



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104558186 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410830131. 2

G01N 33/577(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 26

G01N 33/531(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/91(2006. 01)

CCTCC NO:C201495 2014. 05. 20

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

(72) 发明人 袁宗辉 何秀平 彭大鹏 潘源虎
王玉莲 陈冬梅 陶燕飞 刘振利

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 徐绍新

(51) Int. Cl.

C07K 16/44(2006. 01)

C12N 5/20(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

用于检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体及酶联免疫方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种能识别多种卡巴氧和喹赛多代谢产物的特异性单克隆抗体和一种用于检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫方法及试剂盒，本发明的单克隆抗体是由保藏号为 CCTCC NO:C201495 的杂交瘤细胞株 DCBX5B1 所分泌的。与现有技术相比，本发明制备的单克隆抗体可以同时识别脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多和 N4- 脱一氧喹赛多，而且具有较高的灵敏度和特异性。本发明建立的 ELISA 方法和试剂盒能同时检测卡巴氧和喹赛多代谢产物在肉类食物中的残留，具有检测效率和灵敏度高，精密度和准确度高等优点。

1. 一种能识别卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体,它是由保藏号为 CCTCC NO:C201495 杂交瘤细胞株 DCBX5B1 所分泌的,所述卡巴氧和喹赛多代谢产物是脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多和 N4- 脱一氧喹赛多。

2. 一株杂交瘤细胞株 DCBX5B1,保藏在中国典型培养物保藏中心,其保藏号为 CCTCC NO:C201495,所述杂交瘤细胞株 DCBX5B1 分泌的单克隆抗体能识别卡巴氧和喹赛多代谢产物,所述卡巴氧和喹赛多代谢产物是脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多和 N4- 脱一氧喹赛多。

3. 权利要求 1 所述的单克隆抗体在制备检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫试剂盒中的应用。

4. 包含权利要求 1 所述的单克隆抗体的试剂盒。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,该试剂盒是检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫试剂盒。

6. 权利要求 4 或 5 所述的试剂盒在卡巴氧和喹赛多代谢产物非诊断目的检测中的应用。

7. 一种用于检测肉类食物中卡巴氧和喹赛多代谢产物残留的酶联免疫方法,其特征在于包括以下步骤如下:

- (1) 将喹噁啉 -2- 羧酸与卵清白蛋白偶联得到包被原;
- (2) 用保藏号为 CCTCC NO:C201495 的杂交瘤细胞株 DCBX5B1 制备单克隆抗体;
- (3) 用步骤 (1) 的包被原包被固相载体;
- (4) 将待测样品提取后进行酶联免疫检测。

8. 根据权利要求 7 所述的用于检测肉类食物中卡巴氧和喹赛多代谢产物残留的酶联免疫方法,其特征在于:所述待测样品的提取方法是:将待测样品先用体积比为乙酸乙酯:乙腈=1:1 的混合溶剂振荡提取,再加入 1mol/L 的 NaOH,静置,取有机层用氮气吹干,加入稀释液离心后取上清,

所述稀释液的成分为:NaCl 8.0g, KH₂PO₄0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, Tween20 0.5mL,加双蒸水至 1000mL,调节 pH 至 7.4。

用于检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体及酶联免疫方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于兽药残留分析和免疫学技术领域,涉及一种能识别卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体和一种用于检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫方法(ELISA)及试剂盒。

背景技术

[0002] 脱二氧卡巴氧和脱二氧喹赛多属于喹噁啉类药物,是原型药物卡巴氧和喹赛多在动物体内脱氧代谢的产物,具有苯并吡嗪 1,4-二氮萘的基本结构,卡巴氧和喹赛多抗菌谱较广,抗革兰氏阴性菌的作用要强于阳性菌。在兽医临床和养殖业得到了广泛应用。人们为了追求经济利益而滥用药物,导致药物在动物食品中大量残留。喹噁啉类药物会对动物产生三致作用、光敏反应和肾上腺皮质损坏等毒副作用,部分文献报道,药物对动物机体还有一定程度的生殖毒性和细胞毒性。

[0003] 现已发展了多种用于检测该类药物残留的方法,如微生物方法、仪器方法及酶联免疫方法。微生物法被用于大量样品的初步筛选,仪器方法常用于对阳性样品的确证,ELISA方法既可以定性也可以半定量。在这些残留分析方法中,仪器方法由于其所需仪器昂贵、操作复杂、检测费用高,而不利于大批量样品的筛选及现场检测。微生物法虽在残留筛选高通量上表现出良好的性能,但方法缺乏特异性,不能确证残留物的种类,且所用细菌对不同种类的抗菌药物敏感性存在差异,易导致假阴性和假阳性结果的产生。而ELISA方法操作简便、高通量、高灵敏度、低费用,能很好的克服仪器方法和微生物方法的缺陷。

[0004] 但目前,针对喹噁啉类脱二氧代谢物的检测方法鲜有报道,所以建立一种特异性好、灵敏度高的单克隆抗体以检测动物体内或肉类食物中卡巴氧和喹赛多代谢产物显得十分必要。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种能同时识别多种卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体。

[0006] 本发明的第二个目的是利用该单克隆抗体,制备一种用于检测卡巴氧和喹赛多体内代谢产物的酶联免疫试剂盒。

[0007] 本发明的第三个目的是利用该试剂盒,建立一种能用于卡巴氧和喹赛多代谢产物非诊断目的检测的酶联免疫方法。

[0008] 本发明通过以下技术方案实现:

[0009] 一种能识别卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体,它是由保藏号为 CCTCC NO:C201495 的杂交瘤细胞株 DCBX5B1 所分泌的。

[0010] 上述杂交瘤细胞株 DCBX5B1,保藏在位于湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心(CCTCC),其保藏号为 CCTCC NO:C201495。

[0011] 制备所述单克隆抗体所用的免疫原是由 4-(4-(2-(喹噁啉-2 基亚甲基) 胍羰基) 苯氧基) 丁酸 (QHCPA) 与人血清白蛋白偶联制备的。

[0012] 本发明提供了一种检测肉类食物中卡巴氧和喹赛多代谢产物残留的酶联免疫检测方法, 该方法包括免疫原、包被原、抗体的制备以及样品的提取和检测等步骤, 具体如下:

[0013] (1) 将喹噁啉-2-羧酸 (QCA) 与卵清白蛋白 (OVA) 偶联得到包被原 (QCA-OVA);

[0014] (2) 用保藏号为 CCTCC NO:C201341 的杂交瘤细胞株 DCBX5B1 制备单克隆抗体;

[0015] (3) 用步骤 (2) 的包被原包被固相载体;

[0016] (4) 将待测样品提取后进行酶联免疫检测。

[0017] 优选地, 所述待测样品的提取方法是: 将待测样品先用体积比为乙酸乙酯: 乙腈 = 1 : 1 的混合溶剂振荡提取, 再加入 1mol/L 的 NaOH, 静置, 取有机层用氮气吹干, 加入稀释液离心后取上清,

[0018] 所述稀释液的成分为: NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, Tween200.5mL, 加双蒸水至 1000mL, 调节 pH 至 7.4。

[0019] 本发明以上述单克隆抗体和包被原作为核心试剂与常规的其他试剂组合, 制成了能检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫检测试剂盒, 结合上述酶联免疫方法, 实现了对卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫检测。

[0020] 所述的卡巴氧和喹赛多代谢产物是: 脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多和 N4-脱一氧喹赛多。

[0021] 本发明的主要优点是:

[0022] 1、本发明在单克隆抗体制备时, 采用 QHCPA 作为半抗原, 该半抗原具有脱二氧卡巴氧和脱二氧喹赛多的共同结构, 包括喹噁啉母环、2-位侧链上的碳氮双键和碳氧双键, 由该半抗原制备的单克隆抗体可同时识别脱二氧卡巴氧和脱二氧喹赛多等多种卡巴氧和喹赛多代谢产物。

[0023] 2、本发明制备的单克隆抗体对脱二氧喹赛多、N4-脱一氧喹赛多和脱二氧卡巴氧的灵敏度高, IC_{50} 分别为 3.75 $\mu\text{g/L}$ 、3.80 $\mu\text{g/L}$ 和 2.89 $\mu\text{g/L}$; 该抗体对其它带有甲基的脱二氧代谢物均没有识别, 显示出良好的特异性。

[0024] 3、本发明建立的 ELISA 方法和试剂盒能同时检测卡巴氧和喹赛多代谢产物脱二氧卡巴氧和脱二氧喹赛多等喹噁啉类药物在肉类食物中的残留, 从而防止药物蓄积对人体造成的毒副作用。方法准确度高, 精密度好, 一次测定即可完成, 与现有的检测方法相比, 在检测药物的种类和效率上具有明显的优势, 可以节省大量的时间和成本, 具有更好的市场价值。

[0025] 4、方法中所涉及的样品处理简单, 易操作, 样品处理所用的有机试剂对操作者身体健康危害相对较小。

附图说明

[0026] 图 1 为本发明所使用的半抗原 (QHCPA)、人血清白蛋白 (HSA) 和 QHCPA-HSA 偶联物 (免疫原) 的紫外扫描图谱。

[0027] 图 2 为本发明所使用的半抗原 (QCA)、卵清白蛋白 (OVA) 和 QCA-OVA 偶联物 (包被

原)的紫外扫描图谱。

[0028] 图3为本发明的单克隆抗体与脱二氧卡巴氧(DCBX)标准品的间接竞争ELISA反应曲线,X轴为脱二氧卡巴氧(DCBX)标准溶液浓度对数值,Y轴为脱二氧卡巴氧标准品溶液的光密度值除以“零”孔光密度值(B/B₀)。

具体实施方式

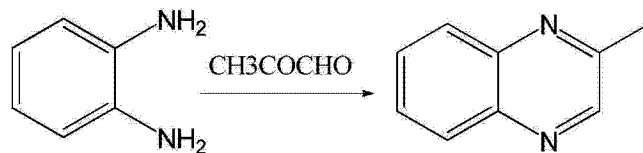
[0029] 下面通过实施例对本发明作进一步说明,但不限制本发明。

[0030] 实施例1 免疫原和包被原的制备

[0031] 1.1 免疫原QHCPA与牛血清白蛋白偶联物(QHCPA-HSA)的制备

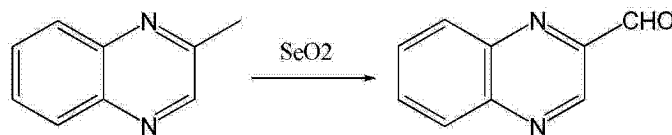
[0032] 1.1.1 2-甲基喹噁啉的合成参照 Xu 等(2006)的合成方法,并做改进。取邻苯二胺 1.08g(0.01mol)投入到500mL的三口烧瓶中,加入150mL的甲醇,升温到70℃,回流,搅拌使之溶解;取丙酮醛0.90mL(0.01mol),加入10mL的甲醇使之稀释,逐滴加入到上述的溶液中,薄层色谱检测反应历程,展开剂用石油醚:乙酸乙酯=3:1。反应12h,热过滤,蒸去少量甲醇,重结晶,得到1.27g淡黄色针尖状晶体,即是2-甲基喹噁啉,收率在70.5%。反应方程式如下:

[0033]



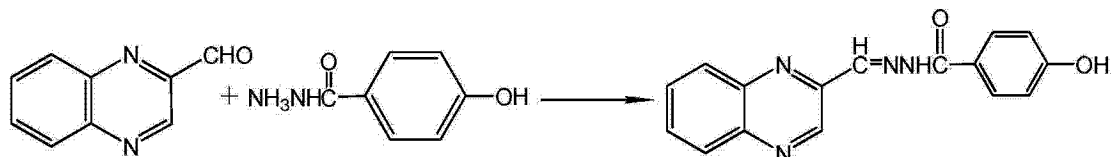
[0034] 1.1.2 2-醛基喹噁啉的合成取二氧化硒1.1g,2-甲基喹噁啉1.0g,乙酸乙酯150mL,60℃反应4h,过滤回收单质硒,滤液旋蒸,得到的油状物进行硅胶柱分离纯化,洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=5:1,收集第2个组分,蒸干即得淡黄色固体2-醛基喹噁啉。反应方程式如下:

[0035]



[0036] 1.1.3 2-(4-羟基苯甲酰肼)喹噁啉的合成取2-醛基喹噁啉0.6g,4-羟基苯甲酰肼0.5g,甲醇40mL,超纯水10mL,常温反应6h,经抽滤得到沉淀,再经甲醇和水洗涤2次,于37℃烘干即得淡黄色固体2-(4-羟基苯甲酰肼)喹噁啉。反应方程式如下:

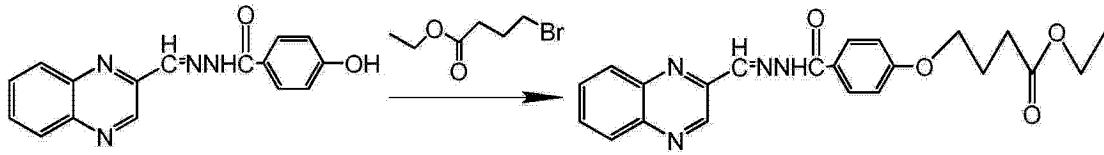
[0037]



[0038] 1.1.4 2-((4-苯氧丁酸乙酯)苯甲酰肼)喹噁啉的合成取2-(4-羟基苯甲酰肼)喹噁啉150mg,溶于3mL DMSO中,4℃条件下加入20mg的NaH,反应约30min,用巴士滴管逐滴加入4-溴丁酸乙酯120mg,反应6h,使用薄层色谱板监测反应历程。待反应完成后,加入蒸馏水20mL,用乙酸乙酯萃取2次,合并有机相,加入无水硫酸镁干燥过夜,过滤,滤液蒸干

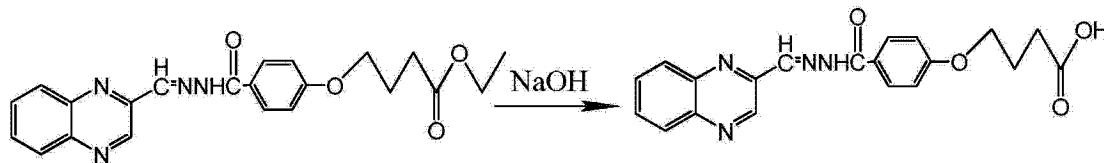
即得所要产物,反应方程式如下:

[0039]



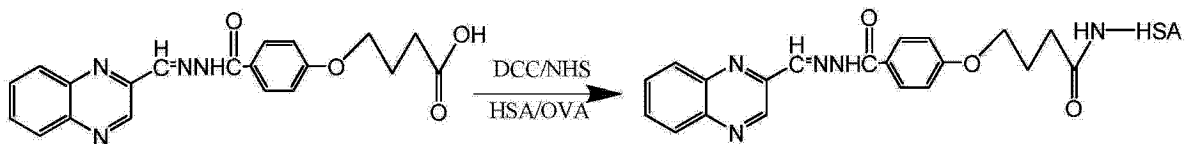
[0040] 1.1.5 QHCPA 的合成取上步所得产物 80mg,溶于 1mL 的 DMSO 中,加入 1mol/L NaOH 15mL,室温搅拌反应 4h,将反应液用 2mol/L HCL 调 pH = 3,有沉淀物析出,将之放置在 4 度冰箱,静置过夜。过滤,滤渣用蒸馏水洗涤 2 遍,于 37℃ 烘干即得淡黄色固体 QHCPA,反应方程式如下:

[0041]



[0042] 1.1.6 完全抗原 QHCPA-HSA 的制备取:39.8mg QHCPA,溶于 1mL DMSO 中,加入 NHS 15.0mg 和 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 20.2mg,室温下反应活化 12h,离心去除沉淀,得到 A 液;再取 HSA 66.0mg,溶于 6mL PBS (pH = 7.4) 中,此为 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,常温条件下避光反应 12h。反应完毕后,将反应液转入透析袋中,4℃ PBS 中透析 5d,每 4~6h 更换一次透析液,透析完后将样品冷冻干燥,即得偶联物 QHCPA-HSA,置 -20℃ 保存。合成路线如下:

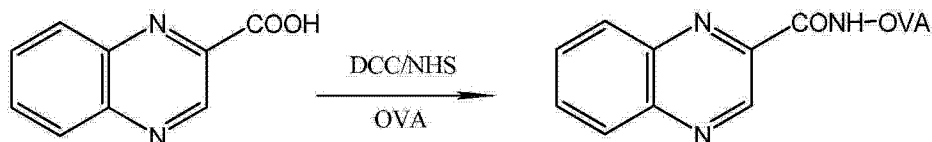
[0043]



[0044] 1.2 喹噁啉-2-羧酸-卵清白蛋白偶联物 (QCA-OVA) 的制备

[0045] 取:17.4mg QCA,溶于 1mL DMF 中,加入 NHS 15.0mg 和 DCC 20.2mg,室温下反应活化 12h,离心去除沉淀,得到 A 液;再取 HSA 66.0mg,溶于 6mL PBS (pH = 7.4) 中,此为 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,常温条件下避光反应 12h。反应完毕后,将反应液转入透析袋中,4℃ PBS 中透析 5d,每 4~6h 更换一次透析液,透析完后将样品冷冻干燥,即得偶联物 QCA-HSA,同理也可获得 QCA-OVA,置 -20℃ 保存。合成路线如下:

[0046]



[0047] 实施例 2 单克隆抗体的制备

[0048] 杂交瘤细胞的制备:参照杨汉春《动物免疫学》,以实施例 1 制备的免疫原 QHCPA-人血清白蛋白偶联物 (QHCPA-HSA) 免疫 Ba1b/C 小鼠 (购自湖北省医学科学院实验动物中心)。免疫程序为:基础免疫用与等体积的弗氏完全佐剂乳化的含 100 μg 免疫原

的蛋白乳液注射于小鼠的颈背部皮下；以后每隔 15 天用弗氏不完全佐剂乳化的含 100 μ g 免疫原的蛋白乳液进行加强免疫。从免疫三次起，每次免疫后第 8 天采尾血，分离血清，间接 ELISA 法检测血清抗体效价。免疫合格的小鼠（效价高、灵敏度好）停止免疫以备融合。融合时，取经最后强化免疫的 Balb/C 鼠一只，眼眶放血处死（收集血清，即为阳性血清），在 75% 酒精中浸泡 5min 消毒。无菌取出小鼠脾脏，分离出脾细胞，与新鲜制备的 SP2/0 骨髓瘤细胞（SP2/0 骨髓瘤细胞来自本实验室）按 $1 \sim 2 \times 10^7$ 个 SP2/0 与 10^8 个免疫脾细胞（1:10 ~ 1:15）的比例于 50mL 离心管，用 15mLRPMI-1640 基础液重悬细胞，1500r/min 离心 5min，洗细胞 1 次。离心的间隙将温浴的培养基，温浴的水，温浴的聚乙二醇（PEG）等放入超净台。然后取出灭菌的吸水纸，将装有骨髓瘤细胞和免疫脾细胞的离心管上清倒尽后，倒扣在吸水纸上控干水滴，轻敲管底使细胞松动。打开计时器，用 1mL 吸管吸取 0.8mLPEG，手持装有混合细胞的离心管，将其放置在水浴中片刻，将 PEG 缓慢的滴加到混合细胞上，边加边轻轻搅拌，1min 内加完，持续搅拌 30s。用吸管取 10mL 基础液，沿管壁缓慢加到融合细胞上，边加边轻轻摇动（不能吹打），5min 内分别加 1mL，2mL，3mL，4mL，最后补加基础液到 40mL，加完后，盖上盖子，反复颠倒几次，使细胞混匀。800r/min 5min 离心，弃上清。吸取含有饲养细胞的 HAT 培养基，用吸管将离心管中的融合细胞轻轻搅拌起来，液面附近逐滴滴入到含饲养细胞的血清瓶中，搅拌混匀，动作要轻将细胞轻轻搅拌起来，千万不要吹打。颠倒混匀。然后将细胞接种在细胞培养板上，每孔两滴，置于培养箱中培养。一次融合可接种 4 ~ 6 块 96 孔板。根据需要也可少种，一般按 SP2/0 的细胞数计算，每孔接种量约含 10^4 左右个 SP2/0 细胞。于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。

[0049] 融合的当天计为 0d，前 3d 尽量不要动细胞板，保持培养箱内环境稳定。第 3d 每孔补加 1 滴 HAT 完全培养基；第 5d 每孔吸出 1/2 培养上清（100 μ L），再加入 1 滴 HT 完全培养基；以后每隔 2d 同上法吸去 1/2 ~ 3/4 培养上清，在 7d 后换入 HT 完全培养基。

[0050] 待融合细胞集落长至培养孔 1/10 ~ 1/5，同时用建立的间接 ELISA 方法进行筛选。与零药物孔相比，药物孔 OD 值能被抑制的判为阳性。根据抑制率和细胞集落生长状况，选择 2 ~ 6 个强阳性的仅有 1-2 个单集落的细胞孔，采用有限稀释方法进行克隆化。

[0051] 经过 5 ~ 6 次克隆，最终筛选出分泌抗脱二氧卡巴氧抗体的单克隆杂交瘤细胞株，经染色体计数，该杂交瘤细胞的染色体数目为 99.3。申请人将其命名为 DCBX5B1，并于 2014 年 05 月 20 日送位于湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心（CCTCC）保藏，保藏编号为 CCTCC NO:C201495。

[0052] 腹水单抗制备与鉴定：将该细胞株 DCBX5B1 经腹腔注射 Balb/C 小鼠，生产单克隆抗体。Thermo Scientific 公司鼠单克隆抗体快速 ELISA 同型检测试剂盒的操作要求，对本发明所得到的单克隆抗体进行亚型鉴定，结果为小鼠 IgG₁ 亚型。

[0053] 实施例 3 脱二氧卡巴氧和脱二氧喹赛多间接竞争 ELISA 检测方法的建立

[0054] 3.1 试剂的配制（本实施例使用的试剂除另注明外均采用以下方法配制）

[0055] 磷酸盐缓冲液：NaCl 8.0g，KH₂PO₄ 0.2g，Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g，KCl 0.2g，加双蒸水至 1000mL，调节 pH 至 7.4；

[0056] 包被液：取 Na₂CO₃ 1.59g，NaHCO₃ 2.93g，加三蒸水至 1000mL，调节 pH 值至 9.6；

[0057] 洗涤液：NaCl 8.0g，KH₂PO₄ 0.2g，Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g，KCl 0.2g，Tween 200.5mL，加双蒸水至 1000mL，调节 pH 至 7.4；

[0058] 封闭液:卵清蛋白 1g 溶于 100mL 磷酸盐缓冲液中;

[0059] 底物液 A :3, 3', 5', 5- 四甲基联苯二胺 (TMB) 200mg, 无水乙醇 100mL, 加双蒸水至 1000mL;

[0060] 底物液 B :Na₂HPO₄ 14.6g, 柠檬酸 9.3g, 0.75% 过氧化氢脲 6.4mL, 加双蒸水至 1000mL;

[0061] 底物混合液:将 A 液和 B 液按体积比 1 : 1 混合即得, 现配现用;

[0062] 终止液 :2mol/L 硫酸溶液。

[0063] 3.2 包被原浓度和抗体工作浓度的初步确定

[0064] 选择上述合成的 QCA-OVA 作为包被原, 用包被液稀释成 32mg/L、16mg/L、8mg/L、4mg/L、2mg/L、1mg/L、0.5mg/L、0.25mg/L 等 8 个浓度, 在 96 孔酶标板, 从第一至第五列依次加入, 4℃ 过夜; 洗涤 3 次, 拍干, 加入封闭液 250 μL, 37℃ 封闭 120min; 洗涤 3 次, 拍干, 在酶标板的每个孔加入 50 μL 磷酸盐缓冲液 (PBS), 然后第一行至第七行再依次加入 50 μL 磷酸盐缓冲液稀释的稀释倍数为 500、1000、2000、4000、8000、16000、32000、64000 的单克隆抗体, 37℃ 孵育 30min, 洗涤 3 次, 拍干; 各孔加入 1 : 5000 倍磷酸盐缓冲液稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (简称二抗, 以下所指二抗均为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 购自武汉飞弈生物技术有限公司) 100 μL, 37℃ 孵育 30min, 洗涤 3 次, 拍干; 各孔加入 100 μL 底物混合液, 避光显色 15min, 加入 50 μL 终止液, 用自动酶标仪在 450nm 波长处测定光密度值 (OD 值), 结果见表 1。

[0065] 结果表明, 初步确定包被原 QCA-OVA 的包被浓度为 4mg/L, 抗体工作浓度为 1 : 16000。

[0066] 表 1 单克隆抗体方阵滴定

[0067]

抗体稀释度 (1 : X)	包被浓度 (μg/mL)							
	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
500	3.587	3.579	3.335	3.336	3.198	2.919	2.751	2.235
1000	3.582	3.568	3.678	3.542	3.104	2.755	2.425	2.068
2000	3.559	3.452	3.547	3.424	2.828	2.586	2.16	1.986
4000	3.458	3.402	3.289	2.895	2.774	2.298	1.852	1.722
8000	3.319	3.097	2.907	2.385	2.467	1.697	1.325	1.124
16000	3.125	2.985	2.408	1.892	1.392	1.155	0.958	0.728
32000	2.907	2.298	2.253	1.446	0.758	0.752	0.698	0.542
64000	2.376	2.219	1.904	1.179	0.598	0.322	0.231	0.124

[0068] 3.3 最佳包被原浓度和抗体工作浓度的确定

[0069] 以初步确定的包被原 QCA-OVA 包被浓度, 以 4mg/L 包被酶标板。将脱二氧卡巴氧用磷酸盐缓冲液稀释成 12 μg/L、6 μg/L、3 μg/L、1.5 μg/L、0.75 μg/L、0 μg/L 6 个浓度,

抗体以 1 : 16000 为中间浓度,按等差设计一系列浓度梯度,其 0 孔与 IC₅₀值见表 2。选择 OD 值在 2.0 左右,IC₅₀值较低所对应的抗体稀释度为最佳一抗稀释度。结果表明,选择 1 : 16000 为最佳抗体稀释度。

[0070] 表 2 最佳抗体稀释度优化

[0071]

抗体稀释倍数 (1:X)	0 孔 OD 值	IC ₅₀ (μg/L)
8000	2.400	3.26
12000	2.293	4.07
16000	1.925	2.57
20000	1.755	3.39
24000	1.503	3.28

[0072] 3.4 标准曲线的建立

[0073] 将脱二氧卡巴氧用磷酸盐缓冲液配制成 12 μg/L、6 μg/L、3 μg/L、1.5 μg/L、0.75 μg/L、0 μg/L 6 个系列浓度,每个浓度重复 5 孔,按照间接竞争 ELISA 方法测定,重复测定 5 次。以脱二氧卡巴氧溶液浓度的对数值为横坐标, B/B₀ 为纵坐标绘制标准曲线,求出 IC₅₀。本试剂盒的 IC₅₀ 值为 2.89 ± 0.29 μg/L。

[0074] 3.5 交叉反应试验

[0075] 将脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多等喹噁啉类药物用磷酸盐缓冲液配制成适当浓度,用建立的 ELISA 方法测定各药物的 IC₅₀值,每个药物 3 个复孔,以单克隆抗体对脱二氧卡巴氧的交叉反应率为 100%,利用公式 1 计算单克隆抗体对各药物的交叉反应率。结果(表 3)表明,本发明建立的间接 ELISA 及试剂盒对脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多、N4- 脱一氧喹赛多和 N1- 脱一氧喹赛多的交叉反应率分别为 100%、77%、76%和 2.3%,而与其他药物均无交叉反应。

[0076]

$$\text{公式 1: 交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{50\%抑制率 (DCBX)}}{\text{50\%抑制率 (其他药物)}} \times 100\%$$

[0077] 表 3 单克隆抗体对喹噁啉类药物交叉反应率

[0078]

药物名称	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 (%)	回归方程	相关系数 r
脱二氧卡巴氧	2.89	100	y = -0.5959x + 1.7678	0.991
脱二氧喹赛多	3.75	77	y = -0.6102x + 0.8664	0.995
脱一氧喹赛多 (N4)	3.80	76	y = -0.5507x + 0.7129	0.991

脱一氧喹赛多 (N1)	125	2.3		
脱二氧乙酰甲喹	>1000	<0.1		
脱二氧喹乙醇	>1000	<0.1		
脱二氧喹烯酮	>1000	<0.1		
原型药物	>1000	<0.1		

[0079] 实施例 4 本发明脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多多残留检测 ELISA 试剂盒的组装

[0080] 4.1 本发明 ELISA 试剂盒由下述部分组成：

[0081] 1) 包被有包被原 QCA-OVA 的固相载体（酶标板）；

[0082] 2) 脱二氧卡巴氧标准溶液 6 瓶，浓度分别为 12 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、1.5 $\mu\text{g/L}$ 、0.75 $\mu\text{g/L}$ 、0 $\mu\text{g/L}$ ；

[0083] 3) 保藏号为 CCTCC NO:C201495 的杂交瘤细胞株 DCBX5B1 分泌的单克隆抗体；

[0084] 4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体工作液；

[0085] 5) 浓缩磷酸盐缓冲液：NaCl 80.0g, KH_2PO_4 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.0g, KCl 2.0g, 加双蒸水至 1000mL；

[0086] 6) 浓缩洗涤液：NaCl 80.0g, KH_2PO_4 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.0g, KCl 2.0g, Tween20 5mL, 加双蒸水至 1000mL；

[0087] 7) 底物液 A：3, 3', 5', 5'-四甲基联苯二胺 (TMB) 200mg, 无水乙醇 100mL, 加双蒸水至 1000mL；

[0088] 8) 底物液 B： Na_2HPO_4 14.6g, 柠檬酸 9.3g, 0.75% 过氧化氢尿素 6.4mL, 加双蒸水至 1000mL, 调节 pH 至 5.0 ~ 5.4；

[0089] 9) 终止液：2mol/L 硫酸溶液。

[0090] 4.2 酶标板的制备

[0091] 用包被液将 QCA-OVA 稀释成 4mg/L, 每孔加入 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 倾去包被液, 每孔加入 250 μL 洗涤液洗涤 3 次, 拍干, 然后每孔加入封闭液 250 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120min, 倾去孔内液体, 洗涤液洗涤 3 次, 拍干, 用锡箔纸真空密封保存。

[0092] 实施例 5 本发明的酶联免疫方法的测定程序

[0093] 5.1 试剂的配制

[0094] 1) 样品稀释液：NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, Tween 200.5mL, 加双蒸水至 1000mL, 调节 pH 至 7.4。

[0095] 2) 洗涤液：将试剂盒中提供的洗涤液用三蒸水稀释 10 倍后使用。

[0096] 3) 底物混合液：根据每次所需用量, 将配制的底物液 A 和底物液 B 按体积 1 : 1 混匀, 现配现用。

[0097] 5.2 样品前处理

[0098] 将猪、鸡、牛肌肉样品用体积比为乙酸乙酯：乙腈 = 1 : 1 的混合溶剂振荡提取, 再加入 1mol/L 的 NaOH 振荡, 静置, 取有机层用氮气吹干, 加入稀释液离心后取上清。

[0099] 5.3 测定步骤

[0100] 1) 加样 : 向酶标板微孔中加入脱二氧卡巴氧系列浓度标准溶液或样品溶液 50 μ L, 然后加入单克隆抗体工作液 50 μ L, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 30min ;

[0101] 2) 洗涤 : 倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液 250 μ L 洗涤 3 次并拍干 ;

[0102] 3) 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体工作液 : 每孔中加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体工作液 100 μ L, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 30min ;

[0103] 4) 洗涤 : 倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液 250 μ L, 洗涤 3 次并拍干 ;

[0104] 5) 加底物 : 每孔中加入底物混合液 100 μ L, 置于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 15min ;

[0105] 6) 加终止液 : 每孔中加入终止液 50 μ L ;

[0106] 7) 测定 : 用酶标仪在 450nm 处测定每孔的光密度值 (OD 值)。

[0107] 5.4 结果判断

[0108] 标准曲线 : 以所测定的标准品 OD 值除以“零”孔 OD 值 (B/B₀) 为纵坐标, 脱二氧卡巴氧浓度的对数值为横坐标作标准曲线, 并进行线性回归, 给出回归方程。

[0109] 实施例 6 本发明试剂盒的灵敏度、精密度、准确度、重复性试验

[0110] 6.1 本发明试剂盒的灵敏度试验

[0111] 以标准曲线的 IC₅₀ 值和组织最低检测限 (LOD) 作为本发明检测试剂盒的灵敏度指标。将脱二氧卡巴氧标准品稀释成为 12 μ g/L、6 μ g/L、3 μ g/L、1.5 μ g/L、0.75 μ g/L、0 μ g/L 6 个浓度, 每个浓度 5 个复孔, 按照间接竞争 ELISA 方法重复测定 5 次, 取 5 次测定的 IC₅₀ 的平均值。LOD 通过以下步骤决定, 测定 20 份空白样品的 OD 值, 根据标准曲线的回归方程计算出相应的脱二氧卡巴氧浓度, 然后计算出脱二氧卡巴氧浓度的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD), 根据公式 $LOD = \bar{X} + 3SD$ 计算出最低检测限。

[0112] 表 4 猪肌肉和肝脏中喹噁啉类药物的最低检测限

[0113]

药物	基质	平均测定值 (μ g/kg)	标准差 (SD) (%)	LOD (μ g/kg)
脱二氧卡巴氧	猪肌肉	0.803	1.3	0.842
	猪肝脏	0.812	1.4	0.854
脱二氧喹赛多	猪肌肉	0.968	1.6	1.016
	猪肝脏	0.998	1.5	1.043

[0114] 6.2 本发明试剂盒的精密度试验

[0115] 将脱二氧卡巴氧标准品稀释成 12 μ g/L、6 μ g/L、3 μ g/L、1.5 μ g/L、0.75 μ g/L、0 μ g/L 6 个浓度, 每浓度 5 个复孔, 按照间接竞争 ELISA 方法重复测定 5 次, 应用标准曲线的回归方程计算出各浓度脱二氧卡巴氧标准溶液的测定值, 计算板内和板间变异系数, 结果见表 5。

[0116] 表 5 标准曲线的板内与板间变异系数

[0117]

脱二氧卡巴氧 ($\mu\text{g/L}$)	测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}, \mu\text{g/L}$)	板内变异系数 (CV %, n=5)	平均测定值 ($\bar{X} \pm \text{SD}, \mu\text{g/L}$)	板间变异系数 (CV %, n=25)
0.75	0.81 \pm 0.03	4.15	0.79 \pm 0.03	3.80
	0.79 \pm 0.02	3.04		
	0.80 \pm 0.06	7.15		
	0.76 \pm 0.03	4.16		
	0.79 \pm 0.03	3.82		
1.5	1.37 \pm 0.03	2.23	1.41 \pm 0.09	6.38
	1.35 \pm 0.05	3.56		
	1.44 \pm 0.14	9.92		
	1.48 \pm 0.13	9.10		
	1.41 \pm 0.08	5.53		
3	2.91 \pm 0.42	14.29	2.88 \pm 0.29	10.07
	3.03 \pm 0.38	12.68		
	2.74 \pm 0.20	7.47		
	2.76 \pm 0.16	5.74		
	2.98 \pm 0.28	9.45		
6	6.43 \pm 0.19	3.01	6.54 \pm 0.43	6.57
	6.54 \pm 0.57	8.75		
	6.50 \pm 0.43	6.57		
	7.08 \pm 0.45	6.34		
	6.15 \pm 0.53	8.56		
12	11.91 \pm 0.40	3.34	11.73 \pm 0.58	4.94
	11.57 \pm 0.65	5.65		
	11.99 \pm 0.64	5.36		
	11.13 \pm 0.65	5.87		
	12.07 \pm 0.56	4.63		

[0118] 6.3 本发明试剂盒的准确度、重复性试验

[0119] 在 2g 匀浆猪肌肉或猪肝组织中加入脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多的标准溶液，

使药物在组织中的浓度分别为 $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，每个浓度重复五次，重复测定 3 次。测定添加组织中的脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多的浓度，按照公式计算回收率，考核试剂盒的准确度；计算批内和批间变异系数，考察试剂盒的重复性。结果见表 6、7，其添加回收率在 $80 \sim 100\%$ 之间，批内与批间变异系数 $\leq 7.5\%$ ，表明试剂盒具有可靠的准确度和良好的重现性。

[0120] 表 6 猪肌肉中的添加回收率

[0121]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV%)
脱二氧 卡巴氧	1.5	99.5 ± 3.6	3.6	91.8 ± 6.9	7.5
		89.6 ± 2.5	2.8		
		86.3 ± 6.5	7.5		
	3	92.3 ± 4.2	4.6	90.7 ± 1.4	1.5
		90.3 ± 3.6	4.0		
		89.5 ± 2.9	3.2		
	6	88.2 ± 6.2	7.2	89.1 ± 3.5	3.9
		85.9 ± 4.9	5.7		
		92.8 ± 5.2	5.6		
脱二氧 喹赛多	1.5	96.5 ± 2.8	2.9	95.6 ± 0.9	0.9
		94.6 ± 4.9	5.2		
		95.6 ± 5.1	5.3		
	3	94.3 ± 3.9	4.1	95.8 ± 1.7	1.8
		97.6 ± 4.8	4.9		
		95.6 ± 5.1	5.3		
	6	94.8 ± 3.7	3.9	93.8 ± 2.9	3.1
		96.1 ± 3.1	3.2		
		90.6 ± 4.6	5.1		

[0122] 表 7 猪肝脏中的添加回收率

[0123]

药物	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV%, n=5)	平均回收率 (%)($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV%)
脱二氧 卡巴氧	1.5	89.6 \pm 4.5	5.2	91.3 \pm 4.3	4.7
		88.1 \pm 6.2	7.1		
		96.2 \pm 4.3	4.5		
	3	89.5 \pm 3.6	4.1	85.7 \pm 3.7	4.3
		85.6 \pm 3.4	3.9		
		82.1 \pm 5.4	6.6		
	6	85.9 \pm 3.9	4.5	90.9 \pm 4.9	5.4
		91.3 \pm 2.9	3.2		
		95.6 \pm 5.1	5.3		
脱二氧 喹赛多	1.5	89.5 \pm 4.9	5.5	91.2 \pm 3.6	3.9
		88.7 \pm 4.5	5.1		
		95.3 \pm 3.2	3.4		
	3	85.4 \pm 2.8	3.3	96.6 \pm 1.1	1.1
		86.9 \pm 5.4	6.2		
		87.5 \pm 4.9	5.6		
	6	95.8 \pm 4.5	4.7	92.2 \pm 3.6	3.9
		92.3 \pm 5.2	5.6		
		88.6 \pm 4.6	5.2		

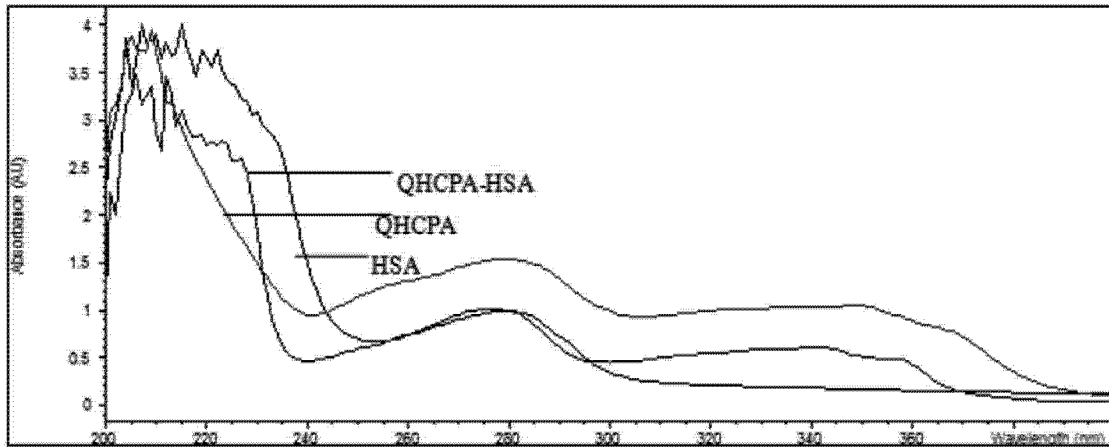


图 1

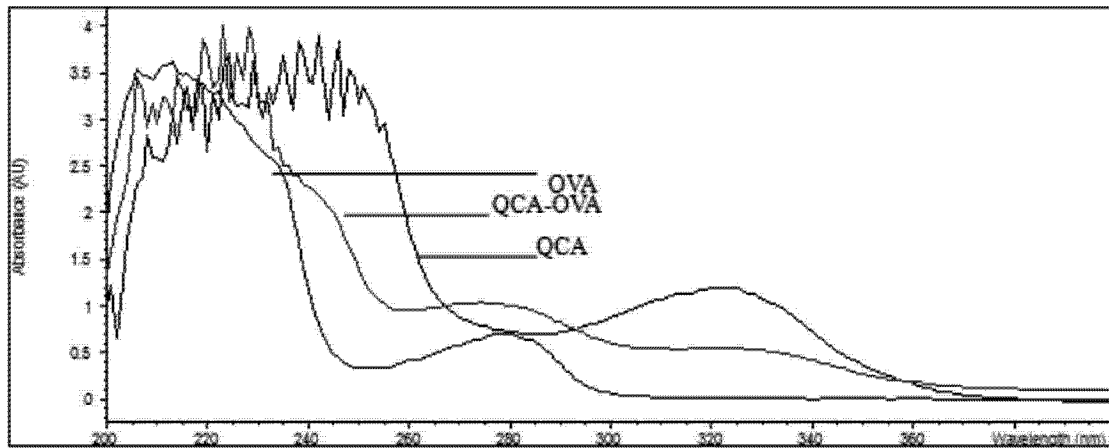


图 2

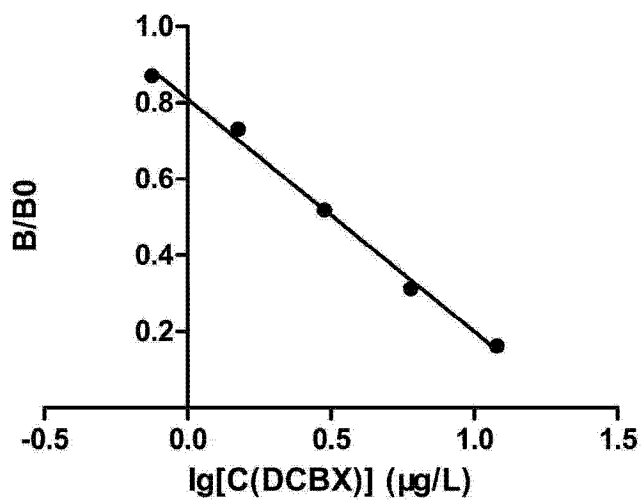


图 3

专利名称(译)	用于检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的单克隆抗体及酶联免疫方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN104558186A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201410830131.2	申请日	2014-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	袁宗辉 何秀平 彭大鹏 潘源虎 王玉莲 陈冬梅 陶燕飞 刘振利		
发明人	袁宗辉 何秀平 彭大鹏 潘源虎 王玉莲 陈冬梅 陶燕飞 刘振利		
IPC分类号	C07K16/44 C12N5/20 G01N33/577 G01N33/531 C12R1/91		
代理人(译)	徐绍新		
其他公开文献	CN104558186B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种能识别多种卡巴氧和喹赛多代谢产物的特异性单克隆抗体和一种用于检测卡巴氧和喹赛多代谢产物的酶联免疫方法及试剂盒,本发明的单克隆抗体是由保藏号为CCTCC ? NO:C201495的杂交瘤细胞株DCBX5B1所分泌的。与现有技术相比,本发明制备的单克隆抗体可以同时识别脱二氧卡巴氧、脱二氧喹赛多和N4-脱一氧喹赛多,而且具有较高的灵敏度和特异性。本发明建立的ELISA方法和试剂盒能同时检测卡巴氧和喹赛多代谢产物在肉类食物中的残留,具有检测效率和灵敏度高,精密度和准确度好等优点。

