



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102043057 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 201010540962. 8

(22) 申请日 2010. 11. 11

(71) 申请人 哈尔滨工业大学

地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区西大直街 92 号

(72) 发明人 崔艳华 马莺 徐桂连 代翠红
丁忠庆

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 韩未洙

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

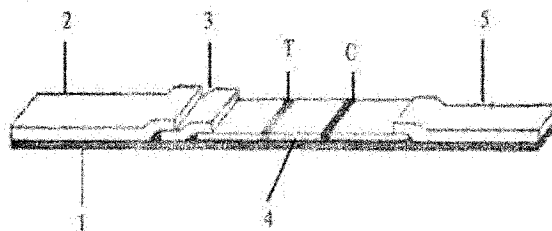
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条及其制备方法

(57) 摘要

一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条及其制备方法, 涉及一种检测食源性土霉素残留的试纸条及其制备方法。本发明为了解决现有检测土霉素的方法操作繁琐, 样品处理复杂, 不适合现场检测的问题。试纸条由 PVC 背板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成。制备方法: 一、土霉素人工抗原的合成; 二、制备土霉素-载体蛋白偶联物, 制成检测线和质控线; 三、制备抗土霉素单克隆抗体; 四、制备胶体金溶液, 制得抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物, 然后包被在结合垫上; 五、在 PVC 背板上依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 即得到用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条。应用于食源性土霉素残留检测领域。



1. 一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条,其特征在于用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条,由PVC背板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,在PVC背板上依次连续粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述样品垫与所述结合垫之间有搭接,所述结合垫与所述硝酸纤维素膜之间有搭接,所述硝酸纤维素膜与所述吸收垫之间有搭接;所述结合垫上包被有抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物,包被量为 $0.1\mu\text{g}$;所述硝酸纤维素膜上分别包被有土霉素-载体蛋白偶联物构成的检测线和羊抗鼠IgG构成的质控线,包被量均为 $0.05\mu\text{g}$ 。

2. 根据权利要求1所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条,其特征在于硝酸纤维素膜上包被的土霉素-载体蛋白偶联物中的载体蛋白为卵清蛋白。

3. 如权利要求1所述的一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,按以下步骤进行:一、土霉素人工抗原的合成:将邻联甲苯胺溶解于 $0.2\sim 0.3\text{mol/L}$ 的 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 的HCl溶液中,然后逐滴加入 $35\sim 36\text{mg/mL}$ 的 NaNO_2 溶液,置于 4°C ,避光反应 $0.5\sim 1\text{h}$,得到溶液A,称取土霉素和牛血清白蛋白,溶解于pH值为 $7.2\sim 7.4$ 的 0.1mol/L 的硼砂缓冲液中,并加入上述溶液A,避光反应 $2\sim 3\text{h}$,在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 条件下用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 $2\sim 3$ 天,每隔 $6\sim 8\text{h}$ 换一次磷酸盐缓冲液,透析完成后,于 $5000\sim 6000\text{r/min}$ 条件下离心 $5\sim 10\text{min}$,弃去沉淀,得到土霉素免疫抗原;二、制备土霉素-载体蛋白偶联物,然后包被在硝酸纤维素膜上构成检测线,再将羊抗鼠IgG包被在硝酸纤维素膜上构成质控线;三、制备抗土霉素单克隆抗体;四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,然后将抗土霉素单克隆抗体加入胶体金溶液中,制得抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物,然后包被在结合垫上;五、在PVC背板上依次连续粘附样品垫、步骤四所得结合垫、步骤二所得硝酸纤维素膜和吸水垫,然后切成 $60\text{mm}\times 4\text{mm}$ 的试纸条,即得到用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条;步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 $0.16\sim 0.2\text{mL}$ 的HCl溶液,每毫克邻联甲苯胺加入 $0.01\sim 0.03\text{mL}$ 的 NaNO_2 溶液;步骤一中土霉素与牛血清白蛋白的质量比为 $1:1.5\sim 2$,硼砂缓冲液和溶液A与土霉素的体积比分别为 $8\sim 10:1$ 和 $4\sim 6:1$;步骤二中土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠IgG的包被量均为 $0.05\mu\text{g}$;步骤四中抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的包被量为 $0.1\mu\text{g}$ 。

4. 根据权利要求3所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 0.18mL 的HCl溶液。

5. 根据权利要求3所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 0.02mL 的 NaNO_2 溶液。

6. 根据权利要求3所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于步骤二中制备土霉素-载体蛋白偶联物的具体步骤为:将 125mg 邻联甲苯胺溶解于 22.5mL 的 0.2mol/L 的 0°C 的HCl溶液中,然后逐滴加入 35mg/mL 的 NaNO_2 溶液 2.5mL ,于 4°C 避光反应 1h ,得到溶液A,称取 0.08g 土霉素和 0.085g 卵清蛋白,溶解于 10mL 的pH值为 7.4 的 0.1mol/L 的硼砂缓冲液中,并加入 5mL 上述溶液A,避光反应 2 小时,用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液于 4°C 透析 3 天,每隔 8h 换一次磷酸盐缓冲液,透析完后,于 5000r/min 离心 5min ,弃去沉淀,即得到土霉素-载体蛋白偶联物。

7. 根据权利要求3所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,

其特征在于步骤二中检测线和质控线的制备方法为:a、用点膜机将土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗小鼠 IgG 包被在纤维素膜上,分别作为检测线和质控线;b、然后于 37℃ 恒温箱中固定 15min,再经封闭液封闭 30min,然后用 PBST 缓冲液冲洗 3 次后,于 37℃ 烘干,即完成检测线和质控线的制备;其中步骤 a 中土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗小鼠 IgG 的包被量均为 0.05 μ g;步骤 b 中的封闭液由 0.01mol/L 的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液和质量浓度 1% 的牛血清白蛋白组成;步骤 b 中的 PBST 缓冲液为含 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求 3 所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于步骤三中制备抗土霉素单克隆抗体的具体步骤为:a、将 100 μ g 土霉素免疫抗原溶解于 100 μ L 生理盐水中,然后与等体积的弗氏佐剂混合乳化,乳化完全,然后首次免疫采用皮下多点注射 BALB/c 小鼠,注射剂量为 1mL/只;b、两周后,改用弗氏不完全佐剂乳化土霉素免疫抗原,采用腹腔注射小鼠,注射剂量为 0.3mL/只;c、之后每隔一周使用弗氏不完全佐剂乳化土霉素免疫抗原,采用腹腔注射免疫小鼠,注射剂量为 0.3mL/只,第 5 次免疫后,尾静脉采血,血液置于 4℃ 静置 24h,然后于 5000r/min 离心 10min,取上清采用间接非竞争 ELISA 测定抗血清效价,当抗血清效价达到 1:6400 以上,取小鼠脾细胞,与骨髓瘤细胞进行细胞融合;d、用间接酶联免疫吸附试验筛选阳性杂交瘤细胞;e、向小鼠腹腔注射 0.5mL 无菌液体石蜡,取阳性杂交瘤细胞,于 2500r/min 离心 5min,将沉淀用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,之后将沉淀用无血清培养基稀释至细胞浓度为 10^5 个/mL,注入小鼠腹腔,待腹腔膨大,采集腹水,于 4℃ 且转速 2500r/min 条件下离心 10min 取上清,采用辛酸-硫酸铵法进行纯化,获得抗土霉素单克隆抗体。

9. 根据权利要求 3 所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于步骤四中采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液的具体步骤为:a、取一个 250mL 三角瓶,加 100mL 双蒸水及 1mL 质量浓度为 1% 的氯化金,加热至沸腾;b、加入 2.5mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠水溶液,混匀,继续加热沸腾 30min;c、溶液颜色首先变黑,再逐渐变紫红,冷却后,于 4℃ 下保存,即完成胶体金溶液制备。

10. 根据权利要求 3 所述的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法,其特征在于步骤四中制备抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的具体步骤为:a、将 pH 值为 7.2 的胶体金溶液置于磁力搅拌器上,将抗土霉素单克隆抗体逐滴加入胶体金溶液中,5min 加入 1mg 抗土霉素单克隆抗体,搅拌 30min;加入牛血清白蛋白至终浓度为 1%,继续搅拌 30min;然后置于 4℃ 作用 2h 后,于 4℃,2000r/min 条件下离心 20min,去沉淀;上清继续在 4℃,10000r/min 条件下离心 1h,去上清,得沉淀,即完成抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备。

一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测食源性土霉素残留的试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 土霉素 (OTC) 是常见的四环素类抗生素, 分子量为 460, 为灰黄色结晶粉末, 难溶于水, 盐酸盐在水中溶解度为 500mg/mL, 微溶于乙醇, 在空气中稳定。土霉素抗菌谱广, 对革兰氏阳性菌和阴性菌、立克次氏体、支原体、衣原体等原核微生物均有抑菌作用且对某些酵母及原生动物等真核微生物也有抑制效果。

[0003] 由于土霉素抗菌效果好, 价格低廉等优点而被广泛应用于水产养殖业, 用于多种水产动物的细菌性疾病防治, 淡水鱼类烂鳃病、肠炎病、赤皮病等。但是由于养殖过程中土霉素的长期滥用, 导致了在水产品中的大量残留, 其对人体健康、生态环境、水产品贸易等方面造成了严重的危害。国家农业部规定土霉素在肌肉中最高残留限量为 100 μ g/kg, 在水产品中的最高残留限量为 100 μ g/kg。

[0004] 目前, 应用于土霉素抗生素残留的检测方法主要有仪器分析法和免疫分析法两大类。前者主要包括高效液相色谱, 高效液相色谱串联质谱等, 具有精确度高、灵敏等优点, 但其存在操作繁琐、样品处理复杂、成本高、不适合现场检测等缺点。酶联免疫检测方法所需试剂主要依赖进口, 费用较高。

发明内容

[0005] 本发明是为了解决现有检测土霉素的方法操作繁琐, 样品处理复杂, 不适合现场检测的问题, 提供一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条及其制备方法。

[0006] 本发明的一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条, 由 PVC 背板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成, 在 PVC 背板上依次连续粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫, 所述样品垫与所述结合垫之间有搭接, 所述结合垫与所述硝酸纤维素膜之间有搭接, 所述硝酸纤维素膜与所述吸收垫之间有搭接; 所述结合垫上包被有抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物, 包被量为 0.1 μ g; 所述硝酸纤维素膜上分别包被有土霉素-载体蛋白偶联物构成的检测线和羊抗鼠 IgG 构成的质控线, 包被量均为 0.05 μ g。

[0007] 上述的一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法, 按以下步骤进行: 一、土霉素人工抗原的合成: 将邻联甲苯胺 (o-Tolidine) 溶解于 0.2 ~ 0.3mol/L 的 0 ~ 4℃ 的 HCl 溶液中, 然后逐滴加入 35 ~ 36mg/mL 的 NaNO₂ 溶液, 置于 4℃, 避光反应 0.5 ~ 1h, 得到溶液 A, 称取土霉素 (OTC) 和牛血清白蛋白 (BSA), 溶解于 pH 值为 7.2 ~ 7.4 的 0.1mol/L 的硼砂缓冲液中, 并加入上述溶液 A, 避光反应 2 ~ 3h, 在 0 ~ 4℃ 条件下用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 2 ~ 3 天, 每隔 6 ~ 8h 换一次磷酸盐缓冲液, 透析完成后, 于 5000 ~ 6000r/min 条件下离心 5 ~ 10min, 弃去沉淀, 得到土霉素免疫抗原 OTC-o-Tolidine-BSA; 二、制备土霉素-载体蛋白偶联物, 然后包被在硝酸纤维素膜上构

成检测线,再将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜上构成质控线;三、制备抗土霉素单克隆抗体;四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,然后将抗土霉素单克隆抗体加入胶体金溶液中,制得抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物,然后包被在结合垫上;五、在 PVC 背板上依次连续粘附样品垫、步骤四所得结合垫、步骤二所得硝酸纤维素膜和吸水垫,然后切成 60mm×4mm 的试纸条,即得到用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条;步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 0.16~0.2mL 的 HCl 溶液,每毫克邻联甲苯胺加入 0.01~0.03mL 的 NaNO₂ 溶液;步骤一中土霉素与牛血清白蛋白的质量比为 1:1.5~2,硼砂缓冲液和溶液 A 与土霉素的体积比分别为 8~10:1 和 4~6:1;步骤二中土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG 的包被量均为 0.05 μg;步骤四中抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的包被量为 0.1 μg。

[0008] 本发明的原理:当待测样品溶液滴入试剂条的加样区后,样品溶液因纤维素膜载体的毛细管作用向另一端扩散。在移动过程中,会发生相应的抗原抗体反应,并通过免疫胶体金的颜色显示出来。如果样品溶液中含有土霉素残留,土霉素将与结合垫上的抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物先行反应,因此当胶体金颗粒随着样品溶液扩散至检测线时,胶体金颗粒上的抗体的活性位点因被样品溶液中的土霉素占据而无法与检测线上土霉素特异性抗原结合;所以当样品中的土霉素含量超过试纸条检出限时,试纸条上的检测线将较控制线显色淡甚至无显色,判定为阳性。反之,当样品中土霉素含量在试纸条检出限以下或者无残留时,试纸条上的检测线显色与控制线相近偏深,判定为阴性。

[0009] 本发明用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条特异性强,灵敏度高,检出限为 5 μg/kg,重复性好,使用时样品制备简单,检测操作简易,适于实地现场操作。

附图说明

[0010] 图 1 为具体实施方式一制备的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的示意图。

具体实施方式

[0011] 本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式,还包括各具体实施方式间的任意组合。

[0012] 具体实施方式一:结合图 1 说明本实施方式,本实施方式用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条,由 PVC 背板 1、样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸收垫 5 组成,在 PVC 背板 1 上依次连续粘附有样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸收垫 5,所述样品垫 2 与所述结合垫 3 之间有搭接,所述结合垫 3 与所述硝酸纤维素膜 4 之间有搭接,所述硝酸纤维素膜 4 与所述吸收垫 5 之间有搭接;所述结合垫 3 上包被有抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物,包被量为 0.1 μg;所述硝酸纤维素膜 4 上分别包被有土霉素-载体蛋白偶联物构成的检测线 T 和羊抗鼠 IgG 构成的质控线 C,包被量均为 0.05 μg。

[0013] 本实施方式中的 PVC 背板 1、样品垫 2、结合垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5 均购自上海金标生物科技有限公司。

[0014] 本实施方式用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的示意图如图 1 所示。

[0015] 本实施方式用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条特异性强,灵敏度高,

检出限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。

[0016] 具体实施方式二：本实施方式与具体实施方式一不同的是：硝酸纤维素膜 4 上包被的土霉素-载体蛋白偶联物中的载体蛋白为卵清蛋白 (OVA)。其它与具体实施方式一相同。

[0017] 具体实施方式三：本实施方式用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法，按以下步骤进行：一、土霉素人工抗原的合成：将邻联甲苯胺 (o-Tolidine) 溶解于 $0.2 \sim 0.3 \text{mol/L}$ 的 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 的 HCl 溶液中，然后逐滴加入 $35 \sim 36 \text{mg/mL}$ 的 NaNO_2 溶液，置于 4°C ，避光反应 $0.5 \sim 1 \text{h}$ ，得到溶液 A，称取土霉素 (OTC) 和牛血清白蛋白 (BSA)，溶解于 pH 值为 $7.2 \sim 7.4$ 的 0.1mol/L 的硼砂缓冲液中，并加入上述溶液 A，避光反应 $2 \sim 3 \text{h}$ ，在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 条件下用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 $2 \sim 3$ 天，每隔 $6 \sim 8 \text{h}$ 换一次磷酸盐缓冲液，透析完成后，于 $5000 \sim 6000 \text{r/min}$ 条件下离心 $5 \sim 10 \text{min}$ ，弃去沉淀，得到土霉素免疫抗原 OTC-o-Tolidine-BSA；二、制备土霉素-载体蛋白偶联物，然后包被在硝酸纤维素膜 4 上构成检测线，再将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜 4 上构成质控线；三、制备抗土霉素单克隆抗体；四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，然后将抗土霉素单克隆抗体加入胶体金溶液中，制得抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物，然后包被在结合垫 3 上；五、在 PVC 背板 1 上依次连续粘附样品垫 2、步骤四所得结合垫 3、步骤二所得硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5，然后切成 $60 \text{mm} \times 4 \text{mm}$ 的试纸条，即得到用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条；步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 $0.16 \sim 0.2 \text{mL}$ 的 HCl 溶液，每毫克邻联甲苯胺加入 $0.01 \sim 0.03 \text{mL}$ 的 NaNO_2 溶液；步骤一中土霉素与牛血清白蛋白的质量比为 $1 : 1.5 \sim 2$ ，硼砂缓冲液和溶液 A 与土霉素的体积比分别为 $8 \sim 10 : 1$ 和 $4 \sim 6 : 1$ ；步骤二中土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG 的包被量均为 $0.05 \mu\text{g}$ ；步骤四中抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的包被量为 $0.1 \mu\text{g}$ 。

[0018] 具体实施方式四：本实施方式与具体实施方式三不同的是：步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 0.18mL 的 HCl 溶液。其它与具体实施方式三相同。

[0019] 具体实施方式五：本实施方式与具体实施方式三或四不同的是：步骤一中每毫克邻联甲苯胺加入 0.02mL 的 NaNO_2 溶液。其它与具体实施方式三或四相同。

[0020] 具体实施方式六：本实施方式与具体实施方式三至五之一不同的是：步骤一中透析完成后，于 5500r/min 条件下离心 5min 。其它与具体实施方式三至五之一相同。

[0021] 具体实施方式七：本实施方式与具体实施方式三不同的是步骤二中制备土霉素-载体蛋白偶联物的具体步骤为：将 125mg 邻联甲苯胺溶解于 22.5mL 的 0.2mol/L 的 0°C 的 HCl 溶液中，然后逐滴加入 35mg/mL 的 NaNO_2 溶液 2.5mL ，于 4°C 避光反应 1h ，得到溶液 A，称取 0.08g 土霉素和 0.085g 卵清蛋白 (OVA)，溶解于 10mL 的 pH 值为 7.4 的 0.1mol/L 的硼砂缓冲液中，并加入 5mL 上述溶液 A，避光反应 2 小时，用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液于 4°C 透析 3 天，每隔 8h 换一次磷酸盐缓冲液，透析完后，于 5000r/min 离心 5min ，弃去沉淀，即得到土霉素-载体蛋白偶联物。其它与具体实施方式三相同。

[0022] 具体实施方式八：本实施方式与具体实施方式三不同的是步骤二中检测线和质控线的制备方法为：a、用点膜机将土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗小鼠 IgG 包被在纤维素膜上，分别作为检测线和质控线；b、然后于 37°C 恒温箱中固定 15min ，再经封闭液封闭 30min ，然后用 PBST 缓冲液冲洗 3 次后，于 37°C 烘干，即完成检测线和质控线的制备；其中步骤 a

中土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗小鼠 IgG 的包被量均为 $0.05 \mu\text{g}$; 步骤 b 中的封闭液由 0.01mol/L 的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液和质量浓度 1% 的牛血清白蛋白组成; 步骤 b 中的 PBST 缓冲液为含 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液。其它与具体实施方式三相同。

[0023] 具体实施方式九: 本实施方式与具体实施方式三不同的是步骤三中制备抗土霉素单克隆抗体的具体步骤为: a、将 $100 \mu\text{g}$ 土霉素免疫抗原 OTC-o-Tolidine-BSA 溶解于 $100 \mu\text{L}$ 生理盐水中, 然后与等体积的弗氏佐剂混合乳化, 乳化完全, 然后首次免疫采用皮下多点注射 BALB/c 小鼠, 注射剂量为 $1\text{mL}/\text{只}$; b、两周后, 改用弗氏不完全佐剂乳化土霉素免疫抗原, 采用腹腔注射小鼠, 注射剂量为 $0.3\text{mL}/\text{只}$; c、之后每隔一周使用弗氏不完全佐剂乳化土霉素免疫抗原, 采用腹腔注射免疫小鼠, 注射剂量为 $0.3\text{mL}/\text{只}$, 第 5 次免疫后, 尾静脉采血, 血液置于 4°C 静置 24h, 然后于 $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min, 取上清采用间接非竞争 ELISA 测定抗血清效价, 当抗血清效价达到 1 : 6400 以上, 取小鼠脾细胞, 与骨髓瘤细胞进行细胞融合; d、用间接酶联免疫吸附试验筛选阳性杂交瘤细胞; e、向小鼠腹腔注射 0.5mL 无菌液体石蜡, 取阳性杂交瘤细胞, 于 $2500\text{r}/\text{min}$ 离心 5min, 将沉淀用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 之后将沉淀用无血清培养基稀释至细胞浓度为 10^5 个 / mL , 注入小鼠腹腔, 待腹腔膨大, 采集腹水, 于 4°C 且转速 $2500\text{r}/\text{min}$ 条件下离心 10min 取上清, 采用辛酸-硫酸铵法进行纯化, 获得抗土霉素单克隆抗体。其它与具体实施方式三相同。

[0024] 具体实施方式十: 本实施方式与具体实施方式三不同的是步骤四中采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液的具体步骤为: a、取一个 250mL 三角瓶, 加 100mL 双蒸水及 1mL 质量浓度为 1% 的氯化金, 加热至沸腾; b、加入 2.5mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠水溶液, 混匀, 继续加热沸腾 30min; c、溶液颜色首先变黑, 再逐渐变紫红, 冷却后, 于 4°C 下保存, 即完成胶体金溶液制备。其它与具体实施方式三相同。

[0025] 具体实施方式十一: 本实施方式与具体实施方式三不同的是步骤四中制备抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的具体步骤为: a、将 pH 值为 7.2 的胶体金溶液置于磁力搅拌器上, 将抗土霉素单克隆抗体逐滴加入胶体金溶液中, 5min 加入 1mg 抗土霉素单克隆抗体, 搅拌 30min; 加入牛血清白蛋白至终浓度为 1%, 继续搅拌 30min; 然后置于 4°C 作用 2h 后, 于 4°C , $2000\text{r}/\text{min}$ 条件下离心 20min, 去沉淀; 上清继续在 4°C , $10000\text{r}/\text{min}$ 条件下离心 1h, 去上清, 得沉淀, 即完成抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备。其它与具体实施方式三相同。

[0026] 具体实施方式十二: 本实施方式用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的制备方法, 按以下步骤进行: 一、土霉素人工抗原的合成: 将 125mg 邻联甲苯胺 (o-Tolidine) 溶解于 22.5mL 的 0.2mol/L 的 0°C 的 HCl 溶液中, 然后逐滴加入 2.5mL 的 $35\text{mg}/\text{mL}$ 的 NaNO_2 溶液, 置于 4°C , 避光反应 1h, 得到溶液 A, 称取 0.08g 土霉素 (OTC) 和 0.145g 牛血清白蛋白 (BSA), 溶解于 10mL 的 pH 值为 7.4 的 0.1mol/L 的硼砂缓冲液中, 并加入 5mL 上述溶液 A, 避光反应 2h, 在 4°C 条件下用 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 3 天, 每隔 7h 换一次磷酸盐缓冲液, 透析完成后, 于 $5000\text{r}/\text{min}$ 条件下离心 5min, 弃去沉淀, 得到土霉素免疫抗原 OTC-o-Tolidine-BSA; 二、制备土霉素-载体蛋白偶联物, 然后包被在硝酸纤维素膜 4 上构成检测线, 再将羊抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维素膜 4 上构成质控线; 三、制备抗土霉素单克隆抗体; 四、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 然后将抗土霉素单克隆抗体加入胶体金溶液中, 制得抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物, 然后包被在结合垫 3 上;

五、在 PVC 背板 1 上依次连续粘附样品垫 2、步骤四所得结合垫 3、步骤二所得硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5, 然后切成 60mm×4mm 的试纸条, 即得到用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条; 其中步骤二中土霉素-载体蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG 的包被量均为 0.05 μg; 步骤四中抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物的包被量为 0.1 μg。

[0027] 本实施方式制备的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条的使用方法:

[0028] 1、样品制备: 称取 2g 待检样品(肉类或水产品), 用 4mL 甲醇旋涡振荡 2min, 过滤, 滤液用 PBST 缓冲液稀释 10 倍, 得待测液, 备用。

[0029] 2、检测步骤: 将制备的用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条插入上述 1 制备的待测液中, 竞争反应 5min 后取出, 目视辨别颜色深浅。

[0030] 3、结果判断: 读取结果时, 将试纸条水平放置于观察者正面。

[0031] 阴性结果: 检测线 T 的颜色比质控线 C 深或者与质控线 C 一样深, 表明样品中土霉素浓度低于 5 μg/kg 或者无土霉素残留。

[0032] 阳性结果: 检测线 T 显色比质控线 C 浅, 或者检测线 T 无显色, 表明样品中土霉素浓度高于 5 μg/kg; 检测线 T 或质控线 C 越浅, 表明样品中土霉素浓度越高。

[0033] 无效: 若质控线 C 不显色, 可能是操作不当或者试剂条已经失效。

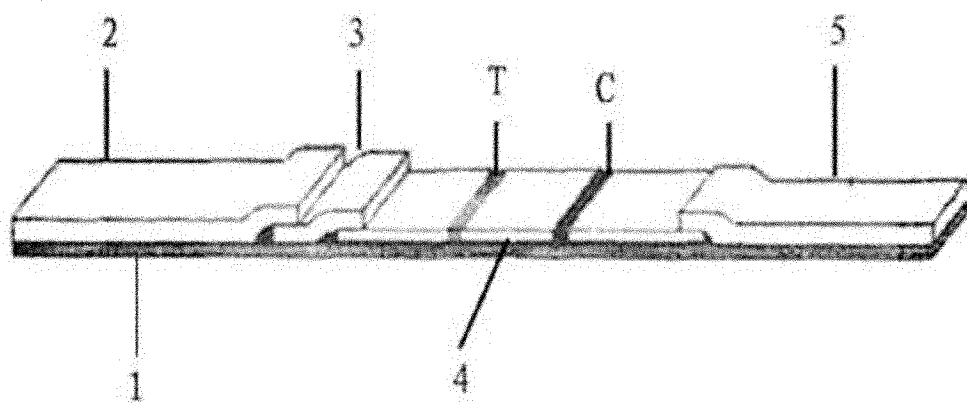


图 1

专利名称(译)	一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN102043057A	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN201010540962.8	申请日	2010-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学		
申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学		
[标]发明人	崔艳华 马莺 徐桂连 代翠红 丁忠庆		
发明人	崔艳华 马莺 徐桂连 代翠红 丁忠庆		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条及其制备方法，涉及一种检测食源性土霉素残留的试纸条及其制备方法。本发明为了解决现有检测土霉素的方法操作繁琐，样品处理复杂，不适合现场检测的问题。试纸条由PVC背板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成。制备方法：一、土霉素人工抗原的合成；二、制备土霉素-载体蛋白偶联物，制成检测线和质控线；三、制备抗土霉素单克隆抗体；四、制备胶体金溶液，制得抗土霉素单克隆抗体-胶体金标记物，然后包被在结合垫上；五、在PVC背板上依次粘附样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，即得到用于检测肉类及水产品中土霉素残留的试纸条。应用于食源性土霉素残留检测领域。

