



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102721805 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201110076459. 6

(22) 申请日 2011. 03. 29

(71) 申请人 宝瑞源生物技术(北京)有限公司
地址 102206 北京市昌平区生命园路29号C座100

(72) 发明人 杨利 陈立柱 李峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

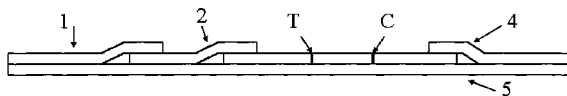
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法, 本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域。本发明的试剂盒由样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)组成, 在PVC支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。胶体金垫为胶体金标记的AMOZ衍生物多克隆抗体聚酯膜, 硝酸纤维素膜上依次包被了AMOZ衍生物偶联载体蛋白作为检测线(T线), 羊抗兔IgG抗体作为质控线(C线)。本发明利用胶体金免疫层析技术, 运用被测样品中可能含有的AMOZ衍生物与硝酸纤维素膜上包被的AMOZ衍生物偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的AMOZ衍生物多克隆抗体的原理检测样品中是否含有AMOZ。



1. 一种呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法,其特征在于由样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和PVC支撑板组成,在PVC支撑板上依次紧密粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的AMOZ衍生物多克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被有检测线(T线)和质控线(C线),其中检测线(T线)上包被了AMOZ衍生物偶联载体蛋白,质控线(C线)上包被了羊抗兔IgG抗体;所述吸样垫为吸水纸。

2. 一种权利要求1所述的呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的AMOZ衍生物偶联载体蛋白为AMOZ衍生物偶联牛血清白蛋白或卵清白蛋白;所述的AMOZ衍生物多克隆抗体由AMOZ衍生物偶联载体蛋白作为免疫原免疫白兔获得。

3. 一种权利要求1所述的呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂枸橼酸三钠作用下制成大小为20-40nm的胶体金颗粒。

4. 一种权利要求1所述的呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金垫的制备方法为:取颗粒大小为20-40nm的胶体金溶液,用0.2mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的pH值调至7.0-9.0,室温放置30分钟;在上述溶液中加入AMOZ衍生物多克隆抗体,使AMOZ衍生物多克隆抗体的浓度为10-40 $\mu\text{g/ml}$ 胶体金,混合均匀后,室温放置30分钟;然后加入10-80 $\mu\text{l/ml}$ 胶体金的10%的牛血清白蛋白(BSA)溶液,混合均匀,室温放置10分钟;上述溶液于12000转离心30分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用30-70%初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到AMOZ衍生物多克隆抗体-胶体金标记物;将AMOZ衍生物多克隆抗体-胶体金标记物按15-35 $\mu\text{l/cm}^2$ 的比例均匀的铺在聚酯膜上,放入45 $^\circ\text{C}$ 干燥箱干燥2.5-3小时,制成胶体金垫。

5. 一种权利要求1所述的呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的胶体金复溶液为含0.30%的Tris,5%蔗糖,0.50%PVP,0.30%Casein-Na,pH值7.0-9.0的溶液。

6. 一种权利要求1所述的呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法,其特征在于所述的硝酸纤维素膜上T、C线的包被方法为:将NC膜粘贴在PVC板上,吸水纸贴到PVC板上压住膜1-1.5mm。打开划膜仪,按清洗键清洗划膜仪,设置划膜仪参数为C线1.0 $\mu\text{l/cm}$,T线1.0 $\mu\text{l/cm}$;将贴好的PVC板放在划膜仪上,用C、T线包被液在NC膜上分别划C、T线。划膜不合格的用红记号笔标出,将包被板置干燥箱设置45 $^\circ\text{C}$,干燥1-1.5小时。其中,T线包被液为0.8-3.5mg/ml的AMOZ衍生物偶联载体蛋白;C线包被液为0.6-2.0mg/ml的羊抗兔IgG抗体。

呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域,特别是涉及一种利用胶体金免疫层析技术制作的一种呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 硝基呋喃类药物为一种光谱抗生素,主要是指呋喃它酮、呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃西林,具有很好的抗菌作用,被广泛应用于饲料添加剂和治疗药物,用于预防和治疗由沙门氏菌和埃希氏杆菌引起的猪、牛、家禽及蜜蜂的胃肠道疾病。他们对人类健康有恶性影响,有致癌性。

[0003] 欧盟出于食品安全的考虑,在 96/23/EC 法规中将硝基呋喃类抗生素列为 A 类禁用药,决定从 1997 年 1 月 1 日起,禁止在动物饲料中添加任何硝基呋喃类抗生素。我国也于 2002 年颁布了禁止使用硝基呋喃类抗生素的禁令。欧盟委员会于 2003 年通过了 2003/181/EC 委员会决议,建立了用于检测禽肉产品和水产品中硝基呋喃类药物的代谢物的各种方法的最小要求性能限值为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前,欧盟、美国及其他国家都对进口动物性食品中硝基呋喃类抗生素残留做了非常严格的限制,要求 4 种硝基呋喃代谢物残留不得超过 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 为了人和动物的安全很有必要对水源和食品(如:肉)进行抗生素残留检测。呋喃类药物本身的检测很难,因为在食入这些药物后会很快地发生代谢。这些代谢产物会在组织中存在很长时间。AMOZ 是呋喃它酮的代谢物,在一般的烹调中不易分解,在温和的酸性条件下可以从组织中释放出来。因此可以用来做检测使用。

[0005] 目前,检测呋喃它酮代谢物 AMOZ 的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)、酶联免疫分析法(ELISA)。这些方法灵敏度高,结果准确,但是具有需要昂贵的仪器,检测繁琐、费时,检测人员需要一定的专业培训等缺点。

[0006] 本发明采用胶体金免疫层析技术制备了一种呋喃它酮代谢物检测试剂盒。本发明具有操作简单、检测快速、灵敏度高、无需复杂仪器等特点。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种简单、快捷、灵敏度高、成本低的呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法。

[0008] 一种呋喃它酮代谢物检测试剂盒,包括样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸样垫和 PVC 支撑板,在 PVC 支撑板上依次紧密粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。所述样品垫为玻璃纤维;所述胶体金垫为胶体金标记的 AMOZ 衍生物多克隆抗体聚酯膜;所述硝酸纤维素膜上依次包被有检测线(T 线)和质控线(C 线),其中检测线(T 线)上包被了 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白,质控线(C 线)上包被了羊抗兔 IgG 抗体;所述吸样垫为吸水纸。

[0009] 偶联呋喃它酮代谢物的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)。

[0010] 本发明采用纳米胶体金技术及抗原抗体特异性反应,应用免疫竞争抑制反应的原理制备而成,通过待检样本中可能含有的 AMOZ 衍生物与硝酸纤维素膜上检测线(T线)包被的 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的 AMOZ 衍生物抗体的反应,使 T 线显现肉眼可见红色条带用于判定待检样本中是否含有 AMOZ。

[0011] 本发明提供了一种呋喃它酮代谢物检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 制备 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白

[0013] 呋喃它酮是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才能具有免疫原性。将 AMOZ 和间羧基苯丙醛在水中反应进行衍生化得到 AMOZ 衍生物半抗原。采用 NHS 活性酯法将 AMOZ 衍生物半抗原与载体蛋白偶联得到 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白作为免疫原和包被原。其中载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)。

[0014] (2) 制备 AMOZ 衍生物多克隆抗体

[0015] 采用 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白作为免疫原免疫白兔,制备抗 AMOZ 衍生物多克隆抗体。

[0016] (3) 制备胶体金

[0017] 取 0.01% 的氯金酸水溶液,加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 1ml,继续煮沸约 5min,出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0018] (4) 制备胶体金垫

[0019] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液,用 0.2mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7.0-9.0,室温放置 30 分钟;在上述溶液中加入 AMOZ 衍生物多克隆抗体,使 AMOZ 衍生物多克隆抗体的浓度为 10-40 $\mu g/ml$ 胶体金,混合均匀后,室温放置 30 分钟;然后加入 10-80 $\mu l/ml$ 胶体金的 10% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液,混合均匀,室温放置 10 分钟;上述溶液于 12000 转离心 30 分钟,仔细吸取上清液,弃去,剩余的沉淀用 30-70% 初始胶体金体积的胶体金复溶液溶解,得到 AMOZ 衍生物多克隆抗体-胶体金标记物;将 AMOZ 衍生物多克隆抗体-胶体金标记物按 15-35 $\mu l/cm^2$ 的比例均匀的铺在聚酯膜上,放入 45°C 干燥箱干燥 2.5-3 小时,制成胶体金垫。

[0020] 上述胶体金复溶液为含 0.30% 的 Tris,5% 蔗糖,0.50% PVP,0.30% Casein-Na, pH 值 7.0-9.0 的溶液。

[0021] (5) 包被 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白、羊抗兔 IgG 抗体

[0022] 将 NC 膜粘贴在 PVC 板上,吸水纸贴到 PVC 板上压住膜 1-1.5mm。打开划膜仪,按清洗键清洗划膜仪,设置划膜仪参数为 C 线 1.0 $\mu l/cm$, T 线 1.0 $\mu l/cm$ 。

[0023] 将贴好的 PVC 板放在划膜仪上,用 C、T 线包被液在 NC 膜上分别划 C、T 线。划膜不合格的用红记号笔标出,将包被板置干燥箱设置 45°C,干燥 1-1.5 小时。

[0024] 其中, T 线包被液为 0.8-3.5mg/ml 的 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白; C 线包被液为 0.6-2.0mg/ml 的羊抗兔 IgG 抗体。

[0025] (6) 样品垫的处理

[0026] 将玻璃纤维浸泡于 0.01M pH 7.0-8.0 的磷酸盐缓冲溶液中 20-40min,其中磷酸盐缓冲溶液中含 0.5-1.5% BSA,0.5-1.0% Tween-20,于烘干箱中 38°C 烘干,保存,备用

[0027] (7) 组装试剂盒

[0028] 取上述制备好的胶体金垫、PVC 板及样品垫,将胶体金垫切成宽度为 10mm 的条型,然后胶体金垫贴于 PVC 板上 NC 膜的靠近 T 线端,压 NC 膜 1-1.5mm,样品垫贴于胶体金垫的上方,露出金垫 2-3mm(如图 1 所示)。打开切条机,按产品要求设置裁切宽度,将上述组装好的 PVC 板放于切条机上,按设置宽度进行切条,得到所述用于检测呋喃它酮代谢物的试纸条;试纸条可以装入塑料卡内,组装成检测卡。

[0029] 本发明所述试剂盒的检测方法为:将被检样品平衡至室温;取出呋喃它酮代谢物检测试剂盒,水平放置;在样品垫中加入 2-3 滴样品,5-10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果;或将呋喃它酮代谢物检测试纸条样品垫末端浸入被测样品溶液中约 10 秒钟后,水平放置;5-10 分钟时观察并记录 C、T 线的显色情况,判断检测结果。

[0030] 本发明所述的试剂盒采用胶体金免疫层析技术测定 AMOZ,因 AMOZ 的分子量较小,属于小分子物质,抗体不能捕获游离的 AMOZ,因此需要检测其衍生物。检测样品时,因毛细作用样品溶液的沿试纸条向吸样垫一端层析,若被测样品中含有 AMOZ 衍生物,它们将和检测线(T 线)上包被的 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的 AMOZ 衍生物多克隆抗体上有限的抗体结合位点,当样品中的 AMOZ 衍生物达到一定浓度时,与胶体金标记的 AMOZ 衍生物多克隆抗体发生免疫反应并完全饱和,此时胶体金复合物已无空余的位点和检测线上包被的 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白结合,此时 T 线不显色,此为阳性结果;若被测样品中不含 AMOZ 衍生物,标记了 AMOZ 衍生物多克隆抗体的胶体金颗粒将随同样品层析至 T 线位置后,与 T 线上包被的 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白发生免疫结合反应,胶体金颗粒在 T 线位置堆积使得 T 线呈现出一条肉眼可见的红色条带,此为阴性结果。无论被测样品中是否含有呋喃它酮,胶体金标记物均会与 C 线包被的羊抗兔 IgG 反应形成一条肉眼可见的红色条带,C 线显色与否,是判定是否有足够样本,层析过程是否正常的标准,同时也作为试剂的内控标准。

附图说明

[0031] 图 1 呋喃它酮代谢物检测试剂盒结构示意图;

[0032] 附图符号说明:

[0033] 1:样品垫;

[0034] 2:胶体金垫(胶体金标记 AMOZ 衍生物多克隆抗体的聚酯膜)

[0035] 3:硝酸纤维素膜(T:包被了 AMOZ 衍生物偶联载体蛋白的检测线;C:包被了羊抗兔 IgG 多克隆抗体的质控线);

[0036] 4:吸样垫;

[0037] 5:PVC 支撑板;

[0038] 图 2 本发明试剂盒的检测结果示意图。

[0039] 自左至右依次为 C 线一条线阳性检测结果;T、C 两条线阴性检测结果;无效。

[0040] 实施例 1:呋喃它酮代谢物检测试剂盒的制备

[0041] 1. 制备 AMOZ 衍生物偶联牛血清白蛋白

[0042] 将 AMOZ 和间羧基苯丙醛在水中反应进行衍生化得到 AMOZ 衍生物半抗原。采用 NHS 活性酯法将 AMOZ 衍生物半抗原与牛血清白蛋白偶联得到 AMOZ 衍生物偶联牛血清白蛋白作为免疫原和包被原。

[0043] 2. 制备 AMOZ 衍生物多克隆抗体

[0044] AMOZ 衍生物偶联牛血清白蛋白作为免疫原免疫白兔, 制备抗 AMOZ 衍生物多克隆抗体。

[0045] 3. 制备胶体金

[0046] 取 0.01% 的氯金酸水溶液, 加热煮沸。根据需要迅速加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 1ml, 继续煮沸约 5min, 出现橙红色。这样制成的胶体金颗粒的大小为 20-40nm。

[0047] 4. 制备胶体金垫

[0048] 取颗粒大小为 20-40nm 的胶体金溶液 5ml, 用 0.2mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0, 室温放置 30 分钟; 在上述溶液中加入 70 μ l 浓度为 3.5mg/ml 的 AMOZ 衍生物多克隆抗体, 混合均匀后, 室温放置 30 分钟; 然后加入 125 μ l 10% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 混合均匀, 室温放置 10 分钟; 上述溶液于 12000 转离心 30 分钟, 仔细吸取上清液, 弃去, 剩余的沉淀用 2.5ml 的胶体金复溶液溶解, 得到 AMOZ 衍生物多克隆抗体-胶体金标记物; 将 AMOZ 衍生物多克隆抗体-胶体金标记物按 20 μ l/cm² 的比例均匀的铺在聚酯膜上, 放入 45°C 干燥箱干燥 3 小时, 制成胶体金垫。

[0049] 上述胶体金复溶液为含 0.30% 的 Tris, 5% 蔗糖, 0.50% PVP, 0.30% Casein-Na, pH 值 8.0 的溶液。

[0050] 5. 包被 AMOZ 衍生物偶联牛血清白蛋白、羊抗兔 IgG 抗体

[0051] 将 NC 膜粘贴在 PVC 板上, 吸水纸贴到 PVC 板上压住膜 1-1.5mm。打开划膜仪, 按清洗键清洗划膜仪, 设置划膜仪参数为 C 线 1.0 μ l/cm, T 线 1.0 μ l/cm。

[0052] 将贴好的 PVC 板放在划膜仪上, 用 C、T 线包被液在 NC 膜上分别划 C、T 线。划膜不合格的用红记号笔标出, 将包被板置干燥箱设置 45°C, 干燥 1.5 小时。

[0053] 其中, T 线包被液为 1.0mg/ml 的 AMOZ 衍生物偶联牛血清白蛋白; C 线包被液为 1.0mg/ml 的羊抗兔 IgG 抗体。

[0054] 6. 样品垫的处理

[0055] 将玻璃纤维浸泡于 0.01M pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液中 20-40min, 其中磷酸盐缓冲溶液中含 1.0% BSA, 0.5% Tween-20, 于烘干箱中 38°C 烘干, 保存, 备用

[0056] 7. 组装试剂盒

[0057] 取上述制备好的胶体金垫、PVC 板及样品垫, 将胶体金垫切成宽度为 10mm 的条型, 然后胶体金垫贴于 PVC 板上 NC 膜的靠近 T 线端, 压 NC 膜 1-1.5mm, 样品垫贴于胶体金垫的上方, 露出金垫 2-3mm (如图 1 所示)。打开切条机, 设置裁切宽度为 3.8mm, 将上述组装好的 PVC 板放于切条机上, 按设置宽度进行切条, 得到所述用于检测呋喃它酮代谢物的试纸条; 试纸条可以装入塑料卡内, 组装成检测卡。

[0058] 实施例 2: 呋喃它酮代谢物检测试剂盒的检测

[0059] 1. 样品的处理

[0060] 取 1g 组织样品组织样品捣碎后, 加入 5ml 蒸馏水, 1M 的 HCl 0.5ml 和 0.01M 的苯甲醛 (乙醇溶液) 100 μ l, 充分振荡, 置于 60°C 过夜。然后加入 1M 的 K_2HPO_4 5ml, 1M 的 NaOH 0.4ml 以及 5ml 的乙酸乙酯, 剧烈振荡 30 秒。室温下 4000rpm 离心 10 分钟, 然后取 2.5ml 乙酸乙酯上清液转移到新容器中。在 45°C 下用氮气将其吹干, 然后用正己烷重新溶解后与 1ml 的 0.01M PBST (pH 7.4, 0.05% Tween-20) 混匀。室温下 4000rpm 离心 10 分钟, 最后取

底部水相测定。

[0061] 2. 检测方法：

[0062] 取出呋喃它酮代谢物检测试剂盒，水平放置；在样品垫上滴入 3 滴样品，10 分钟后观察并记录 C、T 线的显色情况，判断检测结果。

[0063] 3. 结果判定

[0064] 阳性：T 线不显色，仅 C 线显色，判定为阳性结果；

[0065] 阴性：T 线、C 线均显色，判定为阴性结果；

[0066] 无效：C 线不显色，说明不正确操作或试剂盒已经变质损坏。

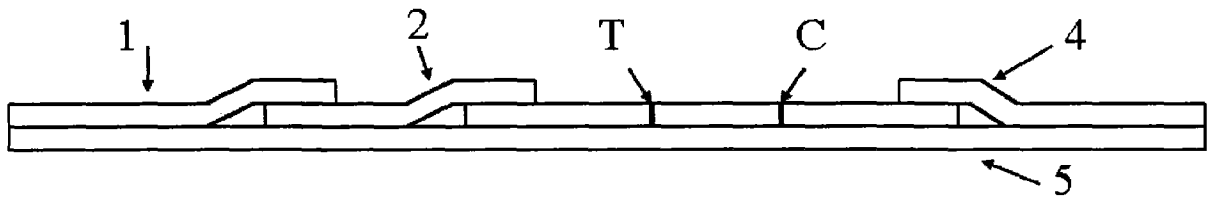


图 1

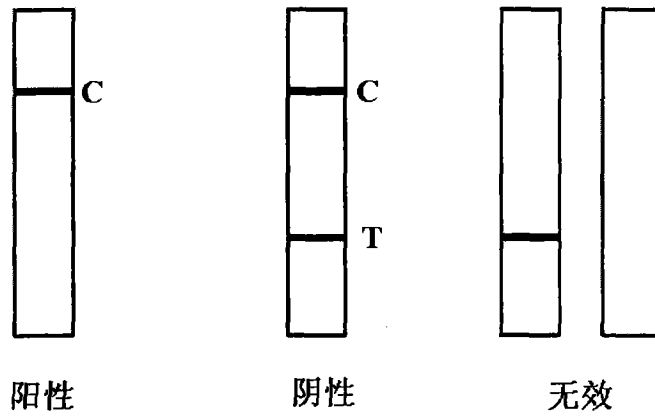


图 2

专利名称(译)	呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102721805A	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN201110076459.6	申请日	2011-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	宝瑞源生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	宝瑞源生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宝瑞源生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	杨利 陈立柱 李峰		
发明人	杨利 陈立柱 李峰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

呋喃它酮代谢物检测试剂盒及其制备方法，本发明涉及生物学免疫方法的测定技术领域。本发明的试剂盒由样品垫(1)、胶体金垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸样垫(4)和PVC支撑板(5)组成，在PVC支撑板上依次连续粘附有样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。胶体金垫为胶体金标记的AMOZ衍生物多克隆抗体聚酯膜，硝酸纤维素膜上依次包被了AMOZ衍生物偶联载体蛋白作为检测线(T线)，羊抗兔IgG抗体作为质控线(C线)。本发明利用胶体金免疫层析技术，运用被测样品中可能含有的AMOZ衍生物与硝酸纤维素膜上包被的AMOZ衍生物偶联载体蛋白竞争结合胶体金标记的AMOZ衍生物多克隆抗体的原理检测样品中是否含有AMOZ。

