



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102879561 A

(43) 申请公布日 2013.01.16

(21) 申请号 201110197450.0

(22) 申请日 2011.07.13

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1号

(72) 发明人 刘榜 刘楚新 翟珊莉 张庆德

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种牛奶中人乳铁蛋白筛查试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明属于转基因成分检测技术领域,与免疫胶体金技术有关。公开了一种用于快速检测转人乳铁蛋白(hLF)基因牛奶的免疫胶体金试纸条及其制备方法,本发明的试纸条,包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬,其特征在于,在PVC背衬上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;所述的结合垫上包被有所述的抗hLF多克隆抗体-胶体金标记物,该多克隆抗体通过人工合成hLF多肽后免疫家兔而制得。所述的硝酸纤维素膜上分别包被有hLF蛋白构成的检测线(5)和山羊抗兔IgG的质控线(6)。本发明的试纸条特异性强,操作简便,检测快速。

1. 一种牛奶中人乳铁蛋白免疫胶体金筛查试纸条,其包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬,其特征在于,在 PVC 背衬 (1) 上依次搭接粘帖样品垫 (3)、结合垫 (4)、硝酸纤维素膜 (2) 及吸水纸 (7);所述的结合垫 (4) 上包被有兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体;所述的硝酸纤维素膜 (2) 上分别包被有人乳铁蛋白的检测线 (5) 和山羊抗兔 IgG 的质控线 (6));

所述的兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体是通过如下步骤制备得到的:

(1) 对人乳铁蛋白进行分析,选择亲水性好、处于分子表面、柔韧性好且与牛乳铁蛋白同源性低的区段,人工合成一段抗原多肽,其蛋白质序列如序列表 SEQ ID NO:2 所示;

(2) 将步骤 (1) 所示的多肽交联到载体蛋白匙孔血蓝蛋白上,得到复合蛋白,以该复合蛋白为抗原,通过免疫获得阳性血清,经亲和纯化后制备得到兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体。

2. 一种牛奶中人乳铁蛋白免疫胶体金筛查试纸条的制备方法,其包括如下步骤:

(1) 用柠檬酸钠与氯金酸反应制备得到胶体金;

(2) 将制备的抗人乳铁蛋白多克隆抗体加入步骤 (1) 制备的胶体金中,得到抗人乳铁蛋白多克隆抗体-胶体金标记物;

(3) 将抗人乳铁蛋白多克隆抗体-胶体金标记物包被到结合垫 (4) 上;

(4) 将人乳铁蛋白蛋白标准品包被到硝酸纤维素膜 (2) 上构成检测线 (5);并将山羊抗兔 IgG 包被到硝酸纤维素膜 (2) 上构成质控线 (6);

(5) 在 PVC 背衬 (1) 上依次搭接粘帖样品垫 (3)、结合垫 (4)、硝酸纤维素膜 (2) 及吸水纸 (7),得到检测牛奶中人乳铁蛋白的免疫胶体金试纸条。

3. 权利要求 1 所述的试纸条在筛查转人乳铁蛋白基因牛奶检测中的应用。

一种牛奶中人乳铁蛋白筛查试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于牛奶转基因成分的检测技术领域,与免疫胶体金检测技术有关。具体涉及一种转人乳铁蛋白(human lactoferrin,简称 hLF) 基因成分的快速简便的免疫胶体金检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 转基因动物及转基因动物产品以其诱人的经济前景,显示出强大的生命力,其市场化将是不可扭转的时代趋势。然而,鉴于生物安全问题,转基因动物生产的各个环节都需受到严格的控制。因此,一套健全、科学、规范的安全评价体系是必不可少的。其中,可靠、准确的转基因检测方法是安全评价体系中的重要环节。

[0003] 中国农业大学的李宁教授已经成功培育出了一批转人乳铁蛋白转基因奶牛,数量达到了产业化规模。这标志着我国转基因奶牛新品种培育和动物乳腺生物反应器技术达到了国际先进水平,鉴于转人乳铁蛋白基因奶牛生产技术的成熟以及其产品市场化的趋势,建立一种快速、简便的检测人乳铁蛋白的方法,有很重要的必要性和紧迫性。

[0004] 目前对于转基因成分的检测可从外源基因的核酸和蛋白质两个水平进行,从蛋白质水平进行转基因成分检测,具有必要性和可行性,这是因为:只有对目的蛋白质进行检测,才能反映外源基因的最终表达情况;对于生物反应器制得的蛋白产品,必须对蛋白质进行定性、定量以及生物活性分析;对蛋白质进行检测,蛋白质样品制样较核酸简单。诸多的蛋白质检测方法,大致可以分为4类:(1) 基于蛋白质的物理化学特性的检测,如双向电泳、质谱、色谱等;(2) 基于核酸与蛋白质之间的互作的检测,如邻位连接技术,是一种依赖于适配子(apramer,能够特异地识别并结合蛋白质的DNA或RNA的总称)的检测技术(Mats G., Simon F., Michael T., et al. A sense of closeness: protein detection by proximity ligation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14:82-86; Simon F., Mats G., Jonas J., et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays[J]. Nature, 2002, 20:473-477);(3) 基于蛋白质与蛋白质之间的互作的检测,如常用的免疫检测方法,包括western blot, dot blot(不需专门的仪器,但是操作繁琐,不适合做批量检测), ELISA(灵敏度高、特异性强、简单快速、稳定性好、便于自动化检测等特点,应用性强),以及免疫组织化学染色法(具有特异性强、灵敏度高、定位准确的特点,便于进行功能研究,但是操作复杂、假阳性率高)等;(4) 将对蛋白质的检测转化为核酸的检测,如Bio-bar code assay,灵敏度高(Khan S, Klein W, Mirkin CA, et al. Fluorescent and scanometric ultrasensitive detection technologies with the bio-bar code assay for Alzheimer's disease[J]. Nanoscale, 2005, 2(1):7-15)。上述提到的这些方法都比较费时费力,而且需要专业技术人员和专门的仪器设备,基本上只能在实验室完成,不便于基层推广。

[0005] 胶体金免疫层析(gold-immunochromatography assay GICA)是20世纪80年代发展起来的一项新的免疫分析方式,是应用胶体金标记技术,以胶体金作为示踪物,应用于

抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。它具有简便,快速,特异性强,灵敏度高,费用低的优点。依据胶体金免疫层析技术,在转基因植物检测中,已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测试纸条。

[0006] 鉴于转基因动物及其产品的应用前景,研发快速、灵敏、准确、安全、便捷的转基因动物及其产品的检测方法,为转基因动物安全评价及转基因动物的监测和监控提供技术支撑,对于转基因动物及其产品的安全管理具有重要意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对转基因动物蛋白质检测体系缺乏的现状,建立一种适用于牛奶中转入人乳铁蛋白(hLF)的快速检测试纸条及其制备方法。本发明能准确快速检测出转基因牛奶中转入人乳铁蛋白(hLF),不需要特殊设备,为基层检测人员提供一种快速简便的方法,本发明的方法同时也为转基因动物及其产品安全评价和管理提供借鉴。

[0008] 本发明的总体技术路线图见图1所示。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 一种检测牛奶中人乳铁蛋白(hLF)的免疫胶体金筛查试纸条,其包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬。在PVC背衬1上依次搭接粘帖的样品垫3、结合垫4、硝酸纤维素膜2及吸水纸7;所述的结合垫4上包被有兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体;所述的硝酸纤维素膜2上分别包被有人乳铁蛋白的检测线5和山羊抗兔IgG的质控线6;

[0011] 上述人乳铁蛋白(hLF)购自Sigma公司,货号:L4894;山羊抗兔IgG购自Millipore公司,货号:IE0035;

[0012] 所述的兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体是通过如下步骤制备得到的:

[0013] (1) 对人乳铁蛋白(hLF)蛋白进行分析,选择亲水性好、处于分子表面、柔韧性好且与牛乳铁蛋白同源性低的区段,人工合成一段抗原多肽,其蛋白质序列如序列表SEQ ID NO:2所示;

[0014] (2) 将步骤(1)所示的多肽交联到载体蛋白匙孔血蓝蛋白(简称KLH)上,得到复合蛋白,再将该复合蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔,取得阳性血清后经亲和纯化制得兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体。

[0015] 申请人提供了一种人乳铁蛋白蛋白筛查试纸条的制备方法,其包括如下步骤:

[0016] (1) 用柠檬酸钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0017] (2) 将制备的抗hLF多克隆抗体加入步骤1制备的胶体金中,得到抗人乳铁蛋白多克隆抗体-胶体金标记物;

[0018] (3) 将抗人乳铁蛋白多克隆抗体-胶体金标记物包被到结合垫4上;

[0019] (4) 将人乳铁蛋白蛋白标准品包被到硝酸纤维素膜2上构成检测线5;并将山羊抗兔IgG包被到硝酸纤维素膜2上构成质控线6;

[0020] (5) 在所述的PVC背衬1上依次搭接粘帖的样品垫3、结合垫4、硝酸纤维素膜2及吸水纸7,得到所述的检测牛奶中人乳铁蛋白的免疫胶体金试纸条。

[0021] 本检测试纸条结构如图2所示。本发明的试纸条是由样品垫3、结合垫4、硝酸纤维素膜2、吸水垫7按图示的顺序依次粘附在PVC背衬1上组装而成的。结合垫上包被有本发明制备的抗hLF多克隆抗体-胶体金标记物,硝酸纤维素膜上包被有检测线5和质控线

6,其中检测线为购买的 hLF 蛋白标准品,质控线为购买的山羊抗兔 IgG。所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC 背衬均购自 Millipore 公司。

[0022] 本发明试纸条检测原理:检测牛奶时,将其滴加到样品垫上,通过毛细作用牛奶就会向吸水垫一端渗透,当溶液经过金标垫时其中的人乳铁蛋白就会与有色颗粒标记的兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体反应,形成抗原-抗体复合物,使得样品中的人乳铁蛋白间接地被有色颗粒标记。此复合物继续向吸水纸一端流动,经过检测线时,由于有色颗粒标记的抗体已经与样品中的 hLF 结合,便失去了与检测线处包被的人乳铁蛋白结合的能力,因此就不会出现红色的检测线;溶液继续向前流动,到达质控线时,有色颗粒标记的抗体被包被的相应的抗体捕获,因此会形成一条红色的质控线。检测结果为阳性,即牛奶样品中含有人乳铁蛋白(图 3A)。如果样品中没有乳铁蛋白,则金标垫上的有色颗粒标记的抗体在层析膜上迁移的过程中,会顺利地先后与检测线处的人乳铁蛋白(hLF)和质控线处相应的抗体结合,分别出现红色的检测线和质控线,检测结果为阴性,即受检的牛奶样品中不存在人乳铁蛋白(图 3B)。如果在检测的过程中质控线没有出现,则该试纸条无效(图 3C、3D)。

[0023] 与现有的转基因动物外源蛋白检测技术相比,本发明具有如下的优点:

[0024] 1. 本发明的检测 hLF 的免疫胶体金试纸条,运用了层析技术,使免疫反应在层析膜上进行,整个过程迅速,耗时少;

[0025] 2. 本发明的检测试纸条不需要任何特殊仪器、设备,检测成本低;

[0026] 3. 本发明的检测试纸条操作简便,不需由专业人员操作;

[0027] 4. 本发明的检测试纸条储存方便,对温度要求不高;

[0028] 5. 本发明采用胶体金标记特异的兔抗人乳铁蛋白抗体,不受牛奶中其它蛋白的干扰,特异性好。

[0029] 综上所述,用本发明对牛奶中的人乳铁蛋白进行检测,具有反应迅速、特异性好、无需其它的任何仪器设备和专业的技术人员,为从基层对转基因牛奶进行监控打下了基础。

附图说明

[0030] SEQ ID NO:1 是人乳铁蛋白人工合成抗原多肽的核苷酸序列。

[0031] SEQ ID NO:2 是人乳铁蛋白的人工合成的抗原多肽序列。

[0032] 图 1:本发明的总体技术路线图。

[0033] 图 2:本发明检测试纸条的组装示意图。

[0034] 图中,1 为试纸条底衬,2 为层析膜,3 为样品垫,4 为金标垫,5 为检测线,6 为质控线,7 为样品垫

[0035] 图 3:本发明检测试纸条结果判定示意图。

[0036] 图中,A 为阳性结果示意图,即为转基因牛奶;B 为阴性结果示意图,即为非转基因牛奶;C、D 为失效试纸条

[0037] 图 4:本发明检测试纸条对牛奶样品的检测结果。

[0038] 图中,1 为 PBS 溶液,2 为人乳铁蛋白(hLF)标准品,3-6 为牛奶样品。

[0039] 图 5:Western blot 对试纸条检测结果的验证。

[0040] 图中,3-6 为牛奶样品,7 为人乳铁蛋白标准品。

具体实施方式

[0041] 实施例 1 (制备实施例)

[0042] 检测 hLF 的免疫胶体金试纸条的制备方法

[0043] 1. 抗原多肽的合成以及兔抗人乳铁蛋白抗体的获得

[0044] 对人乳铁蛋白进行分析,选择亲水性好、处于分子表面、柔韧性好且与牛乳铁蛋白同源性低的区段,人工合成一段抗原多肽,其蛋白质的序列如序列表 SEQ ID NO:2 所示,将它交联到载体蛋白匙孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin,简称 KLH,购自 Sigma 公司,货号:H9035) 上,再将此复合蛋白作为 抗原免疫新西兰大白兔 (6 月龄,体重为 3~4 公斤,购自天津科达养殖中心),取得阳性血清后经亲和纯化制得兔抗 hLF 多克隆抗体。

[0045] 2. 抗人乳铁蛋白多克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0046] (1) 胶体金的制备

[0047] 本发明采用柠檬酸三钠还原的方法,制得金颗粒直径为 40nm 的胶体金溶液。具体为:将 200mL 0.01% 的 HCl_4 溶液煮沸后,快速向其中加入 2.2mL 1% 的柠檬酸三钠溶液,继续煮沸至溶液颜色变为稳定的绛红色,冷却至室温后 4°C 储存备用。

[0048] (2) 金标抗体的制备

[0049] 向每毫升的胶体金溶液中加入 $13\mu\text{L}$ 0.01mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节 pH,以及 16.8 μg 的兔抗人乳铁蛋白多克隆抗体,稳定后加入 10% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液,使其终浓度为 1%;缓慢搅拌 30min 后,11000rpm 离心 40min 去上清,加入等体积的硼酸缓冲液洗涤两次,最后加入 1/20 体积的硼酸缓冲液 (配方:硼酸 0.1237g, PEG-20000 1g,用三馏水定容至 1000mL,调 pH 至 9.0) 将沉淀吹起, 4°C 储存备用。

[0050] 3. 结合垫的制备

[0051] 将结合垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液 (配方及制备:20g BSA,25g 蔗糖,3gPVP K-30,0.2g NaN_3 NaCl 8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KH_2PO_4 0.2g,用蒸馏水定容至 1000mL) 中 30min 后,于 37°C 烘干。然后用点膜仪 (BioDot 公司生产) 将制备好的抗 hLF 多克隆抗体-胶体金标记物均匀包被在结合垫上,每厘米结合垫包被 $6\mu\text{L}$ 抗人乳铁蛋白多克隆抗体-胶体金标记物,真空干燥,真空封装,置 4°C 备用。

[0052] 4. 样品垫的处理

[0053] 将样品垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液 (配方及制备:20g BSA,25g 蔗糖,3gPVP K-30,0.2g NaN_3 NaCl 8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KH_2PO_4 0.2g,用蒸馏水定容至 1000mL) 中 30min 后,于 37°C 烘干,真空封装,置 4°C 备用。

[0054] 5. 硝酸纤维素膜的包被

[0055] 用 0.01M pH 7.4 PBS 缓冲液 (配方:NaCl 8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KH_2PO_4 0.2g,用蒸馏水定容至 1000mL,再加 3% 的甲醇) 将人乳铁蛋白标准品稀释到 1.25mg/mL,用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为检测线,包被量为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$,检测线靠近结合垫端,距结合垫端约 8mm;用 0.01M pH 7.4 PBS 缓冲液 (含 3% 的甲醇) 将山羊抗兔 IgG 抗体稀释 2.5 倍,用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为质控线,包被量为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$,质控线靠近吸水垫,距吸收垫约 8mm,两线距离 5~8mm。 37°C 烘干,封装备

用。

[0056] 5. 试纸条的组装

[0057] 将层析膜、样品垫、金标垫以及吸水纸按照图 1 所示的位置关系,依次粘帖搭建到试纸条底衬上。

[0058] 6. 切条

[0059] 用切条机将试纸条切成宽度为 3.6mm ~ 4.0mm 的窄条。

[0060] 7. 试纸条的储存

[0061] 将切好的试纸条至于干燥器中,干燥保存。

[0062] 实施例 2(应用实施例)

[0063] 牛奶中 PBS 缓冲液筛查免疫胶体金试纸条的使用方法

[0064] 1. 牛奶样品的制备:

[0065] 用 PBS 缓冲液 (0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液,配方:NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g,用蒸馏水定容至 1000mI) 将牛奶样品(采集于 2010 年 4 月, -80℃ 保存,保存期为 14 个月)10 倍稀释,同时以配方:NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g,用蒸馏水定容至 1000mI 配方:NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g,用蒸馏水定容至 1000mI 人乳铁蛋白溶液标准品(来源同前)和 PBS 溶液作为阳性和阴性对照。

[0066] 2. 检测

[0067] 分别取阳性标准品、阴性标准品和各待检样品 100 μ L 加到微孔板中用于检测,将胶体金试纸条插入待检样品中,20min 后观察结果。

[0068] 3. 结果判定

[0069] 其结果如图 3 所示,若待检样品试纸条同时出现检测线和质控线,则判定为阴性样品,即为非转基因牛奶;若试纸条只出现质控线,则判为阳性样品,即为转基因(人乳铁蛋白)牛奶;若质控线没有出现,则表明该试纸条失效。用本发明的试纸条对牛奶样品 4 份进行了检测,结果如图 4 所示。

[0070] 实施例 3(验证试验)

[0071] 对采集的牛奶样品用 Western blot 进行检测,以此方法作为对照,步骤如下:

[0072] 1. 凝胶的制备

[0073] 在两块干净的玻璃板之间,灌制 12% 的分离胶 (10mL 凝胶配方:去离子水 3.3mL, 30% 丙烯酰胺溶液 4.0mL, 1.5moI/L Tris-HCl (pH8.8) 2.5mL, 10% 浓度的十二烷基硫酸钠 (SDS) 100 μ L, 10% 过硫酸铵 100 μ L, N, N, N', N' - 四甲基乙二胺 (TEMED) 8 μ L) 与 5% 的浓缩胶 (4.5mL 凝胶配方:去离子水 3.0mL, 30% 丙烯酰胺溶液 0.75mL, 1.0moI/L Tris-HCl (pH6.8) 2.5mL, 10% SDS 60 μ L, 10% 过硫酸铵 45 μ L, TEMED 6 μ L)。

[0074] 2. 电泳

[0075] 取 2 μ L 牛奶样品,加入 4 μ L loading buffer (5mL 溶液配方:1.0moI/L Tris-HCl (pH6.8) 1.25mL, 甘油 2.5mL, SDS 粉末 0.5g, 溴酚兰 25mg, β - 巯基乙醇 125 μ L) 和 14 μ L 去离子水,在 PCR 仪上 98℃ 变性处理 10min 后用微量进样器将样品全部加到胶孔中。80V 电泳直至蛋白进入分离胶,之后将电压上升至 120V。当样品中的溴酚兰迁移至凝胶的最下端时,电泳结束。

[0076] 3. 转膜

[0077] 按照产品的操作说明组装好转膜系统后,加入适量的 transfer buffer(甘氨酸 2.9g, Tris-HCl 5.8g, SDS 3.7g,溶于 800mL 去离子水中,加入 200mL 甲醇,混匀后室温保存),冰浴条件下 380mA 转膜 40min。

[0078] 4. 洗涤

[0079] 取适量 TBST 缓冲液(配方:量取 1mol/L 的 Tris-HCl(pH7.5)10mL 和 20% 的 Tween-20 25mL,称取氯化钠 8.8g,用去离子水定容至 1000mL)洗膜 3 次,每次 5min。

[0080] 5. 封闭

[0081] 将膜置于 blocking buffer(配方:向 100mL 的 TBST 溶液中加入 5g 脱脂奶粉)中,在摇床上封闭约 1h。

[0082] 6. 洗涤(同 4)

[0083] 7. 一抗孵育

[0084] 用 blocking buffer 将兔抗 hLF 多抗(购自 Santa Cruz 公司)稀释 3000 倍后,将膜置于其中在室温孵育 30 ~ 60min。

[0085] 8. 洗涤(同 4)

[0086] 9. 二抗孵育

[0087] 用 blocking buffer 将 HRP 标记山羊抗兔 IgG 稀释 4000 倍后,将膜置于其中在室温孵育 30 ~ 60min。

[0088] 10. 洗涤(同 4)

[0089] 11. 化学发光检测

[0090] 在暗室中,将膜与化学发光试剂一起孵育约 1min,用滤纸吸去过剩的液体后将膜置于暗匣中(发光面朝上),并在其上压上一块适当大小的 X 光片,盖上暗匣,压片 5 ~ 10s(压片时间视具体情况而定)。X 光片经显影、定影后,保存。检测结果如图 5 所示。

[0091] 通过检测结果对比可以发现,本发明的试纸条与 Western blot 方法得到的检测结果一致:3-5 号样品为转基因牛奶,6 号为非转基因牛奶,说明本发明的试纸条能够快速有效地检测到转基因牛奶中的 hLF 蛋白。Western blot 是转基因动物制备过程中,对外源基因蛋白表达进行确认时应用最为广泛的方法,与本发明的试纸条相比,试纸条检测方法具有如下优点,如表 1:

[0092] 表 1 检测转基因牛奶时本发明试纸条与 Western blot 方法的对比

[0093]

	Western blot	试纸条
所需仪器	电泳仪	无
所需试剂	去离子水、丙烯酰胺溶液、过硫酸胺溶液、TEMED 溶液、Tris-HCl 缓冲液、上样缓冲液、电泳缓冲液、转移缓冲液、洗涤液、封闭液、PVDF 膜、兔抗 hLF 多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG、ECL 发光试剂、X 光片等;	PBS 缓冲液
所需时间	6~8h	10~20min
技术要求	需要专业的技术人员	无

[0094] 尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明,但是不能认为是对本发明范围的限

制,本发明的范围由所附权利要求书限定。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰形式同样落在本发明的保护范围。

[0001]

序 列 表

<110> 华中农业大学

<120> 一种牛奶中人乳铁蛋白筛查试纸条及制备方法

<130>

<141> 2011-07-09

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> gene

<222> (1)..(45)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<223>

<400> 1

gag aac tac aaa tcc caa caa agc agt gac cct gat cct aac tgt
 Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys
 1 5 10 15

45

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys
 1 5 10 15

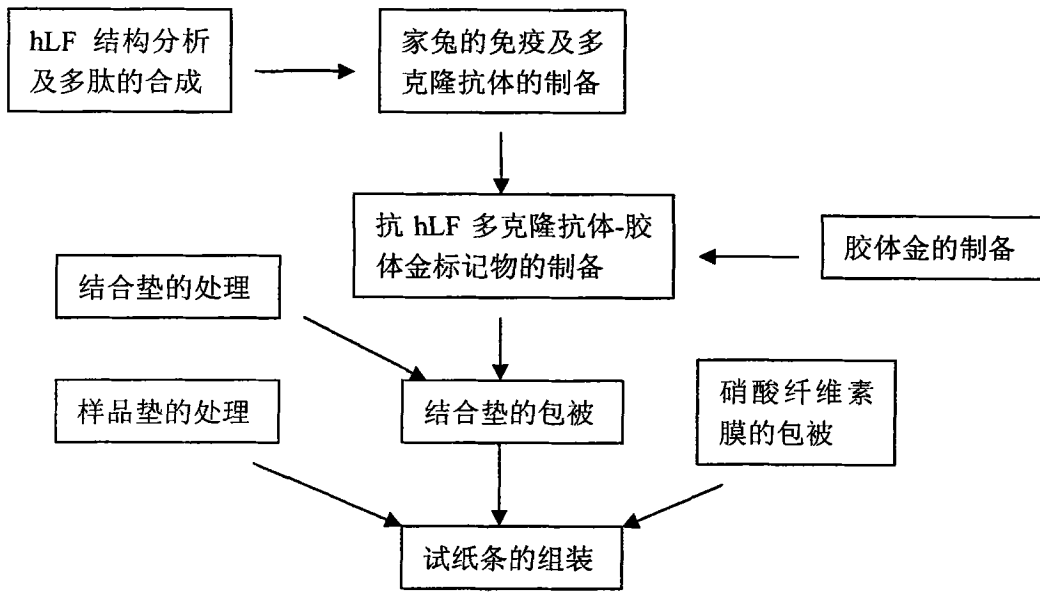


图 1

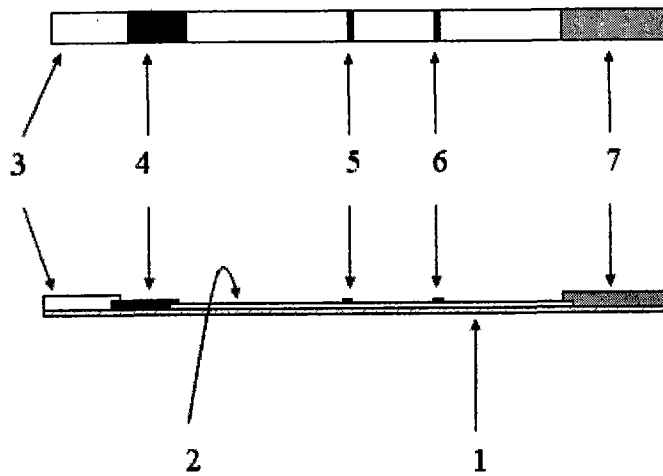


图 2

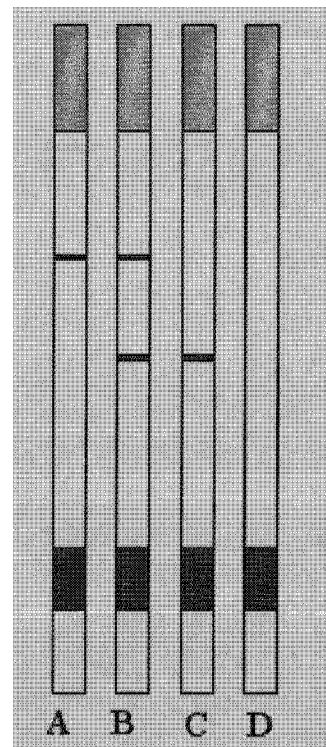


图 3

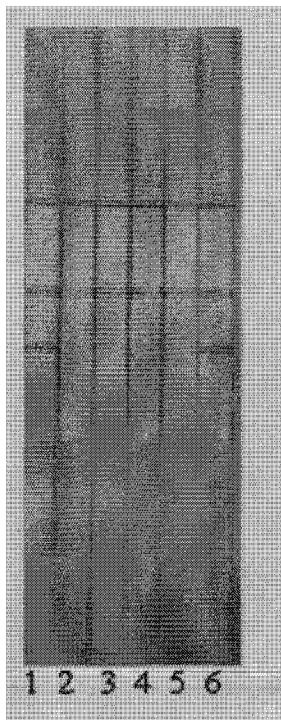


图 4

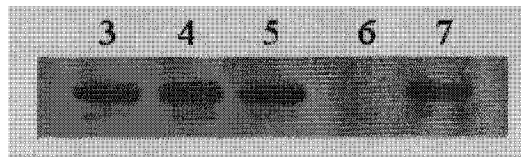


图 5

专利名称(译)	一种牛奶中人乳铁蛋白筛查试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN102879561A	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201110197450.0	申请日	2011-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	刘榜 刘楚新 翟珊瑚 张庆德		
发明人	刘榜 刘楚新 翟珊瑚 张庆德		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532		
代理人(译)	张红兵		
其他公开文献	CN102879561B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于转基因成分检测技术领域，与免疫胶体金技术有关。公开了一种用于快速检测转人乳铁蛋白(hLF)基因牛奶的免疫胶体金试纸条及其制备方法，本发明的试纸条，包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，其特征在于，在PVC背衬上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫；所述的结合垫上包被有所述的抗hLF多克隆抗体-胶体金标记物，该多克隆抗体通过人工合成hLF多肽后免疫家兔而制得。所述的硝酸纤维素膜上分别包被有hLF蛋白构成的检测线(5)和山羊抗兔IgG的质控线(6)。本发明的试纸条特异性强，操作简便，检测快速。

	Western blot	试纸条
所需仪器	电泳仪	无
所需试剂	去离子水、丙烯酰胺溶液、过硫酸胺溶液、TEMED 溶液、Tris-HCl 缓冲液、上样缓冲液、电泳缓冲液、转移缓冲液、洗涤液、封闭液、PVDF 膜、兔抗 hLF 多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG、ECL 发光试剂、X 光片等；	PBS 缓冲液
所需时间	6~8h	10~20min
技术要求	需要专业的技术人员	无