



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109813899 A

(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201711151327.9

(22)申请日 2017.11.18

(71)申请人 丹阳亿太生物科技发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丹阳市开发区
八纬路留学生创业园

(72)发明人 杜霞 张淑雅 洪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析定量检测
试纸条

(57)摘要

本发明涉及头孢噻呋快速时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条制备方法及其应用。该试纸条由Fusion5膜、硝酸纤维素膜和吸水纸三部分组成,通过竞争法原理,利用时间分辨荧光微球作为免疫标记物,对待测抗原进行准确快速的定量检测。

1. 头孢噻呋快速时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条, 其特征在于: 包括Fusion5膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸三部分, 硝酸纤维素膜位于中间, Fusion5膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端, Fusion5膜上有加样区和微球区, 微球区上载有头孢噻呋单克隆抗体时间分辨荧光微球; 硝酸纤维素膜上有检测线和质控线, 检测线上包被头孢噻呋抗原, 质控线上包被抗兔抗体。

2. 如权利要求1所述的试纸条, 其特征在于: 所述时间分辨荧光微球包括检测微球和质控微球, 检测微球为表面包被有头孢噻呋单抗的荧光微球, 质控微球为表面包被有兔抗标记蛋白的荧光微球。

3. 如权利要求1或2所述的试纸条, 其特征在于: 所述时间分辨荧光微球的粒径范围为100 - 1000 nm。

4. 如权利要求1所述的试纸条, 其特征在于: 所述检测线上包被头孢噻呋检测用抗原为头孢噻呋与载体物质形成的偶合物; 检测线上包被二抗 - 抗兔抗体。

5. 如权利要求1所述的试纸条的制备方法, 其制备步骤如下:

(1). 质控微球制备:

① 用生物素标记蛋白;

② 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球;

(2). 检测微球制备: 采用头孢噻呋的单抗包被醛基修饰的荧光微球;

(3). 空白大卡粘贴: 将硝酸纤维素膜粘贴在塑料底板中间, Fusion5膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端;

(4). 喷膜: 将兔抗标记蛋白的荧光微球和头孢噻呋单抗的荧光微球采用释放缓冲液混合稀释到一定浓度, 喷到Fusion5膜的微球区; 头孢噻呋抗原和抗兔抗体稀释后, 分别喷到硝酸纤维素膜的T线和C线位置;

(5) 干燥及切条。

6. 如权利要求5所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(4)中释放缓冲液组成为10 - 15%蔗糖、3 - 10%海藻糖、0.5 - 1% N,0-双三甲硅基乙酰胺(BSA)、0.1 - 0.5%庆大霉素。

7. 如权利要求5所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(4)稀释后检测微球终浓度为0.5 - 3mg/mL, 质控微球终浓度0.05 - 0.3 mg/mL; T线抗原终浓度0.5 - 3mg/mL, C线抗原终浓度0.5 - 3 mg/mL; C, T线喷膜液量为0.5 - 1.5 μ l/cm, 微球喷膜量为2 - 10 μ l/cm。

8. 如权利要求5所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(5)中烘干条件为37℃烘干12 - 16小时。

9. 如权利要求5权利要求所述的头孢噻呋快速时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条, 其特征在于: 试纸条底部设有塑料底板。

10. 如权利要求1所述的试纸条的应用, 其特征在于: 该试纸条用于采用竞争法模式的免疫层析的定量检测。

头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域,具体涉及食品中有害残留物的检测方法,特别是头孢噻呋定量检测的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 头孢噻呋(ceftiofur)又名赛得福,是第1个动物专用的第3代头孢菌素类抗生素。1988年,FDA批准了头孢噻呋钠用于治疗牛呼吸道细菌性疾病,此时该药在美国首次上市。此后FDA又陆续批准了头孢噻呋钠、盐酸头孢噻呋及头孢噻呋晶体自由酸用于1日龄鸡、火鸡,猪、肉牛、奶牛、马、山羊及绵羊等的呼吸道疾病的治疗。加拿大、日本及欧洲一些国家也相继正式批准用于猪、肉牛、奶牛、羊的呼吸道疾病的治疗。头孢噻呋抗菌谱广,抗菌活性强,对革兰阳性菌、阴性菌及厌氧菌都有很强的抗菌活性,而且对胃酸和 β 内酰胺酶较稳定,过敏反应少,体内残留非常低,在世界范围内得到广泛应用。目前,国内有多家公司相继研制出头孢噻呋注射液,但制剂的溶剂体系均为植物油、大豆油等油性介质。华南农业大学联合洛阳惠中兽药有限公司在国内首先研制出水性头孢噻呋注射液,由于其溶剂体系为水性,流动性好,易于吸收,肌注时不容易堵塞针头,对动物的刺激性小,具有广阔的市场应用前景。

[0003] 目前,在肉类组织中,对于头孢噻呋的检测方法有许多,液制连用(LC—MS)、气质连用(GC—MS)、ELISA等等。但是这些方法速度慢,容易受较多因素影响,准确率不高。本发明的目的是研制一种更适合企业进行现场检测且快捷简便、成本低廉的定性检测方法。

[0004] 目前的免疫层析(lateral flow immunoassay,LFIA)快速检测试纸条多以胶体金、彩色乳胶微球或者荧光素作为标记物。基于胶体金标记技术开发的快速检测产品,存在定性或者半定量,批间差异较大等问题;彩色乳胶微球虽然批间差有所改进,但灵敏度依然较低,也只能定性或半定量;基于荧光素标记技术的免疫层析灵敏度有了较大提高,也能进行定量检测,但是由于样本中含有较高的荧光本底信号,且stock位移较小,会对检测产生较大的影响。

[0005] 时间分辨荧光(Time-resolved Fluorescence,TRF)是一种非同位素荧光标记物,与普通荧光相比,具有stock位移大,荧光寿命长等特点,可以有效的避免样品中的本底荧光,以及激发光等杂散光的影响,因此相比普通荧光具有更高的灵敏度和抗干扰能力。

[0006] 本发明利用Fusion5替代传统的样品垫、滤血膜、结合垫,将原有的四层甚至五层膜系统简化,开发出只需要三层膜结构的快速定量免疫层析检测试纸,不仅使生产工艺得到了简化,而且有效的降低了产品的批内差和批间差,提高了检测灵敏度,极具实用价值。

发明内容

[0007] 本发明的目的是为了提供新型的、能快速定量检测头孢噻呋的时间分辨荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法和应用。

[0008] 本发明一方面公开了头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条,该试纸条

包括Fusion5膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸三部分。硝酸纤维素膜位于中间,Fusion5膜与吸水纸分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端。其中,Fusion5膜上设有加样区和微球区,微球区上载有时间分辨荧光微球;硝酸纤维素膜上设有检测线(T线)和质控线(C线),T线接上包被头孢噻呋抗原,C线包被抗兔抗体。

[0009] 本发明的优点是能快速检测出组织中头孢噻呋的含量。

[0010] 所述头孢噻呋时间分辨荧光微球,包括检测微球和质控微球,检测微球为表面包被有头孢噻呋单抗的荧光微球,质控微球为表面包被有兔抗标记蛋白的荧光微球。

[0011] 所述荧光微球中填充了镧系元素化合物;较优的,该镧系元素螯合物为铕螯合物;最优的,该铕螯合物可为Eu(TTA)₃/TOP0或Eu(TTA)₃/Phen。

[0012] 所述蛋白可以是牛血清Y-球蛋白(BGG)或小牛血清白蛋白(BSA)。

[0013] 所述时间分辨荧光微球粒径范围为100 - 1000 nm。

[0014] 所述硝酸纤维素膜上,T线上包被的抗原为头孢噻呋抗原,C线上包被的抗兔抗体。

[0015] 所述头孢噻呋时间分辨荧光免疫定量检测试纸条底部设有塑料底板。

[0016] 本发明第二方面公开了头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1). 质控微球制备:

① 用生物素标记蛋白;

② 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球;

(2). 检测微球制备

采用头孢噻呋的单抗包被醛基修饰的荧光微球;

(3). 空白大卡粘贴

在带有背胶的塑料底板上采用搭接的方式,首先粘贴硝酸纤维素膜,然后在硝酸纤维素膜左右两端分别粘贴吸水纸和Fusion5膜;

(4). 喷膜

将兔抗标记蛋白的荧光微球和头孢噻呋单抗的荧光微球采用释放缓冲液混合稀释到一定浓度,喷到Fusion5膜的微球区;头孢噻呋抗原和抗兔抗体稀释后,分别喷到硝酸纤维素膜的T线和C线位置;

(5). 干燥及切条。

[0017] 将上述喷好试剂的大卡烘干、切条。

[0018] 步骤(4)中用到的释放缓冲液含有10 - 15%蔗糖、3 - 10%海藻糖、0.5 - 1%N,0 - 双三甲硅基乙酰胺(BSA),0.1-0.5%庆大霉素。

[0019] 步骤(4)稀释后检测微球终浓度为0.5 - 3 mg/mL,质控微球终浓度0.05 - 0.2 mg/mL;T线抗原终浓度0.5 - 3 mg/mL,C线抗原终浓度0.5 - 23mg/mL;C,T线喷膜液量为0.5 - 1.5 μ l/cm,微球喷膜量为2 - 10 μ l/cm。

[0020] 步骤(5)中所述的烘干可在恒温烘箱或者烘房中,37℃烘干12 - 16小时。

[0021] 本发明第三方面公开了头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条的应用。

[0022] 本发明的试纸条可通过竞争法原理测定生物分子,适用于所有的采用竞争法模式的免疫层析检测。

[0023] 本发明的头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析试纸条灵敏度高,批内精密度可达10%

左右,批间精密度可达15%,可同时检测全血、血清、血浆、尿液样本,250 mg/dL血红蛋白、500 mg/dL甘油三脂,10 mg/dL胆红素对本试纸条的检测无影响,远超过市场上大多数免疫层析快速诊断产品。

附图说明

[0024] 图1本发明试纸条结构示意图(1. 塑料底板,2. Fusion5膜,3. 硝酸纤维素膜,4. 吸水纸,5. 加样区,6. 微球区,7. T线区,8. C线区)。

具体实施方式

[0025] 1. 试纸条各成分的制备

1.1 质控微球的制备 生物素标记 γ -球蛋白(BGG)包被的质控微球的制备

(1) 生物素标记的BGG的制备

用0.1 M NaCNBH₃将BGG(购自Pel - Freez Biological)配制成10 mg/mL溶液,采用DMSO(二甲基甲酰胺)配置Biotin-X-X-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺修饰生物素,生产商:SIGMA,产品号:B3295)溶液至16.2 mg/mL,按照1 mg BBG蛋白加入5.4 μ l Biotin-X-X-NHS的量将Biotin-X-X-NHS液加入到BGG溶液中,混合均匀并在4℃下放置过夜。采用透析法除去游离未反应的生物素,透析液为生物素标记蛋白透析缓冲液(0.1 M Tris,0.3 M NaCl,0.005 M EDTA-Na-2H₂O,pH8.0)。透析完毕,BCA法测定蛋白浓度。

[0026] (2) 采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球

向10mL醛基修饰的荧光微球中加入6 μ l 20%的Tween-20溶液、2 mg上述(1)中透析得到的生物素标记蛋白以及16 μ l的NaCNBH₃(25 mg/mL,0.05 M pH6.0的MES缓冲液配制,现配现用),补加0.1 M pH6.0 MES至总体积为400 μ l,37℃避光孵育48 h。加入40 μ l的Gly溶液(75 mg/mL,0.05 M pH6.0的MES缓冲液配制),37℃避光旋转反应2 h。加250 μ l N,0-双三甲硅基乙酰胺(200 mg/mL,0.05 M pH6.0的MES缓冲液配制)溶液。37℃避光旋转反应16 h。4℃ 13000 rpm离心30分钟。弃上清,用1 mL pH6.0的MES缓冲液再洗两次。用1 mL 0.05 M pH8.0的HEPES缓冲液(0.05 M HEPES,0.3 M NaCl,0.025 M EDTA-Na-2H₂O,1.6% N,0-双三甲硅基乙酰胺(BSA),0.1% Dextran,0.1%Tween-20,0.3745% Triton X- 405,0.01%庆大霉素,0.05 % Proclin)悬浮(其终浓度为10 mg/mL)。

[0027] (3) 质控微球工作液配制

根据工作需要,采用0.05M pH 8.0的HEPES缓冲液将(2)中悬液稀释到相应浓度,分装保存。

[0028] 1.2 检测微球的制备

向10 mg醛基修饰的荧光微球中加入6 μ l 20%的Tween-20溶液、2 mg头孢噻吩单克隆抗体以及16 μ l的NaCNBH₃(25 mg/mL,0.05 M pH6.0的MES缓冲液配制,现配现用),补加0.1 M pH6.0 MES至总体积为400 μ l,37℃避光孵育48 h。加入40 μ l的Gly溶液(75 mg/mL,0.05 M pH6.0的MES缓冲液配制),37℃避光旋转反应2 h。加250 μ l BSA(200 mg/mL,0.05 M pH6.0的MES缓冲液配制)溶液。37℃避光旋转反应16 h。4℃ 13000 rpm离心30分钟。弃上清,用1 mL pH6.0的MES缓冲液再洗两次。用1 mL 0.05 M pH8.0的HEPES缓冲液(0.05 M HEPES,0.3 M NaCl,0.25 M EDTA-Na-2H₂O,1.6% BSA,0.1% Dextran,0.1% Tween-20,0.3745% Triton

X-405, 0.01%庆大霉素, 0.05% Proclin) 悬浮(其终浓度为10 mg/mL)。

[0029] 1.3 微球溶液的配置

用释放缓冲液(含有20%蔗糖、5%海藻糖、0.5% BSA, 0.2%庆大霉素)将质控微球和检测微球配制成时间分辨荧光微球混合液, 质控微球终浓度为0.2 mg/mL, 检测微球终浓度为1 mg/mL。

[0030] 1.4 检测线(T线)溶液的配制

用0.01 M PB溶液将头孢噻呋抗原复合物稀释成0.5 mg/mL。

[0031] 1.5 质控线(C线)溶液的配制

用0.01 M PB溶液将链霉亲和素稀释成0.5 mg/mL。

[0032] 2. 试纸条的制备

2.1 空白大卡粘贴

按照附图1的膜组合方式, 硝酸纤维素膜3位于中间, Fusion5膜2与吸水纸4分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端, 粘贴在带有背胶的塑料底板上。

[0033] 2.2 喷膜

分别在图1中T线7, C线8位置喷上T, C线溶液, C, T线喷膜液量为0.8 μ l/cm, 在图1中6位置喷上微球溶液, 微球溶液喷膜量为4 μ l/cm。

[0034] 2.3 烘干

将步骤(2)中喷好试剂的头孢噻呋大卡在恒温烘箱中37℃烘干16小时。

[0035] 2.4 切条

将烘干的头孢噻呋大卡切割成4 mm宽度的纸条, 即得到头孢噻呋试纸条。

[0036] 3. 检测仪器原理及应用

3.1 测量仪原理: 聚焦透镜位于与激发光成90度方向, 使样品检测池中的样品产生的荧光信号经聚焦透镜聚焦, 再经光栅分光后到达光电倍增管, 光电倍增管将光信号转变为电信号, 最后传送至A/D转换器进行处理。所述激光光源采用半导体泵浦固体激光器, 输出功率为20 mW, 发射波长为 375 ± 5 nm。激发光经传导光纤耦合后的出纤功率为5 mW以上。样品检测池选用紫外石英玻璃。光栅设置为可分光获得波长为 440 ± 5 nm的光。

[0037] 3.1 检测仪应用: 将含有头孢噻呋的食用动物组织经预处理后的提取物装入样品检测池中, 激光光源发出波长为 375 ± 5 nm的激光, 经传导光纤耦合后传导至样品检测池, 并穿过待测样品, 样品检测池中的样品吸收激发光后产生荧光, 产生的荧光信号经聚焦透镜聚焦, 再经光栅分光, 得到波长为 440 ± 5 nm的光, 到达光电倍增管, 光电倍增管将光信号转变为电信号, 同时将电信号放大后输入A/D转换器, 最后输出给读数装置处理, 通过读数装置即可直接读出结果。

[0038] 4. 试纸条的定量检测

4.1 绘制标准曲线

在制备好的头孢噻呋试纸条加样区中加入不同浓度的头孢噻呋抗原标准品(取五个不同的浓度, 分别为0, 10, 30, 90, 270 ng/mL, 每个浓度设5个重复), 滴加上样缓冲液(PBS, 含有1.6% BSA, 0.1% Tween-20, 防腐剂), 膜层析10分钟以后, 仪器读取C, T线信号,

实验结果及分析见表1:

表1头孢噻呋标准品检测结果

SPE 标准品 (ng/mL)		0	10	30	90	270
信号	1	18.21	12.30	8.53	3.721	1.36
	2	18.93	13.08	9.07	3.67	1.59
	3	19.61	12.56	8.21	4.02	1.23
	4	19.19	11.82	8.48	3.48	1.47
	5	18.65	12.64	8.39	3.64	1.55
mean		18.918	12.48	8.536	3.706	1.44
SD		0.531	0.464	0.322	0.197	0.147

以抗原标准品浓度与测定的信号平均值绘制标准曲线,采用四参数拟合方式,标准曲线数据见表2。

[0039] 表2头孢噻呋定量检测标准曲线数据

SPE标准品 (ng/mL)	0	10	30	90	270
读数	18.918	12.48	8.536	3.706	1.44

4.2样品检测

在头孢噻呋试纸条的加样区依次加入待测样品,滴加上样缓冲液,膜层析10分钟以后,仪器读取C、T线信号。根据步骤(1)中的标准曲线计算待测样品中头孢噻呋抗原浓度。

[0040] 5. 试纸条性能测试

测定2个浓度样本的10次批内差CV,实验结果见表3,实验结果表明,试纸条的批内精密度均小于11%。

[0041] 表3试纸条批内差

样本浓度 (ng/mL)	mean	SD	CV%
50	6.16	0.337	9.7
100	3.43	0.179	8.25

采用此方法制备的头孢噻呋定量检测试纸条检测范围可达到0 - 500 ng/mL,灵敏度在10 ng/mL以下,批内精密度可达11%左右,批间精密度可达15%,可同时检测组织、全血、血清、血浆样本,250 mg/dL血红蛋白、500 mg/dL甘油三酯,10 mg/dL胆红素对本检测无影响,远超过市场上大多数免疫层析快速诊断产品。

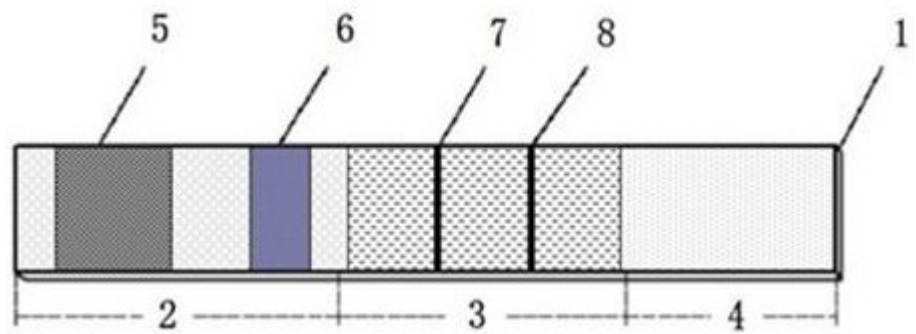


图1

专利名称(译)	头孢噻呋时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条		
公开(公告)号	CN109813899A	公开(公告)日	2019-05-28
申请号	CN201711151327.9	申请日	2017-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丹阳亿太生物科技发展有限公司		
[标]发明人	杜霞 张淑雅 洪霞		
发明人	杜霞 张淑雅 洪霞		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及头孢噻呋快速时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条制备方法及其应用。该试纸条由Fusion5膜、硝酸纤维素膜和吸水纸三部分组成，通过竞争法原理，利用时间分辨荧光微球作为免疫标记物，对待测抗原进行准确快速的定量检测。

SPE标准品 (ng/mL)		0	10	30	90	270
信号	1	18.21	12.30	8.53	3.721	1.36
	2	18.93	13.08	9.07	3.67	1.59
	3	19.61	12.56	8.21	4.02	1.23
	4	19.19	11.82	8.48	3.48	1.47
	5	18.65	12.64	8.39	3.64	1.55
mean		18.918	12.48	8.536	3.706	1.44
SD		0.531	0.464	0.322	0.197	0.147