



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752555 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201711074426.1

(22)申请日 2017.11.05

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司
地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家
科技园B11栋3楼

(72)发明人 杜道林 薛永来 洪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种检测组织中恩诺沙星的免疫胶体检测卡

(57)摘要

本发明恩诺沙星的免疫胶体金检测卡及其制备方法,涉及动物源食品兽药残留检测技术领域。本发明的检测卡外壳中的试纸条,由PVC胶板、样品垫、胶体金结合垫、包被膜和吸水垫组成;胶体金膜为含恩诺沙星单克隆抗体的玻璃纤维素膜,包被膜是硝酸纤维素膜,其上设有T线和C线,T线包被有恩诺沙星蛋白质偶联物,C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测恩诺沙星,方便、快捷、结果准确。

1. 恩诺沙星胶体金检测卡,其特征在于按照下述步骤制备得到:

(1) 胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的恩诺沙星抗体在1000 r/min,4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/ml,过0.22 μm滤膜;

(3) 胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温1500 r/min离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成恩诺沙星单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)恩诺沙星蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含恩诺沙星蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

(5) 包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、恩诺沙星蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干;

(6) 样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于60%的条件下,室温自然晾干;

(7) 检测卡的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

2. 根据权利要求1所述的恩诺沙星胶体金检测卡,其特征在于所述步骤(5)中所包被的检测线T设在质控线C的下方;

所述步骤(6)中的样品垫处理液是由1 g小牛血清蛋白(BSA)和0.8 g氯化钠(NaCl),用含有0.5%TRITON-100的0.01 mol/L PBS定容至100 mL。

一种检测组织中恩诺沙星的免疫胶体检测卡

技术领域

[0001] 本发明涉及谷物食品中农药残留检测技术领域,特别是涉及恩诺沙星的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 恩诺沙星是氟喹诺酮类抗生素,具有下列特性:由于独特的化学结构,使其成为兽医临床药物中十分重要的抗生素。恩诺沙星对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和支原体类病原菌均具有广谱抗菌活性,在一定的浓度下对细菌支原体也具有杀菌作用,还能杀死对抗生素具有抗药力的细菌,例如抗p-乳酸菌素、氨基糖苷等。恩诺沙星因其具有独特的作用,自80年代开始就被广泛的应用于动物和鱼虾类的疾病的预防和治疗。但最近的研究发现,凡使用过恩诺沙星的动物,在一定时期内其产品都有残留,因其具有神经毒性和肾脏毒性,所以在动物食品中残留会对人类健康造成威胁和影响,欧美国家及我国均要求对其限量使用。2002年12月我国农业部公告第235号文规定在所有食品动物的肌肉、脂肪中最高残留限量为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在所有食品动物的肝、肾中最高残留限量为200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此,恩诺沙星已经列为兽药残留监控的重点。检测恩诺沙星残留量的化学方法主要有薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气-质联机(GC/MS)、液-质联机(HPLC/MS)、毛细管电泳(CE)等,由于复杂的仪器设备和繁琐的过程,不适合现场监控和大量样本筛查。

[0003] 免疫分析技术以其抗原抗体反应的高度专一性,以及测定方法简单、快速、灵敏度高、费用低和适于现场大批量样品筛选等优点,在农兽药残留分析中展示了广泛的应用前景。随着农药残留免疫学检测技术不断被完善和商品化,免疫学检测技术会成为食品农兽药残留和食品安全质量控制的有效快速检测手段。基于目前兽药残留诊断试剂的研究现状,及时开发出优于目前的、快速灵敏的检测试剂可谓是当务之急。虽然农兽药残留分析的方法虽然有很多,但是利用免疫学技术进行分析是特异性最好、检测时间最短的方法。

[0004] 现有技术对于恩诺沙星的检测主要是气相色谱-质谱法、高效液相色谱法等检测方法,但这些技术的缺陷明显:设备昂贵、操作复杂、难以推广。所以,建立一种简单、有效、适合基层使用的测定方法是极其必要的。本发明的目的是研制一种更适合企业进行现场检测且快捷简便、成本低廉的定性检测方法。

发明内容

[0005] 针对以上情况,本发明的目的就是为了解决现有技术存在的缺陷而提供一种恩诺沙星的免疫胶体金检测卡及其制备方法,可有效解决能快速、简便地检测出恩诺沙星的问题。

[0006] 本发明的恩诺沙星胶体金检测卡,包括包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了恩诺沙星-BSA和羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、PVC胶板和塑料模具组成,在PVC胶板的一端依次粘附样品垫、结合垫,中间黏贴硝酸纤维素膜,另一端粘附吸水垫。

[0007] 本发明的恩诺沙星胶体金检测卡的制备方法,是由以下步骤实现:

(1) 胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8°C保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的恩诺沙星抗体在1000 r/min, 4°C条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/ml,过0.22 μm 滤膜;

(3) 胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4°C,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成恩诺沙星单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)恩诺沙星蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37°C烘干3 h,制成含恩诺沙星蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

(5) 包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、恩诺沙星蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37°C包被2 h后,室温自然晾干或者37°C烘干;

(6) 样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于60%的条件下,室温自然晾干;

(7) 检测卡的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度的长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

[0008] 所述步骤(5)中所包被的检测线T设在质控线C的下方;

所述步骤(6)中的样品垫处理液是由1 g小牛血清蛋白(BSA)和0.8 g氯化钠(NaCl),用含有0.5%TRITON-100的0.01 mol/L PBS定容至100 mL;

本发明可有效用于测定恩诺沙星,方法简单,方便、快捷,结果准确。

附图说明

[0009] 图1为本发明恩诺沙星的免疫胶体金检测卡的结构图:图中1.加样孔 2.检测线 3.质控线 4.检测孔 5.试纸条 6.检测卡外壳。

[0010] 图2为本发明恩诺沙星的免疫胶体金检测卡内的试纸条的剖视结构图,图中7.样品垫 8.胶体金结合垫 9.PVC胶板 10.硝酸纤维素膜 11.吸水垫。

具体实施方式

[0011] 实施例1

图1、图2所示的实施例:图中9为PVC胶板;7为样品垫;8为胶体金结合垫,该胶体金结合垫上包被了单克隆抗体胶体金标记物;10为包被膜,即硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜上包

被了恩诺沙星-BSA和羊抗鼠IgG;11为吸水垫,由吸水材料如滤纸制成。

[0012] 在PVC胶板9的一端上(样品端)粘附样品垫7、结合垫8,样品垫7和结合垫8为并列结构。

[0013] 在PVC胶板9的中间粘附硝酸纤维素膜10。在硝酸纤维素膜10上设置有羊抗鼠IgG质控线3和恩诺沙星-BSA检测线2。

[0014] 在PVC胶板9的另一端粘附吸水垫11。硝酸纤维素膜10的一端与结合垫8略交叉,另一端与吸水垫11略交叉。该试纸条5可装入有塑料模具制成的检测卡外壳6中,制成检测卡,在检测卡外壳6的上盖上设有加样孔1和检测孔4,样品垫7正对加样孔1,硝酸纤维素膜10正对检测孔4。

[0015] 实施例2

恩诺沙星胶体金检测卡制备,是由以下步骤具体实现:

胶体金溶液制备:取1 L 三角烧瓶1个,加入超纯水495 mL,而后加入1%氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 5 mL,配制成500 mL 0.01%氯金酸水溶液,加热煮沸后在持续搅拌的情况下加入1%柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 溶液5-7 mL,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5 min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,2-8℃保存备用;

抗体的预处理:将要标记的恩诺沙星抗体在1000 r/min, 4℃条件下,离心20 min,取上清,用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/mL;或者用0.01 mol/L PBS稀释成1 mg/ml,过0.22 μm滤膜;

胶体金标记物的制备:取步骤(1)中的胶体金溶液40 mL,用0.25 mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至 8.5,电磁搅拌器250 r/min搅拌,逐滴加入4 mL 含0.3 mg 抗体蛋白的蛋白溶液,反应10 min;逐滴加入4 mL 10% BSA,继续搅拌反应10 min;金标抗体溶液常温低速(1500 r/min)离心10 min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀;红色上清溶液4℃,12000 r/min 离心20 min,弃上清,收集沉淀,将沉淀用金标抗体稀释液定容至1 mL,制备成恩诺沙星单克隆抗体胶体金标记物;

胶体金膜的制备:将步骤(3)恩诺沙星蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物用划膜仪以5 μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维素膜上,室温自然晾干或者37℃烘干3 h,制成含恩诺沙星蛋白质偶联物单克隆抗体胶体金标记物的胶体金膜;

包被膜制备:将羊抗鼠IgG抗体、恩诺沙星蛋白质偶联物稀释成1 mg/mL,用划膜仪依次以1 μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,制备成包被膜,37℃包被2 h后,室温自然晾干或者37℃烘干;

样品垫前处理:将样品垫处理液均匀涂布在玻璃纤维素膜上,在空气湿度低于60%的条件下,室温自然晾干;

检测卡的组装:PVC胶板自上而下依次粘贴样品垫、胶体金膜、包被膜和吸水棉,组装成试纸条,切割成一定宽度长条,再将试纸条安装在长条扁平壳状的检测卡外壳中。

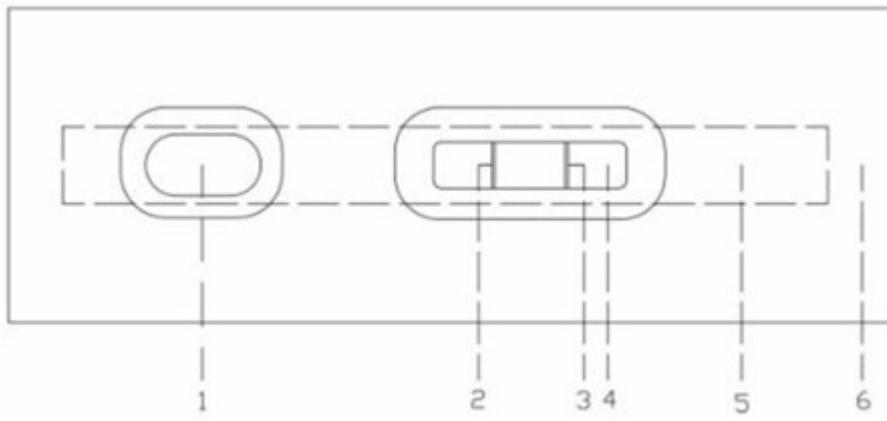


图1

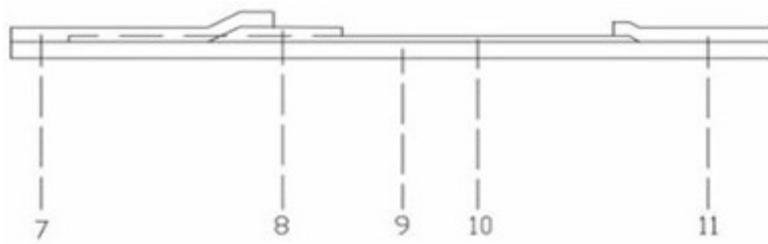


图2

专利名称(译)	一种检测组织中恩诺沙星的免疫胶体检测卡		
公开(公告)号	CN109752555A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN2017111074426.1	申请日	2017-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 薛永来 洪霞		
发明人	杜道林 薛永来 洪霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明恩诺沙星的免疫胶体金检测卡及其制备方法，涉及动物源食品兽药残留检测技术领域。本发明的检测卡外壳中的试纸条，由PVC胶板、样品垫、胶体金结合垫、包被膜和吸水垫组成；胶体金膜为含恩诺沙星单克隆抗体的玻璃纤维素膜，包被膜是硝酸纤维素膜，其上设有T线和C线，T线包被有恩诺沙星蛋白质偶联物，C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测恩诺沙星，方便、快捷、结果准确。

