

[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 200910045165. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 9 日

[11] 公开号 CN 101526536A

[22] 申请日 2009.1.12

[21] 申请号 200910045165. X

[71] 申请人 深圳市绿诗源生物技术有限公司

地址 518000 广东省深圳市龙岗区清林西路
深圳市留学人员(龙岗)创业园一园 111
房(办公住所)

[72] 发明人 聂继斌 唐 俊 杨 宏 温俊梅
齐 欣 吴 青 李 成 杨宗繁

[74] 专利代理机构 深圳市深远专利商标事务所
代理人 褚治保

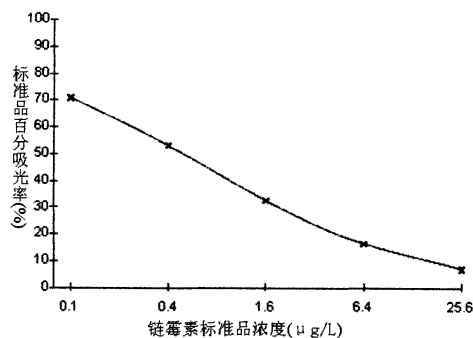
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种链霉素药物快速检测试剂盒及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种检测链霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶联板；酶标记物；链霉素特异性抗体；链霉素标准品溶液；底物显色液；终止液；浓缩洗涤液；浓缩复溶液。本发明还提供了一种检测动物源性食品中链霉素的方法，包括了以下步骤：样品前处理；用试剂盒的试剂进行检测；分析检测结果。本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的检测动物源性食品链霉素的酶联免疫试剂盒及检测方法。



1. 一种检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：

- (1) 包被链霉素抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板；
- (2) 酶标记物；
- (3) 链霉素特异性抗体；
- (4) 链霉素标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 浓缩复溶液；

其特征是：链霉素包被抗原采用碳二亚胺法将链霉素半抗原与卵清白蛋白进行偶联得到，抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是：试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记链霉素抗原，所用酶为过氧化物酶或半乳糖甘酶，酶标记物形式为冻干粉、浓缩液或工作液。

3. 如权利要求2所述的检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫

试剂盒，其中所用酶为过氧化物酶。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是：试剂盒中酶标记抗原是采用活性酯法将标记酶与链霉素半抗原进行偶联得到，链霉素特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体，免疫原是采用碳二亚胺法将链霉素半抗原与钥孔械血蓝蛋白进行偶联得到的；抗体形式为冻干粉、浓缩液或工作液。

5. 如权利要求 4 所述的检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是：包被链霉素抗原或抗抗体的载体物质为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶或琼脂糖凝胶，载体的形式是试管、微量反应板凹孔、小珠或小圆片，洗涤液为含有 0.1%-0.5%w/v 吐温 80，0.5%w/v 叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液，封闭液是含有 8%-15%w/v 的脱脂奶和 1%w/v 惰性蛋白的溶液。

6. 如权利要求 1-3 和 5 任一项所述的检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是：试剂盒中链霉素标准品溶液为六个浓度梯度的链霉素溶液，浓度为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.4 μ g/L、1.6 μ g/L、6.4 μ g/L、25.6 μ g/L。

7. 如权利要求 4 所述的检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是：试剂盒中链霉素标准品溶液为六个浓度梯度的链霉素溶液，浓度为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.4 μ g/L、1.6 μ g/L、6.4 μ g/L、

25.6 μ g/L。

8. 据权利要求 1 所述的链霉素酶联免疫检测试剂盒，其特征在于，所述底物显色液为单底物液。

9. 一种检测动物源性食品中链霉素的方法，包括了以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1-8 任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

一种链霉素药物快速检测试剂盒及其应用

技术领域

本发明涉及一种检测分析动物源性食品中兽药残留的技术，特别是快速检测链霉素药物的酶联免疫试剂及方法。

背景技术

链霉素(*Streptomycin*)是氨基糖苷类抗生素的一种，对革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌特别是结核分枝杆菌具有显著的抗菌活性。链霉素主要作用于细胞的核糖体，通过抑制细菌蛋白质的生物合成而呈现杀菌作用。正是由于其独特的抗菌活性，所以自 1943 年首次在灰色链球菌属中发现链霉素以来，它被广泛应用于多种疾病的治疗和动物饲料添加剂，并在人、畜传染病的防治方面发挥了巨大作用。同时，链霉素对人又有一定的、有时甚至是严重的毒副作用。链霉素引起的主要毒副作用是耳毒性。因其能选择性地损害第 8 对脑神经，导致前庭功能损害和耳蜗神经损害，严重时可能造成永久性的耳聋。长期使用还会使细菌产生耐药性，因此我国制定了食品中链霉素最高残留限量，其中，牛奶中的链霉素残留限量为 200 $\mu\text{g/L}$ 。链霉素目前一般采用 HPLC 或 LC/MS，但这类方法样本前处理及测定操作烦琐，检测所需时间较长，检测费用高，推广使用受到限制。

发明内容

本发明的检测原理：当包被原为链霉素偶联抗原时是将链霉素与卵清白蛋白偶联物（Strep-OVA）吸附于固相载体上，加入样本或链霉素标准品，然后加链霉素特异性抗体，待测样品中残留的链霉素和酶标板上包被的链霉素抗原竞争链霉素特异性抗体。再加入酶标记抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中链霉素残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出链霉素的浓度。

包被原为抗抗体时是将抗抗体吸附于固相载体上，加入链霉素特异性抗体，再加入链霉素酶标记抗原和样本或链霉素标准品溶液，待测样本中残留的链霉素和酶标记链霉素抗原竞争链霉素特异性抗体，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中链霉素残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出链霉素的浓度，与标准溶液颜色比较则可判断样品中链霉素的浓度范围。

本发明提供了一种检测动物源性食品中链霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：

- (1)包被链霉素抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板；
- (2)酶标记物；
- (3) 链霉素特异性抗体；
- (4) 链霉素标准品溶液；
- (5)底物显色液；
- (6)终止液；
- (7)浓缩洗涤液；

(8)浓缩复溶液。

本发明所述试剂盒中链霉素包被抗原是采用碳二亚胺法将链霉素半抗原与卵清白蛋白（OVA）进行偶联得到的，抗抗体可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到。制备酶联板过程中所用的包被缓冲液为批 pH 值 9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；包被链霉素抗原或抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等；载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；所用的洗涤液为含有 0.1%-0.5% 吐温 80，0.5%叠氮化钠（NaN₃）防腐剂的磷酸盐缓冲液；所用的封闭液是含有 8%-15%的脱脂奶和 1%惰性蛋白的溶液。

本发明所述试剂盒中包被链霉素抗原的酶联板或包被抗链霉素抗体的酶联板的制备步骤为：

(1)用包被缓冲液将链霉素半抗原与卵清白蛋白（OVA）偶联物或抗抗体以 0.02-0.08μg/ml 浓度稀释成抗原稀释液或抗抗体稀释液；

(2)向酶联板的每孔中加入 100μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗抗体稀释液，37℃温育 2h，倾去包被液，用洗涤液洗涤 4 次，每次 15-30s，拍干；

(3)向酶联板的每孔中加入 150-200μl 封闭液，37℃温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

以上方法制备的酶联板具有很好的稳定性，经过冷热稳定性试

验,酶联板的相关技术参数均在正常范围,且包被原有良好的特异性。

本发明所述试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记链霉素抗原,所用酶可为过氧化物酶或半乳糖甘酶,本发明优选过氧化物酶;酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液;酶标记物工作液所用的稀释液为含有 50%甘油(可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结,亦可长时间保持酶标记物的生物活性)、1%的叠氮化钠防腐剂(便于保存)的溶液。

本发明所述试剂盒中酶标记抗抗体的制备步骤为:

(1)抗抗体的制备:以鼠源性抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;或以兔源性抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

(2)过氧化物酶标记抗抗体的制备:将抗抗体与过氧化物酶(HRP)进行偶联,采用的方法是戊二醛法,采用戊二醛法使得抗抗体与辣根过氧化物酶的结合率升高,传统 GA 一步法偶联反应不易控制,反应速度快的分子易发生自生聚合,且偶联效率不高。为了解决这些问题,我们将一步法进行了改进,克服了一步法的缺点。首先在被偶联的两种分子中,与偶联剂反映较弱的分子先用过量的偶联剂活化,然后去处多余的偶联剂;第二步将一端与某种分子连接的偶联剂,通过改变反应条件而与另一种分子连接起来。二步法虽然操作较繁,但偶联效率提高,而且形成的同分子聚合物减少。

本发明所述试剂盒中酶标记抗原是采用活性脂法将标记酶与链霉素半抗原进行偶联得到。

本发明所述试剂盒中链霉素特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体,免疫原是采用碳二亚胺法将链霉素半抗原与钥孔械血蓝蛋白进行偶联得到的;抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液;抗体稀释液为 pH 值 8.2、0.05mol/L、含有 3%小牛血清和 5%N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中链霉素特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体,其制备方法如下:

(1) 链霉素单克隆抗体制备的步骤为:

a. 动物免疫程序:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,免疫原(链霉素半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物)免疫剂量为 80-100 μ g/只,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞;

b. 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5-10:1 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,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

c. 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1-5 \times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存,复苏时取出冻存管,立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

d. 单克隆抗体的制备与纯化: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, 7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 - 10^6 个/只, 7-10 天后采集腹水, 用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 小瓶分装, -20°C 保存;

e. 抗体冻干粉可将腹水在 37°C 环境下烘干, 放入 -20°C 保存;

f. 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 0.02 - $0.08\mu\text{g/ml}$ 浓度进行稀释。

(2) 链霉素多克隆抗体制备的步骤为:

采用新西兰大白兔作为免疫动物, 免疫原(链霉素半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物)免疫剂量为 1mg/kg , 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 间隔 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 共免疫 5 次, 最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7-10 天后采血, 测定血清抗体效价, 心脏采血, 经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

本发明所述试剂盒中当标记酶为过氧化物酶时底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为四甲基联苯胺硫酸盐或氨基水杨酸、终止液为 0.1 - 0.5mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液; 当标记酶为半乳糖甘酶时, 底物显色液为 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液, 终止液为 2mol/L 的柠檬酸缓冲液; 浓缩洗涤液为含有 0.1% - 0.5% 吐温 80, 0.5% 叠氮化钠的磷酸盐缓冲液; 浓缩复溶液为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中链霉素标准品溶液为六个浓度梯度的链霉素溶液, 链霉素稀释液为含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中试剂的配制具体为：

- a. 链霉素标准溶液：链霉素系列标准溶液 6 瓶，浓度为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.4 μ g/L、1.6 μ g/L、6.4 μ g/L、25.6 μ g/L，1-3ml/瓶。
- b. 包被缓冲液：pH 值为 9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。
- c. 封闭液：含有 8%-15%的脱脂奶和 1%惰性蛋白的溶液。
- d. 浓缩洗涤液：浓缩洗涤液为含有 0.1%-0.5%吐温 80，0.5%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液(0.01M、 pH7.4)，为正常使用浓度的 15-25 倍，30-50ml/瓶，1 瓶。
- e. 酶标记物：酶标记抗抗体工作液或酶标记链霉素抗原工作液，7-12ml/瓶，1 瓶。
- f. 底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲；
- g. 底物显色液 B 液：邻苯二胺(OPD)或四甲基联苯胺(TMB)；
- h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH8.1、含有 MgCl₂ 0.01% 的 100mmolTris-HCl；
- i. 终止液：1-2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液，5-8ml/瓶，1 瓶。
- j. 抗体稀释液：pH8.2 的 0.05mol/L、含有 3%小牛血清和 5%N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液。
- k. 浓缩复溶液：含有 50%甲醇、1%小牛血清(BSA)的磷酸盐缓冲液，为正常使用浓度的 5-10 倍，30-50ml/瓶，1 瓶。

本发明所述检测动物源性食品中链霉素的方法，包括了以下步骤：

- (1) 样品前处理;
- (2) 用本发明所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

本发明中样品前处理方法为:

样本前处理需配制:

配液 1: 将浓缩复溶液用去离子水按 1: 9 稀释。

配液 2: 0.05M PB 配制 (鸡肉、肝脏样本专用) 13.0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 2.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加去离子水定溶至 1L。

配液 3: 0.04M 磷酸 (蜂蜜样本专用) 1ml 浓磷酸加去离子水定溶至 360ml。

配液 4: 1M NaOH 称取 4g NaOH 加去离子水定溶至 100ml。(蜂蜜样品专用)

(a) 牛奶样本的处理方法

取牛奶 1ml, 按 1:40 稀释。(1950 μl 稀释后的复溶液加 50 μl 牛奶)

取 50 μl 用于分析

(b) 鸡肉、鸡肝样本的处理方法

取 $2 \pm 0.05\text{g}$ 去除脂肪的粉碎样本与 8ml 0.05MPB 缓冲液混合 5min, 置 56℃水浴环境放置 30min;

室温 4000r/min 以上, 离心 10min;

取 50 μl 上清液, 加入 450 μl 稀释后的复溶液混匀;

取 50 μl 用于分析。

样本稀释倍数：40

(c) 蜂蜜、蜂王浆：

称量 2 ± 0.05 g 样本加入 4ml 0.04M 磷酸，振荡 10min 至完全溶解，室温 3000r/min 以上，离心 5min，直至清亮。（蜂蜜样本可不用离心直接进行第 3 步）

加入 450 μ l 1M NaOH 将 PH 值调至 7-9 之间。（蜂王浆样本需将全部上清移至另一干净离心管中调节 PH 值至 7-9 之间）

室温 3000r/min 以上，离心 5min，直至清亮。

取 50 μ l 上清液，加入 450 μ l 稀释后的复溶液混匀；

取 50 μ l 用于分析。

稀释倍数：20 检测下限：10ppb

注：蜂蜜、蜂王浆样本对传统方法做了改进。舍去了过 C18 柱烦琐的过程，使操作时间缩短、方法简便。

(2) 用本发明所述的试剂盒进行检测：

从 4℃ 冷藏环境中取出所需试剂，置室温（20-25℃）平衡 30min 以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

取出需要数量的微孔及框架，将不用的微孔放入自封袋，保存于 2-8℃。

配液：将 40ml 浓缩洗涤液（20 倍浓缩）用蒸馏水或去离子水稀释至 800ml 备用（或按需要量稀释）。

编号：将样本和标准品对应微孔按序编号，每个样本和标准品做 2 孔平行，并记录标准孔和样本孔所在的位置。

加标准品/样本 50 μ l /孔, 然后加酶标记物 50 μ l/孔, 再加入抗体工作液 50 μ l/孔。轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板, 37℃环境反应 40min。

显色: 每孔加入底物 A 液 50 μ l, 再加底物 B 液 50 μ l, 轻轻振荡 混匀, 37℃环境中避光显色 15min。

取出用洗涤液按每孔 250 μ l, 洗板 4—5 次, 每次浸泡 10 秒, 拍干 (拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破)。

显色: 每孔加入底物 A 液 50 μ l, 再加底物 B 液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 37℃水浴或恒温箱避光显色 20min。

测定: 每孔加入终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处 (建议用双波长 450/630nm 检测, 在 5min 内读完数据), 测定每孔 OD 值

(3)分析检测结果:

结果判定有两种方法, 粗略判定可用第 1 种方法, 定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光值与其所含链霉素成反比。

1、用样本的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围 (ppb)。假设样本 1 的吸光度值为 0.250, 样本 2 的吸光度值为 0.720, 标准液吸光度值分别是: 0ppb 为 1.610; 0.1ppb 为 1.380; 0.4ppb 为 1.100; 1.6ppb 为 0.620; 6.4ppb 为 0.289; 25.6ppb 为 0.108。则样本 1 的浓度范围是 6.4ppb-25.6ppb; 样本 2 的浓度范围是 0.4 ppb-1.6ppb。

2、定量分析

(1) 百分吸光率的计算, 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准)

的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B₀—0ng/ml 标准溶液的平均吸光度值

(2) 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标，以链霉素标准品浓度（ng/ml）的半对数为横坐标，绘制标准曲线图，见图 2。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链霉素实际浓度。

注：试剂盒检测过程操作步骤减少，时间减少。

1 免疫原的合成与鉴定

(1) 载体蛋白（钥孔械血蓝蛋白 KLH）与半抗原（链霉素）进行偶联，形成完全抗原。

(2) 采用离心、透析或层析法纯化免疫原。

(3) 在紫外可见分光光度计上扫描测定半抗原、KLH 和联接物的紫外可见吸收光谱，验证半抗原是否与 KLH 联接上，并计算偶联比率。

冷冻保存免疫原。

2 包被抗原的制备

包被抗原的联接方法与免疫抗原制备方法基本上相同，只是把载体蛋白 KLH 改为 OVA。

3 多克隆抗体的制备与纯化

(1) 动物免疫

免疫动物用健康的新西兰大耳白兔，首次免疫时用完全弗氏佐剂与等量的合成免疫原混合，加强免疫用不完全弗氏佐剂与等量的合成免疫原混合；定期在免疫后约 10 天采少量血液，以监视抗体效价，以便确定加强免疫次数。

(2) 血液收集

当抗体效价达到最高或所需水平时，颈动脉采血制备抗体。

(3) 抗体效价测定

将待测血清进行梯度稀释，直至用酶标仪不能检测出酶促反应（即无色）为此。取最后一个呈现颜色反应的稀释度作为抗体的效价，即滴度。

(4) 抗体的纯化与保存

抗血清先用 50%饱和硫酸铵沉淀，再用 DEAE-52 分离 IgG。纯化后的抗体或制备 Fc 片段，或加等量甘油后-20℃或-70℃保存备用。

4 单克隆抗体的制备

(1) 脾细胞和骨髓瘤细胞的融合；

(2) 抗体检测；

(3) 杂交瘤细胞的克隆化；

(4) 单克隆抗体的生产。

5 免疫测定条件的筛选及标准曲线的建立。

用方阵法筛选最佳温育时间、温度及包被抗原、抗体浓度等条件，

建立标准曲线，确定最小检测极限以及与其它物质的交叉反应。

6 样品实地测定与验证

在不含待测物的食品中加入一定量的标准残留物，放置一段时间后从中提取待测物，用所建立的 ELISA 方法检测待测物的残留量，记录数据，并将 ELISA 测定与 GLC 测定结果比较，验证该检测方法的可信度。

附图说明

图 1 为本发明生产的工艺流程图。

图 2 为链霉素检测标准曲线图。

具体实施方式

实施例 1 检测链霉素的酶联免疫试剂盒组分的制备

1. 抗原的合成

a. 包被原的合成

将链霉素半抗原通过重氮化反应和鸡卵清白蛋白（OVA）载体蛋白用活泼酯法进行偶联得到。

b. 免疫原的合成

将链霉素半抗原通过重氮化反应和钥孔械血蓝蛋白载体蛋白用活泼酯法进行偶联得到。

2. 链霉素鼠单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以链霉素半抗原与钥孔械血蓝蛋

白偶联物为免疫原，免疫剂量为 300 μ g/只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

b. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5: 1 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，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

c. 细胞冻存和复苏

取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个/ml 的细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

d. 单克隆抗体的制备与纯化

采用体内诱生法，将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，20 $^{\circ}$ C 保存。

3. 链霉素兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以链霉素半抗原与钥孔械血蓝蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 3mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共

免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

4. 酶标板的制备

用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 $0.06\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 温育 2h，倾去包被液，用洗涤液洗涤 4 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 $150\mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 温育 1h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 2 检测链霉素的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测链霉素的酶联免疫试剂盒，见图 1，使其包含下述组分：

- (1)包被链霉素抗原的酶联板；
- (2)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；
- (3) 链霉素鼠单克隆抗体；
- (4) 链霉素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.4\mu\text{g/L}$ 、 $1.6\mu\text{g/L}$ 、 $6.4\mu\text{g/L}$ 、 $25.6\mu\text{g/L}$ ；
- (5)底物显色液 A 液为过氧化氢，底物显色液 B 液为邻苯二胺；
- (6)终止液为 2 mol/L 的硫酸缓冲液；
- (7)浓缩洗涤液为 pH 7.4，含有 0.1%-0.5%吐温 80，0.5%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液；
- (8)抗体稀释液为 pH 值 8.2、 0.05mol/L 、含有 3%小牛血清和 5%N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液；
- (9)浓缩复溶液为含有 50%甲醇、1%小牛血清(BSA)的磷酸盐缓冲液。

实施例 3 检测链霉素的酶联免疫试剂盒的的组建

组建检测链霉素的酶联免疫试剂盒, 见图 1, 使其包含下述组分:

- (1)包被羊抗兔抗抗体的酶联板;
- (2)用碱性磷酸酯酶标记的链霉素抗原;
- (3) 链霉素兔多克隆抗体;
- (4) 链霉素标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.4\mu\text{g/L}$ 、 $1.6\mu\text{g/L}$ 、 $6.4\mu\text{g/L}$ 、 $25.6\mu\text{g/L}$;
- (5)底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液;
- (6)终止液为 2mol/L 的氢氧化钠缓冲液;
- (7)浓缩洗涤液为 PH 7.4, 含有 0.8%吐温 20 和 0.1%叠氮化钠(NaN_3)防腐剂的磷酸盐缓冲液;
- (8)浓缩复溶液为含有 50%甲醇、1%小牛血清(BSA)的磷酸盐缓冲液。

实施例 4 样品中链霉素残留的检测

1. 样品前处理

取 $2\pm 0.05\text{g}$ 去除脂肪的粉碎鸡肉与 8ml 0.05M PB 缓冲液混合 5min , 置 56°C 水浴环境放置 30min ; 室温 4000r/min 以上, 离心 10min ; 取 $50\mu\text{l}$ 上清液, 加入 $450\mu\text{l}$ 稀释后的复溶液混匀; 取 $50\mu\text{l}$ 用于分析。

2. 用试剂盒检测

向链霉素偶联抗原包被的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品或样本溶液(各 2 孔) $50\mu\text{l}$, 然后加链霉素酶标记物 $50\mu\text{l}$, 再加入链霉素抗体工作液 $50\mu\text{l}$, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜封板, 37°C 恒温箱中反应

40min。倒出孔中液体，每孔加入 250 μ l 稀释好的洗涤液，10 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。加入底物显色液 A 液过氧化氢 50 μ l，再加 B 液邻苯二胺 50 μ l，轻轻振荡混匀，37℃恒温箱避光显色 20min。每孔加入终止液 2 mol/L 硫酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)，除以第一个标准溶液(0 标准)的吸光度值(B_0)，再乘以 100%，得到百分吸光度值。以链霉素浓度的半对数为 x 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，见图 2。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液中链霉素所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中链霉素的实际浓度。

实施例 5 样品中链霉素残留的检测

1. 样品前处理

称量 2 ± 0.05 g 蜂蜜加入 4ml 0.04M 磷酸，振荡 10min 至完全溶解，加入 450 μ l 1M NaOH 将 PH 值调至 7-9 之间，室温 3000r/min 以上，离心 5min，直至清亮。取 50 μ l 上清液，加入 450 μ l 稀释后的复溶液混匀；取 50 μ l 用于分析。

2. 用试剂盒检测

向羊抗兔抗抗体包被的 96 孔酶标板微孔中加入链霉素兔多克隆抗体工作液 100 μ l，用盖板膜封板，20-25℃恒温箱中反应 60min，倒

出孔中液体，每孔加入 250μl 浓缩洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入细菌提取碱性磷酸酯酶标记的链霉素抗原 50μl，再加入系列标准品或样本溶液 50μl，用盖板膜封板，20-25℃恒温箱中反应 30min，重复洗涤过程。加入对硝基磷酸盐缓冲液 100μl，轻轻振荡混匀，20-25℃恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 2mol/L 氢氧化钠溶液 50μl，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3. 检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0 标准)的吸光度值(B₀)再乘以 100%，得到百分吸光度值。以链霉素浓度(μg/L)的半对数为 x 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图，见图 2。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中链霉素实际浓度。

实验例 1 标准品精密度试验

从每批按照实施例 1(4)中的方法制备的酶联板中，各抽出 10 个微孔，测定 1.6μg/L。标准溶液的吸光度值(OD 值)，重复 3 次，计算变异系数 CV%，结果见表 1。

表 1 标准可重复性试验(CV%)

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

01 批	5.6	6.7	9.2	5.9	7.9	9.9	7.6	8.9	5.9	7.1
CV%										
03 批	4.6	6.5	6.3	7.5	10.3	10.9	6.3	4.9	7.6	8.2
CV%										
06 批	3.9	4.9	8.6	6.1	10.6	11.0	10.8	8.0	9.6	10.0
CV%										

结果表明变异系数范围在 3.9%-11.0%之间,符合了变异系数小于 20%的规定,说明本试剂盒标准品精密度达到了标准。

实验例 2 样本可重复性试验

以 0.5 $\mu\text{g/L}$ 浓度的链霉素对鸡肉、鸡肝和蜂蜜,添加到样品中,分别取三个不同批次的试剂盒各五个,每个浓度重复 5 次,分别计算变异系数,结果见表 2、表 3。

表 2 鸡肉、鸡肝样品可重复性试验

批号	实测值 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$					变异系数 CV%
01	0.43	0.50	0.43	0.46	0.41	11.2
	0.39	0.36	0.46	0.40	0.42	10.9
	0.38	0.42	0.43	0.43	0.44	11.6
	0.36	0.42	0.50	0.41	0.39	9.8
03	0.39	0.41	0.50	0.46	0.37	11.0
	0.41	0.46	0.38	0.38	0.39	10.2
	0.45	0.49	0.46	0.46	0.36	11.0
	0.47	0.32	0.38	0.41	0.41	12.3
06	0.46	0.39	0.37	0.46	0.45	11.9

表 3 蜂蜜样品可重复实验

批号	实测值 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$					变异系数 CV%
	0.41	0.46	0.39	0.43	0.42	12.3

01	0.39	0.36	0.37	0.47	0.45	13.0
	0.43	0.43	0.43	0.35	0.47	11.9
	0.45	0.41	0.44	0.50	0.42	12.3
03	0.43	0.37	0.47	0.43	0.43	10.2
	0.39	0.46	0.50	0.39	0.47	9.7
	0.50	0.45	0.41	0.43	0.47	13.6
06	0.43	0.43	0.46	0.39	0.36	13.5
	0.49	0.47	0.32	0.37	0.40	10.9

结果表明鸡肉、鸡肝样本变异系数均低于 20%，蜂蜜样本的变异系数均低于 20%，符合了变异系数小于 25%的规定，说明本试剂盒测定样本的精密度达到了标准。

实验例 3 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的链霉素标准品溶液，分别为 0.5 μ g/kg(L) 和 2 μ g/kg(L)，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，分别计算回收率。

表 4 试剂盒的准确度

样本	鸡肉、鸡肝		蜂蜜	
添加浓度 μ g/ μ l	0.5	2	0.5	2
回收率	92	83	87	85
	84.3	75	96	80
	88	90	98.6	79
	89	84	87.4	86
平均值	88.3	83	92.3	82.5

结果表明鸡肉、鸡肝添加的回收率在 83%-88.3%之间，蜂蜜添加回收率在 82.5%-92.3%之间。

实验例 4

试剂盒保存条件为 2-8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸

光度值(零标准)、50%抑制浓度、链霉素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℃保存的条件下放置 6 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 5 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 6 个月以上。

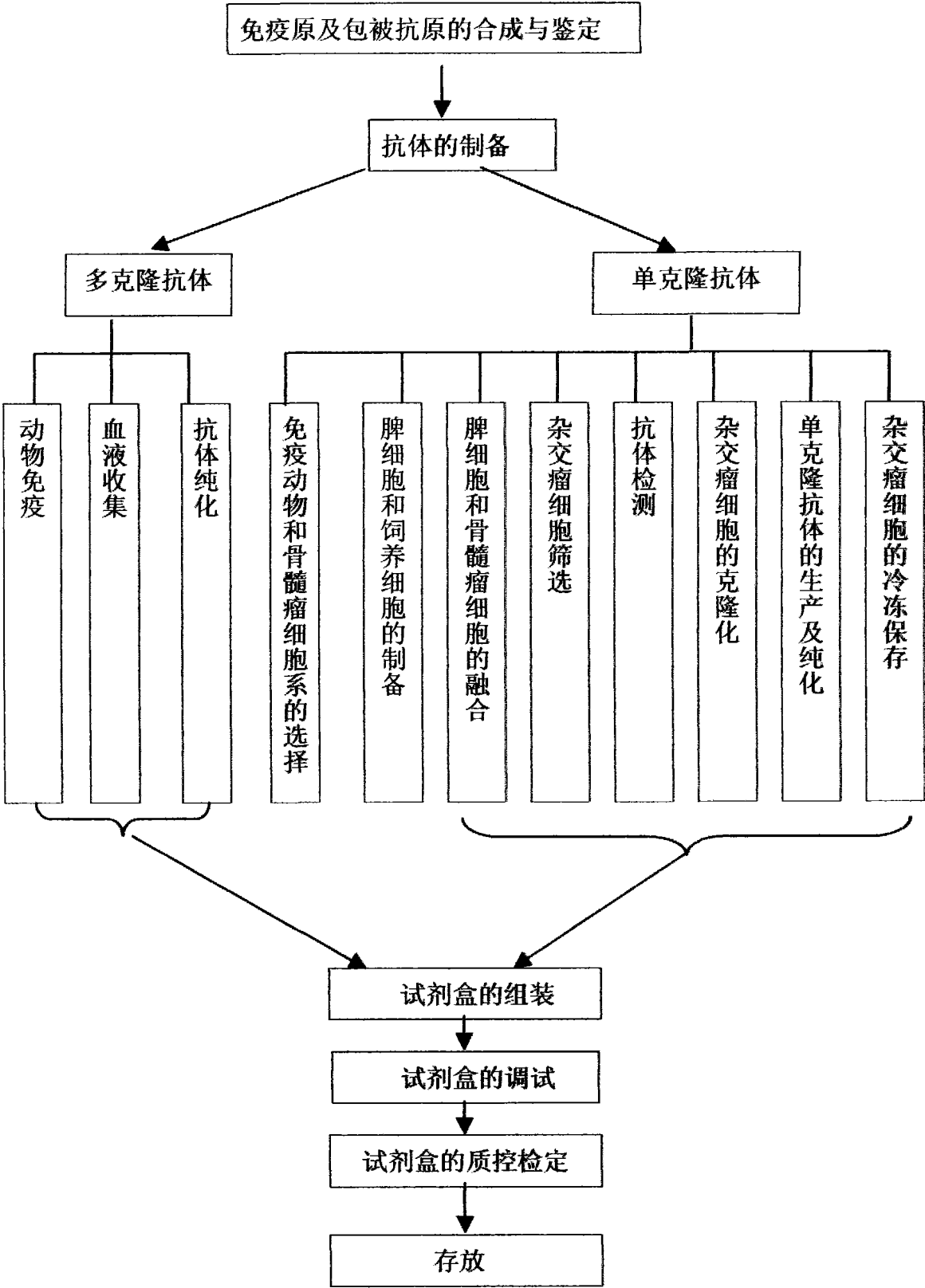


图 1

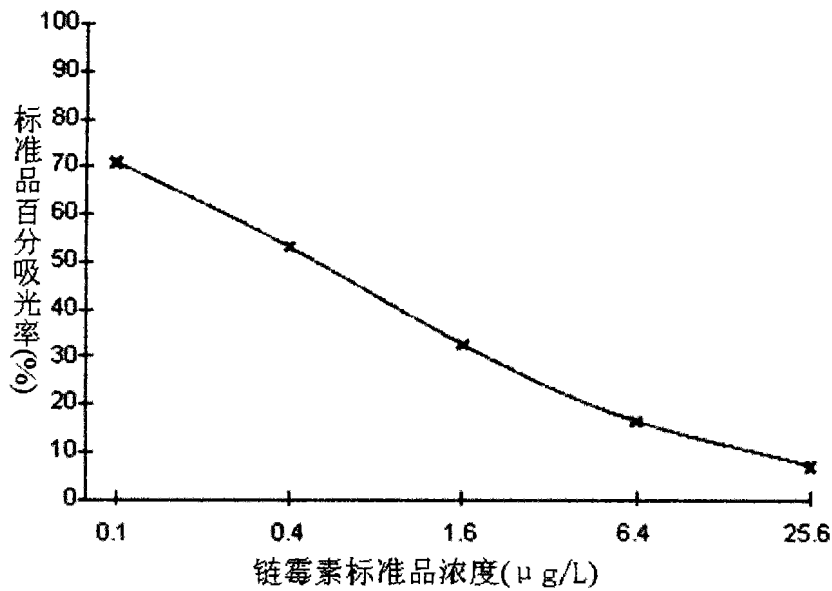


图 2

专利名称(译)	一种链霉素药物快速检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN101526536A	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200910045165.X	申请日	2009-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
[标]发明人	聂继斌 唐俊 杨宏 温俊梅 齐欣 吴青 李成 杨宗繁		
发明人	聂继斌 唐俊 杨宏 温俊梅 齐欣 吴青 李成 杨宗繁		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/547 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测链霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶联板；酶标记物；链霉素特异性抗体；链霉素标准品溶液；底物显色液；终止液；浓缩洗涤液；浓缩复溶液。本发明还提供了一种检测动物源性食品中链霉素的方法，包括了以下步骤：样品前处理；用试剂盒的试剂进行检测；分析检测结果。本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的检测动物源性食品链霉素的酶联免疫试剂盒及检测方法。

