



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111366717 A

(43)申请公布日 2020.07.03

---

(21)申请号 201811588799.5

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 南京亿特生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区江宁科  
学园芝兰路18号

(72)发明人 洪霞 秦悦

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种检测鸡肉中的氯霉素的荧光分析试剂  
盒的制备

(57)摘要

一种检测氯霉素的试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIR)技术领域。本发明配制的试剂盒,采用TRFIR检测氯霉素,测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有CAP—OVA,加入CAP标准或样品,再加入CAP抗体。游离的CAP与微孔板上的CAP—OVA竞争CAP抗体,没有连接的CAP抗体被洗涤除去,加入Eu<sup>3+</sup>—羊抗鼠抗体,标记免疫反应后没有连接的Eu<sup>3+</sup>—羊抗鼠抗体被洗涤除去。加增强液后,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps,荧光强度与样品中的CAP浓度成反比,对照标准曲线即可确定被测样品中CAP的含量。本发明提供的检测CAP试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,操作时间大幅度减少;可用作检测家禽组织(鸡肉)中氯霉素残留检测。

A  
CN 111366717

CN

1. 一种检测氯霉素(CAP)的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征是: (1) 96 或48孔包被板; (2) 缓冲液; (3) 氯霉素标准; (4) 氯霉素的抗体冻干品; (5) 铕标记的羊抗鼠抗体; (6) 洗涤液; (7) 增强液所组成。

2. 一种用权利要求1所述的试剂盒氯霉素的方法,其特征是取包被有CAP-OVA的微孔包被板,加入CAP 标准或处理好的样品到各自的微孔中,再加入CAP抗体,振荡反应,洗涤液洗涤,加铕标记的羊抗鼠 抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加增强液振荡后测量荧光强度cps,对照标准曲线计算样品 中的CAP含量。

3. 根据权利要求2所述的检测氯霉素的方法,其操作为:取包被有CAP-OVA的微孔包被板,加入50 $\mu$ L 的CAP标准或处理好的样品到各自的微孔中,加50 $\mu$ l以缓冲液(2)稀释的CAP抗体,25℃振荡1小 时,洗涤液洗三次,加以缓冲液(2)稀释的100 $\mu$ L Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体,25℃振荡0.5小时,用洗涤液洗 六次,加200 $\mu$ l增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps,从标准曲线计算样品中的CAP含量。

## 一种检测鸡肉中的氯霉素的荧光分析试剂盒的制备

### 技术领域

[0001] 一种检测氯霉素(CAP)的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术领域，用于鸡肉等样品中氯霉素的含量检测。

### 背景技术

[0002] 氯霉素是一种广谱抗生素，常用于动物各种传染病的治疗，对于多种病原菌有较强的抑制作用。氯霉素存在严重的副作用，能抑制人体骨髓造血功能，引起人类的再生障碍性贫血等疾病，因此动物食品中的氯霉素残留对人类的健康构成巨大威胁。

[0003] 目前有关动物源性食品中氯霉素及其代谢物的测定方法主要为理化检测法，如用化学分析法测定鸡肉中的氯霉素残留量，检出限为0.0125ug/kg，用高效液相色谱法测定鱼肉中的氯霉素残留量，检出限为0.0125ug/kg。但这些方法仪器设备昂贵，操作复杂，灵敏度低，且不适用于大批量样品的检测，无法满足国内食品安全检测市场的迫切需要。而时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)由于其特异性强、灵敏度高、操作简便、廉价，且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们重视和采用。

### 发明内容

[0004] 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，用于水产品样品中氯霉素含量的检测。本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)检测CAP。技术方案：该检测CAP的试剂盒是由：(1) 96或48孔包被板；(2) 缓冲液；(3) 氯霉素标准；(4) 氯霉素的抗体冻干品；(5) 铏标记的羊抗鼠抗体；(6) 洗涤液；(7) 增强液所组成。

[0005] 本发明测定方法：测定的基础是标记免疫反应。包被有CAP-OVA的微孔板，加入CAP标准或已处理好的样品到各自的微孔中，再加入CAP抗体，振荡反应，游离的CAP与微孔板上的CAP-OVA竞争CAP抗体，洗涤液洗涤，没有连接的CAP抗体在洗涤步骤中被除去。加入Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体，进行标记免疫反应，再用洗涤液洗涤，反应后没有连接的Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后，在紫外光的激发下发射很强的荧光，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的浓度成反比，对照标准曲线即可确定样品中抗原的量。

### 具体实施方案

[0006] 实施例1

按下列步骤制备试剂盒和检测鸡肉样品：

(1) Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体的制备：

取溶解于50mmol/LPBS pH7.0的5g/L羊抗鼠抗体1.2ml，经PD-10柱转换缓冲条件，洗脱液为含0.155mol/LNaCl的50mmol/LNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>pH8.5缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量(1.46A<sub>280</sub>-0.74A<sub>260</sub>)，用上述洗脱液稀释羊抗鼠抗体至2g/L。取500-1000μl稀释后的羊抗鼠抗体加入含0.2-0.4mg的Eu<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu<sup>3</sup>

<sup>+</sup>-DTTA)的小瓶中,30℃磁力搅拌反应20小时。反应液经用80mmol/L Tris-HCl pH7.8缓冲液平衡的Sephadex CL-6B柱(1×40cm)层析,A280监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

[0007] (2) 包被板固相抗原制备:

将CAP-OVA用50mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH9.6缓冲液稀释至5mg/L的包被液,96(或48)孔微孔板各孔加100μl,4℃放置过夜。弃去包被液,冲洗两次,加150μl含3g/LBSA的上述缓冲液封闭,4℃放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20℃冷冻保存。

[0008] (3) 试剂的配制:

A. 标准氯霉素(CAP):(0ng/ml, 0.025ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 0.3ng/ml, 0.6ng/ml),从CAP纯品中稀释得到,稀释液为甲醇:水=7:3;

B. 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛IgG、50μmol/L二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1ml/LTween-80和0.1%NaN<sub>3</sub>的Tris-HCl pH7.8;

C. 洗涤液:14.5mmol/L NaCl、0.2ml/LTween-80和0.2%NaN<sub>3</sub>的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

D. 增强液的配制:1升pH3.2邻苯二甲酸氢钾缓冲液含15μmolβ-萘甲酰三氟丙酮(β-NTA),50μmol三正辛基氧化膦(TOPO),1ml曲拉通X-100(Triton X-100)。

[0009] (4) 试剂盒提供的试剂:

每一个盒中的试剂足够进行96个测量,盒中的材料如下:

A. 1×96孔板(8条×12孔,可以拆分为单孔)包被有CAP-OVA;

B. 6×CAP标准液,1.0ml/瓶,标准液浓度为:(0ng/ml, 0.025ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 0.3ng/ml, 0.6ng/ml);

C. 1×CAP抗体冻干品,用时0.5ml蒸馏水溶解;

D. 1×Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体冻干品,用时0.5ml蒸馏水溶解;

E. 1×增强液:15ml;

F. 1×洗涤液:30ml,用时以蒸馏水1:25稀释;

G. 1×缓冲液:30ml。

[0010] (5) 测定之前注意事项:

A. 使用之前将所有试剂回升至室温(18-30℃);

B. 使用之后立即将所有试剂放回2-8℃;

C. 如果样品量大建议使用多通道移液器;

D. 在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖子盖住微孔;

E. 取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于2-8℃。

[0011] (6) 具体检测步骤如下:

取CAP-OVA板条,加入50μl的CAP标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液1:5000稀释的CAP抗体50μl,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37℃振荡1小时,洗涤液洗四次,加缓冲液1:400稀释的Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体100μl,37℃振荡45分钟,用洗涤液洗六次,加200μl增强液振荡5分钟后测量。从标准曲线计算样品中的CAP含量,该例的样品浓度0.15ng/ml。

[0012] 实施例2

按下列步骤制备试剂盒和检测猪肉样品：

(1) 制备试剂盒同实施例1的(1)~(5)；

(2) 具体检测步骤如下：

取备好的鸡肉样品5.00g,经匀浆机破碎,依次加入10mL乙酸乙酯和1.0mL 1.0mol/LNaOH溶液,以 12000r/min均质1min,静置0.5h后3000r/min离心5min,取5mL上清液,用1.0mol/LHCl调pH至7.0后备用。

[0013] 取CAP-OVA板条,加入50μl的CAP标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液1:5000稀释的CAP抗体50μl,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37 °C振荡1小时,洗涤液洗四次,加缓冲液1:400稀释的Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体100μl,37℃振荡45分钟,用洗涤液洗4次,加200μl增强液振荡5分钟后测量。从标准曲线计算样品中的CAP含量。

专利名称(译)	一种检测鸡肉中的氯霉素的荧光分析试剂盒的制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN111366717A</a>	公开(公告)日	2020-07-03
申请号	CN201811588799.5	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
[标]发明人	洪霞 秦悦		
发明人	洪霞 秦悦		
IPC分类号	G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

一种检测氯霉素的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析( TRFIR )技术领域。本发明配制的试剂盒，采用TRFIR检测氯霉素，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有CAP - OVA，加入CAP标准或样品，再加入CAP抗体。游离的CAP与微孔板上的CAP - OVA竞争CAP抗体，没有连接的CAP抗体被洗涤除去，加入Eu3+ - 羊抗鼠抗体，标记免疫反应后没有连接的Eu3+ - 羊抗鼠抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的CAP浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中CAP的含量。本发明提供的检测CAP试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，操作时间大幅度减少；可用作检测家禽组织( 鸡肉 )中氯霉素残留检测。