



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103616515 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 05

(21) 申请号 201310601069. 5

(22) 申请日 2013. 11. 25

(71) 申请人 洛阳莱普生信息科技有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛龙科技园区牡丹大道西 N3 号

(72) 发明人 王善普 张江宏 智雪玲 王庆利
张兴伟

(74) 专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 时国珍

(51) Int. Cl.

G01N 33/64 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于免疫学检测领域,具体涉及一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒。所述试剂盒由发光板、辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮多克隆抗体、玉米赤霉烯酮标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光底物液和包被抗原组成。采用本发明进行检测的灵敏度高,本发明的灵敏度可达 5-500ng/mL,能够检出放射免疫分析和酶联免疫分析等方法无法检出的物质,对抗生素残留的检测具有十分重要的意义。本发明发光强度在 4-6 个量级之间与测定物质浓度间呈线性关系。本发明的光信号持续时间长,分析方法简便快速。

1. 一种玉米赤酶烯酮化学发光检测试剂盒,由发光板、试剂和盒体构成,试剂放置在盒体中,其特征在于:所述试剂由辣根过氧化物酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体、玉米赤酶烯酮标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光底物液和包被抗原组成,所述辣根过氧化物酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体为以玉米赤酶烯酮与卵清蛋白偶联作为免疫原的大白兔抗体;

所述玉米赤酶烯酮与卵清蛋白偶联的免疫原制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 10mg 的对氨基苯甲酸加入到体积为 1.1mL 的氯化铵溶液中,制得对氨基苯甲酸溶液;之后称取 6mg 的 NaNO_2 加入到体积为 0.35mL 的蒸馏水中,在温度为 0-4°C 的条件下搅拌均匀,制得 NaNO_2 溶液;将 NaNO_2 溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应 1 小时,得溶液 A;

(2) 量取 2.4 μL 玉米赤酶烯酮溶液加入到体积为 10mL 的硼砂缓冲液中,并在温度为 0-4°C 下搅拌均匀,之后向该溶液中逐滴加入 0.9mL 的溶液 A,避光反应 2 小时,得到桔黄色溶液 B;所述硼砂缓冲液的浓度为 0.05mol/L, pH 值为 8.5,硼砂缓冲液中含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl;

(3) 向溶液 B 中加入 H_3BO_3 晶体直至溶液 B 的 pH 值为 7.4,之后向调过 pH 值的溶液 B 中加入 94mgBSA,80mgEDC,24mgNHS,在室温条件下搅拌 2 小时,得桔黄色溶液 C;

(4) 将溶液 C 转移到透析袋中,之后用 PBS 缓冲液在温度为 0-4°C 的条件下透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液,将透析后的溶液冻干,得到淡黄色固体粉末即为免疫原,将免疫原放置在温度为 -20°C 的条件下保存,备用;所述 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4,浓度为 0.01mol/L;

所述包被抗原的制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 9mg 的 NaNO_2 加入到体积为 3mL 的蒸馏水中,制得 NaNO_2 溶液,然后称取 10mg 的玉米赤酶烯酮加入到体积为 1.6mL、浓度为 0.2mol/L 的盐酸溶液中,在温度为 0-4°C 的条件下搅拌均匀,制得赤酶烯酮溶液,将 NaNO_2 溶液逐滴加入赤酶烯酮溶液中,避光反应 0.5 小时,之后向该溶液中加入 25mg 硫酸铵直至无氮气放出,制得溶液 D;

(2) 称取 70mg 卵清蛋白加入到 4mL 的 PBS 缓冲溶液中,所述 PBS 缓冲溶液的浓度为 0.1mol/L, pH 值为 7.5,然后将溶液 D 逐滴加入到该溶液中,制得混合液,然后用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液将混合液的 pH 值调至 7.5,并在温度为 0-4°C 的条件下避光反应 18 小时,制得溶液 E;

(3) 将溶液 E 转移到透析袋中,并在温度为 0-4°C 的条件下,用浓度为 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液,之后将透析液置于转速为 3000r/min 的离心机中离心 15 分钟,提取上清液并冻干,得到淡黄色固体粉末即为包被抗原,之后将包被抗原置于温度为 -20°C 的条件下保存,备用。

2. 根据权利要求 1 所述的一种玉米赤酶烯酮化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光底物液,包括 A 液和 B 液,所述 A 液的制备方法是:将浓度为 0.01mol/L 的鲁米诺溶解到浓度为 0.01M、pH 为 8.8 的 Tris 缓冲液中制得;所述 B 液的制备方法是:先将浓度为 0.001mol/L 的对碘苯酚溶解到浓度为 0.01mol/L、pH 为 8.8 的 Tris 缓冲液中,之后再向缓冲液中加入双氧水与水比例为 3:10000 的无菌水。

3. 根据权利要求 1 所述的一种玉米赤酶烯酮化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述

玉米赤酶烯酮标准液的浓度分别为 30ng/ml、60ng/ml、200ng/ml、500ng/ml。

4. 根据权利要求 1 所述的一种玉米赤酶烯酮化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的浓缩洗涤液由 NaCl 80g、 KH_2PO_4 2.0g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 229.0g、KCl 2.0g 和吐温 -20 溶于 1000mL 蒸馏水中搅拌均匀后制得,制得的浓缩洗涤液中吐温 -20 质量百分比浓度为 0.5%。

一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体涉及一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] 目前检测谷物中真菌毒素残留的技术主要有以下几种方法:

(1) 理化检测法:20 世纪 90 年代以后,绝大多数测定谷物中真菌毒素残留的理化检测法主要依靠液相色谱技术进行分离,其次是色 / 质谱联用技术,气相色谱法、高效薄层色谱法等检测法,因其各自特有的性能,在真菌毒素检测方面稍有应用。色谱法检测谷物中真菌毒素残留要经过样品处理(包括样品的提取、脱蛋白、离心、层析柱净化、衍生化等步骤)、残留药物的分离和残留药物的检测。理化检测法利用毒素分子中的基团所具有的特殊反应或性质来测定其含量,能进行定性、定量分析和药物鉴定,可作为谷物中真菌毒素残留检测的确证方法。该法检测敏感性较高,但仪器及检测费用高、检测程序复杂、较耗时间等。

[0003] (2) 免疫学分析法:免疫学分析法是以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的分析方法,目前真菌毒素残留免疫分析技术主要分三大类:相对独立的分析方法、免疫分析技术与常规理化分析技术联用的方法、免疫受体法。1973 年荷兰 van weeman、schurrs 及瑞典 Engvall、Perlmann 分别提出酶联免疫吸附法,30 多年来国内外学者对免疫学方法检测谷物中真菌毒素残留进行了大量研究。但由于毒素是半抗原,抗原构建技术难度大、免疫特异性强、检测成本高,目前 IDEXX 实验室公司等人在免疫分析法方面的研究较为成熟,国内该技术仍处于研究发展中。但是酶联免疫吸附法与发光法相比,酶联免疫吸附法灵敏度较低,检测结果不精确,影响进一步研究。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒,不仅灵敏度高、检测范围宽、操作简便快速、无毒无污染,而且所用器材、价格低廉,易于普及使用。

[0005] 本发明所采用的技术方案是,一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒,由发光板、试剂和盒体构成,试剂放置在盒体中,所述试剂由辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮多克隆抗体、玉米赤霉烯酮标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光底物液和包被抗原组成,所述辣根过氧化物酶标记的玉米赤霉烯酮多克隆抗体为以玉米赤霉烯酮与卵清蛋白偶联作为免疫原的大白兔抗体;

所述玉米赤霉烯酮与卵清蛋白偶联的免疫原制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 10mg 的对氨基苯甲酸加入到体积为 1.1mL 的氯化铵溶液中,制得对氨基苯甲酸溶液;之后称取 6mg 的 NaNO_2 加入到体积为 0.35mL 的蒸馏水中,在温度为 0-4°C 的条件下搅拌均匀,制得 NaNO_2 溶液;将 NaNO_2 溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应 1 小时,得溶液 A;

(2) 量取 2.4 μL 玉米赤霉烯酮溶液加入到体积为 10mL 的硼砂缓冲液中,并在温度为 0-4°C 下搅拌均匀,之后向该溶液中逐滴加入 0.9mL 的溶液 A,避光反应 2 小时,得到桔

黄色溶液 B ;所述硼砂缓冲液的浓度为 0.05mol/L, pH 值为 8.5, 硼砂缓冲液中含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl ;

(3) 向溶液 B 中加入 H_3BO_3 晶体直至溶液 B 的 pH 值为 7.4, 之后向调过 pH 值的溶液 B 中加入 94mgBSA, 80mgEDC, 24mgNHS, 在室温条件下搅拌 2 小时, 得桔黄色溶液 C ;

(4) 将溶液 C 转移到透析袋中, 之后用 PBS 缓冲液在温度为 0-4℃ 的条件下透析五天, 每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液, 将透析后的溶液冻干, 得到淡黄色固体粉末即为免疫原, 将免疫原放置在温度为 -20℃ 的条件下保存, 备用 ;所述 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4, 浓度为 0.01mol/L ;

所述包被抗原的制备方法, 包括以下步骤 :

(1) 称取 9mg 的 $NaNO_2$ 加入到体积为 3mL 的蒸馏水中, 制得 $NaNO_2$ 溶液, 然后称取 10mg 的玉米赤酶烯酮加入到体积为 1.6mL、浓度为 0.2mol/L 的盐酸溶液中, 在温度为 0-4℃ 的条件下搅拌均匀, 制得赤酶烯酮溶液, 将 $NaNO_2$ 溶液逐滴加入赤酶烯酮溶液中, 避光反应 0.5 小时, 之后向该溶液中加入 25mg 硫酸铵直至无氮气放出, 制得溶液 D ;

(2) 称取 70mg 卵清蛋白加入到 4mL 的 PBS 缓冲溶液中, 所述 PBS 缓冲溶液的浓度为 0.1mol/L, pH 值为 7.5, 然后将溶液 D 逐滴加入到该溶液中, 制得混合液, 然后用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液将混合液的 pH 值调至 7.5, 并在温度为 0-4℃ 的条件下避光反应 18 小时, 制得溶液 E ;

(3) 将溶液 E 转移到透析袋中, 并在温度为 0-4℃ 的条件下, 用浓度为 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液透析五天, 每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液, 之后将透析液置于转速为 3000r/min 的离心机中离心 15 分钟, 提取上清液并冻干, 得到淡黄色固体粉末即为包被抗原, 之后将包被抗原置于温度为 -20℃ 的条件下保存, 备用。

[0006] 所述化学发光底物液, 包括 A 液和 B 液, 所述 A 液的制备方法是 : 将浓度为 0.01mol/L 的鲁米诺溶解到浓度为 0.01M、pH 为 8.8 的 Tris 缓冲液中制得 ; 所述 B 液的制备方法是 : 先将浓度为 0.001mol/L 的对碘苯酚溶解到浓度为 0.01mol/L、pH 为 8.8 的 Tris 缓冲液中, 之后再向缓冲液中加入双氧水与水比例为 3:10000 的无菌水。

[0007] 所述玉米赤酶烯酮标准液的浓度分别为 30ng/ml、60ng/ml、200ng/ml、500ng/ml。

[0008] 所述的浓缩洗涤液由 NaCl 80g、 KH_2PO_4 2.0g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 229.0g、KCl 2.0g 和吐温 -20 溶于 1000mL 蒸馏水中搅拌均匀后制得, 制得的浓缩洗涤液中吐温 -20 质量百分比浓度为 0.5%。

[0009] 所述的浓缩洗涤液 : 在使用前, 将试剂盒中提供的浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 10 倍。

[0010] 本发明的有益效果有以下五个方面 :

一、本发明的试剂中通过采用多克隆抗体, 不仅利于检测结果的沉淀和凝集, 而且检测时反应强度大、易于观察。且本发明由于采用多克隆抗体, 不仅制备方法简单, 而且价格低廉, 大大降低了生产成本。

[0011] 二、本发明的灵敏度高, 灵敏度是化学发光免疫分析的关键, 本发明通过采用玉米赤酶烯酮与卵清蛋白的偶联物作为包被抗原、辣根过氧化物酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体作为抗体, 灵敏度可达 5-500 ng/mL, 能够检出放射免疫分析和酶联免疫分析等方法无法检出的物质, 对抗生素残留的检测具有重要意义。

[0012] 三、宽的线性动力学范围,本发明的发光强度在 4-6 个量级之间,且与测定物质浓度间呈线性关系。与显色的酶免疫分析吸光度(OD 值)为 2.0 的范围相比,优势明显。

[0013] 四、本产品发光底物稳定好,光信号持续时间长。

[0014] 五、安全性好、保存期长,本发明避免了放射性物质的使用,未发现危害性,且本发明的试剂稳定,保存期可达一年。

具体实施方式

[0015] 一种玉米赤酶烯酮化学发光检测试剂盒,由发光板、试剂和箱体构成,试剂放置在箱体中,所述试剂由辣根过氧化物酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体、玉米赤酶烯酮标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光底物液和包被抗原组成,所述辣根过氧化物酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体为以玉米赤酶烯酮与卵清蛋白偶联作为免疫原的大白兔抗体;

所述玉米赤酶烯酮与卵清蛋白偶联的免疫原制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 10mg 的对氨基苯甲酸加入到体积为 1.1mL 的氯化铵溶液中,制得对氨基苯甲酸溶液;之后称取 6mg 的 NaNO_2 加入到体积为 0.35mL 的蒸馏水中,在温度为 0-4℃ 的条件下搅拌均匀,制得 NaNO_2 溶液;将 NaNO_2 溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应 1 小时,得溶液 A;

(2) 量取 2.4 μL 玉米赤酶烯酮溶液加入到体积为 10mL 的硼砂缓冲液中,并在温度为 0-4℃ 下搅拌均匀,之后向该溶液中逐滴加入 0.9mL 的溶液 A,避光反应 2 小时,得到桔黄色溶液 B;所述硼砂缓冲液的浓度为 0.05mol/L, pH 值为 8.5,硼砂缓冲液中含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl;

(3) 向溶液 B 中加入 H_3BO_3 晶体直至溶液 B 的 pH 值为 7.4,之后向调过 pH 值的溶液 B 中加入 94mgBSA,80mgEDC,24mgNHS,在室温条件下搅拌 2 小时,得桔黄色溶液 C;

(4) 将溶液 C 转移到透析袋中,之后用 PBS 缓冲液在温度为 0-4℃ 的条件下透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液,将透析后的溶液冻干,得到淡黄色固体粉末即为免疫原,将免疫原放置在温度为 -20℃ 的条件下保存,备用;所述 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4,浓度为 0.01mol/L;

所述包被抗原的制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 9mg 的 NaNO_2 加入到体积为 3mL 的蒸馏水中,制得 NaNO_2 溶液,然后称取 10mg 的玉米赤酶烯酮加入到体积为 1.6mL、浓度为 0.2mol/L 的盐酸溶液中,在温度为 0-4℃ 的条件下搅拌均匀,制得赤酶烯酮溶液,将 NaNO_2 溶液逐滴加入赤酶烯酮溶液中,避光反应 0.5 小时,之后向该溶液中加入 25mg 硫酸铵直至无氮气放出,制得溶液 D;

(2) 称取 70mg 卵清蛋白加入到 4mL 的 PBS 缓冲溶液中,所述 PBS 缓冲溶液的浓度为 0.1mol/L, pH 值为 7.5,然后将溶液 D 逐滴加入到该溶液中,制得混合液,然后用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液将混合液的 pH 值调至 7.5,并在温度为 0-4℃ 的条件下避光反应 18 小时,制得溶液 E;

(3) 将溶液 E 转移到透析袋中,并在温度为 0-4℃ 的条件下,用浓度为 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液,之后将透析液置于转速为 3000r/min 的离心机中离心 15 分钟,提取上清液并冻干,得到淡黄色固体粉末即为包被抗

原,之后将包被抗原置于温度为 -20°C 的条件下保存,备用。

[0016] 所述化学发光底物液,包括A液和B液,所述A液的制备方法是:将浓度为 0.01mol/L 的鲁米诺溶解到浓度为 0.01M 、 pH 为 8.8 的Tris缓冲液中制得;所述B液的制备方法是:先将浓度为 0.001mol/L 的对碘苯酚溶解到浓度为 0.01mol/L 、 pH 为 8.8 的Tris缓冲液中,之后再向缓冲液中加入双氧水与水比例为 $3:10000$ 的无菌水。

[0017] 所述玉米赤酶烯酮标准液的浓度分别为 30ng/ml 、 60ng/ml 、 200ng/ml 、 500ng/ml 。

[0018] 所述的浓缩洗涤液由 NaCl 80g 、 KH_2PO_4 2.0g 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 229.0g 、 KCl 2.0g 和吐温-20溶于 1000mL 蒸馏水中搅拌均匀后制得,制得的浓缩洗涤液中吐温-20质量百分比浓度为 0.5% 。

[0019] 实施例1

一种玉米赤酶烯酮化学发光检测试剂盒,由发光板、试剂和盒体构成,试剂放置在盒体中,所述试剂由辣根过氧化酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体、玉米赤酶烯酮标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光底物液和包被抗原组成,所述辣根过氧化酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体为以玉米赤酶烯酮与卵清蛋白偶联作为免疫原的大白兔抗体;

所述玉米赤酶烯酮与卵清蛋白偶联的免疫原制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 10mg 的对氨基苯甲酸加入到体积为 1.1mL 的氯化铵溶液中,制得对氨基苯甲酸溶液;之后称取 6mg 的 NaNO_2 加入到体积为 0.35mL 的蒸馏水中,在温度为 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的条件下搅拌均匀,制得 NaNO_2 溶液;将 NaNO_2 溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应 1 小时,得溶液A;

(2) 量取 $2.4\mu\text{L}$ 玉米赤酶烯酮溶液加入到体积为 10mL 的硼砂缓冲液中,并在温度为 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀,之后向该溶液中逐滴加入 0.9mL 的溶液A,避光反应 2 小时,得到桔黄色溶液B;所述硼砂缓冲液的浓度为 0.05mol/L , pH 值为 8.5 ,硼砂缓冲液中含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl ;

(3) 向溶液B中加入 H_3BO_3 晶体直至溶液B的 pH 值为 7.4 ,之后向调过 pH 值的溶液B中加入 94mgBSA , 80mgEDC , 24mgNHS ,在室温条件下搅拌 2 小时,得桔黄色溶液C;

(4) 将溶液C转移到透析袋中,之后用PBS缓冲液在温度为 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的条件下透析五天,每 12 小时更换一次PBS缓冲液,将透析后的溶液冻干,得到淡黄色固体粉末即为免疫原,将免疫原放置在温度为 -20°C 的条件下保存,备用;所述PBS缓冲液的 pH 值为 7.4 ,浓度为 0.01mol/L ;

所述包被抗原的制备方法,包括以下步骤:

(1) 称取 9mg 的 NaNO_2 加入到体积为 3mL 的蒸馏水中,制得 NaNO_2 溶液,然后称取 10mg 的玉米赤酶烯酮加入到体积为 1.6mL 、浓度为 0.2mol/L 的盐酸溶液中,在温度为 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的条件下搅拌均匀,制得赤酶烯酮溶液,将 NaNO_2 溶液逐滴加入赤酶烯酮溶液中,避光反应 0.5 小时,之后向该溶液中加入 25mg 硫酸铵直至无氮气放出,制得溶液D;

(2) 称取 70mg 卵清蛋白加入到 4mL 的PBS缓冲溶液中,所述PBS缓冲溶液的浓度为 0.1mol/L , pH 值为 7.5 ,然后将溶液D逐滴加入到该溶液中,制得混合液,然后用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液将混合液的 pH 值调至 7.5 ,并在温度为 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的条件下避光反应 18 小时,制得溶液E;

(3) 将溶液E转移到透析袋中,并在温度为 $0-4^{\circ}\text{C}$ 的条件下,用浓度为 0.01mol/L , pH 值

为 7.4 的 PBS 缓冲液透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液,之后将透析液置于转速为 3000r/min 的离心机中离心 15 分钟,提取上清液并冻干,得到淡黄色固体粉末即为包被抗原,之后将包被抗原置于温度为 -20°C 的条件下保存,备用。

[0020] 所述化学发光底物液,包括 A 液和 B 液,所述 A 液的制备方法是:将浓度为 0.01mol/L 的鲁米诺溶解到浓度为 0.01M、pH 为 8.8 的 Tris 缓冲液中制得;所述 B 液的制备方法是:先将浓度为 0.001mol/L 的对碘苯酚溶解到浓度为 0.01mol/L、pH 为 8.8 的 Tris 缓冲液中,之后再向缓冲液中加入双氧水与水比例为 3:10000 的无菌水。

[0021] 所述玉米赤酶烯酮标准液的浓度分别为 30ng/ml、60ng/ml、200ng/ml、500ng/ml。

[0022] 所述的浓缩洗涤液由 NaCl 80g、 KH_2PO_4 2.0g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 229.0g、KCl 2.0g 和吐温 -20 溶于 1000mL 蒸馏水中搅拌均匀后制得,制得的浓缩洗涤液中吐温 -20 质量百分比浓度为 0.5%。

[0023] 样品的前期处理:

(1) 实验准备:配制体积百分比浓度为 60% 的甲醇水溶液和体积百分比浓度为 20% 的甲醇水溶液。

[0024] (2) 称取 5 g 待测样品粉碎后置于 100mL 的带塞三角瓶内,之后向三角瓶内加入 25 mL 体积百分比浓度 60% 甲醇水溶液。

[0025] (3) 将步骤 (2) 处理的样品放入振荡器内,充分振荡 3 分钟后,用 whatman 1 号滤纸过滤,收集滤液。

[0026] (4) 取步骤 (3) 的滤液 2mL,并加入 6 mL 体积百分比浓度为 20% 的甲醇水溶液,搅拌混匀后,用 whatman 1 号滤纸过滤,此为样品待检液。

[0027] 2、检测过程:

选择并将辣根过氧化物酶标记的玉米赤酶烯酮多克隆抗体稀释 8000 倍,包被抗原浓度为 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 进行试剂盒参数的测定。

[0028] (1) 包被:用浓度为 0.05M, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将包被抗原配成 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,每个聚苯乙烯板的反应孔中加 $100 \mu\text{L}$,在温度为 4°C 的条件下过夜保存。次日,除去反应孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次, $300 \mu\text{L}/\text{孔}$,每次 5 分钟,拍干。

[0029] (2) 封闭:用封闭溶液封闭上述已包被的酶标板, $250 \mu\text{L}/\text{孔}$,在温度为 37°C 的条件下孵育 1 小时,然后用洗涤缓冲液洗 3 次, $300 \mu\text{L}/\text{孔}$,每次 5 分钟。

(3) 加样:向步骤 (2) 中已封闭的反应孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 质量浓度分别为 30ng/ml, 60ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml 的赤酶烯酮标准溶液。然后向各反应孔中加入稀释 8000 倍后的辣根过氧化物酶标记的赤酶烯酮抗体, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$,在温度为 37°C 的条件下反应 0.5 小时,然后用洗涤缓冲液洗 3 次, $300 \mu\text{L}/\text{孔}$,每次 5 分钟。

(4) 发光:向各反应孔中加入临时配制的化学发光底物液 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$,并立即用化学发光免疫分析仪进行检测。

[0030] (5) 检测结果:取标准品浓度对数作横坐标,标准品检测发光值对数作纵坐标,做标准曲线,每一个样品的浓度可以从标准曲线上计算出来。

[0031] 检测结果如下表所示:

赤藓烯酮标准品(ng/ml)	发光值
5	458200
10	229100
30	76366
60	38183
200	11570
500	4628

专利名称(译)	一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103616515A	公开(公告)日	2014-03-05
申请号	CN201310601069.5	申请日	2013-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳莱普生信息科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳莱普生信息科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳莱普生信息科技有限公司		
[标]发明人	王善普 张江宏 智雪玲 王庆利 张兴伟		
发明人	王善普 张江宏 智雪玲 王庆利 张兴伟		
IPC分类号	G01N33/64 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学检测领域，具体涉及一种玉米赤霉烯酮化学发光检测试剂盒。所述试剂盒由发光板、辣根过氧化酶标记的玉米赤霉烯酮多克隆抗体、玉米赤霉烯酮标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光底物液和包被抗原组成。采用本发明进行检测的灵敏度高，本发明的灵敏度可达5-500ng/mL，能够检出放射免疫分析和酶联免疫分析等方法无法检出的物质，对抗生素残留的检测具有十分重要的意义。本发明发光强度在4-6个量级之间与测定物质浓度间呈线性关系。本发明的光信号持续时间长，分析方法简便快速。

赤霉烯酮标准品(ng/ml)	发光值
5	458200
10	229100
30	76366
60	38183
200	11570
500	4628