



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107422112 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201710528619.3

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.07.01

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 河南科技大学

地址 471000 河南省洛阳市涧西区西苑路  
48号

(72)发明人 李兆周 陈秀金 王耀 樊振江  
高红丽 李道敏 李松彪 曹力  
吕璞 金东亮 张为民

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所  
(普通合伙) 41120

代理人 程茗

(51)Int.Cl.

G01N 33/549(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

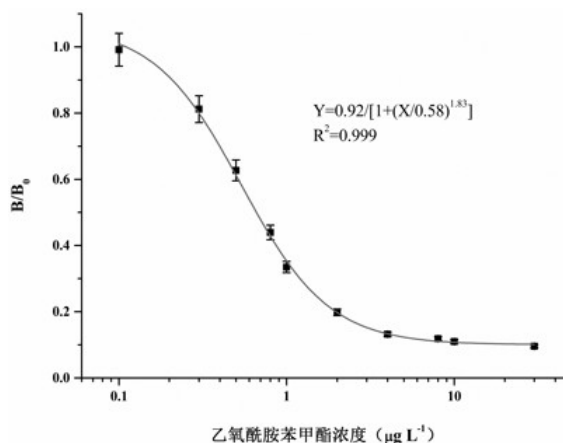
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

## (54)发明名称

一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒、制备方法及应用

## (57)摘要

本发明涉及一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒、制备方法及应用,属于免疫学检测领域,所述试剂盒包括包被有乙氧酰胺苯甲酯抗原的酶标板、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、酶标或荧光标记的羊抗鼠二抗抗体、乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、洗涤液和稀释液;所述乙氧酰胺苯甲酯抗原是乙氧酰胺苯甲酯半抗原与载体的偶联物,所述载体为卵清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白或多聚赖氨酸中的一种或两种。采用该试剂盒检测动物性食品中乙氧酰胺苯甲酯残留,具有灵敏度、精密度和准确度高,特异性强,交叉反应率低,稳定性好,储存时间长,操作简便,快捷,适合现场大批量样品初筛检测等优点,有助于简化该药物的残留分析。



1. 一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤一、乙氧酰胺苯甲酯半抗原的制备

以对氨基水杨酸为原料,甲酯化后,在1w-9w的微波环境中进行乙基化反应,制备4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯;

或,以4-硝基-2-乙氧基苯甲酸为原料,经过甲酯化和还原后,制备4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯;

步骤二、乙氧酰胺苯甲酯抗原的制备

采用重氮化法或戊二醛法,将步骤一制备的乙氧酰胺苯甲酯半抗原与载体进行偶联,合成制备乙氧酰胺苯甲酯包被原和免疫原;所述载体为卵清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白或多聚赖氨酸中的一种或两种;

步骤三、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体的制备

将步骤二合成的免疫原与佐剂进行等体积比乳化,加入氧化石墨烯纳米颗粒或硅胶纳米颗粒,制备产乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株;在杂交瘤细胞株制备过程中,加入人类干细胞因子、白介素-3、重组人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、人类碱性成纤维细胞生长因子和小鼠骨髓瘤细胞与脾细胞进行细胞融合,再加入杂交瘤细胞融合克隆因子,混匀后培养制得;将杂交瘤细胞株进行放大纯培养,生产制备乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体,保存、备用;

步骤四、试剂盒的组建

用包被缓冲液将步骤二制备的包被原稀释成0.1-0.5mg/mL,100 $\mu$ L/孔加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C孵育2h-4h,倾去液体,洗涤液洗涤3-5次,拍干,加入封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育2h-4h,倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱干燥5h,铝箔袋真空塑封,得到含有包被原的酶标板;

将酶标板放入锡箔纸袋中,真空封装,与乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、标记抗体、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、稀释液、洗涤液一同放入专用的包装盒中,置于4 $^{\circ}$ C保存。

2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于:步骤二所述与乙氧酰胺苯甲酯半抗原偶联的载体为卵清蛋白。

3. 如权利要求书1所述的制备方法,其特征在于:步骤四所述包被缓冲液为0.05mol/L且pH 9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液为含有质量分数为1%卵清蛋白的0.2mol/L且pH 7.4的磷酸盐缓冲液;所述洗涤液为含有体积分数为1.5%吐温的0.2mol/L且pH=7.4的磷酸盐缓冲液;所述稀释液为含有质量分数为0.05%-6%脱脂奶粉的0.02mol/L且pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

4. 如权利要求1-3任意一种所述制备方法制备的试剂盒,其特征在于:包括包被有乙氧酰胺苯甲酯抗原的酶标板、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、标记抗体、乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、洗涤液和稀释液。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述标记抗体为经酶或荧光标记的羊抗鼠二抗抗体。

6. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于:所述荧光标记用的荧光标记物为高分子荧光微球、量子点、Alexa-Fluor系列荧光染料、罗丹明、二苯乙烯荧光染料、萘酰亚胺荧光染料、香豆素类荧光染料或藻胆蛋白中的一种。

7. 如权利要求6所述的试剂盒,其特征在于:所述荧光标记物为Alexa-Fluor系列荧光染料中的Alexa Fluor 488。

8. 利用权利要求4-7任意一种所述试剂盒检测乙氧酰胺苯甲酯残留的检测方法,其特征在于:首先对待测样品进行前处理;然后取出试剂盒,恢复至室温后按需要取出酶标板,向酶标板中加入50 $\mu$ L/孔的乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液或待测样品溶液,再加入乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液,振荡,混匀,25 $^{\circ}$ C避光孵育30min,将孔内的液体甩干,再加入250 $\mu$ L/孔的洗涤液,如此洗涤4次,拍干;最后,加入50 $\mu$ L/孔的抗体标记物,25 $^{\circ}$ C避光孵育30min,于特定波长测定吸光度值,然后进行定量或定性分析。

9. 如权利要求8所述的检测方法,其中特征在于:对动物可食性组织进行样品前处理,具体步骤为:称取新鲜组织样品,剪碎,研磨,与pH7.4的磷酸盐缓冲液混匀,加入盐酸溶液,混合,超声波提取1h;冷却至室温后过滤,取滤液,加氢氧化钠溶液,混匀,再加磷酸二氢钾溶液,4 $^{\circ}$ C放置1h,过滤,取滤液加入C18固相萃取小柱,用甲醇洗脱样品,水浴蒸干洗脱液,用蒸馏水溶解后进行检测。

10. 如权利要求8所述的检测方法,其中特征在于:对饲料进行样品前处理,具体步骤为:称取样品,加入甲醇,涡旋,2000-7000g离心5min-15min,取上层有机相至离心管中,氮气吹干,加入正己烷,涡旋,震荡,加入三氯乙酸水溶液,混匀,涡旋,3000-8000g离心5min,取下层液体进行检测。

## 一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒、制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体地,涉及一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒、制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 乙氧酰胺苯甲酯是一种广谱抗球虫增效剂,化学名为4-乙酰胺基-2-乙氧基苯甲酸甲酯,可以抑制鸡排出感染的巨型艾美耳球虫卵囊,阻断对氨基苯甲酸-叶酸代谢路径中四氢叶酸合成而发挥抗球虫作用。在兽医临床中,该药物与某些抗球虫药合用以产生协同作用,作为抗球虫药的增效剂用于家禽饲料中,常与氨丙啉和磺胺喹恶啉联合应用,以控制禽的球虫病。该药物在禽体内不发生代谢,以药物原型进行消除和排泄。

[0003] 2002年发布的中华人民共和国农业部公告第235号《动物性食品中兽药最高残留量》规定乙氧酰胺苯甲酯在禽组织中的最高残留限量为肌肉500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,肝和肾1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。农牧发[2001] 38号文发布了动物源性食品中乙氧酰胺苯甲酯残留检测的高效液相色谱法,但是该方法样品前处理复杂、测定步骤多、检测时间长、费用高、对试验人员技术要求高,不适合大量样品的现场检测。

[0004] 国内外报道的检测乙氧酰胺苯甲酯的其他方法主要有紫外分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法以及液相色谱-质谱联用法。其中,紫外分光光度法的检测灵敏度较低,抗干扰能力差,已较少在残留分析中应用。气相色谱法需要将乙氧酰胺苯甲酯进行柱前衍生化,操作方法较为繁琐,检测结果的稳定性差。高效液相色谱和液相色谱-质谱联用法具有较高的精确性、准确性和敏感性,但因其样品制备流程繁琐、设备昂贵、检测速度慢、特异性差等原因,很难实现现场检测和普及推广。因此,亟需建立特异、快速和灵敏的监测方法。

[0005] 免疫学分析方法是免疫化学为基础发展起来的一种应用范围较广的技术,该方法通过制备目标分子的生物源性抗体,建立相应的特异性分析方法,不仅能通过颜色来快速、简便地做定性和定量结果分析,而且其特异性强、灵敏度高、前处理过程相对简单、检测成本低,尤其适用于大批量样品的筛选。在兽药残留分析中,药物残留的免疫学分析方法已成为现场残留检测的主要方法之一。

[0006] 目前,国内外尚未报道关于乙氧酰胺苯甲酯残留的免疫学分析方法,这在很大程度上影响了该药物在动物可食性组织中的监测。鉴于乙氧酰胺苯甲酯残留对食品安全的不良影响以及已有分析方法的缺陷,建立禽可食性组织中乙氧酰胺苯甲酯残留的免疫学分析方法已成为当务之急。

### 发明内容

[0007] 针对上述问题,本发明的目的在于提供一种检测乙氧酰胺苯甲酯残留的试剂盒及其制备方法。

[0008] 本发明保护一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒的制备方法,包括以下步骤:  
步骤一、乙氧酰胺苯甲酯半抗原的制备

以对氨基水杨酸为原料,甲酯化后,在1w-9w的微波环境中进行乙基化反应,制备4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯;

或,以4-硝基-2-乙氧基苯甲酸为原料,经过甲酯化和还原后,制备4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯;

#### 步骤二、乙氧酰胺苯甲酯抗原的制备

采用重氮化法或戊二醛法,将步骤一制备的乙氧酰胺苯甲酯半抗原与载体进行偶联,合成制备乙氧酰胺苯甲酯包被原和免疫原;所述载体为卵清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白或多聚赖氨酸中的一种或两种;

#### 步骤三、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体的制备

将步骤二合成的免疫原与佐剂进行等体积比乳化,加入氧化石墨烯纳米颗粒或硅胶纳米颗粒,制备产乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体的杂交瘤细胞株;在杂交瘤细胞株制备过程中,加入人类干细胞因子、白介素-3、重组人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、人类碱性成纤维细胞生长因子和小鼠骨髓瘤细胞与脾细胞进行细胞融合,再加入杂交瘤细胞融合克隆因子,混匀后培养制得;将杂交瘤细胞株进行放大纯培养,生产制备乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体,保存、备用;

#### 步骤四、试剂盒的组建

用包被缓冲液将步骤二制备的包被原稀释成0.1-0.5mg/mL,100 $\mu$ L/孔加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C孵育2h-4h,倾去液体,洗涤液洗涤3-5次,拍干,加入封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育2h-4h,倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱干燥5h,铝箔袋真空塑封,得到含有包被原的酶标板;

将酶标板放入锡箔纸袋中,真空封装,与乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、标记抗体、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、稀释液、洗涤液一同放入专用的包装盒中,置于4 $^{\circ}$ C保存。

[0009] 进一步的,步骤二所述与乙氧酰胺苯甲酯半抗原偶联的载体为卵清蛋白。

[0010] 进一步的,步骤四所述包被缓冲液为0.05mol/L且pH 9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液为含有质量分数为1%卵清蛋白的0.2mol/L且pH 7.4的磷酸盐缓冲液;所述洗涤液为含有体积分数为1.5%吐温的0.2mol/L且pH=7.4的磷酸盐缓冲液;所述稀释液为含有质量分数为0.05%-6%脱脂奶粉的0.02mol/L且pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0011] 本发明还保护一种上述制备方法制备的试剂盒,包括包被有乙氧酰胺苯甲酯抗原的酶标板、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、标记抗体、乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、洗涤液和稀释液。

[0012] 进一步的,所述标记抗体为经酶或荧光标记的羊抗鼠二抗抗体。

[0013] 进一步的,所述荧光标记用的荧光标记物为高分子荧光微球、量子点、Alexa-Fluor系列荧光染料、罗丹明、二苯乙烯荧光染料、萘酰亚胺荧光染料、香豆素类荧光染料或藻胆蛋白中的一种。

[0014] 进一步的,所述荧光标记物为Alexa-Fluor系列荧光染料中的Alexa Fluor 488。

[0015] 本发明另外还保护一种利用上述试剂盒检测乙氧酰胺苯甲酯残留的检测方法,首先对待测样品进行前处理;然后取出试剂盒,恢复至室温后按需要取出酶标板,向酶标板中加入50 $\mu$ L/孔的乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液或待测样品溶液,再加入乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液,振荡,混匀,25 $^{\circ}$ C避光孵育30min,将孔内的液体甩干,再加入250 $\mu$ L/孔的洗涤液,

如此洗涤4次,拍干;最后,加入50 $\mu$ L/孔的抗体标记物,25 $^{\circ}$ C避光孵育30min,于特定波长测定吸光度值,然后进行定量或定性分析。

[0016] 进一步的,对动物可食性组织进行样品前处理,具体步骤为:称取新鲜组织样品,剪碎,研磨,与pH7.4的磷酸盐缓冲液混匀,加入盐酸溶液,混合,超声波提取1h;冷却至室温后过滤,取滤液,加氢氧化钠溶液,混匀,再加磷酸二氢钾溶液,4 $^{\circ}$ C放置1h,过滤,取滤液加入C18固相萃取小柱,用甲醇洗脱样品,水浴蒸干洗脱液,用蒸馏水溶解后进行检测。

[0017] 进一步的,对饲料进行样品前处理,具体步骤为:称取样品,加入甲醇,涡旋,2000-7000g离心5min-15min,取上层有机相至离心管中,氮气吹干,加入正己烷,涡旋,震荡,加入三氯乙酸水溶液,混匀,涡旋,3000-8000g离心5min,取下层液体进行检测。

[0018] 有益效果:

1、利用本发明所述试剂盒的制备方法首次制备得到乙氧酰胺苯甲酯半抗原、结合抗原和抗体。在结合抗原制备过程中,首先以氨基水杨酸或4-硝基-2-乙氧基苯甲酸为原料,在微波的辅助作用下制备半抗原,然后将半抗原与载体偶联,制备包被原和免疫原,通过优化半抗原合成和偶联的工艺参数,制备性能稳定的结合抗原,进而为乙氧酰胺苯甲酯残留检测奠定了基础;其次,在抗体制备中,采用免疫原对动物进行免疫时,加入石墨烯纳米颗粒或硅胶纳米颗粒,不仅与免疫原能够协同刺激机体的免疫系统,而且使免疫原在小鼠体内更规律地缓慢释放,增强抗原的刺激作用,达到较好的免疫效果;随后,在细胞融合中,将人类干细胞因子、白介素-3重组人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和人类碱性成纤维细胞生长因子加入脾细胞悬液中,再加入骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞融合克隆因子,提高融合效率和效果,增强所获杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性,提高抗体的亲和力和灵敏度,有利于乙氧酰胺苯甲酯抗体的大量制备和生产。2、本发明所述试剂盒基于乙氧酰胺苯甲酯抗原和抗体,在被检药物上填补了国内外空白,构建了复杂基质中乙氧酰胺苯甲酯的筛选测定方法,形成了具有自主知识产权的新产品。采用该试剂盒对乙氧酰胺苯甲酯残留进行检测,对不同样品的回收率在88.4-99.2%之间,变异系数在15%以下,准确度和精密度较高;对水杨酸钠、氨丙啉和尼卡巴嗪几种类似药物的交叉反应率低于0.01%,特异性强;能够在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C的条件下保存12个月,稳定性好,储存时间长。该试剂盒操作简便,快捷,适合现场大批量样品初筛检测,可提高此类药物残留检测的效率,节约残留检测成本,进一步简化该药物残留的分析过程,具有高通量、快速和灵敏的优点,这对于保障食品安全,提高人民生活水平,具有重要的现实意义。

[0019] 3、在利用本发明所述试剂盒检测乙氧酰胺苯甲酯残留的方法中,样品前处理对检测结果的影响极大,如果样品不能得到有效处理,检测结果即不可靠,为生产带来不必要的负担,本发明在动物可食性组织和饲料样品的前处理方法上进行了优化,配合本发明所述试剂盒和检测方法,降低样品的检测限,提高准确度和精密度,避免基质干扰,减少有机溶剂的使用量。

## 附图说明

[0020] 图1是本发明所述乙氧酰胺苯甲酯免疫试剂盒的标准曲线图。

## 具体实施方式

[0021] 一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒的制备方法,步骤如下:

#### 步骤一、乙氧酰胺苯甲酯半抗原的制备

乙氧酰胺苯甲酯半抗原是指4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯,其能与对应抗体结合出现抗原-抗体反应,又不能单独激发动物体产生抗体。所述半抗原的合成方法可通过以下两种途径进行制备。

[0022] 途径1:以对氨基水杨酸为原料经甲酯化、乙基化两步反应,制得4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯。具体步骤为:首先将对氨基水杨酸、甲醇和浓硫酸在55℃-75℃条件下反应5-24 h生成4-氨基-2-羟基苯甲酸甲酯;然后,取对氨基水杨酸甲酯、硫酸二乙酯、碳酸钠和N,N-二甲基甲酰胺加入微波反应釜中,升温至50℃-100℃,微波功率为1W-9W,反应0.5h-5h。冷却反应釜至室温,取出产物,加水,用二氯甲烷萃取两次,合并萃取液,减压蒸馏,得到4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯。

[0023] 途径2:以4-硝基-2-乙氧基苯甲酸为原料,经过甲酯化后,进行还原制备4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯。具体步骤为:首先进行甲酯化反应,将4-硝基-2-乙氧基苯甲酸和甲醇与浓硫酸混合后,进行加热回流反应,而后用碳酸钠水溶液进行产物的洗涤,最终用蒸馏水洗涤,除去硫酸盐,烘干后得到4-硝基-2-乙氧基苯甲酸甲酯。然后,将4-硝基-2-乙氧基苯甲酸甲酯、硼氢化钠和四氢呋喃依次加入反应装置中,滴加碘的四氢呋喃溶液,反应1-6 h后,产物用二氯甲烷萃取,有机层用饱和碳酸氢钠溶液洗涤至中性,烘干后即可获得目标产物4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯。

[0024] 所述的半抗原合成方法可通过上述两种途径中的一种来实现,优选为第一种合成方法。

#### 步骤二、乙氧酰胺苯甲酯抗原的制备

乙氧酰胺苯甲酯抗原,包括包被原和免疫原,其制备可以通过化学偶联的方法,将乙氧酰胺苯甲酯半抗原与相应载体结合在一起,所述载体为卵清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白和多聚赖氨酸中的一种或两种;所述偶联方法采用重氮化法或戊二醛法。

##### [0026] (1) 重氮化法

免疫原的合成:将1mg-10mg的半抗原4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯溶于盐酸溶液,加入亚硝酸钠溶液,置于4℃反应1-5h,用0.5g/L氨基磺酸铵水溶液终止反应,得到重氮化衍生物。取多聚赖氨酸10-50mg溶于0.1mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液,加入适量体积的重氮化衍生物,用1mol/L 氢氧化钠溶液调至pH7.4,4℃反应6h-18h,产物用SepHdexG-75层析柱纯化,保存于-20℃作免疫原用。

[0027] 包被原的合成方法同上,所用载体为20-40mg的卵清蛋白。

##### [0028] (2) 戊二醛法

免疫原的合成:将10-30mg多聚赖氨酸溶解于0.01mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液中,加入2-10mL 25%的戊二醛溶液,在室温下反应6-24h,用SepHdexG-75层析柱纯化后,用0.01mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液4℃透析72h,每24h更换一次透析液,加入50mg-200mg4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯,20-40℃反应6-48h,

0.01mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液4℃透析120h,保存于-20℃作免疫原用。

[0029] 包被原的合成方法同上,所用载体为20mg-40mg的卵清蛋白。

[0030] 所述抗原的合成方法可通过上述两种方法中的一种,优选为戊二醛法来制备。

[0031] 步骤三、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

选择载体蛋白为多聚赖氨酸的免疫原,腹腔注射,1mg/只,免疫6-8周龄的雌性Blab/C小鼠,每2周免疫1次,共免疫5次。初次免疫时,将免疫原与弗氏完全佐剂进行等体积比乳化,加入0.1-1.5mg/mL氧化石墨烯纳米颗粒或硅胶纳米颗粒,混匀后注射免疫。第2-4次与弗氏不完全佐剂混合乳化,加入0.1-1.5mg/mL硅胶纳米颗粒或氧化石墨烯纳米颗粒,混匀后注射免疫。最后一次不加佐剂,用2-4mg/只的剂量进行免疫。三次免疫后,尾尖取血,测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠,准备进行融合。

[0032] (2) 细胞融合

取步骤(1)选定的小鼠的脾细胞悬液,加入人类干细胞因子1.0-5.0  $\mu\text{g/L}$ 、白介素-3 1.0-8.0 $\mu\text{g/L}$ 、重组人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子500-2000IU/mL、人类碱性成纤维细胞生长因子2.0-10.0 $\mu\text{g/L}$ ,与SP2/0细胞进行融合,再加入杂交瘤细胞融合克隆因子10mL/L-30mL/L混匀,分装,37 $^{\circ}\text{C}$  5%的 $\text{CO}_2$ 条件下培养,应用HAT半固体培养基进行细胞的融合和筛选,培养7天-14天后,待长出肉眼可见的单克隆细胞集落时,用微量移液器挑取,进行放大纯培养,而后测定上清液抗体的效价,进一步进行抗体特性鉴定和腹水生产。

[0033] 其中,所述的HAT半固体培养基包括体积分数为10%的0.3g/mL的羧甲基纤维素钠溶液,体积分数为18%的pH 7.0-7.4的2倍浓缩1640培养基、体积分数为0.2%的1mol/L的L-谷氨酰胺溶液、体积分数为0.5%的1mol/L的 $\beta$ -巯基乙醇溶液、体积分数为10%的胎牛血清、体积分数为0.5%的10000IU/mL的青霉素和10000IU/mL的链霉素混合液、体积分数为4%的MEM非必需氨基酸和体积分数为0.8%的市售50倍HAT溶液,其余为水。

[0034] (3) 单克隆抗体的大量制备

采用体内诱生腹水法,大量制备腹水,通过辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水,分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0035] 步骤四、试剂盒的组建

用包被缓冲液将步骤二制备的包被原稀释成0.1mg/mL-0.5mg/mL,100 $\mu\text{L}$ /孔加入酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2h-4h,倾去液体,洗涤液洗涤3-5次,拍干,加入封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2h-4h,倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱干燥5h,铝箔袋真空塑封,得到含有包被原的酶标板;其中,所述包被液为0.05mol/L且pH 9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液为含有质量分数为1%卵清蛋白的0.2mol/L且pH 7.4的磷酸盐缓冲液。

[0036] 配制乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液,溶液浓度依次为:0  $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、0.8 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、4.0 $\mu\text{g/L}$ 、8.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、30.0 $\mu\text{g/L}$ 。

[0037] 标记抗体采用羊抗鼠二抗,用于标记的标记物为酶标记物或荧光标记物。所述的酶标记物为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,同时配备底物显色液和终止液。所述的荧光标记物为高分子荧光微球、量子点、Alexa-Fluor系列荧光染料(包括Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700和Alexa Fluor 750)、罗丹明、二苯乙烯荧光染料、萘酰亚胺荧光染料、香豆素类荧光染料和

藻胆蛋白中的一种,优选荧光标记物为Alexa Fluor 488。当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述的底物显色液由底物A和底物B组成,底物A为过氧化氢或过氧化脲,底物B为邻苯二胺或四甲基联苯胺,底物A和底物B按体积比1:1,所述的终止液为1-2mol/L的硫酸或盐酸水溶液。当标记酶为碱性磷酸酯酶时,所述的底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述的终止液为1-2mol/L氢氧化钠水溶液。当标记物为荧光物质时,不需要显色液和终止液。

[0038] 配制样品稀释液和洗涤液,其中,稀释液为0.02mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为0.05%-6%脱脂奶粉;洗涤液为0.2mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有体积分数为1.5%吐温-20。

[0039] 将制备的含有包被原的酶标板放入锡箔纸袋中,真空封装,与乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、经标记的羊抗鼠二抗抗体、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、样品稀释液、洗涤液一同放入专用的包装盒中,制备形成检测乙氧酰胺苯甲酯的试剂盒,将试剂盒置于4℃保存。

[0040] 上述试剂盒用于乙氧酰胺苯甲酯检测,包括以下步骤:

a. 样品前处理

动物可食性组织:称取新鲜组织样品5g,剪碎,研磨,与pH7.4的磷酸盐缓冲液混匀,加入50mmol/L的盐酸溶液,混合,超声波提取1h。冷却至室温后过滤,取滤液10mL,加0.2-2.0mL 1mol/L 氢氧化钠溶液,混匀,再加2.0-9.0mL 0.50mol/L磷酸二氢钾溶液,4℃放置1h,过滤,取滤液3.0-8.0mL加入C18固相萃取小柱,用1.0-4.0mL甲醇洗脱样品,水浴蒸干洗脱液,以1.0mL蒸馏水溶解后检测。

[0041] 饲料样品前处理:称取5.0g样品,加入4.0-10.0mL甲醇,涡旋,2000-7000g离心5-15min,取上层有机相至离心管中,氮气吹干,加入1.0-5.0mL正己烷,涡旋,震荡,加入2.0-4.0mL 3%的三氯乙酸水溶液,混匀,涡旋,3000-8000g离心5min,取下层液体进行检测。

[0042] 检测结果采用四参数法拟合做标准曲线,计算半数抑制浓度、检测限、加标回收率等技术参数。

b. 试剂盒检测

取出试剂盒,恢复至室温,按需要取出酶标板,依次加入50 $\mu$ L/孔标准品或待测样品溶液和抗体液,振荡,混匀,25℃避光孵育30min,将孔内的液体甩干,用洗涤液250 $\mu$ L/孔,洗涤4次,拍干。然后,加入抗体标记物50 $\mu$ L/孔,25℃避光孵育30min,在特定的波长下测定,绘制标准曲线,然后根据标准曲线进行定量或定性分析。

[0044] 定量分析:分别测定标准品和样品的吸光度值,以标准品或样品的吸光度值(B)除以标准品的吸光度值(B<sub>0</sub>)再乘以100%,即是百分吸光度值,以该值为纵坐标,标准品浓度的对数值为横坐标,绘制标准曲线。将样本的百分吸光度值代入标准曲线的方程,即可得到相应的测定浓度。

[0045] 定性分析:比较标准品和待测样品的平均吸光度值,即可判断并定性分析待测样品的浓度范围。

[0046] 下面通过具体的试验例和实施例对本发明作进一步的解释说明。

[0047] 实施例1 一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒的制备方法

制备乙氧酰胺苯甲酯半抗原:以对氨基水杨酸为原料,将对氨基水杨酸5g、甲醇50mL和浓硫酸200mL在65℃条件下反应16h生成4-氨基-2-羟基苯甲酸甲酯;取对氨基水杨酸甲酯

2g、硫酸二乙酯3g、碳酸钠10g和N,N-二甲基甲酰胺加入微波反应釜中,升温至70℃,微波功率为5W,反应2h。冷却反应釜至室温,取出产物,加水,用二氯甲烷萃取两次,合并萃取液,减压蒸馏,得到4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯,即乙氧酰胺苯甲酯半抗原。

[0048] 制备乙氧酰胺苯甲酯免疫原和包被原:将20mg多聚赖氨酸溶解于30mL 0.01mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液中,加入7mL 25%的戊二醛溶液,在室温下反应18h,用SepHdexG-75层析柱纯化后,用1000mL 0.01mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液4℃透析72h,每24h更换一次透析液,加入100mg 4-氨基-2-乙氧基苯甲酸甲酯,30℃反应24h,用1000mL 0.01mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液4℃透析120h,保存于-20℃作免疫原用。包被原的合成方法同上,所用载体为30mg的卵清蛋白。

[0049] 制备乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体:

(1) 动物免疫:取上述制备的免疫原,腹腔注射,1mg/只,免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,每2周免疫1次,共免疫5次。初次免疫时,将免疫原与弗氏完全佐剂进行等体积比乳化,加入0.5mg/mL氧化石墨烯纳米颗粒,混匀后注射免疫。第3次与弗氏不完全佐剂混合乳化,加入0.5mg/mL硅胶纳米颗粒,混匀后注射免疫。最后一次不加佐剂,用3mg/只的剂量进行免疫。三次免疫后,尾尖取血,测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠,准备进行融合。

[0050] (2) 免疫脾淋巴细胞的制备:取免疫合格的Balb/C鼠一只,摘除眼球放血致死(收集血液并分离血清,作为阳性血清),自来水冲洗后浸泡于75%酒精中浸泡5min。随即放入超净工作台内小鼠解剖台上,左侧卧位,用7号针头固定四肢。无菌手术开腹取出脾脏(剪开毛皮后换一副剪刀、镊子),用剪刀剪成小块(5-7段)放于研磨器中(预先加入2-3mLRPMI-1640基础培养液)研磨(用力要均匀,以防破坏脾细胞),挤压出脾细胞。补加7mL RPMI-1640基础培养液,静置3-5min,取上2/3部分悬液移入50mL离心管中,上述过程反复2-3次。用RPMI-1640基础培养液洗细胞两次(1000r/min×10min)后重悬,计数后备用。

[0051] (3) 细胞融合:取小鼠的脾细胞,加入人类干细胞因子4.0μg/L、白介素-3 5.0μg/L、重组人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子1000IU/mL、人类碱性成纤维细胞生长因子6.0μg/L,与SP2/0细胞进行融合,再加入杂交瘤细胞融合克隆因子20mL/L,混匀,分装,37℃ 5%的CO<sub>2</sub>条件下培养,应用HAT半固体培养基进行细胞的融合和筛选,培养10天后,待长出肉眼可见的单克隆细胞集落时,用微量移液器挑取,进行放大纯培养,而后测定上清液抗体的效价,进一步进行抗体特性鉴定和腹水生产。

[0052] (4) 单克隆抗体的大量制备:采用动物体内诱生的方法制备。具体步骤为:在接种杂交瘤细胞前1-2周,先给Balb/C小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡;将培养的杂交瘤细胞离心,弃上清,细胞用无血清培养液悬浮,并将细胞数调至1×10<sup>6</sup>个/mL,每只小鼠腹腔注射0.5mL;接种杂交瘤细胞后约11天,可见小鼠腹部明显膨大,此时用碘酒、酒精棉球对小鼠腹部皮肤消毒后,用注射器抽取腹水;将腹水于4℃ 1000 r/min离心10min,取上清,分装后置-20℃保存。

[0053] 采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化单抗,步骤如下:向1份腹水中加入2倍体积的0.06mol L<sup>-1</sup>乙酸缓冲液(pH 5.0),用0.1mol L<sup>-1</sup>的盐酸调pH值至4.5。室温搅拌,并在30min内逐滴加入辛酸,按每毫升腹水加33μL的量加入辛酸。4℃静置2h,15000r/min离心30min,弃沉淀,上清经砂芯漏斗过滤后,加入1/10体积的0.1mol L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH 7.4,含8.5%氯化钠)。在冰浴下于30min内加入0.227g mL<sup>-1</sup>的硫酸铵,使成45%饱和度,静置1h以

上,4℃下12000r/min离心30min,弃上清,将沉淀物溶于适量的pH 7.4磷酸盐缓冲液中,并用pH 7.4磷酸盐缓冲液在4℃透析;4℃下12000r/min离心30min,弃沉淀,上清即为纯化的单抗。

[0054] (5) 组建乙氧酰胺苯甲酯免疫试剂盒:用包被缓冲液将制备的包被原稀释成0.1 - 0.5mg/mL,100 $\mu$ L/孔加入酶标板中,4℃过夜或37℃孵育2h-4h,倾去液体,洗涤液洗涤3 -5次,拍干,加入封闭液,37℃孵育2h-4h,倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱干燥5h,铝箔袋真空塑封,得到含有包被原的酶标板;其中,所述包被液为0.05mol/L且pH 9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;所述封闭液为含有质量分数为1%卵清蛋白的0.2mol/L且pH 7.4的磷酸盐缓冲液。

[0055] 配制乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液,溶液浓度依次为:0  $\mu$ g /L、0.1 $\mu$ g /L、0.3 $\mu$ g /L、0.5 $\mu$ g /L、0.8 $\mu$ g /L、1.0 $\mu$ g /L、2.0 $\mu$ g /L、4.0 $\mu$ g /L、8.0 $\mu$ g /L、10.0 $\mu$ g /L、30.0 $\mu$ g /L。

[0056] 标记抗体采用羊抗鼠二抗,用于标记的标记物Alexa Fluor 488。

[0057] 配制样品稀释液和洗涤液,其中,稀释液为0.02mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为0.05%-6%脱脂奶粉;洗涤液为0.2mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有体积分数为1.5%吐温-20。

[0058] 将制备的含有包被原的酶标板放入锡箔纸袋中,真空封装,与乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、经标记的羊抗鼠二抗抗体、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、样品稀释液、洗涤液一同放入专用的包装盒中,制备形成检测乙氧酰胺苯甲酯的试剂盒,将试剂盒置于4℃保存。

[0059] 实施例2 乙氧酰胺苯甲酯免疫试剂盒检测鸡肉中乙氧酰胺苯甲酯

称取新鲜鸡肉组织样品5g,剪碎,研磨,与pH7.4的磷酸盐缓冲液混匀,加入50mmol/L的盐酸溶液,混合,超声波提取1h。冷却至室温后过滤,取滤液10mL,加 1.0mL 1mol/L 氢氧化钠溶液,混匀,再加5.0mL浓度为0.50mol/L的磷酸二氢钾溶液,4℃放置1h,过滤,取滤液5.0mL加入C18固相萃取小柱,用3.0mL甲醇洗脱样品,水浴蒸干洗脱液,以1.0mL蒸馏水溶解后检测。

[0060] 检测时,取出实施例1制备的试剂盒,恢复至室温后按需要取出酶标板,向酶标板中加入50 $\mu$ L/孔的乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液或待测样品溶液,再加入乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液,振荡,混匀,25℃避光孵育30min,将孔内的液体甩干,再加入250 $\mu$ L/孔的洗涤液,如此洗涤4次,拍干;最后,加入50 $\mu$ L/孔的抗体标记物,25℃避光孵育30min,在488nm波长激发下,测定519nm波长处的吸光度值,绘制标准曲线,如图1所示,然后进行定量或定性分析。

[0061] 实施例3 乙氧酰胺苯甲酯免疫试剂盒检测鸡肝中乙氧酰胺苯甲酯

称取新鲜鸡肝组织样品5g,剪碎,研磨,与pH7.4的磷酸盐缓冲液混匀,加入50mmol/L的盐酸溶液,混合,超声波提取1h。冷却至室温后过滤,取滤液10mL,加 1.0mL 1mol/L 氢氧化钠溶液,混匀,再加5.0mL浓度为0.50mol/L的磷酸二氢钾溶液,4℃放置1h,过滤,取滤液5.0mL加入C18固相萃取小柱,用3.0mL甲醇洗脱样品,水浴蒸干洗脱液,以1.0mL蒸馏水溶解后检测。

[0062] 检测时,取出实施例1制备的试剂盒,恢复至室温后按需要取出酶标板,向酶标板中加入50 $\mu$ L/孔的乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液或待测样品溶液,再加入乙氧酰胺苯甲酯单

克隆抗体液,振荡,混匀,25℃避光孵育30min,将孔内的液体甩干,再加入250 $\mu$ L/孔的洗涤液,如此洗涤4次,拍干;最后,加入50 $\mu$ L/孔的抗体标记物,25℃避光孵育30min,在488nm波长激发下,测定519nm波长处的吸光度值,绘制标准曲线,如图1所示,然后进行定量或定性分析。

[0063] 实施例4 乙氧酰胺苯甲酯免疫试剂盒检测鸡饲料中乙氧酰胺苯甲酯

称取5.0g鸡饲料样品,加入7.0mL甲醇,涡旋,5000g离心10min,取上层有机相至离心管中,氮气吹干,加入4.0mL正己烷,涡旋,震荡,加入3.0mL 3%的三氯乙酸水溶液,混匀,涡旋,6000g离心5min,取下层液体进行检测。

[0064] 检测时,取出实施例1制备的试剂盒,恢复至室温后按需要取出酶标板,向酶标板中加入50 $\mu$ L/孔的乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液或待测样品溶液,再加入乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液,振荡,混匀,25℃避光孵育30min,将孔内的液体甩干,再加入250 $\mu$ L/孔的洗涤液,如此洗涤4次,拍干;最后,加入50 $\mu$ L/孔的抗体标记物,25℃避光孵育30min,在488nm波长激发下,测定519nm波长处的吸光度值,绘制标准曲线,如图1所示,然后进行定量或定性分析。

[0065] 对实施例2、实施例3和实施例4中不同样品检测的技术参数进行评判:

1. 试剂盒检测限测定

取空白样品组织,进行样品处理后,重复测定20次,计算OD值的平均值( $\bar{O}$ )和标准差(SD),根据公式 $Z = -3SD$ ,在标准曲线上查出Z对应的浓度,此即为标准品最低检测限。

[0066] 试剂盒在0.1  $\mu$ g L<sup>-1</sup>-30.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>的浓度范围内,对鸡肉、鸡肝和饲料中乙氧酰胺苯甲酯的检测限为0.21  $\mu$ g/kg、0.34 $\mu$ g/kg和3.52 $\mu$ g/kg。

[0067] 2. 试剂盒准确度和精确度测定

试剂盒的准确度常用加标回收率表示,精密度常用变异系数表示,分别在不同样品基质中添加标准品,采用上述样品处理和检测方法,每批样品重复5次,每个浓度重复5批,测定结果见表1。

[0068] 表1不同样品变异系数和回收率的测定

样品	加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	批内平均回收 率 (%)	批内变异系数 (%)	批间平均回收 率 (%)	批间变异系数 (%)
鸡肉	250	88.4	13.1	85.4	11.1
	500	91.3	9.2	90.8	8.2
	1000	95.2	7.4	94.7	5.3
鸡肝	750	92.2	11.5	91.8	9.1
	1500	96.7	7.7	95.3	6.2
	3000	98.4	5.8	97.7	4.1
鸡饲料	4000	97.6	9.4	96.9	3.7
	8000	98.3	8.5	97.3	3.3
	16000	99.2	7.3	98.8	2.4

结果显示,不同样品的回收率均在88.4%–99.2%之间,变异系数在15%以下,符合农业部农 医发[2005]17号文件试剂盒备案参考评判标准中关于精密度和准确度的规定。

[0069] 对本发明所述试剂盒的交叉反应率进行评价:选择水杨酸钠、氨丙啉和尼卡巴嗪等几种药物,测定交叉反应率[交叉反应率 =  $(\text{IC}_{50}\text{乙氧酰胺苯甲酯}/\text{IC}_{50}\text{竞争物}) \times 100\%$ ],结果见表2。

[0070] 表2试剂盒的交叉反应性

化合物	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	交叉反应率 (%)
乙氧酰胺苯甲酯	0.66	100
水杨酸钠	1050	<0.01
氨丙啉	2230	<0.01
尼卡巴嗪	3320	<0.01

对本发明所述试剂盒的保质期进行确定:将试剂盒放置在 $2^{\circ}\text{C}$ – $8^{\circ}\text{C}$ 保存12个月,每个月检测 1次,测定试剂盒的各种技术参数。同时放置在 $37^{\circ}\text{C}$ 和 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存6天,每天测定1次,计算试剂盒的各种技术参数。结果显示本试剂盒的各项技术指标均符合质量要求,技术指标的 变异系数小于5%,能够在 $2^{\circ}\text{C}$ – $8^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存12个月。

[0071] 需要说明的是,上述实施例仅为说明性的,并不以此限定本发明的保护范围,对本领域普通技术人员来说,在本发明所限定的保护范围内还有很多常规变形和其他实施例,这些变形和实施例都将在本发明待批的保护范围之内。

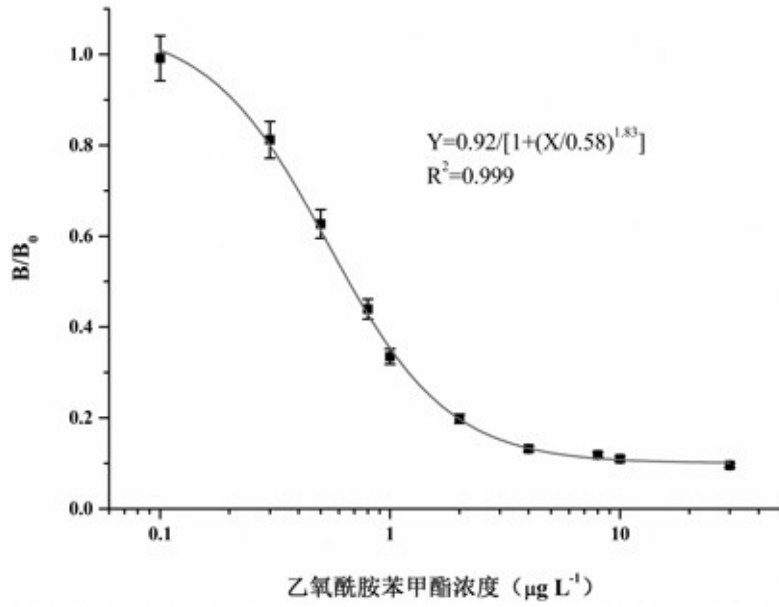


图1

专利名称(译)	一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒、制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107422112A</a>	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN201710528619.3	申请日	2017-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	李兆周 陈秀金 王耀 樊振江 高红丽 李道敏 李松彪 曹力 吕璞 张为民		
发明人	李兆周 陈秀金 王耀 樊振江 高红丽 李道敏 李松彪 曹力 吕璞 金东亮 张为民		
IPC分类号	G01N33/549 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/544 G01N33/577 G01N33/9493 G01N2333/455		
代理人(译)	程茗		
其他公开文献	CN107422112B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种检测乙氧酰胺苯甲酯的免疫试剂盒、制备方法及应用，属于免疫学检测领域，所述试剂盒包括包被有乙氧酰胺苯甲酯抗原的酶标板、乙氧酰胺苯甲酯单克隆抗体液、酶标或荧光标记的羊抗鼠二抗抗体、乙氧酰胺苯甲酯标准品溶液、洗涤液和稀释液；所述乙氧酰胺苯甲酯抗原是乙氧酰胺苯甲酯半抗原与载体的偶联物，所述载体为卵清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白或多聚赖氨酸中的一种或两种。采用该试剂盒检测动物性食品中乙氧酰胺苯甲酯残留，具有灵敏度、精密度和准确度高，特异性强，交叉反应率低，稳定性好，储存时间长，操作简便，快捷，适合现场大批量样品初筛检测等优点，有助于简化该药物的残留分析。

