



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680714 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201210010889. 2

(22) 申请日 2012. 01. 15

(73) 专利权人 河南科技大学

地址 471003 河南省洛阳市涧西区西苑路
48 号

(72) 发明人 孔涛 杨自军 张才 赵振升
郝雪琴 周变华 常景周 李润乐
魏迎军 李嘉嘉 王振华

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限
公司 41119

代理人 牛爱周

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 202101996 U, 2012. 01. 04,

CN 101144819 A, 2008. 03. 19,

JP 2001-272401 A, 2001. 10. 05,
WO 2005/105846 A1, 2005. 11. 10,
张明翠等. 邻苯二甲酸二丁酯免疫检测
I. 人工抗原的制备及表征. 《应用化学》. 2006,
第 23 卷 (第 8 期),
张明翠等. 环境激素邻苯二甲酸二丁酯免疫
检测 II——抗体的制备. 《应用化学》. 2007, 第
24 卷 (第 5 期),

审查员 王在竹

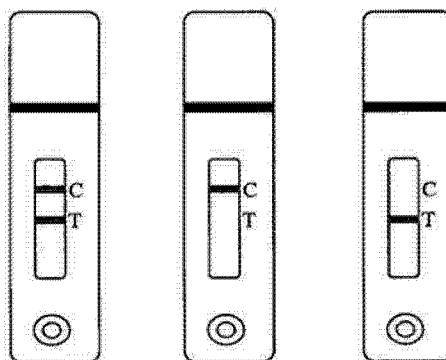
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免
疫试纸及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测
用胶体金免疫试纸及其制备方法和应用,包括反
应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬,在
所述的反应膜上包被有邻苯二甲酸二丁酯-载
体蛋白偶联物的测试区和羊抗鼠 IgG 的质控区,
结合物释放垫包被有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗
体-胶体金标记物。本发明提供的试纸可用于检
测鸡肉、猪肉、尿液、蜂蜜等动物源性食品中的
邻苯二甲酸二丁酯残留含量。该试纸操作简单、成
本低、灵敏度高、检测速度快、适合大规模推广、能
够现场检测,适合大量样本筛查,不需专用仪器
设备及专业人员,易推广实施。



阴性

阳性

无效

1. 一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸,其特征在于:包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬,在所述的反应膜上包被有邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的测试区和羊抗鼠 IgG 的质控区,结合物释放垫包被有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物;其中所述的载体蛋白为牛血清白蛋白;所述的邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物由邻苯二甲酸二丁酯经过硝化与还原反应后形成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯半抗原,然后取碳化二亚胺 100 mg 用 pH8.0 的 10mol/LPBS 液 3.0ml 充分溶解作为 1 液,取 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 10 mg 溶于 1ml 二甲基甲酰胺作为 2 液,取牛血清白蛋白 20 mg 溶于 1ml10mol/L 的 PBS pH8.0 液中作为 3 液,将 2 液与 3 液混合,在磁力搅拌下逐渐加入 1 液,4℃ 搅拌 12h,用蒸馏水使之充分透析 4-6 天。

2. 根据权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸,其特征在于:所述的样本垫、结合物释放垫、反应膜及吸水垫依次设置在背衬上。

3. 根据权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸,其特征在于:所述的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物中的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体是以邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物作为免疫抗原免疫试验动物后制备获得。

4. 一种制备如权利要求 1 所述邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸的方法,其特征在于,具体步骤如下:

(1) 制备包被邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

(2) 制备具有包被邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区的反应膜;

(3) 将步骤 (1) 制备好的结合物释放垫和步骤 (2) 制备好的反应膜与样本垫、吸水垫和背衬组装成试纸。

5. 根据权利要求 4 所述的制备邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸的方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

(1) 半抗原制备:将邻苯二甲酸二丁酯经过硝化与还原反应后形成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯半抗原;

(2) 将邻苯二甲酸二丁酯与载体蛋白偶联,形成邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物;

(3) 用邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌邻苯二甲酸二丁酯的单克隆抗体杂交瘤细胞株;

(4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

(5) 将制备的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体加入步骤 (4) 制备的胶体金中,得到邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物;

(6) 将邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合物释放垫上,用含 0.1-1.5% 卵清蛋白的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸湿 30 秒,37℃ 烘 2h 备用;

(7) 将邻苯二甲酸二丁酯-牛血清白蛋白偶联物包被在反应膜上构成测试区,并将羊抗鼠 IgG 包被在反应膜上构成质控区,用含 0.1% 牛血清的封闭液进行封闭;

(8) 将样本垫用含 0.1-1.5% 的兔血清蛋白、1-1.5% 吐温-20 的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸泡 2h,37℃ 烘 2h 备用;

(9) 邻苯二甲酸二丁酯胶体金试纸卡的组装:在背衬上按顺序依次粘附反应膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,然后切成 3mm 宽的小条,加塑料盒,真空包装。

6. 一种如权利要求 1 所述的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸在检测邻苯二甲酸二丁酯残留中的应用。

一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应,快速检测邻苯二甲酸二丁酯残留的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸,属于残留的免疫化学速测技术领域。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯类化合物 (PAEs) 又称酞酸酯,是一类环境雌激素,是常用增塑剂之一。被普遍应用于玩具、食品包装材料、医用血袋和胶管、乙烯地板和壁纸、清洁剂、润滑油、个人护理用品(如指甲油、头发喷雾剂、香皂和洗发液)等数百种产品中。邻苯二甲酸酯可干扰内分泌,使男性精子数量减少、运动能力低下、形态异常,严重的还会导致死精症和睾丸癌,是造成男性生殖问题的“罪魁祸首”,甚至影响胚胎发育,表现出殖发育毒性。

[0003] 目前,环境中残留、积累的邻苯二甲酸酯的现象普遍存在,人体主要通过食品和空气两个途径吸收它。越来越多的权威科学家认定,过去几十年来男性精子数量和生育能力的下降与摄入越来越多的邻苯二甲酸酯有关。为了男性健康,专家们呼吁男性少用化妆品。通常,人们容易在塑胶制品包装中接触到邻苯二甲酸酯类,在生活中有很多食物在加工、加热、包装、盛装的过程里可能会造成塑化剂的溶出且渗入食物中。例如:塑胶玩具、覆盖食物微波加热的保鲜膜、盛装食物的塑胶容器、室内装潢或家庭产品亦多数属于塑胶材质、吃手扒鸡的塑胶手套、医疗用的塑胶手套或输血袋等,都可见邻苯二甲酸酯类的踪影。儿童用品中的邻苯二甲酸酯最为重视。有关专家发现,含有邻苯二甲酸酯的软塑料玩具及儿童用品有可能被小孩放进口中,如果放置的时间足够长,就会导致邻苯二甲酸酯的溶出量超过安全水平,会危害儿童的肝脏和肾脏,也可引起儿童性早熟。一项最新的研究表明,邻苯二甲酸酯可能与美国男性肥胖以及糖尿病有关。在 1982 年,美国国家毒理规划署的实验报告就已确证大小白鼠通过食物长期吸收邻苯二甲酸酯可引发肝癌。

[0004] 由于塑化剂对环境及人类健康的危害,WHO 1995 年公布,邻苯二甲酸酯类化合物是必须控制一类扰乱内分泌的化学物质。基于 PAEs 在环境中的富集作用对人类健康造成的严重危害,EPA(美国国家环保局)将 6 种 PAEs 列为优先控制污染物:即邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二异辛酯(DEHP)、邻苯二甲酸二正辛酯(DOP)和邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP);8 种 PAEs 被列入 WWF(世界野生动物保护基金会)的环境激素名单中。在我国,DMP、DBP 和 DOP 被列入“中国环境优先污染物黑名单”。

[0005] 世界各国对塑化剂类产品均加强了监控与检测。目前,PAEs 的检测方法有分光光度法、薄层色谱法、气相色谱法(GC)、气相色谱/质谱法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)。EPA 的标准方法是 GC-ECD-MS 法,我国拟发布的标准方法是正相高效液相色谱法(NP-HPLC)。采用分光光度法分析 PAEs 时,只适用于 PAEs 总量的测定,在特定组分的检测上具有一定的局限性,并且检测限较高,难以适应微量检测的需要。色谱法是国内外比较常

用的方法。在用 GC-MS、HPLC 方法检测 PAEs 时,具有更好的灵敏度和选择性。但这些方法大都需要复杂的前处理,昂贵的仪器设备,检测费时费力且成本高,与其它检测系统相比,一次检测样品量少,检测时间长,不适合现场快速检测,仅作为少数实验室的确证方法,满足不了环境和农产品检测快速简便的需要。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种敏感度高、成本低的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸。

[0007] 同时,本发明的目的还在于提供一种制备邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸的方法。

[0008] 进一步地,本发明的目的还在于提供一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸在检测邻苯二甲酸二丁酯残留中的应用。

[0009] 为了实现上述目的,本发明的技术方案采用了一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸,包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬,在所述的反应膜上包被有邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的测试区和羊抗鼠 IgG 的质控区,结合物释放垫上包被有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物。

[0010] 所述的样本垫,结合物释放垫、反应膜及吸水垫依次设置在背衬上。

[0011] 所述的邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物由邻苯二甲酸二丁酯经过硝化与还原反应后形成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯半抗原,然后与载体蛋白偶联得到。

[0012] 所述邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物中的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、卵清蛋白、铁蛋白或多聚赖氨酸。

[0013] 所述的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物中的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体是以邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物作为免疫抗原免疫试验动物后制备获得。

[0014] 同时,本发明的技术方案还在于采用了一种制备邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸的方法,具体步骤如下:

[0015] (1) 制备包被邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0016] (2) 制备具有包被邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区的反应膜;

[0017] (3) 将步骤 (1) 制备好的结合物释放垫和步骤 (2) 制备好的反应膜与样本垫、吸水垫和背衬组装成试纸。

[0018] 本发明的制备邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸的方法,具体包括以下步骤:

[0019] (1) 半抗原制备:将邻苯二甲酸二丁酯与经过硝化与还原反应后形成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯半抗原;

[0020] (2) 将邻苯二甲酸二丁酯与载体蛋白偶联,形成邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物;

[0021] (3) 用邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌邻苯二甲酸二丁酯的单克隆抗体杂交瘤细胞株;

[0022] (4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；

[0023] (5) 将制备的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体加入步骤 4) 制备的胶体金中,得到邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物；

[0024] (6) 将邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合物释放垫上,用含 0.1-1.5% 卵清蛋白的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸湿 30 秒,37℃ 烘 2h 备用；

[0025] (7) 将邻苯二甲酸二丁酯-人血清白蛋白偶联物 (HSA) 包被在反应膜上构成测试区,并将羊抗鼠 IgG 包被在反应膜上构成质控区,用含 0.1% 牛血清的封闭液进行封闭；

[0026] (8) 将样本垫 :0.1-1.5% 的兔血清蛋白、1-1.5% 吐温 -20 用磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液浸泡 2h,37℃ 烘 2h 备用；

[0027] (9) 邻苯二甲酸二丁酯胶体金试纸卡的组装 :在背衬上按顺序依次粘附反应膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,然后切成 3mm 宽的小条,加塑料盒,真空包装。

[0028] 本发明的方法还采用了一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸在检测邻苯二甲酸二丁酯残留中的应用。

[0029] 本发明的邻苯二甲酸二丁酯快速检测试纸采用高度特异性的抗体-抗原反应及免疫层析分析技术,在反应膜测试区包被邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联抗原、结合物释放垫包被胶体金标记的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体,利用竞争法来检测待测样品中是否含有邻苯二甲酸二丁酯。通过待测样品中邻苯二甲酸二丁酯与包被在反应膜上的邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物共同竞争邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物,根据测试区红色条带有无或颜色深浅来判断待测样品液中是否含有邻苯二甲酸二丁酯或含量多少。本发明的试纸将样本垫盖住结合物释放垫可以延长检测结果的观察时间,样本垫也可以将检测液体充分吸收能与金标抗体完全接触充分反应、减少误差。本发明的胶体金试纸具有敏感度高、价格低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长等优点。适合应用于大批样品的检测,尤其是免疫层析法,检测速度快,灵敏度高,与 HPLC、GC-MS 检测有较高一致性,而且非常适合活体动物的检测 ;成本低,无需大型仪器,而且可以直接对尿液、饲料样品进行检测,适用于现场检测。被广泛用于环境监测,农产品生产、销售、质量监督、卫生检验、进出口检验,水产养殖和渔业生产的邻苯二甲酸酯检测。本发明的对邻苯二甲酸酯免疫学检测方法,对提我国高环境和农产品邻苯二甲酸酯控制和监测水平,保障农产品质量和消费者的健康具有重要意义。

[0030] 检测时,样品滴入试剂卡孔内,当邻苯二甲酸二丁酯在样品中浓度低时,胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的邻苯二甲酸二丁酯偶联物结合,在测试区 (T) 质控区 (C) 内会出现各一条红色条带。如果邻苯二甲酸二丁酯在样品中浓度高时,胶体金抗体与邻苯二甲酸二丁酯全部结合,从而在 (T) 区内因为竞争反应不会与邻苯二甲酸二丁酯偶联物结合而不出现红色条带。阴性样品在检测过程中由于缺少抗原抗体竞争反应,将会在 (T) 区与 (C) 区内出现红色条带。

[0031] 阳性 :当 (C) 区显示出红色条带,而 (T) 区不显色时,判为阳性。

[0032] 阴性 :当 (C) 区显示出红色条带,(T) 区同时也显示出红色条带,且 (T) 区颜色接近 (C) 线或者浅于 (C) 线时,判为阳性。

[0033] 无效 :当 (C) 区不显示出红色条带,则无论 (T) 区显示出红色条带与否,该试纸卡

判为无效。

附图说明

[0034] 图 1 为本发明检测试纸卡的组装示意图；

[0035] 图 2 为本发明的检测结果分析示意图。

具体实施方式

[0036] 实施例 1

[0037] 本发明的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸,包括反应膜 2、样本垫 3、结合物释放垫 4、吸水垫 5 和背衬 1,在所述的反应膜 2 上包被有邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的测试区 6 和羊抗鼠 IgG 的质控区 7,结合物释放垫 4 包被有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物 8。

[0038] 本实施例的样本垫 3、结合物释放垫 4、反应膜 2 及吸水垫 5 依次设置在背衬 1 上。

[0039] 邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物由邻苯二甲酸二丁酯经过硝化与还原反应后形成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯半抗原,然后与载体蛋白偶联得到。其中,邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物中的载体蛋白为牛血清白蛋白。邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物中的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体是以邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物作为免疫抗原免疫试验动物后制备获得。

[0040] 实施例 2

[0041] 本发明的邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸制备方法包括以下步骤：

[0042] 1、邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0043] (1) 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯-牛血清白蛋白的合成

[0044] 取碳化二亚胺 100mg 用 pH8.0 的 10mol/L PBS 液 3.0ml 充分溶解(简称 1 液);取 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 10mg 溶于 1ml 二甲基甲酰胺(2 液);取牛血清白蛋白 20mg 溶于 1ml 10mol/L 的 PBS(pH8.0)液中(3 液);将(2 液)与(3 液)混合,在磁力搅拌下逐渐加入(1 液),4℃搅拌 12h。用蒸馏水使之充分透析 4-6 天,得免疫抗原。

[0045] 2、邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体的制备

[0046] (1) 动物免疫

[0047] 将免疫抗原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 50 μg/只,使其产生多克隆抗体。

[0048] (2) 细胞融合和克隆

[0049] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争 ELISA 法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0050] (3) 细胞冻存和复苏

[0051] 将邻苯二甲酸二丁酯的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^8 个/ml 的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0052] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0053] 将Ba1b/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只,7天后腹腔注射邻苯二甲酸二丁酯的单克隆杂交瘤细胞 10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸按法进行纯化,纯化后的腹水放入 -20°C 环境保存。

[0054] 3、邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0055] (1) 胶体金的制备

[0056] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%,置磁力加热棒搅拌器上搅拌煮沸,每100ml0.01%氯金酸加入2ml 1%柠檬酸三钠,继续煮沸,至液体呈红色时停止加热,冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,有效期为一个月。

[0057] (2) 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0058] 在磁力搅拌下,用0.1M碳酸钾调胶体金的pH值至8.2,按 $1\sim 2\mu\text{g/ml}$ 抗体胶体金加入抗体邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10%BSA至终浓度为1%,静置30min。 12000rpm 、 4°C 离心30min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用初始胶体金体积1/20的复溶缓冲液将沉淀重悬,置 4°C 备用,保存60天。

[0059] 4、结合物释放垫的包被

[0060] 将结合物释放垫浸泡于含有0.1-1.5%的卵清蛋白的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制的缓冲液中浸湿30秒, 37°C 烘2h;用点膜仪将制备好的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物均匀包被在结合物释放垫上,真空干燥,真空封装,置 4°C 备用。

[0061] 5、硝酸纤维素膜的处理

[0062] 处理:包被邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物构成测试区,包被羊抗鼠IgG构成质控区,再用含0.1%牛血清的封闭液进行封闭。

[0063] 包被过程:将硝酸纤维素膜用磷酸缓冲液(含3%的甲醇)将邻苯二甲酸二丁酯-血蓝蛋白(KLH)偶联物稀释到 10mg/ml ,用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为测试区,包被量为 $0.8\mu\text{g/cm}^2$,测试区靠近结合垫端,距结合垫端约8mm;用0.01M pH 7.4PBS缓冲液(含3%的甲醇)将羊抗鼠IgG抗体稀释到 $150\mu\text{g/ml}$,用点膜仪将其包被于纤维素膜作为质控区,包被量为 $0.8\mu\text{g/cm}^2$,质控区靠近吸水垫,距吸收垫约8mm,两线距离5-8mm。 37°C 烘干,封装。

[0064] 6、胶体金免疫试纸卡的组装

[0065] 在PVC背衬上按顺序粘附硝酸纤维素膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,将贴样本垫盖住结合物释放垫,然后切成2-3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装。原包装应在 $18\sim 25^{\circ}\text{C}$ 的环境中储存,有效期一年。本发明的试纸卡将样本垫盖住结合物释放垫可以延长检测结果观察时间,样本垫也可以将检测液体充分吸收能与金标抗体完全接触、充分反应,从而减少误差。

[0066] 实施例3:样本中残留的检测

[0067] 1、样本前处理

[0068] 称取鸡肉、猪肉、猪肝、香肠、鱼肉、虾肉、蜂蜜、膨化食品等样本50g,匀浆,放入具塞三角瓶中,加入100ml提取剂(甲醇、乙酸乙酯等),提取1h。离心,取上清,浓缩至1ml,用PBS或生理盐水稀释。

[0069] 2、用试纸卡检测

[0070] 将样品用滴管滴入试剂卡孔内,滴加 3 滴,加后计时,5-8min 内观察结果。超过 10min 样品检测判读无效。

[0071] 3、检测结果分析

[0072] 阳性:当 (C) 区显红色条带,而 (T) 区不显色,判为阳性。

[0073] 阴性:当 (C) 区显示出红色条带,(T) 区同时也显示出红色条带,且 (T) 区颜色接近或浅于 (C) 区时,判为阴性。

[0074] 无效:当 (C) 区不显示出红色条带,则无论 (T) 区显示出红色条带与否,该试纸卡判为无效。

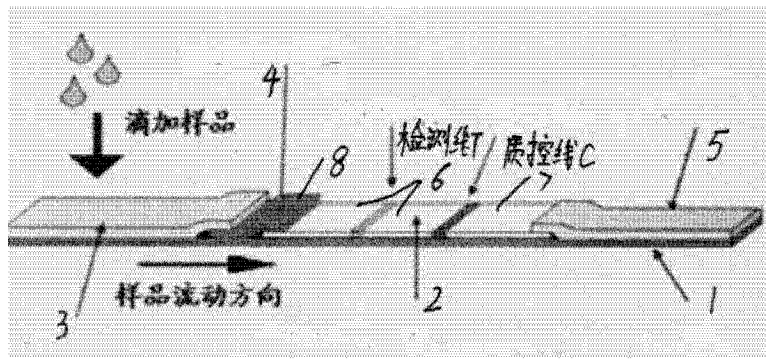


图 1

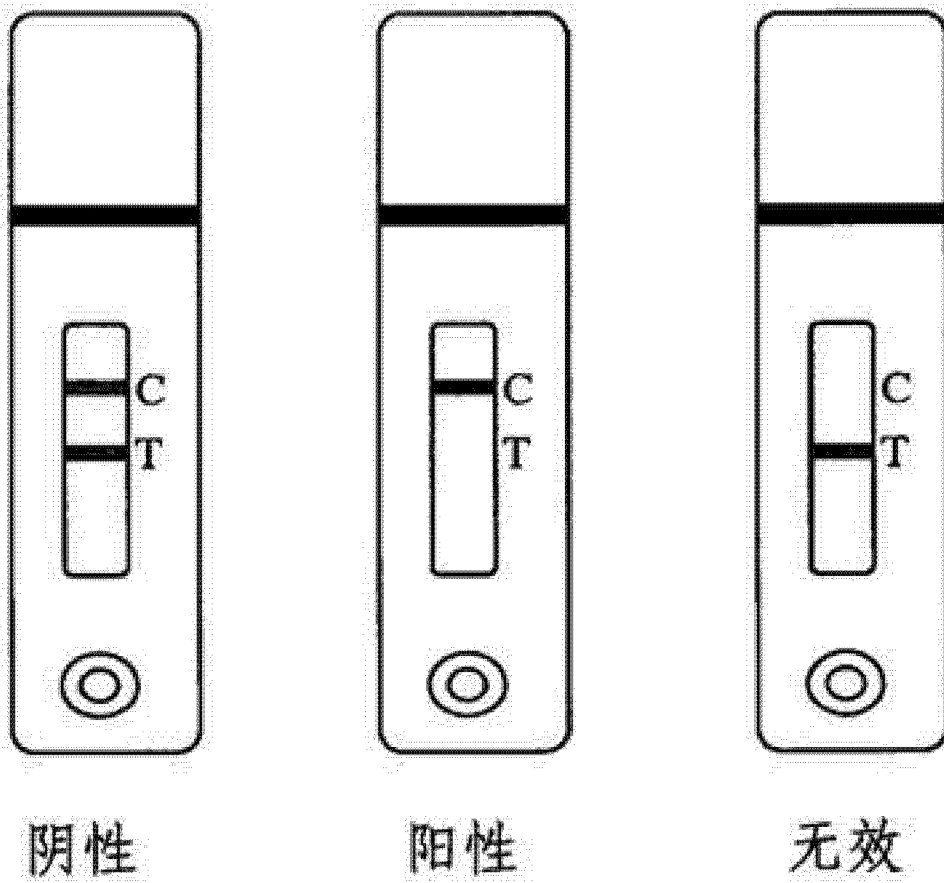
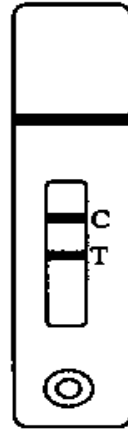


图 2

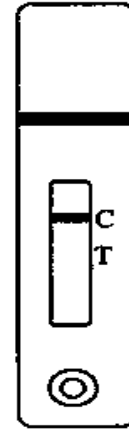
专利名称(译)	一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102680714B	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201210010889.2	申请日	2012-01-15
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	孔涛 杨自军 张才 赵振升 郝雪琴 周变华 常景周 李润乐 魏迎军 李嘉嘉 王振华		
发明人	孔涛 杨自军 张才 赵振升 郝雪琴 周变华 常景周 李润乐 魏迎军 李嘉嘉 王振华		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/531		
其他公开文献	CN102680714A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

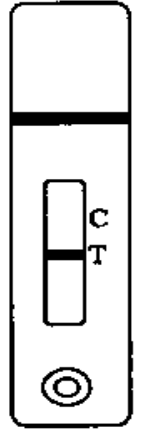
本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯快速检测用胶体金免疫试纸及其制备方法和应用，包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬，在所述的反应膜上包被有邻苯二甲酸二丁酯-载体蛋白偶联物的测试区和羊抗鼠IgG的质控区，结合物释放垫包被有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物。本发明提供的试纸可用于检测鸡肉、猪肉、尿液、蜂蜜等动物源性食品中的邻苯二甲酸二丁酯残留含量。该试纸操作简单、成本低、灵敏度高、检测速度快、适合大规模推广、能够现场检测，适合大量样本筛查，不需专用仪器设备及专业人员，易推广实施。



阴性



阳性



无效