

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510111229.3

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1793926A

[22] 申请日 2005.12.8

[21] 申请号 200510111229.3

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

[72] 发明人 柴春彦 刘国艳

[74] 专利代理机构 上海交大专利事务所

代理人 王锡麟 王桂忠

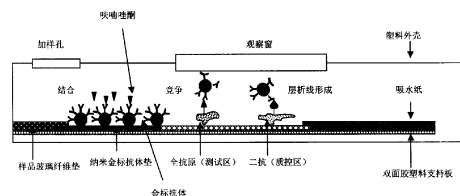
权利要求书4页 说明书11页 附图1页

## [54] 发明名称

快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法

## [57] 摘要

一种检测技术领域的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法。具体为：合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物；将呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物作为免疫全抗原，免疫实验家兔，获得兔抗呋喃唑酮的多克隆抗体并进行亲和层析纯化；制备纳米金试剂并用该试剂标记已纯化的兔抗呋喃唑酮抗体，将纳米金标记好的抗体用玻璃纤维垫吸附后，冷冻干燥待用；将鼠抗兔 IgG 抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定于硝酸纤维素膜上，并用封阻剂封闭未反应的活性基团；以双面胶聚乙烯塑料板为支持底板，将硝酸纤维素膜、金标抗体垫、吸水纸及样品垫组装成免疫纳米金试纸条。本发明快速、灵敏，能实现现场检测饲料及动物性产品中的呋喃唑酮。



1、一种快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 首先合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物；

(2) 其次将呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物作为免疫全抗原，免疫实验动物家兔，获得兔抗呋喃唑酮的多克隆抗体并进行亲和层析纯化；

(3) 然后制备纳米金试剂并用该试剂标记已纯化的兔抗呋喃唑酮的抗体，将纳米金标记好的抗体用玻璃纤维垫吸附后，冷冻干燥待用；同时将鼠抗兔 IgG 的抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定于硝酸纤维素膜上，并用封阻剂封闭未反应的活性基团；

(4) 最后以双面胶聚乙烯塑料板为支持底板，将固定有鼠抗兔 IgG 抗体和呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的硝酸纤维素膜、金标抗体垫、吸水纸及样品垫组装成现场测试呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条。

2、根据权利要求 1 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法，其特征是，所述的步骤 (1)，合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物，具体如下：

A) 称取呋喃唑酮 112.600 毫克放入 25 毫升烧杯中，加入 1.0 克锡粒及 20 毫升 1M 的盐酸液，加热煮沸或在沸水浴中进行还原反应，并不停搅拌，直至溶液变成棕红色，并继续煮沸 30 分钟；

B) 冷却到室温后，用倾倒法除去锡粒，并用 100 毫升乙醚萃取两次，除去未反应的原料及非碱性副产物；

C) 将水溶液迅速倾入过量的苛性钠溶液中，用乙醚提取胺，并在提取液中加入固体碱干燥，然后蒸去乙醚；

D) 用茚三酮来鉴定胺的合成，取 2 毫克合成样品溶于少量水中，加入 4-5 滴 1% 的茚三酮溶液，煮沸 2-3 分钟，呈现深紫色反应即表明样品中有胺存在；

E) 将初合成的带氨基的产物溶于 20 毫升水中，用 1M 的盐酸调 PH 为 1.0，逐滴加入 1.38% 的亚硝酸钠溶液 2 毫升，在 0-4℃ 条件下暗处反应半小时；

F)加入 4.7%的氨基磺酸铵 1.4 毫升,然后用 1M 的氢氧化钠调节 PH 为 7.2;

G)用 pH 为 7.2 且浓度为 0.01M 的 PBS 液配制 2.5%的牛血清白蛋白溶液 4 毫升,并将上述已制备好的 20 毫升含胺产物加入到其中,充分搅拌 5 分钟,在 0-4℃条件下静置过夜;次日装入透析袋,用 0.01M pH 为 7.2 且含有 1%二甲亚砜的 PBS 液在 4℃条件下透析 72 小时,透析完成后,加入等体积的丙三醇,并进行分装冻存。

3、根据权利要求 1 或者 2 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法,其特征是,所述的步骤(1),合成呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物,与呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物的合成方法相同,但过氧化氢酶的用量为 125 毫克。

4、根据权利要求 1 或者 2 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法,其特征是,对合成的呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的结合比用紫外扫描法进行计算,呋喃唑酮与牛血清白蛋白及过氧化氢酶偶联物的分子结合比应控制在 25: 1 到 80: 1 之间。

5、根据权利要求 1 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法,其特征是,所述的步骤(2),具体如下:

将合成的呋喃唑酮—BSA 偶联物的浓度用 0.01M pH 为 7.2 的 PBS 缓冲液调节蛋白浓度为 2 毫克/毫升,过滤除菌;在首次注射时,加入福氏完全佐剂,在兔背部多点注射,总蛋白的注射量为 5 毫克,其后每隔 14 天配合福氏不完全佐剂注射 3-4 次,总蛋白的注射量为 3 毫克,每次注射前采血分离血清,并用琼脂免疫扩散法检测抗体滴度,当抗体滴度达 1: 64 以上时,将兔子作安乐处死,并同时采集血液,分离血清,用饱和硫酸铵法沉淀抗体,并用亲和层析法纯化分离呋喃唑酮抗体。

6、根据权利要求 1 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法,其特征是,所述的步骤(3),制备纳米金试剂并用该试剂标记已纯化的兔抗呋喃唑酮的抗体,将纳米金标记好的抗体用玻璃纤维垫吸附后,冷冻干燥待用,具体如下:

A)纳米金试剂的制备:取 0.005%氯金酸水溶液 100mL 加热至沸腾;一边搅拌一边加入 1%柠檬酸三钠水溶液 0.5mL;待氯金酸水溶液变为紫红色,继续

煮沸 5min, 冷却后蒸馏水恢复到原体积, 将纳米金溶液放在硅化过的试剂瓶中, 4℃保存待用;

B) 纳米金标记呋喃唑酮抗体: 取待标记的呋喃唑酮抗体 100 微升, 12000 转/分钟离心 2min, 取其上清, 以 1mL 纳米金标记系列稀释的浓度范围为 1 $\mu$ g~5 $\mu$ g IgG 的呋喃唑酮多克隆抗体; 用蒸馏水稀释抗体, 做以下稀释梯度 1:200、1:300、1:400、1:600、1:800、1:1000, 然后取 100 $\mu$ L 加入到 1mL 纳米金溶液中, 5min 后加入 0.1mL 10% NaCl 溶液, 混匀后静置 2 小时, 不稳定的金溶胶将发生聚沉, 以能使纳米金稳定的最适蛋白量即为抗体标记用量, 取 20mL 纳米金溶液于 50mL 离心管中, 搅拌, 用 0.2mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调整 pH 值到 7.4, 用铝铂纸包住离心管, 避光条件下, 剧烈搅拌, 迅速加入 0.0075 $\mu$ g 抗体, 然后继续搅拌反应 2 分钟, 并在室温下孵育 20 分钟; 同样在搅拌条件下, 逐滴加入卵清蛋白和聚乙二醇 20000, 使卵清蛋白和聚乙二醇的终浓度分别为 0.2% 及 0.1%, 继续搅拌, 反应 20 分钟, 4℃放置 2~3 小时后, 在 4℃条件下 10000 转/分离心 20min, 离心后取出离心管, 观察沉淀物的状态初步确定标记效果, 用真空泵抽离上清, 留 200 微升上清液, 防止损失纳米金;

C) 纳米金标记抗体玻璃纤维的制备: 用已知阴性尿样分别稀释呋喃唑酮至 0.5ppb、1.0ppb、5.0ppb、10.0ppb、50.0ppb 浓度, 选取在 1.0ppb 浓度以下, 并且当质控线和检测线颜色一致时的纳米金标记抗体浓度作为工作浓度, 取此浓度的纳米金标记的呋喃唑酮为工作金标抗体, 并将该金标抗体均匀涂布在玻璃纤维上, 室温真空抽干备用。

7、根据权利要求 6 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法, 其特征是, 抗体标记用量为 0.0075 $\mu$ g/ml。

8、根据权利要求 6 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法, 其特征是, 所述的步骤 (3), 将鼠抗兔 IgG 的抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定于硝酸纤维素膜上, 并用封阻剂封闭未反应的活性基团, 具体如下:

分别将鼠抗兔 IgG 与呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物用点样机以区带状划在硝酸纤维素膜上, 室温下自然干燥→加入 0.01M pH 为 7.2 的 PBS 缓冲液配制的含有 3%脱脂奶粉的封阻液, 4℃作用 4 到 5 小时或 37℃作用 1 小时→用水冲洗

干净，再用 Tris-HCl 缓冲液洗膜 2 次，室温晾干，密封备用；点样时鼠抗兔 IgG 浓度为 1-3mg/ml，点样量为 1 微升；呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物浓度为 1.5mg/ml，点样量为 0.5 微升。

9、根据权利要求 1 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法，其特征是，所述的步骤（4），具体如下：

以包被有鼠抗兔 IgG 和呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的硝酸纤维素膜作为质控检测区，以吸附有纳米金标记呋喃唑酮抗体的玻璃纤维为加样区，以双层吸水纸为吸附区，按质控检测区、加样区、吸附区顺序贴于双面胶聚乙烯塑料支持板表面，制成试纸条。

10、根据权利要求 1 所述的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法，其特征是，所制备的免疫纳米金试纸条用于现场检测时，先处理待检样品，然后将处理好的待检样品 400 微升逐滴加入加样孔中，15 分钟内观察结果，判断试纸条检测结果的标准如下：

阳性：有一条显色条带，即包被有鼠抗兔 IgG 抗体的质控区显色，呋喃唑酮含量大于 5.6ng/g；

阴性：有两条显色条带，即包被有鼠抗兔 IgG 抗体的质控区和包被有呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的检测区同时显色；

弱阳性：有两条显色条带，即质控区和检测区同时显色，但检测区条带显著浅于控制区条带，呋喃唑酮含量小于 5.6ng/g 且大于 0.2ng/g；

失效：质控区没有显色条带。

## 快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法

### 技术领域

本发明涉及的是一种检测技术领域的方法，具体是一种快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法。

### 背景技术

呋喃唑酮，化学名为 3-(5-硝基糠叉胺基)-2-噁唑烷酮，是一种抗菌类物质，主要用于防治人及动物的细菌性感染并作为畜禽的抗菌促生长剂。但由于该药物能在动物及人体内产生多种较强的副作用而被欧美及中国等一些国家禁止使用。欧盟（EU）N0807/2001 法规中规定使用高效液相色谱方法检测呋喃唑酮，检测限量为 2-4ppb；中国目前使用行业标准 SN0530-1996，要求动物源食品中呋喃唑酮残留检测的国标方法为高效液相色谱法，检测限量 0.01-0.05ppm。目前国内外检测呋喃唑酮的方法主要有比色法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用和高效液相色谱-串联质谱法及电化学检测法等。这些测试方法由于流程繁琐、设备昂贵、检测速度慢等原因，很难实现现场检测和普及推广。国内外有关检测呋喃唑酮的免疫技术方面的资料非常少，而在国内利用免疫纳米金试纸条检测呋喃唑酮的专利文献及相关报道为空白。免疫纳米金试纸条技术具有特异性强、敏感性高、直观准确、成本低、投资少、简便快速、不需专用仪器设备及专业人员等优点，具有广阔的应用前景。

经对现有技术文献的检索发现，美国专利申请号为 US3980434，名称为“Method for determining furazolidone in animal tissue”（动物组织中呋喃唑酮的检测方法），该专利的关键技术是将动物组织中的呋喃唑酮用有机试剂提取后，用一定强度的紫外光进行照射，照射后的呋喃唑酮可转化成具有荧光特性的物质，然后用荧光分光光度计测试其荧光强度来计算呋喃唑酮的含量。该方法虽然操作过程并不复杂，但由于动物组织及饲料中有许多物质具有荧光特性而使该测试受到很大的干扰，如饲料或动物性产品中的维生素 A、维生素 E 物质等也能吸收紫外光而转化成为具有荧光特性的物质，因而该发明检测呋喃唑酮的

特异性也较差，检测的灵敏度也较低，检测下限在 0.2ppm 以上；另外该发明检测时间较长，需要 8 小时以上，再加上需要荧光分光光度计等昂贵设备而不能实现现场检测。

#### 发明内容

本发明针对现有检测呋喃唑酮的技术的不足和缺陷，提供一种快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法，使其利用免疫纳米金标记抗体技术检测呋喃唑酮的手段更加快速、灵敏，并能实现现场检测饲料及动物性产品（肉样或尿样）中的呋喃唑酮，克服了其它方法检测时需要特殊仪器和耗费时间及人力的缺点。

本发明是通过以下技术方案实现的，本发明包括以下步骤：

(1) 首先合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物。

(2) 其次将呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物作为免疫全抗原，免疫实验动物家兔，获得兔抗呋喃唑酮的多克隆抗体并进行亲和层析纯化。

(3) 然后制备纳米金试剂并用该试剂标记已纯化的兔抗呋喃唑酮的抗体，将纳米金标记好的抗体用玻璃纤维垫吸附后，冷冻干燥待用；同时将鼠抗兔 IgG 的抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定于硝酸纤维素膜上，并用封阻剂封闭未反应的活性基团。

(4) 最后以双面胶聚乙烯塑料板为支持底板，将固定有鼠抗兔 IgG 抗体和呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的硝酸纤维素膜、金标抗体垫、吸水纸及样品垫组装成能够现场测试呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条。

以下对本发明作进一步的说明，具体内容如下：

所述的步骤 (1)，具体实现如下：

#### (一) 合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物

A) 准确称取呋喃唑酮 112.600 毫克放入 25 毫升烧杯中，加入 1.0 克锡粒及 20 毫升 1M 的盐酸液，加热煮沸或在沸水浴中进行还原反应，并不停搅拌，直至溶液变成棕红色，并继续煮沸 30 分钟。

B) 冷却到室温后，用倾倒法除去锡粒，并用 100 毫升乙醚萃取两次，除去未反应的原料及非碱性副产物。

C) 将水溶液迅速倾入过量的苛性钠溶液中, 用乙醚提取胺, 并在提取液中加入固体碱干燥, 然后蒸去乙醚。

D) 用茚三酮来鉴定胺的合成。取 2 毫克合成样品溶于少量水中, 加入 4-5 滴 1% 的茚三酮溶液, 煮沸 2-3 分钟, 呈现深紫色反应即表明样品中有胺存在。

E) 将初合成的带氨基的产物溶于 20 毫升水中, 用 1M 的盐酸调 PH 为 1.0, 逐滴加入 1.38% 的亚硝酸钠溶液 2 毫升, 在 0-4℃ 条件下暗处反应半小时。

F) 加入 4.7% 的氨基磺酸铵 1.4 毫升, 然后用 1M 的氢氧化钠调节 PH 为 7.2。

G) 用 pH 为 7.2 且浓度为 0.01M 的 PBS 液配制 2.5% 的牛血清白蛋白溶液 4 毫升, 并将上述已制备好的 20 毫升含胺产物加入到其中, 充分搅拌 5 分钟, 在 0-4℃ 条件下静置过夜。次日装入透析袋, 用 0.01M pH 为 7.2 且含有 1% 二甲基亚砷的 PBS 液在 4℃ 条件下透析 72 小时。透析完成后, 加入等体积的丙三醇, 并进行分装冻存。

## (二) 合成呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物

合成方法基本同呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物的合成, 不同之处是过氧化氢酶的用量为 125 毫克。

对合成的呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的结合比用紫外扫描法进行计算, 呋喃唑酮与牛血清白蛋白及过氧化氢酶偶联物的分子结合比应控制在 25: 1 到 80: 1 之间。

所述的步骤 (2), 具体实现如下:

将合成的呋喃唑酮—BSA 偶联物的浓度用 0.01M pH 为 7.2 的 PBS 缓冲液调节蛋白浓度为 2 毫克/毫升, 过滤除菌。在首次注射时, 加入福氏完全佐剂, 在兔背部多点注射, 总蛋白的注射量为 5 毫克, 其后每隔 14 天配合福氏不完全佐剂注射 3-4 次, 总蛋白的注射量为 3 毫克, 每次注射前采血分离血清, 并用琼脂免疫扩散法检测抗体滴度。当抗体滴度达 1: 64 以上时, 将兔子作安乐处死, 并同时采集血液, 分离血清, 用饱和硫酸铵法沉淀抗体, 并用亲和层析法纯化分离呋喃唑酮抗体。

所述的步骤 (3), 具体实现如下:

A) 纳米金试剂的制备: 取 0.005% 氯金酸水溶液 100mL 加热至沸腾; 一边搅拌一边准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.5mL。待氯金酸水溶液变为紫红色,

继续煮沸 5min，冷却后蒸馏水恢复到原体积。将纳米金溶液放在硅化过的试剂瓶中，4℃保存待用。

**B) 纳米金标记呋喃唑酮抗体：**取待标记的呋喃唑酮抗体 100 微升，12000 转/分钟离心 2min，取其上清。以 1mL 纳米金标记系列稀释的大致浓度范围为 1 $\mu$ g~5 $\mu$ g IgG 的呋喃唑酮多克隆抗体。用蒸馏水稀释抗体，做以下稀释梯度 1:200、1:300、1:400、1:600、1:800、1:1000，然后取 100  $\mu$ L 加入到 1mL 纳米金溶液中。5min 后加入 0.1mL 10% NaCl 溶液，混匀后静置 2 小时，不稳定的金溶胶将发生聚沉，以能使纳米金稳定的最适蛋白量即为最佳抗体标记用量。本发明所用的最佳标记量为 0.0075 $\mu$ g/ml。取 20mL 纳米金溶液于 50mL 离心管中，搅拌，用 0.2mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调整 pH 值到 7.4。用铝铂纸包住离心管，避光条件下，剧烈搅拌，迅速加入 0.0075 $\mu$ g 抗体，然后继续搅拌反应 2 分钟，并在室温下孵育 20 分钟。同样在搅拌条件下，逐滴加入卵清蛋白和聚乙二醇 20000，使卵清蛋白和聚乙二醇的终浓度分别为 0.2% 及 0.1%，继续搅拌，反应 20 分钟。4℃放置 2~3 小时后，在 4℃条件下 10000 转/分 离心 20min。离心后取出离心管，观察沉淀物的状态初步确定标记效果是否理想。用真空泵抽离上清，留 200 微升上清液，防止损失纳米金。

**C) 纳米金标记抗体玻璃纤维的制备：**用已知阴性尿样分别稀释呋喃唑酮至 0.5ppb、1.0ppb、5.0ppb、10.0ppb、50.0ppb 浓度，选取在 1.0ppb 浓度以下，并且当质控线和检测线颜色一致时的纳米金标记抗体浓度作为工作浓度。取此浓度的纳米金标记呋喃唑酮抗体为工作金标抗体，并将该金标抗体均匀涂布在玻璃纤维上，室温真空抽干备用。

#### **D) 硝酸纤维素膜上固定鼠抗兔 IgG 与呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物**

分别将鼠抗兔 IgG 与呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物用点样机以区带状划在硝酸纤维素膜上适当位置，室温下自然干燥→加入 0.01M pH 为 7.2 的 PBS 缓冲液配制的含有 3% 脱脂奶粉的封阻液，4℃作用 4 到 5 小时或 37℃作用 1 小时→用水冲洗干净，再用 Tris-HCl 缓冲液洗膜 2 次，室温晾干，密封备用。点样时鼠抗兔 IgG 浓度为 1-3mg/ml，点样量为 1 微升；呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物浓度为 1.5mg/ml，点样量为 0.5 微升。

所述的步骤 (4)，具体实现如下：

以包被有鼠抗兔 IgG 和呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的硝酸纤维素膜作为质控检测区，以吸附有纳米金标记呋喃唑酮抗体的玻璃纤维为加样区，以未作其任何处理的双层吸水纸为吸附区，按质控检测区、加样区、吸附区顺序贴于双面胶聚乙烯塑料支持板表面，制成 0.38 厘米宽，8.0 厘米长的试纸条。

本发明制得的试纸条具体使用时，放置于带有加样孔及显示窗的轻薄型塑料盒中，规格为 9.0cm×3.0cm。最后把干燥用硅胶小包连同装有试纸条的塑料盒一并用聚四氟乙烯膜封包，并贴上标签，室温保存。现场检测时，先处理待检样品，然后将处理好的待检样品 400 微升逐滴加入加样孔中，15 分钟内观察结果。判断试纸条检测结果的标准如下：

阳性：有一条显色条带。即包被有鼠抗兔 IgG 抗体的质控区显色，呋喃唑酮含量大于 5.6ng/g。

阴性：有两条显色条带。即包被有鼠抗兔 IgG 抗体的质控区和包被有呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的检测区同时显色。

弱阳性：有两条显色条带。即质控区和检测区同时显色，但检测区条带显著浅于控制区条带。呋喃唑酮含量小于 5.6ng/g 且大于 0.2ng/g。

失效：质控区没有显色条带。

本发明是在结合抗原抗体的免疫学反应和层析原理的基础上实现的，增强了检测呋喃唑酮的特异性、灵敏度，显著地缩短了检测时间和降低了检测下限，携带方便，操作简单，成本低廉，能实现现场检测。

本发明在硝酸纤维素膜上的检测区包被呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物作为全抗原，在质控区包被鼠抗兔的 IgG 作为二抗，在点样区的玻璃纤维上包被纳米金标记的抗呋喃唑酮的抗体。当样品中有呋喃唑酮抗原时，样品中的呋喃唑酮与膜上纳米金标抗体结合形成抗原—金标抗体复合物，沿玻璃纤维扩散到质控区，抗原—金标抗体复合物与二抗结合，出现显色条带，而不与检测区的全抗原结合，也不在此区显色，此时，试纸条上只有一个显色条带，即出现一条显色条带判为阳性；当样品中没有待测物呋喃唑酮时，在样品液作用下，只有膜上金标抗体向质控区和检测区同时扩散，一方面，可以在质控区与二抗结合，出现显色条带，另一方面与检测区的全抗原结合，又出现一个显色条带，即出现两条显色条带判为阳性；如果质控区没有显色条带，则说明试纸条失效。

在本发明中，利用层析效应和抗原抗体的免疫结合反应，可使检测呋喃唑酮的下限达到 0.2 ppb 以下，检测时间不超过 15 分钟，检测成本要远远低于仪器分析法，且能实现一次多个样品的检测。本发明方法能够显著提高检测的灵敏度，且操作简便省时，因而应用前景广阔。

#### 附图说明

图 1 本发明使用免疫纳米金试纸条检测呋喃唑酮的原理图。

图 2 本发明的免疫纳米金试纸条组装模式图。

#### 具体实施方式

以下结合本发明的内容提供实施例：

具体实施前，先对 20 份饲料抽检样品进行前处理：准确称取通过 1 毫米细筛的粉碎饲料样品 1.000 克，置于 100 毫升三角瓶中，准确加入 15 毫升水。混合后放置 5 分钟。准确加入提取剂 30 毫升，该提取剂中乙腈与甲醇的体积比为 1: 1。盖好塞子，置于回旋振荡器上剧烈振荡 30 分钟，过滤。将滤出液用稀释剂将呋喃唑酮稀释至终含量达 5 $\mu$ g/L 以下，该稀释剂是用 30 毫升提取剂与 150 毫升水混合而成的。将稀释好的呋喃唑酮样品装入聚四氟乙烯瓶内冷藏待测。

对 20 份猪肉样品的前处理如下：取 -20 $^{\circ}$ C 以下冻存的原始样品 1.0 克，用眼科手术剪充分剪碎后放入镍网内，并用干净的玻璃试管底部将其研磨后，以 4 毫升的蒸馏水、0.5 毫升 1M 的 HCL、100 微升 10mM 的 2-硝基苯甲醛的混合液将其冲洗到玻璃培养皿内，室温孵育半小时后加入 5 毫升 0.1M 的磷酸氢二钾 0.4 毫升，1M 氢氧化钠 5 毫升及乙酸乙酯 5 毫升，剧烈振荡 30 秒。在室温下以 3000 转/分速度离心 10 分钟。取出 2.5 毫升乙酸乙酯层到另一个容器中蒸干。用稀释剂稀释已蒸干的样品，使呋喃唑酮终含量达 5 $\mu$ g/L 以下。将其装入聚四氟乙烯瓶内冷藏待测。

#### 实施例一

①合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物，并进行这两种偶联物结合比的鉴定。在结合比鉴定前将呋喃唑酮配成 225 $\mu$ g/ml 的溶液，并将呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物分别配制成 0.4mg/ml 及 0.32mg/ml 的水溶液，同时分别配制 0.4mg/ml 的牛血清白蛋白溶液及 0.32mg/ml 过氧化氢酶水溶液，然后进行紫外扫描，根据 OD<sub>280</sub> 计算

各自摩尔吸光系数  $\epsilon$ ，分别测定呋喃唑酮与牛血清白蛋白的结合比及呋喃唑酮与过氧化氢酶的结合比，结合比 =  $[\epsilon_{280}(\text{偶联物}) - \epsilon(\text{牛血清白蛋白或过氧化氢酶})] / \epsilon_{280}(\text{呋喃唑酮})$ 。由计算结果得知，呋喃唑酮与牛血清白蛋白及呋喃唑酮与过氧化氢酶的结合比分别为 48: 1 及 40: 1。

② 制备呋喃唑酮抗体并进行抗体特性鉴定。参照药物全抗原免疫实验动物的基本方法，首次用偶联物+福氏完全佐剂，二免、三免及后继免疫均用偶联物+福氏不完全佐剂。5次免疫结束后，静脉采血，分别做 ELISA 及琼脂免疫扩散试验来测试抗体的滴度。用琼脂免疫扩散法检测时抗呋喃唑酮抗体的滴度应在 1: 64 以上；用 ELISA 检测时抗呋喃唑酮抗体的滴度应高于 1: 800 以上。

③ 用纳米金标记抗呋喃唑酮抗体并将其吸附在玻璃纤维垫上，同时在硝酸纤维素膜上固定鼠抗兔 IgG 的抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物。本发明所制备的纳米颗粒经电镜学观察后，测得其粒径为 40nm 左右，该纳米金试剂在硝酸纤维素膜上层析速度快、悬浮稳定、免疫反应明显、显色清晰，适用于免疫定性和定量反应。标记好的纳米金抗体在离心后，观察可见沉淀物呈流动的条带状。如果胶体金标记效果不好，沉淀会呈团状贴在离心管底部。因而初步判断本方法所制得的纳米金标记抗体性能良好。另外，可取 1 $\mu$ l 胶体金稀释 50 倍后，用紫外分光光度法进行扫描，包被有抗体的纳米金溶液的紫外吸收峰发生位移。

玻璃纤维上吸附纳米金标记抗体：在选择好最佳抗体包被量后，将纳米金标记抗体与等体积的 0.2% 的卵清蛋白液相混合，并将其喷涂于玻璃纤维上，并用冷冻干燥法将金标垫干燥。本发明中最佳抗体包被量为 0.0075 $\mu$ g/ml。

在硝酸纤维素膜上固定鼠抗兔 IgG 与呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物时，本发明选用的硝酸纤维素膜的孔径为 8 $\mu$ m，点样后冷冻干燥 30 分钟，然后室温放置 2 小时，并用 3% 的脱脂奶粉进行封闭。如果干燥时间不足，致使全抗原不能与硝酸纤维素膜牢固结合而部分被冲洗掉，导致结合金标抗体的全抗原浓度不够，也不会产生肉眼可见的红色沉淀线，而二抗包被点处仍然显色，因而会出现假阳性结果。因此，为了避免出现假阳性，在硝酸纤维素膜上包被二抗和全抗原时，一定保证在适宜的干燥温度和时间内，使全抗原与硝酸纤维素膜牢固结合。在硝酸纤维素膜上包被全抗原时，需用封阻液对硝酸纤维素膜进行封闭。

如果封闭的效果不好，即使检测样本中有适量的呋喃唑酮存在，并结合了金标抗体的特异性位点，抗原-金标抗体复合物可能还会与全抗原上的非特异性位点结合，产生肉眼可见的两条红色沉淀线，此时出现的结果即为假阴性。因此，为了避免出现假阴性结果，一定要用高浓度蛋白的溶液进行足够长时间的封闭。

④装配免疫纳米金检测试纸条：将组装材料切割好后，把固定有二抗和全抗原的硝酸纤维素膜、金标玻璃纤维垫、样品玻璃纤维垫、双层吸水纸按顺序贴于双面胶支持板表面。制成 0.38 厘米宽，8.0 厘米长的试纸条。

将本发明制得的试纸条放置于带有加样孔及显示窗的轻薄型塑料盒中。最后把硅胶小包连同装有试纸条的塑料盒一并用聚四氟乙烯膜封包，并贴上标签，室温保存待用。装配金标垫时，注意一定要轻压，以免将胶体金中的成分压在硝酸纤维素膜上，使得测试结果不准确或测试失败。然后进行现场检测：

将处理好的待检样品 400 微升逐滴加入加样孔中，15 分钟内观察结果。测定结果如下：20 份猪肉样品中，有 14 份样品的试纸条观察孔中出现两条颜色深度大致相同的红色条带，即判定为阴性；4 份样品的试纸条观察孔中只在质控区出现一条红色条带，判定为阳性；有 2 份样品的检测线显著浅于控制线，判定为弱阳性。20 份饲料样品中，有 16 份样品的试纸条观察孔中出现两条颜色深度大致相同的红色条带，即判定为阴性；4 份样品的试纸条观察孔中只在质控区出现一条红色条带，判定为阳性。

用德国拜发生物技术有限公司的检测呋喃唑酮的 ELISA 试剂盒检测上述 20 份猪肉样品和饲料样品，操作过程按照试剂盒上的指导说明进行。检测结果表明，20 份猪肉样品中有 14 份样品的检测结果仍为 0ppt，有 4 份样品的检测值分别为 0.037ppm、0.046ppm、0.058ppm 及 0.079ppm；有两份样品的检测值为 4.730ppb、6.560ppb。检测时间为 6 小时。20 份饲料样品中有 16 份样品的检测结果仍为 0 ppt，其它份样品的检测值分别为 12.047ppm、8.125 ppm、22.378 ppm、16.327 ppm。当用高效液相色谱法检测时，20 份肉样中只有两份检测到呋喃唑酮，含量分别为 0.105ppm 及 0.092ppm；20 份饲料样品中，16 份样品的呋喃唑酮检测值仍为 0 ppm，有 4 份样品中呋喃唑酮的检测值为 9.052ppm、4.386ppm、15.378ppm、11.735ppm。

经对比性测试结果表明，本发明检测呋喃唑酮的准确率基本上与竞争性

ELISA 方法相吻合，假阳性率及假阴性率小于 0.15%，检测限可达到 0.2ppb，但检测时间远远小于 ELISA 测定时间且不需要特殊仪器。作为快速检测方法，检测灵敏度及检测下限显著优于高效液相色谱法。该方法操作简单、节省时间、显示结果直观、准确性及特异性高，是现场检测及筛选饲料及动物性产品呋喃唑酮的非常有效的工具。

#### 实施例二

① 合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的具体过程及鉴定这两种偶联物结合比的方法基本同实施例一。不同之处是在合成呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物时，呋喃唑酮的用量减少至 56.3 毫克。最终所获得的呋喃唑酮与过氧化氢酶的结合比为 25: 1。将此呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定在硝酸纤维素膜上进行免疫纳米金试纸条测试实验时，在未加测试样品呋喃唑酮的前提下，其显色程度与实施例一无统计学显著差异；但在加入待检样品呋喃唑酮后，检测的灵敏度要略高于实施例一的实施结果，但无统计学显著差异。

② 制备呋喃唑酮抗体及鉴定抗体特性的具体实施过程同实施例一。

③ 纳米金标呋喃唑酮抗体玻璃纤维垫的制备及硝酸纤维素膜上鼠抗兔 IgG 的抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的固定。在本次实施过程中制备纳米金溶液时，还原剂柠檬酸三钠的用量为 1.0 毫升，其它制备条件及检测条件同实施例一所述的方法及步骤。所制得的纳米金颗粒经电镜学观察后，确认其粒径为 23nm 左右，用该纳米金试剂包被抗体并作试纸条模拟测试时发现其在硝酸纤维素膜上层析速度显著优于 40nm 的纳米金试剂，悬浮稳定，但免疫反应性较差，显色条带清晰度不及实施例一的层析结果，即检测灵敏度显著下降和检测限增高。

玻璃纤维上吸附纳米金标记抗体：在此次实施过程中抗体的包被量为 1.0ng/ml，其它处理过程及检测过程同实施例一。在制备成试纸条后进行检测时发现控制线及检测线显色程度变得浅淡，且检测线条带轮廓也不清晰，容易判定成为假阳性结果。

在硝酸纤维素膜上固定鼠抗兔 IgG 与呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的具体实施方法基本同实施例一。不同之处是所用的鼠抗兔 IgG 的浓度为 0.1mg/ml，

点样量为 1 微升；呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的浓度为 0.15mg/ml，点样量为 0.5 微升。由这种纤维素膜制成的试纸条在检测时其检测灵敏度增强，但是重复性及稳定性不及实施例一所制得的试纸条。

④装配免疫纳米金检测试纸条及检测实施过程同实施例一。

在不同的参数条件下获得的实施效果已在上面几步操作过程中分别有阐述。经综合评判，该实施例的效果不及实施例一所达到的效果。

### 实施例三

① 合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的具体过程及鉴定这两种偶联物结合比的方法基本同实施例一。不同之处是在合成呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物时，呋喃唑酮的用量增加至 225.2 毫克。最终所获得的呋喃唑酮与过氧化氢酶的结合比为 82: 1。将此呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定在硝酸纤维素膜上进行免疫纳米金试纸条测试实验时，在未加测试样品呋喃唑酮的前提下，其显色程度显著浅于实施例一的效果；且在加入待检样品呋喃唑酮后，检测的灵敏度也显著下降，表明此次合成的呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物与抗体的免疫反应性不强，导致检测的准确度及灵敏度均显著下降。

② 制备呋喃唑酮抗体及鉴定抗体特性的具体实施过程同实施例一。

③ 纳米金标呋喃唑酮抗体玻璃纤维垫的制备及硝酸纤维素膜上鼠抗兔 IgG 的抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的固定。在本次实施过程中制备纳米金溶液时，还原剂柠檬酸三钠的用量为 0.25 毫升，其它制备条件及检测条件同实施例一所述的方法及步骤。所制得的纳米金溶液呈橙红色，但较为混浊。纳米金颗粒经电镜学观察后，发现颗粒直径大小非常不均一，平均粒径为 68nm 左右，用该纳米金试剂包被抗体并作试纸条模拟测试时发现其在硝酸纤维素膜上层析速度显著低于 40nm 的纳米金试剂，且悬浮不稳定，用这种纳米金试剂标记抗体后所制得的试纸条检测时易在硝酸纤维素膜上形成一条假层析带，干扰了检测结果的判定，出现了假阴性结果，同时检测的灵敏度和检测限显著下降。

玻璃纤维上吸附纳米金标记抗体：在此次实施过程中抗体的包被量为 0.1 $\mu$ g/ml，其它处理过程及检测过程同实施例一。在制备成试纸条后进行阴性对照检测时发现控制线及检测线显色非常深，检测线条带轮廓清晰；但当加入待

检样品呋喃唑酮后发现用这种方法所制得的试纸条的检测灵敏度下降，只能实现较大浓度如含呋喃唑酮 0.01ppm 以上的样品的检测。

在硝酸纤维素膜上固定鼠抗兔 IgG 与呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的具体实施方法基本同实施例一。不同之处是所用的鼠抗兔 IgG 的浓度为 10mg/ml，点样量为 1 微升；呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物的浓度为 15mg/ml，点样量为 0.5 微升。由这种纤维素膜制成的试纸条在检测时其重复性及稳定性要显著优于实施例一所制得的试纸条；但其检测灵敏度显著下降，检测限升高。

④装配免疫纳米金检测试纸条及检测实施过程同实施例一。

在不同的参数条件下获得的实施效果已在上面几步操作过程中分别有阐述。经综合评判，该实施例的效果不及实施例一所达到的效果。

由以上是实施例可以看出，虽然实施例二、三的实施效果不如实施例一，但是相对于现有技术，本发明利用免疫纳米金标记抗体技术检测呋喃唑酮的手段更加快速、灵敏，并能实现现场检测饲料及动物性产品（肉样或尿样）中的呋喃唑酮，克服了其它方法检测时需要特殊仪器和耗费时间及人力的缺点。

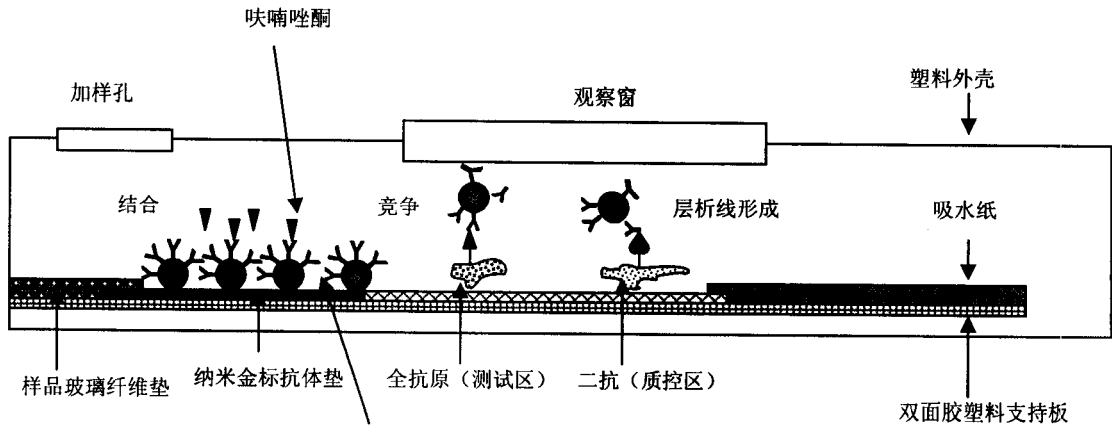


图 1

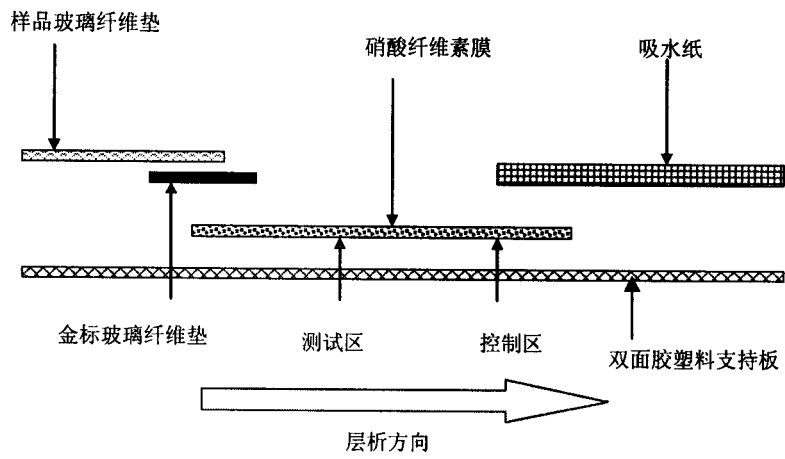


图 2

专利名称(译)	快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1793926A</a>	公开(公告)日	2006-06-28
申请号	CN200510111229.3	申请日	2005-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	柴春彦 刘国艳		
发明人	柴春彦 刘国艳		
IPC分类号	G01N33/532 G01N21/78 G01N33/558		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
其他公开文献	CN100401065C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测技术领域的快速检测呋喃唑酮的免疫纳米金试纸条的制备方法。具体为：合成呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物；将呋喃唑酮—牛血清白蛋白偶联物作为免疫全抗原，免疫实验家兔，获得兔抗呋喃唑酮的多克隆抗体并进行亲和层析纯化；制备纳米金试剂并用该试剂标记已纯化的兔抗呋喃唑酮抗体，将纳米金标记好的抗体用玻璃纤维垫吸附后，冷冻干燥待用；将鼠抗兔IgG抗体及呋喃唑酮—过氧化氢酶偶联物固定于硝酸纤维素膜上，并用封阻剂封闭未反应的活性基团；以双面胶聚乙烯塑料板为支持底板，将硝酸纤维素膜、金标抗体垫、吸水纸及样品垫组装成免疫纳米金试纸条。本发明快速、灵敏，能实现现场检测饲料及动物性产品中的呋喃唑酮。

