



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101955539 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010165185. 3

*C12N 1/15* (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 06

*C12N 1/19* (2006. 01)

(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

*C12N 1/21* (2006. 01)

地址 100085 北京市海淀区上地开拓路 5 号  
中关村生物医药园 B 区 421 室

*C12N 5/10* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

*G01N 33/577* (2006. 01)

(72) 发明人 沈建忠 江海洋 王战辉 吴小平  
李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏  
王奇昌 师伟 李艳伟 杨丽丽  
王世恩

(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 任风华

(51) Int. Cl.

*C07K 16/44* (2006. 01)

*C12N 15/13* (2006. 01)

*C12N 15/63* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页 序列表 2 页  
附图 1 页

## (54) 发明名称

一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体

## (57) 摘要

本发明公开了一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 端起第 23-140 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的的氨基酸序列如序列 1 自 N 端起第 156-273 位氨基酸残基所示。本发明抗体的亲和常数为  $6.97 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.055 \text{ng/mL}$ 。本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对氯霉素和琥珀氯霉素的特异性好,试剂稳定且有效期 (6-18 个月)。用本发明的试剂盒检测样品中氯霉素和琥珀酸钠氯霉素的含量,具有操作简便快捷、稳定快速、样品前处理简单、检测范围宽的特点,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测,自动化程度高。

1. 一种单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 23-140 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 156-273 位氨基酸残基所示。

2. 根据权利要求 1 所述的单链抗体,其特征在于:所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 141-155 位氨基酸残基所示。

3. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体的编码基因。

4. 根据权利要求 3 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 67-420 位核苷酸所示的 DNA 分子;

2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 466-819 位核苷酸所示的 DNA 分子;

3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 421-465 位核苷酸所示的 DNA 分子;

4) 序列表中序列 2 的 5' 末端起第 67-819 位核苷酸所示的 DNA 分子;

5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

5. 含有权利要求 3 或 4 所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒。

6. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体在检测氯霉素或琥珀氯霉素中的应用。

7. 一种检测氯霉素或琥珀氯霉素的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒:

1) 试剂盒中包括氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和酶标记抗体;其中,所述偶联物作为包被原;

2) 试剂盒中包括氯霉素半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和抗抗体;其中,所述抗抗体作为包被原;

3) 试剂盒中包括氯霉素半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体;其中,权利要求 1 或 2 所述单链抗体作为包被原;

4) 试剂盒中包括氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。

8. 根据权利要求 7 所述的免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中包括氯霉素标准品溶液、洗涤液和样品稀释液;所述氯霉素标准品为盐酸氯霉素;

所述氯霉素标准品溶液为如下各浓度的溶液:0  $\mu$ g/L、0.02  $\mu$ g/L、0.1  $\mu$ g/L、0.2  $\mu$ g/L、0.4  $\mu$ g/L 和 1.6  $\mu$ g/L;

每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将 10ml 吐温 20,5g 叠氮化钠和 990ml 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 0.005M ~ 0.015M,具体为 0.01M, pH 值为 7.2-7.6,具体为 7.4;

所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的免疫试剂盒,其特征在于:

所述氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的:将每 5mg 氯霉素半抗

原与 0.1M 盐酸水溶液混合,并预冷至 0 ~ 5℃,加入 10mg NaNO<sub>2</sub>,4℃条件下搅拌 5h,得到溶液 I ;将 20mg 载体蛋白溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中,得到溶液 II ;将溶液 II 加到溶液 I 中,4℃条件下搅拌 6h,得到所述氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物;

所述氯霉素半抗原为盐酸氯霉素;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白;

所述抗体为鼠抗 His 标签单克隆抗体。

10. 一种检测氯霉素或琥珀氯霉素的方法,包括如下步骤:

1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;

2) 用权利要求 7-9 中任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;

所述前处理的方法为下述 a)、b)、c) 和 d) 中的任一:

a) 所述待测样品为蜂蜜;将每 2g 所述待测样品与 4mL 蒸馏水混匀,再加入 4mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,18℃~25℃、4000r/min 离心 10min,取 1mL 上层液;将所述 1mL 上层液 60℃氮气流吹干,用 0.5mL 样品稀释液溶解,得到的溶液即为待测样本溶液;

b) 所述待测样品为牛奶;将所述待测样品在 10℃、4000r/min 离心 10min,吸除上层的脂肪,得到去除脂肪的待测样品;将每 4mL 所述去除脂肪的待测样品与 8mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,25℃、4000r/min 离心 10min,取 6mL 上层液;将所述 6mL 上层液 60℃氮气吹干,用 300 μ L 样品稀释液溶解,得到的溶液即为待测样本溶液;

c) 所述待测样品为虾、鱼、鸡肉、猪肉、鸡肝或猪肝;将所述待测样品去除脂肪并匀浆化,得到去除脂肪和匀浆化的待测样品;将每 3g 所述去除脂肪和匀浆化的待测样品已与 6mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,25℃、4000r/min 离心 10min,取 4mL 上层液;将所述 4mL 上层液 60℃氮气吹干,用 1mL 样品稀释液溶解,再加入 1mL 正己烷,混匀,25℃、4000r/min 离心 10min,取下层液,即得到待测样本溶液;

d) 所述待测样品为蛋:将每 1g 所述待测样品的匀浆物与 6mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,25℃、4000r/min 离心 10min,取 3mL 上层液;将所述 3mL 上层液 60℃氮气吹干,用 0.5mL 样品稀释液溶解,再加入 1mL 正己烷混匀,25℃、4000r/min 离心 10min,取下层液,即得到待测样本溶液;

所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

## 一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体。

### 背景技术

[0002] 氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 是由委内瑞拉链丝菌产生的抗生素,应用广泛,在畜禽疾病控制和治疗中起到了重要作用。但由于氯霉素存在严重的副作用,能抑制骨髓细胞内线粒体的蛋白质合成,造成骨髓细胞和肝细胞的毒性,从而引起人的再生性障碍性贫血,粒细胞缺乏症,新生儿、早产儿灰婴综合症等疾病,欧美等发达国家已相继禁止或严格禁止使用。2002 年 12 月中国农业部公告第 235 号文规定,氯霉素及其盐、酯(包括琥珀氯霉素)在所有食品动物的所有可食组织中不得检出。但由于氯霉素价格便宜且为广谱抗生素,违法使用仍很普遍。因此加强对动物性食品中氯霉素的残留检测是非常必要的。

[0003] 常用于氯霉素残留检测的方法主要有微生物法和仪器分析法。微生物检测法虽然经济、操作简便,但在样本中有其他微生物抑制剂存在时,其灵敏度和特异性受到限制;高效液相色谱分析法、气谱、气质联机等单纯的仪器分析方法,虽然灵敏度高,但是样本前处理及测定操作烦琐,费用高,不适宜于大量样本筛查,可以作为残留的确证分析。免疫化学法,尤其是化学发光酶免疫分析其灵敏度比微生物法和 ELISA 法高,样品前处理又比仪器分析法简单,特别适于现场监控和大量样本筛查。

[0004] 目前,用于免疫检测的抗体都是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体或多克隆抗体的制备必须通过细胞培养获得,整个生产过程复杂,消耗时间长,费用高,且不易进行操作。单链抗体是将抗体重链可变区和轻链可变区基因通过一个短肽链连接后融合表达出来的抗体片断,具有分子量小、特异性高、结合力强、易于利用基因工程技术操作等优点。

[0005] 化学发光酶免疫分析 (Chemiluminescent enzyme immunoassay, CLELA) 是以酶标记生物活性物质进行免疫反应,免疫反应复合物上的酶再作用于发光底物,在信号试剂作用下发光,用发光信号测定仪进行发光测定。化学发光酶免疫分析是目前发展和推广应用最快的免疫分析方法,也是目前最先进的标记免疫测定技术,灵敏度和精确度比酶免法、荧光法高几个数量级,可以完全替代放射免疫分析、彻底淘汰酶联免疫分析。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种单链抗体及其编码基因。

[0007] 本发明所提供的单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 23-140 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 156-273 位氨基酸残基所示。

[0008] 上述单链抗体中,所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 141-155 位氨基酸残基所示。

[0009] 所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

[0010] 1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 67-420 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0011] 2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 466-819 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0012] 3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 421-465 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0013] 4) 序列表中序列 2 的 5' 末端起第 67-819 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0014] 5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

[0015] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒也属于本发明的保护范围。

[0016] 上述任一所述单链抗体在检测氯霉素或琥珀氯霉素中的应用也属于本发明的保护范围。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种检测氯霉素或琥珀氯霉素的免疫试剂盒。

[0018] 本发明所提供的检测氯霉素或琥珀氯霉素的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒：

[0019] 1) 试剂盒中包括氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体和酶标记抗体；其中,所述偶联物作为包被原；

[0020] 2) 试剂盒中包括氯霉素半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体和抗体；其中,所述抗体作为包被原；

[0021] 3) 试剂盒中包括氯霉素半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体；其中,所述单链抗体作为包被原；

[0022] 4) 试剂盒中包括氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体的酶标记物；其中,所述偶联物作为包被原。

[0023] 上述任一所述免疫试剂盒中,所述试剂盒中包括氯霉素标准品溶液、洗涤液和样品稀释液；所述氯霉素标准品为盐酸氯霉素；

[0024] 所述氯霉素标准品溶液为如下各浓度的溶液： $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.02\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.1\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.2\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.4\ \mu\text{g/L}$  和  $1.6\ \mu\text{g/L}$ ；

[0025] 每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990ml 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  $0.005\text{M} \sim 0.015\text{M}$ , 具体为  $0.01\text{M}$ , pH 值为 7.2-7.6, 具体为 7.4；

[0026] 所述样品浓缩液为浓度为  $0.03\text{mol/L} \sim 0.05\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液, 具体为  $0.04\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液。

[0027] 所述氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的：将每 5mg 氯霉素半抗原与  $0.1\text{M}$  盐酸水溶液混合,并预冷至  $0 \sim 5^\circ\text{C}$ , 加入 10mg  $\text{NaNO}_2$ ,  $4^\circ\text{C}$  条件下搅拌 5h, 得到溶液 I；将 20mg 载体蛋白溶于  $0.1\text{M}$  磷酸盐缓冲溶液中, 得到溶液 II；将溶液 II 加到溶液 I 中,  $4^\circ\text{C}$  条件下搅拌 6h, 得到所述氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物；

[0028] 上述任一所述免疫试剂盒中,所述氯霉素半抗原为盐酸氯霉素；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

- [0029] 所述抗体为鼠抗 His 标签单克隆抗体。
- [0030] 本发明的另一个目的是提供一种检测氯霉素或琥珀氯霉素的方法。
- [0031] 本发明所提供的检测氯霉素或琥珀氯霉素的方法,包括如下步骤:
- [0032] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;
- [0033] 2) 用上述任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;
- [0034] 所述前处理的方法为下述 a)、b)、c) 和 d) 中的任一:
- [0035] a) 所述待测样品为蜂蜜;将每 2g 所述待测样品与 4mL 蒸馏水混匀,再加入 4mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,18°C~25°C、4000r/min 离心 10min,取 1mL 上层液;将所述 1mL 上层液 60°C 氮气流吹干,用 0.5mL 样品稀释液溶解,得到的溶液即为待测样本溶液;
- [0036] b) 所述待测样品为牛奶;将所述待测样品在 10°C、4000r/min 离心 10min,吸除上层的脂肪,得到去除脂肪的待测样品;将每 4mL 所述去除脂肪的待测样品与 8mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,25°C、4000r/min 离心 10min,取 6mL 上层液;将所述 6mL 上层液 60°C 氮气吹干,用 300  $\mu$ L 样品稀释液溶解,得到的溶液即为待测样本溶液;
- [0037] c) 所述待测样品为虾、鱼、鸡肉、猪肉、鸡肝或猪肝;将所述待测样品去除脂肪并匀浆化,得到去除脂肪和匀浆化的待测样品;将每 3g 所述去除脂肪和匀浆化的待测样品已与 6mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,25°C、4000r/min 离心 10min,取 4mL 上层液;将所述 4mL 上层液 60°C 氮气吹干,用 1mL 样品稀释液溶解,再加入 1mL 正己烷,混匀,25°C、4000r/min 离心 10min,取下层液,即得到待测样本溶液;
- [0038] d) 所述待测样品为蛋:将每 1g 所述待测样品的匀浆物与 6mL 乙酸乙酯振荡混合 10min,25°C、4000r/min 离心 10min,取 3mL 上层液;将所述 3mL 上层液 60°C 氮气吹干,用 0.5mL 样品稀释液溶解,再加入 1mL 正己烷混匀,25°C、4000r/min 离心 10min,取下层液,即得到待测样本溶液;
- [0039] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。
- [0040] 上述试剂盒既可以为酶联免疫试剂盒,又可为发光免疫试剂盒,当为发光免疫试剂盒时,试剂盒中还包括底物显色液;所述底物显色液由 A 液和 B 液组成;A 液由 (1) 中所述物质(即发光剂)中的至少一种和 (2) 中所述物质(即发光增强剂)中的至少一种组成:(1) 鲁米诺、异鲁米诺和 4-氨基己基-N-乙基异鲁米诺,(2) 对-碘苯酚、邻-碘苯酚和对甲苯酚;B 液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液。所述发光底物液分为 A 液和 B 液保存,在临用前按 1:1 混合使用。
- [0041] 上述试剂盒的检测原理如下:
- [0042] 当在酶标板微孔条上预包被氯霉素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,再加入氯霉素单链抗体溶液,样本中残留的氯霉素或氯霉素标准品与酶标板上包被的氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物竞争氯霉素单链抗体,加入酶标记二抗进行放大作用,催化底物发光,样本发光强度值与样本中氯霉素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氯霉素的含量。
- [0043] 当在酶标板微孔条上预包被二抗时,加入氯霉素单链抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标记氯霉素半抗原溶液,样本中的氯霉素或氯霉素标准品与酶标记氯霉素半抗原竞争氯霉素特异性抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与样本中氯霉素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氯霉素的含量。

[0044] 当在酶标板微孔条上预包被氯霉素单链抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记氯霉素半抗原溶液,样本中残留的氯霉素或氯霉素标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的氯霉素单链抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与氯霉素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氯霉素的含量。

[0045] 当在酶标板微孔条上预包被氯霉素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,再加入酶标记氯霉素单链抗体溶液,样本中的氯霉素或氯霉素标准品与酶标板上包被的氯霉素抗原竞争氯霉素单链抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与样本中氯霉素的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中氯霉素的含量。

[0046] 本发明提供的试剂盒检测方法为:

[0047] 当包被原为氯霉素偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标二抗,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0048] 当包被原为氯霉素偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0049] 当包被原为氯霉素单链抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记氯霉素半抗原,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0050] 当包被原为二抗时,向酶标板微孔中加入氯霉素单链抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标氯霉素半抗原,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值。

[0051] 本发明提供的检测结果分析过程为:

[0052] 以所获得的样品发光强度 (B) 与第一个标准 (0 标准) 的发光强度 ( $B_0$ ) 的比值 ( $B/B_0$ ) 为纵坐标,以 CAP 标准品浓度的对数为横坐标,通过专业分析软件绘制标准曲线,并求出  $IC_{50}$ ,以 20% 的抑制作为最低检测限。

[0053] 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。

[0054] 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,整个检测过程只需较短时间,1.5h 内即可以完成。

[0055] 本发明的单链抗体 (scFv) 是用基因工程方法将抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 通过一段连接肽 (Linker) 连接而成的重组抗体,是保持了亲本抗体的抗原亲和活性和特异性的最小功能性抗体片段,可通过基因工程技术体外表达得到,可在细菌中很经济地大规模生产,从而使得免疫检测抗体的生产变得非常容易、简便和经济,进而大大减少检测试剂的费用,比杂交瘤细胞培养得到单抗的方法要简单得多。本发明抗体的亲和常数为  $6.97 \times 10^9 L/mol$ 、半数抑制量 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.055 ng/mL$ 。本发明为食品中氯霉素残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。

[0056] 标准品精密度试验中,本发明试剂盒的每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数在 4.1%~6.7% 之间;蜂蜜样品的添加回收率为 82.3%~97.3%;鸡肉样品的添加回收率为 84.2%~99.1%。蜂蜜样品的批内变异系数为 6.2%~9.3%,批间变异系数为 8.3%~10.1%;鸡肉样品的批内变异系数为 6.4%~9.5%,批间变异系数为 9.6%~12.1%。交叉反应检测实验中,本发明试剂盒对氯霉素和琥珀氯霉素的特异性好。综上表明,本发明试

试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对氯霉素和琥珀氯霉素的特异性好,试剂稳定且有效期(6-18个月)。另外,本发明试剂盒成本低廉。用本发明的试剂盒检测样品中氯霉素和琥珀酸钠氯霉素的含量,具有操作简便快捷、稳定快速、样品前处理简单、检测范围宽的特点,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测,自动化程度高。因此,本发明的抗体及试剂盒及检测方法在氯霉素和琥珀酸钠氯霉素的检测中将发挥重大作用。

## 附图说明

[0057] 图 1 为试剂盒标准曲线。

[0058] 图 2 为氯霉素单链抗体的 Western-Blotting 结果。

## 具体实施方式

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 实施例 1、抗体的制备及功能检测

[0062] 一、氯霉素单链抗体的制备

[0063] (一) 抗体的筛选及改造

[0064] 取 6 个月雄性 Balb/c 小鼠, Trizol 一步法提取脾细胞总 RNA, 纯化得到 mRNA, 再逆转录得到 cDNA。使用全套引物, 以 cDNA 为模板分别扩增得到重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 基因, 经叠加延伸聚合酶链式反应 (Overlap-PCR) 将 VH、VL 基因随机拼接为单链抗体基因 (ScFv), 然后将 ScFv 与载体 pCANTAB5E 连接得 pCANTAB5E/ScFv, 并转化大肠杆菌 TG1, 即得到鼠源非免疫单链抗体库。用 ELISA 方法筛选得到带有特异性的抗氯霉素的单链抗体的噬菌体颗粒, 通过测序得到其相应的核苷酸序列。

[0065] 该单链抗体的编码基因序列如序列表中序列 2 所示, 自序列 2 的 5' 末端起第 67-420 位核苷酸编码重链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 466-819 位核苷酸编码轻链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 421-465 位核苷酸编码短肽。

[0066] 该单链抗体由重链可变区、连接所述重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区顺次连接组成。该抗体的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示, 自序列 1 的 N 端起第 23-140 位氨基酸残基为重链可变区的氨基酸序列, 自序列 1 的 N 端起第 156-273 位氨基酸残基为轻链可变区的氨基酸序列, 自序列 1 的 N 端起第 141-155 位氨基酸残基为短肽序列。

[0067] (二) 抗体的制备

[0068] 表达载体 pET20b 购自德国 NOVAGEN 公司; 大肠杆菌 BL21 购自德国 NOVAGEN 公司; 蛋白纯化用 HisLink™ Protein Purification Resin 购自美国 Promega 公司, 产品目录号为 V8823。

[0069] 合成序列表中序列 2 自 5' 末端起第 67-819 位核苷酸所示基因, 并在两端引入酶切位点 Xba I 和 Not I, 用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切, 回收目的基因片段; 用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切表达载体 pET20b, 回收载体大片段; 连接, 连接产物转化大肠杆菌, 筛选培养, 挑取单克隆; 将单克隆接入液体培养基进一步培养, 提取质粒, 酶切和测序验证, 结果测得的序列如序列表中序列 2 自 5' 末端起第 67-819 位核苷酸所示, 表明重组载体中基因插入方向和序列均正确, 将阳性重组载体记作重组表达载体 pET20b/ScFv。

[0070] 采用氯化钙法将重组表达载体 pET20b/ScFv 转化大肠杆菌 BL21, 抗性筛选, 经菌液 PCR 及质粒酶切验证, 得到含有重组表达载体 pET20b/ScFv 的重组大肠杆菌, 记作重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv。

[0071] 2×TY 培养液的组成: 由胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl 和水组成, 每 1 升 2×TY 培养液中胰蛋白胨的浓度为 1.6%、酵母提取物的浓度为 1%、NaCl 的浓度为 0.5%; 各百分含量均为质量百分含量。

[0072] 含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液是按照如下方法得到的: 向 2×TY 培养液中添加氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖, 使氨苄青霉素在溶液中的终浓度为 100 μg/ml, 使氯霉素在溶液中的终浓度为 34 μg/ml, 使葡萄糖在溶液中的终浓度为 1% (质量百分含量)。

[0073] 发酵重组菌: 将重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv 的单个阳性菌落接种至含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液中, 37℃ 振摇, 至培养体系的  $A_{600}$  为 0.6 时, 收集细菌; 将细菌重悬于 2ml LB 液体培养基中, 按 1:20 的体积比将菌悬液接种至 50ml 含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基中 (含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基的组成: 氨苄青霉素、氯霉素、酵母提取物、蛋白胨、NaCl 和水组成; 溶液中各成分的浓度为: 酵母提取物 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 1%, 氨苄青霉素 100 μg/ml, 氯霉素 34 μg/ml), 37℃ 振摇, 至培养体系的  $A_{600}$  为 0.6 时, 加 IPTG (0.7mmol/L) 诱导, 30℃ 振摇 2.5h, 在 4℃ 下 5000r/min 离心 10min, 收获细菌。用洗涤液 (将 20mmol Tris 和 0.15mol NaCl 用水溶解, 用 HCL 调 PH 值至 8.0, 再用水定容至 1L, 得到 1 升洗涤液) 洗涤 1 次, 加溶菌液 (将 20mmol Tris、10ml Triton X-100、250 μmol PMSF、62.5×10<sup>4</sup>U 溶菌酶用水溶解, 用 HCL 调 PH 值至 8.0, 再用水定容至 1L, 得到 1 升溶菌液), 30℃ 放置 15min, 然后在冰上超声处理 (输出功率 80%) 10s, 停 10s, 反复 3 次, 至细胞不再粘稠。在 4℃ 2000×g 离心 20min, 分别收集上清及沉淀。将沉淀用结合缓冲液 I (将 20mmol Tris、0.5mol NaCl 和 5mmol 咪唑用水溶解, 用 HCL 调 PH 值至 8.0, 再用水定容至 1L, 得到 1 升结合缓冲液 I) 洗涤一次, 而后, 悬于结合缓冲液 II (将 20mmol Tris、0.5mol NaCl、5mmol 咪唑和 6mol 尿素用水溶解, 用 HCL 调 PH 值至 8.0, 再用水定容至 1L, 得到 1 升结合缓冲液 II) 中, 4℃, 12000×g 离心 20min, 收集上清, 经 0.45mm 滤膜过滤, 收集滤液, 得到抗体的粗制液。

[0074] 纯化: 利用表达载体上带有的组氨酸标签 (His-tag) 标记通过亲和层析纯化单链抗体蛋白。将 HisLink™ Protein Purification Resin 装柱, 以 10 倍柱体积的 binding buffer (将 100mmol HEPES、10mmol 咪唑和 500mmol NaCl 用水溶解, 再调节 pH 值至 7.5, 然后用水定容至 1 升, 得到 1 升 binding buffer) 平衡纯化柱, 取抗体的粗制液上样, 然后用 5 倍柱体积的 wash buffer (将 100mmol HEPES、100mmol 咪唑和用水溶解, 再调节 pH 值至 7.5, 然后用水定容至 1 升, 得到 1 升 wash buffer) 洗脱杂蛋白, 最后用 10 倍柱体积的 elution buffer (将 100mmol HEPES、250mmol 咪唑用水溶解, 再调节 pH 值至 7.5, 然后用水定容至 1 升, 得到 1 升 elution buffer) 洗脱目标蛋白, 收集洗脱液, 透析, 得到纯化的抗体。

[0075] (三) 抗体的功能检测

[0076] 1、用 ELISA 方法, 检测抗体的半抑制率 ( $IC_{50}$ ):

[0077] a、将实施例 2 中制备得到的偶联物 (sCAP-OVA) 用包被缓冲液溶解, 得到 sCAP-OVA 的溶液 (该溶液中 sCAP-OVA 的浓度为 1 μg/ml)。包被缓冲液: pH9.6、0.1mol/L 的碳酸钠

缓冲液。

[0078] 向 96 孔板的孔中加入 sCAP-OVA 的溶液, 100  $\mu$  L 每孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h; 倾去包被液, 用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次, 250  $\mu$  L 每孔, 每次 30s, 甩干孔中液体。

[0079] b、向每孔中加入 200  $\mu$  L 2% BSA 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h, 倾去孔内液体; 用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次, 250  $\mu$  L 每孔, 每次 30s, 甩干孔中液体。

[0080] c、向孔中加入单链抗体溶液和不同浓度的 CAP 标准品溶液, 各 50  $\mu$  L 每孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。以只加入单链抗体溶液不加入 CAP 标准品溶液的孔作阳性对照。

[0081] 单链抗体溶液的制备: 用样品稀释液稀释实验 (二) 中的纯化抗体得到溶液, 抗体在溶液中的浓度为 5ng/mL; 样品稀释液为 0.002mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0082] 不同浓度的 CAP 溶液的制备: 用样品稀释液稀释 CAP 得到溶液。

[0083] d、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次, 250  $\mu$  L 每孔, 甩干孔中液体, 加入 HRP 标记的鼠抗 HIS 标签单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

[0084] e、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次, 250  $\mu$  L 每孔; 加入 TMB 显色, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟, 加入 2M 硫酸终止显色反应, 每孔 50  $\mu$  L, 使用酶标仪进行读数。

[0085] 实验设 3 次重复。

[0086] 结果如下:

[0087] 1) 吸光度值与每孔所加入的标准品溶液中 CAP 的浓度成反比; 证明, 所表达纯化得到的单链抗体具有针对 CAP 的结合特异性, 并呈现线性关系, 说明该抗体可用于对 CAP 的免疫检测。

[0088] 2) 半抑制率 ( $IC_{50}$ ): 阳性对照孔 (即不添加 CAP 标准品溶液的孔) 的发光强度值为  $B_0$ , 各实验孔的发光强度值为 B, 当  $B/B_0$  为 50% 时所对应的 CAP 标准品溶液的浓度即为半抑制率 ( $IC_{50}$ )。该单抗的半抑制率 ( $IC_{50}$ ) 为 0.055ng/mL。

[0089] 2、Western-Blotting: 取纯化的单链抗体 10  $\mu$  L 加入等量的 2 $\times$  上样缓冲液, 煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳; 将切好的凝胶块、NC 膜和滤纸在转印缓冲液中浸泡, 并转入转印夹中, 200mA 恒流转印 1h。转印结束后, 取出 NC 膜以 10mL 3% 的 BSA (PBS 配制) 封闭 2h。取一与膜相当大小的塑料袋, 将膜放入其中, 加入 2mL 酶标半抗原溶液 (用 PBST 对氯霉素-HRP 按进行 1:2000 稀释), 封口。4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 取一层保鲜膜, 加 1mL ECL 发光液 (等量 A、B 液混合), 将 NC 膜沥干洗液后, 靠胶的一面朝下, 浸入发光液中, 室温放置 1min, 用保鲜膜将 NC 膜包好, 靠胶的一面朝上, 放入暗匣中, 于暗室中用 X 光片曝光。该试验结果在 32kD 处出现了特异性的蛋白条带 (见图 2), 与单链抗体的大小相符, 说明纯化后的单链抗体能够与氯霉素特异性结合。图 2 中泳道 1 表示蛋白低分子量 Marker, 泳道 2 表示氯霉素单链抗体。

[0090] 同时以转入空载体 pET20b 的大肠杆菌 BL21 作为对照。对照 Western blot 未检测出目的抗体条带。

[0091] 3、抗体的亲和常数测定

[0092] 方法: 取定量的一定稀释度的抗体, 分别加入逐渐增加的抗原里, 可使抗体的结合达到饱和, 以结合部分 (B) 为纵坐标, 抗原浓度 (mol/L) 为横坐标绘制饱和曲线。求出抗体饱和程度为 50% 时的游离抗原浓度, 其倒数即为该抗体在此稀释度下的亲和常数。

[0093] 结果: 抗体的亲和常数为  $6.97 \times 10^9$  L/mol。

[0094] 实施例 2、化学发光免疫分析试剂盒及其制备与应用

[0095] 一、化学发光免疫分析试剂盒由下述物质组成：

[0096] 1、包被盐酸氯霉素 (sCAP) 半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板；

[0097] 2、氯霉素单链抗体：实施例 1 中所述单链抗体。抗体工作液的浓度为 5ng/mL，抗体工作液是用样品稀释液稀释实施例 1 中的纯化抗体得到的；

[0098] 3、氯霉素标准品：标准品溶液浓度分别为 0  $\mu$ g/L、0.02  $\mu$ g/L、0.1  $\mu$ g/L、0.2  $\mu$ g/L、0.4  $\mu$ g/L 和 1.6  $\mu$ g/L；氯霉素标准品为盐酸氯霉素，购自 Sigma-Aldrich 公司；产品目录号为 C0378；用样品稀释液稀释成上述各浓度；

[0099] 4、酶标二抗：辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗 HIS 标签单克隆抗体；购自美国 Sigma-Aldrich 公司，产品目录号为 A7058。

[0100] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，A 液为鲁米诺与对 - 碘苯酚混合溶液，B 液为过氧化氢水溶液；在该发光体系中加入增强剂对 - 碘苯酚可增加化学发光强度，并在较长时间保持稳定，从而大大提高免疫分析的灵敏度。所述发光底物液分为 A 液和 B 液保存，在临用前按 1 : 1 混合使用。

[0101] 6、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 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990ml 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；

[0102] 7、样品浓缩液：0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液；将其进行 20 倍稀释，成为样品稀释液后使用。

[0103] 二、试剂盒的制备

[0104] 半抗原为盐酸氯霉素 (sCAP)；

[0105] 1、包被原及其制备

[0106] 用重氮化法将半抗原 sCAP 偶联与载体蛋白 OVA 上，由于 sCAP 具有芳伯氨基的半抗原，在强酸和冷却条件下芳伯氨基生成亲电重氮盐，与载体蛋白中的强给电子基团发生反应，生成重氮产物，形成包被抗原 sCAP-OVA。制备过程如下：取 5mg sCAP 溶于 0.1M 盐酸，并预冷至 0 ~ 5 $^{\circ}$ C，加入 10mg NaNO<sub>2</sub>，4 $^{\circ}$ C 条件下搅拌 5h，形成溶液 I。20mg OVA 溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中，形成溶液 II。将溶液 II 加到溶液 I 中，4 $^{\circ}$ C 条件下搅拌 6h，用葡聚糖凝胶 G-25 进行纯化后，测包被原的浓度，存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0107] 2、包被有包被原的酶标板及其制备

[0108] 用包被缓冲液将步骤 1 制得的氯霉素与载体蛋白的偶联物稀释成 5.0  $\mu$ g/mL，每孔加入 100  $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去包被液，用洗涤液稀释 20 倍后洗涤 3 次，每次 30s，拍干，然后在每孔中加入 200  $\mu$ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0109] 包被缓冲液：pH9.6、0.05mol/L 的碳酸钠缓冲液；

[0110] 封闭液：每 1 升封闭液按照如下方法配制：将 5ml 马血清、1g 叠氮化钠、30g 酪蛋白混合，用磷酸盐缓冲液溶解并定容至 1000ml，得到封闭液；其中，磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M，pH 值为 7.2。

[0111] 三、试剂盒检测方法

[0112] (一) 样品前处理

[0113] (1) 蜂蜜样品处理:取 2g 蜂蜜于玻璃管中,加入 4mL 蒸馏水,摇匀,再加入 4mL 乙酸乙酯充分振摇混合 10min,室温 (18 ~ 25℃) 4000r/min 离心 10min。取 1mL 上层液 (相当于 0.5g 样品) 移入另一玻璃管,并用 60℃ 氮气流吹干。于试管残留物中加入 0.5mL 样品稀释液充分摇匀,取 50  $\mu$  L (相当于 1g 样品 /mL 检测液) 用于检测。

[0114] (2) 牛奶样品处理:将牛奶样品在 10℃ 4000r/min 离心 10min。吸除上层的脂肪。取 4mL 去除脂肪的牛奶于玻璃管中,加入 8mL 乙酸乙酯,充分振摇混合 10min,室温 4000r/min 离心 10min。取 6mL 上层液 (相当于 3mL 样品) 移入另一玻璃管,并用 60℃ 氮气流吹干。于试管残留物中加入 300  $\mu$  L 样品稀释液充分摇匀,取 50  $\mu$  L (相当于 10mL 样品 /mL 检测液) 用于检测。

[0115] (3) 虾、鱼、鸡肉、猪肉、鸡肝、猪肝样品处理:取 3g 已去除脂肪并匀浆化的样品于玻璃管中,加入 6mL 乙酸乙酯充分振摇混合 10min,室温 4000r/min 离心 10min。取 4mL 上层液 (相当于 2g 样品) 移入另一玻璃管,并用 60℃ 氮气流吹干。于试管残留物中加入 1mL 样品稀释液,并加入 1mL 正己烷,充分摇匀,室温 4000r/min 离心 10min。离心后,若下层液出现乳化现象,应将试管放入 80℃ 水浴中 5min,再进行离心。完全除去上层的正己烷,从试管底部吸取 50  $\mu$  L 下层液 (相当于 2g 样品 /mL 检测液) 用于检测。

[0116] (4) 蛋样品处理:取 1g 已匀浆全蛋 (含蛋白和蛋黄) 于玻璃管中,加入 6mL 乙酸乙酯充分振摇混合 10min,室温 4000r/min 离心 10min。取 3mL 上层液 (相当于 0.5g 样品) 移入另一玻璃管,并用 60℃ 氮气流吹干,于试管残留物中加入 0.5mL 样品稀释液,并加入 1mL 正己烷充分摇匀,室温 4000r/min 离心 10min。离心后,若下层液出现乳化现象,应将试管放入 80℃ 水浴中 5min,再进行离心。完全除去上层的正己烷,从试管底部吸取 50  $\mu$  L 下层液 (相当于 1g 样品 /mL 检测液) 用于检测。

## [0117] (二) 用试剂盒检测

### [0118] 1、标准曲线的制作

[0119] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入氯霉素标准品溶液 50  $\mu$  L,再加入氯霉素单链抗体工作液 50  $\mu$  L,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  $\mu$  L 洗涤液,30s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的抗 His 抗体工作液 100  $\mu$  L,37℃ 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤,加入底物显色液用化学发光检测仪进行测定。

[0120] 用每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值 (B) 与第一个标准品溶液 (0 标准) 的发光强度值 ( $B_0$ ) 的比值 ( $B/B_0$ ) 作为纵坐标,以氯霉素标准品浓度 ( $\mu$  g/L) 的对数为横坐标,绘制标准曲线,得到的标准曲线如图 1 所示。

### [0121] 2、样品中氯霉素浓度的测定

[0122] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入检测样本溶液 50  $\mu$  L,再加入氯霉素单链抗体工作液 50  $\mu$  L,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  $\mu$  L 洗涤液,30s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入 HRP 标记的抗 His 抗体工作液 100  $\mu$  L,37℃ 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤,加入底物显色液用化学发光检测仪进行测定。

[0123] 用每个检测样本溶液的发光强度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的发光强度值 ( $B_0$ ) 的比值,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氯霉素的残留量。

[0124] 四、试剂盒的效果检测

[0125] (一) 标准品精密度试验

[0126] 用实验一中所述试剂盒,按照实验三中所述方法进行检测。

[0127] 从 3 个不同批次的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒(即 10 个酶标板)进行实验,每个酶标板抽出 20 个微孔,测定 20  $\mu$ g/L 标准品溶液的发光强度值,计算变异系数,结果见表 1。

[0128] 变异系数的计算方法:变异系数(CV) = 测定结果的标准差与其平均值的百分比。

[0129] 表 1 标准品精密度试验结果(CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0130]	CV%	NO. 1	4.9	4.3	4.9	5.8	6.1	5.3	6.6	6.7	6.2	5.9
		NO. 2	5.1	5.7	5.4	6.1	4.1	5.5	5.1	5.6	4.7	4.3
		NO. 3	4.2	5.9	4.7	4.3	6.2	5.2	4.6	4.4	6.3	5.8

[0131] 通过上述试验结果可以得出,每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数在 4.1%~6.7%之间。

[0132] (二) 样本准确度和精密度试验

[0133] 向不含氯霉素的样品(蜂蜜和鸡肉)中添加氯霉素,使氯霉素在样品中的终浓度分别为 0.2、0.5、1.0ng/g;将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理,得到检测样本溶液。

[0134] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒进行检测,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数。结果分别见表 2。

[0135] 回收率的计算方法:RG = 测定值与真实值的比值  $\times$  100% ;

[0136] 变异系数的计算方法:CV = (各平行样本的标准差与各平行样本平均值的比值)  $\times$  100% ;

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 表 2 准确度和精密度试验结果

[0140]

样品	添加浓度 1(0.2 ng/g)			添加浓度 2(0.5 ng/g)			添加浓度 3(1.0 ng/g)		
	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV
蜂蜜	82.3	8.4	9.4	86.1	7.2	10.1	97.3	8.9	8.3
	95.3	9.1		84.9	6.2		95.4	9.3	
	94.2	6.9		94.5	8.4		89.4	7.4	
鸡肉	94.8	7.2	12.1	99.1	6.8	9.6	86.7	8.1	10.7
	91.2	9.5		84.2	7.1		90.3	7.3	
	88.4	6.7		96.5	8.4		94.1	6.4	

[0141] 结果显示,蜂蜜样品的添加回收率为 82.3%~97.3%;鸡肉样品的添加回收率为 84.2%~99.1%,符合准确度的测定标准。蜂蜜样品的批内变异系数为 6.2%~9.3%,批间变异系数为 8.3%~10.1%;鸡肉样品的批内变异系数为 6.4%~9.5%,批间变异系数为 9.6%~12.1%,符合精密度小于或等于 20%的规定。

[0142] (三) 交叉反应率试验:

[0143] 选择与氯霉素相似结构的化合物和临床使用的代表兽药,测定交叉反应率。通过各种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相应物的交叉反应率。

[0144]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制的氯霉素浓度}}{\text{引起50\%抑制的相应物浓度}} \times 100\%$$

[0145] 结果如表 3 所示。

[0146] 表 3 试剂盒的特异性

[0147]

名称	交叉反应率 (%)
氯霉素	100
琥珀氯霉素	300
氟苯尼考	< 1
甲砒霉素	< 1
氟苯尼考胺	< 1
氯霉素碱	< 0.5
甲基氯霉素	< 0.1

四环素	< 0.1
庆大霉素	< 0.1
氨苄青霉素	< 0.1

[0148] 实验表明,本发明试剂盒对氯霉素和琥珀氯霉素的特异性好,即本发明试剂盒可以检测氯霉素和琥珀氯霉素(即琥珀酸钠氯霉素)。

[0149] (四) 试剂盒保存期试验

[0150] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8℃,经过 12 个月的测定,试剂盒的最大发光强度值(零标准)、50%抑制浓度、氯霉素添加实际测定值均在正常范围之内。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℃保存的条件下放置 8 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。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入 -20℃冰箱冷冻 8 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 12 个月以上。

## 序列表

<110> 北京维德维康生物技术有限公司  
 <120> 一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体  
 <160>2

<210>1

<211>273

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala
1			5					10						15	
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly
			20					25						30	
Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly
			35					40						45	
Phe	Ser	Ser	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ala	Trp	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro
			50					55						60	
Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp	Met	Ala	Tyr	Met	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr
65								70						75	
Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Arg	Asp	Thr
								85						90	
Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp
								100						105	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Lys	Ile	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Phe	Asp
								115						120	
Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
								130						135	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Met	Gln	Met	Thr
145								150						155	
Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile
								165						170	
Ser	Tyr	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Met
								180						185	
His	Trp	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
								195						200	
														205	

Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 210 215 220  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser  
 245 250 255  
 Glu Gly Gly Pro Ser Trp Asn Ser Asn Val Leu Ser Thr Arg Pro Gln  
 260 265 270  
 Gly

<210>2

<211>819

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>2

gtgaaaaaat tattattegc aattccttta gttgttcctt tctatgcggc ccagccggcc 60  
 atggcccagg tgcagctgaa ggagtctggg cctggcctgg tgaaaccttc tcagtctctg 120  
 tccctcacct gcactgtcac tggcttctca agcacccgtg attatgcctg gcactggatc 180  
 cggcaatttc caggaaacaa actggagtgg atggcctaca tgagctacag tggtagtact 240  
 aactacaacc catctctcaa aagtegaate tctgtcagtc gagacacatc caagaaccag 300  
 ttcttctctgc aattgaattc tgtgactact gaggacacag ccacatattt ctgtgcaaga 360  
 aaaattaggt acgcctactt tgacctttgg ggccaaggca ccactctcac tgtctcctca 420  
 ggtggcggcg gtagcggcgg tggcggttct ggaggcggcg gttctgatat gcagatgaca 480  
 cagtctctctg cttccttagc tgtatctctg gggcagaggg ccaccatctc atacagggcc 540  
 agcaaaagtg tcagtacatc tggctatagt tatatgcact ggaaccaaca gaaaccagga 600  
 cagccacca gactctcat ctatcttgta tccaacctag aatctggggg ccctgccagg 660  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc accctcaaca tccatcctgt ggaggaggag 720  
 gatctgcaa cctattactg tcagcacatt agggagctta cacgttcgga ggggggacca 780  
 agttggaact caaacgtgct gtcgacgcgg ccgcaaggt 819

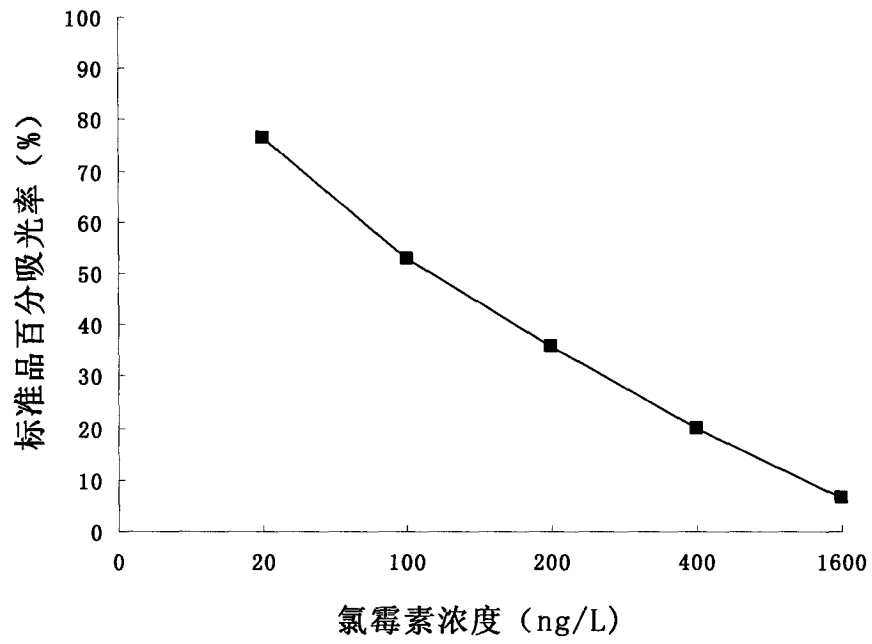


图 1

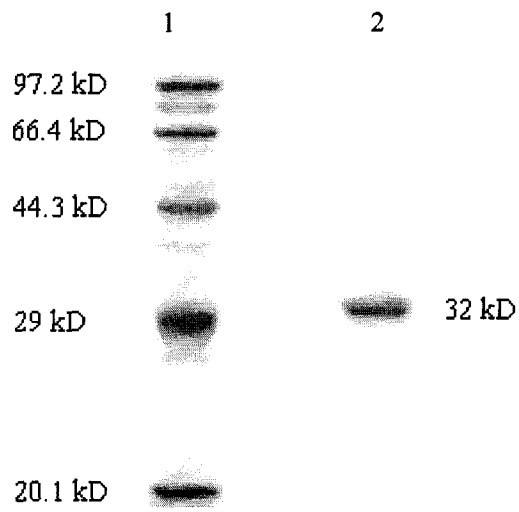


图 2

专利名称(译)	一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101955539A</a>	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010165185.3	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 江海洋 王战辉 吴小平 李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 王奇昌 师伟 李艳伟 杨丽丽 王世恩		
发明人	沈建忠 江海洋 王战辉 吴小平 李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 王奇昌 师伟 李艳伟 杨丽丽 王世恩		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101955539B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测氯霉素的免疫试剂盒及其专用抗体。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成，所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第23-140位氨基酸残基所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第156-273位氨基酸残基所示。本发明抗体的亲和常数为 $6.97 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量(IC50)为0.055ng/mL。本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对氯霉素和琥珀氯霉素的特异性好，试剂稳定且有效期(6-18个月)。用本发明的试剂盒检测样品中氯霉素和琥珀酸钠氯霉素的含量，具有操作简便快捷、稳定快速、样品前处理简单、检测范围宽的特点，能同时快速检测大批量样品，可实现现场高通量快速检测，自动化程度高。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CV%	NO.1	4.9	4.3	4.9	5.8	6.1	5.3	6.6	6.7	6.2	5.9
	NO.2	5.1	5.7	5.4	6.1	4.1	5.5	5.1	5.6	4.7	4.3
	NO.3	4.2	5.9	4.7	4.3	6.2	5.2	4.6	4.4	6.3	5.8