



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752524 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201711057842.0

(22)申请日 2017.11.01

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家
科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 杜霞 张淑雅

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测饲料中己烯雌酚的酶联免疫试剂
盒及其应用

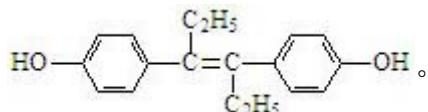
(57)摘要

本发明提供了一种检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒,它含有:包被有己烯雌酚偶联抗原的酶标板.己烯雌酚标准品溶液,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己烯雌酚的方法,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)样本中己烯雌酚的残留量,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. 一种检测己烯雌酚的酶联检测试剂盒,其特征在于包括有:

- (1) 包被有己烯雌酚偶联抗原的酶标板;
- (2) 己烯雌酚标准品溶液;
- (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,其特征在于所述己烯雌酚偶联抗原是由己烯雌酚半抗原与载体蛋白偶联得到,所述己烯雌酚半抗原结构如下:



3. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于所述己烯雌酚半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

- 1) 取20 mg己烯雌酚,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),得到己烯雌酚半抗原。

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己烯雌酚单克隆抗体。

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,所述百分比为重量百分比。

9. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述己烯雌酚标准品溶液浓度分别为0ug/L、1ug/L、3ug/L、9ug/L、27ug/L、81ug/L。

10. 一种检测样品中己烯雌酚含量的方法,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。

一种检测饲料中己烯雌酚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饲料中己烯雌酚的酶联免疫试剂盒,其适用于饲料(原料、配合料、浓缩料)中己烯雌酚测定。

背景技术

[0002] 己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)分子式为C₁₈H₂₀O₂,是一种人工合成的雌性激素,可以提高畜禽的免疫力,缩短畜禽的生长周期,因其作用明显,价格便宜,常被应用在猪、牛、羊、鸡、鸭等畜禽类动物,鱼、虾等水产品的养殖中,人们长期食用这种“有抗畜禽”、“有抗鱼虾”等,可以在人体内引起蓄积,人体摄入过量会出现恶心、呕吐、厌食、头痛等不良反应,长期应用可诱发生殖系统恶性肿瘤,而且女性长期使用会使子宫内膜增生过度而导致子宫出血与子宫肥大,孕妇食用会导致胎儿先天性缺陷。为保障动物源性食品安全,维护人们身体健康,2002年农业部发布了176号公告,公布了禁止在饲料、动物饮用水和畜禽水产养殖中使用DES,但由于使用DES经济效益显著,违法滥用现象仍然存在。

[0003] 科标化工分析检测中心参照国标GB/T5009.108-2003和农业部1163号公告-9-2009采用高效液相色谱法进行了方法确认,取得良好效果,本方法可以检测畜禽肉、水产品中DES残留量以及饲料中DES含量。科标化工分析检测中心通过了中国国家认证认可监督管理委员会和中国合格评定国家认可委员会的二合一(CMA、CNAS)实验室认证认可,能出具权威的第三方检测报告。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于己烯雌酚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) 包被有己烯雌酚偶联抗原的酶标板;
- (2) 己烯雌酚标准品溶液;
- (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] 所述己烯雌酚偶联抗原为己烯雌酚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] 所述己烯雌酚半抗原制备过程:

- 1) 取20mg己烯雌酚,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),得到己烯雌酚半抗原。

[0008] 所述浓缩酶结合物为酶标记的己烯雌酚单克隆抗体,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] 为了更方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括己烯雌酚标准品溶液、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己烯雌酚偶联抗原,加入样本溶液或标准品溶液后,样本中残留的己烯雌酚与酶标板上预包被的己烯雌酚偶联抗原竞争己烯雌酚的酶结合物,用底物显色液显色,样本吸光值与所含己烯雌酚的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中己烯雌酚的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的己烯雌酚标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中己烯雌酚的浓度范围。

[0015] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒己烯雌酚的方法,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] 本发明检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒主要采用竞争ELISA方法检测样品中己烯雌酚的含量;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 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、己烯雌酚半抗原制备

- 1) 取20mg己烯雌酚,10ul,1,3-丙二胺,催化量的4-二甲氨基吡啶溶解于2mlN,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),得到己烯雌酚半抗原,如图1。

[0020] 2、抗原的制备

免疫原制备——己烯雌酚半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

- [0021] 1) 取己烯雌酚半抗原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) 取碳化二亚胺(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——己烯雌酚半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

- [0023] 1) 取己烯雌酚半抗原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EDC10mg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、己烯雌酚单克隆抗体的制备

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150ug/只,使其产生抗血清。

[0025] b. 细胞融合和克隆化

取免疫Bal b/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猪己烯雌酚单克隆抗体的己烯雌酚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-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0.1~0.2ug/ml,每孔加入100 u 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1 50~200 u 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 检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

(1) 包被己烯雌酚偶联抗原的酶标板;

(2) 己烯雌酚标准品溶液6瓶,浓度分别为0ug/L、1ug/L、3ug/L、9ug/L、27ug/L、81ug/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样品中己烯雌酚的检测

1. 样品前处理

用均质器均质饲料样本;称取5.0g±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℃/68-77°F)离心5min;取500 u 1上清液至2ml聚苯乙烯离心管中,加入500 u 110%氯化钠水溶液用振荡器振荡1min,混匀;取20 u 1用于分析。

[0033] 2. 用试剂盒检测

向包被有己烯雌酚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 u 1,再加入酶结合物工作液100 u 1(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℃避光反应10min,倒出孔内液体,每孔加入250 u 1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 u 1,底物液B液四甲基联苯胺(TMB)50 u 1,轻轻振荡混匀,25.℃恒温箱避光显色5min,每孔加入2mol/L终止液硫酸50 u 1,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。以己烯雌酚标准品浓度(ug/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己烯雌酚的含量。

[0035] 实施例4 己烯雌酚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1ug/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份样本己烯雌酚浓度的平均值加上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1 0 ug/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 × 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×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三个浓度己烯雌酚对原料、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1。

[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 | 3.8 |
| | 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 | 9.2 | 8.7 |

以10、20、40ug/kg三个浓度的己烯雌酚对饲料(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、己烯雌酚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。

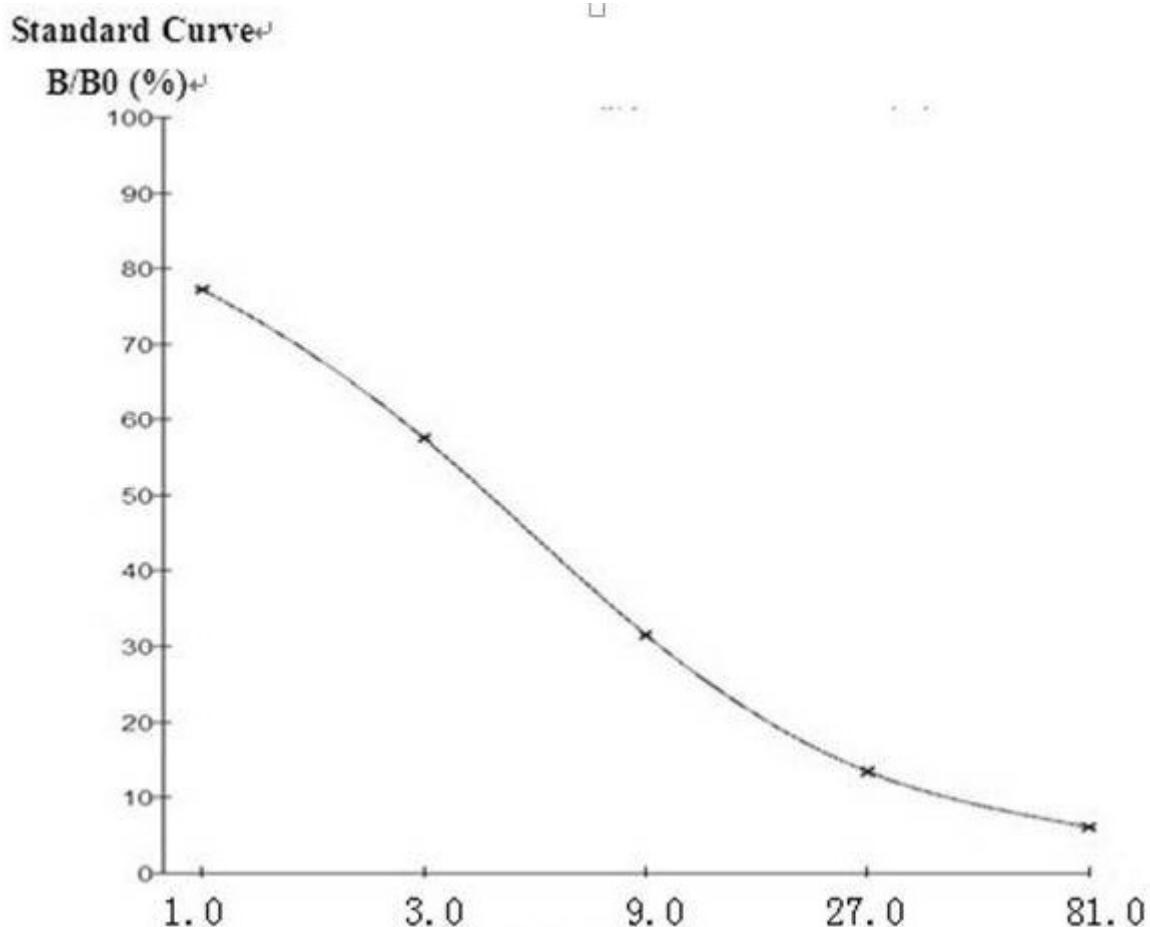


图1

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测饲料中己烯雌酚的酶联免疫试剂盒及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN109752524A | 公开(公告)日 | 2019-05-14 |
| 申请号 | CN201711057842.0 | 申请日 | 2017-11-01 |
| [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 杜霞 张淑雅 | | |
| 发明人 | 洪霞 杜霞 张淑雅 | | |
| IPC分类号 | G01N33/535 | | |
| 外部链接 | Espacenet Sipo | | |

摘要(译)

本发明提供了一种检测己烯雌酚的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有己烯雌酚偶联抗原的酶标板。己烯雌酚标准品溶液，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己烯雌酚的方法，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)样本中己烯雌酚的残留量，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。

