



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226486 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201611158306.5

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 南京亿特生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区江宁科
学园芝兰路18号

(72)发明人 洪霞 杜霞 丁炎

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

马杜霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方
法

(57)摘要

本发明马杜霉素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；胶体金膜为含马杜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线包被有马杜霉素蛋白质偶联物，C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测马杜霉素，方便、快捷、结果准确。

1. 马杜霉素胶体金检测卡,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HAuCl₄ • 3H₂O 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Na₃C₆H₅O₇ • 2H₂O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:将要标记的马杜霉素抗体在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 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,制备成马杜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)马杜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 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°C烘干3 h,制成含马杜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、马杜霉素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°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所述的马杜霉素胶体金检测卡,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。

马杜霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及谷物食品中农药残留检测技术领域,特别是涉及马杜霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 马杜霉素 英文名称Maduramicin,又名马度米星.是一种较新型的聚醚类一价单糖苷离子载体抗生素,本品抗球虫谱广对子孢子和第一代裂殖体均有抗球虫活性。本品能有效控制6种常见的鸡球虫,对鸭球虫病也有良好的预防效果。混饲,每1000 kg饲料5~10 g马杜霉素由美国氰胺公司于20世纪80年代开发,1992年我国开发成功并大批量生产,由于价格较低,对球虫病具有良好的预防和治疗作用,使马杜霉素在临床得到广泛的应用。但该药毒性较大,安全范围窄,使用剂量非常接近鸡的中毒量,超量使用易引起禽中毒。家禽马杜霉素中毒一般为急性过程。急性死亡(1~ 2 d 内死亡)的动物一般会出现典型的中毒症状:东走西窜、站立不安、兴奋亢进等神经症状,或水样腹泻、腿软、行走及站立不稳。严重者两腿麻痹,昏睡直至死亡。亚慢性中毒表现为减食甚至食欲废绝,迅速消瘦,粪便呈现色泽变化,从青灰、浅绿、绿色至胆绿色,出现率约 20% 左右。家禽精神不振、蹲伏驱赶不动,甚至两脚瘫痪、驱赶时跗关节着地,两翅拍动、无力站立,甚至死亡。在临床应用时常因使用不当,造成家禽中毒,经济损失较大。Ft%HWGE

现有技术对于马杜霉素的检测主要是气相色谱-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

[0003] 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马杜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、简便地检测出马杜霉素的问题。

[0004] 本发明的马杜霉素胶体金检测卡,包括包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了马杜霉素-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。

[0005] 本发明的马杜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(HAuCl₄ • 3H₂O) 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(Na₃C₆H₅O₇ • 2H₂O) 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:将要标记的马杜霉素抗体在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 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,制备成马杜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)马杜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 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,制成含马杜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、马杜霉素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。

[0006] 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马杜霉素,方法简单,方便、快捷,结果准确。

附图说明

[0007] 图1为本发明马杜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。

[0008] 图2为本发明马杜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

[0009] 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马杜霉素-BSA和羊抗鼠IgG;11为吸水垫,由吸水材料如滤纸制成。

[0010] 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。

[0011] 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和马杜霉素-BSA检测线2。

[0012] 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。

[0013] 实施例2

马杜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°C保存备用；

抗体的预处理：将要标记的马杜霉素抗体在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；

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°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，制备成马杜霉素单克隆抗体胶体金标记物；

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

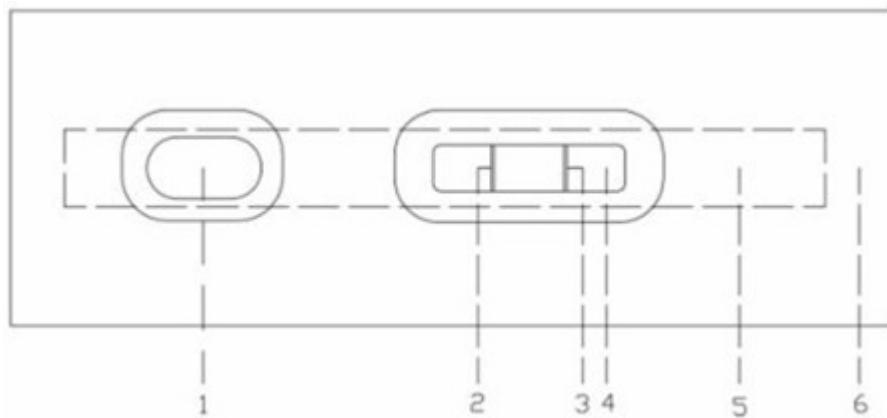


图1

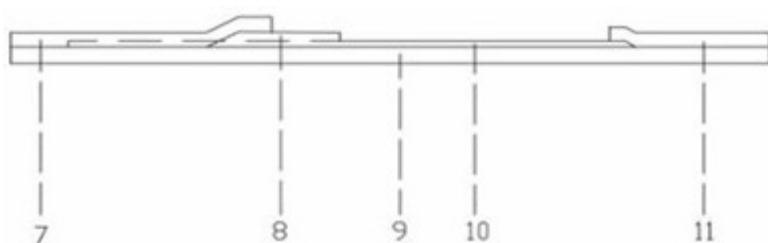


图2

专利名称(译)	马杜霉素的免疫胶体金检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN108226486A	公开(公告)日	2018-06-29
申请号	CN201611158306.5	申请日	2016-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞 丁炎		
发明人	洪霞 杜霞 丁炎		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明马杜霉素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；胶体金膜为含马杜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线包被有马杜霉素蛋白质偶联物，C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测马杜霉素，方便、快捷、结果准确。

