



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105785012 B

(45)授权公告日 2017. 10. 10

(21)申请号 201610238079.0

(22)申请日 2016.04.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105785012 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(73)专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 冯才伟 罗晓琴 冯静 赵正苗

吴小胜 曹东山 王建霞 王琳琛

何方洋 刘玉梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56)对比文件

CN 105087500 A, 2015.11.25,

CN 104387431 A, 2015.03.04,

Shuang Peng et al..Rapid enzyme-
linked immunosorbent assay and
immunochromatographic strip for detecting
ribavirin in chicken muscles.《Food and
Agricultural Immunology》.2015,第27卷(第4
期),

审查员 肖吉

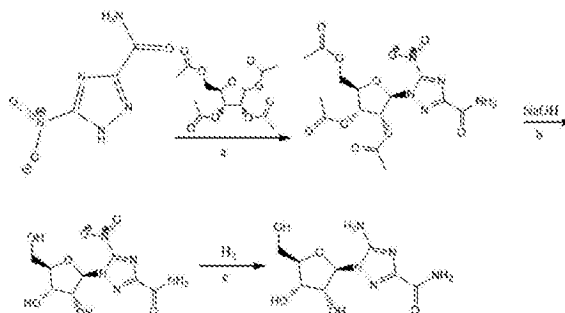
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

检测利巴韦林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利巴韦林的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、利巴韦林标准品溶液、酶标抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为利巴韦林偶联抗原,所述酶标抗体为酶标记的利巴韦林抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测利巴韦林的方法,它包括:首先进行样品前处理,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动物组织样本中利巴韦林的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种利巴韦林酶联免疫检测试剂盒的制备方法, 其中包括制备包被有包被原的酶标板、利巴韦林标准品溶液、酶标抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液, 所述包被原为利巴韦林偶联抗原, 所述酶标抗体为酶标记的利巴韦林抗体, 所述利巴韦林偶联抗原为利巴韦林半抗原与载体蛋白的偶联物, 所述利巴韦林半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

(1) 取 (9ci) -5-硝基-1H-1, 2, 4-噻唑-3-羧酰胺 5g, 加 β -D-呋喃核糖-1, 2, 3, 5-四乙酸酯 3.26g, 加 DMSO 溶解, 加双 (对硝基苯基) 磷酸酯 1.2g, 油浴加热, 170℃ 反应 2h; 停止反应, 加水, 乙酸乙酯萃取, 蒸干, 上硅胶柱, 石油醚与乙酸乙酯的体积比是 2:1, 洗脱分离, 得到中间体 a 4.15g;

(2) 取中间体 a 加氢氧化钠水溶液溶解, 60℃ 反应 2h, 停止反应, 中和, 旋蒸, 蒸干, 加乙醇重结晶, 得到硝基利巴韦林 2.11g;

(3) 取硝基利巴韦林 2.1g, 加甲醇溶解, 加催化量钯碳, 加氢气, 室温搅拌 6h, 检测, 原料反应完全, 抽滤除去钯碳, 旋蒸蒸干, 得到油状物, 1, 2-二氯乙烷重结晶得到氨基利巴韦林半抗原产物 1.21g。

2. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

3. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述的利巴韦林特异性抗体为利巴韦林药物单克隆抗体。

4. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶; 酶标抗体是采用过碘酸钠法将标记酶与抗体偶联得到。

5. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述底物显色液 A 液为过氧化脲溶液, 底物显色液 B 液为四甲基联苯胺溶液, 所述的终止液为 1~2mol/L 的硫酸溶液。

6. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述洗涤液为含 1% 吐温-20 的 0.1~0.3mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液。

7. 如权利要求 1 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述标准品溶液浓度分别为 0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L。

8. 如权利要求 1-7 任一项所述的利巴韦林酶联免疫检测试剂盒检测样本中利巴韦林残留的方法, 主要步骤包括:

- 1) 将待测样本进行前处理, 得到待测样本溶液;
- 2) 用权利要求 1-7 任一项所述的利巴韦林酶联免疫检测试剂盒检测待测样本溶液;
- 3) 分析检测结果。

检测利巴韦林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利巴韦林的酶联免疫试剂盒,可定性、定量检测动物组织中利巴韦林药物的残留量。

背景技术

[0002] 利巴韦林(RBV,病毒唑)为一种高效广谱抗病毒的核苷类药物,对多种DNA和RNA病毒均有较好的抑制作用,具有作用位点多、疗效高、毒性低、不易产生耐药性和副作用少等特点,现已用于多种病毒的治疗。在临床上对流感、各种呼吸道合胞病毒、病毒性肝炎、人免疫缺陷性病毒和流行性出血热的治疗有较高疗效。但是该类药物易产生耐药性,使病毒发生变异,长期使用对机体细胞产生毒害作用,其对人体产生的最突出的安全性问题是溶血性贫血、遗传毒性、生殖毒性和致癌性等。

[0003] 农业部于2005年先后颁布的农业部第560号公告《兽药地方标准废止目录》及农医发[2005]33号文件《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》中,均明确规定“禁止金刚烷胺、金刚乙胺、阿昔洛韦、吗啉(双)胍(病毒灵)、利巴韦林等及其盐、酯的单、复方等制剂生产、经营和使用。违者按生产、经营假兽药和使用禁用兽药处理,依照《兽药管理条例》予以处罚”。

[0004] 目前国内外均无动物源性食品中利巴韦林残留测定的标准方法。由于动物源性食品基质复杂,在提取净化测定过程中可能对利巴韦林造成干扰。另外,利巴韦林是弱碱性的极性小分子,又为核苷类化合物,与组织中的一些内源性物质结构较为类似,给检测带来了一定的困难。目前文献报道的方法主要有放射免疫法、液相色谱法、气相色谱串联质谱法以及液相色谱串联质谱法等。这些方法检测的基体大部分是血液、药剂或兽药等,仅有少数文献报道了动物组织中利巴韦林残留的检测方法。仪器方法具有灵敏度高、结果准确等优点,但是资金和人员等投入成本较高。本发明应用酶联免疫法,测定动物组织中利巴韦林药物的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广等优点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种能够检测动物组织中利巴韦林药物残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0006] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、利巴韦林标准品溶液、酶标抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为利巴韦林偶联抗原,所述酶标抗体为酶标记的利巴韦林抗体。

[0007] 所述利巴韦林偶联抗原是由利巴韦林半抗原与载体蛋白偶联得到,所述利巴韦林半抗原是经还原反应得到,所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0008] 所述利巴韦林特异性抗体是以利巴韦林偶联抗原作为免疫原制备获得,所述利巴

韦林特异性抗体可为利巴韦林单克隆抗体或利巴韦林多克隆抗体,其中优选利巴韦林单克隆抗体。

[0009] 所述酶标抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶标抗体是由酶和利巴韦林抗体偶联得到的。

[0010] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括利巴韦林标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0011] 所述利巴韦林标准品溶液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。

[0012] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,A为过氧化氢或过氧化脲,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2mol/L的硫酸或液盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

[0013] 所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0014] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.02mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0015] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液为pH值为7.1~7.5,含有1%~3%酪蛋白、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0016] 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20 μ g/mL,每孔加入100 μ l,25℃避光孵育2h或4℃过夜,倾去孔中液体,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,25℃避光孵育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0017] 本发明的检测原理为:

[0018] 本试剂盒采用直接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的利巴韦林和酶标板微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗利巴韦林的酶标抗体,用TMB底物显色,样本吸光度值与其所含残留物利巴韦林的含量成负相关,与标准曲线比较,再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样本中利巴韦林的残留量。

[0019] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测利巴韦林的方法,它包括步骤:

[0020] (1) 样品前处理;

[0021] (2) 用试剂盒进行检测;

[0022] (3) 分析检测结果。

[0023] 本发明检测利巴韦林的酶联免疫试剂盒主要采用ELISA方法定性或定量检测样品中利巴韦林的含量;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、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0024] 图1:利巴韦林半抗原合成路线图

[0025] 图2:试剂盒标准曲线图

具体实施方式

[0026] 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。

[0027] 实施例1 试剂盒组分的制备

[0028] 1、利巴韦林半抗原的制备

[0029] a) 取(9ci)-5-硝基-1H-1,2,4-噻唑-3-羧酰胺5g,加 β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯3.26g,加DMSO溶解,加双(对硝基苯基)磷酸酯1.2g,油浴加热,170℃反应2h。停止反应,加水,乙酸乙酯萃取,蒸干,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯(v/v,2/1)洗脱分离,得到中间体a 4.15g。

[0030] b) 取中间体a加氢氧化钠水溶液溶解,60℃反应2h,停止反应,中和,旋蒸,蒸干,加乙醇重结晶,得到硝基利巴韦林2.11g。

[0031] c) 取硝基利巴韦林2.1g,加甲醇溶解,加催化量钯碳,加氢气,室温搅拌6h,检测,原料反应完全,抽滤除去钯碳,旋蒸蒸干,得到油状物,1,2-二氯乙烷重结晶得到氨基利巴韦林半抗原产物1.21g。

[0032] 2、抗原的制备

[0033] 免疫原制备——利巴韦林半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0034] 取15mg氨基利巴韦林半抗原,溶解于1mL DMF中,稀释与pH 9.1的CB中,加戊二醛0.2mL,搅拌反应2h,得到A液。称取BSA50mg,使之充分溶解在4mL CB(PH 9.5)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h,用0.01mol/1PBS 4℃透析3d,每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0035] 包被原制备——利巴韦林半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原。

[0036] 取10mg氨基利巴韦林半抗原,溶解于1mL稀盐酸中,冷却到0℃搅拌,加亚硝酸钠水溶液0.5mL,搅拌1h,得到A液。称取OVA50mg,使之充分溶解在4mL CB(PH 9.0)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于低温下搅拌4h;用0.01mol/1PBS 4度透析3d每天换3次透析液。分装,于-20℃保存备用。

[0037] 3、利巴韦林单克隆抗体的制备

[0038] 动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 μ g/只,使其产生抗血清。

[0039] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌利巴韦林单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0040] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 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。

[0041] 单克隆抗体的生产与纯化：将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只，7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只，7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，-20℃保存。

[0042] 4、酶标抗体的制备

[0043] 将利巴韦林抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联得到。

[0044] 5、酶标板的制备

[0045] 用包被缓冲液将包被原稀释成20μg/mL，每孔加入100μl，25℃避光孵育2h，倾去孔中液体，用洗涤液洗涤2次，每次30s，拍干，然后在每孔中加入200μl封闭液，25℃避光孵育2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0046] 实施例2 检测利巴韦林的酶联免疫试剂盒的组建

[0047] 组建检测利巴韦林的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

[0048] (1) 包被利巴韦林偶联抗原的酶标板；

[0049] (2) 利巴韦林标准品溶液6瓶，浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L、81μg/L；

[0050] (3) 用辣根过氧化物酶标记的利巴韦林抗体；

[0051] (4) 底物显色液由A液和B液组成，A液为过氧化脲，B液为四甲基联苯胺；

[0052] (5) 终止液为2mol/L硫酸；

[0053] (6) 洗涤液为pH值为7.4，含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比；

[0054] (7) 复溶液为pH值为7.0、0.02mol/L的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比。

[0055] 实施例3 动物组织中利巴韦林的检测

[0056] 1、样品前处理

[0057] 称取 1.0 ± 0.05 g组织样本至50ml聚苯乙烯离心管中，加入10ml甲醇，用振荡器振荡2min，混匀，3000g室温(20-25℃/68-77°F)离心5min；移取1ml上层有机相至10ml洁净干燥玻璃管中，于50-60℃(68-86°F)水浴氮气流下吹干；加入1ml复溶工作液，涡动3min；取50μl用于分析。

[0058] 2、用试剂盒检测

[0059] 加标准溶液/样本50μl到对应的微孔中，再加入抗体工作液50μl/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液250μl/孔，充分洗涤4-5次，每次间隔10s，用吸水纸拍干。加入酶标二抗100μl/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min，取出重复洗板。加入底物液A液50μl/孔，再加底物液B液50μl/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中显色15min。加入终止液50μl/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪检测波长450nm，参比波长620nm，请在5min内读完数据)，测定每孔OD值。

[0060] 3、检测结果分析

[0061] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值，再乘以100%，得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标，以利巴韦林标准品浓度(μg/L)的对数为横坐标，绘制

标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中利巴韦林的实际浓度。

[0062] 实施例4 利巴韦林技术参数的确定试验

[0063] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0064] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为0~81 $\mu\text{g/L}$, $1C_{50}$ (50%抑制浓度)浮动范围为2.2~6.5 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对动物组织的检测限均为5 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0065] 2、样本精密度和准确度试验

[0066] 以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times 100\%$,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差 $RSD\% = SD/X \times 100\%$,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0067] 按5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 两个浓度的利巴韦林分别对鸡肉、鸭肉、猪肉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。

[0068] 表1鸡肉样本精密度及准确度试验

[0069]

利巴韦林	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
鸡肉	5	87.4	8.1	9.4
	10	80.2	9.0	9.7

[0070] 表2鸭肉样本精密度及准确度试验

[0071]

利巴韦林	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
鸭肉	5	92.3	9.1	9.5
	10	84.8	8.3	9.9

[0072] 表3猪肉样本精密度及准确度试验

[0073]

利巴韦林	添加浓度($\mu\text{g/kg}$)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
猪肉	5	82.2	7.3	8.9
	10	94.6	8.1	9.3

[0074] 以5 $\mu\text{g/kg}$ 、10 $\mu\text{g/kg}$ 两个浓度的利巴韦林分别对鸡肉、鸭肉、猪肉进行添加,平均回收率在80.2%~94.6%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0075] 3、试剂盒稳定性试验

[0076] 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、利巴韦林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可以在2~8℃至少保存12个月以上。

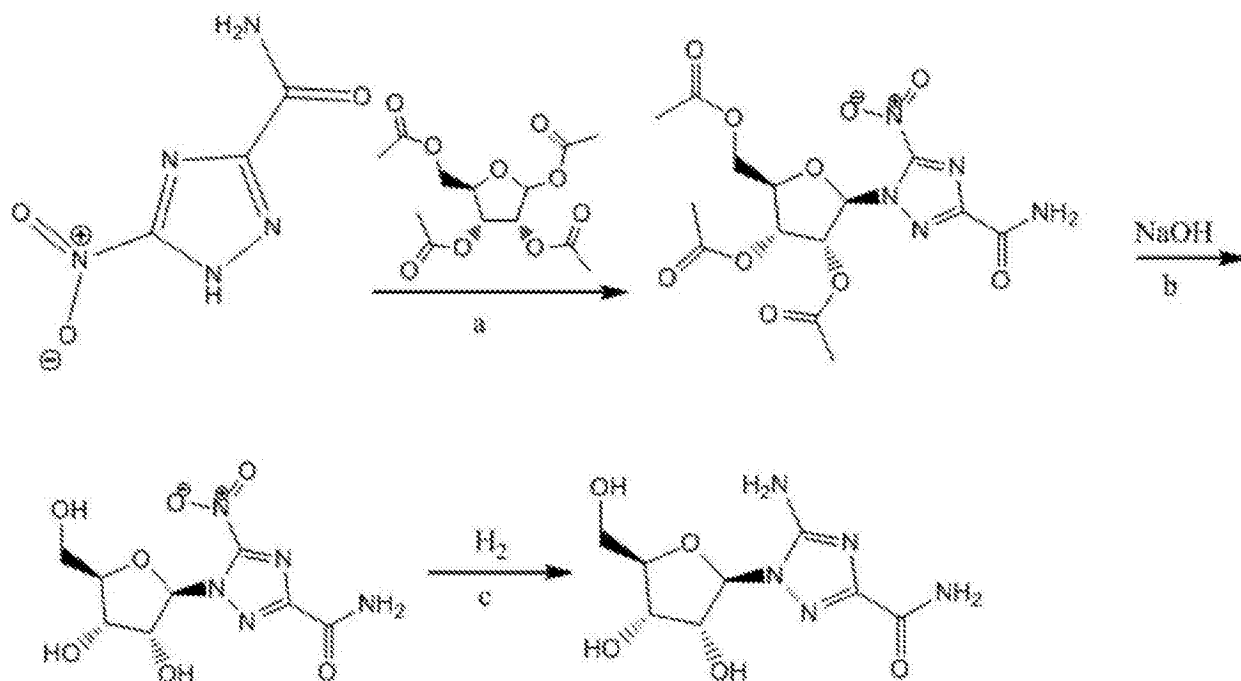


图1

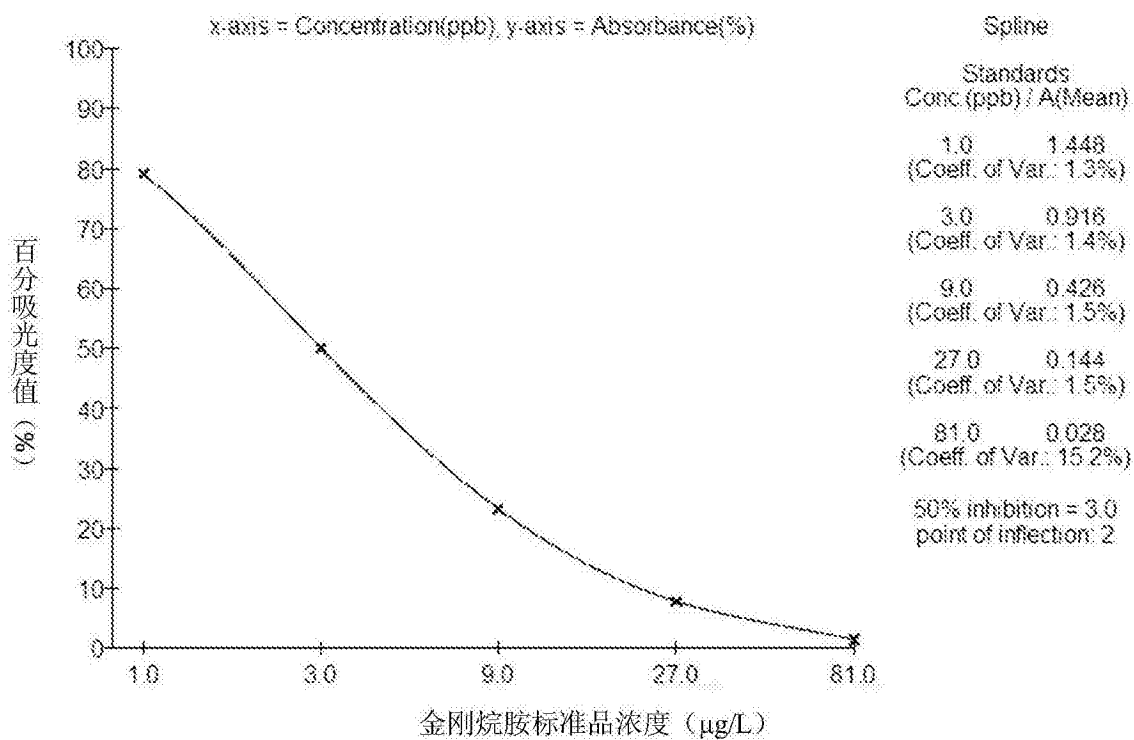


图2

专利名称(译)	检测利巴韦林的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105785012B	公开(公告)日	2017-10-10
申请号	CN201610238079.0	申请日	2016-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	冯才伟 罗晓琴 冯静 赵正苗 吴小胜 曹东山 王建霞 王琳琛 何方洋 刘玉梅		
发明人	冯才伟 罗晓琴 冯静 赵正苗 吴小胜 曹东山 王建霞 王琳琛 何方洋 刘玉梅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N2430/00		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN105785012A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测利巴韦林的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、利巴韦林标准品溶液、酶标抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液，所述包被原为利巴韦林偶联抗原，所述酶标抗体为酶标记的利巴韦林抗体。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测利巴韦林的方法，它包括：首先进行样品前处理，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动物组织样本中利巴韦林的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

