

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610011921.3

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月23日

[11] 公开号 CN 1967250A

[22] 申请日 2006.5.17

[21] 申请号 200610011921.3

[71] 申请人 李 季

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学资源环境学院

[72] 发明人 王保民

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 顾筑华

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被了抗抗体的酶标板、海绵支架、浓缩洗涤液、氯霉素标准品、氯霉素抗体、酶标琥珀氯霉素、显色液、反应终止液。检测已知浓度的氯霉素并绘制标准曲线，可以推算出待测氯霉素的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测动物源食品中的氯霉素残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

1.一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒,其特征在于包含包被了抗抗体的酶标板、浓缩洗涤液、氯霉素标准品、氯霉素抗体、酶标琥珀氯霉素、显色液、反应终止液。

2.根据权利要求1所述的酶联免疫吸附检测试剂盒,其中,氯霉素抗体在制备过程中所用的免疫原是半抗原琥珀氯霉素与牛血清白蛋白的偶联复合物。

3.根据权利要求1或2所述的酶联免疫吸附检测试剂盒,其中,酶标琥珀氯霉素,其特征在于由半抗原琥珀氯霉素与辣根过氧化物酶偶联复合而成。

4.根据权利要求1或2所述的酶联免疫吸附检测试剂盒,其中,浓缩洗涤液的配方为每20mL蒸馏水中加入氯化钠7~9g、磷酸二氢钾0.1~0.3g、磷酸氢二钠2~4g、氯化钾3~6g、吐温-20 0.5~3mL。

5.根据权利要求1或2所述的酶联免疫吸附检测试剂盒,其中,显色液包括A液和B液,A液配方为每1000mL水中加入过氧化脲1g, 10.3g 柠檬酸, 35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 吐温-20 100 μL , pH5; B液配方为每1000mL蒸馏水中加入四甲基联苯胺 700mg, 10.3g 柠檬酸, pH2.4-2.8。

6.根据权利要求1或2所述的酶联免疫吸附检测试剂盒,其中,终止液为2mol/L的硫酸液。

一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒

技术领域

本发明涉及一种酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒,具体地说,涉及一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒。

背景技术

氯霉素(Chloramphenicol,CAP)是Ehrlich(1947)分离出来的一种广谱抗生素。由于其低廉的价格和稳定的抗菌性,曾在一段时间内作为饲料添加剂和兽医临床常用药品。但氯霉素有严重的毒副作用,能引起再生障碍性贫血症和婴儿灰色综合症。美国和欧共体已禁止在动物中使用氯霉素,并规定在动物源食品中不得检出,且这种不得检出的低限已达到 $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前,我国动物源食品中氯霉素残留仍很严重,出口的水产品、蜂蜜屡屡被检出氯霉素残留。为保障人民的身体健康,迫切需要建立灵敏度高,特异性强,简便易行的检验方法。

氯霉素检测方法包括微生物法、色谱法、免疫测定法。微生物法易操作、费用低,但灵敏度低、特异性差。色谱法精确可靠、灵敏度高,检测极限可达到 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$,但前处理步骤多,回收率偏低。免疫测定具有灵敏度高、特异性强、对仪器设备和人员素质要求低以及样品前处理简单等优点,适于现场监控和大规模样品筛选。

发明内容

(一)要解决的技术问题

本发明针对上述不足,公开了一种具有高特异性、高灵敏度、高准确度、高精度、操作方法简单的酶联免疫吸附检测试剂盒,用于动物性食品中氯霉素残留的批量、快速检测。

(二) 技术方案

为实现上述目的，本发明提供了一种氯霉素残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒，该试剂盒包括包被了抗抗体的酶标板、海绵支架、浓缩洗涤液、氯霉素标准品、氯霉素抗体、酶标琥珀氯霉素、显色液、反应终止液。

其中，包被了抗抗体的酶标板中的抗抗体为羊抗兔 IgG 抗体。

其中，氯霉素抗体是氯霉素多克隆抗体，氯霉素抗体的制备过程中所用的免疫原是半抗原琥珀氯霉素与牛血清白蛋白偶联复合物。

其中，所述的酶标琥珀氯霉素是辣根过氧化物酶标记的琥珀氯霉素。

其中，浓缩洗涤液的配方为每 20mL 蒸馏水中加入氯化钠 7~9g、磷酸二氢钾 0.1~0.3g、磷酸氢二钠 2~4g、氯化钾 3~6g、吐温-200.5~3mL。浓缩洗涤液的浓度是正常使用时的 50 倍。

其中，显色液包括 A 液和 B 液，A 液配方为每 1000mL 水中加入过氧化脲 1g，10.3g 柠檬酸，35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，吐温-20 100 μL ，pH5； B 液配方为每 1000mL 蒸馏水中加入四甲基联苯胺 (TMB) 700mg (40mL DMSO 溶解)，10.3g 柠檬酸，pH2.4-2.6。

本发明试剂盒的分析原理是：

酶标板上的每个孔均包被有相同量的抗抗体，加入待测样品稀释液、酶标琥珀氯霉素和氯霉素抗体，氯霉素抗体与抗抗体通过抗原抗体反应结合到固相上，样品中的氯霉素与酶标琥珀氯霉素竞争结合氯霉素抗体。当样品中的氯霉素浓度高的时候，结合的氯霉素抗体就多，而酶标琥珀氯霉素结合的氯霉素抗体就少，用洗涤液洗涤后加入显色液 A 液和 B 液，显色反应浅，用酶标仪检测的 OD 值

低，表明抑制率高。反之，当待测氯霉素浓度低时，则所测的 OD 值高，抑制率低。根据用已知的氯霉素浓度检测所作的标准曲线，可以推算出待测氯霉素的浓度。

(三) 有益效果

本发明的优点是能准确灵敏地检测动物食品中的氯霉素残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。本发明对解决大批量样品的氯霉素残留现场监控技术具有重要的现实意义。

具体实施方式

以下实施例用于对本发明的进一步说明，但不用来限制本发明所要保护的范围。

实施例 1 试剂盒操作及结果计算

待测样品经前处理后，用 PBST 定容备用。拆开真空包装袋并取出酶标板，在室温下平衡 5 分钟备用。将 CAP 标准物用样品稀释液依次稀释成 2000、500、250、100、50、25、10、5、2、0 ng/ml 共 10 个浓度，加入 50 μL 处理好的样品或标样到各孔中，再加入用样品稀释液稀释的辣根过氧化物酶标记的琥珀氯霉素，每孔加 25 μl；又加入用样品稀释液稀释的 CAP 抗体，每孔加 25 μl，37 °C 下竞争 0.5 h。将板洗涤 5 次，甩干。每孔加 100 μl 显色液（A 液和 B 液各 50 μl）。每孔中加入 50 μl 终止液终止反应。将含 0 ng/mL 标准品孔的 OD 值减去 2000 ng/ml 孔的 OD 值定为 B_0 ，其余孔经同样方法校正后的 OD 值定为 B；以 B/B_0 值为纵坐标，相应标准品浓度的 log 值为横坐标，绘制氯霉素标准抑制曲线。其中，曲线回归方程为 $Y = -0.231X + 0.755$ ， $R^2 = 0.993$ ，抑制中浓度 $IC_{50} = 12.9$ ng/ml，最低检测限 $IC_{10} = 0.24$ ng/ml。

实施例 2 酶标半抗原琥珀氯霉素的制备方法

称取3mg琥珀氯霉素，常温下用0.5mL的二甲基亚砜（DMSO）完全溶解，4℃下冷却并加入37.5μl的3-正丁胺（Tri-n-butylamine），搅拌0.5h。再加入18.8μl的氯甲酸异丁酯，搅拌0.5h，得到甲液。称取10mg的辣根过氧化物酶，用2mL碳酸盐缓冲液在4℃下溶解，此为乙液。4℃下甲液滴加到乙液中，搅拌过夜。用PBS充分透析后-20℃贮存。

实施例3 氯霉素多克隆抗体制备

以活性酯法将半抗原琥珀氯霉素与牛血清白蛋白偶联，称2mg偶联物溶于1mL生理盐水中，和1mL完全弗氏佐剂混合，充分乳化后注射新西兰大耳白兔大腿，以后每隔两周加强免疫一次，换用不完全弗氏佐剂与免疫原混合，免疫部位为颈背部皮下，从第三次免疫开始，每次免疫后一周从兔耳静脉采血检测血清效价。总共免疫5次，最后一次免疫后一周从兔颈动脉采全血，用35%的饱和硫酸铵盐析法粗提兔抗血清，最后用DE-52阴离子交换层析法进一步纯化，获得较纯的氯霉素多克隆抗体。

实施例4 氯霉素残留分析酶联免疫吸附检测试剂盒的组建

本例中，试剂盒包含如下部分：

- (1) 包被了羊抗兔抗体的酶标板
- (2) 海绵支架
- (3) 1mg/mL 氯霉素标准品
- (4) 氯霉素多克隆抗体
- (5) 辣根过氧化物酶标记的琥珀氯霉素
- (6) 浓缩洗涤液配方为：氯化钠 8g、磷酸二氢钾 0.2g、磷酸氢二钠 3g、氯化钾 5g、吐温-20 2mL、蒸馏水 20 mL。
- (7) 显色液 A 液配方：过氧化脲 1g，10.3g 柠檬酸，35.8g Na₂

$\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 吐温-20 100 μL , 蒸馏水 1000 mL, pH5。

(8)显色液 B 液配方: 四甲基联苯胺(TMB)700mg (40mL DMSO 溶解), 10.3g 柠檬酸, 蒸馏水 1000 mL, pH2.4-2.6。

实施例 5 试剂盒特异性实验

选择链霉素、四环素、土霉素、青霉素、红霉素、庆大霉素、卡那霉素 7 种常用抗生素及琥珀氯霉素作为待测物, 测得各种物质的抑制中浓度 (IC_{50}), 再用下式计算抗体对这些物质的交叉反应性; 交叉反应率愈小, 则抗体对氯霉素的特异性愈强, 反之则抗体的特异性差。

$$\text{交叉反应 (CR\%)} = \text{IC}_{50}(\text{氯霉素}) / \text{IC}_{50}(\text{供试物}) \times 100\%。$$

实验测定结果见表 1, 采用直接 ELISA 法, 多克隆抗体对常用抗生素的交叉反应率均小于 0.01%, 说明该试剂盒的特异性好, 可保证对样品中氯霉素残留测定结果的可靠性。

表1 抗体与其它相关物质的交叉反应率

Table 1 Cross - reactivity of CAP and related analytes

化合物名称	交叉反应 (%)
氯霉素	100
琥珀氯霉素	174.54
链霉素	<0.01
四环素	<0.01
土霉素	<0.01
青霉素	<0.01
红霉素	<0.01
庆大霉素	<0.01
卡那霉素	<0.01

实施例 6 回收试验

在脱脂牛奶中按照设定的量添加 CAP 标准品, 然后用本方法测定 CAP 的含量。CAP 的测定值与实际的 CAP 添加值之比, 即为添加回收率。CAP 在牛奶中的添加回收率在 95.53 ~ 112.38 % 之间, 6 次

重复测定的变异系数为 0.01 ~ 0.32,均符合农药残留量测定的要求,说明此测定方法是可靠的,可用于 CAP 在牛奶中残留量的分析测定。见表 2。

表 2 牛奶样品中氯霉素的添加回收率

Table 2 Recovery of CAP for spiked milk

实际添加 CAP 浓度 (ng/ml)	实际测定的 CAP 浓度 (ng/ml) (n=6)	回收率 (%)	变异系数 (%)
0.00	0.40±0.02	—	0.05
0.50	0.53±0.09	112.38	0.21
1.00	1.10±0.12	110.11	0.26
2.00	1.95±0.24	95.53	0.32
5.00	5.41±0.01	108.21	0.01

专利名称(译)	一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1967250A	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200610011921.3	申请日	2006-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	李季		
申请(专利权)人(译)	李季		
当前申请(专利权)人(译)	李季		
[标]发明人	王保民		
发明人	王保民		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
其他公开文献	CN1967250B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于氯霉素残留分析的酶联免疫吸附检测试剂盒，包括包被了抗抗体的酶标板、海绵支架、浓缩洗涤液、氯霉素标准品、氯霉素抗体、酶标琥珀氯霉素、显色液、反应终止液。检测已知浓度的氯霉素并绘制标准曲线，可以推算出待测氯霉素的浓度。本发明的优点是能准确灵敏地检测动物源食品中的氯霉素残留，样品的前处理过程简单，耗时少，能同时检测大量的样品，样品检测成本远低于传统的仪器检测方法。

Table 2 Recovery of CAP for spiked milk

实际添加 CAP 浓度 (ng/ml)	实际测定的 CAP 浓度 (ng/ml) (n=6)	回收率 (%)	变异系数 (%)
0.00	0.40±0.02	—	0.05
0.50	0.53±0.09	112.38	0.21
1.00	1.10±0.12	110.11	0.26
2.00	1.95±0.24	95.53	0.32
5.00	5.41±0.01	108.21	0.01