



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103439489 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201310333977. 0

第 3 段, 说明书第 6-8 页, 附图 1-3.

(22) 申请日 2013. 08. 03

CN 102866252 A, 2013. 01. 09, 权利要求 3.

(73) 专利权人 河南省农业科学院

CN 1566954 A, 2005. 01. 19, 第 9 页实施例 1.

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路 116 号

CN 102192983 A, 2011. 09. 21, 全文.

审查员 陈伟潘

(72) 发明人 张改平 王方雨 宋春美 职爱民 胡晓飞 赵东

(74) 专利代理机构 郑州金成知识产权事务所 (普通合伙) 41121

代理人 郭增欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1403815 A, 2003. 03. 19, 说明书第 8-9 页, 第 14 页第 3 段, 第 15 页第 1-2 段, 附图 1-4.

CN 101435823 A, 2009. 05. 20, 说明书第 5 页

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于庆大霉素定量检测的荧光二氧化硅标记的免疫层析试纸及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素免疫层析试纸及制备方法, 免疫层析试纸底层为支撑层, 中间层为吸附层, 保护层固定在吸附层上, 吸附层从测试端依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层, 在纤维素膜层上设有偶联庆大霉素的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹, 以及用羊抗小鼠 IgG、兔抗小鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 抗体溶液或金黄色葡萄球菌蛋白 A 溶液印制的隐形对照印迹; 荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成, 荧光抗体采用荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体制成。本发明的免疫层析试纸简便、快速, 实现了庆大霉素的灵敏、快速的现场检测, 适用范围广, 检测成本低, 易于推广应用。



1. 一种用于庆大霉素定量检测的荧光二氧化硅标记的免疫层析试纸, 底层为支撑层, 中间层为吸附层, 保护层固定在吸附层上, 吸附层从测试端依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层, 其特征在于: 在纤维素膜层上设有偶联庆大霉素的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹, 以及用羊抗小鼠 IgG、兔抗小鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 抗体溶液或金黄色葡萄球菌蛋白 A 溶液印制的隐形对照印迹; 所述荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成, 荧光抗体采用荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体制成;

所述荧光二氧化硅纳米颗粒的粒径为 50-100nm;

所述荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体是以下方法制备的:

将 1g 二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中, 加入 0.3-1mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷, 回流 12-24h; 回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min, 将得到的沉淀用无水乙醇洗涤, 再将沉淀分散在无水乙醇中, 得到氨基化的二氧化硅纳米颗粒;

将庆大霉素抗体置于 2-8℃、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中, 透析 8-12h; 将氨基化的荧光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min, 用所述 CBS 缓冲液洗涤, 然后与透析后的庆大霉素抗体混合均匀, 于 2-8℃反应过夜, 得到荧光二氧化硅的抗体复合物; 向所得的抗体复合物中按 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液, 混匀, 2-8℃反应 8-12h; 用质量浓度为 2% 的 BSA 溶液封闭过夜, 10000-13000rpm 离心 4-8min, 得沉淀; 将沉淀用 0.5mL 浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤, 得到所述的荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体, 于 4℃保存, 备用。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 所述吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成; 吸水材料层用吸水滤纸, 支撑层用不吸水的韧性材料制成; 纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成; 偶联庆大霉素的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 所述隐形检测印迹和隐形对照印迹为平行排列的“||”直线式印迹、“十十”字型排列印迹、“T T”字型排列印迹、“┌ ┐”字型排列印迹、“└ ┘”字型排列印迹或“+ +”字型排列印迹。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸, 其特征是: 所述保护层为覆盖在吸附纤维层、荧光抗体纤维层及吸水材料层上的保护膜; 在吸附纤维层与荧光抗体纤维层交界处对应的保护膜上印制有样品标记线, 该样品标记线偏向吸附纤维层一侧 0.3-0.7cm。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的免疫层析试纸, 其特征是: 所述荧光二氧化硅纳米颗粒采用以下方法制备:

将 47mmol 氨丙基三乙氧基硅、7.1 mmol BHHCT 及 3.55mmol  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  加入 30  $\mu\text{L}$  环己烷中, 超声振荡反应 15 分钟后, 反应液加入到含有 1.1 mL 水、4.74 g Triton X-100、3.64 g 正辛醇及 14.50 g 环己烷的 W/O 型微乳液中, 搅拌 0.5 小时后, 加入 200  $\mu\text{L}$  的四乙氧基硅烷和 200  $\mu\text{L}$  的浓氨水, 室温搅拌反应 24 小时后, 加入 40 mL 丙酮结束反应, 将反应液离心后除去上清液, 沉淀部分用乙醇和双蒸水分别洗三次, 得到所述的荧光二氧化硅纳米颗粒, 悬浮于水中备用。

6. 权利要求 1 所述免疫层析试纸的制备方法, 其特征是: 该方法包括以下步骤:

(1) 庆大霉素单克隆抗体或多克隆抗体的制备;

(2) 荧光抗体纤维层的制备 : 包括荧光二氧化硅纳米颗粒制备、庆大霉素抗体的标记和纤维层的制备 ;

(3) 吸附纤维层的制备 : 吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成 ;

(4) 纤维素膜层的制备 : 纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜, 用点样仪在纤维素膜层的不同位置分别喷点检测印迹和对照印迹, 烘干 ;

(5) 免疫层析试纸的组装 : 将吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维素膜层、吸水材料层从左至右依次贴在带有粘合剂的支撑层上, 依次将支撑层、吸附层和保护层组装成免疫层析试纸。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于 : 所述荧光二氧化硅纳米颗粒是采用以下方法制备的 :

将 47mmol 氨丙基三乙氧基硅、7.1 mmol BHHCT 及 3.55mmol  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  加入 30  $\mu\text{L}$  环己烷中, 超声振荡反应 15 分钟后, 反应液加入到含有 1.1 mL 水、4.74 g Triton X-100、3.64 g 正辛醇及 14.50 g 环己烷的 W/O 型微乳液中, 搅拌 0.5 小时后, 加入 200  $\mu\text{L}$  的四乙氧基硅烷和 200  $\mu\text{L}$  的浓氨水, 室温搅拌反应 24 小时后, 加入 40 mL 丙酮结束反应, 将反应液离心后除去上清液, 沉淀部分用乙醇和双蒸水分别洗三次, 得到所述的荧光二氧化硅纳米颗粒, 悬浮于水中备用。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的制备方法, 其特征在于 : 所述荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体是由以下方法的 :

将 1g 二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中, 加入 0.3-1mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷, 回流 12-24h ; 回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min, 将得到的沉淀用无水乙醇洗涤, 再将沉淀分散在无水乙醇中, 得到氨基化的二氧化硅纳米颗粒 ;

将庆大霉素抗体置于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中, 透析 8-12h ; 将氨基化的荧光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min, 用所述 CBS 缓冲液洗涤, 然后与透析后的庆大霉素抗体混合均匀, 于 2-8 $^{\circ}\text{C}$  反应过夜, 得到荧光二氧化硅的抗体复合物 ; 向所得的抗体复合物中按 1 : 50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液, 混匀, 2-8 $^{\circ}\text{C}$  反应 8-12h ; 用质量浓度为 2% 的 BSA 溶液封闭过夜, 10000-13000rpm 离心 4-8min, 得沉淀 ; 将沉淀用 0.5mL 浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤后, 得到所述的荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  保存, 备用。

## 用于庆大霉素定量检测的荧光二氧化硅标记的免疫层析试纸及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试纸,特别是涉及一种基于荧光二氧化硅纳米颗粒的用于定量检测庆大霉素的免疫层析试纸及制备方法。

### 背景技术

[0002] 庆大霉素(Gentamicin, GM)是氨基糖苷类抗生素的一种,主要作用于革兰氏阴性细菌,由于其抗菌谱广、疗效佳且价格低廉而广泛应用于兽医临床,对奶牛乳房炎、子宫内膜炎等有很好疗效,也作为饲料药物添加剂使用于配合饲料中。不规范用药会引起畜产品尤其是泌乳动物的乳汁中有药物残留,对人类的健康构成潜在危害,造成耳毒性和肾脏毒性。国内外相继规定了庆大霉素在动物性食品中的最高残留限量,中华人民共和国农业部2002年发布的《动物性食品中兽药最高残留量》中规定,动物性食品中GM的最大残留量MRL为 $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,因此亟待加强GM的残留检测方法研究,从而为GM的监控提供可靠手段,为人民的食品安全提供保障。

[0003] 目前国内外关于庆大霉素等残留的检测方法主要有微生物法、仪器分析和免疫分析标记技术三种。微生物法虽然原理简单,操作方便,但测定所需的时间太长,灵敏度不高。检测庆大霉素残留的理化方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、质谱法(MS)和气相色谱法等,虽然这些方法比较灵敏、精确,但由于花费大、时间长、技术要求高等原因而不适合大批量样品的筛选。免疫分析标记技术作为一种快速、特异和灵敏度较高的检测技术正逐步被应用于小分子药物残留的检测。

[0004] 免疫分析标记技术是指以抗原抗体间的特异性反应为基础,通过标记物对某种物质进行定性或定量检测的研究。标记免疫分析一般是将酶、荧光素、放射性核素等标记物对抗体或抗原进行标记,这种标记物保持了抗体或抗原的活性,不影响标记物的活性,当它与相应抗体或抗原反应后,可以直接测定复合物中的标记物,直接对目标物质进行定量分析。通过标记物的信号放大作用,可以提高免疫分析的敏感性。因此,亟待加强该方面的研究和探讨。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题:提供一种用荧光二氧化硅纳米颗粒为标记的检测庆大霉素免疫层析试纸及其制备方法,该层析试纸具有特异、灵敏、快速、简便、能定量检测微量庆大霉素的特点。

[0006] 本发明的技术方案:

[0007] 一种用于庆大霉素定量检测的荧光二氧化硅标记的免疫层析试纸,底层为支撑层,中间层为吸附层,保护层固定在吸附层上,吸附层从测试端依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层,在纤维素膜层上设有用偶联庆大霉素的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹,以及用羊抗小鼠 IgG、兔抗小鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 抗体溶

液或金黄色葡萄球菌蛋白 A 溶液印制的隐形对照印迹 ;所述荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成,荧光抗体采用荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体制成。

[0008] 所述荧光二氧化硅纳米颗粒的粒径为 50-100nm。

[0009] 所述荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体是以下方法制备的 :

[0010] 将 1g 二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,回流 12-24h ;回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,将得到的沉淀用无水乙醇洗涤,再将沉淀分散在无水乙醇中,得到氨基化的二氧化硅纳米颗粒 ;

[0011] 将庆大霉素抗体置于 2-8℃、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中,透析 8-12h ;将氨基化的荧光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,用所述 CBS 缓冲液洗涤,然后与透析后的庆大霉素抗体混合均匀,于 2-8℃ 反应过夜,得到荧光二氧化硅的抗体复合物 ;向所得的抗体复合物中按 1 :50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8℃ 反应 8-12h ;用质量浓度为 2% 的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min,得沉淀 ;将沉淀用 0.5mL 浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤,得到所述的荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体,于 4℃ 保存,备用。

[0012] 所述吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成 ;吸水材料层用吸水滤纸,支撑层用不吸水的韧性材料制成 ;纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成 ;偶联庆大霉素的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

[0013] 所述隐形检测印迹和隐形对照印迹为平行排列的“||”直线式印迹、“十十”字型排列印迹、“— —”字型排列印迹、“— —”字型排列印迹、“| |”字型排列印迹或“— —”字型排列印迹。

[0014] 所述保护层为覆盖在吸附纤维层、荧光抗体纤维层及吸水材料层上的保护膜 ;在吸附纤维层与荧光抗体纤维层交界处对应的保护膜上印制有样品标记线,该样品标记线偏向吸附纤维层一侧 0.3-0.7cm。

[0015] 所述荧光二氧化硅纳米颗粒采用以下方法制备 :

[0016] 将 47mmol 氨丙基三乙氧基硅、7.1 mmol BHHCT 及 3.55mmol  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  加入 30  $\mu\text{L}$  环己烷中,超声振荡反应 15 分钟后,反应液加入到含有 1.1 mL 水、4.74 g Triton X-100、3.64 g 正辛醇及 14.50 g 环己烷的 W/O 型微乳液中,搅拌 0.5 小时后,加入 200  $\mu\text{L}$  的四乙氧基硅烷和 200  $\mu\text{L}$  的浓氨水,室温搅拌反应 24 小时后,加入 40 mL 丙酮结束反应,将反应液离心后除去上清液,沉淀部分用乙醇和双蒸水分别洗三次,得到所述的荧光二氧化硅纳米颗粒,悬浮于水中备用。

[0017] 所述免疫层析试纸的制备方法,包括以下步骤 :

[0018] (1) 庆大霉素单克隆抗体或多克隆抗体的制备 ;

[0019] (2) 荧光抗体纤维层的制备 :包括荧光二氧化硅纳米颗粒制备、庆大霉素抗体的标记和纤维层的制备 ;

[0020] (3) 吸附纤维层的制备 :吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成 ;

[0021] (4) 纤维素膜层的制备 :纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜,用点样仪在纤维素膜层的不同位置分别喷点检测印迹和对照印迹,烘干 ;

[0022] (5)免疫层析试纸的组装:将吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维素膜层、吸水材料层从左至右依次贴在带有粘合剂的支撑层上,依次将支撑层、吸附层和保护层组装成免疫层析试纸。

[0023] 本发明的免疫层析试纸具有以下优点:

[0024] (1)特异性强,灵敏度高。本发明的免疫层析试纸将高灵敏的荧光二氧化硅纳米颗粒与免疫层析技术相结合,荧光二氧化硅纳米颗粒无需包裹任何荧光材料便可自行发光,且荧光寿命长,制作成本低、光稳定性强,能获得比普通荧光检测更高的灵敏度。免疫层析试纸既保持了传统胶体金试纸条简便快速的优点,又克服了后者灵敏度低、无法定量的缺点,检测灵敏度更高、更稳定,最低可检测到匹克级的痕量残留。

[0025] (2)简便、快速。免疫层析试纸可对全血、尿液、唾液、组织匀浆等直接检测,无须进行样品的预处理;检测时只需将试纸插入被检样品 10 ~ 20 秒,5 分钟后放入荧光读条仪即可判定检测结果,可现场操作,省时省力,操作简便,一步完成。通过荧光读条仪直接读值,实现定量检测。

[0026] (3)节省费用。该免疫层析试纸检测时无需另配仪器设备和其它试剂,可随时随地进行检测,既能定性检测又能定量检测;检测费用低廉,能节省大量贵重仪器和设备投入费用。

[0027] (4)适用范围广,便于推广应用。该免疫层析试纸能满足不同层次人员的需要,包括专业化验、海关检疫、卫生检疫、质量监测、畜产品加工、养殖户以及消费者个人等,既适于单个样品的检测,又适于大量样品的筛查,能应用于疾病诊断、毒品检测、细菌检测和环境检测等领域。本发明在保障食品安全、保护消费者健康方面具有极其重要意义,具有明显的经济效益和社会效益。

[0028] (5)本发明制备荧光二氧化硅纳米颗粒的工艺简单可行,易于操作。以荧光二氧化硅纳米颗粒标记庆大霉素抗体时,只需将氨基化的荧光二氧化硅纳米颗粒与抗体直接偶联,方法易行可控,通过调节荧光二氧化硅与抗体的摩尔比控制偶联率,从而有效提高基于荧光二氧化硅纳米颗粒标记的侧流层析免疫试纸的灵敏度。

## 附图说明

[0029] 图 1 为本发明中荧光二氧化硅纳米颗粒的 TEM 表征图;

[0030] 从图 1 可知,荧光二氧化硅纳米颗粒的形态均一、大小一致,呈单分散状,这有利于标记抗体,为其作为探针用于侧流层析免疫试纸奠定基础。图中颗粒粒径为  $50 \pm 5\text{nm}$ 。

[0031] 图 2 为本发明的免疫层析试纸的结构示意图;

[0032] 图 3 为图 1 的免疫层析试纸的侧面结构示意图;

[0033] 图 4 为本发明的免疫层析试纸对庆大霉素的回归曲线图;

[0034] 图 5 为本发明所使用的荧光读条仪。

[0035] 图中,1 为支撑层,2 为吸附纤维层,3 为荧光抗体纤维层,4 为纤维素膜层,5 为吸水材料层,6 为隐形检测印迹,7 为隐形对照印迹,8-1 为样品端保护膜,8-2 为手柄端保护膜,9 为样品标记线。

## 具体实施方式

[0036] 用于庆大霉素定量检测的荧光二氧化硅标记的免疫层析试纸试纸的制备,

[0037] 其过程包括:庆大霉素单克隆或多克隆抗体的制备、荧光抗体纤维层的制备、吸附纤维层的制备、纤维素膜层的制备和试纸组装等步骤。

[0038] (1) 抗庆大霉素单克隆抗体或多克隆抗体的制备

[0039] 单抗制备:以 50 $\mu$ g ~ 100 $\mu$ g/ 只的庆大霉素载体蛋白偶联物免疫 6 ~ 8 周龄 Balb/C 小鼠 3 ~ 4 次,每次免疫间隔时间 3 ~ 5 周,确定抗体效价符合要求后超强免疫,之后 3 ~ 4 天,将免疫小鼠眶下窦采血,分离阳性血清;脱颈致死,用 75% 的酒精浸泡小鼠 5 ~ 10min 消毒体表,无菌取其脾脏,将脾脏剪碎并研磨,经 120 目尼龙纱布过滤,1000rpm 离心 10min,收集脾细胞。将  $1 \times 10^8$  的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合,1000rpm 离心 10min,弃上清,细胞沉淀物于 37 $^{\circ}$ C 水浴中缓缓加入 0.7 ~ 1.0 mL GM 的 50%PEG4000,作用 1min,然后缓缓加入无血清 1640 培养基 15 mL,以终止 PEG 的作用,37 $^{\circ}$ C 水浴 5 ~ 10 min,1000rpm 离心 10min,弃上清,将细胞沉淀物重悬于 HAT 选择培养基中,并加入 96 孔细胞培养板孔 (100 $\mu$ L ~ 200 $\mu$ L/ 孔),置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养 10 ~ 14 天,用间接 ELISA 法进行阳性孔筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化,而后扩大培养,建立杂交瘤细胞株。所制备的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体可特异地与庆大霉素反应,亲和力常数达到  $10^{10}$  ~  $10^{12}$ ,轻链亚型为  $\kappa$  或  $\lambda$ ,重链亚型为 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>,针对庆大霉素特异抗原决定簇的单克隆抗体,用于荧光二氧化硅纳米颗粒的标记。

[0040] 多抗制备:用庆大霉素载体蛋白偶联物免疫新西兰白兔,免疫剂量为 200 $\mu$ g ~ 500 $\mu$ g/ 次,背部皮下分 4 ~ 6 点注射。首免,用无菌 PBS 溶解庆大霉素载体蛋白偶联物,与等量 FCA 混合,充分乳化;加强免疫,用无菌 PBS 溶解庆大霉素载体蛋白偶联物,与等量 FIA 混合,充分乳化,首免后 2 ~ 3 周进行连续免疫 4 ~ 5 次,每次间隔 2 ~ 3 周,最后一次免疫后 10 ~ 15 天,以 ELISA 法测其定效价达到  $10^5$  以上时,采血并分离收集高免血清。以饱和硫酸铵盐析法提取 IgG 抗体,即取 1 份高免血清加 2 份 PBS (pH7.2)混匀,加等体积饱和硫酸铵溶液混匀,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 12h,4 $^{\circ}$ C、2500rpm 离心 15min,弃上清;再以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵溶液至终浓度 33%,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 2h,4 $^{\circ}$ C、2500rpm 离心 15min,弃上清;以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内用 PBS (pH7.2)透析 48 ~ 72h,中间换液数次,4 $^{\circ}$ C、12000rpm 离心 15min,收集上清,得纯化的抗庆大霉素多克隆抗体,-20 $^{\circ}$ C 冻存,用于荧光二氧化硅纳米颗粒的标记。

[0041] (2) 荧光抗体纤维层的制备

[0042] a. 荧光二氧化硅纳米颗粒的制备

[0043] 将 47mmol 氨丙基三乙氧基硅 (APTS),7.1 mmol BHHCT (4,4-bis(1",1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanedion-6"-yl)-chlorosulfo-ortho-terphenyl,分子式 C<sub>30</sub>H<sub>15</sub>ClF<sub>14</sub>O<sub>6</sub>S,分子量 804.93) 及 3.55mmol EuCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O 加入 30  $\mu$ L 环己烷中,超声振荡反应 15 分钟后,反应液加入到含有 1.1 mL 水、4.74 g Triton X-100、3.64 g 正辛醇及 14.50 g 环己烷的 W/O 型微乳液中,搅拌 0.5 小时后,加入 200  $\mu$ L 的 TEOS (四乙氧基硅烷)和 200  $\mu$ L 的浓氨水,室温搅拌反应 24 小时后,加入 40 mL 丙酮结束反应。将反应液离心后除去上清液,沉淀部分用乙醇和双蒸水分别洗三次后悬浮于水中备用。得到的二氧化硅纳米颗粒参见图 1。

[0044] b. 抗庆大霉素单克隆抗体的标记

[0045] 将 1g 二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,回流 12-24h;回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,将得到的沉淀用无水乙醇洗涤,再将沉淀分散在无水乙醇中,得到氨基化的二氧化硅纳米颗粒;

[0046] 将庆大霉素抗体置于 2-8℃、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中,透析 8-12h;将氨基化的荧光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,

[0047] 用 CBS 缓冲溶液洗涤,然后与透析的庆大霉素抗体混合均匀,在 2-8℃反应,过夜,得到荧光二氧化硅的抗体复合物;向抗体复合物中按抗体复合物与氰基硼氢化钠溶液 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8℃反应 8-12h;用质量浓度 2%的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min 得沉淀;将沉淀用 0.5mL 的 Tris-HCL 缓冲液(0.01-0.02mol/L, pH7.8)洗涤,4℃保存,备用。

[0048] c. 荧光抗体纤维层的制备

[0049] 将制备好的荧光二氧化硅-抗体复合物用含有 2% 酪蛋白的 10mM Tris pH 7.8 缓冲液稀释 100-1000 倍,然后将作为标记物垫的玻璃纤维浸入其中,以浸湿为准,然后冻干,备用。或将稀释后的荧光二氧化硅-抗体复合物在检测前以 0.5-1.5 μL 的量滴加到荧光抗体纤维层中。(单位 mM 表示 mmol/L)

[0050] (3) 吸附纤维层的制备

[0051] 测试端吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯 PVDF 膜或聚酯膜制备,将纤维材料剪成宽 1.5cm 的条带,将其放入样品垫封闭液中浸泡 30min,于 37℃烘干,备用。

[0052] (4) 纤维素膜层的制备

[0053] 纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜,剪切成宽 1.5cm 规格的条带,用点样仪在纤维素膜上不同位置分别喷点 GM 抗原和羊抗小鼠 IgG 抗体(或兔抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG 抗体),制作隐形检测印迹带和对照印迹带,于 37℃烘干备用。

[0054] (5) 羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体的制备,或 SPA 溶液的配制。

[0055] 以饱和硫酸铵提取庆大霉素阴性小鼠血清 IgG (或阴性兔血清 IgG),即取 1 份小鼠血清(或兔血清)加 2 份 PBS (pH7.2) 混匀,加等体积饱和硫酸铵溶液混匀,置 4℃冰箱 12h,4℃、2500rpm 离心 15min,弃上清,再以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵溶液至终浓度 33%,置 4℃冰箱 2h,4℃、2500rpm 离心 15min,弃上清,以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,置 4℃冰箱内用 PBS (pH7.2)透析 48h,中间换液 3 次,4℃、12000rpm 离心 15min,收集上清,以紫外分光光度计测定其蛋白浓度,以 50μg ~ 100μg/kg 体重的小鼠血清(或兔血清)IgG 经皮下和肌肉注射健康山羊或家兔 3 ~ 4 次,末次注射 10 天后,以 ELISA 测定其血清效价达到 1:2000 以上时,心脏或动脉采血,分离收集高免血清,以饱和硫酸铵提取羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG)抗体(方法与提取小鼠血清 IgG 相同,不再重述),用于庆大霉素检测试纸对照印迹的制备。

[0056] 金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA)溶液的配制:配置适合浓度的 SPA 水溶液,用于庆大霉素检测试纸对照印迹的制备。

[0057] (6) 本发明的免疫层析试纸的检测反应原理:

[0058] 当检测 GM 试纸测试端插入待测样品溶液后,待测溶液通过虹吸作用带动待测 GM 及荧光抗体玻璃纤维棉中的荧光抗体一起向纤维素膜层扩散,并最终渗入手柄端的吸水材料层。在扩散过程中,待测 GM 可与荧光抗体相结合,进而封闭荧光抗体上 GM 的抗原结合点,

阻止荧光抗体与纤维素膜上的人工抗原的检测印迹结合不能显示检测印迹,而羊或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体或 SPA 溶液则可与荧光抗体结合,在紫外线激发下形成红色对照印迹带“|”,即一条红色带“|”印迹为阳性表示,使用荧光读条仪可读出 C 线的吸收峰;反之样品溶液中无 GM 时,则不能阻止荧光抗体与纤维素膜上的 GM 人工抗原检测印迹结合,显示红色检测印迹带“|”,同样羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体也与金标抗体结合,显示红色对照印迹带“|”,形成两条红色带“||”为阴性表示,使用荧光读条仪可读出 T 线、C 线的吸收峰。如果纤维素膜上没有任何红色带显示,荧光读条仪会显示 T 线、C 线均无吸收峰,则表明试纸已失效。

[0059] 以下实施例具体说明试纸的结构和检测方法。

[0060] 实施例一:参见图 2、图 3。图中支撑层 1 用塑胶薄片条制成,吸附纤维层 2 用玻璃纤维棉制成,荧光抗体纤维层 3 上吸附有抗 GM 单克隆抗体的荧光抗体玻璃纤维棉,纤维素膜层 4 采用硝酸纤维素膜,手柄端的吸水材料层 5 用吸水滤纸制成,将吸附纤维层 2、荧光抗体纤维层 3、纤维素膜层 4、吸水材料层 5 各层从左至右粘贴固定在支撑层 1 上,各层彼此之间交界处的纤维互相交叉渗透。在纤维素膜层 4 上设有隐形检测印迹 6,用偶联 GM 的牛血清白蛋白溶液 (BSA) 制成;隐形对照印迹 7 用羊抗抗体溶液在纤维素膜上印迹制成“|”,两条印迹带平行排列,形成组合印迹带“||”。

[0061] 8-1 为覆盖在吸附纤维层 2 和荧光抗体纤维层 3 上面的样品端保护膜(白色),8-2 为覆盖在吸水材料层 5 上面的其它颜色手柄端保护膜(如黄色),9 为样品标记线,该标记线位于吸附纤维层 2 与荧光抗体纤维层 3 交界处对应的白色保护膜偏向吸附纤维层 2 一侧约 0.5cm 处,在标记线右侧保护膜上印有箭头及 max 字样。

[0062] 检测肉样:将样品剪碎、磨细,以生理盐水稀释成 1:5 的待测样品悬液。

[0063] 操作方法:将检测 GM 试纸样品端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,约 10 秒钟取出试纸,5min 后放入荧光读条仪直接读取结果。本发明所使用的荧光读条仪见图 5,为现有仪器。

[0064] 实施例二:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:荧光抗体纤维层吸附有抗 GM 的多克隆抗体,吸附纤维层用尼龙膜制成,纤维素膜层采用纯纤维素膜,隐形检测印迹和隐形对照印迹均为“十”,覆盖在吸水材料层上面的手柄端保护膜为兰色。

[0065] 用于检测奶样:用生理盐水将奶样稀释制成 1:2 ~ 1:5 的待测样品悬液。

[0066] 操作方法:将检测 GM 试纸样品端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,约 10 秒钟取出试纸,5min 后放入荧光读条仪直接读取结果。

[0067] 实施例三:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:吸附纤维层用聚偏二氟乙烯 PVDF 膜制成,偶联 GM 的载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白 (OVA),隐形对照印迹用兔抗小鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上制成,纤维素膜层采用羧化纤维素膜,覆盖在吸水材料层上面的手柄端保护膜为绿色,隐形检测印迹带和隐形对照印迹带均为“┣”。

[0068] 用于检测血样:提取血清并用生理盐水将其稀释制成 1:2 ~ 10 的待测样品。结果判定和操作方法均同实施例一,不重述。

[0069] 实施例四:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:吸附纤维层用聚酯膜制成,纤维素膜层采用羧化纤维素膜,隐形检测印迹中偶联 GM 的载体蛋白溶液为血蓝蛋白 (KLH)。

[0070] 用于检测尿样,可直接取尿液作为待测样品;检测印迹带和对照印迹带均为“—”。操作方法和结果判定方法同例一。

[0071] 实施例五:试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:隐形对照印迹用羊抗兔 IgG 抗体溶液在纤维素膜上制成,吸附纤维层用尼龙膜制成。检测印迹带和对照印迹带均为“—”。检测样品、结果判定和操作方法同例一。

[0072] 实施例六:和实施例一基本相同,不同之处在于:荧光抗体纤维层吸附有抗 GM 的多克隆抗体,检测样品为奶样;检测印迹带和对照印迹带均为“—”。

[0073] 实施例七:和实施例一基本相同,不同之处在于:荧光抗体纤维层吸附有抗 GM 的多克隆抗体,检测样品为血样。

[0074] 实施例八:和实施例一基本相同,不同之处在于:荧光抗体纤维层吸附有抗 GM 多克隆抗体,检测样品为尿样。

[0075] 实施例九:和实施例一基本相同,不同之处在于:隐形检测印迹中偶联 GM 载体蛋白溶液为血蓝蛋白(KLH)。

[0076] 实施例十:和实施例一基本相同,不同之处在于:隐形检测印迹中偶联 GM 载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白(OVA)。

[0077] 实施例十一:本发明试纸的灵敏性、特异性检测

[0078] 1、灵敏性的检测:用磷酸盐缓冲溶液 PBS (pH7.4)或双蒸水分别配置浓度为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0ng/mL 的 GM 标准品,在本发明的试纸上上样 80-100 $\mu$ L,5min 后放入荧光读条仪直接读取峰图。以峰值或峰面积为纵坐标,以不同 GM 浓度的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,进行相关回归分析,计算该试纸对 GM 的 IC<sub>50</sub>和最低检测限。经测定,该试纸对 GM 的曲线回归方程为: $y = -1153.8x + 2935.5$ ,相关系数为  $R^2 = 0.9927$ ,根据回归方程计算出该试纸对 GM 的 IC<sub>50</sub>为 475.88pg/mL,该试纸最低检测限为 143.71pg/mL。可见,该免疫层析试纸对 GM 具有较高的灵敏度。回归曲线参见图 4。

[0079] 2、特异性的检测:以 GM 的同类药物新霉素、链霉素、卡那霉素、氯霉素、土霉素、四环素、氨苄青霉素作为竞争物,配置上述标品的浓度为 1mg/mL,用本发明的免疫层析试纸检测其抑制率,以该试纸对 GM 的 IC<sub>50</sub>与各竞争物的 IC<sub>50</sub>的百分比为其交叉反应率。

[0080] 测定结果见下表 1。可看出,该免疫层析试纸的特异性较好,与其他药物均无交叉反应。

[0081] 表 1 庆大霉素免疫层析试纸的交叉反应性

[0082]

化合物	半数抑制浓度 IC <sub>50</sub> (pg/mL)	交叉反应性(%)
庆大霉素	475.88	100
新霉素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048
链霉素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048
卡那霉素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048
氯霉素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048
土霉素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048
四环素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048
氨苄青霉素	> 1.0×10 <sup>6</sup>	< 0.048

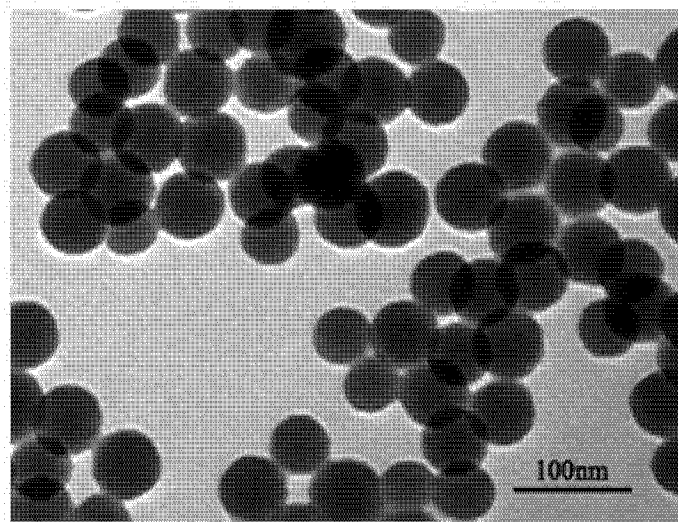


图 1

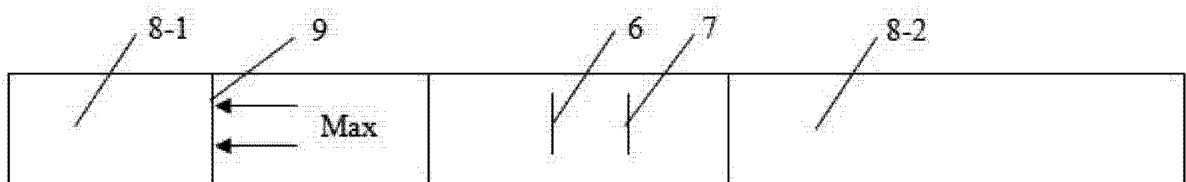


图 2

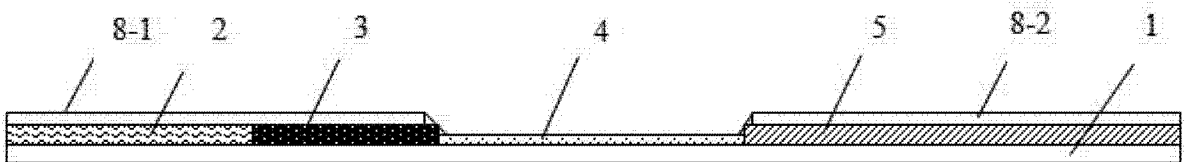


图 3

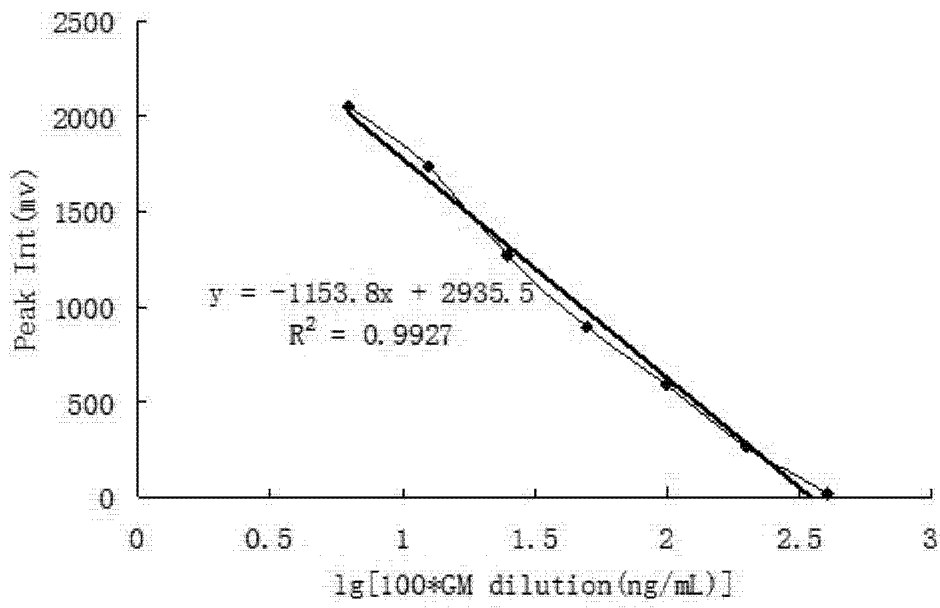


图 4

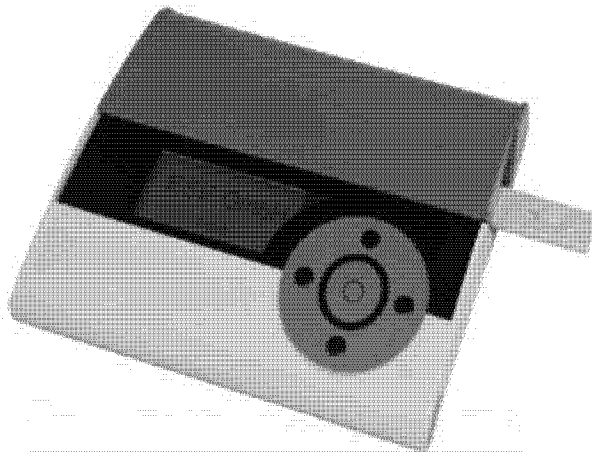


图 5

专利名称(译)	用于庆大霉素定量检测的荧光二氧化硅标记的免疫层析试纸及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103439489B</a>	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201310333977.0	申请日	2013-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	张改平 王方雨 宋春美 职爱民 胡晓飞 赵东		
发明人	张改平 王方雨 宋春美 职爱民 胡晓飞 赵东		
IPC分类号	G01N33/533		
其他公开文献	CN103439489A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素免疫层析试纸及制备方法，免疫层析试纸底层为支撑层，中间层为吸附层，保护层固定在吸附层上，吸附层从测试端依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层，在纤维素膜层上设有用偶联庆大霉素的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹，以及用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液或金黄色葡萄球菌蛋白A溶液印制的隐形对照印迹；荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成，荧光抗体采用荧光二氧化硅纳米颗粒标记的庆大霉素抗体制成。本发明的免疫层析试纸简便、快速，实现了庆大霉素的灵敏、快速的现场检测，适用范围广，检测成本低，易于推广应用。

