



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103869076 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201210543777.3

(22) 申请日 2012.12.14

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际信
息产业基地高新四街8号

(72) 发明人 何方洋 万宇平 冯才伟 田甜
罗晓琴 杨学林 冯静

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条
及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条及方法。试纸条包括试纸和微孔试剂,所述微孔试剂中冻干有胶体金标记的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体;所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜、底板依次连接组成,所述反应膜上包括检测区和质控区,检测区包被有邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体。用本发明试纸条检测邻苯二甲酸二丁酯的方法简单、快速、直观、成本低、易推广使用。

1. 一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条,其特征在于包括试纸和微孔试剂,所述微孔试剂中冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物,所述试纸包括反应膜、样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板,所述反应膜上有检测区和质控区,均呈与所述试纸的长相垂直的条带状,检测区包被有邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有羊抗鼠抗抗体。

2. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次粘贴在底板上组成,所述微孔试剂上具有微孔塞。

3. 根据权利要求2所述的胶体金试纸,其特征在于所述保护膜粘贴在样品吸收垫上,为检测端,上面有MAX标记线。

4. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于所述检测区位于近于有MAX标记的保护膜的一端,所述质控区位于远离有MAX标记的保护膜的一端。

5. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物由邻苯二甲酸酐与正丁醇反应得到邻苯二甲酸单丁酯,然后再和氨基丁酸缩合得全新的邻苯二甲酸二丁酯半抗原,半抗原与载体蛋白偶联制备获得偶联物,所述载体蛋白可为卵清白蛋白、牛血清白蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白。

6. 根据权利要求1所述的胶体金试纸条,其特征在于所述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半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得的。

7. 一种制备权利要求1-6任一项所述的胶体金试纸条的方法,其包括步骤:

- 1) 制备冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;
- 2) 制备具有包被邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;
- 3) 将2)制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸;
- 4) 将1)和3)制备好的冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试纸条。

8. 一种检测白酒中邻苯二甲酸二丁酯残留的方法,其包括步骤:

- 1) 样本前处理;
- 2) 用权利要求1-6任一项所述的胶体金试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测邻苯二甲酸二丁酯的试纸条及方法,具体涉及一种用于检测白酒中邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二丁酯(DBP)属于邻苯二甲酸酯类,是目前国内外工业生产中使用最多的塑化剂(又称增塑剂),广泛存在于食品包装、化妆品、医疗器材以及环境水体中。这类塑化剂并非食品或食品添加剂,但会通过环境迁移、食品包装迁移及非法添加等进入食品,对人体健康产生毒害作用,如造成内分泌失调,影响正常生育能力,在体内长期蓄积会导致畸形、癌变和突变,对心血管、消化和泌尿系统也有很大伤害。因此,我国卫生部卫办监督函(2011)551号文件中规定:严禁在食品、食品添加剂中人为添加邻苯二甲酸酯类物质,食品、食品添加剂中的邻苯二甲酸二(α-乙基己酯)(DEHP)、邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)和邻苯二甲酸二正丁酯(DBP)最大残留量分别为1.5mg/kg、9.0mg/kg和0.3mg/kg。

[0003] 目前文献报道有关邻苯二甲酸酯类物质的检测方法有气相色谱法、超高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱法、气相色谱-离子阱质谱法等。但研究大多集中于环境样品和塑料包装材料,对于食品中的污染情况检测研究较少。我国食品中邻苯二甲酸酯检测使用“GB/T 21911-2008 食品中邻苯二甲酸酯的测定”,包装中邻苯二甲酸酯检测使用“GB/T 21928-2008 食品塑料包装材料中邻苯二甲酸酯的测定”,两种检测方法均运用气相色谱-质谱联用(GC-MS)的方法进行测定。该方法灵敏、准确,特异性强、分离度好,可以同时测定多种药物,但需要昂贵的仪器、样品的前处理复杂、繁琐费时、检测的成本较高,不能现场操作,而且需专业人员操作,所以限制了其应用。酶联免疫检测技术将酶联免疫反应与生物技术相结合用于食品中药物残留的检测,常以ELISA检测试剂盒的形式出现且易商品化,逐渐发展成为食品中残留物含量检测中最实用的检测技术之一。胶体金免疫层析法与酶联免疫法相比检测时间更短,操作简便、成本低廉、无需其他仪器设备,结果判断直观,适用于进行现场快速筛选。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条。

[0005] 本发明所提供的胶体金试纸条包括试纸、微孔试剂,微孔试剂具有微孔塞,微孔试剂中冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物;试纸包括反应膜、样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板;反应膜上包括检测区和质控区,均呈与所述试纸的长相垂直的条带状,检测区包被有邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有羊抗鼠抗抗体。

[0006] 所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物是由邻苯二甲酸二丁酯半抗原与载体蛋白偶联得到,所述半抗原是由邻苯二甲酸酐与正丁醇反应得到邻苯二甲酸单丁酯,然后再和氨基丁酸缩合得全新的邻苯二甲酸二丁酯半抗原,所述载体蛋白可为牛血清

白蛋白、卵清白蛋白、甲状腺蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白。

[0007] 所述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半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体。

[0008] 所述保护膜粘贴在样品吸收垫上,为检测端,上面有 MAX 标记线。

[0009] 所述检测区位于近于有 MAX 标记的保护膜的一端,所述质控区位于远离有 MAX 标记的保护膜的一端。

[0010] 所述底板可为 PVC 底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫为全血滤血膜;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜;所述保护膜为 PE 材质保护膜。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述胶体金试纸条的方法,其包括步骤:

[0012] 1) 制备冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

[0013] 2) 制备具有包被邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0014] 3) 将 2) 制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸;

[0015] 4) 将 1) 和 3) 制备好的冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试纸条。

[0016] 具体地说,步骤包括:

[0017] 1) 制备邻苯二甲酸二丁酯半抗原;

[0018] 2) 将邻苯二甲酸二丁酯半抗原与载体蛋白偶联,制备邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物;

[0019] 3) 用邻苯二甲酸二丁酯半抗原-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单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0020] 4) 提取小鼠 IgG 免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0021] 5) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0022] 6) 将制备的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物;

[0023] 7) 将邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物冻干在微孔试剂中后,将微孔试剂加上微孔塞;

[0024] 8) 将样品吸收垫用含牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的终浓度为 0.5% 体积百分含量)、pH 为 7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液浸泡 2h,37℃ 下烘干 2h;

[0025] 9) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、反应膜、吸水垫和保护膜;

[0026] 10) 将制备好的微孔试剂、试纸组装成试纸条,2~8℃ 条件下保存 12 个月。

[0027] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述胶体金试纸条检测白酒中邻苯二甲酸二丁酯残留的方法,它包括步骤:

[0028] (1) 样本前处理;

[0029] (2) 用试纸条进行检测;

[0030] (3) 分析检测结果。

[0031] 本发明中用试纸条检测样品时,将待检样品溶液滴加于微孔试剂中,缓慢抽吸且充分与微孔中试剂混匀,将标有 MAX 标记线端向下,插入孵育后的微孔试剂,待检样品液与

微孔中的金标抗体结合后一起向反应膜扩散；若待检样品液中邻苯二甲酸二丁酯的含量高，则扩散过程中待检样品液中的邻苯二甲酸二丁酯可与金标抗体相结合，进而完全封闭金标抗体上邻苯二甲酸二丁酯的抗原结合点，阻止金标抗体与反应膜上邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物结合，检测区不显色或检测区显色明显弱于质控区，而抗抗体则可与金标抗体结合，质控区显色；若待检样品液中邻苯二甲酸二丁酯的含量低或无，则金标抗体上的抗原结合位点不能被封闭，进而金标抗体会与反应膜上邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物结合，检测区显色强于质控区或与质控区显色无明显差异，同时抗抗体也可与金标抗体结合，质控区显色。如果质控区不显色，则试纸失效。如图 4a、4b、4c、4d、4e、4f 所示。

[0032] 阴性：检测区 T 线显色强于质控区 C 线或与 C 线显色无明显差异，表示白酒样本中不含有 DBP 或浓度低于检测限，判为阴性，用“-”表示。

[0033] 阳性：T 线显色明显弱于 C 线显色或 T 线不显色，表示白酒样本中 DBP 浓度等于或高于检测限。判为阳性，用“+”表示。

[0034] 无效：未出现 C 线，试纸失效。

[0035] 本发明采用将高特异性的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物冻干在微孔试剂中，能够使金标抗体与待检样品液充分接触，充分反应，从而减少误差，增加整个体系的反应灵敏度。本发明的试纸条具有快速、直观、操作简单、成本低等优点。用本发明的试纸条检测白酒中的邻苯二甲酸二丁酯，方法简便、快速、直观、成本低、易推广使用。

附图说明

[0036] 图 1 为试纸剖面结构示意图。

[0037] 图 2 为试纸俯视图。

[0038] 图 3 为微孔试剂图。

[0039] 图 4a、4b、4c、4d、4e、4f 为试纸检测结果判定图。

[0040] 图 5 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原合成路线图。

[0041] 图 6 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原核磁共振氢谱图。

具体实施方式

[0042] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0043] 实施例 1 检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条的构成

[0044] 一、试纸(图 1)

[0045] 所述试纸是由底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜组成；

[0046] 所述样品吸收垫 1、反应膜 2、吸水垫 3 和保护膜 7 依次按顺序粘贴在底板 6 上，样品吸收垫的末端与反应膜相连，反应膜的末端与吸水垫相连，样品吸收垫的始端与底板的始端对齐，吸水垫的末端与底板的末端对齐；

[0047] 所述试纸的样品吸收垫端粘贴有保护膜，保护膜 7 覆盖在样品吸收垫上的检测端，在检测端保护膜上印有 MAX 字样(图 2)；

[0048] 所述反应膜上有检测区 4 和质控区 5，均呈与所述试纸的长相垂直的条带状，检测区位于近于有 MAX 标记的保护膜的一端，质控区位于远离有 MAX 标记的保护膜的一端。检

测区包被有邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有羊抗鼠抗抗体;

[0049] 所述底板为PVC底板;所述样品吸收垫为全血滤血膜;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜;所述保护膜为PE材质保护膜。

[0050] 二、微孔试剂(图3)

[0051] 所述微孔试剂8具有微孔塞9,微孔试剂中冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物。

[0052] 将上述试纸、微孔试剂组装成试纸条,在2~8℃环境中保存,有效期12个月。

[0053] 实施例2 实施例1中所述的胶体金试纸条的制备方法

[0054] 一、试纸条的制备

[0055] 试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0056] 1) 制备冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

[0057] 2) 制备具有包被邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0058] 3) 将2)制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸;

[0059] 4) 将1)和3)制备好的冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试纸条。

[0060] 下面分步详细叙述:

[0061] (一) 各部件的制备

[0062] 1. 邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0063] (1) 邻苯二甲酸二丁酯半抗原的合成和鉴定

[0064] 半抗原的合成(合成路线如图5)

[0065] 将1.48g邻苯二甲酸酐溶于50ml三氯甲烷中,搅拌下滴加入3ml 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)和1.0ml正丁醇在10ml三氯甲烷中的混合液,室温搅拌6h,蒸除溶剂后,柱层析纯化得到邻苯二甲酸单丁酯;将1.11g邻苯二甲酸单丁酯溶于40ml三氯甲烷中,加入2.06g二环己基碳二亚胺(DCC),催化量的4-二甲氨基吡啶(DMAP),搅拌下缓慢滴加入0.8g 4-氨基丁酸在20ml三氯甲烷中的悬浮物,加毕继续室温反应8h,过滤,水洗,蒸干溶剂后柱层析纯化得到邻丁氧酰基羧丁基苯甲酰胺,即为邻苯二甲酸二丁酯半抗原。

[0066] 半抗原的鉴定

[0067] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图6所示,12.0ppm左右的羧基信号峰,8.5ppm左右的亚氨基信号峰,8.0ppm左右的两组芳环信号峰以及0.8-4.3ppm的烷基信号峰说明半抗原合成成功。

[0068] (2) 免疫原的制备

[0069] 取10mg半抗原,溶解于1ml二甲基甲酰胺(DMF)中;取15mg碳化二亚胺(EDC)用0.2ml水充分溶解后加入半抗原溶液中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A;称取牛血清白蛋白(BSA)30mg,使之充分溶解在3ml 0.1mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CB)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h,用0.01mol/L PBS 4℃透析3d,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于-20℃保存备用。

[0070] (3) 包被原的制备

[0071] 取 10mg 半抗原,溶解于 1ml DMF 中;取 15mg EDC 用 0.2ml 水充分溶解后加入半抗原溶液中,室温下搅拌 24h,即可得到反应液 A;称取卵清白蛋白(OVA) 30mg,使之充分溶解在 3ml 0.1mol/L CB (pH 9.6) 中,将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌 24h,用 0.01mol/L PBS 4℃透析 3d,每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20℃保存备用。

[0072] 2. 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体的制备

[0073] (1) 动物免疫

[0074] 将上述得到的免疫原注入 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 150 μg/只,使其产生抗血清。

[0075] (2) 细胞融合和克隆化

[0076] 小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按 8:1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选得到稳定分泌邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0077] (3) 细胞冻存和复苏

[0078] 将单克隆抗体杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 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。

[0079] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0080] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只,7 天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, -20℃保存。

[0081] 3. 羊抗鼠抗抗体的制备

[0082] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗体。

[0083] 4. 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0084] (1) 胶体金的制备

[0085] 用双蒸去离子水将 1% 氯金酸稀释成 0.01% (质量百分含量),取 100ml 置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入 2.5ml 1% 柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0086] (2) 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0087] 在磁力搅拌下,用 0.2mol/L 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 7.2,按每毫升胶体金溶液中加入 20~50 μg 抗体的标准向胶体金溶液中加入上述邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体,继续搅拌混匀 10min,加入 10% 牛血清白蛋白(BSA)使其在胶体金溶液中的终浓度为 1% (体积百分含量),静置 10min。12000rpm,4℃离心 40min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积 1/10 的复溶缓冲液将沉淀重悬,置 4℃备用。

[0088] 复溶缓冲液:含牛血清白蛋白(BSA) 0.2%~0.5% (体积百分含量)、吐温-80 0.05%~0.2% (质量百分含量)、pH7.2 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0089] 5. 将邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体-胶体金标记物冻干到微孔试剂上

[0090] 向微孔试剂微孔板中加入 50 μ l 邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体 - 胶体金标记物, 放入冷冻干燥机中, 在冷阱温度为 -50°C 条件下, 预冻 3h 后, 再真空干燥 15h, 即可取出, 得到冻干有邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体 - 胶体金标记物的微孔试剂, 将微孔试剂加上微孔塞, 密封保存。

[0091] 6. 样品吸收垫的制备

[0092] 将样品吸收垫置于含牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的终浓度为 0.5% (体积百分含量))、pH7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中浸泡 2h, 37°C 烘 2h 备用。

[0093] 7. 反应膜的制备

[0094] 包被过程: 用磷酸缓冲液将邻苯二甲酸二丁酯半抗原 - 载体蛋白偶联物稀释到 1mg/mL, 用 Isoflow 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区(T), 包被量为 1.0 μ l/cm; 用 0.01mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠 IgG 抗体稀释到 200 μ g/mL, 用 Isoflow 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区(C), 包被量为 1.0 μ l/cm。将包被好的反应膜置于 37°C 条件下干燥 8h, 备用。

[0095] (二) 各部件的组装

[0096] 1. 试纸的组装

[0097] 将所述样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次按顺序粘贴在所述底板上; 样品吸收垫的末端与反应膜的始端相连, 反应膜的末端与吸水垫的始端相连, 样品吸收垫的始端与底板的始端对齐, 吸水垫的末端与底板的末端对齐; 在组装好的试纸样品吸收垫上粘贴保护膜, 保护膜上印有 MAX 标记线。

[0098] 2. 试纸条的组装

[0099] 将上述步骤 1 得到的试纸与微孔试剂组装成试纸条, 在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的环境中贮存, 有效期 12 个月。

[0100] 实施例 3 白酒中邻苯二甲酸二丁酯的检测

[0101] 1. 样本前处理方法

[0102] 移取 50 μ l 白酒样品于 10ml 玻璃离心管中, 再加入 450 μ l 样本稀释液(pH 值为 7.0、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液), 充分振荡混匀, 待检。

[0103] 2. 用试纸条检测样品

[0104] 从原包装中取出所需数目的微孔试剂和试纸, 并做好标记; 用微量移液器移取 200 μ l 稀释后的待检溶液于微孔中, 缓慢抽吸且充分与微孔中试剂混匀; 将印有“MAX”线端朝下插入微孔中, 使之充分浸入溶液中; 室温($20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$) 孵育 5min 后, 取出试纸, 判定结果。

[0105] 3. 检测结果分析

[0106] 阴性: 检测区 T 线显色强于质控区 C 线或与 C 线显色无明显差异, 表示白酒样本中不含有 DBP 或浓度低于检测限, 判为阴性, 用“-”表示, 如图 4a 和 4b 所示;

[0107] 阳性: T 线显色明显弱于 C 线显色或 T 线不显色, 表示白酒样本中 DBP 浓度等于或高于检测限。判为阳性, 用“+”表示, 如图 4c 和 4d 所示;

[0108] 无效: 未出现 C 线, 试纸失效, 如图 4e 和 4f 所示。

[0109] 实施例 4 试纸条技术参数的确定

[0110] 1. 检测限试验

[0111] 向空白白酒样本中分别添加邻苯二甲酸二丁酯标准品至终浓度为 0、150、300、600 $\mu\text{g/L}$ ，用试纸条进行白酒样本检测，结果为：当邻苯二甲酸二丁酯标准品浓度为 0、150 $\mu\text{g/L}$ 时，试纸显示出 T 线显色与 C 线显色无明显差异，呈阴性；当邻苯二甲酸二丁酯标准品浓度为 300、600 $\mu\text{g/L}$ 时，试纸 C 线显色 T 线不显色，呈阳性，表明本试纸条对白酒样本中邻苯二甲酸二丁酯检测限为 300 $\mu\text{g/L}$ 。

[0112] 2. 假阳性率、假阴性率试验

[0113] 取已知邻苯二甲酸二丁酯含量大于 300 $\mu\text{g/L}$ 的白酒阳性样本 20 份和邻苯二甲酸二丁酯含量小于 300 $\mu\text{g/L}$ 的白酒阴性样本 20 份，用 3 个批次生产的试纸条分别进行检测，结果见表 1、表 2。

[0114] 表 1 检测阳性样本结果

	浓度 批次	阳性白酒样本 (20 份)
[0115]	1	20 份阳性
	2	20 份阳性
	3	20 份阳性

[0116] 表 2 检测阴性样本结果

	浓度 批次	阴性白酒样本 (20 份)
[0117]	1	20 份阴性
	2	20 份阴性
	3	20 份阴性

[0118] 结果表明：用 3 个批次生产的试纸条检测阳性白酒样本时，结果全为阳性，可知阳性样本符合率为 100%，假阴性率为 0。检测 20 份阴性白酒样本时，结果全为阴性，可知阴性符合率为 100%，假阳性率为 0。本发明的检测邻苯二甲酸二丁酯试纸条可以对白酒样本中邻苯二甲酸二丁酯残留进行快速检测。

[0119] 3. 特异性试验

[0120] 特异性常用交叉反应率表示，是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。用该试纸条检测 1000 $\mu\text{g/L}$ 的邻苯二甲酸二辛酯 (DEHP)、邻苯二甲酸二异壬酯 (DINP)、邻苯二甲酸二异辛酯 (DIOP)、邻苯二甲酸二甲酯 (DMP) 等，结果均呈阴性，说明本试纸条对这些物质无交叉反应。

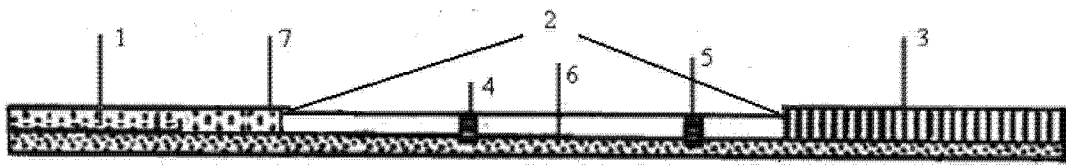


图 1

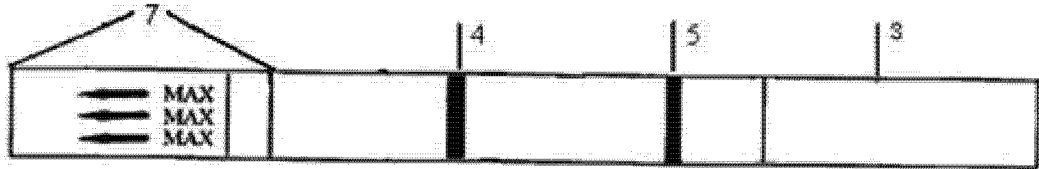


图 2

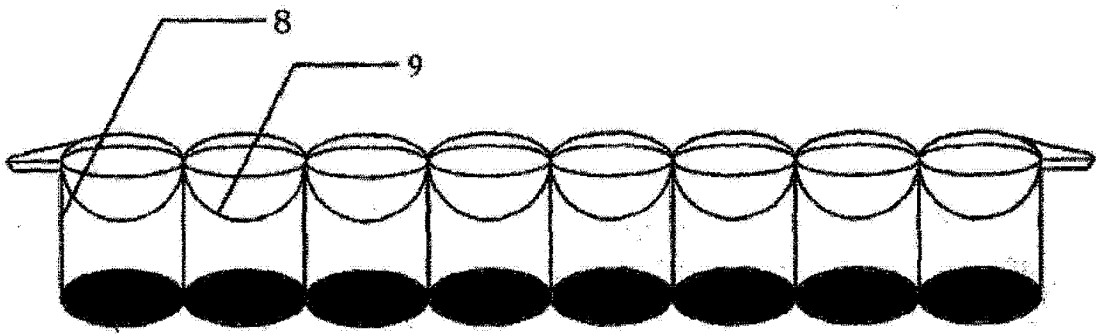


图 3

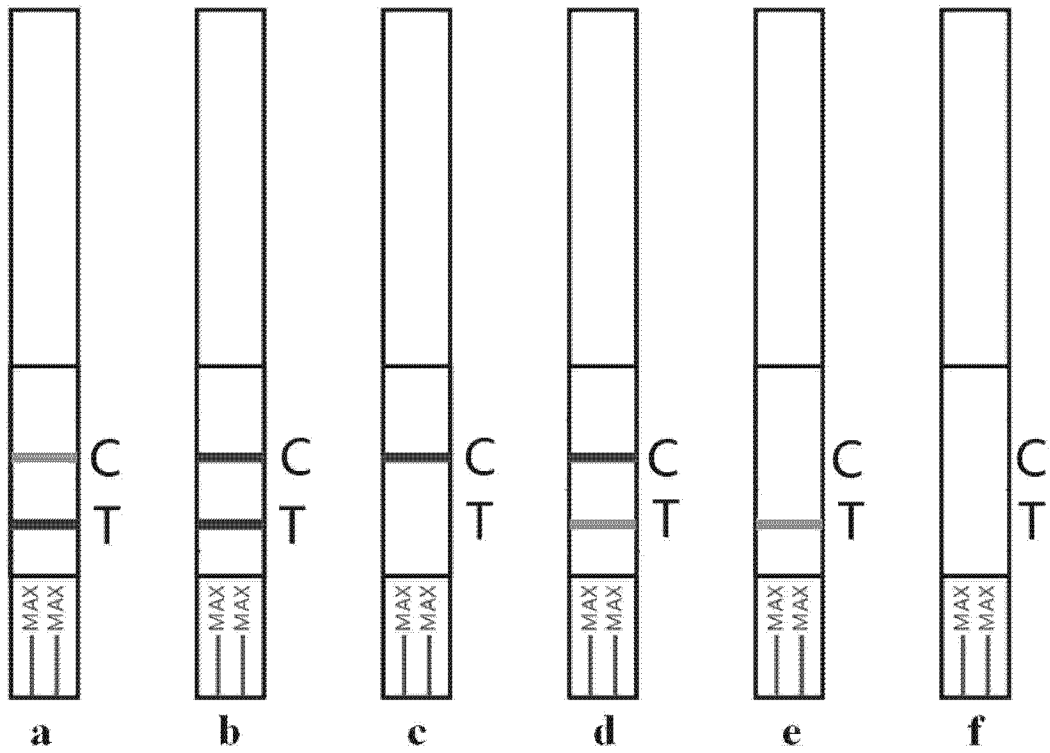


图 4

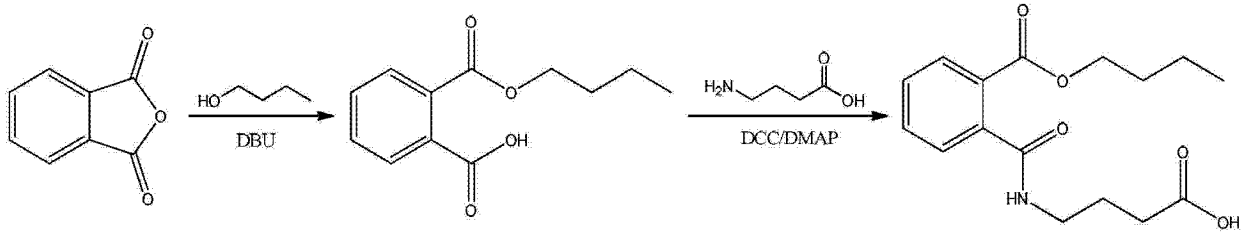


图 5

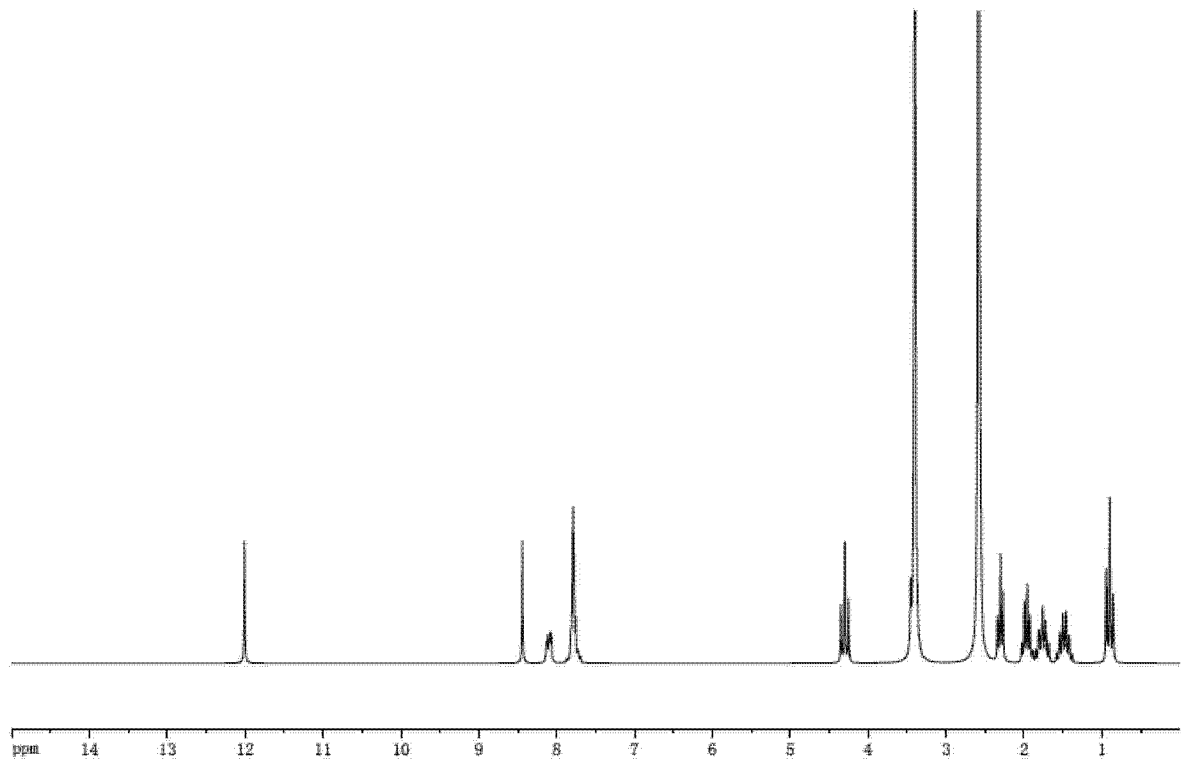


图 6

专利名称(译)	一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条及方法		
公开(公告)号	CN103869076A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201210543777.3	申请日	2012-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 田甜 罗晓琴 杨学林 冯静		
发明人	何方洋 万宇平 冯才伟 田甜 罗晓琴 杨学林 冯静		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68		
其他公开文献	CN103869076B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测邻苯二甲酸二丁酯的胶体金试纸条及方法。试纸条包括试纸和微孔试剂，所述微孔试剂中冻干有胶体金标记的邻苯二甲酸二丁酯单克隆抗体；所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜、底板依次连接组成，所述反应膜上包括检测区和质控区，检测区包被有邻苯二甲酸二丁酯半抗原-载体蛋白偶联物，质控区包被有抗抗体。用本发明试纸条检测邻苯二甲酸二丁酯的方法简单、快速、直观、成本低、易推广使用。

