



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239328 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811120981.8

(22)申请日 2018.09.26

(71)申请人 南京财经大学

地址 210023 江苏省南京市仙林大学城文苑路3号

申请人 南京禾舜诚生物技术有限公司  
北京美正生物科技有限公司  
北京华安麦科生物技术有限公司

(72)发明人 袁建 董雪 邢常瑞 柳家鹏  
张勋

(74)专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237  
代理人 邓丽 王伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法

(57)摘要

本发明涉及一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法。在本发明中,羊抗鼠IgG标记的铂(III)纳米粒子偶联物作为一种通用的平台,可以介导多重抗体的标记,提高标记特异性和效率。以AHD、AOZ、SEM和AMAZ为例,本发明涉及一种同时检测四种呋喃代谢物的多重荧光试纸条检测方法,并将这种纸传感器的应用于鱼肉样品的检测。结果表明在10分钟内同时对其进行肉眼检测,其消线值分别为0.1,0.5,0.5和0.5ng/g。简而言之,本发明中开发的这种免疫测定方法是检测饲料或食品动物样品中硝基呋喃代谢物的有效工具。



1. 一种快速检测四种硝基咪喃代谢物的免疫层析法,其特征如下,具体步骤如下:

(1) 单克隆抗体mAb的表征:

首先,通过用于96孔板的棋盘试验获得CPAHD-OVA和AHD-mAb的最佳工作浓度;然后,在该工作点建立2-NPAHD的竞争抑制曲线,并拟合四参数逻辑方程以获得2-NPAHD的 $IC_{50}$ ;

(2) Eu纳米球抗体偶联物的制备:

首先,用50mM pH值6.0的MES缓冲液将100 $\mu$ L Eu纳米球稀释至1mL并超声处理;随后,将10 $\mu$ L 2mg/ml的NHS溶液和10 $\mu$ L 1mg/ml的EDC溶液加入混合物中并搅拌30分钟;接下来,将100 $\mu$ g羊抗鼠IgG二抗溶液和100 $\mu$ LCBS缓冲液加入到NHS活化溶液中,将混合物在室温下孵育2小时,并用40 $\mu$ L 4%BSA溶液封闭;然后,将混合物离心15分钟,将沉淀物悬浮在1mL PBST中并超声处理1分钟;最后,在室温下将50 $\mu$ g AHD-mAb加入溶液中孵育2小时,将混合物离心15分钟;除去上清液,将沉淀重悬于1mL硼酸缓冲液中并超声处理以备进一步使用;将AOZ-mAb, SEM-mAb和AMOZ-mAb按上述相同的程序标记;

(3) 羊抗鼠二抗介导钬(III)纳米粒子免疫层析法的建立:

钬(III)纳米粒子免疫试纸条是将NC膜,样品垫和吸收垫逐层粘贴到PVC粘合剂卡上制成的;分别将CPSEM-OVA, CPAMOZ-OVA, CPAOZ-OVA, CPAHD-OVA和羊抗鼠IgG喷到NC膜上,T线1, T线2, T线3, T线4和C线彼此间隔3.8mm;然后,将组装好的卡在37 $^{\circ}$ C下干燥6小时;最后,将条带卡切成3.9mm宽的条带,并在室温下储存在干燥的箱子中。

2. 根据权利要求1所述的一种快速检测四种硝基咪喃代谢物的免疫层析法,其特征在于,所制备的纳米粒子免疫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160 $\mu$ L和四种Eu纳米球标记抗体各10 $\mu$ L加入微量滴定孔中,10分钟内读取结果。

3. 根据权利要求1所述的一种快速检测四种硝基咪喃代谢物的免疫层析法,其特征在于,所制备的纳米粒子免疫试纸条对CPSEM、CPAMOZ、CPAHD和CPAOZ的检测限分别为0.5, 0.5, 0.1, 0.5ng/g。

## 一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及了一种纳米粒子标记免疫层析法检测4种硝基呋喃代谢物的技术,总体属于农业领域畜牧与水产业,具体属于动物源性产品安全检测兽药残留检测领域。

### 背景技术

[0002] 硝基呋喃是一种合成的广谱抗生素,广泛用于医疗和兽医行业,用于治疗胃肠道感染,预防病原微生物感染。硝基呋喃对多种生物具有杀菌作用,并具有低毒性。但是,硝基呋喃的滥用会导致耐药菌株的出现。此外,动物实验表明,硝基呋喃具有一定的致癌性,致突变性和环境毒性。为确保人类食品安全,自1995年以来,欧盟已禁止将硝基呋喃用于食用动物。美国和中国也严格禁止在育种过程和饮用水中添加硝基呋喃。2003年,为这些硝基呋喃代谢物设定了1ng/g的最低要求性能限值(MRPL)。因此,必须开发有效的方法和便携式工具来监测和量化动物源性食品中硝基呋喃的代谢产物。

[0003] 近几十年来,检测食品中硝基呋喃的最常用方法是液相质谱分析方法,包括液相色谱-质谱(LC-MS),超高效液相色谱-串联质谱光谱法(UPLC-MS)和超高效液相色谱法与三重四极杆串联质谱联用技术(UHPLC-QqQ-MS / MS)。这些方法虽然准确性和灵敏度很高,但是仪器价格昂贵,需要专业技术人员操作,此外,这些方法也不适用于高通量现场检测过程。而快速免疫分析技术具有灵敏度高,成本低,样本量小等优点,广泛用于小分子,核酸和蛋白质的快速检测。虽然酶联免疫吸附测定(ELISA)的灵敏度相对较高,但操作步骤复杂,需要四个独立的板来分析四种代谢物,这不适合现场快速检测和同时检测四种代谢物。基于上述缺陷,近年来在ELISA的基础上开发了一种新的高灵敏度检测方法,用于同时检测多种代谢物的免疫色谱法(ICA)。

[0004] 免疫色谱分析是基于抗原-抗体反应的一种常见类型的免疫分析,并根据抗原-抗体复合物的性质和复合物形成的顺序分为两个主要类别:“夹心”和“竞争”。近年来,这些方法结合了新的纳米材料(铈(III)纳米粒子,功能金纳米粒子,碳纳米粒子,量子点纳米珠和上转换材料,磁性纳米粒子)或新技术(热对比,纳米催化剂放大,无功信号放大器,表面增强拉曼散射,等温核酸扩增)。这些方法已被广泛用于疾病筛查和诊断,被称为“试纸”,并且具有灵敏,操作简单,快速,成本低,多路复用和智能等许多优点。还有一些用于监测硝基呋喃代谢物的免疫色谱技术,然而,他们中的大多数只专注于一种硝基呋喃代谢物,很少有人追求多重免疫色谱分析。因此,仍需要开发多重免疫测定法用于食品中硝基呋喃残留物的高通量筛选。

### 发明内容

[0005] 本发明旨在开发一种基于四种单克隆抗体(mAb)和羊抗鼠IgG的羊抗鼠二抗介导铈(III)纳米粒子标记免疫层析法(M-EICA),可以同时和特异性地鉴定样品中的四种硝基呋喃代谢物。以1-氨基-2-内酰脲(AHD)、3-氨基-2-唑烷基酮(AOZ)、氨基脲(SEM)和5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)为例,本发明主要包括单克隆抗体mAb的表征、用Eu纳米球

标记AHD-mAb, AOZ-mAb, SEM-mAb和AMOZ-mAb、羊抗鼠二抗介导铕(III)纳米粒子标记免疫层析法(M-EICA)的制备。

[0006] 本发明通过以下技术方法实现:

一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法,具体步骤如下:

(1) 单克隆抗体mAb的表征:

间接竞争ELISA方法用于表征硝基呋喃单克隆抗体的灵敏度和交叉反应性(CR),例如,AHD检测程序的细节如下:首先,通过用于96孔板的棋盘试验获得CPAHD-OVA和AHD-mAb的最佳工作浓度。然后,在该工作点建立2-NPAHD的竞争抑制曲线,并拟合四参数逻辑方程以获得2-NPAHD的IC50。

[0007] (2) 用Eu纳米球标记抗体:

标记过程如下。首先,用50mM pH 6.0的MES缓冲液将100 $\mu$ LEu纳米球稀释至1mL并超声处理。随后,将10 $\mu$ L 2mg/ml的NHS溶液和10 $\mu$ L 1mg/ml的EDC溶液加入混合物中并搅拌30分钟。接下来,将100 $\mu$ g羊抗鼠IgG二抗溶液和100 $\mu$ L CBS缓冲液加入到NHS活化溶液中。将混合物在室温下孵育2小时,并用40 $\mu$ L 4%BSA溶液封闭。然后,将混合物离心15分钟。将沉淀物悬浮在1mL PBST中并超声处理1分钟。最后,在室温下将50 $\mu$ g AHD-mAb加入溶液中孵育2小时,将混合物离心15分钟。除去上清液,将沉淀重悬于1mL硼酸缓冲液中并超声处理以备进一步使用。将AOZ-mAb, SEM-mAb和AMOZ-mAb按上述相同的程序标记。

[0008] (3) 羊抗鼠二抗介导铕(III)纳米粒子标记免疫层析法的制备:

羊抗鼠二抗介导铕(III)纳米粒子免疫试纸条是将NC膜,样品垫和吸收垫逐层粘贴到PVC粘合剂卡上制成的。分别将CPSEM-OVA, CPAMOZ-OVA, CPAOZ-OVA, CPAHD-OVA和羊抗鼠IgG喷到NC膜上,T线1,T线2,T线3,T线4和C线彼此间隔3.8mm。然后,将组装好的卡在37 $^{\circ}$ C下干燥6小时。最后,将条带卡切成3.9mm宽的条带,并在室温下储存在干燥的箱子中。

[0009] 所制备的快速检测四种硝基呋喃代谢物的复合铕(III)纳米粒子免疫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160 $\mu$ L和四种Eu纳米球标记抗体各10 $\mu$ L加入微量滴定孔中,10分钟内读取结果。

[0010] 所制备的快速检测四种硝基呋喃代谢物的复合铕(III)纳米粒子免疫试纸条对呋喃西林(CPSEM)、呋喃它酮(CPAMOZ)、呋喃妥因(CPAHD)和呋喃唑酮(CPAOZ)的检测限分别为0.5,0.5,0.1,0.5ng/g。

[0011] 与现有的方法技术相比,本发明取得的积极效果为:

(1) 灵敏度高,成本低,样本量小;

(2) 操作简单,快速,多路复用和智能;

(3) 可用于动物组织,尿液等快速、高通量筛选,广泛用于小分子,核酸和蛋白质的快速检测;

(4) 所制备的纳米粒子免疫试纸条可以同时检测四种硝基呋喃代谢物,并在10分钟内可读取检测结果。

## 附图说明

[0012] 图1为本发明实施例中M-EICA条带的结构示意图;

图2为本发明实施例中Eu纳米球标记-(羊抗鼠IgG)-mAb缀合物的标记过程;

图3本发明实施例中M-EICA检测的鱼肉中四种硝基呋喃代谢物。

### 具体实施方式

[0013] 以下结合附图对本发明作进一步说明。

[0014] 羊抗鼠二抗介导铂(III)纳米粒子标记免疫层析法的原理是基于样品中四种硝基呋喃与分散在测试线上的包被原之间的竞争反应,并将四种Eu纳米球标记的抗体混匀在一个微量滴定孔中。在检测之前,将样品溶液加入到一个微量滴定孔中以允许在微孔板孔中与Eu纳米球标记的抗体反应。然后,立即将多重条带置于微孔板中。由于毛细管作用,标记的抗体和分析物迅速从样品垫扩散到吸收垫中。如果样品为阴性,则Eu纳米球标记的抗体将形成Eu纳米球标记的抗体-抗原缀合物,例如在T线2上Eu纳米球标记的-(羊抗鼠IgG)-AMOZ-mAb与CPAMOZ-OVA缀合。随着液体流动,多余的Eu纳米球标记的抗体与控制区上的羊抗鼠免疫球蛋白结合,形成C线。因此,在这种情况下,条带上将有五个区域(阴性样品)。然而,如果样品含有一种硝基呋喃代谢物,则Eu纳米球标记的抗体和相应的分析物偶联在一起形成抗体-分析物缀合物。由于样品中的分析物与NC膜上的包被原之间的竞争效应,样品中的分析物越多,测试线上的Eu纳米球越少。例如,如果样品含有一定量的SEM,则T线1变为无色(SEM阳性结果),其他三种硝基呋喃代谢物也变为无色。如果样品含有一定量的四种硝基呋喃代谢物,则所有T系都变为无色(所有阳性结果)。

[0015] 实施例1

一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法,具体步骤如下:

(1) 单克隆抗体mAb的表征:

首先,通过用于96孔板的棋盘试验获得CPAHD-OVA和AHD-mAb的最佳工作浓度。然后,在该工作点建立2-NPAHD的竞争抑制曲线,并拟合四参数逻辑方程以获得2-NPAHD的IC<sub>50</sub>。结果如下表1所示:

表1四种硝基呋喃代谢物单克隆抗体的IC<sub>50</sub>值

代谢物	缩写	抗体	IC <sub>50</sub>
1-氨基-2-内酰胺	AHD	AHD-mAb	0.2ng/ml
3-氨基-2-吡啶基酮	AOZ	AOZ-mAb	0.1ng/ml
氨基脒	AMOZ	AMOZ-mAb	0.25ng/ml
5-甲基吗啉-3-氨基-2-吡啶基酮	SEM	SEM-mAb	0.15ng/ml

(2) 用Eu纳米球标记抗体:

首先,用50mM pH 6.0的MES缓冲液将100μLEu纳米球稀释至1mL并超声处理。随后,将10μL 2mg/ml的NHS溶液和10μL 1mg/ml的EDC溶液加入混合物中并搅拌30分钟。接下来,将100μg羊抗鼠IgG二抗溶液和100μLCBS缓冲液加入到NHS活化溶液中。将混合物在室温下孵育2小时,并用40μL 4%BSA溶液封闭。然后,将混合物离心15分钟。将沉淀物悬浮在1mL PBST中并超声处理1分钟。最后,在室温下将50μg AHD-mAb加入溶液中孵育2小时,将混合物离心15分钟。除去上清液,将沉淀重悬于1mL硼酸缓冲液中并超声处理以备进一步使用。将AOZ-mAb, SEM-mAb和AMOZ-mAb按上述相同的程序标记。

[0016] (3) 羊抗鼠二抗介导铂(III)纳米粒子标记免疫层析法的制备:

羊抗鼠二抗介导铂(III)纳米粒子免疫试纸条是将NC膜,样品垫和吸收垫逐层粘贴到PVC粘合剂卡上制成的。分别将CPSEM-OVA,CPAMOZ-OVA,CPAOZ-OVA,CPAHD-OVA和羊抗鼠IgG喷到NC膜上,T线1,T线2,T线3,T线4和C线彼此间隔3.8mm。然后,将组装好的卡在37℃下干燥6小时。最后,将条带卡切成3.9mm宽的条带,并在室温下储存在干燥的箱子中。

[0017] 实施例2 本发明M-EICA在检测鱼样中的应用

(1) Qtrap-MS / MS方法确认阴性鱼样品

阴性鱼样(草鱼)购自当地超市,并依常规进行预处理。然后是QTRAP 5500三合一四极质谱(AB Sciex)方法进行定量分析鱼样中的硝基呋喃代谢物。

[0018] (2) 鱼样中M-EICA的分析曲线和灵敏度

将四种硝基呋喃代谢物溶解在甲醇中并稀释至储备溶液(10 $\mu$ g/mL),加标鱼样品用于评估条带检测硝基呋喃代谢物的灵敏度,随后将代谢物衍生为2-NP-分析物(2-NPAHD,2-NPAOZ,2-NPAMOZ和2-NPSEM)。用AHD,AOZ,AMOZ和SEM同时加标鱼肉匀浆(5g),具体加标浓度见表2。简而言之,将5g鱼肉匀浆放入50mL离心管中,接下来,在剧烈振荡下加入7mL盐酸(1M)和500 $\mu$ L 2-NBA(0.1M)反应2分钟。将样品在65℃孵育30分钟后,向管中加入5mL磷酸氢二钾(0.1M)和2mL氢氧化钠(2M),将混合物剧烈振荡1分钟。随后,立即向溶液中加入8mL乙酸乙酯并振荡2分钟,将混合物以4000rpm离心5分钟。将4mL上清液置于5mL离心管中并在60℃下空气干燥。最后,在pH7.4下,3mL的己烷和0.1M PBS按2:1(v / v)混匀,混合物剧烈振荡1分钟使2-NP-分析物完全溶解,并以4000rpm离心1分钟。将160 $\mu$ L样品溶液和40 $\mu$ L四种Eu纳米球标记的抗体在微量滴定孔中混合在一起。然后将条带插入微量滴定孔中,并在10分钟内读取结果。

[0019] 表2 鱼肉匀浆加标浓度

	AHD(ng/g)	AOZ(ng/g)	AMOZ(ng/g)	SEM(ng/g)
1)	0	0	0	0
2)	0.02	0.02	0.02	0.02
3)	0.05	0.05	0.05	0.05
4)	0.1	0.1	0.1	0.1
5)	0.2	0.2	0.2	0.2
6)	0.5	0.5	0.5	0.5
7)	1.0	1.0	1.0	1.0

(3) 通过M-EICA和商业ELISA试剂盒分析鱼样品

仪器检测结果显示,混合标准品中2-NPAMOZ,2-NPSEM,2-NPAHD和2-NPAOZ的保留时间分别为10.82分钟,13.25分钟,13.51分钟和14.22分钟。采用相同的方法对鱼样进行检测,确认所购鱼样为空白样品。

[0020] 用浓度水平分别为0,0.3,0.5和1.0ng/g的AHD,AOZ,AMOZ和SEM加标鱼肉匀浆(20g),并通过本发明开发的M-EICA和商业ELISA试剂盒进行分析,结果见下表3。

[0021] 表3 M-EICA和ELISA检测加标鱼样

AHD/AOZ/AMAZ/SEM 浓度 (ng/g)	M-EICA 检测(n=5)				商业试剂盒 ELISA 检测			
	AHD	AOZ	AMAZ	SEM	AHD	AOZ	AMAZ	SEM
0/0/0/0	- <sup>a</sup>	-	-	-	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
0.3/0.3/0.3/0.3	+ <sup>b</sup>	+	+	+	0.28	0.31	0.34	0.27
0.5/0.5/0.5/0.5	+	+	+	+	0.53	0.51	0.48	0.47
1.0/1.0/1.0/1.0	+	+	+	+	1.17	1.17	0.97	1.21

注释：<sup>a</sup>阴性结果，观察到测试线。

[0022] <sup>b</sup>阳性结果，没有观察到测试线。



图1

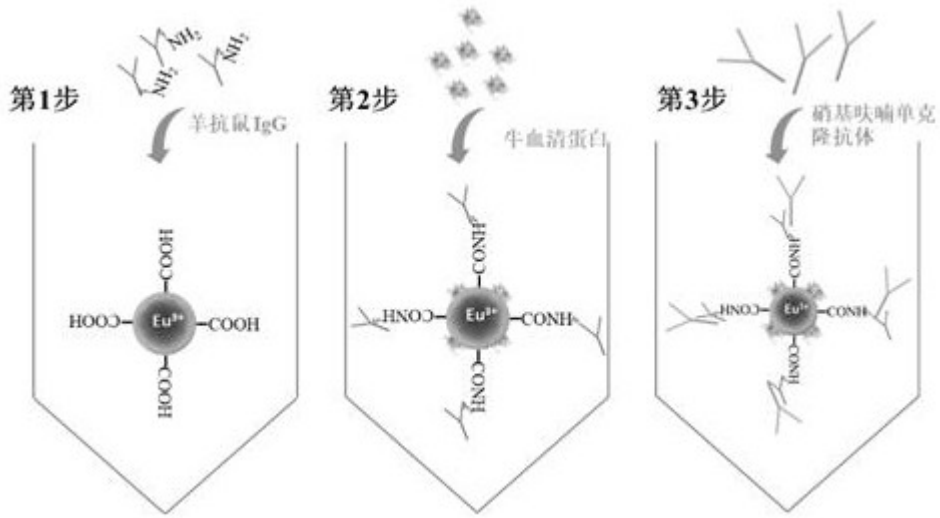


图2

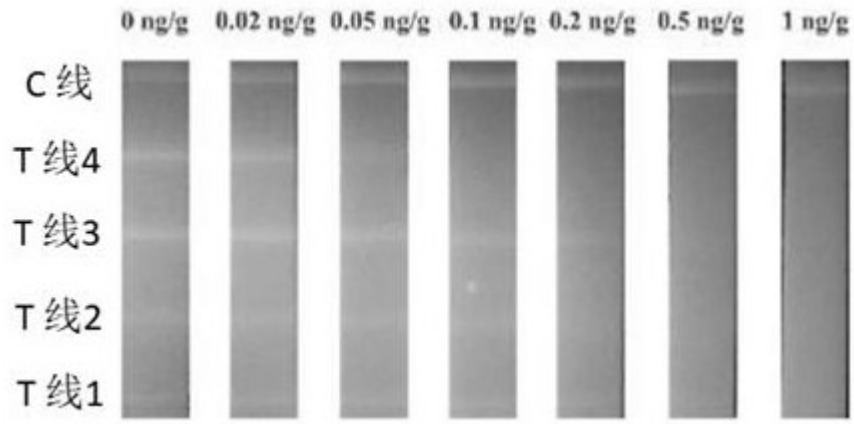


图3

专利名称(译)	一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109239328A</a>	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811120981.8	申请日	2018-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	南京财经大学 南京禾舜诚生物技术有限公司 北京美正生物科技有限公司 北京华安麦科生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京财经大学 南京禾舜诚生物技术有限公司 北京美正生物科技有限公司 北京华安麦科生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京财经大学 南京禾舜诚生物技术有限公司 北京美正生物科技有限公司 北京华安麦科生物技术有限公司		
[标]发明人	袁建 董雪 邢常瑞 柳家鹏 张勋		
发明人	袁建 董雪 邢常瑞 柳家鹏 张勋		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54346		
代理人(译)	邓丽 王伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种快速检测四种硝基呋喃代谢物的免疫层析法。在本发明中，羊抗鼠IgG标记的铂(III)纳米粒子偶联物作为一种通用的平台，可以介导多重抗体的标记，提高标记特异性和效率。以AHD、AOZ、SEM和AMOZ为例，本发明涉及一种同时检测四种呋喃代谢物的多重荧光试纸条检测方法，并将这种纸传感器的应用于鱼肉样品的检测。结果表明在10分钟内同时对其进行肉眼检测，其消线值分别为0.1，0.5，0.5和0.5 ng/g。简而言之，本发明中开发的这种免疫测定方法是检测饲料或食品动物样品中硝基呋喃代谢物的有效工具。

