



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103713122 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201410001015. X

(22) 申请日 2014. 01. 02

(71) 申请人 中山市粤尔生物技术有限公司

地址 528400 广东省中山市火炬开发区创业大厦 222 号

(72) 发明人 唐俊 谭彩莲 覃波强

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种地塞米松快速检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种地塞米松快速检测试剂盒, 包含有:(1) 包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板;(2) 酶标记地塞米松特异性抗体或酶标记地塞米松抗原;(3) 地塞米松标准品溶液;(4) 底物显色液;(5) 终止液;(6) 浓缩洗涤液和(7) 浓缩复溶液。本发明样品前处理过程简单, 检测时间短、费用低廉, 灵敏度和检测限都大幅度提高且能同时检测大批样品, 本方法的检测线可以达到试剂盒灵敏度:0. 05ug/kg, 样本最低检测限组织 0. 05ug/kg, 回收率组织 85±10%, 试剂盒采用一步法, 检测的时间缩短为 45 分钟。

1. 一种地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含有:

(1) 包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板;(2) 酶标记地塞米松特异性抗体或酶标记地塞米松抗原;(3) 地塞米松标准品溶液;(4) 底物显色液;(5) 终止液;(6) 浓缩洗涤液和(7) 浓缩复溶液。

2. 如权利要求1所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于,所述包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板的制备步骤为:

(1) 用包被缓冲液将地塞米松半抗原与载体蛋白偶联物或抗体以 0.02-0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度稀释成抗原稀释液或抗体稀释液;

(2) 向酶联板的每孔中加入 100 μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗体稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h,倾去包被液,用洗涤液洗涤 4 次,每次 15-30s,拍干;

(3) 向酶联板的每孔中加入 150-200 μl 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1-2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

3. 如权利要求2所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于,所述的缓冲液为 pH 值 9.6、0.05mol/L、含有 0.5% 甲醇的碳酸盐缓冲液;所述的洗涤液为含有 8%-15% 吐温 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的去离子水或超纯水;所述的封闭液为含有 8%-15% 的脱脂奶和 1% 惰性蛋白的溶液;所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、人血纤维蛋白或血蓝蛋白。

4. 如权利要求1所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于,所述的酶标记地塞米松抗原为采用戊二醛法将标记酶与地塞米松半抗原进行偶联得到。

5. 如权利要求1所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于,所述的地塞米松特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

6. 如权利要求5所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于所述单克隆抗体制备的步骤为:

(1) 动物免疫程序:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,地塞米松半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物免疫剂量为 80-100 $\mu\text{g}/$ 只,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 2-3 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,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞;

(2) 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5-10 :1 比例与 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,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(3) 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 1-5 $\times 10^6$ 个 /ml 的细胞悬液,分装于冻存管,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;

(4) 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/ 只,7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5 $\times 10^5$ -10 6 个 / 只,7-10 天后采集腹水,用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化,小瓶分装,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

(5) 抗体冻干粉可将腹水在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下烘干,放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

(6) 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 0.02~0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度进行稀释。

7. 如权利要求5所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于所述多克隆抗体制备的

步骤为：

采用新西兰大白兔作为免疫动物,地塞米松半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物免疫剂量为 1mg/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 7-10 天后采血,测定血清抗体效价,心脏采血,经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

8. 如权利要求 1 所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于:当标记酶为过氧化物酶时所述的底物显色液为过氧化氢或过氧化脲与四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,所述的终止液为 0.1-0.5mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为半乳糖甘酶时,所述的底物显色液为 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液,所述的终止液为 2mol/L 的柠檬酸缓冲液。

9. 如权利要求 1 所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于:试剂盒中地塞米松标准品溶液为六个浓度梯度的地塞米松溶液,地塞米松稀释液为磷酸盐缓冲液,地塞米松标准溶液浓度为:0 μ g/L、0.05 μ g/L、0.15 μ g/L、0.45 μ g/L、1.35 μ g/L、4.05 μ g/L,1 \sim 3ml/瓶。

10. 如权利要求 1 所述的地塞米松快速检测试剂盒,其特征在于:所述的浓缩复溶液为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

一种地塞米松快速检测试剂盒

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及一种地塞米松快速检测试剂盒，为一种检测动物源性食品中地塞米松的酶联免疫试剂盒。

[0003]

背景技术

[0004] 地塞米松(Dexamethasone, DSMS)又名氟美松、氟甲强地松龙、德沙美松，是一种人工合成的肾上腺皮质激素。是糖皮质类激素类抗炎、抗过敏药物，其药理作用主要是抗炎、抗毒、抗过敏、抗风湿，临床使用较广泛。近年来，欧盟认为食用含有雌烯二醇、黄体酮、甲羟孕酮等激素的牛肉可扰乱人体内分泌、生长发育、免疫系统、生殖系统等方面的正常功能，还可能致癌、致畸，因而禁止这类激素在动物中的使用。此外，地塞米松还作为动物生长调节剂，促进动物蛋白质合成和代谢，增加产肉量，曾经被广泛应用作为家畜、家禽、使用。但通过长期的实验室研究发现，地塞米松可以使实验动物发生癌变和基因突变，地塞米松及其残留对人、畜均有明显的毒副作用，使用高剂量的地塞米松可导致肌肉萎缩、生长抑制等副作用。并由此推断，人类长期使用该类药物或长期食用添加该类促生长剂的家畜、家禽、同样也可发生癌变和基因突变。所以此类药物禁止在治疗和饲料中使用。

[0005] 我国于2002年在农业部发布的235号公告的《动物性食品中兽药最高残留限量》中，地塞米松在所有食品动物肌肉中不得超过0.75ug/kg 肝脏中不得超过2ug/kg 因此，为确保动物源性食品的安全和对外出口贸易的发展，建立准确可靠，灵敏度高的定性定量方法是十分必要的。

[0006] 国内外现已开发出检测地塞米松的酶联免疫试剂盒，但是现在国内生产的试剂盒在准确性、灵敏度、特异性等方面还不能完全达到检测的要求。本试剂盒的开发提高了检测的灵敏度和准确性，可进行大量样本的检测，缩短了时间为企业降低了成本。本发明由此产生。

[0007]

发明内容

[0008] 为解决现有技术的上述技术问题，本发明的目的是提供一种地塞米松快速检测试剂盒，样品前处理过程简单，检测时间短、费用低廉，灵敏度和检测限都大幅度提高且能同时检测大批样品。

[0009] 为达到上述目的，本发明是通过以下技术方案实现的：

一种地塞米松快速检测试剂盒，所述的试剂盒包含有：

(1) 包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板；(2) 酶标记地塞米松特异性抗体或酶标记地塞米松抗原；(3) 地塞米松标准品溶液；(4) 底物显色液；(5)

终止液；(6) 浓缩洗涤液和 (7) 浓缩复溶液。

[0010] 所述包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板的制备步骤为：

(1) 用包被缓冲液将地塞米松半抗原与载体蛋白偶联物或抗体以 0.02-0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度稀释成抗原稀释液或抗体稀释液；

(2) 向酶联板的每孔中加入 100 μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗体稀释液，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h，倾去包被液，用洗涤液洗涤 4 次，每次 15-30s，拍干；

(3) 向酶联板的每孔中加入 150-200 μl 封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0011] 所述的缓冲液为 pH 值 9.6、0.05mol/L、含有 0.5% 甲醇的碳酸盐缓冲液；所述的洗涤液为含有 8%-15% 吐温 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的去离子水或超纯水；所述的封闭液为含有 8%-15% 的脱脂奶和 1% 惰性蛋白的溶液；所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、人血纤维蛋白或血蓝蛋白。

[0012] 所述的酶标记抗原为采用戊二醛法将标记酶与地塞米松半抗原进行偶联得到。

[0013] 所述的地塞米松特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0014] 所述单克隆抗体制备的步骤为：

(1) 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，地塞米松半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物免疫剂量为 80-100 $\mu\text{g}/$ 只，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 2-3 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，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞；

(2) 细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5-10 : 1 比例与 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，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

(3) 细胞冻存和复苏：取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 1-5 $\times 10^6$ 个 /ml 的细胞悬液，分装于冻存管，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；

(4) 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml / 只，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5 $\times 10^5$ -10 6 个 / 只，7-10 天后采集腹水，用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存；

(5) 抗体冻干粉可将腹水在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下烘干，放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存；

(6) 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 0.02~0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度进行稀释。

[0015] 所述多克隆抗体制备的步骤为：

采用新西兰大白兔作为免疫动物，地塞米松半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物免疫剂量为 1mg/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 7-10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0016] 标记酶为过氧化物酶时所述的底物显色液为过氧化氢或过氧化脲与四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液，所述的终止液为 0.1-0.5mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为半乳

糖苷酶时,所述的底物显色液为 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液,所述的终止液为 2mol/L 的柠檬酸缓冲液。

[0017] 所述的浓缩洗涤液为去离子水或超纯水。

[0018] 所述的浓缩复溶液为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0019] 本发明的有益效果如下:

本发明提供的检测动物源性食品中地塞米松残留的酶联免疫试剂盒,样品前处理过程简单,检测时间短、费用低廉,灵敏度和检测限都大幅度提高且能同时检测大批样品。本试剂盒方法,灵敏度和检测限都有所提高,增强了检测的准确度,检测时间有所缩短,步骤更简便。农业部发布的 235 号公告的《动物性食品中兽药最高残留限量》中,地塞米松在所有食品动物肌肉中不得超过 0.75ug/kg, 本方法的检测线可以达到试剂盒灵敏度:0.05ug/kg, 样本最低检测限组织 0.05ug/kg, 回收率组织 85±10%, 试剂盒采用一步法,检测的时间缩短为 45 分钟。

[0020]

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明,但本发明的保护范围并不限于此。

[0022] 本发明的地塞米松快速检测试剂盒包含有:

(1) 包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板;(2) 酶标记地塞米松特异性抗体或酶标记地塞米松抗原;(3) 地塞米松标准品溶液;(4) 底物显色液;(5) 终止液;(6) 浓缩洗涤液和 (7) 浓缩复溶液。

[0023] 包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板的制备步骤为:

(1) 用包被缓冲液将地塞米松半抗原与载体蛋白偶联物或抗体以 0.02-0.08μg/ml 浓度稀释成抗原稀释液或抗体稀释液;

(2) 向酶联板的每孔中加入 100μl 已经稀释好的抗原稀释液或抗抗体稀释液,37℃温育 2h,倾去包被液,用洗涤液洗涤 4 次,每次 15-30s,拍干;

(3) 向酶联板的每孔中加入 150-200μl 封闭液,37℃温育 1-2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0024] 本发明中缓冲液为 pH 值 9.6、0.05mol/L、含有 0.5% 甲醇的碳酸盐缓冲液;洗涤液为含有 8%-15% 吐温 -20℃的去离子水或超纯水;封闭液为含有 8%-15% 的脱脂奶和 1% 惰性蛋白的溶液;本发明试剂盒中地塞米松包被抗原是采用活性酯法将地塞米松半抗原与载体蛋白进行偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、人血纤维蛋白或血蓝蛋白。

[0025] 标记酶为过氧化物酶时所述的底物显色液为过氧化氢或过氧化脲与四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液,所述的终止液为 0.1-0.5mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为半乳糖苷酶时,所述的底物显色液为 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液,所述的终止液为 2mol/L 的柠檬酸缓冲液。

[0026] 包被地塞米松抗原或抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙

烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等；载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等；浓缩洗涤液为去离子水或超纯水；浓缩复溶液为含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0027] 以上方法制备的酶联板具有很好的稳定性,经过冷热稳定性试验,酶联板的相关技术参数均在正常范围,且包被原有良好的特异性。

[0028] 本发明试剂盒中酶标记物为酶标记地塞米松特异性抗体或酶标记地塞米松抗原,所用酶可为过氧化物酶或半乳糖苷酶,本发明优选过氧化物酶;酶标记物形式可为冻干粉、浓缩液和工作液;酶标记物工作液所用的稀释液为含有 50% 甘油(可防止放入 -20°C 环境的酶标记物冻结,亦可长时间保持酶标记物的生物活性)、1% 的叠氮化钠防腐剂(便于保存)的溶液。

[0029] 本发明试剂盒中酶标记地塞米松特异性抗体的制备步骤为:

(1) 过氧化物酶标记地塞米松特异性抗体的制备:将抗体与过氧化物酶(HRP)进行偶联,采用的方法是戊二醛法,采用戊二醛法使得抗体与辣根过氧化物酶的结合率升高,传统 GA 一步法偶联反应不易控制,反应速度快的分子易发生自生聚合,且偶联效率不高。为了解决这些问题,我们将一步法进行了改进,克服了一步法的缺点。首先在被偶联的两种分子中,与偶联剂反应较弱的分子先用过量的偶连剂活化,然后去处多余的偶连剂;第二步将一端与某种分子连接的偶连剂,通过改变反应条件而与另一种分子连接起来。二步法虽然操作较繁,但偶连效率提高,而且形成的同分子聚合物减少。

[0030] 酶标记抗原为采用戊二醛法将标记酶与地塞米松半抗原进行偶联得到。

[0031] 本发明试剂盒中地塞米松特异性抗体为鼠源单克隆抗体或兔源多克隆抗体,免疫原是采用混合酸酐法将地塞米松半抗原与鸡卵清蛋白(OVA)行偶联得到的;抗体形式可为冻干粉、浓缩液、工作液;抗体稀释液为 pH 值 7.4、 0.08mol/L 、含有 0.3% 明胶、5% 吐温-80 和 5% 甲醇的磷酸盐缓冲液。

[0032] 地塞米松特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0033] 单克隆抗体制备的步骤为:

(1) 动物免疫程序:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,地塞米松半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物免疫剂量为 $80-100\mu\text{g/只}$,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳剂,颈背部皮下多点注射,间隔 2-3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳剂,加强免疫一次,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞;

(2) 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5-10:1 比例与 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,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(3) 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1-5 \times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存,复苏时取出冻存管,立即放入 37°C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

(4) 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 8 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只 ,7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5-10^6$ 个/只,7-10 天后采集腹水,用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,小瓶分装, -20°C 保存;

(5) 抗体冻干粉可将腹水在 37°C 环境下烘干,放入 -20°C 保存;

(6) 抗体工作液是用抗体稀释液将抗体以 $0.02 \sim 0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度进行稀释。

[0034] 多克隆抗体制备的步骤为：

采用新西兰大白兔作为免疫动物，地塞米松半抗原与钥孔械血蓝蛋白的偶联物免疫剂量为 $1\text{mg}/\text{kg}$ ，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 7-10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0035] 本发明试剂盒中地塞米松标准品溶液为六个浓度梯度的地塞米松溶液，地塞米松稀释液为 0.02M 的磷酸盐缓冲液。

[0036] 作为优选的，本发明试剂盒中试剂的配制具体为：

(1) 地塞米松标准溶液：地塞米松系列标准溶液 6 瓶，浓度为 $0\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $0.05\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $0.15\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $0.45\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $1.35\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $4.05\mu\text{g}/\text{L}$ ， $1-3\text{ml}/\text{瓶}$ ；

(2) 包被缓冲液：pH 值 9.6、 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 、含有 0.5% 甲醇的碳酸盐缓冲液；

(3) 封闭液：含有 8%-15% 的脱脂奶和 1% 惰性蛋白的溶液；

(4) 洗涤液：含有 8%-15% 吐温 -20°C 的去离子水或超纯水， $30-50\text{ml}/\text{瓶}$ ，1 瓶；

(5) 酶标记物：酶标记抗抗体工作液或酶标记地塞米松抗原工作液， $7-12\text{ml}/\text{瓶}$ ，1 瓶；

(6) 底物显色液过氧化氢或过氧化脲与四甲基联苯胺硫酸盐混合溶液， $10-15\text{ml}/\text{瓶}$ ，1 瓶；

(7) 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH8.1、含有 MgCl_2 0.01% 的 100mmol Tris-HCl ；

(8) 终止液： $1-2\text{mol}/\text{L}$ 硫酸、盐酸或 $2\text{mol}/\text{L}$ 氢氧化钠缓冲液， $5-8\text{ml}/\text{瓶}$ ，1 瓶。

[0037] (9) 抗体稀释液：pH 值 7.4、 $0.08\text{mol}/\text{L}$ 、含有 0.3% 明胶、5‰土温 -80 和 5‰甲醇的磷酸盐缓冲液。

[0038] (10) 浓缩复溶液：含有 5% 甲醇、1% 小牛血清 (BSA) 的磷酸盐缓冲液，为正常使用浓度的 5-10 倍， $30-50\text{ml}/\text{瓶}$ ，1 瓶。

[0039] 本发明检测动物源性食品中地塞米松的方法，包括了以下步骤：

(1) 样品前处理；样本前处理需配制：

用去离子水将 $2 \times$ 浓缩复溶液按 1:1 稀释，用于样本提取后的复溶。

[0040] 0.1M NaOH 称取 0.4g NaOH 加水定溶至 100ml 。

[0041] 畜禽类组织 (样本稀释倍数 2)

a、 $\pm 0.05\text{g}$ 均质过的组织样本于 50ml 离心管中；

b、入 $3\text{ml } 0.1\text{M}$ 氢氧化钠溶液，充分混匀 1 分钟；

c、 4ml 乙酸乙酯充分振荡 5 分钟，室温 $4000\text{r}/\text{min}$ ，离心 10 分钟；

d、 1ml 清澈上层有机相至干净玻璃试管中， 56°C 水浴氮气 / 空气吹干；

e、 1 正己烷振荡 30 秒，再加入 0.5ml 复溶工作液充分振荡混合 30 秒；室温 4000 转 / 分，离心 5 分钟；

f、除上层有机相，取下层 $50\mu\text{l}$ 液体用于分析。

[0042] (2) 用本发明所述的试剂盒进行检测：

a、所需试剂从冷藏环境中取出，在室温下平衡 30 分钟，每种液体使用前均须摇匀；注意标准液均需做 2 个平行试验；

b、和酶标浓缩液混合：将抗体工作液和酶标浓缩液按 10:1 体积比混合均匀(即 1000ml 抗体工作液 +100ml 酶标浓缩液,此混合液现配现用,不能保存)加 50ml 标准品或样品,于对应微孔中,再加 50 μ l 抗体工作液和酶标浓缩液混合液,用膜盖好,25℃ 下避光反应 30 分钟;

c、洗板：小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加洗涤液 250ml/孔,每次浸泡 15-30 秒,充分洗涤 4-5 次,用吸水纸拍干;

d、显色：每孔先各加入底物液 A 50 μ l,再各加入底物液 B 50 μ l,轻轻晃动混匀,并在 25℃ 下避光反应 15 分钟;

e、读数：每孔各加 50 μ l 终止液,在酶标仪于 450nm 处测定 OD 值(建议用 450/630nm 双波长检测,在 5 分钟内读完数据)。

[0043] (3) 分析检测结果。

[0044] 所获得的每个浓度标准溶液和样本吸光度值的平均值(B)除以第一个标准(0 标准)的吸光度值(B₀)再乘以 100%,即百分吸光度值。

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

[0045] B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B₀—0ng/ml 标准溶液的平均吸光度值

以标准品百分吸光率为纵坐标,以 DSMS 标准品浓度(ng/ml)的半对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中 DSMS 实际浓度。

[0046] 本发明提供的检测动物源性食品中地塞米松残留的酶联免疫试剂盒,样品前处理过程简单,检测时间短、费用低廉,灵敏度和检测限都大幅度提高且能同时检测大批样品。本试剂盒方法,灵敏度和检测限都有所提高,增强了检测的准确度,检测时间有所缩短,步骤更简便。农业部发布的 235 号公告的《动物性食品中兽药最高残留限量》中,地塞米松在所有食品动物肌肉中不得超过 0.75ug/kg,本方法的检测线可以达到试剂盒灵敏度:0.05ug/kg,样本最低检测限组织 0.05ug/kg,回收率组织 85±10%,试剂盒采用一步法,检测的时间缩短为 45 分钟。

[0047] 上述实施例仅用于解释说明本发明的发明构思,而非对本发明权利保护的限定,凡利用此构思对本发明进行非实质性的改动,均应落入本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种地塞米松快速检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103713122A	公开(公告)日	2014-04-09
申请号	CN201410001015.X	申请日	2014-01-02
[标]发明人	唐俊 谭彩莲 覃波强		
发明人	唐俊 谭彩莲 覃波强		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/74 C07K16/44 G01N33/543 G01N2333/695		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种地塞米松快速检测试剂盒，包含有：(1)包被地塞米松抗原的酶联板或包被地塞米松特异性抗体的酶联板；(2)酶标记地塞米松特异性抗体或酶标记地塞米松抗原；(3)地塞米松标准品溶液；(4)底物显色液；(5)终止液；(6)浓缩洗涤液和(7)浓缩复溶液。本发明样品前处理过程简单，检测时间短、费用低廉，灵敏度和检测限都大幅度提高且能同时检测大批样品，本方法的检测线可以达到试剂盒灵敏度：0.05ug/kg，样本最低检测限组织0.05ug/kg，回收率组织85±10%，试剂盒采用一步法，检测的时间缩短为45分钟。

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