



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101995461 A

(43) 申请公布日 2011.03.30

(21) 申请号 200910189654.2

(22) 申请日 2009.08.27

(71) 申请人 深圳市三方圆生物科技有限公司
地址 518102 广东省深圳市宝安区西乡街道
桃花源科技创新园 B-305

(72) 发明人 钟松清 谭攀 李细清 张世伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

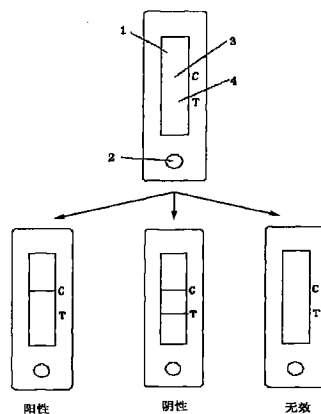
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡及其生产和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡及其生产和使用方法，属于免疫学技术领域。该快速诊断卡包括外壳和试纸条，其特征在于：所述外壳壳体开有加样孔和观察窗，所述试纸条安放于外壳内，在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜，两端分别叠置吸水垫和样品垫，硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连，在样品区附置一段含有磺胺二甲嘧啶单克隆抗体免疫胶体金复合物的膜，在硝酸纤维素膜上有一条含磺胺二甲嘧啶包被抗原的检测带和一条含羊抗鼠 IgG 的质控带。本发明是一种快速、准确、灵敏的诊断卡，无需专门仪器，操作简单，能满足食品安全、畜牧业、检测机构的检测要求。



1. 磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡,其特征在於:其包括试纸条和外壳两部分,试纸条置于外壳内。

2. 根据权利要求 1 所述的磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡,其特征在於:所述的试纸条用 PVB 作为背衬,在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜,两端分别叠置吸水垫和样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连,在样品区附置一段含有磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的膜,在硝酸纤维素膜上有一条含磺胺二甲嘧啶抗原的检测带和一条含羊抗兔 IgG 的质控带。

3. 磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡的生产方法,其特征在於由下列过程与步骤组成:

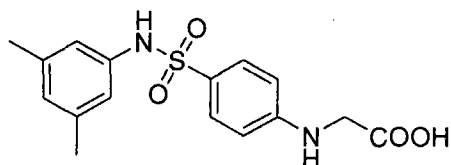
- (1) 磺胺二甲嘧啶免疫半抗原的合成
- (2) 磺胺二甲嘧啶免疫抗原的合成;
- (3) 磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的制备;
- (4) 胶体金颗粒的制备;
- (5) 胶体金标记磺胺二甲嘧啶单克隆抗体;
- (6) 样品垫的制备,该垫附置一段胶体金标记磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的膜;
- (7) 磺胺二甲嘧啶包被抗原的合成;

(8) 磺胺二甲嘧啶固相硝酸纤维素膜的制备,该膜包被一条含磺胺二甲嘧啶包被抗原的检测带和一条包被羊抗鼠 IgG 的质控带;

(9) 样品垫的处理:选择适当的封闭试剂、表面活性剂和(或)非离子型去污剂单独或以适当比例组合后均匀浸于玻璃纤维素膜,室温干燥备用;

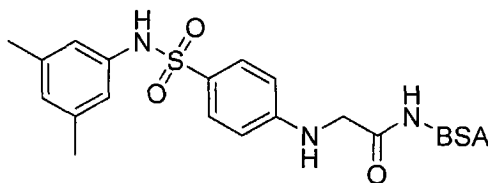
(10) 组装磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡,该检测卡用 PVB 作为背衬,在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜,两端分别叠置吸水垫和样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连。

4. 根据权利要求 4 所述的磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡的生产方法,其特征在於所述的半抗原具有式 (I) 所示结构。



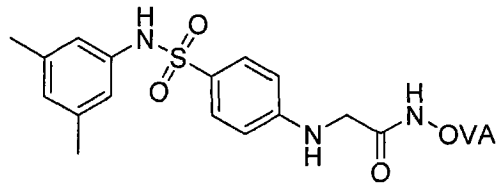
(I)

5. 根据权利要求 4 所述的磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡的生产方法,其特征在於所述的免疫抗原具有式 (II) 所示结构。



(II)

6. 根据权利要求 4 所述的磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡的生产方法,其特征在於所述的包被抗原具有式 (III) 所示结构。



(III)

7. 磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡的使用方法,其特征在于将 30 μ l 待检液加入到加样孔,并充分吹打混匀,放置 5-10 分钟内观察结果。

磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡及其生产和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡,属于免疫学技术领域。

背景技术

[0002] 磺胺二甲嘧啶(英文名:Sulfamethazine),曾被广泛应用于兽医临床以治疗细菌性传染病,其亚治疗浓度又可作为畜禽的饲料药物添加剂,以控制某些动物性疾病、提高饲料的转化率和促进动物的生长发育。但因长期使用,其在动物性食品中残留现象十分严重,可导致人的过敏反应、诱导耐药菌株的产生、影响机体免疫系统、破坏人体造血机能等,且可诱发人的甲状腺癌。美国FDA、欧盟、中国农业部等规定在肌肉、脂肪、肝脏和肾脏中磺胺类药物的含量不能超过100ng/g(ppb),在牛奶中磺胺类药物的含量不能超过100ng/g(ppb)。但是违法添加时间仍然时有发生。2002年中国出口至日本的鳗鱼被检出磺胺二甲嘧啶超标。2006年12月辽宁省抚顺市在全市动物产品抽查检查中也发现多种饲料因含有磺胺二甲嘧啶而违反国家规定。

[0003] 磺胺二甲嘧啶是小分子化合物,常用的检测方法有高效液相色谱分析法(HPLC)或液相色谱/质谱联用分析法(LC/MS)。这些方法普遍存在着仪器昂贵,方法复杂,操作烦琐,试剂消耗量大的局限性。20世纪80年代兴起的胶体金免疫层析检测,基于免疫学检测原理,操作简单快捷、结果清晰易于判断、无需复杂的实验技能和设备,特别适于现场检测。而国内外尚无该技术监控磺胺二甲嘧啶的报道。

发明内容

[0004] 针对上诉问题,本发明提供了一种磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡,该快速诊断卡检测快速、准确、稳定。

[0005] 本发明的另一个目的是提供该胶体金检测卡的应用。

[0006] 上述磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡的制备包括以下步骤:

[0007] (1) 磺胺二甲嘧啶半抗原的合成

[0008] (2) 磺胺二甲嘧啶免疫抗原的合成;

[0009] (3) 磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的制备;

[0010] (4) 胶体金颗粒的制备;

[0011] (5) 胶体金标记磺胺二甲嘧啶单克隆抗体;

[0012] (6) 样品垫的制备,该垫附置一段胶体金标记磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的膜;

[0013] (7) 磺胺二甲嘧啶包被抗原的合成;

[0014] (8) 磺胺二甲嘧啶固相硝酸纤维素膜的制备,该膜包被一条含磺胺二甲嘧啶包被抗原的检测带和一条包被羊抗鼠IgG的质控带;

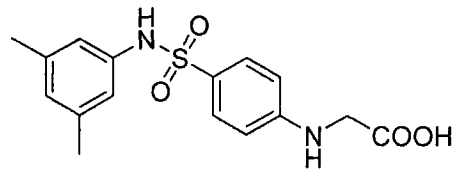
[0015] (9) 样品垫的处理:选择适当的封闭试剂、表面活性剂和(或)非离子型去污剂单独或以适当比例组合后均匀浸于玻璃纤维素膜,室温干燥备用;

[0016] (10) 组装磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡,该检测卡用PVB作为背衬,在PVC衬板的中

部叠置硝酸纤维素膜,两端分别叠置吸水垫和样品垫,硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连。

[0017] 所述的半抗原具有式 (I) 所示结构:

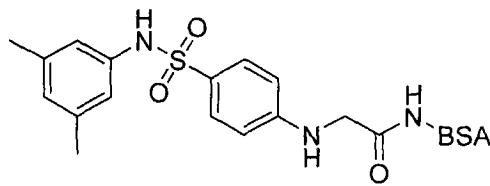
[0018]



(I)

[0019] 所述的免疫抗原具有式 (II) 所示结构:

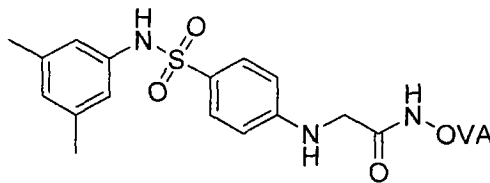
[0020]



(II)

[0021] 所述的包被抗原具有式 (III) 所示结构:

[0022]



(III)

[0023] 发明通过以下操作步骤进行牛奶或尿液中磺胺二甲嘧啶检测:将 30 μ l 液态奶或尿液加入到加样孔中,放置 5-10 分钟内观察结果。

[0024] 发明通过以下操作步骤进行饲料中磺胺二甲嘧啶检测:

[0025] (1) 称取待测样品 2.5g 放入 50ml 带盖离心管中,然后加入提取液 7.5ml 盖紧盖子充分混匀 3min。

[0026] (2) 3000 转 / 分离心 5 分钟,或用滤纸过滤上清到滤瓶中待检。

[0027] (3) 用移液器取样品液 30 μ l 滴入加样孔中,放置 5-10 分钟内观察结果。

[0028] 发明通过以下操作步骤进行动物组织或蜂蜜中磺胺二甲嘧啶检测:

[0029] (1) 取适量动物组织,用匀浆机匀浆 2min,称取 1 ± 0.05 g 匀浆物(蜂蜜直接称取)置 15ml 离心管中,加入 10ml 二氯甲烷混合,剧烈振荡 10min。3000g 以上速度离心 10min。

[0030] (2) 取 5ml 移另一 15ml 离心管中,50 $^{\circ}$ C 水浴用氮气吹干。加入 1ml 水复溶。

[0031] (3) 用移液器从水相中取样品液 30 μ l 滴入检测孔中,放置 5-10 分钟内观察结果。

[0032] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:价格便宜,检测费用低廉,检测速度快,整个检测过程只需要 10-15 分钟,操作简单,无需专门仪器,肉眼观测结果,结果稳定,能满足食品安全、屠宰、饲料、检测机构的检测要求,更方便于现场检测。

附图说明

[0033] 图 1 磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡检测示意图

[0034] 其中：

[0035] 1 为观测窗

[0036] 2 为加样孔

[0037] 3 为质控带

[0038] 4 为检测带

[0039] 图 2 磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡结构图

[0040] 其中

[0041] 5 为样品垫

[0042] 6 为胶体金标记磺胺二甲嘧啶单克隆抗体玻璃纤维膜

[0043] 7 为吸水膜

[0044] 8 为纤维素膜

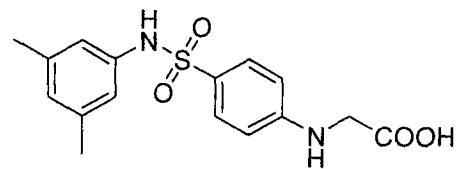
具体实施方式

[0045] 实施例 1 磺胺二甲嘧啶半抗原的合成

[0046] 称取 4 磺胺二甲嘧啶 1.0g, 0.5gNaOH, 溶解于 20mL 水中, 室温条件下缓慢加入等量的 1.0g 氯乙酸。逐步升温至回流状态, 反应 4h。调节 pH = 6, 有沉淀析出。过滤沉淀并用蒸馏水洗涤 2 遍, 得磺胺二甲嘧啶半抗原 0.2g。

[0047] 制备的半抗原结构为：

[0048]



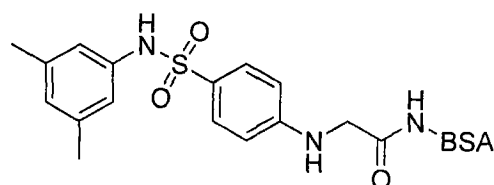
(I)

[0049] 实施例 2 磺胺二甲嘧啶免疫抗原的合成

[0050] 取磺胺二甲嘧啶半抗原 0.1mmol 溶于 2mLDMF 中, 搅拌加入 27.5mg DCC 和 14.4mg NHS。4℃下磁力搅拌反应过夜, 离心后上清液为 A 液, 称取 BSA140mg 溶于 10mL 浓度为 0.1mol/L 的 PBS(pH8.0) 中。加入 DMF1mL, 搅拌溶解制备 B 液, 磁力搅拌下, A 液逐渐滴入 B 液中, 4℃下反应 12h。离心后, 取上清液, 4℃下用生理盐水透析 3d, 每天更换 3 次透析液。得到的全抗原以 1mg/mL 的浓度分装于 0.5mL 离心管中。冻存于 -20℃冰箱中。

[0051] 制备的免疫抗原结构为：

[0052]



(II)

[0053] 实施例 3 实验动物免疫

[0054] 用半抗原磺胺二甲嘧啶免疫抗原分别免疫 6 周雌性 balb/c 鼠, 每组 3 只。首次免疫注射时, 分别 100 μ g/mL 的免疫抗原 100 μ L, 与等量弗氏完全佐剂充分乳化, 腹腔直接注射。间隔两周后, 取用样的抗原, 与 100 μ L 不完全佐剂乳化, 同样方法注射。

[0055] 实施例 4 细胞融合

[0056] 在细胞融合前 1d 或当天拉颈处死昆明鼠, 浸泡在 70% 酒精中, 体表消毒。用大头针固定昆明鼠在蜡板上, 超净工作台上剪开腹部, 用小镊子挑起腹膜, 注入 5mL RPMI-1640 完全培养液, 用手轻轻揉动腹腔, 将其体内液体用无菌吸管移入 75mL HAT 完全培养液 (75mL RPMI-1640 完全培养液中加入 0.75mL 100 \times HAT 液) 中, 反复 2~3 次。用吸管混匀, 铺 24 孔板, 每孔加 0.5mL, 置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中。

[0057] 小鼠眼眶放血, 收集血清, 拉颈处死, 70% 酒精浸泡消毒体表, 无菌取出脾脏, 放入 RPMI-1640 基础培养液中, 并小心剔除筋膜及脂肪, 剪碎, 置于不锈钢筛 (100 目) 内, 无菌研磨, 释放出单个脾细胞, 吸取含有脾细胞的液体置于 50mL 无菌离心管中, 离心。

[0058] 将骨髓瘤细胞和上述制备好的脾细胞以个数 5 : 1 的比例加入同一 50mL 的离心管中, 加入 37 $^{\circ}$ C 温浴的 RPMI-1640 不完全培养液 20mL, 混合均匀, 离心 (1500r/min, 6min)。除上清, 用手指轻击离心管底部, 使沉淀混匀如糊状。用移液管取 37 $^{\circ}$ C 预热的 PEG 1mL, 滴入离心管, 静置 1min 后, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中在 2min 内滴加 RPMI-1640 完全培养液 10mL。1000r/min 离心 6min, 弃去上清, 加 75mL HAT 培养液, 轻轻混匀, 将混匀悬液分装于有饲养细胞的 24 孔板中, 每孔 0.5mL, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育。

[0059] 实施例 5 杂交瘤细胞的培养和筛选

[0060] 融合后 6~9d, 用 HT 培养液半量换液 1 次, 在 12~14d 后根据增殖情况改用完全培养液。待细胞贴壁至占板孔 1/3 时, 计杂交瘤细胞生长的孔数及细胞总数。取上清液, 间接 ELISA 选择效价高和间接竞争 ELISA 选择药物抑制强的阳性杂交瘤细胞。

[0061] 采用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞筛选, 显示阳性并出现竞争抑制反应的孔为产磺胺二甲嘧啶抗体的孔, 并可用于进一步的亚克隆。

[0062] 无菌条件下, 洗脱阳性孔内的细胞, 用弯头吸管将细胞转移至预先以饲养细胞铺板的 96 孔培养板中, 每个原始孔克隆成 8 孔, 待细胞贴壁长满 1/2~1/3 孔底后, 取上清液, 间接 ELISA 检测。取呈阳性强的亚克隆, 如此反复 2~5 次, 待所克隆的 8 个孔上清液中抗体阳性率为 100% 时, 挑取单细胞克隆, 检测为全阳性者转移至 24 孔细胞培养板或 25mL 细胞培养瓶扩大培养, 建株并以分装、冻存。提前一周注射 0.5mL 降植烷至 Balb/c 小鼠腹腔。取冻存细胞株, 复苏后, 经大量培养繁殖, 收集细胞, 用不完全培养基洗涤二次后, 再用 10mL 不完全培养基悬浮, 计数。将细胞 (每只小鼠 1mL, 含 3.1×10^7 个细胞) 腹腔注射小鼠腹部, 10~15d 后, 待小鼠腹部明显膨大时用 16 号注射器无菌采集腹水。2000r/min 离心 10min, 去除上层脂肪和下层纤维蛋白及细胞, 收集中层, 取部分 ELISA 法测定其效价, 其余分装 -70 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0063] 实施例 6 磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的制备和纯化

[0064] 取腹水约 3mL, 加入 2 倍体积的 0.06mol/L、pH 4.5 醋酸钠缓冲液。将正辛酸 (33 μ g/mL 腹水) 逐滴慢慢加入样品中, 边加边搅拌, 加完后继续搅拌 30min, 4 $^{\circ}$ C 下 10000r/min 离心 30min, 去沉淀 (白蛋白和其它非 IgG 蛋白)。取上清经 0.45 μ m 微孔膜过滤, 与

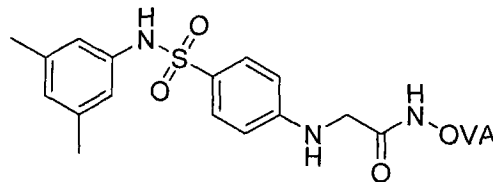
1/10 体积 10×PBS 混合 (10×PBS :80gNaCl、2g KCl、11.5g Na₂HPO₄、2g KH₂PO₄、0.5845g EDTA、1000mL 蒸馏水, pH 7.4), 用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 值到 7.4。上清冷却到 4℃, 加硫酸铵 (0.277g/mL, 使最终饱和度为 45%)。搅拌 30min, 4℃下 10000r/min 离心 30min, 弃上清。用少量 PBS 溶液溶解沉淀, 用 50 ~ 100 倍体积的 PBS 透析过夜, 换液 3 次。透析后的溶液用 PEG-6000 适当浓缩, 4℃下贮藏备用。

[0065] 实施例 7 磺胺二甲嘧啶包被抗原的制备

[0066] 取磺胺二甲嘧啶半抗原 0.1mmol 溶于 2mLDMF 中, 搅拌加入 27.5mg DCC 和 14.4mg NHS。4℃下磁力搅拌反应过夜, 离心后上清液为 A 液, 称取 BSA140mg 溶于 10mL 浓度为 0.1mol/L 的 PBS(pH8.0) 中。加入 DMF1mL, 搅拌溶解制备 B 液, 磁力搅拌下, A 液逐渐滴入 B 液中, 4℃下反应 12h。离心后, 取上清液, 4℃下用生理盐水透析 3d, 每天更换 3 次透析液。得到的全抗原以 1mg/mL 的浓度分装于 0.5mL 离心管中。冻存于 -20℃冰箱中。

[0067] 制备的包被抗原结构为:

[0068]



(III)

[0069] 实施例 8 胶体金颗粒的制备

[0070] 取 1% 氯金酸溶液 1ml, 加 99ml 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液, 加热沸腾后, 取 1% 柠檬酸三钠 1.6ml 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中, 继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色, 颜色稳定后继续加热 5min, 室温冷却, 补充失水至原体积。

[0071] 实施例 9 胶体金标记磺胺二甲嘧啶单克隆抗体复合物的制备

[0072] 当蛋白质的最适稳定量及标记的最佳 pH 值被确定以后便可进行标记。具体步骤如下: 按最低稳定量的 120% 计算出所需待标记蛋白质的总量。在磁力搅拌下, 将蛋白质溶液加入胶体金溶液中 (pH 已调至 5.9 ~ 6.2), 加入蛋白质时应逐滴加入, 1mg 的蛋白质大约 5min 加完。分别取 1ml 胶体金 - 葡萄球菌 A 蛋白结合物液 (实验组) 和 1ml 胶体金原液 (对照组) 于试管中加 10% 氯化钠溶液 0.1ml, 室温静置 1h, 观察结果: 如果对照组试管溶液由红色转为蓝色, 甚至可以看到聚合物沉淀, 而实验组溶液仍保持红色, 无沉淀, 方可继续下一步实验, 否则需补加标记用蛋白葡萄球菌 A 蛋白。最后加入终浓度为 0.2% 的聚乙二醇 (PEG MW20000), 继续搅拌 30min。

[0073] 实施例 10 样品垫的制备

[0074] 保存液稀释胶体金标记单克隆磺胺二甲嘧啶抗体复合物原液至工作浓度, 按比例均匀浸于玻璃纤维素膜, -20℃冻存, 冷冻真空干燥后, 密封保存。

[0075] 实施例 11 磺胺二甲嘧啶包被抗原固相硝酸纤维素膜的制备:

[0076] 取磺胺二甲嘧啶包被抗原 2mg/ml 用 0.01mol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.2) 以 250 μg/ml 间隔, 经 BIO-DOT 型 XYZ3000 点样仪 dispenser 线形包被于硝酸纤维素膜的观察结果的测试反应区, 定义为检测带, 距离检测带 5mm 远的质控带用 dispenser 线形包被正常兔 IgG (2mg/ml)。37℃干燥 2h, 4℃密封保存 (见图 2)。

[0077] 实施例 12 试纸条组装

[0078] 用 PVB 作为背衬, 在 PVC 衬板的中部叠置硝酸纤维素膜, 两端分别叠置吸水垫和样品垫, 硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连 (见图 2)。

[0079] 实施例 13 检测卡的使用

[0080] 称取饲料待测样品 2.5g 放入 50ml 带盖离心管中, 然后加入提取液 7.5ml 盖紧盖子充分混匀 3min。3000 转 / 分离心 5 分钟, 或用滤纸过滤上清到滤瓶中待检。用移液器取样品液 80 μ l (或用滴管取 3 ~ 4 滴) 滴入样品孔中, 并充分吹打混匀, 将试纸条插入到微孔中, 放置 5-10 分钟内观察结果。参看图 1, 如质控线 (编号 3) 位置处出现红色条带, 检测线 (编号 4) 位置处不显色则样品为阳性; 如质控线和检测线均出现红色条带, 则样品为阴性; 如质控线不显色则检测结果无效。

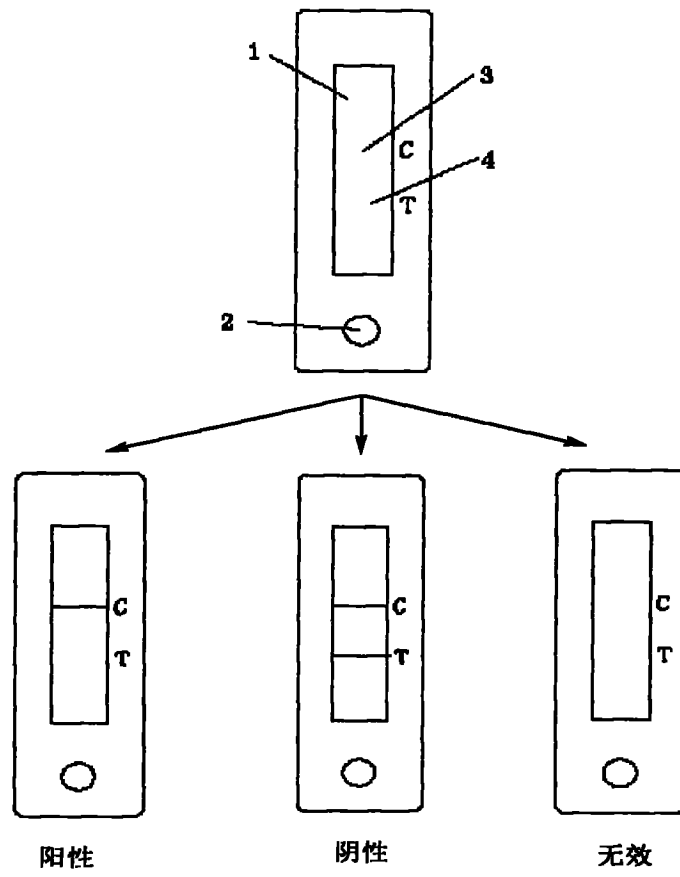


图 1

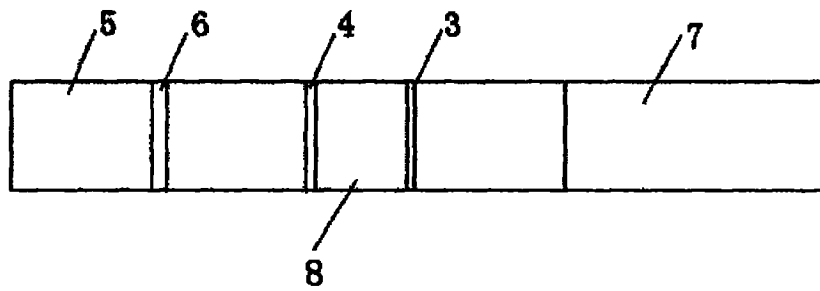


图 2

专利名称(译)	磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡及其生产和使用方法		
公开(公告)号	CN101995461A	公开(公告)日	2011-03-30
申请号	CN200910189654.2	申请日	2009-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
[标]发明人	钟松清 谭攀 李细清 张世伟		
发明人	钟松清 谭攀 李细清 张世伟		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/532 C07K14/765 C07K14/77		
其他公开文献	CN101995461B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种磺胺二甲嘧啶胶体金检测卡及其生产和使用方法，属于免疫学技术领域。该快速诊断卡包括外壳和试纸条，其特征在于：所述外壳壳体开有加样孔和观察窗，所述试纸条安放于外壳内，在PVC衬板的中部叠置硝酸纤维素膜，两端分别叠置吸水垫和样品垫，硝酸纤维素膜和吸水垫、样品垫相搭连，在样品区附置一段含有磺胺二甲嘧啶单克隆抗体免疫胶体金复合物的膜，在硝酸纤维素膜上有一条含磺胺二甲嘧啶包被抗原的检测带和一条含羊抗鼠IgG的质控带。本发明是一种快速、准确、灵敏的诊断卡，无需专门仪器，操作简单，能满足食品安全、畜牧业、检测机构的检测要求。

