



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101726600 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910201244.5

G01N 33/558(2006.01)

(22) 申请日 2009.12.16

(71) 申请人 上海海洋大学

地址 201306 上海市浦东新区临港新城沪城环路 999 号

(72) 发明人 何培民 柳俊秀 蔡春尔 汪卿 饶涛

(74) 专利代理机构 上海智力专利商标事务所 31105

代理人 瞿承达 罗芳英

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

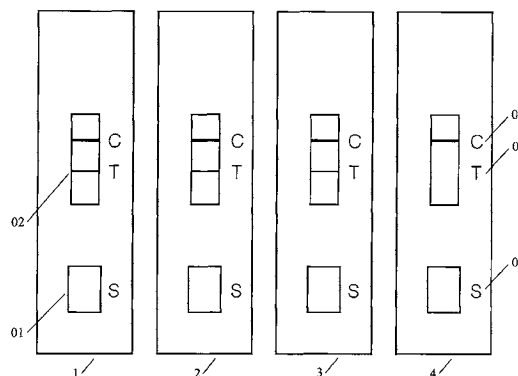
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条及其制备方法,提供了一种赤潮毒素腹泻性贝毒软海绵酸的快速胶体金免疫层析检测方法。本发明通过制备平均粒径 30nm 的胶体金,用以标记抗软海绵酸单克隆抗体;将软海绵酸半抗原与卵清蛋白的偶联物包被在硝酸纤维素膜上作为检测带,羊抗鼠二抗作为质控带,依据免疫竞争法原理,制备了快速检测腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条。本发明通过对胶体金的制备,胶体金的标记等等,多个条件的优化,大大提高了 OA 金标测试板条的检测速度。该方法灵敏度达 25ng/mL,只需 3-5min 即可目测判断结果,可作为检验水产品贝类是否感染赤潮毒素并进行现场大量筛选的有效手段。



1. 一种腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条,包括胶金垫,检测线,控制线,所述的胶金垫包被有金标记的软海绵酸 OA 单克隆抗体,其特征在于,所述的控制线为羊抗鼠多克隆抗体,包被浓度为 0.4-1.8mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

2. 如权利要求 1 所述的金标测试板条,其特征在于,所述的金标记的软海绵酸 OA 单克隆抗体使用 30nm 的胶金体进行金标记,金标记的单克隆抗体浓度为 200ug/ml。

3. 如权利要求 2 所述的金标测试板条,其特征在于,所述的胶金垫的 OA 单克隆抗体包被量为 2.5 μ l/cm。

4. 如权利要求 1 所述的金标测试板条,其特征在于,所述的检测线包被有软海绵酸-卵白蛋白偶联物,包被浓度为 0.75mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

5. 如权利要求 1 所述的金标测试板条,其特征在于,所述的控制线包被有羊抗鼠多克隆抗体,包被浓度 1.0mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

6. 一种权利要求 1 所述的腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 单克隆抗体的制备:用软海绵酸-牛血清蛋白偶联物免疫 BALB/c 小鼠,取效价达到 1 : 1.28 $\times 10^6$ 以上的免疫小鼠腹水用作软海绵酸单克隆抗体;

(2) 金标胶金体的制备:制备 30nm 的胶金体用于金标记软海绵酸单克隆抗体,金标时软海绵酸单克隆抗体浓度为 200ug/ml;

(3) 检测线包被抗原及浓度确定:用碳二亚胺法制备包被抗原软海绵酸-卵白蛋白偶联物,包被浓度用 0.75mg/ml,包被量用 0.5ul/cm;

(4) 控制线的制备:用羊抗鼠多克隆抗体包被,包被浓度为 0.4-1.8mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫测定方法,更具体地,涉及一种应用金标技术进行免疫学检测的方法。

背景技术

[0002] 近 20 年来,有害赤潮在全球范围内频繁爆发,其中有毒赤潮和藻毒素问题日渐突出。赤潮藻毒素通过食物链传递,在鱼、贝类体内累积,会造成严重的海产品食用安全问题。由这类海洋生物毒素引起食源性中毒事件已经引起了各国的关注,因此国内外纷纷对各种毒素进行了多方面的研究,包括结构和功能、毒素生源和检测方法的研究等。腹泻性贝毒 (diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 是由有毒赤潮藻类鳍藻属 *Dinophysis* 和原甲藻属 *Prorocentrum* 中部分藻种产生的一类脂溶性天然化合物,主要成分为软海绵酸 (okadaic acid, OA) 及其衍生物 DTXs。DSP 引起的中毒症状包括腹泻 (92%)、恶心 (80%)、呕吐 (79%)、下腹部疼痛 (53%),一般在食用后几小时,严重时短至 30min 发作,且无有效药物治疗。

[0003] 由于 OA 对热稳定,一般的加热处理不会使毒性失效,因此由 OA 引起的海产品食物中毒事件已成为国内外卫生学上严重的问题之一。目前,国内检测 OA 的方法主要是小鼠法、高效液相色谱法 (HPLC) 和免疫检测技术。小鼠法简便易行,但缺点是不能区别毒素的种类和结构,受干扰较大,数据不精确;HPLC 法可准确分析毒素的含量和种类,检测限可低至 ng/g,但样品前处理过程复杂,且仪器昂贵,需要专门的分析技术人员。免疫层析法是出现于 20 世纪 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式,由于它的快速简便、准确,具有高度特异性和高敏感性,结果直观可靠,而且试剂和样品用量极少,无需贵重仪器设备,简化了烦琐的常规操作过程,同时也减小了因操作引起的误差,因此已成为一种目前发展最快的复合型免疫技术,受到国内外研究人员的广泛关注。

[0004] 免疫层析法 (immunochromatography) 是胶体金在免疫层析快速诊断技术中的应用,其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品 (尿液或血清) 后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,若用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。

[0005] 专利 CN101131390A 描述了一种快速检测腹泻性贝毒的免疫胶体金试纸条及其制法,检测下限达到 12.5ng/ml,检测速度达到 15min。现场检测的即时性需要更短的检测时间。影响免疫层析法诊断结果的因素很多,包括胶体金的制备,胶体金的标记等等,本发明通过对多个条件的优化,在不降低检测灵敏度的同时,大大提高了检测速度。

发明内容

[0006] 本发明通过对 OA 金标测试板条及其制备方法中各个条件的优化,使 OA 金标测试条的检测速度大大提高。技术方案如下:

[0007] 一种腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条,包括胶金垫,检测线,控制线,所述的胶金垫包被有金标记的软海绵酸 OA 单克隆抗体,所述的控制线为羊抗鼠多克隆抗体,包被浓度为 0.4-1.8mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

[0008] 所述的金标记的软海绵酸 OA 单克隆抗体使用 30nm 的胶金体进行金标记,金标记的单克隆抗体浓度优选为 200ug/ml。

[0009] 所述的胶金垫的 OA 单克隆抗体包被量优选为 2.5 μ l/cm。

[0010] 所述的检测线包被有软海绵酸-卵白蛋白偶联物,包被浓度优选为 0.75mg/ml,包被量优选为 0.5ul/cm。

[0011] 所述的控制线包被有羊抗鼠多克隆抗体,包被浓度优选 1.0mg/ml,包被量优选为 0.5ul/cm。

[0012] 一种权利要求 1 所述的腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条制备方法,包括如下步骤:

[0013] (1) 单克隆抗体的制备:用软海绵酸-牛血清蛋白偶联物免疫 BALB/c 小鼠,取效价达到 1 : 1.28 $\times 10^6$ 以上的免疫小鼠腹水用作软海绵酸单克隆抗体;

[0014] (2) 金标胶金体的制备:制备 30nm 的胶金体用于金标记软海绵酸单克隆抗体,金标时软海绵酸单克隆抗体浓度优选为 200ug/ml;

[0015] (3) 检测线包被抗原及浓度确定:用碳二亚胺法制备包被抗原软海绵酸-卵白蛋白偶联物,包被浓度优选 0.75mg/ml,包被量优选 0.5ul/cm;

[0016] (4) 控制线的制备:用羊抗鼠多克隆抗体包被,包被浓度为 0.4-1.8mg/ml,包被量优选为 0.5ul/cm。

[0017] 本发明工作原理是:待检样品溶液加在试纸条的一端,通过毛细作用向上移行,样品中的 OA 先与金标记的 anti-OA-IgG 发生特异性免疫反应;反应后,免疫复合物继续上移至测试区(喷有 OA-OVA,测试带检测线 T),如果样品中的 OA 足够多,全部结合了金标抗体的位点,则免疫复合物在测试区不停留,测试条带不显色;随后,免疫复合物继续移动至对照区(喷有羊抗鼠的第二抗体,对照带控制线 C),发生第二种免疫结合反应,免疫复合物被截留,对照带显红色。当样品中不含 OA 或 OA 的量低于检出限时,两条带均显红色,根据测试带颜色的深浅可判断样品中待测物 OA 的多少。

[0018] 影响金标测试条灵敏度及快速检测的因素很多,包括金标及金标单抗的制备,金标单抗的包被,检测线 T 上抗体偶联物的包被,控制线 C 上多抗的包被条件等等。本发明通过摸索不同用量的柠檬酸三钠与氯金酸反应,不同的金标单抗浓度,不同的金标单抗包被量,不同的抗原偶联物包被浓度,不同的二抗包被浓度以及不同的反应时间来研究比较胶体金层析方法的效果,由此制备的金标测试条灵敏度达到 25ng/ml,只需 3-5min 即可目测判断结果,大大提高了检测效率。

[0019] 对比文件声明测试灵敏度达到 12.5ng/ml,是由于其将弱阳性视为检出,而本发明将弱阳性视为未检出,从而造成灵敏度表述上的差异。根据有关 OA 等 DSP 毒素的食用标准,各国所建议食用标准的安全浓度不同,美国食品和药品管理局(FDA)规定水产品可食部分为 0.2mg/L;日本规定扇贝中肠腺 OA 为 2.5 μ g/g,紫贻贝中肠腺 1.5 μ g/g;澳大利亚规定 100g 可食部分 OA 含量低于 25 μ g,1g 中肠腺 OA 含量低于 2 μ g;欧洲规定 1g 可食部分允许含 0.2-0.6 μ gOA 等价物;加拿大、英国等为 20 μ g/100g 软组织;荷兰定为 0.12-0.14 μ g/g

消化腺；我国贝类产品出口卫生要求 DSP 毒素含量小于 0.8mg/L(80 μg/100g)。因此，本发明建立的 OA 检测方法的检出限，完全能满足海产贝类食品安全检测的需要。

附图说明

[0020] 图 1 :腹泻性贝毒软海绵酸 OA 金标测试板条制备工艺流程图

[0021] 图 2 :胶体金层析试纸条检测结果

具体实施方式

[0022] 下面根据具体实施例对本发明进行进一步说明，所述方法若未说明均属常规方法，如记载于 [美]J. 萨姆布鲁克 D. W 拉塞尔著的《分子克隆实验指南》或教科书。

[0023] 一、试剂与仪器

[0024] 软海绵酸 (OA) 标准品 (购自台湾藻类生物技术有限公司) ;1.0mg/ml 羊抗鼠 HRP-IgG (购自上海鼎国生物技术有限公司) ;卵白蛋白 (OVA)、牛血清白蛋白 (BSA)、新生牛血清、N-羟丁二酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide)、N, N 二环乙烷碳二亚胺 (N, N-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N, N-二甲基甲酰胺 (N, N-dimethylformamide, DMF)、聚乙二醇 (polyethylene glycol-4000, PEG)、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、二甲基亚砜 (DMSO)、MES 缓冲液等为 Sigma 公司产品 ;SP2/0 骨髓瘤细胞 (来自国家农科院上海兽医研究所) ;1% 氯金酸 (HAuCl_4) ,1% 柠檬酸三钠,0.02M Tris+1% BSA,其余为国产分析纯。

[0025] 硝酸纤维素 NC 膜,胶体金垫,吸水纸,样品垫 (均为德国 Schleicher Schull 产品) ;酶标仪 (Bio-Rad iMark),喷膜机 (Biodot-ZX1000),喷金机 (Biodot-XYZ 3000),切条机 (Biodot-CM4000)。

[0026] 二、包被抗原 OA-OVA 的制备

[0027] 取 4.5mg N-羟丁二酰亚胺和 9mg N, N 二环乙烷碳二亚胺溶于 30ml MES 缓冲液,然后取 50 μl 加入到 100 μl 含 1mg OA 的 DMSO 溶液中 ;另称取 3mg OVA,用 PBS 溶液溶解 ;将上述活化的 OA 和 10 μl 吡啶加入 OVA 溶液中,搅拌 6 小时,4℃ 过夜。随后透析,分装,-20℃ 保存。

[0028] 三、OA 单克隆抗体的制备

[0029] 制备免疫原 :取 4.5mg N-羟丁二酰亚胺和 9mg N, N 二环乙烷碳二亚胺溶于 30ml MES 缓冲液,然后取 50 μl 加入到 100 μl 含 1mg OA 的 DMSO 溶液中 ;另称取 3mg BSA,用 PBS 溶液溶解 ;将上述活化的 OA 和 10 μl 吡啶加入 BSA 溶液中,搅拌 6 小时,4℃ 过夜。随后透析,分装,-20℃ 保存。制得免疫抗原 OA-BSA。

[0030] 免疫小鼠 :取 BALB/c 小鼠 (购于上海斯克莱实验动物有限责任公司),首免按 150 μg/ 只 OA-BSA 加完全弗氏佐剂足垫注射,三周后加强免疫一次,改用不完全弗氏佐剂,皮下注射,剂量为 200 μg/ 只 ;以后每隔二周继续加强免疫,用不完全弗氏佐剂,肌肉注射,剂量为 200 μg/ 只。第四次腹腔加强免疫,剂量为 200 μg/ 只,不用佐剂。3d 后取脾脏,进行细胞融合。

[0031] 细胞融合 :无菌取免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞以 5 : 1 体积比混合,按常规方法进行融合,融合剂为 PEG。

[0032] 阳性杂交瘤细胞的筛选 :融合细胞生长到培养孔面积的 1/3 ~ 1/2 时,采用间接

ELISA 方法分步筛选杂交瘤细胞,首先标记单个克隆或 2 个克隆(细胞克隆相互分开)的细胞培养孔,以 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ OA-OVA 包被酶标板孔,分别加入被测孔的培养上清液,常规 ELISA 筛选阳性孔 ($P/N > 2.1$),然后分别以 OA-OVA 和 BSA 包被,进行阳性克隆的再次筛选,以仅对 OA-OVA 包被孔显色判为阳性,最后对初筛的阳性孔的上清液作间接竞争 ELISA,判断 $50\text{ng}/\text{mL}$ OA 对 OD 值的影响,经 2~3 次检测抑制率均达到 100% 的孔,及时转移到单孔中培养并用有限稀释法进行克隆化。经过亚克隆,并进行扩大培养,取细胞生长状态良好即在一般光镜下观察,细胞是均质而透明的,结构不是很明显,且增值速度快的克隆细胞进行建株液氮保存。

[0033] 单抗的生产与纯化:取 7 周龄的 BLAB/c 雌性小鼠,腹腔注射灭菌降植烷 0.5mL 。7d 后腹腔接种处于对数生长期的杂交瘤细胞,每只小鼠分别注射 1×10^6 个细胞,待小鼠腹部膨大,濒死不动时,用针头采集腹水,用硫酸铵沉淀法纯化腹水,并用 DEAE 纤维素层析柱继续纯化腹水,冻干保存。收集的腹水液,用间接 ELISA 方法测定效价。效价达到 $1 : 1.28 \times 10^6$ 以上的免疫小鼠腹水即可用作单克隆抗体。

[0034] 四、OA 单抗的定量

[0035] 将 OA 单抗用 PBS 作 $1 : 10$ 稀释,测定 $A_{260} = 0.2496$, $A_{280} = 0.4273$,按公式 $A_{280} \times 1.45 - A_{260} \times 0.74$ 计算单抗的浓度为 $4.35\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0036] 五、胶体金的制备

[0037] 柠檬酸三钠还原法制备胶体金,金颗粒大小受柠檬酸三钠浓度等因素影响很大,改变柠檬酸三钠浓度,便可制备出不同颗粒大小的胶体金。

[0038] 根据 Frens 于 1973 介绍的胶体金颗粒的制备方法:取 1mL 1% 氯金酸 (HAuCl_4) 溶液,加入到 100mL 水中,加热至沸,再加入 $0.5\text{--}4\text{mL}$ 1% 柠檬酸三钠,混合煮沸 5 分钟,直到颜色不发生变化。该方法可制备 $15\text{--}60\text{nm}$ 不同直径大小的金颗粒,颗粒大小取决于加入的柠檬酸三钠的量。

[0039] 通过这种方法制得不同直径大小的金颗粒,标记鼠抗 OA 单克隆抗体,按工艺组装试纸条,以一例阳性标本及 PBS 加样,比较不同颗粒大小金标结合物的生物活性。(阳性标本为 $50\text{ng}/\text{mL}$ 浓度的 OA,要求 5 分钟内不出现检测线,PBS 要求显色强,下同)

[0040] 结果见表 1:

[0041] 表 1 不同大小金颗粒标记的效果比较

	柠檬酸三钠的量	金颗粒直径	阳性标本检出结果*	PBS 标本结果	稳定性
	4.0ml	5nm	不出线	显色弱	差
[0042]	2.5ml	18nm	不出线	显色弱	差
	1.5ml	30nm	不出线	显色强	好
	0.75ml	50nm	出线	显色强	差

[0043] *注:指 5 分钟检测结果

[0044] 综合比较上述方法及发明的结果,只有 30nm 的胶体金能同时满足阳性检出时间要求和 PBS 结果要求,因此选择 30nm 的胶体金用于标记,确定胶体金颗粒的制备工艺: 0.01% 氯金酸 (HAuCl_4) 水溶液 100mL 加热至沸腾,加入 1% 柠檬酸三钠 1.5mL ,混匀,煮沸 5

分钟,待胶体金溶液颜色由蓝经紫变紫红后,冷却备用。据此工艺制备的胶体金颗粒满足试纸的检测要求。

[0045] 六、胶体金对单抗的标记

[0046] 取 30nm 的胶体金 2ml,加 50-400ug/ml 单抗 0.2ml,搅拌中混匀 1 小时,再加 20mgBSA,继续搅拌 30 分钟,10000rpm 离心 30 分钟,去上清,沉淀用 PH7.420mM Tris-HCL 100u1 溶解,加 BSA 至终浓度为 10mg/ml,置 4℃中备用。

[0047] 七、金标时单抗浓度的确定

[0048] 用喷金机对各单抗浓度标记的金标鼠抗 OA 进行包被,均喷 2.5u1/cm,干燥,组装试纸,以 50ng/ml,OA 阳性标本和 PBS 加样比较不同单抗量对金标单抗灵敏度的影响。

[0049] 表 2 不同金标记单抗浓度的效果比较

	单抗标记浓度 (ug/ml)	阳性标本检出结果*	PBS 标本结果
[0050]	50	不出线	显色弱
	100	不出线	显色弱
	200	不出线	显色强
	300	不出线	显色强
	400	出线	显色强

[0051] *注:指 5 分钟检测结果

[0052] 结果显示,金标记时单抗浓度用 200ug/ml,阳性与阴性标本的检测结果最满意。

[0053] 八、金标鼠抗 OA 单克隆抗体包被量的确定

[0054] 用喷金机对金标鼠抗 OA 单克隆抗体进行包被,喷不同的喷量,干燥,按工艺组装试纸,以阳性标本和 PBS 加样比较不同包被浓度的灵敏度高低。

[0055] 表 3 不同喷量下阳性标本和 PBS 的检出结果

	喷量 (μl/cm)	阳性标本检出结果*	PBS 标本结果
[0056]	1.0	不出线	显色弱
	1.5	不出线	显色弱
	2.0	不出线	显色弱
	2.5	不出线	显色强
	3.0	出线	显色强
	3.5	出线	显色强

[0057] *注:指 5 分钟检测结果

[0058] 当喷量达到 2.5 μ l/cm,阳性标本和 PBS 标本的检出结果即已符合设计要求,综合考虑最终确定金标单抗的包被量,即喷金机喷量为 2.5 μ l/cm。

[0059] 九、检测线 (T) 工作液浓度的确定

[0060] 调整鼠抗 OA-OVA 的包被浓度,按工艺(见图 1)组装试剂条,以阳性标本和 PBS 加样比较不同包被浓度的灵敏度高低。

[0061] 结果见表 4:

[0062] 表 4 不同 OA-OVA 包被浓度的效果比较

	OA-OVA (mg/ml)	阳性标本检出结果*	PBS 标本结果
	0.1	不出线	显色弱
	0.25	不出线	显色弱
[0063]	0.5	不出线	显色强
	0.75	不出线	显色强
	1.0	出线	显色强

[0064] *注:指 5 分钟检测结果

[0065] 当包被浓度达到 0.75mg/ml,既能满足阳性标本的检出要求,又能达到 PBS 标本的要求,而进一步提高包被浓度则满足不了阳性标本的要求,降低浓度则不能达到 PBS 标本的检出要求。综合考虑最终确定鼠抗 OA-OVA 检测线包被浓度为 0.75mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

[0066] 十、控制线 (C) 工作液浓度的确定

[0067] 调整羊抗鼠 IgG 抗体浓度,按正常制备工艺,见流程图 1,组装试剂条,以 PBS 加样比较不同包被浓度对照线显色时间。

[0068] 结果见表 5:

[0069] 表 5 不同二抗包被浓度的效果比较

	羊抗鼠 IgG 多克隆抗体	对照线显色时间
	0.4mg/ml	超过 2 min
	0.8mg/ml	超过 1.5 min
[0070]	1.0mg/ml	1min
	1.4mg/ml	1min
	1.8mg/ml	1min

[0071] 包被浓度达到 1.0mg/ml,对照线即在 1min 内清晰可辨,符合设计要求。最终确定对照线包被浓度 1.0mg/ml,包被量为 0.5ul/cm。

[0072] 十一、反应时间的确定

[0073] A 方案:反应 2 分钟观察结果。

[0074] B 方案:反应 3 分钟观察结果。

[0075] C 方案:反应 5 分钟观察结果。

[0076] D 方案:反应 10 分钟观察结果。

[0077] A 方案结果:选择检测浓度为 50ng/ml 的 OA 标准品,在 2 分钟内检测区 (T) 无条

带, PBS 显色弱, 测试不合格。

[0078] B 方案结果 : 选择检测浓度为 50ng/ml 的 OA 标准品, 在 3 分钟内检测区 (T) 无条带, PBS 显色强, 测试合格。

[0079] C 方案结果 : 选择检测浓度为 50ng/ml 的 OA 标准品, 在 5 分钟内检测区 (T) 无条带, PBS 显色强, 测试合格。

[0080] D 方案结果 : 选择检测浓度为 50ng/ml 的 OA 标准品, 在 10 分钟内检测区 (T) 有条带, PBS 显色强, 测试不合格。

[0081] 根据结果选择反应时间为 3-5 分钟观察结果, 10 分钟结果无效。

[0082] 十二、灵敏度的检测

[0083] 以各最佳条件制备金标测试条, 对各浓度 OA 作灵敏度检测, 结果如下 :

[0084] 表 6 不同 OA 浓度的灵敏度效果比较

	OA 浓度 (ng/ml)	T 线显色程度*
	400	不出线
	300	不出线
	200	不出线
	100	不出线
[0085]	50	不出线
	25	不出线
	12.5	显色微弱
	6.25	显色强
	0 (PBS)	显色强

[0086] *注 : 指 5 分钟检测结果

[0087] 结果见图 2, 从左至右为检测不同样本的 OA 金标测试板条显示结果。所检测的 OA 浓度依次为 : 1, 空白对照, PBS 溶液 ; 2, OA 浓度 6.25ng/ml ; 3, OA 浓度 12.5ng/ml ; 4, OA 浓度 25ng/ml。其中 OA 金标测试板条上, 01 为样本区, 02 为结果观测区, 03C 为控制线, 04T 为检测线, 05S 为样本区的标志。

[0088] 由图可知, 检测空白对照和 6.25ng/mL 的 OA 标准溶液, 测试带有明显的红色 (见图 1 第 1、2 块测试板条的 T 线) ; 测试 12.5ng/mL 的 OA 标准溶液, 测试带显示非常浅的紫红色 (见图 1 第 3 块测试板条的 T 线) ; 测试 25ng/mL 的 OA 标准溶液, 测试带完全被抑制, 没有颜色 (见图 1 第 4 块测试板条的 T 线)。由此可以看出, 在 C 线清晰可见的同时, 以肉眼不出 T 线为标准, 制备的金标试纸条灵敏度可达到 25ng/ml。

[0089] 十三、使用方法

[0090] 若测试板条放 4℃ 中保存, 由冰箱中取出后需在室温中放置 30 分钟, 方能启封。

[0091] 板条平放, 加样, 滴加 3 滴样品, 待 3-5 分钟观察结果。

[0092] T 线不显色为阳性结果, 显色为阴性结果。

- [0093] C 线显色为该板条有效,不显色为板条已无效。
- [0094] 十四、保存和有效期
- [0095] 置 2℃ -30℃ 中保存,远离潮湿和光照。
- [0096] 有效期为二年。

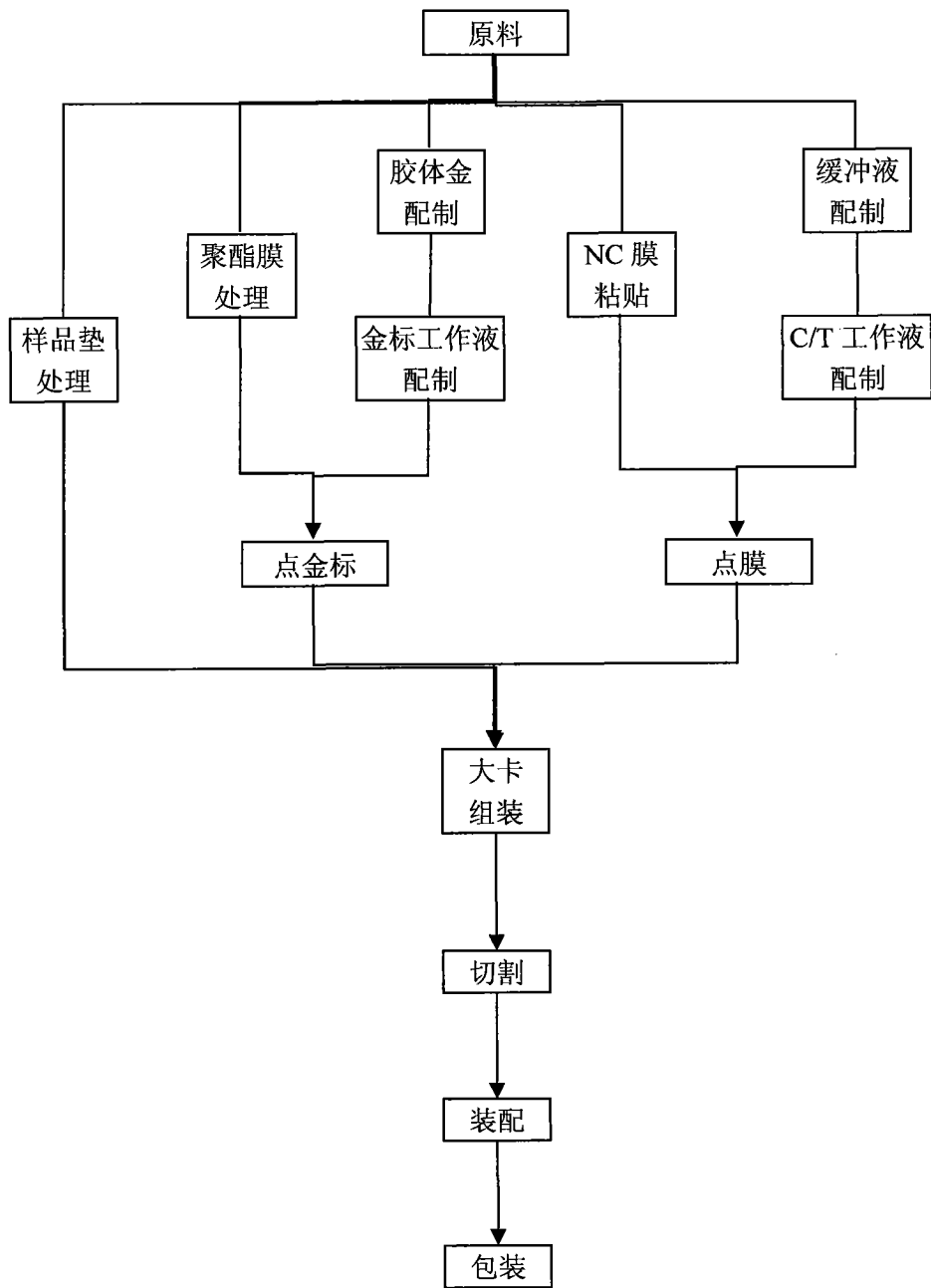


图 1

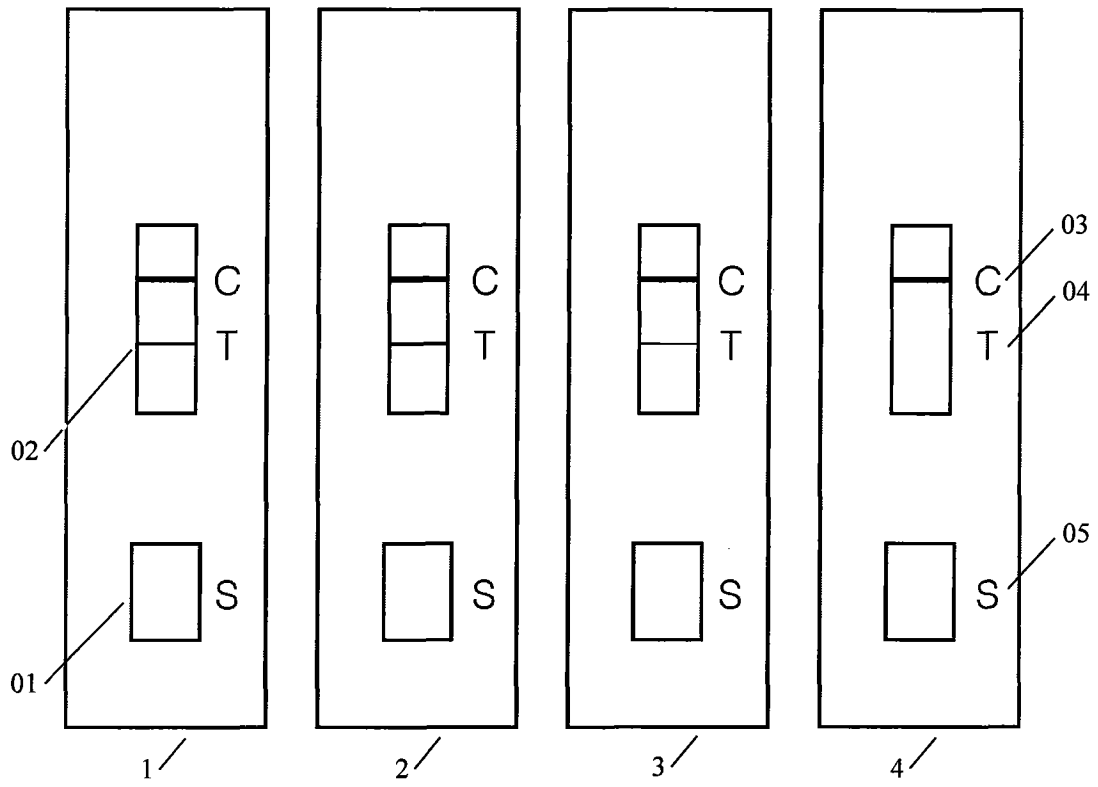


图 2

专利名称(译)	腹泻性贝毒软海绵酸OA金标测试板条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101726600A	公开(公告)日	2010-06-09
申请号	CN200910201244.5	申请日	2009-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
[标]发明人	何培民 柳俊秀 蔡春尔 汪卿 饶涛		
发明人	何培民 柳俊秀 蔡春尔 汪卿 饶涛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/558		
代理人(译)	罗芳英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种腹泻性贝毒软海绵酸OA金标测试板条及其制备方法，提供了一种赤潮毒素腹泻性贝毒软海绵酸的快速胶体金免疫层析检测方法。本发明通过制备平均粒径30nm的胶体金，用以标记抗软海绵酸单克隆抗体；将软海绵酸半抗原与卵清蛋白的偶联物包被在硝酸纤维素膜上作为检测带，羊抗鼠二抗作为质控带，依据免疫竞争法原理，制备了快速检测腹泻性贝毒软海绵酸OA金标测试板条。本发明通过对胶体金的制备，胶体金的标记等等，多个条件的优化，大大提高了OA金标测试板条的检测速度。该方法灵敏度达25ng/mL，只需3-5min即可目测判断结果，可作为检验水产品贝类是否感染赤潮毒素并进行现场大量筛选的有效手段。

