



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106568939 A

(43)申请公布日 2017. 04. 19

(21)申请号 201610933988.6

(22)申请日 2016.10.31

(71)申请人 王文科

地址 201802 上海市嘉定区南翔镇芳林路
819弄276号401

(72)发明人 王武康 王文科

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

化学发光免疫检测试剂条及其检测农药兽药残留的应用

(57)摘要

本发明提供用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂条,包括样品垫(1)、吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜(2)、固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜(3)、发光剂膜(4)、过氧化脲膜(5)和吸收垫(6),以上各部分依次粘贴在PVC衬板(7)上。测定时,以样品垫上滴加的待测样品以及所述玻璃纤维膜或聚酰酯膜上吸附的酶标记的被检测物作为移动相,由所述硝酸纤维素膜上固定的被检测物抗体、发光剂膜和过氧化脲膜组成的发光区,作为固定相,发光区所发光强度与样品中待测物的含量呈相应的比例关系,通过光传感检测仪,直接显示测定结果。本发明的试剂条为定量检测食品中农药和兽药残留提供了快速、简捷、准确的检测手段。

1. 用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂条, 其特征在于, 包括样品垫 (1)、吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜 (2)、固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜 (3)、发光剂膜 (4)、过氧化脲膜 (5)、吸收垫 (6) 和PVC衬板 (7);

所述样品垫 (1)、吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜 (2)、固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜 (3)、发光剂膜 (4) 和吸收垫 (6) 依次粘贴在PVC衬板 (7) 上; 其中, 所述过氧化脲膜 (5) 设置在所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜 (3) 的下方, 与所述发光剂膜 (4) 的位置相对应。

2. 根据权利要求1所述的试剂条, 其特征在于, 所述PVC衬板长40-60mm, 宽3-4mm; 所述样品垫长8-10mm, 宽3-4mm, 材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸; 所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜长3-5mm, 宽3-4mm, 所述酶为辣根过氧化物酶; 所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜长20-30mm, 宽3-4mm, 所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体; 所述抗体固定在其靠近样品垫一侧硝酸纤维素膜6-10mm处; 所述发光剂膜长2-5mm, 宽3-4mm, 材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸, 所用发光剂为鲁米诺或其衍生物; 所述过氧化脲膜长2-5mm, 宽3-4mm, 材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸; 所述吸收垫长12-15mm, 宽3-4mm, 材质选自滤纸材料。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂条, 其特征在于, 所述样品垫压在所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜上1-2mm, 所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜压在所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜上3-4mm, 所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜另一端距离边缘5-7mm处粘贴所述发光剂膜, 所述吸收垫压在所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜上2-3mm。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的试剂条, 其特征在于, 所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜是将酶标记被检测物溶液喷涂于玻璃纤维膜或聚酰酯膜后经干燥得到的;

所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜是将被检测物抗体溶液喷涂于硝酸纤维素膜后经干燥得到的。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的试剂条, 其特征在于, 所述发光剂膜是将浓度为0.5-10.0mM鲁米诺或其衍生物溶液喷涂于膜上经干燥得到的; 其中, 所述鲁米诺或其衍生物溶液用0.1-1%, pH8-9.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液配制;

所述过氧化脲膜是用浓度为10%-30%的过氧化脲溶液浸膜后, 经干燥得到的。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的试剂条, 其特征在于, 所述被检测物包括各种抗生素, 类固醇激素和农药; 优选地, 所述被检测物包括氯霉素、庆大霉素、孕酮、睾酮、氯胺灵、多灵菌素以及可获得相关抗体的各类有机物。

7. 含有权利要求1-6任一项所述试剂条的用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 其是将所述试剂条置于一塑料卡壳中组装得到的;

所述卡壳包括盒体和盖板, 所述盒体的底板上平行设有二个大小相同的凹槽, 凹槽内分别放置所述化学发光免疫检测试剂条和对照试剂条; 二槽间有脊将之分开, 盖上盖板时, 盒体内部被分隔为二个不透光的空间; 其中, 所述对照试剂条是将所述化学发光免疫检测试剂条上的固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜替换成空白硝酸纤维素膜得到的;

所述盖板一端设有至少一个加样孔, 对应于所述试剂条的样品垫; 所述盖板另一端平

行设有二个发光孔,分别对应于所述试剂条上发光剂膜的位置;任选在所述加样孔和发光孔之间设有至少一个观察窗,用于监测样品的流动情况。

8. 权利要求1-6任一项所述试剂条或权利要求7所述试剂盒在检测农药兽药残留中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,测定时,以样品垫上滴加的待测样品以及所述玻璃纤维膜或聚酰酯膜上吸附的酶标记的被检测物作为移动相,由所述硝酸纤维素膜上固定的被检测物抗体、发光剂膜和过氧化脲膜组成的发光区,作为固定相,发光区所发光强度与样品中待测物的含量呈相应的比例关系,通过光传感检测仪,直接显示测定结果。

化学发光免疫检测试剂条及其检测农药兽药残留的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域中的生物检测技术领域,具体地说,涉及一种化学发光免疫检测试剂条及其检测农药兽药残留的应用。

背景技术

[0002] 当今检测技术主要包括二个发展方向,其一是向大型精密自动控制的检验技术方面发展,使检验技术标准化、精确化、集约化程度越来越高,其二则是向经济、快捷、普及化、大众化的检测技术方面发展,以满足大众自我保健、自我防护意识的需求。就食品安全而言,国家规定的监察项目,农药有136种,兽药有217种。面对如此多的检测种类,如何提高检测效率,定量而又便捷检测食品中农药和兽药残留,一直是一个亟待解决的问题。

[0003] 目前针对农药兽药快速检测,应用最多的是“胶体金免疫层析试剂条”。该试剂条是利用胶体金颗粒吸附的抗体与样品液为移动相,样品中的待测物(抗原)与固定在硝酸纤维素膜上的抗原(固定相),共同竞争与抗体结合,样品中抗原多,与胶体金中抗体结合多,则沉积在固定相中抗体少,在固定相的位置,显示的红色线浅。相反,样品中待测物少,显示的红色线深。以肉眼观察红色的深浅,来判断残留物的多少,是否超标。此法简便,快速。但结果是依据目测判断,常模棱两可。胶体金试剂条只能用来定性,阳性—超标,阴性—未超标,使用有一定的局限性。一些情况下不能达到检测所需的检测限。现已有“金标条读卡仪”,通过发射光到膜上,读取反射光的强度来测定固定相红色深浅,以此来定量测定残留物的量。但仪器通过发射光在膜上的折射,检测反射光强度,其灵敏度、准确性都有一定的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种化学发光免疫检测试剂条及其在检测农药兽药残留中的应用。

[0005] 为了实现本发明目的,本发明用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂条,包括样品垫1、吸附有酶标记的被检测物(酶标抗原)的玻璃纤维膜或聚酰酯膜2、固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜(NC膜)3、发光剂膜4、过氧化脲膜5、吸收垫6和PVC衬板7。

[0006] 所述样品垫1、吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜2、固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜3、所述发光剂膜4和吸收垫6依次粘贴在PVC衬板7上;其中,所述过氧化脲膜5设置在所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜3的下方,与所述发光剂膜4的位置相对应。试剂条结构如图1所示。

[0007] 所述PVC衬板长40-60mm,宽3-4mm;所述样品垫长8-10mm,宽3-4mm,材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸;所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜长3-5mm,宽3-4mm,所述酶为辣根过氧化物酶;所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜长20-30mm,宽3-4mm,所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体;所述抗体固定在其靠近样品垫一侧硝酸纤维素膜6-10mm处;所述发光剂膜长2-5mm,宽3-4mm,材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸,所用发光剂为鲁米诺或其衍生物;所述过氧化脲膜长2-5mm,宽3-4mm,材质选自聚酰酯、玻璃纤维

或滤纸,其中可用过氧化苯甲酸等过氧化物代替过氧化脲;所述吸收垫长12-15mm,宽3-4mm,材质选自滤纸材料。

[0008] 所述样品垫压在所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜上1-2mm,所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜压在所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜上3-4mm,所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜另一端距离边缘5-7mm处粘贴所述发光剂膜,所述吸收垫压在所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜上2-3mm。

[0009] 所述吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜是将酶标记被检测物溶液喷涂于玻璃纤维膜或聚酰酯膜后经干燥得到的;

[0010] 所述固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜是将被检测物抗体溶液喷涂于硝酸纤维素膜后经干燥得到的。

[0011] 所述发光剂膜是将浓度为0.5-10.0mM鲁米诺或其衍生物溶液喷涂于膜上经干燥得到的;其中,所述鲁米诺或其衍生物溶液用0.1-1%,pH8-9.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液配制;

[0012] 所述过氧化脲膜是用浓度为10%-30%的过氧化脲溶液浸膜后,经干燥得到的。

[0013] 所述被检测物包括各种抗生素,类固醇激素和农药。优选地,所述被检测物包括氯霉素、庆大霉素、孕酮、睾酮、氯胺灵、多灵菌素,以及可获得相关抗体的各类有机物等。

[0014] 本发明还提供含有所述化学发光免疫检测试剂条的用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂盒,其是将所述试剂条置于一塑料卡壳中组装得到的。

[0015] 所述卡壳包括盒体和盖板,所述盒体的底板上平行设有二个大小相同的凹槽,凹槽内分别放置所述化学发光免疫检测试剂条和对照试剂条;二槽间有峭将之分开,盖上盖板时,盒体内部被分隔为二个不透光的空间。试剂盒结构如图2所示。

[0016] 其中,所述对照试剂条是将所述化学发光免疫检测试剂条上的固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜替换成空白硝酸纤维素膜得到的。

[0017] 所述盖板一端设有至少一个加样孔,对应于所述试剂条的样品垫;所述盖板另一端平行设有二个发光孔,分别对应于所述试剂条上发光剂膜的位置。任选可在所述加样孔和发光孔之间设有至少一个观察窗,用于监测样品的流动情况。此外,在对应底板峭的位置,上盖板向上突起一梁,可插入光传感检测仪的暗箱之中。

[0018] 利用光传感检测仪采集从试剂盒的发光孔中发出的光信号,转换成电信号,根据标准曲线,得出样品中农药兽药的残留量。

[0019] 所述光传感检测仪外型呈长方体,规格130mm×75mm×30mm(图3),包括光电传感器、微电流放大器、电压跟随器及电子开关、单片机及显示器等组件。也可以使用市面上类似的光传感检测仪产品用于检测。

[0020] 本发明进一步提供所述化学发光免疫检测试剂条或所述试剂盒在检测农药兽药残留中的应用。

[0021] 测定时,以样品垫上滴加的待测样品以及所述玻璃纤维膜或聚酰酯膜上吸附的酶标记的被检测物作为移动相,由所述硝酸纤维素膜上固定的被检测物抗体、发光剂膜和过氧化脲膜组成的发光区,作为固定相,发光区所发光强度与样品中待测物的含量呈相应的比例关系,通过光传感检测仪,直接显示测定结果。

[0022] 本发明利用化学发光免疫检测试剂条,基于抗原抗体反应结合化学发光,作为信号源,通过光传感检测仪直接显示测定结果,该方法快速、简捷、准确,为定量检测食品中农药和兽药残留提供了有效措施。用直接光为信号源,而不像胶体金试剂条的色带目测法。本方法不仅可用于农药、兽药残留的检测,还可以广泛应用于医学临床药物、激素等,环境监测中多种毒素、化学品污染等多项检测。

附图说明

[0023] 图1为本发明用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂条的结构示意图;其中,1-样品垫,2-吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰酯膜,3-固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜,喷有抗体(中画线位置),4-发光剂膜,5-过氧化脲膜,6-吸收垫,7-PVC衬板。

[0024] 图2为本发明用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂盒的俯视图;其中,8-发光孔,9-观察窗,10-加样孔,11-中央隔板及中嵴。

[0025] 图3为本发明光传感检测仪的主视图;其中,12-显示器,13-暗箱,14-开关,15-校正键,16-测定键。

[0026] 图4为本发明实施例2中绘制的氯霉素标准曲线。

具体实施方式

[0027] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0028] 本发明中涉及到的百分号“%”,若未特别说明,是指质量百分比;但溶液的百分比,除另有规定外,是指100mL溶液中含有溶质的克数。

[0029] 本发明中,若未特别说明,术语“上”、“下”等指示的方位或状态关系仅是为了便于描述本发明和简化描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。

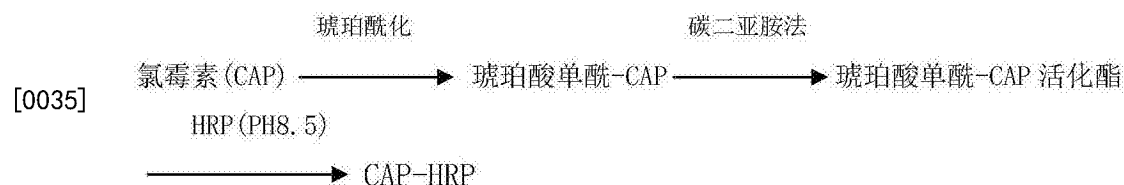
[0030] 实施例1用于检测氯霉素残留的化学发光免疫检测试剂条

[0031] 1、氯霉素抗体的制备

[0032] 本实施例中使用多抗(用氯霉素交联牛血清白蛋白为免疫原,免疫新西兰大耳兔所得免疫血清),效价1:32万,经纯化后配制浓度为3mg/ml,可用抗体稀释液按1:20-300倍比稀释,本实施例中用按1:35稀释,用喷膜机将抗体液喷在硝酸纤维素膜(NC)上;然后将膜在室温干燥30分钟,真空37℃干燥2小时,即得固定有氯霉素抗体的NC膜。

[0033] 2、氯霉素-HRP的制备

[0034] 流程如下:



[0036] CAP-HRP浓度为0.3mg/ml,使用时用0.1M PBS液(pH8.0)作为交联剂稀释液,可按1:30-50稀释。本实施例中按1:30稀释,用此稀释液浸润玻璃纤维膜30分钟,然后室温干燥

30分钟,真空37℃干燥2小时,即得CAP-HRP膜。

[0037] 3、鲁米诺膜(发光剂膜)的制备

[0038] 将鲁米诺溶于0.5M碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液(pH8.9)中,配成0.5-10mM溶液,添加0.1%对碘苯酚。用此液浸润宽为3mm的玻璃纤维膜条15分钟,然后室温干燥30分钟,真空37℃干燥2小时,即得鲁米诺膜条。

[0039] 4、过氧化脲膜的制备

[0040] 用0.1M Tris-HCL (pH8.5) 缓冲溶液,添加适量二甲其亚砷作为助溶剂,配成浓度为20%过氧化脲液,浸润宽为3mm的聚酯膜条10分钟,然后室温干燥30分钟,真空37℃干燥2小时,即得过氧化脲膜条。

[0041] 5、试剂条的组装

[0042] 用宽5cm的PVC衬板,分步贴上过氧化脲膜条、固定有氯霉素抗体的NC膜、CAP-HPP膜、样品垫膜条和吸收垫膜条,在NC膜上对应过氧化脲膜条处,用透明胶带固定鲁米诺膜条,用切条机将整片切成4mm宽的试剂条。本实施例的用于检测氯霉素残留的化学发光免疫检测试剂条长宽为50mm*4mm。

[0043] 其中,所述样品垫长8-10mm,材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸;所述CAP-HPP膜长3-5mm,所述固定有氯霉素抗体的NC膜长20-30mm;所述抗体固定在其靠近样品垫一侧NC膜6-10mm处;所述鲁米诺膜长2-5mm,材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸;所述过氧化脲膜长2-5mm,材质选自聚酰酯、玻璃纤维或滤纸;所述吸收垫长12-15mm,材质为滤纸。

[0044] 所述样品垫、CAP-HPP膜、固定有氯霉素抗体的NC膜、鲁米诺膜和吸收垫依次交互层叠黏贴到PVC衬板上;所述样品垫压在所述CAP-HPP膜上1-2mm,所述CAP-HPP膜压在所述固定有氯霉素抗体的NC膜上3-4mm,所述固定有氯霉素抗体的NC膜另一端距离边缘5-7mm处用透明胶带固定所述鲁米诺膜,所述吸收垫压在所述固定有氯霉素抗体的NC膜上2-3mm。其中,所述过氧化脲膜设置在所述固定有氯霉素抗体的NC膜的下方,与所述鲁米诺膜的位置相对应。

[0045] 6、对照试剂条的组装

[0046] 步骤同上述化学发光免疫检测试剂条,仅是用未固定抗体的NC膜条,即空白NC膜条代替固定有抗体的NC膜条。

[0047] 组装后的用于检测氯霉素残留的化学发光免疫检测试剂条结构如图1所示。

[0048] 实施例2用于检测氯霉素残留的化学发光免疫检测试剂盒及应用

[0049] 本实施例的检测试剂盒包括盒体和盖板,所述盒体的底板上平行设有二个大小相同的凹槽,凹槽内分别放置实施例1制备的化学发光免疫检测试剂条和对照试剂条;二槽间有嵴将之分开,盖上盖板时,盒体内部被中央隔板及中嵴分隔为二个不透光的空间。

[0050] 所述盖板一端设有至少一个加样孔,对应于所述试剂条的样品垫;所述盖板另一端平行设有二个发光孔,分别对应于所述试剂条上发光剂膜的位置。可在所述加样孔和发光孔之间设有至少一个观察窗,用于监测样品的流动情况。此外,在对应底板嵴的位置,上盖板向上突起一梁,可插入光传感检测仪的暗箱之中。

[0051] 1、氯霉素标准曲线的绘制

[0052] ①将光传感检测仪调到校正档。

[0053] ②向试剂盒的加样孔,分别加入氯霉素标准液:0.05、0.1、0.3、0.5、1.0、2.0、

4.0ng/ml,每孔加样量为200 μ l。

[0054] ③加样后,观测液体样品达观察窗时,拉出检测仪的暗箱,将试剂盒放入,推进暗箱回到检测仪中,3分钟后,开始测定。显示器显示出对照孔(对应于对照试剂条)与测定孔(对应于化学发光免疫检测试剂条)比值,即由电信号转换成的数值之比,以此制作标准曲线。结果如表1和图4所示。

[0055] 表1对照孔与测定孔比值

	(对照孔与测定孔比值) \times 100%	浓度(ng/ml)
	100%	对照
[0056]	89%	4
	71%	2
	57%	1
	48%	0.5
	37%	0.3
	20%	0.1
	11%	0.05

[0057] 注:比值是以对照孔数值为分母,分别以各浓度读数为分子得出比值的百分

[0058] 数,以比值为纵坐标,以浓度的对数为横坐标作图,得标准曲线。

[0059] 将此标准曲线及公式: $y=0.1741\ln(x)+0.603$, $R^2=0.989$,预存于所述光传感检测仪的单片机中,即完成检测仪的校正。

[0060] 现场检测时,检测仪调到测定档,按以上操作,每次在加样孔加入200 μ l样品液,将试剂条盒放入暗箱中3分钟后,每间隔5秒仪器读一次,每个样品读取5个数值,计算其平均值为测定值,通过与预存的标准曲线值对照,即可从显示屏直接得出结果。单次测定仅需要5分钟。

[0061] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

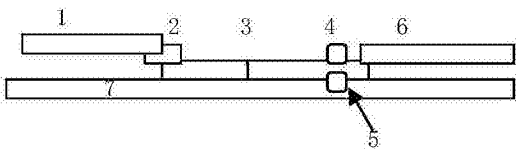


图1

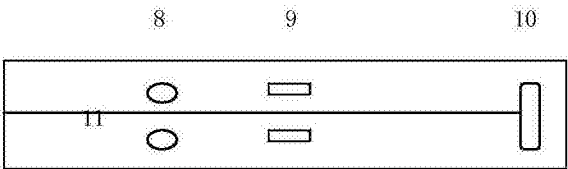


图2

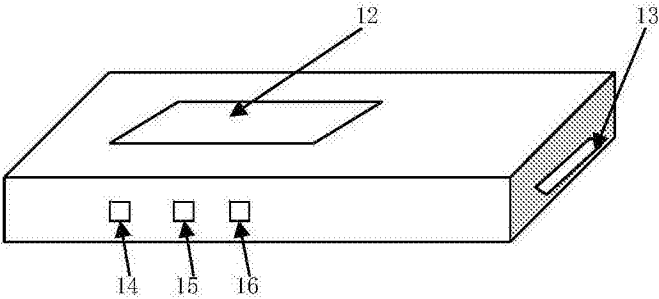


图3

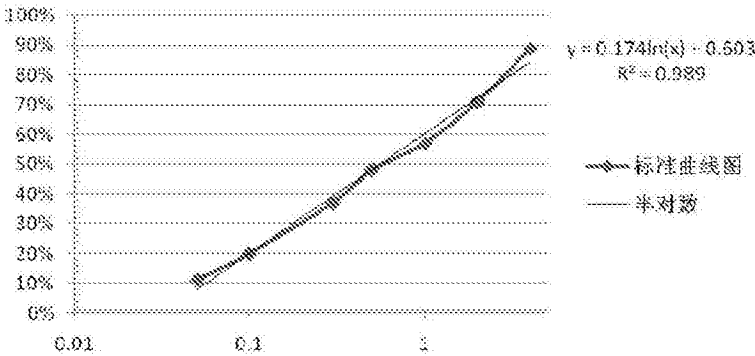


图4

专利名称(译)	化学发光免疫检测试剂条及其检测农药兽药残留的应用		
公开(公告)号	CN106568939A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201610933988.6	申请日	2016-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	王文科		
申请(专利权)人(译)	王文科		
当前申请(专利权)人(译)	王文科		
[标]发明人	王武康 王文科		
发明人	王武康 王文科		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN106568939B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于检测农药兽药残留的化学发光免疫检测试剂条，包括样品垫(1)、吸附有酶标记的被检测物的玻璃纤维膜或聚酰胺膜(2)、固定有被检测物抗体的硝酸纤维素膜(3)、发光剂膜(4)、过氧化脲膜(5)和吸收垫(6)，以上各部分依次粘贴在PVC衬板(7)上。测定时，以样品垫上滴加的待测样品以及所述玻璃纤维膜或聚酰胺膜上吸附的酶标记的被检测物作为移动相，由所述硝酸纤维素膜上固定的被检测物抗体、发光剂膜和过氧化脲膜组成的发光区，作为固定相，发光区所发光强度与样品中待测物的含量呈相应的比例关系，通过光传感检测仪，直接显示测定结果。本发明的试剂条为定量检测食品中农药和兽药残留提供了快速、简捷、准确的检测手段。

