



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810059821.7

[43] 公开日 2008年8月6日

[11] 公开号 CN 101236200A

[22] 申请日 2008.2.6

[21] 申请号 200810059821.7

[71] 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学  
源街中国计量学院

共同申请人 杭州迪恩科技有限公司

[72] 发明人 张明洲 王旻子 刘 军 陈宗伦  
胡华军 傅小伟 程 晔 魏建良

[74] 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公司

代理人 王鹏举

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

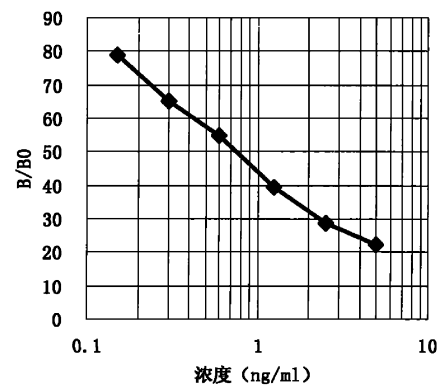
## [54] 发明名称

氯丙嗪的酶联免疫试剂盒及其检测方法

## [57] 摘要

本发明涉及兽药残留检测分析技术领域一种检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒及其检测方法。氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括氯丙嗪标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、样品稀释液。另外，还包括氯丙嗪特异性抗体、包被有氯丙嗪特异性抗体的酶标板和酶标记物；所述酶标记物为酶标记氯丙嗪抗原。本发明的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在氯丙嗪残留的检测中发挥重要作用。

标准曲线图



1. 氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括氯丙嗪标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、样品稀释液，其特征在于：还包括氯丙嗪特异性抗体、包被有氯丙嗪特异性抗体的酶标板和酶标记物；所述酶标记物为酶标记氯丙嗪抗原。
2. 根据权利要求1所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述氯丙嗪特异性抗体为氯丙嗪多克隆抗体。
3. 根据权利要求2所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：氯丙嗪多克隆抗体为氯丙嗪兔多克隆抗体。
4. 根据权利要求3所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：制备氯丙嗪兔多克隆抗体的氯丙嗪免疫抗原为用氯丙嗪与载体蛋白通过碳化二亚胺法合成的偶联物。
5. 根据权利要求4所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。
6. 根据权利要求5所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：以氯丙嗪-BSA作为免疫抗原制备氯丙嗪多克隆抗体，以氯丙嗪-OVA作为包被抗原。
7. 根据权利要求1所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。
8. 根据权利要求1所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，其特征在于：样品稀释液为含有1%BSA，pH7.4，0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS；浓缩洗涤液为含有0.5%吐温，pH7.4，0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS；显色剂为邻苯二胺或四甲基联苯胺；终止液为1-2mol/L的硫酸、盐酸或氢氧化钠缓冲液。
9. 氯丙嗪的检测方法，其特征在于：被检样品为尿液，直接采用如权利要求1～

8 任意一项权利要求所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒检测。

10. 氯丙嗪的检测方法，其特征在于：被检样品为动物组织，用均质器均质样本，称取 0.5~2g 匀浆的动物组织样品，加入 2~10 mL 1%NaOH 的甲醇溶液，置旋涡混合器上混合 0.5~2 min，静置 5~20min；2000~500g 离心 3~10min；取上清液，50~70℃氮吹干，残渣用 1~2ml 样品稀释液稀释，振荡器上振荡充分溶解，即可采用如权利要求 1~8 任意一项权利要求所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒检测。

## 氯丙嗪的酶联免疫试剂盒及其检测方法

### 技术领域

本发明涉及兽药残留检测分析技术领域一种检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

氯丙嗪系吩噻嗪类代表药物，为中枢多巴胺受体的阻断剂，具有抗精神病、镇吐、降温和增强催眠麻醉等多种药理活性。在动物饲料和运输过程中使用可降低动物的维持需要和减少途中失重、死亡率。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，在动物组织中残留导致畜产品的不安全。2002年下半年全国饲料和饲料添加剂质量监督抽查结果中，共有258批次样品检出了违禁药物和违规添加药物，其中安定120批次占全部1650批次不合格样品的7.2%。为此国家有关部门也下文将安定类明确定为禁用药物之一。为了打击非法使用违禁药物，保护消费者的健康安全，我们除了健全法律法规，建立有效的监督管理体系外，还需要健全相应的检测方法。因此，建立快速、灵敏、有效的氯丙嗪、地西洋残留检测方法具有重要的意义。

目前氯丙嗪的检测技术主要有色谱技术。色谱技术为经典技术，主要有高压液相色谱(HPLC)，高压液相色谱/荧光(HPLC/FLD)，液相色谱-质谱连用(LC-MS)，气相色谱-质谱连用(GC-MS)，毛细管电泳等方法。这些方法灵敏准确，但是样品处理烦琐费时，成本高，而且需要有经过专门训练的专业人员来操作复杂的仪器设备。因此，很有必要

研究更加简单快捷方便的检测方法。

## 发明内容

为了解决上述色谱技术样品处理烦琐费时，成本高，操作复杂的技术缺陷。本发明的一个目的是提供一种具有高特异性、高灵敏度、高精度度、高准确度氯丙嗪的酶联免疫试剂盒。本发明的另外一个目的是提供一种氯丙嗪检测方法。

为了实现上述的第一个目的，本发明采用了以下的技术方案：

氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括氯丙嗪标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、样品稀释液。另外，还包括氯丙嗪特异性抗体、包被有氯丙嗪特异性抗体的酶标板和酶标记物；所述酶标记物为酶标记氯丙嗪抗原。

作为优选，上述的氯丙嗪特异性抗体为氯丙嗪多克隆抗体。作为再优选，上述的氯丙嗪多克隆抗体为氯丙嗪兔多克隆抗体。

作为优选，制备氯丙嗪兔多克隆抗体的氯丙嗪免疫抗原为用氯丙嗪与载体蛋白通过碳化二亚胺法合成的偶联物。作为再优选，上述的载体蛋白可为鼠血清蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白。作为最优选，以氯丙嗪-BSA作为免疫抗原制备氯丙嗪多克隆抗体。

作为优选，上述的酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。作为最优选，酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶。制备酶标板所需试剂为：

包被缓冲液：pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液 (CBS) : 2.93gNaHCO<sub>3</sub>, 1.59gNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 加蒸馏水定容至 1000mL；

封闭液:含有 3%的聚乙二醇 8000, 1%的酪蛋白, 4%的甘氨酸, 1%的卵清蛋白, 1%的明胶的溶液。

作为优选, 上述的样品稀释液为含有 1%BSA pH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS): 8.00gNaCl, 0.2gKCl, 0.2gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.58gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 溶于蒸馏水中, 用 NaOH 或 HCl 调 pH 到 7.4, 定容至 1000mL; 所述浓缩洗涤液为含有 0.5%吐温 pH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS); 所述显色剂为邻苯二胺或四甲基联苯胺; 所述终止液为 1-2mol/L 的硫酸、盐酸或氢氧化钠缓冲液。所述氯丙嗪标准品溶液为含有氯丙嗪七个浓度梯度的溶液, 用上述样品稀释液稀释。

为了实现上述的第二个目的, 本发明采用了以下的技术方案:

氯丙嗪的检测方法。当被检样品为尿液, 直接采用上述任意一种技术方案所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒检测。

当被检样品为动物组织, 用均质器均质样本, 称取 0.5~2g 匀浆的动物组织样品, 加入 2~10mL 1%NaOH 的甲醇溶液, 置旋涡混合器上混合 0.5~2min, 静置 5~20min; 2000~500g 离心 3~10min; 取上清液, 50~70℃氮吹干, 残渣用 1~2ml 样品稀释液稀释, 振荡器上振摇充分溶解, 即采用如上述任意一种技术方案所述的氯丙嗪的酶联免疫试剂盒检测。

本发明的试剂盒可定性、定量检测动物源食品样品中动物组织(肌肉、肝脏)中的氯丙嗪含量。本发明的方法中, 酶标板的微孔中包被有氯丙嗪特异性抗体, 加入样品溶液或标准品溶液及酶标记氯丙嗪抗原, 样本中残留物氯丙嗪将和酶标抗原竞争抗氯丙嗪抗体, 显色; 显色终止后用酶标仪测定吸光度值 (OD 值), 样品吸光度值与其所含残

留物氯丙嗪的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出样品中残留的氯丙嗪含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的氯丙嗪的标准液颜色的比较可判断样品中氯丙嗪的浓度范围。

本发明的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品。经过对试剂盒的精密度和准确度测试实验表明，本发明的酶联免疫试剂盒具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在氯丙嗪残留的检测中发挥重要作用。本发明的试剂盒结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带，可实现现场监控及大量的样本筛查。本发明的检测氯丙嗪的方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测。本发明简化了传统检测方法的步骤，缩短了检测的时间，具有可观的社会效益和经济效益。

## 附图说明

图1为本发明的酶联免疫试剂盒氯丙嗪标准曲线图。

## 具体实施方式

下述实施例的方法如无特别说明，均为常规方法。

### 1. 抗原的制备

取40mg载体蛋白溶于1mL的水中，取氯丙嗪半抗原10mg，碳化二亚胺30mg，溶于1mL水中，混合液逐滴加到载体蛋白溶液中，在20-25℃下，搅拌反应过夜，再次加入15mg碳化二亚胺，后放于4℃冰箱内24-28h，反应完成后将反应液装入透析袋，4℃下，pH=7.4的PBS中透析，分装，-20℃保存；以氯丙嗪-BSA作为免疫抗原。

## 2. 多克隆抗体的制备

免疫兔子：

免疫动物选用新西兰大白兔，免疫前耳缘静脉取血 5-10mL，作为阴性血清对照。初免将 0.5mg 的免疫抗原与等量弗氏完全佐剂混合，完全乳化后，采用背部皮下多点注射；三周后用取相同剂量免疫原与弗氏不完全佐剂混合后同法进行加强免疫；以后每两周加强免疫一次，共免疫 6 次后，血清效价达到很高时，最后一次加强免疫，4 天后颈动脉采全血。

抗血清处理：

采全血后，3000rpm 离心 20min，取出上层抗血清。获得的抗血清分成三部分保存：一部分与等量甘油混合后保存，一部分用饱和硫酸铵法纯化提取 IgG 并冷冻干燥后保存，另一部分直接分装后保存。三部分血清均保存在 -20℃ 冰箱内。

饱和硫酸铵法纯化抗血清：

将 5mL 抗血清与等体积的生理盐水混合后，边搅拌边逐滴加入 10mL 的饱和硫酸铵。4℃ 冰箱静置过夜。第二天，4℃，4000rpm 离心 20min，弃上清。沉淀用少量生理盐水重新溶解后，加生理盐水恢复至 10mL，然后边轻轻搅拌边逐滴加入 5mL 饱和硫酸铵溶液，4℃ 冰箱静置过夜。4℃，4000rpm 离心 20min，弃上清，沉淀用饱和硫酸铵重复提取一次。最后获得的沉淀用少量生理盐水溶解后，放入透析袋中于 4℃ 进行透析，以除去残留的硫酸铵。透析完后冷冻干燥，得到纯化的多克隆抗体，-20℃ 冰箱保存备用。

### 3. 酶联免疫试剂盒及其制备方法

以氯丙嗪抗体作为包被原的酶联免疫试剂盒包括：

(1) 包被有氯丙嗪抗体的酶标板；

(2) 辣根过氧化物酶标记抗原工作液，1瓶，13ml。

(3) 氯丙嗪标准品溶液：氯丙嗪系列标准溶液 7 瓶，0ng/ml，0.15ng/ml，0.30ng/ml，0.60ng/ml，1.25ng/ml，2.5ng/ml，5.0ng/ml，1ml/瓶。用所述的样品稀释液稀释。

(4) 显色剂为：四甲基联苯胺磷酸盐缓冲液。均为 13ml/瓶。

(6) 浓缩洗涤液：浓缩洗涤液为含有 0.5%吐温、1‰（质量浓度）的叠氮化钠防腐剂 pH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 50ml/瓶，1 瓶。为正常使用浓度的 10 倍。

(7) 终止液：2mol/L 硫酸，12ml/瓶，1 瓶。

(8) 样品稀释液：为含有 1%BSA pH7.4, 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 50ml/瓶，1 瓶。

#### 制备酶标板所需试剂：

(1) 包被缓冲液：包被缓冲液：pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液 (CBS)。

(2) 封闭液：含有 3%的聚乙二醇 8000，1%的酪蛋白，4%的甘氨酸，1%的卵清蛋白，1%的明胶的磷酸盐缓冲溶液。

#### 酶标板的制备

用包被缓冲液将氯丙嗪抗体稀释，每孔加入 100  $\mu$  l，37℃温育 2h 或 4℃过夜；倾去包被液，用洗涤液（浓缩洗涤液用去离子水稀释 10 倍）洗涤 4 次，每次 1min；拍干，然后在每孔中加入 200  $\mu$  l 封闭液，

37℃温育 2h；倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

### 酶标抗原的制备

辣根过氧化物酶标记抗原：将氯丙嗪半抗原与辣根过氧化物酶通过戊二醛法进行偶联得到酶标记氯丙嗪抗原。

利用该试剂盒检测样品中残留的氯丙嗪的方法如下：

#### (1) 样品前处理

动物组织（肌肉、肝脏）：用均质器均质样本，称取 1g 匀浆的动物组织样品，加入 5mL (1%NaOH) 甲醇溶液，置旋涡混合器上混合 1min，静置 10min；3000g 离心 5min；取上清液，60℃氮吹干；残渣用 1ml 样品稀释液稀释，振荡器上振摇充分溶解即可用于检测。

#### (2) 酶免分析步骤

向包被有氯丙嗪抗体的 96 孔酶标板微孔中加入 50 μ L 的标准品溶液或样品溶液，尽快在所有孔中加入 100 μ L 溶解后的酶标物溶液，轻轻晃动反应板几秒钟；室温下（20-23℃）温浴 10min；倒掉微孔中的液体，在所有微孔中加满洗涤液（300~400 μ L），在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡，洗涤 4 次；洗涤程序完成后，立即用微量进样器在每个微孔中加入 100 μ L 显色液；晃动反应板使之彻底混匀，室温（20~23℃）温浴 10min；每孔中加入 100 μ L 反应终止液，混匀；用酶标仪在 450nm 下检测吸光度，结果应该在 60min 内读取。

#### (3) 结果分析

- a. 计算每个标准品和样品的平均吸光度
- b. 所有标准品和样品的平均吸光度除以零标准的平均吸光度，再乘以 100，即得以%表示的结合率：

$$\frac{\text{标准（或样品）的吸光度}}{\text{零标准的吸光度}} \times 100 = \frac{B}{B_0} \quad (\%)$$

c. 将每个标准的  $B/B_0$  值输入半对数系统中，对应于各自的氯丙嗪标准的浓度可以获得一个标准曲线。

d. 用样品的  $B/B_0$  值在标准曲线中就可以找到对应的氯丙嗪浓度。

e. 在标准曲线中得到的浓度结果还要通过换算，以获得样品稀释前实际的氯丙嗪含量，用 ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  或  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 表示。

结果分析表明，制备的试剂盒整个检测过程只需 20min 就可以完成，最低检测限为  $0.5\mu\text{g}/\text{L}$ 。

#### 4. 试剂盒精密度、灵敏度、准确度和保存期试验

##### 1、试剂盒精密度试验

精密度试验将制备的试剂盒分别取三批（A、B、C）进行精密度实验，每批试剂盒抽取 4 个试剂盒，再从每个试剂盒的酶联板中各抽出 6 个微孔，测定  $1.25\mu\text{g}/\text{L}$  标准品溶液的吸光度值（OD 值），计算变异系数。测定结果如表 1 所示，结果表明变异系数范围在 0.9%–5.7% 之间。

表 1 试剂盒可重复性试验

		1	2	3	4
CV%	A	1.2	3.0	4.1	5.2
	B	1.3	4.5	3.9	5.7
	C	4.3	0.9	3.3	3.0

##### 2、试剂盒灵敏度试验

配制不同浓度的标准品绘制曲线，得到线性回归方程，取  $R^2 > 0.95$  曲线段安排合理的浓度作标准曲线，经过试验选取了  $0-5.0\text{ng}/\text{ml}$  绘制

标准曲线（见附图 1）得线性回归方程  $y = -0.382x + 0.8401$ ,  $R^2 = 0.9902$ , 确定该试剂盒的线性范围为 0.15-5.0ng/ml, IC<sub>50</sub> 在 1.0ng/ml 左右, 具体见表 2。

表 2 试剂盒标准曲线绘制

浓度 (ng/mL)	OD1	OD2	OD3	平均值	SD	CV%
0	1.847	1.896	1.785	1.843	0.056	3.0
0.15	1.432	1.463	1.459	1.451	0.017	1.2
0.3	1.231	1.125	1.252	1.203	0.068	5.7
0.6	1.023	1.001	1.015	1.013	0.011	1.1
1.25	0.745	0.705	0.731	0.727	0.020	2.8
2.5	0.523	0.521	0.534	0.526	0.007	1.3
5	0.401	0.412	0.415	0.409	0.007	1.8

### 3、试剂盒准确度试验

分别取阴性猪的尿、肌肉作为样本, 在每个样本中, 添加氯丙嗪使浓度为 0、0.3、0.5、1.0、2.0、5.0ng/g, 经样品前处理后检测, 并计算回收率, 结果回收率在 80-120%之间的为 0.5、1.0、2.0、5.0ng/g, 故确定该试剂盒的检测限为 0.5ng/g, 具体结果见表 3。

表 3 样品添加回收试验

	添加浓度				
	0.3ng/g	0.5ng/g	1.0ng/g	2.0ng/g	5.0ng/g
(尿)	0.18	0.41	0.85	1.74	4.36
平均值	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
回收率	60.0%	82.0%	85.0%	87.0%	87.2%
(肌肉)	0.17	0.42	0.81	1.69	4.15
平均值	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
回收率	56.6%	84.0%	81.0%	84.5%	83.0%

#### 4、试剂盒保存期试验

将制备的试剂盒分别保存在 2-8℃，12 个月后，测定试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、氯丙嗪添加实际测定值，结果表明试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将上述试剂盒在 37℃保存的条件下放置 7 天，进行加速老化实验，结果表明制备的试剂盒各项指标完全符合要求。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，测定结果也表明制备的试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8℃至少可以保存 12 个月以上。

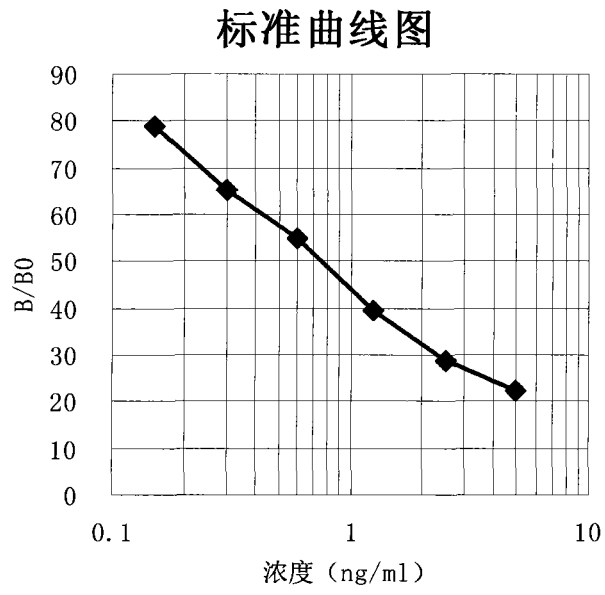


图 1

专利名称(译)	氯丙嗪的酶联免疫试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101236200A</a>	公开(公告)日	2008-08-06
申请号	CN200810059821.7	申请日	2008-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学 杭州迪恩科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院 杭州迪恩科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院 杭州迪恩科技有限公司		
[标]发明人	张明洲 王旻子 刘军 陈宗伦 胡华军 傅小伟 程晔 魏建良		
发明人	张明洲 王旻子 刘军 陈宗伦 胡华军 傅小伟 程晔 魏建良		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	王鹏举		
其他公开文献	CN101236200B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及兽药残留检测分析技术领域一种检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒及其检测方法。氯丙嗪的酶联免疫试剂盒，包括氯丙嗪标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、样品稀释液。另外，还包括氯丙嗪特异性抗体、包被有氯丙嗪特异性抗体的酶标板和酶标记物；所述酶标记物为酶标记氯丙嗪抗原。本发明的检测氯丙嗪的酶联免疫试剂盒对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在氯丙嗪残留的检测中发挥重要作用。

标准曲线图

