

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 33/532 G01N 33/64

A61K 39/395



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310109463.3

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1547014A

[22] 申请日 2003.12.16

[21] 申请号 200310109463.3

[71] 申请人 博顿生物检验技术(杭州)有限公司

地址 311215 浙江省杭州市萧山经济技术开发区建设四路

[72] 发明人 张少恩

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 杜 军

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法

[57] 摘要

检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法, 该试剂包括样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬, PVC 背衬一端依次粘附样品垫、胶体金结合垫, 中间粘附硝酸纤维素膜, 另一端粘附吸水垫, 其特征在于胶体金结合垫上包被了抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物, 硝酸纤维素膜上包被了玉米赤霉酮—BSA 偶联物和羊(兔)抗鼠 IgG。该试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测, 全过程只需 30 分钟, 操作人员无需专业培训, 按说明书即可完成操作。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法，该试剂包括样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、胶体金结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫，其特征在于胶体金结合垫上包被了抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物，硝酸纤维素膜上包被了玉米赤霉酮-BSA偶联物和羊（兔）抗鼠IgG。

2、根据权利要求1所述的检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法，其特征在于该试剂的制备方法包括以下步骤：（1）制备玉米赤霉酮-BSA偶联物：将玉米赤霉酮与BSA按1：5～50（mol/mol）比例混匀，使玉米赤霉酮与BSA形成稳定的颗粒，通过纯化形成玉米赤霉酮—BSA偶联物；（2）制备抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体：用玉米赤霉酮-BSA偶联物多次免疫Balb/c纯系小鼠，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞，经选择性培养基筛选可得阳性杂交瘤细胞株。通过将杂交瘤注入小鼠腹腔获取腹水或体外细胞培养收集培养上清液等方式，大量制备抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体；（3）制备羊（兔）抗鼠IgG：用玉米赤霉酮-BSA多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊或家兔，纯化后得羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG。（4）制备胶体金：用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成20nm～40nm的胶体金颗粒；（5）制备单克隆抗体胶体金标记：将胶体金与抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体按1：0.005～0.015（ml/mg）比例混匀，使胶体金与抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体形成稳定的胶体颗粒，通过纯化、浓缩形成抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物；（6）将抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将玉米赤霉酮-BSA偶联物和羊（兔）抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区，充分干燥。

检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测抗体的免疫胶体金试剂，还涉及该试剂的制备方法。

背景技术

现有用于检测玉米赤霉酮的方法主要有酶联免疫吸附（EIA）、放射免疫试验（RIA）、免疫亲和色谱（IAC）、气/质联用分析法。酶联免疫吸附（EIA）方法的缺陷是：需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用；检测操作人员需要经过专业培训；操作过程相对比较复杂，检测所需时间比较长；检测所需费用较高，不能实现单人份检测。放射免疫试验的缺陷是：需要专业的仪器设备辅助，且设备昂贵；操作人员需要经过专业培训；操作过程复杂，要求高；试剂需要低温保存；由于试验涉及到放射性同位素，试验不是很安全，所以很少采用；检测费用较高；检测所需时间长。免疫亲和色谱（IAC）的缺陷是：需要制备专门的免疫亲和色谱柱；操作人员需要经过专业培训；操作过程复杂，要求高；检测费用高；检测所需时间长；主要用于样品处理，在残留分析中的应用和研究尚处于探索阶段。气/质联用分析法的缺陷是：需要专业的仪器设备辅助，且设备昂贵；样品的预处理程序繁琐，要求高；对操作时使用的水及各种溶剂有着严格的要求；操作过程复杂，时间长；需要经过专业培训的技术人员操作，操作人员要有丰富的相关经验；操作人员必须了解影响色谱分析的各种干扰因素，了解所使用的预处理方法的优缺点，才能获得可靠的分析结果；需要昂贵的仪器设备辅助，难以在城市及中小企业中普及；仪器保养的要求高，保养的好坏直接影响分析结果的准确性；检测费用高。

发明内容

本发明的目的是为了克服当前技术在推广使用中存在的缺陷，提

供一种不需要特定仪器设备辅助的检测试剂,并且能有效地降低检测成本,减轻需检测单位的负担。同时提供该试剂的制备方法。

检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法,该试剂包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬,PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫,中间粘附硝酸纤维素膜,另一端粘附吸水垫。结合垫上包被了抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物。硝酸纤维素膜上包被了玉米赤霉酮-BSA偶联物和羊(兔)抗鼠IgG。

该试剂的制备方法包括以下步骤:(1)制备玉米赤霉酮-BSA偶联物:将玉米赤霉酮与BSA按1:5~50(mol/mol)比例混匀,使玉米赤霉酮与BSA形成稳定的颗粒,通过纯化形成玉米赤霉酮—BSA偶联物;(2)制备抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体:用玉米赤霉酮-BSA偶联物多次免疫Balb/c纯系小鼠,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞,经选择性培养基筛选可得阳性杂交瘤细胞株。通过将杂交瘤注入小鼠腹腔获取腹水或体外细胞培养收集培养上清液等方式,大量制备抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体;(3)制备羊(兔)抗鼠IgG:用玉米赤霉酮-BSA多次免疫小鼠,提取抗血清免疫山羊或家兔,纯化后得羊抗鼠IgG或兔抗鼠IgG。(4)制备胶体金:用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成20nm~40nm的胶体金颗粒;(5)制备单克隆抗体胶体金标记:将胶体金与抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体按1:0.005~0.015(ml/mg)比例混匀,使胶体金与抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体形成稳定的胶体颗粒,通过纯化、浓缩形成抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物;(6)将抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物包被在胶体金结合垫上,将玉米赤霉酮-BSA偶联物和羊(兔)抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区,充分干燥。

本发明的积极效果在于:价格低廉,生产流程简单,成本低,检测的费用比使用其它检测方法都要便宜得多;检测速度快,全过程只需15-30分钟,可以实现自我检测;可以现场检测;特异性好、灵敏

度高、重复性好；操作简便，快速定性，结果准确、快速，操作简便，无需冲洗过程和标准对照，可分批或单个样品及时检测；易于推广使用，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

具体实施方式

将 PVC 背衬一端依次粘附样品垫、胶体金结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫。胶体金结合垫上包被了抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物。硝酸纤维素膜上包被了玉米赤霉酮-BSA 偶联物和羊（兔）抗鼠 IgG。

按以下步骤制备：（1）制备玉米赤霉酮-BSA 偶联物：将玉米赤霉酮与 BSA 按 1：5~50（mol/mol）比例混匀，使玉米赤霉酮与 BSA 形成稳定的颗粒，通过纯化形成玉米赤霉酮—BSA 偶联物；（2）制备抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体：用玉米赤霉酮-BSA 偶联物多次免疫 Balb/c 纯系小鼠，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞，经选择性培养基筛选可得阳性杂交瘤细胞株。通过将杂交瘤注入小鼠腹腔获取腹水或体外细胞培养收集培养上清液等方式，大量制备抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体；（3）制备羊（兔）抗鼠 IgG：用玉米赤霉酮-BSA 多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊或家兔，纯化后得羊抗鼠 IgG 或兔抗鼠 IgG。（4）制备胶体金：将 100ml 0.01%氯化金用 0.9ml 1%柠檬酸三钠还原成 40nm 大小的颗粒；（5）制备单克隆抗体胶体金标记：用 0.1mol /L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.1 左右，将胶体金溶液与单克隆抗体按 100ml 胶体金溶液中加入 1mg 单克隆抗体的比例混合均匀，使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物，再通过多次离心、弃上清、清洗，通过纯化、浓缩形成抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物，冷藏备用；（6）用 Biodot 点膜机将抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将玉米赤霉酮-BSA 偶联物和羊（兔）抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区，充分干燥。（7）将硝酸纤维素膜、胶

体金结合垫、样品垫、吸水垫等依次粘在 PVC 背衬上；（8）将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试剂条，即制成检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂。

在检测前先将样本和试剂条(板)放在室温条件下放置一段时间（约 10 分钟），使其恢复至室温；从铝箔袋中取出检测试剂条，按 MARK 线下箭头所示的方向将试剂条浸入样本溶液中，液面不得超过 MARK 线，5 秒-8 秒后取出，平放在操作台上；如果是试剂板：从铝箔袋中取出检测试剂板，平放在操作台上，往加样孔中滴加 3 滴（约 120ul）样品溶液；3 分钟-15 分钟内即可判断结果，30 分钟后判断的结果为无效。结果判断：如果样品中有要检测的“玉米赤霉酮”存在，则检测线处不出现条带，而质控线上出现红色条带，此时结果为阳性；如果样品中没有要检测的“玉米赤霉酮”存在，则检测线处有红色条带出现，同时质控线上也出现红色条带，此时结果为阴性。如果质控线上没有红色条带出现，则该产品无效。

专利名称(译)	检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN1547014A	公开(公告)日	2004-11-17
申请号	CN200310109463.3	申请日	2003-12-16
[标]发明人	张少恩		
发明人	张少恩		
IPC分类号	A61K39/395 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/64		
代理人(译)	杜军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测玉米赤霉酮的免疫胶体金试剂及制备方法，该试剂包括样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、胶体金结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫，其特征在于胶体金结合垫上包被了抗玉米赤霉酮特异性单克隆抗体—胶体金标记物，硝酸纤维素膜上包被了玉米赤霉酮 - BSA偶联物和羊(兔)抗鼠IgG。该试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测，全过程只需30分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。