



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105319355 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410356194. 9

(22) 申请日 2014. 07. 25

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯国家科技园 B11 栋 3 楼

(72) 发明人 杜道林 洪霞 江振飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

敌百虫胶体金试纸条的制备及使用方法

(57) 摘要

本发明属生物检测领域,涉及一种敌百虫胶体金试纸条的制备及使用方法,其特征在于:包括纸板,纸板的一面从上到下依次粘贴吸水垫、检测垫、金标垫和样品垫,相邻各垫在连接处交叠连接,所述检测垫以硝酸纤维素膜为基垫,硝酸纤维素膜上自上而下设置横向参考线和检测线,所述检测线包被有敌百虫-牛血清白蛋白偶联物,参考线包被有兔抗多克隆抗体;所述金标垫横向喷涂有纳米金标记的抗敌百虫单克隆抗体。该试纸条用于检测敌百虫,具有检测快速、操作简单、灵敏度高的特点。

1. 敌百虫胶体金试纸条,其特征在于:在试纸的背衬上依次贴有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,金标垫上标记的物质为第二种属动物蛋白和敌百虫抗体的混合物;硝酸纤维素膜包被有检测用敌百虫抗原 1 条作为检测线,同时还包被有抗第二种属动物蛋白的 IgG 1 条作为参照线。

2. 根据权利要求 1 所述的敌百虫胶体金试纸条,其特征在于:敌百虫检测用抗原为敌百虫与载体物质形成的偶合物。

3. 根据权利要求 2 所述的敌百虫胶体金试纸条,其特征在于:所述的载体物质,为蛋白质、蛋白质片段、合成多肽、半合成多肽或多糖。

4. 根据权利要求 1 所述的敌百虫胶体金试纸条,其特征在于:所述的第二种属动物蛋白为非抗体来源动物的蛋白质。

敌百虫胶体金试纸条的制备及使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域,具体涉及食品中残留物质的检测方法,特别是一种敌百虫胶体金试纸条的制备及使用方法。

背景技术

[0002] 敌百虫是用作杀虫剂。适用于水稻、麦类、蔬菜、茶树、果树、桑树、棉花等作物上的咀嚼式口器害虫,及家畜寄生虫、卫生害虫的防治,高效、低毒、低残留、广谱性杀虫剂,以胃毒作用为主,兼有触杀作用,也有渗透活性。农业上应用范围很广,用于防治菜青虫、棉叶跳虫、桑野蚕、桑黄、象鼻虫、果树叶蜂、果蝇等多种害虫。精制敌百虫可用于防治猪、牛、马、骡牲畜体内外寄生虫,对家庭和环境卫生害虫均有效。

[0003] 我国农业部于 2003 年也颁布了关于敌百虫的最大残留限量,敌百虫在水果中最大残留限量分别为 0.1 mg/kg。因此加强对敌百虫残留检测技术的研究,是有效控制水果中药物残留的关键措施,也是建立和完善药物残留监控体系的任务之一。目前对敌百虫的检测方法有气象色谱法,气-质联机和高效液相色谱法,由于以上诸分析法样品前处理比较复杂,操作时需专门的技术人员、检测费用昂贵,不利于推广应用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,提供一种特异性强,灵敏度高,且操作简单方便,对样品经过简单处理即可检测的敌百虫快速试纸半定量检测方法。

[0005] 本发明的目的可通过以下技术方案来实现:

敌百虫胶体金试纸条检测方法其技术要点是:试纸的背衬上依次贴有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,金标垫上标记的物质为第二种属动物蛋白与敌百虫检测用抗原的混合物或第二种属动物蛋白与敌百虫抗体的混合物;硝酸纤维素膜上包被有敌百虫抗体 1 条作为检测线,同时还包被有抗第二种属动物蛋白的 IgG 1 条作为参考线或包被有敌百虫检测用抗原 1 条作为检测线,同时还包被有抗第二种属动物蛋白的工 IgG 1 条作为参考线。在试纸制备时通过调节检测线和参考线包被物的浓度,控制检测时检测线和参考线的显色深浅,并将其显色深浅与标准物质浓度对应起来,达到半定量检测。

[0006] 所述的检测用抗原是指敌百虫与载体物质明胶形成的偶合物,免疫用抗原是指敌百虫与载体物质匙孔血蓝蛋白(KLH)形成的偶合物。

[0007] 所述的载体物质也可以选用其他大分子物质,如:脂蛋白、多聚氨基酸、葡聚糖、卵清

白蛋白等,但要求检测用抗原与免疫用抗原的载体无交叉免疫反应。

[0008] 所述的第二种属动物蛋白指非抗体来源属动物的蛋白,例如,抗体为兔源性,则第二种属动物蛋白可以是卵清白蛋白、猪血清白蛋白等鸡、鸭或其他非兔源性动物蛋白。

[0009] 本发明所描述的试纸的各部分处理与功能如下:

背衬:为一面涂有不干胶的不吸水的韧性材料,如 PVC 板,起固定支持试纸其他组成部

分的作用。

[0010] 样品垫制备:将滤纸或玻璃纤维纸浸入 pH 7.0-8.4 的 PBS 中约莫 2 min,取出,80℃烘干或其他方式干燥,即作为样品垫,检测时起吸收样品溶液的作用,便于样品溶液向上移动。

[0011] 胶体金标记部分的制备:该部分起固定胶体金标记的抗原或抗体的作用。

[0012] 制备步骤包括胶体金溶液的制备、胶体金标记敌百虫抗原或敌百虫抗体。

[0013] 胶体金标记部分处理。

[0014] (1)胶体金溶液的制备:将氯金酸(HAuCl_4)用超纯水配制成 1% 的母液,取 1 mL 的母液,用超纯水定容至 100 mL,配成 0.01% 的溶液,加热至沸腾,加入 1-5 mL 1% 的柠檬酸三钠水溶液,继续加热至出现透明的橙红色为止,即为胶体金溶液。

[0015] (2)胶体金标记敌百虫抗原:将敌百虫检测用抗原和第二种属动物蛋白分别用 PBS (0.01mol/L, pH 7.0-7.5) 溶解稀释至 2-4 mg/mL,每 100 mL 胶体金溶液加入 1-3 mL 2-4 mg/mL 的检测用抗原和 1-1.5 mL 2-4 mg/mL 第二种属动物蛋白震荡 2 min,用 0.2mol/L 的 K_2CO_3 : ,调节 pH 至 8.4,震荡 5 min 加入 11% PEG-10000 2 mL,震荡 5 min,8000-15000r/min 离心 15 min,除去上清,将沉淀用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.0-7.5)复溶,以 6000-13000r/min 离心 15 min,除去上清,将沉淀用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.0-7.5) 稀释 500-2000 倍产物作为金标记敌百虫抗原。

[0016] (3)胶体金标记敌百虫抗体:将敌百虫单克隆抗体或多克隆抗体和第二种属蛋白分别用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.0-7.5) 溶解稀释至 2-4 mg/mL,每 100 mL 胶体金溶液加入 1-3 mL 2-4 mg/mL 的敌百虫抗体和 1-1.5 mL 2-4 mg/mL 第二种属动物蛋白,震荡 2 min,用 0.2 mol/L 的 K_2CO_3 ,调节 pH 至 8.4,震荡 5 min,加 11% PEG-10000 2 mL,震荡 5 min,8000-15000r/min 离心 15 min,除上清,将沉淀用 PBS (0.01 mol /L, pH 7.0-7.5)复溶,6000-13000 r/min 离心 15 min,除去上清,将沉淀用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.0-7.5) 稀释 500-2000 倍,产物作为金标敌百虫抗体。

[0017] (4)金标垫处理:将敌百虫抗原或敌百虫抗体倒入一槽中,将玻璃纤维或滤纸浸入 1 min,取出,室温干燥后,即作为金标垫。

[0018] 硝酸纤维素膜分制备:用 0.8% 的戊二醛溶液或 0.2% 的碳二亚胺溶液浸泡硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜或尼龙膜 30 min,取出,37℃烘干,上边包被 1 条不同浓度的敌百虫检测用抗原线或敌百虫抗体线作为检测线,同时包被 1 条抗第二种属动物蛋白的工 IgG 线作为参考线。当胶体金标记部分标记对象为敌百虫检测用抗原和第二种属蛋白时,检测线则包被敌百虫抗体。此即为检测反应部分,该部分主要作用是将反应结果以肉眼可见的颜色表征出来。

[0019] 吸水纸制备:将玻璃纤维纸或滤纸或吸水纸室温干燥后,即作为吸水部分。该部分主要作用在于将移动上来的多余的样品溶液吸收。

[0020] 试纸组装:在背衬上依次粘贴有样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,即成敌百虫检测试纸。

[0021] 检测原理:检测原理因胶体金标记的对象不同,而稍有差异。

[0022] 当胶体金标记部分标记对象为敌百虫检测用抗原和第二种属动物蛋白时,如果样品中含有敌百虫,样品溶液被试纸的样品垫吸收并通过毛细作用上移,样品中的游离敌百

虫分子量小移动速度快,先到达检测线,先与检测线上包被的敌百虫抗体结合,因检测线上包被的敌百虫抗体只有特定的结合位点,而且样品中游离的敌百虫结合能力比偶合态的敌百虫检测用抗原强,于是胶体金标记的检测用抗原不能再被检测线上的敌百虫抗体捕获,于是检测线无色,此即为阳性;如果样品中无敌百虫,则胶体金标记的敌百虫检测用抗原到达检测线后就被检测线上包被的敌百虫抗体捕获,形成肉眼可见的红色,此即为阴性。无论样品中是否含有敌百虫,胶体金标记的第二种属动物蛋白上移到达参考线时都可被参考线上包被的抗第二种属动物蛋白的工 IgG 捕获形成肉眼可见的红色,此即为参考线。

[0023] 当胶体金标记部分标记对象为敌百虫抗体和第二种属动物蛋白时,如果样品中含有敌百虫,样品溶液被试纸的样品垫吸收并通过毛细作用上移到达胶体金标记部分,样品溶液中的敌百虫与胶体金标记的敌百虫抗体反应形成结合物,结合物继续上移到检测线,因胶体金标记的敌百虫抗体只有特定的结合位点,样品溶液中的敌百虫与之结合后,检测线上的检测用抗原就不能再与胶体金标记的敌百虫抗体结合,于是检测线无色,此即为阳性;当样品中没有敌百虫时,胶体金标记的敌百虫抗体到达检测线时被检测用抗原捕获,则形成肉眼可见的红色。无论样品中是否含有敌百虫,胶体金标记的第二种属蛋白上移到达参考线时都可被参考线上包被的抗第二种属动物蛋白的工 IgG 捕获形成肉眼可见的红色,此即为参考线。

[0024] 以上两种方式的试纸,在试纸制备时通过调节检测线和参考线包被物浓度,控制检测时检测线和参考线的显色深浅,并将其显色深浅与标准物质浓度对应起来,即可达到半定量检测目的。

附图说明

[0025] 附图为本发明检测试纸条的结构示意图:

图中 1 为样液吸收部分、2 为胶体金标记部分、3 为检测反应部分、4 为检测线、5 为参考线、6 为吸水部分。

[0026] 实施方式

敌百虫半定量快速检测试纸条制备如上述技术方案所述。

[0027] 实施例:谷类、豆类中敌百虫检测

前处理:称取样品 1.0g,加水 2mL,放置 2 小时。加入 10mL 丙酮,搅拌 3 分钟后,用涂布 1cm 厚硅藻土的滤纸,抽滤于磨口减压浓缩器中。取出滤纸上的残留物,加入 5mL 丙酮,搅拌 3 分钟后,按上述同样操作,合并滤液于减压浓缩器中,40℃ 以下浓缩至约 3mL。将其移入预先注入 10mL 10%氯化钠溶液的分液漏斗中。用 10mL 乙酸乙酯洗涤上述减压浓缩器的茄型瓶,并入洗液于上述分液漏斗中。用振荡器激烈振荡 5 分钟后,静置,乙酸乙酯层移入 30mL 三角瓶瓶中。水层中加入 5mL 乙酸乙酯,按上述同样操作。合并乙酸乙酯层于上述 30mL 三角瓶中。加入适量无水硫酸钠,不时振荡、混合,放置 15 分钟后,滤入磨口减压浓缩器中。再用 2mL 乙酸乙酯洗涤上述三角瓶,以此洗涤液洗涤滤纸上的残留物,重复操作二次。合并两洗涤液于上述减压浓缩器中,40℃ 以下除去乙酸乙酯。残留液中加入 3mL 正己烷,移入 10mL 分液漏斗中。加入 3mL 正己烷饱和乙腈,用振荡器激烈振荡 5 分钟后,静置,乙腈层移入磨口减压浓缩器中。正己烷层中再加入 3 mL 正己烷饱和乙腈,按上述同样操作,重复操作两次。合并乙腈层于减压浓缩器中,40℃ 以下浓缩至约 1mL,在室温下用氮气进一步吹干。用

去离子水按 1 : 19 比例稀释 ;取稀释后液体待测。

[0028] 敌百虫半定量快速检测试纸条产品的使用方法 :取样品液 100 μ g 缓慢滴加于试纸条的玻璃纤维膜上,15 分钟后观察试纸条上检测线(T 线)、参考线(C 线)的显色情况。根据试纸条的检测原理来限量判定样品提取液中敌百虫的含量 :若只有一条红色色带出现则判定样液为阳性,敌百虫超标 ;若出现两条红色色带则判定样液为阴性,没有超标 ;若无色带出现则该试纸条失效。

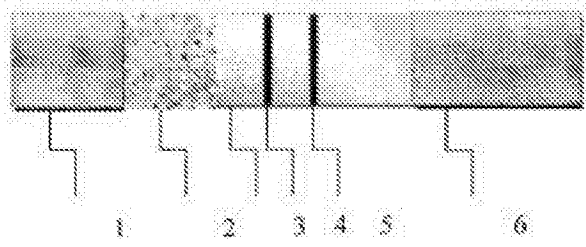


图 1