



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 206594181 U

(45)授权公告日 2017. 10. 27

(21)申请号 201720173786.6

(22)申请日 2017.02.26

(73)专利权人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段
90号

(72)发明人 吴世秀 王磊 姜金庆 王自良
张海荣 齐永华 范国英 李广领

(74)专利代理机构 新乡市平原专利有限责任公
司 41107

代理人 于兆惠

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

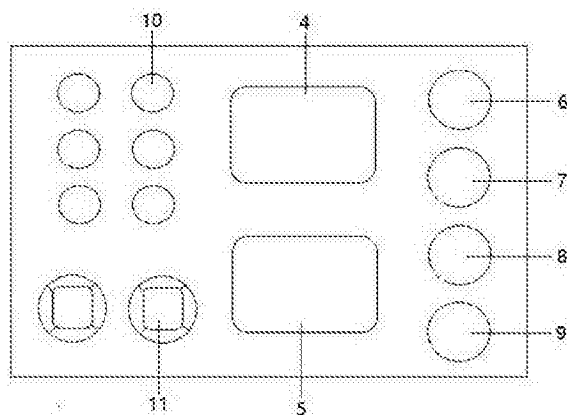
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)实用新型名称

一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒

(57)摘要

本实用新型公开了一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒,属于免疫化学检测技术领域。本实用新型的技术方案要点为:一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒,包括盒体、盒盖和设置于盒体内侧底部的固定座,固定座上设有试剂瓶下凹瓶位,分别用于放置浓缩洗涤液试剂瓶、样品稀释液试剂瓶、酶标二抗工作液试剂瓶、底物显色剂A液试剂瓶、底物显色剂B液试剂瓶、终止液试剂瓶和标准品溶液试剂瓶,盒体内还放置有酶标板、微吸管、离心管、比色卡、说明书和盖板膜。本实用新型采用直接竞争ELISA模式进行呕吐毒素的定性、定量检测,具有操作简单、灵敏度高、成本低廉、检测步骤少和检测时间短等优点,适合大批量样品的现场快速检测。



1. 一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒,包括箱体、连接于箱体一侧的盒盖、设置于箱体内侧底部的固定座及设置于箱体内部的酶标板、微吸管、离心管、比色卡、说明书和盖板膜,其特征在于:所述的酶标板由聚苯乙烯制成,采用96孔试剂板作为固相载体,放于铝铂袋内,并且酶标板由外框支撑架和放置其上的可拆装酶标反应微孔条组成,每个可拆装酶标反应微孔条有12个反应孔,其上预包被抗呕吐毒素单克隆抗体;所述的微吸管有四种不同容量,其中1.0mL容量的微吸管30根用于样品基质的采样,100 μ L容量的微吸管10根用于添加终止液,50 μ L容量的微吸管20根用于添加酶标二抗工作液,30 μ L容量的微吸管40根用于添加底物显色剂A液和底物显色剂B液;所述的离心管有三种不同容量,分别为10mL、5mL和1.5mL,用于样品采集和基质前处理;所述的比色卡有5张,显示不同颜色试剂孔对应的吸光度值,用于水样、奶制品、茶叶、饲料和食品中呕吐毒素残留含量的推算;所述的说明书用于介绍试剂盒的原理、标准曲线、适用范围、交叉反应率、所需仪器和试剂、使用方法和注意事项;所述的盖板膜5张,用于样品检测时覆盖酶标板以防止液体蒸发影响检测结果;所述的固定座上设有12个试剂瓶下凹瓶位和2个备用试剂瓶下凹瓶位,其中12个试剂瓶下凹瓶位分别用于放置浓缩洗涤液试剂瓶、样品稀释液试剂瓶、酶标二抗工作液试剂瓶、底物显色剂A液试剂瓶、底物显色剂B液试剂瓶、终止液试剂瓶、200ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、100ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、50ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、25ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、12.5ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶和6.25ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶,2个备用试剂瓶下凹瓶位分别用于放置高浓度标准品溶液试剂瓶、稀酸溶液试剂瓶、稀碱溶液试剂瓶或吐温-20溶液试剂瓶。

一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型属于免疫化学检测技术领域,具体涉及一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 呕吐毒素(vomitoxin)又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol,DON),具有很强的细胞毒性,可导致动物肠功能紊乱,口腔黏膜和真皮损伤,免疫力下降。人和牲畜误食被毒素污染的粮谷后产生广泛的毒性效应,可引起呕吐、拒食、体重减轻等症状,免疫和造血系统受到损害,还具有很强的皮肤毒性和细胞毒性,严重时损害造血系统造成死亡。DON多分布于小麦、大麦、玉米等谷物籽实中,是在黄曲霉毒素之后污染最严重的真菌毒素。由于DON的危害严重,引起了各国的普遍重视,相继制定了谷物及饲料中DON残留量的严格限量标准。我国谷物、猪配合饲料、犊牛配合饲料、泌乳期动物配合饲料中DON的限量标准为1.0mg/kg,牛配合饲料、家禽配合饲料中DON的限量标准为5.0mg/kg。

[0003] DON残留检测的传统方法有微生物学法,荧光法,薄层色谱法(TLC),高效液相色谱法(HPLC),以及液质联用法(LC-MS),气质联用检测法(GC-MS)和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等方法。这些方法灵敏度高,定性准确,可以确定化合物的分子量、分子式,甚至官能团,适合定量检测该化合物及其代谢物。但这些方法成本高,需要专业的技术人员,昂贵的实验仪器及长时间的前期准备工作。而免疫学检测方法建立在抗体对抗原的分子识别上,其主要优点是亲和力高、快速、简单、经济实用,能够实现对生物液体的小体积、大通量检测,逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速检测的方法之一。

[0004] 因此,研制快速、灵敏、高效的呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒对于保障动物性食品安全具有十分重要的意义。

发明内容

[0005] 本实用新型解决的技术问题是提供了一种小巧轻便的呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒,使用该试剂盒操作简便,灵敏度高,成本低,稳定性好,检测步骤少,检测时间短,可进行一次连续多个样品中呕吐毒素含量的测定,减少了样品检测所需要的时间。

[0006] 本实用新型为解决上述技术问题采用如下技术方案,一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒,包括盒体、连接于盒体一侧的盒盖、设置于盒体内侧底部的固定座及设置于盒体内部的酶标板、微吸管、离心管、比色卡、说明书和盖板膜,其特征在于:所述的酶标板由聚苯乙烯制成,采用96孔试剂板作为固相载体,放于铝铂袋内,并且酶标板由外框支撑架和放置其上的可拆装酶标反应微孔条组成,每个可拆装酶标反应微孔条有12个反应孔,其上预包被抗呕吐毒素单克隆抗体;所述的微吸管有四种不同容量,其中1.0mL容量的微吸管30根用于样品基质的采样,100 μ L容量的微吸管10根用于添加终止液,50 μ L容量的微吸管20根用于添加酶标二抗工作液,30 μ L容量的微吸管40根用于添加底物显色剂A液和底物显色剂B液;所述的离心管有三种不同容量,分别为10mL、5mL和1.5mL,用于样品采集和基质前处

理;所述的比色卡有5张,显示不同颜色试剂孔对应的吸光度值,用于水样、奶制品、茶叶、饲料和食品中呕吐毒素残留含量的推算;所述的说明书用于介绍试剂盒的原理、标准曲线、适用范围、交叉反应率、所需仪器和试剂、使用方法和注意事项;所述的盖板膜5张,用于样品检测时覆盖酶标板以防止液体蒸发影响检测结果;所述的固定座上设有12个试剂瓶下凹瓶位和2个备用试剂瓶下凹瓶位,其中12个试剂瓶下凹瓶位分别用于放置浓缩洗涤液试剂瓶、样品稀释液试剂瓶、酶标二抗工作液试剂瓶、底物显色剂A液试剂瓶、底物显色剂B液试剂瓶、终止液试剂瓶、200ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、100ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、50ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、25ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶、12.5ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶和6.25ng/mL的呕吐毒素标准品溶液试剂瓶,2个备用试剂瓶下凹瓶位分别用于放置高浓度标准品溶液试剂瓶、稀酸溶液试剂瓶、稀碱溶液试剂瓶或吐温-20溶液试剂瓶。

[0007] 本实用新型用不同大小、不同颜色的塑料瓶盛装液体并固定在盒体内侧底部的固定座上,与酶标板、微吸管、离心管、比色卡、说明书和盖板膜一同封装在试剂盒内,便于携带和运输。每一个试剂盒中的试剂足够进行96份测定,即可进行一次连续多个样品的检测,也可将酶标板微孔条拆开多次使用。此时,将剩下的微孔条放回铝箔袋中用自封袋密封,这样可以保证试剂盒检测结果的准确性和稳定性。

[0008] 本实用新型的试剂盒根据抗原抗体竞争性免疫层析原理设计,在酶标板微孔条上预包被抗呕吐毒素单克隆抗体,样品中污染的呕吐毒素和酶标二抗直接竞争包被在酶标板微孔条上的单克隆抗体,呕吐毒素污染物含量越高,酶标二抗和呕吐毒素单克隆抗体结合数量越少,当加入底物显色剂溶液时,样品吸光度值与呕吐毒素含量呈负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中呕吐毒素的残留含量。

[0009] 本实用新型与现有技术相比具有以下有益效果:

[0010] (1)本实用新型的操作步骤包括添加样品和酶标二抗、添加底物显色液及硫酸终止液,检测步骤少、检测时间短,比传统间接竞争ELISA试剂盒节约30min的时间,与传统理化检测方法(1d)相比,优势更为明显;

[0011] (2)本实用新型是以抗原抗体分子的特异性、可逆性反应为基础的分析技术,具有高度的选择性和敏感性,且具有简便、快速、筛检量大等优势,代表着呕吐毒素残留检测的发展方向;

[0012] (3)本实用新型经济实惠、时效性强,能进行现场检测,与理化检测方法相比,检测成本不到理化分析方法的1/20;

[0013] (4)本实用新型主要用于水样、茶叶、饲料和食品中呕吐毒素污染残留检测,既可用于大批量样品筛选,又可进行小批量样品的快速检测,对于提高食品安全、保障人民身心健康、保持环境友好与实现可持续发展具有重要现实意义;

[0014] (5)本实用新型易于大范围推广应用,且适合不同类别的人员使用,如实验室检测、海关检疫、卫生监督、规模养殖及个体生产等,具有广阔的市场前景和显著的经济效益和社会效益。

附图说明

[0015] 图1是本实用新型的结构示意图;

[0016] 图2是本实用新型中固定座的结构示意图。

[0017] 图中：1、盒体，2、盒盖，3、固定座，4、浓缩洗涤液瓶位，5、样品稀释液瓶位，6、酶标二抗工作液瓶位，7、底物显色剂A液瓶位，8、底物显色剂B液瓶位，9、终止液瓶位，10、标准品溶液瓶位，11、备用试剂瓶下凹瓶位。

具体实施方式

[0018] 结合附图详细描述本实用新型的具体内容。一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒，包括盒体1、连接于盒体1一侧的盒盖2及设置盒体1内侧底部的固定座3，所述的盒盖2覆盖盒体1的顶部和前侧部，边缘宽度比盒体1突出0.3-0.5cm，用于开关试剂盒。

[0019] 所述的固定座3上设有12个试剂瓶下凹瓶位和2个备用试剂瓶下凹瓶位11，浓缩洗涤液瓶位4放置有底部形状为矩形、半透明塑料试剂瓶封装的100mL浓缩洗涤液(10×)，样品稀释液瓶位5放置有底部形状为矩形、蓝色帽的半透明塑料试剂瓶封装的100mL样品稀释液，酶标二抗工作液瓶位6放置有红色塑料试剂瓶封装的7mL羊抗鼠酶标二抗(GaMIgG-HRP)，底物显色剂A液瓶位7放置有黑色塑料试剂瓶封装的4mL底物显色剂A液，底物显色剂B液瓶位8放置有绿色塑料试剂瓶封装的4mL底物显色剂B液，终止液瓶位9放置有黄色塑料试剂瓶封装的7mL 2M硫酸溶液，标准品溶液瓶位10放置有乳白色塑料试剂瓶封装的1mL呕吐毒素标准品溶液共6瓶，浓度分别为200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL和6.25ng/mL，备用试剂瓶下凹瓶位11用于放置的高浓度标准品溶液试剂瓶、稀酸溶液试剂瓶、稀碱溶液试剂瓶、吐温-20溶液试剂瓶或特殊样品处理液试剂瓶。

[0020] 所述试剂盒的盒体1内还放置有酶标板、微吸管、离心管、比色卡、说明书和盖板膜，所述的酶标板由聚苯乙烯制成，采用96孔试剂板作为固相载体，放于铝铂袋内，并且酶标板由外框支撑架和放置其上的可拆装酶标反应微孔条组成，每个可拆装酶标反应微孔条有12个反应孔，其上预包被抗呕吐毒素单克隆抗体。所述的微吸管有四种不同容量，其中1.0mL容量的微吸管30根用于样品基质的采样，100μL容量的微吸管10根用于添加终止液，50μL容量的微吸管20根用于添加酶标二抗工作液，30μL容量的微吸管40根用于添加底物显色剂A液和B液。所述的离心管有三种不同容量，分别为10mL、5mL和1.5mL，主要用于样品采集和基质前处理。所述的比色卡有5张，显示不同颜色试剂孔对应的吸光度值，用于水样、奶制品、茶叶、饲料和食品中呕吐毒素残留含量的大概推算。所述的说明书1份，详细介绍试剂盒的原理、标准曲线、适用范围、交叉反应率、所需仪器和试剂、使用方法和注意事项。所述的盖板膜5张，用于样品检测时覆盖酶标板，防止液体蒸发，影响检测结果。

[0021] 样品基质中呕吐毒素残留含量测定：

[0022] 1) 样品前处理：称取花生、玉米、小麦、大米及其制品或饲料25g，粉碎后加入10g聚乙二醇8000，用去离子水定容，转移至均质杯中，均质器高速均质2min，然后4000r/min离心5min或用定量滤纸过滤，取上清液进行样品检测。

[0023] 2) 试剂盒的操作步骤：1、将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温(20-25℃)平衡30min，注意每种液体试剂使用前均须摇匀；2、取出所需数量的微孔条，将不用的微孔条放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封，保存于2-8℃；3、编号：将样品对应微孔按序编号，每个样品做3孔平行，并记录样品孔所在的位置；4、加样品：将样品处理液50μL加入酶标板微孔条中，同时加入酶标二抗工作液50μL，混匀静置15min后洗板，注意检测设三

个重复,并设置NC和BC对照;5、显色:加底物显色剂A液和底物显示剂B液各30 μ L,静置5min后洗板;6、终止反应:加入H₂SO₄终止液100 μ L,静置5min后酶标仪读取吸光度值。

[0024] 3)测定样品基质中呕吐毒素残留含量:

[0025] 1、定性测定:底物显色5min后,将样品孔蓝色深浅与比色卡对比,获得样品基质中呕吐毒素残留含量大概范围;

[0026] 2、定量测定:加入终止液静置5min后,将酶标仪测定的吸光度值代入说明书中的标准曲线,可准确测定样品基质中呕吐毒素残留含量。

[0027] 4)注意事项:

[0028] 1、室温低于20℃或试剂及样品没有回到室温(20-25℃)会导致吸光度值偏低;

[0029] 2、洗板过程中如出现板孔干燥的情况,会导致标准曲线不成线性,重复性不好的现象;

[0030] 3、不使用过有效日期的试剂盒,不交换使用不同批号试剂盒中的试剂;

[0031] 4、标准品、酶标二抗和显色剂对光敏感,因此恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖板膜封住微孔板;

[0032] 5、反应终止液为2M硫酸,避免接触皮肤;

[0033] 6、显色时间按说明书要求进行,否则会导致标准曲线与实际检测数据不吻合。

[0034] 以上显示和描述了本实用新型的基本原理,主要特征和优点,在不脱离本实用新型精神和范围的前提下,本实用新型还有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本实用新型的范围。

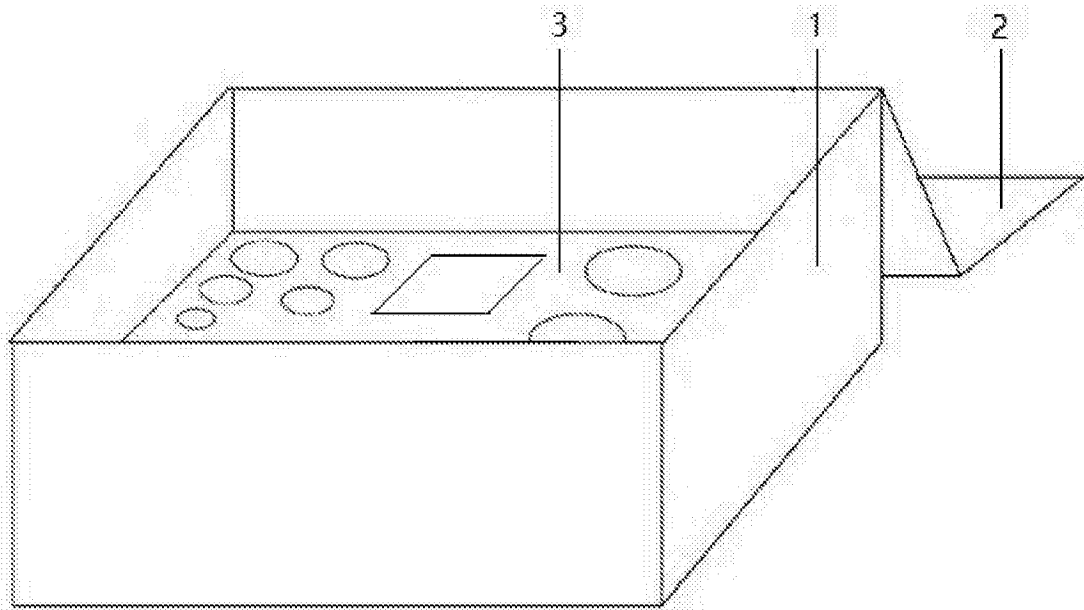


图1

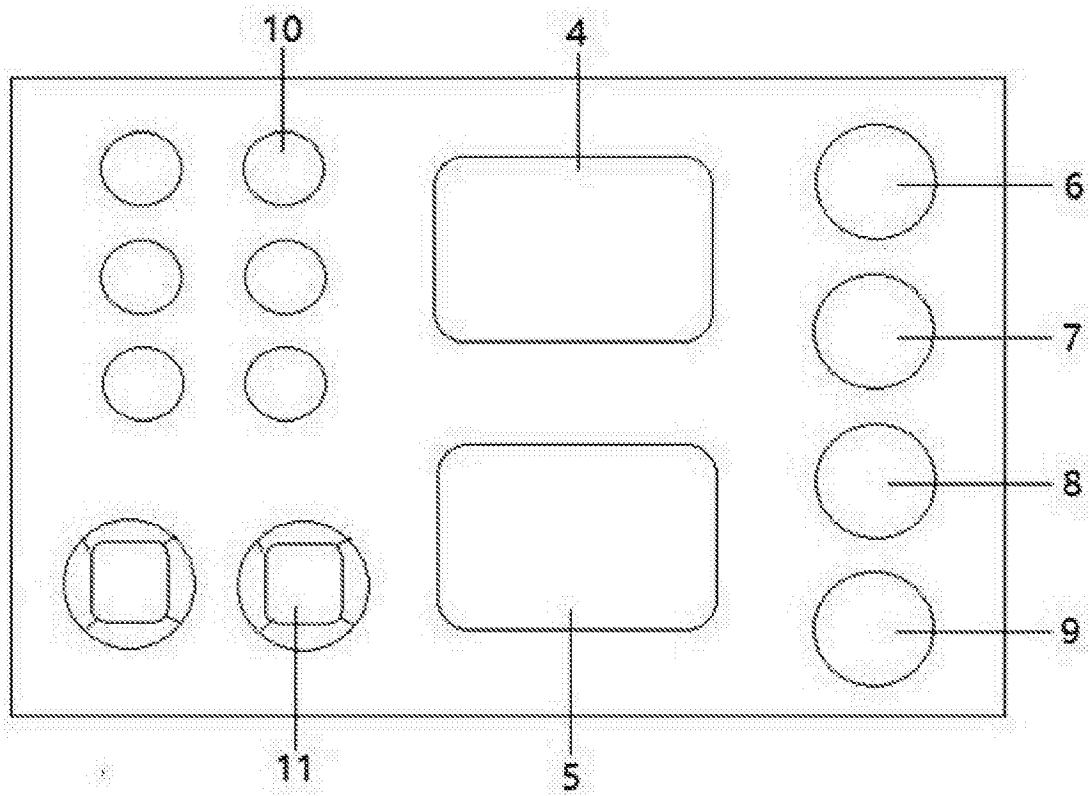


图2

专利名称(译)	一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN206594181U	公开(公告)日	2017-10-27
申请号	CN201720173786.6	申请日	2017-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	吴世秀 王磊 姜金庆 王自良 张海棠 齐永华 范国英 李广领		
发明人	吴世秀 王磊 姜金庆 王自良 张海棠 齐永华 范国英 李广领		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒，属于免疫化学检测技术领域。本实用新型的技术方案要点为：一种呕吐毒素直接竞争ELISA试剂盒，包括盒体、盒盖和设置于盒体内侧底部的固定座，固定座上设有试剂瓶下凹瓶位，分别用于放置浓缩洗涤液试剂瓶、样品稀释液试剂瓶、酶标二抗工作液试剂瓶、底物显色剂A液试剂瓶、底物显色剂B液试剂瓶、终止液试剂瓶和标准品溶液试剂瓶，盒体内还放置有酶标板、微吸管、离心管、比色卡、说明书和盖板膜。本实用新型采用直接竞争ELISA模式进行呕吐毒素的定性、定量检测，具有操作简单、灵敏度高、成本低廉、检测步骤少和检测时间短等优点，适合大批量样品的现场快速检测。

