



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110567929 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910965914.4

(22)申请日 2019.10.10

(66)本国优先权数据

201910387246.1 2019.05.08 CN

(71)申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号

(72)发明人 华修德 王鸣华 丁园 陈贺
孙娜娜

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

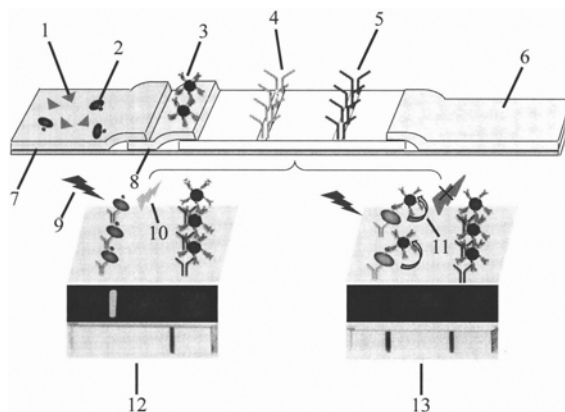
权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析检测方法,首先重组示踪物与分析物共同竞争偶联在胶体金上的分析物抗体的结合位点,随后重组示踪物被抗His-tag抗体捕获,对于色度信号,可直接再自然光源下用相机拍照,对于荧光信号,将试纸条放置于多功能成像仪中拍照,随后对图像进行分析及结果判定。本发明提供的方法利用噬菌体展示多肽模拟表位与增强型绿色荧光蛋白的重组蛋白为荧光供体,以抗氯噻啉抗体偶联的胶体金颗粒为荧光受体,根据荧光内滤效应,以侧流层析的方式实现对小分子化合物的检测。本发明灵敏度高、快速、简便、经济、实用性强,可以对小分子的定量、在线检测。



1. 一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析检测方法,其特征包括:

第一步:重组示踪物与分析物共同竞争偶联在胶体金上的分析物抗体的结合位点,随后重组示踪物被抗His-tag抗体捕获,

硝酸纤维素(NC)膜的处理:用PBS稀释的抗His-tag抗体(4.0mg/mL)和羊抗鼠IgG抗体(1.0mg/mL)分别作为检测(test,T)线和控制(control,C)线,以1 μ L/cm的速度喷在NC膜上。将NC膜在37 $^{\circ}$ C下干燥1小时。将分析物抗体标记的胶体金溶液以34 μ L/cm的速度喷在结合垫(玻璃纤维垫,已用含1mg/mL BSA的PBS溶液处理)上。然后将处理好的NC膜,结合垫与样品垫(玻璃纤维垫)和吸水垫组装成整条,将组装好的膜切成3.5mm宽,在室温下储存备用;加样:将75 μ L的样品与75 μ L的重组示踪物:SEQ ID No.1所示序列(含有4 μ g蛋白质,0.5%吐温20)混合,将混合物滴到样品垫上,并流过膜15分钟;

第二步:NC膜上的双信号的检测,

色度信号:将试纸条置于自然光源下,用相机直接拍照。

荧光信号:将试纸条置于多功能成像仪中,设置激发波长为470nm,滤光片为535nm,用成像仪自带相机拍照。

第三步:检测结果的分析及结果判定,

方法1:将图片导入imageJ 1.46r软件中,测量T线和相邻T线区域的平均灰度/光密度(背景信号),而后扣除背景信号得到校正后的T线平均灰度/光密度值,以校正后的灰度/光密度值为纵坐标,氯噻啉标准溶液的对数为横坐标建立标准曲线,获得线性方程,将检测结果带入线性方程中计算出样品中氯噻啉的含量;

方法2:用肉眼直接观察在自然光源和多功能成像仪中拍摄的图像。相对阴性对照的结果:在自然光源下拍摄的图片,若T线区域颜色未变淡为阴性,若无条带则为阳性;在多功能成像仪中拍摄的图片,若T线区域未出现绿色荧光为阴性,若T线区域出现明显绿色荧光为阳性。

一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析方法,利用噬菌体展示多肽模拟表位与增强型绿色荧光蛋白的重组蛋白为荧光供体,利用分析物抗体偶联的胶体金做为荧光受体,根据荧光内滤效应,以侧流层析的方式实现对小分子化合物的在线、定量及高敏感性检测。

背景技术

[0002] 氯噻啉是我国自主研发的新烟碱类杀虫剂,广泛用于防治小麦、水稻、果树和蔬菜等作物上的害虫。然而,过量的使用使其广泛分布于水体和农产品中,对非靶标生物如蜜蜂等造成了潜在的威胁。因此,建立简单、快速、灵敏的检测方法监测环境和农产品中氯噻啉残留是保障环境和农产品安全的重要抓手。

[0003] 噬菌体展示随机多肽库已广泛应用于免疫检测,病原细菌检测,细胞成像等领域。在小分子免疫分析中,噬菌体展示随机肽的主要有两个用途:1) 筛选模拟表位代替化学半抗原或分析物,开发竞争型免疫分析;2) 筛选抗免疫复合体,其能与抗原-抗体的复合物结合,开发非竞争型免疫分析。噬菌体展示随机多肽容易获得且在分析中具有较高的敏感性。然而,由于噬菌体颗粒的尺寸较大(880×6-7nm),流动性较差,限制了噬菌体展示肽的应用。使得噬菌体展示多肽技术不适合用于开发快速检测。另一方面,噬菌体不是一种常规的生产试剂,作为商业试剂使用可能存在不同批次间的差异,长期储存的稳定性和其生物安全性也进一步限制了其应用。为了克服这些缺陷,通过化学方式合成噬菌体展示的多肽,并与载体蛋白,纳米颗粒或者链霉亲和素偶联,已经被用于开发无噬菌体的小分子免疫分析,但化学合成代价较高,合成后仍需标记。并不适合大量生产。将多肽与蛋白质融合表达制备重组蛋白,则可通过细菌发酵来实现大量的生产,大大降低成本。而且,如果与多肽融合的蛋白是荧光蛋白,那么这种重组蛋白则又可以直接作为示踪物,避免了标记步骤。

[0004] 荧光内滤效应是当荧光供体的发射光谱与荧光受体的吸收光谱重叠时,受体对供体发射荧光重吸收,导致荧光强度减弱的现象。目前,基于荧光内滤效应的免疫分析方法已被应用小分子,蛋白质,核酸等的检测。增强型绿色荧光蛋白为绿色荧光蛋白的突变体,在光稳定性和光强度方面的性能被大大提高,且容易在大肠杆菌中表达,是一种理想的蛋白类荧光供体。胶体金是通过弱还原剂还原氯金酸中的金离子,制备的一种纳米颗粒,已被广泛应用于免疫层析试纸条。胶体金合成简单,成本较低,性质稳定,吸收光谱宽,且易于和各种生物大分子偶联,是一种理想的荧光受体。

[0005] 以噬菌体展示多肽模拟表位与增强型绿色荧光蛋白的重组蛋白(在C端带有一个His标签)为荧光供体,利用分析物抗体偶联的胶体金颗粒做为荧光受体,开发一种双信号(色度信号和荧光信号)侧流免疫层析方法。色度信号由胶体金产生,荧光信号由重组蛋白产生。当分析物浓度增高时,与重组蛋白结合的胶体金减少,使得检测线处的色度信号降低,色度信号与分析物浓度呈负相关;同时,由于荧光内滤效应,重组蛋白的荧光强度得以恢复,荧光信号与分析物浓度呈正相关。

[0006] 该发明为食品安全检测、农产品等的出入境检测、环境监测部门的监测提供有效的技术手段和检测方法。对我国农产品的可持续发展和食品安全问题具有重要的现实意义和重要的社会、经济价值。目前,国内外尚未见有基于模拟表位多肽与荧光蛋白重组表达示踪物的双信号侧流免疫层析方法的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种新颖、快速、灵敏的双信号侧流免疫层析系统,以多肽模拟表位重组示踪物(在本说明书中使用增强型绿色荧光蛋白(EmGFP)与氯噻啉多肽模拟表位C2-15融合表达,在C端带有一个His标签)为荧光供体,以抗氯噻啉抗体偶联的胶体金颗粒为荧光受体,根据荧光内滤效应,以实现对小分子的定量、在线检测。

[0008] 本发明提供的一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析方法,包括:

[0009] 1.一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析方法,其特征包括:

[0010] 第一步:重组示踪物与分析物共同竞争偶联在胶体金上的分析物抗体的结合位点,随后重组示踪物被抗His-tag抗体捕获,

[0011] 硝酸纤维素(NC)膜的处理:用PBS稀释的抗His-tag抗体(4.0mg/mL)和羊抗鼠IgG抗体(1.0mg/mL)分别作为检测(test,T)线和控制(control,C)线,以1 μ L/cm的速度喷在NC膜上。将NC膜在37 $^{\circ}$ C下干燥1小时。将分析物抗体标记的胶体金溶液以34 μ L/cm的速度喷在结合垫(玻璃纤维垫,已用含1mg/mL BSA的PBS溶液处理)上。然后将NC膜,结合垫与样品垫(玻璃纤维垫)和吸水垫组装成整条,将组装好的膜切成3.5mm宽,在室温下储存备用;加样:将75 μ L的样品与75 μ L的重组示踪物:SEQ ID No.1所示序列(含有4 μ g蛋白质,0.5%吐温20)混合,将混合物滴到样品垫上,并流过膜15分钟;

[0012] 第二步:NC膜上的双信号的检测,

[0013] 色度信号:将试纸条置于自然光源下,用相机直接拍照。

[0014] 荧光信号:将试纸条置于多功能成像仪中,设置激发波长为470nm,滤光片为535nm,用成像仪自带相机拍照。

[0015] 第三步:检测结果的分析及结果判定,

[0016] 方法1:将图片导入imageJ 1.46r软件中,测量T线和相邻T线区域的平均灰度/光密度(背景信号),而后扣除背景信号得到校正后的T线平均灰度/光密度值,以校正后的灰度/光密度值为纵坐标,氯噻啉标准溶液的对数为横坐标建立标准曲线,获得线性方程,将检测结果带入线性方程中计算出样品中氯噻啉的含量;

[0017] 方法2:用肉眼直接观察在自然光源和多功能成像仪中拍摄的图像。相对阴性对照的结果:在自然光源下拍摄的图片,若T线区域颜色未消失为阴性,若无条带则为阳性;在多功能成像仪中拍摄的图片,若T线区域未出现绿色荧光为阴性,若T线区域出现明显绿色荧光为阳性。

[0018] 本发明技术方案实现的有益效果:

[0019] 1.灵敏度高:应用于氯噻啉的检测,本方法的定性检测线为8.00ng/mL,比基于相同抗体的传统胶体金免疫层析方法提高了62.5倍。本方法的定量检测限为3.21ng/mL,比基于相同抗体的传统酶联免疫吸附分析法提高了5.5倍;

[0020] 2.经济实用:重组示踪物可通过细菌发酵大量产生,降低了检测成本;

[0021] 3.结果直观:重组示踪物提供的荧光信号与氯噻啉浓度呈正相关,使得结果更加直观,易理解。

[0022] 4.新颖度高:目前,国内外尚未见有基于模拟表位多肽与荧光蛋白重组表达示踪物的双信号侧流免疫层析方法的报道。

附图说明

[0023] 图1为本发明技术方案的原理示意图;

[0024] 图中“1”表示氯噻啉;“2”表示重组示踪物;“3”表示抗氯噻啉抗体偶联的胶体金颗粒;“4”表示T线;“5”表示C线;“6”表示吸水垫;“7”表示样品垫;“8”表示结合垫;“9”表示重组示踪物的激发光;“10”表示重组示踪物的发射光;“11”表示荧光内滤效应;“12”表示典型阳性结果图;“13”表示典型阴性结果图;

[0025] 图2为本发明在自然光下和多功能成像仪中对不同浓度氯噻啉标准品溶液的检测图像;

[0026] 图3为本发明对氯噻啉标准品检测的标准曲线;

[0027] 图4为本发明对氯噻啉添加样品的检测图像。

具体实施方式

[0028] 以下结合附图详细描述本发明的技术方案。本发明实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

[0029] 使用载体pRSET/EmGFP(含增强型绿色荧光蛋白基因,购买自Invitrogen公司)作为模板,通过PCR产生重组基因片段。用EcoRI和Xho I酶切,凝胶纯化后,将重组基因片段克隆到pET-22b(+)载体(购买自Novagen公司)。连接后的载体转化到大肠杆菌JM109感受态细胞中。随机选择10个阳性克隆验证序列。将含有正确序列的质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中。挑取转化后的大肠杆菌BL21(DE3)细胞在含有50 μ g/mL羧苄青霉素的LB培养基中于37 $^{\circ}$ C、250rpm培养直至OD600值达到0.6。然后加入0.1mM异丙基硫代半乳糖苷(终浓度),并在20 $^{\circ}$ C、250rpm培养过夜。通过“渗透性休克法”提取位于周质的重组蛋白,使用1mL HisTrap HP柱在 \ddot{A} KTAavant 25上纯化获得重组蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0030] 将100mL 0.01%氯金酸溶液加热至沸腾。在搅拌的条件下,快速加入1.7mL 1%柠檬酸三钠溶液,待溶液颜色变为酒红色后,继续反应5min,随后冷却至室温,即得到粒径为20nm的胶体金溶液。将Protein G-cysteine与HS-mPEG(分子量为5kDa)按照摩尔比1:10混合,加入到30mL上述胶体金溶液中(胶体金:Protein G-cysteine=1:1000),室温下缓慢振荡5小时。离心去除未反应的试剂,随后用含有1mg/mL BSA的PBS重悬沉淀,加入抗氯噻啉抗体(抗氯噻啉抗体:胶体金=100:1),室温震荡条件下,反应1小时。离心去除多余抗体,将抗氯噻啉抗体偶联的胶体金颗粒重悬于1mL PBS溶液中,4 $^{\circ}$ C保存。

[0031] 用PBS稀释的抗His-tag抗体(4.0mg/mL)和羊抗鼠IgG抗体(1.0mg/mL)分别作为T线和C线喷在NC膜上。将NC膜在37 $^{\circ}$ C下干燥1小时。将分析物抗体标记的胶体金溶液喷在结合垫(玻璃纤维垫,已用含1mg/mL BSA的PBS溶液处理)上。然后将NC膜,结合垫与样品垫(玻

玻璃纤维垫)和吸水垫组装成整条,将组装好的膜切成3.5mm宽,在室温下储存备用。将75 μ L的样品与75 μ L的重组示踪物(含有4 μ g蛋白质,0.5%吐温20)混合,滴到样品垫上,并流过膜15分钟。将试纸条置于自然光源下,用相机直接拍照,检测色度信号。将试纸条置于多功能成像仪中,设置激发波长为470nm,滤光片为535nm,用成像仪自带相机拍照,检测荧光信号。对于定性判断(阴性/阳性),直接通过肉眼观察,相对阴性对照的结果:在自然光源下拍摄的图片,若T线区域颜色未消失为阴性,若无条带则为阳性;在多功能成像仪中拍摄的图片,若T线区域未出现绿色荧光为阴性,若T线区域出现明显绿色荧光为阳性。对于定量分析,将图片导入imageJ 1.46r软件中,测量T线和相邻T线区域的平均灰度/光密度(背景信号),而后扣除背景信号得到校正后的T线平均灰度/光密度值,以校正后的灰度/光密度值为纵坐标,氯噻啉标准溶液的对数为横坐标建立标准曲线,获得线性方程,将检测结果带入线性方程中计算出样品中氯噻啉的含量。本实施例的同步反应方法中所涉及的所有过程和材料如图1所示。

[0032] 实施例1:发光侧流免疫层析检测法对氯噻啉农药标准品的检测

[0033] 1. 氯噻啉农药标准溶液的配制

[0034] 用甲醇配制氯噻啉标准品母液(1mg/mL),用含有10%甲醇的PBS将母液稀释成128ng/mL至1ng/mL系列浓度用于侧流免疫层析检测。

[0035] 2. 重组示踪物与分析物共同竞争捕获抗体的结合位点

[0036] 将75 μ L的标准品溶液与75 μ L的重组示踪物(含有4 μ g蛋白质,0.5%吐温20)混合,并将混合物滴到样品垫上并流过膜15分钟。

[0037] 3. 色度和荧光信号的检测

[0038] 色度信号:将试纸条置于自然光源下,用相机直接拍照;荧光信号:将试纸条置于多功能成像仪中,设置激发波长为470nm,滤光片为535nm,用成像仪自带相机拍照。如图2所示。

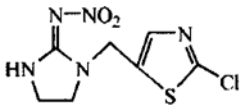
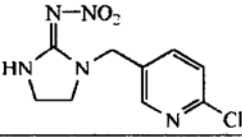
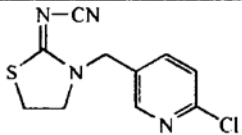
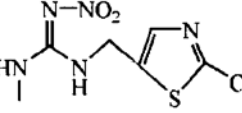
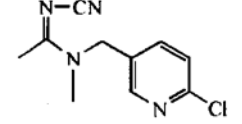
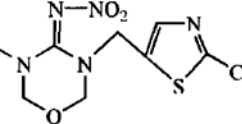
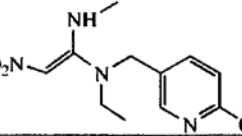
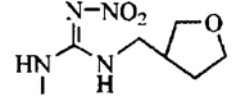
[0039] 4. 检测结果的分析及结果判定

[0040] 方法1:将图片导入imageJ 1.46r软件中,测量T线和相邻T线区域的平均灰度/光密度(背景信号),而后扣除背景信号得到校正后的T线平均灰度/光密度值,以校正后的灰度/光密度值为纵坐标,氯噻啉标准溶液的对数为横坐标建立标准曲线,如图3所示。由于两个信号并非相互独立,故两种信号在定量分析中,显示出相似的敏感性。根据标准曲线计算,最低检测限(LOD)为3.21ng/mL(色度信号)/2.62ng/mL(荧光信号),抑制中浓度(IC₅₀)/饱和中浓度(SC₅₀)为9.62ng/mL/10.01ng/mL。

[0041] 方法2:用肉眼直接观察在自然光源和多功能成像仪中拍摄的图像。相对阴性对照的结果(0ng/mL):在自然光源下拍摄的图片,1ng/mL至32ng/mL检测结果显示T线区域颜色未消失,为阴性,浓度高于64ng/mL的检测结果显示T线区域无条带,为阳性;在多功能成像仪中拍摄的图片,1ng/mL至4ng/mL检测结果显示T线区域未有明显绿色荧光,为阴性,浓度高于8ng/mL的检测结果显示T线区域有明显绿色荧光,为阳性。

[0042] 本发明提供的双信号侧流免疫层析方法,特异性通过交叉反应率(CR)进行评价,其计算公式为 $CR = SC_{50}(\text{氯噻啉}) / SC_{50}(\text{其他化合物}) \times 100$,7种氯噻啉农药类似物的交叉反应率如表1所示。

[0043] 表1双信号侧流免疫层析方法对氯噻啉类似物的交叉反应率

化合物	结构	SC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
氯噻啉		10.1	100
吡虫啉		9.68	104.2
噻虫啉		481	2.1
噻虫胺		2605	0.4
啉虫脒		2014	0.5
噻虫嗪		9248	0.1
烯啶虫胺		>10000	<0.02
呋虫胺		>10000	<0.02

[0044]

[0045] 实施例2:双信号侧流免疫层析检测法对添加样品进行检测

[0046] 1. 添加样品的制备及处理

[0047] 将氯噻啉标准品分别添加到土壤和麦粉样品进行添加回收试验。称取粉碎混匀后的土壤和麦粉样品10g,添加标准品至50、100、200、400和800ng/g的终浓度,混匀,暗处室温静置过夜,加入20mL含30%甲醇的PBS缓冲液混匀,涡旋5min,超声15min,再涡旋5min,4000rpm离心5min,通过真空抽滤收集上清。再用PBS缓冲液稀释3倍用于检测。

[0048] 2. 重组示踪物与分析物共同竞争捕获抗体的结合位点

[0049] 将75μL的样品溶液与75μL的重组示踪物(含有4μg蛋白质,0.5%吐温20)混合,并将混合物滴到样品垫上并流过膜15分钟。

[0050] 3. 色度和荧光信号的检测

[0051] 色度信号:将试纸条置于自然光源下,用相机直接拍照;荧光信号:将试纸条置于多功能成像仪中,设置激发波长为470nm,滤光片为535nm,用成像仪自带相机拍照。如图4所示。

[0052] 4. 检测结果的分析及结果判定

[0053] 方法1:将图片导入imageJ 1.46r软件中,测量T线和相邻T线区域的平均灰度/光密度(背景信号),而后扣除背景信号得到校正后的T线平均灰度/光密度值,将其带入标准曲线方程,计算获得样品溶液中氯噻啉的含量,并用样品前处理过程中的稀释倍数进行校正,获得样品中氯噻啉的残留量,结果见表2。

[0054] 方法2:用肉眼直接观察在自然光源和多功能成像仪中拍摄的图像。相对阴性对照的结果(0ng/mL):在自然光源下拍摄的图片,50、100、200和400ng/g样品检测结果显示T线区域有条带,为阴性,800ng/g样品检测结果显示T线区域无条带,为阳性;在多功能成像仪中拍摄的图片,50ng/g样品检测结果显示T线区域无明显绿色荧光,为阴性,100、200、400和800ng/g样品检测结果显示T线区域有明显绿色荧光,为阳性。

[0055] 本发明提供的双信号侧流免疫层析方法,对添加样品的检测准确,结果如表2所示。

[0056] 表2双信号侧流免疫层析方法对添加样品进行检测的结果

[0057]

样品	添加浓度(ng/g)	检测浓度±SD (ng/g)	平均回收率(%)	RSD (%)
土壤	50	40.5±3.6	81.0	8.9
	100	86.2±5.3	86.2	6.1
	200	195±10	97.5	5.1
	400	370±25	92.5	6.8
	800	686±42	85.8	6.1
麦粉	50	42.9±2.2	85.8	5.1
	100	80.9±7.3	80.9	9.0
	200	177±13	88.5	7.3
	400	368±21	92.0	5.7
	800	641±31	80.1	4.8

SEQUENCE LISTING

<110> 南京农业大学

<120> 一种氯噻啉的双信号侧流免疫层析检测方法

<130> 20190428

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 267

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gly Gly Cys Leu Pro Pro Arg Met Ile Tyr Glu Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val
20 25 30

[0001] Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe
35 40 45

Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr
50 55 60

Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr
65 70 75 80

Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro
85 90 95

Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly
100 105 110

Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys
115 120 125

Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile
130 135 140

Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His

145	150	155	160
Lys Leu Glu Tyr	Asn Tyr Asn Ser His	Lys Val Tyr Ile Thr	Ala Asp
	165	170	175
Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val	Asn Phe Lys Thr Arg	His Asn Ile	
	180	185	190
Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro			
	195	200	205
[0002]			
Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr			
	210	215	220
Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val			
	225	230	235
Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu			
	245	250	255
Leu Tyr Lys Leu Glu His His His His His His			
	260	265	

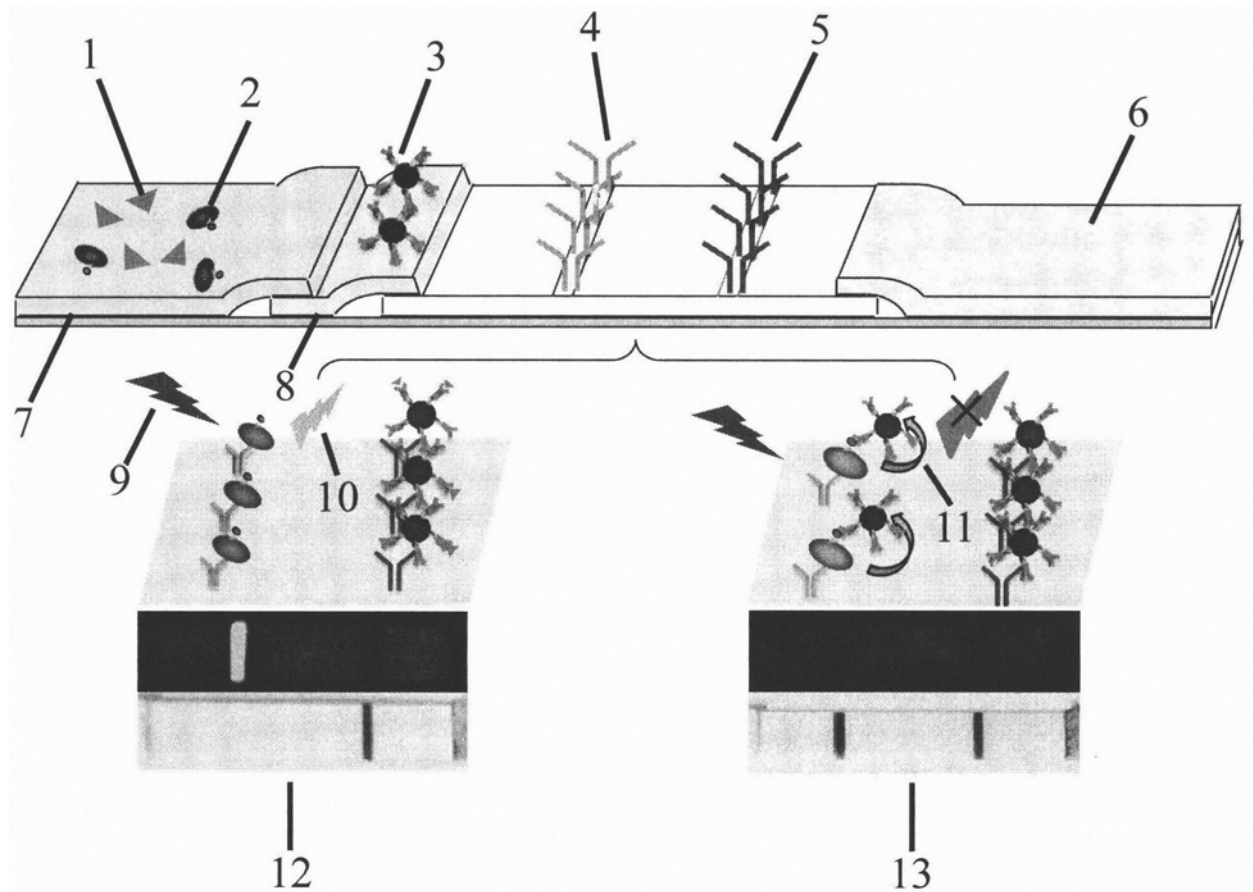


图1

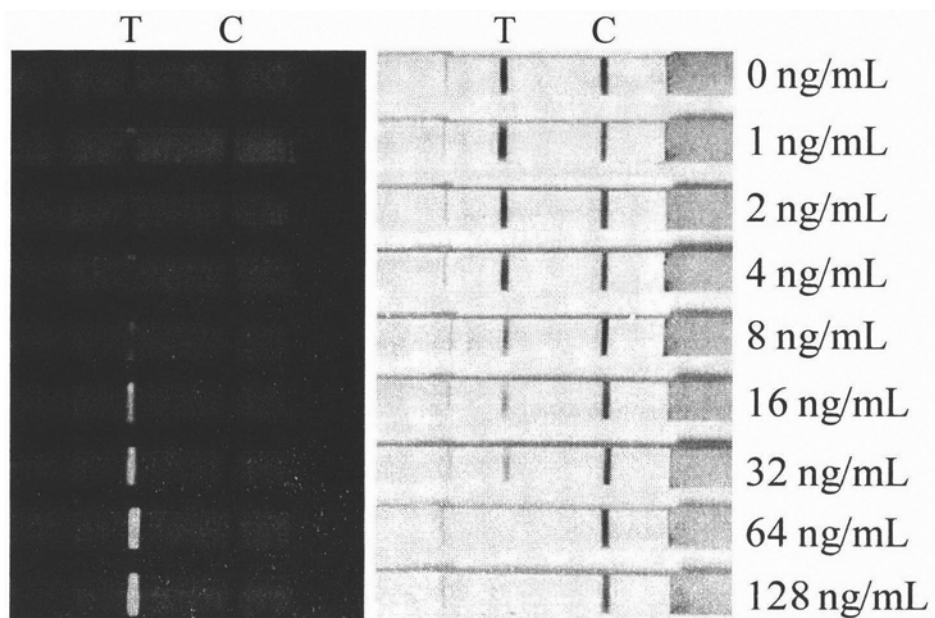


图2

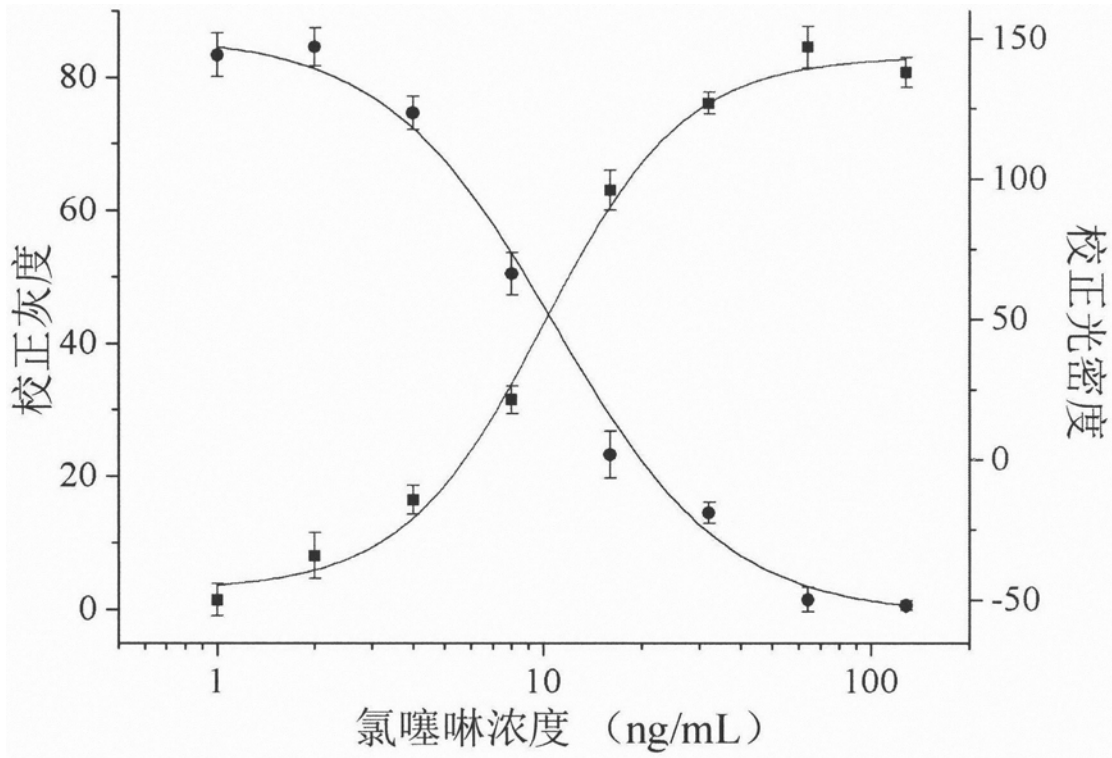


图3

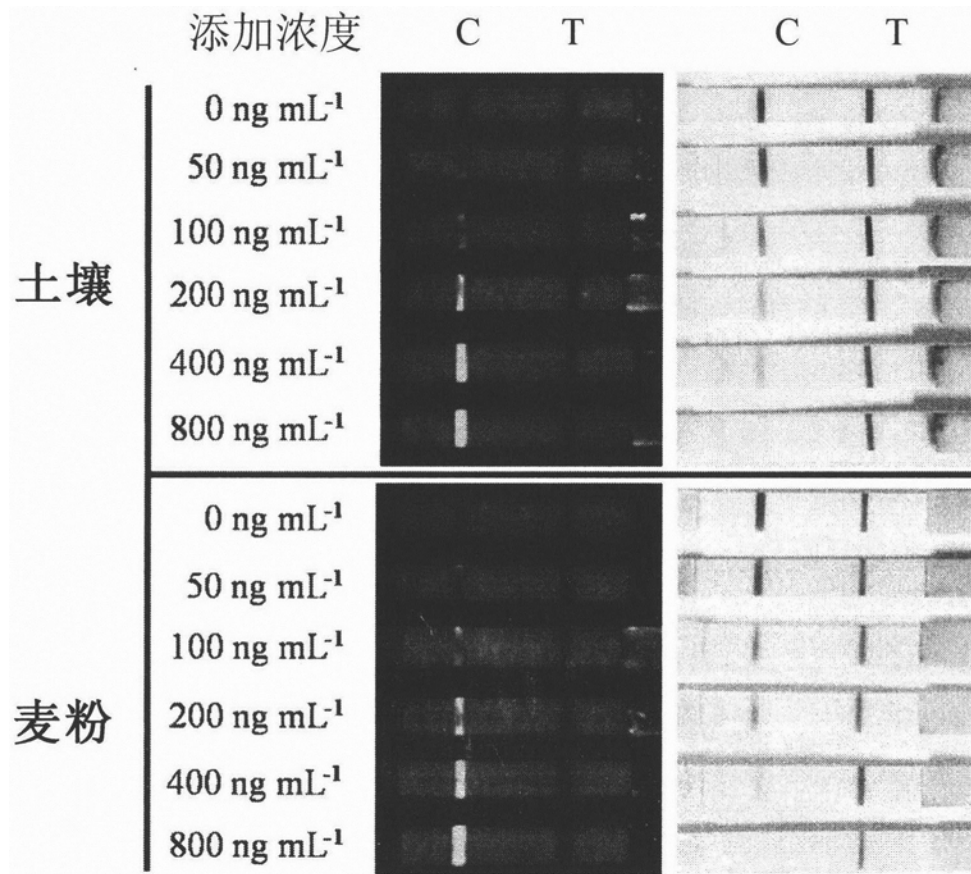


图4

专利名称(译)	一种氟喹啉的双信号侧流免疫层析检测方法		
公开(公告)号	CN110567929A	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910965914.4	申请日	2019-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	华修德 王鸣华 丁园 陈贺 孙娜娜		
发明人	华修德 王鸣华 丁园 陈贺 孙娜娜		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/558 G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/68		
优先权	201910387246.1 2019-05-08 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种氟喹啉的双信号侧流免疫层析检测方法，首先重组示踪物与分析物共同竞争偶联在胶体金上的分析物抗体的结合位点，随后重组示踪物被抗His-tag抗体捕获，对于色度信号，可直接再自然光源下用相机拍照，对于荧光信号，将试纸条放置于多功能成像仪中拍照，随后对图像进行分析及结果判定。本发明提供的方法利用噬菌体展示多肽模拟表位与增强型绿色荧光蛋白的重组蛋白为荧光供体，以抗氟喹啉抗体偶联的胶体金颗粒为荧光受体，根据荧光内滤效应，以侧流层析的方式实现对小分子化合物的检测。本发明灵敏度高、快速、简便、经济、实用性强，可以对小分子的定量、在线检测。

