



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107449898 A

(43)申请公布日 2017.12.08

(21)申请号 201710560230.7

(22)申请日 2017.07.11

(71)申请人 中检国研(北京)科技有限公司
地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲
三号2号楼4层403室

(72)发明人 邹明强 齐小花 赵兵洁

(51)Int.Cl.
G01N 33/533(2006.01)

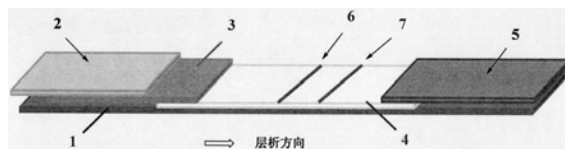
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种卡那霉素残留荧光免疫层析试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种卡那霉素残留荧光免疫层析检测试纸及制备方法。包括样品垫,抗体结合垫,NC纤维素膜,吸水纸,自下而上依次通过带有粘合剂的底板互相搭接而成,所述NC纤维素膜上从靠近抗体结合垫一端依次为包被检测线T线和质控线C线。所述抗体结合垫承载荧光标记抗体的结合物,所述NC纤维素膜自上而下分别设有用偶联包被抗原Kana-BSA喷划的T线和用羊抗鼠二抗IgG喷划的C线,荧光标记探针为稀土荧光二氧化硅纳米颗粒,荧光标记探针以醛基葡聚糖作为交联试剂与抗体结合;利用凝胶成像系统和荧光读卡仪考察荧光免疫层析试纸条的制备条件,利用荧光读卡仪检测T线的荧光强度,通过卡那霉素抗原浓度的标准曲线完成定量检测。



1. 一种卡那霉素残留荧光免疫层析试纸及其制备方法,包括样品垫,抗体结合垫,NC纤维素膜,吸水纸,自下而上依次通过带有粘合剂的底板互相搭接而成,其特征在于,所述NC纤维素膜上从靠近抗体结合垫一段分别依次包被检测线和质控线,所述抗体结合垫承载荧光标记抗体的结合物,所述NC纤维素膜自上而下分别设有用偶联抗原喷划的检测线T线和用羊抗鼠二抗IgG喷划的质控线C线,其特征在于,荧光标记探针为稀土荧光二氧化硅纳米颗粒BHHCT-Eu³⁺@SiO₂,荧光标记探针以醛基葡聚糖作为交联试剂与抗体结合,利用凝胶成像系统和荧光读卡仪考察荧光免疫层析试纸条的制备条件,利用荧光读卡仪检测T线的荧光强度,通过卡那霉素抗原浓度的标准曲线完成定量检测。

2. 根据权利要求1所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的荧光标记探针为稀土荧光二氧化硅纳米颗粒BHHCT-Eu³⁺@SiO₂,由以下方法制备:

(1) 二氧化硅纳米颗粒的制备:取环己烷6mL、Tx-1002.13mL、正辛醇1.87mL和0.6mL超纯水加入锥形瓶中,磁力搅拌,待搅拌均匀后,依次加入100μLTEOS和60μL氨水,室温搅拌24h,得到SiO₂纳米微乳液。

(2) 二氧化硅纳米颗粒表面氨基化:取3μL 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMs)加入到(1)中得到的SiO₂纳米微乳液中,微波加热,微波功率700W,温度70℃,反应时间考察20min。

(3) BHHCT-Eu³⁺荧光稀土络合物的合成:将5mg 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-氯磺酰-邻-三联苯(BHHCT)溶于700μL无水乙醇,加入4.84μL Eu³⁺(0.64mol/L),制得荧光稀土络合物。

(4) BHHCT-Eu³⁺修饰的二氧化硅荧光纳米颗粒的制备:将步骤(3)中得到荧光络合物加入到(2)中微乳液体系,微波加热,微波功率700W,温度59℃,反应时间考察20min。加入5mL丙酮,混匀,离心,再用乙醇/水(v:v,1:1)洗涤颗粒3次,最后用无水乙醇洗涤颗粒1次,离心,烘干,即得产物荧光稀土二氧化硅纳米颗粒。

3. 根据权利要求1所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光标记抗体结合物(简称荧光标记抗体)是以醛基化葡聚糖作为交联剂,将荧光标记探针与抗体进行交联,形成荧光标记抗体,具体方法如下:

(1) 200mg葡聚糖,溶于0.03M高碘酸钠5ml溶液,避光,室温反应过夜。然后用超纯水透析过夜,除去未反应的小分子,4℃储存备用。

(2) 取卡那霉素抗体,以25mM pH8.0碳酸缓冲液(简称CBS)透析过夜。

(3) 取制备好的Eu³⁺-BHHCT@SiO₂荧光纳米颗粒4mg悬浮于400μL 25mM pH9.6的碳酸盐缓冲液中,再加入400μL醛基化葡聚糖,避光反应7h。以25mM pH9.6的碳酸盐缓冲液洗涤3遍,悬浮于200μL 25mM pH9.6的碳酸盐缓冲液中。

(4) 将透析好的卡那抗体200μL与上述醛基葡聚糖修饰的荧光纳米粒子混合,4℃反应过夜。加硼氢化钠,终浓度为5mM,4℃反应4h,再加等体积的50mM pH7.8 Tris-HCl(含2% BSA,4%蔗糖)封闭液封闭12h。

(5) 最后用50mM pH7.8Tris-HCl洗涤颗粒3遍,然后用100μL 50mM pH7.8 Tris-HCl(含0.9%NaCl,0.2%BSA,0.05%Tween 20,0.1%NaN₃)悬浮备用。

4. 根据权利要求1所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述样品垫和抗体结合垫用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;吸水纸用吸水滤纸制成,底板用不吸水的韧性材料制成。

5. 根据权利要求1所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于,硝酸纤维素膜即NC膜是M130,AE99,M90中的一种。

6. 根据权利要求1所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于,偶联抗原的载体蛋白为牛血清蛋白,鸡卵清蛋白或血蓝蛋白中的一种。

7. 根据权利要求1所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 荧光标记抗体的制备:先制备荧光标记探针即稀土荧光二氧化硅纳米颗粒,所述荧光标记以二氧化硅纳米颗粒作为基质,通过微波加热技术以稀土荧光络合物BHHCT-Eu³⁺共价交联而成,直径30-60nm的纳米颗粒,然后将Kana单克隆抗体进行荧光标记;

(2) 荧光标记抗体的固相化:将制备好的标记探针用以200mM pH7.8 Tris-HCl缓冲液按一定倍数稀释;然后将作为抗体结合垫的玻璃纤维浸入其中,以浸湿为准,然后冻干备用。

(3) 质控线(C线)及检测线(T线)的包被:在NC膜上用点膜仪将包被抗原Kana-BSA点成带状作为检测线(T线);在距检测线0.5cm的膜上,用羊抗鼠二抗IgG再划一条对照线,作为质控线(C线),烘干备用。

(4) 试纸条的装配:在一长方形底板的中部贴上NC膜,点膜仪划线,在膜的一端贴上玻璃纤维,并在于膜交接侧铺上抗体结合垫,在NC膜的另外一端贴上吸水纸。然后切成4mm条形检测试纸条。

(5) 免疫层析:在试纸条的样品垫上加150 μ L的待测样品,避光反应结束后,利用凝胶成像系统进行辅助观察并通过荧光定量检测读卡仪测量T线或C线的荧光强度,实现定量检测。

8. 根据权利要求7所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于,利用凝胶成像系统辅助荧光读卡仪进行试纸条制备条件的优化。

9. 根据权利要求8所述的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,其特征在于,使用优化条件下制备的荧光免疫层析试纸条检测卡那霉素残留,利用荧光读卡仪读取荧光信号强度值,绘制标准曲线,实现简便、快捷定量检测,适用于大量样品现场筛选。

一种卡那霉素残留荧光免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试纸,特别是涉及一种检测卡那霉素的荧光免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 卡那霉素(Kanamycin,简称Kana),属于氨基糖苷类抗生素中的一种,对常见的致病菌,如大肠杆菌、结核杆菌等革兰氏阴性菌有很强的抑制作用,主要通过和细菌的30S核糖体RNA相互作用抑制其蛋白质合成而起到杀菌作用。一旦用量不规范,通过食物或药物摄入人体过量,会产生严重的副作用,包括肾毒性、听力丧失、过敏性等。然而由于其价格低廉且抗菌性广,卡那霉素被广泛使用,容易造成其在动物源性食品中的残留,危及人类身体健康,欧盟规定牛奶中卡那霉素的残留量为150 $\mu\text{g/L}$ 。

[0003] 目前,用于卡那霉素检测的方法有:ELISA、液相色谱-串联质谱法、高效液相色谱法和微生物检测法。液相色谱-串联质谱法检测灵敏度高,依据国家标准GB/T22969-2008,牛奶中卡那霉素检出限为10 $\mu\text{g/kg}$,但检测程序复杂,费用较高。微生物检测法应用较为广泛,但其测定时间长,且结果误差较大。酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法利用抗原抗体特异性结合,具有高选择性,但药品昂贵,操作较为复杂,费时,限制了它的使用。因此,建立一种低成本、低消耗、高灵敏、高选择性且适用于食品安全现场快速检测的卡那霉素检测技术是很有必要的。目前,现场快检方法用的较多的是胶体金免疫试纸条法,该方法简便快捷、费用低,但在定量检测和灵敏度方面存在不足。为弥补上述问题,以镧系荧光二氧化硅纳米颗粒为代表的荧光材料作为标记探针的荧光免疫层析技术(lateral flow immunoassay,LFIA)近些年来得到广泛发展,该方法能有效消除检测背景强度,大大提高了检测灵敏度,增强了方法选择性,可实现定量及多元检测,同时适合于对大批量样品的筛查。

[0004] 作为荧光标记探针的稀土荧光二氧化硅纳米颗粒主要包含两种,一种是掺杂型,另外一种是非共价型。由于掺杂型纳米颗粒主要是通过物理掺杂制备而成,其在应用过程中会存在荧光泄露的问题,而通过共价交联制备的共价型纳米颗粒避免了该问题的发生,但其制备时间较长,因此如何大大缩短荧光纳米颗粒的制备时间是亟需解决的问题。

[0005] 中国专利CN201710012482.6公开了一种利用微波加热技术制备稀土荧光二氧化硅纳米颗粒的方法,利用油包水(W/O)微乳分散体系制备表面带有羟基的 SiO_2 纳米颗粒,依次将氨基硅烷试剂、 Eu^{3+} 的BHHCT络合物采用微波加热的方法对 SiO_2 进行表面修饰,形成具有荧光的稀土络合物,经丙酮封闭反应体系后,洗涤,即得产物共价型荧光稀土二氧化硅纳米颗粒。大大地缩短了反应时间,且荧光强度更高。

[0006] 但上述专利所述的稀土荧光二氧化硅纳米颗粒尚未进行生物标记的应用,本发明以上述专利所述的稀土荧光二氧化硅纳米颗粒作为荧光探针,以醛基化葡聚糖作为交联剂,完成对卡那霉素单克隆抗体的荧光标记,实现了上述专利所述稀土荧光二氧化硅纳米颗粒生物应用检测。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题:针对现有技术存在的不足,以稀土荧光二氧化硅纳米颗粒为荧光探针,结合凝胶电泳成像与荧光免疫读卡仪,制备了一种特异性好、灵敏度高、快速简便、能定量检测卡那霉素残留的荧光免疫层析试纸条。

[0008] 本发明的技术方案:

[0009] 本发明提供了一种荧光免疫层析检测试纸及制备方法。以稀土荧光二氧化硅纳米颗粒 BHHCT-Eu³⁺@SiO₂作为标记探针,与卡那霉素抗体通过醛基化葡聚糖进行交联,制备荧光标记抗体Eu³⁺-Kana-ab,结合凝胶电泳成像系统和ESE Quant定量侧向层析读卡仪建立Kana 残留的快速定量检测方法;所述免疫层析试纸条组装包括样品垫,抗体结合垫,NC纤维素膜,吸水纸,自下而上依次通过带有粘合剂的底板互相搭接而成,该方法包括以下步骤:

[0010] (1) 荧光标记抗体的制备:先制备荧光标记探针即稀土荧光二氧化硅纳米颗粒,所述荧光标记以二氧化硅纳米颗粒作为基质,通过微波加热技术以稀土荧光络合物BHHCT-Eu³⁺共价交联而成,直径30-60nm的纳米颗粒,然后将Kana单克隆抗体进行荧光标记;

[0011] (2) 荧光标记抗体的固相化:将制备好的荧光标记抗体用以200mM pH 7.8 Tris-HCl缓冲液按一定比例稀释;然后将作为抗体结合垫的玻璃纤维浸入其中,以浸湿为准,然后冻干备用。

[0012] (3) 质控线(C线)及检测线(T线)的包被:在NC膜上用点膜仪将包被抗原Kana-BSA点成带状作为检测线(T线);在距检测线0.5cm的膜上,用羊抗鼠二抗IgG再划一条对照线,作为质控线(C线),烘干备用。

[0013] (4) 试纸条的装配:在一长方形底板的中部贴上NC膜,点膜仪划线,在膜的一端贴上玻璃纤维,并在于膜交接侧铺上抗体结合垫,在NC膜的另外一端贴上吸水纸。然后切成4mm 条形检测试纸条。

[0014] (5) 免疫层析:在试纸条的样品垫上加150μL的待测样品,避光反应结束后,利用凝胶成像系统进行辅助观察并通过荧光定量检测读卡仪测量T线或C线的荧光强度,实现定量检测。

[0015] (6) 检测反应原理:

[0016] 当试纸条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卡那霉素及抗体结合垫中的荧光标记抗体一起向NC膜层扩散,并渗入另一端的吸水纸层。在扩散过程中,待测卡那霉素可与荧光抗体相结合,进而封闭荧光抗体上的卡那霉素抗原结合点,阻止荧光标记抗体与NC膜T线上的包被抗原Kana-BSA结合,不能显示检测线,而C线处的羊抗鼠二抗IgG抗体则可与荧光标记抗体结合,在通过荧光读卡仪时T线处不会出现吸收峰,只在C线出现吸收峰;反之样品溶液中无Kana时,则不能阻止荧光标记抗体与Kana包被抗原Kana-BSA结合,同时羊抗鼠二抗IgG也可以与荧光标记抗体结合,则通过荧光读卡仪时在T线和C线两处同时出现吸收峰。如果C线不出现吸收峰则表明试纸条已失效。

[0017] 所述的荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述样品垫和抗体结合垫用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;吸水纸用吸水滤纸制成,底板用不吸水的韧性材料制成。

[0018] 所述的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,硝酸纤维素膜即NC膜是M130,AE99,M90等中的一种。

[0019] 所述的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,偶联抗原的载体蛋白为牛血清蛋白,鸡卵清蛋白或血蓝蛋白中的一种。

[0020] 所述稀土荧光二氧化硅纳米颗粒的制备,具体方法如下:

[0021] (1) 二氧化硅纳米颗粒的制备:取环己烷6mL、Tx-100 2.13mL、正辛醇1.87mL和0.6mL超纯水加入锥形瓶中,磁力搅拌,待搅拌均匀后,依次加入100 μ L TEOS和60 μ L氨水,室温搅拌24h,得到SiO₂纳米微乳液。。

[0022] (2) 二氧化硅纳米颗粒表面氨基化:取3 μ L 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMs)加入到(1)中得到的SiO₂纳米微乳液中,微波加热,微波功率700W,温度70 $^{\circ}$ C,反应时间考察20min。

[0023] (3) BHHCT-Eu³⁺荧光稀土络合物的合成:将5mg 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基)-氯磺酰-邻-三联苯(BHHCT)溶于700 μ L无水乙醇,加入4.84 μ L Eu³⁺(0.64 mol/L),制得荧光稀土络合物。

[0024] (4) BHHCT-Eu³⁺修饰的二氧化硅荧光纳米颗粒的制备:将步骤(3)中得到荧光络合物加入到(2)中微乳液体系,微波加热,微波功率700W,温度59 $^{\circ}$ C,反应时间考察20min。加入5mL丙酮,混匀,离心,再用乙醇/水(v:v,1:1)洗涤颗粒3次,最后用无水乙醇洗涤颗粒1次,离心,烘干,即得产物荧光稀土二氧化硅纳米颗粒。

[0025] 所述荧光标记抗体结合物的标记方法,包括以下步骤:

[0026] (1) 200mg葡聚糖,溶于0.03M高碘酸钠5ml溶液,避光,室温反应过夜。然后用超纯水透析过夜,除去未反应的小分子,4 $^{\circ}$ C储存备用。

[0027] (2) 取卡那霉素抗体,以25mM pH8.0碳酸缓冲液(简称CBS)透析过夜。

[0028] (3) 取制备好的Eu³⁺-BHHCT@SiO₂荧光纳米颗粒4mg悬浮于400 μ L 25mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,再加入400 μ L醛基化葡聚糖,避光反应7h。以25mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液洗涤3遍,悬浮于200 μ L 25mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液中。

[0029] (4) 将透析好的卡那抗体200 μ L与上述醛基葡聚糖修饰的荧光纳米粒子混合,4 $^{\circ}$ C反应过夜。加硼氢化钠,终浓度为5mM,4 $^{\circ}$ C反应4h,再加等体积的50mM pH 7.8 Tris-HCl(含2%BSA,4%蔗糖)封闭液封闭12h。

[0030] (5) 最后用50mM pH 7.8Tris-HCl洗涤颗粒3遍,然后用100 μ L 50mM pH 7.8 Tris-HCl(含0.9%NaCl,0.2%BSA,0.05%Tween 20,0.1%NaN₃)悬浮备用。

[0031] 本发明的优点:

[0032] (1) 特异性强,灵敏度高。本发明荧光免疫层析试纸以稀土荧光二氧化硅纳米颗粒BHHCT-Eu³⁺@SiO₂作为标记探针,由于稀土荧光二氧化硅纳米颗粒BHHCT-Eu³⁺@SiO₂的特殊光学特性,使得卡那霉素的残留的检测消除了背景光的干扰,灵敏度大大提高

[0033] (2) 稳定性高,灵活性好。荧光试纸条中稀土离子的发光是根据稀土离子的物理过程产生的,可以有效避免来自外界背景的干扰;同时可通过组合多样稀土离子,形成多样特征光谱,使其能使用多重分析。

[0034] (3) 简便、快速。荧光免疫层析试纸条可对全血、尿液等进行现场检测,无须繁杂的前处理,仪器调试等步骤,直接读数,实现现场定量检测。本发明检测时间5min,即可半定量

检测,30min后即可读取稳定数值,实现定量检测。

[0035] (4) 使用范围广、便于推广应用。本发明实现了稀土荧光二氧化硅纳米颗粒标记的免疫层析技术在定量检测卡那霉素残留中的应用,使卡那霉素残留的检测无背景干扰;该试纸条操作简便,能满足不同层次人员的需要,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的意义,将具有明显的经济效益和社会效益。

附图说明

[0036] 图1为本发明的免疫层析试纸的结构示意图。其中1为底板,2为样品垫,3为抗体结合垫,4为NC膜,5为吸水纸,6为检测线T线,7为质控线C线。

[0037] 图2为本发明的免疫层析试纸的检测原理图。

[0038] 图3为本发明所使用的荧光读卡仪示意图(3a)及荧光谱图(3b)。

[0039] 图4为荧光标记抗体 Eu^{3+} -Kana-ab稀释倍数对免疫层析试纸条荧光检测强度影响示意图。其中图4a为不同 Eu^{3+} -Kana-ab稀释倍数下,免疫层析试纸条荧光凝胶成像示意图,图4b为不同 Eu^{3+} -Kana-ab稀释倍数下,免疫层析试纸条荧光强度T/C比值变化趋势图。

[0040] 图5为包被抗原Kana-BSA浓度对免疫层析试纸条荧光检测强度影响示意图。其中图5a为不同Kana-BSA浓度下,免疫层析试纸条荧光凝胶成像示意图,图5b为不同Kana-BSA浓度下,免疫层析试纸条荧光强度T/C比值变化趋势图。

[0041] 图6为羊抗鼠二抗IgG浓度对免疫层析试纸条荧光检测强度影响示意图。其中图6a为不同IgG浓度下,免疫层析试纸条荧光凝胶成像示意图,图6b为不同IgG浓度下,免疫层析试纸条荧光强度T/C比值变化趋势图。

[0042] 图7为不同免疫反应时间对免疫层析试纸条荧光强度影响趋势图。

[0043] 图8为本发明的免疫层析试纸条交叉反应结果示意图。

[0044] 图9为本发明的荧光免疫层析试纸对卡那霉素的回归曲线图。

具体实施方式

[0045] 本发明的荧光免疫层析试纸条制备过程包括:荧光标记抗体的制备,NC膜的喷划,试纸条的组装等步骤。下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0046] 实施例1:制备稀土荧光二氧化硅纳米颗粒标记的卡那霉素抗体结合物(Eu^{3+} -Kana-ab)

[0047] (1) 200mg葡聚糖,溶于0.03M高碘酸钠5ml溶液,避光,室温反应过夜。然后用超纯水透析过夜,除去未反应的小分子,4℃储存备用。

[0048] (2) 取卡那霉素抗体,以25mM pH 8.0碳酸缓冲液(简称CBS)透析过夜。

[0049] (3) 取制备好的 Eu^{3+} -BHHCT@ SiO_2 荧光纳米颗粒4mg悬浮于400 μL 25mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,再加入400 μL 醛基化葡聚糖,避光反应7h。以25mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液洗涤3遍,悬浮于200 μL 25mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液中。

[0050] (4) 将透析好的卡那抗体200 μL 与上述醛基葡聚糖修饰的荧光纳米粒子混合,4℃反应过夜。加硼氢化钠,终浓度为5mM,4℃反应4h,再加等体积的50mM pH 7.8 Tris-HCl(含2%BSA,4%蔗糖)封闭液封闭12h。

[0051] (5) 最后用50mM pH 7.8Tris-HCl洗涤颗粒3遍,然后用100 μ L 50mM pH 7.8Tris-HCl (含0.9%NaCl,0.2%BSA,0.05%Tween 20,0.1%NaN₃) 悬浮备用。

[0052] 实施例2:制备卡那霉素残留荧光免疫检测试纸条

[0053] (1) 荧光标记抗体的固相化:将制备好的荧光标记抗体用以200mM pH 7.8 Tris-HCl缓冲液按一定比例稀释;然后将作为抗体结合垫的玻璃纤维浸入其中,以浸湿为准,然后冻干备用。

[0054] (2) 质控线(C线)及检测线(T线)的包被:在NC膜上用点膜器将包被抗原Kana-BSA点成带状作为检测线(T线);在距检测线0.5cm的膜上,用羊抗鼠二抗IgG再划一条对照线,作为质控线(C线),烘干备用。

[0055] (3) 试纸条的装配:在一长方形底板的中部贴上NC膜,点膜仪划线,在膜的一端贴上玻璃纤维,并在于膜交接侧铺上抗体结合垫,在NC膜的另外一端贴上吸水纸。然后切成4mm 条形检测试纸条。

[0056] (4) 免疫层析:在试纸条的样品垫上加150 μ L的待测样品,避光反应结束后,利用凝胶成像系统进行辅助观察并通过荧光定量检测读卡仪测量T线或C线的荧光强度,实现定量检测,荧光读卡仪示意图及荧光光谱图如图3所示。

[0057] 当试纸条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卡那霉素及抗体结合垫中的荧光标记抗体一起向NC膜层扩散,并渗入另一端的吸水纸层,如图1所示。在扩散过程中,待测卡那霉素可与荧光抗体相结合,进而封闭荧光抗体上的卡那霉素抗原结合点,阻止荧光标记抗体与NC膜T线上的包被抗原Kana-BSA结合,不能显示检测线,而C线处的羊抗鼠二抗IgG抗体则可与荧光标记抗体结合,在通过荧光读卡仪时T线处不会出现吸收峰,只在C线出现吸收峰;反之样品溶液中无卡那霉素时,则不能阻止荧光标记抗体与包被抗原Kana-BSA结合,同时羊抗鼠二抗IgG也可以与荧光标记抗体结合,则通过荧光读卡仪时在T线和C线两处同时出现吸收峰,如图2所示。如果C线不出现吸收峰则表明试纸条已失效。

[0058] 实施例3:卡那霉素残留荧光免疫检测试纸条的制备,不同荧光标记抗体Eu³⁺-Kana-ab 稀释倍数对试纸条荧光性能影响的研究试验

[0059] 将荧光稀土二氧化硅纳米颗粒标记抗体(Eu³⁺-Kana-ab)溶液倍比稀释1:1000,1:1500,1:2000,1:4000,添加150 μ L空白样品,避光反应,进行凝胶电泳成像检测和荧光读卡仪测定。

[0060] 凝胶电泳图(图4a)显示,随着Eu³⁺-Kana-ab稀释比的增加,C线和T线亮度逐渐变浅,其中稀释1000倍、1500倍和2000倍时,视觉上亮度区分不大。在荧光试纸条制作过程中,T线与C线荧光强度比接近1为最佳,如图4b,故Eu³⁺-Kana-ab稀释1500倍,选为最佳工作浓度。

[0061] 实施例4:卡那霉素残留荧光免疫检测试纸条的制备,不同包被抗原Kana-BSA浓度对试纸条荧光性能影响的研究试验

[0062] 荧光标记抗体稀释1500倍,固定羊抗鼠二抗IgG的浓度,将浓度分别为1.57、1.00、0.75、0.50mg/mL的Kana-BSA喷于NC膜上,进行凝胶电泳成像检测和荧光读卡仪测定。

[0063] 凝胶电泳图(图5a)显示,随着Kana-BSA浓度的增加,C线亮度逐渐减弱,同时T线亮度逐渐加深。当Kana-BSA浓度为0.75mg/mL时,C线和T线亮度适中,荧光比(即T/C)最低,如

图5b,故Kana-BSA浓度0.75mg/mL选为最佳工作浓度。

[0064] 实施例5:卡那霉素残留荧光免疫检测试纸条的制备,不同质控线羊抗鼠二抗IgG浓度对试纸条荧光性能影响的研究试验

[0065] 在荧光标记抗体1:1500稀释,包被抗原Kana-BSA浓度为0.75mg/mL条件下,将浓度分别为1.0,0.8,0.6,0.4mg/mL的羊抗鼠二抗IgG喷于NC膜上,进行凝胶电泳成像检测和荧光读卡仪测定。

[0066] 凝胶电泳图(图6a)显示,随着IgG浓度的减少,C线亮度逐渐减弱,。当IgG浓度为1.0mg/mL时,C线和T线亮度适中,荧光比最低,如图6b故IgG浓度1.0mg/mL选为最佳工作浓度。

[0067] 实施例6:卡那霉素残留荧光免疫检测试纸条的制备,不同免疫反应时间对试纸条荧光性能影响的研究试验

[0068] 荧光信号强度是荧光免疫试纸条的定量依据,而免疫反应时间是影响信号强度的重要因素,在优化条件下制备卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,考察不同免疫反应时间(5min, 10min,15min,20min,25min,30min,35min,40min)对试纸条荧光信号的影响,。

[0069] 图7考察了阴性样品(a)和10ng/ml卡那霉素样品溶液(b)在不同免疫反应时间下,对试纸条荧光信号的影响。在免疫反应前30min内,荧光信号强度随着反应时间的增加而增加,30min后变化趋于平缓,故免疫反应时间选为30min。

[0070] 实施例7:卡那霉素残留荧光免疫检测试纸条的制备,特异性考察研究试验

[0071] 分别使用不同梯度浓度(0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000ng/mL)的卡那霉素、庆大霉素、安普霉素、妥布霉素和阿米卡霉素检测本发明制备的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条的特异性效果,用荧光读卡仪读数,计算抑制率 A_0/A ,绘制抑制曲线(图8)。

[0072] 图8显示,应用本发明制备的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条检测卡那霉素,具有明显的抑制作用,而对其他类似物的抑制作用不明显,说明本发明制备的荧光免疫层析试纸条对卡那霉素检测具有良好的特异选择性。

[0073] 实施例8:牛奶中卡那霉素残留荧光免疫检测

[0074] 1、利用制备的卡那霉素残留荧光免疫层析试纸条,对不同卡那霉素标准品溶液(0、0.3215、0.625、1.25、2.5、5、10、25、50、100、200、400ng/ml)进行荧光免疫检测,避光反应30min,用荧光读数仪测定T线荧光信号值,空白溶液的荧光信号强度值为 A_0 ,不同浓度溶液的荧光信号强度值为 A ,以 A/A_0 为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线。

[0075] 2、取经仪器确证过的空白牛奶样品,分别添加1、5、10ng/mL 3个浓度水平的卡那霉素,并设置空白对照。离心脱脂,然后用 $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}-\text{ZnSO}_4$ 进行沉淀蛋白,离心取上清液,用20mM pH 8.0 Tris-HCl稀释液稀释10倍,。荧光免疫层析分析,6次平行。计算平均测量值、回收率以及RSD%。

[0076] 如图9所示,荧光免疫层析法检测卡那霉素的标准曲线的拟合方程为 $y = 0.12 + 0.82 / (1 + (x/11.28)^{1.18})$, $R^2 = 0.9970$,半抑制率 IC_{50} :12.76ng/mL,最低检出限(IC_{10}):0.85ng/mL,线性范围(以20%-80%抑制率对应的浓度计算):3.0ng/mL-76ng/mL;采用加标回收率实验对本研究建立的方法进行准确度和精密度的考察,卡那霉素在牛奶样品中的添加回收率范围是85.83%-99.71%,RSD%为3.11%-4.64%,说明本发明所制备的荧光免疫层析试纸条可用于实际样品检测。

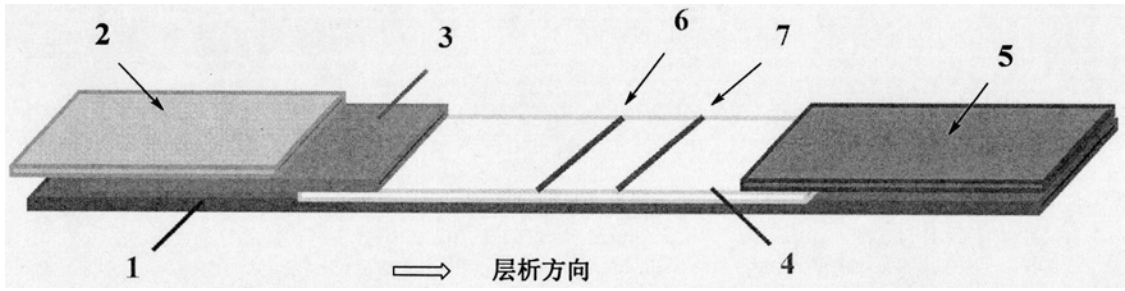


图1

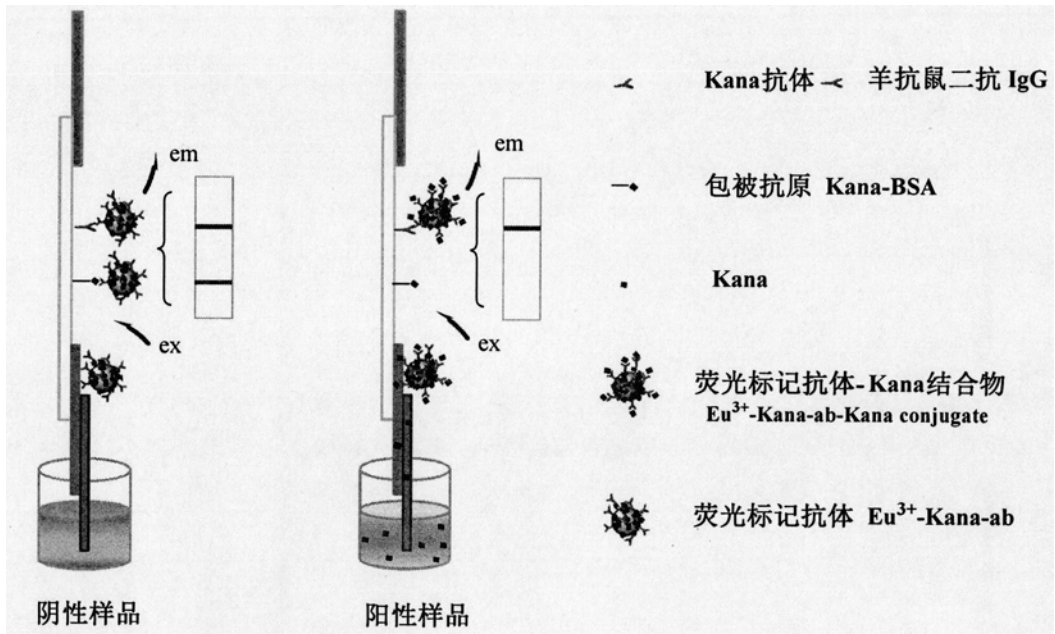


图2

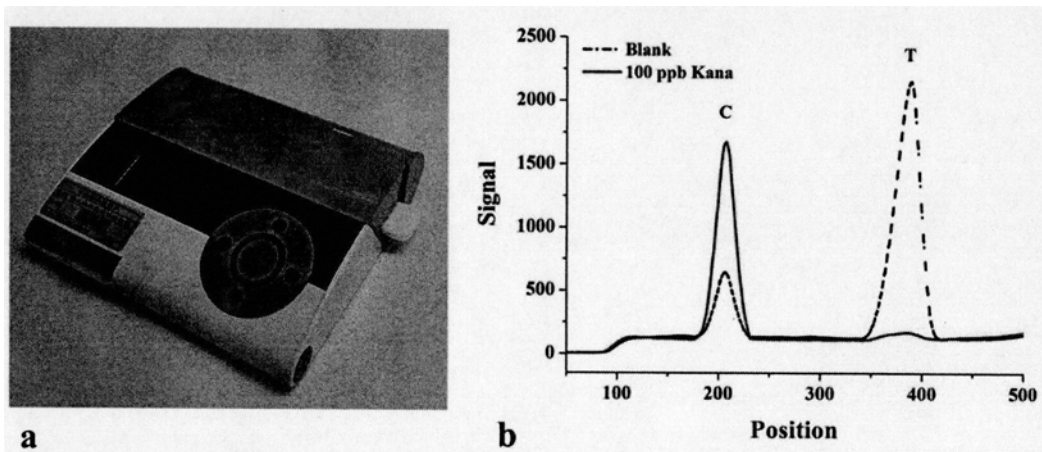


图3

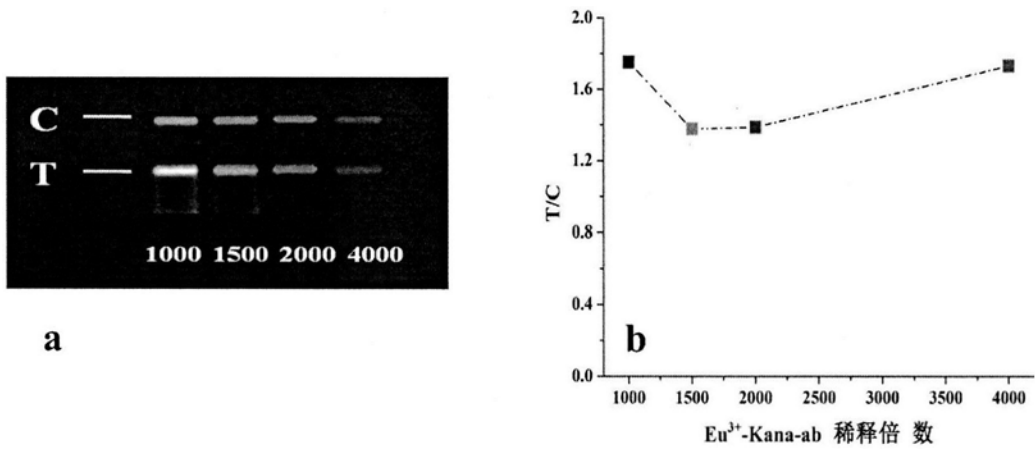


图4

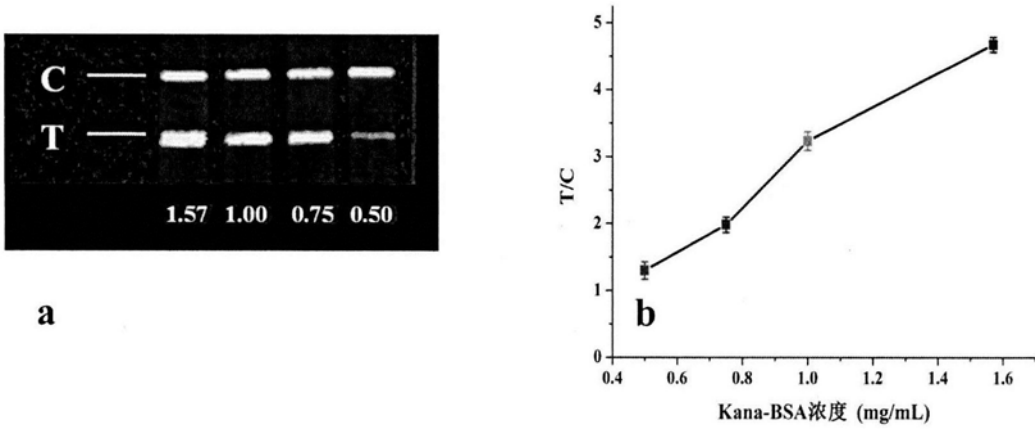


图5

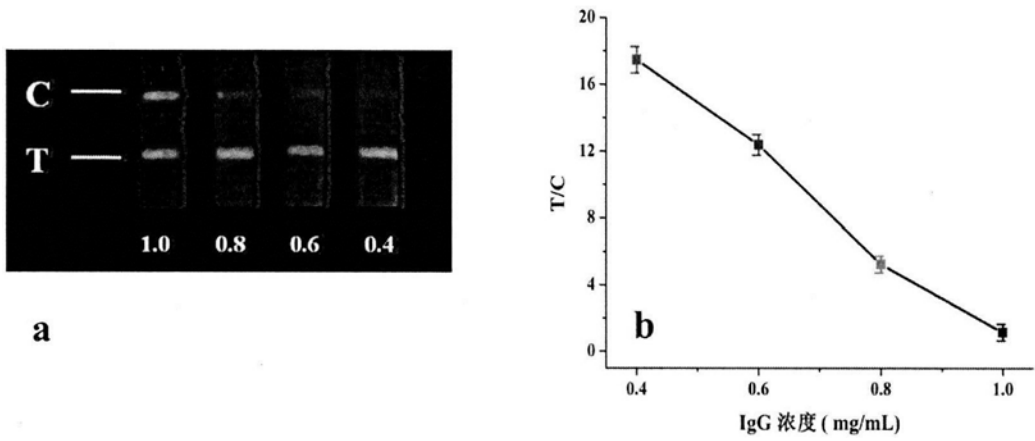


图6

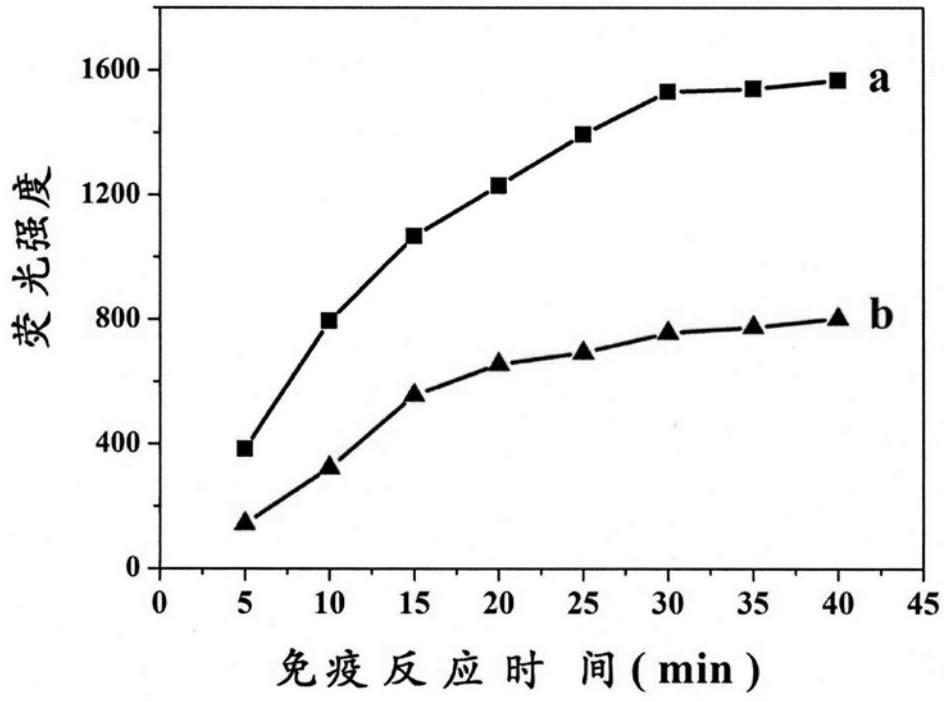


图7

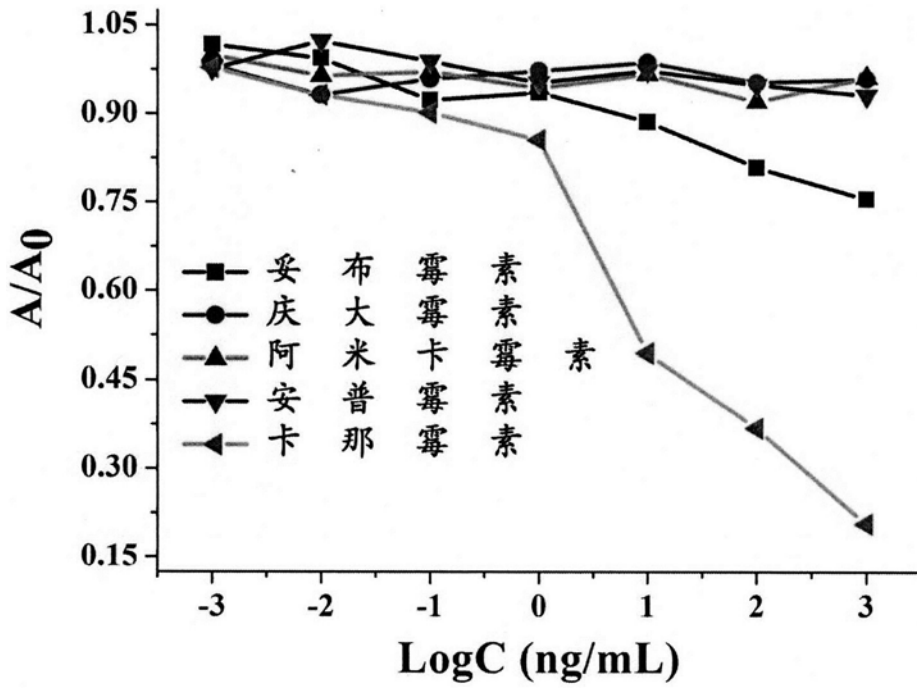


图8

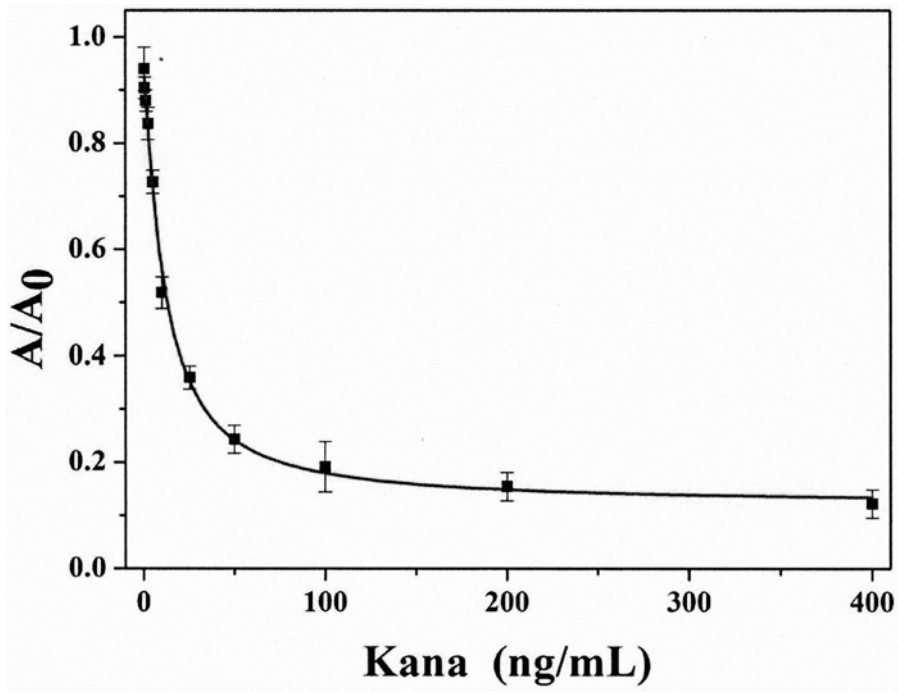


图9

专利名称(译)	一种卡那霉素残留荧光免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN107449898A	公开(公告)日	2017-12-08
申请号	CN2017110560230.7	申请日	2017-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	中检国研(北京)科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	中检国研(北京)科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中检国研(北京)科技有限公司		
[标]发明人	邹明强 齐小花 赵兵洁		
发明人	邹明强 齐小花 赵兵洁		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种卡那霉素残留荧光免疫层析检测试纸及制备方法。包括样品垫，抗体结合垫，NC纤维素膜，吸水纸，自下而上依次通过带有粘合剂的底板互相搭接而成，所述NC纤维素膜上从靠近抗体结合垫一端依次为包被检测线T线和质控线C线。所述抗体结合垫承载荧光标记抗体的结合物，所述NC纤维素膜自上而下分别设有用偶联包被抗原Kana-BSA喷划的T线和用羊抗鼠二抗IgG喷划的C线，荧光标记探针为稀土荧光二氧化硅纳米颗粒，荧光标记探针以醛基葡聚糖作为交联试剂与抗体结合；利用凝胶成像系统和荧光读卡仪考察荧光免疫层析试纸条的制备条件，利用荧光读卡仪检测T线的荧光强度，通过卡那霉素抗原浓度的标准曲线完成定量检测。

