



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111077319 A

(43)申请公布日 2020.04.28

(21)申请号 201911310232.6

(22)申请日 2019.12.18

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 杨金易 吴颖 曾道平 苏晓娜
沈玉栋 王弘 陈丽 韦田

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 孙凤侠

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

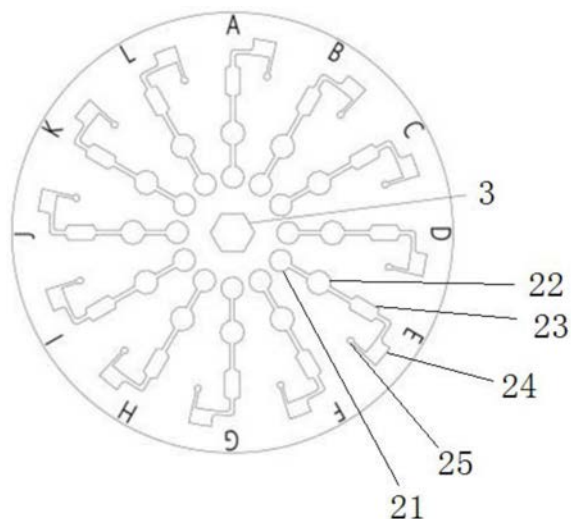
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种微流控芯片免疫检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种微流控芯片免疫检测试剂盒及其检测方法。所述试剂盒含有微流控芯片,包括通过上下键合而成的圆片盖板和圆片底板;所述圆片底板内设有一条或多条检测单元,所述检测单元包括依次连接的储液池、混合反应池、检测池、废液池和第一通气孔;其中所述混合反应池固定有检测药物相应荧光探针;所述检测池内固定有羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原。本发明利用所述试剂盒的检测方法,具有高通量、样品消耗少、检测速度快、操作简便等特点,不需要使用电极、电压或外加磁场,不需借助电渗驱动、热气泵驱动或光学捕获微泵等驱动,可同时检测多种基质中的多种类兽药残留,适用于现场快速筛选分析,能极大缓解相关检测人员的检测压力。



1. 一种微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有微流控芯片, 包括圆片盖板(1)和圆片底板(2); 所述圆片底板(2)内设有一条或多条检测单元, 所述检测单元设置在圆片底板(2)的半径轴上, 以圆片底板(2)的圆心点发散排列; 所述检测单元自圆点向边缘依次排列有储液池(21)、混合反应池(22)、检测池(23)、废液池(24)和第一通气孔(25), 其依次通过微通道进行连接; 其中所述混合反应池(22)固定有检测药物相应荧光探针; 所述检测池(23)内固定有羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原;

所述圆片盖板(1)上还设有进样孔(11)和第二通气孔(12); 所述进样孔(11)的位置与圆片底板(2)上储液池(21)的位置相对应; 所述第一通气孔(25)和第二通气孔(12)位置相对应;

所述圆片盖板(1)和圆片底板(2)通过上下键合而成。

2. 根据权利要求1所述微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述圆片盖板(1)和圆片底板(2)的圆点出均设有固定孔(3)。

3. 根据权利要求1所述微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述圆片底板(2)为聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰胺、聚苯乙烯、聚碳酸酯、环氧树脂和/或聚氨酯材料制备。

4. 根据权利要求1所述微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述微通道的宽度为5~50 μm , 深度为5~150 μm 。

5. 根据权利要求1所述微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述储液池(21)、混合反应池(22)、检测池(23)和废液池(24)的容积各自为10~40 μL 。

6. 根据权利要求1所述微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述微流控芯片仅有进样孔(11)和第二通气孔(12)与外界相通。

7. 根据权利要求1所述微流控芯片免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述药物相应荧光探针通过点样涂抹在混合反应池(22)中, 并于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定0.5h; 所述羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原通过点样在检测池(23), 并于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定1h。

8. 权利要求1至7所述微流控芯片免疫检测试剂盒在可食性动物组织、动物尿液和/或动物血清中药物残留检测中的应用。

9. 根据权利要求8所述应用, 其特征在于, 所述药物为 β -受体激动剂、氯霉素、氟苯尼考、孔雀石绿、金刚烷胺、喹乙醇、大环内酯类、呋喃类、磺胺类、氟喹诺酮类、四环素类、氨基糖苷类和/或青霉素类药物或其代谢物。

10. 权利要求1至7所述微流控芯片免疫检测试剂盒的检测方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

S1. 根据待检测药物的种类, 制备具有相应的荧光探针和药物抗原的微流控芯片;

S2. 将制备好的微流控芯片通过固定孔固定在离心机中; 然后将待检测样品通过进样孔(11)加入到微流控芯片的储液池(21); 然后进行离心, 驱动储液池(21)中的液体进入混合反应池(22)中, 并与其固定的荧光探针混合反应3min; 二次离心驱动混合液进入检测池(23), 与其中羊抗鼠免疫球蛋白G及药物抗原反应5min; 再次离心驱动, 使得多余的液体进入废液池(24)中;

S3. 然后进行检测, 检测(23)中的荧光强度, 并将检测信号值进行换算, 即可得到待测物的检测浓度。

一种微流控芯片免疫检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全快速检测技术领域,更具体地,涉及一种微流控芯片免疫检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 兽药残留是指给动物服用药物后蓄积或贮存在动物细胞、组织或器官内的药物原形、代谢产物和药物杂质。兽药在防治动物疾病、提高生产效率、改善畜产品质量等方面起着十分重要的作用,但由于养殖人员对科学用药知识的缺乏或受经济利益的驱使,在养殖过程使用违禁药物、不合药理用药和使用假劣药物,致使兽药残留问题十分严重。动物源食品中有害物质的残留不仅对人类生命健康造成直接危害,同时也极大危害着畜牧业的发展和生态环境。

[0003] 兽药残留主要包括促生长类、抗生素类和抗菌类兽药残留,如莱克多巴胺、盐酸克伦特罗等促生长类兽药残留,氯霉素、氟苯尼考、四环素类、庆大霉素等抗生素类药物残留;呋喃类、磺胺类和喹诺酮类等抗菌类药物残留等。

[0004] 目前,我国针对上述多种兽药残留的检测主要采用仪器分析方法或以ELISA、胶体金法为主的免疫快速检测法。传统的仪器分析方法及ELISA法需要专业人员操作,过程繁琐、检测耗时较长,且需要配合大型仪器或分析软件进行检测;胶体金免疫层析快速检测法需要多层材料衔接、流动速度控制不定,检测重复性较差。这些方法均存在着无法同时检测多项指标的缺点,均无法实现兽药多残留的现场简便快速检测,给企业、检测机构、政府部门等相关的检测人员带来巨大的检测压力。

[0005] 微流控芯片技术具有将化学和生物实验室的基本功能微缩到一个几平方厘米大小芯片上的能力,可以实现从样品处理到检测的微型化、自动化、集成化及便携化,已在多个领域得到应用,具有强大的发展活力。虽然微流控芯片制造技术蓬勃发展,但是目前多数实验室芯片需要借助电渗驱动、热气泵驱动或光学捕获微泵等驱动,造价成本较高。另外,芯片本身材质、构造等多种因素给免疫分析方法的建立等带来一定难度,如免疫试剂在芯片上的固定、释放与流动等,目前尚未有较成熟的将微流控芯片应用于兽药多残留免疫快速检测的方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种微流控芯片免疫检测试剂盒。本发明所述微流控芯片免疫检测试剂盒在进行检测过程中,具有高通量、样品消耗少、检测速度快、操作简便等特点,不需要使用电极、电压或外加磁场,不需借助电渗驱动、热气泵驱动或光学捕获微泵等驱动,可同时检测多种基质中的多种类兽药残留,适用于现场快速筛选分析,能极大缓解相关检测部门、检测人员的检测压力。

[0007] 本发明的另一目的在于提供所述微流控芯片免疫检测试剂盒在可食性动物组织、动物尿液和/或动物血清中药物残留检测中的应用。

[0008] 本发明的再一目的在于提供所述微流控芯片免疫检测试剂盒的检测方法。

[0009] 本发明的上述目的是通过以下方案予以实现的：

[0010] 一种微流控芯片免疫检测试剂盒，所述试剂盒含有微流控芯片，包括圆片盖板和圆片底板；所述圆片底板内设有一条或多条检测单元，所述检测单元设置在圆片底板的半径轴上，以圆片底板的圆心点发散排列；所述检测单元自圆点向边缘依次排列有储液池、混合反应池、检测池、废液池和第一通气孔，其依次通过微通道进行连接；其中所述混合反应池固定有检测药物相应荧光探针；所述检测池内固定有羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原；

[0011] 所述圆片盖板上还设有进样孔和第二通气孔；所述进样孔的位置与圆片底板上储液池的位置相对应；所述第一通气孔和第二通气孔位置相对应；

[0012] 所述圆片盖板和圆片底板通过上下键合而成。

[0013] 优选地，所述键合包含超声键合、热压键合和/或激光键合。

[0014] 优选地，所述圆片盖板和圆片底板的圆点出均设有固定孔。

[0015] 优选地，所述圆片底板为聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰胺、聚苯乙烯、聚碳酸酯、环氧树脂和/或聚氨酯材料制备；更优选地，所述圆片底板为聚二甲基硅氧烷材料制备。

[0016] 所述圆片底板采用聚二甲基硅氧烷制备时，进行表面局部改性，具体的改性过程为：使用甲苯清洗检测池后，用5%3-氨丙基三乙氧硅烷(APTES)的乙醇溶液处理检测池表面2h；依次用乙醇溶液、纯水清洗检测池并烘干，加入2%戊二醛的PBS溶液处理反应池1h；使用纯水清洗3次、烘干，即完成芯片表面改性，提高蛋白质固定效率。

[0017] 优选地，所述微通道的宽度为5~50 μ m，深度为5~150 μ m。

[0018] 优选地，所述储液池、混合反应池、检测池和废液池的容积各自为10~40 μ L。

[0019] 优选地，所述微流控芯片仅有进样孔和第二通气孔与外界相通。

[0020] 优选地，所述荧光探针为聚苯乙烯荧光探针抗体复合物；更优选地，所述聚苯乙烯荧光探针抗体复合物的制备方法为：将荧光探针经洗涤、超声，复溶于MES(吗啉乙磺酸)缓冲液中；依次加入EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化30min；活化后经洗涤、超声，复溶于BB(硼酸)缓冲液中，然后加入相应抗体与荧光探针室温偶联1~2h，洗涤后加入BSA(牛血清蛋白)缓冲液，室温对荧光探针封闭30min；洗涤后用复溶液复溶，即得聚苯乙烯荧光探针抗体复合物。

[0021] 优选地，所述荧光探针与抗体的标记量比例为1:6~40。

[0022] 优选地，以质量百分比计，所述复溶液的配方为：2.5%的海藻糖、2.5%蔗糖、0.5%蛋白牛血清蛋白(BSA)、0.5%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、0.5%Tween-20、0.03%ProClin-300，余量为磷酸缓冲液(PB, 0.02M, pH 7.4)。其中海藻糖和蔗糖属小分子，BSA为惰性蛋白，对保护目的蛋白活性、维持稳定有重要作用；PVP属大分子，对促进荧光探针抗体的释放有重要作用；Tween-20为表面活性剂，对促进荧光探针抗体的分散、维持其稳定等有重要作用；Procline-300为防腐剂。

[0023] 复溶液的组分对荧光探针抗体在溶液中的均匀分散性、稳定性及在反应中的释放有重要影响，本发明所述复溶液可保证聚苯乙烯荧光探针抗体复合物在复溶液中均匀且稳定的分散。

[0024] 所述聚苯乙烯荧光探针抗体复合物在混合反应池上固定的方法为：使用微流移液器吸取聚苯乙烯荧光探针抗体复合物，点样涂抹在混合反应池，于4℃固定0.5h。

[0025] 所述羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原在检测池上固定方法为：使用微流移液器吸取羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原点样于检测池，于4℃固定1h。

[0026] 本发明同时还保护所述微流控芯片免疫检测试剂盒在可食性动物组织、动物尿液和/或动物血清中药物残留检测中的应用。

[0027] 优选地，所述药物为 β -受体激动剂、氯霉素、氟苯尼考、孔雀石绿、金刚烷胺、喹乙醇、大环内酯类、呋喃类、磺胺类、氟喹诺酮类、四环素类、氨基糖苷类和/或青霉素类药物或其代谢物。

[0028] 优选地，所述 β -受体激动剂包括莱克多巴胺、盐酸克伦特罗、沙丁胺醇等。

[0029] 优选地，所述大环内酯类包括替米考星、泰乐菌素等。

[0030] 优选地，所述呋喃类包括呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃西林、呋喃它酮等。

[0031] 优选地，所述磺胺类包括磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑等。

[0032] 优选地，所述氟喹诺酮类包括诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星等。

[0033] 优选地，所述四环素类包括金霉素、土霉素等。

[0034] 优选地，所述氨基糖苷类包括庆大霉素、新霉素、卡那霉素、链霉素等。

[0035] 优选地，所述青霉素类包括羟氨苄青霉素、氨苄青霉素等。

[0036] 所述微流控芯片免疫检测试剂盒的检测方法也在本发明的保护范围之内，包括如下步骤：

[0037] S1. 根据待检测药物的种类，制备具有相应的荧光探针和药物抗原的微流控芯片；

[0038] S2. 将制备好的微流控芯片通过固定孔固定在离心机中；然后将待检测样品通过进样孔加入到微流控芯片的储液池；然后进行离心，驱动储液池中的液体进入混合反应池中，并与其中固定的荧光探针混合反应3min；二次离心驱动混合液进入检测池，与其中羊抗鼠免疫球蛋白G及药物抗原反应5min；再次离心驱动，使得多余的液体进入废液池中；

[0039] S3. 然后进行检测，检测中的荧光强度，并将检测信号值进行换算，即可得到待测物的检测浓度。

[0040] 优选地，整个检测过程中，离心过程均在37℃恒温条件下进行。

[0041] 优选地，检测过程采用荧光检测仪进行检测。

[0042] 应用所述微流控芯片免疫检测试剂盒进行检测的原理如下：

[0043] (1) 检测过程中，匹配的具离心及恒温保持功能(37℃)的荧光检测仪离心驱动芯片储液池液体进入混合反应池，与池中固定的荧光探针抗体(第一抗体)混合反应；

[0044] (2) 当待测液含目标检测物(抗原)时，反应池形成荧光探针-第一抗体-抗原复合物；

[0045] (3) 二次离心驱动混合液进入检测池，未与待测液中目标检测物结合的荧光探针-第一抗体复合物将与检测池中固定的抗原结合，在抗原固定区形成荧光探针-第一抗体-抗原复合物；未被抗原结合的过量荧光探针-第一抗体复合物或流动荧光探针-第一抗体-抗原复合物都与检测池中固定的羊抗鼠免疫球蛋白G(第二抗体)发生反应，形成荧光探针-第一抗体-第二抗体复合物或荧光探针-第一抗体-抗原-第二抗体复合物；

[0046] (4) 再次离心驱动多余液体进入废液池；仪器以一定波长的光照射检测池，检测羊

抗鼠免疫球蛋白G及抗原固定处发光强度,转为信号值;当待测液中目标检测物含量越高时,抗原固定区结合的荧光探针-第一抗体复合物越少,荧光强度越弱,信号值越低;羊抗鼠免疫球蛋白G固定区作为质控区,起质控作用,当该区无荧光信号值时,检测结果无效。信号值与检测物浓度相关,检测仪根据信号值输出检测结果。

[0047] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0048] 本发明提供了的基于微流控芯片免疫检测试剂盒的兽药多残留免疫检测方法,具有高通量、样品消耗少、检测速度快、操作简便等特点,适用于现场快速筛选分析,能极大缓解相关检测部门、检测人员的检测压力。

[0049] 从技术层面看,与传统的仪器分析方法及ELISA法相比,本方法不需要专业人员操作,不需要配合大型仪器或另外的分析软件进行检测;与胶体金免疫层析快速检测法相比,本方法检测重复性较好,灵敏度较高,避免了胶体金法仅靠肉眼判断带来的人为误差;传统的仪器分析方法、ELISA法及胶体金法均无法同时检测多项指标,无法实现兽药多残留的现场简便快速检测;与现有微流控技术相比,相关免疫试剂的制备、免疫方法的建立较成熟,可达到现场快速检测兽药多残留的目的。

[0050] 从经济效益看,与传统检测方法或目前多数实验室芯片相比,本方法使用试剂消耗少,不需要使用电极、电压或外加磁场,不需借助电渗驱动、热气泵驱动或光学捕获微泵等驱动,造价成本较低;可同时检测多种基质中的多种类兽药残留,极大节省了时间、人力成本。

附图说明

[0051] 图1为实施例1中微流控芯片免疫检测试剂盒的圆片底板的结构示意图。

[0052] 图2为实施例1中微流控芯片免疫检测试剂盒的圆片盖板的结构示意图。

[0053] 图3为实施例1中微流控芯片免疫检测试剂盒中一条检测单元结构顺序示意图。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施例对本发明做出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0055] 实施例1

[0056] 一种微流控芯片免疫检测试剂盒,其结构示意图如图1至图3所示,试剂盒含有微流控芯片,包括圆片盖板1和圆片底板2;其中圆片盖板1的结构示意图如图2所示,圆片底板2的结构示意图如图1所示。

[0057] 圆片底板2内设有一条或多条检测单元,单条检测单元的结构顺序示意图如图3所示;检测单元设置在圆片底板2的半径轴上,以圆片底板2的圆心点发散排列;检测单元自圆点向边缘依次排列有储液池21、混合反应池22、检测池23、废液池24和第一通气孔25,其依次通过微通道进行连接;其中混合反应池22固定有检测药物相应荧光探针;检测池23内固定有羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原;

[0058] 圆片盖板1上还设有进样孔11第二通气孔12;进样孔11的位置与圆片底板2上储液池21的位置相对应;第一通气孔25和第二通气孔12位置相对应;

[0059] 圆片盖板1和圆片底板2通过上下键合而成;常采用的键合方式包含超声键合、热压键合和/或激光键合。

[0060] 圆片盖板1和圆片底板2的圆点出均设有固定孔3,用于将微流控芯片固定在离心机中。

[0061] 圆片底板2可以采用聚二甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰胺、聚苯乙烯、聚碳酸酯、环氧树脂和/或聚氨酯材料进行制备;本实施例中的圆片底板2为聚二甲基硅氧烷材料制备。

[0062] 圆片底板2采用聚二甲基硅氧烷制备时,进行表面局部改性,具体的改性过程为:使用甲苯清洗检测池后,用5%3-氨丙基三乙氧硅烷(APTES)的乙醇溶液处理检测池表面2h;依次用乙醇溶液、纯水清洗检测池并烘干,加入2%戊二醛的PBS溶液处理反应池1h;使用纯水清洗3次、烘干,即完成芯片表面改性,提高蛋白质固定效率。

[0063] 微通道的宽度为5~50 μm ,深度为5~150 μm 。

[0064] 储液池21、混合反应池22、检测池23和废液池24的容积各自为10~40 μL 。

[0065] 微流控芯片仅有进样孔11和第二通气孔12与外界相通。

[0066] 荧光探针为聚苯乙烯荧光探针抗体复合物;具体的制备方法为:将10 μL 荧光探针经洗涤、超声,复溶于1mL MES(吗啉乙磺酸)缓冲液中;依次加入10 μL 0.8mg/mL EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)和10 μL 1.6mg/mL NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化30min;活化后经洗涤、超声,复溶于1mL BB(硼酸)缓冲液中,然后加入相应抗体与荧光探针室温偶联1~2h,洗涤后加入15 μL 20%BSA(牛血清蛋白)缓冲液,室温对荧光探针封闭30min;洗涤后用复溶液复溶,即得聚苯乙烯荧光探针抗体复合物。

[0067] 荧光探针与抗体的标记量比例为1:6~40。

[0068] 以质量百分比计,复溶液的配方为:2.5%的海藻糖、2.5%蔗糖、0.5%蛋白牛血清蛋白(BSA)、0.5%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、0.5%Tween-20、0.03%ProClin-300,余量为磷酸缓冲液(PB,0.02M,pH 7.4)。其中海藻糖和蔗糖属小分子,BSA为惰性蛋白,对保护目的蛋白活性、维持稳定有重要作用;PVP属大分子,对促进荧光探针抗体的释放有重要作用;Tween-20为表面活性剂,对促进荧光探针抗体的分散、维持其稳定等有重要作用;Procline-300为防腐剂。

[0069] 复溶液的组分对荧光探针抗体在溶液中的均匀分散性、稳定性及在反应中的释放有重要影响,本发明所述复溶液可保证聚苯乙烯荧光探针抗体复合物在复溶液中均匀且稳定的分散。

[0070] 聚苯乙烯荧光探针抗体复合物在混合反应池22上固定的方法为:使用微流移液器吸取聚苯乙烯荧光探针抗体复合物,点样涂抹在混合反应池22,于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定0.5h。

[0071] 羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原在检测池23上固定方法为:使用微流移液器吸取羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原点样于检测池23,于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定1h。

[0072] 实施例2

[0073] 应用实施例1制备的一种微流控芯片免疫检测试剂盒进行检测,本实施例以猪尿为待检测样品,检测其中莱克多巴胺的含量为例,进行检测,具体的检测过程如下:

[0074] 1、检测前制备检测莱克多巴胺的微流控芯片若干

[0075] 2、样品处理:

[0076] (1) 选取3份不同的阴性猪尿,选择0.5~15ng/mL浓度范围中的三个浓度添加莱克多巴胺药物。

[0077] (2) 取添加药物后新鲜清亮的猪尿进行分析。如尿样浑浊,必须于室温(20℃~25℃)4000r/min离心5min以上,取上清液检测。

[0078] 3、检测

[0079] 将制备的检测莱克多巴胺的微流控芯片置于相应检测仪的离心机中,使芯片牢固固定在离心轴上。吸取30μL待测液(上清液)经芯片进样孔加入使其进入储液池,待芯片各检测单元加样完毕后,启动仪器,仪器依次运行以下步骤:离心驱动储液池液体进入混合反应池,与池中固定的荧光微球抗体混合反应3min;二次离心驱动混合液进入检测池,与检测池羊抗鼠免疫球蛋白G及抗原反应5min;再次离心驱动多余液体进入废液池;仪器以一定波长的光照射检测池,获取检测池中的荧光强度,检测信号值与待测物浓度相关,输出检测结果。

[0080] 使用3个不同批次的芯片对同一添加药物的样品进行检测,每一样品重复检测3次。计算添加回收率、变异系数。结果如表1所示。

[0081] 表1

样本	添加量 (ng/mL)	批内 (n=3)			批间(n=3)		
		平均值±SD (ng/mL)	添加回收 率(%)	变异系 数 (%)	平均值±SD (ng/mL)	添加回 收率(%)	变异系数 (%)
猪尿 1	0.5	0.447±0.04072	89	9.11	0.432±0.03699	86	8.56
	1	1.082±0.10312	108	9.53	0.962±0.04811	96	5.00
	2	1.862±0.1037	93	5.57	2.062±0.09802	103	4.75
猪尿 2	0.5	0.462±0.03476	92	7.52	0.512±0.02355	102	4.60
	1	0.89±0.06683	85	7.51	1.042±0.07972	104	7.65
	2	2.182±0.09856	109	4.52	1.962±0.12568	98	6.41
猪尿 3	0.5	0.532±0.02698	106	5.07	0.482±0.03476	96	7.21
	1	1.122±0.11031	112	9.83	0.892±0.06953	89	7.80
	2	1.842±0.04283	92	2.33	2.262±0.12375	113	5.47

[0083] 从上述结果中可知,本试验中添加回收率均在80%~120%之间,变异系数均小于10%,表明本实施例所述测试方法的准确性和稳定性较好。

[0084] 实施例3

[0085] 应用实施例1制备的一种微流控芯片免疫检测试剂盒进行检测,本实施例以猪肉为待检测样品,检测其中氯霉素的含量为例,进行检测,具体的检测过程如下:

[0086] 1、检测前制备检测氯霉素的微流控芯片若干。

[0087] 2、样品处理:

[0088] (1) 选取3份不同的阴性猪肉样品,选择0.5~15ng/mL浓度范围中的三个浓度添加氯霉素药物。

[0089] (2) 称取2±0.05g均质后添加药物的猪肉样本至50mL离心管中,加入6mL乙酸乙酯,充分震荡混匀3min;室温(20℃~25℃)4000r离心5min;取3mL上清液在60℃~70℃水浴

氮气吹干;取1mL正己烷复溶,并加入1mL的PBS溶液,充分震荡1min;室温(20℃~25℃)4000r离心5min;取30μL下清液进行检测。

[0090] 3、检测

[0091] 将制备的检测氯霉素的微流控芯片置于相应检测仪的离心机中,使芯片牢固固定在离心轴上。其余步骤如实施例2中的检测步骤相同。

[0092] 使用3个不同批次的芯片对同一添加药物的样品进行检测,每一样品重复检测3次。计算添加回收率、变异系数。结果如表2所示。

[0093] 表2

样本	添加量 (ng/mL)	批内 (n=3)			批间(n=3)		
		平均值±SD (ng/mL)	添加回收 率(%)	变异系 数 (%)	平均值±SD (ng/mL)	添加回收 率(%)	变异系 数 (%)
猪肉 1	1	0.922±0.08347	92	9.05	0.862±0.05722	86	6.64
	2	2.042±0.04511	102	2.21	1.902±0.07399	95	3.89
	3	2.942±0.03456	98	1.17	3.362±0.18535	112	5.51
猪肉 2	1	0.942±0.06289	94	6.68	0.892±0.06203	89	6.95
	2	2.202±0.11665	110	5.3	1.842±0.06538	92	3.55
	3	3.392±0.13926	113	4.11	3.092±0.13772	103	4.45
猪肉 3	1	0.892±0.03278	89	3.68	0.922±0.08806	92	9.55
	2	2.242±0.05133	112	2.29	1.862±0.07453	93	4.00
	3	2.852±0.08829	95	3.1	3.182±0.27003	106	8.49

[0095] 从上述结果中可知,本试验中添加回收率均在80%~120%之间,变异系数均小于10%,表明本实施例所述测试方法的准确性和稳定性较好。

[0096] 实施例4

[0097] 应用实施例1制备的一种微流控芯片免疫检测试剂盒进行检测,本实施例以鸡肉为待检测样品,检测其中金刚烷胺的含量为例,进行检测,具体的检测过程如下:

[0098] 1、检测前制备检测金刚烷胺的微流控芯片若干。

[0099] 2、样品处理:

[0100] (1) 选取3份不同的阴性鸡肉样品,选择1~20ng/mL浓度范围中的三个浓度添加金刚烷胺药物。

[0101] (2) 称取2±0.05g均质后添加药物的鸡肉样本至50mL离心管中,加入6mL乙腈,充分震荡混匀3min;室温(20℃~25℃)4000r离心5min;取3mL上清液在60℃~70℃水浴氮气吹干;加入1mL的PBS溶液,充分震荡1min;室温(20℃~25℃)4000r离心5min;取30μL下清液进行检测。

[0102] 3、检测

[0103] 将制备的检测金刚烷胺的微流控芯片置于相应检测仪的离心机中,使芯片牢固固定在离心轴上。其余步骤如实施例2中的检测步骤相同。

[0104] 使用3个不同批次的芯片对同一添加药物的样品进行检测,每一样品重复检测3

次。计算添加回收率、变异系数。结果如表3所示。

[0105] 表3

样本	添加量 (ng/mL)	批内 (n=3)			批间(n=3)		
		平均值±SD (ng/mL)	添加回收 率(%)	变异系 数 (%)	平均值±SD (ng/mL)	添加回 收率(%)	变异系 数 (%)
鸡肉 1	1	0.942±0.02466	94	2.62	0.892±0.02466	89	2.76
	2	2.142±0.08022	107	3.74	1.882±0.06579	94	3.5
	3	3.182±0.01061	106	0.33	3.092±0.14517	103	4.7
鸡肉 2	1	0.962±0.01883	96	1.96	1.122±0.08392	11	7.48
	2	2.062±0.07699	103	3.73	2.102±0.16287	105	7.75
	3	3.152±0.17965	105	5.7	3.152±0.02269	105	0.72
鸡肉 3	1	0.892±0.05545	89	6.22	0.912±0.02085	91	2.29
	2	1.962±0.10958	98	5.59	1.942±0.02673	97	1.38
	3	3.062±0.03699	102	1.21	2.852±0.11151	95	3.91

[0107] 从上述结果中可知,本试验中添加回收率均在80%~120%之间,变异系数均小于10%,表明本实施例所述测试方法的准确性和稳定性较好。

[0108] 上述实施例表明本发明所述微流控芯片免疫检测试剂盒可以对多种样品、多种药物进行检测,且检测方法的准确性、稳定性和重复性均较好,可广泛的应用的实际的多用动物样本中药物残留的检测,且检测过程简单、便捷,可操作性强。

[0109] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,对于本领域的普通技术人员来说,在上述说明及思路的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

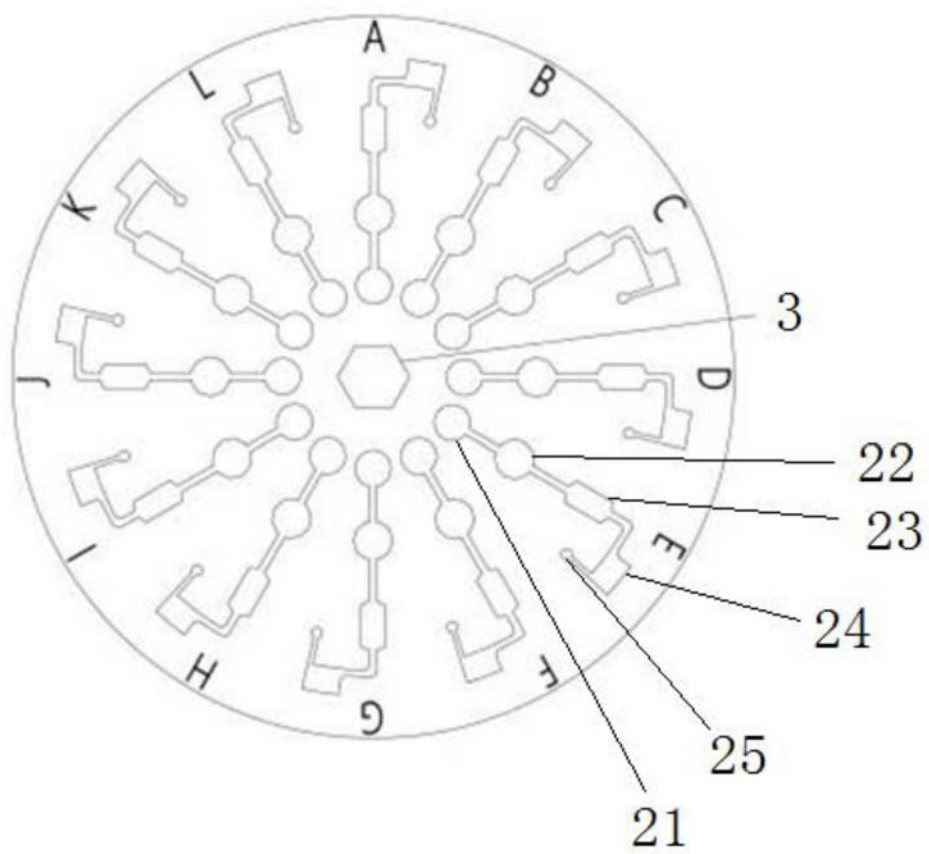


图1

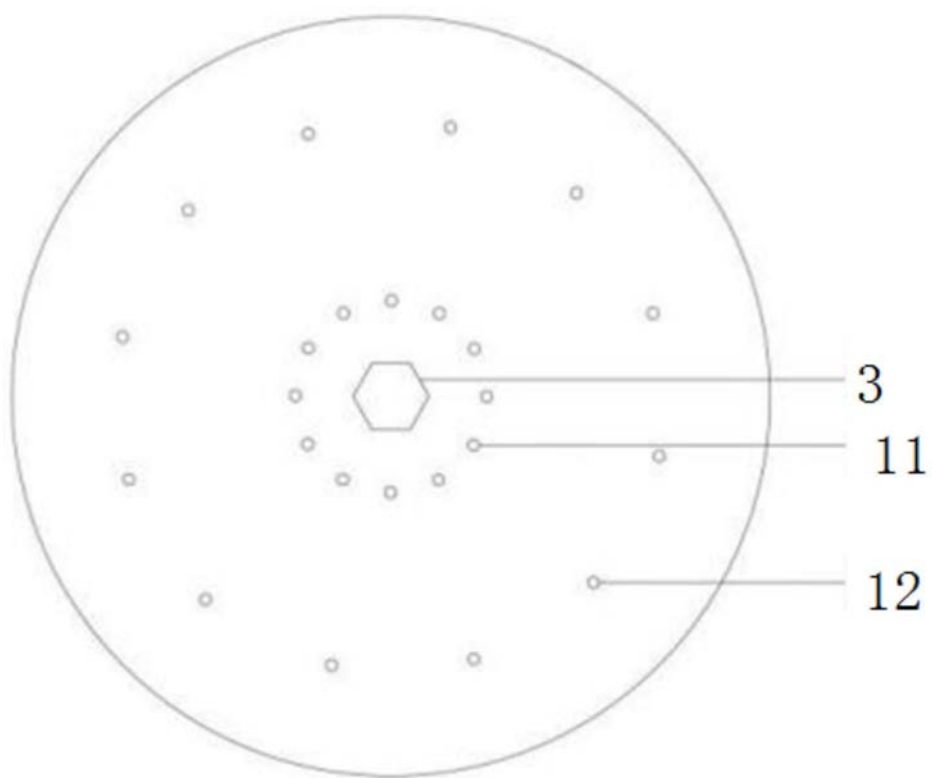


图2

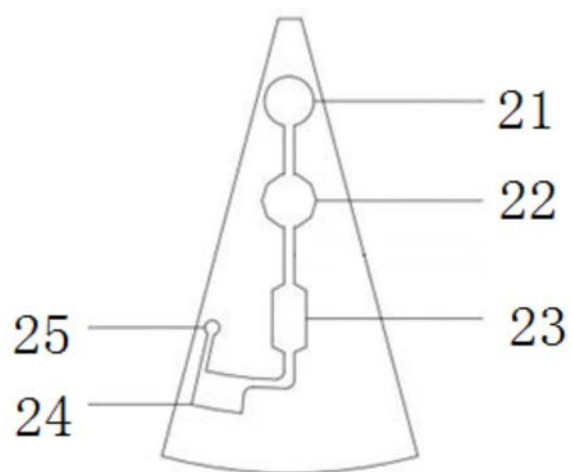


图3

专利名称(译)	一种微流控芯片免疫检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN111077319A	公开(公告)日	2020-04-28
申请号	CN201911310232.6	申请日	2019-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	杨金易 吴颖 曾道平 苏晓娜 沈玉栋 王弘 陈丽 韦田		
发明人	杨金易 吴颖 曾道平 苏晓娜 沈玉栋 王弘 陈丽 韦田		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/53 B01L3/00		
CPC分类号	B01L3/5027 G01N33/5304 G01N33/582 G01N33/94 G01N33/9446		
代理人(译)	孙凤侠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种微流控芯片免疫检测试剂盒及其检测方法。所述试剂盒含有微流控芯片，包括通过上下键合而成的圆片盖板和圆片底板；所述圆片底板内设有一条或多条检测单元，所述检测单元包括依次连接的储液池、混合反应池、检测池、废液池和第一通气孔；其中所述混合反应池固定有检测药物相应荧光探针；所述检测池内固定有羊抗鼠免疫球蛋白G及相应药物抗原。本发明利用所述试剂盒的检测方法，具有高通量、样品消耗少、检测速度快、操作简便等特点，不需要使用电极、电压或外加磁场，不需借助电渗驱动、热气泵驱动或光学捕获微泵等驱动，可同时检测多种基质中的多种类兽药残留，适用于现场快速筛选分析，能极大缓解相关检测人员的检测压力。

