



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110058011 A

(43)申请公布日 2019. 07. 26

(21)申请号 201910436476.2

(22)申请日 2019.05.23

(71)申请人 广州元睿生物科技有限公司

地址 510670 广东省广州市黄埔区香山路
17号B304房

(72)发明人 于运威

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 任重

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

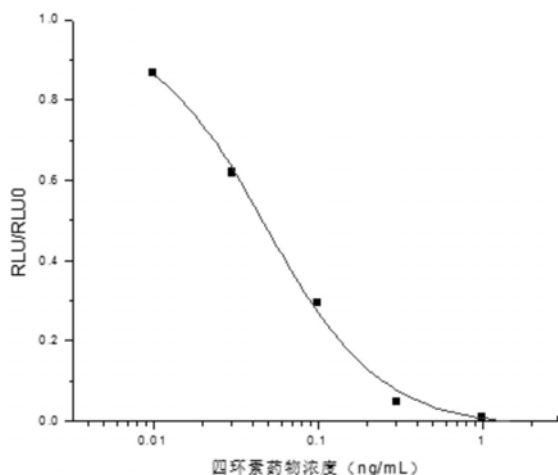
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒包括四环素基因工程抗体,以及其他酶联免疫检测所需试剂,如包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板,四环素标准品,酶标抗体,化学发光液和洗涤液。本发明的试剂盒具有高通量检测、高灵敏度、高特异性、高精密度、高稳定性、检测范围宽、分析速度快、准确的优点;标准曲线最大检测范围为15~120pg/mL,灵敏度45pg/mL,检出限40pg/mL;且无毒、环保、经济,可通过基因工程技术进行大量生产,对培养基无特殊要求,发酵密度高、发酵周期短,制造成本低。该试剂盒非常适用于四环素残留的痕量分析与批量样品的筛查检测,具有重要的现实意义和推广前景。



1. 一种四环素基因工程抗体,其特征在于,所述四环素基因工程抗体的制备方法:以经过四环素免疫抗原免疫的动物细胞的总RNA为模版,利用SEQ ID NO.1~4所示引物RT-PCR扩增出抗体的轻链可变区基因、重链可变区基因,并将其连接起来后插入载体pCANTAB5E,在大肠杆菌中表达获得四环素基因工程抗体。

2. 根据权利要求1所述四环素基因工程抗体,其特征在于,轻链的扩增条件为:94℃×5min变性,加入1μL 2.5U高保真Pfu酶,进行以下循环:94℃×30s,54℃×1min,72℃×1min,共25个循环,最后72℃延伸10min。

3. 根据权利要求1所述四环素基因工程抗体,其特征在于,重链的扩增条件为:94℃×5min变性,加入1μL 2.5U高保真Pfu酶,进行以下循环:94℃×30s,60℃×1min,72℃×1min,共30个循环,最后72℃延伸10min。

4. 根据权利要求1所述四环素基因工程抗体,其特征在于,以扩增出的轻链片段和重链片段互为模板,通过PCR完成VH--VL片段的预拼接,以预拼接产物的稀释液为模板进行VH--VL全长基因的拼接,并采用引物Q-B/Q-F对抗体进行二次PCR扩增,得到全长抗体基因片段,将片段用Bgl I及Not I双酶切后,与载体pCANTAB5E连接,转化大肠杆菌TG3进行IPTG诱导表达。

5. 一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,含有权利要求1~4任一所述四环素基因工程抗体。

6. 根据权利要求5所述试剂盒,其特征在于,还含有包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板,四环素标准品,酶标抗体,化学发光液和洗涤液。

7. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述的四环素包被抗原为重氮化后的对氨基苯甲酸与四环素的酚羟基的对位发生偶氮化,进而引入羧基,含羧基的四环素半抗原与牛血清白蛋白BSA的偶联物;四环素包被抗原的包被浓度为0.5mg/L。

8. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述的酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG或羊抗兔IgG。

9. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征在于,所述的化学发光液由A液和B液组成,A液为100mL去离子水中含有20mg对碘苯酚、8mg鲁米诺、1.21g Tris,pH8.4;B液为100mL去离子水中含有体积分数0.40% H_2O_2 、1.21g Tris,pH7.0;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合;所述的洗涤液为20倍浓缩洗涤液,20倍浓缩洗涤液是含有体积分数0.5%Tween20的pH7.4 0.4mol/L的磷酸盐缓冲液。

10. 根据权利要求5所述试剂盒,其特征在于,使用时对待测样品的预处理处理方法如下:

待测样品为奶样:用PBST稀释,离心取上清液测定;

待测样品为鸡蛋:蛋液用PBS溶液稀释,离心取上清液测定;所述PBS溶液中含0.1%曲拉通x-100;

待测样品为组织样品:分别取鸡、猪的鸡肉、肝脏或肾脏组织样品,加McIlvaine缓冲液,振荡离心,取上清液备用;Oasis HLB固相萃取柱依次用无水甲醇、水预洗;取备用上清液过柱,用水淋洗,挤干;用草酸甲醇溶液洗脱,挤干,收集洗脱液;将收集的洗脱液摇匀,用PBST溶液稀释后作为试样溶液待测。

一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于药物残留检测技术领域。更具体地,涉及一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 四环素类药物(TCs)具有广谱高效的杀菌抗生功效,可以与大多数药物或饲料添加剂混用,已被广泛应用于畜禽生产中。但过量使用不可避免的造成了严重的药物残留,成为严重危害人类健康的食品安全隐患之一。为此世界各国对TCs残留的检测十分关注。欧盟第675/92号令中初步规定在肌肉及牛奶中的四环素类药物的总量不得超过100 μ g/kg,在肾脏、肝脏及鸡蛋中四环素类药物不得超过600 μ g/kg、300 μ g/kg及200 μ g/kg。日本肯定列表制度规定奶和鸡蛋中四环素类化合物的总量分别不得超过100ng/mL和400ng/mg。

[0003] 已报道的四环素类药物残留的检测方法有微生物法、薄层色谱法、高效液相测定法、高效液相色谱-串联质谱法、毛细管电泳、电化学分析、酶联免疫法、胶体金法等,仪器检测方法对待测样品的前处理要求高,操作繁琐,需要精密仪器设备。酶联免疫法(ELISA)虽具有简单、快速、灵敏的特点,也适宜大规模的筛查工作,但其灵敏度有一定的制约,而且现用的检测四环素的ELISA试剂盒需要使用具有腐蚀性的硫酸等有毒或为致癌物质的底物。

[0004] 因此,建立一种经济、可靠、特异、敏感、快速有效的四环素类药物检测方法有很大的实际意义和应用前景。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有四环素类药物检测技术的缺陷和不足,提供一种具有高通量检测、高灵敏度、高特异性、高精密度、高稳定性、检测范围宽、分析速度快、准确,且环保经济等优点的四环素类药物化学发光酶联免疫检测技术。

[0006] 本发明的目的是提供一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒。

[0007] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0008] 一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒,含有四环素基因工程抗体。

[0009] 优选地,所述四环素基因工程抗体的制备方法:以经过四环素免疫抗原免疫并检测血清效价滴度达到要求的动物细胞(脾脏细胞)的总RNA为模版,利用SEQ ID NO.1~4所示引物RT-PCR扩增出抗体的轻链、重链可变区基因并将其连接起来,并插入载体pCANTAB5E,在大肠杆菌中表达。

[0010] 优选地,轻链的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C $\times$ 5min变性,加入1 μ L 2.5U高保真Pfu酶,进行以下循环:94 $^{\circ}$ C $\times$ 30s,54 $^{\circ}$ C $\times$ 1min,72 $^{\circ}$ C $\times$ 1min,共25个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0011] 优选地,重链的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C $\times$ 5min变性,加入1 μ L 2.5U高保真Pfu酶,进行以下循环:94 $^{\circ}$ C $\times$ 30s,60 $^{\circ}$ C $\times$ 1min,72 $^{\circ}$ C $\times$ 1min,共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0012] 优选地,再扩增出轻链和重链片段后,根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,以扩增出的轻链和重链片段互为模板,通过PCR完成VH--VL片段的预拼接,以预拼接产物的1/

50稀释液为模板,进行VH--VL全长基因的拼接,并采用引物Q-B/Q-F(含有Bgl I及Not I酶切位点)对抗体进行二次PCR扩增,得到长约760bp的全长抗体基因片段,将抗体片段用Bgl I及Not I双酶切后,与载体pCANTAB5E连接,转化大肠杆菌TG3进行IPTG诱导表达。其中,所述二次PCR扩增的条件为:94℃×5min预变性,加0.5μL高保真Pfu酶,进行以下循环:94℃×45s,50℃×1min,72℃×1min。

[0013] 优选地,所述试剂盒还含有包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板,四环素标准品,酶标抗体,化学发光液和洗涤液;

[0014] 优选地,所述的化学发光酶标板为96孔可拆不透明白色发光板;

[0015] 优选地,所述的四环素包被抗原为四环素半抗原与牛血清白蛋白BSA的偶联物;

[0016] 优选地,所述的四环素包被抗原的包被浓度为0.5mg/L;

[0017] 优选地,包被液优选为将1.69g碳酸钠和2.95g碳酸氢钠溶于1L双蒸水中得到,四环素包被抗原的包被浓度为0.5mg/L。

[0018] 优选地,封闭液优选为取0.1gBSA(牛血清白蛋白),5g甘氨酸溶于100mLPBS(0.01mol/L PH7.4)溶液得到。

[0019] 优选地,所述的四环素包被抗原的制备方法是重氮化后的对氨基苯甲酸与四环素的酚羟基的对位发生偶氮化,进而引入羧基,含羧基的四环素半抗原采用DCC法与载体蛋白BSA偶联。

[0020] 具体地,所述的四环素抗原(包被抗原、免疫抗原)的制备方法如下:

[0021] (1)四环素半抗原的合成:

[0022] a:将对氨基苯甲酸溶于1.5~2.5mol/L、4℃的HCl中,加入0.4~0.5mg/mL的亚硝酸钠溶液,置于0~8℃搅拌8~15min,得到的反应液,称为A液;

[0023] b:称取四环素原药,将其溶解于0.1~0.3mol/L NaOH中,称为B液;

[0024] c:然后将A液逐底滴加到B液中,混合物pH保持在8~9之间,并在10℃搅拌1~3h,取出冷却至室温,弱酸化后,滤除液用浓盐酸调节至3.0,然后过滤得沉淀,沉淀用冷蒸馏水洗涤,最后冷冻干燥获得对氨基苯甲酸四环素;

[0025] (2)四环素包被抗原的制备:

[0026] 称取对氨基苯甲酸四环素、NHS和DCC,溶解于N-N-二甲基甲酰胺中,在室温下搅拌4~6h,离心得上清;将BSA溶解于0.04~0.06mol/L、pH 8的磷酸缓冲液中,在0~8℃缓慢搅拌20~30h;待上述反应完成后将反应液转移至处理好的透析袋中,于0~8℃、搅拌下用磷酸缓冲液透析,-20℃保存备用;

[0027] (3)四环素免疫抗原的制备:

[0028] 称取对氨基苯甲酸四环素、NHS和DCC,溶解于N-N-二甲基甲酰胺中,在室温下搅拌4~6h,离心得上清;将KLH溶解于0.04~0.06mol/L、pH 8的磷酸缓冲液中,在0~8℃缓慢搅拌20~30h;待上述反应完成后将反应液转移至处理好的透析袋中,于0~8℃、搅拌下用磷酸缓冲液透析,-20℃保存备用。

[0029] 其中,步骤a中HCl的浓度为2mol/L,亚硝酸钠溶液的浓度为0.48mg/mL。

[0030] 步骤a中对氨基苯甲酸:HCl:亚硝酸钠溶液的比例为0.69g:16mL:1mL。

[0031] 步骤a中NaOH的浓度为0.2mol/L。

[0032] 步骤a中四环素:NaOH的比例为2.220g:60mL。

[0033] 步骤(2)、(3)中磷酸缓冲液的浓度为0.05mol/L。

[0034] 步骤(2)、(3)中对氨基苯甲酸四环素:NHS:DCC:N-N-二甲基甲酰胺的比例为0.594g:0.115g:0.21g:5mL。

[0035] 步骤(2)、(3)中BSA或KLH:磷酸缓冲液的比例为0.8375g:10mL。

[0036] 步骤(2)、(3)中磷酸缓冲液的浓度为0.01mol/L,透析时间为72h,前24h每8h换液1次。

[0037] 另外,优选地,包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板的制备:取酶标板,包被抗原用包被液稀释至0.5mg/L后加入每孔内,37℃过夜,倾去孔内液体,用洗液洗涤数次,在吸水纸上拍干;然后每孔加入封闭液,37℃孵育过夜,倾去孔内液体,置于37℃烘干后真空密封4℃保存。

[0038] 优选地,四环素基因工程抗体的原浓度为2mg/mL,使用时用0.01mol/L PBST稀释6000倍。

[0039] 所述0.01mol/L PBST的配方为 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、NaCl 8.5g、KCl 0.2g、 KH_2PO_4 0.2g、Tween-20 0.5mL,定容至1mL。

[0040] 优选地,所述的四环素标准品的浓度为1mg/mL,使用时用0.01mol/L PBST将标准品稀释成浓度为0、0.03、0.1、0.3、1、3 $\mu\text{g/L}$ 的一系列四环素标准品溶液。

[0041] 优选地,所述的酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG或羊抗兔IgG(优选羊抗鼠IgG);其原浓度为10mg/mL,使用时优选为0.01mol/L PBST稀释6000倍。

[0042] 优选地,所述的化学发光液由A液和B液组成,A液为100mL去离子水中含有20mg对碘苯酚、8mg鲁米诺、1.21g Tris,pH8.4;B液为100mL去离子水中含有体积分数0.40% H_2O_2 、1.21g Tris,pH7.0;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合。

[0043] 优选地,所述的洗涤液为20倍浓缩洗涤液,20倍浓缩洗涤液是含有体积分数0.5% Tween20的pH7.4 0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成1倍洗涤液。

[0044] 上述试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0045] S1.待测样品的前处理;

[0046] S2.试剂盒检测:依次加入四环素标准品溶液或样品、四环素基因工程抗体,竞争反应后加入酶标抗体,最后加入化学发光液通过化学发光免疫分析仪进行四环素的定量检测;

[0047] S3.结果处理与分析。

[0048] 其中,当步骤S1中所述待测样品为奶样、鸡蛋或组织样品时,其处理方法如下:

[0049] 奶样:直接取新鲜的牛奶或冻融的牛奶,用PBST稀释,离心取上清液测定;(优选地,直接取新鲜的牛奶或冻融的牛奶,用0.05M PBST以1:10稀释,离心后取上清液测定);

[0050] 鸡蛋:蛋液用PBS溶液稀释,离心取上清液测定;所述PBS溶液中含0.1%曲拉通x-100;(优选地,以蛋液:PBS溶液1:10稀释,离心后取上清液测定;所述PBS溶液中含0.1%曲拉通x-100);

[0051] 组织样品:分别取鸡、猪的鸡肉、肝脏或肾脏组织样品,加McIlvaine缓冲液,振荡离心,取上清液备用;Oasis HLB固相萃取柱依次用无水甲醇、水预洗;取备用上清液过柱,用水淋洗,挤干;用草酸甲醇溶液洗脱,挤干,收集洗脱液;将收集的洗脱液摇匀,用PBST溶液稀释后作为试样溶液待测。

[0052] 优选地,取组织样品,加McIlvaine缓冲液,振荡离心,取上清液备用;Oasis HLB固相萃取柱依次用无水甲醇、水预洗;取备用上清液过柱,用水淋洗,挤干;用20mmol/L草酸甲醇溶液1ml洗脱,挤干,收集洗脱液;将收集的洗脱液摇匀,用PBST溶液10倍稀释后作为试样溶液待测;所述McIlvaine缓冲液的配方:0.1M柠檬酸缓冲液、0.1M EDTA,pH3.8。

[0053] 优选地,步骤S2的具体方法如下:

[0054] S21.将试剂盒置于室温(25~27℃)平衡30~40min;

[0055] S22.取出化学发光酶标板,往标准孔中加入不同浓度的四环素标准品溶液,样品孔中加入待测样品,然后每孔加入四环素基因工程抗体,盖上盖板膜振摇混匀,孵育;

[0056] S23.倒去板孔中的反应液,加入洗涤液洗涤,将酶标板拍干;

[0057] S24.往各孔中加入酶标抗体,轻拍混匀,孵育,

[0058] S25.每孔加入化学发光反应液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU。

[0059] 步骤S3的方法是按照如下公式计算与分析:

[0060] 抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%) ,

[0061] 式中:B—不同浓度四环素标准溶液孔(或样品孔)的发光值;B₀—0浓度四环素标准溶液发光值;以抑制率为纵坐标,四环素浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中四环素的含量。

[0062] 具体地,作为一种可选择的方案,所述试剂盒的使用方法包含如下步骤:

[0063] (1)将试剂盒置于室温平衡30min以上,用0.01mol/L PBST将标准品稀释成浓度为0、0.03、0.1、0.3、1、3μg/L的一系列四环素标准品溶液;

[0064] (2)取出化学发光酶标板,在标准孔加入50μL不同浓度的四环素标准品溶液,样品孔加入50μL待测样品,然后每孔加入50μL稀释好的四环素基因工程抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振荡10min后,置于37℃孵育50min;

[0065] (3)吸除板孔中的反应液,各孔加入洗涤液约300μL,静置20秒左右,除去其中液体,如此共洗5次,最后一次将板拍干;也可用自动洗板机洗5次,洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。

[0066] (4)往各孔中加入100μL稀释好的辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG酶标抗体,轻拍混匀后,置于37℃孵育30min;

[0067] (5)每孔加入100μLA液与B液等体积混合后的化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min,后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU,保存数据;

[0068] (6)检测结果计算与分析:抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%) ,式中:B—不同浓度四环素标准溶液孔(或样品孔)的发光值;B₀—0浓度四环素标准溶液发光值;以抑制率为纵坐标,四环素浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中四环素的含量。

[0069] 本发明具有以下有益效果:

[0070] 本发明提供了一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒,将发光物质直接标记到抗原或抗体上,与抗体或抗原发生特异性免疫反应后,通过测定标记物的化学发光强度确定被测抗体或抗原的含量。具有高通量检测、灵敏度高、检测范围宽、分析速度快、价廉经济等优点。本发明构建的四环素化学发光酶联免疫检测技术具有如下优势:

[0071] (1) 环保经济:与现用的检测四环素的ELISA试剂盒相比,不需要再使用具有腐蚀

性的硫酸、以及大部分有毒或为致癌物质的底物,更加环保。基因工程抗体能在各种表达系统中表达,并且可通过基因工程技术进行大量生产,对培养基无特殊要求,发酵密度高、发酵周期短,可降低制造成本。

[0072] (2) 高灵敏度、高特异性:与现有的检测四环素的ELISA试剂盒相比,克服了试剂盒检测中易受到内源性酶干扰、吸光度的检测也易受到多种外在因素的影响的弊端,本发明采用高特异性、高亲和力的抗体,检测四环素的化学发光酶联免疫检测灵敏度更高,可达到0.045ng/mL。

[0073] (3) 高精密度、高稳定性:采用包被抗原进行酶标板的包被,相对于抗体包被,更有利于达到较好的包被效果与较长的保存时间,从而提高了试剂盒检测的精密度与稳定性。

[0074] (4) 快速、准确:前处理方法简单快速、符合试剂盒的快速、准确的检测要求。

[0075] 基于以上优点本试剂盒非常适用于四环素残留的痕量分析与批量检测,具有重要的现实意义和推广应用前景。

附图说明

[0076] 图1为四环素标准曲线图。

具体实施方式

[0077] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0078] 除非特别说明,本发明所用试剂和材料均为市购。

[0079] 以下实施例中所使用试剂如下:

[0080] 包被液:将1.69g碳酸钠和2.95g碳酸氢钠溶于1L双蒸水中得到。

[0081] 20倍浓缩洗涤液:体积分数0.5% Tween20的pH7.4 0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释1倍。

[0082] 封闭液:取0.1gBSA(牛血清白蛋白)、5g甘氨酸溶于100mL PBS溶液(0.01mol/L pH7.4)的得到

[0083] 四环素标准溶液:用色谱级乙腈将四环素标准品稀释成1mg/mL备用;再用0.01mol/L PBST将标准品稀释成浓度为0、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/L的四环素标准品溶液,4 $^{\circ}$ C保存。

[0084] 化学发光液:由A液和B液组成,A液优选为将20mg对碘苯酚、8mg鲁米诺、1.21g Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至8.4;B液优选为将体积分数0.40% H₂O₂、1.21g Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至7.0得到;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合。

[0085] 实施例1四环素基因工程抗体、包被抗原、免疫抗原的制备

[0086] (1) 包被抗原、免疫抗原的制备

[0087] 四环素半抗原的合成:

[0088] a:将0.69g对氨基苯甲酸溶于16mL,2mol/L 4 $^{\circ}$ C的HCl中,加入1mL0.48mg/mL的亚硝酸钠溶液,置于4 $^{\circ}$ C搅拌10min,得到的反应液,称为A液

[0089] b:称取2.220g四环素原药,将其溶解于60mL 0.2mol/L NaOH中,称为B液。

[0090] c:然后将A液逐底滴加到B液中,混合物pH保持在8~9之间,并在10℃搅拌2h,取出冷却至室温,弱酸化后,滤除液用浓盐酸调节至3.0,然后过滤得沉淀,沉淀用冷蒸馏水洗涤,最后冷冻干燥获得对氨基苯甲酸四环素。

[0091] 四环素包被抗原的制备:

[0092] 称取0.594g对氨基苯甲酸四环素、0.115gNHS和0.21g DCC,溶解于5mL的N-N-二甲基甲酰胺中,在室温下搅拌5h,离心得上清。将0.8375g的BSA溶解于10mL 0.05mol/L (pH 8)的磷酸缓冲液中,在4℃缓慢搅拌24h。

[0093] 待上述反应完成后将反应液转移至处理好的透析袋中,于4℃冰箱中,搅拌下用0.01mol/L磷酸缓冲液透析72h,前24h每8h换液1次,透析完成后将透析后的交联产物分装,于-20℃保存备用。

[0094] 四环素免疫抗原的制备:

[0095] 称取0.594g对氨基苯甲酸四环素、0.115gNHS和0.21g DCC,溶解于5mL的N-N-二甲基甲酰胺中,在室温下搅拌5h,离心得上清。将0.8375g的KLH溶解于10mL 0.05mol/L (pH 8)的磷酸缓冲液中,在4℃缓慢搅拌24h。

[0096] 待上述反应完成后将反应液转移至处理好的透析袋中,于4℃冰箱中,搅拌下用0.01mol/L磷酸缓冲液透析72h,前24h每8h换液1次,透析完成后将透析后的交联产物分装,于-20℃保存备用。

[0097] (2) 四环素基因工程抗体的制备

[0098] 设计简并引物:

[0099] 重链引物

[0100] VH-B (SEQ ID NO.1): 5'-AATACGGCCCAACCGGCCTGAGTCGG-3'

[0101] VH-F (SEQ ID NO.2): 5'-TGAGGAGATTTGCGGCCGCGTCCCTTGG-3'

[0102] 轻链引物

[0103] VL-B (SEQ ID NO.3): 5'-GACATACGGCCCAACCGGCCGTCACCA-3'

[0104] VL-F (SEQ ID NO.4): 5'-CATTTTAGCGGCCGAGCTTGGTGCC-3'

[0105] 全长引物

[0106] Q-B (SEQ ID NO.5):

[0107] 5'-GTTGCCATTATGGCTACGGCCCAACCGGCCTGAGTCGG-3'

[0108] Q-F (SEQ ID NO.6):

[0109] 5'-GAGTCGCGGCCGATTTAGCGGCCGAGCTTGGTGCC-3'

[0110] 引物R1 (SEQ ID NO.7): 5'-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGGC-3'

[0111] 引物R2 (SEQ ID NO.8): 5'-CGATCTAATGTTTTGTCGTCTTACC-3'

[0112] 其中引物VH (Back) 含SfiI酶切位点,VH (For) 含NotI酶切位点;VL (For) 含NotI酶切位点,VL (Back) 含SfiI酶切位点,全长引物 (Back) 含BglI酶切位点,全长引物 (For) 含NotI酶切位点,R1,R2为载体特异性引物,用于插入片段的PCR鉴定。

[0113] 以合成的四环素免疫抗原对小鼠进行了免疫,检测血清效价滴度达到要求;取小鼠脾脏,提取总RNA,利用设计的简并引物经RT-PCR成功扩增出了免疫小鼠的全套轻、重链可变区基因,轻链的扩增条件为:94℃×5min变性,加入1μL高保真Pfu酶(2.5U),进行以下循环:94℃×30s,54℃×1min,72℃×1min,共25个循环,最后72℃延伸10min。重链的扩增

条件为:94℃×5min变性,加入1μL高保真Pfu酶(2.5U),进行以下循环:94℃×30s,60℃×1min,72℃×1min,共30个循环,最后72℃延伸10min。VH基因片段大小约为345bp,VL基因片段大小约为330bp。取纯化的VH-VL各150ng,通过PCR完成VH-VL片段的预拼接(预拼接程序:94℃2min;94℃1min、60℃1min、72℃1min,30个循环;72℃10min)。以预拼接产物的1/50稀释液为模板,进行VH-VL全长基因的拼接,并采用两条含有Bgl I及Not I酶切位点的上下游引物(即引物对Q-B/Q-F,序列如SEQ ID NO.5-6所示)对抗体进行二次PCR扩增,条件为94℃×5min预变性,加0.5μL高保真Pfu酶,进行以下循环:94℃×45s,50℃×1min,72℃×1min,得到长约760bp的全长抗体基因片段,将抗体片段用Bgl I及Not I双酶切后,与载体pCANTAB5E连接,转化大肠杆菌TG3,IPTG诱导抗四环素抗体进行可溶性表达。采用渗透休克法提取了菌体细胞周质腔中的可溶性抗四环素抗体,并对培养上清及周质腔提取物中表达的抗体进行SDS-PAGE,Western-Blotting及ELISA鉴定,并利用亲和层析对其进行纯化。

[0114] 实施例2化学发光酶免疫方法的建立

[0115] (1) 包被抗原与抗体浓度的优选

[0116] 1) 将包被抗原按2.5mg/L,1.25mg/L,0.833mg/L,0.625mg/L,0.5mg/L用包被液(0.05mol/L pH5.0碳酸盐缓冲液)稀释并纵向包被不透明白色发光板,100μL/孔,37℃24h,用洗液洗涤2次,在吸水纸上拍干。

[0117] 2) 加入配置好的封闭液150μL/孔进行封闭,37℃过夜,甩干后放入烘箱烘干。

[0118] 3) 加入50μL/孔用0.01mol/L PBST稀释的四环素标准品系列溶液。

[0119] 4) 加入50μL/孔用0.01mol/L PBST稀释的四环素基因工程抗体(1:4000、1:5000、1:6000、1:7000、1:8000),37℃60min,洗板5次,在吸水纸上拍干。

[0120] 5) 加入100μL/孔已稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,37℃30min,用洗液洗板5次,在吸水纸上拍干。

[0121] 6) 加入100μL/孔现配的化学发光液,用化学发光免疫分析仪测定发光值。以发光值随包被抗原浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释度为最佳浓度进行特异性测定。得到包被抗原最佳浓度为0.5mg/L,抗体(浓度2mg/mL)稀释倍数为1:6000。

[0122] (2) 抗体灵敏度的测定

[0123] 以包被抗原浓度为0.5mg/L,四环素基因工程抗体(浓度2mg/mL)稀释倍数为1:6000,进行抗体灵敏度的测定。

[0124] 1) 取96孔不透明白色发光板,将包被抗原用包被液稀释至0.5mg/L,每孔加入100μL,37℃过夜,用洗液冲洗2次在吸水纸上拍干。

[0125] 2) 加入封闭液150μL/孔进行封闭,37℃过夜,甩干后放入烘箱烘干。

[0126] 3) 先加不同浓度的四环素标准液50μL/孔,再加稀释倍数为1:6000的四环素基因工程抗体50μL/孔,37℃60min,洗板5次,在吸水纸上拍干。

[0127] 4) 加入100μL/孔稀释倍数为1:6000的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,37℃30min,洗板5次,在吸水纸上拍干。

[0128] 5) 加入现配的化学放光反应液,100μL/孔,测定发光值。

[0129] 检测结果以抑制率计算,抑制率(%)=B/B₀×100(%),B是不同浓度标准溶液竞争的发光值,B₀是不加标准品的发光值。计算50%抑制率时标准品的浓度即为四环素基因工程抗体的灵敏度,为0.045ng/mL。

[0130] 实施例3四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒的构建

[0131] (1) 试剂盒的组成

[0132] 1) 包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板:酶标板为96孔可拆不透明白色发光板,已包被四环素包被抗原和封闭液;四环素包被抗原为四环素半抗原与牛血清白蛋白的偶联物,包被浓度为0.5mg/L。

[0133] 酶标板的制备:取96孔可拆不透明白色发光板,包被抗原用包被液稀释至0.5mg/L,每孔内加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C过夜,倾去孔内液体,用洗液洗涤2次,在吸水纸上拍干。然后每孔加入封闭液150 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育过夜,倾去孔内液体,置于37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干后用铝箔袋真空密封4 $^{\circ}$ C保存。

[0134] 2) 四环素系列标准品溶液(浓度0、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/L)。

[0135] 3) 四环素基因工程抗体2mg/mL,其工作浓度为1:6000。

[0136] 4) 辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG 10mg/mL,其工作浓度为1:6000。

[0137] 5) 化学发光液:由A液和B液组成。

[0138] 6) 20倍浓缩洗涤液。

[0139] (2) 试剂分装:将各试剂测定合格后无菌分装,四环素标准品(10 μ g/mL) 1mL/瓶,已稀释的四环素基因工程抗体7mL/瓶,已稀释的辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG 7mL/瓶,A液7mL/瓶,B液7mL/瓶,20倍浓缩洗涤液50mL/瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4 $^{\circ}$ C保存。

[0140] (3) 试剂盒的组装:分别将步骤(1)的包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板1块和四环素标准品、四环素基因工程抗体、辣根过氧化酶标记的羊抗鼠IgG、A液、B液、20倍浓缩洗涤液各1瓶及使用说明书1份置试剂盒内指定位置,试剂盒检验合格后封装,4 $^{\circ}$ C保存。

[0141] 实施例4四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法

[0142] (1) 样品前处理

[0143] 1) 牛奶:将待测样品摇匀,称取1ml样品加入9ml 0.05M PBST溶液,振荡2min,4000r/min离心5min,上清液即可用于检测

[0144] 2) 鸡蛋:称取1g混匀的蛋液,加入含0.1%曲拉通x-100的PBS溶液9mL,振荡2min,4000r/min离心5min,取上清液测定。

[0145] 3) 组织样品:分别取鸡、猪的鸡肉、肝脏、肾脏各组织样品各称取2g,加McIlvaine缓冲液(0.1M柠檬酸缓冲液、0.1M EDTA,pH3.8) 8mL,振荡5min,4000r/min离心5min,取上清液备用。Oasis HLB固相萃取柱依次用无水甲醇3mL,水2mL预洗。取备用液5mL过柱,用水2mL淋洗,挤干。用20mmol/L草酸甲醇溶液1ml洗脱,挤干,收集洗脱液。将收集的洗脱液摇匀,用PBST溶液10倍稀释后作为试样溶液待测。

[0146] (2) 试剂盒的检测方法

[0147] 1) 取出试剂盒,置于室温(25~27 $^{\circ}$ C)平衡30min以上,取出化学发光酶标板,用0.01mol/L PBST将四环素标准品稀释成浓度0、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/L。

[0148] 2) 在标准孔加入50 μ L不同浓度的四环素标准品溶液,样品孔加入50 μ L待测样品,之后每孔加入50 μ L用0.01mol/L PBST稀释好的四环素基因工程抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振荡10min后,置于37 $^{\circ}$ C孵育50min。

[0149] 3) 甩去板孔中的反应液,各孔加入洗液300 μ L,静置20秒,甩去齐总液体,如此共洗

板5次,最后一次将板拍干;也可用自动洗板机洗板5次。洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每轮洗板拍打3次)以保证完全除去孔中的液体。

[0150] 4) 酶标板中加入100 μ L稀释好的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,轻拍混匀后,置于37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0151] 5) 每孔加入100 μ L底物缓冲液和底物液同体积混合后的化学发光反应液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min后用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光值RLU,保存数据。

[0152] (2) 检测结果计算与分析

[0153] 抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%)

[0154] 式中:B—不同浓度四环素标准溶液孔(或样品孔)的发光值; B_0 —0浓度四环素标准溶液发光值;

[0155] 以抑制率为纵坐标,四环素浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中四环素的含量。

[0156] 实施例5试剂盒与准确度实验

[0157] (1) 四环素标准品溶液的重复性试验

[0158] 从3批按照实施例3中的方法制备的酶标板中,各抽出20个微孔,按照实施例4中试剂盒的检测方法测定0.1 μ g/L和0.3 μ g/L四环素标准溶液的发光值,重复20次,计算变异系数CV%,结果见表1。

[0159] 表1四环素标准溶液重复性试验

[0160]	样品	浓度 μ g/L	第一批	第二批	第三批	批间 CV%
			CV%	CV%	CV%	
[0161]	标准溶液	0.1	6.1	5.4	6.9	9.1
	标准溶液	0.3	5.7	6.3	7.1	8.6

[0162] (2) 样本重复性与准确度试验

[0163] 准确度是指测得值与真值的复合程度,在酶联免疫测定中,准确度常以回收率表示,精密度常以变异系数来表示。在牛奶、鸡蛋、组织样品中,添加四环素至终浓度为0.1、0.3、1 μ g/L,每个浓度各10个平行,测定3批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表2。

[0164] 回收率(%) = (检出量-空白量)/添加量 $\times 100$ %;

[0165] CV(%) = (SD/X) $\times 100$ %;

[0166] 表2样本重复性与准确度试验结果

[0167]

样品	添加浓度	第一批			第二批			第三批			批间
	$\mu\text{g/kg}$	含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	CV%
牛奶	0.1	0.113	113	5.3	0.107	107	6.7	0.099	99	4.5	12.3
	0.3	0.321	107	3.7	0.314	104.7	3.9	0.307	102.3	3.6	9.0
	1	0.987	98.7	2.6	0.908	90.8	4.8	0.945	94.5	7.4	10.5
鸡蛋	0.1	0.097	97	7.3	0.092	92	5.4	0.104	104	7.5	8.7
	0.3	0.289	96.3	4.5	0.293	97.7	8.3	0.297	99	6.5	7.2
	1	0.957	95.7	3.7	0.932	93.2	6.9	0.896	89.6	7.6	6.9
组织	0.1	0.083	83	6.3	0.091	91	3.1	0.087	87	7.2	7.0
	0.3	0.274	91.3	8.2	0.269	89.7	7.5	0.258	86	6.1	8.5
	1	0.816	81.6	4.8	0.809	80.9	2.8	0.798	79.8	4.7	9.1

[0168] 结果表明牛奶、鸡蛋、组织样品的添加回收率在范围内,批内变异系数范围内,批间变异系数在范围内,符合国家对于试剂盒各项指标的标准。

[0169] 实施例6保存期试验

[0170] (1) 将实施例3的试剂盒放置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$,分别取放置0、2、4、6、8、9、10和12个月的试剂盒,对四环素标准品($0.1\mu\text{g/L}$)的发光值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0171] (2) 将试剂盒在 37°C 保存的条件下放置12天,每天对四环素标准品 $0.1\mu\text{g/L}$ 的发光值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0172] (3) 将试剂盒在 -20°C 冰箱保存12天,每天对四环素标准品($0.1\mu\text{g/L}$)的发光值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0173] 从结果可看出,经过三种条件保存试验,四环素标准品($0.1\mu\text{g/L}$)的发光值下降小于5%,50%抑制率在 $0.03\sim 0.06\mu\text{g/L}$ 之间,回收率在78%~105%之间;批间变异系数小于10%;各项指标均符合质量要求,因此,试剂盒可以在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存12个月。

[0174] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 广州元睿生物科技有限公司

<120> 一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒

<130>

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 引物VH-B

<400> 1

aatacggccc aaccggcctg agtcgg 26

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 引物VH-F

<400> 2

tgaggagatt tgcggccgcg tcccttgg 28

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 引物VL-B

<400> 3

gacatacggc ccaaccggcc gtcacca 27

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> 引物VL-F

<400> 4

catttttagcg gccgcagctt ggtgcc 26

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> 引物 Q-B

<400> 5

gttgccatta tggctacggc ccaaccggcc tgagtcgg 38

<210> 6

<211> 37

<212> DNA
<213> 引物Q-F
<400> 6
gagtcgcggc cgcathtagc ggccgcagct tggtgcc 37
<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> 引物R1
<400> 7
ccatgattac gccaaagcttt ggaggc 26
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 引物R2
<400> 8
cgatctaata ttttgtcgtc ttacc 25

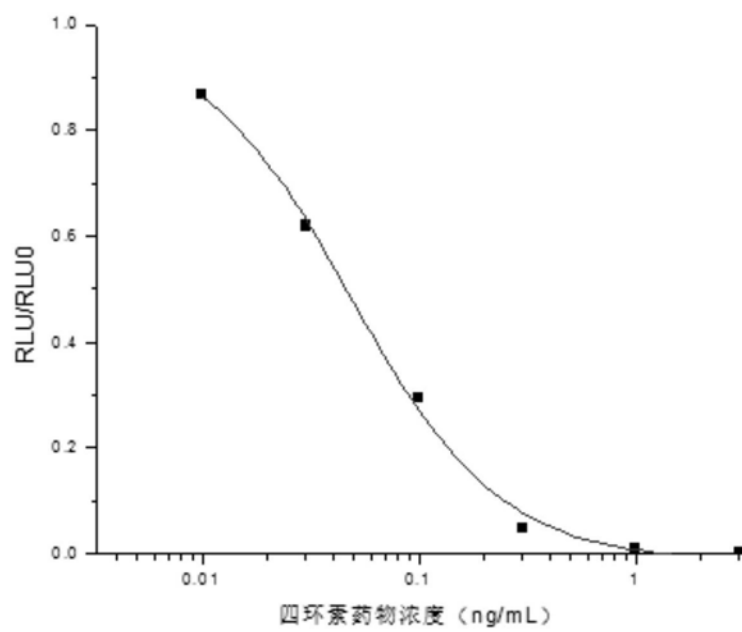


图1

专利名称(译)	一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110058011A	公开(公告)日	2019-07-26
申请号	CN201910436476.2	申请日	2019-05-23
发明人	于运威		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5304 G01N33/532		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种四环素化学发光酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒包括四环素基因工程抗体，以及其他酶联免疫检测所需试剂，如包被有四环素包被抗原的化学发光酶标板，四环素标准品，酶标抗体，化学发光液和洗涤液。本发明的试剂盒具有高通量检测、高灵敏度、高特异性、高精密度、高稳定性、检测范围宽、分析速度快、准确的优点；标准曲线最大检测范围为15~120pg/mL，灵敏度45pg/mL，检出限40pg/mL；且无毒、环保、经济，可通过基因工程技术进行大量生产，对培养基无特殊要求，发酵密度高、发酵周期短，制造成本低。该试剂盒非常适用于四环素残留的痕量分析与批量样品的筛查检测，具有重要的现实意义和推广应用前景。

