



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374882 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811233605.X

(22)申请日 2018.10.23

(71)申请人 山东出入境检验检疫局检验检疫技
术中心

地址 266002 山东省青岛市市南区瞿塘峡
路70号

(72)发明人 李兆杰 王松 赵祖亮 王骏
毕乐飞 崔鹤 姜勇 相湛昌

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

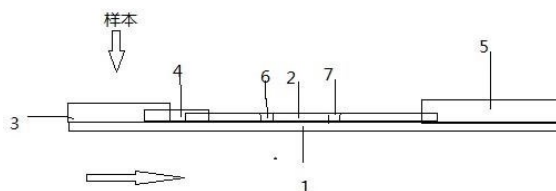
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

检测黄盖鲈鱼卵黄蛋白原免疫胶体金试纸
条及制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测黄盖鲈鱼卵黄蛋白原免疫胶体金试纸条及制备方法及应用,免疫胶体金试纸包括硬质聚氯乙烯背衬板、硝酸纤维素膜、样品垫、胶体金结合垫吸水垫,硝酸纤维素膜粘贴于在硬质聚氯乙烯背衬板上,在硝酸纤维素膜的一端粘贴有胶体金结合垫,在胶体金结合垫上粘贴有样品垫,吸水垫置于硝酸纤维素膜的另一端上;步骤:(1)用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;(2)将兔抗黄盖鲈鱼卵黄蛋白原单克隆抗体标记在胶体金颗粒上;(3)将兔抗黄盖鲈鱼卵黄蛋白原抗体包被在硝酸纤维素膜上;(4)按顺序粘合一起得到胶体金试纸条。一种免疫胶体金试纸条在检测卵黄蛋白原中的应用,该试纸操作简单、检测快速、灵敏、结果清晰易于判断。便于携带和使用,节约了卵黄蛋白原检测成本。



1. 一种检测黄盖鲮鱼卵黄蛋白原的免疫胶体金试纸条,包括硬质聚氯乙烯背衬板(1)、硝酸纤维膜(2)、样品垫(3)、胶体金结合垫(4)吸水垫(5),其特征在于:硝酸纤维膜(2)粘贴于在硬质聚氯乙烯背衬板(1)上,在硝酸纤维膜(2)的一端粘贴有胶体金结合垫(4),在胶体金结合垫(4)上粘贴有样品垫(3),吸水垫(5)置于硝酸纤维膜(2)的另一端上;所述的胶体金结合垫(4)喷涂有抗黄盖鲮鱼vtg单克隆抗体-胶体金标记物;所述的硝酸纤维膜(2)上分别喷涂有兔抗黄盖鲮鱼卵黄磷脂蛋白(LV)抗体多克隆抗体检测线(6)和羊抗鼠抗体的质控线(7)。

2. 根据权利要求1所述的免疫胶体金试纸条,其特征在于:所述的硝酸纤维膜(2)为试纸条的检测膜,上面靠左侧的是检测线(6),质控线(7)位于右侧,两条线的间隔距离是4~6mm。

3. 权利要求1所述的免疫胶体金试纸条的制备方法,其步骤如下:

(1)将制金用烧杯、锥形瓶、容量瓶等玻璃器皿置于铬酸溶液中浸泡24 h后用自来水清洗10遍,用双蒸水清洗10遍,烘干后备用;量取99 mL的超纯水装入250 mL的圆底烧瓶,放入搅拌子,置于磁力搅拌器上搅拌;加入1%氯金酸溶液1 mL,搅拌,加热至溶液沸腾;迅速加入柠檬酸三钠溶液1.6 mL,氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色,颜色稳定后继续加热10 min,待溶液冷却后,用微孔滤膜过滤,即为胶体金溶液;

(2)胶体金的标记:将步骤(1)所得的胶体金用0.1 mol/L 碳酸钾调节pH 值到8.0 ;加入抗黄盖鲮鱼vtg单克隆抗体,搅拌40 min ;在搅动下,加入稳定剂10% BSA 溶液封闭38~42 min 得到稳定的黄盖鲮鱼段黄蛋白原(vtg)单克隆抗体-胶体金标记物;将标记好的胶体金溶液8800 rpm 离心28~32min 后重悬喷涂在胶体金结合垫上;

(3)将鼠抗黄盖鲮鱼卵黄磷脂蛋白多克隆抗体和羊抗鼠IgG 抗体稀释后分别喷涂在硝酸纤维膜上构成检测线和质控线;

(4)将硬质聚氯乙烯背衬板(1)、硝酸纤维膜(2)、胶体金结合垫(4)、样品垫(3)、吸水垫(5)按顺序粘合在一起组成得到检测黄盖鲮鱼卵黄蛋白原的免疫胶体金试纸条。

4. 权利要求1 所述的免疫胶体金试纸条在检测水产品受环境雌激素污染的检测中应用。

检测黄盖鲮鱼卵黄蛋白原免疫胶体金试纸条及制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测黄盖鲮鱼卵黄蛋白原免疫胶体金试纸条及制备方法及应用,属于环境雌激素的检测技术领域。

背景技术

[0002] 环境雌激素 (Environmental estrogens; EEs), 又称为环境内分泌干扰物质 (Environmental endocrine disruption chemicals, EDCs), 是一类外源性化合物, 能干扰人类和动物体内激素的合成、释放、运输、代谢, 激素与受体的结合、功能的表达等一系列过程, 从而扰乱内分泌系统、神经系统和免疫系统的调控功能, 造成生殖器官异常, 雄性生物雌性化等现象, 甚至造成对生物后代生殖功能的潜在影响。目前, 环境雌激素已成为继臭氧层破坏、全球气候变暖之后的第三大环境问题。

[0003] EEs分布广泛, 种类繁多, 并且随着工业化的进程, EEs的污染有进一步扩大的趋势, 不仅威胁到动物种群的存亡, 也成为人类健康的潜在威胁因素。各国政府、WHO等组织高度重视, 美国国家资源委员会将其列为5个最优先项目之一。因此, 必须建立一套快速简便、科学灵敏的EEs检测方法, 对EEs做出科学、综合的评价, 以保护人类健康。

[0004] 生物检测方法具有简便、快捷、特异性好的优点, 不仅可以测定海洋生物是否受到EEs的污染, 还能评价环境中EEs对生物体的危害程度, 尤其适用于大批量样品中EEs的境检测, 但生物分析方法也存在一定问题, 它无法区分环境样品中EEs的组分。因此, 将生物检测与分析化学方法配合使用则成为一种趋势, 可节省大量的人力物力, 使EEs常规性检测成为可能。生物检测方法一般分为生物标志物、生物检测方法一般分为生物标志物检测法、免疫胶体金法和生物传感器测定法。

[0005] 1、生物标志物检测法

“生物标志物” (Biomarker) 是指在外源物质诱导下, 引起生物系统内在细胞水平, 生化组成、过程、结构、功能的可测变化, 是可以检测的亚有机体单位, 能够提供一种或几种化学污染物的暴露和/或毒性效应的证据。生物标志物检测法就是利用生物分子较高的分子识别功能, 结合切换功能, 来测定有机污染物。生物标志物在生物监测中具有感知作用, 被广泛的用于生态环境恶化的早期预警 (early warning); 风险评价 (risk assessment); 生态系统的健康评价 (ecosystem health assessment)。由于生物标志物在生物检测中给出的是生物学信息, 所以对于管理、保护和维护自然生态系统非常重要。

[0006] 将生物标志物检测技术应用于海产品中EEs检测, 是对EEs化学检测方法的补充, 通过标志物含量的高低来反映生物体受EEs影响的程度, 分析水产品中EEs富集水平。这种方法的特点是更具目的地性、快速、不需专业人员操作、降低被检样品的数量, 从而节约成本和资源。2003年全球环境基金 (Global Environment Facility, GEF) 的科学技术顾问团 (The Scientific and Technical Advisory Panel, STAP) 提出利用生物标志物对环境中POPs进行监测; 全球海洋环境污染物调查 (Global Investigation of Pollution of the

Marine Environment ,GIPME) 也利用生物标志物测定污染物在海洋生物中的作用;而德国和英国等发达国家已经将生物标志物检测作为国家监测计划中的一部分以降低成本,提高监测效率。

[0007] 经济合作与发展组织(OECD)将卵黄蛋白原(vitellogenin, Vtg)作为环境雌激素化学物理理想的暴露标志物。内源性雌激素或外源性雌激素能刺激卵生动物肝细胞(作用于肝雌激素受体)产生Vtg,经血运输到卵巢,作为卵黄蛋白的营养支持。在鱼类中,雌鱼在卵黄生成期可合成大量Vtg,而在其他生活期及雄鱼体内的Vtg的含量很低。但雄鱼在环境雌激素长期作用下,也能诱导体内Vtg的生成。根据这一特性,检测雄性鱼体血浆或体表粘液中的Vtg可以评价环境中化学物质的雌激素效应,也可以评价水产品是否受到EEs的污染。因此,可以考虑将Vtg作为EEs生物标志物的首选。目前已经有ELISA与免疫组化方法检测样品中的Vtg,进行EEs污染状况评价。

[0008] 2. 免疫胶体金技术

ELISA与免疫组化方法虽然能准确的检测大批量样品中的Vtg含量,但是这些方法通常需要较长的检测时间,步骤较为复杂,且需要仪器来辅助,对操作人员要求高,因此需要建立一种野外快速检测Vtg的方法。

[0009] 免疫胶体金层析方法(Gold immunochromatographic assay,GICA)是一种将胶体金免疫技术和色谱层析技术相结合的固相膜免疫分析方法。由于具有成本低廉,快速简便,结果直观,特异性强等优点,目前已广泛用于检测领域中。

[0010] 因此本文利用制备的胶体金颗粒,通过NaCl破坏实验确定抗体标记的最佳的PH值和蛋白量,并利用标记好的单克隆抗体建立了两种胶体金免疫层析方法,分别优化了最佳的T线和C线浓度,确立了最佳的标准曲线,用建立的胶体金免疫层析方法检测了EE₂对黄盖鲮的雌激素效应。

[0011] 胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。由于它不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题,且利用不同颗粒大小的胶体金还可以作双重甚至多重标记,使定位更加精确。因此已成为继荧光素、酶、同位素及乳胶标记技术之后的一种新型标记技术。

[0012] 用胶体金作为特殊标记物的研究始于60年代初,1962年Feldberr等报道了用胶体金标记细胞进行电子显微镜的研究。1971年,Taylor又将胶体金引入电镜免疫标记技术中。近年来的研究表明,胶体金也可作为体外免疫加层试验的指示物。由于胶体金作为标记物具有很多优点,自其问世以来在国内外的许多研究领域得到了迅速的发展。近年来,研究人员根据胶体金的物化性质进一步拓展了基于胶体金标记的生物检测技术及胶体金在其他生物学方面的应用。

[0013] 当前,检测Vtg主要有ELISA、Western Blotting和色谱分析等方法。但这些测试手段主要是在实验室内进行,需要拥有较复杂的实验条件和具备良好的实验技能。而免疫胶体金技术的应用可以开发一种操作简单、价格便宜、能够适应野外现场检测的卵黄蛋白原检测手段。目前这方面的研究还很少,杨方星与徐盈(2007)开发了斑马鱼原位检测类雌激素暴露的胶体金免疫检测试片,检出限为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由于该方法使用多克隆抗体,其检测敏感性远高于ELISA与Western Blotting的检出限,并且其特异性还有待进一步验证。

[0014] 因此本发明利用制备的胶体金颗粒,通过NaCl破坏实验确定抗体标记的最佳的PH

值和蛋白量,并利用标记好的单克隆抗体建立了两种胶体金免疫层析方法,分别优化了最佳的T线和C线浓度,确立了最佳的标准曲线,用建立的胶体金免疫层析方法检测了EE₂对黄盖鲮的雌激素效应。

发明内容

[0015] 本发明所要解决的技术问题是:提供免疫胶体金试纸条及其制备方法和应用。

[0016] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

一种能检测黄盖鲮卵黄蛋白原的免疫胶体金试纸条,所述的试纸条包括有硬质聚氯乙烯背衬板、硝酸纤维膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫。

[0017] 硝酸纤维膜粘贴在硬质聚氯乙烯背衬板上,在硝酸纤维膜的一端粘贴有胶体金结合垫,在胶体金结合垫上粘贴有样品垫,吸水垫置于硝酸纤维膜的另一端上面。

[0018] 所述的样品垫具体为缓冲液A 处理过的吸水纸。缓冲液A 配方为:当0.2 mol/L K₂CO₃为2 μL时,pH9.0最佳可以用于标记黄盖鲮Lv抗体。

[0019] 所述的吸水垫具体为裁切过的吸水纸。

[0020] 所述的硝酸纤维膜为试纸条的检测膜,上面靠左侧的是检测线,质控线位于右侧,两条线的间隔距离是4 ~ 6mm。

[0021] 所述的胶体金结合垫喷涂有抗黄盖鲮卵黄蛋白原单克隆抗体-胶体金标记物。

[0022] 所述的硝酸纤维膜上分别喷涂有兔抗卵黄磷蛋白多克隆抗体检测线和兔抗鼠抗体的质控线。

[0023] 一种能检测卵黄蛋白原免疫胶体金试纸条的制备方法,其步骤是:

(1)将制金用烧杯、锥形瓶、容量瓶等玻璃器皿置于铬酸溶液中浸泡24 h后用自来水清洗10遍,用双蒸水清洗10遍,烘干后备用。量取99 mL的超纯水装入250 mL的圆底烧瓶,放入搅拌子,置于磁力搅拌器上搅拌。加入1%氯金酸溶液1 mL,适当速度搅拌,加热至溶液沸腾。迅速加入柠檬酸三钠溶液1.6 mL,氯金酸溶液由灰色逐渐变为酒红色,颜色稳定后继续加热10 min,待溶液冷却后,用微孔滤膜过滤,即为胶体金溶液。

[0024] (2)胶体金的标记:将步骤(1)所得的胶体金用0.1 mol/L 碳酸钾调节pH 值到8.0;加入单抗,搅拌40 min;在搅动下,加入稳定剂10% BSA 溶液封闭38 ~ 42 min 得到稳定的黄盖鲮卵黄蛋白原(vtg)单克隆抗体-胶体金标记物;将标记好的胶体金溶液8800 rpm 离心28 ~ 32min 后重悬喷涂在胶体金结合垫上。

[0025] (3)将兔抗黄盖鲮卵黄磷蛋白多克隆抗体和兔抗鼠IgG 抗体稀释后分别喷涂在硝酸纤维膜上构成检测线和质控线。

[0026] (4)将硬质聚氯乙烯背衬板(1)、硝酸纤维膜(2)、胶体金结合垫(4)、样品垫(3)、吸水垫(5)按顺序粘合在一起组成得到检测犬腺病毒II型的免疫胶体金试纸条。

[0027] 与现有技术相比,本发明具有以下突出优点:

(1)适用于卵黄蛋白原的快速检测,本试纸条检测结果特异性强,灵敏度高。本检测方法与临床酶联免疫吸附试验检测比较,120 份被检测的经雌二醇暴露的黄盖鲮幼鱼的样本中,用酶联免疫吸附试验检测阳性为102 份,阴性18份,用本发明的试纸条检测阳性为97 份,阴性为23份,结果显示:黄盖鲮卵黄蛋白原用本发明试纸条检测阳性率为80.9%,酶联

免疫吸附试验的检测阳性率85.0%，本发明试纸条与酶联免疫吸附试验的符合率为94.1%。

[0028] (2) 本发明的试纸条不需要任何仪器设备，携带方便，检测成本低。

[0029] (3) 本发明的试纸条操作简单易于掌握，无需专业人员操作。

[0030] (4) 本发明的试纸条保存方便，稳定性好。常温保存12个月试纸条与4℃保存的检测结果一致。

[0031] 本发明的有益效果：

本发明提供一种免疫胶体金试纸条，该试纸操作简单、检测快速、灵敏、结果清晰易于判断。

[0032] 本发明提供的免疫胶体金试纸条的制备方法，试纸条制备过程简单，原辅料廉价易得，胶体金试纸条操作简单。

[0033] 本发明的免疫胶体金试纸条在检测环境雌激素中的应用，临床使用中不需要任何设备，便于携带和使用，检测快速敏感性高，大大节约了环境雌激素检测成本。

[0034] 本发明利用胶体金标记的单克隆抗体构建了胶体金免疫层析技术，能在10 min内对Vtg进行检测，相比ELISA和免疫组化方法相比，节省了样品前处理和抗体孵育的时间，能对Vtg进行较快的检测。

[0035] 本发明构建的夹心法胶体金试纸条检测范围为15~500 ng/mL ($R^2 > 0.9738$)，检出限为10 ng/mL，与本文构建的Vtg ELISA相当，并且优于此前研究者建立的蓖麻毒素的胶体金检测技术(检测范围为50 ng/L)，明显优于刘宏伟建立关于肌红蛋白的胶体金检测技术(检测范围为100 ng/L)。建立的夹心免疫胶体金技术在黄盖鲮Vtg为0 ng/mL时，T线位置未见红色沉淀线，为阴性反应，证明胶体金未发生非特异性吸附，在Vtg为20 ng/mL和1000 ng/mL时，出现阳性反应，证明本文制备的胶体金试纸条具有较好的特异性，同时重复性实验发现，1天、15天、30天制备的黄盖鲮Vtg胶体金试纸条未加差异，证明具有较好的稳定性和重复性。为环境雌激素的检测提供了一个简单，便捷的检测方法。

附图说明

[0036] 图1 为一种检测卵黄蛋白原的免疫胶体金试纸条的结构示意图。硬质聚氯乙烯背衬板1、硝酸纤维膜 2、胶体金结合垫 4、样品垫3、吸水垫5、检测线6，质控线7。

具体实施方式

[0037] 实施例1：

下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0038] 本实施例提供一种检测卵黄蛋白原的免疫胶体金试纸条，它由硬质聚氯乙烯背衬板1、硝酸纤维膜 2、胶体金结合垫 4、样品垫3、吸水垫5、检测线6，质控线7 组成，其特征在于：硝酸纤维膜2 粘贴在硬质聚氯乙烯背衬板1 上面，在硝酸纤维膜2 上面靠左侧由下而上依次粘贴有胶体金结合垫4、样品垫3，吸水垫5，设置在硝酸纤维膜2 上面靠右侧的位置。所述的胶体金结合垫4 由玻璃纤维制成，该胶体金结合垫4 先用缓冲液浸泡30 分钟，37℃ 烘干后，喷涂上胶体金标记的卵黄蛋白原单克隆抗体。硝酸纤维膜2 为试纸条的检测膜，上面靠左侧的是检测线6，质控线7 位于右侧，两条线的间隔距离是4 或5 或6mm，检测线6 和质控线7 分别喷涂的是兔抗卵黄蛋白原多克隆抗体和羊抗鼠抗体。当被检测样本中含有卵

黄蛋白原时,蛋白可分别先与金标抗乱晃蛋白亚原单克隆抗体结合,然后在层析作用下与相应检测线上的抗体结合而聚集后形成肉眼可见的色带,进而根据显色结果进行判定。

[0039] 实施例2:

本实施例提供一种检测卵黄蛋白原的免疫胶体金试纸条的制备方法,其步骤是:

(1) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金:已硅化的瓶子中入100 mL 注射用水,再加入1.2 mL 1 % (w/v) 氯金酸,放在电炉上加热(电炉功率调至1500W,200 ~ 300℃)至完全沸腾;迅速一次加入1.8 mL 的1.05% (w/v) 柠檬酸三钠水溶液,继续加热(电炉功率调至1500W,200~300℃)至溶液变成酒红色,室温(20 ~ 25℃)下自然冷却室温(20~25℃),即为胶体金溶液。制备的胶体金外观呈清亮透明的酒红色,通过分光光度计扫描在450~600 nm 处光谱,最大吸收波长为520 nm,通过电镜观察颗粒大小均匀。

[0040] (2) 卵黄蛋白原单克隆抗体胶体金标记制备:

(a) 确定最佳标记量和最佳标记pH 值:将上述步骤(1)所得的胶体金用0.1 mol/L 碳酸钾调节pH 值分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 ;取各pH 的胶体金溶液1 mL 于一系列PE 管中混匀,在以上各pH 条件下用胶体金标记抗犬腺病毒 II 型单克隆抗体(购于Santa公司,浓度调整为1.0 mg/mL),蛋白标记量分别为1 μg、2 μg、5 μg、8 μg、10 μg、15 μg、20 μg,混匀后静置30 min ;离心去除沉淀后测各个试管的OD_{520nm},以OD_{520nm} 值最大时的pH(8.0)为最佳pH 值。当胶体金标记的最佳pH 值为8.0,胶体金中单克隆抗体添加量为8 μg 时,对应的吸收峰最大,在此基础上再加20%,即每1 mL 胶体金溶液的最适当单克隆抗体的标记量为9.6 μg。

[0041] (b) 卵黄蛋白原单克隆抗体胶体金标记:于广口瓶中加入100 mL 的胶体金,0.1mol/L 碳酸钾调节pH 为8.0 后,边磁力搅拌边滴加卵黄蛋白原单克隆抗体(购于Santa公司),搅拌38 或39 或40 或41 或42min ;加入10 % (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)至终浓度为1 %,继续搅拌38 或39 或40 或41 或42min ;分装于50 mL 离心管中,8800 r/min 离心28 或29 或30 或31 或32min,弃去上清,加入重悬液15 mL。

[0042] (3) 胶体金结合垫制备:

(a) 配制包被液:0.05 mol/L pH 9.0 Tris 缓冲液、0.5% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮K40 (PVP K40)、1.0% (w/v) 蔗糖、0.8% (w/v) 吐温20 搅拌均匀后滤纸过滤。

[0043] (b) 制备胶体金结合垫:将玻璃纤维素膜浸泡在上述包被液中28 或29 或30 或31 或32 分钟,37℃烘箱中烘干;上述步骤(2)制备的胶体金标记的抗卵黄蛋白原单克隆抗体喷涂于处理过胶体金结合垫上,喷量为10 μL/cm,于37℃烘箱中烘干2 小时,裁切成宽0.5cm 条状备用。

[0044] (4) 检测线和质控线制备:

(a) 配制包被液:0.02 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)、1.0% (w/v) 海藻糖、1.0% (w/v) 山梨醇、0.3% (w/v) 吐温20、搅拌均匀后0.22 μm 滤膜过滤。

[0045] (b) 将羊抗鼠多抗用上述包被液稀释后,喷涂于硝酸纤维膜(Millipore HF135)上作为检测线,兔抗犬腺病毒 II 型多抗浓度为1.0 mg/ mL,喷量为0.8 μL/cm ;喷涂在硝酸纤维膜上质控线上兔抗鼠抗体浓度为1.5 mg/ mL,喷量为0.8 μL/cm,检测线和质控线的距离是5 mm,于37℃烘箱中烘干2 小时备用。

[0046] (5) 处理样品垫:将吸水纸浸泡在缓冲液中30 min,37℃烘箱中烘干,裁切成宽为

1.5 cm 条状备用。上述的缓冲液配方为:0.05 mol/L 的Tris-Cl,pH 9.0。

[0047] (6) 试纸的组装:将处理好的样品垫、喷有抗卵黄蛋白原单克隆抗体-胶体金标记物的胶体金结合垫、喷有羊抗鼠多克隆抗体的检测线的硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序依次粘贴在硬质聚氯乙烯上组成试纸条。

[0048] 实施例3:

本实施例提供一种免疫胶体金试纸条在检测卵黄蛋白原中的方法,其步骤是:

(1) 样品的预处理:将EE2暴露21天的黄碟鱼幼鱼血浆样品,阴性样本作对照。将样本每份取约0.5 mL左右,加生理盐水约0.5 mL,制成混悬液。

[0049] (2) 检测:分别取上清液2 ~ 4 滴(70~140 μ L)滴在本发明试纸上,15 min 后观察结果。

[0050] (3) 结果判定:在质控线、检测线上均出现红色时,为卵黄蛋白原阳性,检测线不出现红色为卵黄蛋白原阴性,即样本中不含有卵黄蛋白原。若质控线未出现红色线,则试纸无效。

[0051] 实施例4 本发明应用效果举例:

(1) 夹心法胶体金试纸条的特异性和重复性:用三个不同批次制备的胶体金试纸条检测含有1000 ng/mL、20 ng/mL和0 ng/mL的抗原稀释液(0.02 M Tris-HCl,1% BSA,5% 蔗糖),结果分别为阳性,弱阳性和阴性,并且三个不同批次制备的竞争法胶体金试纸条并无明显差异。证明本文制备的胶体金试纸条具有良好的特异性和重复性。

[0052] (2) 敏感性试验:用生理盐水对TCID₅₀ 为10-5.2/0.1ml 的卵黄蛋白原作倍比稀释至1:128,分别取120 μ L 滴加在样品垫上,试纸仍呈阳性反应,重复3 次后结果相同,本发明试纸敏感性强。

[0053] (3) 与酶联免疫吸附试验比较:本检测方法与临床酶联免疫吸附试验检测比较,120 份被检测的经雌二醇暴露的黄盖鲈幼鱼的样本中,用酶联免疫吸附试验检测阳性为102 份,阴性18份,用本发明的试纸条检测阳性为97 份,阴性为23份,结果显示:黄盖鲈卵黄蛋白原用本发明试纸条检测阳性率为80.9%,酶联免疫吸附试验的检测阳性率85.0%,本发明试纸条与酶联免疫吸附试验的符合率为94.1%。

[0054] (4) 美国红鱼幼苗购自青岛市水产市场,以含双酚A分别为0 ng/L、2 ng/L、10 ng/L和50 ng/L海水中暴露21天后,取美国红鱼血浆用夹心法胶体金试纸条检测,结果显示,在对照组和2 ng/L组中未出现T线,证明未有Vtg产生,而在10 ng/L和50 ng/L组中出现了明显的阳性结果,其中50 ng/L组的T线显色强度明显强于10 ng/L组,证明50 ng/L组中的Vtg含量要明显多于10 ng/L组,证明胶体金未发生非特异性吸附,具有较好的特异性。重复性实验发现,以胶体金试纸条检测,未见差异,证明具有较好的稳定性和重复性。这与ELISA的结果相近。

[0055] 当然,上述说明并非是对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例,本技术领域的普通技术人员,在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,都应属于本发明的保护范围。

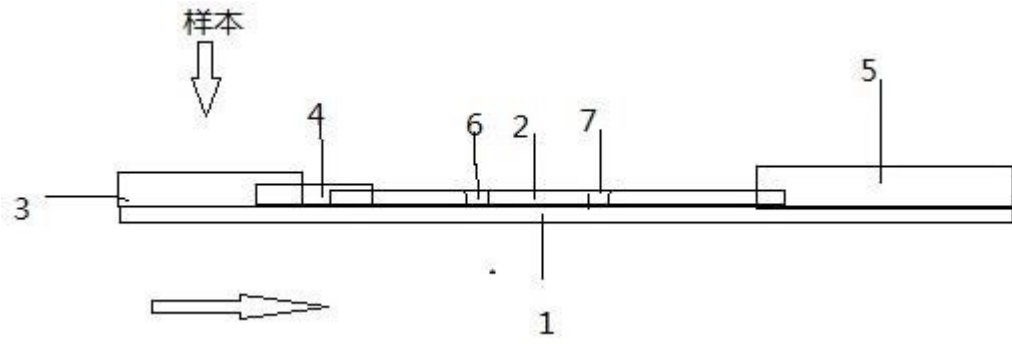


图1

专利名称(译)	检测黄盖鲮鱼卵黄蛋白原免疫胶体金试纸条及制备方法及应用		
公开(公告)号	CN109374882A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201811233605.X	申请日	2018-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	李兆杰 王松 赵祖亮 王骏 毕乐飞 崔鹤 姜勇 相湛昌		
发明人	李兆杰 王松 赵祖亮 王骏 毕乐飞 崔鹤 姜勇 相湛昌		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/74 G01N33/58 G01N33/558 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/74 G01N2333/4603		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测黄盖鲮鱼卵黄蛋白原免疫胶体金试纸条及制备方法及应用，免疫胶体金试纸包括硬质聚氯乙烯背衬板、硝酸纤维膜、样品垫、胶体金结合垫吸水垫，硝酸纤维膜粘贴于在硬质聚氯乙烯背衬板上，在硝酸纤维膜的一端粘贴有胶体金结合垫，在胶体金结合垫上粘贴有样品垫，吸水垫置于硝酸纤维膜的另一端上；步骤：（1）用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；（2）将免抗黄盖鲮鱼卵黄蛋白原单克隆抗体标记在胶体金颗粒上；（3）将免抗黄盖鲮鱼卵黄蛋白原抗体包被在硝酸纤维膜上；（4）按顺序粘合一起得到胶体金试纸条。一种免疫胶体金试纸条在检测卵黄蛋白原中的应用，该试纸操作简单、检测快速、灵敏、结果清晰易于判断。便于携带和使用，节约了卵黄蛋白原检测成本。

