



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109752368 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201711054365.2

(22)申请日 2017.11.01

(71)申请人 镇江华维检测技术有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十
五路99号11幢

(72)发明人 洪霞 杜霞 丁炎

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有芬普尼-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、芬普尼标准品、芬普尼-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩样品稀释液、浓缩洗涤液组成。所述芬普尼-载体蛋白偶联物是将芬普尼与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,浓缩洗涤液含有0.05%吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较,本发明的试剂盒具有更高的灵敏度,且检测时间短、费用低,可用于鸡蛋样品中芬普尼的残留量检测。

1. 一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于试剂盒中的以下成份:

(1) 包被有芬普尼-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板;所述芬普尼-载体蛋白偶联物是将芬普尼与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白;

(2) 芬普尼标准品;

(3) 芬普尼-过氧化物酶标记抗体:该成分为用过氧化物酶标记的芬普尼抗体,所述芬普尼抗体为单克隆抗体;

(4) 发光底物液:该发光底物液是以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液,分为A液和B液保存,在使用前按1:1混合使用;其中A液为发光增强剂加鲁米诺货发光增强剂加异鲁米诺,B液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液;

(5) 2倍浓缩稀释液;

(6) 20倍浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述不透明白色酶标板为96孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

3. 根据权利要求1的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述芬普尼标准品的浓度为0.02~5.12 ng/mL的浓度区间。

4. 根据权利要求1的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述芬普尼-过氧化物酶标记抗体工作液是用抗体稀释液稀释成1:20000比例。

5. 根据权利要求1的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

6. 根据权利要求1的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述2倍浓缩稀释液,其成分为0.01mol/L, pH7.4的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl缓冲液或Tris-HCl缓冲液,使用前请按1:1稀释(1份浓缩样品稀释液+1份去离子水)。

7. 根据权利要求1的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述20倍浓缩洗涤液,其包含0.05%吐温-20, 0.01mol/L的PBST, pH值范围7.0-7.5之间,使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)。

一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,用于检测动物源性食品中如鸡蛋中的芬普尼含量或残留量。属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 芬普尼(Fipronil),分子式为 $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$,是一种农药、杀虫剂,广泛被用于除去跳蚤、头虱类害虫,被世界卫生组织列为中等毒性,杀虫作用主要是神经毒使其死亡。摄入大量的芬普尼对人体可能产生负面影响,除了伤害肝、肾、甲状腺外,还可能出现恶心、呕吐、癫痫等症状。美国环保署也把芬普尼列为C级致癌物,在动物实验中会增加癌症风险,例如甲状腺肿瘤。

[0003] 一些研究实验证实芬普尼会使动物、环境生态带来危害,也是一种致癌物质,因此目前芬普尼已被许多国禁用,包含意大利、法国、中国大陆,且目前英国、澳洲也考虑禁止使用这种特殊农药。

[0004] 芬普尼为GABA-氯离子通道抑制剂,与现有杀虫剂无交互抗性,对有机磷、有机氯、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯等类杀虫剂已经产生抗性的或敏感害虫均有较好的防治效果。适宜的作物有水稻、玉米、棉花、香蕉、甜菜、马铃薯、花生等,推荐剂量下对作物无药害。

[0005] 今年,继欧洲等地出现芬普尼鸡蛋后,中国台湾农业防检主管部门也确认中国台湾地区鸡蛋验出数据偏高的芬普尼。世界卫生组织(WHO)指,大量进食高浓度芬普尼一段时间,会损害肝脏、甲状腺和肾脏。

[0006] 化学发光免疫检测技术是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光检测技术的高灵敏性和免疫分析技术的高特异性。本发明通过特有的免疫动物制备具有高亲和力、高特异性的芬普尼抗体,并采用酶标记抗体,建立一种可以检测芬普尼的化学发光免疫试剂盒,将为鸡蛋产品中芬普尼药物留检测提供新方法,对保证畜产品安全提供重要的理论和实践依据,维护畜牧业健康发展具有重要意义。

发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的问题,本发明主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来实现的。化学发光免疫分析是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中芬普尼含量越高,反应体系中发光强度越弱;反之,样品中芬普尼含量越少,发光强度越高。

[0008] 本发明是一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于含有以下成份:

1、包被有芬普尼-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板;所述芬普尼-载体蛋白偶联物是将芬普尼与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白;

2、芬普尼标准品;

3、芬普尼-过氧化物酶标记抗体：该成分为用过氧化物酶标记的芬普尼抗体，所述芬普尼抗体为单克隆抗体或多克隆抗体；

4、发光底物液：该发光底物液是以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液，分为A液和B液保存，在使用前按1:1混合使用；其中A液位发光增强剂加鲁米诺货发光增强剂加异鲁米诺，B液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液；

5、2倍浓缩稀释液；

6、20倍浓缩洗涤液；

本发明中，所述的不透明白色酶标板为96孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

[0009] 本发明中，所述的芬普尼标准品，由一系列不同浓度的芬普尼标准品组成，浓度为0.02~5.12 ng/mL的浓度区间。

[0010] 本发明中，所述的芬普尼-过氧化物酶标记抗体为用过氧化物酶标记的芬普尼抗体，如辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的芬普尼抗体。

[0011] 本发明中，所述的发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

[0012] 本发明中，所述所述2倍浓缩稀释液，其成分为0.01mol/L, pH7.4的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl缓冲液或Tris-HCl缓冲液，使用前请按1:1稀释 (1份浓缩样品稀释液+1份去离子水)。

[0013] 本发明中，所述20倍浓缩洗涤液，其包含0.05%吐温-20, 0.01mol/L的PBST, pH值范围7.0~7.5之间，使用前请按1:19稀释 (1份浓缩稀释液+19份去离子水)。

[0014] 本发明的芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒应用于芬普尼的检测时，检测步骤为：

(1) 预处理待测样品，即将待测试的样品处理为液体样品，或者用有机溶剂提取待测样品，氮气吹干并将其复溶于样品稀释液工作液中；

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温 (20~25℃) 平衡30 min以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀；

(3) 取包被芬普尼抗原的酶标板，加标准品/待测样品50μL /孔到对应的微孔中，标准品和样品每个浓度做两个平行实验；

(4) 加入芬普尼抗体工作液，50 μL/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应45 min；

(5) 小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液250μL /孔，充分洗涤4~5次，每次间隔10 s，用吸水纸拍干 (拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)；

(6) 加入发光底物液混合液 (A液与B液在使用前按1:1混合) 100μL /孔，轻轻振荡混匀，混合好后在化学发光检测仪内检测发光强度 (RLU)；

(7) 检测结果的计算：用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式：

$$\text{相对发光强度} = \text{RLU} / \text{RUL}_{\max}$$

式中：

RLU=标准 (或样品) 溶液的发光强度值；

RLU_{max}=空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0015] 将计算的相对发光强度值对应芬普尼($\mu\text{g/L}$)的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的芬普尼浓度根据其RLU值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品处理中有稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。即为样本中芬普尼的实际浓度。

[0016] 本发明的试剂盒可用于鸡蛋样品中芬普尼的残留量检测。与现有的其它检测芬普尼残留量的实验方法比较,本发明的试剂盒有以下优点:

(1) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比色谱方法(高效液相、液质联用、气质联用)、毛细管电泳方法更为快速简便,所需仪器更为简单,检测成本更为低廉,同时具有高通量的特点。

[0017] (2) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比ELISA方法更为灵敏,可以检测出更低浓度和含量的芬普尼残留,同时线性范围更宽。

[0018] (3) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,减少了二抗的使用环节,从而缩短了检测时间;不透明白色酶标板增加了化学发光检测仪灵敏度。另外,用芬普尼-载体蛋白偶联物而非芬普尼抗体来包被不透明白色酶标板,减少了芬普尼抗体的不稳定性,保证了试剂盒的长期有效性。

具体实施方式

[0019] 以下通过具体的实施例对本发明作进一步描述。这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0020] 实施例1

1、试剂盒各组分的制备

(1) 芬普尼半抗原的制备:将芬普尼酸化,在4℃无光低温环境中与亚硝酸钠作用,生成含重氮基正离子的中间体。重氮化的芬普尼作为半抗原,用于后面合成免疫抗原与包被抗原。

[0021] (2) 芬普尼-牛血清白蛋白(BSA)免疫原的制备:将芬普尼与牛血清白蛋白(BSA)采用重氮化法进行偶联得到免疫抗原。

[0022] (3) 芬普尼-卵血清白蛋白(OVA)包被抗原的制备:将芬普尼与卵血清白蛋白(OVA)采用重氮化法进行偶联得到包被抗原。

[0023] (4) 芬普尼-过氧化物酶标记抗体的制备:对6~8周龄的雌性BALB/c小鼠(体重18~20 g),大剂量免疫方案为,首次免疫用160 μg 芬普尼-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。3周后,再用80 μg 芬普尼-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。此后每隔3周用80 μg 芬普尼-BSA与等量弗氏完全佐剂混匀,腹腔注射。最后一次脾内免疫80 μg 芬普尼-BSA作为加强免疫。三天后处死小鼠,取其脾脏,与骨髓瘤细胞融合。用间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞。通过小鼠腹腔注射杂交瘤细胞来大量制备小鼠腹水,腹水经过过滤、离心初步纯化后,采用辛酸法和亲和层析法纯化腹水,再经透析得到纯化的芬普尼单克隆抗体。芬普尼单克隆抗体与辣根过氧化物酶偶联,从而得到芬普尼-过氧化物酶标记抗体。

[0024] (5) 包被有芬普尼-OVA偶联物的不透明白色酶标板制备:用缓冲液将芬普尼-OVA偶联物稀释后用于包被不透明白色酶标板的检测孔,4℃过夜后用PBST缓冲液洗涤,然后加

入180 μ L封闭液(5%脱脂奶粉溶液),37℃温育1.5 h,倾去孔内液体,吸水纸拍干后密封保存。

[0025] 2、检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒的组建

组建的检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96孔不透明白色酶标板(8孔 \times 12条)包被有芬普尼-OVA偶联物,用铝箔袋真空密封包装。

[0026] (2) 芬普尼标准溶液6瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.02 ng/mL、0.08ng/mL、0.32ng/mL、1.28 ng/mL、5.12 ng/mL。

[0027] (3) 芬普尼-辣根过氧化物酶标记抗体溶液。

[0028] (4) 发光底物A液(鲁米诺及增强剂),发光底物B液(尿素过氧化氢)。

[0029] (5) 2倍浓缩样品稀释液。使用前请按1:1稀释(1份浓缩稀释液+1份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为0.05 mol/L,pH 7.4的PBST缓冲液。

[0030] (6) 20倍浓缩洗涤液。使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为pH值范围7.0-7.5之间,含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST缓冲液。

[0031] 3、芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒的试用

1) 样品的前处理:鸡蛋

a. 取1g均质样本于50 mL离心管中,加入5 mL水,剧烈振荡1 min;

b. 加入5 mL乙腈,剧烈振荡3 min,4000g以上离心5 min;

c. 取1ml上清液于10ml玻璃试管中,50~60℃水浴氮气流下吹干;

d. 加入1ml正己烷用涡旋仪涡动30s,再加入1ml样品稀释液,涡动30s,4000 r/min离心5 min;

e. 除去上层有机相,将下层液体转移到另一洁净离心管中,用于检测。

[0032] 2) 化学发光免疫检测试剂盒

将标准和试样所需数量的孔条插入微孔板框架中,记录标准和样品的位置。于适当微孔中分别加入50 μ L /孔芬普尼标准溶液和待测样品。加入50 μ L /孔芬普尼-辣根过氧化物酶标记抗体到每一个微孔中,充分混合后于室温下避光静置温育45 min。将孔内液体甩干,用洗涤工作液充分洗涤4~5次。完全除去孔中的液体,用吸水纸拍干,加入发光底物液混合液(A液与B液在使用前按1:1混合) 100 μ L /孔。混合好后立即在化学发光检测仪内检测发光强度(RLU)。

[0033] 3) 检测结果的计算分析

用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式:

相对发光强度=RLU/RULmax

式中:

RLU=标准(或样品)溶液的发光强度值;

RLUmax=空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0034] 将计算的相对发光强度值对应芬普尼(μ g/L)的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的芬普尼浓度根据其RLU值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品经过了预先稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍

数。

[0035] 实施例2

检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96孔不透明白色酶标板(8孔 \times 12条)包被有芬普尼-鼠血清白蛋白偶联物,用铝箔袋真空密封包装。

[0036] (2) 芬普尼标准溶液6瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.02 ng/mL、0.08ng/mL、0.32ng/mL、1.28 ng/mL、5.12 ng/mL。

[0037] (3) 芬普尼-辣根过氧化物酶标记抗体溶液。

[0038] (4) 发光底物A液(鲁米诺及增强剂),发光底物B液(尿素过氧化氢)。

[0039] (5) 2倍浓缩样品稀释液。使用前请按1:1稀释(1份浓缩稀释液+1份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为0.05 mol/L,pH 7.4的Tris-HCl缓冲液。

[0040] (6) 20倍浓缩洗涤液。使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为pH值范围7.0-7.5之间,含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST缓冲液。

实施例3

检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96孔不透明白色酶标板(8孔 \times 12条)包被有芬普尼-鸡蛋白蛋白偶联物,用铝箔袋真空密封包装。

[0041] (2) 芬普尼标准溶液6瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.02 ng/mL、0.08ng/mL、0.32ng/mL、1.28 ng/mL、5.12 ng/mL。

[0042] (3) 芬普尼-辣根过氧化物酶标记抗体溶液。

[0043] (4) 发光底物A液(鲁米诺及增强剂),发光底物B液(尿素过氧化氢)。

[0044] (5) 2倍浓缩样品稀释液。使用前请按1:1稀释(1份浓缩稀释液+1份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为0.05 mol/L,pH 7.4的甘氨酸-HCl缓冲液。

[0045] (6) 20倍浓缩洗涤液。使用前请按1:19稀释(1份浓缩稀释液+19份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为pH值范围7.0-7.5之间,含0.05%吐温-20,0.01mol/L的PBST缓冲液。

专利名称(译)	一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109752368A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN2017111054365.2	申请日	2017-11-01
[标]发明人	洪霞 杜霞 丁炎		
发明人	洪霞 杜霞 丁炎		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测芬普尼的化学发光免疫检测试剂盒，属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有芬普尼-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、芬普尼标准品、芬普尼-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩样品稀释液、浓缩洗涤液组成。所述芬普尼-载体蛋白偶联物是将芬普尼与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到，浓缩洗涤液含有0.05%吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较，本发明的试剂盒具有更高的灵敏度，且检测时间短、费用低，可用于鸡蛋样品中芬普尼的残留量检测。