



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105759040 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(21)申请号 201511015733.3

(22)申请日 2015.12.31

(71)申请人 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司

地址 550009 贵州省贵阳市小河区小孟工业园标准厂房二期1#楼1-2楼

(72)发明人 陆苇 谢体波 汪善良 李平
刘红 王大敏 冯才伟 何方洋

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有氯霉素抗体的酶标板、氯霉素抗体、氯霉素标准品溶液、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物液、终止液和复溶液。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于快速检测动物源性食品中氯霉素的残留,具有检测快速、灵敏、特异性好、准确度高、检测成本低等特点,能够满足现场快速定性、定量检测的要求。

1.一种用于检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒,由包被了氯霉素抗体的酶标板、氯霉素抗体、氯霉素标准品溶液、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物液、终止液和复溶液组成,其中所述氯霉素抗体是通过所述氯霉素抗原制备获得,所述氯霉素抗原是通过将氯霉素分子结构中的羟基与琥珀酸酐反应,得到具有氯霉素官能团的半抗原,再与载体蛋白偶联获得,载体蛋白可为牛血清蛋白,卵清蛋白,血蓝蛋白,人血白蛋白,甲状腺蛋白。

2.如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述氯霉素标准品溶液浓度为0ug/L, 0.025ug/L,0.075ug/L,0.3ug/L,1.2ug/L,4.8 ug/L。

检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测领域,具体地说,涉及一种检测食品中氯霉素类药物残留的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 氯霉素(Chloramphenicol,CAP)是一种高效广谱抗生素,能够抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,广泛应用于各类家禽、家畜、水产品生产过程中的传染性疾病预防,但氯霉素有严重的毒副作用,在食品中的残留会对人体健康构成潜在危害,引起人的骨髓造血机能紊乱,造成再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症及新生儿、早产儿灰色综合症等疾病,美国和欧盟已禁止在动物中使用氯霉素,并规定在动物源食品中不得检出。我国农业部公告第235号文件也规定,氯霉素及其盐、酯(包括琥珀氯霉素)在所有食品动物的所有可食组织中不得检出。目前,我国食品中氯霉素残留仍很严重,出口的水产品、蜂蜜屡屡被检出氯霉素残留,严重影响我国农产品出口贸易。

[0003] 目前检测氯霉素的最常用方法主要是气相色谱、液相色谱及色谱-质谱法,这些方法具有灵敏度高、结果准确、重复性好、假阳性少等优点,但样品前处理过程复杂,仪器昂贵,需要专业检测技术人员,已难以满足实际检测的要求。微生物法检测氯霉素易操作、费用低,但灵敏度低、特异性差。寻找一种灵敏度较高、特异性强、样品处理简单、分析时间短的方法势在必行,免疫学测定方法,适合现场监控和大量样本的筛查,是一种简便易行的检验方法。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒,该检测试剂盒能最大限度地减少操作误差和工作强度。

[0005] 本发明所提供的试剂盒包括包被有氯霉素抗体的酶标板、氯霉素标准品、氯霉素高浓度标准品、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物液A液、底物液B液、终止液和浓缩复溶液。

[0006] 所述氯霉素抗体是由氯霉素半抗原-载体蛋白偶联物,免疫小鼠得到,所述氯霉素半抗原与琥珀酸酐反应,制得半抗原,半抗原直接与载体蛋白进行偶联,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试剂盒的方法,其包括步骤:

- 1)将氯霉素与琥珀酸酐反应,制备氯霉素半抗原;
- 2)将氯霉素半抗原与载体蛋白偶联,制备氯霉素半抗原-载体蛋白偶联物;
- 3)用氯霉素半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌氯霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株;
- 4)提取小鼠IgG或兔IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗体;
- 5)将氯霉素特异性抗体包被在酶标板孔上;

6)试剂盒组装;

7)利用试剂盒检测样品中氯霉素的残留;

本发明的另一个目的是提供一种应用上述试剂盒检测食品中氯霉素残留的方法,它包括步骤:

(1)样品处理;

(2)用试剂盒进行检测;

(3)检测结果分析。

[0008] 本发明的试剂盒原理:采用竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被氯霉素抗体,样品中残留的氯霉素和氯霉素酶结合竞争酶标板微孔条上的氯霉素抗体,用TMB底物显色,样本吸光度值与其所含残留物氯霉素的含量呈负相关,与标准曲线比较,再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样本中氯霉素的残留量。

[0009] 本发明的试剂盒采用高特异性的氯霉素单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性;在检测过程中,能够使微孔上的氯霉素抗体与待检样品液充分接触,充分反映,从而减少误差,增加整个体系的反应灵敏度,具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。其中,用本发明试剂盒检测样品中氯霉素残留的方法,简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0010] 图1 氯霉素半抗原合成路线。

[0011] 图2 氯霉素半抗原合成鉴定结果。

[0012] 图3 氯霉素试剂盒标准曲线。

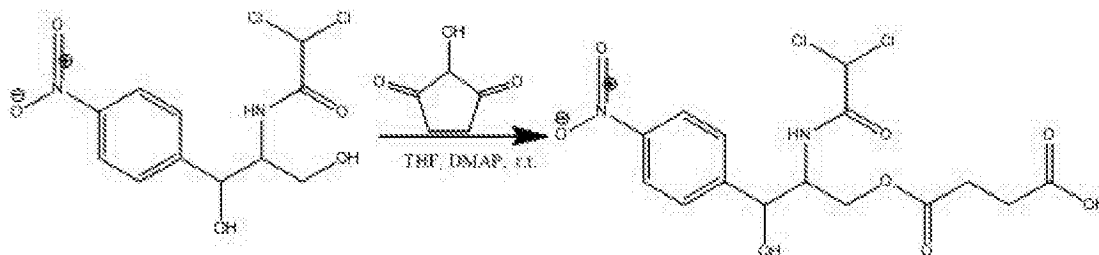
具体实施方式

[0013] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0014] 实施例1 试剂盒组分的制备

1、氯霉素半抗原的制备及鉴定

称取0.42g-3g氯霉素溶于经干燥后的二氯甲烷中,通氮气保护,加入0.12-0.8琥珀酸酐常温搅拌溶解,加入0.1-1g DMAP固体进行催化反应,用TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应,硅胶柱净化,浓缩得产物。经核磁共振氢谱进行结构分析,半抗原合成成功。



[0015] 2、抗原的制备

免疫原制备——氯霉素半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0016] 称取26mg半抗原溶解于4mL DMF溶液中,加入各60mg EDC和60mgNHS(溶于2mL水中)进行活化30分钟,加入到110-264mg载体蛋白BSA(溶于5mL含30%DMF水溶液中)进行偶联制备出免疫原,用0.02mol/L PB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,透析完成后用于动物免疫制备出抗体。分装,于-20℃保存备用。

[0017] 免疫原制备——氯霉素半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原。

[0018] 称取26.5mg半抗原溶解于2mL DMF溶液中,加入各60mg EDC和NHS(溶于2mL水中)进行活化30分钟,加入到110-264mg载体蛋白OVA(溶于5mL水中)进行偶联制备出免疫原,用0.02mol/L PB缓冲液透析3天,每天早晚更换透析液,以除去未反应的小分子物质;透析完成后用于动物免疫制备出抗体。分装,于-20℃保存备用。

[0019] 3、氯霉素单克隆抗体的制备

动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0020] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1(数量配比)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。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌氯霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0021] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/ml的细胞悬液,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。

[0022] 单克隆抗体的生产与纯化:将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只,7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃保存。

[0023] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0024] 5、酶标二抗的制备

将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。改良后的反应体系中酶与抗体的摩尔浓度比为2.0-2.5:1。

[0025] 6、酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成20μg/ml,每孔加入100μl,37℃避光孵育2h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤1次,停留30s,拍干,然后在每孔中加入150μl封闭液,37℃避光孵育2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0026] 实施例2 检测氯霉素的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测氯霉素的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1)包被氯霉素偶联抗原的酶标板;
- (2)氯霉素标准品溶液6瓶,浓度分别为0μg/L、0.025μg/L、0.075μg/L、0.3μg/L、1.2μg/L、4.8μg/L;
- (3)氯霉素单克隆抗体工作液;
- (4)用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (5)底物显色液由底物显色液A液和底物显色液B液组成,底物显色液A液为过氧化脲,底物显色液B液为四甲基联苯胺;

(6)终止液为1mol/L硫酸;

(7)洗涤液为pH值7.2-7.5,含有1.0%-1.5%吐温-20、0.03%-0.05%叠氮化钠防腐剂、0.1-0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0027] (8)复溶液为pH值为7.0、0.02mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0028] 实施例3 组织 样品中氯霉素残留的检测

样品前处理

1. 组织(鸡肉/肝、猪肉/肝、虾、鱼等)样本前处理方法

(1)用均质器均质组织样本;

(2)称取 3.0 ± 0.05 g 均质物至50ml 聚苯乙烯离心管中,加入6ml 乙酸乙酯,用振荡器振荡5min,3000g 以上, 20-25℃离心5min;

(3)移取4ml 上层有机相至10ml 洁净干燥玻璃试管中,于50-60℃水浴氮气流下吹干;

(4)加入1ml 正己烷,用涡旋仪涡动2min,再加入1ml复溶工作液,用涡旋仪涡动30s, 3000g以上, 20-25℃离心5min;

(5)除去上层有机相,取下层50ul用于分析。

[0029] 2. 溶液的配制

0.1M CB: 称取4.66g 无水碳酸钠、0.5g 碳酸氢钠加入500ml 去离子水溶解混匀。

[0030] 复溶液的配制:用去离子水将浓缩复溶液按1:1体积比进行稀释,用于样本的复溶,复溶工作液在4℃环境可保存一个月。

[0031] 3. 试剂盒检测操作步骤:

(1)将所需试剂从冷藏环境中取出,按照上述方法进行回温,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0032] (2)取出需要数量的微孔板,将不用的微孔板放回铝箔袋重新真空密封,保存于2-8℃环境中。

[0033] (3)浓缩复溶液和尿样稀释液在使用前也需按上述方法回温。

[0034] 4. 编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做2孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0035] 5. 酶结合物工作液配制:根据需要量将酶结合物浓缩液用酶结合物稀释液按1:10 体积进行稀释。

[0036] 6. 加标准品/样本和酶结合物工作液:加标准品/样本50ul到对应的微孔中,然后加入酶结合物工作液50ul/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。

[0037] 7、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入去离子水250ul/孔,充分洗涤4-5 次,每次间隔10s,泼掉板孔内液体,用吸水纸拍干。

[0038] 8、显色:加入底物液A液50ul/孔,再加入底物液B液50ul/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境反应20min。

[0039] 9、测定:加入终止液50ul/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪双波长450/630nm检测,请在5min内读完数据,测定每孔OD值。若无酶标仪,则不加终止液用目测法可进行判定。

[0040] 4、检测结果分析

标准品或样本的平均吸光度值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的平均吸光度值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以氯霉素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中氯霉素的实际浓度。

$$\text{百分吸光率}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0041] B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B₀—0ppb标准溶液的平均吸光度值

实施例4 熟食 样品中氯霉素残留的检测

样品前处理

1. 熟食样本前处理方法

- (1)用均质器均质组织样本;
- (2)称取 $3.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质物至50ml 聚苯乙烯离心管中,加入3ml 去离子水,再加入6ml 乙酸乙酯,用振荡器振荡10min,3000g以上, 20-25℃离心10min;
- (3)移取4ml 上层有机相至10ml 洁净干燥玻璃试管中,于50-60℃水浴氮气流下吹干;
- (4)加入1ml 正己烷,用涡旋仪涡动1min,再加入1ml复溶工作液,用涡旋仪涡动15s, 3000g以上, 20-25℃离心5min;
- (5)除去上层有机相,取下层50u1用于分析。

[0042] 2. 溶液的配制

0.1M CB: 称取4.66g 无水碳酸钠、0.5g 碳酸氢钠加入500ml 去离子水溶解混匀。

[0043] 复溶液的配制:用去离子水将浓缩复溶液按1:1体积比进行稀释,用于样本的复溶,复溶工作液在4℃环境可保存一个月。

[0044] 3. 试剂盒检测操作步骤:

(1)将所需试剂从冷藏环境中取出,按照上述方法进行回温,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0045] (2)取出需要数量的微孔板,将不用的微孔板放回铝箔袋重新真空密封,保存于2-8℃环境中。

[0046] (3)浓缩复溶液和尿样稀释液在使用前也需按上述方法回温。

[0047] 4. 编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做2孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0048] 5. 酶结合物工作液配制:根据需要量将酶结合物浓缩液用酶结合物稀释液按1:10 体积进行稀释。

[0049] 6. 加标准品/样本和酶结合物工作液:加标准品/样本50u1到对应的微孔中,然后加入酶结合物工作液50u1/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。

[0050] 7、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入去离子水250u1/孔,充分洗涤4-5 次,每次间隔10s,泼掉板孔内液体,用吸水纸拍干。

[0051] 8、显色:加入底物液A液50u1/孔,再加入底物液B液50u1/孔,轻轻振荡混匀,用盖

板膜盖板后置25℃避光环境反应20min。

[0052] 9、测定：加入终止液50u1/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪双波长450/630nm检测，请在5min内读完数据，测定每孔OD值。若无酶标仪，则不加终止液用目测法可进行判定。

[0053] 4、检测结果分析

标准品或样本的平均吸光度值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的平均吸光度值，再乘以100%，得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标，以氯霉素标准品浓度(μg/L)的对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中氯霉素的实际浓度。

$$\text{百分吸光率}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0054] B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B0—0ppb标准溶液的平均吸光度值

实施例5 组织 样品中氯霉素残留的检测

样品前处理

1. 蜂王浆样本前处理方法

- (1)称取1.0±0.05g 蜂王浆至50ml 聚苯乙烯离心管中；
- (2)加入1ml 0.1M CB,8ml 乙酸乙酯，再加入2g 无水碳酸钠；
- (3)用振荡器振荡5min,3000g以上,20-25℃离心5min；
- (4)移取2ml 上层有机相至10ml 洁净干燥玻璃试管中，于50-60℃水浴氮气流下吹干；
- (5)加入1ml 正己烷，涡动1min，再加入1ml 复溶工作液，用涡旋仪涡动15s,3000g 以上，20-25℃离心5min；
- (6)除去上层有机相，取下层50u1用于分析。

[0055] 2. 溶液的配制

0.1M CB:称取4.66g 无水碳酸钠、0.5g 碳酸氢钠加入500ml 去离子水溶解混匀。

[0056] 复溶液的配制：用去离子水将浓缩复溶液按1:1体积比进行稀释，用于样本的复溶，复溶工作液在4℃环境可保存一个月。

[0057] 3. 试剂盒检测操作步骤：

(1)将所需试剂从冷藏环境中取出，按照上述方法进行回温，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0058] (2)取出需要数量的微孔板，将不用的微孔板放回铝箔袋重新真空密封，保存于2-8℃环境中。

[0059] (3)浓缩复溶液和尿样稀释液在使用前也需按上述方法回温。

[0060] 4. 编号：将样本和标准品对应微孔按序编号，每个样本和标准品做2孔平行，并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0061] 5. 酶结合物工作液配制：根据需要量将酶结合物浓缩液用酶结合物稀释液按1:10 体积进行稀释。

[0062] 6. 加标准品/样本和酶结合物工作液：加标准品/样本50u1到对应的微孔中，然后加入酶结合物工作液50u1/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应

30min。

[0063] 7、洗板：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，加入去离子水250ul/孔，充分洗涤4—5次，每次间隔10s，泼掉板孔内液体，用吸水纸拍干。

[0064] 8、显色：加入底物液A液50ul/孔，再加入底物液B液50ul/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境反应20min。

[0065] 9、测定：加入终止液50ul/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪双波长450/630nm检测，请在5min内读完数据，测定每孔OD值。若无酶标仪，则不加终止液用目测法可进行判定。

[0066] 4、检测结果分析

标准品或样本的平均吸光度值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的平均吸光度值，再乘以100%，得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标，以氯霉素标准品浓度(μg/L)的对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中氯霉素的实际浓度。

$$\text{百分吸光率}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0067] B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B0—0ppb标准溶液的平均吸光度值

实施例6 饲料 样品中氯霉素残留的检测

1. 饲料样本前处理方法

- (1)称取1.0±0.05g饲料至50ml聚苯乙烯离心管中；
- (2)加入10ml乙酸乙酯用振荡器振荡5min,3000g以上,20-25℃离心5min；
- (3)移取2ml 上层有机相至10ml 洁净干燥玻璃试管中,于50-60℃氮气流下吹干；
- (4)加入1ml 正己烷,用涡旋仪涡动1min,再加入1ml复溶工作液,用涡旋仪涡动15s,3000g以上,20-25℃离心5min；
- (5)除去上层有机相,取下层50ul用于分析。

[0068] 2. 溶液的配制

0.1M CB: 称取4.66g 无水碳酸钠、0.5g 碳酸氢钠加入500ml 去离子水溶解混匀。

[0069] 复溶液的配制：用去离子水将浓缩复溶液按1:1体积比进行稀释，用于样本的复溶，复溶工作液在4℃环境可保存一个月。

[0070] 3. 试剂盒检测操作步骤：

(1)将所需试剂从冷藏环境中取出，按照上述方法进行回温，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0071] (2)取出需要数量的微孔板，将不用的微孔板放回铝箔袋重新真空密封，保存于2-8℃环境中。

[0072] (3)浓缩复溶液和尿样稀释液在使用前也需按上述方法回温。

[0073] 4. 编号：将样本和标准品对应微孔按序编号，每个样本和标准品做2孔平行，并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0074] 5. 酶结合物工作液配制：根据需要量将酶结合物浓缩液用酶结合物稀释液按1:10 体积进行稀释。

[0075] 6. 加标准品/样本和酶结合物工作液:加标准品/样本50u1到对应的微孔中,然后加入酶结合物工作液50u1/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。

[0076] 7、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入去离子水250u1/孔,充分洗涤4—5次,每次间隔10s,泼掉板孔内液体,用吸水纸拍干。

[0077] 8、显色:加入底物液A液50u1/孔,再加入底物液B液50u1/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境反应20min。

[0078] 9、测定:加入终止液50u1/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪双波长450/630nm检测,请在5min内读完数据,测定每孔OD值。若无酶标仪,则不加终止液用目测法可进行判定。

[0079] 4、检测结果分析

标准品或样本的平均吸光度值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的平均吸光度值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以氯霉素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中氯霉素的实际浓度。

$$\text{百分吸光率}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0080] B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B0—0ppb标准溶液的平均吸光度值

实施例7 鸡蛋 样品中氯霉素残留的检测

鸡蛋样本前处理方法

- (1)用均质器低速均质样本,使蛋清和蛋黄充分混合;
- (2)称取 $1.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质后的鸡蛋样本至50ml 聚苯乙烯离心管中;
- (3)加入8ml 乙酸乙酯,再加入1ml 0.1M CB,用振荡器振荡5min,3000g 以上, 20-25℃离心5min;
- (4)移取4ml 上层有机相至10ml 洁净干燥玻璃试管中,于50-60℃水浴氮气流下吹干;
- (5)加入1ml 正己烷,用涡旋仪涡动1min,再加入1ml复溶工作液,用涡旋仪涡动15s, 3000g以上, 20-25℃离心5min;
- (6)除去上层有机相,取下层50ml用于分析。

[0081] 2. 溶液的配制

0.1M CB:称取4.66g 无水碳酸钠、0.5g 碳酸氢钠加入500ml 去离子水溶解混匀。

[0082] 复溶液的配制:用去离子水将浓缩复溶液按1:1体积比进行稀释,用于样本的复溶,复溶工作液在4℃环境可保存一个月。

[0083] 3. 试剂盒检测操作步骤:

(1)将所需试剂从冷藏环境中取出,按照上述方法进行回温,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0084] (2)取出需要数量的微孔板,将不用的微孔板放回铝箔袋重新真空密封,保存于2-8℃环境中。

[0085] (3)浓缩复溶液和尿样稀释液在使用前也需按上述方法回温。

[0086] 4. 编号:将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做2孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。

[0087] 5. 酶结合物工作液配制:根据需要量将酶结合物浓缩液用酶结合物稀释液按1:10 体积进行稀释。

[0088] 6. 加标准品/样本和酶结合物工作液:加标准品/样本50u1到对应的微孔中,然后加入酶结合物工作液50u1/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。

[0089] 7、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入去离子水250u1/孔,充分洗涤4—5 次,每次间隔10s,泼掉板孔内液体,用吸水纸拍干。

[0090] 8、显色:加入底物液A液50u1/孔,再加入底物液B液50u1/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境反应20min。

[0091] 9、测定:加入终止液50u1/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪双波长450/630nm检测,请在5min内读完数据,测定每孔OD值。若无酶标仪,则不加终止液用目测法可进行判定。

[0092] 4、检测结果分析

标准品或样本的平均吸光度值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的平均吸光度值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以氯霉素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中氯霉素的实际浓度。

$$\text{百分吸光率}(\%) = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0093] B—标准品或样本溶液的平均吸光度值

B0—0ppb标准溶液的平均吸光度值

实施例8 氯霉素技术参数的确定试验

1、试剂盒灵敏度和检测限

按照常规方法测定试剂盒灵敏度,试剂盒标准曲线最低点为0.025 $\mu\text{g/L}$,标准曲线的范围为0.025—4.8 $\mu\text{g/L}$,1C₅₀(50%抑制浓度)浮动范围为0.3—1.2 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果得该方法对组织的检测限为0.0125 $\mu\text{g/kg}$,熟食的检测限为0.0125 $\mu\text{g/kg}$,蜂王浆的检测限为0.25 $\mu\text{g/kg}$,饲料的检测限为0.0125 $\mu\text{g/kg}$,鸡蛋的检测限为0.05 $\mu\text{g/kg}$,灵敏度为0.025 $\mu\text{g/kg}$ 。

[0094] 2、样本精密度和准确度试验

以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)= 实际测定值/理论值 $\times$ 100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差RSD%=SD/X $\times$ 100%,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0095] 按0.1 $\mu\text{g/g}$ 、0.3 $\mu\text{g/g}$ 、0.6 $\mu\text{g/g}$ 三个浓度氯霉素分别对鸡肉组织、熟食、鸡蛋样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0096]

$$\text{百分吸收率 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

表1 鸡肉组织精密度及准确度试验

氯霉素	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 ($n=4$) %	批内 RSD ($n=4$) %	批间 RSD ($n=3$) %
鸡肉组织	0.1	90.7	7.5	8.6
	0.3	94.2	5.6	7.0
	0.6	97.5	8.4	9.3

表2 熟食精密度及准确度试验

氯霉素	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 ($n=4$) %	批内 RSD ($n=4$) %	批间 RSD ($n=3$) %
熟食	0.1	88.1	4.9	5.5
	0.3	99.6	6.4	7.2
	0.6	94.7	5.6	6.9

表3 鸡蛋精密度及准确度试验

氯霉素	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 ($n=4$) %	批内 RSD ($n=4$) %	批间 RSD ($n=3$) %
鸡蛋	0.1	89.8	5.6	6.9
	0.3	96.5	6.9	7.6
	0.6	100.3	7.2	8.4

以0.1、0.3、0.6 $\mu\text{g/g}$ 三个浓度的氯霉素分别对组织、熟食和鸡蛋样品进行添加,平均回收率在88.1%~100.3%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0097] 3、试剂盒稳定性试验

试剂盒保存条件为2~8℃,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、氯霉素添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8℃至少保存12个月以上。

[0098] 4、试剂盒交叉反应率

表4 氯霉素与其他抗生素交叉反应率对比

物 质	交叉反应率
氯霉素	100%
氯霉素-葡萄糖苷酸	86.3%
棕榈氯霉素	<0.1%
甲矾氯霉素	<0.1%
氟甲矾霉素	<0.1%
己酰氯霉素	<0.1%

从上述数据中,可以发现,本发明检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒特异性良好。

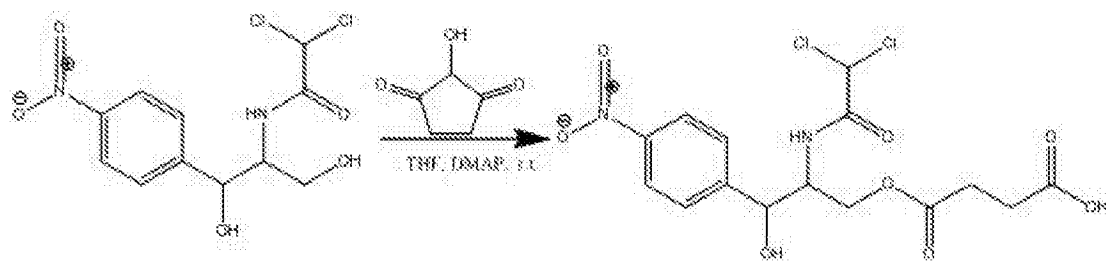


图1

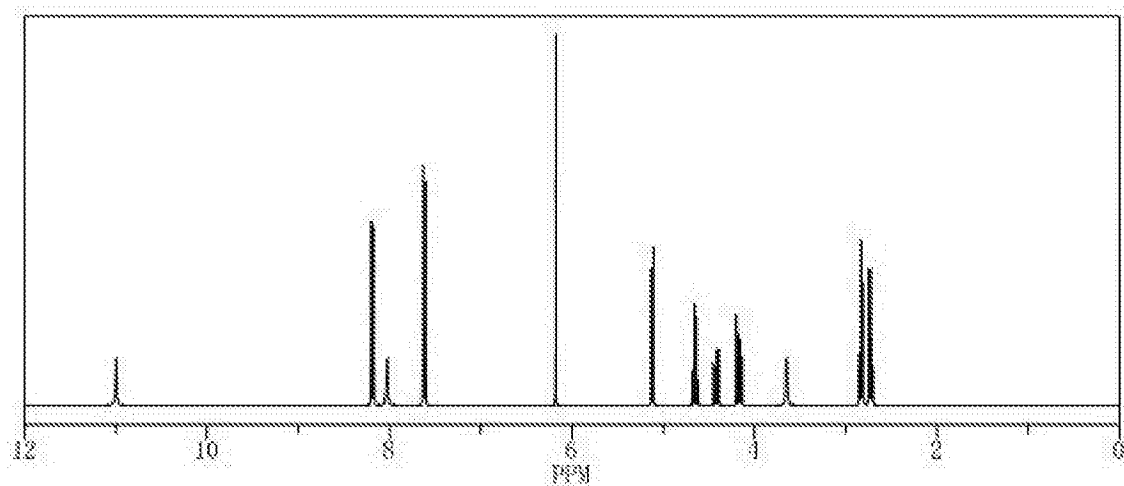


图2

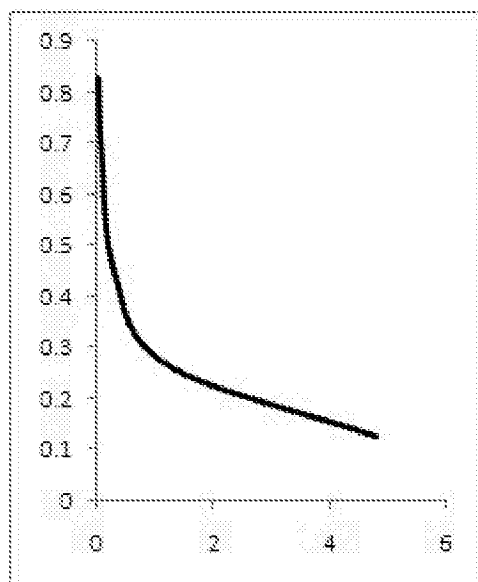


图3

专利名称(译)	检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN105759040A	公开(公告)日	2016-07-13
申请号	CN201511015733.3	申请日	2015-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贵州勤邦食品安全科学技术有限公司		
[标]发明人	陆苇 谢体波 汪善良 李平 刘红 王大敏 冯才伟 何方洋		
发明人	陆苇 谢体波 汪善良 李平 刘红 王大敏 冯才伟 何方洋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测氯霉素残留的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有氯霉素抗体的酶标板、氯霉素抗体、氯霉素标准品溶液、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物液、终止液和复溶液。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于快速检测动物源性食品中氯霉素的残留，具有检测快速、灵敏、特异性好、准确度高、检测成本低等特点，能够满足现场快速定性、定量检测的要求。

