



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 207866825 U

(45)授权公告日 2018.09.14

(21)申请号 201721542873.0

(22)申请日 2017.11.17

(73)专利权人 深圳容金科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市宝安区西乡街道固戍二路泳辉商务大厦907室

(72)发明人 陈欢 林金昌 催让莲 邓兴朝
曾祥富

(74)专利代理机构 深圳市徽正知识产权代理有限公司 44405

代理人 李想

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

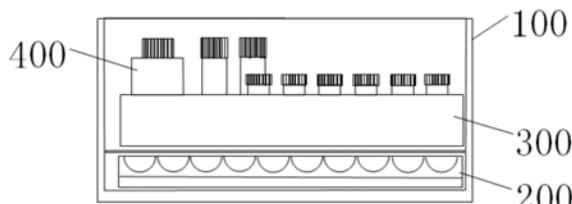
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)实用新型名称

一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检
测试剂盒

(57)摘要

本实用新型实施例公开了一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，包括盒体及覆盖盒体顶部的盒盖，所述盒体内设置有酶标板和用于固定试剂瓶的海绵托架，所述海绵托架与酶标板形状与盒体开口相适应，盛装试剂瓶的海绵托架与酶标板依次叠置于盒体内。本实用新型实施例提供的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，能够克服现有技术测试时间久，操作复杂的缺陷，具有灵敏度高，结构简单，样本处理时间短，使用和携带方便等优点，动物检验检疫单位可使用该检测试剂盒对动物源食品中呋喃唑酮残留进行快速分析检测。



1. 一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，包括盒体及覆盖盒体顶部的盒盖，其特征在于，所述盒体内设置有酶标板和用于固定试剂瓶的海绵托架，所述海绵托架与酶标板形状与盒体开口相适应，盛装试剂瓶的海绵托架与酶标板依次叠置于盒体内；

所述海绵托架上固定的试剂瓶包括洗涤液试剂瓶、样品提取液试剂瓶、辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体试剂瓶、底物液试剂瓶、终止液试剂瓶、3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液试剂瓶和3-氨基-2-恶唑烷酮单克隆抗体试剂瓶，海绵托架上对应各试剂瓶设置有适应于试剂瓶形状的固定槽；

3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液试剂瓶设置为6瓶，所述海绵托架上设置有并排设置的6个标准溶液试剂瓶固定槽；

所述底物液试剂瓶包括底物液A液试剂瓶和底物液B液试剂瓶；

所述海绵托架上对应设置有底物液A液试剂瓶固定槽和底物液B液试剂瓶固定槽；

所述酶标板由塑料支架和各自分开的微孔条组成，各微孔条依次排布设置于塑料支架上；

所述塑料支架由对应设置的用于担载微孔条的侧壁及两端的用于对微孔条限位的挡壁组成，微孔条两端设置承托部，通过塑料支架侧壁对微孔条承托部的支撑实现微孔条的布设；

每一微孔条上排列设置有8个规格一致的微孔，所述塑料支架上共设置有12条微孔条；

所述微孔条的微孔内设置有内含能与呋喃唑酮残留标识物3-氨基-2-恶唑烷酮特异性抗体结合的包被抗原的包被液层；

塑胶支架底部设置网格，每一网格对应一微孔位置，网格承托并固定微孔。

一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及免疫检测技术领域,尤其涉及一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 呋喃唑酮又名痢特灵,属于硝基呋喃类药物,为人工合成广谱抗菌药,曾作为促生长剂广泛用于畜、禽、水产养殖中,具有致癌和致突变性。欧盟1995年将其列为禁用药,中国农业部2002年也将其列为禁用药品之一。由于呋喃唑酮确实具有很好的预防和治疗效果,且价格便宜,目前仍畜、禽、水产养殖中非法使用。因此为保障动物性食品食用者的健康,加强对动物性食品中呋喃唑酮残留的检测是很有必要的。

[0003] 呋喃唑酮在动物体内很快代谢成AOZ,能与组织蛋白结合,被视为呋喃唑酮的残留标识物,所以分析呋喃唑酮残留通常分析其代谢产物AOZ。

[0004] 目前检测AOZ残留的方法有高效液相色谱法(HPLC)、液质联用(LC-MS)、液质串联质谱法(LC-MS-MS)和酶联化学分析法(IA),常用的仪器法所需仪器价格昂贵,对操作人员要求较高,难于推广不适合高通量的样品筛选。免疫化学分析法特别是酶联免疫吸附分析技术(ELISA)具有快速、灵敏度高、操作简单、专一性好等优点,适合高通量的样品筛选。近年来国内外都已开展了呋喃唑酮酶联免疫方法的研究,但在样本处理方面用时比较长,整个流程下来也是比较耗费时间。

[0005] 因此,现有技术还有待进一步发展。

实用新型内容

[0006] 针对上述技术问题,本实用新型实施例提供了一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒,以解决呋喃唑酮检测时间久,技术操作要求高的问题。

[0007] 一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒,包括盒体及覆盖盒体顶部的盒盖,其特征在于,所述盒体内设置有酶标板和用于固定试剂瓶的海绵托架,所述海绵托架与酶标板形状与盒体开口相适应,盛装试剂瓶的海绵托架与酶标板依次叠置于盒体内。

[0008] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒,其中,所述海绵托架上固定的试剂瓶包括洗涤液试剂瓶、样品提取液试剂瓶、辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体试剂瓶、底物液试剂瓶、终止液试剂瓶、3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液试剂瓶和3-氨基-2-恶唑烷酮单克隆抗体试剂瓶,海绵托架上对应各试剂瓶设置有适应于试剂瓶形状的固定槽。

[0009] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒,其中,3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液试剂瓶设置为6瓶,所述海绵托架上设置有并排设置的6个标准溶液试剂瓶固定槽。

[0010] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒,其中,所述底物液试剂瓶包括底物液A液试剂瓶和底物液B液试剂瓶,

[0011] 所述海绵托架上对应设置有底物液A液试剂瓶固定槽和底物液B液试剂瓶固定槽。

[0012] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述酶标板由塑料支架和各自分开的微孔条组成，各微孔条依次排布设置于塑料支架上。

[0013] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述塑料支架由对应设置的用于担载微孔条的侧壁及两端的用于对微孔条限位的挡壁组成，微孔条两端设置承托部，通过塑料支架侧壁对微孔条承托部的支撑实现微孔条的布设。

[0014] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，其中，每一微孔条上排列设置有8个规格一致的微孔，所述塑料支架上共设置有12条微孔条。

[0015] 所述的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，其中，所述微孔条的微孔内设置有内含能与呋喃唑酮残留标识物3-氨基-2-恶唑烷酮特异性抗体结合的包被抗原的包被液层。

[0016] 本实用新型实施例提供的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，能够克服现有技术测试时间久，操作复杂的缺陷，具有灵敏度高，结构简单，样本处理时间短，使用和携带方便等优点，动物检验检疫单位可使用该检测试剂盒对动物源食品中呋喃唑酮残留进行快速分析检测。

附图说明

[0017] 图1为本实用新型实施例的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒的结构示意图。

[0018] 图2为本实用新型实施例的酶联免疫检测试剂盒中酶标板的结构示意图。

具体实施方式

[0019] 下面将结合本实用新型实施例中的附图，对本实用新型实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本实用新型一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本实用新型中的实施例，本领域技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本实用新型保护的范围。

[0020] 需要说明的是，当元件被表述“固定于”另一个元件，它可以直接在另一个元件上、或者其间可以存在一个或多个居中的元件。当一个元件被表述“连接”另一个元件，它可以是直接连接到另一个元件、或者其间可以存在一个或多个居中的元件。本说明书所使用的术语“垂直的”、“水平的”、“左”、“右”、“上”、“下”、“内”、“外”、“底部”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系，仅是为了便于描述本实用新型和简化描述，而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作，因此不能理解为对本实用新型的限制。此外，术语“第一”、“第二”等仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性。

[0021] 除非另有定义，本说明书所使用的所有的技术和科学术语与属于本实用新型的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本说明书中在本实用新型的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施方式的目的，不是用于限制本实用新型。本说明书所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。此外，下面所描述的本实用新型不同实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互结合。

[0022] 如图1所示的一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，包括盒体100及

覆盖盒体顶部的盒盖，其特征在于，所述盒体内设置有酶标板200和用于固定试剂瓶的海绵托架300，所述海绵托架与酶标板形状与盒体开口相适应，盛装试剂瓶400的海绵托架与酶标板依次叠置于盒体内。

[0023] 具体的，所述海绵托架上固定的试剂瓶包括洗涤液试剂瓶、样品提取液试剂瓶、辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体试剂瓶、底物液试剂瓶、终止液试剂瓶、3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液试剂瓶和3-氨基-2-恶唑烷酮单克隆抗体试剂瓶，海绵托架上对应各试剂瓶设置有适应于试剂瓶形状的固定槽。

[0024] 进一步的，3-氨基-2-恶唑烷酮标准溶液试剂瓶设置为6瓶，所述海绵托架上设置有并排设置的6个标准溶液试剂瓶固定槽。

[0025] 所述底物液试剂瓶包括底物液A液试剂瓶和底物液B液试剂瓶，所述海绵托架上对应设置有底物液A液试剂瓶固定槽和底物液B液试剂瓶固定槽。

[0026] 如图2所示，所述酶标板由塑料支架210和各自分开的微孔条220组成，各微孔条依次排布设置于塑料支架上。

[0027] 其中，所述塑料支架由对应设置的用于担载微孔条的侧壁及两端的用于对微孔条限位的挡壁组成，微孔条两端设置承托部，通过塑料支架侧壁对微孔条承托部的支撑实现微孔条的布设。塑胶支架底部设置网格，每一网格对应一微孔位置，网格承托并固定微孔，从而使整条微孔条牢牢固定于塑料支架上。

[0028] 其中，每一微孔221条上排列设置有8个规格一致的微孔，均为圆形微孔，所述塑料支架上共设置有12条微孔条。

[0029] 具体的，所述微孔条的微孔内设置有内含能与呋喃唑酮残留标识物3-氨基-2-恶唑烷酮特异性抗体结合的包被抗原的包被液层，其中包被液为碳酸盐缓冲液，样本提取液试剂瓶内的样本提取液为pH7.4的磷酸盐缓冲液，洗涤液试剂瓶内的洗液为含0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液，底物液A液试剂瓶内的底物液A液为过氧化尿素，底物液B液试剂瓶内的底物液B液为四甲基联苯胺(TMB)，终止液试剂瓶内为2mol硫酸水溶液。而3-氨基-2-恶唑烷酮单克隆抗体试剂瓶内的3-氨基-2-恶唑烷酮单克隆抗体是由人工免疫原免疫小鼠得到的血清。

[0030] 利用改进检测试剂盒需要将动物可食性组织如肝脏、肌肉样品进行预处理，即将待测动物组织经盐酸水解释放AOZ，邻硝基苯甲醛衍生，最后有机试剂萃取浓缩，本实用新型的试剂盒采用简洁竞争ELISA法，用于检测鸡蛋、蜂蜜、鱼、虾、肌肉、肝脏等动物源食品中AOZ的残留。其具有样品处理时间短，适合高通量样品筛选，具有高特异性、高灵敏度、高精确度等特点，最低检测限达0.02ug/kg。

[0031] 实施例1、呋喃唑酮间接竞争检测方法的建立

[0032] 抗原最佳包被浓度和抗体最佳工作浓度的确定：

[0033] 通过方阵滴定试验确定，以吸光度值为1.8-2.2为参照标准。操作步骤：在96孔酶标板上包被稀释倍数为5000、10000、20000、40000的包被原，每个浓度三列，即24孔，4℃过夜，3%脱脂乳37℃封闭1小时，洗涤2次，拍干，取适当数量的孔分为4组，每组都包含4个酶标板的浓度，每孔加入50μL标准品稀释液和50μL酶标二抗工作液，4组微孔依次加入50μL稀释倍数为20000、40000、80000、160000单克隆抗体工作液，混匀后室温孵育30分钟，洗涤4次，拍干，各孔加入100μL底物液，室温避光孵育15分钟，加入100μL终止液，用自动酶标仪与

450nm波长下测定OD值。

[0034] 选择OD值在1.8-2.2的抗原包被浓度和单克隆抗体的浓度组合,可能满足条件的组合有多个,每个组合取已包被好且没用过的微孔6个,分别加入50 μ L 0 μ g/L(即标准品稀释液)、0 μ g/L、0.02 μ g/L、0.06 μ g/L、0.18 μ g/L、0.54 μ g/L、1.62 μ g/L这6个药物浓度,再每孔加入50 μ L酶标二抗工作液,最后每孔加入50 μ L该组对应浓度的单克隆抗体工作液,混匀后室温孵育30分钟,洗涤4次,拍干,各孔加入100 μ L底物液,室温避光孵育15分钟,加入100 μ L终止液,用自动酶标仪450nm波长下测定OD值。选择0.02 μ g/L、0.06 μ g/L、0.18 μ g/L、0.54 μ g/L、1.62 μ g/L抑制率分别为20%、40%、60%、80%、90%的组合的抗原包被浓度和单克隆抗体工作浓度作为最适工作浓度。

[0035] 结果表明,在酶标二抗浓度一定的情况下,某浓度的抗原最佳包被浓度为1:20000,某浓度抗体最佳工作浓度为1:120000.

[0036] 实施例2、本实用新型呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒的制备

[0037] 试剂瓶内试剂的配制

[0038] 包被稀释液:无水碳酸钠1.59g,碳酸氢钠2.93g,加双蒸水至1000mL,调至pH9.6;

[0039] 封闭液:脱脂乳3g溶于含0.05%吐温20的pH7.4PBS100mL;

[0040] 洗液:氯化钠8.0g,磷酸二氢钾0.2g,十二水合磷酸氢二钠2.9g,氯化钾0.2g,吐温20 0.5mL,加双蒸水至1000mL,调至pH7.4:;

[0041] 样本提取液:氯化钠8.0g,磷酸二氢钾0.2g,十二水合磷酸氢二钠2.9g,氯化钾0.2g,加双蒸水至1000mL,调至pH7.4;底物液(TMB-过氧化尿素溶液):

[0042] 底物A液:磷酸氢二钠14.6g,柠檬酸9.33g,0.75%过氧化尿素6.4mL,加双蒸水至1000mL,调至pH5.0-5.4;

[0043] 底物B液:四甲基联苯胺(TMB) 200mg,无水乙醇或二甲亚砜100mL,加双蒸水至1000mL;

[0044] 将底物A液和底物B液按1:1混合即成TMB-过氧化尿素溶液;

[0045] 终止液:18mol/L浓硫酸100mL缓慢加入到1700mL双蒸水中;邻硝基苯甲醛溶液:50mM,无水甲醇溶。

[0046] 酶标板的制备

[0047] 用包被缓冲液将NPAOZ-OVA稀释20000倍,每微孔加入100 μ L,4℃过夜或37℃孵育2小时,倒去包被液,洗液洗2次,拍干,然后每微孔加入180 μ L封闭液,37℃孵育1小时,倒去微孔内液体,洗液洗三次,拍干,用铝膜真空密封保存、备用。

[0048] 实施例3、本实用新型的酶联免疫检测试剂盒的测定程序

[0049] 测定前注意事项

[0050] 使用之前将所需试剂从4℃冷藏环境中取出,恢复至室温,室温低于25℃或试剂及样本没有回到室温(25℃)会导致所有标准的OD值偏低;

[0051] 取出需要数量的微孔条及塑料支架,将不用的微孔条放入自封袋,保存于2-8℃;

[0052] 每种液体试剂使用前均须摇匀;

[0053] 在实验过程中尽量不要让微孔干燥,在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况,则会出现标准曲线不成线性,重复性不好的现象,所以洗板拍干后应立即进行下一步操作;

[0054] 混合要均匀,洗板要彻底,在ELISA分析中的再现性,很大程度上取决于洗板的一

致性；

- [0055] 在所有孵育过程中,用盖板膜封住微孔板,避免光线照射;
- [0056] 不要使用过了有效期的试剂盒,不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂;
- [0057] 反应终止液有腐蚀性,避免接触皮肤。
- [0058] 样品提取
- [0059] 使用适当匀浆器匀浆样品;
- [0060] 称取1g匀浆样品加入0.5mL1×样品提取液,3.5mL蒸馏水,0.5mL 1M HCl和40μL50mM 2-硝基苯甲醛,剧烈振荡30秒;
- [0061] 60℃恒温培养0.5小时,在培养期间,每10分钟振荡5秒;
- [0062] 加入5mL 0.1M K2HP04,0.4mL 1M NaOH,加入6mL乙酸乙酯,涡旋震荡2分钟;室温下(20-25℃)4000g离心5分钟;
- [0063] 取3mL乙酸乙酯上清液(相当于0.5g的原始样品)到另一试管(避免触及下层水相!如果移取液中含有水相,再次4000g离心5分钟,取上层有机相),如果出现乳化现象,上清液不足3mL,请85℃水浴3分钟。在60-70℃水浴减压蒸馏干燥或60-70℃水浴氮气或空气吹干;
- [0064] 用1mL正己烷(或者正庚烷)溶解干燥物;(注:对于富含脂肪、色素多的组织,为防止乳化现象发生,建议选用4mL正己烷溶解,涡旋震荡30秒后,再进行下一步操作)
- [0065] 加入0.5mL1×样品提取液,剧烈振荡涡旋2分钟;室温下4000g离心10分钟;
- [0066] 每孔取50μL下清液,进行样品测试。
- [0067] 测定步骤
- [0068] 加入50uL的标准品或样品于所设定的孔中;
- [0069] 在每孔中加入50uL酶标二抗工作液和50uL单抗工作液,轻敲微孔板混匀60秒;
- [0070] 室温(25℃左右)孵育30分钟;
- [0071] 洗板3次,每次应该加入250uL 1×洗液,最后一次使板尽量甩干并在吸水纸上吸干;
- [0072] 加入100uL的底物液;在室温下培养15分钟;
- [0073] 加入100uL的终止液终止反应,在450nm下读OD值(读数前,用无绒布擦去微孔底部的水分和指纹)
- [0074] 结果判断
- [0075] 百分吸光率的计算:标准液或样本的百分吸光率等于标准液或样本的百分吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准液(0ppb)的吸光度值,再乘以100%,即

$$[0076] \text{百分吸光度值} (\%) = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

[0077] A—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

[0078] A0—0ppb标准溶液的平均吸光度值

[0079] 标准曲线的绘制与计算:以标准液百分吸光率为纵坐标,对应的标准液浓度(ppb)的对数为横坐标,绘制标准液的半对数曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中待测物的实际浓度。

[0080] 实施例4、本实用新型试剂盒的灵敏度、特异性、准确性、精密度试验

[0081] 4.1本实用新型试剂盒的灵敏度试验

[0082] 以 IC50 (抑制率为50%对应的药物浓度) 作为本实用新型检测试剂盒的灵敏地指标。测定20次标准曲线的IC50值。计算20个0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准液OD值的平均值 (X) 和标准差 (SD) , 根据最低检测限公式Z=X-3SD,在标准曲线上查出标准品最低检测限。

[0083] 4.2本实用新型试剂盒的特异性试验

[0084] 以交叉反应率为指标判定试剂盒的特异性。将呋喃唑酮与其类似物等要物配制成不同的浓度,用试剂盒测定各药物的IC50值,计算其交叉反应率。

[0085] 本实用新型试剂盒与其他药物基本无交叉反应,说明本实用新型试剂盒NPAOZ特异性高,专一性好。

[0086] 4.3本实用新型试剂盒的准确度试验

[0087] 将配置好的AOZ母液稀释成100 $\mu\text{g}/\text{L}$,添加到1g组织中使其终浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每个浓度3个重复,重复3天,按照试剂盒的测定程序,测定各组织中AOZ浓度,并计算回收率和变异系数。

[0088] 样本中回收率均在75%-115%,批间变异系数低于20%,表明本实用新型试剂盒测定结果准确、可靠,重复性好

[0089] 4.4本实用新型试剂盒的精密度试验

[0090] 按照本试剂盒的操作说明测定标准溶液,每个标准溶液8个复孔,以浓度的抑制率计算变异系数。结果表明本试剂盒的板内变异系数小于10%,板内测定结果稳定,精密度高。

[0091] 本实用新型实施例提供的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒,能够克服现有技术测试时间久,操作复杂的缺陷,具有灵敏度高,结构简单,样本处理时间短,使用和携带方便等优点,动物检验检疫单位可使用该检测试剂盒对动物源食品中呋喃唑酮残留进行快速分析检测。

[0092] 可以理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据本实用新型的技术方案及本实用新型构思加以等同替换或改变,而所有这些改变或替换都应属于本实用新型所附的权利要求的保护范围。

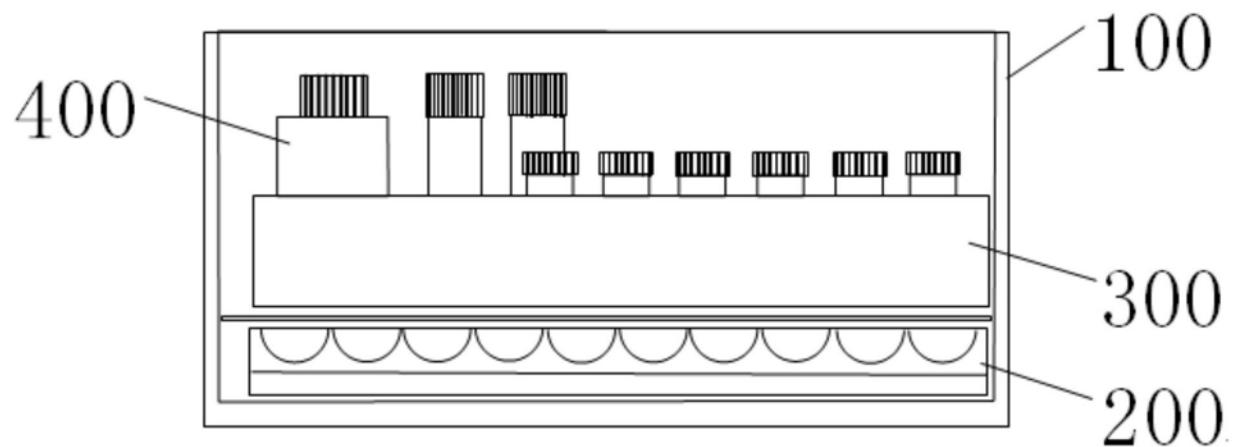


图1

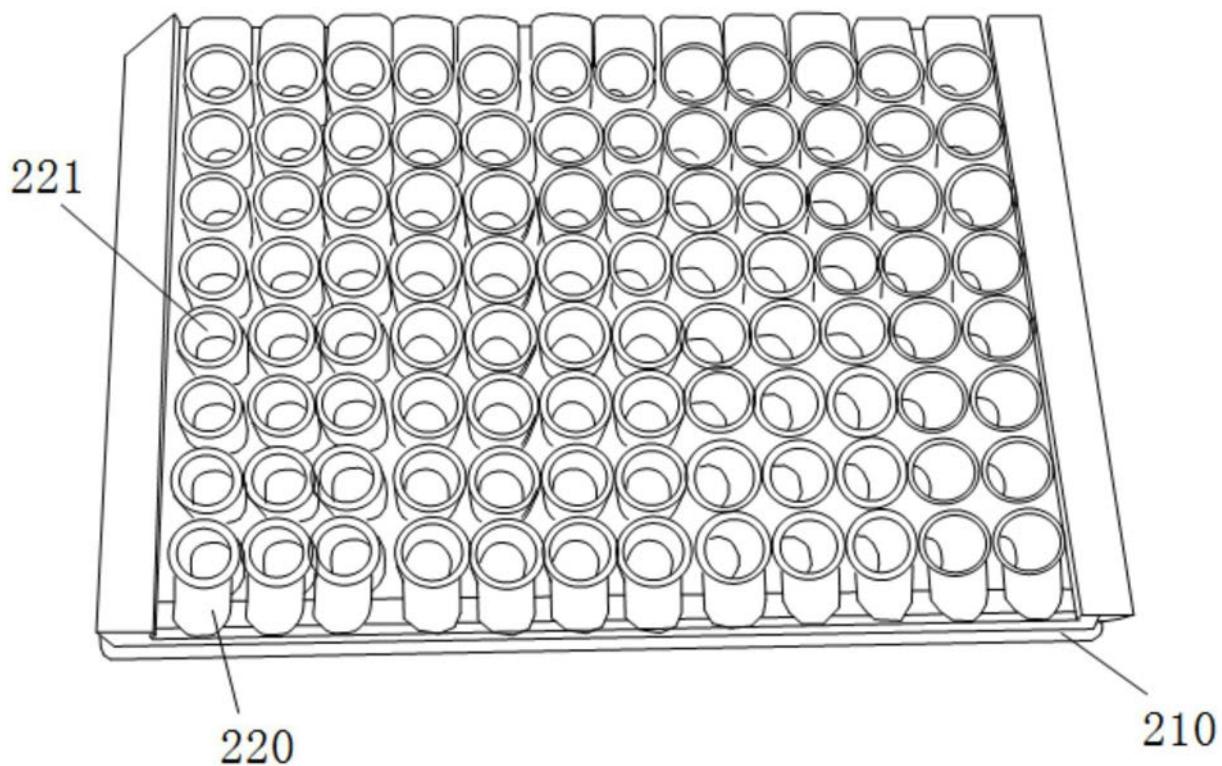


图2

专利名称(译)	一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN207866825U	公开(公告)日	2018-09-14
申请号	CN201721542873.0	申请日	2017-11-17
[标]发明人	陈欢 林金昌 催让莲 邓兴朝 曾祥富		
发明人	陈欢 林金昌 催让莲 邓兴朝 曾祥富		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	李想		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本实用新型实施例公开了一种用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，包括盒体及覆盖盒体顶部的盒盖，所述盒体内设置有酶标板和用于固定试剂瓶的海绵托架，所述海绵托架与酶标板形状与盒体开口相适应，盛装试剂瓶的海绵托架与酶标板依次叠置于盒体内。本实用新型实施例提供的用于呋喃唑酮残留分析的酶联免疫检测试剂盒，能够克服现有技术测试时间久，操作复杂的缺陷，具有灵敏度高，结构简单，样本处理时间短，使用和携带方便等优点，动物检验检疫单位可使用该检测试剂盒对动物源食品中呋喃唑酮残留进行快速分析检测。

