



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 201518027 U

(45) 授权公告日 2010.06.30

(21) 申请号 200920189681.5

(22) 申请日 2009.07.24

(73) 专利权人 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

(72) 发明人 张少恩 桑丽雅 卜令杰 邵伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

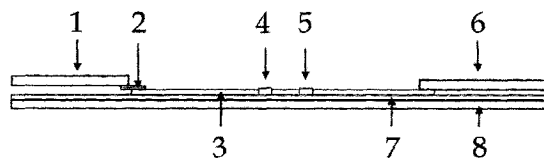
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 实用新型名称

四环素免疫胶体金快速检测试剂板

(57) 摘要

本实用新型四环素免疫胶体金快速检测试剂板,属于兽药残留免疫化学的快速测定试纸,由上下两块塑料模板和试纸条组成。在试纸条背衬上依次粘附有样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,相邻各部分间有 1-2mm 的重叠,胶体金结合垫上包被有抗四环素单克隆抗体与胶体金的结合物,硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有四环素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和质控线。本实用新型特异性好,可同时检测四环素、土霉素、金霉素等四环素类抗生素残留,灵敏度高达 5 μ g/kg,操作简便快速,整个检测过程仅需 5 分钟左右,且无需任何实验设备,尤其适合于野外及现场操作,易于推广使用。



1. 一种检测四环素药物残留的免疫胶体金快速检测试剂板, 含有塑料模板上下板、背衬、附着在背衬上依次紧密相连的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫, 其特征在于样品吸收垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分之间有 1-2mm 的重叠, 胶体金结合垫上包被有抗四环素单克隆抗体与胶体金的结合物, 硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有四环素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG, 分别作为检测线和质控线。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂板, 其特征在于偶联四环素的载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂板, 其特征在于背衬为一面涂有不干胶的 PVC 板, 样品垫由玻璃纤维制成, 胶体金结合垫由聚酯膜制成, 吸水垫为滤纸。

四环素免疫胶体金快速检测试剂板

技术领域

[0001] 本实用新型属于兽药残留免疫化学快速检测技术领域,具体涉及一种检测试剂板。

背景技术

[0002] 四环素是由链霉菌产生的一种广谱抗生素,在畜禽、水生生物等产业领域应用此类药物对动物进行诊断、预防和治疗疾病,以及促进动物生长、提高饲料转化率,带来了可观的经济效益。但是,长期食用这种动物食品及其制品,必然会危及人类的健康。四环素药物的毒性反应主要表现在对胃、肠、肝脏的损害,以及牙齿的染色,还会造成过敏反应、二重感染、致畸胎作用。目前,四环素造成的动物性食品的药物残留,已经对人类健康构成了潜在的危害。欧美、日本及中国均要求其限量使用。

[0003] 目前,食品中四环素残留常用的检测方法主要是仪器法和免疫分析法。仪器法,如高效液相色谱法(HPLC)、液-质联用(LC-MS)等,具有特异性好、准确率高的特点,但由于存在对设备、环境、操作技能等要求,且检测周期长,不利于大规模样本筛选。免疫分析法,如酶联免疫吸附法(ELISA),具有检测量大,操作相对简单等优点,但是该法同样需要实验室设备,分析时间较长,具有一定局限性。

实用新型内容

[0004] 本实用新型的目的在于针对上述方法的不足,提供一种灵敏度高、操作简单、检测时间短、不需要特殊仪器设备、生产成本低的牛奶中四环素残留检测试剂板。

[0005] 本实用新型试剂板由塑料模板上下板、背衬及粘附在背衬上依次紧密相连的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫组成。其中样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫相邻各部分间有1-2mm的重叠,其目的的一方面是保证层析作用从样品垫到吸水垫部位顺利进行,另一方面是为了使样品溶液与样品垫有充分反应时间,样品垫上的缓冲体系可以中和样品溶液的酸碱度,保证样品溶液中的有效成分与胶体金结合垫上的金标抗体顺利发生反应。

[0006] 胶体金结合垫上包被有抗四环素单克隆抗体与胶体金的结合物;硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有四环素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠IgG,分别作为检测线和质控线。偶联四环素的载体蛋白可为牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、血蓝蛋白(KLH)等。

[0007] 本实用新型所描述的试剂板的各部分组成成分与功能如下:

[0008] 塑料模板,起固定试纸条及标示功能区(加样孔、检测区、控制区)的作用

[0009] 背衬为一面涂有不干胶的不吸水的韧性材料,如PVC板,起固定支持试纸其他组成部分的作用。

[0010] 样品垫由玻璃纤维制成,起吸收样品溶液与缓冲样品溶液pH值的作用。

[0011] 胶体金结合垫由聚酯膜制成,其上标记有抗四环素单克隆抗体与胶体金的结合

物,是样品溶液中的有效成分与金标抗体发生反应的场所。

[0012] 硝酸纤维素膜部分主要作用是将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0013] 吸水垫为滤纸,作为吸水部分其作用是将移动上来的多余的溶液吸收。

[0014] 本实用新型试纸板具有如下有益效果:

[0015] (1) 特异性好。本实用新型试剂板的抗四环素单克隆抗体除对四环素的交叉反应率为 100%外,对四环素类药物中的土霉素、金霉素的交叉反应率分别为 69%和 62%,因此本实用新型可以同时检测牛奶中多种四环素类药物残留。此外,本实用新型试剂对氯霉素、链霉素、庆大霉素、青霉素、磺胺类等其他种类抗生素药物无交叉反应。

[0016] (2) 灵敏度高。我国国家标准规定牛奶中四环素残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本实用新型试剂板的灵敏度可达到四环素标准品 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、土霉素标准品 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、金霉素标准品 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,用于检测牛奶中的四环素类残留,最低检测限可达到四环素 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、土霉素 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、金霉素 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0017] (3) 操作简便快速。本实用新型将免疫层析反应所需的大部分原料已整合到试剂条中,滴样后抗原抗体反应在固相膜上快速进行,大大缩短了检样时间,且样品无需处理,滴样后 3 ~ 5 分钟内读取结果,使得整个检测过程仅需 5 分钟左右。本方法不需任何专业培训,普通人员均可操作,只需按说明滴样后用肉眼判读即可。

[0018] (4) 不依赖于实验设备。本实用新型在直接滴样跑板后,通过肉眼判断硝酸纤维素膜上检测线和控制线的颜色深浅对比来判读结果,整个检测过程无需用到任何实验设备,真正做到了对实验设备零要求的目标,尤其适合于野外及现场操作,易于推广使用。

[0019] (5) 成本低,效益好。本实用新型试剂板生产工艺流程简单,生产成本低廉,投资少,见效快。

[0020] 附图说明

[0021] 图 1. 为四环素免疫胶体金快速检测试纸板结构示意图,其中 1 为样品垫,2 为胶体金结合垫,3 为硝酸纤维素膜,4 为检测线,5 为控制线,6 为吸水垫,7 为不干胶,8 为 PVC 板。

[0022] 图 2. 为四环素免疫胶体金快速检测试纸板操作示意图,其中 S 为加样孔,C 为控制区,T 为检测区。

[0023] 图 3. 为四环素免疫胶体金快速检测试纸板结果判定示意图,其中 C 为控制区,T 为检测区。

[0024] 具体实施方式

[0025] 要制备四环素免疫胶体金快速检测试纸板需要制备四环素载体蛋白偶联物、抗四环素单克隆抗体、胶体金溶液、胶体金标记抗四环素单克隆抗体,这些物质的制备方法如下。

[0026] 1. 四环素与载体蛋白的偶联

[0027] 采用 Mannich 法将盐酸四环素与载体蛋白偶联制备免疫抗原和包被抗原。称取 50mg 盐酸四环素溶于 2mL 水中,加入到 50mg/mL 载体蛋白溶液中,再加入 2mL 3mol/L pH 5 醋酸钠缓冲液和 2mL 7.5% 甲醛溶液,上述混合溶液室温下搅拌 2h,用双蒸水透析 5 天,滤膜过滤后,收集。

[0028] 2. 抗四环素单克隆抗体的制备

[0029] 取 6 ~ 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,将作为免疫原的四环素载体蛋白偶联物与等体积

的弗氏完全佐剂乳化,皮下注射,剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{只}$,以后每隔 3 周加强免疫 1 次,改用不完全佐剂,腹腔注射。融合前 3d 强化免疫 1 次,不用佐剂,剂量加倍。细胞融合按常规方法进行:将 Sp2/0 多发性骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1 : 10 的比例混合,在 50% PEG 作用下融合,然后用 HAT 培养基悬浮,再分种于 96 孔培养板中,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

[0030] 融合后,待细胞生长到培养孔面积的 $1/4$ 时,采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初筛以 $10\text{mg}/\text{L}$ 四环素载体蛋白偶联物(此处载体蛋白与作为免疫原的载体蛋白应为不同种类)包被酶联板,被测孔加培养上清,孵育、清洗后,加入羊抗鼠 IgG-HRP(1 : 1000),OPD 显色。筛选出的阳性孔再用四环素载体蛋白偶联物(同初筛)包被的酶联板进行阻断间接 ELISA。先将细胞培养上清与 $2 \times 10^{-3}\text{mol}/\text{L}$ TC 溶液等量混合, 37°C 感作 1h,再加入已包被的酶标板中。同时用 PBS($0.01\text{mol}/\text{L}$ 、 $\text{pH}7.4$)替代 TC 溶液作对照,其余步骤同上。若 TC 阻断后的 OD 值降至对照孔的 50% 以下,则判为阳性孔。经 2 ~ 3 次检测都呈阳性的孔,立即用有限稀释法进行克隆化。

[0031] 体外培养:将克隆化的细胞株扩大培养,待细胞浓度达 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 时停止换液,直至细胞全部死亡,收集培养液。体内诱生腹水:给腹腔注射液体石蜡 10 天后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10^7 个细胞,7 天后抽取腹水。

[0032] 3. 胶体金溶液的制备

[0033] 胶体金颗粒的大小平均为 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°C 下保存备用。

[0034] 4. 胶体金标记抗四环素单克隆抗体制备

[0035] 取已制备好的 100mL 胶体金溶液,用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入 1.5mg 抗四环素单抗,搅拌 20min,再逐滴加入 2mL $25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚乙二醇 20000(PEG20000),搅拌 15min。 $20,000\text{rpm}$ 离心 15min,弃上清液,加入 10mL pH 7.4PBS 缓冲液(含 $0.4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PEG)清洗 2 次。将沉淀用 5mL 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)溶解,用 $0.22 \mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤后, 4°C 保存备用。

[0036] 5. 四环素免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0037] 参照图 1,用点膜机把适当浓度的四环素-载体蛋白偶联物及羊抗鼠 IgG 喷在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线和控制线,在 37°C 烘箱干燥 8h。以同样方法,将制备好的金标记四环素单克隆抗体包被在胶体金结合垫上。

[0038] 检测试剂组成为一个 PVC 背衬,在其上按顺序粘上样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。用切割机将贴好的大卡切割成 4mm 宽的条,装入塑料模板中制成检测试剂板,再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

[0039] 6. 四环素免疫胶体金快速检测试剂板检测原理

[0040] 当待检样品溶液滴入试剂板加样孔后,样品溶液因硝酸纤维素膜载体的毛细管作用向另一端扩散。在移动的过程中,会发生相应的抗原抗体反应,并通过免疫胶体金的颜色显示出来。如果样品溶液含有四环素残留,四环素药物将和胶体金颗粒上的抗体先行反应,因此当胶体金颗粒随样品溶液扩散至检测线时,胶体金颗粒上抗体的活性位点因被样品溶液中的四环素药物占据而无法与检测线上四环素特异性抗原结合;所以当样品中的四环素含量超过试剂板检出限时,试剂板上的检测线将较控制线显色淡甚至无显色,判定为阳性。反之,当样品中四环素含量在试剂板检出限以下或无残留时,试剂板上的检测线显色与控

制线相近或偏深,判定为阴性。

[0041] 7. 四环素免疫胶体金快速检测试剂板检测实施例操作方法

[0042] 7.1 样品制备

[0043] 将牛奶样品预热到 50℃左右。

[0044] 7.2 检测步骤

[0045] 从包装袋中取出试剂板后立即使用,用滴管吸取预热牛奶溶液,于加样孔中滴加 5 滴(约 150 μL),加样后开始计时,结果应在 5 ~ 10 分钟读取,其他时间判读无效。

[0046] 7.3 结果判断

[0047] 读取结果时,试剂板水平置于观察者正面,如图 3 右侧所示。

[0048] 阴性(-):T 线显色比 C 线深或一样深,表明样品中四环素浓度低于 10 μg/kg 或无四环素残留。如图 4. a 所示。

[0049] 阳性(+):T 线显色比 C 线浅,或 T 线无显色,表明样品中四环素浓度高于 10 μg/kg;T 线比 C 线越浅,表明样品中四环素浓度越高。如图 4. b 所示。

[0050] 无效:未出现 C 线,可能操作不当或试剂板已失效。如图 4. c 所示。

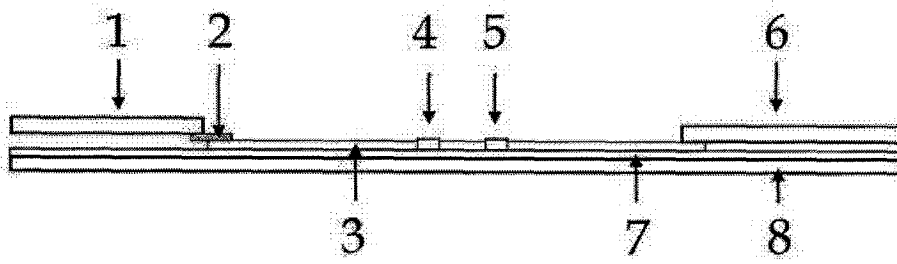


图 1

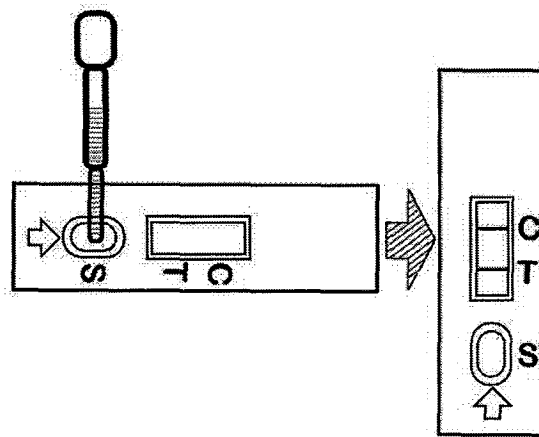


图 2

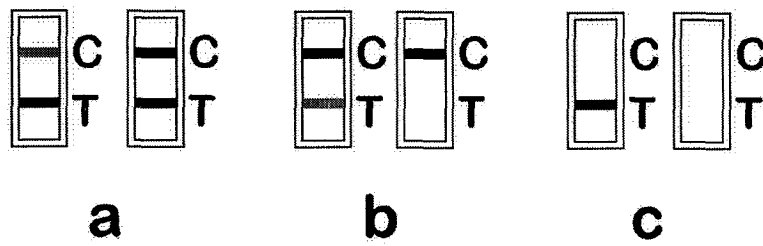


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 四环素免疫胶体金快速检测试剂板 | | |
| 公开(公告)号 | CN201518027U | 公开(公告)日 | 2010-06-30 |
| 申请号 | CN200920189681.5 | 申请日 | 2009-07-24 |
| [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 | 张少恩 桑丽雅 卜令杰 邵伟 | | |
| 发明人 | 张少恩 桑丽雅 卜令杰 邵伟 | | |
| IPC分类号 | G01N33/558 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/532 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本实用新型四环素免疫胶体金快速检测试剂板，属于兽药残留免疫化学的快速测定试纸，由上下两块塑料模板和试纸条组成。在试纸条背衬上依次粘附有样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，相邻各部分间有1-2mm的重叠，胶体金结合垫上包被有抗四环素单克隆抗体与胶体金的结合物，硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有四环素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠IgG，分别作为检测线和质控线。本实用新型特异性好，可同时检测四环素、土霉素、金霉素等四环素类抗生素残留，灵敏度高达5 μ g/kg，操作简便快速，整个检测过程仅需5分钟左右，且无需任何实验设备，尤其适合于野外及现场操作，易于推广使用。

