



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104101710 B

(45) 授权公告日 2016.02.03

(21) 申请号 201410130212.1

(22) 申请日 2014.04.02

(73) 专利权人 浙江省海洋开发研究院

地址 316100 浙江省舟山市定海区临城街道
体育路10号

(72) 发明人 相兴伟 周宇芳 周利辉 万婧
付万冬 杨会成 郑斌

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 尉伟敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2009/077593 A1, 2009.06.25,

CN 1327158 A, 2001.12.19,

CN 1049864 A, 1991.03.13,

CN 102879568 A, 2013.01.16,

CN 103197006 A, 2013.07.10,

US 4042682 A, 1977.08.16,

Alexis Laux et al. Mapping of endogenous
morphine-like compounds in the adult mouse

brain: Evidence of their localization in
astrocytes and GABAergic cells.. 《The
Journal of Comparative Neurology》.2011,

Yannick Goumon et al. Central and
peripheral endogenous morphine. 《An. R.
Acad. Nac. Farm.》.2009, 第75卷(第3期),

BQ KITS. Morphine Specific Direct ELISA
Kit. 《Morphine ELISA》.2010,

审查员 舒霏霏

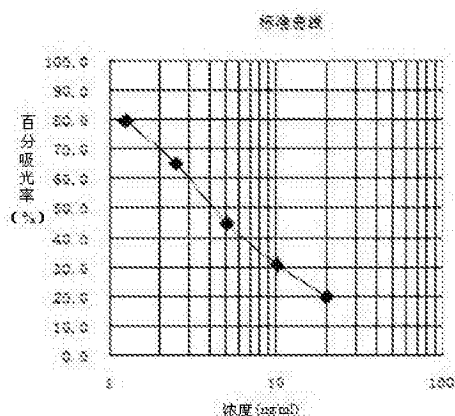
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种海水鱼内生吗啡的检测方法及其检测试
剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种海水鱼内生吗啡的检测方
法及其检测试剂盒,主要采用直接竞争酶联免疫
测定法,将以前酶联免疫法中繁琐的操作步骤进
行精简、优化,检测快速、灵敏、准确,样品前处
理过程简单,能同时快速检测大批样品。



1. 一种海水鱼内生吗啡的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 样品前处理

取海水鱼的脑部神经节,用甲醇清洗,沥干,然后将脑部神经节撕碎,称取 $0.2 \pm 0.05\text{g}$ 撕碎的脑部神经节,加入 $0.5\text{--}2\text{mL}$ 甲醇, $70\text{--}75^{\circ}\text{C}$ 水浴 $2\text{--}3$ 小时,冷却至室温,离心,取上清液于冷冻离心浓缩机中离心直至液体挥发完全,残渣用 $100\text{--}200\ \mu\text{L}$ 样品稀释液稀释,振荡器上振荡充分溶解得样品溶液;

(2) 试剂盒检测

包被有吗啡特异性抗体的酶标板上的微孔编号:将样品和标准品对应微孔按序编号,每个样品和标准品做两孔平行,并记录样品孔和标准品孔所在位置;

将样品溶液和吗啡标准品溶液均按照每孔 $20\text{--}30\ \mu\text{L}$ 的量加到对应微孔中,然后加入吗啡抗原酶标记物 $100\text{--}120\ \mu\text{L}/\text{孔}$,室温孵育 $30\text{--}35$ 分钟后倒去孔内液体,用洗涤液 $250\text{--}300\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 洗涤 $3\text{--}5$ 次,加入显色剂 $100\text{--}120\ \mu\text{L}/\text{孔}$,室温孵育 $10\text{--}15$ 分钟,然后加终止液 $100\text{--}120\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 终止,酶标仪 450nm 下测定每孔的吸光度值;

(3) 结果分析

以标准品百分吸光率为纵坐标,以吗啡标准品浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线图,将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中内生吗啡的实际含量。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于:所述样品稀释液为 $\text{pH}7.4, 0.01\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测方法,其特征在于:所述吗啡抗原酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测方法,其特征在于:所述显色剂为四甲基联苯胺。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的检测方法,其特征在于:所述终止液为浓度为 2mol/L 的硫酸溶液或浓度为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于:包被有吗啡特异性抗体的酶标板制备方法为:用包被缓冲液将吗啡单克隆抗体稀释至 $1\ \mu\text{g/mL}$ 得包被液,酶标板每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 包被液, 37°C 孵育 2h 或者 4°C 过夜,倒去包被液,用洗涤液洗涤 3 次,拍干,然后每孔中加入 $200\ \mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 温育 2h ,倒去孔内液体,干燥后得包被有吗啡特异性抗体的酶标板。

7. 根据权利要求 1 或 6 所述的检测方法,其特征在于:所述洗涤液为含有体积分数 0.5% 吐温-20 的 $\text{pH}7.4, 0.01\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍后所得。

8. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于:所述包被缓冲液为 $\text{pH}9.6, 0.05\text{mol/L}$ 的碳酸盐缓冲液;所述封闭液为含有 $3\text{wt}\%$ 的聚乙二醇、 $1\ \text{wt}\%$ 的酪蛋白、 $4\ \text{wt}\%$ 的甘氨酸、 $1\ \text{wt}\%$ 的卵清蛋白及 $1\ \text{wt}\%$ 的明胶的磷酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于:所述吗啡单克隆抗体的制备方法为:

A、吗啡抗原的合成

称取吗啡原料 500mg ,加入 50mL 苯和 1g 琥珀酸酐,加热回流 8h ,蒸发除去苯,残留物分别用无水乙醚、无水乙醇洗涤,然后真空干燥,即得到粉末状的 6-琥珀酸-吗啡,称取 6-琥

珀酸-吗啡 20mg 溶于 10mL PBS 缓冲液中,加入 30 μ L 三乙胺,再加入 30 μ L 氯甲酸异丁酯,反应半小时得反应液;称取 20mg BSA 溶解于 10mL PBS 缓冲液中,加入上述反应液,搅拌反应过夜,透析 3 天,离心,收集上清液,得到吗啡抗原;

B、取 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠六只,将 PBS 缓冲液与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后,采用腹腔注射的方法进行免疫,按 1mg/kg 体重的量进行首次免疫,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,采用与首次免疫相同的方法每隔两周加强免疫一次,共加强免疫四次,从第三次免疫开始,每次免疫后 7 天,小鼠尾静脉取血 1mL,进行抗体效价检测,选择经 ELISA 检测效价最高的 BALB/c 小鼠用于制备脾细胞,3 天后取效价最高的 BALB/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选获得杂交瘤细胞;另一批 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 液体石蜡致敏,7-14 天后向小鼠腹腔内注射 1×10^6 个杂交瘤细胞,7-10 天后开始用注射器从小鼠腹腔抽取腹水,之后每隔 1-3 天抽取腹水 1 次,离心,收集上清液,-20℃ 保存,进一步采用辛酸-硫酸铵法纯化上清液获得吗啡单克隆抗体。

10. 一种用于权利要求 1 所述检测方法的海水鱼内生吗啡检测试剂盒,其特征在于,包括如下组分:

1、吗啡标准品溶液,浓度分别为:0 ng/mL,1.25 ng/mL,2.5 ng/mL,5 ng/mL,10 ng/mL,20 ng/mL;

2、包被有吗啡特异性抗体的酶标板;

3、吗啡抗原酶标记物;

4、显色剂:四甲基联苯胺;

5、浓缩洗涤液 10 $\times$:含有体积分数 0.5% 吐温-20 的 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液;

6、终止液:浓度为 2mol/L 的硫酸溶液或浓度为 2mol/L 的氢氧化钠溶液;

7、样品稀释液:pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液。

一种海水鱼内生吗啡的检测方法及其检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生化检测技术领域,特别涉及一种海水鱼内生吗啡的检测方法及其检测试剂盒。

背景技术

[0002] 人们通常认为吗啡对高等哺乳动物而言是剧烈的毒品,仅能从植物中提取。但是经过深入研究表明,在低等软体动物和高等哺乳动物中,除神经肽,氨基酸及其他小分子神经介质传递机制外,还存在以内生吗啡类物质为介质的神经传递机制。人们的痛觉、精神上的愉快和抑郁以及生理上的快感,在一定程度上取决于大脑产生内生吗啡的多少,因此,内生吗啡的产生、增加及减少,在一些特定的情况下对疼痛有着不同的反应和感觉。

[0003] 之前的研究发现贻贝、龙虾等海洋软体动物神经节自身可产生微量的内生吗啡;在大白鼠大脑区的杏仁核区内存在内生吗啡,而且内生吗啡可使杏仁核区产生一氧化氮;在人的白细胞中也能检测到微量的内生吗啡。目前报道用于检测内生吗啡的方法主要高效液相色谱(HPLC)、高效液相色谱-质谱联用法(HPLC/MS)。色谱法是目前国际上普遍采用的检测方法,灵敏度高、准确性好,常作为药物残留检测的确认方法,但其对仪器和操作人员要求都较高,成本也比较高,一个样品检测要几百元,检测时间也很长,不利于在基层单位推广使用。免疫分析法是国际上通用的一种生化方法。目前常用的胶体金法受所用的生物制剂的影响,假阳性出现的概率很高,而且由于胶体金法灵敏度低,颜色判断有人为因素致使准确性差。

[0004] 因此建立一种快速、灵敏、准确,并可以大批量应用于内生吗啡检测的方法是具有非常重要的现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种海水鱼内生吗啡的检测方法,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品,主要采用直接竞争酶联免疫测定法,将以前酶联免疫法中繁琐的操作步骤进行精简、优化,检测快速、灵敏、准确。

[0006] 本发明还提供了一种海水鱼内生吗啡检测试剂盒,试剂盒具有保存时间长、自动化程度高、成本低、无放射性同位素污染、快速简便、灵敏度高、准确可靠等特点。

[0007] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0008] 一种海水鱼内生吗啡的检测方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 样品前处理

[0010] 取海水鱼的脑部神经节,用甲醇清洗,沥干,然后将脑部神经节撕碎,称取 $0.2 \pm 0.05\text{g}$ 撕碎的脑部神经节,加入 $0.5\text{--}2\text{ml}$ 甲醇, $70\text{--}75^{\circ}\text{C}$ 水浴 $2\text{--}3$ 小时,冷却至室温,离心,取上清液于冷冻离心浓缩机中离心直至液体挥发完全,残渣用 $100\text{--}200\ \mu\text{l}$ 样品稀释液稀释,振荡器上振荡充分溶解得样品溶液。

[0011] 现有高效液相色谱的处理样品的方法用于本发明的检测样品的处理,无法检测到

内生吗啡,因此,本发明首先改进了样品的前处理方法,以适合于下一步的试剂盒的检测。

[0012] (2) 试剂盒检测

[0013] 包被有吗啡特异性抗体的酶标板上的微孔编号:将样品和标准品对应微孔按序编号,每个样品和标准品做两孔平行,并记录样品孔和标准品孔所在位置;

[0014] 将样品溶液和吗啡标准品溶液均按照每孔 20-30 μ l 的量加到对应微孔中,然后加入吗啡抗原酶标记物 100-120 μ l/孔,室温孵育 30-35 分钟后倒去孔内液体,用洗涤液 250-300 μ l/孔洗涤 3-5 次,加入显色剂 100-120 μ l/孔,室温孵育 10-15 分钟,然后加终止液 100-120 μ l/孔终止,酶标仪 450nm 下测定每孔的吸光度值。

[0015] (3) 结果分析

[0016] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以吗啡标准品浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线图,将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中内生吗啡的实际含量。

[0017] 作为优选,所述样品稀释液为 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0018] 作为优选,所述吗啡抗原酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶。

[0019] 作为优选,所述显色剂为四甲基联苯胺。

[0020] 作为优选,所述终止液为浓度为 2mol/L 的硫酸溶液或浓度为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

[0021] 作为优选,包被有吗啡特异性抗体的酶标板制备方法为:用包被缓冲液将吗啡单克隆抗体稀释至 1 μ g/ml 得包被液,酶标板每孔加入 100 μ l 包被液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 或者 4 $^{\circ}$ C 过夜,倒去包被液,用洗涤液洗涤 3 次,拍干,然后每孔中加入 200 μ l 封闭液,37 $^{\circ}$ C 温育 2h,倒去孔内液体,干燥后得包被有吗啡特异性抗体的酶标板。

[0022] 作为优选,所述洗涤液为含有体积分数 0.5%吐温-20 的 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍后所得。

[0023] 作为优选,所述包被缓冲液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述封闭液为含有 3wt%的聚乙二醇、1 wt %的酪蛋白、4 wt %的甘氨酸、1 wt %的卵清蛋白及 1 wt %的明胶的磷酸盐缓冲液。

[0024] 作为优选,所述吗啡单克隆抗体的制备方法为:

[0025] A、吗啡抗原的合成

[0026] 称取吗啡原料 500mg,加入 50mL 苯和 1g 琥珀酸酐,加热回流 8h,蒸发除去苯,残留物分别用无水乙醚、无水乙醇洗涤,然后真空干燥,即得到粉末状的 6-琥珀酸-吗啡,称取 6-琥珀酸-吗啡 20mg 溶于 10ml PBS 缓冲液中,加入 30 μ l 三乙胺,再加入 30 μ l 氯甲酸异丁酯,反应半小时得反应液;称取 20mg BSA 溶解于 10ml PBS 缓冲液中,加入上述反应液,搅拌反应过夜,透析 3 天,离心,收集上清液,得到吗啡抗原;

[0027] B、取 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠六只,将 PBS 缓冲液与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后,采用腹腔注射的方法进行免疫,按 1mg/kg 体重的量进行首次免疫,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,采用与首次免疫相同的方法每隔两周加强免疫一次,共加强免疫四次,从第三次免疫开始,每次免疫后 7 天,小鼠尾静脉取血 1ml,进行抗体效价检测,选择经 ELISA 检测效价最高的 BALB/c 小鼠用于制备脾细胞,3 天后取效价最高的 BALB/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选获得杂交瘤细胞;另一批 BALB/c 小鼠腹腔

注射 0.5mL 液体石蜡致敏,7-14 天后向小鼠腹腔内注射 1×10^6 个杂交瘤细胞,7-10 天后开始用注射器从小鼠腹腔抽取腹水,之后每隔 1-3 天抽取腹水 1 次,离心,收集上清液, -20°C 保存,进一步采用辛酸-硫酸铵法纯化上清液获得吗啡单克隆抗体。

[0028] 用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,采用与首次免疫相同的方法每隔两周加强免疫一次即将 PBS 缓冲液与等体积弗氏不完全佐剂混合,充分乳化后,采用腹腔注射的方法进行免疫,按 1mg/kg 体重的量进行加强免疫。

[0029] 根据本发明上述方法制备的吗啡单克隆抗体,特异性好,检测效果佳。

[0030] 一种海水鱼内生吗啡检测试剂盒,包括如下组分:

[0031] 1、吗啡标准品溶液,浓度分别为:0 ng/ml,1.25 ng/ml,2.5 ng/ml,5 ng/ml,10 ng/ml,20 ng/ml;

[0032] 2、包被有吗啡特异性抗体的酶标板;

[0033] 3、吗啡抗原酶标记物;

[0034] 4、显色剂:四甲基联苯胺;

[0035] 5、浓缩洗涤液 $10\times$:含有体积分数 0.5% 吐温-20 的 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液;

[0036] 6、终止液:浓度为 2mol/L 的硫酸溶液或浓度为 2mol/L 的氢氧化钠溶液;

[0037] 7、样品稀释液:pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0038] 本发明的有益效果是:

[0039] 1、本发明方法可以定性、定量检测海水鱼中内生吗啡的含量,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样品。

[0040] 2、主要采用直接竞争酶联免疫测定法,将以前酶联免疫法中繁琐的操作步骤进行精简、优化,主要试剂又以溶液的形式提供,可减少试剂盒的操作步骤,为使用者节省时间并降低因操作步骤繁琐而造成的误差。

[0041] 3、试剂盒保存时间长、自动化程度高、成本低、无放射性同位素污染等优点。

[0042] 4、具有高特异性、高灵敏度、高准确度等特点,将在内生吗啡检测中发挥重要作用。

附图说明

[0043] 图 1 是本发明吗啡标准品的标准曲线图。

具体实施方式

[0044] 下面通过具体实施例,并结合附图,对本发明的技术方案作进一步的具体说明。

[0045] 本发明中,若非特指,所采用的原料和设备等均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0046] 一种海水鱼内生吗啡检测试剂盒,包括如下组分:

[0047] 1、吗啡标准品溶液,浓度分别为:0 ng/ml,1.25 ng/ml,2.5 ng/ml,5 ng/ml,10 ng/ml,20 ng/ml。

[0048] 2、包被有吗啡特异性抗体的酶标板,1 块,96 孔。

[0049] 3、吗啡抗原酶标记物,吗啡抗原酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶。

[0050] 4、显色剂：四甲基联苯胺(市售)。

[0051] 5、浓缩洗涤液 10×：含有体积分数 0.5% 吐温-20 的 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0052] 浓缩洗涤液 10× 的配制为：将 0.5ml 吐温-20 与 pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 99.5ml 混合均匀。

[0053] 6、终止液：浓度为 2mol/L 的硫酸溶液或浓度为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

[0054] 7、样品稀释液：pH7.4、0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, 市售)。

[0055] 洗涤液的配制为：用去离子水将浓缩洗涤液 10× 按 1:9 体积比进行稀释, 即：1 份浓缩洗涤液 10×+9 份去离子水；用于酶标板的洗涤, 洗涤液在 4℃ 环境可保存一个月。

[0056] 一、包被有吗啡特异性抗体的酶标板制备方法为：

[0057] 溶液准备：

[0058] 1、包被缓冲液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液(市售)。

[0059] 2、封闭液：3g 聚乙二醇+1g 酪蛋白+4g 甘氨酸+1g 卵清蛋白+1g 明胶+90g 磷酸盐缓冲液(pH7.4、0.01mol/L) 混合而成得到含有 3wt% 的聚乙二醇、1 wt % 的酪蛋白、4 wt % 的甘氨酸、1 wt % 的卵清蛋白及 1 wt % 的明胶的磷酸盐缓冲液。

[0060] 用包被缓冲液将吗啡单克隆抗体稀释至 1 μg/ml 得包被液, 酶标板每孔加入 100 μl 包被液, 37℃ 孵育 2h 或者 4℃ 过夜, 倒去包被液, 用洗涤液洗涤 3 次, 拍干, 然后每孔中加入 200 μl 封闭液, 37℃ 温育 2h, 倒去孔内液体, 干燥后得包被有吗啡特异性抗体的酶标板。

[0061] 二、吗啡单克隆抗体的制备方法为：

[0062] A、吗啡抗原的合成

[0063] 称取吗啡原料 500mg, 加入 50mL 苯和 1g 琥珀酸酐, 加热回流 8h, 蒸发除去苯, 残留物分别用无水乙醚、无水乙醇洗涤, 然后真空干燥, 即得到粉末状的 6-琥珀酸-吗啡, 称取 6-琥珀酸-吗啡 20mg 溶于 10ml PBS 缓冲液(20 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L NaCl ; pH 7.2) 中, 加入 30 μl 三乙胺, 再加入 30 μl 氯甲酸异丁酯, 反应半小时得反应液; 称取 20mg BSA 溶解于 10ml PBS 缓冲液(20 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L NaCl ; pH 7.2) 中, 加入上述反应液, 搅拌反应过夜, 透析 3 天, 离心, 收集上清液, 得到吗啡抗原。

[0064] B、取 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠六只(浙江大学实验动物中心提供), 将 PBS 缓冲液(20 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L NaCl ; pH 7.2) 与等体积弗氏完全佐剂(市售) 混合, 充分乳化后, 采用腹腔注射的方法进行免疫, 按 1mg/kg 体重的量进行首次免疫, 用弗氏不完全佐剂(市售) 代替弗氏完全佐剂, 采用与首次免疫相同的方法每隔两周加强免疫一次, 共加强免疫四次, 从第三次免疫开始, 每次免疫后 7 天, 小鼠尾静脉取血 1ml, 进行抗体效价检测, 选择经 ELISA 检测(现有方法) 效价最高的 BALB/c 小鼠用于制备脾细胞, 3 天后取效价最高的 BALB/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞(市售) 融合, 筛选获得杂交瘤细胞(融合及筛选均为现有常规方法); 另一批 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 液体石蜡致敏, 7-14 天后向小鼠腹腔内注射 $1-2 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞, 7-10 天后开始用注射器从小鼠腹腔抽取腹水, 之后每隔 1-3 天抽取腹水 1 次, 4000rpm 离心 15min, 收集上清液, -20℃ 保存, 进一步采用辛酸-硫酸铵法(现有方法) 纯化上清液获得吗啡单克隆抗体。

[0065] 三、吗啡抗原酶标记物的制备：

[0066] 称取辣根过氧化物酶 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，于室温静置过夜，经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱，流速控制在 1ml/min，收集棕色流出液，以聚乙二醇浓缩至 5ml 得浓缩液。称取 12.5mg 的吗啡抗原，用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入上述浓缩液中。然后加入 1mol/L 的碳酸盐缓冲液 0.25ml，持续搅拌 3h，加 0.2mol/L 的赖氨酸溶液 0.25ml，混匀后置于室温 2h。在搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液，4℃ 放置 1h。3000r/min 离心半小时，弃上清，沉淀用半饱和硫酸铵溶液洗两次后用 0.15mol/L 的 PBS 缓冲液溶解，之后装入透析袋中，用 0.15mol/L 的 PB 缓冲液 S 透析，去除铵离子后，10000r/min 离心半小时去除沉淀，上清液即为吗啡抗原酶标记物。

[0067] 实施例 1：

[0068] 一种海水鱼内生吗啡的检测方法，包括以下步骤：

[0069] (1) 样品前处理

[0070] 取大黄鱼的脑部神经节，用甲醇（分析纯）清洗，沥干，然后用镊子将脑部神经节撕碎，称取 0.2 ± 0.05 g 撕碎的脑部神经节，加入 0.5ml 甲醇，70℃ 水浴 3 小时，冷却至室温，5000rpm 离心 2min，取上清液于冷冻离心浓缩机（Labconco CentriVap，美国）中 10000rpm 离心直至液体挥发完全，残渣用 100 μ l 样品稀释液稀释，振荡器上振荡充分溶解得样品溶液。

[0071] (2) 试剂盒检测

[0072] 包被有吗啡特异性抗体的酶标板上的微孔编号：将样品和标准品对应微孔按序编号，每个样品和标准品做两孔平行，并记录样品孔和标准品孔所在位置；

[0073] 将样品溶液和吗啡标准品溶液均按照每孔 20 μ l 的量加到对应微孔中，然后加入吗啡抗原酶标记物 100 μ l/孔，室温孵育 30 分钟后倒去孔内液体，使得待测样品中的内生吗啡与酶标记的竞争酶标板上的吗啡抗体有效结合，用洗涤液 250 μ l/孔洗涤 5 次，除去未结合的酶标记物，加入显色剂 100 μ l/孔，室温孵育 10 分钟，然后加终止液（2mol/L 的硫酸溶液）100/孔终止，酶标仪 450nm 下测定每孔的吸光度值。

[0074] (3) 结果分析

[0075] 百分吸光率的计算，标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样品的吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准（0 标准）的吸光度值，再乘以 100%，即

[0076]

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

[0077] B—标准品或样品溶液的平均吸光度值。

[0078] B_0 —0 标准品的吸光度值。

[0079] 以标准品百分吸光率为纵坐标，以吗啡标准品浓度的对数为横坐标，绘制标准曲线图（如图 1 所示），步骤（2）获得的吸光度值与样品中内生吗啡的量呈负关系，将样品的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品中内生吗啡的实际含量，经计算，大黄鱼脑中内生吗啡的含量为 33.52 ng/ml。

[0080] 实施例 2：

[0081] 一种海水鱼内生吗啡的检测方法,包括以下步骤:

[0082] (1) 样品前处理

[0083] 取大黄鱼的脑部神经节,用甲醇(分析纯)清洗,沥干,然后用镊子将脑部神经节撕碎,称取 $0.2 \pm 0.05\text{g}$ 撕碎的脑部神经节,加入 2ml 甲醇, 75°C 水浴 2 小时,冷却至室温, 5000rpm 离心 2min,取上清液于冷冻离心浓缩机(Labconco CentriVap,美国)中 10000rpm 离心直至液体挥发完全,残渣用 200 μl 样品稀释液稀释,振荡器上振荡充分溶解得样品溶液。

[0084] (2) 试剂盒检测

[0085] 包被有吗啡特异性抗体的酶标板上的微孔编号:将样品和标准品对应微孔按序编号,每个样品和标准品做两孔平行,并记录样品孔和标准品孔所在位置;

[0086] 将样品溶液和吗啡标准品溶液均按照每孔 30 μl 的量加到对应微孔中,然后加入吗啡抗原酶标记物 120 μl /孔,室温孵育 35 分钟后倒去孔内液体,使得待测样品中的内生吗啡与酶标记的竞争酶标板上的吗啡抗体有效结合,用洗涤液 300 μl /孔洗涤 3 次,除去未结合的酶标记物,加入显色剂 120 μl /孔,室温孵育 15 分钟,然后加终止液(2mol/L 的氢氧化钠溶液) 120 μl /孔终止,酶标仪 450nm 下测定每孔的吸光度值。

[0087] (3) 结果分析

[0088] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以吗啡标准品浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线图(如图 1 所示),步骤(2)获得的吸光度值与样品中内生吗啡的量呈负关系,将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中内生吗啡的实际含量,经计算,大黄鱼脑中内生吗啡的含量为 34.29 ng/ml。

[0089] 实施例 3:

[0090] 一种海水鱼内生吗啡的检测方法,包括以下步骤:

[0091] (1) 样品前处理

[0092] 取大黄鱼的脑部神经节,用甲醇(分析纯)清洗,沥干,然后用镊子将脑部神经节撕碎,称取 $0.2 \pm 0.05\text{g}$ 撕碎的脑部神经节,加入 1ml 甲醇, 72°C 水浴 2.5 小时,冷却至室温, 5000rpm 离心 2min,取上清液于冷冻离心浓缩机(Labconco CentriVap,美国)中 10000rpm 离心直至液体挥发完全,残渣用 150 μl 样品稀释液稀释,振荡器上振荡充分溶解得样品溶液。

[0093] (2) 试剂盒检测

[0094] 包被有吗啡特异性抗体的酶标板上的微孔编号:将样品和标准品对应微孔按序编号,每个样品和标准品做两孔平行,并记录样品孔和标准品孔所在位置;

[0095] 将样品溶液和吗啡标准品溶液均按照每孔 20 μl 的量加到对应微孔中,然后加入吗啡抗原酶标记物 100 μl /孔,室温孵育 30 分钟后倒去孔内液体,使得待测样品中的内生吗啡与酶标记的竞争酶标板上的吗啡抗体有效结合,用洗涤液 300 μl /孔洗涤 3 次,除去未结合的酶标记物,加入显色剂 100 μl /孔,室温孵育 12 分钟,然后加终止液(2mol/L 的硫酸溶液) 100 μl /孔终止,酶标仪 450nm 下测定每孔的吸光度值。

[0096] (3) 结果分析

[0097] 以标准品百分吸光率为纵坐标,以吗啡标准品浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线图(如图 1 所示),步骤(2)获得的吸光度值与样品中内生吗啡的量呈负关系,将样品的百

分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中内生吗啡的实际含量,经计算,大黄鱼脑中内生吗啡的含量为 33.39 ng/ml。

[0098] 本发明样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品,检测快速、灵敏、准确。

[0099] 本发明的海水鱼内生吗啡检测试剂盒,保存时间长(有效期 12 个月),成本低,无放射性同位素污染,检测快速、灵敏、准确。

[0100] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

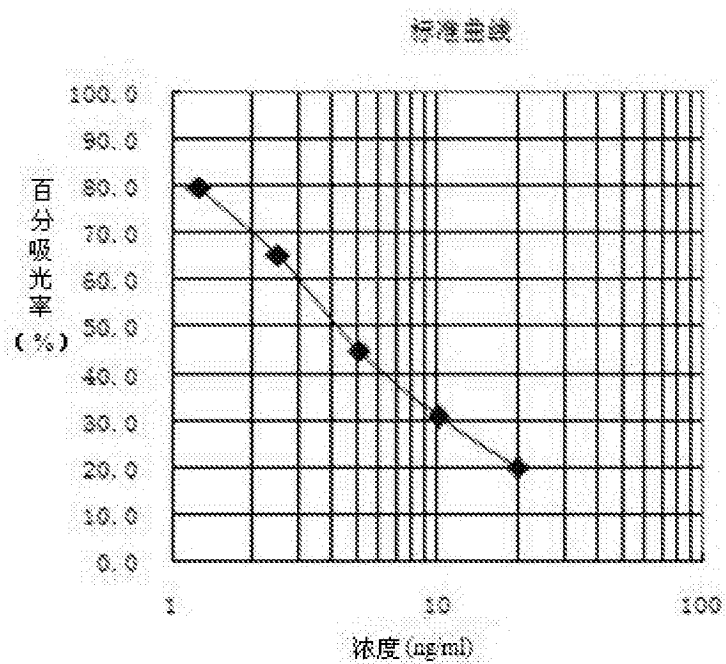


图 1

专利名称(译)	一种海水鱼内生吗啡的检测方法及其检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104101710B	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201410130212.1	申请日	2014-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省海洋开发研究院		
申请(专利权)人(译)	浙江省海洋开发研究院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省海洋开发研究院		
[标]发明人	相兴伟 周宇芳 周利辉 万婧 付万冬 杨会成 郑斌		
发明人	相兴伟 周宇芳 周利辉 万婧 付万冬 杨会成 郑斌		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54373		
其他公开文献	CN104101710A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种海水鱼内生吗啡的检测方法及其检测试剂盒，主要采用直接竞争酶联免疫测定法，将以前酶联免疫法中繁琐的操作步骤进行精简、优化，检测快速、灵敏、准确，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品。

