

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810028633.8

[43] 公开日 2008 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 101290316A

[22] 申请日 2008.6.6

[21] 申请号 200810028633.8

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山 483 号

[72] 发明人 孙远明 杨金易 王 弘 吴 青
雷红涛 沈玉栋 肖治理 柳春红
刘细霞

[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

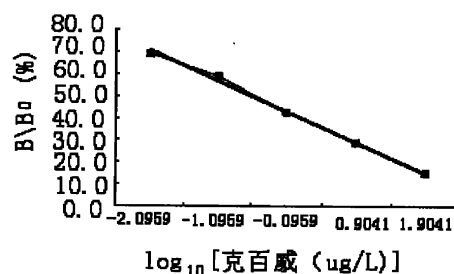
权利要求书 4 页 说明书 18 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种克百威的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种克百威的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法。检测方法包括将克百威抗原包被于固相载体上、加入标样或待测样品，再加入克百威双功能基因工程抗体，反应后加入底物液进行显色，测定百分吸光度、根据克百威的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克百威的浓度等步骤；本发明同时公开了实现所述检测方法的试剂盒及试剂盒的制备方法。本发明采用克百威双功能基因工程抗体与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，且降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。



1、一种克百威的酶联免疫检测方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 将克百威抗原包被于固相载体上；

(2) 加入标样或待测样品，再加入克百威双功能基因工程抗体反应；

(3) 加入底物液进行显色加以测定百分吸光度值；根据标准曲线，和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克百威的浓度。

2、根据权利要求 1 所述克百威的酶联免疫检测方法，其特征在于步骤 (1) 所述固相载体为酶标板，包被有能与克百威双功能基因工程抗体特异结合的克百威抗原，并封闭微孔表面未吸附位点；步骤 (2) 所述克百威双功能基因工程抗体为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶克百威双功能基因工程抗体，基因工程抗体为 Fab、Fv、ScFv 或单域抗体。

3、根据权利要求 1 或 2 所述克百威的酶联免疫检测方法，其特征在于当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、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；当酶为碱性磷酸酯酶时，底物液为 pH9.8 的 4-硝基酚磷酸钠盐 (PNPP) 二乙醇胺溶液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

4、一种实现权利要求 1 所述克百威的酶联免疫检测方法的试剂盒，其特征在于由以下部分组成：

- (1) 试剂盒盒体;
- (2) 包被克百威抗原的酶标板, 1 块;
- (3) 克百威双功能基因工程抗体工作液, 1 瓶;
- (4) 克百威标准品溶液, 共 6 瓶;
- (5) 底物液, 1 瓶;
- (6) 底物缓冲液, 1 瓶;
- (7) 终止液, 1 瓶;
- (8) 浓缩洗涤液, 1 瓶;
- (9) 使用说明书, 1 份;
- (10) 盖板膜, 2 张;
- (11) 含干燥剂的自封袋, 1 个。

5、根据权利要求 4 所述的试剂盒, 其特征在于所述盒体为硬纸盒; 所述酶标板是 96 孔或 40 孔的聚苯乙烯酶标板, 放于铝铂袋内; 所述盖板膜采用不透明塑料贴纸; 标准溶液、克百威双功能基因工程抗体、底物液、底物缓冲液、终止液和浓缩洗涤液分别采用不同颜色盖的透明塑料瓶分装; 所述试剂盒盒内设有内垫, 内垫设下凹瓶位, 采用塑料泡沫材料。

6、根据权利要求 4 所述的试剂盒, 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 pH 值为 7.4, 浓度为 0.1mol/L; 所述 6 瓶克百威标准品溶液浓度分别为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L 和 8.1 μ g/L; 所述 6 瓶克百威标准品溶液每瓶 1mL; 所述克百威双功能基因工程抗体工作液体积为

7mL, 底物液体积为 7mL, 底物缓冲液体积为 7mL, 终止液体积为 7mL, 浓缩洗涤液体积为 50mL。

7、一种权利要求 4 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

- (1) 制备克百威双功能基因工程抗体;
- (2) 制备包被克百威抗原的酶标板;
- (3) 按要求配制所需溶液并分装;
- (4) 组装试剂盒。

8、根据权利要求 7 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于步骤(1)所述制备克百威双功能基因工程抗体包括以下步骤:

(a) 提取克百威单克隆细胞或经克百威免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA, 反转录为 cDNA, 设计抗体轻重链与连接肽的扩增引物, 利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因并将其连接起来, 将其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;

(b) 以重组噬菌体阳性克隆质粒为模板, PCR 扩增抗克百威基因工程抗体片段; 经酶切, 纯化, 亚克隆到携带辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 AP 基因的载体 pPhoA(+), 转化大肠杆菌, 抗性筛选, 获得重组大肠杆菌阳性克隆; 诱导双功能基因抗体的表达得到克百威双功能基因工程抗体。

9、根据权利要求 8 所述其特征在于试剂盒的制备方法, 其特征在于步骤(a)所述扩增引物为:

$V_H(\text{Back}):5'-\text{TTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCCAGGTS}$
 $\text{MARCTGCAGSAGTCWGG}-3'$;

$V_H(\text{For}):5'-\text{GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGTCCACCTG}$
 $\text{AGGAGACGGTGAC CGTGGTGCC}-3'$;

$V_L(\text{Back}):5'-\text{TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCG}$
 $\text{GACATTGAG CTC ACC CAG TCTCCA}-3'$;

$V_L(\text{For}):5'-\text{GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCAGCT}$
 $\text{TGGTCCC}-3'$;

$R_1: 5'-\text{CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC}-3'$;

$R_2: 5'-\text{CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC}-3'$;

其中引物 $V_H(\text{Back})$ 含 Sfi I 酶切位点, $V_H(\text{For})$ 含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽部分序列; $V_L(\text{For})$ 含 Not I 酶切位点, $V_L(\text{Back})$ 含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 $V_H(\text{For})$ 部分序列相重叠, R_1 , R_2 为载体特异性引物, 用于插入片段的 PCR 鉴定。

10、根据权利要求 7 所述其特征在于试剂盒的制备方法, 其特征在于步骤 (2) 所述制备包被克百威抗原的酶标板的方法是用包被缓冲液将克百威抗原按需要稀释, 向酶联板微孔中加入抗原稀释液; 放入 37°C 环境进行孵育; 放入 4°C 环境中过夜孵育; 倾去包被液, 用洗涤液洗涤后在每孔中加入封闭液, 37°C 孵育; 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

一种克百威的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明属于检测技术领域，具体涉及一种检测克百威残留的双功能基因工程抗体免疫检测方法和实现所述方法的试剂盒以及试剂盒的制备方法。

背景技术

克百威 (carbofuran, 化学名 2,3 二氢-2,2 二甲基-7-苯并呋喃基-N-甲基氨基甲酸酯), 商品名呋喃丹, 自 1969 年由 FMC 公司和 Mobay 化学公司开发生产后即作为一种高效、广谱的杀虫剂, 广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治。克百威是一种胆碱酯酶抑制剂, 对人和野生动物具有很高的毒性 (小鼠经口 LD_{50} 为 8mg/kg), 是蔬菜农药残留规定中不得检出的一种, 但由于杀虫效果较好, 目前在粮食和蔬菜上存在不合理使用的现象比较严重, 对公众健康具有较大的危害。另外, 克百威在酸性土壤中不易降解, 极易污染土壤和地下水源, 容易造成环境污染。因此, 除加强克百威的使用管理, 从源头控制的同时, 还应加强对其的检测与监管, 防止其进入食物链中。

目前, 检测克百威残留的常规方法有气相色谱法 (GC) 和高效液相色谱法 (HPLC), 这些方法虽然灵敏精确, 但需要昂贵的专业仪器, 分析费时, 成本较高。而酶联免疫分析 (ELISA) 快速检测技术因成本低、操作简单、速度快、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。

酶联免疫分析技术的基本原理就是利用酶标记的抗原或抗体之间的反应，通过酶作用底物的显色以对抗体或抗原进行分析。显然，在对抗原分子检测时，抗体本身以及酶标抗体的质量是保证该检测手段实施的关键。在以往对克百威的免疫法检测中，采用的是多克隆抗体或单克隆抗体。多抗较易获得但特异性不高，有研究者已报道抗克百威多克隆抗体中因存在不同IgG亚型，从而对克百威及载体蛋白BSA表现出不同的绑定能力。而单克隆抗体则不存在该问题，但值得注意的是，采用杂交瘤细胞培养进行单克隆抗体（McAb）周期长、产量低（产量平均只有10~100mg/L）。另外，无论是多克隆抗体还是单克隆抗体，在采用酶联免疫分析时都要对其进行酶的体外标记过程，将不可避免地存在以下缺点：1）化学共价交联过程对酶和抗体造成一定的变性，从而影响活性；2）酶标抗体批次产物的不均一性导致在使用前需对其进行校正；3）酶与抗体偶联前后产物都需要进行纯化，步骤繁琐。目前，我国自行生产的ELISA试剂盒在灵敏度及数量上都无法满足实际需要，仅深圳市每年进口克百威ELISA试剂盒一项费用达几百万元。由于试剂盒价格高，每个样品检测成本在几十元以上。因此，建立有效、实际的抗体及酶标抗体获得方法是进一步实现克百威快速检测需要解决的核心问题。

重组抗体技术引发了免疫检测技术的革命，尤其是噬菌体表面呈现技术的出现，使获得具有理想抗原亲和性及特异性的基因工程抗体成为可能。其优点在于能够将全套抗体可变区基因组装到表达载体内形成噬菌体抗体库，通过“吸附-洗脱-扩增”的富集过程，极为有效地

从噬菌体抗体库中筛选出特异性抗体的可变区基因,便于进一步的基因操作。基于此的双功能基因工程抗体,就是指在DNA水平上把一种抗体片段的基因与其他功能分子如酶等的基因片段通过重组进行融合表达的抗体分子复合蛋白。该抗体不仅具有基因工程抗体分子量小,特异性高的特点,而且保持了酶特异性结合底物的活性;更值得注意的是,双功能基因工程抗体能够在各种表达系统中表达,并且可通过基因工程技术进行大量生产,对培养基无特殊要求,发酵密度高、发酵周期短、操作简便,整体费用较低,这就为双功能基因工程抗体在各相关领域中的实际应用从根本上提供了保障。但目前尚没有见到利用上述方法进行克百威检测的相关报道。

因此,本申请人在申请号为 200610122594.9 的专利申请中公开了一种检测克百威的酶联免疫分析方法,但并没有应用双功能基因工程抗体技术,本申请人期望利用噬菌体表面呈现技术获得抗克百威抗体基因,通过重组构建抗克百威双功能基因工程抗体表达载体,采用分子生物学、细胞生物学与生物分离相结合的方法,实现抗克百威双功能基因工程抗体在大肠杆菌中的高效表达及分离纯化,并将其替代体外酶标多克隆/单克隆抗体用于酶免疫法分析克百威。本发明的检测方法为酶免疫检测技术进一步应用于小分子农、兽药残留的快速检测提供一种新途径,如果能进一步基于本发明所述克百威检测方法制备得到相应的检测用试剂盒,将具有重要的应用意义。

发明内容

本发明的一个目的是针对现有技术的不足,提供一种高特异性、

高灵敏度、价格低廉、操作简单，能大批量快速检测克百威的双功能基因工程抗体免疫检测方法。

本发明的另一个目的是提供实现所述方法的试剂盒，以及所述试剂盒的制备方法。

本发明的目的通过以下技术方案来予以实现：

提供一种克百威的双功能基因工程抗体免疫检测方法，包括以下步骤：

- (1) 将克百威抗原包被于固相载体上；
- (2) 加入标样或待测样品，再加入克百威双功能基因工程抗体反应；
- (3) 加入底物液进行显色加以测定百分吸光度值；根据标准曲线，和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克百威的浓度。

可以作为固定克百威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，步骤

(1) 所述固相载体酶标板可采用 96 孔或 40 孔，优选 96 孔的聚苯乙烯酶标板，包被有能与克百威双功能基因工程抗体特异结合的克百威抗原，并封闭微孔表面未吸附位点；所用的包被液为 pH 值为 9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液，碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠，双蒸水 1L，封闭液为 1~5% 脱脂奶粉溶液。

步骤 (2) 所述克百威双功能基因工程抗体为利用基因工程方法制备的辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶克百威基因工程抗体，抗体可为

Fab（由完整的轻链和 **Fd** 构成）、**Fv**（由 **V_H** 和 **V_L** 构成），**scFv**（单链抗体，**V_H** 和 **V_L** 之间由一条连接肽连接而成）、单域抗体（仅由 **V_H** 组成），大量表达，收集发酵液，用亲和层析方法进行纯化。

当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（**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；当酶为碱性磷酸酯酶时，底物液为 **pH9.8** 的 4-硝基酚磷酸钠盐（**PNPP**）二乙醇胺溶液，终止液为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

本发明测定原理如下：首先将克百威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，再加入克百威双功能基因工程抗体，包括辣根过氧化物酶 **HRP** 或碱性磷酸酶 **AP** 基因工程抗体，包被抗原与待测样品中的克百威竞争双功能基因工程抗体，待测样品克百威含量高时，则与固相抗原结合的双功能基因工程抗体就少，反之结合在固相抗原上的双功能基因工程抗体就多，反应后加入底物进行显色加以测定，当双功能基因工程抗体量一定时，加入的待测样品含克百威越多，与固相抗原结合的双功能基因工程抗体就越少，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克百威浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线，再根据克百威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克百威的浓度。

本发明同时提供一种实现所述克百威的双功能基因工程抗体免

疫检测方法的试剂盒，由以下部分组成：

- (1) 试剂盒箱体；
- (2) 包被克百威抗原的酶标板，1 块；
- (3) 克百威双功能基因工程抗体工作液，1 瓶；
- (4) 克百威标准品溶液，共 6 瓶；
- (5) 底物液，1 瓶；
- (6) 底物缓冲液，1 瓶；
- (7) 终止液，1 瓶；
- (8) 浓缩洗涤液，1 瓶；
- (9) 使用说明书，1 份；
- (10) 盖板膜，2 张；
- (11) 含干燥剂的自封袋，1 个。

所述箱体为硬纸盒；所述酶标板放于铝铂袋内；所述盖板膜采用不透明塑料贴纸；标准溶液、克百威双功能基因工程抗体、底物液、底物缓冲液、终止液和浓缩洗涤液分别采用不同颜色盖的透明塑料瓶分装，例如标准溶液均用红色盖的透明塑料瓶，克百威双功能基因工程抗体用绿色盖的透明塑料瓶，底物液用黑色盖透明塑料瓶，底物缓冲液用白色盖透明塑料瓶，终止液用黄色盖透明塑料瓶，浓缩洗涤液用白色透明盖透明塑料瓶；试剂盒内垫设有下凹瓶位，内垫采用塑料泡沫材料。

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 pH 值为 7.4，浓度为 0.1mol/L，为常规使用浓度的 15~25 倍；

所述 6 瓶克百威标准品溶液浓度分别为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L 和 8.1 μ g/L；所述 6 瓶克百威标准品溶液每瓶 1mL；所述克百威双功能基因工程抗体工作液体积为 7mL，底物液体积为 7mL，底物缓冲液体积为 7mL，终止液体积为 7mL，浓缩洗涤液体积为 50mL。

本发明还提供了所述试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

- (1) 制备克百威双功能基因工程抗体；
- (2) 制备包被克百威抗原的酶标板；
- (3) 按要求配制所需溶液并分装；
- (4) 组装试剂盒。

步骤 (1) 所述制备克百威双功能基因工程抗体包括以下步骤：

(a) 提取克百威单克隆细胞或经克百威免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链与连接肽的扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因并将其连接起来，将其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；

(b) 以重组噬菌体阳性克隆质粒为模板，PCR 扩增抗克百威基因工程抗体片段；经酶切，纯化，亚克隆到携带辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 AP 基因的载体 pPhoA(+), 转化大肠杆菌，抗性筛选，获得重组大肠杆菌阳性克隆；诱导双功能基因抗体的表达得到克百威双功能基因工程抗体。

步骤 (a) 所述扩增引物为：

V_H(Back):5'-TTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCCAGGTS
MARCTGCAGSAGTCWGG-3';

V_H(For):5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGTCCACCTG
AGGAGACGGTGAC CGTGGTGCC-3';

V_L(Back):5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCG
GACATTGAG CTC ACC CAG TCTCCA-3';

V_L(For):5'-GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCCAGCT
TGGTCCC-3';

R1: 5'-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3';

R2: 5'-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC-3';

其中引物 V_H(Back)含 Sfi I 酶切位点, V_H(For)含(Gly₄Ser)₃ 连接肽部分序列; V_L(For)含 Not I 酶切位点, V_L(Back)含(Gly₄Ser)₃ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 V_H(For)部分序列相重叠, R1, R2 为载体特异性引物, 用于插入片段的 PCR 鉴定。

步骤(2)所述制备包被克百威抗原的酶标板的方法是用包被缓冲液将克百威抗原按需要稀释, 向酶联板微孔中加入抗原稀释液; 放入 37℃ 环境进行孵育; 放入 4℃ 环境中过夜孵育; 倾去包被液, 用洗涤液洗涤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。

本试剂盒最低检测限为 0.1ng/mL, 回收率为 95±15%, 批内变异系数小于 10%, 同呋喃酚、异丙威、丁硫克百威、灭多威等结构类似物的交叉反应均小于 0.01%, 试剂盒可以在 2~8℃ 保存 12 个月。

本发明具有以下有益效果：

1、提供了一种新的克百威残留的检测方法，避免传统化学共价交联过程对酶和抗体造成的变性，可以很好保持两者的活性；避免了酶标抗体批次产物的不均一性导致的批间差异；减少了酶与抗体偶联前后产物纯化的步骤；

2、本发明提供采用基因工程抗体的试剂盒，成本极低，采用直接竞争 ELISA 检测模式，减少了操作步骤，提高了检测的灵敏度、准确度；

3、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，从而提高了检测方法检测的精密度与稳定性。

基于以上优点本试剂盒非常适用于克百威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

图 2 试剂盒的直观示意图

图 3 试剂盒的外观示意图

图 4 酶标板

图 5 试剂瓶

图 6 试剂盒内垫下凹瓶位示意图

图 7 试剂盒附件

具体实施方式

实施例1 克百威双功能基因工程抗体的制备

设计简并引物:

V_H(Back):5'-TTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCCAGGTS
MARCTGCAGSAGTCWGG-3'

V_H(For):5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGTCCACCTG
AGGAGACGGTGAC CGTGGTGCC-3'

V_L(Back):5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCG
GACATTGAG CTC ACC CAG TCTCCA-3'

V_L(For):5'-GAGTCATTCTGCGGCCGCCCCGTTTTATTTCAGCT
TGGTCCC-3'

R1: 5'-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3'

R2: 5'-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC-3'

其中引物 V_H(Back)含 Sfi I 酶切位点, V_H(For)含(Gly₄Ser)₃ 连接肽部分序列; V_L(For)含 Not I 酶切位点, V_L(Back)含(Gly₄Ser)₃ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 V_H(For)部分序列相重叠。R1, R2 为载体特异性引物, 用于插入片段的 PCR 鉴定。

以合成的克百威人工抗原对动物进行了免疫, 检测血清效价滴度达到要求; 取致敏动物脾脏, 提取总 RNA, 利用设计的简并引物经 RT-PCR 成功扩增免疫小鼠的全套轻、重链可变区基因, 轻链的扩增条件为: 94 °C×5 min 变性, 加入 1 μL 高保真 Pfu 酶 (2.5U), 进行以下循环: 94 °C×30 s, 54 °C×1 min, 72 °C×1 min, 共 25 个循环, 最后 72 °C延伸 10 min。重链的扩增条件为: 94 °C×5 min 变性, 加入

1 μL 高保真 Pfu 酶 (2.5U), 进行以下循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}\times 30\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}\times 1\text{ min}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\times 1\text{ min}$, 共 30 个循环, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。V_H 基因片段大小约为 350 bp, V_L 基因片段大小为 320bp。以扩增出的 V_H、V_L 片段互为模板, 采用含 (Gly₄Ser)₃ 连接肽的接头引物, 重叠延伸 PCR 法合成抗体基因片段, 并采用两条含 Bgl I 及 Not I 酶切位点的上下游引物对基因工程抗体进行二次 PCR 扩增, 条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}\times 5\text{ min}$ 预变性, 加 0.5 μL 高保真 Pfu 酶, 进行以下循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}\times 45\text{ s}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}\times 1\text{ min}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}\times 1\text{ min}$, 共 30 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 得到 760 bp 的全长抗体基因片段。将抗体片段用 Bgl I 及 Not I 双酶切后, 与载体 pCANTAB5E 连接, 转化大肠杆菌 TG1, 用辅助噬菌体 M₁₃KO₇ 进行超感染, 构建噬菌体单链抗体库。抗体库库容约为 1.6×10^4 。采用固相抗原法, 以克百威包被抗原包被酶标板, 对噬菌体抗体库进行亲和富集, 经 ELISA 筛选出 15 个阳性重组噬菌体克隆。

将筛选出具有抗体活性的阳性克隆提取质粒, 将质粒用 Bgl I 及 Not I 双酶切后与经相同酶切的载体 pPhoA(+)连接, 连接产物转化大肠杆菌抗性筛选阳性克隆, 并经过酶切、PCR 鉴定。从上面鉴定为阳性的克隆中提取质粒 DNA, 转化琥珀终止非抑制型大肠杆菌 HB2151, IPTG 诱导抗克百威单链双功能抗体进行可溶性表达。采用渗透休克法提取了菌体细胞周质腔中的可溶性单链双功能抗体, 并对培养上清及周质腔提取物中表达的抗体进行 SDS-PAGE, Western-Blotting 及 ELISA 鉴定, 并采用常规方法利用亲和层析对其进行纯化。

实施例2 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 (pH7.4, 0.1mol/L)，为现有常规方法使用浓度的 15~25 倍。

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

(3) 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-柠檬酸缓冲液采用 0.2M Na_2HPO_4 25.7mL、0.1M 柠檬酸 24.3mL、加蒸馏水 50mL 配制而成。

(4) 底物液的配制：当酶为辣根过氧化物酶 (HRP) 时底物液是将 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。所述的磷酸-柠檬酸缓冲液采用 0.2M Na_2HPO_4 25.7mL、0.1M 柠檬酸 24.3mL、加蒸馏水 50mL 配制而成。当酶为碱性磷酸酶 (AP) 时底物液是将 4-硝基酚磷酸钠盐 (PNPP) 100 mg 溶解于 100 mL pH9.8 的二乙醇胺缓冲液中，4℃ 保存。二乙醇胺缓冲液采用二乙醇胺 97 mL、叠氮钠 0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中，用浓盐酸调节 pH 值至 9.8，并储存于 4℃。

(5) 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，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。碳酸盐缓冲溶液采用 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠溶于双蒸水 1L 配制而成。

(6) 克百威标准溶液的配制：准确称取克百威标样 8.1mg，溶

于 0.1L 缓冲液中，然后用缓冲液稀释分别配制 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 克百威溶液，另外缓冲液配制 0 μ g/L 对照样，4℃保存。

(7) 试剂分装：各种试剂按要求配制，测定合格后无菌分装。克百威双功能基因工程抗体工作液 7mL/瓶，克百威标准样品 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，浓缩样品稀释液 50mL/瓶。分装后贴标签，注明批号和有效期，4℃保存。

(8) 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，克百威双功能基因工程抗体工作液、底物液、底物缓冲液、终止液、浓缩洗液、浓缩样品稀释液各 1 瓶，克百威标准溶液 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。试剂盒结构示意图见附图 2～附图 7 所示，实施例 3 同时提供了一个具体的试剂盒的组装实施方案。

实施例 3 检测克百威的酶联免疫试剂盒的组建

如附图 2 所示，组建的一个检测克百威的酶联免疫试剂盒，其可以包含下述组分：

- (1) 试剂盒盒体，可采用硬纸盒；
- (2) 包被克百威抗原的酶标板，96 孔；
- (3) 克百威双功能基因工程抗体工作液，7mL/瓶；
- (4) 克百威标准品溶液 6 瓶，浓度分别为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L、8.1 μ g/L，1mL/瓶；

- (5) 底物液, 7mL/瓶;
- (6) 底物缓冲液, 7mL/瓶;
- (7) 终止液, 7mL/瓶;
- (8) 浓缩洗涤液, 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。

附图 2 中, 1: 克百威标准溶液; 2: 克百威双功能基因工程抗体工作液; 3: 包被了克百威抗原的酶标板; 4: 使用说明书; 5: 20 倍浓缩洗涤液; 6: 底物缓冲液; 7: 底物液; 8: 终止液; 9: 自封袋; 10: 盖板膜; 附图 3 中, 11: 铝箔袋; 附图 4 中 12: 96 孔酶标板板框; 13: 96 孔可拆酶标条; 附图 5 中 14: 20 倍浓缩洗涤液 (透明白盖); 15: 酶标记物 (绿盖); 16: 底物液 (黑盖); 17: 底物缓冲液 (白盖); 18: 终止液 (黄盖); 19: 标准溶液 (6 瓶红盖); 附图 6 中 20: 标准品凹孔; 21: 终止液凹孔; 22: 底物液凹孔; 23: 底物缓冲液凹孔; 24: 酶标记物凹孔; 25: 20 倍浓缩液凹孔; 26: 外包装纸盒; 附图 7 中 27: 盖板膜 (2 个); 28: 自封袋 (带干燥剂); 29: 说明书。

实施例 4 利用试剂盒检测克百威的实验

一、样品前处理

水样: 过滤后即可取样进行 ELISA 分析。

土样: 取 10g 土壤用 20~40mL 甲醇提取三次, 合并提取液, 浓

缩，然后用 PBST 稀释定容至 10mL，进行 ELISA 分析。

蔬菜样品：取蔬菜样品用粉碎机绞碎后称取 10g，20~40mL 甲醇提取三次，合并提取液，浓缩，用 PBST 定容至 10mL，取样进行 ELISA 分析。

血液：取人体血液，加抗凝素后直接用 ELISA 法进行分析。

洗胃液（2%碳酸氢钠溶液）：取 10mL 洗胃液，用稀 HCl 调 PH 值到中性后即可用 ELISA 法进行分析。

呕吐物：取样品研碎，离心取上清用 ELISA 法进行分析。

二、检测方法

（1）将试剂盒从冷藏环境中取出，置于室温（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 50μL 标准品，样品孔加入 50μL 待测样品。然后每孔加入 50μL 双功能抗体，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，可每轮洗板拍打 3 次，以保证完全除去孔中的液体。用 250μL 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 100μL 显色液，轻拍混匀，盖上盖板膜，暗处室温孵育 15min。

（5）加入 50μL 反应终止液到微孔中。混合好在波长 450nm，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。

三、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，克百威标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，见附图 1，求出直线方程为 $y=-13.959x+84.352$ 。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克百威浓度。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，**B₀** 为 0μg/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，对克百威线性检测范围为 0.1~8.1μg/L，检测限为 0.1μg/L，整个检测过程只需 35min 就可以完成。

实施例 5 试剂盒精密度与准确度试验

1、标准品溶液重复性实验

从 3 批按照实施例 2（6）中的方法制备的酶标板中，各抽出 20 个微孔，测定 0.9μg/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 μg/L	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.9	4.8	4.5	4.1	8.5

结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 4.1~4.8% 之间，批间变异系数为 8.5%。

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。在空白水样、蔬菜中，将克百威添加至终浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)、5 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)，在空白土壤中，将克百威添加至终浓度为 50 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$ ，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 $\mu\text{g/L}$	含量	第 1 批 回收率 %	CV%	含量	第 2 批 回收率 %	CV%	含量	第 3 批 回收率 %	CV%	批间 CV%
水样	1	0.902	90.2	3.9	0.91	91.0	4.5	0.875	87.5	4.2	11.8
	5	4.035	80.7	7.6	4.155	83.1	6.9	4.325	86.5	6.1	12.6
蔬菜	1	1.034	103.4	6.4	0.837	83.7	7.1	0.812	81.2	3.8	14.9
	5	4.16	83.2	4.9	4.675	93.5	3.4	4.795	95.9	4.7	12.3
土样	50	40.15	80.3	3.9	44.55	89.1	8.2	45.70	91.4	7.7	10.9
	100	81.4	81.4	3.8	89.7	89.7	6.7	82.4	82.4	4.1	13.1

结果表明尿样、猪肝、饲料样本的添加回收率在 80.3~103.4% 之间，批内变异系数在 3.4~8.2% 之间，批间变异系数在 10.9~14.9% 之间。

实施例 6 试剂盒保存期试验

(1) 将试剂盒放置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ ，分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒，对克百威标准样品 (0.1 $\mu\text{g/L}$) 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，每天对克百威标准样品 (0.1μg/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，每天对克百威标准样品 (0.1μg/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，克百威标准样品 (0.1μg/L) 的吸光度值下降小于 5%，且 OD 不低于 1.5；50%抑制率在 0.6~1.2μg/L 之间；添加回收率在 80~110%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。

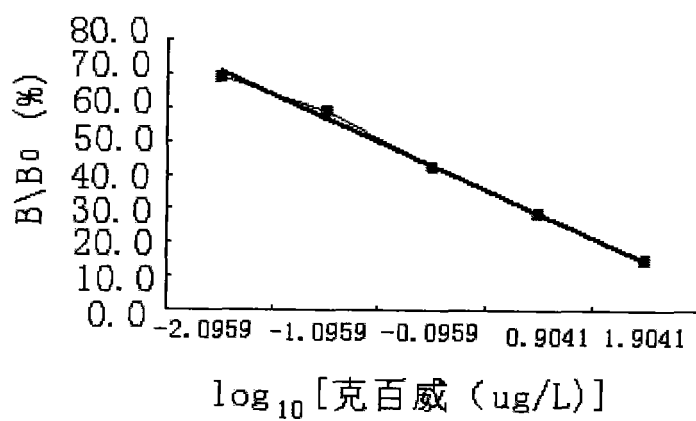


图 1

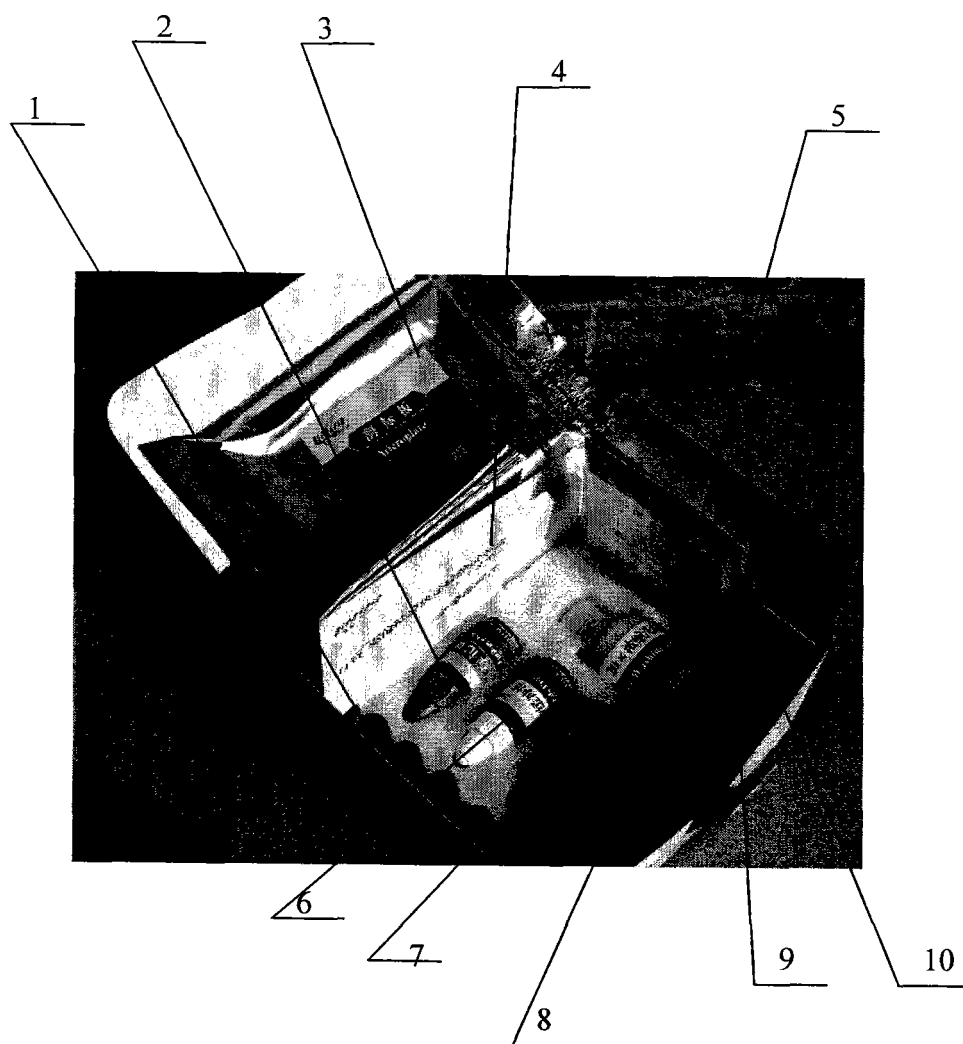


图 2

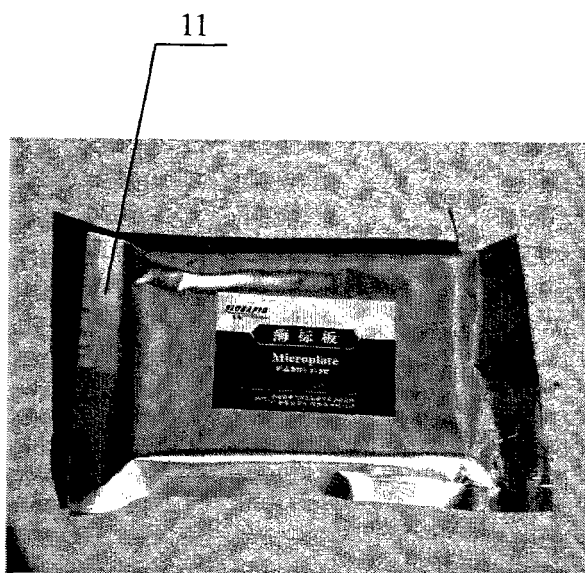


图 3

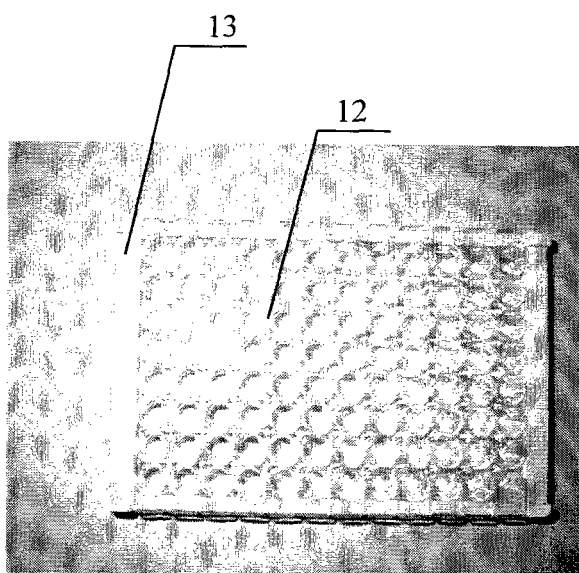


图 4

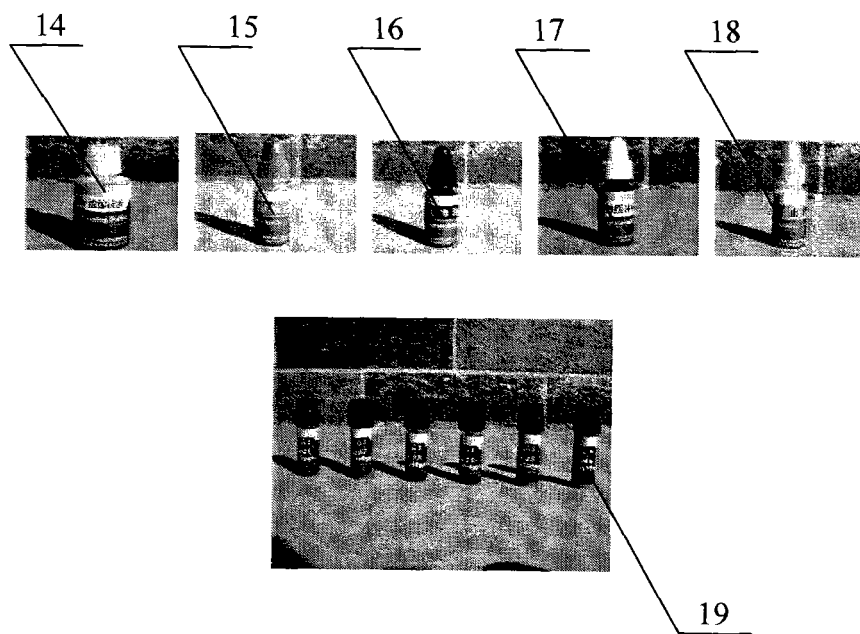


图 5

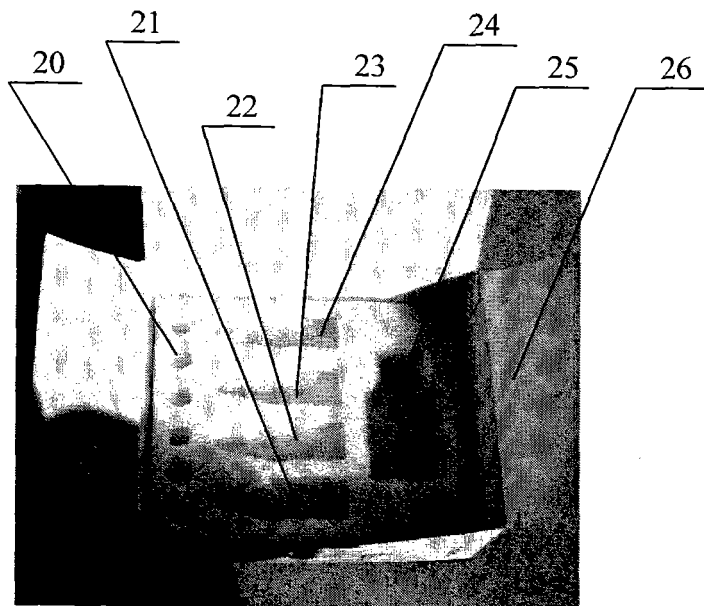


图 6

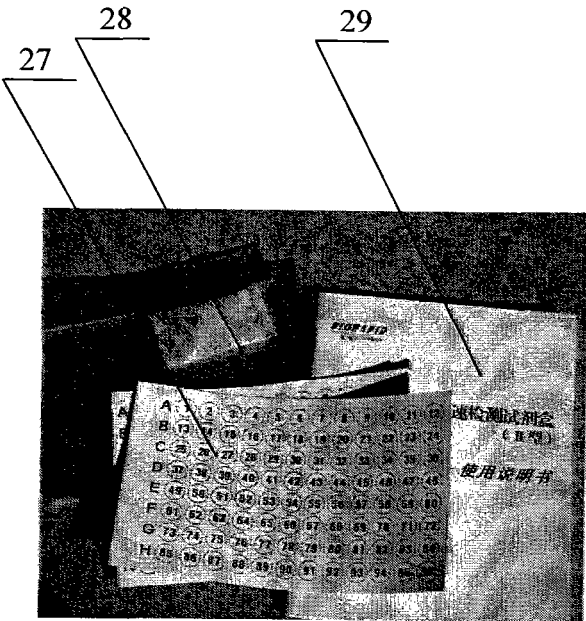


图 7

专利名称(译)	一种克百威的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101290316A	公开(公告)日	2008-10-22
申请号	CN200810028633.8	申请日	2008-06-06
[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 王弘 吴青 雷红涛 沈玉栋 肖治理 柳春红 刘细霞		
发明人	孙远明 杨金易 王弘 吴青 雷红涛 沈玉栋 肖治理 柳春红 刘细霞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/25 G01N33/543		
代理人(译)	林丽明 任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种克百威的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法。检测方法包括将克百威抗原包被于固相载体上、加入标样或待测样品，再加入克百威双功能基因工程抗体，反应后加入底物液进行显色，测定百分吸光度、根据克百威的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克百威的浓度等步骤；本发明同时公开了实现所述检测方法的试剂盒及试剂盒的制备方法。本发明采用克百威双功能基因工程抗体与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，且降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。

