



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849453 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510266432. 1

(22) 申请日 2015. 05. 22

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038
号

(72) 发明人 刘冰 王玲玲 张燕 生威 王硕

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理
有限公司 12211

代理人 刘莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

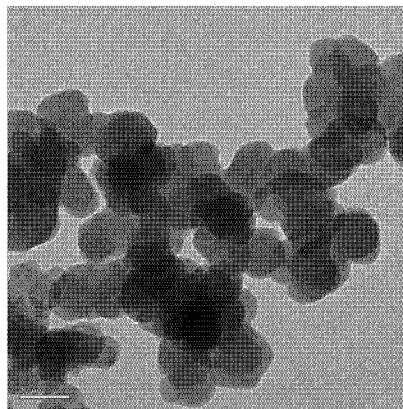
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条

(57) 摘要

本发明提供了一种胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条,本发明选择沙丁胺醇作为目标物,将沙丁胺醇抗体加入到胶体碳溶液,制得胶体碳标记抗体,建立了检测沙丁胺醇的胶体碳标记免疫层析分析方法,并应用于动物源性食品中沙丁胺醇残留的可视化检测。本发明制备的试纸条,其检出限为 $2\mu\text{g L}^{-1}$ 。选择猪肉、牛肉、羊肉和猪肝四种实际样品进行添加回收实验,样品检出限为 $10\mu\text{g L}^{-1}$ 。试纸条在室温下至少可以稳定保存 16 周。



1. 一种胶体碳标记抗体的制备方法,其特征在于:包括如下步骤,
 - 1) 将炭黑分散到缓冲液中,冰浴超声 10-40min,得到均匀分散的胶体碳溶液;优选的,冰浴超声 20min。
 - 2) 将沙丁胺醇抗体用缓冲液稀释至 $0.1-1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;优选的, 0.5mgmL^{-1} ;
 - 3) 在搅拌速度 $50 \sim 150\text{rpm}$ 条件下将沙丁胺醇抗体加入到胶体碳溶液中,在 $0-25^{\circ}\text{C}$ 下,搅拌速度 $50 \sim 150\text{rpm}$ 条件下搅拌 $10 \sim 15\text{h}$ 得到胶体碳标记抗体;优选的, 4°C 下搅拌;
 - 4) 用硼酸盐缓冲液洗涤胶体碳标记抗体,重复 2-5 次,于 $2000-15000\text{r}/\text{min}$, $0-25^{\circ}\text{C}$, 离心 $10-40\text{min}$;将最终沉淀用洗涤缓冲液稀释至最初体积, $0-25^{\circ}\text{C}$ 保存备用;优选的,用硼酸盐缓冲液洗涤胶体碳标记抗体,重复 3 次,于 $12000\text{r}/\text{min}$, 10°C , 离心 30min ;将最终沉淀用硼酸盐缓冲液重悬至最初体积, 4°C 保存备用。
2. 根据权利要求 1 所述的胶体碳标记抗体的制备方法,其特征在于:步骤 1) 以及步骤 2) 中,所述缓冲液均为硼酸盐缓冲液,且其 pH 为 8.8。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的胶体碳标记抗体的制备方法,其特征在于:步骤 3) 中,沙丁胺醇抗体的浓度为 $60-350 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;胶体碳的浓度为 $0.5-1.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。
4. 根据权利要求 3 所述的胶体碳标记抗体的制备方法,其特征在于:步骤 3) 中,沙丁胺醇抗体的浓度为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;胶体碳的浓度为 $0.6\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。
5. 一种使用如权利要求 1~4 任一项所述的制备方法制备的胶体碳标记抗体的制备的试纸条,其特征在于:包括如下组装步骤,
 - 1) 取一定量的稀释的胶体碳标记抗体溶液,加入微孔板的微孔中,在 $0 \sim -40^{\circ}\text{C}$ 条件下真空冷冻干燥 $1-20\text{h}$;优选的,在 -21°C 条件下真空冷冻干燥 12h ;优选的,取 $10 \mu\text{L}$ 稀释倍数为 10 倍的胶体碳标记抗体溶液;
 - 2) 向微孔中加入 $100-200 \mu\text{L}$ 标准品,快速混合均匀,置于室温孵育 $1-5\text{min}$,将半组装的试纸条插入到微孔中, $5-15\text{min}$ 即可观察试纸条检测结果;优选的,向微孔中加入 $120 \mu\text{L}$ 标准品,快速混合均匀,置于室温孵育 3min ,将组半组装的试纸条插入到微孔中, 10min 后读取结果;优选的,标准品是由 pH 值为 8.8,离子强度为 0.1mol L^{-1} 的硼酸盐缓冲液配制而成,且其中含有质量浓度为 1.0% 牛血清白蛋白、 0.05% 吐温 -20、 0.1% PEG-200。
6. 根据权利要求 5 所述的试纸条,其特征在于:步骤 2) 中,所述半组装的试纸条的材质为硝酸纤维素膜,优选的,Whatman 公司的 HF135 型号;且半组装的试纸条上固定有包被抗原、羊抗兔二抗,所述羊抗兔二抗包被在硝酸纤维素膜质控线上;所述包被抗原在检测线上。
7. 根据权利要求 6 所述的试纸条,其特征在于:所述硝酸纤维素膜上包被抗原的稀释倍数为 5 倍,其使用的稀释液为磷酸盐缓冲液,且其 pH 值为 7.4。
8. 根据权利要求 6 所述的试纸条,其特征在于:所述硝酸纤维素膜上羊抗兔二抗的稀释倍数为 150 倍,其使用的稀释液为硼酸盐缓冲液。
9. 如权利要求 1~4 任一项所述的制备方法制备的胶体碳标记抗体在沙丁胺醇检测中的应用。
10. 如权利要求 5~8 任一项所述的试纸条在沙丁胺醇检测中的应用。

一种胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于兽药残留快速检测领域,尤其是涉及一种胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条。

背景技术

[0002] 免疫层析分析方法具有灵敏度高、操作简便、省时省力、成本低廉,适用于大量样本的快速现场筛选等优势,近年来在兽药残留检测领域得到了快速的发展。胶体金具有生物兼容性好,不同粒径可呈现不同的颜色,易于通过改性提高信号强度等优势,成为免疫层析分析方法中最常用的标记材料。但是胶体金价格昂贵,批间差异大,不利于实现试纸条的批量生产。胶体金免疫层析技术对抗体、包被原等材料的要求比较高,而且胶体金的信号较弱,限制了其应用。

[0003] 炭黑又名碳黑,是一种具有局部石墨化结构的无定形碳,是由烃类物质(包括天然气、燃料油、重油等)在不完全燃烧或者热裂解条件下制得的产物。其主要组成元素为碳元素,碳质量分数为 90% -99%,同时还含有少量氢、氧、硫、氮等元素。炭黑以近似于球体的胶体原生粒子以及聚集体形式存在,外观为黑色粉末状固体,其基本粒子尺寸在 10-100nm 之间,通常情况下,炭黑粒子不是独立存在的,而是由多个粒子通过碳晶层相互穿插,形成链枝状的稳定结构。炭黑的前体性质以及合成方法决定了炭黑的粒径大小、粒径分布以及表面化学特性。

[0004] 由德国 Degussa 公司生产的 SB4 型号炭黑是普通黑度气法炭黑,经过氧化处理。氧化处理使炭黑表面及内部 O 元素含量升高,表面引入了具有良好亲水性能的含氧酸性基团,如羧基、羟基、醛基等,通过引入这些官能团,提高了炭黑在水溶液中的分散稳定性,使得炭黑在不需要稳定剂和表面活性剂的条件下就能形成稳定的胶体状分散液。

[0005] 1993 年 Van Amerongen A 等人首次将 SB4 炭黑用作标记物使用,为炭黑的应用开辟了新的领域。SB4 炭黑具有很大的比表面积,在水性体系中分散性良好,在缓冲液中抗体等大分子物质可以通过表面吸附等物理作用与胶体碳相结合,这种标记方式属于物理吸附,不会改变抗体的活性和特异性。2009 年 Blazkova M 等人将胶体碳作为标记物,建立了检测地表水中灭虫威的免疫层析试纸条方法。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明旨在提出一种胶体碳标记抗体的制备方法及免疫层析分析方法,可以可视化快速检测沙丁胺醇残留,以解决胶体金标记免疫层析分析方法成本较高,批间差异大,信号强度较弱等问题。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0008] 一种胶体碳标记抗体的制备方法,包括如下步骤,

[0009] 1) 将炭黑分散到缓冲液中,冰浴超声 10-40min,得到均匀分散的胶体碳溶液;优选的,冰浴超声 20min。

- [0010] 2) 将沙丁胺醇抗体用缓冲液稀释至 $0.1-1\text{mg mL}^{-1}$; 优选的, 0.5mg mL^{-1} ;
- [0011] 3) 在搅拌速度 100rpm 条件下将沙丁胺醇抗体加入到胶体碳溶液中, 在 $0-25^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌速度 100rpm 条件下搅拌 12h 得到胶体碳标记抗体; 优选的, 4°C 下搅拌;
- [0012] 4) 用硼酸盐缓冲液洗涤胶体碳标记抗体, 重复 $2-5$ 次, 于 $2000\text{r/min}-15000\text{r/min}$, $0-25^{\circ}\text{C}$, 离心 $10-40\text{min}$; 将最终沉淀用洗涤缓冲液稀释至最初体积, $0-25^{\circ}\text{C}$ 保存备用; 优选的, 用洗涤缓冲液洗涤胶体碳标记抗体, 重复 3 次, 于 12000r/min , 10°C , 离心 30min ; 将最终沉淀用硼酸盐缓冲液重悬至最初体积, 4°C 保存备用。
- [0013] 优选的, 步骤 1) 以及步骤 2) 中, 所述缓冲液均为硼酸盐缓冲液, 且其 pH 为 8.8 。
- [0014] 优选的, 步骤 3) 中, 沙丁胺醇抗体的浓度为 $60-350\ \mu\text{g mL}^{-1}$; 胶体碳的浓度为 $0.5-1.5\text{mg mL}^{-1}$ 。
- [0015] 优选的, 步骤 3) 中, 沙丁胺醇抗体的浓度为 $80\ \mu\text{g mL}^{-1}$; 胶体碳的浓度为 0.6mg mL^{-1} 。
- [0016] 本发明还提供了一种使用如上所述的制备方法制备的胶体碳标记抗体的试纸条, 包括如下组装步骤,
- [0017] 1) 取一定量的稀释的胶体碳标记抗体溶液, 加入微孔板的微孔中, 在 $0-40^{\circ}\text{C}$ 条件下真空冷冻干燥 $1-20\text{h}$; 优选的, 在 -21°C 条件下真空冷冻干燥 12h ;
- [0018] 2) 向微孔中加入 $100-200\ \mu\text{L}$ 标准品, 快速混合均匀, 置于室温孵育 $1-5\text{min}$, 将组装好的试纸条插入到微孔中, $5-15\text{min}$ 后记得到组装好的试纸条; 优选的, 向微孔中加入 $120\ \mu\text{L}$ 标准品或待测样品, 快速混合均匀, 置于室温孵育 3min , 将半组装好的试纸条插入到微孔中, 10min 后读取结果; 优选的, 标准品是由 pH 值为 8.8 , 离子强度为 0.1mol L^{-1} 的硼酸盐缓冲液配制而成, 且其中含有质量浓度为 1.0% 牛血清白蛋白、 0.05% 吐温 -20 、 0.1% PEG-200。
- [0019] 优选的, 步骤 1) 中, 取 $10\ \mu\text{L}$ 稀释倍数为 10 倍的胶体碳标记抗体溶液。
- [0020] 优选的, 步骤 2) 中, 所述试纸条的材质为硝酸纤维素膜, 优选的, Whatman 公司的 HF135 型号; 且半组装好的试纸条上固定有包被抗原、羊抗兔二抗, 所述羊抗兔二抗包被在硝酸纤维素膜质控线上; 所述包被抗原在检测线上。
- [0021] 优选的, 所述硝酸纤维素膜上包被抗原的稀释倍数为 5 倍, 其使用的稀释液为磷酸盐缓冲液, 且其 pH 值为 7.4 。
- [0022] 优选的, 所述硝酸纤维素膜上羊抗兔二抗的稀释倍数为 150 倍, 其使用的稀释液为硼酸盐缓冲液。
- [0023] 本发明同时提供了如上所述的制备方法制备的胶体碳标记抗体在沙丁胺醇检测中的应用以及如上所述的试纸条在沙丁胺醇检测中的应用。
- [0024] 相对于现有技术, 本发明所述的胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条, 具有以下优势:
- [0025] (1) 本发明所述的胶体碳标记抗体的制备中, 使用的标记材料胶体碳, 成本远低于氯金酸, 降低了现有的农药检测的成本。
- [0026] (2) 本发明所述的试纸条, 抗体用量少, 同样节约了成本。

附图说明

[0027] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0028] 图 1 为本发明实施例一所述的胶体碳标记抗体的透射电子显微镜扫描图;

[0029] 图 2 为本发明实施例一所述的胶体碳分散性能的验证结果;

[0030] 图 3 是本发明中胶体碳标记抗体最适 pH 值优化结果;其中两组试纸条对应的沙丁胺醇的浓度从左到右依次为 $0 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g L}^{-1}$;

[0031] 图 4 是本发明中实施例一中试纸条的跑条结果;其中对应的沙丁胺醇的浓度从左到右依次为 $0 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g L}^{-1}$;

[0032] 图 5 是本发明中实施例二中试纸条的跑条结果;其中对应的沙丁胺醇的浓度从左到右依次为 $0 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $5 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g L}^{-1}$ 。

具体实施方式

[0033] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0034] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0035] 实施例一

[0036] 一种胶体碳标记抗体的制备方法,包括如下步骤,

[0037] 1) 将炭黑分散到缓冲液中,冰浴超声 20min,得到均匀分散的胶体碳溶液;

[0038] 2) 将沙丁胺醇抗体用缓冲液稀释至 0.5mg mL^{-1} ;

[0039] 3) 在搅拌速度 100rpm 条件下将沙丁胺醇抗体加入到胶体碳溶液中,在 4°C 下,搅拌速度 100rpm 条件下搅拌 12h 得到胶体碳标记抗体;

[0040] 4) 用洗涤缓冲液洗涤胶体碳标记抗体,重复 3 次,于 $12000\text{r}/\text{min}$, 10°C , 离心 30min;将最终沉淀用硼酸盐缓冲液重悬至最初体积, 4°C 保存备用。

[0041] 其中,步骤 1) 以及步骤 2) 中,所述缓冲液均为硼酸盐缓冲液,且其 pH 为 8.8。步骤 3) 中,沙丁胺醇抗体的浓度为 $80 \mu\text{g mL}^{-1}$;胶体碳的浓度为 0.6mg mL^{-1} 。

[0042] 一种使用如上所述的制备方法制备的胶体碳标记抗体的制备的试纸条,包括如下组装步骤,

[0043] 1) 取 $10 \mu\text{L}$ 稀释倍数为 10 倍的胶体碳标记抗体溶液,加入微孔板的微孔中,在 -21°C 条件下真空冷冻干燥 12h;

[0044] 2) 向微孔中加入 $120 \mu\text{L}$ 标准品或待测样品,快速混合均匀,置于室温孵育 3min,将组装好的试纸条插入到微孔中,10min 后读取结果,如图 3 所示;

[0045] 标准品是由 pH 值为 8.8,离子强度为 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸盐缓冲液配制而成,且其中含有质量浓度为 1.0% 牛血清白蛋白、0.05% 吐温-20、0.1% PEG-200。

[0046] 步骤 2) 中,所述试纸条的材质为硝酸纤维素膜,其型号为 Whatman 公司的 HF135 型号;且试纸条上固定有包被抗原、羊抗兔二抗,所述羊抗兔二抗包被在硝酸纤维素膜质控线上;所述包被抗原在检测线上。

[0047] 所述硝酸纤维素膜上包被抗原的稀释倍数为 5 倍,其使用的稀释液为磷酸盐缓冲液,且其 pH 值为 7.4。

[0048] 所述硝酸纤维素膜上羊抗兔二抗的稀释倍数为 150 倍,其使用的稀释液为硼酸盐

缓冲液。

[0049] 实验效果验证结果：

[0050] 1、制备的胶体碳标记抗体的表征，如图 1 所示，本实施例制备的胶体碳标记抗体的聚集状态及粒径分布，炭黑以近似于球体的胶体聚集体形式存在，由多个粒子通过碳晶层相互穿插，形成链枝状的稳定结构，其基本粒子尺寸在 50nm 左右。

[0051] 2、胶体碳分散性能的验证：

[0052] 配制相同 pH 值 8.8 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 和硼酸盐缓冲液 (BB)，取适量炭黑固体，分别加入到两种缓冲液中，配制成 0.6mg mL^{-1} 的炭黑溶液，冰浴超声 20min，于室温下静置一段时间，观察炭黑在两种缓冲体系中的分散状态和稳定性以及静置后是否会发生聚沉，结果如图 2 所示，静置 5min 后，PBS 缓冲液中的炭黑出现明显沉淀，分散状态不稳定；而在 BB 缓冲液中的炭黑分散状态稳定，静置一周后未见沉淀。

[0053] 3、使用本实施例制备的胶体碳标记抗体，检测试剂样品的过程，取 1g 均质后的样品于 50mL 离心管中，加入 1mL $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液，超声 15min，再加入 4mL 优化出的标准品稀释液，高速混旋 3min，于 4000r/min， 10°C 条件下离心 10min，吸取上清液，用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液将 pH 值调至 8.8 (若有沉淀，在 5000r/min， 10°C 条件下离心 10min)，取上清液直接用于试纸条检测。经过反复的验证，本实施例制备的胶体碳标记免疫层析试纸条在实际样品中的检出限为 $10\ \mu\text{g kg}^{-1}$ ；试纸条的直接目视检出限为 $2\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[0054] 4、胶体碳标记免疫层析试纸条稳定性实验，组装试纸条，分别在四周、八周、十二周和十六周取出，取不同浓度的沙丁胺醇标准品溶液进行跑条，观察试纸条显色情况和灵敏度。结果验证，试纸条在室温下至少可以稳定保存十六周。

[0055] 实施例二

[0056] 一种胶体碳标记抗体的制备方法，包括如下步骤，

[0057] 1) 将炭黑分散到缓冲液中，冰浴超声 30min，得到均匀分散的胶体碳溶液；

[0058] 2) 将沙丁胺醇抗体用缓冲液稀释至 0.8mg mL^{-1} ；

[0059] 3) 在搅拌速度 100rpm 条件下将沙丁胺醇抗体加入到胶体碳溶液中，在 25°C 下，搅拌速度 100rpm 条件下搅拌 12h 得到胶体碳标记抗体；

[0060] 4) 用洗涤缓冲液洗涤胶体碳标记抗体，重复 2 次，于 10000r/min， 4°C ，离心 20min；将最终沉淀用硼酸盐缓冲液重悬至最初体积， 4°C 保存备用。

[0061] 其中，步骤 1) 以及步骤 2) 中，所述缓冲液均为硼酸盐缓冲液，且其 pH 为 8.8。步骤 3) 中，沙丁胺醇抗体的浓度为 $120\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ；胶体碳的浓度为 1mg mL^{-1} 。

[0062] 一种使用如上所述的制备方法制备的胶体碳标记抗体的制备的试纸条，包括如下组装步骤，

[0063] 1) 取 $10\ \mu\text{L}$ 稀释倍数为 10 倍的胶体碳标记抗体溶液，加入微孔板的微孔中，在 -30°C 条件下真空冷冻干燥 12h；

[0064] 2) 向微孔中加入 $150\ \mu\text{L}$ 标准品或待测样品，快速混合均匀，置于室温孵育 5min，将组装好的试纸条插入到微孔中，5min 后读取结果，如图 3 所示；

[0065] 标准品是由 pH 值为 8.8，离子强度为 0.1mol L^{-1} 的硼酸盐缓冲液配制而成，且其中含有质量浓度为 1.0% 牛血清白蛋白、0.05% 吐温 -20、0.1% PEG-200。

[0066] 步骤 2) 中，所述试纸条的材质为硝酸纤维素膜，其型号为 Whatman 公司的 HF135

型号；且试纸条上固定有包被抗原、羊抗兔二抗，所述羊抗兔二抗包被在硝酸纤维素膜质控线上；所述包被抗原在检测线上。

[0067] 所述硝酸纤维素膜上包被抗原的稀释倍数为 5 倍，其使用的稀释液为磷酸盐缓冲液，且其 pH 值为 7.4。

[0068] 所述硝酸纤维素膜上羊抗兔二抗的稀释倍数为 150 倍，其使用的稀释液为硼酸盐缓冲液。

[0069] 将实施例二同样进行表征，得到的结果同样是炭黑以近似于球体的胶体聚集体形式存在，由多个粒子通过碳晶层相互穿插，形成链枝状的稳定结构，其基本粒子尺寸在 50nm 左右。

[0070] 将实施例二进行如实施例一所述的检测试剂样品的实验，得出试纸条的检出限同样为 $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ 。

[0071] 将实施例二进行试纸条稳定性实验，结果验证，试纸条在室温下同样至少可以保存十六周。

[0072] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

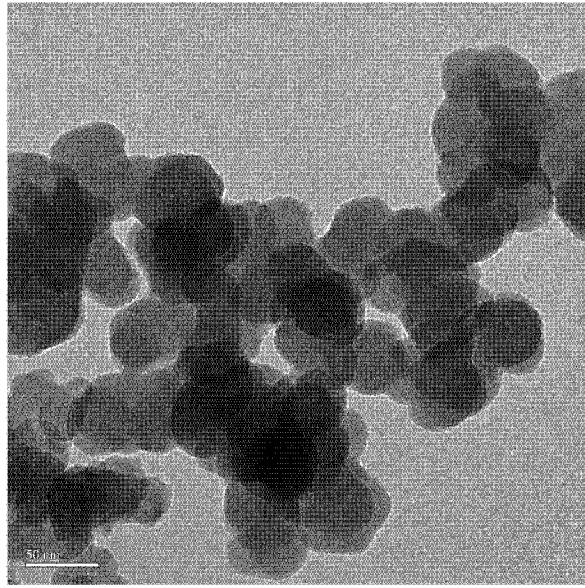


图 1



图 2

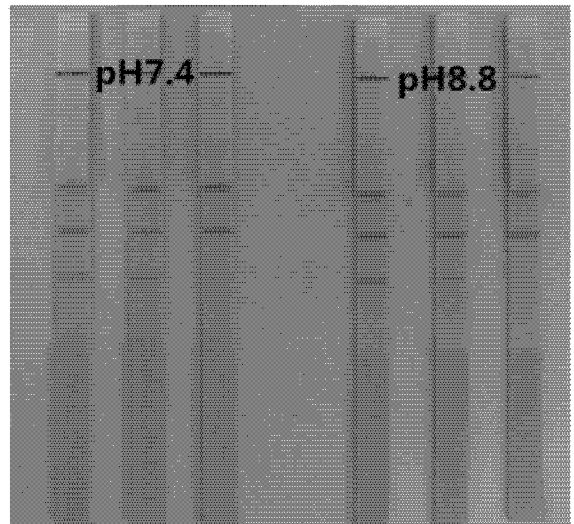


图 3

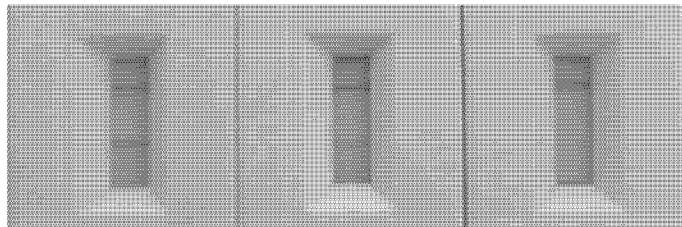


图 4

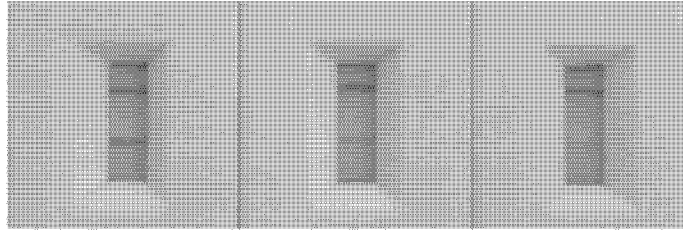


图 5

专利名称(译)	一种胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条		
公开(公告)号	CN104849453A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510266432.1	申请日	2015-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	刘冰 王玲玲 张燕 生威 王硕		
发明人	刘冰 王玲玲 张燕 生威 王硕		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	刘莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种胶体碳标记抗体的制备方法及使用其制备的试纸条，本发明选择沙丁胺醇作为目标物，将沙丁胺醇抗体加入到胶体碳溶液，制得胶体碳标记抗体，建立了检测沙丁胺醇的胶体碳标记免疫层析分析方法，并应用于动物源性食品中沙丁胺醇残留的可视化检测。本发明制备的试纸条，其检出限为 $2\mu\text{g L}^{-1}$ 。选择猪肉、牛肉、羊肉和猪肝四种实际样品进行添加回收实验，样品检出限为 $10\mu\text{g L}^{-1}$ 。试纸条在室温下至少可以稳定保存16周。

