



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105510587 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201410547766. 1

(22) 申请日 2014. 10. 16

(71) 申请人 镇江先创生物科技有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十五
路 99 号 11 幢

(72) 发明人 洪霞 杜霞 江振飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法, 涉及 β -肾上腺素受体激动剂检测技术领域。本发明的检测卡外壳中的试纸条, 由 PVC 胶板、样品垫、胶体金结合垫、包被膜和吸水垫组成; 胶体金膜为含新霉素单克隆抗体的玻璃纤维素膜, 包被膜是硝酸纤维素膜, 其上设有 T 线和 C 线, T 线包被有新霉素蛋白质偶联物, C 线包被有羊抗鼠 IgG 抗体。本发明有效用于快速检测新霉素, 方便、快捷、结果准确。

1. 新霉素胶体金检测卡,其特征在于按照下述步骤制备得到:

(1) 胶体金溶液制备:取 1 L 三角烧瓶 1 个,加入超纯水 495 mL,而后加入 1% 氯金酸 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mL,配制成 500 mL 0.01% 氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入 1% 柠檬酸三钠 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持 5 min 后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃ 保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的新霉素抗体在 1000 r/min,4℃ 条件下,离心 20 min,取上清,用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL;或者用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/ml,过 0.22 μm 滤膜;

(3) 胶体金标记物的制备:取步骤 (1) 中的胶体金溶液 40 mL,用 0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH 至 8.5,电磁搅拌器 250 r/min 搅拌,逐滴加入 4 mL 含 0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应 10 min;逐滴加入 4 mL 10% BSA,继续搅拌反应 10 min;金标抗体溶液常温 1500 r/min 离心 10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液 4℃,12000 r/min 离心 20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至 1 mL,制备成新霉素单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤 (3) 新霉素蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以 5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者 37℃ 烘干 3 h,制成含新霉素蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

(5) 包被膜制备:将羊抗鼠 IgG 抗体、新霉素蛋白质偶联物稀释成 1 mg/mL,用划膜仪依次以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃ 包被 2 h 后,室温自然晾干或者 37℃ 烘干;

(6) 样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于 60% 的条件下,室温自然晾干;

(7) 检测卡的组装:PVC 胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

2. 根据权利要求 1 所述的新霉素胶体金检测卡,其特征在于所述步骤 (5) 中所包被的检测线 T 设在质控线 C 的下方;

所述步骤 (6) 中的样品垫处理液是由 1 g 小牛血清蛋白 (BSA) 和 0.8 g 氯化钠 (NaCl),用含有 0.5%TRITON-100 的 0.01 mol/L PBS 定容至 100 mL。

新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物源食品抗生素检测技术领域,特别是涉及新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 新霉素是一种广谱抗生素,常用于动物各种传染病的治疗,对于多种病原菌有较强的抑制作用,对革兰氏阳性和阴性菌皆有效。新霉素存在严重的副作用,具有肾毒性和内耳毒性,它对内耳的伤害,往往是不可逆转的,因此动物食品中的新霉素残留对人类的健康构成巨大威胁。检测动物源食品中新霉素的含量显得更直接、方便,且可实现宰前检测,为及时排除食品安全隐患,保障食品的质量安全,特开展本试验方法研究。

[0003] 现有技术对于新霉素的检测主要是高效液相色谱-串联质谱法、高效液相色谱法等检测方法,但这些技术的缺陷明显:设备昂贵、操作复杂、难以推广。所以,建立一种简单、有效、适合基层使用的测定方法是极其必要的。本发明的目的是研制一种更适合企业进行现场检测且快捷简便、成本低廉的定性检测方法。

发明内容

[0004] 针对以上情况,本发明的目的就是为了克服现有技术存在的缺陷而提供一种新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法,可有效解决能快速、简便地检测出 β -肾上腺素受体激动剂新霉素的问题。

[0005] 本发明的新霉素胶体金检测卡,包括包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了新霉素-BSA 和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、PVC 胶板和塑料模具组成,在 PVC 胶板的一端依次粘附样品垫、结合垫,中间黏贴硝酸纤维素膜,另一端粘附吸水垫。

[0006] 本发明的新霉素胶体金检测卡的制备方法,是由以下步骤实现:

(1) 胶体金溶液制备:取 1 L 三角烧瓶 1 个,加入超纯水 495 mL,而后加入 1% 氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成 500 mL 0.01% 氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入 1% 柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液 5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持 5 min 后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃ 保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的新霉素抗体在 1000 r/min, 4℃ 条件下,离心 20 min,取上清,用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL;或者用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL,过 0.22 μm 滤膜;

(3) 胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液 40 mL,用 0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH 至 8.5,电磁搅拌器 250 r/min 搅拌,逐滴加入 4 mL 含 0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应 10 min;逐滴加入 4 mL 10% BSA,继续搅拌反应 10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心 10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液 4℃,12000 r/min 离心 20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至 1 mL,制备

成新霉素单克隆抗体胶体金标记物；

(4) 胶体金膜的制备：将步骤 (3) 新霉素蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以 5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上，室温自然晾干或者 37℃ 烘干 3 h，制成含新霉素蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜；

(5) 包被膜制备：将羊抗鼠 IgG 抗体、新霉素蛋白质偶联物稀释成 1 mg/mL，用划膜仪依次以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上，制备成包被膜，37℃ 包被 2 h 后，室温自然晾干或者 37℃ 烘干；

(6) 样品垫前处理：将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上，在空气湿度低于 60% 的条件下，室温自然晾干；

(7) 检测卡的组装：PVC 胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉，组装成试纸条，切割成一定宽度的长条，再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

[0007] 所述步骤 (5) 中所包被的检测线 T 设在质控线 C 的下方；

所述步骤 (6) 中的样品垫处理液是由 1 g 小牛血清蛋白 (BSA) 和 0.8 g 氯化钠 (NaCl)，用含有 0.5% TRITON-100 的 0.01 mol/L PBS 定容至 100 mL；

本发明可有效用于测定 β -肾上腺素受体激动剂新霉素，方法简单，方便、快捷，结果准确。

附图说明

[0008] 图 1 为本发明新霉素的免疫胶体金检测卡的结构图：图中 1. 加样孔 2. 检测线 3. 质控线 4. 检测孔 5. 试纸条 6. 检测卡外壳。

[0009] 图 2 为本发明新霉素的免疫胶体金检测卡内的试纸条的剖视结构图，图中 7. 样品垫 8. 胶体金结合垫 9. PVC 胶板 10. 硝酸纤维素膜 11. 吸水垫。

具体实施方式

[0010] 实施例 1

图 1、图 2 所示的实施例：图中 9 为 PVC 胶板；7 为样品垫；8 为胶体金结合垫，该胶体金结合垫上包被了单克隆抗体胶体金标记物；10 为包被膜，即硝酸纤维素膜，该硝酸纤维素膜上包被了新霉素-BSA 和羊抗鼠 IgG；11 为吸水垫，由吸水材料如滤纸制成。

[0011] 在 PVC 胶板 9 的一端上（样品端）粘附样品垫 7、结合垫 8，样品垫 7 和结合垫 8 为并排结构。

[0012] 在 PVC 胶板 9 的中间粘附硝酸纤维素膜 10。在硝酸纤维素膜 10 上设置有羊抗鼠 IgG 质控线 3 和新霉素-BSA 检测线 2。

[0013] 在 PVC 胶板 9 的另一端粘附吸水垫 11。硝酸纤维素膜 10 的一端与结合垫 8 略交叉，另一端与吸水垫 11 略交叉。该试纸条 5 可装入有塑料模具制成的检测卡外壳 6 中，制成检测卡，在检测卡外壳 6 的上盖上设有加样孔 1 和检测孔 4，样品垫 7 正对加样孔 1，硝酸纤维素膜 10 正对检测孔 4。

[0014] 实施例 2

新霉素胶体金检测卡制备，是由以下步骤具体实现：

胶体金溶液制备：取 1 L 三角烧瓶 1 个，加入超纯水 495 mL，而后加入 1% 氯金酸

($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL, 配制成 500 mL 0.01% 氯金酸水溶液, 加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液 5-7 mL, 继续搅拌加热, 当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时, 维持 5 min 后停止加热, 补水至原体积, 冷却至室温, 2-8℃ 保存备用;

抗体的预处理: 将要标记的新霉素抗体在 1000 r/min, 4℃ 条件下, 离心 20 min, 取上清, 用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL; 或者用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL, 过 0.22 μm 滤膜;

胶体金标记物的制备: 取步骤 (1) 中的胶体金溶液 40 mL, 用 0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH 至 8.5, 电磁搅拌器 250 r/min 搅拌, 逐滴加入 4 mL 含 0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液, 反应 10 min; 逐滴加入 4 mL 10% BSA, 继续搅拌反应 10 min; 金标抗体溶液常温低速 (1500 r/min) 离心 10 min, 弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀; 红色上清溶液 4℃, 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 收集沉淀, 将沉淀用金标抗体稀释液定容至 1 mL, 制备成新霉素单克隆抗体胶体金标记物;

胶体金膜的制备: 将步骤 (3) 新霉素蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以 5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上, 室温自然晾干或者 37℃ 烘干 3 h, 制成含新霉素蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

包被膜制备: 将羊抗鼠 IgG 抗体、新霉素蛋白质偶联物稀释成 1 mg/mL, 用划膜仪依次以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上, 制备成包被膜, 37℃ 包被 2 h 后, 室温自然晾干或者 37℃ 烘干;

样品垫前处理: 将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上, 在空气湿度低于 60% 的条件下, 室温自然晾干;

检测卡的组装: PVC 胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉, 组装成试纸条, 切割成一定宽度长条, 再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

[0015] 实施例 3

新霉素最低检出限量试验

准确称量 0.500 g 新霉素抗原溶于超纯水并定容至 100 mL, 标为 A_1 溶液, 取 A_1 溶液 1 mL 于容量瓶加超纯水并定容至 1000 mL, 形成 A_2 溶液, 取 A_2 溶液 1 mL 于容量瓶加超纯水并定容至 1000 mL, 形成 A_3 溶液, 则 A_3 溶液的浓度为 5 ng/mL (5ppb)。取 A_3 溶液 1 mL 于 4 支试管中, 并分别标号 1~4, 往试管中分别加入 9 mL、4 mL、1 mL、0 mL 超纯水, 配成新霉素抗原溶液浓度分别是: 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL; 另取一支空试管, 加入 5 mL 超纯水, 标为 5 号试管。取上述 1~5 号试管中液体作为样品滴加到新霉素检测卡上, 加样后 5 min 观察结果, 检测线 2 和质控线 3 的显色结果见表 1。

[0016] 表 1 新霉素最低检出限量试验

试管编号	盐酸赛庚啉溶液 浓度 (ng/mL)	测定结果
1	0.5	检测线 T 显色比质控线 C 略淡
2	1	检测线 T 显色稍淡
3	2.5	检测线 T 显色较淡
4	5	检测线 T 不显色
5	0	检测线 T 与质控线显色基本相同

经多次检验,新霉素的检出率达 99%,最低检出限量为 5 ng/mL。

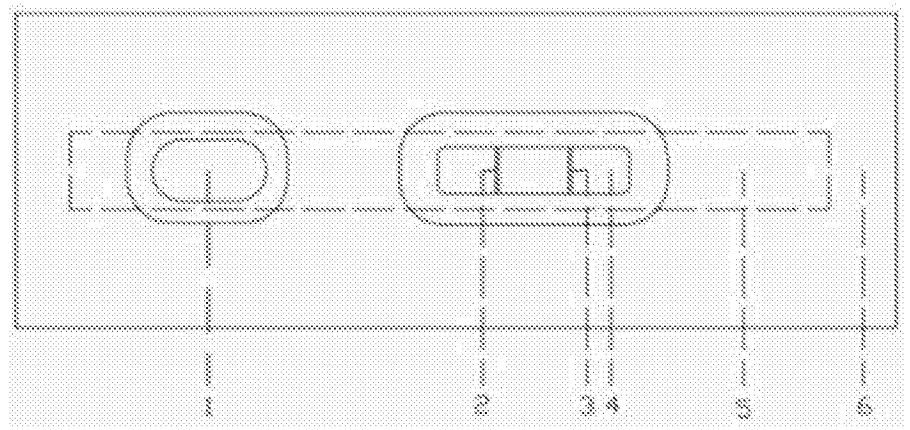


图 1

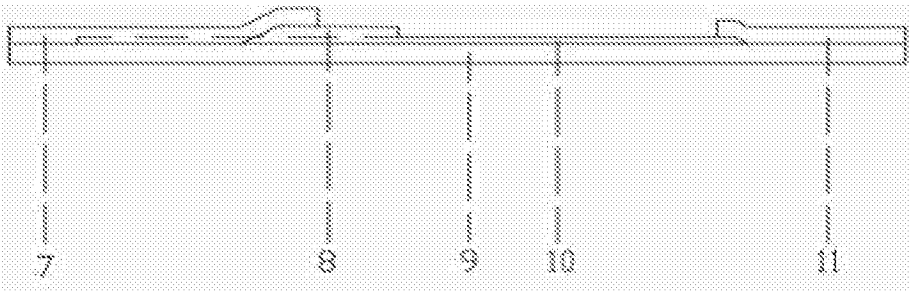


图 2

专利名称(译)	新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN105510587A	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201410547766.1	申请日	2014-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	镇江先创生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	镇江先创生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	镇江先创生物科技有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞 江振飞		
发明人	洪霞 杜霞 江振飞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明新霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法,涉及 β -肾上腺素受体激动剂检测技术领域。本发明的检测卡外壳中的试纸条,由PVC胶板、样品垫、胶体金结合垫、包被膜和吸水垫组成;胶体金膜为含新霉素单克隆抗体的玻璃纤维素膜,包被膜是硝酸纤维素膜,其上设有T线和C线,T线包被有新霉素蛋白质偶联物,C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测新霉素,方便、快捷、结果准确。

