



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109709338 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201811623398.9

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.12.28

G01N 33/58(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2018218 2018.12.20

CCTCC NO:C2018217 2018.12.20

(71)申请人 河北省科学院生物研究所

地址 050081 河北省石家庄市桥西区友谊
南大街46号

(72)发明人 李春生 李玉静 刘静静 杜顺丰

张岩 张静 吴萌 曹秀梅

(74)专利代理机构 河北东尚律师事务所 13124

代理人 李国聪

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

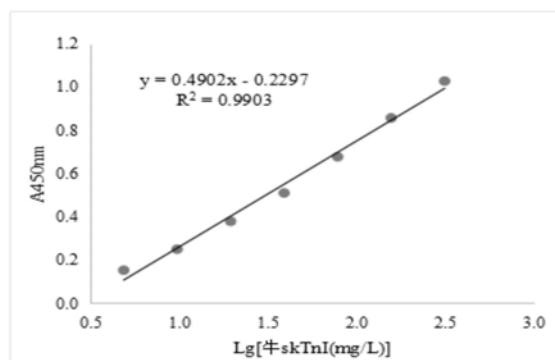
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试
剂盒及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法与应用,属于免疫学技术领域和食品安全分析技术领域。该酶联免疫试剂盒含有包被有捕获抗体的酶标板、辣根过氧化物酶标记的检测抗体、牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液。所述捕获抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018217的杂交瘤细胞株3A8分泌得到,所述检测抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018218的杂交瘤细胞株3D3分泌得到。该酶联免疫试剂盒具有灵敏度、精密度、准确度高,交叉反应率低,适合大批量样品检测等优点。



1. 一种检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该酶联免疫试剂盒由包被有捕获抗体的酶标板、酶标记的检测抗体、牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液组成。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述捕获抗体由保藏编号为CCTCC N0:C2018217的杂交瘤细胞株3A8分泌得到,所述检测抗体由保藏编号为CCTCC N0:C2018218的杂交瘤细胞株3D3分泌得到;两株细胞株于2018年12月20日送交中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述捕获抗体和检测抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源单克隆抗体,优选鼠源单克隆抗体;其由牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I提取免疫抗原免疫得到。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶标记检测抗体采用碘酸钠法将标记酶与检测抗体偶联得到。

5. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶标记的检测抗体中标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液包括显色底物A和显色底物B,所述显色底物A为过氧化氢或过氧化脲,所述显色底物B为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1-2mol/L的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1-2mol/L氢氧化钠。

6. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液的浓度分别为4.875mg/L、9.75mg/L、19.5mg/L、39mg/L、78.125mg/L、156.25mg/L、312.5mg/L;所述浓缩洗涤液为含有1%吐温-20的0.2mol/L PH7.4的磷酸缓冲液。

7. 一种制备如权利要求1至6任一权利要求所述的酶联免疫试剂盒的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备包被有捕获抗体的酶标板:

(a) 用包被缓冲液将捕捉抗体稀释成1:4000,100uL/孔加入到酶标板孔内;

(b) 4℃过夜或37℃孵育2h,倾去孔中液体,洗涤液洗涤4-5次,拍干;

(c) 加入封闭液缓冲液,200uL/孔,37℃孵育2h;

(d) 倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱中抽干5h,用铝箔袋真空塑封,即得包被有捕获抗体的酶标板;

其中,所述包被缓冲液为pH9.6的0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为1%的明胶;

(2) 制备酶标记检测抗体工作液:

将辣根过氧化物酶与检测抗体采用碘酸钠法进行偶联;

(3) 组建用于检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒,包括下述各组分:

(a) 包被有捕获抗体的酶标板;

(b) 酶标记检测抗体工作液;

(c) 牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液:采用梯度稀释法配制标准品溶液,1ml/瓶,浓度分别为4.875mg/L、9.75mg/L、19.5mg/L、39mg/L、78.125mg/L、156.25mg/L、312.5mg/L;

(d) 底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺(TMB)溶液;

(e) 终止液为1-2mol/L的硫酸溶液;

(f) 浓缩洗涤液为含有1%吐温-20的0.2mol/L PH7.4的磷酸盐缓冲液。

8. 权利要求1所述的酶联免疫试剂盒用于生鲜肉及其制品中牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的应用,包括如下步骤:

(1) 样品前处理

生鲜肉类去除脂肪和结缔组织,加工肉类食品去掉肠衣,称取1g加入0.15M的NaCL溶液2ml (1:2w/v),匀浆后用沸水加热20min,2000g离心30min;去除沉淀,上清用Whatman1号滤纸过滤,收集滤液用于检测;

(2) 使用试剂盒进行检测

取出酶联免疫试剂盒,试剂恢复至室温(20-25℃),在室内放置30min以上;按需要取出板条,放置在酶标板上;向孔内依次加入标准品或待测样品100u1,轻轻振荡混匀,37℃避光孵育30min;将孔内液体甩干,将洗涤工作液用去离子水将20×浓缩洗涤液20倍稀释后,250u1/孔,洗涤4次,拍干;加入稀释的酶标记检测抗体工作液100u1,轻轻振荡混匀,37℃避光孵育30min;将显色液A和显色液B按体积比1:1比例混合,100u1/孔加入显色,25℃避光孵育15min;加终止液50u1终止反应,酶标仪450nm下采用双波长450nm/630nm测定,根据标准曲线进行定量或定性;

(3) 分析检测结果

(a) 定量分析:分别计算标准品和待测样本的平均吸光度值,标准品或待测样本的吸光度值(B)为纵坐标,标准浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线;将待测样本的吸光度值代入标准曲线,即可求出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样本的含量;

(b) 定性分析:用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较,即可得出待测样本的浓度范围。

检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用,属于免疫学技术领域和食品安全分析技术领域。

背景技术

[0002] 在肉类食品中,由于价格、宗教、健康等原因,许多国家制定法规要求食品标签真实明确地标出肉类来源,禁止掺假行为,以保护消费者的利益,但是市场上混淆肉类品种的现象仍然非常普遍,掺假的方式包括掺兑、混入、抽取、假冒等手段,尤其以牛、羊肉制品的掺杂、掺假的行为最为常见,这些掺假行为极大地损害了消费者的利益。

[0003] 目前,国内外许多实验室都使用分子生物学技术手段检测肉制品中的源性成分,DNA检测方法手段多样,主要为核酸探针杂交、DNA指纹分析、PCR特异扩增、PCR-RFLP等。这些方法具有一定的灵敏度,但同时也存在着成本高、对检测对象要求高、工作量大、不能现场检测等缺点,尤其是对于熟肉制品检测有很大不确定性,因为这很大程度上依赖于熟肉制品的处理过程,生产过程的多样性导致了基因物质的不同降解水平。再者,该方法只能检测动物DNA的可能来源,必须时刻防止交叉污染,乳汁、血液、脂肪都有可能是DNA的来源。因此,需要其他的方法来与他它的检测结果相互印证。免疫学方法具有灵敏度高、特异性好、成本低、操作方便等特点,适于大批量样品筛选,其中酶联免疫吸附法和胶体金试纸条是最常用的方法。

[0004] 然而熟肉制品一般都要经过高温、高压处理,在这个过程中许多蛋白都发生了变性,失去了抗原性和水溶性,这就给免疫学方法的建立带来了困难。要想将免疫学法应用于动物源性成分的检测,必须找到一个特异性的热稳定的蛋白质作为标志物抗原,然后研制出针对此抗原的特异性的单克隆抗体。动物骨骼肌中的肌钙蛋白I (TnI) 具有种属专一性,可以作为一种耐热种类标志蛋白,区分不同种属生、熟肉制品的肉种类来源。以牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I (skTnI) 为目标检测物,能实现牛或羊肉源性成分免疫学检测鉴别技术的建立。因此,牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I酶联免疫检测试剂盒的制备对于开展牛肉或羊肉肉源成分的免疫学检验鉴定工作具有重要的实际意义和社会意义。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术缺陷,提供一种检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白 I 的酶联免疫检测试剂盒,该酶联免疫试剂盒具有灵敏度、精密度、准确度高,交叉反应率低,适合大批量样品检测等优点。此外,本发明进一步提供该检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒的制备方法与应用。

[0006] 本发明所述技术问题是由以下技术方案实现的。

[0007] 一种检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒,该酶联免疫试剂盒采用双抗夹心法,由包被有捕获抗体的酶标板、酶标记的检测抗体、牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准

品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液组成。

[0008] 上述酶联免疫试剂盒,所述捕获抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018217的杂交瘤细胞株3A8分泌得到,所述检测抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018218的杂交瘤细胞株3D3分泌得到;两株细胞株于2018年12月20日送交中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏。

[0009] 上述酶联免疫试剂盒,所述捕获抗体和检测抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源单克隆抗体,优选鼠源单克隆抗体;其由牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I提取免疫抗原免疫得到。

[0010] 上述酶联免疫试剂盒,所述酶标记检测抗体,其采用本领域常规的酶标记方案,例如,可以采用碘酸钠法将标记酶与检测抗体偶联得到。

[0011] 上述酶联免疫试剂盒,所述酶标记的检测抗体中标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液包括显色底物A和显色底物B,所述显色底物A为过氧化氢或过氧化脲,所述显色底物B为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1-2mol/L的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为碱性磷酸酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1-2mol/L氢氧化钠。

[0012] 上述酶联免疫试剂盒,所述牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液的浓度分别为4.875mg/L、9.75mg/L、19.5mg/L、39mg/L、78.125mg/L、156.25mg/L、312.5mg/L;所述浓缩洗涤液为含有1%吐温-20的0.2mol/L PH7.4的磷酸缓冲液。

[0013] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述酶联免疫试剂盒中牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液均以工作液形式提供。

[0014] 通过上述技术方案,本发明能够通过双抗夹心酶联免疫检测方法,对生鲜肉及其制品中牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I实现快速检测,对牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的最低检测限为4.8mg/L,对牛羊肉的检测灵敏度为1%,对鸡、鸭、猪骨骼肌肌钙蛋白I提取物无交叉反应,具有较高的灵敏度和特异性。

[0015] 本发明所述的酶联免疫试剂盒制备方法,包括如下步骤:

[0016] (1) 制备包被有捕获抗体的酶标板:

[0017] (a) 用包被缓冲液将捕捉抗体稀释成1:4000,100ul/孔加入到酶标板孔内;

[0018] (b) 4℃过夜或37℃孵育2h,倾去孔中液体,洗涤液洗涤4-5次,拍干;

[0019] (c) 加入封闭液缓冲液,200ul/孔,37℃孵育2h;

[0020] (d) 倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱中抽干5h,用铝箔袋真空塑封,即得包被有捕获抗体的酶标板;

[0021] 其中,所述包被缓冲液为pH9.6的0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为1%的明胶;

[0022] (2) 制备酶标记检测抗体工作液:

[0023] 将辣根过氧化物酶与检测抗体采用碘酸钠法进行偶联;

[0024] (3) 组建用于检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒,包括下述各组分:

[0025] (a) 包被有捕获抗体的酶标板;

[0026] (b) 酶标记检测抗体工作液;

[0027] (c) 牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液:采用梯度稀释法配制标准品溶液,1ml/瓶,浓度分别为4.875mg/L、9.75mg/L、19.5mg/L、39mg/L、78.125mg/L、156.25mg/L、

312.5mg/L;

[0028] (d) 底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺 (TMB) 溶液;

[0029] (e) 终止液为1-2mol/L的硫酸溶液;

[0030] (f) 浓缩洗涤液为含有1%吐温-20的0.2mol/L PH7.4的磷酸盐缓冲液。

[0031] 上述酶联免疫试剂盒在用于生鲜肉及其制品中牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的应用,包括如下步骤:

[0032] (1) 样品前处理

[0033] 生鲜肉类去除脂肪和结缔组织,加工肉类食品去掉肠衣,称取1g加入0.15M的NaCl溶液2ml (1:2w/v),匀浆后用沸水加热20min,2000g离心30min;去除沉淀,上清用Whatman 1号滤纸过滤,收集滤液用于检测;

[0034] (2) 使用试剂盒进行检测

[0035] 取出酶联免疫试剂盒,试剂恢复至室温 (20-25℃),在室内放置30min以上;按需要取出板条,放置在酶标板上;向孔内依次加入标准品或待测样品100ul,轻轻振荡混匀,37℃避光孵育30min;将孔内液体甩干,将洗涤工作液用去离子水将20×浓缩洗涤液20倍稀释后,250ul/孔,洗涤4次,拍干;加入稀释的酶标记检测抗体工作液100ul,轻轻振荡混匀,37℃避光孵育30min;将显色液A和显色液B按体积比1:1比例混合,100ul/孔加入显色,25℃避光孵育15min;加终止液50ul终止反应,酶标仪450nm下采用双波长450nm/630nm测定,根据标准曲线进行定量或定性;

[0036] (3) 分析检测结果

[0037] (a) 定量分析:分别计算标准品和待测样本的平均吸光度值,标准品或待测样本的吸光度值 (B) 为纵坐标,标准浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线;将待测样本的吸光度值代入标准曲线,即可求出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样本的含量;

[0038] (b) 定性分析:用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较,即可得出待测样本的浓度范围。

[0039] 检测结果也可以用专业的计算机软件进行计算,测试范围为4.8mg/L~312.5mg/L。

[0040] 本发明中试剂盒的检测原理是双抗夹心ELISA方法。用抗体 (3D3) 包被微孔板条,制成固相捕获抗体,往包被单抗的微孔中依次加入标准品或样品,再与辣根过氧化物酶标记的检测抗体 (3A8) 结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,加TMB显色,呈蓝色,在酸的作用下最终呈黄色,颜色深浅与样品中牛骨骼肌肌钙蛋白I含量成正相关。

[0041] 本发明所述的酶联免疫试剂盒的曲线范围在4.8mg/L~312.5mg/L范围内;对牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的最低检测限为4.8mg/L,对牛羊肉的检测灵敏度为1%;批内变异系数均在13.6%以下,批间变异系数均在14.1%以下;与牛、羊骨骼肌肌钙蛋白I提取物交叉反应率为100%,与鸡、鸭、猪骨骼肌肌钙蛋白I提取物交叉反应率低于0.1%;试剂盒放置在2℃-8℃保存12个月,期间每隔1个月检测一次,测定试剂盒的OD_{max}、变异系数等各项参数,结果显示各参数均在正常范围内,同时将试剂盒放置在37℃和-20℃放置6天,每天检测一次,测定试剂盒的OD_{max}、变异系数等各项参数均在正常范围之内,因此,此试剂盒可以在2℃-8℃保存至少12个月。

附图说明

[0042] 图1本发明所述酶联免疫检测试剂盒检测牛skTnI的标准曲线图

[0043] 图2本发明所述酶联免疫检测试剂盒检测羊skTnI的标准曲线图

[0044] 图3本发明所述酶联免疫检测试剂盒特异性测定图

[0045] 图4本发明所述酶联免疫检测试剂盒实际样品测定图

[0046] 本发明所述的抗牛骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞株skTnI-3A8,已于2018年12月20日送交中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址:武汉大学,中国典型培养物保藏中心,邮编:430072)保藏,保藏编号CCTCC NO:C2018217。

[0047] 本发明所述的抗羊骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体的杂交瘤细胞株skTnI-3D3,已于2018年12月20日送交中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址:武汉大学,中国典型培养物保藏中心,邮编:430072)保藏,保藏编号CCTCC NO:C2018218。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体的实例来进一步阐述本发明。应理解,这些实例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0049] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0050] 实施例一 本发明所述牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I抗原的制备

[0051] 取牛或羊的骨骼肌去除脂肪和结缔组织,研磨混匀,称取40g加入0.15M的NaCl溶液(1:2w/v);进一步混匀后,超声提取5min(50W,20KHz),再用沸水加热20min后,2000g离心30min;去除沉淀,取一半上清液过滤后为处理液1。另一半上清液用121℃高压30min,5000g离心30min后,用Whatman 1号滤纸过滤,滤液加入90%乙醇(1:3.74v/v),取混合液7000g离心20min,取沉淀37℃烘干,生理盐水复溶后为处理液2。处理液1和处理液2经SDS-PAGE电泳鉴定,鉴定结果显示牛和羊骨骼肌肌钙蛋白I免疫原和检测原在21~22kD有蛋白条带,与文献报道的skTnI的分子量21~24kD相符。将skTnI电泳条带研磨,用生理盐水稀释后分别作为检测抗原和免疫抗原。

[0052] 实施例二 本发明所述牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体的制备

[0053] 1、动物免疫:选择提取的免疫抗原,免疫6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,间隔2周免疫1次,3次免疫后断尾取血测定效价和抑制率,选择免疫结果最佳的小鼠准备融合;

[0054] 2、细胞融合:取步骤1选定的小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,间接ELISA法测定上清液选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生单一抗牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0055] 3、单克隆抗体的大量制备:选取个体较大的雌性Balb/c小鼠,采用体内诱生腹水法,大量制备腹水,并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,分成小管,-20℃保存,获得牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体。

[0056] 实施例三 本发明所述捕获抗体和检测抗体特性鉴定

[0057] 1、效价测定

[0058] 用pH9.6的碳酸盐缓冲液将检测抗原稀释为5μg/ml包被检测板,将纯化后的单克隆抗体进行1:2000,1:4000,1:8000,……1:1024000稀释,加入到酶标板孔内,反应后加入HRP标记的羊抗鼠二抗,最后用TMB显色,结果显示,纯化后的牛骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗

体浓度为1mg/mL时的效价达 $1:10^6$,纯化后的羊骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体浓度为1mg/mL时的效价达 $1:2.56 \times 10^5$ 。

[0059] 2、亚型测定

[0060] 采用购自Sigma公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒进行亚型测定,结果显示,牛骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体亚型为IgG1,羊骨骼肌肌钙蛋白I单克隆抗体亚型为IgM。

[0061] 3、亲和力测定

[0062] 采用间接酶联免疫法测定单克隆抗体的亲和常数,结果显示,抗牛骨骼肌肌钙蛋白I单克隆亲和常数为 $K_a = 8.1 \times 10^8 \text{ L/mol}$,抗羊骨骼肌肌钙蛋白I单克隆亲和常数为 $K_a = 7.6 \times 10^8 \text{ L/mol}$ 。

[0063] 实施例四 本发明所述包被有捕获抗体的酶标板的制备

[0064] 用PH9.6的碳酸盐缓冲液将捕获抗体3D3按1:4000稀释,100 μL /孔加入到酶标板孔上,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;洗涤4-5次,拍干;用含1%明胶的PBS进行封闭,200 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2h;室温在真空干燥箱中抽干5h,用铝箔袋真空塑封。

[0065] 实施例五 本发明所述酶标记检测抗体工作液的制备

[0066] 酶标记检测抗体的制备:采用碘酸钠法将辣根过氧化物酶与检测抗体3A8进行偶联,偶联后抗体浓度为7.7mg/ml,效价为 $1:2.0 \times 10^6$ 。

[0067] 实施例六 本发明所述用于检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I酶联免疫试剂盒的组建

[0068] 组建牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I酶联免疫检测试剂盒,包括下述各组分:

[0069] (1) 包被有捕获抗体的酶标板;

[0070] (2) 酶标记检测抗体工作液;

[0071] (3) 牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液:采用梯度稀释法配制标准品溶液,1ml/瓶,浓度分别为4.875mg/L、9.75mg/L、19.5mg/L、39mg/L、78.125mg/L、156.25mg/L、312.5mg/L;

[0072] (4) 底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺(TMB)溶液;

[0073] (5) 终止液为1-2mol/L的硫酸溶液;

[0074] (6) 浓缩洗涤液为含有1%吐温-20的0.2mol/L PH7.4的磷酸盐缓冲液。

[0075] 实施例七 使用本发明所述的酶联免疫试剂盒检测样本中牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I

[0076] 1、样本的前处理

[0077] 生鲜肉去除脂肪和结缔组织,加工肉类食品去掉肠衣,称取1g加入0.15M的NaCl溶液 2ml (1:2w/v),匀浆后用沸水加热20min,2000g离心30min;去除沉淀,上清用Whatman 1号滤纸过滤,收集滤液用于检测。

[0078] 2、检测方法

[0079] (1) 取出酶联免疫试剂盒,试剂恢复至室温(20-25 $^{\circ}\text{C}$),至少在室内放置30min;

[0080] (2) 按需要取出板条,放置在酶标板上;

[0081] (3) 向孔内依次加入标准品(或待测样品)100 μL ,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30min;

[0082] (4) 将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水将20 $\times$ 浓缩洗涤液20倍稀释)250 μL /孔,洗涤4次,拍干;

[0083] (5) 加入稀释的HRP标记的单抗,100 μ L/孔,37℃温育30min;

[0084] (6) 将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水将20 $\times$ 浓缩洗涤液20倍稀释)250 μ L /孔,洗涤4次,拍干;

[0085] (7) 将显色液A和显色液B按1:1比例混合,100 μ L/孔加入显色,25℃避光孵育15min;

[0086] (8) 加终止液50 μ L终止反应,酶标仪450nm下测定(建议采用双波长450/630测定),根据标准曲线进行定量或定性。

[0087] 3、检测结果

[0088] (a) 定量分析:分别计算标准品和待测样本的平均吸光度值,标准品或待测样本的吸光度值(B)为纵坐标,标准浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线;将待测样本的吸光度值代入标准曲线,即可求出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样本的含量。

[0089] (b) 定性分析:用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较,即可得出待测样本的浓度范围。

[0090] 检测结果也可以用专业的计算机软件进行计算,测试范围为4.8mg/L~312.5mg/L。

[0091] 实施例八 本发明所述酶联免疫试剂盒灵敏度、特异性、精确度和保质期实验

[0092] 1、试剂盒标准曲线的建立

[0093] 检测牛skTnI标准曲线的绘制如图1所示,标准曲线在4.8mg/L~312.5mg/L范围内呈良好的线性关系,线性方程 $y=0.4902x-0.2297$ ($R^2=0.9903$),牛骨骼肌肌钙蛋白I的最低检测限为4.8mg/L。检测羊skTnI标准曲线的绘制如图2所示,标准曲线在4.8mg/L~312.5mg/L范围内呈良好的线性关系,线性方程 $y=0.6626x-0.312$ ($R^2=0.9934$),羊骨骼肌肌钙蛋白I的最低检测限为4.8mg/L。

[0094] 2、试剂盒精确度测定

[0095] 精密度是反应测定方法对某一特定样本多次测定所得结果的重复程度,常用变异系数表示。从检测合格的试剂盒中选取同一批次和不同批次的酶标板,将煮沸的牛羊肉提取物用做1:10、1:20、1:50倍稀释,作为阳性样品,同一批次、不同批次分别重复4次,测定批内、批间变异系数及回收率。结果见表1,批内变异系数均在13.6%以下,批间变异系数均在14.1%以下。

[0096] 表1样品批内、批间变异系数的测定

[0097]

样品	添加量	批内			批间		变异系数
		X	SD	CV	X	SD	
牛肉	1%	0.293	0.03	10.2%	0.317	0.04	12.6%
	5%	0.807	0.06	7.4%	0.775	0.07	9.0%
	10%	1.19	0.09	7.6%	1.089	0.09	8.3%
羊肉	1%	0.284	0.04	14.1%	0.295	0.04	13.6%
	5%	0.879	0.07	8.0%	0.891	0.08	9.0%

[0098]

10%	1.285	0.1	7.8%	1.268	0.11	8.7%
-----	-------	-----	------	-------	------	------

[0099] 3、交叉反应测定

[0100] 将煮沸的牛羊鸡鸭肉的提取物以及BSA (阴性对照) 用PBS做1:20和1:40稀释, 用本发明所述试剂盒进行检测, 以判定该方法的特异性。由图3可知, 建立的夹心ELISA方法具有牛羊特异性, 不与鸡、鸭、猪骨骼肌提取物反应。

[0101] 4、试剂盒保存期实验

[0102] 将试剂盒放置在2℃-8℃保存12个月, 期间每隔1个月检测一次, 测定试剂盒的OD_{max}、变异系数等各项参数均在正常范围内。同时将试剂盒放置在37℃和-20℃放置6天, 每天检测一次, 测定试剂盒的OD_{max}、变异系数等各项参数均在正常范围之内。此试剂盒可以在2℃ -8℃保存至少12个月。

[0103] 5、样品测试

[0104] 将新鲜的牛羊肉, 分别按1%、5%、10%、20%、50%的比例加入到鸡鸭肉 (1:1, w/w) 中, 用本发明所述试剂盒进行测试, 结果如图4所示, 建立的夹心ELISA方法检测鸡鸭肉中的牛羊肉, 当其含量达到1%时, 吸光度值高于阴性2倍以上, 因此该方法的灵敏度可以达到 1%。

[0105] 上述实施例只为说明本发明的技术构思和优点, 本发明也可以具有其它的形式变化, 如本领域技术人员所熟知, 上述实施例仅仅起到对上述发明保护范围内的示范作用, 对本领域普通技术人员来说, 在本发明所限定的保护范围内还有很多常规变形和其它实施例, 这些变形和实施例都将在本发明待批的保护范围之内。

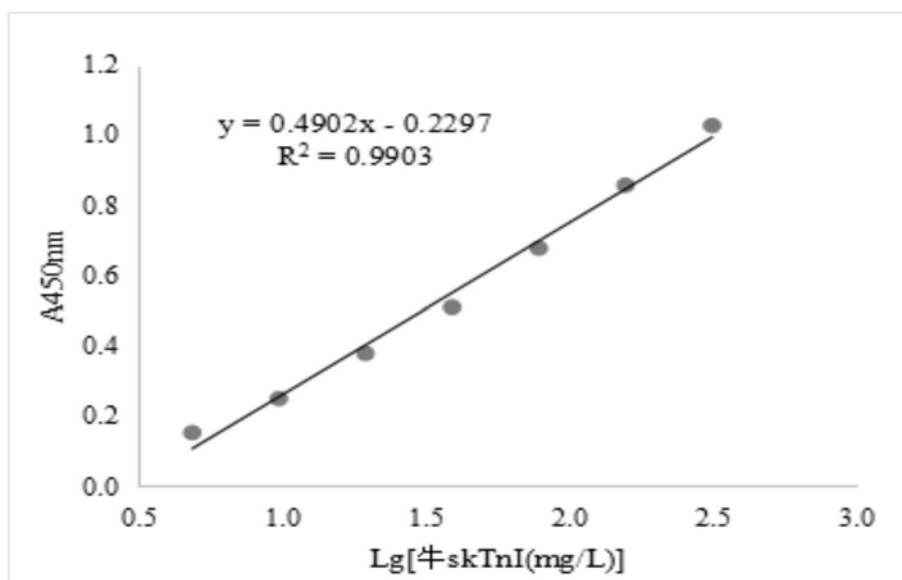


图1

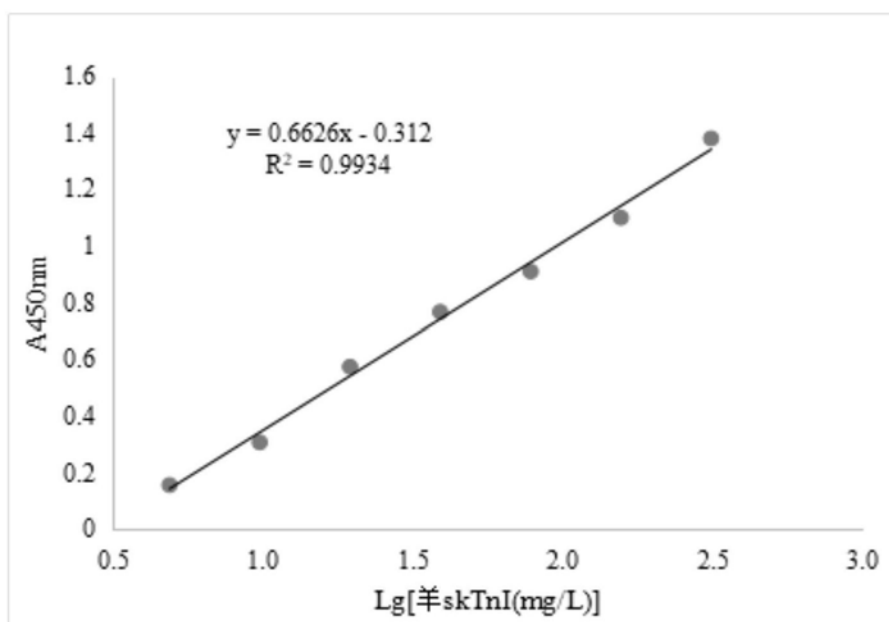


图2

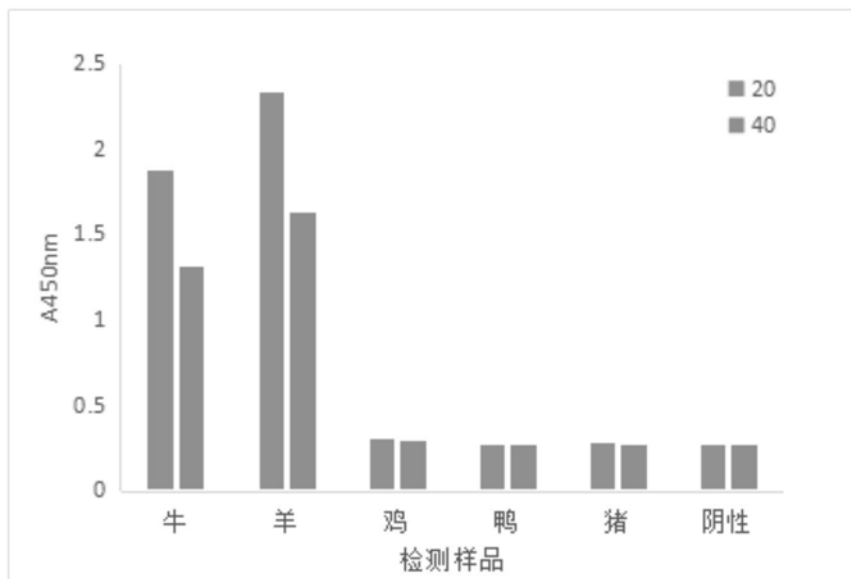


图3

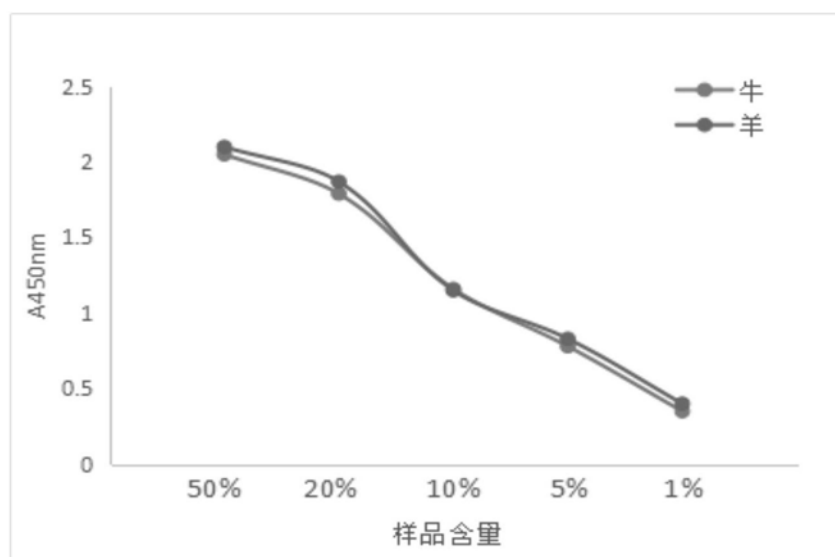


图4

专利名称(译)	检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109709338A	公开(公告)日	2019-05-03
申请号	CN201811623398.9	申请日	2018-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
[标]发明人	李春生 李玉静 刘静静 杜顺丰 张岩 张静 吴萌 曹秀梅		
发明人	李春生 李玉静 刘静静 杜顺丰 张岩 张静 吴萌 曹秀梅		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/58		
代理人(译)	李国聪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I的酶联免疫检测试剂盒及其制备方法与应用，属于免疫学技术领域和食品安全分析技术领域。该酶联免疫试剂盒含有包被有捕获抗体的酶标板、辣根过氧化物酶标记的检测抗体、牛或羊骨骼肌肌钙蛋白I标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液。所述捕获抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018217的杂交瘤细胞株3A8分泌得到，所述检测抗体由保藏编号为CCTCC NO:C2018218的杂交瘤细胞株3D3分泌得到。该酶联免疫试剂盒具有灵敏度、精密度、准确度高，交叉反应率低，适合大批量样品检测等优点。

