(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107192814 A
(43)申请公布日 2017.09.22

(21)申请号 201710308814.5

(22)申请日 2017.05.04

(71)申请人 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司

地址 011500 内蒙古自治区呼和浩特市和林格尔盛乐经济园区

(72)发明人 解鑫 许璐 任丽 喻东威 梁春梅 赵媛 宿烨 袁凤琴 李照 李秋琴 宋晓东

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

代理人 赵天月

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/77(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

组合试剂及利用其检测的方法

(57)摘要

本发明提出了组合试剂、组合试剂在酶联免疫检测中的用途、利用组合试剂检测的方法以及测定液态乳品中氯霉素含量的方法。所述组合试剂包括:第一试剂,所述第一试剂为结晶紫溶液;以及第二试剂,所述第二试剂为亚甲基蓝溶液。利用本发明的组合试剂能够有效地避免出现漏加或者重复添加等操作失误,从而提高了检测效率及准确率,降低成本。

CN 107192814 A

1.一种组合试剂,其特征在于,包括:

第一试剂,所述第一试剂为结晶紫溶液;以及

第二试剂,所述第二试剂为亚甲基蓝溶液。

2.根据权利要求1所述的组合试剂,其特征在于,所述结晶紫溶液的浓度为10%质量%。

3.根据权利要求1所述的组合试剂,其特征在于,所述亚甲基蓝溶液的浓度为10质量%。

4.权利要求1～3任一项所述组合试剂在酶联免疫检测中的用途。

5.利用权利要求1～3任一项所述组合试剂进行检测的方法,其特征在于,包括:

分别将酶结合物和抗体配制得到酶结合物工作液和抗体工作液;

将所述第一试剂和第二试剂分别独立地加入所述酶结合物工作液和抗体工作液之一中,以便得到不同颜色的染色酶结合物工作液和染色抗体工作液;以及

利用所述染色酶结合物工作液和染色抗体工作液对待测样品进行酶联免疫检测。

6.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述利用染色酶结合物工作液和染色抗体工作液对待测样品进行酶联免疫检测包括:

将空白样品加入空白孔中,将不同浓度标准品溶液加入不同标准品孔中,将样品加入样品孔中;

分别向所述标准品孔和样品孔中加入所述染色酶结合物工作液;

分别向所述标准品孔和样品孔中加入所述染色抗体工作液;

封板并进行孵育后,洗板;

向所述空白孔、标准品孔和样品孔中加入底物溶液,并进行孵育;以及

向所述空白孔、标准品孔和样品孔中加入终止液,并测定所得到的反应液的吸光值,计算得到所述待测样品中待测组分的含量。

7.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述结晶紫溶液或亚甲基蓝溶液与酶结合物工作液或抗体工作液之间的体积比为1:1000。

8.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,向所述酶结合物工作液中加入所述结晶紫溶液,向所述抗体工作液中加入所述亚甲基蓝溶液。

9.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述待测样品选自生牛乳以及液态乳制品。

10.一种测定液态乳品中氯霉素含量的方法,其特征在于,包括:

(1)提供下列至少之一:

10体积%的结晶紫母液;

10体积%的亚甲基蓝母液;

缓冲液;

酶标记氯霉素;

氯霉素特异性结合抗体;

TMB显色液;

0.1M硫酸;

包被液;

磷酸盐缓冲液；

氯霉素标准品；以及

待测乳品；

(2)分别将所述酶标记氯霉素和氯霉素特异性结合抗体与4mL缓冲液进行混合，以便得到酶结合物工作液和抗体工作液；

(3)按照1:1000的比例将所述结晶紫母液加入所述酶结合物工作液，混匀，得到染色酶结合物工作液；

(4)按照1:1000的比例将所述亚甲基蓝母液加入所述抗体工作液，混匀，得到染色抗体工作液；

(5)滴加100μL所述缓冲液于空白孔中，滴加50μL各标准品于不同的标准品孔中(标准品的浓度为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5和2.0ng/mL)；

(6)将所述待测乳品在3000g的转速下离心10分钟，取50μL中间层的液体滴加至样品孔中；

(7)分别滴加25μL所述染色酶结合物工作液于所述标准品孔和样品孔中；

(8)分别滴加25μL所述TMB显色液于所述标准品孔和样品孔中；

(9)用胶条封板，并摇板1min；

(10)2℃～8℃下在暗处孵育1小时；

(11)洗板时将微孔板上端朝下倒空各孔后，再平稳快速向下垂直甩动，并将微孔板倒置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体，用250～300μL/孔所述磷酸盐缓冲液注入全部板孔，再次倒掉微孔中液体，重复上述操作3遍；

(12)分别将100μL所述TMB显色液加入所述空白孔、标准品孔和样品孔中，20～25℃下暗处温育30min；

(13)分别将100μL所述硫酸加入所述空白孔、标准品孔和样品孔中；以及

(14)立即在450nm波长下读取步骤(13)所得到的反应液的吸光值，并计算得到所述液态乳品中氯霉素含量。

组合试剂及利用其检测的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品领域。具体地，本发明涉及组合试剂及利用其检测的方法。更具体地，本发明涉及组合试剂、组合试剂在酶联免疫检测中的用途、利用组合试剂检测的方法以及测定液态乳品中氯霉素含量的方法。

背景技术

[0002] 试剂盒广泛的应用于乳及乳制品中毒素、激素、抗生素等残留量的检测，具有快速、准确和方便等优点。

[0003] 然而，目前的试剂盒仍有待开发。

发明内容

[0004] 本发明旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明提出了组合试剂、其在酶联免疫检测中的用途、利用组合试剂检测的方法以及测定液态乳品中氯霉素含量的方法。由此，利用本发明的组合试剂进行酶联免疫检测能够有效地避免出现漏加或者重复添加等操作失误，从而提高了检测效率及准确率，降低成本。

[0005] 需要说明的是，本发明是基于发明人的下列发现而完成的：

[0006] 目前，酶标记物工作液及抗体工作液通常是透明无色的，不易辨别是否加入反应体系中，即加入这两种液体后，反应体系无肉眼可见的颜色变化。另外，其加入量通常较少，仅为几十微升，加入后液面无明显肉眼可见的变化。因此，不易准确、快速地判断是否出现漏加或者重复添加等操作失误。然而，这两种试剂的添加与否会显著影响检测结果的准确性。

[0007] 有鉴于此，发明人经过大量实验，提出了在酶标记物工作液及抗体工作液中加入染色剂的构思，以便区别这两个颜色。进一步地，发明人发现，结晶紫和亚甲基蓝作为染色剂的效果较好，各自独立地加入酶标记物工作液或者抗体工作液中，能够得到颜色明显不同的两种工作液。将所得到的两种工作液加入反应体系中，会发现明显地、肉眼可见的颜色变化，从而可以推断出是否出现漏加或者重复添加等操作失误。由此，提高了检测效率及准确率，降低成本。

[0008] 为此，在本发明的一个方面，本发明提出了一种组合试剂。根据本发明的实施例，所述组合试剂包括：第一试剂，所述第一试剂为结晶紫溶液；以及第二试剂，所述第二试剂为亚甲基蓝溶液。发明人发现，以结晶紫和亚甲基蓝作为染色剂，各自独立地与酶标记物工作液及抗体工作液进行混合，以便区分酶标记物工作液及抗体工作液。将这两种工作液加入反应体系中，会发现明显地、肉眼可见的颜色变化，从而可以推断出是否出现漏加或者重复添加等操作失误。由此，利用根据本发明实施例的组合试剂进行酶联免疫检测能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0009] 根据本发明的实施例，上述组合试剂还可以具有下列附加技术特征：

[0010] 根据本发明的实施例，所述结晶紫溶液的浓度为10％质量％。由此，利用根据本发

明实施例的组合试剂进行酶联免疫检测能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0011] 根据本发明的实施例，所述亚甲基蓝溶液的浓度为10质量%。由此，利用根据本发明实施例的组合试剂进行酶联免疫检测能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0012] 在本发明的另一方面，本发明提出了前面所述组合试剂在酶联免疫检测中的用途。利用前面所述组合试剂进行酶联免疫检测，能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0013] 在本发明的又一方面，本发明提出了一种利用前面所述组合试剂检测的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：分别将酶结合物和抗体配制得到酶结合物工作液和抗体工作液；将所述第一试剂和第二试剂分别独立地加入所述酶结合物工作液和抗体工作液之一中，以便得到不同颜色的染色酶结合物工作液和染色抗体工作液；以及利用所述染色酶结合物工作液和染色抗体工作液对待测样品进行酶联免疫检测。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0014] 根据本发明的实施例，所述利用染色酶结合物工作液和染色抗体工作液对待测样品进行酶联免疫检测包括：将空白样品加入空白孔中，将不同浓度标准品溶液加入不同标准品孔中，将样品加入样品孔中；分别向所述标准品孔和样品孔中加入所述染色酶结合物工作液；分别向所述标准品孔和样品孔中加入所述染色抗体工作液；封板并进行孵育后，洗板；向所述空白孔、标准品孔和样品孔中加入底物溶液，并进行孵育；以及向所述空白孔、标准品孔和样品孔中加入终止液，并测定所得到的反应液的吸光值，计算得到所述待测样品中待测组分的含量。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0015] 根据本发明的实施例，所述结晶紫溶液或亚甲基蓝溶液与酶结合物工作液或抗体工作液之间的体积比为1:1000。根据本发明的优选实施例，向所述酶结合物工作液中加入所述结晶紫溶液，向所述抗体工作液中加入所述亚甲基蓝溶液。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0016] 根据本发明的实施例，所述待测样品选自生牛乳以及液态乳制品。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0017] 在本发明的又一方面，本发明提出了一种测定液态乳品中氯霉素含量的方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：(1)提供下列至少之一：10体积%的结晶紫母液；10体积%的亚甲基蓝母液；缓冲液；酶标记氯霉素；氯霉素特异性结合抗体；TMB显色液；0.1M硫酸；包被液；磷酸盐缓冲液；氯霉素标准品；以及待测乳品；(2)分别将所述酶标记氯霉素和氯霉素特异性结合抗体与4mL缓冲液进行混合，以便得到酶结合物工作液和抗体工作液；(3)按照1:1000的比例将所述结晶紫母液加入所述酶结合物工作液，混匀，得到染色酶结合物工作液；(4)按照1:1000的比例将所述亚甲基蓝母液加入所述抗体工作液，混匀，得到染色抗体工作液；(5)滴加100μL缓冲液于空白孔中，滴加50μL各标准品于不同的标准品孔中(标准品的浓度为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5和2.0ng/mL)；(6)将所述待测乳品在3000g的转速下离心10分钟，取50μL中间层的液体滴加至样品孔中；(7)分别滴加25μL染色酶结合物工作液于所述标准品孔和样品孔中；(8)分别滴加25μL所述TMB显色液于所述标准品孔和样品孔中；(9)用胶条封板，并摇板1min；(10)2℃～8℃下在暗处孵育1小时；(11)洗板时将微

孔板上端朝下倒空各孔后，再平稳快速向下垂直甩动，并将微孔板倒置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体，用250～300μL/孔所述磷酸盐缓冲液注入全部板孔，再次倒掉微孔中液体，重复上述操作3遍；(12)分别将100μL所述TMB显色液加入所述空白孔、标准品孔和样品孔中，20～25℃下暗处温育30min；(13)分别将100μL所述硫酸加入所述空白孔、标准品孔和样品孔中；以及(14)立即在450nm波长下读取步骤(13)所得到的反应液的吸光值，并计算得到所述液态乳品中氯霉素含量。由此，根据本发明实施例的测定液态乳品中氯霉素含量的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0018] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

具体实施方式

[0019] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

[0020] 需要说明的是，术语“第一”、“第二”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地，在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上。

[0021] 本发明提出了组合试剂、组合试剂在酶联免疫检测中的用途、利用组合试剂检测的方法以及测定液态乳品中氯霉素含量的方法，下面将分别对其进行详细描述。

[0022] 组合试剂

[0023] 在本发明的一个方面，本发明提出了一种组合试剂。根据本发明的实施例，该组合试剂包括：第一试剂，所述第一试剂为结晶紫溶液；以及第二试剂，所述第二试剂为亚甲基蓝溶液。

[0024] 酶结合物以及抗体对于整个酶联免疫反应至关重要。由于这两个物质配成的工作液通常为透明无色的，不易辨别是否加入反应体系中，即加入这两种液体后，反应体系无肉眼可见的颜色变化。另外，其加入量通常较少，仅为几十微升，加入后液面无明显肉眼可见的变化。因此，不易准确、快速地判断是否出现漏加或者重复添加等操作失误，从而造成检测结果不准确。然而，这两种试剂的添加与否会显著影响检测结果的准确性。

[0025] 发明人发现，以结晶紫和亚甲基蓝作为染色剂，分别与酶标记物工作液及抗体工作液进行混合，以便通过颜色区分酶标记物工作液及抗体工作液。将所得到的两种工作液加入反应体系中，会发现明显地、肉眼可见的颜色变化，从而可以推断出是否出现漏加或者重复添加等操作失误。例如，将结晶紫与酶标记物工作液进行混合，得到紫色酶标记物工作液，将亚甲基蓝与抗体工作液进行混合，得到蓝色抗体工作液。可以先将紫色酶标记物工作液加入反应体系中，则反应体系变为紫色，进而可以通过颜色明显地、肉眼可见地判断出是否出现漏加或者重复添加酶标记物工作液等操作失误。接着，再将蓝色抗体工作液加入紫色的反应体系中，反应体系类似蓝紫色，明显区别于原先的紫色反应体系，进而能够判断出是否出现漏加或者重复添加抗体工作液等操作失误。

[0026] 另外，结晶紫和亚甲基蓝是发明人在众多染色剂中意外发现具有较好效果的染色剂，其不仅能够为反应体系提供明显地、肉眼可见的颜色变化，而且不会对检测结果造成影

响。其他染色剂的效果不佳，例如溴百里香酚兰和溴甲酚红。由此，利用根据本发明实施例的组合试剂能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0027] 根据本发明的实施例，结晶紫溶液的浓度为10％质量％，亚甲基蓝溶液的浓度为10质量％。由此，利用根据本发明实施例的组合试剂进行酶联免疫检测能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0028] 组合试剂在酶联免疫检测中的用途

[0029] 在本发明的另一方面，本发明提出了前面所描述组合试剂在酶联免疫检测中的用途。由此，利用前面所描述的组合试剂进行酶联免疫检测，能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0030] 本领域技术人员能够理解的是，前面针对组合试剂所描述的特征和优点，同样适用于该组合试剂在酶联免疫检测中的用途，在此不再赘述。

[0031] 利用组合试剂检测的方法

[0032] 在本发明的又一方面，本发明提出了一种利用前面所描述组合试剂检测的方法。根据本发明的实施例，方法包括：分别将酶结合物和抗体配制得到酶结合物工作液和抗体工作液；将第一试剂和第二试剂分别独立地加入酶结合物工作液和抗体工作液之一中，以便得到不同颜色的染色酶结合物工作液和染色抗体工作液；以及利用染色酶结合物工作液和染色抗体工作液对待测样品进行酶联免疫检测。

[0033] 发明人发现，以结晶紫和亚甲基蓝作为染色剂，分别独立地与酶标记物工作液及抗体工作液进行混合，以便通过颜色区分酶标记物工作液及抗体工作液。将所得到的两种工作液加入反应体系中，会发现明显地、肉眼可见的颜色变化，从而可以推断出是否出现漏加或者重复添加等操作失误。例如，将结晶紫与酶标记物工作液进行混合，得到紫色酶标记物工作液，将亚甲基蓝与抗体工作液进行混合，得到蓝色抗体工作液。可以先将紫色酶标记物工作液加入反应体系中，则反应体系变为紫色，进而可以通过颜色明显地、肉眼可见地判断出是否出现漏加或者重复添加酶标记物工作液等操作失误。接着，再将蓝色抗体工作液加入紫色的反应体系中，反应体系类似蓝紫色，明显区别于原先的紫色反应体系，进而能够判断出是否出现漏加或者重复添加抗体工作液等操作失误。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0034] 需要说明的是，根据本发明的实施例，“将结晶紫溶液和亚甲基蓝溶液分别独立地加入酶结合物工作液和抗体工作液之一中”是指将一种染色剂加入一种工作液中，将另一种染色剂加入另一种工作液中，使得到的两种工作液颜色不同，分别为紫色和蓝色。例如，可以将结晶紫溶液加入到酶结合物工作液中，亚甲基蓝溶液加入到抗体工作液中；或者将结晶紫溶液加入到抗体工作液中，亚甲基蓝溶液加入到酶结合物工作液中。根据本发明的优选实施例，向酶结合物工作液中加入结晶紫溶液，向抗体工作液中加入亚甲基蓝溶液。由此，利用根据本发明实施例的组合试剂能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0035] 根据本发明的实施例，利用染色酶结合物工作液和染色抗体工作液对待测样品进行酶联免疫检测包括：将空白样品加入空白孔中，将不同浓度标准品溶液加入不同标准品孔中，将样品加入样品孔中；分别向标准品孔和样品孔中加入染色酶结合物工作液；分别向标准品孔和样品孔中加入染色抗体工作液；封板并进行孵育后，洗板；向空白孔、标准品孔和样品孔中加入底物溶液，并进行孵育；以及向所述空白孔、标准品孔和样品孔中加入终止

液，并测定所得到的反应液的吸光值，计算得到所述待测样品中待测组分的含量。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0036] 根据本发明的实施例，结晶紫溶液或亚甲基蓝溶液与酶结合物工作液或抗体工作液之间的体积比为1:1000，即染色剂与工作液的体积比为1:1000。发明人经过大量实验得到较佳的体积比，由此，染色剂与工作液混合后所得到的染色酶结合物工作液和染色抗体工作液之间的颜色明显地、肉眼可见地不同。若结晶紫溶液或亚甲基蓝溶液的用量过多，加入后会稀释反应体系，易造成检测结果不准确，且增加了检测成本，另外过多地添加染色剂也容易引入过多杂质，造成检测结果不准确；若结晶紫溶液或亚甲基蓝溶液的用量过少，染色酶结合物工作液或染色抗体工作液的颜色较浅，加入体系后不易观察颜色变化，易出现漏加或者重复添加酶标记物工作液等操作失误。根据本发明的优选实施例，向酶结合物工作液中加入结晶紫溶液，向抗体工作液中加入亚甲基蓝溶液。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0037] 根据本发明的实施例，待测样品选自生牛乳以及液态乳制品。由此，根据本发明实施例的利用前面所述组合试剂检测的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0038] 本领域技术人员能够理解的是，前面针对组合试剂所描述的特征和优点，同样适用于该利用组合试剂检测的方法，在此不再赘述。

[0039] 测定液态乳品中氯霉素含量的方法

[0040] 在本发明的又一方面，本发明提出了一种测定液态乳品中氯霉素含量的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：(1)提供下列至少之一：10体积%的结晶紫母液；10体积%的亚甲基蓝母液；缓冲液；酶标记氯霉素；氯霉素特异性结合抗体；TMB显色液；0.1M硫酸；包被液；磷酸盐缓冲液；氯霉素标准品；以及待测乳品；(2)分别将酶标记氯霉素和氯霉素特异性结合抗体与4mL缓冲液进行混合，以便得到酶结合物工作液和抗体工作液；(3)按照1:1000的比例将结晶紫母液加入酶结合物工作液，混匀，得到染色酶结合物工作液；(4)按照1:1000的比例将亚甲基蓝母液加入抗体工作液，混匀，得到染色抗体工作液；(5)滴加100μL缓冲液于空白孔中，滴加50μL各标准品于不同的标准品孔中(标准品的浓度为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5和2.0ng/mL)；(6)将所述待测乳品在3000g的转速下离心10分钟，取50μL中间层的液体滴加至样品孔中；(7)分别滴加25μL染色酶结合物工作液于所述标准品孔和样品孔中；(8)分别滴加25μL所述TMB显色液于所述标准品孔和样品孔中；(9)用胶条封板，并摇板1min；(10)2℃～8℃下在暗处孵育1小时；(11)洗板时将微孔板上端朝下倒空各孔后，再平稳快速向下垂直甩动，并将微孔板倒置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体，用250～300μL/孔磷酸盐缓冲液注入全部板孔，再次倒掉微孔中液体，重复上述操作3遍；(12)分别将100μLTMB显色液加入空白孔、标准品孔和样品孔中，20～25℃下暗处温育30min；(13)分别将100μL硫酸加入空白孔、标准品孔和样品孔中；以及(14)立即在450nm波长下读取步骤(13)所得到的反应液的吸光值，并计算得到液态乳品中氯霉素含量。由此，根据本发明实施例的测定液态乳品中氯霉素含量的方法能够有效地提高检测效率及准确率，降低成本。

[0041] 需要说明的是，步骤(6)中，离心后的液体自上而下肉眼可见地分为脂肪层、中间层以及蛋白层，氯霉素主要存在于中间层中。

[0042] 本领域技术人员能够理解的是，前面针对组合试剂和利用组合试剂检测的方法同

样适用于该测定液态乳品中氯霉素含量的方法，在此不再赘述。

[0043] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0044] 实施例1

[0045] 在该实施例中，按照下列方法测定纯牛奶中氯霉素含量：

[0046] 1、试剂及溶液

[0047] 10体积%的结晶紫母液；

[0048] 10体积%的亚甲基蓝母液；

[0049] 荷兰EP氯霉素检测试剂盒，含有缓冲液、酶结合物(酶标记氯霉素)、抗体(氯霉素特异性结合抗体)、底物溶液(TMB显色液)、终止液(0.1M硫酸)、包被液以及洗涤液(磷酸盐缓冲液)；

[0050] 氯霉素标准品；以及

[0051] 纯牛奶。

[0052] 2、设备仪器。

[0053] 漩涡混合仪，移液器(10μL、100μL和1mL)，离心管(1.5mL、2mL和15mL)、离心机、洗板机、酶标仪。

[0054] 3、操作步骤

[0055] (1)将试剂盒恢复至室温20-25℃；

[0056] (2)分别将酶结合物和抗体与4mL缓冲液进行混合，以便得到酶结合物工作液和抗体工作液；

[0057] (3)按照1:1000的比例将结晶紫母液加入酶结合物工作液，混匀，得到染色酶结合物工作液；

[0058] (4)按照1:1000的比例将亚甲基蓝母液加入抗体工作液，混匀，得到染色抗体工作液；

[0059] (5)滴加100μL缓冲液于零标准品空白孔中、滴加50μL各标准品于不同的标准品孔中(标准品的浓度为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5和2.0ng/mL)；

[0060] (6)将待测乳品在3000g的转速下离心10分钟，取50μL中间层的液体滴加至样品孔中；

[0061] (7)分别滴加25μL染色酶结合物工作液于标准品孔和样品孔中；

[0062] (8)分别滴加25μL染色抗体工作液于标准品孔和样品孔中；

[0063] (9)用胶条封板，并摇板1min；

[0064] (10)2℃～8℃下在暗处孵育1小时；

[0065] (11)洗板时将微孔板上端朝下倒空各孔后，再平稳快速向下垂直甩动，并将微孔板倒置在吸水纸上拍打以除去孔中的液体，用250-300μL/孔洗涤液注入全部板孔，再次倒掉微孔中液体，重复上述操作3遍；

[0066] (12)分别将100μL底物溶液加入空白孔、标准品孔和样品孔中，20～25℃下暗处温育30min；

[0067] (13)分别将100μL终止液加入空白孔、标准品孔和样品孔中;以及

[0068] (14)立即在450nm波长下读取步骤(13)所得到的反应液的吸光值,并计算得到纯牛奶中氯霉素含量。

[0069] 4、结果判定

[0070] 依据吸光度值通过蝴蝶软件计算检测结果,定量检出限为0.1ng/mL。

[0071] 实施例2

[0072] 在该实施例中,按照下列方法测定回收率:

[0073] (1)以纯牛奶为本底加入标准品,标准品的添加浓度分别为0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL,得到不同浓度的加标样品;

[0074] (2)按照实施例1的方法测定不同加标样品中氯霉素含量,同时,以不添加染色剂作为对照组,并按照下列公式计算回收率:加标回收率=[(加标样品测定值-本底样品测定值)÷加标量]×100%。

[0075] 结果如下表所示,可以看出,染色剂的添加对样品检测结果无明显影响,每个样品经两种方法检测结果变异系数均≤12.3%,符合试剂盒板内变异系数要低于15%的要求;各加标浓度回收率介于82%-108.5%之间,符合试剂盒要求。说明本发明中结晶紫和亚甲基蓝的添加对于检测结果无显著影响,可以准确地测定样品中氯霉素含量。同时,能够为反应体系带来明显地、肉眼可见的颜色变化,从而避免出现漏加或者重复添加等操作失误。

[0076]

检测样品	用染色剂示踪酶联免疫试剂				未使用染色剂示踪酶联免疫试剂			
	检测结果(ng/mL)		回收率		检测结果(ng/mL)		回收率	
纯牛奶本底	0.036	0.042	/		0.046	0.048	/	
纯牛奶本底+0.1ng/mL 氯霉素	0.125	0.133	86%	94%	0.138	0.150	91%	103%
纯牛奶本底+0.2ng/mL 氯霉素	0.256	0.247	108.5%	104%	0.237	0.211	95	82%
纯牛奶本底+0.3ng/mL 氯霉素	0.295	0.312	85.3%	91%	0.327	0.301	93.3%	84.6%

[0077] 实施例3

[0078] 在该实施例中,研究染色剂对检测方法的精密度影响

[0079] (1)以纯牛奶为本底加入0.1ng/mL的氯霉素标准品,得到加标样品;

[0080] (2)按照实施例1的方法测定加标样品中氯霉素含量。

[0081] 结果如下表所示,可以看出,本底和加标样品各20组样品,CV分别为14.8%和8.0%,精密度满足要求。说明本发明中结晶紫和亚甲基蓝的添加对于检测结果无显著影响,可以准确地测定样品中氯霉素含量。同时,能够为反应体系带来明显地、肉眼可见的颜色变化,从而避免出现漏加或者重复添加等操作失误。

[0082]

样本名称	本底检测结果（ng/mL）	加标样品检测结果（ng/mL）
1	0.035	0.129
2	0.048	0.135
3	0.052	0.135
4	0.044	0.145
5	0.045	0.162
6	0.039	0.152
7	0.029	0.155
8	0.038	0.142
9	0.044	0.141
10	0.044	0.132
11	0.045	0.151
12	0.045	0.135

[0083]

13	0.035	0.136
14	0.035	0.166
15	0.045	0.152
16	0.055	0.142
17	0.045	0.165
18	0.048	0.155
19	0.047	0.125
20	0.038	0.152
平均值	0.0428	0.146
CV	14.8%	8.0%

[0084] 对比例1

[0085] 按照实施例2的方法测定回收率，区别在于，实施例1中，将结晶紫母液和亚甲基蓝母液分别替换为溴百里香酚兰和溴甲酚红。

[0086]

染色剂	溶液颜色
溴百里香酚兰	黄色
溴甲酚红	橙色

[0087] 如上表所示：二者颜色区分度并不大，分别与酶结合物和抗体溶液混合，加入微孔后，在牛奶为背景的情况下颜色区分更加不明显，不能满足检测要求，其中溴百里香酚兰颜色太淡，因此不再作为备选。

[0088] 对比例2

[0089] 按照实施例2的方法测定回收率，区别在于，实施例1中，将亚甲基蓝母液替换为溴甲酚红。

[0090] 如果是先加入溴甲酚红，之后再加结晶紫则很容易用肉眼判断；但如果是反过来，则肉眼不易观察，区分度不高。综上，如果选择用溴甲酚红替换亚甲基蓝母液，则必须注意染色剂和试剂的搭配，因为试剂的加入有先后顺序。便利性有一定程度的降低，而结晶紫和亚甲基蓝的组合则可以随意与试剂搭配，易于操作，失误率抵。

[0091] 对比例3

[0092] 按照实施例2的方法测定回收率，区别在于，实施例1中，将结晶紫母液和亚甲基蓝母液分别以2:1000的体积比独立地加入酶结合物工作液和抗体工作液。

[0093]

检测样品	用染色剂示踪酶联免疫试剂		未使用染色剂示踪酶联免疫试剂	
	检测结果（ng/mL）	回收率	检测结果（ng/mL）	回收率

[0094]

纯牛奶本底	0.036	0.036	/		0.046	0.048	/	
纯牛奶本底+0.1ng/mL 氯霉素	0.188	0.192	152%	156%	0.138	0.150	91%	103%
纯牛奶本底+0.2ng/mL 氯霉素	0.358	0.385	161%	174%	0.237	0.211	95	82%
纯牛奶本底+0.3ng/mL 氯霉素	0.465	0.482	143%	149%	0.327	0.301	93.3%	84.6%

[0095] 如上表所示：染色剂的含量增加后，检测结果的回收率产生明显的上升，可能的原因是染色剂中的杂质对抗原抗体的结合产生了一定的影响，从而导致酶结合物的结合率降低，催化底物显色较浅，结果偏高。

[0096] 对比例4

[0097] 按照实施例2的方法测定回收率，区别在于，实施例1中，将结晶紫母液和亚甲基蓝母液分别以1:1500的体积比独立地加入酶结合物工作液和抗体工作液。

[0098]

检测样品	用染色剂示踪酶联免疫试剂				未使用染色剂示踪酶联免疫试剂			
	检测结果（ng/mL）		回收率		检测结果（ng/mL）		回收率	
纯牛奶本底	0.036	0.036	/		0.046	0.048	/	
纯牛奶本底+0.1ng/mL 氯霉素	0.125	0.133	95%	109%	0.138	0.150	91%	103%
纯牛奶本底+0.2ng/mL 氯霉素	0.256	0.247	98%	115%	0.237	0.211	95	82%
纯牛奶本底+0.3ng/mL 氯霉素	0.295	0.312	85%	99%	0.327	0.301	93.3%	84.6%

[0099] 如上表所示，染色剂浓度较低时检测回收率无明显变化，但低浓度的染色剂显色效果较差，不能形成明显的色差比对，达到肉眼易于区分的目的。

[0100] 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0101] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

专利名称(译)	组合试剂及利用其检测的方法		
公开(公告)号	CN107192814A	公开(公告)日	2017-09-22
申请号	CN201710308814.5	申请日	2017-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
[标]发明人	解鑫 许璐 任丽 喻东威 梁春梅 赵媛 宿烨 袁凤琴 李照 李秋琴 宋晓东		
发明人	解鑫 许璐 任丽 喻东威 梁春梅 赵媛 宿烨 袁凤琴 李照 李秋琴 宋晓东		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 G01N21/77		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N21/77 G01N33/581 G01N2021/775		
代理人(译)	赵天月		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了组合试剂、组合试剂在酶联免疫检测中的用途、利用组合试剂检测的方法以及测定液态乳品中氯霉素含量的方法。所述组合试剂包括：第一试剂，所述第一试剂为结晶紫溶液；以及第二试剂，所述第二试剂为亚甲基蓝溶液。利用本发明的组合试剂能够有效地避免出现漏加或者重复添加等操作失误，从而提高了检测效率及准确率，降低成本。

检测样品	用染色剂示踪酶联免疫试剂				未使用染色剂示踪酶联免疫试剂			
	检测结果（ng/mL）		回收率		检测结果（ng/mL）		回收率	
纯牛奶本底	0.036	0.042	/		0.046	0.048	/	
纯牛奶本底+0.1ng/mL 氯霉素	0.125	0.133	86%	94%	0.138	0.150	91%	103%
纯牛奶本底+0.2ng/mL 氯霉素	0.256	0.247	108.5%	104%	0.237	0.211	95	82%
纯牛奶本底+0.3ng/mL 氯霉素	0.295	0.312	85.3%	91%	0.327	0.301	93.3%	84.6%