



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277683 A

(43) 申请公布日 2016.01.27

(21) 申请号 201410352469.1

(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 薛永来 邓榕榕

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测虾肉中的氯霉素的荧光分析法

(57) 摘要

一种检测氯霉素的试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIR)技术领域。本发明配制的试剂盒,采用 TRFIR 检测氯霉素,测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 CAP-OVA,加入 CAP 标准或样品,再加入 CAP 抗体。游离的 CAP 与微孔板上的 CAP-OVA 竞争 CAP 抗体,没有连接的 CAP 抗体被洗涤除去,加入 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体,标记免疫反应后没有连接的 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体被洗涤除去。加增强液后,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的 CAP 浓度成反比,对照标准曲线即可确定被测样品中 CAP 的含量。本发明提供的检测 CAP 试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,操作时间大幅度减少;可用作检测水产品(鱼肉、虾肉)中氯霉素残留检测。

1. 一种检测氯霉素 (CAP) 的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征是:(1)96 或 48 孔包被板;(2) 缓冲液;(3) 氯霉素标准;(4) 氯霉素的抗体冻干品;(5) 铕标记的羊抗鼠抗体;(6) 洗涤液;(7) 增强液所组成。

2. 一种用权利要求 1 所述的试剂盒氯霉素的方法,其特征是取包被有 CAP-OVA 的微孔包被板,加入 CAP 标准或处理好的样品到各自的微孔中,再加入 CAP 抗体,振荡反应,洗涤液洗涤,加铕标记的羊抗鼠 抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加增强液振荡后测量荧光强度 cps,对照标准曲线计算样品 中的 CAP 含量。

3. 根据权利要求 2 所述的检测氯霉素的方法,其操作为:取包被有 CAP-OVA 的微孔包被板,加入 50 μ L 的 CAP 标准或处理好的样品到各自的微孔中,加 50 μ l 以缓冲液 (2) 稀释的 CAP 抗体,25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小 时,洗涤液洗三次,加以缓冲液 (2) 稀释的 100 μ L Eu^{3+} -羊抗鼠抗体,25 $^{\circ}$ C 振荡 0.5 小时,用洗涤液洗 六次,加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps,从标准曲线计算样品中的 CAP 含量。

一种检测虾肉中的氯霉素的荧光分析法

技术领域

[0001] 一种检测氯霉素 (CAP) 的试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域,用于鱼、虾等样品中氯霉素的含量检测。

背景技术

[0002] 氯霉素是一种广谱抗生素,常用于动物各种传染病的治疗,对于多种病原菌有较强的抑制作用。氯霉素存在严重的副作用,能抑制人体骨髓造血功能,引起人类的再生障碍性贫血等疾病,因此动物食品中的氯霉素残留对人类的健康构成巨大威胁。

[0003] 目前有关动物源性食品中氯霉素及其代谢物的测定方法主要为理化检测法,如用化学分析法测定虾肉中的氯霉素残留量,检出限为 0.0125ug/kg,用高效液相色谱法测定鱼肉中的氯霉素残留量,检出限为 0.0125ug/kg。但这些方法仪器设备昂贵,操作复杂,灵敏度低,且不适用于大批量样品的检测,无法满足国内食品安全检测市场的迫切需要。而时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 由于其特异性强、灵敏度高、操作简便、廉价,且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种检测 CAP 的试剂盒及其检测方法,用于水产品样品中氯霉素含量的检测。本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 检测 CAP。技术方案:该检测 CAP 的试剂盒是由:(1)96 或 48 孔包被板;(2)缓冲液;(3)氯霉素标准;(4)氯霉素的抗体冻干品;(5)钕标记的羊抗鼠抗体;(6)洗涤液;(7)增强液所组成。

[0005] 本发明测定方法:测定的基础是标记免疫反应。包被有 CAP-OVA 的微孔板,加入 CAP 标准或已处理好样品到各自的微孔中,再加入 CAP 抗体,振荡反应,游离的 CAP 与微孔板上的 CAP-OVA 竞争 CAP 抗体,洗涤液洗涤,没有连接的 CAP 抗体在洗涤步骤中被除去。加入 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外光的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中抗原的量。

附图说明

[0006] 图 1 CAP-TRFIA 反应示意图。

[0007] 图 2 CAP-TRFIA 标准曲线图。

[0008] 图 3 检测氯霉素的试剂盒示意图:(1)96 或 48 孔包被板,(2)缓冲液,(3)氯霉素标准,(4)氯霉素的抗体冻干品,(5)钕标记的羊抗鼠抗体,(6)洗涤液,(7)增强液。

具体实施方案

[0009] 实施例 1

按下列步骤制备试剂盒和检测虾肉样品：

(1) Eu^{3+} - 羊抗鼠抗体的制备：

取溶解于 50mmol/LPBS pH7.0 的 5g/L 羊抗鼠抗体 1.2ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 洗脱液为含 0.155mol/LNaCl 的 50mmol/LNa₂CO₃-NaHCO₃pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰, 经紫外吸收分析定量 (1.46A280-0.74A260), 用上述洗脱液稀释羊抗鼠抗体至 2g/L。取 500-1000 μ l 稀释后的羊抗鼠抗体加入含 0.2-0.4mg 的 Eu^{3+} -N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu^{3+} -DTTA) 的小瓶中, 30℃ 磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1×40cm) 层析, A280 监测收集蛋白峰, 稀释分装备用。

[0010] (2) 包被板固相抗原制备：

将 CAP-OVA 用 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH9.6 缓冲液稀释至 5mg/L 的包被液, 96 (或 48) 孔微孔板各孔加 100 μ l, 4℃ 放置过夜。弃去包被液, 冲洗两次, 加 150 μ l 含 3g/LBSA 的上述缓冲液封闭, 4℃ 放置过夜。弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20℃ 冷冻保存。

[0011] (3) 试剂的配制：

A. 标准氯霉素 (CAP) : (0ng/ml, 0.025ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 0.3ng/ml, 0.6ng/ml), 从 CAP 纯品中稀释得到, 稀释液为甲醇 : 水 = 7 : 3 ;

B. 缓冲液 : 8mmol/L NaCl、0.1% BSA、0.2% 牛 IgG、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA)、0.1ml/LTween-80 和 0.1% NaN₃ 的 Tris-HCl pH7.8 ;

C. 洗涤液 : 14.5mmol/L NaCl、0.2ml/LTween-80 和 0.2% NaN₃ 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8 ;

D. 增强液的配制 : 1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮 (β -NTA), 50 μ mol 三正辛基氧化膦 (TOPO), 1ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100)。

[0012] (4) 试剂盒提供的试剂：

每一个盒中的试剂足够进行 96 个测量, 盒中的材料如下：

A. 1×96 孔板 (8 条 ×12 孔, 可以拆分为单孔) 包被有 CAP-OVA ;

B. 6×CAP 标准液, 1.0ml/瓶, 标准液浓度为 : (0ng/ml, 0.025ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 0.3ng/ml, 0.6ng/ml) ;

C. 1×CAP 抗体冻干品, 用时 0.5ml 蒸馏水溶解 ;

D. 1× Eu^{3+} - 羊抗鼠抗体冻干品, 用时 0.5ml 蒸馏水溶解 ;

E. 1× 增强液 : 15ml ;

F. 1× 洗涤液 : 30ml, 用时以蒸馏水 1 : 25 稀释 ;

G. 1× 缓冲液 : 30ml。

[0013] (5) 测定之前注意事项：

A. 使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30℃) ;

B. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃ ;

C. 如果样品量大建议使用多通道移液器 ;

D. 在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖子盖住微孔 ;

E. 取出需用数量的微孔板及框架, 将不用的微孔板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℃。

[0014] (6) 具体检测步骤如下：

取 CAP-OVA 板条,加入 50 μ l 的 CAP 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 5000 稀释的 CAP 抗体 50 μ l,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时,洗涤液洗四次,加缓冲液 1 : 400 稀释的 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 振荡 45 分钟,用洗涤液洗六次,加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 CAP 含量,和图 2,该例的样品浓度 0.15ng/ml。

[0015] 实施例 2

按下列步骤制备试剂盒和检测猪肉样品：

(1) 制备试剂盒同实施例 1 的 (1)~(5)；

(2) 具体检测步骤如下：

取备好的鸡肉样品 5.00g,经匀浆机破碎,依次加入 10mL 乙酸乙酯和 1.0mL 1.0mol/L NaOH 溶液,以 12000r/min 均质 1min,静置 0.5h 后 3000r/min 离心 5min,取 5mL 上清液,用 1.0mol/L HCl 调 pH 至 7.0 后备用。

[0016] 取 CAP-OVA 板条,加入 50 μ l 的 CAP 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 5000 稀释的 CAP 抗体 50 μ l,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时,洗涤液洗四次,加缓冲液 1 : 400 稀释的 Eu^{3+} -羊抗鼠抗体 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 振荡 45 分钟,用洗涤液洗 4 次,加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 CAP 含量,如图 2 为 CAP 标准曲线图。

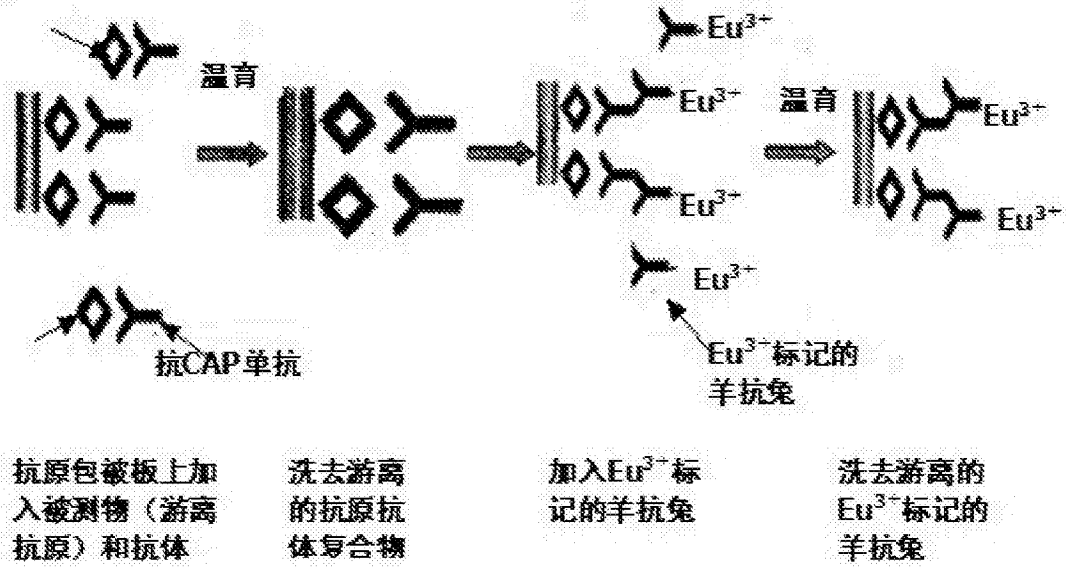


图 1

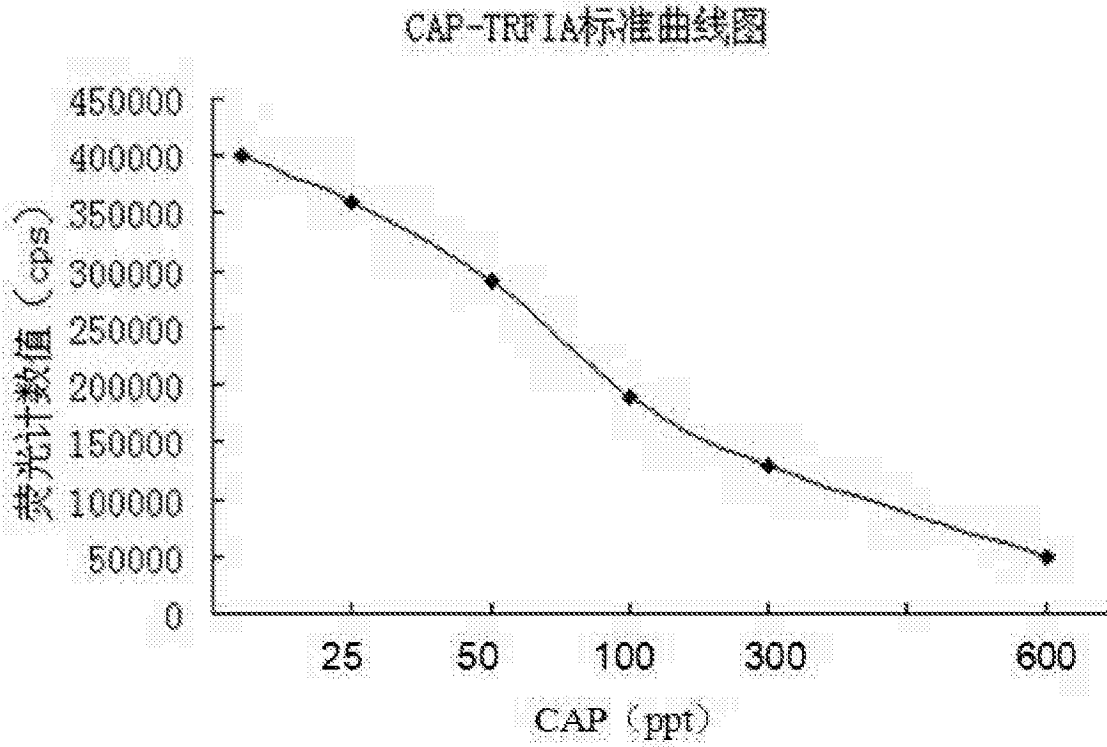


图 2

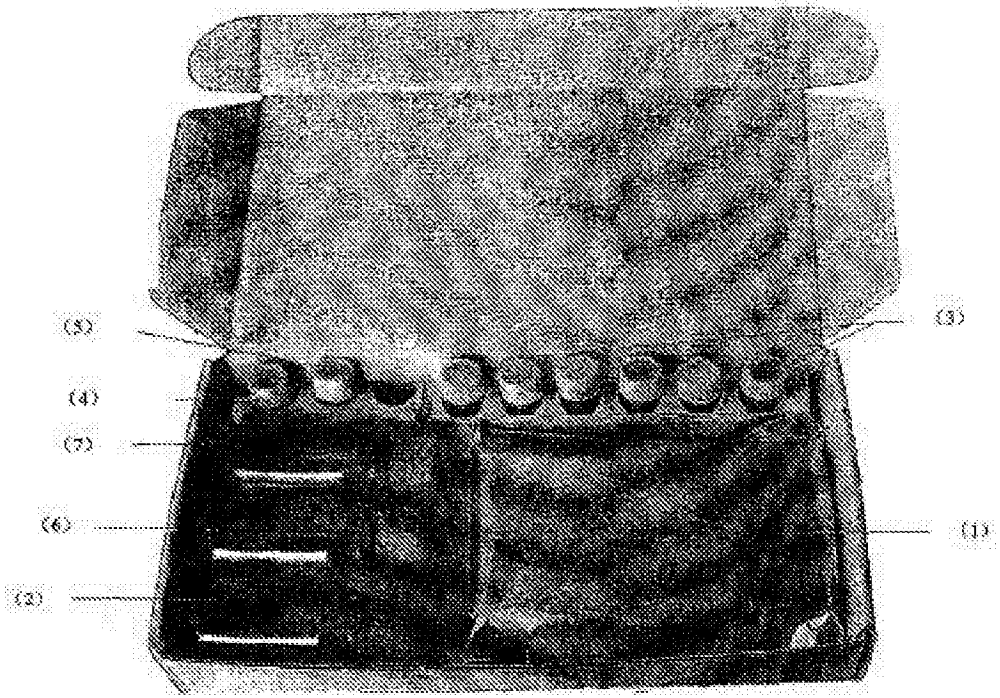


图 3

专利名称(译)	一种检测虾肉中的氯霉素的荧光分析法		
公开(公告)号	CN105277683A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410352469.1	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 薛永来 邓榕榕		
发明人	洪霞 薛永来 邓榕榕		
IPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测氯霉素的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析（TRFIR）技术领域。本发明配制的试剂盒，采用TRFIR检测氯霉素，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有CAP - OVA，加入CAP标准或样品，再加入CAP抗体。游离的CAP与微孔板上的CAP - OVA竞争CAP抗体，没有连接的CAP抗体被洗涤除去，加入Eu³⁺ - 羊抗鼠抗体，标记免疫反应后没有连接的Eu³⁺ - 羊抗鼠抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的CAP浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中CAP的含量。本发明提供的检测CAP试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，操作时间大幅度减少；可用作检测水产品(鱼肉、虾肉)中氯霉素残留检测。

