



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277692 A

(43) 申请公布日 2016.01.27

(21) 申请号 201410353133.7

(22) 申请日 2014.07.24

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 邓榕榕 杜霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种测定水产品中的孔雀石绿酶联免疫吸附法

(57) 摘要

本发明涉及一种测定水产品及水样中孔雀石绿(MG)的间接竞争酶联免疫吸附分析法。对孔雀石绿分子进行修饰,使其与载体蛋白交联,得到免疫原和包被抗原,经过多次免疫动物制得抗孔雀石绿的多克隆抗体。在优化的实验条件下,IC₅₀值(标准曲线中吸光度抑制至最大吸光度值的50%时所对应的待测物浓度)为0.9~2.6ug/L,检出限为0.02~0.10ug/L。孔雀石绿在水样及水产品中的回收率为76.2~95.0%,与无色孔雀石绿的交叉反应率为95.25%。本发明包括包被液、洗涤液、终止液、封闭液以及底物溶液的配制,抗体固定,免疫反应,检测信号的获得等步骤。结合竞争酶联免疫吸附法的特点对水产品中的孔雀石绿含量进行检测,灵敏度高、干扰小、简便、快速、操作安全、特异性强,测试成本低。

1. 一种水产品中孔雀石绿含量的检测方法,其特征是,包括以下步骤:

(1) 溶液的配制

a. 包被液的配制:将碳酸钠、碳酸氢钠配制成 pH7.0-8.0 的溶液,低温保存;

b. 洗涤液的配制:将氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾及吐温 20 配制成 pH7-8 的溶液,低温保存;

c. 终止液的配制:配制 10-15% 的浓硫酸;

d. 封闭液的配制:将氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、吐温 20 及牛血清白蛋白配制成 pH7-8 的溶液,低温保存;

e. 底物溶液的配制:将磷酸氢二钠、柠檬酸、 H_2O_2 及四甲基联苯胺配制成溶液;

(2) 抗体固定

将孔雀石绿多克隆抗体用包被液稀释,以每孔 100 μ L 加入酶标板中,同时设立正常血清稀释液的阳性对照,低温过夜保存;将孔中液体倒尽,加入洗涤液,保留 3min,再倒尽,如此重复洗涤多次;每孔中添加 100 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C,保留 1h;将孔中液体倒尽,加入洗涤液,保留 3min,再倒尽,如此重复洗涤多次;

(3) 免疫反应

用封闭液稀释待测样品溶液后加入酶标板孔中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,保留 1-2h,孔中液体倒掉,加入洗涤液,保留 3min,倒尽,如此重复洗涤多次;用封闭液稀释酶标孔雀石绿溶液后加入孔中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,保留 1-2h,孔中液体倒掉,加入洗涤液,保留 3min,倒尽,如此重复洗涤多次;加入底物溶液,100 μ L/孔,避光,37 $^{\circ}$ C,10-15min;加入终止液终止反应,100 μ L/孔;

(4) 检测信号的获得

a. 用酶标仪检测酶标板孔中的液体 OD 值,根据 OD 值判断样品中孔雀石绿的含量,根据孔雀石绿含量的标准曲线可计算出样品中孔雀石绿的含量大小;

b. 按照权利要求 1 所述的水产品中孔雀石绿含量的检测方法,其特征是:所述重复洗涤的次数为三次;

c. 按照权利要求 1 所述的水产品中孔雀石绿含量的检测方法,其特征是:所述低温为 4 $^{\circ}$ C。

一种测定水产品中的孔雀石绿酶联免疫吸附法

技术领域

[0001] 孔雀石绿 (MG) 是一种三苯甲烷类工业染料,常用于制陶、纺织、皮革、食品颜色剂和细胞化学染色剂等…。也可用作驱虫剂、杀虫剂、防腐剂,是药用染料中抗菌效力较强的一类,用于预防与治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等。近年来发现孔雀石绿 (MG) 特别是其代谢产物无色孔雀石绿 (LMG) 在水产动物体内有明显的蓄积残留现象,而其化学官能团三苯甲烷是一类致癌物质,食用经 MG 治疗的水产品后,免疫系统和繁殖系统受到较大的影响,具体地说是一种水产品中孔雀石绿含量的检测方法。

背景技术

[0002] 目前已发现可以致癌的化合物约有 450 余种,孔雀石绿,三苯甲烷类工业染料,是一种重要的化学致癌物,使用被其污染的水体,对人体健康有很大的威胁。测定食品及环境中孔雀石绿及其代谢物常用高效液相色谱法。采用二氧化铅衍生柱进行柱前或柱后氧化,将无色孔雀石绿氧化为孔雀石绿后进行检测,或者利用 HPLC 一荧光检测法直接检测鱼肉组织中的无色孔雀石绿。虽然这些方法的准确度较高,但仪器昂贵、样品预处理复杂、费时、检测成本高。为了确保动物食品安全,避免孔雀石绿对水生物及人体健康的危害,有必要建立对水产动物中孔雀石绿残留监测的灵敏、快速的分析方法。本文自制无色孔雀石绿完全免疫抗原和无色孔雀石绿多克隆抗体,经过实验条件的筛选和优化,建立了测定孔雀石绿和无色孔雀石绿的酶联免疫吸附分析法,并用于真实样品的测定。

发明内容

[0003] 本发明针对上述问题,提供一种水产品中孔雀石绿含量的检测方法,该方法可快速、简便、准确地定量检测孔雀石绿的含量。

[0004] 按照本发明的技术方案:一种水产品中孔雀石绿含量的检测方法,包括以下步骤:

(1) 溶液的配制

- a. 包被液的配制:将碳酸钠、碳酸氢钠配制成 pH7.0-8.0 的溶液,低温保存;
- b. 洗涤液的配制:将氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾及吐温 20 配制成 pH7-8 的溶液,低温保存;
- c. 终止液的配制:配制 10-15% 的浓硫酸;
- d. 封闭液的配制:将氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、吐温 20 及牛血清白蛋白配制成 pH7-8 的溶液,低温保存;
- e. 底物溶液的配制:将磷酸氢二钠、柠檬酸、 H_2O_2 及四甲基联苯胺配制成溶液。

[0005] (2) 抗体固定

将孔雀石绿多克隆抗体用包被液稀释,以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入酶标板中,同时设立正常血清稀释液的阳性对照,低温过夜保存;

将孔中液体倒尽,加入洗涤液,保留 3min,再倒尽,如此重复洗涤多次;每孔中添加

100 μ L 封闭液, 37 $^{\circ}$ C, 保留 1h;

将孔中液体倒尽, 加入洗涤液, 保留 3min, 再倒尽, 如此重复洗涤多次。

(3) 免疫反应

用封闭液稀释待测样品溶液后加入酶标板孔中, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C, 保留 1-2h, 孔中液体倒掉, 加入洗涤液, 保留 3min, 倒尽, 如此重复洗涤多次;

用封闭液稀释酶标孔雀石绿溶液后加入孔中, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C, 保留 1-2h, 孔中液体倒掉, 加入洗涤液, 保留 3min, 倒尽, 如此重复洗涤多次;

加入底物溶液, 100 μ L/ 孔, 避光, 37 $^{\circ}$ C, 10-15min; 加入终止液终止反应, 100 μ L/ 孔。

[0006] (4) 检测信号的获得

用酶标仪检测酶标板孔中的液体 OD 值, 根据 OD 值判断样品中孔雀石绿的含量, 根据孔雀石绿含量的标准曲线可计算出样品中孔雀石绿的含量大小。

[0007] 所述重复洗涤的次数为三次; 所述低温为 4 $^{\circ}$ C。

[0008] 本发明的技术效果在于: 本发明结合竞争酶联免疫吸附法的特点对水产品中的孔雀石绿含量进行检测, 灵敏度高、干扰小、简便、快速、操作安全、无污染、特异性强, 测试成本低。

附图说明

[0009] 图 1 是酶联免疫测定孔雀石绿的标准曲线。

具体实施方式

[0010] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0011] 如图 1 所示, 本发明是一种水产品中孔雀石绿含量的检测方法, 包括以下步骤:

(1) 溶液的配制

a. 包被液的配制: 将碳酸钠、碳酸氢钠配制成 pH7.0-8.0 的溶液, 低温保存;

b. 洗涤液的配制: 将氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾及吐温 20 配制成 pH7-8 的溶液, 低温保存;

c. 终止液的配制: 配制 10-15% 的浓硫酸;

d. 封闭液的配制: 将氯化钠、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、吐温 20 及牛血清白蛋白配制成 pH7-8 的溶液, 低温保存;

e. 底物溶液的配制: 将磷酸氢二钠、柠檬酸、 H_2O_2 及四甲基联苯胺配制成溶液;

(2) 抗体固定

将孔雀石绿多克隆抗体用包被液稀释, 以每孔 100 μ L 加入酶标板中, 同时设立正常血清稀释液的阳性对照, 低温过夜保存;

将孔中液体倒尽, 加入洗涤液, 保留 3min, 再倒尽, 如此重复洗涤多次;

每孔中添加 100 μ L 封闭液, 37 $^{\circ}$ C, 保留 1h;

将孔中液体倒尽, 加入洗涤液, 保留 3min, 再倒尽, 如此重复洗涤多次;

(3) 免疫反应

用封闭液稀释待测样品溶液后加入酶标板孔中, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C, 保留 1-2h, 孔中液体倒掉, 加入洗涤液, 保留 3min, 倒尽, 如此重复洗涤多次;

用封闭液稀释酶标孔雀石绿溶液后加入孔中,100 μ L/ 孔,37℃,保留 1-2h,孔中液体倒掉,加入洗涤液,保留 3min,倒尽,如此重复洗涤多次;

加入底物溶液,100 μ L/ 孔,避光,37℃,10-15min;

加入终止液终止反应,100 μ L/ 孔;

(4) 检测信号的获得

用酶标仪检测酶标板孔中的液体 OD(optical density,光密度) 值,根据 OD 值判断样品中孔雀石绿的含量。如果样品中没有孔雀石绿,则反应孔中颜色最深。如果待检溶液中抗原越多,竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会,使酶标抗原与固相载体的结合量减少,有色产物就越多,这样根据有色产物的变化就可求出未知抗原的量。根据颜色的深浅可初步判断孔雀石绿含量的大小。根据孔雀石绿含量的标准曲线可计算出样品中孔雀石绿的含量大小。

[0012] 所述重复洗涤的次数为三次;所述低温为 4℃。

[0013] 以下是本发明的具体实施例:

1、包被液的配制:1.465g 碳酸氢钠和 0.795g 碳酸钠用 500mL 去离子水配制成溶液,4℃保存;

洗涤液的配制:用 8g 氯化钠,2.9g 十二水磷酸氢二钠,0.2g 磷酸二氢钾,0.2g 氯化钾,0.5mL 的 0.05%吐温 20,高压蒸馏水 1000mL,配制成溶液,pH7.4,4℃保存;

终止液的配制:用 21.7mL 浓硫酸,178.3mL 高压蒸馏水配制成溶液;

封闭液的配制:8g 氯化钠,2.9g 十二水磷酸氢二钠,0.2g 磷酸二氢钾,0.2g 氯化钾,0.5mL 的 0.05%吐温 20,高压蒸馏水 1000mL,10g 牛血清白蛋白,配制成溶液,pH7.4;

底物溶液的配制:用 25.7mL、0.2mol/L 的磷酸氢二钠,24.3mL、0.1mol/L 的柠檬酸,配制 0.1% H_2O_2 溶液,0.1%的四甲基联苯胺溶液。

[0014] 2、抗体固定

将孔雀石绿多克隆抗体用包被液稀释一定浓度,以每孔 100 μ L 加入酶标板中,同时设立阳性对照(正常血清稀释液),4℃过夜保存。将孔中液体倒尽,加入洗涤液,保留 3min,再倒尽。如此重复洗涤 3 次。

[0015] 每孔中添加 100 μ L 封闭液,37℃,保留 1h。将孔中液体倒尽,加入洗涤液,保留 3min,再倒尽。如此重复洗涤 3 次。

[0016] 3、免疫反应

用封闭液稀释适当倍数的待测样品溶液加入酶标板孔中,100 μ L/ 孔,37℃,保留 1-2h。孔中液体倒掉,加入洗涤液,保留 3min,倒尽。如此重复洗涤 3 次。

[0017] 用封闭液稀释适当倍数的酶标抗原(酶标孔雀石绿)溶液加入孔中,100 μ L/ 孔,37℃,保留 1-2h 孔中液体倒掉,加入洗涤液,保留 3min,倒尽。如此重复洗涤 3 次。

[0018] 加入底物溶液,100 μ L/ 孔,避光,37℃,10-15min。

[0019] 加入终止液终止反应,100 μ L/ 孔。

[0020] 4 检测信号的获得

用酶标仪检测酶标板孔中的液体 OD 值,根据 OD 值判断样品中孔雀石绿的含量。如果样品中没有孔雀石绿,则反应孔中颜色最深。如果待检溶液中抗原越多,竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会,使酶标抗原与固相载体的结合量减少,有色产物就越多,这

样根据有色产物的变化就可求出未知抗原的量。根据颜色的深浅可初步判断孔雀石绿含量的大小。根据孔雀石绿含量的标准曲线可计算出样品中孔雀石绿的含量大小。

[0021] 酶联免疫吸附法(ELISA)是日前分析化学领域中的前沿课题,特别是在食品和饲料中有毒有害物质的检测中占有极大的优势。它是把抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化作用原理有机地结合起来的一种检测技术。本发明结合竞争酶联免疫吸附法的特点对水产品中的孔雀石绿含量进行检测,灵敏度高、干扰小、简便、快速、操作安全、无污染、特异性强,测试成本低。

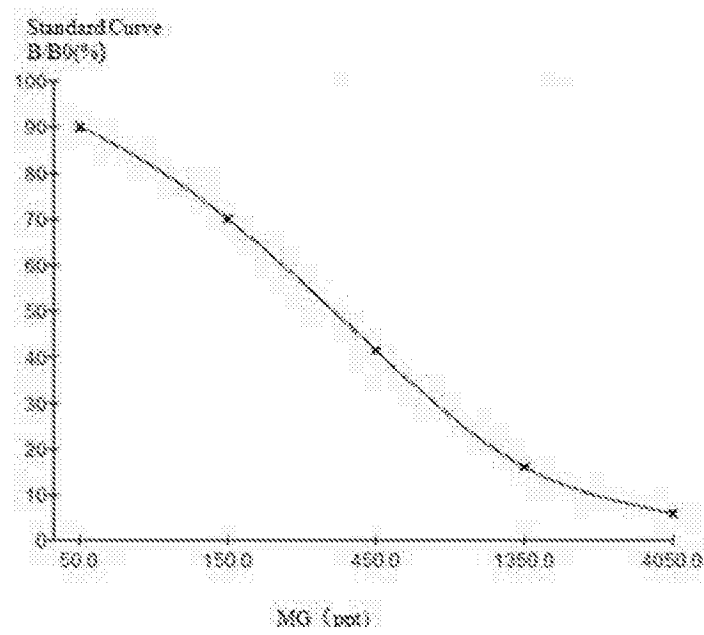


图 1

专利名称(译)	一种测定水产品中的孔雀石绿酶联免疫吸附法		
公开(公告)号	CN105277692A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410353133.7	申请日	2014-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 邓榕榕 杜霞		
发明人	洪霞 邓榕榕 杜霞		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种测定水产品及水样中孔雀石绿(MG)的间接竞争酶联免疫吸附分析法。对孔雀石绿分子进行修饰,使其与载体蛋白交联,得到免疫原和包被抗原,经过多次免疫动物制得抗孔雀石绿的多克隆抗体。在优化的实验条件下,IC₅₀值(标准曲线中吸光度抑制至最大吸光度值的50%时所对应的待测物浓度)为0.9~2.6ug/L,检出限为0.02~0.10ug/L。孔雀石绿在水样及水产品中的回收率为76.2~95.0%,与无色孔雀石绿的交叉反应率为95.25%。本发明包括包被液、洗涤液、终止液、封闭液以及底物溶液的配制,抗体固定,免疫反应,检测信号的获得等步骤。结合竞争酶联免疫吸附法的特点对水产品中的孔雀石绿含量进行检测,灵敏度高、干扰小、简便、快速、操作安全、特异性强,测试成本低。

