



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102253213 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 201110187474. 8

(22) 申请日 2011. 07. 06

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 王利兵 胥传来 邢常瑞 匡华
刘丽强 宋珊珊 马文蔚 赵媛

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

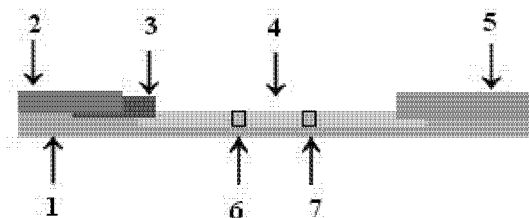
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测铅离子的胶体金层析试纸条

(57) 摘要

一种快速检测铅离子的胶体金层析试纸条，属于免疫学技术领域。本发明由衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、包被膜和吸水垫组成；金标结合垫为吸附铅离子金标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上依次有用铅离子偶联载体蛋白的溶液印制的直线式隐形检测线 T 线，用羊抗鼠 IgG 溶液印制的直线式隐形对照线 C 线，两条线平行排列。所提供的快速检测铅离子的金标层析试纸条特异性强，敏感性高；能更加快速、灵敏、简便地检测铅离子残留；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；节省费用，适用范围广，便于推广；具有广阔的市场前景和明显的经济、社会效益。



1. 一种铅离子胶体金层析检测试纸条,其特征在于由衬板(1)和在衬板上依次衔接的样品垫(2)、金标结合垫(3)、包被膜(4)和吸水垫(5)组成:金标结合垫为吸附铅离子金标抗体的玻璃纤维棉,在包被膜上依次有用铅离子偶联载体蛋白的溶液印制的直线式隐形检测线 T 线(6),用羊抗鼠 IgG 溶液印制的直线式隐形对照线 C 线(7),两条线平行排列。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是:所述的衬板为不吸水的硬质塑胶条,或不吸水硬纸条;所述的样品垫为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、或聚酯膜;所述的包被膜为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、或羧化纤维素膜;所述的吸水垫为吸水滤纸或滤油纸。

3. 根据权利要求 1 所述的试纸条,其特征是:所述的铅离子金标抗体为胶体金标记的铅离子单克隆抗体;所述的偶联铅离子的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白 KLH,或为牛血清白蛋白 BSA,螯合剂为对硫氰苄基-乙二氨四乙酸 ITCBE。

一种快速检测铅离子的胶体金层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种快速检测铅离子的胶体金层析试纸条及其制备方法和用途，属于免疫学技术领域。

背景技术

[0002] 铅是当前工业生产中的一种主要原料，对人体的危害是很大的。铅中毒可引起神经衰弱和消化不良，严重的可发生铅脑病，形成癫痫、痴呆或精神烦躁错乱，视力减退甚至失明。1923 年开始在汽油中加入铅用作抗爆剂以后，更加速了全球性铅的污染。铅的污染已经遍及全球范围，格陵兰和南极的冰中含铅量已有成倍的增加。因此可以说如今世界上已难找到土壤铅含量不受人类活动影响的一片“净土”。

[0003] 我国地下水质量标准(GB/T14848-93)中规定，主要适用于集中式生活饮用水水源及工、农业用水的铅离子限量 $\leq 0.05\text{mg/L}$ 。

[0004] 目前，检测铅离子的方法主要有仪器分析法和酶联免疫分析法(ELISA)。目前常用的重金属仪器分析方法包括：ICP-AES、石墨炉原子吸收法、紫外-可见分光光度法、原子荧光分析法等。以上这些检测方法虽然能精确测量样品中单种金属的总量，但检测相对费力、费时、费用昂贵，需要进行大量的样品预处理，且样品的检测需在大型分析设备的室内进行，不能用于现场检测。由于上述缺点的限制，检测的样品数受限制，导致在随后进行的重金属污染程度和风险的评估工作存在较大的不确定性。重金属免疫学检测方法的建立为这类污染物的检测提供了另一种途径。该方法具有检测速度较快、费用低廉、简单易携、高度的灵敏度和选择性的特点。这种方法理论上能应用于能产生合适抗体的任何污染物。自从 Reardan 等人首次通过金属-螯合剂抗原产生并分离出单克隆抗体以来(Reardan 等, 1985)，国外越来越多的抗 Hg、In、Cd、Pb 等金属螯合剂复合物抗体被研制出来(Johnson 等, 2003)，能用于重金属污染物的现场快速检测和常规检测，这对于重金属污染地区的补救和恢复工作具有很大的意义，因而发展和普及应用潜力很大。国外学者通过选择或合成双功能螯合剂螯合重金属离子并与载体蛋白偶联制备出完全抗原，进一步制备出金属特异性单抗。目前应用免疫学检测方法检测环境中的重金属离子还处于实验室的试验阶段。

发明内容

[0005] 本发明的目的：针对现有检测铅离子的技术的不足和缺陷，提供一种快速检测铅离子的金标层析试纸条的制备方法，使其能更加快速、灵敏、简便地检测铅离子残留。

[0006] 本发明的技术方案：一种铅离子胶体金层析检测试纸条，由衬板(1)和在衬板上依次衔接的样品垫(2)、金标结合垫(3)、包被膜(4)和吸水垫(5)组成：金标结合垫为吸附铅离子金标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上依次有用铅离子偶联载体蛋白的溶液印制的直线式隐形检测线 T 线(6)，用羊抗鼠 IgG 溶液印制的直线式隐形对照线 C 线(7)，两条线平行排列。

[0007] 所述的衬板为不吸水的硬质塑胶条，或不吸水硬纸条；所述的样品垫为玻璃纤维

棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、或聚酯膜；所述的包被膜为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜、或羧化纤维素膜；所述的吸水垫为吸水滤纸或滤油纸。

[0008] 所述的铅离子金标抗体为胶体金标记的铅离子单克隆抗体；所述的偶联铅离子的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白 KLH, 或为牛血清白蛋白 BSA, 螯合剂为 ITCBE。

[0009] 本发明的有益效果：本发明的检测试纸条具有下列优点：

①特异性强, 敏感性高。该胶体金层析检测试纸条以胶体金标记高亲和力的单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, 试纸条具有较强的特异性和较高的敏感性, 检出最低限量可达到 5ppb。

[0010] ②简便、快速、时效性强。使用胶体金层析检测试纸条, 无需任何其它试剂和仪器, 可现场操作, 试纸条加入被检样品液后, 在 10min 内即可判定检测结果。

[0011] ③结果显示形象、直观、准确。检测试纸条均以显示红色线 T 线和 C 线作为检测结果阳性和阴性标记, 即在包被膜上显示一条红色线 C 线时, 表示在被检样品中含有被检物, 显示两条红色线 T 线和 C 线时, 表示在被检样品中不含被检物。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。

[0012] ④节省费用, 适用范围广, 便于推广。使用检测试纸条, 比用仪器分析和 ELISA 试剂盒的费用大幅下降。另外, 试纸条的适用范围广, 可满足不同层次人员需要, 包括专业检验, 海关检疫, 卫生检疫, 质量监测, 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

[0013] 图 1、铅离子胶体金层析检测试纸条剖面结构示意图。1、衬板, 2、样品垫, 3、金标结合垫, 4、包被膜, 5、吸水垫, 6、T 线, 7、C 线。

[0014] 图 2、铅离子胶体金层析检测试纸条俯视结构示意图。6、T 线, 7、C 线。

具体实施方式

[0015] 要制成铅离子检测试纸条, 首先需要制备偶联铅离子的载体蛋白, 用于制备相应的检测线(T 线)和抗体; 而且需要制备铅金标抗体, 用于制备相应的金标抗体纤维棉; 另外需要制备羊抗鼠 IgG 抗体, 用于制备对照线(C 线)。

[0016] 1、铅与载体蛋白偶联

免疫抗原铅 - 对硫氰苄基 - 乙二氨四乙酸 - 匙孔血蓝蛋白 (Pb-ITCBE-KLH) 的制备。

[0017] 先将 2mg 的 ITCBE 和 4.5mg 的 KLH 蛋白在 pH9.4 的 HEPES 缓冲液中反应 24h 后, 在 4℃、6000r/min 的条件下, 超滤 10min 去除未偶联上的 ITCBE, 再用 pH7.4 的 HEPES 缓冲液洗取截留物, 然后逐滴加入 1 mol/L 的 Pb^{2+} 标准溶液 100 μ L 反应 1h 后, 超滤去除未螯合上的 Pb^{2+} , 再用 pH7.4 的 HEPES 缓冲液稀释截留物, 最终得到 2mL 的溶液。使用前, 用 0.1 mol/L EDTA 和 0.1mol/L pH7.4 的 HEPES 缓冲液对超滤离心管预处理。

[0018] 包被抗原铅 - 对硫氰苄基 - 乙二氨四乙酸 - 牛血清白蛋白 (Pb-ITCBE-BSA) 的制备, 用 BSA 代替 KLH, 方法同上。

[0019] 无 Pb^{2+} 检测抗原对硫氰苄基 - 乙二氨四乙酸 - 牛血清白蛋白 (ITCBE-BSA) 的制备,

用三蒸水替代 Pb^{2+} 的标准溶液即可,用 BSA 替代 KLH,其余步骤同上。

[0020] 2、抗铅离子单克隆抗体的制备

单抗制备:用铅离子载体蛋白结合的免疫抗原(Pb-ITCBE-KLH)免疫 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,免疫剂量为 $100 \mu g/次$,采用快速佐剂,腿部肌肉注射。首免,用铅离子载体蛋白免疫抗原与等体积快速佐剂 1:1 混合,充分混匀;首免 3 周后进行加强免疫,方法同上,连续免疫 3-4 次,每次间隔 3 周,最后一次免疫后 10 ~ 15 天。完全抗原金属离子-螯合剂-载体蛋白与螯合剂-载体蛋白同时包被酶标板,以间接 ELISA 检测小鼠血清效价,结果显示小鼠血清效价可达 1 : 8000 ~ 1 : 128000,并金属离子-螯合剂-载体蛋白的 OD 值远大于螯合剂-载体蛋白检测值,说明制备的抗原具有较好的免疫原性。免疫 3-4 次后对小鼠进行尾静脉加强免疫。

[0021] 3、单克隆抗体的制备和腹水纯化

取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选出稳定分泌抗铅离子与 ITCBE 螯合剂络合物的单克隆抗体的阳性细胞株并扩大培养,注射细胞进小鼠体内诱导腹水;采用辛酸硫酸铵法纯化。

[0022] 4、铅离子金标抗体和金标物结合垫的制备

柠檬酸三钠还原法制备胶体金:由于氯化金极易吸湿,因此使用小剂量封装的氯化金时,必须一次配完。将 1g 的氯化金一次溶解于双蒸水中配成 1% 的水溶液。放在 $4^{\circ}C$ 冰箱内保存,保存时间长达几个月至 1 年左右。再取 1% 的氯金酸溶液 10mL,配制成浓度为 0.1g/L 的氯金酸溶液。取 0.1g/L 氯金酸溶液 50 mL 放入锥形瓶,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾并持续 2min,在 100r/min 磁力搅拌下,加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2mL,保持温度和搅拌速度不变,继续搅拌加热 6min,直至溶液呈透亮的酒红色。室温冷却, $4^{\circ}C$ 保存备用。获得直径为 20nm 的胶体金溶液。

[0023] 用 0.1 mol/L K_2CO_3 或 0.1 mol/L HCl 调节胶体金溶液为 pH 9.0,将 10 mL 胶体金溶液加入 50 mL 烧杯中,用电磁搅拌器 250 rpm 搅拌,逐滴加入 150 μL 抗体溶液,平衡过夜。逐滴加入 5% BSA,使 BSA 的终浓度为 1%,持续搅拌 5 min,用以饱和游离的胶体金。再将金标抗体溶液常温低速(3000 rpm)离心 15 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀。取红色上清溶液于 $4^{\circ}C$ 以 11000 rpm 离心 40 min。溶液分为二层:透明上清,管底可流动的暗红色沉淀。轻吸并弃去上清液,将可流动的暗红色沉淀用重悬液混悬,恢复原体积后再离心,所用重悬液为 0.05M 的 CBS 缓冲液。如此重复 2 ~ 4 次,以彻底除去未结合的蛋白质。最后用重悬液将沉淀混悬为原体积的 1/10, $4^{\circ}C$ 保存备用,获得铅离子胶体金标记抗体。

[0024] 用 0.05M 的 CBS 缓冲液以 1:100 ~ 500 稀释的胶体金标记抗体吸附于精制玻璃纤维棉中, $37^{\circ}C$ 干燥,制得铅离子的金标结合垫。

[0025] 4、铅离子胶体金层析试纸条检测反应原理

铅(Pb)原子量仅为 207,属于小分子物质。抗体对游离铅不能捕获,需要检测 Pb-ITCBE 络合物。本发明采用竞争法,即样品中的 Pb-ITCBE 络合物和固定在包被膜上的包被抗原 Pb-ITCBE-BSA 竞争胶体金标记的抗 Pb-ITCBE 单克隆抗体。

[0026] 当试纸条以样品垫末端浸入样本后,样品溶液沿着试纸条通过毛细作用从下往上泳动,溶解金标垫上干燥的金标抗体,若待测样品中铅含量小于 10ng/mL,则金标抗体会直接泳动到检测线(T)和硝酸纤维膜上的 Pb-ITCBE-BSA 发生免疫反应,从而胶体金颗粒发生

聚集,形成红色的线条,然后其他未结合的金标抗体继续通过毛细管作用向前泳动,与控制线(C)的羊抗鼠二抗发生第二次免疫反应,同样形成红色线条,这样包被膜上就会有两条红色线条,表示样品为阴性。若待测样品中铅含量大于 10ng/mL,金标抗体全部和样品中的 Pb-ITCBE 发生免疫结合,就不会再有抗体与 T 线包被原结合,从而 T 线就不会有红色线条出现,表示样品为阳性。C 线是为检验金标免疫层析方法本身是否有效而设定的,所以无论样品中是否存在 Pb,控制线都应该显色。如果控制线不显色,则说明试纸条失效。

[0027] 实施例 1、把选定浓度的包被抗原及羊抗鼠 IgG 喷在包被膜上,分别作为检测线(T)和控制线(C),在 37℃烘箱干燥 10 min。以同样方法,将一定浓度的金标抗体包被在结合垫上。试纸条组成为一个衬板,在其上按顺序粘上样品垫、金标结合垫、包被膜和吸水垫。将贴好的板切割成 3mm 宽的条,然后将试纸条与干燥剂一起装入铝箔袋内密封保存。

[0028] 检测样品前处理成消化液:取 1.0g 猪肉匀质样品,在聚四氟乙烯坩埚中加入硝酸 2mL,室温放置 4h。将样品转移到消化管中,用 2mL 硝酸多次润洗坩埚,全部转移进消化管,再加入 1.5mL 的 30% 过氧化氢。放入微波消化仪,微波加热,消化 15 min。取出静置至冷却,调节 pH 到 7.2,将消化液转移到 20mL 容量瓶,定容待测。

[0029] 操作方法:按照 1:1 的体积比将猪肉样品消化液和 4mmol/L 的 ITCBE 螯合剂混匀,使铅离子和 ITCBE 充分螯合,得到猪肉样品溶液。

[0030] 将铅离子胶体金层析检测试纸条样品垫端插入待测样品液 100 μ L 中,插入深度不超过标记线,约 3-5 min 读取试纸条检测结果,读取时,试纸条水平放置,正面观察。

[0031] 结果判定:如果在包被膜上仅有 C 线一条红线显色,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中铅离子浓度大于 10ng/mL;如果在包被膜上 C 线和 T 线两条红线都显色,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中铅离子浓度低于 10ng/mL;如果在包被膜上 C 线红线不显色,则表明试纸条已失效。

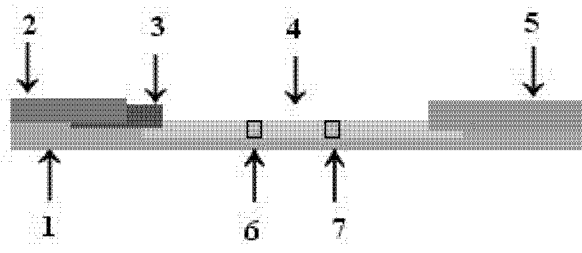


图 1

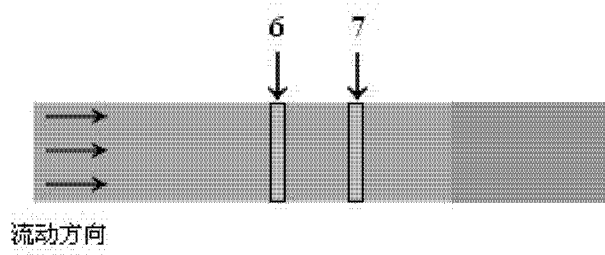


图 2

专利名称(译)	一种快速检测铅离子的胶体金层析试纸条		
公开(公告)号	CN102253213A	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN201110187474.8	申请日	2011-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	王利兵 胥传来 邢常瑞 匡华 刘丽强 宋珊珊 马文蔚 赵媛		
发明人	王利兵 胥传来 邢常瑞 匡华 刘丽强 宋珊珊 马文蔚 赵媛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/544 G01N33/531 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速检测铅离子的胶体金层析试纸条，属于免疫学技术领域。本发明由衬板和在衬板上依次衔接的样品垫、金标结合垫、包被膜和吸水垫组成：金标结合垫为吸附铅离子金标抗体的玻璃纤维棉，在包被膜上依次有用铅离子偶联载体蛋白的溶液印制的直线式隐形检测线T线，用羊抗鼠IgG溶液印制的直线式隐形对照线C线，两条线平行排列。所提供的快速检测铅离子的金标层析试纸条特异性强，敏感性高；能更加快速、灵敏、简便地检测铅离子残留；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；节省费用，适用范围广，便于推广；具有广阔的市场前景和明显的经济、社会效益。

