



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104165990 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201410356798. 3

(22) 申请日 2014. 07. 24

(71) 申请人 广州万联生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业开发区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器E区E402号房

(72) 发明人 曾道平 路俊山 卢秋鸿 陈莲英

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

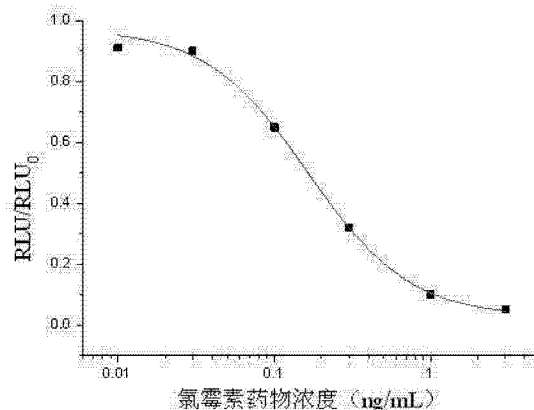
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法,属于化学发光酶联免疫检测技术领域。该检测试剂盒采用直接竞争法,试剂盒包括包被有氯霉素抗原的化学发光酶标板,氯霉素标准品,氯霉素酶标抗体,化学发光液和洗涤液。该试剂盒的使用方法包括如下步骤:(1)待测样品的前处理;(2)顺序加入氯霉素标准品溶液或样品、加入氯霉素酶标抗体,最后加入化学发光液通过化学发光免疫分析仪进行氯霉素的定量检测;(3)结果处理与分析。本发明提供的检测试剂盒灵敏度高、稳定性好,适合大量样品的筛查,具有重要的实际应用推广意义。



1. 一种氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括包被有氯霉素抗原的化学发光酶标板、氯霉素标准品、氯霉素酶标抗体、化学发光液和洗涤液;所述的氯霉素抗原为氯霉素与 OVA 的偶联物,所述的氯霉素抗原的包被浓度为 0.25 mg/L;所述的包被液为 0.02 M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的化学发光酶标板为 96 孔可拆不透明白色发光板。

3. 根据权利要求 1 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的氯霉素标准品的浓度为 1mg/mL,使用时用 0.01 mol/L PBST 将标准品稀释成浓度为 0.0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/L 的一系列氯霉素标准品溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的氯霉素酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的氯霉素单克隆抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的氯霉素酶标抗体的原浓度为 1mg/mL,使用时用 0.01 mol/L PBST 稀释 6000 倍。

6. 根据权利要求 1 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光液由 A 液和 B 液组成,A 液为将 20mg 对碘苯酚、8mg 鲁米诺、1.21gTris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 8.4 得到;B 液为将体积分数 0.40% H_2O_2 、1.21gTris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 7.0 得到;使用时将底物液和底物缓冲液按体积比 1:1 的比例混合。

7. 根据权利要求 1 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的洗涤液为 20 倍浓缩洗涤液,为含有体积浓度 0.5% Tween20 的 pH7.4 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成 1 倍洗涤液。

8. 权利要求 1~7 任一项所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于包含如下步骤:

(1) 将试剂盒置于 15~35℃平衡 30 min 以上;

(2) 取出化学发光酶标板,往标准孔中加入不同浓度的氯霉素标准品溶液,样品孔中加入待测样品,然后每孔加入氯霉素酶标抗体,盖上盖板膜振摇混匀,孵育;

(3) 吸除板孔中的反应液,加入洗涤液洗涤,将酶标板拍干;

(4) 每孔加入化学发光反应液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min 后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值 RLU;

(5) 检测结果计算与分析,从而确定样品中氯霉素的含量。

9. 根据权利要求 8 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,步骤(2)中所述的待测样品为鸡肉或肝脏。

10. 根据权利要求 9 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,所述鸡肉和肝脏在检测之前,要先经过以下预处理:用均质器均质组织样本,称 3 ± 0.05 g 样本于离心管中,加入 6mL 乙酸乙酯,振荡 10min,室温 4000r/min 以上,离心 10min;取出 4mL 上层液体在氮气流 50~60℃水浴中干燥;加入 1 mL 正己烷溶解干燥的残留物,再加 1mL 稀释后的复溶液强烈振荡 1min,室温 4000r/min 以上离心 10min,取 50 μ L 下层相用于分析。

氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光酶联免疫检测技术领域,特别涉及一种氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法。

背景技术

[0002] 氯霉素 (Chloramphenicol, 简称 CAP) 是一种有效的广谱抗生素,1947 年由 Ehrlich J 等人从链丝菌的培养液中提取而得到的抗生素,其化学名称为 D- 苏式 - 对硝基苯基 -1- 二氯乙酰基 -1-3 丙二醇,是白色的针状或片状晶体,味极苦。微溶于水,易溶于甲醇、乙酸乙酯等有机溶剂。在酸性和中性溶液中稳定,遇碱易失效。常用于畜禽养殖中各种传染性疾病的治疗。

[0003] 目前氯霉素被广泛用于家禽、家畜、蜜蜂及水产品中各种传染性疾病的治疗,但氯霉素易在动物体内蓄积,且毒性较大,在畜禽体内蓄积会严重损害其生殖系统。同时,氯霉素可危害人体造血系统,易引发人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症;可引起中毒性精神病、视神经炎、角膜瘫痕、皮疹等,对新生儿、早产儿、老年人以及肝肾功能不全的病人影响更大,对人类健康构成巨大的潜在威胁。

[0004] 由于氯霉素存在严重的毒副作用,许多国家和地区均规定氯霉素最高残留限量为“不得检出”。欧盟各成员国自 1994 年以来已全面废止氯霉素的使用,并将氯霉素列为“不设定最高残留限量”的禁用药物,即氯霉素的最高残留限量为“不得检出”(2377/90/EC)。美国仅允许将氯霉素用于非食用动物。FDA 规定氯霉素的检出限为 0.3 ng/mL。2000 年我国农业部将氯霉素从《中国兽药典》中删除。2002 年 12 月农业部发布 235 号公告《动物性食品兽药最高残留限量》,规定所有动物性食品及所有可食性组织中不得检出氯霉素及其盐,并在出口的日常检测中,将其列为必检项目。

[0005] 目前氯霉素残留已成为扩大动物性食品国际贸易的主要障碍之一,引起了世界上许多国家和国际组织的高度重视,近年来,我国出口水产品、蜂蜜等动物性食品仍多次被进口国检出氯霉素残留超标。因此需建立一种高度灵敏、低检测限的检测方法。

[0006] 氯霉素残留检测方法通常采用微生物法、色谱法和免疫分析法等。微生物法虽然操作简便,检测成本低,在基层大规模筛选工作中有较大的应用价值,但其灵敏度低,检测周期长,易受组织中其它抗生素的影响。采用色谱法进行检测,成本高,耗时长,要达到较高的灵敏度,通常需要加大样品称取量,而氯霉素样品前处理多采用有机试剂萃取,蒸干后复溶的方式,加大样品量意味着萃取剂用量相应提高,从而使前处理操作更为繁琐,消耗时间延长。尽管能达到大部分检测要求,但色谱法无法应对大量样品现场快速检测的需求,因而通常作为确证方法。

[0007] ELISA 方法虽具有简单、快速、灵敏的特点,也适宜大规模的筛查工作,但其灵敏度有一定的制约。因此,建立一种经济、可靠、特异、敏感、快速有效的检测方法有很大的实际意义和应用前景。化学发光免疫分析 (CLIA) 是化学发光和免疫分析结合的产物,将发光物质直接标记到抗原或抗体上,与抗体或抗原发生特异性免疫反应后,通过测定标记物的

化学发光强度确定被测抗体或抗原的含量。具有高通量检测、灵敏度高、检测范围宽、分析速度快、价廉经济等优点,是免疫分析的重要发展方向,并被逐渐引入食品安全领域有毒有害物质的检测。

发明内容

[0008] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

[0009] 本发明的另一目的在于提供上述氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法。

[0010] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

一种氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括包被有氯霉素抗原的化学发光酶标板,氯霉素标准品,氯霉素酶标抗体,化学发光液和洗涤液;所述的氯霉素抗原为氯霉素与卵清蛋白(OVA)的偶联物,氯霉素抗原的包被浓度为 0.25 mg/L;所述的包被液为 0.02 M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

[0011] 优选地,所述的化学发光酶标板优选为 96 孔可拆不透明白色发光板。

[0012] 所述的氯霉素酶标抗体为实验室前期制备;所述的酶标抗体优选为辣根过氧化物酶标记的氯霉素抗体。其原浓度为 1mg/mL,使用时优选为 0.01 mol/L PBST 稀释 6000 倍。

[0013] 优选地,封闭液优选为取 0.1g BSA(牛血清白蛋白)、5g 甘氨酸溶于 100mL PBS (0.01mol/L pH7.4) 溶液得到。

[0014] 优选地,所述的氯霉素标准品浓度为 1mg/mL,使用时用 0.01mol/L PBST(配方为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、NaCl 8.5g、KCl 0.2g、 KH_2PO_4 0.2g、Tween-20 0.5mL,定容至 1L) 将标准品稀释成浓度为 0.0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 $\mu\text{g/L}$ 的一系列氯霉素标准品溶液。

[0015] 优选地,所述化学发光液由 A 液和 B 液组成,A 液优选为将 20mg 对碘苯酚、8mg 鲁米诺、1.21g Tris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 8.4 得到;B 液优选为将体积分数 0.40% H_2O_2 、1.21g Tris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 7.0 得到;临用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 的比例混合。

[0016] 优选地,所述的洗涤液优选为 20 倍浓缩洗涤液,20 倍浓缩洗涤液是含有体积分数 0.5% Tween20 的 pH7.4 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成 1 倍洗涤液。

[0017] 所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒最大检测范围为 0.058 ~ 0.466 ng/mL,灵敏度 0.16 ng/mL,检出限 0.025 ng/mL。

[0018] 上述氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

(1) 将试剂盒置于 15 ~ 35℃ 平衡 30 min 以上。

[0019] (2) 取出化学发光酶标板,往标准孔中加入不同浓度的氯霉素标准品溶液,样品孔中加入待测样品,然后每孔加入氯霉素酶标抗体,盖上盖板膜振摇混匀,孵育。

[0020] (3) 吸除板孔中的反应液,加入洗涤液洗涤,将酶标板拍干。

[0021] (4) 每孔加入化学发光反应液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1 ~ 2min 后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值 RLU。

[0022] (5) 检测结果计算与分析:抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%),式中:B—不同浓度氯霉素标准溶液孔(或样品孔)的发光值; B_0 —0 浓度氯霉素标准溶液发光值;以抑制率为纵坐标,

氯霉素浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中氯霉素的含量。

[0023] 优选地,步骤(2)中所述的待测样品为鸡肉/肝、猪肉/肝、虾、鱼等组织样品。

[0024] 优选地,以上组织在进行检测之前,需经过以下预处理:

用均质器均质组织样本,称 $3\pm 0.05\text{g}$ 样本于离心管中,加入6mL乙酸乙酯,振荡10min,室温4000r/min以上,离心10min;取出4mL上层液体在氮气流50–60℃水浴中干燥;加入1mL正己烷溶解干燥的残留物,再加1mL稀释后的复溶液强烈振荡1min,室温4000r/min以上离心10min。取50 μL 下层相用于分析。

[0025] 优选的,所述的氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包含如下步骤:

(1)将试剂盒置于室温平衡30 min以上,用0.01 mol/L PBST将氯霉素标准品稀释成浓度分别为0.0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素标准品溶液。

[0026] (2)取出化学发光酶标板,在标准孔加入50 μL 不同浓度的氯霉素标准品溶液,样品孔加入50 μL 待测样品,然后每孔加入50 μL 稀释好的氯霉素的酶标抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇10 min后,置于37℃ 孵育30 min。

[0027] (3)吸除板孔中的反应液,各孔加入洗涤液约300 μL ,静置20秒左右,除去其中液体,如此共洗5次,最后一次将板拍干;也可用自动洗板机洗板5次,洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。

[0028] (4)每孔加入100 μL A液与B液等体积混合后的化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU,保存数据。

[0029] (5)检测结果计算与分析:抑制率(%)= $B/B_0\times 100$ (%),式中:B—不同浓度氯霉素标准溶液孔(或样品孔)的发光值; B_0 —0浓度氯霉素标准溶液发光值;以抑制率为纵坐标,氯霉素浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中氯霉素的含量。

[0030] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

(1) 环保经济:与现有的检测氯霉素的ELISA试剂盒相比,不需要再使用具有腐蚀性的硫酸、以及大部分有毒或为致癌物质的底物,更加环保经济。

[0031] (2) 高灵敏度、高特异性:与现有的检测氯霉素的ELISA试剂盒相比,克服了试剂盒检测过程中易受到内源性酶干扰、吸光度的检测也易受到多种外在因素的影响的弊端,本发明采用高特异性、高亲合力的抗体,检测氯霉素的化学发光酶免疫试剂盒灵敏度更高,可达到0.16ng/mL。

[0032] (3) 快速、准确:反应时间短,前处理方法简单快速、符合试剂盒的快速、准确的检测要求。

[0033] 基于以上优点本试剂盒非常适用于氯霉素残留的痕量分析与批量检测,具有重要的现实意义。

[0034] (4) 由于氯霉素结构的特异性,其包被抗原在酶标板中的包被浓度比较大才可以实现对氯霉素的灵敏性检测,但是,包被浓度过高的话,常规的包被液(将1.69g碳酸钠和2.95g碳酸氢钠溶于1L双蒸水中得到。)很难将0.25 mg/L的氯霉素高效率的包被在酶标板上。经过大量创造性的摸索,发明人发现只有包被液为0.02 M pH8.0的Tris-HCl缓冲溶液,才能实现高效率的包被。

附图说明

[0035] 图 1 是氯霉素标准曲线图。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0037] 实施例中所使用试剂如下:

包被液为 0.02 M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液。如果用常规的包被液(将 1.69g 碳酸钠和 2.95g 碳酸氢钠溶于 1L 双蒸水中得到。)包被氯霉素的话,很难将 0.25 mg/L 的氯霉素高效率的包被在酶标板上。

[0038] 20 倍浓缩洗涤液:体积分数 0.5% Tween20 的 pH7.4 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成 1 倍。

[0039] 封闭液:取 0.1g BSA (牛血清白蛋白)、5g 甘氨酸溶于 100mL PBS 溶液(0.01mol/L pH7.4)得到。

[0040] 氯霉素标准溶液:用色谱级甲醇将氯霉素标准品稀释成 1mg/mL 备用;再用 0.01 mol/L PBST 稀释为浓度分别为 0.0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/L 的氯霉素标准品溶液,4℃保存。

[0041] 化学发光液:化学发光液由 A 液和 B 液组成,A 液为将 20mg 对碘苯酚、8mg 鲁米诺、1.21gTris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 8.4 得到;B 液为将体积分数 0.40% H_2O_2 、1.21gTris 溶于 100mL 去离子水,用盐酸调 pH 至 7.0 得到;使用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 的比例混合。

[0042] 氯霉素单克隆抗体(2mg/mL):实验室前期制备。

[0043] 辣根过氧化物酶标记的氯霉素抗体(1mg/mL):实验室前期制备。

[0044] 实施例 1 氯霉素单克隆抗体、氯霉素酶标抗体、包被抗原的制备

(1) 包被抗原的制备

取氯霉素半抗原 80 μ mol 用 1mL DMF 溶解,然后加入等当量的正三丁胺和氯甲酸乙酯,室温下搅拌反应 1h。取反应液 400 μ L 缓慢加入到 6 mL pH 9.0, 0.2mol/L 的碳酸盐缓冲溶液溶解的 20 mg/mL 的 OVA 溶液中,室温下搅拌反应 2 h 后,装入透析袋,先用蒸馏水透析 2 次,然后用 PBS 透析 3 d 后,取出分装,于 -20℃保存。

[0045] (2) 氯霉素单克隆抗体的制备

用常规方法进行细胞融合。融合 7~8d 后,取上清液用 ELISA 法进行筛选, $OD_{450} \geq 1.0$ 的孔判定为阳性孔。并同时观察 100 μ g/L 氯霉素标准品的抑制情况。用有限稀释法对该孔中的杂交瘤细胞进行多次克隆化,直至所有细胞生长孔的上清均为阳性为止。将杂交瘤细胞注入 Balb/c 小鼠腹腔中并收集腹水。采用 Protein-G 亲和层析柱对小鼠腹水进行纯化,并用紫外分光光度法测定抗体浓度。

[0046] (3) 氯霉素酶标抗体的制备:

将 HRP 25mg 溶于含 1.25% 戊二醛的 pH 6.8 的 0.01M PBS 0.5mL 中,室温中避光静置过夜。将反应后的酶溶液置于生理盐水中透析 1d 以除去小分子化合物戊二醛等,并定容至 5mL;将抗体 12.5mg 用生理盐水稀释到 5mL,在搅拌下逐滴加入酶溶液中;加 1M pH 9.5 碳

酸盐缓冲液 0.25mL,继续搅拌 3h,加 0.2M 赖氨酸 0.25mL,混匀,置室温 2h;在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4℃冰箱 1 h;3000 rpm 离心 30min,弃上清,沉淀物用饱和硫酸铵洗涤 2 次,最后溶于 pH7.4 0.02M PBS 中;0.02M pH7.4 PBS 透析,去除 NH_4^+ 离子,1000 rpm 离心 30min 去除沉淀,上清液加入等体积甘油后分装冷藏以用于下一步的分析和测定。

[0047] 实施例 2 化学发光酶免疫方法的建立

(1) 包被抗原与抗体浓度的优选

1) 将包被抗原按 1.25 mg/L、0.625mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L、0.125 mg/L 用包被液 (0.02 M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液) 稀释并纵向包被不透明白色发光板,100 μL /孔,37℃ 24 h,用洗液洗涤 2 次,在吸水纸上拍干。

[0048] 2) 加入配制好的封闭液 150 μL /孔进行封闭,37℃过夜,甩干后放入烘箱烘干。

[0049] 3) 加入 50 μL /孔用 0.01 mol/L PBST 稀释的氯霉素标准品系列溶液

4) 加入 50 μL /孔用 0.01 mol/L PBST 系列稀释的氯霉素酶标抗体 (1:4000、1:5000、1:6000、1:7000、1:8000),37℃ 60min,洗板 5 次,在吸水纸上拍干。

[0050] 5) 加入现配的化学发光反应液,100 μL /孔,用化学发光免疫分析仪测定发光值。以发光值随包被抗原浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释度为最佳浓度进行特异性测定。得到包被抗原最佳浓度为 0.25 mg/L,酶标抗体 (浓度 1 mg/mL) 稀释倍数为 1:6000。

[0051] (2) 抗体灵敏度的测定

以包被抗原浓度为 0.25 mg/L,氯霉素酶标抗体 (浓度 1mg/mL) 稀释倍数为 1:6000,进行抗体灵敏度的测定。

[0052] 1) 取 96 孔不透明白色发光板,将包被抗原用包被液稀释至 0.25 mg/L,每孔内加入 100 μL ,37℃过夜,用洗涤液洗涤 2 次,在吸水纸上拍干。

[0053] 2) 加入封闭液 150 μL /孔进行封闭,37℃过夜,甩干后放入烘箱烘干。

[0054] 3) 加稀释倍数为 1:6000 的氯霉素酶标抗体 50 μL /孔与不同浓度的氯霉素溶液 50 μL /孔于相应孔内,37℃ 40 min,洗板 5 次,在吸水纸上拍干。

[0055] 4) 加入现配的化学发光反应液,100 μL /孔,测定发光值。

[0056] 检测结果以抑制率计算,抑制率 (%) = $B/B_0 \times 100$ (%),B 是不同浓度标准溶液竞争的发光值, B_0 是不加标准品的发光值。计算 50% 抑制率时标准品的浓度即为氯霉素酶标抗体的灵敏度,为 0.16ng/mL。

[0057] 实施例 3 氯霉素化学发光酶联免疫检测试剂盒

(1) 试剂盒的组成

1) 包被有氯霉素抗原的化学发光酶标板:酶标板为 96 孔可拆不透明白色发光板,已包被氯霉素抗原和封闭液;氯霉素抗原为氯霉素与 OVA 的偶联物,包被浓度为 0.25 mg/L。

[0058] 酶标板的制备:取 96 孔可拆不透明白色发光板,包被抗原用包被液稀释至 0.25 mg/L,每孔内加入 100 μL ,37℃过夜,倾去孔内液体,洗涤液洗涤 2 次,在吸水纸上拍干。然后每孔加入封闭液 150 μL ,37℃孵育过夜,倾去孔内液体,置于 37℃烘箱中烘干后用铝箔袋真空密封 4℃保存。

[0059] 2) 氯霉素系列标准品溶液 (浓度 0.0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 $\mu\text{g/L}$)。

[0060] 3) 辣根过氧化物酶标记的氯霉素单克隆抗体 1mg/mL,其工作浓度为 1:6000。

[0061] 4) 化学发光液 : 由 A 液和 B 液组成。

[0062] 5) 20 倍浓缩洗涤液。

[0063] (2) 试剂分装 : 将各试剂测定合格后无菌分装, 已稀释好的氯霉素标准品 1 mL/瓶, 已稀释的辣根过氧化酶标记的氯霉素抗体 7mL/ 瓶, A 液 7mL/ 瓶, B 液 7mL/ 瓶, 20 倍浓缩洗涤液 50mL/ 瓶。分装后贴标签, 注明批号和有效期, 4℃ 保存。

[0064] (3) 试剂盒的组装 : 分别将步骤(1)的包被有氯霉素抗原的化学发光酶标板 1 块和氯霉素标准品、辣根过氧化酶标记的氯霉素抗体、A 液、B 液、20 倍浓缩洗涤液各 1 瓶及使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置, 试剂盒检验合格后封装, 4℃ 保存。

[0065] 实施例 4 氯霉素化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法

(1) 样品前处理

用均质器均质组织样本, 称 3 ± 0.05 g 样本于离心管中, 加入 6mL 乙酸乙酯, 振荡 10min, 室温 4000r/min 以上, 离心 10min; 取出 4mL 上层液体在氮气流 50-60℃ 水浴中干燥; 加入 1 mL 正己烷溶解干燥的残留物, 再加 1mL 稀释后的复溶液强烈振荡 1min, 室温 4000r/min 以上离心 10min。取 50 μ L 下层相用于分析。

[0066] (2) 试剂盒的检测方法

1) 取出试剂盒, 置于室温 (20 ~ 24℃) 平衡 30 min 以上, 取出化学发光酶标板, 用 0.01 mol/L PBST 将氯霉素标准品稀释成一系列不同浓度的氯霉素标准品溶液 (0.0、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/L)。

[0067] 2) 在标准孔加入 50 μ L 不同浓度的氯霉素标准品溶液, 样品孔加入 50 μ L 待测样品, 然后每孔加入 50 μ L 用 0.01 mol/L PBST 稀释好的氯霉素酶标抗体, 盖上盖板膜在微量振荡器上振摇 10 min 后, 置于 37℃ 孵育 30 min。

[0068] 3) 吸除板孔中的反应液, 各孔加入洗涤液约 300 μ L, 静置 20 秒左右, 除去其中液体, 如此共洗 5 次, 最后一次将板拍干; 也可用自动洗板机洗板 5 次。洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打 (每轮洗板拍打 3 次) 以保证完全除去孔中的液体。

[0069] 4) 每孔加入 100 μ L 底物缓冲液与底物液等体积混合后的化学发光反应液, 轻拍混匀, 盖上盖板膜, 1 ~ 2min 后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值 RLU, 保存数据。

[0070] (3) 检测结果计算与分析

$$\text{抑制率}(\%) = B/B_0 \times 100(\%)$$

式中 : B—不同浓度标准溶液孔 (或样品孔) 的发光值 ; B_0 —0 浓度标准溶液发光值。

[0071] 以抑制率为纵坐标, 氯霉素标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线, 从而确定样品中氯霉素的含量。

[0072] 实施例 5 试剂盒精密度与准确度试验

(1) 氯霉素标准品溶液的重复性试验

从 3 批按照实施例 3 中的方法制备的酶标板中, 各抽出 20 个微孔, 按照实施例 4 中试剂盒的检测方法测定 0.1 μ g/L 氯霉素标准溶液的发光值, 重复 20 次, 计算变异系数 CV%, 结果见表 1。

[0073] 表 1 氯霉素标准溶液重复性试验

样品	浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准溶液	0.1	8.1	6.5	7.3	7.8

(2) 样本重复性与准确度试验

准确度是指测得值与真值的符合程度,在酶联免疫测定中,准确度常以回收率表示,精密密度常以变异系数来表示。在空白样品中,添加氯霉素至终浓度为 0.05、0.5、1.5 $\mu\text{g/L}$,每个浓度各 10 个平行,测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{检出量} - \text{空白值}}{\text{添加量}} \times 100\%$$

[0074]

$$\text{CV}(\%) = \frac{SD}{X} \times 100$$

表 2 样本重复性与准确度试验结果

样品	添加 浓度	第 1 批			第 2 批			第 3 批			批间
		含量	回收 率%	CV%	含量	回收 率%	CV%	含量	回收 率%	CV%	
鸡肉	0.05	0.043	86	5.5	0.053	106	7.2	0.049	98	4.3	10.5
	0.5	0.520	104	3.7	0.455	91	6.5	0.530	106	6.5	7.4
	1.5	1.420	94.7	4.8	1.530	102	4.7	1.480	98.7	4.8	9.1
肝脏	0.05	0.048	96	6.2	0.043	86	8.2	0.044	88	5.9	7.9
	0.5	0.505	101	3.8	0.479	95.8	5.3	0.476	95.2	6.7	9.8
	1.5	1.150	76.7	5.7	1.346	89.7	4.9	1.415	94.3	4.4	6.8

结果表明鸡肉、肝脏样本的添加回收率在 76.7 ~ 106% 之间,批内变异系数在 3.7 ~ 8.2% 之间,批间变异系数在 6.8 ~ 10.5% 之间,符合国家对于试剂盒各项指标的标准。

[0075] 实施例 6 保存期试验

(1) 将实施例 3 的试剂盒放置于 2 ~ 8℃,分别取放置 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒,对氯霉素标准样品(0.1 $\mu\text{g/L}$)的发光值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0076] (2) 将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 12 天,每天对氯霉素标准样品 0.1 $\mu\text{g/L}$ 的发光值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0077] (3) 将试剂盒在 -20℃ 冰箱保存 12 天,每天对氯霉素标准样品(0.1 $\mu\text{g/L}$)的发光值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0078] 结果表明,经过三种条件保存试验,该试剂盒各项指标完全符合要求,因此,从以上结果可得出试剂盒可以在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 12 个月。

[0079] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

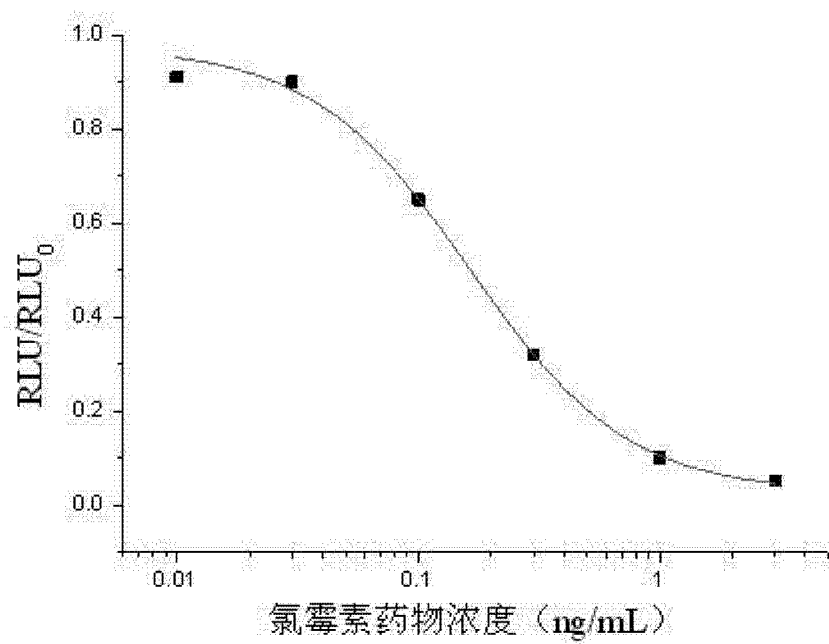


图 1

专利名称(译)	氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN104165990A	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	CN201410356798.3	申请日	2014-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	广州万联生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万联生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万联生物科技有限公司		
[标]发明人	曾道平 路俊山 卢秋鸿 陈莲英		
发明人	曾道平 路俊山 卢秋鸿 陈莲英		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N1/28		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/9446		
代理人(译)	陈卫		
其他公开文献	CN104165990B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氯霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒及使用方法，属于化学发光酶联免疫检测技术领域。该检测试剂盒采用直接竞争法，试剂盒包括包被有氯霉素抗原的化学发光酶标板，氯霉素标准品，氯霉素酶标抗体，化学发光液和洗涤液。该试剂盒的使用方法包括如下步骤：（1）待测样品的前处理；（2）顺序加入氯霉素标准品溶液或样品、加入氯霉素酶标抗体，最后加入化学发光液通过化学发光免疫分析仪进行氯霉素的定量检测；（3）结果处理与分析。本发明提供的检测试剂盒灵敏度高、稳定性好，适合大量样品的筛查，具有重要的实际应用推广意义。

