



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808931 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201210438069. 3

(22) 申请日 2012. 11. 06

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 张恽韡

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

一种检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒及其检测方法。本发明所提供的检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒,包括磺胺嘧啶特异性抗体及包被的磺胺嘧啶与载体蛋白的偶联物和酶标二抗,或包被的二抗和酶标磺胺嘧啶。本发明的检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒能同时快速检测大批样品;主要试剂均以工作液形式提供,检验方法简单易行;具有高特异性、高灵敏度、高精确度、高准确度等特点,将在动物性食品和饲料磺胺嘧啶残留量的检测中发挥重要作用。

1. 一种磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 有一盒体, 其特征在于所述盒体中包括:

- (1) 包被有磺胺嘧啶抗原的酶标板(96孔);
- (2) 磺胺嘧啶特异性抗体;
- (3) 酶标记物;
- (4) 磺胺嘧啶标准品溶液;
- (5) 底物 A 显色液和底物 B 显色液;
- (6) 终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 浓缩复溶液;

根据权利要求 1 所述的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于所述磺胺嘧啶抗原由磺胺嘧啶半抗原和载体蛋白通过重氮化法偶联得到, 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、兔血清蛋白或鼠血清蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于所述磺胺嘧啶特异性抗体为由所述磺胺嘧啶抗原按常规的免疫方法制备得到单克隆抗体或多克隆抗体, 其工作液为 pH 7.4 的含有 0.1-5% 脱脂奶粉的磷酸缓冲液, 磺胺嘧啶特异性抗体与上述工作液的比为 1:2000。

3. 根据权利要求 1 所述的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于所述酶标记物为酶标记的抗鼠或抗兔的抗抗体, 其工作液为 pH 7.4 的含有 0.1-5% 脱脂奶粉的磷酸缓冲液, 酶标记物与上述工作液的比为 1:4000, 标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

4. 根据权利要求 1 所述的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于所述磺胺嘧啶标准品溶液浓度分别为 0 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.5 $\mu\text{g/L}$ 、4.5 $\mu\text{g/L}$ 、13.5 $\mu\text{g/L}$ 、40.5 $\mu\text{g/L}$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于所述底物 A 为过氧化氢溶液, 底物 B 为四甲基联苯二胺。

6. 根据权利要求 1 所述的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于所述组织样本提取液为乙腈和丙酮混合溶液, 所述浓缩复溶液为含 0.1%-0.6%DMSO 的磷酸盐缓冲液, 所述浓缩洗涤液为含 Tween-80 的 NaCl 溶液, 所述终止液为 2 mol/L 的硫酸溶液。

一种检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒,属于生物及食品安全检测技术领域。。

技术背景

[0002] 磺胺嘧啶,作为磺胺类药物的一种,其性质稳定、抑菌谱广、毒性小、口服易吸收且价格低廉,是畜牧业上应用最广泛、应用量最大的药物之一。但是由于它在体内的作用时间和代谢时间较长,易残留在动物体内,通过任何途径都可能在人体中蓄积。药物蓄积浓度超过一定值对人体机能是有害的,长期蓄积则会导致磺胺药抗药性的产生,造成耐药菌的流行性感染,且有潜在的致癌性。因此,欧盟对牛奶和肉类食品中的磺胺类药物制定了最高允许值,即磺胺类药物总量不得超过 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,单个磺胺类药物的浓度不得超过 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。2002 年 12 月我国农业部公告第 235 号文件规定在所有食品动物的肌肉、脂肪、肝和肾中磺胺类最高残留限量 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,并将磺胺嘧啶列作为重点监控的对象。

[0003] 目前,检测磺胺嘧啶的方法有微生物法,物理化学法,如高压液相色谱 (HPLC)、气-液色谱 (GLC)、质谱 (MS)、薄层色谱法 (TLC) 等,微生物法检测速度较快,但对磺胺药缺乏灵敏性和特异性,物理化学法则存在前处理繁琐,需要昂贵仪器及其专业操作等特点,检测大批样本较为困难,不利于大范围的推广应用。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种操作简便、快速、适合大批量样品初筛的磺胺嘧啶酶联免疫检测试剂盒。

[0005] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案:

本发明所提供的检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒,包括磺胺嘧啶特异性抗体及包被的磺胺嘧啶与载体蛋白偶联物和酶标二抗,或包被的二抗和酶标磺胺嘧啶。其中,所述磺胺嘧啶特异性抗体可为磺胺嘧啶单克隆抗体或磺胺嘧啶多克隆抗体,所述磺胺嘧啶单克隆抗体优选为磺胺嘧啶鼠单克隆抗体,所述磺胺嘧啶多克隆抗体优选为磺胺嘧啶兔多克隆抗体,以上抗体均可按常规方法制备;所述载体蛋白可为牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、卵清蛋白 (OVA)、血兰蛋白 (KLH) 等常用载体蛋白,所述磺胺嘧啶与载体蛋白的偶联物可通过将磺胺嘧啶和载体蛋白用戊二醛法或重氮化法进行偶联得到;所述标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸醋酶,优选为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体或磺胺嘧啶上所述二抗优选为抗鼠或抗兔抗体。

[0006] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括磺胺嘧啶标准溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液。

[0007] 所述浓缩洗涤液为含有 0.8%-1.2% 吐温的磷酸盐缓冲液;所述显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成,所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化氢脲,所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述浓缩复溶液为含有 0.1%-0.5% DMF 的磷酸盐缓冲液。

[0008] 本发明的检测原理为将磺胺嘧啶与载体蛋白的偶联物作为包被原吸附于固相载体上或将抗兔或抗鼠的抗抗体吸附于固相载体上,加入样品和磺胺嘧啶特异性抗体,当酶标板为磺胺嘧啶与载体蛋白偶联物包被的固相载体时,加入酶标二抗,当酶标板为抗兔或抗鼠的抗抗体包被的固相载体时,加入酶标磺胺嘧啶,待测样品中残留的磺胺嘧啶和固相载体上包被的磺胺嘧啶与载体蛋白偶联物或酶标磺胺嘧啶竞争特异性抗体,显色后终止,测定样品吸光值,该值与样品中磺胺嘧啶残留物含量呈负相关,与标准曲线(图 1)比较即可得出磺胺嘧啶的含量。

[0009] 本发明的检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测动物组织、血清、尿样、蜂蜜、牛奶及饲料等样品中磺胺嘧啶的残留量;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;采用高特异性的磺胺嘧啶单克隆抗体或多克隆抗体,主要试剂均以工作液形式提供,检验方法方便易行;高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,将在食品和饲料磺胺嘧啶残留量的检测中发挥重要作用。

[0010] 抗原的合成:

将磺胺嘧啶和人血清白蛋白(HSA)采用戊二醛法进行偶联得到免疫原。将磺胺嘧啶和卵清蛋白(OVA)采用戊二醛法进行偶联得到包被原。

[0011] 磺胺嘧啶鼠单克隆抗体制备:

动物免疫程序采用 BALB/c 小鼠作为免疫动物,以磺胺嘧啶与人血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 80-100 μg /只,首免时将抗原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞。

[0012] 细胞融合与克隆化取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞,按 5-10 :1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0013] 细胞冻存和复苏取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ 个/mL 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37°C 中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0014] 单克隆抗体的制备与纯化采用体内诱生法,将 BALB/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油 0.5 mL/只,7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 - 10^6$ 个/只,7-10 天后采集腹水。经辛酸一饱和硫酸按法进行腹水纯化,小瓶分装,-20°C 保存。

[0015] 磺胺嘧啶兔多克隆抗体的制备:

采用新西兰大白兔作为免疫动物,以磺胺嘧啶与人血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1 mg/kg,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 3-4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,共免疫 5 次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 7-10 天后采血,测定血清抗体效价,颈动脉放血,经硫酸按分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0016] 二抗的制备:

以羊作为免疫动物,以鼠或兔 IgG 为免疫原进行免疫,得到羊抗鼠或羊抗兔抗抗体。

[0017] 具体实施:

包被板固相抗原制备：

将磺胺嘧啶抗原用 50 mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH9.6 缓冲液稀释至 10 mg/L 的包被液，96 孔微孔板各孔加 100 μL ，37 $^\circ\text{C}$ 下避光孵育 2 h，弃去包被液，洗涤 2 次，加入 150 μL 含有 10% 小牛血清的封闭液，37 $^\circ\text{C}$ 下避光孵育 1.5 h，弃去封闭液，拍干，晾干，板条密封后置 -4 $^\circ\text{C}$ 保存。

[0018] 试剂的配制：

(1) 磺胺嘧啶标准品：(0 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1.5 ng/mL, 4.5 ng/mL, 13.5 ng/mL, 40.5 ng/mL)，从磺胺嘧啶高标中稀释得到，稀释液为甲醇：水体积比为 4 : 6；

(2) 洗涤液：14.5 mmol/L NaCl 、0.2 mL/L Tween-80 和 0.2 % NaN_3 的 50 mmol/L Tris-HCl pH7.8；

(3) 显色液 A：0.2 M Na_2HPO_4 25.7 mL, 0.1 M 柠檬酸 24.3 mL 和 30% 的 H_2O_2 50 mL；

(4) 显色液 B：称取 5 mg 四甲基联苯二胺 (TMB) 加入 2.5 mL 无水乙醇中，可加热至 37 $^\circ\text{C}$ ~ 40 $^\circ\text{C}$ 直到 TMB 完全溶解；

(5) 终止液：2 mol/L 的 H_2SO_4 ；

(6) 样品复溶液：用去离子水将 2 \times 浓缩样品复溶液按 1 : 1 体积比进行稀释 (1 份 2 \times 浓缩样品复溶液 + 1 份去离子水) 用于提取样本的稀释；

(7) 洗涤工作液：用去离子水将 20 \times 浓缩洗涤液按 1 : 19 体积比进行稀释 (1 份 20 \times 浓缩洗涤液 + 19 份去离子水) 用于酶标板的洗涤；

(8) 组织样本提取液：将乙腈和丙酮按 1 : 1 体积比进行稀释 (1 份乙腈 + 1 份丙酮)，用于组织样本提取；

(9) 蜂蜜样本缓冲液：称取 20g 氯化钠，用去离子水溶解后定容至 500 mL。

[0019] 实验室应自备的试剂

甲醇、正己烷、乙腈、丙酮、去离子水等。

[0020] 测定之前注意事项

- 1、使用之前将所有试剂和需用微孔板回升至室温；
- 2、使用之后立即将所有试剂放回 2~8 $^\circ\text{C}$ ；
- 3、在使用中不要让微孔干燥；
- 4、在 ELISA 分析中的重复性，很大程度上取决于洗板的一致性，正确的洗板操作是 ELISA 测定程序中的要点；
- 5、在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，用盖板膜盖住微孔板；
- 6、取出需用数量的微孔板及框架，将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封，保存于 2-8 $^\circ\text{C}$ 。

[0021] 实施例 1 检测动物组织 (鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾) 样品

前处理：

- 1、称取 2.0 \pm 0.05 g 匀浆样品至 50 mL 离心管中；
- 2、加入 8 mL 的组织样本提取液 (见配液 3)，用涡旋仪振荡 3~5 min；
- 3、4000 r/min 离心 10 min；
- 4、取 1 mL 上层液体于另一离心管中在 50~60 $^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干；
- 5、向离心管中加入 1 mL 正己烷，再加入 1 mL 稀释后的样品复溶液并充分振荡摇匀；

6、4000 r/min 离心 5 min；

7、去除上层相，取下层液体 50 μL 用于分析。

[0022] 测定：

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

2、加标准品 / 样本：加标准品 / 样本 50 μL / 孔到对应的微孔中，然后加入磺胺多残抗试剂 50 μL / 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 30 min；

3、洗板：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液 250 μL / 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、加酶标物：加入磺胺多残的酶标物 100 μL / 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 30 min，取出重复洗板步骤 6；

5、显色：加入底物液 A 液 50 μL / 孔，再加底物液 B 液 50 μL / 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 15 ~ 20 min；

6、测定：加入终止液 50 μL / 孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450 nm 处（建议用双波长 450/630 nm 检测，请在 5 min 内读完数据），测定每孔 OD 值。（建议用 450/630 nm 双波长检测，在 5 min 内读完数据）。根据标准曲线计算动物组织（鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、鱼、虾）样本中磺胺嘧啶的含量（若无酶标仪，则不加终止液用目测法可进行判定）。

[0023] 实施例 2 牛奶样品的检测

前处理：

1、将牛奶室温 4000 r/min 离心 15 min，去除上层脂肪（脱脂奶可省去此步）；

2、将离心后的牛奶用去离子水 5 倍稀释（1 份牛奶 +4 份去离子水）并充分振荡摇匀；

3、取 50 μL 用于分析；

测定：具体测定步骤同实施例 1。

[0024] 实施例 3 蜂蜜样品的检测

前处理：

1、称取 1 ± 0.05 g 蜂蜜，加入 2 mL 蜂蜜样本缓冲液（见配液 4），涡流振荡至蜂蜜全部溶解；

2、加入 4 mL 乙腈，充分振荡摇匀；

3、室温 4000 r/min 离心 10min；

4、取上层有机相 1 mL 于 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干；

5、加入 1 mL 稀释后的样品复溶液溶解干燥的残留物；

6、取 50 μL 用于分析；

测定：具体测定步骤同实施例 1。

[0025] 实施例 4 尿液样品的检测

前处理

1、（如尿样浑浊须经过滤或 4000 r/min 以上，15 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 直至清亮），暂不使用的样本需冷冻保存；

2、将尿液用去离子水 1:2 稀释（即 1 份尿液 +2 份去离子水）；

3、取 50 μL 用于分析；

测定：具体测定步骤同实施例 1。

附图说明

[0026] 图 1 是磺胺嘧啶标准品的标准曲线。

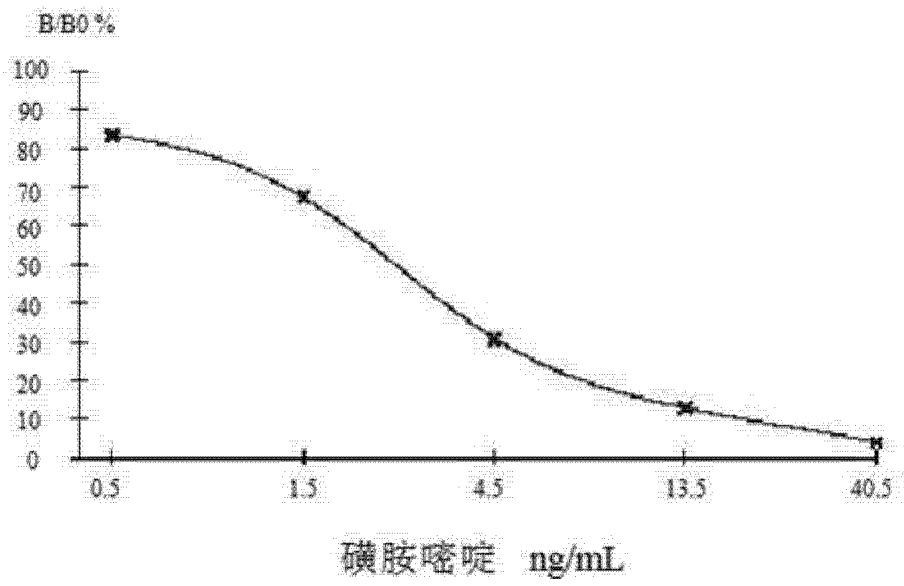


图 1

专利名称(译)	一种检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN103808931A	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201210438069.3	申请日	2012-11-06
[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	杜道林 张恽韡		
发明人	杜道林 张恽韡		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/94		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒及其检测方法。本发明所提供的检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒，包括磺胺嘧啶特异性抗体及包被的磺胺嘧啶与载体蛋白的偶联物和酶标二抗，或包被的二抗和酶标磺胺嘧啶。本发明的检测磺胺嘧啶的酶联免疫试剂盒能同时快速检测大批样品；主要试剂均以工作液形式提供，检验方法简单易行；具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在动物性食品和饲料磺胺嘧啶残留量的检测中发挥重要作用。

