

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/543

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02137940.8

[43] 公开日 2003 年 1 月 8 日

[11] 公开号 CN 1389729A

[22] 申请日 2002.7.12 [21] 申请号 02137940.8

[71] 申请人 江南大学

地址 214036 江苏省无锡市惠河路 170 号

[72] 发明人 胥传来 丁宏标 李相前

邵蔚蓝 徐保国 詹 斌

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利事务所

代理人 时旭丹

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种动物性食品中氯霉素酶免疫检测试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

一种氯霉素 (CAP) 酶免疫检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。本发明配制的试剂盒,采取酶免疫吸附 (ELISA) 竞争法检测 CAP,利用 CAP 和牛血清白蛋白 (BSA) 偶连物作为 CAP 抗原免疫小鼠,获得含有 CAP 抗体的单克隆 CAP 抗血清,经分离、提纯、稀释后包被在酶标板上,温育、洗涤,加入样品稀释液及酶标抗原,使两者进行反应、洗涤,加酶底物显色。本发明样品前处理简单,是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法,尤其适用于肉制品的 CAP 残留检测。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种氯霉素（CAP）酶免疫检测试剂盒，其特征在于由盒体（1），酶标板（2），A 试剂瓶（标准 CAP 试剂）（3），B 试剂瓶（稀释液）（4），C 试剂瓶（酶标抗原试剂）（5），D 试剂瓶（酶标抗原稀释液）（6），E 试剂瓶（含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体）（7），F 试剂瓶（邻苯二胺 OPD 试剂）（8），G 试剂瓶（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）（9），H 试剂瓶（H₂O₂ 溶液）（10），I 试剂瓶（硫酸溶液）（11），海绵托架（12）所组成，海绵托架（12）内装有上述 A、B、C、D、E、F、G、H、I 试剂瓶，海绵托架（12）及酶标板（2）均安放在盒体（1）内。

2、按照权利要求 1 所述的氯霉素（CAP）酶免疫检测试剂盒，其特征在于所述的海绵托架（12）上制有孔和凹槽。

3、按照权利要求 1 所述的氯霉素（CAP）酶免疫检测试剂盒，其特征在于所述的酶标板（2）有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成。

4、一种用氯霉素（CAP）酶免疫检测试剂盒检测氯霉素的方法，先进行样品处理，其特征在于首先将单克隆 CAP 抗体包被在酶标板上，酶标板放在 4℃ 冰箱过夜，再进行试剂及酶底物混合液的配制，在 A 试剂（标准 CAP）中加 20-30ml B 试剂混匀，在 C 试剂（酶标抗原）中加入 10-20ml D 试剂，溶解混匀，在 2-8℃ 下保存，用 E 试剂加入去离子水配制成 E 洗涤液，用 E 洗涤液洗酶标板 2-4 次，洗液不得溢出，每次间隔 3-4 分钟，洗后用吸水纸拍干，在酶标板小孔中加入配制好的试剂及样品稀释液进行竞争免疫反应，在 37-38℃ 温育 1~1.5h，再用 E 洗涤液洗板 4-6 次，每次间隔 3-4min，拍干，再加入酶底物混合液，混匀，在 37-38℃ 避光作用 15-20 分钟，显色，最后加入 I 终止液（硫酸溶液）中止反应，用酶标仪测定 A_{490nm} 值。

5、按照权利要求 4 所述的检测氯霉素（CAP）的方法，其特征在于所述的 C 试剂（酶标抗原试剂）为氯霉素-辣根过氧化物酶（CAP-HRP）或酶标羊抗兔抗体（SABC，上海）或酶标猪抗兔抗体（Sigma, USA），B 试剂（稀释液）为 PBST 溶液（含 10g/L BSA, 0.01mol/L, PH7.4），D 试剂（酶标抗原稀释液）为 PBS 溶液（含 1%明胶，0.01mol/L, PH7.4）。

6、按照权利要求 4 所述的检测氯霉素（CAP）的方法，其特征在于所述的酶底物混合液，采用 G 试剂（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）和 F 试剂（邻苯二胺）按 G：F=7-9：3-1，和每 ml 此稀释液加 14μl H 试剂（H₂O₂）混合配制而成，临用前半小时内配制。

一种动物性食品中氯霉素酶免疫检测试剂盒及其检测方法

技术领域

一种动物性食品中氯霉素(chloramphenicol, CAP)酶免疫检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。

背景技术

氯霉素是一种广谱抗生素,已广泛用于动物各种传染性疾病的治疗,但是氯霉素有严重的副作用,它能抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病,因此动物性食品中的氯霉素残留对人类的健康构成了潜在的危害,美国和欧共体对氯霉素使用于动物和动物性食品中氯霉素残留量有严格的限止。我国尚未制定氯霉素残留量的食品卫生标准。由于氯霉素抑菌广谱,效果好和价廉,在我国用它治疗家畜、禽类疾病也较普遍,为了保障我国人民的健康和扩大动物性食品的贸易往来,加强对动物性食品中氯霉素残留的检测是非常必要的。

测定氯霉素残留的方法,主要有微生物学方法,色谱法,放射免疫法,酶免疫分析法等。国内外文献已有许多报导(见“中国食品卫生杂志”2002年第14卷第2期P44-47)对检测方法的要求是操作简便,精确度高,特异性强。国外氯霉素酶免疫检测试剂盒有若干种推向市场已见文献报导,但国内尚未见有此类试剂盒面市的报导。

发明内容

本发明的目的是提供一种结构简单,操作方便,价格便宜的氯霉素酶免疫检测试剂盒。同时提供一种样品前处理简单,提取后就可直接测定一次可测定大量样本,简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测氯霉素的方法。

本发明试剂盒主要由盒体(1)、酶标板(2)、A试剂瓶(标准氯霉素试剂)(3)、B试剂瓶(稀释液)(4)、C试剂瓶(酶标抗原试剂)(5)、D试剂瓶(酶标抗原稀释液)(6)、E试剂瓶(含吐温-20的磷酸盐固体)(7)、F试剂瓶(邻苯二胺OPD试剂)(8)、G试剂瓶(醋酸钠-柠檬酸缓冲液)(9)、H试剂瓶(H_2O_2 溶液)(10)、I试剂瓶(硫酸溶液)(11)、海绵托架(12)所组成,海绵托架(12)上制有孔和凹槽,上述A、B、C、D、E、F、G、H、I试剂瓶安放在海绵托架

的孔和凹槽内。海绵托架（12）及酶标板（2）均安放在盒体（1）内。酶标板（2）有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成。

本发明原理是采用酶免疫吸附（ELISA）竞争法来检测氯霉素（CAP）。

一、特异性抗体（CAP 单抗）的制备：

1、抗原制备，以人工合成的氯霉素——牛血清白蛋白（CAP-BSA）作为免疫抗原。

2、免疫动物

采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物，免疫抗原剂量为 50~100ng，皮下注射，3~4 周后，腹腔注射加强免疫 2~4 次，取脾细胞。

3、细胞融合

将 SP2/0 骨髓瘤细胞与脾细胞在聚乙烯醇的溶剂中进行细胞融合，在 HAT 培养液中作选择培养。

4、杂交瘤细胞克隆化

采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，直至得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

5、单克隆抗体（McAb）的保存

在液氮-20℃冻存，使用时 37℃水浴快速解冻。

6、McAb 的生产和提纯

先小鼠腹腔注射液体石蜡，0.5ml/只，7-10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ /只，7-10 天后采集腹水。经硫酸铵盐析法进行纯化，小瓶分装待用。

二、样品处理

1、牛奶样品

a. 3500 转/分 离心 10 分钟去脂。

b. 吸取并弃去上层脂肪层。

c. 取 5ml 去脂牛奶加入 150 μ l 革瑞氏液 I，摇匀后振荡再加入 150 μ l 革瑞氏液 II，迅速摇匀。

d. 3500 转/分 离心 10 分钟。

e. 移去上清液，再用缓冲液将其 1: 1 稀释（1 份上清液+1 份缓冲液）。

f. 取 50 μ l 用于检测。

2、肉样

a. 用均质器或捣碎机将去质肉样或肾脏进行均质。

b. 取均质后样品 5g，加 20ml 乙腈水溶液（84 份乙腈+16 份水）提取 10 分

钟。

- c. 3000 转/分 离心 10 分钟。
- d. 用 3ml 去离子水稀释 3ml 上清液，再用 4.5ml 乙酸乙酯提取。
- e. 3000 转/分 离心 10 分钟。
- f. 将乙酸乙酯层吹干。
- g. 用 1.5ml 缓冲液将残渣溶解，再加入 1.5ml 正己烷或正庚烷去脂。
- h. 彻底移去上层的正己烷或正庚烷层。
- i. 取 50 μ l 下层液用于检测。

酶标板有 12 孔、12 条。酶标板上用单克隆 CAP 抗体包被，每孔 50-100 μ l，37℃，温育 2hr，用 10g/L 明胶封闭。包被后的每条酶标板用铝箔袋封好，置 2-8℃冷芷保存。

用本试剂盒检测氯霉素（CAP）的方法，是将单克隆 CAP 抗体包被在酶标板（2）上，酶标板（2）放在 4℃左右冰箱过夜。再进行试剂及酶底物混合液的配制。在 A 试剂（标准 CAP）中加 20-30ml B 试剂混匀，在 C 试剂（酶标抗原）中加入 10-20ml D 试剂（酶标抗原稀释液），溶解、混匀，在 2-8℃下保存，E 试剂（含吐温 20 的 PBS 固体）中加入去离子水配制成 E 洗涤液。先取出酶标板，用 E 洗涤液洗涤 2-4 次，洗液不得溢出，每次间隔 3-4 分钟，洗后用吸水纸拍干。然后加反应物竞争吸附，在酶标板小孔中加入配制好的试剂及样品稀释液进行竞争免疫反应，在 1-3 标准对照孔中仅加或不加酶标抗原，加或不加标准 CAP 试剂，而在 4-12 样品测定孔中，先后加入待测抗原和酶标抗原，在 37-38℃温育 1-1.5 小时。再用 E 洗涤液洗板 4-6 次，每次间隔 3-4 分钟，拍干，再加入酶底物混合液，混匀，在 37-38℃避光作用 15-20 分钟，显色，最后加入 I 终止液（硫酸溶液）中止反应，测定 A_{490nm} 值。

C 试剂（酶标抗原试剂）为氯霉素-辣根过氧化物酶（CAP-HRP），或酶标羊抗兔抗体（SABC 上海），或酶标猪抗兔抗体（Sigma, USA），B 试剂为 PBST 溶液（含 10g/L BSA，0.01mol/L，PH7.4），D 试剂瓶（酶标抗原稀释液）为 PBS 溶液（含 1%明胶，0.01mol/L，PH7.4）。

酶底物混合液，采用 G 试剂（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）和 F 试剂（邻苯二胺）按 G：F=7-9：3-1 稀释和每 ml 此稀释液加 14 μ l H 试剂（H₂O₂）混合配制而成，临用前半小时内配制。

本发明的优点是样品前处理简单，利用本试剂盒检测 CAP 残留，是简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法。最低检测限达 50ng/kg。

附图说明

图 1 试剂盒的直观示意图

图 2 酶标板的直观示意图

图中：盒体（1）、酶标板（2），A 试剂瓶（标准 CAP 试剂）（3），B 试剂瓶（稀释液）（4），C 试剂瓶（酶标抗原试剂）（5），D 试剂瓶（酶标抗原稀释液）（6），E 试剂瓶（含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体）（7），F 试剂瓶（邻苯二胺 OPD 试剂）（8），G 试剂瓶（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）（9），H 试剂瓶（ H_2O_2 溶液）（10），I 试剂瓶（硫酸溶液）（11），海绵托架（12），试剂盒应放在 2-8℃ 贮存，忌 0℃ 下冻存，有效期为 12 个月。

具体实施方式

实施例 1

采用按照前述方法制备的单克隆 CAP 抗血清包被在酶标板上，放入 4℃ 冰箱过夜。

1、按照前述方法，进行样品处理。

2、试剂配制。

1) 标准 CAP 试剂：CAP 加 20ml B 试剂（稀释液）混匀。

2) 酶标抗原试剂：C 试剂加 10ml D 试剂（酶标抗原稀释液）溶解、混匀。

3) E 洗涤液配制：在含 0.1% 吐温-20（Tween-20）的磷酸盐（PBS）的 E 试剂中加入 200ml 蒸馏水配制 E 洗涤液，用于酶标板洗涤。

4) 底物混合液配制：根据每次所需用量，用 F 试剂（邻苯二胺）和 G 试剂（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）按 G：F=7-9：3-1 的比例稀释 F 试剂，再按每 ml 此稀释液需加入 14 μ l 的双氧水 H 试剂，配制成底物混合液，临用前半个小时内配制。

3、将试剂盒平衡至室温。

4、用 E 洗涤液洗酶标板 2 次，洗液不得溢出；每次间隔 3 分钟，放在吸水纸上拍干。

5、加反应物进行反应，按下表所列，依次加入配制好的试剂及待测样品稀释液，1-3 号孔为标准对照孔，4-12 号孔为样品测定孔，每批测定时，可以每孔置一只待测样品，也可几只孔置同一只待测样品，进行平行测定，也可用另一根酶标板同时检测，其 1-12 孔扩大均为样品孔，这可视具体待测样品的数目多少而灵活决定。

次序	加入量	孔号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	25 μl	B	A	B	……稀释后样品液……								
2		摇匀											
3	25 μl	C	C	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4		摇匀											

按上表在 4-12 样品测定孔中，先后加入待测抗原和酶标抗原，而在 1-3 标准对照孔中，仅加或不加酶标抗原。

6、反应：在 37℃ 温育放置 1.5 小时。

7、洗涤显色：用 E 洗涤液洗酶标板 4 次，拍干，每孔加入 50 μ l 底物混合液，摇匀，在 37° 温育 15 分钟，显色。

8、终止，加入 I 终止液（硫酸溶液）2mol/L: 50 μ l/孔。

9、测定：先比较 1-3 号孔颜色，1 号孔最深，2 号孔次之，3 号孔接近无色，说明标准正确。

目视法：比较样品孔与 2 号孔颜色，若比 2 号孔颜色浅，则为阳性，反之为阴性。若颜色与 2 号孔接近。则用酶标仪测 A_{490nm} 。

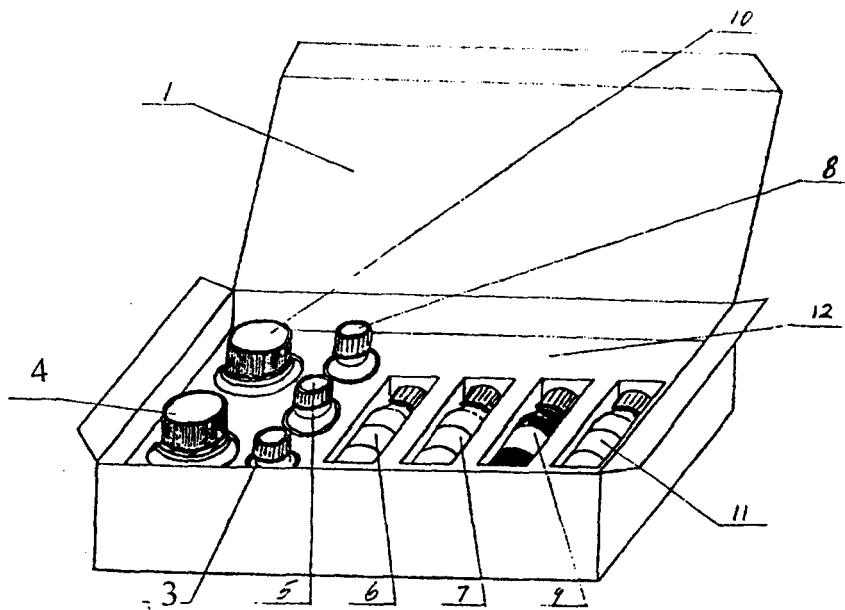


图 1

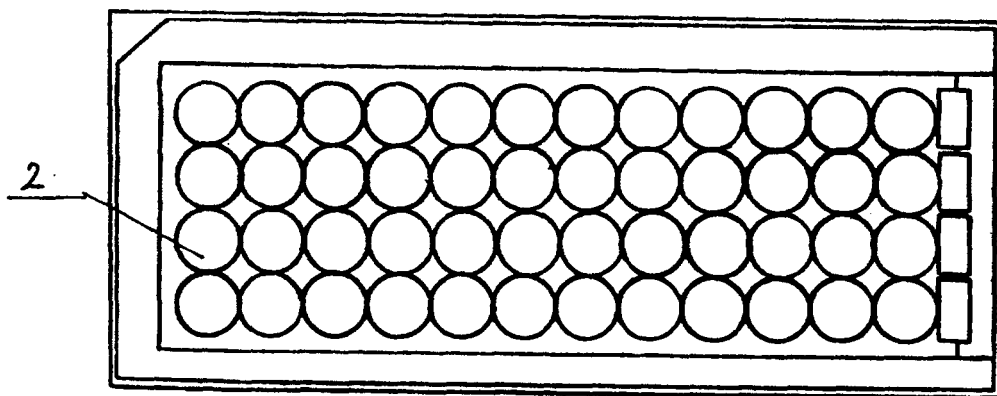


图 2

专利名称(译)	一种动物性食品中氯霉素酶免疫检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1389729A	公开(公告)日	2003-01-08
申请号	CN02137940.8	申请日	2002-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 丁宏标 李相前 邵蔚蓝 徐保国 詹斌		
发明人	胥传来 丁宏标 李相前 邵蔚蓝 徐保国 詹斌		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种氯霉素(CAP)酶免疫检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。本发明配制的试剂盒,采取酶免疫吸附(ELISA)竞争法检测CAP,利用CAP和牛血清白蛋白(BSA)偶连物作为CAP抗原免疫小鼠,获得含有CAP抗体的单克隆CAP抗血清,经分离、提纯、稀释后包被在酶标板上,温育、洗涤,加入样品稀释液及酶标抗原,使两者进行反应、洗涤,加酶底物显色。本发明样品前处理简单,是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法,尤其适用于肉制品的CAP残留检测。

