



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101655498 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 03

(21) 申请号 200910093010. 3

(22) 申请日 2009. 09. 25

(73) 专利权人 江西中德生物工程有限公司
地址 江西省南昌市高新开发区高新一路
(昌建工业园内)

(72) 发明人 赖卫华 黄启明 杨晓慧 陈媛
魏华 熊勇华

(51) Int. Cl.

- G01N 33/577(2006. 01)
- G01N 33/558(2006. 01)
- G01N 33/532(2006. 01)
- G01N 33/566(2006. 01)
- C07K 14/765(2006. 01)
- C07K 14/77(2006. 01)
- C07K 1/113(2006. 01)
- C07K 16/44(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101308140 A, 2008. 11. 19, 说明书第 2 页第 6-14 行, 第 3 页第 1 行至第 4 页第 9 行, 第 8 页第 1-16 行, 图 2.

CN 101451999 A, 2009. 06. 10, 说明书第 4 页第 1. 2. 1 部分, 第 5 页第 2. 1 部分.

US 2007072242 A1, 2007. 03. 29, 全文.

CN 101308140 A, 2008. 11. 19, 说明书第 2 页第 6-14 行, 第 3 页第 1 行至第 4 页第 9 行, 第 8 页第 1-16 行, 图 2.

审查员 潘浩

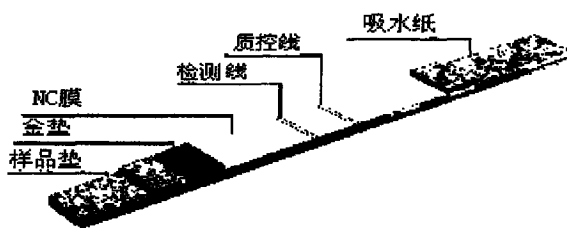
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

水产品中检测隐性孔雀石绿的免疫胶体金试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测隐性孔雀石绿胶体金免疫试纸条及其制备方法。本发明所提供的直接竞争法检测隐性孔雀石绿的胶体金试纸条,包括样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬,PVC背衬一端依次黏附样品垫、胶体金结合垫、中间黏附NC膜层,另一端依次黏附吸水垫,其特征是胶体金结合垫包被了抗隐性孔雀石绿特异性单克隆抗体-胶体金标记物,NC膜上吸附了隐性孔雀石绿-OVA和羊抗鼠IgG。本发明的检测灵敏度高、简单快速、价廉物美,整个反应只用30分钟,可用于大批样品的筛查,现场快速检测水产品中残留的隐性孔雀石绿情况。



1. 一种快速检测隐性孔雀石绿免疫胶体金试纸条的制备方法,其中,所述的试纸条包括:样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜 NC、吸水垫和 PVC 背衬;所述 PVC 背衬一端依次黏附样品垫、胶体金结合垫、NC 膜层、吸水垫;所述的胶体金结合垫包被了抗隐性孔雀石绿特异性单克隆抗体-胶体金标记物,NC 膜上吸附了隐性孔雀石绿-OVA 或隐性孔雀石绿-BSA 和羊或兔抗鼠 IgG;

其特征在于所述试纸条的制备方法包括以下步骤:

(1) 隐性孔雀石绿全抗原的合成:通过在苯环对位偶联一活性基团-COOH,合成隐性孔雀石绿半抗原;将隐性孔雀石绿半抗原与载体蛋白按 1:10-30 摩尔比混匀,采用戊二醛或重氮法合成隐性孔雀石绿-载体蛋白偶联物,经分离纯化后得到隐性孔雀石绿半抗原-载体蛋白偶联物;

(2) 隐性孔雀石绿特异性单克隆抗体的制备:以半抗原-BSA 为免疫原多次免疫 Balb/c 纯系小鼠,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞体外融合产生杂交瘤细胞,经选择性培养基筛选获得阳性杂交瘤细胞株;将所述杂交瘤细胞株注入小鼠腹腔获取腹水或体外细胞培养收集上清液,大量制备抗隐性孔雀石绿单克隆抗体;

(3) 羊或兔抗鼠 IgG 的获得:将半抗原-OVA 多次免疫小鼠,获取抗血清,再免疫山羊或兔,经分离纯化后获得羊或兔抗鼠 IgG;

(4) 特异性单克隆抗体胶体金制备:用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原成 20~40nm 的胶体金颗粒;然后把胶体金与抗隐性孔雀石绿单克隆抗体按体积质量比 1:0.005~0.015 混匀,使其结合形成稳定的胶体金颗粒,经纯化和浓缩产生抗隐性孔雀石单克隆抗体-胶体金标记物;

(5) 胶体金结合垫的制备:将隐性孔雀石绿特异单克隆抗体-胶体金标记物包被在胶体金结合垫上,将隐性孔雀石绿-OVA 偶联物和羊或兔抗鼠 IgG 吸附在 NC 膜的检测区和控制区,在 37°C 充分干燥;

(6) 胶体金试剂条组装:将样品垫、胶体金结合垫、NC 膜层,吸水垫依次粘连在 PVC 背衬上,将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试剂条,最后组装到一定大小的塑料盒中即可;

其中,步骤(1)中半抗原及完全抗原的合成步骤如下:

(a) 对隐性孔雀石绿乙酮的制备

在 100mL 三颈瓶中加入 20mL 二氯甲烷,18g 无水三氯化铝;冰盐浴冷却至 -10°C,滴加 7.1g 醋酐和 21.61g 隐性孔雀石绿的混合液,控制内温不超过 -5°C;滴加完毕后,继续搅拌 15h,溶液从黄色变成暗红色;将反应液倾入 50mL 浓盐酸和 50g 碎冰的混合物中,然后用分液漏斗分出水层,并用二氯甲烷萃取两次;合并有机相,用水洗至中性,无水硫酸钠干燥;蒸馏除去溶剂得黄色油状物 9.8g;粗品直接用于溴仿反应;

(b) 对隐性孔雀石绿甲酸的制备

氢氧化钠 6.3g 溶于 54mL 水中,冷却至 -5°C;滴加溴 6.4g,控制内温不超过 0°C;然后将对隐性孔雀石绿乙酮粗品 5.04g 滴加至反应液中,控制内温不超过 10°C;滴加完毕,保温 1h,然后于室温搅拌 2h;静置分层,分去生成的溴仿;水层用浓盐酸调至 pH1~2,析出白色固体;抽滤,水洗至中性;将固体溶于 20mL 浓度为 5%的氢氧化钠溶液中,过滤,浅黄色澄清液体用浓盐酸调至 pH1~2,析出白色晶体;抽滤,水洗至中性,烘干,得白色晶体 1.7g,按隐性孔雀石绿计其收率为 81%;

(c) 免疫原的合成

活泼酯法制备免疫原是这样实现的：取等摩尔量的隐性孔雀石绿半抗原和 N- 羟基琥珀酰亚胺 NHS, 环二己基碳二亚胺 DCC, 用二甲基甲酰胺 DFM 将混合物溶解, 室温下避光反应过夜, 离心去除沉淀后, 取上清液干燥, 取其 225 μ L 加入含 250mgBSA 的 8mL 甲醇碳酸盐缓冲液中, 混合物在 4°C 下磁力搅拌 2 小时, 在 4°C、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液的条件透析过夜 4 次, 经紫外扫描仪进行全波长扫描鉴定偶联结果 ; 其中, 所述甲醇碳酸盐缓冲液的 pH 为 9.6, 其含 5% 甲醇。

水产品中检测隐性孔雀石绿的免疫胶体金试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中涉及免疫胶体金和兽药残留检测领域。具体而言,本发明涉及一种适用于检测水产品中隐性孔雀石绿残留的免疫胶体金试纸条。

背景技术

[0002] 孔雀石绿 (Malachite green) 分子式为 $C_{23}H_{25}ClN_2$, 是一种工业用三苯甲烷 triphenylmethane 类染料, 由于具有抗菌及抗革兰氏阳性菌的功效, 且价格便宜, 所以被广泛用于养殖渔业之预防鱼的水霉病、鳃霉病、小瓜虫病等, 而且为了使鳞受损的鱼延长生命, 在运输过程中和存放池内, 也常使用孔雀石绿。当养殖水含有孔雀石绿时, 鱼体、虾等会快速吸收孔雀石绿进而代谢成为隐性孔雀石绿 (Leuco malachite green, LMG), 即 N,N-二甲基苯胺, 分子式 $C_{23}H_{26}N_2$, 隐色孔雀石绿不溶于水, 残留毒性比孔雀石绿更强, 可囤积在肌肉中长达数月。近年来有关此类染料的毒理研究发现: 孔雀石绿及其主要代谢物隐性孔雀石绿具有多重毒性, 包括致癌性、致基因突变、引起染色体断裂、致畸胎及呼吸道毒性。鉴于此, 许多国家均将孔雀石绿列为水产养殖禁用药物。

[0003] 因为水产品 (鱼肉、虾等) 具有营养齐全、平衡的特点, 越来越受到人们的青睐。到 1996 年, 我国水产品产量已超过 2000 万吨, 占全国肉类食物生产总量的 1/3, 跃居世界第一位。随着人民生活水平的提高, 对水产品的数量和质量有了更新的要求。然而, 我国渔业发展面临着一系列新的挑战, 其中食品安全问题在一定程度上严重制约了我国渔业的产业化发展, 而违法添加孔雀石绿是目前最突出的问题。我国于 2002 年 5 月将孔雀石绿列入禁用的兽药。

[0004] 农业部新闻办公室发布了 2007 年第一次水产品质量安全的监测结果。去年具体年份月上旬, 农业部组织有关质检机构对我国 22 个城市水产品中孔雀石绿污染情况进行了本年度第一次例行监测, 10 个城市均有样品检出了孔雀石绿。由于巨大利益的驱动, 很难真正有效地控制杜绝孔雀石绿的使用, 这也就意味着对孔雀石绿检测需求是长期的。

[0005] 目前国际上对孔雀石绿和隐性孔雀石绿的检测技术路线主要有两条: 一条是以色 (质) 谱技术为核心的化学检测技术, 另一条是快速生物检测技术。高效液相色谱法成本高, 操作时间长, 步骤多且复杂, 因此无法实现真正意义上的现场检测。而胶体金试纸条检测法灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便、现场快检测等优点, 容易被基层掌握并大面积推广, 适合于大批量样品的现场快速检测, 不需要特定的仪器设备, 也不需要特定的其他检测试剂, 减少了检测单位的负担, 能快速检测获得初步的检测结果, 适合我国当前社会经济水平, 因此是未来孔雀石绿检测的主要发展方向。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种采用金标技术现场快速检测隐性孔雀石绿残留的胶体金试纸条。

[0007] 本发明提供了一种快速检测隐性孔雀石绿残留的胶体金试纸条,所产生的单克隆抗体为特异性抗隐性孔雀石绿单克隆抗体。所述的隐性孔雀石绿单克隆抗体为隐性孔雀石绿半抗原与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物(例如兔、鼠)制得。所述的隐性孔雀石绿半抗原是采用化学方法使其含有活性基团,所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白或钥孔铜兰蛋白(KLH)。所述的隐性孔雀石绿-载体蛋白偶联物采用混合酸酐法、重氮法或戊二醛法等偶联得到。所述胶体金标记可以用商品化的氯金酸,通过产生的氯金酸与隐性孔雀石绿单克隆抗体偶联制得。

[0008] 为方便现场检测和大量样本筛查,所述隐性孔雀石绿的免疫胶体金试纸条包括:NC膜、样品垫、胶金垫、吸水纸、柠檬酸三钠、PVC背衬和结合垫,PVC背衬一端依次黏附样品垫、胶体金结合垫、中间黏附NC膜层,另一端依次黏附吸水垫,其特征是胶体金结合垫包被了抗隐性孔雀石绿特异性单克隆抗体-胶体金标记物,NC膜上吸附了隐性孔雀石绿-OVA和羊或兔抗鼠IgG。

[0009] 制备本发明检测水中产品隐性孔雀石绿的免疫胶体金试剂方法为:

[0010] (1) 隐性孔雀石绿半抗原和全抗原合成通过在苯环对位偶联一活性基团-COOH,合成隐性孔雀石绿半抗原;将隐性孔雀石绿半抗原与载体蛋白按1:10~30摩尔比混匀,戊二醛或重氮法等合成隐形孔雀石绿-载体蛋白偶联物,经分离纯化后得到隐性孔雀石绿半抗原-载体蛋白偶联物;

[0011] (2) 单克隆抗体制备以半抗原-BSA为免疫原多次免疫Balb/c纯系小鼠,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞体外融合产生杂交瘤细胞,经选择性培养基筛选获得阳性杂交瘤细胞株。将杂交瘤细胞株注入小鼠腹腔获取腹水或体外细胞培养收集上清液等方法,大量制备抗隐性孔雀石绿单克隆抗体;

[0012] (3) 单克隆抗体胶体金标记用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成20~40nm的胶体金颗粒;然后把胶体金与抗隐性孔雀石绿单克隆抗体按1:0.005~0.015(体积质量比)混匀,使其结合形成稳定的胶体金颗粒,经纯化和浓缩产生抗隐性孔雀石单克隆抗体-胶体金标记物;

[0013] (4) 羊(兔)抗鼠IgG制备将半抗原-OVA多次免疫小鼠,获取抗血清,再免疫山羊或兔,经分离纯化后获得羊(兔)抗鼠IgG;

[0014] (5) 胶体金结合垫的制备将隐性孔雀石绿特异单克隆抗体-胶体金标记物包被在胶体金结合垫上,将隐性孔雀石绿-OVA偶联物和羊(兔)抗鼠IgG吸附在NC膜的检测区和控制区,在37℃充分干燥;

[0015] (6) 胶体金试纸条组装:将NC膜、胶体金结合垫、样品垫和吸水垫等依次粘连在PVC背衬上,将粘好的PVC材料切成一定宽度的试纸条,最后组装到一定大小的塑料盒中即可。

[0016] 有益效果

[0017] 本发明的检测隐性孔雀石绿免疫胶体金试纸条,采用直接竞争免疫法,以胶体金标记隐性孔雀石绿特异单克隆抗体,能快速定性检测,结果准确,无需试剂洗涤和标准对照,能分批或单个样品及时检测。

[0018] 本发明的检测隐性孔雀石绿免疫胶体金试纸条,使用原材料进行生产,产品生产流程简单,成本低,检测费用仅为气相/液相色谱的1/5左右,为酶标试剂盒的1/3。为使用

者节省时间,降低因操作步骤冗繁造成的误差,试剂保存时间长、现场操作方便等优点,可在水产品检测中发挥重要作用。

附图说明

[0019] 图 1 为隐形孔雀石绿免疫胶体金试纸条结构图

[0020] 图 2 为胶体金溶液可见光扫描图谱

[0021] 图 3 为隐形孔雀石绿免疫胶体金试纸条保质期检测数据曲线图

[0022] 具体实施提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明,而决不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但不作为对本发明的限定。

[0024] 实施例 1 半抗原及完全抗原(免疫原)合成

[0025] 1.1 对隐性孔雀石绿乙酮的制备

[0026] 在 100mL 三颈瓶中加入 20mL 二氯甲烷,18g (0.135mol) 无水三氯化铝。冰盐浴冷却至 -10°C ,滴加 7.1g (0.07mol) 醋酐和 21.61g (0.065mol) 隐性孔雀石绿的混合液,控制内温不超过 -5°C 。滴加完毕后,继续搅拌 15h,溶液从黄色变成暗红色。将反应液倾入 50mL 浓盐酸和 50g 碎冰的混合物中,然后用分液漏斗分出水层,并用二氯甲烷萃取两次。合并有机相,用水洗至中性,无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂得黄色油状物 9.8g。粗品可直接用于溴仿反应。

[0027] 1.2 对隐性孔雀石绿甲酸的制备

[0028] 氢氧化钠 6.3g 溶于 54mL 水中,冷却至 -5°C 。滴加溴 6.4g (0.04mol),控制内温不超过 0°C 。然后将对隐性孔雀石绿乙酮粗品 5.04g 滴加至反应液中,控制内温不超过 10°C 。滴加完毕,保温 1h,然后于室温搅拌 2h。静置分层,分去生成的溴仿。水层用浓盐酸调至 pH1 ~ 2,析出白色固体。抽滤,水洗至中性。将固体溶于 20mL 氢氧化钠溶液 (5%) 中,过滤,浅黄色澄清液体用浓盐酸调至 pH1 ~ 2,析出白色晶体。抽滤,水洗至中性,烘干,得白色晶体 1.7g,收率 81% (按隐性孔雀石绿计)。m. p. $117 \sim 120^{\circ}\text{C}$ 。HNMR (300MHz, CDCl_3), δ : 1.28 (d, 6H, $J = 6.9\text{Hz}$); 2.99 (m, 1H, $J = 6.9\text{Hz}$); 7.33 (d, 2H, $J = 8.3\text{Hz}$); 8.05 (d, 2H, $J = 8.3\text{Hz}$)。

[0029] 1.3 免疫原的合成

[0030] 活泼酯法制备免疫原是这样实现的:取等摩尔量的隐性孔雀石绿半抗原和 N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS),环二己基碳二亚胺 (DCC),用二甲基甲酰胺 (DMF) 将混合物溶解,室温下避光反应过夜,离心去处沉淀后,取上清液干燥,取其 225 μL 加入含 250mgBSA 的 8mL 碳酸盐缓冲液 (pH9.6 含 5% 甲醇) 中,混合物在 4°C 下磁力搅拌 2 小时,在 4°C 条件下透析过夜 4 次 (pH7.4 的磷酸盐缓冲液),经紫外扫描仪进行全波长扫描鉴定偶联结果。

[0031] 图 2 为采用活泼酯法制备的 BSA-半抗原的偶联物(免疫原)的紫外扫描图,图中三种物质由上到下分别是载体蛋白 BSA、载体蛋白 BSA-半抗原的偶联物、半抗原的紫外吸收图谱,从图中可看出载体蛋白 BSA 特征吸收峰在 278nm 处,半抗原特征吸收峰在 260nm 处,载体蛋白 BSA-半抗原的偶联物特征吸收峰在 255nm 处,偶联物特征峰发生漂移。

[0032] 实施例 2 全抗原单克隆抗体的制备及效价检测

[0033] 2.1 单克隆抗体的制备

[0034] 以 BSA- 半抗原为免疫原, 免疫 4 只 BALB/C 小鼠, 每只小鼠取 100 μ g 免疫原, 与等体积弗氏完全佐剂混合乳化均匀, 沿腹股沟注入腹腔膜内。4 个周后, 加强免疫, 剂量不变, 佐剂改为弗氏不完全佐剂。加强免疫三次后, 采血测效价, 待血清效价不再上升, 用两倍剂量的抗原不加佐剂免疫小鼠, 三天后在无菌条件下取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞按 5-10 : 1 的比例混合于 50mL 离心管, 加入 30mL 无血清 IPMI1640 培养基, 1200r/min 离心 10min 弃上清, 将细胞团轻轻振松, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中。把 1mL 50% PEG-4000 缓缓加入细胞中, 在 1min 内滴完, 同时轻轻搅动底部沉淀, 静置 1min。沿管壁缓慢加入无血清培养基终止融合过程。前 30 秒缓慢匀速加入 1mL 后 30 秒加入 2mL, 然后快速加入 27mL 无血清培养基, 1200r/min 离心 10min, 弃上清。融合后的细胞先在 HAT 选择性培养液中筛选, 5 天后换成 HT 培养液, 待孔内的杂交细胞数量达到 300 个以上时, 用 ELISA 对细胞培养上清液进行复孔检测, 次日重复检测已确定结果。将强阳性孔内的细胞用有限稀释法进行克隆培养, 并跟踪记录, 经 3 次以上的克隆培养和检测, 均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞经过扩大培养, 选 4 只经产 BALB/C 小鼠, 腹腔注射液体石蜡油 0.5mL/只, 7 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 - 10^6 /只, 10 天后, 待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用正辛酸 - 硫酸铵沉淀法来纯化腹水, 经核酸蛋白紫外扫描仪蛋白分析初步判断得到的蛋白为 IgG 蛋白。

[0035] 2.2 检测抗体效价

[0036] 以 1 μ g/mL 浓度按每孔 100 μ L 包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 洗涤 5 次, 拍干, 按每孔 200 μ L 封闭液 4 $^{\circ}$ C 下封闭 12h, 洗涤 3 次, 拍干。按每孔 100 μ L 加入抗血清稀释倍数为 2000、10000、250000、50000、250000、1250000, 阴性血清及空白 (不加抗血清, 只加其稀释液) 室温作用 30min, 洗涤五次, 拍干。加入每孔 100 μ L 酶标羊抗兔 (鼠) 抗体, 室温作用 30min, 洗涤五次, 拍干。加入每孔 100 μ L 显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光作用 15min。加入每孔 50 μ L 终止液终止反应, 酶标仪检测 A 值 (450nm)。以两倍于阴性血清 OD 值的血清 OD 值对应的抗血清稀释度为抗血清效价。检测结果见表 1:

[0037] 表 1 单克隆抗体效价检测结果

[0038]

稀释倍数	2000	10000	15000	30000	50000	250000	阴性血清	空白
OD1 值	0.988	0.692	0.415	0.324	0.317	0.362	0.172	0.024
OD1 值	0.975	0.673	0.442	0.398	0.365	0.354	0.207	0.02
OD1 值	1.136	0.943	0.754	0.503	0.387	0.351	0.193	0.032
OD1 值	0.982	0.669	0.411	0.376	0.344	0.351	0.223	0.03

[0039] 从表 1 的数据可以推断本发明制备的单克隆抗体的效价达 15000。

[0040] 实施例 3 本发明中羊 (兔) 抗鼠 IgG 的制备

[0041] 选取健康雄性新西兰大白兔或山羊, 以 OVA- 半抗原为免疫原与等量弗氏完全佐

剂通过注射器对抽法混合成油包水的乳浊液,按 1mg/kg 体重的量进行首次免疫,采取背部皮下多点注射。每隔两周加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,剂量及方法同首次免疫。从第三次免疫开始,每次免疫后 10 天,耳缘静脉取血 1mL,进行抗体效价检测,当抗体效价不再升高时,不加佐剂进行最后一次(第 7 次)免疫,大腿肌肉注射,7 天后颈动脉放血,室温凝固 2h 后 4℃过夜,8000r/min 离心 10 分钟,除去血块,血清部分用 50%饱和硫酸铵溶液沉淀,离心去上清液,沉淀用磷酸盐缓冲液重悬,再用 33%饱和硫酸铵溶液沉淀两次,沉淀物用尽可能少的磷酸缓冲液溶解,经透析得隐性孔雀石绿-OVA 羊(兔)抗鼠 IgG。

[0042] 实施例 4 本发明中胶体金试纸条的制备

[0043] 4.1 胶体金的制备

[0044] 免疫胶体金技术的基本原理是,氯金酸在还原剂的作用下,可聚合为一定大小的金颗粒,形成带负电荷的、由于静电作用而稳定的疏水胶溶液。本公司采用柠檬酸三钠这种还原剂还原法制备胶体金,具体过程如下:取 0.01%氯金酸 100mL 水溶液加热至沸,搅动下准确加入 1%柠檬酸三钠水溶液 0.7mL,金黄色的氯金酸在 2 分钟内变为紫红色,继续煮沸 15min,冷却后用蒸馏水恢复原来的体积,即为制备的胶体金溶液。此胶体金溶液是否符合生产需求,除肉眼观察颜色需要为紫红色外,还需要采用紫外可见分光光度计分析,胶体金溶液需在可见区 535nm 有最高吸收峰(见图 2),同时,电镜图显示制备的胶体金颗粒均一性较好、颗粒大小约在 40m。

[0045] 4.2 胶体金标记抗体的制备

[0046] 调节胶体金溶液 pH 值至 8.2,用恒速搅拌器均匀搅拌,同时逐滴加入抗隐性孔雀石绿的单克隆抗体,并加入其它保护剂,全部加完后,继续搅拌 15 分钟。通过两次不同转速的离心获得均一性金标抗体沉淀。再加入重悬液,混匀后移至干净烧杯中备用。

[0047] 4.3 孔雀石绿胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备

[0048] 依次将吸水纸、喷有氨基隐色孔雀石绿-BSA(检测线)和羊(兔)抗鼠 IgG(质控线)的 NC 膜、喷有抗隐色孔雀石绿抗体的金垫和样品垫相互叠合固定在 PVC 底板上,再切成试纸条,装在塑料模块中,制成胶体金免疫层析快速检测卡。

[0049] 实施例 5 样品中隐性孔雀石绿残留的检测

[0050] 5.1 本发明试剂盒检测原理

[0051] 抗体标记在胶体金颗粒上,胶体金和样本同时在 NC 膜上移动,在移动的过程中,样本中的孔雀石绿或隐色孔雀石绿和标记在胶体金颗粒上的抗体特异性的反应,当样本中的孔雀石绿或隐色孔雀石绿含量低于试纸条的检测限时,则免疫金颗粒会和喷在 NC 膜上的抗原线反应形成一条红色的检测线带,反之,则不能形成有色的检测线带。

[0052] 5.2 样品处理

[0053] 取 5g 样品(鱼肉/虾)绞碎置入 50mL 离心管中,加入 10mL 乙酸乙酯均质,以 4000g 离心 5 分钟,取 5mL 上清液置入玻璃管中,于 60℃下以氮气吹干,于此玻璃管中加入 1mL 正己烷和 1mL 蒸馏水,振荡混匀 2 分钟,室温 4000g 离心 10 分钟,取 100 μL 下层液,经样品稀释液稀释 5 倍,待测。

[0054] 实施例 6 胶体金试纸条灵敏度试验

[0055] 取 3ng/ml 完全抑制产品,在缓冲溶液与 5 个阴性水产品处理样品中加入隐形孔雀

石绿标品,使其终浓度分别为 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 30ng/mL。每种样品重复 5 次,判断试纸条的检测灵敏度,结果见下表:

[0056] 表 2 本发明采用单克隆抗体的胶体金试纸条灵敏度试验

[0057]

阴性水产品处理溶液和孔雀石绿添加终浓度 (ng/mL)	水产品处理样品				
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号
阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
0.1	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
1	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
2	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
3	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
5	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
7	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
10	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
30	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性

[0058] 从以上结果可以看出,隐性孔雀石绿胶体金免疫快速检测试纸条的检测阈值为 3ng/mL。

[0059] 实施例 7 本发明胶体金试纸条的特异性试验

[0060] 在阴性的水产品中 (ELISA 测定为阴性) 分别加入孔雀石绿、隐性结晶紫、结晶紫、克伦特罗、磺胺二甲嘧啶、氯霉素、呋喃唑酮,使其终浓度为 1, 5, 10, 50, 100, 500ng/mL 水产品处理溶液。用试纸条检测的标准方法检测,判断试纸条检测的特异性,每种浓度的水产品处理样品做 5 次重复。

[0061] 表 3 水产品中隐性孔雀石绿免疫胶体金试纸条特异性实验结果

[0062]

隐性孔雀石绿构类似物	隐性孔雀石绿胶体金免疫快速检测试纸条检测结果					
	1ng/mL	5ng/mL	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL	500ng/mL
孔雀石绿	阴性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
隐性结晶紫	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
克伦特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
磺胺二甲嘧啶	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
氯霉素	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
呋喃唑酮	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0063] 实验结果如表 3 所示,隐性结晶紫、结晶紫、克伦特罗、磺胺二甲嘧啶、氯霉素、呋喃唑酮这些结构类似物在隐形孔雀石绿胶体金免疫快速检测试纸条中未产生交叉反应。

[0064] 实施例 8 胶体金试纸条的准确度试验

[0065] 隐形孔雀石绿胶体金免疫快速检测试纸条是定性,而不是定量卡。该产品对凡是

等于或超过 3ng/mL 的样品都表现为阳性。

[0066] 添加隐形孔雀石绿到阴性水产品处理样品中时,是没有任何提取过程的,只需直接将水产品处理样品用塑料吸管垂直滴加 3 滴无气泡的待检样品(约 70 μ l)于加样孔内即可。因此当添加隐性孔雀石绿 \geq 3ng/mL,则检测线不显色,即判为阳性,所以没有类似于 ELISA 的回收试验结果本检测卡的准确率大于 96%。

[0067] 实施例 9 胶体金试纸条保存期试验

[0068] 试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}$ C,经过 6 个月的测定,隐性孔雀石绿添加实际样品测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 保存条件下放置 6 天,进行加速稳定性实验,结果表明该胶体金试纸条各项指标完全符合要求。

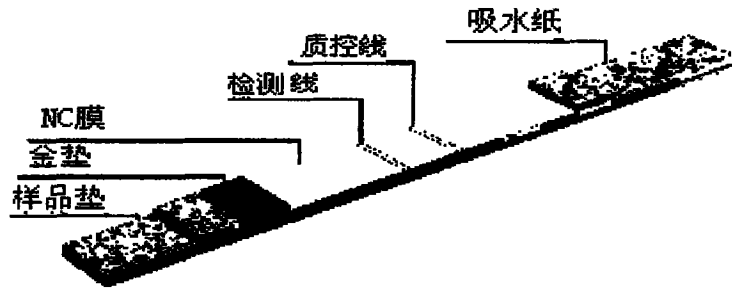


图 1

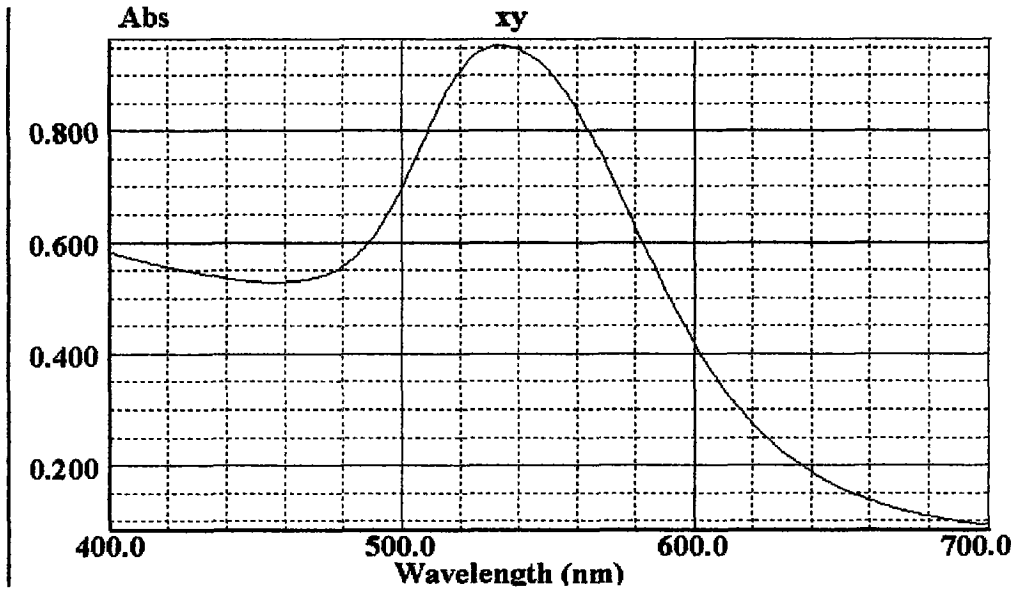


图 2

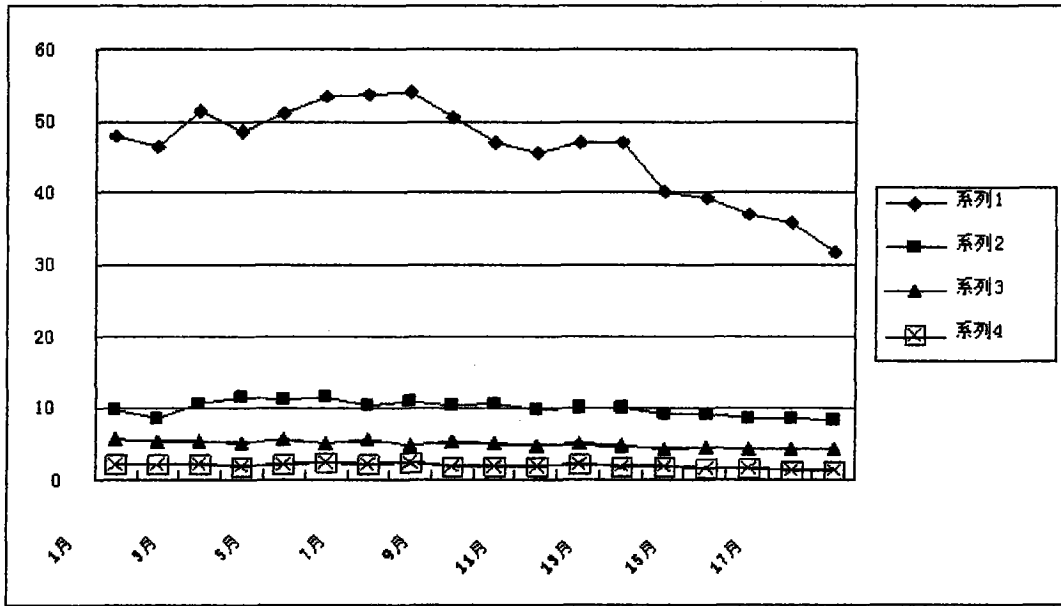


图 3

专利名称(译)	水产品中检测隐性孔雀石绿的免疫胶体金试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN101655498B	公开(公告)日	2013-07-03
申请号	CN200910093010.3	申请日	2009-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
[标]发明人	赖卫华 黄启明 杨晓慧 陈媛 魏华 熊勇华		
发明人	赖卫华 黄启明 杨晓慧 陈媛 魏华 熊勇华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/566 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/113 C07K16/44		
审查员(译)	潘浩		
其他公开文献	CN101655498A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测隐性孔雀石绿胶体金免疫试纸条及其制备方法。本发明所提供的直接竞争法检测隐性孔雀石绿的胶体金试纸条，包括样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜(NC)、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次黏附样品垫、胶体金结合垫、中间黏附NC膜层，另一端依次黏附吸水垫，其特征是胶体金结合垫维包被了抗隐性孔雀石绿特异性单克隆抗体-胶体金标记物，NC膜上吸附了隐性孔雀石绿-OVA和羊抗鼠IgG。本发明的检测灵敏度高、简单快速、价廉物美，整个反应只用30分钟，可用于大批样品的筛查，现场快速检测水产品中残留的隐性孔雀石绿情况。

