

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510060995.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 176623A

[22] 申请日 2005.10.8

[21] 申请号 200510060995.1

[71] 申请人 中华人民共和国上海出入境检验检疫局

地址 200135 上海市浦东新区民生路1208号

共同申请人 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所

[72] 发明人 郭德华 李健 王权 龚朋飞
薛飞群 顾惠明 陈永军 陈燕军

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司
代理人 冯子玲

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

水产品中孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒

[57] 摘要

本发明为一种水产品中无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒。试剂盒的检测板为包被无色孔雀石绿与白蛋白偶联物的可拆 96 孔酶标板，抗无色孔雀石绿抗体为利用无色孔雀石绿与白蛋白的偶联物免疫小鼠而制备的单克隆抗体，检测样品先经过匀质后用乙酸乙酯和环己烷进行提取，调节 pH 值后稀释用于检测。样本检测的判定标准为：以标样浓度的对数值为横坐标，抑制率为纵坐标的回归曲线。根据每个样品的抑制率就可从曲线上读出相对应样品的浓度。该方法检测的灵敏度为 $0.0023 \mu\text{g/ml}$ ，检测范围是 $0.0016 - 1 \mu\text{g/ml}$ 。本发明试剂盒的操作简单，能较好满足目前对水产品孔雀石绿残留检测的迫切的需要，用于海关检测、食品卫生部门检测等，易于大范围推广应用。

1、无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒，试剂盒内设有微孔检测板，单抗冻干物，酶标二抗，样品稀释液，10×浓缩洗涤液，显色物 A，显色液 B、终止液和标准溶液，其特征在于：微孔检测板为包被无色孔雀石绿与白蛋白偶联物（LMG-RSA 或 LMG-OVA）的可拆 96 孔酶标板，标准溶液为无色孔雀石绿（LMG）标准溶液。

2、根据权利要求 1 所述的一种无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒，其特征在于微孔检测板的最佳制备方案为：用 pH9.6 的 0.2M 碳酸盐缓冲液作包被液，将无色孔雀石绿与白蛋白偶联物（LMG-RSA 或 LMG-OVA）稀释至 2 μ g/ml，按 100 μ l/孔加入聚苯乙烯微孔板中，4 $^{\circ}$ C 包被过夜，甩干，按 200 μ l/孔加入含 1% 明胶，PH7.4 的磷酸盐缓冲液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时，洗涤甩干，再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，装入含干燥剂的包装袋中保存。

3、根据权利要求 1 所述的一种无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说单抗冻干物为利用无色孔雀石绿与白蛋白的偶联物免疫小鼠及单抗制备技术制备的抗无色孔雀石绿单克隆抗体，可与无色孔雀石绿特异结合。

4、根据权利要求 1 所述的一种无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所述样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)，10×浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)，显色物 A 为邻苯二胺（OPD），显色液 B 为含 0.5% 过氧化氢的柠檬酸—磷酸盐缓冲液，无色孔雀石绿单抗为 10 μ l 提纯的单抗加 50 μ l 牛血清/管冻干物，终止液为 2M 硫酸溶液，LMG 标准溶液的配制为：精确称取 LMG 10 mg，先用 0.1 ml 0.1 mol / L 盐酸溶解，然后用 ddH₂O 稀释到 10ml，用 ddH₂O 配制系列浓度为 0, 1.6, 8, 40, 200, 1000 ng/ml 的标准 LMG 溶液。

5、根据权利要求 1 所述的一种无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒，其检测程序为：

(1) 将 10×浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；(2) 将待检样品匀质并用乙酸乙酯和环己烷进行提取，调节 PH 值为 7 左右后用稀释液作 1:4 稀释；(3) 于部分微孔中分别加入 50 μ l 标准溶液，在另外微孔中加入 50 μ l 已完成前处理的检测样品溶液，在一孔中加入 100 μ l 洗涤液作不加单抗的对照孔；(4) 除对照孔外，再于每一微孔中加入 50 μ l 适当稀释的抗无色孔雀石绿单抗，37 $^{\circ}$ C 孵育 120 分钟，甩干，每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(5) 每孔加 100 μ l 的 1: 1000 稀释的羊抗鼠 Ig-HRP，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟，甩干，

每孔加洗涤液 200 μ l, 洗涤 6 次, 每次间隔 1 分钟, 拍干; (6) 将显色液 B 全移入显色物 A 中, 溶解混匀后, 在每微孔中加 100 μ l 显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10-15 分钟; (7) 加 50 μ l 终止液, 用酶标仪在 490nm 波长下读取每孔光吸收值。

6、根据权利要求 5 所述的一种无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒, 所述步骤 (2) 的具体做法为: (a) 取剪碎样品置入离心管中, 按每克样品加入 2mL 加入乙酸乙酯, 充分打碎匀质; (b) 4000 rpm/min 离心 10min, 取上清在 50 $^{\circ}$ C 水浴下氮气流吹干样品; (c) 以等量环己烷和蒸馏水混合提取涡旋 1 分钟, 取环己烷层, 按每克样品加入 12.5 μ l 加入 1M HCl, 涡旋 1 分钟, 静置 30min; (d) 加入 2 倍于 HCl 液量的蒸馏水, 8000 rpm/min 离心 10min, 弃去上层环己烷, 吸取下层清液, 用 1N NaOH 调整到 pH 6.0~8.0, 与稀释液进行 4 倍稀释后, 取 50 μ l 进行分析。

水产品中孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及水产类肉食品一种药物的快速诊断方法和器具，具体是孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒

背景技术

无色孔雀石绿（Leucomalachite green, LMG）是孔雀石绿（malachite green, MG）在生物体内主要代谢残留物，对人类有致癌危险。

孔雀石绿又称为苯胺绿、维多利亚绿或中国绿，是一种具有金属光泽的绿色晶体，溶于水、乙醇和甲醇，水溶液的颜色为蓝绿色（最大吸收波长为 618nm），最早在 1913 年有人发现孔雀石绿等染料可破坏病原菌而不引起宿主损害，从而使这些染料用做防腐剂、杀锥虫药和其它医疗作用。自磺胺类药物和其它抗菌素的出现，孔雀石绿作为抗菌素在畜牧业中的应用已日渐衰退。然而在水产养殖中由于价格低廉和抗菌、抗真菌效果好，广泛用于进行水体消毒和防止鱼水霉病。

近年来发现孔雀石绿特别是其代谢物在水产体内有明显的蓄积残留现象，残留时间也较长。由于其化学官能团三苯甲烷是一种致癌物质，所以国外一些发达国家，如欧盟、美国已宣布禁止其在经济鱼类（观赏鱼除外）养殖过程中使用。我国农业部发布的《无公害食品 中华绒螯蟹》（NY5064-2001）和农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》文件（农牧发[2002]1号）中明确规定所有可食组织中禁用孔雀石绿。

《2000 年度中国出口动物源性食品中有毒有害物质残留监控计划》首次将鳗鱼中孔雀石绿项目的监控列入年度计划，并延续至今。试验证实孔雀石绿在动物体内 8 小时后 50% 转变为无色孔雀石绿，24 小时后 84% 转变成无色孔雀石绿，而长期滞留在组织中。国内外检测 MG 主要采用以色谱技术（HPLC）检测技术，虽然灵敏、定量准确，但大批量检测时速度慢，成本相对较高。以竞争性酶联免疫法（ELISA）为代表的快速筛选法是免疫学主流技术，快速、成本低、可以大批量检测，国内外尚无该技术报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种运用抗无色孔雀石绿单抗建立的孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒。

本发明的目的是这样实现的：采用无色孔雀石绿与白蛋白偶联物作为抗原包被可拆 96

孔酶标板，然后同时加入经前处理过的待测样品和抗无色孔雀石绿单克隆抗体，让两者竞争抗体以检测样品中的 LMG。具体如下：

本发明的检测试剂盒内设有微孔检测板，单抗冻干物，酶标二抗，样品稀释液，10×浓缩洗涤液，显色物 A，显色液 B、终止液和标准溶液，微孔检测板为包被无色孔雀石绿与白蛋白偶联物（LMG-RSA 或 LMG-OVA）的可拆 96 孔酶标板，标准溶液为无色孔雀石绿（LMG）标准溶液。

微孔检测板的最佳制备方案为：用 pH9.6 的 0.2M 碳酸盐缓冲液作包被液，将无色孔雀石绿与白蛋白偶联物（LMG-RSA 或 LMG-OVA）稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，按 100 μl /孔加入聚苯乙烯微孔板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜，甩干，按 200 μl /孔加入含 1%明胶，PH7.4 的磷酸盐缓冲液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 小时，洗涤甩干，再加入 20%蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，装入含干燥剂的包装袋中保存。

上述单抗冻干物为利用无色孔雀石绿与白蛋白的偶联物免疫小鼠及单抗制备技术制备的抗无色孔雀石绿单克隆抗体，可与无色孔雀石绿特异结合。

上述样品稀释液为含 0.05%吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)，10×浓缩洗涤液为含 0.5%吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)，显色物 A 为邻苯二胺（OPD），显色液 B 为含 0.5%过氧化氢的柠檬酸—磷酸盐缓冲液，无色孔雀石绿单抗为 10 μl 提纯的单抗加 50 μl 牛血清/管冻干物，终止液为 2M 硫酸溶液，LMG 标准溶液的配制为：精确称取 LMG 10 mg，先用 0.1 ml 0.1 mol / L 盐酸溶解，然后用 ddH₂O 稀释到 10ml，用 ddH₂O 配制系列浓度为 0, 1.6, 8, 40, 200, 1000 ng/ml 的标准 LMG 溶液。

本发明无色孔雀石绿间接竞争 ELISA 检测试剂盒的检测程序为：

(1) 将 10×浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；(2) 将待检样品匀质并用乙酸乙酯和环己烷进行提取，调节 PH 值为 7 左右后用稀释液作 1:4 稀释；(3) 于部分微孔中分别加入 50 μl 标准溶液，在另外微孔中加入 50 μl 已完成前处理的检测样品溶液，在一孔中加入 100 μl 洗涤液作不加单抗的对照孔；(4) 除对照孔外，再于每一微孔中加入 50 μl 适当稀释的抗无色孔雀石绿单抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 分钟，甩干，每孔加洗涤液 200 μl ，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(5) 每孔加 100 μl 的 1: 1000 稀释的羊抗鼠 Ig-HRP，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 分钟，甩干，每孔加洗涤液 200 μl ，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(6) 将显色液 B 全移入显色物 A 中，溶解混匀后，在每微孔中加 100 μl 显色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10-15 分钟；(7) 加 50 μl 终止液，用酶标仪在 490nm 波长下读取每孔光吸收值。

上述步骤(2)的具体做法为：(a)取剪碎样品置入离心管中，按每克样品加入2mL计加入乙酸乙酯，充分打碎匀质；(b)4000 rpm/min离心10min，取上清在50℃水浴下氮气流吹干样品；(c)以等量环己烷和蒸馏水混合提取涡旋1分钟，取环己烷层，按每克样品加入12.5μl计加入1M HCl，涡旋1分钟，静置30min；(d)加入2倍于HCl液量的蒸馏水，8000 rpm/min离心10min，弃去上层环己烷，吸取下层清液，用1N NaOH调整到pH 6.0~8.0，与稀释液进行4倍稀释后，取50μL进行分析。

本发明孔雀石绿间接竞争ELISA检测试剂盒，其检测样本的判定标准为：先计算标准样品抑制率(B/B₀)，然后以抑制率为纵坐标，以标样无色孔雀石绿浓度的对数值为横坐标，做标准曲线；根据每个样品的B/B₀值就可从曲线上读出相对应的无色孔雀石绿的浓度。

本发明有益的积极效果是：操作简单，能较好满足目前对水产品孔雀石绿残留检测的迫切的需要，用于海关检测、食品卫生部门检测等，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

本发明具有下列优点：

(1) 特异性强，敏感性高，安全性好。抗无色孔雀石绿单抗间接竞争ELISA检测试剂盒以人工合成纯抗原制备的单克隆抗体为基础制备的而成；不含针对载体蛋白的抗体，只与相应无色孔雀石绿特异结合或与含同一母环结构的孔雀石绿部分结合，不与水产动物其它抗生素药物和消毒药发生交叉反应。因此具有很高的特异性和敏感性。

(2) 操作简便快速。使用孔雀石绿间接竞争ELISA检测试剂盒检测无色孔雀石绿时，无需另配其它试剂，样品无需无菌处理，按试剂盒说明在5-6小时内即可判定检测结果。

(3) 结果判定形象、准确、可靠。孔雀石绿间接竞争ELISA检测试剂盒以显色的深浅定性显示检测结果，即检测孔出现桔黄色显色为阴性，中止后呈黄色或棕色，无色和较浅色为阳性，结果判定形象。采用酶标仪机读数定量显示检测结果，减少主观性，准确可靠。

(4) 成本低，批量检测。孔雀石绿间接竞争ELISA检测试剂盒可批量检测，一步到位，成本低廉，投资少，见效快。

附图说明

图1为LMG标准抑制曲线，图中的纵坐标为抑制率=OD(加入LMG)/OD(未加入LMG)横坐标为LMG溶液浓度的对数。

图2为检验试剂盒的不同浓度标准溶液的吸光值变异系数(CV%)图，图中的纵坐标为变异系数(CV%)，横坐标为LMG溶液浓度的对数。

具体实施方式

根据本发明的技术方案，具体制备如下：

(1) 无色孔雀石绿微孔检测板的制备

用 pH9.6 的 0.2M 碳酸盐缓冲液作包被液，将无色孔雀石绿与白蛋白偶联物 (LMG-RSA 或 LMG-OVA) 稀释至 2 μ g/ml，按 100 μ l/孔加入聚苯乙烯微孔板中，4 $^{\circ}$ C 包被过夜，甩干，按 200 μ l/孔加入含 1%明胶的 0.01 M PH7.4 的磷酸盐缓冲液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时，洗涤甩干，再加入 20%蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，装入含干燥剂的包装袋中保存。

(2) 样品稀释液、洗涤液、单抗稀释，终止液的配制

样品或血清稀释液为含 0.05%吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8g, 定容至 1000ml, pH7.4, 再加 0.5ml 吐温-20); 10 \times 浓缩洗涤液为含 0.5%吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (KH_2PO_4 2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g, NaCl 80g, 定容至 1000ml, pH7.4, 再加 5ml 吐温-20); 单抗稀释：在单抗管中加入 500 μ l 稀释液，取部分抗体稀释液再稀释 200-500 倍；终止液为 2M 硫酸溶液，即量取 111.2ml 浓硫酸(18M)稀释定容至 1000ml。

(3) 无色孔雀石绿标准溶液的制备

LMG 标准溶液的配制：精确称取 LMG 10 mg，先用 0.1 ml 0.1 mol / L 盐酸溶解，然后用 ddH₂O 稀释到 10ml。用 ddH₂O 配制系列浓度为 0, 0.32, 1.6, 8, 40, 200, 1000 ng/ml 的标准 LMG 溶液。

(4) 显色液的配制

称取 2mg 邻苯二胺 (OPD) 作为显色 A 装入 6ml 小瓶中；取 PH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 5.9ml 加入 3%过氧化氢 100 μ l 配制成显色液 B；PH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液配制： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.84g，柠檬酸 0.467g 加蒸馏水到 50ml。

(5) 样品前处理：

鱼肉样品的前处理：1) 取 4g 已剪碎样品置入离心管中，再加入 8mL 乙酸乙酯，在匀质机下充分打碎；2) 然后离心 4000 rpm/min 10min，取上清在 50 $^{\circ}$ C 水浴下氮气流吹干样品；3) 以 1ml 环己烷和 1ml 蒸馏水混合提取涡旋 1 分钟，取环己烷层；加入 50 μ l 1M HCl，涡旋 1 分钟，静置 30min；4) 加入 0.1 ml 蒸馏水，离心 8000 rpm/min 10min，弃去上层环己烷，吸取下层清液（若有乳化现象，请先将大部分上层液-正己烷取出后，再将玻璃管置入 80 $^{\circ}$ C 水中，隔水加热约 5~10 分钟，可改善乳化情形）。用 1N NaOH 调整到 pH 6.0~8.0，与稀释液进行 4 倍稀释后，取 50 μ l 进行分析。

(6) 试剂盒检测操作程序

其检测程序为：(1) 将 10 \times 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；(2) 将待检鱼肉样品匀

质并用乙酸乙酯和环己烷进行提取，调节 PH 值为 7 左右后用稀释液作 1:4 稀释，(3) 于适当微孔中分别加入 50 μ l 标准溶液，在另外的微孔中加入 50 μ l 已完成前处理的样品溶液，在一孔中加入 100 μ l 洗涤液作不加单抗的对照孔用于测定 OD 值时的对照孔。(4) 除对照孔外，再于每一微孔中加入 50 μ l 适当稀释的抗无色孔雀石绿单抗，37 $^{\circ}$ C 孵育 120 分钟，甩干，每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(5) 每孔加 100 μ l 的 1: 1000 稀释的羊抗鼠 Ig-HRP，37 $^{\circ}$ C 孵育 90 分钟，甩干；每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(6) 将显色液 B 全移入显色物 A 瓶中，溶解混匀后，在每微孔中加 100 μ l 显色液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10-15 分钟；(5) 加 50 μ l 终止液，用酶标仪在 490nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD_{490nm} 值)。

(7) 结果判定标准

根据每个样品的 B/B₀ 值就可从曲线上读出相对应的无色孔雀石绿浓度，再乘以相应稀释倍数。

为验证本发明效果的可靠性，进行以下鉴定：

(1) LMG 标准抑制曲线与灵敏度

取已经封闭好的酶标板，将配好的系列 LMG 标准溶液 (0、1.6、8、40、200、1000ppb) 50 μ L/孔与稀释 2 万倍的双抗工作液 50 μ L/孔于酶标板孔中混合，在一孔中加入 100 μ l 洗涤液作不加单抗的对照孔，37 $^{\circ}$ C 于 37 $^{\circ}$ C 温育 2h，洗板；加 1:1000 HRP 酶标羊抗鼠 (二抗)，100 μ L/孔，于 37 $^{\circ}$ C 温育 1.5h，洗板；每孔加新鲜配制的 OPD 低物显色液 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 暗室反应 15min；加入 2mol/L H₂SO₄ 50 μ l 终止显色反应，用酶标仪于波长 490nm 下判读。以抑制率 I 为纵坐标，LMG 溶液浓度的对数为横坐标，绘制出标准曲线。抑制率 $I = B / B_0$ (B 为样品 OD 值，B₀ 为空白对照 OD 值)。竞争 ELISA 结果及相关参数见表 1，标准抑制曲线见图 1

表 1 间接竞争 ELISA 结果的相关参数

LMG 标准液浓度 (μ g/ml)	LMG 浓度 对数	OD 均值 (B)	抑制率 (B/B ₀)	标准差 (SD)	变异系数 (CV%)
5	0.7	0.012	0.011	0.00134	12.48
1	0	0.077	0.070	0.00732	10.394
0.2	-0.7	0.424	0.388	0.02843	7.3275
0.04	-1.4	0.699	0.638	0.03147	4.9301
0.008	-2.1	0.825	0.754	0.03462	4.5939
0.0016	-2.8	0.943	0.860	0.03163	3.6798
0		1.096	1	0	0

回归曲线方程为 $Y = -0.0814X^2 - 0.5058X + 0.0731$, $R^2 = 0.9979$

从图 1 可看到 0.0016—1 $\mu\text{g/ml}$ 范围内 (B/B₀) 与 LMG 浓度的对数值呈一元二次曲线关系, 相关系数为 $r=0.9979$, 用 B₀-3SD 外推法经计算灵敏度为 0.0023 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) 结果再现性

针对 LMG 检验试剂盒的精密度测试, 批间重复 6 次, 所得不同浓度标准溶液的吸光值变异系数 (CV%) 如图 2 所示, 显示本产品有很高的再现性:

(3) 回收率计算

取在 4g 空白鱼肉中加入无色孔雀石绿标样, 提取液作适当稀释后, 进行 ELISA 测定。根据 OD 值及 B / B₀ 值从标准曲线查得无色孔雀石绿含量后再乘以相应稀释倍数即为样品中无色孔雀石绿的含量, 然后计算回收率 见表 2。

样品中添加 LMG 量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	测定的 LMG 的量	回收率%
250	265 \pm 12.4	106 \pm 4.85
125	120 \pm 5.5	96 \pm 4.4
12.5	11.5 \pm 0.8	92 \pm 6.4
2.5	2.8 \pm 0.20	112 \pm 6.0

从上表可看出回收率 92-112%

(4) 结果特异性

针对以下药物运用竞争 ELISA 进行特异性交叉反应测试, 结果如下:

药物	交叉反应 (%)
无色孔雀绿	100
孔雀石绿	36.56
副品红	< 0.02
结晶紫	< 0.06
甲基兰	< 0.02
氯霉素	< 0.02
己烯雌酚	< 0.02
四环素	< 0.02

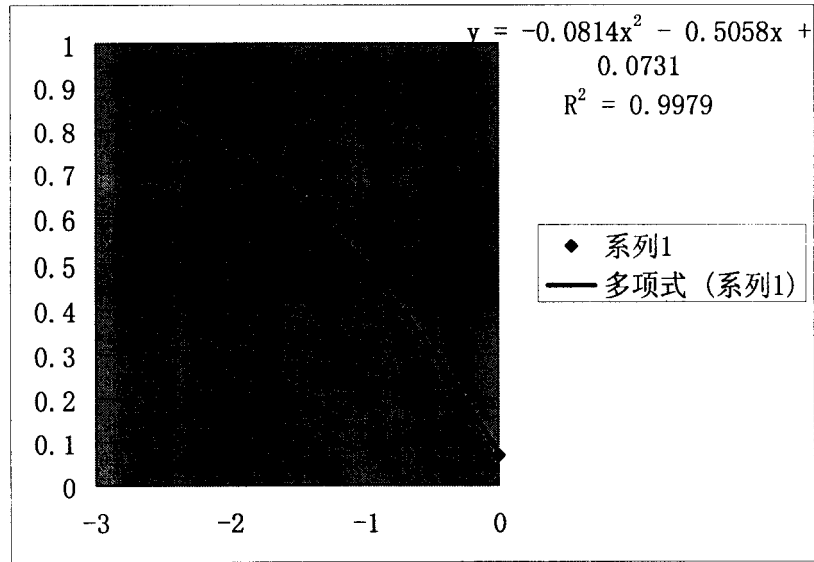


图 1

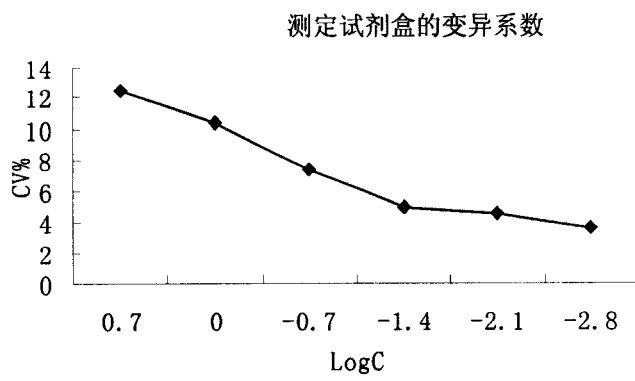


图 2

专利名称(译)	水产品中孔雀石绿间接竞争ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1766623A	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510060995.1	申请日	2005-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国上海出入境检验检疫局 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国上海出入境检验检疫局 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所		
[标]发明人	郭德华 李健 王权 龚朋飞 薛飞群 顾惠明 陈永军 陈燕军		
发明人	郭德华 李健 王权 龚朋飞 薛飞群 顾惠明 陈永军 陈燕军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/15 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为一种水产品中无色孔雀石绿间接竞争ELISA检测试剂盒。试剂盒的检测板为包被无色孔雀石绿与白蛋白偶联物的可拆96孔酶标板，抗无色孔雀石绿抗体为利用无色孔雀石绿与白蛋白的偶联物免疫小鼠而制备的单克隆抗体，检测样品先经过匀质后用乙酸乙酯和环己烷进行提取，调节pH值后稀释用于检测。样本检测的判定标准为：以标样浓度的对数值为横坐标，抑制率为纵坐标的回归曲线。根据每个样品的抑制率就可从曲线上读出相对应样品的浓度。该方法检测的灵敏度为0.0023μg/ml，检测范围是0.0016 - 1μg/ml。本发明试剂盒的操作简单，能较好满足目前对水产品孔雀石绿残留检测的迫切的需要，用于海关检测、食品卫生部门检测等，易于大范围推广应用。

