



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108845131 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201810635223.3

(22) 申请日 2018.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108845131 A

(43) 申请公布日 2018.11.20

(73) 专利权人 广州质量监督检测研究院

地址 510000 广东省广州市番禺区石楼潮
田工业区珠江路1-2号

(72) 发明人 刘香梅 刘颖 庞增雄 黄金凤

郭燕华 郭新东 陈立伟 洗燕萍

侯向昶 吴玉銮

(74) 专利代理机构 广州海心联合专利代理事务
所(普通合伙) 44295

代理人 王洪娟

(51) Int.Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

审查员 胡晓佳

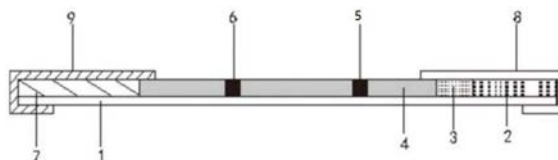
权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,属于添加剂检测技术领域。该检测卡上设有顺次搭接粘贴在底板上的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述胶体金结合垫上吸附有胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有检测线与质控线,所述检测线包被有双酚B-载体蛋白偶联物,所述质控线包被有抗鼠二抗。该检测卡可快速特异地定性检测塑料奶瓶等塑料制品中含有的双酚B,具有特异性强的优点,并且该检测卡由于样本量需要少、检测速度快,检测时间为5-10min,适用范围广,易于推广使用,可分批或单个样品及时检测。



1. 一种检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,其特征在于,所述检测卡上设有顺次搭接粘贴在底板上的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;

所述胶体金结合垫上吸附有胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体;

所述硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有检测线与质控线,所述检测线包被有双酚B-载体蛋白偶联物,所述质控线包被有抗鼠二抗:

所述双酚B-载体蛋白偶联物通过以下方法制备得到:将0.24g双酚B、0.15g 3-溴丙胺、0.70g无水碳酸钾分散至20mL干燥丙酮中,加热回流反应8h,制得双酚B半抗原,将纯化后的双酚B半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加于烧杯中,加入3mL二甲基亚砷溶解,磁力搅拌过夜,然后称取0.12g载体蛋白,溶解在5mL pH7.0的0.1mol/L NaHCO₃中,得载体蛋白溶液,将含有双酚B半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中,边搅拌边缓慢滴加,反应过夜,所得溶液4℃透析3天,即得;

所述抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到:

(A) 动物免疫:取上述双酚B-载体蛋白偶联物,与弗氏完全佐剂乳化完全后,免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫后断尾取血测定效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

(B) 细胞融合:取经选定小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,以HAT培养基筛选融合的细胞,用间接ELISA法测定上清液进行阳性筛选,筛选出稳定分泌抗双酚B的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(C) 抗体制备:取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后,注射入Balb/C小鼠腹腔,抽取腹水,通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,并以亲和层析法得到纯化的抗双酚B-单克隆抗体;

所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到:

(A) 胶体金溶液制备:在水中加入柠檬酸三钠,煮沸后加入氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色后停止加热,补水至原体积,冷却,保存备用;

(B) 胶体金标记物的制备:取已制备好的胶体金溶液40mL,用0.1mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至8.2;取等量抗双酚B单克隆抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育15min,10000r/min离心30min,弃上清;将所得沉淀用含2%BSA、0.1%叠氮钠的pH7.4的PBS缓冲液溶解稀释,即获得胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体;

所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体的浓度为40-80μg/ml,在检测卡上的用量为4-6μL/cm;

所述检测线包被的双酚B-载体蛋白偶联物的浓度为0.1-0.3μg/ml,在检测卡上的用量为0.5-1.5μL/cm;

所述质控线包被的抗鼠二抗的浓度为0.1-0.3mg/ml,在检测卡上的用量为0.5-1.5μL/cm。

2. 根据权利要求1所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,其特征在于,所述检测卡样品垫端和吸水垫端还分别设有样品端保护膜和手柄端保护膜,所述样品端保护膜覆盖样品垫、胶体金结合垫、以及硝酸纤维素膜与所述胶体金结合垫搭接端,所述手柄端保护膜覆盖吸水垫、以及硝酸纤维素膜与所述吸水垫搭接端。

3. 根据权利要求2所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,其特征在于,所述底板为PVC条;

所述样品垫和胶体金结合垫由玻璃纤维棉制成;

所述吸水垫由吸水滤纸制成；

所述保护膜为不透明的胶膜。

4. 根据权利要求1所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡，其特征在于，所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白；所述抗鼠二抗为羊抗鼠IgG抗体、兔抗鼠IgG抗体或驴抗鼠IgG抗体。

5. 根据权利要求4所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡，其特征在于，所述抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到：

(A) 动物免疫：取上述双酚B-载体蛋白偶联物，与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后，免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠，间隔2周免疫1次，三次免疫后断尾取血测定效价，选择结果最佳的小鼠准备融合；

(B) 细胞融合：取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合，以HAT培养基筛选融合的细胞，用间接ELISA法测定上清液进行阳性筛选，筛选出稳定分泌抗双酚B的单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

(C) 抗体制备：取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后，注射入Balb/C小鼠腹腔，10d后抽取腹水，通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水，并以亲和层析法得到纯化的抗双酚B-单克隆抗体；

所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到：

(A) 胶体金溶液制备：在100mL超纯水中加入1mL 1%柠檬酸三钠，煮沸后迅速加入1mL 1%氯金酸，继续搅拌加热，当溶液的颜色变为透明的紫红色时，维持5min后停止加热，补水至原体积，冷却至室温，4℃下保存备用；

(B) 胶体金标记物的制备：取已制备好的胶体金溶液40mL，用0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至8.2；取等量抗双酚B单克隆抗体溶液，磁力搅拌下与胶体金溶液混合，室温孵育15min，10000r/min离心30min，弃上清；将所得沉淀用含2%BSA、0.1%叠氮钠的pH7.4的PBS缓冲液溶解稀释，即获得胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体，4℃保存备用。

6. 权利要求1-5任一项所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 胶体金结合垫的制备：将所述抗双酚B单克隆抗体-胶体金标记物喷在载体玻璃纤维棉上，烘干，备用；

(2) 硝酸纤维素膜制备：将所述抗鼠二抗、双酚B-载体蛋白偶联物依次喷涂在硝酸纤维素膜上，烘干，备用；

(3) 检测卡的组装：在所述底板上依次粘贴样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，并在检测卡样品垫端和吸水垫端分别粘贴样品端保护膜和手柄端保护膜，组装成检测卡，切割为预定宽度，即得；

所述双酚B-载体蛋白偶联物通过以下方法制备得到：将0.24g双酚B、0.15g 3-溴丙胺、0.70g无水碳酸钾分散至20mL干燥丙酮中，加热回流反应8h，制得双酚B半抗原，将纯化后的双酚B半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加于烧杯中，加入3mL二甲基亚砷溶解，磁力搅拌过夜，然后称取0.12g载体蛋白，溶解在5mL pH7.0的0.1mol/L $NaHCO_3$ 中，得载体蛋白溶液，将含有双酚B半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中，边搅拌边缓慢滴加，反应过夜，所得溶液4℃透析3天，即得；

所述抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到：

(A) 动物免疫：取上述双酚B-载体蛋白偶联物，与弗氏完全佐剂乳化完全后，免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠，免疫后断尾取血测定效价，选择结果最佳的小鼠准备融合；

(B) 细胞融合：取经选定小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合，以HAT培养基筛选融合的细胞，用间接ELISA法测定上清液进行阳性筛选，筛选出稳定分泌抗双酚B的单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

(C) 抗体制备：取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后，注射入Balb/C小鼠腹腔，抽取腹水，通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水，并以亲和层析法得到纯化的抗双酚B-单克隆抗体；

所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到：

(A) 胶体金溶液制备：在水中加入柠檬酸三钠，煮沸后加入氯金酸，继续搅拌加热，当溶液的颜色变为透明的紫红色后停止加热，补水至原体积，冷却，保存备用；

(B) 胶体金标记物的制备：取已制备好的胶体金溶液40mL，用0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至8.2；取等量抗双酚B单克隆抗体溶液，磁力搅拌下与胶体金溶液混合，室温孵育15min，10000r/min离心30min，弃上清；将所得沉淀用含2%BSA、0.1%叠氮钠的pH7.4的PBS缓冲液溶解稀释，即获得胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体。

7. 根据权利要求1所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，

所述胶体金结合垫的制备步骤中，将所述已制备好的抗双酚B单克隆抗体-胶体金标记物以5 μ L/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维棉上，37℃烘干3h，密封，4℃保存备用；

所述硝酸纤维素膜制备步骤中，将预定浓度的抗鼠二抗、双酚B-载体蛋白偶联物依次以1 μ L/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上，37℃烘干8h，密封，4℃保存备用。

8. 权利要求1-5任一项所述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡的使用方法，其特征在于，包括以下前处理步骤：称取待检试样，加水后水浴加热回流，取回流得到的蒸馏液，即得待测溶液。

检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及添加剂检测技术领域,特别是涉及一种检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 双酚A,学名2,2-二(4-羟基苯基)丙烷,简称BPA,在许多塑料制品中都可能含有双酚A。但双酚A是雌激素类似物,能引起男孩女性化、女孩性早熟,对婴儿的生长发育也有影响。美国已禁止婴儿奶瓶等食品和饮料容器中使用化学物质双酚A。双酚B,2,2-二(4-羟基苯基)丁烷,简称BPB,在化学结构上与双酚A极其类似。动物实验显示,双酚B在生物学特性上也有与双酚A类似的雌激素效果。

[0003] 《GB 14942-1994食品容器、包装材料用聚碳酸酯成型品卫生标准》中规定:奶瓶中酚类物质通过蒸馏水回流6小时的溶出游离量不大于0.05毫克/公斤。

[0004] 目前,现有技术对于双酚B的检测有滴定法、比色法、示波极谱法、液相色谱荧光法和高效液相色谱-串联质谱法,这些方法普遍存在操作繁琐,对实验仪器设备要求高,需要专门技术人员操作等缺点。

[0005] 因此亟需开发一种能够方便、快捷检测双酚B的适合现场快速检测双酚B的方法。

发明内容

[0006] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,该检测卡具有便捷、快速、直观、成本低的特点,适合现场快速检测。

[0007] 一种检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,所述检测卡上设有顺次搭接粘贴在底板上的样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;

[0008] 所述胶体金结合垫上吸附有胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体;

[0009] 所述硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有检测线与质控线,所述检测线包被有双酚B-载体蛋白偶联物,所述质控线包被有抗鼠二抗。

[0010] 上述检测卡,采用层析式抗体免疫竞争的方法检测双酚B,具有便捷、快速、直观、成本低的特点,适合现场快速检测。

[0011] 在其中一个实施例中,所述检测卡样品垫端和吸水垫端还分别设有样品端保护膜和手柄端保护膜,所述样品端保护膜覆盖样品垫、胶体金结合垫、以及硝酸纤维素膜与所述胶体金结合垫搭接端,所述手柄端保护膜覆盖吸水垫、以及硝酸纤维素膜与所述吸水垫搭接端。通过上述保护膜的实用,能够避免检测过程中受到的干扰和污染,确保检测结果的稳定可靠。

[0012] 在其中一个实施例中,所述底板为PVC条;所述样品垫和胶体金结合垫由玻璃纤维棉制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成;所述保护膜为不透明的胶膜。

[0013] 在其中一个实施例中,所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;所述抗鼠二抗为羊抗鼠IgG抗体、兔抗鼠IgG抗体或驴抗鼠IgG抗体。

[0014] 在其中一个实施例中,所述双酚B-载体蛋白偶联物通过以下方法制备得到:将双酚B、3-溴丙胺、无水碳酸钾分散至丙酮中,加热回流反应,制得双酚B半抗原,将纯化后的双酚B半抗原、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)加入二甲基亚砜(DMSO)中溶解,搅拌反应,然后称取载体蛋白,溶解在溶液中 NaHCO_3 得到载体蛋白溶液,将含有双酚B半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应,所得溶液透析,即得;

[0015] 所述抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到:

[0016] (A) 动物免疫:取上述双酚B-载体蛋白偶联物,与弗氏完全佐剂乳化完全后,免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫后断尾取血测定效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0017] (B) 细胞融合:取经选定小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,以HAT培养基筛选融合的细胞,用间接ELISA法测定上清液进行阳性筛选,筛选出稳定分泌抗双酚B的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0018] (C) 抗体制备:取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后,注射入Balb/C小鼠腹腔,抽取腹水,通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,并以亲和层析法得到纯化的抗双酚B-单克隆抗体。

[0019] 所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到:

[0020] (A) 胶体金溶液制备:在水中加入柠檬酸三钠,煮沸后加入氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色后停止加热,补水至原体积,冷却,保存备用;

[0021] (B) 胶体金标记物的制备:取已制备好的胶体金溶液,用 K_2CO_3 调节胶体金溶液pH;取抗双酚B单克隆抗体溶液,与胶体金溶液混合,室温孵育,离心后弃上清;将所得沉淀用PBS缓冲液溶解稀释,即获得胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体。

[0022] 在其中一个实施例中,所述双酚B-载体蛋白偶联物通过以下方法制备得到:将0.24g双酚B、0.15g 3-溴丙胺、0.70g无水碳酸钾分散至20mL干燥丙酮中,加热回流反应8h,制得双酚B半抗原,将纯化后的双酚B半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加于烧杯中,加入3mL二甲基亚砜溶解,磁力搅拌过夜,然后称取0.12g载体蛋白,溶解在5mL pH7.0的0.1mol/L NaHCO_3 中,得载体蛋白溶液,将含有双酚B半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中,边搅拌边缓慢滴加,反应过夜,所得溶液4℃透析3天,即得;

[0023] 所述抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到:

[0024] (A) 动物免疫:取上述双酚B-载体蛋白偶联物,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,间隔2周免疫1次,三次免疫后断尾取血测定效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0025] (B) 细胞融合:取经选定小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,以HAT培养基筛选融合的细胞,用间接ELISA法测定上清液进行阳性筛选,筛选出稳定分泌抗双酚B的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0026] (C) 抗体制备:取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后,注射入Balb/C小鼠腹腔,10d后抽取腹水,通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,并以亲和层析法得到纯化的抗双酚B-单克隆抗体;

[0027] 所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体通过以下方法制备得到:

[0028] (A) 胶体金溶液制备:在100mL超纯水中加入1mL 1%柠檬酸三钠,煮沸后迅速加入

1mL1%氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色时,维持5min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,4℃下保存备用;

[0029] (B) 胶体金标记物的制备:取已制备好的胶体金溶液40mL,用0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液pH至8.2;取等量抗双酚B单克隆抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育15min,10000r/min离心30min,弃上清;将所得沉淀用含2%BSB、0.1%叠氮钠的pH7.4的PBS缓冲液溶解稀释,即获得胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体,4℃保存备用。

[0030] 在其中一个实施例中,所述胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体的浓度为40-80 μ g/ml,优选60 μ g/mL,在检测卡上的用量为4-6 μ L/cm,优选5 μ L/cm;

[0031] 所述检测线包被的双酚B-载体蛋白偶联物的浓度为0.1-0.3 μ g/ml,优选0.2mg/mL,在检测卡上的用量为0.5-1.5 μ L/cm,优选1.0 μ L/cm;

[0032] 所述质控线包被的抗鼠二抗的浓度为0.1-0.3,优选0.2mg/mL,在检测卡上的用量为0.5-1.5 μ L/cm,优选1.0 μ L/cm。

[0033] 本发明还公开了上述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0034] (1) 胶体金结合垫的制备:将所述抗双酚B单克隆抗体-胶体金标记物喷在载体玻璃纤维棉上,烘干,备用;

[0035] (6) 硝酸纤维素膜制备:将所述抗鼠二抗、双酚B-载体蛋白偶联物依次喷涂在硝酸纤维素膜上,烘干,备用;

[0036] (7) 检测卡的组装:在所述底板上依次粘贴样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,并在检测卡样品垫端和吸水垫端分别粘贴样品端保护膜和手柄端保护膜,组装成检测卡,切割为预定宽度,即得。

[0037] 在其中一个实施例中,所述胶体金结合垫的制备步骤中,将所述已制备好的抗双酚B单克隆抗体-胶体金标记物以5 μ L/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维棉上,37℃烘干3h,密封,4℃保存备用;

[0038] 所述硝酸纤维素膜制备步骤中,将适当浓度的抗鼠二抗、双酚B-载体蛋白偶联物依次以1 μ L/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,37℃烘干8h,密封,4℃保存备用。

[0039] 本发明还公开了上述的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡的使用方法,包括以下前处理步骤:称取待检试样,加水后水浴加热回流,取回流得到的蒸馏液,即得待测溶液。

[0040] 本发明的检测卡的检测原理为:

[0041] 本发明检测卡应用层析式抗体免疫竞争原理,通过抗原(双酚B)与金标抗体的显色反应,特异性检测样本中双酚B残留。如果样品溶液中含有双酚B残留,双酚B先与胶体金颗粒上的抗双酚B单克隆抗体反应,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双酚B占据而无法与检测线上双酚B特异性抗原(双酚B-载体蛋白偶联物)结合;当样品中双酚B的含量超出试剂板检出限时,检测卡上的检测线显色比质控线浅甚至显无色,判定为阳性。相反,当样品中双酚B含量在检测卡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。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0043] 本发明的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,采取免疫学竞争法的原理,结合胶体金标记技术和免疫层析法设计,可快速特异地半定量检测塑料奶瓶等塑料制品中含有的

双酚B。具有特异性强的优点,可避免其它检测方法的假阳性导致的误检问题。并且该检测卡由于样本量需要少、检测速度快,检测时间为5-10min,适用范围广,易于推广使用,可分批或单个样品及时检测。

附图说明

[0044] 图1为实施例1中检测卡俯视结构示意图;

[0045] 图2为本实施例1中检测卡剖面结构示意图;

[0046] 图中:1.底板;2.样品垫;3.胶体金结合垫;4.硝酸纤维素膜;5.检测线;6.质控线;7.吸水垫;8.样品端保护膜;9.手柄端保护膜。

[0047] 图3本发明所述双酚B胶体金免疫层析检测卡结果读取示意图;

[0048] 图中:T为检测线,C为质控线;图3-a中T线颜色比C线深或者一样深,为阴性;图3-b中T线颜色比C线浅或T线消失,为阳性;图3-c中C线消失,为无效。

具体实施方式

[0049] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0050] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0051] 以下实施例所用原料均为市售购得。

[0052] 实施例1

[0053] 一种检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡,如图1-2所示,该检测卡上设有顺次搭接粘贴在底板1上的样品垫2、胶体金结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫7,所述样品垫2、胶体金结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫7各部分首尾均有1~2mm的重叠;所述胶体金结合垫3上吸附有胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜4上由样品垫端至吸水垫端依次设有相互平行的检测线5与质控线6,所述检测线5包被有双酚B-载体蛋白偶联物,所述质控线6包被有抗鼠二抗。

[0054] 在本实施例中,为了避免检测过程受到干扰,优选地,所述检测卡样品垫端和吸水垫端还分别设有样品端保护膜8和手柄端保护膜9,所述样品端保护膜8覆盖样品垫2、胶体金结合垫3和硝酸纤维素4膜与所述胶体金结合垫3搭接端,所述手柄端保护膜9覆盖吸水垫7和硝酸纤维素膜4与所述吸水垫7搭接端,如图2所示。

[0055] 在本实施例中,所述底板为PVC条;所述样品垫2和胶体金结合垫3由玻璃纤维棉制成;所述吸水垫7由吸水滤纸制成;所述样品端保护膜8和手柄端保护膜9为不透明的胶膜。

[0056] 使用上述检测卡进行检测时,先将待检测样品的待测溶液滴注入双酚B的胶体金免疫层析检测卡的样品垫2上,由于虹吸作用原理,使待测溶液及胶体金结合垫3所含的抗双酚B单克隆抗体-胶体金标记物一起向硝酸纤维素膜4扩散,5-10分钟内观察结果。

[0057] 该检测卡的主要反应是免疫学的抗原和抗体反应,在硝酸纤维素膜上迁移的胶体金标记的抗体,在检测线上分别与含双酚B蛋白质偶联物,以及质控线抗鼠二抗反应,形成棕红色条带。若样品中有待检双酚B存在,当样品加入后即与抗体发生反应,而不会与检测线所含的双酚B反应,从而不显色。如图3所示,主要反应的结果有以下3种情况:

[0058] 1、当显示检测线T和质控线C同时显现棕红色印迹带,且检测线T的颜色比质控线C深或一样深,则表示检测结果为阴性,说明被检测样品中双酚B含量未超标或被检测样品中无双酚B,如图3-a所示;

[0059] 2、当检测线T不显示颜色,只有质控线C显现棕红色印迹,检测结果为阳性,或其颜色比质控线C浅,说明被检测样品中双酚B含量超标,如图3-b所示;

[0060] 3、当质控线C均不显色,则表明检测试条已失效,如图3-c所示。

[0061] 实施例2

[0062] 实施例1的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡制备方法,包括以下步骤:

[0063] (1) 双酚B-载体蛋白偶联物的合成:首先将0.24g双酚B、0.15g 3-溴丙胺和0.70g无水碳酸钾分散至20mL干燥丙酮中,加热回流反应8h,经硅胶色谱柱纯化后制得双酚B半抗原。将纯化后的双酚B半抗原、NHS (N-羟基丁二酰亚胺) 和EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 加于烧杯中,加入3mLDMSO (二甲基亚砷) 溶解,磁力搅拌过夜。然后称取0.12g载体蛋白 (牛血清蛋白,市售购得) 溶解在5mL 0.1mol/LNaHCO₃ (pH 7.0) 溶液中,得到载体蛋白溶液,将含有双酚B半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中,边搅拌边缓慢滴加,反应过夜,所得溶液4℃透析3天,得到纯化后的双酚B-载体蛋白偶联物,分装后-20℃保存。

[0064] (2) 抗双酚B单克隆抗体的制备:

[0065] (a) 动物免疫:取上述制得的双酚B-载体蛋白偶联物,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,间隔2周免疫1次,三次免疫后断尾取血测定效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0066] (b) 细胞融合:取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,以HAT培养基筛选融合的细胞,用间接ELISA法测定上清液进行阳性筛选,筛选出稳定分泌抗双酚B的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0067] (c) 抗体制备:取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后,注射入Balb/C小鼠腹腔,10d后抽取腹水。通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,并以亲和层析法得到纯化的抗双酚B-单克隆抗体。

[0068] (3) 胶体金溶液制备:在100mL超纯水中加入1mL 1%柠檬酸三钠,煮沸后迅速加入1mL1%氯金酸,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5min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,4℃下保存备用。

[0069] (4) 胶体金标记物的制备:取已制备好的胶体金溶液40mL,用0.1mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至8.2;取等量抗双酚B单克隆抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育15min,10000r/min离心30min,弃上清;将所得沉淀用含2%BSA、0.1%叠氮钠的PBS缓冲液 (pH7.4) 溶解稀释,即获得胶体金标记的抗双酚B单克隆抗体,4℃保存备用。

[0070] (5) 胶体金结合垫的制备:将上述已制备好的60mg/ml的抗双酚B单克隆抗体-胶体金标记物以5μL/cm的浓度均匀喷在载体玻璃纤维棉上,37℃烘干3h,密封,4℃保存备用。

[0071] (6) 硝酸纤维素膜制备:将1:100稀释的抗鼠二抗 (羊抗鼠IgG,市售购得,浓度为

0.2mg/ml) 双酚B-载体蛋白偶联物(浓度为0.2μg/ml)依次以1μL/cm的浓度喷涂在硝酸纤维素膜上,37℃烘干8h,密封,4℃保存备用。

[0072] (7) 检测卡的组装:在PVC底板上依次粘贴样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,并在检测卡样品垫端和吸水垫端分别粘贴样品端保护膜和手柄端保护膜,组装成检测卡,切割为预定宽度,密封储存。

[0073] 实施例3

[0074] 双酚B最低检出限量试验。

[0075] 一、实验方法

[0076] 准确称量0.500g双酚B标准品溶于超纯水并定容至100mL,标为B1溶液,取B1溶液1mL于容量瓶加超纯水并定容至1000mL,形成B2溶液,取B2溶液1mL于容量瓶加超纯水并定容至1000mL,形成B3溶液,则B3溶液的浓度为5ng/mL (5ppb)。

[0077] 取B3溶液1mL于5支试管中,并分别标号1~5,往试管中分别加入19mL、9mL、4mL、1mL、0mL超纯水,配成双酚B标准品溶液浓度分别是:0.25ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL;另取一支空试管,加入5mL超纯水,标为6号试管。

[0078] 取上述1~6号试管中液体作为样品滴加到实施例1的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡上,加样后5min观察结果。

[0079] 二、结果。

[0080] 检测线T和质控线C的显色结果见表1。

[0081] 表1双酚B最低检出限量试验

	试管编号	双酚 B 溶液浓度 (ng/mL)	显色结果	测定结果
[0082]	1	0.25	检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性
	2	0.5	检测线 T 显色比质控线 C 略淡	阳性
	3	1.0	检测线 T 显色稍淡	阳性
[0083]	4	2.5	检测线 T 显色较淡	阳性
	5	5.0	检测线 T 不显色	阳性
	6	0	检测线 T 与质控线 C 显色相同	阴性

[0084] 从上述结果可以看出,上述实施例1的半定量检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡的检出限为0.5ng/mL。

[0085] 实施例4

[0086] 采用实施例1的检测双酚B的胶体金免疫层析检测卡检测样品,操作方法如下:分别称取约1g待检试样(食品包装制品和婴儿奶瓶),精确至0.01g,加蒸馏水100mL,水浴加热微沸回流6小时,取蒸馏液作为待测溶液用于测定,滴加到检测卡上,加样后5min观察结果。

[0087] 并同时上述待测试样以液相色谱串联质谱法进行平行检测,检测方法参见文献(超高效液相色谱—串联质谱法快速测定纸质食品包装材料及容器中的7种双酚类化合物[J].中国卫生检验杂志,2017,27(13):1858—1862),作为参比。

[0088] 结果如下表所示:

[0089] 表2样品检测结果

	编号	显色结果	测定结果	对比检测结果 ng/mL
[0090]	1	检测线 T 不显色	阳性	3.26
		检测线 T 不显色	阳性	3.54
	2	检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
	3	检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
	婴儿奶瓶	检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1
[0091]		检测线 T 显色与质控线 C 相近	阴性	<0.1

[0092] 从上述结果可以看出,采用实施例1的检测卡,能够检出食品包装制品中的双酚B,且与液相色谱串联质谱法检测方法相比,具有很好的一致性。

[0093] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0094] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

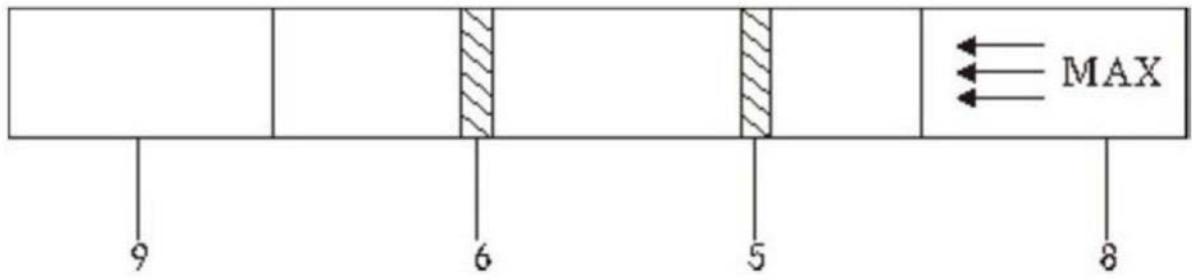


图1

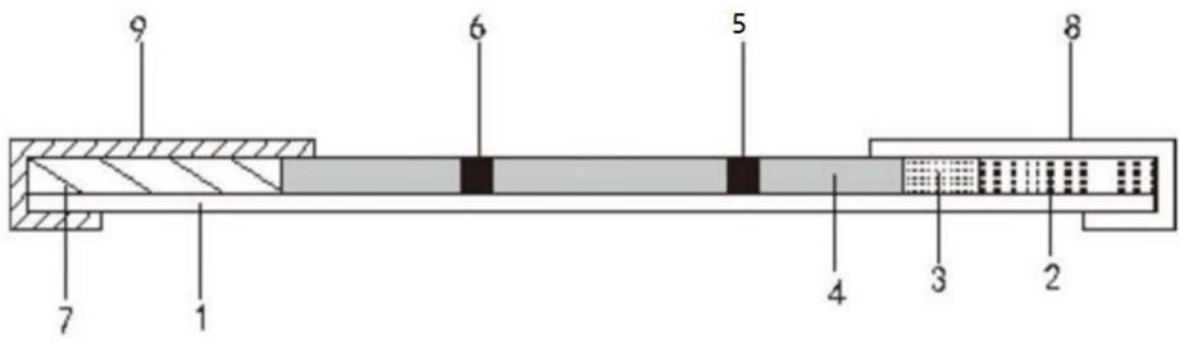


图2

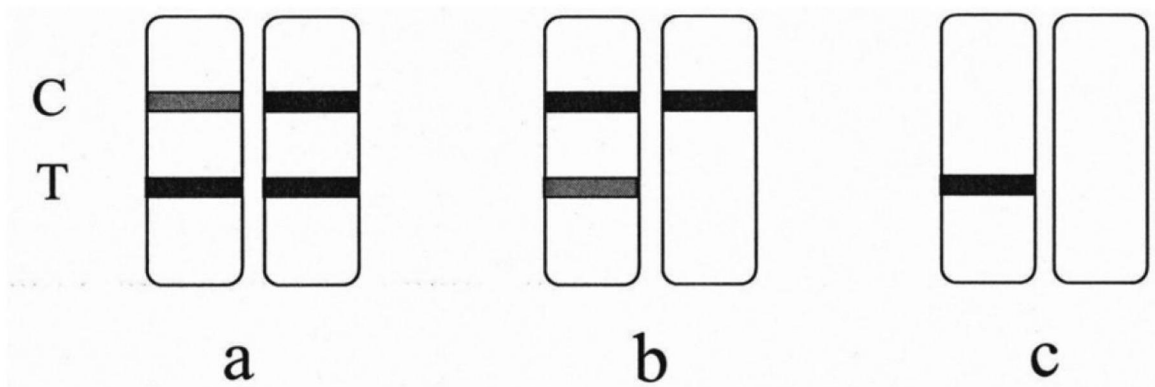


图3