



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 206945624 U

(45)授权公告日 2018.01.30

(21)申请号 201720566716.7

(22)申请日 2017.05.15

(73)专利权人 杭州南开日新生物技术有限公司

地址 310015 浙江省杭州市滨江区滨文路
95号活水工业园6幢4楼

专利权人 杭州市农业科学研究院

(72)发明人 王伟萍 赵芸 柳爱春 陈飞东

王振国 陈思思 胡叶军

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

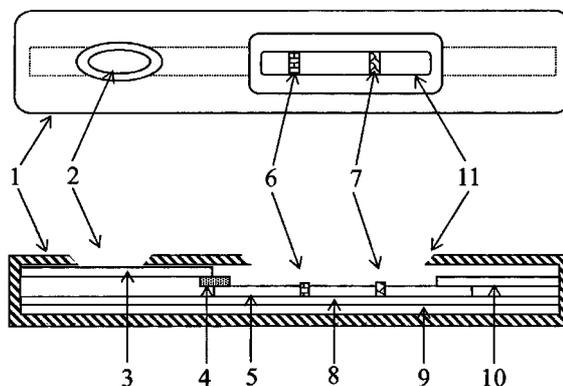
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)实用新型名称

一种链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板

(57)摘要

本实用新型涉及一种链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板,可用于快速检测蜂蜜、畜禽肉、果蔬、奶制品的链霉素残留。本实用新型由试剂板塑料外壳以及位于塑料外壳内的试纸条组成,试纸条包括底板以及粘贴在底板上的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;胶体金结合垫上含有胶体金-抗链霉素单克隆抗体的结合物;硝酸纤维素膜上从左到右依次设有相互平行的一条检测线与一条质控线。链霉素检测结果能以肉眼可见的颜色表征出来,进行定性检测,还可用读取装置读取两条线上的具体数值,进行一个半定量检测,适用于工商局、食品加工企业、渔业局对链霉素残留的快速检测。



1. 一种链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板, 包含试剂板塑料外壳(1)以及位于塑料外壳内的试纸条, 其特征在于: 所述试剂板塑料外壳上层依次设有加样孔(2)和观察窗(11); 所述试纸条包括底板(9)以及粘贴在底板上的样品垫(3)、胶体金结合垫(4)、硝酸纤维素膜(5)、吸水垫(10); 所述底板上的胶体金结合垫(4)、硝酸纤维素膜(5)、吸水垫(10)从左至右依次排列; 所述胶体金结合垫(4)上含有胶体金-抗链霉素单克隆抗体的结合物; 所述硝酸纤维素膜(5)上从左到右依次设有相互平行的一条检测线(6)与一条质控线(7); 所述加样孔(2)的长度与宽度略小于加样孔正对的样品垫(3); 所述观察窗(11)的长度与宽度略小于观察窗正对的硝酸纤维素膜(5)。

2. 如权利要求1所述的试剂板, 其特征在于加样孔(2)和观察窗(11)为防溢出设计, 开口上端大、下端小。

3. 如权利要求1所述的试剂板, 其特征在于样品垫(3)、胶体金结合垫(4)、硝酸纤维素膜(5)和吸水垫(10)各部分首尾均有1~2mm的重叠; 所述胶体金结合垫(4)与硝酸纤维素膜(5)上的检测线(6)和质控线(7)平行。

4. 如权利要求1所述的试剂板, 其特征在于样品垫(3)由玻璃纤维、聚酯膜或纤维素滤纸制成, 胶体金结合垫(4)由玻璃纤维膜或聚酯纤维素膜制成, 吸水垫(10)为滤纸。

5. 如权利要求1所述的试剂板, 其特征在于检测线(6)上喷有链霉素-载体蛋白偶联物。

6. 如权利要求5所述的试剂板, 其特征在于载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白。

7. 如权利要求1所述的试剂板, 其特征在于质控线(7)上喷有二抗。

8. 如权利要求7所述的试剂板, 其特征在于二抗可为羊抗鼠IgG、兔抗鼠IgG。

一种链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板

技术领域

[0001] 本实用新型属于胶体金免疫层析快速检测领域,具体涉及一种检测链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板。

背景技术

[0002] 链霉素属于氨基糖苷碱性化合物,是一种广谱抗生素,常作为饲料添加剂、治疗动物疾病的治疗剂、果蔬病害防治剂在畜牧业、养蜂业、水产业、农业上广泛应用,已成为畜牧业发展必不可少的物质基础。但是链霉素在农业、畜牧业等的大量使用,导致动植物体内药物的滞留和蓄积,并会以残留的方式进入人体及生态系统,危害人类健康和环境。食物中链霉素过量残留可能会损害人的前庭神经和耳蜗神经,导致眩晕和听力减退,同时链霉素还具有潜在的致畸作用。

[0003] 因此,针对链霉素在食品中的残留,许多国家和机构都明确规定了最大残留限量。如欧盟2377/90/EEC规定动物源性食品肝脏中链霉素最大残留限量为 $2.0\mu\text{g/g}$,肾脏中为 $5.0\mu\text{g/g}$,肌肉中为 $0.3\mu\text{g/g}$ 。2002年农业部第235号公告规定,牛奶中链霉素最大残留限量为 $200\mu\text{g/kg}$,禽畜肉肌肉中为 $600\mu\text{g/kg}$,脂肪中为 $600\mu\text{g/kg}$,肝脏中为 $600\mu\text{g/kg}$,肾脏中为 $1000\mu\text{g/kg}$ 。但是由于链霉素效果好,价格便宜,在农业、畜牧业、水产养殖等过程中仍被大量使用。为了保障人民健康,必需对动植物食品中链霉素进行检测。

[0004] 目前,食品中链霉素残留检测的方法主要有微生物法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、酶联免疫分析法、化学发光法、荧光分光光度法等。微生物法的实验条件、技术要求高,所需时间较长,灵敏度不够高。高效液相色谱法虽然精确度和灵敏度较高,但是样品前处理步骤繁琐,对样品纯度要求高,分析成本也高。酶联免疫分析法具有灵敏度高、特异性强、耗时短、精确度高及能大批量测定等优点,但是其中的酶活性易受反应条件的影响,试剂需低温保存,因而实验结果重复性差。

实用新型内容

[0005] 基于现有的链霉素检测方法存在的缺陷,本实用新型针对检测要求,提供一种现场快速检测链霉素的免疫胶体金试剂板。本实用新型试剂板可用于检测链霉素的残留,检测样本可为蜂产品、畜禽肉、水产品、奶制品、果蔬等。本实用新型试剂板检测限符合要求,重现性好,检测时间短,适合现场快速检测,仪器设备要求成本低。

[0006] 本实用新型试剂板应用层析式抗体免疫竞争原理,通过抗原与金标抗体的显色反应,特异性检测样本中链霉素残留。如果样品溶液中含有链霉素残留,链霉素先与胶体金颗粒上的抗体反应,因此当胶体金颗粒随样品溶液扩散至检测线时,胶体金颗粒上抗体的活性位点因被样品溶液中链霉素占据而无法与检测线上链霉素特异性抗原结合;当样品中链霉素的含量超出试剂板检出限时,试剂板上的检测线显色比质控线浅甚至显无色,判定为阳性。相反,当样品中链霉素含量在试剂板检出限以下或者无残留时,试剂板上的检测线显色与质控线相近或深,判定为阴性。

[0007] 本实用新型试剂板包含试剂板塑料外壳以及位于塑料外壳内的试纸条,其特征在于:所述试剂板塑料外壳上层依次设有加样孔和观察窗;所述试纸条包括底板以及粘贴在底板上的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;所述底板上的胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次排列;所述胶体金结合垫上含有胶体金-抗链霉素单克隆抗体的结合物;所述硝酸纤维素膜上从左到右依次设有相互平行的一条检测线与一条质控线。

[0008] 本实用新型试剂板开设的加样口长度与宽度略小于加样孔正对的样品垫,观察窗的长度与宽度略小于观察窗正对的硝酸纤维素膜,可以防止样品滴加过程中试纸条的移动;另外加样口和观察窗采用开口上端大、下端小的防溢出设计,降低加样过程中的操作误差的产生几率。

[0009] 本实用新型试剂板的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫各部分首尾均有1~2mm的重叠,该设计能让样品在试纸条上充分与胶体金结合垫、检测线及质控线上的抗原/抗体充分反应。所述胶体金结合垫与硝酸纤维素膜上的检测线和质控线平行。

[0010] 本实用新型试剂板的样品垫由玻璃纤维、聚酯膜或纤维素滤纸制成,结合垫由玻璃纤维膜或聚酯纤维素膜制成,吸水垫为滤纸。

[0011] 检测线上喷有链霉素-载体蛋白偶联物,其中载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白。

[0012] 质控线上喷有二抗,其中二抗可为羊抗鼠IgG、兔抗鼠IgG。

[0013] 本实用新型试剂板具有如下有益效果:

[0014] (1) 特异性强。本实用新型试剂板对链霉素的交叉反应率为100%,对其他类型抗生素如氯霉素、四环素等的交叉反应率均低于1%,具有高度的专一性。

[0015] (2) 灵敏度高。本实用新型试剂板对蜂蜜中链霉素检出限为10 μ g/kg,在同类检测中达到了较优水平。

[0016] (3) 操作简单快速。本实用新型试剂板将加样后的反应过程进行整合,不仅简化了操作还大大缩短检样时间。滴样后,3-5min即可用肉眼通过判断硝酸纤维素膜上的检测线和质控线颜色的深浅读取结果。

[0017] (4) 成本低,易推广。本实用新型试剂板生产工艺简单,流程成熟。生产成本低,投资少,收效快。

附图说明

[0018] 图1为链霉素免疫胶体金快速检测试剂板结构示意图,其中1为塑料外壳,2为加样孔,3为样品垫,4为胶体金结合垫,5为硝酸纤维素膜,6为检测线,7为质控线,8为不干胶,9为底板,10为吸水垫,11为观察窗。

[0019] 图2为链霉素免疫胶体金快速检测试剂板结果读取示意图,其中T为检测线,C为质控线;图2-a中T线颜色比C线深或者一样深,为阴性;图2-b中T线颜色比C线浅或T线消失,为阳性;图2-c中C线消失,为无效。

具体实施方式

[0020] 实例1试剂板的制备

[0021] 1.1链霉素-载体蛋白偶联物的制备

[0022] 1.1.1链霉素-肟(SM-肟)的合成

[0023] 取81.3mg链霉素及13.2mg羧甲基羟胺溶于340 μ L双蒸水,加入1.4mg醋酸钠,室温搅拌反应24h。

[0024] 1.1.2链霉素-牛血清白蛋白(SM-BSA)的合成

[0025] 取170 μ L SM-肟及100mg EDC溶于20%乙醇溶液中,加入51.6mg BSA(溶于1mL双蒸水),室温缓慢搅拌反应24h,用0.02M pH 7.2的磷酸缓冲液透析两天,分装且4 $^{\circ}$ C保存。

[0026] 1.1.3链霉素-卵清蛋白(SM-OVA)的合成

[0027] 将1.1.2的BSA换成OVA,其它步骤同上,用于小鼠免疫。

[0028] 1.2抗链霉素单克隆抗体的制备

[0029] 选取6~8周龄雌性BALB/c小鼠,取SM-BSA偶联物,20 μ g/只小鼠,加生理盐水到50 μ L,与等体积的弗氏完全佐剂乳化,按每只小鼠100 μ L进行初免,颈部、皮下多点注射。之后每隔两周加强免疫一次,以不完全佐剂。融合前3d,不加佐剂,腹腔免疫1次。

[0030] 免疫鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按1:5的比例混合细胞,在50%PEG作用下促进细胞融合,后置于在37 $^{\circ}$ C,体积分数为5%的CO₂培养箱中,以HAT培养基筛选融合的细胞。用间接抑制ELISA进行阳性筛选。

[0031] 腹水McAb的制备: BALB/c小鼠腹腔注射灭菌的0.5mL液体石蜡,7~17d后同法注射单抗细胞 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个,10d后抽取腹水,离心去油脂沉淀后即得到小鼠腹水McAb。

[0032] 1.3胶体金溶液的制备

[0033] 胶体金颗粒的平均大小为30nm,其制备方法为在100mL去离子水中加入1mL 1%柠檬酸三钠,煮沸后迅速加入1mL 1%氯金酸,继续煮沸10min,冷却后,4 $^{\circ}$ C下保存备用。

[0034] 1.4胶体金-抗链霉素单克隆抗体结合物的制备

[0035] 取已制备好的100mL胶体金溶液,用0.1mol/L碳酸钾溶液调pH到8.0。边搅拌边加入1.5mg抗链霉素单抗,搅拌20min,再逐滴加入2mL 25mol/L聚乙二醇20000(PEG20000),搅拌15min。20000rpm离心15min,弃上清液,加入10mL pH 7.4PBS缓冲液(含0.4mol/L PEG)清洗2次。将沉淀用5mL含2%BSA的PBS缓冲液(pH 7.4)溶解,用0.22 μ m无菌过滤器过滤后,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0036] 1.5链霉素免疫胶体金快速检测试剂板的组装

[0037] 用点膜机把适当浓度的载体蛋白偶联物及羊抗鼠IgG喷在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线和质控线,37 $^{\circ}$ C烘箱干燥8h。以同样的方法,将制备好的胶体金-抗链霉素单克隆抗体结合物包被在胶体金结合垫上。

[0038] 检测试剂组成为塑料背衬,在其上按顺序粘上样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。用切割机将贴好的大卡切割成4.0mm宽的条,装入塑料模板中制成检测试剂板,再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存。

[0039] 1.6链霉素免疫胶体金快速检测试剂板实施操作方法

[0040] 1.6.1蜂蜜样品制备

[0041] 称取2g待检蜂蜜于15mL离心管中,加入4mL提取液,振荡摇匀,室温下4000rpm离心10min;取上清过C18固相萃取柱,用2mL甲醛洗涤柱子(10滴/min),弃流出液,用4mL蒸馏水洗涤柱子(1滴/s),弃流出液,取5mL上清进柱(15滴/min),弃流出液,用3mL蒸馏水洗涤柱子

(15滴/min),弃流出液,小心压出所有液体,用2mL甲醛洗脱(10滴/min),用5mL离心管收集洗脱液;65℃氮气(或者空气)吹干,加入300μL PBST缓冲液,冲洗充分溶解管内壁残留,静置2min,用滴管取100μL下清,待检。

[0042] 1.6.2使用步骤

[0043] 从原包装袋中取出试剂板,吸取待检样品溶液100μL到加样孔,加样后开始计时;结果应在3~5min读取,其他时间判读无效。观察时,试剂板应置于观察者正面。

[0044] 1.6.3结果判断

[0045] 阴性(-):T线比C线显色深或一样深,表明样品中链霉素浓度低于检出限10μg/kg或无链霉素残留,如图2-a。

[0046] 阳性(+):T线比C线显色浅,或T线无显色,表明样品中链霉素浓度高于检出限10μg/kg;T线比C线显色越浅,表明样品中链霉素浓度越高,如图2-b。

[0047] 无效:未出现C线,可能操作不当或试剂板已失效。应再次仔细阅读说明书,且用新的试剂板重新测试,如图2-c。

[0048] 实例2灵敏度实验

[0049] 1.实验样品准备

[0050] 空白样品:经液相色谱-串联质谱法鉴定为阴性蜂蜜样品3份。

[0051] 加标样品:在空白样品中分别加入适量STR标准品,制成STR浓度为2.5μg/kg、5μg/kg、10μg/kg、20μg/kg、40μg/kg的蜂蜜样品各3份。

[0052] 2.实验方法

[0053] 取实施例1制备的试剂板,检测阴性空白样品、标准品STR浓度为2.5μg/kg、5μg/kg、10μg/kg、20μg/kg、40μg/kg的加标样品,每个浓度重复3次,按照实例1的操作方法进行测定,观察结果。

[0054] 3.实验结果

[0055] 实验结果如表1所示,实用新型试剂板的检测灵敏度为10μg/kg,该链霉素胶体金检测试剂板灵敏度符合检测要求。

[0056] 表1链霉素胶体金检测试剂板的灵敏度实验结果

[0057]

浓度(μg/kg)	0	2.5	5	10	20	40
实验结果 ^a	—	—	—	+	+	+
	—	—	—	+	+	+

[0058] ^a+代表实验结果为阳性,-代表实验结果为阴性。

[0059] 实例3特异性实验

[0060] 1.实验样品准备

[0061] 将氯霉素标准品、四环素标准品和磺胺嘧啶标准品分别用PBST配制成100mg/L的标准品溶液。将空白样品中添加氯霉素、四环素和磺胺嘧啶标准品溶液至终浓度为1.0mg/kg的加标样品各3份。

[0062] 2.检测方法

[0063] 取实例1制备的链霉素胶体金检测试剂板,按照实例1的操作方法对加标样品进行测定,每个标准品重复3次,观察结果。

[0064] 3. 实验结果

[0065] 实验结果如表2所示,实验结果为阴性。试剂板的检测线和质控线均显色,且检测线色带颜色比质控线深或一样深。结果证实,这些药物浓度在1.0mg/kg时不会产生交叉反应。

[0066] 表2交叉反应实验结果

[0067]

交叉反应检测项目	浓度范围	实验结果
氯霉素		
四环素	$\leq 1.0 \text{ mg/kg}$	阴性
磺胺嘧啶		

[0068] 实验例4稳定性实验

[0069] 1. 实验样品准备:

[0070] 空白样品:经液相色谱-串联质谱法测定为阴性蜂蜜样品30份。

[0071] 加标样品:在空白样品中分别加入适量STR标准品,制成STR浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 蜂蜜样品各30份。

[0072] 2. 实验方法:

[0073] 将链霉素胶体金检测试剂板密封保存,并存放于4 $^{\circ}\text{C}$ 及37 $^{\circ}\text{C}$ 下,观察不同存放温度对试剂板稳定性的影响。保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 的试剂板取出5盒,分别检测阴性空白样品、标准品浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品;保存于37 $^{\circ}\text{C}$ 左右) 30d的试剂板取出5盒,分别检测阴性空白样品、标准品浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品,每个浓度重复3次,观察实验结果。

[0074] 3. 实验结果:

[0075] 经验证,试剂板在37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置30d后的检测灵敏度与放置在4 $^{\circ}\text{C}$ 下的试剂板的检测灵敏度均为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,符合检测要求。

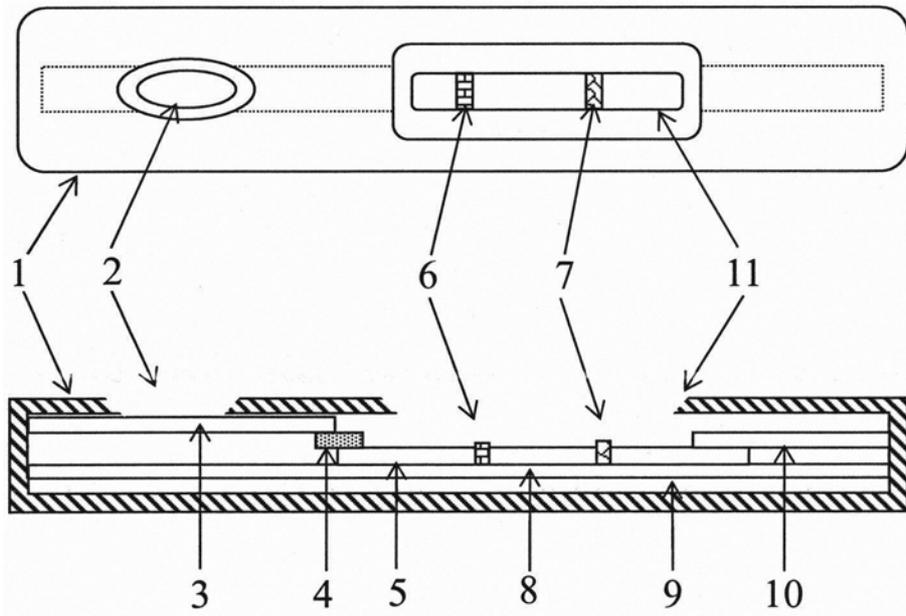


图1

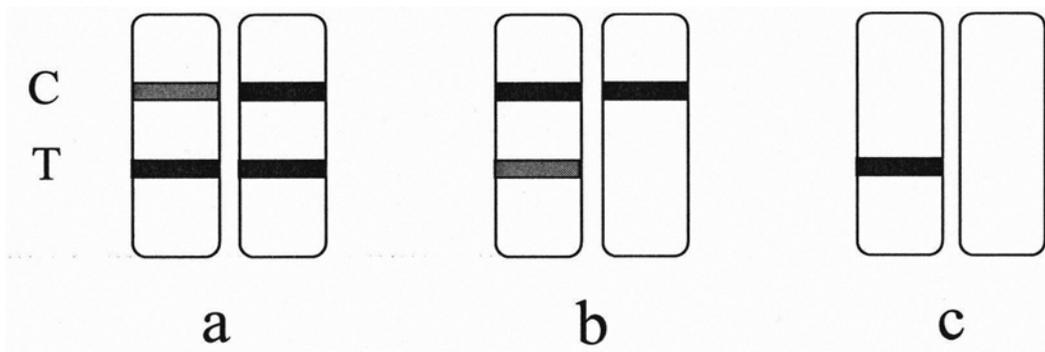


图2

专利名称(译)	一种链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板		
公开(公告)号	CN206945624U	公开(公告)日	2018-01-30
申请号	CN201720566716.7	申请日	2017-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司 杭州市农业科学研究院		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司 杭州市农业科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司 杭州市农业科学研究院		
[标]发明人	王伟萍 赵芸 柳爱春 陈飞东 王振国 陈思思 胡叶军		
发明人	王伟萍 赵芸 柳爱春 陈飞东 王振国 陈思思 胡叶军		
IPC分类号	G01N30/02 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种链霉素的免疫胶体金快速检测试剂板，可用于快速检测蜂蜜、畜禽肉、果蔬、奶制品的链霉素残留。本实用新型由试剂板塑料外壳以及位于塑料外壳内的试纸条组成，试纸条包括底板以及粘贴在底板上的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫；胶体金结合垫上含有胶体金-抗链霉素单克隆抗体的结合物；硝酸纤维素膜上从左到右依次设有相互平行的一条检测线与一条质控线。链霉素检测结果能以肉眼可见的颜色表征出来，进行定性检测，还可用读取装置读取两条线上的具体数值，进行一个半定量检测，适用于工商局、食品加工企业、渔业局对链霉素残留的快速检测。

