



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101936985 A

(43) 申请公布日 2011.01.05

(21) 申请号 201010244284.0

C12R 1/91 (2006.01)

(22) 申请日 2010.08.03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3775 2010.04.12

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王战辉 沈建忠 张素霞 史为民
吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

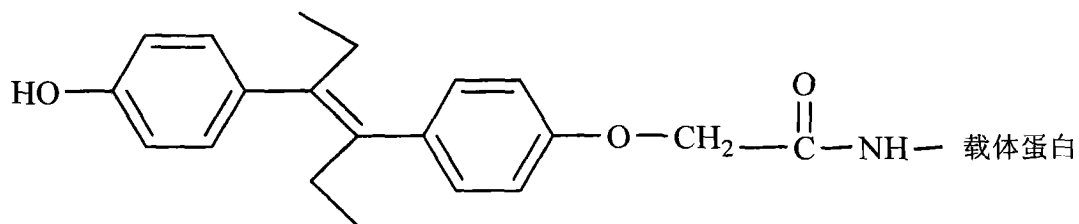
(54) 发明名称

一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。本发明所提供的检测己烯雌酚的化学发光免疫试剂盒,包括己烯雌酚特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示。本发明的检测方法,具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点,能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测己烯雌酚的化学发光免疫试剂盒,包括己烯雌酚特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示:



(式 I)。

2. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗抗体;

所述试剂盒由己烯雌酚特异性抗体、包被原、标准品溶液、发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗抗体组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述己烯雌酚特异性抗体为己烯雌酚单克隆抗体或己烯雌酚多克隆抗体;

所述己烯雌酚单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3775 的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES 分泌的抗体。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $5 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 或 $50 \mu\text{g/L}$,所述标准品为己烯雌酚;

所述发光液由 C 液和 D 液组成,发光液 C 液为过氧化氢;发光液 D 液为鲁米诺溶液;

所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮钠防腐剂和 100mL 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液;

所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液;

所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液;

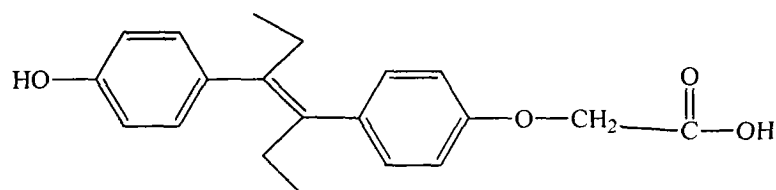
所述封闭液是将 0.01g 叠氮化钠、10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L、pH 值为 7.4 磷酸盐溶液混合得到的溶液。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述包被原是按照如下方法制备得到的:a、将每 18mg 己烯雌酚半抗原、2.5mL 二甲基甲酰胺、 $15 \mu\text{L}$ 三正丁胺和 $9 \mu\text{L}$ 氯甲酸异丁酯混合反应 30min,得到的产物溶液称为 A 液;将每 15mg 载体蛋白溶于 1mL 50%的二甲基甲酰胺水溶液(体积百分含量)中,调节 pH 至 9,得到的产物溶液称为 B 液;

b、将 A 液加入到 B 液, 4°C 反应 4h 后,再经过透析得到包被原;

所述己烯雌酚半抗原的结构式如式 II 所示:



(式 II)。

6. 根据权利要求 1-5 任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述己烯雌酚半抗原是按照如下方法制备得到的:

I、先将每 110mg 己烯雌酚、200mg 无水碳酸钠、50 μ L 4-溴丁酸乙酯和 5mL 丙酮混合得到混合物,II、将步骤 I 得到的混合物进行 60 $^{\circ}$ C 回流提取 4h,抽干反应液,得到残留物,III、再将步骤 II 得到的残留物溶解于 5mL 甲醇-氢氧化钾混合液后进行 80 $^{\circ}$ C 回流提取 1h,抽干反应液,再次得到残留物,IV、向步骤 III 得到的残留物中加入 8mL 水得到混合液,调节 pH 为 3,离心收集沉淀;V、向步骤 IV 的沉淀加入 5mL 氯仿抽提,将有机相用硫酸钠干燥得到残留物;VI、将步骤 V 得到的残留物溶于沸氯仿,再加入石油醚重结晶,干燥后得到的产物即为己烯雌酚半抗原;所述甲醇-氢氧化钾液为将 88mg 氢氧化钾溶解于 5mL 甲醇得到的溶液。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白,优选为卵清蛋白;

所述酶标记抗抗体为酶标记羊抗鼠抗抗体。

8. 一种检测己烯雌酚的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

将每 2g 动物组织匀浆与 10mL 乙腈-丙酮溶液混匀 1min,以 3000g 转速离心 5min,取上清液;将每 2mL 所述上清液用氮气干燥,再加入 1mL 复溶液溶解,再向其中加入 1mL 正己烷混合,3000g 离心 5min,取下层溶液稀释 5 倍即为待测样本溶液;所述乙腈-丙酮溶液为将乙腈和丙酮按体积比为 80 : 20 混合获得;所述动物组织为猪肉或鸡肉;所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的;

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的检测己烯雌酚的化学发光免疫试剂盒检测步骤 1) 中的样本溶液。

9. 由保藏号为 CGMCC No. 3775 的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES 分泌的己烯雌酚单克隆抗体。

10. 保藏号为 CGMCC No. 3775 的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES。

一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 目前动物性食品安全已成为全世界关注的焦点,其中兽药残留问题是影响动物性食品安全的最主要因素之一,由于动物样本成分复杂,待测物浓度较低,而且大多数取样量很少,这就对分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。化学发光免疫分析(Chemiluminescence analysis, CLIA) 技术将高灵敏的化学发光技术与高特异性的免疫反应结合起来,具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、不需要十分昂贵的仪器设备等特点。CLIA 不需要外来光源,具有比荧光免疫分析更高的信噪比,比常规的酶联免疫吸附检测方法的抗背景干扰能力强,其灵敏度比 ELISA 高 1 至 2 个数量级,检测范围可达 6 个数量级,自动化程度高,提高了分析方法的精密度,CLIA 已经成为一种先进的痕量或超痕量物质的检测技术。CLIA 在兽医学、医学、食品分析等方面将会有更广阔的应用前景。

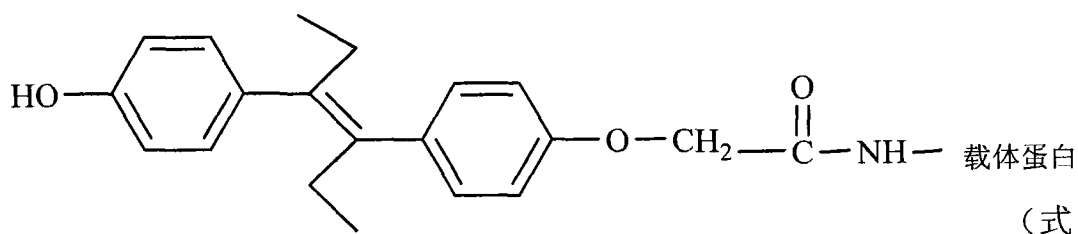
[0003] 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES) 是一种人工合成的雌激素,因其能促进蛋白合成,加快增重和骨骼钙化,并减少饲料消耗,被作为动物促生长剂应用于畜禽生产和水产养殖等方面。但许多科学试验证实了己烯雌酚是一种致癌物质,并具有以生殖毒性为主的严重毒副作用对人和动物的健康危害较大,现在欧美、中国等许多国家已禁止将其用于动物饲料中,但在畜牧生产上的常有非法应用的情况,导致其在畜禽产品中残留,危害公众健康。目前,动物组织中己烯雌酚残留的检测方法主要采用气相色谱法、液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-联质谱法、酶联免疫法等。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测己烯雌酚的化学发光免疫试剂盒,包括己烯雌酚特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示:

[0006]



[0007] 所述试剂盒还包括发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗体;

[0008] 所述试剂盒由己烯雌酚特异性抗体、包被原、标准品溶液、发光液、浓缩洗涤液、浓

缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗抗体组成。

[0009] 所述己烯雌酚特异性抗体为己烯雌酚单克隆抗体或己烯雌酚多克隆抗体；

[0010] 所述己烯雌酚单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3775 的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES 分泌的抗体。

[0011] 所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $5 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 或 $50 \mu\text{g/L}$ ，所述标准品为己烯雌酚；

[0012] 所述发光液由 C 液和 D 液组成，发光液 C 液为过氧化氢；发光液 D 液为鲁米诺溶液；

[0013] 所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮化钠和 100mL 浓度为 0.02M 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液；

[0014] 所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液；

[0015] 所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0016] 所述封闭液是将 0.01g 叠氮化钠、 10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L 、 pH 值为 7.4 磷酸盐溶液混合得到的溶液。所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白，优选为卵清蛋白。

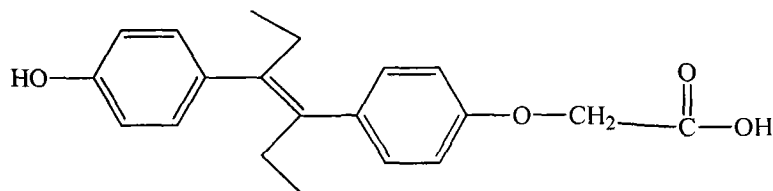
[0017] 所述酶标记抗抗体为酶标记羊抗鼠抗抗体。

[0018] 所述包被原是按照如下方法制备得到的：a、将每 18mg 己烯雌酚半抗原、 2.5mL 二甲基甲酰胺、 $15 \mu\text{L}$ 三正丁胺和 $9 \mu\text{L}$ 氯甲酸异丁酯混合反应 30min ，得到的产物溶液称为 A 液；将每 15mg 载体蛋白溶于 1mL 50% 的二甲基甲酰胺水溶液（体积百分含量）中，调节 pH 至 9 ，得到的产物溶液称为 B 液；

[0019] b、将 A 液加入到 B 液， 4°C 反应 4h 后，再经过透析得到包被原；

[0020] 所述己烯雌酚半抗原的结构式如式 II 所示：

[0021]



[0022] (式 II)。

[0023] 所述己烯雌酚半抗原是按照如下方法制备得到的：

[0024] I、先将每 110mg 己烯雌酚、 200mg 无水碳酸钠、 $50 \mu\text{L}$ 4-溴丁酸乙酯和 5mL 丙酮混合得到混合物，II、将步骤 I 得到的混合物进行 60°C 回流提取 4h ，抽干反应液，得到残留物，III、再将步骤 II 得到的残留物溶解于 5mL 甲醇-氢氧化钾混合液后进行 80°C 回流提取 1h ，抽干反应液，再次得到残留物，IV、向步骤 III 得到的残留物中加入 8mL 水得到混合液，调节 pH 为 3 ，离心收集沉淀；V、向步骤 IV 的沉淀加入 5mL 氯仿抽提，将有机相用硫酸钠干燥得到残留物；VI、将步骤 V 得到的残留物溶于沸氯仿，再加入石油醚重结晶，干燥后得到的产物即为己烯雌酚半抗原；所述甲醇-氢氧化钾液为将 88mg 氢氧化钾溶解于 5mL 甲醇得到的溶液；

[0025] 本发明的另一个目的是提供一种检测己烯雌酚的方法。

[0026] 本发明提供的方法包括以下步骤：

[0027] 1) 样品前处理：

[0028] 将每 2g 动物组织匀浆与 10mL 乙腈-丙酮溶液混匀 1min, 以 3000g 转速离心 5min, 取上清液; 将每 2mL 所述上清液用氮气干燥, 再加入 1mL 复溶液溶解, 再向其中加入 1mL 正己烷混合, 3000g 离心 5min, 取下层溶液稀释 5 倍即为待测样本溶液; 所述乙腈-丙酮溶液为将乙腈和丙酮按体积比为 80 : 20 混合获得; 所述动物组织为猪肉或鸡肉; 所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的;

[0029] 2) 利用所述的检测己烯雌酚的化学发光免疫试剂盒检测步骤 1) 中的样本溶液。

[0030] 由保藏号为 CGMCC No. 3775 的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES 分泌的己烯雌酚单克隆抗体也是本发明保护的范畴。

[0031] 保藏号为 CGMCC No. 3775 的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES 也是本发明保护的范畴该细胞株为对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES, 均于 2010 年 4 月 12 日保藏保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏编号为 CGMCC NO. 3775。

[0032] 己烯雌酚的通用名称为己烯雌酚, 化学名称为 (E)-4,4'-(1,2-二乙基-1,2-亚乙烯基) 双苯酚。

[0033] 本发明的实验证明, 本发明制备的化学发光免疫试剂盒主要采用间接竞争 CLIA 方法定性或定量检测己烯雌酚的残留量。该试剂盒的主要内容物采用了方便使用的工作液形式, 工作液保存性及稳定性好; 利用本发明试剂盒检测己烯雌酚的残留量的方法, 可用于检测动物组织如猪肉、鸡肉等样品中己烯雌酚的残留量, 具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点, 能够现场监控且适合大量样本的筛查。因此本发明检测方法及其专用试剂盒将在动物源性食品中己烯雌酚的残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0034] 图 1 为已烯雌酚标准曲线图。

具体实施方式

[0035] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0036] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0037] 下述实施例各试剂盒的检测原理如下：

[0038] 当在化学发光板微孔上预包被己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物时, 加入样本溶液或标准品溶液后, 再加入己烯雌酚抗体溶液, 样本中残留的己烯雌酚或己烯雌酚标准品与化学发光板上包被的己烯雌酚偶联抗原竞争己烯雌酚抗体, 加入酶标记抗抗体进行放大作用, 加入发光液反应, 样本发光强度值与样本中己烯雌酚的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中己烯雌酚的残留量。

[0039] 实施例 1、化学发光免疫试剂盒的制备及其检测方法

[0040] 一、化学发光免疫试剂盒组成：

[0041] (1) 包被原溶液：将包被原溶解于包被缓冲液中得到的, 其中包被原在包被原溶

液中的浓度为 $0.08 \mu\text{g/mL}$;包被原为已烯雌酚半抗原与卵清蛋白的偶联物。

[0042] (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 :

[0043] 用稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体得到的, 稀释度为 1 : 500 ;

[0044] 稀释液为 50mL 牛血清白蛋白和 950mL 磷酸盐缓冲液混合得到 ;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M, pH 值为 7.4。

[0045] 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 产品目录号为 115-035-003。

[0046] (3) 已烯雌酚标准品溶液 :将标准品溶于稀释液中得到的, 其中标准品在已烯雌酚标准品溶液的浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$, $0.5 \mu\text{g/L}$, $1 \mu\text{g/L}$, $5 \mu\text{g/L}$, $10 \mu\text{g/L}$, $50 \mu\text{g/L}$;

[0047] 已烯雌酚标准品为已烯雌酚, 购自中国药品生物制品检定所, 产品目录号为 100033-200406。

[0048] 所述稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0049] (4) 发光液 :发光液由 C 液和 D 液组成, 发光液 C 液为过氧化氢, 8mL/ 瓶, 1 瓶 ;发光液 D 液为鲁米诺溶液, 8mL/ 瓶, 1 瓶。

[0050] (5) 已烯雌酚单克隆抗体工作液 :

[0051] 将单抗溶于稀释液中得到的, 单抗与稀释液的配比为 1 : 1000 ;单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3775 的对已烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES 产生。

[0052] 稀释液为 25g 酪蛋白、0.03g 叠氮化钠和 1000mL 磷酸盐缓冲液混合得到。

[0053] (6) 浓缩洗涤液 :将 0.05g 叠氮化钠与 100mL 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到。

[0054] (7) 浓缩复溶液 :将 0.1g 牛血清白蛋白与 100mL 浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合而成。400mL/ 瓶, 1 瓶。

[0055] (8) 包被缓冲液 :pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0056] (9) 封闭液 :将 0.01g 叠氮化钠、10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐溶液混合而成。

[0057] 二、试剂盒的制备

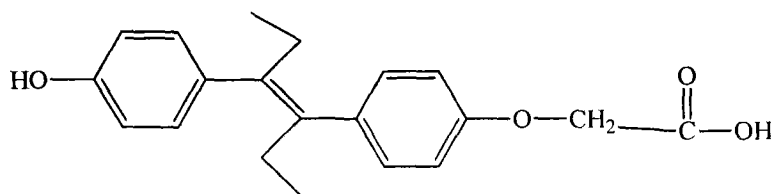
[0058] 1、化学发光板的制备 :

[0059] (1) 已烯雌酚半抗原的合成 :

[0060] I、先将 110mg 已烯雌酚 (购自中国药品生物制品检定所, 产品目录号为 100033-200406) 溶解于 5mL 丙酮, 再向其中加入 200mg 无水碳酸钠和 $50 \mu\text{L}$ 4- 溴丁酸乙酯, 得到混合物, II、将步骤 I 得到的混合物进行 60°C 回流提取 4h, 抽干反应液, 得到残留物, III、再将步骤 II 得到的残留物溶解于 5mL 甲醇 - 氢氧化钾混合液后进行 80°C 回流提取 1h, 抽干反应液, 再次得到残留物, IV、向步骤 III 得到的残留物中加入 8mL 水得到混合液, 调节 pH 为 3, 离心收集沉淀 ;V、向步骤 IV 的沉淀加入 5mL 氯仿抽提, 将有机相用硫酸钠干燥得到残留物 ;VI、将步骤 V 得到的残留物溶于沸氯仿, 再加入石油醚重结晶, 干燥后得到的产物即为已烯雌酚半抗原 ;所述甲醇 - 氢氧化钾液为将 88mg 氢氧化钾溶解于 5mL 甲醇得到的溶液 ;

[0061] 所述已烯雌酚半抗原的结构式如式 II 所示 :

[0062]



[0063] (式 II)

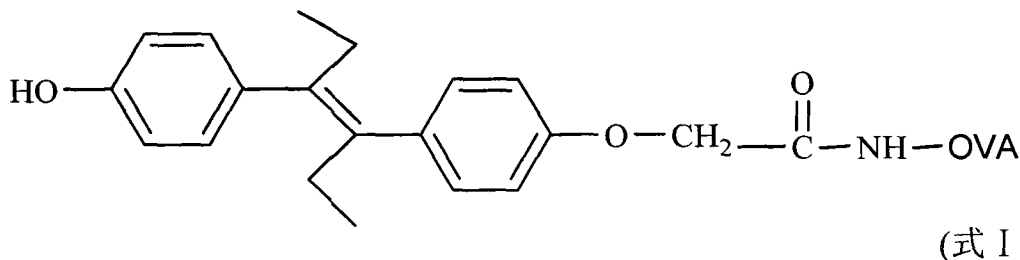
[0064] (2) 包被原的制备:采用混合酸酐法将己烯雌酚半抗原和卵清蛋白偶联得到包被原。

[0065] a、将每 18mg 己烯雌酚半抗原、2.5mL 二甲基甲酰胺、15 μ L 三正丁胺和 9 μ L 氯甲酸异丁酯混合反应 30min,得到的产物溶液称为 A 液;将每 15mg 卵清蛋白溶于 1mL50%的二甲基甲酰胺水溶液(体积百分含量)中,调节 pH 至 9,得到的产物溶液称为 B 液;

[0066] b、将 A 液加入到 B 液,4 $^{\circ}$ C 反应 4h 后,再经过透析得到包被原;

[0067] 其结构式如式 I 所示:

[0068]



[0069] (3) 化学发光板的制备:

[0070] 用包被缓冲液将步骤(2)得到的包被原(即己烯雌酚半抗原和卵清蛋白偶联物)稀释成 0.08 μ g/mL,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 2h,倾去包被液,用稀释 20 倍的洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,倾去孔内液体,干燥后获得包被有包被原的化学发光板,用铝膜真空密封保存。

[0071] 2、己烯雌酚单克隆抗体的制备:

[0072] (1) 免疫原合成:

[0073] 将己烯雌酚半抗原和牛血清白蛋白通过混合酸酐法偶联得到免疫原。

[0074] 具体制备过程如下:与包被原的制备方法相同,不同的是将卵清蛋白替换为牛血清白蛋白 BSA。

[0075] (2) 动物免疫与细胞融合

[0076] 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以步骤 2 的(1)获得的免疫原进行免疫,免疫剂量为 100 μ g/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,颈背部皮下多点注射,间隔 2-3 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。

[0077] 取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞,按 5:1 比例(数量配比)与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。采用间接竞争 ELISA 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,命名为 DES。

[0078] 经筛选得到能稳定分泌己烯雌酚克隆抗体的对己烯雌酚的单克隆杂交瘤细胞株 DES,已于 2010 年 4 月 12 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简

称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC No. 3775。

[0079] (3) 细胞冻存和复苏: 将上述单克隆杂交瘤细胞株 DES CGMCC No. 3775 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°C 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0080] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0081] 增量培养法: 将上述培养的杂交瘤细胞置于细胞培养基中, 在 37°C 条件下进行培养, 获得细胞培养液, 用下述辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化, 得到单克隆抗体, -20°C 保存。

[0082] 所述细胞培养基为向 RPMI-1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠得到的细胞培养基, 使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (体积百分含量), 使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量); 所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0083] 辛酸-饱和硫酸铵法: 1) 50% 饱和度盐析: 取上述细胞培养液 5mL, 加等量 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 混匀, 然后逐渐滴加等体积的饱和硫酸铵 (pH7.4) 溶液 (使硫酸铵溶液的饱和度达到 50%), 边加边搅拌, 室温放置 30min, 3000g 离心 30min, 弃上清液留沉淀。2) 33% 饱和度盐析: 在步骤 1) 得到的沉淀中分别加入 5mL 0.01mol/L PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 溶解沉淀, 再加饱和硫酸铵溶液达到 33% 饱和度, 边加边搅拌, 室温放置 30min, 弃上清液留沉淀。重复操作 2 次。3) 脱盐: 取 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 溶解步骤 2) 得到的沉淀, 装于透析袋中, 悬于盛有 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 的烧杯中脱盐, 放置于 4°C, 每天换液 3-4 次, 1% BaCl₂ 检测直至透析液中无硫酸根离子为止。4) 透析完毕, 3000g 离心 5min, 取上清液得到纯化的己烯雌酚单克隆抗体, -20°C 冰箱保存。

[0084] 三、用步骤一所述试剂盒检测样品中残留的己烯雌酚的方法

[0085] 方法如下:

[0086] 1、样品前处理

[0087] 样品为猪肉、鸡肉等组织样本。

[0088] 将每 2g 动物组织匀浆与 10mL 乙腈-丙酮溶液混匀 1min, 以 3000g 转速离心 5min, 取上清液; 将每 2mL 所述上清液用氮气干燥, 再加入 1mL 复溶液溶解, 再向其中加入 1mL 正己烷混合, 3000g 离心 5min, 取下层溶液稀释 5 倍即为待测样本溶液; 所述乙腈-丙酮溶液为将乙腈和丙酮按体积比为 80 : 20 混合获得; 所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的。

[0089] 2、检测

[0090] 向步骤一获得的包被有包被原 (己烯雌酚半抗原与卵清蛋白偶联物) 的化学发光板微孔中加入己烯雌酚标准品溶液或样本溶液 50 μ l, 再加入己烯雌酚单克隆抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 37°C 恒温箱中反应 30min; 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 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; 每孔加入辣根过氧化物酶

标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100mL, 37℃ 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤; 每孔加入发光液 C 液过氧化氢, 发光液 D 液鲁米诺, 用化学发光免疫分析仪, 测定每孔发光强度值。

[0091] 3、结果分析

[0092] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值 (B) 除以第一个标准溶液 (0 标准) 的发光强度值 (B0) 再乘以 100%, 即百分发光值。计算公式为:

[0093] 百分发光值 (%) = $(B/B_0) \times 100\%$

[0094] 以己烯雌酚标准品溶液的浓度 ($\mu\text{g/L}$) 的半对数值为 X 轴, 百分发光值为 Y 轴, 绘制标准曲线图 (图 1。)。用同样的办法计算样品溶液的百分发光值, 相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中己烯雌酚的残留量。本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法, 计算出样品溶液浓度。本发明中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。

[0095] 按照上述方法获得三批试剂盒 (01 批、02 批、03 批)。

[0096] 实施例 2、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

[0097] 一、试剂盒灵敏度实验

[0098] 对零标准溶液 (pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液) 进行 20 次检测, 测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0099] 表 1 零标准测定结果统计表 $\mu\text{g/L}$

[0100]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.1	0.4	0.3	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.2	0.4	0.4	0.3	0.3	0.1	0.5	

[0101] 由表 1 可知, 试剂盒的最低检测限为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。

[0102] 二、标准品精密度试验:

[0103] 从实施例 1 中所述的三批试剂盒 (01 批、02 批、03 批) 中每批抽取 10 个试剂盒, 测定 $5 \mu\text{g/L}$ 己烯雌酚标准品溶液的发光强度值, 计算变异系数。检测方法与实施例 1 中实验三所述一致。

[0104] 实验设 3 次重复, 结果如表 2 所示, 表明变异系数范围在 4.7%~12.4% 之间, 符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0105] 表 2 标准可重复性试验 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0106]	01 批	4.7	8.2	7.8	9.3	5.7	8.6	6.9	10.5	8.5	7.3
	CV% 02 批	8.7	6.7	7.9	8.1	6.7	12.4	9.5	9.7	6.8	8.5
	03 批	8.2	8.1	9.7	7.5	5.2	7.4	10.1	7.3	6.4	9.7

[0107] 三、样本精密度和准确度试验

[0108] 1、样品精密度试验：

[0109] 将不含己烯雌酚的猪肉、鸡肉按照实施例 1 的方法进行样品前处理后，添加己烯雌酚标准品，使其终浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。从实施例 1 中所述的三批试剂盒（01 批、02 批、03 批）中每批抽取 3 个试剂盒，进行实验，每个实验重复 5 次，分别计算变异系数，结果如表 3 和表 4 所示（各表中的数值为 5 次重复的平均值）。结果表明猪肉、鸡肉样本的变异系数均小于 20%，符合了《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四点精密度和准确度的精密度标准。

[0110] 表 3 猪肉样本可重复性试验

[0111]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	3.7	4.8	4.0	4.2	4.5	10.1
	4.3	4.3	4.5	4.1	4.8	6.1
	4.5	4.1	4.3	4.5	4.7	5.2
02	4.9	4.0	4.6	4.9	4.2	9.1
	3.9	4.6	4.1	4.8	4.2	8.6
	4.8	4.5	4.2	4.6	4.0	7.2
03	4.2	3.8	4.9	4.3	3.9	10.2
	4.1	4.0	4.7	3.7	4.7	10.5
	4.6	4.7	3.8	4.2	4.5	8.4

[0112] 表 4 鸡肉样本可重复性试验

[0113]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	4.1	3.9	4.3	4.8	4.2	7.9
	4.5	4.6	4.4	4.5	3.7	8.4
	4.3	4.2	4.7	3.8	4.5	7.9
02	4.7	4.8	3.9	4.6	4.2	8.5
	3.9	4.5	4.2	4.7	4.6	7.5
	4.4	4.7	4.2	4.3	4.7	5.2
03	4.3	4.6	4.7	4.1	3.8	8.5
	4.1	3.8	4.8	4.0	4.2	9
	4.3	4.8	4.1	4.6	4.4	6.1

[0114]

[0115] 2、样本准确度试验

[0116] 将不含己烯雌酚的猪肉、鸡肉按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理，然后向每种组织中加入己烯雌酚标准品溶液，使其终浓度分别为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；然后用实施例 1 中所述的试剂盒检测猪肉、鸡肉中己烯雌酚，每个浓度做 4 个平行，分别计算准确度（准确度 = 实测值 / 添加值）。结果如表 5 所示，表明各样本以 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 己烯雌酚添加回收率均在 77.6% - 94.7% 之间。

[0117] 表 5 试剂盒的准确度

[0118]

样本		猪肉		鸡肉	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	20	10	20
准确度%	1	79.0	96.2	85.3	94.7
	2	88.1	91.5	78.9	85.0
	3	93.2	87.4	93.5	81.3
	4	82.5	77.6	84.6	83.6
平均值%		85.7	88.2	85.6	86.1

[0119] 四、交叉反应率试验

[0120] 选择与己烯雌酚有类似结构和类似功能的 4 种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。交叉反应越小，那么此试剂盒对己烯雌酚的检测特异性就越好。

[0121] 交叉反应率 (%) = (抑制 50% 己烯雌酚的浓度 / 抑制 50% 的己烯雌酚类似物浓度) * 100%

[0122] 表 6 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
[0123]	己烯雌酚	100
	炔雌醇	7.0
	雌酚酮	<0.1
[0124]	苯甲酸己烯雌酚	<0.1
	雌三醇	<0.1

[0125] 实验结果表明，本发明所研制的试剂盒对己烯雌酚的特异性好。

[0126] 五、试剂盒保存期试验

[0127] 试剂盒保存条件为 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，保存 6 个月后，测定试剂盒的 50% 抑制浓度、己烯雌酚实际添加测定，结果表明试剂盒的 50% 抑制浓度均在正常范围之内。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°C 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℃至少可以保存 6 个月以上。

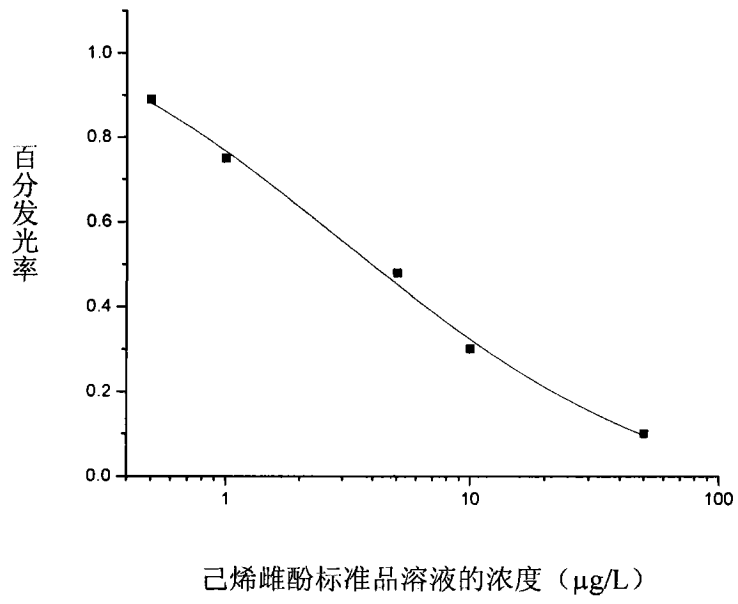


图 1

专利名称(译)	一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101936985A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010244284.0	申请日	2010-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 张素霞 史为民 吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生		
发明人	王战辉 沈建忠 张素霞 史为民 吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/531 C07K16/44 C12N5/20 C12R1/91		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101936985B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测己烯雌酚的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。本发明所提供的检测己烯雌酚的化学发光免疫试剂盒，包括己烯雌酚特异性抗体、包被原和标准品溶液；所述包被原为己烯雌酚半抗原与载体蛋白的偶联物，其结构式如式I所示。本发明的检测方法，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。

