



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102297970 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 201110140024. 3

(22) 申请日 2011. 05. 27

(71) 申请人 重庆市科学技术研究院

地址 401123 重庆市渝北区北部新区黄山大道中段杨柳路 2 号

(72) 发明人 乐涛 魏启明

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所
50211

代理人 郭云

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

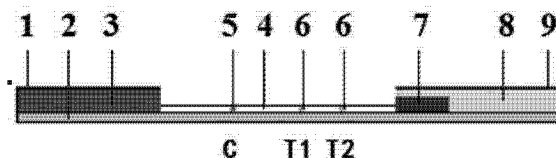
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 4 页

(54) 发明名称

环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条及其制备方法,硝酸纤维膜(4)上包被有兔抗鼠的 IgG 质控线(5)和 MA-BSA、CA-BSA 两条检测线(6);结合垫(8)上包被有的抗 MA 药物单克隆抗体-胶体金标记物、抗 CA 药物单克隆抗体-胶体金标记物。本发明应用免疫学技术筛选出抗 MA 药物单克隆抗体、抗 CA 药物的单克隆抗体,通过胶体金的制备及胶体金标记条件的探索研究,在应用抗 MA 药物单克隆抗体、抗 CA 药物单克隆抗体和胶体金技术研究建立抗 MA、CA 药物二联检测胶体金试纸条,并对其性能进行测定。试纸条检测样品范围较宽,假阳性低,检测灵敏、准确、可靠,适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏和肾脏等组织及牛奶中 CA、MA 药物残留的二联检测。



1. 一种环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条,包括背板(2)、吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)、结合垫(7)、样品垫(8),其特征在于:所述背板(2)上依次连续粘附有吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)、结合垫(7)和样品垫(8),所述样品垫(8)靠结合垫(7)一端搭接在结合垫(7)上,所述吸水垫(3)上表面吸附有手控区封膜(1),所述样品垫(8)上表面吸附有样品端封膜(9),所述硝酸纤维膜(4)上包被有兔抗鼠的 IgG 质控线(5)和 MA-BSA、CA-BSA 两条检测线(6);结合垫(7)上包被有所述的抗 MA 药物单克隆抗体-胶体金标记物和抗 CA 药物单克隆抗体-胶体金标记物。

2. 一种权利要求 1 所述环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条的制备方法,其特征在于按如下步骤进行:

1) 将半抗原 MA、CA 与牛血清白蛋白偶联合成偶联物 MA-BSA、CA-BSA;

2) 将步骤 1) 合成的 2 种偶联物免疫原免疫小鼠,通过细胞融合筛选得到分别抗 MA 单克隆细胞株、抗 CA 药物单克隆细胞株,分别将得到单克隆细胞株注射小鼠腹腔,得到抗 MA 药物单抗、CA 药物单抗;

3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

4) 提取小鼠 IgG 免疫健康家兔,得到兔抗鼠 IgG 抗体;

5) 将步骤 2) 制成的分别抗 MA、CA 单克隆抗体加入步骤 3) 制备的胶体金中,得到抗 MA 单克隆抗体-胶体金标记物、抗 CA 单克隆抗体-胶体金标记物;

6) 将抗 MA 单克隆抗体-胶体金标记物、抗 CA 单克隆抗体-胶体金标记物分别包被在结合垫上;

7) 将步骤 1) 合成 MA-BSA、CA-BSA 分别包被在硝酸纤维素膜(4)得到两条检测线(6),分别为 T1、T2;

8) 将步骤 4) 兔抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜(4)得到质控线(5);

9) 将手控区封膜(1)、吸水垫(3)、硝酸纤维素膜(4)结合垫(7)、样品垫(8)和样品端封膜(9)依次粘贴在背板(2)上。

环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条及其制备方法

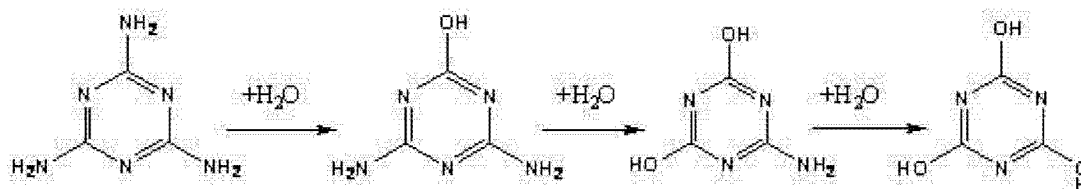
技术领域

[0001] 本发明属于食品药物残留免疫学快速检测技术领域。具体涉及环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联胶体金免疫层析快速检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 环丙氨嗪(cyromazine, CA)是一种高效的昆虫生长调节剂。在养殖业中,它主要用做预混剂,通过饲料途径杀灭蝇蛆。环丙氨嗪的主要功能就是控制动物厩舍内的苍蝇、蝇蛆。环丙氨嗪作为预混剂拌入全价料中,通过饲喂方式进入动物体内,其绝大部分(约99%)以原形及其代谢产物(三聚氰胺)的形式随粪便排出体外并沉积在粪便中,从而在粪便中杀灭蝇蛆。环丙氨嗪急、慢性毒性均很低,而且无致畸、致癌、致突变作用,其主要代谢产物三聚氰胺毒性也特别低。环丙氨嗪在动物体内基本不被吸收。鸡摄入环丙氨嗪后,有99.1%被排泄出体外。环丙氨嗪的残留非常低。在鸡体内,肝脏的残留最高,为0.1 ppm,肾脏、肌肉、脂肪,包括鸡蛋的残留均低于0.05 ppm。在羊体内,肝脏、肾脏、肌肉、脂肪的最大残留限制均低于0.03 ppm。

[0003] 三聚氰胺(Melamine, MA)是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,重要的氮杂环有机化工原料。由于其氮的含量很高,加之其生产工艺简单、成本很低,被一些不法商人用作食品添加剂。2007年,美国爆发宠物食品受污染事件,美国食品药品监督管理局(FDA)查明:参杂了低于6.6%三聚氰胺的小麦蛋白粉是宠物食品导致中毒的原因。2008年9月,中国甘肃省有14名婴儿患肾结石,导致婴幼儿泌尿系统产生高度结石的罪魁祸首也是配方奶粉中添加了三聚氰胺。两起事件发生后,世界各国和地方政府对于食品和饲料的三聚氰胺的检测趋于高度重视。三聚氰胺是一种白色粉末状物质,呈碱性,pH8.0。与盐酸、硫酸、草酸等都能形成三聚氰胺盐。在中性或微碱性情况下,与甲醛缩合而成羟甲基三聚氰胺,在微酸性中与羟甲基的衍生物进行缩聚反应而生成树脂产物。遇强酸或强碱水溶液水解,胺基逐步被羟基取代,先生成三聚氰酸二酰胺,进一步水解生成三聚氰酸一酰胺,最后生成三聚氰酸。其结构式及化学反应关系式如下:



三聚氰胺 三聚氰酸二酰胺 三聚氰酸一酰胺 三聚氰酸

作为含三个氨基的化合物,三聚氰胺是一种用途广泛的基本有机化工中间产品,可用作黏合剂、复合板、阻燃剂,在涂料、造纸、橡胶、塑料、纺织中有广泛用途。在部分亚洲国家,它也被用以制造化肥。由于食品和饲料工业用的“凯氏定氮法”来估算蛋白质含量。因此,三聚氰胺(含氮量为66%左右)被不法商人用作食品添加剂,以达到提升食品检测中的蛋白质含量指标目的,并且三聚氰胺为一种白色结晶粉末,无味,掺杂后不易被发现。

[0004] 由于三聚氰胺属于化工原料,国内外尚无饲料或动物组织中的国家标准。2007年,农业部颁布了关于饲料中三聚氰胺残留测定方法行业标准(NY/T1372-2007)。2008年10月7日,卫生部、国家质检总局等五部门联合制定了乳品中三聚氰胺临时管理限量值。2008年10月7日国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会发布了《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》国家标准,标准规定了高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱/质谱法三种方法为三聚氰胺的检测方法,检测定量限分别为2 mg/kg、0.05 mg/kg、0.01mg/kg。标准适用于原料乳、乳制品以及含乳制品中三聚氰胺的定量测定。

[0005] 目前在食品中环丙氨嗪及其代谢物三聚氰胺的分析检测方法有很多,包括高效液相色谱法、薄层色谱法、液相色谱-质谱联用法、酶联免疫法。仪器检测主要存在仪器购置费用昂贵、样品前处理复杂、程序繁琐费时、检测费用高、不能现场操作等缺陷,所以在生产中应用受到限制。ELISA方法灵敏度高、成本低,在药物残留检测中应用也很广泛,但该方法需要酶标仪等实验室设备,分析时间长,在应用中有局限性。近年来,胶体金免疫层析技术与目前普遍采用的标记免疫分析技术相比,具有简便快速,特异性强、敏感性高,肉眼判断,实验结果易保存,无需特殊仪器设备等优点,因此胶体金技术在药物残留检测领域得到了广泛应用。目前还没有针对环丙氨嗪和三聚氰胺多残留二联检的免疫胶体金试纸条及其制备方法报道。

发明内容

[0006] 为解决以上技术问题,本发明的目的之一在于提供一种特异性强、灵敏度高、且操作简单,对样品简单处理即可同时检测MA、CA药物残留的二联检免疫胶体金试纸条。

[0007] 本发明目的之二在于提供一种制备环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联胶体金免疫层析快速检测试纸条的方法。

[0008] 本发明目的之一是这样实现的:一种环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联胶体金免疫层析快速检测试纸条,包括背板(2)、吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)、结合垫(7)、样品垫(8),其关键在于:所述背板(2)上依次连续粘附有吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)、结合垫(7)和样品垫(8),所述样品垫(8)靠结合垫(7)一端搭接在结合垫(7)上,所述吸水垫(3)上表面吸附有手控区封膜(1),所述样品垫(8)上表面吸附有样品端封膜(9),所述硝酸纤维膜(4)上包被有兔抗鼠的IgG质控线(5)和MA-BSA、CA-BSA两条检测线(6);结合垫(8)上包被有所述的抗MA、CA药物单克隆抗体-胶体金标记物。

[0009] 本发明目的之二是这样实现的:一种环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备方法,其关键在于按如下步骤进行:

- 1) 将半抗原MA、CA与牛血清白蛋白偶联合成偶联物MA-BSA、CA-BSA;
- 2) 将步骤1)合成的2种偶联物免疫原分别免疫小鼠,通过细胞融合筛选得到分别抗MA、CA药物的2种单克隆抗体的细胞株,将细胞株注射小鼠腹腔,得到抗MA药物单克隆抗体、抗CA药物单克隆抗体;
- 3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;
- 4) 提取小鼠IgG免疫健康家兔,得到兔抗鼠IgG抗体;
- 5) 将步骤2)制成的分别抗MA、CA单克隆抗体加入步骤3)制备的胶体金中,得到抗MA单克隆抗体-胶体金标记物、抗CA单克隆抗体-胶体金标记物;

6) 将抗 MA 单克隆抗体 - 胶体金标记物、抗 CA 单克隆抗体 - 胶体金标记物分别包被在结合垫上;

7) 将步骤 1) 合成 MA-BSA、CA-BSA 分别包被在硝酸纤维素膜(4) 得到两条检测线(6), 分别为 T1、T2;

8) 将步骤 4) 兔抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜(4) 得到质控线(5);

9) 将手控区封膜(1)、吸水垫(3)、硝酸纤维素膜(4) 结合垫(7)、样品垫(8) 和样品端封膜(9) 依次粘贴在背板(2) 上。

[0010] 联检试纸条其反应原理为竞争法: 将样品液滴加到试纸条样品垫上, 样品在毛细管作用下沿试纸条泳动, 当泳动至金标垫时, 固态化的金标抗单抗迅速溶解释放, 随样品一起沿试纸条泳动至检测线, 若样品中含有 MA、CA, MA、CA 首先与金标抗 MA 单抗、抗 CA 单抗发生免疫反应, 形成免疫复合物, 抑制金标抗 MA 单抗、抗 CA 单抗与检测线(T1、T2) 包被的 MA-BSA、CA-BSA 偶联物的结合, 使检测线截获的金标抗体的量减少, T 线颜色变浅, 当样品中 MA、CA 的量足够大时, 检测线将无颜色出现, 金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获 C 线出现红色条带; 反之, 若样品中不含 MA、CA, 金标抗 MA 单抗、抗 CA 单抗与包被于 NC 膜上的 MA-BSA、CA-BSA 偶联物发生特异性免疫反应而被截获, 在检测线位置(T1、T2) 形成红色条带, 即阴性结果, 部分金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获, 形成红色条带。

[0011] 有益效果: 本发明应用免疫学技术筛选出抗 MA、CA 药物的单克隆抗体, 通过胶体金的制备及胶体金标记条件的探索研究, 在应用抗 MA、CA 药物单克隆抗体和胶体金技术研究建立抗 MA、CA 药物单克隆抗体快速二联检测试纸条, 并对其性能进行测定。试纸条检测样品范围较宽, 假阳性低, 检测灵敏、准确、可靠, 适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏和肾脏等组织及牛奶中 CA、MA 药物残留的二联检测。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明检测试纸条的组装示意图;

图 2 为结果判定示意图;

图 3 为本发明检测试纸条检测不同浓度 CA、MA 标准品结果图;

图 4 为本发明检测试纸条标准曲线示意图。

具体实施方式

实施例

[0013] 1 药物(CA 或 MA) - 载体蛋白偶联物的制备

本发明免疫原及试纸条检测线上的包被原(CA-BSA、MA-BSA) 合成方法。准确称取 BSA (0.001mmol), 室温下, PBS 10mL 使其充分溶解。取 CA (或 MA) 标准品 (0.02 mmol), 室温下溶于 1ml 甲醇在磁力搅拌器下, 将 25% 戊二醛溶液和 CA (或 MA) 溶液同时缓慢滴加到 BSA 溶液中, 室温下反应 3 h。将连接产物装入透析袋, 用生理盐水透析三天后, 冻干, -20℃ 保存备用。

[0014] 2 抗 CA、MA 单克隆抗体制备

2.1 动物免疫

用实施例 1 制备的免疫原 (CA-BSA、MA-BSA) 分别免疫 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 每只小鼠的免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}$ 。首次免疫, 用无菌 0.01 mol/L pH7.4 PBS 溶解免疫原, 再与等量弗氏完全佐剂混合, 完全乳化, 颈背部皮下分 2~3 点注射; 加强免疫, 用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 溶解免疫原与等量弗氏不完全佐剂混合, 充分乳化, 小鼠腹腔注射。每次间隔 14~21 d, 第 3 次免疫后 7~10 d 开始对免疫小鼠尾静脉采血, 收集血清, 用 ELISA 检测小鼠血清效价。末次免疫后间隔 4 周以上, 在细胞融合前 3~4 d, 腹腔注射 CA-BSA (或 MA-BSA) 抗原 100 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}/\text{只}$, 注射后每天注意观察, 保证融合前小鼠状态良好。

[0015] 2.2 CA (或 MA) 单克隆抗体制备

取 1 只用 CA-BSA (或 MA-BSA) 免疫的 Balb/c 小鼠, 从眼眶放血分离血清, 处死。小鼠用 75% 酒精中浸泡 5 min, 进行整体消毒。将小鼠四肢固定, 然后用镊子夹住小鼠下腹部皮肤, 剪开一小口, 再用镊子撕开皮肤, 露出腹膜, 在腹膜上用剪刀 (操作时要换一套镊子和剪刀) 剪一小口 (在腹部中央)。剪开腹膜 (换 1 套镊子和剪刀), 露出脾脏, 用镊子夹住脾脏 (再换 1 套器械), 用剪刀将脾脏外膜剪破, 然后放入事先灭菌的匀浆器中。加适量基础培养基 (RPMI-1640) 于匀浆器中, 进行研磨, 挤压出脾细胞, 取出匀浆器的匀浆棒, 再补加适量基础培养基 (RPMI-1640), 静置 2 min, 将上层细胞悬液吸取后, 放入腹腔巨噬细胞离心管中, 重复上述操作 1 次。1200 r/min 离心 10 min, 除去上清。将 10^8 个免疫脾细胞与 $1\sim 2\times 10^7$ 个 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1: 10 或 1: 5 的比例加入 50 mL 离心管中, 进行混匀, 然后于 1500 r/min 水平离心 10 min, 弃去上清。将离心管倒扣在灭菌的吸水纸上, 把管中液体吸干。用手指或桌面轻轻敲击管底, 让沉淀的细胞松动, 再把离心管置于 37℃ 水浴锅中。在 1 min 内缓慢将 50% PEG 0.8 mL 滴入离心管中, 边加边轻轻用吸管尖搅拌沉淀细胞。再继续搅拌 30 sec 后, 静置 1 min, 然后慢慢加入 40 mL 1640 基础培养基 (事先进行 37℃ 预温)。加基础培养基方法为: 第 1 min 内逐滴滴入 1 mL, 第 2 min 内加 2 mL, 第 3 min 内加 3 mL, 第 4 min 内加其余的 4 mL, 在每次加培养基时需缓慢加入, 并轻轻地搅拌培养基, 最后将剩余的 1640 培养基慢慢加入。1000 r/min 离心 5 min, 除去上清。然后用 HAT 培养基悬浮混合的细胞, 再加入饲养脾细胞。根据需要补加适量的 HAT 培养基, 混合均匀, 再将含有饲养细胞的细胞融合液滴加到 96 孔细胞培养板上, 滴加量约为 150 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。将培养板置于 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中, 进行培养。用建立的间接 ELISA 筛选阳性细胞克隆。选择强阳性集落生长的孔, 用有限稀释法进行克隆。并对其他阳性孔, 进行 24 孔扩大培养, 用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 对扩大培养孔的上清液进行检测, 对间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 均为阳性孔的细胞进行液氮冷冻保存。通过融合检测, 并进行 3 次亚克隆后获得杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过多次传代、冻存、复苏, 杂交瘤细胞分泌抗体稳定。进行杂交瘤细胞染色体的计数, 将每株杂交瘤细胞随机选择 20 个细胞, 进行细胞染色体条数的计数, 再计算细胞染色体条数的平均值。取细胞株细胞分泌的培养上清液, 进行 1:10 稀释后, 用夹心 ELISA 方法测定抗体亚型。通过上述方法分别制备了抗 CA 单克隆抗体细胞株 (2.2.4/6A11) 和抗 MA 单克隆抗体细胞株 (4.1.4/5D8)。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化。该单克隆抗体可用于制备胶体金。

[0016] 2.3 兔抗鼠 IgG 抗体的制备

用 Balb/C 小鼠 IgG 免疫健康新西兰大白兔, 制备高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清, 采用

饱和硫酸铵沉淀法对血清进行粗提,经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG。利用兔抗鼠 IgG 作为质控线。

[0017] 3 抗 CA (或 MA) 单克隆抗体-胶体金标记物的制备

胶体金的制备

量取去离子水 100 mL,移入 500 mL 的平底烧瓶中,将烧瓶置于磁力搅拌器的加热套内,打开搅拌旋钮和加热旋钮,加热至沸腾。加入 1% HAuCl_4 溶液 1.0 mL,继续加热 2 min,然后一次性迅速加入 1% 柠檬酸三钠溶液,继续加热。待溶液变为亮红色或橙红色后,再继续加热搅拌 15 min。关掉加热旋钮,冷却至室温,过滤备用。

[0018] 3.2 抗 CA 或 MA 单克隆抗体-胶体金标记物的制备与纯化

于 50 mL 的小烧杯中加入 30 mL 的胶体金,用 0.1 mol/L K_2CO_3 适量调 pH 达到最佳标记 pH 值,在搅拌的状态下,缓慢加入一定量稀释好的抗 CA(或 MA)单克隆抗体,继续搅拌 30 min;加 10% BSA 使其终浓度为 1%,搅拌 30 min;4℃ 放置 2 h 后,将以上胶体金标记物分装,以 2 000 r/min 离心 15 min,取上清,弃去沉淀;以 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,加入标记洗涤液到原体积;再次以 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,加入标记洗涤液到原体积;以 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀用 1.0 mL 标记洗涤液进行重悬,然后置 4℃ 冰箱。

[0019] 金标垫的制备

分别剪取规格为 20×4 mm 的玻璃纤维棉,然后将上述 4 种金标抗体复合物溶液用 ZX1000 喷点平台系统均匀喷洒于玻璃纤维棉上,置于 37℃ 干燥 1 h,加入干燥剂密封保存,后置于 4℃ 冰箱。

[0020] 硝酸纤维素膜(NC 膜)的制备

将 NC 膜置于 ZX1000 喷点平台系统上,将浓度为 0.2 mg/mL 的完全抗原 CA-BSA(或 MA-BSA)放于贮存池 A,浓度为 0.6 mg/mL 的 GaMIgG 放于贮存池 B。将 NC 膜展平,放上压条,质控线与检测线位于膜的中间相距 0.5 cm,其距膜的边距为 0.75 cm。开机后,喷点平台系统将完全抗原 CA-BSA、MA-BSA 和兔抗鼠 IgG 分别点射于 NC 膜上,形成 2 条检测线和 1 条质控线,置室温自然干燥后,加入干燥剂密封,置于 4℃ 保存,备用。

[0021] 检测试纸条的组装

将背板(2)、样品端封膜(9)、结合垫(7)、硝酸纤维素膜(4)、吸水垫(3)和手控区封膜(1)按一定的工艺组装到一起。将组装的半成品试纸条放入试纸条切割机槽内进行切割,然后将制备成品的试纸条注明生产时间和批次,置 4℃ 保存(密封)。

[0022] 4 检测 CA、MA 的免疫胶体金试纸条的使用方法

4.1 组织样品预处理

将猪肌肉、肝脏、肾脏等待检组织样品匀浆,取 2 g 加入 4 mL 乙酸乙酯振荡 2 min,室温 3000 r/min 离心 5 min,取 300 μL 上层液体于 1.5 mL 离心管中 80℃ 水浴蒸干(大约 30 min)或在氮气流下吹干,用 150 μL 稀释液溶解残留物。

[0023] 4.2 检测结果判定

如图 1、图 2 所示,一种环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联胶体金免疫层析快速检测试纸条,包括背板 2、吸水垫 3、硝酸纤维素膜 4、结合垫 7、样品垫 8,所述背板 2 上依次连续粘附有吸水垫 3、硝酸纤维素膜 4、结合垫 7 和样品垫 8,所述样品垫 8 靠结合垫 7 一端搭接在结合垫

7 上,所述吸水垫 3 上表面吸附有手控区封膜 1,所述样品垫 8 上表面吸附有样品端封膜 9,所述硝酸纤维膜 4 上包被有兔抗鼠的 IgG 质控线 5 和 MA-BSA、CA-BSA 两条检测线 6;样品垫 8 上包被有所述的抗 MA、CA 药物单克隆抗体-胶体金标记物。

[0024] 将样品液滴加到试纸条样品垫上,样品在毛细管作用下沿试纸条泳动,当泳动至金标垫时,固态化的金标抗单抗迅速溶解释放,随样品一起沿试纸条泳动至检测线,若样品中含有 CA、MA 首先与金标抗 CA 单抗、MA 单抗发生免疫反应,形成免疫复合物,抑制金标抗 CA 单抗、MA 单抗与检测线(T1、T2)包被的 CA-BSA、MA-BSA 偶联物的结合,使检测线截获的金标抗体的量减少,T 线颜色变浅,当样品中 CA、MA 量足够大时,检测线将无颜色出现,金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获 C 线出现红色条带;反之,若样品中不含 CA、MA,金标抗 CA 单抗、MA 单抗与包被于 NC 膜上的 MA-BSA、CA-BSA 偶联物发生特异性免疫反应而被截获,在检测线位置(T1、T2)形成红色条带,即阴性结果,部分金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获,形成红色条带。

[0025] 5 本发明药物检测试纸条的应用

、MA 残留 2 联检测试纸条的灵敏度测定

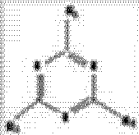
将 CA 配成浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g/L}$ 的标准品,分别加到试纸条的样品垫上,测试重复 8 次,静置试纸条反应 10 min,然后用 BioDot-TSR3000 读条仪扫描检测线的相对光密度值(G/Peak-ROD 值)以不同浓度标准品与空白标准品相对光密度值的百分率(B/B0%)为纵坐标,以标准品不同浓度的常用对数值作为横坐标,绘制检测试纸条的标准曲线,求回归方程,进行相关回归分析,标准曲线结果见图 3(a: 阴性对照;b:阴性样品;c:CA 阳性样品;d:MA 阳性样品;e:CA&MA 阳性样品;f:失效)。G/Peak-ROD 值进行统计学分析,确定试纸条的检测限。CA 标准曲线半数抑制率(IC50)为 1.75 ng/mL、最低检测线 0.22 ng/mL,MA 标准曲线半数抑制率(IC50)为 2.04 ng/mL、最低检测线 0.26 ng/mL。

[0026] 目测检测方法建立:在有红色质控线出现的情况下,当试纸条与阴性对照试纸条检测线颜色相似红色条带时判为阴性;当试纸条检测线颜色明显浅于阴性对照试纸条检测线颜色时判为弱阳性;当试纸条检测线位置无红色条带出现时判为阳性。在试纸条没有出现红色质控线的情况下,说明试纸条已失效,此时不管检测线颜色的深浅和有无,检测结果都判为无效,应更换另一批次的试纸条重新检测,两种药物目测检测临界值为 <0.5 ng/mL、0.5 - 25 ng/mL、>25 ng/mL。

[0027] 二联检残留检测试纸条的特异性试验

二联检胶体金免疫层析快速检测试纸条与其它三嗪类药物的交叉反应率见表 1。从表中可以看出,二联检胶体金免疫层析快速检测试纸条与常用三嗪类药物的交叉反应率,说明该试纸条可用于食品中 CA、MA 药物残留检测。

[0028] 表 1 CA 与 MA 残留检测试纸条与三嗪类药物的交叉反应率

三嗪类药物				2.2.4.6 A11		4.1.4/5D8	
	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (ng/ml)	交叉反应率 (%)	IC ₅₀ (ng/ml)	交叉反应率 (%)
CA	NH ₂	NH ₂	NH(C ₂ H ₅)	1.75	100	>2000	<0.1
MA	NH ₂	NH ₂	NH ₂	>2000	<0.1	2.04	100
三聚氰酸二 酰胺	NH ₂	NH ₂	OH	>2000	<0.1	1000	0.17
三聚氰酸一 酰胺	NH ₂	OH	OH	>2000	<0.1	2000	<0.1
三聚氰酸	OH	OH	OH	>2000	<0.1	2000	<0.1
阿特拉津	NH(CH ₂ (CH ₃) ₂)	NH(CH ₂ CH ₃)	Cl	>2000	<0.1	>2000	<0.1

5.3 二联检胶体金免疫层析快速检测试纸条的样品添加回收试验及和液相比对

二联检试纸条样品添加回收率、批间批内变异系数、液相复核对比结果见表 2。结果表明, CA、MA 在不同样品中回收率在 73.9%-104.2% 范围内, 变异系数均小于 15%, 完全符合产品化试剂盒的要求。

[0029] 表 2 纸条法与 HPC 法检测 CA、MA 在动物源性食品中的回收率对比试验

样品	分析物	浓度 (ng/g)	试纸条			液相		
			回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)	回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
猪肉	CA	50	85.5±5.3	6.2	7.8	89.8±6.5	7.2	6.5
		100	81.2±4.3	5.3	8.4	91.1±5.3	5.8	7.4
		150	79.3±4.2	5.3	9.3	92.6±7.5	8.1	5.3
	MA	50	102.2±5.1	5.0	6.4	98.3±6.8	6.9	6.2
		100	83.6±5.4	6.5	7.4	89.6±7.2	8.0	8.8
		150	82.4±4.5	5.5	8.1	88.6±5.8	6.5	8.3
猪肝	CA	50	75.6±3.7	4.9	10.2	92.4±6.8	7.3	7.3
		100	86.6±5.3	6.1	8.2	90.7±7.3	8.0	6.4
		150	96.5±7.2	7.5	9.4	93.8±6.9	7.3	5.4
	MA	50	88.3±6.3	7.1	8.9	89.6±8.9	9.9	7.2
		100	97.6± 6.3	6.5	8.4	89.8±7.4	8.2	3.6
		150	75.1±2.3	3.1	6.4	93.2±8.6	9.2	5.3
牛肉	CA	50	102.2±2.3	2.3	5.1	93.7±7.5	8.0	6.2
		100	73.9±1.9	2.6	8.2	87.6±6.5	7.4	7.9
		150	78.2±7.1	9.1	8.6	89.6±7.4	8.2	8.2
	MA	50	88.5±9.4	10.6	9.7	94.5±7.8	8.2	7.4
		100	84.6±4.2	5.0	6.9	84.9±5.4	6.3	6.2
		150	87.8±4.6	5.2	7.6	89.8±4.3	4.7	6.1
牛肝	CA	50	87.3±2.9	3.3	6.5	90.6±4.5	4.9	6.8
		100	81.3±7.3	9.0	8.6	91.4±5.3	5.7	7.6
		150	78.6±4.1	5.2	6.4	92.3±4.8	5.2	7.2
	MA	50	75.1±7.7	10.3	9.4	87.4±6.4	7.3	6.9
		100	102.1±6.3	6.2	8.6	87.4±5.7	6.5	7.5
		150	81.5±5.8	7.1	7.9	89.6±4.8	5.3	6.4
羊肉	CA	50	81.8±3.3	4.0	6.3	90.6±7.1	7.8	6.1
		100	104.2±6.5	6.2	7.9	91.4±5.3	5.7	7.3

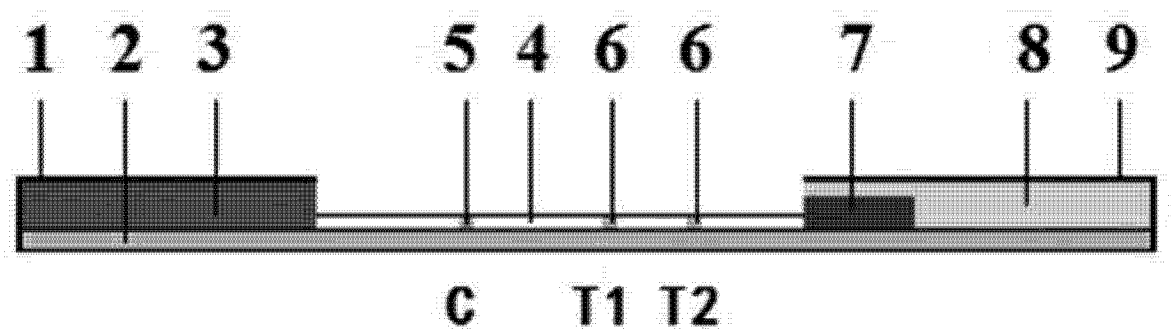


图 1

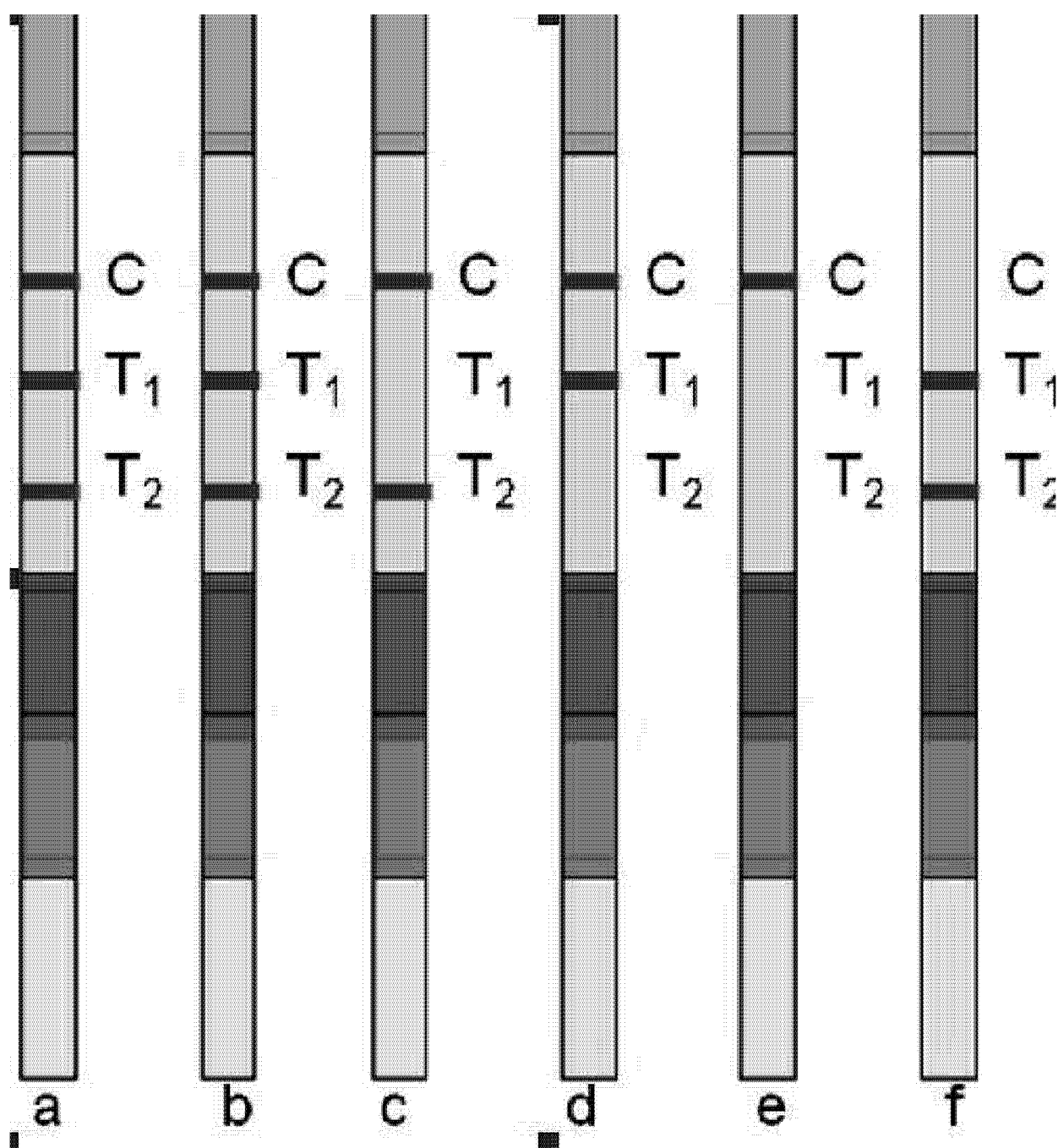


图 2

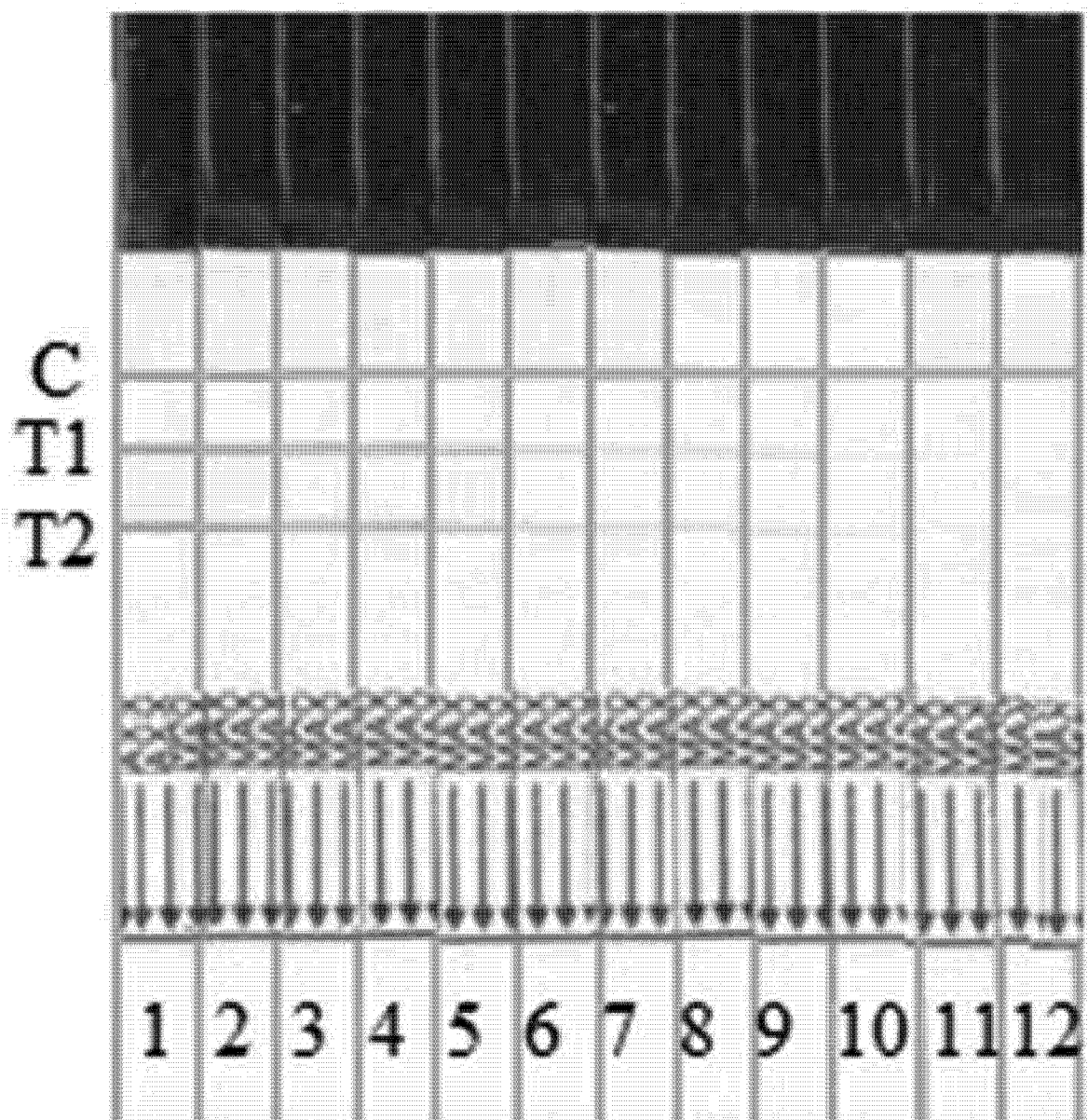


图 3

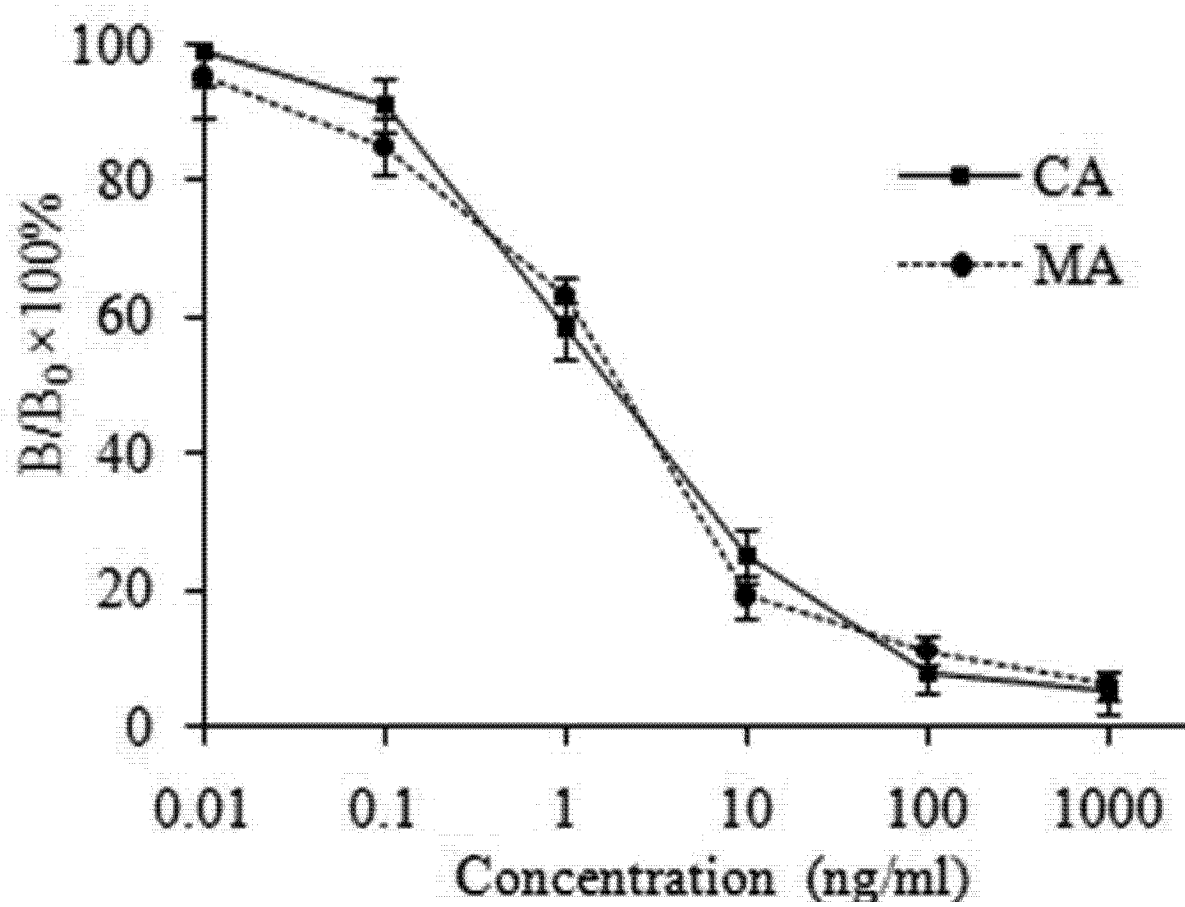


图 4

专利名称(译)	环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN102297970A	公开(公告)日	2011-12-28
申请号	CN201110140024.3	申请日	2011-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
[标]发明人	乐涛 魏启明		
发明人	乐涛 魏启明		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	郭云		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了环丙氨嗪、三聚氰胺残留二联检快速检测试纸条及其制备方法，硝酸纤维膜（4）上包被有兔抗鼠的IgG质控线（5）和MA-BSA、CA-BSA两条检测线（6）；结合垫（8）上包被有的抗MA药物单克隆抗体-胶体金标记物、抗CA药物单克隆抗体-胶体金标记物。本发明应用免疫学技术筛选出抗MA药物单克隆抗体、抗CA药物的单克隆抗体，通过胶体金的制备及胶体金标记条件的探索研究，在应用抗MA药物单克隆抗体、抗CA药物单克隆抗体和胶体金技术研究建立抗MA、CA药物二联检测胶体金试纸条，并对其性能进行测定。试纸条检测样品范围较宽，假阳性低，检测灵敏、准确、可靠，适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏和肾脏等组织及牛奶中CA、MA药物残留的二联检检测。

