



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102288761 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201110118658. 9

(22) 申请日 2011. 05. 09

(71) 申请人 广州万孚生物技术有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城荔  
枝山路 8 号

(72) 发明人 唐海波 王继华

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理  
有限公司 44224

代理人 万志香 曾旻辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

### (54) 发明名称

一种氯霉素检测试剂盒及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种氯霉素检测试剂盒及其制备方法, 试剂盒主要包括有包被有氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板、氯霉素单克隆抗体溶液、酶标记物溶液, 所述氯霉素单克隆抗体溶液与酶标记物溶液的用量比为 1 : 2。本试剂盒通过抗原抗体的特异性反应和酶对底物的高效催化作用实现对样本中残留的兽药氯霉素的快速定性、定量检测; 可检测的样本包括鱼肉和蜂蜜, 可满足食品生产企业从原料到成品的质控要求, 也可作为食品安全监督和检测机构的常规筛查手段, 还能用于动物和微生物实验中的药理与毒理学研究。

1. 一种氯霉素检测试剂盒,其特征在于,主要包括有:

(1) 包被有氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板,所述酶标板的每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $1 \sim 3 \mu\text{g/ml}$ ;

(2) 氯霉素单克隆抗体溶液,所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为  $0.02 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ ;

(3) 酶标记物溶液,所述酶标记物为辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG,所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ ;

所述氯霉素单克隆抗体溶液与酶标记物溶液的用量比为  $1 : 2$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的氯霉素检测试剂盒,其特征在于,所述酶标板的每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $2 \mu\text{g/ml}$ ;所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为  $0.05 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ ;所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5 \mu\text{g/ml} \sim 0.8 \mu\text{g/ml}$ 。

3. 一种权利要求 1 或 2 所述的氯霉素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备包被氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板

将氯霉素和卵清蛋白采用活化酯法进行偶联得到氯霉素-卵清蛋白偶联抗原,所述氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $6 \sim 8\text{mg/ml}$ ;用  $0.05\text{mol/L}$ 、 $\text{pH}9.6$  的碳酸盐缓冲液将所述氯霉素-卵清蛋白偶联抗原稀释后,每孔加入  $100 \mu\text{l}$  包被酶标板, $4^\circ\text{C}$  过夜,洗涤缓冲液洗板,每孔加  $200 \sim 300 \mu\text{l}$  封闭液于  $37^\circ\text{C}$  封闭,封闭 2h 后甩出封闭液,拍干;将已包被了 CAP-OVA 偶联抗原的酶标板晾干,即得,所述酶标板的每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $1 \sim 3 \mu\text{g/ml}$ ;

(2) 制备氯霉素单克隆抗体溶液

制备纯度在 90% 以上、浓度为  $10 \sim 20\text{mg/ml}$  的氯霉素单克隆抗体,用 0.2% BSA-PBST 将所述氯霉素单克隆抗体稀释;所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为  $0.02 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ ;

(3) 制备酶标记物溶液

制备辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG,用 1% 脱脂奶粉-PBST 将所述辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG 稀释,所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ 。

4. 根据权利要求 3 所述的氯霉素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述氯霉素单克隆抗体的制备方法为:取 8-10 周大小 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以氯霉素-牛血清白蛋白偶联物为免疫原,将氯霉素-牛血清白蛋白偶联物与等体积的弗氏完全佐剂乳化, $100 \mu\text{g/}$  只的剂量对小鼠皮下注射,以后每隔两周加强免疫一次,改用弗氏不完全佐剂,腹腔注射;融合前三天强化免疫一次,不用佐剂,但是剂量改为  $200 \mu\text{g/}$  只;细胞融合按照常规方法操作,当融合后的细胞生长到培养孔面积的四分之一时,取细胞培养上清间接 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选,选择阳性强,细胞生长旺盛的细胞,用有限稀释法进行克隆,然后扩大培养、冻存并进行鉴定;单克隆抗体的制备与纯化采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油  $0.5\text{ml/}$  只,7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞  $5-10^6$  个/只,7-10 天后采集腹水,经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,即得。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的氯霉素检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤 (1) 中

所述酶标板的每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $2\ \mu\text{g/ml}$  ;步骤(2)中所述氯霉素单克隆抗体工作浓度为  $0.05\sim 0.1\ \mu\text{g/ml}$  ;步骤(3)中所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5\ \mu\text{g/ml}\sim 0.8\ \mu\text{g/ml}$  。

## 一种氯霉素检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于兽药残留检测领域,具体地说,本发明涉及一种氯霉素检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 氯霉素 (CAP) 是一种广谱抗生素,因其售价低、效价高,曾经在我国畜牧业和水产养殖业中得到广泛应用,并成为畜禽及水产品疾病防治的重要药物。随着氯霉素的广泛应用和研究,人们发现其会引起毒副作用,尤其对人体造血系统的毒性极大。1950年发现其可造成严重致死性再生不良性贫血。2002年农业部发布第193号公告将氯霉素及其盐、酯列入食品动物禁用药名单,并且规定氯霉素作为出口肉制品的必检指标。

[0003] 目前检测氯霉素的方法主要有:

[0004] 微生物法:是氯霉素检测最常用的方法,该方法又可分为棉签法 (STOP)、杯碟法 (CPM)、纸片法、琼脂扩散法等。微生物法优点在于简单、快速,在大规模的定性筛选工作中具有一定的应用价值。但其也存在灵敏度低、易受干扰、易漏检、结果易出现假阳性、检出限较高等缺点。

[0005] 气相色谱法 (GC):可以对于分配系数相差很近的组分进行分离,从而分离出极为复杂的混合物。有许多高灵敏、通用性或专一性强的检测器供选用,如氢焰离子化检测器 (FID)、电子捕获检测器 (ECD)、氮磷检测器 (NPD) 等,检出限一般为 ppb 级。气相色谱法具有分离效能高、选择性强、灵敏度高、检出限低等优点,但是由于受到氯霉素挥发性和热稳定性的限制,样品前处理过程复杂、分析速度慢、仪器化程度高且价格昂贵,气相色谱法在基层推广使用还是比较困难的。

[0006] 氯霉素残留检测色谱-质谱联用技术主要为液质联用仪 (LC-MS) 和气质联用仪 (GC-MS)。LC-MS 现在已进入实用阶段,其灵敏度较荧光检测器高 1 个数量级,能方便地对 ng/kg 级的药物残留组分进行分析检测与结构确认,LC-MS 法目前也是美国 FDA 推荐使用的氯霉素确证方法。但是仪器分析方法因为需要贵重仪器,操作复杂,检测成本高的原因一般在科研和检测机构使用。

[0007] 酶联免疫吸附试验 (ELISA):氯霉素的 ELISA 法检测现已开发出商业试剂盒,但是目前大多数试剂盒检测过程需 2 ~ 3h。ELISA 法检测原理是将氯霉素标准品或样品、酶标物加入微孔,温浴时,游离的和酶标记的氯霉素竞争结合氯霉素抗体的结合位点。所有的未反应的酶标物,在清洗步骤中被清除,结合了的酶可以由显色剂显色出来 (酶可以使无色的显色剂转变为蓝色),反应终止液的加入可以使蓝色变成黄色。吸收值在 450nm 处进行测定。颜色变化的程度反映样品中氯霉素的含量。酶联免疫法的缺点在于影响因素较多,其中包被抗原 CAP-OVA、抗 CAP 单克隆抗体的选择和使用对产品质量影响重大,并且抗原抗体的配对使用极其重要,其制备和筛选与试剂盒性能密切相关,易出现假阳性结果,抗体批次不同,测定结果也会出现差异等,但该法作为一种快速筛选手段,在现场监控和大规模筛选检测中有广阔的应用前景。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服上述现有技术的缺陷,提供一种成本低廉、操作简便、灵敏性高的氯霉素检测试剂盒。

[0009] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0010] 一种氯霉素检测试剂盒,主要包括有:

[0011] (1) 包被有氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板,所述酶标板的每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $1\mu\text{g/ml} \sim 3\mu\text{g/ml}$ ;

[0012] (2) 氯霉素单克隆抗体溶液,所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为  $0.02\mu\text{g/ml} \sim 0.2\mu\text{g/ml}$ ;

[0013] (3) 酶标记物溶液,所述酶标记物为辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG,所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5\mu\text{g/ml} \sim 1\mu\text{g/ml}$ ;

[0014] 所述氯霉素单克隆抗体溶液与酶标记物溶液的用量比为 1 : 2。

[0015] 优选地,每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $2\mu\text{g/ml}$ ;所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为  $0.05\mu\text{g/ml} \sim 0.1\mu\text{g/ml}$ ;所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5\mu\text{g/ml} \sim 0.8\mu\text{g/ml}$ 。

[0016] 本发明的目的还在于提供上述氯霉素检测试剂盒的制备方法,采取了以下技术方案:

[0017] 一种氯霉素检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 制备包被氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板

[0019] 将氯霉素和卵清蛋白采用活化酯法进行偶联得到氯霉素-卵清蛋白偶联抗原,所述氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $6 \sim 8\text{mg/ml}$ ;用  $0.05\text{mol/L}$ 、 $\text{pH}9.6$  的碳酸盐缓冲液将所述氯霉素-卵清蛋白偶联抗原稀释后,每孔加入  $100\mu\text{l}$  包被酶标板, $4^\circ\text{C}$  过夜,洗涤缓冲液洗板,每孔加  $200 \sim 300\mu\text{l}$  封闭液于  $37^\circ\text{C}$  封闭,封闭 2h 后甩出封闭液,拍干;将已包被了 CAP-OVA 偶联抗原的酶标板晾干,即得,所述酶标板的每个微孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为  $1\mu\text{g/ml} \sim 3\mu\text{g/ml}$ ;

[0020] (2) 制备氯霉素单克隆抗体溶液

[0021] 制备纯度在 90% 以上、浓度为  $10\text{mg/ml} \sim 20\text{mg/ml}$  的氯霉素单克隆抗体,用 0.2% BSA-PBST 将所述氯霉素单克隆抗体稀释;所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为  $0.02\mu\text{g/ml} \sim 0.2\mu\text{g/ml}$ ;

[0022] (3) 制备酶标记物溶液

[0023] 制备辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG,用 1% 脱脂奶粉-PBST 将所述辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG 稀释,所述酶标记物溶液的工作浓度为  $0.5\mu\text{g/ml} \sim 1\mu\text{g/ml}$ 。

[0024] 所述氯霉素单克隆抗体的制备方法为:取 8-10 周大小 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以氯霉素-牛血清白蛋白偶联物为免疫原,将氯霉素-牛血清白蛋白偶联物与等体积的弗氏完全佐剂乳化, $100\mu\text{g/}$  只的剂量对小鼠皮下注射,以后每隔两周加强免疫一次,改用弗氏不完全佐剂,腹腔注射;融合前三天强化免疫一次,不用佐剂,但是剂量改为  $200\mu\text{g/}$  只;细胞融合按照常规方法操作,当融合后的细胞生长到培养孔面积的四分之一时,取细胞培

养上清间接 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选,选择阳性强,细胞生长旺盛的细胞,用有限稀释法进行克隆,然后扩大培养、冻存并进行鉴定;单克隆抗体的制备与纯化采用体内诱生法,将 Ba1b/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 5-106 个/只,7-10 天后采集腹水,经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,即得。

[0025] 缓冲液:PBS(0.1M pH7.6,0.15M NaCl);BSA 的浓度为 15mg/ml。

[0026] 所述辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG 的制备方法为:为常规方法制备,以小鼠 IgG 作为免疫原,制备羊抗血清,抗体经亲和层析方法进行纯化,去除羊抗血清中其他非特异蛋白,获得仅识别小鼠 IgG、IgM、IgA 的高亲合力抗体。羊抗鼠 IgG 采用常规方法进行辣根过氧化酶蛋白保护剂标记,为了减低与其他物种血清蛋白的交叉反应性,需进行进一步纯化。

[0027] 本试剂盒的原理是采用间接竞争 ELISA 法检测肉类(牛肉、猪肉、鸡肉)、水产(鱼肉、虾肉)、奶类(固态、液态)、蜂蜜、家禽蛋等样本中的氯霉素。试剂盒酶标板微孔内包被有氯霉素-卵清蛋白的偶联抗原,加入样本或标准液后,样本或标准液中的氯霉素和微孔内包被的偶联抗原竞争结合抗体溶液,加入酶标记物溶液后,用 TMB 底物显色,样本和标准液中的氯霉素含量与吸光度值呈反比,与标准曲线比较即可得出氯霉素含量。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0029] 本试剂盒通过抗原抗体的特异性反应和酶对底物的高效催化作用实现对样本中残留的兽药氯霉素(CAP)的快速定性、定量检测;可检测的样本包括鱼肉和蜂蜜,可满足食品生产企业从原料到成品的质控要求,也可作为食品安全监督和检测机构的常规筛查手段,还能用于动物和微生物实验中的药理与毒理学研究。

## 具体实施方式

[0030] 以下通过具体实施例来详细说明本发明。

[0031] 实施例 1 一种氯霉素检测试剂盒

[0032] 本实施例所述的氯霉素检测试剂盒的主要组成成分如下:

[0033] (1) 包被氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板 1 块

[0034] 配合不同的酶标仪选择,如:48 孔、96 孔(12 条微孔条×8 孔)等,每孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为 2 μg/ml

[0035] (2) 氯霉素单克隆抗体溶液 1 瓶:7ml/瓶,工作浓度为 0.1 μg/ml

[0036] (3) 酶标记物溶液 1 瓶:15ml/瓶

[0037] 辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG,工作浓度为 0.8 μg/ml

[0038] (4) 显色液 A 1 瓶:7ml/瓶

[0039] 用 0.1mol/L、pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液配制,显色液 A 含 0.045%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。磷酸盐-柠檬酸缓冲液的配制:称取柠檬酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)21.01g,用去离子水溶解,定容至 1000ml,量取 243ml 与 0.2mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液 257ml 混合。在 100ml、pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液中加入 45 μl 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,混匀,即得。

[0040] (5) 显色液 B 1 瓶:7ml/瓶

[0041] 显色液 B 含 0.04%的 TMB 含 0.04wt%的四甲基联苯胺(TMB)的 0.1mol/L、pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液;称取 40mg 的 TMB 溶于 100ml、pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液

中,即得。

[0042] (6) 终止液 1 瓶 :7ml/ 瓶

[0043] 为 2mol/L 的硫酸,量取浓硫酸 4ml 加入 32ml 去离子水中,混匀即得。

[0044] (7) 20× 洗涤缓冲液 1 瓶 :20ml/ 瓶,使用时稀释 20 倍

[0045] 为 0.05 %、pH7.4 的 PBST 缓冲液,在 1×PBS 中加入 0.05 % 的 Tween-20 得到 PBST 缓冲液。其中 10×PBS(磷酸盐缓冲液,0.01mol/L、pH7.4):称取 NaCl80g、KCl 2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>14.4g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2.4g 溶于 800ml 去离子水中,调节 pH 至 7.4 后,定容至 1L。使用时用去离子水稀释 10 倍即得 1×PBS。

[0046] (8) 标准液 6 瓶 :1ml/ 瓶

[0047] 氯霉素浓度分别为 0ng/ml、0.05ng/ml、0.15ng/ml、0.45ng/ml、1.35ng/ml、4.05ng/ml。

[0048] (9) 自封袋 :1 个

[0049] 本实施例所述的氯霉素检测试剂盒的制备方法如下:

[0050] (1) 制备包被氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板

[0051] 将氯霉素和卵清蛋白采用活化酯法进行偶联得到氯霉素-卵清蛋白偶联抗原,所述氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为 6~8mg/ml;用 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸盐缓冲液将所述氯霉素-卵清蛋白偶联抗原稀释;100 μ l/ 孔包被酶标板,包被过夜,包被温度为 4℃,1× 洗涤缓冲液洗板 5 次,加封闭液(在酶标板保护剂中加入 1% BSA 和 0.2% 明胶)于 37℃ 封闭,封闭液的量为 200~300 μ l/ 孔。封闭 2h 后甩出封闭液,在吸水纸上拍干。每孔内氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的浓度为 2 μ g/ml。将已包被了 CAP-OVA 偶联抗原的酶标板晾干,封袋保存于 4℃ 备用。

[0052] (2) 制备氯霉素单克隆抗体溶液

[0053] 取 8-10 周大小 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以氯霉素-牛血清白蛋白偶联物为免疫原,将氯霉素-牛血清白蛋白偶联物(将氯霉素和牛血清白蛋白(BSA)采用活化酯法进行偶联得到免疫原)与等体积的弗氏完全佐剂乳化,100 μ g/ 只的剂量对小鼠皮下注射,以后每隔两周加强免疫一次,改用弗氏不完全佐剂,腹腔注射;融合前三天强化免疫一次,不用佐剂,但是剂量改为 200 μ g/ 只;细胞融合按照常规方法操作,当融合后的细胞生长到培养孔面积的四分之一时,取细胞培养上清间接 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选,选择阳性强,细胞生长旺盛的细胞,用有限稀释法进行克隆,然后扩大培养、冻存并进行鉴定;单克隆抗体的制备与纯化采用体内诱生法,将 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 5-10<sup>6</sup> 个/ 只,7-10 天后采集腹水,经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃ 保存即得氯霉素单克隆抗体。

[0054] 在 1× 磷酸盐缓冲液中加入 0.05 % 的 Tween-20 得到 PBST 缓冲液,用 0.2 % BSA-PBST 将所述氯霉素单克隆抗体稀释即得工作浓度为 0.1 μ g/ml;

[0055] (3) 制备酶标记物溶液

[0056] 制备辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG,用 1% 脱脂奶粉-PBST 将所述辣根过氧化酶蛋白保护剂标记的羊抗鼠 IgG 稀释;得到工作浓度为 0.8 μ g/ml 的酶标记物溶液。

[0057] 实施例 1 的试剂盒的性能指标如下:

[0058] (1) 灵敏度 :0.1ppb

[0059] (2) 检测下限

[0060] 肉类 (牛肉、猪肉、鸡肉) :0.02ng/g ;水产 (鱼肉、虾肉) :0.025ng/g ;奶类 (固态、液态) :0.25ng/g ;蜂蜜 :0.05ng/g ;家禽蛋 :0.05ng/g ;

[0061] (3) 交叉反应率

[0062] 氯霉素 (Chloramphenicol) :100% ;氯霉素琥珀酸钠 (Chloramphenicol succinate sodium) :152.63 % ;氟苯尼考 (Florfenicol) : < 0.01 % ;四环素 (Tetracycline) : < 0.01% ;新霉素 (Neomycin) : < 0.01% ;金霉素 (Chlortetracycline) : < 0.01% ;磺胺二甲嘧啶 (Sulphadimidine) : < 0.01% ;诺氟沙星 (Norfloxacin) : < 0.01% ;盐酸克伦特罗 (Clenbuterol Hydrochloride) : < 0.01% ;潮霉素 B (Hygromycin B) : < 0.01% 。

[0063] (4) 回收率

[0064] 肉类 (牛肉、猪肉、鸡肉) :100% ±5% ;水产 (鱼肉、虾肉) :80% ;奶类 (固态、液态) :90% ±10% ;蜂蜜、家禽蛋 :80% ±5% 。

[0065] 实施例 2 一种氯霉素检测试剂盒

[0066] 本实施例所述的氯霉素检测试剂盒每个微孔内氯霉素 - 卵清蛋白偶联抗原的浓度为 1 μg/ml ;所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为 0.02 μg/ml ;所述酶标记物溶液的工作浓度为 0.5 μg/ml 。其他组分均与实施例 1 相同,制备方法也与实施例 1 相同。

[0067] 实施例 3 一种氯霉素检测试剂盒

[0068] 本实施例所述的氯霉素检测试剂盒每个微孔内氯霉素 - 卵清蛋白偶联抗原的浓度为 3 μg/ml ;所述氯霉素单克隆抗体的工作浓度为 0.18 μg/ml ;所述酶标记物溶液的工作浓度为 1 μg/ml 。其他组分均与实施例 1 相同,制备方法也与实施例 1 相同。

[0069] 实施例 4 采用实施例 1 的检测试剂盒检测鱼肉中的氯霉素含量

[0070] 使用前将试剂盒置于室温 (20 ~ 25℃ ) 平衡 30min 以上,每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的酶标板微孔条插入微孔架中,将样本和标准液对应微孔按序编号。标准液做两个平行实验,记录下标准液和样品的位置。将不用的微孔条放入铝箔袋密封,保存于 2 ~ 8℃ 。

[0071] (1) 样品液的制备

[0072] a 取 3g 绞碎的鱼肉组织样本,加入 6ml 乙酸乙酯,振荡 10min,3000g 离心 15min ;

[0073] b 取 4ml 上清液,加入 4ml 氯仿,再加 4ml 水,振荡 10min,3000g 离心 15min,吸取下层 4ml 用旋转蒸发仪或氮气吹干仪吹干 (50 度 ~ 60 度) ;

[0074] c 加入 0.5ml PBS 和 0.5ml 正己烷复溶,振荡 10min 后 3000g 离心 15min,去除上层正己烷,取下层 50ul 即可以用于分析,稀释倍数为 0.5 ;

[0075] (2) 加入 100 μl 标准液或处理好的样品液到各自的微孔中,每个孔加入样品液或标准液时注意更换移液器的吸头。

[0076] (3) 加入 50 μl 氯霉素单克隆抗体溶液到每一个微孔中,轻轻敲打酶标板以充分混合,注意不要颠出,于 37℃ 温育 40min 。

[0077] (4) 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。每孔中加入 170 μl 1× 洗涤缓冲液,再次倒掉微孔中液体,在吸水纸上拍干,重复上述操作 3 次。

[0078] (5) 加入 100  $\mu$ l 酶标记物溶液到每一个微孔,轻轻敲打酶标板以充分混合,注意不要颠出,于 37 $^{\circ}$ C 温育 40min。取出酶标板,洗涤 3 次。

[0079] (6) 每孔加入 50  $\mu$ l 显色液 A 和 50  $\mu$ l 显色液 B,充分混合并在 37 $^{\circ}$ C 暗处孵育 15 ~ 30min。亦可将显色液 A、B 等比例充分混合后,加入 100  $\mu$ l 至每孔,催化反应不得超过 30min。

[0080] (7) 每孔加入 50  $\mu$ l 终止液,轻轻振荡混匀,立刻于 450nm(建议用双波长 450/630nm 检测)处用酶标仪测量吸光度值(OD 值)。取 OD<sub>450</sub> 或 OD<sub>450</sub>-OD<sub>630</sub>(推荐)用于结果分析。

[0081] (8) 结果判定

[0082] 所获得的每个浓度标准液或样本吸光度值的平均值 B(双孔)除以第一个标准(0 标准)的吸光度值 B<sub>0</sub>再乘以 100%,即百分吸光度值。

[0083] 百分吸光度值(%) =  $B/B_0 \times 100\%$

[0084] B- 标准液或样本的平均吸光度值

[0085] B<sub>0</sub>-0ng/ml 标准液的平均吸光度值

[0086] 以标准液的百分吸光度值为纵坐标,标准液浓度(ng/ml)的半对数值为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光度值代入标准曲线中,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氯霉素的实际浓度。如果利用试剂盒专业分析软件进行计算,便于大量样品的准确、快速分析。

[0087] (9) 试验结果

[0088] 用实施例 1 的氯霉素酶联免疫检测试剂盒检测 32 份经 GC-MS 法确证为阴性的鱼肉,32 份样品的测定值均小于 0.1  $\mu$ g/kg,为阴性,与仪器法检测结果相符。用实施例 1 的氯霉素酶联免疫检测试剂盒检测 20 份经 GC-MS 法确证为阳性的鱼肉,20 份样品的测定值均大于 0.2  $\mu$ g/kg,为阳性,与仪器法检测结果相符。

[0089] 实施例 5 采用实施例 1 的检测试剂盒检测蜂蜜中的氯霉素含量

[0090] 使用前将试剂盒置于室温(20 ~ 25 $^{\circ}$ C)平衡 30min 以上,每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的酶标板微孔条插入微孔架中,将样本和标准液对应微孔按序编号。标准液做两个平行实验,记录下标准液和样品的位置。将不用的微孔条放入铝箔袋密封,保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C。

[0091] 样品液的制备方法为:

[0092] a 取 4g 蜂蜜,加入 4ml 水,4ml 乙酸乙酯,振荡 10min 后 3000g 离心 15min;

[0093] b 取上层乙酸乙酯 2ml,用旋转蒸发仪或氮气吹干仪吹干(50 度 ~ 60 度);

[0094] c 用 1mlPBS 复溶,吸取 50 $\mu$ l 用于分析。稀释倍数为 0.5。

[0095] 其他步骤均与实施例 4 步骤相同。试验结果如下:

[0096] 用实施例 1 的氯霉素酶联免疫检测试剂盒检测 40 份经 GC-MS 法确证为阴性的蜂蜜,40 份样品的测定值均小于 0.1  $\mu$ g/kg,为阴性,与仪器法检测结果相符。用实施例 1 的氯霉素酶联免疫检测试剂盒检测 22 份经 GC-MS 法确证为阳性的蜂蜜,22 份样品的测定值均大于 0.2  $\mu$ g/kg,为阳性,与仪器法检测结果相符。实施例 6 采用实施例 1 的检测试剂盒检测牛奶中的氯霉素含量

[0097] 使用前对试剂盒的处理同实施例 4 和 5。

[0098] 样品液的制备方法为：

[0099] a 取 4ml 液态奶（若为固态奶粉，则取 1g 奶粉加 6ml 水，混匀后取 1ml 用于处理），加入 5.5ml 乙腈，振荡混匀 5min；

[0100] b 4000g 离心 15min，弃除上层液，下层有机相转入旋转蒸发仪蒸干或氮气吹干仪吹干（50 ~ 60℃）；

[0101] c 用 4ml PBS 复溶，加 4ml 乙酸乙酯，振荡混匀 5min，离心后，转移上层有机层到旋转蒸发仪蒸干或氮气吹干仪吹干（50 ~ 60℃）；

[0102] d 用 1ml PBS 复溶，吸取 50ul 用于分析。如清亮无杂质，可进一步进行浓缩。样本稀释倍数为 0.5。

[0103] 其他步骤均与实施例 4 步骤相同。试验结果与仪器法检测结果相符。

[0104] 实施例 7 采用实施例 1 的检测试剂盒检测家禽蛋中的氯霉素含量

[0105] 使用前对试剂盒的处理同实施例 4 和 5。

[0106] 样品液的制备方法为：

[0107] a 将整个蛋样的蛋清和淡黄，混匀。取 4g 或 4ml 混合样，加入 8ml 乙腈，振荡混匀 5min；

[0108] b 4000g 离心 15min，吸取 4ml 上层液，转入旋转蒸发仪蒸干或氮气吹干仪吹干（50 ~ 60℃）；

[0109] c 用 4ml PBS 复溶，加入 4ml 乙酸乙酯，振荡混匀 5min，离心后，转移上层有机层到旋转蒸发仪蒸干或氮气吹干仪吹干（50 ~ 60℃）；

[0110] d 加入 1ml PBS 和 1ml 正己烷复溶，振荡 10min 后 3000g 离心 15min，去除上层正己烷。取下层 50ul 即可以用于分析。样本稀释倍数为 0.5。

[0111] 其他步骤均与实施例 4 步骤相同。试验结果与仪器法检测结果相符。

[0112] 以上是针对本发明的可行实施例的具体说明，但该实施例并非用以限制本发明的专利范围，凡未脱离本发明的等效实施或变更，均应包含于本发明的专利范围内。

专利名称(译)	一种氯霉素检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102288761A</a>	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201110118658.9	申请日	2011-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
[标]发明人	唐海波 王继华		
发明人	唐海波 王继华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种氯霉素检测试剂盒及其制备方法，试剂盒主要包括有包被有氯霉素-卵清蛋白偶联抗原的酶标板、氯霉素单克隆抗体溶液、酶标记物溶液，所述氯霉素单克隆抗体溶液与酶标记物溶液的用量比为1:2。本试剂盒通过抗原抗体的特异性反应和酶对底物的高效催化作用实现对样本中残留的兽药氯霉素的快速定性、定量检测；可检测的样本包括鱼肉和蜂蜜，可满足食品生产企业从原料到成品的质控要求，也可作为食品安全监督和检测机构的常规筛查手段，还能用于动物和微生物实验中的药理与毒理学研究。