



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101839909 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 201010166288.1

(22) 申请日 2010.05.07

(71) 申请人 杭州南开日新生物技术有限公司  
地址 310051 浙江省杭州市滨江区滨文路  
95号活水工业园6幢4楼杭州南开日  
新生物技术有限公司

(72) 发明人 张少恩 桑丽雅 邵伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

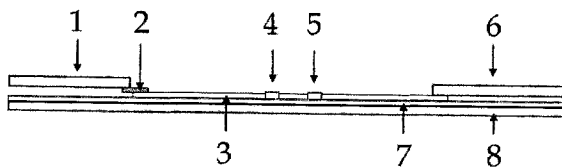
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种检测氯霉素的试剂板的制备方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种检测氯霉素的免疫胶体金试剂板的制备方法,可用于检测蜂蜜(包括原蜜和浓缩蜜)中的氯霉素残留。本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成,背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线,可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板可进行半定量直观检测,整个操作过程仅需 20~30min,且无需任何昂贵实验设备辅助,利于大规模样本筛选,适合工商部门、检验检疫机构、养蜂场及蜂产品生产加工企业 对蜂产品原料及产品中的氯霉素进行大规模快速检测。



1. 一种检测氯霉素的试剂板的制备方法,其特征在于试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成,试剂板背衬上依次紧密粘贴的样品垫、胶金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫相邻各部分间有 1-2mm 的重叠以保证层析作用从样品垫到吸水垫部位的顺利进行。

2. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于试剂板的硝酸纤维素膜上的胶体金结合垫上包被有抗氯霉素单克隆抗体-胶体金标记物,从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线,包被有氯霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG,将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

3. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于胶金结合垫上包被有抗氯霉素单克隆抗体与胶体金结合物,胶体金颗粒的平均大小为 30nm。

4. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于偶联氯霉素的载体蛋白可为牛血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白。

5. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于样品中的氯霉素含量超过试剂板检出限时,试剂板上的检测线显色较控制线浅甚至无显色,判定为阳性;反之,当样品中氯霉素含量在试剂板检出限以下或无残留时,试剂板上的检测线显色与控制线相近或偏深,判定为阴性。

6. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于工艺流程包括制备氯霉素-BSA 偶联物、制备抗氯霉素单克隆抗体、制备胶体金溶液、制备胶体金标记抗氯霉素单克隆抗体和组装氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板。

## 一种检测氯霉素的试剂板的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测蜂蜜中氯霉素残留的试剂板的制备方法,具体涉及一种检测氯霉素的免疫胶体金快速检测试剂板的制备方法。

### 背景技术

[0002] 氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 是一种高效广谱抗生素,常用于蜜蜂的各种传染性疾病的治疗。但是,氯霉素存在严重的毒副作用,在蜂蜜中的残留严重威胁人体健康,能引起再生障碍性贫血和粒状白细胞缺乏症等疾病,长期微量摄入还会诱发致病菌的耐药性、引起机体正常菌群失调。欧盟理事会 508/1999/EEC 号指令中将氯霉素列入动物性食品中禁用药物。2002 年农业部发布第 193 号公告《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》将氯霉素及其盐、酯列入食品动物禁用兽药名单。同年 12 月农业部发布第 253 号公告《动物性食品中兽药残留最高限量》将氯霉素及其盐、酯被列为禁止使用药物,在动物性食品中不得检出。

[0003] 农业部对氯霉素残留确认的推荐方法为酶联免疫试剂盒 ELISA+ 气相色谱仪确证 (农业部 1025 号公告 -21-2008) 或气相色谱 - 质谱法 (农业部 781 号公告 -1-2006),检出限为 0.1ppb,定量限为 0.2ppb,方法特异性好、准确率高,但存在对设备、环境、操作技能等要求,所需费用高,不利于大规模样本筛选。

[0004] 相比前述几种方法,免疫胶体金技术将反应时间大大缩短,且操作简单,不需要配备复杂仪器设备,结果直观肉眼可判断。

[0005] 食品安全关系国计民生,研制开发一种检测限符合要求,重现性好,检测时间短,适合现场快速检测,技术产品或仪器设备成本较低,运行费用低的快速检测试剂迫在眉睫。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种灵敏度高,特异性好,简便快速,生产成本低的氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板的制备方法。

[0007] 本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成,背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。相邻各部分间有 1-2mm 的重叠以保证层析作用从样品垫到吸水垫部位的顺利进行。

[0008] 本发明试剂板的各部分组成成分和功能如下:

[0009] 塑料模板,起固定背衬和标示各功能区(加样孔、检测区、控制区)的作用。

[0010] 背衬,由一面涂有不干胶的不吸水韧性材料制成,起固定支撑试剂板其他组成部分的作用。

[0011] 样品垫,由玻璃纤维制成,起吸收样品溶液和缓冲样品溶液 pH 值的作用。

[0012] 胶金结合垫,由聚酯膜制成,其上有抗氯霉素单克隆抗体与胶体金颗粒的结合物。为样品溶液中有效成分和金标抗体反应提供场所。

[0013] 硝酸纤维素膜,从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线,将反应结果

以肉眼可见的颜色表征出来。

[0014] 吸水垫,由滤纸制成,将反应过程中多余的溶液吸收。

[0015] 本发明试剂板具有如下有益效果:

[0016] (1) 特异性好。本发明试剂板对氯霉素的交叉反应率为 100%,对如甲砒霉素、氟甲砒霉素、棕榈氯霉素等抗生素的交叉反应率均低于 1%。可见,本发明试剂板对氯霉素反应具有高度专一性。

[0017] (2) 灵敏度高。本发明试剂板对原蜜、浓缩蜜中氯霉素的检出限为 0.1ppb,符合国家限量要求。

[0018] (3) 操作简单快捷。本发明试剂板将反应所需的大部分原料整合到 PVC 背衬中,滴样后,抗原抗体反应在固相膜上快速进行,大大缩短检样时间,且样品无需特殊处理,滴样后 5-10 分钟即可用肉眼通过判断硝酸纤维素膜上的检测线和质控线的颜色深浅读取结果。检测实施过程不依赖任何实验设备,普通人员均可操作,不需专业培训。

[0019] (4) 成本低,易推广。本发明试剂板生产工艺简单,流程成熟。生产成本低廉,投资少,收效快。

#### 附图说明

[0020] 图 1 为氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板背衬结构示意图,其中 1 为样品垫,2 为胶金结合垫,3 为硝酸纤维素膜,4 为检测线,5 为质控线,6 为吸水垫,7 为不干胶,8 为 PVC 底板。

[0021] 图 2 为氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板操作示意图,其中 S 为加样孔,C 为控制区,T 为检测区。

[0022] 图 3 为氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板结果判定示意图,其中 C 为控制区,T 为检测区。

[0023] 具体实施方法

[0024] 本发明试剂板的制备包括氯霉素-载体蛋白偶联物的制备,抗氯霉素单克隆抗体的制备,胶体金溶液的制备,胶体金标记抗氯霉素单克隆抗体的制备和氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板的组装。

[0025] 1. 氯霉素与载体蛋白的偶联

[0026] 采用碳二亚胺 (EDC·HCl) 法将氯霉素与载体蛋白偶联制备免疫抗原及包被抗原。称取 20mg 牛血清蛋白 (BSA),加入 1mL 蒸馏水。另外用 1mL 蒸馏水溶解 20mg EDC·HCl 和 20mg 氯霉素,加入到上述溶液中。将溶液混匀后,置于 4℃ 下避光反应 12 小时(期间可颠倒混匀)。之后用 PBS 缓冲液透析 4 天,期间每间隔 8 小时换液 1 次。再将溶液离心,收集上清液,-20℃ 下冻存储用。

[0027] 卵清蛋白 (OVA) 替代 BSA,同同样方法制备氯霉素-OVA 偶联物。

[0028] 2. 氯霉素单克隆抗体的制备

[0029] 取 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,将作为免疫原的氯霉素-BSA 偶联物与等体积的弗氏完全佐剂乳化,按 100 μg/只剂量皮下注射,之后每隔 3 周加强免疫 1 次,用不完全佐剂替代完全佐剂进行腹腔注射。融合前 3d 强化免疫 1 次,不用佐剂,剂量加倍。细胞融合按常规方法进行:将 Sp2/0 多发性骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1:10 的比例混合,在 50%

PEG 作用下融合, HAT 培养基悬浮, 分种于 96 孔培养板中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

[0030] 融合后, 待细胞生长到培养孔面积的 1/4 时, 采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初筛选择 10mg/L 氯霉素-OVA 偶联物包被酶联板, 被测孔加培养上清, 孵育、清洗后, 加入羊抗鼠 IgG-HRP (1 : 1000), OPD 显色。筛选出的阳性孔再用氯霉素-OVA 偶联物包被的酶联板进行阻断间接 ELISA。将细胞培养上清与 2×10<sup>-3</sup>mol/L 氯霉素溶液等量混合, 37℃感作 1h, 加入已包被的酶标板中。另外用 PBS (0.01mol/L、pH 7.4) 替代氯霉素溶液作对照, 其余步骤同上。若氯霉素阻断后的 OD 值降至对照孔的 50% 以下, 则判为阳性孔。经 2~3 次检测都呈阳性的孔, 立即用有限稀释法进行克隆化。

[0031] 体外培养: 将克隆化的细胞株扩大培养, 细胞浓度达 5×10<sup>5</sup>mL<sup>-1</sup> 时停止换液, 细胞全部死亡后收集培养液。体内诱生腹水: 给腹腔注射液体石蜡 10 天后的小鼠腹腔注射克隆化细胞株 10<sup>7</sup> 个细胞, 7 天后抽取腹水。

[0032] 3. 胶体金溶液的制备

[0033] 胶体金颗粒的平均大小为 30nm, 其制备方法为在 100mL 去离子水中加入 1mL 1% 的柠檬酸三钠, 煮沸后迅速加入 1mL 1% 的氯金酸, 继续煮沸 10min, 冷却后, 4℃ 下保存备用。

[0034] 4. 胶体金标记抗氯霉素单克隆抗体的制备

[0035] 取已制备好的 100mL 胶体金溶液, 用 0.1mol/L 碳酸钾溶液调 pH 到 8.0。边搅拌边加入 1.5mg 抗氯霉素单抗, 搅拌 20min, 再逐滴加入 2mL 聚乙二醇 20000 (25mol/L, PEG 20000), 搅拌 15min。20,000rpm 离心 15min, 弃上清液, 加入 10mL pH 7.4PBS 缓冲液 (含 0.4mol/LPEG) 清洗 2 次。将沉淀用 5mL 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 溶解, 用 0.22 μm 无菌过滤器过滤后, 4℃ 保存备用。

[0036] 5. 氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0037] 参照图 1, 用点膜机把适当浓度的氯霉素-BSA 偶联物及羊抗鼠 IgG 喷在硝酸纤维素膜上, 分别作为检测线和控制线, 37℃烘箱干燥 8h。以同样方法, 将制备好的金标记氯霉素单克隆抗体包被在胶金结合垫上。

[0038] 检测试剂组成为 PVC 背衬, 在其上按顺序粘上样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。用切割机将贴好的大卡切割成 4mm 宽的条, 装入塑料模板中制成检测试剂板, 再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

[0039] 6. 氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板检测实施操作方法

[0040] 6.1 样品制备

[0041] 对于无结晶的蜂蜜样品, 可直接搅拌均匀; 对于有结晶的样品, 将装有样品的容器于 60℃~80℃ 的热水中温浴至融化, 搅匀。

[0042] 取蜂蜜 3mL 加入 15mL 刻度冷冻管中, 再依次加入氯霉素 A 液和 B 液各 1mL, 于 60℃~80℃ 的热水中温热数分钟, 溶解蜂蜜, 振荡混匀。加入 8mL 乙酸乙酯, 上下翻转振荡 5min 后静置。用滴管转移 5mL 上层有机溶剂于 5mL 刻度冷冻管中, 用 65℃ 氮 (空) 气吹干。在该 5mL 刻度冷冻管中滴加 5 滴氯霉素专用 PBST 缓冲液, 充分溶解管内壁上残留物, 待检。

[0043] 6.2 检测步骤

[0044] 从包装袋中取出试剂板, 用滴管吸取待检溶液, 在加样孔中滴入 3 滴 (约 100 μL), 加样后开始计时, 结果应在 3~5min 读取, 其他时间判读无效。

[0045] 6.3 结果判读

[0046] 读取结果时,将试剂板水平置于观察者正面,如图 2 右侧所示。

[0047] 阴性 (-):T 线显色比 C 线深或一样深,表明样品中氯霉素浓度低于 0.1ppb 或无氯霉素残留。如图 3. a 所示。

[0048] 阳性 (+):T 线显色比 C 线浅,或 T 线无显色,表明样品中氯霉素浓度高于 0.1ppb ; T 线比 C 线越浅,表明样品中氯霉素浓度越高。如图 3. b 所示。

[0049] 无效:未出现 C 线,可能操作不当或试剂板已失效。应再次阅读说明书,并用新试剂板重新测试。如图 3. c 所示。

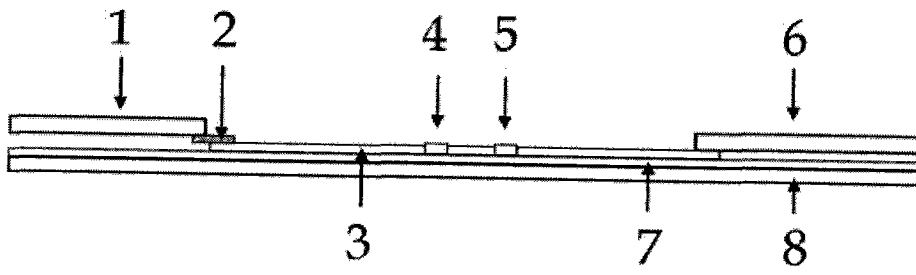


图 1

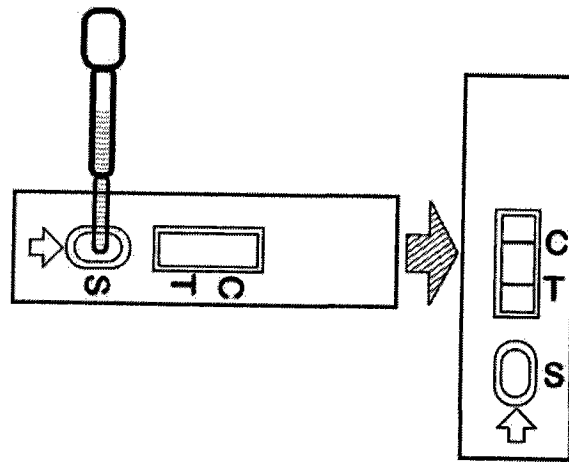


图 2

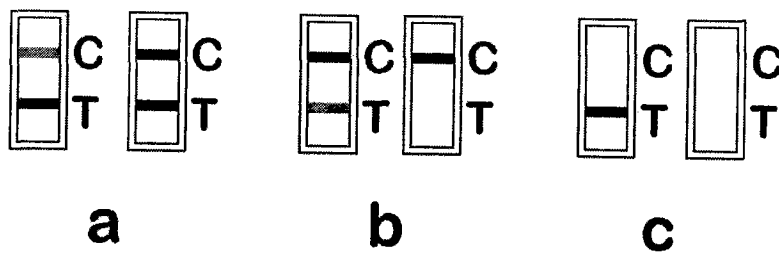


图 3

专利名称(译)	一种检测氯霉素的试剂板的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101839909A</a>	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	CN201010166288.1	申请日	2010-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
[标]发明人	张少恩 桑丽雅 邵伟		
发明人	张少恩 桑丽雅 邵伟		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/566 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测氯霉素的免疫胶体金试剂板的制备方法，可用于检测蜂蜜(包括原蜜和浓缩蜜)中的氯霉素残留。本发明试剂板由上下两块塑料模板和背衬组成，背衬上依次紧密粘贴着样品垫、胶金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。硝酸纤维素膜从样品垫到吸水垫方向上依次喷有检测线和质控线，可将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。该试剂板可进行半定量直观检测，整个操作过程仅需20~30min，且无需任何昂贵实验设备辅助，利于大规模样本筛选，适合工商部门、检验检疫机构、养蜂场及蜂产品生产加工企业对接产品原料及产品中的氯霉素进行大规模快速检测。

