



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808932 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201210438092. 2

(22) 申请日 2012. 11. 06

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 齐加也

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

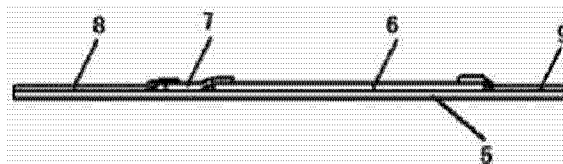
权利要求书2页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

马杜霉素胶体金检测卡

(57) 摘要

本发明涉及马杜霉素胶体金检测卡。该方法在试纸的背衬上依次粘贴有样液吸收部分、胶体金标记部分、检测反应部分及吸水部分。检测反应部分上面包被有检测用抗原 1 条作为检测线,同时还包被有抗第二种属动物蛋白的 IgG1 条作为参照线。该快速检测试纸条特异性强,能够半定量检测,环境温度为 4-40℃ 都可以使用,适合于个体养殖户、食品卫生质检部门、海关等动物源食品进行大观霉素残留的快速检测。本发明具有特异性强、灵敏性高、能够实现半定量检测,且操作简单方便等有益效果。



1. 一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡,其包括试纸条,所述试纸条封装于检测卡壳体中,所述检测卡壳体上开有加样孔和观测孔,所述试纸条包括底板,其特征在于:所述试纸条的底板上一次设置有吸水纸、硝酸纤维素膜两端,在所述硝酸纤维素的两端结合处,所述吸水纸和金标垫的一小段重叠压在所述硝酸纤维素膜上,所述样品垫设置在所述金标垫的另一端,所述样品垫的一小段重叠在所述金标垫上;所述金标垫上喷涂有金标抗马杜霉素单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上依次喷涂有材质为马杜霉素抗原的检测限、材质为羊抗鼠 IgG 的质控线。

2. 根据权利要求 1 所述一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡,其特征在于:所述样品垫位置正对加样孔;所述硝酸纤维素膜位置正对所述观测孔。

3. 一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

(1) 用免疫原免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞,筛选能够稳定分泌抗马杜霉素单克隆抗体细胞株,制备抗马杜霉素单克隆抗体;

(2) 制备胶体金溶液;

(3) 用制备好的胶体金溶液标记抗马杜霉素单克隆抗体;

(4) 用制备好的抗原以及羊抗鼠 IgG 处理硝酸纤维素膜;

(5) 用制备好的金标抗马杜霉素单克隆抗体处理金标垫;

(6) 组装金标试纸条。

4. 根据权利要求 2 所述一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其特征在于:所述胶体金溶液的制备,用新制双蒸水配制 0.01%~0.1% 氯金酸溶液,置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至 100°C ~120°C,在 100 rpm~200 rpm 磁力搅拌下,迅速加入预先在 35°C ~45°C 保温的 1%~3% 柠檬酸三钠溶液,保持温度和转速不变,继续搅拌加热 15 分钟~30 分钟左右,直至溶液呈现清亮的酒红色;室温冷却,2°C ~8°C 冰箱保存备用;上述成分的比例为:氯金酸:柠檬酸三钠=(10~1000) mL:(1~20) mL

根据权利要求 2 所述一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其特征在于:所述胶体金标记抗马杜霉素单克隆抗体的制备,取胶体金溶液与离心管中,用 0.1 M~1.0 M HCl 调节 pH 至 7~8 左右,用铝箔纸包住离心管,轻轻振荡;边振荡边逐滴加入抗体蛋白溶液,继续振荡 10 分钟~30 分钟;离心后取出离心管,将上清液轻轻吸掉一部分后,用移液枪将管底沉淀小心吸至离心管中,2°C ~8°C 保存备用;上述成分的比例为:胶体金溶液:抗体蛋白:BSA=(10~1000) mL:(50~5000) μg:(1~100) mL。

5. 根据权利要求 2 所述一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其特征在于:所述硝酸纤维素膜的处理,用金标点样仪喷涂两条平行线于硝酸纤维素膜上,马杜霉素抗原作为检测线,羊抗鼠 IgG 作为质控线,置 35 °C ~45°C 真空干燥后备用;所述金标垫的处理:将一定量金标抗马杜霉素单克隆抗体均匀喷涂于金标垫上,置 35°C ~45°C 真空干燥后备用。

6. 根据权利要求 2 所述一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其特征在于:所述金标试纸条的组装,取制作试纸条专用的底板,先将干燥好的硝酸纤维素膜粘贴在相应位置,再将吸水纸和干燥好的金标垫粘贴在相应位置并稍微压住硝酸纤维素膜,最后将样品垫粘好并压住金标垫,用切条机切割成 3 mm 宽的试纸条装入检测卡中,此时,样品

垫的位置正对检测卡的加样孔、硝酸纤维素膜位置正对检测卡的观测孔,与干燥剂一起装入铝箔袋中,密封包装。

马杜霉素胶体金检测卡

技术领域

[0001] 属于食品安全检测领域,具体涉及食品中有害残留物的检测方法,特别是马杜霉素试纸检测方法。

背景技术

[0002] 马杜霉素 英文名称 Maduramicin, 又名马度米星, 是一种较新型的聚醚类一价单糖苷离子载体抗生素,本品抗球虫谱广对子孢子和第一代裂殖体均有抗球虫活性。本品能有效控制 6 种常见的鸡球虫,对鸭球虫病也有良好的预防效果。混饲,每 1000 kg 饲料 5 ~ 10 g 马杜霉素由美国氰胺公司于 20 世纪 80 年代开发,1992 年我国开发成功并大批量生产,由于价格较低,对球虫病具有良好的预防和治疗作用,使马杜霉素在临床得到广泛的应用。但该药毒性较大,安全范围窄,使用剂量非常接近鸡的中毒量,超量使用易引起禽中毒。家禽马杜霉素中毒一般为急性过程。急性死亡(1 ~ 2 d 内死亡)的动物一般会出现典型的中毒症状:东走西窜、站立不安、兴奋亢进等神经症状,或水样腹泻、腿软、行走及站立不稳。严重者两腿麻痹,昏睡直至死亡。亚慢性中毒表现为减食甚至食欲废绝,迅速消瘦,粪便呈现色泽变化,从青灰、浅绿、绿色至胆绿色,出现率约 20% 左右。家禽精神不振、蹲伏驱赶不动,甚至两脚瘫痪、驱赶时跗关节着地,两翅拍动、无力站立,甚至死亡。在临床应用时常因使用不当,造成家禽中毒,经济损失较大。Ft%HWGE

目前,现有的技术对于马杜霉素的检测主要依赖于色谱和质谱技术,也有酶联免疫检测试剂盒,但是还没有马杜霉素的检测卡出现。

发明内容

[0003] 针对上述问题,本发明提供了一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡,能够满足现场快速检测的需要,检测快速,携带方便,操作简单,无需特殊设备和仪器,为此本发明者还提供了快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其制备工艺简单,成本低。一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡,其包括试纸条,所述试纸条封装于检测卡壳体中,所述检测卡壳体上开有加样孔和观测孔,所述试纸条包括底板,其特征在于:所述试纸条的底板上依次粘贴有吸水纸、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫,所述吸水纸和所述金标垫分别粘贴在所述硝酸纤维素膜两端,在所述硝酸纤维素膜的两端结合处,所述吸水纸和金标垫的一小段重叠压在所述硝酸纤维素膜上,所述样品垫粘贴在所述金标垫的另一端,所述样品垫的一小段重叠在所述金标垫上;所述金标垫上喷涂有金标抗马杜霉素单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上依次喷涂有材质为马杜霉素抗原的检测线、材质为羊抗鼠 IgG 的质控线。

[0004] 其进一步特征在于:所述样品垫位置正对所述加样孔,所述硝酸纤维素膜位置正对所述观测孔。

[0005] 一种快速检测马杜霉素的胶体金试纸条的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

- (1) 用免疫原免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞杂交融合,制备杂交瘤细胞,筛选能

够稳定分泌抗马杜霉素单克隆抗体的细胞株,制备抗马杜霉素单克隆抗体;

- (2) 制备胶体金溶液;
- (3) 用制备好的胶体金溶液标记抗马杜霉素单克隆抗体;
- (4) 用制备好的包被抗原以及羊抗鼠 IgG 处理硝酸纤维素膜;
- (5) 用制备好的金标抗三聚氰胺单克隆抗体处理金标垫;
- (6) 组装金标试纸条。

样品处理方法是:称取试样 2 ± 0.05 g于50 mL的离心管中,加入10 mL超纯水,在1800 r/min条件下用高速组织粉碎机打碎(约1 min),取粘稠液加50%三氯乙酸2 mL和二氯甲烷10 mL,在回旋式振荡器上高速振摇30 min。然后在4℃ 5000 rpm条件下离心30 min,取上清10 mL,加二氯甲烷2 mL,在回旋加速器上振荡混合20 min,再在4℃ 12000 rpm条件下离心30 min,上清液即为药物的抽提液。

[0006] 本发明的优点是能快速检测出饲料、肌肉、组织中含有的马杜霉素,且节省检测成本,使用方便,检测快速,灵敏度高,结果准确。

附图说明

[0007] 图1是马杜霉素检测卡外壳及检测试纸条在外壳内的安置图。

[0008] 图2是马杜霉素检测卡检测试纸条结构示意图。

[0009] 图3是检测试纸条硝酸纤维素膜上显示印迹带示意图。

具体实施方式

[0010] 1. 标记胶体金的制备:所述一种快速检测马杜霉素的胶体金检测卡的制备方法,其特这在于:所述胶体金溶液的制备,用新制双蒸水配制0.01%~0.1%氯金酸溶液,置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至100℃~120℃,在100 rpm~200 rpm磁力搅拌下,迅速加入预先在35℃~45℃保温的1%~3%柠檬酸三钠溶液,保持温度和转速不变,继续搅拌加热15分钟~30分钟左右,直至溶液呈现清亮的酒红色;室温冷却,2℃~8℃冰箱保存备用;上述成分的比例为:氯金酸:柠檬酸三钠=(10~1000) ml:(1~20) ml

抗体标记:确定抗体所需的0.1 mol/L K_2CO_3 的比例,取100 mL胶体金溶液,加入此比例0.1 mol/L的 K_2CO_3 ,混匀(约5 min),再将马杜霉素和第二种属动物蛋白分别用PBS(0.01 mol/L, pH7.4)溶解稀释至2 mg/mL,加入2 mL 2 mg/mL的马杜霉素抗体(或2 mL 2 mg/mL第二种属动物蛋白),混匀(5 min),最后加入10% BSA 2 mL,混匀(5 min)。离心三次留沉淀,此三次收集的沉淀即为金标马杜霉素抗体。

[0011] 胶体金标记部分处理:将马杜霉素抗体稀释后,按一定比例将载体(如玻璃纤维、聚酯膜等)浸透,铺均匀,取出放于37℃恒温烘箱烘制8-12 h,干燥后即作为胶体金标记部分。

[0012] 2. 免疫层析专用高分子复合膜制备

首先用一种硝酸纤维素膜制成透明背衬膜,在背衬膜上覆盖一层对蛋白质结合力强,浸润性能好的具有一定孔径的层析膜。背衬膜的作用是阻止粘合剂中的有机溶剂对层析膜上蛋白质的破坏。

[0013] 3. 层析膜的点样方法

将一定浓度的马杜霉素抗原(马杜霉素与载体物质形成的偶合物)精确定量;以一定间距(5 mm)呈横条状点定于层析膜上,供检测用。

[0014] 马杜霉素检测卡是在检测卡外壳1中设置检测试纸条2,检测卡外壳1的结构及检测试纸条2的设置见附图1,检测卡外壳1为长条扁平薄壳状外壳,长70 mm,宽20 mm,厚5 mm,薄壳壁厚1 mm,由工程塑料制成,检测卡外壳1由上盖和下盖两半联接而成,在检测卡外壳1上盖上有检测窗孔3和加样孔4。检测试纸条2放置在检测卡外壳1的下盖内;检测试纸条2是多层结构的窄条薄片,片长60 mm,片宽约4 mm,厚度小于2.5 mm。检测试纸条2是多层结构:底层是支承背板5,为聚乙烯薄片,厚度约0.5 mm,长60 mm,宽4 mm;支承背板5中部粘贴硝酸纤维素膜6,硝酸纤维素膜厚0.5 mm,长20 mm,宽4 mm。硝酸纤维素膜6上有两条间隔开的横向显示印迹带,参见附图3,两条显示印迹中,一条是检测线10,含马杜霉素偶联物,另一条是参照线11,含第二种属动物蛋白的IgG。支承背板5一端上粘贴吸水纸9,另一端粘贴样品垫8,吸水纸9内端与硝酸纤维素膜6搭接,样品垫8与硝酸纤维素膜6之间则有一段金标垫7,由金标垫7将样品垫8与硝酸纤维素膜6连接在一起,搭接宽度在1-2 mm。样品垫8材料为吸水玻璃纤维或聚酯膜。

[0015] 使用马杜霉素胶体金检测卡时,先将待检测的样品液(药物的抽提液稀释后,直接用于检测)从加样孔4中滴入马杜霉素检测试纸条2的样品垫8,由于层析原理,带动待检测的样品液及胶体金膜7所含的抗马杜霉素单克隆抗体·1胶体金标记物一起向硝酸纤维素膜6扩散,5-10分钟内观察结果。

[0016] 检测卡的主要反应是免疫学的抗原和抗体反应,在硝酸纤维素膜上迁移的胶体金标记的抗体,在测试线上与含有马杜霉素蛋白质偶联物,以及参照线含第二种属动物蛋白的IgG反应,形成棕红色条带。若样品中相应的待测马杜霉素高于允许值,样品加入后先与金标垫中的抗体反应,而不会与检测带所带有的马杜霉素蛋白质偶联物反应,从而不显色。主要有以下3种检测结果:

1. 检测线10和参照线11同时显现棕红色印迹,表示检测结果为阴性,说明被测样品中不含马杜霉素或含量低于允许值。

[0017] 2. 检测线10不显色,参照线11显现棕红色印迹,表示检测结果为阳性,说明被测样品中马杜霉素含量高于允许值。

[0018] 3. 检测线10显现棕红色印迹,参照线11不显色,或检测线10和参照线11均不显色,表示检测试纸条失效。

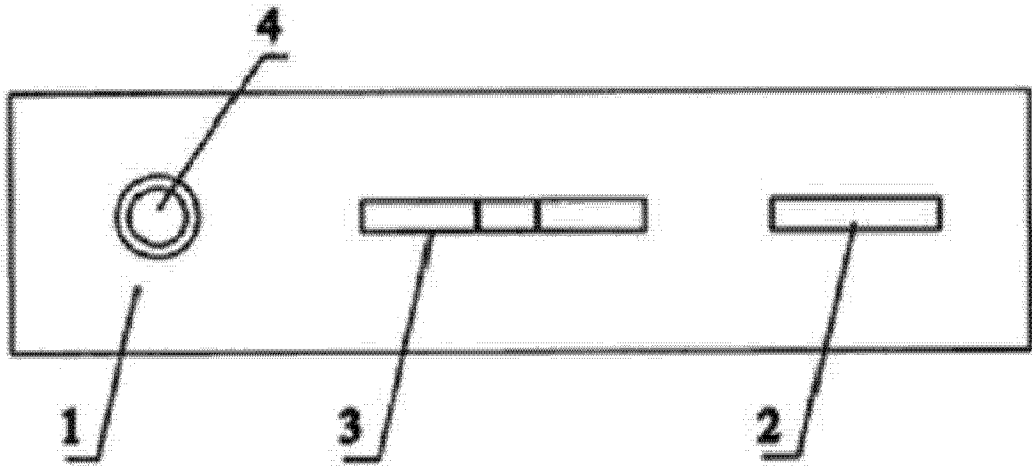


图 1

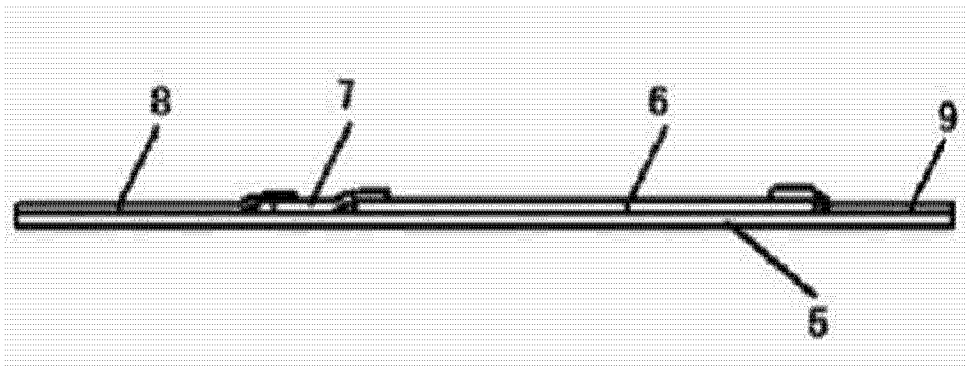


图 2

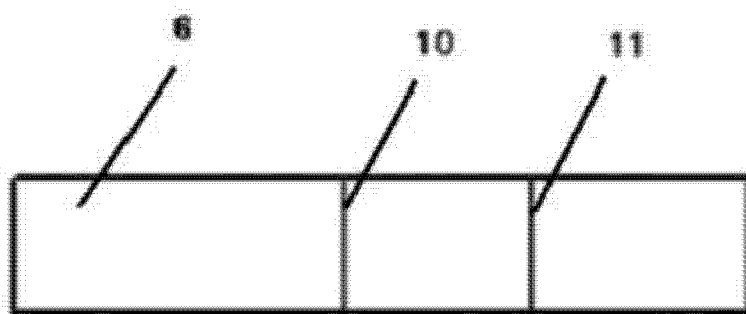


图 3

专利名称(译)	马杜霉素胶体金检测卡		
公开(公告)号	CN103808932A	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201210438092.2	申请日	2012-11-06
[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	杜道林 齐加也		
发明人	杜道林 齐加也		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54386		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及马杜霉素胶体金检测卡。该方法在试纸的背衬上依次粘贴有样液吸收部分、胶体金标记部分、检测反应部分及吸水部分。检测反应部分上面包被有检测用抗原1条作为检测线，同时还包被有抗第二种属动物蛋白的IgG1条作为参照线。该快速检测试纸条特异性强，能够半定量检测，环境温度为4-40℃都可以使用，适合于个体养殖户、食品卫生质检部门、海关等动物源食品进行大观霉素残留的快速检测。本发明具有特异性强、灵敏度高、能够实现半定量检测，且操作简单方便等有益效果。

