

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101936986 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010244304. 4

(22) 申请日 2010. 08. 03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3774 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 史为民 沈建忠 张素霞 王战辉

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

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)

C12R 1/91(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

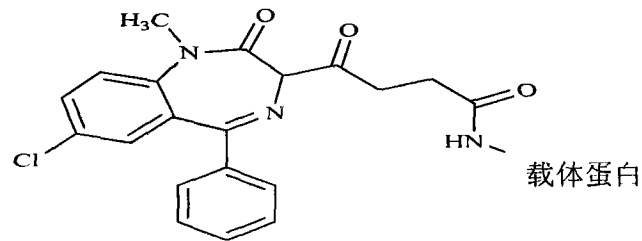
(54) 发明名称

一种检测地西洋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地西洋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地西洋的专用化学发光免疫试剂盒,包括地西洋特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为地西洋半抗原与载体蛋白的偶联物;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. 一种检测地西洋的化学发光免疫试剂盒,包括地西洋特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为地西洋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;

所述试剂盒由地西洋特异性抗体、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:

所述地西洋特异性抗体为地西洋的多克隆抗体或地西洋的单克隆抗体;

所述地西洋的单克隆抗体为由保藏号为 CGMCC No. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA 分泌的地西洋单克隆抗体。

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 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 或 $100 \mu\text{g/L}$,所述标准品为地西洋;

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;

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;

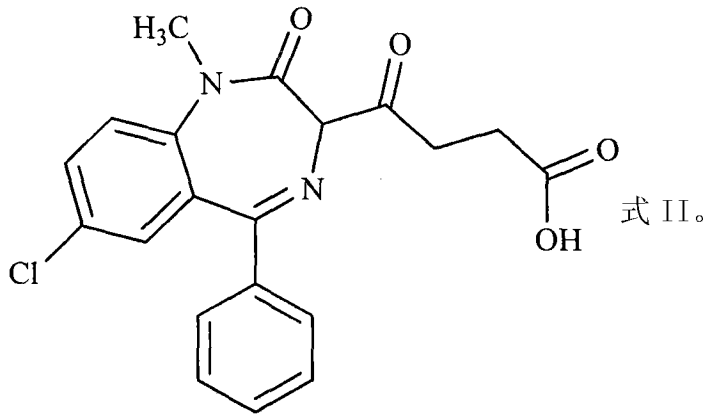
所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

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 中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 60g 地西洋半抗原与 1mL 二甲基甲酰胺、 10mg 二环己基碳化二亚胺和 5mg N-羟基琥珀酰亚胺混合,在 25°C 下搅拌 30min ,得到的产物溶液称为 A 液;将载体蛋白 30mg 溶于 3mL 0.13M 碳酸氢钠水溶液中,得到的溶液称为 B 液;b、将 A 液加入到 B 液, 25°C 搅拌 1.5h ,得到所述包被原;

所述地西洋半抗原的结构式如式 II 所示:



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:

所述地西洋半抗原是按照如下方法制备得到的: I、将每 57mg 地西洋与 30mg 羧甲基羟胺半盐酸盐、1mg 乙酸钠和 4mL 甲醇的水溶液混合, 25°C 搅拌反应 12 小时, 其中甲醇的水溶液为甲醇与水以 9 : 1 的体积比混合得到的; II、将步骤 I 得到的产物进行浓缩; III、用三氯甲烷对步骤 II 得到的产物进行萃取, 取三氯甲烷层, 即得到地西洋半抗原。

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:

所述酶标抗抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

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。

8. 一种检测地西洋的方法, 包括以下步骤:

1) 样品前处理:

将每 1g 动物组织匀浆与 5mL 0.1M 氢氧化钠水溶液混匀 5min, 以 3000g 的速度离心 10min, 取上清液; 将每 1mL 所述上清液与 10mL 正己烷混合 5min, 以 3000g 的速度离心 5min, 取正己烷相; 将每 5mL 正己烷相干燥, 再用 1mL 复溶液溶解, 再将溶解产物稀释 10 倍, 即为待测样本溶液; 所述动物组织为猪肉或猪肝; 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 中任一所述的检测地西洋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. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA 分泌的地西洋单克隆抗体。

10. 保藏号为 CGMCC No. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA。

一种检测地西洋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地西洋的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。

背景技术

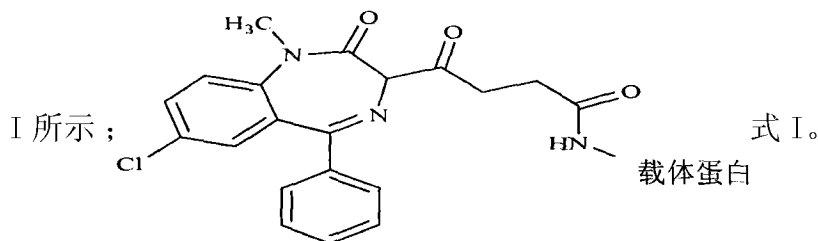
[0002] 目前动物性食品安全已成为全世界关注的焦点,其中兽药残留问题是影响动物性食品安全的最主要因素之一,由于动物样本成分复杂,待测物浓度较低,而且大多数取样量很少,这就对分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。化学发光免疫分析(Chemiluminescence analysis, CLIA) 技术将高灵敏的化学发光技术与高特异性的免疫反应结合起来,具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、不需要十分昂贵的仪器设备等特点。CLIA 不需要外来光源,具有比荧光免疫分析更高的信噪比,比常规的酶联免疫吸附检测方法的抗背景干扰能力强,其灵敏度比 ELISA 高 1 至 2 个数量级,检测范围可达 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] 地西洋(Diazepam, DIA) 是一种苯二氮卓类镇静催眠药,兽医主要用于各种动物镇静、保定、基础麻醉等方面畜牧生产中曾被用作猪抗运输应激及奶牛抗热应激的药物。近年来,随着畜牧养殖业的迅速发展,一些不法分子在经济利益的驱动下,擅自在畜禽饲养中添加使用。地西洋在饲料中的滥用,将最终导致畜产品中药物的残留,从而严重影响人们的身体健康,威胁人们的生命安全。我国农业部 2002 年 4 月发布《食品动物禁用的兽药及其他化合物清单》中,明令禁止将地西洋以抗应激、提高饲料报酬、促进动物生长为目的在食用动物饲养过程中使用。动物组织中地西洋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地西洋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地西洋的专用化学发光免疫试剂盒,包括地西洋特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为地西洋半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示;



[0006] 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;

[0007] 所述试剂盒由地西洋特异性抗体、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。

[0008] 所述地西洋特异性抗体为地西洋的多克隆抗体或地西洋的单克隆抗体;

[0009] 所述地西洋的单克隆抗体由保藏号为 CGMCC No. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA 分泌的地西洋单克隆抗体。

[0010] 所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 或 $100 \mu\text{g/L}$ ，所述标准品为地西洋；

[0011] 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。

[0012] 所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮化钠和 100mL 浓度为 0.02mol/L 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液；

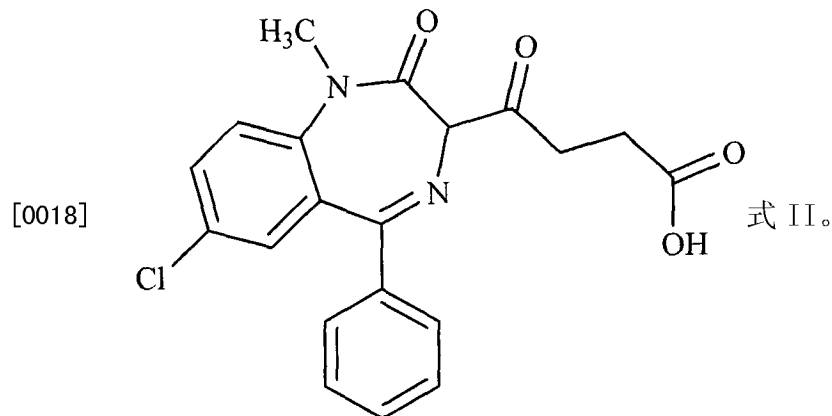
[0013] 所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液；

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 所述包被原是按照如下方法制备得到的：a、将每 60mg 地西洋半抗原与 1mL 二甲基甲酰胺、 10mg 二环己基碳化二亚胺和 5mg N-羟基琥珀酰亚胺混合，在 25°C 下搅拌 30min ，得到的产物溶液称为 A 液；将载体蛋白 30mg 溶于 3mL 0.13M 碳酸氢钠水溶液中，得到的溶液称为 B 液；b、将 A 液加入到 B 液， 25°C 搅拌 1.5h ，得到所述包被原；

[0017] 所述地西洋半抗原的结构式如式 II 所示：



[0019] 所述地西洋半抗原是按照如下方法制备得到的：I、将每 57mg 地西洋与 30mg 羧甲基羟胺半盐酸盐、 1mg 乙酸钠和 4mL 甲醇的水溶液混合， 25°C 搅拌反应 12 小时，其中甲醇的水溶液为甲醇与水以 $9:1$ 的体积比混合得到的；II、将步骤 I 得到的产物进行旋蒸浓缩；III、用三氯甲烷对步骤 II 得到的产物进行萃取，取三氯甲烷层，即得到地西洋半抗原。

[0020] 所述酶标抗抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体。

[0021] 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。

[0022] 本发明的另一个目的是提供一种检测地西洋的方法。

[0023] 本发明提供的方法包括以下步骤：

[0024] 1) 样品前处理：

[0025] 将每 1g 动物组织匀浆与 5mL 0.1M 氢氧化钠水溶液混匀 5min ，以 3000g 的速度离心 10min ，取上清液；将每 1mL 所述上清液与 10mL 正己烷混合 5min ，以 3000g 的速度离

心 5min,取正己烷相;将每 5mL 正己烷相干燥,再用 1mL 复溶液溶解,再将溶解产物稀释 10 倍,即为待测样本溶液;所述动物组织为猪肉或猪肝;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;

[0026] 2) 利用上述的检测地西洋的化学发光免疫试剂盒检测步骤 1) 中的样本溶液。

[0027] 由保藏号为 CGMCC No. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA 分泌的地西洋单克隆抗体也是本发明保护的范畴。

[0028] 保藏号为 CGMCC No. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA 也是本发明保护的范畴。该细胞株于 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. 3774。

[0029] 地西洋的通用名称为地西洋,化学名称为 1-甲基-5-苯基-7-氯-1,3-二氢-2H-1,4-苯并二氮杂卓-2-酮。

[0030] 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地西洋的残留量,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地西洋的残留量的方法,可用于检测动物组织如猪肉、猪肝等样品中地西洋的残留量,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地西洋的残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0031] 图 1 为地西洋标准曲线图

具体实施方式

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 下述实施例中各试剂盒的检测原理如下:

[0035] 当在化学发光板微孔上预包被地西洋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,再加入地西洋抗体溶液,样本中残留的地西洋或地西洋标准品与化学发光板上包被的地西洋偶联抗原竞争地西洋抗体,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地西洋的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中地西洋的残留量。

[0036] 实施例 1、化学发光免疫试剂盒的制备及其检测方法

[0037] 一、化学发光免疫试剂盒组成:

[0038] (1) 包被原溶液:将包被原溶解于包被缓冲液中得到的,其中包被原的浓度为 0.08 μ g/mL;包被原为地西洋半抗原与卵清蛋白的偶联物。

[0039] (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液: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 1:1000;稀释液组成 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。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。

[0040] (3) 地西洋标准品溶液：将标准品溶于稀释液中得到的，其中标准品的浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$, $0.1 \mu\text{g/L}$, $0.5 \mu\text{g/L}$, $1 \mu\text{g/L}$, $10 \mu\text{g/L}$, $100 \mu\text{g/L}$ ；地西洋标准品为地西洋，购自中国药品生物制品检定所，产品目录号为 171225-200302。稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0041] (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。

[0042] (5) 地西洋单克隆抗体工作液：将单抗溶于稀释液中得到的；单抗与稀释液的配比为 1 : 2000；单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC NO. 3774 的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA 产生。

[0043] 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。

[0044] (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。

[0045] (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。

[0046] (8) 包被缓冲液：pH 值为 9.6 的 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0047] (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。

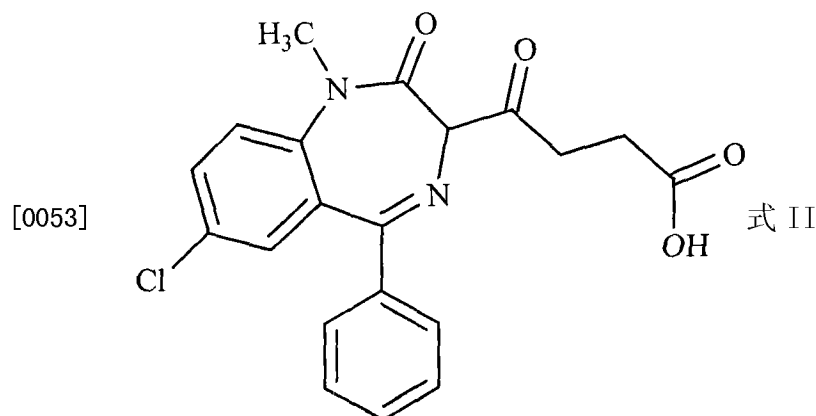
[0048] 二、试剂盒的制备

[0049] 1、化学发光板的制备：

[0050] (1) 地西洋半抗原的合成：

[0051] I、称取地西洋标准品 57mg，羧甲基羟胺半盐酸盐 30mg，乙酸钠 1mg，溶于 4mL 甲醇的水溶液（其中甲醇：水 = 9 : 1，体积比），25℃ 搅拌 12 小时；II、将步骤 I 得到的产物进行旋蒸浓缩，以去除产物中的溶剂。III、向步骤 II 得到的产物中加入三氯甲烷，进行萃取，取三氯甲烷层，将三氯甲烷层用水洗 3 次，再用无水硫酸钠干燥，得到的产物即为地西洋半抗原。

[0052] 所述地西洋半抗原的结构式如式 II 所示：



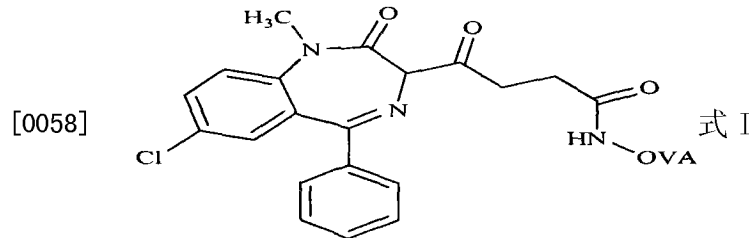
[0054] (2) 包被原的制备：采用活性酯法将地西洋半抗原和卵清蛋白 (OVA) 偶联得到包被原。

[0055] a、将 60mg 步骤 (1) 得到的地西洋半抗原溶于 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF)，再加二环

己基碳化二亚胺 (DCC) 10mg, N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 5mg, 然后室温 (25℃) 搅拌 30min, 得到的产物溶液称为 A 液; 将 OVA 30mg 溶于 3mL 0.13M 碳酸氢钠水溶液中, 称为 B 液;

[0056] b、将 A 液缓慢加入到 B 液, 室温 (25℃) 搅拌 1.5h 得到偶联产物, 将偶联产物在 0.1M 碳酸氢钠液中透析 3 天, 用 1M 盐酸调节偶联产物的 pH 值为 5.5, 2500rpm 离心 30min, 取上清液, 得到包被原。

[0057] 所述包被原为地西洋半抗原与载体蛋白的偶联物, 其结构式如式 I 所示;



[0059] (3) 化学发光板的制备:

[0060] 用包被缓冲液将步骤 (2) 得到的包被原 (即地西洋半抗原和卵清蛋白偶联物) 稀释成 0.08 μg/mL, 每孔加入 100 μL, 37℃ 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 μL 封闭液, 37℃ 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。

[0061] 2、地西洋单克隆抗体的制备:

[0062] (1) 免疫原合成:

[0063] 将地西洋半抗原和牛血清白蛋白通过活性酯法偶联得到免疫原。

[0064] 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。

[0065] (2) 动物免疫与细胞融合

[0066] 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 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, 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。

[0067] 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 DIA。

[0068] 经筛选得到能稳定分泌地西洋单克隆抗体的对地西洋的单克隆杂交瘤细胞株 DIA, 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. 3774。

[0069] (3) 细胞冻存和复苏: 将上述单克隆杂交瘤细胞株 DIA CGMCC No. 3774 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。

[0070] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0071] 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℃ 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℃保存。

[0072] 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。

[0073] 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℃, 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地西洋单克隆抗体, -20℃冰箱保存。

[0074] 三、用试剂盒检测样品中残留的地西洋的方法

[0075] 方法如下:

[0076] 1、样品前处理

[0077] 样品为猪肉、猪肝等组织样本。

[0078] 将 1g 动物组织匀浆与 5mL 0.1M 氢氧化钠水溶液混匀 5min, 以 3000g 的速度离心 10min, 取上清液; 将每 1mL 所述上清液与 10mL 正己烷混合 5min, 以 3000g 的速度离心 5min, 取正己烷相; 将每 5mL 正己烷相干燥, 再用 1mL 复溶液溶解, 再将溶解产物稀释 10 倍, 即为待测样本溶液; 取样进行分析。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。

[0079] 2、检测

[0080] 向步骤一获得的包被有包被原 (地西洋半抗原与卵清蛋白偶联物) 的化学发光板微孔中加入地西洋标准品溶液或样本溶液 50 μl, 再加入地西洋单克隆抗体工作液 50 μl, 用盖板膜封板, 37℃恒温箱中反应 30min; 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μl 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 100μL, 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 液鲁米诺的溶液, 用化学发光免疫分析仪, 测定每孔发光强度值。

[0081] 3、结果分析

[0082] 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:

[0083] 百分发光值 (%) = (B/B₀) × 100%

[0084] 以地西洋标准品溶液的浓度 (μg/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地西洋的残留量。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。

[0085] 按照上述方法获得三批试剂盒（01 批、02 批、03 批）。

[0086] 实施例 2、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

[0087] 一、试剂盒灵敏度实验

[0088] 对零标准溶液（即稀释液为 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。

[0089] 表 1 零标准测定结果统计表 $\mu\text{g/L}$

[0090]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.05	0.08	0.04	0.07	0.06	0.07	0.07	0.05
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.07	0.07	0.04	0.06	0.08	0.08	0.06	0.06
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.09	0.06	0.07	0.08	0.07	0.01	0.1	

[0091] 由表 1 可知，试剂盒的最低检测限为 $0.1 \mu\text{g/L}$ 。

[0092] 二、标准品精密度试验：

[0093] 从由实施例 1 的获得的所述的三批试剂盒（01 批、02 批、03 批）中每批抽取 10 个试剂盒，测定浓度为 $1 \mu\text{g/L}$ 的地西洋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。

[0094] 实验设 3 次重复，结果如表 2 所示，表明变异系数范围在 6.5%~15.6% 之间，符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0095] 表 2 标准可重复性试验 (CV%)

[0096]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	11.0	9.1	12.4	11.3	8.6	14.7	12.9	10.8	12.4	7.6
CV% 02 批	13.4	7.8	13.1	13.4	9.4	15.6	8.7	11.4	11.6	8.8
03 批	13.1	15.4	7.4	9.9	11.8	14.1	16.2	8.1	6.5	10.3

[0097] 三、样本精密度和准确度试验

[0098] 1、样品精密度试验：

[0099] 将不含地西洋的猪肉、猪肝添加地西洋标准品，使其终浓度为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。按照实施例 1 的方法进行样品前处理后，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，检测方法与实施例 1 中实验三所述一致。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、猪肝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。

[0100] 表 3 猪肉样本可重复性试验

[0101]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	4.6	4.3	3.9	4.2	4.5	6.4
	3.8	4.5	4.3	4.1	4.3	6.3
	3.9	4.8	4.6	3.8	4.1	10.4
02	4.5	3.8	4.7	4.3	4.5	7.9
	4.3	3.8	4.7	4.2	4	8.1
	3.9	3.9	4.5	4.2	4.5	7.2
03	3.8	4.1	4.0	4.7	3.8	9.1
	4.4	4.6	3.8	3.9	4.1	8.2
	3.8	4.2	3.7	4.8	4.6	11.4

[0102] 表 4 猪肝样本可重复性试验

[0103]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
01	4.2	4.8	4.0	4.6	4.7	7.7
	4.4	4.5	4.2	4.8	4.4	4.9
	4.5	3.8	4.7	4.5	4.8	8.8
02	4.4	3.9	3.9	4.3	3.9	6.1
	4.8	4.5	4.5	4.4	3.8	8.4
	4.6	3.8	4.3	4.8	4.3	8.7
03	3.9	4.1	4.7	3.9	3.9	8.4
	4.2	4.7	4.4	4.0	4.5	6.2
	4.1	4.6	4.9	4.2	4.6	7.3

[0104]

[0105] 2、样本准确度试验

[0106] 将不含地西洋的猪肉、猪肝按照实施例 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地西洋标准品, 使其在检测样品中的终浓度分别为 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 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、猪肝中地西洋, 每个浓度做 4 个平行, 分别计算准确度 (即添加回收率) (准确度 = 实测值 / 添加值)。检测方法与实施例 1 中实验三所述一致。结果如表 5 所示, 表明各样本以 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 地西洋添加回收率均在 76.2% -95.3% 之间。

[0107] 表 5 试剂盒的准确度

[0108]

样本		猪肉		猪肝	
添加浓度 (μg/kg)		2	20	2	20
准确度%	1	83.7	79.2	95.3	86.9
	2	90.1	85.7	91.4	87.3
	3	76.2	78.6	85.4	78.4
	4	85.6	92.5	79.6	90.2
平均值%		83.9	84.0	87.9	85.7

[0109] 三、交叉反应率试验

[0110] 选择与地西洋有类似结构和类似功能的 2 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,那么此试剂盒对地西洋的检测特异性就越好。

[0111] 交叉反应率 (%) = (抑制 50% 地西洋标准品的浓度 / 抑制 50% 的地西洋类似物浓度) * 100%

[0112] 实验设 3 次重复,结果取平均数。

[0113] 表 6 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
[0114]	地西洋	100
	硝西洋	7.6
	奥沙西洋	8.8

[0115] 实验结果表明,本发明所研制的试剂盒对地西洋的特异性好。

[0116] 四、试剂盒保存期试验

[0117] 试剂盒保存条件为 2-8℃,保存 6 个月后,测定试剂盒的 50% 抑制浓度、地西洋实际添加测定,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℃ 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。

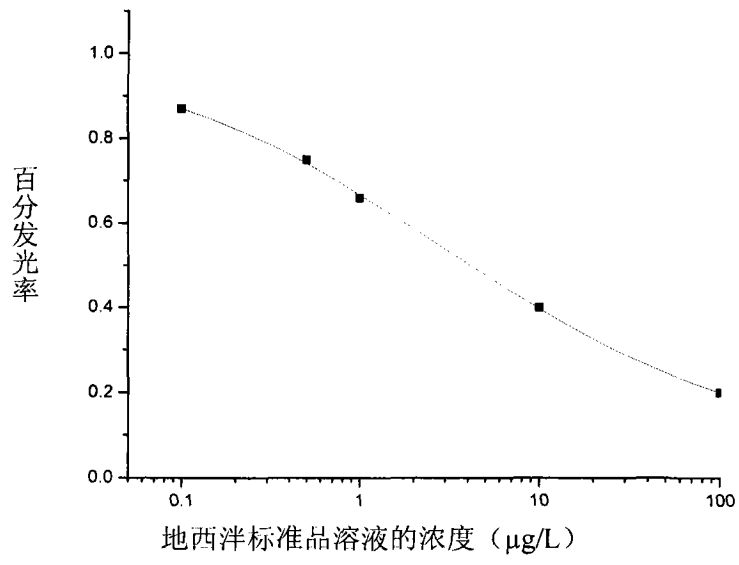


图 1

专利名称(译)	一种检测地西洋的方法及其专用化学发光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101936986A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010244304.4	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	史为民 沈建忠 张素霞 王战辉 吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生		
发明人	史为民 沈建忠 张素霞 王战辉 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	CN101936986B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测地西洋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地西洋的专用化学发光免疫试剂盒，包括地西洋特异性抗体、包被原和标准品溶液；所述包被原为地西洋半抗原与载体蛋白的偶联物；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。

