



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102721808 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201110076447. 3

(22) 申请日 2011. 03. 29

(71) 申请人 库尔医疗技术(北京)有限公司  
地址 102206 北京市昌平区生命园路29号C座100

(72) 发明人 杨利 陈立柱 李峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

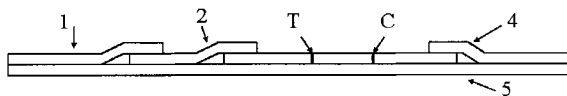
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域。本发明的试剂盒由样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)组成,在PVC支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。胶体金垫为胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体聚酯膜,硝酸纤维素膜上依次包被了螺旋霉素偶联载体蛋白作为检测线(T线),羊抗鼠IgG多克隆抗体作为质控线(C线)。本发明利用胶体金免疫层析技术,运用被测样品中可能含有的螺旋霉素与硝酸纤维素膜上包被的螺旋霉素偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体的原理检测样品中的螺旋霉素。



1. 一种螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,其特征在于由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和PVC支撑板组成,在PVC支撑板上依次紧密粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被有检测线(T线)和质控线(C线),其中检测线(T线)上包被了螺旋霉素偶联载体蛋白,质控线(C线)上包被了羊抗鼠IgG多克隆抗体;所述吸样垫为吸水纸。

2. 一种权利要求1所述的螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的螺旋霉素偶联载体蛋白为螺旋霉素偶联牛血清白蛋白,或卵清白蛋白,或血蓝蛋白;所述的螺旋霉素单克隆抗体由螺旋霉素偶联载体蛋白作为免疫原免疫BALB/C小鼠获得。

3. 一种权利要求1所述的螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金是由氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )在还原剂枸橼酸三钠作用下制成大小为20-40nm的胶体金颗粒。

4. 一种权利要求1所述的螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金垫的制备方法为:取颗粒大小为20-40nm的胶体金溶液,用0.2mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7.0-9.0,室温放置30分钟;在上述溶液中加入螺旋霉素单克隆抗体,使螺旋霉素单克隆抗体的浓度为20-100  $\mu\text{g/ml}$ 胶体金,混合均匀后,室温放置30分钟;取初始胶体金溶液体积5%的量的胶体金复溶液于上述溶液中,混合均匀,室温放置10分钟;上述溶液于12000转离心30分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用30-70%初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到螺旋霉素单克隆抗体-胶体金标记物;将螺旋霉素单克隆抗体-胶体金标记物按15-35  $\mu\text{l/cm}^2$ 的比例均匀的铺在聚酯膜上,放入45°C干燥箱干燥2.5-3小时,制成胶体金垫。

5. 一种权利要求1所述的螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金复溶液为含0.30%的Tris,5%蔗糖,0.50%PVP,0.30%Casein-Na,pH值7.0-9.0的溶液。

6. 一种权利要求1所述的螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上T、C线的包被方法为:将NC膜粘贴在PVC板上,吸水纸贴到PVC板上压住膜1-1.5mm。打开划膜仪,按清洗键清洗划膜仪,将贴好的PVC板放在划膜仪上,设置划膜仪参数为C线1.0  $\mu\text{l/cm}$ ,T线1.0  $\mu\text{l/cm}$ ;用C、T线包被液在NC膜上分别划C、T线。划膜不合格的用红记号笔标出,将包被板置干燥箱设置45°C,干燥1-1.5小时。其中,T线包被液为0.8-3.5mg/ml的螺旋霉素偶联载体蛋白;C线包被液为0.6-2.0mg/ml的羊抗鼠IgG多克隆抗体。

## 螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域,特别是涉及一种利用胶体金免疫层析技术制作的一种螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 螺旋霉素,英文名 Spiramycin,是兽药中常见的大环内脂类抗生素。螺旋霉素对葡萄球菌、化脓性链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎球菌、淋球菌等具有抗菌作用,主要用于抗禽兽细菌及支衣原体感染,也可以作为饲料添加剂促进增重和提高饲料转换率。动物长期服用后,代谢物会在动物的组织及器械内蓄积或贮存,达到一定浓度可造成动物前庭和俄耳蜗神经的损害,导致眩晕和听力减退,严重者还将造成肝肾的损害。螺旋霉素能够通过食物链进入人体,将对人类健康造成严重的危害。国际食品法典委员会、欧盟以及日本均规定该药物的最高残余量限量值为 200  $\mu$ g/L,因此,需要建立一种快速、灵敏的螺旋霉素检测方法。

[0003] 目前,关于螺旋霉素残留的检测分析方法主要为高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、薄层色谱分析法、微生物效价法等,但这些方法存在着仪器昂贵、检测过程繁琐、对检验人员的技能要求高等缺点,不适合现场监控和大量样本的筛查,在实际的应用中受到限制。而本发明方法克服了上述方法的缺点,能够实现螺旋霉素的快速检测。

[0004] 本发明采用胶体金免疫层析技术制备了一种螺旋霉素检测试剂盒。本发明具有操作简单、检测快速、灵敏、无需复杂仪器等特点。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种简单、快捷、灵敏度高、成本低的螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 一种螺旋霉素检测试剂盒,包括样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和 PVC 支撑板,在 PVC 支撑板上依次紧密粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被有检测线(T线)和质控线(C线),其中检测线(T线)上包被了螺旋霉素偶联载体蛋白,质控线(C线)上包被了羊抗鼠 IgG 多克隆抗体;所述吸样垫为吸水纸。

[0007] 偶联螺旋霉素的载体蛋白为牛血清白蛋白,或卵清白蛋白,或血蓝蛋白。

[0008] 本发明采用纳米胶体金技术及抗原抗体特异性反应,应用免疫竞争抑制反应的原理制备而成,即待检样本中可能含有的螺旋霉素与硝酸纤维素膜上检测线(T线)包被的螺旋霉素偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的螺旋霉素抗体,通过 T 线的显色来判定待检样本中是否含有螺旋霉素。

[0009] 本发明提供了一种螺旋霉素检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 制备螺旋霉素偶联载体蛋白

[0011] 将螺旋霉素与载体蛋白偶联,合成螺旋霉素偶联载体蛋白作为免疫原和包被原。

[0012] (2) 制备螺旋霉素单克隆抗体

[0013] 采用螺旋霉素偶联载体蛋白为免疫原免疫 BALB/C 小鼠,制备螺旋霉素单克隆抗体。

[0014] (3) 制备胶体金

[0015] 取 0.01% 的氯金酸水溶液,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 1ml,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0016] (4) 制备胶体金垫

[0017] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液,用 0.2mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 7.0-9.0,室温放置 30 分钟;在上述溶液中加入螺旋霉素单克隆抗体,使螺旋霉素单克隆抗体的浓度为 20-100  $\mu g/ml$  胶体金,混合均匀后,室温放置 30 分钟;取初始胶体金溶液体积 5% 的量的胶体金复溶液于上述溶液中,混合均匀,室温放置 10 分钟;上述溶液于 12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 30-70% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到螺旋霉素单克隆抗体-胶体金标记物;将螺旋霉素单克隆抗体-胶体金标记物按 15-35  $\mu l/cm^2$  的比例均匀的铺在聚酯膜上,放入 45°C 干燥箱干燥 2.5-3 小时,制成胶体金垫。

[0018] 上述胶体金复溶液为含 0.30% 的 Tris,5% 蔗糖,0.50% PVP,0.30% Casein-Na, pH 值 7.0-9.0 的溶液。

[0019] (5) 包被螺旋霉素偶联载体蛋白、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体

[0020] 将 NC 膜粘贴在 PVC 板上,吸水纸贴到 PVC 板上压住膜 1-1.5mm。打开划膜仪,按清洗键清洗划膜仪,设置划膜仪参数为 C 线 1.0  $\mu l/cm$ , T 线 1.0  $\mu l/cm$ 。

[0021] 将贴好的 PVC 板放在划膜仪上,用 C、T 线包被液在 NC 膜上分别划 C、T 线。划膜不合格的用红记号笔标出,将包被板置干燥箱设置 45°C,干燥 1-1.5 小时。

[0022] 其中, T 线包被液为 0.8-3.5mg/ml 的螺旋霉素偶联载体蛋白; C 线包被液为 0.6-2.0mg/ml 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。

[0023] (6) 样品垫的处理

[0024] 将玻璃纤维浸泡于 0.01M pH 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲溶液中 20-40min,其中磷酸盐缓冲溶液中含 0.5-1.5% BSA,0.5-1.0% Tween-20,于烘干箱中 38°C 烘干,保存,备用。

[0025] (7) 组装试剂盒

[0026] 取上述制备好的胶体金垫、PVC 板及样品垫,将胶体金垫切成宽度为 10mm 的条型,然后胶体金垫贴于 PVC 板上 NC 膜的靠近 T 线端,压 NC 膜 1-1.5mm,样品垫贴于胶体金垫的上方,露出金垫 2-3mm (如图 1 所示)。打开切条机,按产品要求设置裁切宽度,将上述组装好的 PVC 板放于切条机上,按设置宽度进行切条,得到所述用于检测螺旋霉素的试纸条;试纸条可以装入塑料卡内,组装成检测卡。

[0027] 本发明所述试剂盒的检测方法为:将被检样品平衡至室温;取出螺旋霉素检测装置,水平放置;在样品垫中加入 2-3 滴样品,5-10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果;或将螺旋霉素检测试纸条样品垫末端浸入被测样品溶液中约 10 秒钟后,水平放置;5-10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0028] 本发明所述的试剂盒采用胶体金免疫层析技术测定螺旋霉素,检测时,将被测样品加在试剂盒上的样品垫上,可以直接观察到免疫反应的结果,完成样品检测。本发明可用

于检测样本中可能存在的螺旋霉素,具有使用方便、操作简单、反应迅速、经济实用等特点。

#### 附图说明

[0029] 图 1 螺旋霉素检测试剂盒结构示意图;

[0030] 附图符号说明:

[0031] 1:样品垫;

[0032] 2:胶体金垫(胶体金标记螺旋霉素单克隆抗体的聚酯膜)

[0033] 3:硝酸纤维素膜(T:包被了螺旋霉素偶联载体蛋白的检测线;C:包被了羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的质控线);

[0034] 4:吸样垫;

[0035] 5:PVC 支撑板;

[0036] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。

[0037] 自左至右依次为 C 线一条线阳性检测结果;T、C 两条线阴性检测结果;无效。

[0038] 实施例 1:螺旋霉素检测试剂盒的制备

[0039] 1. 制备螺旋霉素偶联牛血清白蛋白

[0040] 将螺旋霉素与牛血清白蛋白偶联,合成螺旋霉素偶联牛血清白蛋白做为免疫原和包被原。

[0041] 2. 制备螺旋霉素单克隆抗体

[0042] 采用螺旋霉素偶联牛血清白蛋白为免疫原免疫 BALB/C 小鼠,制备螺旋霉素单克隆抗体。

[0043] 3. 制备胶体金

[0044] 取 0.01% 的氯金酸水溶液,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 1ml,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0045] 4. 制备胶体金垫

[0046] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml,用 0.2mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0,室温放置 30 分钟;在上述溶液中加入 70  $\mu$ l 浓度为 3.5mg/ml 的螺旋霉素单克隆抗体,混合均匀后,室温放置 30 分钟;取 250  $\mu$ l 的胶体金复溶液于上述溶液中,混合均匀,室温放置 10 分钟;上述溶液于 12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 2.5ml 的胶体金复溶液溶解,得到螺旋霉素单克隆抗体-胶体金标记物;将螺旋霉素单克隆抗体-胶体标记物按 20  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 的比例均匀的铺在聚酯膜上,放入 45℃ 干燥箱干燥 3 小时,制成胶体金垫。

[0047] 上述胶体金复溶液为含 0.30% 的 Tris,5% 蔗糖,0.50% PVP,0.30% Casein-Na, pH 值 8.0 的溶液。

[0048] 5. 包被螺旋霉素偶联牛血清白蛋白、羊抗鼠 IgG 多克隆抗体

[0049] 将 NC 膜粘贴在 PVC 板上,吸水纸贴到 PVC 板上压住膜 1-1.5mm。打开划膜仪,按清洗键清洗划膜仪,设置划膜仪参数为 C 线 1.0  $\mu$ l/cm, T 线 1.0  $\mu$ l/cm。

[0050] 将贴好的 PVC 板放在划膜仪上,用 C、T 线包被液在 NC 膜上分别划 C、T 线。划膜不合格的用红记号笔标出,将包被板置干燥箱设置 45℃,干燥 1 小时。

[0051] 其中, T 线包被液为 3.0mg/ml 的螺旋霉素偶联牛血清白蛋白;C 线包被液为

1. 0mg/ml 的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。

[0052] 6. 样品垫的处理

[0053] 将玻璃纤维浸泡于 0.01M pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液中 20-40min, 其中磷酸盐缓冲溶液中含 1.0% BSA, 0.5% Tween-20, 于烘干箱中 38℃ 烘干, 保存, 备用

[0054] 7. 组装试剂盒

[0055] 取上述制备好的胶体金垫、PVC 板及样品垫, 将胶体金垫切成宽度为 10mm 的条型, 然后胶体金垫贴于 PVC 板上 NC 膜的靠近 T 线端, 压 NC 膜 1-1.5mm, 样品垫贴于胶体金垫的上方, 露出金垫 2-3mm (如图 1 所示)。打开切条机, 设置裁切宽度为 3.8mm, 将上述组装好的 PVC 板放于切条机上, 按设置宽度进行切条, 得到所述用于检测螺旋霉素的试纸条; 试纸条可以装入塑料卡内, 组装成检测卡。

[0056] 实施例 2: 螺旋霉素检测试剂盒的检测

[0057] 1. 样品的处理

[0058] 血清: 抽取血清, 离心或静置后取透明上清液使用;

[0059] 尿液: 用尿液直接进行测试, 若尿液呈可见的混浊状, 需先离心、过滤或待其沉淀后取上清液检测;

[0060] 牛奶: 4℃、3000r/min 离心 15min, 去除上层脂肪后检测。

[0061] 蜂蜜、蛋: 用 0.01mol/L, pH 7.5 的 PBS 制成 1:2 的待测样品悬浮液, 震荡 10min, 3000r/min 离心 15min, 取上清液检测。

[0062] 组织样品: 取 5-10g 组织样品捣碎后, 加入 20-30ml (0.01mol/L, pH 7.5) PBS, 震荡 10min, 37℃ 恒温箱中反应 30min 后, 水浴 10min, 于 4℃、3000r/min 离心 15min, 去除上层脂肪, 取上清液检测。

[0063] 饲料: 取 0.5-2g 磨碎的待测饲料, 加入 8-20ml (0.01mol/L, pH 7.5) PBS, 37℃ 恒温箱中反应 30min 后, 水浴 10min, 于 4℃、3000r/min 离心 15min, 取上清液检测。

[0064] 2. 检测方法:

[0065] 取出螺旋霉素检测试剂盒, 水平放置; 在样品垫上滴入 3 滴样品, 10 分钟后观察并记录 C、T 线的显色情况, 判断检测结果。

[0066] 3. 结果判定

[0067] 阳性: T 线不显色, 仅 C 线显色, 判定为阳性结果;

[0068] 阴性: T 线、C 线均显色, 判定为阴性结果;

[0069] 无效: C 线不显色, 说明不正确操作或试剂盒已经变质损坏。

[0070] 检测样品时, 样品因毛细管作用向吸样垫一端层析。若被测样品中含有螺旋霉素, 它们将和检测线 (T 线) 上包被的螺旋霉素偶联牛血清白蛋白竞争结合胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体上有限的抗体结合位点, 当样品中的螺旋霉素达到一定浓度时, 与胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体发生免疫反应并完全饱和, 此时胶体金复合物已无空余的位点和检测线上包被的螺旋霉素偶联牛血清白蛋白结合, 此时 T 线不显色, 此为阳性结果; 若被测样品中不含螺旋霉素, 标记了螺旋霉素单克隆抗体的胶体金颗粒将随同样品层析至 T 线位置后, 与 T 线上包被的螺旋霉素偶联牛血清白蛋白发生免疫结合反应, 胶体金颗粒在 T 线位置堆积使得 T 线呈现出一条肉眼可见的红色条带, 此为阴性结果。无论被测样品中是否含有螺旋霉素, 胶体金标记物均会与 C 线包被的羊抗鼠 IgG 反应形成一条肉眼可见的红色

条带,C线显色与否,是判定是否有足够样本,层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准。

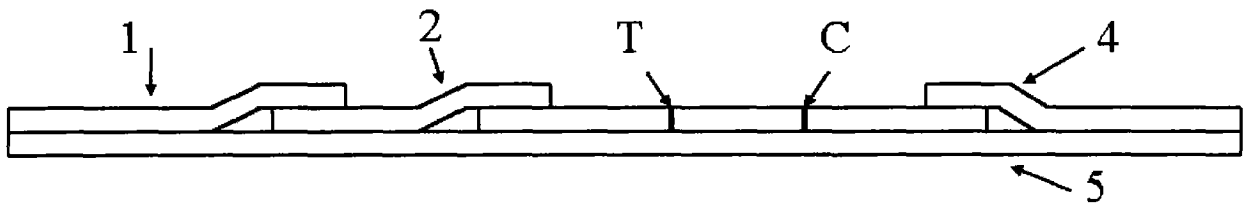


图 1

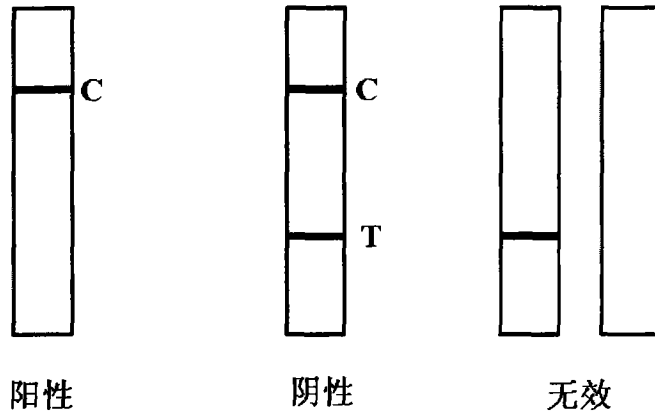


图 2

专利名称(译)	螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102721808A</a>	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN201110076447.3	申请日	2011-03-29
[标]发明人	杨利 陈立柱 李峰		
发明人	杨利 陈立柱 李峰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

螺旋霉素检测试剂盒及其制备方法，本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域。本发明的试剂盒由样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)组成，在PVC支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。胶体金垫为胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体聚酯膜，硝酸纤维素膜上依次包被了螺旋霉素偶联载体蛋白作为检测线(T线)，羊抗鼠IgG多克隆抗体作为质控线(C线)。本发明利用胶体金免疫层析技术，运用被测样品中可能含有的螺旋霉素与硝酸纤维素膜上包被的螺旋霉素偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的螺旋霉素单克隆抗体的原理检测样品中的螺旋霉素。

