

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910182284. X

[43] 公开日 2009年12月16日

[11] 公开号 CN 101603961A

[22] 申请日 2009.7.7

[21] 申请号 200910182284. X

[71] 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市滨湖区钱荣路 20 号

[72] 发明人 黄 飏 张 艺 张 珏 周 彬
赵卫国 金 坚

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

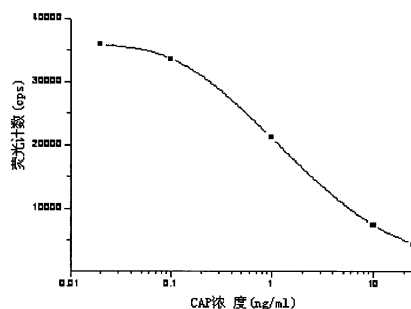
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种氯霉素的光激化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

一种氯霉素(CAP)的光激化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法,属于光激化学发光免疫分析技术领域。向不透明白色微孔板顺序加入:包被有CAP-OVA的发光微粒、CAP标准品或待测样品、兔抗CAP抗体及生物素化羊抗兔抗体,避光反应,再加入包被有链霉亲和素的感光微粒,孵育后检测。发光微粒上的CAP-OVA与游离CAP竞争连接到CAP抗体,再与生物素化羊抗兔抗体及包被链霉亲和素的感光微粒形成复合体,在红光激发下,通过单线态离子氧的产生和传递,将能量传递给发光微粒产生荧光,用光激化学发光检测仪检测,光信号强度与样品中CAP浓度成反比,对照标准曲线测得样品中CAP含量。本发明用于蜂蜜、牛奶、鸡蛋等食品中CAP含量的检测,试剂盒结构简单,检测时间短、灵敏度高、操作简便。



1、一种氯霉素 CAP 的光激化学发光免疫分析试剂盒，其特征是由(1)白色不透明微孔板，(2)CAP 标准品，(3) 包被有 CAP-OVA 的发光微粒，(4)兔抗 CAP 的抗体冻干品，(5)生物素化羊抗兔抗体冻干品和(6)包被有链霉亲和素的感光微粒六件物品组成。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征是包被有 CAP-OVA 的发光微粒(3)的制备：在离心管中加入 1mg 发光微粒，加入 12.5 μL 1% Tween-20，0.05 mg CAP-OVA 人工抗原，10 μL 硼氢化氰钠，用 0.1M、pH 6.0 的 2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液将体积补充到 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光振荡反应 48 小时，加入 10 μL 0.3 M、pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐溶液封闭未结合位点，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 小时，离心纯化，洗去未反应的试剂后，分离得到包被有 CAP-OVA 的发光微粒，稀释后备用。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征是 CAP 标准品(2)，从 CAP 纯品中稀释得到，稀释液为含有质量浓度 10% 甲醇的 0.05 mmol/L、pH 7.4 的 PBS，CAP 标准品的 CAP 浓度分别为：0 ng/mL，0.02 ng/mL，0.1 ng/mL，1 ng/mL，10 ng/mL，25 ng/mL。

4、一种用权利要求 1 所述的试剂盒检测 CAP 的方法，其特征是顺次向白色不透明微孔板中加入包被有 CAP-OVA 的发光微粒，CAP 标准品或处理好的被测样品，兔抗 CAP 抗体及生物素化羊抗兔抗体进行免疫反应；接着加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应后检测光信号，以加入 CAP 标准品的检测值绘制标准曲线，以加入被测样品的检测值从标准曲线计算被测样品中的 CAP 含量。

5、根据权利要求 4 所述的检测 CAP 的方法，其特征是操作为：取包被有 CAP-OVA 的发光微粒，CAP 标准品或处理好的被测样品、一定浓度的兔抗 CAP 抗体和生物素化羊抗兔抗体共四种试剂各 20 μL 加到白色不透明微孔板，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 分钟；加入 175 μL 包被有链霉亲和素的感光微粒，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟；在光激化学发光检测仪上检测光信号，从标准曲线计算出被测样品中的 CAP 含量。

6、根据权利要求 4 或 5 所述的检测 CAP 的方法，其特征是样品处理：

蜂蜜样品处理：2g 样品与 4mL 蒸馏水充分混合，加入 4mL 乙酸乙酯，加塞震荡 10min，3000g 离心 10min；取 2mL 上清到干净玻璃管，50 $^{\circ}\text{C}$ 温和氮流蒸干，残留物充分溶解于 1mL 稀释标准品用的稀释液待测；

鸡蛋样品处理：3g 样品均质后，加入 6mL 乙酸乙酯，震荡 10min，3000g 离心 10min；取 2mL 上清液到干净玻璃管，50 $^{\circ}\text{C}$ 温和氮流蒸干，用 1mL 正己烷溶解干燥的残留物，加入 1mL 稀释标准品用的稀释液充分混合，3000g 离心 10min；吸取下层水相用于检测；

牛奶样品处理：5mL 牛奶样品，2000rpm 离心 15min，取 2.5mL 下层脱脂奶与 5mL 乙酸乙酯充分混合，震荡 10min，再静置 5~10min；转移 4mL 上层溶液到干净玻璃管中，温和氮流蒸干；残留物溶解于 200 μ L 稀释标准品用的稀释液，待测。

一种氯霉素的光激化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法

技术领域

一种氯霉素的光激化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法，属于光激化学发光免疫分析（LICLIA）技术领域，用于食品中 CAP 含量的检测。

背景技术

氯霉素(Chloramphenicol, CAP)是一种廉价高效的广谱抗生素，对革兰氏阳性和阴性细菌都有很好的抑制作用，因此一度被广泛应用于农牧业中。但是动物源性食品随着食物链被人体长期摄入，可引发多种疾病。轻者破坏人体内正常菌群的平衡状态，菌群失调，使人体产生耐药菌株，给今后患病使用抗生素治疗带来不良影响；抗生素过敏体质的人会出现过敏反应，危及健康。严重时干扰骨髓细胞蛋白质的合成，并抑制幼稚细胞 DNA 合成，导致粒细胞减少，引发再生障碍性贫血、溶血、紫癜等恶性疾病。

鉴于 CAP 的毒副作用，国际食品学界将其列为禁药，欧盟、美国等均在法规中规定 CAP 残留限量标准为“零容忍量”（Zerotolerance），即不得检出，根据欧盟“2002/657/EC”标准规定，动物源性食物中 CAP 的最小要求检出极限是 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。不久美国 FDA 也做出相应的规定。我国农业部规定了 CAP 在所有食品动物的可食用组织中不得检出，并将其从《中国兽药典》中删除，列为禁药。并相应制定了 SN0219-93 和 SCT3018-2004 行业标准，与国际接轨。

为适应更高的检测标准，检测技术水平必须相应的提高，近十年 CAP 检测技术一直是国际专家学者研究的热门项目之一。CAP 的检测方法分为物理化学法和免疫化学法，前者有液相色谱法（LC）、高效液相色谱法（HPLC）、质谱法（MS）等，后者主要是酶免法（ELISA），检测的灵敏度均达到 ppb（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）级别。当前主流的检测方法是 LC——我国行业标准所使用的方法，以及 ELISA。近几年，国内外学者又研发出液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）、液相色谱电喷雾电离质谱法（LC-EITMS）、微生物分析等物理检测新方法，对 ELISA 方法的应用也有了进一步研究。

光激化学发光免疫分析（LICLIA）是以纳米级高分子微粒为基础的新一代化学发光免疫技术，又称为 AlphaLISA 分析法，该项技术将被广泛地应用于研究生物分子的相互作用。其主要原理是由光激发产生的均相化学发光技术，它具有快速、均相（免洗）、高灵敏、量程宽和操作简便的特点。LICLIA 试剂由含有感光化合物的感光微粒和含有发光化合物的发光微粒组成，微粒直径约 188nm，表面覆盖多糖水凝胶。水凝胶能减少非特异性结合，同时增加微粒的悬

浮性。微粒通过水凝胶表面的功能团与生物分子共价连接。纳米级微粒大大增加了反应的表面积，每个微粒表面覆盖成百上千个生物分子，可捕获目标分子。

LICLIA 技术的核心原理是单线态氧的产生和传递。在受到红色激光（680 nm）照射后，感光微粒能使周围环境中的氧转化为单线态氧，单线态氧的生存时间仅为 4 微秒。短暂的生存时间决定了单线态氧的传播直径很小（约为 200 nm）。当发光微粒在 200nm 范围之内就能接受单线态氧，并发出高能级的光（520 nm-620nm）。相反，如果在 200nm 直径范围内没有发光微粒，单线态氧就会回落到基态氧而没有信号产生。这种依赖于两种微粒相互接近的化学能量传递是 LICLIA 均相反应的基础。通常在该反应体系中，微粒的浓度是很低的。两种微粒相互随机碰撞的几率很低，因此，反应体系的本底非常微弱。如果包被在微粒表面的生物分子相互作用，拉近了两个微粒的距离，例如形成免疫夹心或受体-配体复合物，这样就能产生能量的有效传递并发出光信号。

发明内容

本发明的目的在于提供一种检测 CAP 的试剂盒及其检测方法，用于对蜂蜜等产品中 CAP 含量的检测。

本发明主要采用光激化学发光免疫分析法（LICLIA）检测 CAP。其技术方案：一种氯霉素 CAP 的光激化学发光免疫分析试剂盒，由(1)白色不透明微孔板，(2)CAP 标准品，(3) 包被有 CAP-OVA 的发光微粒，(4)兔抗 CAP 的抗体冻干品，(5)生物素化羊抗兔抗体冻干品和(6)包被有链霉亲和素的感光微粒六件物品组成。

包被有 CAP-OVA 的发光微粒(3)的制备：在离心管中加入 1mg 发光微粒，加入 12.5 μL 1% Tween-20，0.05 mg CAP-OVA 人工抗原，10 μL 硼氢化氰钠，用 0.1M、pH 6.0 的 2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液将体积补充到 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光振荡反应 48 小时，加入 10 μL 0.3 M、pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐溶液封闭未结合位点，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 小时，离心纯化，洗去未反应的试剂后，分离得到包被有 CAP-OVA 的发光微粒，稀释后备用。

CAP 标准品(2)，从 CAP 纯品中稀释得到，稀释液为含有质量浓度 10% 甲醇的 0.05 mmol/L、pH 7.4 的 PBS，CAP 标准品的 CAP 浓度分别为：0 ng/mL，0.02 ng/mL，0.1 ng/mL，1 ng/mL，10 ng/mL，25 ng/mL。

用所述的试剂盒检测 CAP 的方法，测定的基础是标记免疫反应。顺次向白色不透明微孔板中加入包被有 CAP-OVA 的发光微粒，CAP 标准品或处理好的被测样品，兔抗 CAP 抗体及生物素化羊抗兔抗体进行免疫反应；接着加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应后检测光信号，以加入 CAP 标准品的检测值绘制标准曲线，以加入被测样品的检测值从标准曲线计算被测样品的 CAP 含量。

所述的检测 CAP 的方法，其操作为：取包被有 CAP-OVA 的发光微粒，CAP

标准品或处理好的被测样品、一定浓度的兔抗 CAP 抗体和生物素化羊抗兔抗体共四种试剂各 20 μ L 加到白色不透明微孔板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟; 加入 175 μ L 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟; 在光激化学发光检测仪上检测光信号, 从标准曲线计算出被测样品中的 CAP 含量。

所述的检测 CAP 的方法, 其样品处理:

蜂蜜样品处理: 2g 样品与 4mL 蒸馏水充分混合, 加入 4mL 乙酸乙酯, 加塞震荡 10min, 3000g 离心 10min; 取 2mL 上清到干净玻璃管, 50 $^{\circ}$ C 温和氮流蒸干, 残留物充分溶解于 1mL 稀释标准品用的稀释液待测;

鸡蛋样品处理: 3g 样品均质后, 加入 6mL 乙酸乙酯, 震荡 10min, 3000g 离心 10min; 取 2mL 上清液到干净玻璃管, 50 $^{\circ}$ C 温和氮流蒸干, 用 1mL 正己烷溶解干燥的残留物, 加入 1mL 稀释标准品用的稀释液充分混合, 3000g 离心 10min; 吸取下层水相用于检测;

牛奶样品处理: 5mL 牛奶样品, 2000rpm 离心 15min, 取 2.5mL 下层脱脂奶与 5mL 乙酸乙酯充分混合, 震荡 10min, 再静置 5~10min; 转移 4mL 上层溶液到干净玻璃管中, 温和氮流蒸干; 残留物溶解于 200 μ L 稀释标准品用的稀释液, 待测。

本发明的有益效果: 该检测试剂盒结构简单, 操作简便、检测时间短、灵敏度高。

附图说明

图 1 检测 CAP 的试剂盒示意图。1、白色不透明微孔板, 2、CAP 标准品, 3、包被有 CAP-OVA 的发光微粒, 4、兔抗 CAP 的抗体冻干品, 5、生物素化羊抗兔抗体冻干品, 6、包被有链霉亲和素的感光微粒。

图 2 CAP- LICLIA 反应示意图。

图 3 CAP- LICLIA 标准曲线图。

具体实施方式

实施例 1 制备试剂盒

包被有 CAP-OVA 的发光微粒制备:

在离心管中加入 1mg 发光微粒, 加入 12.5 μ L 1% Tween-20, 0.05 mg CAP-OVA 人工抗原, 10 μ L 硼氢化氰钠, 用 0.1M、pH 6.0 的 2-(N-吗啉)乙磺酸 (MES) 缓冲液将体积补充到 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光振荡反应 48 小时。加入 10 μ L 0.3 M、pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐 (CMO) 溶液封闭未结合位点, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 小时后离心, 分离得到已包被有 CAP-OVA 的发光微粒, 稀释后备用。

CAP 标准品试剂的配制: (0 ng/mL, 0.02 ng/mL, 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL), 从 CAP 纯品中稀释得到, 稀释液为含有 10% 甲醇的 PBS(0.05 mmol/L、pH 7.4)。

试剂盒的组成:

- (1)、白色不透明微孔板 (12条×8孔, 可以拆分为单孔)。
- (2)、1×包被有CAP-OVA的发光微粒: 2mL。
- (3)、6×CAP 标准品, 1.0mL/瓶, 标准品 CAP 浓度为: 0, 0.02, 0.1, 1, 10, 25ng/mL。
- (4)、1×兔抗 CAP 抗体冻干品, 用时 0.5mL 蒸馏水溶解。
- (5)、1×生物素化羊抗兔抗体冻干品, 用时 0.5mL 蒸馏水溶解。
- (6)、1×包被有链霉亲和素的感光微粒: 20mL。

测定时注意事项

1. 使用之前将所有试剂回升至室温(18-30℃)。
2. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。
3. 在所有恒温孵育过程中避免光线照射。

实施例 2: 检测蜂蜜、鸡蛋、牛奶样品

样品处理:

蜂蜜样品处理: 2g 样品与 4mL 蒸馏水充分混合, 加入 4mL 乙酸乙酯, 加塞震荡 10min, 3000g 离心 10min。取 2mL 上清到干净玻璃管, 50℃温和氮流蒸干, 残留物充分溶解于 1mL 标准品稀释液, 备用。

鸡蛋样品处理: 3g 样品均质后, 加入 6mL 乙酸乙酯, 震荡 10min, 3000g 离心 10min。取 2mL 上清液到干净玻璃管, 50℃温和氮流蒸干, 用 1mL 正己烷溶解干燥的残留物, 加入 1mL 标准品稀释液充分混合。3000g 离心 10min。吸取下层水相用于检测。

牛奶样品处理: 5mL 样品, 2000rpm 离心 15min, 取 2.5mL 下层脱脂奶与 5mL 乙酸乙酯充分混合, 震荡 10min, 再静置 5~10min。转移 4mL 上层溶液到干净玻璃管中, 温和氮流蒸干。残留物溶解于 200 μ L 标准品稀释液, 待测。

取包被有 CAP-OVA 发光微粒、CAP 标准品或处理好的样品、一定浓度的兔抗 CAP 抗体和生物素化羊抗兔抗体共四种试剂各 20 μ L 加到白色不透明微孔板, 37℃孵育 20 分钟; 加入 175 μ L 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37℃孵育 10 分钟; 在光激化学发光检测仪上检测光信号, 从标准曲线测算出样品中的 CAP 含量。结果见表 1, 由标准曲线求得该例蜂蜜、鸡蛋、牛奶样品所含 CAP 浓度分别为 0.748、0.334、0.017ng/mL。

表 1

	标准品						蜂蜜样品	鸡蛋样品	牛奶样品
荧光值(cps)	38909	35887	33672	21145	7352	4306	23100	28176	35969
CAP 浓度(ng/mL)	0	0.02	0.1	1	10	25	0.748	0.334	0.017

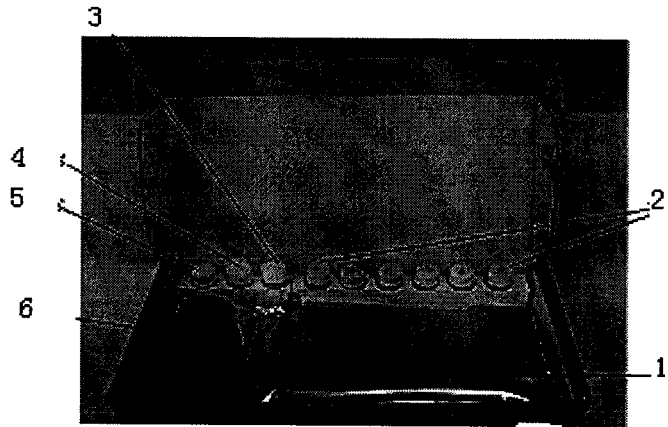


图 1

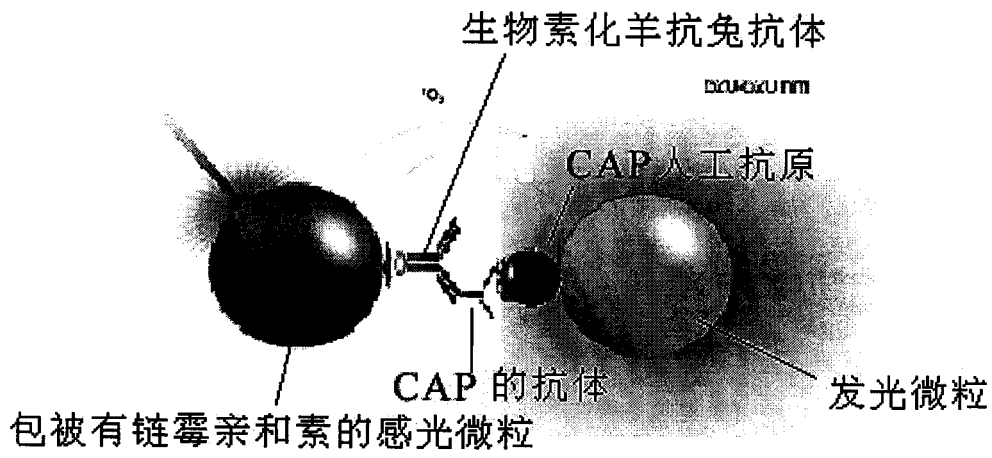


图 2

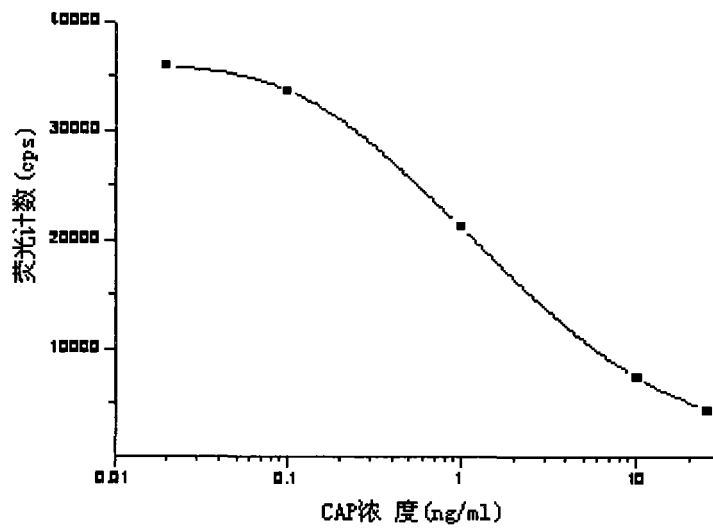


图 3

专利名称(译)	一种氯霉素的光激化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN101603961A	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	CN200910182284.X	申请日	2009-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	黄飏 张艺 张珏 周彬 赵卫国 金坚		
发明人	黄飏 张艺 张珏 周彬 赵卫国 金坚		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N1/28		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种氯霉素(CAP)的光激化学发光免疫分析试剂盒及其检测方法,属于光激化学发光免疫分析技术领域。向不透明白色微孔板顺序加入:包被有CAP - OVA的发光微粒、CAP标准品或待测样品、兔抗CAP抗体及生物素化羊抗兔抗体,避光反应,再加入包被有链霉亲和素的感光微粒,孵育后检测。发光微粒上的CAP - OVA与游离CAP竞争连接到CAP抗体,再与生物素化羊抗兔抗体及包被链霉亲和素的感光微粒形成复合体,在红光激发下,通过单线态离子氧的产生和传递,将能量传递给发光微粒产生荧光,用光激化学发光检测仪检测,光信号强度与样品中CAP浓度成反比,对照标准曲线测得样品中CAP含量。本发明用于蜂蜜、牛奶、鸡蛋等食品中CAP含量的检测,试剂盒结构简单,检测时间短、灵敏度高、操作简便。

