



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061168 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810978254.9

(22)申请日 2018.08.27

(71)申请人 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 万宇平 何方洋 崔海峰 王琳琛
韩深 王兆芹 韩光耀 冯才伟
杨春艳 杨烁

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

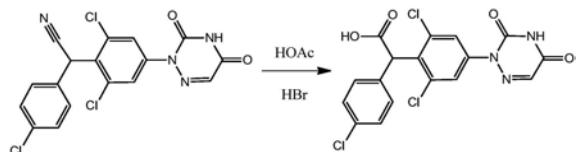
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

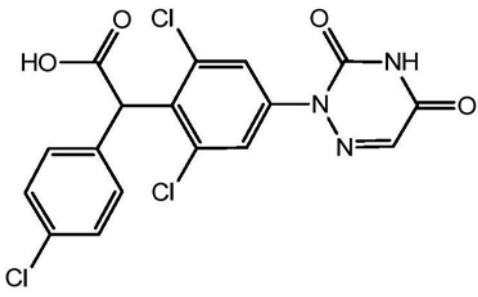
检测地克珠利的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种检测地克珠利的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有地克珠利偶联抗原的酶标板、地克珠利单克隆抗体、酶标记抗抗体、地克珠利标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测地克珠利的方法,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中地克珠利的含量,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. 一种检测地克珠利的酶联免疫试剂盒,包括:包被有地克珠利偶联抗原的酶标板、地克珠利单克隆抗体、酶标记抗抗体、地克珠利标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;其特征在于所述地克珠利单克隆抗体是以地克珠利偶联抗原作为免疫原制备获得,所述地克珠利偶联抗原是由地克珠利半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原,所述地克珠利半抗原是由地克珠利与冰乙酸、氢溴酸反应得到,分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记抗抗体的抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,所述底物液A液为过氧化氢或过氧化脲,所述底物液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2mol/L的硫酸溶液。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液;所述复溶液为pH值为7.0、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述地克珠利标准品溶液的浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L。

6. 一种检测样品中地克珠利残留量的方法,包括步骤:

(1) 样品前处理;

(2) 用权利要求1~5任一项所述的试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

检测地克珠利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地克珠利的酶联免疫试剂盒,其特别适于动物组织中地克珠利含量的检测。

背景技术

[0002] 地克珠利是20世纪80年代由比利时杨森制药公司开发研制的非聚醚类化学合成抗球虫药,属三嗪苯乙腈化合物,具有高效、低毒、广谱的特点,常被用于养禽业和养兔业抗球虫病的预防和治疗。地克珠利对水生动物孢子虫等有抑制或杀灭作用,在水产养殖中主要用于防治鲤科鱼类粘孢子虫、碘泡虫、尾孢子、四极虫、单极虫等孢子虫病。由于地克珠利具有低毒、广谱、用量小等特点,在使用过程中存在滥用药物、不遵守休药期等情况,因此带来了一系列兽药残留问题,对人体健康存在潜在的危害。

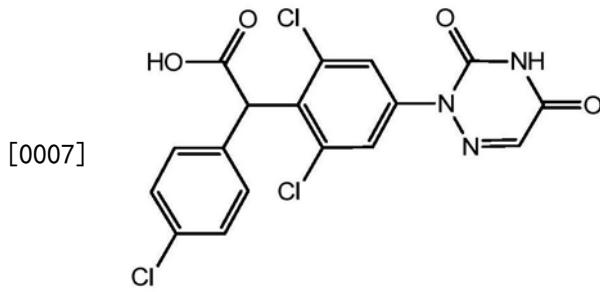
[0003] 地克珠利的残留标示物是其本身。各国政府和国际组织均制定了动物源性食品中地克珠利的最大残留限量(maximum residue limits, MRLs)。我国农业部公告第235号规定地克珠利在绵羊/禽/兔的肌肉、脂肪、肝和肾组织中的MRLs分别为500、1000、3000、2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 目前,地克珠利残留量的检测方法主要有气相色谱-质谱法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法及高分辨质谱法。这些方法可以同时进行地克珠利等同类药物的多残留定性定量分析,但需要昂贵的仪器和专门的技术人员,样品前处理过程复杂且花费高、费时长,难以满足大量样品和现场样品快速检测的需要。酶联免疫吸附分析法(ELISA)具有简便快速、特异灵敏、样品容量大、分析成本低的特点,可以简化甚至省去样品净化步骤,在大量样本和现场样本快速筛选检测中显示出独特优势,能够更好地满足我国食品企业、政府职能部门等开展检测工作,极具发展潜力。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于地克珠利检测的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样本筛选的定性、定量检测方法。

[0006] 本发明试剂盒,它包括:包被有地克珠利偶联抗原的酶标板、地克珠利单克隆抗体、酶标记抗抗体、地克珠利标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液;所述地克珠利单克隆抗体是以地克珠利偶联抗原作为免疫原制备获得,所述地克珠利偶联抗原是由地克珠利半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原,所述地克珠利半抗原是由地克珠利与冰乙酸、氢溴酸反应得到,分子结构式为:



- [0008] 所述酶标记抗抗体的抗抗体为羊抗鼠抗抗体。
- [0009] 所述酶标记抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶;所述酶标记抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的。
- [0010] 为了更方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括地克珠利标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。
- [0011] 所述地克珠利标准品溶液5瓶,浓度分别为0μg/L、1μg/L、3μg/L、9μg/L、27μg/L。
- [0012] 所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,所述底物液A液为过氧化氢或过氧化脲,所述底物液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、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液。
- [0014] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液。
- [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。
- [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20μg/mL,每孔加入100μL,37℃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150~200μL封闭液,37℃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] 在微孔条上预包被地克珠利偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入地克珠利单克隆抗体溶液,样本中的地克珠利与酶标板上包被的地克珠利偶联抗原竞争地克珠利单克隆抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光度值与地克珠利的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得到样本中地克珠利的残留量;同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的标准品溶液颜色的比较可粗略判断样本中地克珠利残留量的浓度范围。
- [0019] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测地克珠利残留量的方法,它包括步骤:
- [0020] (1)样本前处理;
- [0021] (2)用试剂盒进行检测;
- [0022] (3)分析检测结果。
- [0023] 本发明检测地克珠利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 本中地克珠利的残留量;对样本的前处理要求低,样本前处理过程简单,能同时快速检测大批量样本;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、适于大批量样本筛选的定性、定量检测。

附图说明

[0024] 图1:地克珠利半抗原合成路线图

[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、地克珠利半抗原的合成(合成路线见附图1)

[0029] 取地克珠利1g,加冰乙酸5mL溶解澄清,加氢溴酸水溶液20mL,100℃加热,搅拌反应2h。停止反应,加水100mL,加1mol/L NaOH中和至pH 6,加乙酸乙酯200mL×3,萃取三次,合并有机相,20g无水硫酸钠干燥,蒸干,上硅胶柱,乙酸乙酯/石油醚(v/v,1/1)洗脱分离,得到羧基地克珠利半抗原产物0.91g,收率87.5%。

[0030] 2、地克珠利偶联抗原的合成及鉴定

[0031] 免疫原制备——地克珠利半抗原与牛血清白蛋白(BSA) 偶联得到免疫原。

[0032] 取羧基地克珠利半抗原16mg,加N,N-二甲基甲酰胺0.5mL溶解,加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)6mg,碳化二亚胺(EDC)12mg,搅拌2h,得到半抗原活化液A液;取BSA 50mg,加0.1mol/L碳酸氢钠溶液3mL,溶解澄清,得到B液;将A液缓慢滴加到B液中,4℃搅拌4h,0.02mol/L PB缓冲液透析纯化3d,每天换液3次,分装,得到地克珠利半抗原-BSA免疫原,-20℃保存备用。

[0033] 包被原制备——地克珠利半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0034] 取羧基地克珠利半抗原9mg,加N,N-二甲基甲酰胺0.4mL溶解,加NHS 5mg,EDC 9mg,搅拌2h,得到半抗原活化液A液;取OVA 50mg,加0.1mol/L碳酸氢钠溶液3mL,溶解澄清,得到B液;将A液缓慢滴加到B液中,4℃搅拌4h,0.02mol/L PB缓冲液透析纯化3d,每天换液3次,分装,得到地克珠利半抗原-OVA包被原,-20℃保存备用。

[0035] 按合成地克珠利偶联抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,进行紫外(200nm~400nm)扫描测定,通过比较三者分别在260nm和280nm的吸光值计算其结合比。偶联物地克珠利半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与地克珠利半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明地克珠利半抗原-载体蛋白的合成是成功的。

[0036] 3、地克珠利单克隆抗体的制备

[0037] (1) 杂交瘤细胞的获得

[0038] 1)首次免疫:将地克珠利半抗原-BSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射6周龄的Balb/c小鼠,每只0.2mL;

[0039] 2)加强免疫两次:从首次免疫开始,每两周加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂代替

弗氏 完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

[0040] 3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1mL,三天后处死小鼠,取 其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

[0041] 4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌地克珠利单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0042] (2) 单克隆抗体的制备

[0043] 1) 细胞复苏:取出地克珠利单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,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;

[0044] 2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵 法进行纯化,得到地克珠利单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0045] (3) 单克隆抗体效价的测定

[0046] 用间接竞争ELISA法测定抗体的效价为1:(100000~300000)。

[0047] 间接竞争ELISA方法:用地克珠利半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入地克珠利标准品溶液、地克珠利单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体溶液,25℃反应 30min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应15min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450nm处测定每孔吸光度值。

[0048] (4) 单克隆抗体特异性的测定

[0049] 抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用 交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0050] 本实验将地克珠利、妥曲珠利、莫能菌素、马杜霉素、盐霉素做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到IC₅₀,然后按下式计算交叉反应率:

$$[0051] \text{交叉反应率} (\%) = \frac{\text{引起 50\% 抑制的地克珠利浓度}}{\text{引起 50\% 抑制的地克珠利类似物浓度}} \times 100\%$$

[0052] 结果显示各类似物的交叉反应率为:地克珠利100%、妥曲珠利11.4%、莫能菌素<0.1%、马杜霉素<0.1%、盐霉素<0.1%。本发明抗体对妥曲珠利、莫能菌素、马杜霉素、盐霉素等 类似物无交叉反应,只针对地克珠利有特异性结合。

[0053] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0054] 以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0055] 5、酶标记抗抗体的制备

[0056] 将羊抗鼠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体的摩尔浓度比为4:1,由于辣根过氧化物酶在强氧化作用下产生许多与抗体结合的位点,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体。为了解决这个问题,我们将 传统的方法进行了改良,即:

[0057] (1) 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;

[0058] (2) 降低辣根过氧化物酶与抗体的摩尔浓度比率至2:1,改良后的方

法简便,对酶活性的损失减少。

[0059] 6、酶标板的制备

[0060] 用包被缓冲液将包被原(地克珠利半抗原-OVA偶联物)稀释成20 μ g/mL,每孔加入100 μ L,37℃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200 μ L封闭液,37℃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。

[0061] 实施例2检测地克珠利的酶联免疫试剂盒的组建

[0062] 组建检测地克珠利的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0063] (1)包被地克珠利偶联抗原的酶标板;

[0064] (2)地克珠利标准品溶液5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;

[0065] (3)地克珠利单克隆抗体工作液;

[0066] (4)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0067] (5)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;

[0068] (6)终止液为2mol/L硫酸;

[0069] (7)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、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液;

[0070] (8)复溶液为pH值为7.0、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0071] 实施例3样本中地克珠利的检测

[0072] 1、样本前处理

[0073] 称取1.0g±0.05g组织样本至50mL离心管中,加入1mL 0.1mol/L氢氧化钠,用涡动仪涡动1min,再加入7mL乙腈,用涡动仪涡动2min,3000g室温(20~25℃)离心5min;移取1mL上层有机相至10mL洁净干燥玻璃管中,于50~60℃水浴氮气流下吹干;加入1mL复溶液,用涡旋仪涡动30s;取50 μ L用于分析。

[0074] 2、用试剂盒检测

[0075] 向包被有地克珠利偶联抗原的酶标板微孔中加入地克珠利标准品溶液或经前处理的样本溶液50 μ L/孔,然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体50 μ L/孔,再加入地克珠利单克隆抗体工作液50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min;倒出孔内液体,每孔加入250 μ L洗涤液充分洗涤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,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15min,每孔加入终止液2mol/L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)。

[0076] 3、检测结果分析

[0077] 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(B₀)再乘以100%,得到百分吸光度值。以地克珠利标准品浓度(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,如图2所示。用同样的办法计算样本溶液的百分吸光度值,相对应每一个样本的地克珠利含量则可从标准曲线上读出。

[0078] 实施例4地克珠利酶联免疫试剂盒技术参数的确定试验

[0079] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0080] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,试剂盒标准曲线最低点为1 μ g/L,标准曲线的范围为1~27 μ g/L,IC₅₀(50%抑制浓度)浮动范围为2.5~4.5 μ g/L;对空白猪肉、鸡肉样本各

20份进行检测,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,结果得该方法对组织样本的检测限为8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0081] 2、样本精密度和准确度试验

[0082] 以回收率作为准确度评价指标,以重复测定某一浓度样本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 $\times 100\%$, 其中理论值为样本的添加浓度;相对标准偏差 $\text{RSD\%} = \text{SD}/\bar{X} \times 100\%$, 其中SD为标准偏差, \bar{X} 为测定数据的平均值。

[0083] 按8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度地克珠利对空白猪肉、鸡肉样本进行添加回收测定, 每个样本做4个平行, 用三批不同试剂盒进行测定, 计算样本平均回收率及精密度结果见下表。

[0084] 表1 精密度及准确度试验

[0085]

样本	添加浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
猪肉	8	94.1	7.3	9.1
	16	102.5	5.9	8.5
	32	87.6	8.0	10.2
鸡肉	8	105.0	6.4	7.9
	16	92.7	7.7	8.6
	32	98.4	7.2	9.4

[0086] 以8、16、32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度的地克珠利对空白猪肉、鸡肉样本进行添加, 平均回收率在80%~110%之间;批内、批间相对标准偏差均小于15%。

[0087] 3、试剂盒稳定性试验

[0088] 试剂盒保存条件为2~8°C, 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、地克珠利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°C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°C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°C至少保存12个月以上。

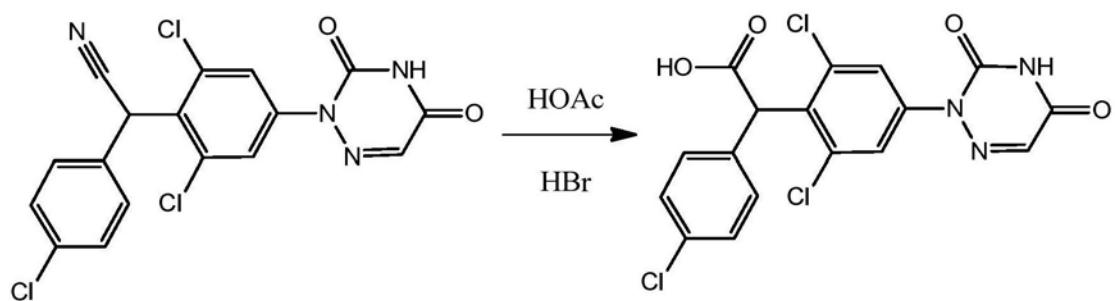


图1

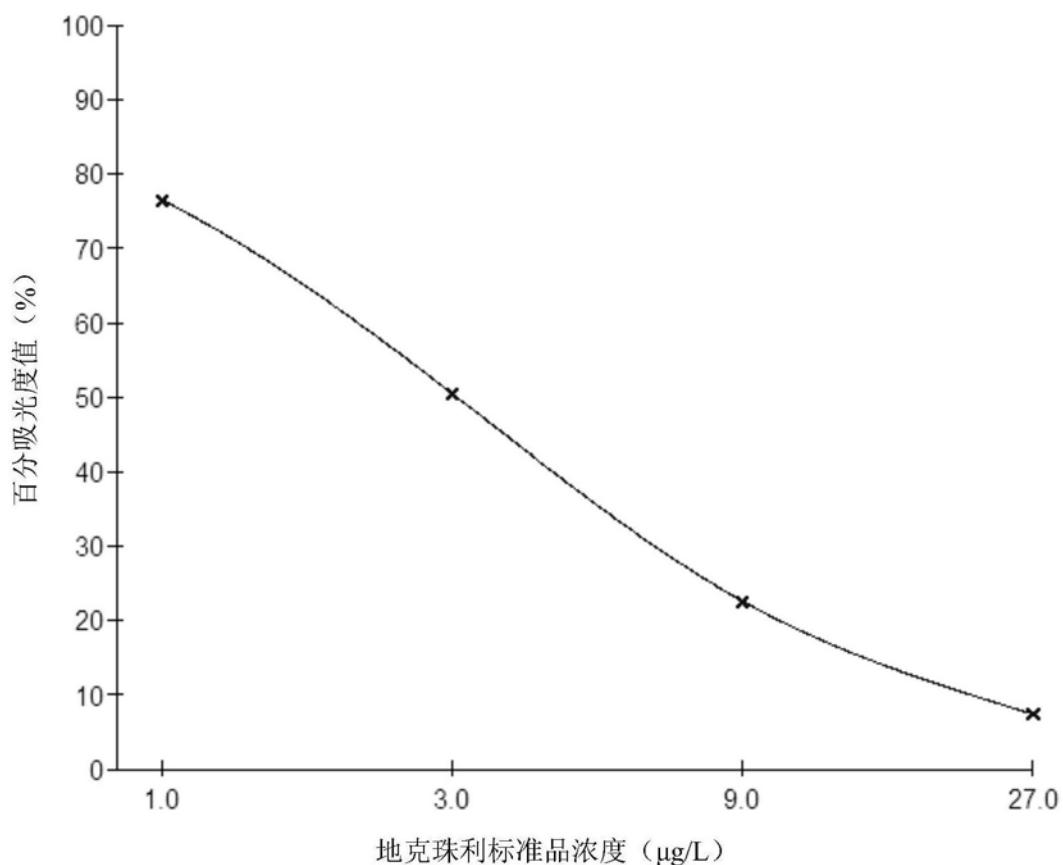


图2

专利名称(译)	检测地克珠利的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109061168A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810978254.9	申请日	2018-08-27
[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	万宇平 何方洋 崔海峰 王琳琛 韩深 王兆芹 韩光耀 冯才伟 杨春艳 杨烁		
发明人	万宇平 何方洋 崔海峰 王琳琛 韩深 王兆芹 韩光耀 冯才伟 杨春艳 杨烁		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种检测地克珠利的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有地克珠利偶联抗原的酶标板、地克珠利单克隆抗体、酶标记抗抗体、地克珠利标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测地克珠利的方法，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中地克珠利的含量，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。

