



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102288762 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201110179489. X

(22) 申请日 2011. 06. 29

(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 周崇盈

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

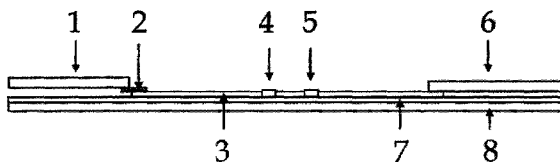
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测水产品中氯霉素的试剂板的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测水产品中氯霉素的试剂板的制备方法,可用于检测水产品中的氯霉素残留。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、胶体金结合垫、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控制线,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,适合检验检疫机构、海洋与渔业局、水产质量检测部门等对水产品中非法使用氯霉素进行大规模快速检测。



1. 一种检测水产品中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,背衬上依次紧密粘贴的样品垫、胶体金结合垫、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。样品垫由玻璃纤维制成,胶体金结合垫由聚酯膜制成,吸水垫为滤纸。

2. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于胶体金结合垫上包被有抗氯霉素单克隆抗体与胶体金的结合物;硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有氯霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和控制线。偶联氯霉素的载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白等。

3. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于氯霉素与载体蛋白的偶联采用碳二亚胺法将氯霉素与载体蛋白偶联制备免疫抗原及包被抗原。

4. 如权利要求 1 所说的制备方法,其特征在于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°C 下保存备用。

5. 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。

一种检测水产品中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水产品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) 是一种有效的广谱抗生素,常用于动物各种传染性疾病的治疗,对多种病原菌有较强的抑制作用,曾在水产养殖业中得到广泛应用,同时也带来了水产品中氯霉素残留的严重问题。氯霉素存在严重的毒副作用,能抑制人体骨髓造血功能,引起人类的再生障碍性贫血,粒状白细胞缺乏症,新生儿、早产儿灰色综合症等疾病,低浓度的药物残留还会诱发致病菌的耐药性,因此动物食品中的氯霉素残留对人类的健康构成了巨大威胁。氯霉素残留问题已引起国际组织和世界上许多国家与地区的高度重视。欧盟、美国等均在法规中规定 CAP 残留限量标准为“零容许量”,即不得检出。自 2001 年以来,我国出口水产品频频被进口国检出氯霉素残留,药物残留已成为扩大水产品国际贸易的主要障碍。针对这种情况,农业部已将氯霉素从 2000 年《中国兽药典》中删除,此药重新进入安全评价体系,在《动物性食品兽药残留规定》中规定可食部分不得检出,并且在出口的日常检测中,将其列为必检项目,一旦发现超标,一律禁止出口。

[0003] 对于氯霉素残留,存在多种检测方法,大致可分为三大类:第一类是生物测定法,第二类是化学分析法,第三类是兼有生物和化学的酶联免疫检测法。

[0004] 国际上公认的定量确认方法是理化分析法,主要是气相色谱法和液相色谱法,这两种方法灵敏度高,结果准确,重复性好,假阳性少,用配有 ECD 的气相色谱仪及 GC-MS 联用技术进行确认及定量分析,检出限可以达到 0.1ppb。缺点是样品前处理过程复杂仪器化程度高且价格昂贵,分析速度慢,不利于大规模样本筛选。

[0005] 基于抗原抗体特异性反应建立起来的免疫学测定方法灵敏度较高,特异性强,试样预处理简单,分析时间短,使用方便。因此,在现场监控和基层的大规模筛选检测中,免疫学检测方法更实际。

[0006] 胶体金免疫层析法是在免疫渗滤技术的基础上建立的一种简易快速的免疫学检测技术,除了具备酶联免疫法的诸多优点外,还克服了酶联免疫法的一些不足。该方法将反应所需要的原料的全部或大部分均已整合到试剂中,反应通常只需数分钟,测试结果以肉眼可见的显色条带来判断。具有简便快速、操作简单、特异性强、不需要额外设备等优点。

发明内容

[0007] 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。

[0008] 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、胶体金结合垫、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。

[0009] 胶体金结合垫上包被有抗氯霉素单克隆抗体与胶体金的结合物；硝酸纤维素膜上从样品垫到吸水垫方向依次包被有氯霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG，分别作为检测线和控制线。偶联氯霉素的载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白等。

[0010] 本发明试剂板的各部分组成成分和功能如下：

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 胶体金结合垫，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。

[0015] 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控制线，将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0016] 吸水垫，由滤纸制成，将反应过程中多余的溶液吸收。

[0017] 本发明试剂板具有如下有益效果：

[0018] (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。

[0019] (2) 灵敏度高。本发明试剂板对水产品中氯霉素的检出限为 0.3ppb，在水产品中对氯霉素的快速检测达到了较优水平，适用于各类企业及检测机构的现场快速筛选。

[0020] (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控制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。

[0021] (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

[0022] 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 为控制线，6 为吸水垫，7 为不干胶，8 为 PVC 底板。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 具体实施方法

[0026] 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。

[0027] 1. 氯霉素与载体蛋白的偶联

[0028] 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℃ 下冻存备用。

[0029] 卵清蛋白 (OVA) 替代 BSA, 同样方法制备氯霉素-OVA 偶联物。

[0030] 2. 氯霉素单克隆抗体的制备

[0031] 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% CO₂ 培养箱中培养。

[0032] 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 2×10⁻³mol/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。

[0033] 体外培养: 将克隆化的细胞株扩大培养, 细胞浓度达 5×10⁵mL⁻¹ 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 10⁷ 个细胞, 7 天后抽取腹水。

[0034] 3. 胶体金溶液的制备

[0035] 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。

[0036] 4. 胶体金标记抗氯霉素单克隆抗体的制备

[0037] 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。

[0038] 5. 氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0039] 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体金结合垫上。

[0040] 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。

[0041] 6. 氯霉素免疫胶体金快速检测试剂板检测实施操作方法

[0042] 6.1 样品制备

[0043] 取切碎的一定量的去脂肪组织样本,用均质机均质。称取 2g 均质物于 5mL 离心管中,然后加入 3mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 3min 后,室温下 4000rpm 离心 5min;移取 2mL 上清液于试管中,65℃下氮气吹干 10 分钟;向吹干的试管中依次加入 0.3mL 正己烷和 0.3mL 氯霉素专用 PBST 缓冲液,用滴管冲洗溶解试管内壁上残留物;静置 2min,分层后吸取下层溶液,待检。

[0044] 6.2 检测

[0045] 从包装袋中取出试剂板,置于平整的台面上,用滴管吸取待检溶液,在加样孔中滴入 3 滴(约 100 μ L),加样后开始计时,结果应在 3 ~ 5min 读取,其他时间判读无效。

[0046] 6.3 结果判读

[0047] 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。

[0048] 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 0.3ppb 或无氯霉素残留。如图 3. a 所示。

[0049] 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 0.3ppb;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。

[0050] 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。

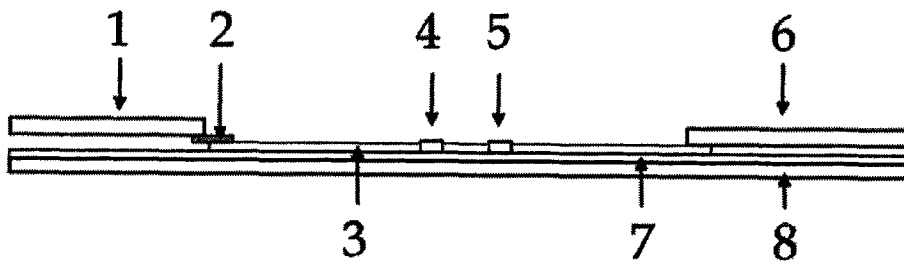


图 1

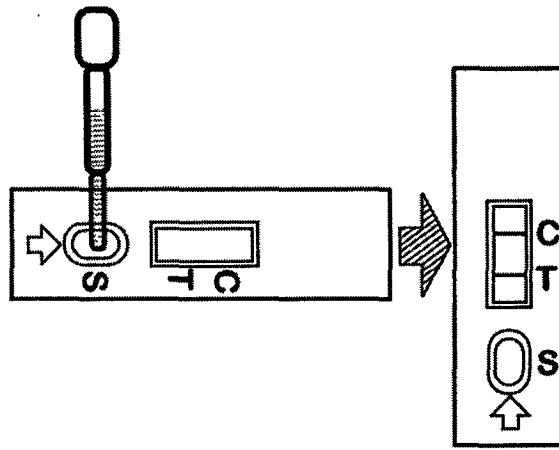


图 2

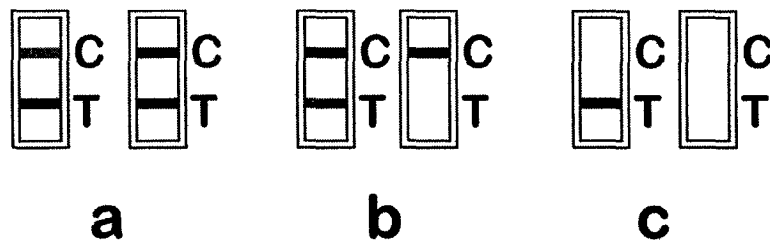


图 3

专利名称(译)	一种检测水产品中氯霉素的试剂板的制备方法		
公开(公告)号	CN102288762A	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201110179489.X	申请日	2011-06-29
[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 周崇盈		
发明人	张少恩 桑丽雅 周崇盈		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/544 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测水产品中氯霉素的试剂板的制备方法，可用于检测水产品中的氯霉素残留。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、胶体金结合垫、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控制线，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，适合检验检疫机构、海洋与渔业局、水产质量检测部门等对水产品中非法使用氯霉素进行大规模快速检测。

