(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108982833 A
(43)申请公布日 2018.12.11

(21)申请号 201810344361.6

(22)申请日 2018.04.17

(71)申请人 山东安博仪器股份有限公司
地址 261061 山东省潍坊市高新区玉清东街13426号

(72)发明人 张西森 张立联 褚刚 李钟涛 王振录 武蔚霞

(74)专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公司 37205
代理人 吕翠莲

(51)Int.Cl.
G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种孔雀石绿的检测试纸及检测方法

(57)摘要

本发明提供一种孔雀石绿的检测试纸，其特征在于：包括样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫与PVC底板，所述的金标垫包括膜和喷涂于膜上的量子点-抗体复合物。所述的NC膜上喷有检测线和质控线；所述检测线的成分为：MG偶联抗原，浓度为0.15-0.25mg/m L，用量为0.7-0.75μL/cm；所述质控线的成分为：兔抗鼠IgG，浓度为0.4-0.6mg/mL，用量为0.7-0.75μL/cm。本发明解决了养殖的水产品体内的孔雀石绿残留量的检测灵敏度不高、检测时间较长的问题。

CN 108982833 A

1.一种孔雀石绿的检测试纸，其特征在于：包括样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫与PVC底板，所述的金标垫包括膜和喷涂于膜上的量子点-抗体复合物。

2.根据权利要求1所述的一种孔雀石绿的检测试纸，其特征在于：

所述的NC膜上喷有检测线和质控线；

所述检测线的成分为：MG偶联抗原，浓度为0.15-0.25mg/m L，用量为0.7-0.75μL/cm；

所述质控线的成分为：兔抗鼠IgG，浓度为0.4-0.6mg/mL，用量为0.7-0.75μL/cm。

3.根据权利要求1所述的一种孔雀石绿的检测试纸，其特征在于：

所述样品垫：选择PVP/PBST缓冲液，喷涂于玻璃纤维素膜，制成样品垫；所述缓冲液，PVP与PBST的质量配比为1:1。

4.根据权利要求1所述的一种孔雀石绿的检测试纸的制备方法，其特征在于：包括CdTe量子点的制备、量子点与抗体复合以及制得孔雀石绿量子点免疫层析试纸条步骤。

5.根据权利要求4所述的一种孔雀石绿的检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的CdTe量子点的制备：包括NaHTe的制备、CdTe量子点的水相合成、CdTe/ZnS 核壳结构量子点的合成；

所述的CdTe量子点的水相合成：将$CdCl_2 \cdot 5H_2O$加入水中，然后加入巯基丙酸，用NaOH 调溶液的pH 至7.0；通 N_2除氧，然后加入NaHTe溶液，在 130-150℃恒温加热5.5-6.5h，得到红色的CdTe量子点溶液。

6.根据权利要求5所述的一种孔雀石绿的检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的CdTe/ZnS 核壳结构量子点的合成：将$Zn(Ac)_2 \cdot 2H_2O$和$Na_2S \cdot 9H_2O$溶液交替加入CdTe量子点溶液中，控制S^{2-}与Zn^{2+}摩尔比为 1:1；往其中加入巯基丙酸，反应得到CdTe/ZnS 核壳结构量子点。

7.根据权利要求4所述的一种孔雀石绿的检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的量子点与抗体复合包括CdTe/ZnS QDs 的纯化、量子点与抗体复合步骤；

所述的CdTe/ZnS QDs 的纯化：将CdTe/ZnS QDs浓缩，温度 45-55℃，浓缩4-5倍；将异丙醇逐滴加入到浓缩后的量子点中，当出现浑浊，停止加入异丙醇，继续搅拌10-20min，然后离心收集沉淀，沉淀用丙酮清洗三次；得到CdTe/ZnS QDs量子点浓度 C为10^{-5} mol/L。

8.根据权利要求7所述的一种孔雀石绿的检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的量子点与抗体复合：向CdTe/ZnS QDs量子点中加入PBS，调节pH为7，加入EDC、NHS活化过夜后加入MG抗体；QDs与MG抗体的摩尔比为 1:1，偶联8h后，得到量子点与抗体复合物。

9.根据权利要求1所述的一种孔雀石绿的检测试纸的制备方法，其特征在于：孔雀石绿检测试纸的检测限为2ppb。

一种孔雀石绿的检测试纸及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种孔雀石绿的检测试纸及制备方法，具体涉及一种孔雀石绿胶体金免疫层析法对养殖的水产品体内的孔雀石绿的检测方法及检测试纸，属于水产品孔雀石绿的检测领域。

背景技术

[0002]

孔雀石绿 (malachite green, MG) 是一种绿色的带有金属光泽的结晶体，易溶于水。由于其具有很好的抗菌效果，且价格低廉，常被作为杀虫剂和杀菌剂违规应用于水产养殖业中。孔雀石绿具有潜在的致癌作用，2002年，中国《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中被明确列入。在中国《无公害食品水产品中渔药残留限量》(NY5070—2002) 中也明确指出孔雀石绿为不得检出，但实际上，在水产品养殖中还不时能检测到违规添加的孔雀石绿残留。目前，已报道的孔雀石绿残留检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、表面增强拉曼散射光谱法 (surface enhanced Raman scattering, SERS)、液质联用法、紫外光谱法 (ultraviolet spectrum, UV)、荧光光谱法等，这些检测方法或灵敏度不高，或单个样品上机检测时间较长，或仪器昂贵，或操作复杂，不易在基层得到应用与推广。

[0003] 综上所述，现有技术对养殖的水产品体内的孔雀石绿的检测方法具有以下缺陷：灵敏度不高、检测时间较长、所需的仪器昂贵、操作复杂，不易推广。

发明内容

[0004] 针对以上现有技术的缺陷，本发明提供一种孔雀石绿的检测试纸及制备方法，并达到以下发明目的：提高对养殖的水产品体内的孔雀石绿的检测灵敏度和准确度，缩短检测时间，降低检测成本，简化操作。

[0005] 为实现以上发明目的，本发明采用的技术方案如下：一种孔雀石绿的检测试纸包括样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫与PVC底板；

所述样品垫：选择摩尔比为1:1的PVP/PBST缓冲液，喷涂于6cm×2.5cm的玻璃纤维素膜，制成样品垫；

所述金标垫：选用J102膜，膜上喷涂量子点-抗体复合物，即CdTe/ZnS QDs-MG复合物，喷涂量为10μl；所述的量子点为：CdTe量子点，所述的抗体为孔雀石绿抗体。

[0006] 所述的量子点-抗体复合物制备方法为：

将巯基丙酸(MPA)作为稳定剂，制备水溶性CdTe量子点(QDs)。对其进行包壳，得到核壳结构的CdTe/ZnS QDs。将此 QDs 纯化后，与孔雀石绿抗体偶联，制备了量子点-抗体复合物。

[0007] 所述的NC膜(硝酸纤维素膜)上喷有检测线(T线)和质控线(C线)；

所述检测线为：MG偶联抗原，浓度为0.2mg/m L，用量为0.74μL/cm；

所述质控线为:兔抗鼠IgG,浓度为0.5mg/mL,用量为0.74μL/cm;

孔雀石绿免疫层析试剂条检测孔雀石绿含量的最低检测限为2ppb,检测时间为8min。

[0008] 具体制作步骤如下:

一、CdTe量子点的制备

(1)NaHTe的制备

将80mg 的Te粉,0.2g 的$NaBH_4$,分别倒入25ml的烧瓶中,通氮气排除其中空气,通过注射器加入10ml的除氧水,反应过程中,反应体系通氮气保持无氧状态并强磁力搅拌,用气球收集排除的氢气,室温6小时后反应结束。

[0009] 溶液颜色为无色或淡粉色。反应式如下:

$NaBH_4+Te+H_2O\rightarrow NaHTe+Na_2B_4O_7+H_2\uparrow$

(2)CdTe量子点的水相合成

称取0.1g $CdCl_2\cdot 5H_2O$,加入100ml超纯水,通 N_2除氧,加入3ml 的巯基丙酸,用 1mol/L NaOH 调溶液的pH 至7.0。剧烈搅拌下通 N_2除氧20 min,然后迅速加入步骤(1)新制备的NaHTe溶液,溶液变为红色,整个反应过程一直通 N_2保护。在 140℃恒温加热6h,得到红色的CdTe量子点溶液。

[0010] (3)CdTe/ZnS 核壳结构量子点的合成

制备过程如下:

将$Zn(Ac)_2\cdot 2H_2O$和$Na_2S\cdot 9H_2O$溶液交替加入制好的红色的CdTe量子点溶液中,控制S^{2-}与Zn^{2+}摩尔比为 1:1;往其中加入一定量的巯基丙酸(摩尔比1:2.4)

,50℃加热搅拌 1h,得到 CdTe/ZnS 核壳结构的 QDs,即为CdTe/ZnS QDs量子点。

[0011] 二、量子点与抗体复合

第一步:CdTe/ZnS QDs 的纯化

操作如下:取适量CdTe/ZnS QDs,将其用旋转蒸发仪浓缩,温度 50℃,浓缩4-5倍;在磁力搅拌下将异丙醇逐滴加入到浓缩后的量子点中,当出现浑浊现象,停止加入异丙醇,继续搅拌15 min,然后离心(9000r/10min)收集沉淀。沉淀用丙酮清洗三次,用适量的蒸馏水分散,得到纯化的CdTe/ZnS QDs。

[0012] 将纯化的CdTe/ZnS QDs 测紫外,得到吸光度 A。测荧光,得到发射波长λ。通过朗伯比尔定律计算CdTe/ZnS QDs的浓度 C,得到CdTe/ZnS QDs量子点浓度 C为10^{-5} mol/L。

[0013] 第二步:量子点与抗体复合

取 50μL 纯化好的浓度为10^{-5} mol/L的CdTe/ZnS QDs量子点,加入 500μl 的 PBS(磷酸盐缓冲液),调节pH为7,加入10μl 1mg/ml的EDC和8μl 1mg/ml的NHS,活化过夜后,加入MG抗体;QDs与MG抗体的摩尔比为 1:1,偶联8h后,得到QDs-MG的复合物,4℃保存备用。

[0014] 三、制得孔雀石绿量子点免疫层析试纸条

将CdTe/ZnS QDs-Mg复合物,喷涂在2.5cm×0.5cm的聚脂纤维素膜上,喷涂量为10μl,制成金标垫,金标垫选用的聚脂纤维素膜为J102膜;

不同的缓冲溶液有不同的跑膜结果,本发明选择摩尔比1:1的PVP/PBST缓冲溶液,喷涂于6cm×2.5cm的玻璃纤维素膜,制成样品垫,样品垫采用的玻璃纤维素膜为GL-3膜;

NC膜(硝酸纤维素膜)上喷有检测线(T线)和质控线(C线);

所述检测线为:MG偶联抗原,浓度为0.2mg/m L,用量为0.74μL/cm;配制时,采用的缓冲

液为PBS缓冲液；

所述质控线为：兔抗鼠IgG，浓度为0.5mg/mL，用量为0.74μL/cm；配制时，采用的缓冲液为含10%甲醇的0.01M PBS。

[0015] 选用H-8吸水纸作为吸收垫。

[0016] 样品垫、金标垫等干燥后，依次将样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫粘贴于PVC底板上，如附图1所示。

[0017] 各部分(样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫)的下方重叠1-2mm，

将组装好的试剂条切割成3mm宽，放于塑料保护壳中，得到成品孔雀石绿的检测试纸；

然后将干燥剂和塑料滴管密封于铝箔纸袋中，可置于4℃干燥处保存备用。

[0018] 本发明孔雀石绿的检测试纸储存条件及有效期为：原装试纸条2～8℃保存，有效期12个月；试剂拆封后，应在30min内使用。

[0019] 检测的样本要求为：样本为水产品的肌肉及内脏等机体组织，配制检测液浓度为10ng/ml。

[0020] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明解决了养殖的水产品体内的孔雀石绿残留量的检测灵敏度不高、检测时间较长的问题。本发明孔雀石绿检测试纸的检测限为2ppb，8min显示结果。操作简单、不需要贵重仪器，容易推广。

[0021] 检测取样量少，配制的检测液仅10ng/ml。

[0022] 量子点免疫层析技术是以量子点作为示踪标志物应用于免疫层析法中，它一方面利用了量子点的独特荧光作为观测信号，具有灵敏度高、快速的优点，另一方面利用了免疫层析技术的简便、特异性强、费用低等优点。

附图说明

[0023]

附图1为本发明孔雀石绿检测试纸的示意图；

图中，1-样品垫，2-金标垫，3-检测线，4-质控线，5-NC膜，6-吸水垫，7-PVC支撑板。

具体实施方式

[0024] 以下对本发明的优选实施例进行说明，应当理解，此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明，并不用于限定本发明。

[0025] 实施例1 一种孔雀石绿的检测试纸

所述检测试纸包括样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫与PVC底板；

所述样品垫：选择摩尔比为1:1的PVP/PBST缓冲液，喷涂于6cm×2.5cm的玻璃纤维素膜，制成样品垫；

所述金标垫：选用J102膜，膜上喷涂量子点-抗体复合物，即CdTe/ZnS QDs-MG复合物，喷涂量为10μl；所述的量子点为：CdTe量子点，所述的抗体为孔雀石绿抗体。

[0026] 所述的量子点-抗体复合物制备方法为：

将巯基丙酸(MPA)作为稳定剂，制备水溶性CdTe量子点(QDs)。对其进行包壳，得到核壳结构的CdTe/ZnS QDs。将此 QDs 纯化后，与孔雀石绿抗体偶联，制备了量子点-抗体复合

物。

[0027] 所述的NC膜(硝酸纤维素膜)上喷有检测线(T线)和质控线(C线)；

所述检测线为:MG偶联抗原,浓度为0.2mg/m L,用量为0.74μL/cm；

所述质控线为:兔抗鼠IgG,浓度为0.5mg/mL,用量为0.74μL/cm；

孔雀石绿免疫层析试剂条检测孔雀石绿含量的最低检测限为2ppb,检测时间为8min。

[0028] 具体制作步骤如下：

一、CdTe量子点的制备

(1)NaHTe的制备

将80mg 的Te粉,0.2g 的$NaBH_4$,分别倒入25ml的烧瓶中,通氮气排除其中空气,通过注射器加入10ml的除氧水,反应过程中,反应体系通氮气保持无氧状态并强磁力搅拌,用气球收集排除的氢气,室温6小时后反应结束。

[0029] 溶液颜色为无色或淡粉色。反应式如下：

$NaBH_4+Te+H_2O\rightarrow NaHTe+Na_2B_4O_7+H_2\uparrow$

(2)CdTe量子点的水相合成

称取0.1g $CdCl_2\cdot 5H_2O$,加入100ml超纯水,通 N_2除氧,加入3ml 的巯基丙酸,用 1mol/L NaOH 调溶液的pH 至7.0。剧烈搅拌下通 N_2除氧20 min,然后迅速加入步骤(1)新制备的NaHTe溶液,溶液变为红色,整个反应过程一直通 N_2保护。在 140℃恒温加热6h,得到红色的CdTe量子点溶液。

[0030] (3)CdTe/ZnS 核壳结构量子点的合成

制备过程如下：

将$Zn(Ac)_2\cdot 2H_2O$和$Na_2S\cdot 9H_2O$溶液交替加入制好的红色的CdTe量子点溶液中,控制S^{2-}与Zn^{2+}摩尔比为 1:1;往其中加入一定量的巯基丙酸(摩尔比1:2.4)

,50℃加热搅拌 1h,得到 CdTe/ZnS 核壳结构的 QDs,即为CdTe/ZnS QDs量子点。

[0031] 二、量子点与抗体复合

第一步:CdTe/ZnS QDs 的纯化

操作如下:取适量CdTe/ZnS QDs,将其用旋转蒸发仪浓缩,温度 50℃,浓缩4-5倍;在磁力搅拌下将异丙醇逐滴加入到浓缩后的量子点中,当出现浑浊现象,停止加入异丙醇,继续搅拌15 min,然后离心(9000r/10min)收集沉淀。沉淀用丙酮清洗三次,用适量的蒸馏水分散,得到纯化的CdTe/ZnS QDs。

[0032] 将纯化的CdTe/ZnS QDs 测紫外,得到吸光度 A。测荧光,得到发射波长λ。通过朗伯比尔定律计算CdTe/ZnS QDs的浓度 C,得到CdTe/ZnS QDs量子点浓度 C为10^{-5} mol/L。

[0033] 第二步:量子点与抗体复合

取 50μL 纯化好的浓度为10^{-5} mol/L的CdTe/ZnS QDs量子点,加入 500μl 的 PBS(磷酸盐缓冲液),调节pH为7,加入10μl 1mg/ml的EDC和8μl 1mg/ml的NHS,活化过夜后,加入MG抗体;QDs与MG抗体的摩尔比为 1:1,偶联8h后,得到QDs-MG的复合物,4℃保存备用。

[0034] 三、制得孔雀石绿量子点免疫层析试纸条

将CdTe/ZnS QDs-Mg复合物,喷涂在2.5cm×0.5cm的聚脂纤维素膜上,喷涂量为10μl,制成金标垫,金标垫选用的聚脂纤维素膜为J102膜；

不同的缓冲溶液有不同的跑膜结果,本发明选择摩尔比1:1的PVP/PBST缓冲溶液,喷涂

于6cm×2.5cm的玻璃纤维素膜，制成样品垫，样品垫采用的玻璃纤维素膜为GL-3膜；

NC膜(硝酸纤维素膜)上喷有检测线(T线)和质控线(C线)；

所述检测线为:MG偶联抗原，浓度为0.2mg/m L，用量为0.74μL/cm;配制时，采用的缓冲液为PBS缓冲液；

所述质控线为:兔抗鼠IgG，浓度为0.5mg/mL，用量为0.74μL/cm;配制时，采用的缓冲液为含10%甲醇的0.01M PBS。

[0035] 选用H-8吸水纸作为吸收垫。

[0036] 样品垫、金标垫等干燥后，依次将样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫粘贴于PVC底板上，如附图1所示。

[0037] 各部分(样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫)的下方重叠1-2mm，

将组装好的试剂条切割成3mm宽，放于塑料保护壳中，得到成品孔雀石绿的检测试纸；

然后将干燥剂和塑料滴管密封于铝箔纸袋中，可置于4℃干燥处保存备用。

[0038] 本发明孔雀石绿的检测试纸储存条件及有效期为:原装试纸条2～8℃保存，有效期12个月;试剂拆封后，应在30min内使用。

[0039] 检测的样本要求为:样本为水产品的肌肉及内脏等机体组织，配制检测液浓度为10ng/ml。

[0040] 实施例2 一种孔雀石绿的检测试纸的应用

检测试纸在水产品检测中的应用方法：

检测过程采用湿法，将配制好的样品溶液或标液滴入样品槽中，待测物质随着溶液的毛细管作用，跑到样品垫上方与抗体结合，在 C 线形成抗原抗体-量子点复合物；

若样品槽中含待测物质，则 C 线显色，T 线不显色，检测结果为阳性。

[0041] 若样品槽中不含待测物质，则 T 线和 C 线都显色，检测结果为阴性。

[0042] 采用实施例1的一种孔雀石绿的检测试纸，包括塑料保护壳、免疫层析试纸条、塑料滴管、干燥剂。

[0043] 具体操作如下：

依次配制2ppb，3ppb，4ppb，5ppb，6ppb浓度的孔雀石绿标准液，同时以蒸馏水做空白对照，按实验方法对其进行检验，8min显示结果。结果显示，1ppb浓度的检测线与蒸馏水的颜色相同，2ppb浓度的检测线与蒸馏水的颜色相比较浅，5ppb浓度时检测线颜色已基本消失，说明孔雀石绿免疫层析试剂条的检测限为2ppb。

[0044] 实施例3 一种孔雀石绿的检测试纸的应用

采用实施例1的一种孔雀石绿的检测试纸，包括塑料保护壳、免疫层析试纸条、塑料滴管、干燥剂；

随机选取草鱼、鲢鱼、鲤鱼、鲶鱼、鲫鱼和养殖水体6个样品，分别配制10ng/ml浓度的待检液。分别用量子点免疫层析法与胶体金免疫层析法、酶联免疫吸附分析法和高效液相色谱荧光检测法进行检测比对。表1量子点免疫层析法与酶联免疫吸附分析法检测试剂样品结果。

[0045] 表1

	量子点免疫层析试纸检测	胶体金免疫层析法	酶联免疫吸附分析法	高效液相色谱荧光检测法
检测时间	8min	10min	1.5-2h	12-18h
检测样品：草鱼	阴性	阴性	阴性	阴性
检测样品：鲢鱼	阴性	阴性	阴性	阴性
检测样品：鲫鱼	阳性	阴性	阳性	阳性
检测样品：鲤鱼	阴性	阴性	阴性	阴性
检测样品：鲶鱼	阴性	阴性	阴性	阴性
检测样品：养殖水体	阳性	阴性	阳性	阳性

结果(表1)表明，量子点免疫层析法和高效液相色谱荧光检测法、酶联免疫吸附分析法的测定结果一致，符合率达到100％。而胶体金免疫层析法在取样量少、孔雀绿含量低的情况下，检测结果准确率低，检测结果不可靠；也就是说其对孔雀绿残留的最低检出限较高。

[0046] 这表明量子点免疫层析试纸条适用于水产养殖违禁添加品孔雀石绿的检测，且具有较好的选择性。

[0047] 综上所述，孔雀石绿免疫层析试剂条的检测限为2ppb，8min显示结果，且结果准确可靠。操作简单、不需要贵重仪器，容易推广。

[0048] 本发明中所述的英文符号代表的含义如下：

MG 孔雀石绿

IgG 免疫球蛋白

MPA 巯基丙酸

QDs 量子点

PBS 磷酸盐缓冲液

EDC 碳二亚胺

NHS N-羟基琥珀酰亚胺

PVP 乙烯吡咯烷酮

PBST PBS+0.1%Tween-20。

[0049] 除特殊说明外，本发明中所述的比例均为质量比，所述的百分数均为质量百分数。

[0050] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。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。

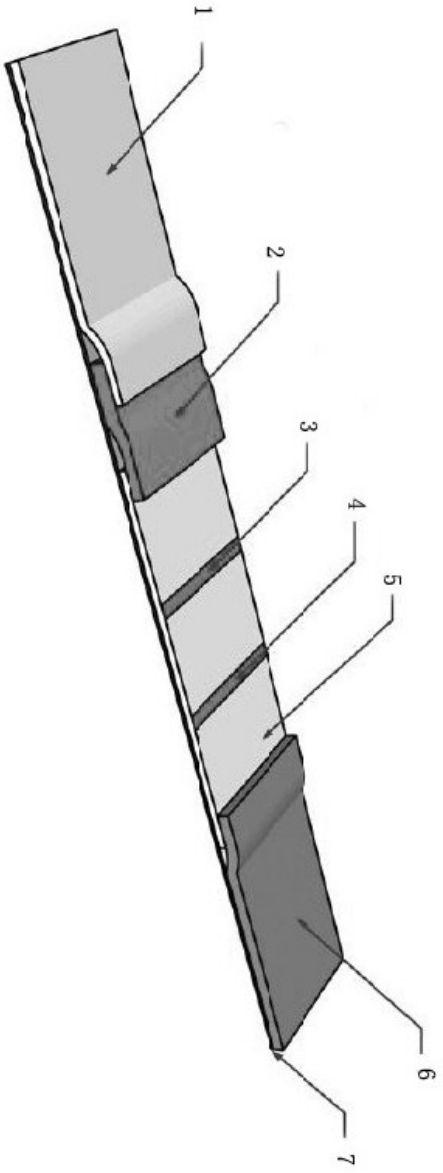

图1

专利名称(译)	一种孔雀石绿的检测试纸及检测方法		
公开(公告)号	CN108982833A	公开(公告)日	2018-12-11
申请号	CN201810344361.6	申请日	2018-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	山东安博仪器股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东安博仪器股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东安博仪器股份有限公司		
[标]发明人	张西森 张立联 褚刚 李钟涛 王振录 武蔚霞		
发明人	张西森 张立联 褚刚 李钟涛 王振录 武蔚霞		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	吕翠莲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种孔雀石绿的检测试纸，其特征在于：包括样品垫、金标垫、NC膜、吸收垫与PVC底板，所述的金标垫包括膜和喷涂于膜上的量子点-抗体复合物。所述的NC膜上喷有检测线和质控线；所述检测线的成分为：MG偶联抗原，浓度为0.15-0.25mg/m L，用量为0.7-0.75μL/cm；所述质控线的成分为：兔抗鼠IgG，浓度为0.4-0.6mg/mL，用量为0.7-0.75μL/cm。本发明解决了养殖的水产品体内的孔雀石绿残留量的检测灵敏度不高、检测时间较长的问题。