



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110927377 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201910948272.7

(22)申请日 2019.10.08

(71)申请人 杭州佰昕科技有限公司

地址 310016 浙江省杭州市经济技术开发
区宝龙商业中心1幢1016室

申请人 浙江工商大学

(72)发明人 王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军

(74)专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33283

代理人 向庆宁

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书4页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒
及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用,本发明制备的抗喹乙醇单克隆抗体特异性强,制备的试剂盒具有较高的精密度和准确度,而且该试剂盒对喹乙醇有高度的特异性;该试剂盒能够对水和饲料中的喹乙醇进行定性和定量检测,样品预处理过程简单,方便快捷,检测准确度高;本发明的试剂盒为化学发光检测试剂盒,具有灵敏度高,准确率高、背景干扰不明显,检测时间短、操作方便等特点,而且是基于磁珠为载体的化学发光免疫分析,将化学发光免疫分析的优点有效发挥,检测结果可以通过常规的化学发光分析仪进行读数,具有很好的兼容性,应用价值大,市场前景广,能够有效推动喹乙醇快速检测技术的发展。

1. 一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,包括反应板,喹乙醇磁标抗体,喹乙醇酶标半抗原,磁标抗体稀释液,酶标半抗原稀释液,喹乙醇标准品母液,化学发光底物A液,化学发光底物B液,浓缩洗涤液;

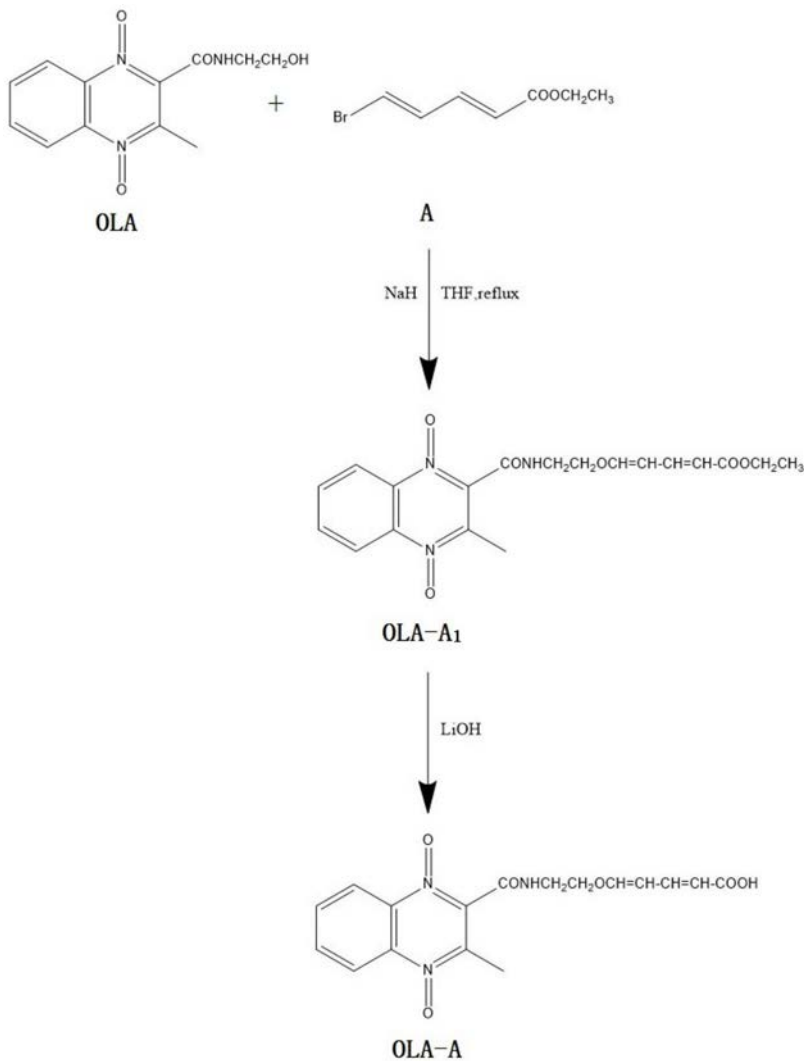
所述酶标半抗原是辣根过氧化物酶标记的喹乙醇半抗原;所述喹乙醇磁标抗体是磁珠标记的喹乙醇单克隆抗体;

所述喹乙醇单克隆抗体是由喹乙醇半抗原与牛血清白蛋白偶联后制备得到人工抗原,然后免疫小鼠后通过细胞融合、筛选、抗体的制备、纯化获得的;

喹乙醇半抗原由以下步骤制备得到:

(1.1) 将1mmol喹乙醇溶于2-5mLTHF中,0°C下加入1.0-1.2mmol NaH,搅拌0.5-2小时,后加入1mmol的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯,65°C下反应6-8小时,待反应完全后,加入30-50mL H₂O,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋干溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为-CH=CH-CH=CH-COOCH₂CH₃;

(1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于8-12mL甲醇与水的混合液中,其中,甲醇与水的体积均为5mL),加入氢氧化锂1-1.5mmol,搅拌,室温下反应1-3h;反应完全后,用1mol/L的盐酸溶液调节pH等于5-6,乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为-CH=CH-CH=CH-COOH;具体的合成路线如下:

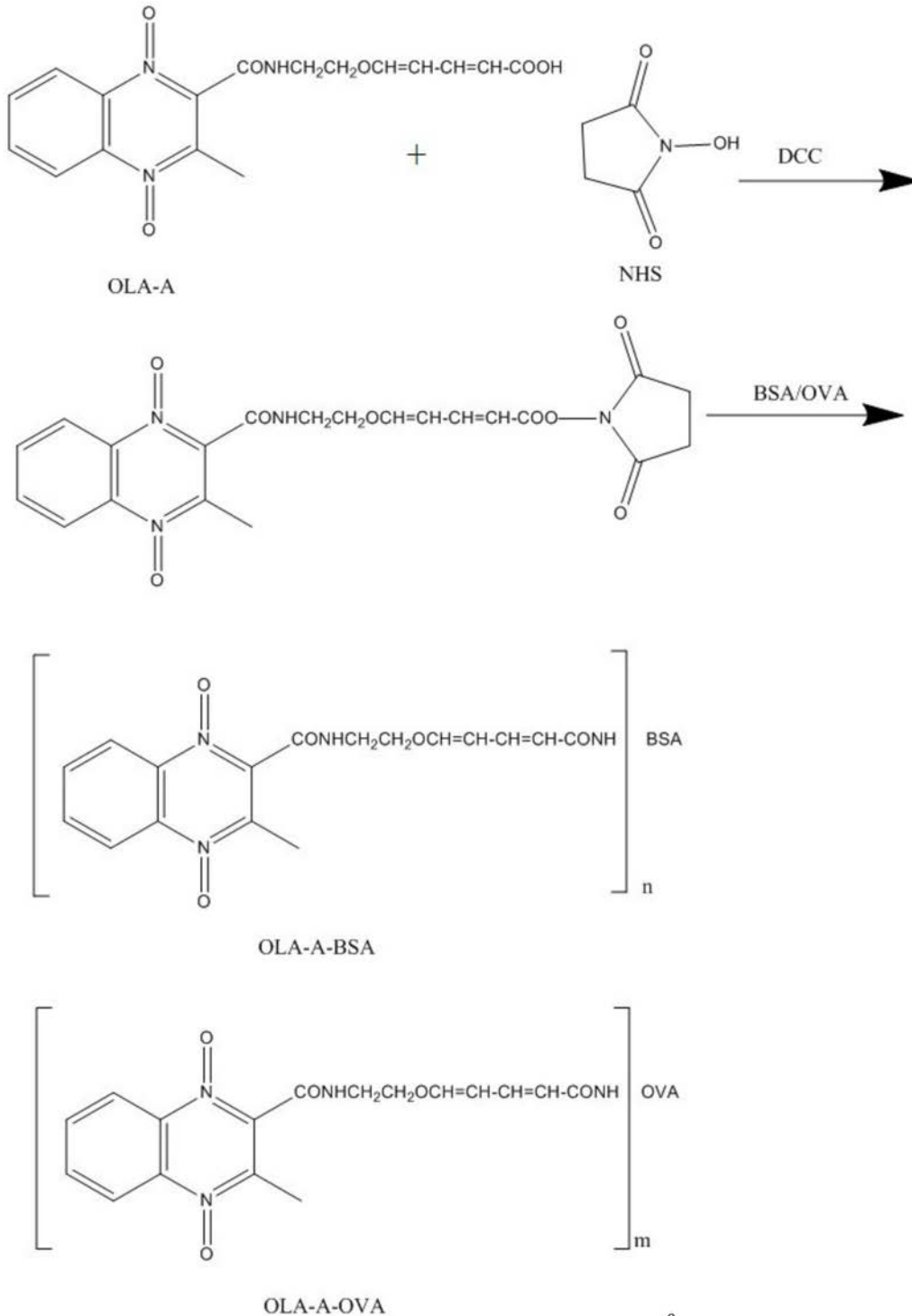


(2) 喹乙醇人工抗原的合成,包括以下步骤:

取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10-12h后2000r/min离心10min,离心后上清液为a液;

称取20mg OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

4℃下将0.6mLa液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA, -A-表示-CH=CH-CH=CH-COO-;具体的合成路线如下:



2. 根据权利要求1所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述反应板是96孔反应板,其材质是石英材质或者玻璃材质。

3. 根据权利要求1所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,磁珠粒径为 $2.8\mu\text{m}$,磁珠末端具有 $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{NH}_2$ 基团。

4. 根据权利要求1所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物A液为 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲁米洛与 $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四溴苯酚等比例混合,其中, $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH为8.5的Tris-HCl为缓冲液;

化学发光底物B液为用 $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH为8.5的Tris-HCl为稀释液,将质量分数为30%双氧水溶液稀释500倍。

5. 根据权利要求1所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,喹乙醇酶标半抗原的制备包括以下步骤:

将 0.1mmol 的喹乙醇半抗原溶解于 1.0mL 的N,N-二甲基甲酰胺中,在搅拌下逐滴加入 0.3mmol 的N-羟基琥珀酰亚胺,反应1h后加入 0.15mmol 的N,N-二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应过夜;然后将反应液转入离心管中, $5000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min后取上清 $300\mu\text{L}$,滴加到 5.0mL 含有 10mg 辣根过氧化物酶HRP的pH=9.6, $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸钠缓冲液, 4°C 避光搅拌反应4h,后将反应液装入截留量为 8000KD 的透析袋中,选用 500mL pH=7.4, $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液,在 4°C 避光下透析,每2h更换透析液一次,透析5-8次后,将透析后溶液加等体积甘油,使酶标半抗原浓度为 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, -20°C 保存。

6. 根据权利要求3所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,喹乙醇磁标抗体的制备包括以下步骤:

选择粒径为 $2.8\mu\text{m}$ 的磁珠为载体,磁珠末端具有羧基基团,在经过活化处理后,活化的磁珠与喹乙醇单克隆抗体进行偶联,制备喹乙醇磁标抗体,合成步骤如下:

1) 清洗:离心管预先用超纯水洗涤后灭菌烘干,备用,吸取 $500\mu\text{L}$ 羧基磁珠置于 1.5mL 离心管中,用 $500\mu\text{L}$ 含体积分数为0.05%吐温-20的pH=5.0, $0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液洗涤3次,磁分离后移除上清;

2) 活化:pH=5.0, $0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液在 4°C 预冷后用于配置 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EDC和NHS溶液;将配置好的EDC溶液和NHS溶液各 $250\mu\text{L}$ 加入到步骤1)所述的离心管中,漩涡震荡1min,磁分离后弃去上清,用pH=5.0, $0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液洗涤3次;

3) 偶联:将 10mg 喹乙醇单克隆抗体冻干粉用 1mL pH=5.0, $0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液溶解,溶解后逐滴加入到步骤2)活化后的磁珠中,混匀后在室温下偶联2h或者置于 4°C 冰箱中反应12h;

4) 封闭:偶联结束后进行磁分离清洗,移除上清,后加入 $500\mu\text{L}$,pH=7.4, $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TRIS溶液封闭30min;

5) 保存:磁分离后移除上清,用 $500\mu\text{L}$ 含质量分数为1%BSA,体积分数为0.05%吐温-20的TRIS溶液洗涤4次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含质量分数为1%BSA,体积分数为0.05%吐温-20和质量分数为0.02% NaN_3 的TRIS溶液,使磁标抗体中抗体浓度为 $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

7. 根据权利要求1所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述磁标抗体稀释液为 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为1%~

2%的BSA和质量分数为0.01%~0.03%的叠氮化钠。

8. 根据权利要求1所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述酶标半抗原稀释液为 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为1%~2%的BSA。

9. 一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒在检测喹乙醇中的应用,其特征在于,所述试剂盒为权利要求1-8任一项所述的试剂盒,利用该试剂盒检测喹乙醇的方法包括以下步骤:

- 1) 使用喹乙醇标准品母液配置系列标准溶液;
- 2) 将待测样本进行预处理,得到待检样本溶液;

3) 反应板每孔依次加入稀释好的喹乙醇磁标抗体 $100\mu\text{L}$ 、稀释好的酶标半抗原 $50\mu\text{L}$,所述稀释好的喹乙醇磁标抗体指的是将喹乙醇磁标抗体用磁标抗体稀释液稀释100倍,稀释前的磁标抗体的浓度为 $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;

所述稀释好的喹乙醇酶标半抗原指的是将喹乙醇酶标半抗原用酶标半抗原稀释液稀释100倍,稀释前的酶标半抗原的浓度为 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;

- 4) 标准溶液或者样品溶液每孔 $50\mu\text{L}$ 加入到反应孔中, 37°C 反应1h;

5) 将浓缩洗涤液用去离子水稀释10倍后配置洗液,采用洗液对反应孔中反应液进行磁分离清洗3~5次;

6) 每孔分别加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各 $100\mu\text{L}$ 后在化学发光检测仪中检测,计算喹乙醇残留量结果。

10. 根据权利要求9所述的一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒在检测喹乙醇中的应用,其特征在于,系列标准溶液的配制包括以下步骤:

用试剂盒中的喹乙醇标准品母液进行配置;使用稀释液进行稀释得到浓度依次为 $32\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $16\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $8\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.5\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 8个梯度的系列标准溶液;喹乙醇标准品母液浓度为 $640\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,其中,溶剂为甲醇;稀释液为含体积分数为5%甲醇的 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析技术中的磁珠免疫分析技术领域,具体涉及一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 喹乙醇(Olaquinox,OLA)是一种抗菌促生长剂,曾广泛应用于水产养殖,一度被称为“水产瘦肉精”。喹乙醇的毒副作用不容小觑,存在明显的遗传毒性和蓄积毒性,因此国内外相继制定了严格的使用规范和残留限量标准。如美国和欧盟禁止使用喹乙醇,日本规定喹乙醇在动物组织和内脏中的最大残留限量(MRL)为 $300\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,我国农业部在2001年发布的第168号公告《饲料药物添加剂使用规范》中规定饲料中的添加量不得高于 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,同时规定禁止在鱼、禽及体重超过35kg猪的养殖过程中使用。尽管如此,抗菌促生长效果好且廉价的喹乙醇目前仍存在违规添加使用的现象。因此,加强喹乙醇的检测监督,特别是加强喹乙醇检测技术的研究极为必要。

[0003] 喹乙醇的残留检测方法,主要包括传统的仪器分析和免疫分析两大类。其中仪器法主要包括光谱法、色谱法以及液质联用技术等,仪器分析准确度高、精密度强,但其样品前处理过程复杂繁琐、耗时长、需要专业技术人员操作、仪器试剂等价格昂贵,无法在基层得到极大推广。免疫分析技术凭借着其高效、快速、高灵敏度以及高特异性等优势广泛应用于小分子药物残留检测中。目前常用的免疫检测方法主要包括酶联免疫检测法、胶体金免疫层析、荧光免疫分析等,但存在灵敏度不理想,假阳性和假阴性等问题。

发明内容

[0004] 为了解决上述存在的问题,本发明提供了一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒,包括反应板,喹乙醇磁标抗体,喹乙醇酶标半抗原,磁标抗体稀释液,酶标半抗原稀释液,喹乙醇标准品母液,化学发光底物A液,化学发光底物B液,浓缩洗涤液;

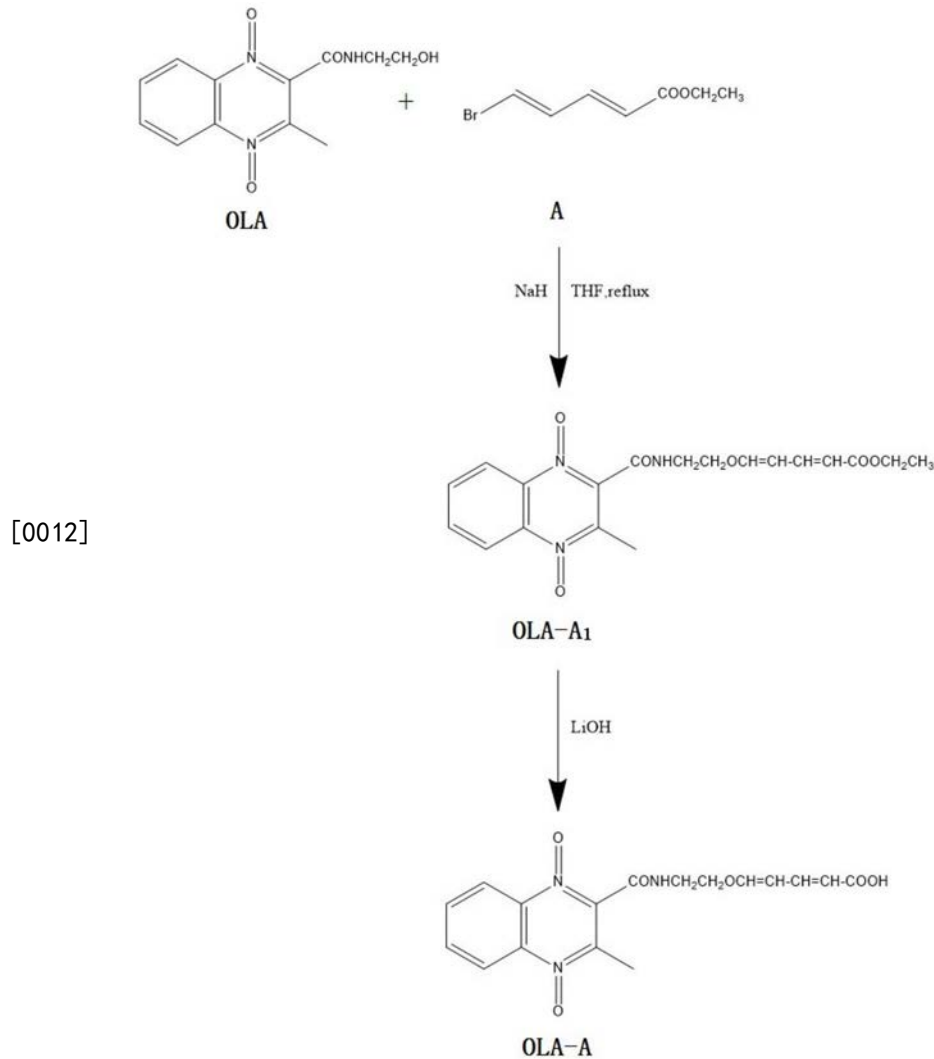
[0007] 所述酶标半抗原是辣根过氧化物酶标记的喹乙醇半抗原;所述喹乙醇磁标抗体是磁珠标记的喹乙醇单克隆抗体;

[0008] 所述喹乙醇单克隆抗体是由喹乙醇半抗原与牛血清白蛋白偶联后制备得到人工抗原,然后免疫小鼠后通过细胞融合、筛选、抗体的制备、纯化获得的;

[0009] 喹乙醇半抗原由以下步骤制备得到:

[0010] (1.1) 将 1mmol 喹乙醇溶于 $2\text{--}5\text{mL}$ THF中, 0°C 下加入 $1.0\text{--}1.2\text{mmol}$ NaH,搅拌 $0.5\text{--}2$ 小时,后加入 1mmol 的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯, 65°C 下反应 $6\text{--}8$ 小时,待反应完全后,加入 $30\text{--}50\text{mL}$ H_2O ,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋干溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$;

[0011] (1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于8-12mL甲醇与水的混合液中,其中,甲醇与水的体积均为5mL),加入氢氧化锂1-1.5mmol,搅拌,室温下反应1-3h;反应完全后,用1mol/L的盐酸溶液调节pH等于5-6,乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为-CH=CH-CH=CH-COOH;具体的合成路线如下:

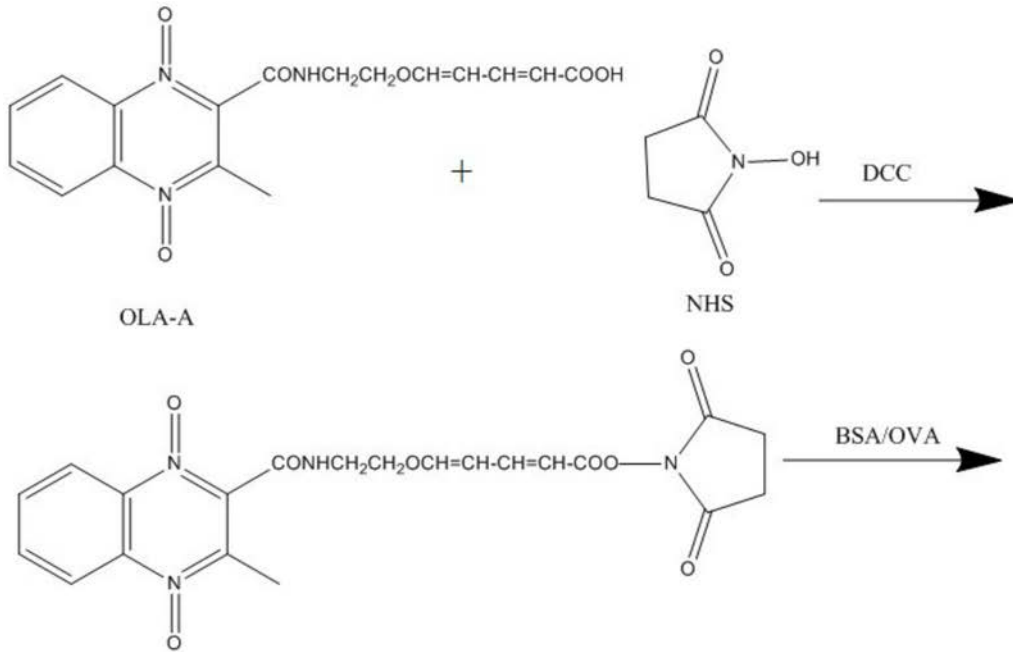


[0013] (2) 喹乙醇人工抗原的合成,包括以下步骤:

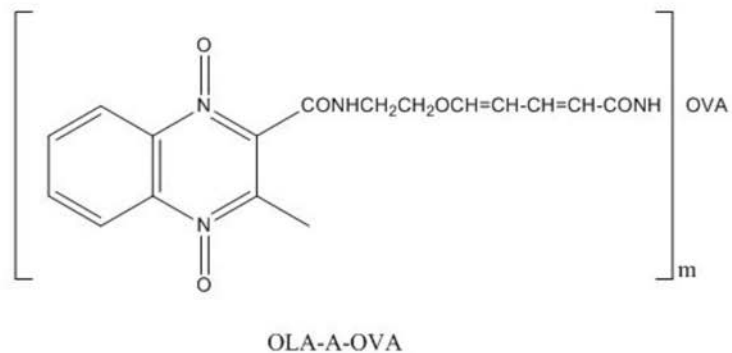
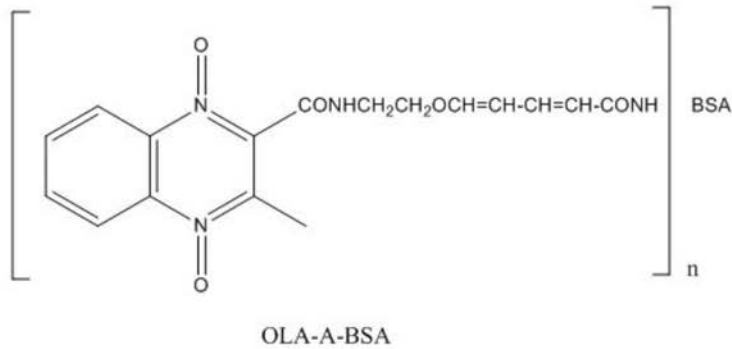
[0014] 取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10-12h后2000r/min离心10min,离心后上清液为a液;

[0015] 称取20mg OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

[0016] 4℃下将0.6mL a液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA,-A表示-CH=CH-CH=CH-COO-;具体的合成路线如下:



[0017]



[0018] 进一步地,所述反应板是96孔反应板,其材质是石英材质或者玻璃材质。

[0019] 进一步地,磁珠粒径为 $2.8\mu\text{m}$,磁珠末端具有 $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{NH}_2$ 基团。

[0020] 进一步地,所述化学发光底物A液为 $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲁米洛与 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四溴苯酚等比例混合,其中, $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH为8.5的Tris-HCl为缓冲液;

[0021] 化学发光底物B液为用 $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH为8.5的Tris-HCl为稀释液,将质量分数为30%双氧水溶液稀释500倍。

[0022] 进一步地,喹乙醇半抗原的制备包括以下步骤:

[0023] 将 0.1mmol 的喹乙醇半抗原溶解于 1.0mL 的N,N-二甲基甲酰胺中,在搅拌下逐滴加

入0.3mmol的N-羟基琥珀酰亚胺,反应1h后加入0.15mmol的N,N-二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应过夜;然后将反应液转入离心管中,5000r·min⁻¹离心15min后取上清300μL,滴加到5.0mL含有10mg辣根过氧化物酶HRP的pH=9.6,0.05mol·L⁻¹的碳酸钠缓冲液,4℃避光搅拌反应4h,后将反应液装入截留量为8000KD的透析袋中,选用500mL pH=7.4,0.01mol·L⁻¹的磷酸盐缓冲液,在4℃避光下透析,每2h更换透析液一次,透析5-8次后,将透析后溶液加等体积甘油,使酶标半抗原浓度为200μg·mL⁻¹, -20℃保存。

[0024] 进一步地,喹乙醇磁标抗体的制备包括以下步骤:

[0025] 选择粒径为2.8μm的磁珠为载体,磁珠末端具有羧基基团,在经活化处理后,活化的磁珠与喹乙醇单克隆抗体进行偶联,制备喹乙醇磁标抗体,合成步骤如下:

[0026] 1) 清洗:离心管预先用超纯水洗涤后灭菌烘干,备用,吸取500μL羧基磁珠置于1.5mL离心管中,用500μL含体积分数为0.05%吐温-20的pH=5.0,0.25mmol·L⁻¹的2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液洗涤3次,磁分离后移除上清;

[0027] 2) 活化:pH=5.0,0.25mmol·L⁻¹的MES溶液在4℃预冷后用于配置50mmol·L⁻¹的EDC和NHS溶液;将配置好的EDC溶液和NHS溶液各250μL加入到步骤1)所述的离心管中,漩涡震荡1min,磁分离后弃去上清,用pH=5.0,0.25mmol·L⁻¹的MES溶液洗涤3次;

[0028] 3) 偶联:将10mg喹乙醇单克隆抗体冻干粉用1mL pH=5.0,0.25mmol·L⁻¹的MES溶液溶解,溶解后逐滴加入到步骤2)活化后的磁珠中,混匀后在室温下偶联2h或者置于4℃冰箱中反应12h;

[0029] 4) 封闭:偶联结束后进行磁分离清洗,移除上清,后加入500μL, pH=7.4, 0.01mol·L⁻¹的TRIS溶液封闭30min;

[0030] 5) 保存:磁分离后移除上清,用500μL含质量分数为1%BSA,体积分数为0.05%吐温-20的TRIS溶液洗涤4次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含质量分数为1%BSA,体积分数为0.05%吐温-20和质量分数为0.02%NaN₃的TRIS溶液,使磁标抗体中抗体浓度为400μg·mL⁻¹。

[0031] 进一步地,所述磁标抗体稀释液为10mmol·L⁻¹、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为1%~2%的BSA和质量分数为0.01%~0.03%的叠氮化钠。

[0032] 进一步地,所述酶标半抗原稀释液为10mmol·L⁻¹、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为1%~2%的BSA。

[0033] 一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒在检测喹乙醇中的应用,所述试剂盒为以上所述的试剂盒,利用该试剂盒检测喹乙醇的方法包括以下步骤:

[0034] 1) 使用喹乙醇标准品母液配置系列标准溶液;

[0035] 2) 将待测样本进行预处理,得到待检样本溶液;

[0036] 3) 反应板每孔依次加入稀释好的喹乙醇磁标抗体100μL、稀释好的酶标半抗原50μL,所述稀释好的喹乙醇磁标抗体指的是将喹乙醇磁标抗体用磁标抗体稀释液稀释100倍,稀释前的磁标抗体的浓度为400μg·mL⁻¹;

[0037] 所述稀释好的喹乙醇酶标半抗原指的是将喹乙醇酶标半抗原用酶标半抗原稀释液稀释100倍,稀释前的酶标半抗原的浓度为200μg·mL⁻¹;

[0038] 4) 标准溶液或者样品溶液每孔50μL加入到反应孔中,37℃反应1h;

[0039] 5) 将浓缩洗涤液用去离子水稀释10倍后配置洗液,采用洗液对反应孔中反应液进

行磁分离清洗3~5次;

[0040] 6) 每孔分别加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各100 μ L后在化学发光检测仪中检测,计算喹乙醇残留量结果。

[0041] 进一步地,系列标准溶液的配制包括以下步骤:

[0042] 用试剂盒中的喹乙醇标准品母液进行配置;使用稀释液进行稀释得到浓度依次为32ng \cdot mL⁻¹、16ng \cdot mL⁻¹、8ng \cdot mL⁻¹、4ng \cdot mL⁻¹、2ng \cdot mL⁻¹、1ng \cdot mL⁻¹、0.5ng \cdot mL⁻¹和0ng \cdot mL⁻¹ 8个梯度的系列标准溶液;喹乙醇标准品母液浓度为640ng \cdot mL⁻¹,其中,溶剂为甲醇;稀释液为含体积分数为5%甲醇的0.01mol \cdot L⁻¹,pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0043] 本发明的有益效果是:

[0044] (1) 本发明制备的抗喹乙醇单克隆抗体特异性强,制备的试剂盒具有较高的精密度和准确度,而且该试剂盒对喹乙醇有高度的特异性;该试剂盒能够对水和饲料中的喹乙醇进行定性和定量检测,样品预处理过程简单,方便快捷,检测准确度高。

[0045] (2) 本发明的试剂盒为化学发光检测试剂盒,具有灵敏度高,准确率高、背景干扰不明显,检测时间短、操作方便等特点,而且是基于磁珠为载体的化学发光免疫分析,将化学发光免疫分析的优点有效发挥,检测结果可以通过常规的化学发光分析仪进行读数,具有很好的兼容性,应用价值大,市场前景广,能够有效推动喹乙醇快速检测技术的发展。

附图说明

[0046] 图1为喹乙醇半抗原合成路线。

[0047] 图2为喹乙醇人工抗原合成路线。

具体实施方式

[0048] 以下结合附图对本发明的技术方案做进一步详细说明,应当指出的是,具体实施方式只是对本发明的详细说明,不应视为对本发明的限定。

[0049] 以下实施例中所采用的物质及检测仪器等均可以通过商业途径购得。

[0050] 以下实施例中所用的PBS缓冲液,如无特殊说明,均为pH=7.4、0.01 mol \cdot L⁻¹的磷酸盐缓冲液;实施例中所用的CBS缓冲液均为pH=9.6、0.05mol \cdot L⁻¹的碳酸盐缓冲液;牛血清白蛋白简称BSA;卵清白蛋白简称OVA,钥孔血蓝蛋白简称KLH,2-(N-吗啉)乙磺酸溶液简称MES溶液,喹乙醇简称OLA。

[0051] 实施例1

[0052] 1. 喹乙醇磁免疫化学发光检测试剂盒具体组分的制备

[0053] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0054] (1.1) 将1mmol喹乙醇溶于2-5mLTfHf中,冰浴(0 $^{\circ}$ C)下加入1.1-1.2mmol NaH,搅拌1小时,后加入1mmol的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯(A),65 $^{\circ}$ C下回流反应6小时,待反应完全后,加入30mL H₂O,后用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋蒸除去溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为-CH=CH-CH=CH-COOCH₂CH₃;洗脱剂为:石油醚:乙酸乙酯=1:1;

[0055] (1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于10mL甲醇与水的混合液中(甲醇与水的体积均为5mL),加入氢氧化锂1.5mmol,室温下反应2h;反应完全后,用1mol/L的盐酸溶液调节pH等于5-6,乙酸乙酯50ml萃取两次,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,

得产物OLA-A, -A为 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$;具体的合成路线如图1所示;

[0056] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0057] 取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10h后2000r/min离心10min,离心后上清液为a液;

[0058] 称取20mg载体蛋白OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

[0059] 4℃下将0.6mL a液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA, -A-表示 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-$;具体的合成路线如图2所示;m、n分别表示一个载体蛋白OVA、BSA上偶联的喹乙醇半抗原的个数;每次制备得到的喹乙醇人工抗原中,m或者n的数值不是唯一的,会有一些变化。

[0060] 载体蛋白可以为牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)或者其他载体蛋白。

[0061] (3) 人工抗原的鉴定:

[0062] 采取紫外扫描与SDS-PAGE鉴定得到:偶联成功。

[0063] 紫外扫描方案:BSA(OVA)、OLA-A和OLA-A-BSA(OVA)分别配制成浓度为1~5mg·mL⁻¹范围内的溶液,测定200~400nm波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0064] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量10μL每孔,浓缩胶电压75V,分离胶电压100V,考马斯亮蓝染色1h,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0065] 紫外扫描图谱中,OLA-A-BSA(OVA)溶液与BSA(OVA)溶液相比,最大吸收波长有变化,而且经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0066] 对比例1

[0067] 采用常规方法合成喹乙醇人工抗原,具体步骤如下:

[0068] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0069] 向三口圆底烧瓶中准确加入2.106g喹乙醇和1.6g琥珀酸酐,加入80mL吡啶,115℃下回流反应4h后减压蒸除吡啶,向剩余混合物中加入60mL冰蒸馏水,2mol·L⁻¹HCl调pH至2.0~3.0,4℃下放置过夜。减压抽滤并用冰蒸馏水洗涤3次后抽干,淡黄色粉状物质即为OLA-HS;

[0070] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0071] 取14.528mg OLA-HS溶于0.8mL DMF中,加入4.603mg NHS和8.253mg DCC,室温下避光搅拌反应10h后2000r·min⁻¹离心10min,离心后上清液为c液。

[0072] 称取20mg OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mol·L⁻¹, pH=7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)中,此为b液。4℃下将0.6mL c液逐滴加入到缓慢搅拌的b液中,4℃搅拌反应过夜。次日转入透析袋内,0.01mol·L⁻¹, pH=7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)透析2d,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-HS-OVA或OLA-HS-BSA。

[0073] (2) 人工抗原的鉴定:

[0074] 采取紫外扫描与SDS-PAGE电泳鉴定其偶联效果。

[0075] 紫外扫描方案:BSA (OVA)、OLA-HS和OLA-HS-BSA (OVA) 配制成浓度为 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定 $200\sim 400\text{nm}$ 波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0076] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量 $10\mu\text{L}$ 每孔,浓缩胶电压 75V ,分离胶电压 100V ,考马斯亮蓝染色 1h ,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0077] 紫外扫描图谱中,OLA-HS-BSA (OVA) 溶液与BSA (OVA) 溶液相比,最大吸收波长有变化,而且经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0078] 2. 抗血清效价的测定

[0079] 将实施例1、对比例1制备的人工抗原分别对BALB/C小鼠进行免疫,初次免疫采用弗氏完全佐剂乳化人工抗原,乳化后,注射,计量为 $250\mu\text{g}/\text{小鼠}$,后每间隔21天加强免疫,共加强免疫3次,加强免疫采用不完全佐剂进行乳化,免疫计量为 $150\mu\text{g}/\text{小鼠}$,加强免疫14d(天)后小鼠断尾采血进行多抗血清的效价测定,血清用封闭液倍比稀释后ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值与阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价,结果如表1所示。最后进行末免,末免采用人工抗原直接腹腔注射的方式进行,免疫计量为 $300\mu\text{g}/\text{小鼠}$ 。

[0080] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0081] a. 包被:分别以实施例1中的人工抗原OLA-A-OVA或者对比例1中的人工抗原OLA-HS-OVA为包被原, $\text{pH } 9.6, 0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CBS为包被缓冲液,包被原浓度为 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,包被量为 $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 中包被2h,后PBST洗液洗板4次;

[0082] b. 封闭:加入封闭液 $250\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育30min后,PBST洗液洗板4次;

[0083] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清 $10000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取 $10\mu\text{L}$ 加入到 2mL 封闭液,(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照, $100\mu\text{L}/\text{孔}$,每个梯度4个重复, 37°C 孵育1h,后采用PBST洗液洗板4次;

[0084] d. 加酶标二抗:反应结束后PBST洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0085] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育15min;

[0086] f. 终止读数:加入 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸 $50\mu\text{L}/\text{孔}$,用酶标仪读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

[0087] 表1实施例1与对比例1中的抗血清效价测定结果

[0088]

免疫抗原	检测抗原	抗血清效价
OLA-A-BSA实施例1	OLA-A-OVA实施例1	614400
OLA-HS-BSA对比例1	OLA-HS-OVA对比例1	102400

[0089] 由表1的抗血清效价测定结果表明,实施例1的抗血清效价比较高,实施例1制备的人工抗原中存在共轭效应,使得人工抗原更加稳定,而且能更好地把噻乙醇的特征结构暴露出来,抗原特异性较强,有利于制备特异性强的单克隆抗体。

[0090] 3. 噻乙醇单克隆抗体的制备

[0091] (1) 小鼠免疫:

[0092] 选择6-8周龄、体重18~20g BALB/C雌性小鼠。将制备的免疫原(OLA-A-BSA)与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后,腹部和腋下多点注射,剂量为100-200 μg /只,后每间隔21天进行加强免疫,3次加强免疫后采血测定效价,效价采用间接ELISA方法测定,血清用封闭液倍比稀释后,采用ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值与阴性血清比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价。当效价不再明显升高时加倍剂量进行末免,末免3d后进行细胞融合。免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫采用弗氏不完全佐剂,末免不使用佐剂,直接免疫原注射免疫。

[0093] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0094] a. 包被:以OLA-A-OVA为包被原,pH9.6,0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CBS为包被缓冲液,包被原浓度为10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,包被量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 中包被2h后,PBST洗液洗板4次;

[0095] b. 封闭:加入封闭液250 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后,PBST洗板4次,每孔加PBST 300 μL ;

[0096] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取10 μL 加入到2mL封闭液(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照,100 μL /孔,每个梯度4个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0097] d. 加酶标二抗:反应结束后洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0098] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min;

[0099] f. 终止读数:加入2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸50 μL /孔,用酶标仪读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

[0100] TMB底物缓冲液由A液,B液和C液组成,具体配方和使用体积比如下:

[0101] 显色液A:2.35g柠檬酸,9.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,加纯水定容至490mL,调节pH值5.0~5.4,再用纯水定容至500mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

[0102] 显色液B:取30%双氧水1.25mL,用纯水定容至50mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

[0103] 显色液C:取200mg四甲基联苯胺(TMB)溶解于100ml无水乙醇中,溶解后4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

[0104] TMB底物缓冲液使用前临时配用,配用比率为A液9.5mL,B液42 μL ,C液0.5mL,混匀后使用。

[0105] (2) 细胞融合及培养:

[0106] 在末免3天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量1500)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0107] a. 末免后的小鼠眼球放血,血清收集后离心吸上清备用,拉颈处死后置于70%酒精中3~5min,无菌条件下取小鼠脾脏,用无菌手术剪剪碎后置入无菌碾钵中碾磨,用RPMI-1640基础培养基吹悬细胞后,过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

[0108] b. 收集SP2/0细胞(骨髓瘤细胞),要求细胞生长状态佳,细胞活性大于90%,吸去细胞上清后加入新的RPMI-1640基础培养基并将细胞吹打悬浮,后进行细胞计数;

[0109] c. 根据细胞计数结果,将脾细胞与SP2/0细胞按照5-10:1的比例混合后,1800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5分钟后吸去上清,向剩余细胞中加入0.6mL PEG,在1分钟内边加边轻轻搅拌均匀,加完后静置1min后,由慢到快再加入RPMI-1640基础培养基45mL,后1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5

分钟后去上清,加入选择性HAT培养基后,铺板于96孔细胞培养板,每孔250 μ L,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的培养箱中培养。

[0110] d. 培养3~5天后,用HAT培养基换液1次,第10天换为HT培养基培养。

[0111] (3) 细胞筛选与细胞株建立:

[0112] 待融合细胞生长到覆盖培养孔10%~30%孔底面积时,取上清用间接ELISA筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为OLA-A-OVA交联物,并以OVA、BSA作阴性对照。筛选出的阳性反应孔进一步用竞争ELISA分析抗体的检测灵敏度。灵敏度好的杂交瘤细胞用有限稀释法连续克隆3~4次,获得杂交瘤细胞株。

[0113] 杂交瘤细胞株经扩大培养后,一方面可以将该细胞株用于腹水制备、单克隆抗体的纯化和应用;另一方面可以将建立的杂交瘤细胞株移入细胞冻存管并放入液氮中长期保存。

[0114] (4) 单克隆抗体的制备、纯化和鉴定

[0115] 采用动物体内诱生法制备单克隆抗体。

[0116] 选择6~8周龄健康BALB/C小鼠,在BALB/C小鼠腹腔注射降植烷,0.3mL/只,7~10d后同法注射筛选到的杂交瘤细胞株细胞(0.4mL/只,每mL细胞株数量在 $2.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 之间),5~7d待小鼠腹腔明显胀大后无菌操作抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水。

[0117] 腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化后过protein A蛋白亲和层析柱纯化,用紫外分光光度计分别测定纯化抗体的紫外260nm和280nm的光密度,用Lowry-kalokar公式计算蛋白质浓度为6.4mg \cdot mL⁻¹。其余纯化的单抗-70 $^{\circ}$ C保存备用。

[0118] 4. 一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒的组成

[0119] 该试剂盒包含以下组分:

[0120] (1) 反应板1块;

[0121] (2) 喹乙醇磁标抗体1瓶;

[0122] (3) 喹乙醇酶标半抗原1瓶;

[0123] (4) 磁标抗体稀释液1瓶;

[0124] (5) 酶标半抗原稀释液1瓶;

[0125] (6) 喹乙醇标准品母液1瓶;

[0126] (7) 化学发光底物A液1瓶;

[0127] (8) 化学发光底物B液1瓶;

[0128] (9) 浓缩洗涤液;

[0129] 所述反应板可以是96孔反应板,其材质是石英材质或者玻璃材质。

[0130] 喹乙醇酶标半抗原的制备包括以下步骤:

[0131] 将0.1mmol的喹乙醇半抗原溶解于1.0mL的N,N-二甲基甲酰胺DMF中,在搅拌下逐滴加入0.3mmol的N-羟基琥珀酰亚胺NHS,反应1h后加入0.15mmol的N,N-二环己基碳二亚胺(DCC),室温下避光搅拌反应过夜;然后将反应液转入离心管中,5000r \cdot min⁻¹离心15min后取上清300 μ L,缓慢滴加到5.0mL含有10mg辣根过氧化物酶HRP的pH=9.6,0.05mol \cdot L⁻¹的碳酸钠缓冲液CBS,4 $^{\circ}$ C避光搅拌反应4h,后将反应液装入截留量为8000KD的透析袋中,选用500mL pH=7.4,0.01mol \cdot L⁻¹的磷酸盐缓冲液,在4 $^{\circ}$ C避光下透析,每2h更换透析液一次,透

析5-8次后,将透析后溶液加等体积甘油,使酶标半抗原浓度为 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, -20°C 保存。

[0132] 噻乙醇磁标抗体的制备包括以下步骤:

[0133] 磁珠选择粒径为 $2.8\mu\text{m}$ 的羧基磁珠为载体,羧基磁珠末端具有反应活性的羧基集团,在经过活化剂EDC-NHS处理后,活化的磁珠与噻乙醇单克隆抗体进行偶联,制备噻乙醇磁标抗体,合成步骤如下:

[0134] 1) 清洗:离心管预先用超纯水洗涤后灭菌烘干,备用,吸取 $500\mu\text{L}$ 羧基磁珠置于 1.5mL 离心管中,用 $500\mu\text{L}$ 含体积分数为 0.05% 吐温-20的 $\text{pH}=5.0, 0.25\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液洗涤3次,磁分离后移除上清;

[0135] 2) 活化: $\text{pH}=5.0, 0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液在 4°C 预冷后用于配置 $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EDC和BHS溶液。将配置好的EDC溶液和NHS溶液各 $250\mu\text{L}$ 加入到离心管中,漩涡震荡 1min ,磁分离后弃去上清,用 $\text{pH}=5.0, 0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液洗涤3次;

[0136] 具体地,将 9.59mg 碳二亚胺(EDC)溶解于 1mL 上述预冷后的 $\text{pH}=5.0, 0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液,得到EDC溶液;将 5.75mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶解于 1mL 上述预冷后的 $\text{pH}=5.0, 0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液,得到NHS溶液;

[0137] 3) 偶联:将 10mg 噻乙醇单克隆抗体冻干粉用 1mL $\text{pH}=5.0, 0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MES溶液溶解,溶解后逐滴加入到活化后的磁珠中,混匀后在室温下偶联 2h 或者置于 4°C 冰箱中反应 12h ;

[0138] 4) 封闭:偶联结束后进行磁分离清洗,上清移除后加入 $500\mu\text{L}$, $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TRIS溶液封闭 30min ;其中,TRIS溶液采购自浙江森瑞生物科技有限公司,货号210012;

[0139] 5) 保存:磁分离后移除上清,用 $500\mu\text{L}$ 含质量分数为 1% BSA,体积分数为 0.05% 吐温-20的TRIS溶液洗涤4次,磁分离后移除上清,将磁珠复溶于含质量分数为 1% BSA,体积分数为 0.05% 吐温-20和质量分数为 0.02% Na_3N_3 的TRIS溶液,使磁标抗体中抗体浓度为 $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

[0140] 噻乙醇系列标准溶液的配制包括以下步骤:

[0141] 由噻乙醇标准品母液做系列稀释,配置成浓度依次为 $32\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $16\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $8\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.5\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 8个梯度的系列标准溶液;噻乙醇标准品母液浓度为 $640\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,其中,溶剂为甲醇;稀释液为含体积分数为 5% 甲醇的 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液。

[0142] 所述化学发光底物A液为 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲁米洛与 $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四溴苯酚等比例混合, $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 为 8.5 的Tris-HCl为缓冲液,化学发光底物B液为用 $0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 为 8.5 的Tris-HCl为稀释液,将质量分数为 30% 双氧水溶液稀释500倍。

[0143] 所述磁标抗体稀释液为 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为 $1\%\sim 2\%$ 的BSA和质量分数为 $0.01\%\sim 0.03\%$ 的叠氮化钠。

[0144] 所述酶标抗原稀释液为 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,其中含有质量分数为 $1\%\sim 2\%$ 的BSA。

[0145] 所述浓缩洗涤液为: $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液,且该缓冲液中含有体积百分比浓度为 0.5% 的吐温20和质量百分比含量为 0.2% 叠氮化钠。

[0146] 溶液配制:

[0147] PBST洗液:取 500mL $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液,加入 0.25mL 吐温20,混

匀备用。

[0148] 封闭液:1g脱脂奶粉溶解于50mL pH=7.4,0.01mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液。

[0149] pH=9.6,0.05mol·L⁻¹碳酸盐缓冲液(CBS):称取Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃2.93g,加入纯水至990mL,调pH至9.6,再用纯水定容至1000mL,4℃贮存备用。

[0150] 0.01mol·L⁻¹,pH=7.4的磷酸缓冲液(PBS):8.5g NaCl,2.2g Na₂HPO₄·12H₂O,0.2g NaH₂PO₄·2H₂O,溶于900mL纯水中,调pH至7.4,定容至1000mL。

[0151] pH=5.0,0.25mmol·L⁻¹的2-(N-吗啉)乙磺酸溶液(MES):53.3mg 2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物溶于900mL纯水中,调pH至5.0,定容至1000mL。

[0152] 实施例2

[0153] 利用喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒检测样品中喹乙醇残留

[0154] 本发明还提供了一种利用喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒检测样品中喹乙醇残留的方法,主要包括以下步骤:

[0155] 1)配置系列标准溶液;用试剂盒中的喹乙醇标准品母液640ng·mL⁻¹进行配置,其中,溶剂为甲醇;现配现用,具体的配置方法如上所述;

[0156] 2)将待测样本进行预处理,得到待检样本溶液;

[0157] 3)反应板每孔依次加入稀释好的喹乙醇磁标抗体100μL、稀释好的酶标半抗原50μL,所述稀释好的喹乙醇磁标抗体指的是将喹乙醇磁标抗体用磁标抗体稀释液稀释100倍,稀释前的磁标抗体的浓度为:400μg·mL⁻¹;

[0158] 所述稀释好的喹乙醇酶标半抗原指的是将喹乙醇酶标半抗原用酶标半抗原稀释液稀释100倍,稀释前的酶标半抗原的浓度为:200μg·mL⁻¹;

[0159] 4)标准溶液或者样品溶液每孔50μL加入到反应孔中,37℃反应1h;

[0160] 5)将浓缩洗涤液用去离子水稀释10倍后配置洗液,采用洗液对反应孔中反应液进行磁分离清洗3~5次;

[0161] 6)每孔分别加入化学发光底物A液和化学发光底物B液各100μL后在化学发光检测仪中检测,并计算喹乙醇残留量结果;

[0162] 每次试剂盒检测需要建立标准曲线,公式为 $y=A \ln(x)+B$,其中A为曲线斜率,B为系数,x为浓度,y为抑制率,通过测定y的值来推导出x的值。

[0163] 检测样品预处理方法

[0164] (1)池塘水样预处理

[0165] 将池塘水样用定性滤纸过滤后,准确吸取1mL过滤后的池塘水,加入1mL样品稀释液(样品稀释液为体积百分含量为5%甲醇的0.01mol·L⁻¹,pH 7.4的磷酸盐缓冲液),混匀后吸取50μL混合液加入反应板中进行检测。

[0166] (2)饲料样品预处理

[0167] 市场上购买的饲料用粉碎机粉碎后过60目筛,称取筛好的饲料样品1g放入5mL离心管中,加入3mL含体积百分含量为5%甲醇的0.01mol·L⁻¹,pH=7.4的磷酸盐缓冲液,在漩涡振荡器上振荡2min,后5000r·min⁻¹离心10min,小心吸取上清液后转入1.5mL离心管并在10000r·min⁻¹下离心10min,吸取50μL上清液加入反应板中进行检测。

[0168] 实施例3

[0169] 1.试剂盒精密度和准确度试验

[0170] 回收率为试剂盒准确度的重要评价指标,通过添加一定量的标准样品到样品中,进行测定,根据建立的标准曲线计算得到喹乙醇含量,并与实际添加量进行比较得到回收率数值。回收率越接近实际100%说明试剂盒检测的准确度较高,结果可信。

[0171] 回收率(%) = 实际测定值/理论添加值 × 100%; 相对标准偏差RSD% = SD/X × 100%,其中SD为标准偏差,X为测定数值的平均值。

[0172] 对于水样,添加喹乙醇标准样品后,水样中喹乙醇标准样品的浓度分别为5ng · mL⁻¹和10ng · mL⁻¹;对于饲料,添加喹乙醇标准样品后,饲料样品中喹乙醇标准样品的浓度分别为5ng · mL⁻¹和10ng · mL⁻¹,结果见表2。

[0173] 表2精密度及准确度试验

样品	添加后,喹乙醇标准样品的浓度(ng/mL)	回收率 (n=4)%	批内 RSD (n=4)%	批间 RSD (n=3)%
水样	5	93.7	7.5	7.8
	10	104.2	8.2	7.4
饲料	5	85.4	9.0	8.5
	10	96.1	6.8	9.2

[0175] 从结果来看,样品添加回收率介于80%-120%之间,同时试剂盒批内和批间相对标准偏差均小于10%,说明试剂盒检测准确度与精密度均较高。

[0176] 2. 试剂盒特异性试验

[0177] 选择喹乙醇结构类似物分别进行交叉反应率测定,测定过程和步骤与建立标准曲线方法一致,只是将喹乙醇标准品更换为结构类似物系列浓度,进行检测,最终计算获得交叉反应率,交叉反应率计算公式如下:

[0178] 交叉反应率(%) = (喹乙醇IC₅₀) / (结构类似物IC₅₀) × 100%

[0179] 交叉反应率越高,说明喹乙醇单克隆抗体特异性越好,检测结果见表3。

[0180] 表3试剂盒的特异性

化合物 Compounds	抑制中浓度 IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 Cross reactivity (%)
喹乙醇 Olaquinox	9.7	100
3-甲基喹啉林-2-羧酸 4-3-Methylquinoline-2-carboxylic acid	>1000	<0.96
卡巴氧 Carbadox	>5×10 ³	<0.18
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	>5×10 ³	<0.18
莱克多巴胺 Ractopamine	>5×10 ³	<0.18
青霉素 Penicillin	>5×10 ³	<0.18
氯霉素 Chloroamphenicol	>5×10 ³	<0.18
四环素 Tetracycline	>5×10 ³	<0.18

[0182] 从交叉反应率结果来看, 喹乙醇与其他类似物的反应率均小于1%, 说明试剂盒对喹乙醇有高度的特异性。

[0183] 3. 试剂盒保存期试验

[0184] 试剂盒保存条件为2-8℃, 经过12个月保存后测定, 试剂盒最大吸光度值, IC₅₀值, 喹乙醇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℃保存条件下放置7天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻7天, 测定结果也表明试剂盒各项指标正常。从以上结果得到喹乙醇的磁免疫化学发光免疫分析试剂盒可以在2-8℃保存12个月。

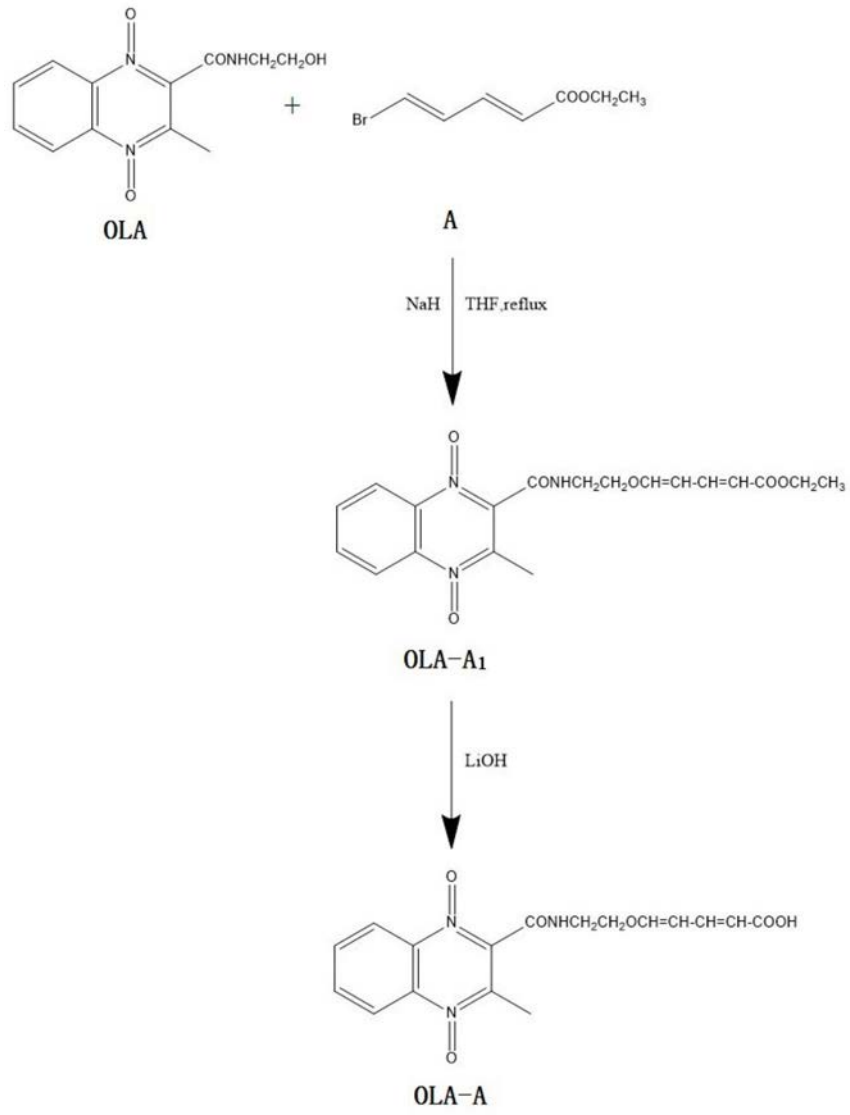


图1

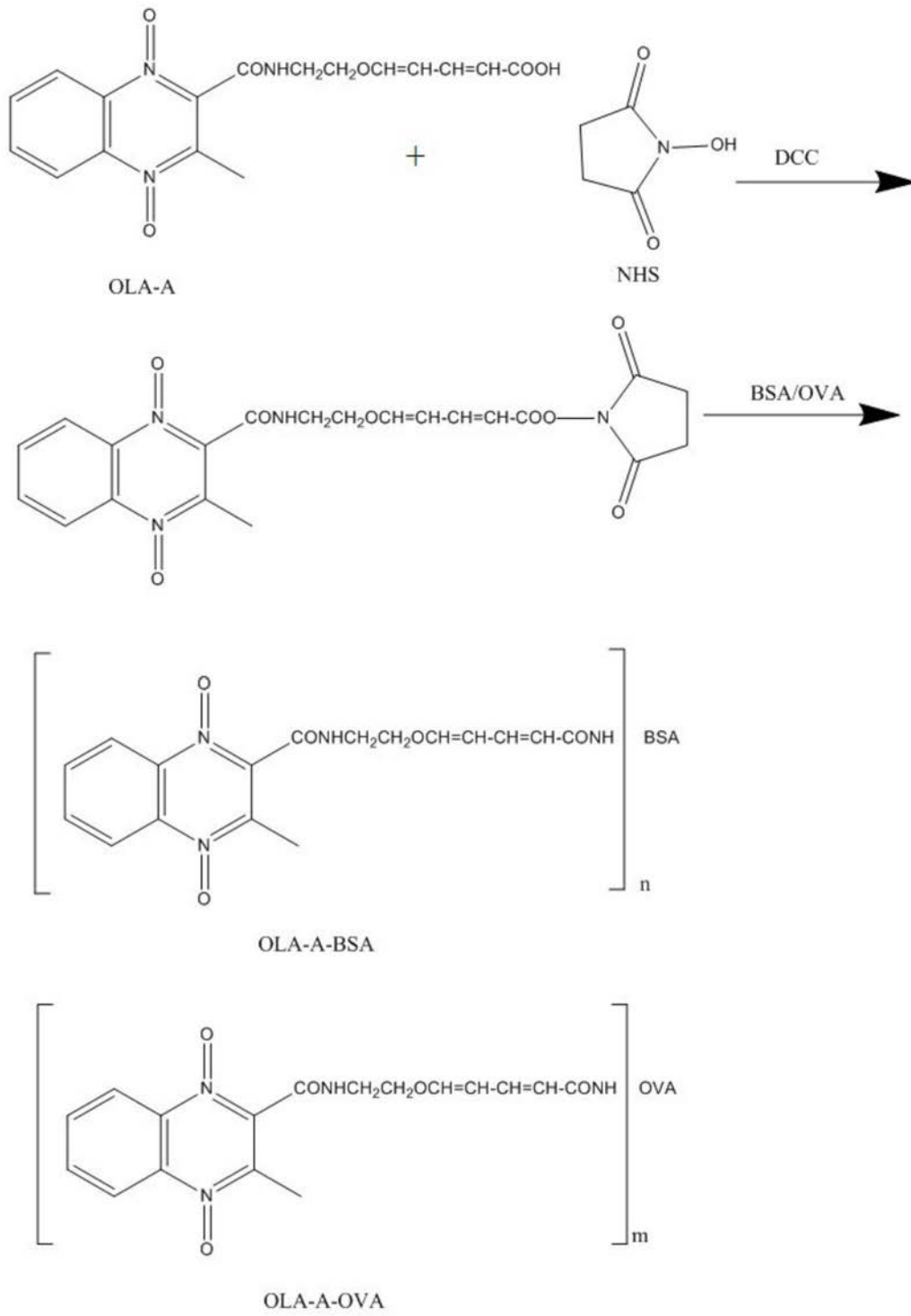


图2

专利名称(译)	一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110927377A	公开(公告)日	2020-03-27
申请号	CN201910948272.7	申请日	2019-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
[标]发明人	王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军		
发明人	王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/577		
代理人(译)	向庆宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种喹乙醇的磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用，本发明制备的抗喹乙醇单克隆抗体特异性强，制备的试剂盒具有较高的精密度和准确度，而且该试剂盒对喹乙醇有高度的特异性；该试剂盒能够对水和饲料中的喹乙醇进行定性和定量检测，样品预处理过程简单，方便快捷，检测准确度高；本发明的试剂盒为化学发光检测试剂盒，具有灵敏度高，准确率高、背景干扰不明显，检测时间短、操作方便等特点，而且是基于磁珠为载体的化学发光免疫分析，将化学发光免疫分析的优点有效发挥，检测结果可以通过常规的化学发光分析仪进行读数，具有很好的兼容性，应用价值大，市场前景广，能够有效推动喹乙醇快速检测技术的发展。

