

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03160299.1

[43] 公开日 2005 年 4 月 6 日

[11] 公开号 CN 1603829A

[22] 申请日 2003.9.30 [21] 申请号 03160299.1

[71] 申请人 江西中德生物工程有限公司

地址 330029 江西省南昌市高新一路海外大厦南 210 号

[72] 发明人 许 杨 邓舜洲 赖卫华 陈高明
熊勇华

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所

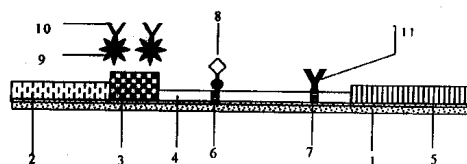
代理人 杨志宇

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 2 页

[54] 发明名称 展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种展青霉素免疫层析检测试纸及其制作方法与应用。本发明的检测试纸，包括衬垫，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线；在衬垫上按顺序有样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫；示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线上有展青霉素检测抗原，质控线上有抗抗体，其中抗抗体是抗展青霉素的抗体的抗体。本发明的优点在于：本发明有放射免疫分析和酶联免疫吸附试验 ELISA 的优点。同时，本发明有简单、快速、常温保存、单份测定、一次试验测出展青霉素、除商品试剂外不需任何仪器设备的优点，特别适合展青霉素的现场快速检测。



ISSN 1008-4274

- 1、一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，展青霉素免疫层析检测试纸，包括衬垫(1)，样品垫(2)，示踪粒子结合物垫(3)，硝酸纤维素膜(4)，吸水垫(5)，检测线(6)，质控线(7)，在衬垫(1)上按顺序有样品垫(2)，示踪粒子结合物垫(3)，硝酸纤维素膜(4)，吸水垫(5)；示踪粒子结合物垫(3)上有示踪粒子(9)标记的抗展青霉素的抗体(10)，硝酸纤维素膜(4)上还设有检测线(6)和质控线(7)，检测线(6)上有展青霉素检测抗原(8)，质控线(7)上有抗抗体(11)，其中抗抗体(11)是抗展青霉素的抗体(10)的抗体。其特征在于：包括如下步骤，(A)展青霉素抗原的制备，包括单克隆抗体的免疫抗原和展青霉素检测抗原(8)的制备；(B)硝酸纤维素膜(4)的检测线(6)和质控线(7)的制备；(C)示踪粒子结合物垫(3)的制备；(D)组装试纸条。
- 2、如权利要求书1所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：示踪粒子(9)标记为如下任意一种：胶体金颗粒；乳胶颗粒；胶体硒颗粒；明胶颗粒；磁性颗粒。
- 3、如权利要求书1所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：展青霉素抗原的制备，包括如下步骤：(A)展青霉素通过戊二酸酐法使其羟基与戊二酸羧基以酯键相连，形成新的化合物。(B)该化合物再次通过活性酯法与高分子量载体物质的蛋白质、多糖、多核苷酸、多聚赖氨酸、多聚苯乙烯或其它人工合成的高分子量物质相连形成人工抗原；(C)选择展青霉素抗原的一种作为免疫抗原；(D)选择展青霉素抗原的一种作为检测抗原；用于制备检测线的展青霉素人工抗原和用于制备抗展青霉素的免疫抗原的载体是这样选择的：①选择牛血清白蛋白、钥眼贝血蓝蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白、人血清白蛋白的一种为载体用于制备展青霉素人工抗原。②选择多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚混合氨酸的一种为载体用于制备展青霉素人工抗原。③展青霉素免疫抗原和检测抗原的载体可以相同，也可以不同。
- 4、如权利要求书1所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：硝酸纤维素膜(4)的检测线(6)和质控线(7)的制备，包括如下步骤：(A)用展青霉素检测抗原(8)在硝酸纤维素膜(4)上线状点样制备一条检测线(6)；(B)用抗抗体(11)在硝酸纤维素膜(4)上进行线状点样制备一条质控线(7)。
- 5、如权利要求书4所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：检测线(6)和质控线(7)是这样制备的：将硝酸纤维素膜(4)按10-35mm宽的尺寸剪裁；将经生理盐水缓冲液充分透析，浓度调整为0.01-5mg/mL的展青霉素检测抗原(8)在膜上线状点样作为检测线(6)，检测线(6)点样位置离膜底边4-16mm，然后在膜的顶端用浓度调整为0.01-5mg/mL的抗抗体(11)喷涂质控线(6)，硝酸纤维素膜(4)室温干燥30分钟，置于0.1-5%脱脂奶粉的生理盐水中浸泡30分钟，取出吸干水分，于37℃孵育30分钟，置室温下干燥处密封储藏。
- 6、如权利要求书1所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：示踪粒子结合物垫(3)的制备包括如下步骤：(A)用示踪粒子标记抗展青霉素的抗体(10)，抗体(10)包括IgG型抗体、IgM型抗体、IgA抗体；(B)把示踪粒子(9)标记好的抗展青霉素的抗体(10)分散在硝酸纤维素膜(4)上。
- 7、如权利要求书1所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：组装试纸条，步骤如下：在衬垫(1)上加上有检测线(6)和质控线(7)的硝酸纤维素膜(4)；在衬垫(1)上加上示踪粒子结合物垫(3)；在衬垫(1)上加上样品垫(2)；在衬垫(1)上加上吸水垫(5)；组装为检测试纸条。
- 8、如权利要求书1所述的一种展青霉素免疫层析检测试纸在检测展青霉素中的应用。

展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法与应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，公开了一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法与应用。

背景技术

展青霉素 Patulin, PAT 是由真菌产生的一种有毒代谢产物，由 Glister 在 1941 首先发现并分离纯化。实验发现展青霉素是一种广谱抗生素，但随后的研究证实它对实验动物有较强的毒性。从此对展青霉素的研究转移到其毒性及对食品和饲料的污染上。

真菌中共 3 个属 16 种，如扩张青霉、展青霉、棒型青霉、土壤青霉等，能产生展青霉素，调查发现一些展青霉素的产生菌在自然界分布广泛，经常引起苹果、山楂等水果霉烂、大米和饲料等的霉变。宋家玉等在 1995 对山东省苹果和山楂及其制品进行展青霉素检测，烂苹果展青霉素的污染率为 40%，而且距霉烂部 1cm 处取样展青霉素平均含量为 329 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，苹果制品污染率为 70%，阳性样品平均含量为 80.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国国家标准 GB 14974—94《苹果和山楂制品中展青霉素限量卫生标准》规定的展青霉素最大限量水果半成品的原汁、果酱为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，果汁、果酱、果酒、罐头、山楂条、饼为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

展青毒素具有强烈的神经毒，奶牛中毒时出现上行神经麻痹、中枢神经系统水肿及灶性出血；小鼠则出现下水肿、腹腔和胸腔积液，肾瘀血及变性、肺水肿、呼吸困难、尿量减少；小鼠反复皮下注射展青霉素可产生局部肉瘤；并且有致畸性、致突变作用。

目前真菌毒素检测的方法可分为两类。一类为色谱分析法，包括薄层色谱法 TLC、气相色谱法 GC、高效液相色谱法 HPLC 等。70 年代首先建立了薄层液相色谱法 TLC 检测展青霉素。目前我国 GB 14974—1994 苹果和山楂制品中展青霉素国标检测方法采用薄层色谱法 TLC。但 TLC 对于展青霉素与羟甲基糠醛 HMF 的分离效果不好，只能半定量，且灵敏度不高 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，因此很快被高效液相色谱法 HPLC 取代。之后气相色谱法 GC、气相色谱-质谱联机法 GC-MS 也相继建立。但这些方法都需要较昂贵的设备，因此推广使用受到一定的限制。另一类是免疫化学方法。该方法对样品的纯度要求不高，并具有较高的灵敏度和特异性，适合于大批量样本的检测。近年来被广泛应用于各种真菌毒素的检测。这类方法包括放射免疫分析法 RIA 和酶联免疫分析法 ELISA 等。RIA 方法尽管具有较高的灵敏度，但由于使用了对人体有害的放射性物质，无法推广使用。ELISA 方法由于操作简单、使用安全而被普遍采用。但目前未检索到展青霉素免疫化学检测方法的报道。

免疫层析技术目前已广泛应用于临床医学检测中。国内外现有的商品供应及文献报道的检测项目主要包括以下方面：违禁药物检测，如苯丙胺、可卡因、大麻、吗啡、海洛因等、传染病病原检测，如梅毒螺旋体、淋球菌、泌尿生殖系沙眼衣原体、幽门螺杆菌等、激素检测、寄生虫、肿瘤标记物、心血管病检测标志物等。免疫层析技术用于检测展青霉素目前尚未见报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法。

本发明的另一目的在于应用该检测试纸。

本发明的技术方案为：

一种展青霉素免疫层析检测试纸，包括衬垫，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线；在衬垫上按顺序有样品垫，示踪粒

子结合物垫, 硝酸纤维素膜, 吸水垫; 示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体, 硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线, 检测线上有展青霉素检测抗原, 质控线上有抗抗体, 其中抗抗体是抗展青霉素的抗体的抗体。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 示踪粒子标记为如下任意一种: 胶体金颗粒; 乳胶颗粒; 胶体硒颗粒; 明胶颗粒; 磁性颗粒。

检测原理是这样的: 在样品垫上滴加样品, 如果样品中有展青霉素, 则展青霉素经层析作用移动到示踪粒子结合物垫, 与限量的抗展青霉素的抗体结合, 当移动到检测线时, 示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体已无多余的结合位点与检测线上的检测抗原结合, 检测线不显色或不出现磁性增强。示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体继续向前移动到质控线, 与质控线上的抗抗体反应, 质控线显色或出现磁性增强。若样品中无展青霉素, 则示踪粒子结合物垫上的示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体和检测线上的检测抗原结合, 检测线显色或出现磁性增强, 质控线显色或出现磁性增强。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 包括如下步骤, (A) 展青霉素抗原的制备, 包括多克隆抗体或单克隆抗体的免疫抗原和展青霉素检测抗原的制备; (B) 硝酸纤维素膜的检测线和质控线的制备; (C) 示踪粒子结合物垫的制备; (D) 组装试纸条。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 展青霉素抗原的制备, 包括如下步骤: (A) 展青霉素通过戊二酸酐法使其羟基与戊二酸羧基以酯键相连, 形成新的化合物。(B) 该化合物再次通过活性酯法与高分子量载体物质的蛋白质、多糖、多核苷酸、多聚赖氨酸、多聚苯乙烯或其它人工合成的高分子量物质相连形成人工抗原; (C) 选择展青霉素抗原的一种作为免疫抗原。(D) 选择展青霉素抗原的一种作为检测抗原。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 硝酸纤维素膜的检测线和质控线的制备, 包括如下步骤: (A) 用展青霉素检测抗原在硝酸纤维素膜上线状点样制备一条检测线; (B) 用抗抗体在硝酸纤维素膜上进行线状点样制备一条质控线。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 检测线和质控线是这样制备的: 将硝酸纤维素膜按 10-35mm 宽的尺寸剪裁; 将经生理盐水缓冲液充分透析, 浓度调整为 0.01-5mg/mL 的展青霉素检测抗原在膜上线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 4-16mm, 然后在膜的顶端用浓度调整为 0.01-5mg/mL 的抗抗体喷涂质控线, 硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟, 置于 0.1-5% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟, 取出吸干水分, 于 37°C 孵育 30 分钟, 置室温下干燥处密封储藏。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 示踪粒子结合物垫的制备包括如下步骤: (A) 用示踪粒子标记抗展青霉素的抗体, 抗体包括 IgG 型抗体、IgM 型抗体、IgA 抗体; (B) 把示踪粒子标记好的抗展青霉素的抗体分散在硝酸纤维素膜上。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 制备示踪粒子结合物垫的示踪粒子为如下任意一种: 胶体金颗粒; 乳胶颗粒; 胶体硒颗粒; 明胶颗粒; 磁性颗粒。

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法: 组装试纸条, 步骤如下: 在衬垫 1 上加上有检测线和质控线的硝酸纤维素膜; 在衬垫上加上示踪粒子结合物垫; 在衬垫上加上样品垫; 在衬垫上加上吸水垫; 组装为检测试纸条。

一种展青霉素免疫层析检测试纸在检测展青霉素中的应用。

免疫层析法是在免疫化学基础上发展起来的定性测定方法, 它往往以条状纤维层析材料为固相, 通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动, 并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体, 如抗体或抗原, 发生高特异高亲和性的免疫反应, 层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定

区域如检测带，通过酶反应或直接运用可目测的标记物，如胶体金，而得到直观的实验现象，如显色。而游离标记物则越过检测带，达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金，乳胶，胶体硒、明胶等，其中运用最成功的标记物为胶体金。

示踪粒子选用常用的显色标记，当检测线、质控线如正常显色，肉眼可很容易分辨，但仪器分辨磁性颗粒的灵敏度。更高。

本发明免疫层析技术检测展青霉素，测定的原理类似于间接竞争 ELISA 方法，在玻璃纤维上涂布一定浓度示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体，在硝酸纤维素膜上分别吸附检测抗原（由于展青霉素不直接固定于硝酸纤维素膜，故需制备展青霉素与载体蛋白质的偶联物作为检测抗原）和抗抗体作为检测线和质控线。以塑料底板、吸水滤纸、玻璃纤维和硝酸纤维素膜组成检测试纸夹。样品加入后，液体沿滤纸向上渗透，若样品中含有待检毒素，则会与硝酸纤维素膜上的检测抗原竞争玻璃纤维上的标记抗体，当毒素含量高时，它们会占据绝大多数标记抗体的抗原结合部位，从而阻止标记抗体与检测线上的检测抗原结合，因而在检测线上不显色。相反，若样品中不含待检毒素，标记抗体就会与检测线上的抗原结合而显色。质控线上的抗抗体则通过富集标记抗体而显色，以证明结果的可靠性。

展青霉素属于小分子化合物，只有反应原性而无免疫原性，不能刺激机体产生免疫应答反应，必须和大分子载体偶联后制成人工抗原才能激发有效的免疫反应。能否成功地得到对展青霉素有高度亲和力、高度特异性的多克隆抗体或单克隆抗体，人工抗原（免疫抗原）的制备尤为重要，需要根据展青霉素的分子大小、空间构像、化学性质等慎重选择偶联方法。偶联过程要尽量保持展青霉素结构的完整性，尤其是不能破坏其分子构像，因为正是其特殊的三维空间结构，抗原决定簇，与相应的淋巴细胞表面的受体相吻合，才能启动针对它的免疫应答。若其构像发生了细微的变化，就有可能导致其抗原改变。另外，只有抗原决定簇与淋巴细胞表面相应的受体相接触，才能启动免疫应答，展青霉素属小分子化合物，当它和载体蛋白质直接偶联时，不易接近受体，如能在两者之间加上一个连接侧链，将有助于半抗原暴露在外面，形成理想的空间易近性，则效果可能会更好。由于展青霉素分子上具有羟基，本发明设计用戊二酸酐法使其羟基与戊二酸羧基以酯键相连，形成新的化合物。再通过活性酯法使其与载体蛋白质相连，形成一个偶联桥，取得了比较理想的效果。

本发明的优点及应用范围：

本发明与以往检测食品、饲料及红曲制品中展青霉素的技术相比具有如下优点：(1)操作简便、快捷，仅需 5-10 分钟；(2)灵敏度高；(3)无需特殊仪器设备，除商品试剂外不需任何仪器设备，所耗费用低；特别适合展青霉素的现场快速检测。(4)无需另外再加底物显色指示，而直接通过颜色判断结果；(5)室温保存、单份测定，可随身携带。

本发明属于免疫生物技术领域，主要用于展青霉素检测。本发明的试纸条的使用单位主要为食品、饲料的加工生产部门、食品卫生检验部门、产品质量监督部门等。

附图说明

图 1 为本发明的展青霉素免疫层析检测试纸直观结构示意图。

图 2 为本发明的展青霉素免疫层析检测试纸的示踪粒子结合物垫局部放大图。

图 3 为本发明的展青霉素免疫层析检测试纸的检测线局部放大图。

图 4 为本发明的展青霉素免疫层析检测试纸的质控线局部放大图。

图 5 为本发明的展青霉素免疫层析检测试纸工作原理示意图。

具体实施方式

实施例 1

一种展青霉素免疫层析检测试纸，包括衬垫 1，样品垫 2，示踪粒子结合物垫 3，硝酸纤维素膜 4，吸水垫 5，检测线 6，质控线 7，在衬垫 1 上按顺序有样品垫 2，示踪粒子结合物垫 3，硝酸纤维素膜 4，吸水垫 5；示踪粒子结合物垫 3 上有示踪粒子 9 标记的抗展青霉素的抗体 10，硝酸纤维素膜 4 上还设有检测线 6 和质控线 7，检测线 6 上有展青霉素检测抗原 8，质控线 7 上有抗体 11，其中抗体 11 是抗展青霉素的抗体 10 的抗体。

检测原理是这样的：在样品垫 2 上滴加样品 12，如果样品 12 中有展青霉素，则展青霉素经层析作用移动到示踪粒子结合物垫 3，与限量的抗展青霉素的抗体 10 结合，当移动到检测线 6 时，示踪粒子 9 标记的抗展青霉素的抗体 10 已无多余的结合位点与检测线 6 上的检测抗原 8 结合，检测线 6 不显色或不出现磁性增强。示踪粒子 9 标记的抗展青霉素的抗体 10 继续向前移动到质控线 7，与质控线 7 上的抗体 11 反应，质控线 7 显色或出现磁性增强。若样品 12 中无展青霉素 8，则示踪粒子结合物垫 3 上的示踪粒子 9 标记的抗展青霉素的抗体 10 和检测线 6 上的检测抗原 8 结合，检测线 6 显色或出现磁性增强，质控线 7 显色或出现磁性增强。

展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，包括如下步骤，(A)展青霉素抗原的制备，包括多克隆抗体或单克隆抗体的免疫抗原和展青霉素检测抗原 8 的制备；(B)硝酸纤维素膜 4 的检测线 6 和质控线 7 的制备；(C)示踪粒子结合物垫 3 的制备；(D)组装试纸条。

实施例 2

示踪粒子 9 选用胶体金颗粒。其余同实施例 1。

实施例 3

示踪粒子 9 选用乳胶颗粒。其余同实施例 1。

实施例 4

示踪粒子 9 选用胶体硒颗粒。其余同实施例 1。

实施例 5

示踪粒子 9 选用明胶颗粒。其余同实施例 1。

实施例 6

示踪粒子 9 选用乳胶颗粒。其余同实施例 1。

实施例 7

示踪粒子 9 选用磁性颗粒。其余同实施例 1。

在实施例 2-7 中：

示踪粒子 9 选用常用的显色标记，当检测线 6、质控线 7 如正常显色，肉眼很容易分辨，但仪器分辨磁性颗粒的灵敏度。更高。

实施例 8

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，展青霉素抗原的制备，包括如下步骤：(A)展青霉素通过戊二酸酐法使其羟基与戊二酸羧基以酯键相连，形成新的化合物。(B)该化合物再次通过活性酯法与高分子量载体物质的蛋白质、多糖、多核苷酸、多聚赖氨酸、多聚苯乙烯或其它人工合成的高分子量物质相连形成人工抗原；(C)选择展青霉素抗原的一种作为免疫抗原。(D)选择展青霉素抗原的一种作为检测抗原。其余同实施例 1。

实施例 9

硝酸纤维素膜 4 的检测线 6 和质控线 7 的制备，包括如下步骤：(A)用展青霉素检测抗原 8 在硝酸纤维素膜 4 上线状点样制备一条检测线 6；(B)用抗体 11 在硝酸纤维素膜 4 上进行线状点样制备一条质控线 7。其余同实施例 1。

实施例 10

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法，检测线 6 和质控线 7 是这样制备的：将硝酸纤维素膜 4 按 10-35mm 宽的尺寸剪裁；将经生理盐水缓冲液充分透析，浓度调整为 0.01-5mg/mL 的展青霉素检测抗原 8 在膜上线状点样作

为检测线 6, 检测线 6 点样位置离膜底边 4-16mm, 然后在膜的顶端用浓度调整为 0.01-5mg/mL 的抗抗体 11 喷涂质控线 7, 硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟, 置于 0.1-5% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟, 取出吸干水分, 于 37°C 孵育 30 分钟, 置室温下干燥处密封储藏。其余同实施例 1。

实施例 11

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法, 示踪粒子结合物垫 3 的制备包括如下步骤: (A) 用示踪粒子标记抗展青霉素的抗体 10, 抗体 10 包括 IgG 型抗体、IgM 型抗体、IgA 抗体; (B) 把示踪粒子 9 标记好的抗展青霉素的抗体 10 分散在硝酸纤维素膜 4 上。其余同实施例 1。

实施例 12

一种展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法, 组装试纸条, 步骤如下: 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4; 在衬垫 1 上加上示踪粒子结合物垫 3; 在衬垫 1 上加上样品垫 2; 在衬垫 1 上加上吸水垫 5; 组装为检测试纸条。其余同实施例 1。

实施例 13

一种免疫层析检测展青霉素试纸的制备, 并将其具体应用于具体的检测。

包括如下步骤:

(1). 展青霉素人工抗原的制备, 包括用于免疫动物以制备多克隆抗体或单克隆抗体的免疫抗原和用于制备检测线的检测抗原。

(2). 硝酸纤维素膜检测线 6 和质控线 7 的制备。

① 用展青霉素与载体蛋白质的偶联物作为检测抗原线状点样作为检测线 6。

② 用展青霉素的抗体 10 的抗体线状点样作为质控线 7。

(3). 示踪粒子结合物垫 3 的制备:

将示踪粒子 9 标记的抗展青霉素的抗体 10 分散在玻璃纤维上制作示踪粒子结合物垫 3。

(4). 试纸条的组装:

① 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4;

② 在衬垫 1 上加上示踪粒子结合物垫 3;

③ 在衬垫 1 上加上样品垫 2;

④ 在衬垫 1 上加上吸水垫 5; 组装为检测试纸条。

(5). 待检样品的处理。

方案具体可细分为五部分:

1. 展青霉素人工抗原 (包括免疫抗原和检测抗原) 的制备, 包括如下步骤:

① 将 0.5mg 展青霉素、7.4mg 戊二酸酐和 1.6mg 4-二甲氨基吡啶溶于 200 μ L 无水四氢呋喃中, 37°C 振荡反应 1 小时; 加 100 μ L 酸性蒸馏水 (pH2-3) 终止反应;

② 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀, 上清液抽真空去除四氢呋喃; 用 300 μ L 氯仿抽提三次; 用薄层层析法纯化出反应产物展青霉素-半戊二酸。

③ 将纯化的展青霉素-半戊二酸溶解于 100 μ L 四氢呋喃中, 0.6mg 氮羟基琥珀酸 (NHS) 和 3.2mg 二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶解于 200 μ L 四氢呋喃中。二者混匀, 置室温避光振荡反应 24 小时。

④ 反应完全后, 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀。上清液真空抽干, 溶解于 300 μ L 二甲基亚砜中, 再加入 600 μ L 载体 (钥孔贝血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白、人血清白蛋白、多聚赖氨酸、多聚谷氨酸或多聚混合氨基酸的一种) 溶液中 (4mg 溶于 600 μ L 0.13M NaHCO₃ 中), 室温下振荡, 避光反应 2 小时。

⑤ 反应结束后, 0.01M PBS (pH7.4) 4°C 透析 72 小时, 紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比, 真空冻干待用。

2. 硝酸纤维素膜检测线 6 和质控线 7 的制备

(1) 制备检测线 6 的展青霉素检测抗原 8 的选择

选择牛血清白蛋白、钥眼贝血蓝蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白或人血清白蛋白与展青霉素-半戊二酸偶联制备的检测抗原的一种用于制备一条检测线 6;

(2) 制备质控线 7 的抗抗体 11 的选择

① 选择展青霉素的 IgG 型、IgM 型、IgA 型单克隆抗体的抗抗体的一种用于制备一条质控线;

② 选择展青霉素的多克隆抗体的抗抗体 11 的一种用于制备一条质控线 7;

(3) 硝酸纤维素膜检测线 6 和质控线 7 的制备方法

将硝酸纤维素膜 4 按 10mm 宽的尺寸剪裁; 将经生理盐水缓冲液充分透析, 浓度调整为 0.01mg/mL 的展青霉素检测抗原 8 在膜上线状点样作为检测线 6, 检测线 6 点样位置离膜底边 4mm, 然后在膜的顶端用浓度调整为 0.01mg/mL 的抗抗体 11 喷涂质控线 7, 硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟, 置于 0.1% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟, 取出吸干水分, 于 37°C 孵育 30 分钟, 置室温下干燥处密封储藏。

3. 示踪粒子结合物垫 3 的制备

(1) 制备示踪粒子结合物垫的示踪粒子为如下一种

- ① 胶体金颗粒
- ② 乳胶颗粒
- ③ 胶体硒颗粒
- ④ 明胶颗粒
- ⑤ 磁性颗粒

(2) 示踪粒子的制备和标记

① 胶体金溶胶制备标记:

a) 胶体金溶胶制备: 取 0.01% 四氯化金水溶液 200mL, 加热至沸腾, 加入 1-20mL 1% 柠檬酸钠水溶液, 煮沸 5 分钟, 出现橙红色, 胶体金颗粒直径由电镜测定为 10-80nm;

b) 胶体金标记抗体: 取 50mL 胶体金, 用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH(8.0), 搅拌下将胶体金溶胶和抗体混合, 再加入聚乙二醇水溶液, 使最终浓度为 0.05%。将粗制品 6000g 离心 45 分钟, 沉淀用生理盐水混悬至 1.5mL, 4°C 保存。

② 胶体硒溶胶制备和抗体标记:

a) 胶体硒溶胶制备: 在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550mL 和聚丙烯酸 10g, 通氮室温搅拌并加入水合肼 69.5mL, 继续搅拌 20 分钟。亚硒酸 9.63g 溶解于 280mL 水, 室温搅拌下滴入反应混合液内, 得到 120nm 红色硒溶胶。

b) 胶体硒抗体标记: 抗体 IgG 用 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成 4.6mg/mL 浓度溶液, 加 25 μ l 于 pH7.3 的 25mL 硒溶胶中, 室温搅拌 10 分钟后加 1% PEG8000 1mL, 混匀, 于 4°C 以 5000rpm 离心 5 分钟, 得到松软的红色沉淀, 用含 0.05% NaN₃ 的磷酸盐缓冲液配成 1mL 悬液。

③ 乳胶的制备和抗体标记:

彩色乳胶颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。抗体标记程序为: 用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将乳胶稀释到 1% 浓度, 搅拌下加入一定量的 IgG 溶液, 室温搅拌 30 分钟后于 37°C 水浴孵化 60 分钟, 4°C 放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟, 用适量磷酸盐缓冲液重悬。

④ 磁性颗粒结合物垫的制备:

磁性颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将磁性颗粒稀释到 1% 浓度, 分别取 50mL, 搅拌下将其与抗展青霉素抗体混合, 室

温搅拌 30 分钟后于 37℃ 水浴孵化 60 分钟, 4℃ 放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟, 用 2mL 磷酸盐缓冲液重悬。

(3) 示踪粒子结合物垫 3 的制备

将标记示踪粒子 9 的抗体按比例混合分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上, 冻干密封干燥保存。

4. 试纸条的组装:

- ① 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4;
- ② 在衬垫 1 上加上示踪粒子结合物垫 3;
- ③ 在衬垫 1 上加上样品垫 2;
- ④ 在衬垫 1 上加上吸水垫 5; 组装为检测试纸条。

5. 待检样品的处理

(1) 液体样品处理方法: 量取待样品 25mL, 置于分液漏斗中, 加入等体积的乙酸乙酯, 振摇 2 分钟, 静置分层, 重复以上步骤两次, 合并有机相, 加 2.5mL 1.5% 碳酸钠振摇 1 分钟, 静置分层后, 弃去碳酸钠层, 同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入 100mL 梨形瓶中, 于 40℃ 水浴上用真空减压浓缩至近干, 用少许氯仿清洗瓶壁, 浓缩干, 加蒸馏水 0.4mL 定容备用。

(2) 固体和半固体样品处理方法: 称取样品 25g 置于乳钵中, 加适量无水硫酸钠研磨后, 加至三角瓶中, 加 80mL 乙酸乙酯浸泡 30 分钟, 振荡 30 分钟, 过滤, 取滤液 50mL, 置于分液漏斗中, 加入等体积的乙酸乙酯, 振摇 2 分钟, 静置分层, 重复以上步骤两次, 合并有机相, 加 2.5mL 1.5% 碳酸钠振摇 1 分钟, 静置分层后, 弃去碳酸钠层, 同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入 100mL 梨形瓶中, 于 40℃ 水浴上用真空减压浓缩至近干, 用少许氯仿清洗瓶壁, 浓缩干, 加蒸馏水 0.4mL 定容备用。

实施例 14:

胶体金免疫层析检测展青霉素的方法及试纸的制备并用于检测固体样品
本实施例分为 6 部分: (1) 展青霉素人工抗原 8 的制备; (2) 硝酸纤维素膜 4 的制备; (3) 胶体金结合物垫的制备; (4) 试纸条的组装; (5) 待检样品的处理; (6) 检测和结果判断。

(1) 展青霉素检测抗原 8 的制备, 包括如下步骤:

① 将 0.5mg 展青霉素、7.4mg 戊二酸酐和 1.6mg 4-二甲氨基吡啶溶于 200 μ L 无水四氢呋喃中, 37℃ 振荡反应 1 小时; 加 100 μ L 酸性蒸馏水 (pH2-3) 终止反应;

② 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀, 上清液抽真空去除四氢呋喃; 用 300 μ L 氯仿抽提三次, 合并抽提液; 用薄层层析法纯化出反应产物 (展青霉素-半戊二酸)。

③ 将纯化的展青霉素-半戊二酸溶解于 100 μ L 四氢呋喃中, 0.6mg 氮羟基琥珀酸 (NHS) 和 3.2mg 二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶解于 200 μ L 四氢呋喃中; 二者混匀, 置室温避光振荡反应 24 小时。

④ 反应完全后, 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀。上清液真空抽干, 溶解于 300 μ L 二甲基亚砜中, 再加入 600 μ L 脱脂奶粉的溶液中 (4mg 溶于 600 μ L 0.13M NaHCO_3 中), 室温下振荡反应 2 小时 (避光)。

⑤ 反应结束后, 0.01M PBS (pH7.2) 4℃ 透析 72 小时, 紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比, 真空冻干待用。

(2) 硝酸纤维素膜 4 的制备

① 选择制备检测线 6 的检测抗原和制备质控线 7 的抗抗体 11

a. 选择脱脂奶粉与展青霉素-半戊二酸偶联制备的检测抗原用于制备检测线 6;

b. 选择展青霉素的 IgG 型单克隆抗体的抗抗体 11 用于制备质控线 7。

② 制备检测线 6 和质控线 7

将硝酸纤维素膜 4 按 10-35mm 宽的尺寸剪裁；将经生理盐水缓冲液充分透析，浓度调整为 0.2mg/mL 的展青霉素检测抗原 8 在膜上线状点样作为检测线 6，检测线 6 点样位置离膜底边 8mm，然后在膜的顶端用浓度调整为 0.5mg/mL 的抗抗体 11 喷涂质控线 7，硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟，置于 0.5% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟，取出吸干水分，于 37℃ 孵育 30 分钟，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 胶体金结合物垫的制备

分别取 50mL 颗粒直径为 30-50nm 胶体金，用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH 至 8.0，搅拌下将胶体金溶胶和展青霉素单克隆抗体混合，再加入聚乙二醇水溶液，使最终浓度为 0.05%。将粗制品 6000g 离心 45 分钟，沉淀用生理盐水混悬至 1.5mL，4℃ 保存。将标记胶体金颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装

① 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4；② 在衬垫 1 上加上胶体金结合物垫；③ 在衬垫 1 上加上样品垫 2；④ 在衬垫 1 上加上吸水垫 5；组装为检测试纸条。

(5) 样品的处理

称取固体样品 25g 置于乳钵中，加适量无水硫酸钠研磨后，称至三角瓶中，加 80mL 乙酸乙酯浸泡 30 分钟，振荡 30 分钟，过滤，取滤液 50mL，置于分液漏斗中，加入等体积的乙酸乙酯，振摇 2 分钟，静置分层，重复以上步骤两次，合并有机相，加 2.5mL 1.5% 碳酸钠振摇 1 分钟，静置分层后，弃去碳酸钠层，同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入 100mL 梨形瓶中，于 40℃ 水浴上用真空减压浓缩至近干，用少许氯仿清洗瓶壁，浓缩干，加蒸馏水 0.4mL 定容备用。

(6) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.4mL，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 5 秒，垂直取出试纸，5 分钟后观察。

结果判断：检测线 6 和质控线 7 处有红线出现为阴性；检测线 6 无红线出现，质控线 7 出现红色为阳性；质控线 7 无红线出现为失效。

检测线	质控线	结果判断
+/-	-	结果不可靠
-	+	样品中含有展青霉素
+	+	样品中无展青霉素或样品中展青霉素含量低于检测底限

实施例 15:

胶体金免疫层析检测展青霉素试纸的制备并用于检测液体样品

本实施例分为 6 部分：(1)展青霉素检测抗原 8 的制备；(2)硝酸纤维素膜 4 的制备；(3)胶体金结合物垫的制备；(4)试纸条的组装；(5)待检样品的处理；(6)检测和结果判断。

(1)展青霉素检测抗原 8 的制备，包括如下步骤：

①将 0.5mg 展青霉素、7.4mg 戊二酸酐和 1.6mg 4-二甲氨基吡啶溶于 200 μL 无水四氢呋喃中，37℃ 振荡反应 1 小时；加 100 μL 酸性蒸馏水 (PH2-3) 终止反应；

② 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀，上清液抽真空去除四氢呋喃；用 300 μL 氯仿抽提三次；用薄层层析法纯化出反应产物 (展青霉素-半戊二酸)。

③将纯化的展青霉素-半戊二酸溶解于 100 μL 四氢呋喃中，0.6mg 氮羟基琥珀酸 (NHS) 和 3.2mg 二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶解于 200 μL 四氢呋喃中；二者混匀，置室温避光振荡反应 24 小时。

④反应完全后，12000rpm 离心 5 分钟去沉淀。上清液真空抽干，溶解于 300

μL 二甲基亚砷中,再加入 600 μL 钥孔贝血蓝蛋白 (KLH) 溶液中 (4mg 溶于 600 μL 0.13M NaHCO_3 中), 室温下振荡反应 2 小时 (避光)。

③ 反应结束后, 0.01M PBS (pH7.2) 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 72 小时, 紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比, 真空冻干待用。

(2) 硝酸纤维素膜 4 的制备:

① 选择制备检测线 6 的检测抗原和制备质控线 7 的抗抗体 11

a. 选择钥眼贝血蓝蛋白 (KLH) 与展青霉素-半戊二酸偶联制备的检测抗原用于制备检测线 6。

b. 选择展青霉素的 IgG 型单克隆抗体的抗抗体用于制备质控线。

② 制备检测线 6 和质控线 7

将硝酸纤维素膜 4 按 18mm 宽的尺寸剪裁; 将经生理盐水缓冲液充分透析, 浓度调整为 1mg/mL 的展青霉素检测抗原 8 在膜上线状点样作为检测线 6, 检测线 6 点样位置离膜底边 6mm, 然后在膜的顶端用浓度调整为 0.05mg/mL 的抗抗体 11 喷涂质控线 7, 硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟, 置于 5% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟, 取出吸干水分, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟, 置室温下干燥处密封储藏。

(3) 胶体硒结合物垫的制备:

a. 胶体硒溶胶制备: 在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550mL 和聚丙烯酸 10g, 通氮室温搅拌并加入水合肼 69.5mL, 继续搅拌 20 分钟。亚硒酸 9.63g 溶解于 280mL 水, 室温搅拌下滴入反应混合液内, 得到 120nm 红色硒溶胶。

b. 胶体硒抗体标记: 将展青霉素单克隆抗体用 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成 4.6mg/mL 浓度溶液, 加 25 μL 于 pH7.3 的 25mL 硒溶胶中, 室温搅拌 10 分钟后加 1% PEG8000 1mL, 混匀, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 5000rpm 离心 5 分钟, 得到松软的红色沉淀, 用含 0.05% NaN_3 的磷酸盐缓冲液配成 1mL 悬液。

c. 将标记胶体硒颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上, 冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装:

① 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4; ② 在衬垫 1 上加上胶体硒结合物垫; ③ 在衬垫 1 上加上样品垫 2; ④ 在衬垫 1 上加上吸水垫 5; 组装为检测试纸条。

(5) 样品的处理:

量取等检样品 25mL, 置于分液漏斗中, 加入等体积的乙酸乙酯, 振摇 2 分钟, 静置分层, 重复以上步骤两次, 合并有机相, 加 2.5mL 1.5% 碳酸钠振摇 1 分钟, 静置分层后, 弃去碳酸钠层, 同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入 100mL 梨形瓶中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上用真空减压浓缩至近干, 用少许氯仿清洗瓶壁, 浓缩干, 加蒸馏水 0.4mL 定容备用。

(6) 检测和结果判断

检测: 取处理好的样本 0.4mL, 离心片刻, 垂直插入试纸条, 插入深度不超过样品垫, 在样本中停留约 5 秒, 垂直取出试纸, 5 分钟后观察。

结果判断: 检测线 6 和质控线 7 处有红线出现为阴性; 检测线 6 无红线出现, 质控线 7 出现红色为阳性; 质控线 6 无红线出现为失效。

检测线	质控线	结果判断
+/-	-	结果不可靠
-	+	样品中含有展青霉素
+	+	样品中无展青霉素或样品中展青霉素含量低于检测底限

实施例 16:

乳胶颗粒免疫层析检测展青霉素试纸的制备并用于检测半固体样品

本实施例分为6部分：(1)展青霉素检测抗原8的制备；(2)硝酸纤维素膜4的制备；(3)乳胶颗粒结合物垫的制备；(4)试纸条的组装；(5)待检样品的处理；(6)检测和结果判断。

(1)展青霉素检测抗原8的制备，包括如下步骤：

①将0.5mg展青霉素、7.4mg戊二酸酐和1.6mg 4-二甲氨基吡啶溶于200 μL 无水四氢呋喃中，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应1小时；加100 μL 酸性蒸馏水 (PH2-3) 终止反应；

②12000rpm离心5分钟去沉淀，上清液抽真空去除四氢呋喃；用300 μL 氯仿抽提三次；用薄层层析法纯化出反应产物（展青霉素-半戊二酸）。

③将纯化的展青霉素-半戊二酸溶解于100 μL 四氢呋喃中，0.6mg氮羟基琥珀酸 (NHS) 和3.2mg二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶解于200 μL 四氢呋喃中。二者混匀，置室温避光振荡反应24小时。

④反应完全后，12000rpm离心5分钟去沉淀。上清液真空抽干，溶解于300 μL 二甲基亚砜中，再加入600 μL 卵清白蛋白 (OVA) 溶液中 (4mg溶于600 μL 0.13M NaHCO_3 中)，室温下振荡反应2小时 (避光)。

⑤反应结束后，0.01M PBS (pH7.2) 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析72小时，紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比，真空冻干待用。

(2) 硝酸纤维素膜4的制备：

①选择制备检测线6的检测抗原和制备质控线7的抗抗体11

a. 选择卵清白蛋白与展青霉素-半戊二酸偶联制备的检测抗原用于制备检测线；

b. 选择展青霉素的IgM型单克隆抗体的抗抗体用于制备质控线。

②制备检测线6和质控线7

将硝酸纤维素膜4按18mm宽的尺寸剪裁；将经生理盐水缓冲液充分透析，浓度调整为0.04mg/mL的展青霉素检测抗原(8)在膜上线状点样作为检测线(6)，检测线(6)点样位置离膜底边7mm，然后在膜的顶端用浓度调整为3mg/mL的抗抗体(11)喷涂质控线(6)，硝酸纤维素膜(4)室温干燥30分钟，置于3%脱脂奶粉的生理盐水中浸泡30分钟，取出吸干水分，于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 乳胶结合物垫的制备

彩色乳胶颗粒购自Bangs Laboratories公司，颜色为兰色。用pH7.1的磷酸盐缓冲液将乳胶颗粒稀释到1%浓度，分别取50mL，搅拌下将乳胶溶液展青霉素单克隆抗体混合，室温搅拌30分钟后于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵化60分钟，4 $^{\circ}\text{C}$ 放置4-5小时。15000rpm离心30分钟，用2mL磷酸盐缓冲液重悬。将标记乳胶颗粒的抗体混合并分散在厚度为1mm的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装

①在衬垫1上加上有检测线6和质控线7的硝酸纤维素膜4；②在衬垫1上加上乳胶结合物垫；③在衬垫1上加上样品垫2；④在衬垫1上加上吸水垫5；组装为检测试纸条。

(5) 样品的处理

称取半固体样品25g置于乳钵中，加适量无水硫酸钠研磨后，称至三角瓶中，加80mL乙酸乙酯浸泡30分钟，振荡30分钟，过滤，取滤液50mL，置于分液漏斗中，加入等体积的乙酸乙酯，振摇2分钟，静置分层，重复以上步骤两次，合并有机相，加2.5mL 1.5%碳酸钠振摇1分钟，静置分层后，弃去碳酸钠层，同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入100mL梨形瓶中，于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上用真空减压浓缩至近干，用少许氯仿清洗瓶壁，浓缩干，加蒸馏水0.4mL定容备用。

(6) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本0.5mL，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不

超过样品垫，在样本中停留约 5 秒，垂直取出试纸，5 分钟后观察。

结果判断如下：

检测线 6 和质控线 7 处有兰线出现为阴性；检测线 6 无兰线出现，质控线 7 出现兰色为阳性；质控线 7 无兰线出现为失效。

检测线	质控线	结果判断
+/-	-	结果不可靠
-	+	样品中含有展青霉素
+	+	样品中无展青霉素或样品中展青霉素含量低于检测底限

实施例 17:

明胶颗粒免疫层析检测展青霉素试纸的制备并用于检测半固体样品

本实施例分为 6 部分：(1)展青霉素检测抗原 8 的制备；(2)硝酸纤维素膜 4 的制备；(3)明胶颗粒结合物垫的制备；(4)试纸条的组装；(5)待检样品的处理；(6)检测和结果判断。

(1)展青霉素检测抗原的制备，包括如下步骤：

①将 0.5mg 展青霉素、7.4mg 戊二酸酐和 1.6mg 4-二甲氨基吡啶溶于 200 μ L 无水四氢呋喃中，37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时；加 100 μ L 酸性蒸馏水 (pH2-3) 终止反应；

② 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀，上清液抽真空去除四氢呋喃；用 300 μ L 氯仿抽提三次；用薄层层析法纯化出反应产物 (展青霉素-半戊二酸)。

③将纯化的展青霉素-半戊二酸溶解于 100 μ L 四氢呋喃中，0.6mg 氮羟基琥珀酸 (NHS) 和 3.2mg 二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶解于 200 μ L 四氢呋喃中。二者混匀，置室温避光振荡反应 24 小时。

④反应完全后，12000rpm 离心 5 分钟去沉淀。上清液真空抽干，溶解于 300 μ L 二甲基亚砜中，再加入 600 μ L 钥孔贝血蓝蛋白溶液中 (4mg 溶于 600 μ L 0.13M NaHCO₃ 中)，室温下振荡反应 2 小时 (避光)。

⑤反应结束后，0.01M PBS (pH7.2) 4 $^{\circ}$ C 透析 72 小时，紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比，真空冻干待用。

(2) 硝酸纤维素膜 4 的制备：

① 选择制备检测线 6 的检测抗原和制备质控线 7 的抗抗体 11

a. 选择钥孔贝血蓝蛋白与展青霉素-半戊二酸偶联制备的检测抗原用于制备检测线；

b. 选择展青霉素的 IgG 型单克隆抗体的抗抗体 11 用于制备质控线 7。

② 制备检测线 6 和质控线 7

将硝酸纤维素膜 4 按 10-35mm 宽的尺寸剪裁；将经生理盐水缓冲液充分透析，浓度调整为 5mg/mL 的展青霉素检测抗原 8 在膜上线状点样作为检测线 6，检测线 6 点样位置离膜底边 16mm，然后在膜的顶端用浓度调整为 5mg/mL 的抗抗体 11 喷涂质控线 7，硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟，置于 2% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟，取出吸干水分，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 明胶结合物垫的制备：

明胶颗粒购自 Zodalabs 公司，颜色为兰色。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将明胶颗粒稀释到 1% 浓度，分别取 50mL，搅拌下将明胶溶液展青霉素单克隆抗体混合，室温搅拌 30 分钟后于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵化 60 分钟，4 $^{\circ}$ C 放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟，用 2mL 磷酸盐缓冲液重悬。将标记明胶颗粒抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装：

① 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4；② 在衬垫 1

上加上明胶颗粒结合物垫；③ 在衬垫 1 上加上样品垫 2；④ 在衬垫 1 上加上吸水垫 5；组装为检测试纸条。

(5) 样品的处理：

称取半固体样品 25g 置于乳钵中，加适量无水硫酸钠研磨后，加到三角瓶中，加 80mL 乙酸乙酯浸泡 30 分钟，振荡 30 分钟，过滤，取滤液 50mL，置于分液漏斗中，加入等体积的乙酸乙酯，振摇 2 分钟，静置分层，重复以上步骤两次，合并有机相，加 2.5mL 1.5% 碳酸钠振摇 1 分钟，静置分层后，弃去碳酸钠层，同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入 100mL 梨形瓶中，于 40℃ 水浴上用真空减压浓缩至近干，用少许氯仿清洗瓶壁，浓缩干，加蒸馏水 0.4mL 定容备用。

(6) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.5mL，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 5 秒，垂直取出试纸，5 分钟后观察。

结果判断如下：

检测线 6 和质控线 7 处有兰线出现为阴性；检测线 6 无兰线出现，质控线 7 出现兰色为阳性；质控线 7 无兰线出现为失效。

检测线	质控线	结果判断
+/-	-	结果不可靠
-	+	样品中含有展青霉素
+	+	样品中无展青霉素或样品中展青霉素含量低于检测底限

实施例 18：

磁性颗粒免疫层析检测展青霉素试纸的制备并用于检测液体样品

本实施例分为 6 部分：(1) 展青霉素检测抗原 8 的制备；(2) 硝酸纤维素膜 4 的制备；(3) 磁性颗粒结合物垫的制备；(4) 试纸条的组装；(5) 待检样品的处理；(6) 检测和结果判断。

(1) 展青霉素检测抗原 8 的制备，包括如下步骤：

① 将 0.5mg 展青霉素、7.4mg 戊二酸酐和 1.6mg 4-二甲氨基吡啶溶于 200 μ L 无水四氢呋喃中，37℃ 振荡反应 1 小时；加 100 μ L 酸性蒸馏水 (PH2-3) 终止反应；

② 12000rpm 离心 5 分钟去沉淀，上清液抽真空去除四氢呋喃；用 300 μ L 氯仿抽提三次；用薄层层析法纯化出反应产物 (展青霉素-半戊二酸)。

③ 将纯化的展青霉素-半戊二酸溶解于 100 μ L 四氢呋喃中，0.6mg 氮羟基琥珀酸 (NHS) 和 3.2mg 二环己基碳化二亚胺 (DCC) 溶解于 200 μ L 四氢呋喃中。二者混匀，置室温避光振荡反应 24 小时。

④ 反应完全后，12000rpm 离心 5 分钟去沉淀。上清液真空抽干，溶解于 300 μ L 二甲基亚砜中，再加入 600 μ L 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液中 (4mg 溶于 600 μ L 0.13M NaHCO_3 中)，室温下振荡反应 2 小时 (避光)。

⑤ 反应结束后，0.01M PBS (pH7.2) 4℃ 透析 72 小时，紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比，真空冻干待用。

(2) 硝酸纤维素膜 4 的制备：

① 选择制备检测线 6 的检测抗原和制备质控线 7 的抗抗体 11

a. 选择牛血清白蛋白与展青霉素-半戊二酸偶联制备的检测抗原用于制备检测线；

b. 选择展青霉素的 IgG 型单克隆抗体的抗抗体用于制备质控线。

② 制备检测线 6 和质控线 7

将硝酸纤维素膜 4 按 25mm 宽的尺寸剪裁；将经生理盐水缓冲液充分透析，浓度调整为 0.08mg/mL 的展青霉素检测抗原 8 在膜上线状点样作为检测线 6，

检测线 6 点样位置离膜底边 9mm，然后在膜的顶端用浓度调整为 0.03mg/mL 的抗体 11 喷涂质控线 7，硝酸纤维素膜 4 室温干燥 30 分钟，置于 0.18% 脱脂奶粉的生理盐水中浸泡 30 分钟，取出吸干水分，于 37℃ 孵育 30 分钟，置室温下干燥处密封储藏。

(3) 磁性颗粒结合物垫的制备：

磁性颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将磁性颗粒稀释到 1% 浓度，分别取 50mL，搅拌下将展青霉素单克隆抗体混合，室温搅拌 30 分钟后于 37℃ 水浴孵化 60 分钟，4℃ 放置 4-5 小时。15000rpm 离心 30 分钟，用 2mL 磷酸盐缓冲液重悬。将标记磁性颗粒的抗体混合并分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

(4) 试纸条的组装：

① 在衬垫 1 上加上有检测线 6 和质控线 7 的硝酸纤维素膜 4；② 在衬垫 1 上加上磁性颗粒结合物垫；③ 在衬垫 1 上加上样品垫 2；④ 在衬垫 1 上加上吸水垫 5；组装为检测试纸条。

(5) 样品的处理：

量取等检样品 25mL，置于分液漏斗中，加入等体积的乙酸乙酯，振摇 2 分钟，静置分层，重复以上步骤两次，合并有机相，加 2.5mL 1.5% 碳酸钠振摇 1 分钟，静置分层后，弃去碳酸钠层，同上步骤再用碳酸钠处理一次。将提取液滤入 100mL 梨形瓶中，于 40℃ 水浴上用真空减压浓缩至近干，用少许氯仿清洗瓶壁，浓缩干，加蒸馏水 0.4mL 定容备用。

(6) 检测和结果判断

检测：取处理好的样本 0.5mL，离心片刻，垂直插入试纸条，插入深度不超过样品垫，在样本中停留约 5 秒，垂直取出试纸，5 分钟后用磁读取仪判断结果。

结果判断如下：相应位置出现磁性增强为阳性，无磁性增强为阴性

检测线	质控线	结果判断
+/-	-	结果不可靠
-	+	样品中含有展青霉素
+	+	样品中无展青霉素或样品中展青霉素含量低于检测底限

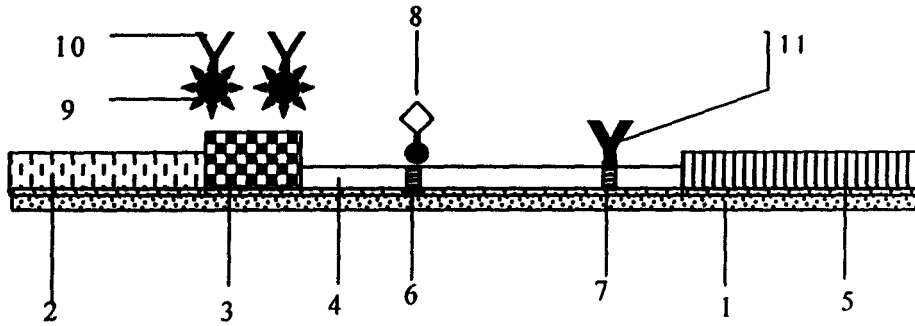


图 1

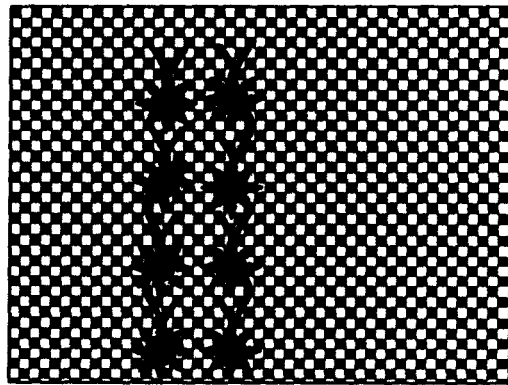


图 2

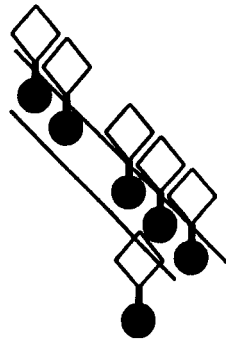


图 3

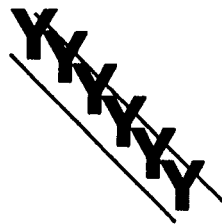


图 4

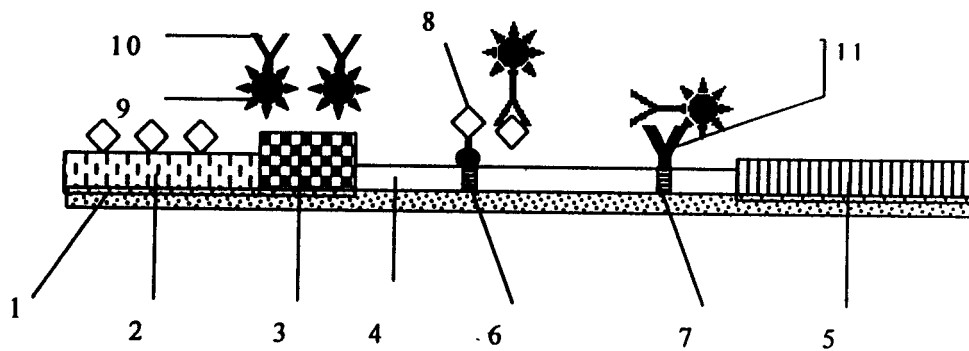


图 5

专利名称(译)	展青霉素免疫层析检测试纸的制作方法与应用		
公开(公告)号	CN1603829A	公开(公告)日	2005-04-06
申请号	CN03160299.1	申请日	2003-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
[标]发明人	许杨 邓舜洲 赖卫华 陈高明 熊勇华		
发明人	许杨 邓舜洲 赖卫华 陈高明 熊勇华		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	杨志宇		
其他公开文献	CN1300586C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种展青霉素免疫层析检测试纸及其制作方法与应用。本发明的检测试纸，包括衬垫，样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫，检测线，质控线；在衬垫上按顺序有样品垫，示踪粒子结合物垫，硝酸纤维素膜，吸水垫；示踪粒子结合物垫上有示踪粒子标记的抗展青霉素的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线上有展青霉素检测抗原，质控线上有抗抗体，其中抗抗体是抗展青霉素的抗体的抗体。本发明的优点在于：本发明有放射免疫分析和酶联免疫吸附试验ELISA的优点。同时，本发明有简单、快速、常温保存、单份测定、一次试验测出展青霉素、除商品试剂外不需任何仪器设备的优点，特别适合展青霉素的现场快速检测。

