

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/543

G01N 33/577 C12Q 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02125370.6

[43] 公开日 2004 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 1472533A

[22] 申请日 2002.7.29 [21] 申请号 02125370.6

[71] 申请人 中国农业科学院饲料研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 12
号中国农科院饲料所

[72] 发明人 丁宏标

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 一种检测醋酸甲羟孕酮含量的试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测醋酸甲羟孕酮含量的试剂盒及其检测方法，目的是提供一种结构简单，操作方便，价格便宜的醋酸甲羟孕酮酶免疫检测试剂盒。本发明的试剂盒，包括盒体；酶标板；装有标准醋酸甲羟孕酮试剂的试剂瓶 A；装有醋酸甲羟孕酮抗体稀释液的试剂瓶 B；装有酶标抗原试剂的试剂瓶 C；装有酶标抗原稀释液的试剂瓶 D；装有含吐温-20 的磷酸盐固体的试剂瓶 E；装有邻苯二胺的试剂瓶 F；装有醋酸钠-柠檬酸缓冲液的试剂瓶 G；装有 H₂O₂ 溶液的试剂瓶 H；装有硫酸溶液的试剂瓶 I。本发明采用酶免疫吸附竞争法的原理检测样品中的醋酸甲羟孕酮，简便、快速、灵敏、准确、价格低廉，尤其适用于肉奶蛋制品的醋酸甲羟孕酮残留检测。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种醋酸甲羟孕酮酶免疫检测试剂盒，其特征在于它包括盒体；酶标板；装有标准醋酸甲羟孕酮试剂的试剂瓶 A；装有醋酸甲羟孕酮抗体稀释液的试剂瓶 B；装有酶标抗原试剂的试剂瓶 C；装有酶标抗原稀释液的试剂瓶 D；装有含吐温-20 的磷酸盐固体的试剂瓶 E；装有邻苯二胺的试剂瓶 F；装有醋酸钠-柠檬酸缓冲液的试剂瓶 G；装有 H₂O₂ 溶液的试剂瓶 H；装有硫酸溶液的试剂瓶 I。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂瓶 B 中的稀释液为含 10g/L BAS, 0.01mol/L, pH7.4 的 PBST 溶液；所述试剂瓶 C 中的酶标抗原试剂为醋酸甲羟孕酮-辣根过氧化物酶或酶标羊抗兔抗体或酶标猪抗兔抗体；所述试剂瓶 D 中的酶标抗原稀释液为含 1%明胶，0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒内还设有海绵托架。

4、根据权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于：所述海绵托架上制有 9 个安放试剂瓶的孔和凹槽，所述试剂瓶 A、B、C、D、E、F、G、H、I 均装在海棉托架内相应的孔和凹槽内。

5、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述酶标板由塑料支架和若干各自分开的带孔穴的塑料条组成。

6、一种利用权利要求 1 所述试剂盒检测醋酸甲羟孕酮的方法，包括以下步骤：

1) 处理被检测样品；

2) 将多克隆或单克隆醋酸甲羟孕酮抗体包被在酶标板上，酶标板放在 2℃-8℃ 冰箱过夜；

3) 在 A 试剂瓶中加入 20-30ml B 试剂瓶中的稀释液混匀；

4) 在 C 试剂瓶中加入 10-20ml D 试剂瓶中的酶标抗原稀释液，溶解混匀，在 2-8℃ 下保存；

5) 在 E 试剂瓶中加入去离子水配制成洗涤液，用该洗涤液洗酶标板 2-4 次，每次间隔 3-4 分钟，洗后用吸水纸拍干；

6) 在酶标板小孔中分别加入配制好的 A 试剂瓶和 B 试剂瓶中的试剂以及处理过的样品稀释液，A 试剂瓶和 B 试剂瓶中的试剂作为阳性和阴性对照，然后加入配制好

的 C 试剂瓶中的试剂进行竞争免疫反应，在 37-38℃条件下温育 1.5 小时后，再用 E 洗涤液洗板 4-6 次，每次间隔 3-4 分钟，拍干；

7) 向酶标板小孔中分别加入酶底物混合液，混匀，在 37-38℃避光作用 15-20 分钟，显色；

8) 向酶标板小孔中分别加入 I 试剂瓶中的终止液中中止反应，目测或用酶标仪测定 $A_{490\text{nm}}$ 值。

7、根据权利要求 6 所述的检测醋酸甲羟孕酮的方法，其特征在于：所述酶底物混合液是在使用前半小时内用试剂瓶 F、G、H 中的试剂配制的，配制的方法是，G 试剂瓶和 F 试剂瓶的试剂按体积份数比为 7-9：3-1 的比例混合，并按每毫升该混合液中加入 $14 \mu\text{l}$ H 试剂瓶中的 H_2O_2 配制而成。

8、根据权利要求 6 所述的检测醋酸甲羟孕酮的方法，其特征在于：所述试剂瓶 B 中的稀释液为含 10g/L BAS, 0.01mol/L, pH7.4 的 PBST 溶液；所述试剂瓶 C 中的酶标抗原试剂为醋酸甲羟孕酮-辣根过氧化物酶或酶标羊抗兔抗体或酶标猪抗兔抗体；所述试剂瓶 D 中的酶标抗原稀释液为含 1%明胶，0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液。

一种检测醋酸甲羟孕酮含量的试剂盒及其检测方法

技术领域

本发明涉及一种检测醋酸甲羟孕酮含量的试剂盒及其检测方法，特别是涉及一种检测动物性食品及饲料中醋酸甲羟孕酮的免疫检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

醋酸甲羟孕酮 (Medroxyprogesterone, MPA)，又名醋酸甲孕酮，醋酸安宫黄体酮，是一种类甾体激素药物，已广泛用于妇女绝经期综合症疾病的替代治疗。但是食品中的醋酸甲羟孕酮对人有严重的副作用，可抑制人的精子生成，导致不育，因此动物性食品中的醋酸甲羟孕酮残留对人类，特别是儿童的健康构成了潜在的严重危害。美国和欧共体对动物体和动物性食品中醋酸甲羟孕酮残留有严格的限定，我国尚未制定醋酸甲羟孕酮残留量的食品卫生标准。由于醋酸甲羟孕酮具有显著的同化作用，可明显促进动物生长，效果好和价廉，在美国、澳大利亚、新西兰已批准用作饲料添加剂，但有严格的停药期。我国和欧盟禁止用它作饲料添加剂，但仍有人非法使用。为了保障动物性食品食用者的健康，扩大动物产品和饲料的检测是非常必要的。

测定醋酸甲羟孕酮残量的方法，主要有小白鼠生物活性法，色谱法，放射免疫法，酶免疫分析法等，国内外文献已有许多报导，但是寻求操作更为简便，精确度更高，特异性更强的检测方法，一直是广大科研工作者致力研究的方向。

发明内容

本发明的目的是提供一种结构简单，操作方便，价格便宜的醋酸甲羟孕酮酶免疫检测试剂盒。

一种醋酸甲羟孕酮酶免疫检测试剂盒，它包括盒体；酶标板；装有标准醋酸甲羟孕酮试剂的试剂瓶 A；装有醋酸甲羟孕酮抗体稀释液的试剂瓶 B；装有酶标抗原试剂的试剂瓶 C；装有酶标抗原稀释液的试剂瓶 D；装有含吐温-20 的磷酸盐固体的试剂瓶 E；装有邻苯二胺的试剂瓶 F；装有醋酸钠-柠檬酸缓冲液的试剂瓶 G；装有 H₂O₂ 溶液的试剂瓶 H；装有硫酸溶液的试剂瓶 I。

所述试剂瓶 B 中的稀释液为含 10g/L BAS, 0.01mol/L, pH7.4 的 PBST 溶液；所述试剂瓶 C 中的酶标抗原试剂为醋酸甲羟孕酮-辣根过氧化物酶或酶标羊抗兔抗体或酶

标猪抗兔抗体；所述试剂瓶 D 中的酶标抗原稀释液为含 1%明胶，0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液。

为了使试剂盒中的试剂瓶放置得更加稳固并不易破碎，所述试剂盒内还设有海棉托架。所述海棉托架上制有 9 个安放试剂瓶的孔和凹槽，所述试剂瓶 A、B、C、D、E、F、G、H、I 均装在海棉托架内相应的孔和凹槽内。

所述酶标板由塑料支架和若干各自分开的带孔穴的塑料条组成。

试剂盒应放在 2-8℃ 条件下贮存。

本发明的第二个目的是提供一种利用本发明上述醋酸甲羟孕酮酶免疫检测试剂盒检测醋酸甲羟孕酮的方法。

为实现这一目的，本发明采用酶免疫吸附（ELISA）竞争法的原理检测样品中的醋酸甲羟孕酮，其技术方案包括以下步骤：

- 1) 处理被检测样品；
- 2) 将多克隆或单克隆醋酸甲羟孕酮抗体包被在酶标板上，酶标板放在 2℃-8℃ 冰箱过夜；
- 3) 在 A 试剂瓶中加入 20-30ml B 试剂瓶中的稀释液混匀；
- 4) 在 C 试剂瓶中加入 10-20ml D 试剂瓶中的酶标抗原稀释液，溶解混匀，在 2-8℃ 下保存；
- 5) 在 E 试剂瓶中加入去离子水配制成洗涤液，用该洗涤液洗酶标板 2-4 次，每次间隔 3-4 分钟，洗后用吸水纸拍干；
- 6) 在酶标板小孔中分别加入配制好的 A 试剂瓶和 B 试剂瓶中的试剂以及处理过的样品稀释液，A 试剂瓶和 B 试剂瓶中的试剂作为阳性和阴性对照，然后加入配制好的 C 试剂瓶中的试剂进行竞争免疫反应，在 37-38℃ 条件下温育 1.5 小时后，再用 E 洗涤液洗板 4-6 次，每次间隔 3-4 分钟，拍干；
- 7) 向酶标板小孔中分别加入酶底物混合液，混匀，在 37-38℃ 避光作用 15-20 分钟，显色；
- 8) 向酶标板小孔中分别加入 I 试剂瓶中的终止液中止反应，目测或用酶标仪测定 A_{490nm} 值。

所述酶底物混合液是在使用前半小时内用试剂瓶 F、G、H 中的试剂配制的，配制的方法是，G 试剂瓶和 F 试剂瓶的试剂按体积份数比为 7-9: 3-1 的比例混合，并按每

毫升该混合液中加入 14 μ l H 试剂瓶中的 H₂O₂ 配制而成。

利用本发明所提供的试剂盒可以简便、快速、灵敏、准确地检测动物性食品或饲料中是否含有醋酸甲羟孕酮，价格低廉，样品前处理简单，提取后就可直接测定，并且一次可测定大量样本。用本发明的方法检测醋酸甲羟孕酮，最低检测限可达 100ng/kg 尤其适用于肉奶蛋制品的 MPA 残留检测。

具体实施方式

实施例 1、特异性抗体（MPA 单体）的制备：

1、抗原制备

以人工合成的醋酸甲羟孕酮—牛血清白蛋白（MPA-BSA）作为免疫抗原。

2、免疫动物

采用 BALB/C 小白鼠或兔作为免疫动物，免疫抗原剂量为 50—100ng，皮下注射，3—4 周后，腹腔注射加强免疫 2—4 次取脾细胞。

3、细胞融合

将 SP2/0 骨髓瘤细胞与脾细胞在聚乙烯醇的溶剂中进行细胞融合，在 HAT 培养液中作选择培养。

4、杂交瘤细胞克隆化

采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，直到得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

5、单克隆抗体（McAb）的保存

在液氮或 -20℃ 保存，使用时 37℃ 水浴快速解冻。

6、McAb 的生产和提纯

光小鼠腹腔注射液体石蜡，0.5ml/只，7-10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 - 10^6$ /只，7-10 天后采集腹水。经硫酸铵盐析法进行纯化，小瓶分装待用。

实施例 2、被检样品牛奶的处理

1、牛奶样品 3500 rpm 离心 10 分钟去脂；

2、吸取并弃去上层脂肪层；

3、取 5ml 去脂牛奶加入 150 μ l 革瑞氏液 I，摇匀后振荡再加入 150 μ l 革瑞氏液 II，迅速摇匀；

4、3500 rpm 离心 10 分钟；

- 5、移去上清液，再用缓冲液将其 1: 1 稀释（1 份上清液+1 份缓冲液）；
- 6、取 50 μ l 用于检测。

实施例 3、被检肉样的处理

- 1、用均质器或捣碎机将肉样或肾脏进行均质；
- 2、取均质后样品 5g，加 20ml 乙腈水溶液（84 份乙腈+16 份水）提取 10 分钟；
- 3、3000 rpm 离心 10 分钟；
- 4、用 3ml 去离子水稀释 3ml 上清液，再用 4.5ml 乙酸乙酯提取；
- 5、3000 rpm 离心 10 分钟；
- 6、将乙酸乙酯层吹干；
- 7、用 1.5ml 缓冲液将残渣溶解，再加入 1.5ml 正乙烷或正庚烷去脂；
- 8、彻底移去上层的正己烷或正庚烷层；
- 9、取 50 μ l 下层液用于检测。

实施例 4、用本发明试剂盒检测醋酸甲羟孕酮

- 1、处理被检测样品；
- 2、将多克隆或单克隆醋酸甲羟孕酮抗体包被在酶标板上，酶标板为 12 \times 8 孔，每孔 50-100 μ l，37 $^{\circ}$ C，温育 2hr，用 10g/L 明胶封闭。包被后的每条酶标板用铝箔袋封好，放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜；
- 3、在 A 试剂瓶中加入 25ml B 试剂瓶中的稀释液混匀；A 试剂瓶中为标准醋酸甲羟孕酮试剂，B 试剂瓶中为含 10g/L BAS, 0.01mol/L, pH7.4 的 PBST 溶液；
- 4、在 C 试剂瓶中的醋酸甲羟孕酮-辣根过氧化物酶中加入 15ml D 试剂瓶中的酶标抗原稀释液，溶解混匀，在 4 $^{\circ}$ C 下保存；D 试剂瓶中的酶标抗原稀释液为含 1%明胶，0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 溶液；
- 5、在含 0.1%吐温-20 (Tween-20) 的磷酸盐 (PBS) 的 E 试剂瓶中加入 200ml 蒸馏水配制成 E 洗涤液，用于酶标板洗涤。用该洗涤液洗酶标板 3 次，洗液不得溢出，每次间隔 3 分钟，洗后用吸水纸拍干；
- 6、底物混合液配制：临用前半小时内，根据每次所需用量，用 F 试剂瓶中的邻苯二胺和 G 试剂瓶中的醋酸钠-柠檬酸缓冲液按体积比 G: F=8: 1 的比例混合，再按每毫升此混合液加入 14 μ l H 试剂瓶中的双氧水的比例配制成底物混合液；
- 7、将试剂盒平衡至室温，在酶标板小孔中分别加入配制好的 A 试剂瓶和 B 试剂

瓶中的试剂以及处理过的样品稀释液，A 试剂瓶和 B 试剂瓶中的试剂作为阳性和阴性对照，然后加入配制好的 C 试剂瓶中的试剂进行竞争免疫反应，具体如表 1 所列，依次加入配制好的试剂及待测样品稀释液，1-3 号孔为标准对照孔，4-12 号孔为样品测定孔，每批测定时，可以每孔置一只待测样品，也可几只孔置同一只待测样品，进行平行测定，也可用另一块酶标板同时检测，其 1-12 孔扩大均为样品孔，可视具体待测样品的数目多少而灵活决定。

表 1:

次序	加入量	孔号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	25 μ l	A	B	A	……稀释后样品液……								
2		摇均											
3	25 μ l	C	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4		摇均											

按上表在 4-12 样品测定孔中，先后加入待测抗原和酶标抗原，而在 1-3 标准对照孔中，仅加或不加酶标抗原。在 37℃ 条件下温育 1.5 小时后，再用 E 洗涤液洗板 4-6 次，每次间隔 3 分钟，拍干；

8、向各酶标板小孔中分别加入 50 μ l 酶底物混合液，混匀，37℃ 避光作用 15 分钟，显色；

9、向酶标板小孔中分别加入 I 试剂瓶中的硫酸终止液中止反应（2mol/L；50 μ l/孔）；

10、测定：先比较 1-3 号孔颜色，1 号孔最深，2 号孔次之，3 号孔接近无色，说明标准正确。

目视法：比较样品孔与 2 号孔颜色，若比 2 号孔颜色浅，则为阳性，反之为阴性。若颜色与 2 号孔接近，则用酶标仪测 A_{490nm} 值，以达到准确检测的目的。

专利名称(译)	一种检测醋酸甲羟孕酮含量的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1472533A	公开(公告)日	2004-02-04
申请号	CN02125370.6	申请日	2002-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院饲料研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院饲料研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院饲料研究所		
[标]发明人	丁宏标		
发明人	丁宏标		
IPC分类号	C12Q1/00 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测醋酸甲羟孕酮含量的试剂盒及其检测方法，目的是提供一种结构简单，操作方便，价格便宜的醋酸甲羟孕酮酶免疫检测试剂盒。本发明的试剂盒，包括盒体；酶标板；装有标准醋酸甲羟孕酮试剂的试剂瓶A；装有醋酸甲羟孕酮抗体稀释液的试剂瓶B；装有酶标抗原试剂的试剂瓶C；装有酶标抗原稀释液的试剂瓶D；装有含吐温-20的磷酸盐固体的试剂瓶E；装有邻苯二胺的试剂瓶F；装有醋酸钠-柠檬酸缓冲液的试剂瓶G；装有H₂O₂溶液的试剂瓶H；装有硫酸溶液的试剂瓶I。本发明采用酶免疫吸附竞争法的原理检测样品中的醋酸甲羟孕酮，简便、快速、灵敏、准确、价格低廉，尤其适用于肉奶蛋制品的醋酸甲羟孕酮残留检测。

表1:

次序	加入量	孔号												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	25 μl	A	B	A	……稀释后样品液……									
2		摇均												
3	25 μl	C	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
4		摇均												