



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101655494 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 09

(21) 申请号 200910192450. 4

(22) 申请日 2009. 09. 17

(73) 专利权人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市黄埔大道西 601 号

(72) 发明人 唐勇 向军俭 翟一凡 邓宁
王宏 杨红宇

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 裘晖 陈燕娴

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 1/113 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101041696 A, 2007. 09. 26,

朱晓霞. 重金属镉、铅单克隆抗体、单链抗体的研制及单链抗体三维结构的模建. 《中国博士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2008, 第 2008 年卷 (第 05 期), D046-4.

杨挺等. 动物源食品中氯霉素残留速测金标试纸条的研制. 《中国农学通报》. 2007, 第 23 卷 (第 11 期), 157-161.

杨挺等. 动物源食品中氯霉素残留速测金标试纸条的研制. 《中国农学通报》. 2007, 第 23 卷 (第 11 期), 157-161.

XIAOXIA ZHU 等. Characterization of Monoclonal Antibodies for Lead-Chelate Complexes: Applications in Antibody-Based Assays. 《Journal of Agricultural and Food Chemistry》. 2007, 第 55 卷 (第 13 期), 4993-4998.

审查员 张丽华

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条及制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条及其制备方法和用途。试纸条的制备方法:(1) 抗铅离子单抗的制备和纯化;(2) 检测抗原 Pb-DTPA-OVA 的制备;(3) 胶体金溶液的制备;(4) 抗铅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) 试纸条的组装。利用此试纸条进行铅离子检测的方法, 包括以下步骤:a、在待测样品消解液中加入 DTPA 螯合剂, 使铅离子与 DTPA 充分螯合;b、用滴管吸取待检样品溶液, 滴加 3 滴于试纸条的样品垫上, 加样后开始计时;c、在加样后 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;d、结果判断。

CN 101655494 B

1. 一种铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备方法,其特征在于包括以下操作步骤:

(1) 抗铅离子单抗的制备和纯化;所述抗铅离子单抗的制备和纯化按以下操作步骤:用双功能二乙烯三胺五乙酸螯合剂将铅离子偶联到牛血清白蛋白上,混合弗式不完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选出稳定分泌抗铅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 2 倍体积的醋酸钠缓冲液,调节 pH 至 4.5;于室温搅拌下逐滴加入体积比为 33 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的辛酸,4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置、离心,得到上清液;调节上清液 pH 至 7.4,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴下逐滴加入占上清液体积 82 % 的饱和硫酸铵溶液,静置、离心,得沉淀;将沉淀溶于磷酸盐缓冲溶液中,透析,4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置过夜、离心,弃沉淀,得到抗铅离子单抗;所述醋酸钠缓冲液的摩尔体积比浓度为 0.06 mol/L, pH 值为 5.0,所述磷酸盐缓冲溶液的摩尔体积比浓度为 0.01 mol/L, pH 值为 7.4;

(2) 检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白的制备;所述铅的检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白的制备按以下步骤:将异硫氰基二乙烯三胺五乙酸以质量体积比为 20 mg/ml 溶于二甲基亚砷中形成 A 液;将兔抗鸡卵白蛋白以质量体积比为 15.4 mg/ml 溶于 300 μl 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 1.3 % 的三乙胺和聚乙二醇 600,形成 B 液;将 A 液逐滴加入 B 液中,振荡 24 h;用超滤管离心,得到异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白;取硝酸铅 21.1 mg 溶于 100 μl 二甲基亚砷中形成 C 液;将 C 液逐滴加入异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白中,振荡 3 h;用超滤管离心,得到检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白;

(3) 胶体金溶液的制备:取质量浓度为 0.01 % 的氯金酸水溶液 100 mL,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 2.2 mL,继续搅拌加热 0.5 ~ 24 小时,直至溶液呈酒红色,室温冷却,得到含有粒径为 20 ~ 40 nm 的胶体金颗粒的胶体金溶液;

(4) 抗铅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 100 mL,用摩尔浓度为 0.25 mol/L 的碳酸钾溶液将其 pH 值调至 8.5;将步骤(1)所得抗铅离子单抗 1.6 mg 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 10 % 的无菌牛血清白蛋白 11 mL,搅拌 0.5 ~ 24 小时,4 $^{\circ}\text{C}$ ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜;将上述标记后的胶体金溶液于 12000 ~ 14000 r/min 离心 40 min,弃去上清液,加入摩尔浓度为 0.015 mol/L 的磷酸盐缓冲液 4 mL 重悬,得到抗铅离子单抗标记的胶体金溶液;

(5) 喷金:把步骤(4)所得抗铅离子单抗标记的胶体金溶液按 2 ~ 10 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 的喷量喷在结合垫上,37 $^{\circ}\text{C}$ ~ 45 $^{\circ}\text{C}$ 抽风烘干,时间为 5 ~ 24 h,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 ~ 1.5 mg/ml;T 线为检测线,包被铅的检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白,浓度为 0.1 ~ 0.9 mg/ml;37 $^{\circ}\text{C}$ ~ 45 $^{\circ}\text{C}$ 抽风烘干,时间为 2 ~ 24 h;得到包被后的硝酸纤维素膜;

(7) 铅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按照以下所述方式组装,切割成条,得到铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条;

所述试纸条是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的;所述包被后的硝酸纤维素膜上设置检测线 T 线和质控线 C 线,其中检测线 T 线靠近样品垫一端;所述结合垫和样品垫是将聚酯膜经过摩尔浓度为 0.01 ~ 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液、质量体积比为 3 g/100ml ~ 6 g/100ml 的非离子表面活性剂、体积比为 1 ml/100ml ~ 4 ml/100ml 的吐温 20 和质量体积比为 5 g/100ml ~ 20 g/100ml 聚乙二醇 6000 组成的混合液中浸泡 5 ~ 24 h,取出后于 37 ~ 45 °C 抽风烘干得到;所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0 ~ 7.5。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤(7)所述试纸条是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粘贴在聚氯乙烯底板上,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。

铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条及制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种铅离子胶体金免疫层析快速检测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 (lead) 原子序数 82, 是严重危害人类健康的重金属之一, 在所有已知毒性物质中, 书上记载最多的是铅。铅的污染来自矿山开采、冶炼、橡胶生产、染料、印刷、陶瓷、铅玻璃、焊锡、电缆及铅管等生产废水和废弃物。另外, 汽车尾气中的四乙基铅是剧毒物质。随着我国工农业的迅速发展, 环境中重金属的污染越来越严重。重金属污染引起的毒害持久存在, 会随土壤、水体再次循环而进入食物链, 对食品安全构成威胁, 危害人类生命和健康。急性铅中毒症状为: 胃痛, 头痛, 颤抖, 神经性烦躁, 在最严重的情况下, 可能人事不省, 直至死亡。慢性中毒症状多样化, 主要有: 肠胃道的紊乱如食欲不振、便秘 (有时为腹泻)、由于小肠痉挛而发生铅绞痛, 齿龈及颊粘膜上由于硫化铅的沉着而形成的灰蓝色铅线等。神经系统受侵犯而发生头痛、头晕、疲乏、烦躁易怒、失眠, 晚期可发展为铅脑病, 引起幻觉、谵妄、惊厥等; 外周可发生多发性神经炎, 出现铅毒性瘫痪。我国各类食品中重金属的国家限量卫生标准, 农产品安全质量无公害水产品安全要求 (GB 18406. 4-2001) 中对铅含量都有限定 $\leq 0.5\text{mg/kg}$ 。欧盟, 美国, 日本, 韩国等我国水产品的主要出口国对水产品的重金属含量的限定也越来越严格, 法规和标准也越来越苛刻。

[0003] 目前重金属铅的检测方法主要有:

[0004] 1. 物理和化学的方法: 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。

[0005] 2. 免疫学检测技术:

[0006] 酶联免疫吸附检测法 (ELISA): 其检测的原理是利用样品中的铅离子与标准品中铅离子竞争结合抗体并以此对样品中的铅进行定性或定量分析。该方法比较简便、快速, 可同时分析大批量样品, 目前国内外已有出重金属铅的 ELISA 检测的报道。

[0007] 胶体金免疫层析法 (GICA): 其检测的原理是将各种反应试剂 (抗原和抗体) 以条带状固定在同一试纸条上, 待检样品加在试纸条的一端, 通过毛细作用在试纸条上渗滤、移行并与纸上另一种试剂发生抗原抗体特异性免疫反应, 层析过程中免疫复合物被截留、聚集在层析材料的一定区域 (检测带), 通过可目测的胶体金标记物得到直观的显色结果, 而游离的标记物则越过检测带, 达到与结合标记物自动分离的目的。

[0008] 胶体金免疫层析试纸条因具有体积小、携带方便、不需要仪器设备、操作简单、可现场检测、3~5min 出结果以及结果可由肉眼根据 T 线颜色有无判断等诸多优点, 非常适合对大批量样品进行现场初筛, 近几年在食品安全快速检测中颇受关注。目前国内外尚未见铅离子胶体金免疫层析快速检测方法的报道, 国内市场尚无该试纸条产品, 因此, 自主知识

产权的重金属铅离子胶体金免疫层析快速检测方法及其试纸条具有重要价值。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于克服现有技术存在的缺点和不足,为了实现大规模地对环境(水体和土壤等)与水产类食品中残留的重金属铅进行快速、方便的检测,保障我国海产品食用安全及维护我国在相关国际贸易领域中的利益,提供一种铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条。

[0010] 本发明的另一目的在于提供上述铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备方法。

[0011] 本发明的再一目的在于提供一种利用上述铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条进行铅离子检测的方法。

[0012] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条,其特征在于:该试纸条是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的;所述包被后的硝酸纤维素膜上设置检测线 T 线和质控线 C 线,其中检测线 T 线靠近样品垫一端;所述结合垫和样品垫是将聚酯膜经过摩尔浓度为 0.01 ~ 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液、质量体积比为 3g/100ml ~ 6g/100ml 的非离子表面活性剂、体积比为 1ml/100ml ~ 4ml/100ml 的吐温 20 和质量体积比为 5g/100ml ~ 20g/100ml 聚乙二醇 6000 组成的混合液中浸泡 5 ~ 24h,取出后于 37 ~ 45℃抽风烘干得到;所述磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0 ~ 7.5。

[0013] 所述试纸条是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粘贴在聚氯乙烯底板上,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。

[0014] 上述的铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备方法,包括以下操作步骤:

[0015] (1) 抗铅离子单抗的制备和纯化;

[0016] (2) 检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白(Pb-DTPA-OVA)的制备;

[0017] (3) 胶体金溶液的制备;

[0018] (4) 抗铅离子单抗标记的胶体金溶液的制备;

[0019] (5) 喷金:把步骤(4)所得抗铅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;

[0020] (6) 硝酸纤维素(NC)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,包被铅的检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白,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;

[0021] (7) 铅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按照权利要求 1 所述方式组装,切割成条,得到铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条。

[0022] 步骤(1)所述抗铅离子单抗的制备和纯化按以下操作步骤:用双功能二乙烯三胺

五乙酸 (p-SCN-Bn-DTPA) 螯合剂将铅离子偶联到牛血清白蛋白 (BSA) 上, 混合弗式不完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 筛选出稳定分泌抗铅离子单克隆抗体 (MAb-Pb) 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 2 倍体积的醋酸钠缓冲液, 调节 pH 至 4.5; 于室温搅拌下逐滴加入体积比为 33 μ l/ml 的辛酸, 4 $^{\circ}$ C 下静置、离心, 得到上清液; 调节上清液 pH 至 7.4, 4 $^{\circ}$ C 冰浴下逐滴加入占上清液体积 82% 的饱和硫酸铵溶液, 静置、离心, 得沉淀; 将沉淀溶于磷酸盐缓冲溶液中, 透析, 4 $^{\circ}$ C 下静置过夜、离心, 弃沉淀, 得到抗铅离子单抗; 所述醋酸钠缓冲液的摩尔体积比浓度为 0.06mol/L, pH 值为 5.0, 所述磷酸盐缓冲溶液的摩尔体积比浓度为 0.01mol/L, pH 值为 7.4。

[0023] 步骤 (2) 所述铅的检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白的制备按以下步骤: 将异硫氰基二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 以质量体积比为 20mg/ml 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中形成 A 液; 将兔抗鸡卵白蛋白 (OVA) 以质量体积比为 15.4mg/ml 溶于三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCL) 中, 分别加入占三羟甲基氨基甲烷盐酸盐体积 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, 振荡 24h; 用超滤管离心, 得到异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白; 取硝酸铅 (Pb(NO₃)₂) 以质量体积比为 11mg/ml 溶于二甲基亚砜中形成 C 液; 将 C 液逐滴加入异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白中, 振荡 3h; 用超滤管离心, 得到检测抗原铅-异硫氰基二乙烯三胺五乙酸-鸡卵清白蛋白。

[0024] 步骤 (3) 所述胶体金溶液的制备按以下操作步骤: 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 ~ 24 小时, 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。

[0025] 步骤 (4) 所述抗铅离子单抗标记的胶体金溶液的制备按以下操作步骤: 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) 所得抗铅离子单抗 1.6mg 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 10% 的无菌牛血清白蛋白 (BSA) 11mL, 搅拌 0.5 ~ 24 小时, 4 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C 静置过夜; 将上述标记后的胶体金溶液于 12000 ~ 14000r/min 离心 40min, 弃去上清液, 加入摩尔浓度为 0.015mol/L 的磷酸盐缓冲液 4ml 重悬, 得到抗铅离子单抗标记的胶体金溶液。

[0026] 一种利用上述铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条进行铅离子检测的方法, 包括以下操作步骤:

[0027] a、在铅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 的二乙烯三胺五乙酸螯合剂, 混合均匀, 使铅离子与二乙烯三胺五乙酸充分螯合, 得到待检样品溶液。

[0028] b、用滴管吸取步骤 a 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;

[0029] c、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;

[0030] d、结果判断: C 线显示为红色线条, 当 T 线显色, 结果为阴性, 待测样品中的铅离子浓度小于 50ng/ml; 当 T 线不显色, 结果为阳性, 待测样品中的铅离子浓度大于 50ng/ml。

[0031] 步骤 a 所述待测样品消解液是将待测样品加酸后进行微波或加热消解, 然后用纳米二氧化钛 (TiO₂) 富集, 再调 PH 至中性获得。

[0032] 为了更好地实现本发明,可以将铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条装入塑料板中,该塑料板的上面有两个孔:加样孔和检测显示窗口。其中,加样孔正对试纸条的样品垫,检测结果显示窗口正对NC膜。检测时,将待检样品溶液滴于加样孔中,根据检测结果窗口显示的T线颜色的有无进行判断。

[0033] 为了更好地实现本发明,水产类样品按下述方法预处理:准确称取1.0g鱼肉样品,在聚四氟乙烯坩埚中加入硝酸2ml,室温下放置4~6小时。然后将肉样转移进消化管内,用共计4ml的硝酸多次润洗坩埚,全部转移进消化管,再加入1.5ml的30%的过氧化氢。拧紧消化管盖,按规定位置置于微波消解仪内,调节时间为15min,进行微波加热。加热15min,取出,静置半个小时让其冷却。开盖取样品消解液,用NaOH溶液调节PH至7.4,用50ml容量瓶定容待测。

[0034] 环境水体类样品按下述方法预处理:取摇匀水体样品20mL,移入50mL聚四氟乙烯烧杯中,在通风橱内,将烧杯置于放有石棉网的电热炉上加热,加入1ml硝酸。待浓缩至2ml左右时取下冷却,沿杯壁加入2ml硝酸和0.8ml高氯酸。继续加热消解,待溶液清澈后,加入少许三蒸水,加热煮沸,驱尽氯气和氮化合物。用三蒸水溶解,滤入烧杯中,用NaOH溶液调节PH至7.4,用50ml容量瓶定容待测。

[0035] 环境土壤类样品按下述方法预处理:准确称取1.2g土壤样品于50mL微波管中,用少许水湿润后加入2mLHNO₃和6mL HCl,在室温下放置过夜,再置于微波消解炉中,编定微波程序,使其从室温逐渐升温至180℃并保持15min,然后逐渐降温至室温,取下,用NaOH溶液调节PH至7.4,用50ml容量瓶定容待测。

[0036] 本发明的原理是:将螯合剂-铅离子半抗原与载体蛋白偶联成为完全抗原免疫动物,获得针对铅离子特异性抗体,再将该抗铅离子的单克隆抗体与胶体金偶联,Pb-DTPA-OVA包被于NC膜的T线上。当滴加铅离子标准品竞争物(Pb-DTPA)或待测样品(X-DTPA)于加样孔中时,由于毛细作用液体向前移动。到达T线时,样品中的Pb-DTPA与固定在T线上的Pb-DTPA-OVA复合物竞争结合抗铅离子单抗-胶体金复合物,若样品中的铅离子浓度小于50ng/ml,则胶体金结合垫中的抗铅离子单抗-胶体金复合物与T线上Pb-DTPA-OVA及C线上羊抗鼠IgG大量结合,T线显色,结果为阴性;若样品中铅离子的浓度大于50ng/ml,则抗铅离子单抗-胶体金复合物全部与检测样品中的Pb-DTPA结合,不与T线上的Pb-DTPA-OVA结合,因此T线完全看不到,T线不显色,结果为阳性。

[0037] 本发明相对现有技术具有如下的优点及有益效果:(1)本发明利用得到的分泌抗铅离子单克隆抗体的阳性细胞可大量制得抗铅离子的单克隆抗体,所建立的方法成本低廉,可快速、简便、灵敏地测定样品中Pb²⁺的含量;(2)本发明制备的铅离子胶体金免疫层析试纸条体积小、携带方便、不需要大型仪器设备、操作简单,非常适合对大批量样品进行现场初筛,可以大规模地对海洋贝类食品中残留的重金属铅进行快速、方便的检测,保障我国海产品食用安全及维护我国在相关国际贸易领域中的利益。

附图说明

[0038] 图1是铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条的结构示意图,

[0039] 其中,1是聚氯乙烯底板;2是包被后的硝酸纤维素膜;3是喷金后的结合垫;4是样品垫;5是吸水纸;6是质控线(C线);7是检测线(T线)。

- [0040] 图 2 是铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条装入塑料板的外形图，
- [0041] 其中，1 是加样孔；2 是检测结果显示窗口；3 是 C 线位置；4 是 T 线位置。
- [0042] 图 3 是利用铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条进行铅离子检测的操作示意图。
- [0043] 图 4 是利用铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条进行铅离子检测的结果分析示意图。

具体实施方式

[0044] 下面结合实施例及附图对本发明做进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0045] 实施例 1

[0046] (1) 抗铅离子单抗的制备和纯化：用双功能二乙烯三胺五乙酸 (p-SCN-Bn-DTPA) 螯合剂将铅离子偶联到牛血清白蛋白 (BSA) 上，混合弗式不完全佐剂免疫 BALB/c 小鼠，取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，筛选出稳定分泌抗铅离子单克隆抗体 (MAb-Pb) 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 1 体积的腹水，加入 2 体积 0.06mol/L pH5.0 的醋酸钠缓冲液 (59ml 浓度为 0.06mol/L 的醋酸钠溶液 +41ml 浓度为 0.06mol/L 的冰醋酸混合而成)，再用 1mol/L 的盐酸调至 pH4.5；于室温搅拌下 30min 内逐滴缓慢加入体积比为 33 μ l/ml 的辛酸，4 $^{\circ}$ C 静置 2h，然后 4 $^{\circ}$ C 10000rpm/min 离心 30min，得上清液；用 1mol/L NaOH 溶液将上清液调 PH 至 7.4；4 $^{\circ}$ C 冰浴下 30min 内逐滴加入饱和硫酸铵溶液至 45% 饱和度 (饱和硫酸铵体积 = 上清体积 \times 0.82)，静置 1h，然后于 4 $^{\circ}$ C 10000rpm/min 离心 30min，得沉淀；将沉淀溶于摩尔浓度为 0.01mol/L、PH7.4 的磷酸盐缓冲液溶液 (将十二水磷酸氢二钠 28.94g、磷酸二氢钾 2.61g、氯化钠 8.0g、氯化钾 0.2g、二乙烯三胺五乙酸 0.06g 加入蒸馏水中溶解并定容至 1000ml) 中，用 0.01mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液溶液 (将十二水磷酸氢二钠 28.94g、磷酸二氢钾 2.61g 加入蒸馏水中溶解并定容至 1000ml) 透析，4 $^{\circ}$ C 过夜，期间换水 3 次；取出 4 $^{\circ}$ C 10000rpm/min 离心 30min，弃沉淀，得到抗铅离子单抗。

[0047] (2) 铅的检测抗原铅 - 异硫氰基二乙烯三胺五乙酸 - 鸡卵清白蛋白的制备：将异硫氰基二乙烯三胺五乙酸以质量体积比为 20mg/ml 溶于二甲基亚砜中形成淡黄色的 A 液；将兔抗鸡卵白蛋白 4.62mg 溶于 PH7.4 的 300 μ l 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液中，加入 4 μ l 三乙胺和 4 μ l 的 PEG600 聚乙二醇形成 B 液；将 A 逐滴加入 B 中，并不停的振荡；将混合物放于摇床上，室温，125r/min，24h；用 30KD 的超滤管 6500g 离心，10min，3 次，每次超滤的时候改用 PH7.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液，最后用 PH7.0 的三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液将截留物冲洗下来，约 3ml 放于玻璃瓶内；取硝酸铅 21.1mg 溶于 100 μ l 二甲基亚砜中形成无色的 C 液；将 C 液逐滴加入装有截留物的玻璃瓶中，将混合物放于摇床上，室温，125r/min，3h；用 30KD 的超滤管 6500g 离心，10min，3 次，最后用 PH7.0 的 Tris-HCL 将截留物冲洗下来，约 1ml 放于 EP 管内 (淡棕色)，得到检测抗原铅 - 异硫氰基二乙烯三胺五乙酸 - 鸡卵清白蛋白 Pb-DTPA-OVA。

[0048] (3) 胶体金溶液的制备：取质量分数为 0.01% 的氯金酸水溶液 100mL，用恒温电磁搅拌器加热至沸腾，一次性快速加入质量分数为 1% 的柠檬酸三钠水溶液 2.2mL，继续搅拌

加热 20min,直至溶液呈酒红色且稳定不变,室温冷却,4℃保存备用。通过透射电镜及紫外分光光度计检测胶体金溶液中胶体金颗粒的粒径为 20nm。

[0049] (4) 抗铅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)所得抗铅离子单抗 1.6mg 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 10% 的无菌牛血清白蛋白 11mL,室温静置过夜;将上述标记后的胶体金溶液于 13000r/min 离心 40min,弃去上清,加入摩尔浓度为 0.015mol/L 的磷酸盐缓冲液 4ml 重悬,得到抗铅离子单抗标记的胶体金溶液。分装后 4℃保存。

[0050] (5) 喷金:把标记好铅离子单抗的胶体金溶液按 10 μ l/cm 的喷量喷在已处理好的结合垫上,37℃抽风烘干,时间为 24 小时。

[0051] (6) 硝酸纤维素(NC)膜上包被 C,T 线:在 NC 膜上喷 C,T 线。C 线为质控线,包被羊抗鼠 IgG,浓度为 1.5mg/ml;T 线为检测线,包被重金属铅的检测抗原 Pb-DTPA-OVA,浓度为 0.9mg/ml,45℃抽风烘干,时间为 24 小时。

[0052] (7) 重金属铅的检测试纸条组装:以聚氯乙烯底板为底部支撑,将步骤(6)所得包被后的硝酸纤维素膜、步骤(5)所得喷金后的结合垫、样品垫和吸水纸以从左至右、依次相连的方式粘贴在聚氯乙烯底板上,其中硝酸纤维素膜的检测线 T 线位于左侧,质控线 C 线位于左侧(见图 1 所示);切割成条,宽度为 0.384 厘米,得到镉离子胶体金免疫层析快速检测试纸条。

[0053] (8) 将步骤(7)所得试纸条装入塑料板中,该塑料板的上面有两个孔:加样孔和检测显示结果窗口;其中,加样孔正对试纸条的样品垫,检测结果显示窗口正对 NC 膜。检测时,将待检样品溶液滴于加样孔中,根据检测结果窗口显示的 T 线颜色的有无进行判断。(见图 2 所示)

[0054] 实施例 2

[0055] 验证本发明的检测特异性试验:

[0056] 针对以下重金属运用实施例制得的铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条进行特异性交叉反应测试,结果如下:

[0057] 表 1 重金属铅其他几种的交叉反应

| 金属离子 | 标准样品浓度(ng/mL) | C,T 线显示 | 结果判断 | 交叉反应 |
|-------------------------|---------------|---------|------|------|
| Pb ²⁺ | ≥10 | T<C | 阳性 | 有 |
| Fe ³⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Cd ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Cu ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| [0058] Al ³⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Zn ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Cr ³⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Co ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Ca ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Mg ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |

[0059] 结果显示,抗体除对 Pd²⁺ 以外,对其他几种金属交叉反应几乎没有,因此此胶体金试纸条可以用来检测 Pd²⁺。

[0060] 实施例 3

[0061] 验证本发明的可靠性试验:(步骤 b 和 c 见图 3 所示,步骤 d 见图 4 所示)

[0062] a、先配制好 Pd²⁺ 系列梯度的标准溶液(10、20、50、80、100ng/mL)各 50 μL,再分别加入 50 μL 1mmol/L DTPA 溶液作为螯合剂,混合均匀,使铅离子与 DTPA 充分螯合成 Pd-DTPA,作为待测样品溶液。

[0063] b、用滴管吸取步骤 a 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;

[0064] c、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;

[0065] d、结果判断:C 线显示为红色线条,当 T 线显色,结果为阴性,待测样品中的铅离子浓度小于 50ng/ml;当 T 线不显色,结果为阳性,待测样品中的铅离子浓度大于 50ng/ml。

[0066] 从密封铝箔袋取出铅离子胶体金快速检测试纸条,用滴管吸取待检样品溶液,滴加 3 滴于加样孔中,加样后开始计时;结果应在 3 ~ 5 分钟读取,其他时间判读无效;读取结果时,检测试剂应摆放置于观察者正面。

[0067] 实施例 4

[0068] 验证本发明的稳定性试验:

[0069] 每隔 5 天,从密闭储存的铝箔袋中取出实施例 1 制得的铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条,用同一批次不同检测试纸条检测同一样品,及用不同批次检测试纸条测定同一样品,其质控线、检测线的显色时间及颜色深浅和最终结果判读相同。

[0070] 实施例 5

[0071] 先将待测样品预处理成消解液:准确称取 1.2g 土壤样品于 50mL 微波管中,用少

许水湿润后加入 2mLHNO₃ 和 6mL HCl, 在室温下放置过夜, 再置于微波消解炉中, 编定微波程序, 使其从室温逐渐升温至 180℃ 并保持 15min, 然后逐渐降温至室温, 取下, 用 NaOH 溶液调节 PH 至 7.4, 用 50ml 容量瓶定容待测。

[0072] 利用实施例 1 制备的铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条对上述土壤样品消解液进行铅离子检测, 包括以下操作步骤:(步骤 b 和 c 见图 3 所示, 步骤 d 见图 4 所示)

[0073] a、在土壤样品消解液中按照 1 : 1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的 DTPA 螯合剂, 混合均匀, 使铅离子与 DTPA 充分螯合, 得到土壤样品溶液。

[0074] b、用滴管吸取步骤 a 所得土壤样品溶液 100 μ L, 滴加于试纸条的加样孔中, 加样后开始计时;

[0075] c、在加样后 3 ~ 5min 读取结果, 读取时, 将试纸条以加样孔向下的方向垂直置于观察者正面;

[0076] d、结果判断 :C 线显示为红色线条, 当 T 线显色, 结果为阴性, 待测样品中的铅离子浓度小于 50ng/ml ; 当 T 线不显色, 结果为阳性, 待测样品中的铅离子浓度大于 50ng/ml。

[0077] 实施例 6

[0078] 先将待测样品预处理成消解液 : 准确称取 1.0g 鱼肉样品, 在聚四氟乙烯坩埚中加入硝酸 2ml, 室温下放置 4 ~ 6 小时。然后将肉样转移进消化管内, 用共计 4ml 的硝酸多次润洗坩埚, 全部转移进消化管, 再加入 1.5ml 的 30% 的过氧化氢。拧紧消化管盖, 按规定位置置于微波消解仪内, 调节时间为 15min, 进行微波加热。加热 15min, 取出, 静置半个小时让其冷却。开盖取鱼肉样品消解液, 用 NaOH 溶液调节 PH 至 7.4, 用 50ml 容量瓶定容待测。

[0079] 利用实施例 1 制备的铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条对上述鱼肉样品消解液进行铅离子检测, 包括以下操作步骤:(步骤 b 和 c 见图 3 所示, 步骤 d 见图 4 所示)

[0080] a、在鱼肉样品消解液中按照 1 : 1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的 DTPA 螯合剂, 混合均匀, 使铅离子与 DTPA 充分螯合, 得到鱼肉样品溶液。

[0081] b、用滴管吸取步骤 a 所得鱼肉样品溶液 100 μ L, 滴加于试纸条的加样孔中, 加样后开始计时;

[0082] c、在加样后 3 ~ 5min 读取结果, 读取时, 将试纸条以加样孔向下的方向垂直置于观察者正面;

[0083] d、结果判断 :C 线显示为红色线条, 当 T 线显色, 结果为阴性, 待测样品中的铅离子浓度小于 50ng/ml ; 当 T 线不显色, 结果为阳性, 待测样品中的铅离子浓度大于 50ng/ml。

[0084] 实施例 7

[0085] 取剪碎样品置于离心管中, 按每克样品加入 2mL 计加入乙酸乙脂, 充分打碎匀质 ; 4000rpm/min 离心 10min, 取上清在 50℃ 水浴下氮气流吹干样品 ; 以等量环己烷和蒸馏水混合提取涡漩 1min, 取环己烷层, 按每克样品加入 12.5 μ L 计加入 1M HCl, 涡漩 1min, 静置 30min ; 加入 2 倍于 HCl 液量的蒸馏水, 8000rpm/min, 弃去上层环己烷, 吸取下层清液, 用 NaOH 溶液调节 PH 至 7.4, 用 50ml 容量瓶定容待测。

[0086] 利用实施例 1 制备的铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条对上述水体样品消解液进行铅离子检测, 包括以下操作步骤:(步骤 b 和 c 见图 3 所示, 步骤 d 见图 4 所示)

[0087] a、在水体样品消解液中按照 1 : 1 的体积比加入摩尔浓度为 1mmol/L 的 DTPA 螯合剂, 混合均匀, 使铅离子与 DTPA 充分螯合, 得到鱼肉样品溶液。

[0088] b、用滴管吸取步骤 a 所得水体样品溶液 100 μ L, 滴加于试纸条的加样孔中, 加样后开始计时;

[0089] c、在加样后 3 ~ 5min 读取结果, 读取时, 将试纸条以加样孔向下的方向垂直置于观察者正面;

[0090] d、结果判断 :C 线显示为红色线条, 当 T 线显色, 结果为阴性, 待测样品中的铅离子浓度小于 50ng/ml ;当 T 线不显色, 结果为阳性, 待测样品中的铅离子浓度大于 50ng/ml。

[0091] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

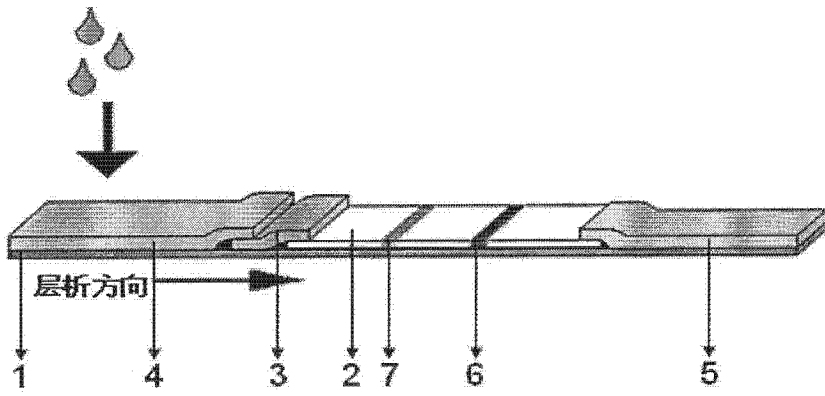


图 1

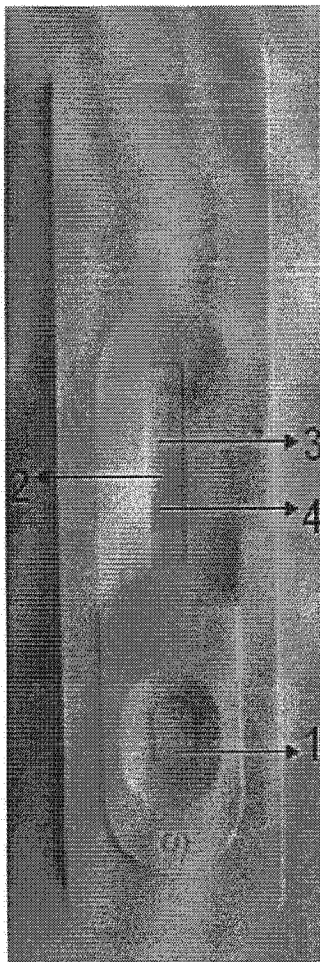


图 2

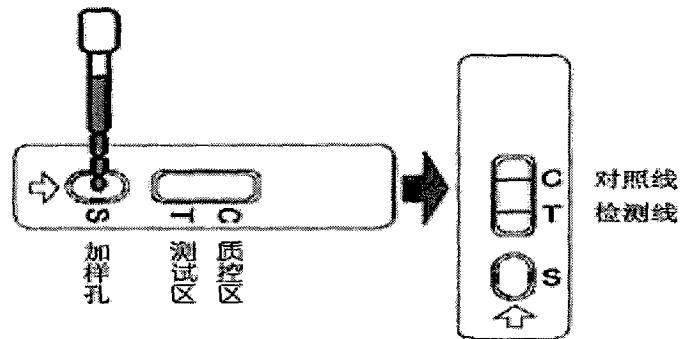


图 3

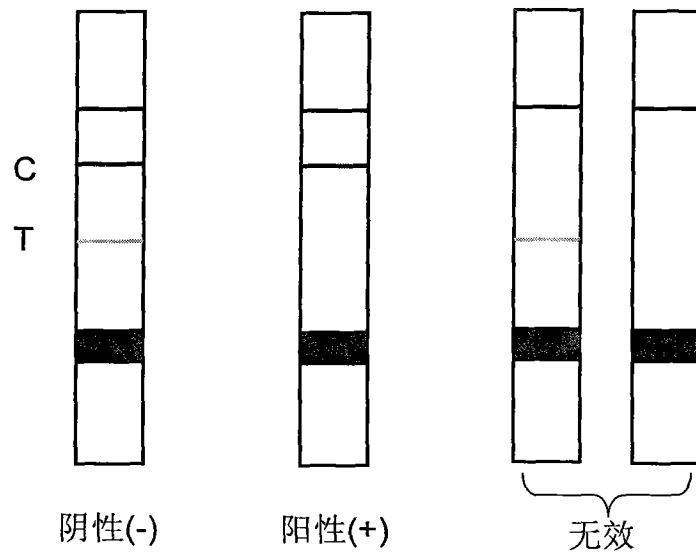


图 4

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条及制备方法和用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN101655494B | 公开(公告)日 | 2014-04-09 |
| 申请号 | CN200910192450.4 | 申请日 | 2009-09-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 暨南大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 暨南大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 暨南大学 | | |
| [标]发明人 | 唐勇 向军俭 翟一凡 邓宁 王宏 杨红宇 | | |
| 发明人 | 唐勇 向军俭 翟一凡 邓宁 王宏 杨红宇 | | |
| IPC分类号 | G01N33/558 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/52 C07K16/44 C07K14/77 C07K11/113 | | |
| 审查员(译) | 张丽华 | | |
| 其他公开文献 | CN101655494A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种铅离子胶体金免疫层析快速检测试纸条及其制备方法和用途。试纸条的制备方法：(1)抗铅离子单抗的制备和纯化；(2)检测抗原Pb-DTPA-OVA的制备；(3)胶体金溶液的制备；(4)抗铅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)试纸条的组装。利用此试纸条进行铅离子检测的方法，包括以下步骤：a、在待测样品消解液中加入DTPA螯合剂，使铅离子与DTPA充分螯合；b、用滴管吸取待检样品溶液，滴加3滴于试纸条的样品垫上，加样后开始计时；c、在加样后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；d、结果判断。

| 金属离子 | 标准样品浓度(ng/mL) | C,T 线显示 | 结果判断 | 交叉反应 |
|------------------|---------------|---------|------|------|
| Pb ²⁺ | ≥10 | T<C | 阳性 | 有 |
| Fe ³⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Cd ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Cu ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Al ³⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Zn ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Cr ³⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Co ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Ca ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |
| Mg ²⁺ | ≥10 | T>=C | 阴性 | 无 |