



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226471 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201611158280.4

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 南京亿特生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区江宁科
学园芝兰路18号

(72)发明人 杜道林 洪霞 杜霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种检测马杜霉素的化学发光酶联免疫分
析法

(57)摘要

本发明公开了一种马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂;其特征在于,所述酶标板的各孔包被有包被抗原即马杜霉素类母核与载体蛋白的偶联物;所述试剂包括:马杜霉素类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、马杜霉素类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液;本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高、检测药物种类多的特点,与传统的比色ELISA法比较,操作时间大幅度减少;该方法可直接用于检测肌肉组织(鸡肉、猪肉、鱼肉等)中的马杜霉素含量。

1. 一种马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 包括盒体, 设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂; 其特征在于, 所述酶标板的各孔包被有以马杜霉素母核与卵清蛋白偶联制成的包被抗原; 所述试剂包括: 马杜霉素类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、马杜霉素类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液。

2. 根据权利要求1所述马杜霉素类的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述酶标板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光酶标板。

3. 根据权利要求1所述马杜霉素类的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述包被抗原浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 。

4. 根据权利要求1所述马杜霉素类的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述马杜霉素单克隆抗体在工作浓度为 $1:64000$ 。

5. 根据权利要求1所述马杜霉素类的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述马杜霉素的单克隆抗体是由马杜霉素母核与牛血清蛋白偶合制成的偶联物作为免疫原免疫Balb/c小鼠制备获得。

6. 根据权利要求1所述马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述马杜霉素系列标准溶液浓度分别为: 0mg/kg , 0.1mg/kg , 0.3mg/kg , 0.9mg/kg , 2.7mg/kg 和 8.1mg/kg 。

7. 根据权利要求1所述马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述浓缩磷酸盐缓冲液是每升含 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.74g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 32.6g的水溶液。

8. 根据权利要求1所述马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.05%吐温-20的 $\text{pH}=7.4$, 0.1mol/L 磷酸盐缓液。

9. 根据权利要求1所述马杜霉素类的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述化学发光液A液为鲁米诺含量为 0.01M 、对甲苯酚含量为 0.001M $\text{pH}8.8$ 的三(羟甲基)氨基甲烷溶液; B液为 100mL 溶液含柠檬酸 2.1g , 无水 Na_2HPO_4 2.82g , 0.75% 的过氧化氢脲 0.64mL 的溶液, 所述百分比为质量百分比。

一种检测马杜霉素的化学发光酶联免疫分析法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种酶联免疫检测试剂盒,尤其涉及一种马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 马杜霉素 英文名称Maduramycin,又名马度米星.是一种较新型的聚醚类一价单糖苷离子载体抗生素,本品抗球虫谱广对子孢子和第一代裂殖体均有抗球虫活性。本品能有效控制6种常见的鸡球虫,对鸭球虫病也有良好的预防效果。混饲,每1000 kg饲料5~10 g马杜霉素由美国氰胺公司于20世纪80年代开发,1992年我国开发成功并大批量生产,由于价格较低,对球虫病具有良好的预防和治疗作用,使马杜霉素在临床得到广泛的应用。但该药毒性较大,安全范围窄,使用剂量非常接近鸡的中毒量,超量使用易引起禽中毒。家禽马杜霉素中毒一般为急性过程。急性死亡(1~2 d内死亡)的动物一般会出现典型的中毒症状:东走西窜、站立不安、兴奋亢进等神经症状,或水样腹泻、腿软、行走及站立不稳。严重者两腿麻痹,昏睡直至死亡。亚慢性中毒表现为减食甚至食欲废绝,迅速消瘦,粪便呈现色泽变化,从青灰、浅绿、绿色至胆绿色,出现率约20%左右。家禽精神不振、蹲伏驱赶不动,甚至两脚瘫痪、驱赶时跼关节着地,两翅拍动、无力站立,甚至死亡。在临床应用时常因使用不当,造成家禽中毒,经济损失较大。Ft%HWGE

目前,检测马杜霉素的方法主要有:高效液相色谱法(HPLC)、色/质联用分析法(LC-MS)、液/质联用分析法(LC-MS/MS)。薄层色谱法的缺陷是:操作过程复杂,时间长;操作人员需要经过专业培训;影响分析的干扰因素较多,结果重复性差。放射免疫法,高效液相色谱法、色/质连用分析法、液/质联用分析法这些理化方法的缺陷是仪器设备昂贵,样品前处理复杂,费时,费力,不易普及,检测费用高,特别是放射免疫法还需要配备放射源,有一定危险性。鉴于此,建立一种有效、快速、简单、灵敏的检测肌肉组织中马杜霉素含量的方法具有重要意义。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒具有检测灵敏度高、应用灵活、方便的特点。

[0004] 本发明所述马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的酶标板和设在盒体内的马杜霉素系列标准溶液、酶标羊抗兔抗体、马杜霉素抗体、发光溶液、洗涤溶液、包被溶液及封闭溶液;其特征在于:

所述酶标板的各孔包被有以马杜霉素与卵清蛋白偶合制成的包被抗原,其中包被抗原浓度优选10 μ g/mL。

[0005] 所述卵清蛋白的分子量范围优选6.7KDa~6.8KDa。

[0006] 所述马杜霉素系列标准溶液分别是0mg/kg,0.1mg/kg,0.3mg/kg,0.9mg/kg,2.7mg/kg和8.1mg/kg所述酶标羊抗兔抗体为辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG原液,其工作浓度优

选为1:1000。

[0007] 所述马杜霉素抗体是由马杜霉素与分子量范围是6.7KDa~6.8KDa的牛血清蛋白偶合制成的人工免疫原免疫动物制得的多克隆抗体,其工作浓度优选为1:1000。

[0008] 所述发光液是0.01M鲁米诺与0.001M对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液(pH=8.8)和3/10000(体积比)H₂O₂的混合液。所述鲁米诺为发光底物,对甲苯酚为发光增强剂。

[0009] 所述洗涤溶液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH7.5、0.1mol/L磷酸盐缓冲液。

[0010] 所述包被溶液是每升水中含1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠的溶液,pH为9.5。

[0011] 所述封闭溶液是每升洗涤溶液中含10g卵清蛋白(OVA,ovalbumin,也称鸡卵清白蛋白或鸡卵白蛋白,由386aa组成,分子量约43Kd)且加入重量分数0.5%NaN₃的溶液。

[0012] 本发明试剂盒最大检测范围为0.1mg/kg~8.1mg/kg。

[0013] 本发明试剂盒中涉及的马杜霉素标准溶液、酶标羊抗兔抗体溶液、马杜霉素抗体溶液、发光溶液及洗涤溶液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大;其中各溶液的主要成分及其配制方法是:

1、马杜霉素标准溶液:以常规方法配制浓度分别为0mg/kg,0.1mg/kg,0.3mg/kg,0.9mg/kg,2.7mg/kg和8.1mg/kg的马杜霉素标准溶液;

2、酶标羊抗兔抗体溶液:酶标羊抗兔抗体为辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG原液,使用时用洗涤溶液配制成1:1000的工作浓度;

3、马杜霉素抗体溶液:马杜霉素抗体是用人工免疫抗原免疫动物制得的多克隆抗体,将所得马杜霉素抗体用洗涤溶液稀释成1:1000的工作浓度;

4、发光溶液:是0.01M鲁米诺与0.001M对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液(pH=8.8)和3/10000(体积比)H₂O₂的混合液;

5、洗涤溶液:指含有体积分数0.05%吐温-20的pH7.5、0.1mol/L磷酸盐缓冲液;

6、包被溶液:1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中,调节pH为9.5;

7、封闭溶液配制:10g OVA溶于1L洗涤溶液中,再加入重量比为0.05%的NaN₃。

[0014] 本发明所述酶标板的制备:

本发明所述酶标板的包被方法是采用马杜霉素-OVA在设定的包被溶液中,以设定的浓度,在4℃中过夜反应包被。

[0015] 本发明采用的是pH为9.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。本发明酶标板中所包被的马杜霉素-卵清蛋白(OVA)在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上,可以经受多次洗板,采用的包被抗原浓度为10μg/mL。

[0016] 包被好的酶标板可以用封闭溶液封闭,封闭液中惰性蛋白优选卵清蛋白(OVA),需加入NaN₃防止变质。

[0017] 马杜霉素抗体溶液和酶标羊抗兔抗体溶液的制备:

本发明中马杜霉素抗体溶液、酶标羊抗兔抗体溶液浓度是决定本发明中莱克多巴胺酶联免疫测试试剂盒测定范围及灵敏度的重要因素。

[0018] 本发明中涉及的马杜霉素抗体溶液可以用洗涤溶液配制成浓度为0.1~8.1mg/kg溶液;或用洗涤溶液稀释成1:1000的工作浓度。

[0019] 本发明中涉及的酶标羊抗兔抗体溶液优选洗涤溶液配制的浓度为1:1000。

[0020] 按照上述马杜霉素抗体溶液浓度和酶标羊抗兔抗体溶液浓度制备的试剂盒可以

达到很好的线性范围(标准线范围可以达到0.1mg/kg~8.1mg/kg)及和好的灵敏度(0.2mg/kg)。

[0021] 发光溶液的配制:

本发明采用辣根过氧化物酶标记底物发光系统,主要是鲁米诺-过氧化氢系统。

[0022] 所述发光液是0.01M鲁米诺与0.001M对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液(pH=8.8)和3/10000(体积比)H₂O₂的混合液。所述鲁米诺为发光底物,对甲苯酚为发光增强剂。

[0023] 本发明的原理是将抗体-抗原反应的高度特异性与酶催化的高度灵敏性结合起来,利用酶催化底物的化学发光反应检测产物浓度。

[0024] 本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的点,与传统的比色ELISA法比较,灵敏度可以提高一个数量级。有望在肌肉组织产品中的马杜霉素残留检测中发挥重要作用。

具体实施方式

[0025] 实施例1、免疫原、包被抗原的及抗体的制备

(1) 免疫原的合成

将马杜霉素与牛血清蛋白(BSA)采用对氨基苯甲酸法进行偶联得到免疫原。具体包括以下步骤:

a、称取14mg(100μmol)对氨基苯甲酸(ABA)溶于1.5mL0.2M盐酸中,然后称取8.3mg(120μmol)的亚硝酸钠(NaNO₂)溶于0.24mL的蒸馏水中,0—4℃搅拌,将亚硝酸钠(NaNO₂)溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1小时,得溶液A;

b、称取34mg(100μmol)马杜霉素溶于5mL冰冷的硼砂缓冲(0.05M)(pH8.5,含0.15M的NaCl)中,0—4℃搅拌,将上述的A溶液2mL逐滴加入到该溶液中,避光反应2小时,得到桔黄色溶液;

c、把溶液加少量的硼酸晶体调pH至7.4,然后加入136mg(2μmol)cBSA(牛血清白蛋白),同时加入160mg(834μmol)水溶性碳二亚胺(EDC),48mg(417μmol)N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌3小时,得桔黄色溶液;

d、将反应液转移到半透膜中,在0—4℃用磷酸盐缓冲溶液(PBS)(0.01M,pH7.4)透析3天,其间每4—6小时换一次透析液;随后用高纯水透析3天,其间每4—6小时换一次透析液;透析完毕,用冷冻干燥机冻干,得桔黄色固体粉末即为免疫原(马杜霉素与牛血清蛋白的偶联物),-20℃保存,备用。

[0026] (2) 包被抗原的合成

将马杜霉素与卵清蛋白(OVA)采用1,4-丁二醚法进行偶联得到包被抗原。具体包括以下步骤:

a.称取66mg卵清蛋白(OVA)溶于5mL50mM碳酸盐(pH10.7)缓冲液中,然后向溶液中加入28μL(147.9μmol)的1,4-丁二醚(BDE),室温反应24小时,得溶液A;

b.称取76mg(277.1μmol)马杜霉素溶于1mLDMF(无水N-N二甲基甲酰胺)中,再加1mL50mM碳酸盐(pH10.7)缓冲液中,把溶液A通入氮气,随后将马杜霉素溶液逐滴加入A溶液中,室温反应24小时,得淡黄色溶液;

c.将反应液转移到半透膜中,在0—4℃用磷酸盐缓冲溶液(PBS)(0.01M,pH7.4)透析3

天,其间每4-6小时换一次透析液;随后用高纯水透析3天,其间每4-6小时换一次透析液;透析完毕,用冷冻干燥机冻干,得白色固体粉末即为包被抗原(马杜霉素与卵清蛋白的偶联物), -20°C 保存,备用。

[0027] (3) 马杜霉素多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物,以马杜霉素与分子量范围是6.7KDa~6.8KDa的牛血清蛋白的偶联物为免疫原,首次免疫剂量为 $500\mu\text{g/mL}$,首免时将免疫原溶于入等体积的生理盐水和弗氏完全佐剂制成乳化剂,颈背部多点注射,以后免疫取剂量减半的免疫原溶于等体积的生理盐水和弗氏不完全佐剂混合乳化,首免与二免间隔20天,以后每隔两周免疫一次共免疫五次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫7天以后心脏采血,离心得抗血清,得到马杜霉素多克隆抗体。

[0028] 实施例2、马杜霉素-ELISA检测方法的建立

(1) 抗体与包被抗原浓度的优选(方阵)

纵向用每种包被抗原按 $40.0\mu\text{g/mL}$ 、 $20.0\mu\text{g/mL}$ 、 $10.0\mu\text{g/mL}$ 、 $5.0\mu\text{g/mL}$ 、 $2.5\mu\text{g/mL}$ 、 $1.25\mu\text{g/mL}$ 、 $0.625\mu\text{g/mL}$ 、 $0.3125\mu\text{g/mL}$ 的系列稀释度包被酶标板, $100\mu\text{L/孔}$, $0-4^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,用洗涤液洗板三次,每次拍干; $250\mu\text{L/孔}$ 封闭溶液封闭,室温放置2小时,洗板三次,每次拍干;加入 $100\mu\text{L/孔}$ 一系列稀释的抗体(1:100至1:1024000),室温放置2.5小时,洗板三次,每次拍干;加入 $100\mu\text{L/孔}$ 的1:1000的辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG抗体,室温放置1小时,洗板三次,每次拍干;加入 $100\mu\text{L/孔}$ 的发光液,测定发光值。以发光值随包被抗原的浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释度为最佳浓度进行特异性测定。

[0029] (2) 抗体灵敏度的测定

根据上述对抗体及包被抗原浓度的优选实验,申请人选择并确定抗体浓度为1:1000,包被抗原浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 进行抗体的灵敏度的测定:

a、包被:用0.05M pH9.6的碳酸盐包被溶液将马杜霉素的包被抗原配成 $10\mu\text{g/mL}$ 的溶液,每个聚苯乙烯板的反应孔中加 $100\mu\text{L}$, 4°C 过夜;

次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次, $300\mu\text{L/孔}$,每次5分钟,拍干;(此步简称洗涤,下同);

b、封闭:用封闭溶液封闭上述已包被的酶标板, $250\mu\text{L/孔}$,室温孵2-4小时,然后洗涤;

c、加样:加稀释马杜霉素抗体(1:1000) $50\mu\text{L/孔}$ 与不同浓度的马杜霉素溶液 $50\mu\text{L/孔}$ 于上述已封闭的反应孔中,室温2-4小时,然后洗涤;

d、加酶标抗体:于各反应孔中,加入新鲜稀释辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG的抗体(1:1000) $100\mu\text{L/孔}$,1.5小时,洗涤;

e、发光:于各反应孔中加入临时配制的发光溶液 $100\mu\text{L/孔}$,立即用化学发光免疫分析仪检测;

f、检测结果以抑制率计算:

抑制率($\%$) = $B/B_0\%$, B是不同浓度的药物作为竞争者的发光值, B_0 是不加药的发光值,计算50%抑制率时药物的浓度即为该抗体的灵敏度。

[0030] 实施例3、检测马杜霉素的化学发光酶联免疫试剂盒

(1) 检测马杜霉素的化学发光酶联免疫试剂盒的组成

a、包被有包被抗原(马杜霉素与载体蛋白的偶联物)的固相载体(酶标板);

- b、马杜霉素标准溶液:0mg/kg,0.1mg/kg,0.3mg/kg,0.9mg/kg,2.7mg/kg和8.1mg/kg;
- c、酶标羊抗兔抗体溶液:酶标羊抗兔抗体为辣根过氧化物酶-羊抗兔IgG原液,装入,使用时用洗涤溶液配制成1:1000的工作浓度;
- d、马杜霉素抗体溶液:用人工免疫抗原免疫动物制备所得的多克隆抗体,将所得马杜霉素抗体用洗涤溶液稀释成1:1000工作浓度;
- e、发光溶液:使用pH8.8的0.0001M对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液配制成0.01M的鲁米诺溶液,再与H₂O₂按照3:10000的体积比混合;
- f、洗涤溶液:含有体积分数0.05%吐温-20的pH7.5、0.1mol/L磷酸盐缓冲液;
- g、包被溶液:1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中,调节pH9.5;
- h、封闭溶液配制:10g卵清蛋白(OVA)溶于1L洗涤溶液中,再加入重量比为0.05%的NaN₃。

[0031] (2) 酶标板的制备

用包被液将包被抗原稀释成10μg/mL,每孔加入100μL,4℃过夜,倾去包被液,每孔加入250μL洗涤液洗涤3次,拍干,然后每孔加入封闭液250μL,37℃孵育1h,倾去孔内液体,洗涤液洗涤3次,拍干,用锡箔纸真空密封保存。

实施例

[0032] 4、检测马杜霉素的化学发光酶联免疫试剂盒的应用

(1) 试剂的配制

- a. 样品稀释液:将试剂盒中提供的浓缩磷酸盐缓冲溶液用蒸馏水稀释10倍后使用;
- b. 洗涤溶液:将试剂盒中提供的浓缩洗涤液用蒸馏水稀释10倍后使用;
- c. 发光溶液:0.01M鲁米诺+0.001M对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液(pH8.8)+3/10000(体积比)H₂O₂。

[0033] (2) 检测步骤

- a、加样:向酶标板微孔中加入马杜霉素系列标准浓度溶液或样品溶50μL,然后加入马杜霉素抗体溶液50μL,室温(25℃)恒温孵育2.5h;
- b、洗涤:倾出孔中液体,每孔加入洗涤溶液250μL,洗涤3次,拍干;
- c、加酶标羊抗兔抗体溶液:每孔加入酶标羊抗兔抗体溶液100μL,室温恒温孵育1h;
- d、洗涤:倾出孔中液体,每孔加入洗涤溶液250μL,洗涤3次,拍干;
- e、加发光溶液:每孔加入发光溶液100μL;
- f、检测:用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光强度。

[0034] (3) 结果判断

所获得的标准品和样品发光值的平均值除以第一个标准(0标准)的发光值再乘以100,以抑制率为纵坐标,马杜霉素浓度的对数为横坐标作标准曲线,每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

[0035] 抑制率(%) = 标准品发光值(或样品) × 100% / 0标准品发光值。

[0036] 实施例5试剂盒精密度和准确度试验

取0.1mg/kg,0.3mg/kg,0.9mg/kg,2.7mg/kg和8.1mg/kg的马杜霉素标样,添加到肌肉组织样品中,来检测马杜霉素回收率。每个浓度的批间变异系数都以不同的5天的5个重复

数据进行计算,批内变异系数以同一天的5次重复数据计算。

[0037] 根据制定的标准曲线的线性方程进行回收率的定量计算。

[0038] 从上述测定结果看,变异系数低于25.4%,回收率82-118%之间。表明本试剂盒有很好的重复性和准确度。

专利名称(译)	一种检测马杜霉素的化学发光酶联免疫分析法		
公开(公告)号	CN108226471A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201611158280.4	申请日	2016-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
[标]发明人	杜道林 洪霞 杜霞		
发明人	杜道林 洪霞 杜霞		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54313		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种马杜霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒，包括盒体，设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂；其特征在于，所述酶标板的各孔包被有包被抗原即马杜霉素类母核与载体蛋白的偶联物；所述试剂包括：马杜霉素类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、马杜霉素类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液；本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高、检测药物种类多的特点，与传统的比色ELISA法比较，操作时间大幅度减少；该方法可直接用于检测肌肉组织（鸡肉、猪肉、鱼肉等）中的马杜霉素含量。