



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572390 A

(43) 申请公布日 2016.05.11

(21) 申请号 201410536733.7

(22) 申请日 2014.10.13

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 洪霞 杜霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

除草剂 2,4-D 的免疫胶体金检测卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明 2,4-D 的免疫胶体金检测卡及其制备方法,涉及动物源食品兽药残留检测技术领域。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 2,4-D 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 2,4-D 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 2,4-D,方便、快捷、结果准确。

1. 2, 4-D 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°C 保存备用;

(2) 抗体的预处理: 将要标记的 2, 4-D 抗体在 1000 r/min, 4°C 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°C, 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 2, 4-D 单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备: 将步骤 (3) 2, 4-D 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°C 烘干 3 h, 制成含 2, 4-D 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、2, 4-D 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°C 包被 2 h 后, 室温自然晾干或者 37°C 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 2, 4-D 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。

除草剂 2, 4-D 的免疫胶体金检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及环境激素检测技术领域,特别是涉及 2, 4-D 的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 近些年来,科学家不断发现一些来源于环境中的化学物质能够模拟内分泌激素功能而引起生物体内分泌系统紊乱,称其为环境激素或环境荷尔蒙。环境激素已成为继臭氧层、地球气候变暖之后全球的第三大环境问题,成为环境科学研究领域中的热门课题。美国环境保护局给出的环境激素的定义,是指一类干扰体内与生物体的正常行为及与生殖、发育相关的正常激素的合成、贮存、分泌、体内运输、结合及清除等过程的外源性化合物。

[0003] 环境激素是环境中的激素类似物,它能通过与激素受体结合,干扰生物体正常的生理代谢、内分泌和生殖机能,引起种种负面的生物学效应。环境激素通过环境介质和食物链进入人体或动物体内,干扰其内分泌系统和生殖功能系统,影响后代的生存和繁衍。

[0004] 现代工农业生产在不断满足人类的生活需要的同时也给环境带来了沉重的负担,并且已经威胁到人类的生殖健康,甚至物种的繁衍。我国是世界上的农药生产与使用大国,资料显示 2011 年我国农药原药产量为 264.87 万吨,其中杀虫剂原药产量为 70.9 万吨,占总产量的 44.35%;除草剂产量为 117.5 万吨,占总产量的 26.77%;杀菌剂原药的产量为 15 万吨,占总产量的 5.67%。此类农药除部分出口外,大部分在国内销售和使用。据相关数据估算我国每年约有 50~60 万吨有机氯农药直接排放至环境中,如除草剂 2, 4-滴(2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 2, 4-D)。而多数有机氯农药具有较强的内分泌干扰作用。此类农药一旦进入环境就会通过多种暴露途径进入生物体内,富集于生物体的脂肪组织内进而危害人和动物的生殖健康。

[0005] 目前,环境激素污染物的分析方法主要分为以 GC-MS、HPLC 与 LC-MS 技术为代表的仪器分析方法以及基于抗原抗体反应的免疫分析技术,这些常规的残留分析技术通常操作程序复杂,效率较低,分析成本较高,不利于推广使用,难以适应大量样本和现场检测的要求。基于环境激素污染物的危害性、代表性及目前的研究热点,本发明涉及一种除草剂 2, 4-D 检测卡及其制备方法。本发明的检测卡具有简便快捷、易于操作、成本低廉等优点,并且能同时检测水样中这二种环境激素污染物质,产生了良好的社会效益和经济效益。

[0006] 本发明的 2, 4-D 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 2, 4-D-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。

[0007] 本发明的 2, 4-D 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 2,4-D 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 K₂CO₃ 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 2,4-D 单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)2,4-D 蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以 5 μL/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 2,4-D 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、2,4-D 蛋白质偶联物稀释成 1 mg/mL,用划膜仪依次以 1 μL/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。

[0008] 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 2,4-D,方法简单,方便、快捷,结果准确。

附图说明

[0009] 图 1 为本发明 2,4-D 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。

[0010] 图 2 为本发明 2,4-D 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

[0011] 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 2,4-D-BSA 和羊抗鼠 IgG;11 为吸水垫,由吸水材料如滤纸制成。

[0012] 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。

[0013] 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 2, 4-D-BSA 检测线 2。

[0014] 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。

[0015] 实施例 2

2, 4-D 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 2, 4-D 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 2, 4-D 单克隆抗体胶体金标记物;

胶体金膜的制备:将步骤(3)2, 4-D 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 2, 4-D 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、2, 4-D 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。

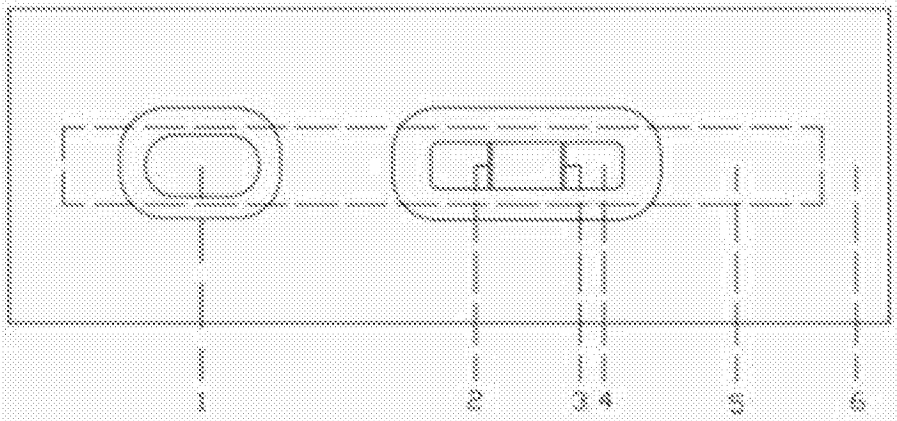


图 1

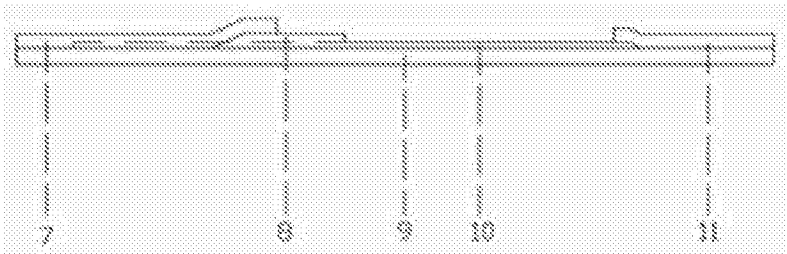


图 2

专利名称(译)	除草剂2,4-D的免疫胶体金检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN105572390A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410536733.7	申请日	2014-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞		
发明人	洪霞 杜霞		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明2,4-D的免疫胶体金检测卡及其制备方法，涉及动物源食品兽药残留检测技术领域。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2,4-D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2,4-D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2,4-D，方便、快捷、结果准确。

