

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810117523.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 24 日

[11] 公开号 CN 101329339A

[22] 申请日 2008.7.31

[21] 申请号 200810117523.9

[71] 申请人 邹志飞

地址 102206 北京市昌平回龙观镇国际信息
产业基地高新四街 8 号

共同申请人 万宇平 高东微 余厚美 陈文锐
冯才伟 李丹宁 马孝斌

[72] 发明人 邹志飞 万宇平 高东微 余厚美
陈文锐 冯才伟 李丹宁 马孝斌

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任凤华

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种检测牛免疫球蛋白 G 的方法及其专用酶
联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测牛免疫球蛋白 G 的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明试剂盒包括牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和牛免疫球蛋白 GFc 片段的特异性抗体；所述特异性抗体为所述牛免疫球蛋白 GFc 片段的克隆抗体或单克隆抗体。本发明酶联免疫试剂盒主要采用了工作液形式，其使用方便，稳定性好，成本低廉。利用发明试剂盒检测保健食品中牛免疫球蛋白(牛 IgG)含量的方法，具有操作简单、灵敏度、精确度高、准确度高的特点，可用于多种样本的检测，尤其适合于现场查验及对大量样本的筛查。

1、一种检测牛免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒，包括牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和牛免疫球蛋白 G Fc 片段的特异性抗体；所述特异性抗体为所述牛免疫球蛋白 G Fc 片段的多克隆抗体或单克隆抗体。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和牛免疫球蛋白 G Fc 片段的特异性抗体以下述任一种形式存在：

1) 所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段进行酶标记后作为酶标记物。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括抗抗体；所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；

所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和抗抗体以下述任一种形式存在：

1) 所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段为包被原，所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述抗抗体为包被原，所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段进行酶标记后作为酶标记物。

4、根据权利要求 1、2 或 3 所述的试剂盒，其特征在于：所述单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 2436 的牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4 分泌产生的抗体。

5、根据权利要求 1-4 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括牛免疫球蛋白 G 标准品溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液；所述终止液为 1-2mol/L 的硫酸、盐酸溶液或氢氧化钠溶液；所述浓缩洗涤液为含有 0.8-1.2%吐温-20、0.02-0.05%叠氮化钠防腐剂、pH 为 6.5-7.4 的 0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液为含有 0.05-0.2 %的牛血清白蛋白和 pH 值为 5.3-6.0、0.05-0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

6、根据权利要求 1-5 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶；当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成，显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液；当标记

酶为碱性磷酸酯酶时，显色剂为硝基磷酸盐缓冲液，终止液为1-2mol/L氢氧化钠溶液。

7、根据权利要求5或6中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述终止液为2mol/L盐酸；所述浓缩洗涤液为含有1.0%吐温-20、0.05%叠氮化钠防腐剂、pH值为7.4的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液；所述浓缩复溶液为含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为5.6的0.05mol/L磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

8、根据权利要求1-7中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述抗抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到酶标抗抗体；所述过碘酸钠方法中，所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为2:1。

9、一种检测牛免疫球蛋白G的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

将样品溶于氯化钠溶液中，混匀得到溶液I；用权利要求5-7中任一所述浓缩复溶液稀释所述溶液I，取稀释液进行分析；

2) 利用权利要求1-8中任一所述的酶联免疫试剂盒检测1)中所述稀释液。

10、由保藏号为CGMCC No. 2436的牛IgG高效单克隆杂交瘤细胞株C-1-4分泌产生的牛免疫球蛋白G的单克隆抗体，或保藏号为CGMCC No. 2436的牛IgG高效单克隆杂交瘤细胞株C-1-4。

一种检测牛免疫球蛋白 G 的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测牛免疫球蛋白 G 的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

牛初乳是指乳牛产犊后 3 天内所分泌的乳汁，是母牛为了供给牛犊在新生环境下，可以抗外来病毒及细菌而合成的，它富含在体内自然合成的天然抗体。牛初乳中除了含有丰富的优质蛋白质、维生素和矿物质等营养成分外，还富含免疫蛋白球（主要为 IgG）、生长因子等活性功能组分，能攻击侵入人体的致病原，抑制病菌繁殖，是一种能增强人体免疫力、促进组织生长的健康功能性食品。

目前多种功能性食品中都添加牛初乳以增强免疫力，但是市面上的产品混杂，很难辨别其中是否含有牛初乳及其中的牛初乳真正含量是多少。因此，一种能够检测保健食品中牛初乳含量的方法显得特别重要。目前多是通过检测其中的牛免疫球蛋白 G (IgG) 含量高低来确定食品中是否含有真正的牛初乳的。国内外主要采用琼脂双向或单向免疫扩散法，此外还有免疫电泳法、高压液相色谱法等等。由于上述方法所用技术难以系统化和标准化、仪器设备复杂和操作繁琐等因素，不适合现场查验和大量样本筛查。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种检测牛免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测牛免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒，包括牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和牛免疫球蛋白 G Fc 片段的特异性抗体；所述特异性抗体为所述牛免疫球蛋白 G Fc 片段的多克隆抗体或单克隆抗体。

其中，所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和牛免疫球蛋白 G Fc 片段的特异性抗体可以以下述任一种形式存在：

1) 所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段为包被原，所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物；

2) 所述特异性抗体为包被原，所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段进行酶标记后作为酶标记物。

所述试剂盒还可以包括抗抗体；所述抗抗体可以为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗

体;

所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段和抗抗体可以以下述任一种形式存在:

1) 所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段为包被原, 所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

2) 所述抗抗体为包被原, 所述牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段进行酶标记后作为酶标记物。

其中, 所述单克隆抗体具体是由保藏号为 CGMCC No. 2436 的牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4 分泌产生的抗体。

所述牛 IgG 多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

所述试剂盒还可包括牛免疫球蛋白 G 标准品溶液、显色液、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液; 所述终止液为 1-2mol/L 的硫酸、盐酸溶液或氢氧化钠溶液; 所述浓缩洗涤液为含有 0.8-1.2%吐温-20、0.02-0.05%叠氮化钠防腐剂、pH 为 6.5-7.4 的 0.1-0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液; 所述浓缩复溶液为含有 0.05-0.2 % 的牛血清白蛋白和 pH 值为 5.3-6.0、0.05-0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

所述酶标记中所用的标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶; 当标记酶为辣根过氧化物酶时, 所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成, 显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲, 显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺, 终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液; 当标记酶为碱性磷酸酯酶时, 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液, 终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

所述浓缩洗涤液为含有 1.0%吐温-20、0.05%叠氮化钠防腐剂、pH 值为 7.4 的 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液; 所述浓缩复溶液为含有 0.1%牛血清白蛋白、pH 值为 5.6 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

所述抗抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到酶标抗抗体; 所述过碘酸钠方法中, 所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2: 1。

酶标记牛 IgG 抗原是将牛 IgG 的 Fc 片段与标记酶采用戊二醛法或过碘酸钠法偶联得到的; 酶标记特异性抗体是将牛 IgG 特异性抗体与标记酶通过戊二醛法或过碘酸钠法偶联得到。

本发明的另一个目的是提供一种检测牛免疫球蛋白 G 的方法

本发明所提供的检测牛免疫球蛋白 G 的方法，包括以下步骤：

1) 样品前处理

将样品溶于氯化钠溶液中，混匀得到溶液 I；用上述任一种浓缩复溶液稀释所述溶液 I，取稀释液进行分析；

2) 利用上述任一酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述稀释液。

由保藏号为 CGMCC No. 2436 的牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4 分泌产生的牛免疫球蛋白 G 的单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

保藏号为 CGMCC No. 2436 的牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4 也属于本发明的保护范围。

本发明酶联免疫试剂盒主要采用了工作液形式，其使用方便，稳定性好，成本低廉。利用发明试剂盒检测保健食品中牛免疫球蛋白 G（牛 IgG）含量的方法，具有操作简单、灵敏度、精确度高、准确度高的特点，可用于多种样本的检测，尤其适合于现场查验及对大量样本的筛查。

附图说明

图 1 为牛 IgG 的 Fc 片段为包被原、酶标抗抗体为酶标记物的试剂盒的标准曲线图。

图 2 为纯化的牛 IgG 的 Fc 片段的电泳图。

具体实施方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法。

实施例 1、以牛 IgG 单价抗原（牛 IgG 的 Fc 片段）为包被原的试剂盒的组成及其制备与应用

一、以牛 IgG 单价抗原为包被原的试剂盒的检测原理如下：

本发明的检测原理为：当在酶标板微孔条上预先包被牛 IgG 单价抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入牛 IgG 特异性抗体溶液。样本中的牛 IgG 或牛 IgG 标准品与酶标板上包被的牛 IgG 竞争牛 IgG 特异性抗体，加入酶标记抗抗体进行放大作用，用显色液显色，样本吸光值与样本中牛 IgG 的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中牛 IgG 的含量。同时也可根据酶标板上颜色的深浅，通过与系列浓度牛 IgG 标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中牛 IgG 的浓度范围。

二、以牛 IgG 单价抗原为包被原的试剂盒的组成

(一) 以牛IgG单价抗原为包被原的试剂盒的一般组成如下:

(1) 包被牛IgG的Fc片段的酶标板;

(2) 酶标记物: 酶标抗抗体工作液, 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体, 或者碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体均可以;

(3) 牛IgG特异性抗体工作液: 可以为牛IgG单克隆抗体工作液或多克隆抗体工作液; 抗体稀释液为含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为5.6的0.05mol/L磷酸盐缓冲液。

(4) 牛IgG标准品溶液6瓶(Sigma化学公司, 货号I5506), 浓度分别为0 μ g/L, 0.2g/L, 0.8g/L, 3.2g/L, 12. μ g/L, 5.12 μ g/L;

(5) 底物显色液: 当标记酶为辣根过氧化物酶时, 所述显色液由显色液A液和显色液B液组成, 显色液A液为过氧化氢或过氧化脲, 显色液B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺, 终止液为1~2mol/L硫酸或盐酸溶液; 当标记酶为碱性磷酸酯酶时, 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液(4-硝基酚磷酸盐缓冲液), 终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

(6) 终止液为1~2mol/L硫酸或盐酸溶液; 或1~2mol/L氢氧化钠溶液。

(7) 浓缩洗涤液为含有0.8-1.2%吐温-20、0.02-0.05%叠氮化钠防腐剂、pH为6.5-7.4的0.1-0.2mol/L的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

(8) 浓缩复溶液为含有0.05-0.2%的牛血清白蛋白和pH值为5.3-6.0、0.05-0.1mol/L的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

(二)、以牛IgG单价抗原(牛IgG的Fc片段)为包被原的试剂盒的具体举例:

1、试剂盒的组成如下:

(1) 包被牛IgG单价抗原(牛IgG的Fc片段)的酶标板;

(2) 酶标抗抗体工作液: 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

(3) 牛IgG单克隆抗体工作液: 单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 2436的牛IgG高效单克隆杂交瘤细胞株C-1-4分泌产生。抗体稀释液为含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为5.6的0.05mol/L磷酸盐缓冲液。

(4) 牛IgG标准品(Sigma化学公司, 货号I5506)溶液6瓶, 浓度分别为0 μ g/L, 0.2g/L, 0.8g/L, 3.2g/L, 12. μ g/L, 5.12 μ g/L;

(5) 底物显色液由A液和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2mol/L盐酸;

(7) 浓缩洗涤液为含有1.0%吐温-20、0.05%叠氮化钠防腐剂、pH值为 7.4的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

(8) 浓缩复溶液为含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为5.6的0.05mol/L磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

三、试剂盒中相关组分的制备:

1、包被有包被原牛IgG单价抗原(牛IgG的Fc片段)的酶标板的制备:

(1) 牛免疫球蛋白G(IgG)单价抗原(牛IgG的Fc片段)的制备

a、将木瓜蛋白酶按照2mg/mL的浓度溶解于含有0.05M半胱氨酸、0.01M、pH值为7.4的PBS溶液中, 37°C温育30min;

b、将牛IgG按照5mg/mL的浓度溶于0.01M、pH值为7.4的PBS溶液中, 然后加所配制的木瓜蛋白酶溶液使酶和牛IgG质量比为1:20, 37°C温育4h进行酶切反应;

c、向步骤(2)的反应溶液中加入固体碘乙酰胺, 使其最终浓度为0.03M, 中止反应;

d、将步骤(3)的混合溶液进行4°C透析过夜, 所用的透析溶液为0.2M、pH值为8.0的PBS溶液;

e、将透析反应液用经0.2M、pH值为8.0的PBS溶液平衡过的蛋白G柱(HiTrap rProtein G HP, 通用电气医疗集团生命科学部, 货号17-0404-01)进行层析纯化, 除去Fab片段, 再用100mM、pH值为6.0的柠檬酸盐洗脱柱子, 得到Fc段和未反应的牛IgG混合液;

f、将混合液用经0.02M、pH值为8.0的PBS溶液平衡过的SEC凝胶过滤柱(Bio-Silect SEC凝胶过滤HPLC柱, Bio-Rad公司, 货号125-0476)(size exclusion chromatography)进行层析分离, 收集分子量为50KDa的Fc片段;

g、用10%的SDS-PAGE鉴定最终产物Fc片段的纯度。结果如图2所示(泳道1表示Marker, 泳道2表示点30 μ l样品的结果, 泳道3为点15 μ l样品的结果), 纯化产物的分子量为50Kda, 表明纯化得到的产物为目的Fc片段。

(2) 酶标板的制备

用包被缓冲液将包被原稀释成0.05~0.1 μ g/mL, 每孔加入100 μ L, 37°C温育2h或4°C过夜, 倾去包被液, 用稀释20倍的浓缩洗涤液洗涤2次, 每次30秒, 拍

干，然后向每孔中加入 150~200 μ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1~2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

2、牛免疫球蛋白 G (IgG) 的单克隆抗体的制备

a. 动物免疫

以步骤 1 中制得的牛免疫球蛋白 G (IgG) 单价抗原为免疫原。将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内，免疫剂量为 100 μ g/只，使其产生多克隆抗体。

b. 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

小鼠血清测定结果较高后，取其脾细胞，按 5: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争 ELISA 方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到能稳定分泌牛免疫球蛋白 G (IgG) 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。将该细胞株命名为牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4，该细胞株已于 2008 年 04 月 03 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编 100101），保藏编号为 CGMCC No. 2436。

c. 细胞冻存和复苏

将牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4 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 $^{\circ}$ C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

d. 单克隆抗体的制备与纯化

将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.4mL/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞株 C-1-4 5×10^5 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化，纯化后的腹水放入 -20 $^{\circ}$ C 环境保存。

3、多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以牛 IgG 单价抗原为免疫原，免疫剂量为 1.8mg/kg，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

4、抗抗体的制备及酶标记：

(1)、抗抗体制备：

羊抗鼠抗抗体的制备过程：以山羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体；

羊抗兔抗抗体的制备：以山羊作为免疫动物，以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗兔抗抗体。

(2)、辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

将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。

传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1；由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点，这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁，降低了酶标记物的酶活性，使制备的偶联物中混有许多聚合物。

本发明利用改良的过碘酸钠法进行了抗体的酶标，其省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。降低了辣根过氧化物酶：抗抗体的摩尔浓度比率至 2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶的活性的损失减少。

四、以牛 IgG 单价抗原为包被原的试剂盒的应用

1、样品前处理：

称取需检测的匀质样本（如牛乳、牛乳粉、牛奶片等含牛免疫球蛋白的保健食品）0.02g 溶于 20mL 5%的（质量百分含量）氯化钠溶液中，用涡旋仪涡动 2min 混匀样品溶液（样品的终浓度为 1mg/mL）；将上述溶液按照 1：19 体积比用浓缩复溶液进行稀释（20 μ L 样本溶液+380 μ L 复溶液），用涡旋仪涡动 2min 混匀样品稀释液，取 40 μ L 稀释液用于分析。

2、用试剂盒检测

向酶标板的各孔中加入稀释 20 倍的洗涤液，250 μ L/孔，洗涤 2min，拍干；再向酶标板各孔中加入标准品或样本溶液 40 μ L，加入抗体工作液 60 μ L，轻轻振荡摇匀，盖上盖板膜置 37 $^{\circ}$ C 避光环境反应 10min；小心揭开盖板膜，直接加入酶标抗抗体工作液 50 μ L/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 37 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30min；取板倒出孔内液体，每孔加入 150 μ L 稀释 20 倍的洗涤液，30s 后倒出孔内液体，如此重复操作共洗板 4-5 次，用吸水纸拍干；每孔加入底物液 A 液 50 μ L，再加入底物液 B 液 50 μ L，轻轻振荡摇匀，盖上盖板膜置 37 $^{\circ}$ C 避光环境显色 15 min；每孔加入

终止液 50 μ L，轻轻振荡摇匀，设酶标仪波长于 450nm 处，在 5min 内读取检测数据，测定每孔吸光度值（OD 值）。

3、检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值（B）除以第一个标准品溶液（0标准）的吸光度值（B₀）再乘以100，得到百分吸光度值。

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

公式中B为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值，B₀为0 μ g/L标准品溶液的平均吸光度值。

以牛IgG标准品浓度（ μ g/L）值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图（图1）。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品的浓度，则可从标准曲线上读出样本中牛IgG的量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需1小时可以完成。

五、试剂盒精密度、灵敏度、准确度和保存期试验

（一）标准品精密度试验：

取步骤二中（二）所述试剂盒进行实验，分别从三个不同时间段制备的不同批次（01批、02批、03批）的试剂盒中各抽取10个试剂盒，从每个试剂盒的酶标板中各抽出20个微孔，测定3.2 μ g/L标准溶液的吸光度值（OD值），计算变异系数。结果如表1所示，表明每批试剂盒各测定10次标准品变异系数均在3.6-16.8%之间，符合精密度小于或等于20%的规定。

表1、标准品可重复性试验结果

酶标板编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CV%	01批	6.8	12.6	13.9	15.6	14.3	9.5	10.6	7.3	3.6	5.8
	02批	16.8	13.2	8.5	7.4	5.1	8.8	9.4	13.5	14.6	15.9
	03批	16.3	10.3	9.2	13.3	14.4	5.6	10.2	9.5	8.5	5.6

（二）样本精密度和准确度试验：

1、样本精密度试验：

向不含牛IgG的阴性牛乳粉和阴性牛奶片样本中添加牛IgG标准品，使牛IgG在样本中的终浓度为20%（200mg/g），按照步骤四中方法进行样品前处理。取步骤二中（二）所述试剂盒进行实验，分别从三个不同时间段制备的不同批次（01批、02批、03批）的试剂盒中各抽取3个试剂盒，进行实验，每个样本重复5次，分别计算变异系数（CV%）。结果如表2和表3所示。结果表明，在牛乳粉样本可重复性试验中样本回收率在82.0%-121.5%，牛奶片样本可重复性试验中样本回收率在81.5%-117.0%。以上样本中的变异系数均低于20%。

表2、牛 IgG 含量为 20%的牛乳粉样本可重复性试验结果

批号	实测值 (%)					CV%
1 批	23.1	18.6	16.7	19.3	18.9	12.1
	16.6	19.6	18.0	19.6	17.3	7.4
	20.9	18.5	21.0	19.0	19.7	5.6
2 批	17.0	18.5	16.8	19.6	20.4	8.5
	18.8	21.4	19.1	20.9	19.5	5.7
	20.5	19.9	17.2	18.4	24.3	13.5
3 批	19.5	18.6	18.7	16.7	20.2	7.0
	16.4	19.9	23.9	18.4	19.3	14.1
	19.3	17.9	18.5	19.0	21.3	6.7

表 3、牛 IgG 含量为 20% 的阴性牛奶片样本可重复性试验结果

批号	实测值 (%)					CV%
1 批	17.5	18.5	16.5	22.0	18.0	11.3
	18.3	17.0	16.9	16.3	17.5	4.4
	18.9	23.1	19.5	21.2	21.4	8.0
2 批	19.8	23.2	16.4	18.2	17.8	13.6
	16.9	18.5	18.1	19.3	22.9	11.9
	18.2	18.9	17.3	19.2	18.5	4.0
3 批	20.3	18.6	22.5	19.5	18.7	8.0
	18.5	17.2	18.2	23.4	19.2	12.4
	18.5	19.5	19.9	18.7	18.2	3.8

2、样本准确度试验

分别向不含牛IgG的阴性牛乳粉、阴性牛乳和阴性牛奶片样本中添加牛IgG标准品，使牛IgG在样本中的终浓度为分别为20%（200mg/g）和40%（400mg/g），按照步骤四中方法进行样品前处理。取步骤二中（二）所述试剂盒进行实验，检测样本中牛IgG的浓度，每个浓度做4个平行，根据公式计算准确度。结果如表4所示。结果表明，试验结果准确度在81.5%-120.0%之间。

$$\text{准确度 (\%)} = \frac{\text{实际检测值 (\%)}}{\text{添加样本浓度 (\%)}} \times 100\%$$

表4、阴性样本添加回收试验结果

样本		阴性牛乳粉		阴性牛奶片		阴性牛乳	
添加水平 (%)		20	40	20	40	20	40
实测值%	1	19.6	38.5	17.6	36.5	16.3	39.8
	2	22.5	42.9	24.0	45.2	18.5	37.5
	3	16.5	32.9	19.4	33.4	19.1	35.8
	4	18.2	34.7	19.0	40.5	18.9	41.1
平均值%		19.2	37.3	20.0	38.9	18.2	38.6

(三) 交叉反应率试验:

选择与牛IgG有类似结构和类似功能的4种蛋白测定交叉反应率,通过各种蛋白的标准曲线分别得到其50%抑制浓度。用下式计算步骤二(二)中试剂盒对其它蛋白的交叉反应率。

交叉反应率(%) = (引起50%抑制牛IgG的浓度/引起50%抑制牛IgG的类似物浓度) × 100%。重复测定3次,结果取平均值。

实验结果如表5所示,表明,本发明试剂盒对牛IgG的特异性好,即本发明试剂盒可以检测牛IgG。

表5、交叉反应实验

竞争物	交叉反应率 (%)
牛 IgG	100
酪蛋白	<1
不含牛 IgG 的乳粉	<1
牛血清蛋白 (BSA)	<1
卵清蛋白 OVA	<1

(四) 试剂盒保存

试剂盒保存条件为2~8℃,经过6个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(0标准)、

50%抑制浓度、牛IgG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℃保存的条件下放置6天，进行加速老化试验，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5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在2~8℃至少可以保存6个月以上。

六、本发明检测方法与高效液相色谱方法比较

从市售的含有牛 IgG 的不同奶粉中，随即采集 10 种，分别用《GB/T 5009.194-2003 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定》方法（HPLC 方法）和本发明提供的 ELISA 方法检测牛 IgG 含量，结果如表 6 所示。

表 6、各种功能性食品样本采用不同方法的检测结果

样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA 结果(%)	0.5	33.7	28.4	13.4	28.1	15.6	20.6	0.6	27.9	20.5
HPLC 结果 (%)	0.9	30.2	25.9	14.0	25.8	13.2	18.9	0.2	24.8	22.5

结果表明，与HPLC方法检测结果相比，对牛IgG含量低于1%的样本的检测结果标准偏差小于0.3%，对牛IgG含量在13.2-30.2%的样本的检测结果标准偏差小于2.5%，说明本发明完全可以用于功能性食品中牛IgG含量的检测。

实施例2、用于检测牛免疫球蛋白G的试剂盒还可以有如下几种：

一、包被原为特异性抗体，酶标记物为酶标抗原

（一）本试剂盒的工作原理为：

当在微孔条上预包被牛IgG特异性抗体时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记牛IgG抗原溶液。样本中的牛IgG或牛IgG标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的牛IgG特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中牛IgG的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中牛IgG的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度的牛IgG标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中牛IgG的浓度范围。

（二）本试剂盒的组成为：

（1）包被有包被原的酶标板：包被原为单克隆抗体，由保藏号为CGMCC No. 2436

的牛IgG高效单克隆杂交瘤细胞株C-1-4分泌产生。

(2) 酶标记物：酶标抗原工作液，抗原为牛免疫球蛋白G 的Fc片段；标记酶为辣根过氧化物酶。

(3) 牛IgG标准品（Sigma化学公司，货号I5506）溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L，0.2g/L，0.8g/L，3.2g/L，12. μ g/L，5.12 μ g/L。

(4) 底物显色液：由显色液A液和显色液B液组成，显色液A液为过氧化氢，显色液B液为邻苯二胺。

(5) 终止液为1-2mol/L硫酸溶液。

(6) 浓缩洗涤液为含有1.0%吐温-20、0.05%叠氮化钠防腐剂、pH值为 7.4的0.1mol/L的磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

(7) 浓缩复溶液为含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为5.6的0.05mol/L磷酸盐缓冲液；所述百分含量为质量百分含量。

二、包被原为抗原，酶标记物为酶标特异性抗体

(一) 工作原理

当在微孔条上预包被牛IgG的Fc片段时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入酶标记牛IgG特异性抗体溶液。样本中的牛IgG或牛IgG标准品与酶标板上包被的牛IgG抗原竞争牛IgG特异性抗体，用显色液显色，样本吸光值与样本中牛IgG的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中牛IgG的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅，通过与系列浓度牛IgG标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中牛IgG的浓度范围。

(二) 本试剂盒的组成

(1) 包被有包被原的酶标板：包被原为牛免疫球蛋白G 的Fc片段。

(2) 酶标记物：酶标特异性抗体工作液，碱性磷酸酶标记的单克隆抗体；单克隆抗体是由保藏号为CGMCC No. 2436的牛IgG高效单克隆杂交瘤细胞株C-1-4分泌产生。抗体稀释液为含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为5.6的0.05mol/L磷酸盐缓冲液。

(3) 牛IgG标准品（Sigma化学公司，货号I5506）溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L，0.2g/L，0.8g/L，3.2g/L，12. μ g/L，5.12 μ g/L。

(4) 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液（4-硝基酚磷酸盐缓冲液）。

(5) 终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

(6) 浓缩洗涤液为0.01M, pH 7.4, 含有0.8~1.2%吐温-20和0.05%叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

(7) 浓缩复溶液为0.01~0.05mol/L、含有0.1%牛血清白蛋白、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。

三、包被原为抗抗体, 酶标记物为酶标抗原

(一) 工作原理

当在微孔条上预包被抗抗体时, 加入牛 IgG 抗体孵育后, 加入样本溶液或标准品溶液, 再加入酶标记牛 IgG 抗原溶液。样本中的牛 IgG 或牛 IgG 标准品与酶标记牛 IgG 抗原竞争牛 IgG 特异性抗体, 用显色液显色, 样本吸光度值与样本中牛 IgG 的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中牛 IgG 的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅, 通过与系列浓度牛 IgG 标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中牛 IgG 的浓度范围。

(二) 试剂盒组成如下:

- (1) 包被有包被原的酶标板: 包被原为羊抗鼠抗抗体;
- (2) 酶标记物: 辣根过氧化物酶标记的牛 IgG 的 Fc 片段;
- (3) 特异性抗体工作液: 单克隆抗体: 由保藏号为 CGMCC No. 2436 的牛 IgG 高效单克隆杂交瘤细胞株 C-1-4 分泌产生。
- (4) 牛 IgG 标准品(Sigma 化学公司, 货号 I5506)溶液 6 瓶, 浓度分别为 0 μ g/L, 0.2g/L, 0.8g/L, 3.2g/L, 12. μ g/L, 5.12 μ g/L;
- (5) 底物显色液: 所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成, 显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲, 显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;
- (6) 浓缩洗涤液为含有1.0%吐温-20、0.05%叠氮化钠防腐剂、pH值为 7.4的 0.1mol/L的磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。
- (7) 浓缩复溶液为含有 0.1%牛血清白蛋白、pH 值为 5.6 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液; 所述百分含量为质量百分含量。
- (8) 终止液: 终止液为 1~2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

上述三种试剂盒中, 抗原(牛免疫球蛋白 G 的 Fc 片段)、单抗、多抗、与实施例 1 中所述相同; 酶标板的制备方法与实施例 1 中所述相同。

酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为 pH 值为 9.4、0.2M 的碳酸盐缓冲液；所用的封闭液为含有 0.5% 脱脂奶粉、0.01% 叠氮化钠、0.2% 蔗糖的 0.1M, pH7.4 的磷酸盐溶液；所述百分含量为质量百分含量。

酶标记牛 IgG 抗原是将牛 IgG 的 Fc 片段与标记酶采用戊二醛法或过碘酸钠法偶联得到的；酶标记特异性抗体是将牛 IgG 特异性抗体与标记酶通过戊二醛法或过碘酸钠法偶联得到。

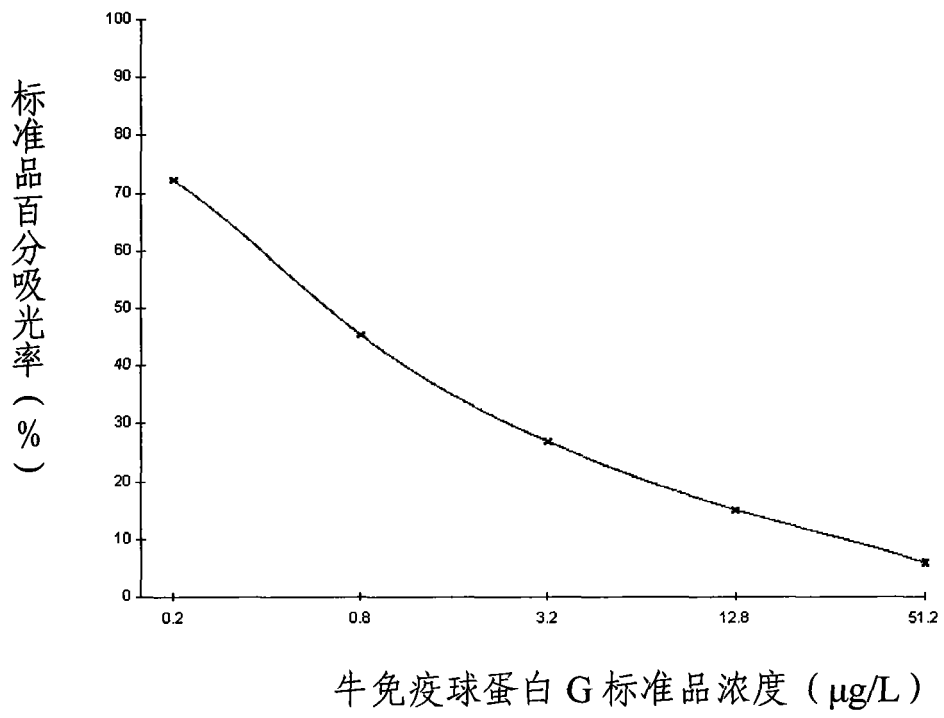


图 1

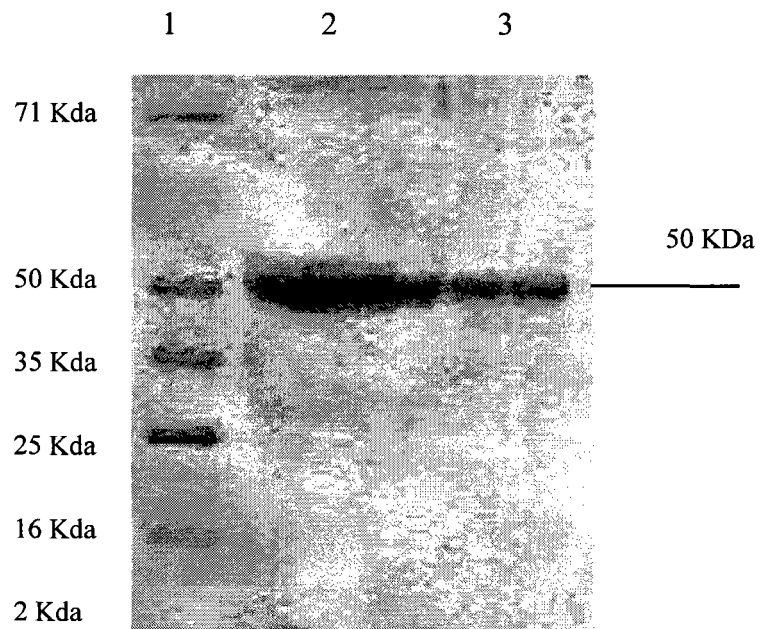


图 2

专利名称(译)	一种检测牛免疫球蛋白G的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101329339A	公开(公告)日	2008-12-24
申请号	CN200810117523.9	申请日	2008-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	邹志飞 万宇平 高东微 余厚美 陈文锐 冯才伟 李丹宁 马孝斌		
申请(专利权)人(译)	邹志飞 万宇平 高东微 余厚美 陈文锐 冯才伟 李丹宁 马孝斌		
当前申请(专利权)人(译)	邹志飞 万宇平 高东微 余厚美 陈文锐 冯才伟 李丹宁 马孝斌		
[标]发明人	邹志飞 万宇平 高东微 余厚美 陈文锐 冯才伟 李丹宁 马孝斌		
发明人	邹志飞 万宇平 高东微 余厚美 陈文锐 冯才伟 李丹宁 马孝斌		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101329339B		

摘要(译)

本发明公开了一种检测牛免疫球蛋白G的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明试剂盒包括牛免疫球蛋白G的Fc片段和牛免疫球蛋白GFc片段的特异性抗体；所述特异性抗体为所述牛免疫球蛋白GFc片段的克隆抗体或单克隆抗体。本发明酶联免疫试剂盒主要采用了工作液形式，其使用方便，稳定性好，成本低廉。利用发明试剂盒检测保健食品中牛免疫球蛋白(牛IgG)含量的方法，具有操作简单、灵敏度、精确度高、准确度高的特点，可用于多种样本的检测，尤其适合于现场查验及对大量样本的筛查。

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