



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752526 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201711074454.3

(22)申请日 2017.11.05

(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 杜霞 洪霞 张淑雅

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测氯喹含量的酶联免疫试剂盒

(57)摘要

本发明为检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及其检测方法,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括:包被了氯喹抗原的酶标板、氯喹标准品、氯喹抗体工作液、氯喹酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。氯喹检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液A、底物液B,在酶的作用下孔里将会出现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中氯喹的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测饲料、动物组织中的氯喹含量。

1. 检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,包括氯喹酶标板、氯喹标准品、氯喹抗体工作液、氯喹酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。

2. 检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,包括以下步骤:氯喹酶标板的制备、氯喹标准品的制作、氯喹单克隆抗体及其工作液的制备、氯喹酶标二抗工作液的制备、洗涤液的制备、底物液A的制备、底物液B的制备、终止液的制备、浓缩样品稀释液的制备。

3. 根据权利要求2所述的检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的氯喹包被抗原是将氯喹半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将氯喹抗原稀释成1:10000比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液300 μ L/孔,洗板2次,30s/次;然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,150 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1.5h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置4 $^{\circ}$ C下保存。

4. 根据权利要求2所述的检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的氯喹标准品浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1.5ng/mL、4.5ng/mL、13.5ng/mL、40.5ng/mL。

5. 根据权利要求2所述的检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的氯喹抗体工作液是采用氯喹人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:40000比例制备。

6. 根据权利要求2所述的检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,其特征在于:所述的氯喹酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成1:5000比例;所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为2mol/L的硫酸;所述浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,其包含0.5%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

7. 权利要求2所述的检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及检测方法,基于抗原抗体进行间接竞争酶联免疫反应,该方法包括以下步骤:

(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,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 $^{\circ}$ C)平衡30min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有氯喹抗原的酶标板,加标准品/样本50 μ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入氯喹酶标二抗工作液,50 μ L/孔,然后加入氯喹抗体工作液,50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μ L/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10s,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) 加入底物液A 50 μ L/孔,底物液B 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应15min;

(7) 加入终止液50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处或双波长450/630nm检测,测定每孔吸光度值(请在5min内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中氯喹的含量。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

(1) 配制稀释液:水-乙腈-甲磺酸溶液(7mL甲磺酸加入到4mL冰醋酸中,用水稀释到100mL)-二乙胺溶液(2mL稀释到20mL,摇匀)(86:10:2:2);

(2) 研磨代表性样品或将组织匀浆;

(3) 称量160mg处理好的样品加入80mL甲醇溶液;

(4) 在密封的容器里混合,震荡涡旋30min;

(5) 室温离心4000r/min以上,10min;取3ml上清液;

(6) 以1:9的比例稀释上清液,混匀待测。

一种检测氯喹含量的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域,特别是检测氯喹的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 氯喹在人体内代谢较慢,含量超过一定量时易引起食欲减退、恶心呕吐、腹泻等反应;还可出现皮肤瘙痒、紫癜、脱毛、毛发变白,湿疹和剥脱性皮炎、牛皮癣;头重、头痛、头昏、耳鸣、眩晕、倦怠、睡眠障碍、精神错乱、视野缩小、角膜及视网膜变性等。

[0003] 目前,氯喹的测定方法主要有高效液相色谱法、反相高效液相色谱法、表面增强拉曼光谱法等,其检测结果准确可靠,但仪器设备比较昂贵,且样本前处理过程相对复杂。酶联免疫吸附法是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选,近年来已广泛应用于农产品安全检测行业。本发明旨在建立一种检测氯喹的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

发明内容

[0004] 为了克服色谱法的不足,本发明提供一种检测氯喹的酶联免疫试剂盒及其检测方法。该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

[0005] 本发明检测氯喹的酶联免疫试剂盒,包括氯喹酶标板、氯喹标准品、氯喹抗体工作液、氯喹酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

[0006] 本发明检测氯喹的酶联免疫试剂盒的制备,包括以下步骤:酶标板的制备、氯喹标准品的制备、氯喹抗体工作液的制备、氯喹酶标二抗工作液的制备、底物液A的制备、底物液B的制备、终止液的制备、浓缩稀释液的制备和浓缩洗涤液的制备。

[0007] 氯喹包被抗原是将氯喹半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将氯喹抗原稀释成1:10000比例,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液300 μ L/孔,洗板2次,30s/次;然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,150 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1.5h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置4 $^{\circ}$ C下保存。

[0008] 氯喹标准品浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1.5ng/mL、4.5ng/mL、13.5ng/mL、40.5ng/mL。

[0009] 氯喹抗体工作液是采用氯喹人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:40000比例制备。

[0010] 氯喹酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成1:5000比例;底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;终止液为2mol/L的硫酸;浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,其包含0.5%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

[0011] 氯喹的ELISA试剂盒的检测方法包括以下步骤:

(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,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30min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被有氯喹抗原的酶标板,加标准品/样本50μL/孔到对应的微孔中;

(4) 加入氯喹酶标二抗工作液,50μL/孔,然后加入氯喹抗体工作液,50μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光环境中反应30min;

(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10s,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) 加入底物液A 50μL/孔,底物液B 50μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15min;

(7) 加入终止50μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处或双波长450/630nm检测,测定每孔吸光度值(请在5min内读完数据);

(8) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中氯喹的含量。

[0012] 待测样品用以下方法进行预处理:

(1) 配制稀释液:水-乙腈-甲磺酸溶液(7mL甲磺酸加入到4mL冰醋酸中,用水稀释到100mL)-二乙胺溶液(2mL稀释到20mL,摇匀)(86:10:2:2);

(2) 研磨代表性样品或将组织匀浆;

(3) 称量160mg处理好的样品加入80mL甲醇溶液;

(4) 在密封的容器里混合,震荡涡旋30min;

(5) 室温离心4000r/min以上,10min;取3ml上清液;

(6) 以1:9的比例稀释上清液,混匀待测。

具体实施方式

[0013] 氯喹蛋白质偶联物的制备:

采用琥珀酸酐法得到带羧基的氯喹半抗原衍生物,之后取0.05mmol与载体蛋白BSA按10:1的结合比混合在0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)中,然后加入0.15mmol碳二亚胺,搅拌置室温反应24h,最后于0.2mol/L pH 7.6的PBS缓冲液中透析两天,除去未反应的半抗原,将得到的蛋白质偶联物溶液于-20℃保存备用。

[0014] 氯喹抗体的制备:

选用健康成年纯种BALB/C小鼠,取与蛋白质偶联制备的免疫抗原50μg与等量完全弗氏佐剂混合采用腹腔注射进行初次免疫,之后每隔3周用相同剂量免疫抗原加等量不完全弗氏佐剂采用腹腔注射进行二次、三次免疫,每次免疫6天后尾静脉采血测定抗血清效价至一定滴度后,用相同剂量不加佐剂进行末次免疫,3天后取脾制备脾细胞悬浮液与骨髓瘤细胞进行细胞融合,筛选出所需要的杂交瘤细胞系进行克隆化,选择处于对数生长期的杂交瘤细胞进行冻存,用于腹水制备,先腹腔注射0.5ml液体石蜡于BALB/C鼠致敏,2周后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞,接种细胞7-10天后可产生腹水,待腹水尽可能多时用注射器抽取腹水,反复收集数次,4000rpm离心15min,收集上清,采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水对单克隆抗

体进行纯化,冷冻干燥得冻干粉后于-20℃保存备用。

[0015] 制备包被有氯喹包被抗原的酶标板:

氯喹包被抗原是将氯喹半抗原与载体蛋白偶联得到的,该载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA);用0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐(CBS)缓冲液作为包被液,将氯喹抗原稀释成1:10000比例,100μL/孔,37℃放置2h,取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液300μL/孔,洗板2次,30s/次;然后加入0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭,150μL/孔,37℃放置1.5h,弃去封闭液,拍干后的酶标板放置恒温间(25℃)晾干;抽检合格后将酶标板真空密封后置4℃下保存。

[0016] 氯喹标准品配制浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1.5ng/mL、4.5ng/mL、13.5ng/mL、40.5ng/mL。

[0017] 氯喹抗体工作液是采用氯喹人工抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:40000比例制备。

[0018] 氯喹酶标二抗工作液用酶标二抗稀释液稀释成1:5000比例;底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;终止液为2mol/L的硫酸;浓缩洗涤液是10倍浓缩洗涤液,其包含0.5%吐温-20,0.01mol/L的PBST,pH值范围7.0-7.5之间。

[0019] 基于上述制备的试剂,本发明用于检测氯喹的酶联免疫试剂盒包括如下材料:

- (1) 96孔酶标板×1块;
- (2) 标准液×6瓶:(1mL/瓶) 0ng/mL、0.5ng/mL、1.5ng/mL、4.5ng/mL、13.5ng/mL、40.5ng/mL;
- (3) 抗体工作液 7 mL;
- (4) 酶标二抗工作液 7 mL;
- (5) 底物液A 7 mL;
- (6) 底物液B 7 mL;
- (7) 终止液 7 mL;
- (8) 10×浓缩稀释液 40 mL;
- (9) 10×浓缩洗涤液 40 mL;

本发明的试剂盒用于检测样品中氯喹残留量时,通过以下步骤实施:样品预处理、用本发明试剂盒进行检测、分析结果。

[0020] (1) 样品预处理

称量160mg研磨过滤后的样品加入80mL甲醇溶液,在密封的容器里混合,震荡涡旋1min;室温离心4000r/min以上,10min;取3ml上清液;以1:9的比例稀释上清液,混匀待测。

[0021] (2) 用本发明试剂盒检测待测样品中氯喹残留量

取包被有氯喹抗原的酶标板,加标准品/样本50μL/孔到对应的微孔中;加入酶标二抗工作液,50μL/孔,然后加入氯喹抗体工作液,50μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光环境中反应30min;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10s,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);加入底物液A50 μL/孔,底物液B 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15min;加入终止液50μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处或双波

长450/630nm检测,测定每孔吸光度值(请在5min内读完数据);对比待测样品与标准品的吸光度值大小,定量分析待测样品中氯喹残留量。

[0022] (3) 分析结果

百分吸光度值的计算,标准品或样本的百分吸光度值等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准(0标准)的吸光度值,再乘以100%,即

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

其中B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,B₀—0ppb标准溶液的平均吸光度值。

[0023] 以氯喹的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,求出直线方程。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喹的实际浓度。

专利名称(译)	一种检测氯喹含量的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN109752526A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN2017111074454.3	申请日	2017-11-05
[标]发明人	杜霞 洪霞 张淑雅		
发明人	杜霞 洪霞 张淑雅		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为检测氯喹的ELISA试剂盒的制备及其检测方法，其检测灵敏、准确、快速，操作简便、特异性强，适用于大批样品的检测。所述试剂盒包括：包被了氯喹抗原的酶标板、氯喹标准品、氯喹抗体工作液、氯喹酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩样品稀释液和浓缩洗涤液。氯喹检测试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应，把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标孔中，孵育一段时间后，洗板加入底物液A、底物液B，在酶的作用下孔里将会出现蓝色，加入终止液，颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中氯喹的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测饲料、动物组织中的氯喹含量。