

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610018120.X

[51] Int. Cl.

C12N 5/18 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月29日

[11] 授权公告号 CN 100482787C

[22] 申请日 2006.1.9

[21] 申请号 200610018120.X

[73] 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 毕丁仁 王喜亮 熊宁 石德时
李自力 刘百红 李晓云 张道宏
金秀娥

[56] 参考文献

WO03016914A1 2003.2.27

CN1547017A 2004.11.17

CN1547016A 2004.11.17

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于快速检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条及其制备方法，属于兽药残留的免疫化学速测技术领域。本发明的试纸条，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，其特征在于，在PVC背衬上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫；所述的结合垫上包被有所述的抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物，该单克隆抗体由杂交瘤细胞系BDRXN（保藏号为CCTCC-C200522）所分泌得到的。所述的硝酸纤维素膜上分别包被有磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物构成的检测线和兔抗鼠IgG构成的质控线。本发明的试纸条有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确等显著优点。

- 1、一种杂交瘤细胞系 BDRXN，其保藏号为 CCTCC - C200522。
- 2、一种能够专门识别磺胺嘧啶的单克隆抗体，它是由权利要求 1 所述的杂交瘤细胞系 BDRXN 所分泌的。
- 3、一种适用于检测磺胺嘧啶残留的试纸条，它包括样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）和 PVC 背衬（7），其特征在于，在 PVC 背衬(7) 上按顺序依次粘附有样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）；所述的结合垫（2）上包被有胶体金与权利要求 2 所述的单克隆抗体所形成的抗磺胺嘧啶单克隆抗体—胶体金标记物；所述的硝酸纤维素膜（3）上分别包被有磺胺嘧啶—牛血清白蛋白偶联物构成的检测线（5）和兔抗鼠 IgG 构成的质控线（6）。
- 4、权利要求 2 所述的单克隆抗体在制备检测磺胺嘧啶残留试纸条中的应用。

检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条及其制备方法

技术领域

本发明属于兽药残留的免疫化学速测技术领域，具体地说，是一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应，用以快速检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条及其制备方法。

背景技术

长期以来磺胺嘧啶(SD)一直被作为一种优良的抗菌药物应用于临床和作为兽用药物。近年研究发现，磺胺嘧啶具有诸多副作用，如：由其及其乙酰衍生物在尿液中的结晶可引起肾损伤，也可引起肝损伤、末端神经炎及一种类似结节性周围动脉炎的病症，以及药物过敏性皮炎、白细胞减少、溶血性贫血和药物热等。另外，长期应用时许多细菌也可对其产生抗药性。因此，目前磺胺嘧啶已被抗菌作用更强、副作用更小的抗菌素类药物所替代，但其作为兽药应用仍十分普遍。由于磺胺嘧啶在畜禽生产中的不合理使用，致使磺胺嘧啶在动物源食品中残留并通过食物链对人类健康造成潜在的危害。磺胺嘧啶残留已引起了国内外的高度重视。因此我国以及美国、欧盟等国家规定了动物源性食品中磺胺类药物残留量必须低于0.1mg/kg，其中包括磺胺嘧啶。为杜绝磺胺嘧啶超标的畜产品进入市场，必须加强对磺胺嘧啶残留的监测。

目前对磺胺嘧啶常用的检测方法主要有两种：一种是色谱分析，如高效液相色谱法(HPLC)，一种为免疫学方法，如酶联免疫吸附法(ELISA)。

色谱技术对磺胺嘧啶检测是非常有效、准确和敏感的，但也存在如下缺点：(1)待检测样品预处理程序繁琐费时(2)需要经过专业培训的技术人员操作，操作人员要有丰富的相关经验，操作人员必须了解影响色谱分析的各种干扰因素，了解所使用的预处理方法的优缺点，才能获得可靠的分析结果；(3)需要昂贵的仪器设备辅助，难以在中小城市及中小企业中普及。(4)仪器保养的要求高，保养的好坏直接影响分析结果的准确性；(5)检测费用高。

酶联免疫吸附法(ELISA)是以竞争性酶联反应为检测原理，以磺胺嘧啶抗体包被酶标板，检测时将待检样品和酶标结合物同时加入酶标板，反应后通过显色测OD值来判定结果。存在的缺点是：(1)需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用，不利于在基层单位进行推广使用；(2)检测操作人员需要经过专业培训；(3)操作过程相对比较复杂，检测所需时间比较长，全程需要2h—4h；(4)检测所需费用较高，不能实现单份检测。

胶体金免疫层析(gold-immunochromatography assay GICA)是20世纪80年代发展起来的一项新的免疫分析方式，是应用胶体金标记技术，以胶体金作为示踪物，应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。它具有简便，快速，特异性强，灵敏度高，费用低的优点。依据胶体金免疫层析技术，在国内外无论人医应用方面，还是兽医应用方面，都已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测试纸条。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术存在的缺陷，提供一种特异性强、灵敏度高，操作简便，检测快速、准确的专门用于检测磺胺嘧啶残留的试纸条及其制备方法。

本发明的总体技术路线图见图1所示。

本发明是这样实现的：

为了实现本发明，申请人制备了一种能分泌抗磺胺嘧啶的单克隆抗体杂交瘤细胞系 BDRXN，其保藏号为 CCTCC - C200522。

一种适用于检测磺胺嘧啶残留的试纸条，它包括样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸

水垫(4)和PVC背衬(7),其具体结构是:在PVC背衬(7)按顺序依次粘附有样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4);所述的结合垫(2)上包被有所述的抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物;所述的硝酸纤维素膜(3)上分别包被有磺胺嘧啶-载体蛋白(牛血清白蛋白)偶联物构成的检测线(5)和兔抗鼠IgG构成的质控线(6)。

一种适用于检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条的制备方法,其步骤包括:

- 1) 将磺胺嘧啶与载体蛋白偶联,形成磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物;
- 2) 用磺胺嘧啶-载体蛋白(人血清白蛋白)偶联物免疫小鼠,得到分泌抗磺胺嘧啶的单克隆抗体的细胞系BDRXN,其保藏号为CCTCC-C200522;
- 3) 提取小鼠IgG免疫健康家兔,得到兔抗鼠IgG抗体;
- 4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;
- 5) 将步骤2)制备的抗磺胺嘧啶单克隆抗体加入步骤4)制备的胶体金中,得到抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物;
- 6) 将抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合垫(2)上;
- 7) 将磺胺嘧啶-载体蛋白(牛血清白蛋白)偶联物包被在硝酸纤维素膜(3)上构成检测线(5);并将兔抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜(3)上构成质控线(6);
- 8) 在所述的PVC背衬(7)上按顺序依次粘附所述的样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4),得到所述的检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条。

本发明选用磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物作为检测线,抗磺胺嘧啶特异性单克隆抗体为胶体金标记的抗体,利用竞争法来检测待测样品中是否含有磺胺嘧啶。通过待检样品中的磺胺嘧啶与包被于硝酸纤维素膜上的磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物共同竞争抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物,在检测线处出现颜色深浅不同的红色条带或不出现条带,质控线处出现红色条带。若待测样品试纸条检测线颜色明显浅于阴性标准品试纸条检测线颜色,同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品,即待测样品中磺胺嘧啶的浓度在20ppb-80ppb范围内;若待测样品试纸条检测线无颜色出现,同时质控线上出现红色条带也判断为阳性样品,即待测样品中磺胺嘧啶的浓度高于80ppb;若待测样品试纸条检测线颜色等于或深于阴性标准品试纸条检测线颜色,同时质控线上出现红色条带则判断为阴性样品,即磺胺嘧啶的浓度小于20ppb;如果质控线上没有红色条带出现,则该试纸条无效。

本检测试纸条(结构图如图2所示)由样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4)按图示的顺序依次粘附在PVC背衬(7)上组装而成的。结合垫上包被有本发明制备的抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物,硝酸纤维素膜上包被有检测线(5)和质控线(6),其中检测线为本发明制备的磺胺嘧啶-载体蛋白(牛血清白蛋白)偶联物,质控线为本发明制备的兔抗鼠IgG。所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC背衬均购自Millipore公司。所述的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒购自ROCKLAND公司。

与现有技术相比,本发明具有以下突出的优点:

- 1、本发明的检测磺胺嘧啶的免疫胶体金试纸条,具有特异性强,灵敏度高,检测时间短(20分钟)等优点。
- 2、本发明的检测试纸条不需要任何特殊仪器、设备,检测成本低。
- 3、本发明的检测试纸条操作简便,不需由专业人员操作。
- 4、本发明的检测试纸条储存方便,对温度要求不高,在4~8℃下有效保存期可达一年;在室温下可保存六个月。

附图说明

图 1: 本发明的总体技术路线图

图 2: 本发明检测试纸条的组装示意图

图中 1 为样品垫, 2 为结合垫, 3 为硝酸纤维素膜, 4 为吸收垫, 5 为检测线, 6 为质控线, 7 为 PVC 背衬

图 3: 本发明检测试纸条结果判定示意图

图中: A: 为阴性标准品结果, B: 为阴性样品结果, C、D: 为阳性样品结果, E、F: 为试纸条失效。

具体实施方式

实施例 1 (制备实施例)

检测磺胺嘧啶的免疫胶体金试纸条的制备方法

1、磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物的制备

合成磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物:

(1) 准确称取 40mg 磺胺嘧啶溶于 2ml 1M NaOH 和 1.1ml 1% NaNO₂ 的混合溶液中, 配制成磺胺嘧啶溶液。

(2) 冰水浴且磁力搅拌下, 将磺胺嘧啶溶液逐滴加到 2.4ml 1mol/l HCl 中, 进行重氮化 (Itaru Y, Kohji I. Enzyme immunoassay for clenbuterol, an β_2 -adrennergic stimulant [J]. Journal of immunoassay, 1982, 3(2):155-171) 反应, 加完后继续反应 5min。

(3) 磁力搅拌下, 将重氮化产物分别逐滴加到人血清白蛋白 (HSA)、牛血清白蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 溶液中, 用 1mol/l NaOH 调 pH 值到 9.5, 4℃ 缓慢搅拌过夜, 得到三种连接产物, 即磺胺嘧啶-HSA、磺胺嘧啶-BSA、磺胺嘧啶-OVA。

(4) 将步骤 (3) 得到的连接产物磺胺嘧啶-HSA、磺胺嘧啶-BSA、磺胺嘧啶-OVA 分别装入透析袋, 用 0.01M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (配方: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, 用蒸馏水定容至 1000ml) 透析三天, 去除游离的磺胺嘧啶小分子后, -20℃ 保存备用。

2、抗磺胺嘧啶单克隆抗体的制备:

利用申请人所制备的磺胺嘧啶-人血清白蛋白 (HSA) 偶联物免疫 Balb/C 小鼠 (购自湖北省医科院实验动物中心), 免疫程序是取含磺胺嘧啶-人血清白蛋白 (HSA) 偶联物 100 μ g 的溶液与等体积的弗氏完全佐剂 (购自 sigma 公司) 乳化, 注射小鼠腹腔, 以后每间隔十天加强一次, 换用弗氏不完全佐剂乳化 (购自 sigma 公司)。最后于融合前三天, (最好与上次免疫相隔 4 周以上), 腹腔强化免疫, 抗原量加倍 (200 μ g), 不加佐剂。融合时, 取经最后强化免疫的 Balb/C 小鼠一只, 眼眶放血处死 (收集血清, 即为阳性血清), 在 75% 酒精中浸泡 5 min 消毒。无菌取出小鼠脾脏, 分离出脾细胞, 与新鲜制备的 SP2/0 骨髓瘤细胞 (SP2/0 骨髓瘤细胞购自卫生部武汉生物制品所) 按 1~2 $\times 10^7$ 个 SP2/0 与 10⁸ 个免疫细胞 (1:10~1:15) 的比例于 50 ml 离心管中混匀, 1500 rpm, 离心 10min。倒净上清 (可用灭菌的滤纸吸干), 轻轻敲击管底, 使细胞沉淀略加松动。将装有细胞混合物的离心管放于 37℃ 水浴中。然后在 1 min 内慢慢滴入预温至 37℃ 的 50% 聚乙二醇 (PEG) 0.8ml (购自 sigma 公司产品), 边加边轻轻用吸管尖搅拌, 继续搅拌 1 min。然后慢慢加入 37℃ 预温的 1640 (购自 sigma 公司产品) 基础液 (配方: 1640 10.4g, NaHCO₃ 2g, 用蒸馏水用蒸馏水定容至 1000ml, 调 pH 至 7.2) 10 ml。具体方法为: 第一分钟逐滴滴入 1ml。第二分钟加 1ml, 第 3~4 分钟加 3ml, 第 5 分钟加其余的 5ml, 每次加时需缓慢加入, 并不断轻轻地搅拌。最后加入 30 ml 1640 液, 也需慢慢加入。800 rpm 离心 5 min, 去上清, 于 37℃ 放置 5~8 min。用 HAT (购自 Sigma 公司产品, 其成

分为 100%含量)培养基悬浮,同时也用 HAT 培养基悬浮制备好的饲养脾细胞并与融合后的细胞混合,根据需要补加适量的 HAT 培养基(培养基的成分:80ml1640 基础液,20ml 灭菌小牛血清,1ml100%的 HAT,1ml 双抗),分种于 96 孔培养板中,约 250 μ l/孔。一次融合可接种 4~8 块 96 孔板。根据需要也可少种,一般按 SP2/0 的细胞数计算,每孔接种量约含 104 左右个 SP2/0 细胞。于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。融合后第二天开始观察有无污染,于第 4 天补加 1 滴 HAT 培养基,第 8~10 天吸去 100 μ l 培养基换 HT (购自 sigma 公司)培养基 100 μ l。待融合细胞集落长至培养孔 1/4,培养基略变黄时,进行抗体检测。采用磺胺嘧啶-卵清蛋白(OVA)作为筛选抗原,利用 ELISA 方法筛选出分泌抗磺胺嘧啶的阳性孔。对筛选出来的阳性孔立刻用有限稀释法(参照薛庆善《体外培养的原理与技术》科学出版社 2001 年版)进行克隆、筛选。经过 3~4 次克隆,最终筛选出分泌抗磺胺嘧啶的单克隆杂交瘤细胞系,该细胞系编号为 BDRXN,于 2005 年 12 月 30 日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏编号:CCTCC-C200522。对该细胞系进行了染色体计数,结果显示,SP2/0 的染色体的平均数为 70,脾细胞染色体为 40 条,而杂交瘤细胞的染色体数目在 80~94 之间。均高于两亲本细胞的染色体数目,说明融合细胞的确是 SP2/0 细胞与脾细胞的杂交产物,杂交瘤细胞的染色体数目明显多于骨髓瘤细胞 SP2/0 的染色体。将该细胞系注射 Balb/C 小鼠腹腔,生产单克隆抗体。采用购自 ROCKLAND 公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒(Mouse Mab Isotyping Test Kit)对本发明所得到的单克隆抗体进行亚型鉴定,结果为小鼠 IgG2b 亚类。

3、抗磺胺嘧啶单克隆抗体的纯化

参照朱立平等,《免疫学常用实验方法》,人民军医出版社 2000 版教导的方法:取所得的小鼠腹水 5ml 与适量的二氧化硅混合,加入等体积的巴比妥缓冲液(配方:氯化钠 85.00g,巴比妥 5.75g,巴比妥钠 3.75g,叠氮钠 2.00g,用蒸馏水用蒸馏水定容至 2000ml),室温振荡 1h 后,室温静置 30 min,取上清于洁净离心管中,4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm 离心 10min;取上清液 8ml,加入 16ml 0.06mol 醋酸钠缓冲液,用 HCL 调 pH 值至 4.5,充分搅拌下缓缓加入辛酸 132 μ l 后,室温搅拌 30min,然后转入 4 $^{\circ}$ C 冰箱充分沉淀 2h,4 $^{\circ}$ C, 15000 rpm 离心 30min,得上清液 22ml,加入 2.2ml pH7.2、0.1M 的磷酸缓冲液(PB),用 NaOH 调 pH 值至 7.6,搅拌下缓缓加入硫酸铵至终浓度为 0.277g/ml,4 $^{\circ}$ C 冰箱充分沉淀 2h 后,4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 离心 30min,弃上清,沉淀用 5ml 0.01MpH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,装入透析袋,对 5000ml 0.01MpH7.2 磷酸盐缓冲液充分透析后,再对 2000 ml 蒸馏水透析,最后对 3000ml 三蒸去离子水透析,将充分透析好的蛋白溶液用聚乙二醇-20000(PEG-20000)浓缩至 3 ml,然后 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm 离心 30min,弃沉淀,收集上清液,测得蛋白浓度为 1.6mg/ml。经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳(SDS-PAGE)鉴定为纯化的单克隆抗体,纯度大于 95%。该单克隆抗体可用于制备免疫胶体金。

4、兔抗鼠 IgG 抗体的制备:

利用申请人所在的微生物与免疫实验室提取的 Balb/C 小鼠 IgG 免疫健康家兔,制备高特异性、高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清,对高免血清采用饱和硫酸铵沉淀法进行粗提,经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG 抗体。利用该抗体作为质控线。

5、抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物的制备

(1) 胶体金的制备:

用双蒸去离子水将 1%氯金酸稀释成 0.01%,置磁力加热搅拌器上搅拌煮沸,按每 100 ml 0.01%氯金酸加入 2 ml 1%柠檬酸三钠,继续煮沸,直到液体呈橙红色即停止加热,冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,有效期一周。

(2) 抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物的制备:

磁力搅拌下,用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.2,按 1~2 μ g 抗体/ml 胶体金加入抗磺胺嘧啶单克

隆抗体, 继续搅拌混匀 30 min, 加入 10%BSA 至终浓度为 1%, 静置 30 min。12000 rpm、4℃离心 30min, 弃上清, 沉淀用 0.02M pH9.0 的硼酸盐缓冲液(配方: 硼酸 0.1237g, PEG-20000 1g, 用三馏水定容至 1000ml, 调 pH 至 9.0) 洗涤两次, 用二十分之一初始胶体金体积的 0.02M pH9.0 的硼酸盐缓冲液(配方: 硼酸 0.1237g, PEG-20000 1g, 用三馏水定容至 1000ml, 调 pH 至 9.0) 将沉淀重悬, 置 4℃备用, 有效期 60 天。

6、结合垫的包被

将结合垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液(配方及制备: 20g BSA, 25g 蔗糖, 3gPVP K-30, 0.2gNa₃NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, 用蒸馏水定容至 1000ml) 中 30 min 后, 于 37℃ 烘干。然后用 Biodot 点膜仪将制备好的抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物均匀包被在结合垫上, 每厘米结合垫包被 9μl 抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物, 真空干燥, 真空封装, 置 4℃备用。

7、样品垫的处理

将样品垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液(配方及制备: 20g BSA, 25g 蔗糖, 3gPVP K-30, 0.2gNa₃NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, 用蒸馏水定容至 1000ml) 中 30 min 后, 于 37℃ 烘干, 真空封装, 置 4℃备用。

8、硝酸纤维素膜的包被

用 0.01M pH 7.4 PBS 缓冲液(含 3%的甲醇)将磺胺嘧啶-牛血清白蛋白(BSA)偶联物稀释到 65μg/ml, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为检测线, 包被量为 0.6μl/cm, 检测线靠近结合垫端, 距结合垫端约 8mm; 用 0.01M pH 7.4 PBS 缓冲液(含 3%的甲醇)将兔抗鼠 IgG 抗体稀释到 200μg/ml, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为质控线, 包被量为 0.6μl/cm, 质控线靠近吸水垫, 距吸收垫约 8mm, 两线距离 5~8 mm。37℃烘干, 封装备用。

9、试纸条的组装

将样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4)按图 2 所示的顺序依次粘附在 PVC 背衬(7)上, 切成 3mm 宽的小条, 真空封装。4~8℃保存, 有效期一年; 常温保存, 有效期 6 个月。

实施例 2 (应用实施例)

检测磺胺嘧啶的免疫胶体金试纸条的使用方法

1、样品的预处理

(1)组织样品的预处理

将待检组织样品匀浆, 取 3g 待检组织样品加入 6 ml 乙酸乙酯上下振荡 10 min, 室温 2000g 离心 10 min, 取 2 ml 上层液体蒸干或在氮气流下吹干, 用 1 ml 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液(配方: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, 用蒸馏水定容至 1000ml) 溶解残留物。

(2)蜂蜜样品的预处理

取 2g 蜂蜜样品加入 4ml 双蒸水溶解, 加 4ml 乙酸乙酯上下振荡 10 min, 室温 3000g 离心 10 min, 取 1ml 上层液体蒸干或在氮气流下吹干, 用 0.5 ml 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS) 溶解残留物。

(3)牛奶样品的预处理

牛奶样品经 3500rpm 离心 10min 脱脂后, 吸取中层牛奶 3ml 加入 6 ml 乙酸乙酯上下振荡 10 min, 室温 2000g 离心 10 min, 取 2 ml 上层液体蒸干或在氮气流下吹干, 用 1 ml 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS) 溶解残留物。

(4)鸡蛋样品的预处理

吸取3ml蛋黄加入6 ml乙酸乙酯上下振荡10 min, 室温2000g离心10 min, 取2 ml上层液体蒸干或在氮气流下吹干, 用1 ml 0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)溶解残留物。

2、检测

阴性标准品(0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液, 配方: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, 用蒸馏水定容至1000ml)及待检样品各取120μl加入微孔板中, 将胶体金试纸条插入待检样品中, 20分钟后观察结果。

3、结果判定

如图3所示, 若待测样品试纸条检测线颜色明显浅于阴性标准品试纸条检测线颜色, 同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品, 即待测样品中磺胺嘧啶的浓度在20ppb-80ppb范围内; 若待测样品试纸条检测线无颜色出现, 同时质控线上出现红色条带也判断为阳性样品, 即待测样品中磺胺嘧啶的浓度高于80ppb; 若待测样品试纸条检测线颜色等于或深于阴性标准品试纸条检测线颜色, 同时质控线上出现红色条带则判断为阴性样品, 即磺胺嘧啶的浓度小于20ppb; 如果质控线上没有红色条带出现, 则该试纸条无效。

实施例3 (应用实施例)

检测磺胺嘧啶的免疫胶体金试纸条的应用

1、特异性试验

将磺胺嘧啶、磺胺嘧啶钠、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、克伦特罗、氯霉素配制成浓度为500ppb的样品。按实施例2所述方法进行试验。试验结果(见表1)表明, 磺胺嘧啶、磺胺嘧啶钠样品检测线无颜色出现, 同时质控线上出现红色条带, 而磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、克伦特罗、氯霉素样品试纸条检测线颜色与标准品试纸条检测线颜色一致, 同时质控线上出现红色条带, 这表明磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、克伦特罗、氯霉素与本发明试纸条无交叉反应, 显示本发明试纸条具有好的特异性。

表1 本发明试纸条特异性试验结果

检测样品	磺胺嘧啶	磺胺嘧啶钠	磺胺二甲嘧啶	磺胺甲噁唑	磺胺对甲氧嘧啶	磺胺喹噁啉	磺胺二甲氧嘧啶	磺胺间甲氧嘧啶	克伦特罗	氯霉素
检测结果	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

2、敏感性试验

按实施例2所述的方法, 用本发明检测试纸条分别检测浓度为0、5、10、20、40、80ppb的磺胺嘧啶标准品, 重复8次, 用Biodot TSR3000读条系统测其检测线吸光值(G/Peak-ROD值), 结果见表2。根据统计学分析, 5ppb磺胺嘧啶标准品的检测线G/Peak-ROD值与0ppb磺胺嘧啶标准品检测线G/Peak-ROD值差异极显著。因此当磺胺嘧啶标准品浓度在5ppb-20ppb范围内时可借助Biodot TSR3000读条系统来判定结果; 当磺胺嘧啶标准品浓度在20ppb-80ppb范围内时检测线受到明显抑制(抑制率为30.51%), 肉眼很容易判定结果。当磺胺嘧啶标准品浓度高于80ppb时检测线无颜色出现。因此本发明检测试纸条灵敏度为5ppb, 肉眼判定检测限为20ppb, 符合中华人民共和国国家“磺胺嘧啶残留限量标准”。

表2 本发明试纸条敏感性(灵敏度)试验结果

磺胺嘧啶标准品	检测线吸光值 (G/ Peak-ROD)								\bar{x}	S	CV (%)	抑制率 (%)
0ppb	0.0595	0.0521	0.0695	0.0556	0.0597	0.0604	0.0545	0.0606	0.0590	0.0053	8.98	100
5ppb	0.0395	0.0395	0.034	0.0427	0.0399	0.0395	0.0399	0.0424	0.0397	0.0026	6.55	67.29
10ppb	0.0251	0.0239	0.0220	0.0249	0.0230	0.0260	0.0214	0.0287	0.0243	0.0024	9.88	41.19
20ppb	0.0168	0.0185	0.0173	0.0192	0.0177	0.0188	0.0165	0.0191	0.0180	0.0011	6.11	30.51
40ppb	0.0037	0.0039	0.0036	0.0034	0.0029	0.0037	0.0035	0.0036	0.0035	0.0003	8.57	5.93
80ppb	0.0028	0.0020	0.0021	0.0025	0.0028	0.0024	0.0023	0.0023	0.0024	0.0003	12.5	4.09

注： \bar{x} 表示平均值，S表示标准差，CV表示变异系数，抑制率=标准品的平均吸光值/0标准品的平均吸光值

3、样品中的磺胺嘧啶模拟检测试验

(1) 鸡肉样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向鸡肉样品中添加磺胺嘧啶标准品，使鸡肉样品中磺胺嘧啶浓度分别为0ppb，20ppb，制成0ppb和20ppb磺胺嘧啶鸡肉样品。按实施例2所述方法，用本发明检测试纸条分别对0ppb和20ppb磺胺嘧啶鸡肉样品进行检测，重复8次，结果显示，0ppb磺胺嘧啶鸡肉样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而20ppb磺胺嘧啶鸡肉样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测鸡肉样品。

(2) 鸡肝脏样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向鸡肝脏样品中添加磺胺嘧啶标准品，使鸡肝脏样品中磺胺嘧啶浓度分别为0ppb，20ppb，制成0ppb和20ppb磺胺嘧啶鸡肝脏样品。按实施例2所述方法，用本发明检测试纸条分别对0ppb和20ppb磺胺嘧啶鸡肝脏样品进行检测，重复8次，结果显示，0ppb磺胺嘧啶鸡肝脏样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而20ppb磺胺嘧啶鸡肝脏样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测鸡肝脏样品。

(3) 猪肉样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向猪肉样品中添加磺胺嘧啶标准品，使猪肉样品中磺胺嘧啶浓度分别为0ppb，20ppb，制成0ppb和20ppb磺胺嘧啶猪肉样品。按实施例2所述方法，用本发明检测试纸条分别对0ppb和20ppb磺胺嘧啶猪肉样品进行检测，重复8次，结果显示，0ppb磺胺嘧啶猪肉样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而20ppb磺胺嘧啶猪肉样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测猪肉样品。

(4) 猪肝脏样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向猪肝脏样品中添加磺胺嘧啶标准品，使猪肝脏样品中磺胺嘧啶浓度分别为0ppb，20ppb，制成0ppb和20ppb磺胺嘧啶猪肝脏样品。按实施例2所述方法，用本发明检测试纸条分别对0ppb和20ppb磺胺嘧啶猪肝脏样品进行检测，重复8次，结果显示，0ppb磺胺嘧啶猪肝脏样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而20ppb磺胺嘧啶猪肝脏样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测猪肝脏样品。

(5) 鸡蛋样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向鸡蛋样品中添加磺胺嘧啶标准品，使鸡蛋样品中磺胺嘧啶浓度分别为 0 ppb，20ppb，制成 0ppb 和 20ppb 磺胺嘧啶鸡蛋样品。按实施例 2 所述方法，用本发明检测试纸条分别对 0ppb 和 20ppb 磺胺嘧啶鸡蛋样品进行检测，重复 8 次，结果显示，0ppb 磺胺嘧啶鸡蛋样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而 20ppb 磺胺嘧啶鸡蛋样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测鸡蛋样品。

(6) 蜂蜜样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向蜂蜜样品中添加磺胺嘧啶标准品，使蜂蜜样品中磺胺嘧啶浓度分别为 0ppb，20ppb，制成 0ppb 和 20ppb 磺胺嘧啶蜂蜜样品。按实施例 2 所述方法，用本发明检测试纸条分别对 0ppb 和 20ppb 磺胺嘧啶蜂蜜样品进行检测，重复 8 次，结果显示，0ppb 磺胺嘧啶蜂蜜样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而 20ppb 磺胺嘧啶蜂蜜样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测蜂蜜样品。

(7) 牛奶样品中磺胺嘧啶的模拟检测试验

分别向牛奶样品中添加磺胺嘧啶标准品，使牛奶样品中磺胺嘧啶浓度分别 0ppb，20ppb，制成 0ppb 和 20ppb 磺胺嘧啶牛奶样品。按实施例 2 所述方法，用本发明检测试纸条分别对 0ppb 和 20ppb 磺胺嘧啶牛奶样品进行检测，重复 8 次，结果显示，0ppb 磺胺嘧啶牛奶样品检测线颜色与阴性标准品检测线颜色一致，判为阴性样品，而 20ppb 磺胺嘧啶牛奶样品检测线颜色明显浅于阴性标准品检测线颜色，判为阳性样品。说明用本发明检测试纸条可以用来检测牛奶样品。

4、样品检测

(1) 动物试验

选择健康仔肉鸡（0.75kg/只）80只，随机分成2组，即对照组和试验组。对照组饲喂不含任何抗菌药物的饲料，试验组饲喂含500mg/kg磺胺嘧啶的饲料。试验期间，自由采食，自由饮水。试验组连续喂药7d后停药，喂药之前、喂药后1d、3d、5d、7d，停药后0d、1d、2 d每天宰杀试验组鸡5只，对照组2只，采肌肉同时用本发明检测试纸条法（GICA）和高效液相法（HPLC）测定，结果见表3。56份样品中，HPLC法检测结果为阳性28份，阴性28份；GICA法检测结果为阳性30份，阴性26份；HPLC法和GICA法检测均为阳性者28份，均为阴性者26份，二者阳性符合率为93.3%（28/30），阴性符合率为92.9%（26/28），总符合率为96.4%（54/56）。说明本发明的检测试纸条完全可以作为常规方法用于市场上鸡肉产品中磺胺嘧啶残留的快速检测。

表 3 本发明试纸条法与 HPLC 法对鸡肌肉样品检测效果的比较

	高效液相法（HPLC）		
	阳性	阴性	合计
阳性	28	2	30
试纸条法（GICA） 阴性	0	26	26
合计	28	28	

(2) 农贸市场和超级市场中样品的检测

2005年10月和11月在武汉市的农贸市场和超级市场采集鸡肌肉样品68份，用本发明检测试纸条进行检测，检出阳性样品2份，阳性检出率为2.94%，用HPLC法复核，含量分别为138ppb、56ppb，大于20ppb，判为阳性，与试纸条检测结果一致。

尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明，但是不能认为是对本发明范围的限制，本发明的范围由所附权利要求书限定。另外，本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰，这些改动或修饰形式同样落在本发明的保护范围。

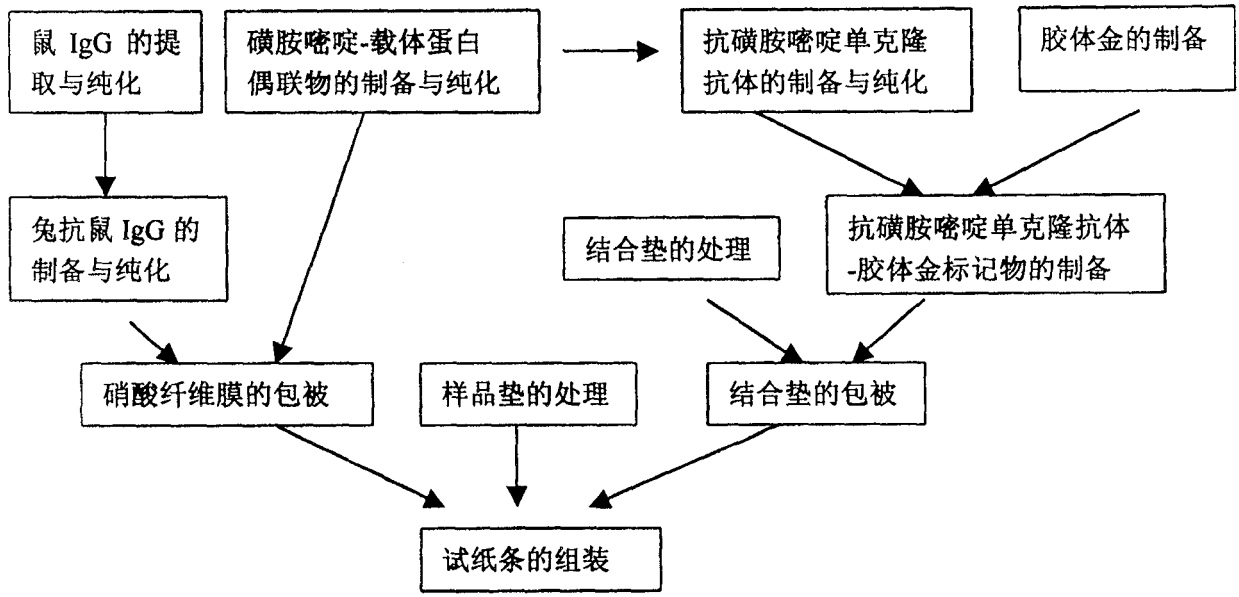


图 1

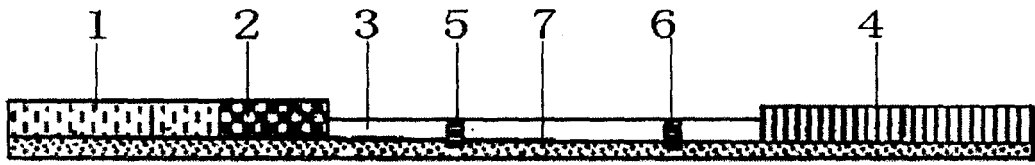


图 2

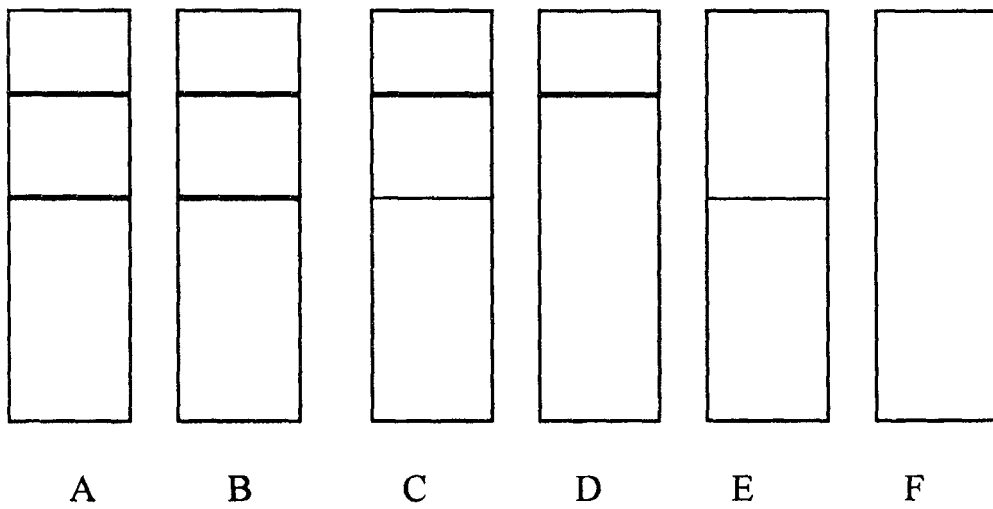


图 3

专利名称(译)	检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN100482787C	公开(公告)日	2009-04-29
申请号	CN200610018120.X	申请日	2006-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	毕丁仁 王喜亮 熊宁 石德时 李自力 刘百红 李晓云 张道宏 金秀娥		
发明人	毕丁仁 王喜亮 熊宁 石德时 李自力 刘百红 李晓云 张道宏 金秀娥		
IPC分类号	C12N5/18 C07K16/18 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/52		
代理人(译)	王敏锋		
审查员(译)	张秀丽		
其他公开文献	CN1807601A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于快速检测磺胺嘧啶残留的免疫胶体金试纸条及其制备方法，属于兽药残留的免疫化学速测技术领域。本发明的试纸条，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，其特征在于，在PVC背衬上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫；所述的结合垫上包被有所述的抗磺胺嘧啶单克隆抗体-胶体金标记物，该单克隆抗体由杂交瘤细胞系BDRXN(保藏号为CCTCC-C200522)所分泌得到的。所述的硝酸纤维素膜上分别包被有磺胺嘧啶-载体蛋白偶联物构成的检测线和兔抗鼠IgG构成的质控线。本发明的试纸条有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测快速、准确等显著优点。

检测标准 品	检测线吸光值 (G/ Peak-ROD)								\bar{x}	S	CV (%)	抑制 率 (%)
0ppb	0.0595	0.0521	0.0695	0.0556	0.0597	0.0604	0.0545	0.0606	0.0590	0.0053	8.98	100
5ppb	0.0395	0.0395	0.034	0.0427	0.0399	0.0395	0.0399	0.0424	0.0397	0.0026	6.55	67.29
10ppb	0.0251	0.0239	0.0220	0.0249	0.0230	0.0260	0.0214	0.0287	0.0243	0.0024	9.88	41.19
20ppb	0.0168	0.0185	0.0173	0.0192	0.0177	0.0188	0.0165	0.0191	0.0180	0.0011	6.11	30.51
40ppb	0.0037	0.0039	0.0036	0.0034	0.0029	0.0037	0.0035	0.0036	0.0035	0.0003	8.57	5.93
80ppb	0.0028	0.0020	0.0021	0.0025	0.0028	0.0024	0.0023	0.0023	0.0024	0.0003	12.5	4.09