[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 33/566 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910045166.4

[43] 公开日 2009 年 9 月 9 日

[11] 公开号 CN 101526537A

[22] 申请日 2009.1.12

[21] 申请号 200910045166.4

[71] 申请人 深圳市绿诗源生物技术有限公司

地址 518000 广东省深圳市龙岗区清林西路深圳市留学人员(龙岗)创业园一园 111 房(办公住所)

[72] 发明人 聂继斌 唐 俊 杨 宏 温俊梅 齐 欣 吴 青 李 成 杨宗繁

[74] 专利代理机构 深圳市深远专利商标事务所

代理人 褚治保

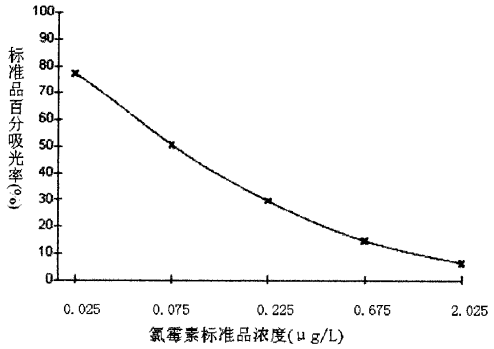
权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测氯霉素的酶联免疫试剂及方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测氯霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶联板；酶标记物；氯霉素特异性抗体；氯霉素标准品溶液；底物显色液；终止液；浓缩洗涤液；浓缩复溶液。 氯霉素包被抗原是采用活泼酯法将氯霉素半抗原与牛丙种球蛋白进行偶联得到，所述抗体为多克隆抗体或者单克隆抗体。 本发明还提供了一种检测动物源性食品中氯霉素的方法，包括了以下步骤：样品前处理；用试剂盒的试剂进行检测；分析检测结果。 本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的检测动物源性食品氯霉素的酶联免疫试剂盒及检测方法。



1.一种检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，它含有：

(1) 包被氯霉素抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板；

(2) 酶标记物；

(3) 氯霉素特异性抗体；

(4) 氯霉素标准品溶液；

(5) 底物显色液；

(6) 终止液；

(7) 浓缩洗涤液；

(8) 浓缩复溶液；

试剂盒中氯霉素包被抗原是采用活泼酯法将氯霉素半抗原与牛丙种球蛋白进行偶联得到的，抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到。

2. 如权利要求1所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记氯霉素抗原，所用酶为过氧化物酶或半乳糖甘酶；酶标记物形式为冻干粉、浓缩液或工作液。

3.如权利要求2所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫

试剂盒，其特征是，所用的酶为过氧化物酶。

4. 如权利要求2或3所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，试剂盒中酶标记抗原是采用活性酯法将标记酶与氯霉素半抗原进行偶联得到。

5. 如权利要求4所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，试剂盒中氯霉素特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体，免疫原是采用活泼酯法将氯霉素半抗原与钥孔槭血蓝蛋白进行偶联得到的；抗体形式为冻干粉、浓缩液或工作液；抗体稀释液为pH值8.2、0.05mol/L、含有3%w/v马血清和5‰w/v明胶的磷酸盐缓冲液。

6. 如权利要求5所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，试剂盒中当标记酶为过氧化物酶时底物显色液为过氧化氢或过氧化脲、四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液、终止液为0.1-0.5mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为半乳糖甘酶时，底物显色液为0.5mol/L 磷酸钾缓冲液，终止液为2mol/L 的柠檬酸缓冲液；浓缩洗涤液为去离子水或三蒸水；浓缩复溶液为去离子水或三蒸水。

7. 如权利要求6所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，制备酶联板过程中所用的包被缓冲液为批 pH值9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；包被氯霉素抗原或抗抗体的载体物质为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联

葡聚糖、玻璃、硅橡胶或琼脂糖凝胶；载体的形式是试管、微量反应板凹孔、小珠或小圆片；洗涤液为去离子水或三蒸水；封闭液是含有 15%-30%w/v 的马血清和 1%w/v 惰性蛋白的溶液。

8. 如权利要求 1-3 和 5-7 任一项所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，试剂盒中氯霉素标准品溶液为六个浓度梯度的氯霉素溶液，氯霉素稀释液为去离子水或三蒸水，氯霉素标准溶液浓度为：0μg/L、0.025μg/L、0.075μg/L、0.225μg/L、0.675μg/L、2.025μg/L，1-3ml/瓶。

9. 如权利要求4所述的检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，其特征是，试剂盒中氯霉素标准品溶液为六个浓度梯度的氯霉素溶液，氯霉素稀释液为去离子水或三蒸水，氯霉素标准溶液浓度为：0μg/L、0.025μg/L、0.075μg/L、0.225μg/L、0.675μg/L、2.025μg/L，1-3ml/瓶。

10. 一种检测动物源性食品中氯霉素的方法，包括以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1-9 任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

一种检测氯霉素的酶联免疫试剂及方法

技术领域

本发明涉及酶联免疫和兽药残留检测分析技术领域中的一种检测氯霉素的酶联免疫试剂及方法。

背景技术

氯霉素(chloramphenicol, CAP) 是第一个采用化学合成法生产的抗生素, 对多种病原菌具有较强的抑制作用。由于其效高价廉, 曾被广泛应用于各类家禽、家畜、蜜蜂和水产品的各种传染病的防治。然而, 氯霉素存在着严重的毒副作用, 能引起人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺症以及新生儿、早产儿灰色综合症等, 对人类健康构成巨大的潜在威胁。因此, 氯霉素残留问题已引起国际组织和许多国家及地区的高度重视。欧盟、美国等发达国家已相继禁止氯霉素用于动物源性食品, 并明确规定氯霉素残留限量为不得检出。

目前国内外的氯霉素检测技术方法主要有微生物法、放射免疫法、气相色谱法(GC) 、液相色谱法(HPLC) 、质谱分析等,这些方法各有优劣,而酶联免疫法(ELISA) 具有特异性强、灵敏度高,样品预处理简单，检测时间短、检测样本量大等优点。

发明内容

本发明的检测原理：当包被原为氯霉素偶联抗原时是将氯霉素半抗原与牛丙种球蛋白偶联物（CAP-BGG）吸附于固相载体上，加入

样本或氯霉素标准品，然后加氯霉素特异性抗体，待测样品中残留的氯霉素和酶标板上包被的氯霉素抗原竞争氯霉素特异性抗体。再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中氯霉素残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出氯霉素的浓度。

包被原为抗抗体时是将抗抗体吸附于固相载体上，加入氯霉素特异性抗体，再加入氯霉素酶标记抗原和样本或氯霉素标准品溶液，待测样本中残留的氯霉素和酶标记氯霉素抗原竞争氯霉素特异性抗体，显色后终止，测定样品的吸光度值，该值与样品中氯霉素残留量呈负相关，与标准曲线比较即可得出氯霉素的浓度，与标准溶液颜色比较则可判断样品中氯霉素的浓度范围。

本发明提供了一种检测动物源性食品中氯霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：

(1) 包被氯霉素抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板；

(2) 酶标记物；

(3) 氯霉素特异性抗体；

(4) 氯霉素标准品溶液；

(5) 底物显色液；

(6) 终止液；

(7) 浓缩洗涤液；

(8) 浓缩复溶液。

本发明所述试剂盒中氯霉素包被抗原是采用活泼酯法将氯霉素

半抗原与牛丙种球蛋白进行偶联得到的，抗抗体可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体，羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到，羊抗兔抗抗体是以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到。制备酶联板过程中所用的包被缓冲液为批 pH 值 9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；包被氯霉素抗原或抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等；载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；所用的洗涤液为去离子水或三蒸水；所用的封闭液是含有 8%-15%的马血清和 1%惰性蛋白的溶液。

本发明所述试剂盒中包被氯霉素抗原的酶联板或包被抗抗体的酶联板的制备步骤为：

(1)用包被缓冲液将氯霉素半抗原与牛丙种球蛋白(BGG)偶联物或抗抗体以 0.02-0.08μg/ml 浓度稀释成抗原稀释液或抗抗体稀释液；

(2)向酶联板的每孔中加入 100μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗抗体稀释液，37℃温育 2h，倾去包被液，用洗涤液洗涤 4 次，每次 15-30s，拍干；

(3)向酶联板的每孔中加入 150-200μl 封闭液，37℃温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

以上方法制备的酶联板具有很好的稳定性，经过冷热稳定性试验，酶联板的相关技术参数均在正常范围，且包被原有良好的特异性。

本发明所述试剂盒中酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记氯霉素抗原，所用酶可为过氧化物酶或半乳糖甘酶，本发明优选过氧化物酶；

酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液；酶标记物工作液所用的稀释液为含有 50%甘油(可防止放入-20℃环境的酶标记物冻结，亦可长时间保持酶标记物的生物活性)、1%的叠氮化钠防腐剂(便于保存)的溶液。

本发明所述试剂盒中酶标记抗抗体的制备步骤为：

(1)抗抗体的制备：以鼠源性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；或以兔源性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)过氧化物酶标记抗抗体的制备：将抗抗体与过氧化物酶(HRP)进行偶联，采用的方法是戊二醛法，采用戊二醛法使得抗抗体与辣根过氧化物酶的结合率升高，传统 GA 一步法偶联反应不易控制，反应速度快的分子易发生自生聚合，且偶联效率不高。为了解决这些问题，我们将一步法进行了改进，克服了一步法的缺点。首先在被偶联的两种分子中，与偶联剂反映较弱的分子先用过量的偶连剂活化，然后去处多余的偶连剂；第二步将一端与某种分子连接的偶连剂，通过改变反应条件而与另一种分子连接起来。二步法虽然操作较繁，但偶连效率提高，而且形成的同分子聚合物减少。

本发明所述试剂盒中酶标记抗原是采用活性酯法将标记酶与氯霉素半抗原进行偶联得到。

本发明所述试剂盒中氯霉素特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体，免疫原是采用活泼酯法将氯霉素半抗原与钥孔槭血蓝蛋白进行偶联得到的；抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液；抗体

稀释液为 pH 值 8.2、0.05mol/L、含有 3%马血清和 5‰明胶的磷酸盐缓冲液。

本发明所述试剂盒中氯霉素特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体，其制备方法如下：

(1) 氯霉素单克隆抗体制备的步骤为：

a. 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，免疫原(氯霉素半抗原与钥孔槭血蓝蛋白的偶联物)免疫剂量为 80-100μg/只，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 2-3 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，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞；

b. 细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5-10：1 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，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

c. 细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1\text{-}5\times10^6$ 个/ml 的细胞悬液，分装于冻存管，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；

d. 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 Balb/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5\times10^5\text{-}10^6$ 个/只，7-10 天后采集腹水，用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃保存；

e. 抗体冻干粉可将腹水在37℃环境下烘干，放入-20℃保存；

f. 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以0.02-0.08μg/ml浓度进行稀释。

(2) 氯霉素多克隆抗体制备的步骤为：

采用新西兰大白兔作为免疫动物，免疫原(氯霉素半抗原与钥孔槭血蓝蛋白的偶联物)免疫剂量为1mg/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7-10天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

本发明所述试剂盒中当标记酶为过氧化物酶时底物显色液为过氧化氢或过氧化脲、四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液、终止液为0.1-0.5mol/L的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为半乳糖甘酶时，底物显色液为0.5mol/L磷酸钾缓冲液，终止液为2mol/L的柠檬酸缓冲液；浓缩洗涤液为去离子水或三蒸水；浓缩复溶液为去离子水或三蒸水。

本发明所述试剂盒中氯霉素标准品溶液为六个浓度梯度的氯霉素溶液，氯霉素稀释液为去离子水或三蒸水。

本发明所述试剂盒中试剂的配制具体为：

a. 氯霉素标准溶液：氯霉素系列标准溶液6瓶，浓度为0μg/L、0.025μg/L、0.075μg/L、0.225μg/L、0.675μg/L、2.025μg/L，1-3ml/瓶。

b. 包被缓冲液：pH值为9.6，0.05mol/L的碳酸盐缓冲液。

c. 封闭液：8%-15%的马血清和1%惰性蛋白的溶液。

d. 浓缩洗涤液：去离子水或三蒸水 30-50ml/瓶，1 瓶。

e. 酶标记物：酶标记抗抗体工作液或酶标记氯霉素抗原工作液，7-12ml/瓶，1 瓶。

f. 底物显色液为过氧化氢或过氧化脲与邻苯二胺(OPD)或四甲基联苯胺(TMB)的混合液；

g. 终止液：1-2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液，5-8ml/瓶，1 瓶。

h. 抗体工作稀释液：为 pH 值 8.2、0.05mol/L、含有 3%马血清和 5‰明胶的磷酸盐缓冲液。

i. 浓缩复溶液：去离子水或三蒸水，30-50ml/瓶，1 瓶。

本发明所述检测动物源性食品中氯霉素的方法，包括了以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用本发明所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

本发明中样品前处理方法为：

样本前处理需配制：

配液 1：**C 液**（牛奶样本使用）：

0.36M 亚硝基铁氰化钠（$Na_2Fe(CN)_5 \cdot NO \cdot 2H_2O$）10.7g 亚硝基铁氰化钠加去离子水 100ml 溶解

配液 2：**D 液**（牛奶样本使用）：

1M 硫酸锌（$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$）28.8g 硫酸锌加去离子水 100ml 溶解

配液 3：（尿样本使用）：pH4.8 100mM 醋酸钠缓冲液，称 2.4g 醋酸钠、1.2ml 醋酸加去离子水 500ml 溶解混合

配液 4：乙腈-水溶液 $V_{乙腈}$：V_{H2O}＝84：16

配液 5：将 2×浓缩复溶液用去离子水按 1：1 稀释。(用于抗体的稀释和样本提取后的复溶)

（a）组织(鸡肉/肝、猪肉/肝、虾、鱼等)前处理方法

用均质器均质组织样本；

称 3±0.05g 样本于离心管中，先加入 3ml 去离子水充分混匀再加入 6ml 乙酸乙酯，振荡 10min，室温 4000r/min 以上，离心 10min；

取出 2ml 上层液体 （约相当于 1g 的样本）在氮气流 50-60℃水浴中干燥；

加入 1 ml 正己烷溶解干燥的残留物，再加 1ml 稀释后的复溶液强烈振荡 1min，室温 4000r/min 以上离心 15min。

取 50 μl 下层相用于分析。

样本稀释倍数：1

（b）血清血浆

取 1ml 血清或血浆至试管中，加 2ml 乙酸乙酯振荡 1min；

静置使水相与有机相分层或室温 4000r/min 离心 5min；

移取上层的乙酸乙酯至另一试管中，用氮气流 50℃水浴中干燥；

残留物用 1 ml 稀释后的复溶液溶解；

取 50μl 用于分析。

（c） 尿液

移取 2ml 尿液到离心管中，加 pH4.8 100mM 醋酸钠缓冲液 0.5ml 混合；

加 40μl 葡萄糖苷酸酶(Merck,Art.No.4114)到稀释的尿液中，在 37℃水解至少 2 小时（或过夜）；

该溶液恢复至室温后加入 8ml 乙酸乙酯混合 1min；

室温 4000r/min 离心 10min，取出 4ml 上层液体在氮气下 50～60℃干燥；

用 1ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物；

取 50μl 用于分析。

（d）蜂蜜

取 2±0.05 g 蜂蜜，放入离心管中，用 4ml 去离子水溶解；

加入 4ml 乙酸乙酯上下振荡 10min；

室温 4000r/min 以上离心 10min；

移取 1ml 上层乙酸乙酯（相当于 0.5g 样本）到另一离心管中，50-60℃氮气流下干燥；

用 0.5ml 稀释后的复溶液溶解；

取 50 μl 用于分析。

（e）肠衣

用均质器均质样本注：干样本需剪碎（长度不超 5mm）后再均质，湿样本需用去离子水漂洗 20min 以上(去除表面的盐份)，沥干后再进行均质。

称 1±0.05g 均质后的样本于离心管中，加入 10ml 乙酸乙酯，振

荡 10min，室温 4000r/min 以上，离心 10min。

取出 5ml 上层液体（相当于 0.5g 的样本）在氮气流下 50-60℃干燥。

加入 1 ml 正己烷溶解干燥的残留物，再加 0.5ml 稀释后的复溶液强烈振荡 1min，室温 4000r/min 以上，离心 5min。

去上层相，取下层 50 μl 用于分析。

（f）牛奶和奶粉

牛奶样本处理方法一

牛奶样本，10℃4000r/min 以上离心 10min，吸除上层脂肪；

取 5ml 去除脂肪奶样至离心管中，加入 150μl **C 液**出现沉淀，短暂振荡后加入 150μl **D 液**混合；

15℃4000r/min 以上，离心 10min，移取上层液；

用稀释后的复溶液以等体积稀释上层液；

取 50μl 用于分析。

注：如果离心后仍然浑浊，再重复沉淀过程。

牛奶样本处理方法二

取 5ml 去除脂肪奶样至离心管中；

加入 250μl **C 液**和 250μl **D 液**彻底混合，4-12℃4000r/min 以上离心 10min。如果没有冷冻离心机，请预先将样本冷却到 8℃；

转移出 2.2ml 上层液（相当于 2ml 奶样）至一个新的离心管中，加入 4ml 乙酸乙酯上下振荡 10min；

室温（20-25℃）4000r/min 以上离心 10min ；

转移出 2ml 乙酸乙酯上层液体（相当于 1ml 奶样），60℃氮气流下完全干燥；

用 0.5ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物；

取 50μl 用于分析。

由于阴性样本可能会产生背景干扰 （在某些情况下干扰数值在标准 2 到 3 之间），所以推荐标准 3 作为阳性结果的 CUT OFF 判断值。

奶粉样本处理方法

称 2±0.05 g 奶粉至离心管中，加入 10ml 去离子水，振荡溶解；

加 1ml **C 液**和 1ml **D 液**彻底混合。4-12℃4000r/min 以上离心 10min。若无冷冻离心机，请预先将样本冷却到 8℃；

转移出 3.6ml 上层液（相当于 0.6g 奶粉）至一个新的离心管中，加入 6ml 乙酸乙酯上下来回振荡 10min；

室温（20-25℃）4000r/min 以上离心 10min；

转移出 4ml 乙酸乙酯上层液体（相当于 0.4g 奶粉），60℃氮气流下完全干燥；

用 0.4ml 稀释后的复溶液溶解干燥的残留物；

取 50μl 用于分析。

由于阴性样本可能会产生背景干扰 （在某些情况下干扰数值在标准 2 到 3 之间），所以推荐标准 3 作为阳性结果的 CUT OFF 判断值。

（g）蛋类

用均质器低速均质样本(蛋黄或全蛋)；

称取 3±0.05 g 均质过的样本，与 9ml 乙腈-水溶液（84∶16；V_Z

腈：$V_{水}$）振荡 10min，15℃ 4000r/min 以上离心 10min；

取 3ml 上层与 3ml 蒸馏水混合，加入 4.5ml 乙酸乙酯混合 5min，15℃4000r/min 以上离心 10min；

将上层有机相转移到试管中 50℃下氮气吹干；

加入 1ml 正己烷溶解残留物后，用 2ml 稀释后的复溶液混合 1min，离心去除正己烷。

取 50μl 用于分析。

(2)用本发明所述的试剂盒进行检测：

从 4℃冷藏环境中取出所需试剂，置室温（20-25℃）平衡 30min 以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

取出需要数量的微孔及框架，将不用的微孔放入自封袋，保存于 2-8℃。

配液：将 40ml 浓缩洗涤液（20 倍浓缩）用蒸馏水或去离子水稀释至 800ml 备用（或按需要量稀释）。

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。

加标准品/样本 50μl/孔到各自的微孔中，然后加抗体工作液 50μl/孔，用盖板膜封板，轻轻震荡混匀。37℃环境中反应 30min。

取出将孔内液体甩干，用洗液 250μl/孔洗板 4-5 次，每次间隔 10 秒，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破）。

每孔加入酶标记物 100μl，盖板膜盖板后置 37℃环境中反应 30min。将孔内液体甩干，用洗涤液充分洗，4-5 遍（同上），用吸水

纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头刺破）。

显色：每孔加入底物 100μl，轻轻振荡混匀，37℃环境中避光显色 15min。

测定：每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm 处（建议用双波长 450/630nm 检测，在 5min 内读完数据），测定每孔 OD 值。

七、 结果判定

结果判定有两种方法，粗略判定可用第 1 种方法，定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光值与其所含氯霉素成反比。

粗略判定：

用样本的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围(ppb)。假设样本 1 的吸光度值为 0.250，样本 2 的吸光度值为 0.720，标准液吸光度值分别是：0ppb 为 1.610；0.025ppb 为 1.380；0.075ppb 为 1.100；0.225ppb 为 0.620；0.675ppb 为 0.289；2.025ppb 为 0.108。则样本 1 的浓度范围是 0.675ppb-2.025ppb； 样本 2 的浓度范围是 0.075 ppb-0.225 ppb。

2、定量分析

百分吸光率的计算，标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准（0 标准）的吸光度值，再乘以 100%，即

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

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B_0—0ng/ml 标准溶液的平均吸光度值

标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标，以氯霉素标准品浓度（ng/ml）的半对数为横坐标，绘制标准曲线图，见图 1。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实际浓度。若利用试剂盒专业分析软件进行计算，更便于大量样本的准确、快速分析。

附图说明

图 1 为氯霉素的检测标准曲线图，横坐标表示氯霉素标准品浓度，纵坐标表示标准品百分吸光率。

具体实施方式

实施例 1 检测氯霉素的酶联免疫试剂盒组分的制备

1．抗原的合成

a．包被原的合成

将氯霉素采用衍生物法合成氯霉素半抗原，再将半抗原通过重氮化反应和牛丙种球蛋白载体蛋白用活泼酯法进行偶联得到。

b．免疫原的合成

将氯霉素半抗原通过重氮化反应和钥孔槭血蓝蛋白载体蛋白用活泼酯法进行偶联得到。

2．氯霉素鼠单克隆抗体的制备

a．动物免疫

采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以氯霉素半抗原与钥孔槭血蓝蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 300μg/只，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 2 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，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

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，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，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

c．细胞冻存和复苏

取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个/ml 的细胞悬液，分装于冻存管，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。

d．单克隆抗体的制备与纯化

采用体内诱生法，将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，20℃保存。

3．氯霉素兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以氯霉素半抗原与钥孔槭血蓝

蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 3mg/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 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 7 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

4．酶标板的制备

用包被缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释成 0.06μg/ml，每孔加入 100μl，37℃温育 6h，倾去包被液，用洗涤液洗涤 4 次，每次 1min，拍干，然后在每孔中加入 150μl 封闭液，37℃温育 1h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

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) 包被氯霉素抗原的酶联板；

(2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；

(3) 氯霉素鼠单克隆抗体；

(4) 氯霉素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0μg/L、0.025μg/L、0.075μg/L、0.225μg/L、0.675μg/L、2.025μg/L；

(5) 底物显色液为过氧化氢或过氧化脲与邻苯二胺(OPD)或四甲基联苯胺(TMB)的混合液；

(6) 终止液为 2 mol/L 的硫酸缓冲液；

(7) 浓缩洗涤液为去离子水或三蒸水;

(8) 抗体稀释液为 pH 值 8.2、0.05mol/L、含有 3%马血清和 5‰

明胶的磷酸盐缓冲液。

(9) 浓缩复溶液为去离子水或三蒸水。

实施例 3 检测氯霉素的酶联免疫试剂盒的的组建

组建检测氯霉素的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

(1) 包被羊抗兔抗抗体的酶联板；

(2) 用碱性磷酸酯酶标记的氯霉素抗原；

(3) 氯霉素兔多克隆抗体；

(4) 氯霉素标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0μg/L、0.025μg/L、0.075μg/L、0.225μg/L、0.675μg/L、2.025μg/L；

(5) 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液；

(6) 终止液为 2mol/L 的氢氧化钠缓冲液；

(7) 浓缩洗涤液去离子水或三蒸水；

(8) 浓缩复溶液为去离子水或三蒸水。

实施例 4 样品中氯霉素残留的检测

1．样品前处理

用均质器均质组织样本；称 3±0.05g 样本于离心管中，先加入 3ml 去离子水充分混匀再加入 6ml 乙酸乙酯，振荡 10min，室温 4000r/min 以上，离心 10min；取出 2ml 上层液体 （约相当于 1g 的样本）在氮气流 50-60℃水浴中干燥；加入 1 ml 正己烷溶解干燥的残留物，再加 1ml 稀释后的复溶液强烈振荡 1min，室温 4000r/min 以上离心 15min。取 50μl 下层相用于分析。

2．用试剂盒检测

向氯霉素偶联抗原包被的 96 孔酶标板微孔中加系列标准品或样本溶液(各 2 孔)50μl，再加入氯霉素抗体工作液 50μl，用盖板膜封板，37℃恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体，每孔加入 250μl 洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体 100μl，用盖板膜封板，37℃恒温箱中反应 30min，重复洗涤工作。加入底物显色液 100μ1，轻轻振荡混匀，37℃恒温箱避光显色 15min。每孔加入终止液 2 mol/L。硫酸 50μl，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3．检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)，除以第一个标准溶液(0 标准)的吸光度值(B_0)，再乘以 100%，得到百分吸光度值。以氯霉素浓度的半对数为 x 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液中氯霉素所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中氯霉素的实际浓度。

实施例 5 样品中氯霉素残留的检测

1．样品前处理

取 2±0.05 g 蜂蜜，放入离心管中，用 4ml 去离子水溶解；加入 4ml 乙酸乙酯上下振荡 10min；室温 4000r/min 以上离心 10min；移取 1ml 上层乙酸乙酯（相当于 0.5g 样本）到另一离心管中，50-60℃氮气流下干燥；用 0.5ml 稀释后的复溶液溶解；取 50 μl 用于分析。

2．用试剂盒检测

向羊抗兔抗抗体包被的 96 孔酶标板微孔中加入氯霉素兔多克隆抗体工作液 100μl，用盖板膜封板，37℃恒温箱中反应 30min，倒出孔中液体，每孔加入 250μl 浓缩洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，用吸水纸拍干。每孔加入细菌提取碱性磷酸酯酶标记的氯霉素抗原 50μl，再加入系列标准品或样本溶液 50μl，用盖板膜封板，37℃恒温箱中反应 30min，重复洗涤过程。加入对硝基磷酸盐缓冲液 100μl，轻轻振荡混匀，37℃恒温箱避光显色 15min。每孔加入终止液 2mol/L 氢氧化钠 50μl，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值。

3．检测结果分析

用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0 标准)的吸光度值(B_0)再乘以 100%，得到百分吸光度值。以氯霉素浓度(μg/L)的半对数为 x 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，将样品溶液的百分吸光度值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品溶液所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品溶液中氯霉素实际浓度。

实验例 1 标准品精密度试验

从每批按照实施例 1(4)中的方法制备的酶联板中，各抽出 10 个微孔，测定 0.45μg/L。标准溶液的吸光度值(OD 值)，重复 3 次，计算变异系数 CV%，结果见表 1。

表 1 标准可重复性试验(CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批 CV%	8.9	9.3	10.2	8.5	7.6	7.3	7.9	5.1	6.3	6.9
03 批 CV%	6.7	7.9	12.3	5.5	6.9	5.6	6.8	5.6	5.7	8.3
06 批 CV%	5.6	8.5	7.6	8.2	5.9	7.5	8.6	7.3	8.6	6.7

结果表明变异系数范围在 5.1%-12.3%之间，符合了变异系数小于 20%的规定，说明本试剂盒标准品精密度达到了标准。

实验例 2 样本可重复性试验

以 0.4μg/L，浓度的氯霉素对鱼虾、鸡肉和蜂蜜，添加到样品中，分别取三个不同批次的试剂盒各五个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数，结果见表 2、表 3。

表 2 鱼虾、鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 μg/L					变异系数 CV%
	0.35	0.36	0.29	0.36	0.35	12.2
01	0.37	0.40	0.31	0.40	0.36	11.3
	0.36	0.34	0.36	0.37	0.31	10.9
	0.38	0.36	0.37	0.28	0.35	13.2
03	0.33	0.40	0.29	0.37	0.36	10.5
	0.38	0.34	0.39	0.30	0.35	12.3
	0.32	0.35	0.30	0.29	0.37	13.9
06	0.39	0.36	0.32	0.39	0.40	13.0
	0.37	0.39	0.32	0.31	0.30	16.0

表 3 蜂蜜样品可重复实验

批号	实测值 μg/L	变异系数 CV%

	0.32	0.39	0.32	0.30	0.32	11.6
01	0.31	0.40	0.37	0.36	0.39	13.7
	0.30	0.28	0.33	0.31	0.40	10.9
	0.40	0.36	0.38	0.32	0.37	11.8
03	0.35	0.33	0.39	0.30	0.37	13.4
	0.37	0.30	0.34	0.36	0.33	12.4
	0.30	0.33	0.37	0.40	0.28	15.7
06	0.29	0.37	0.36	0.30	0.34	13.9
	0.32	0.38	0.31	0.37	0.36	10.3

结果表明鱼虾、鸡肉样本变异系数均低于20%，蜂蜜样本的变异系数均低于 20%，符合了变异系数小于 25%的规定，说明本试剂盒测定样本的精密度达到了标准。

实验例 3 抗体的特异性：

特异性是指抗体对待测物的识别能力，强调抗体与待测物间结合反应的专一性和对结构相近或相关物质的区分能力。特异性取决于待测物与其他物质的交叉反应。在竞争分析中，不同物质的交叉反应率可用如下公式计算：

交叉反应率（%）=IC_{50}（竞争物）/IC_{50}（待测物）*100

表 4 用 KLH 蛋白偶联的抗原制备的抗体的交叉反应率

化合物	交叉反应率（%）
氯霉素	100
甲砜霉素	0.01
氟甲砜霉素	0.01

实验例 4 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的氯霉素标准品溶液，分别为 0.15μg/kg(L)和

1μg/kg(L)，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，分别计算回收率。

表 5 试剂盒的准确度

样本	鱼虾、鸡肉		蜂蜜	
添加浓度 μg/L	0.15	1	0.15	1
	90	93	79	83
回收率	99	87	82	85
	88	83	84	84
	85	82	90	89
平均值	90.5	86.3	83.8	85.3

结果表明鱼虾、鸡肉添加的回收率在 86.3%-90.5%之间，蜂蜜添加回收率在 83.8%-85.3%之间。

实验例 5

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(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℃保存的条件下放置 6 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 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℃可以保存 6 个月以上。

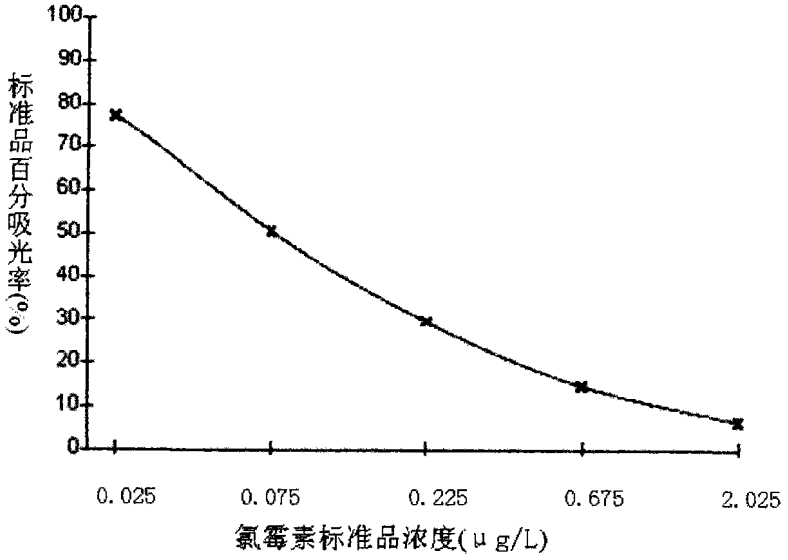
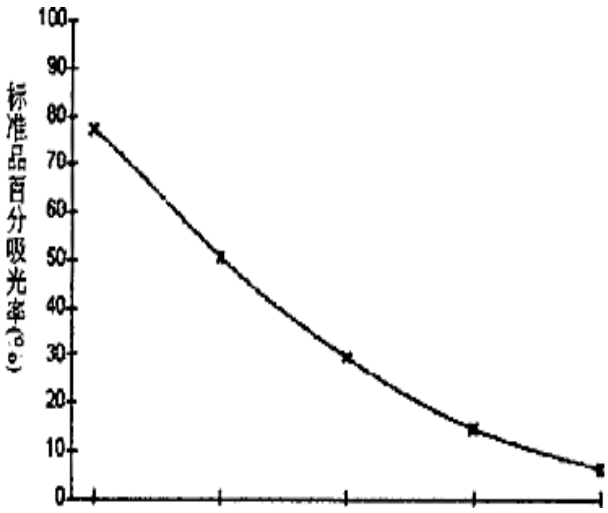

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
标准品百分吸光率(%)
0.025
0.075
0.225
0.675
2.025
氯霉素标准品浓度(μg/L)

图 1

专利名称(译)	一种检测氯霉素的酶联免疫试剂及方法		
公开(公告)号	CN101526537A	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200910045166.4	申请日	2009-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
[标]发明人	聂继斌 唐俊 杨宏 温俊梅 齐欣 吴青 李成 杨宗繁		
发明人	聂继斌 唐俊 杨宏 温俊梅 齐欣 吴青 李成 杨宗繁		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/52 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测氯霉素的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶联板；酶标记物；氯霉素特异性抗体；氯霉素标准品溶液；底物显色液；终止液；浓缩洗涤液；浓缩复溶液。氯霉素包被抗原是采用活泼酯法将氯霉素半抗原与牛丙种球蛋白进行偶联得到，所述抗体为多克隆抗体或者单克隆抗体。本发明还提供了一种检测动物源性食品中氯霉素的方法，包括了以下步骤：样品前处理；用试剂盒的试剂进行检测；分析检测结果。本发明的目的是提供一种操作简便、费用低廉、适用于大量样本筛查的检测动物源性食品氯霉素的酶联免疫试剂盒及检测方法。