



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103645310 B

(45) 授权公告日 2016.06.01

(21) 申请号 201310578405.9

CN 102565032 A, 2012.07.11,

(22) 申请日 2013.11.18

张会彩 等. 动物饲料中呋喃唑酮的酶联免疫吸附检测研究. 《“2008 年京津冀畜牧兽医科技创新交流会暨新思想、新观点、新方法论坛”论文集》. 2010, 第 159-163 页.

(73) 专利权人 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

宋宁宁 等. 呋喃妥因残留代谢物人工抗原的合成与鉴定. 《中国动物传染病学报》. 2012, 第 20 卷 (第 3 期), 第 55-61 页.

(72) 发明人 王善普 李秀梅 耿玉静 李权伟
张和平 高进勇 李志彦 李胜利
刘海强 周小双 沈成蕊 张志鹏
张鹏翼

Wenxiao Jiang, et al.. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of nitrofurantoin metabolite, 1-amino-hydantoin, in animal tissue. 《Food Control》. 2012, 第 23 卷 (第 1 期), 第 20-25 页.

(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

审查员 赵晓明

(51) Int. Cl.

G01N 33/545(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101597330 A, 2009.12.09,

CN 101393212 A, 2009.03.25,

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

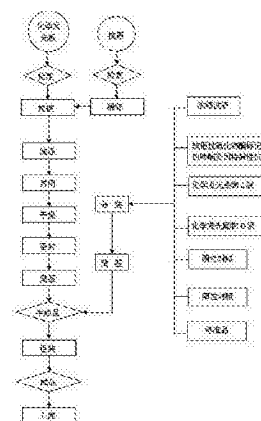
(54) 发明名称

一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种检测呋喃妥因化学发光检测试剂盒,包括浓缩洗液、阴性对照品、阳性对照品、化学发光液、呋喃妥因标准品、辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体和已包被呋喃妥因的发光板;所述的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体为,辣根过氧化物酶标记的以呋喃妥因-BSA 为免疫原免疫新西兰大白兔所得抗呋喃妥因多克隆抗体;用过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体;本发明检测呋喃妥因化学发光检测试剂盒灵敏度高、检测范围宽、操作简便快速且无毒无污染;采用呋喃妥因的代谢物与载体偶联制备包被抗原,更为经济;辣根过氧化物酶标记物的制备,采用一步法,方法简单步骤更为简单,利于工业化生产。

CN 103645310 B



1. 一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒,其特征在於:包括浓缩洗液、阴性对照品、阳性对照品、化学发光液、呋喃妥因标准品、辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体和已包被呋喃妥因的发光板;

所述的浓缩洗液为:含有 Tween-20 和氯化钠的磷酸盐缓冲液;

所述的阴性对照品为:5 份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阴性的猪尿混合物;

所述的阳性对照品为:5 份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阳性的猪尿混合物;

所述的化学发光液,包括 A 液和 B 液;A 液配制方法为:首先配置 0.2 mol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中加入鲁米诺和四苯硼钠,混合均匀即可得到 A 液;B 液配制方法为:首先配置 0.2 mol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中按重量比加入 0.1% H_2O_2 混合均匀即可得到 B 液;

所述的呋喃妥因标准品为浓度分别为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1ng/ml 呋喃妥因的稀释液;

所述的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体为,辣根过氧化物酶标记的以呋喃妥因-BSA 为免疫原免疫新西兰大白兔所得抗呋喃妥因多克隆抗体;用过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体,反应体系为:先用 1ml 浓度 5mg/ml 的辣根过氧化物酶溶液与 0.15ml 浓度 0.1 mol/L 的 $NaIO_4$ 溶液混匀后,置于 4℃ 避光 0.5 小时,然后加入 0.25ml 的乙二醇摇匀室温避光 1 小时,然后置于 4℃ 透析过夜,之后用 0.2ml 浓度 0.2 mol/L, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将透析后得到的醛化辣根过氧化物酶溶液调 pH 值为 9.2-9.5,将 5mg 抗呋喃妥因多克隆抗体溶于 1.0ml 浓度 0.01 mol/L, pH9.6 的碳酸盐包被溶液后立即加入上述醛化后的辣根过氧化物酶溶液中于 37℃ 反应 1 小时,然后加入 0.1ml 浓度 3.5mg/ml 的 $NaBH_4$ 溶液,混匀于 4℃ 放置 2 小时,用凝胶过滤层析进行纯化后,选择效价 $\geq 1:1000$ 的无色或带棕色澄清液体,即为辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体;

所述的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体的制备方法为:

步骤一、免疫原制备:

(1) 称 10mg 对氨基苯甲酸溶于 1.1ml 0.2 mol/L HCl 中,置于 0-4℃ 搅拌至完全溶解,得到对氨基苯甲酸溶液;然后称取 6mg 的 $NaNO_2$ 溶于 0.35ml 的蒸馏水中,置于 0-4℃ 搅拌至完全溶解,得到 $NaNO_2$ 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,得混合溶液 A;

(2) 称取 0.3-1.2mg 的呋喃妥因溶于 10ml 含 NaCl 的硼砂缓冲液中,置于 0-4℃ 下搅拌至完全溶解,得到混合溶液 B;将上述步骤所得混合溶液 A 逐滴加入到混合溶液 B 中,避光反应 2 小时,得到桔黄色溶液 C;

所述含 NaCl 的硼砂缓冲液中,硼砂的浓度为 0.05mol/L, pH 值为 8.5,并含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl;

(3) 在桔黄色溶液 C 中添加 H_3BO_3 晶体调节其 pH 值至 7.4,然后加入 94mg 牛血清白蛋白、80mg 碳二亚胺和 4mg N-羟基琥珀酰亚胺,然后置于室温搅拌 2 小时,得桔黄色溶液 D;

(4) 将上述步骤所得桔黄色溶液 D 转移到透析袋中,用 0.01mol/L, pH 为 7.4 的 PBS 缓

冲液,在 0-4℃下透析五天,每 12 小时更换一次透析液;将透析后的溶液冻干,得到淡黄色固体粉末即为免疫原呋喃妥因-BSA,将其置于 -20℃保存,备用;

步骤二、采用新西兰大白兔作为免疫动物,以呋喃妥因-BSA 为免疫原,首次免疫剂量为 100 μg/只兔子,首次免疫时将免疫原溶于等体积的生理盐水和弗氏完全佐剂制成乳化剂,颈背部多点注射,加强免疫剂量减半于等体积的生理盐水和弗氏不完全佐剂混合乳化,首次免疫与二次免疫间隔 14 天,以后每隔 2 周免疫一次共免疫五次,最后一次不加佐剂;最后一次免疫 7 天以后心脏采血,离心得到抗呋喃妥因多克隆抗体;

所述的已包被呋喃妥因的发光板的制备方法为:

步骤一、将呋喃妥因与卵清蛋白进行偶联得到包被抗原:

(1)称取 9mg 的 NaNO₂溶于 0.3mL 的蒸馏水中,得到 NaNO₂溶液;称取 10mg 呋喃妥因溶于 1.6mL 0.2mol/L 的盐酸中,0-4℃搅拌至完全溶解,得到呋喃妥因溶液;然后将所得 NaNO₂溶液逐滴加入所得呋喃妥因溶液中,避光反应 0.5 小时;

(2)反应结束后,加入 25mg 硫酸胺直至无氮气放出,即得到重氮化的呋喃妥因溶液;

(3)称 70mg 卵清蛋白溶解在 4mL 的 0.1mol/L, pH 值为 7.5 的 PBS 磷酸缓冲溶液中,得到卵清蛋白溶液;然后将上述步骤所述的重氮化的呋喃妥因溶液逐滴加入到卵清蛋白溶液中,得到混合溶液 E;接着用 1mol/L 的氢氧化钠将混合溶液 E 的 pH 值调至 7.5,然后置于 0-4℃下,避光反应 18 小时;

(4)将上述步骤避光反应后的反应液转移到透析袋中,用 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液,在 0-4℃下透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液;然后将透析液 3000 转/分离心 15 分钟,冻干上清液,得到淡黄色固体粉末即为包被抗原呋喃妥因-OVA,将其置于 -20℃保存,备用;

步骤二、包被:

(1)用 0.05 mol/L, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将包被抗原配成 1.5 μg/mL 的溶液,并向每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μL,之后 4℃下过夜,次日弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟;

(2)用封闭溶液封闭上述已包被的聚苯乙烯板,250 μL/孔,37℃孵育 1 小时后洗涤,得到已包被呋喃妥因的发光板;

所制备的呋喃妥因化学发光检测试剂盒检测呋喃妥因残留的方法,其具体检测步骤为:

步骤一、加样:将各浓度的呋喃妥因标准品溶液和样品溶液,以 50 μL/孔的加入量加入到已包被呋喃妥因的发光板的反应孔中,然后每孔加入 100 μL 采用包被液以 1:7000 比例稀释的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体,然后 37℃孵育 0.5 小时;

步骤二、洗涤:倾出已包被呋喃妥因的发光板的孔中液体,每孔加入洗涤溶液 250 μL,洗涤 3 次,拍干;

步骤三、加发光底物液:将发光底物的 A 液和 B 液混合后得混合物,在已包被呋喃妥因的发光板中每孔加入 100 μL 发光底物液混合物,

步骤四、检测:用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光强度;

步骤五、结果判断:取标准品浓度对数做横坐标,标准品检测发光值对数做纵坐标,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。

一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,具体的说是一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] 目前检测饲料中抗生素的技术主要有以下几种方法:

[0003] (1) 理化检测法

[0004] 20 世纪 90 年代以后,绝大多数测定呋喃妥因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,在抗生素残留检测方面稍有应用。色谱法检测饲料中的药物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)、药物的分离和药物的检测。理化检测法利用抗生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,可作为饲料抗生素检测的确证方法。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。

[0005] (2) 免疫学分析法

[0006] 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,目前药物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食品中抗生素进行了大量研究。但由于抗生素是半抗原,抗原构建技术难度大、免疫特异性强、检测成本高,目前 IDEXX 等公司在免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。当前主要是用酶联免疫吸附试验、放射性免疫发光法、荧光免疫法、化学发光法等;酶联免疫吸附试验、放射性免疫发光法、荧光免疫法等方法与发光相化学发光法比较,其酶免灵敏度较低。

发明内容

[0007] 本发明目的是为解决上述技术问题的不足,提供一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒,其具有灵敏度高、检测范围宽、操作简便快速等优点。

[0008] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案是:一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒,包括浓缩洗液、阴性对照品、阳性对照品、化学发光液、呋喃妥因标准品、辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体和已包被呋喃妥因的发光板;

[0009] 所述的浓缩洗液为:含有 Tween-20 和氯化钠的磷酸盐缓冲液;

[0010] 所述的阴性对照品为:5 份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阴性的猪尿混合物;

[0011] 所述的阳性对照品为:5 份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阳性的猪尿混合物;

[0012] 所述的化学发光液,包括 A 液和 B 液;A 液配制方法为:首先配置 0.2 mol/L pH7.8

的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中加入鲁米诺和四苯硼钠,混合均匀即可得到 A 液;B 液配制方法为:首先配置 0.2 mol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中按重量比加入 0.1% H₂O₂混合均匀即可得到 B 液;

[0013] 所述的呋喃妥因标准品为浓度分别为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1ng/ml 呋喃妥因的稀释液;

[0014] 所述的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体为,辣根过氧化物酶标记的以呋喃妥因-BSA 为免疫原免疫新西兰大白兔所得抗呋喃妥因多克隆抗体;用过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体,反应体系为:先用 1ml 浓度 5mg/ml 的辣根过氧化物酶溶液与 0.15ml 浓度 0.1 mol/L 的 NaIO₄溶液混匀后,置于 4℃避光 0.5 小时,然后加入 0.25ml 的乙二醇摇匀室温避光 1 小时,然后置于 4℃透析过夜,之后用 0.2ml 浓度 0.2 mol/L, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将透析后得到的醛化辣根过氧化物酶溶液调 pH 值为 9.2-9.5,将 5mg 抗呋喃妥因多克隆抗体溶于 1.0ml 浓度 0.01 mol/L, pH9.6 的包被液后立即加入上述醛化后的辣根过氧化物酶溶液中于 37℃反应 1 小时,然后加入 0.1ml 浓度 3.5mg/ml 的 NaBH₄溶液,混匀于 4℃放置 2 小时,用凝胶过滤层析进行纯化后,选择效价 ≥ 1:1000 的无色或带棕色澄清液体,即为辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体;

[0015] 所述的呋喃妥因-BSA 免疫原的制备方法为:

[0016] 步骤一、免疫原制备:

[0017] 步骤一、称 10mg 对氨基苯甲酸溶于 1.1ml 0.2 mol/L HCl 中,置于 0-4℃搅拌至完全溶解,得到对氨基苯甲酸溶液;然后称取 6mg 的 NaNO₂溶在 0.35ml 的蒸馏水中,置于 0-4℃搅拌至完全溶解,得到 NaNO₂溶液;将 NaNO₂溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应 1 小时,得混合溶液 A;

[0018] 步骤二、称取 0.3-1.2mg 的呋喃妥因溶在 10ml 含 NaCl 的硼砂缓冲液中,置于 0-4℃下搅拌至完全溶解,得到混合溶液 B;将上述步骤所得混合溶液 A 逐滴加入到混合溶液 B 中,避光反应 2 小时,得到桔黄色溶液 C;

[0019] 所述含 NaCl 的硼砂缓冲液中,硼砂的浓度为 0.05mol/L, pH 值为 8.5,并含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl;

[0020] 步骤三、在桔黄色溶液 C 中添加 H₃BO₃晶体调节其 pH 值至 7.4,然后加入 94mg 牛血清白蛋白、80mg 碳二亚胺和 4mg N-羟基琥珀酰亚胺,然后置于室温搅拌 2 小时,得桔黄色溶液 D;

[0021] 步骤四、将上述步骤所得桔黄色溶液 D 转移到透析袋中,用 0.01mol/L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液,在 0-4℃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呋喃妥因-BSA,将其置于 -20℃保存,备用。

[0022] 所述的已包被呋喃妥因的发光板的制备方法为:

[0023] 步骤一、将呋喃妥因与卵清蛋白进行偶联得到包被抗原:

[0024] (1)称取 9mg 的 NaNO₂溶于 0.3ml 的蒸馏水中,得到 NaNO₂溶液;称取 10mg 呋喃妥因溶在 1.6ml 0.2mol/L 的盐酸中,0-4℃搅拌至完全溶解,得到呋喃妥因溶液;然后将所得 NaNO₂溶液逐滴加入所得呋喃妥因溶液中,避光反应 0.5 小时;

[0025] (2)反应结束后,加入 25mg 硫酸胺直至无氮气放出,即得到重氮化的呋喃妥因溶液;

[0026] (3) 称 70mg 卵清蛋白溶解在 4mL 的 0.1mol/L, pH 值为 7.5 的 PBS 磷酸缓冲溶液中, 得到卵清蛋白溶液; 然后将上述步骤所述的重氮化的呋喃妥因溶液逐滴加入到卵清蛋白溶液中, 得到混合溶液 E; 接着用 1mol/L 的氢氧化钠将混合溶液 E 的 pH 至调至 7.5, 然后置于 0-4℃ 下, 避光反应 18 小时;

[0027] (4) 将上述步骤避光反应后的反应液转移到透析袋中, 用 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液, 在 0-4℃ 下透析五天, 每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液; 然后将透析液 3000 转/分离心 15 分钟, 冻干上清液, 得到淡黄色固体粉末即为包被抗原呋喃妥因-OVA, 将其置于 -20℃ 保存, 备用;

[0028] 步骤二、包被:

[0029] (1) 用 0.05 mol/L, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将包被抗原配成 1.5 μg/mL 的溶液, 并向每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μL, 之后 4℃ 下过夜, 次日弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 分钟;

[0030] (2) 用封闭溶液封闭上述已包被的聚苯乙烯板, 250 μL/孔, 37℃ 孵育 1 小时后洗涤, 得到已包被呋喃妥因的发光板。

[0031] 一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒的检测方法, 其具体检测步骤为:

[0032] 步骤一、加样: 将各浓度的呋喃妥因标准品溶液和样品溶液, 以 50 μL/孔的加入量加入到已包被呋喃妥因的发光板的反应孔中, 然后每孔加入 100 μL 采用包被液以 1:7000 比例稀释的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体, 然后 37℃ 孵育 0.5 小时;

[0033] 步骤二、洗涤: 倾出已包被呋喃妥因的发光板的孔中液体, 每孔加入洗涤溶液 250 μL, 洗涤 3 次, 拍干;

[0034] 步骤三、加发光底物液: 将发光底物的 A 液和 B 液混合后得混合物, 在已包被呋喃妥因的发光板中每孔加入 100 μL 发光底物液混合物,

[0035] 步骤四、检测: 用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光强度;

[0036] 步骤五、结果判断: 取标准品浓度对数做横坐标, 标准品检测发光值对数做纵坐标, 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。

[0037] 有益效果是:

[0038] 1、本发明呋喃妥因化学发光检测试剂盒, 灵敏度高、检测范围宽、操作简便快速、无毒无污染、光信号持续时间长且所用仪器简单, 经济的检测呋喃妥因的化学发光检测试剂盒, 同时提供了其制备方法, 以及检测样品中呋喃妥因抗生素的方法。抗生素残留检测的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确、安全性好及使用期长的特点, 与传统的比色 ELISA 法比较, 分析方法简便快速、灵敏度可以提高一个数量级。有望在饲料中呋喃妥因残留检测中发挥重要作用。

[0039] 2、本发明呋喃妥因化学发光检测试剂盒采用呋喃妥因的代谢物与载体偶联制备包被抗原, 更为经济, 步骤更为简单, 利于工业化生产; 辣根过氧化物酶标记物的制备, 采用一步法, 方法简单, 更适合工业化生产, 且经试验验证得到了很好的效果。

附图说明

[0040] 图 1 为本发明制备呋喃妥因化学发光检测试剂盒的工艺流程图;

[0041] 图 2 为本发明的实施例检测的结果标准曲线图;

具体实施方式

[0042] 一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒,包括浓缩洗液、阴性对照品、阳性对照品、化学发光液、呋喃妥因标准品、辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体和已包被呋喃妥因的发光板;具体制备过程如图1中所示;

[0043] 所述的浓缩洗液为:含有 Tween-20 和氯化钠的磷酸盐缓冲液;

[0044] 所述的阴性对照品为:5份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阴性的猪尿混合物;

[0045] 所述的阳性对照品为:5份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阳性的猪尿混合物;

[0046] 所述的化学发光液,包括A液和B液;A液配制方法为:首先配置0.2 mol/L pH7.8的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中加入鲁米诺和四苯硼钠,混合均匀即可得到A液;B液配制方法为:首先配置0.2 mol/L pH7.8的 Tris-HCl 缓冲液,在此缓冲液中按重量比加入0.1% H₂O₂混合均匀即可得到B液;

[0047] 所述的呋喃妥因标准品为浓度分别为0ng/ml、0.1ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1ng/ml 呋喃妥因的稀释液;

[0048] 所述的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体的制备方法为:

[0049] 步骤一、免疫原制备:

[0050] (1) 称10mg对氨基苯甲酸溶于1.1mL 0.2 mol/L HCl 中,置于0-4℃搅拌至完全溶解,得到对氨基苯甲酸溶液;然后称取6mg的NaNO₂溶于0.35mL的蒸馏水中,置于0-4℃搅拌至完全溶解,得到NaNO₂溶液;将NaNO₂溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1小时,得混合溶液A;

[0051] (2) 称取0.3-1.2mg的呋喃妥因溶于10mL含NaCl的硼砂缓冲液中,置于0-4℃下搅拌至完全溶解,得到混合溶液B;将上述步骤所得混合溶液A逐滴加入到混合溶液B中,避光反应2小时,得到桔黄色溶液C;

[0052] 所述含NaCl的硼砂缓冲液中,硼砂的浓度为0.05mol/L, pH值为8.5,并含有浓度为0.15mol/L的NaCl;

[0053] (3) 在桔黄色溶液C中添加H₃BO₃晶体调节其pH值至7.4,然后加入94mg牛血清白蛋白、80mg碳二亚胺和4mg N-羟基琥珀酰亚胺,然后置于室温搅拌2小时,得桔黄色溶液D;

[0054] (4) 将上述步骤所得桔黄色溶液D转移到透析袋中,用0.01mol/L, pH为7.4的PBS缓冲液,在0-4℃下透析五天,每12小时更换一次透析液;将透析后的溶液冻干,得到淡黄色固体粉末即为免疫原呋喃妥因-BSA,将其置于-20℃保存,备用。

[0055] 步骤二、采用新西兰大白兔作为免疫动物,以呋喃妥因-BSA为免疫原,首次免疫剂量为100 μg/只兔子,首次免疫时将免疫原溶于入等体积的生理盐水和弗氏完全佐剂制成乳化剂,颈背部多点注射,加强免疫剂量减半于等体积的生理盐水和弗氏不完全佐剂混合乳化,首次免疫与二次免疫间隔14天,以后每隔2周免疫一次共免疫五次,最后一次不加佐剂;最后一次免疫7天以后心脏采血,离心得到抗呋喃妥因多克隆抗体。

[0056] 步骤三、辣根过氧化物酶标记物的制备

[0057] 用过碘酸钠法制备酶标记呋喃妥因抗体,反应体系为:先用 1ml 浓度 5mg/ml 的辣根过氧化物酶溶液与 0.15ml 浓度 0.1 mol/L 的 NaIO_4 溶液混匀后,置于 4℃ 避光 0.5 小时,然后加入 0.25ml 的乙二醇摇匀室温避光 1 小时,然后置于 4℃ 透析过夜,之后用 0.2ml 浓度 0.2 mol/L, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将透析后得到的醛化辣根过氧化物酶溶液调 pH 值为 9.2-9.5,将 5mg 抗呋喃妥因多克隆抗体溶于 1.0ml 浓度 0.01 mol/L, pH 9.6 的包被液后立即加入上述醛化后的辣根过氧化物酶溶液中于 37℃ 反应 1 小时,然后加入 0.1ml 浓度 3.5mg/ml 的 NaBH_4 溶液,混匀于 4℃ 放置 2 小时,用凝胶过滤层析进行纯化后,选择效价 $\geq 1:1000$ 的无色或带棕色澄清液体,即为辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体;

[0058] 所述的已包被呋喃妥因的发光板的制备方法为:

[0059] 步骤一、将呋喃妥因与卵清蛋白进行偶联得到包被抗原:

[0060] (1)称取 9mg 的 NaNO_2 溶于 0.3ml 的蒸馏水中,得到 NaNO_2 溶液;称取 10mg 呋喃妥因溶在 1.6ml 0.2mol/L 的盐酸中,0-4℃ 搅拌至完全溶解,得到呋喃妥因溶液;然后将所得 NaNO_2 溶液逐滴加入所得呋喃妥因溶液中,避光反应 0.5 小时;

[0061] (2)反应结束后,加入 25mg 硫酸胺直至无氮气放出,即得到重氮化的呋喃妥因溶液;

[0062] (3)称 70mg 卵清蛋白溶解在 4ml 的 0.1mol/L, pH 值为 7.5 的 PBS 磷酸缓冲溶液中,得到卵清蛋白溶液;然后将上述步骤所述的重氮化的呋喃妥因溶液逐滴加入到卵清蛋白溶液中,得到混合溶液 E;接着用 1mol/L 的氢氧化钠将混合溶液 E 的 pH 至调至 7.5,然后置于 0-4℃ 下,避光反应 18 小时;

[0063] (4)将上述步骤避光反应后的反应液转移到透析袋中,用 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液,在 0-4℃ 下透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液;然后将透析液 3000 转/分离心 15 分钟,冻干上清液,得到淡黄色固体粉末即为包被抗原呋喃妥因-OVA,将其置于 -20℃ 保存,备用;

[0064] 步骤二、包被:

[0065] (1)用 0.05 mol/L, 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,并向每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μL ,之后 4℃ 下过夜,次日弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟;

[0066] (2)用封闭溶液封闭上述已包被的聚苯乙烯板,250 $\mu\text{L}/$ 孔,37℃ 孵育 1 小时后洗涤,得到已包被呋喃妥因的发光板。

[0067] 一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒的检测方法,其具体检测步骤为:

[0068] 步骤一、加样:将各浓度的呋喃妥因标准品溶液以 50 $\mu\text{L}/$ 孔的加入量加入到已包被呋喃妥因的发光板的反应孔中,然后每孔加入 100 μL 采用包被液以 1:7000 比例稀释的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体,然后 37℃ 孵育 0.5 小时;

[0069] 步骤二、洗涤:倾出已包被呋喃妥因的发光板的孔中液体,每孔加入洗涤溶液 250 μL ,洗涤 3 次,拍干;

[0070] 步骤三、加发光底物液:将发光底物的 A 液和 B 液混合后得混合物,在已包被呋喃妥因的发光板中每孔加入 100 μL 发光底物液混合物,

[0071] 步骤四、检测:用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光强度;

[0072] 步骤五、结果判断:取标准品浓度对数做横坐标,标准品检测发光值对数做纵坐

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。

实施例

[0073] 一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒, 包括浓缩洗液、阴性对照品、阳性对照品、化学发光液、呋喃妥因标准品、辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体和已包被呋喃妥因的发光板;

[0074] 所述的浓缩洗液为: 含有 Tween-20 和氯化钠的磷酸盐缓冲液;

[0075] 所述的阴性对照品为: 5 份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阴性的猪尿混合物;

[0076] 所述的阳性对照品为: 5 份以上单独存放的除菌过滤后的呋喃妥因检测为阳性的猪尿混合物;

[0077] 所述的化学发光液, 包括 A 液和 B 液; A 液配制方法为: 首先配置 0.2 mol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 在此缓冲液中加入鲁米诺和四苯硼钠, 混合均匀即可得到 A 液; B 液配制方法为: 首先配置 0.2 mol/L pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 在此缓冲液中按重量比加入 0.1% H_2O_2 混合均匀即可得到 B 液;

[0078] 所述的呋喃妥因标准品为浓度分别为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1ng/ml 呋喃妥因的稀释液;

[0079] 所述的辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体的制备方法为:

[0080] 步骤一、免疫原制备:

[0081] (1) 称 10mg 对氨基苯甲酸溶于 1.1mL 0.2 mol/L HCl 中, 置于 0-4°C 搅拌至完全溶解, 得到对氨基苯甲酸溶液; 然后称取 6mg 的 $NaNO_2$ 溶于 0.35mL 的蒸馏水中, 置于 0-4°C 搅拌至完全溶解, 得到 $NaNO_2$ 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, 得混合溶液 A;

[0082] (2) 称取 0.3-1.2mg 的呋喃妥因溶于 10mL 含 NaCl 的硼砂缓冲液中, 置于 0-4°C 下搅拌至完全溶解, 得到混合溶液 B; 将上述步骤所得混合溶液 A 逐滴加入到混合溶液 B 中, 避光反应 2 小时, 得到桔黄色溶液 C;

[0083] 所述含 NaCl 的硼砂缓冲液中, 硼砂的浓度为 0.05mol/L, pH 值为 8.5, 并含有浓度为 0.15mol/L 的 NaCl;

[0084] (3) 在桔黄色溶液 C 中添加 H_3BO_3 晶体调节其 pH 值至 7.4, 然后加入 94mg 牛血清白蛋白、80mg 碳二亚胺和 4mg N-羟基琥珀酰亚胺, 然后置于室温搅拌 2 小时, 得桔黄色溶液 D;

[0085] (4) 将上述步骤所得桔黄色溶液 D 转移到透析袋中, 用 0.01mol/L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液, 在 0-4°C 下透析五天, 每 12 小时更换一次透析液; 将透析后的溶液冻干, 得到淡黄色固体粉末即为免疫原呋喃妥因-BSA, 将其置于 -20°C 保存, 备用。

[0086] 步骤二、采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以呋喃妥因-BSA 为免疫原, 首次免疫剂量为 100 μ g/ 只兔子, 首次免疫时将免疫原溶于入等体积的生理盐水和弗氏完全佐剂制成乳化剂, 颈背部多点注射, 加强免疫剂量减半于等体积的生理盐水和弗氏不完全佐剂混合乳化, 首次免疫与二次免疫间隔 14 天, 以后每隔 2 周免疫一次共免疫五次, 最后一次不加佐剂; 最后一次免疫 7 天以后心脏采血, 离心得到抗呋喃妥因多克隆抗体。

[0087] 步骤三、辣根过氧化物酶标记物的制备

[0088] 用过碘酸钠法制备酶标记呋喃妥因抗体,反应体系为:先用 1ml 浓度 5mg/ml 的辣根过氧化物酶溶液与 0.15ml 浓度 0.1 mol/L 的 NaIO_4 溶液混匀后,置于 4℃ 避光 0.5 小时,然后加入 0.25ml 的乙二醇摇匀室温避光 1 小时,然后置于 4℃ 透析过夜,之后用 0.2ml 浓度 0.2 mol/L, pH 值为 9.6 的碳酸盐包被溶液将透析后得到的醛化辣根过氧化物酶溶液调 pH 值为 9.2-9.5,将 5mg 抗呋喃妥因多克隆抗体溶于 1.0ml 浓度 0.01 mol/L, pH9.6 的包被液后立即加入上述醛化后的辣根过氧化物酶溶液中于 37℃ 反应 1 小时,然后加入 0.1ml 浓度 3.5mg/ml 的 NaBH_4 溶液,混匀于 4℃ 放置 2 小时,用凝胶过滤层析进行纯化后,选择效价 $\geq 1:1000$ 的无色或带棕色澄清液体,即为辣根过氧化物酶标记的呋喃妥因特异性抗体;

[0089] 所述的已包被呋喃妥因的发光板的制备方法为:

[0090] 步骤一、将呋喃妥因与卵清蛋白进行偶联得到包被抗原:

[0091] (1)称取 9mg 的 NaNO_2 溶于 0.3mL 的蒸馏水中,得到 NaNO_2 溶液;称取 10mg 呋喃妥因溶在 1.6mL 0.2mol/L 的盐酸中,0-4℃ 搅拌至完全溶解,得到呋喃妥因溶液;然后将所得 NaNO_2 溶液逐滴加入所得呋喃妥因溶液中,避光反应 0.5 小时;

[0092] (2)反应结束后,加入 25mg 硫酸胺直至无氮气放出,即得到重氮化的呋喃妥因溶液;

[0093] (3)称 70mg 卵清蛋白溶解在 4mL 的 0.1mol/L, pH 值为 7.5 的 PBS 磷酸缓冲溶液中,得到卵清蛋白溶液;然后将上述步骤所述的重氮化的呋喃妥因溶液逐滴加入到卵清蛋白溶液中,得到混合溶液 E;接着用 1mol/L 的氢氧化钠将混合溶液 E 的 pH 至调至 7.5,然后置于 0-4℃ 下,避光反应 18 小时;

[0094] (4)将上述步骤避光反应后的反应液转移到透析袋中,用 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液,在 0-4℃ 下透析五天,每 12 小时更换一次 PBS 缓冲液;然后将透析液 3000 转/分离心 15 分钟,冻干上清液,得到淡黄色固体粉末即为包被抗原呋喃妥因-OVA,将其置于 -20℃ 保存,备用;

[0095] 步骤二、包被:

[0096] (1)用 0.05 mol/L, 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,并向每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μL ,之后 4℃ 下过夜,次日弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟;

[0097] (2)用封闭溶液封闭上述已包被的聚苯乙烯板,250 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37℃ 孵育 1 小时后洗涤,得到已包被呋喃妥因的发光板。

[0098] 一种呋喃妥因化学发光检测试剂盒的具体检测步骤:

[0099] 步骤一、样品前处理

[0100] 饲料前处理方法:称取 $1.0 \pm 0.05\text{g}$ 饲料样本;加入 5ml 去离子水,充分振荡至溶解;取出 50 μL 上清用做分析。

[0101] 步骤二、检测步骤

[0102] (1)加样:向发光板中加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的呋喃妥因代谢物系列标准浓度溶液及样品溶液,然后加入呋喃妥因代谢物抗体工作液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,加入新鲜稀释辣根过氧化物酶-呋喃妥因抗体 (1:7000) 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37℃ 0.5 小时;

[0103] (2)洗涤:倾出孔中液体,向发光板中加入 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的洗涤液,静置 5min 后拍干,

重复三次；

[0104] (3) 加发光液：每孔加入发光液 100uL；

[0105] (4) 结果判断：取标准品浓度对数做横坐标，标准品检测发光值对数做纵坐标，做标准曲线，结果如图 2，图中标准曲线 $y=-1.0354x+4.7213$ ， $R^2=0.9983$ ；每一个样品的浓度可以从标准曲线上计算出来，结果如表 1。

[0106] 表 1：

[0107]

呋喃妥因标准品 (ng/ml)	发光值
0.1	550000
0.3	183000
0.9	60000
2.7	21000
8.1	5500
24.3	1800

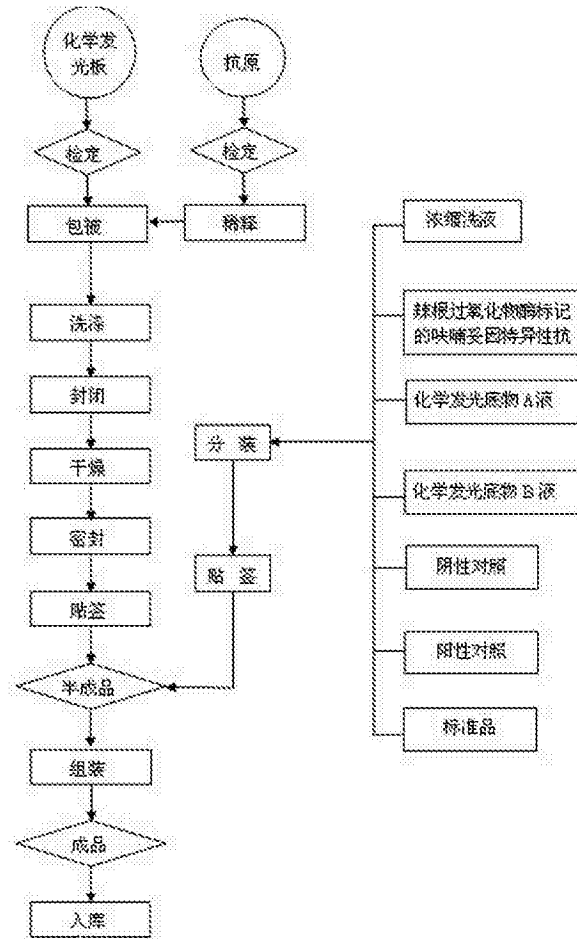


图 1

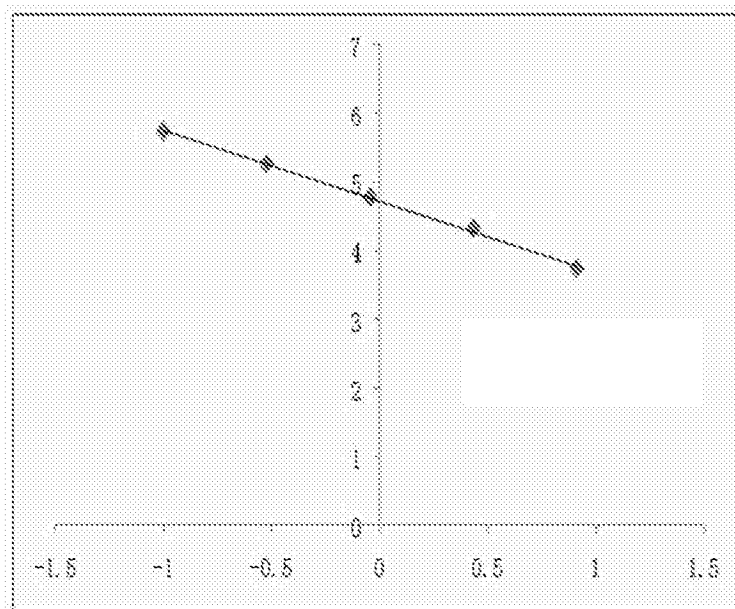


图 2

专利名称(译)	一种咪喃妥因化学发光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103645310B	公开(公告)日	2016-06-01
申请号	CN201310578405.9	申请日	2013-11-18
[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 李秀梅 耿玉静 李权伟 张和平 高进勇 李志彦 李胜利 刘海强 周小双 沈成蕊 张志鹏 张鹏翼		
发明人	王善普 李秀梅 耿玉静 李权伟 张和平 高进勇 李志彦 李胜利 刘海强 周小双 沈成蕊 张志鹏 张鹏翼		
IPC分类号	G01N33/545 G01N21/76 G01N33/532		
CPC分类号	G01N21/763 G01N33/535 G01N33/54373		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN103645310A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测咪喃妥因化学发光检测试剂盒，包括浓缩洗液、阴性对照品、阳性对照品、化学发光液、咪喃妥因标准品、辣根过氧化物酶标记的咪喃妥因特异性抗体和已包被咪喃妥因的发光板；所述的辣根过氧化物酶标记的咪喃妥因特异性抗体为，辣根过氧化物酶标记的以咪喃妥因-BSA为免疫原免疫新西兰大白兔所得抗咪喃妥因多克隆抗体；用过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标

记的呋喃妥因特异性抗体；本发明检测呋喃妥因化学发光检测试剂盒灵敏度高、检测范围宽、操作简便快速且无毒无污染；采用呋喃妥因的代谢物与载体偶联制备包被抗原，更为经济；辣根过氧化物酶标记物的制备，采用一步法，方法简单步骤更为简单，利于工业化生产。

