



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572335 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410531004.2

(22) 申请日 2014.10.10

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 张淑雅

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒,包括包被的大豆凝集素与载体蛋白的偶联物,所述大豆凝集素的特异性抗体和酶标二抗。本发明的检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒,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;最低检测限达 10ng/mL 以下,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在动物性食品大豆凝集素残留检测中发挥重要作用。

1. 一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒,其特征在于:由多孔包被板,缓冲液,大豆凝集素标准品,大豆凝集素的抗体冻干品,酶标记的羊抗鼠抗体,洗涤液所组成。

2. 一种根据权利要求1所述检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒的检测方法,包括,免疫原、包被原和单克隆抗体的制备及样本前处理,其特征在于:

(1) 将大豆凝集素与牛血清白蛋白偶联,得到免疫原;

(2) 选择兔红细胞膜包被酶标板作为功能 ELISA 捕获大豆凝集素的载体,得到包被原;

(3) 用步骤(1)的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗 SBA 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(4) 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用 Protein G 柱进行纯化,获得抗 SBA 的单克隆抗体 IgG;

(5) 用步骤(2)的包被原包被固相载体;

(6) 取适量待测大豆样品,用超细粉碎机粉碎,取 1g 待测样品加 10 ml 生理盐水,室温磁力搅拌浸提 2 h,9 000 rpm 离心 15 min,取上清备用,得到待测物;

(7) 将步骤(6)的待测物进行酶联免疫,对照标准曲线计算样品中的大豆凝集素的含量。

3. 根据权利要求1所述检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的固相载体是多孔包被板,采用 48 或者 96 孔的多微孔包被板作为固相载体。

4. 根据权利要求1所述检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于:取包被有 SBA 的的微孔包被板,加入 50 μ l 的 SBA 或处理好的样品到各自的微孔中,加 50 μ l 以缓冲液稀释的 SBA 抗体,25℃反应 0.5 小时,用洗涤液洗 3 次,加以缓冲液稀释的 100 μ l 羊抗鼠抗体,25℃反应 0.5 小时,用洗涤液洗 3 次,加底物 A、B 各 50 μ l,25℃反应 15min 后终止,测量其吸光度值,从标准曲线计算样品中的 SBA 的含量。

一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫和兽药残留监测分析技术领域中的一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 大豆凝集素(Soybean Agglutinin SBA)作为一种抗营养因子主要存在于饲料、食品等豆类制品中,由于其能凝集红细胞,影响营养物质的消化吸收、抑制动物生长,导致过敏反应等,在动物和人体内引发一系列抗营养作用,严重影响动物生长及人类健康,因此准确检测饲料、食品中大豆凝集素的含量具有重要意义。虽然检测大豆凝集素的方法很多,但是都存在着一定的缺陷,不能对具有生物学性的大豆凝集素完全定量,而试剂盒价格昂贵,且只能检测具有免疫学活性的大豆凝集素。本研究通过制备抗 SBA 单克隆抗体,根据其能凝集红细胞的特性。建立了快速、准确、稳定的检测大豆凝集素含量的功能性 ELISA 法。

[0003] 目前国内外关于大豆凝集素的检测方法很多,根据大豆凝集素的凝集活性和免疫活性分为红细胞凝集反应法和免疫测定法。但是红细胞凝集反应法只能检测出具有凝集活性的大豆凝集素,对大豆凝集素进行定性及半定量测定。而免疫测定法所使用的抗体大多是自制的多克隆抗体,其特异性较差。一些大豆凝集素 ELISA 检测试剂盒采用双抗体夹心法只能进行半定量,且价格昂贵。故此,本发明采用了高特异性的抗大豆凝集素的单克隆抗体,并建立了检测大豆凝集素含量的功能 ELISA 方法。

发明创造内容

[0004] 本发明的目的是提供一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒,包括包被的大豆凝集素与载体蛋白的偶联物,所述大豆凝集素的特异性抗体和酶标二抗。

[0006] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括 A , B , C , D , E , F 试剂液、G 试剂液、H 试剂液、I 试剂液、J 试剂液、K 试剂液、L 试剂液和 M 试剂液。

[0007] 所述 A , B , C , D , E , F 试剂液为大豆凝集素系列浓度标准溶液。

[0008] 所述 G 试剂液为蛋白浓度为 0.1—10mg/L 的酶标二抗。

[0009] 所述 H 试剂液为蛋白浓度为 0.1—10mg/L 的大豆凝集素单克隆抗体。

[0010] 所述 I 试剂液为四甲基联苯胺。

[0011] 所述 J 试剂液为含 0.1—10%BSA 的磷酸盐缓冲液。

[0012] 所述 K 试剂液为含 0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液。

[0013] 所述 L 试剂液为柠檬酸缓冲液。

[0014] 所述 M 试剂液为终止液。

[0015] 所述大豆凝集素的特异性抗体为大豆凝集素单克隆抗体 ;所述大豆凝集素单克隆抗体为鼠源抗体,所述多西环素单克隆抗体优选为大豆凝集素鼠克隆抗体。

[0016] 以上抗体均可用大豆凝集素与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。

[0017] 所述载体蛋白为所述载体蛋白可谓牛血清蛋白(BSA)等常用载体蛋白;所述大豆凝集素与载体蛋白的偶联物可采用甲醛法、联氨法、重氮化法或 EDS 法合成。

[0018] 所述标记酶可谓辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,优选为辣根过氧化物酶;所述二抗可为抗鼠抗体。

[0019] 可作为固定大豆凝集素与载体蛋白的偶联物的载体的物质很多,如聚苯乙烯等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

[0020] 在优选的条件下,本发明的检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒,包括包被的与大豆凝集素载体蛋白的偶联物,大豆凝集素的特异性抗体和酶标二抗。

[0021] 本发明的检测原理为将大豆凝集素与载体蛋白的偶联物做包被原吸附于固相载体上,加入样品和特异性抗体,再加入酶标二抗,待测样品中残留的大豆凝集素和固相载体上包被的大豆凝集素与载体蛋白的偶联物竞争结合特异性抗体,显色后终止,测定样品吸光值,该值与样品中大豆凝集素残留物含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出大豆凝集素的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅,与系列浓度的大豆凝集素标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

[0022] 本发明主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测大豆等样品中大豆凝集素的残留量;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;最低检测限达 10ng/mL 以下,可直接判断样品是否超标,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在植物性食品大豆凝集素残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0023] 图 1 为试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0024] 实施例 1、抗原及抗体的制备

(1) 包被抗原的合成

选择兔红细胞膜包被酶标板作为功能 ELISA 捕获大豆凝集素的载体,得到包被原。

[0025] (2) 免疫(抗)原的合成

取冻干后的大豆凝集素,用灭菌的生理盐水稀释到适当的浓度,加入等体积的弗氏完全佐剂 FCA 或者弗氏不完全佐剂 FICA,然后用注射器双推法混匀佐剂与免疫抗原,使其充分混匀成油包水乳状物,混匀后可用平皿取少量清水,将乳化液滴入清水中,如果乳化液形成油滴,且不立即扩散溶解,即为乳化良好,可以用于免疫老鼠。

[0026] (3) 抗大豆凝集素单克隆抗体的制备

动物免疫程序采用 BALB / C 小鼠作为免疫动物,以多西环素与牛血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 50g(0.1mL) 免疫原加等体积完全福氏佐剂乳化,进行首次皮下注射免疫。一月后,取同样量免疫抗原加等量不完全福氏佐剂乳化,进行加强免疫,再过一月后,取同样量免疫抗原不加佐剂腹腔注射进行加强免疫,之后 5 天采血,测定抗体效价,取脾细胞。

[0027] 细胞融合与克隆化 取免疫 BALB、C 小鼠脾细胞,按 4:1 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。利用有限稀释或软琼脂平板法对阳性孔进行克隆化,得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

[0028] 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 $10^6 - 5 \times 10^6$ 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℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0029] 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 $5 \times 10^5 - 10^6$ 个 / 只,7-10 天后采集腹水。经辛酸—硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,小瓶分装, -20℃ 保存。

[0030] 二抗的制备

以羊作为免疫动物,以鼠或兔 IgG 为免疫原进行免疫,得到羊抗鼠或羊抗兔抗体。

[0031] 用高碘酸钠法多戊二醛法合成辣根过氧化物酶—羊抗兔 IgG 或辣根过氧化物酶—羊抗鼠 IgG 标记物。

[0032] 实施例 2、检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒

(1) 检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒的结构

该试剂盒主要由盒体、铝膜真空包装 96/40 孔酶标板、A , B , C , D , E, F 试剂液(大豆凝集素系列浓度标准溶液)、G 试剂液(酶结合二抗)、H 试剂液(大豆凝集素抗体)、J 试剂液(含 BSA 磷酸盐缓冲液);K 试剂液(含吐温—20 磷酸盐缓冲液);I 试剂液(四甲基联苯胺);L 试剂液(柠檬酸缓冲液);M 试剂液(终止液);F、G、H、I 试剂瓶。托架,酶标板, J 试剂瓶, K 试剂瓶, L 试剂瓶, M 试剂瓶和盖板膜均安装在盒体内。酶标板由塑料支架和各自分开的带孔的塑料条组成。

[0033] (2) 所用试剂的配制

A , B , C , D , E, F 试剂液 :大豆凝集素系列浓度标准溶液,其浓度分别为 0、3、10、30、100、300 μ g/L。

[0034] G 试剂液 :蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的辣根过氧化物酶—羊抗兔标记或辣根过氧化物酶—羊抗鼠 IgG 标记物。

[0035] H 试剂液 :蛋白浓度为 0.1-10mg/L 的大豆凝集素单克隆抗体。

[0036] I 试剂液 :1-10mg/mL 四甲基联苯胺溶液。

[0037] J 试剂液 :含 0.1-10% BSA 的磷酸盐缓冲液 (0.01M pH7.2)。

[0038] K 试剂液 :含 0.5% 吐温的磷酸盐缓冲液 (0.5M pH7.2)。

[0039] L 试剂液 :0.1M pH5.0 柠檬酸缓冲液。

[0040] M 试剂液 :1—2mol/L 硫酸或盐酸。

[0041] (3) 酶标板的制备

将自制的红细胞外壳用 pH9.8 的磷酸盐缓冲液稀释至一定浓度,每孔 100 μ L 包被于 96 孔酶标反应板,置于 37℃ 温箱中,过夜。

[0042] 洗板 :甩去孔中液体,用 PBST 洗板 3 次,每次 5 min,拍干。

[0043] 封闭 :每孔加 200 μ L 1%牛血清白蛋白,37℃,封闭 3 h,洗板 3 次,每次 5 min。

[0044] 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0045] 实施例 3、样品的前处理及检测

取适量待测大豆样品,用超细粉碎机粉碎,取 1 g 待测样品加 10 ml 生理盐水,室温磁力搅拌浸提 2 h,9 000 rpm 离心 15 min,取上清备用。

[0046] 3、检测

检测前将试剂盒恢复室温(18℃—30℃),再用 A, B, C, D, E, F 试剂液与 J 试剂液配制大豆凝集素标准溶液 0、2.5、5、10、20、40 试剂液加水配制成洗液(0.05% 吐温的磷酸盐缓冲液),用 H 试剂液与洗液配制抗体溶液(0.1mg/L),取包被有 SBA 的的微孔包被板,加入 50 uL 的 SBA 或处理好的样品到各自的微孔中,加 50 uL 以缓冲液稀释的 SBA 抗体,25℃ 反应 0.5 小时,用洗涤液洗 3 次,加以缓冲液稀释的 100 uL 羊抗鼠抗体,25℃ 反应 0.5 小时,用洗涤液洗六 3 次,加底物 A、B 各 50uL,25℃ 反应 15min 后每孔加入 M 终止液(1mol/L1 硫酸)100 μl,用酶标仪测定 450nm 处 A_{450} 值。按下式计算百分吸光度值:

(B—准溶液或样品的平均吸光度值; B_0 —为 0 浓度的标准溶液平均吸光度值)

百分吸光度值 = $B/B_0 \times 100\%$

以标准溶液中大豆凝集素浓度的对数为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线,从标准曲线上计算出试样溶液中大豆凝集素的浓度。

[0047] 实施例 5、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度

该试剂盒的抗原为大豆凝集素与 BSA 的偶联物,大豆凝集素的特异性抗体为大豆凝集素单克隆抗体,酶标二抗为辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG 标记物,其中标准溶液为大豆凝集素标准溶液。

[0048] 1. 试剂盒灵敏度试验

按常规方法进行了试剂盒灵敏度试验,结果表明该试剂盒的标准曲线为 $Y=0.2058x+0.172$, $R^2=0.9958$, 其中 IC_{50} 为 10.65 μg/L, LOD 为 1.79 μg/L,检测范围为 10^1-10^4 ng/mL。

[0049] 2. 准确度测定

对混合了不同浓度 SBA 标准品的样品进行回收试验,结果见表 1,回收率为 92%—96%,回收率变异系数为 3.81%,表明该方法有良好的准确性。

[0050] 表 1

样品中 SBA 含量(mg/g)							批间变异系数
1	3.933	4.399	4.302	4.704	4.811	4.549	6.59
2	4.448	4.549	3.933	4.704	4.113	4.302	6.00
3	4.350	5.088	4.498	4.652	4.448	4.920	5.68
4	5.627	4.920	5.564	5.088	5.690	5.564	5.43
5	4.920	4.652	4.652	4.757	4.399	4.975	5.24
6	4.206	4.254	4.652	3.933	4.350	3.761	6.84

3. 精密度测定

将 SBA 标准品配置系列浓度,用间接竞争 ELISA 方法进行抑制实验测定,以批内变异系数和批间变异系数来评价方法的精密度。对同一样品每天测 6 个结果,连续测定 6 天,结果见表 2,测得同一样本同一天测得的批内变异系数在 5.24%—6.84%之间,连续 6 天测得的 SBA 含量平均为 4.630mg/g,批间变异系数为 8.47%,表明该方法具有良好的精密度。

[0051] 表 2 SBA 样品的回收实验

试样测定量 ng	加标量 ng	加标试样测定量 ng	回收率
459	200	643	92%
459	400	841	96%
459	800	1217	95

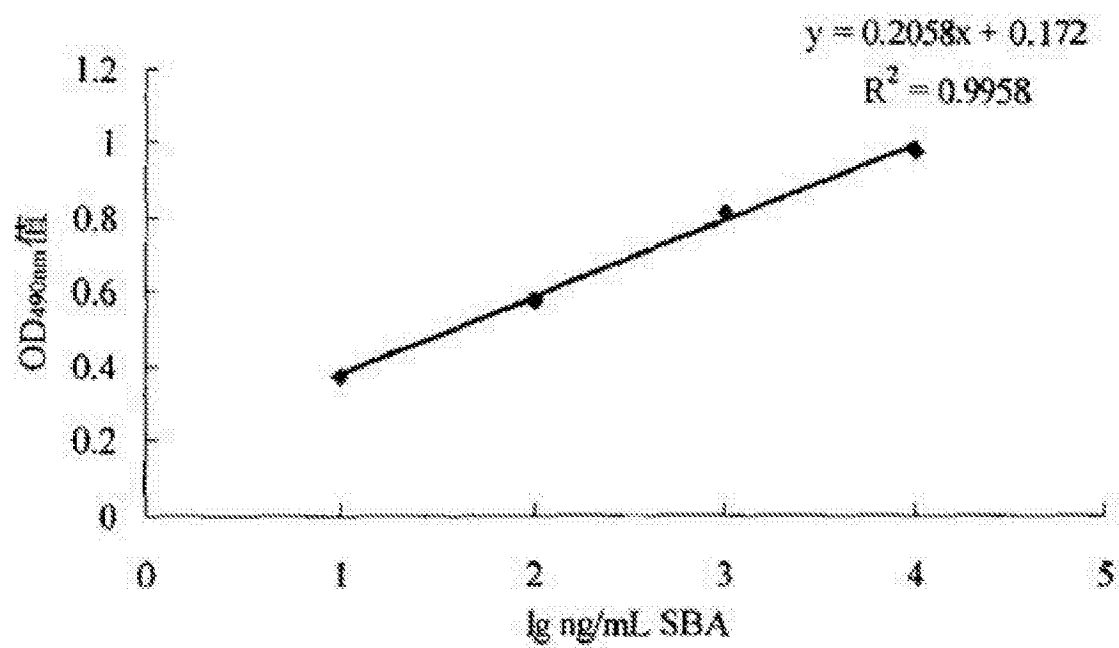


图 1

专利名称(译)	一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN105572335A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410531004.2	申请日	2014-10-10
[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 张淑雅		
发明人	洪霞 张淑雅		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒，包括包被的大豆凝集素与载体蛋白的偶联物，所述大豆凝集素的特异性抗体和酶标二抗。本发明的检测大豆凝集素的酶联免疫试剂盒为多残留检测试剂盒，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；最低检测限达10ng/mL以下，可直接判断样品是否超标，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在动物性食品大豆凝集素残留检测中发挥重要作用。

