

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810131796.9

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年11月19日

[11] 公开号 CN 101308140A

[22] 申请日 2008.6.30

[21] 申请号 200810131796.9

[71] 申请人 江苏省苏微微生物研究有限公司

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号

[72] 发明人 赵晓联 赵春城 徐帮兴 叶进

刘一军 蔡建荣 谢俊 周群兰

张凌裳 龚燕 孙蔚榕 张东升

蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静

[74] 专利代理机构 无锡盛阳专利事务所

代理人 刘瑞平

权利要求书3页 说明书9页 附图1页

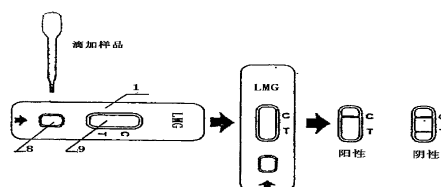
## [54] 发明名称

一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒及其制备方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒。该检测试纸盒检测快速、准确、灵敏度高，为此，本发明还提供了测试纸盒的制备方法。其包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：所述试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸附含有胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置有材质为隐性孔雀石绿-卵清白蛋白的检测线，和材质为羊抗鼠 IgG 质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为1%牛血清白蛋白层；所述注

样孔对应于所述试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。



1、一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒，其包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：所述试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸附含有胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置有材质为隐性孔雀石绿-卵清白蛋白的检测线，和材质为羊抗鼠 IgG 质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为 1% 牛血清白蛋白层；所述注样孔对应于所述试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

2、根据权利要求 1 所述一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒，其特征在于：所述硝酸纤维素膜厚度为  $120\mu\text{m}$ ，蛋白质负载量为  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为  $100\mu\text{m}$ ，试纸条的尺寸为  $(55\sim 65)\text{mm}\times(3\sim 5)\text{mm}$ ，检测线和质控线的宽度为  $0.5\text{mm}\sim 1\text{mm}$ 。

3、一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：其包括以下步骤：

(1) 隐性孔雀石绿金标检测试纸条的制备：将胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物稀释至  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}\sim 2.0\mu\text{g}/\text{ml}$ ，放入  $10\text{mm}\times 300\text{mm}$  玻璃纤维膜，浸泡 10 分钟 $\sim$ 20 分钟， $37^\circ\text{C}$  烘干， $4^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$  保存，粘贴在背衬一端的注样区；在背衬中间检测区粘贴硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜上喷涂浓度为  $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$  隐性孔雀石绿-卵清白蛋白作检测线，喷涂浓度为  $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$  羊抗鼠 IgG 作质控线，再用 1% 牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜；在背衬另一端吸水区粘贴吸水纸；

(2) 所得隐性孔雀石绿金标检测试纸条包封在开有注样孔和观测孔的盒壳体内，所述注样孔对应于所述试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

4、根据权利要求 3 所述一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：所述胶体金的制备，

取 50ml 0.01%的氯金酸溶液, 1000r/min 磁力搅拌下, 加热至 110°C, 迅速加入 1%柠檬酸钠水溶液 2ml, 保持反应温度和搅拌转速不变, 沸腾反应 5min, 溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应; 获得的胶体金平均粒径为 10.7nm。

5、根据权利要求 4 所述一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法, 其特征在于: 抗隐性孔雀石绿 (LMG) 单克隆抗体及其溶液的制备,

50  $\mu\text{g}$  LMG-BSA 偶联抗原用 50  $\mu\text{l}$  生理盐水配成 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  抗原溶液, 与等体积完全福氏佐剂混匀, 充分乳化, 供首次免疫用; 加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂; 首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射, 免疫剂量为 50  $\mu\text{g}/\text{只}$  小鼠; 以后每隔 2 周加强免疫一次, 加强免疫采用尾静脉注射, 免疫剂量 10  $\mu\text{g}/\text{只}$ ; 最后一次免疫采用脾内注射, 4 天后取脾融合; 将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10:1 比例混合; 离心, 去除上清; 在 50S~90 S 内将 1 ml 50%聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中, 充分混匀, 使其融合, 1 min 后加入 20 ml DEM 培养液, 终止融合; 水浴静止 10 min 后离心, 去除上清; 将融合细胞用含 20%小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后, 以最后浓度为  $1 \times 10^4$  饲养细胞/0.1 ml 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中, 于 5%CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下培养, 8 天后, 每培养孔更换 2/3 HT 培养液; 10 天~20 天后, 开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔, 取上清液进行筛选, 对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆; 杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行; 以 LMG-OVA 为包被抗原, 以免疫小鼠的血清为阳性对照, 以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照; 阳性细胞孔的判定标准为  $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$ ; 对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法, 将阳性克隆细胞吹匀, 取一微滴至培养瓶内, 倒置显微镜下准确计数细胞个数, 稀释为 70 个 / ml 再取 1 ml 稀释 20 倍, 接种入 96 孔培养板中进行亚克隆; 直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止; 对 10~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3 ml/只~0.5 ml/只, 8d~10d 后, 腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞,  $5 \times 10^5$  细胞/只; 5d 后注意观察, 收集腹水, 离心去除沉淀, 加甘油于 -20°C 保存。

6、根据权利要求 5 所述一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法, 其特征在于: 完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=

12 g:20 ml:0.105g; 不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml。

7、根据权利要求6所述一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法, 其特征在于: 胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的制备, 在一定体积的胶体金溶液中, 缓慢滴加 0.1 mg/ml 抗隐性孔雀石绿 (LMG) 单克隆抗体溶液溶于 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中, 超声波混匀 2 min, 静置 0.5 h 后通过 4°C 冷冻离心进行纯化, 首次离心转速 10000 r/min, 时间 45 min, 弃上清, 沉淀用 10%BSA 溶液溶解, 进行下次离心; 第二次用 10%~30%甘油密度梯度离心, 转速 7000 r/min, 时间 45 min, 用于除去未标记的蛋白和金颗粒聚集体, 收集中间红褐色部分即可。

## 一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒及其制备方法

### (一)技术领域

本发明涉及水产类肉食品中药物的快速诊断用器具及其制备方法，属于生物技术领域，具体为一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒及其制备方法。

### (二)背景技术

隐性孔雀石绿（Leucomalachite green, LMG）是孔雀石绿（malachite green, MG）在生物体内主要代谢残留物，对人类有致癌危险。

孔雀石绿又称为苯胺绿、维多利亚绿或中国绿，是一种具有金属光泽的绿色晶体，溶于水、乙醇和甲醇，水溶液的颜色为蓝绿色（最大吸收波长为 618nm），最早在 1913 年有人发现孔雀石绿等染料可破坏病原菌而不引起宿主损害，从而使这些染料用做防腐剂、杀锥虫药和其它医疗作用。自磺胺类药物和其它抗菌素的出现，孔雀石绿作为抗菌素在畜牧业中的应用已日渐衰退。然而在水产养殖中由于价格低廉和抗菌、抗真菌效果好，广泛用于进行水体消毒和防止鱼水霉病。

近年来发现孔雀石绿特别是其代谢物在水产体内有明显的蓄积残留现象，残留时间也较长。由于其化学官能团三苯甲烷是一种致癌物质，所以国外一些发达国家，如欧盟、美国已宣布禁止其在经济鱼类（观赏鱼除外）养殖过程中使用。我国农业部发布的《无公害食品中华绒鳌蟹》（NY5064-2001）和农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》文件（农牧发[2002]1 号）中明确规定所有可食组织中禁用孔雀石绿。

《2000 年度中国出口动物源性食品中有毒有害物质残留监控计划》首次将鳗鱼中隐性孔雀石绿项目的监控列入年度计划，并延续至今。试验证实孔雀石绿在动物体内 8 小时后 50% 转变为隐性孔雀石绿，24 小时后 84% 转变成隐性孔雀石绿，而长期滞留在组织中。国内外检测 LMG 主要采用以色谱技术（HPLC）检测技术，虽然灵敏、定量准确，但大批量检测时速度慢，成本相对较高。以金标检测试纸盒为代表的快速筛选法是免疫学主流技术，快速、成本低、可以

大批量检测，国内外尚无该技术报道。

### (三)发明内容

针对上述问题，本发明提供了一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒及其制备方法，该检测试纸盒检测快速、准确、明显、灵敏度高，为此，本发明还提供了该测试纸盒的制备方法。

一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒，其包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：所述试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸附含有胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置有材质为隐性孔雀石绿-卵清白蛋白的检测线，和材质为羊抗鼠 IgG 质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为 1% 牛血清白蛋白层；所述注样孔对应于所述试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

其进一步特征在于：所述硝酸纤维素膜厚度为  $120\mu\text{m}$ ，蛋白质负载量为  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为  $100\mu\text{m}$ ，试纸条的尺寸为  $(55\sim 65)\text{mm}\times(3\sim 5)\text{mm}$ ，检测线和质控线的宽度为  $0.5\text{mm}\sim 1\text{mm}$ 。

一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法，其特征在于：其包括以下步骤：

(1) 隐性孔雀石绿金标检测试纸条的制备：将胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物稀释至  $0.5\mu\text{g}/\text{mL}\sim 2.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ，放入  $10\text{mm}\times 300\text{mm}$  玻璃纤维膜，浸泡 10 分钟 $\sim$ 20 分钟， $37^\circ\text{C}$  烘干， $4^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$  保存，粘贴在背衬一端的注样区；在背衬中间检测区粘贴硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜上喷涂浓度为  $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$  隐性孔雀石绿-卵清白蛋白作检测线，喷涂浓度为  $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$  羊抗鼠 IgG 作质控线，再用 1% 牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜；在背衬另一端吸水区粘贴吸水纸；

(2) 所得隐性孔雀石绿金标检测试纸条包封在开有注样孔和观测孔的盒壳体内，所述注样孔对应于所述试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

其进一步特征在于：

胶体金的制备：

取 50ml 0.01%的氯金酸溶液，1000r/min 磁力搅拌下，加热至 110℃，迅速加入 1%柠檬酸钠水溶液 2ml，保持反应温度和搅拌转速不变，沸腾反应 5min，溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应；获得的胶体金平均粒径为 10.7nm。

抗隐性孔雀石绿（LMG）单克隆抗体及其溶液的制备：

50  $\mu\text{g}$  LMG-BSA 偶联抗原用 50  $\mu\text{l}$  生理盐水配成 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  抗原溶液，与等体积完全福氏佐剂混匀，充分乳化，供首次免疫用；加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂；首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射，免疫剂量为 50  $\mu\text{g}/\text{只}$  小鼠；以后每隔 2 周加强免疫一次，加强免疫采用尾静脉注射，免疫剂量 10  $\mu\text{g}/\text{只}$ ；最后一次免疫采用脾内注射，4 天后取脾融合；将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10:1 比例混合；离心，去除上清；在 50S~90 S 内将 1 ml 50%聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中，充分混匀，使其融合，1 min 后加入 20 ml DEM 培养液，终止融合；水浴静止 10 min 后离心，去除上清；将融合细胞用含 20%小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后，以最后浓度为  $1 \times 10^4$  饲养细胞/0.1 ml 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中，于 5%CO<sub>2</sub>，37℃条件下培养，8 天后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液；10 天~20 天后，开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔，取上清液进行筛选，对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆；杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行；以 LMG-OVA 为包被抗原，以免疫小鼠的血清为阳性对照，以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照；阳性细胞孔的判定标准为  $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$ ；对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法，将阳性克隆细胞吹匀，取一微滴至培养瓶内，倒置显微镜下准确计数细胞个数，稀释为 70 个 / ml 再取 1 ml 稀释 20 倍，接种入 96 孔培养板中进行亚克隆；直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止；对 10~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3 ml/只~0.5 ml/只，8 天~10 天后，腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞， $5 \times 10^5$  细胞/只；5 天后注意观察，收集腹水，离心去除沉淀，加甘油于 -20℃ 保存；

完全福氏佐剂是由下列材料配比而成，液体石蜡:羊毛脂:卡介苗 = 12 g:20

ml:0.105g; 不完全福氏佐剂是由下列材料配比而成, 液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml;

胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的制备: 在一定体积的胶体金溶液中, 缓慢滴加 0.1 mg/ml 抗隐性孔雀石绿 (LMG) 单克隆抗体溶液溶于 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中, 超声波混匀 2 min, 静置 0.5 h 后通过 4℃ 冷冻离心进行纯化, 首次离心转速 10000 r/min, 时间 45 min, 弃上清, 沉淀用 10%BSA 溶液溶解, 进行下次离心; 第二次用 10%~30%甘油密度梯度离心, 转速 7000 r/min, 时间 45 min, 用于除去未标记的蛋白和金颗粒聚集体, 收集中间红褐色部分即可。

采用本发明中的测试纸盒检测水产类肉食品中隐性孔雀石绿的含量, 检测时只需将检测样品滴入注样孔中, 稍许, 即可在观测区中观察检测线和质控线的变色情况, 确定样品中隐性孔雀石绿含量是否超标, 与现有测试方法相比, 不需要大型检测仪器, 检测快速、准确、明显、灵敏度高。

#### (四)附图说明

图 1 隐性孔雀石绿金标检测试纸盒检测示意图;

图 2 隐性孔雀石绿金标检测试纸条结构图。

#### (五)具体实施方式

见图 1、图 2, 本发明包括试纸条 2, 试纸条 2 被封装于盒壳体 1, 盒壳体 1 上面开有注样孔 8, 观测孔 9, 试纸条 2 用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬, 在试纸条 2 一端的注样区粘贴吸附含有胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜 3; 在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜 4, 玻璃纤维膜 3 的一小段重叠在硝酸纤维素膜 4 上, 在试纸条 2 另一端吸水区粘贴吸水纸 7; 在硝酸纤维素膜 4 上从注样区到吸水区的方向, 依次设置有材质为隐性孔雀石绿-卵清白蛋白的检测线 5, 盒材质为羊抗鼠 IgG 质控线 6, 硝酸纤维素膜 4 上覆盖有浓度为 1%牛血清白蛋白层; 注样孔 8 对应于试纸条 2 注样区的玻璃纤维膜 3, 观测孔 9 对应于试纸条 2 的测试区。硝酸纤维素膜 4 厚度为 120 $\mu\text{m}$ , 蛋白质负载量为 5 $\mu\text{g} / \text{cm}^2 \sim 20\mu\text{g} / \text{cm}^2$ , 最佳为 12.5 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ , 聚氯乙烯或聚乙烯背衬厚度为 100 $\mu\text{m}$ , 试纸条 2 的尺寸约为 (55~65) mm $\times$  (3~5) mm, 检测线 5 和质控线 6 的宽度为 0.5 mm~1mm, 最佳为 0.75 mm。

下面结合附图描述本发明中隐性孔雀石绿金标检测试纸盒的制备方法，

胶体金的制备：取 50ml 0.01%的氯金酸溶液，1000r/min 磁力搅拌下，加热至 110℃，迅速加入 1%柠檬酸钠水溶液 2ml，保持反应温度和搅拌转速不变，沸腾反应 5min，溶液颜色刚刚变为清亮橘红色后停止反应，获得的胶体金平均粒径为 10.7nm。

抗隐性孔雀石绿（LMG）单克隆抗体及其溶液的制备：

50 μg LMG-BSA 偶联抗原用 50 μl 生理盐水配成 1 μg/μl 抗原溶液，与等体积完全福氏佐剂混匀，充分乳化，供首次免疫用。完全福氏佐剂由下列材料配比而成，液体石蜡:羊毛脂:卡介苗=12 g:20 ml:0.105g；加强免疫时用同量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂。不完全福氏佐剂由下列材料配比而成，液体石蜡:羊毛脂=12 g:20 ml；首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射，免疫剂量为 50 μg/只小鼠；以后每隔 2 周加强免疫一次，加强免疫采用尾静脉注射，免疫剂量 10 μg/只，最后一次免疫采用脾内注射，4 天后取脾融合，将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/o 以 10:1 比例混合；离心，去除上清；在 50 秒~90 秒内将 1 ml 50%聚乙二醇(分子量为 1500)加至细胞中，充分混匀，使其融合，1 min 后加入 20 ml DEM 培养液，终止融合；水浴静止 10 min 后离心，去除上清；将融合细胞用含 20%小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后，以最后浓度为  $1 \times 10^4$  饲养细胞/0.1 ml 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中，于 5%CO<sub>2</sub>，37℃条件下培养，8 天后，每培养孔更换 2/3 HT 培养液；10 天~20 天后，开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔，取上清液进行筛选，对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆；杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行；以 LMG-OVA 为包被抗原，以免疫小鼠的血清为阳性对照，以 SP-2/o 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照；阳性细胞孔的判定标准为  $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2.1$ ；对分泌阳性抗体的细胞进行克隆；采用有限稀释法，将阳性克隆细胞吹匀，取一微滴至培养瓶内，倒置显微镜下准确计数细胞个数，稀释为 70 个 / ml 再取 1 ml 稀释 20 倍，接种入 96 孔培养板中进行亚克隆；直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止；对 10~13 周龄 Balb/c 小鼠腹腔注射液石蜡 0.3 ml/只~0.5 ml/只，8 天~10 天后，腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞， $5 \times 10^5$  细胞/只；5 天后注意观察，收集

腹水，离心去除沉淀，加甘油于-20℃保存。

胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的制备：

在一定体积的胶体金溶液中，缓慢滴加 0.1 mg/ml 抗隐性孔雀石绿（LMG）单克隆抗体溶液溶于 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液中，超声波混匀 2 min，静置 0.5 h 后通过 4℃ 冷冻离心进行纯化，首次离心转速 10000 r/min，时间 45 min，弃上清，沉淀用 10%BSA 溶液溶解，进行下次离心；第二次用 10%~30%甘油密度梯度离心，最佳为 20%，转速 7000r/min，时间 45 min，用于除去未标记的蛋白和金颗粒聚集体，收集中间红褐色部分即可；

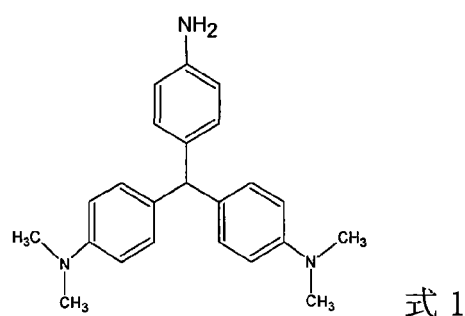
将胶体金-抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物稀释至 0.5 ug/ml~2.0ug/ml，最佳为 1.25 ug/ml，放入 10mm×300mm 玻璃纤维膜，浸泡 10 分钟~20 分钟，最佳为 15 分钟，37℃ 烘干，4℃~8℃ 保存，最佳为 6℃，粘贴在背衬一端的注样区；在背衬中间检测区粘贴硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜上喷涂浓度为 100μg / mL~500μg / mL，最佳浓度为 300μg / mL，隐性孔雀石绿-卵清白蛋白作检测线，喷涂浓度为 50μg / mL~200μg / mL，最佳浓度 125μg / mL，羊抗鼠 IgG 作质控线，再用 1% 牛血清白蛋白封闭硝酸纤维素膜；在背衬另一端吸水区粘贴吸水纸；所得隐性孔雀石绿金标检测试纸条包封在开有注样孔和观测孔的盒壳体内，注样孔对应于试纸条注样区的玻璃纤维膜，观测孔对应于试纸条的测试区。

本发明实施中，有关抗隐性孔雀石绿抗体的产生见如下方法：

半抗原

隐性孔雀石绿（Leucomalachite green）分子量很小（330.4 道尔顿），是半抗原物质，只具备抗原性而无免疫原性，不能直接免疫动物而制备抗体。因此，为了制备本发明的完全抗原，对隐性孔雀石绿进行了活化，并制得了本发明的半抗原。

如本发明所指的“半抗原”或“氨基-隐性孔雀石绿衍生物”是指经本发明的衍生反应得到的具有结构式 1 的物质，其结构如式 1 所示：



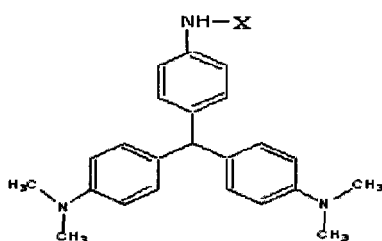
### 完全抗原

通常，半抗原需要和大分子如 KLH（血蓝蛋白）或 BSA（牛血清白蛋白）以共价键方式偶联，成为既具有免疫反应性，又具有免疫原性的完全抗原。

如本文所用，本发明的“完全抗原”是指本发明的半抗原与适当的蛋白质载体结合后的产物。

如本文所用，本发明中的“蛋白质载体”是指任何在免疫学上可接受的用于形成完全抗原的蛋白质，其可为例如，血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或  $\gamma$  球蛋白等。

本发明用于隐性孔雀石绿检测及抗体制备的完全抗原的结构如式 2 所示：



式 2

其中，X 为蛋白质载体，本发明中优选牛血清白蛋白（BSA）或血蓝蛋白（KLH）；与 X 载体共价交联的部分为隐性孔雀石绿的衍生物 1-氨基-隐性孔雀石绿。

在本发明的一个优选的方案中，X 为牛血清白蛋白，完全抗原为隐性孔雀石绿-BSA，作为免疫用抗原，用于制备分泌抗隐性孔雀石绿单克隆抗体的杂交瘤细胞。

在本发明的另一个优选的方案中，X 为血蓝蛋白，完全抗原为隐性孔雀石绿-KLH，作为检测用抗原，用于制备检测去甲氯胺酮的单克隆抗体免疫检测板。

本发明的完全抗原的制备方法如下：

首先将隐性孔雀石绿活化，得到其衍生物：1-氨基-隐性孔雀石绿，再将其与适合的蛋白质载体（例如，BSA、KLH）进行连接，得到完全抗原。其中 X 为蛋白质载体，本发明中优选牛血清白蛋白（BSA）或血蓝蛋白（KLH）；与 X 载体共价交联的部分为隐性孔雀石绿的衍生物 1-氨基-隐性孔雀石绿；

1-氨基-隐性孔雀石绿的制备：取 25ml 圆底烧瓶，加入 10ml 65%浓硝酸，冰浴冷却到-5℃，取 1g 隐性孔雀石绿在搅拌下，缓慢加入，待全部加完后，立即将反应液倾入足量冰水中，将浓硝酸稀释，吸收其反应热，并在低温条件下，迅速用浓氨水调节溶液 pH 值达到 9 以上，使硝基隐性孔雀石绿析出，保持低温，抽滤。将滤饼置于 20ml 乙醇中，加入 5mL 的浓盐酸使所得的硝基隐性孔雀石绿完全溶解，另取 5g SnCl<sub>2</sub> 溶于 15mL 浓盐酸。将上述两种溶液混合，缓慢升温至 55℃，此时几乎所有的固体均已溶解，保持 0.5 小时，溶液由混浊变澄清透明。加入 60ml 蒸馏水稀释，冷水浴冷却，用固体 NaOH 调节其 pH 值达到 12 以上，并不断搅拌，使溶液析出沉淀物，抽滤后进行冷冻干燥。

本发明的半抗原和蛋白质载体的连接可使用本领域已知的任何连接方式。例如但不限于：重氮法、琥珀酸法等。

本发明制备的完全抗原，隐性孔雀石绿-BSA 有很好的免疫原性，能刺激小鼠产生强烈的免疫反应，经过 1 次基础免疫、3 次加强免疫，抗血清效价可达 1:7200；完全抗原隐性孔雀石绿-BSA 很好的保留了隐性孔雀石绿的免疫反应性。

#### 抗隐性孔雀石绿单克隆抗体的制备

本文所用的术语“单克隆抗体”是指获自基本上同源的抗体群的抗体，即，组成该群体的抗体个体都相同，除了可能存在少量可能的自发突变。因此，修饰语“单克隆的”是指该抗体的性质不是离散抗体的混合物。

本发明的检测原理是：样品中的隐性孔雀石绿（LMG）首先与胶体金颗粒表面的抗隐性孔雀石绿（LMG）单克隆抗体反应，如果样品中隐性孔雀石绿的含量超过限值，胶体金的抗体位点将不再有剩余，当胶体金颗粒层析经过检测线时，胶体金颗粒将不会停留在该线的所在位置，继续上行时与控制线上喷涂的羊抗鼠 IgG 的反应，呈现出胶体金的红色。如果样品中不含隐性孔雀石绿或隐性孔雀石绿含量低于限值，胶体金表面的抗体将与检测线上的化合物反应呈现出红

色，质控线也呈现红色。

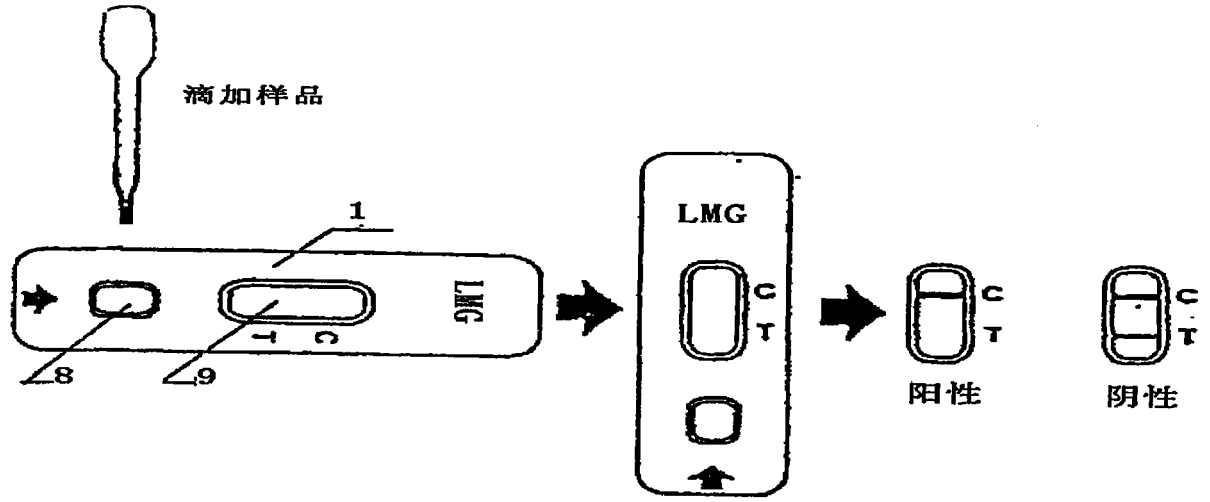


图 1

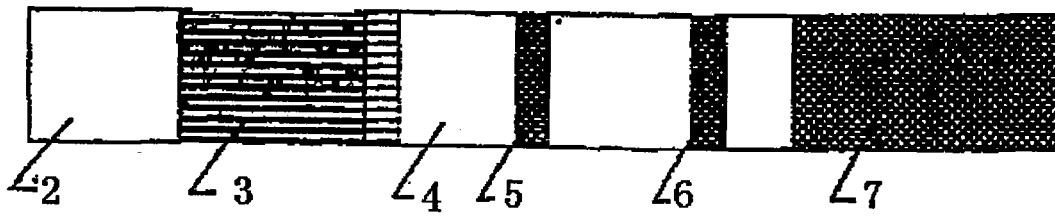


图 2

专利名称(译)	一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101308140A</a>	公开(公告)日	2008-11-19
申请号	CN200810131796.9	申请日	2008-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省苏微微生物研究有限公司		
[标]发明人	赵晓联 赵春城 徐帮兴 叶进 刘一军 蔡建荣 谢俊 周群兰 张凌裳 龚燕 孙蔚榕 张东升 蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静		
发明人	赵晓联 赵春城 徐帮兴 叶进 刘一军 蔡建荣 谢俊 周群兰 张凌裳 龚燕 孙蔚榕 张东升 蔡正森 吴杰 沈雯琰 王文静		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/532		
代理人(译)	刘瑞平		
其他公开文献	CN101308140B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		
摘要(译)			

本发明涉及一种隐性孔雀石绿金标检测试纸盒。该检测试纸盒检测快速、准确、灵敏度高，为此，本发明还提供了测试纸盒的制备方法。其包括试纸条，所述试纸条被封装于盒壳体，所述盒壳体上面开有注样孔，观测孔，其特征在于：所述试纸条用聚氯乙烯或聚乙烯作背衬，在试纸条一端的注样区粘贴吸含有胶体金 - 抗隐性孔雀石绿单克隆抗体结合物的玻璃纤维膜；在试纸条中间的测试区粘贴硝酸纤维素膜，玻璃纤维膜的一小段重叠在硝酸纤维素膜上，在试纸条另一端吸水区粘贴吸水纸；在硝酸纤维素膜上从注样区到吸水区的方向，依次设置有材质为隐性孔雀石绿 - 卵清白蛋白的检测线，和材质为羊抗鼠IgG质控线，所述硝酸纤维素膜上覆盖有浓度为1%牛血清白蛋白层；所述注样孔对应于所述试纸条注样区的玻璃纤维膜，所述观测孔对应于试纸条的测试区。

