



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110927383 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201910948223.3

C07K 1/107(2006.01)

(22)申请日 2019.10.08

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 杭州佰昕科技有限公司

地址 310016 浙江省杭州市经济技术开发区
宝龙商业中心1幢1016室

申请人 浙江工商大学

(72)发明人 王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军

(74)专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33283

代理人 向庆宁

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

权利要求书4页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析
试纸条及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条及其应用,本发明的试纸条能够对水、饲料中的喹乙醇进行定性和定量检测,样品前处理过程简单,方便快捷,检测时间短,试纸条具有很高的精密度和灵敏度;而且本发明制备的抗喹乙醇单克隆抗体特异性强,采用荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体,荧光微球的发光强度和检测信号可随着激发光强度的增强而增强,所以荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体能有效提高免疫层析技术的分析灵敏度,与传统的胶体金免疫层析法相比,本发明的分析法具有更高的灵敏度;同时由于荧光微球具有相对稳定的形态结构,微球粒度均一,分散性和稳定性好,发光效率高,重复性好,染料荧光猝灭大大减少。

1. 一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在于,包括底板、样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在底板上,样品结合垫的末端与硝酸纤维素膜的始端连接,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品结合垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐;所述样品结合垫上包埋有荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体;

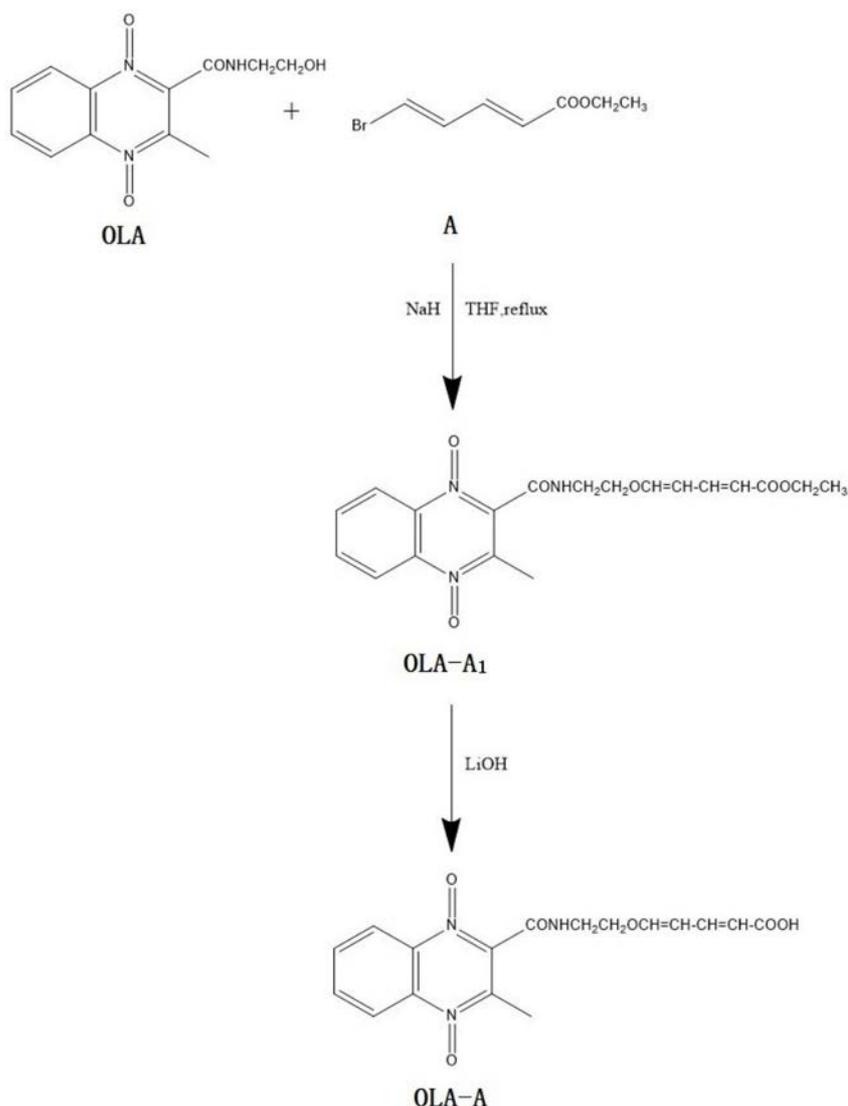
所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区;检测区位于接近样品结合垫的一侧,质控区位于远离样品结合垫的一侧,质控区喷涂有羊抗鼠二抗,检测区喷涂有喹乙醇半抗原-载体蛋白偶联物,所述喹乙醇半抗原-载体蛋白偶联物为喹乙醇半抗原-卵清白蛋白偶联物 OLA-A-OVA,

喹乙醇半抗原-卵清白蛋白偶联物由以下步骤制备得到:

(1) 喹乙醇半抗原的合成

(1.1) 将1mmol喹乙醇溶于2-5mLTHF中,0℃下加入1.0-1.2mmol NaH,搅拌0.5-2小时,后加入1mmol的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯,65℃下反应6-8小时,待反应完全后,加入30-50mL H₂O,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋干溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为-CH=CH-CH=CH-COOCH₂CH₃;

(1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于8-12mL甲醇与水的混合液中,其中,甲醇与水的体积均为5mL),加入氢氧化锂1-1.5mmol,搅拌,室温下反应1-3h;反应完全后,用1mol/L的盐酸溶液调节pH等于5-6,乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为-CH=CH-CH=CH-COOH;具体的合成路线如下:



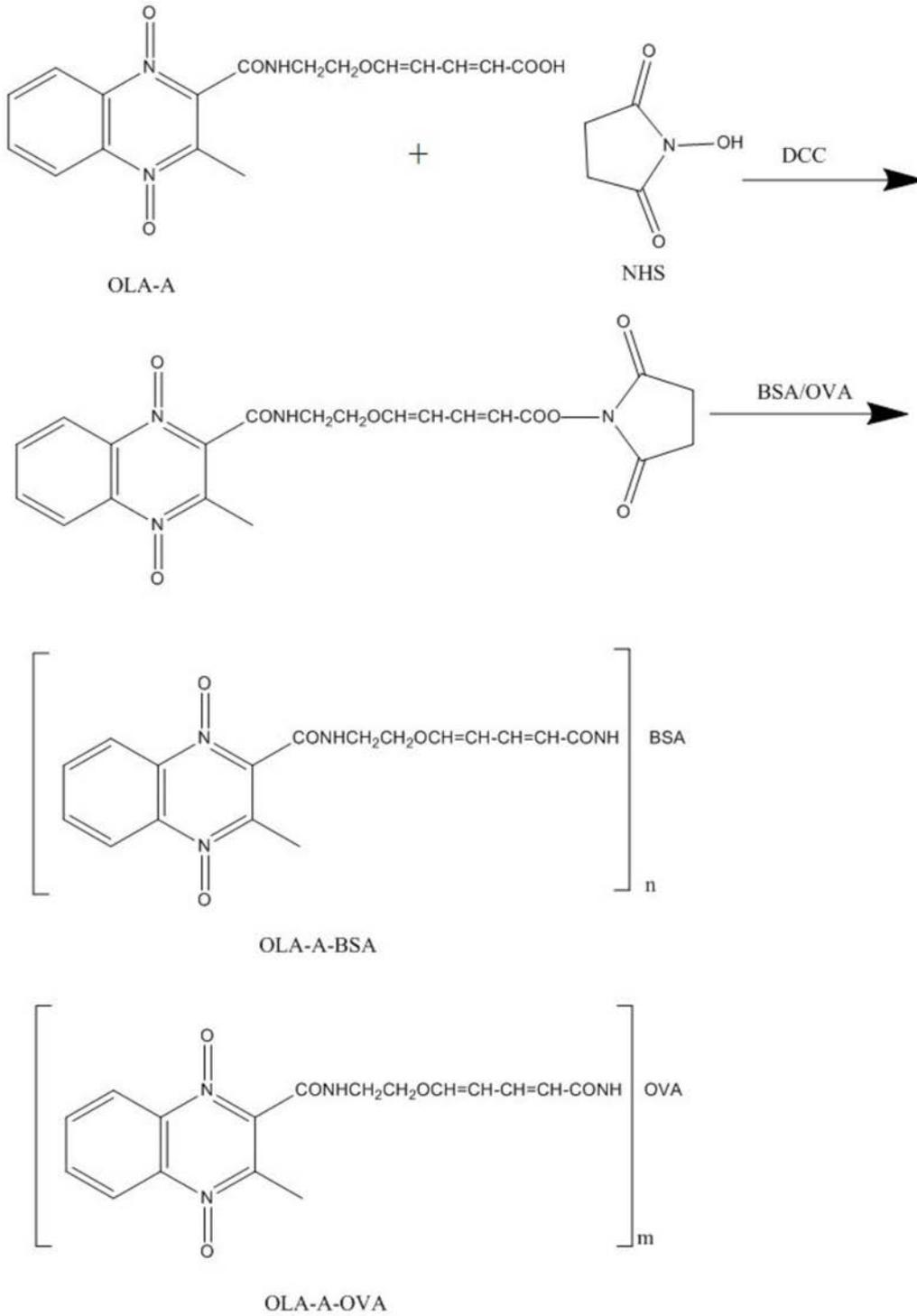
;

(2) 喹乙醇人工抗原的合成

取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10-12h后2000r/min离心10min,离心后上清液为a液;

称取20mg OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

4℃下将0.6mLa液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA,-A-表示-CH=CH-CH=CH-COO-;具体的合成路线如下:



2. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在于,所述底板为聚氯乙烯底板;所述样品结合垫为玻璃棉;所述吸水垫为吸水纸。

3. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在于,所述喹乙醇单克隆抗体是由喹乙醇半抗原与载体蛋白偶联制备人工抗原,免疫小鼠后筛选获得,载体蛋白为卵清白蛋白或者牛血清白蛋白。

4. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球是直径100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,微球表面连接有羧基官能团,所述荧光物质为铈的配合物。

5. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在在于,荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体的制备包括以下步骤:

1) 活化:取内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100 μ L混悬于900 μ L活化缓冲液中,于4 $^{\circ}$ C条件下10000r \cdot min $^{-1}$ 离心10min后移除上清液,用1mL活化缓冲液重新悬浮微球2次后,加入200 μ L活化剂,混匀后室温震荡活化15min;所述微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有-COOH基团,所述荧光物质为钬的配合物;

2) 偶联:将上述混合液10000r \cdot min $^{-1}$ 离心10min后移除上清,加入100~200 μ L浓度为1mg \cdot mL $^{-1}$ 喹乙醇单克隆抗体,在室温下震荡反应2h;

3) 封闭:震荡反应后将反应液在4 $^{\circ}$ C条件下5000r \cdot min $^{-1}$ 离心15min后移除上清,用封闭缓冲液重悬后室温震荡封闭1h;

4) 贮存:将上述封闭后反应液在4 $^{\circ}$ C条件下12000r \cdot min $^{-1}$ 离心15min后移除上清,用贮存缓冲液重新悬浮后离心弃上清,后再次用贮存液悬混后于4 $^{\circ}$ C避光保存;

所述活化缓冲液为pH=6.0,0.05mol \cdot L $^{-1}$ 的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES);

所述活化剂为水溶性碳二亚胺,其中摩尔质量比EDC:NHS:COOH=(2~4):(10~20):1;

所述偶联缓冲液为pH=7.5~8.5、0.05mol \cdot L $^{-1}$ 的硼酸盐缓冲液;

所述封闭缓冲液为含0.1~0.4mol \cdot L $^{-1}$ 乙醇胺、质量分数为2~5%的BSA、pH=7.4的磷酸盐缓冲液;

所述贮存缓冲液为含质量分数为0.01%NaN₃、质量分数为0.5%BSA的pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求1所述的一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在在于,样品结合垫的制备包括以下步骤:

1) 将样品结合垫用含质量分数为0.5%的牛血清白蛋白、pH=7.4、0.1mol \cdot L $^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液中浸泡2h,在37 $^{\circ}$ C下烘干2h;

2) 将贮存的荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体用贮存缓冲液稀释,将步骤1)处理过的样品结合垫浸泡于上述稀释后的溶液中30min,后经真空干燥后备用;所述贮存缓冲液为含质量分数为0.01%NaN₃、质量分数为0.5%BSA的pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

7. 一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条在检测喹乙醇中的应用,其特征在在于,所述试纸条为权利要求1-6任一项所述的试纸条,包括以下步骤:

1) 样品预处理,得到待检样品;

2) 用试纸条检测:吸取100 μ L待检样品溶液垂直滴加到试纸条样片结合垫上,液体流动时开始计时,反应10min后将试纸条插入荧光检测仪中检测,获得检测结果;

3) 结果分析:测试完成后,仪器将根据检测得到的荧光信号强弱,计算出样品中喹乙醇的浓度,并根据预设的阈值给出阴阳性判断。

一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术中的时间分辨荧光免疫分析技术领域,具体涉及一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 喹乙醇(Olaquinox,OLA)是一种抗菌促生长剂,曾广泛应用于水产养殖,一度被称为“水产瘦肉精”。喹乙醇的毒副作用不容小觑,存在明显的遗传毒性和蓄积毒性,因此国内外相继制定了严格的使用规范和残留限量标准。如美国和欧盟禁止使用喹乙醇,日本规定喹乙醇在动物组织和内脏中的最大残留限量(MRL)为 $300\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,我国农业部在2001年发布的第168号公告《饲料药物添加剂使用规范》中规定饲料中的添加量不得高于 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,同时规定禁止在鱼、禽及体重超过35kg猪的养殖过程中使用。尽管如此,抗菌促生长效果好且廉价的喹乙醇目前仍存在违规添加使用的现象。因此,加强喹乙醇的检测监督,特别是加强喹乙醇检测技术的研究极为必要。

[0003] 喹乙醇的残留检测方法,主要包括传统的仪器分析和免疫分析两大类。其中仪器法主要包括光谱法、色谱法以及液质联用技术等,仪器分析准确度高、精密度强,但其样品前处理过程复杂繁琐、耗时长、需要专业技术人员操作、仪器试剂等价格昂贵,无法在基层得到极大推广。免疫分析技术凭借着其高效、快速、高灵敏度以及高特异性等优势广泛应用于小分子药物残留检测中。目前常用的免疫检测方法主要包括酶联免疫检测法、胶体金免疫层析、荧光免疫分析等,但存在灵敏度不理想,假阳性和假阴性等问题。

发明内容

[0004] 为了解决上述存在的问题,本发明提供了一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条及其应用。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条,包括底板、样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在底板上,样品结合垫的末端与硝酸纤维素膜的始端连接,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品结合垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐;所述样品结合垫上包埋有荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体;

[0007] 所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区;检测区位于接近样品结合垫的一侧,质控区位于远离样品结合垫的一侧,质控区喷涂有羊抗鼠二抗,检测区喷涂有喹乙醇半抗原-载体蛋白偶联物,所述喹乙醇半抗原-载体蛋白偶联物为喹乙醇半抗原-卵清白蛋白偶联物OLA-A-OVA,

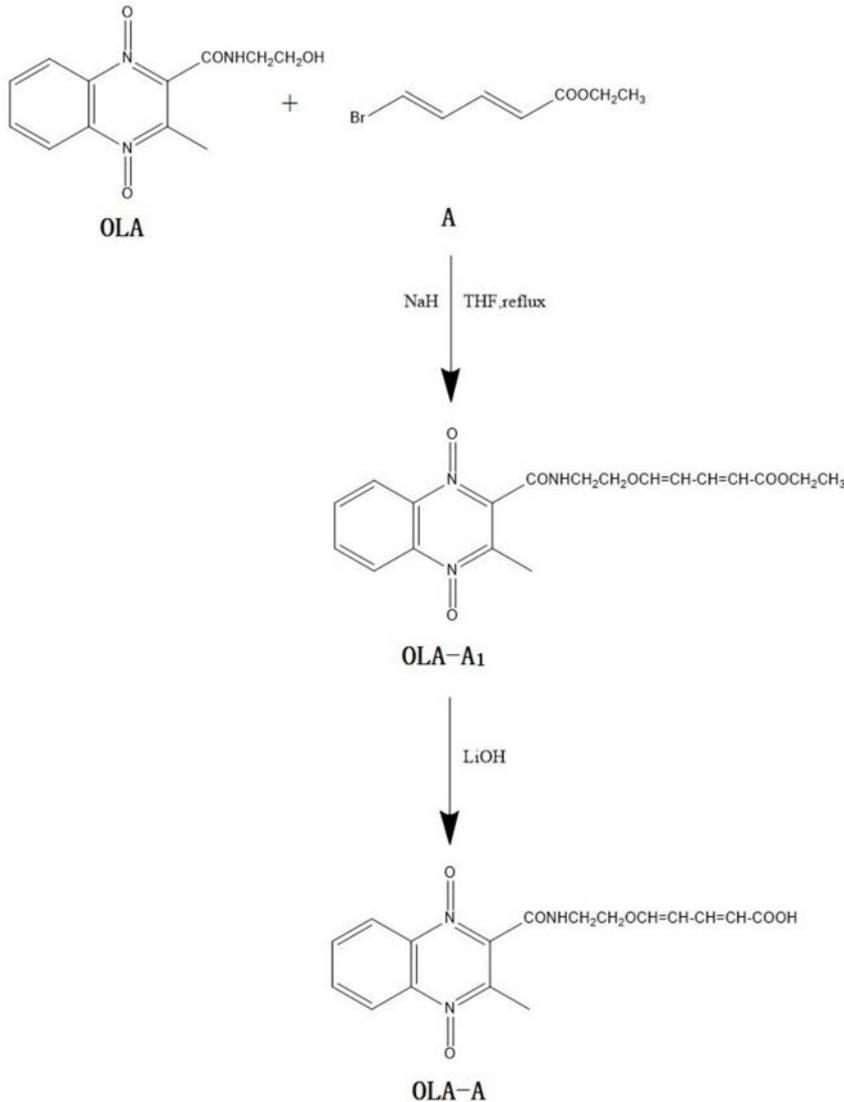
[0008] 喹乙醇半抗原-卵清白蛋白偶联物由以下步骤制备得到:

[0009] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0010] (1.1) 将 1mmol 喹乙醇溶于 $2\text{--}5\text{mL}$ LTHF中, 0°C 下加入 $1.0\text{--}1.2\text{mmol}$ NaH,搅拌 $0.5\text{--}2$ 小

时,后加入1mmol的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯,65℃下反应6-8小时,待反应完全后,加入30-50mL H₂O,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,旋干溶剂,经柱层析分离得到OLA-A₁,A₁为-CH=CH-CH=CH-COOCH₂CH₃;

[0011] (1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于8-12mL甲醇与水的混合液中,其中,甲醇与水的体积均为5mL),加入氢氧化锂1-1.5mmol,搅拌,室温下反应1-3h;反应完全后,用1mol/L的盐酸溶液调节pH等于5-6,乙酸乙酯萃取,有机相用饱和食盐水洗涤,再用无水硫酸钠干燥,旋蒸除去溶剂,得产物OLA-A,-A为-CH=CH-CH=CH-COOH;具体的合成路线如下:



[0012]

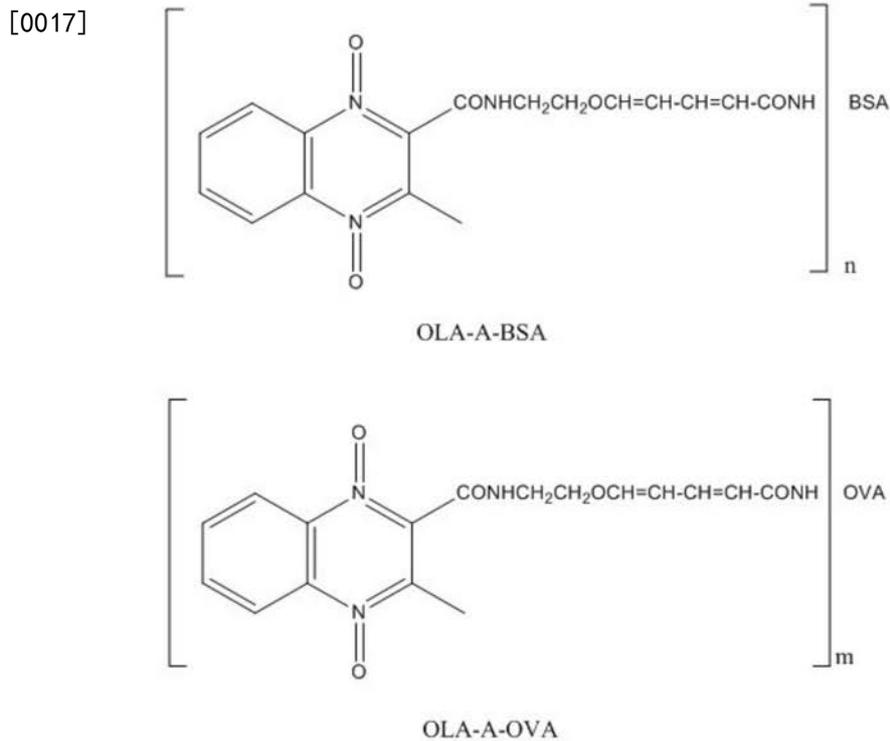
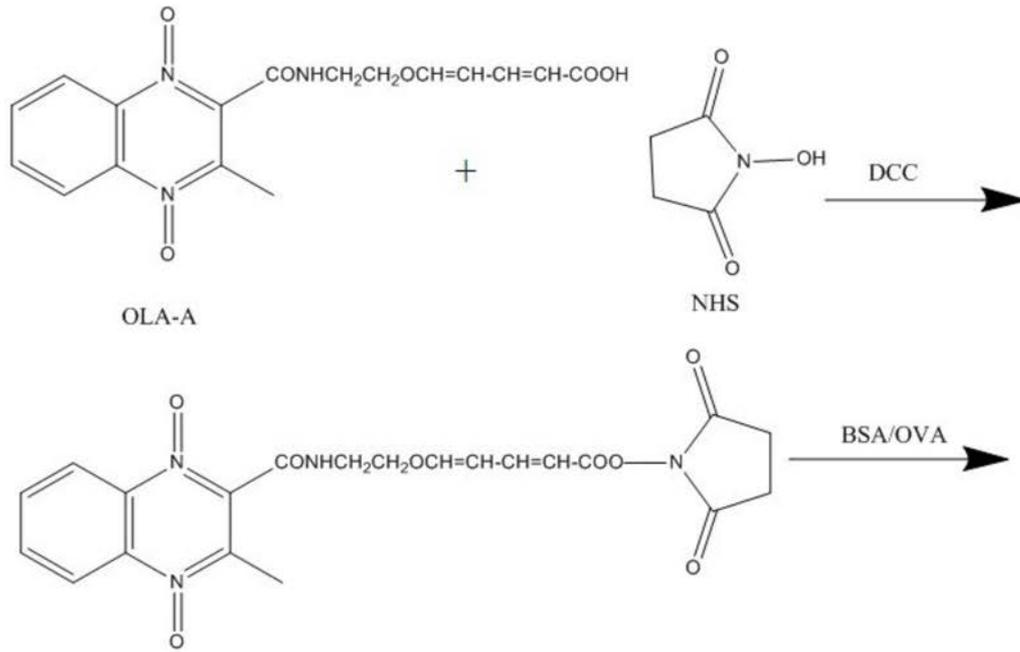
[0013] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0014] 取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中,加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺,室温下避光搅拌反应10-12h后2000r/min离心10min,离心后上清液为a液;

[0015] 称取20mg OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L,pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,此为b液;

[0016] 4℃下将0.6mL a液逐滴加入到b液中,4℃搅拌反应过夜;次日转入透析袋内,0.01mmol/L,pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-A-

OVA或OLA-A-BSA, -A-表示-CH=CH-CH=CH-COO-; 具体的合成路线如下:



[0018] 进一步地,所述底板为聚氯乙烯底板;所述样品结合垫为玻璃棉;所述吸水垫为吸水纸。

[0019] 进一步地,所述喹乙醇单克隆抗体是由喹乙醇半抗原与载体蛋白偶联制备人工抗原,免疫小鼠后筛选获得,载体蛋白为卵清白蛋白或者牛血清白蛋白。

[0020] 进一步地,所述荧光微球是直径100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,微球表面连接有羧基官能团,所述荧光物质为铈的配合物。荧光微球的激发波长为365nm,发射波长为610nm。

[0021] 进一步地, 荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体的制备包括以下步骤:

[0022] 1) 活化: 取内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100 μ L混悬于900 μ L活化缓冲液中, 于4 $^{\circ}$ C条件下10000r \cdot min $^{-1}$ 离心10min后移除上清液, 用1mL活化缓冲液重新悬浮微球2次后, 加入200 μ L活化剂, 混匀后室温震荡活化15min。所述微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球, 其表面连接有-COOH基团, 所述荧光物质为铈的配合物;

[0023] 2) 偶联: 将上述混合液10000r \cdot min $^{-1}$ 离心10min后移除上清, 加入100~200 μ L喹乙醇单克隆抗体(1mg \cdot mL $^{-1}$), 在室温下震荡反应2h;

[0024] 3) 封闭: 震荡反应后将反应液在4 $^{\circ}$ C条件下5000r \cdot min $^{-1}$ 离心15min后移除上清, 用封闭缓冲液重悬后室温震荡封闭1h;

[0025] 4) 贮存: 将上述封闭后反应液在4 $^{\circ}$ C条件下12000r \cdot min $^{-1}$ 离心15min后移除上清, 用贮存缓冲液重新悬浮后离心弃上清, 后再次用贮存液悬混后于4 $^{\circ}$ C避光保存;

[0026] 所述活化缓冲液为pH=6.0, 0.05mol \cdot L $^{-1}$ 的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES);

[0027] 所述活化剂为水溶性碳二亚胺, 其中摩尔质量比EDC:NHS:COOH=(2~4):(10~20):1, 临用前用活化缓冲液稀释到所需浓度;

[0028] 所述偶联缓冲液为pH=7.5~8.5、0.05mol \cdot L $^{-1}$ 的硼酸盐缓冲液;

[0029] 所述封闭缓冲液为含0.1~0.4mol \cdot L $^{-1}$ 乙醇胺、质量分数为2~5%的BSA、pH为7.4的磷酸盐缓冲液;

[0030] 所述贮存缓冲液为含质量分数为0.01%NaN₃、质量分数为0.5%BSA的pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0031] 进一步地, 样品结合垫的制备包括以下步骤:

[0032] 3) 将样品结合垫用含质量分数为0.5%的牛血清白蛋白、pH=7.4、0.1mol \cdot L $^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液中浸泡2h, 在37 $^{\circ}$ C下烘干2h;

[0033] 4) 将贮存的荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体用贮存缓冲液稀释, 将步骤1)处理过的样品结合垫浸泡于上述稀释后的溶液中30min, 后经真空干燥后备用; 所述贮存缓冲液为含质量分数为0.01%NaN₃、质量分数为0.5%BSA的pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0034] 一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条在检测喹乙醇中的应用, 所述试纸条为以上所述的试纸条, 包括以下步骤:

[0035] 1) 样品预处理, 得到待检样品;

[0036] 2) 用试纸条检测: 吸取100 μ L待检样品溶液垂直滴加到试纸条样片结合垫上, 液体流动时开始计时, 反应10min后将试纸条插入荧光检测仪中检测, 获得检测结果;

[0037] 3) 结果分析: 测试完成后, 仪器将根据检测得到的荧光信号强弱, 通过系统设定的计算程序计算出样品中喹乙醇的浓度, 并根据预设的阈值给出阴阳性判断。因为每批试纸条在前期都会做大量的标准曲线试验, 确定本批次的标准曲线, 如果采用本批次的试纸条去检测实际的新样品, 计算检测结果时, 直接针对之前拟合的标准曲线进行计算即可, 仪器系统里的计算芯片进行处理, 得到喹乙醇浓度。

[0038] 本发明的有益效果是:

[0039] (1) 本发明的试纸条能够对水、饲料中的喹乙醇进行定性和定量检测, 样品前处理过程简单, 方便快捷, 检测时间短, 试纸条具有很高的精密度和灵敏度。

[0040] (2) 本发明制备的抗噻乙醇单克隆抗体特异性强,采用荧光微球标记的抗噻乙醇单克隆抗体,荧光微球的发光强度和检测信号可随着激发光强度的增强而增强,所以荧光微球标记抗噻乙醇单克隆抗体能有效提高免疫层析技术的分析灵敏度,与传统的胶体金免疫层析法相比,本发明的免疫分析法具有更高的灵敏度;同时由于荧光微球具有相对稳定的形态结构,微球粒度均一,分散性和稳定性好,发光效率高,重复性好,染料荧光猝灭大大减少。

附图说明

[0041] 图1为荧光微球免疫层析试纸条剖面结构示意图。

[0042] 图2为荧光微球免疫层析试纸条的俯视图。

[0043] 图3为噻乙醇半抗原的合成路线。

[0044] 图4为噻乙醇人工抗原的合成路线。

具体实施方式

[0045] 以下结合附图对本发明的技术方案做进一步详细说明,应当指出的是,具体实施方式只是对本发明的详细说明,不应视为对本发明的限定。

[0046] 以下实施例中所采用的物质及检测仪器等均可以通过商业途径购得。

[0047] 以下实施例中所用的PBS缓冲液,如无特殊说明,均为 $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液;实施例中所用的CBS缓冲液均为 $\text{pH}=9.6, 0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液;牛血清白蛋白简称BSA;卵清白蛋白简称OVA,钥孔血蓝蛋白简称KLH,噻乙醇简称OLA。

[0048] 以下实施例中所用的相关溶液配制:

[0049] PBST洗液:取500mL $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液,加入0.25mL吐温20,混匀备用。

[0050] 封闭液:1g脱脂奶粉溶解于50mL $\text{pH}=7.4, 0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液。

[0051] $\text{pH}=9.6, 0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液(CBS):称取 Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g,加入纯水至990mL,调pH至9.6,再用纯水定容至1000mL,4℃贮存备用。

[0052] $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{pH}=7.4$ 的磷酸缓冲液(PBS):8.5g NaCl , 2.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,溶于900mL纯水中,调pH至7.4,定容至1000mL。

[0053] 检测噻乙醇残留的时间分辨荧光微球免疫层析试纸条的构成

[0054] 如图1所示,所述试纸条是由底板6、样品结合垫1、硝酸纤维素膜2和吸水垫3组成;所述样品结合垫1、硝酸纤维素膜2和吸水垫3依次按顺序粘贴在底板6上,样品结合垫1的末端与硝酸纤维素膜2的始端连接,硝酸纤维素膜2的末端与吸水垫3的始端相连,样品结合垫1的始端与底板6的始端对齐,吸水垫3的末端与底板6的末端对齐;

[0055] 所述硝酸纤维素膜2上固定有检测区4和质控区5;检测区4位于接近样品结合垫1的一侧,质控区5位于远离样品结合垫1的一侧,二者均为条带状,平行排列并且长度方向垂直于试纸条的长度方向,如图2所示。检测区4喷涂有噻乙醇半抗原-载体蛋白偶联物,此处噻乙醇半抗原-载体蛋白偶联物为噻乙醇半抗原-卵清白蛋白偶联物,质控区5喷涂有羊抗鼠二抗。

[0056] 所述底板6为聚氯乙烯底板(PVC底板);所述样品结合垫1为玻璃棉;所述吸水垫3

为吸水纸。

[0057] 检测喹乙醇残留的时间分辨荧光微球免疫层析试纸条的制备

[0058] 检测喹乙醇残留的时间分辨荧光微球免疫层析试纸条的制备方法主要包括以下步骤：

[0059] 1) 样品结合垫1的制备：用Bangs Laboratories公司生产的时间分辨荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体，并将其以缓冲体系稀释后，将样品结合垫1浸泡于稀释缓冲液中，经真空冷冻干燥后制备；

[0060] 所述荧光微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球，其表面连接有-COOH基团，所述荧光物质为钬配合物。

[0061] 2) 硝酸纤维素膜2的制备：将喹乙醇半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜2上的检测区范围，制成检测区4；将羊抗鼠二抗喷涂到硝酸纤维素膜2上的质控区范围，制成质控区5；

[0062] 3) 组装和剪切：在底板6上依次粘制包埋有时间分辨荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体的样品结合垫1、固定有检测区4和质控区5的硝酸纤维素膜2及吸水垫3，并剪切成所需的宽度即为喹乙醇荧光微球免疫层析试纸条。

[0063] 实施例1

[0064] 喹乙醇人工抗原的合成

[0065] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0066] (1.1) 将1mmol喹乙醇溶于2-5mLTHF中，冰浴(0℃)下加入1.1-1.2mmol NaH，搅拌1小时，后加入1mmol的5-溴-2,4-二烯戊酸乙酯(A)，65℃下回流反应6小时，待反应完全后，加入30mL H₂O，后用乙酸乙酯萃取，合并有机相，用饱和食盐水洗涤，旋蒸除去溶剂，经柱层析分离得到OLA-A₁，A₁为-CH=CH-CH=CH-COOCH₂CH₃；洗脱剂为：石油醚：乙酸乙酯=1:1；

[0067] (1.2) 将1mmol OLA-A₁溶于10mL甲醇与水的混合液中(甲醇与水的体积均为5mL)，加入氢氧化锂1.5mmol，室温下反应2h；反应完全后，用1mol/L的盐酸溶液调节pH等于5-6，乙酸乙酯50ml萃取两次，有机相用饱和食盐水洗涤，再用无水硫酸钠干燥，旋蒸除去溶剂，得产物OLA-A，-A为-CH=CH-CH=CH-COOH；具体的合成路线如图3所示。

[0068] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0069] 取0.04mmol OLA-A溶于0.8-1.0mL DMF中，加入0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和0.04mmol二环己基碳二亚胺，室温下避光搅拌反应10h后2000r/min离心10min，离心后上清液为a液；

[0070] 称取20mg载体蛋白OVA(或BSA)溶于5mL 0.01mmol/L，pH=7.4的磷酸盐缓冲液中，此为b液；

[0071] 4℃下将0.6mL a液逐滴加入到b液中，4℃搅拌反应过夜；次日转入透析袋内，0.01mmol/L，pH=7.4的磷酸盐缓冲液透析2天，离心弃沉淀，得到交联产物，命名为OLA-A-OVA或OLA-A-BSA，-A-表示-CH=CH-CH=CH-COO-；具体的合成路线如图4所示；m、n分别表示一个载体蛋白OVA、BSA上偶联的喹乙醇半抗原的个数；每次制备得到的喹乙醇人工抗原中，m或者n的数值不是唯一的，会有一些变化。

[0072] 载体蛋白可以为牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)或者其他载体蛋白。

[0073] (3) 人工抗原的鉴定:

[0074] 采取紫外扫描与SDS-PAGE鉴定得到:偶联成功。

[0075] 紫外扫描方案:BSA (OVA)、OLA-A和OLA-A-BSA (OVA) 分别配制成浓度为 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定 $200\sim 400\text{nm}$ 波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0076] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量 $10\mu\text{L}$ 每孔,浓缩胶电压 75V ,分离胶电压 100V ,考马斯亮蓝染色 1h ,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0077] 紫外扫描图谱中,OLA-A-BSA (OVA) 溶液与BSA (OVA) 溶液相比,最大吸收波长有变化,而且经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0078] 对比例1

[0079] 采用常规方法合成喹乙醇人工抗原,具体步骤如下:

[0080] (1) 喹乙醇半抗原的合成

[0081] 向三口圆底烧瓶中准确加入 2.106g 喹乙醇和 1.6g 琥珀酸酐,加入 80mL 吡啶, 115°C 下回流反应 4h 后减压蒸除吡啶,向剩余混合物中加入 60mL 冰蒸馏水, $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 调pH至 $2.0\sim 3.0$, 4°C 下放置过夜。减压抽滤并用冰蒸馏水洗涤3次后抽干,淡黄色粉状物质即为OLA-HS;

[0082] (2) 喹乙醇人工抗原的合成

[0083] 取 14.528mg OLA-HS溶于 0.8mL DMF中,加入 4.603mg NHS和 8.253mg DCC,室温下避光搅拌反应 10h 后 $2000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min ,离心后上清液为c液。

[0084] 称取 20mg OVA(或BSA)溶于 5mL $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,此为b液。 4°C 下将 0.6mL c液逐滴加入到缓慢搅拌的b液中, 4°C 搅拌反应过夜。次日转入透析袋内, $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$ 的磷酸盐缓冲液(PBS)透析 2d ,离心弃沉淀,得到交联产物,命名为OLA-HS-OVA或OLA-HS-BSA。

[0085] (2) 人工抗原的鉴定:

[0086] 采取紫外扫描与SDS-PAGE电泳鉴定其偶联效果。

[0087] 紫外扫描方案:BSA (OVA)、OLA-HS和OLA-HS-BSA (OVA) 配制成浓度为 $1\sim 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内的溶液,测定 $200\sim 400\text{nm}$ 波长范围内的吸光度,并建立紫外扫描图谱,通过比较每种溶液的吸收曲线来鉴别合成是否成功。

[0088] SDS-PAGE电泳方案:选择体积分数为5%浓缩胶,选择体积分数为10%分离胶,上样量 $10\mu\text{L}$ 每孔,浓缩胶电压 75V ,分离胶电压 100V ,考马斯亮蓝染色 1h ,脱色4次,凝胶成像仪拍照分析。

[0089] 紫外扫描图谱中,OLA-HS-BSA (OVA) 溶液与BSA (OVA) 溶液相比,最大吸收波长有变化,而且经SDS-PAGE显示偶联物电泳条带比单一的蛋白条带有滞后现象,偶联物的分子量比单一蛋白分子量要大,说明偶联成功。

[0090] 实施例2

[0091] 抗血清效价的测定:

[0092] 将实施例1、对比例1制备的人工抗原分别对BALB/C小鼠进行免疫,初次免疫采用

弗氏完全佐剂乳化人工抗原,乳化后,注射,计量为250 μg /小鼠,后每间隔21天加强免疫,共加强免疫3次,加强免疫采用不完全佐剂进行乳化,免疫计量为150 μg /小鼠,加强免疫14d(天)后小鼠断尾采血进行多抗血清的效价测定,血清用封闭液倍比稀释后ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清OD_{450nm}值比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价,结果如表1所示。最后进行末免,末免采用人工抗原直接腹腔注射的方式进行,免疫计量为300 μg /小鼠。

[0093] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0094] a. 包被:分别以实施例1中的人工抗原OLA-A-OVA或者对比例1中的人工抗原OLA-HS-OVA为包被原,pH 9.6,0.05mol $\cdot\text{L}^{-1}$ CBS为包被缓冲液,包被原浓度为10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,包被量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 中包被2h,后PBST洗液洗板4次;

[0095] b. 封闭:加入封闭液250 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后,PBST洗液洗板4次;

[0096] c. 加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清10000r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取10 μL 加入到2mL封闭液,(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照,100 μL /孔,每个梯度4个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后采用PBST洗液洗板4次;

[0097] d. 加酶标二抗:反应结束后PBST洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0098] e. 加底物反应液:加入TMB底物缓冲液,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min;

[0099] f. 终止读数:加入2mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸50 μL /孔,用酶标仪读取OD_{450nm}值。

[0100] 表1实施例1与对比例1中的抗血清效价测定结果

[0101]

免疫抗原	检测抗原	抗血清效价
OLA-A-BSA实施例1	OLA-A-OVA实施例1	614400
OLA-HS-BSA对比例1	OLA-HS-OVA对比例1	102400

[0102] 由表1的抗血清效价测定结果表明,实施例1的抗血清效价比较高,实施例1制备的人工抗原中存在共轭效应,使得人工抗原更加稳定,而且能更好地把喹乙醇的特征结构暴露出来,抗原特异性较强,有利于制备特异性强的单克隆抗体。

[0103] 实施例3

[0104] 喹乙醇单克隆抗体的制备

[0105] (1) 小鼠免疫:

[0106] 选择6-8周龄、体重18~20g BALB/C雌性小鼠。将制备的免疫原(OLA-A-BSA)与等体积弗氏完全佐剂采用注射器加压充分混合乳化后,腹部和腋下多点注射,剂量为100-200 μg /只,后每间隔21天进行加强免疫,3次加强免疫后采血测定效价,效价采用间接ELISA方法测定,血清用封闭液倍比稀释后,采用ELISA法测定抗血清效价,以免疫之前的小鼠血清为阴性对照,以阳性血清OD_{450nm}值与阴性血清比值大于2.1所在稀释度为抗血清效价。当效价不再明显升高时加倍剂量进行末免,末免3d后进行细胞融合。免疫过程中第一次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫采用弗氏不完全佐剂,末免不使用佐剂,直接免疫原注射免疫。

[0107] 效价测定采用间接ELISA方法,具体实验步骤如下:

[0108] a. 包被:以OLA-A-OVA为包被原,pH=9.6,0.05mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸盐缓冲液(CBS)为包被缓冲液,包被原浓度为10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,包被量为100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 中包被2h后,PBST洗液洗板4次;

[0109] b. 封闭:加入封闭液250 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min后,PBST洗板4次,每孔加PBST 300 μ

L;

[0110] c.加抗血清:将小鼠采血获得的抗血清 $10000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min后,吸取 $10\mu\text{L}$ 加入到 2mL 封闭液(起始稀释倍数为200倍),后采用封闭液倍比稀释11个梯度和1个阴性对照, $100\mu\text{L}/\text{孔}$,每个梯度4个重复, 37°C 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0111] d.加酶标二抗:反应结束后洗板4次,HRP标记的羊抗鼠二抗10000倍稀释后加入酶标板, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育1h,后PBST洗液洗板4次;

[0112] e.加底物反应液:加入TMB底物缓冲液, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育15min;

[0113] f.终止读数:加入 $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 $50\mu\text{L}/\text{孔}$,用酶标仪读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

[0114] (2) 细胞融合及培养:

[0115] 在末免3天后,按照常规PEG(聚乙二醇,分子量1500)方法进行细胞融合,具体步骤如下:

[0116] a.末免后的小鼠眼球放血,血清收集后离心吸上清备用,拉颈处死后置于70%酒精中3~5min,无菌条件下取小鼠脾脏,用无菌手术剪剪碎后置入无菌碾钵中碾磨,用RPMI-1640基础培养基吹悬细胞后,过200目细胞筛网得到脾细胞悬液,并进行细胞计数;

[0117] b.收集SP2/0细胞(骨髓瘤细胞),要求细胞生长状态佳,细胞活性大于90%,吸去细胞上清后加入新的RPMI-1640基础培养基并将细胞吹打悬浮,后进行细胞计数;

[0118] c.根据细胞计数结果,将脾细胞与SP2/0细胞按照5-10:1的比例混合后, $1800\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5分钟后吸去上清,向剩余细胞中加入 0.6mL PEG,在1分钟内边加边轻轻搅拌混匀,加完后静置1min后,由慢到快再加入RPMI-1640基础培养基 45mL ,后 $1500\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5分钟后去上清,加入选择性HAT培养基后,铺板于96孔细胞培养板,每孔 $250\mu\text{L}$,置于 37°C ,体积分数为5% CO_2 的培养箱中培养。

[0119] d.培养3~5天后,用HAT培养基换液1次,第10天换为HT培养基培养。

[0120] (3) 细胞筛选与细胞株建立:

[0121] 待融合细胞生长到覆盖培养孔10%~30%孔底面积时,取上清用间接ELISA筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为OLA-A-OVA偶联物,并以OVA、BSA作阴性对照。筛选出的阳性反应孔进一步用竞争ELISA分析抗体的检测灵敏度。灵敏度好的杂交瘤细胞用有限稀释法连续克隆3~4次,获得杂交瘤细胞株。

[0122] 杂交瘤细胞株经扩大培养后,一方面可以将该细胞株用于腹水制备、单克隆抗体的纯化和应用;另一方面可以将建立的杂交瘤细胞株移入细胞冻存管并放入液氮中长期保存。

[0123] (4) 单克隆抗体的制备、纯化和鉴定

[0124] 采用动物体内诱生法制备单克隆抗体。

[0125] 选择6~8周龄健康BALB/C小鼠,在BALB/C小鼠腹腔注射降植烷, $0.3\text{mL}/\text{只}$,7~10d后同法注射筛选到的杂交瘤细胞株细胞($0.4\text{mL}/\text{只}$,每 mL 细胞株数量在 $2.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 之间),5~7d待小鼠腹腔明显胀大后无菌操作抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水。

[0126] 腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化后过protein A蛋白亲和层析柱纯化,用紫外分光光度计分别测定纯化抗体的紫外260nm和280nm的光密度,用Lowry-kalokar公式计算蛋白质浓度为 $6.4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其余纯化的单抗 -70°C 保存备用。

[0127] 实施例4

[0128] 羊抗鼠二抗的制备

[0129] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,通过血清纯化后获得;或者采购商品化羊抗鼠二抗产品;

[0130] 实施例5

[0131] 荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体的制备

[0132] (1) 活化:取市售的内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100 μ L混悬于900 μ L活化缓冲液中,于4 $^{\circ}$ C条件下10000r \cdot min $^{-1}$ 离心10min后移除上清液,用1mL活化缓冲液重新悬浮微球2次后,加入200 μ L活化剂,混匀后室温震荡活化15min。所述微球悬液,购自Bangs Laboratories公司,此微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有-COOH基团,所述荧光物质为铈的配合物。

[0133] (2) 偶联:将上述混合液10000r \cdot min $^{-1}$ 离心10min后移除上清,加入100~200 μ L喹乙醇单克隆抗体(1mg \cdot mL $^{-1}$),在室温下震荡反应2h。

[0134] (3) 封闭:震荡反应后将反应液在4 $^{\circ}$ C条件下5000r \cdot min $^{-1}$ 离心15min后移除上清,用封闭缓冲液重悬后室温震荡封闭1h。

[0135] (4) 贮存:将上述封闭后反应液在4 $^{\circ}$ C条件下12000r \cdot min $^{-1}$ 离心15min后移除上清,用贮存缓冲液重新悬浮后离心弃上清,后再次用贮存液悬混后于4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0136] 所述活化缓冲液为pH=6.0,0.05mol \cdot L $^{-1}$ 的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)。

[0137] 所述活化剂为水溶性碳二亚胺,其中摩尔质量比EDC:NHS:COOH=(2~4):(10~20):1,临用前用活化缓冲液稀释到所需浓度。

[0138] 所述偶联缓冲液为pH=7.5~8.5、0.05mol \cdot L $^{-1}$ 的硼酸盐缓冲液。

[0139] 所述封闭缓冲液为含0.1~0.4mol \cdot L $^{-1}$ 乙醇胺、质量分数为2~5%的BSA、pH为7.4的磷酸盐缓冲液。

[0140] 所述贮存缓冲液为含质量分数为0.01%Na₃N₃、质量分数为0.5%BSA的pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0141] 实施例6

[0142] 样品结合垫的制备

[0143] (1) 将样品结合垫用含质量分数为0.5%的牛血清白蛋白、pH=7.4、0.1mol \cdot L $^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液中浸泡2h,在37 $^{\circ}$ C下烘干2h;

[0144] (2) 将贮存的荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体用贮存缓冲液稀释,将处理过的样品结合垫浸泡于上述稀释后的溶液中30min,后经真空干燥后备用。

[0145] 实施例7

[0146] 硝酸纤维素膜的制备

[0147] 用0.05mol \cdot L $^{-1}$ 、pH=7.4的磷酸盐缓冲液将喹乙醇半抗原-卵清白蛋白偶联物(OLA-A-OVA)稀释到100 μ g \cdot mL $^{-1}$,用划膜仪将其喷涂于硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测区(N),喷涂量为1.0~2.0 μ L \cdot cm $^{-1}$;用0.01mol \cdot L $^{-1}$ 、pH=7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠二抗稀释到60 μ g \cdot mL $^{-1}$,用划膜仪将其喷涂于硝酸纤维素膜上的质控区(C),喷涂量为1.0~2.0 μ L \cdot cm $^{-1}$ 。将制备好的硝酸纤维素膜在37 $^{\circ}$ C下干燥2h后备用。

[0148] 实施例8

[0149] 试纸条的组装

[0150] 如图1-2所示,将样品结合垫1、硝酸纤维素膜2、吸水垫3从左到右顺序依次粘贴固定在底板6上,样品结合垫1的末端与硝酸纤维素膜2的始端相连,硝酸纤维素膜2的末端与吸水垫3的始端相连,样品结合垫1的始端与底板6的始端对齐,吸水垫3的末端与底板6的末端对齐,所述硝酸纤维素膜2上固定有检测区4和质控区5;检测区4位于接近样品结合垫1的一侧,质控区5位于远离样品结合垫1的一侧;然后用机器切成4mm宽的小条,形成试纸条,将试纸条装入塑料卡壳中,形成试纸卡。喹乙醇荧光微球免疫层析试纸卡在4℃下避光干燥保存有效期可达12个月。

[0151] 实施例9

[0152] 试纸条的使用方法,包括以下步骤:

[0153] 1) 样品预处理,得到待检样品;

[0154] 2) 用试纸条检测:吸取100 μ L待检样品溶液垂直滴加到试纸卡加样孔中,液体流动时开始计时,反应10min后将试纸卡插入荧光检测仪中检测,获得检测结果;

[0155] 3) 结果分析:测试完成后,仪器将根据检测得到的荧光信号强弱,通过系统设定的计算程序计算出样品中喹乙醇的浓度,并根据预设的阈值给出阴阳性判断。因为每批试纸条在前期都会做大量的标准曲线试验,确定本批次的标准曲线,如果采用本批次的试纸条去检测实际的新样品,计算检测结果时,直接针对之前拟合的标准曲线进行计算即可,仪器系统里的计算芯片进行处理,得到喹乙醇的浓度。

[0156] 阴性(-):若荧光检测仪的结果为阴性,表示样本中喹乙醇含量低于试纸条的检测限;

[0157] 阳性(+):若荧光检测仪的结果为阳性,表示样本中喹乙醇含量高于试纸条的检测限;

[0158] 无效:若质控区未检出荧光信号值,表明检测过程操作不正确或者试纸条已经失效。

[0159] 实施例10

[0160] 检测样品预处理方法

[0161] (1) 池塘水样预处理

[0162] 将池塘水样用定性滤纸过滤后,准确吸取1mL过滤后池塘水,加入1mL样品稀释液(样品稀释液包括体积百分含量5%甲醇的0.01mol \cdot L⁻¹,pH 7.4的磷酸盐缓冲液),混匀后吸取100 μ L混合液加入试纸卡加样孔中进行检测。

[0163] (2) 饲料样品预处理

[0164] 市场上购买的饲料用粉碎机粉碎后过60目筛,称取筛好的饲料样品1g放入5mL离心管中,加入3mL含体积百分含量为5%甲醇的0.01mol \cdot L⁻¹,pH=7.4磷酸盐缓冲液,在漩涡振荡器上振荡2min,后5000r \cdot min⁻¹离心10min,小心吸取上清液后再次转入1.5mL离心管并在10000r \cdot min⁻¹下离心10min,吸取100 μ L上清加入试纸卡加样孔中进行检测。

[0165] 实施例11

[0166] 试纸条检测限的确定

[0167] 在水样中分别添加喹乙醇标准品,添加之后,喹乙醇标准品的浓度分别为1ng \cdot mL⁻¹、2ng \cdot mL⁻¹和5ng \cdot mL⁻¹,在饲料样品中分别添加喹乙醇标准品,添加之后,喹乙醇标准

品的浓度分别为 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,通过荧光检测仪检测后结果显示表明,水样中,当喹乙醇浓度为 $1\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,结果显示为阴性,当喹乙醇浓度为 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,结果显示为阳性,说明试纸条对水样的检测限为 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;在饲料样品中,当喹乙醇浓度为 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,结果显示为阴性,当喹乙醇浓度为 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,结果显示为阳性,说明试纸条对饲料样品的检测限为 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0168] 实施例12

[0169] 试纸条假阳性率、假阴性率试验

[0170] 对于水样样品,分别取喹乙醇终浓度为小于 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和大于 $2\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阴性样本和阳性样本;对于饲料样品,分别取喹乙醇终浓度为小于 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和大于 $5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阴性样本和阳性样本;每个样本100份,用3个不同批次生产的试纸条分别进行检测,计算其阴阳性率,检测结果见下表1,其中,标准差与平均数的比值称为变异系数,记为CV(%),变异系数数值越小,说明数据越集中,越稳定。

[0171] 表1检测结果

样本名称	试纸条批次	阳性样本 (100份)	CV(%)	阴性样本 (100份)	CV(%)
水样	1	100份阳性	7.4	100份阴性	5.5
	2	100份阳性	8.3	100份阴性	4.7
	3	100份阳性	8.5	100份阴性	5.6
饲料	1	100份阳性	7.6	100份阴性	7.2
	2	100份阳性	6.8	100份阴性	8.8
	3	100份阳性	9.2	100份阴性	6.9

[0173] 从表中数据可以看出,用3个批次生产的试纸条检测阳性样本时,结果全为阳性,检测阴性样本时,结果全为阴性,说明试纸条的假阳性率和假阴性率均为0;说明本发明建立的检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条可以对水样、饲料样品进行快速检测,而且结果准确度高。

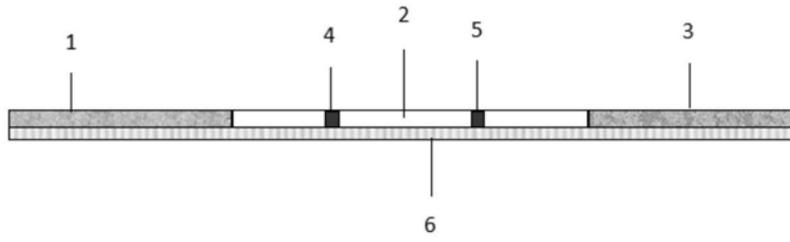


图1

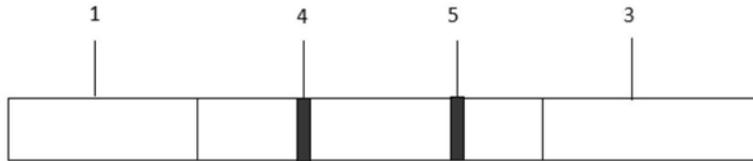


图2

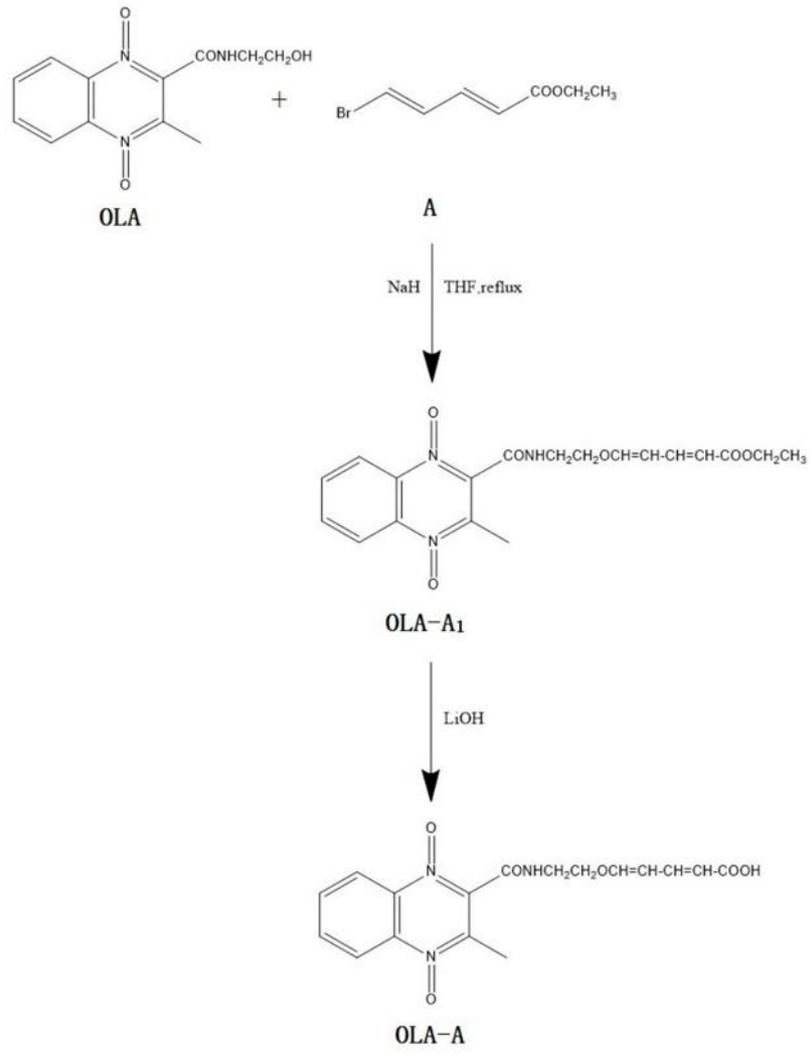


图3

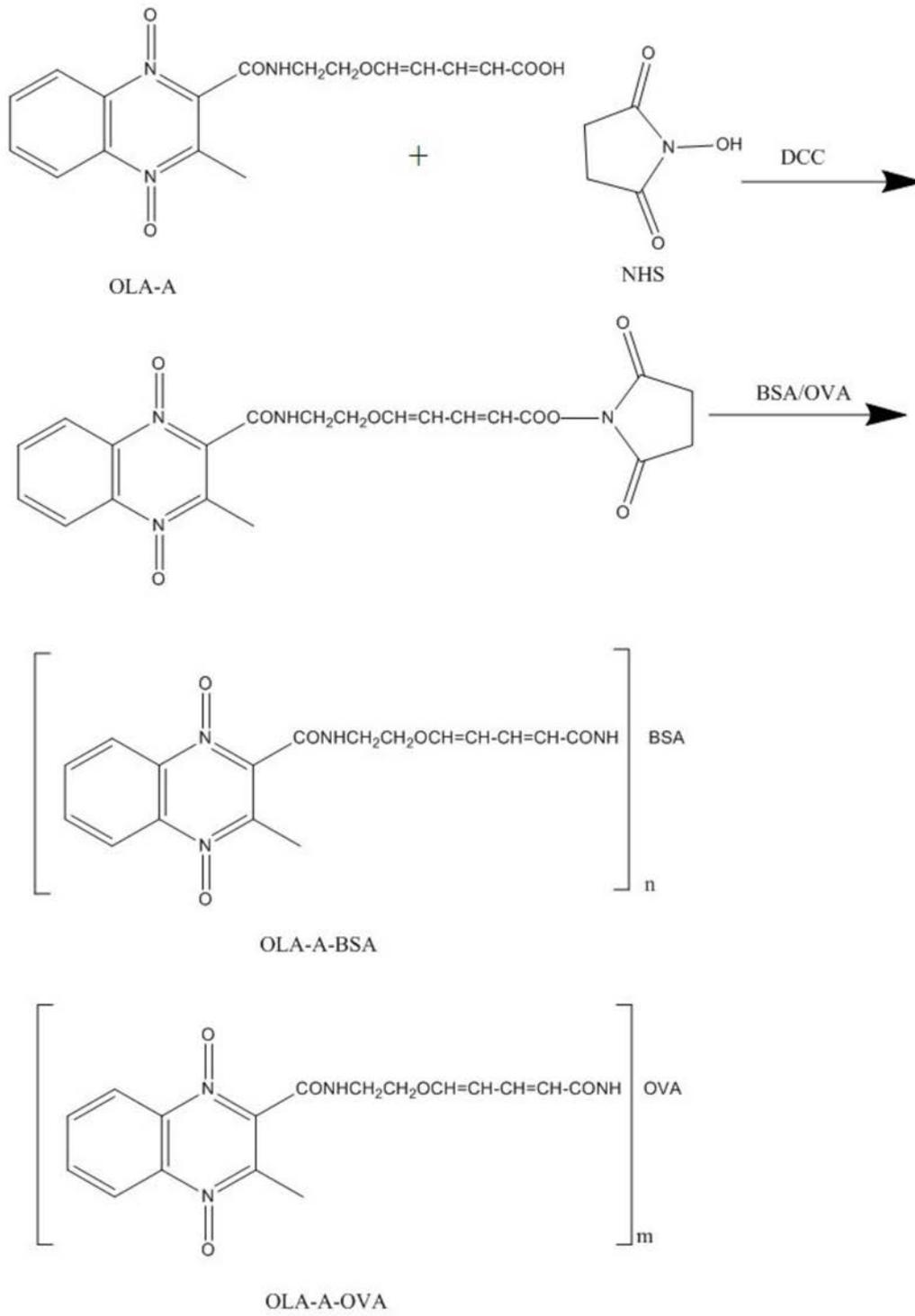


图4

专利名称(译)	一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条及其应用		
公开(公告)号	CN110927383A	公开(公告)日	2020-03-27
申请号	CN201910948223.3	申请日	2019-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江工商大学		
[标]发明人	王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军		
发明人	王赛赛 金仁耀 翟璐 郭建军		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/577 G01N33/558 C07K14/77 C07K1/107 G01N33/533		
CPC分类号	C07K14/77 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582 G01N33/94 G01N33/9446		
代理人(译)	向庆宁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测喹乙醇残留的荧光微球免疫层析试纸条及其应用，本发明的试纸条能够对水、饲料中的喹乙醇进行定性和定量检测，样品前处理过程简单，方便快捷，检测时间短，试纸条具有很高的精密度和灵敏度；而且本发明制备的抗喹乙醇单克隆抗体特异性强，采用荧光微球标记的抗喹乙醇单克隆抗体，荧光微球的发光强度和检测信号可随着激发光强度的增强而增强，所以荧光微球标记抗喹乙醇单克隆抗体能有效提高免疫层析技术的分析灵敏度，与传统的胶体金免疫层析法相比，本发明的分析法具有更高的灵敏度；同时由于荧光微球具有相对稳定的形态结构，微球粒度均一，分散性和稳定性好，发光效率高，重复性好，染料荧光猝灭大大减少。

