



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106872691 B

(45)授权公告日 2018.11.30

(21)申请号 201710049196.7

(22)申请日 2017.01.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106872691 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(73)专利权人 云南双鱼贝贝健康管理有限公司

地址 653100 云南省玉溪市高新区抚仙路  
86号C幢101室

(72)发明人 杨绍元 杨少琼

(74)专利代理机构 江苏爱信律师事务所 32241

代理人 赵赞赞

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

CN 103713132 A,2014.04.09,说明书第  
0006-0012段,附图1.

CN 102230936 A,2011.11.02,说明书第  
0007-0060段,附图1.

CN 204374218 U,2015.06.03,说明书第  
0010-0014段,附图1.

赵霞等.以烟草花叶病毒为半抗原载体的活  
体免疫反应.《应用化学》.2015,第32卷(第10  
期),第1107-1112页.

yu dong shen等.design and efficient  
synthesis of novel haptens and complete  
antigens for the AOZ,a toxic metabolite  
of furazolidone.《Chinese chemical  
letters》.2007,第18卷(第12期),第1490-1492  
页.

审查员 陈伟潘

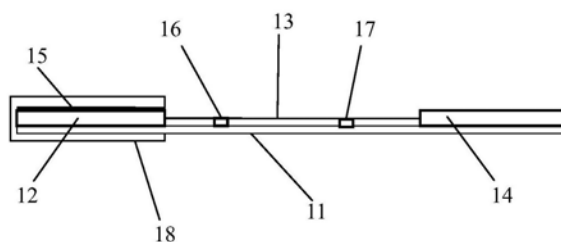
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

一种大观霉素胶体金检测试剂盒

### (57)摘要

本发明公开了一种大观霉素胶体金检测试剂盒及其应用,属于生物工程技术领域,包括试剂盒盒体,在所述盒体内设有样品稀释液、一次性吸管及检测试纸条;其中,所述检测试纸条包括底板、吸收垫、反应膜、吸水垫和保护套;所述检测试纸条上反应膜上设置有NC膜检测线和质控线;所述吸收垫内含有冻干大观霉素特异性抗体-胶体金标记物。本发明提供的大观霉素胶体金检测试剂盒,是利用胶体金进行抗生素残留有效的检测产品,与现有技术相比,具有检测快速、准确、便捷的有点,而且成本较低,便于操作,非常适合畜牧产品的快速检测,是一种十分理想的大观霉素残留检测试剂盒。



1. 一种大观霉素胶体金检测试剂盒, 包括试剂盒盒体, 其特征在于: 在所述盒体内设有样品稀释液、一次性吸管及检测试纸条;

其中, 所述检测试纸条包括底板、吸收垫、反应膜、吸水垫和保护套; 所述吸收垫和吸水垫位于底板两端, 保护套设置在吸收垫上;

其中, 所述检测试纸条上反应膜上设置有NC膜检测线和质控线;

其中, 所述NC膜检测线包被有大观霉素-BSA偶联物; 所述质控线包被有大观霉素抗体, 所述大观霉素-BSA偶联物由大观霉素抗原与BSA偶联得到, 所述大观霉素抗原由大观霉素的四氢呋喃溶液与马来酸酐在DMAP固体催化剂反应下得到;

其中, 所述吸收垫内含有冻干大观霉素特异性抗体-胶体金标记物, 所述大观霉素特异性抗体由大观霉素-BSA偶联物作为免疫原免疫的得到;

其中, 所述胶体金为40nm胶体金。

2. 根据权利要求1所述的大观霉素胶体金检测试剂盒, 其特征在于: 所述稀释液为pH7.2、0.2mol/L的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的大观霉素胶体金检测试剂盒, 其特征在于: 所述试纸条上的吸收垫上还设有保护膜。

4. 根据权利要求1所述的大观霉素胶体金检测试剂盒, 其特征在于: 所述NC膜检测线距离吸收垫5-11mm, 所述质控线距离吸收垫12-16mm。

5. 根据权利要求1所述的大观霉素胶体金检测试剂盒, 其特征在于: 所述40nm胶体金的制备工艺为: 99单位体积的超纯水在700r/min搅拌速度下加热沸腾, 加入1单位体积的1%柠檬酸三钠溶液, 加热保持170s, 然后加入1单位体积的0.1%氯金酸, 反应15min后, 直接收集, 自然冷却。

## 一种大观霉素胶体金检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,涉及胶体金标记检测技术,具体涉及一种大观霉素胶体金检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 大观霉素又称壮观霉素、奇放线菌素、壮观菌素等,是链霉素所产生的一种由中性糖和氨基环醇一苷键结合而成的氨基环醇类抗生素,主要通过作用于细菌核糖体30s亚基来抑制其蛋白质的合成,对革兰阴性菌(如大肠埃希菌、沙门菌、布鲁菌、变形菌、铜绿假单胞菌、巴氏杆菌等)有较强作用,对革兰阳性菌和支原体亦有一定作用。

[0003] 大观霉素作为一种专治淋病的抗生素,其对于家畜生长具有促进作用,现在已广泛用于动物饲料领域,常作为饲料添加剂使用。但是,由于我国目前饲料行业对于添加剂使用的极不透明,加入监管部门的监管不力,导致饲料行业存在多种抗生素滥用的行为,导致畜牧产品大量抗生素残留,被人体摄入之后,人体内细菌产生抗性,对人们的身体健康造成严重威胁。我国兽药典兽药使用指南(化学药品卷,2005版)及美国FDA均规定本品在牛、羊、猪、鸡等食用组织中最高允许残留量分别为:肌肉:500 $\mu$ g/kg;脂肪、肝:2000 $\mu$ g/kg和肾:5000 $\mu$ g/kg。

[0004] 目前,对于大观霉素的检测,有理化方法和生物学方法;其中,有研究人员已经研究出反相色谱测定法,但是存在成本高,对于设备要求严格的特点,不利于快速检测;生物学方法中酶联免疫法相关技术也已经公开,测定的结果较为精确,但是同样不能快速检测,而且成本也相对较高;胶体金测定法是目前较为理想的快速测定方法,但是目前仍存在检测不精确的特点,一方面是研究人员对于胶体金与特异性抗体结合之问题,另一方面是外界环境对于检测的影响。

[0005] 公开号为CN 103808939A专利文献,公开了一种“大观霉素胶体金检测卡”,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 $^{\circ}$ C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。

[0006] 通过以上技术方案可知,这也是通过胶体金标记大观霉素特异性抗体进行检测的方法,该方案虽然可以进行检测,但是存在两个问题:第一,检测卡容易受到外界因素的干扰;第二,检测结果并不精确,实际并不能做到半定量检测。

### 发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于:现有大观霉素胶体金标记检测方法检测结果灵敏度不高、准确性较差的问题,本发明提供一种大观霉素胶体金检测试剂盒。

[0008] 技术方案:

[0009] 一种大观霉素胶体金检测试剂盒,包括试剂盒盒体,在所述盒体内设有样品稀释液、一次性吸管及检测试纸条;

[0010] 其中,所述检测试纸条包括底板、吸收垫、反应膜、吸水垫和保护套;所述吸收垫和吸水垫位于底板两端,保护套设置在吸收垫上,不仅可以降低外界的干扰,也便于试纸条的抽取;

[0011] 其中,所述检测试纸条上反应膜上设置有NC膜检测线和质控线,用于检测分析;

[0012] 其中,所述NC膜检测线包被有大观霉素-BSA偶联物;所述质控线包被有大观霉素抗抗体;

[0013] 其中,所述吸收垫内含有冻干大观霉素特异性抗体-胶体金标记物,将大观霉素特异性抗体-胶体金标记物冻干于吸收垫内,不仅能够方便快捷,而且也利于样品内大观霉素与大胶体金标记的大观霉素特异性抗体结合,以提高检测结果的精确性;

[0014] 其中,所述胶体金为40nm胶体金,40nm胶体金对于大观霉素特异性抗体的结合性能更为理想,对于样品中大观霉素的吸收更为有效;

[0015] 作为优选,所述40nm胶体金的制备工艺为,取99单位体积的超纯水在700r/min搅拌速度下加热沸腾,加入1单位体积的1%柠檬酸三钠溶液,继续加热保持170s,然后加入1单位体积的0.1%氯金酸,反应15min后,直接收集,自然冷却;制备得到的40nm胶体金清亮透明,颜色为酒红色,颗粒大小均匀,无聚集现象;

[0016] 作为优选,所述稀释液为pH7.2、0.2mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0017] 作为优选,所述试纸条上的吸收垫上还设有保护膜,用于保护吸收垫,使用时可取下;

[0018] 作为优选,所述NC膜检测线距离吸收垫5-11mm,所述质控线距离吸收垫12-16mm,以利于检测结果的准确性分析。

[0019] 作为优选,所述大观霉素-BSA偶联物由大观霉素抗原与BSA偶联得到。

[0020] 作为优选,所述大观霉素抗原由大观霉素的四氢呋喃溶液与马来酸酐在DMAP固体催化反应下得到。

[0021] 有益效果:

[0022] 本发明的检测原理:本发明大观霉素胶体金检测试剂盒采用了竞争抑制免疫层析的原理,样品中的大观霉素在流动的过程中与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合,抑制抗体和NC膜检测线上的大观霉素-BSA偶联物结合,从而导致检测线颜色深浅的变化。利用NC膜检测线和质控线的颜色变化,来快速测定大观霉素的残留。

[0023] 本发明提供的大观霉素胶体金检测试剂盒,是利用胶体金进行抗生素残留有效的检测产品,与现有技术相比,具有检测快速、准确、便捷的有点,而且成本较低,便于操作,非常适合畜牧产品的快速检测,是一种十分理想的大观霉素残留检测试剂盒。

## 附图说明

[0024] 图1为本发明大观霉素胶体金检测试剂盒中试纸条的结构示意图。

[0025] 图中:11、底板;12、吸收垫;13、反应膜;14、吸水垫;15、保护膜;16、NC膜检测线;17、质控线;18、保护套。

[0026] 图2为本发明大观霉素胶体金检测试剂盒中试纸条的俯视结构示意图。

[0027] 图中:1、试纸条。

[0028] 图3为本发明大观霉素胶体金检测试剂盒中试纸条的检测结果示意图。

### 具体实施方式

[0029] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0030] 本发明一种大观霉素胶体金检测试剂盒,包括试剂盒盒体,在所述盒体内设有样品稀释液、一次性吸管及检测试纸条1;

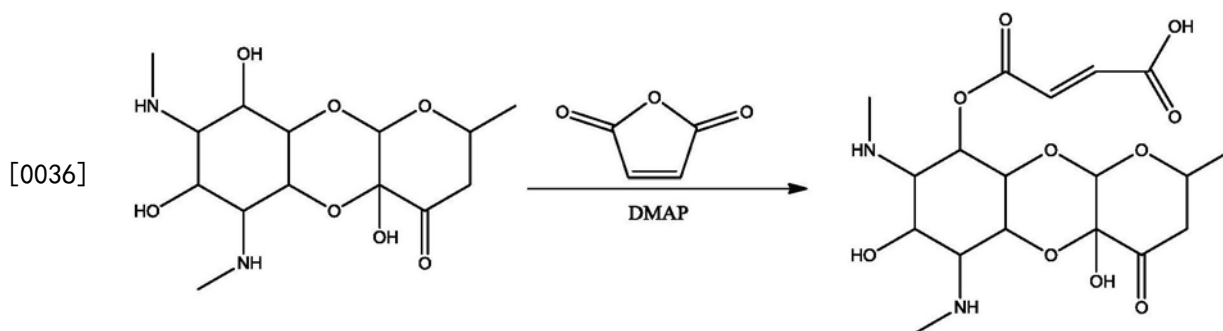
[0031] 其中,所述检测试纸条1,如图1和图2所示,包括底板11、吸收垫12、反应膜13、吸水垫14和保护套15,吸收垫12和吸水垫14位于底板11两端,所述吸收垫12为多层吸滤纸,吸水垫14为吸水纸;反应膜13为硝酸纤维素膜,位于吸收垫12和吸水垫14位于底板11两端之间,在反应膜13上设置有NC膜检测线16(T线)和质控线17(C线);所述NC膜检测线16距离吸收垫12的距离为7mm,所述质控线17距离吸收垫12的距离为15mm,

[0032] 其中,所述保护套18为方形盒体,套在吸收垫12上;

[0033] 其中,所述NC膜检测线16包被有大观霉素-BSA偶联物;大观霉素-BSA偶联物由大观霉素半抗原与BSA偶联得到;大观霉素半抗原是通过由大观霉素的四氢呋喃溶液与马来酸酐在DMAP固体催化反应下得到;

[0034] 一、制备大观霉素抗原及大观霉素-BSA偶联物

[0035] 称取1.6g大观霉素溶于经干燥后的四氢呋喃中,通氮气保护,加入0.85g马来酸酐在室温下搅拌溶解,加入0.15g DMAP固体进行催化反应,用TLC薄层板(德国默克,产品货号:1.05735.0001)监测反应进行,待原料点很浅或没有原料,停止反应;利用硅胶柱净化,浓缩得产物,即制备得到大观霉素抗原,合成线路如下:



[0037] 将大观霉素抗原溶解之后,加入到牛血清白蛋白(BSA)水溶液中,磁力搅拌器搅拌反应,透析除去未反应的小分子物质,离心收集上清液,分装,低温保存备用;

[0038] 所述质控线17包被有大观霉素抗体;

[0039] 二、制备大观霉素抗体

[0040] 首先,通过动物免疫法将上述制备的大观霉素-BSA偶联物注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 $\mu$ g/只,使其产生抗血清;其次,取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按9:1的比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选得到稳定分泌大观霉素单克隆抗体的大观霉素单克隆杂交瘤细胞株;第三,将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^9$ 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存;复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;第

四,增量培养:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体-20℃保存。

[0041] 所述细胞培养基为向RPMI-1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20% (质量百分含量),使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2% (质量百分含量);所述细胞培养基的pH7.4。

[0042] 其中,作为优选,所述大观霉素抗抗体为羊抗鼠抗抗体,以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;

[0043] 其中,所述吸收垫12内含有冻干大观霉素特异性抗体-胶体金标记物,其中,所述胶体金为40nm胶体金;

[0044] 本实施例大观霉素特异性抗体选用单克隆抗体,同理适用于多克隆抗体。

[0045] 三、制备胶体金及大观霉素特异性抗体-胶体金标记物

[0046] (1) 胶体金的制备

[0047] 取99mL超纯水加入到平底双劲烧瓶中,利用加热磁力搅拌器,在700r/min的搅拌速度下加热至沸腾,加入1mL的1%柠檬酸三钠溶液,继续加热并保持170s,然后加入1mL的0.1%氯金酸(购于sigma公司,产品目录号T09041),反应15min后,直接收集,自然冷却,制备得到的40nm胶体金清亮透明,颜色为酒红色,颗粒大小均匀,无漂浮物、无聚集现象;

[0048] (2) 大观霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0049] 去100mL胶体金溶液,在磁力搅拌下,加入0.2mol/L碳酸钾调节胶体金的pH值至7.0,向胶体金溶液中加入12-15mg大观霉素单克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10% BSA,至BSA体积浓度为1%后,静置30min;12000rpm、4℃离心30min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积10mL的复溶缓冲液将沉淀重悬,得到的大观霉素单克隆抗体-胶体金标记物溶液的浓度为50μg单抗/mL溶液,置4℃备用;

[0050] 其中,所述复溶缓冲液:含酪蛋白、吐温-80的0.02mol/L、pH7.2的磷酸盐溶液,其中酪蛋白在复溶缓冲液中的终浓度为0.05%-0.1% (体积百分含量),吐温-80在复溶缓冲液中的终浓度为0.05%-0.15% (质量百分含量)。

[0051] 四、大观霉素单克隆抗体-胶体金标记物冻干处理

[0052] 取100μL大观霉素单克隆抗体-胶体金标记物滴加至吸收垫12上(可根据吸收垫大小选择不同的加入量,本实施例加入100μL)放入冷冻干燥机中,冻干处理后取出,将样品吸收垫置于BSA-磷酸盐缓冲液在4℃下浸泡2h,滴干后,装载在试纸条底板对应的位置;

[0053] 其中,所述BSA-磷酸盐缓冲液,为BSA终浓度为0.5% vol和pH7.2、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0054] 五、大观霉素胶体金检测试剂盒检测分析

[0055] (1) 试纸条的灵敏度

[0056] 将大观霉素标准品(德国Dr)稀释成如下不同浓度:5μg/L、25μg/L、50μg/L、100μg/L;所用的稀释液为pH7.2、0.2mol/L的磷酸盐缓冲液;

[0057] 分别取4试纸条进行检测,将保护套和保护膜取下,用一次性吸管取大观霉素标准品稀释液滴加至试纸条吸收垫末端,滴加3至4滴,液体流动时开始计时,反应5~10min,根据示意图判定结果,结果如下:

[0058] 滴加5μg/L大观霉素标准品稀释液,试纸条上显示出肉眼可见的两条红色条线,呈

阴性;

[0059] 滴加25 $\mu$ g/L大观霉素标准品稀释液,试纸条质控线(C)显色,NC膜检测线(T)不显色,呈阳性;

[0060] 滴加50 $\mu$ g/L大观霉素标准品稀释液,试纸条质控线(C)显色,NC膜检测线(T)不显色,呈阳性;

[0061] 滴加100 $\mu$ g/L大观霉素标准品稀释液,试纸条质控线(C)显色,NC膜检测线(T)不显色,呈阳性;

[0062] 本试纸条对大观霉素测灵敏度为:25 $\mu$ g/L。

[0063] (2) 特异性试验

[0064] 特异性是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。

[0065] 本试纸条对大观霉素检测灵敏度为25 $\mu$ g/L,将牛奶中常检的其他药物(新霉素、链霉素、庆大霉素、安普霉素、卡那霉素)用pH7.2、0.2mol/L的磷酸盐缓冲液进行稀释,用本实施例中所述的试纸条进行检测,结果显示新霉素、链霉素、庆大霉素、安普霉素、卡那霉素在200 $\mu$ g/L浓度时,试纸条质控线17和NC膜检测线16均显色,可以得出本实施例的试纸条1未对这些药物发生交叉反应。

[0066] (3) 大观霉素胶体金检测试剂盒检测的应用

[0067] 移取牛奶液100 $\mu$ L与100 $\mu$ L样品稀释液混匀,取出试纸条1,取下保护套18及保护膜15,用一次性吸管吸取稀释后的样品溶液滴加3~4滴于试纸条1上的吸收垫12上,液体流动时开始计时,反应8min,根据图3所示示意图判定结果;

[0068] 阳性:当质控线(C)显示一条红色条带,NC膜检测线(T)不显色,判为阳性;

[0069] 阴性:当质控线(C)显示一条红色条带,NC膜检测线(T)同时也显示出一条红色条带,判为阴性;

[0070] 无效:当质控线(C)不显示出红色条带,则无论NC膜检测线(T)显示出红色条带与否,该试纸均判为无效。

[0071] (4) 假阴性率测定

[0072] 取经过气相色谱法确证的阴性牛奶样品100份,编号为1#-100#,按规定的检测限浓度添加大观霉素,将样品用本发明试纸条进行检测,计算其假阴性率。

[0073] 结果显示:在100份阳性牛奶样品的测定中,试剂盒检测出的阴性样品为0份,假阴性率为0,本发明的大观霉素胶体金检测试剂盒可以对大观霉素残留进行快速精确的检测。

[0074] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

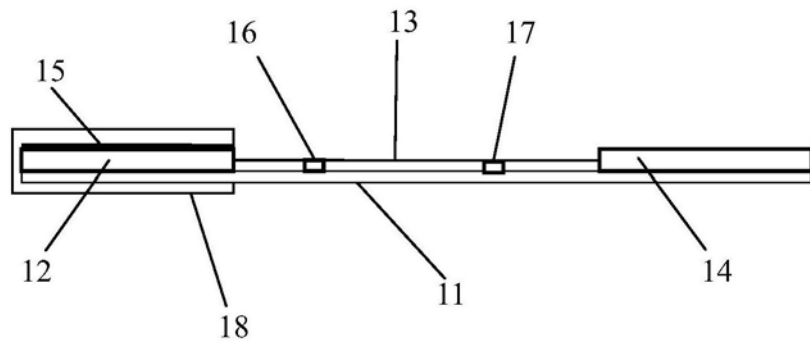


图1

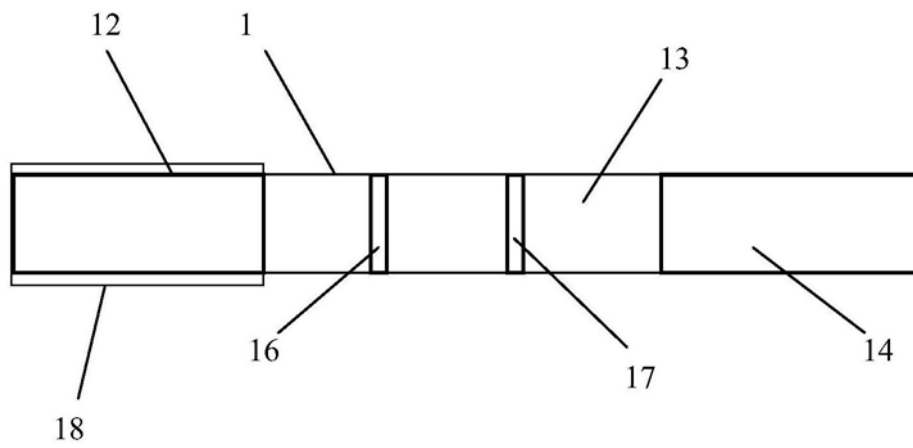


图2

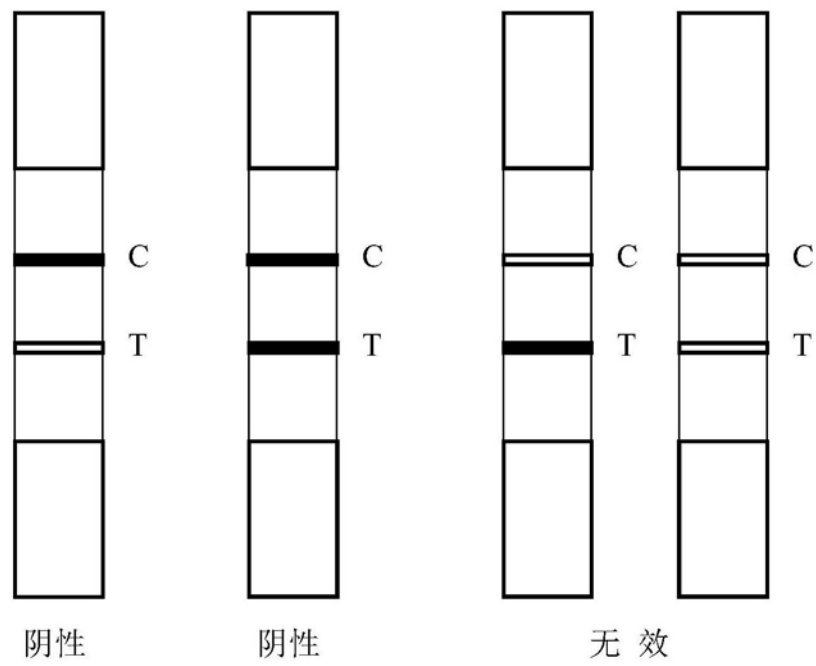


图3

|         |                                                |         |            |
|---------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种大观霉素胶体金检测试剂盒                                 |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN106872691B</a>                   | 公开(公告)日 | 2018-11-30 |
| 申请号     | CN201710049196.7                               | 申请日     | 2017-01-23 |
| [标]发明人  | 杨绍元<br>杨少琼                                     |         |            |
| 发明人     | 杨绍元<br>杨少琼                                     |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543               |         |            |
| CPC分类号  | G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/558             |         |            |
| 代理人(译)  | 赵赞赞                                            |         |            |
| 其他公开文献  | CN106872691A                                   |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种大观霉素胶体金检测试剂盒及其应用，属于生物工程技术领域，包括试剂盒盒体，在所述盒体内设有样品稀释液、一次性吸管及检测试纸条；其中，所述检测试纸条包括底板、吸收垫、反应膜、吸水垫和保护套；所述检测试纸条上反应膜上设置有NC膜检测线和质控线；所述吸收垫内含有冻干大观霉素特异性抗体-胶体金标记物。本发明提供的大观霉素胶体金检测试剂盒，是利用胶体金进行抗生素残留有效的检测产品，与现有技术相比，具有检测快速、准确、便捷的有点，而且成本较低，便于操作，非常适合畜牧产品的快速检测，是一种十分理想的大观霉素残留检测试剂盒。

