



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104142394 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 12

(21) 申请号 201310172166. 7

(22) 申请日 2013. 05. 10

(71) 申请人 福建省水产研究所

地址 361013 福建省厦门市东渡海山路 7 号

(72) 发明人 苏捷 姜琳琳 吴靖娜 张农

刘智禹

(74) 专利代理机构 徐州市淮海专利事务所

32205

代理人 华德明

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

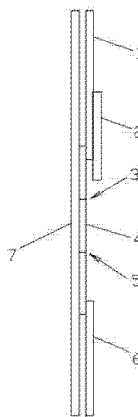
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法

(57) 摘要

本发明公开了一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,包括以下步骤,a、胶体金样品组合垫的制备;b、层析膜的加工:用划膜仪将形成检测线的河豚毒素人工抗原与形成质控线的质控抗体均匀地划在层析膜中间;c、组装:将载体垫、所述层析膜、所述胶体金样品组合垫以及吸水垫拼接成层状结构,所述载体垫位于底部,其上方设有所述层析膜,所述胶体金样品组合垫和所述吸水垫分别设置于所述层析膜的两端。本发明的产品可以通过目测对河豚毒素进行快速半定量分析,产品体积小、重量轻、携带方便、易于保存流通,并且检测样不需分离纯化就可以检测等特点。



1. 一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、胶体金样品组合垫的制备:取河豚毒素人工抗原免疫过小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合培养,筛选阳性杂交瘤细胞体外培养,克隆扩大培养后冻存,选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,先用降植烷或液体石蜡进行小鼠腹腔注射,6-8 天后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中,接着在 5-12 天后收集腹水,然后在 pH7-pH11 的环境下向腹水中加入 10 倍至 50 倍的胶体金标记溶液进行标记,接着将胶体金标记的腹水,用硫酸铵沉淀,胶体金缓冲液溶解后,用喷膜仪器喷到玻璃纤维膜上,真空干燥;

b、层析膜的加工:用划膜仪将形成检测线的河豚毒素人工抗原与形成质控线的质控抗体均匀地划在层析膜中间,干燥;

c、组装:将载体垫、所述层析膜、所述胶体金样品组合垫以及吸水垫拼接成层状结构,所述载体垫位于底部,其上方设有所述层析膜,所述胶体金样品组合垫和所述吸水垫分别设置于所述层析膜的两端,且所述胶体金样品组合垫和所述吸水垫分别与所述层析膜部分重叠,所述检测线设置在靠近所述胶体金样品组合垫的一端,所述质控线设置在靠近所述吸水垫的一端,用切条机将组装后的膜切割成条状结构,用卡式外壳进一步组装成检测卡。

2. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:将所述条状结构的所述胶体金样品组合垫放置在所述卡式外壳的点样窗口,将所述条状结构上所述层析膜的检测线与质控线分别放置在所述卡式外壳检测窗口的 T 端和 C 端,组装成卡式结构。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:在胶体金样品组合垫的制备过程中,腹水在胶体金标记后还要用 30%-50% 的硫酸铵沉淀,离心,用胶体金缓冲液溶解后再喷膜、真空干燥。

4. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:步骤 b 中的人工抗原是通过在河豚毒素粗制品中加入牛血清蛋白,再加入乙酸钠缓冲液和乙醛于离心管在空气浴摇床后用 pH7.0 的磷酸缓冲液透析,接着冻干后制成。

5. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:所述质控抗体为羊抗鼠二抗,所述河豚毒素人工抗原和质控抗体的划膜浓度均为 0.5mg/mL-2mg/mL。

6. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:所述检测线和质控线的间距为 0.4cm-0.6cm。

7. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:所述层析膜为硝酸纤维素膜。

8. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:所述层析膜在室温 25℃,相对湿度小于 40% 的气氛下进行干燥。

9. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:所述胶体金样品组合垫的上方部分覆盖有胶带层。

10. 根据权利要求 1 所述的一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其特征在于:所述条状结构的宽度控制在 2.5mm-3.5mm。

## 一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别是指一种半定量河豚毒素检测试纸的制作方法。

### 背景技术

[0002] 自上世纪 90 年代以来,我国共报道织纹螺中毒事件 50 起,中毒人数 369 人,死亡人数 43,中毒死亡率 11.2%,申请人所在的福建省在 2009 年与 2010 年都有因食用织纹螺而中毒死亡的事件发生。除织纹螺外,每年也都有发生河豚鱼中毒事件。

[0003] 织纹螺与河豚鱼中所含有的毒素主要成份是河豚毒素及衍生物。

[0004] 河豚毒素是一种非蛋白,低分子量的神经毒素,其可以与钠离子通道结合,进而影响到动物的肌肉与神经功能。河豚毒素最早是在河豚鱼中发现的,并在陆生及水生的生物中分布广泛,如在甲藻孢囊、钙性藻类、节肢动物、棘皮动物、软体动物、蠕虫、蝶螈以及青蛙中都有发现。

[0005] 目前国内外对河豚毒素的检测主要为 1)生物检测法,具体为小鼠检测法或组织培养检测法等,2)理化检测法,具体为荧光分析法、薄层层析法、高效液相色谱法或气相色谱法等;3)免疫学检测法,如直接竞争酶联免疫法等。

[0006] 目前我们检测织纹螺毒素主要是应用小鼠检测法(DB35/531-2004《棕斑腹刺鲀、暗鳍腹刺鲀加工品》附录 B 河豚毒素检验),由小鼠法检测法直接测定毒性,对于水产品安全性检测是很重要的,尤其是对于未知的毒素和污染物,是难以替代的直观测定方法。但小鼠检测法的缺点是灵敏度不高,有假阳性现象,且重现性较差(标准偏差较大),无法断定毒素的成分,并对实验所用的小鼠的品系和体重要求苛刻。

[0007] 理化检测法所需的样品前处理非常复杂。

[0008] 目前,河豚毒素的仪器检测及小鼠检测都需要在实验室内由专业技术人员完成检测,并且成本昂贵,难以适应实际工作的需要。

[0009] 为简单、方便的检测出水产品中是否有河豚毒素的存在,专利 CN202522562U 提供了一种河豚毒素检测试纸,其是由载体板、硝酸纤维膜、胶体金垫、加样垫和吸收垫组成,载体板位于底层,硝酸纤维膜、胶体金垫、加样垫、吸收垫依次粘贴在载体板上表面,硝酸纤维膜位于载体板中部,胶体金垫设在硝酸纤维膜的一侧并与硝酸纤维膜部分重叠,加样垫设在胶体金垫上并与胶体金垫部分重叠,吸收垫设在硝酸纤维膜的另一侧并与硝酸纤维膜部分重叠,胶体金垫上均匀的涂布一层有胶体金标记的鼠抗河豚毒素单克隆抗体,硝酸纤维膜上靠近加样垫一端设有包被有检测抗原的检测线,靠近吸收垫一端设有包被有质控抗体的质控线。这种试纸虽然使用方便,但是它同时存在下列问题:1)对河豚毒素检测只是定性,没有定量,并且也没有给出检测限;2)试纸宽 1cm,太宽,检测时浪费较多;3)使用纯化的单克隆抗体及高纯度的河豚毒素标准品制备人工抗原,抗体效价降低、成本高昂;4)金标抗体、人工抗原及羊抗鼠的使用量高,提高使用成本;5)层析试纸条设计不够合理,检测样品使用量较多,还需滴加生理盐水,检测方法不够简便;6)玻璃纤维膜切条后,再用胶体金标记的单克隆抗体涂布,37℃烘干,制备不方便,不适用于产业化生产。

## 发明内容

[0010] 本发明提供了一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,其目的之一在于克服现有技术存在的仪器检测较为繁琐且太过专业化的缺陷以及现有的检测试纸只能定性检测的缺陷,并克服现有检测试纸使用纯化的单克隆抗体作为金标原料成本过高的缺陷。

[0011] 本发明的技术方案如下:

一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法,它包括以下步骤:

a、胶体金样品组合垫的制备:取河豚毒素人工抗原免疫过小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合培养,筛选阳性杂交瘤细胞体外培养,克隆扩大培养后冻存,选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,先用降植烷或液体石蜡进行小鼠腹腔注射,6-8 天后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中,接着在 5-12 天后收集腹水,然后在 pH7-pH11 的环境下向腹水中加入 10 倍至 50 倍的胶体金标记溶液进行标记,接着将胶体金标记的腹水,用硫酸铵沉淀,胶体金缓冲液溶解后,用喷膜仪器喷到玻璃纤维膜上,真空干燥;

b、层析膜的加工:用划膜仪将形成检测线的河豚毒素人工抗原与形成质控线的质控抗体均匀地划在层析膜中间,干燥;

c、组装:将载体垫、所述层析膜、所述胶体金样品组合垫以及吸水垫拼接成层状结构,所述载体垫位于底部,其上方设有所述层析膜,所述胶体金样品组合垫和所述吸水垫分别设置于所述层析膜的两端,且所述胶体金样品组合垫和所述吸水垫分别与所述层析膜部分重叠,所述检测线设置在靠近所述胶体金样品组合垫的一端,所述质控线设置在靠近所述吸水垫的一端,用切条机将组装后的膜切割成条状结构,用卡式外壳进一步组装成检测卡。

[0012] 使用时,取 2 滴待测溶液滴加于检测卡的样品窗口(S)中,如果在质控线与检测线都出现红线说明样品的中河豚毒素含量小于最低检测限;如果只在质控线出现有红线,说明河豚毒素含量大于最低检测限,样品按倍数稀释后,用光学仪器检测质控线(C)与检测线(T)颜色的深度的比值,进而计算出样品中河豚毒素的含量;如果质控线没有红线,说明试纸检测失效。

[0013] 作为本发明的改进,将所述条状结构的所述胶体金样品组合垫放置在所述卡式外壳的点样窗口,将所述条状结构上所述层析膜的检测线与质控线分别放置在所述卡式外壳检测窗口的 T 端和 C 端,组装成卡式结构。

[0014] 作为本发明的改进,在胶体金样品组合垫的制备过程中,为了避免由于腹水中杂蛋白太多,加样层析前端形成凝固物质,阻止样品层析并与硝酸纤维膜上的人工抗原及质控抗体结合的问题产生,腹水在胶体金标记后还要用 30%-50% 的硫酸铵沉淀,离心,用胶体金缓冲液溶解后,用喷膜仪器喷到玻璃纤维膜上,真空干燥。用腹水代替价格高昂的单克隆抗体,提高抗体的使用效率,同时极大的降低了使用成本。

[0015] 作为本发明的改进,步骤 a 中的河豚毒素人工抗原是通过在河豚毒素粗制品中加入牛血清蛋白,再加入乙酸钠缓冲液和乙醛于离心管在空气浴摇床后用 pH7.0 的磷酸缓冲液透析,接着冻干后制成。人工抗原通过河豚毒素粗制品制得,而不再使用河豚毒素高纯品,其成本得到有效控制。

[0016] 作为本发明的改进,所述质控抗体为羊抗鼠二抗,所述河豚毒素人工抗原和质控抗体的划膜浓度均为 0.5mg/mL-2mg/mL。

[0017] 作为本发明的改进,所述检测线和质控线的间距为 0.4cm-0.6cm。

[0018] 作为本发明的改进,所述层析膜在室温 25℃,相对湿度小于 40% 的气氛下进行干燥。

[0019] 作为本发明的改进,所述层析膜为硝酸纤维素膜。

[0020] 作为本发明的改进,所述胶体金样品组合垫的上方部分覆盖有胶带层,胶带层能有效起到良好的水封作用,这样便可避免加样量过多的情况发生。

[0021] 在组装完成后用切条机将条状结构的宽度控制在 2.9mm-3.5mm。

[0022] 由上述对本发明的描述可知,和现有技术相比本发明的优点在于:

1、本发明产品可以通过目测对河豚毒素进行快速半定量分析,产品体积小、重量轻、携带方便、易于保存流通。

[0023] 2、用小鼠生产的腹水代替纯化后的抗河豚毒素单克隆抗体作为金标原料,而不是用纯化后的抗体,这样既提高了抗体的活性效价又降低了使用成本。

[0024] 3、人工抗原可选择使用粗制的河豚毒素而不是用河豚毒素高纯品,极大地降低了使用成本。

[0025] 4、试纸宽度约为 3mm 左右,减少检测样品使用量并降低了使用成本。

[0026] 5、样品垫与金垫合一,减少材料及组装工序。

## 附图说明

[0027] 图 1 为本发明试纸的结构示意图;

图 2 为检测卡的俯视图。

## 具体实施方式

[0028] 下面参照附图说明本发明的具体实施方式。

[0029] 实施例 1

一种半定量河豚毒素检测卡,如图 1 和图 2 中所示,包括将载体垫 7、硝酸纤维素膜 4、胶体金样品组合垫 1、吸水垫 6、胶带层 2 及卡式外壳。

[0030] 检测卡的制作工艺分为两个步骤,即前期准备的预处理和后期的组装,其中预处理主要分为胶体金样品组合垫的制备和层析膜加工两个环节,其具体步骤如下:

1) 胶体金样品组合垫 1 的制备:用河豚毒素人工抗原免疫小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合培养,筛选阳性杂交瘤细胞体外培养,克隆扩大培养后冻存,选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,先用降植烷进行小鼠腹腔注射,6 天后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中,接着在 5 天后收集腹水,然后在 pH7 的环境下向腹水中加入 50 倍的胶体金标记溶液进行标记,为了避免由于腹水中杂蛋白太多,加样层析前端形成凝固物质,阻止样品层析并与硝酸纤维素膜上的人工抗原及质控抗体结合的问题产生,腹水在胶体金标记后还要用 30% 的硫酸铵沉淀,并在 8000r/min 的环境下离心 15min,最后用胶体金缓冲液溶解后,用喷膜仪器喷到玻璃纤维膜上,真空干燥;

2) 硝酸纤维素膜的加工:用划膜仪将河豚毒素人工抗原与羊抗鼠二抗均匀地划在硝酸纤维素膜 4 中间,在室温 25℃,相对湿度小于 40% 的气氛下进行干燥。河豚毒素人工抗原形成检测线(T 线)3,羊抗鼠二抗形成质控线(C 线)5,其中人工抗原和羊抗鼠二抗的划膜浓度

均为 0.5mg/mL,且检测线 3 和质控线 5 的间距为 0.4cm。这其中,河豚毒素人工抗原是通过在河豚毒素粗制品中加入牛血清蛋白,再加入乙酸钠缓冲液和乙醛于离心管在空气浴摇床 74 小时后用 pH7.0 的磷酸缓冲液透析 72 小时,接着冻干后制成。

[0031] 后期组装工作是将载体垫 7、硝酸纤维素膜 4、胶体金样品组合垫 1、胶带层 2 以及吸水垫 6 拼接成层状结构,载体垫 7 位于底部,载体垫 7 的上方设有硝酸纤维素膜 4,胶体金样品组合垫 1 和吸水垫 6 分别设置于硝酸纤维素膜 4 的两端,且胶体金样品组合垫 1 和吸水垫 6 分别与硝酸纤维素膜 4 部分重叠,部分胶体金样品组合垫 1 的上方覆盖有胶带层 2,硝酸纤维素膜 4 上,检测线 3 靠近胶体金样品组合垫 1 的一端,质控线 5 靠近吸水垫 6 的一端。

[0032] 组装完成后,用切条机将试纸的宽度控制在 2.97mm 左右,获得条状结构,将条状结构的胶体金样品组合垫 1 放置在卡式外壳 10 的点样窗口 11,将条状结构上硝酸纤维素膜 4 的检测线 3 与质控线 5 分别放置在卡式外壳 10 检测窗口 12 的 T 端和 C 端,再组装成卡式结构。配制 0.1MU/ml、0.2MU/ml、0.3 MU/ml、0.4 MU/ml、0.5 MU/ml、0.6 MU/ml、0.7 MU/ml、0.8 MU/ml、0.9 MU/ml、1.0 MU/m 的河豚毒素标准品对同一批次生产的检测卡进行最低检测限的确定。

[0033] 当检测样品中有河豚毒素,样品中的河豚毒素与胶体金标记的抗体结合,随后由于层析作用,胶体金标记的抗原抗体复合物沿着硝酸纤维素膜(NC 膜)4 移动,由于胶体金标记的抗体已经与河豚毒素结合,就不能与 NC 膜 4 上的检测抗原结合,样品中的河豚毒素的量越多,检测线 3 的红色条带越不明显,超过一定的量后,检测线 3 就不显色。如果样品中没有待测物质,胶体金标记的抗体则与检测线 3 的检测抗原结合,检测线 3 显色,然后再与质控线 5 上的羊抗鼠二抗反应,在质控线 5 区域形成红色条带。如果试剂盒失效后,胶体金标记的抗体不与二抗结合,结果质控线不显色。

[0034] 对阳性样品按倍数稀释后结合光学仪器可以对样品进行半定量检测。

#### [0035] 实施例 2

实施例 2 与实施例 1 的不同在于:

1) 胶体金样品组合垫 1 的制备:用河豚毒素人工抗原免疫小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合培养,筛选阳性杂交瘤细胞体外培养,克隆扩大培养后冻存,选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠,先用液体石蜡进行小鼠腹腔注射,8 天后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中,接着在 12 天后收集腹水,然后在 pH11 的环境下向腹水中加入 10 倍的胶体金标记溶液进行标记,为了避免由于腹水中杂蛋白太多,加样层析前端形成凝固物质,阻止样品层析并与硝酸纤维素膜上的人工抗原及质控抗体结合的问题产生,腹水在胶体金标记后还要用 50% 的硫酸铵沉淀,并在 8000r/min 的环境下离心 10min,最后用胶体金缓冲液溶解后,用喷膜仪器喷到玻璃纤维膜上,真空干燥;

2) 硝酸纤维素膜的加工:用划膜仪将河豚毒素人工抗原与羊抗鼠二抗均匀地划在硝酸纤维素膜 4 中间,在室温 25℃,相对湿度小于 40% 的气氛下进行干燥。河豚毒素人工抗原形成检测线(T 线)3,羊抗鼠二抗形成质控线(C 线)5,其中人工抗原和羊抗鼠二抗的划膜浓度均为 1mg/mL,且检测线 3 和质控线 5 的间距为 0.6cm。这其中,河豚毒素人工抗原是通过在河豚毒素粗制品中加入牛血清蛋白,再加入乙酸钠缓冲液和乙醛于离心管在空气浴摇床 70 小时后用 pH7.0 的磷酸缓冲液透析 70 小时,接着冻干后制成。

[0036] 对阳性样品按倍数稀释后结合光学仪器可以对样品进行半定量检测。

[0037] 实施例 3

实施例 3 与实施例 1 的不同在于：

1) 胶体金样品组合垫的制备：用河豚毒素人工抗原免疫小鼠，取免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合培养，筛选阳性杂交瘤细胞体外培养，克隆扩大培养后冻存，选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠，选用 BALB/c 小鼠或其亲代小鼠，先用液体石蜡进行小鼠腹腔注射，7 天后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中，接着在 10 天后收集腹水，然后在 pH9 的环境下向腹水中加入 15 倍的胶体金标记溶液进行标记，为了避免由于腹水中杂蛋白太多，加样层析前端形成凝固物质，阻止样品层析并与硝酸纤维素膜上的人工抗原及质控抗体结合的问题产生，腹水在胶体金标记后还要用 40% 的硫酸铵沉淀，并在 8000r/min 的环境下离心 15min，最后用胶体金缓冲液溶解后，用喷膜仪器喷到玻璃纤维膜上，真空干燥；

2) 硝酸纤维素膜的加工：用划膜仪将河豚毒素人工抗原与羊抗鼠二抗均匀地划在硝酸纤维素膜 4 中间，在室温 25℃，相对湿度小于 40% 的气氛下进行干燥。河豚毒素人工抗原形成检测线 (T 线)3，羊抗鼠二抗形成质控线 (C 线)5，其中人工抗原和羊抗鼠二抗的划膜浓度均为 2mg/mL，且检测线 3 和质控线 5 的间距为 0.5cm。这其中，河豚毒素人工抗原是通过在河豚毒素粗制品中加入牛血清蛋白，再加入乙酸钠缓冲液和乙醛于离心管在空气浴摇床 72 小时后用 pH7.0 的磷酸缓冲液透析 72 小时，接着冻干后制成。

[0038] 上述仅为本发明的具体实施方式，但本发明的设计构思并不局限于此，凡利用此构思对本发明进行非实质性的改动，均应属于侵犯本发明保护范围的行为。

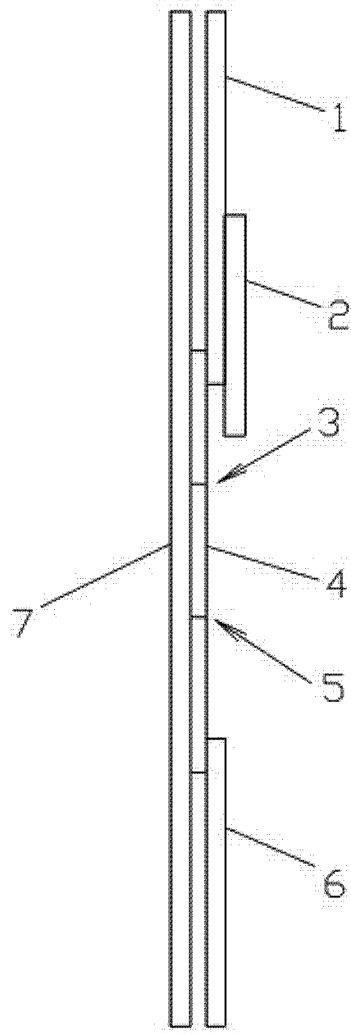


图 1

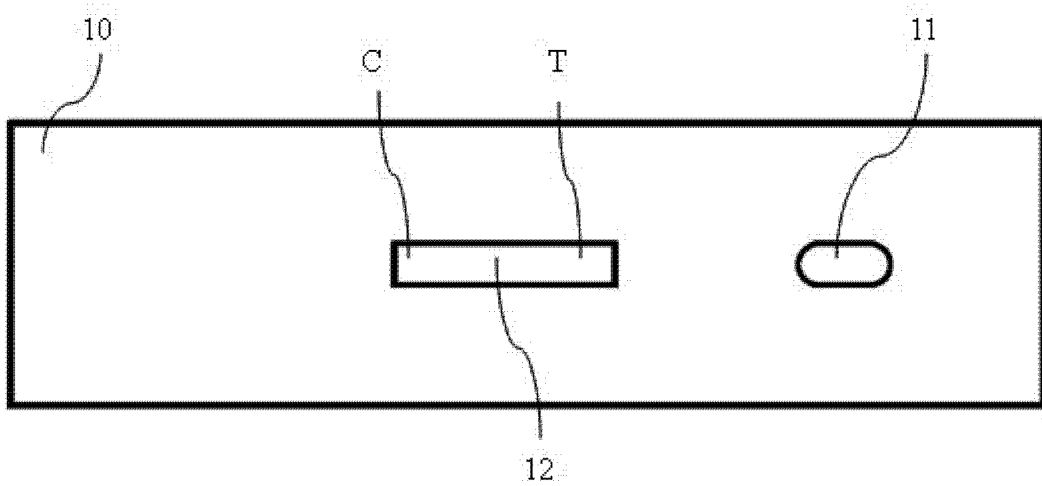


图 2

专利名称(译)	一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104142394A</a>	公开(公告)日	2014-11-12
申请号	CN201310172166.7	申请日	2013-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	福建省水产研究所		
申请(专利权)人(译)	福建省水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	福建省水产研究所		
[标]发明人	苏捷 姜琳琳 吴靖娜 张农 刘智禹		
发明人	苏捷 姜琳琳 吴靖娜 张农 刘智禹		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种半定量河豚毒素检测卡的制作方法，包括以下步骤，  
a、胶体金样品组合垫的制备；b、层析膜的加工：用划膜仪将形成检测线的河豚毒素人工抗原与形成质控线的质控抗体均匀地划在层析膜中间；c、组装：将载体垫、所述层析膜、所述胶体金样品组合垫以及吸水垫拼接成层状结构，所述载体垫位于底部，其上方设有所述层析膜，所述胶体金样品组合垫和所述吸水垫分别设置于所述层析膜的两端。本发明的产品可以通过目测对河豚毒素进行快速半定量分析，产品体积小、重量轻、携带方便、易于保存流通，并且检测样不需分离纯化就可以检测等特点。

