



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107247140 A

(43)申请公布日 2017.10.13

(21)申请号 201710351732.9

(22)申请日 2017.05.18

(71)申请人 深圳市三方圆生物科技有限公司
地址 518110 广东省深圳市龙华新区观澜街道观湖南大富社区虎地排119号锦绣大地9号楼5层

(72)发明人 钟松清 谭攀 孙晶玮 王军亮

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务有限公司 44205

代理人 唐致明

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

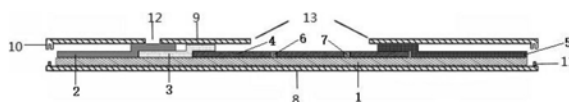
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用,检测卡包括垫板、附于所述垫板上且依次紧密相连的样品垫、耦联物垫、反应膜和吸水垫,耦联物垫上荧光微球标记的氯霉素抗体,反应膜上设有检测线和质控线,检测线靠近耦联物垫,质控线靠近吸水垫,检测线上包被有氯霉素抗原,质控线上包被有识别氯霉素抗体的二抗;其制备方法包括制备样品垫、制备耦联物垫、制备反应膜、制备吸水垫、组装的步骤;将待测定样品加到样品垫上,进行免疫反应,然后将测定氯霉素的免疫荧光检测卡置于荧光读卡仪上,对荧光信号的强度进行读取,即可得到检测结果;该检测卡检测氯霉素使用快速方便,且灵敏度很高,可以达到0.05ng/mL。



1. 一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡,包括垫板,其特征在于,还包括附于所述垫板上且依次紧密相连的样品垫、耦联物垫、反应膜和吸水垫,所述耦联物垫上荧光微球标记的氯霉素抗体,所述反应膜上设有检测线和质控线,所述检测线靠近所述耦联物垫,所述质控线靠近所述吸水垫,所述检测线上包被有氯霉素抗原,所述质控线上包被有识别氯霉素抗体的二抗。

2. 根据权利要求1所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡,其特征在于,所述免疫荧光检测卡还包括上外壳和下外壳,所述上外壳盖于所述样品垫、所述耦联物垫、所述反应膜和所述吸水垫上方,所述下外壳设于所述垫板的下方,所述上外壳和所述下外壳相互盖合,所述上外壳在对应所述样品垫的位置开设有加样孔,所述上外壳在对应所述反应膜的位置设有观察窗。

3. 一种如权利要求1或2所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

制备样品垫;

制备耦联物垫:裁剪耦联物垫膜,取荧光微球标记的氯霉素抗体喷涂在所述膜上,干燥;

制备反应膜:取反应膜,在所述反应膜上喷涂氯霉素抗原溶液,形成检测线,在所述反应膜上喷涂识别氯霉素抗体的二抗溶液,形成质控线;

组装检测卡:取吸水垫和垫板,在所述垫板上依次搭接粘贴所述样品垫、所述耦联物垫、所述反应膜和所述吸水垫。

4. 根据权利要求3所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,其特征在于,所述荧光微球标记的氯霉素抗体的制备方法包括以下步骤:

(1) 荧光微球活化:将待活化的荧光微球加入缓冲液中,洗涤,固液分离,弃去上清液,收集固体物质复溶于缓冲液中,向所述缓冲液中加入N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,振荡反应,固液分离,收集固体物质并溶解于PB缓冲液中,得到荧光微球溶液;

(2) 抗体标记:取氯霉素抗体溶于PBS缓冲液中,并将其加入所述荧光微球溶液中,振荡反应一段时间,加入乙醇胺振荡反应一段时间,再加入牛血清白蛋白溶液,封闭反应一段时间,固液分离,收集固体物质用PB缓冲液重新悬浮,得到荧光微球标记的氯霉素抗体。

5. 根据权利要求4所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,其特征在于,所述氯霉素抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为抗原获得。

6. 根据权利要求5所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,其特征在于,所述氯霉素半抗原的制备包括以下步骤:称取氯霉素、琥珀酸酐,加入丙酮、吡啶,加热回流,薄层层析检测确认产物,去除丙酮,加水,调节pH至8-10,采用乙酸乙酯萃取,去除乙酸乙酯层,水相调节pH至酸性,采用异丁醇萃取,洗涤有机相,干燥,浓缩,得到氯霉素半抗原。

7. 根据权利要求5所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白。

8. 根据权利要求4-7任一项所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,其特征在于,所述氯霉素抗体的制备包括以下步骤:以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为抗原,用所述抗原免疫小鼠,将免疫鼠的脾脏细胞与鼠源骨髓瘤细胞融合,筛选,得到分泌氯霉素

单克隆抗体的杂交瘤细胞株,通过制备腹水得到氯霉素抗体。

9.一种采用权利要求1或2所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡进行氯霉素检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将待测定样品加到所述样品垫上,进行免疫反应;

(2)将测定氯霉素的免疫荧光检测卡置于荧光读卡仪上,对荧光信号的强度进行读取;

(3)结果的判断:当所述检测线和所述质控线在345nm激发光照射下同时显示橙色荧光,且所述检测线较所述质控线深或两者颜色相同或相近,即表示检测结果为阴性,说明检测物中不含有氯霉素或所含氯霉素浓度小于0.05ng/mL;当所述检测线和所述质控线在345nm激发光照射下,所述质控线显示橙色荧光,而所述检测线不显荧光或较所述质控线显色浅,即表示检测结果为阳性,说明检测物中含有氯霉素且浓度大于0.05ng/mL。

一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫荧光分析技术领域,具体涉及一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 氯霉素(Chloramphenicol,CAP)是应用广泛的抗菌素,曾对畜禽疾病控制和治疗起到了重要作用。但氯霉素残留能引起人的再生障碍性贫血,粒细胞缺乏症等疾病,欧美等发达国家已相继禁止使用,我国在《动物性食品兽药残留规定》中也规定可食部分不得检出,在出口产品中一旦发现超标,一律禁止出口。目前,用于氯霉素残留检测的主要方法是仪器分析法,因其样品前处理过程繁琐费时,检测费用高,不利于广泛应用。

[0003] 免疫荧光分析技术是在免疫标记技术中逐渐发展起来的一种以荧光物作为标记物应用于抗原-抗体反应的分析技术。使用免疫荧光分析技术可以用来检测抗原,也可用来检测抗体。其中用于检测抗原的方法较为常用,通常称其为荧光抗体法。

[0004] 用荧光微球作为标记物,每个微球中可以包裹成千上万个荧光分子,从而可以提高标记的效率,有效的提高了检测灵敏度;同时在荧光微球表面修饰有适宜密度的羧基,用于与蛋白或抗体的共价偶联,提高标记物的稳定性。与传统的胶体金标记法不同,应用荧光免疫分析技术进行检测时,其信号特异性强、灵敏度高,特别适合于现场快速检测。

[0005] 免疫层析技术又称侧向流动技术,是以固相试纸条为载体的抗原-抗体免疫分析技术。一般试纸条由样品垫、偶联物垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成。其中的样品垫和结合垫均为玻纤纸,样品垫为待测样品起始流动区,偶联物垫为标记物吸附区,硝酸纤维素膜一般由检测线和质控线构成,是免疫分析的反应区,吸水垫为层析液的流动提供虹吸动力。免疫层析技术最大的优点就是检测速度快,一般检测用时10-15min,不需要大型仪器设备,可用于现场检测。

[0006] 但是目前检测氯霉素的检测卡和检测方法均存在灵敏度不够的问题,需要提供一种灵敏度更高的检测卡和检测方法。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高的测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用。

[0008] 本发明所采取的技术方案是:

[0009] 一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡,包括垫板,还包括附于所述垫板上且依次紧密相连的样品垫、耦联物垫、反应膜和吸水垫,所述耦联物垫上荧光微球标记的氯霉素抗体,所述反应膜上设有检测线和质控线,所述检测线靠近所述耦联物垫,所述质控线靠近所述吸水垫,所述检测线上包被有氯霉素抗原,所述质控线上包被有识别氯霉素抗体的二抗。

[0010] 在一些优选的实施方式中,所述免疫荧光检测卡还包括上外壳和下外壳,所述上外壳盖于所述样品垫、所述耦联物垫、所述反应膜和所述吸水垫上方,所述下外壳设于所述

垫板的下方,所述上外壳和所述下外壳相互盖合,所述上外壳在对应所述样品垫的位置开设有加样孔,所述上外壳在对应所述反应膜的位置设有观察窗。

[0011] 此外,本发明还提供了一种如上所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0012] 制备样品垫;

[0013] 制备耦联物垫:裁剪耦联物垫膜,取荧光微球标记的氯霉素抗体喷涂在所述膜上,干燥;

[0014] 制备反应膜:取反应膜,在所述反应膜上喷涂氯霉素抗原溶液,形成检测线,在所述反应膜上喷涂识别氯霉素抗体的二抗溶液,形成质控线;

[0015] 组装检测卡:取吸水垫和垫板,在所述垫板上依次搭接粘贴所述样品垫、所述耦联物垫、所述反应膜和所述吸水垫。

[0016] 在一些优选的实施方式中,所述荧光微球标记的氯霉素抗体的制备方法包括以下步骤:

[0017] (1) 荧光微球活化:将待活化的荧光微球加入缓冲液中,洗涤,固液分离,弃去上清液,收集固体物质复溶于缓冲液中,向所述缓冲液中加入N-羧基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,振荡反应,固液分离,收集固体物质并溶解于PB缓冲液中,得到荧光微球溶液;

[0018] (2) 抗体标记:取氯霉素抗体溶于PBS缓冲液中,并将其加入所述荧光微球溶液中,振荡反应一段时间,加入乙醇胺振荡反应一段时间,再加入牛血清白蛋白溶液,封闭反应一段时间,固液分离,收集固体物质用PB缓冲液重新悬浮,得到荧光微球标记的氯霉素抗体。

[0019] 在一些进一步优选的实施方式中,所述氯霉素抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为抗原获得。

[0020] 在一些进一步优选的实施方式中,所述氯霉素半抗原的制备包括以下步骤:称取氯霉素、琥珀酸酐,加入丙酮、吡啶,加热回流,薄层层析检测确认产物,去除丙酮,加水,调节pH至8-10,采用乙酸乙酯萃取,去除乙酸乙酯层,水相调节pH至酸性,采用异丁醇萃取,洗涤有机相,干燥,浓缩,得到氯霉素半抗原。

[0021] 在一些进一步优选的实施方式中,所述载体蛋白为牛血清白蛋白。

[0022] 在一些进一步优选的实施方式中,所述氯霉素抗体的制备包括以下步骤:以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为抗原,用所述抗原免疫小鼠,将免疫鼠的脾脏细胞与鼠源骨髓瘤细胞融合,筛选,得到分泌氯霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,通过制备腹水得到氯霉素抗体。

[0023] 此外,本发明还提供了一种采用如上所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡进行氯霉素检测的方法,包括以下步骤:

[0024] (1) 将待测定样品加到所述样品垫上,进行免疫反应;

[0025] (2) 将测定氯霉素的免疫荧光检测卡置于荧光读卡仪上,对荧光信号的强度进行读取;

[0026] (3) 结果的判断:当所述检测线和所述质控线在345nm激发光照射下同时显示橙色荧光,且所述检测线较所述质控线深或两者颜色相同或相近,即表示检测结果为阴性,说明检测物中不含有氯霉素或所含氯霉素浓度小于0.05ng/mL;当所述检测线和所述质控线在

345nm激发光照射下,所述质控线显示橙色荧光,而所述检测线不显荧光或较所述质控线显色浅,即表示检测结果为阳性,说明检测物中含有氯霉素且浓度大于0.05ng/mL。

[0027] 本发明的有益效果是:

[0028] 本发明设计了一种新型的用于测定氯霉素的免疫荧光检测卡,将氯霉素抗原包被在反应膜上形成检测线,将氯霉素抗体的二抗包被在反应膜上形成质控线,将荧光微球标记的氯霉素抗体涂覆在耦联物垫上,得到的免疫荧光检测卡,用于氯霉素的检测使用非常方便,只要将待测定样品放入样品垫,然后免疫反应后读取荧光信号的强度即可,免疫反应的过程也很快,15min足矣,能够快速检测样品中是否含有氯霉素,而且氯霉素的检测灵敏度很高,可以达到0.05ng/mL,能够满足食品安全对氯霉素残留快速检测的需求,特别适合监管部门现场检测使用,该检测卡使用方便、快捷、检测灵敏度高。

附图说明

[0029] 图1为实施例1的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的结构示意图。

[0030] 图2为实施例2的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的结构示意图。

具体实施方式

[0031] 实施例1:

[0032] 参照图1,图1为实施例1的测定氯霉素的免疫荧光检测卡的结构示意图,本实施例提供了一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡,包括垫板1,还包括附于所述垫板1上且依次紧密相连的样品垫2、耦联物垫3、反应膜4和吸水垫5,所述耦联物垫3上荧光微球标记的氯霉素抗体,所述反应膜4上设有检测线6和质控线7,所述检测线6靠近所述耦联物垫3,所述质控线7靠近所述吸水垫5,所述检测线6上包被有氯霉素抗原,所述质控线7上包被有识别氯霉素抗体的二抗。

[0033] 如上所述的测定氯霉素的免疫荧光检测卡是通过以下步骤制备得到的:(1)制备样品垫2:裁取1.1cm×10cm的玻璃纤维素膜,将其均匀浸泡于封闭液中10min,室温洁净条件真空干燥,得到样品垫2备用;(2)制备耦联物垫3:裁取20mm×4mm的玻璃纤维素膜,取适量的荧光微球标记的氯霉素抗体用BIODOT喷点仪按4uL/cm喷涂在玻璃纤维素膜上,37℃干燥1h,得到耦联物垫膜3;(3)制备反应膜4:取市场上可购买的规定尺寸的反应膜4,反应膜4是免疫荧光检测卡进行免疫分析的区域,在所述反应膜4上喷涂氯霉素抗原溶液,形成检测线6,在所述反应膜4上喷涂识别氯霉素抗体的二抗溶液,形成质控线7;(4)取市场上购买的规定尺寸的吸水垫5;(5)组装检测卡:取市场上购买的规定尺寸的垫板1,在垫板1上依次搭接粘贴所述样品垫2、所述耦联物垫3、所述反应膜4和所述吸水垫5。

[0034] 所述荧光微球标记的氯霉素抗体通过以下步骤制备得到:(1)荧光微球活化:将待活化的荧光微球加入缓冲液中,所述缓冲液为pH为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸溶液,超声洗涤微球数分钟,离心15min,弃上清,可重复洗涤步骤,收集固体物质并加入缓冲液中,所述缓冲液为pH为6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸溶液,向所述缓冲液中先后加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDS),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDS)的质量比为6:1,室温振荡反应30min,将上述反应溶液离心15min,弃掉上清,收集固体物质并溶解于硼酸缓冲液(0.05mol/L,pH

为8.0)中,得到荧光微球溶液;(2)抗体标记:取氯霉素抗体溶于PBS缓冲液(pH为7.4)中,将抗体浓度稀释至1mg/mL,并将其加入所述荧光微球溶液中,室温振荡反应60min,加入乙醇胺10 μ L,室温振荡反应60min,再加入牛血清白蛋白溶液(BSA溶液),封闭反应60min,将上述反应体系离心15min,弃上清,收集固体物质用硼酸缓冲液(0.05mol/L,pH为8.0)重悬,得到荧光微球标记的氯霉素抗体,4 $^{\circ}$ C保存。

[0035] 上述的氯霉素抗体是以氯霉素半抗原与载体蛋白的偶联物为抗原获得,具体步骤是:以氯霉素半抗原与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物为抗原,用所述抗原免疫小鼠,将免疫小鼠的脾脏细胞与鼠源骨髓瘤细胞融合,筛选,得到分泌氯霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,通过制备腹水即可得到大量的氯霉素抗体。而氯霉素半抗原是通过以下步骤制备得到:1)在50mL的单口瓶中,加入646mg氯霉素和200mg琥珀酸酐,一次性加入8mL丙酮,1mL吡啶,加热回流过夜,薄层层析(TLC)检测,蒸去丙酮,加入40mL水,用10%的NaHCO₃,1mol/L的NaOH调pH至8-10,用40*2mL乙酸乙酯提取,去除乙酸乙酯层,水层用1mol/L的盐酸调至酸性,用异丁醇提取,饱和食盐水洗2次,干燥,浓缩,得到氯霉素半抗原。半抗原本身分子量过低,不足以刺激机体产生免疫应答,生成抗体,所以必须与大分子蛋白偶联,增强其免疫原性。

[0036] 采用上述测定氯霉素的免疫荧光检测卡进行氯霉素检测的方法,包括以下步骤:

[0037] (1) 将待测定样品加到所述样品垫上,进行免疫反应;

[0038] (2) 将测定氯霉素的免疫荧光检测卡置于荧光读卡仪上,对荧光信号的强度进行读取;

[0039] (3) 结果的判断:当所述检测线和所述质控线在345nm激发光照射下同时显示橙色荧光,且所述检测线较所述质控线深或两者颜色相同或相近,即表示检测结果为阴性,说明检测物中不含有氯霉素或所含氯霉素浓度小于0.05ng/mL;当所述检测线和所述质控线在345nm激发光照射下,所述质控线显示橙色荧光,而所述检测线不显荧光或较所述质控线显色浅,即表示检测结果为阳性,说明检测物中含有氯霉素且浓度大于0.05ng/mL。该检测卡检测氯霉素的灵敏度很高,可以达到0.05ng/mL。

[0040] 实施例2:

[0041] 本实施例所提供的测定氯霉素的免疫荧光检测卡与实施例1基本相同,不同之处在于:所述免疫荧光检测卡还包括上外壳9和下外壳8,所述上外壳9盖于所述样品垫2、所述耦联物垫3、所述反应膜4和所述吸水垫5上方,所述下外壳8设于所述垫板1的下方,所述上外壳9和所述下外壳8相互盖合,所述下外壳8的周边设有卡齿11,所述上外壳9的周边设有与所述卡齿11配合的卡孔10,所述上外壳9和所述下外壳8通过所述卡齿11和所述卡孔10连接。所述上外壳9在对应所述样品垫2的位置开设有加样孔12,待测定样品从所述加样孔加入,流向所述样品垫2,然后依次顺着样品垫2、耦联物垫3、反应膜4和吸水垫5扩散,所述上外壳9在对应所述反应膜4的位置设有观察窗13,用于观察反应膜4上检测线6和质控线7的荧光信号。

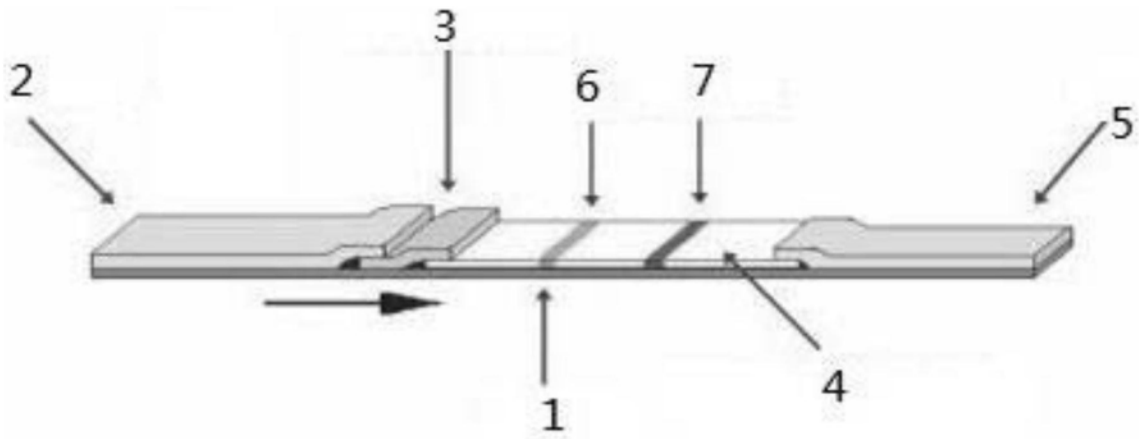


图1

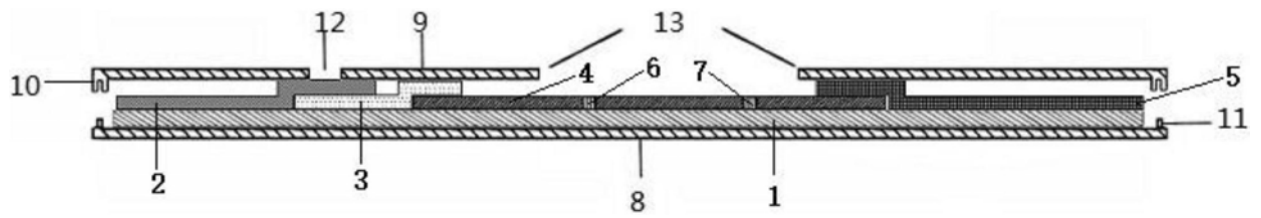


图2

专利名称(译)	一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN107247140A	公开(公告)日	2017-10-13
申请号	CN2017110351732.9	申请日	2017-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市三方圆生物科技有限公司		
[标]发明人	钟松清 谭攀 孙晶玮 王军亮		
发明人	钟松清 谭攀 孙晶玮 王军亮		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/9446 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/585		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定氯霉素的免疫荧光检测卡及其制备方法与应用，检测卡包括垫板、附于所述垫板上且依次紧密相连的样品垫、耦联物垫、反应膜和吸水垫，耦联物垫上荧光微球标记的氯霉素抗体，反应膜上设有检测线和质控线，检测线靠近耦联物垫，质控线靠近吸水垫，检测线上包被有氯霉素抗原，质控线上包被有识别氯霉素抗体的二抗；其制备方法包括制备样品垫、制备耦联物垫、制备反应膜、制备吸水垫、组装的步骤；将待测定样品加到样品垫上，进行免疫反应，然后将测定氯霉素的免疫荧光检测卡置于荧光读卡仪上，对荧光信号的强度进行读取，即可得到检测结果；该检测卡检测氯霉素使用快速方便，且灵敏度很高，可以达到0.05ng/mL。

