

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910060513.0

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101482565A

[22] 申请日 2009.1.14

[21] 申请号 200910060513.0

[71] 申请人 艾博(武汉)生物技术有限公司

地址 430074 湖北省武汉市东湖开发区留学生创业园创业中心7-5栋6198室

[72] 发明人 钱金宏 廖园园

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 王敏锋

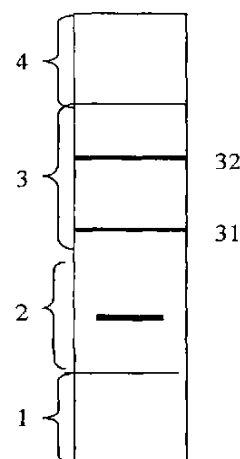
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称

三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸及制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸及制备方法,在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜上铺设玻璃纤维纸以及硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上包被检测线和对照线,检测线侧贴有金标探针结合垫,对照线侧贴有吸水垫,其中检测线是包被三聚氰胺,对照线是包被羊抗鼠IgG纯化抗体。本发明采用的是直接竞争法,其制备步骤是将三聚氰胺包被于免疫层析膜上,用胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体,制成金标探针结合垫。本发明的试纸检测特异性强,准确率高,重复性好,且检测快速,操作简便,无需特殊的设备和仪器,携带方便,可在常温下保存,保存期可达1年。



1、一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸，试纸水平面自下而上依次为：样品吸收区（1）、金标抗体区（2）、固相化抗原抗体区（3）和吸水区（4），其特征在于：样品吸收区（1）铺设的为聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜（5）上铺设玻璃纤维膜；金标抗体区（2）为：将胶体金标记的抗三聚氰胺单克隆抗体均匀的喷洒于单位面积的聚酯膜上；固相化抗原和抗体区（3）为：将三聚氰胺抗原和羊抗鼠 IgG 纯化抗体分别固定在单位面积的免疫层析膜上；吸水区为吸水纸，玻璃纤维膜上依次铺设金标探针结合垫（7）和硝酸纤维素膜（6），硝酸纤维素膜（6）上包被检测线（31）和对照线（32），检测线（31）侧贴有金标探针结合垫（7），对照线（32）侧贴有吸水滤纸（8）。

2、根据权利要求1所述的一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸，其特征在于：所述的检测线（31）包被的是三聚氰胺，对照线（32）包被的是羊抗鼠 IgG 纯化抗体，三聚氰胺包被量为 0.5-10 μ g，金标探针抗体标记量为 2-40 μ g/ml，羊抗鼠 IgG 纯化抗体包被量为 1-10 μ g。

3、一种实现权利要求1所述的三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸的制备方法，其步骤是：

（1）、三聚氰胺单克隆抗体的制备：用纯化的三聚氰胺-KLH 人工抗原免疫 BALB/c 小鼠，得到抗原刺激的脾脏细胞，融合该脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞系，利用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞，用 ELISA 方法鉴定抗三聚氰胺的细胞株，进行三次克隆化后得到分泌高特异性的单克隆抗体的细胞株，通过小鼠腹水生产抗三聚氰胺的单克隆抗体；

（2）、胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体的制备：分别取半径为 5-60nm 的胶体金 20ml 及鼠抗三聚氰胺单克隆抗体 200 μ g，在 pH7-12 的条件下通过磁力搅拌振荡使其结合，加牛血清白蛋白（BSA）作为稳定剂，使得 BSA 最终浓度为 0.2-6%，采用高速离心法除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物，在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体，即金标探针；

（3）、金标探针用 0.5-5mmol/L，pH7.5-12.5 的硼酸缓冲液溶解后用喷膜仪喷涂于聚酯膜上，15-30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1-6 小时，即得到金标探针结合垫；

（4）、在硝酸纤维素膜上包被三聚氰胺检测线，以及用羊抗鼠 IgG 纯化抗体包被对照线，15-30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1-6 小时，制成免疫层析膜；

（5）、将金标探针结合垫和免疫层析膜铺设在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜上，再铺上吸水滤纸和样品吸收区的玻璃纤维膜就得到三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸。

4、根据权利要求3所述的一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸的制备方法，其特征在于：所述的包含5个步骤的胶体金免疫层析检测试纸的制备方法同样适用于三聚氰胺三嗪类含氮杂环有机化合物的胶体金免疫层析检测试纸的制备。

三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸及制备方法

技术领域

本发明涉及三聚氰胺胶体金免疫层析检测技术领域，更具体本发明涉及一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸，同时还涉及三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸的制备方法，该制备方法同样适用于三聚氰酸等其他三嗪类含氮杂环有机化合物的胶体金免疫层析检测试纸的制备。

背景技术

三聚氰胺(英文名 Melamine),简称三胺,又叫 2,4,6-三氨基-1,3,5-三嗪、1,3,5-三嗪-2,4,6-三胺、2,4,6-三氨基脲、蜜胺、三聚氰酰胺、氰脲三酰胺,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,是重要的氮杂环有机化工原料。白色结晶粉末,无味。这种化学品常被用于生产塑料、胶水和阻燃剂,在部分亚洲国家,它也被用以制造化肥。它是一种禁止用于宠物食品及动物饲料的化学物质,动物食用后可以使动物发生肾衰竭并导致死亡。

在食品工业中,因为需要测定食品的蛋白质含量,而直接测量蛋白质技术上比较复杂,所以通常采用凯氏定氮法测定蛋白质含量,即通过测定食品中氮的含量来间接推算蛋白质的含量。由于三聚氰胺与蛋白质相比含有更多的氮原子,所以添加在食品中的三聚氰胺可以造成食品蛋白质含量较高的假象,因而被不法商贩所利用。三聚氰胺被摄入人体后,通过小肠吸收进入血液循环并最终进入肾脏,形成肾结石,尤其对于哺乳期的婴儿,更容易造成结石。

三聚氰胺的检测目前主要采用仪器检测的方法。主要方法有:GC-MS法、Spectra-Quad在线检测、超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法、反相高效液相色谱法、高效液相色谱-二极管阵列法、高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱-四极杆质谱联用、固相萃取与高效液相色谱联用、液相色谱串联质谱法(LC-MSMS)等。这些仪器方法价格昂贵,且方法操作复杂,需受过专门训练的人员才能操作,而且存在着适用范围窄、设备昂贵、成本高等问题。酶联免疫试剂盒检测方法也需要有完善的实验室,有经验的技术人员,复杂的仪器设备,且检测过程繁琐,存在检测时间长等缺点。不适应现场大量样本的快速筛查。

目前还没有一种特异性强、灵敏度高、且操作简单方便、适宜快速的现场检测和大规模普查要求的乳制品中三聚氰胺检测方法。为解决现有技术的不足,本发明提出了一

种特异性强、灵敏度高，且操作简单方便，对样品经过简单处理即可检测的三聚氰胺快速试纸检测方法，为开展三聚氰胺快速现场检测和大规模普查提供了方便。该技术的关键是抗三聚氰胺单克隆抗体的制备和三聚氰胺免疫层析试纸的制作。

目前，利用单克隆抗体进行三聚氰胺的竞争胶体金快速检测方法尚未见报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸，检测试纸特异性强，准确率高，重复性好，且检测快速，操作简便，无需特殊的设备和仪器，携带方便，可在常温下保存，保存期可达1年。

本发明的另一个目的是在于提供了一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸的制备方法，此方法利用抗三聚氰胺单克隆抗体作为金标探针，特异性强，灵敏度高，结合胶体金标记技术，使检测方法快速，简便。

为了实现上述目的，本发明采用以下技术措施：

三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸，包括胶体金标记的鼠抗三聚氰胺单克隆抗体，羊抗鼠 IgG 抗体，聚乙烯板，聚氯乙烯衬膜，玻璃纤维纸，聚酯膜，免疫层析膜和吸水纸组成。试纸水平面自下而上依次为：样品吸收区、金标单抗区、固相化抗原和抗体区、吸水区，试纸水平面自下而上依次为：样品吸收区、金标单抗区、固相化抗原和抗体区、吸水区，其特征在于：样品吸收区铺设的为在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜上铺设玻璃纤维膜；金标单抗区为：将胶体金标记的抗三聚氰胺单克隆抗体均匀的喷洒于单位面积的聚酯膜上；固相化抗原和抗体区为：将三聚氰胺抗原和羊抗鼠 IgG 纯化抗体分别固定在单位面积的免疫层析膜上；吸水区为吸水纸。玻璃纤维膜上依次铺设金标探针结合垫和硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上包被检测线和对照线，检测线侧贴有金标探针结合垫，对照线侧贴有吸水滤纸，其中检测线包被的是三聚氰胺，对照线包被的是羊抗鼠 IgG 纯化抗体，三聚氰胺合适包被量为 0.5-10 μ g，金标探针合适抗体标记量为 2-40 μ g/ml，羊抗鼠 IgG 纯化抗体合适包被量为 1-10 μ g 蛋白。

其中样品吸收区对应的是聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜及铺设玻璃纤维膜，金标抗体区对应的是金标探针结合垫，固相化抗原抗体区对应的是硝酸纤维素膜及包被的被检测线和对照线，吸水区对应的是吸水滤纸。

三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸的制备方法，其步骤是：

1、三聚氰胺单克隆抗体的制备：用纯化的三聚氰胺-KLH 人工抗原免疫 BALB/c 小鼠，得到抗原刺激的脾脏细胞，融合该脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞系，利用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞，用 ELISA 方法（传统的常用方法）鉴定抗三聚氰胺的细胞株，进行三次克隆化后得到分泌高特异性的单克隆抗体的细胞株，通过小鼠腹水生产抗三聚氰胺的单克隆抗体。

2、胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体的制备：分别取半径为 5-60nm 的胶体金

20ml 及鼠抗三聚氰胺单克隆抗体 200 μ g, 在 pH7-12 的条件下通过磁力搅拌振荡使其结合, 加牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂, 且使得 BSA 最终浓度为 0.2-6%, 采用高速离心法除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物。在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体(胶体金-抗体复合物), 即金标探针。

3、将胶体金-抗体复合物喷涂于聚酯膜上得到金标探针结合垫:

用 20ml 聚乙二醇缓冲液洗涤胶体金-抗体复合物, 离心除去上清液, 得到深红色沉淀, 纯化后的沉淀用 2ml 浓度为 0.5-5mmol/L, pH7.5-12.5 的硼酸缓冲液溶解, 用喷膜仪喷涂于聚酯膜上, 15-30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1-6 小时, 即得到金标探针结合垫。(金标探针用 0.5-5mmol/L, pH7.5-12.5 的硼酸缓冲液溶解后用喷膜仪喷涂于聚酯膜上, 15-30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1-6 小时, 即得到金标探针结合垫)。

4、在硝酸纤维素膜上包被三聚氰胺检测线, 以及用羊抗鼠 IgG 纯化抗体包被对照线, 每条线宽 4mm, 三聚氰胺合适包被量为 0.5-10 μ g, 羊抗鼠 IgG 纯化抗体合适包被量为 1-10 μ g, 15-30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1-6 小时, 即得到免疫层析膜。

5、将金标探针结合垫和免疫层析膜铺设在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜(购于上海金标公司)上, 再铺上吸水滤纸(购于上海金标公司)和样品吸收区的玻璃纤维膜(购于上海金标公司)就得到三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸。

利用上述 1-5 步骤的方法同样可以制备出三聚氰酸等三嗪类含氮杂环有机化合物的胶体金免疫层析快速检测试纸。

本发明的试纸具有以下优点:

检测时, 将试纸浸入被测样, 对比检测线和对照线的颜色, 即可判定被测样中是否含有三聚氰胺。

1、检测快速: 检测时间只需 5-10 分钟, 能够满足现场检测的需要。

2、检测准确率高、特异性强: 本反应与其他三嗪类含氮杂环有机化合物没有交叉反应, 检测灵敏度与 ELISA 基本相同。

3、携带方便, 操作简便: 本发明不需要借助其它仪器设备, 适合各级检测机构及个人使用。

4、检测试纸在常温下即可保存, 保存期可达 1 年。

附图说明

图 1 为三聚氰胺检测试纸平面结构区域图。

图 2 为三聚氰胺检测试纸纵切面结构图。

其中: 1-样品吸收区, 2-金标抗体区, 3-固相化抗原抗体区, 4-吸水区, 5-聚乙烯

板及聚氯乙烯衬膜, 6-硝酸纤维素膜, 7-金标探针结合垫, 8-吸水滤纸; 31-检测线, 32-对照线

具体实施方式

三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸, 试纸水平面自下而上依次为:

样品吸收区 1、金标抗体区 2、固相化抗原抗体区 3 和吸水区 4, 样品吸收区 1 铺设的为在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜 5 上铺设玻璃纤维膜, 玻璃纤维膜上依次铺设金标探针结合垫 7 和硝酸纤维素膜 6, 硝酸纤维素膜 6 上包被检测线 31 和对照线 32, 检测线 31 侧贴有金标探针结合垫 7, 对照线 32 侧贴有吸水滤纸 8, 其中检测线 31 包被的是三聚氰胺, 对照线 32 包被的是羊抗鼠 IgG 纯化抗体, 三聚氰胺合适包被量为 0.5 或 1 或 2.6 或 3.8 或 4.6 或 5.9 或 6.2 或 7.5 或 8.8 或 9.4 或 10 μ g, 金标探针合适抗体标记量为 2 或 4 或 7 或 9.5 或 15 或 19 或 28 或 35 或 40 μ g/ml, 羊抗鼠 IgG 纯化抗体合适包被量为 1 或 2 或 3.3 或 4 或 5.6 或 6.6 或 7.8 或 8.8 或 10 μ g。

本发明试纸的制备步骤是:

1、本发明中三聚氰胺单克隆抗体的制备方法是用纯化的三聚氰胺-KLH 人工抗原免疫 BALB/c 小鼠, 得到抗原刺激的脾脏细胞, 融合该脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞系, 利用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞, 用 ELISA 方法鉴定抗三聚氰胺的细胞株, 进行三次克隆化后得到分泌高特异性的单克隆抗体的细胞株, 通过小鼠腹水生产抗三聚氰胺的单克隆抗体。

2、胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体的制备:

分别取半径为 10 或 15 或 20 或 25 或 31 或 38 或 42 或 48 或 55nm 的胶体金 20ml 及鼠抗三聚氰胺单克隆抗体 200 μ g, 在 pH7.5 或 8.2 或 9.1 或 10.2 或 11.6 的条件下通过磁力搅拌振荡使其结合, 加牛血清白蛋白 (BSA) 作为稳定剂, 且使得 BSA 最终浓度为 0.4 或 0.7 或 1.1 或 1.6 或 2.5 或 3 或 3.5 或 4.2 或 4.8 或 5.5%, 采用高速离心法除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物, 在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-抗体复合物。

3、将胶体金-抗体复合物喷涂于聚酯膜上得到金标探针结合垫:

用 20ml 聚乙二醇缓冲液洗涤胶体金-抗体复合物, 离心除去上清液, 得到深红色沉淀, 纯化后的沉淀用 2ml 浓度为 0.6 或 1.1 或 1.7 或 2.4 或 3.1 或 3.7 或 4.5mmol/L, pH7.8 或 8.5 或 9 或 9.5 或 9.9 或 10.6 或 11.2 或 12.0 的硼酸缓冲液溶解, 用喷膜仪喷涂于聚酯膜上, 15 或 18 或 21 或 24 或 27 或 30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 小时, 即得到金标探针结合垫。

4、免疫层析膜的制备

在硝酸纤维素膜上包被三聚氰胺检测线, 以及用羊抗鼠 IgG 纯化抗体包被对照线, 每条线宽 4mm, 三聚氰胺合适包被量为 0.5 或 1.5 或 3 或 5 或 6 或 7 或 8 或 10 μ g, 羊抗

鼠 IgG 纯化抗体合适包被量为 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 或 7 或 8 或 10 μ g, 15 或 18 或 21 或 26 或 30 $^{\circ}$ C 真空干燥 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 小时, 即得到免疫层析膜。

5、试纸装备

塑料聚乙烯板作为支撑载体, 上面粘有一层聚氯乙烯衬膜, 由下至上是一层玻璃纤维膜组成的样品吸收区, 其次是吸附了金标探针的聚酯膜组成的金标探针结合垫。然后是硝酸纤维膜, 最上一层是吸水区, 由一层滤纸组成, 外面用胶带包封, 即装备成三聚氰胺胶体金免疫层析快速检测试纸。

利用上述 1-5 步骤的方法同样可以制备出三聚氰酸等三嗪类含氮杂环有机化合物的胶体金免疫层析快速检测试纸。

三聚氰胺快速检测试纸的使用方法:

被测样品含三聚氰胺达 1 μ g/ml (1ppm) 及以上时, 检测线不出现红色线条, 为阳性反应; 如检测线出现红色线条, 即为阴性, 表明被测样品中没有三聚氰胺或三聚氰胺含量不足 1 μ g/ml (1ppm), 对照线不管被测样品中有没有三聚氰胺均出现红色的阳性反应, 表明试纸有效, 如对照线无反应, 说明试纸失效。

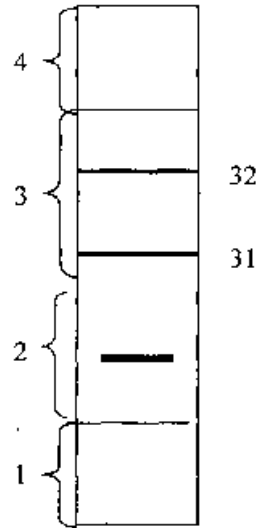


图 1

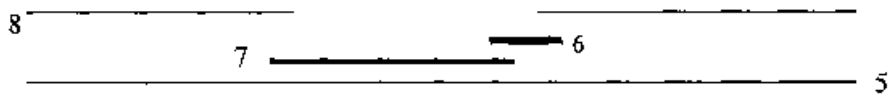


图 2

专利名称(译)	三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸及制备方法		
公开(公告)号	CN101482565A	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN200910060513.0	申请日	2009-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	艾博(武汉)生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	艾博(武汉)生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾博(武汉)生物技术有限公司		
[标]发明人	钱金宏 廖园园		
发明人	钱金宏 廖园园		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
代理人(译)	王敏锋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸及制备方法，在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜上铺设玻璃纤维纸以及硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上包被检测线和对照线，检测线侧贴有金标探针结合垫，对照线侧贴有吸水垫，其中检测线是包被三聚氰胺，对照线是包被羊抗鼠IgG纯化抗体。本发明采用的是直接竞争法，其制备步骤是将三聚氰胺包被于免疫层析膜上，用胶体金标记鼠抗三聚氰胺单克隆抗体，制成金标探针结合垫。本发明的试纸检测特异性强，准确率高，重复性好，且检测快速，操作简便，无需特殊的设备和仪器，携带方便，可在常温下保存，保存期可达1年。

