



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 204556636 U

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201520068182. 6

(22) 申请日 2015. 01. 29

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 刘丽强 陈燕妮 胥传来 匡华
徐丽广 马伟 宋珊珊 吴晓玲

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/557(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

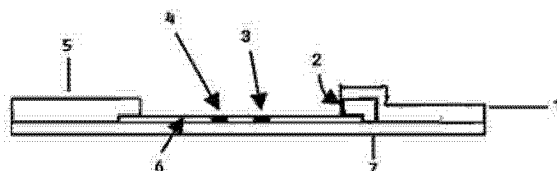
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 实用新型名称

一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条

(57) 摘要

一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,属于免疫检测技术领域。该试纸条由 PVC 底板、样品垫、涂覆金标标记抗纳他霉素抗体(2A4)的金标垫,在检测线包被有纳他霉素抗原和在质控线包被有羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜检测层、及吸水垫构成,依次按样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜检测层、吸水垫顺序粘附在 PVC 底板上。该试纸条操作简便、快速、准确,全过程只需 5min,不受环境条件的干扰,特异性好,检测灵敏度高,检测限为 20ng/mL。本实用新型适用于海关、企业、检验检疫单位等,可实现牛奶中纳他霉素的快速检测。



1. 一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:在PVC底板(7)两端分别设有样品垫(1)和吸水垫(5);在PVC底板(7)中部设有硝酸纤维素膜检测层(6),在硝酸纤维素膜检测层(6)与样品垫(1)之间设有金标垫(2);金标垫(2)的一端与样品垫(1)相叠加,另一端叠加在硝酸纤维素膜检测层(6)上;在硝酸纤维素膜检测层(6)上依次设有检测线(3)和质控线(4)。

2. 根据权利要求1所述纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:所述金标垫(2)上包被有金标标记抗纳他霉素抗体 2A4。

3. 根据权利要求1所述纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:所述检测线(3)上包被有纳他霉素抗原。

4. 根据权利要求1所述纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,其特征在于:所述质控线(4)上包被有羊抗鼠 IgG。

一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条

技术领域

[0001] 本实用新型涉及了一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,可以实现纳他霉素的快速检测,适用于大量样品的现场检测、进出口牛奶的快速检测与应急处理,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 纳他霉素是一种天然、广谱、高效安全的酵母菌及霉菌等丝状真菌抑制剂,属于多烯大环内酯类。它不仅能够抑制真菌,还能防止真菌毒素的产生,可广泛用于食品防腐保鲜以及抗真菌治疗。纳他霉素对细菌没有抑制作用,因此它不影响酸奶、奶酪、生火腿、干香肠的自然成熟过程。1982年6月,美国FDA正式批准纳他霉素可以用作食品防腐剂。1996年,中国食品添加剂标准化技术委员会正式批准纳他霉素可作为食品防腐剂。

[0003] 目前,纳他霉素的测定方法主要有生物效价法、微孔板生物检测法、紫外分光光度计法、元素分析法、比色分析法、薄层色谱法和液相色谱法等。生物效价测定法对实验环境因素(温度等)、材料因素(培养基等)、操作技术等条件要求高,操作过程也比较繁琐;微孔板生物检测法适用大批量的发酵液或样品的检测;紫外分光光度法一般用来做纳他霉素检测的常规对照,若将其用于定量分析,对实验条件要求比较高;元素分析法、比色分析法和薄层色谱法主要用于纳他霉素的定性分析;高效液相色谱法(HPLC)多集中于高纯度纳他霉素产品及食品中纳他霉素残留量的检测分析,但是这种方法的样品前处理繁琐、耗时、仪器贵重、需要专业人员来操作,不能实现大量样品的同时检测。因此建立一种快速、简单、高通量的纳他霉素检测方法具有重要意义。酶联免疫吸附分析法(ELISA)是一种极为高效、灵敏的检测方法。而胶体金试纸条具有操作简单、稳定性高、不需要借助专门仪器、适合现场快速检测的优点。

发明内容

[0004] 本实用新型的目的在于提供一种检测纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,操作简单,快速方便,灵敏度高,稳定性好,成本低廉。

[0005] 本实用新型的技术方案:一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,在PVC底板两端分别设有样品垫和吸水垫;在PVC底板中部设有硝酸纤维素膜检测层,在硝酸纤维素膜检测层与样品垫之间设有金标垫;金标垫的一端与样品垫相叠加,另一端叠加在硝酸纤维素膜检测层上;在硝酸纤维素膜检测层上依次设有检测线和质控线。

[0006] 所述金标垫上包被有金标标记抗纳他霉素抗体2A4。所述检测线上包被有纳他霉素抗原。所述质控线上包被有羊抗鼠IgG。

[0007] 所述纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法,步骤如下:

[0008] (1) 纳他霉素单克隆抗体的制备

[0009] 单克隆抗体是采用纳他霉素免疫原经过特定免疫程序免疫BALB/c小鼠,经杂交瘤技术融合、筛选得到的。纳他霉素与蛋白的偶联物做为免疫原,免疫8周龄的BALB/c

小鼠,免疫程序如下:第一周进行首免,100 $\mu\text{g}/\text{只}$,弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射;第四周进行二免,50 $\mu\text{g}/\text{只}$,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;第六周进行三免,50 $\mu\text{g}/\text{只}$,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;第七周尾部采血测效价,挑选对纳他霉素效价最高,抑制最好的老鼠;第九周进行冲刺免疫,30 $\mu\text{g}/\text{只}$,生理盐水溶解,腹腔注射;冲刺免疫 3 天后分别眼眶采血后进行融合、筛选。

[0010] (2) 纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条的制备:

[0011] a、空白胶体金的制备:采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒,在锥形瓶中加入 200 mL 去离子水和 2 mL 1% 氯金酸,搅拌加热至沸腾,快速加入 4 mL 1% 柠檬酸钠,继续加热 15~20 min,至呈亮红色,然后室温中冷却,4℃ 冷藏保存;

[0012] b、胶体金标记抗体的制备:空白胶体金溶液用 0.1M K_2CO_3 调节 pH 值至 7.4,搅拌中滴加适量浓度步骤(1)制备的抗体,每 mL 胶体金加入 30 μg 抗体 2A4,继续搅拌 30 min,离心,吸取上清,用金标抗体保存液(0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液)重旋;

[0013] c、金标垫的制备:调试三维平面点膜喷金仪仪器(HM3055),将 0.2 mg/mL 标记好胶体金的抗纳他霉素抗体 2A4 均匀的喷在玻璃纤维膜检测层上,喷液量 0.6 $\mu\text{L}/\text{cm}$,37℃ 烘干过夜,封袋备用;

[0014] d、包被膜的制备:

[0015] 调试三维平面点膜喷金仪仪器(HM3055),将稀释好的 0.2 mg/mL 纳他霉素抗原均匀喷在硝酸纤维素膜检测层上,得到检测线;将稀释好的羊抗鼠 IgG 均匀喷在硝酸纤维素膜上,得到质控线,喷液量为 0.6 $\mu\text{L}/\text{cm}$,37℃ 烘干过夜,封袋备用。

[0016] 将 PVC 底板、样品垫、金标垫、涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜检测层、和吸水垫组合,即得产品纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条。

[0017] 其适用于海关、企业、检验检疫单位等,可实现牛奶样本中纳他霉素的快速检测。

[0018] 本实用新型的有益效果:

[0019] 1、检测速度快,全过程只需要 5 min 即可,可以实施大批量样品的快速检测;

[0020] 2、灵敏度高,样本中纳他霉素浓度达到 20 ng/mL 时,胶体金试纸条的 T 线完全不显色;

[0021] 3、操作简便,无需经过专业培训,易于推广;

[0022] 4、不需要仪器,适合现场检测;

[0023] 5、过程简单,直接上样检测,样品前处理简单。

附图说明

[0024] 图 1 是本实用新型结构示意图。

[0025] 附图标记说明:

[0026] 1、样品垫;2、金标垫;3、检测线(T 线);4、质控线(C 线);5、吸水垫;6、硝酸纤维素膜检测层;7、PVC 底板。

具体实施方式

[0027] 实施例 1

[0028] 如图 1 所示,一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条,包括 PVC 底板 7,在 PVC

底板 7 两端分别设有样品垫 1 和吸水垫 5 ;在 PVC 底板 7 中部设有硝酸纤维素膜检测层 6 ,在硝酸纤维素膜检测层 6 与样品垫 1 之间设有金标垫 2 ;金标垫 2 一端与样品垫 1 相叠加,另一端叠加在硝酸纤维素膜检测层 6 上 ;在硝酸纤维素膜检测层 6 上按先后顺序设有检测线(T 线) 3 和质控线(C 线) 4。

[0029] 所述金标垫 2 上包被有金标标记抗纳他霉素抗体 2A4 ;所述检测线(T 线) 3 上包被有纳他霉素抗原 ;所述质控线(C 线) 4 上包被有羊抗鼠 IgG。

[0030] 实施例 2

[0031] 所述纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条的制备方法,其步骤是 :

[0032] (1) 纳他霉素单克隆抗体的制备 :

[0033] 单克隆抗体是采用纳他霉素免疫原经过特定免疫程序免疫 BALB/c 小鼠,经杂交瘤技术融合、筛选得到的。纳他霉素与蛋白的偶联物做为免疫原,免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠,免疫程序如下 :第一周进行首免,100 μ g/ 只,弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射 ;第四周进行二免,50 μ g/ 只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射 ;第六周进行三免,50 μ g/ 只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射 ;第七周尾部采血测效价,挑选对纳他霉素效价最高,抑制最好的老鼠 ;第九周进行冲刺免疫,30 μ g/ 只,生理盐水溶解,腹腔注射 ;冲刺免疫 3 天后分别眼眶采血后进行融合、筛选。

[0034] (2) 纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条的制备 :

[0035] a、空白胶体金的制备 :采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒,在锥形瓶中加入 200 mL 去离子水和 2 mL 1% 氯金酸,搅拌加热至沸腾,快速加入 4 mL 1% 柠檬酸钠,继续加热 15~20 min,至呈亮红色,然后室温中冷却,4℃ 冷藏保存 ;

[0036] b、胶体金标记抗体的制备 :空白胶体金溶液用 0.1 M K_2CO_3 调节 pH 值至 7.4,搅拌中滴加适量浓度步骤(1)制备的抗体,每 mL 胶体金加入 30 μ g 抗体 2A4,继续搅拌 30 min,离心,吸取上清,用金标抗体保存液(0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液)重旋 ;

[0037] c、金标垫的制备 :调试三维平面点膜喷金仪仪器(HM3055),将 0.2 mg/mL 标记好胶体金的抗纳他霉素抗体 2A4 均匀的喷在玻璃纤维膜检测层上,喷液量 0.6 μ L/cm,37℃ 烘干过夜,封袋备用 ;

[0038] d、包被膜的制备 :

[0039] 调试三维平面点膜喷金仪仪器(HM3055),将稀释好的 0.2 mg/mL 纳他霉素抗原均匀喷在硝酸纤维素膜检测层上,得到检测线 ;将稀释好的羊抗鼠 IgG 均匀喷在硝酸纤维素膜上,得到质控线,喷液量为 0.6 μ L/cm,37℃ 烘干过夜,封袋备用。

[0040] 将 PVC 底板、样品垫、金标垫、涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜检测层、和吸水垫组合,即得产品纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条。

[0041] 本实用新型试纸条的工作原理 :采用胶体金免疫层析技术,利用间接竞争法原理检测样品中是否含有纳他霉素。当待检样品中含有纳他霉素时,抗原先和胶体金标记的抗纳他霉素抗体 2A4 结合,由于层析作用复合物沿包被膜向前移动,当遇到检测线上的纳他霉素抗原时,形成抗体 - 抗原 - 金标抗体复合物,在检测线上富集,形成红色沉淀线。

[0042] 检测时按如下步骤处理检测样品 :牛奶直接稀释 10 倍即可进行样品检测。

[0043] 检测时如样品为阴性,则试纸条质控线 C 线,检测线 T 线均显色 ;如果样品为阳性,纳他霉素浓度大于 20 ng/mL,则试纸条只有质控线 C 线显色。如果试纸条 C 线不显色,则说

明试纸条质量出现问题。

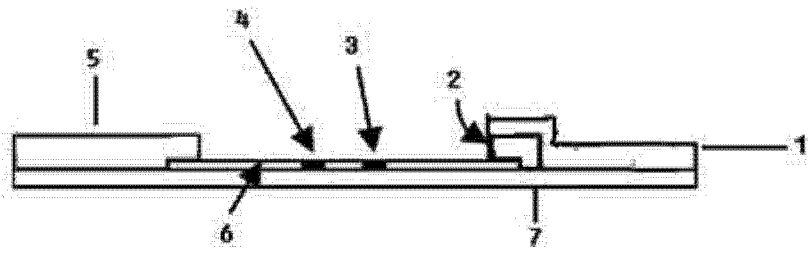


图 1

专利名称(译)	一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条		
公开(公告)号	CN204556636U	公开(公告)日	2015-08-12
申请号	CN201520068182.6	申请日	2015-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	刘丽强 陈燕妮 胥传来 匡华 徐丽广 马伟 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	刘丽强 陈燕妮 胥传来 匡华 徐丽广 马伟 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	G01N33/557 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种纳他霉素的免疫胶体金快速检测试纸条，属于免疫检测技术领域。该试纸条由PVC底板、样品垫、涂覆金标标记抗纳他霉素抗体（2A4）的金标垫，在检测线包被有纳他霉素抗原和在质控线包被有羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜检测层、及吸水垫构成，依次按样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜检测层、吸水垫顺序粘附在PVC底板上。该试纸条操作简便、快速、准确，全过程只需5min，不受环境条件的干扰，特异性好，检测灵敏度高，检测限为20ng/mL。本实用新型适用于海关、企业、检验检疫单位等，可实现牛奶中纳他霉素的快速检测。

