

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510125680.0

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1979169A

[22] 申请日 2005.12.5

[21] 申请号 200510125680.0

[71] 申请人 曹际娟

地址 116021 辽宁省大连市沙河口区永平街
122-1-2-2号

共同申请人 周卫东

[72] 发明人 曹际娟 周卫东

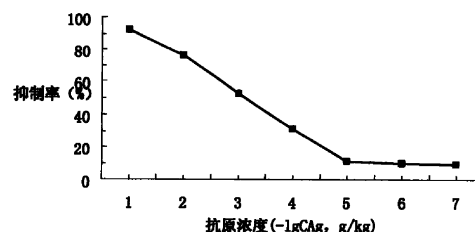
权利要求书1页 说明书17页 附图2页

[54] 发明名称

腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒及其制备和应用

[57] 摘要

本发明涉及腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒，其特征在于它含有：由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板、腹泻性贝类毒素标准抗原液、包被液、封闭液、辣根过氧化物酶标记抗原结合物、底物、反应停止液和洗涤液。其制备主要包括由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板的制备。它应用于样品中腹泻性贝类毒素的检测，具有灵敏度高，特异性好，重复性高和检测准确快速的优点。满足了国际上越来越严格的允许限量标准要求，以及食品安全监控中快速检测的要求。并且减少了检测费用，扩大了监测样本数量，使我国食品中生物毒素危害得到有效控制。并在毒物的快速鉴定、检测，及病人的应急救治方面有着重要作用。



1、腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒，其特征在于它含有：（1）由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板；

（2）腹泻性贝类毒素标准抗原液；

（3）包被液：PH9.6，0.05M 碳酸盐缓冲液；

（4）封闭液：1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液；

（5）辣根过氧化物酶标记抗原结合物；

（6）底物，过氧化尿素和四甲基联苯胺；

（7）反应停止液：2M 硫酸溶液；

和（8）洗涤液：磷酸盐缓冲液。

2、根据权利要求1所述的腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒，其特征在于试剂盒中含有90%的甲醇。

3、腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒的制备，主要包括由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板的制备，其特征在于：

（1）样品抗原的制备：称取贝类样品或中肠腺放进均质器，加5倍90%的甲醇均质1-2min，离心取上清液，用重蒸馏水稀释；

（2）单克隆抗体的制备：以BSA和OVA作为载体，用氯甲酸异丁酯法将半抗原OA与BSA和OVA制成了免疫抗原OA-BSA和OA-OVA。以所获抗原免疫Balb/c小鼠，取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/O融合，培养，筛选克隆，将特异性性的抗OA单克隆细胞株小鼠腹腔注射，收取腹水，采用辛酸-饱和硫酸铵改进方法进行单克隆抗体的纯化；

（3）单克隆抗体包被的酶标板的制作：将所纯化的单克隆抗体用包被液碳酸盐缓冲液稀释至最适浓度包被，加入酶标板，37℃孵育3h，磷酸盐缓冲液洗涤液洗涤酶标板，再用封闭液，1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液37℃封闭2h，洗涤酶标板，甩干，吹干。

4、腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒做为检测样品中的腹泻性贝类毒素的试剂的应用。

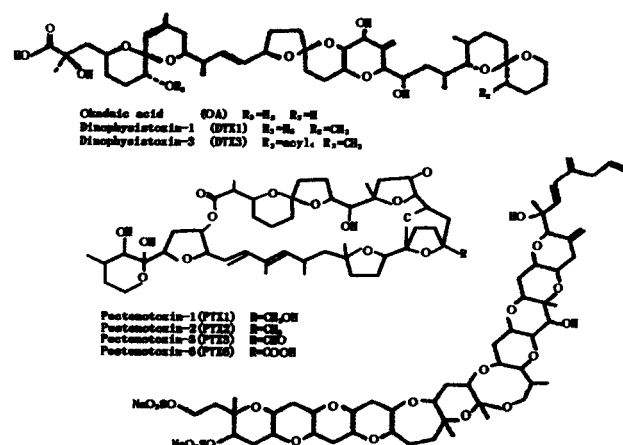
腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒及其制备和应用

技术领域

本发明涉及腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒及其制备和应用，具体的说是涉及一种用竞争酶免疫分析法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)定量检测贝类产品中的腹泻性贝类毒素的试剂盒及其制备和应用。

技术背景

腹泻性贝类毒素(DSP)是双壳贝类在摄取有毒浮游生物鳍藻作为饵料，在中肠腺累积了毒物。DSP的成分有三个组分。第一组为大田软海绵藻(OA)及其衍生物鳍藻毒素-1(DTX₁)和鳍藻毒素-3(DTX₃)；第二组为扇贝毒素-1(PTX₁)、扇贝毒素-2(PTX₂)、扇贝毒素-3(PTX₃)、扇贝毒素-6(PTX₆)；第三组为虾夷扇贝毒素(YTX)及其衍生物45-OH YTX。至今已知的至少有12种成分，其中9种的结构已明确。与腹泻有关的主要是第一组分，另外还发现OA和DTX₁能够抑制，并且有明显的致癌作用。DSP的结构如图1所示。



当人们食用这些被毒化的贝类后，就会发生食物中毒。DSP 的中毒症状以消化系统为主。腹泻（水便样）是必发症状，恶心、腹痛在 60% 以上的患者都有表现，几乎不发烧。70% 以上的患者在进食后 15min 至 4h 以内发病。通常需 3d 才能康复。

目前 DSP 的分析方法主要是针对 OA 和 DTX₁，被普遍接受的主要是 HPLC 技术。最早是 Lee 等 1987 年建立起来的。该方法是用 OA 和 DTX 上的羧基和荧光试剂 ADAM (9-anthryldiazomehtane) 反应，从而对毒素进行标记，以酸化的乙腈水溶液作为流动相，在 C₁₈ 反相柱上进行分离。具体操作步骤是：取中肠腺（1g），加 4mL80%的甲醇均质 2min，离心（3000r/min, 10min），以石油醚提取上清液（两次），醚层以氯仿提取后，蒸发至干，再用 ADAM 荧光标记，过 Sep-pak 柱，以 MeOH 溶解，进行 HPLC 分析，检测柱为 Develosyl, ODS。但由于 ADAM 不稳定，限制了该方法的广泛应用。同时，该方法的背景干扰也很严重，需要对衍生产物进行预处理，以充分除去造成干扰的杂质。为减少杂质干扰，柱切换系统也被尝试用于 DSP 分析，然而由于仪器的复杂性使其难以推广。

现在检测贝类毒素的方法是小鼠活体实验，这种方法的局限性是结果的高变异性和低敏感性（近似值 370ppb, 37ugPSP/100g 样品），这种低灵敏度的方法使欧盟各成员国不得不分别给出了 40ug-80ugPSP/100g 样品这样特别有问题的允许限，此外，从动物保护观点看，这种方法也将引起很大的争议。

发明内容

本发明的目的在于提供一种具有高灵敏度、高特异性和相对较低的交叉反应的商品化的分析快速准确的腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒及其制备和应用。

本发明的目的是这样实现的：

腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒，其特征在于它含有：

- (1) 由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板，
- (2) 腹泻性贝类毒素（DSP）标准抗原液，
- (3) 包被液，PH9.6，0.05M 碳酸盐缓冲液（CBS），

(4) 封闭液, 1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS),

(5) 辣根过氧化物酶标记抗原结合物,

(6) 底物, 过氧化尿素和四甲基联苯胺,

(7) 反应停止液, 2M 硫酸溶液,

和(8) 洗涤液, 磷酸盐缓冲液(PBS)。

其中腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒还可含有 90%甲醇, 用于样品处理。

腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒的制备, 主要包括由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板的制备, 其特征在于:

(1) 样品抗原的制备: 称取样品放进均质器; 加 5 倍 90%的甲醇均质 1—2min; 离心取上清液, 用重蒸馏水稀释;

(2) 单克隆抗体的制备: 以牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)作为载体, 用氯甲酸异丁酯法将半抗原 OA 与 BSA 和 OVA 制成了免疫抗原 OA-BSA 和 OA-OVA。以所获抗原免疫 Balb/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 培养, 筛选克隆; 将特异性的抗 OA 单克隆细胞株小鼠腹腔注射, 收取腹水, 采用辛酸-饱和硫酸铵改进方法进行单克隆抗体的纯化;

(3) 单克隆抗体包被的酶标板的制作: 将所纯化的单克隆抗体用包被液碳酸盐缓冲液稀释至最适浓度包被, 加入酶标板, 37℃孵育 3h, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤液洗涤酶标板, 再用封闭液, 1%BSA 的磷酸盐缓冲液(PBS) 37℃封闭 2h, 洗涤酶标板。甩干, 吹干。

腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒的制备, 其中样品为贝类样品或中肠腺。

腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒做为检测样品中的腹泻性贝类毒素试剂盒的应用

本发明的测定基础是竞争性酶联免疫反应。酶标板包被有针对腹泻性贝类毒素抗体, 当加入游离腹泻性贝类毒素(标准或样品溶液)及腹泻性贝类毒素标准抗原酶标记物, 游离的腹泻性贝类毒素与腹泻性贝类毒素标准抗原酶标记物竞争腹泻性贝类毒素抗体。没

有被结合的标准抗原酶标记物在洗涤步骤中被除去。将酶底物（过氧化尿素和四甲基联苯胺）加入到孔中并且孵育。结合的标准抗原酶标记物将无色的发色剂转化为蓝色的产物。加入反应停止液 2M 硫酸后使颜色由蓝转变为黄色。在 450nm 波长的酶标仪测量微孔溶液的吸光度值，样品中的腹泻性贝类毒素溶液与吸光度值成反比，按绘制的校正曲线定量计算。

本发明与现有技术相比，它以竞争性酶联免疫反应为测定基础，具有灵敏度高，特异性好，重复性高和检测准确快速的优点。满足了国际上越来越严格的允许限量标准要求，以及食品安全监控中快速检测的要求。并且减少了检测费用，扩大了监测样本数量，可以用于定量检测贝类产品中的腹泻性贝类毒素，使我国食品中生物毒素危害得到有效控制。并在毒物的快速鉴定、检测，及病人的应急救治方面有着重要作用。可以强化基层卫生医疗部门的毒物检测手段，完善我国急性中毒救治体系。

附图说明

图 1：纯化 IgG 电泳图。

图 2：抗体亚型 ELISA 曲线图

图 3：不同抗原与 DSP 单克隆抗体反应的曲线图

图 4：推荐曲线图

图 5：样品线性评价曲线

图 6：灵敏度测定曲线

具体实施方式

以下结合实施例进一步说明本发明

实施例 1：样品抗原的制备：

称取 10 克贝类样品放进均质器，加 5 倍 90%的甲醇，均质 2min，取 3000g 离心 10min，取上清液，用重蒸馏水按 1：2 稀释，取 50 μ L 用试剂盒进行分析，此时的稀释倍数是 10。

实施例 2：单克隆抗体的制备及单抗性质检测

1. 将 10 克的大田软海绵酸 (OA) 标准品溶于 300 毫升的吡啶后, 加入一定量的琥珀酸酐, 搅拌至反应完全后, 用酸水洗涤, 抽滤沉淀, 干燥, 得到粗制品。将粗制品加入丙酮溶解, 拌以适量的硅胶, 晾干, 用硅胶柱进行柱层析分离, 用 TLC 监测, 收集 $R_f=0.09$ (展开剂, 石油醚: 丙酮=3: 1) 的点合并, 常温下干燥, 即得大田软海绵酸 (OA) 活化物。

2. 取大田软海绵酸 (OA) 活化物 50mg 溶于 5mL 二氧六环中, 置 4°C 下 10min, 加入三正丁胺 25 μ L, 混匀后再加入 19 μ L 氯甲酸异丁酯, 于 4°C 磁力搅拌 30min, 此为甲液。与此同时, 称取 300mg BSA 溶于 10mL 50% 二氧六环水溶液中 (含 200 μ l 1N NaOH), 此为乙液。乙液在 4°C 溶解预冷, 随后将乙液倾入甲液中, 在 4°C 下搅拌过夜。反应液用 0.85% 的 NaCl 溶液在 4°C 透析 72h, 透析液冷冻干燥, 即得免疫抗原。于 -20°C 保存。

3. 选用 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠 3 只, 体重 18-22 g, 将分装好的 600 μ L (1 mg/mL) 抗原用生理盐水稀释至 1.5 mL。加等体积弗氏完全佐剂, 用注射器在安培瓶中反复抽吸搅拌直至乳化药液在水中呈不溶液滴 (水包油状态)。在小鼠颈部, 背部多点注射进行初次免疫, 每只小鼠 0.5 mL; 间隔 10d 后, 抗原量减半用弗氏不完全佐剂混合, 进行第二次免疫, 再过 10d 后, 进行第三次免疫, 方法同上。10d 后采血测效价, 并再次加强免疫直至效价达到 10^4 。

(1) 准备骨髓瘤细胞: 将骨髓瘤细胞 SP2/0 从液氮中取出, 立即放入 37-40°C 水浴中, 待完全融化后, 1,000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀细胞用 5% DMEM 完全培养液悬浮, 移入细胞培养瓶, 置 37°C, CO₂ 浓度为 5% 的二氧化碳培养箱中培养, 次日换液。(2) 免疫脾细胞的获取: 将免疫 Balb/c 小鼠, 摘除眼球放血, 收集免疫个体的血液制备阳性血清。在无菌条件下, 取出脾脏, 置于不锈钢网上, 用不完全培养液洗涤 2 次, 并剥去周围的结缔组织, 用玻璃注射器柄轻轻碾压, 收集钢网下的脾细胞于 50mL 离心管, 离心后取悬液, 加台盼兰染液做活细胞计数。(3) 饲养细胞准备: 将幼龄

Balb/c 小鼠摘除眼球放血，并分离血清供阴性对照用。拉颈脱臼处死小鼠，在无菌条件下，剥离胸骨两侧白色的胸腺置于钢网上，加 IMDM 培养基，用玻璃注射器柄轻碾，吸取液体反复洗二次，然后 1,000 rpm 离心 5 min，弃去上清液，计数后将细胞稀释到所需浓度。（4）细胞融合① 将骨髓瘤细胞和脾细胞悬液以 1:10 的比例混合，1,000 rpm 离心 5 min，弃去上清液，在台面上轻轻敲打试管底部，使沉淀细胞均匀松散成糊状。② 吸取 0.8 mL (50%) PEG，加入到上述细胞中，1 min 内加完，静止 90 s。③ 加 IMDM 25 mL 于上述试管中，轻吹混匀。300 rpm 离心 3 min。④ 离心后的细胞加 1 mL IMDM，3 mL 胸腺细胞，1 mL HAT 溶液，10 mL 胎牛血清，轻摇，混匀。⑤ 加入 25 mL 甲基纤维素半固体培养基，边加入边轻摇搅拌混匀。⑥ 吸取 1.5-2.0 mL 上述混合液于小培养皿中，在细胞培养箱中培养，并观察记录。

4. 混合细胞在半固体培养基中生长 10 d 左右，在显微镜下观察，有成团生长的活细胞，肉眼观察呈灰白色，此即为杂交瘤细胞群落。在解剖镜下，用 200 μ L 移液枪将其吸出。放在已铺好饲养细胞的 96 孔培养板中，同时加 200 μ L HT 培养基，常规培养。

5. 待 96 孔培养板中细胞长满至 2/3 时，用间接 ELISA 法测定其阳性（步骤同阳性血清检测）。并将阳性细胞依次扩增到 24 酶标板、6 酶标板和培养瓶中，每次扩增均测定其阳性。选择能稳定分泌抗体的细胞株，一部分液氮冻存，一部分注入动物体内诱导产生大量抗体。

6. 选用 20-24 g 雌性 Balb/c 小鼠 10 只，每只腹腔注射石蜡油 0.5 mL；2 周后，将培养的杂交瘤细胞从培养瓶中吹打下来，1,000 rpm 离心 5 min，弃去上清液，加生理盐水将沉淀细胞混匀，并调节细胞至 5×10^6 个/mL，每只小鼠注射 0.5 mL。1 周后观察小鼠腹部的肿大情况，待有明显膨大时，收取腹水，5,000 rpm 离心 10 min，收集上清液，分装，即得单克隆抗体粗品。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

7. 取单克隆抗体粗品 2,500 rpm 离心 15 min。将 1 mL 上清液缓慢加入到 4 mL 醋酸缓冲溶液 (0.06 mol/L, pH 4.8) 中。将预

先已与少量醋酸缓冲液混合的辛酸滴加到上述混合液中，边加边轻柔搅拌，使辛酸最终浓度为 33 μ L/mL，加完后继续搅拌 30 min。12,000 rpm 室温离心 30 min，取上清液，弃去沉淀。将上清液与 0.1 mol/L 的 PBS 按 10:1 比例混合，然后用浓氨水调节至 pH 7.2-7.4。4 $^{\circ}$ C 下滴加饱和硫酸铵至终浓度为 45%，继续搅拌 30min，4 $^{\circ}$ C 静置 2 h。取 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min，弃去上清液，保留沉淀。沉淀用少量 PBS 溶液溶解，PBS 溶液 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。收集透析液，测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值，分装，即为改进辛酸-饱和硫酸铵法纯化的单克隆抗体。保存于-20 $^{\circ}$ C。

实施例 3：单克隆抗体分子量的确定（见图 1）

在 Bio-Rad 电泳槽中，灌入 12%分离胶，并加入微量水，使凝胶凝固后边缘呈水平状态。滤纸吸除水分，灌入电极缓冲液，恒流（I=12mA）电泳 10 min。吸出电极缓冲液后，槽中灌入 3%浓缩胶。胶凝后，每个样品孔加入 10 μ l 纯化后的单克隆抗体和标准蛋白样品。样品在浓缩胶中恒流（I=20mA）浓缩 20min，然后在分离胶中分离 2.5 h。分离完毕后，分离胶经固定、染色、脱色和干胶（分子克隆试验指南第二版，1999）。SDS-PAGE 不连续电泳中，每种蛋白质的相对迁移率 Mr（蛋白质从原点迁移的距离与原点 to 参考点距离的比值）与标准蛋白质分子量有如下关系 $\lg MW = -K \times Mr + b$ ，通过工作曲线求得单抗的相对分子量 166,900 道尔顿，其中重链为 56,500 道尔顿，轻链为 27,200 道尔顿。

实施例 4：单克隆抗体类及亚类测定

将 2 μ g/mL 的重链特异性羊抗鼠亚型抗体 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA 和 IgM 以每孔 100 μ L 包被酶标板，每孔加入 100 μ L 系列稀释的单克隆抗体与之进行免疫反应，酶标二抗免疫反应后，加入底物过氧化尿素和四甲基联苯胺显色，最后 450 nm 波长下比色测定，根据吸光度值与抗体稀释度的关系确定抗体的亚型。以单克隆

抗体不同稀释倍数的对数值为横坐标，以 OD_{450} 值为纵坐标作图（见图 2）。结果表明 G6 细胞系分泌的单克隆抗体为 IgG_1 亚型。

实施例 5：单克隆抗体亲和常数的确定

按照间接 ELISA 法，将抗原稀释成 8 个梯度（每孔分别为 8、6、4、2、1、0.5、0.2、0.1 μ g）包被酶标板，将已知浓度的抗体进行不同梯度稀释，测定相应的 OD_{450} 值。以 OD_{450} 值为纵坐标，抗体不同稀释倍数的对数值为横坐标，绘制不同浓度的抗原反应曲线。以曲线上部趋于平坦段的 OD_{450} 为 $OD_{450-100}$ 查出 OD_{450-50} 处相应的抗体浓度值，根据公式 $K_{aff} = (n-1)/2[n(Ab')_t - (Ab)_t]$ 其中 $n = (Ag)_t / (Ag')_t$ （其中 $(Ag)_t$ 、 $(Ag')_t$ 分别为包被的抗原浓度， $(Ab')_t$ 、 $(Ab)_t$ 为对应抗体浓度）计算单克隆抗体与抗原的亲和常数 K_{aff} 为 2.1×10^6 。以阳性 OD_{450} 值在 1.0 左右，同时与阴性孔的 OD_{450} 值差距（P/N, positive/negative）最大的抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。抗原的最佳包被浓度为 2 μ g/mL，抗体的最佳稀释倍数为 1000。

表 2：棋盘法确定抗体亲和常数及抗原抗体使用浓度

抗原浓度 (μ g/mL) Concentration of Ag (μ g/mL)	抗体稀释倍数 Dilutions of monoclonal antibody (Times)				
	200 (25)	1000 (5)	5000 (1)	10000 (0.5)	50000 (0.1)
80	1.586	0.953	0.186	0.099	0.083
60	1.556	0.910	0.171	0.085	0.090
40	1.551	0.952	0.187	0.109	0.068
20	1.502	1.048	0.184	0.114	0.058
10	1.541	1.046	0.224	0.125	0.078
5	1.583	1.203	0.208	0.121	0.068
2	1.561	1.242	0.196	0.169	0.078
1	1.559	1.094	0.245	0.161	0.112

实施例 6：单克隆抗体的交叉反应（见图 3）

将 DSP 和牛血清白蛋白 (BSA) 作为抗原包被酶标板, 将单克隆抗体不同梯度稀释作为一抗, 用已建立的间接 ELISA 法测定抗体的特异性 (以 OD_{450} 值大于等于其阴性值的 2 倍判定为阳性)。DSP 抗体检测其它抗原时表现为阴性 (OD_{450} 指大于或等于阴性对照 2 倍, 即判为阳性), 说明该抗体与其它抗原几乎不存在交叉反应。

实施例 7: 单克隆抗体包被的酶标板的制作:

将所纯化的单克隆抗体用包被液碳酸盐缓冲液按体积比稀释 1000 倍包被, 加入酶标板, 37°C 孵育 3h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤液洗涤酶标板, 再用封闭液, 1%BSA 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 37°C 封闭 2 h, 洗涤酶标板。甩干, 吹干。

实施例 8: 制备腹泻性贝类毒素竞争酶联免疫定量检测试剂盒

- (1) 样品抗原的制备: 同实施例 1。
- (2) 单克隆抗体的制备: 同实施例 2。
- (3) 单克隆抗体包被的酶标板的制作: 同实施例 7。
- (4) 试剂的配制:

腹泻性贝类毒素 (DSP) 标准抗原液 1, 10ppb; 腹泻性贝类毒素 (DSP) 标准抗原液 2, 100ppb。准确加入 5mL 45%的甲醇到标准 1 和标准 2 (市售) 中, 盖上瓶盖用手剧烈振荡, 这时标准 1 的浓度是 10 ppb, 标准 2 的浓度是 100ppb。

包被液, PH9.6, 0.05M 碳酸盐缓冲液 (CBS) (市售);

封闭液, 1%BSA 的磷酸盐缓冲液 (PBS) (市售);

辣根过氧化物酶标记抗原结合物 (市售), 按体积比稀释 100 倍;

底物过氧化尿素和四甲基联苯胺 (市售), 按体积比 1: 100 混合;

反应停止液, 2M 硫酸溶液 (市售);

洗涤液磷酸盐缓冲液 (PBS) (市售)。

实施例 9：应用腹泻性贝类毒素竞争酶联免疫定量检测试剂盒检测样品中的腹泻性贝类毒素的方法检测

(1) 样品处理：称取 2g 中肠腺放进均质器；加 5 倍 90%的甲醇，均质 1min；3000g 离心 10min；取上清液，用重蒸馏水按 1:2 稀释；取 50mL 用试剂盒进行分析，此时的稀释倍数是 10；

(2) 包被抗原：用包被液 CBS (pH9.6, 0.05 mol/L) 将单克隆抗体 800 倍稀释，每孔 100 μ L 加入酶标板，37 $^{\circ}$ C 孵育 3h，用洗涤液洗涤 3 次，拍干；

(3) 封闭：每孔加 200 μ L 封闭液 (1% BSA, PBS 稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h，洗涤 3 次，拍干；

(4) 加样：

①待测样品：每孔加入样品 50 μ L，稀释后的酶标抗原 50 μ L；

②标准曲线：分别加入 10ppb 和 100ppb 的标准抗原 50 μ L，两孔再加稀释后的酶标抗原 50 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育反应 0.5h。孵育完成后，用洗涤液洗涤 5 次，每次 3min，拍干；

(5) 加底物过氧化尿素和发色剂四甲基联苯胺混合液 50 μ L，室温放置 10 min；

(6) 终止反应：加 2mol/L 硫酸溶液 50 μ L，终止反应；

(7) 读数：在 450nm 波长下用酶标仪测定 OD 值；

(8) 结果计算：①计算每个标准样，待测样和参照样的 OD₄₅₀ 值；②以每个标准样品的平均吸光度的 lg 值为 X 轴，以抑制率为 Y 轴作图，此图为线性图，其中，抑制率 = (参照 OD₄₅₀ - 待测 OD₄₅₀ 或标准样 OD₄₅₀) \times 100 / 参照孔 OD₄₅₀；③利用标准曲线计算出待检测样品中的抗原量。

1. 精密度试验：用变异系数表示。结果显示，该试剂盒检测样品的板内和板间变异系数分别为 3.6% 和 4.8% (表 3 和表 4)。批内和批间变异系数分别为 5.4% 和 11.6% (表 5 和表 6)。根据多次试验结果，本研究给出推荐标准曲线 (见图 4)。 $Y=77.65-22.78X$ ($R^2=-0.92$, $P=0.002$)。

表 3: 板内变异系数的测定 (mg/g)

样本	平行孔 Replicate wells								均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV%
	1	2	3	4	5	6	7	8			
1	2.71	2.87	2.73	3.09	3.18	3.18	2.79	3.20	2.97	0.215	7.2
2	3.18	3.22	3.13	3.46	3.46	3.06	3.39	3.20	3.27	0.154	4.7
3	4.21	4.36	4.27	3.97	4.20	3.94	4.12	4.36	4.19	0.160	3.8
4	5.88	5.96	6.08	6.22	6.17	6.22	6.04	5.87	6.06	0.143	2.4
5	14.07	14.48	14.38	14.08	14.59	14.19	14.81	14.38	14.37	0.257	1.8
6	7.78	7.84	7.90	7.78	8.12	8.12	7.84	7.67	7.88	0.162	2.1
总的变异系数 CV%: 3.4											

表 4: 板间变异系数的测定 (mg/g)

样本	酶标板 Plates								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NO. 4	0.509	0.491	0.517	0.479	0.537	0.471	0.503	0.540	0.525
NO. 4	0.511	0.487	0.497	0.480	0.541	0.471	0.507	0.546	0.525
NO. 4	0.517	0.479	0.493	0.471	0.547	0.479	0.509	0.541	0.514
Mean	0.512	0.486	0.502	0.477	0.542	0.474	0.506	0.542	0.521
平均值 Mean: 0.507 标准差 SD: 0.025 变异系数 CV: 5.0%									
NO. 5	2.68	2.90	2.73	2.98	2.55	2.73	2.53	2.59	2.56
NO. 5	2.70	2.89	2.72	2.72	2.60	2.76	2.72	2.68	2.72
NO. 5	2.73	2.94	2.74	2.56	2.52	2.72	2.52	2.27	2.48
Mean	2.70	2.91	2.73	2.75	2.55	2.74	2.59	2.51	2.59
平均值 Mean: 2.68 标准差 SD: 0.126 变异系数 CV: 4.7%									
总的板间变异系数 CV%: 4.8									

表 5: 批内变异系数的测定 (mg/g)

	平行样本 Replicate Sample			
	1	2	3	4
	3.17	2.23	2.34	2.84
	3.03	2.60	2.08	2.58
	3.14	2.37	2.19	2.69
	3.06	2.56	2.56	2.72
	3.12	2.35	2.10	2.60
	2.98	2.56	2.36	2.86
	3.08	2.52	2.64	2.89
	2.94	2.26	2.24	2.74
	2.94	2.26	2.24	2.74
平均 Mean	3.06	2.43	2.31	2.74
标准差 SD	0.079	0.146	0.204	0.116
变异系数 CV%	2.6	6	8.8	4.3
总变异系数 CV%: 5.4				
平均值 Mean: 2.68 标准差 SD: 0.126 变异系数 CV: 4.7%				
总的板间变异系数 CV%: 4.8				

表 6: 批间变异系数的测定 (mg/g)

测定批次 Replication of assay	样本					
	扇贝	牡蛎	蛤	贻贝 025	贻贝 032	处理 2
1	15.13	21.57	0.48	0.28	0.21	0.16
2	15.17	17.88	0.42	0.33	0.26	0.12
3	17.44	20.91	0.54	0.33	0.24	0.12
4	17.72	18.02	0.43	0.31	0.20	0.15
5	15.64	20.79	0.53	0.33	0.20	.014
6	15.12	17.71	0.53	0.33	0.19	0.11

7	15.387	17.72	0.56	0.38	0.20	0.15
8	18.90	19.32	0.37	0.26	0.26	0.13
9	15.28	17.07	0.40	0.36	0.21	0.12
10	16.03	16.44	0.44	0.28	0.22	0.11
平均 Mean	16.23	18.74	0.47	0.32	0.21	0.13
标准差 SD	1.325	1.786	0.067	0.037	0.026	0.018
变异系数 CV%	8.20	9.50	14.2	11.6	12.2	13.8
总变异系数 CV%: 11.6						

2. 线性评定

用线性测定（健全性测定）对开发的试剂盒的准确性进行检测，结果表明（表 7），该试剂盒检测样品线性关系良好（见图 5）
 $Y=89.13-19.69X$ ($R^2=0.966$, $P<0.01$)

表 7: 不同稀释梯度样品测定的 OD₄₅₀ 值和抑制率

项目 Item	参照 Control	样品稀释倍数 Dilutions of soybean sample(Times)					
		10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
lg 值 lg Value	0.845	5	4	3	2	1	0
OD ₄₅₀ 值 D ₄₅₀ value		0.868	0.772	0.627	0.542	0.249	0.099
抑制率 Inhibition rate (%)		-2.94	9.14	27.30	37.95	74.64	93.43

3. 灵敏度试验

由检测的标准曲线（图 6）可以看出，在抑制率 10—80% 的范围内，线性关系良好，即检测范围为 10—100 μg/kg。试剂盒对 DSP 的最低检测水平为 10 μg/kg。

4. 回收实验

应用试剂盒对添加不同剂量 DSP 的样品进行检测，本实验采用经气相色谱未检出 DSP 的样品中分别添加不同浓度 DSP 标准溶液，依次为 0.05mg/kg，0.28mg/kg，0.93mg/kg，所用样品有扇贝、牡蛎、蛤及贻贝，经检测后确定回收率。表 8 结果显示回收率如下：牡蛎样品平均回收率 95%，蛤样品平均回收率 92%，贻贝样品平均回收率 95%，扇贝样品平均回收率 92%。

表 8：回收率的测定

样品编号	添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ELISA 测定 值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收 率%	平均 回收率%
牡蛎样品	1.00	1.04	104	95
牡蛎样品	5.60	4.98	89	
牡蛎样品	18.60	17.30	93	
杂色蛤样品	1.00	0.89	89	92
杂色蛤样品	5.60	4.82	86	
杂色蛤样品	18.60	18.97	102	
贻贝样品	1.00	0.93	93	95
贻贝样品	5.60	5.10	91	
贻贝样品	18.60	18.97	102	
扇贝样品	1.00	0.86	87	92
扇贝样品	5.60	5.04	94	
扇贝样品	18.60	17.11	96	

实施例 10：腹泻性贝类毒素竞争酶联免疫定量检测试剂盒的应用

1 试剂：

(1) 同实施例 8

2 其他辅助材料和试剂：

甲醇：样品处理用（本试剂盒不提供）

酶标仪(450nm) 定量分析用

离心机

均质器

磁搅拌器

刻度移液管

50 μ L, 100 μ L, 500 μ L 微量加样器

3 样品处理：

称取 2 克贝类样品放进均质器；加 5 倍 90%的甲醇，均质 2min；3000g 离心 10min；取上清液，用重蒸馏水按 1：2 稀释（1+1）；取 50 μ L 用试剂盒进行分析，此时的稀释倍数是 10；

4 测定程序（在 20-25 $^{\circ}$ C 条件下操作）：

（1）将 6 个孔条插入酶标板架，标准及样品做平行，并记录标准及样品的位置。

（2）加入 50 μ L 的标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头。

（3）加入 50 μ L 稀释的辣根过氧化物酶标记抗原结合物到微孔底部，充分混合。

（4）22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 黑暗避光处孵育 10min。

（5）倒出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去微孔中的液体。用洗瓶或多通道移液器将 250 μ L 洗涤液加入孔中。再次倒出孔中的液体，完全除去孔中的液体，再重复操作洗涤步骤四次。

（6）加入 50 μ L 发色剂至每个微孔中，轻拍混匀，22 $^{\circ}$ C—25 $^{\circ}$ C 黑暗避光处孵育 6min。

（7）加入 50 μ L 反应停止液到微孔中，（注意此操作步骤要快，如果实验所用孔数量多，请用多通道移液器加液。）迅速混匀后在 450nm 处测量吸光度值，以空气为空白调零，必须在加入停止液后 10 min 内读取吸光度值。

结果：

计算百分比吸光度值：

计算腹泻性贝类毒素标准液和样液的平均吸光度值，按公式分别求得每个腹泻性贝类毒素标准液和样液的百分比吸光度值：

$$\% \text{ 吸光度值} = \frac{\text{标准(或样品)的吸光度值}}{\text{0标准的吸光度值}} \times 100\%$$

绘制校正曲线：

以百分比吸光度值（算术级）为纵坐标，以腹泻性贝类毒素溶液（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）（对数级）为横坐标，绘制出腹泻性贝类毒素标准液百分比吸光度值与腹泻性贝类毒素溶液的校正曲线。每次试验均应重新绘制校正曲线。

结果的计算：

任何腹泻性贝类毒素含量值大于 $0.2\mu\text{g}/100\text{g}$ 的样品即被认为是有害的，对人类食用不安全。

在绘制的校正曲线上读取样液百分比吸光度值所对应的腹泻性贝类毒素浓度即为试样中腹泻性贝类毒素的含量（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）。

当测定值 $< 0.2\mu\text{g}/100\text{g}$ 时，腹泻性贝类毒素为阴性；当测定值 $\geq 0.2\mu\text{g}/100\text{g}$ 时，腹泻性贝类毒素为阳性。

请注意：为了获得样品中的腹泻性贝类毒素的实际浓度（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ），从校正曲线上读出的浓度值必须乘以相对应的稀释系数。

检出限：

检测范围为 $10-100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。检测下限为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

回收率：

添加回收实验：约 90%。

5 完成实验的关键注意点：

(1) 按要求将所有试剂回升至室温 $22-25^\circ\text{C}$ ，测量实验台面的温度为 $22-25^\circ\text{C}$ 。

(2) 将锡箔袋回至室温后，沿横向边压封线外侧剪开，取出需用数量的酶标板及框架，将不用的酶标板立即放回原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封，保存于 2-8℃。

(3) 如果用移液器洗酶标板时，移液器管尖千万不要进入酶标板孔中，不要接触到放进孔中的液体，避免污染洗涤液造成洗板不彻底。

(4) 实验完毕后，如果容器再次使用，请认真洗净容器，不要造成容器的交叉污染，特别是不要将盛装过标准溶液的容器与其它容器同时洗涤（最好丢弃）。

(5) 所有吸头应该一次性使用，要使用高品质的吸头。

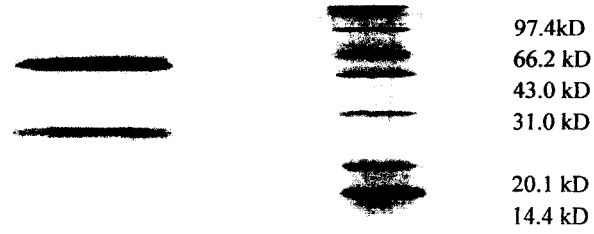


图 1

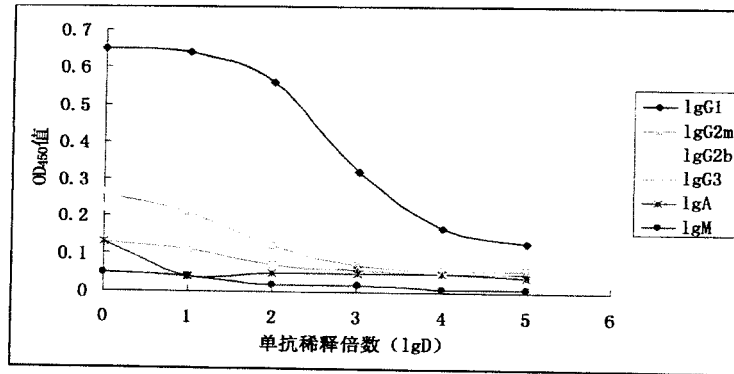


图 2

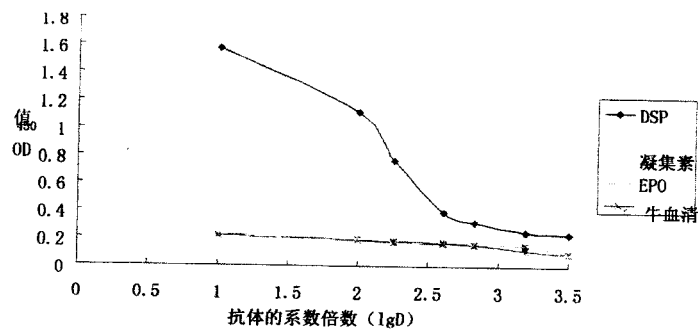


图 3

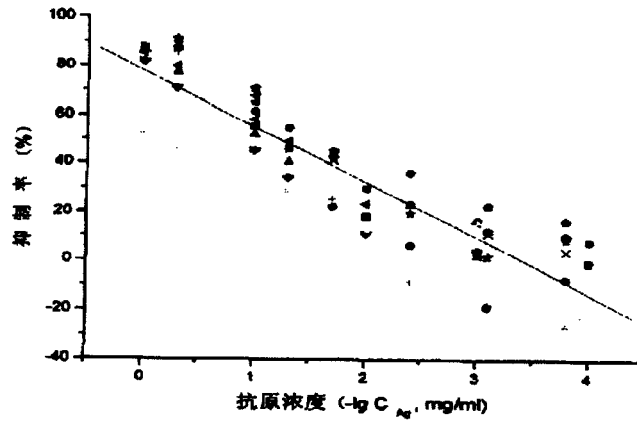


图 4

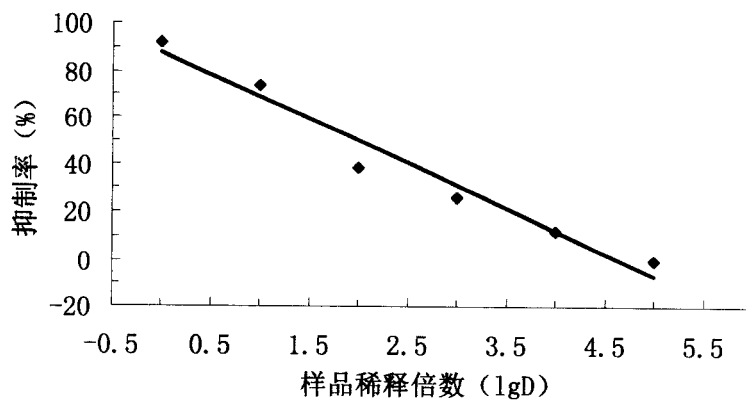


图 5

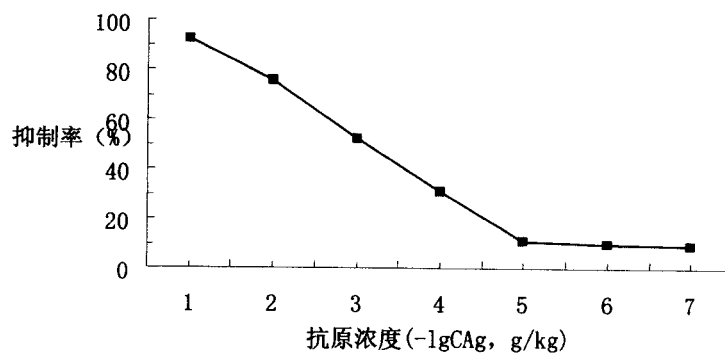


图 6

专利名称(译)	腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒及其制备和应用		
公开(公告)号	CN1979169A	公开(公告)日	2007-06-13
申请号	CN200510125680.0	申请日	2005-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	曹际娟 周卫东		
申请(专利权)人(译)	曹际娟 周卫东		
当前申请(专利权)人(译)	曹际娟 周卫东		
[标]发明人	曹际娟 周卫东		
发明人	曹际娟 周卫东		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及腹泻性贝毒竞争酶联免疫定量检测试剂盒，其特征在于它含有：由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板、腹泻性贝类毒素标准抗原液、包被液、封闭液、辣根过氧化物酶标记抗原结合物、底物、反应停止液和洗涤液。其制备主要包括由腹泻性贝类毒素单克隆抗体包被的酶标板的制备。它应用于样品中腹泻性贝类毒素的检测，具有灵敏度高，特异性好，重复性高和检测准确快速的优点。满足了国际上越来越严格的允许限量标准要求，以及食品安全监控中快速检测的要求。并且减少了检测费用，扩大了监测样本数量，使我国食品中生物毒素危害得到有效控制。并在毒物的快速鉴定、检测，及病人的应急救治方面有着重要作用。

