



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110467678 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910853219.9

(22)申请日 2019.09.10

(71)申请人 江苏农牧科技职业学院

地址 225300 江苏省泰州市凤凰东路8号

(72)发明人 冒玉娟 王婧 陈晓兰 王帅兵

吴萌 王莹 赵丽

(74)专利代理机构 南京瑞弘专利商标事务所

(普通合伙) 32249

代理人 蔡天敏

(51) Int. Cl.

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

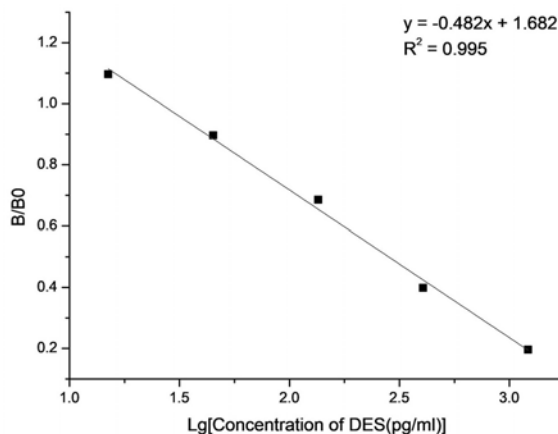
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

## (54)发明名称

一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法

## (57)摘要

本发明公开了一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法。本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括己烯雌酚单克隆抗体、包被原、己烯雌酚标准品溶液；所述己烯雌酚单克隆抗体为己烯雌酚杂交瘤细胞株分泌的抗体；所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物。使用该酶联免疫试剂盒进行己烯雌酚残留物的检测操作简单、无需复杂前处理、适合大量样品的高效、快速、准确的检测己烯雌酚检测，且该试剂盒稳定性较高。



1. 一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒包括己烯雌酚单克隆抗体、包被原、己烯雌酚标准品溶液;所述己烯雌酚单克隆抗体为己烯雌酚杂交瘤细胞株分泌的抗体;所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物。

2. 根据权利要求1所述的一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于,所述己烯雌酚半抗原可以为半抗原己烯雌酚单羧基酞DES-1C,制备方法如下:

称取537mg己烯雌酚、276mg碳酸钾( $K_2CO_3$ )溶于15ml二甲基亚砜(DMSO)中,缓慢加入4ml溴甲酸乙酯,60℃加热避光搅拌6h,冷却置室温后得到混合物;用乙醚萃取该混合物,收集有机层于通风柜中室温下挥干,再经氢氧化钠(NaOH)的乙醇溶液水解,制得己烯雌酚半抗原DES-1C。

3. 根据权利要求1所述的一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于,所述载体蛋白可以为牛血清白蛋白(BSA);所述包被原的制备方法如下:

称取7.0mg己烯雌酚半抗原DES-1C、13.0mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、8.0mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)依次溶于0.6ml DMSO,加入0.5ml 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液,室温搅拌活化5h,得到溶液1;取2ml浓度为5mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)用1ml PBS稀释得到溶液2;将溶液1慢慢加入到溶液2,边加边搅拌,室温下搅拌3h;

将反应液装入透析袋,用0.01M的PBS透析纯化72h,每8h更换DES-1C-BSA透析液,除去未反应的小分子物质,取出透析袋内DES-1C-BSA透析液冷冻干燥,-20℃保存,作为包被原。

4. 根据权利要求1所述的一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于,所述己烯雌酚杂交瘤细胞株的制备方法如下:将己烯雌酚半抗原与载体蛋白进行偶联制备免疫原,对若干BSLB/c的雌性小鼠进行多次免疫后,取抗血清价效高的小鼠脾脏与骨髓瘤细胞融合,并进行阳克隆筛选,得到可稳定分泌抗己烯雌酚杂交瘤细胞株。

5. 根据权利要求1所述的一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于,所述该试剂盒还包括包被了己烯雌酚抗原的酶标板、酶标二抗、缓冲液、洗涤液、显色液、终止液。

6. 根据权利要求2所述的一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于,所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(羊抗鼠-HRP二抗);

所述缓冲液为PBS含量为0.01mol/L,PH=7.4的磷酸盐缓冲液,配方为:8.0g NaCl、3.62g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、0.2g  $KH_2PO_4$ 和0.2g KCl溶于1L双蒸水中并调节pH为7.4;

所述洗涤液为含0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST,0.01 mol/L, pH= 7.4);

所述显色液为底物缓冲液与TMB使用液体积比5:1的混合物,所述底物缓冲液为0.1mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH5.0),其中100ml中含有180 $\mu$ l 30%  $H_2O_2$ ,所述TMB使用液为60mg TMB溶于100ml乙二醇;

所述终止液为2 mol/L 硫酸溶液。

7. 一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒在检测己烯雌酚残留的应用。

8. 根据权利要求7所述一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒在检测己烯雌酚残留的应用,其特征在于,主要包括以下步骤:

1) 样品处理;

2) 根据权利要求1-6任一项所述的酶联免疫试剂盒进行检测;

3) 分析检测结果。

9. 根据权利要求8所述一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒在检测己烯雌酚残留的应用, 其特征在于, 所述样品处理包括样品前处理和样品基质效应消除。

## 一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种酶联免疫(ELISA)试剂盒,具体地说,涉及一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备及应用。

### 背景技术

[0002] 为了追求经济效益,过度使用己烯雌酚(Diethylstilbestrol,DES)在动物体内的残留危害也日渐暴露出来,研究发现雌激素残留会对人体造成潜在的致癌、致畸风险。欧盟、美国等西方各国从20世纪70年代先后颁布禁令,将己烯雌酚列为禁用兽药。我国1999年的实施残留监控计划中规定禁止使用己烯雌酚,2002年农业部修订的《动物性食品中兽药最高残留限量》中规定在所有可食动物组织中不得检出对己烯雌酚及其盐和酯。

[0003] 目前国内己烯雌酚检测主要是采用LC-MS法(高效液相色谱-质谱)或者GC-MS法(气相色谱-质谱),色谱法灵敏度高、精确性强,但样品前处理复杂、对实验人员要求较高,无法满足大批量样品快速筛查的要求;而ELISA盒操作简便、检测迅速,非常适合大量样品的快速筛选。现在已有商业化的己烯雌酚ELISA试剂盒,主要来自国外公司,且价格不菲。国内科研工作者也在己烯雌酚免疫测定方法上积极探索,但目前的试剂盒稳定性和灵敏度与国外产品还有一定差距。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒,操作简单、无需复杂前处理、适合大量样品的高效、快速、准确的检测己烯雌酚检测,且稳定性较高。

[0005] 一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法如下:其中所述酶联免疫试剂盒包括己烯雌酚单克隆抗体、包被原、己烯雌酚标准品溶液;所述己烯雌酚单克隆抗体为己烯雌酚杂交瘤细胞株分泌的抗体;所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物。

[0006] 所述己烯雌酚半抗原可以为半抗原己烯雌酚单羧基醚DES-1C,制备方法如下:

[0007] 称取537mg己烯雌酚、276mg碳酸钾( $K_2CO_3$ )溶于15ml二甲基亚砜(DMSO)中,缓慢加入4ml溴甲酸乙酯,60℃加热避光搅拌6h,冷却置室温后得到混合物;用乙醚萃取该混合物,收集有机层于通风柜中室温下挥干,再经氢氧化钠(NaOH)的乙醇溶液水解,制得己烯雌酚半抗原DES-1C。

[0008] 所述载体蛋白可以为牛血清白蛋白(BSA);所述包被原的制备方法如下:

[0009] 称取7.0mg己烯雌酚半抗原DES-1C、13.0mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、8.0mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)依次溶于0.6ml DMSO,加入0.5ml 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液,室温搅拌活化5h,得到溶液1;取2ml浓度为5mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)用1ml PBS稀释得到溶液2;将溶液1慢慢加入到溶液2,边加边搅拌,室温下搅拌3h。将反应液装入透析袋,用0.01M的PBS透析纯化72h,每8h更换透析液,除去未反应的小分子物质,-20℃保存,作为包被原。

[0010] 所述己烯雌酚杂交瘤细胞株的制备方法如下:将己烯雌酚半抗原与载体蛋白进行偶联制备免疫原,对若干BSLB/c的雌性小鼠进行多次免疫后,取抗血清价效高的小鼠脾脏与骨髓瘤细胞融合,并进行阳克隆筛选,得到可稳定分泌抗己烯雌酚杂交瘤细胞株。

[0011] 所述该试剂盒还包括包被了己烯雌酚抗原的酶标板、酶标二抗、缓冲液、洗涤液、显色液、终止液。

[0012] 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(羊抗鼠-HRP二抗);

[0013] 所述缓冲液为PBS含量为0.01mol/L,PH=7.4的磷酸盐缓冲液,配方为:8.0g NaCl、3.62g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和0.2g KCl溶于1L双蒸水中并调节pH为7.4;

[0014] 所述洗涤液为含0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST,0.01mol/L,pH=7.4);

[0015] 所述显色液为底物缓冲液与TMB使用液体积比5:1的混合物,所述底物缓冲液为0.1mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH5.0),其中100ml中含有180 $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,所述TMB使用液为60mg TMB溶于100ml乙二醇;;

[0016] 所述终止液为2mol/L硫酸溶液。

[0017] 一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒在检测己烯雌酚残留的应用。

[0018] 所述一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒在检测己烯雌酚残留的应用,主要包括以下步骤:

[0019] 1) 样品处理;

[0020] 2) 用酶联免疫试剂盒进行检测;

[0021] 3) 分析检测结果。

[0022] 所述样品处理包括样品前处理和样品基质效应消除。

## 附图说明

[0023] 图1为SDS-PAGE鉴定结果图;

[0024] 图2为己烯雌酚间接竞争ELISA标准曲线;

[0025] 图3为半抗原DES-1C合成路线;

[0026] 图4为免疫抗原DES-1C-KLH合成路线;

[0027] 图5为DES、KLH、DES-1C-KLH的紫外扫描图谱;

[0028] 图6为DES、BSA、DES-1C-BSA的紫外扫描图谱。

## 具体实施方式

[0029] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明范围。

[0030] 实施例1试剂盒组分的准备

[0031] 1、半抗原制备

[0032] 称取537mg己烯雌酚、276mg碳酸钾( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )溶于15ml二甲基亚砜(DMSO)中,缓慢加入4ml溴甲酸乙酯,60 $^\circ\text{C}$ 加热避光搅拌6h,冷却置室温得混合物;用乙醚萃取该混合物,收集有机层于通风柜中室温下挥干,再经氢氧化钠(NaOH)的乙醇溶液水解,制得己烯雌酚半抗原DES-1C。

[0033] 2、抗原的制备与紫外鉴定

[0034] 免疫原制备:将己烯雌酚半抗原与载体蛋白进行偶联,称取7.0mg DES-1C、13.0mg

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、8.0mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)依次溶于0.6ml二甲基亚砜(DMSO),加入0.5ml 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液,室温搅拌活化5h,得到溶液3;取2ml浓度为5mg/ml的匙孔蓝蛋白(KLH)用1ml PBS稀释得到溶液4;将溶液1慢慢加入到溶液2,边加边搅拌,室温下搅拌3h。将反应液装入透析袋,用0.01M的PBS透析纯化72h,每8h更换透析液,除去未反应的小分子物质;将DES-1C-KLH透析液冷冻干燥,-20℃保存,作为免疫原。

[0035] 包被原制备:称取7.0mg己烯雌酚半抗原DES-1C、13.0mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、8.0mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)依次溶于0.6ml DMSO,加入0.5ml 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液,室温搅拌活化5h,得到溶液1;取2ml浓度为5mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)用1ml PBS稀释得到溶液2;将溶液1慢慢加入到溶液2,边加边搅拌,室温下搅拌3h。将反应液装入透析袋,用0.01M的PBS透析纯化72h,每8h更换透析液,除去未反应的小分子物质,将DES-1C-BSA透析液冷冻干燥,-20℃保存,作为包被原。

[0036] 最后通过紫外扫描初步判定人工抗原耦合成功。

[0037] 3、单克隆抗体制备

[0038] 1) 动物免疫:选用6~8周龄的BALB/c雌性小鼠3只,将100μg免疫原DES-1C-KLH以无菌磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至150μl,与150μl弗氏完全佐剂(CFA)乳化后经皮下注射小鼠,免疫剂量为100μg/只;此后,每隔2周进行一次加强免疫,免疫佐剂为弗氏不完全佐剂(IFA),剂量为50μg/只,最后一次加强免疫改为免疫原100μg单独腹腔注射(不加佐剂);从第二次免疫后开始监测血清,通过间接ELISA测定抗血清效价,经五次免疫后选择抗血清效价高、竞争抑制强的小鼠脾脏细胞,3天后取脾脏进行融合;

[0039] 2) 杂交瘤细胞筛选:取上述脾脏,按照5:1的数量配比和SP2/0骨髓瘤细胞融合,通过PEG1500介导在37℃水浴中反应2分钟后用DMEM培养基终止反应,1000rpm离心5min后弃上清,细胞重悬至含1%次黄嘌呤氨基蝶呤胸腺嘧啶核苷(HAT)、20%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中,把融合的细胞铺到以DES-1C-BSA为包被原,用磷酸盐缓冲液稀释至2μg/ml包被96孔酶标板中,每孔200μl;然后将细胞培养板放到37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待生长至第8天用HT培养基换液,待细胞生长至孔底面积30%以上时进行阳克隆筛选;收集细胞上清液采用间接ELISA法筛选出阳性孔,挑选OD<sub>450</sub>值较高的孔进一步进行间接竞争ELISA筛选,来排除假阳性孔;从阳性孔中选出2个抑制DES较好的孔按照有限稀释法进行亚克隆,经过2~3次亚克隆后,最终获得了2株稳定分泌抗DES杂交瘤细胞株,扩大培养并冻存;

[0040] 3) 单克隆抗体的制备与腹水纯化:经过多次传代,冻存及复苏,使所述2株杂交瘤细胞株均可稳定产生抗体(DES单克隆抗体),选择其一细胞株进行腹水制备;收集的小鼠腹水加入等体积的饱和硫酸铵融合,充分搅拌均匀,4℃冰箱中沉淀过夜,在Allegra 21R台式高速冷冻离心机中10000rpm冷冻离心30min,去上清,收集沉淀,再用磷酸盐溶解,在PBS溶液中透析后过Protein A柱亲和层析;用磷酸盐以3mL/min的流速平衡10个柱床体积后,透析液以流速1.5mL/min上样,随后用磷酸盐以流速2mL/min洗脱流川,去除杂蛋白;用0.1mol/L pH2.7的甘氨酸溶液以2mL/min对抗体进行洗脱,收集洗液,用0.1mol/L Tris-HCl(pH8.0)中和抗体,于磷酸盐中透析,最后将纯化后的己烯雌酚单克隆抗体置于-20℃保存备用。

[0041] 通过SDS-PAGE检测,可以看见纯化后的抗体在150KD有1条明显的条带,而纯化前

的腹水则出现许多杂蛋白,由图1可得表明抗体纯化取得了较好的效果,用抗体亚型测试盒对细胞株分泌的DES单克隆抗体的亚型为免疫球蛋白G1 (IgG1)。

[0042] 4、酶标板的制备及包被原浓度和抗体工作浓度优化:采用棋盘滴定法确定包被原浓度和抗体的最适工作浓度。用合成的DES-1C-BSA作为包被原,将浓度为0.05mol/L、PH为9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液分别稀释成0.25 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml 5个浓度包被96孔酶标板,100 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵化2h,用PBST洗板3次,加含2%FBS的PBS溶液200 $\mu$ l于37 $^{\circ}$ C封闭1h。将制得的酶标板PBST洗涤后拍干,抗体倍比稀释(1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000),每孔100 $\mu$ l加入酶标板,以未免疫小鼠血清作阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h。

[0043] 洗板后将GaM-IgG-HRP按说明书1:1000稀释后100 $\mu$ l/孔加入,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h。洗板后拍干,然后每孔加入100 $\mu$ l新鲜配制的TMB显色液,室温避光孵育10min,用2mol/L硫酸溶液(50 $\mu$ l/孔)终止反应,测定每孔OD<sub>450</sub>值。选择OD<sub>450</sub>值为1.0左右且与阴性对照OD<sub>450</sub>值相差最大对应的包被原和抗体浓度为最适工作浓度。结果如表1,最佳包被浓度为1 $\mu$ g/ml,相应的抗体最佳工作稀释浓度为1:32000。

[0044] 表1 抗体稀释倍数和包被抗原的选取(方阵实验)

[0045]

抗体稀释 倍数	包被抗原浓度 ( $\mu$ g/ml)					阴性对照
	4	2	1	0.5	0.25	
1:8000	3.351	2.873	2.284	1.876	1.224	0.098
1:16000	3.134	2.462	1.844	1.467	0.972	0.073
1:32000	2.254	1.887	1.085	0.834	0.621	0.069
1:64000	1.673	1.456	0.782	0.354	0.252	0.065

[0046]

1:128000	1.263	0.875	0.587	0.201	0.124	0.055
----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0047] 实施例2己烯雌酚的检测

[0048] 1、样品处理:

[0049] 前处理:

[0050] 取牛奶样品5mL放置于50mL离心管中,加入5mL乙腈,然后再加入0.5mL三氯甲烷涡旋振荡2min,4000r/mim,离心10min;小心移取上清液,用含20%甲醇的PBS缓冲液稀释后,取50 $\mu$ L进行检测。

[0051] 称取5 $\pm$ 0.05g奶粉于50mL离心管中,加入5mL乙腈,然后再加入0.5mL三氯甲烷涡旋振荡2min,4000r/mim,离心10min;小心移取上清液,用含20%甲醇的PBS缓冲液稀释后,取50 $\mu$ L进行检测。

[0052] 样品基质效应消除:

[0053] 采用稀释法消除基质干扰,将前处理后的样品分别作2、4、8、16倍稀释后,建立间接Elisa标准曲线,并与含20%甲醇的PBST中的标准曲线进行比较,结果表明,当牛奶、奶粉

样品稀释2倍时两条曲线基本吻合,说明牛奶和奶粉经过简单处理及稀释后均能消除基质的影响。

[0054] 2、检测的方法步骤及标准曲线的建立:

[0055] 采用优化后的实验条件组装试剂盒,建立间接竞争ELISA检测方法。包被原以1 $\mu$ g/ml包被96孔酶标板,100 $\mu$ l/孔,将DES用含20%甲醇的PBS溶液稀释成0、15、45、135、405、1215pg/ml,50 $\mu$ l/孔加入,再加入最佳工作浓度的抗体50 $\mu$ l/孔(1:16000,因为间接竞争ELISA中,抗体的加样体积为50 $\mu$ l,是间接ELISA中加样体积的一半,故相应的抗体稀释度也减小一半)。以DES标准溶液浓度对数值为横坐标,以百分吸光系数值B/B<sub>0</sub>为纵坐标(B<sub>0</sub>标准品溶液浓度为零测定的OD<sub>450</sub>值,B为DES不同浓度标准品溶液的OD<sub>450</sub>值),每个浓度设置5个复孔,不同时间重复5次。测定结果用Origin8.0软件拟合,绘制标准曲线。

[0056] 3、结果分析:

[0057] 由图2可见,DES标准溶液溶度在15~1215pg/ml范围内,B/B<sub>0</sub>~LgC线性良好,线性方程为 $y = -0.482x + 1.682$ , $R^2 = 0.995$ ,多次测定IC<sub>50</sub>平均值为285pg/ml,最低检测限IC<sub>10</sub>为42pg/ml。牛奶、奶粉中己烯雌酚浓度的计算:根据样品经过处理后测得的OD<sub>450</sub>值除以B<sub>0</sub>计算得到样品的B/B<sub>0</sub>,代入线性回归方程,得到检测样品中DES的含量。

[0058] 实施例3试剂盒的精密度、稳定性

[0059] 一、交叉反应与特异性

[0060] 将双烯雌酚、己烷雌酚、雌二醇、雌三醇、雌酮、炔雌醇、黄体酮标准品按DES标准品相同的方法配制成所需的一系列标准浓度,同时拟合以上7种物质的间接竞争ELISA标准曲线,计算单克隆抗体对各药物的交叉反应率CR(%),计算公式如下:

[0061]  $CR(\%) = (IC_{50DES} / IC_{50实验药物}) \times 100\%$ 。

[0062] 7种药物的IC<sub>50</sub>值及它们与DES的交叉反应率见表2,结果可见,己烷雌酚、双烯雌酚、雌二醇与己烯雌酚的交叉反应率分别为2.6%、0.9%、0.04%,其他结构类似物的交叉反应率均小于0.01%,表明我们获得的抗体对DES具有优良的选择性,可用于DES残留的ELISA检测。

[0063] 表2 DES结构类似物与抗DES单抗的交叉反应率

	药物	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	CR (%)
	己烯雌酚	0.275	100
[0064]	双烯雌酚	30.2	0.9
	己烷雌酚	10.5	2.6
	雌二醇	687.5	0.04
	雌三醇	> 3.0 $\times 10^3$	< 0.01
	雌酮	> 3.0 $\times 10^3$	< 0.01
[0065]	炔雌醇	> 3.0 $\times 10^3$	< 0.01
	黄体酮	> 3.0 $\times 10^3$	< 0.01

[0066] 二、样品添加回收率试验

[0067] 按上述方法进行前处理后,在空白牛奶、奶粉样品中添加1.0 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、0.25 $\mu\text{g/L}$ 三个浓度的己烯雌酚,按间接竞争ELISA法对每个浓度进行6次检验,计算药物含量、加标回收率和变异系数,结果如表3所示。

[0068] 表3 样品加样回收率结果 (n=6)

样品	DES添加量 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率 (%)	变异系数CV (%)
牛奶	0.25	82.04	6.0
	0.5	94.64	7.8
	1.0	89.98	7.8
奶粉	0.25	80.04	7.8
	0.5	95.12	7.3
	1.0	90.12	8.1

[0070] 三、精密度

[0071] 在上述线性范围内,取同一生产批次6个试剂盒和的6个不同批次的试剂盒,分别测定加入上述不同DES浓度的空白牛奶、空白奶粉,各个浓度进行6次检验,计算批内、批间变异系数,表4数据结果显示空白牛奶、空白奶粉的平均批内CV分别为7.3%、7.0%,平均批间CV分别为7.0%、6.9%,均小于10%,证明试剂盒的精密度较好,能满足己烯雌酚残留检测的要求。

[0072] 表4 样品加精密度实验结果 (n=6)

[0073]

样品	DES添加量 ( $\mu\text{g/L}$ )	实测平均值 ( $\mu\text{g/L}$ )		变异系数 (%) CV	
		批内	批间	批内	批间
牛奶	0.25	0.2213	0.2105	6.1	5.8
	0.5	0.4795	0.4740	7.7	7.5
	1.0	0.9132	0.9002	8.0	7.7
奶粉	0.25	0.2125	0.2085	8.1	6.5
	0.5	0.4682	0.4744	7.5	7.0
	1.0	0.9133	0.9056	7.8	7.3

[0074]

[0075] 四、稳定性:

[0076] 将试剂盒避光放置于4 $^{\circ}\text{C}$ ,每隔1个月进行间接竞争Elisa检测,测定IC<sub>50</sub>分别为291pg/ml、308pg/ml、324pg/ml、346pg/ml、375pg/ml、565pg/ml,IC<sub>50</sub>虽然略有增加,但在各个时间段的标准曲线灵敏度无明显变化,曲线拟合较好,表明试剂盒在4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下可存放6个月,质量稳定。

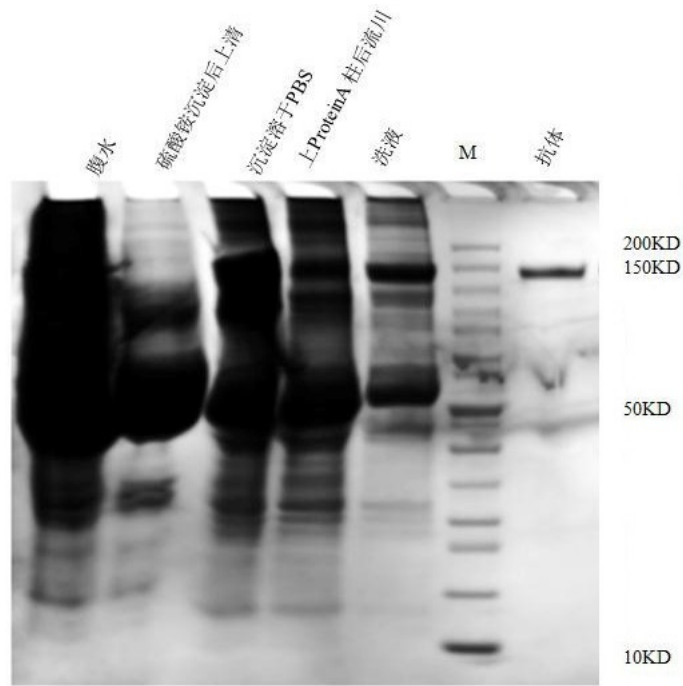


图1

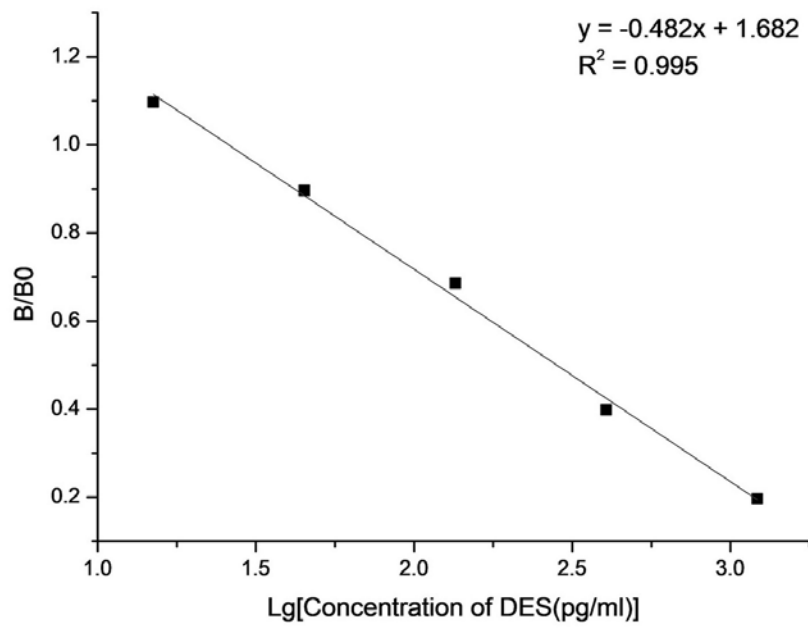


图2

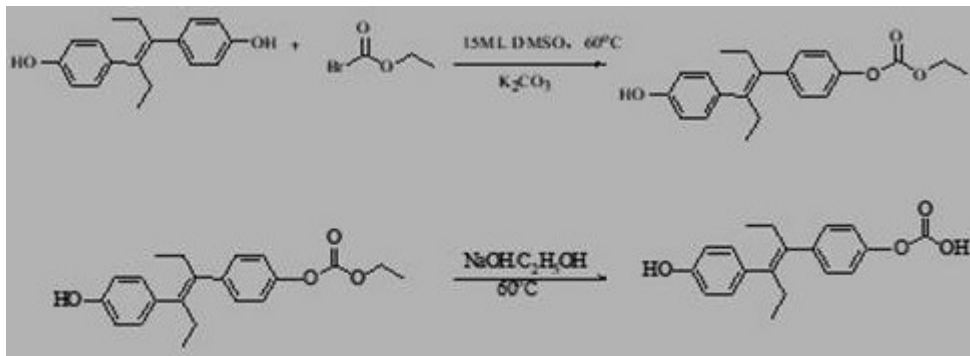


图3

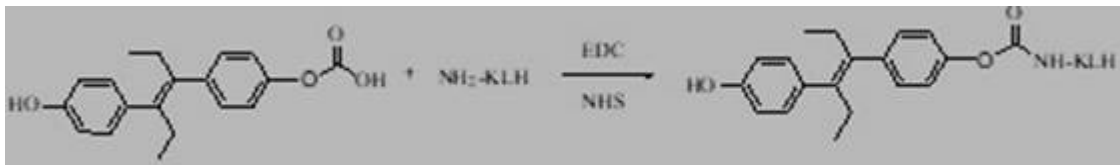


图4

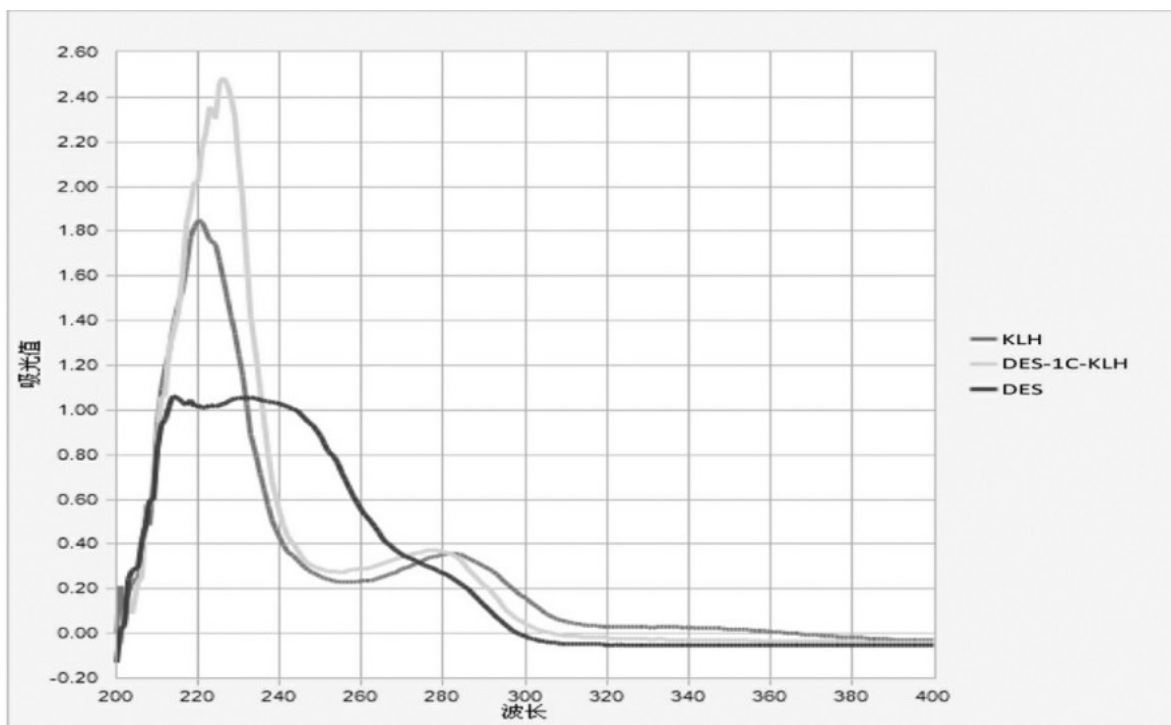


图5

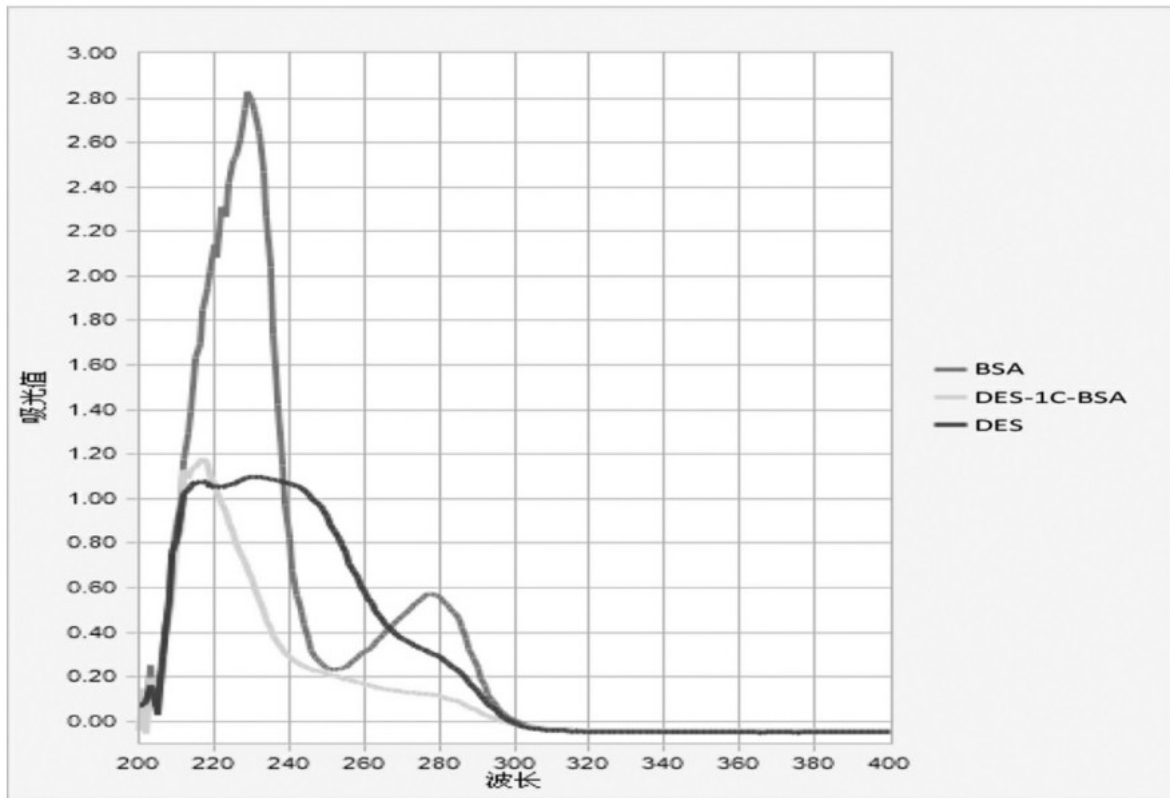


图6

专利名称(译)	一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110467678A</a>	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201910853219.9	申请日	2019-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	江苏农牧科技职业学院		
申请(专利权)人(译)	江苏农牧科技职业学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏农牧科技职业学院		
[标]发明人	冒玉娟 王婧 陈晓兰 王帅兵 吴萌 王莹 赵丽		
发明人	冒玉娟 王婧 陈晓兰 王帅兵 吴萌 王莹 赵丽		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577 G01N2333/575		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种己烯雌酚单克隆抗体及酶联免疫试剂盒的制备方法。本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括己烯雌酚单克隆抗体、包被原、己烯雌酚标准品溶液；所述己烯雌酚单克隆抗体为己烯雌酚杂交瘤细胞株分泌的抗体；所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物。使用该酶联免疫试剂盒进行己烯雌酚残留物的检测操作简单、无需复杂前处理、适合大量样品的高效、快速、准确的检测己烯雌酚检测，且该试剂盒稳定性较高。

