



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103472232 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201310449633. 6

(22) 申请日 2013. 09. 28

(73) 专利权人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段

(72) 发明人 王自良 王爱萍 范国英 张海棠

葛亚明 王顺岗 李艺 丁函

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所

(普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101979511 A, 2011. 02. 23,

CN 102260347 A, 2011. 11. 30,

CN 201298041 Y, 2009. 08. 26,

CN 201773105 U, 2011. 03. 23,

JP 2009072441 X, 2011. 04. 21,

Wu Shixiu et al. Development of a Polyclonal Antibody Based Strip Assay for Detection of Cadmium Residue. 《2011 International Conference on Computer Science ad Network Technology》. 2011,

Wu Shixiu et al. Development of a Polyclonal Antibody Based Strip Assay for Detection of Cadmium Residue. 《2011 International Conference on Computer Science ad Network Technology》. 2011,

审查员 舒霏霏

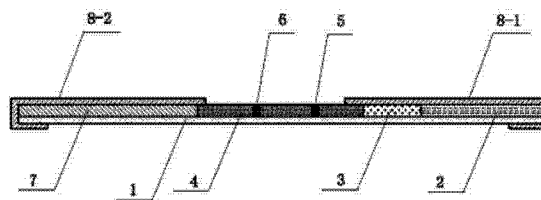
权利要求书3页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

锌离子胶体金层析快速检测试纸条或试纸卡及制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种锌离子胶体金层析快速检测试纸条或试纸卡及制备方法, 试纸条结构包括支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫, 试纸条两端设有保护膜, 所述样品垫、金标抗体结合垫、包被膜、吸水垫依次粘贴于支撑板上; 金标抗体结合垫上包被有胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体或多克隆抗体; 包被膜上设有偶联锌离子的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹, 以及用羊抗小鼠 IgG 溶液印制的隐形对照印迹。本发



1. 一种锌离子胶体金层析快速检测试纸条,包括支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫,试纸条两端设有保护膜,其特征在于:所述样品垫、金标抗体结合垫、包被膜、吸水垫依次粘贴于支撑板上;金标抗体结合垫上包被有胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体或多克隆抗体;包被膜上设有偶联锌离子的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹,以及用羊抗小鼠 IgG 溶液印制的隐形对照印迹;

所述偶联锌离子载体蛋白溶液由以下方法制备:

称取 20mg 载体蛋白溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 值为 9.0 的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸的缓冲液中,形成载体蛋白溶液;称取 10mg 对氨基苯基-二乙三胺五乙酸溶于 1mL 二甲基亚砷中,形成金属螯合剂溶液;取 100 μ L DTPA 溶液在搅拌下逐滴加到 0.5mL 载体蛋白溶液中,用 10mol/L 的 KOH 调节其 pH 至 9.0,室温反应 24h,形成 DTPA-载体蛋白溶液;称取 100mg 氯化锌溶于 100 μ L 浓硝酸中,加纯水溶解得到终体积为 1mL、浓度为 733.7mmol/L 的 Zn^{2+} 溶液;

将 Zn^{2+} 溶液加入到 DTPA-载体蛋白溶液中,调节其 pH 值至 7.4,室温孵育 4h,用 PBS 缓冲液透析 10d,形成 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原,收集分装,-20 $^{\circ}$ C 冻存。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是:所述支撑板为硬质塑胶条或不吸水的硬纸条;所述样品垫和金标抗体结合垫由玻璃纤维棉制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成;所述包被膜由硝酸纤维素膜制成;所述载体蛋白为鸡卵清蛋白、血蓝蛋白或牛血清蛋白。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试纸条,其特征是:所述保护膜覆盖在样品垫、金标抗体结合垫和吸水垫上,保护膜上印制有样品标记线,该样品标记线偏向样品垫一侧 0.3-0.5cm 处;隐形检测印迹上偶联二价锌离子的载体蛋白溶液的包被量为 1 μ L/cm,载体蛋白浓度为 1mg/mL;隐形对照印迹上羊抗小鼠 IgG 抗体的包被量为 1 μ L/cm,抗体浓度为 1mg/mL;所述隐形检测印迹和隐形对照印迹的排列方式为“||”、“++”或“●●”。

4. 权利要求 1 所述锌离子胶体金层析快速检测试纸条的制备方法,其特征在于:金标试纸条制备步骤如下:

(1) 偶联锌离子载体蛋白溶液的制备:

称取 20mg 载体蛋白溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 值为 9.0 的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸的缓冲液中,形成载体蛋白溶液;称取 10mg 对氨基苯基-二乙三胺五乙酸溶于 1mL 二甲基亚砷中,形成金属螯合剂溶液;取 100 μ L DTPA 溶液在搅拌下逐滴加到 0.5mL 载体蛋白溶液中,用 10mol/L 的 KOH 调节其 pH 至 9.0,室温反应 24h,形成 DTPA-载体蛋白溶液;称取 100mg 氯化锌溶于 100 μ L 浓硝酸中,加纯水溶解得到终体积为 1mL、浓度为 733.7mmol/L 的 Zn^{2+} 溶液;

将 Zn^{2+} 溶液加入到 DTPA-载体蛋白溶液中,调节其 pH 值至 7.4,室温孵育 4h,用 PBS 缓冲液透析 10d,形成 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原,收集分装,-20 $^{\circ}$ C 冻存;

(2) 单克隆抗体的制备:用 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白免疫 6 周龄 BALB/C 小鼠,采用细胞融合技术,在 PEG-1500 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合;用 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,经扩大培养、冻存并鉴定,制备杂交瘤细胞株,之后采用体内诱生腹水法制备锌离子单克隆抗体;

(3) 金标抗体制备:

将待标记的锌离子单克隆抗体溶液 10000r/min 离心 30min,取胶体金溶液 10mL,用 0.1

mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2；取等量锌离子单克隆抗体溶液，磁力搅拌下与胶体金溶液混合，室温孵育 15min，10000r/min 离心 30min，弃上清，将所得沉淀用每升含 10 g BSA、0.5 g 叠氮钠、浓度为 0.02 mol/L 的 $Na_2B_4O_7$ 溶液稀释，即获得胶体金标记的锌离子单克隆抗体，4℃保存备用；

(4) 金标抗体结合垫制备：按规格裁取玻璃纤维棉，将金标抗体用单向喷点仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上，37℃干燥 1h，密封，4℃保存备用；

(5) 隐形检测印迹和隐形对照印迹的制备：将 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原放于单向喷点仪贮存池 A，羊抗小鼠 IgG 溶液放于贮存池 B，开机分别点射于膜中央，形成间距 0.5cm 的隐形检测印迹和隐形对照印迹，自然干燥，密封，4℃保存备用；

(6) 试纸条组装：将样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫按顺序依次粘贴于支撑板上，并在试纸条两端的表面粘贴保护膜，在切槽机上切割成试纸条。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于：其中锌离子单克隆抗体与胶体金溶液的标记比为 1 : 5.2×10^4 ，所得胶体金溶液中金颗粒的粒径为 30 nm；所含羊抗小鼠 IgG 溶液的浓度为 0.34 μ g/mL。

6. 一种锌离子胶体金层析快速检测试纸卡，包括壳体和位于壳体内部的试纸芯，试纸芯包括底层支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫，其特征在于：所述样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫依次粘贴于底层支撑板上；金标抗体结合垫上包被有胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体；所述包被膜上设有偶联锌离子的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹，以及用羊抗小鼠 IgG 溶液印制的隐形对照印迹；

所述偶联锌离子的载体蛋白溶液是通过以下步骤制备的：

(1) 称取 20mg 载体蛋白溶于 1mL、浓度为 10mmol/L、pH 值为 9.0 的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸的缓冲液中，形成载体蛋白溶液；

(2) 称取 10mg 金属螯合剂对氨基苯基-二乙三胺五乙酸溶于 1mL 二甲基亚砜中，形成金属螯合剂溶液；

(3) 取 100 μ L DTPA 溶液轻轻搅拌下逐滴滴加到 0.5mL 载体蛋白溶液中，用 10mol/L KOH 调节 pH 至 9.0，室温下反应 24h，形成 DTPA-载体蛋白溶液；

(4) 称取 100mg 氯化锌溶于 100 μ L 浓硝酸中，加纯水溶解得到终体积为 1mL、浓度为 733.7mmol/L 的 Zn^{2+} 溶液；

(5) 将 Zn^{2+} 溶液加入到 DTPA-载体蛋白溶液中，调节 pH 值至 7.4，室温孵育 4h，用 PBS 透析 10d，即形成 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原，收集分装，-20℃冻存。

7. 根据权利要求 6 所述的试纸卡，其特征是：所述壳体由底座和面盖构成，底座和面盖通过嵌合连在一起，底座上设有放置试纸芯的凹槽，面盖上设有观察窗、加样孔，观察窗与试纸芯的包被膜相对应，加样孔与试纸芯的样品垫相对应。

8. 根据权利要求 6 所述的试纸卡，其特征是：所述支撑板为硬质塑胶条或不吸水的硬纸条；所述样品垫与金标抗体结合垫由玻璃纤维棉制成；所述吸水垫由吸水滤纸制成；所述包被膜由硝酸纤维素膜制成；所述载体蛋白为鸡卵清蛋白、血蓝蛋白或牛血清蛋白；所述隐形检测印迹上偶联二价锌离子的载体蛋白的包被量为 1 μ L/cm，载体蛋白浓度为 1mg/mL；隐形对照印迹上羊抗小鼠 IgG 抗体的包被量为 1 μ L/cm，抗体浓度为 1mg/mL；所述隐形检测印迹和隐形对照印迹的排列方式为“||”、“++”或“●●”。

9. 根据权利要求 6-8 任一项所述的试纸卡,其特征在于:所述胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体是由以下方法制备的:

(1) 单克隆抗体的制备:用 Zn^{2+} -DTPA-KLH 免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠,剂量为 $20\mu\text{g}/0.2\text{mL}$ /只,背部皮下分点注射;采用细胞融合技术,在 PEG-1500 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合;用间接 ELISA 和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,筛选后进行有限稀释克隆化,然后扩大培养、冻存并鉴定,获得杂交瘤细胞株,之后采用体内诱生腹水法制备锌离子单克隆抗体;

(2) 金标抗体制备:将待标记的锌离子单克隆抗体溶液 $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min,取胶体金溶液 10mL,用 $0.1\text{ mol}/\text{L}$ 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2;取等量锌离子单克隆抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育 15min, $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min,弃上清,将得到的沉淀物用每升含 10 g BSA、0.5 g 叠氮钠、浓度为 $0.02\text{ mol}/\text{L}$ 的 $Na_2B_4O_7$ 溶液稀释,即获得胶体金标记的锌离子单克隆抗体, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用;所得胶体金溶液中金颗粒的粒径为 30 nm,每毫升胶体金中含有 5 ng 锌离子的单克隆抗体。

锌离子胶体金层析快速检测试纸条或试纸卡及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测微量锌离子的器具,特别是涉及一种用于快速检测锌离子的金标试纸条/卡及制备方法,属于免疫学和卫生检验学技术领域。

背景技术

[0002] 土壤和农产品中的重金属与人类健康密切相关。重金属污染主要是指生物毒性显著的汞、铬、镉、铅以及类金属砷,还包括具有毒性的重金属铜、钴、镍、锡等金属污染物。重金属污染不同于其他类型污染,具有隐蔽性、长期性和不可逆转性等特点。随着城市的扩大和大规模工业发展,大量重金属进入环境后,即使浓度很低也可能造成危害,通过饮用水或者通过生物富集以及食物链等方式最终威胁到人体健康。

[0003] 锌参与体内 200 多种酶的合成和活化,是机体新陈代谢的重要物质,是动物生长发育及维持正常生理机能所必须的微量元素,参与蛋白质的合成,促进细胞分裂、生长和再生;但环境污染和饲料、药物添加剂的滥用,造成畜禽产品锌的残留不同程度超标。过量锌是一种作用迅速的中枢神经毒素,通过对神经细胞的直接损害以及对体内各种物质的拮抗而影响脑功能,摄入过量会导致机体代谢紊乱;过量的锌还可明显抑制红细胞的免疫功能,造成雏鸡肝、脾的结构和功能受损。许多实验和流行病学调查已证实,如果锌在体内含量过高,将会抑制吞噬细胞的活性和杀菌力,降低人体免疫功能,抵抗力减弱,对疾病易感性增加。

[0004] 同时,锌主要来源于采矿、电镀和冶炼行业污染物的排放,水和土壤中的锌污染已经引起环境科学工作者的广泛关注。土壤中锌超过 200mg/kg 时可能对植物生长造成危害,过量锌可直接导致植物发生锌污染中毒,也可能间接影响植物对于重要营养元素 Fe 的吸收,进而使植物因缺 Fe 而引起生长障碍、甚至死亡。在重金属污染的预防和治理中,重金属污染物的监测和识别至关重要。

[0005] 因此,痕量重金属的定性定量分析在食品和环境检测等方面非常重要。传统的重金属离子检测法有无火焰原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、火焰原子吸收光谱法、伏安法和离子色谱法,以及电热原子化原子吸收光谱法等,检测必须在具备大型分析仪器的重点实验室内进行,无法用于现场检测,且受到费用高、处理量有限和检测时间长等限制,不利于在生产中推广应用,难以适应环境及市场产品的现场抽查及产品进出口快速通关的要求。

[0006] 因此,建立快速、简便、经济、大批量筛检的锌免疫检测技术,对于减少环境污染、提高食品质量和保障食品安全具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题:提供一种能够快速、简便、敏感、特异的检测锌离子污染残留的锌离子金标试纸条或试纸卡;还提供锌离子金标试纸条的制备方法。

[0008] 本发明的技术方案:

[0009] 一种锌离子胶体金层析快速检测试纸条,包括支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫,试纸条两端设有保护膜,所述样品垫、金标抗体结合垫、包被膜、吸水垫依次粘贴于支撑板上;金标抗体结合垫上包被有胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体或多克隆抗体;包被膜上设有偶联锌离子的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹,以及用羊抗小鼠 IgG 溶液印制的隐形对照印迹。

[0010] 所述支撑板为硬质塑胶条或不吸水的硬纸条;所述样品垫和金标抗体结合垫由玻璃纤维棉制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成;所述包被膜由硝酸纤维素膜制成;所述载体蛋白为鸡卵清蛋白(OVA)、血蓝蛋白(KLH)或牛血清蛋白(BSA)。

[0011] 所述保护膜覆盖在样品垫、金标抗体结合垫和吸水垫上,保护膜上印制有样品标记线,该样品标记线偏向样品垫一侧 0.3-0.5cm 处;隐形检测印迹上偶联六价锌离子的载体蛋白溶液的包被量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$,载体蛋白浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$;隐形对照印迹上羊抗小鼠 IgG 抗体的包被量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$,抗体浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$;所述隐形检测印迹和隐形对照印迹的排列方式为“||”、“++”或“●●”。

[0012] 锌离子胶体金层析快速检测试纸条的制备方法,所述制备步骤如下:

[0013] (1) 偶联锌离子载体蛋白溶液的制备:

[0014] 称取 20mg 载体蛋白溶于 1mL、浓度为 $10\text{mmol}/\text{L}$ 、pH 值为 9.0 的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸的缓冲液中,形成载体蛋白溶液;称取 10mg 对氨基苯基-二乙三胺五乙酸溶于 1mL 二甲基亚砜中,形成金属螯合剂溶液;取 $100\mu\text{L}$ DTPA 溶液在搅拌下逐滴加到 0.5mL 载体蛋白溶液中,用 $10\text{mol}/\text{L}$ 的 KOH 调节其 pH 至 9.0,室温反应 24h,形成 DTPA-载体蛋白溶液;称取 100mg 氯化锌溶于 $100 \mu\text{L}$ 浓硝酸中,加纯水溶解得到终体积为 1mL、浓度为 $733.7\text{mmol}/\text{L}$ 的 Zn^{2+} 溶液;

[0015] 将 Zn^{2+} 溶液加入到 DTPA-载体蛋白溶液中,调节其 pH 值至 7.4,室温孵育 4h,用 PBS 缓冲液透析 10d,形成 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原,收集分装, -20°C 冻存;

[0016] (2) 单克隆抗体的制备:用 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白免疫 6 周龄 BALB/C 小鼠,采用细胞融合技术,在 PEG-1500 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合;用 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选,经扩大培养、冻存并鉴定,制备杂交瘤细胞株,之后采用体内诱生腹水法制备锌离子单克隆抗体;

[0017] (3) 金标抗体制备:

[0018] 将待标记的锌离子单克隆抗体溶液 $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min,取胶体金溶液 10mL,用 $0.1 \text{mol}/\text{L}$ K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2;取等量锌离子单克隆抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育 15min, $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min,弃上清,将所得沉淀用每升含 10 g BSA、0.5 g 叠氮钠、浓度为 $0.02 \text{mol}/\text{L}$ 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液稀释,即获得胶体金标记的锌离子单克隆抗体, 4°C 保存备用;

[0019] (4) 金标抗体结合垫制备:按规格裁取玻璃纤维棉,将金标抗体用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上, 37°C 干燥 1h,密封, 4°C 保存备用;

[0020] (5) 隐形检测印迹和隐形对照印迹的制备:将 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A,羊抗小鼠 IgG 溶液放于贮存池 B,开机分别点射于膜中央,形成间距 0.5cm 的隐形检测印迹和隐形对照印迹,自然干燥,密封, 4°C 保存备用;

[0021] (6) 试纸条组装:将样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫按顺序依次粘贴于

支撑板上,并在试纸条两端的表面粘贴保护膜,在切槽机上切割成试纸条。

[0022] 其中锌离子单克隆抗体与胶体金溶液的标记比为 $1 : 5.2 \times 10^4$, 所得胶体金溶液中金颗粒的粒径为 30 nm; 所含羊抗小鼠 IgG 溶液的浓度为 $0.34 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0023] 一种锌离子胶体金层析快速检测试纸卡, 包括壳体和位于壳体内部的试纸芯, 试纸芯包括底层支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫, 所述样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫依次粘贴于底层支撑板上; 金标抗体结合垫上包被有胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体; 所述包被膜上设有偶联锌离子的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹, 以及用羊抗小鼠 IgG 溶液印制的隐形对照印迹。

[0024] 所述壳体由底座和面盖构成, 底座和面盖通过嵌合连在一起, 底座上设有放置试纸芯的凹槽, 面盖上设有观察窗、加样孔, 观察窗与试纸芯的包被膜相对应, 加样孔与试纸芯的样品垫相对应。

[0025] 所述支撑板为硬质塑胶条或不吸水的硬纸条; 所述样品垫与金标抗体结合垫由玻璃纤维棉制成; 所述吸水垫由吸水滤纸制成; 所述包被膜由硝酸纤维素膜制成; 所述载体蛋白为鸡卵清蛋白、血蓝蛋白或牛血清蛋白; 所述隐形检测印迹上偶联六价锌离子的载体蛋白的包被量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$, 载体蛋白浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$; 隐形对照印迹上羊抗小鼠 IgG 抗体的包被量为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$, 抗体浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$; 所述隐形检测印迹和隐形对照印迹的排列方式为“|”、“++”或“●●”。

[0026] 所述偶联锌离子的载体蛋白溶液是通过以下步骤制备的:

[0027] (1) 称取 20mg 载体蛋白溶于 1mL、浓度为 $10\text{mmol}/\text{L}$ 、pH 值为 9.0 的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸的缓冲液中, 形成载体蛋白溶液;

[0028] (2) 称取 10mg 金属螯合剂对氨基苯基-二乙三胺五乙酸溶于 1mL 二甲基亚砷中, 形成金属螯合剂溶液;

[0029] (3) 取 100 μL DTPA 溶液轻轻搅拌下逐滴滴加到 0.5mL 载体蛋白溶液中, 用 $10\text{mol}/\text{L}$ KOH 调节 pH 至 9.0, 室温下反应 24h, 形成 DTPA-载体蛋白溶液;

[0030] (4) 称取 100mg 氯化锌溶于 100 μL 浓硝酸中, 加纯水溶解得到终体积为 1mL、浓度为 $733.7\text{mmol}/\text{L}$ 的 Zn^{2+} 溶液;

[0031] (5) 将 Zn^{2+} 溶液加入到 DTPA-载体蛋白溶液中, 调节 pH 值至 7.4, 室温孵育 4h, 用 PBS 透析 10d, 即形成 Zn^{2+} -DTPA-载体蛋白人工抗原, 收集分装, -20°C 冻存。

[0032] 所述胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体是由以下方法制备的:

[0033] (1) 单克隆抗体的制备: 用 Zn^{2+} -DTPA-KLH 免疫 6 周龄雌性 BALB/C 小鼠, 剂量为 $20\mu\text{g}/0.2\text{mL}/$ 只, 背部皮下分点注射; 采用细胞融合技术, 在 PEG-1500 作用下与 NS0 骨髓瘤细胞进行融合; 用间接 ELISA 和阻断 ELISA 法进行阳性杂交瘤细胞株的筛选, 筛选后进行有限稀释克隆化, 然后扩大培养、冻存并鉴定, 获得杂交瘤细胞株, 之后采用体内诱生腹水法制备锌离子单克隆抗体;

[0034] (2) 金标抗体制备: 将待标记的锌离子单克隆抗体溶液 $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min, 取胶体金溶液 10mL, 用 $0.1 \text{mol}/\text{L}$ 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2; 取等量锌离子单克隆抗体溶液, 磁力搅拌下与胶体金溶液混合, 室温孵育 15min, $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min, 弃上清, 将得到的沉淀物用每升含 10 g BSA、0.5 g 叠氮钠、浓度为 $0.02 \text{mol}/\text{L}$ 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液稀释, 即获得胶体金标记的锌离子单克隆抗体, 4°C 保存备用; 所得胶体金溶液中金颗

粒的粒径为 30 nm,每毫升胶体金中含有 5 ng 锌离子的单克隆抗体。

[0035] 本发明的锌离子检测试纸条/卡具有下列优点:

[0036] ① 特异性强,敏感性高。 Zn^{2+} -Strip 以胶体金标记高亲和力的单克隆抗体或多克隆抗体为基础制备而成,金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成,二者通过异性电荷间的范德华力相结合,胶体金标记对单克隆抗体或多克隆抗体的特异性和亲和力影响很小,且具有较高的标记率。因此,该试纸条或卡具有较强的特异性和较高的敏感性,最低检测限为 $1 \mu g/L$,与其它金属离子交叉反应较小。

[0037] ② 简便、快速、时效性强。使用 Zn^{2+} -Strip,无需任何其它试剂和仪器,可现场操作,只需将试纸条插入待检样品或将待检样品滴加在试纸卡上 10-20 秒,5 分钟内即可判定检测结果。

[0038] ③ 结果显示直观、形象、准确。 Zn^{2+} -Strip 以显示棕红色线“|”和“||”作为检测结果阳性和阴性标记,即在包被膜上显示一条棕红色线“|”时,表示在被检样品中含有 Zn^{2+} ,显示两条棕红色线“||”时,表示被检样品中不含 Zn^{2+} 。结果判定形象、直观、准确,简单明了,不易出现假阳性和假阴性等人为误判。

[0039] ④ 本发明金标试纸条的制备方法,制备出了锌离子载体蛋白偶联物,得到了适宜分子结合比的人工免疫抗原和包被抗原,获得了高效价、敏感、特异的抗血清;采用柠檬酸钠还原法制备胶体金溶液,反应过程比较温和,可在常温和中性 pH 条件下进行,易于操作和控制。

[0040] ⑤ 本发明金标试纸的制备方法,制备了抗锌离子高效价、高亲和力、特异性强的单克隆抗体,抗体腹水效价为 $1 : 1.2 \times 10^6$,交叉反应率小于 0.01%,为锌离子的痕量快速检测提供了保障。

[0041] ⑥ 适用范围广,节省费用,便于推广。使用 Zn^{2+} -Strip 比仪器分析费用低,适用范围广,可满足不同层次人员的需要,包括专业检验、海关检疫、卫生检疫、质量监测和加工企业和养殖场户等,便于推广应用,具有广阔的市场前景和明显的经济、社会效益。

附图说明

[0042] 图 1、锌离子检测试纸条俯视结构示意图。

[0043] 图 2、锌离子检测试纸条剖面结构示意图。

[0044] 图 3、锌离子检测试纸卡俯视结构示意图。

[0045] 图 4、锌离子检测试纸卡剖面结构示意图。

[0046] 图中,1:支撑板,2:样品垫,3:金标抗体结合垫,4:包被膜,5:隐形检测印迹,6:隐形对照印迹,7:吸水垫,8-1:样品端保护膜,8-2:手柄端保护膜,9:样品标记线,10:加样孔,11:观察窗,12:面板,13:固定槽,14:底座,15:凹槽。

具体实施方式

[0047] 以下用实施例具体说明本发明,但是并不表示对本发明的任何限制,如没有特别说明,其中的百分含量均为重量百分含量。

[0048] 要制备检测锌离子金标试纸条或试纸卡,首先要制备锌离子人工免疫抗原,之后

免疫 Balb/c 小鼠,制备抗锌离子的单克隆抗体,在此基础上组装锌离子金标试纸条或试纸卡。

[0049] 实施例 1、Zn²⁺人工抗原的合成

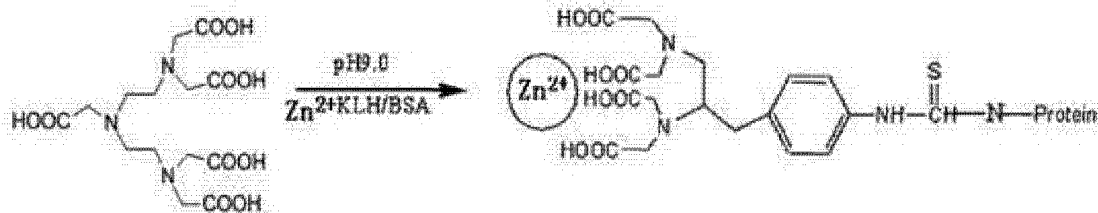
[0050] 称取 20mg KLH,溶于 1mL 浓度为 10mmol/L、pH9.0 的 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸缓冲液 (HBS) 中,形成 KLH 溶液。

[0051] 称取 10mg 金属螯合剂对氨基苯基-二乙三胺五乙酸 (P-NH₂-Bn-DTPA),溶于 1mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中,形成金属螯合剂溶液;取 160μL 金属螯合剂溶液在轻轻搅拌下逐滴加入到 1mL 的 KLH 溶液中,用 10mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 9.0,室温下反应 24h;反应产物用 30Kd 的超滤管纯化,超滤管内加入反应产物超滤,超滤管先用 10 mmol/L、pH9.0 HBS 冲洗 3 次,再用 10 mmol/L、pH7.4 的 HBS 缓冲液洗 2 次,除去其中未反应的小分子金属螯合剂。

[0052] 取 16 μL 浓度为 733.7mmol/L 锌溶液滴加到已反应过的载体蛋白溶液中,用 NaOH 溶液调节其 pH 值至 9.0,室温摇床反应 24 小时,然后移入透析袋中透析 10 天。所得产物即为纯化的锌离子螯合后的人工抗原 Zn²⁺-DTPA-KLH。用蛋白核酸分析仪在 280nm 波长下测定人工抗原中的蛋白浓度。

[0053] 同法制得包被抗原 Zn²⁺-DTPA-BSA 或 Zn²⁺-DTPA-OVA。反应原理见以下反应式。

[0054]



[0055] 实施例 2、Zn²⁺单克隆抗体的制备

[0056] (1)动物免疫。免疫 Balb/c 小鼠,用 Zn²⁺-DTPA-KLH 免疫 6 周龄雌性 Balb/C 小鼠 5 只,剂量为 20μg/0.2mL/只,背部皮下分点注射。首免,用灭菌 PBS 稀释 Zn²⁺-DTPA-KLH,与等量 CFA 混合乳化;加强免疫,用灭菌 PBS 稀释 Zn²⁺-DTPA-KLH,与等量 IFA 混合乳化,首免后 3 周进行第二次免疫,以后间隔 2 周免疫一次,共免疫 5 次,第三次免疫后 10 d 断尾取血,37 °C 水浴 30 min,4 °C 放置过夜,4000 r/min 4 °C 离心 5 min,取上清,-20 °C 保存备用。

[0057] (2)细胞融合备用小鼠选择。间接 ELISA 检测抗血清中 Zn²⁺螯合物 pAb 效价,阻断 ELISA 检测 Zn²⁺-DTPA pAb 对 Zn²⁺-DTPA 的 IC₅₀,挑选效价最高、IC₅₀最低的小鼠,超免后用于细胞融合。

[0058] (3)阳性杂交瘤细胞株筛选。细胞融合,将 PEG-1500 溶液、GNK 溶液预热至 40 °C,将制备好的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10 : 1 的比例混合于 50 mL 离心管中,加 GNK 溶液至 40 mL,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,打散细胞团,将此融合管移入 40 °C 水浴中。用 1mL 吸管将预热的 50% 的 PEG-1500 (pH 8.0) 滴加到融合管中,边加边轻轻摇动融合管,1min 内加完,并继续在水浴中缓缓摇动融合管 1.5 min;然后慢慢补加 GNK 溶液至 40 mL,37 °C 水浴静置 5 min,1000 r/min 离心 10 min,弃上清。打散细胞团,加 40 mL HAT 吹打混匀,加到 96 孔细胞培养板上,每孔 100 μL,置于 37 °C、5% 的 CO₂培养箱中培养。

[0059] 阳性杂交瘤细胞的筛选,用间接 ELISA 和阻断 ELISA 进行阳性杂交瘤细胞株的筛

选。选择强阳性、抑制效果好、细胞生长旺盛的孔,进行3次有限稀释克隆化,分别于冻存15 d、30 d 和 60 d 后复苏杂交瘤细胞,培养后取上清液,间接 ELISA 测定抗体效价,考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性。

[0060] (4) 单克隆抗体的制备。采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体。取8周龄健康 Balb/c 雌性小鼠,腹腔注射 IFA 0.5 mL/只,10~15 d 后使用。将培养的阳性杂交瘤细胞 1000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集细胞沉淀。用灭菌的 PBS 将细胞沉淀悬浮、混匀,将细胞数调至 10^6 个/mL,腹腔注射 Balb/C 小鼠 0.5 mL/只。接种细胞 7-10 d 后产生腹水,进行收集,于 37 °C 水浴 30 min,4 °C 放置过夜,12000 r/min 离心 5min,弃去上层的脂肪、IFA 和下层的沉淀,用蛋白核酸分析仪在 280nm 波长下测定所获抗体的 IgG 含量,计算该单抗的亲和力常数; -20°C 保存备用。

[0061] 实施例 3、抗 Zn^{2+} mAb 的鉴定

[0062] (1) 腹水效价测定。给腹腔注射液体石蜡 10 d 后的小鼠注射克隆化细胞株 10^7 个细胞,10 d 后抽取腹水,饱和硫酸铵盐析法提纯,间接 ELISA 测定 Zn^{2+} mAb 的腹水效价为 1 : 1.2×10^6 ;

[0063] (2) 敏感性鉴定。用阻断 ELISA 测定 Zn^{2+} mAb 对不同浓度 Zn^{2+} -EDTA 标准液的抑制率,以抑制率 B/B_0 为纵坐标,以不同浓度 Zn^{2+} -EDTA 的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,进行相关回归分析,计算 Zn^{2+} mAb 对 Zn^{2+} -EDTA 的 IC_{50} 。 Zn^{2+} mAb 的线性回归方程为 $y = -33.827x + 99.512$, $R^2 = 0.9891$, IC_{50} 为 29.08 μ g/L。

[0064] (3) 特异性鉴定。采用交叉反应试验,选择汞、铅、镉、铜、铬、钴、铁等金属离子与 EDTA 的螯合物、EDTA、ITCBE、DOTA、DTPA 为抑制物,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 Zn^{2+} mAb 对 Zn^{2+} 的 IC_{50} 和对其它各竞争物的 IC_{50} 的百分率为其交叉反应率(CR%)。鉴定结果,与其它重金属离子交叉反应率小于 0.01%。

[0065] 实施例 4、 Zn^{2+} 金标试纸条 / 试纸卡的制备

[0066] (1) 胶体金溶液制备。采用柠檬酸盐还原法制备,取 1000mL 三角烧瓶,加入 975mL 双蒸水煮沸,加入 15mL 柠檬酸三钠继续加热 5min,加入 10mL 1% 的氯金酸,继续加热至溶液呈现橘红色,冷却至室温后,4°C 保存备用。

[0067] (2) 金标抗体制备。将待标 mAb 溶液 10000r/min 离心 30 min,用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2;根据聚沉现象,确定 Zn^{2+} -DTPA-BSA mAb 与胶体金溶液的最适宜标记比,按照 1 : 5.2×10^4 的比例进行稀释,所含 IgG 浓度为 0.34 μ g/mL。

[0068] 取胶体金溶液 10mL,用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.2。取等量的浓度为 0.34mg/mL mAb 溶液,磁力搅拌下混合,室温孵育 15min,10000r/min 离心 30min,弃上清,沉淀物用 0.02 mol/L 的 $Na_2B_4O_7$ 溶液(含 10 g/L BSA、0.5 g/L 叠氮钠)稀释,4 °C 保存备用;其中胶体金溶液中金颗粒的粒径为 30nm,标记量为 1mL 胶体金 : 5ng Zn^{2+} mAb。

[0069] (3) 金标抗体结合垫的制备。裁取规格为 20×4mm 的玻璃纤维棉,将金标抗体用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上,37°C 干燥 1h,密封,4°C 保存备用。

[0070] (4) 检测线、质控线的制备。将浓度为 1mg/mL 的 Zn^{2+} -DTPA-BSA 放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A,浓度为 1mg/mL 的 RaMIgG 放于贮存池 B,开机分别点射于膜中央,形成间距为 0.5cm 的检测线和质控线,自然干燥,密封,4°C 保存备用。

[0071] (5)试纸条的组装。将样品垫、金标抗体结合垫、包被膜、吸水垫按顺序依次粘贴于支撑板上,并在试纸条两端的表面粘贴保护膜,在切槽机上切割成宽度 4mm 的金标试纸条。

[0072] 实施例 5:锌离子试纸条的结构,参见图 1、图 2。图中支撑板 1 用塑胶薄片条制成,样品垫 2 用玻璃纤维棉制成,金标抗体结合垫 3 上吸附有抗锌离子的单克隆抗体,包被膜 4 采用硝酸纤维素膜,吸水垫 7 用吸水滤纸制成,将编号 2、3、4、7 各层从右至左依次粘贴固定在支撑板 1 上,彼此交界处纤维互相交叉渗透。在包被膜 4 上设有隐形检测印迹 5 和隐形对照印迹 6,隐形检测印迹用偶联锌离子的牛血清白蛋白(BSA)溶液印制,隐形对照印迹用羊抗小鼠 IgG 抗体溶液印制,两条印迹平行排列成“||”。8-1 为覆盖在样品垫 2 和金标抗体结合垫 3 上面的样品端保护膜(白色),8-2 为覆盖在吸水垫 7 上面的手柄端保护膜(如黄色),在样品垫 2 与金标抗体结合垫 3 交界处、对应的白色保护膜偏向样品垫 2 一侧约 0.5 cm 处印制有样品标记线 9,在样品标记线右侧的保护膜上印有箭头及 MAX 字样。

[0073] 其中各组件及金标抗体、人工免疫抗原、抗锌离子单克隆抗体等的制备参见以上实施例。

[0074] (1)检测反应原理。当锌离子试纸条测试端插入待测样品溶液后,待测溶液通过虹吸作用带动待测锌离子及金标抗体一起向包被膜扩散,并渗入手柄端的吸水垫。扩散过程中待测锌离子可与金标抗体相结合,进而封闭金标抗体上锌离子的抗原结合点,阻止金标抗体与包被膜上偶联锌离子载体蛋白的检测印迹结合,不能显示检测印迹,而羊抗小鼠 IgG 抗体则可与金标抗体结合,形成棕红色对照印迹“|”,即一条棕红色印迹为阳性表示;反之,样品溶液中无锌离子,则不能阻止金标抗体与包被膜上偶联锌离子的载体蛋白检测印迹结合,显示棕红色检测印迹,同样羊抗小鼠 IgG 抗体也与金标抗体结合,显示棕红色对照印迹,形成两条棕红色带为阴性表示。如果纤维素膜上没有棕红色印迹显示,则表明试纸条已失效。

[0075] (2)检测步骤。样品预处理,样品包括土壤、水、食品、饲料、动物组织、血液、尿液等,固体待检物研磨捣碎,进行硝酸-高氯酸硝化,液体待检物直接加入硝酸硝化。

[0076] ①固体样品的硝化:分别取 1g 样品放入玻璃消化管中,加 15mL 浓硝酸,置于通风窗过夜;然后加入 5mL 浓高氯酸,恒温下缓缓加热至高氯酸白色烟雾逸尽,同时溶液澄清透明为止,冷却后转移到 25mL 容量瓶中待用。

[0077] ②液体样品的硝化:液体待检物直接加入 15mL 硝酸,室温静置 2h,恒温电热板中,体积浓缩至 2~3mL 时,冷却后用 2.5% 硝酸稀释,定容到 25mL 容量瓶中待用。

[0078] 按照 1:1 体积比将样品消化液与 10% EDTA 螯合剂混匀,使 Zn^{2+} 与 EDTA 充分螯合,形成样品待测液。

[0079] 检测步骤:试纸条直接插入待测样品中,水平放置,5min 内观察结果,10min 以后结果无效;用试纸卡检测时,用滴管吸取待测样品 100 μ L 或两滴滴加于试纸卡的加样孔中,5min 内观察结果。

[0080] 经测定,该试纸条/卡的目测灵敏度为 5 μ g/L,机读灵敏度为 1 μ g/L;可应用于环境、土壤、水、食品中 Zn^{2+} 污染残留的快速检测。

[0081] 实施例 6:试纸条结构和实施例 6 基本相同,不同之处在于:金标抗体结合垫吸附有抗锌离子的多克隆抗体,样品垫用尼龙膜制成,包被膜采用纯纤维素膜,检测印迹和对照印迹均为“十”,覆盖在吸水垫上面的手柄端保护膜为兰色。

[0082] 实施例 7:试纸条结构和实施例 6 基本相同,不同之处在于:样品垫用 PVDF 膜制成,偶联锌离子的载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白(OVA),包被膜采用羧化纤维素膜,覆盖在吸水垫上面的手柄端保护膜为绿色。

[0083] 实施例 8:试纸条结构和实施例 6 基本相同,不同之处在于:样品垫用聚酯膜制成,包被膜采用羧化纤维素膜,偶联锌离子的载体蛋白溶液为血蓝蛋白(KLH),检测印迹和对照印迹排列为“●●”。

[0084] 实施例 9:锌离子检测试纸卡,参见图 3、图 4。试纸卡包括壳体和位于壳体内部的试纸芯,试纸芯包括支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫,试纸芯的结构和例 6 相同,不同之处在于:

[0085] 试纸卡壳体材料为塑料,壳体底座 14 上设有固定试纸芯的固定槽 13;面板 12 上的加样孔 10 与试纸芯的样品垫 2 相对应,加样孔 10 是滴加待检样品的位置;面板 12 上设有和底座相结合的凹槽 15,在面板 12 上的观察窗 11 与试纸芯的包被膜 4 相对应,是观察判定结果的窗口,其旁边印有 T 和 C,分别与包被膜 4 上的隐形检测印迹 5 和隐形对照印迹 6 相对应。

[0086] 检测时,将试纸卡平放,从加样孔滴加待测样品液,5 分钟内从观察窗判定检测结果。

[0087] 结果判定:如在包被膜上对应 T 的位置显示有一条棕红色线“|”时,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有锌离子;如在包被膜上对应 T、C 的位置显示有两条棕红色线“||”时,表示检测结果为阴性,说明待测样品不含锌离子;如在包被膜上没有棕红色线显示,则表明试纸卡已失效。

[0088] 实施例 10:试纸卡结构和实施例 10 基本相同,不同之处在于:以抗锌离子多克隆抗体替代锌离子单克隆抗体,偶联锌离子的载体蛋白为鸡卵清白蛋白 OVA,用兔抗小鼠 IgG 替代羊抗小鼠 IgG 在包被膜上制备对照印迹。

[0089] 实施例 11、Zn²⁺金标试纸条/纸条卡的性能测定

[0090] (1) Zn²⁺金标试纸条/卡的敏感度试验。用 Zn²⁺-Strip 测定浓度分别为 0、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320、640 μg/L 的 Zn²⁺标准品,每个浓度设 6 个重复。用读条仪读取 T 线扫描面积光密度的相对光密度值(G/D×A-ROD(pixel),式中 G 表示图表,D 表示光密度,A 表示扫描面积,D×A 为扫描面积的光密度,ROD 表示相对光密度值),以不同浓度标准品与空白标准品相对光密度值的百分率(G/D×A-ROD(pixel)%)为纵坐标,以不同标准品浓度的常用对数值为横坐标,在半对数坐标纸上绘制检测试纸的标准曲线,添加回归方程,进行相关回归分析。根据检测试纸的显色结果,取 80% 为机读敏感度,取 50% 为目测敏感度,确定 Zn²⁺-Strip 的检测限。Zn²⁺金标试纸的目测灵敏度为 5 μg/L,机读为灵敏度 1 μg/L。

[0091] 表 1 测定 Zn²⁺-Strip 敏感度试验(μg/L, n=6)

[0092]

Zn ²⁺ 浓度	0	1.25	2.5	5	10	16	20	40	80	160	320	640
结果	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0093] (2) Zn²⁺金标试纸条/卡的特异性试验。采用交叉反应试验,选择汞、钼、镉、铜、铅、等金属离子与 EDTA 的螯合物,以 ITCBE 为抑制物,用 Zn²⁺-Strip 测定终浓度分别为 0、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320、640 μg/L 重金属离子标准品,每个浓度设 6 个重复,以此判断其特异性。结果见表 2, Zn²⁺-Strip 与 Zn²⁺特异性结合,与其它重金属离子无交叉反

应。

[0094] 表 2 测定 Zn^{2+} -Strip 特异性试验(n=6)

[0095]

离子种类	离子浓度 ($\mu\text{g/L}$)											
	0	125	25	5	10	16	20	40	80	160	320	640
Zn^{2+} -EDTA	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ITCBE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DTPA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hg^{2+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mn^{6+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cd^{2+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cu^{2+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pb^{2+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cr^{3+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ca^{2+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fe^{2+} -EDTA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[0096] (3) Zn^{2+} 金标试纸条 / 卡的重复性试验。取不同批次的 6 批 Zn^{2+} 金标试纸, 分别 在第 1、7、14、28、56、112 天对 Zn^{2+} 浓度为 0、2、4、8 $\mu\text{g/L}$ 的土壤、自来水、猪肉等样品进行检 测, 每个浓度设 6 个重复, 检验其重复性。结果见表 3, 检测结果完全一致, 证明不同批次生 产的金标试纸检测结果稳定可靠, 具有良好的重复性。

[0097] 表 3 Zn^{2+} -Strip 重复性试验(n=6)

[0098] (4)

批次	锌离子浓度 (ng/mL)											
	土壤				自来水				猪肉			
	0	2	5	10	0	2	5	10	0	2	5	10
第 1 天	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+
第 7 天	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+
第 14 天	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+
第 28 天	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+
第 56 天	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+
第 112 天	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+

[0099] (5) Zn^{2+} 金标试纸条 / 试纸卡的保存期试验。保存期检验: 将不同批次的 Zn^{2+} 金 标试纸分别保存于普通冰箱(2~8 $^{\circ}\text{C}$)12 个月和室温干燥保存 6 个月, 研究不同保存时间 的检测结果, 确定其保存期。结果表明, Zn^{2+} 金标试纸在保存期内其外观、准确性、敏感性、 特异性等均未发生变化, 与新制备试纸的测试结果完全相同, 其有效期为 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 个月, 室温干燥条件下 6 个月。

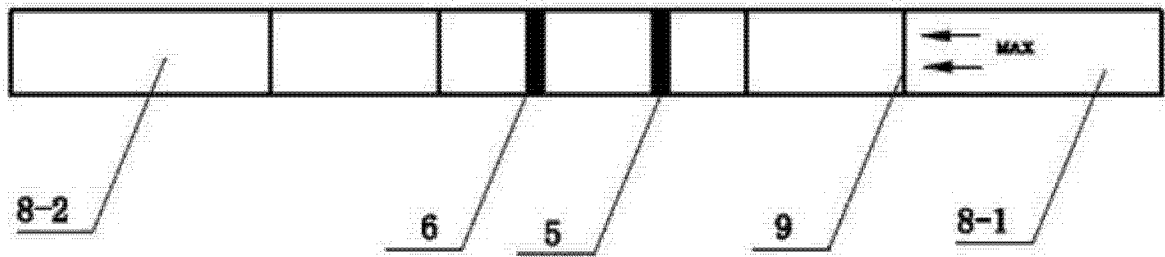


图 1

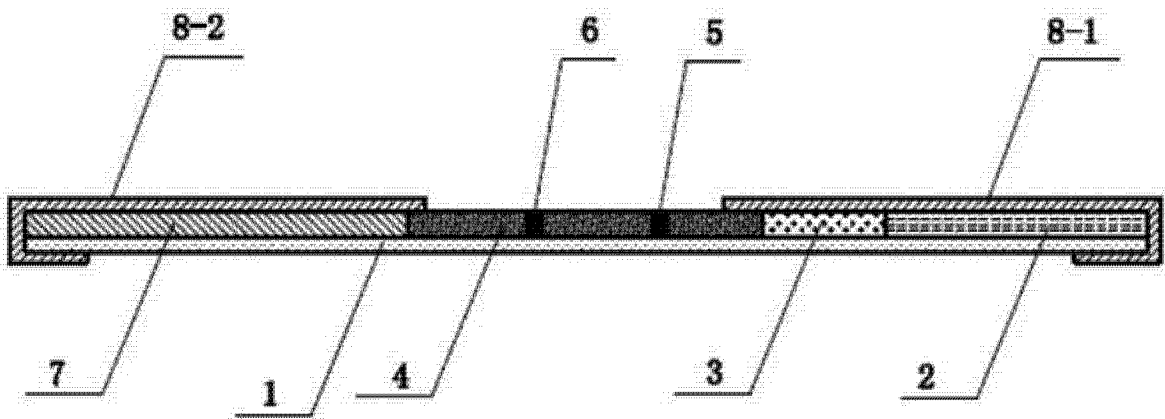


图 2

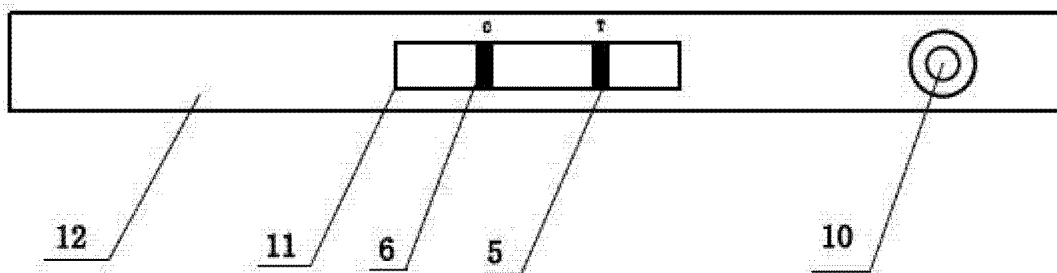


图 3

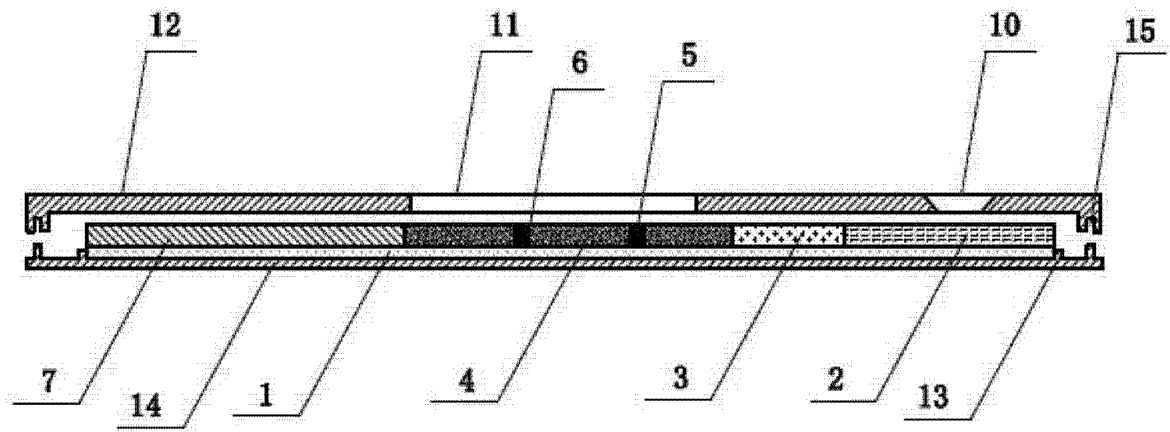


图 4

专利名称(译)	锌离子胶体金层析快速检测试纸条或试纸卡及制备方法		
公开(公告)号	CN103472232B	公开(公告)日	2015-09-23
申请号	CN201310449633.6	申请日	2013-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	王自良 王爱萍 范国英 张海棠 葛亚明 王顺岗 李艺 丁函		
发明人	王自良 王爱萍 范国英 张海棠 葛亚明 王顺岗 李艺 丁函		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	张爱军		
其他公开文献	CN103472232A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种锌离子胶体金层析快速检测试纸条或试纸卡及制备方法，试纸条结构包括支撑板、样品垫、金标抗体结合垫、包被膜和吸水垫，试纸条两端设有保护膜，所述样品垫、金标抗体结合垫、包被膜、吸水垫依次粘贴于支撑板上；金标抗体结合垫上包被有胶体金标记的能识别锌离子的单克隆抗体或多克隆抗体；包被膜上设有偶联锌离子的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹，以及用羊抗小鼠IgG溶液印制的隐形对照印迹。本发明的胶体金层析检测试纸条或试纸卡特异性强、灵敏度高、使用便捷、快速、时效性强；结果显示形象、直观、准确、节省费用，适用范围广，便于推广应用。

