

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103267842 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 28

(21) 申请号 201310178452. 4

(22) 申请日 2013. 05. 15

(71) 申请人 郭杰标

地址 512000 广东省韶关市韶关学院英东食品科学与工程学院

(72) 发明人 郭杰标

(74) 专利代理机构 韶关市雷门专利事务所
44226

代理人 周胜明

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

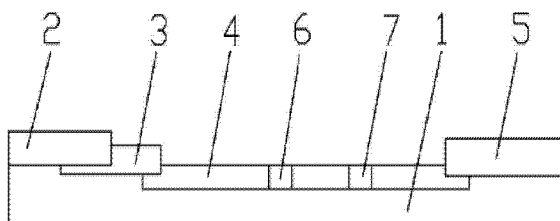
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

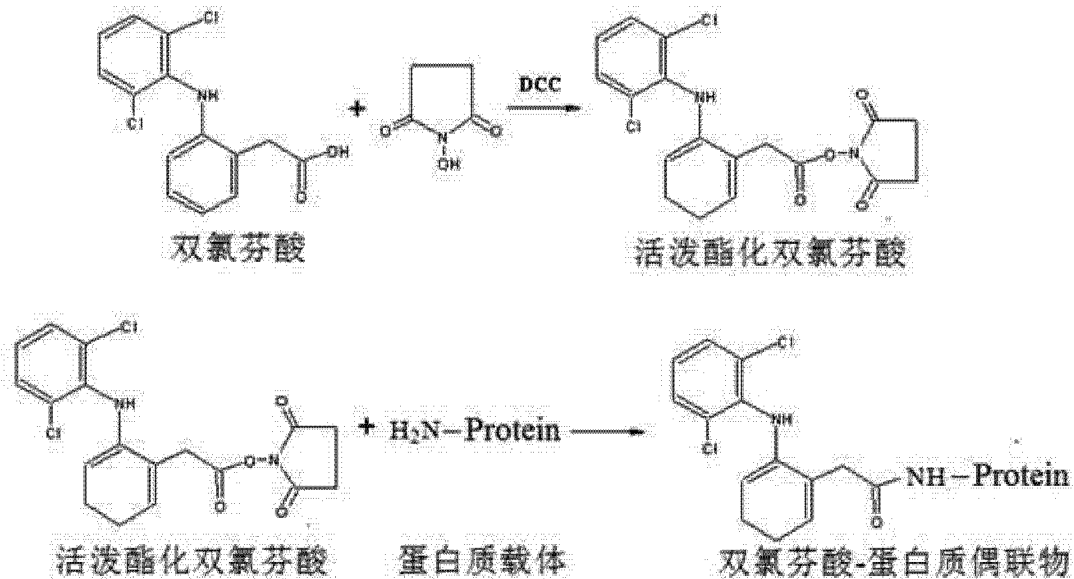
检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,以活性酯法将双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联,合成人工免疫抗原,并用于免疫动物,制备特异性抗双氯芬酸抗体;并将双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联,合成检测抗原,用于构建免疫检测方法;抗双氯芬酸抗体经分离纯化后标记于纳米胶体金,然后和双氯芬酸检测抗原以及羊抗兔 IgG 分别固化在一载体上,根据竞争抑制免疫层析原理,进行双氯芬酸的半定量分析测定,所建立的检测体系对保健品、中成药中违法添加双氯芬酸的最低检出限度为 2.0 μg/kg,能在 5 分钟内完成快速检测;使纳米技术及免疫技术应用于食品药品安全检测领域,实现一步法快速检测双氯芬酸的违法添加。



1. 一种检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是以活性酯法将双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联,合成人工免疫抗原,并用于免疫动物,制备特异性抗双氯芬酸抗体;并将双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联,合成检测抗原,用于构建免疫检测方法;抗双氯芬酸抗体经分离纯化后标记于纳米胶体金,然后和双氯芬酸检测抗原以及羊抗兔 IgG 分别固化在一载体上,根据竞争抑制免疫层析原理,进行双氯芬酸的半定量分析测定,所建立的检测体系对保健品、中成药中违法添加双氯芬酸的最低检出限度为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,能在 5 分钟内完成快速检测;



其中,protein 是牛血清白蛋白(BSA) 或卵清白蛋白(OVA)。

2. 如权利要求 1 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征在于工艺步骤是:

- 步骤一:双氯芬酸人工抗原的制备;
- 步骤二:抗双氯芬酸特异性抗体的制备;
- 步骤三:胶体金的制备;
- 步骤四:抗双氯芬酸特异性抗体标记胶体金;
- 步骤五:硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜的处理;
- 步骤六:免疫层析试纸条的制备;
- 步骤七:样品测试和结果判断方法。

3. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:所述步骤一是采用改良活性酯法分别合成免疫抗原和检测抗原,其中免疫抗原的合成是将 0.03g 双氯芬酸溶于 1.0mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)中,再加入 0.016g 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.009g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),在室温下反应过夜,离心取上清液,逐滴加入 20mL 的 15mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA) 碳酸缓冲液(pH 值为 8.5)中,磁力搅拌反应 4 小时后,用生理盐水透析 72 小时除去未反应的双氯芬酸,每 6 小时换透析液一次,分装冻存于 -20°C 冰箱,本步骤所合成的双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA) 偶联物将用作免疫抗原;

其中检测抗原的合成是将 0.01g 双氯芬酸溶于 1.0mL 无水二甲基甲酰胺(DMF),再加

入 0.010g 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.008g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),在室温下反应过夜,离心取上清液,逐滴加入 20mL 的 15mg/mL 的卵清白蛋白(OVA)碳酸缓冲液(pH 值为 8.5)中,磁力搅拌反应 4 小时后,用生理盐水透析 72 小时除去未反应的双氯芬酸,每 6 小时换透析液一次,分装冻存于 -20°C 冰箱,本步骤所合成的双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联物将用作检测抗原。

4. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:所述步骤二用合成的免疫抗原对实验用新西兰大白兔进行皮下注射免疫,每只大白兔初次免疫用 0.2mg/0.2mL 免疫抗原加等量的福氏完全佐剂乳化后免疫,初次免疫相隔 28 天,用 0.1mg/0.1mL 免疫抗原以福氏不完全佐剂乳化抗原后皮下注射,进行加强免疫,以后每隔 21 天以同样剂量加强免疫一次,共进行四次加强免疫,最后一次加强免疫后 7 天收集血清, -20°C 冻存储备用。

5. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:所述步骤三是在 100mL 超纯水中加入 1.0mL 1% 浓度的氯金酸,加热至沸腾,再加入 1% 柠檬酸三钠溶液 1mL,继续煮沸 10 分钟,冷却后, 4°C 保存备用,取样扫描测定最大吸收峰并进行透射电镜观察粒子大小。

6. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:在所述步骤四中,调节如上制备的 100mL 胶体金溶液的 pH 值为 8.2,快速搅拌下加入经纯化的抗双氯芬酸抗体 400 μg ,使其终浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,室温反应 15 分钟后,加入聚乙二醇 PEG 至终浓度为 1%,继续搅拌 15 分钟,用 15000r/min 离心 30 分钟,吸去上清液后,所得沉淀为纯化的金标记抗体,此金标记抗体复悬于保存液中,于 4°C 保存。

7. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:在所述步骤五中,用微量喷头喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上,双氯芬酸偶联卵清蛋白结合物作为测试线,羊抗兔 IgG 作为质控线,用定量喷头喷涂金标记抗双氯芬酸抗体于玻璃纤维素膜上,干燥硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜后备用。

8. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:所述步骤六在 60mm \times 300mm 的单面胶 PVC 板上,依次粘贴上玻璃纤维素膜、已固定有金标记抗双氯芬酸抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被双氯芬酸-卵清蛋白和羊抗兔 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水玻璃纤维素膜,用切条机将粘贴好的 PVC 板纵向切成 5mm \times 60mm 的试纸条。

9. 如权利要求 2 所述检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,其特征是:所述步骤七将试纸条插入待测样品中,停留 5 秒后取出平放,或用滴管在样品垫上滴加 3~4 滴液体样品,10 分钟后观察结果,羊抗兔 IgG 和双氯芬酸偶联 OVA 结合物分别喷涂在 NC 膜的质控线(C)和测试线(T),含双氯芬酸待测样品经 S 端根据层析原理向另一端移动,并先后越过测试线和质控线,固化在玻璃纤维膜上的金标记抗双氯芬酸特异性抗体与样品中的双氯芬酸起特异性反应,并竞争性地抑制其与测试线上的双氯芬酸结合,因此当样品中的双氯芬酸含量不到一定量时,金标记抗双氯芬酸特异性抗体与测试线双氯芬酸结合后金颗粒凝集显色,当样品中的双氯芬酸含量超过一定量时,金标记抗体完全被抑制而不显色,质控线(C)是检验方法本身有效与否而设定,显色有效,不显色表明方法本身无效。

检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品药品安全检测技术领域,涉及一种对保健品和中成药中违法添加的化学药品进行检测的双氯芬酸免疫胶体金层析检测方法。

背景技术

[0002] 双氯芬酸的化学名为 2-[(2,6-二氯-3-甲基苯基)氨基]苯甲酸,属于非甾体抗炎药,它具有抗炎、镇痛及解热作用,用于风湿性关节炎、粘连性脊椎炎、非炎性关节痛、关节炎、非关节性风湿病、非关节性炎症引起的疼痛,各种神经痛、癌症疼痛、创伤后疼痛及各种炎症所致发热等。但有一定的副作用,在临床上属于处方药,必须在医生的指导下服用。

[0003] 风湿性疾病是以关节、肌肉、软组织、神经等疼痛为主要症状,病程多呈慢性和反复发作。我国有通过“食疗”或中药调理慢性疾病的传统,在化学合成药品存在诸多副作用的背景下,针对风湿性疾病的保健食品(以保健酒为主)、中成药近年来广受市场青睐。

[0004] 双氯芬酸止痛效果迅速且价格低廉,于是有不法厂家在保健食品、中成药中违法添加双氯芬酸,以增强疗效牟取不正当利益。不当服用双氯芬酸可能产生恶心、头痛或过敏性皮疹等不良反应,对消化道、肝脏和肾脏造成损伤,严重的甚至导致过敏性休克和急性肾功能衰竭。患者不知情而长期服用含双氯芬酸的保健食品,其危害性是非常严重的,必须加强对违法添加双氯芬酸产品的监督检查。目前,检测违法添加双氯芬酸的确证方法是高效液相色谱、液质联用检测。但是这些方法设备投入大、运行费用高,样品预处理复杂,不能够现场进行检测,难以大规模对违法添加现象展开筛查。

[0005] 现有的双氯芬酸快速检测方法主要是化学检测方法和薄层色谱检测方法,检测的灵敏度和抗干扰能力有提高的需要。免疫学检测方法灵敏、特异、快速和价廉,在环境监测和食品安全领域已广泛应用。

[0006] 经文献检索,未发现利用胶体金免疫层析方法检测双氯芬酸的相关报道。

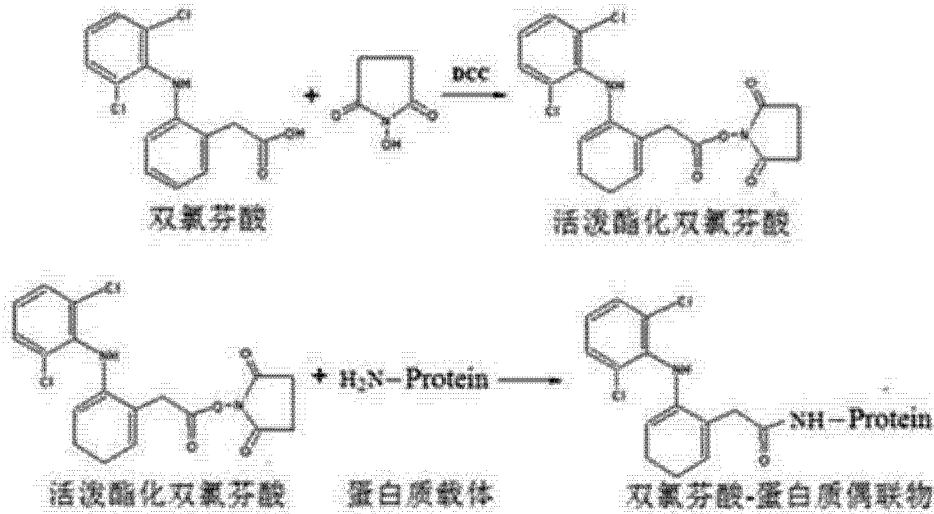
[0007] 本发明涉及双氯芬酸的人工抗原合成方法,以人工免疫抗原免疫动物诱导产生特异性抗体,开发检测违法添加胶体金的免疫层析方法,为大规模的专项筛查工作提供高效的技术工具。本发明将为食品药品安全检测工作提供新的工具。

发明内容

[0008] 为了克服现有技术的上述缺点,本发明提供一种使用纳米技术及免疫技术应用于食品药品安全检测,实现一步法快速检测保健品、中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法。

[0009] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:一种检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法,以活性酯法将双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联,合成人工免疫抗原,并用于免疫动物,制备特异性抗双氯芬酸抗体;并将双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联,合成检测抗原,用于构建免疫检测方法;抗双氯芬酸抗体经分离纯化后标记于纳米胶体金,然后和双氯芬酸检测抗原以及羊抗兔 IgG 分别固化在一载体上,根据竞争抑制免疫层

析原理,进行双氯芬酸的半定量分析测定,所建立的检测体系对保健品、中成药中违法添加双氯芬酸的最低检出限度为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,能在 5 分钟内完成快速检测;



其中,protein 是牛血清白蛋白(BSA) 或卵清白蛋白(OVA)。

[0010] 它的具体步骤为:

- 步骤一:双氯芬酸人工抗原的制备;
- 步骤二:抗双氯芬酸特异性抗体的制备;
- 步骤三:胶体金的制备;
- 步骤四:抗双氯芬酸特异性抗体标记胶体金;
- 步骤五:硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜的处理;
- 步骤六:免疫层析试纸条的制备;
- 步骤七:样品测试和结果判断方法。

[0011] 所述步骤一是采用改良活性酯法分别合成免疫抗原和检测抗原,其中免疫抗原的合成是将 0.03g 双氯芬酸溶于 1.0mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)中,再加入 0.016g 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.009g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),在室温下反应过夜,离心取上清液,逐滴加入 20mL 的 15mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA)碳酸缓冲液(pH 值为 8.5)中,磁力搅拌反应 4 小时后,用生理盐水透析 72 小时除去未反应的双氯芬酸,每 6 小时换透析液一次,分装冻存于 -20°C 冰箱,本步骤所合成的双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联物将用作免疫抗原;

其中检测抗原的合成是将 0.01g 双氯芬酸溶于 1.0mL 无水二甲基甲酰胺(DMF),再加入 0.010g 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.008g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),在室温下反应过夜,离心取上清液,逐滴加入 20mL 的 15mg/mL 的卵清白蛋白(OVA)碳酸缓冲液(pH 值为 8.5)中,磁力搅拌反应 4 小时后,用生理盐水透析 72 小时除去未反应的双氯芬酸,每 6 小时换透析液一次,分装冻存于 -20°C 冰箱,本步骤所合成的双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联物将用作检测抗原。

[0012] 所述步骤二用合成的免疫抗原对实验用新西兰大白兔进行皮下注射免疫,每只大白兔初次免疫用 0.2mg/0.2mL 免疫抗原加等量的福氏完全佐剂乳化后免疫,初次免疫相隔 28 天,用 0.1mg/0.1mL 免疫抗原以福氏不完全佐剂乳化抗原后皮下注射,进行加强免疫,以后每隔 21 天以同样剂量加强免疫一次,共进行四次加强免疫,最后一次加强免疫后 7 天收

集血清, -20°C 冻存备用。

[0013] 所述步骤三是在 100mL 超纯水中加入 1.0mL 1% 浓度的氯金酸, 加热至沸腾, 再加入 1% 柠檬酸三钠溶液 1mL, 继续煮沸 10 分钟, 冷却后, 4°C 保存备用, 取样扫描测定最大吸收峰并进行透射电镜观察粒子大小。

[0014] 在所述步骤四中, 调节如上制备的 100mL 胶体金溶液的 pH 值为 8.2, 快速搅拌下加入经纯化的抗双氯芬酸抗体 $400\mu\text{g}$, 使其终浓度为 $4\mu\text{g}/\text{mL}$, 室温反应 15 分钟后, 加入聚乙二醇 PEG 至终浓度为 1%, 继续搅拌 15 分钟, 用 15000r/min 离心 30 分钟, 吸去上清液后, 所得沉淀为纯化的金标记抗体, 此金标记抗体复悬于保存液中, 于 4°C 保存。

[0015] 在所述步骤五中, 用微量喷头喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上, 双氯芬酸偶联卵清蛋白结合物作为测试线, 羊抗兔 IgG 作为质控线, 用定量喷头喷涂金标记抗双氯芬酸抗体于玻璃纤维素膜上, 干燥硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜后备用。

[0016] 所述步骤六在 $60\text{mm}\times 300\text{mm}$ 的单面胶 PVC 板上, 依次粘贴上玻璃纤维素膜、已固定有金标记抗双氯芬酸抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被双氯芬酸-卵清蛋白和羊抗兔 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水玻璃纤维素膜, 用切条机将粘贴好的 PVC 板纵向切成 $5\text{mm}\times 60\text{mm}$ 的试纸条。

[0017] 所述步骤七将试纸条插入待测样品中, 停留 5 秒后取出平放, 或用滴管在样品垫上滴加 3~4 滴液体样品, 10 分钟后观察结果, 羊抗兔 IgG 和双氯芬酸偶联 OVA 结合物分别喷涂在 NC 膜的质控线 (C) 和测试线 (T), 含双氯芬酸待测样品经 S 端根据层析原理向另一端移动, 并先后越过测试线和质控线, 固化在玻璃纤维膜上的金标记抗双氯芬酸特异性抗体与样品中的双氯芬酸起特异性反应, 并竞争性地抑制其与测试线上的双氯芬酸结合, 因此当样品中的双氯芬酸含量不到一定量时, 金标记抗双氯芬酸特异性抗体与测试线双氯芬酸结合后金颗粒凝集显色, 当样品中的双氯芬酸含量超过一定量时, 金标记抗体完全被抑制而不显色, 质控线 (C) 是检验方法本身有效与否而设定, 显色有效, 不显色表明方法本身无效。

[0018] 本发明的积极效果是: 将免疫化学检测技术应用于保健品和中成药中的违法添加化学药品的检测, 使纳米技术及免疫技术应用于食品药品安全检测领域, 实现一步法快速检测双氯芬酸的违法添加。

附图说明

[0019] 图 1 是双氯芬酸、牛血清白蛋白 (BSA) 和双氯芬酸-BSA 偶联物的紫外扫描数据, 经软件拟合的图谱。

[0020] 图 1 中: 1- 双氯芬酸、2-BSA、3- 双氯芬酸 BSA 结合物。

[0021] 图 2 是双氯芬酸、卵清白蛋白 (OVA) 和双氯芬酸-OVA 偶联物的紫外扫描数据, 经软件拟合的图谱。

[0022] 图 2 中: 1- 双氯芬酸、2-OVA、3- 双氯芬酸 OVA 结合物。

[0023] 图 3 是样品检测分析图。

[0024] 图 3 中: 1- 阴性样品、2-2ng/mL、3-4ng/mL、4-8ng/mL、5-8ng/mL、, 6 -10ng/mL。

[0025] 图 4 是胶体金检测试剂装配图。

[0026] 图 4 中: 1- 底板、2- 样品垫、3- 胶体金垫、4- 硝酸纤维素膜、5- 吸水垫、6- 检测线、

7- 质控线。

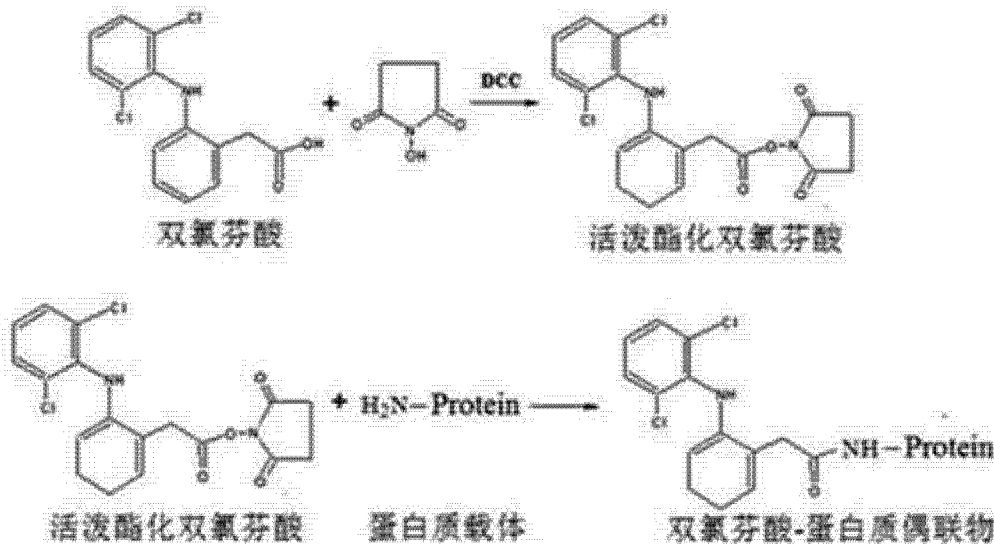
具体实施方式

[0027] 下面结合实施例和附图对本发明进一步说明。

[0028] 一种检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法，它属于食品药品安全检测技术领域，涉及一种将免疫化学检测技术应用于保健品和中成药中的违法添加化学药品的进行检测的方法，尤其是一种双氯芬酸的纳米胶体金标记免疫测定方法，使纳米技术及免疫技术应用于食品药品安全检测领域，实现一步法快速检测双氯芬酸违法添加的方法。

[0029] 本发明以活性酯法将双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联，合成人工免疫抗原，并用于免疫动物，制备特异性抗双氯芬酸抗体。另外将双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联，用于构建免疫检测方法。抗双氯芬酸抗体经分离纯化后标记于纳米胶体金，然后和双氯芬酸检测抗原以及羊抗兔 IgG 分别固化在一载体上，根据竞争抑制免疫层析原理，进行双氯芬酸的半定量分析测定，所建立的检测体系对保健品、中成药中违法添加双氯芬酸的最低检出限度为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，且在 5 分钟内完成快速检测。方法稳定、快速、准确，适合于进行一步法违法添加药品的快速检测。以下对本发明的技术方案作出进一步说明，其具体的步骤为：

构建检测双氯芬酸的免疫学检测方法，关键是获得能够识别双氯芬酸的特异性抗体。双氯芬酸是分子量小于 500 的小分子，是只有免疫反应性而没有免疫原性的“半抗原”。必须把双氯芬酸共价偶联到蛋白质载体，增加免疫原性才能够刺激免疫系统，获得特异性抗体。使用活泼酯法将双氯芬酸连接到载体蛋白的原理如下式所示：



其中，载体蛋白 protein 是牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)。

[0030] 它的具体步骤是：

步骤一：将 0.03g 双氯芬酸溶于 1.0mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)，再加入 0.016g 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.009g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，在室温下反应过夜，离心取上清液，逐滴加入 20mL 的 15mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA)碳酸缓冲液(pH 值为 8.5)中，磁力搅拌反应 4 小时，然后生理盐水透析 72 小时除去未反应的双氯芬酸，每 6 小时换透析液一次，分装冻存于 -20°C 冰箱，本步骤所合成的双氯芬酸与牛血清白蛋白(BSA)偶联物将用作免

疫抗原。

[0031] 步骤二的具体含义为：将 0.01g 双氯芬酸溶于 1.0mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)，再加入 0.010g 二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.008g N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，在室温下反应过夜，离心取上清液，逐滴加入 20mL 的 15mg/mL 的卵清白蛋白(OVA)碳酸缓冲液(pH 值为 8.5)中，磁力搅拌反应 4 小时，生理盐水透析 72 小时除去未反应的双氯芬酸，每 6 小时换透析液一次，分装冻存于 -20℃ 冰箱。本步骤所合成的双氯芬酸与卵清白蛋白(OVA)偶联物将用作检测抗原。

[0032] 参见图 1 和图 2，经扫描鉴定双氯芬酸-牛血清白蛋白偶联物具备牛血清白蛋白(BSA)和双氯芬酸的吸收特征，双氯芬酸-卵清白蛋白偶联物具备卵清白蛋白(OVA)和双氯芬酸的吸收特征。证明双氯芬酸人工免疫抗原和人工检测抗原合成成功。

[0033] 步骤二：用合成的双氯芬酸-BSA 免疫实验用新西兰大白兔，每只大白兔初次免疫用 0.2mg/0.2mL 免疫抗原加等量的福氏完全佐剂乳化后皮下注射免疫。初次免疫相隔 28 天，用 0.1mg/0.1mL 免疫抗原以福氏不完全佐剂乳化抗原后皮下注射，进行加强免疫。以后每隔 21 天以同样剂量加强免疫一次，共进行四次加强免疫。最后一次加强免疫后，7 天以后取血收集兔子血清，-20℃ 冻存储备用。

[0034] 步骤三：在 100mL 超纯水中加入 1.0mL 1% 浓度的氯金酸，加热至沸腾，再加入 1% 柠檬酸三钠溶液 1mL，继续煮沸 10 分钟，冷却后，4℃ 保存备用，取样扫描测定最大吸收峰并进行透射电镜观察粒子大小。

[0035] 胶体金标记抗双氯芬酸特异性抗体：调节如上制备的胶体金溶液(100mL)的 pH 值为 8.2，快速搅拌下加入抗双氯芬酸特异性抗体 400 μg，使其终浓度为 4 μg/mL 室温反应 15 分钟后，加入聚乙二醇(PEG)至终浓度为 1%，继续搅拌 15 分钟，用 15000r/min 离心 30 分钟，吸去上清液后，所得沉淀即为纯化的金标记抗体，此金标记抗体复悬于保存液中，4℃ 保存。

[0036] 硝酸纤维素膜和玻璃纤维素膜的处理，步骤四：调节如上制备的 100mL 胶体金溶液的 pH 值为 8.2，快速搅拌下加入经纯化的抗双氯芬酸抗体 400 μg，使其终浓度为 4 μg/mL，室温反应 15 分钟后，加入聚乙二醇 PEG 至终浓度为 1%，继续搅拌 15 分钟，用 15000r/min 离心 30 分钟，吸去上清后所得沉淀即为纯化的金标记抗体，此金标记抗体复悬于保存液中，4℃ 保存。

[0037] 免疫层析试纸条的制备，在 60mm×300mm 的单面胶 PVC 板上，依次粘贴上玻璃纤维素膜、已固定有金标记抗双氯芬酸抗体的玻璃纤维素膜、已平行包被双氯芬酸-卵清蛋白结合物和羊抗兔 IgG 抗体的硝酸纤维素膜、吸水玻璃纤维素膜。用切条机将粘贴好的 PVC 板纵向切成 5mm×60mm 的试纸条。

[0038] 样品测试和结果判断方法，将试纸条插入待测样品中，停留 5 秒后取出平放，或用滴管在样品垫上滴加 3-4 滴液体样品，10 分钟后观察结果。羊抗兔 IgG 和双氯芬酸偶联 OVA 结合物分别喷涂在 NC 膜的质控线(C)和测试线(T)，含双氯芬酸待测样品经 S 端根据层析原理向另一端移动，并先后越过测试线和质控线，固化在玻璃纤维膜上的金标记抗双氯芬酸特异性抗体与样品中的双氯芬酸起特异性反应，并竞争性地抑制其与测试线上的双氯芬酸结合，因此当样品中的双氯芬酸含量不到一定量时，金标记抗双氯芬酸特异性抗体与测试线双氯芬酸结合后金颗粒凝集显色，当样品中的双氯芬酸含量超过一定量时，金标记特

异性抗体完全被抑制而不显色,质控线(C)是检验方法本身有效与否而设定,显色有效,不显色表明方法本身无效。

[0039] 参见图3,不含双氯芬酸的样品显明显的两条线,呈阴性结果。含2ng/mL双氯芬酸的样品,检测线已经大部分被抑制,呈弱阳性。双氯芬酸含量大于2ng/mL的样品,检测线全部被抑制,呈强阳性。

[0040] 实施例一:

采用改良活性酯法分别合成免疫抗原和包被抗原,分别将0.05g半抗原溶于1.0mL无水DMF,再加入0.016g DCC和0.009g NHS,室温下反应过夜,离心取上清液,分别逐滴加入15mg/mL的BSA和OVA碳酸缓冲液(pH8.5)中,磁力搅拌反应4小时;生理盐水透析72小时除去未反应的双氯芬酸,每6小时换透析液一次,分装冻存于-20°C冰箱。

[0041] 用合成的双氯芬酸-牛血清白蛋白偶联物免疫实验用新西兰大白兔,每只大白兔初次免疫用0.2mg/0.2mL免疫抗原加等量的福氏完全佐剂乳化后皮下注射免疫。初次免疫相隔28天,用0.1mg/0.1mL免疫抗原以福氏不完全佐剂乳化抗原后皮下注射,进行加强免疫。以后每隔21天以同样剂量加强免疫一次,共进行四次加强免疫。最后一次加强免疫后,7天以颈动脉取血收集兔子血清,-20°C冻存备用。

[0042] 然后将经分离纯化的400 μ g,单抗加入预先制备的40nm大小胶体金溶液(pH值为8.2)中,室温反应15分钟,加入聚乙二醇(PEG)至终浓度为1%,继续搅拌15分钟。用8000r/min离心30分钟,吸去上清液后,所得沉淀即为纯化的金标记抗体。将此金标记抗体结合物喷涂于玻璃纤维素膜上,将双氯芬酸偶联-OVA结合物喷涂于NC膜,作为测试线,将羊抗兔IgG喷涂于NC膜,作为质控线,然后将样品吸收垫、喷涂有胶体金抗体的玻璃纤维、喷有测试线和质控线的NC膜以及吸水玻璃纤维依次粘贴于一塑料底板(5mm \times 6mm)。

[0043] 测试样品时,将试纸条插入待测样品中,停留5秒后取出平放,或用滴管在样品垫上滴加3-4滴液体样品,10分钟后观察结果,若只有质控线出现紫红色条带,结果为阳性,若质控线和测试线都出现紫红色条带,结果为阴性,若质控线不出现紫红色条带,认为测试结果无效。

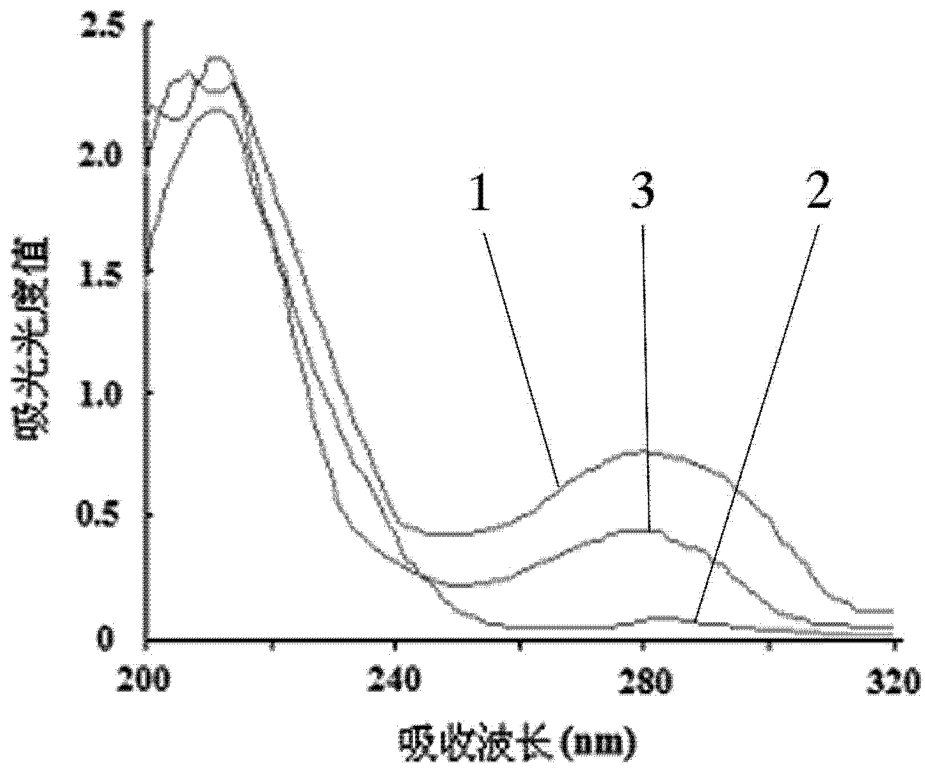


图 1

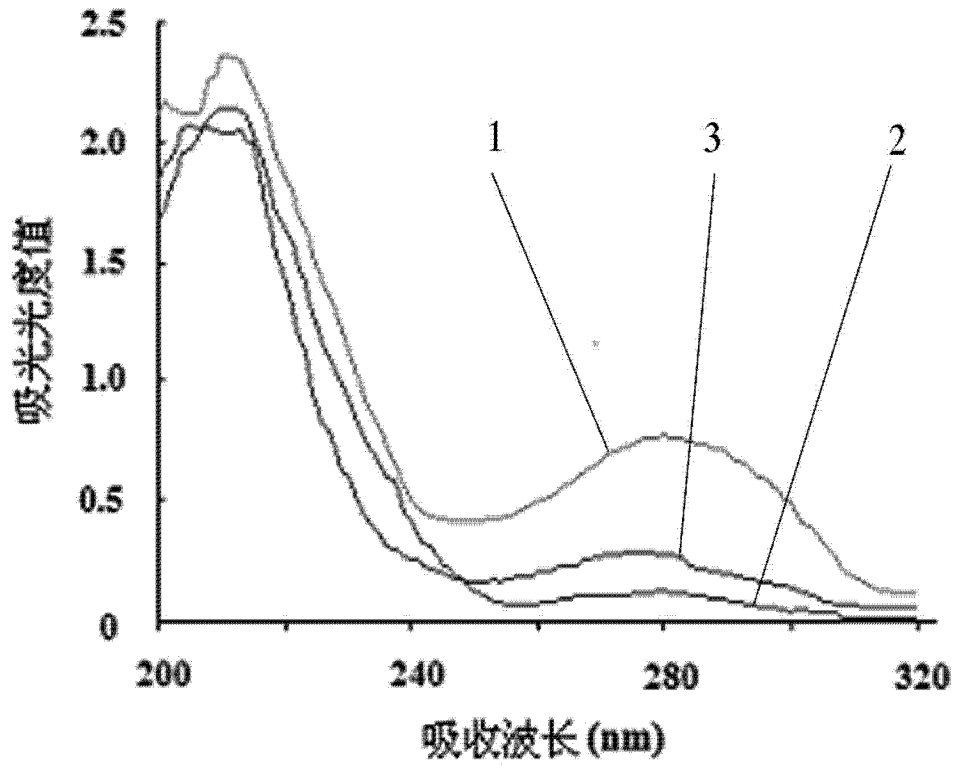


图 2

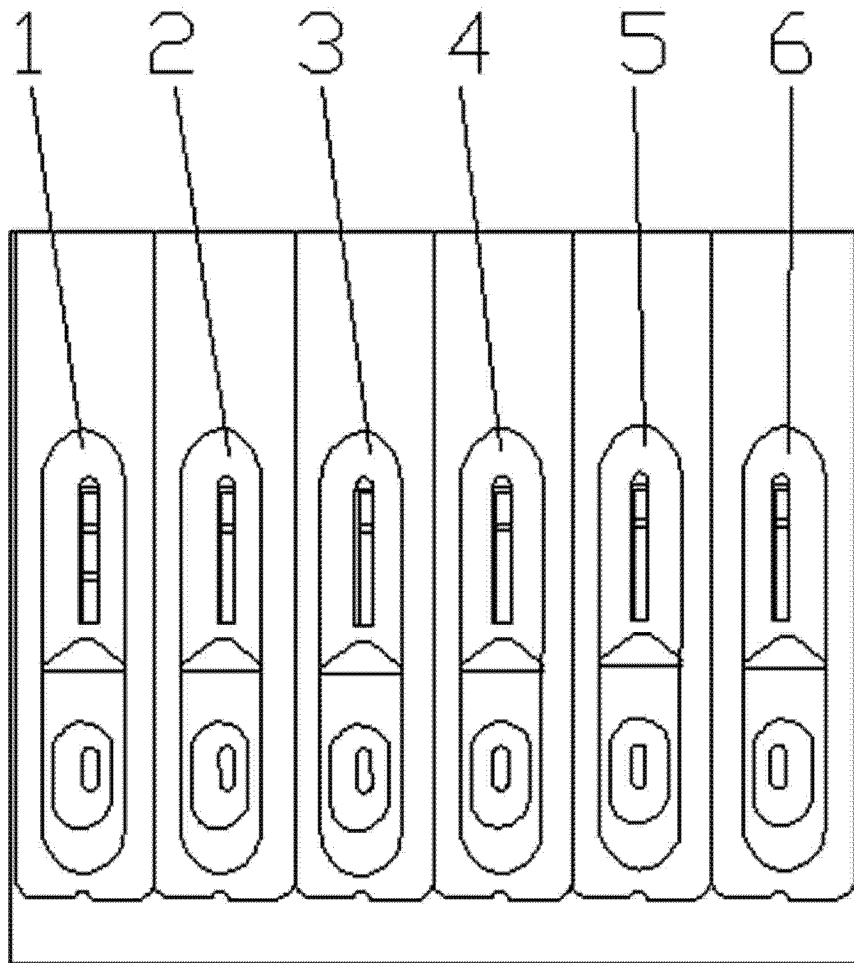


图 3

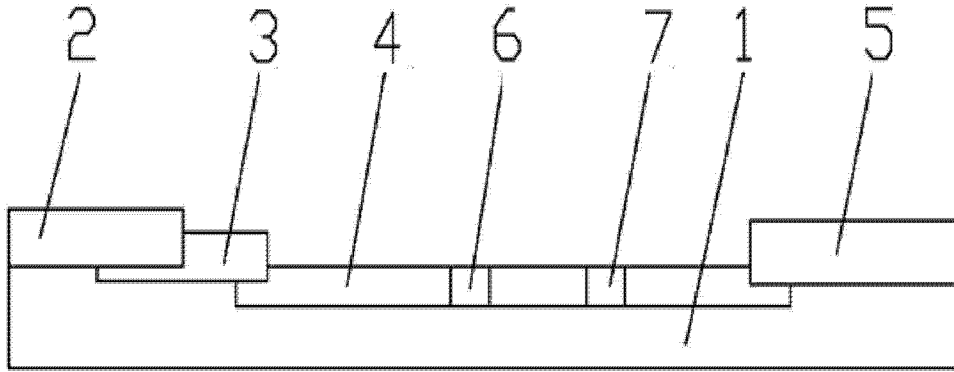


图 4

专利名称(译)	检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法		
公开(公告)号	CN103267842A	公开(公告)日	2013-08-28
申请号	CN201310178452.4	申请日	2013-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	郭杰标		
申请(专利权)人(译)	郭杰标		
当前申请(专利权)人(译)	韶关学院		
[标]发明人	郭杰标		
发明人	郭杰标		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	周胜明		
其他公开文献	CN103267842B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测中成药违法添加双氯芬酸的免疫胶体金方法，以活性酯法将双氯芬酸与牛血清白蛋白（BSA）偶联，合成人工免疫抗原，并用于免疫动物，制备特异性抗双氯芬酸抗体；并将双氯芬酸与卵清白蛋白（OVA）偶联，合成检测抗原，用于构建免疫检测方法；抗双氯芬酸抗体经分离纯化后标记于纳米胶体金，然后和双氯芬酸检测抗原以及羊抗兔IgG分别固化在一载体上，根据竞争抑制免疫层析原理，进行双氯芬酸的半定量分析测定，所建立的检测体系对保健品、中成药中违法添加双氯芬酸的最低检出限度为2.0μg/kg，能在5分钟内完成快速检测；使纳米技术及免疫技术应用于食品药品安全检测领域，实现一步法快速检测双氯芬酸的违法添加。

