



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107064496 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710414945.1

(22)申请日 2017.06.05

(71)申请人 苏州快捷康生物技术有限公司  
地址 215128 江苏省苏州市吴中经济开发区田上江路105号15幢302室

(72)发明人 盛相国

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 谈杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

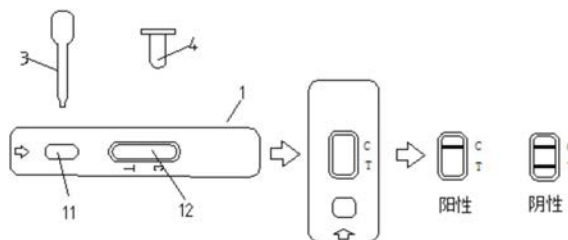
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡,该检测卡检测快速、准确、灵敏度高,为此,本发明还提供了检测卡的制备方法。其包括盒壳及封装在盒壳内的测试纸、滴管和金标微孔。测试纸包括底层的支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的硝酸纤维素膜上有孔雀石绿-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,金标微孔内放置有特制的胶体金颗粒。本发明通过将待检测样品先与金标微孔融合,在滴入注样孔内,使得待检测样品与溶剂的反应更充分,使其检测更为精确。



1. 一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

(1) 孔雀石绿测试用测试纸的制备:包括底层的支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的硝酸纤维素膜上有孔雀石绿一载体蛋白偶联物溶液印制的1mm检测线(T线)和羊抗鼠IgG溶液印制的1mm质控线(C线),检测线的浓度为0.95mg/ml,质控线的浓度为0.32mg/ml,再用封闭剂(5%BSA和0.5%酪蛋白的溶液)封闭硝酸纤维素膜;

(2) 所得孔雀石绿测试用测试纸包封在开有注样孔和观测孔的盒壳体内,所述注样孔与所述测试纸的样品垫位置相对应,所述观测孔与所述测试纸的硝酸纤维素膜位置相对应;

(3) 所述胶体金的制备,将洗净的玻璃容器中加入超纯水,加热煮沸,保持一定的搅拌速度,加入2.5ml 0.01%的氯金酸溶液,同时迅速加入1%柠檬酸钠水溶液5ml,保持反应温度和搅拌转速不变,待溶液颜色刚刚变为清亮橘、红色后保持沸腾10min,放凉后定容至1L,获得的胶体金平均粒径为10.7nm;

(4) 金标微孔的制备,取1ml的胶体金,加入12 $\mu$ l pH调剂(0.1M碳酸钾溶液加入1M盐酸调节pH值至 $10\pm 0.2$ ),震荡混匀,将pH调至 $8.2\pm 0.1$ ;加入5 $\mu$ l的孔雀石绿抗体,震荡混匀,滴加在硝酸纤维素膜(C线:0.3mg/ml;T线:0.3mg/ml)后反应,2分钟显色,当C线和T线显色一致,则在混悬仪上缓慢震荡20分钟;加入60 $\mu$ l封闭剂(5%BSA和0.5%酪蛋白的溶液),震荡混匀,在混悬仪上,缓慢震荡10分钟;4 $^{\circ}$ C下6000rpm离心12分钟,弃上清;加入600 $\mu$ l的胶体金专用重悬液TY(1%PEG2000+5%蔗糖+3%海藻糖+10%BSA),滴加在硝酸纤维素膜(C线:0.3mg/ml;T线:0.3mg/ml)后反应,2分钟显色T线大于C线;取40 $\mu$ l的上述液体,加入到XRI酶标板中(深圳金灿华实业有限公司),在相对湿度低于30%的房间内,烘干12小时以上,用3X4自封袋保存。

2. 如权利要求1所述的孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡的制备方法,其特征在于:所述孔雀石绿一载体蛋白偶联物溶液批号为MGKY1610A;初始浓度为9mg/ml;用含4%甲醇的20mMPBS溶液配制。

3. 如权利要求1所述的孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡的制备方法,其特征在于:所述羊抗鼠IgG溶液为克隆号为0A05;初始浓度为8mg/ml;用含4%甲醇的20mMPBS溶液配制。

4. 如权利要求1所述的孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡的制备方法,其特征在于:所述硝酸纤维素膜的孔径型号为140。

5. 如权利要求1所述的孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡的制备方法,其特征在于:所用孔雀石绿抗体克隆号为9D73;初始浓度为10mg/ml;用10mMPBS稀释成1 $\mu$ g/ml使用。

6. 一种如权利要求1所述的孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡的制备方法所用的快速检测卡,其特征在于:包括盒壳及设置在盒壳体内的测试纸、金标微孔和滴管。

## 一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及水产类肉食品中药物的快速诊断用器具及其制备方法,属于生物技术领域,具体涉及一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 孔雀石绿是人工合成的有机化合物,孔雀石绿是一种带有金属光泽的绿色晶体,既是杀真菌剂又是染料,常被用作水产品的杀菌剂。孔雀石绿是一种高毒性的三苯甲烷类致畸、致癌、致突变物体,研究表明,孔雀石绿在鱼内会快速代谢成脂溶性的无色孔雀石绿(隐性孔雀石绿),具有高残留和高毒性。我国在农业行业标准《NY5071-2002无公害食品渔用药使用准则》中,也将孔雀石绿列为禁止添加药物。

[0003] 目前,国内外孔雀石绿的检测方法主要有,GC-MS检测法、ELISA试剂盒、仪器设备和胶体金免疫层析检测。其中,GC-MS检测法和ELISA试剂盒检测周期长,成本高。仪器设备配套成本高,检测灵敏度不够。而胶体金免疫层析检测,成本低,适用于现场检测,而且灵敏度高。

[0004] 市面上的孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡存在灵敏度不高、抗干扰能力弱、前处理复杂、耗费时间长等技术问题。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的不足,本发明的目的旨在提出一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡及其制备方法,该检测卡检测快速、准确、明显、灵敏度高,为此,本发明还提供了该检测卡的制备方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下之技术方案:

[0007] 一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡及其制备方法,其包括以下步骤:

[0008] (1) 孔雀石绿测试用测试纸的制备:包括底层的支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的硝酸纤维素膜上有孔雀石绿一载体蛋白偶联物溶液印制的1mm检测线(T线)和羊抗鼠IgG溶液印制的1mm质控线(C线),检测线的浓度为0.95mg/ml,质控线的浓度为0.32mg/ml,再用封闭剂(5%BSA和0.5%酪蛋白的溶液)封闭硝酸纤维素膜;

[0009] (2) 所得孔雀石绿测试用测试纸包封在开有注样孔和观测孔的盒壳体内,所述注样孔与所述测试纸的样品垫位置相对应,所述观测孔与所述测试纸的硝酸纤维素膜位置相对应;

[0010] (3) 所述胶体金的制备,将洗净的玻璃容器中加入超纯水,加热煮沸,保持一定的搅拌速度,加入2.5ml 0.01%的氯金酸溶液,同时迅速加入1%柠檬酸钠水溶液5ml,保持反应温度和搅拌转速不变,待溶液颜色刚刚变为清亮橘、红色后保持沸腾10min,放凉后定容至1L,获得的胶体金平均粒径为10.7nm;

[0011] (4) 金标微孔的制备,取1ml的胶体金,加入12 $\mu$ l pH调剂(0.1M碳酸钾溶液加入1M

盐酸调节pH值至 $10 \pm 0.2$ ),震荡混匀,将pH调至 $8.2 \pm 0.1$ ;加入 $5\mu\text{l}$ 的孔雀石绿抗体,震荡混匀,滴加在硝酸纤维素膜(C线: $0.3\text{mg/ml}$ ;T线: $0.3\text{mg/ml}$ )后反应,2分钟显色,当C线和T线显色一致,则在混悬仪上缓慢震荡20分钟;加入 $60\mu\text{l}$ 封闭剂(5%BSA和0.5%酪蛋白的溶液),震荡混匀,在混悬仪上,缓慢震荡10分钟; $4^\circ\text{C}$ 下6000rpm离心12分钟,弃上清;加入 $600\mu\text{l}$ 的胶体金专用重悬液TY(1%PEG2000+5%蔗糖+3%海藻糖+10%BSA),滴加在硝酸纤维素膜(C线: $0.3\text{mg/ml}$ ;T线: $0.3\text{mg/ml}$ )后反应,2分钟显色T线大于C线;取 $40\mu\text{l}$ 的上述液体,加入到XRI酶标板中(深圳金灿华实业有限公司),在相对湿度低于30%的房间内,烘干12小时以上,用3X4自封袋保存。

[0012] 采用上述方法制备而成的快速检测卡包括盒壳及设置在盒壳体内的测试纸、金标微孔和滴管。在使用过程中先需要对检测样本进行前处理,其处理步骤如下:

[0013] 取 $3\text{g} \pm 0.1\text{g}$ 切碎的去脂肪水产品组织样本,用均质机匀碎,(虾要去掉头和壳后彻底清洗干净,鱼要去鳞后清洗干净)。加入到20ml离心管中;向上述20ml离心管中依次加入酸性提取剂溶液4ml,乙腈4ml,盖上盖子剧烈振荡3min,然后再加入1瓶固体提取剂,盖上盖子剧烈振荡3min后,室温下4000r/min离心10min。移取1.5ml上清液于5ml离心管中,加入 $100\mu\text{l}$ 氧化剂(0.1%四氯苯醌,用乙腈溶解),颠倒混匀1min, $65^\circ\text{C}$ 下,利用氮吹仪或吹风机吹干。(若管底剩余少于100微升吹不干液体为正常现象,可直接复溶使用,不影响检测结果),向吹干的离心管中加入0.3mlMG专用复溶液,复溶离心管底及内壁固体残留物,静置2min,吸取 $120\mu\text{l}$ (约4-5滴)溶液,待检。先用滴管吸取上述待检溶液,并将该溶液先注入金标微孔所在的容器内,使得待检溶液先与金标微孔内物质接触,使得两者之间能够充分接触,然后再使用滴管将反应后的溶液汲取滴入盒壳的注样孔内,与测试纸反应。其中,所述的酸性提取剂的1L配方:10.32g对甲苯磺酸,0.4g乙酸铵,用2M氢氧化钠调节pH至 $4.5 \pm 0.1$ ;所述固体提取剂由2g中性氧化铝+2g无水硫酸钠组成;所述MG专用复溶液的4L配方:13.05g十二水合磷酸氢二钠,1.33g二水合磷酸二氢钠,50g氯化钠,4g吐温-20,调节pH至 $7.3 \pm 0.2$ 。

[0014] 在上述所使用的测试纸中所使用的孔雀石绿-载体蛋白偶联物溶液批号为MGKY1610A;初始浓度为 $9\text{mg/ml}$ ;用含4%甲醇的20mMPBS溶液配制。所使用的羊抗鼠IgG溶液为克隆号为0A05;初始浓度为 $8\text{mg/ml}$ ;用含4%甲醇的20mMPBS溶液配制。所使用的硝酸纤维素膜的孔径型号为140。所用孔雀石绿抗体克隆号为9D73;初始浓度为 $10\text{mg/ml}$ 。

[0015] 由于上述技术方案运用,本发明与现有技术相比具有下列优点:

[0016] 采用本发明中的快速检测卡检测水产类肉食品中孔雀石绿的含量,检测时将待检测样品先与金标微孔融合,再滴入注样孔内,使得待检测样品与溶剂的反应更充分,使其检测更为精确。

## 附图说明

[0017] 图1为本发明的检测示意图。

[0018] 图2为本发明测试纸的结构示意图。

[0019] 图中:1.盒壳;11.注样孔;12.观测孔;2.测试纸;21.支撑层;22.样品垫;23.吸收垫;24.检测线;25.硝酸纤维素膜;26.质控线;3.滴管;4.金标微孔。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述：

[0021] 实施例：

[0022] 结合图1和图2所示：一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡，包括盒壳1及设置在盒壳1体内的测试纸2、金标微孔4和滴管3。在所述盒壳1上设有注样孔11和观测孔12，在观测孔12一侧印制有与质控线相适配的C和与检测线相适配的T。所述测试纸2包括底层的支撑层21，该支撑层21上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫22、硝酸纤维素膜25和吸收垫23，所述的硝酸纤维素膜25上有孔雀石绿一载体蛋白偶联物溶液印制的1mm检测线24 (T线) 和羊抗鼠IgG溶液印制的1mm质控线26 (C线)。其中检测线24的浓度为0.95mg/ml，质控线26的浓度为0.32mg/ml，再用封闭剂 (5% BSA和0.5% 酪蛋白的溶液) 封闭硝酸纤维素膜。所述注样孔11与所述测试纸2的样品垫22位置相对应，所述观测孔12与所述测试纸2的硝酸纤维素膜25位置相对应。并根据上述要求制成孔雀石绿测试用测试纸，所述测试纸中所使用的孔雀石绿一载体蛋白偶联物溶液批号为MGKY1610A；初始浓度为9g/ml；用含4% 甲醇的20mMPBS溶液配制。所使用的羊抗鼠IgG溶液为克隆号为0A05；初始浓度为8mg/ml；用含4% 甲醇的20mMPBS溶液配制。所使用的硝酸纤维素膜的孔径型号为140。所用孔雀石绿抗体克隆号为9D73；初始浓度为10mg/ml。

[0023] 在本实施例中，金标微孔单独设置在盒壳外部，其内放置的反应颗粒的制作工艺如下：

[0024] 1、先制作胶体金，将洗净的玻璃容器中加入超纯水，加热煮沸，保持一定的搅拌速度，加入2.5ml 0.01%的氯金酸溶液，同时迅速加入1% 柠檬酸钠水溶液5ml，保持反应温度和搅拌转速不变，待溶液颜色刚刚变为清亮橘、红色后保持沸腾10min，放凉后定容至1L，获得的胶体金平均粒径为10.7nm。

[0025] 2、取1ml上述制作完成的胶体金，加入12 $\mu$ l pH调剂 (0.1M碳酸钾溶液加入1M盐酸调节pH值至 $10\pm 0.2$ )，震荡混匀，将pH调至 $8.2\pm 0.1$ ；加入5 $\mu$ l的孔雀石绿抗体，震荡混匀，滴加在硝酸纤维素膜 (C线:0.3mg/ml；T线:0.3mg/ml) 后反应，2分钟显色，当C线和T线显色一致，则在混悬仪上缓慢震荡20分钟；加入60 $\mu$ l封闭剂 (5% BSA和0.5% 酪蛋白的溶液)，震荡混匀，在混悬仪上，缓慢震荡10分钟；4 $^{\circ}$ C下6000rpm离心12分钟，弃上清；加入600 $\mu$ l的胶体金专用重悬液TY (1% PEG2000+5% 蔗糖+3% 海藻糖+10% BSA)，滴加在硝酸纤维素膜 (C线:0.3mg/ml；T线:0.3mg/ml) 后反应，2分钟显色T线大于C线；取40 $\mu$ l的上述液体，加入到XRI酶标板中 (深圳金灿华实业有限公司)，在相对湿度低于30%的房内，烘干12小时以上，用3X4自封袋保存。注：PEG2000：聚乙二醇-2000；BSA：牛血清白蛋白。

[0026] 在使用该快速检测卡进行检测时，先需要对检测样本 (水产组织) 进行前处理，该前处理的步骤：

[0027] 1. 取 $3g\pm 0.1g$ 切碎的去脂肪水产品组织样本，用均质机匀碎，(虾要去掉头和壳后彻底清洗干净，鱼要去鳞后清洗干净)。

[0028] 2. 加入到20ml离心管中；向上述20ml离心管中依次加入酸性提取剂溶液4ml，乙腈4ml，盖上盖子剧烈振荡3min，然后再加入1瓶固体提取剂，盖上盖子剧烈振荡3min后，室温下4000r/min离心10min。其中：所述的酸性提取剂的1L配方：10.32g对甲苯磺酸，0.4g乙酸

铵,用2M氢氧化钠调节pH至 $4.5 \pm 0.1$ ;所述固体提取剂由2g中性氧化铝+2g无水硫酸钠组成。

[0029] 3.移取1.5ml上清液于5ml离心管中,加入100 $\mu$ l氧化剂(0.1%四氯苯醌,用乙腈溶解),颠倒混匀1min,65 $^{\circ}$ C下,利用氮吹仪或吹风机吹干。(若管底剩余少于100微升吹不干液体为正常现象,可直接复溶使用,不影响检测结果),向吹干的离心管中加入0.3mlMG专用复溶液,复溶离心管底及内壁固体残留物,静置2min,吸取120 $\mu$ l(约4-5滴)溶液,待检。其中:所述MG专用复溶液的4L配方:13.05g十二水合磷酸氢二钠,1.33g二水合磷酸二氢钠,50g氯化钠,4g吐温-20,调节pH至 $7.3 \pm 0.2$ 。

[0030] 通过上述处理后的检测样本,先用滴管汲取生成的待检溶液,并将该溶液先注入金标微孔所在的容器内,使得待检溶液先与金标微孔内物质接触,使得两者之间能够充分接触,然后再使用滴管将反应后的溶液汲取滴入盒壳的注样孔内,与测试纸反应。测试纸上的硝酸纤维素膜能够更快速的与溶液进行接触,方便质控线和检测线与溶液进行接触,从而使得该快速检测卡的检测效率及精确度提高。

[0031] 以上仅就本发明的最佳实施例作了说明,但不能理解为是对权利要求的限制。本发明不仅限于以上实施例,凡在本发明独立权利要求的保护范围内所作的各种变化均在本发明的保护范围内。

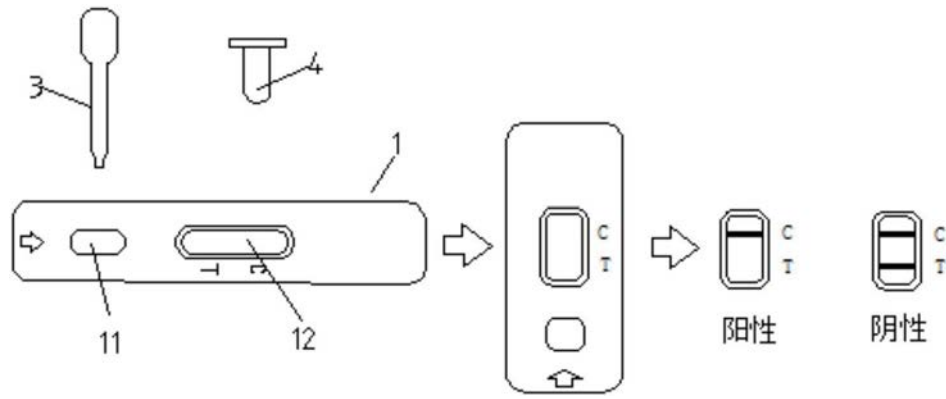


图1

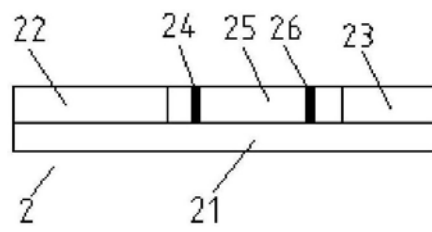


图2

专利名称(译)	一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107064496A</a>	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN201710414945.1	申请日	2017-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	苏州快捷康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州快捷康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州快捷康生物技术有限公司		
[标]发明人	盛相国		
发明人	盛相国		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	谈杰		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测卡，该检测卡检测快速、准确、灵敏度高，为此，本发明还提供了检测卡的制备方法。其包括盒壳及封装在盒壳内的测试纸、滴管和金标微孔。测试纸包括底层的支撑层，该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述的硝酸纤维素膜上有孔雀石绿 - 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，金标微孔内放置有特制的胶体金颗粒。本发明通过将待检测样品先与金标微孔融合，在滴入注样孔内，使得待检测样品与溶剂的反应更充分，使其检测更为精确。

