



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105319351 A

(43) 申请公布日 2016.02.10

(21) 申请号 201410355296.9

(22) 申请日 2014.07.24

(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 杜道林 邢海龙 洪霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒

(57) 摘要

本发明为金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量、操作简单、且对样品纯度要求不高,特异性强,特别适用于大批量样品的检测,为此本发明还提供了专用测试盒的制备及检测方法。其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显色液 B 和终止液,其特征在于:包被有金刚烷胺固相抗原的包被板、金刚烷胺标准品、金刚烷胺抗体冻干品。检测时,取包被板,加入 50 μ L 抗金刚烷胺抗体,25 $^{\circ}$ C 左右孵育 0.5h,洗涤液洗 3~5 次,加 100 μ L 辣根过氧化物酶(HRP)一羊抗鼠抗体,25 $^{\circ}$ C 左右孵育 0.5h,用洗涤液洗 3~5 次,加 50 μ L 显色液 A 和 50 μ L 显色液 B,避光静置 10 分钟~20 分钟后加终止液 50 μ L,在 450nm 处测吸光度值,根据标准曲线计算样品中金刚烷胺的含量。

1. 金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒,其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显色液 B 和终止液,其特征在于:包被有金刚烷胺固相抗原的包被板、金刚烷胺标准品、金刚烷胺抗体冻干品以及酶标记的羊抗鼠抗体冻干品。

2. 金刚烷胺的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其包括以下步骤,包被板的制备、金刚烷胺标准品的制备、金刚烷胺—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备,抗金刚烷胺抗体及其溶液的制备,完全福氏佐剂的制备,不完全福氏佐剂的制备、酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备;显色液 A 的制备;显色液 B 的制备;终止液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述包被板包被金刚烷胺固相抗原,其采用 96 或 48 或 24 孔微孔板,用 pH9~10 Na_2CO_3 NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将金刚烷胺—卵清蛋白(OVA)稀释至 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,96 或 48 或 24 孔微孔板各加 100 μL ,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜或放 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中孵育 2 h,弃去包被液,洗涤 2~3 次,加入含 1%~5%牛血清蛋白(溶于 pH 7~8 的磷酸盐缓冲液),2~8 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中放置 1.5 h,弃去封闭液,吹干,板条密封后置 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. 根据权利要求 2 所述金刚烷胺的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述金刚烷胺标准品用 10% 甲醇溶液稀释,浓度为:1 ng/mL~81ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:金刚烷胺—牛血清白蛋白(BSA)偶联物的制备:将金刚烷胺溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 120 分钟~180 分钟;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5mL 甲醇中,超声波处理 30 分钟后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 30 分钟,取上清液;将沉淀物用甲醇溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡 60 min,离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于 0.01 M—0.2 M NaH CO_3 溶液中),在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 2h~3h,然后,在 0.01 M—0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH7~8)中透析,换透析液 3~8 次;冷冻干燥,偶联物 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6. 根据权利要求 2 所述金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:金刚烷胺—卵清蛋白(OVA)偶联物的制备:将金刚烷胺溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 120 分钟~180 分钟;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 甲醇中,超声波处理 30 分钟后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 30 分钟,取上清液;将沉淀物用甲醇溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC)溶于 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,室温震荡 60 min,离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于 0.01 M—0.2 M NaH CO_3 溶液中),在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 2 h~3 h,然后,在 0.01 M—0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液)(pH7~8)中透析,换透析液 3~8 次;冷冻干燥,偶联物 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7. 根据权利要求 2 所述的金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:金刚烷胺抗体及其溶液的制备:取金刚烷胺—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注

射,免疫剂量为 $50 \sim 100 \mu\text{g}$ /只小鼠,以后每隔 2 周到 4 周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量为 $50 \sim 100 \mu\text{g}$ /只,最后一次免疫采用脾内注射,4 天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10 : 1 比列混合,离心,去除上清,在 $50 \text{ s} \sim 90 \text{ s}$ 内将 $0.1 \text{ mL} \sim 10 \text{ mL}$ 50% 聚乙二醇(分子量为 1500) 加至细胞中,充分混匀,使其溶解,1~3 min 后加入 $10 \text{ mL} \sim 50 \text{ mL}$ DMEM 培养液,终止融合,水浴静置 $10 \text{ min} \sim 30 \text{ min}$ 后离心,去除上清;将融合细胞用含 5%~30% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 饲养细胞 / 0.1 mL 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5%~10% CO_2 , $35^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 条件下培养,5 天—10 天后,每培养孔更换 2/3 HT 培养液,10 天~20 天后,开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争 ELISA 法进行,以金刚烷胺—卵清蛋白为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照,以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为 70 个 / mL ,再取 1 mL 稀释至 20 倍,接种于 96 孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对 10 周龄~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 $0.3 \text{ mL}/\text{只} \sim 0.5 \text{ mL}/\text{只}$;8 天~10 天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞 / 只,5 天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于 $2\text{--}8^\circ\text{C}$ 保存;上述反应成分的比列为:金刚烷胺—卵清蛋白:生理盐水 = $(10 \sim 1000) \mu\text{g} : (0.1 \sim 10) \text{ mL}$ 。

8. 根据权利要求 2 所述的金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂:卡介苗 = $(6 \sim 24) \text{ g} : (10 \sim 40) \text{ mL} : (0.05 \sim 0.5) \text{ g}$;所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂 = $(6 \sim 24) \text{ g} : (10 \sim 40) \text{ mL}$ 。

9. 根据权利要求 2 所述的金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:所述的酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根或氧化物酶—羊抗鼠抗体冻干品;所述浓缩洗涤液为含有吐温和 NaN_3 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 0.8 mol/L pH7.2~7.5 的磷酸盐缓冲液;所述显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液;所述显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为硫酸溶液。

10. 金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的检测方法,其特征在于:1) 将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液:所述待测样品为组织;取待测样品 2g,加入 8mL 甲醇—1% 三氯乙酸溶液中,充分振荡混匀;室温 $4000\text{g}/\text{min}$ 离心 10min;取 1mL 上清液于 50 度氮气流下吹干;加入 1mL 磷酸盐缓冲液充分溶解干燥的残留物后待测;2) 用所述试剂盒对所述样本进行检测:取包被有金刚烷胺—卵清蛋白的微孔包被板,加入 $50 \mu\text{L}$ 金刚烷胺标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加入 $50 \mu\text{L}$ 抗金刚烷胺抗体, 25°C 左右孵育 0.5 h,洗涤液洗 3~5 次,加 $100 \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶(HRP)—羊抗鼠抗体, 25°C 左右孵育 0.5,用洗涤液洗 3~5 次,加 $50 \mu\text{L}$ 显色液 A 和 $50 \mu\text{L}$ 显色液 B,避光静置 10~20 分钟后加终止液 $50 \mu\text{L}$,在 450 nm 处测其吸光度值,根据标准曲线计算样品中金刚烷胺的含量。

金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物及食品安全检测领域,具体为金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒及制备及检测方法。

背景技术

[0002] 金刚烷胺是最早用于抑制流感病毒的抗病毒药,美国于亚洲感冒流行的 1966 年批准其作为预防药。并于 1976 年在预防药的基础上确认其为治疗药。该药对成年患者的疗效及安全性已得到广泛认同。但治疗剂量与产生副作用的剂量很接近,对高龄者及有慢性心肺疾病或肾脏疾病者的剂量和给药计划很难确定,因此尚未在临床上推广应用。在日本,金刚烷胺一直作为帕金森病的治疗药,直到 1998 年才被批准用于流感病毒 A 型感染性疾病的治疗。

[0003] 金刚烷胺可用于亚洲甲 - II 型流感的预防和早期治疗,与抗菌素合用可治败血症和病毒性肺炎,并有退烧作用。也有抗震颤麻痹的作用。适用于原发性帕金森病、脑炎后的帕金森综合征、药物诱发的锥体外系反应、一氧化碳中毒后帕金森综合征及老年人合并有脑动脉硬化的帕金森综合征。

[0004] 根据其药理作用,国内现在主要将金刚烷胺用于鸡、猪流感的预防和早期治疗,及猪传染性胃肠炎的防治。为避免影响国家动物疫病强制性免疫政策落实,给重大动物疫病防控工作带来不良后果,农业部发布《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》,规定除经批准生产、使用的疫苗产品外,禁止使用金刚烷胺防治高致病性禽流感等一类病原微生物引起的病毒性疫病。

[0005] 2005 年农业部《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》,已将金刚烷胺、金刚乙胺等列入《兽药地方标准废止目录》,明确要求立即停止生产、经营和使用,违者按生产、经营假兽药和使用禁用兽药处理。

[0006] 2005 年中国政府《农业部公告(第 560 号)》也明确指出,“金刚烷胺类等人用抗病毒药移植兽用,缺乏科学规范、安全有效实验数据,用于动物病毒性疫病不但给动物疫病控制带来不良后果,而且影响国家动物疫病防控政策的实施。”

2012 年 11 月底被爆出养殖的一只鸡从孵出到端上餐桌,只需要 45 天,是用饲料和药物喂养的。其中一些不法商贩采用金刚烷胺人用药物,用于抑制禽类的禽流感等病症。其原因是价格低廉,但如果用量不当会导致其在禽类体内残留或禽流感病毒变异,人体食用后会对人体造成伤害。

[0007] 我国对于动物源性食品中金刚烷胺残留含量的相关研究报道属于空白,也未曾制定或立项过国家标准、行业标准,国际上也无特定限量要求及相应检测方法。研究食品中金刚烷胺残留含量的检测技术,对于指导进出口食品中金刚烷胺含量控制,有效应对日本肯定列表制度,及时消除潜在的出口贸易障碍,促进相关行业拓展国际市场,具有紧迫的现实意义。

发明内容

[0008] 针对上述问题,本发明提供了金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒,其检测快速、灵敏、准确、可定量、操作简便、无需贵重仪器设备,且对样品纯度要求不高,特异性强,简化了样品预处理和纯化过程,特别适用于大批量样品的检测,为此本发明还提供了专用测试盒的制备及检测方法。

[0009] 金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒,其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液 A、显色液 B 和终止液,其特征在于:其还包括包被有金刚烷胺固相抗原的包被板、金刚烷胺标准品、金刚烷胺抗体冻干品。

[0010] 金刚烷胺的酶联免疫吸附检测专用测试盒的制备,其特征在于:其包括以下步骤,包被板的制备、金刚烷胺标准品的制备、金刚烷胺—卵清蛋白(OVA) 偶联物的制备,抗金刚烷胺抗体及其溶液的制备,完全福氏佐剂的制备,不完全福氏佐剂的制备、酶标记的羊抗鼠抗体冻干品的制备;显色液 A 的制备;显色液 B 的制备;终止液的制备。

[0011] 其进一步特征在于:所述包被板包被金刚烷胺固相抗原,其采用 96 或 48 或 24 孔微孔板,用 pH9~10 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液作为包被液,将金刚烷胺—卵清蛋白(OVA) 稀释至 $0.1 \mu\text{g/mL}$ ~ $1.0 \mu\text{g/mL}$,96 或 48 或 24 孔微孔板各加 $100 \mu\text{L}$, $2\sim 8^\circ\text{C}$ 放置过夜或放 37°C 烘箱中孵育 2 h, 弃去包被液,洗涤 2~3 次,加入含 1%~5% 牛血清蛋白(溶于 pH 7~8 的磷酸盐缓冲液), $2\sim 8^\circ\text{C}$ 封闭过夜或 37°C 烘箱中放置 1.5 h, 弃去封闭液,吹干,板条密封后置 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存。

[0012] 所述金刚烷胺标准品用 10% 甲醇溶液稀释,浓度为: 1 ng/mL ~ 81 ng/mL 。

[0013] 金刚烷胺—牛血清白蛋白(BSA) 偶联物的制备:将金刚烷胺溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 120 分钟~180 分钟;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5mL 甲醇中,超声波处理 30 分钟后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 30 分钟,取上清液;将沉淀物用甲醇溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 中,室温震荡 60 min, 离心;将上清液缓慢滴加到牛血清白蛋白(溶于 0.01 M — 0.2 M NaHCO_3 溶液中),在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 震荡 2h~3h, 然后,在 0.01 M — 0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液) (pH7~8) 中透析,换透析液 3~8 次;冷冻干燥,偶联物 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存。

[0014] 金刚烷胺—卵清蛋白(OVA) 偶联物的制备:将金刚烷胺溶解在吡啶中,在反应瓶中加入 1—丁基硼酸;混合物在室温下搅拌过夜;再在其中加入琥珀酸酐,并通入氮气;密封反应瓶,混合物在沸水浴中搅拌 120 分钟~180 分钟;将吡啶在室温吹干后,加入少量的水,然后将残余物溶解于 5 mL 甲醇中,超声波处理 30 分钟后,6000 rpm—15000 rpm 下离心 30 分钟,取上清液;将沉淀物用甲醇溶解,重复上述操作,合并上清液,将上清液减压浓缩后备用;取浓缩物与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳化二亚胺(DCC) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 中,室温震荡 60 min, 离心;将上清液缓慢滴加到卵清蛋白(溶于 0.01 M — 0.2 M NaHCO_3 溶液中),在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 震荡 2 h~3 h, 然后,在 0.01 M — 0.2 M 磷酸盐缓冲液(PBS 溶液) (pH7~8) 中透析,换透析液 3~8 次;冷冻干燥,偶联物 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存。

[0015] 抗金刚烷胺抗体及其溶液的制备:取金刚烷胺—牛血清白蛋白偶联物用生理盐水配成 $0.1 \mu\text{g/mL}$ ~ $10 \mu\text{g/mL}$ 抗原溶液与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫

用,加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂,首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为 50 ~100 μg /只小鼠,以后每隔 2 周到 4 周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量为 50 ~100 μg /只,最后一次免疫采用脾内注射,4 天后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10:1 比列混合,离心,去除上清,在 50 s~90 s 内将 0.1 mL~10 mL 50% 聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中,充分混匀,使其溶解,1~3 min 后加入 10 mL~50 mL DMEM 培养液,终止融合,水浴静置 10 min~30 min 后离心,去除上清;将融合细胞用含 5%~30% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 饲养细胞 /0.1 mL 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5%~10% CO_2 , 35°C—45°C 条件下培养,5 天—10 天后,每培养孔更换 2/3 HT 培养液,10 天~20 天后,开始对对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆,杂交瘤筛选采用固相抗原间接竞争 ELISA 法进行,以金刚烷胺—卵清蛋白为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照。以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照;阳性细胞孔的判断标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆;采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为 70 个 /mL,再取 1 mL 稀释至 20 倍,接种于 96 孔培养板中进行亚克隆,直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止;对 10 周龄~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3 mL/只~0.5 mL/只。8 天~10 天后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞 /只,5 天后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,加甘油于 2-8°C 保存;上述反应成分的比列为:金刚烷胺—卵清蛋白:生理盐水 = (10—1000) μg : (0.1~10) mL。

[0016] 所述完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂:卡介苗 = (6~24)g : (10~40) mL : (0.05~0.5) g ;所述不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成,液体石蜡:羊毛脂 = (6~24) g : (10~40) mL。

[0017] 所述的酶标记的羊抗鼠抗体冻干品为辣根或氧化物酶—羊抗鼠抗体冻干品;所述浓缩洗涤液为含有吐温和 NaN_3 磷酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为 0.8 mol/L pH7.2-7.5 的磷酸盐缓冲液;所述显色液 A 为含有过氧化氢的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲溶液;所述显色液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为硫酸溶液。

[0018] 金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒的检测方法,其特征在于:1) 将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液:所述待测样品为组织;取待测样品 2g,加入 8mL 甲醇-1% 三氯乙酸溶液中,充分振荡混匀;室温 4000g/min 离心 10min;取 1mL 上清液于 50 度氮气流下吹干;加入 1mL 磷酸盐缓冲液充分溶解干燥的残留物后待测。2) 用所述试剂盒对所述样本进行检测:取包被有金刚烷胺—卵清蛋白的微孔包被板,加入 50 μL 金刚烷胺标准品或处理好的样品到各自的微孔中,加入 50 μL 抗金刚烷胺抗体,25°C 左右孵育 0.5 h,洗涤液洗 3~5 次,加 100 μL 辣根过氧化物酶(HRP)—羊抗鼠抗体,25°C 左右孵育 0.5 ,用洗涤液洗 3~5 次,加 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,避光静置 10~20 分钟后加终止液 50 μL ,在 450 nm 处测其吸光度值,根据标准曲线计算样品中金刚烷胺的含量。

[0019] 本发明的金刚烷胺酶联免疫吸附检测方法操作简便,检测快速、灵敏、准确,专用测试盒使用方便、价格低,适用于大批量样品的检测。

附图说明

[0020] 图 1 为金刚烷胺标准曲线图,横坐标为金刚烷胺标准溶液浓度的对数,纵坐标为百分比,即各标准品孔和样品孔光密度值除以零标准品孔光密度值(B₀)再乘以 100% 所得:光密度值(标准孔或样品孔 B) / 光密度值(B₀) × 100% = % (纵坐标)。

具体实施方式

[0021] 样本前处理

处理前须知:

- (a) 实验中必须使用一次性吸头,在吸取不同的试剂时要更换吸头;
- (b) 实验之前须检查各种实验器具是否洁净,必须使用洁净实验器具,以避免污染干扰实验结果;
- (c) 未处理的样本冷冻保存;
- (d) 处理后的样本可在 2-8℃ 避光保存 24 h;
- (e) 所有样品应于 2-8℃ 避光保存。

[0022] 样品前处理

- 1、取待测组织样品 2g,加入 8mL 甲醇 -1% 三氯乙酸溶液中,充分振荡混匀;
- 2、室温 4000g/min 离心 10min;
- 3、取 1mL 上清液于 50 度氮气流下吹干;
- 4、加入 1mL 磷酸盐缓冲液充分溶解干燥的残留物后待测。

[0023] 测定步骤:

- 1、将所需试剂和微孔板从冷藏环境中取出,在室温下平衡 30 min,每种液体使用前均须摇匀。注意标准液均需做 2 个平行试验;
- 2、加标准品:加金刚烷胺标准品 / 样本 50 μL 到对应的微孔中,再加入 50 μL / 孔抗金刚烷胺抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min;
- 3、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250 μL / 孔,每次浸泡 15 ~ 30 s,充分洗涤 4 ~ 5 次,用吸水纸拍干;
- 4、加入 100 μL / 孔酶标物工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光反应 30 min;
- 5、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250 μL / 孔,每次浸泡 15 ~ 30 s,充分洗涤 4 ~ 5 次,用吸水纸拍干;
- 6、显色:加入显色液 A 和 B 各 500 μL / 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃ 避光环境反应 15 min;
- 7、测定:每孔各加 50 μL 终止液,设定酶标仪在 450 nm 处,测定 OD 值(建议用 450/630 nm 双波长检测,在 5 min 内读完数据)。

[0024] 结果分析

所测得的标准液或样品吸光度的平均值(B)除以第一个标准液(O 标准液)的吸光度(B₀)值再乘以 100%,得到百分吸光度值。

[0025] 百分吸光度值(%) = B / B₀ × 100%

以标准品浓度的 10 为底的对数为 X 轴,百分吸光值为 Y 轴,绘制标准曲线。然后将样

本的百分吸光值代入标准曲线,从标准曲线上读出样本所对应的值,为 10 的幂,乘以稀释倍数,即为样品中所含金刚烷胺的量。

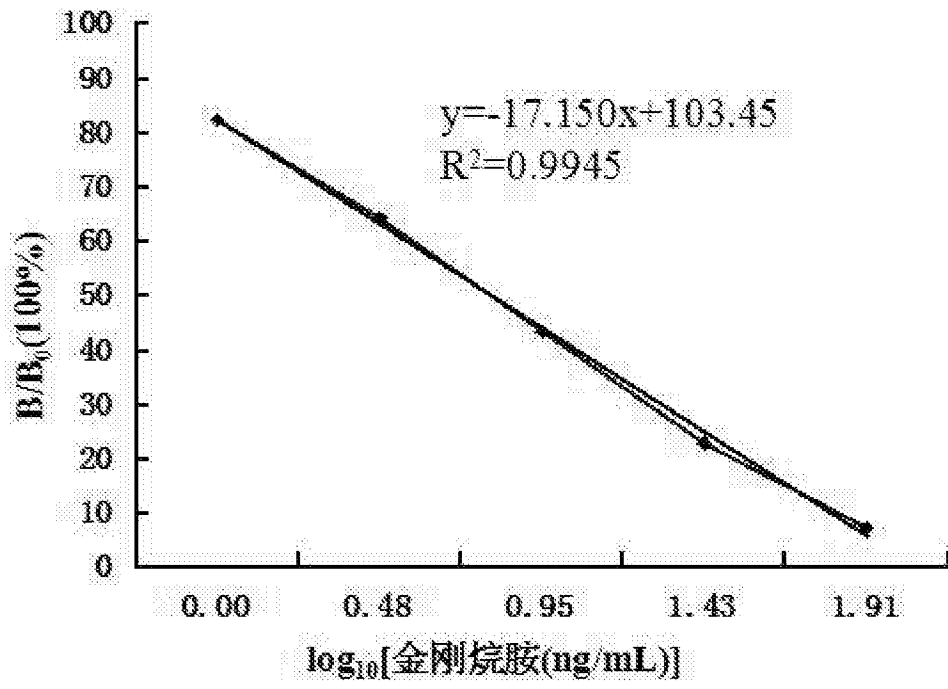


图 1

专利名称(译)	金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒		
公开(公告)号	CN105319351A	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410355296.9	申请日	2014-07-24
[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	杜道林 邢海龙 洪霞		
发明人	杜道林 邢海龙 洪霞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为金刚烷胺酶联免疫吸附检测专用测试盒。其检测快速、灵敏、准确、可定量、操作简单、且对样品纯度要求不高，特异性强，特别适用于大批量样品的检测，为此本发明还提供了专用测试盒的制备及检测方法。其包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、显色液A、显色液B和终止液，其特征在于：包被有金刚烷胺固相抗原的包被板、金刚烷胺标准品、金刚烷胺抗体冻干品。检测时，取包被板，加入50μL抗金刚烷胺抗体，25℃左右孵育0.5h，洗涤液洗3~5次，加100μL辣根过氧化物酶（HRP）—羊抗鼠抗体，25℃左右孵育0.5h，用洗涤液洗3~5次，加50μL显色液A和50μL显色液B，避光静置10分钟~20分钟后加终止液50μL，在450nm处测吸光度值，根据标准曲线计算样品中金刚烷胺的含量。

