



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106053787 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(21)申请号 201610394964.8

(22)申请日 2016.06.06

(71)申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路100号

(72)发明人 魏新林 王元凤 余超 徐乃丰

汪艳姣 徐凤

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 褚明伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

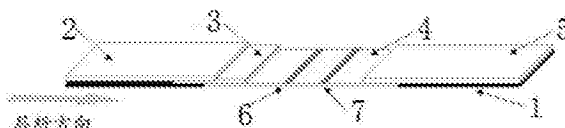
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

## (54)发明名称

检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及制备与应用

## (57)摘要

本发明涉及一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用。该荧光免疫层析试纸条包括底板、样品垫、结合垫、层析膜及吸水垫，层析膜上设有检测线与质控线，结合垫上固定有荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针，检测线处包被有抗原AOZ-BSA，质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。与现有技术相比，本发明利用氨基化修饰的荧光CdTe量子点的高灵敏度的特点，标记AOZ单克隆抗体制成荧光探针，组装成AOZ荧光免疫层析试纸条，可进行定性、半定量、荧光读数仪器辅助定量检测，大大提高了检测的灵敏度，不仅适用于AOZ的现场检测，对其他农残及抗生素的检测提供较高价值的参考。



1. 一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条,包括底板,沿底板长度依次设置的样品垫、结合垫、层析膜及吸水垫,所述的层析膜上设有检测线与质控线,所述的检测线与质控线相互分离,其特征在于,所述的结合垫上固定有荧光纳米粒子标记呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的荧光探针,所述的检测线处包被有抗原呋喃唑酮代谢物-BSA,所述的质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述的呋喃唑酮代谢物为AOZ,荧光纳米粒子标记呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的荧光探针为荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针,抗原呋喃唑酮代谢物-BSA为抗原AOZ-BSA。

3. 根据权利要求2所述的一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,对于荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针,所述的荧光纳米粒子为氨基化修饰的荧光CdTe量子点。

4. 根据权利要求2所述的一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述抗原AOZ-BSA为4-NPAOZ-BSA。

5. 一种如权利要求1-4中任一项所述的检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)制备荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针;

(2)用浸泡结合垫的方式将制备的荧光探针固定在结合垫上,冷冻干燥后,密封保存备用;

(3)包被抗原AOZ-BSA及羊抗鼠IgG抗体划线于层析膜上,分别为检测线和质控线;

(4)将样品垫、结合垫、层析膜与吸水垫粘帖在底板上,组成检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条。

6. 根据权利要求5所述的一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述的制备荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针,具体包括以下步骤:

(1.1)采用水相合成、氨基化修饰的方法制备氨基化修饰的水溶性CdTe量子点;

(1.2)对CdTe量子点进行纯化:丙酮沉淀离心法纯化CdTe量子点,并用磷酸缓冲液复溶;

(1.3)连手臂法偶联CdTe量子点和抗AOZ单克隆抗体制备荧光探针。

7. 一种如权利要求1所述的检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,用甲醇将衍生化后的呋喃唑酮代谢物稀释成不同浓度的标准检测样品溶液,用移液器取标准品滴加到样品垫上,10min之内层析检测,置于紫外透射分析仪中进行检测结果观察。

8. 根据权利要求7所述的一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,所述的衍生化剂为4-硝基苯甲醛。

9. 根据权利要求7所述的一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的应用,其特征在于,所述的呋喃唑酮代谢物为AOZ。

## 检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测呋喃唑酮代谢物的方法,尤其是涉及一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及制备与应用,属于荧光免疫检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 呋喃唑酮(Furazolidone)又称痢特灵,化学名为3-(5-硝基糠醛缩氨基)-2-恶唑烷酮,是一种硝基呋喃类广谱抗生素,对常见的革兰氏阴性菌和阳性菌有抑制作用,与其余三种(呋喃西林、呋喃它酮、呋喃妥因)硝基呋喃类药物一样用于细菌和原虫引起的痢疾、肠炎、胃溃疡等胃肠道疾患的预防及治疗,广泛用于畜禽和水产养殖业。

[0003] 上世纪九十年代发现呋喃唑酮及其代谢物3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)可通过食物链传递被人体所吸收,长期使用不仅对养殖动物产生毒性及致癌、致畸、致突变的作用,还会对人类健康造成严重威胁。世界各国开始禁止该药物的使用,欧盟于1995年禁止呋喃唑酮在食用物中使用,食品药品监督管理局(FDA)及中华人民共和国农业部于2002年3月将呋喃唑酮列为禁止使用的药物,规定不得在动物性食品中检出。

[0004] 但近几年所发生的食品安全问题中,AOZ被检事件屡屡发生。如我国2006年被日本单方面全部退回的27.5t冻烤鳗,被检出AOZ超标,损失达54.6万美元;2007年,台湾地区于7月底至8月中抽验的大陆冷冻虾,发现五批含禁用抗生素“硝基呋喃”超标,台湾地区决定全面禁止中国虾类进口至情况改善为止;2008年,加拿大食品检验署检出我国的湛江国联水产冷冻产品中含硝基呋喃不合格,被退货;2010年,韩国食品医药安全厅称,从出口到韩国的中国产冷冻蚬肉汤里检出禁用药物呋喃唑酮代谢物,决定在确定中国产冷冻蚬肉汤安全之前停止该产品进口以及在韩国市场销售;2014年,日本厚生劳动省发出通报,在中国某企业生产的冷冻章鱼中检出呋喃唑酮,决定将我国生产的章鱼加工品监视检查率提高至30%;2015年中,国内各省也依然有AOZ被检出的事件发生,不仅对我国经济造成巨大损失,对我国声誉也造成较坏的影响。

[0005] 目前,用于呋喃唑酮代谢物的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相一质谱法(HPLC-MS)、液相一串联质谱法(HPLC-MS/MS)、酶联免疫分析法(ELISA)和胶体金免疫层析法(GICA)等。HPLC具有检测精度高、假阳性率低的特点,但仪器价格昂贵、操作比较繁琐、耗时长、检测费用昂贵、对检测人员专业要求较高、样本前处理较复杂;HPLC-MS和HPLC-MS/MS检测准确,重复性好,但检测仪器昂贵、操作复杂不利于大范围推广使用;ELISA于20世纪90年代开始在我国食品安全检测领域中使用,该方法基于抗原抗体的特异性反应来检测待检样品,检测灵敏度高、特异性好,促进了食品安全检测技术的发展。但实验步骤多、检测过程繁琐、需酶催化造成的试剂稳定性差;GICA是免疫分析方法中比较常用的方法,具有省时、高效、成本低等优点,而且检测结果重现性好、变异系数小,非常适用于现场检测和大批量筛查,但仍具有指示物灵敏度不够,检测结果不易保存的缺点。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的就是为了解决上述现有技术存在的缺陷而提供一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及制备与应用,该发明的试纸条用于检测呋喃唑酮代谢物,10min之内可判定检测结果,灵敏度高、稳定性好、简捷、低成本、适用范围广,可在食品安全检测中推广使用。

[0007] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0008] 技术方案一:提供一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条。

[0009] 一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条,包括底板,沿底板长度依次设置的样品垫、结合垫、层析膜及吸水垫,所述的层析膜上设有检测线与质控线,所述的检测线与质控线相互分离,间隔2~4mm,所述的检测线靠近结合垫,所述的质控线靠近吸水垫,所述的结合垫上固定有荧光纳米粒子标记呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的荧光探针,所述的检测线处包被有抗原呋喃唑酮代谢物-BSA,所述的质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0010] 本发明中,所述的呋喃唑酮代谢物主要为AOZ,进一步地,荧光纳米粒子标记呋喃唑酮代谢物单克隆抗体的荧光探针为荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的 荧光探针,抗原呋喃唑酮代谢物-BSA为抗原AOZ-BSA。

[0011] 对于荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针,所述的荧光纳米粒子为氨基化修饰的荧光CdTe量子点。

[0012] 所述抗原AOZ-BSA为已知的市售产品4-NPAOZ-BSA。。

[0013] 所述羊抗鼠IgG抗体为已知市售产品。

[0014] 所述样品垫材料为GL-b02型玻璃纤维素膜,样品垫的处理液为:0.5%BSA、2%曲拉通、0.2%NaCl、2%PVP的超纯水溶液(上述水溶液中各组分的百分含量均是质量分数,m/v),处理条件为将样品垫浸泡在处理液中,半小时后取出真空干燥2小时。

[0015] 所述结合垫材料为AhIstrom8964型玻璃纤维素膜,结合垫处理液为:含1%蔗糖、0.2%曲拉通、0.2%Tween-20的超纯水溶液(上述水溶液中各组分的百分含量均是体积分数,v/v),处理条件为将结合垫浸泡在处理液中,半小时后取出真空干燥1小时。

[0016] 所述层析膜材料为Millipore 135硝酸纤维素膜,不进行封闭,铝箔袋密封保存于干燥箱中。

[0017] 所述层析膜上用划膜仪将浓度同为2mg/mL抗原AOZ-BSA及羊抗鼠IgG抗体划线分别作为检测线(T线)和质控线(C线)。

[0018] 所述吸水垫优选0.85mm厚度的H5072型吸水纸。

[0019] 所述底板优选DB-4型纯黑色PVC板。

[0020] 所述荧光免疫层析试纸条用斩切机切割成60×3.8mm的试纸条。

[0021] 技术方案二:提供所述的检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的制备方法。

[0022] 荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0023] (1)制备荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针:

[0024] (1.1)采用水相合成、氨基化修饰的方法制备氨基化修饰的水溶性CdTe量子点;

[0025] (1.2)对CdTe量子点进行纯化:丙酮沉淀离心法纯化CdTe量子点,并用0.01mol/L pH为7.4的磷酸缓冲液复溶;

[0026] (1.3)连手臂法偶联CdTe量子点和抗AOZ单克隆抗体制备荧光探针。

[0027] (2)用浸泡结合垫的方式将制备的荧光探针固定在结合垫上,冷冻干燥后,密封保存备用;

[0028] (3)包被抗原AOZ-BSA及羊抗鼠IgG抗体划线于层析膜上,分别为检测线(T线)和质控线(C线);

[0029] (4)将样品垫、结合垫、层析膜与吸水垫粘帖在底板上,组成检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条。

[0030] 技术方案三:提供所述的检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条的应用。

[0031] 荧光免疫层析试纸条使用时,用甲醇将衍生化后的呋喃唑酮代谢物稀释成不同浓度的标准检测样品溶液,用移液器取100 $\mu$ L标准品滴加到样品垫上,10min之内层析检测,置于紫外透射分析仪中进行检测结果观察。所述的衍生化剂为4-硝基苯甲醛。所述的呋喃唑酮代谢物为AOZ。

[0032] 与现有技术相比,本发明具有以下优点及有益效果:

[0033] 本发明的检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用,是利用氨基化修饰的荧光CdTe量子点的高灵敏度的特点,标记AOZ单克隆抗体制成荧光探针,组装成AOZ荧光免疫层析试纸条,可进行定性、半定量、荧光读数仪器辅助定量检测,大大提高了检测的灵敏度,不仅适用于AOZ的现场检测,对其他农残及抗生素的检测提供较高价值的参考。

[0034] 水相合成、聚乙烯亚胺修饰得到的氨基化的水溶性CdTe量子点具有量子产率高,粒径均一,分散性好等优点,可经紫外透射而呈现橙红色荧光,因此作为优良的标记材料,偶联单克隆抗体固定于结合垫,进行层析检测,通过紫外仪肉眼可判定检测结果。本发明的AOZ荧光免疫层析试纸条进行半定量检测的灵敏度为5ppb,通过荧光读数仪器辅助读取荧光信号,制成标准曲线,对AOZ的定量检测可提升2个数量级。

## 附图说明

[0035] 图1本发明制备的AOZ荧光试纸条结构示意图。

## 具体实施方式

[0036] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0037] 下述实施例中所使用的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0038] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0039] 实施例1

[0040] 氨基化修饰的水溶性荧光量子点的制备

[0041] 将31.9mg Te粉、28.5mg NaBH<sub>4</sub>加入到自制白色橡胶盖的小玻璃瓶中,通入氮气进行排氧,半小时后用注射器注入5mL无氧水,在室温下剧烈搅拌反应1h,4℃冰浴静置10min,整个过程通氮气进行无氧保护,最终得到淡紫色的NaHTe水溶液;反应同时,将142.75mg CdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O和245mL无氧水,加入到250mL三颈瓶中,磁力搅拌,待白色固体完全溶解后再加入超声溶解的0.1g聚乙烯亚胺(PEI)/3mL乙二醇溶液中,搅拌约10min后,用1mol/L NaOH溶液调节pH值保持碱性,通入氮气,升温至105℃,气压及温度稳定之后,将新制得的NaHTe溶液用注射器吸出迅速加入到三颈瓶中,此时溶液中Te<sup>2-</sup>:Cd<sup>2+</sup>=1:2.5。稳定反应20h后得

到氨基化修饰的水溶性荧光量子点(CdTe QDs)。将制备的量子点进行透射电镜扫描及荧光强度测定。

[0042] 实施例2

[0043] 荧光量子点的纯化

[0044] 采用丙酮沉淀离心的方法纯化量子点,具体操作如下:取20mL CdTe QDs水溶液于50mL离心管中,加入等量的丙酮溶液,静置10min后于14000r/min,4℃下离心30min,去除无色上清液,接着加入与剩余溶液等量的丙酮溶液,离心,去除无色上清液,重复上述步骤1~2次直到得到红色沉淀,即红色固体量子点,将红色固体量子点进行避光烘干,之后溶于2mL PBS(0.01mol/L pH=7.4)中避光室温保存,即得到纯化后的CdTe QDs PBS溶液。

[0045] 实施例3

[0046] 荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针制备

[0047] 取上述实施例2纯化后的CdTe QDs PBS溶液2mL,加120uI MES缓冲液和280uI超纯水溶液,混匀后加入0.04mg EDC交联,室温磁力搅拌15min;加20uI氨基己酸,室温磁力搅拌30min;加1mL MES缓冲液,25000rpm离心清洗30min,弃上清后加200uI MES缓冲液溶解沉淀;加0.04mg NHS和0.02mg EDC,室温搅拌混匀15min;加1mLMES缓冲液,离心清洗30min,弃去上清;加400uI交联缓冲液(0.05mol/L,pH=8.0的硼酸缓冲液),溶解沉淀后加入AOZ单克隆抗体(AOZ-mAb),室温磁力搅拌50min;加80uI Tris-HCl(0.5mol/L,pH=8.0)终止反应后,加入50uI BSA封闭液(100mg/mL BSA),室温避光放置12h;加入1mLMES 缓冲液交联后,25000rpm离心清洗30min,弃去上清,加入交联缓冲液(0.05mol/L,pH=8.0的硼酸缓冲液)复溶沉淀,使其终浓度为2mg/mL并加入少许BSA,4℃冰箱保存备用,即得到荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针。

[0048] 实施例4

[0049] 用浸泡结合垫的方式将实施例3制备的荧光探针固定在结合垫上,冷冻干燥后,密封保存备用;包被抗原AOZ-BSA及羊抗鼠IgG抗体划线于层析膜上,分别为检测线(T线)和质控线(C线);将样品垫、结合垫、层析膜与吸水垫粘帖在底板上,组成检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条。

[0050] 荧光免疫层析试纸条结构如图1所示,包括底板1,按层析方向,沿底板1长度依次设置的样品垫2、结合垫3、层析膜4及吸水垫5,层析膜4上设有检测线6与质控线7,检测线6与质控线7相互分离,间隔2~4mm,检测线6靠近结合垫3,质控线7靠近吸水垫5,结合垫3上固定有氨基化修饰的荧光CdTe量子点标记AOZ单克隆抗体的荧光探针,检测线6处包被有抗原AOZ-BSA,质控线7处包被有羊抗鼠IgG抗体。

[0051] 样品垫材料为GL-b02型玻璃纤维素膜,样品垫的处理液为:0.5%BSA、2%曲拉通、0.2%NaCl、2%PVP的超纯水溶液(上述水溶液中各组分的百分含量均是质量分数,m/v),处理条件为将样品垫浸泡在处理液中,半小时后取出真空干燥2小时。

[0052] 结合垫材料为AhIstrom8964型玻璃纤维素膜,结合垫处理液为:含1%蔗糖、0.2%曲拉通、0.2%Tween-20的超纯水溶液(上述水溶液中各组分的百分含量均是体积分数,v/v),处理条件为将结合垫浸泡在处理液中,半小时后取出真空干燥1小时。

[0053] 层析膜材料为Millipore 135硝酸纤维素膜,不进行封闭,铝箔袋密封保存于干燥箱中。

- [0054] 层析膜上用划膜仪将浓度同为2mg/mL抗原AOZ-BSA及羊抗鼠IgG抗体划线分别作为检测线(T线)和质控线(C线)。
- [0055] 吸水垫优选0.85mm厚度的H5072型吸水纸。
- [0056] 底板优选DB-4型纯黑色PVC板。
- [0057] 荧光免疫层析试纸条用斩切机切割成60×3.8mm的试纸条。
- [0058] 实施例5
- [0059] 实施例4得到的AOZ荧光免疫层析试纸条检测实施操作方法
- [0060] 样品处理:将已去除脂肪的组织(鱼),用绞肉机绞成肉泥,取1g待检样品于50mL离心管中,其余分装保存于-20℃冰箱中;
- [0061] 依次加4mL的去离子水、0.5mL 1mol/L盐酸溶液于离心管,用振荡器充分振荡2min后,加入0.1mL衍生化试剂4-硝基苯甲醛,震荡混匀2分钟后置60℃水浴中孵育1h;
- [0062] 取出后加入5mL 0.1mol/L磷酸氢二钾溶液,0.4mL 1mol/L氢氧化钠溶液,6mL乙酸乙酯,充分混合1min,4000r/min,离心5min,移取上层溶液3mL于5mL离心管中,60℃水浴蒸干或50~60℃氮气流下吹干;
- [0063] 向蒸干离心管中加入1mL正己烷,加盖振荡1min,然后加入0.3mL PBST缓冲液,充分混匀,4000r/min,离心1min(或静置至明显分层),吸取0.1mL下层溶液,待检。
- [0064] 检测操作方法:将斩切好的AOZ荧光免疫层析试纸条水平放置,用移液器取100uL待检样品溶液滴加到样品垫上,5~10min之内在紫外透射仪中进行结果判定。
- [0065] 结果判定:若硝酸纤维素膜上只有C线呈现荧光条带,则检测结果为阳性,说明待检样品中含有AOZ,且浓度大于等于5ppb;若硝酸纤维素膜上T线和C线都呈现荧光条带,则检测结果为阴性,说明待检样品中不含AOZ或含量低于检测限;若硝酸纤维素膜上C线不呈现荧光条带,无论T线是否出现,都判定无效,说明该试纸条因制作或保存不当已失效。
- [0066] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

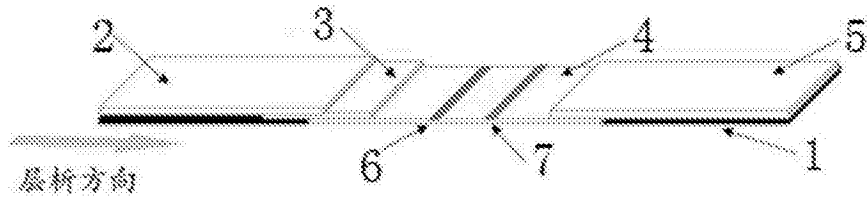


图1

专利名称(译)	检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及制备与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106053787A</a>	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201610394964.8	申请日	2016-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	魏新林 王元凤 余超 徐乃丰 汪艳姣 徐凤		
发明人	魏新林 王元凤 余超 徐乃丰 汪艳姣 徐凤		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	褚明伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测呋喃唑酮代谢物的荧光免疫层析试纸条及其制备与应用。该荧光免疫层析试纸条包括底板、样品垫、结合垫、层析膜及吸水垫，层析膜上设有检测线与质控线，结合垫上固定有荧光纳米粒子标记AOZ单克隆抗体的荧光探针，检测线处包被有抗原AOZ-BSA，质控线处包被有羊抗鼠IgG抗体。与现有技术相比，本发明利用氨基化修饰的荧光CdTe量子点的高灵敏度的特点，标记AOZ单克隆抗体制成荧光探针，组装成AOZ荧光免疫层析试纸条，可进行定性、半定量、荧光读数仪器辅助定量检测，大大提高了检测的灵敏度，不仅适用于AOZ的现场检测，对其他农残及抗生素的检测提供较高价值的参考。

