



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103698524 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310744221. 5

(22) 申请日 2013. 12. 19

(71) 申请人 杭州南开日新生物技术有限公司  
地址 310051 浙江省杭州市滨江区滨文路  
95 号活水工业园 6 幢 4 楼杭州南开日  
新生物技术有限公司

(72) 发明人 吴光红 张美琴 王扬 王伟萍  
邵伟 陈笑笑 胡叶军 刘敏

(51) Int. Cl.  
G01N 33/577 (2006. 01)  
G01N 33/531 (2006. 01)

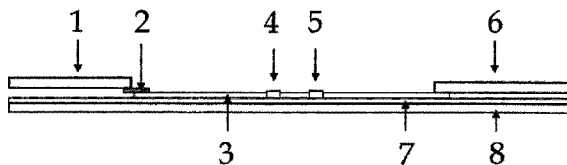
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板及其制备方法,可用于检测水产品 and 水中是否含有五氯酚钠残留。本发明试剂板由上下两块塑料壳和置于内部的试纸条组成。试纸条由背衬及背衬上依次黏贴着的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫组成,相邻各部分间有 1~2mm 的重叠。金标结合垫上包被有胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体。硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有五氯酚钠-OVA 和羊抗鼠 IgG, 分别作为检测线和质控线, 可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板操作过程仅需 5min 左右, 且无需任何昂贵实验设备辅助, 利于大规模样本筛选, 适合水产养殖及检验检疫机构的检测需求。



1. 一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试纸板,其特征就在于所述试纸板由上下两块塑料壳和置于内部的试纸条组成,所述试纸条由背衬及背衬上依次黏贴着的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述金标结合垫上包被有胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次包被有五氯酚钠-卵清蛋白偶联物(五氯酚钠-OVA)和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和质控线,所述检测线与质控线间隔 0.6cm。

2. 如权利要求 1 所述的试纸板的制备方法,其特征就在于,包括如下步骤:

(1) 五氯酚钠-载体蛋白偶联物的制备:将五氯酚钠与载体蛋白牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)分别进行偶联,制备免疫抗原五氯酚钠-BSA 和包被抗原五氯酚钠-OVA;

(2) 抗五氯酚钠单克隆抗体的制备:按照常规方法使用免疫抗原五氯酚钠-BSA 免疫制得抗五氯酚钠单克隆抗体;

(3) 使用柠檬酸三钠法制备平均粒径为 30nm 的胶体金;

(4) 胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体的制备:标记前将抗五氯酚钠单克隆抗体溶液置于氯化钠溶液中透析除盐,取已制备好的胶体金溶液 100mL,边搅拌边加入抗五氯酚钠单克隆抗体,使终浓度为  $7.9 \mu\text{g/mL}$ ,  $25^\circ\text{C}$  室温下孵育 15min;再用  $0.1\text{mol/L}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节胶体金溶液的 PH 为 7.4,加入 10% 的 BSA 使其终浓度为 0.14%; $20000\text{r/min}$  离心 10min,弃上清液;加入  $10\text{mL}$   $0.002\text{mol/L}$  pH8.0 的 PBS 缓冲液(含 1% BSA), $20000\text{r/min}$  离心 20min,弃上清液,如此洗涤 2~4 次,以彻底除去未结合的蛋白质;将沉淀用  $10\text{mL}$  含 1% BSA 的 PBS 缓冲液(pH7.4,  $0.002\text{mol/L}$ ) 溶解;用  $0.22 \mu\text{m}$  无菌过滤器过滤后,  $4^\circ\text{C}$  保存备用;

(5) 金标结合垫的预处理和包被

将玻璃纤维膜用金标结合垫处理液浸泡 30min,取出后用滚筒轻压以除去多余水分,置于  $37^\circ\text{C}$  的干燥箱或烘房中 16h 后,放置环境温度为室温,湿度低于 40% 的房间内备用;

金标结合垫处理液制备方法:称取 5g PVA、7.1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、5g BSA、1mL TritonX-100,加 1L  $\text{H}_2\text{O}$  溶解,调节 PH 为 7.6;

使用点膜仪将制备好的胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体包被到预处理后的金标结合垫上,包被量  $1.5 \sim 2.0 \mu\text{L/cm}$ ,置于  $37^\circ\text{C}$  烘箱干燥 8h;

(6) 硝酸纤维素膜的包被:用  $0.01\text{mol/L}$  PH7.4、含 4% 海藻糖和 2% NaCl 的 PBS 缓冲液将五氯酚钠-OVA 和羊抗鼠 IgG 分别稀释到  $0.5 \sim 1.5 \mu\text{g/L}$  和  $1.0 \sim 2.0 \mu\text{g/L}$ ;使用点膜仪将稀释后的五氯酚钠-OVA 包被到  $25\text{mm} \times 300\text{mm}$  硝酸纤维素膜上作为检测线,包被量为  $0.8 \sim 1.2 \mu\text{L/cm}$ ;在距检测线 0.6cm 处,将稀释后的羊抗鼠 IgG 包被到硝酸纤维素膜上作为质控线,包被量为  $0.8 \sim 1.2 \mu\text{L/cm}$ ;检测线和质控线两者平行;置于  $37^\circ\text{C}$  烘箱干燥 8h;

(7) 试剂板的组装:将样品垫和吸水垫切割成  $18\text{mm} \times 300\text{mm}$ ,将金标结合垫切割成  $8\text{mm} \times 300\text{mm}$ ;将切割好的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘于背衬上,相邻各部分有 1~2mm 的重叠,组成  $60\text{mm} \times 300\text{mm}$  的大卡;使用切割机将大卡切成  $3.84\text{mm} \times 60\text{mm}$  的试纸条,装入塑料壳中组成试纸板。

## 一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫胶体金检测领域,具体涉及一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 五氯酚钠 (PCP-Na) 在渔业生产上曾作为清塘药物广泛用于杀灭小型野、杂鱼以及藻类、螺类、细菌和霉菌等。五氯酚钠属于有机氯农药,难于降解,在我国长江中下游 11 个省、市、自治区被大范围、长时间地用于杀灭钉螺,对环境造成了持久污染。五氯酚钠具有较高的水溶性,易以水为载体广泛扩散,从而影响生态安全和鱼类食品安全。五氯酚钠在人和动物体内会分解成五氯酚,而五氯酚具有强大的解偶联作用,可引起急性或慢性中毒,会出现乏力、头昏、恶心、呕吐、腹泻等症状,严重者可引发心动过速、血压下降、昏迷。国际癌症研究总局 (IARC) 已经将五氯酚归为 2B 类,即“可能的致癌物”。

[0003] 我国农业部农牧发 [2002]1 号通知中明确指出,在水生动物食品生产中严禁使用五氯酚钠。虽然我国 2002 年规定在水生动物生产中禁止使用五氯酚钠,但其残余效应将维持数年至数十年,且目前作为防治血吸虫病的灭钉螺药仍然在大量使用。2009 年农业部药物残留监督检查任务中,五氯苯酚及其钠盐已作为监控参数之一。为了解决当前水产品 and 水中五氯酚钠残留问题,保障人民的身体健康,开发一种灵敏度高、准确性好、特异性强、简便易行的水产品 and 水中五氯酚钠残留的检测方法十分必要。

[0004] 目前,五氯酚钠检测方法主要有分光光度法 (AAS)、薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法 (GC)、气质联用法 (GC/MS) 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 等。

[0005] 分光光度法虽然不需昂贵的仪器与试剂,样品处理操作简单,但其测定结果准确度较低。

[0006] 薄层色谱法的优点在于所用的试剂、设备简单,费用低廉,容易掌握,适用大量样品的分离、筛选,一般的实验室均可开展,属于定性和半定量的精度。但该方法灵敏度低、重现差、操作烦琐、时间长且安全性差,已越来越不适用现代分析的要求。

[0007] 液相色谱法、气相色谱法及其联用技术等方法检测五氯酚钠是一种灵敏度高、重复性好、可靠性强的方法,较其他方法来讲准确率高,也是我国现行标准中使用的方法之一。但这些方法都需配备价格昂贵的设备,对操作人员技术要求高、前处理烦琐,在基层大规模筛选工作中很难有应用价值。

[0008] 酶联免疫吸附法是目前使用较普遍的方法,该法操作简便、灵敏度高、特异性强、样品预处理简单,可以批量检测,分析成本低,是目前较理想的残留筛选分析方法之一,目前已有商品化的酶联免疫试剂盒供应,但是 ELISA 法中酶的活性易受反应条件影响,由此易造成测定结果重复性较差,而且 ELISA 试剂寿命短,需要低温保藏。

[0009] 免疫胶体金快速检测法是二十世纪九十年代新兴的一种新型免疫学检测技术。其反应所需要的原料的全部或大部分均已整合到试剂中,当待测样品加入到样品膜上后,由于微孔滤膜的毛细管作用,使抗原抗体反应在固相膜上快速进行,整个检测过程仅需 5 ~

10min, 滴样后可用肉眼直接判断, 无需特殊仪器设备辅助。与酶联免疫吸附法相比, 免疫胶体金快速检测法在样品处理和检测步骤上都更简便、快速、方便。

### 发明内容

[0010] 本发明的目的是解决现有的检测技术存在的不足, 旨在开发一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板, 用于水产品 and 水中五氯酚钠残留物的检测, 本发明操作简便快捷, 灵敏度高, 特异性好, 实验结果肉眼可直观判断, 无需配备仪器设备, 5 ~ 10min 即可完成对五氯酚钠的测定。

[0011] 本发明的另一目的是提供该试剂板的制备方法。

[0012] 本发明的再一目的是提供该试剂板的应用。

[0013] 所述试剂板应用层析式抗体免疫竞争原理, 通过抗原和胶体金标记的抗单克隆抗体反应显色, 特异性检测水产品 and 水中五氯酚钠的残留水平。如果样品溶液含有五氯酚钠残留, 五氯酚钠先和胶体金标记的抗单克隆抗体反应, 然后当胶体金颗粒随样品溶液扩散至检测线时, 胶体金标记的抗单克隆抗体的活性位点因被样品溶液中的五氯酚钠占据而无法与检测线上抗原结合; 当样品中的五氯酚钠含量超过试剂板检出限时, 从试剂板的观察窗中看到检测线显色较质控线浅或无显色时, 判定为阳性。反之, 当样品中五氯酚钠含量在试剂板检出限以下或无残留时, 从试剂板的观察窗中看到检测线显色与质控线一样深或偏深, 判定为阴性。

[0014] 所述试剂板由上下两块塑料壳和置于内部的试纸条组成。试纸条由背衬及背衬上依次黏贴着的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成。样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫相邻的地方有 1 ~ 2mm 的重叠, 样品垫经过盐离子缓冲液及活性剂的浸泡干燥后, 上面附着有盐离子及活性剂等物质。金标结合垫上包被有胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体。硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向上依次包被有五氯酚钠 - 卵清蛋白偶联物 (五氯酚钠 -OVA) 和羊抗鼠 IgG, 分别作为检测线和质控线, 检测线与质控线间隔 0.6cm。

[0015] 所述试剂板的各部分组成成分及功能:

[0016] 塑料壳, 位于上方的塑料壳设有加样孔和观察窗, 下方的塑料壳内部固定着试纸条, 上下两块塑料壳可以紧密嵌合, 起固定和保护试纸条不受污染的作用。其中加样孔对应着试纸条的样品垫, 观察窗对应着试纸条的硝酸纤维素膜, 且观察窗旁标示有 C 和 T 分别表示质控区和检测区, 从观察窗中可以观看硝酸纤维素膜上检测线和质控线的显色反应。

[0017] 背衬, 是一面涂有不干胶的聚氯乙烯材料, 起固定支撑试纸条其他组成部分的作用。

[0018] 样品垫, 由玻璃纤维膜制成, 起吸收样品溶液和缓冲样品溶液 pH 值的作用。

[0019] 金标结合垫, 由玻璃纤维膜制成, 为样品溶液中五氯酚钠和胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体的反应提供场所。

[0020] 硝酸纤维素膜, 从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线, 将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0021] 吸水垫, 由滤纸制成, 吸收反应过程中多余的溶液。

[0022] 所述试剂板的制备方法, 包括如下步骤:

[0023] (1) 五氯酚钠-载体蛋白偶联物的制备:将五氯酚钠与载体蛋白牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)分别进行偶联,制备免疫抗原五氯酚钠-BSA和包被抗原五氯酚钠-OVA;

[0024] (2) 抗五氯酚钠单克隆抗体的制备:按照常规方法使用免疫抗原五氯酚钠-BSA免疫制得抗五氯酚钠单克隆抗体;

[0025] (3) 使用柠檬酸三钠法制备平均粒径为30nm的胶体金;

[0026] (4) 胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体的制备:标记前将抗五氯酚钠单克隆抗体溶液置于氯化钠溶液中透析除盐,取已制备好的胶体金溶液100mL,边搅拌边加入抗五氯酚钠单克隆抗体,使终浓度为 $7.9\mu\text{g/mL}$ , $25^{\circ}\text{C}$ 室温下孵育15min;再用 $0.1\text{mol/L}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调节胶体金溶液的PH为7.4,加入10%的BSA使其终浓度为0.14%; $20000\text{r/min}$ 离心10min,弃上清液;加入10mL $0.002\text{mol/L}$  pH8.0的PBS缓冲液(含1%BSA), $20000\text{r/min}$ 离心20min,弃上清液,如此洗涤2~4次,以彻底除去未结合的蛋白质;将沉淀用10mL含1%BSA的PBS缓冲液(pH7.4, $0.002\text{mol/L}$ )溶解;用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤后, $4^{\circ}\text{C}$ 保存备用;

[0027] (5) 金标结合垫的预处理和包被

[0028] 将玻璃纤维膜用金标结合垫处理液浸泡30min,取出后用滚筒轻压以除去多余水分,置于 $37^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱或烘房中16h后,放置环境温度为室温,湿度低于40%的房间内备用;

[0029] 金标结合垫处理液制备方法:称取5g PVA、7.1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、5g BSA、1mL TritonX-100,加1L  $\text{H}_2\text{O}$ 溶解,调节PH为7.6;

[0030] 使用点膜仪将制备好的胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体包被到预处理后的金标结合垫上,包被量 $1.5\sim 2.0\mu\text{L/cm}$ ,置于 $37^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥8h;

[0031] (6) 硝酸纤维素膜的包被:用 $0.01\text{mol/L}$  PH7.4、含4%海藻糖和2%NaCl的PBS缓冲液将五氯酚钠-OVA和羊抗鼠IgG分别稀释到 $0.5\sim 1.5\mu\text{g/L}$ 和 $1.0\sim 2.0\mu\text{g/L}$ ;使用点膜仪将稀释后的五氯酚钠-OVA包被到 $25\text{mm}\times 300\text{mm}$ 硝酸纤维素膜上作为检测线,包被量为 $0.8\sim 1.2\mu\text{L/cm}$ ;在距检测线0.6cm处,将稀释后的羊抗鼠IgG包被到硝酸纤维素膜上作为质控线,包被量为 $0.8\sim 1.2\mu\text{L/cm}$ ;检测线和质控线两者平行;置于 $37^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥8h;

[0032] (7) 试剂板的组装:将样品垫和吸水垫切割成 $18\text{mm}\times 300\text{mm}$ ,将金标结合垫切割成 $8\text{mm}\times 300\text{mm}$ ;将切割好的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘于背衬上,相邻各部分有1~2mm的重叠,组成 $60\text{mm}\times 300\text{mm}$ 的大卡;使用切割机将大卡切成 $3.84\text{mm}\times 60\text{mm}$ 的试纸条,装入塑料壳中组成试剂板。

[0033] 所述试剂板的检测方法,包括:

[0034] (1) 样品前处理

[0035] 水:取 $200\mu\text{L}$ 五氯酚钠专用PBST缓冲液加入1.5mL离心管中,用滴管吸取 $100\mu\text{L}$ 待测水加入到离心管中,混合均匀,待检。

[0036] 水产品:切碎一定量的组织样品,用均质机均质,称取2.0g试样于5mL离心管中;加入4mL酸化乙腈,剧烈震荡5min后, $4000\text{r/min}$ 离心5min后静置分层,取上层溶液1mL到另一5mL离心管中, $65^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干;加入0.3mL正己烷,再加0.3mL复溶液于5mL离心管中,上下颠倒混匀,将混合液下层吸入1.5mL离心管中静置1min,加入0.4mL稀释液混匀,待检。

[0037] (2) 水平放置试剂板,用滴管吸取待检样品溶液 100  $\mu$  L 滴加到加样孔中,加样后开始计时,结果应在 3 ~ 5min 读取,其他时间判读无效。

[0038] (3) 结果判读:读取结果时,将试剂板水平放置于观察者正面。

[0039] 阴性(-):观察窗中 T 线显色比 C 线深或一样深,表示样品中五氯酚钠含量低于 10  $\mu$  g/kg 或不含五氯酚钠。

[0040] 阳性(+):观察窗中 T 线显色比 C 线浅或 T 线无显色,表示样品中五氯酚钠含量等于或高于 10  $\mu$  g/kg。

[0041] 无效:观察窗中未出现 C 线,可能是操作不当或试剂板已失效。应再次阅读说明书,并用新的试剂板重新测试。

[0042] 本发明具有如下有益效果:

[0043] (1) 特异性好、灵敏度高

[0044] 本发明试剂板与五氯酚钠的交叉反应率为 100%,与六氯苯酚的交叉反应率为 3.33%,与 2-氯苯酚的交叉反应率为 2.5%,与对硝基苯酚钠的交叉反应率为 2.86%,与多氯联苯的交叉反应率小于 1%。本发明试剂板的检出限可达 10  $\mu$  g/kg,完全满足水产养殖及检验检疫机构的检测需求。

[0045] (2) 操作简便、快速

[0046] 本发明试剂板将免疫层析反应所需的大部分原料整合到试剂板中,滴样后抗原抗体反应在固相膜上快速进行,3 ~ 5min 内即可读取结果,大大缩短了检样时间。本试剂板的操作人员不需任何专业培训,只需按照说明书进行样品前处理。

[0047] (3) 对实验设备的依赖性小

[0048] 本发明试剂板在检测水产品 and 水中五氯酚钠时,除在样品前处理过程中需要用到一些轻便的小型仪器外,其他过程均不需要使用仪器。滴样跑板后,通过肉眼观察硝酸纤维素膜上检测线和质控线的颜色深浅对比来判读结果,此优点使其便于野外及现场操作。

[0049] (4) 成本低,效益好

[0050] 本发明试剂板生产工艺简单,检测过程中需要的试剂价格低廉,既可检测单个样品,也适用于大批量样品检测,生产成本低,大大降低了检测费用。

## 附图说明

[0051] 图 1 为本发明试剂板中试纸条的侧面结构示意图。其中 1 为样品垫,2 为金标结合垫,3 为硝酸纤维素膜,4 为检测线(T 线),5 为质控线(C 线),6 为吸水垫,7 为不干胶,8 为背衬。

[0052] 图 2 为本发明试剂板操作示意图,其中 S 为加样孔,观察窗旁标示有 C 和 T,C 为质控区,T 为检测区。

[0053] 图 3 为本发明试剂板检测结果为阴性的示意图;图 4 为本发明试剂板检测结果为阳性的示意图;图 5 为本发明试剂板检测结果为无效的示意图,C 为质控区,T 为检测区。

[0054] 具体实施方式

[0055] 实施例 1

[0056] 一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板的制备方法

[0057] 1、五氯酚钠-载体蛋白偶联物的制备

[0058] 称取 65mg 0.2mmol/L 五氯苯氧乙酸和 24mg 0.2mmol/L N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)，溶于 2mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中。再称取 43mg 二环己基碳二亚胺 (DCC) 溶于 0.5mL DMF 中。将上述两种溶液混合室温搅拌 18h 后，离心。取上清液 1mL，逐滴滴入溶于 5mL PH7.4PBS 的 BSA (或 OVA)，4℃ 搅拌 4h。先用蒸馏水透析 2d，再用 0.9% 生理盐水透析 3d，离心后取上清液即为五氯酚钠 -BSA (或五氯酚钠 -OVA)，然后加入等量甘油置于 4℃ 下保存。

#### [0059] 2、抗五氯酚钠单克隆抗体的制备

[0060] 将五氯酚钠 -BSA 与等量的弗氏完全佐剂乳化，皮下注射免疫 6 周龄的 BALB/c 小鼠，每只 0.1mL；两周后，改用弗氏不完全佐剂再次免疫，同法，再进行第三次免疫。5d 后当效价达到 1 : 10000 以上时加强免疫：腹腔注射不加佐剂的抗原 0.1mL，3d 后取小鼠脾脏与骨髓瘤细胞融合，并筛选阳性杂交瘤细胞。通过对小鼠腹腔注射杂交瘤细胞制备大量小鼠腹水，并将制备的腹水纯化，得到抗五氯酚钠单克隆抗体。

#### [0061] 3、胶体金的制备

[0062] 胶体金的平均粒径为 30nm，其制备方法为在 100mL 去离子水中加入 1mL 1% 柠檬酸三钠，煮沸后迅速加入 1mL 1% 氯金酸，继续煮沸 10min，冷却后，4℃ 下保存备用。

#### [0063] 4、胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体的制备

[0064] 标记前将抗五氯酚钠单克隆抗体溶液置于氯化钠溶液中透析除盐，取已制备好的胶体金溶液 100mL，边搅拌边加入抗五氯酚钠单克隆抗体，使终浓度为 7.9 μg/mL，25℃ 室温下孵育 15min；再用 0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节胶体金溶液的 PH 为 7.4，加入 10% 的 BSA 使其终浓度为 0.14%；20000r/min 离心 10min，弃上清液；加入 10mL 0.002mol/L pH8.0 的 PBS 缓冲液 (含 1% BSA)，20000r/min 离心 20min，弃上清液，如此洗涤 2 ~ 4 次，以彻底除去未结合的蛋白质；将沉淀用 10mL 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液 (pH7.4, 0.002mol/L) 溶解；用 0.22 μm 无菌过滤器过滤后，4℃ 保存备用。

#### [0065] 5、金标结合垫的预处理和包被

[0066] 将玻璃纤维膜用金标结合垫处理液浸泡 30min，取出后用滚筒轻压以除去多余水分，置于 37℃ 的干燥箱或烘房中 16h 后，放置环境温度为室温，湿度低于 40% 的房间内备用；

[0067] 金标结合垫处理液制备方法：称取 5g PVA、7.1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、5g BSA、1mL TritonX-100，加 1L H<sub>2</sub>O 溶解，调节 PH 为 7.6；

[0068] 使用点膜仪将制备好的胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体包被到预处理后的金标结合垫上，包被量 1.5 ~ 2.0 μL/cm，置于 37℃ 烘箱干燥 8h；

#### [0069] 6、硝酸纤维素膜的包被

[0070] 用 0.01mol/L PH7.4、含 4% 海藻糖和 2% NaCl 的 PBS 缓冲液将五氯酚钠 -OVA 和羊抗鼠 IgG 分别稀释到 0.5 ~ 1.5 μg/L 和 1.0 ~ 2.0 μg/L；使用点膜仪将稀释后的五氯酚钠 -OVA 包被到 25mm × 300mm 硝酸纤维素膜上作为检测线，包被量为 0.8 ~ 1.2 μL/cm；在距检测线 0.6cm 处，将稀释后的羊抗鼠 IgG 包被到硝酸纤维素膜上作为质控线，包被量为 0.8 ~ 1.2 μL/cm；检测线和质控线两者平行；置于 37℃ 烘箱干燥 8h；

#### [0071] 7、试剂板的组装

[0072] 将样品垫和吸水垫切割成 18mm × 300mm，将金标结合垫切割成 8mm × 300mm；将切割好的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘于背衬上，相邻各部分有 1 ~ 2mm

的重叠,组成60mm×300mm的大卡;使用切割机将大卡切成3.84mm×60mm的试纸条,装入塑料壳中组成试剂板。

[0073] 实施例 2

[0074] 一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板的性能评价

[0075] 1、五氯酚钠免疫胶体金试剂板的检出限试验

[0076] 取阴性样品组织均浆添标至五氯酚钠浓度分别为 0、5、8、10、15、20、40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,按试剂板的检测方法进行样品处理及结果判读,每个浓度设 3 个重复,滴板检测并观察实验结果。试验结果显示:当五氯酚钠浓度为 0、5、8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时,T 线显色深于 C 线显色或和 C 线显色一样深,当五氯酚钠浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及以上时,T 线显色浅于 C 线显色。故该发明试剂板的检出限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0077] 2、五氯酚钠免疫胶体金试剂板的特异性试验

[0078] 取六氯苯酚、2-氯苯酚、对硝基苯酚钠、多氯联苯标准品制成系列浓度的标准品溶液,用五氯酚钠的胶体金试剂板进行检测,计算交叉反应率。

[0079] 试验结果表明本发明试剂板与六氯苯酚的交叉率为 3.33%,与 2-氯苯酚的交叉反应率为 2.5%,与对硝基苯酚钠的交叉反应率为 2.86%,与多氯联苯的交叉反应率小于 1%。

[0080] 3、五氯酚钠免疫胶体金试剂板的稳定性试验

[0081] 将试剂板分别放置于 37℃、25℃、4℃的环境中,湿度保持在 40%~60%,每隔一段时间取出后使用五氯酚钠专用 PBST 缓冲液滴板读数,观察试剂板的显色变化。

[0082] 试验结果表明试剂板在 25℃下保存时间较 37℃及 4℃长,1 年内试剂板显色较为稳定,符合检测需求。

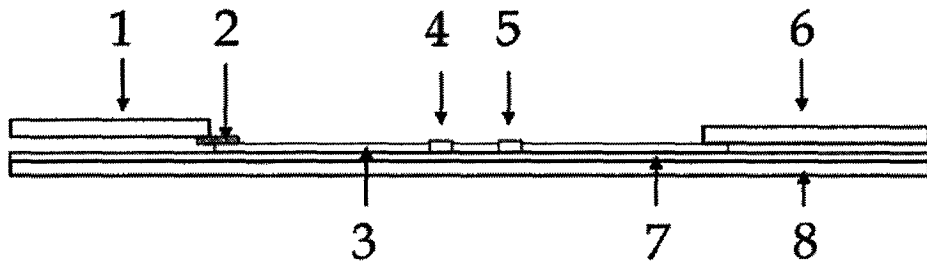


图 1

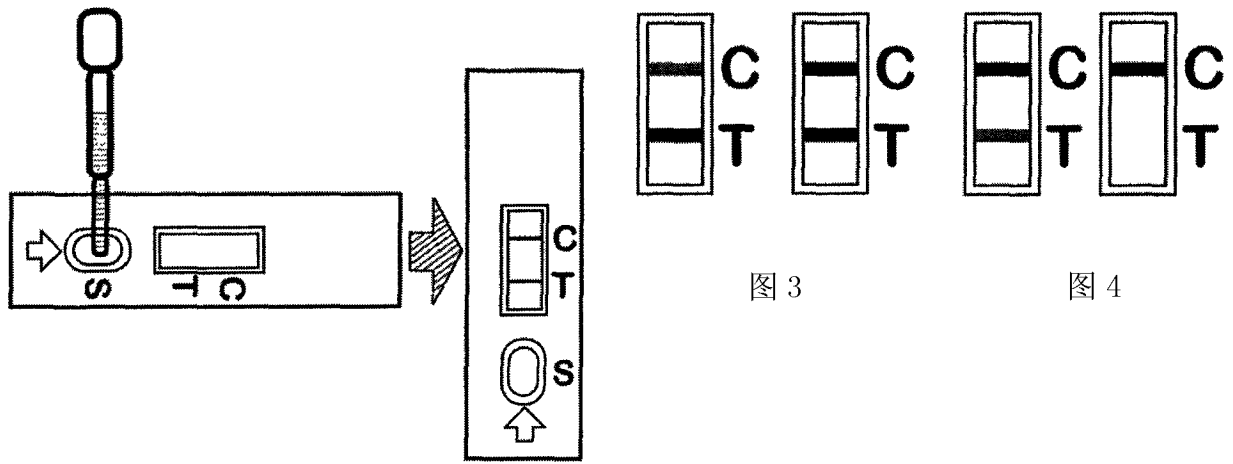


图 2

图 3

图 4

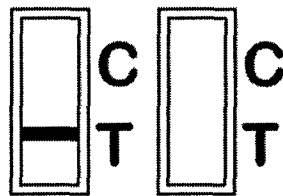


图 5

专利名称(译)	一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103698524A</a>	公开(公告)日	2014-04-02
申请号	CN201310744221.5	申请日	2013-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
[标]发明人	吴光红 张美琴 王扬 王伟萍 邵伟 陈笑笑 胡叶军 刘敏		
发明人	吴光红 张美琴 王扬 王伟萍 邵伟 陈笑笑 胡叶军 刘敏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测五氯酚钠的免疫胶体金试剂板及其制备方法，可用于检测水产品和水中的五氯酚钠残留。本发明试剂板由上下两块塑料壳和置于内部的试纸条组成。试纸条由背衬及背衬上依次黏贴着的样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫组成，相邻各部分间有1~2mm的重叠。金标结合垫上包被有胶体金标记的抗五氯酚钠单克隆抗体。硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有五氯酚钠-OVA和羊抗鼠IgG，分别作为检测线和质控线，可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板操作过程仅需5min左右，且无需任何昂贵实验设备辅助，利于大规模样本筛选，适合水产养殖及检验检疫机构的检测需求。

