



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103472228 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 25

(21) 申请号 201310408148. 4

G01N 21/76(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 09. 10

(71) 申请人 广西壮族自治区兽医研究所

地址 530001 广西壮族自治区南宁市友爱北路 51 号

(72) 发明人 吴健敏 马玲 张启模 陈凤莲

覃绍敏 白安斌 韦建兴 林俊

刘金凤 黄红梅 关忠谊

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务所有

限责任公司 45104

代理人 杨立华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒,该法结合了间接酶免疫反应和化学发光技术,在不需另外制备酶标单克隆抗体的情况下,将传统两步式化学发光酶免疫分析法简化为一步,并利用 15 ~ 35% 乙腈对高浓度无色孔雀石绿溶解力有限的特性,将其作为样品溶解液。该法应用在动物源性食品中孔雀石绿残留检测,具有快速、简便、特异、灵敏、准确、检测范围宽等特点,更加符合快速检测的要求,具有较好的应用前景。本发明试剂盒的  $IC_{50}$  为  $0.45 \mu g/L$ ,回收率为 86.37 ~ 116.84%,与标准检测方法的吻合率为 100%,适合用于孔雀石绿的痕量分析与批量检测。

1. 一种孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法,其特征在于包括以下步骤:

<1> 处理待测样品;

<2> 将半抗原无色孔雀石绿与载体蛋白卵清蛋白的偶联物作为抗原包被于发光固相载体,封闭后,依次加入系列标准样品或经前处理的待测样品、酶标二抗 HRP- 山羊抗小鼠 IgG 和无色孔雀石绿单克隆抗体进行反应,然后再加入化学发光液,测定系列标准样品和待测样品的发光值;

<3> 以步骤<2>测得的发光值计算抑制率,绘制标准曲线,并根据标准曲线的回归方程和待测样品的抑制率计算待测样品中孔雀石绿的含量。

2. 根据权利要求1所述的孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法,其特征在于:

步骤<1>按以下操作进行:取5g组织样品加入10mL乙腈超声波震荡15min,4000r/min离心10min,取上清液加入20g中性氧化铝,震荡混匀5min,4000r/min离心5min,取上清液于氮气吹干,加入15~35%乙腈溶液溶解,用于检测;

步骤<2>按以下操作进行:用包被液将抗原稀释成 $5\mu\text{g/mL}$ ,每孔加入 $100\mu\text{L}$ , $4^{\circ}\text{C}$ 孵育10~16h后,倾去包被液,用洗板机洗涤化学发光板3次,拍干;然后,每孔加入 $350\mu\text{L}$ 封闭液, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1~2h,倾去封闭液,用洗板机洗涤3次,拍干; $37^{\circ}\text{C}$ 烘干后,用锡箔纸真空密封, $4^{\circ}\text{C}$ 保存;将化学发光板从 $4^{\circ}\text{C}$ 中取出,待温度平衡至室温,按照每孔 $50\mu\text{L}$ 将系列标准样品溶液和待测样品加入化学发光板,各设3孔重复,然后依次按照每孔 $50\mu\text{L}$ 加入酶标二抗、无色孔雀石绿单克隆抗体,混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育60min;倾去液体,用洗板机洗涤5次,拍干;每孔中加入 $100\mu\text{L}$ 化学发光液,混匀,尽快测定各孔发光值。

3. 根据权利要求2所述的孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法,其特征在于:所述封闭液是5%的脱脂奶粉;所述无色孔雀石绿单克隆抗体的稀释为 $1.15\mu\text{g/mL}$ ;所述系列标准样品溶液的浓度为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.001\mu\text{g/L}$ 、 $0.01\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ ;所述包被液是pH9.6的碳酸盐缓冲液。

4. 一种孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测试剂盒,其特征在于包括包被有包被抗原的化学发光板、无色孔雀石绿系列标准样品溶液、无色孔雀石绿单克隆抗体工作液、浓缩洗涤液、HRP-山羊抗小鼠IgG工作液、化学发光液;所述包被抗原为无色孔雀石绿与载体蛋白卵清蛋白的偶联物;所述无色孔雀石绿系列标准样品溶液为7个浓度梯度,分别是 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.001\mu\text{g/L}$ 、 $0.01\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ ;所述浓缩洗涤液由NaCl8.00g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.20g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90g、KCl0.20g、吐温-200.50mL,加水定容至100mL制成;化学发光液来自超敏ECL化学发光试剂盒P0018--BeyoECL Plus。

5. 根据权利要求4所述试剂盒应用于动物源性食品中孔雀石绿残留的检测。

6. 一种无色孔雀石绿单克隆抗体,其特征在于按以下操作制备:以半抗原无色孔雀石绿与载体蛋白牛血清白蛋白的偶联物作为免疫原,免疫6周龄雌性BALB/c小鼠,按照常规方法进行细胞融合和阳性株的筛选,对筛选出的阳性细胞株连续克隆3次,经过鉴定、冻存和建株后,进行腹水的制备,然后通过纯化腹水,获得能特异性识别无色孔雀石绿的单克隆抗体。

7. 根据权利要求6所述的无色孔雀石绿单克隆抗体,其特征在于按以下操作制备:

<1> 动物免疫

将健康的 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠通过基础免疫和 5 次加强免疫后,对效价最高、竞争性最强的小鼠进行冲击免疫;

#### <2> 细胞融合和克隆筛选

冲击免疫 3 天后,摘除小鼠眼球放血后处死,收集血液、无菌取脾脏,利用细胞融合技术将小鼠免疫脾细胞与 Sp2/0 细胞进行融合,融合后的细胞悬液加至已事先铺有饲养细胞的 96 孔板中,采用 HAT 选择培养基筛选融合细胞;

待细胞生长至培养孔面积 1/10 时,无菌准确吸取 100  $\mu$  L 上清,加至已包被抗原的酶标板内;以间接 ELISA 法测细胞培养上清效价,采用有限稀释法对阳性细胞连续克隆 3 次,直至阳性率为 100% 时,对细胞株进行扩大培养、鉴定、冻存和建株,对鉴定后细胞株进行连续培养传代 2 个月以上,每隔 5 代检测其稳定性和抗体分泌能力;

#### <3> 细胞冻存与复苏

用冻存液将处于对数生长期的杂交瘤细胞制成细胞悬液,分装于冻存管,置于液氮中保存;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,移入细胞瓶中培养;

#### <4> 腹水的制备与纯化

采用体内诱生法,将灭菌石蜡油注入 8 周龄 Balb/c 小鼠腹腔,7-14 天后注入杂交瘤细胞,7-10 天后收集腹水;收集的腹水用饱和硫酸铵法进行初纯后,再用亲和层析法进一步纯化,即得无色孔雀石绿单克隆抗体。

## 孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及孔雀石绿残留检测分析领域,尤其涉及一种孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒。

### 背景技术

[0002] 孔雀石绿(Malachite Green, MG) 分子式为  $C_{23}H_{25}N_2Cl$ , 属于三苯甲烷类染料, 曾因其在预防和治疗水霉病、鳃霉病、小瓜虫病、鱼卵霉菌等方面的显著功效, 而广泛应用于渔业养殖。近年来的研究发现, 孔雀石绿特别是其代谢产物在水生动物体内具有明显的蓄积残留现象, 且因为 MG 具有使动物肝细胞空泡化、影响动物的生长和繁殖能力、致癌性等危害, 已严重威胁到水生动物和人类健康, 所以美国、加拿大、欧盟等许多国家都禁止在水产品中使孔雀石绿; 欧盟、澳大利亚和新西兰确定孔雀石绿和无色孔雀石绿的最低执法限量为  $2 \mu g/kg$ ; 我国也在 2002 年将其列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》(农业部公告 193 号), 并在《2000 年度中国出口动物源性食品有毒有害物质残留监控计划》中首次将鳗鱼中 MG 项目的监控列入年度计划, 并延续至今。然而, 由于目前尚无孔雀石绿的较好替代品, 因此一些不法商贩仍在非法使用, 导致孔雀石绿残留超标事件时有发生。

[0003] 鉴于孔雀石绿的危害, 世界各国相继立法禁止其在食品动物中使用, 并建立了许多残留检测方法, 用于检测孔雀石绿的残留量。常用的有理化方法(如高效液相色谱法、气相色谱、液质联用、薄层层析) 以及免疫学方法(如放射免疫法、荧光免疫分析法、酶联免疫吸附法、电化学分析法、化学发光分析法等)。其中理化方法具有精密度与准确度高的优点, 往往被用作最终确证的检测方法, 而免疫学方法因其简便、快速、廉价、高灵敏性、高通量等特点, 较好地弥补了理化方法的不足, 近年来越来越多地被应用于药物残留的检测。

[0004] 试验证实, 孔雀石绿进入动物体内会快速转化为无色孔雀石绿(Leucomalachite Green, LMG), 24h 内转化率达 80%, 而且 LMG 不溶于水, 难于排出体外, 消除速度慢, 残留时间达 100 天以上, 残留毒性比 MG 更高, 在很多国家被视为残留标示物, 因此以 LMG 为检测对象更能说明 MG 在动物体内残留的情况。

[0005] 中国专利申请“一种孔雀石绿的化学发光酶联免疫检测方法及试剂盒”(申请号 201210106196.3 公开日 2013 年 9 月 12 日)采用两步式化学发光酶联免疫检测体系和检测方法对待测样品中孔雀石绿残留进行检测, 操作步骤多、分析时间长、检测范围窄。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种快速、简便、特异、灵敏、准确、检测范围宽的孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒。

[0007] 本发明要解决的另一技术问题提供一种特异性高、亲和力强的无色孔雀石绿单克隆抗体。

[0008] 为了解决上述技术问题, 本发明采用以下技术方案:

[0009] 孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法, 包括以下步骤:

[0010] <1> 处理待测样品；

[0011] <2> 将半抗原无色孔雀石绿与载体蛋白卵清蛋白的偶联物(LMG-OVA)作为抗原包被于发光固相载体,封闭后,依次加入系列标准样品或经前处理的待测样品、酶标二抗 HRP- 山羊抗小鼠 IgG 和无色孔雀石绿单克隆抗体进行反应,然后再加入化学发光液,测定系列标准样品和待测样品的发光值；

[0012] <3> 以步骤<2>测得的发光值计算抑制率,绘制标准曲线,并根据标准曲线的回归方程和待测样品的抑制率计算待测样品中孔雀石绿的含量。

[0013] 步骤<1>按以下操作进行:取 5g 组织样品加入 10mL 乙腈超声波震荡 15min, 4000r/min 离心 10min,取上清液加入 20g 中性氧化铝,震荡混匀 5min,4000r/min 离心 5min,取上清液于氮气吹干,加入 15 ~ 35% 乙腈溶液溶解,用于检测；

[0014] 步骤<2>按以下操作进行:用包被液将抗原稀释成  $5 \mu\text{g/mL}$ ,每孔加入  $100 \mu\text{L}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 10 ~ 16h 后,倾去包被液,用洗板机洗涤化学发光板 3 次,拍干;然后,每孔加入  $350 \mu\text{L}$  封闭液,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 ~ 2h,倾去封闭液,用洗板机洗涤 3 次,拍干;  $37^{\circ}\text{C}$  烘干后,用锡箔纸真空密封,  $4^{\circ}\text{C}$  保存;将化学发光板从  $4^{\circ}\text{C}$  中取出,待温度平衡至室温,按照每孔  $50 \mu\text{L}$  将系列标准样品溶液和待测样品加入化学发光板,各设 3 孔重复,然后依次按照每孔  $50 \mu\text{L}$  加入酶标二抗 HRP- 山羊抗小鼠 IgG、无色孔雀石绿单克隆抗体,混匀,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 60min;倾去液体,用洗板机洗涤 5 次,拍干;每孔中加入  $100 \mu\text{L}$  化学发光液,混匀,尽快测定各孔发光值。

[0015] 封闭液是 5% 的脱脂奶粉;无色孔雀石绿单克隆抗体稀释为  $1.15 \mu\text{g/mL}$ ;系列标准样品溶液的浓度为  $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.001 \mu\text{g/L}$ 、 $0.01 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $100 \mu\text{g/L}$ ;包被液是 pH9.6 的碳酸盐缓冲液。

[0016] 孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测试剂盒,包括包被有包被抗原(LMG-OVA)的化学发光板、无色孔雀石绿系列标准样品溶液、无色孔雀石绿单克隆抗体工作液、浓缩洗涤液、HRP- 山羊抗小鼠 IgG (酶标二抗)工作液、化学发光液;包被抗原为无色孔雀石绿与载体蛋白卵清蛋白的偶联物;无色孔雀石绿系列标准样品溶液为 7 个浓度梯度,分别是  $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.001 \mu\text{g/L}$ 、 $0.01 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $100 \mu\text{g/L}$ ;浓缩洗涤液由  $\text{NaCl} 18.00\text{g}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.20\text{g}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} 2.90\text{g}$ 、 $\text{KCl} 0.20\text{g}$ 、吐温 -200.  $50\text{mL}$ ,加水定容至  $100\text{mL}$  制成;化学发光液来自超敏 ECL 化学发光试剂盒 P0018--BeyoECL Plus。

[0017] 上述试剂盒在动物源性食品中孔雀石绿残留检测中的应用。

[0018] 无色孔雀石绿单克隆抗体,按以下操作制备:以半抗原无色孔雀石绿与载体蛋白牛血清白蛋白的偶联物(LMG-BSA)作为免疫原,免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,按照常规方法进行细胞融合和阳性株的筛选,对筛选出的阳性细胞株连续克隆 3 次,经过鉴定、冻存和建株后,进行腹水的制备,然后通过纯化腹水,获得能特异性识别无色孔雀石绿的单克隆抗体。

[0019] 上述的无色孔雀石绿单克隆抗体,按以下操作制备:

[0020] <1> 动物免疫

[0021] 将健康的 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠通过基础免疫和 5 次加强免疫后,对效价最高、竞争性最强的小鼠进行冲击免疫;

[0022] <2> 细胞融合和克隆筛选

[0023] 冲击免疫 3 天后,摘除小鼠眼球放血后处死,收集血液、无菌取脾脏,利用细胞融

合技术将小鼠免疫脾细胞与 Sp2/0 细胞进行融合,融合后的细胞悬液加至已事先铺有饲养细胞的 96 孔板中,采用 HAT 选择培养基筛选融合细胞;

[0024] 待细胞生长至培养孔面积 1/10 时,无菌准确吸取 100  $\mu$  L 上清,加至已包被抗原(LMG-OVA)的酶标板内;以间接 ELISA 法测细胞培养上清效价,采用有限稀释法对阳性细胞连续克隆 3 次,直至阳性率为 100% 时,对细胞株进行扩大培养、鉴定、冻存和建株,对鉴定后细胞株进行连续培养传代 2 个月以上,每隔 5 代检测其稳定性和抗体分泌能力;

[0025] <3> 细胞冻存与复苏

[0026] 用冻存液将处于对数生长期的杂交瘤细胞制成细胞悬液,分装于冻存管,置于液氮中保存;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,移入细胞瓶中培养;

[0027] <4> 腹水的制备与纯化

[0028] 采用体内诱生法,将灭菌石蜡油注入 8 周龄 Balb/c 小鼠腹腔,7-14 天后注入杂交瘤细胞,7-10 天后收集腹水;收集的腹水用饱和硫酸铵法进行初纯后,再用亲和层析法进一步纯化,即得无色孔雀石绿单克隆抗体。

[0029] 本发明首次探讨了检测无色孔雀石绿残留的一步式化学发光酶免疫机理,发明人结合了间接酶免疫反应和化学发光技术,在不需另外制备酶标单克隆抗体的情况下,将传统两步式化学发光酶免疫分析法简化为一步,并利用 15~35% 乙腈对高浓度无色孔雀石绿溶解力有限的特性,将其作为样品溶解液,成功建立了一步式孔雀石绿化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒。本发明“一步法”的线性检测范围(0.001~100  $\mu$  g/L)比“两步法”和 ELISA 宽,最低检测限(0.0016  $\mu$  g/L)降低了 10~100 倍,更加符合痕量分析和批量检测;另外,本发明配制的 15~35% 乙腈对高浓度孔雀石绿溶解力有限,当待测样品中孔雀石绿含量超过本发明的最高检测限 100  $\mu$  g/L 时,会出现肉眼可见的浑浊,因此,当检测孔雀石绿严重超标的样品时(含量超过上述两种方法检测范围而低于 100  $\mu$  g/L),无需对样品进一步稀释并重复检测;而当孔雀石绿残留量超过最高检测限时,则利用 15~35% 乙腈溶解样品直观地提示需对样品进一步稀释,然后再进行检测。通过以上改进,本法简化了操作步骤,减少了工作量,降低了试验误差,缩短了检测时间,节省了检测成本,具有快速、特异、灵敏、准确等特点,更加符合快速检测的要求,具有较好的应用前景。本发明试剂盒的 IC<sub>50</sub> 为 0.45  $\mu$  g/L,回收率为 86.37~116.84%,与标准检测方法的吻合率为 100%,适用于孔雀石绿的痕量分析与批量检测。

#### 附图说明

[0030] 图 1 为实施例 2 孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法的标准曲线。

[0031] 图中:X 轴为孔雀石绿梯度浓度标准样品浓度的对数值;Y 轴为各浓度孔雀石绿标准样品的发光值除以“0”浓度孔发光值(RLU/RUL<sub>0</sub>%)。

#### 具体实施方式

[0032] 实施例 1 无色孔雀石绿单克隆抗体的制备

[0033] 1.1 动物免疫

[0034] 以半抗原无色孔雀石绿与载体蛋白牛血清白蛋白的偶联物(LMG-BSA)作为免疫

原,对健康的 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行基础免疫和 5 次加强免疫后,测定血清效价和  $IC_{50}$ ,选取效价最高、竞争性最强的小鼠进行冲击免疫;

#### [0035] 1.2 细胞融合和克隆筛选

[0036] 冲击免疫 3 天后,摘除小鼠眼球放血后处死,收集血液、无菌取脾脏,利用细胞融合技术将小鼠免疫脾细胞与 Sp2/0 细胞进行融合,融合后的细胞悬液加至已事先铺有饲养细胞的 96 孔板中,采用 HAT 选择培养基筛选融合细胞;

[0037] 待细胞生长至培养孔面积 1/10 时,无菌准确吸取 100  $\mu$ L 上清,加至已包被抗原 LMG-OVA 的酶标板内;以间接 ELISA 法测细胞培养上清效价,采用有限稀释法对阳性细胞连续克隆 3 次,直至阳性率为 100% 时,对细胞株进行扩大培养、鉴定、冻存和建株,对鉴定后细胞株进行连续培养传代 2 个月以上,每隔 5 代检测其稳定性和抗体分泌能力;1.3 细胞冻存与复苏

[0038] 用冻存液将处于对数生长期的杂交瘤细胞制成细胞悬液,分装于冻存管,置于液氮中保存;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,移入细胞瓶中培养;

#### [0039] 1.4 腹水的制备与纯化

[0040] 采用体内诱生法,将灭菌石蜡油注入 8 周龄 Balb/c 小鼠腹腔,7-14 天后注入杂交瘤细胞,7-10 天后收集腹水;收集的腹水用饱和硫酸铵法进行初纯后,再用亲和层析法进一步纯化,经 SDS-PAGE 电泳鉴定,证实获得的无色孔雀石绿单克隆抗体 1H10 达到电泳纯。

#### 1.5 单克隆抗体的鉴定

##### [0041] 1.5.1 杂交瘤细胞培养上清及纯化后抗体效价的测定

[0042] 采用间接 ELISA 方法,测定杂交瘤细胞培养上清中 LMG-McAb 的效价为 1:640,亲和层析纯化后的腹水效价达到  $1:5 \times 10^5$ 。

##### [0043] 1.5.2 亲和力的测定

[0044] 通过非竞争 ELISA,分别以  $OD_{450}$  值为纵坐标,以 LMG-McAb 的浓度为横坐标,绘制亲和曲线,以公式 1 计算不同抗原包被浓度下的亲和常数,取平均值得出无色孔雀石绿单克隆抗体的亲和常数 ( $K_a$ ) 为  $6.2 \times 10^8$  L/mol。

$$[0045] \quad K_a = \frac{n-1}{2(n[Ab']-[Ab]_0)} \quad (\text{公式 1})$$

##### [0046] 1.5.3 亚类的鉴定

[0047] 采用美国 Southern Biotech 公司的免疫球蛋白亚类检测试剂盒测定无色孔雀石绿单克隆抗体 1H10 为 IgG<sub>1</sub> 亚类,  $\kappa$  轻链。

[0048] 实施例 2 孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法的建立

#### [0049] 2.1 相关试剂的配制

[0050] 碳酸盐缓冲液 (pH9.6, 即包被液): 准确称取  $Na_2CO_3$  1.59g、 $NaHCO_3$  2.93g, 超纯水溶解后,调节 pH 至 9.6,定容至 1000mL。

[0051] 洗涤液 (pH7.4): 准确称取 NaCl 8.00g、 $KH_2PO_4$  0.20g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  2.90g、KCl 0.20g, 超纯水溶解后,调节 pH 至 7.4,加入吐温 -200.50mL,定容至 1000mL。

[0052] 磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH7.4): 准确称取 NaCl 8.00g、 $KH_2PO_4$  0.20g、

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 90g、 $\text{KCl}$ : 20g, 超纯水溶解后, 调节 pH 至 7.4, 定容至 1000mL。

[0053] 封闭液: 准确称取脱脂奶粉 1.0g, 加入 20mL 磷酸盐缓冲液, 搅拌均匀至完全溶解。

[0054] BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒, P0018, 100mL): 购自碧云天生物技术研究所以。

[0055] 2.2 抗原、抗体稀释倍数的确定

[0056] 采用方阵滴定确定抗原、抗体稀释倍数: 将 LMG-OVA (10mg/mL) 按照 1:2000、1:4000、1:6000 和 1:8000 稀释后包被化学发光板, 并以 1:1000、1:2000、1:3000 和 1:4000 稀释无色孔雀石绿单克隆抗体 (4.6mg/mL), 进行反应, 选择反应标准曲线  $\text{IC}_{50}$  (50% 抑制率时药物的浓度, 即反应的灵敏度) 最小的条件作为最佳抗原包被条件。由表 1 结果确定包被抗原和单克隆抗体的最佳稀释倍数分别为 1:2000、1:4000, 即  $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.15 \mu\text{g/mL}$ 。

[0057] 表 1 抗原、抗体稀释倍数的确定

LMG 单克隆 抗体稀释倍数	LMG-OVA 稀释倍数			
	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000
1:1000	42.971	32.934	30.312	15.132
1:2000	0.197	5.579	378.562	38.274
1:3000	0.155	1.548	96.425	113.197
1:4000	0.150	8.795	7.706	8.186

[0059] 2.3 封闭液的确定

[0060] 以最佳抗原包被条件包被化学发光板, 以 20mM 的 PBS、5% 的脱脂奶粉、1% 的 BSA、5% 的胎牛血清作为封闭材料, 选择反应标准曲线  $\text{IC}_{50}$  最小, 作为反应封闭液。由表 2 结果确定 5% 的脱脂奶粉为最佳。

[0061] 表 2 封闭液的确定

[0062]

	10mM PBS	5%Skim milk	1%BSA	1%OVA
$\text{IC}_{50}$	56.829	3.067	3.367	23.211

[0063] 2.4 乙腈浓度对反应的影响

[0064] 将乙腈用去离子水稀释成 0%、15% ~ 35%、40% ~ 60%、70% ~ 100%, 并分别配制 10ppb LMG 标准品, 进行反应, 通过比较每个反应的 10ppb 标准品与 0 标品 RLU 的比值, 选择比值最小的乙腈溶液为配制 LMG 标准品的溶剂。由表 3 可见, 当使用 15 ~ 35% 乙腈配制 LMG 标准品进行反应时,  $\text{RLU}_{10}/\text{RLU}_0$  比值最小, 说明 15 ~ 35% 乙腈溶液可以提高反应的敏感性, 推测是由有机溶剂对蛋白反应的影响造成。另外, 分别用以上浓度乙腈溶液配制 100ppb LMG 标准品, 发现当用 15 ~ 35% 乙腈溶液溶解超过 100ppb LMG 标准品时, 会出现浑浊, 形成悬液, 这也可以直观地提示检测者需对样品进一步稀释, 直至浑浊消失。

[0065] 表 3 乙腈浓度对反应的影响

[0066]

	0% 乙腈	15% ~ 35% 乙腈	40% ~ 60% 乙腈	70% ~ 100% 乙腈

RLU <sub>10</sub> /RLU <sub>0</sub>	63.65%	33.15%	78.38%	87.33%
-------------------------------------	--------	--------	--------	--------

[0067] 2.5 竞争反应时间的确定

[0068] 在前述已确定的最佳条件下,分别选择 15min、30min、60min 和 90min 作为竞争反应时间,以反应标准曲线 IC<sub>50</sub> 作为判定指标,同时结合标准曲线的 R<sup>2</sup> 值、RLU<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 选择竞争反应时间。由表 4 结果确定 60min 为最佳竞争反应时间。

[0069] 表 4 竞争反应时间的确定

[0070]

	公式	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μg/L)	RLU <sub>max</sub> /IC <sub>50</sub>
20min	y=-27.434x+74.484	0.9595	7.81	57002
45min	y=-27.489x+68.523	0.9843	4.72	169551
60min	y=-16.174x+48.742	0.9775	0.836	2122784
90min	y=-27.081x+81.071	0.9876	14.040	90321

[0071] 2.6 标准曲线的建立、IC<sub>50</sub> 和最低检测限

[0072] 在最优条件下,将无色孔雀石绿配成 0.001 ~ 100 μg/L 系列浓度,每个浓度 3 孔重复,进行检测。以标准样品溶液浓度的对数值为横坐标,以各浓度无色孔雀石绿标准品的发光值除以“0”浓度孔发光值 (RLU/RUL<sub>0</sub>%) 为纵坐标,绘制标准曲线。如图 1 所示,标准曲线的回归方程为 y=-10.462x+46.389, R<sup>2</sup>=0.9829,曲线在 0.001 ~ 100 μg/L 之间呈现良好的线性关系,最低检测限是 0.016 μg/L, IC<sub>50</sub> 为 0.45 μg/L。

[0073] 2.7 本发明的特异性

[0074] 以本发明的分析检查法对 LMG 结构类似物亚甲基蓝和一些常见抗生素(氯霉素、己烯雌酚、磺胺二甲嘧啶、头孢噻吩钠)进行检测,测定 IC<sub>50</sub>,按照公式 2,计算各药物的交叉反应率。由表 5 可见,本发明所建立的方法与常见抗生素的交叉反应率均小于 0.01%,表明本法特异性较好。

[0075] 交叉反应率 = IC<sub>50</sub>(无色孔雀石绿) / IC<sub>50</sub>(其他药物) × 100% (公式 2)

[0076] 表 5 本发明特异性测定结果

[0077]

化合物	交叉反应率(%)
无色孔雀石绿	100
亚甲基蓝	<0.01
氯霉素	<0.01
己烯雌酚	<0.01

磺胺二甲嘧啶	<0.01
头孢噻吩钠	<0.01

[0078] 2.8 本发明的准确度

[0079] 以低、中、高三个浓度(0.1 μg/L、1 μg/L、10 μg/L)进行回收率实验,每个样品设定3孔重复,测定其化学发光值,将得到的平均值代入标准曲线的回归方程,求出相应标准样品浓度值,计算回收率。由表6结果确定本发明的回收率在86.37~116.84%之间,表明本法具有可靠的准确度。

[0080] 表6 本发明准确度的测定结果

次数	各测定浓度(μg/L)		
	0.1	1	10
1	443256	398837	259631
2	433698	359755	253848
3	452784	326043	247465
平均值	443246	359755	253648
计算测定值	0.11684	0.79334	9.050
回收率(%)	116.84%	86.37%	90.50%

[0082] 2.9 与两步式化学发光酶免疫分析法的比较

[0083] 在最优反应条件下分别以本发明一步式与常规两步式方法进行反应,计算得到各自的 $IC_{50}$ 值及 $RLU_{max}/IC_{50}$ 值,由表7可见,二者指标相近,在一步法中,将标准品抗原或待测样品、LMG-McAb和酶标二抗HRP-山羊抗小鼠IgG同时加入到包被有LMG-OVA的酶标板中,较两步式方法,一步法减少了操作步骤,缩短了实验时间约1.5h,更符合快速检测的要求。

[0084] 表7 一步式与两步式化学发光酶免疫分析法的比较结果

[0085]

	一步式	两步式
$IC_{50}$ (μg/L)	0.45	0.4650
$RLU_{max}/IC_{50}$	1165539	1009487

[0086] 实施例3孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测试剂盒的研制

[0087] 根据实施例1和2的研究结果,组装孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测试剂盒。

[0088] 3.1 试剂盒组成

[0089] A 包被有包被抗原(LMG-OVA)的化学发光板;

[0090] B 无色孔雀石绿系列标准样品溶液:0 μg/L、0.001 μg/L、0.01 μg/L、0.1 μg/L、

1  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ ；

[0091] C 无色孔雀石绿单克隆抗体 1H10 工作液；

[0092] D HRP- 山羊抗小鼠 IgG 工作液；

[0093] E 浓缩洗涤液：NaCl 18.00g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.90g、KCl 0.20g、吐温-20 0.50mL，加水定容至 100mL；

[0094] F 化学发光液 A 液、B 液（超敏 ECL 化学发光试剂盒 P0018—BeyoECL Plus）；

[0095] 3.2 化学发光板的包被

[0096] 用包被液将抗原稀释成 5  $\mu\text{g/mL}$ ，每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 ~ 16h 后，倾去包被液，用洗板机洗涤化学发光板 3 次，拍干；然后每孔加入 350  $\mu\text{L}$  封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1h，倾去封闭液，用洗板机洗涤 3 次，拍干；37 $^{\circ}\text{C}$  烘干后，用锡箔纸真空密封，4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

[0097] 实施例 4 孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测试剂盒的应用

[0098] 4.1 试剂的配制

[0099] A 洗涤液：将试剂盒中提供的浓缩洗涤液用超纯水稀释 10 倍后使用。

[0100] B 化学发光液：在添加化学发光液前，将化学发光液 A 液、B 液按照 1:1 混合均匀。

[0101] 4.2 组织样品的前处理

[0102] A 取 5g 组织样品于 50mL 离心管内；

[0103] B 加入 10mL 乙腈超声波震荡提取 15min，4000r/min 离心 10min；

[0104] C 取上清液加入 20g 中性氧化铝，吸附样品中油脂，震荡混匀 5min，4000r/min 离心 5min；

[0105] D 取上清液于氮气吹干，加入 15 ~ 35% 乙腈溶液溶解，用于检测。

[0106] 4.3 检测过程

[0107] A 将化学发光板从 4 $^{\circ}\text{C}$  中取出，待温度平衡至室温；

[0108] B 按照每孔 50  $\mu\text{L}$  将系列标准样品溶液和待测样品加入化学发光板，各设 3 孔重复，然后每孔依次加入 50  $\mu\text{L}$  酶标二抗 HRP- 山羊抗小鼠 IgG、50  $\mu\text{L}$  无色孔雀石绿单克隆抗体，混匀，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 60min；

[0109] C 倾去液体，用洗板机洗涤 5 次，拍干；

[0110] D 每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  化学发光液，混匀，尽快测定各孔发光值；

[0111] E 按照公式，根据所获得样品发光值，计算样品的抑制率，并将抑制率代入标准回归方程，计算出残留量；如样品曾稀释，则乘以稀释倍数，即为样品中孔雀石绿的残留量。

[0112]

$$\text{抑制率} = \frac{\text{标准样品或样品化学发光值}}{\text{0 标准样品化学发光值}} \times 100\%$$

[0113] 4.4 样品的检测

[0114] 采集市售的虾、鱼样品共 206 份，参考上述方法进行样品的前处理，然后用本发明的试剂盒进行检测。检出含量超过 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 1 份，超过 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 4 份，超过 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 1 份，其余未检出。

[0115] 实施例 5 本发明的化学发光酶免疫试剂盒与标准检测方法的比较

[0116] 选取 10 份组织样品，分别用本发明的检测试剂盒和我国水产行业标准检测方法

《SC/T3021-2004 水产品中孔雀石绿残留量的测定液相色谱法》检测其中无色孔雀石绿残留量,结果见表 8。由于本发明试剂盒最低检测限 ( $0.0016 \mu\text{g/L}$ ) 远低于行业标准检测方法 ( $4 \mu\text{g/L}$ ),所以可以检测其无法检出的样品。该结果说明两种方法的符合率为 100%,本发明的试剂盒具有较好的应用效果。

[0117] 表 8 检测结果的比较

[0118]

样品	1-1 蟹	1-2 蟹	1-5 虾	1-9 鱼	2-4 虾	2-8 鱼	2-10 鱼	3-1 鱼	3-5 鱼	3-8 虾
行标方法 ( $\mu\text{g/L}$ )	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
本试剂盒 ( $\mu\text{g/L}$ )	1.06	0.051	0.029	0.0022	1.89	2.36	1.42	0.095	1.026	0.327

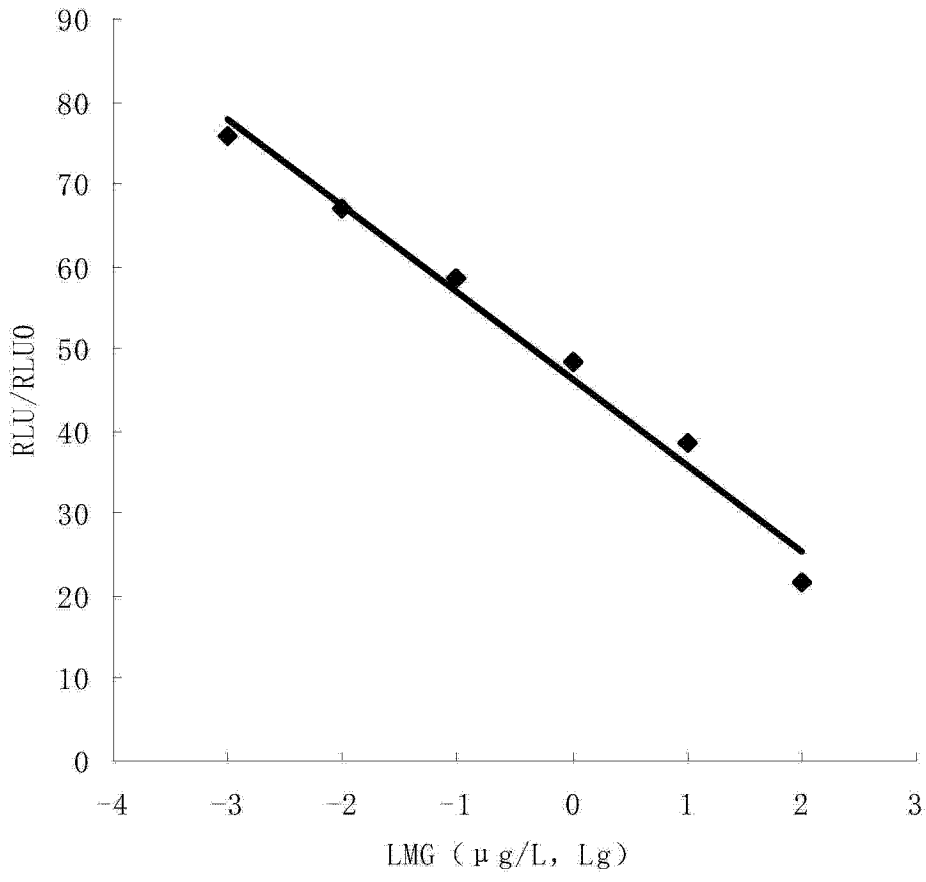


图 1

专利名称(译)	孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN103472228A</a>	公开(公告)日	2013-12-25
申请号	CN201310408148.4	申请日	2013-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
[标]发明人	吴健敏 马玲 张启模 陈凤莲 覃绍敏 白安斌 韦建兴 林俊 刘金凤 黄红梅 关忠谊		
发明人	吴健敏 马玲 张启模 陈凤莲 覃绍敏 白安斌 韦建兴 林俊 刘金凤 黄红梅 关忠谊		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	杨立华		
其他公开文献	<a href="#">CN103472228B</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种孔雀石绿残留一步式化学发光酶免疫分析检测法及试剂盒，该法结合了间接酶免疫反应和化学发光技术，在不需要另外制备酶标单克隆抗体的情况下，将传统两步式化学发光酶免疫分析法简化为一步，并利用15~35%乙腈对高浓度无色孔雀石绿溶解力有限的特性，将其作为样品溶解液。该法应用在动物源性食品中孔雀石绿残留检测，具有快速、简便、特异、灵敏、准确、检测范围宽等特点，更加符合快速检测的要求，具有较好的应用前景。本发明试剂盒的IC<sub>50</sub>为0.45μg/L，回收率为86.37~116.84%，与标准检测方法的吻合率为100%，适用于孔雀石绿的痕量分析与批量检测。

$$K_a = \frac{n-1}{2(n[Ab'] - [Ab]_0)}$$