



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107677807 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201610877183.4

(22)申请日 2016.09.30

(71)申请人 青岛大学

地址 266071 山东省青岛市市南区宁夏路
308号

(72)发明人 谷正 赵凯 刘芳 许晨 李健
李云龙

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 赵妍

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页
序列表2页

(54)发明名称

一种吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种高灵敏度、高准确度、高精
确度的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒，包
括辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标
记物、酶标抗原稀释液，磁标抗体，磁标抗体稀释
液，吉他霉素系列标准品溶液，浓缩复溶液，浓缩
洗涤液，化学发光底物A、B液。通过大量试验筛选
具有优良性质的特异性的单克隆抗体，以及确定
反应液中各组分的合适浓度，本发明的吉他霉素
磁免疫化学发光检测试剂盒能够快速、精准的检
测到较低含量的吉他霉素，适合于检测猪或禽类
的动物性食品中对吉他霉素药物残留量检测需
求。

1. 一种高灵敏度、高准确度、高精确度的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒，其特征在于包括的试剂有：辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标记物、酶标抗原稀释液，磁标抗体，磁标抗体稀释液，吉他霉素系列标准品溶液，浓缩复溶液，浓缩洗涤液，化学发光底物A、B液。

2. 根据权利要求1所述的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒，其特征在于：

所述辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标记物通过如下方法制备得到：取25mg吉他霉素半抗原，溶解于1.2mLN,N-二甲基甲酰胺(DMF)中；取15mg二氯乙烷(EDC)和15mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.4mL水充分溶解后加入半抗原溶解液中，室温下搅拌24h，即可得到反应液A；称取辣根过氧化物酶(HRP)50mg，使之充分溶解在pH7.2,5mL的磷酸盐缓冲液中，将反应液A逐滴缓慢滴加到HRP溶液中，并于室温下搅拌24h；用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析4天，每天换3次透析液，以除去未反应的小分子物质，得到吉他霉素酶标抗原；分装，于-20℃保存备用；

所述的磁标抗体通过如下方法制备得到：A) 磁珠活化：表面有-COOH基团的磁珠(购于DYNAL,粒径为2.8μm)，其含量是0.1eq/g-0.3eq/g，取100μL磁珠，用含有pH5.0、0.05%的吐温-20的浓度为27mmol/L的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物(MES)100mL洗涤两次，磁分离后移除上清；磁珠活化前，用4℃贮存的上述MES溶液分别配制50mmol/L的二氯乙烷(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液；分别向装有磁珠的离心管中加入新配置的EDC和NHS溶液各50μL，涡旋混匀，室温活化30min；将离心管置于磁分离架上进行磁分离4min，移除上清液，再向其中加入100μL、pH5.0、27mmol/L的MES清洗2-3次后即可得到表面有羧基活化的磁珠，所述百分含量为质量百分含量，B) 磁珠偶联吉他霉素单克隆抗体的制备：将10μg吉他霉素单克隆抗体溶解到50μL、pH5.0、27mmol/L的MES中，向其中加入5mg活化的磁珠，并用上述浓度MES溶液调节总体积至100μL，轻柔地混匀磁珠与吉他霉素单克隆抗体；室温条件下偶联40min，该期间可利用涡旋仪使磁珠保持混匀状态；离心管置于磁分离架上进行磁分离5min，移除上清液；加入100μL、pH7.5的三羟甲基氨基甲烷(TRIS)反应15min以淬灭未反应的-COOH，加入100μL、pH8.0、乙醇胺浓度为50mmol/L的磷酸盐缓冲液封闭磁珠；用100μL、0.2%BSA、0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液清洗封闭好的磁珠3-5次，将磁珠复溶于含0.1%的BSA、0.07%吐温-20、0.03%NaN₅的磷酸盐缓冲液中，于2℃-8℃保藏；所述百分含量为质量百分含量；所述吉他霉素单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区分别为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2，具体而言，S E Q I D N O . 1 为EVKVEESGGGLVQPGGIVSPQGFKDEWCLLTLPMNWVRQSPEKGYYPMNSRMRHCNGHSVTQLNTAKGRFTMSRDDS KSSVYLQM SHMCNMMNRQQCTS IYYDNLYYAMDYWGQGT S VTVSS, SEQ ID NO.2 为DILMTQSPASLSASVGHINWPCIGNLCSPSCYLAWYQQKQGKSPQLLVYYAKTLLFNNPITKYDMCLVERIAPSLKINSLRPCTGIWKMCPLEVITFGGGTKLEIKR；

所述吉他霉素标准品溶液，浓度分别为：0μg/L,0.1μg/L,0.5μg/L,1.0μg/L,5μg/L和10μg/L，标准品稀释液为pH7.4，含0.05%吐温-20,0.05mol/L的磷酸盐缓冲液，所述百分含量是质量百分含量；

所述浓缩复溶液为浓缩磷酸盐缓冲液，是每升含6.0g的NaH₂PO₄·2H₂O、32.0g Na₂HPo₄·12H₂O的水溶液；

所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.07%吐温-20的pH=7.5,0.6mol/L磷酸盐缓冲

液；

所述化学发光底物A液为鲁米诺含量为0.04μg/L、对甲苯酚含量为0.005μg/L、pH为9.2的三羟甲基氨基甲烷溶液，B液为每100mL水溶液含柠檬酸2.6g，无水Na₂HP0₄ 3.2g和体积百分含量为0.75%的CO(NH₂)₂ • H₂O₂ 0.9mL；

所述酶标抗原稀释液和是pH7.4-pH7.8、Na₃PO₄浓度为0.02mol/L、NaCl浓度为0.25mol/L的缓冲溶液；

所述磁标抗体稀释液是pH7.4-pH7.8、Na₃PO₄浓度为0.02mol/L、NaCl浓度为0.25mol/L的缓冲溶液。

3. 权利要求2中吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒的使用方法，其特征在于，包括如下步骤：

A. 样品的处理方法

样品前处理：取待测样品，用均质器均质样本（猪或禽类的肌肉、或肝脏、或肾脏样本），用均质器均质样本；称取1g均质后的组织样本到50mL聚苯乙烯离心管中，加入5mL乙酸乙酯，用振荡器振荡15min, 4000r/min室温（约25℃）离心10min；移取4mL上层有机相至10mL干净的玻璃管中，于50-55℃水浴氮气吹干，加入1mL正丁烷，用涡旋仪涡动1min，复溶，用涡旋仪涡动10S, 4000r/min室温离心10min；除去上层有机相，取下层于10mL离心管，40±5℃水浴，氮气吹干，加入PBS2mL，漩涡混匀1min，取澄清水相待检测；

B. 用试剂盒检测与结果分析

将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:12的体积比进行稀释，装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中；将磁标抗体与磁标抗体稀释液按照1:8的体积比进行稀释，装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中；对每个样品/标准品设置样品架上的位置，输入样品信息和需要检测的测试项目名称；将样品管/标准品管放入已设定好的样品架上，化学发光检测仪依次吸取50μL酶标抗原、50μL待测样品/标准品和50μL磁标抗体加入到反应杯中，混匀，并在室温下反应15min，再通过清洗装置进行磁分离4min，再用洗涤液为pH7.5、350μL的磷酸盐缓冲液清洗3次-5次，再加入化学发光底物A液和B液各50μL，检测其发出的相对光强度（RLU），样品中吉他霉素的含量与RLU成负相关关系，可以通过RLU结合标准曲线法计算吉他霉素的浓度；

采用吉他霉素标准品进行曲线测绘，将所获得的标准品和样品RLU值的平均值除以第一个标准品的RLU值（RLU₀值）再乘以100，以相对发光强度（%）=RLU/RLU₀为纵坐标，吉他霉素浓度的对数为横坐标做标准曲线，每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

4. 权利要求1或2的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒在检测动物性食品（例如猪或禽类的肉、肝脏等）中吉他霉素的残留量的应用。

一种吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化学发光检测试剂盒及其检测方法,具体的说是一种磁免疫化学发光检测试剂盒,以及使用该试剂盒对待检样品中吉他霉素残留量进行测定的方法。

背景技术

[0002] 随着人们生活质量的提高,食品安全问题越来越为广大消费者所关注,特别是农药和抗生素等药物残留问题更是广大消费者所关注的焦点问题。在食品安全这个全球关注的热点问题上,如何快速、准确地检测食品安全的问题已成为重中之重。要检测抗生素在食品中的残留,必须选择特异性强、灵敏度高、高效快速的检测方法。因此,研究各种抗生素类残留检测的方法,提高其灵敏度与选择性具有十分重要的意义。

[0003] 抗生素广泛应用于治疗人和动物的多种细菌性感染疾病。作为临床用药的抗生素类常常在短期内服用,主要是通过注射、口服、饮水等方式进入动物体内。在休药期结束前注射部位的肌肉和奶中会残留超量的抗生素。兽医在临床用药时,将不同的抗生素联合起来使用,也容易造成抗生素类药物在动物体内残留,导致动物性食品污染。有些抗生素类还被作为药物添加剂,用来预防动物细菌性疾病和促进动物生长而被长期使用。如土霉素添加剂、金霉素添加剂等经口腔进入动物体内,短时间不能完全排出,极易在体内蓄积,造成动物性食品中的抗生素残留。

[0004] 现代养殖业的迅速发展引起的抗生素的滥用,进而导致的大量药物残留已经成为威胁人类健康的严重经济社会问题。动物源性食品中抗菌素污染的问题已引起全世界广泛关注,许多国家均对各种动物源性食品中的抗菌素残留提出限量标准。我国农业部在2002年公告的《关于动物性食品中兽药最高残留限量的通知》中,规定了92种动物性食品中兽药最高残留限量,其中吉他霉素(Kitasamycin)在猪/禽的肌肉、肝、肾组织中的最高残留限量为200 μ g/kg。吉他霉素又称柱晶白霉素,是由北里链霉菌产生的一种多组分大环内酯类抗生素,对多数革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性菌及霉形体均有较强抗菌活性,用于防治畜禽细菌感染和霉形体病等以及用作促生长剂,近年来,随着吉他霉素的广泛应用,其在动物性食品中的残留问题也日益突出。

[0005] 因此,亟需建立能够快速、灵敏地检测吉他霉素残留的检测方法。目前已有一些监测方法,包括传统的仪器法,微生物检测法和新兴的酶联免疫检测法(ELISA)等。传统检测药物残留的仪器分析方法包括HPLC、LC-UV、LC-MS和LC-MS-MS等。这些方法优点是准确、稳定、特异性好,可以作为标准方法,但仪器设备昂贵,笨重,需要大量的溶剂,对操作人员要求很高,样品前处理复杂、费时、费力、不易普及,不适合对大规模的样品进行即时检测。微生物检测法虽然可以进行大量样品的即时检测,但是特异性差,不能进行准确的定性定量分析。酶联免疫检测法(ELISA)克服了以上方法的缺点,是一种快速、灵敏、方便的检测方法,可以用于大量样品的即时检测。

[0006] 但市场对于提高检测方法的灵敏度、精准度总是有更高的需要。免疫磁珠(IMB)是免疫学和磁载体技术相结合而发展起来的一类新型材料。IMB是包被有单克隆抗体的磁性

微球,可与含有相应抗原的靶物质特异性地结合形成新的复合物,通过外加磁场的作用,使磁球和上清快速分离,可以在短时间内得到浓缩、纯净的待测样品,缩短检测时间,提高检测效益和灵敏度。目前,IMB-ELISA检测方法是免疫磁珠在免疫检测领域最主要的应用,其采用免疫磁珠配合常规ELISA方法主要用于免疫检测、细胞和微生物的分离和蛋白质、DNA、RNA以及mRNA等生物大分子纯化检测。

[0007] 目前已有检测吉他霉素残留的专利申请,例如申请号为CN201210049826.8,或CN201210049798.X等。但为了满足进一步降低检测限,提高检测方法的灵敏度,提高检测试剂盒的准确度、精密度的要求,需要进一步改进检测试剂盒以及检测方法。

发明内容

[0008] 为了解决上述技术问题,发明人筛选了不同的单克隆抗体,进行了大量的试验后,得到了一种具有良好效果的单克隆抗体,并在此基础上开发了一种具有高灵敏度、高特异性、且具有高反应速度、准确度和精密度的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒。

[0009] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案为:

[0010] 一种高灵敏度、高准确度、高精确度的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒,包括的试剂有:辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标记物、酶标抗原稀释液,磁标抗体,磁标抗体稀释液,吉他霉素系列标准品溶液,浓缩复溶液,浓缩洗涤液,化学发光底物A、B液。

[0011] 所述辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标记物通过如下方法制备得到:取25mg吉他霉素半抗原,溶解于1.2mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;取15mg二氯乙烷(EDC)和15mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.4mL水充分溶解后加入半抗原溶解液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取辣根过氧化物酶(HRP)50mg,使之充分溶解在pH7.2,5mL的磷酸盐缓冲液中,将反应液A逐滴缓慢滴加到HRP溶液中,并于室温下搅拌24h;用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析4天,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到吉他霉素酶标抗原;分装,于-20℃保存备用。

[0012] 所述的磁标抗体通过如下方法制备得到:A)磁珠活化:表面有-COOH基团的磁珠(购于DYNAL,粒径为2.8μm),其含量是0.1eq/g-0.3eq/g,取100μL磁珠,用含有pH5.0、0.05%的吐温-20的浓度为27mmol/L的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物(MES)100mL洗涤两次,磁分离后移除上清;磁珠活化前,用4℃贮存的上述MES溶液分别配制50mmol/L的二氯乙烷(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液;分别向装有磁珠的离心管中加入新配置的EDC和NHS溶液各50μL,涡旋混匀,室温活化30min;将离心管置于磁分离架上进行磁分离4min,移除上清液,再向其中加入100μL、pH5.0、27mmol/L的MES清洗2-3次后即可得到表面有羧基活化的磁珠。所述百分含量为质量百分含量。B)磁珠偶联吉他霉素单克隆抗体的制备:将10μg吉他霉素单克隆抗体溶解到50μL、pH5.0、27mmol/L的MES中,向其中加入5mg活化的磁珠,并用上述浓度MES溶液调节总体积至100μL,轻柔地混匀磁珠与吉他霉素单克隆抗体;室温条件下偶联40min,该期间可利用涡旋仪使磁珠保持混匀状态;离心管置于磁分离架上进行磁分离5min,移除上清液;加入100μL、pH7.5的三羟甲基氨基甲烷(TRIS)反应15min以淬灭未反应的-COOH,加入100μL、pH8.0、乙醇胺浓度为50mmol/L的磷酸盐缓冲液封闭磁珠;用100μL、0.2%BSA、0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液清洗封闭好的磁珠3-5次,将磁珠复溶于含0.1%

的BSA、0.07%吐温-20、0.03%NaN₅的磷酸盐缓冲液中,于2℃-8℃保藏。所述百分含量为质量百分含量。所述吉他霉素单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区分别为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2,具体而言,SEQ ID NO.1为EVKVEESGGGLVQPGGIVSPQGFKDEWLPMNWVRQSPEKGYYPMSRMHCNGHSVTQLNTAKGRFTMSRDDS KSSVYLQMSHMCMNMMNRQQCTS IYYDNLYYAMDYWGQGTTSVTVSS,SEQ ID NO.2为DILMTQSPASLSASVGHINWPCIGNLCSPSCYLAWYQQKQGKSPQLLVYYAKTLLFNNPITKYDMCLVERIAPSLKINSLRPCTGIWKMCWPLEVITFGGGTKLEIKR。

[0013] 所述吉他霉素标准品溶液,浓度分别为:0μg/L,0.1μg/L,0.5μg/L,1.0μg/L,5μg/L和10μg/L,标准品稀释液为pH7.4,含0.05%吐温-20,0.05mol/L的磷酸盐缓冲液。所述百分含量是质量百分含量。

[0014] 所述浓缩复溶液为浓缩磷酸盐缓冲液,是每升含6.0g的NaH₂PO₄ • 2H₂O、32.0g Na₂HPO₄ • 12H₂O的水溶液。

[0015] 所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.07%吐温-20的pH=7.5,0.6mol/L磷酸盐缓冲液。

[0016] 所述化学发光底物A液为鲁米诺含量为0.04μg/L、对甲苯酚含量为0.005μg/L、pH为9.2的三羟甲基氨基甲烷溶液,B液为每100mL水溶液含柠檬酸2.6g,无水Na₂HPO₄3.2g和体积百分含量为0.75%的CO(NH₂)₂ • H₂O₂ 0.9mL。

[0017] 3. 权利要求2中吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0018] A. 样品的处理方法

[0019] 样品前处理:取待测样品,用均质器均质样本(猪或禽类的肌肉、或肝脏、或肾脏样本),用均质器均质样本;称取1g均质后的组织样本到50mL聚苯乙烯离心管中,加入5mL乙酸乙酯,用振荡器振荡15min,4000r/min室温(约25℃)离心10min;移取4mL上层有机相至10mL干净的玻璃管中,于50-55℃水浴氮气吹干,加入1mL正丁烷,用涡旋仪涡动1min,复溶,用涡旋仪涡动10S,4000r/min室温离心10min;除去上层有机相,取下层于10mL离心管,40±5℃水浴,氮气吹干。加入PBS 2mL,漩涡混匀1min,取澄清水相待检测。

[0020] B. 用试剂盒检测与结果分析

[0021] 将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:12的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;将磁标抗体与磁标抗体稀释液按照1:8的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;对每个样品/标准品设置样品架上的位置,输入样品信息和需要检测的测试项目名称;将样品管/标准品管放入已设定好的样品架上,化学发光检测仪依次吸取50μL酶标抗原、50μL待测样品/标准品和50μL磁标抗体加入到反应杯中,混匀,并在室温下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离4min,再用洗涤液为pH7.5、350μL的磷酸盐缓冲液清洗3次-5次,再加入化学发光底物A液和B液各50μL,检测其发出的相对光强度(RLU),样品中吉他霉素的含量与RLU成负相关关系,可以通过RLU结合标准曲线法计算吉他霉素的浓度。

[0022] 采用吉他霉素标准品进行曲线测绘。将所获得的标准品和样品RLU值的平均值除以第一个标准品的RLU值(RLU₀值)再乘以100,以相对发光强度(%)=RLU/RLU₀为纵坐标,吉他霉素浓度的对数为横坐标做标准曲线,每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

[0023] 上述吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒在检测动物性食品(例如猪或禽类的肉、肝脏等)中吉他霉素的残留量的应用。

[0024] 本发明的原理是将抗体-抗原反应的高度特异性与酶催化的高度灵敏性结合起来,利用酶催化底物的化学发光反应检测产物浓度。

[0025] 有益效果:本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的特点,与传统的比色ELISA法比较,灵敏度可以提高一个数量级,有望在动物性食品中的吉他霉素药物残留检测中发挥重要作用。

具体实施方式

[0026] 实施例1吉他霉素半抗原及免疫原的制备

[0027] 称取吉他霉素标准品100mg,50mL甲醇溶解。称取氧羧甲基轻胺50mg,10mL水溶解。将氧羧甲基轻胺溶液缓慢加入吉他霉素甲醇溶液中,搅拌反应过夜。反应溶液60℃旋转蒸干。准确吸取10mL DMF溶解蒸干物,加入二环己基碳二亚胺1g搅拌反应过夜,得到吉他霉素半抗原。

[0028] 称取35mg羰基二咪唑,用0.7mL丙酮充分溶解,加入30mg吉他霉素半抗原37℃振荡反应2h后,真空干燥过夜;加入1mL用0.2mol/L pH8.0的硼酸缓冲液溶解的BSA10mg,4℃振荡3.5天;用0.2mol/L pH8.0的硼酸缓冲液透析2d,加入柳硫汞,置4℃保存;采用紫外扫描法进行鉴定,确认偶联物结合成功,从而制得吉他霉素免疫原。

[0029] 实施例2酶标抗原的制备

[0030] 取25mg吉他霉素半抗原,溶解于1.2mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中;取15mg二氯乙烷(EDC)和15mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用0.4mL水充分溶解后加入半抗原溶解液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取辣根过氧化物酶(HRP)50mg,使之充分溶解在pH7.2,5mL的磷酸盐缓冲液中,将反应液A逐滴缓慢滴加到HRP溶液中,并于室温下搅拌24h;用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液于4℃透析4天,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质,得到吉他霉素酶标抗原;分装,于-20℃保存备用。

[0031] 实施例3吉他霉素单克隆抗体的制备

[0032] 动物免疫:用实施例1制备出的免疫原按120μg/只,以生理盐水溶解免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀,颈背部皮下注射免疫6-8周龄Balb/c雌鼠,初次免疫后第7、14、28天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀,各追加免疫一次,融合前3天以免疫复合物120μg/只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0033] 细胞融合:按常规方法进行,取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)混合,然后在45秒内缓慢加入预热的融合剂(PEG4000)进行融合,用HAT培养基悬浮均匀,再加入适量的饲养细胞,培养于96孔培养板,于37℃,5%CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半换液,9天时候进行全换液。

[0034] 杂交瘤细胞的筛选:细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的1/2时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初选采用间接ELISA方法,以包被抗原(预先用方阵法常规滴定其最佳包被浓度和阳性血清稀释度)包被酶标板,加入被测孔培养上清,孵育,清洗后加入羊抗鼠IgG-HRP和IgM-HRP,邻苯二胺(OPD)进行显色反应。筛选出的阳性孔再用间接竞争ELISA方法筛选,先将细胞上清与100μg/mL的苏丹红等体积混合,37℃水浴作用30min,再加入到包

被好的酶标板中。同时用PBS取代苏丹红对照,其余步骤同上。若经苏丹红阻断后的OD450nm值下降到对照孔的50%以下,则判为阳性,经2-3次检测都为阳性的孔,立即用有限稀释法进行亚克隆化。

[0035] 单克隆抗体制备:将2-3次亚克隆建株后的杂交瘤细胞扩大培养,收集上清液用间接ELISA测定效价,冻存;并取8-10周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.5mL/只,7-10日后腹腔注射杂交瘤细胞 $1-2 \times 10^6$ /只,7-10日后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,并冻存备用。

[0036] 单克隆抗体结构鉴定:采用本领域常规的方法对所得到的杂交瘤细胞所分泌单克隆抗体的结构进行测序,该单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列分别为SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2。具体而言,SEQ ID NO. 1 为EVKVEESGGGLVQPGGIVSPQGFKDEWCLLTPMNWVRQSPEKGYYPMMSRMRCNGHSVTQLNTKAKGRFTMSRDDS KSSVYLQM SHMC MNMM NRQQ CTSI YYDNL YYAMD YWG QGT S VTVSS, SEQ ID NO. 2 为DILMTQSPASLSASVGHINWPCIGNLCSPSCYLAWYQQKQGKSPQLVYYAKTLLFNNPITKYDMCLVERIAPSLKINSLRPCTGIWKMCWPLEVITFGGGTKLEIKR。

[0037] 实施例4磁标抗体的制备

[0038] A) 磁珠活化

[0039] 表面有-COOH基团的磁珠(购于DYNAL,粒径为 $2.8\mu\text{m}$),其含量是0.1eq/g-0.3eq/g,取100 μL 磁珠,用含有pH5.0、0.05%的吐温-20的浓度为27mmol/L的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物(MES)100mL洗涤两次,磁分离后移除上清;磁珠活化前,用4℃贮存的上述MES溶液分别配制50mmol/L的二氯乙烷(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液;分别向装有磁珠的离心管中加入新配置的EDC和NHS溶液各50 μL ,涡旋混匀,室温活化30min;将离心管置于磁分离架上进行磁分离4min,移除上清液,再向其中加入100 μL 、pH5.0、27mmol/L的MES清洗2-3次后即可得到表面有羧基活化的磁珠。所述百分含量为质量百分含量。

[0040] B) 磁珠偶联吉他霉素单克隆抗体的制备

[0041] 将10 μg 实施例3制备的吉他霉素单克隆抗体溶解到50 μL 、pH5.0、27mmol/L的MES中,向其中加入5mg活化的磁珠,并用上述浓度MES溶液调节总体积至100 μL ,轻柔地混匀磁珠与吉他霉素单克隆抗体;室温条件下偶联40min,该期间可利用涡旋仪使磁珠保持混匀状态;离心管置于磁分离架上进行磁分离5min,移除上清液;加入100 μL ,pH7.5的三羟甲基氨基甲烷(TRIS)反应15min以淬灭未反应的-COOH,加入100 μL 、pH8.0、乙醇胺浓度为50mmol/L的磷酸盐缓冲液封闭磁珠;用100 μL 、0.2%BSA、0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液清洗封闭好的磁珠3-5次,将磁珠复溶于含0.1%的BSA、0.07%吐温-20、0.03%NaN₅的磷酸盐缓冲液中,于2℃-8℃保藏。所述百分含量为质量百分含量。

[0042] 实施例5试剂盒组建

[0043] 组建检测吉他霉素类药物的磁免疫化学发光检测试剂盒,使其含有下列组分:

[0044] 1) 辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标记物;

[0045] 2) 酶标抗原稀释液;

[0046] 3) 吉他霉素单克隆抗体与磁珠的偶联物;

[0047] 4) 磁标抗体稀释液;

[0048] 5) 吉他霉素标准品溶液,浓度分别为:0 $\mu\text{g}/\text{L}$,0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$,0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$,1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和

10μg/L,标准品稀释液为pH7.4,含0.05%吐温-20,0.05mol/L的磷酸盐缓冲液。所述百分含量是质量百分含量;

[0049] 6) 浓缩复溶液为浓缩磷酸盐缓冲液,是每升含6.0g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、32.0g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 的水溶液;

[0050] 7) 浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.07%吐温-20的pH=7.5,0.6mol/L磷酸盐缓冲液;

[0051] 8) 化学发光底物A液为鲁米诺含量为0.04μg/L、对甲苯酚含量为0.005μg/L、pH为9.2的三羟甲基氨基甲烷溶液,B液为每100mL水溶液含柠檬酸2.6g,无水 Na_2HPO_4 3.2g和体积百分含量为0.75%的 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 0.9mL。

[0052] 所述酶标抗原稀释液和是pH7.4-pH7.8、 Na_3P_0_4 浓度为0.02mol/L、 NaCl 浓度为0.25mol/L的缓冲溶液。

[0053] 所述磁标抗体稀释液是pH7.4-pH7.8、 Na_3P_0_4 浓度为0.02mol/L、 NaCl 浓度为0.25mol/L的缓冲溶液。

[0054] 实施例6样品中吉他霉素残留量的检测

[0055] 1. 样品前处理方法

[0056] (1) 猪肉

[0057] 样品的处理方法:样品前处理:取待测样品,用均质器均质样本,用均质器均质样本;称取1g均质后的组织样本到50mL聚苯乙烯离心管中,加入5mL乙酸乙酯,用振荡器振荡15min,4000r/min室温(约25℃)离心10min;移取4mL上层有机相至10mL干净的玻璃管中,于50-55℃水浴氮气吹干,加入1mL正丁烷,用涡旋仪涡动1min,复溶,用涡旋仪涡动10S,4000r/min室温离心10min;除去上层有机相,取下层于10mL离心管,40±5℃水浴,氮气吹干。加入PBS 2mL,漩涡混匀1min,取澄清水相待检测。

[0058] 2. 用试剂盒检测与结果分析

[0059] 将酶标抗原与酶标抗原稀释液按照1:12的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;将磁标抗体与磁标抗体稀释液按照1:8的体积比进行稀释,装入化学发光检测仪酶标抗原工作液容器中;对每个样品/标准品设置样品架上的位置,输入样品信息和需要检测的测试项目名称;将样品管/标准品管放入已设定好的样品架上,化学发光检测仪依次吸取50μL酶标抗原、50μL待测样品/标准品和50μL磁标抗体加入到反应杯中,混匀,并在室温下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离4min,再用洗涤液为pH7.5、350μL的磷酸盐缓冲液清洗3次-5次,再加入化学发光底物A液和B液各50μL,检测其发出的相对光强度(RLU),样品中吉他霉素的含量与RLU成负相关关系,可以通过RLU结合标准曲线法计算吉他霉素的浓度。

[0060] 本发明采用6个吉他霉素标准品进行曲线测绘。将所获得的标准品和样品RLU值的平均值除以第一个标准品的RLU值(RLU0值)再乘以100,以相对发光强度(%)=RLU/RLU0为纵坐标,吉他霉素浓度的对数为横坐标做标准曲线,每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

[0061] 实施例7试剂盒质量测试

[0062] 称取均质猪肌肉、猪肝脏、鸡肌肉、鸡肝脏样品于离心管中,添加吉他霉素标准溶液,使组织中添加药物的浓度为0.05、0.1、0.5、1倍最高残留限量。按照实施例6中样品的前

处理方法进行处理,并按照实施例6的检测方法进行检测。每个样品浓度测定5个平行样,不同的时间重复3次。计算平均回收率、标准差、批内和批间变异系数。结果如表1所示。可见,本发明的试剂盒对组织中吉他霉素的添加回收率均在90-110%之间,批内和批间变异系数小于15%。

[0063] 表1吉他霉素添加回收率及变异系数

样品	样品添加浓度 (μ g/kg)	回收率 (%)	CV (%)
猪肉	10	101.3±7.7	7.6
	20	103.7±8.6	8.3
	100	106.6±8.2	7.7
	200	99.1±7.3	7.4
猪肝	10	92.5±9.4	10.2
	20	100.5±8.4	8.4
	100	94.4±9.7	10.3
	200	104.1±11.1	10.7
鸡肉	10	104.8±8.5	8.1
	20	97.1±12.4	12.8
	100	104.4±11.8	11.3
	200	96.4±10.4	10.8
鸡肝	10	92.1±12.1	13.1
	20	104.8±11.9	11.4
[0065]	100	95.1±8.6	9.0
	200	96.7±9.95	10.3

[0066] 由上述结果可以看出,本发明的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒,无论是从试剂盒的检测限还是精密度、准确度上来看,均优于现有的检测试剂盒品种。这样的优良效果来自于本发明所使用单克隆抗体,以及试剂盒中其他组分及含量的最优选择。因此,本发明的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒具有良好的应用前景。

序列表

<110>

<120> 一种吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒

<160> 2

<170> PatentIn Version 3.1

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Glu Val Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

[0001] Ile Val Ser Pro Gln Gly Phe Lys Asp Glu Trp Cys Leu Leu Thr Leu

20 25 30

Pro Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Tyr Tyr Pro Met

35 40 45

Ser Arg Met Arg His Cys Asn Gly His Ser Val Thr Gln Leu Asn Thr

50 55 60

Lys Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Ser His Met Cys Met Asn Met Met Asn Arg Gln

85 90 95

Gln Cys Thr Ser Ile Tyr Tyr Asp Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

His Ile Asn Trp Pro Cys Ile Gly Asn Leu Cys Ser Pro Ser Cys Tyr

20 25 30

[0002] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Tyr Ala Lys Thr Leu Leu Phe Asn Asn Pro Ile Thr Lys Tyr Asp

50 55 60

Met Cys Leu Val Glu Arg Ile Ala Pro Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu

65 70 75 80

Arg Pro Cys Thr Gly Ile Trp Lys Met Cys Trp Pro Leu Glu Val Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

专利名称(译)	一种吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN107677807A	公开(公告)日	2018-02-09
申请号	CN201610877183.4	申请日	2016-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	青岛大学		
申请(专利权)人(译)	青岛大学		
当前申请(专利权)人(译)	青岛大学		
[标]发明人	谷正 赵凯 刘芳 许晨 李健 李云龙		
发明人	谷正 赵凯 刘芳 许晨 李健 李云龙		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/532 G01N2333/36		
代理人(译)	赵妍		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种高灵敏度、高准确度、高精确度的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒，包括辣根过氧化物酶标记的吉他霉素半抗原的标记物、酶标抗原稀释液，磁标抗体，磁标抗体稀释液，吉他霉素系列标准品溶液，浓缩复溶液，浓缩洗涤液，化学发光底物A、B液。通过大量试验筛选具有优良性质的特异性的单克隆抗体，以及确定反应液中各组分的合适浓度，本发明的吉他霉素磁免疫化学发光检测试剂盒能够快速、精准的检测到较低含量的吉他霉素，适合于检测猪或禽类的动物性食品中对吉他霉素药物残留量检测需求。

样品	样品添加浓度 (μ g/kg)	回收率 (%)	CV (%)
猪肉	10	101.3 \pm 7.7	7.6
	20	103.7 \pm 8.6	8.3
	100	106.6 \pm 8.2	7.7
	200	99.1 \pm 7.3	7.4
猪肝	10	92.5 \pm 9.4	10.2
	20	100.5 \pm 8.4	8.4
	100	94.4 \pm 9.7	10.3
	200	104.1 \pm 11.1	10.7
鸡肉	10	104.8 \pm 8.5	8.1
	20	97.1 \pm 12.4	12.8
	100	104.4 \pm 11.8	11.3
	200	96.4 \pm 10.4	10.8
鸡肝	10	92.1 \pm 12.1	13.1
	20	104.8 \pm 11.9	11.4