

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810025908.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 101226194A

[22] 申请日 2008.1.18

[21] 申请号 200810025908.2

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山

[72] 发明人 孙远明 杨金易 沈玉栋 王 宇
雷红涛 王 弘 肖治理

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 林丽明 任 重

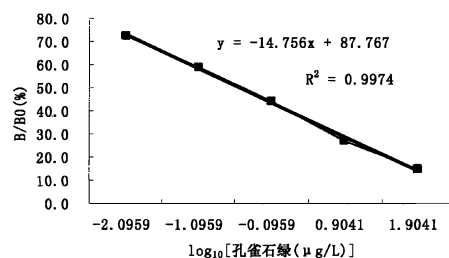
权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 1 页

[54] 发明名称

孔雀石绿残留的酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测动物源性食品中孔雀石绿残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被孔雀石绿抗原的酶标板，酶标记孔雀石绿抗体工作液、孔雀石绿标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液和样品稀释液。本发明还公开了应用上述试剂盒检测孔雀石绿残留的方法，包括进行样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析等步骤。本发明提供的检测孔雀石绿的试剂盒采用直接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。



1、一种孔雀石绿残留的酶联免疫检测试剂盒，其特征在于包含下列成分：

- (1) 包被了孔雀石绿抗原的酶标板；
- (2) 酶标记孔雀石绿抗体工作液；
- (3) 孔雀石绿标准溶液；
- (4) 底物液；
- (5) 底物缓冲液；
- (6) 反应终止液；
- (7) 浓缩洗涤液；
- (8) 样品稀释液。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述酶标板采用96孔或40孔酶标板，包被有能与抗孔雀石绿抗体特异结合的孔雀石绿抗原，并封闭微孔表面未吸附孔雀石绿抗原的位点；所述孔雀石绿抗原是采用重氮化法将孔雀石绿半抗原与载体蛋白进行偶联得到。

3、根据权利要求1所述酶联免疫分析试剂盒，其特征在于所述酶标记孔雀石绿抗体工作液为采用戊二醛法或过碘酸盐氧化法将标记酶与孔雀石绿抗体进行偶联得到；所述标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取的碱性磷酸酯酶。

4、根据权利要求3所述酶联免疫分析试剂盒，其特征在于所述孔雀石绿抗体为鼠单克隆抗体、兔多克隆抗体或基因工程抗体任意一

种。

5、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于当标记酶为辣根过氧化物酶时，所述底物液为含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺或邻苯二胺的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为1~2mol/L硫酸溶液或2mol/L的氢氧化钠溶液；

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时，所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为1~2mol/L硫酸溶液或2mol/L的氢氧化钠溶液。

6、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述浓缩洗涤液为含0.5~1.5%吐温20的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液pH7.4，浓度为0.1mol/L。

7、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述样品稀释液为含0.05%吐温20的0.01mol/L磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液pH7.4。

8、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述孔雀石绿标准溶液的浓度分别为：8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L和0 μ g/L。

9、一种权利要求1所述的酶联免疫检测试剂盒的使用方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 使用试剂盒进行检测;

(3) 结果处理与分析。

10、根据权利要求 9 所述方法, 其特征在于步骤 (2) 包括以下步骤:

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出, 置于室温平衡;

(2) 将标准品或待测样品加入已经包被有孔雀石绿抗原的酶标板孔内, 然后每孔加入酶标记物, 轻拍混匀, 孵育;

(3) 洗涤;

(4) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液, 轻拍混匀, 避光孵育;

(5) 每孔加入反应终止液, 混合均匀, 在波长 450nm 或 492nm 下, 以空气为空白, 酶标仪测定各孔吸光值。

孔雀石绿残留的酶联免疫检测试剂盒及其使用方法

技术领域

本发明涉及酶联免疫检测技术领域，具体涉及一种动物源性食品中孔雀石绿残留的酶联免疫检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

孔雀石绿具有潜在的致癌、致畸、致突变的作用，其在养殖业中的使用未得到美国食品与药物管理局（FDA）的认可；根据欧盟法案2002 /675 /EC规定，动物源性食品中孔雀石绿和无色孔雀石绿残留总量限制为 $2\mu\text{g/kg}$ ；日本的肯定列表也明确规定在进口水产品中不得检出孔雀石绿残留；我国在农业行业标准《NY5071 - 2002 无公害食品鱼药使用准则》中也将孔雀石绿列为禁用药物。

2005年，福建、江西、安徽等省出口欧盟、日本、韩国的鳗鱼产品先后被检出孔雀石绿残留，我国水产品出口因此受严重影响；2006年，上海市场上的多宝鱼和香港市场上的桂花鱼，也都检出孔雀石绿残留。水产品中孔雀石绿的残留问题日益成为社会关注的焦点。

孔雀石绿在水生动物体内会很快代谢成无色孔雀石绿，无色孔雀石绿的毒性甚至超过孔雀石绿。因此，有关法规对动物源性食品中孔雀石绿残留限量的规定都是以孔雀石绿和无色孔雀石绿的总量为限量指标，要求相关的检测方法能检测出孔雀石绿和无色孔雀石绿总量。目前，孔雀石绿的检测方法以理化检测法和免疫学检测法为主。

通常，检测孔雀石绿的方法主要有高效液相色谱法（HPLC），气

相色谱-质谱法（GC-MS）、理化检测法和免疫分析技术（IA）等等。HPLC 法与 GC-MS 法是孔雀石绿残留检测的确证方法，其优点是检测精确度高，但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等而阻碍其推广应用。理化检测法多以有机溶剂萃取后过层析柱，然后观察颜色进行孔雀石绿残留的判断，此方法主观性强，对微量残留进行很难测定，而且无法定量，因此很难符合检测单位实际使用的要求。而酶联免疫分析（ELISA）快速检测技术因灵敏度高、特异性好、既可定性又可定量，且成本低、操作简单快速、一次检测样本量大、仪器化程度低现已成为常用的筛选方法。

检索相关文献与专利发现，国内关于孔雀石绿免疫检测的方法与试剂盒很少，检索到一篇中国专利《水产品中孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒》（申请号 200510060995.1）中提到一种孔雀石绿酶联免疫试剂盒，此试剂盒采用的检测原理为，酶标板中包被有孔雀石绿抗原，样品与包被抗原竞争结合孔雀石绿抗体，洗涤去除未反应试剂，然后再加入酶标记抗抗体反应，再洗涤，加入底物显色，终止后，读数；该试剂盒由于采用间接竞争 ELISA 检测模式，操作复杂、步骤多，检测时间长，生产与保存成本高，很难满足实际应用的需求。

总之，现有酶联免疫试剂盒采用的检测方法复杂、繁琐，很难应用于实践，且现有技术由于普遍存在稳定性差、样品前处理及检测步骤复杂、设备条件要求较高、价格昂贵等不足，严重影响了孔雀石绿残留检测与监控，因此研制稳定性高、操作简单、设备要求低、廉价的孔雀石绿 ELISA 试剂盒具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

本发明的目的是针对现有孔雀石绿检测产品中存在的不足，提供一种高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单，能大批量快速检测孔雀石绿的酶联免疫试剂盒。

本发明的另一目的是提供利用上述酶联免疫试剂盒检测孔雀石绿残留的方法。

为了实现上述目的，本发明采用如下测定原理：首先将孔雀石绿抗原包被于固相载体，例如酶标板上，然后加入标样或待测样品，再加入酶标记孔雀石绿抗体，包被抗原与待测样品中的孔雀石绿竞争酶标抗体，待测样品孔雀石绿含量高时，则与固相抗原结合的酶标抗体就少，反之结合在固相抗原上的酶标抗体就多，反应后加入底物进行显色加以测定，当酶标抗体量一定时，加入的待测样品含孔雀石绿越多，与固相抗原结合酶标抗体就越少，发色反应减弱，百分吸光度值低，反之，则发色反应增强，百分吸光度增高，因而根据百分吸光度值与孔雀石绿浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线，再根据孔雀石绿的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，即可推算出待测样品中孔雀石绿的浓度。

本发明的具体技术方案为：

提供一种孔雀石绿残留的酶联免疫检测试剂盒，包含下列成分：

- (1) 包被了孔雀石绿抗原的酶标板；
- (2) 酶标记孔雀石绿抗体工作液；
- (3) 孔雀石绿标准溶液；

- (4) 底物液;
- (5) 底物缓冲液;
- (6) 反应终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 样品稀释液。

所述酶标板是 96 孔或 40 孔酶标板,酶标板孔内包被有能与抗孔雀石绿抗体特异结合的孔雀石绿抗原,其是使用重氮法将孔雀石绿与载体蛋白偶联得到的,所用的包被液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠、2~4g 碳酸氢钠和双蒸水 1L,封闭液为 1~5%脱脂奶粉溶液。

所述孔雀石绿抗体的制备,所用的免疫原为采用重氮法将孔雀石绿半抗原与载体蛋白共价偶联合成得到的,以免疫抗原免疫兔子或小鼠,制备孔雀石绿多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备孔雀石绿单克隆抗体或利用基因工程方法制备基因工程抗体。收集抗血清、腹水、发酵液等,用辛酸硫酸铵沉淀纯化或过亲和层析柱进行纯化。

所述酶标记孔雀石绿抗体工作液为采用戊二醛法或过碘酸盐氧化法将酶与孔雀石绿抗体进行偶联得到的。所用标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,本发明优选为辣根过氧化物酶,且采用改良后的过碘酸盐氧化法进行标记,提高了标记效率,节省了酶与抗体的用量,保证标记后酶与抗体具有良好的活性。

所述孔雀石绿标准溶液的浓度为: 8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L 和 0 μ g/L。

所述底物显色液当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物液为含有 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD) 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液，底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液；

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时，所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液 pH7.4，浓度为 0.1mol/L，为正常使用浓度的 15~25 倍。

所述样品稀释液为含 0.05%吐温 20 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液 pH7.4。

可以作为固定孔雀石绿抗原的载体的物质较多，例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

本发明所述抗原抗体的制备方法陈述如下：

(1) 抗原的合成

半抗原的合成：

用化学方法先合成硝基无色孔雀石绿 (NO₂-LMG)，然后将其还原为氨基无色孔雀石绿 (NH₂-LMG)，用硅层析法分析两者的纯度，并进行回收。

包被原和免疫原的合成：

将孔雀石绿半抗原和牛血清白蛋白（BSA）、人血清白蛋白（HSA）、钥孔血蓝蛋白（KLH）等载体蛋白，通过重氮化法进行偶联得到包被抗原与免疫原。免疫原与包被原通过柱层析进行纯化，纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定。

（2）孔雀石绿单克隆抗体的制备

动物免疫：以半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对 Balb/c 小鼠进行间隔免疫，间接 ELISA 检测并得到血液里含有孔雀石绿特异性抗体的小鼠脾脏。

细胞融合与克隆：取产生特异性抗体的 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 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。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化，得到并建立产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-饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化，纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定，小瓶分装，-20℃ 保存。

（3）孔雀石绿兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以孔雀石绿与载体蛋白偶联物

为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸胺分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

（4）孔雀石绿基因工程抗体的制备

基因工程抗体主要指小分子抗体，包括：Fab（由完整的轻链和Fd 构成），Fv（由 VH 和 VL 构成），ScFv（单链抗体，VH 和 VL 之间由一条连接肽连接而成），单域抗体（仅由 VH 组成）等经基因工程技术改造后的抗体。

制备方法为：提取孔雀石绿单克隆细胞或经孔雀石绿免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因，插入适当的表达质粒，在大肠杆菌中表达，利用免疫亲和方法进行纯化，纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定。

其中，酶标记孔雀石绿抗体的制备：

将孔雀石绿抗体与辣根过氧化物酶（HRP）采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为：

①溶解 5mg HRP 于 1mL 超纯水中，加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75 μ L，置室温或 4℃冰箱反应 20min 或 30min。

②反应完后装入透析袋，0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液 4℃透析过夜，期间需更换透析液几次。

③将抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL，另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中，置室温或 4℃冰箱反应 2h。

④加入 100 μ L 4mg/mL 硼氢化钠, 4℃冰箱反应 2h。

⑤对 0.01mol/L PBS 透析过夜, 加入保存液-20℃保藏备用。

其中, 酶标板的制备方法为:

用包被缓冲液将孔雀石绿抗原按需要稀释, 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℃环境中过夜孵育, 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。

本发明同时提供了利用上述酶联免疫试剂盒进行动物源性食品中孔雀石绿检测的使用方法:

- (1) 样品前处理;
- (2) 使用试剂盒检测;
- (3) 结果处理与分析。

本发明提供待测样品前处理方法为:

(1) 取剪碎样品置入离心管中, 按每克样品加入 2mL 加入乙酸乙酯, 充分打碎均质;

(2) 4000rpm/min 离心 10min, 取上清在 50℃水浴下氮气流吹干样品;

(3) 以等量环己烷和蒸馏水混合提取涡旋 1 分钟, 取环己烷层, 按每克样品加入 12.5 μ L 加入 1M HCL, 涡旋 1 分钟, 静置 30min;

(4) 加入 2 倍于 HCL 液量的蒸馏水, 8000rpm/min 离心 10min, 弃去上层环己烷, 吸取下层清液, 用 1N NaOH 调整到 pH6.0~8.0 与

稀释液进行 4 倍稀释后，取 50 μ L 进行分析。

使用试剂盒检测的方法为：

- (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出，置于室温平衡；
- (2) 将标准品或待测样品加入已经包被有孔雀石绿抗原的酶标板孔内，然后每孔加入酶标记物，轻拍混匀，孵育；
- (3) 洗涤；
- (4) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液，轻拍混匀，避光孵育；
- (5) 每孔加入反应终止液，混合均匀，在波长 450nm 或 492nm 下，以空气为空白，酶标仪测定各孔吸光值；

本发明提供的检测结果处理与分析方法为：

以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值，以百分吸光度值为纵坐标，孔雀石绿标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，根据方程式求出对应样品的孔雀石绿浓度。所述百分吸光度值的计算式为：

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

其中，B 为标准溶液或样品的平均吸光值， B_0 为 0 μ g/L 标准溶液的平均吸光度值。

检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析，对孔雀石绿线性检测范围为 0.1~8.1 μ g/L，检测限为 0.1 μ g/L，整个检测过程只需 35min 就可以完成。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

本发明的试剂盒采用直接竞争 ELISA 检测模式，采用高特异性、高亲合力的抗体，减少了操作步骤，提高了检测的灵敏度、准确度；采用包被抗原进行酶标板的包被，相对于抗体包被，更有利于达到较好的包被效果与较长的保存时间，从而提高了试剂盒检测的精密度与稳定性；另外本试剂盒利用酶标记抗体技术，且采用改良后的过碘酸盐氧化法进行标记，将酶直接标记于孔雀石绿特异性抗体上，将孔雀石绿特异性抗体与酶两种最重要的反应物合二为一，提高了标记效率，节省了酶与抗体的用量，保证标记后酶与抗体具有良好的活性，不仅大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，而且无需在试剂盒内再配置抗抗体，同时也节约了孔雀石绿特异性抗体与酶的用量，从而大大降低了试剂盒的成本。基于以上优点本试剂盒非常适用于孔雀石绿残留的痕量分析与批量检测，具有重要的现实意义。

附图说明

图 1 为标准曲线

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例来进一步详细说明本发明。

实施例 1 抗原的制备

孔雀石绿抗原的制备：

a. 200mg 纯化的氨基无色孔雀石绿加 0.3mol/L HCL 12mL 的比例，将纯化的氨基无色孔雀石绿搅拌溶解；

b. 在冰浴搅拌的条件下缓慢加入 10g/L NaNO_2 ，使氨基无色孔雀石绿重氮化，同时监测 NaNO_2 是否过量，检测方法：取淀粉/碘化钾溶液滴于白色干燥玻璃片上，滴加 1 滴上述重氮化溶液，混合后 30s 内呈现蓝黑色即完成氨基无色孔雀石绿的重氮化；

c. 上述重氮化的氨基无色孔雀石绿继续反应 20min，称取 800mg 的 BSA，溶于碳酸盐缓冲液，制成 20g/L 蛋白溶液，在冰浴搅拌条件下缓慢加入重氮化氨基无色孔雀石绿溶液；边加边用 0.01mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5~8.0，获得无色孔雀石绿与牛血清白蛋白得偶联物 (LMG-BSA)，置于 4℃ 冰箱过夜；

d. 于 4℃ 条件下，先用 pH 值较低的稀 HCL (0.01mol/L) 溶液透析，然后用 0.1mol/L pH7.2 的 PBS 透析 3d，每天换透析液 3 次，分装冻干后，-20℃ 保存。

实施例 2 抗体的制备

孔雀石绿鼠单克隆抗体制备：

动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以孔雀石绿半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 60 μg /只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，腹腔注射，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 4: 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。利用显微克隆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 -70°C 超低温冰箱中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37°C 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 8 周龄的小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，14 天后采集腹水。用免疫层析法进行腹水纯化，小瓶分装， -20°C 保存。

实施例 3 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的提取

1、辣根过氧化物酶的提取

a. 水提取：称取 20 千克已洗干净的鲜辣根或辣根皮，切成小块，在粉碎机中绞碎。碎渣浆加 10 千克水在低温下搅拌浸提 8 小时，以 3000 转/分速度离心 10 分钟，收集上清液。

b. 硫酸铵分级分离：每升滤液加 226 克硫酸铵粉末，边加边搅拌，置室温下过夜。次日吸取上清液，再按每升上清液加 258 克硫酸铵粉末，随加随搅拌，待硫酸铵完全溶解后，置冷室过夜。次日吸去上清液，沉淀部分在冷冻离心机中以 13000 转/分离心 20 分钟，弃去上清液，收集沉淀。将沉淀溶于 200~300 毫升蒸馏水中，分装于透析袋中，在流动水中透析 1~2 天，直至透出的水加入氯化钡溶液无沉淀生成为止。然后再在蒸馏水中透析 8 小时。合并透析液，在冷冻离心机中以 4000 转/分离心 15 分钟，收集上清液。

c. 丙酮分级分离：将上清液倒入烧杯并置冰盐浴中，在不断搅

拌下，用滴管沿杯壁加入等体积预冷至 -15°C 的丙酮，在冷冻离心机中以4000转/分离心15分钟，收集上清液，再加入原上清液体积0.8倍的 -15°C 丙酮，离心（条件同上）收集沉淀。将沉淀溶于少量蒸馏水中，透析（方法同上）除去丙酮，即得粗HRP。

d. 精制：每升粗酶液加入1毫升1摩尔硫酸锌溶液，在冷冻离心机中以5000转/分离心10分钟，收集上清液，分装于透析袋内，于流水中透析除硫酸锌，约需1天，然后在蒸馏水中透析8小时。将透析液合并，进行真空干燥即得精制HRP。产品呈米黄色纤维状松软物。

2、碱性磷酸酶

利用产生碱性磷酸酯酶的 *E. Coli* 1, 317 菌株发酵培养，发酵液经离心（8000r/min，10min）后，沉淀的菌体经 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ EDTA—0.03M pH 8.0 Tris—0.5M 蔗糖高渗液处理后用溶菌酶破壁，上清酶液经 DEAE 纤维素搅拌吸附和洗脱，热处理和 Sephadex G-100 分子筛层析纯化。

实施例 4 酶标记孔雀石绿抗体的制备

辣根过氧化物酶 HRP 标记孔雀石绿抗体的制备采用过碘酸盐氧化法，具体方法为：

a. 溶解 5mg HRP 于 1mL 超纯水中，加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75 μL ，置室温或 4°C 冰箱反应 20min 或 30min。

b. 反应完后装入透析袋，0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液 4°C 透析过夜，期间需更换透析液几次。

c. 将孔雀石绿抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL, 另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中, 置室温或 4℃冰箱反应 2h。

d. 加入 100 μ L 4mg/mL 硼氢化钠, 4℃冰箱反应 2h。

e. 对 0.01mol/L PBS 透析过夜, 加入保存液-20℃保藏备用。

实施例 5 酶联免疫试剂盒组分的配制

(1) 浓缩洗涤缓冲液的配制: 含 0.5~1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液, 磷酸盐缓冲液 pH7.4, 浓度为 0.1mol/L, 为正常使用浓度的 15~25 倍。

(2) 样品稀释液的配制: pH7.4、0.01mol/L、含有 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液。

(3) 封闭液的配制: 脱脂奶粉 1.0~5.0 g 溶于 100mL 蒸馏水。

(4) 底物缓冲液的配制: 30%过氧化氢 30 μ L 溶于 19mL 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中, 4℃保存。磷酸-柠檬酸缓冲液: 0.2M Na_2HPO_4 25.7mL, 0.1M 柠檬酸 24.3mL, 加蒸馏水 50mL。

(5) 底物液的配制: 将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 80mg 溶于 10mL pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中, 4℃保存。磷酸-柠檬酸缓冲液: 0.2M Na_2HPO_4 25.7mL, 0.1M 柠檬酸 24.3mL, 加蒸馏水 50mL。

(6) 酶标板微孔板的包被: 包被抗原用 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 0.1~5 μ g/mL, 其中碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠以及双蒸水 1L。在酶标板的每孔加 100 μ L, 37℃包被 1h 后 4℃下包被过夜, 倾去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 拍干,

然后在每孔中加入 200 μ L 1.0~5.0%脱脂奶粉，放入 37℃温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次，干燥后封入铝箔袋中 4℃保存。

(7) 孔雀石绿标准溶液的配制：准确称取无色孔雀石绿标样 10mg，溶于 0.1mL 0.1mol/L 盐酸溶液，然后用样品稀释液分别配制 8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L、0 μ g/L 孔雀石绿溶液，4℃保存。

(8) 试剂分装：各种试剂按要求配制，测定合格后无菌分装。酶标记孔雀石绿抗体工作液 7mL/瓶，孔雀石绿标准样品 1mL/瓶，底物液 7mL/瓶，底物缓冲液 7mL/瓶，终止液 7mL/瓶，浓缩洗液 50mL/瓶，样品稀释液 50mL/瓶。分装后贴标签，注明批号和有效期，4℃保存。

(9) 试剂盒的组装：分别将可拆卸包被好包被抗原的微孔板 1 块，酶标记孔雀石绿抗体工作液、底物液、底物缓冲液、终止液、浓缩洗液、样品稀释液各 1 瓶，孔雀石绿标准溶液 6 瓶，使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装，4℃保存。

实施例 6 酶联免疫试剂盒组分的配制

实验步骤同实施例 5，不同的是采用细菌提取的碱性磷酸酯酶为标记酶，所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液，所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液，按照实验室常规方法配制。

实施例 7 组建检测孔雀石绿的酶联免疫试剂盒，包含下述组分：

- (1) 包被孔雀石绿抗原的 96 孔酶标板，或根据产品规格的需要选用 40 孔酶标板；
- (2) 辣根过氧化物酶标记孔雀石绿单克隆抗体，7mL/瓶；
- (3) 孔雀石绿标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.3\mu\text{g/L}$ 、 $0.9\mu\text{g/L}$ 、 $2.7\mu\text{g/L}$ 和 $8.1\mu\text{g/L}$ ，1mL/瓶；
- (4) 底物缓冲液，7mL/瓶；
- (5) 底物液，7mL/瓶；
- (6) 终止液，7mL/瓶；
- (7) 浓缩洗涤液，50mL/瓶；
- (8) 样品稀释液，50mL/瓶；
- (9) 使用说明书，1 份；
- (10) 盖板膜，2 张；
- (11) 自封袋（含干燥剂），1 个。

实施例 8 待测样品前处理

- (1) 取剪碎鱼肉样品 5g 置入离心管中，加入 10mL 乙酸乙酯，充分打碎均质；
- (2) 4000rpm/min 离心 10min，取上清在 50℃水浴下氮气流吹干样品；
- (3) 以等量环己烷和蒸馏水混合提取涡旋 1 分钟，取环己烷层，加入 $62.5\mu\text{L}$ 1M HCL，涡旋 1 分钟，静置 30min；
- (4) 加入 $125\mu\text{L}$ 蒸馏水，8000rpm/min 离心 10min，弃去上层环己烷，吸取下层清液，用 1N NaOH 调整到 pH6.0~8.0 与稀释液进

行4倍稀释后,取50 μ L 进行分析。

实施例9 使用试剂盒的检测方法

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温,即20~24℃,平衡30min以上,将足够标准和样品所用数量的条板固定于支架,标准和样品做两个平行实验,按顺序编号。

(2) 在标准品孔加入50 μ L 标准品,样品孔加入50 μ L 待测样品。然后每孔加入50 μ L 酶标记物,轻拍混匀。盖上盖板膜,在室温孵育20min。

(3) 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打,每轮洗板拍打3次,以保证完全除去孔中的液体。用250 μ L 蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中的液体,再重复操作3遍。

(4) 每孔加入100 μ L 显色液(将底物缓冲液与底物液等体积混合),轻拍混匀,盖上盖板膜,暗处室温孵育15min。

(5) 加入50 μ L 反应终止液到微孔中。混合好在波长450nm或492nm,以空气为空白,测定各孔吸光值,必须在加入终止液后60min内读取吸光值。

检测结果计算与分析:

以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值,以百分吸光度值为纵坐标,孔雀石绿标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。见附图1。 $Y=-14.756X+87.767$; $R^2=0.9974$ 。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值,根据方程式求出对应样品的孔雀石绿浓度。所述百分吸光度值的计算式为:

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

其中，B 为标准溶液或样品的平均吸光值， B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。

检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析，对孔雀石绿线性检测范围为 $0.1 \sim 8.1 \mu\text{g/L}$ ，检测限为 $0.1 \mu\text{g/L}$ ，整个检测过程只需 35min 就可以完成。

实施例 10 试剂盒精密度与准确度试验

1、标准品溶液重复性试验

从 3 批按照实施例 4（6）中的方法制备的酶标板中，各抽出 20 个微孔，测定 $0.9 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值（OD 值），重复 20 次，计算变异系数 CV%，结果见表 1。

表 1 标准品溶液重复性试验

样品	浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.9	4.8	3.7	4.3	8.7

结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 $3.7 \sim 4.8\%$ 之间，批间变异系数为 8.7% 。

2、样本重复性与准确度试验

准确度是指测得值与真值的符合程度，在 ELISA 测定中，准确度常以回收率表示，精密度常以变异系数来表示。在空白淡水鱼肉中，将孔雀石绿添加至终浓度为 $1 \mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)、 $5 \mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)，每个浓度各 10 个平行，测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批

间变异系数。结果见表 2。

表 2 样本重复性与准确度试验结果

样品	添加 浓度 μg/L	第 1 批			第 2 批			第 3 批			批间 CV%
		含量	回收 率%	CV%	含量	回收 率%	CV%	含量	回收 率%	CV%	
鱼肉	1	0.83	83.0	6.3	1.08	108	7.8	0.924	92.4	8.5	12.8
	5	5.35	107	4.1	4.05	81.0	6.3	5.45	109	8.8	13.7

结果表明淡水鱼肉样本的添加回收率在 81.0~109%之间，批内变异系数在 4.1~8.8%之间，批间变异系数在 12.8~13.7%之间。

实施例 11 保存期试验

(1) 将试剂盒放置于 2~8℃，分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒，对孔雀石绿标准样品（0.1 μg/L）的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

(2) 将试剂盒在 37℃保存的条件下放置 12 天，每天对孔雀石绿标准样品（0.1 μg/L）的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

(3) 将试剂盒在-20℃冰箱保存 12 天，每天对孔雀石绿标准样品（0.1 μg/L）的吸光度值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

从结果可看出，经过三种条件保存试验，孔雀石绿标准样品（0.1 μg/L）的吸光度值下降小于 5%，且 OD 不低于 1.5；50%抑制率在 0.5~1.0 μg/L 之间；添加回收率在 70~105%之间；批内变异系数

小于 10%；各项指标均符合质量要求，因此，试剂盒可以在 2~8℃
保存 12 个月。

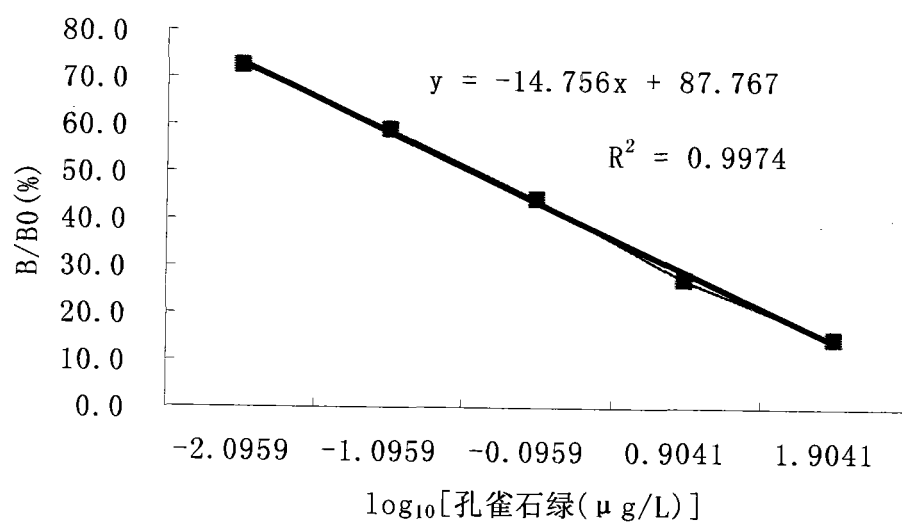


图 1

专利名称(译)	孔雀石绿残留的酶联免疫检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN101226194A	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	CN200810025908.2	申请日	2008-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 杨金易 沈玉栋 王宇 雷红涛 王弘 肖治理		
发明人	孙远明 杨金易 沈玉栋 王宇 雷红涛 王弘 肖治理		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	林丽明 任重		
其他公开文献	CN101226194B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测动物源性食品中孔雀石绿残留的酶联免疫试剂盒，包括：包被孔雀石绿抗原的酶标板，酶标记孔雀石绿抗体工作液、孔雀石绿标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液和样品稀释液。本发明还公开了应用上述试剂盒检测孔雀石绿残留的方法，包括进行样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析等步骤。本发明提供的检测孔雀石绿的试剂盒采用直接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。

