



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645684 A

(43)申请公布日 2017.05.10

---

(21)申请号 201610983889.9

(22)申请日 2016.11.09

(71)申请人 百奥森(江苏)食品安全科技有限公司

地址 214070 江苏省无锡市滴翠路100号创意园三期A幢303

(72)发明人 张进 吴念绮 周朱晨 张根义  
胡彬

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:(1)贝类毒素半抗原的制备;(2)贝类毒素免疫原的制备;(3)包被原的制备;(4)单克隆抗体的制备;(5)兔抗鼠抗体的制备;(6)免疫胶体金标记物的制备;(7)试纸条的制备。本发明的试纸板具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点,操作简单、快速、安全,将反应所需的大部分原料整合到PVC背衬中,滴样后,抗原抗体反应在固相膜上快速进行,大大缩短检样时间,且样品无需特殊处理,成本低,易推广,生产成本低廉,投资少,收效快。

1. 一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 贝类毒素半抗原的制备:取贝类毒素标准品1mg,N-甲基己内酰胺0.70mL,3,5-二氯苯胺1.20mL及1-乙酰-4-(2-羟乙基)哌嗪0.25mL加入3mL的3-氧代环丁烷基羧酸中,作为A液;取5-三氟甲基尿嘧啶25mg溶解于1.5mL干燥的3-氧代环丁烷基羧酸中,作为B液;10℃条件下缓慢滴加B液于A液中,滴加完毕后进行摇匀,蒸除溶剂,柱层析纯化后,即得;

(2) 贝类毒素免疫原的制备:取2mg贝类毒素半抗原,溶解于0.74mL 3-氧代环丁烷基羧酸中;取3-甲基吗啉盐酸盐溶液0.4mL,加入贝类毒素半抗原溶液中,低温搅拌2h,即得反应液A;称取牛血清白蛋白(BSA)17mg,使之充分溶解在5.25mL磷酸盐缓冲液中,随后将反应液A逐滴缓慢滴加到BSA溶液中,并于室温下搅拌24h,超滤后分装,于-20℃保存备用;

(3) 包被原的制备:取3mg贝类毒素半抗原,溶解于2mL 3-氧代环丁烷基羧酸中;取氰基吡咯烷酮溶液0.4mL,加入贝类毒素半抗原溶液中,室温下搅拌24h,即得反应液A;称取牛血清白蛋白(BSA)25mg,使之充分溶解在5.25mL磷酸盐缓冲液中,将反应液A逐滴缓慢滴加到BSA溶液中,并于室温下搅拌24h,超滤后分装,于-20℃保存备用;

(4) 单克隆抗体的制备:

将上述步骤(2)中制得的贝类毒素免疫原注入昆明小鼠体内,免疫剂量为200μg/只,随后每隔2天注射不完全佐剂量,使其产生抗血清;随后将免疫昆明小鼠肝细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选后进行克隆化和扩增,以备冻存保存;随后将融合后的骨髓瘤细胞与慢病毒HIV-1进行再次融合,进行扩大培养;

(5) 兔抗鼠抗体的制备:以兔作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体兔进行免疫,得到兔抗鼠抗体;

(6) 免疫胶体金标记物的制备:以氯金酸为基体,将单克隆抗体进行包覆在氯金酸上,柱层析纯化后即得;

(7) 试纸条的制备:准备基板、衬板、金标垫、样品垫、硝酸纤维素膜,其中金标垫中涂抹有单克隆抗体,硝酸纤维素膜上设有检测线和质控线,检测线上涂抹包被原,质控线上包被兔抗鼠抗体;接着,将硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫依次按照从下到上的顺序粘附在衬板上;最后,将衬板和基板进行压制,即得。

2. 根据权利要求1所述的一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(2)中3-甲基吗啉盐酸盐溶液为含EDTA的盐溶液。

3. 根据权利要求1所述的一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(6)中氯金酸的质量百分比浓度为1%。

4. 根据权利要求1所述的一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(7)中基板采用有机玻璃制成。

## 一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金检测试剂板，具体是一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法。

### 背景技术

[0002] 当前，我国用于腹泻性贝类毒素的检测方法主要有小鼠生物法及酶联免疫吸附检测试法。小鼠生物法的检测原理：贝类样品用丙酮、乙醚提取后，经减压蒸干，以1%吐温-60生理盐水溶解后注射入小鼠腹腔，观察小鼠存活情况，计算其毒力。ELISA的检测原理：测定的基础是抗原抗体反应，微孔板包被有针对大田软海绵酸(DSP的主要成分)抗体的捕捉抗体，加入标准或样品溶液及OA酶标记物，游离OA与OA酶标记物竞争OA抗体，同时OA抗体与捕捉抗体连接。洗涤后，将底物和发色剂加入到孔中并且孵育。加入终止液后，在450nm波长下测定吸光度值。小鼠生物法是当前我国腹泻性贝类毒素的标准检测方法，但其不足之处显而易见，如：(1)动物使用带来的伦理问题，受到动物保护组织的强烈反对；(2)灵敏度低，可比性和重复性差，检测结果与小鼠的品系、体重及状态等有关，难以形成统一的检测标准；(3)准确性差，该方法只能检测出毒力的大小，无法确定毒素的成分和含量，容易因高浓度的锌或不饱和脂肪酸的存在导致假阳性；(4)样品提取过程复杂。

[0003] ELISA法主要存在以下不足：(1)抗体往往只针对主要成分，其类似物可能会产生交叉反应，从而出现假阳性或对毒性的估计不准确；(2)单克隆抗体的制备困难，试剂盒价格昂贵；(3)我国目前尚无商品化ELISA试剂盒可售。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种灵敏度高、操作简单的贝类毒素快速检测试纸条的制备方法，以解决上述背景技术中提出的问题。

[0005] 为实现上述目的，本发明提供如下技术方案：

一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 贝类毒素半抗原的制备：取贝类毒素标准品1mg，N-甲基己内酰胺0.70mL，3,5-二氯苯胺1.20mL及1-乙酰-4-(2-羟乙基)哌嗪0.25mL加入3mL的3-氧代环丁烷基羧酸中，作为A液；取5-三氟甲基尿嘧啶25mg溶解于1.5mL干燥的3-氧代环丁烷基羧酸中，作为B液；10℃条件下缓慢滴加B液于A液中，滴加完毕后进行摇匀，蒸除溶剂，柱层析纯化后，即得；

(2) 贝类毒素免疫原的制备：取2mg贝类毒素半抗原，溶解于0.74mL 3-氧代环丁烷基羧酸中；取3-甲基吗啉盐酸盐溶液0.4mL，加入贝类毒素半抗原溶液中，低温搅拌2h，即得反应液A；称取牛血清白蛋白(BSA)17mg，使之充分溶解在5.25mL磷酸盐缓冲液中，随后将反应液A逐滴缓慢滴加到BSA溶液中，并于室温下搅拌24h，超滤后分装，于-20℃保存备用；

(3) 包被原的制备：取3mg贝类毒素半抗原，溶解于2mL 3-氧代环丁烷基羧酸中；取氨基吡咯烷酮溶液0.4mL，加入贝类毒素半抗原溶液中，室温下搅拌24h，即得反应液A；称取牛血清白蛋白(BSA)25mg，使之充分溶解在5.25mL磷酸盐缓冲液中，将反应液A逐滴缓慢滴加到

BSA溶液中，并于室温下搅拌24h，超滤后分装，于-20℃保存备用；

(4) 单克隆抗体的制备：

将上述步骤(2)中制得的贝类毒素免疫原注入昆明小鼠体内，免疫剂量为200μg/只，随后每隔2天注射不完全佐剂量，使其产生抗血清；随后将免疫昆明小鼠肝细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合，筛选后进行克隆化和扩增，以备冻存保存；随后将融合后的骨髓瘤细胞与慢病毒HIV-1进行再次融合，进行扩大培养；

(5) 兔抗鼠抗体的制备：以兔作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病原体兔进行免疫，得到兔抗鼠抗体；

(6) 免疫胶体金标记物的制备：以氯金酸为基体，将单克隆抗体进行包覆在氯金酸上，柱层析纯化后即得；

(7) 试纸条的制备：准备基板、衬板、金标垫、样品垫、硝酸纤维素膜，其中金标垫中涂抹有单克隆抗体，硝酸纤维素膜上设有检测线和质控线，检测线上涂抹包被原，质控线上包被兔抗鼠抗体；接着，将硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫依次按照从下到上的顺序粘附在衬板上；最后，将衬板和基板进行压制，即得。

[0006] 作为本发明进一步的方案：步骤(2)中3-甲基吗啉盐酸盐溶液为含EDTA的盐溶液。

[0007] 作为本发明进一步的方案：步骤(6)中氯金酸的质量百分比浓度为1%。

[0008] 作为本发明进一步的方案：步骤(7)中基板采用有机玻璃制成。

[0009] 与现有技术相比，本发明的有益效果是：

本发明的试纸板具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点，操作简单、快速、安全，将反应所需的大部分原料整合到PVC背衬中，滴样后，抗原抗体反应在固相膜上快速进行，大大缩短检样时间，且样品无需特殊处理，成本低，易推广，生产成本低廉，投资少，收效快。

## 具体实施方式

[0010] 下面结合具体实施方式对本专利的技术方案作进一步详细地说明。

[0011] 一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 贝类毒素半抗原的制备：取贝类毒素标准品1mg，N-甲基己内酰胺0.70mL，3,5-二氯苯胺1.20mL及1-乙酰-4-(2-羟乙基)哌嗪0.25mL加入3mL的3-氧代环丁烷基羧酸中，作为A液；取5-三氟甲基尿嘧啶25mg溶解于1.5mL干燥的3-氧代环丁烷基羧酸中，作为B液；10℃条件下缓慢滴加B液于A液中，滴加完毕后进行摇匀，蒸除溶剂，柱层析纯化后，即得；

(2) 贝类毒素免疫原的制备：取2mg贝类毒素半抗原，溶解于0.74mL 3-氧代环丁烷基羧酸中；取3-甲基吗啉盐酸盐溶液0.4mL，加入贝类毒素半抗原溶液中，低温搅拌2h，即得反应液A；称取牛血清白蛋白(BCA)17mg，使之充分溶解在5.25mL磷酸盐缓冲液中，随后将反应液A逐滴缓慢滴加到BCA溶液中，并于室温下搅拌24h，超滤后分装，于-20℃保存备用；

(3) 包被原的制备：取3mg贝类毒素半抗原，溶解于2mL 3-氧代环丁烷基羧酸中；取氨基吡咯烷酮溶液0.4mL，加入贝类毒素半抗原溶液中，室温下搅拌24h，即得反应液A；称取牛血清白蛋白(BCA)25mg，使之充分溶解在5.25mL磷酸盐缓冲液中，将反应液A逐滴缓慢滴加到BCA溶液中，并于室温下搅拌24h，超滤后分装，于-20℃保存备用；

(4) 单克隆抗体的制备：

将上述步骤(2)中制得的贝类毒素免疫原注入昆明小鼠体内,免疫剂量为200 $\mu\text{g}$ /只,随后每隔2天注射不完全佐剂量,使其产生抗血清;随后将免疫昆明小鼠肝细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选后进行克隆化和扩增,以备冻存保存;随后将融合后的骨髓瘤细胞与慢病毒HIV-1进行再次融合,进行扩大培养;

(5) 兔抗鼠抗体的制备:以兔作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体兔进行免疫,得到兔抗鼠抗体;

(6) 免疫胶体金标记物的制备:以氯金酸为基体,将单克隆抗体进行包覆在氯金酸上,柱层析纯化后即得;

(7) 试纸条的制备:准备基板、衬板、金标垫、样品垫、硝酸纤维素膜,其中金标垫中涂抹有单克隆抗体,硝酸纤维素膜上设有检测线和质控线,检测线上涂抹包被原,质控线上包被兔抗鼠抗体;接着,将硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫依次按照从下到上的顺序粘附在衬板上;最后,将衬板和基板进行压制,即得。

[0012] 其中:

步骤(2)中3-甲基吗啉盐酸盐溶液为含EDTA的盐溶液。

[0013] 步骤(6)中氯金酸的质量百分比浓度为1%。

[0014] 步骤(7)中基板采用有机玻璃制成。

[0015] 本发明的试纸板具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点,操作简单、快速、安全,将反应所需的大部分原料整合到PVC背衬中,滴样后,抗原抗体反应在固相膜上快速进行,大大缩短检样时间,且样品无需特殊处理,成本低,易推广,生产成本低廉,投资少,收效快。

[0016] 上面对本专利的较佳实施方式作了详细说明,但是本专利并不限于上述实施方式,在本领域的普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本专利宗旨的前提下作出各种变化。

专利名称(译)	一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106645684A</a>	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201610983889.9	申请日	2016-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	百奥森江苏食品安全科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
[标]发明人	张进 吴念绮 周朱晨 张根义 胡彬		
发明人	张进 吴念绮 周朱晨 张根义 胡彬		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577 G01N2333/43508		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了一种贝类毒素快速检测试纸条的制备方法，包括以下步骤：(1)贝类毒素半抗原的制备；(2)贝类毒素免疫原的制备；(3)包被原的制备；(4)单克隆抗体的制备；(5)兔抗鼠抗体的制备；(6)免疫胶体金标记物的制备；(7)试纸条的制备。本发明的试纸板具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点，操作简单、快速、安全，将反应所需的大部分原料整合到PVC背衬中，滴样后，抗原抗体反应在固相膜上快速进行，大大缩短检样时间，且样品无需特殊处理，成本低，易推广，生产成本低廉，投资少，收效快。