



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111366722 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 201811587662.8

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 南京亿特生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区江宁科
学园芝兰路18号

(72)发明人 杜霞 洪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

阿德呋啉的免疫胶体金检测卡及其制备方法

(57)摘要

本发明阿德呋啉的免疫胶体金检测卡及其制备方法,涉及 β -肾上腺素受体激动剂检测技术领域。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;胶体金膜为含阿德呋啉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线包被有阿德呋啉蛋白质偶联物,C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测阿德呋啉,方便、快捷、结果准确。

1. 阿德吠啉胶体金检测卡,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:将要标记的阿德吠啉抗体在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,制备成阿德吠啉单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)阿德吠啉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,制成含阿德吠啉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、阿德吠啉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所述的阿德吠啉胶体金检测卡,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。

阿德吠啉的免疫胶体金检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物源食品添加剂检测技术领域,特别是涉及阿德吠啉的免疫胶体金检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 当前由艾美耳属球虫引起鸡球虫病的危害程度非常高,严重影响家禽生长发育并造成环境污染。阿德吠啉属核苷酸类化合物,在国外已经有很多研究,属于一种新型的高效抗球虫药物,它通过干扰球虫的嘌呤代谢而发挥抗球虫作用,其抗球虫作用峰期为球虫的无性生殖期,即在球虫感染后1 ~ 3 d 作用最强。阿德吠啉是由安徽农业大学药理学实验室和南京农业大学药理学实验室共同研发的新一代抗球虫药物,具有抗球虫谱广、高效、低毒等优点,对柔嫩艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫和毒害艾美耳球虫都有效。近年来,由于家禽养殖规模的不断扩大,全国范围内球虫病的频繁爆发致使各种抗球虫药大量使用。另外,有些养殖户为了经济利益,不合理使用抗球虫药且不遵照休药期规定。由于阿德吠啉在鸡体内代谢主要以原药形式存在,并以原药形式排泄,因此造成该药在鸡肉组织中的残留及对环境的污染。如果人体经常摄入低剂量的同样残留物,会导致体内耐药性细菌的增加及对临床上治疗感染性疾病造成困难;同时,由于残留物在体内蓄积,导致各种器官病变,甚至癌变,这将对我国动物产品质量安全和消费者健康造成严重威胁。国内尚没有鸡肉中阿德吠啉残留检测的相关报道,因此,有必要建立一种鸡肉组织中阿德吠啉残留的检测技术。

[0003] 现有技术对于阿德吠啉的检测主要是高效液相色谱-串联质谱法、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

[0004] 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阿德吠啉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 β -肾上腺素受体激动剂阿德吠啉的问题。

[0005] 本发明的阿德吠啉胶体金检测卡,包括包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了阿德吠啉-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。

[0006] 本发明的阿德吠啉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℃保存备用;

(2) 抗体的预处理:将要标记的阿德吠啉抗体在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 K₂CO₃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,制备成阿德吠啉单克隆抗体胶体金标记物;

(4) 胶体金膜的制备:将步骤(3)阿德吠啉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,制成含阿德吠啉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、阿德吠啉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。

[0007] 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β-肾上腺素受体激动剂阿德吠啉,方法简单,方便、快捷,结果准确。

附图说明

[0008] 图1为本发明阿德吠啉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。

[0009] 图2为本发明阿德吠啉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

[0010] 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阿德吠啉-BSA和羊抗鼠IgG;11为吸水垫,由吸水材料如滤纸制成。

[0011] 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。

[0012] 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和阿德吠啉-BSA检测线2。

[0013] 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。

[0014] 实施例2

阿德吠啉胶体金检测卡制备,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:将要标记的阿德吠啉抗体在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,制备成阿德吠啉单克隆抗体胶体金标记物;

胶体金膜的制备:将步骤(3)阿德吠啉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,制成含阿德吠啉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、阿德吠啉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。

[0015] 实施例3

阿德吠啉最低检出限量试验

准确称量0.500 g阿德吠啉抗原溶于超纯水并定容至100 mL,标为A₁溶液,取A₁溶液1 mL于容量瓶加超纯水并定容至1000 mL,形成A₂溶液,取A₂溶液1 mL于容量瓶加超纯水并定容至1000 mL,形成A₃溶液,则A₃溶液的浓度为5 ng/mL (5ppb)。取A₃溶液1 mL于4支试管中,并分别标号1~4,往试管中分别加入9 mL、4 mL、1 mL、0 mL超纯水,配成阿德吠啉抗原溶液浓度分别是:0.5 ng/mL、1 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL;另取一支空试管,加入5 mL超纯水,标为5号试管。取上述1~5号试管中液体作为样品滴加到阿德吠啉检测卡上,加样后5

min观察结果,检测线2和质控线3的显色结果见表1。

[0016] 表1 阿德呋啉最低检出限量试验

试管编号	盐酸赛庚啉溶液 浓度 (ng/mL)	测定结果
1	0.5	检测线 T 显色比质控线 C 略淡
2	1	检测线 T 显色稍淡
3	2.5	检测线 T 显色较淡
4	5	检测线 T 不显色
5	0	检测线 T 与质控线显色基本相同

经多次检验,阿德呋啉的检出率达99%,最低检出限量为5 ng/mL。

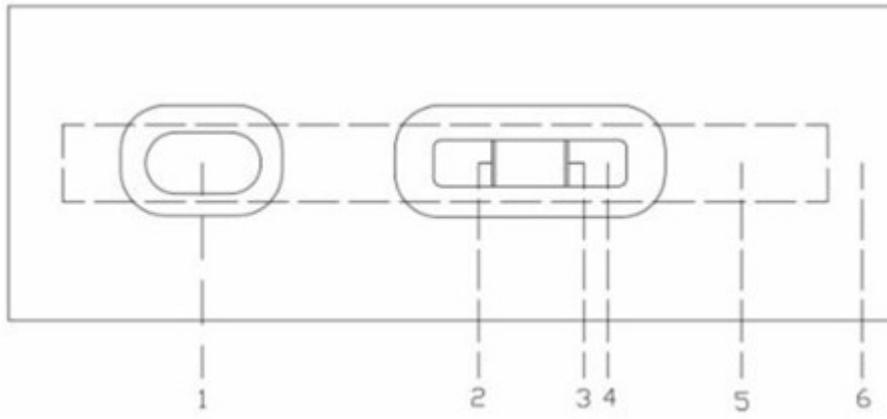


图1

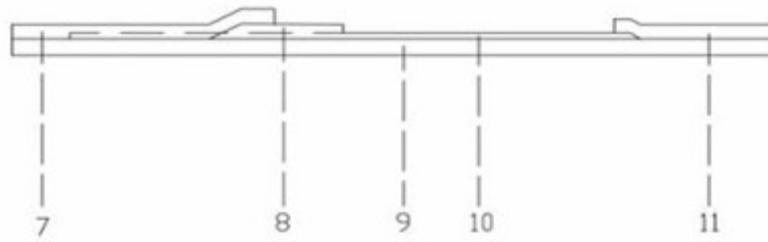


图2

专利名称(译)	阿德吠啉的免疫胶体金检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN111366722A	公开(公告)日	2020-07-03
申请号	CN201811587662.8	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京亿特生物科技有限公司		
[标]发明人	杜霞 洪霞		
发明人	杜霞 洪霞		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明阿德吠啉的免疫胶体金检测卡及其制备方法,涉及β-肾上腺素受体激动剂检测技术领域。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;胶体金膜为含阿德吠啉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线包被有阿德吠啉蛋白质偶联物,C线包被有羊抗鼠IgG抗体。本发明有效用于快速检测阿德吠啉,方便、快捷、结果准确。

试管编号	盐酸美托洛尔溶液 浓度 (ng/mL)	测定结果
1	0.5	检测线 T 显色比质控线 C 略淡
2	1	检测线 T 显色稍淡
3	2.5	检测线 T 显色较淡
4	5	检测线 T 不显色
5	0	检测线 T 与质控线显色基本相同