



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101358966 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 28

(21) 申请号 200810118443. 5

C12N 5/12(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 22

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 2541 2008. 06. 04

周艳等. 粘杆菌素研究及其应用. 《中国饲料》. 2006, (第 16 期), 全文.

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平回龙观镇国际信息
产业基地高新四街 8 号

胡坚等. 多粘菌素 B 对小鼠免疫功能的影响. 《中国药理学与毒理学杂志》. 1990, 第 4 卷 (第 4 期), 全文.

(72) 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟

汪善良 刘福林 赵正苗 冯才茂
余厚美

Gertrand Suhren et al. Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC-and ELISA-technique. 《Analytica chimica》. 2004, 第 529 卷 (第 2005 期), 第 99 页.

(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 任凤华

审查员 刘苗

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测粘杆菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测粘杆菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体；所述特异性抗体为所述粘杆菌素的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的粘杆菌素单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精密度高、准确度高等特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测粘杆菌素的方法，操作简便，缩短了检测的时间，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法将在粘杆菌素的检测中发挥重要作用。

CN 101358966 B

1. 一种检测粘杆菌素的酶联免疫试剂盒,包括粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体;所述特异性抗体为所述粘杆菌素的单克隆抗体;

所述单克隆抗体是由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体以下述任一种形式存在:

1) 将所述粘杆菌素与载体蛋白进行偶联,得到粘杆菌素与载体蛋白的偶联物,将其作为包被原,所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物;

2) 所述特异性抗体为包被原,所述粘杆菌素进行酶标记后作为酶标记物。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括抗抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;

所述粘杆菌素和抗抗体以下述任一种形式存在:

1) 将所述粘杆菌素与载体蛋白进行偶联,得到粘杆菌素与载体蛋白的偶联物,将其作为包被原,所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

2) 所述抗抗体为包被原,所述粘杆菌素进行酶标记后作为酶标记物。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括粘杆菌素标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液;所述浓缩洗涤液为含有 0.8-1.3% 牛血清蛋白、45-60% 甘油, pH 值为 9.2-9.5、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于:所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶;当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色剂为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为含有 1.0% 牛血清蛋白、55% 甘油和 pH 值为 9.3、0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液为含有 0.4% 的人血清蛋白、pH 为 9.6、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述抗抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到酶标抗抗体;所述过碘酸钠方法中,所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2 : 1。

8. 由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生的粘杆菌素单克隆抗体。

9. 保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4。

一种检测粘杆菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测粘杆菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 粘杆菌素 (colistin, CLS), 又称多粘菌素 E (polymyxin E), 由多个粘杆菌素 (*B. polymyxa*) 产生。它对革兰氏阴性菌有很强的抑制作用, 可治疗志贺氏痢疾杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、沙门氏杆菌和普通变形杆菌引起的感染, 它还可以用作饲料添加剂, 提高饲料转化率, 促进畜禽生长, 预防规模化养殖中畜禽疾病的发生。因硫酸粘杆菌素具有抗菌作用强、残留量低、不易产生耐药性的特点, 因此, 中国、美国、欧盟和日本等许多国家和地区批准将其作为饲料添加剂或兽药。

[0003] 随着硫酸粘杆菌素在养殖业中的应用日益增多, 动物性食品中硫酸粘杆菌素的残留问题逐渐受到各国的重视, 欧盟率先制定了粘杆菌素在动物可食用组织中的最高残留限量标准, 其中肌肉、肝和肾的最高残留限量标准分别为 150、150 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国农业部公告第 235 号文件 (发布《动物性食品中兽药最高残留限量》) 中规定的粘杆菌素最高残留限量与欧盟的相一致。

[0004] 目前, 用来检测粘杆菌素残留量的分析方法主要是微生物测定法, 但是粘杆菌素属高分子量 (相对于常用抗生素而言)、高极性物质, 其热稳定性差导致其不宜采用 GC 法进行分析, 其选择性差导致使用仪器方法不能达到所需的检测灵敏度和检测限。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种检测粘杆菌素的酶联免疫试剂盒。

[0006] 本发明所提供的检测粘杆菌素的酶联免疫试剂盒, 包括粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体; 所述特异性抗体为所述粘杆菌素的多克隆抗体或单克隆抗体。其中, 所述粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体可以以下述任一种形式存在:

[0007] 1) 将所述粘杆菌素与载体蛋白进行偶联, 得到粘杆菌素与载体蛋白的偶联物, 将其作为包被原, 所述特异性抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0008] 2) 所述特异性抗体为包被原, 所述粘杆菌素进行酶标记后作为酶标记物。

[0009] 所述试剂盒还可以既包括粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体又包括抗抗体; 所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体; 其中, 所述粘杆菌素和抗抗体以下述任一种形式存在:

[0010] 1) 将所述粘杆菌素与载体蛋白进行偶联, 得到粘杆菌素与载体蛋白的偶联物, 将其作为包被原, 所述抗抗体进行酶标记后作为酶标记物;

[0011] 2) 所述抗抗体为包被原, 所述粘杆菌素进行酶标记后作为酶标记物。

[0012] 所述粘杆菌素多克隆抗体和所述粘杆菌素单克隆抗体, 均是以粘杆菌素与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的; 所述载体蛋白可以为甲状腺蛋白、牛血清蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、兔血清蛋白、血蓝蛋白、纤维蛋白原或卵清蛋白。

[0013] 所述粘杆菌素单克隆抗体是由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生的抗体。

[0014] 所述粘杆菌素多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体。

[0015] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括粘杆菌素标准品溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

[0016] 其中,所述浓缩洗涤液可为含有 0.8-1.3% 牛血清蛋白、45-60% 甘油, pH 值为 9.2-9.5、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液可为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

[0017] 所述酶标记中所用的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶;当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述显色液由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1-2mol/L 硫酸或盐酸溶液;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色剂为硝基磷酸盐缓冲液,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0018] 所述浓缩洗涤液具体可为含有 1.0% 牛血清蛋白、55% (质量百分含量) 甘油和 pH 值为 9.3、0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述浓缩复溶液具体可为含有 0.4% 的人血清蛋白、pH 为 9.6、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0019] 所述抗抗体进行酶标记的方法是采用过碘酸钠法将所述标记酶与所述抗抗体进行偶联得到酶标抗抗体;所述过碘酸钠方法中,所述标记酶与所述抗抗体的摩尔浓度比为 2:1。本发明的该改良的过碘酸钠法省略了封闭酶上氨基的步骤,节省了时间,又降低了辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗抗体的浓度比率,节省了原材料。

[0020] 粘杆菌素分子量小于 3000,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。粘杆菌素可以通过戊二醛法或碳化二亚胺法直接与载体蛋白偶联,得到免疫源或包被源。在制备免疫原时,粘杆菌素与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利,本发明通过实验表明,粘杆菌素与载体蛋白的结合摩尔比为 (8-10):1 比较合适;所述载体蛋白具体可为甲状腺蛋白。在制备包被原时,粘杆菌素与所述载体蛋白的摩尔配比为 10:1 比较合适。

[0021] 制作包被有包被原的酶标板时,所用的包被缓冲液可以为 pH 值为 9.1-9.9、0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;所述封闭液可以为含有 0.4-0.6% 的卵清白蛋白、0.2-0.5% 的脱脂奶粉、0.05-0.3% 的蔗糖、pH 值为 4.0-5.0、0.1mol/L 柠檬酸缓冲液;所述百分含量均为质量百分含量。

[0022] 本发明的又一个目的是提供一种检测粘杆菌素的方法。

[0023] 本发明所提供的检测粘杆菌素的方法,包括以下步骤:

[0024] 1) 样品前处理

[0025] 向每 1.0g 动物组织匀浆物中,加入 9-12ml 0.03-0.07M 硫酸溶液,混匀,置于 37°C 温箱孵育 20-40min,在 5-10°C 下以 3000g 以上的速度离心 5-15min,取上层液体 3-5ml,加入 140-170ml 1.5-2.5M 的氢氧化钠溶液,混匀,调 pH 值为 6-8 后移取液体,加入等体积的上述任一所述复溶液,混匀,取样进行分析;

[0026] 2) 利用上述任一所述的酶联免疫试剂盒检测 1) 中所述稀释液。

[0027] 由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生的粘杆菌素单克隆抗体属于本发明的保护范围。

[0028] 保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 也属于本发明的保护范围。

[0029] 本发明的检测粘杆菌素的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中粘杆菌素的残留量。本试剂盒中采用高特异性的粘杆菌素单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性,实验结果表明,本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精密度高、准确度高等特点;本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式,使用方便,成本低廉。用本发明试剂盒检测粘杆菌素的方法,操作简便,简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测的时间,对样品的前处理要求低,能同时快速检测大批量样品。因此,利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法,能够进行现场监控且适合大量样本的定性和定量筛查,将在粘杆菌素的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0030] 图 1 为以粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的标准曲线图。

具体实施方式

[0031] 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。

[0032] 实施例 1、以粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的制备及使用

[0033] 一、以粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的检测原理如下:

[0034] 当在酶标板微孔条上的包被原为粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液,再加入粘杆菌素特异性抗体,样本中残留的粘杆菌素与酶标板上粘杆菌素偶联抗原竞争粘杆菌素特异性抗体,再加入酶标抗抗体,用显色液显色,样本吸光值与粘杆菌素的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中粘杆菌素的残留含量。

[0035] 二、以粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒一般可以包括如下:

[0036] 1、包被有包被原(包被原为粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物)的酶标板;包被原的浓度可以为 0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$;

[0037] 2、酶标抗抗体工作液:酶标二抗为用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;酶标二抗的稀释液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,酶标抗抗体工作液稀释度为 1:400,所述百分含量为质量百分含量。

[0038] 3、粘杆菌素特异性抗体工作液:可以为粘杆菌素多克隆抗体工作液或粘杆菌素单克隆抗体工作液;用稀释液将粘杆菌素特异性抗体稀释 2500 倍,得到特异性抗体工作液,所述稀释液为含有 3.0% (质量百分含量) 酪蛋白和 0.003% (质量百分含量) 的叠氮化钠、pH 值为 5.6、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0039] 4、粘杆菌素标准品(上海贝基生物科技有限公司)溶液 6 瓶,浓度分别为 0 $\mu\text{g/}$

L、0.5 μg/L、1.5 μg/L、4.5 μg/L、13.5 μg/L、40.5 μg/L；配制标准品的溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0040] 5、底物显色液由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺；7ml/瓶，1 瓶；

[0041] 6、终止液：1-2M 硫酸或盐酸；7ml/瓶，1 瓶；

[0042] 7、浓缩洗涤液为含有 0.8-1.3% 牛血清蛋白、45-60% 甘油，pH 值为 9.2-9.5、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；50ml/瓶，1 瓶；所述百分含量为质量百分含量。

[0043] 8、复溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液；400ml/瓶，1 瓶；所述百分含量为质量百分含量。

[0044] 三、以粘杆菌素半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原、酶标二抗为酶标记物的试剂盒的具体组成及其制备：

[0045] (一) 组成

[0046] 1、包被有包被原（包被原为粘杆菌素半抗原与血蓝蛋白偶联物）的酶标板；包被原的浓度为 0.2 μg/ml。

[0047] 2、酶标抗抗体工作液：用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；酶标二抗稀释液为含有 0.4% 的人血清蛋白、pH 为 9.6、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液，酶标抗抗体工作液稀释度为 1:400，所述百分含量为质量百分含量。

[0048] 3、粘杆菌素单克隆抗体工作液：粘杆菌素单克隆抗体是由保藏编号为 CGMCCNo. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生的；粘杆菌素单克隆抗体工作液是按照以下方法制备的：用稀释液将粘杆菌素单克隆抗体稀释 2500 倍，得到单抗工作液；所述稀释液为含有 3.0%（质量百分含量）酪蛋白和 0.003%（质量百分含量）叠氮化钠、pH 值为 5.6、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0049] 4、粘杆菌素标准品（上海贝基生物科技有限公司）溶液：6 瓶，浓度分别为 0 μg/L、0.5 μg/L、1.5 μg/L、4.5 μg/L、13.5 μg/L、40.5 μg/L，配制标准品的溶液为含有 0.4% 的人血清蛋白、pH 为 9.6、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0050] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，底物显色液 A 液为过氧化脲，7ml/瓶，1 瓶；底物显色液 B 液为四甲基联苯胺，7ml/瓶，1 瓶。

[0051] 6、终止液：2mol/L 硫酸，7ml/瓶，1 瓶。

[0052] 7、浓缩洗涤液：含有 1.0% 牛血清蛋白、55% 甘油和 pH 值为 9.3、0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；50ml/瓶，1 瓶。

[0053] 8、浓缩复溶液：含有 0.4% 的人血清蛋白、pH 为 9.6、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液；400ml/瓶，1 瓶。

[0054] (二) 制备

[0055] 1、包被有粘杆菌素半抗原与血蓝蛋白偶联物的酶标板的制备

[0056] (1) 包被原的制备

[0057] 将粘杆菌素和血蓝蛋白，采用碳化二亚胺法进行偶联得到包被抗原。

[0058] 称取血蓝蛋白 36mg，使之充分溶解在 2mL 蒸馏水中得 I 液；称取 EDC20mg 和 NHS15mg，使之充分溶解在 0.5mL 蒸馏水中得到 II 液；然后在搅拌条件下将 I 液加入 II 液中，室温活化反应 1h 得溶液 III；取粘杆菌素 5mg 用 1.5ml 水溶解，然后缓慢加入溶液 III

中,搅拌反应过夜,得到粘杆菌素和血蓝蛋白的偶联物即包被原;其中粘杆菌素与所述血蓝蛋白的摩尔配比为 10 :1。

[0059] (2) 包被有包被原的酶标板的制备

[0060] 用包被缓冲液将包被原稀释成 0.15-0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h, 再 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 2 次, 每次 30 秒, 拍干, 然后在每孔中加入 150-200 μl 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1-2h, 倾去孔内液体拍干, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0061] 包被缓冲液为 pH 值为 9.9、0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0062] 封闭液为含有 0.4% 的卵清白蛋白、0.3% 的脱脂奶粉、0.2% 的蔗糖、pH 值为 4.20、1mol/L 柠檬酸缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

[0063] 2、粘杆菌素单克隆抗体的制备

[0064] (1) 免疫原的制备

[0065] 将粘杆菌素和甲状腺蛋白采用戊二醛法进行偶联得到免疫原。

[0066] 取粘杆菌素 5mg 用 0.5ml 水溶解, 在搅拌的条件下加入浓度为 2.5% (质量百分含量) 的戊二醛 0.1ml, 室温活化反应 18h, 再加入甲状腺蛋白 50mg, 搅拌反应过夜, 得到粘杆菌素免疫原;粘杆菌素与甲状腺蛋白的结合摩尔比为 9 :1。

[0067] (2) 制备单抗

[0068] a. 动物免疫

[0069] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/$ 只, 使其产生多克隆抗体血清。

[0070] b. 细胞融合和克隆化

[0071] 小鼠血清测定结果较高后, 取其脾细胞, 按 7:1 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, 直到得到能稳定分泌粘杆菌素单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 将该细胞株命名为对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4, 该细胞株已于 2008 年 06 月 04 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), 保藏编号为 CGMCC No. 2541。

[0072] c. 细胞冻存和复苏

[0073] 将粘杆菌素的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^9 个 /ml 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 立即放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养。

[0074] d. 单克隆抗体的生产与纯化

[0075] 可以用如下两种方法制备单抗:

[0076] 方法 1: 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/ 只, 7 天后腹腔注射粘杆菌素的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^7 个 / 只, 7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 得到单克隆抗体, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0077] 方法 2: 增量培养法: 将杂交瘤细胞 CGMCC No. 2541 置于 pH 为 7.4、0.2% 碳酸氢钠、1640+20% 小牛血清培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行培养, 用辛酸-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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0078] 3、多克隆抗体的制备

[0079] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以粘杆菌素抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 1.5mg/kg,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 3-4 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,共免疫 5 次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血,测定血清抗体效价,心脏采血,用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0080] 4、辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备过程:

[0081] 羊抗鼠抗抗体购自北京博奥森公司,货号 bse-0296G。

[0082] 羊抗兔抗抗体购自北京博奥森公司,货号 bse-0295G。

[0083] (2) 辣根过氧化物酶标记的抗抗体的制备

[0084] 将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。

[0085] 传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1;由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合物。

[0086] 本发明利用改良的过碘酸钠法进行了抗体的酶标,其省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。降低了辣根过氧化物酶:抗抗体的摩尔浓度比率至 2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0087] 四、样品中粘杆菌素的检测

[0088] 本发明试剂盒可以用于检测动物组织(如猪肌肉、鸡肝脏、鱼、虾等)。

[0089] 1、样品前处理

[0090] 取 1g 动物组织匀浆物,加入 10ml 0.05M 硫酸溶液,用涡旋仪涡动 5min,置于 37°C 温箱孵育 30min,3000g 以上 10°C 离心 10min,取上层液 4ml,加入 160ml 2M 氢氧化钠溶液,用涡旋仪涡动 30s,调 pH 为中性,移取液体 500 μ l,加入 500 μ l 复溶液,用涡旋仪涡动 30s,充分混匀,取样进行分析。样品的前处理主要是为了更精密的提取样品中的目标物,从而用于后续的检测。

[0091] 2、用试剂盒检测

[0092] 向包被有粘杆菌素偶联抗原的酶标板微孔中加入粘杆菌素标准品溶液或样本溶液 50 μ l,加入粘杆菌素特异性抗体工作液 50 μ l,用盖板膜封板,25°C 避光环境中反应 30min。将孔内液体甩干,每孔加入 250 μ l 洗涤液,10 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,再加入粘杆菌素酶标抗抗体工作液 100 μ l,用盖板膜封板,25°C 避光环境中反应 30min,将孔内液体甩干,重复洗涤步骤,每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲和底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB) 各 50 μ l,轻轻振荡混匀,用盖板膜封板,25°C 避光环境中反应 30min,每孔加入 2mol/L 终止液硫酸 50 μ l,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在 450nm 处,测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0093] 3、检测结果分析

[0094] 用所获得的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 (B0) 再乘以 100%,得到百分吸光度值。

[0095]

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0096] 公式中 B 为标准品溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准品溶液的平均吸光度值。

[0097] 以粘杆菌素标准品浓度 ($\mu\text{g/L}$) 值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图 (图 1)。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样品的浓度, 则可从标准曲线上读出粘杆菌素的残留量。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 小时可以完成。

[0098] 五、试剂盒灵敏度、精密度、准确度和保存期检测

[0099] (一) 标准品精密度试验:

[0100] 从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次 (01 批、03 批、03 批) 的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒, 从每个试剂盒的酶联板中各抽出 20 个微孔, 测定 $4.5 \mu\text{g/L}$ 粘杆菌素标准品溶液的吸光度值 (OD 值), 计算变异系数。结果如表 1, 标准品吸光度值的变异系数均在 4.4% -11.3% 之间, 符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0101] 表 1、标准可重复性试验 (CV%)

[0102]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	6.1	8.6	9.2	7.4	10.3	5.5	5.8	5.9	5.4	7.0
	02 批	8.2	5.4	11.3	9.0	4.7	9.8	4.4	6.5	8.2	8.7
	03 批	6.7	4.7	5.8	6.8	7.2	8.3	5.7	6.3	8.7	4.6

[0103] 二、样本精密度和准确度试验

[0104] (一) 样品精密度检测:

[0105] 向不含粘杆菌素的猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝样本中添加粘杆菌素, 使其终浓度为 $20 \mu\text{g/kg(L)}$, 按照实施例 1 的方法进行样品前处理。从实施例 1 中步骤三中不同时间段制备的不同批次 (01 批、02 批、03 批) 的试剂盒中各抽取 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 2-5 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、鸡肉、鸡肝样本的变异系数均在 6.6% -14.6% 之间, 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标准。

[0106] 表 2、鸡肌肉样本可重复性试验

[0107]

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数 CV%
01	15.9	15.8	12.8	16.7	18.3	12.6
	15.6	14.6	15.9	17.5	18.0	8.6
	17.5	15.6	17.0	13.6	14.2	10.9
02	18.6	13.8	19.2	17.4	18.2	12.3
	15.0	17.9	16.9	18.5	19.2	9.3
	14.9	16.3	12.7	17.5	14.6	12.0
03	15.3	17.4	14.0	18.0	19.8	13.5
	16.4	15.0	17.1	16.2	18.1	6.9
	14.2	18.5	13.9	19.1	16.3	14.6

[0108] 表 3、猪肌肉样本可重复性试验

[0109]

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数 CV%
01	19.7	18.4	17.4	15.6	13.4	14.6
	14.5	16.3	14.2	17.4	18.7	11.8
	16.3	17.9	16.3	15.7	12.8	11.8
02	14.4	17.5	18.1	17.6	17.8	8.9
	14.6	14.9	15.8	18.6	17.5	10.6
	17.7	16.3	19.5	17.3	14.7	10.4
03	15.2	14.9	18.5	17.3	16.8	9.1
	13.2	18.5	19.1	17.7	15.4	14.6
	18.2	15.2	17.1	16.3	14.0	10.1

[0110] 表 4、鸡肝样本可重复性试验

[0111]

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数 CV%
01	15.6	16.3	18.5	17.4	19.6	9.3
	16.3	17.7	13.5	16.9	17.1	10.1
	16.3	14.9	15.6	18.9	12.6	14.6
02	13.9	17.4	15.2	16.7	14.9	9.0
	17.2	12.4	13.7	14.1	13.5	12.7
	16.1	16.9	16.5	15.1	18.1	6.6
03	18.8	16.3	18.5	17.4	15.2	8.7
	18.4	16.7	19.2	13.2	15.8	14.1
	19.6	18.5	17.7	17.6	15.6	8.2

[0112] 表 5、猪肝脏样本可重复性试验

[0113]

批号	实测值 ($\mu\text{g/L}$)					变异系数 CV%
01	15.2	14.6	16.8	13.3	17.6	11.1
	18.1	16.3	17.7	19.2	16.3	7.1
	17.8	15.2	13.4	16.3	15.9	10.2
02	15.8	16.5	12.7	18.2	13.6	14.5
	16.5	15.9	17.4	19.5	17.0	8.0
	17.9	15.0	18.4	12.7	16.6	14.4
03	16.9	17.8	18.5	15.3	17.4	7.0
	19.0	16.3	15.7	14.7	18.5	10.9
	18.8	17.1	14.7	14.2	16.3	11.5

[0114] 2、样本准确度试验

[0115] 向不含有粘杆菌素的猪肉、猪肝、鸡肉、鸡肝组织中分别添加粘杆菌素,使粘杆菌素的终浓度分别为 $40 \mu\text{g/kg}$ 、 $80 \mu\text{g/kg}$,然后按照实施例 1 中所述的样本前处理方法进行处理;再用实施例 1 中步骤三中所述的试剂盒检测组织中的粘杆菌素,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 6 所示,结果表明粘杆菌素以 $40 \mu\text{g/kg}$ 、 $80 \mu\text{g/kg}$ 三个浓度对鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝样品添加准确度在 61.5% -96.3% 之间。

[0116] 表 6、试剂盒的准确度

[0117]

样本	猪肉		鸡肉		猪肝		鸡肝		
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	40	80	40	80	40	80	40	80	
准确度%	1	75.6	95.6	75.6	98.7	95.6	90.2	89.6	85.6
	2	81.5	88.5	92.3	85.5	87.5	74.5	91.5	80.2
	3	71.5	74.5	90.5	96.3	70.9	85.5	75.8	74.9
	4	84.6	78.9	96.6	80.7	86.9	98.3	85.3	85.6
平均值%	78.3	84.3	88.8	90.3	85.2	87.1	85.6	81.6	

[0118] (三) 交叉反应率试验：

[0119] 选择与粘杆菌素有类似结构和类似功能的 1 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。用下式计算步骤三中试剂盒对粘杆菌素交叉反应率。试剂盒对于粘杆菌素交叉反应率越大，那么此试剂盒对粘杆菌素的检测的特异性就越好。重复测定 3 次，结果取平均值。

[0120] 交叉反应率 (%) = (引起 50% 抑制粘杆菌素的浓度 / 引起 50% 抑制的粘杆菌素类似物浓度) \times 100%

[0121] 表 7、试剂盒的特异性

[0122]

药物名称	交叉反应率 (%)
粘杆菌素	100%
杆菌肽锌	<1

[0123] 结果如表 7 所示，实验表明，本发明试剂盒对粘杆菌素的特异性好，即本发明试剂盒可以检测粘杆菌素。

[0124] (四) 试剂盒保存期试验

[0125] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ ，经过 6 个月的测定，步骤三中试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50% 抑制浓度、粘杆菌素添加实际测定值均在正常范围之内。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 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 至少可以保存 6 个月以上。

[0126] (五) 试剂盒的灵敏度

[0127] 取不含粘杆菌素的阴性猪肉组织样本用实施例 1 步骤三中试剂盒分别进行 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。

[0128] 表 8、阴性猪肉样本测定结果统计表 $\mu\text{g}/\text{kg}$

[0129]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	5.36	4.22	3.64	5.16	6.05	3.42	5.02	4.46
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	3.64	5.64	7.02	4.14	3.36	2.36	6.09	4.74
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	5.03	4.32	6.33	3.96	4.70	1.17	8.21	

[0130] 由表 8 可知,本发明所研制的试剂盒最低检测限为 8.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0131] 实施例 2、用于检测粘杆菌素的试剂盒还可以有如下几种:

[0132] 一、包被原为特异性抗体,酶标记物为酶标粘杆菌素半抗原的试剂盒

[0133] (一) 本试剂盒的工作原理为:

[0134] 当在微孔条上预包被粘杆菌素特异性抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记粘杆菌素半抗原溶液。样本中的粘杆菌素或粘杆菌素标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的粘杆菌素特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与样本中粘杆菌素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中粘杆菌素的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度的粘杆菌素标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中粘杆菌素的浓度范围。

[0135] (二) 本试剂盒的组成为:

[0136] (1) 包被有包被原的酶标板:包被原为粘杆菌素单克隆抗体,是由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生的;包被原的浓度可以为 0.15-0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0137] (2) 酶标记物:酶标粘杆菌素工作液;标记酶为辣根过氧化物酶。

[0138] (3) 粘杆菌素标准品(上海贝基生物科技有限公司)溶液 6 瓶,浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、13.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、40.5 $\mu\text{g}/\text{L}$;配制标准品的溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0139] (4) 底物显色液:由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢,显色液 B 液为邻苯二胺。

[0140] (5) 终止液为 1-2mol/L 硫酸溶液。

[0141] (6) 浓缩洗涤液为含有 0.8-1.3% 牛血清蛋白、45-60% 甘油, pH 值为 9.2-9.5、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;50ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0142] (7) 浓缩复溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液;400ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0143] 二、包被原为粘杆菌素与载体蛋白偶联物、酶标记物为酶标粘杆菌素特异性抗体的试剂盒

[0144] (一) 工作原理

[0145] 当在微孔条上预包被粘杆菌素与载体蛋白偶联物时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标粘杆菌素特异性抗体溶液。样本中的粘杆菌素或粘杆菌素标准品与酶标板上包被的粘杆菌素竞争粘杆菌素特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与样本中粘杆菌

素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中粘杆菌素的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度粘杆菌素标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中粘杆菌素的浓度范围。

[0146] (二) 本试剂盒的组成

[0147] (1) 包被有包被原的酶标板:包被原为粘杆菌素与血蓝蛋白偶联物。

[0148] (2) 酶标记物:酶标特异性抗体工作液,标记酶为碱性磷酸酶;特异性抗体是单克隆抗体,由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生。

[0149] (3) 粘杆菌素标准品(上海贝基生物科技有限公司)溶液 6 瓶,浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1.5 \mu\text{g/L}$ 、 $4.5 \mu\text{g/L}$ 、 $13.5 \mu\text{g/L}$ 、 $40.5 \mu\text{g/L}$;配制标准品的溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0150] (4) 显色剂为硝基磷酸盐缓冲液(4-硝基酚磷酸盐缓冲液)。

[0151] (5) 终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0152] (6) 浓缩洗涤液为含有 0.8-1.3% 牛血清蛋白、45-60% 甘油, pH 值为 9.2-9.5、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;50ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0153] (7) 浓缩复溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液;400ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0154] 三、包被原为抗抗体,酶标记物为酶标粘杆菌素

[0155] (一) 工作原理

[0156] 当在微孔条上预包被抗抗体时,加入粘杆菌素特异性抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标粘杆菌素溶液。样本中的粘杆菌素或粘杆菌素标准品与酶标粘杆菌素半抗原竞争粘杆菌素特异性抗体,用显色液显色,样本吸光度值与样本中粘杆菌素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中粘杆菌素的含量。同时也可根据酶标板上的颜色深浅,通过与系列浓度粘杆菌素标准品溶液颜色的比较粗略判断样本中粘杆菌素的浓度范围。

[0157] (二) 试剂盒组成如下:

[0158] (1) 包被有包被原的酶标板:包被原为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体;包被原的浓度可以为 0.15-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0159] (2) 酶标记物:辣根过氧化物酶标记的粘杆菌素;

[0160] (3) 特异性抗体工作液:单克隆抗体:由保藏编号为 CGMCC No. 2541 的对粘杆菌素药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-4 分泌产生。

[0161] (4) 粘杆菌素标准品(上海贝基生物科技有限公司)溶液 6 瓶,浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1.5 \mu\text{g/L}$ 、 $4.5 \mu\text{g/L}$ 、 $13.5 \mu\text{g/L}$ 、 $40.5 \mu\text{g/L}$;配制标准品的溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0162] (5) 底物显色液:由 A 液和 B 液组成,底物显色液 A 液为过氧化脲或过氧化氢,7ml/瓶,1 瓶;底物显色液 B 液为四甲基联苯胺或邻苯二胺,7ml/瓶,1 瓶。

[0163] (6) 浓缩洗涤液为含有 0.8-1.3% 牛血清蛋白、45-60% 甘油, pH 值为 9.2-9.5、0.05-0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液;50ml/瓶,1 瓶;所述百分含量为质量百分含量。

[0164] (7) 浓缩复溶液为含有 0.2-0.5% 的人血清蛋白、pH 为 9.1-9.9、0.05-0.1mol/L 碳

酸盐缓冲液 ;400ml/ 瓶,1 瓶 ;所述百分含量为质量百分含量。

[0165] (8) 终止液 :终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸或盐酸溶液。

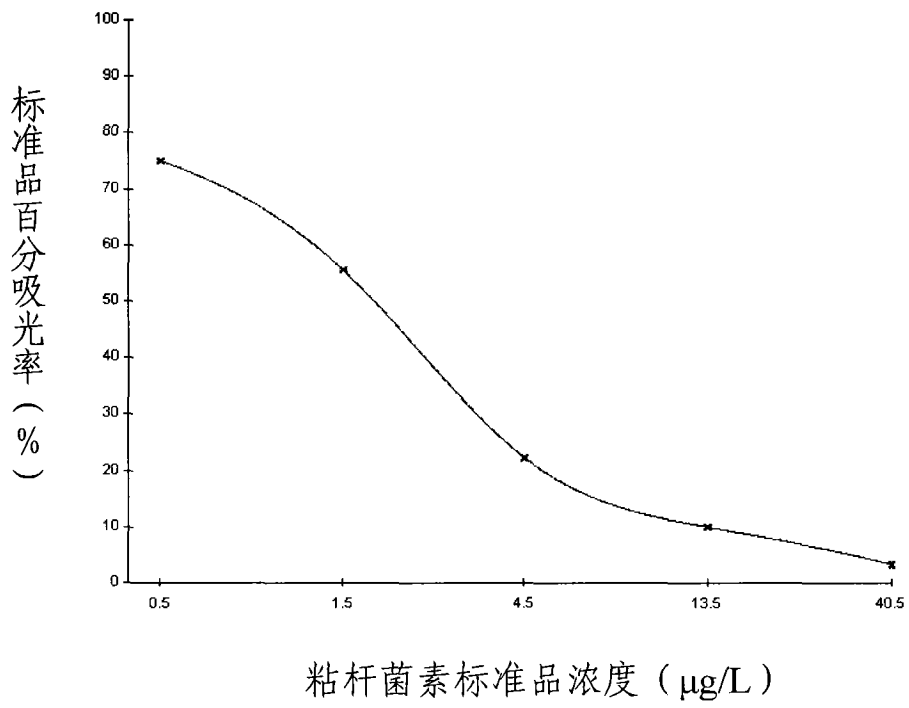


图 1

专利名称(译)	一种检测粘杆菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101358966B	公开(公告)日	2012-11-28
申请号	CN200810118443.5	申请日	2008-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 汪善良 刘福林 赵正苗 冯才茂 余厚美		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 汪善良 刘福林 赵正苗 冯才茂 余厚美		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/535 C12N5/12		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	刘苗		
其他公开文献	CN101358966A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测粘杆菌素的方法及其专用酶联免疫试剂盒。本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括粘杆菌素和粘杆菌素的特异性抗体；所述特异性抗体为所述粘杆菌素的多克隆抗体或单克隆抗体。本试剂盒中采用高特异性的粘杆菌素单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性，实验结果表明，本试剂盒具有特异性高、灵敏度高、精密度高、准确度高等特点；本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式，使用方便，成本低廉。用本发明试剂盒检测粘杆菌素的方法，操作简便，缩短了检测的时间，对样品的前处理要求低，能同时快速检测大批量样品。因此，利用本发明酶联免疫试剂盒进行检测的方法将在粘杆菌素的检测中发挥重要作用。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$