



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103983775 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201410254564. 8

(22) 申请日 2014. 06. 10

(73) 专利权人 无锡迪腾敏生物科技有限公司
地址 214125 江苏省无锡市锦溪路 99 号
专利权人 江南大学

(72) 发明人 匡华 胥传来 郭靖男 徐丽广
马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

审查员 李宏悦

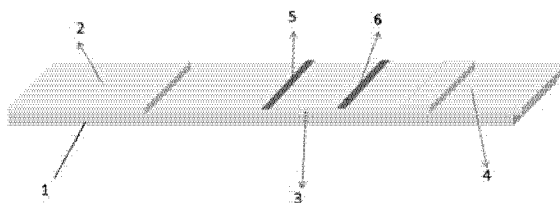
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

一种基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法,属于免疫学检测技术领域。本发明试纸条包括 PVC 背衬, PVC 背衬前端设置样品垫,样品垫与硝酸纤维素膜前端连接,硝酸纤维素膜后端与吸水垫连接;结合微孔板上含有抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物的混合物;硝酸纤维素膜上依次包被有氨苄西林-BSA 检测线和羊抗鼠 IgG 控制线。本发明适合进行现场检测的免疫层析色谱检测法,能实现至少十五种 β -内酰胺类抗生素的多残留检测;检测快速,仅需要 5-10min;便携,适合现场检测;操作简便,不需要专业技术人员。



1. 一种基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于制备步骤为:

(1) 氨苄西林-BSA 偶联物的制备:将氨苄西林与碳二亚胺 EDC 以 1 : 3 摩尔比溶于 0.01mol/L、pH 5 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸 MES 中,室温搅拌活化 1h,之后将活化物逐滴加入溶解了牛血清蛋白 BSA 的 0.01mol/L、pH 7.0 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 HEPES 中,牛血清蛋白 BSA 和氨苄西林的摩尔比为 1 : 50,室温反应 4h,用生理盐水 4℃透析 3 天,形成氨苄西林-BSA 偶联物;

(2) 制备胶体金颗粒:用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20-40nm 胶体金颗粒;

(3) 抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物的制备:取步骤(2)制备的 4mL 胶体金调至 pH 9.0,搅拌下逐滴加入蛋白浓度为 0.1mg/mL 的抗 β -内酰胺类抗生素受体 0.4mL,放置 30min 后加入牛血清蛋白 BSA 使终浓度为 1%,放置至少 30min 后,10000rpm 离心 50min,并用 0.002mol/L、pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 4mL 重悬两次,最后用该硼酸盐缓冲液 0.4mL 重悬,得到稳定的抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物;

(4) 小鼠阴性血清-胶体金标记物的制备:将步骤(3)中的抗 β -内酰胺类抗生素受体替换为阴性小鼠的纯化血清,重复步骤(3),得到小鼠阴性血清-胶体金标记物;

(5) 制作配套使用的结合微孔板:将步骤(3)和步骤(4)得到的抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物按体积比 1:1 混合后,取 10 μ L 混合物包被在 96 微孔板上;

(6) 硝酸纤维素膜的处理:将氨苄西林-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG 分别包被在作为反应垫的硝酸纤维素膜上,依次作为检测线和控制线,在 37℃烘箱干燥;

(7) 试纸条的组装:将样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫由一端依次黏附在 PVC 背衬上,用切条机切割成 3mm 宽的细条,即得到用于检测的免疫层析试纸条,4℃冷藏备用。

2. 用权利要求 1 所述方法制备的基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫胶体金试纸条的应用,其特征在于可以检测至少 15 种 β -内酰胺类抗生素;所述 15 种 β -内酰胺类抗生素分别为阿莫西林,氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、邻氯青霉素,双氯青霉素,萘夫西林、苯唑西林、头孢克洛,头孢替唑、头孢噻肟、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢硫脒,头孢吡肟。

一种基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法,属于免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 因为现有兽药种类繁多,就 β -内酰胺类抗生素也有很多种,仅是单残留检测不能满足对兽药滥用而导致的药物残留的很好检测。运用抗原抗体反应能够实现对一小部分的 β -内酰胺类抗生素的检测,但仍难以满足多残留检测的需要。现有的能实现多残留检测的方法主要是仪器分析,其中包括高效液相色谱法、液质联用(HPLC-MS)、气质联用(GC-MS)和 TTC 法等。但这些检测方法需要昂贵的仪器设备,操作需要专业技术人员,且不能适应高通量、现场的快速检测。因此实现具有快速,便携优点的免疫检测方法的多残留检测具有现实意义。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种基于受体的能够同时检测十五种 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法,该方法是基于针对该类抗生素的受体的。

[0004] 本发明的技术方案,一种基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条,包括PVC背衬,在PVC背衬前端设置样品垫,样品垫为德国 Schleicher&Schuell 公司的 Glass24 垫,样品垫与硝酸纤维素膜前端连接,硝酸纤维素膜后端与吸水垫连接,吸水垫材料是吸水纸;硝酸纤维素膜上依次包被有氨苄西林-BSA 检测线和羊抗鼠 IgG 控制线;与其配套使用的结合微孔板,结合微孔板上的微孔中含有抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物的混合物。

[0005] 所述基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条的制备方法,制备步骤为:

[0006] (1) 氨苄西林-BSA 偶联物的制备:将氨苄西林(AMP)与碳二亚胺(EDC)以 1:3 摩尔比溶于 pH 5.0、0.01mol/L 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)溶液中,室温搅拌活化 1h,按摩尔比 AMP:BSA=50:1 称取 BSA 溶解在 0.01M、pH7.0 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 HEPES 溶液中,将 AMP 的活化物逐滴滴入 BSA 溶液中,室温反应 4h,用生理盐水 4℃透析 3 天,形成氨苄西林-BSA 偶联物;

[0007] (2) 制备胶体金颗粒:用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20-40nm 胶体金颗粒;

[0008] (3) 抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物的制备:取步骤(2)制备的 4mL 胶体金调至 pH 9,搅拌下逐滴加入蛋白浓度为 0.1mg/mL 的抗 β -内酰胺类抗生素受体 0.4mL,放置 30min 后加入牛血清蛋白 BSA 使终浓度为 1%,放置至少 30min 后,10000 rpm 离心 50min,并用 0.002mol/L、pH 9.0 的硼酸盐缓冲液 4mL 重悬两次,最后用该硼酸盐缓冲液

0.4mL 重悬,得到稳定的抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物。

[0009] (4)小鼠阴性血清-胶体金标记物的制备:将步骤(3)中的抗 β -内酰胺类抗生素受体替换为阴性小鼠的纯化血清,重复步骤(3),得到小鼠阴性血清-胶体金标记物。

[0010] (5)制作配套使用的结合微孔板:将步骤(3)和步骤(4)得到的抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物按体积比 1:1 混合后,取 10 μ L 混合物包被在 96 微孔板上;

[0011] (6)硝酸纤维素膜的处理:将氨苄西林-BSA 偶联物和羊抗鼠 IgG 分别包被在作为反应垫的硝酸纤维素膜上,依次作为检测线和控制线,在 37 $^{\circ}$ C 烘箱干燥;

[0012] (7)试纸条的组装:将样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫由一端依次黏附在 PVC 背衬上,用切条机切割成 3mm 宽的细条,即得到用于检测的免疫层析试纸条,4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

[0013] 所述基于受体的检测 β -内酰胺类抗生素的免疫胶体金试纸条的应用,其特征在于可以检测至少 15 种 β -内酰胺类抗生素;分别为阿莫西林,氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、邻氯青霉素,双氯青霉素,萘夫西林、苯唑西林、头孢克洛,头孢替唑、头孢噻肟、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢硫脒,头孢吡肟。

[0014] 本发明的有益效果:本发明提供一种便携、快速、适合进行现场检测的免疫层析色谱检测法(gold immunochromatography assay;GICA),能实现至少十五种 β -内酰胺类抗生素的多残留检测。本发明检测快速,仅需要 5-10min;便携,适合现场检测;操作简便,不需要专业技术人员。

附图说明

[0015] 图 1 组装完成的免疫层析试纸条结构。1、PVC 背衬;2、样品垫,3、硝酸纤维素膜,4、吸水垫,5、检测线,6、控制线。

[0016] 图 2 该试纸条对氨苄西林等十五种 β -内酰胺类抗生素的检测结果。

具体实施方式

[0017] 实施例 1

[0018] 如图 1 所示,PVC 背衬 1 一端依次粘贴样品垫 2、硝酸纤维素膜 3,另一端粘附吸水垫 4,硝酸纤维素膜 3 上包被了氨苄西林-BSA 作为检测线 5,和羊抗鼠 IgG 作为控制线 6。配套使用的微孔板上包被了抗 β -内酰胺类抗生素的簇特异性抗体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物。

[0019] 按以下步骤制备:

[0020] (1)氨苄西林-BSA 偶联物的制备:将氨苄西林与 EDC 以 1:3 摩尔比溶于 MES (0.01mol/L、pH 5),室温搅拌活化 1h,之后将活化物逐滴加入溶解了 BSA 的 HEPES (0.01mol/L、pH 7)中,BSA 和氨苄西林的摩尔比为 1:50,反应 4h,用生理盐水 4 $^{\circ}$ C 透析 3 天,形成氨苄西林-BSA 偶联物;

[0021] (2)制备胶体金颗粒:用柠檬酸三钠还原剂将氯金酸还原制成 20nm-40nm 胶体金颗粒;

[0022] (3)抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物的制备:取步骤(2)制备的 4mL 胶体金调至 pH 9.0,搅拌下逐滴加入蛋白浓度为 0.1mg/mL 的抗 β -内酰胺类抗生素受体

0.4mL,放置30min后加入牛血清蛋白BSA使终浓度为1%,放置至少30min后,10000 rpm离心50min,并用0.002mol/L、pH 9.0的硼酸盐缓冲液4mL重悬两次,最后用该硼酸盐缓冲液0.4mL重悬,得到稳定的抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物;

[0023] (4)小鼠阴性血清-胶体金标记物的制备:将步骤(3)中的抗 β -内酰胺类抗生素受体替换为阴性小鼠的纯化血清,重复步骤(3),得到小鼠阴性血清-胶体金标记物;

[0024] (5)制作配套使用的结合微孔板:将步骤(3)和步骤(4)得到的抗 β -内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物按体积比1:1混合后,取10 μ L混合物包被在96微孔板上;

[0025] (6)硝酸纤维素膜的处理:将氨苄西林-BSA偶联物和羊抗鼠IgG分别包被在作为反应垫的硝酸纤维素膜上,依次作为检测线和控制线,在37 $^{\circ}$ C烘箱干燥;

[0026] (7)试纸条的组装:将样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫由一端依次黏附在PVC背衬上,用切条机切割成3mm宽的细条。即得到用于检测的免疫层析试纸条,4 $^{\circ}$ C冷藏备用。

[0027] 应用实施例1

[0028] 将阴性的纯牛奶与0.01M PBS按1:9混合得到牛奶混合液(A液),用0.01M PBS:DMF=1:1的混合溶液分别配制1mg/mL的阿莫西林,氨苄西林,青霉素G,青霉素V,邻氯青霉素,双氯青霉素,萘夫西林,苯唑西林,头孢克洛,头孢替唑,头孢噻肟,头孢噻吩,头孢哌酮,头孢硫脒,头孢吡肟,头孢氨苄,头孢羟氨苄,头孢拉定,头孢呋辛,头孢地嗪。用A液稀释得到浓度为1 μ g/mL的标准品溶液。

[0029] 检测时取50 μ L 1 μ g/mL的上述标准品溶液,加入已经包有金标受体和金标小鼠阴性血清的微孔板中,反应3min,然后将试纸条样品垫一端浸入样本溶液,液面不得超过MARK线,5-15min内可以判定结果,30min后结果无效。

[0030] 结果判断:若检测线和控制线同时出现红色条带,则说明该受体不能识别该种抗生素,或者灵敏度过低。若控制线没有红色条带出现则表示该试纸条无效。

[0031] 将上述检测线不出现红色条带的标准品溶液继续用A液稀释到合适梯度,用多个试纸条同时进行上述检测步骤,至检测线出现有梯度的红色条带为止,得到合适的梯度条带后,拍照保存。

[0032] 如图2所示,每根试纸条测试内容如下:(1) 0ng/mL阿莫西林;(2) 1ng/mL阿莫西林;(3) 2ng/mL阿莫西林;(4) 2ng/mL氨苄西林;(5) 5ng/mL氨苄西林;(6) 0.5ng/mL青霉素G;(7) 1ng/mL青霉素G;(8) 1ng/mL青霉素V;(9) 2ng/mL青霉素V;(10) 5ng/mL邻氯青霉素;(11) 10ng/mL邻氯青霉素;(12) 10ng/mL双氯青霉素;(13) 20ng/mL双氯青霉素;(14) 5ng/mL萘夫西林;(15) 10ng/mL萘夫西林;(16) 20ng/mL苯唑西林;(17) 50ng/mL苯唑西林;(18) 50ng/mL头孢克洛;(19) 100ng/mL头孢克洛;(20) 10ng/mL头孢替唑;(21) 25ng/mL头孢替唑;(22) 250ng/mL头孢噻肟;(23) 500ng/mL头孢噻肟;(24) 25ng/mL头孢噻吩;(25) 50ng/mL头孢噻吩;(26) 5ng/mL头孢哌酮;(27) 10ng/mL头孢哌酮;(28) 25ng/mL头孢硫脒;(29) 50ng/mL头孢硫脒;(30) 10ng/mL头孢吡肟;(31) 25ng/mL头孢吡肟。

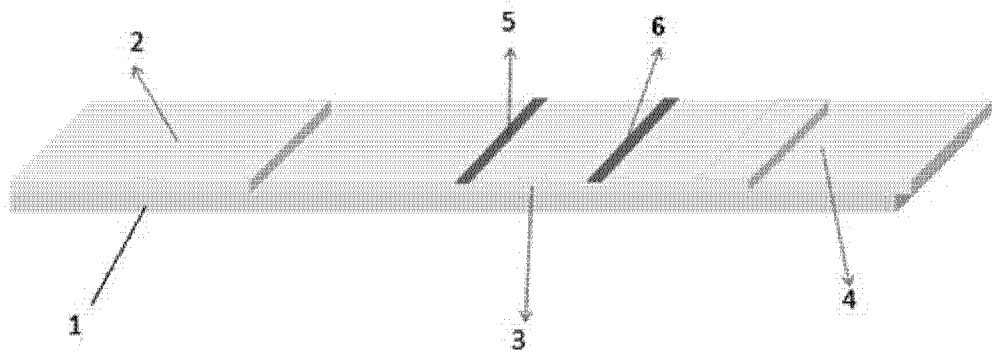


图 1

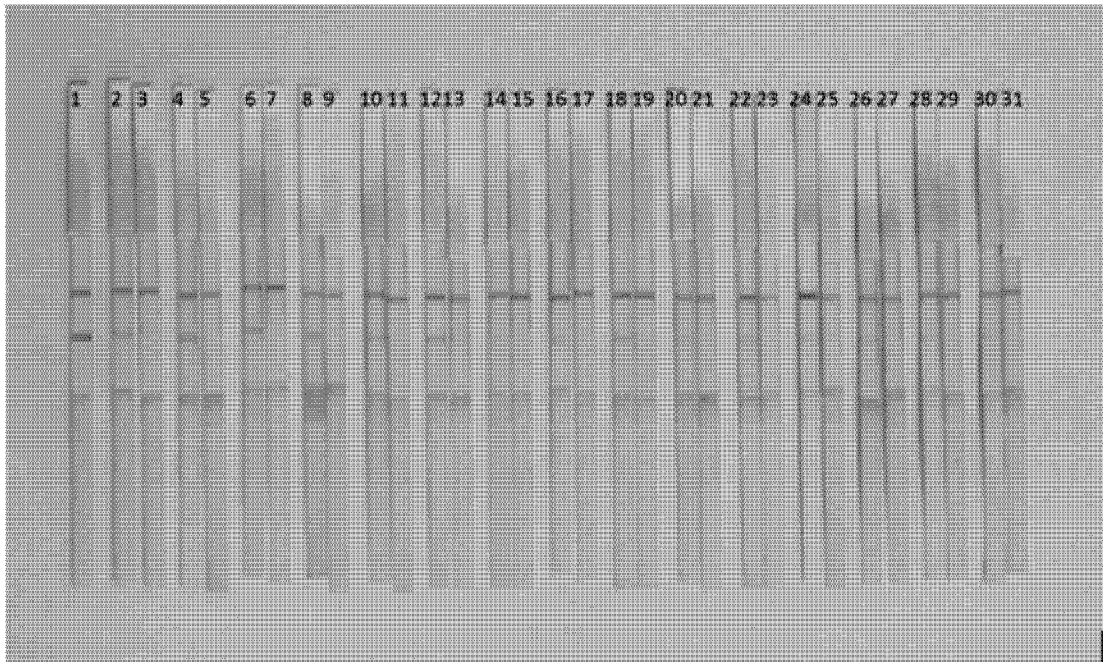


图 2

专利名称(译)	一种基于受体的检测β-内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN103983775B	公开(公告)日	2015-09-23
申请号	CN201410254564.8	申请日	2014-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	无锡杰圣杰康生物科技有限公司 江南大学		
申请(专利权)人(译)	无锡杰圣杰康生物科技有限公司 江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	无锡迪腾敏生物科技有限公司 江南大学		
[标]发明人	匡华 胥传来 郭靖男 徐丽广 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	匡华 胥传来 郭靖男 徐丽广 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558		
其他公开文献	CN103983775A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于受体的检测β-内酰胺类抗生素的免疫层析试纸条及其制备方法，属于免疫学检测技术领域。本发明试纸条包括PVC背衬，PVC背衬前端设置样品垫，样品垫与硝酸纤维素膜前端连接，硝酸纤维素膜后端与吸水垫连接；结合微孔板上含有抗β-内酰胺类抗生素受体-胶体金标记物和小鼠阴性血清-胶体金标记物的混合物；硝酸纤维素膜上依次包被有氨苄西林-BSA检测线和羊抗鼠IgG控制线。本发明适合进行现场检测的免疫层析色谱检测法，能实现至少十五种β-内酰胺类抗生素的多残留检测；检测快速，仅需要5-10min；便携，适合现场检测；操作简便，不需要专业技术人员。

