

(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 203053980 U

(45) 授权公告日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201320046438. 4

G01N 33/532 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 29

(73) 专利权人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段河南科技学院

(72) 发明人 姜金庆 范国英 王自良 张海棠  
杨雪峰 吴世秀 王方明 李新朋  
刘庆立 丁涵

(74) 专利代理机构 新乡市平原专利有限责任公司 41107

代理人 于兆惠

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/544 (2006. 01)

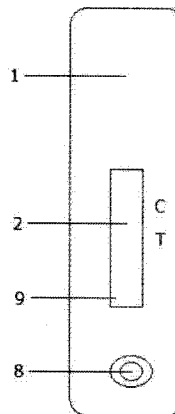
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 实用新型名称

一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡

(57) 摘要

本实用新型公开了一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡。本实用新型的技术方案要点为：一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡，包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条，所述的试纸条的底层为支撑层，该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述的塑料盒体上开有加样孔和观察窗，该加样孔的位置与试纸条上的样品垫位置相对应，观察窗与试纸条上的硝酸纤维素膜位置相对应。本实用新型操作简单、快速准确、灵敏度高、成本低、稳定性好，可进行批量检测。



1. 一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条,所述的试纸条的底层为支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的塑料盒体上开有加样孔和观察窗,该加样孔的位置与试纸条上的样品垫位置相对应,观察窗与试纸条上的硝酸纤维素膜位置相对应,所述的硝酸纤维素膜上有 19- 去甲睾酮-载体蛋白偶联物溶液印制的检测线和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线,两者间距 5 mm,其中 19- 去甲睾酮-载体蛋白偶联物溶液印制的检测线位于靠近样品垫的一侧,所述的结合垫上灌注有胶体金标记的抗 19- 去甲睾酮单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的支撑层是 PVC 板。

3. 根据权利要求 1 所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的吸收垫是由植物长纤维为原材料制成的纯白滤纸。

4. 根据权利要求 1 所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的样品垫和金标抗体结合垫是由玻璃纤维棉制作而成的。

5. 根据权利要求 1 所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的样品垫和金标抗体结合垫的叠压宽度为 2 mm,吸收垫与硝酸纤维素膜的叠压宽度为 2 mm。

6. 根据权利要求 1 所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的样品垫、金标抗体结合垫和吸收垫上方覆盖有胶膜保护层。

7. 根据权利要求 1 所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的硝酸纤维素膜两端分界处有标记线。

## 一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡

### 技术领域

[0001] 本实用新型属于免疫化学检测技术领域,具体涉及一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡。

### 背景技术

[0002] 19- 去甲睾酮(19-Nortestosterone, NT),又名诺龙,是甾环结构上脱去第 19 位碳原子而形成的内源性和外源性蛋白同化激素,具有雄激素样性质和蛋白同化作用的功能。它被广泛地应用于治疗血液学疾病和手术后治疗,恶病质、黄体酮替换治疗,以及治疗人和动物的蛋白质缺陷型疾病,骨质疏松症和烧伤,甚至有潜在的避孕性能和改善阉割家禽骨骼的性能。由于具有很强的促蛋白质合成能力,参与生长发育的生理调节,增加瘦肉生长,减少脂肪贮积,进而提高饲料转化效率和经济效益,所以在食源性动物生产中也大量使用。运动员服用后可增强肌肉力量和体力,提高比赛成绩,所以也被违法应用到运动会和动物竞技比赛中。

[0003] 19 世纪七十年代末,一系列事故使人们认识到激素残留的危害。研究表明,19- 去甲睾酮及其代谢物可造成肝脏黄疸、紫癜性肝炎、肾上腺萎缩;还可引起低蛋白血症、血糖耐受性增加、男性精液稀少、女性月经周期不正常;以及内分泌失调、痤疮、毛发减少等。自从 1986 年以来,欧盟委员会就禁止在肉食性动物生产中以促进生长为目的使用人工合成的促蛋白同化激素,以避免消费者可能因食用激素的残留物或代谢物而引起的发育问题,神经问题,遗传毒性和癌症问题。我国农业部 2002 年 4 月发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中也明确规定性激素类原料药及其单方、复方制剂产品不准以抗应激、提高饲料报酬、促进动物生长为目的在饲养过程中使用。

[0004] 然而食源性动物生产中使用 19- 去甲睾酮的案例在欧洲被大量报道,兽药监测也表明,中国的养殖场中激素仍被非法应用于动物生产过程中。这就要求对食源性动物进行严格的激素滥用监控,以保护消费者的合法权益。激素残留常用的检测方法有高效液相色谱法(HPLC),气相色谱-质谱法(GC-MS)和液相色谱-质谱法(LC-MS)等。这些方法灵敏度高,定性准确,可以确定化合物的分子量、分子式,甚至官能团,适合定量检测 19- 去甲睾酮及其代谢物。但这些方法成本高,需要专业的技术人员,昂贵的实验仪器及长时间的前期准备工作。而免疫学检测方法建立在抗体对抗原的分子识别上,其主要优点是抗原抗体的亲和力高、检测快速、经济实用,能够实现对生物液体的小体积、大通量检测,是最灵敏的方法之一。

[0005] 胶体金标记免疫分析法是近年来迅速发展的一种新型分析技术,其特点是简便快速、成本低、无污染、无需培训,非常适合于现场检测。与 ELISA 相比,具有样品前处理简单,显色时间短(3-5 min),且所有试剂包含在一根试纸条上,无需使用仪器等优点,具有广阔的市场前景和应用价值。因此,研制快速、灵敏、高效的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡对于保障动物性食品安全具有十分重要的意义。本项目也得到 2012 年度国家自然科学基金项目(U1204310)资金支持。

## 发明内容

[0006] 本实用新型解决的技术问题是提供了一种操作简单、快速准确、灵敏度高、成本低、稳定性好,可进行批量检测的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡。

[0007] 本实用新型的技术方案是:一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,其特征在于:所述的 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条,所述的试纸条的底层为支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的塑料盒体上开有加样孔和观察窗,该加样孔的位置与试纸条上的样品垫位置相对应,观察窗与试纸条上的硝酸纤维素膜位置相对应,所述的硝酸纤维素膜上有 19- 去甲睾酮-载体蛋白偶联物溶液印制的检测线(T 线)和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线(C 线),两者间距 5 mm,其中 19- 去甲睾酮-载体蛋白偶联物溶液印制的检测线(T 线)位于靠近样品垫的一侧,所述的结合垫上灌注有胶体金标记的抗 19- 去甲睾酮单克隆抗体。

[0008] 本实用新型所述的支撑层是由聚氯乙烯树脂与稳定剂及辅料配合制成的 PVC 板。本实用新型所述的吸收垫是由吸水能力极强的植物长纤维为原材料制成的纯白滤纸。本实用新型所述的样品垫和金标抗体结合垫是由玻璃纤维棉制作而成的。本实用新型所述的样品垫和金标抗体结合垫的叠压宽度为 2 mm,吸收垫与硝酸纤维素膜的叠压宽度为 2 mm。本实用新型所述的样品垫、金标抗体结合垫和吸收垫上方覆盖有胶膜保护层。本实用新型所述的硝酸纤维素膜两端分界处有标记线。

[0009] 本实用新型具有以下优点:(1)灵敏度高、特异性强。19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡以胶体金标记高亲和力的单克隆抗体制备而成,金标抗体中金颗粒与抗体分子通过异性电荷间范德华力相结合,胶体金对单克隆抗体的特异性和亲和力影响很小。因此,快速检测试纸卡具有较高的灵敏度和特异性,其检测灵敏度可达 2.0 ng/ml;

[0010] (2)操作简单、方便快捷。使用快速检测试纸卡时无需其它任何试剂,只要将处理后的样品溶液用滴管滴入试纸卡加样孔内 3~4 滴,3~5 min 即可观察结果;

[0011] (3)检测结果形象、直观。试纸卡以红色印迹线“|”或“||”作为检测线的阳性和阴性标记,即在硝酸纤维素膜上质控线(C 线)显示一条红色“|”印迹时,表示被检测样品溶液中 19- 去甲睾酮残留含量 $\geq 2.0$  ng/ml;若硝酸纤维素膜上质控线(C 线)和检测线(T 线)同时出现两条红色“||”印迹时,表示样品溶液中 19- 去甲睾酮残留含量 $< 2.0$  ng/ml。结果形象直观,简单准确,不容易出现误判;

[0012] (4)胶膜的使用可以延长检测结果观察时间,试纸卡稳定性好。本试纸卡样品吸收垫将检测溶液完全吸收,使之与偶联垫上金标抗体充分反应,可以有效减少误差率;还可以防止外界杂质干扰,影响金标抗体与检测抗原的结合;

[0013] (5)成本低、投资少。使用本实用新型试纸卡,不需要另配复杂的仪器设备和昂贵的试剂,现场检测一步到位,成本低廉,见效快;

[0014] (6)易于大范围推广应用。本试纸卡操作简单,适合不同类别的人员使用,如实验室检测、海关检疫、卫生监督、规模养殖及个体生产等,具有广阔的市场前景和较大的经济效益和社会效益。

## 附图说明

[0015] 图 1 是本实用新型的结构示意图 ;图 2 是本实用新型中试纸条的侧视图 ;图 3 是本实用新型中试纸条的俯视图 ;图 4 是本实用新型检测结果为阴性的使用状态参考图 ;图 5 是本实用新型检测结果为阳性的使用状态参考图 ;图 6 是本实用新型检测结果无效的使用状态参考图。

## 具体实施方式

[0016] 结合附图详细描述实施例。一种 19- 去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡,包括塑料盒体 1 和封装于塑料盒体 1 内的试纸条 2,所述的试纸条 2 的底层为支撑层 3,该支撑层 3 上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫 4、金标抗体结合垫 5、硝酸纤维素膜 6 和吸收垫 7,所述的塑料盒体 1 上开有加样孔 8 和观察窗 9,该加样孔 8 的位置与试纸条 2 上的样品垫 4 位置相对应,观察窗 9 与试纸条 2 上的硝酸纤维素膜 6 位置相对应,所述的硝酸纤维素膜 6 上有 19- 去甲睾酮-载体蛋白偶联物溶液印制的检测线(T 线)11 和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线(C 线)10,两者间距 5 mm,其中 19- 去甲睾酮-载体蛋白偶联物溶液印制的检测线(T 线)11 位于靠近样品垫 4 的一侧,所述的结合垫 5 上灌注有胶体金标记的抗 19- 去甲睾酮单克隆抗体。

[0017] 本实用新型所述的支撑层 3 是由聚氯乙烯树脂与稳定剂及辅料配合制成的 PVC 板。本实用新型所述的吸收垫 7 是由吸水能力极强的植物长纤维为原材料制成的纯白滤纸。本实用新型所述的样品垫 4 和金标抗体结合垫 5 是由玻璃纤维棉制作而成的。本实用新型所述的样品垫 4 和金标抗体结合垫 5 的叠压宽度为 2 mm,吸收垫 7 与硝酸纤维素膜 6 的叠压宽度为 2 mm。本实用新型所述的样品垫 4、金标抗体结合垫 5 和吸收垫 7 上方覆盖有胶膜保护层 12。本实用新型所述的硝酸纤维素膜 6 两端分界处有标记线 13。

[0018] 本实用新型所述的试纸卡的制备方法 :

[0019] 1)硝酸纤维素膜的制备 :将硝酸纤维素膜置于 X-only 单向喷点仪平台上,检测抗原放于 A 池,RaMIgG 放于 B 池,展平压紧,开机后将抗原和二抗分别点射于硝酸纤维素膜上,形成检测线(T 线)和质控线(C 线)。室温自然干燥后,将其浸入封闭液(质量浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液,pH 7.4)中 30 min,37 °C 烘干后,加入干燥剂,4 °C 密封保存。

[0020] 2)结合垫的制备 :将玻璃纤维棉裁成 4 mm 宽的细条,放入含质量浓度为 5% 的 BSA,质量浓度为 2% 的蔗糖,质量浓度为 0.8% 的 NaCl 和质量浓度为 0.05% 的  $\text{NaN}_3$  的 PBS 处理液中 20 min,37 °C 恒温烘干,然后将金标抗体灌注已处理好的玻璃纤维棉上,真空冻干 4 h,即为结合垫。

[0021] 3)样品垫的制备 :玻璃纤维棉要用含质量浓度为 2% 的 BSA,质量浓度为 1% 的蔗糖,质量浓度为 0.5% 的硼酸钠和质量浓度为 0.1% 的  $\text{NaN}_3$  的 PBS 处理后,干燥备用,即为样品垫。

[0022] 4)吸收垫的制备 :将吸水能力极强的植物长纤维为原材料制作的纯白滤纸用切割机切成 4 mm 宽的细条,并用胶膜进行一侧封闭,干燥备用。

[0023] 5)试纸条的制备 :在支撑板(PVC 板)上,将硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫、吸收垫和胶膜等按一定工艺组装在一起,用 CM4000 切割机制成 4 mm 宽的试纸条,放入带干燥剂的密闭容器中储存。

[0024] 6) 试纸卡的组装:按一定工艺将试纸条封装于带有加样孔和观察窗的特制的塑料盒体中,即为本实用新型试纸卡。

[0025] 本实用新型所述的试纸卡的检测原理:

[0026] 试纸卡根据抗原抗体竞争性免疫层析原理设计。滴加样品液后,在吸收垫和硝酸纤维素膜的毛细作用下,样品溶液向上迁移,到达结合垫时,金标抗体将被溶解。当样品中含有 19-去甲睾酮时,它们将和金标抗体结合,并一起向上迁移,到达固定有 NT-OVA 的检测线位置时,检测抗原将和 19-去甲睾酮竞争结合金标抗体上有限的抗原结合位点。样品中 NT 含量越高,检测抗原和金标抗体结合数量就越少,T 线显色就越弱;当样品中 NT 高于一定数值(2.0 ng/ml)时,检测抗原就无法和金标抗体结合,T 线不显色。无论样品中是否有 NT 存在,过量的金标抗体或检测抗原与金标抗体的结合物都将和二抗 RaMIgG 结合,在 C 线形成红色。

[0027] 本实用新型所述的试纸卡的使用方法:

[0028] 1) 样品前处理:

[0029] 动物尿样:采集新鲜尿样放于 4 °C 冰箱中待检,一般不需特殊处理,可直接用于试纸卡检测;若尿液中有污染和混浊,5000 r/min 离心 10 min 或过滤后检测。

[0030] 动物血液:用加有肝素钠(20-30 单位/mL 血样)的离心管采集血液样本,5000 r/min 离心 10 min;取出血浆 2 mL 加入干净的玻璃离心管中,再加入 2 mL 醋酸缓冲液(pH 6.5,0.2 mM),用振荡器混匀 5 min 后上样检测。

[0031] 动物组织:准确称取  $10 \pm 1.0$  g 已绞碎的动物组织样品于 50 mL 具拧盖的塑料离心管中。加入 20 mL 醋酸缓冲液(pH 6.5,0.2 mM),均质 5 min。再加入 100  $\mu$ L  $\beta$ -盐酸葡萄糖醛酰酶溶液,震荡、超声 15 min。置 50 °C 恒温箱内孵育 4 h,3500 r/min 离心 5 min,上清液待检。

[0032] 2) 样品滴加:

[0033] 将试纸卡平放后,用滴管将样品溶液滴入试纸卡加样孔内 3~4 滴,3~5 min 后即可观察结果。

[0034] 3) 检测结果分析:

[0035] 阴性:若硝酸纤维素膜上质控线(C 线)和检测线(T 线)同时出现两条红色“||”印迹时,表示样品溶液中 19-去甲睾酮残留含量  $< 2.0$  ng/ml,判为阴性,如图 4 所示。

[0036] 阳性:若硝酸纤维素膜上质控线(C 线)显示一条红色“|”印迹,而检测线(T 线)不显色,表示被检测样品溶液中 19-去甲睾酮残留含量  $\geq 2.0$  ng/ml,判为阳性,如图 5 所示。

[0037] 无效:若硝酸纤维素膜上质控线(C 线)不显示红色条带,则无论检测线(T 线)是否出现红色印迹,该试纸卡均判为无效,如图 6 所示。

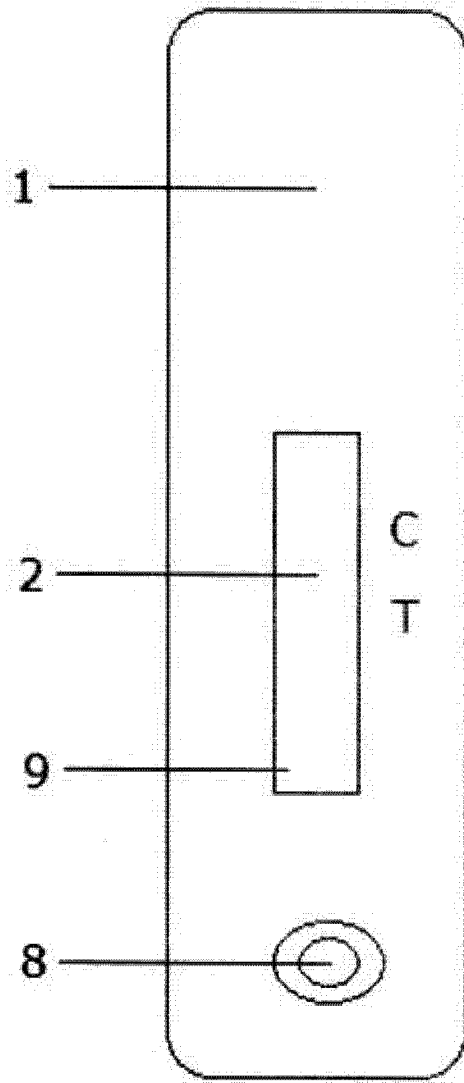


图 1

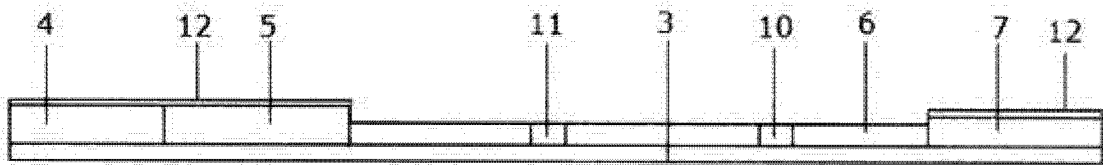


图 2

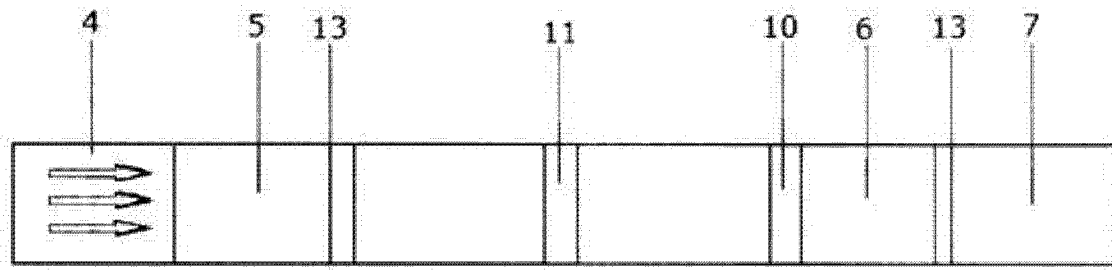


图 3

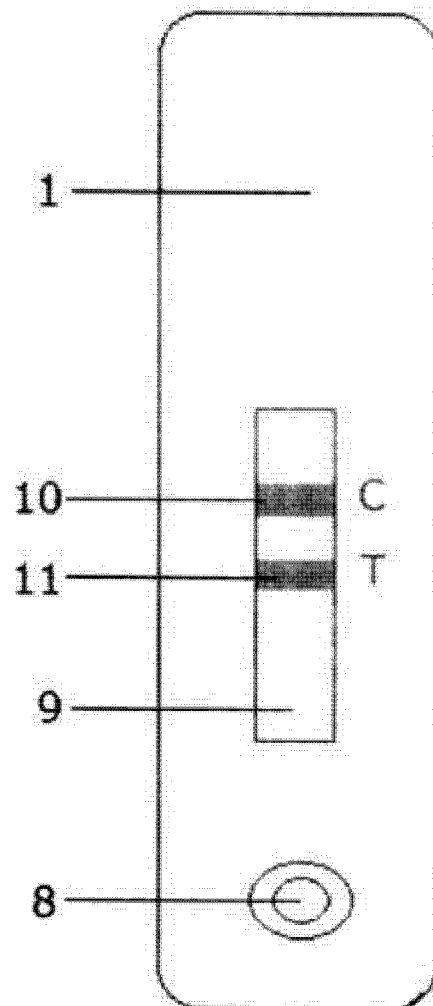


图 4

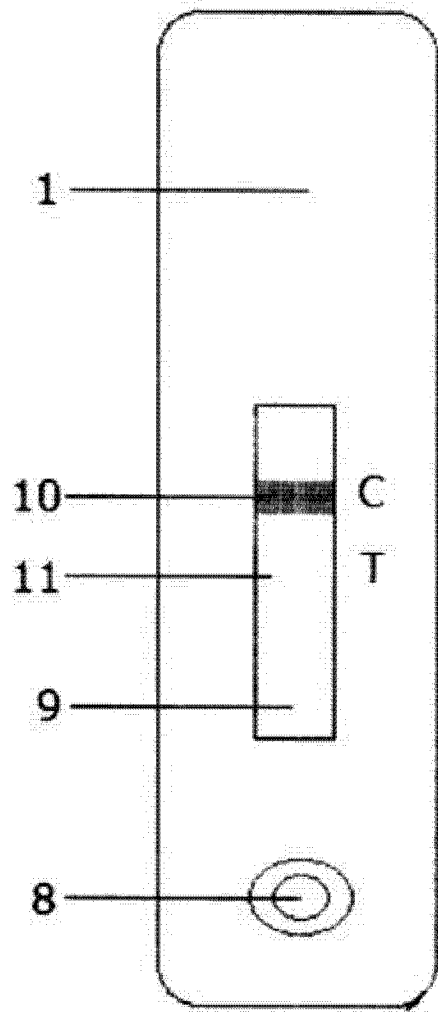


图 5

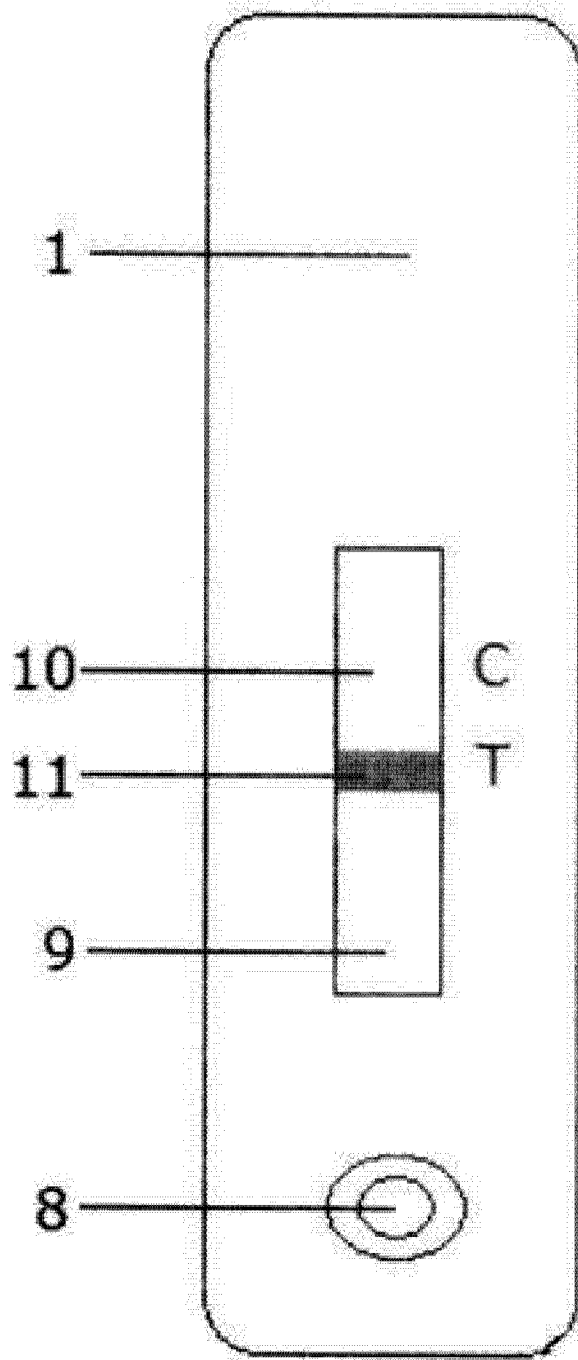


图 6

专利名称(译)	一种19-去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡		
公开(公告)号	<a href="#">CN203053980U</a>	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN201320046438.4	申请日	2013-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	姜金庆 范国英 王自良 张海棠 杨雪峰 吴世秀 王方明 李新朋 刘庆立 丁涵		
发明人	姜金庆 范国英 王自良 张海棠 杨雪峰 吴世秀 王方明 李新朋 刘庆立 丁涵		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本实用新型公开了一种19-去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡。本实用新型的技术方案要点为：一种19-去甲睾酮胶体金免疫层析试纸卡，包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条，所述的试纸条的底层为支撑层，该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述的塑料盒体上开有加样孔和观察窗，该加样孔的位置与试纸条上的样品垫位置相对应，观察窗与试纸条上的硝酸纤维素膜位置相对应。本实用新型操作简单、快速准确、灵敏度高、成本低、稳定性好，可进行批量检测。

