

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610010569.1

[43] 公开日 2007年3月14日

[11] 公开号 CN 1928559A

[22] 申请日 2006.9.18

[21] 申请号 200610010569.1

[71] 申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测
技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 12
号

[72] 发明人 王 静 曹维强 丁志刚 金 芬
邵 华 杨 锚

[74] 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所
代理人 单 军

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法

[57] 摘要

制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法，它涉及一种制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素检测方法。它解决了目前硫酸庆大霉素检测法检测时间长的问题。绘标准曲线：蛋白与硫酸庆大霉素偶联后注射入小鼠体内制备抗体，再用免疫反应棋盘法选择抗原抗体反应的工作浓度，然后挑选 OD₄₅₀ 值为 1 ~ 1.5 的孔计算、绘制标准曲线。检测步骤：(一) 抗体按工作浓度稀释后封闭，再按绘制标准曲线过程中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比加入经梯度稀释的样品，再在 41℃ 条件下酶联反应 1 ~ 1.5h 并用 TMB 显色；(二) 测量 OD₄₅₀ 值，选 OD 值为 0.4 ~ 1.5 的样品稀释液；(三) 查曲线中对应数值再乘以样品稀释倍数，即得出样品硫酸庆大霉

素残留量。本发明检测时间短为 1 ~ 1.5h，比传统酶联免疫法快 2 ~ 3h。

1、制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法，其特征在于制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法如下：（1）取 0.17g 硫酸庆大霉素分别与 0.12g 牛血清白蛋白和 0.12g 卵清白蛋白溶解于 20mL、pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲液，再分别加入浓度为 2.5%的戊二醛 10mL，搅拌 28~32h；（2）在 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中透析 6~8h，微孔膜收集抗原硫酸庆大霉素蛋白偶联物；（3）取 2mL 硫酸庆大霉素牛血清白蛋白偶联物与 8mL 完全福氏佐剂或 8mL 不完全福氏佐剂乳化，每只鼠腹腔内注射乳化抗原 0.2mL，加强免疫注射硫酸庆大霉素，直到抗体效价为 1：16 以上；（4）分离血清；（5）采用硫酸铵盐析法分离血清中的抗体，再以 DEAE—离子交换剂法纯化抗体；（6）梯度稀释抗体，并用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭；（7）梯度稀释抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物；（8）采用免疫反应棋盘法选择抗原抗体反应的工作浓度：按棋盘法将梯度稀释的抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物加入梯度稀释的抗体中酶联，反应完全后用 TMB 显色；（9）用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值，挑选 OD_{450} 值为 1~1.5 的孔，以所选孔中抗体的稀释倍数作为工作浓度，并通过抗原稀释的倍数计算、绘制出标准曲线。

2、根据权利要求 1 所述的制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法，其特征在于步骤（8）中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比为 1：1~10。

3、根据权利要求 1 所述的制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法，其特征在于步骤（5）中采用饱和硫酸铵三步法分离抗体。

4、根据权利要求 1 所述的制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法，其特征在于步骤（5）中制备的抗体于 4℃环境中保藏。

5、根据权利要求 1 所述的制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法，其特征在于步骤（3）中加强免疫小鼠每只注射硫酸庆大霉素 0.227mg。

6、硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法，其特征在于硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法步骤如下：（一）抗体按权利要求 1 得出的工作浓度稀释，制成包被液后加入 ELISA 检测板，再用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭，然后按绘制权利要求 1 标准曲线过程中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比加入经梯度稀释的样品，再在 41℃条件下酶联反应 1~1.5h 并用 TMB 显色；（二）用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值，选择 OD_{450} 值为 0.4~1.5 的样品稀释液；（三）根据权利要求 1 绘制的标准曲线查出对应数值再乘以样品的稀释

倍数，即得出样品硫酸庆大霉素残留量。

7、根据权利要求6所述的硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法，其特征在于步骤（一）中抗体稀释 $200\times$ ，制成包被液。

8、根据权利要求6所述的硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法，其特征在于步骤（一）中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比为 $1:1\sim 10$ 。

制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法

技术领域

本发明涉及一种制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素检测方法。

背景技术

硫酸庆大霉素作为一种常用的抗生素被广泛的应用于农、畜、禽、林和水产品的病虫害防治，由于使用者的滥用常常出现硫酸庆大霉素残留量大的问题。硫酸庆大霉素残留会严重危害人类的健康和我国畜禽产品及水产品的出口，所以对食品进行严格的安全检测。目前检测硫酸庆大霉素的方法有色谱检测法和微生物检测法，但存在检测时间长的问题，而且色谱检测法样品前处理操作难度大、无法检测微量残留、无法定量分析。面对高速发展的时代和快速、简便、准确检测的需要，目前的这些硫酸庆大霉素检测法都无法满足要求。

发明内容

本发明的目的是为了解决目前硫酸庆大霉素检测法检测时间长的问题，而提供一种制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法。制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法如下：（1）取 0.17g 硫酸庆大霉素分别与 0.12g 牛血清白蛋白和 0.12g 卵清白蛋白溶解于 20mL、pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲液，再分别加入浓度为 2.5%的戊二醛 10mL，搅拌 28~32h；（2）在 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中透析 6~8h，微孔膜收集抗原硫酸庆大霉素蛋白偶联物；（3）取 2mL 硫酸庆大霉素牛血清白蛋白偶联物与 8mL 完全福氏佐剂或 8mL 不完全福氏佐剂乳化，每只鼠腹腔内注射乳化抗原 0.2mL，加强免疫注射硫酸庆大霉素，直到抗体效价为 1：16 以上；（4）分离血清；（5）采用硫酸铵盐析法分离血清中的抗体，再以 DEAE—离子交换剂法纯化抗体；（6）梯度稀释抗体，并用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭；（7）梯度稀释抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物；（8）采用免疫反应棋盘法选择抗原抗体反应的工作浓度：按棋盘法将梯度稀释的抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物加入梯度稀释的抗体中酶联，反应完全后用 TMB 显色；（9）用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值，挑选 OD_{450} 值为 1~1.5 的孔，以所选孔中

抗体的稀释倍数作为工作浓度,并通过抗原稀释的倍数计算、绘制出标准曲线。硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法步骤如下:(一)抗体按上述标准曲线绘制得出的工作浓度稀释,制成包被液后加入 ELISA 检测板,再用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭,然后按绘制上述标准曲线过程中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比加入经梯度稀释的样品,再在 41℃条件下酶联反应 1~1.5h 并用 TMB 显色;(二)用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值,选择 OD₄₅₀ 值为 0.4~1.5 的样品稀释液;(三)根据上面所述绘制出的标准曲线查出对应数值再乘以样品的稀释倍数,即得出样品硫酸庆大霉素残留量。本发明可以通过颜色改变快速做出定性分析,3,3',5,5'—四甲基联苯胺(TMB)作为反应底物溶液,无抗原混合液为蓝色,有抗原混合液则变为黄色,根据颜色的变化可进行定性分析;而且特异性强,3,3',5,5'—四甲基联苯胺(TMB)遇到硫酸庆大霉素催化其发生水解、氧化或还原反应,形成有色、发光或荧光产物易于识别。酶联免疫测定法是根据酶标记的抗体或抗抗体来进行的抗原—抗体反应。由于酶的专一性催化和放大反应的作用;所以本发明灵敏度高,准确度高,可检测至 ng 级,从而可检测出极微量硫酸庆大霉素的存在。本发明一次可作多份样品检测,更适宜于处理大批量样品。本发明检测时间短为 1~1.5h,比传统酶联免疫法快 2~3h。本发明检测方法简单易行,可独立操作,而且成本低不足进口试剂盒价格的一半,更易于推广使用。

附图说明

图 1 是根据具体实施方式九绘制出的标准曲线图。

具体实施方式

具体实施方式一:本实施方式制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法如下:(1)取 0.17g 硫酸庆大霉素分别与 0.12g 牛血清白蛋白和 0.12g 卵清白蛋白溶解于 20mL、pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲液,再分别加入浓度为 2.5%的戊二醛 10mL,搅拌 28~32h;(2)在 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中透析 6~8h,微孔膜收集抗原硫酸庆大霉素蛋白偶联物;(3)取 2mL 硫酸庆大霉素牛血清白蛋白偶联物与 8mL 完全福氏佐剂或 8mL 不完全福氏佐剂乳化,每只鼠腹腔内注射乳化抗原 0.2mL,加强免疫注射硫酸庆大霉素,直到抗体效价为 1:16 以上;(4)分离血清;(5)采用硫酸铵盐析法分离血清中的抗体,再以 DEAE—离子交换剂法纯化抗体;(6)梯度稀释抗体,并用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭;(7)梯度稀释抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物;(8)采用免疫反应棋盘法选择抗原抗体反应的工作浓度:按棋盘法将梯度稀释的抗原硫酸庆

大霉素卵清白蛋白偶联物加入梯度稀释的抗体中酶联，反应完全后用 TMB 显色；(9) 用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值，挑选 OD_{450} 值为 1~1.5 的孔，以所选孔中抗体的稀释倍数作为工作浓度，并通过抗原稀释的倍数计算、绘制出标准曲线。

具体实施方式二：本实施方式与具体实施方式一的不同点是：步骤 (8) 中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比为 1 : 1~10。其它步骤与实施方式一相同。

具体实施方式三：本实施方式与具体实施方式一的不同点是：步骤 (5) 中采用饱和硫酸铵三步法分离抗体。其它步骤与实施方式一相同。

具体实施方式四：本实施方式与具体实施方式一的不同点是：步骤 (5) 中制备的抗体于 4°C 环境中保藏。其它步骤与实施方式一相同。

具体实施方式五：本实施方式与具体实施方式一的不同点是：步骤 (3) 中加强免疫小鼠每只注射硫酸庆大霉素 0.227mg。其它步骤与实施方式一相同。

具体实施方式六：本实施方式硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法步骤如下：(一) 抗体按具体实施方式一得出的工作浓度稀释，制成包被液后加入 ELISA 检测板，再用浓度为 1% 的酪蛋白—PBS 溶液封闭，然后按绘制具体实施方式一标准曲线过程中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比加入经梯度稀释的样品，再在 41°C 条件下酶联反应 1~1.5h 并用 TMB 显色；(二) 用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值，选择 OD_{450} 值为 0.4~1.5 的样品稀释液；(三) 根据具体实施方式一绘制出的标准曲线查出对应数值再乘以样品的稀释倍数，即得出样品硫酸庆大霉素残留量。

具体实施方式七：本实施方式与具体实施方式六的不同点是：步骤 (一) 中抗体稀释 $200\times$ ，制成包被液。其它步骤与实施方式六相同。

抗体稀释 $200\times$ 为抗体最佳工作浓度。

具体实施方式八：本实施方式与具体实施方式六的不同点是：步骤 (一) 中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比为 1 : 1~10。其它步骤与实施方式六相同。

具体实施方式九：本实施方式检测硫酸庆大霉素。首先是绘制标准曲线：
(1) 取 0.17g 硫酸庆大霉素分别与 0.12g 牛血清白蛋白和 0.12g 卵清白蛋白溶解于 20mL、pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲液，再分别加入浓度为 2.5% 的戊二醛 10mL，搅拌 30h；(2) 在 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中透析 7h，微孔膜收集

抗原硫酸庆大霉素蛋白偶联物；(3) 取 2mL 硫酸庆大霉素牛血清白蛋白偶联物和 8mL 福氏完全佐剂乳化，每只鼠腹腔内注射乳化抗原 0.2mL，加强免疫每只小鼠注射硫酸庆大霉素 0.227mg，直到抗体效价为 1:16 以上，采用双向琼脂扩散实验测定抗体效价；(4) 分离血清；(5) 采用饱和硫酸铵三步法分离血清中的抗体，再以 DEAE—离子交换剂法纯化抗体；(6) 梯度稀释抗体，并用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭；(7) 梯度稀释抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物；(8) 采用免疫反应棋盘法选择抗原抗体反应的工作浓度：按棋盘法将梯度稀释的抗原硫酸庆大霉素卵清白蛋白偶联物加入梯度稀释的抗体中酶联，抗原稀释液与抗体稀释液的体积比为 1:1，反应完全后用 TMB 显色，混合液变为黄色；(9) 用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量 OD 值，挑选 OD_{450} 值为 1~1.5 的孔，所选孔中抗体稀释 200 \times ，以抗体稀释 200 \times 作为工作浓度，并通过抗原稀释的倍数计算、制出标准曲线和标准数据表，标准曲线如图 1 所示，图 1 中曲线 $R^2=0.9847$ (R^2 值 ≥ 0.97 的点可取为线性点) 符合 $y=-0.0064x+1.3788$ 的直线公式，标准数据表如表 1 所示，表 1 中 n 为抗原稀释的倍数。

选取样品进行硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测：(一) 抗体按工作浓度稀释 200 \times ，制成包被液后加入 ELISA 检测板，再用浓度为 1%的酪蛋白—PBS 溶液封闭，然后按 1:1 体积比向包被液中加入经梯度稀释的样品，再在 41 $^{\circ}\text{C}$ 条件下酶联反应 1.1~1.4h 并用 TMB 显色，混合液仍为蓝色证明样品中无硫酸庆大霉素残留，混合液变为黄色证明样品中有硫酸庆大霉素残留；(二) 用酶标仪在紫外光 $\lambda=450\text{nm}$ 下测量变色混合液的 OD 值，选择 OD_{450} 值为 0.4~1.5 的样品稀释液；(三) 根据标准曲线图 1 和标准数据表表 1 查出的数值再乘以样品对应的稀释倍数 n，即得出样品硫酸庆大霉素残留量。

表 1

	1	2	3	4	5	6	7	8
浓度 (ng/mL)	0.0	5.0 $\times n$	10.0 $\times n$	20.0 $\times n$	40.0 $\times n$	80.0 $\times n$	160.0 $\times n$	320.0 $\times n$
$\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值	1.361	1.346	1.327	1.284	1.017	0.873	0.648	0.426

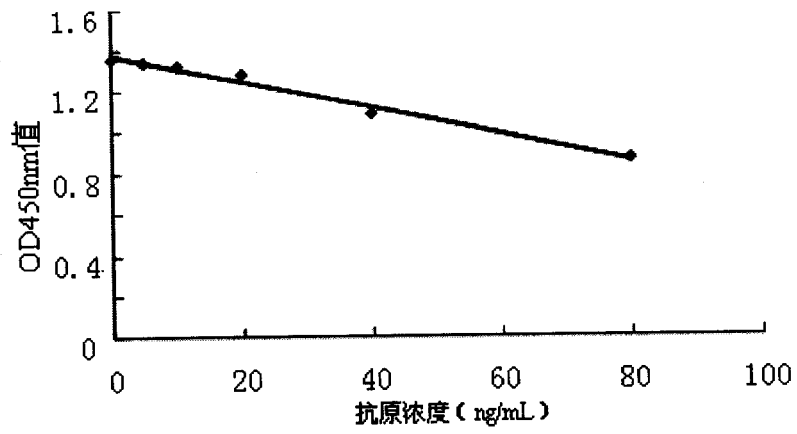


图 1

专利名称(译)	制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法		
公开(公告)号	CN1928559A	公开(公告)日	2007-03-14
申请号	CN200610010569.1	申请日	2006-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	王静 曹维强 丁志刚 金芬 邵华 杨锚		
发明人	王静 曹维强 丁志刚 金芬 邵华 杨锚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	单军		
其他公开文献	CN100582776C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素酶联免疫快速检测方法，它涉及一种制作硫酸庆大霉素检测标准曲线的方法及硫酸庆大霉素检测方法。它解决了目前硫酸庆大霉素检测法检测时间长的问题。绘标准曲线：蛋白与硫酸庆大霉素偶联后注射入小鼠体内制备抗体，再用免疫反应棋盘法选择抗原抗体反应的工作浓度，然后挑选OD450值为1~1.5的孔计算、绘制标准曲线。检测步骤：(一)抗体按工作浓度稀释后封闭，再按绘制标准曲线过程中抗原稀释液与抗体稀释液的体积比加入经梯度稀释的样品，再在41°C条件下酶联反应1~1.5h并用TMB显色；(二)测量OD450值，选OD值为0.4~1.5的样品稀释液；(三)查曲线中对应数值再乘以样品稀释倍数，即得出样品硫酸庆大霉素残留量。本发明检测时间短为1~1.5h，比传统酶联免疫法快2~3h。

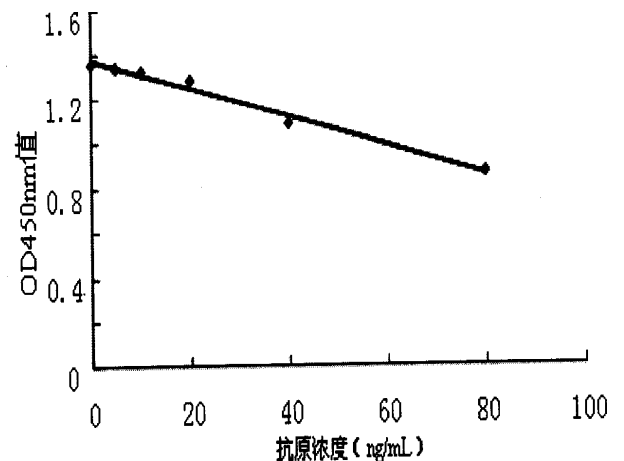


图 1