



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104007262 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201410208120. 0

(22) 申请日 2014. 05. 16

(71) 申请人 中南林业科技大学

地址 410004 湖南省长沙市天心区韶山南路
174 号

(72) 发明人 刘博 林亲录 罗非君 杨涛
汪龙 肖华西

(74) 专利代理机构 长沙星耀专利事务所 43205
代理人 宁星耀 许伯严

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用

(57) 摘要

镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用, 本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条按照以下方法制备而成: (1) 抗镉离子单抗的制备和纯化; (2) 检测抗原镉-乙烯基二胺-N, N, N', N'-四乙酸-牛血清蛋白的制备; (3) 胶体金溶液的制备; (4) 抗镉离子单抗标记的胶体金溶液的制备; (5) 喷金; (6) 硝酸纤维素膜上包被 C, T 线; (7) 镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的组装。本发明还包括所述镉离子胶体金免疫层析检测试纸条的应用。本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条, 成本低廉, 检测精度高, 可大规模地对粮食及其加工产品残留重金属镉进行快速、方便、准确的检测。

1. 镉离子胶体金免疫层析检测试纸条,其特征在于,按照以下方法制备而成:

(1) 抗镉离子单抗的制备和纯化:用双功能乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸螯合剂将镉离子偶联到牛血清蛋白上,混合弗氏不完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选出稳定分泌抗镉离子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生腹水;取 2-4 ml 腹水,加入相当于腹水体积 1.8-2.2 倍的醋酸钠缓冲液,调节 pH 到 4.0-5.0,得混合液;于室温搅拌下逐滴加入辛酸,所述辛酸与所述混合液的体积比为 30-40 μ l/ml;2-8℃下静置、离心,得到上清液;调节 pH 到 7.0-7.8,2-8℃冷水浴下加入硫酸铵,控制硫酸铵终浓度为 0.25-0.30g/ml,静置 1-2h;然后 2-8℃、8000-12000r/min 离心 10-20min,弃上清液,将沉淀溶于 0.008-0.012mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中进行透析,2-8℃静置过夜,8000-12000r/min 离心 10-20min,弃沉淀;得到抗镉离子单抗;

(2) 检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白的制备:取乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸以质量体积比为 15-25mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 A 液;将兔抗牛血清蛋白以质量体积比为 15-16mg/ml 溶于三羟甲基氨基甲烷盐酸盐中,分别加入占三羟甲基氨基甲烷盐酸盐体积 1-2% 的三乙胺和聚乙二醇 600,形成 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,所述 A 液与 B 液体积比为 1:0.8-1.2,震荡 12-24h;用超滤管离心,得到乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白;取硝酸镉以质量体积比为 10-12mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 C 液;将 C 液逐滴加入到乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白中,乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白与 C 液的体积比为 1:0.8-1.2,震荡 2-5h;用超滤管离心,得到检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白;

(3) 胶体金溶液的制备:取质量浓度为 0.008-0.012% 的氯金酸水溶液 80-120ml,搅拌加热至沸腾,一次性快速加入质量浓度为 0.8-1.2% 的柠檬酸三钠水溶液 2-3ml,继续搅拌加热 0.5-24h,直至溶液呈酒红色,室温冷却,得到含有粒径为 20-40nm 的胶体金颗粒的胶体金溶液;

(4) 抗镉离子单抗标记的胶体金溶液的制备:取步骤(3)所得胶体金溶液 80-120ml,用摩尔浓度为 0.2-0.3mol/L 的碳酸钾溶液将其 pH 值调至 8.3-8.8;将步骤(1)所得抗镉离子单抗 1.2-2.0mg 加入到胶体金溶液中,搅拌均匀,静置 0.5-24 小时;逐滴加入质量浓度为 8-12% 的无菌牛血清蛋白 8-14ml,搅拌 0.5-24h,4℃-30℃静置过夜;将标记后的胶体金溶液于 12000-14000r/min 离心 20-60min,弃去上清液,加入摩尔浓度 0.01-0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液 2-6ml 重悬,得到抗镉离子单抗标记的胶体金溶液;

(5) 喷金:把步骤(4)所得抗镉离子单抗标记的胶体金溶液按 2-10 μ l/cm 的喷量喷在结合垫上,37℃-45℃抽风烘干,时间为 5-24h,得到喷金后的结合垫;

(6) 硝酸纤维素膜上包被 C、T 线:在硝酸纤维素膜上包被 C 线和 T 线,其中 C 线为质控线,包被羊抗鼠免疫球蛋白 G,浓度为 0.2-1.5mg/ml;T 线为检测线,包被镉的检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白,浓度为 0.1-0.9mg/ml;37℃-45℃抽风烘干,时间为 2-24h;得到包被后的硝酸纤维素膜;

所述包被后的硝酸纤维素膜上设置检测 T 线和质控 C 线,其中检测线 T 线靠近样品垫一端;

(7) 镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的组装:将聚氯乙烯底板、样品垫、步骤

(5)所得喷金后的结合垫、步骤(6)所得包被后的硝酸纤维素膜和吸水纸组装,切割成条,得到镉离子胶体金免疫层析快速检测测试纸条;

组装方式如下:以聚氯乙烯底板为底部支撑,将样品垫、喷金后的结合垫、包被后的硝酸纤维素膜和吸水纸以依次相连的方式粘贴在聚氯乙烯底板上制成;其中样品垫和吸水纸位于两端,包被后的硝酸纤维素膜的两端分别位于结合垫和吸水纸的下面,结合垫的一端设置于样品垫的下面,另一端设置于包被后的硝酸纤维素膜的上面;

所述结合垫和样品垫是将聚酯膜经过混合液浸泡 5—24h,取出后于 37—45℃抽风烘干得到;所述混合液为摩尔浓度为 0.01—0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液、质量体积比为 3g—6g/(100ml 磷酸盐缓冲液)的非离子表面活性剂、体积比为 1ml—4ml/(100ml 磷酸盐缓冲液)的吐温 20 和质量体积比为 5g—20g/(100ml 磷酸盐缓冲液)的聚乙二醇 6000 组成的,所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0—7.5。

2. 根据权利要求 1 所述的镉离子胶体金免疫层析检测测试纸条,其特征在于,步骤(1)中,所述醋酸钠缓冲液的摩尔浓度为 0.05—0.08mol/L, pH 值为 4.5—5.5,所述磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为 0.008—0.012mol/L, pH 值为 7.0—7.8。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的镉离子胶体金免疫层析检测测试纸条,其特征在于,步骤(7)中,所述非离子表面活性剂为脂肪醇聚氧乙烯醚、烷基酚聚氧乙烯醚或脂肪酸聚乙二醇酯。

4. 如权利要求 1—3 之一所述镉离子胶体金免疫层析检测测试纸条的应用,包括以下步骤:

(1) 在镉离子标准液或待测样品消解液中按照 1:1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸螯合剂,混合均匀,使镉离子与乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸充分螯合,得到待检测样品溶液;

所述待测样品消解液是将待测样品灰化后加酸进行微波或者加热消解,然后用纳米二氧化钛富集,再调 pH 至中性并浓缩到 0.5ml 得到的溶液;

(2) 用滴管吸取步骤(1)所得待检样品溶液 80—100 μl,滴加于试纸条的样品垫上,滴加样品后开始计时;

(3) 在滴加样品后 3—5min 读取结果,读取时,将试纸条以样品垫一端向下的方式垂直置于观察者正面;

(4) 结果判断:C 线显示为红色线条,当 T 线显色,结果为阴性,待测样品中的镉离子浓度小于 50ng/ml;当 T 线不显色,结果为阳性,待测样品中的镉离子浓度大于 50ng/ml。

镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用,尤其是涉及一种镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 镉以二价离子形式存在于环境中,是水体污染中的主要重金属,进入人体后能引发中毒反应,使肾功能遭到破坏,引起肠胃炎和贫血等症状,骨骼中积累过多镉易引发癌症。WHO 对镉的安全标准就是基于对肾脏的毒性建立的,上限是每周每公斤体重 7 微克。这相当于一个 60 公斤的人,每天不超过 60 微克。我国大米的安全标准是每公斤 0.2 毫克,然而,2013 年中国报道的“镉大米”事件中,镉的含量最高可达每公斤 1.005 毫克,严重超过我国安全生产标准。

[0003] 目前,重金属镉的检测方法主要有:

(1) 物理和化学方法:原子吸收分光光度法(AAS)、电感耦合等离子体-原子发射光谱法(ICP-AES)、电感耦合等离子体质谱分析(ICP-MS)、原子荧光光谱分析(AFS)等。这些方法的特点是灵敏、准确,但是需要复杂的仪器设备,专门的分析技术人员,且标准品价格昂贵,前处理麻烦,不能同时检测大量样品,不适合现场及大规模的推广应用。

[0004] (2) 免疫学检测技术-酶联免疫吸附检测法(ELISA):其检测原理是利用样品中的镉离子与标准品中的镉离子竞争结合抗体并以此对样品中的镉进行定性或定量分析,该方法比较简便快速,可同时处理大量样品。但价格昂贵,单次检测成本高。

[0005] 现有技术中还没有使用胶体金免疫层析法检测食物或水中镉离子的。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术的不足,提供一种镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用,可大规模地对粮食及其加工产品残留重金属镉进行快速、方便、准确的检测。

[0007] 本发明解决其技术问题采用的技术方案是:

本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条,按照以下方法制备而成:

(1) 抗镉离子单抗的制备和纯化:用双功能乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸螯合剂(iEDTA)将镉离子偶联到牛血清蛋白上,混合弗氏不完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选出稳定分泌抗镉离子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生腹水;取 2-4 ml 腹水,加入相当于腹水体积 1.8-2.2 倍的醋酸钠缓冲液,调节 pH 到 4.0-5.0,得混合液;于室温搅拌下逐滴加入辛酸,所述辛酸与所述混合液的体积比为 30-40 μ l/ml;2-8℃下静置、离心,得到上清液;调节 pH 到 7.0-7.8,2-8℃冷水浴下加入硫酸铵,控制硫酸铵终浓度为 0.25-0.30g/ml (优选 0.277 g/ml),静置 1-2h;然后 2-8℃、8000-12000r/min 离心 10-20min,弃上清液,将沉淀溶于 0.008-0.012mol/L 的 PBS 溶液(磷酸盐缓冲溶液)中进行透析,2-8℃静置过夜,

8000-12000r/min 离心 10-20min,弃沉淀;得到抗镉离子单抗;

所述醋酸钠缓冲液的摩尔浓度为 0.05-0.08mol/L, pH 值为 4.5-5.5,所述磷酸盐缓冲溶液的摩尔浓度为 0.008-0.012mol/L, pH 值为 7.0-7.8;

(2) 检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白的制备:取乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸以质量体积比为 15-25mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 A 液;将兔抗牛血清蛋白以质量体积比为 15-16mg/ml 溶于三羟甲基氨基甲烷盐酸盐中,分别加入占三羟甲基甲烷盐酸盐体积 1-2% 的三乙胺和聚乙二醇 600,形成 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,所述 A 液与 B 液体积比为 1:0.8-1.2,震荡 12-24h;用超滤管离心,得到乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白;取硝酸镉以质量体积比为 10-12mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 C 液;将 C 液逐滴加入到乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白中,乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白与 C 液的体积比为 1:0.8-1.2,震荡 2-5h;用超滤管离心,得到检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白;

(3) 胶体金溶液的制备:取质量浓度为 0.008-0.012% 的氯金酸水溶液 80-120ml,搅拌加热至沸腾,一次性快速加入质量浓度为 0.8-1.2% 的柠檬酸三钠水溶液 2-3ml,继续搅拌加热 0.5-24h,直至溶液呈酒红色,室温冷却,得到含有粒径为 20-40nm 的胶体金颗粒的胶体金溶液;

(4) 抗镉离子单抗标记的胶体金溶液的制备:取步骤(3)所得胶体金溶液 80-120ml,用摩尔浓度为 0.2-0.3mol/L 的碳酸钾溶液将其 pH 值调至 8.3-8.8;将步骤(1)所得抗镉离子单抗 1.2-2.0mg 加入到胶体金溶液中,搅拌均匀,静置 0.5-24 小时;逐滴加入质量浓度为 8-12% 的无菌牛血清蛋白 8-14ml,搅拌 0.5-24h,4℃-30℃静置过夜;将标记后的胶体金溶液于 12000-14000r/min 离心 20-60min,弃去上清液,加入摩尔浓度 0.01-0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液 2-6ml 重悬,得到抗镉离子单抗标记的胶体金溶液;

(5) 喷金:把步骤(4)所得抗镉离子单抗标记的胶体金溶液按 2-10 μ l/cm 的喷量喷在结合垫上,37℃-45℃抽风烘干,时间为 5-24h,得到喷金后的结合垫;

(6) 硝酸纤维素膜上包被 C, T 线:在硝酸纤维素膜上包被 C 线和 T 线,其中 C 线为质控线,包被羊抗鼠免疫球蛋白 G,浓度为 0.2-1.5mg/ml;T 线为检测线,包被镉的检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白,浓度为 0.1-0.9mg/ml;37℃-45℃抽风烘干,时间为 2-24h;得到包被后的硝酸纤维素膜;

所述包被后的硝酸纤维素膜上设置检测 T 线和质控 C 线,其中检测线 T 线靠近样品垫一端;

(7) 镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的组装:将聚氯乙烯底板、样品垫、步骤(5)所得喷金后的结合垫、步骤(6)所得包被后的硝酸纤维素膜和吸水纸组装,切割成条,得到镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条;

组装方式如下:以聚氯乙烯底板为底部支撑,将样品垫、喷金后的结合垫、包被后的硝酸纤维素膜和吸水纸以依次相连的方式粘贴在聚氯乙烯底板上制成;其中样品垫和吸水纸位于两端,包被后的硝酸纤维素膜的两端分别位于结合垫和吸水纸的下面,结合垫的一端设置于样品垫的下面,另一端设置于包被后的硝酸纤维素膜的上面;

所述结合垫和样品垫是将聚酯膜经过混合液浸泡 5-24h,取出后于 37-45℃抽风烘干得到;所述混合液为摩尔浓度为 0.01-0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液、质量体积比为 3g-

6g/ (100ml 磷酸盐缓冲液) 的非离子表面活性剂、体积比为 1ml — 4ml/ (100ml 磷酸盐缓冲液) 的吐温 20 和质量体积比为 5g — 20g/ (100ml 磷酸盐缓冲液) 的聚乙二醇 6000 组成的, 所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0 — 7.5 ;

所述非离子表面活性剂优选脂肪醇聚氧乙烯醚、烷基酚聚氧乙烯醚、脂肪酸聚乙二醇酯等。

[0008] 本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条的应用, 包括以下操作步骤:

(1) 在镉离子标准液或待测样品消解液中按照 1:1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的乙烯基二胺 -N, N, N', N' - 四乙酸螯合剂, 混合均匀, 使镉离子与乙烯基二胺 -N, N, N', N' - 四乙酸充分螯合, 得到待检测样品溶液;

所述待测样品消解液是将待测样品 (大米准确称量 100mg) 灰化后加酸进行微波或者加热消解, 然后用纳米二氧化钛富集, 再调 pH 至中性并浓缩到 0.5ml 得到的溶液;

所述高温灰化是把样品放在坩埚中灼烧成灰;

(2) 用滴管吸取步骤 (1) 所得待检样品溶液 80 — 100 μ l, 滴加于试纸条的样品垫上, 滴加样品后开始计时;

(3) 在滴加样品后 3 — 5min 读取结果, 读取时, 将试纸条以样品垫一端向下的方式垂直置于观察者正面;

(4) 结果判断 :C 线显示为红色线条, 当 T 线显色, 结果为阴性, 待测样品中的镉离子浓度小于 50ng/ml ; 当 T 线不显色, 结果为阳性, 待测样品中的镉离子浓度大于 50ng/ml。

[0009] 该试纸条检测精度符合国家对大米中镉含量的国家标准。

[0010] 本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条, 通过螯合镉离子制成抗原, 并通过混合弗氏不完全佐剂免疫小鼠的方法生产抗体, 有效降低生产成本, 提高抗体的高度灵敏性, 提高检测精度。本发明以国家标准中大米中的镉的含量为标准, 结合胶体金试纸条的检测范围, 改变待测原料的量, 并且通过对原料进行预处理 — 高温灰化消解, 首次克服了现有技术中胶体金法无法检测大米中镉离子的不足。

[0011] 本发明之试纸条可大规模地对粮食及其加工产品残留重金属镉进行快速、方便、准确的检测, 检测灵敏度高, 结果稳定、可靠。

[0012] 本发明之试纸条除可以检测粮食及其加工产品中的金属镉以外, 还能检测其他食物和自来水中镉离子浓度是否超过国家标准 (城市自来水国家标准为镉不超过 10 μ g/ml)。自来水中镉离子浓度是否超标的检测方法, 具体操作为: 取待测样品浓缩至原有体积 1/5, 吸取 80 — 100 μ l 浓缩后的样品, 滴加于试纸条的样品垫上, 其他操作方法同大米中镉的检测。

具体实施方式

[0013] 以下结合具体实施例对本发明作进一步详细说明。

[0014] 实施例 1

本实施例之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条, 其制备方法, 包括以下操作步骤:

(1) 抗镉离子单抗的制备和纯化: 用双功能乙烯基二胺 -N, N, N', N' - 四乙酸螯合剂 (iEDTA) 将镉离子偶联到牛血清蛋白上, 混合弗氏不完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选出稳定分泌抗镉离子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生腹水;取腹水,加入相当于腹水体积 2 倍的醋酸钠缓冲液,调节 pH 到 4.5,得混合液;于室温搅拌下逐滴加入辛酸,所述辛酸与所述混合液的体积比为 $33 \mu\text{l/ml}$; 4°C 下静置、离心,得到上清液;调节 pH 到 7.4, 4°C 冷水浴下加入硫酸铵,控制硫酸铵终浓度为 0.277 g/ml ,静置 1h,然后 4°C , 10000r/min 离心 10min,弃上清液,将沉淀溶于 0.01mol/L 的 PBS 溶液中进行透析, 4°C 静置过夜, 10000r/min 离心 10min,弃沉淀;得到抗镉离子单抗;

所述醋酸钠缓冲液的摩尔浓度为 0.06mol/L , pH 值为 5.0,所述磷酸盐缓冲溶液的摩尔浓度为 0.01mol/L , pH 值为 7.4;

(2) 检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白的制备:取乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸以质量体积比为 20mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 A 液;将兔抗牛血清蛋白以质量体积比为 15.4mg/ml 溶于三羟甲基氨基甲烷盐酸盐中,分别加入占三羟甲基甲烷盐酸盐体积 1.3% 的三乙胺和聚乙二醇 600,形成 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中(A、B 液的体积比 1:1),震荡 24h;用超滤管离心,得到乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白;取硝酸镉以质量体积比为 11mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 C 液;将 C 液逐滴加入到乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白中(乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白与 C 液的体积比为 1:1),震荡 3h;用超滤管离心,得到检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白;

(3) 胶体金溶液的制备:取质量浓度为 0.01% 的氯金酸水溶液 100ml,搅拌加热至沸腾,一次性快速加入质量浓度为 1% 的柠檬酸三钠水溶液 2.2ml,继续搅拌加热 0.5-24h,直至溶液呈酒红色,室温冷却,得到含有粒径为 20-40nm 的胶体金颗粒的胶体金溶液;

(4) 抗镉离子单抗标记的胶体金溶液的制备:取步骤(3)所得胶体金溶液 100ml,用摩尔浓度为 0.25mol/L 的碳酸钾溶液将其 pH 值调至 8.5;将步骤(1)所得抗镉离子单抗 1.6mg 加入到胶体金溶液中,搅拌均匀,静置 12 小时;逐滴加入质量浓度为 10% 的无菌牛血清蛋白 11ml,搅拌 5h, 20°C 静置过夜;将标记后的胶体金溶液于 12000r/min 离心 40min,弃去上清液,加入摩尔浓度 0.015mol/L 的磷酸盐缓冲液 4ml 重悬,得到抗镉离子单抗标记的胶体金溶液;

(5) 喷金:把步骤(4)所得抗镉离子单抗标记的胶体金溶液按 $5 \mu\text{l/cm}$ 的喷量喷在结合垫上, 40°C 抽风烘干,时间为 12h,得到喷金后的结合垫;

(6) 硝酸纤维素膜上包被 C、T 线:在硝酸纤维素膜上包被 C 线和 T 线,其中 C 线为质控线,包被羊抗鼠免疫球蛋白 G,浓度为 1.0 mg/ml ; T 线为检测线,包被镉的检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白,浓度为 0.5mg/ml ; 40°C 抽风烘干,时间为 12h;得到包被后的硝酸纤维素膜;

所述包被后的硝酸纤维素膜上设置检测 T 线和质控 C 线,其中检测线 T 线靠近样品垫一端;

(7) 镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的组装:将聚氯乙烯底板、样品垫、步骤(5)所得喷金后的结合垫、步骤(6)所得包被后的硝酸纤维素膜和吸水纸组装,切割成条,得到镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条;

组装方式如下:以聚氯乙烯底板为底部支撑,将样品垫、喷金后的结合垫、包被后的硝酸纤维素膜和吸水纸以依次相连的方式粘贴在聚氯乙烯底板上制成;其中样品垫和吸水纸

位于两端,包被后的硝酸纤维素膜的两端分别位于结合垫和吸水纸的下面,结合垫的一端设置于样品垫的下面,另一端设置于包被后的硝酸纤维素膜的上面;

所述结合垫和样品垫是将聚酯膜经过混合液浸泡 12h,取出后于 40℃抽风烘干得到;所述混合液为摩尔浓度为 0.015mol/L 的磷酸盐缓冲液、质量体积比为 6g/(100ml 磷酸盐缓冲液)的脂肪醇聚氧乙烯醚、体积比为 2ml/(100ml 磷酸盐缓冲液)的吐温 20 和质量体积比为 10g/(100ml 磷酸盐缓冲液)的聚乙二醇 6000 组成的,所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.4。

[0015] 实施例 2

本实施例使用实施例 1 之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条检测大米中的镉离子,包括以下操作步骤:

(1) 检测大米:准确称量 100mg 大米,高温灰化,加入硝酸(0.5mol/L)溶解,调节 pH,定容为待测溶液,或者用二氧化钛富集,调节溶液量为 0.5ml;在镉离子标准液或待测样品消解液或待检测液中按照 1:1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸螯合剂,混合均匀,使镉离子与乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸充分螯合,得到待检测样品溶液,定容为 1ml;

所述待测样品消解液是将待测样品(大米准确称量 100mg)灰化后加酸进行微波或者加热消解,然后用纳米二氧化钛富集,再调 pH 至中性并浓缩到 0.5ml 得到的溶液;

(2) 用滴管吸取步骤(1)所得待检样品溶液 80—100 μl,滴加于试纸条的样品垫上,滴加样品后开始计时;

(3)在滴加样品后 3—5min 读取结果,读取时,将试纸条以样品垫一端向下的方式垂直置于观察者正面;

(4) 结果判断:C 线显示为红色线条,当 T 线显色,结果为阴性,待测样品中的镉离子浓度小于 50ng/ml;当 T 线不显色,结果为阳性,待测溶液中的镉离子浓度大于 50ng/ml,即待测样品中的镉离子浓度大于 0.2mg/kg。

[0016] 实施例 3

本实施例使用实施例 1 之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条检测城市自来水中的镉离子,包括以下操作步骤:

(1) 检测城市自来水:取待测样品浓缩至原有体积 1/5,得到待检测液,在镉离子标准液或待测样品消解液或待检测液中按照 1:1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸螯合剂,混合均匀,使镉离子与乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸充分螯合,得到待检测样品溶液,定容为 1ml;

(2) 用滴管吸取步骤(1)所得待检样品溶液 80—100 μl,滴加于试纸条的样品垫上,滴加样品后开始计时;

(3)在滴加样品后 3—5min 读取结果,读取时,将试纸条以样品垫一端向下的方式垂直置于观察者正面;

(4) 结果判断:C 线显示为红色线条,当 T 线显色,结果为阴性,待测样品中的镉离子浓度小于 50ng/ml;当 T 线不显色,结果为阳性,待测溶液中的镉离子浓度大于 50ng/ml,即待测样品中的镉离子浓度大于 0.2mg/kg。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN104007262A | 公开(公告)日 | 2014-08-27 |
| 申请号 | CN201410208120.0 | 申请日 | 2014-05-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中南林业科技大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中南林业科技大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中南林业科技大学 | | |
| [标]发明人 | 刘博 林亲录 罗非君 杨涛 汪龙 肖华西 | | |
| 发明人 | 刘博 林亲录 罗非君 杨涛 汪龙 肖华西 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | G01N33/558 G01N33/54373 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

镉离子胶体金免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用，本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条按照以下方法制备而成：（1）抗镉离子单抗的制备和纯化；（2）检测抗原镉-乙烯基二胺-N,N,N',N'-四乙酸-牛血清蛋白的制备；（3）胶体金溶液的制备；（4）抗镉离子单抗标记的胶体金溶液的制备；（5）喷金；（6）硝酸纤维素膜上包被C,T线；（7）镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的组装。本发明还包括所述镉离子胶体金免疫层析检测试纸条的应用。本发明之镉离子胶体金免疫层析检测试纸条，成本低廉，检测精度高，可大规模地对粮食及其加工产品残留重金属镉进行快速、方便、准确的检测。