硼砂-硼酸缓冲液；所述浓缩复溶液可为含有 2-5% 的羊血清、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

所述浓缩洗涤液具体可为含有 1.0% 卵清蛋白、0.002% 硫柳汞防腐剂、pH 值为 7.6、0.2mol/L 硼砂-硼酸缓冲液；所述浓缩复溶液具体可为含有 4% 羊血清、pH 为 9.7、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液；所述底物显色液 A 液为过氧化脲，所述底物显色液 B 液为四甲基联苯胺；所述终止液为 2mol/L 的盐酸。

本发明中，在洗涤液中加入一定量卵清蛋白和硫柳汞的作用在于：卵清蛋白会减少抗体的非特异性吸附，还能对蛋白起到一定的保护作用；硫柳汞在溶液中抑制细菌的生长，对溶液的稳定性起到一个保护作用。

所述抗抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到酶标抗抗体；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为3:1。本发明的该改良的过碘酸钠法省略了封闭酶上氨基的步骤，节省了时间，又降低了辣根过氧化物酶（HRP）与抗抗体的浓度比率，节省了原材料。

氯丙嗪是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。因此采用了氯丙嗪的同类药物异丙嗪来制备半抗原，这样突出了氯丙嗪分子结构中的特征基团，使制备的氯丙嗪抗体对氯丙嗪的特异性很高。将半抗原与牛血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原，半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利，半抗原与牛血清白蛋白的结合摩尔比为10-12:1比较合适。在制备包被原时，半抗原与所述载体蛋白的摩尔配比为11:1比较合适。

制作包被有包被原的酶标板时，所述包被缓冲液可以为pH值为7.2-8.0、0.1mol/L巴比妥钠-盐酸缓冲液，所用封闭液可以为0.3-0.6%的人血清白蛋白、pH值为7.0-7.6 0.05mol/L Tris-缓冲液和0.5%的蔗糖。

本发明的另一个目的是提供一种检测氯丙嗪的方法。

本发明所提供的检测氯丙嗪的方法，包括以下步骤：

#### 1) 样品前处理

向每 2.0g 动物组织匀浆中，加入 3-6ml 乙腈和 1-4ml 0.05-0.15M 盐酸溶液，混匀，在 10-20℃ 条件下以 3000g 以上的速度离心 5-10min，取上清液体；向所述上清液体中加入 0.5-1.0ml 4-8M 氢氧化钠溶液，再加入 3-8ml 三氯甲烷，混匀，再在 10-20℃ 条件下以 3000g 以上的速度离心 5-10min，取下层液体，氮气吹干，加入 0.5-2ml 上述任一所述浓缩复溶液，溶解混匀，取样进行分析；

#### 2) 利用上述任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所得到的样品。

由保藏号为 CGMCC No. 2544 的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-1 分泌产生的氯丙嗪的单克隆抗体属于本发明的保护范围。

保藏号为 CGMCC No. 2544 的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-1 也属于本发明的保护范围。

本发明的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中氯丙嗪的残留量。本试剂盒中采用高特异性的氯丙嗪单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精

确度高、准确度高等特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测氯丙嗪的方法，操作简便，简化了传统检测方法的步骤，缩短了检测的时间，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法，能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查，将在氯丙嗪的检测中发挥重要作用。

### **附图说明**

图 1 为氯丙嗪的化学结构式。

图 2 为半抗原合成图。

图 3 为包被原为半抗原与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标抗抗体的试剂盒的标准曲线。

### **具体实施方式**

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。

实施例 1、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备及使用

一、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的检测原理如下：

当在酶标板微孔条上的包被原为半抗原与载体蛋白偶联物时，向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液后，加入氯丙嗪特异性抗体，样本中残留的氯丙嗪与酶标板上氯丙嗪偶联抗原竞争氯丙嗪特异性抗体，再加入酶标抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与氯丙嗪的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样本中氯丙嗪的残留含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅，通过与系列浓度氯丙嗪标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中氯丙嗪的浓度范围。

二、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒一般可以包括如下：

1、包被有半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.1-0.2  $\mu\text{g/ml}$ 。

2、酶标抗抗体工作液：酶标二抗为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；酶标二抗的稀释液为含有 2-5%的羊血清、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释度为 1:300，所述百分含量为质量百分含量。

3、氯丙嗪特异性抗体工作液：可以为氯丙嗪多克隆抗体或氯丙嗪单克隆抗体工作液；用稀释液将氯丙嗪单克隆抗体稀释 1000 倍，得到特异性抗体工作液，所述稀释液为含有 1.6%（质量百分含量）卵清蛋白、0.006%（质量百分含量）硫柳汞、pH 值为 7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

4、氯丙嗪标准品溶液（Sigma 德国进口）：6 瓶，浓度分别为 0 $\mu$ g/L，0.1 $\mu$ g/L，0.3 $\mu$ g/L，0.9 $\mu$ g/L，2.7 $\mu$ g/L，8.1 $\mu$ g/L。配制标准品的溶液为含有 2-5%的羊血清、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺，7ml/瓶，1 瓶。

6、终止液：1-2mol/L 盐酸或硫酸。

7、浓缩洗涤液：含有 0.6-1.3%（质量百分含量）卵清蛋白和 0.001-0.002%（质量百分含量）硫柳汞、pH 值为 7.6-8.2、0.05-0.2mol/L 的硼砂-硼酸缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

8、浓缩复溶液：含有 2-5%（质量百分含量）的羊血清、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；50ml/瓶，1 瓶。

三、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的具体组成及其制备：

#### （一）组成

1、包被有半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板，包被原的浓度可以为 0.15  $\mu$ g/ml。

2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；酶标抗抗体工作液稀释度为 1:300；酶标二抗的稀释液为含有 4%（质量百分含量）羊血清、pH 为 9.7、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释度为 1:300。

3、氯丙嗪单克隆抗体工作液：单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2544 的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-1 分泌产生，氯丙嗪单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的：用稀释液将氯丙嗪单克隆抗体稀释 1000 倍，得到单抗工作液，所述稀释液为含有 1.6%（质量百分含量）卵清蛋白、0.006%（质量百分含量）硫柳汞、pH 值为 7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

4、氯丙嗪标准品溶液（Sigma 德国进口）：6 瓶，浓度分别为 0 $\mu$ g/L，0.1 $\mu$ g/L，0.3 $\mu$ g/L，0.9 $\mu$ g/L，2.7 $\mu$ g/L，8.1 $\mu$ g/L，配制标准品的溶液为含有 4%羊血清、pH

为 9.7、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺，7ml/瓶，1 瓶。

6、终止液：2mol/L 盐酸。

7、浓缩洗涤液：含有 1.0%（质量百分含量）卵清蛋白、0.002%（质量百分含量）的硫柳汞防腐剂、pH 值为 7.6、0.2mol/L 硼砂-硼酸缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。

8、浓缩复溶液：含有 4%（质量百分含量）羊血清、pH 为 9.7、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液；200ml/瓶，1 瓶。

## （二）制备

### 1、包被有半抗原与卵清蛋白偶联物的酶标板的制备

#### （1）半抗原的制备

由于氯丙嗪缺少可活化的基团，所以本方法采用了氯丙嗪的同类药物异丙嗪来制备半抗原，方法如下：

称取 10mg 异丙嗪溶于 2.5ml 无水乙醇，与溶于 1ml 双蒸水的盐酸经胺（2.5mg）混合，在水浴加热回流条件下反应 2.5h，其间滴入 0.05mol/L 的 NaOH 溶液约 1ml。反应后滴入 0.2mol/L、pH 值为 4 的醋酸盐缓冲液约 1ml，并加入碎冰约 4mg，出现白色沉淀，在 4℃ 下静置 1d。将反应液离心（转速 10000r/min）10min，弃去上清液。白色沉淀用 2.5ml 二甲基甲酰胺溶解后，加入 6mg 琥珀酸酐，室温反应 2h，随后加入三乙胺 100 $\mu$ l，继续反应 4h，即得到半抗原（图 2）。

#### （2）包被原的制备

将半抗原与卵清蛋白偶联得到包被原，具体步骤如下：

将步骤（1）制备的半抗原 1ml、20mg 碳化二亚胺（DCC）和 12.5mg N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）充分溶解于 0.5mL DMF 中，于室温下搅拌 24 h，得到反应液 I 液；称取 OVA 50mg，使之充分溶解在 3.5mL PBS（pH 7.2）中，得到反应液 II 液；将 I 液缓慢加入到 II 液中（半抗原与卵清蛋白的摩尔比为 11:1），并于室温下搅拌 3h，用 0.01mol/L PBS 缓冲液透析 3d，每天换 2 次透析液，以除去未反应的小分子物质，以 12000 rpm 的速度离心 30min，收集上清，得到半抗原与卵清蛋白的偶联物，分装，于 -20℃ 保存备用。

#### （3）包被有包被原的酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成 0.1-0.2 $\mu$ g/ml，每孔加入 100 $\mu$ l，37℃ 温育 2h，

再4℃过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤2次，每次30秒，拍干，然后在每孔中加入150-200μl封闭液，37℃温育1-2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

其中，所用的包被缓冲液是pH值为7.6、0.1mol/L巴比妥钠-盐酸缓冲液；所用封闭液是含有0.3%的人血清白蛋白、0.5%的蔗糖、pH值为7.5、0.05mol/L的Tris-缓冲液；所述百分含量为质量百分含量；

## 2、氯丙嗪单克隆抗体的制备

### (1) 免疫原的制备

氯丙嗪是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

将半抗原与牛血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原，具体步骤如下：

取上述制备的半抗原1mL，冷却至10℃，加入氯甲酸异丁酯15μl，10℃搅拌反应30min，得到反应液I液；称取BSA 36mg，使之充分溶解在2mL 50mmol/L碳酸钠溶液中，得到反应液II液；将反应液I液逐滴缓慢滴加到II液中，半抗原与牛血清白蛋白的摩尔配比为(10-12):1，10℃反应4h，然后4℃过夜，用0.01mol/L PBS缓冲液透析3d，每天换2次透析液，分装，于-20℃保存备用。

### (2) 制备单抗

#### a. 动物免疫

将步骤(1)得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内，免疫剂量为150μg/只，使其产生抗血清。

#### b. 细胞融合和克隆化

取免疫Balb/c小鼠脾细胞，按7:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合，筛选得到稳定分泌氯丙嗪单克隆抗体的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株，将此细胞株命名为C-2-1，该细胞株已于2008年06月04日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编100101)，保藏号为CGMCC No. 2544。

#### c. 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞C-2-1用冻存液制成 $1 \times 10^7$ 个/ml的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入37℃水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养

瓶内培养。

#### d. 单克隆抗体的制备与纯化

可以通过以下两种方法制备单抗：

方法 1：将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 C-2-1  $5 \times 10^7$  个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化，纯化后的腹水放入  $-20^\circ\text{C}$  环境保存。

方法 2：增量培养法：将杂交瘤细胞 CGMCC No. 2544 置于 pH 为 7.4、0.2%碳酸氢钠、1640+20%小牛血清培养基中，在  $37^\circ\text{C}$  条件下进行培养，用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化，得到单克隆抗体， $-20^\circ\text{C}$  保存。

#### 3、氯丙嗪多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 1.5mg/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 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

#### 4、辣根过氧化物酶标记抗抗体：

羊抗鼠抗抗体购自北京博奥森公司，货号 bse-0296G。

羊抗兔抗抗体购自北京博奥森公司，货号 bse-0295G。

##### (2) 辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1；由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点，这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁，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物。

本发明采用改良的过碘酸钠法进行抗体的标记，其操作省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。降低了辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比率至 3:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶的活性的损失减少。

#### 四、以半抗原与载体蛋白偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒的应用

本发明试剂盒可以用于检测动物组织肌肉和肝脏等（如猪肌肉、鸡肝脏、鱼、虾）中的氯丙嗪。

### 1、组织样品前处理

取 2.0g 动物组织匀浆物，再加入 4ml 乙腈和 2ml 0.1M 盐酸溶液，用振荡器振荡 10min，再在 15℃条件下以 3000g 以上的速度离心 5min；吸取上层液至另一离心管中，加入 0.5ml 6M 氢氧化钠溶液，再加入 6ml 三氯甲烷，用振荡器振荡 10min，再在 15℃条件下以 3000g 以上的速度离心 5min；去除上层，取下层到另一试管中，于 50~60℃水浴氮气流下吹干，加入 1ml 浓缩复溶液（含有 4%羊血清、pH 为 9.7、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液）溶解干燥的残留物，用涡旋仪涡动 1min，混匀，取样进行分析。

### 2、检测

向包被有氯丙嗪偶联抗原的酶标板微孔中加入氯丙嗪标准品溶液或样品溶液 50 μl，再加入氯丙嗪单克隆抗体工作液 50 μl，用盖板模封板，37℃恒温箱中反应 30min，倒出孔内液体，每孔加入 250 μl 洗涤液，30s 后倒出孔内液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干；加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100 μl，37℃恒温箱中反应 30min，倒出孔内液体，重复洗板步骤；每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲，底物显色液 B 液四甲基联苯胺（TMB），轻轻振荡混匀，37℃恒温箱避光显色 15min，每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 50 μl，轻轻振荡混匀，用酶标仪波长设定在 450nm 处，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（B<sub>0</sub>）再乘以 100%，得到百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B<sub>0</sub>为 0μg/L 标准品溶液的平均吸光度值。

以氯丙嗪标准品浓度（μg/L）值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图（图 3）。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样本中氯丙嗪的残留量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。本发明中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 75 分钟可以

完成。

## 五、试剂盒灵敏度、精密度、准确度和保存期检测

### (一) 标准品精密度试验：

从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次（01 批、02 批、03 批）的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒，从每个试剂盒的酶标板中各抽出 20 个微孔，测定 0.9 $\mu\text{g}$  /L 氯丙嗪标准溶液的吸光度值（OD 值），计算变异系数。

实验结果如表 1 所示，标准品吸光度值的变异系数在 4.9%–12.8%之间，符合精密度小于或等于 20%的规定。

表 1、标准品可重复性试验（CV%）

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV %	01 批	6.2	8.9	10.4	12.8	7.2	8.6	10.4	11.6	5.9	10.4
	02 批	6.8	4.9	5.3	6.7	6.8	9.7	8.3	10.6	11.2	6.3
	03 批	5.5	6.9	7.0	8.6	10.7	6.2	6.8	9.7	6.9	11.5

### (二) 样本精密度和准确度试验

#### 1、样品精密度试验：

向不含氯丙嗪的鸡肉、猪肉、虾样本中添加氯丙嗪标准品，使氯丙嗪在样本中的终浓度为 4 $\mu\text{g}$ /kg，再分别按照实施例 1 中所述方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中所述的不同时间段制备的三个批次的试剂盒（01 批、03、06 批）中各抽取 3 个试剂盒，进行实验，每个样本重复 5 次，分别计算变异系数（CV%）。结果如表 2、表 3 和表 4 所示（各表中的数值为 5 次重复的平均值）。

结果表明鸡肉、猪肉、虾样本的变异系数均在 5.7%–15.4%之间，符合了《农业部文件》农医发【2005】17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度标准。

表 2、鸡肉可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	2.9	3.6	3.0	3.6	2.8	11.9
	3.7	3.4	2.9	3.6	3.3	9.2
	2.9	2.8	3.4	3.7	3.4	11.7
02	3.3	3.4	3.0	2.8	2.6	11.1
	2.6	3.7	3.4	3.6	3.1	13.5
	3.6	3.5	3.8	3.4	3.0	8.6
03	3.7	3.6	3.3	2.7	2.8	14.1
	3.5	3.4	3.3	3.0	3.3	5.7
	2.8	3.1	3.8	3.4	3.3	11.3

表 3、猪肉可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	2.9	3.1	3.5	3.7	3.4	9.6
	2.7	3.3	3.5	3.6	3.3	10.6
	3.0	3.5	3.8	3.4	3.7	8.9
02	3.1	3.8	3.3	2.7	2.9	13.4
	3.7	3.4	2.9	2.7	3.6	13.5
	3.2	3.0	3.7	3.5	3.4	8.0
03	2.6	2.8	3.4	3.7	3.3	14.3
	3.4	3.0	2.8	3.6	3.1	10.0
	3.1	3.5	2.7	2.9	3.4	10.7

表 4、虾可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g/L}$ )					变异系数 CV%
01	3.6	3.7	3.0	2.9	3.4	10.7
	3.3	3.4	3.2	2.8	3.6	9.1
	3.5	3.8	2.7	2.9	3.1	14.0
02	3.1	2.7	3.7	3.5	3.2	11.9
	2.7	2.9	3.3	3.7	3.6	13.4
	2.9	2.8	3.8	3.5	2.7	15.4
03	3.4	3.7	3.5	2.9	3.0	10.3
	3.0	2.8	3.7	3.4	3.5	11.3
	3.3	3.6	3.0	2.8	2.9	10.5

## 2、样本准确度试验

向不含氯丙嗪的鸡肉、猪肉、鸡肝、猪肝组织中添加氯丙嗪标准品溶液，使其终浓度分别为  $4\mu\text{g/kg}$  (L) 和  $8\mu\text{g/kg}$  (L)，然后按照实施例 1 中所述的样本前处理方法进行处理；再用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒进行检测，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度（准确度=实测值/添加值）。结果如表 5 所示。结果表明鸡肉样本添加回收率在 69.7%–92.7%之间，猪肉样本添加回收率在 68.9%–94.7%之间，虾样本添加回收率在 73.8%–94.1%之间。

表 5、试剂盒的准确度

样本	猪肉		鸡肉		猪肝		鸡肝		虾肉		
	40	80	40	80	40	80	40	80	40	80	
添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )											
准确度 %	1	69.7	90.3	82.4	76.1	75.8	73.8	69.7	90.3	77.9	94.1
	2	83.6	82.6	73.6	83.2	94.1	79.4	83.6	82.6	85.8	75.6
	3	84.5	87.4	79.2	68.9	86.3	85.2	84.5	87.4	83.6	85.6
	4	92.7	76.8	92.6	94.7	80.7	87.4	92.7	76.8	90.2	78.6
平均值%	82.6	84.3	82.0	80.7	84.2	81.5	82.6	84.3	89.6	93.5	

### (三) 交叉反应率试验:

选择与氯丙嗪有类似结构和类似功能的 5 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。用下式计算步骤三中试剂盒对其它药物的交叉反应率。试剂盒对于氯丙嗪的交叉反应率越大, 则其对该药物检测的特异性就越好。重复测定 3 次, 结果取平均值。

交叉反应率 (%) = (引起 50%抑制氯丙嗪的浓度/引起 50%抑制的氯丙嗪类似物浓度)  $\times$  100%

实验结果如表 6 所示, 表明, 本发明试剂盒对氯丙嗪的特异性好, 即本发明试剂盒可以检测氯丙嗪。

表 6、试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
氯丙嗪	100
异丙嗪	1
乙酰丙嗪	<0.5
氟哌啶醇	<0.1
阿扎哌隆	<0.1
阿扎哌醇	<0.5

#### (四) 试剂盒保存期试验

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、氯丙嗪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℃ 至少可以保存 6 个月以上。

#### (五) 试剂盒的最低检测限

取不含氯丙嗪的阴性鸡肉样本，用步骤三中试剂盒分别进行 20 次检测，测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

结果如表 7 所示，表明试剂盒的最低检测限为 0.50μg/kg。

表 7、阴性鸡肉样本测定结果统计表 (μg/kg)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.12	0.32	0.00	0.22	0.27	0.30	0.21	0.15
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.00	0.30	0.24	0.26	0.16	0.00	0.31	0.24
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.25	0.14	0.24	0.20	0.20	0.10	0.50	

实施例 2、用于检测氯丙嗪的试剂盒还可以有如下几种：

一、包被原为特异性抗体，酶标记物为酶标半抗原的试剂盒

(一) 本试剂盒的工作原理为：

当在微孔条上预包被氯丙嗪特异性抗体时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记半抗原溶液。样本中的氯丙嗪或氯丙嗪标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的氯丙嗪特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中氯丙嗪的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中氯丙嗪的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度的氯丙嗪标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中氯丙嗪的浓度范围。

(二) 本试剂盒的组成为：

(1) 包被有包被原的酶标板：包被原为氯丙嗪单克隆抗体，由保藏号为CGMCC No. 2544的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-1分泌产生；包被原的浓度可以为0.1-0.2  $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) 酶标记物：酶标半抗原工作液；标记酶为辣根过氧化物酶。

(3) 氯丙嗪标准品溶液 (Sigma德国进口)：6瓶，浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ ，0.1 $\mu\text{g/L}$ ，0.3 $\mu\text{g/L}$ ，0.9 $\mu\text{g/L}$ ，2.7 $\mu\text{g/L}$ ，8.1 $\mu\text{g/L}$ 。配制标准品的溶液为含有2-5%的羊血清、pH为9.1-9.9、0.05-0.1mol/L碳酸盐缓冲液。

(4) 底物显色液：由显色液A液和显色液B液组成，显色液A液为过氧化氢，显色液B液为邻苯二胺。

(5) 终止液为1-2mol/L硫酸溶液。

(6) 浓缩洗涤液：含有0.6-1.3% (质量百分含量) 卵清蛋白和0.001-0.002% (质量百分含量) 硫柳汞、pH值为7.6-8.2、0.05-0.2mol/L的硼砂-硼酸缓冲液；40ml/瓶，1瓶。

(7) 浓缩复溶液：含有2-5% (质量百分含量) 的羊血清、pH为9.1-9.9、0.05-0.1mol/L的碳酸盐缓冲液；50ml/瓶，1瓶。

二、包被原为半抗原与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标氯丙嗪特异性抗体的试剂盒

(一) 工作原理

当在微孔条上预包被半抗原与载体蛋白偶联物时，加入样本溶液或标准品溶液

后,再加入酶标氯丙嗪特异性抗体溶液。样本中的氯丙嗪或氯丙嗪标准品与酶标板上包被的半抗原竞争氯丙嗪特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与样本中氯丙嗪的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氯丙嗪的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度氯丙嗪标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中氯丙嗪的浓度范围。

## (二) 本试剂盒的组成

(1) 包被有包被原的酶标板:包被原为半抗原与卵清蛋白偶联物。

(2) 酶标记物:酶标特异性抗体工作液,标记酶为碱性磷酸酶;特异性抗体是单克隆抗体,由由保藏号为CGMCC No. 2544的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株C-2-1分泌产生。

(3) 氯丙嗪标准品溶液(Sigma德国进口):6瓶,浓度分别为0 $\mu$ g/L,0.1 $\mu$ g/L,0.3 $\mu$ g/L,0.9 $\mu$ g/L,2.7 $\mu$ g/L,8.1 $\mu$ g/L。配制标准品的溶液为含有2-5%的羊血清、pH为9.1-9.9、0.05-0.1mol/L碳酸盐缓冲液。

(4) 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液(4-硝基酚磷酸盐缓冲液)。

(5) 终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

(6) 浓缩洗涤液:含有0.6-1.3%(质量百分含量)卵清蛋白和0.001-0.002%(质量百分含量)硫柳汞、pH值为7.6-8.2、0.05-0.2mol/L的硼砂-硼酸缓冲液;40ml/瓶,1瓶。

(7) 浓缩复溶液:含有2-5%(质量百分含量)的羊血清、pH为9.1-9.9、0.05-0.1mol/L的碳酸盐缓冲液;50ml/瓶,1瓶。

## 三、包被原为抗抗体,酶标记物为酶标半抗原

### (一) 工作原理

当在微孔条上预包被抗抗体时,加入氯丙嗪特异性抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标半抗原溶液。样本中的氯丙嗪或氯丙嗪标准品与酶标半抗原竞争氯丙嗪特异性抗体,用显色液显色,样本吸光度值与样本中氯丙嗪的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氯丙嗪的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度氯丙嗪标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中氯丙嗪的浓度范围。

### (二) 试剂盒组成如下:

- (1) 包被有包被原的酶标板：包被原为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；包被原的浓度可以为 0.1-0.2  $\mu\text{g/ml}$ 。
- (2) 酶标记物：辣根过氧化物酶标记的半抗原；
- (3) 特异性抗体工作液：单克隆抗体：是由保藏号为 CGMCC No. 2544 的对氯丙嗪药物的单克隆杂交瘤细胞株 C-2-1 分泌产生。
- (4) 氯丙嗪标准品溶液 (Sigma 德国进口)：6 瓶，浓度分别为 0 $\mu\text{g/L}$ , 0.1 $\mu\text{g/L}$ , 0.3 $\mu\text{g/L}$ , 0.9 $\mu\text{g/L}$ , 2.7 $\mu\text{g/L}$ , 8.1 $\mu\text{g/L}$ ，配制标准品的溶液为含有 4%羊血清、pH 为 9.7、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。
- (5) 底物显色液：由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺，7ml/瓶，1 瓶。
- (6) 浓缩洗涤液：含有 0.6-1.3% (质量百分含量) 卵清蛋白和 0.001-0.002% (质量百分含量) 硫柳汞、pH 值为 7.6-8.2、0.05-0.2mol/L 的硼砂-硼酸缓冲液；40ml/瓶，1 瓶。
- (7) 浓缩复溶液：含有 2-5% (质量百分含量) 的羊血清、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；50ml/瓶，1 瓶。
- (8) 终止液：终止液为 1~2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

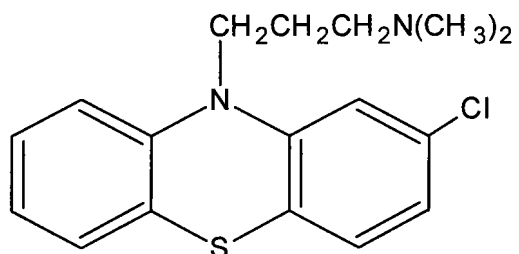


图 1

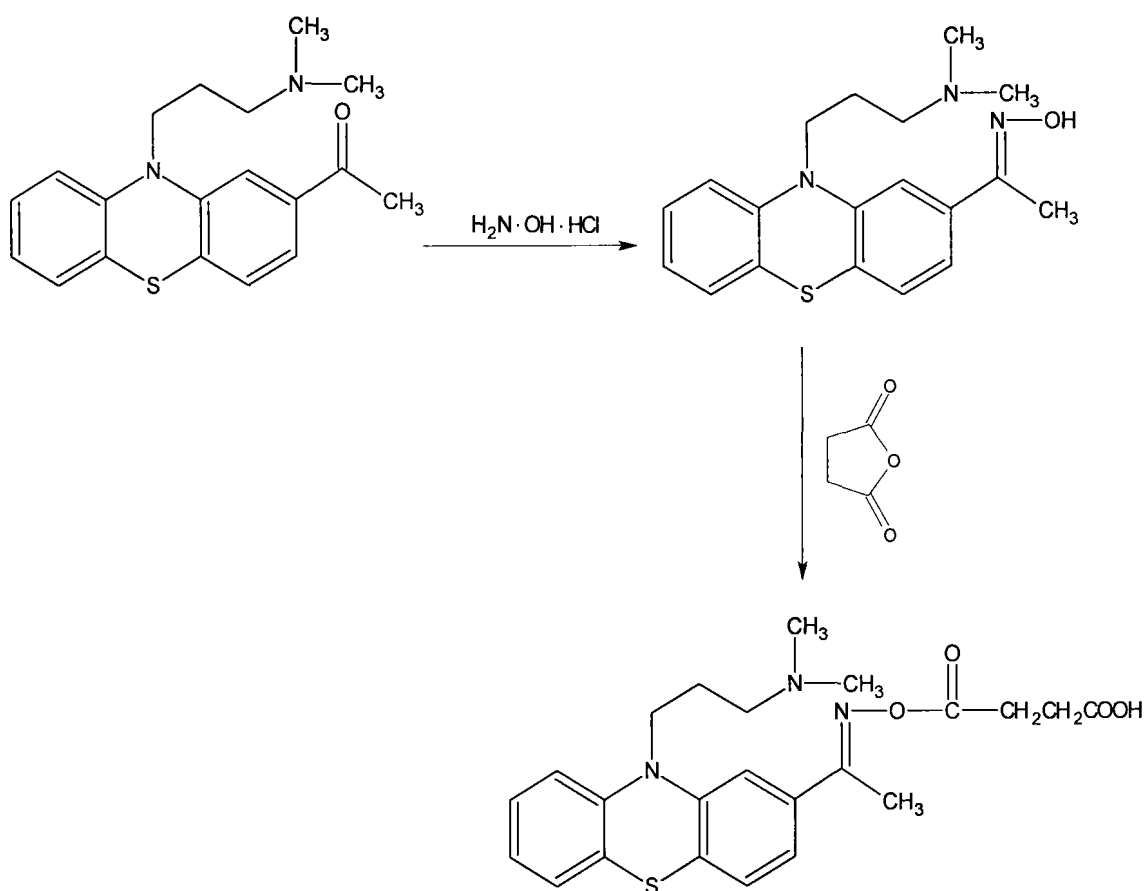


图 2

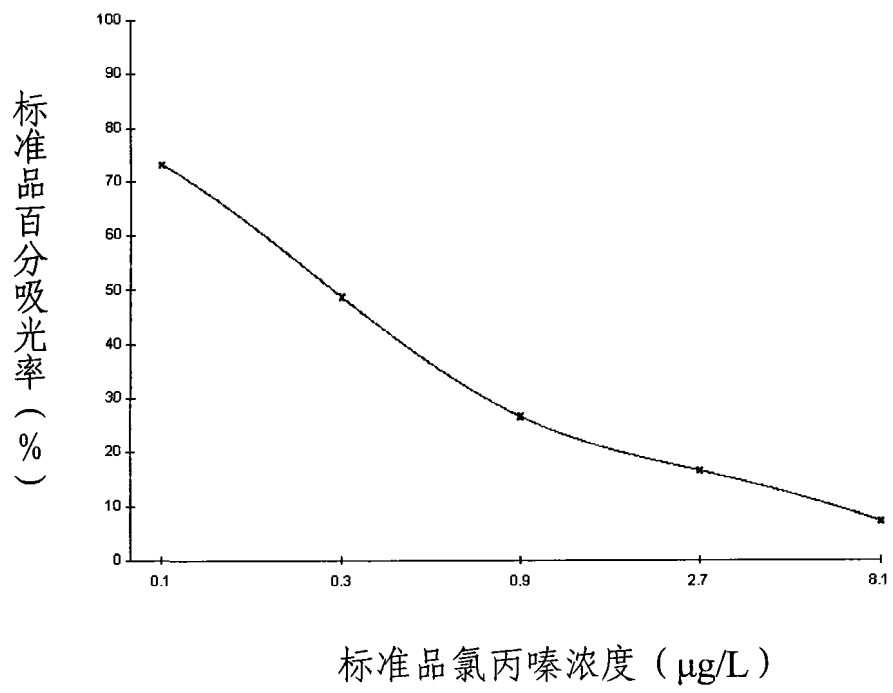


图 3

专利名称(译)	一种检测氯丙嗪的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101358967A</a>	公开(公告)日	2009-02-04
申请号	CN200810118444.X	申请日	2008-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(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 冯才伟 万宇平 冯才茂 汪善良 刘福林 赵正苗 李勇		
发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 冯才茂 汪善良 刘福林 赵正苗 李勇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/535 C12N5/12 C07D279/36		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101358967B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测氯丙嗪的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括半抗原和氯丙嗪的特异性抗体；所述特异性抗体为所述氯丙嗪的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的氯丙嗪单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测氯丙嗪的方法，操作简便，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法，能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查。

