



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105319370 A

(43) 申请公布日 2016.02.10

(21) 申请号 201410357559.X

(22) 申请日 2014.07.25

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 薛永来 毛楠楠

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测苯二氮卓类药物残留试剂盒的制备

(57) 摘要

本发明为检测苯二氮卓类药物残留的 ELISA 试剂盒的制备及其检测方法,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括:包被了 BZD 抗原的酶标板、BZD 标准品、BZD 抗体工作液、BZD 酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液 A、底物液 B,在酶的作用下孔里将会出现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中 BZD 的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测血液及组织中的 BZD 含量。

1. 检测苯二氮卓类药物残留的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括酶标板、BZD 标准品、BZD 抗体工作液、BZD 酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液和浓缩洗涤液。

2. 检测 BZD 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:酶标板的制备、一系列 BZD 标准品的制作、单克隆抗体及其工作液的制备、酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备。

3. 根据权利要求 2 所述 检测 BZD 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的包被抗原是将 药物残留半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白 (BSA);用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐 (CBS) 缓冲液作为包被液,将 BZD-BSA 抗原稀释成 1:3200 比例,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 250  $\mu$ L/孔,洗板 2 次,30 s/次;然后加入 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭,150  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间 (25 $^{\circ}$ C) 晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存。

4. 根据权利要求 2 所述检测 BZD 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的一系列 标准品浓度分别为 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL。

5. 根据权利要求 2 所述检测 BZD 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的 蛋白质偶联物单克隆抗体是采用人工抗原免疫兔所得,该抗体工作液用抗体稀释液稀释成 1:12000。

6. 根据权利要求 2 所述检测 BZD 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的 BZD 酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成 1:3000 比例;所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为 2 mol/L 的硫酸;所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,其包含 0.5% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

7. 权利要求 2 所述的检测 BZD 的 ELISA 试剂盒的制备及检测方法,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温 (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) 平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有 BZD-BSA 抗原的酶标板,加标准品 / 样本 60  $\mu$ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入 40  $\mu$ L 抗体工作液,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;然后加入 100  $\mu$ L/孔酶标二抗工作液,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu$ L/孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干 (拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);

(6) 加入底物液 A 50  $\mu$ L/孔,底物液 B 50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30min;

(7) 加入终止液 50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值 (请在 5 min 内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中 BZD 的含量。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

- (1) 配制样品复溶液(甲醇:1M HCL=9:1);
- (2) 称量 3g 样品,研磨成粉;
- (3) 加入样品复溶液 6ml 混合,以 4000r/min,离心 10min;
- (4) 取上层液进行氮吹,加入 1ml 正己烷及 1ml 样复进行复溶;
- (5) 以 4000r/min 离心 5min,去除上层,取下层进行分析。

## 一种检测苯二氮卓类药物残留试剂盒的制备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域,特别是检测苯二氮卓类的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] BZD 是一类作用突出的化合物,具有抗惊厥、抗焦虑、松弛肌肉和安眠的临床作用,且毒性较小。国外在 70 年代对 BZD 食欲促进剂做了大量深入的研究,试验了 1500 中化合物对动物摄食的影响,发现多种 BZD 化合物可促进动物摄食,其中乙磺氟安定的效果最为显著。肌注、灌服及日粮添加均可有效增加健康动物特别是反刍动物的摄食量及摄食频率,提高日摄食量。近几年来有些饲料企业为了追求饲料的转化率和高额利润,在饲料中随意添加镇静、催眠类违禁药物。医学界已经证实畜禽产品中的激素及其它合成药物的连用与残留往往与人类常见的疾病问题及某些食品中毒有关。

[0003] 目前,BZD 的测定方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法、薄层层析法、高效液相色谱-质谱联用法等,其检测结果准确可靠,但仪器设备比较昂贵,且样本前处理过程相对复杂。酶联免疫吸附法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用于食品安全检测行业。本发明旨在建立一种检测 BZD 的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 发明内容

[0004] 为了克服色谱法的不足,本发明提供一种检测 BZD 的酶联免疫试剂盒及其检测方法。该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

[0005]

### 发明内容

[0006] 本发明检测苯二氮卓类的酶联免疫试剂盒,包括酶标板、BZD 标准品、BZD 抗体工作液、BZD 酶标二抗工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

[0007] 本发明检测苯二氮卓类的酶联免疫试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、BZD 标准品的制备、苯二氮卓类抗体工作液的制备、BZD 酶标二抗工作液的制备、底物液 A 的制备、底物液 B 的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

[0008] 其进一步特征在于:所述的酶标板经由 BZD 抗原包被制备,具体步骤是将 BZD 半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联得到包被抗原,用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将 BZD 包被抗原稀释成 1:3200 比例,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h,取出酶标板甩掉板内液体,加入经稀释的浓缩洗涤液 300  $\mu$ L/孔,洗板 2 次,30 s/次,然后加入 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭液,150  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h,甩掉封闭液直接拍干,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干,抽检合格后将酶标板真空密封于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。

[0009] BZD 标准品浓度分别为 0 ng/mL、5 ng/mL、10ng/mL、20 ng/mL、50ng/mL、100ng/mL。

[0010] 所述 BZD 抗体工作液是采用 BZD 人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成 1 :12000 比例制备。

[0011] 所述 BZD 酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成 1 :3000 比例,所述底物液 A 为含有 0.5 mmol/L 的过氧化氢脲的柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲溶液,所述底物液 B 为四甲基联苯二胺的乙醇溶液,所述终止液为 2 mol/L 的硫酸,所述浓缩稀释液是 10 倍浓缩稀释液,为 0.1 mol/L 的 PBS, pH 值范围 7.0-7.5 之间,所述浓缩洗涤液是 10 倍浓缩洗涤液,为含 0.5% 吐温 -20,0.1 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间。

[0012] 检测 BZD 的酶联免疫试剂盒及其检测方法,基于抗原抗体的间接竞争酶联免疫反应原理,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,并将其复溶于样品稀释液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20 ~ 25℃)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有 BZD 抗原的酶标板,加标准品 / 样本 60  $\mu$  L/ 孔到对应的微孔中,加入 BZD 抗体工作液,40  $\mu$  L/ 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25℃避光环境中反应 30 min ;用洗涤工作液 250  $\mu$  L/ 孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);

(4) 再加入 BZD 酶标二抗工作液,100  $\mu$  L/ 孔,然后小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu$  L/ 孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);

(5) 加入底物液 A 50  $\mu$  L/ 孔,底物液 B 50  $\mu$  L/ 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中反应 30 min ;

(6) 加入终止液 50  $\mu$  L/ 孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);

(7) 以的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中 BZD 的含量。

[0013] 其中,所述待测样品用以下方法进行预处理:

配制样品复溶液(甲醇 :1M HCL=9:1)称量 3g 样品,研磨成粉。加入样品复溶液 6ml 混合,以 4000r/min,离心 10min. 取上层液进行氮吹。加入 1ml 正己烷及 1ml 样复进行复溶。以 4000r/min 离心 5min, 去除上层,取下层进行分析。

[0014] 本发明检测 BZD 的酶联免疫试剂盒及其检测方法的测定原理:样品中的 BZD 与酶标板上固定的抗原特异性竞争抗体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中 BZD 的含量。如果样品中的 BZD 含量少,显色深;反之,则显色浅。本发明的试剂盒检测方法操作简便,检测灵敏、准确、快速,适用于大批量样品的快速检测。

## 附图说明

[0015] 图 1 为苯二氮卓类的标准曲线。

## 具体实施方式

### [0016] BZD 蛋白质偶联物的制备：

采用琥珀酸酐法得到带羧基的BZD半抗原衍生物，之后取0.05 mmol与载体蛋白BSA按10:1的结合比混合在0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)中，然后加入0.15 mmol碳二亚胺，搅拌置室温反应24 h，最后于0.2 mol/L pH 7.6的PBS缓冲液中透析两天，除去未反应的半抗原，将得到的蛋白质偶联物溶液于-20℃保存备用。

### [0017] BZD 抗体的制备：

选用健康成年纯种BALB/C小鼠，取与蛋白质偶联制备的免疫抗原50 μg与等量完全弗氏佐剂混合采用腹腔注射进行初次免疫，之后每隔3周用相同剂量免疫抗原加等量不完全弗氏佐剂采用腹腔注射进行二次、三次免疫，每次免疫6天后尾静脉采血测定抗血清效价至一定滴度后，用相同剂量不加佐剂进行末次免疫，3天后取脾制备脾细胞悬浮液与骨髓瘤细胞进行细胞融合，筛选出所需要的杂交瘤细胞系进行克隆化，选择处于对数生长期的杂交瘤细胞进行冻存，用于腹水制备，先腹腔注射0.5 ml液体石蜡于BALB/C鼠致敏，2周后腹腔注射 $1 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞，接种细胞7-10天后可产生腹水，待腹水尽可能多时用注射器抽取腹水，反复收集数次，4000 rpm离心15 min，收集上清，采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水对单克隆抗体进行纯化，冷冻干燥得冻干粉后于-20℃保存备用。

### [0018] 制备包被有BZD包被抗原的酶标板：

包被抗原是将BZD半抗原与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)偶联得到的，用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液，将BZD抗原稀释成1:3200比例，100 μL/孔，37℃放置2 h，取出酶标板甩掉板内液体，用稀释后的浓缩洗涤液250 μL/孔，洗板2次，30 s/次，然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭，150 μL/孔，37℃放置1.5 h，弃去封闭液，拍干后的酶标板放置恒温间(25℃)晾干，抽检合格后将酶标板真空密封后置4℃下保存。

[0019] BZD标准品配制浓度分别为0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20ng/mL、50 ng/mL、100ng/mL。

[0020] BZD抗体工作液的制备：采用BZD人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体，用抗体稀释液稀释成1:12000比例制备。

[0021] BZD酶标二抗工作液由酶标二抗加稀释液稀释成1:3000比例，底物液A为含有0.5 mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液，底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液，终止液为2 mol/L的硫酸，浓缩稀释液是10倍浓缩稀释液，为0.1 mol/L的PBS，pH值范围7.0-7.5之间，浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液，为含0.5%吐温-20，0.01mol/L的PBST，pH值范围7.0-7.5之间。

[0022] 基于上述制备的试剂，本发明用于检测苯二氮卓类的酶联免疫试剂盒包括如下材料：

- (1) 96孔酶标板 ×1 块；
- (2) 标准液 ×6 瓶：(1mL/瓶) 0 ppm、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL；
- (3) 抗体工作液 7 mL；
- (4) 酶标二抗工作液 12 mL；
- (5) 底物液 A 7 mL；

- (6) 底物液 B 7 mL ;
- (7) 终止液 7 mL ;
- (8) 10× 浓缩稀释液 40 mL ;
- (9) 10× 浓缩洗涤液 40 mL ;

本发明的试剂盒用于检测样品中苯二氮卓类残留量时,通过以下步骤实施:样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0023] (1) 样品预处理

配制样品复溶液(甲醇:1M HCL=9:1)称量 3g 样品,研磨成粉。加入样品复溶液 6ml 混合,以 4000r/min,离心 10min. 取上层液进行氮吹。加入 1ml 正己烷及 1ml 样复进行复溶。以 4000r/min 离心 5min, 去除上层,取下层进行分析。

[0024] (2) 用本发明试剂盒检测待测样品中苯二氮卓类残留量

取包被有苯二氮卓类抗原的酶标板,加标准品 / 样本 60  $\mu\text{L}$ / 孔到对应的微孔中;加入苯二氮卓类抗体工作液,40 $\mu\text{L}$ / 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu\text{L}$ / 孔,充分洗涤 4 次,浸泡 15-30 s,用吸水纸拍干;加入酶标二抗工作液 100 $\mu\text{L}$ / 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu\text{L}$ / 孔,充分洗涤 4 次,浸泡 15-30 s,用吸水纸拍干;加入底物液 A 50  $\mu\text{L}$ / 孔,底物液 B 50  $\mu\text{L}$ / 孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30min;加入终止液 50  $\mu\text{L}$ / 孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5 min 内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中苯二氮卓类残留量。

[0025] (3) 分析结果

百分吸光度值的计算,标准品或样本的百分吸光度值等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0 标准)的吸光度值,再乘以 100%,即

$$\text{百分吸光度值}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

其中 B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,  $B_0$ —0 ppb 标准溶液的平均吸光度值。

[0026] 以苯二氮卓类的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,求出直线方程。将样本的百分吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中苯二氮卓类的实际浓度。

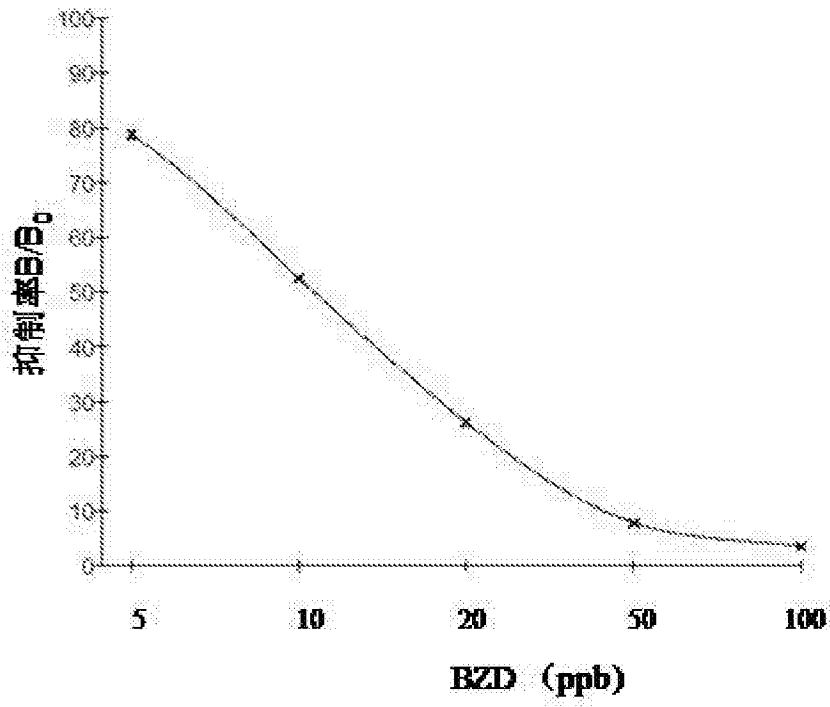


图 1

专利名称(译)	一种检测苯二氮卓类药物残留试剂盒的制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN105319370A</a>	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410357559.X	申请日	2014-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 薛永来 毛楠楠		
发明人	洪霞 薛永来 毛楠楠		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明为检测苯二氮卓类药物残留的ELISA试剂盒的制备及其检测方法，其检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括：包被了BZD抗原的酶标板、BZD标准品、BZD抗体工作液、BZD酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应，把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中，孵育一段时间后，洗板加入底物液A、底物液B，在酶的作用下孔里将会出现蓝色，加入终止液，颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中BZD的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测血液及组织中的BZD含量。

