



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752534 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201711073707.5

(22)申请日 2017.11.05

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司  
地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家  
科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 张淑雅 立雯馨

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(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

一种检测邻苯基苯酚的免疫胶体金检测卡  
及其制备方法

(57)摘要

本发明邻苯基苯酚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;胶体金膜为含邻苯基苯酚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线包被有邻苯基苯酚蛋白质偶联物,C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测邻苯基苯酚,方便、快捷、结果准确。

1. 邻苯基苯酚胶体金检测卡,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:将要标记的邻苯基苯酚抗体在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  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 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,制备成邻苯基苯酚单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)邻苯基苯酚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,制成含邻苯基苯酚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、邻苯基苯酚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。

2. 根据权利要求1所述的邻苯基苯酚胶体金检测卡,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( $\text{NaCl}$ ),用含有0.5%TRITON-100的0.01 mol/L PBS定容至100 mL。

## 一种检测邻苯基苯酚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,特别是涉及邻苯基苯酚的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 食品安全卫生关系到人类的生命和健康,引起了国际社会的广泛关注。随着食品生产自然方式的减少,工业化比重的增加,食品被人们故意或非故意污染的机会正逐渐增加,而且随着国际贸易的日益发达,食品污染扩散的速度之快、范围之广、危害之大,也是前所未有的。现在的果蔬保鲜贮藏技术,主要是依靠适宜的低温和空气调节,但在果蔬贮藏期间它们能够承受的温使用度和气体条件下,控制不住霉菌的生长;另外果蔬保鲜贮藏需要的较高湿度,正式霉菌生长的良好条件,因此在果蔬保鲜中使用防腐剂是必不可少的。防腐剂不但对果蔬保鲜有利,而且它也可控制产生霉菌,从而使人们免受霉菌毒素的侵害。

[0003] 防腐剂的使用对食品贮藏具有重要意义。但在食品中使用化学品难免让人们担心,防腐剂能杀菌,同时对人体也有害处。人们对于在食品中使用化学品,尤其是使用防腐剂很担心,但在实际上不使用又不行,防腐剂成了一把双刃剑。为此,有关专家提出几点建议,其中一点要严格执行GB2760中规定的最高使用限量和最高残留限量,选择合适的剂量,最大限度地提高药效,从而减少使用量,将污染降至最低水平。这就需要发展相应的检测方法,快速、准确的检测出果蔬中残留的防腐剂,给消费者提供最大限度的博阿胡。防腐剂在实际应用时,由于微生物种类的多样性和防腐剂作用的特点,人们致力加强复配技术的开发和应用,采用多种保鲜剂的混合应用。因此,需要发展同时测定果蔬中多种保鲜剂的分析方法,提高分析时间和材料方面效率。

[0004] 在世界各国广泛使用,防止水果在生长、储存、运输过程中腐烂变质。但水果中残留的防腐剂对人体具有一定的毒性,主要侵害人体的肝肾、神经系统和骨髓。有文献报道邻苯基苯酚对试验动物具有潜在的致膀胱癌作用。因此,需要发明一种工序少、操作简便检测的新方法。

### 发明内容

[0005] 针对以上情况,本发明的目的就是为了解决现有技术存在的缺陷而提供一种邻苯基苯酚的免疫胶体金检测卡及其制备方法,可有效解决能快速、简便地检测出邻苯基苯酚的问题。

[0006] 本发明的邻苯基苯酚胶体金检测卡,包括包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了邻苯基苯酚-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] 本发明的邻苯基苯酚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:将要标记的邻苯基苯酚抗体在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  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 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,制备成邻苯基苯酚单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)邻苯基苯酚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,制成含邻苯基苯酚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、邻苯基苯酚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( $\text{NaCl}$ ),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邻苯基苯酚,方法简单,方便、快捷,结果准确。

## 附图说明

[0009] 图1为本发明邻苯基苯酚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为本发明邻苯基苯酚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邻苯基苯酚-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和邻苯基苯酚-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

邻苯基苯酚胶体金检测卡制备,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:将要标记的邻苯基苯酚抗体在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  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 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,制备成邻苯基苯酚单克隆抗体胶体金标记物;

胶体金膜的制备:将步骤(3)邻苯基苯酚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,制成含邻苯基苯酚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、邻苯基苯酚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;

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。

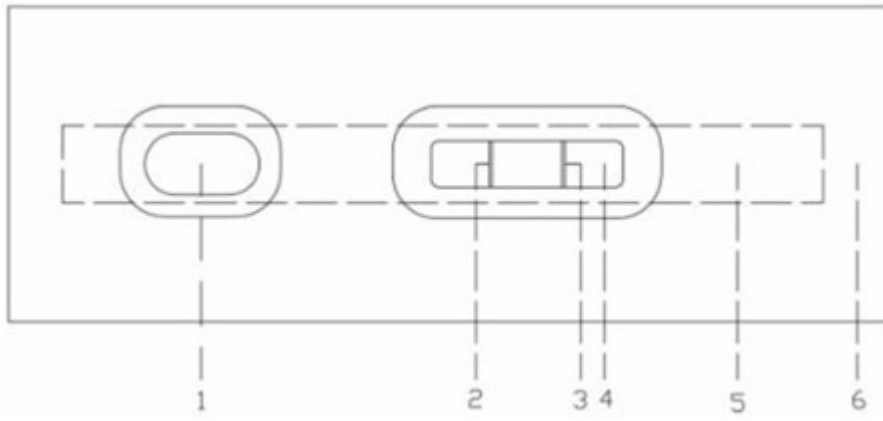


图1

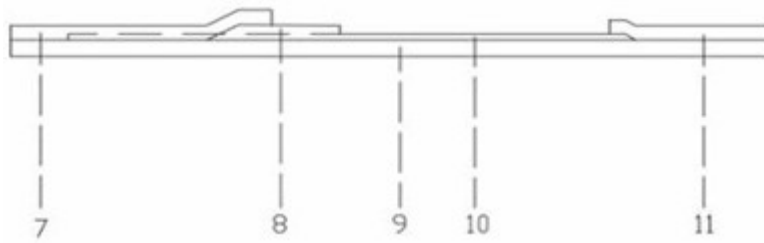


图2

专利名称(译)	一种检测邻苯基苯酚的免疫胶体金检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109752534A</a>	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN2017111073707.5	申请日	2017-11-05
[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 张淑雅 立雯馨		
发明人	洪霞 张淑雅 立雯馨		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明邻苯基苯酚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；胶体金膜为含邻苯基苯酚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线包被有邻苯基苯酚蛋白质偶联物，C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测邻苯基苯酚，方便、快捷、结果准确。

