



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109180519 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810652749.2

C07K 14/765(2006.01)

(22)申请日 2018.06.22

C07K 14/795(2006.01)

(71)申请人 华南农业大学

C07K 14/435(2006.01)

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

C07K 14/75(2006.01)

申请人 广东温氏食品集团股份有限公司

C07K 16/44(2006.01)

(72)发明人 杨金易 沈玉栋 曾道平 谭庶
孙远明 陈丽 韦田

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

(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 林丽明

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(51)Int.Cl.

C07C 233/83(2006.01)

C07C 231/02(2006.01)

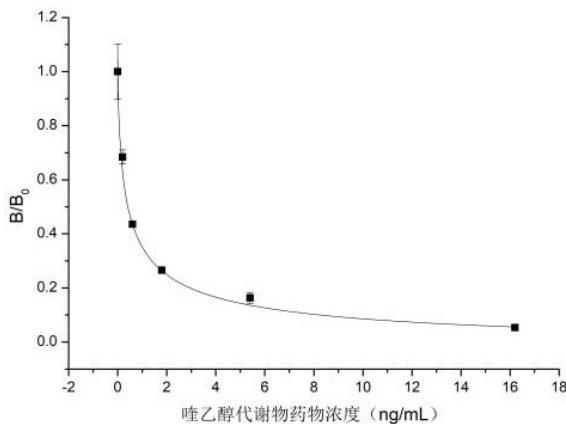
C07K 14/77(2006.01)

(54)发明名称

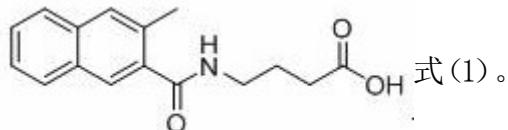
一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检
测试剂盒与检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检测试剂盒与检测方法。本发明以4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸为喹乙醇代谢物半抗原,该半抗原与载体蛋白后偶联可以得到喹乙醇代谢物抗原,所述喹乙醇代谢物抗原可应用于制备喹乙醇代谢物特异性抗体,该特异性抗体又可用于制备检测食品中喹乙醇代谢物残留的酶联免疫试剂盒或者胶体金试纸卡。本发明还公开了相应的试剂盒检测方法。该方法简便、快速,其线性检测范围为0.2~16.2 ng/mL,灵敏度为0.54 ng/mL,检出限为0.32 ng/mL,回收率为80%~109.8%,检出限低、灵敏度高、特异性强、稳定性好,成本低,非常适合大量样品检测及现场快速检测。



1. 一种喹乙醇代谢物半抗原, 其特征在于, 所述半抗原为4-(3-甲基-2-萘酰胺基) 丁酸, 其分子结构式如式(1)所示:



2. 一种喹乙醇代谢物抗原, 其特征在于, 是将权利要求1所述的喹乙醇代谢物半抗原与载体蛋白偶联得到。

3. 权利要求2所述喹乙醇代谢物抗原在制备喹乙醇代谢物抗体中的应用。
4. 应用权利要求2所述喹乙醇代谢物抗原制备得到的喹乙醇代谢物抗体。
5. 权利要求4所述喹乙醇代谢物抗体在检测喹乙醇代谢物中的应用。
6. 应用权利要求1所述喹乙醇代谢物半抗原、权利要求2所述喹乙醇代谢物抗原、权利要求4所述喹乙醇代谢物抗体制备得到的酶联免疫试剂盒或胶体金试纸卡。
7. 权利要求6所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 含有: 包被有喹乙醇代谢物抗原的酶标板、喹乙醇代谢物抗体、酶标二抗、喹乙醇代谢物系列标准品溶液、底物缓冲液与底物工作液、浓缩洗涤液、终止液、复溶液和硫酸溶液。
8. 根据权利要求7所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于, 所述底物工作液为pH为4.5~5.5, 含有过氧化氢或过氧化脲的磷酸-柠檬酸缓冲液; 所述底物缓冲液为pH为4.5~5.5, 含有3,3,5,5-四甲基联苯胺的磷酸-柠檬酸缓冲溶液; 所述浓缩洗涤液为pH为7.0~7.8, 含有0.4%~0.6%吐温-20、0.3~0.5 mol/L的磷酸盐缓冲液。
9. 一种检测样品中喹乙醇代谢物残留的方法, 其特征在于, 以权利要求7或8所述的酶联免疫试剂盒进行检测。
10. 根据权利要求9所述检测样品中喹乙醇代谢物残留的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

- S1. 将所述酶联免疫试剂盒从冷藏环境中取出, 置于15~35℃平衡30~45 min;
- S2. 取出酶标板, 往标准孔内加入不同浓度的喹乙醇代谢物系列标准品溶液, 往样品孔中加入待测样品, 然后每孔分别加入酶标二抗、喹乙醇代谢物抗体工作液, 孵育;
- S3. 吸除板孔中的反应液, 用浓缩洗涤液进行洗涤, 将酶标板拍干;
- S4. 每孔加入底物工作液和底物缓冲液, 轻拍混匀, 盖上盖板膜;
- S5. 10~20 min后每孔加入终止液, 测定各孔的吸光度;
- S6. 分析检测结果: 确定样品中喹乙醇代谢物的含量。

一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检测试剂盒与检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于药品残留检测技术领域。更具体地，涉及一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检测试剂盒与检测方法。

背景技术

[0002] 喹乙醇是喹噁啉类药物的早期产品，20世纪70年代以来，曾在全世界范围内广泛应用，但目前被全世界禁用于食品动物促生长作用。欧洲联盟于1998年禁止卡巴氧和喹乙醇的使用，我国禁止将喹乙醇和卡巴氧用于食品动物促生长，并规定动物组织中喹乙醇残留标示物的最大残留限量。近年，喹乙醇药物主要在澳大利亚、巴西、日本及中国等地使用。

[0003] 喹乙醇对动物体产生的毒性主要包括急性毒性和蓄积毒性。喹乙醇摄入过量会使动物应激性大量出血而死亡，在动物体内蓄积到一定程度时也会对动物或人产生致畸、致癌、致突变的“三致作用”。因此，使用时，必须严格按其使用范围、剂量浓度实行休药期。鉴于喹乙醇的毒性和存在的潜在危害，因而人们重新对喹乙醇的安全性进行评价，对喹乙醇的使用也做出了新的规定。喹乙醇本身不稳定，其在动物体内短时间代谢有十多种代谢产物，大部分不具备检测条件，其中3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)是主要代谢物，在体内相对稳定，是国家食品法典委员会认定的标示残留物，因此通常将喹乙醇代谢物MQCA作为残留分析和监控的目标物。2003年我国农业部规定了肌肉和肝脏组织中MQCA的最大残留量分别为4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 然而，喹乙醇药物在生产实践中依然被大量非法使用或滥用，药物的残留对消费者健康和动物性食品出口造成巨大潜在威胁，从而带动相关检测方法的研究。这些检测方法有液相色谱-质谱法、液相色谱法、气相方法、酶联免疫法、胶体金吸附检测法、分子印迹和生物传感器方法等。其中，液相色谱-质谱法和酶联免疫法为主流分析方法。与之相比，免疫分析法因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低，成为值得推广常用的筛选方法。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足，提供一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检测试剂盒与检测方法。该酶联免疫试剂盒具有准确、灵敏、快速、能够高通量检测喹乙醇代谢物的优点，能够高效检测喹乙醇代谢物，为喹乙醇代谢物快速检测产品的开发提供了一定的理论指导，对药品安全的监控具有重要意义。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种喹乙醇代谢物半抗原。

[0007] 本发明的第二个目的是提供应用上述喹乙醇代谢物半抗原制备得到的喹乙醇代谢物抗原。

[0008] 本发明的第三个目的是提供上述喹乙醇代谢物抗原在制备喹乙醇代谢物抗体中的应用。

[0009] 本发明的第四个目的是提供应用上述喹乙醇代谢物抗原制备得到的喹乙醇代谢物抗体。

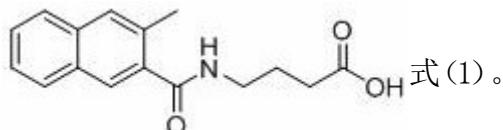
[0010] 本发明的第五个目的是提供上述喹乙醇代谢物抗体在检测喹乙醇代谢物中的应用。

[0011] 本发明的第六个目的是提供应用上述喹乙醇代谢物半抗原、喹乙醇代谢物抗原、喹乙醇代谢物抗体制备得到的酶联免疫试剂盒。

[0012] 本发明的第七个目的是提供应用上述酶联免疫试剂盒进行检测样品中喹乙醇代谢物残留的方法。

[0013] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：

本发明涉及一种喹乙醇代谢物半抗原，所述半抗原为4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸，其分子结构式如式(1)所示：



[0014] 所述半抗原4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸的制备方法，包括以下步骤：将3-甲基-2-萘酸溶解在SOCl₂中，在氮气保护下加热至90~110℃反应1~3 h；减压除去溶剂，将残余物溶解在1,4-二噁烷中，在搅拌条件下，将其滴加至氨基酸和Na₂CO₃的混合水溶液中；室温搅拌过夜，加入盐酸溶液酸化后，用EtOAC进行萃取，合并有机相后，用饱和NaCl溶液洗涤、干燥后，采用硅胶柱层析纯化得到4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸，即为所述半抗原。

[0015] 本发明还涉及一种喹乙醇代谢物抗原，是将所述的喹乙醇代谢物半抗原与载体蛋白偶联得到。

[0016] 其中，所述载体蛋白可为鼠血清白蛋白、甲状腺蛋白(BCG)、牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白(OVA)、血蓝蛋白或纤维蛋白原等常用载体蛋白。

[0017] 优选地，所述载体蛋白为卵清蛋白。

[0018] 所述喹乙醇代谢物抗原的制备方法为：采用活泼酯方法，将所述半抗原(4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸)与载体蛋白偶联，即可得到喹乙醇代谢物抗原。

[0019] 所述喹乙醇代谢物抗原可以作为免疫原制备喹乙醇代谢物抗体，也可以作为包被原制备酶标板。

[0020] 所述抗体可为单克隆抗体、多克隆抗体或基因工程抗体，优选为单克隆抗体。

[0021] 所述的喹乙醇代谢物多克隆抗体的制备方法如下：

将上述喹乙醇代谢物抗原作免疫原免疫兔子或小鼠，制备喹乙醇代谢物多克隆抗体，最后收集抗血清，用辛酸硫酸镀沉淀纯化及过亲和层析柱进行纯化。

[0022] 所述的喹乙醇代谢物单克隆抗体的制备方法如下：

将上述喹乙醇代谢物抗原作免疫原免疫小鼠，用小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合，获得杂交瘤细胞，将杂交瘤细胞置于雌性Balb/c小鼠体内培养，获得含高浓度单克隆抗体的腹水，并对腹水纯化得到高特异性抗喹乙醇代谢物单克隆抗体。

[0023] 相应地，应用所述喹乙醇代谢物抗原制备得到的抗体及其在检测喹乙醇代谢物中的应用，也在本发明的保护范围之内。

[0024] 应用所述喹乙醇代谢物半抗原、所述喹乙醇代谢物抗原、所述喹乙醇代谢物抗体

制备得到的酶联免疫试剂盒或胶体金试纸卡,也在本发明的保护范围之内。

[0025] 优选地,所述的酶联免疫试剂盒,含有:包被有喹乙醇代谢物抗原的酶标板、喹乙醇代谢物抗体、酶标二抗、喹乙醇代谢物系列标准品溶液、底物缓冲液与底物工作液、浓缩洗涤液、终止液、复溶液和硫酸溶液。

[0026] 优选地,所述包被喹乙醇代谢物抗原的包被液为:将1.69 g碳酸钠和2.95 g碳酸氢钠溶于1 L双蒸水中得到;喹乙醇代谢物抗原的包被浓度为0.125 μ g/L。

[0027] 优选地,所述酶标板可为96孔可拆透明酶标板,材质为聚苯乙烯,包被有能与抗喹乙醇代谢物抗体特异性结合的喹乙醇代谢物抗原,并封闭微孔表面未吸附喹乙醇代谢物抗原的位点。

[0028] 所述包被有喹乙醇代谢物抗原的酶标板的制备方法为:用包被液将喹乙醇代谢物抗原按需要稀释,向孔中加入包被液,放入37℃环境进行孵育过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤,然后在每孔中加入封闭液,37℃孵育,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0029] 本文中的过夜是指8~16 h。

[0030] 其中在酶标板制备过程中,所用封闭液是将0.1 g BSA(牛血清白蛋白)、5 g甘氨酸、5 g蔗糖溶于100 mL PBS(0.01 mol/L, pH为7.4)溶液得到。

[0031] 另外,可以作为固定喹乙醇代谢物抗原固相载体的物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酷胶、交联葡萄糖、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

[0032] 优选地,所述酶标二抗为羊抗兔IgG。酶标抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶,优选为辣根过氧化物酶。

[0033] 优选地,所述喹乙醇代谢物系列标准品溶液,在使用时用0.2 mol/L、pH为5.4的磷酸盐缓冲液,将喹乙醇代谢物标准品溶液稀释成浓度分别为0、0.2、0.6、1.8、5.4、16.2 ng/mL的一系列喹乙醇代谢物标准品溶液。

[0034] 更优选地,所述磷酸盐缓冲液的配方为:2.9 g的NaH₂PO₄ • 12H₂O、8.5 g的NaCl、0.2 g的KCl、0.2 g的KH₂PO₄,定容至1 L。

[0035] 优选地,所述底物工作液为pH为4.5~5.5,含有过氧化氢或过氧化脲的磷酸-柠檬酸缓冲液;所述底物缓冲液为pH为4.5~5.5,含有3,3,5,5-四甲基联苯胺的磷酸-柠檬酸缓冲溶液。

[0036] 更优选地,所述底物工作液和所述底物缓冲液按体积比为1:1的比例进行混合得到底物液。

[0037] 优选地,所述浓缩洗涤液为pH为7.0~7.8,含有0.4%~0.6%吐温-20、0.3~0.5 mol/L的磷酸盐缓冲液,该百分比为重量体积百分比。

[0038] 更优选地,所述浓缩洗涤液为20倍的浓缩洗涤液;使用时用去离子水稀释成1倍洗涤液。

[0039] 优选地,所述终止液为0.5 M H₂SO₄。

[0040] 优选地,所述硫酸溶液为3 M的硫酸溶液。

[0041] 优选地,所述复溶液为0.2 M PBS。

[0042] 本发明还涉及以上述酶联免疫试剂盒进行检测样品中喹乙醇代谢物残留的方法。

[0043] 具体优选地,所述检测样品中喹乙醇代谢物残留的方法,包括以下步骤:

S1. 将所述酶联免疫试剂盒从冷藏环境中取出,置于15~35℃平衡30~45min;

S2. 取出酶标板,往标准孔内加入不同浓度的喹乙醇代谢物系列标准品溶液,往样品孔中加入待测样品,然后每孔分别加入酶标二抗、喹乙醇代谢物抗体工作液,孵育;其中,所述喹乙醇代谢物标系列准品溶液由磷酸盐缓冲液稀释喹乙醇代谢物标准品成不同浓度得到;

S3. 吸除板孔中的反应液,用浓缩洗涤液进行洗涤,将酶标板拍干;

S4. 每孔加入底物工作液和底物缓冲液,轻拍混匀,盖上盖板膜;

S5. 10~20 min后每孔加入终止液,测定各孔的吸光度;

S6. 分析检测结果:确定样品中喹乙醇代谢物的含量。

[0044] 结果以抑制率计算,抑制率(%) = $B/B_0 \times 100\%$;式中:B是不同浓度喹乙醇代谢物的标准品溶液孔或待测样品孔的吸光度值, B_0 为0浓度喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值;以抑制率为纵坐标,以喹乙醇代谢物标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中喹乙醇代谢物的含量。

[0045] 本发明的待测样品包括但不限于鸡肉、鸡肝、猪肉或猪肝等动物组织。

[0046] 优选地,步骤S2所述的待测样品为鸡肉、鸭肉、猪肉。

[0047] 优选地,用所述的试剂盒进行检测前先进行样品前处理。样品的前处理主要是为了从样品中获得喹乙醇代谢物溶液,从而用于后续的检测。

[0048] 下面是常见的几种样品(鸡肉、鸭肉、猪肉)的前处理方法,包括以下步骤:

(1) 将样品取出解冻,称取均质好的样品(2.00±0.05)g至50 mL聚苯乙烯离心管,加入2 mL的蒸馏水,充分振荡2 min;

(2) 加入8 mL乙酸乙酯,1 mL 1.5 M的H₂SO₄,震荡1 min,于室温(20~25℃)以4000 r/min以上的转速离心5 min;

(3) 取出4 mL的上清液至玻璃试管中50 ℃氮气吹干或空气吹干;

(4) 加入0.5 mL正己烷,用涡旋仪涡旋涡动30 s,再加入0.5 mL复溶液,用涡旋仪涡动10 s,4000 r/min以上,于室温(20~25℃)离心5 min;

(5) 除去上层正己烷相,取50 μL下层清液待测。

[0049] 酶联免疫分析是将酶催化反应与免疫反应相结合,用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术。其检测原理是:(1)使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性;(2)使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性;(3)洗涤后加入底物,酶促使底物生成有色产物,通过专用的仪器检测吸光度,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,从而反算出未知抗原或抗体的浓度。此方法的突出优点表现为灵敏度高,分析方法简便快速,结果稳定、误差小,安全性好且使用期长,相比仪器分析方法的优势表现在:能实现大批量检测,且更经济、省时。

[0050] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

(1) 本发明的半抗原在喹乙醇代谢物残留的检测中发挥重要作用,用该半抗原作为原料,制备适于动物免疫的抗原体系免疫动物,所得抗体的效价、特异性、亲和力都比较好;所得的抗体用于酶联免疫试剂盒,使用方便、检测成本低,检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本,适于动物组织中喹乙醇代谢物残留的现场监控和大量样本的筛查。

[0051] (2) 本发明提供的酶联免疫试剂盒及其方法,其最大线性检测范围为0.2~16.2 ng/mL,灵敏度为0.54 ng/mL,检出限为0.32 ng/mL,回收率为80%~109.8%,该试剂盒检测快速、大大缩短了检测时间,不考虑检测人员操作熟练程度的影响,整个检测过程仅仅需要70 min左右即可完成,且检出限更低、灵敏度更高;同时,采用包被抗原的包被板提升了试剂盒的稳定性和精密度,检测更稳定、更准确。

附图说明

[0052] 图1为喹乙醇代谢物酶联免疫试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0053] 以下结合具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0054] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0055] 本发明实施例中所使用试剂如下:

包被液:将1.69 g碳酸钠和2.95 g碳酸氢钠溶于1 L双蒸水中得到。

[0056] 20倍浓缩洗涤液:pH为7.4,含有0.5%吐温-20的0.4 mol/L的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成1倍,该百分比为重量体积百分比。

[0057] 封闭液:取0.1 g的BSA(牛血清白蛋白)、5 g甘氨酸、5 g蔗糖溶于100 mL的PBS溶液(0.01 mol/L, pH7.4)得到。

[0058] 喹乙醇代谢物系列标准品溶液:用色谱级甲醇将喹乙醇代谢物标准品溶液稀释成1 mg/mL备用;再用0.2 mol/L、pH为5.4的PBS稀释为浓度分别为0 ng/mL、0.2 ng/mL、0.6 ng/mL、1.8 ng/mL、5.4 ng/mL、16.2 ng/mL的一系列喹乙醇代谢物标准品溶液,4°C保存。

[0059] 底物液:底物液由A液(底物工作液)和B液(底物缓冲液)组成,A液为pH为5.0,含有过氧化脲的磷酸-柠檬酸缓冲液;B液为pH为5.0,含有3,3,5,5-四甲基联苯胺的磷酸-柠檬酸缓冲溶液;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合,即可得到底物液。

[0060] 喹乙醇代谢物单克隆抗体(2.5 mg/mL):实验室前期制备。

[0061] 辣根过氧化酶标记的羊抗兔IgG(10 mg/mL):购自武汉博士得生物工程有限公司。

[0062] 实施例1 喹乙醇代谢物半抗原、免疫原、包被原及单克隆抗体的制备

1.半抗原、免疫原与包被原的制备

采用活泼酯法,将半抗原4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸(缩写为MNBA)分别与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联,制备成免疫原MNBA-BSA和包被原MNBA-OVA。具体方法如下:

(1)半抗原合成:

将3-甲基-2-萘酸(1.3 mmol)溶解在SOCl₂(11 mmol)中,在氮气保护下微波加热至100°C反应2 h;在减压下除去溶剂,将残余物溶解在1,4-二噁烷(5 mL)中;在搅拌条件下,将其滴加至混合有氨基酸(1.3 mmol/L)和Na₂CO₃(3.2 mmol/L)的5 mL水溶液中;在室温下搅拌过夜,加入20 mL盐酸溶液(1 mol/L)酸化后,用EtOAC(3×15 mL)进行萃取;合并有机相后,用饱和NaCl溶液洗涤3次,用无水硫酸钠干燥后,蒸除溶剂;残余物采用硅胶柱层析纯化,得到4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸,即为目标半抗原。

[0063] ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 8.29–8.22 (m, 4H), 7.97–7.90 (m, 2H), 7.88 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.88–7.81 (m, 3H), 7.61–7.53 (m, 4H), 3.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.57 (s, 6H), 2.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.89 (p, *J* = 7.1 Hz, 4H)。

[0064] (2) 免疫原合成：

称取0.32 g半抗原4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸,再称取0.131 g NHS加到半抗原中,用400 μL DMF溶解于反应装置中,在磁力搅拌下于室温进行反应10 h;将反应终液置于4℃冰箱中冷却2 h以上,经1.2万rpm离心5 min,取上清(即活泼酯液),并缓慢滴加到5 mL 6 mg/mL的BSA溶液中反应;反应缓冲液为0.2 mol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS液),在磁力搅拌下于室温进行反应4 h(从加样结束开始记时);将反应终液置于透析袋内,于0.01 mol/L pH7.4的PBS溶液中4℃搅拌透析,每4~8 h换一次透析液,共透析3天;透析结束后,将透析袋中的蛋白溶液(即为MQCA的免疫原MNBA-BSA),分成若干等份分装于1 mL离心管中,于-20℃冰箱中存放,备用。

[0065] (3) 包被原合成:包被原的合成方法与上述免疫原合成方法过程相同,仅把免疫原合成中的载体蛋白BSA更换为OVA,即可得到包被原MNBA-OVA。

[0066] 2、喹乙醇代谢物单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

用上述制备出的免疫原按150 μg /只以生理盐水溶解后,与弗氏完全佐剂等体积混匀,颈背部皮下注射免疫6、8周龄的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150 μg /只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0067] (2) 细胞融合

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 s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,在37℃,5%CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半换液,9天时进行全换液。

[0068] (3) 阳性杂交瘤的筛选

细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的1/4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,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100 μg /mL的喹乙醇代谢物等体积混合,37℃水浴作用30 min,再加入到包被好的酶标板中;同时用PBS取代喹乙醇代谢物作对照,其余步骤同上;若经喹乙醇代谢物阻断后的OD_{450nm}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;

(4) 杂交瘤细胞的扩大培养

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周龄的Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.5 mL/只,7~10天后腹腔注射杂交瘤细胞1~2×10⁶/只,7~10天后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,并冻存备用。

[0069] 实施例2 酶联免疫测定喹乙醇代谢物方法的建立

(1)包被原浓度与抗体浓度的优选,包括以下步骤:

1)将包被原按照15.6、8.9、5.0、2.5、1.25 ng/mL的浓度用包被液稀释并纵向包被酶标板,100 μ L/孔,37℃孵育过夜,用洗涤液洗涤两次,吸水纸上拍干;

2)加入配制好的封闭液170 μ L/孔进行封闭,37℃过夜,甩干放入烘箱;

3)加入50 μ L/孔PBS溶液稀释好的喹乙醇代谢物标准品溶液;

4)加入50 μ L/孔用PBS溶液稀释的不同梯度的喹乙醇代谢物单克隆抗体(1:32000、1:64000、1:96000、1:128000),25℃孵育30 min,洗板5次,吸水纸上拍干;

5)加入100 μ L/孔稀释5000倍的酶标二抗(羊抗鼠IgG),25℃孵育30 min,洗板5次,吸水纸上拍干;

6)加入现配的底物液,100 μ L/孔,25℃反应10 min;

7)加入终止液,50 μ L/孔,用酶标仪读值,在单波长450 nm或者双波450 nm/630 nm下读取各孔的吸光度值。

[0070] 实验结果显示,得到的包被原最佳工作浓度为1.25 ng/mL,抗体稀释倍数为64000倍。

[0071] (2)抗体灵敏度的测定

以包被浓度为包被原最佳浓度为1.25 ng/mL,抗体稀释倍数为64000倍,进行抗体灵敏度的测定。包括以下步骤:

1)取96孔板,将包被原用稀释液稀释至1.25 ng/mL,每孔加入100 μ L,37℃孵育过夜,用洗涤液洗涤两次,吸水纸上拍干;

2)加入配制好的封闭液170 μ L/孔进行封闭,37℃过夜,甩干放入烘箱;

3)分别加入50 μ L/孔PBS稀释好的不同梯度的喹乙醇代谢物标准品溶液和稀释64000倍的抗体,25℃孵育30min,洗板5次,吸水纸上拍干;

4)加入100 μ L/孔稀释5000倍的酶标二抗(羊抗鼠IgG),25℃孵育30 min,洗板5次,吸水纸上拍干;

5)加入现配的底物液,100 μ L/孔,25℃反应10 min;

6)加入终止液,50 μ L/孔,用酶标仪读值,在单波长450 nm或者双波450 nm/630 nm下读取各孔吸光度值;

结果以抑制率计算,抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%),半数抑制越低,说明抗体的灵敏度越高;式中,B是不同标准浓度溶液竞争的吸光度,B₀为0浓度喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值,以50%抑制率(半数抑制浓度,IC₅₀)计算喹乙醇代谢物单克隆抗体的灵敏度,为0.54 ng/mL。

[0072] 实施例3 喹乙醇代谢物酶联免疫试剂盒的制备

1、准备试剂

(1)包被有喹乙醇代谢物抗原的酶标板

96孔可拆酶标板,已包被喹乙醇代谢物抗原及封闭液,包被浓度为1.25 mg/L;所述喹乙醇代谢物为喹乙醇代谢物半抗原4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸与卵清蛋白(OVA)的偶联物;

酶标板微孔板的包被:包被抗原用包被液稀释至1.25 mg/L,每孔内加入100 μ L包被液,37℃孵育过夜,倾去孔内液体,洗涤液洗涤2次,拍干;然后每孔中加入170 μ L封闭液,37

℃孵育3 h,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。

[0073] (2) 噻乙醇代谢物标准品溶液的配制

准确称取噻乙醇代谢物标准品溶液,用色谱级甲醇稀释成1 mg/mL,再用0.2 mol/L PBS缓冲液(配方为2.9 g的NaH₂PO₄ • 12H₂O、8.5 g的NaCl、0.2 g的KCl、0.2 g的KH₂PO₄,定容至1 L)分别配制浓度为0、0.2、0.6、1.8、5.4、16.2 ng/mL的噻乙醇代谢物溶液,4℃保存。

[0074] (3) 噻乙醇代谢物抗体工作液

噻乙醇代谢物单克隆抗体浓度为1.25 mg/mL;其工作浓度为1:64000,用P液进行稀释。

[0075] (4) 底物液

由A液(底物工作液)和B液(底物缓冲液)组成,使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合,即可得到底物液;其中A液为pH为5.0,含有过氧化脲的磷酸-柠檬酸缓冲液;B液为pH为5.0,含有3,3,5,5-四甲基联苯胺的磷酸-柠檬酸缓冲溶液。

[0076] (5) 20倍浓缩洗涤液

pH为7.4,含有0.5%吐温-20的0.4 mol/L的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成1倍,该百分比为重量体积百分比。

[0077] 2、试剂分装

将各试剂测定合格后无菌分装,噻乙醇代谢物抗体工作液7 mL/瓶;酶标二抗7 mL/瓶;噻乙醇代谢物标准品溶液1 mL/瓶;底物液7 mL/瓶;底物缓冲液7 mL/瓶;终止液7 mL/瓶;3M硫酸溶液50 mL/瓶;复溶液50 mL/瓶;20倍浓缩洗涤液50 mL/瓶。采用不同颜色盖的透明塑料瓶分装后贴标签,注明批号和有效期,4℃保存。

[0078] 3、试剂盒的组装

分别将上述包被有噻乙醇代谢物抗原的酶标板1块,噻乙醇代谢物抗体工作液、辣根过氧化酶标记的二抗、底物液、底物缓冲液、20倍浓缩洗涤液、终止液、3M硫酸溶液和复溶液各1瓶,噻乙醇代谢物标准品工作液6瓶和使用说明书1份置于试剂盒内指定位置,试剂盒检验合格后封装,4℃保存。

[0079] 实施例4 噻乙醇代谢物酶联免疫检测试剂盒的应用

1、利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测

(1) 加样:将所需数量的板条固定于板架,加入50 μL样品或标准品到微孔板中,将50 μL酶标记物加入微孔中,再加入50 μL抗体工作液到微孔板中,用盖板膜盖好,充分振荡混匀;

(2) 温育:置室温(25℃)温育30 min;

(3) 洗涤:弃去孔内液体,将稀释后的洗液注满各孔,静置30~60 s,弃去孔内洗液;重复洗4次后拍干;

(4) 显色:每孔加入底物缓冲液50 μL,再加入底物工作液50 μL,振荡混匀(或将底物缓冲液和底物工作液以1:1比例混合后,再加入100 μL显色液),置室温(25℃)温育10~15 min;

(5) 终止:每孔加入终止液50 μL,轻拍混匀;

(6) 读值:用酶标仪读值,在单波长450 nm或双波长450 nm/630 nm下读取各孔吸光度值。

[0080] 2、检测结果计算与分析

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

式中: B是不同浓度喹乙醇代谢物的标准品溶液孔或待测样品孔的吸光度值, B_0 为0浓度喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值。

[0081] 以抑制率为纵坐标, 以喹乙醇代谢物标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线, 以喹乙醇代谢物的吸光值代入上述标准曲线中求出待测样品中喹乙醇代谢物的含量。

[0082] 不考虑检测人员操作熟练程度的影响, 整个检测过程仅仅需要70 min左右即可完成。检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。

[0083] 3、标准曲线

通过对标准品溶液的检测结果分析得到喹乙醇代谢物标准曲线图(如附图1所示), 表明了本发明试剂盒对喹乙醇代谢物的线性检测范围为0.2~16.2 ng/mL, 灵敏度为0.54 ng/mL, 检出限为0.32 ng/mL。

[0084] 实施例5 喹乙醇代谢物酶联免疫检测试剂盒的应用效果评价

检测方法同实施例4。

[0085] 1、待测样品前处理

(1) 将样品取出解冻, 称取均质好的样品(2.00 ± 0.05)g至50 mL聚苯乙烯离心管, 加入2 mL的蒸馏水, 充分振荡2 min;

(2) 加入8 mL乙酸乙酯, 1 mL、1.5M的H₂SO₄, 震荡1 min, 室温(20~25℃)4000 r/min以上的转速离心5min;

(3) 取出4 mL的上清液至玻璃试管中50℃氮气吹干或空气吹干;

(4) 加入0.5 mL正己烷, 用涡旋仪涡旋涡动30 s, 在加入0.5 mL复溶液, 用涡旋仪涡动10 s, 室温(20~25℃)4000 r/min以上的转速离心5 min;

(5) 除去上层正己烷相, 取50 μL下层清液待测。

[0086] 2、喹乙醇代谢物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, 各随机抽出16个微孔, 按照实施例4中试剂盒的检测方法测定喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值, 重复16次, 计算变异系数(CV, %), 结果如表1所示。

[0087] 表1 喹乙醇代谢物标准品溶液重复性试验

标液浓度 (ng/mL)	批内 CV (%)	批间 CV (%)
0.2	10.77	12.93
0.6	10.59	14.56
1.8	5.72	7.43
5.4	2.45	8.69
16.2	2.82	7.57

批内变异系数: 同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0088] 批间变异系数: 同一样本在不同批次测定结果的变异系数, 取其平均值。

[0089] 结果表明,本发明试剂盒标准品溶液检测的批内变异系数范围在2.45%~10.77%之间,批间变异系数为7.43%~14.56%。可知CV<15%,说明该方法准确度好,该试剂盒可适用于实际样品中喹乙醇代谢物的检测。

[0090] 3、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,精密度常以变异系数来表示。在空白样品中,添加喹乙醇代谢物至终浓度为0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{L}$,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。

[0091] 表2 样本重复性与准确度试验结果

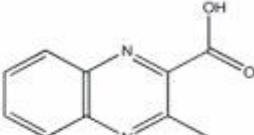
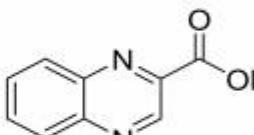
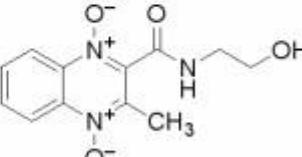
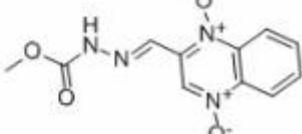
样品	添加量 (ng/g)	平均检测 值 \pm SD (ng/g)	平均回 收率 (%)	批内变 异系数 (%)	批间变 异系数 (%)
鸡肉	0.5	0.45 \pm 0.05	90.44	4.52~5.81	10.93
	1	0.98 \pm 0.03	98.04	2.67~2.83	3.56
	2	2.14 \pm 0.04	107.16	1.45~2.01	1.93

结果表明,鸡肉样品的平均添加回收率在90.4%~107.2%之间,批内变异系数在1.45%~5.81%,批间变异系数1.93%~10.93%之间,符合国家对于试剂盒各项指标的标准。

[0092] 4、交叉反应

抗体的特异性是衡量抗体质量的重要指标。抗体特异性越高则其对目标抗原的识别能力越强,对非目标抗原的交叉反应越小,从而检测出现假阳性的概率也较小。试验选择了喹乙醇代谢物结构类似物及功能类似物进行抗体结合反应。与其他药物的交叉反应率越小,说明喹乙醇代谢物酶联免疫检测试剂盒对喹乙醇代谢物的检测特异性越好。结果见表3。

[0093] 表3 交叉反应结果

药物名称	结构式	IC ₅₀ (nmol/mL)	交叉反应 率 (%)
MQCA		1.44	100.00
QCA		16.63	4.68
喹乙醇		ND	≤0.01
卡巴氧		ND	≤0.01

注:QCA为喹喔啉-2-羧酸;ND代表无法检测到。

[0094] 结果表明,喹乙醇代谢物检测试剂盒与其他药物的交叉反应率低,说明喹乙醇代谢物酶联免疫检测试剂盒对喹乙醇代谢物的检测特异性好。

[0095] 5、试剂盒保存期实验

(1) 将实施例3制备的试剂盒放置于2~8℃,分别取储存了0、2、4、6、8、9、10、11和12个月的试剂盒,对喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0096] (2) 将试剂盒在37℃保存的条件下放置12天,每天对喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0097] (3) 将试剂盒在-20℃冰箱保存12天,每天对喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0098] 结果表明,经过三种条件保存试验,喹乙醇代谢物标准品溶液的吸光度值下降小于10%,各项指标均符合质量要求,因此,试剂盒可以在2~8℃保存12个月。

[0099] 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。

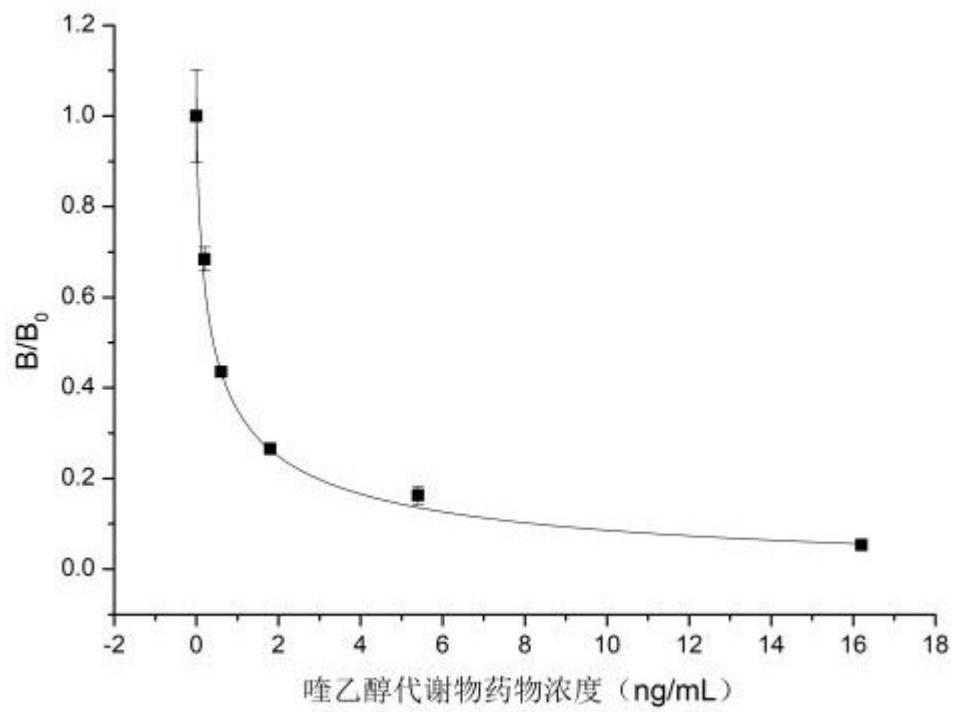


图1

专利名称(译)	一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检测试剂盒与检测方法		
公开(公告)号	CN109180519A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810652749.2	申请日	2018-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学 广东温氏食品集团股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学 广东温氏食品集团股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学 广东温氏食品集团股份有限公司		
[标]发明人	杨金易 沈玉栋 曾道平 谭庶 孙远明 陈丽 韦田		
发明人	杨金易 沈玉栋 曾道平 谭庶 孙远明 陈丽 韦田		
IPC分类号	C07C233/83 C07C231/02 C07K14/77 C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 C07K14/75 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	C07C233/83 C07K14/435 C07K14/75 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/56966		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种喹乙醇代谢物抗原、抗体及酶联免疫检测试剂盒与检测方法。本发明以4-(3-甲基-2-萘酰胺基)丁酸为喹乙醇代谢物半抗原，该半抗原与载体蛋白后偶联可以得到喹乙醇代谢物抗原，所述喹乙醇代谢物抗原可应用于制备喹乙醇代谢物特异性抗体，该特异性抗体又可用于制备检测食品中喹乙醇代谢物残留的酶联免疫试剂盒或者胶体金试纸卡。本发明还公开了相应的试剂盒检测方法。该方法简便、快速，其线性检测范围为0.2~16.2 ng/mL，灵敏度为0.54 ng/mL，检出限为0.32 ng/mL，回收率为80%~109.8%，检出限低、灵敏度高、特异性强、稳定性好，成本低，非常适合大量样品检测及现场快速检测。

