



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107677810 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201710810430.3

(22)申请日 2017.09.11

(71)申请人 扬州市伊绿鲜生态农业科技有限公司

地址 225200 江苏省扬州市江都区邵伯镇
公路村西高组

(72)发明人 刘蓓一 于洋 徐恒

(74)专利代理机构 北京连和连知识产权代理有限公司 11278

代理人 田方正

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

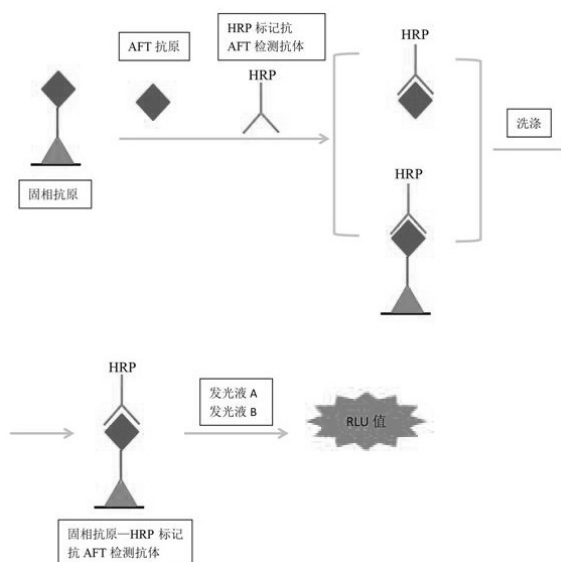
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:包括盒体,所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂,所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。本发明提供的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,将化学发光和酶联免疫技术相结合,具有灵敏度高、线性范围宽、分析方法更简便快速、稳定性强、高特异性等特点。



1. 一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:包括盒体,所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂,所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述预包被化学发光板的制备方法包括以下步骤:取乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,将AFT-HSA交联复合物置于包被溶液中,混合均匀后吸取适量加入至化学发光板的微孔中,在37℃恒温箱中放置2-2.5小时,完成包被过程,形成固相抗原;用稀释过的所述浓缩洗涤液多次洗涤化学发光板;包被好的化学发光板再用封闭溶液封闭,在37℃恒温箱中放置2-2.5小时,完成封闭过程。

3. 根据权利要求2所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述包被溶液包括pH9.4-9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述包被溶液的浓度为0.95-1.05μg/mL;所述封闭溶液包括其中含BSA、4.8-5.2%的 P300的磷酸盐缓冲液),所述BSA溶液的浓度为9.8-10.2g/L。

4. 根据权利要求1或2所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为20×洗涤液,所述20×洗涤液为含有0.99-1.01%吐温-20的pH7.3-7.5,0.19-0.21 mol/L的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液使用时稀释成1×洗涤液,所述1×洗涤液为含有0.045-0.055%吐温-20的pH7.3-7.5,0.009-0.011 mol/L的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述HRP-抗AFT抗体的制备方法包括以下步骤:取适量HRP溶解于蒸馏水中,加入适量新配的0.09-0.11M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌18-22分钟后装入透析袋中,将透析袋置于1mM pH4.3-4.5的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;将透析袋中的HRP转移至离心管中,取适量HRP加入适量标记液和待标记AFT抗体;标记过程如下:在室温避光条件下轻轻搅拌1.9-2.1小时后加适量新配的3.9-4.1mg/mL NaBH₄液,混匀,再3.8-4.2℃条件下放置1.9-2.1小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,并置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需4~6h更换一次,更换5次后即可收HRP-抗AFT抗体。

6. 根据权利要求5所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述标记液包括pH9.4-9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述透析液包括pH7.3-7.5的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠-氯化钠-氯化钾溶液。

7. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述发光液A为鲁米诺含量为0.009-0.011M、对甲苯酚含量为0.0009-0.0011M, pH8.7-8.9的三(羟甲基)氨基甲烷溶液。

8. 根据权利要求1所述的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:所述发光液B为每 100 mL溶液含柠檬酸2.05-2.15g,无水 Na₂HP0₄ 2.81-2.83g,0.75%的过氧化氢脲 0.63-0.65mL 的水溶液。

一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,尤其涉及一种用于检测花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品中的黄曲霉毒素含量的化学发光法定量测定试剂盒;属于免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(Clenbuterol,AFT)是一类化学结构类似的化合物,均为二氢呋喃香豆素的衍生物。黄曲霉毒素是主要由黄曲霉(*aspergillus flavus*)寄生曲霉(*a.parasiticus*)产生的次生代谢产物,在湿热地区食品和饲料中出现黄曲霉毒素的机率最高,当粮食未能及时晒干及储藏不当时,往往容易被黄曲霉或寄生曲霉污染而产生此类毒素。AFT存在于土壤、动植物、各种坚果中,特别是容易污染花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品,是霉菌毒素中毒性最大、对人类健康危害极为突出的一类霉菌毒素。1995年,世界卫生组织制定的食品黄曲霉毒素最高允许浓度为15 μ g/kg。

[0003] 目前最为常用的AFT检测方法包括色谱法和免疫分析法。气相色谱-质谱联用(GC-MS)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)等色谱方法操作步骤繁琐,需要贵重仪器,所以一般在对阳性结果做出准确判断时使用。而免疫检测法成本低、操作简单,更适合大规模的普遍检测,但是存在灵敏度低的问题。本发明的化学发光酶免疫分析法(CLEIA)将化学发光和酶联免疫技术相结合,具有灵敏度高、线性范围宽、分析方法更简便快速、稳定性强特点。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种将化学发光法和酶联免疫分析法结合,因此同时具有化学发光法的高灵敏性和免疫分析法的高特异性的黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:

一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,包括盒体,所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂,所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。

[0006] 所述预包被化学发光板的制备方法包括以下步骤:取乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,将AFT-HSA交联复合物置于包被溶液中,混合均匀后吸取适量加入至化学发光板的微孔中,在37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置2-2.5小时,完成包被过程,形成固相抗原;用稀释过的所述浓缩洗涤液多次洗涤化学发光板;包被好的化学发光板再用封闭溶液封闭,在37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置2-2.5小时,完成封闭过程。

[0007] 所述包被溶液包括pH9.4-9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述包被溶液的浓度为0.95-1.05 μ g/mL;所述封闭溶液包括其中含BSA、4.8-5.2%的P300的磷酸盐缓冲液,所述BSA溶液的浓度为9.8-10.2g/L。

[0008] 所述浓缩洗涤液为20 \times 洗涤液,所述20 \times 洗涤液为含有0.99-1.01%吐温-20的

pH7.3-7.5, 0.19-0.21 mol/L的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液使用时稀释成1×洗涤液,所述1×洗涤液为含有0.045-0.055%吐温-20的pH7.3-7.5, 0.009-0.011 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0009] 所述HRP-抗AFT抗体的制备方法包括以下步骤:取适量HRP溶解于蒸馏水中,加入适量新配的0.09-0.11M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌18-22分钟后装入透析袋中,将透析袋置于1mM pH4.3-4.5的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;将透析袋中的HRP转移至离心管中,取适量HRP加入适量标记液和待标记AFT抗体;标记过程如下:在室温避光条件下轻轻搅拌1.9-2.1小时后加适量新配的3.9-4.1mg/mL NaBH₄液,混匀,再3.8-4.2℃条件下放置1.9-2.1小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,并置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需4~6h更换一次,更换5次后即可收HRP-抗AFT抗体。

[0010] 所述标记液包括pH9.4-9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述透析液包括pH7.3-7.5的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠-氯化钠-氯化钾溶液。

[0011] 所述发光液A为鲁米诺含量为0.009-0.011M、对甲苯酚含量为0.0009-0.0011M, pH8.7-8.9的三(羟甲基)氨基甲烷溶液。

[0012] 所述发光液B为每 100 mL溶液含柠檬酸2.05-2.15g,无水 Na₂HPO₄ 2.81-2.83g, 0.75%的过氧化氢脲 0.63-0.65mL 的水溶液。

[0013] CLEIA采用了竞争法,主要原理是将AFT-人血清白蛋白(AFT-HSA)交联复合物包被于微孔板中形成固相抗原,在包被后的微孔中加入标准品、质控品、样品和HRP-抗AFT抗体反应后,弃上清洗液,最终形成固相抗原-抗AFT抗体复合物-HRP,加入发光液A、发光液B,立刻读数获得RLU值。在整个反应过程中,样品中AFT含量越高,反应体系中发光强度越低;反之,样品中AFT含量越少,发光强度越高。

[0014] 本发明提供的AFT的CLEIA检测试剂盒适用于检测花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品中的AFT含量。

[0015] 本发明的有益效果:本发明的化学发光酶免疫分析法(CLEIA)将化学发光和酶联免疫技术相结合,具有灵敏度高、线性范围宽、分析方法更简便快速、稳定性强、高特异性、准确度高等特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。

附图说明

[0016] 图1为本发明的原理图;

图2为本发明的工艺流程图;

图3为本发明的标准曲线图。

具体实施方式

[0017] 下面结合附图对本发明作更进一步的说明。

[0018] 实施例1

如图1~图3所示,一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,包括盒体,所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂,所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。

[0019] AFT的CLEIA检测试剂盒的性能考察:用0、1、5、15、50、100μg/L的AFT标准品溶液建

立起标准曲线,根据标准曲线考察该试剂盒性能,检测限是指 IC_{10} 所对应的浓度值。检测范围是指 $IC_{15} \sim IC_{90}$ 所对应的浓度值范围。指灵敏度是指抑制率为50%时(IC_{50})的浓度。

[0020] 该AFT的CLEIA检测试剂盒的检测范围为 $1.55 \sim 97.39 \mu\text{g/L}$,理论最低检测限为 $0.82 \mu\text{g/L}$,灵敏度 IC_{50} 为 $25.13 \mu\text{g/L}$ 。

[0021] AFT的CLEIA检测试剂盒的准确度考察:根据AFT的CLEIA测定方法的检测步骤,取定值样本进行检测。重复测量3次后,其平均结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差。

[0022] $B = (M - T) / T \times 100\%$ 式(1)

式(1)中:B代表相对偏差;M代表测量浓度3次结果的平均值;T代表定值样本的浓度。

[0023] 准确度结果如表1所示,其相对偏差为6.23%,小于10%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的准确度:

表1:AFT的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的准确度

样本定值浓度 T (ng/ml)	测定值 (ng/ml)	平均值 M	相对偏差 B (%)
25	27.74	26.49	6.23
	25.21		
	26.72		

AFT的CLEIA检测试剂盒的重复性考察:用两个浓度水平的样本各重复检测10次,计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出变异系数CV。

[0024] $CV = SD / M \times 100\%$ 式(2)

式(2)中:CV代表变异系数;SD代表10次测量结果的标准差;M代表10次测量结果的平均值。

[0025] 重复性结果如表2所示,变异系数CV均小于10%,显示该试剂盒在检测样本时具有较好的重复性:

表2:AFT的化学发光酶免疫(CLEIA)检测试剂盒的重复性

样本定值浓度 T (ng/ml)	平均值 M (ng/ml)	标准差 SD	变异系数 CV
25	26.56	1.14	4.29%
1	1.08	0.10	9.26%

AFT的CLEIA检测试剂盒的添加回收实验:采用添加法配制高中低三个定值浓度样本重

复测量3次,计算每个样本的3次测量浓度结果的平均值M,均值与实际添加浓度比值即为回收率。

[0026] 表3 AFT-CLEIA的回收率实验结果

添加浓度	3.3ng/ml	10ng/ml	30ng/ml
测量值 (ng/ml)	3.28	9.42	28.93
	3.14	9.26	29.16
	3.23	8.96	28.49
均值 (ng/ml)	3.22	9.21	28.86
回收率	97.47%	92.13%	96.20%

本发明的AFT的CLEIA检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的预包被化学发光板和设在盒体内的试剂,具体包括以下组成:

1.包被有AFT-HSA交联复合物的白色不透明96孔可拆卸或不可拆卸的聚苯乙烯化学发光板,抗体包被浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0027] 2.AFT系列标准品溶液。浓度分别为:0、1、5、15、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0028] 3.AFT系列质控品溶液。浓度分别为:25 \pm 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 \pm 0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0029] 4.HRP-抗AFT抗体:是由AFT抗体与HRP偶合制成的偶联物作为检测抗体。

[0030] 5.发光底物液。发光底物液分为发光液A和发光液B。发光液A液为化学发光底物(鲁米诺)和发光增强剂(对甲苯酚溶液),发光液B液为过氧化氢脲溶液。

[0031] 6.浓缩洗涤液:浓缩洗涤溶液具体为含有吐温-20(Tween-20)冲液的20倍浓缩磷酸盐缓冲液,使用前用双蒸水稀释至工作浓度后使用,用于实验过程中洗涤化学发光板。

[0032] 本发明提供的AFT的CLEIA检测试剂盒的制备过程,对本发明试剂盒检测的灵敏度以及相关性能影响很大,其制备关键步骤如下:

1.预包被化学发光板的制备:用将AFT-HSA置于设定的包被溶液中,以设定的浓度,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应2小时包被。采用的抗体包被浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,采用的是pH=9.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。微孔板中所包被的抗AFT抗体在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上,可以经受多次洗板。包被好的微孔板可以用封闭溶液封闭,在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应2小时封闭。

[0033] 2.AFT系列标准品溶液的制备:AFT抗原溶液浓度标定是决定本发明中AFT测定范围及灵敏度的重要因素。将AFT抗原溶液可以用抗原稀释液稀释成1:1000的工作浓度,而后按照倍比稀释的方法稀释抗原至终浓度为0、1、5、15、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准品溶液。

[0034] 3.AFT系列质控溶液的制备:AFT质控溶液浓度是本发明中检测试剂盒实验操作质控的重要因素。将AFT抗原纯品溶液用抗原稀释液稀释成1:1000的工作浓度,而后稀释至终浓度为25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的质控溶液。

[0035] HRP-抗AFT抗体的制备:是由AFT抗体与HRP偶联制成的偶联复合物作为检测抗体,

适量5mg HRP溶解于1ml蒸馏水中,加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20分钟,装入透析袋中,置于1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜。取10 μl HRP和80μl标记液和10 μl标记抗体和室温避光轻轻搅拌2小时,加0.1ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再置4℃2小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需4~6h更换一次,更换5次后即可收抗体。

[0036] 本发明提供的AFT的CLEIA检测试剂盒中涉及的AFT标准品溶液、HRP-抗AFT抗体、化学发光溶液及洗涤溶液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大;其中各溶液的主要成分及其配制方法是:

1、AFT标准品溶液:以既定方法将AFT纯品用抗原稀释液配制成浓度分别为0、1、5、15、50、100μg/L的AFT标准溶液。

[0037] 2、AFT系列质控品溶液:以既定方法将AFT纯品用抗原稀释液配制成浓度分别为:25 μg/L、1 μg/L。

[0038] 3、HRP-抗AFT抗体:是由AFT抗体与HRP偶合制成的偶联物,所得HRP-抗AFT抗体用抗体稀释液稀释成1:1000 的工作浓度作为检测抗体。

[0039] 4、抗原稀释液:为含有BSA,蔗糖的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20 g BSA,50 g蔗糖,16 g NaCl,0.4 g KCl,0.4 g KH₂PO₄,5.8 g Na₂HPO₄的水溶液。

[0040] 5、抗体稀释液:为含有BSA的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,是每升含有20 g BSA,16 g NaCl,0.4 g KCl,0.4 g KH₂PO₄,5.8 g Na₂HPO₄的水溶液。

[0041] 6、化学发光溶液:A液为鲁米诺含量为 0.01M、对甲苯酚含量为 0.001M,pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液,B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g,无水Na₂HPO₄ 2.82g,0.75%的过氧化氢脲 0.64mL 的水溶液。

[0042] 7、浓缩洗涤液:20×洗涤液:0.99~1.01%吐温-20的pH7.3~7.5,0.19~0.21 mol/L的磷酸盐缓冲液,此处的浓缩洗液就是20倍浓缩的洗涤液。

[0043] 8、包被溶液:1.59 g 碳酸钠和 2.53 g 碳酸氢钠溶于1 L水中,调节pH=9.5。

[0044] 9、封闭溶液:10 g BSA 溶于 1L 洗涤溶液中,再加入重量比为 5‰的 P300。

[0045] 10、0.1M NaIO₄溶液:称取241mg高碘酸钠溶于蒸馏水10ml中。

[0046] 11、1mM PH4.4醋酸钠缓冲液:0.2M NaAc (1.361g溶于50ml蒸馏水) 3.7ml,0.2M HAc (0.601ml溶于50ml蒸馏水) 6.3ml加蒸馏水至2000ml。

[0047] 12、NaBH₄溶液:临用时称取NaBH₄4mg溶于1ml蒸馏水中。

[0048] 13、标记液:1.59 g 碳酸钠和 2.53 g 碳酸氢钠溶于1 L水中,调节pH=9.5

14、透析液:0.24 g磷酸二氢钠、1.44g磷酸氢二钠、8g氯化钠、0.2g氯化钾溶于1L水中,调节PH=7.4。

[0049] 本发明提供的AFT的CLEIA检测试剂盒的测定方法的检测步骤如下:

1、使用前,将试剂盒所有组分于室温下放置20分钟,浓缩洗涤液(20×)在使用前必须用纯化水稀释20倍,作为清洗液备用。

[0050] 2、化学发光板使用前每孔加200μl清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,并去除水滴(在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作2次。

[0051] 3、将标准品、质控品或样本各100μl分别加入化学发光板微孔中,再加入HRP-抗AFT抗体100μl,震荡混匀后,用封板膜封板,37℃水浴30分钟。

[0052] 4、甩去化学发光板孔内液体,每孔加200 μ l清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,并去除水滴(在厚叠吸水纸上拍干)。重复此操作5次。

[0053] 5、加入100 μ l发光液A和发光液B混合液(稀释比为1:1)立刻置于化学发光仪上读数,获得RLU值。

[0054] 6、根据标准品的RLU值和浓度为坐标轴,选择合适的数学模型建立标准曲线。将样本的RLU值,代入上述的标准曲线中,得出样本浓度。

[0055] 实施例2

如图1~图3所示,一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:包括盒体,所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂,所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。

[0056] 所述预包被化学发光板的制备方法包括以下步骤:取乳白色不透明聚苯乙烯可拆卸96孔化学发光板,将AFT-HSA交联复合物置于包被溶液中,混合均匀后吸取适量加入至化学发光板的微孔中,在37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置2小时,完成包被过程,形成固相抗原;用稀释过的浓缩洗涤液多次洗涤化学发光板;包被好的化学发光板再用封闭溶液封闭,在37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置2小时,完成封闭过程。

[0057] 所述包被溶液包括pH9.4的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述包被溶液的浓度为0.95 μ g/mL;所述封闭溶液包括其中含BSA、4.8‰的P300的磷酸盐缓冲液),所述BSA溶液的浓度为9.8g/L。

[0058] 所述浓缩洗涤液为20 \times 洗涤液,所述20 \times 洗涤液为含有0.99%吐温-20的pH7.3,0.19 mol/L的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液使用时稀释成1 \times 洗涤液,所述1 \times 洗涤液为含有0.045%吐温-20的pH7.3,0.009 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0059] 所述HRP-抗AFT抗体的制备方法包括以下步骤:取适量HRP溶解于蒸馏水中,加入适量新配的0.09M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌18分钟后装入透析袋中,将透析袋置于1mM pH4.3的醋酸钠缓冲液透析,4 $^{\circ}$ C过夜;将透析袋中的HRP转移至离心管中,取适量HRP加入适量标记液和待标记AFT抗体;标记过程如下:在室温避光条件下轻轻搅拌1.9小时后加适量新配的3.9mg/mL NaBH₄液,混匀,再3.8 $^{\circ}$ C条件下放置1.9小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,并置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需4h更换一次,更换5次后即可收HRP-抗AFT抗体。

[0060] 所述标记液包括pH9.4的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述透析液包括pH7.3的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠-氯化钠-氯化钾溶液。

[0061] 所述发光液A为鲁米诺含量为0.009M、对甲苯酚含量为0.0009M, pH8.7的三(羟甲基)氨基甲烷溶液。

[0062] 所述发光液B为每 100 mL溶液含柠檬酸2.05g,无水 Na₂HPO₄ 2.81g,0.75%的过氧化氢脲 0.63mL 的水溶液。

[0063] 实施例3

如图1~图3所示,一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒,其特征在于:包括盒体,所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂,所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。

[0064] 所述预包被化学发光板的制备方法包括以下步骤:取乳白色不透明聚苯乙烯可拆

卸96孔化学发光板,将AFT-HSA交联复合物置于包被溶液中,混合均匀后吸取适量加入至化学发光板的微孔中,在37℃恒温箱中放置2.5小时,完成包被过程,形成固相抗原;用稀释过的浓缩洗涤液多次洗涤化学发光板;包被好的化学发光板再用封闭溶液封闭,在37℃恒温箱中放置2.5小时,完成封闭过程。

[0065] 所述包被溶液包括pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述包被溶液的浓度为1.05μg/mL;所述封闭溶液包括其中含BSA、5.2‰的P300的磷酸盐缓冲液),所述BSA溶液的浓度为10.2g/L。

[0066] 所述浓缩洗涤液为20×洗涤液,所述20×洗涤液为含有1.01%吐温-20的pH7.5, 0.21 mol/L的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液使用时稀释成1×洗涤液,所述1×洗涤液为含有0.055%吐温-20的pH7.5, 0.011 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0067] 所述HRP-抗AFT抗体的制备方法包括以下步骤:取适量HRP溶解于蒸馏水中,加入适量新配的0.11M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌22分钟后装入透析袋中,将透析袋置于1mM pH4.5的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;将透析袋中的HRP转移至离心管中,取适量HRP加入适量标记液和待标记AFT抗体;标记过程如下:在室温避光条件下轻轻搅拌2.1小时后加适量新配的4.1mg/mL NaBH₄液,混匀,再4.2℃条件下放置2.1小时,而后转移至准备好的透析袋中,置于透析液中,并置在磁力搅拌器上进行透析,透析液需6h更换一次,更换5次后即可收HRP-抗AFT抗体。

[0068] 所述标记液包括pH9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液;所述透析液包括pH7.5的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠-氯化钠-氯化钾溶液。

[0069] 所述发光液A为鲁米诺含量为0.011M、对甲苯酚含量为0.0011M, pH8.9的三(羟甲基)氨基甲烷溶液。

[0070] 所述发光液B为每100 mL溶液含柠檬酸2.15g,无水 Na₂HPO₄ 2.83g, 0.75%的过氧化氢脲 0.65mL 的水溶液。

[0071] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

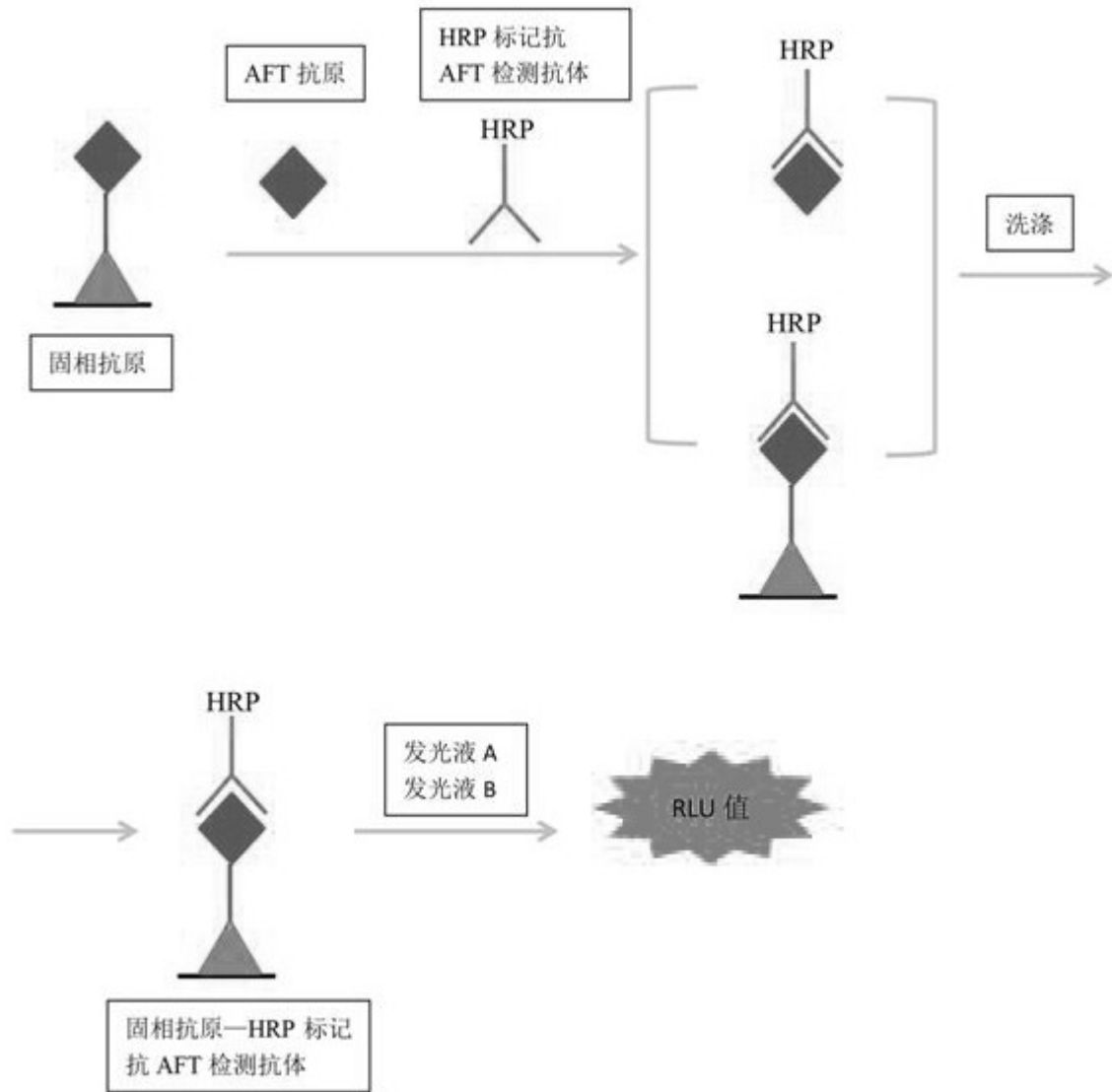


图1

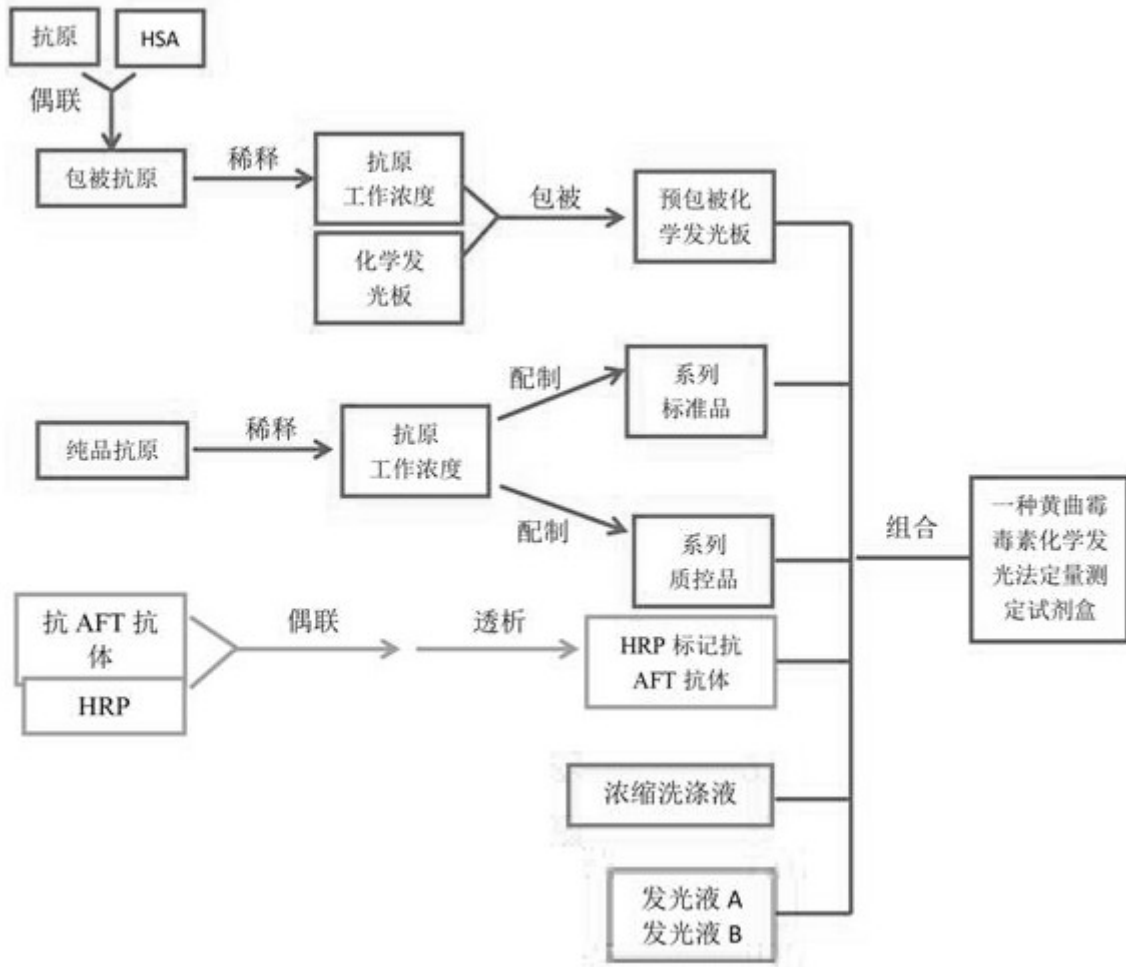


图2

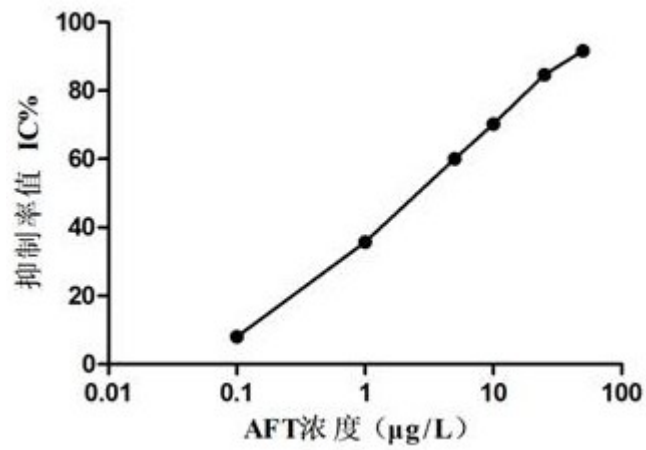


图3

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒		
公开(公告)号	CN107677810A	公开(公告)日	2018-02-09
申请号	CN2017110810430.3	申请日	2017-09-11
[标]发明人	刘蓓一 于洋 徐恒		
发明人	刘蓓一 于洋 徐恒		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/54306		
代理人(译)	田方正		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒，其特征在于：包括盒体，所述盒体内设置有预包被化学发光板和试剂，所述试剂包括AFT系列标准品溶液、AFT系列质控品、HRP-抗AFT抗体、发光液A、发光液B和浓缩洗涤液。本发明提供的一种黄曲霉毒素化学发光法定量测定试剂盒，将化学发光和酶联免疫技术相结合，具有灵敏度高、线性范围宽、分析方法更简便快速、稳定性强、高特异性等特点。

