

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03135011.9

G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/558 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 100405063C

[22] 申请日 2003.9.30 [21] 申请号 03135011.9

[73] 专利权人 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 210 号

[72] 发明人 许 杨 刘仁荣 熊勇华 赖卫华  
陈高明

[56] 参考文献

CN1402004A 2003.3.12  
WO03070003A1 2003.8.28  
WO8903037 1989.4.6  
审查员 李 冰

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所  
代理人 杨志宇

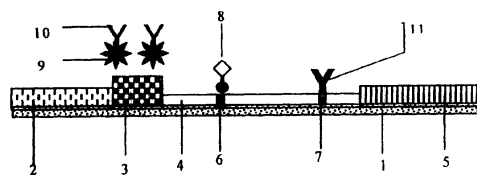
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

桔霉素免疫层析检测试纸及其制作方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种桔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桔霉素的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线上有桔霉素检测抗原，质控线上有抗抗体，其中抗抗体是抗桔霉素的抗体的抗体。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、一次试验测出桔霉素、除商品试剂外不需任何仪器设备的优点，特别适合桔霉素的



- 1、桔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)标记的抗桔霉素的抗体(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)上有桔霉素检测抗原(8)，质控线(7)上有抗抗体(11)，其中抗抗体(11)是抗桔霉素的抗体(10)的抗体。
- 2、如一种桔霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：包括如下步骤，(A)桔霉素抗原的制备，包括单克隆抗体的免疫抗原和桔霉素检测抗原(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。
- 3、如权利要求2所述的一种桔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。
- 4、如权利要求2所述的一种桔霉素免疫层析检测试纸的制作方法，其特征在于：桔霉素抗原的制备，包括如下步骤：(A)桔霉素通过活性酯法使其羧基与一同时带有羧基和氨基的小分子化合物的氨基以肽键相连，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)选择桔霉素抗原的一种作为免疫抗原；(D)选择桔霉素抗原的一种作为检测抗原。
- 5、如权利要求2所述的一种桔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)用桔霉素检测抗原(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)。
- 6、如权利要求5所述的一种桔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的桔霉素检测抗原(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。
- 7、如权利要求2所述的一种桔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)用示踪粒子标记抗桔霉素的抗体(10)，抗体(10)包括IgG型抗体、IgM型抗体、IgA抗体；(B)把示踪粒子(9)标记好的抗桔霉素的抗体(10)分散在硝酸纤维素膜(4)上。
- 8、如权利要求2所述的一种桔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。
- 9、采用权利要求2所述的制作方法制作的桔霉素免疫层析检测试纸在检测桔霉素中的应用。

## 桔霉素免疫层析检测试纸及其制作方法与应用

## 技术领域

本发明属于生物技术领域，公开了一种桔霉素免疫层析检测试纸及其制作方法与应用。

## 背景技术

桔霉素是青霉属和曲霉属的某些菌株产生的真菌毒素，于1931年首次被分离纯化。它能引起显著的肾脏毒性，并有致癌性。调查发现，一些桔霉素的产生菌在自然界分布广泛，经常引起玉米、大米等农作物的霉变。近年来，桔霉素的污染问题越来越引起人们的关注。在1991年法国里昂召开的真菌毒素和地方肾病及泌尿道肿瘤研讨会上，讨论了桔霉素在Balcan地方肾病发生中的作用，引起了国际癌症研究会的高度重视。当年，桔霉素被国际生命科学院自然毒素检测委员会欧洲分会列为必须检测的毒素之一。1995年法国学者Blanc证实某些红曲霉菌株也能产生桔霉素。这一发现在食品界引起了不小的震动。在此之前，红曲霉一直是作为食品生产加工的菌种来使用的。在我国，利用红曲霉发酵生产食品和药品已有上千年的历史，许多传统食品如红曲米、红曲酒和腐乳等深受人们的喜爱。现代研究还发现红曲霉的代谢产物中有许多在食品、医药和化工中很有价值的发酵产物。如品质优异、着色性好、色调丰富的天然红曲色素；能显著抑制胆固醇合成、降低血脂含量的莫那可林Monacollin K和洛伐它丁Lovastain；还有含量非常丰富的麦角固醇、长链脂肪酸及多种抗菌活物质。90年代初，欧美、日本等国对我国的食用红曲、药用红曲及其相关产品需求猛增，给我国的红曲生产厂家带来了可观的经济效益。桔霉素问题不仅使我国的红曲产品出口受到了损失，还严重地威胁到人们的健康。日本、德国等国家制定了针对我国出口的红曲相关产品的标准，规定桔霉素的含量必须低于规定值，否则严禁进口销售。而我国的红曲产品大多达不到这些标准。面对这一严峻的形势，应尽快建立桔霉素快速检测的方法，才能保障人民健康，并挽救这一古老而年轻的食物生产行业。

目前检测桔霉素的技术可分为两类，一类为色谱分析法，包括薄层色谱、气相色谱、液相色谱等，一直是最重要的真菌毒素的化学分析方法，薄层色谱由于方法灵敏度和分离效率等问题，1985年以后便很被采用。现在比较普遍的真菌毒素的分析方法还是液相色谱法，包括液相色谱-质谱联用技术，在方法适用性、分离效率和灵敏度方面，液相色谱法及液相色谱-质谱联用技术都是其他方法所无法替代的。近年来，毛细管电泳及毛细管电泳-质谱联用技术以其高分离效率也开始应用在真菌毒素分析领域并引起了广泛关注。但是由于其设备昂贵、操作复杂和对样品的纯度有较高的要求，不适合对大批量的样本进行检测，因而使用受到限制。另一类是免疫化学方法，由于对样品的纯度要求不高，并具有较高的灵敏度和特异性。特别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。这类方法通常包括放射免疫分析法RIA和酶联免疫分析法ELISA。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，故无法推广使用。ELISA方法由于操作简单、使用安全而被普遍采用。

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、磁性颗粒等，其中运用最成功的标记物为胶体金。

示踪粒子若选用常用的显色标记，当检测线、质控线正常显色，肉眼可直接分辨，若采用磁性颗粒作为示踪粒子，则需仪器判读。

#### 发明内容

本发明的目的在于提供一种桔霉素免疫层析检测试纸及其制作方法。

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：

一种桔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桔霉素的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线上有桔霉素检测抗原，质控线上有抗抗体，其中抗抗体是抗桔霉素的抗体的抗体。

一种桔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，如果样品中有桔霉素，则桔霉素经层析作用移动到示踪粒子结合物垫，与限量的抗桔霉素的抗体结合，当移动到检测线时，示踪粒子标记的抗桔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。示踪粒子标记的抗桔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。若样品中无桔霉素，则示踪粒子结合物垫上的示踪粒子标记的抗桔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。

一种桔霉素免疫层析检测试纸的制作方法：包括如下步骤，(A)桔霉素抗原的制备，包括单克隆抗体的免疫抗原和桔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。

一种桔霉素免疫层析检测试纸的制作方法：桔霉素抗原的制备，包括如下步骤：(A)桔霉素通过活性酯法使其羧基与一同时带有羧基和氨基的小分子化合物的氨基以肽键相连，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)选择桔霉素抗原的一种作为免疫抗原。(D)选择桔霉素抗原的一种作为检测抗原。

一种桔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)用桔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。

一种桔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的桔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℃孵育30分钟，置室温下干燥处密封储藏。

一种桔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)用示踪粒子标记抗桔霉素的抗体，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桔霉素的抗体分散在硝酸纤维素膜上。

一种桔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。

一种桔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。

一种桔霉素免疫层析检测试纸在检测桔霉素中的应用。

本发明免疫层析技术检测桔霉素，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桔霉素的抗体，在硝酸纤维素膜上分别吸附检测抗原（由于桔霉素不直接固定于硝酸纤维素膜，故需制备桔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。

桔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。能否成功地得到对桔霉素有高度亲和力和高度特异性的单克隆抗体，免疫抗原的制备尤为重要，需要根据桔霉素的分子大小、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桔霉素结构的完整性，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，桔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，形成理想的空易近性，则效果可能会更好。由于桔霉素分子上具有羧基，本发明设计用活性酯法使其与一同时带有羧基和氨基的小分子化合物如  $\epsilon$ -氨基己酸或  $\delta$ -氨基戊酸的氨基以肽键相连，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、饲料及红曲制品中桔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；特别适合桔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，主要用于桔霉素检测。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 为本发明的桔霉素免疫层析检测试纸直观结构示意图。

图 2 为本发明的桔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 为本发明的桔霉素免疫层析检测试纸的检测线局部放大图。

图 4 为本发明的桔霉素免疫层析检测试纸的质控线局部放大图。

图 5 为本发明的桔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

一种桔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 标记的抗桔霉素的抗体 10，硝酸纤维素膜 4 上还有检测线 6 和质控线 7，检测线 6 上有桔霉素检测抗原 8，质控线 7 上有抗抗体 11，其中抗抗体 11 是抗桔霉素的抗体 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 中有桔霉素，则桔霉素经层析作用移动到示踪粒子结合物垫 3，与限量的抗桔霉素的抗体 10 结合，当移动到检测线 6 时，示踪粒子 9 标记的抗桔霉素的抗体 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 标记的抗桔霉素的抗体 10 继续向前移动到质控线 7，与质控线 7 上的抗抗体 11 反应，质控线 7 显色或出现磁性增强。若样品 12 中无桔霉素 8，则示踪粒子结合物垫 3 上的示踪粒子 9 标记的抗桔霉素的抗体 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。

桔霉素免疫层析检测试纸的制作方法，包括如下步骤，(A) 桔霉素抗原的制备，包括单克隆抗体的免疫抗原和桔霉素检测抗原 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：

示踪粒子若选用常用的显色标记，当检测线、质控线正常显色，肉眼可直接分辨，若采用磁性颗粒作为示踪粒子，则需仪器判读。仪器分辨磁性颗粒的灵敏度更高。

#### 实施例 8

一种桔霉素免疫层析检测试纸的制作方法，桔霉素抗原的制备，包括如下步骤：(A) 桔霉素通过活性酯法使其羧基与一同时带有羧基和氨基的小分子化合物的氨基以肽键相连，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) 选择桔霉素抗原的一种作为免疫抗原。(D) 选择桔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) 用桔霉素检测抗原 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。其余同实施例 1。

#### 实施例 10

一种桔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 的桔霉素检测抗原 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℃ 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

一种桔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) 用示踪粒子标记抗桔霉素的抗体 10, 抗体 10 包括 IgG 型抗体、IgM 型抗体、IgA 抗体; (B) 把示踪粒子 9 标记好的抗桔霉素的抗体 10 分散在硝酸纤维素膜 4 上。其余同实施例 1。

#### 实施例 12

一种桔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

一种免疫层析检测桔霉素试纸的制备, 并将其具体应用于具体的检测。

包括如下步骤:

(1). 桔霉素人工抗原的制备, 包括用于免疫动物以制备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 用桔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 用抗桔霉素的抗体 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 标记的抗桔霉素的抗体 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). 桔霉素人工抗原的制备, 包括用于免疫动物以制备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; (3). 示踪粒子结合物垫 3 的制备; (4). 试纸条的组装; (5). 待检样品的处理。

其中

1 桔霉素人工抗原的制备:

① 桔霉素 1.25mg (5 $\mu$ mol) 溶解于 0.3mL 四氢呋喃 (THF) 中, 氮羟基琥珀酸 (NHS) 0.9mg (7.5 $\mu$ mol) 和二环己基碳化二亚胺 (DCC) 2mg (10 $\mu$ mol) 溶解于 0.18mL THF 中, 二者混匀, 置室温避光振荡反应 24 小时。

② 反应完全后, 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀。上清液真空抽干, 加入 600 $\mu$ L 氮、氮-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 缓慢滴入 10 $\mu$ mol  $\epsilon$ -氨基己酸或  $\delta$ -氨基戊酸溶液中, 在 400 $\mu$ L 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶解, 室温下振荡反应 2 小时 (避光)。

③ 反应结束后, 用 2mL 氯仿抽提三次。有机相减压蒸干。重溶于 0.1-3mL THF 中, 重复上述步骤, 将已接上氨基己酸的桔霉素进一步活化。

④ 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀后, 有机相真空抽干, 溶解于 0.3-3mL

二甲基亚砷中,再加入 0.9mL 载体物质(匙孔贝血蓝蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、脱脂奶粉、聚赖氨酸或其它人工合成的带有氨基的高分子物质中的一种)溶液中(0.5mg 溶于 0.13M  $\text{NaHCO}_3$  中),室温下振荡反应 2 小时(避光)。反应结束后,0.01M PBS (pH7.2) 4°C 透析 72 小时,用 Sephadex G-25 纯化,紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比,真空冻干待用。

⑤ 选择与不同载体物质偶联形成的人工抗原中的一种作为免疫抗原,另一种作为检测抗原。

2. 硝酸纤维素膜检测线 6 和质控线 7 的制备,包括如下步骤:

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 的检测抗原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 的相应抗桔霉素的抗体 10 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) 示踪粒子 9 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与抗体混合,再加入聚乙二醇水溶液,使最终浓度为 0.05%。将粗制品 6000rpm 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,室温下搅拌并滴入反应混合液内,得到 120nm 红色硒溶胶。

b) 胶体硒抗体标记:抗桔霉素的抗体 10 用 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成 4.6mg/mL 浓度溶液,加 25 $\mu$ 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%  $\text{NaN}_3$  的磷酸盐缓冲液配成 1mL 悬液。

③ 乳胶和明胶的制备和抗体标记:

彩色乳胶颗粒和明胶颗粒颜色为兰色。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将乳胶颗粒或明胶颗粒稀释到 1% 浓度,分别取 50mL,搅拌下将乳胶或明胶溶液和抗桔霉素的抗体 10 混合,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 2mL 磷酸盐缓冲液重悬。

④ 磁性颗粒抗体标记:

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,取 50mL,搅拌下将其与抗桔霉素的抗体 10 混合,室温搅拌 30 分钟,37°C 水浴孵化 60 分钟,4°C 放置 4 小时。15000rpm 离心 30 分钟,用 2mL 磷酸盐缓冲液重悬。

(2) 示踪粒子结合物垫的制备

将标记示踪粒子 9 的抗桔霉素的抗体 10 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. 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 固态样品处理方法: 在 50 mL 三角瓶中, 称入红曲米 1-5g, 用 15mL 甲醇-氯仿溶液 (1: 1) 分三次萃取, 每次萃取时, 在磁力搅拌下持续 1h, 合并萃取液。用旋转蒸发器在 40℃ 下蒸干, 再用含 10% 甲醇的 PBS (pH7.6) 溶解。
- ② 含脂待测样品处理方法: 称取样品 1-5g, 用 10-20mL 甲醇浸泡 12 h, 然后用异辛烷脱脂两遍; 再加入蒸馏水, 用  $H_2SO_4$  调 pH 至 4.5, 用氯仿萃取后, 水浴蒸干, 用含 10% 甲醇的 PBS (pH7.6) 定容至 1 mL, 备用。
- ③ 饲料样品的处理方法: 称取样品 3.0-5.0 g, 加入乙腈 (或甲醇): 硫酸 (20%) = 99: 1 的混合溶液 20-30mL, 超声波处理 15 分钟后, 离心取上清液 (3000rpm/分钟, 20 分钟), 重复 3 次, 萃取液合并, 60℃ 水浴浓缩至干, 加含 10% 甲醇的 PBS (pH7.6) 溶解, 直接用于测定。
- ④ 液态样品的处理方法: 取一定体积的样品, 用滤纸过滤, 加等体积的含 10% 甲醇的 PBS (pH7.6), 备用。

#### 实施例 14:

胶体金免疫层析检测桔霉素的方法及试纸的制备并用于检测红曲米样品。

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

#### (1)待检样品的处理

在 50 mL 三角瓶中, 称入红曲米 5g, 用 10mL 甲醇-氯仿溶液 (1: 1) 分三次萃取, 每次萃取时, 在磁力搅拌下持续 1h, 合并萃取液。用旋转蒸发器在 40 摄氏度下蒸干, 再用含 10% 甲醇的 PBS (pH7.6) 溶解。

#### (2)人工抗原的制备

- ① 桔霉素 1.25mg (5 $\mu$ mol) 溶解于 0.3mL 四氢呋喃 (THF) 中。氮羟基琥珀酸 (NHS) 0.9mg (7.5 $\mu$ mol) 和二环己基碳化二亚胺 (DCC) 2mg (10 $\mu$ mol) 溶解于 0.2mL THF 中。二者混匀, 置室温避光振荡反应 24 小时。
- ② 反应完全后, 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀。上清液真空抽干, 加入 200 $\mu$ L 氮、氮-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 缓慢滴入 10 $\mu$ mol  $\epsilon$ -氨基己酸溶液中 (400 $\mu$ L 1M  $Na_2CO_3$  溶解), 室温下振荡反应 2 小时 (避光)。
- ③ 反应结束后, 用 0.2mL 氯仿抽提三次。有机相减压蒸干。重溶于 0.4mL THF 中, 重复上述步骤, 将已接上氨基己酸的桔霉素进一步活化。
- ④ 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀后, 有机相真空抽干, 溶解于 0.2mL 二甲基亚砷中, 再加入 400 $\mu$ L 匙孔贝血蓝蛋白溶液中 (0.5mg 溶于 0.13M  $NaHCO_3$  中), 室温下振荡反应 2 分钟 (避光)。
- ⑤ 反应结束后, 0.01M PBS (pH7.2) 4 C 透析 72 小时, 用 Sephadex G-25 纯化, 紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比, 真空冻干待用。

#### (3)硝酸纤维素膜 4 的制备

将硝酸纤维素膜 4 按 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 16mm, 然后在膜的顶端用浓度调整为 5mg/mL 的相应抗桔霉素的抗体 10 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℃ 孵育 30 分钟, 置

室温下干燥处密封储藏。

#### (4) 胶体金结合物垫的制备

- ① 胶体金溶胶制备标记: 取 0.01% 四氯化金水溶液 200mL, 加热至沸腾, 加入 10mL 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; 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与抗桔霉素的抗体 10 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。
- ② 将胶体金标记的抗桔霉素的抗体 10 按比例混合分散在厚度为 1m 的玻璃纤维纸上, 冻干密封干燥保存。

#### (5) 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 在衬垫上 1 加上吸水垫 2; 组装为检测试纸条。

#### (6) 检测和结果判断:

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 2, 在样本中停留约 5 秒, 垂直取出试纸, 5 分钟后判断结果: 检测线和质控线处有红色出现为阴性; 检测线无红色出现, 质控线出现红色为阳性; 质控线无红色出现为失效。

#### 实施例 15

乳胶颗粒或明胶颗粒免疫层析检测桔霉素的方法及试纸的制备并用于检测红曲腐乳样品。

本实施例分为 5 部分: (1) 待检样品的处理; (2) 人工抗原的制备; (3) 硝酸纤维素膜的制备; (4) 乳胶颗粒或明胶颗粒结合物垫的制备; (5) 试纸条的组装; (6) 检测和结果判断

#### (1) 红曲腐乳样品处理方法

称取样品 2g, 用 10mL 甲醇浸 1h, 然后用异辛烷脱脂两遍; 再加入蒸馏水, 用  $H_2SO_4$  调 pH 至 4.5, 氯仿萃取后, 水浴蒸干, 用含 10% 甲醇的 PBS (pH7.6) 溶解, 备用。

#### (2) 人工抗原的制备

- ① 桔霉素 1.25mg (5 $\mu$ mol) 溶解于 0.3mL 四氢呋喃 (THF) 中。氮羟基琥珀酸 (NHS) 0.9mg (7.5 $\mu$ mol) 和二环己基碳化二亚胺 (DCC) 2mg (10 $\mu$ mol) 溶解于 0.2mL THF 中。二者混匀, 置室温避光振荡反应 24 小时。
- ② 反应完全后, 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀。上清液真空抽干, 加入 200 $\mu$ L 氮、氮-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 缓慢滴入 10 $\mu$ mol 的  $\epsilon$ -氨基己酸溶液中 (400 $\mu$ L 1M  $Na_2CO_3$  溶解), 室温下振荡反应 2 小时 (避光)。
- ③ 反应结束后, 用 0.2mL 氯仿抽提三次。有机相减压蒸干。重溶于 0.4mL THF 中, 重复上述步骤, 将已接上氨基己酸的桔霉素进一步活化。
- ④ 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀后, 有机相真空抽干, 溶解于 0.2mL 二甲基亚砷中, 再加入 400 $\mu$ L 脱脂奶粉溶液中 (0.5mg 溶于 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, 用 Sephadex G-25 纯化, 紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比, 真空冻干待用。

#### (3) 硝酸纤维素膜 4 的制备

将硝酸纤维素膜 4 按 15mm 宽的尺寸剪裁。将经生理盐水缓冲液充分透析, 浓度调整为 3mg/mL 的检测抗原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 3mg/mL 的相应抗桔霉素的

抗体 10 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 1% 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。

#### (4) 乳胶和明胶结合物垫的制备:

彩色乳胶颗粒和明胶颗粒颜色为兰色。用 pH7.1 的磷酸盐缓冲液将乳胶颗粒或明胶颗粒稀释到 1% 浓度，分别取 50mL，搅拌下将溶液与抗桔霉素的抗体 10 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。将标记乳胶颗粒或明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。

#### (5) 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。

#### (6) 检测和结果判断:

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 2，在样本中停留约 5 秒，垂直取出试纸，5 分钟后判断结果：检测线 6 和质控线处 7 都有兰色出现为阴性；检测线 6 无兰色出现，质控线 7 出现兰色为阳性；质控线 7 无兰色出现为失效。

检测原理是这样的：在样品垫 2 上滴加样品，如果样品中有外来的桔霉素，则样品中的桔霉素经层析作用移动到示踪粒子结合物垫 3，与限量的抗桔霉素的抗体 10 结合，当移动到检测线 6 时，示踪粒子 9 标记的抗桔霉素的抗体 10 已无多余的结合位点与检测线 6 上的检测抗原 8，检测抗原 8 为桔霉素与载体的偶联产物的结合，检测线 6 不显色或不出现磁性增强。示踪粒子 9 标记的抗桔霉素的抗体 10 继续向前移动到质控线 7，与质控线 7 上抗桔霉素的抗体 10 的抗体 11 反应，质控线 7 显色或出现磁性增强。若样品中无桔霉素 8，则示踪粒子结合物垫 3 上的示踪粒子 9 标记的抗桔霉素的抗体 10 和检测线 6 上的检测抗原（桔霉素与载体的偶联产物）8 结合，检测线 6 显色或出现磁性增强，质控线 7 同上显色或出现磁性增强。

#### 实施例 16

胶体硒免疫层析检测桔霉素的方法及试纸的制备并用于检测饲料样品

本实施例分为 5 部分：(1) 待检样品的处理；(2) 人工抗原的制备；(3) 硝酸纤维素膜 4 的制备；(4) 胶体硒结合物垫的制备；(5) 试纸条的组装；(6) 检测和结果判断

#### (1) 待检样品的处理

在 50mL 离心管中，称取饲料样品 3.0g，加入乙腈（或甲醇）：硫酸（20%）=99:1 的混合溶液 20mL，超声波处理 15 分钟后，离心取上清液（3000rpm/分钟，20 分钟），重复共 3 次，萃取液合并，60℃ 水浴浓缩至干，加含 10% 甲醇的 PBS（pH7.6）溶解，直接用于测定。

#### (2) 人工抗原的制备

- ① 桔霉素 1.25mg (5 $\mu$ mol) 溶解于 0.3mL 四氢呋喃 (THF) 中。氮羟基琥珀酸 (NHS) 0.9mg (7.5 $\mu$ mol) 和二环己基碳化二亚胺 (DCC) 2mg (10 $\mu$ mol) 溶解于 0.2mL THF 中。二者混匀，置室温避光振荡反应 24 小时。
- ② 反应完全后，10000rpm 离心 10 分钟去沉淀。上清液真空抽干，加入 200 $\mu$ L 氮、氮-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解，缓慢滴入 10 $\mu$ mol  $\epsilon$ -氨基己酸溶液中 (400 $\mu$ L 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶解)，室温下振荡反应 2 小时（避光）。
- ③ 反应结束后，用 0.2mL 氯仿抽提三次。有机相减压蒸干。重溶于 0.4mL THF 中，重复上述步骤，将已接上氨基己酸的桔霉素进一步活化。
- ④ 10000rpm 离心 10 分钟去沉淀后，有机相真空抽干，溶解于 0.2mL

二甲基亚砷中,再加入400 $\mu$ L卵清白蛋白溶液中(0.5mg溶于0.13M NaHCO<sub>3</sub>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,用Sephadex G-25纯化,紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比,真空冻干待用。

### (3)硝酸纤维素膜4的制备

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0.8mg/mL的检测抗原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0.5mg/mL的相应抗桔霉素的抗体10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1%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。

### (4)胶体硒结合物垫的制备:

胶体硒抗体标记:抗桔霉素的抗体用20mmol/L pH7.3磷酸盐缓冲液配成4.6mg/mL浓度溶液,分别取25 $\mu$ L加入25mL硒溶胶中,室温搅拌10分钟后加1%PEG8000 1mL,混匀,于4℃以5000rpm离心5分钟,得到松软的红色沉淀,用含0.05%NaN<sub>3</sub>的磷酸盐缓冲液配成1mL悬液。将标记胶体硒颗粒的抗桔霉素的抗体10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。

### (5)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。

### (6)检测和结果判断:

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分钟后判断结果: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。

#### 实施例17

磁性颗粒为示踪粒子的免疫层析检测桔霉素的方法及试纸的制备并用于检测红曲酒样品

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

#### (1)待检样品的处理

取一定体积的样品,用滤纸过滤,加等体积的含10%甲醇的PBS (pH7.6),备用。

#### (2)人工抗原的制备

- ① 桔霉素1.25mg (5 $\mu$ mol)溶解于0.3mL四氢呋喃(THF)中。氮羟基琥珀酸(NHS)0.9mg (7.5 $\mu$ mol)和二环己基碳化二亚胺(DCC)2mg (10 $\mu$ mol)溶解于0.2mL THF中。二者混匀,置室温避光振荡反应24小时。
- ② 反应完全后,10000rpm离心10分钟去沉淀。上清液真空抽干,加入200 $\mu$ L氮、氮-二甲基甲酰胺(DMF)溶解,缓慢滴入10 $\mu$ mol  $\epsilon$ -氨基己酸溶液中(400 $\mu$ L 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶解),室温下振荡反应2小时(避光)。
- ③ 反应结束后,用0.2mL氯仿抽提三次。有机相减压蒸干。重溶于0.4mL THF中,重复上述步骤,将已接上氨基己酸的桔霉素进一步活化。
- ④ 10000rpm离心10分钟去沉淀后,有机相真空抽干,溶解于0.2mL二甲基亚砷中,再加入400 $\mu$ L甲状腺球蛋白溶液中(0.5mg溶于0.13M NaHCO<sub>3</sub>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°C透析72小时, 用 Sephadex G-25 纯化, 紫外扫描分析测定偶联产物的摩尔比, 真空冻干待用。

### (3) 硝酸纤维素膜4的制备

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的检测抗原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的相应抗桔霉素的抗体10的抗体11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。

### (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, 取50mL, 搅拌下将其与抗桔霉素的抗体10混合, 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。

### (5) 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。

### (6) 检测和结果判断:

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2, 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: 检测线和质控线处出现磁性增强为阴性; 检测线无磁性增强, 质控线有磁性增强为阳性; 质控线无磁性增强出现为失效。

#### 实施例18

使用1%牛血清白蛋白代替0.1-5%脱脂奶粉, 其余按实施例15的方法检测。经过对比发现使用1%脱脂奶粉与1%牛血清白蛋白相比, 使用1%脱脂奶粉成本更低, 本底吸附可降低20%, 本底降低20%意味检测的灵敏度提高20%。

#### 实施例19

按照实施例15的方法检测, 对多个样品检测, 红曲米中的桔霉素的含量为3.2mg/kg-1500mg/kg, 红曲色素中桔霉素的含量为193mg/kg-17452mg/kg, 饲料中的桔霉素含量为5mg/kg-632mg/kg。

上述实施例的样品检测的下线灵敏度高。

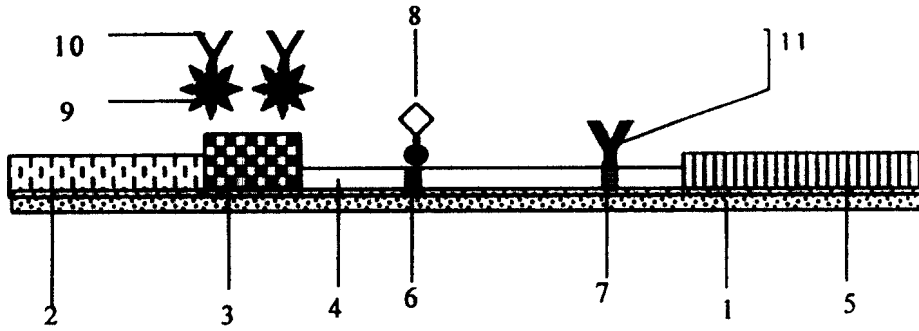


图 1

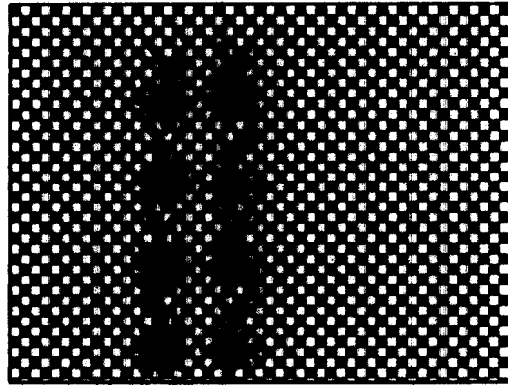


图 2

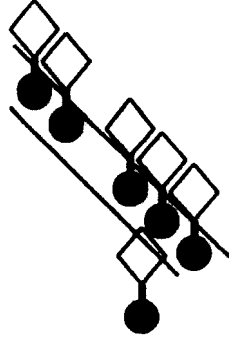


图 3

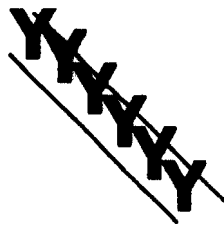


图 4

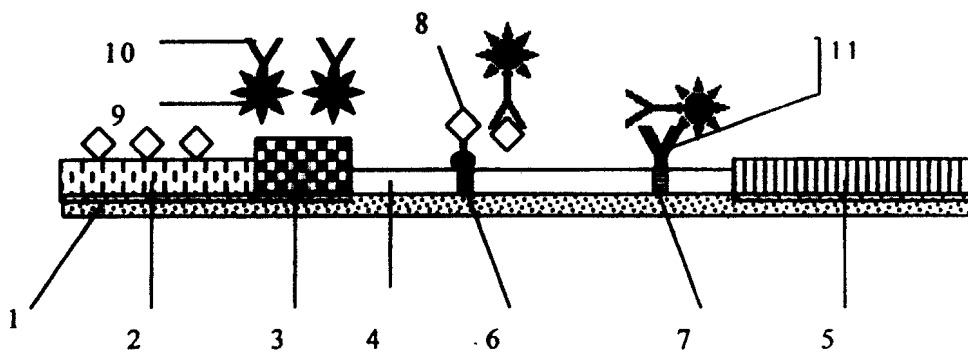


图 5

专利名称(译)	桔霉素免疫层析检测试纸及其制作方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100405063C</a>	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	CN03135011.9	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 刘仁荣 熊勇华 赖卫华 陈高明		
发明人	许杨 刘仁荣 熊勇华 赖卫华 陈高明		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	杨志宇		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1603823A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种桔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桔霉素的抗体，硝酸纤维素膜上还设有检测线和质控线，检测线上有桔霉素检测抗原，质控线上有抗抗体，其中抗抗体是抗桔霉素的抗体的抗体。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、一次试验测出桔霉素、除商品试剂外不需任何仪器设备的优点，特别适合桔霉素的现场快速检测。

