

[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 200810162591.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月13日

[11] 公开号 CN 101429244A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 9/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2008.12.4

[21] 申请号 200810162591.7

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市浙大路 38 号

[72] 发明人 吴建祥 张少恩

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

四环素与载体蛋白偶联产物和四环素类抗生素抗体制备的方法及用途

[57] 摘要

本发明提供一种四环素与载体蛋白偶联产物、四环素类抗生素抗体制备的方法及用途。用本发明偶联的四环素人工抗原免疫动物制备可用于食品中四环素类抗生素检测的抗体；免疫的 BALB/C 小鼠脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合，用与载体蛋白偶联的四环素作为包被抗原筛选阳性杂交瘤细胞、经细胞克隆获得能稳定传代并分泌抗四环素类抗生素抗体的杂交瘤细胞，并制备腹水单抗。利用制备的抗体建立了对四环素类抗生素具有高度特异性、灵敏性和精确性的直接竞争 ELISA 方法及免疫胶体金试纸条，可为快速检测食品中四环素残留服务。

1. 一种四环素与载体蛋白偶联产物的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
 - a) 将5-1000mg的四环素盐酸盐溶解于1-20ml超纯水中;
 - b) 10-3000mg的载体蛋白溶解于1-110ml的0.1-0.2M pH3-6的醋酸钠缓冲溶液中;
 - c) 将上述两种溶液混匀后,在搅拌状态下逐滴加入25%的甲醛10-3000ul,加毕后在10-35℃下避光搅拌反应1-48小时,合成四环素-载体蛋白偶联产物;
 - d) 四环素-载体蛋白偶联产物放入透析袋中,用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天;
 - e) 透析后的四环素-载体蛋白偶联产物进行紫外扫描,分析鉴定偶联产物及浓度测定,分装后于-20℃冰箱保存备用。
2. 根据权利要求1所述一种四环素与载体蛋白偶联产物的制备方法,其特征在于所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。
3. 一种如权利要求1所述方法制备的四环素与载体蛋白偶联产物的用途,其特征在于所述的四环素-载体蛋白偶联产物可免疫动物制备四环素类抗生素抗体及作为人工抗原应用于食品中四环素检测的免疫学方法。
4. 一种抗四环素类抗生素单抗的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
 - 1) 四环素-载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠;
 - 2) 取免疫鼠的脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞在 50 % 聚乙二醇融合剂下融合, HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞,用间接 ELISA 方法筛选分泌抗四环素类抗生素抗体的细胞;
 - 3) 采用有限稀释法进行细胞克隆,经间接 ELISA 筛选阳性克隆,获得能稳定传代并分泌抗四环素类抗生素特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株,杂交瘤细胞注射入 BALB/C 小鼠腹腔制备单抗腹水;
 - 4) 采用直接竞争 ELISA 方法测定抗四环素类抗生素单抗与土霉素、金霉素、链霉素、卡那霉素、青霉素、庆大霉素、氯霉素的交叉反应率,选择仅与四环素类抗生素有特异性免疫反应,且检测灵敏度达到 0.5-3 ng/mL 的单抗。
5. 根据权利要求4所述的一种抗四环素类抗生素单抗的制备方法,其特征在于所述的免疫原是根据权利要求1方法偶联的四环素-载体蛋白偶联产物。
6. 根据权利要求4所述的一种抗四环素类抗生素单抗的制备方法,其特征在于所述的免疫原的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、

牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

7.一种如权利要求4所述方法制备的抗四环素类抗生素单抗的用途,其特征在于,四环素单抗用于检测食品中四环素类抗生素残留的免疫学方法。

8.根据权利要求7所述的一种四环素类抗生素单抗的用途,其特征在于所述的用于检测食品中四环素类抗生素残留的免疫学方法为竞争ELISA或免疫检测试纸条。

9.一种用权利要求1所述方法制备的偶联产物免疫鼠、兔子、羊、驴、牛或禽制备抗四环素类抗生素多抗的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 初次免疫采用0.1-5mg偶联产物抗原与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射免疫;

2) 每间隙2-4周,用弗氏不完全佐剂与偶联产物抗原充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射,进行2-5加强免疫;

3) 末免不加佐剂,加倍剂量肌肉注射免疫,末免后7-10天后采血,离心分离血清;

4) 用蛋白A/G亲和柱纯化IgG,纯化的IgG冻干冰箱保存。

四环素与载体蛋白偶联产物和四环素类抗生素抗体制备的方法及用途 技术领域

本发明属于免疫化学生物技术领域，尤其是涉及一种四环素与载体蛋白偶联产物和四环素类抗生素抗体制备的方法及用途。

背景技术

关于药物残留的控制既需要完善的检验方法和标准，又需要健全的监控体系。目前国际上对抗生素类药物残留的检测主要有仪器分析法（包括 HPLC 和 GC-MS）和微生物学法（主要用于抗生素残留的检测）等。仪器分析法既要求仪器设备具有相当高的精度，也要求技术人员具有较好的分析操作技能，其昂贵的价格和缓慢的软件更新速度以及操作上的烦琐限制了其在一般实验室中的应用。但由于检测的灵敏度可以达到 ng 级水平（ppb 级），在一些大型实验室仍将其作为残留检测的参考标准使用。

四环素类抗生素在畜牧业中的滥用导致动物体内药物的滞留或蓄积，并以残留的方式进入人体及生态系统。它对人体及环境的危害主要是慢性、远期和累积性的。四环素可与新形成的骨、牙中所沉积的钙相结合。妊娠 5 个月以上的妇女服用这类抗生素时，出生的幼儿乳牙可出现荧光、变色、牙釉质发育不全，畸形和生长抑制。幼儿，尤其是出生后第 1 年，由于肾发育不全，药物不能充分排泄，即使短期用药，也极易引起乳牙的色素沉着和牙釉质发育不全，易于造成龋齿，牙染色由黄转为棕黄。剂量越大，黄染越深，牙釉质发育不全也更加显著。四环素引起恶心、呕吐、上腹部不适、腹胀、腹泻等。长期用四环素后，使正常菌群的分布发生改变，敏感菌受到抑制，耐药细菌、真菌(主要是白色念珠菌)等乘机在体内繁殖，发生消化道、呼吸道和泌尿道等感染。在长期的生活中，恰恰是人类和动物肠道的正常菌群成了耐药基因的储存库，并不断的将耐药基因转移给致病菌，并在人和动物中交叉传播，尤其是释放到环境中耐药菌的危害更为严重，可造成耐药基因的迅速转移。随着人们生活水平以及对滥用抗生素危害性认识的提高，人们非常重视食品中抗生素的残留，喜欢食用无抗生素残留的畜产品和水产品。

发明内容

本发明的目的是提供一种四环素与载体蛋白偶联产物和四环素类抗生素抗体制备的方法及用途。

四环素与载体蛋白偶联产物的制备方法包括如下步骤：

- a) 将5-1000mg的四环素盐酸盐溶解于1-20ml超纯水中；
- b) 10-3000mg的载体蛋白溶解于1-110ml的0.1-0.2M pH3-6的醋酸钠缓冲溶液中；
- c) 将上述两种溶液混匀后，在搅拌状态下逐滴加入25%的甲醛10-3000ul，加毕后在10-35℃下避光搅拌反应1-48小时，合成四环素-载体蛋白偶联产物；
- d) 四环素-载体蛋白偶联产物放入透析袋中，用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天；
- e) 透析后的四环素-载体蛋白偶联产物进行紫外扫描，分析鉴定偶联产物及浓度测定，分装后于-20℃冰箱保存备用。

所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

所述的四环素-载体蛋白偶联产物可免疫动物制备四环素类抗生素抗体及作为人工抗原应用于食品中四环素类抗生素检测的免疫学方法。

抗四环素类抗生素单抗的制备方法包括如下步骤：

- 1) 四环素-载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠；
- 2) 取免疫鼠的脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞在 50 % 聚乙二醇融合剂下融合，HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞，用间接 ELISA 方法筛选分泌抗四环素抗体的细胞；
- 3) 采用有限稀释法进行细胞克隆，经间接 ELISA 筛选阳性克隆，获得能稳定传代并分泌抗四环素类抗生素特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株；杂交瘤细胞注射入 BALB/C 小鼠腹腔制备单抗腹水；
- 4) 采用直接竞争 ELISA 方法测定抗四环素类抗生素单抗与土霉素、金霉素、链霉素、卡那霉素、青霉素、庆大霉素、氯霉素的交叉反应率，选择仅与四环素类抗生素有特异性免疫反应，且检测灵敏度达到 0.5-3 ng/mL 的单抗，可用于畜产品中四环素类抗生素残留的检测。

所述的免疫原是根据权利要求书 1 方法偶联的四环素-载体蛋白偶联产物。

所述的免疫原的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

抗四环素类抗生素单抗用于检测食品中四环素类抗生素残留的免疫学方法。所述的用于检测食品中四环素类抗生素残留的免疫学方法为竞争 ELISA 或免疫检测试纸条。

四环素-载体蛋白偶联产物免疫鼠、兔子、羊、驴、牛或禽制备抗四环素类

抗生素多抗的制备方法包括如下步骤：

1) 初次免疫采用 0.1-5mg 偶联产物抗原与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射免疫；

2) 每间隙 2-4 周，用弗氏不完全佐剂与偶联产物抗原充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射，进行 2-5 加强免疫；

3) 末免不加佐剂，加倍剂量肌肉注射免疫，末免后 7-10 天后采血，离心分离血清；

4) 用蛋白 A/G 亲和柱纯化 IgG，纯化的 IgG 冻干冰箱保存。

本发明的优点是：1) 本发明提供一种能制备检测食品中四环素类抗生素残留的抗体的四环素免疫原偶联方法，其操作简单方便；2) 提供了一种能获得检测四环素类抗生素残留的特异、灵敏抗体的制备方法，其方法简单有效；3) 利用本发明所制备的抗体，可有效地用于畜产品中四环素类抗生素残留的检测。目前四环素残留的检测主要有仪器分析和免疫分析两种方法，其中仪器分析法主要用高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱(GC)，由于其存在仪器昂贵、操作烦琐、费时费力、费用高、不能大规模现场检测等问题，也要求技术人员具有一定的操作和分析技能，因而不能很好推广应用。酶联免疫吸附分析(ELISA) 具有简便、快捷、能大规模检测、灵敏和成本低廉及现场检测的优点，尤其适合在生产 and 流通过程中对畜产品及水产品中四环素等抗生素残留进行检测。胶体金免疫层析试纸条应用广泛，已有多种可检测人、动物、植物病原、癌症抗原、激素、药物与农药残留的试纸条，该方法具有如下优点：操作简单、方便、快速，几乎人人都会使用；不需任何设备；结果准确可靠、特异性强、灵敏度高；低成本高效益；保存方便等。因此免疫层析试纸条目前已成为多种物质免疫学检测的发展方向之一。本专利应偶联的人工抗原制备抗四环素抗体，以该多抗为核心开发四环素残留检测试剂盒及胶体金免疫层析试纸条，为我国动物源食品中四环素残留的快速检测服务。

具体实施方式

本发明提供了四环素与载体蛋白偶联产物和四环素类抗生素抗体制备的方法及用途。用制备的免疫原制备四环素的特异性强、灵敏度高、稳定性好、能大量生产的单克隆抗体和多抗，并用这些抗体建立了检测食品中四环素类抗生素残留具有高度特异性、灵敏性和正确性的快速诊断方法—竞争 ELISA 及免疫层析试纸条，可有效地用于畜产品中四环素类抗生素残留的检测，为我国的食品安全服务。

1.一种四环素与牛血清白蛋白（BSA）偶联产物的制备方法的步骤：

- a) 将5mg的四环素盐酸盐溶解于1ml超纯水中；
- b) 10mg的载体蛋白BSA溶解于1ml的0.1-0.2M pH3-6的醋酸钠缓冲溶液中；
- c) 将上述两种溶液混匀后，在搅拌状态下逐滴加入25%的甲醛10ul,加毕后在10-35℃下避光搅拌反应1-48小时，合成四环素-BSA偶联产物；
- d)四环素-BSA偶联产物放入透析袋中，用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天；

e) 透析后的四环素-BSA偶联产物、四环素、BSA溶液进行紫外扫描，分析鉴定偶联产物及浓度测定，分析发现偶联产物的紫外扫描图形与BSA、四环素的扫描图形明显不同，说明四环素已与BSA偶联成功，偶联产物分装后于-20℃冰箱保存，用于免疫动物制备抗体及作为四环素人工抗原应用于食品中四环素类抗生素检测的免疫学方法。

2.一种四环素与牛血清白蛋白（BSA）偶联产物的制备方法的步骤：

- a) 将1000mg的四环素盐酸盐溶解于20ml超纯水中；
- b)3000mg的载体蛋白BSA溶解于110ml的0.1-0.2M pH3-6的醋酸钠缓冲溶液中；
- c) 将上述两种溶液混匀后，在搅拌状态下逐滴加入25%的甲醛3000ul,加毕后在10-35℃下避光搅拌反应1-48小时，合成四环素-BSA偶联产物；
- d)四环素-BSA偶联产物放入透析袋中，用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天；

e) 透析后的四环素-BSA偶联产物、四环素、BSA溶液进行紫外扫描，分析鉴定偶联产物及浓度测定，分析发现偶联产物的紫外扫描图形与BSA、四环素的扫描图形明显不同，说明四环素已与BSA偶联成功，偶联产物分装后于-20℃冰箱保存，用于免疫动物制备抗体及作为四环素人工抗原应用于食品中四环素类抗生素检测的免疫学方法。

3.四环素类抗生素单克隆抗体的制备方法

1) 免疫动物

四环素-BSA 偶联产物免疫四周龄体重 18-20 g BALB/C 雌性小鼠：取 1 mg/ml 四环素-BSA 偶联产物 0.5-0.7 ml 与等体积福氏完全佐剂混合，充分乳化后，经背腹部皮下多点注射 0.2-0.3ml/只，间隔 3-4 周，取与一免等量抗原和等体积的福氏不完全佐剂充分乳化后，进行腹腔注射加强免疫（0.2-0.3ml/只），共进行 3-5 次加强免疫，不加佐剂的末免用加倍剂量的抗原进行腹腔注射，3 天后

取脾细胞进行融合。

2) 细胞融合

取上述免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 5-10: 1 的比例, 在无血清的 RPMI-1640 (Gibco) 培养基中混匀, 1500 rpm 离心 5 min, 去除培养基, 用 50% PEG(聚乙二醇, Sigma) 作为融合剂, 在 37°C 下水浴下加入 0.5-0.7ml, 使其融合 2 min, 用无血清的 RPMI-1640 培养基终止融合后 1500 rpm 离心 5 min, 沉淀用 HAT 筛选培养基 (Sigma) 悬浮, 分装到 96 孔含有饲养细胞的细胞板中, 37°C, 5% CO₂ 的细胞培养器皿中培养。

3) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆

细胞在培养器皿中培养 5 天后, 用 HAT 筛选培养基换液一次, 第 10 天用 HT 培养基换液, 等到融合细胞覆盖孔底 5%-50% 时, 用四环素偶联卵清蛋白作为包被抗原进行间接 ELISA 方法筛选阳性孔, 共获 500 多个对四环素有反应的阳性孔, 阳性率为 1%。选择 12 个呈强阳性反应的细胞孔, 进行有限稀释法克隆, 获得 1C1 株能分泌抗四环素的特异性抗体的杂交瘤细胞株。经 6 个月以上体外传代和多次冻存复苏后, 细胞株均能良好生长, 并稳定分泌抗体。经扩大培养后, 用于腹水制备和液氮保存。

4) 单克隆抗体腹水制备及纯化

取 8 周龄左右 BALB/C 小鼠, 腹腔注射 0.3-0.5 ml 降植烷 (Sigma), 7-10 天后腹腔注入 $5-10 \times 10^5$ 个杂交瘤细胞, 注射后 7-10 天可见小鼠腹部明显膨大, 采取腹水, 3000-5000 rpm 离心 3-5 min, 收集上清液, 即为单克隆抗体腹水。取 1 倍体积腹水加 2 倍体积 0.06 M pH 4.8 醋酸缓冲液稀释, 加辛酸 (30 ul/ml 腹水), 室温下边加边搅拌, 4°C 澄清 1 小时, 12000 rpm 离心 20 min, 收集上清, 再用 50% 饱和硫酸铵沉淀免疫球蛋白, 4°C 放置 2 小时, 3000-5000 rpm 离心 20 min, 沉淀用 2 倍体积的 PBS 溶液溶解, 在 4°C 流动透析 24 小时后即获纯化的腹水抗体, -70°C 保存。

5) 单克隆抗体的亚类鉴定和腹水效价测定

将纯化的单抗腹水与 Sigma 公司的标准抗 BALB/C 小鼠 IgG、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 抗体, 作双向琼脂扩散试验, 结果为, 1C1 的抗体类型及亚类为 IgG₁, 单克隆抗体的轻链为 κ 链。用常规间接 ELISA 方法检测单抗腹水效价, 结果为上述腹水效价均在 10^{-6} 以上。

4. 检测四环素残留的直接竞争 ELISA 方法的建立

1) 四环素-辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联产物的制备:

- a) 将1000mg的四环素盐酸盐溶解于20ml超纯水中；
- b) 3000mg的HRP溶解于110ml的0.1-0.2M pH3-6的醋酸钠缓冲溶液中；
- c) 将上述两种溶液混匀后，在搅拌状态下逐滴加入25%的甲醛3000ul,加毕后在10-35℃下避光搅拌反应1-48小时，合成四环素-HRP偶联产物；
- d) 四环素-辣根过氧化物酶（HRP）偶联产物放入透析袋中，用pH7.2的磷酸盐缓冲液（PBS）在4℃透析1-3天；
- e) 透析后的四环素-HRP偶联产物、四环素、HRP溶液进行紫外扫描，鉴定偶联产物，分析发现偶联产物的紫外扫描图形与四环素、HRP的扫描图形明显不同，说明四环素已与HRP偶联成功，偶联产物分装后于-20℃冰箱保存，用于检测四环素类抗生素的竞争ELISA方法。

2) 直接竞争 ELISA 方法条件优化：

用方阵试验法对抗体和酶标半抗原的进行一系列浓度的稀释，确定直接竞争 ELISA 法抗体和酶标半抗原的最适工作浓度。OD₄₅₀ 值约为 1.0，抗体抗原用量较少的浓度组合，即为抗体-抗原的最佳工作浓度。首先，将单抗用 PBS（0.01 M, pH 7.4）稀释成一系列浓度，分别依次加入 96 孔酶标板（100μL/well），37℃ 下温育 2 h, PBST 洗涤 3 次；用含 2.0%脱脂奶的 PBS 封闭，每孔 300 μL, 37℃ 温育 0.5 h, 后用 PBST 洗涤 3 次；加入预先以 PBS 稀释成不同浓度的酶标半抗原，在微量震荡器上混匀，37℃ 下温育 1 h, PBST 洗涤 3 次；加入底物溶液（100 μL/well），37℃ 温育 15 min，加入终止液（50 μL/well），用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

3) 抗体亲和性及检测灵敏度

在优化的条件下，在预先包被好单抗的酶标板上，加入系列浓度的四环素标样，每浓度3孔重复，设不加四环素对照和溶剂空白对照，50 μL/well，再加入 0.22μg/ml 酶标半抗原50 μL，震荡1 min后37℃ 下温育1 h, PBST洗涤 4次；加入TMB底物溶液（100 μL/well），37℃ 温育15 min，加入2M硫酸终止液（50 μL/well），用酶标仪测定各孔的OD₄₅₀值。以抑制率与四环素浓度的半对数绘制标准曲线。抑制率I计算公式如下：

$$I \% = \frac{(OD_{max} - OD_{min}) - (OD_x - OD_{min})}{(OD_{max} - OD_{min})} \times 100$$

式中：OD_{max}-不加抗生素的吸光值；OD_x-抗生素浓度为x时的吸光值；OD_{min}-空白对照孔的吸光值。

以抑制率达到 50%的抗生素浓度（IC₅₀）来表示抗体对四环素的亲和性，以

IC₁₀ 作为 ELISA 方法的检测灵敏度。在优化的 ELISA 分析条件下，对四环素建立标准曲线，以考察其在最优化的反应体系中的检测灵敏度。根据竞争 ELISA 反应标准曲线计算得单抗对四环素的 IC₅₀ 为 5.21 ng/ml，IC₁₀ 为 0.35 ng/ml。

4) 单抗的特异性

在优化的条件下，将盐酸四环素标准品、土霉素、金霉素、链霉素、卡那霉素、青霉素、庆大霉素、氯霉素、作系列稀释，分别与单抗进行直接竞争 ELISA，制作标准曲线，并在曲线上找出抑制率 50% 的浓度，以及上述几种物质 50% 抑制率的浓度，然后计算出各类抗生素的交叉反应率。交叉反应率 CR 计算方法为 $CR\% = \text{四环素 IC}_{50} / \text{其它抗生素 IC}_{50} \times 100$ 。结果表明，1C1 单抗与土霉素、金霉素交叉反应率分别为 30%、65%，而与庆大霉素、卡那霉素、链霉素、青霉素、氯霉素的交叉反应率均小于 0.1%。说明单抗能检测食品中的四环素类抗生素残留。

5. 抗四环素类抗生素多抗的制备

用四环素与载体蛋白偶联产物免疫鼠、兔子、羊、驴、牛、禽等动物制备多抗。初次免疫采用偶联产物人工抗原 (0.1-5mg) 与等体积弗氏完全佐剂 (complete freund's adjvant, CFA) 充分乳化，然后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射；间隙 2-4 周后，再用弗氏不完全佐剂 (incomplete freund's adjvant, IFA) 与抗原充分乳化，然后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射进行加强免疫；间隙 2-4 周，进行 2-5 加强免疫；末免不加佐剂，直接肌肉注射，末免后 7-10 天后采血。每次免疫后 4-8 采少量血，进行 ELISA 效价的测定，效价满意后大量采血，离心分离血清。用蛋白 A/G 亲和柱纯化 IgG，纯化的 IgG 用于食品中四环素类检测的免疫学方法。

6. 免疫层析试纸条的制备

胶体金的制备及单抗的金标记：

胶体金颗粒制备：在 100 ml 去离子水中加入 1% 柠檬酸三钠 1 ml，煮沸后迅速加入 1% 氯金酸 1 ml，继续煮沸 15 min，冷却后，4 °C 下保存备用。通常情况下，制备好的胶体金颗粒的大小平均为 30 nm。

单抗的金标记：

取已制备好的胶体金溶液 100 ml，用 0.1 mol/L 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入单抗 2.0 mg，搅拌 15 min，再逐滴加入 2.5 ml 25 mg/ml 聚乙二醇 20000 (PEG 20000)，搅拌 20 min。20 000 r/min 离心 20 min，弃上清液，加入 10 ml pH 7.4 PBS 缓冲液 (含 0.4 mg/ml PEG) 清洗 2 次。将沉淀用 5ml 含 2% BSA 的 PBS 缓

冲液 (pH 7.4) 溶解, 用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

免疫层析试纸条的组装:

用点膜机把适当浓度的四环素-BSA抗原及羊抗鼠IgG 喷在NC 膜上, 分别作为检测线 (T) 和控制线 (C), 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥8 h。以同样方法, 将制备好的金标记四环素单抗包被在胶体金结合垫上。将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫依次粘贴在底板上, 从而组成一个连续的微滤体系。将贴好的板切割成4 mm 宽的条, 装入模板中制成检测试剂板, 避光、密闭、常温保存备用。

用滴管吸取待检样品溶液, 滴加3滴 (约100ul) 于上述试剂板的加样孔中, 加样后开始计时; 结果应在3-5分钟内读取, 其他时间判读无效; 读取结果时, 检测试剂应图3右侧所示摆放方式置于观察者正面。根据观察区的T、C线的颜色比对来确定结果, T线显色比C线深或者相等时, 结果判定为阴性。当T线颜色显色比C线浅时, 检测结果为阳性。

将盐酸四环素标准品配置成不同浓度的分析试样溶液: 0、1、3、5、7、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100 ng/ml, 用检测试纸条进行测定, 每个试样做3 个重复, 5 min 后观察结果, 检测结果表明, 当样品中四环素残留药物的含量达到或超过 0.85g/ml , 由于大多数单克隆抗体被样品中的四环素残留竞争结合, T线的包被抗原结合到的四环素单克隆抗体就很少或者没有, T线的显色明显比C线浅或不显色, 结果为阳性; 当样品中四环素残留的含量低于 0.56ng/ml 时, T 线呈色与C 线一致或比C线浅, 结果为阴性; 无论是阳性还是阴性结果, 胶体金-四环素单抗结合物总能与C线处的羊抗鼠IgG结合, 形成一条紫红色的条带。如果, C线不显色, 无论是T线有无, 这时的结果均无效。

检测试剂板的稳定性试验:

用同一批次不同检测试剂板检测同一样品, 及用不同批次检测试剂板测定同一样品, 其质控线、检测线的显色时间及颜色深浅和最终结果判读基本相同。将相同批次的试剂板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、室温、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密闭保存3个月, 每2周各检测阳性和阴性奶样各20份, 结果显示随着时间和温度的变化, 检测结果未发生大的变化。根据 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下一天相当于1周估算, 本试剂板可以在室温下保存12个月。

专利名称(译)	四环素与载体蛋白偶联产物和四环素类抗生素抗体制备的方法及用途		
公开(公告)号	CN101429244A	公开(公告)日	2009-05-13
申请号	CN200810162591.7	申请日	2008-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	吴建祥 张少恩		
发明人	吴建祥 张少恩		
IPC分类号	C07K14/795 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/00 C07K16/44 C07K16/06 C12N9/00 G01N33/53 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种四环素与载体蛋白偶联产物、四环素类抗生素抗体制备的方法及用途。用本发明偶联的四环素人工抗原免疫动物制备可用于食品中四环素类抗生素检测的抗体；免疫的BALB/C小鼠脾细胞与SP2/0鼠骨髓瘤细胞融合，用与载体蛋白偶联的四环素作为包被抗原筛选阳性杂交瘤细胞、经细胞克隆获得能稳定传代并分泌抗四环素类抗生素抗体的杂交瘤细胞，并制备腹水单抗。利用制备的抗体建立了对四环素类抗生素具有高度特异性、灵敏性和精确性的直接竞争ELISA方法及免疫胶体金试纸条，可为快速检测食品中四环素残留服务。

$$I\% = \frac{(OD_{max} - OD_{min}') - (OD_x - OD_{min}')}{(OD_{max} - OD_{min}')} \times 100$$