



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572363 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410534145.X

(22) 申请日 2014.10.11

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 刘静

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有洛克沙肿偶联抗原的酶标板、洛克沙肿标准品溶液,浓缩酶结合物,酶结合物工作液,底物显色液,终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测样本中洛克沙肿的方法,它包括:首先进行样本前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测饲料(原料、配合料和浓缩料)样本中洛克沙肿的残留量,其操作简便、成本低、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测洛克沙肿的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于包括有:
 - (1) 包被有洛克沙肿偶联抗原的酶标板;
 - (2) 洛克沙肿标准品溶液;
 - (3) 浓缩酶结合物;
 - (4) 酶结合物稀释液;
 - (5) 底物显色液;
 - (6) 终止液。
2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述洛克沙肿偶联抗原是由洛克沙肿半抗原与载体蛋白偶联得到。
3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于所述洛克沙肿半抗原的制备方法主要包括如下步骤:
 - 1) 取 20 mg 洛克沙肿,10ul,1,3- 丙二胺,催化量的 4- 二甲氨基吡啶溶解于 2ml N, N' - 二甲基甲酰胺中,得到 I 液;
 - 2) 取 20mg N, N' - 二环己基碳二亚胺溶解于 0.5mlDMF 中,得到 II 液;
 - 3) 在 0℃ 条件下,将 II 液缓慢滴加至 I 液中,恢复室温后,继续反应 20 h;
 - 4) 蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷 / 甲醇,体积比 20 :1),得到洛克沙肿半抗原。
4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的浓缩酶结合物为酶标记的洛克沙肿单克隆抗体。
5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述浓缩酶结合物的标记酶为辣根过氧化物酶;酶结合物是采用过碘酸钠法将酶标记物与抗体偶联得到。
6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸溶液,所述底物显色液由底物液 A 液和底物液 B 液组成,底物液 A 液为过氧化脲溶液,底物液 B 液为四甲基联苯胺溶液。
7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所用包被缓冲液为 PH9.6,0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,所用封闭液为 PH7.2~7.4,0.5%~1% 牛血清白蛋白,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。
8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的酶结合物稀释液为 PH7.2~7.4,含 0.5%~1% 牛血清白蛋白,0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重最百分比。
9. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于 r 所述洛克沙肿标准品溶液浓度分别为 0ug/L、1ug/L、3ug/L、9ug/L、27ug/L、81ug/L。
10. 一种检测样品中洛克沙肿含量的方法,主要步骤包括:
 - 1) 将待测样品进行前处理;
 - 2) 用权利要求 1—9 任意一项所述的酶联免疫试剂盒进行检测;
 - 3) 分析检测结果。

检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒,其适用于饲料(原料、配合料、浓缩料)中洛克沙肿测定。

技术背景

[0002] 有机肿制剂作为饲料添加剂,在世界备广泛应用于禽类促生长,在禽畜养殖中取得了相应的经济效益。目前我国及美国药品与食品管理局(FDA)等批准使用的有机肿制剂主要有洛克沙肿和阿散酸。以洛克沙肿使用较多。它们都具有广谱杀菌作用,对肠道寄生虫也有抑制和杀灭作用。还可使毛细血管通透性增强,主要作用于肠道,改善肠道的理化环境。具有类似抗生素的作用。对猪能促进生长。提高饲料利用率,使其皮肤红润,毛发光亮,防止腹泻;对鸡可促进生长、提高饲料报酬和产蛋率,增进卵黄色素沉着,防止球虫病和大脑杆菌病的产生。因此,对动物有一定的促生长和改善产品外观作用。

[0003] 含砷饲料添加剂的使用,促进了畜牧业的发展,取得了较好的社会经济教益。但有机肿饲料添加剂在动物体内吸收较少,大多数随着禽粪便直接排出但有机肿饲料添加剂在动物体内吸收较少,大多数随着禽粪便直接排出。且前我国大多数的畜禽粪便未经无害化处理。大量含肿的畜排泄物进入环境,对环境造成了污染。在生态环境日趋恶化的今天,人们越来越关注含肿饲料添加剂随畜禽排泄物进入环境后在环境中的降解、转化,迁移、归趋以及对环境生物造成的影响。肿制剂的环境污染问题,已逐渐成为有肿制剂研究的重点,并在国际上形成新的研究热点,在我国在这方面研究目前处于起步阶段。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于洛克沙肿含量测定的酶联免疫试剂盒,其操作简单,适合现场大批量样品的筛选。

[0005] 本发明试剂盒,它包括:

- (1) 包被有洛克沙肿偶联抗原的酶标板;
- (2) 洛克沙肿标准品溶液;
- (3) 浓缩酶结合物;
- (4) 酶结合物稀释液;
- (5) 底物显色液;
- (6) 终止液。

[0006] 所述洛克沙肿偶联抗原为洛克沙肿半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白可为卵清蛋白、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白。

[0007] 所述洛克沙肿半抗原制备过程:

- 1) 取 20mg 洛克沙肿,10 μ l,1,3-丙二胺,催化量的 4-二甲氨基吡啶溶解于 2ml N,N'-二甲基甲酰胺中,得到 I 液;
- 2) 取 20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于 0.5mlDMF 中,得到 II 液;

3) 在 0℃条件下,将 II 液缓慢滴加至 I 液中,恢复室温后,继续反应 20 h;

4) 蒸除溶剂,柱层析(洗脱液:二氯甲烷/甲醇,体积比 20:1),得到洛克沙肿半抗原。

[0008] 所述浓缩酶结合物为酶标记的洛克沙肿单克隆抗体,所述标记酶为辣根过氧化物酶;酶结合物是采用过碘酸钠法将标记酶与抗体进行偶联得到的。

[0009] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括洛克沙肿标准品溶液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液。

[0010] 所述的终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸溶液,所述底物显色液由底物液 A 液和底物液 B 液组成,底物液 A 液为过氧化脲溶液,底物液 B 液为四甲基联苯胺溶液。

[0011] 所述的酶结合物稀释液为 PH7.2~7.4,0.5%~1% 牛血清白蛋白,0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0012] 其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为 pH9.6,0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,

所用封闭液为 PH7.2~7.4,0.5%~1% 牛血清白蛋白,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0013] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成 0.1~0.2ug/ml,每孔加入 100 uL,37℃温育 2h 或 4℃过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤 2 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 150~200uL 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。

[0014] 本发明的检测原理为:

当在微孔条上预包被洛克沙肿偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,样本中残留的洛克沙肿与酶标板上预包被的洛克沙肿偶联抗原竞争洛克沙肿的酶结合物,用底物显色液显色,样本吸光值与所含洛克沙肿的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中洛克沙肿的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的洛克沙肿标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中洛克沙肿的浓度范围。

[0015] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒洛克沙肿的方法,它包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

[0016] 本发明检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒主要采用竞争 ELISA 方法检测样品中洛克沙肿的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、准确度高、精确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,携带便利、使用方便、结构简单、检测方法快速、简便、适于大批量样品筛选。

附图说明

[0017] 图 1 为试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,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。

[0019] 实施例 1 试剂盒组分的制备**1、洛克沙肿半抗原制备**

1) 取 20mg 洛克沙肿, 10 μ l, 1,3-丙二胺, 催化量的 4-二甲氨基吡啶溶解于 2ml N,N'-二甲基甲酰胺中, 得到 I 液;

2) 取 20mg N,N'-二环己基碳二亚胺溶解于 0.5ml DMF 中, 得到 II 液;

3) 在 0℃ 条件下, 将 II 液缓慢滴加至 I 液中, 恢复室温后, 继续反应 20 h;

4) 蒸除溶剂, 柱层析 (洗脱液: 二氯甲烷 / 甲醇, 体积比 20 : 1), 得到洛克沙肿半抗原, 如图 1。

[0020] 2、抗原的制备

免疫原制备——洛克沙肿半抗原与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联得到免疫原。

[0021] 1) 取洛克沙肿半抗原 5.3mg 用 0.5ml DMF 溶解, 得到 I 液;

2) 取 BSA 30mg 用 2.0ml, pH7.0, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液溶解, 得到 II 液;

3) 取碳化二业胺 (EDC) 10mg 用 0.5ml, pH7.0, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液溶解, 得到 III 液;

4) 将 I 液与 II 液混合, 在搅拌下缓慢滴加入 III 液, 室温反应 2 小时, 4℃ 透析二天, 每天换液三次, 得到免疫原。

[0022] 包被原制备——洛克沙肿半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联得到包被原。

[0023] 1) 取洛克沙肿半抗原 5.3mg 用 0.5ml DMF 溶解, 得到 I 液;

2) 取 OVA 18mg 用 2.0ml, pH7.0, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液溶解, 得到 II 液;

3) 取 EDC 10mg 用 0.5ml, pH7.0, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液溶解, 得到 III 液;

4) 将 I 液与 II 液混合, 在搅拌下缓慢滴加入 III 液, 室温反应 2 小时, 4℃ 透析二天, 每天换液三次, 得到包被原。

[0024] 3、洛克沙肿单克隆抗体的制备**a. 动物免疫**

将上述步骤得到的免疫抗原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂最为 150 μ g/ 只, 使其产生抗血清。

[0025] b. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 9:1 (数最配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合筛选得到稳定分泌赭洛克沙肿单克隆抗体的洛克沙肿单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0026] c. 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^9 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。

[0027] d. 单克隆抗体的制备与纯化

增量培养法: 将杂交瘤细胞置于细胞培养基中, 在 37℃ 条件下进行培养, 用辛酸一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℃ 保存。

[0028] 4、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成 0.1~0.2 μ g/ml, 每孔加入 100 μ l, 37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 150~200 μ l 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。

[0029] 5、酶标记抗体的制备

将抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用过碘酸钠法进行偶联制备酶标记抗体,酶与抗体的摩尔浓度比为 2:1。

[0030] 实施例 2 检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

(1) 包被洛克沙肿偶联抗原的酶标板;

(2) 洛克沙肿标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L。

[0031] (3) 浓缩酶结合物;

(4) 酶结合物稀释液;

(5) 底物显色液由底物液 A 液和底物液 B 液组成,底物液 A 液为过氧化脲,底物液 B 液为四甲基联苯胺;

(6) 终止液为 2mol/L 硫酸。

[0032] 实施例 3 样品中洛克沙肿的检测

1. 样品前处理

用均质器均质饲料样本;称取 5.0g \pm 0.05g 均质后的饲料样小至 50ml 聚苯乙烯离心管中,加入 25ml 50% 甲醇,用振荡器剧烈振荡 5min,3000r 以上,室温 (20-25 $^{\circ}$ C /68-77 $^{\circ}$ F) 离心 5min;取 500 μ l 上清液至 2ml 聚苯乙烯离心管中,加入 500 μ l 10% 氯化钠水溶液用振荡器振荡 1min,混匀;取 20 μ l 用于分析。

[0033] 2. 用试剂盒检测

向包被有洛克沙肿偶联抗原的酶标板微孔中加入赭曲霉毒素 A 标准品溶液/样品 20 μ l,再加入酶结合物工作液 100 μ l (将浓缩酶结合物用酶结合物稀释液按照 1:20 的体积进行稀释),用盖板膜封板,25 $^{\circ}$ C 避光反应 10min,倒出孔内液体,每孔加入 250 μ l 去离子水充分洗涤 4-5 次,每次间隔 10s,用吸水纸拍干,每孔加入底物液 A 液过氧化脲 50 μ l,底物液 B 液四甲基联苯胺 (TMB) 50 μ l,轻轻振荡混匀,25 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 5min,每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 50 μ l,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)。

[0034] 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 (Bo) 再乘以 100%,得到百分吸光度值。以洛克沙肿标准品浓度 (μ g/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洛克沙肿的含量。

[0035] 实施例 4 洛克沙肿酶联免疫试剂盒灵敏度、精密度和准确度、保存期实验

1. 试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验,试剂盒灵敏度为 1 μ g/L, 分别对 20 份空白饲料 (原料、配合料、浓缩料) 样本进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光率的浓度,以 20 份样本洛克沙肿浓度的平均值加上 3 倍标准差表示检测限,结果得该方法对饲料 (原料、配合料、浓缩料) 样本检测限为 10 μ g/kg。

[0036] 2. 试剂盒准确度和精密度

以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数(CV%)作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。变异系数 CV% 计算公式为: $CV\% = SD/X \times 100\%$; 其中 SD 为标准偏差, X 为测定数据的平均值。回收率计算公式为: 回收率(%) = 实际测定值 / 理论值 $\times 100\%$ 。其中理论值为模拟样品的添加浓度。

[0037] 按 10ug/kg、20ug/kg、40 ug/kg 三个浓度洛克沙肿对原料、配合料、浓缩料样品进行添加回收测定, 每个样品做 4 个平行, 用三批不同试剂进行测定, 计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0038] 表 1 精密度及准确度试验

样品名称	添加浓度	回收率	批内变异系数	批间变异系数
原料	10	88.5	10.5	10.6
	20	98.7	7.8	8.8
	40	95.6	6.4	7.5
配合料	10	91.4	9.8	10.3
	20	96.0	11.3	11.6
	40	102.8	10.5	11.5
浓缩料	10	87.8	7.5	8.0
	20	95.6	11.3	11.6
	40	94.2	8.2	8.7

以 10、20、40ug/kg 三个浓度的洛克沙肿对饲料(原料、配合料、浓缩料)样品进行添加, 平均回收率在 87.8%~102.8% 之间; 变异系数均小于 20%。检测结果的精密度和准确度均符合相关标准要求。

[0039] 3. 试剂盒保存期试验

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、洛克沙肿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 7 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在 2~8℃ 可以保存 12 个月。

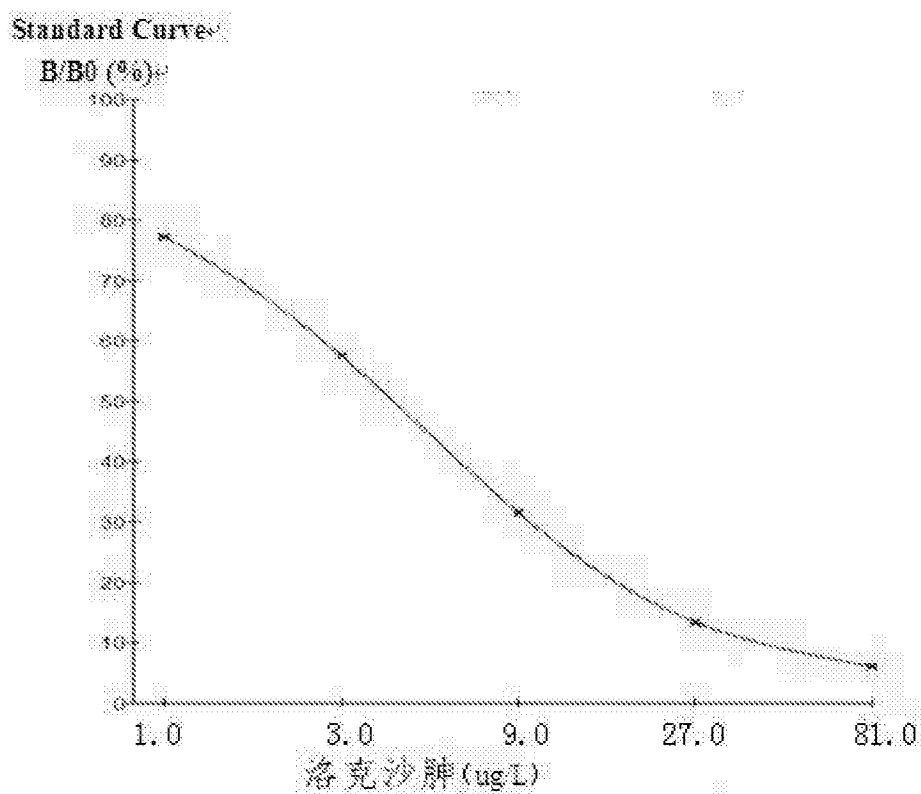


图 1

专利名称(译)	检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105572363A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410534145.X	申请日	2014-10-11
[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 刘静		
发明人	洪霞 刘静		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测洛克沙肿的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有洛克沙肿偶联抗原的酶标板；洛克沙肿标准品溶液，浓缩酶结合物，酶结合物工作液，底物显色液，终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测样本中洛克沙肿的方法，它包括：首先进行样本前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测饲料(原料、配合料和浓缩料)样本中洛克沙肿的残留量，其操作简便、成本低、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

