

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/549 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310109471.8

[45] 授权公告日 2006 年 3 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1246697C

[22] 申请日 2003.12.16

[21] 申请号 200310109471.8

[71] 专利权人 博顿生物检验技术(杭州)有限公司
地址 311215 浙江省杭州市萧山经济技术开发区建设四路

[72] 发明人 张少恩
审查员 孙春梅

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 杜 军

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

检测爱比菌素的免疫胶体金试剂及制备方法

[57] 摘要

检测爱比菌素的免疫胶体金试剂及制备方法，该试剂包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬，PVC 背衬一端依次粘附样品垫、结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫，其特征在于结合垫上包被了抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物，硝酸纤维素膜上包被了爱比菌素—BSA 偶联物和羊(兔)抗鼠 IgG。该试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测，全过程只需 30 分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

1、检测爱比菌素的免疫胶体金试剂条，该试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬，PVC 背衬一端依次粘附样品垫、结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫，其特征在于结合垫上包被了抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物，硝酸纤维素膜上包被了爱比菌素-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG。

2、制备权利要求 1 试剂条的方法，其特征在于该方法包括以下步骤：
(1)制备爱比菌素-BSA 偶联物：将爱比菌素与 BSA 按 1：5~50mol/mol 比例混匀，使爱比菌素与 BSA 形成稳定的颗粒，通过纯化形成爱比菌素—BSA 偶联物；(2)制备抗爱比菌素特异性单克隆抗体：用爱比菌素-BSA 偶联物多次免疫 Balb/c 纯系小鼠，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞，经选择性培养基筛选可得阳性杂交瘤细胞株，通过将阳性杂交瘤细胞注入小鼠腹腔获取腹水，大量制备抗爱比菌素特异性单克隆抗体；(3)制备羊抗鼠 IgG：用爱比菌素-BSA 偶联物多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊，纯化后得羊抗鼠 IgG；(4)制备胶体金：用柠檬酸三钠将氯金酸还原成 20nm~40nm 的胶体金颗粒；(5)制备单克隆抗体胶体金标记：将胶体金与抗爱比菌素特异性单克隆抗体按 1：0.005~0.015ml/mg 比例混匀，使胶体金与抗爱比菌素特异性单克隆抗体形成稳定的胶体颗粒，通过纯化、浓缩形成抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物；(6)将抗爱比菌素特异性单克隆抗体--胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将爱比菌素-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区，充分干燥。

检测爱比菌素的免疫胶体金试剂及制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测抗体的免疫胶体金试剂条，还涉及该试剂条的制备方法。

背景技术

现有用于检测爱比菌素的方法主要有直接紫外检测法、荧光衍生化检测法、液/质联用分析法（LC/MS）。以上方法的缺陷是：需要专业的仪器设备辅助；样品的预处理程序繁琐，要求高；操作过程复杂，时间长；需要经过专业培训的技术人员操作，操作人员要有丰富的相关经验；操作人员必须了解影响色谱分析的各种干扰因素，了解所使用的预处理方法的优缺点，才能获得可靠的分析结果；需要的仪器设备昂贵，难以在城市及中小企业中普及；仪器保养的要求高，保养的好坏直接影响分析结果的准确性；检测费用高。

发明内容

本发明的目的是为了克服当前技术在推广使用中存在的缺陷，提供一种不需要特定仪器设备辅助的检测试剂条，并且能有效地降低检测成本，减轻需检测单位的负担。同时提供该试剂条的制备方法。

检测爱比菌素的免疫胶体金试剂条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬，PVC 背衬一端依次粘附样品垫、结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫。结合垫上包被了抗爱比菌素

特异性单克隆抗体—胶体金标记物。硝酸纤维素膜上包被了爱比菌素-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG。

该试剂条的制备方法包括以下步骤：

(1) 制备爱比菌素-BSA 偶联物：将爱比菌素与 BSA 按 1：5~50 (mol/mol) 比例混匀，使爱比菌素与 BSA 形成稳定的颗粒，通过纯化形成爱比菌素—BSA 偶联物。

(2) 制备抗爱比菌素特异性单克隆抗体：用爱比菌素-BSA 偶联物多次免疫 Balb/c 纯系小鼠，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞，经选择性培养基筛选可得阳性杂交瘤细胞株。通过将阳性杂交瘤细胞注入小鼠腹腔获取腹水，大量制备抗爱比菌素特异性单克隆抗体。

(3) 制备羊抗鼠 IgG：用爱比菌素-BSA 偶联物多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊，纯化后得羊抗鼠 IgG。

(4) 制备胶体金：用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成 20nm~40nm 的胶体金颗粒。

(5) 制备单克隆抗体胶体金标记：将胶体金与抗爱比菌素特异性单克隆抗体按 1：0.005~0.015 (ml/mg) 比例混匀，使胶体金与抗爱比菌素特异性单克隆抗体形成稳定的胶体颗粒，通过纯化、浓缩形成抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物。

(6) 将抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将爱比菌素-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区，充分干燥。

本发明的积极效果在于：价格低廉，生产流程简单，成本低，检测

的费用比使用其它检测方法都要便宜得多；检测速度快，全过程只需15-30分钟，可以实现自我检测；可以现场检测；特异性好、灵敏度高、重复性好；操作简便，快速定性，结果准确、快速，操作简便，无需冲洗过程和标准对照，可分批或单个样品及时检测；易于推广使用，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

具体实施方式

将PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫。结合垫上包被了抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物。硝酸纤维素膜上包被了爱比菌素-BSA偶联物和羊抗鼠IgG。按以下步骤制备：(1)制备爱比菌素-BSA偶联物：将爱比菌素与BSA按1:5~50 (mol/mol) 比例混匀，使爱比菌素与BSA形成稳定的颗粒，通过纯化形成爱比菌素—BSA偶联物；(2)制备抗爱比菌素特异性单克隆抗体：用爱比菌素-BSA偶联物多次免疫Balb/c纯系小鼠，取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞在体外融合形成杂交瘤细胞，经选择性培养基筛选可得阳性杂交瘤细胞株，通过将阳性杂交瘤细胞注入小鼠腹腔获取腹水，大量制备抗爱比菌素特异性单克隆抗体；(3)制备羊抗鼠IgG：用爱比菌素-BSA偶联物多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊，纯化后得羊抗鼠IgG；(4)制备胶体金：将100ml 0.01%氯化金用0.9ml 1%柠檬酸三钠还原成40nm大小的颗粒；(5)制备单克隆抗体胶体金标记：用0.1mol/L K₂CO₃将胶体金溶液的pH值调至8.1左右，将胶体金溶液与单克隆抗体按100ml胶体金溶液中加入1mg单克隆抗体的比例混合均匀，使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物，再通过多次离心、弃上清、清洗，通过纯化、浓缩

形成抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物，冷藏备用；(6)用 Biodot 点膜机将抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将爱比菌素-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜的检测区和控制区，充分干燥；(7) 将硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫等依次粘在 PVC 背衬上；(8) 将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试剂条，即制成检测爱比菌素的免疫胶体金试剂条。

在检测前先将样本和试剂条放在室温条件下放置一段时间（约 10 分钟），使其恢复至室温；从铝箔袋中取出检测试剂条，按 MARK 线下箭头所示的方向将试剂条浸入样本溶液中，液面不得超过 MARK 线，5-8 秒后取出，平放在操作台上；如果是试剂板：从铝箔袋中取出检测试剂板，平放在操作台上，往加样孔中滴加 3 滴（约 120 μ l）样品溶液；3-15 分钟内即可判断结果，30 分钟后判断的结果为无效。结果判断：如果样品中有要检测的“爱比菌素”存在，则检测线处不出现条带，而质控线上出现红色条带，此时结果为阳性；如果样品中没有要检测的“爱比菌素”存在，则检测线处有红色条带出现，同时质控线上也出现红色条带，此时结果为阴性。如果质控线上没有红色条带出现，则该产品无效。

专利名称(译)	检测爱比菌素的免疫胶体金试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN1246697C	公开(公告)日	2006-03-22
申请号	CN200310109471.8	申请日	2003-12-16
[标]发明人	张少恩		
发明人	张少恩		
IPC分类号	G01N33/549 G01N33/532 G01N33/577 A61K39/395 G01N33/558 G01N33/569		
代理人(译)	杜军		
其他公开文献	CN1547022A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测爱比菌素的免疫胶体金试剂及制备方法，该试剂包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端粘附吸水垫，其特征在于结合垫上包被了抗爱比菌素特异性单克隆抗体—胶体金标记物，硝酸纤维素膜上包被了爱比菌素-BSA偶联物和羊(兔)抗鼠IgG。该试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测，全过程只需30分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。