



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152499 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711278198.X

(22)申请日 2017.12.06

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

申请人 广东温氏食品集团股份有限公司

(72)发明人 杨金易 沈玉栋 曾道平 谭庶
孙远明 徐振林 陈丽 韦田

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

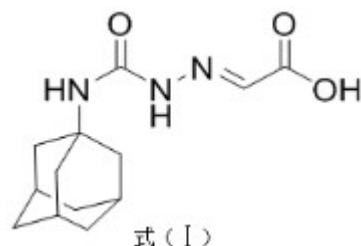
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测
试剂盒

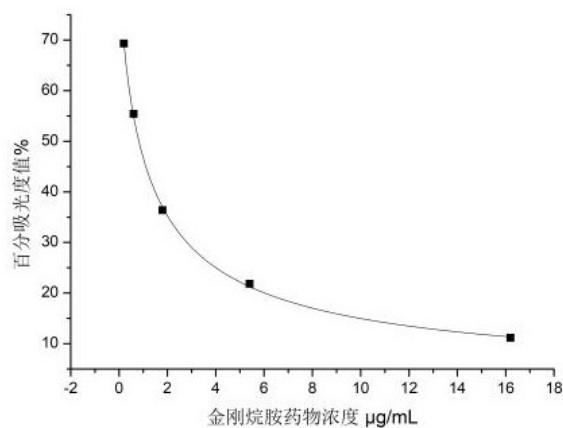
(57)摘要

本发明公开了一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测试剂盒。本发明首先制备了金刚烷胺半抗原,其分子结构式如式(I)所示:

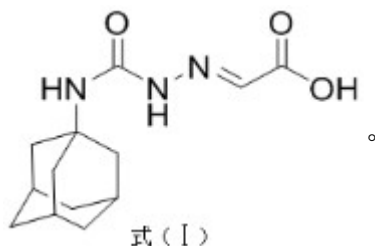


,然后与偶联载体

蛋白后得到人工抗原,然后通过杂交瘤技术获得金刚烷胺的单克隆抗体,从而以所述金刚烷胺单克隆抗体建立了竞争性酶联免疫检测方法及其试剂盒。本发明的金刚烷胺酶联免疫检测试剂盒可用于检测动物组织样品中金刚烷胺的含量,检出限为 $0.10 \mu\text{g/kg}$, IC_{50} 为 $0.79 \mu\text{g/L}$,线性检测范围为 $0 \sim 16.2 \mu\text{g/L}$,该方法简便、快速,成本低廉、灵敏度高、特异性强,适合现场快速检测。



1. 一种金刚烷胺半抗原,其特征在于,分子结构式如式(I)所示:



2. 权利要求1所述的金刚烷胺半抗原的制备方法,其特征在于,按质量体积比为8~12 mg:100~150 μ L的比例,将N-(1-金刚烷)肼羧酰胺溶解于甲醇中,得A液;按质量体积比为2~6 mg:100~150 μ L的比例,将乙醛酸溶解于甲醇中,得B液;将A液和B液混匀,室温搅拌反应36~60 h,离心过滤后将沉淀干燥即得。

3. 一种金刚烷胺人工抗原,其特征在于,由权利要求1所述的金刚烷胺半抗原与载体蛋白偶联得到。

4. 根据权利要求3所述的金刚烷胺人工抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:按质量比为4~6:3~5:4~6的比例称取金刚烷胺半抗原、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺,分别溶解于二甲基甲酰胺中,混合后室温搅拌反应1~3 h,得到C溶液;将载体蛋白溶解于碳酸氢钠缓冲液中,配制成浓度为8~12 mg/mL的蛋白溶液;将上述C溶液逐滴加入到蛋白溶液中,室温搅拌过夜,4 $^{\circ}$ C下用PBS溶液透析2~4 d即得。

5. 一种金刚烷胺抗体,其特征在于,由权利要求1所述的金刚烷胺半抗原或权利要求3所述的金刚烷胺人工抗原制备得到。

6. 一种金刚烷胺的酶联免疫检测方法,其特征在于,利用权利要求3所述的金刚烷胺人工抗原包被酶标板,进行酶联免疫检测。

7. 一种用于检测金刚烷胺的酶联免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求3所述的金刚烷胺人工抗原和/或权利要求5所述的金刚烷胺抗体。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:包被有金刚烷胺人工抗原的酶标板、金刚烷胺抗体工作液、酶标记的二抗、金刚烷胺标准品工作液、底物液和底物缓冲液、终止液和浓缩洗涤液、提取剂和复溶液。

9. 权利要求1所述的金刚烷胺半抗原、权利要求3所述的金刚烷胺人工抗原、权利要求5所述的金刚烷胺抗体在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用,或在制备检测金刚烷胺或其结构类似物的产品中的应用。

10. 权利要求7或8所述的试剂盒在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用。

一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域。更具体地,涉及一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 金刚烷胺(Amantadine)属于抑制流感病毒的抗病毒类药物,曾经用于禽类抵抗禽流感,因而受到广大养殖户的青睐,但因其缺乏安全性和有效性的数据,金刚烷胺在美国不再被推荐用作治疗流感,且其对神经系统和心血管系统有一定的毒副作用,因此我国农业部2005年发出《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》要求禁止生产、经营和使用金刚烷胺等抗病毒药物。美国FDA于2006年禁止金刚烷类和神经氨酸酶抑制剂类抗流感病毒药物用于禽类。

[0003] 目前,对金刚烷胺的检测主要依靠高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、薄层色谱法(TLC)、质谱法(MS)等,地方标准《DB21/2394-2014食品安全地方标准鸡肝和鸡肉中金刚烷胺、金刚乙胺的检测超高效液相色谱串联质谱法》、《DB32/T1163-2007鸡肝中金刚烷胺残留量的测定液相色谱-串联质谱法》均采用仪器方法,仪器方法具有灵敏度高、结果准确等优点,但是存在仪器昂贵、检测费时的缺陷,并且需要专业技术人员进行操作,不能达到现代检测对快速、准确的要求。

[0004] 免疫分析法可以弥补以上所有缺点。免疫分析法是一种利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的分析方法,而建立小分子化合物的免疫分析方法的关键是能够制造出对小分子化合物具有高亲和力和高特异性的抗体。国外现已开发出能够检测金刚烷胺的酶联免疫试剂盒,但是国内生产的试剂盒在准确性、灵敏度、特异性等方面还不能完全达到检测的要求,并且过程复杂,不满足市场上对金刚烷胺的检测要求。

[0005] 因此,研究高灵敏的免疫检测方法对金刚烷胺的有效监控和药代动力学研究具有非常积极的意义。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术中金刚烷胺检测方法出现的上述缺陷,提供一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测试剂盒。本发明公开的金刚烷胺半抗原为进一步研制金刚烷胺抗体及金刚烷胺酶联免疫检测试剂盒提供了原料;所述试剂盒利用竞争性酶联免疫反应原理对动物组织样品中金刚烷胺的残留进行定量检测,具有准确、灵敏、快速、简便的优点,能够高效检测金刚烷胺,为金刚烷胺快速检测产品的开发提供了一定的理论指导,这对食品安全的监控具有重要意义。

[0007] 本发明的目的是提供一种金刚烷胺半抗原。

[0008] 本发明的第二个目的是提供金刚烷胺的人工抗原。

[0009] 本发明的第三个目的是提供金刚烷胺的抗体。

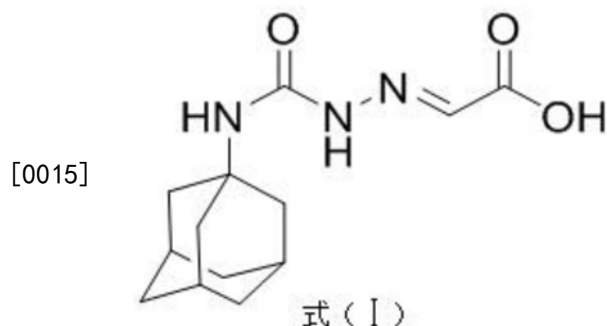
[0010] 本发明的第四个目的是提供上述金刚烷胺的酶联免疫检测方法。

[0011] 本发明的第五个目的是提供上述金刚烷胺的酶联免疫检测试剂盒。

[0012] 本发明的第六个目的是提供上述金刚烷胺的半抗原、人工抗原、抗体在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用,或在制备检测金刚烷胺或其结构类似物的产品中的应用,或酶联免疫检测试剂盒在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用。

[0013] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0014] 一种金刚烷胺半抗原,其分子结构式如式(I)所示:



[0016] 申请人将多种物质结合,研究其免疫效果,结果表明当N-(1-金刚烷)肼羧酰胺和乙醛酸相结合制备半抗原后,利用所述半抗原制备人工抗原,具有优异的免疫效果。

[0017] 本发明还提供式(I)所述化合物作为检测金刚烷胺或其结构类似物的半抗原的应用。

[0018] 本发明所述的金刚烷胺半抗原的制备方法为:按质量体积比为8~12mg:100~150 μ L,将N-(1-金刚烷)肼羧酰胺溶解于甲醇中,得A液;按质量体积比为2~6mg:100~150 μ L,将乙醛酸溶解于甲醇中,得B液;将A液和B液混匀,室温搅拌反应36~60h,离心过滤后将沉淀干燥即得。

[0019] 优选地,离心条件为:于4500r/min下离心15min;干燥条件为:40~60 $^{\circ}$ C(优选50 $^{\circ}$ C)真空干燥。

[0020] N-(1-金刚烷)肼羧酰胺和乙醛酸的投料比以及二者的反应温度、反应时间显著影响获得半抗原的效果,必须要在上述范围内才能获得效果良好的半抗原。

[0021] 本发明还提供一种金刚烷胺人工抗原,由所述的金刚烷胺半抗原与载体蛋白偶联得到;其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白、鼠血清白蛋白、甲状腺蛋白或血蓝蛋白。

[0022] 本发明所述的金刚烷胺人工抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0023] 按质量比为4~6:3~5:4~6的比例,称取金刚烷胺半抗原、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺,分别溶解于二甲基甲酰胺中,混合后室温搅拌反应1~3h,得到溶液C;将载体蛋白溶解于碳酸氢钠缓冲液中,配制成浓度为8~12mg/mL的蛋白溶液;将上述溶液C逐滴加入到蛋白溶液中,室温搅拌过夜,4 $^{\circ}$ C下用PBS溶液透析2~4d即得。

[0024] 本文中的过夜是指8~16h。

[0025] 本发明还提供所述金刚烷胺人工抗原制备得到的金刚烷胺抗体,包括金刚烷胺多克隆抗体、金刚烷胺单克隆抗体和基因工程抗体,其中优选为金刚烷胺单克隆抗体。

[0026] 所述的金刚烷胺多克隆抗体的制备方法如下:将上述金刚烷胺人工抗原作免疫原

免疫兔子或小鼠,制备金刚烷胺多克隆抗体,最后收集抗血清,用辛酸硫酸铵沉淀纯化及过亲和层析柱进行纯化。

[0027] 所述的金刚烷胺单克隆抗体的制备方法如下:

[0028] 为本实验室前期制备得到,其具体制备方法如下:将上述金刚烷胺人工抗原作免疫原免疫小鼠,用小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,获得杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞置于雌性Balb/c小鼠体内培养,获得含高浓度单克隆抗体的腹水,并对腹水纯化得到高特异性抗金刚烷胺单克隆抗体。

[0029] 本发明还提供上述金刚烷胺半抗原在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用;本发明还提供上述金刚烷胺半抗原在制备检测金刚烷胺或其结构类似物的产品中的应用。

[0030] 本发明还提供上述金刚烷胺人工抗原在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用;本发明还提供上述金刚烷胺人工抗原在制备检测金刚烷胺或其结构类似物的产品中的应用。

[0031] 本发明还提供上述金刚烷胺抗体在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用;本发明还提供上述金刚烷胺抗体在制备检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用。

[0032] 本发明还提供一种金刚烷胺的酶联免疫检测方法,是利用所述的金刚烷胺抗原包被酶标板。

[0033] 本发明还提供一种用于检测金刚烷胺的酶联免疫检测试剂盒,所述试剂盒含有上述金刚烷胺人工抗原和/或金刚烷胺抗体。

[0034] 优选地,所述试剂盒包括:包被有金刚烷胺人工抗原的酶标板、金刚烷胺抗体工作液、酶标记的二抗、金刚烷胺标准品工作液、底物液和底物缓冲液、终止液和浓缩洗涤液、提取剂和复溶液。

[0035] 其中,所述的包被的金刚烷胺人工抗原为金刚烷胺人工合成半抗原与牛血清白蛋白的偶联物;所述的金刚烷胺包被抗原的工作浓度为 $2.1\mu\text{g/mL}$ 。

[0036] 所述酶标抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,优选为辣根过氧化物酶;酶标记的二抗优选为羊抗鼠IgG-HRP。

[0037] 二抗的工作浓度为1:8000;金刚烷胺包被抗原的工作浓度为 $2.1\mu\text{g/mL}$;所述金刚烷胺单克隆抗体的工作浓度为1:40000。

[0038] 所述金刚烷胺标准品工作液有6瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.2\mu\text{g/L}$ 、 $0.6\mu\text{g/L}$ 、 $1.8\mu\text{g/L}$ 、 $5.4\mu\text{g/L}$ 、 $16.2\mu\text{g/L}$ 。

[0039] 所述底物液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH为5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液。优选为含有过氧化脲的pH5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液。

[0040] 所述底物缓冲液为含有3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的pH为5.0的磷酸-柠檬酸缓冲溶液,或是pH为9.8的4-硝基酚磷酸钠盐二乙醇胺溶液,优选为含有3,3,5,5-四甲基联苯胺的pH为5.0的磷酸-柠檬酸缓冲溶液。

[0041] 所述终止液优选为1~2mol/L的硫酸溶液或1~2mol/L的氢氧化钠溶液。

[0042] 所述20倍浓缩洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1%的吐温-20、0.01~0.4mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0043] 所述提取剂优选为20%~80%的盐酸;所述复溶液优选为pH值为6.5、0.05~0.2mol/L的磷酸缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0044] 其中,在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液优选为pH值为9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液优选为pH为7.0~7.5、0.05%~0.5%的BSA、0.01~0.04mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0045] 所述包被有金刚烷胺抗原的酶标板是96孔或40孔酶标板,材质为聚苯乙烯,包被有能与抗金刚烷胺抗体特异性结合的金刚烷胺抗原,并封闭微孔表面未吸附金刚烷胺抗原的位点。

[0046] 另外,可以作为固定金刚烷胺人工抗原固相载体的物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酯胶、交联葡萄糖、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。

[0047] 本发明中酶标板的制备过程优选为:包被:用包被液将包被抗体(或包被抗原)稀释到合适浓度,加入96孔板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;封闭:用洗液洗板两次,拍干,每孔加入120 μ L封闭液,置37 $^{\circ}$ C孵育2h,甩干孔中的液体,置37 $^{\circ}$ C烘箱中1h,备用。

[0048] 本发明还提供所述的试剂盒在检测金刚烷胺或其结构类似物中的应用。

[0049] 本发明中,所述的金刚烷胺的结构类似物是指金刚乙胺。

[0050] 具体地,所述应用是利用所述试剂盒检测金刚烷胺,包括如下步骤:

[0051] S1.加样:取出包被有上述金刚烷胺人工抗原的酶标板,往标准孔中加入经稀释过的,不同浓度的金刚烷胺标准品溶液(所述金刚烷胺标准品溶液由金刚烷胺标准品工作液经稀释获得),样品孔中加入待测样品,然后每孔加入辣根过氧化物酶标记的二抗和金刚烷胺抗体,盖上盖板膜振摇混匀;

[0052] S2.温育:置室温(25 $^{\circ}$ C)温育30min;

[0053] S3.洗涤:吸除板孔中的反应液,用洗涤液进行洗涤,将酶标板拍干;

[0054] S4.显色:将底物液和底物缓冲液等体积混合得到显色液,每孔加入显色液,轻拍混匀,避光孵育;

[0055] S5.终止:每孔加入终止液,混合均匀;

[0056] S6.读值:在波长450nm或630nm处,以空气为空白,测定各孔的吸光值。

[0057] 优选地,待测样品检测前需要进行前处理,具体如下:

[0058] 取(2 $\pm$ 0.05g)去除脂肪并匀浆化的待测样品于50mL离心管中,加入6mL乙腈,100 μ L盐酸水溶液,剧烈震荡2min;室温4000r/min以上离心5min;取4mL上清液于离心管中,于60 $^{\circ}$ C氮气或空气吹干;加入0.5mL复溶液,充分涡动30s;取50 μ L进行分析。

[0059] 优选地,所述待测样品包括但不限于鸡肉、鸡肝、猪肉或猪肝等动物组织。

[0060] 本发明的检测原理为:固相载体微孔板上包被有金刚烷胺人工抗原,加入待测金刚烷胺标准品或样品溶液、加入酶标记物及金刚烷胺的抗体,包被在微孔板上的金刚烷胺抗原和标准品或样品中的金刚烷胺竞争性地与金刚烷胺抗体结合,形成抗原抗体复合物;再洗涤后加入显色剂,结合的酶标记物将无色的显色剂转化为蓝色的产物;加入终止液后使颜色由蓝色变为黄色;在450nm波长进行检测,样品中的金刚烷胺浓度与吸收光强度成反比。

[0061] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0062] 本发明提供的金刚烷胺半抗原既最大程度地保留了金刚烷胺的化学结构,又通过化学合成改造引入了可以与蛋白质偶联的-COOH,合成方法简单,纯度、产率较高;用该半抗

原作为原料,制备适于动物免疫的抗原体系免疫动物,所得抗体的效价、特异性、亲和力都比较好;所得的抗体用于酶联免疫试剂盒,使用方便、检测成本低,检测方法高效、准确、快速、可同时检测大批量的样本,适于动物组织中金刚烷胺残留的现场监控和大量样本的筛查。本发明的金刚烷胺半抗原在金刚烷胺的检测中发挥重要作用,还能检测金刚烷胺结构类似物,这对动物组织中金刚烷胺残留的快速检测具有很重要的现实意义。

附图说明

- [0063] 图1为金刚烷胺半抗原合成路线图。
[0064] 图2为金刚烷胺半抗原核磁共振氢谱图。
[0065] 图3为试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0066] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0067] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0068] 实施例1金刚烷胺半抗原的制备和鉴定

[0069] 1、金刚烷胺半抗原的制备

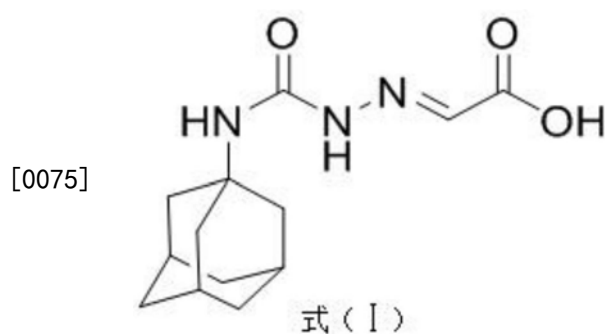
[0070] (1) 准确称量10mg的N-(1-金刚烷) 肼羧酰胺溶于125 μ L甲醇中,搅拌溶解,得A液;

[0071] (2) 将4.0mg的乙醛酸溶于125 μ L甲醇中得B液;

[0072] (3) 将A、B液混匀放入带有磁力搅拌器的圆底烧瓶中,室温搅拌反应48h,将反应后的混合液于4500r/min下离心15min,然后弃去上清液,将沉淀在50 $^{\circ}$ C真空干燥,最终得到白色固体粉末,即为金刚烷胺半抗原。

[0073] 2、金刚烷胺半抗原的鉴定

[0074] 对所得的半抗原进行质谱鉴定, $-MS:M-1=264.6$,如图2所示。结果显示金刚烷胺半抗原的化学结构式如式(I)所示:



[0076] 实施例2金刚烷胺人工抗原的制备

[0077] 1、金刚烷胺免疫抗原的合成

[0078] (1) 称取5.93mg半抗原溶于1mL的DMF,加入4.3mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和5.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺,室温搅拌反应2h,得到溶液C;

[0079] (2) 将50mg的BSA溶于5mL的0.1mol/L的碳酸氢钠缓冲液中,得到蛋白溶液;

[0080] (3) 将上述溶液C逐滴加入到蛋白溶液中,室温搅拌过夜,4 $^{\circ}$ C下用PBS溶液透析3d,

期间换透析液6次;将透析液在无菌条件下用0.22 μ m孔径的滤膜过滤,分装于安培瓶中,-20℃保存。

[0081] 2、金刚烷胺包被原的合成

[0082] 以与上述金刚烷胺免疫抗原相同的合成方法制备金刚烷胺包被原。

[0083] 实施例3金刚烷胺单克隆抗体的制备及特异性鉴定

[0084] 1、金刚烷胺单克隆抗体的制备

[0085] (1) 动物免疫:用上述制备出的免疫原按150 μ g/只以生理盐水溶解后,与弗氏完全佐剂等体积混匀,颈背部皮下注射免疫6、8周龄的Balb/c雌鼠,初次免疫后第7、14、28天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀,各追加免疫一次,融合前3天以免疫复合物150 μ g/只,不加弗氏佐剂再追加免疫一次;

[0086] (2) 细胞融合:取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)混合,然后在45s内缓慢加入预热的融合剂(PEG4000)进行融合,用HAT培养基悬浮均匀,再加入适量的饲养细胞,培养于96孔培养板,在37℃,5%CO₂培养箱中培养,5天后用HT培养基半换液,9天时进行全换液;

[0087] (3) 阳性杂交瘤的筛选:细胞融合后,待细胞长到培养孔面积的1/4时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞;初选采用间接ELISA方法,以包被抗原(预先用方阵法常规滴定其最佳包被浓度和阳性血清稀释度)包被酶标板,加入被测孔培养上清,孵育,清洗后加入羊抗鼠IgG-HRP和IgM-HRP,OPD进行显色反应;筛选出的阳性孔再用间接竞争ELISA方法筛选,先将细胞上清与100 μ g/mL的金刚烷胺等体积混合,37℃水浴作用30min,再加入到包被好的酶标板中;同时用PBS取代金刚烷胺作对照,其余步骤同上;若经金刚烷胺阻断后的OD_{450nm}值下降到对照孔的50‰以下,则判为阳性,经2、3次检测都为阳性的孔,立即用有限稀释法进行亚克隆化;

[0088] (4) 杂交瘤细胞的扩大培养:将2~3次亚克隆建株后的杂交瘤细胞扩大培养,收集上清液用间接ELISA测定效价,冻存;并取8~10周龄的Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.5mL/只,7~10天后腹腔注射杂交瘤细胞 $1\sim 2\times 10^6$ /只,7~10天后抽取小鼠腹水,离心取上清,测定效价,并冻存备用。

[0089] 2、金刚烷胺抗体效价的测定

[0090] 用方阵滴定法确定金刚烷胺包被抗原和上述制备的单克隆抗体的最适工作浓度,其中金刚烷胺包被抗原的工作浓度为2.1 μ g/mL,单克隆抗体工作浓度为1:40000。用不同浓度的金刚烷胺标准品溶液做实验溶液,其浓度如下:0、0.2、0.6、1.8、5.4、16.2 μ g/L,采用6组平行试验(n=6)。

[0091] 采用间接ELISA法测定抗血清的效价和特异性,其步骤如下:

[0092] (1) 加样:将所需数量的板条固定于板架,加入50 μ L样品或标准品到微孔板中,将50 μ L酶标记物加入微孔中,再加入50 μ L抗体工作液到微孔板中,充分振荡混匀,用盖板膜盖好;

[0093] (2) 温育:置室温(25℃)温育30min;

[0094] (3) 洗涤:弃去孔内液体,将稀释后的洗液注满各孔,静置30~60s,弃去孔内洗液;重复洗4次后拍干;

[0095] (4) 显色:每孔加入底物缓冲液50 μ L,再加入底物液50 μ L,振荡混匀(或将底物缓冲

液和底物液以1:1比例混合后,再加入100 μ L显色液),置室温(25 $^{\circ}$ C)温育10~15min;

[0096] (5) 终止:每孔加入终止液50 μ L,轻拍混匀;

[0097] (6) 读值:用酶标仪读值,在单波长450nm或双波长450nm/630nm下读取各孔吸光值(OD值)。

[0098] 以OD值为纵坐标,以金刚烷胺标准品浓度的Log₁₀值为横坐标,绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反s形状,并具有上平台和下平台,标准曲线的平行测定次数6次,实验重复性良好,相对标准偏差(变异系数)均在10%以内。

[0099] 根据标准曲线得出半数抑制量(IC₅₀),确定检测灵敏度。抑制率用以下式计算:

$$[0100] \quad \text{抑制率}(\%) = \frac{(OD_{\max} - OD_{\min}) - (OD_x - OD_{\min})}{(OD_{\max} - OD_{\min})} \times 100\%$$

[0101] 式中:OD_{max}为不加标准品时的吸光值,OD_x为标准品x时的吸光值,OD_{min}为空白对照孔的吸光值。抗体效果可通过对一定浓度药物的抑制率来表示:相同的药物浓度下,抑制率越高,则抗体对此药物的灵敏度越高。

[0102] 由上述公式计算得金刚烷胺抗体在缓冲液中的半数抑制量(IC₅₀)为0.79 μ g/L。

[0103] 实施例4金刚烷胺的酶联免疫检测试剂盒的制备

[0104] 1、准备试剂:

[0105] (1) 包被有金刚烷胺抗原的酶标板;

[0106] (2) 金刚烷胺抗体工作液;

[0107] (3) 酶标二抗:以1:8000的倍数稀释羊抗鼠IgG-HRP;

[0108] (4) 金刚烷胺标准品:金刚烷胺标准品溶液浓度分别为0 μ g/L、0.2 μ g/L、0.6 μ g/L、1.8 μ g/L、5.4 μ g/L、16.2 μ g/L;

[0109] (5) 底物液为2%过氧化脲的pH为5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液,底物缓冲液为1%的3,3',5,5'-四甲基联苯胺的pH为5.0的磷酸-柠檬酸缓冲溶液;

[0110] (6) 终止液:2mol/L硫酸水溶液;

[0111] (7) 20倍浓缩洗涤液:每1升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的,将10mL的吐温-20、990mL的磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01M、pH值为7.4;

[0112] (8) 提取剂:20%的盐酸水溶液;

[0113] (9) 复溶液:0.05M的磷酸缓冲液;

[0114] 其中,包被有金刚烷胺抗原的酶标板的制备方法为:用0.05mol/L的碳酸盐溶液将金刚烷胺抗原稀释至2.1 μ g/mL,包被96孔聚苯乙烯酶标板,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜包被,倾去包被液(包被缓冲液为pH值为9.6、0.05mol/L的碳酸盐缓冲液),用上述洗涤液洗涤2次,每次10s,拍干,然后在每孔中加入120 μ L封闭液(封闭液为由0.05%的BSA与0.01mol/L的磷酸盐缓冲液组成的pH为7.0的溶液),37 $^{\circ}$ C温育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0115] 2、试剂分装

[0116] 将各试剂测定合格后无菌分装,金刚烷胺抗体工作液7mL/瓶;酶标二抗7mL/瓶;金刚烷胺标准品溶液1mL/瓶;底物液7mL/瓶;底物缓冲液7mL/瓶;终止液7mL/瓶;提取剂10mL/瓶;复溶液50mL/瓶;20倍浓缩洗涤液50mL/瓶。采用不同颜色盖的透明塑料瓶分装后贴标

签,注明批号和有效期,4℃保存。

[0117] 3、试剂盒的组装

[0118] 分别将上述包被有金刚烷胺抗原的酶标板1块,金刚烷胺抗体工作液、辣根过氧化物酶标记的二抗、底物液、底物缓冲液、20倍浓缩洗涤液、提取剂和复溶液各1瓶,金刚烷胺标准品工作液6瓶和使用说明书1份置于试剂盒内指定位置,试剂盒检验合格后封装,4℃保存。

[0119] 实施例5试剂盒检测方法

[0120] 1、样品前处理:适用于检测鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝等样品。

[0121] (1)取(2±0.05)g去除脂肪并匀浆化的样品于50mL离心管中,加入6mL乙腈,100μL提取液,剧烈震荡2min;

[0122] (2)室温4000r/min以上离心5min;

[0123] (3)取4mL上清液于离心管中,于60℃氮气或空气吹干;

[0124] (4)加入0.5mL复溶液,充分涡动30s;

[0125] (5)取50μL进行分析。

[0126] 2、用试剂盒检测

[0127] (1)加样:将所需数量的板条固定于板架,加入50μL样品或标准品到微孔板中,将50μL酶标记物加入微孔中,再加入50μL抗体工作液到微孔板中,用盖板膜盖好,充分振荡混匀;

[0128] (2)温育:置室温(25℃)温育30min;

[0129] (3)洗涤:弃去孔内液体,将稀释后的洗液注满各孔,静置30~60s,弃去孔内洗液。重复洗4次后拍干;

[0130] (4)显色:每孔加入底物缓冲液50μL,再加入底物液50μL,振荡混匀(或将底物缓冲液和底物液以1:1比例混合后,再加入100μL显色液),置室温(25℃)温育10~15min;

[0131] (5)终止:每孔加入终止液50μL,轻拍混匀;

[0132] (6)读值:用酶标仪读值,在单波长450nm或双波长450nm/630nm下读取各孔A值。

[0133] 用每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值B除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0 为0浓度标准品溶液吸光值)再乘以100%,得到百分吸光度值,计算公式为:百分吸光度值(%) = $(B/B_0) \times 100\%$ 。以金刚烷胺标准品浓度(ug/L)的半对数值为X轴,百分吸光度值为Y轴,绘制标准曲线图,得到的标准曲线如图3所示。

[0134] 3、样品中金刚烷胺浓度的测定

[0135] 用每个检测样本溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准品溶液(0标准)的吸光度值(B_0 为0浓度标准品溶液吸光值)再乘以100%,得到百分吸光度值。相对应每一个检测样本溶液的百分吸光度值,则可从标准曲线上读出检测样本溶液的吸光度值,再根据标准品溶液的浓度值换算出样本溶液中金刚烷胺的残留量,最后再乘以样品前处理过程的稀释倍数0.375,即可计算出样品中金刚烷胺的浓度。

[0136] 4、试剂盒检测效果评价

[0137] (1)试剂盒灵敏度和检测限

[0138] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为0~16.2μg/L,IC₅₀的浮动范围为0.7~1.2μg/L;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓

度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对动物组织的检测限均为0.10 μ g/kg。

[0139] (2) 准确度和精密度试验

[0140] 向不含金刚烷胺的鸡肉样品中添加金刚烷胺标准品,使金刚烷胺标准品在样品中的终浓度分别为0.5、1、5ng/g,将添加后的样品分别按照上述方法进行前处理,得到检测样本溶液。从三个不同批次的试剂盒中各抽取3个试剂盒进行检测,检测方法如上所述,每个实验重复4次,分别计算变异系数。其中:

[0141] 1) 以回收率作为准确度评价指标,其计算公式为:样品的添加浓度回收率的计算方法:平均回收率(RG) = 测定值与真实值的比值 $\times 100\%$ 。

[0142] 2) 变异系数的计算方法:变异系数(CV) = (各平行样本的标准差与各平行样本平均值的比值) $\times 100\%$;其中批内变异系数的计算方法:批内CV = 同一次测定中各平行样本的变异系数,取其平均值;批间变异系数的计算方法:批间CV = 同一样本在不同批次测定结果的变异系数,取其平均值。

[0143] 3) 结果见表1。实验结果表明:本发明的试剂盒的平均回收率在101%~108%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%,符合国家对于试剂盒各项指标的标准。

[0144] 表1准确度和精密度试验结果

样品	添加量 (ng/g)	平均检测值 $\pm$ SD (ng/g)	平均回收率 (%)	批内变异 (%)	批间变异 (%)
[0145] 鸡肉	0.5	0.51 $\pm$ 0.03	101.69	6.35~10.57	9.28
	1	1.09 $\pm$ 0.07	108.71	6.80~10.31	10.33
	5	5.18 $\pm$ 0.07	103.66	1.35~9.55	8.36

[0146] (3) 试剂盒保存期的试验

[0147] 1) 试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}$ C,经过15个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(0标准)、50%抑制浓度、金刚烷胺添加实际测定值均在正常范围之内。

[0148] 2) 考虑到运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}$ C保存的条件下放置12天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒的各项指标完全符合要求。

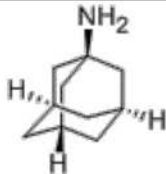
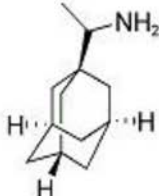
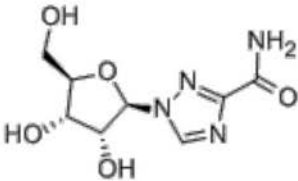
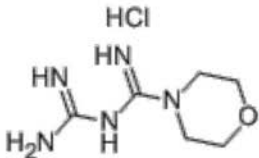
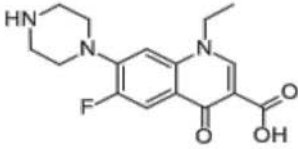
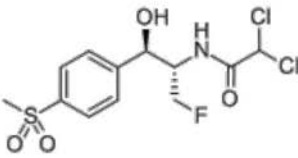
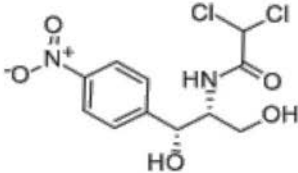
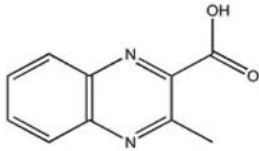
[0149] 3) 考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}$ C冰箱冷冻12天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。

[0150] 4) 从以上结果可得出,本发明的试剂盒可以在2~8 $^{\circ}$ C至少可以保存一年。

[0151] (4) 交叉反应率试验

[0152] 1) 选择与金刚烷胺结构或功能相似的其他药物进行交叉反应试验,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度(IC₅₀)和交叉反应率。与其他药物的交叉反应率越小,说明金刚烷胺酶联免疫检测试剂盒对金刚烷胺的检测特异性越好。结果见表2。

[0153] 表2金刚烷胺试剂盒交叉反应率

药物名称	结构式	IC ₅₀	交叉反应率
		(nmol/mL)	(%)
金刚烷胺		1.24	100.00
金刚乙胺		1.55	79.89
利巴韦林		ND	≤0.01
盐酸吗啉胍		ND	≤0.01
诺氟沙星		ND	≤0.01
氟苯尼考		ND	≤0.01
氯霉素		ND	≤0.01
喹乙醇代谢物		ND	≤0.01

[0156] 2) 实验结果表明:除金刚乙胺以外,与结构类似物和功能类似物的交叉反应率均小于0.01%,受其他化合物的影响小,该抗体特异性好,不易出现假阳性、错检等现象,可以应用于实际样品中金刚烷胺残留的筛查检测;使用本发明得到的抗体建立免疫检测试剂盒

不仅能特异、快速检测金刚烷胺,还能检测金刚烷胺结构类似物(金刚乙胺),这对动物组织中金刚烷胺残留的快速检测具有很重要的现实意义。

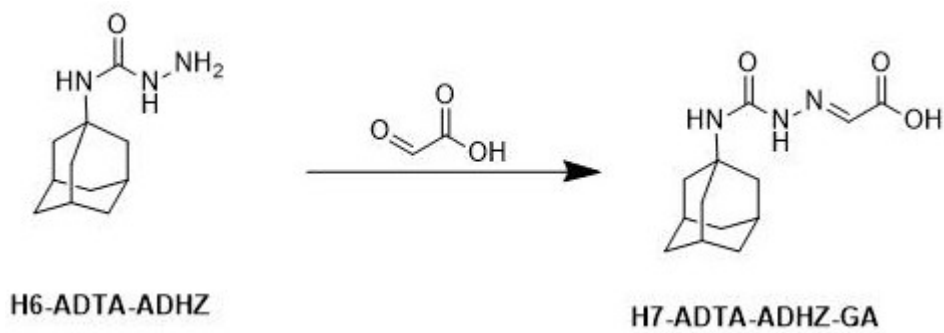


图1

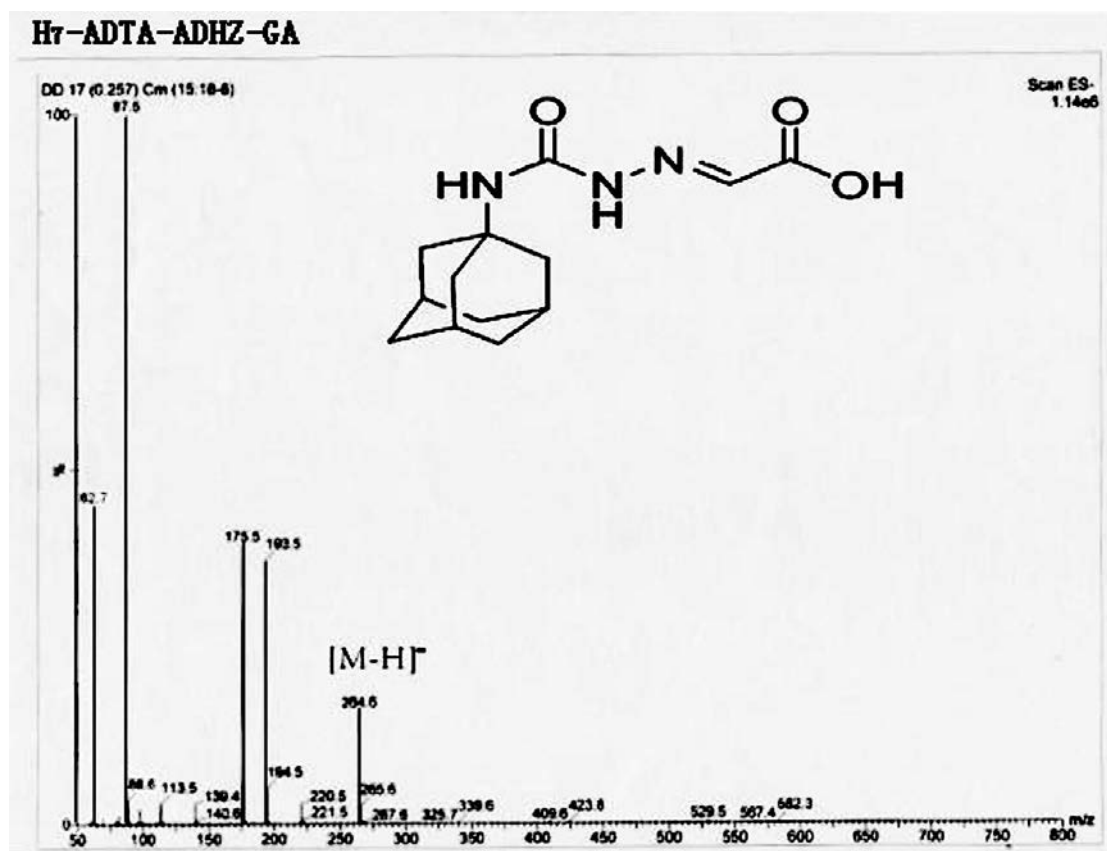


图2

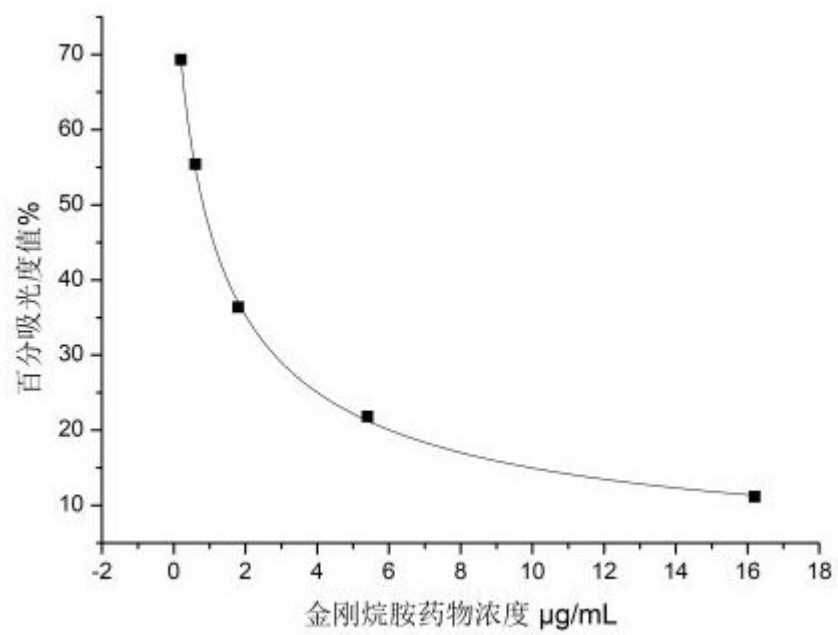


图3

专利名称(译)	一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN108152499A	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN201711278198.X	申请日	2017-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学 广东温氏食品集团股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学 广东温氏食品集团股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学 广东温氏食品集团股份有限公司		
[标]发明人	杨金易 沈玉栋 曾道平 谭庶 孙远明 徐振林 陈丽 韦田		
发明人	杨金易 沈玉栋 曾道平 谭庶 孙远明 徐振林 陈丽 韦田		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	林丽明		
其他公开文献	CN108152499B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种金刚烷胺的抗原、抗体及其酶联免疫检测试剂盒。本发明首先制备了金刚烷胺半抗原，其分子结构式如式(1)所示：，然后与偶联载体蛋白后得到人工抗原，然后通过杂交瘤技术获得金刚烷胺的单克隆抗体，从而以所述金刚烷胺单克隆抗体建立了竞争性酶联免疫检测方法及其试剂盒。本发明的金刚烷胺酶联免疫检测试剂盒可用于检测动物组织样品中金刚烷胺的含量，检出限为0.10μg/kg，IC₅₀为0.79μg/L，线性检测范围为0~16.2μg/L，该方法简便、快速，成本低廉、灵敏度高、特异性强，适合现场快速检测。

