

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510086775.6

[51] Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月17日

[11] 授权公告号 CN 100501409C

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086775.6

[73] 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西区动医学院国家兽药安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟
吴小平 冯才茂 汪善良 李军
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞
丁双阳 罗晓琴 孙倩

[56] 参考文献

CN1690709A 2005.11.2
CN1670710A 2005.11.2
CN1389729A 2003.1.8

鸡肌肉组织中氯霉素残留的ELISA检测方法的研究. 魏书林等. 中国兽医杂志, 第40卷第9期. 2004

氯霉素人工抗原的合成及其结合比的测定. 徐修远等. 中国畜牧兽医, 第32卷第2期. 2005

马杜霉素在鸡组织中残留检测方法的研究. 沈建忠等. 畜牧兽医学报, 第30卷第2期. 1999

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 向华

权利要求书2页 说明书16页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒, 该酶联免疫试剂盒包括: 包被了氯霉素类药物抗原或抗抗体的酶标板、氯霉素类药物鼠单克隆抗体浓缩液、氯霉素类药物标准品溶液、酶标记物、底物显色液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测氯霉素类药物的方法, 它包括以下步骤: 首先进行样品前处理, 然后用试剂盒进行检测, 最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中氯霉素类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

1、一种用于检测动物组织中氯霉素类药物的试剂盒，其特征在于它包含下列成分：

- (1) 包被了氯霉素类药物抗原或抗抗体的酶标板；
- (2) 氯霉素类药物抗体；
- (3) 氯霉素类药物标准品溶液；
- (4) 酶标记物；
- (5) 底物显色液；
- (6) 浓缩洗涤液；
- (7) 浓缩复溶液；
- (8) 终止液，

其中所述氯霉素类药物抗原是通过将氯霉素类药物分子结构中的醇羟基采用戊二酸酐酰化得到具有氯霉素类药物官能团的半抗原，再与载体蛋白偶联获得；其中所述氯霉素类药物抗体是通过所述抗原制备获得，

其中浓缩洗涤液为含有 0.8 ~ 1.2% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为含有 5% N,N' - 二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于所述抗抗体是以羊为免疫动物，以鼠源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到的。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：酶标记物是酶标记的羊抗鼠抗抗体或酶标记的氯霉素类药物抗原，酶标记的羊抗鼠抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与抗抗体偶联得到，酶标记氯霉素类药物抗原是采用活化酯法将标记酶与氯霉素类药物半抗原偶联得到。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B

液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

5、如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于氯霉素类药物抗体的蛋白浓度为 0.5~5.0 μ g/L。

6、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于氯霉素类药物标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L、0.05 μ g/L、0.15 μ g/L、0.45 μ g/L、1.35 μ g/L、4.05 μ g/L。

7、一种检测样品中氯霉素类药物残留的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1~6 之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

8、如权利要求 7 所述的方法，其中试剂盒检测为向包被有氯霉素类药物抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液，再加入氯霉素类药物抗体，温育后洗涤拍干，加入酶标记羊抗鼠抗抗体，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

9、如权利要求 7 所述的方法，其中试剂盒检测为向包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入氯霉素类药物抗体，再加入酶标抗原及标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

一种检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫学检测领域，具体地说，涉及一种检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

背景技术

氯霉素类药物(Chloramphenicol, CAP)是应用广泛的抗菌素，曾对畜禽疾病控制和治疗起重要作用。但由于氯霉素类药物在食品中残留对人体有严重的副作用，能引起人的再生性障碍性贫血，粒细胞缺乏症等疾病，欧美等发达国家已相继禁止或严格禁止使用。我国农业部第 235 号文件中规定，动物源性食品中氯霉素的残留限量为不得检出。用酶联免疫测定方法和高效液相色谱分析法(HPLC)检测时，要求其检测限均为 1ng/kg。由于高效液相色谱分析法和气相色谱等仪器分析方法样本前处理及测定操作烦琐和费用高，推广使用受到限制。酶联免疫测定法具有灵敏度高，特异性强，仪器化程度低和样本前处理相对简单等优点，适于现场监控和大量样本筛查。

发明内容

(一) 要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

(二) 技术方案

为解决所述问题，本发明提供了一种用于检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒，该试剂盒由下列成分组成：

- (1) 包被了氯霉素类药物抗原或抗抗体的酶标板；
- (2) 氯霉素类药物抗体；
- (3) 氯霉素类药物标准品溶液；
- (4) 酶标记物；

- (5) 底物显色液;
- (6) 浓缩洗涤液;
- (7) 浓缩复溶液;
- (8) 终止液。

本发明中所指的氯霉素类药物为氯霉素和琥珀氯霉素, 或者其它与氯霉素结构相似、具有相同药理活性的氯霉素类药物。

其中所述的包被了氯霉素类药物抗原的酶标板在制备的过程中, 所用的包被原是用混合酸酐法将氯霉素合成氯霉素类药物半抗原, 再采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)将氯霉素类药物半抗原与兔血清白蛋白(RSA)偶联得到的; 所用的包被液是 pH 值 9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液; 所用的封闭液是含有 3~10%小牛血清和 3%惰性蛋白的溶液。

其中所述的氯霉素类药物抗体在制备的过程中的免疫原是采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)将氯霉素类药物半抗原和甲状腺蛋白 (BCG) 进行偶联得到的, 所用的抗体稀释液是 pH 值 7.4、0.02mol/L、含有 1%卵清蛋白的磷酸盐缓冲液。本发明试剂盒中氯霉素类药物抗体的蛋白浓度为 0.5~5.0 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述的氯霉素类药物标准品溶液浓度为 0~4.05 $\mu\text{g/L}$, 可以为 0 $\mu\text{g/L}$ 、0.05 $\mu\text{g/L}$ 、0.15 $\mu\text{g/L}$ 、0.45 $\mu\text{g/L}$ 、1.35 $\mu\text{g/L}$ 、4.05 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记氯霉素类药物抗原, 所用的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶; 本发明优选辣根过氧化物酶。所述标记酶可采用现有技术中的多种方法将其与抗抗体进行偶联, 如戊二醛法, 过碘酸钠法等, 本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良, 使反应更加省时, 并且降低了辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗抗体的浓度比率, 节省了原材料; 酶标记氯霉素类药物抗原是采用混合酸酐法将标记酶与氯霉素类药物半抗原进行偶联得到的。

当标记酶为辣根过氧化物酶时, 其中所述的底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺; 当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液。

其中所述的浓缩洗涤液为含有 0.8~1.2%吐温 20 和 1%叠氮化钠 (NaN_3)

防腐剂的磷酸盐缓冲液。

其中所述的浓缩复溶液为含有 5‰ N,N'-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

当标记酶为辣根过氧化物酶时，其中所述的终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸，当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，终止液为 2mol/L 的氢氧化钠缓冲液。

可作为固定氯霉素抗原与载体蛋白的偶联物或氯霉素类特异性抗体的载体的物质很多，如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

本发明还提供了使用上述试剂盒定性、定量检测动物源性食品中氯霉素类药物残留量的方法，它包括以下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

优选地，样品处理方法为：

a、动物组织

组织样本(鸡肉/肝、猪肉/肝、虾、鱼)前处理方法：均质样品，称取均质后的样品于离心管中，加入乙酸乙酯，振荡，离心，取出上层液体，在氮气流下干燥，加入正己烷溶解干燥的残留物，再加稀释了的复溶液强烈振荡，离心，去除上层相，取下层水相进行分析。

b、尿液

移取尿液到离心管中，加 pH4.8、100mM 醋酸钠缓冲液混合，加葡萄糖苷酸酶(Merck,Art.No.4114)到稀释的尿液中，在 37℃ 水解至少 2 小时，该溶液恢复至室温后加入乙酸乙酯混合，离心，取出上层液体在氮气下 50~60℃ 干燥，用稀释后的复溶液溶解干燥的残留物，即可进行分析。

c、血清血浆

取血清或血浆至试管中，加乙酸乙酯上下振荡，静置使水相与有机相分

层，移取上层的乙酸乙酯至另一试管中，用氮气流 60℃水浴中吹干，残留物用稀释后的复溶液溶解，即可进行分析。

d、蜂蜜

取蜂蜜，放入离心管中，用去离子水溶解。加入乙酸乙酯上下震荡，离心，移取上层乙酸乙酯到另一离心管中，50~60℃氮气流下蒸干，残留物用稀释后的复溶液溶解，即可进行分析。

优选地，其中试剂盒检测是向包被有氯霉素类药物抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液和氯霉素类药物抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。或者，是向包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入氯霉素类药物抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标抗原及标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

优选地，检测结果分析过程为：用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%，即百分吸光度值。计算公式为：

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = (B/B_0) \times 100\%$$

公式中B为标准溶液的平均吸光度值， B_0 为0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。以氯霉素类药物浓度的自然对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品中氯霉素的浓度则可从标准曲线上读出，根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中氯霉素的浓度范围，再根据氯霉素的实际残留量利用交叉反应率计算出样本中氯霉素类药物的实际残留量。

优选地，检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液中氯霉素类药物的浓度。

优选地，检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需1.5小时可以完成，最低检测限为0.5 $\mu\text{g/L}$ 。

其中，抗原及抗体的制备方法为：

(1) 抗原的合成

将氯霉素类药物分子结构中的醇羟基采用戊二酸酐酰化得到具有氯霉素类药物官能团的半抗原，再与兔血清白蛋白（RSA）、甲状腺蛋白（BCG）等载体蛋白采用水溶性碳化二亚胺法(EDC) 在不同的溶剂中进行偶联得到免疫原。

所述合成半抗原的优点为：

- a、突出了氯霉素类药物母核的分子结构。
- b、反应产率大大提高，使合成的氯霉素类药物分子在较温和的条件下不被分解。
- c、保留了氯霉素类药物半抗原分子结构中有较强免疫原性的抗原决定簇——苯环上的硝基，提高特异性抗体的亲和力。

通常免疫原的纯度要求较高，免疫原的纯度越高，制备的抗体特异性越强，至少要达到 90%以上，本发明合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 98.5%。

(2) 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

采用改良后的过碘酸钠法将羊抗鼠抗抗体与辣根过氧化物酶（HRP）进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体或氯霉素类药物抗原的摩尔浓度比为 4:1；由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点，活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁，从而降低酶标记物的酶活性，使制备的偶联物中混有许多聚合物。这样为了解决这个问题，我们将传统的方法进行了改良，即：

- 1) 省去了氨基的封闭过程，因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。
- 2) 降低了辣根过氧化物酶：抗抗体或氯霉素类药物抗原的摩尔浓度比率至 2:1，改良后的方法比传统的方法简便，对酶活性的损失减少。

(3) 酶标记氯霉素类药物抗原的制备

采用混合酸酐法将标记酶与氯霉素类药物半抗原偶联得到酶标记氯霉素类药物抗原。

(4) 氯霉素类药物单克隆抗体的制备

动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以氯霉素类药物半抗原与甲状腺蛋白偶联物为免疫原对小鼠进行免疫，可以得到血液里含有氯霉素类药物特异性抗体的小鼠脾脏。

细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

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℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

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，7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7~10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

其中本发明的试剂盒所用试剂的配制方法为：

- a. 氯霉素类药物标准溶液：氯霉素类药物系列标准溶液 6 瓶，0μg/L、0.05μg/L、0.15μg/L、0.45μg/L、1.35μg/L、4.05μg/L；
- b. 包被缓冲液：pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；
- c. 封闭液：含有 3%~10%小牛血清、3%惰性蛋白的溶液；
- d. 浓缩洗涤液：含 0.8%~1.2%吐温 20 和 1%叠氮化钠（Na₃N）防腐剂的磷酸盐缓冲液（0.01M pH7.4），为正常使用浓度的 15~25 倍；
- e. 氯霉素类药物抗体工作液：将抗体用 pH 值 7.4、0.02mol/L、含 1% 卵清蛋白的磷酸盐缓冲液稀释成蛋白浓度为 0.1~1μg/L 使用；
- f. 酶标记物工作液：酶标记羊抗鼠抗抗体或酶标记氯霉素类药物抗原稀释液；
- f. 底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲；
- g. 底物显色液 B 液：邻苯二胺（OPD）或四甲基联苯胺（TMB）；
- h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH 8.1、含有 MgCl₂ 0.01% 100mmol Tris-HCl；

i. 终止液: 1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液;

j. 浓缩复溶液: 为含有 5%二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液, 为正常使用浓度的 2~3 倍。

其中酶标板的制备方法为:

(1) 用包被缓冲液将氯霉素类药物半抗原与兔血清白蛋白的偶联物稀释, 向酶联板微孔中加入抗原稀释液, 放入 37℃环境进行孵育, 再放入 4℃环境过夜(得到的酶联板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37℃孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

(2) 用包被缓冲液稀释抗抗体, 向酶联板微孔中加入抗抗体稀释液, 放入 37℃环境进行孵育, 放入 4℃环境过夜(得到的酶联板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37℃孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

本发明试剂盒的检测原理为:

(1) 将氯霉素类药物抗原偶联物(CAP-RSA)吸附在固相载体上, 加入样本或氯霉素类药物标准品并加入氯霉素类药物抗体工作液, 待测样本中残留的氯霉素类药物与固相载体上包被的氯霉素类药物抗原竞争氯霉素类药物单克隆抗体, 再加入酶标记抗抗体进行酶活性放大作用, 显色后终止, 测定的样品的吸光度值, 该值与样品中氯霉素残留量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中氯霉素的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅, 与系列浓度的氯霉素标准溶液颜色的比较可判断样品中氯霉素的浓度范围, 再根据样本中氯霉素实际残留量利用交叉反应率计算出样本中其它氯霉素类药物在样本中的残留量。

(2) 将抗抗体吸附与固相载体上, 加入氯霉素类药物抗体工作液, 再加入酶标记氯霉素类药物抗原, 并加入样本或氯霉素类药物标准溶液, 待测样本中残留的氯霉素类药物与酶标记氯霉素类药物抗原竞争结合在抗抗体上的氯霉素类药物单克隆抗体, 显色后终止, 测定的样品的吸光度值, 该值与样品中氯霉素残留量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出氯霉素的含量, 再根据样本中氯霉素实际残留量利用交叉反应率计算出样本中其它氯霉素类药

物在样本中的残留量。

(三) 有益效果

本发明的检测氯霉素类药物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、尿液、蜂蜜、虾等样品中氯霉素类药物的残留量；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。

本发明的试剂盒采用高特异性的氯霉素类药物单克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，可以减少试剂盒的操作步骤，为使用者节省时间并降低因操作步骤的冗繁造成的误差，本发明具有灵敏度高、特异性强、精确度高、准确度高、对仪器设备要求低、试剂保存时间长、自动化程度高、无放射性同位素污染的等优点，可在动物源性食品中氯霉素类药物残留量的检测中发挥重要作用。

附图说明

图 1 氯霉素类药物检测标准曲线图。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例 1 试剂盒组分的制备

1、半抗原的合成

将氯霉素分子结构中的醇羟基采用戊二酸酐酰化得到氯霉素半抗原。

2、抗原的合成

a、取氯霉素类药物半抗原 2g 溶于 20ml, 0.5M 的氢氧化钠溶液中。

b、取 1.5g 碳化二亚胺溶于 5ml 纯水并加到半抗原溶液中室温搅拌反应 2 小时。

c、取载体蛋白兔血清白蛋白 (RSA) 或甲状腺蛋白 (BCG) 20g 溶于 75ml pH9.6 碳酸盐缓冲液。

d、将载体蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜。

e、将反应完的人工抗原对 0.1M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天,每天换液 3~4 次。最后将抗原浓缩或冻干保存。

3、酶标记抗抗体的制备

将抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联,采用的方法是改良的过碘酸钠法,方法如下:

a、8mg 辣根过氧化物酶溶解于 2mL 蒸馏水中。

b、加入现配制的 100mmol/L NaIO_4 溶液 0.4mL,室温搅拌反应 20 分钟。

c、用 1mmol/L 醋酸盐缓冲液于 4℃透析过夜,除去多余的 NaIO_4 ,同时使自身偶联的酶还原。

d、加入磷酸盐缓冲液 (pH8.6、0.5mol/L) 40 μ l 和含有 IgG16mg 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.6、5mol/L) 2.0mL,室温搅拌反应 4 小时。

e、加入现配制的 NaBH_4 水溶液 (1mol/L) 0.1mL 4℃反应 4 小时,以还原 Schiff 碱。

f、纯化保存。

4、氯霉素类药物单克隆抗体制备

动物免疫程序 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以氯霉素类药物半抗原与甲状腺蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 100 μ g/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 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。

细胞融合与克隆化 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,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。

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 5×10^6 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℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

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 0.5ml/只, 7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只, 7 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 小瓶分装, -20°C 保存。

5、酶标板的制备

用包被缓冲液将氯霉素类药物半抗原与兔血清白蛋白偶联物稀释成 $0.05\mu\text{g/ml}$, 每孔加入 $100\mu\text{l}$, 37°C 温育 2h, 4°C 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 5 次, 每次 15~30 秒, 拍干, 然后在每孔中加入 $150\mu\text{l}$ 封闭液, 37°C 温育 1~2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 2 检测氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测氯霉素的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被氯霉素类抗原的酶标板;
- (2) 蛋白浓度为 $0.5\mu\text{g/L}$ 的氯霉素类鼠单克隆抗体工作液;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (4) 氯霉素标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.05\mu\text{g/L}$ 、 $0.15\mu\text{g/L}$ 、 $0.45\mu\text{g/L}$ 、 $1.35\mu\text{g/L}$ 、 $4.05\mu\text{g/L}$;
- (5) 底物显色液 A 液为过氧化氢, 底物显色液 B 液为邻苯二胺;
- (6) 浓缩洗涤液为含有 0.8% 吐温 20 和 1% 叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液;
- (7) 浓缩复溶液为含有 5% N,N'-二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。
- (8) 终止液为 1mol/L 的硫酸溶液。

实施例 3 检测氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测氯霉素的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板;
- (2) 蛋白浓度为 $5.0\mu\text{g/L}$ 的氯霉素类鼠单克隆抗体工作液;
- (3) 用碱性磷酸酯酶标记的氯霉素类药物抗原;
- (4) 氯霉素标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.05\mu\text{g/L}$ 、 $0.15\mu\text{g/L}$ 、

0.45 $\mu\text{g/L}$ 、1.35 $\mu\text{g/L}$ 、4.05 $\mu\text{g/L}$;

(5) 底物液为对硝基磷酸盐缓冲液;

(6) 浓缩洗涤液为含有1.2%吐温20和1%叠氮化钠防腐剂的磷酸盐缓冲液;

(7) 浓缩复溶液为含有5% N,N' - 二甲基甲酰胺的磷酸盐缓冲液。

(8) 终止液为2mol/L的氢氧化钠溶液。

实施例 4 样品中氯霉素类药物残留的检测

1、样品前处理

(1) 动物组织

组织样本(鸡肉/肝、猪肉/肝、虾、鱼)前处理方法: 用均质器均质样品, 称 $3\text{g} \pm 0.1\text{g}$ 均质后的样品于离心管中, 加入 6ml 乙酸乙酯, 振荡 10min, 室温 3000g 以上离心 10min, 取出 4ml 上层液体, 在氮气流下 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 干燥, 加入 1 ml 正己烷溶解干燥的残留物, 再加 1ml 复溶液强烈振荡 1min, 室温 3000g, 离心 5min, 去除上层相, 取下层水相 50 μl 进行分析。

(2) 尿液

移取 2ml 尿液到离心管中, 加 pH4.8 100mM 醋酸钠缓冲液 0.5ml 混合, 加 40 μl 葡萄糖苷酸酶 (Merck, Art.No.4114)到稀释的尿液中, 在 37°C 水解至少 2 小时, 该溶液恢复至室温后加入 8ml 乙酸乙酯混合 1min, 室温 3000g 离心 10min, 取出 4ml 上层液体, 在氮气流下 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 干燥, 用 1ml 复溶液溶解干燥的残留物, 取 50 μl 进行分析。

(3) 血清血浆

取 1ml 血清或血浆至试管中, 加 2 ml 乙酸乙酯上下振荡 1min, 静置使水相与有机相分层, 移取上层的乙酸乙酯至另一试管中, 用氮气流 60°C 水浴中吹干, 残留物用 1 ml 复溶液溶解, 取 50 μl 进行分析。

(4) 蜂蜜

取 2g 蜂蜜, 放入离心管中, 用 4ml 去离子水溶解。加入 4ml 乙酸乙酯上下震荡 10min, 室温 3000g 离心 10min, 移取 1ml 上层乙酸乙酯到另一离心管

中，50~60℃氮气流下蒸干，残留物用稀释后的0.5ml复溶液溶解，取50ul进行分析。

2、用试剂盒进行检测

向包被氯霉素类药物半抗原与兔血清白蛋白偶联物的96孔酶标板微孔中加分别加系列标准溶液50μl，然后加入氯霉素类药物鼠单克隆抗体工作液50μl，用盖板膜封板，25℃恒温箱中反应1h。倒出孔中液体，每孔加入250μl洗涤液，30秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板5次，用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液100μl，用盖板膜封板，25℃恒温箱中反应30min。取出酶标板，如前述洗板5次。每孔加入底物显色液A液50μl，再加B液50μl，轻轻振荡混匀，25℃恒温箱避光显色30min。每孔加入终止液50μl，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔吸光度值(OD值)。

对50μl样品溶液重复上述操作。

结果分析：

计算百分吸光度值并绘制标准曲线，相对应每一个样品中氯霉素的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本溶液浓度再根据样本中残留的氯霉素的浓度利用交叉反应率计算出其它氯霉素类药物在样本的残留量。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。

根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

实验例1 试剂盒可重复性试验

标准品可重复性试验：

从每批按照实施例2(3)中的方法制备的酶联板中，各抽出20个微孔，测定0.45μg/L标准溶液的吸光度值(OD值)，重复3次，计算变异系数，结果见表1。

表1 标准品可重复性试验

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

CV%	01批	6.5	5.9	6.2	6.3	6.5	6.9	7.5	6.1	6.2	6.6
	03批	5.8	7.3	5.2	5.6	7.1	5.9	6.1	4.9	5.5	5.1
	06批	5.6	6.5	6.2	6.6	5.9	6.3	6.0	7.2	5.8	5.7

结果表明变异系数范围在 4.9%~7.5%之间,符合了变异系数小于 20%的规定,说明本试剂盒标准品精密度达到了《农业部文件》农医发[2005]17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第 4 点精密度和准确度的精密度的标准。

样本可重复性试验:

取两个浓度的氯霉素标样,添加到样品中,分别取三个不同批次的试剂盒各三个,每个浓度重复 5 次,分别计算板内,批间变异系数。

表2 鸡肝样品可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数CV%
01	2	2.3	1.9	2.2	2	7.9
	1.8	1.6	1.7	1.5	1.6	6.9
	1.7	1.8	2.1	1.9	2	8.3
03	2.1	2.3	2.3	2	2	7.0
	2.1	2	1.9	2.1	1.7	8.5
	1.9	2.1	1.9	2.2	2.1	6.5
06	1.9	1.7	2	1.8	1.5	10.8
	1.9	1.4	2	1.7	1.8	13.1
	2.2	2	2.1	1.8	2.2	8.1

表3 鸡肉样品可重复性试验

批号	实测值 (μg/kg)					变异系数CV%
01	1.8	1.7	2.1	2.2	2.4	13.0
	1.7	2.1	1.8	2.3	1.9	7.3
	1.8	1.6	2.3	2.0	1.8	14.8
03	1.5	1.7	2.0	2.3	1.9	13.0
	1.6	1.9	2.3	2.1	1.9	13.3
	1.8	2.0	1.5	2.5	1.7	17.5
06	1.8	2.1	1.6	2.0	1.5	13.4
	1.9	1.5	2.0	1.7	1.9	11.6
	1.7	1.8	2.3	1.9	2.1	12.3

表4 虾样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	2	1.7	1.8	1.5	2.1	13.1
	1.8	2.5	2.3	1.8	2.5	16.3
	1.9	2.4	1.6	1.9	2	14.7
03	2.1	1.8	2.3	1.7	1.6	15.3
	2	1.7	1.9	2.5	1.7	16.8
	2.1	1.9	1.8	2.6	1.9	15.6
06	2	1.9	1.5	2.3	1.6	17.3
	2.1	1.9	1.8	2.2	2.2	8.9
	2	2	1.8	1.7	2.6	17.3

表5 蜂蜜样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	2.0	2.5	1.9	1.8	2.6	16.9
	2.3	1.8	2.2	2.1	1.93	19.9
	2.1	2.4	2.0	1.7	1.5	18.1
03	2.0	2.4	1.8	1.5	2.3	17.8
	2.1	1.6	2.0	2.7	2.4	16.4
	1.7	2.1	1.8	2.3	1.9	18.2
06	1.5	1.8	1.9	1.7	2.1	15.3
	2.1	2.0	2.4	2.3	1.8	11.3
	1.5	1.7	1.9	2.1	2.0	13.1

结果表明动物组织(鸡肉/肝、猪肉/肝、鱼和)虾样品的变异系数均小于18%，蜂蜜样品的变异系数均小于20%。符合了变异系数小于20%的规定，说明本试剂盒测定样本的精密度达到了《农业部文件》农医发[2005]17号附件2试剂盒备案参考评判标准中第4点精密度和准确度的精密度的标准。

实验例2 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的氯霉素标样，对样品进行添加回收试验，每个浓度做4个平行，分别计算回收率。

表6 准确度测定试验

样本		鸡肉		鸡肝	
添加浓度 (μg/kg)		1	2.5	1	2.5
回收率%	1	65.5	87.5	92.5	86.2
	2	78.5	75.2	86.2	65.2
	3	82.4	69.5	72.5	92.5
	4	86.1	83.4	94.5	76.5
平均值		78.1	78.9	86.4	80.1
CV%		11.5%	10.3%	11.5%	14.9%
样本		蜂蜜		虾	
添加浓度 (μg/kg)		1	2.5	1	2.5
回收率%	1	74.5	73.5	72.5	64.5
	2	65.5	61.5	68.5	72.5
	3	78.5	86.5	82.5	90.5
	4	91.5	84.2	76.5	85.5
平均值		77.3	76.4	75.0	78.3
CV%		13.4	15.0	8.0	15.2

结果表明猪肉和猪肝的回收率在 62.4%~89.8%之间, 鸡肉和鸡肝样本的回收率为 65.5%~94.5%, 虾样本的回收率 64.5%~90.5%, 蜂蜜样本回收率 61.5%~91.5%。

实验例 3 试剂盒特异性试验

选择与氯霉素类似结构和类似功能的 2 种氯霉素类药物测定交叉反应率。通过各种药物的标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应率愈小, 表明试剂盒的特异性愈高。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\%抑制氯霉素的浓度}}{\text{引起 50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$

表7 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率(%)
氯霉素	100.0
琥珀氯霉素	120.0

实验例 4 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2~8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、氯霉素添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 37℃保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明该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 5 天，测定结果也表明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℃保存 6 个月以上。

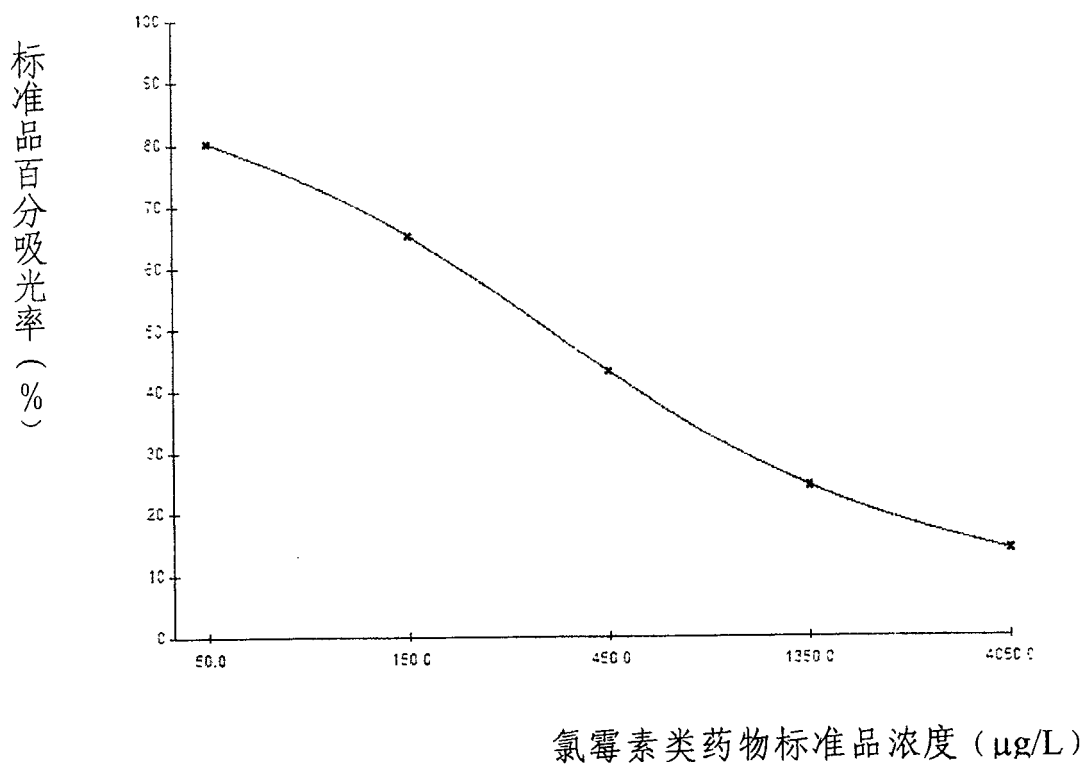


图 1

专利名称(译)	一种检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100501409C	公开(公告)日	2009-06-17
申请号	CN200510086775.6	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN1766629A		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明提供了一种检测动物源性食品中氯霉素类药物的酶联免疫试剂盒，该酶联免疫试剂盒包括：包被了氯霉素类药物抗原或抗抗体的酶标板、氯霉素类药物鼠单克隆抗体浓缩液、氯霉素类药物标准品溶液、酶标记物、底物显色液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、终止液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测氯霉素类药物的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中氯霉素类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

