



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107807235 A

(43)申请公布日 2018.03.16

(21)申请号 201711055603.1

(22)申请日 2017.11.01

(71)申请人 郑州欧柯奇仪器制造有限公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发区翠竹街1号企业总部基地园区28号楼29号楼

(72)发明人 宋俊奇 白长江 陈冲 秦志洋

(74)专利代理机构 河南科技通律师事务所

41123

代理人 樊羿 张晓辉

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

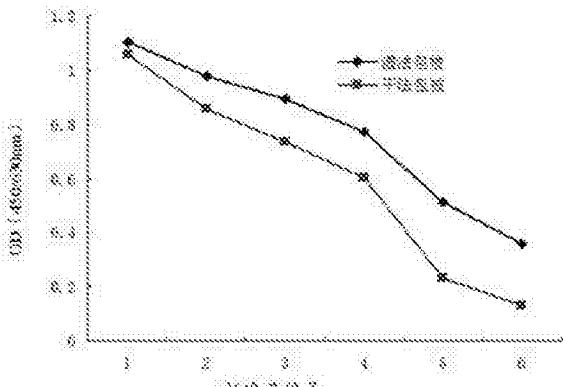
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

克仑特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种克仑特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用，旨在解决克仑特罗不具备免疫原性和传统酶标板包被方法需要过夜存放的问题。该试剂盒包括包被的偶联克仑特罗的抗原蛋白，其制备方法为：取亚硝酸钾溶于蒸馏水中配置成的亚硝酸钾溶液；以H₂SO₄溶解克仑特罗；冷却后缓慢加入亚硝酸钾溶液并不断搅拌，静置；将载体蛋白溶于磷酸盐缓冲液中；将重氮化克仑特罗加入，保持酸碱度稳定，过夜；用PBS透析偶连后的产物直至透析液中检测不出任何小分子物质；将偶连后的产物过滤，分装保存；取酶标板，每孔加入克仑特罗完全抗原，干燥后封闭；反复洗涤后固定，干燥后即得。本发明检测特异性强，试剂用量少，缩短试剂盒制作周期。



1. 一种克仑特罗ELISA检测试剂盒,其特征在于,含干法包被有偶联克仑特罗的抗原蛋白的酶标板。

2. 权利要求1所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 配置亚硝酸钾溶液,调温至0~5℃;
- (2) 以H₂SO₄溶解克仑特罗;
- (3) 冷却并缓慢加入亚硝酸钾溶液,静置;
- (4) 将载体蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,冷却;
- (5) 将重氮化克仑特罗缓慢加入,过夜反应;
- (6) 用 PBS透析步骤(5)所得溶液;
- (7) 将步骤(6)所得溶液过滤,-20℃分装保存;
- (8) 取酶标板,加入克仑特罗完全抗原,干燥;
- (9) 加入BSA封闭;
- (10) 用PBST反复洗涤;
- (11) 加入固定液,干燥后即得。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(8)中的所述干燥温度为37℃。

4. 根据权利要求2所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤(11)中的所述干燥温度为37℃。

5. 权利要求1所述的试剂盒的在食品安全检测中的应用。

克伦特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,具体涉及一种克伦特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 克伦特罗(Clenbuterol)是一种强效 β_2 -肾上腺素受体激动剂,将其添加到饲料中,可促进动物生长,增加蛋白质的合成,提高家禽瘦肉比,但克伦特罗可在动物的可食性组织中蓄积致使食用者产生毒副作用,我国农业部做出规定,严格禁止在养殖业中使用克伦特罗,并要求加强对该物质在动物源性食品中的残留检测盒监督。目前测定克伦特罗残留的方法较多,有GC法、HPLC法、GC/MS法、LC-MS法,这些方法虽然检测灵敏度高、准确性好、结果稳定,并且部分方法具备即可定性又可定量等特点,但对于现场和基层单位的检测工作而言,也有诸多不足之处,如仪器设备昂贵,不适合于广泛应用;前处理操作繁琐,操作技术要求较高,检测周期比较长,且不能一次大批量进行样品的检测。

[0003] ELISA作为最常用的筛选克伦特罗残留的方法,与常规的化学、生物学的检测方法比较,具有检测时间短、操作简便、具有较高的灵敏度及较高的特异性的优点,并可用于一次大批量的进行检测。但目前国内生产使用的试剂存在着包被技术繁杂,成本相对较高订购周期较长的缺点。

[0004] 因此开发出一种包被技术简洁、包板成本低、试剂盒制备周期短的产品用于检测动物源食品中盐酸克伦特罗残留,将具有非常广阔的应用前景。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种克伦特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术路线:

由于克伦特罗是小分子化合物,属于半抗原,本身只具有反应原性,不具备免疫原性,所以需与大分子载体蛋白进行偶联成完全抗原才能用酶联免疫法包被在酶标板上,传统酶标板包被方法使用湿法包被,需要过夜存放,在此基础上改变包被环境选择使用干法包被,可大大缩短包被时间。

[0007] 具体技术方案如下:

设计一种克伦特罗ELISA检测试剂盒,包括包被的偶联克伦特罗的抗原蛋白。

[0008] 所述的试剂盒的制备方法包括以下步骤:

- (1)取亚硝酸钾溶于蒸馏水中配置成的亚硝酸钾溶液,调温度至0~5℃;
- (2)以H₂SO₄溶解克伦特罗,水浴作用20 min;
- (3)待上清液冷却,缓慢加入亚硝酸钾溶液并不断搅拌,静置反应;
- (4)将载体蛋白溶于磷酸盐缓冲液中,冷却;
- (5)将重氮化克伦特罗缓慢加入并不断搅拌,保持酸碱度稳定,过夜反应;

- (6) 用 PBS透析偶连后的产物直至透析液中检测不出任何小分子物质；
- (7) 将偶连后的产物以滤膜过滤，-20℃分装保存；
- (8) 取干净的酶标板，每孔加入克仑特罗完全抗原，干燥；
- (9) 每孔加入BSA封闭；
- (10) 用PBST反复洗涤；
- (11) 加入固定液固定，完全干燥后即得。

[0009] 优选的，所述步骤(8)中的所述干燥温度为37℃。

[0010] 优选的，所述步骤(11)中的所述干燥温度为37℃。

[0011] 所述的试剂盒在食品安全检测中的应用。

[0012] 与现有技术相比，本发明的有益技术效果在于：

1. 本发明使克仑特罗与大分子载体蛋白进行偶联成完全抗原，用竞争酶联免疫法包被在酶标板上，检测敏感度高，针对克仑特罗物质检测特异性强。

[0013] 2. 本发明试剂用量少，使试剂盒制备过程大大简便易行，节约成本，使用简便，易于推广和应用。

[0014] 3. 本发明改变包被环境选择使用干法包被，可大大缩短包被时间，酶标板制备耗时短，缩短试剂盒制作周期，节省大量时间。

附图说明

[0015] 图1为干法包被与湿法包被检测OD值的比较图；

图2为各标准溶液的板内变异系数图。

具体实施方式

[0016] 下面结合附图和实施例来说明本发明的具体实施方式，但以下实施例只是用来详细说明本发明，并不以任何方式限制本发明的范围。在以下实施例中所涉及的仪器设备如无特别说明，均为常规仪器设备；所涉及的试剂如无特别说明，均为市售常规试剂；所涉及的检测方法，如无特别说明，均为常规方法。

[0017] 实施例一：一种克仑特罗ELISA检测试剂盒的制备

详细操作步骤如下：

1. 取亚硝酸钾溶于蒸馏水中配置成0.2 M的亚硝酸钾溶液，以冰水浴调温度至0～5℃；

2. 以4 mL 0.5 M的H₂SO₄溶解12 mg克仑特罗，37℃水浴作用20 min；

3. 待上清液冷却至4℃，缓慢加入0.2 M亚硝酸钾溶液并不断搅拌，静置反应30 min；

4. 将100 mg卵清蛋白(OVA)作为载体蛋白溶于4 mL磷酸盐缓冲液中，冷却至4℃左右；

5. 将重氮化克仑特罗缓慢加入并不断搅拌，为保持加入过程中酸碱度的稳定，同时加入0.2 M NaOH，调节pH值至7.4，4℃过夜反应；

6. 在4℃条件下用 PBS透析偶连后的产物3 d，每6 h换液一次，直至透析液中检测不出任何小分子物质；

7. 将偶连后的产物以0.45 μm滤膜过滤，-20℃分装保存；

8. 取干净的酶标板，每孔加入100 μL用PBS稀释成浓度为1.25 μg/mL的克仑特罗完全

抗原,置于37℃恒温箱中使包被液完全干燥;

9. 每孔加入200 μ L质量体积比为1%的BSA于37℃封闭1h;
10. 用质量体积比为0.05%的PBST反复洗涤4~5次;
11. 加入200 μ L 质量体积比均为10%蔗糖、海藻糖的混合溶液作为固定液固定0.5 h;
12. 置于37℃恒温箱中使完全干燥后得到包被完整的酶标板。

[0018] 实施例二:克仑特罗ELISA检测试剂盒与传统试剂盒的比较

(一) 检测结果比较

1. 将酶联免疫试剂和酶标板从冷藏环境中取出,在室温下平衡30 min,每种液体使用前均须摇匀,其中标准液需做2个平行试验。

[0019] 2. 加标准品:每孔加入克仑特罗标准品或样品20 μ L(浓度为0 ppb,0.1 ppb,0.3 ppb,0.9 ppb,2.7 ppb,8.1 ppb),再加羊抗小鼠酶标记物50 μ L(1:1500比例稀释液),再加入克仑特罗单克隆抗体工作液80 μ L(浓度确定为0.125 μ g/mL),轻轻振荡混匀,用盖板膜盖好,室温25℃下避光反应30 min;

3. 洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加0.05% PBST反复洗涤,每次浸泡15~30s,充分洗涤4~5次,用吸水纸拍干;

4. 显色:每孔先各加入TMB显色液A(主要成分为H₂O₂)50 μ L,再各加入TMB显色液B(主要成分为3,3,5,5-四甲基联苯胺)50 μ L,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖好,室温25℃下避光反应15 min;

5. 测定:每孔各加50 μ L硫酸终止液,设定酶标仪450/630 nm双波长,测定OD值,5 min内读完数据。

[0020] 克仑特罗ELISA检测试剂盒与传统湿法包被的试剂盒检测数据进行比较,结果如表1和图1所示:

表1 湿法包被和干法包被酶标板检测结果

标准品 编号	OD (450/630nm)			
	湿法包被酶标板结果	干法包被酶标板结果		
1	1.116	1.093	1.064	1.046
2	0.978	0.973	0.873	0.835
3	0.913	0.879	0.713	0.758
4	0.765	0.775	0.615	0.586
5	0.534	0.496	0.261	0.252
6	0.355	0.361	0.123	0.138

[0021] (二) 精准度比较

精准度以变异系数表示,变异系数=SD的平均值/平均结合率

结果如图2所示:干法包板和湿法包板相比较,板内变异系数均在0.035以下,干法包板可大大缩短包板时间,减少试剂盒生产周期。

[0022] 上面结合附图和实施例对本发明作了详细的说明,但是,所属技术领域的技术人

员能够理解,在不脱离本发明宗旨的前提下,还可以对上述实施例中的各个具体参数进行变更,形成多个具体的实施例,均为本发明的常见变化范围,在此不再一一详述。

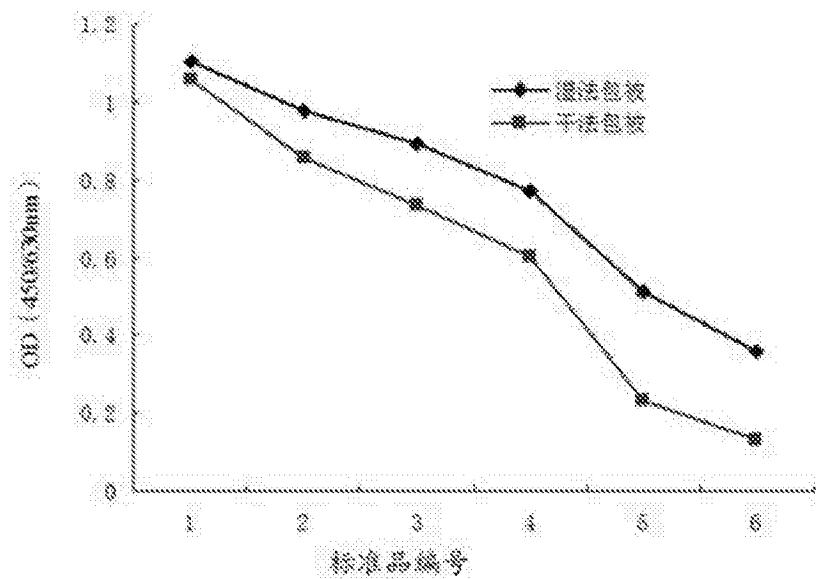


图1

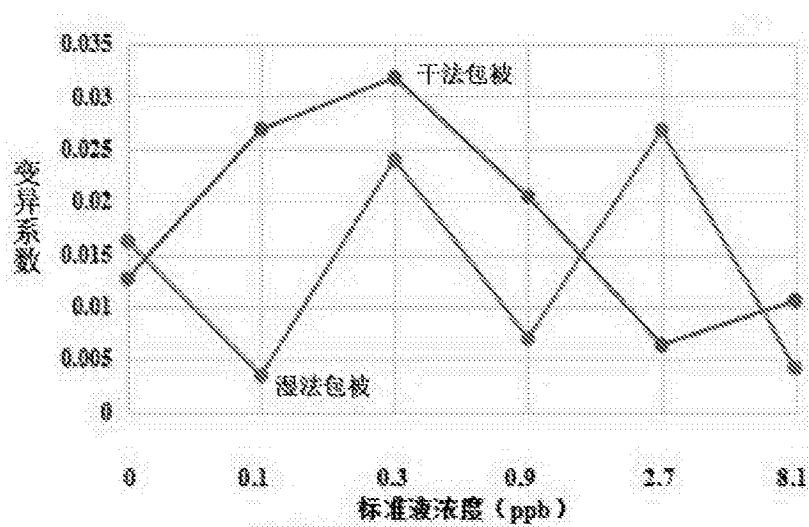


图2

专利名称(译)	克伦特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN107807235A	公开(公告)日	2018-03-16
申请号	CN201711055603.1	申请日	2017-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	郑州欧柯奇仪器制造有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州欧柯奇仪器制造有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州欧柯奇仪器制造有限公司		
[标]发明人	宋俊奇 白长江 陈冲 秦志洋		
发明人	宋俊奇 白长江 陈冲 秦志洋		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/544 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/94 G01N33/535 G01N33/544 G01N33/577		
代理人(译)	张晓辉		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种克伦特罗ELISA检测试剂盒、其制备方法及其应用，旨在解决克伦特罗不具备免疫原性和传统酶标板包被方法需要过夜存放的问题。该试剂盒包括包被的偶联克伦特罗的抗原蛋白，其制备方法为：取亚硝酸钾溶于蒸馏水中配置成的亚硝酸钾溶液；以H₂SO₄溶解克伦特罗；冷却后缓慢加入亚硝酸钾溶液并不断搅拌，静置；将载体蛋白溶于磷酸盐缓冲液中；将重氮化克伦特罗加入，保持酸碱度稳定，过夜；用PBS透析偶连后的产物直至透析液中检测不出任何小分子物质；将偶连后的产物过滤，分装保存；取酶标板，每孔加入克伦特罗完全抗原，干燥后封闭；反复洗涤后固定，干燥后即得。本发明检测特异性强，试剂用量少，缩短试剂盒制作周期。

