



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108426996 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201710079789.8

(22)申请日 2017.02.15

(71)申请人 江苏美正生物科技有限公司

地址 214000 江苏省无锡市无锡新区菱湖
大道97-1太湖国际科技园传感网大学
科技园兴业楼C区301号

(72)发明人 张勋 孙成 伦丽丽 李奇富

(74)专利代理机构 常州佰业腾飞专利代理事务
所(普通合伙) 32231

代理人 康潇

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

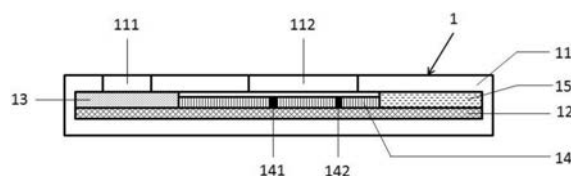
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测
试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明属于荧光免疫分析技术领域,涉及一种3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒及其制备方法和应用。该试剂盒包括检测卡和荧光试剂微孔,检测卡中的试纸条包括底板、样品垫、层析膜和吸水垫,层析膜的基材上设置有用包被3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物的检测区和用于包被羊抗鼠二抗的质控区;荧光试剂微孔包括3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球和可密封容器。利用该试剂盒能够在较短时间内检测动物组织样本中是否含有3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留,不需要昂贵设备,适于推广。另外,检测方法灵敏度高,检测限可达 $0.2 \mu\text{g/kg}$,持平或高于ELISA法,而且检测时间更短。



1. 一种3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其包括检测卡和荧光试剂微孔,其中:

所述检测卡包括试纸条和用于容纳所述试纸条的外壳,所述试纸条包括底板、样品垫、层析膜和吸水垫,其中:

所述底板上依次固定有所述样品垫、层析膜和吸水垫,所述样品垫的始端与所述底板的始端对齐,所述样品垫的末端与所述层析膜的始端相连,所述层析膜的末端与所述吸水垫的始端相连,所述吸水垫的末端与所述底板的末端对齐;

所述层析膜的基材上设置有用包被3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物的检测区和用于包被羊抗鼠二抗的质控区,所述检测区位于接近所述样品垫的一侧,所述质控区位于远离所述样品垫的一侧;

所述外壳上设置有加样孔和观察孔;当所述外壳中容纳有所述试纸条时,所述加样孔位于所述样品垫的上方,所述观察孔位于所述层析膜的上方,并且通过所述观察孔能够观察到所述检测区和所述质控区;

所述荧光试剂微孔包括3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球和用于容纳所述3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球的可密封容器。

2. 根据权利要求1所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述外壳由聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯或聚乙烯制成;

所述底板由聚氯乙烯或聚苯乙烯制成;

所述样品垫由玻璃纤维、聚酯纤维、吸水滤纸或滤血膜制成;

所述层析膜的基材由硝酸纤维素膜制成;

所述吸水垫由吸水纸制成。

3. 根据权利要求1所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物由3-甲基喹噁啉-2-羧酸、乙二胺和载体蛋白经偶联反应制成。

4. 根据权利要求3所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔戚血蓝素或多聚赖氨酸。

5. 根据权利要求1所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体通过以3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物作为免疫原对小鼠进行免疫而获得。

6. 根据权利要求1所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述时间分辨荧光微球为内部包裹含镧配合物、外部修饰羧基官能团的聚苯乙烯微球。

7. 根据权利要求6所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述时间分辨荧光微球的直径为100~300nm,激发波长为365nm,发射波长为610nm。

8. 根据权利要求1所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒,其特征在于:

所述可密封容器为采用锡箔纸不干胶进行密封的酶标板。

9. 一种根据权利要求1至8中任一项所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒的制备方法,其包括下列步骤:

1) 3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物的制备:通过偶联反应,利用乙二胺将3-甲

基喹噁啉-2-羧酸与载体蛋白进行偶联,得到3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物;

2) 3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体的制备:以步骤1)中得到的3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物作为免疫原来免疫小鼠,获得3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体;

3) 3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球的制备:通过单克隆抗体表面的氨基与微球表面的羧基之间的酰胺化反应,将步骤2)中得到的3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体包被在时间分辨荧光微球上,得到3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球;

4) 荧光试剂微孔的装配:将步骤3)中得到的3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球用稀释液稀释,转移至可密封容器中进行真空冷冻干燥,然后将容器密封,完成荧光试剂微孔的装配;

5) 层析膜的制备:将步骤1)中得到的3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物包被在检测区,并且将羊抗鼠二抗包被在质控区,得到层析膜;

6) 检测卡的装配:将样品垫、步骤5)中得到的层析膜、吸水垫依次固定在底板上,得到试纸条,再将试纸条裁切成预定的尺寸,装入外壳中,完成检测卡的装配。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒在检测动物组织样品中3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留中的应用。

一种3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒及其制备方法 和应用

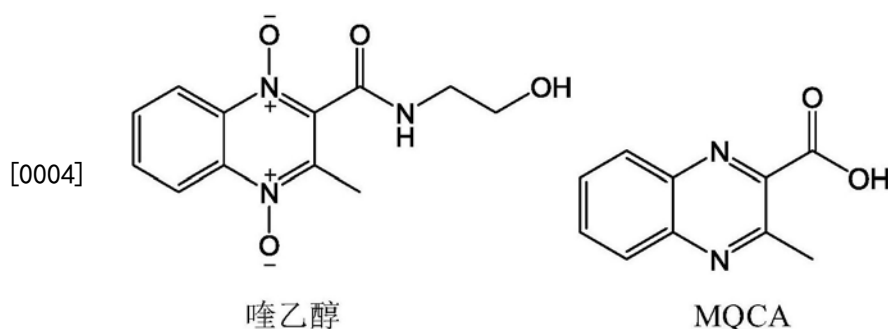
技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫分析技术领域,涉及一种用于快速检测喹乙醇代谢物3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的试剂盒,其制备方法,及其在检测动物组织样品中3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留中的应用。

背景技术

[0002] 喹乙醇(又称喹酰胺醇),商品名为倍育诺、快育灵,CAS号为23696-28-8,分子式为 $C_{12}H_{13}N_3O_4$,化学名为2-[N-(2-羟基)乙基]氨基甲酰基-3-甲基-喹噁啉-1,4-二氧化物,是一种饲料添加剂,虽然能够提高饲料转化率,促进牲畜生长,但对大多数动物具有明显的致畸作用,对人也具有潜在的三致作用(致突变、致癌、致畸)。因此,喹乙醇在美国和欧盟都被禁止用作饲料添加剂,2005版《中国兽药典》也明确规定:禁止将喹乙醇用于家禽及水产养殖。

[0003] 喹乙醇在动物体内不稳定,短时间内即可产生十多种代谢物,3-甲基喹噁啉-2-羧酸(又称3-甲基喹噁啉-2-羧酸,MQCA)则是其主要代谢产物之一。该化合物在体内相对稳定,是国际食品法典委员会(CAC)认定的标示残留物之一。我国农业部第235号公告中规定:动物肌肉和肝脏组织中的最大残留限量分别为 $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 。



[0005] 目前,针对动物组织样品中MQCA残留的检测方法主要有仪器检测方法和免疫学快速检测方法。仪器检测方法一般需要昂贵的仪器和专业的操作人员,目前的方法主要有农业部第1077号公告-5-2008水产品中喹乙醇代谢物残留量的测定高效液相色谱法、GB/T 20746-2006牛、猪的肝脏和肌肉中卡巴氧和喹乙醇及代谢物残留量的测定液相色谱-串联质谱法等,最低检测限为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。免疫学快速检测方法目前只有ELISA方法能达到 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 的检测限,而且仍然需要酶标仪等大型仪器,检测操作时间长。同样基于免疫学原理的胶体金检测方法虽然具有操作方法简便的优点,但其灵敏度比ELISA差,达不到检测要求,因而目前尚未用于MQCA的检测。

发明内容

[0006] 针对现有技术中MQCA残检方法存在的仪器依赖度高、检测限高、操作复杂、操作时间长等问题,本发明旨在提供一种MQCA残留的快速检测试剂盒及其制备方法和应用。本发明利用时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)技术替代胶体

金标记方法,并结合免疫层析技术,成功开发出针对MQCA残留的快速检测试剂盒,可以简便、快速地检测动物组织样品中的MQCA残留,并且可以达到0.2 μ g/kg的检测限。

[0007] 具体而言,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一方面,本发明提供了一种MQCA残留的快速检测试剂盒,其包括检测卡和荧光试剂微孔,其中:

[0009] 所述检测卡包括试纸条和用于容纳所述试纸条的外壳,所述试纸条包括底板、样品垫、层析膜和吸水垫,其中:

[0010] 所述底板上依次固定有所述样品垫、层析膜和吸水垫,所述样品垫的始端与所述底板的始端对齐,所述样品垫的末端与所述层析膜的始端相连,所述层析膜的末端与所述吸水垫的始端相连,所述吸水垫的末端与所述底板的末端对齐;

[0011] 所述层析膜的基材上设置有用于包被MQCA-载体蛋白偶联物的检测区(又称T线)和用于包被羊抗鼠二抗的质控区(又称C线),所述检测区位于接近所述样品垫的一侧,所述质控区位于远离所述样品垫的一侧;优选的,所述检测区和质控区均为条带状,二者平行排列并且长度方向垂直于所述层析膜的长度方向;

[0012] 所述外壳上设置有加样孔和观察孔;当所述外壳中容纳有所述试纸条时,所述加样孔位于所述样品垫的上方,所述观察孔位于所述层析膜的上方,并且通过所述观察孔能够观察到所述检测区和所述质控区;

[0013] 所述荧光试剂微孔包括MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球和用于容纳所述MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球的密封容器。

[0014] 在上述快速检测试剂盒中,所述底板由聚氯乙烯(PVC)或聚苯乙烯(PS)制成。

[0015] 在上述快速检测试剂盒中,所述样品垫由玻璃纤维、聚酯纤维、吸水滤纸或滤血膜制成。

[0016] 在上述快速检测试剂盒中,所述层析膜的基材由硝酸纤维素(NC)膜制成。现有的NC膜主要包括Sartorius NC140、NC95,Millipore 135、180,PALL vivid170,WHATMAN FF125,Prima 40、60、85等。

[0017] 在上述快速检测试剂盒中,所述吸水垫由吸水纸制成。吸水纸的厚度为0.4~2mm,克重为200~500g/m²。

[0018] 在上述快速检测试剂盒中,所述MQCA-载体蛋白偶联物由MQCA、乙二胺和载体蛋白经偶联反应制成,所述载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔戚血蓝素(KLH)或多聚赖氨酸(PLL)。

[0019] 在上述快速检测试剂盒中,所述外壳由聚氯乙烯(PVC)、聚苯乙烯(PS)、聚碳酸酯(PC)、聚丙烯(PP)或聚乙烯(PE)制成。

[0020] 在上述快速检测试剂盒中,所述MQCA单克隆抗体通过以MQCA-载体蛋白偶联物作为免疫原对小鼠进行免疫而获得。

[0021] 在上述快速检测试剂盒中,所述MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球为表面包被有MQCA单克隆抗体的时间分辨荧光微球;所述时间分辨荧光微球为市售的内部包裹含铕(Eu³⁺)配合物、外部修饰羧基(-COOH)官能团的聚苯乙烯微球;所述时间分辨荧光微球通过外部修饰的羧基与MQCA单克隆抗体中的氨基结合来完成单抗的包被过程;所述时间分辨荧光微球的直径为100~300nm;所述时间分辨荧光微球的激发波长为365nm,发射波长为

610nm。

[0022] 在上述快速检测试剂盒中,所述可密封容器为采用锡箔纸不干胶进行密封的酶标板,优选可拆酶标板(该可拆酶标板既有透光的,也有不透光的,而不透光的可拆酶标板既有白色的,也有黑色的),更优选黑色不透光的可拆酶标板,最优选黑色不透光的96孔(8*12)可拆酶标板。

[0023] 另一方面,本发明提供了上述快速检测试剂盒的制备方法,其包括下列步骤:

[0024] 1) MQCA-载体蛋白偶联物的制备:通过偶联反应,利用乙二胺将MQCA与载体蛋白进行偶联,得到MQCA-载体蛋白偶联物;

[0025] 2) MQCA单克隆抗体的制备:以步骤1)中得到的MQCA-载体蛋白偶联物作为免疫原来免疫小鼠,获得MQCA单克隆抗体;

[0026] 3) MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球的制备:通过单克隆抗体表面的氨基与微球表面的羧基之间的酰胺化反应,将步骤2)中得到的MQCA单克隆抗体包被在时间分辨荧光微球上,得到MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球;

[0027] 4) 荧光试剂微孔的装配:将步骤3)中得到的MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球用稀释液稀释,转移至可密封容器中进行真空冷冻干燥,然后将容器密封,完成荧光试剂微孔的装配;

[0028] 5) 层析膜的制备:将步骤1)中得到的MQCA-载体蛋白偶联物包被在检测区,并且将羊抗鼠二抗包被在质控区,得到层析膜;

[0029] 6) 检测卡的装配:将样品垫、步骤5)中得到的层析膜、吸水垫依次固定在底板上,得到试纸条,再将试纸条裁切成预定的尺寸,装入外壳中,完成检测卡的装配。

[0030] 再一方面,本发明提供了上述快速检测试剂盒在检测动物组织样品中MQCA残留中的应用,尤其提供了一种利用上述快速检测试剂盒检测MQCA残留的方法,其包括下列步骤:

[0031] 1) 样品前处理:

[0032] 2) 利用所述快速检测试剂盒进行检测;

[0033] 3) 采用荧光检测卡读数仪检测结果。

[0034] 与现有技术相比,采用上述技术方案的本发明具有下列优点:

[0035] (1) 本发明的检测方法方便快捷,能够在较短时间内检测动物组织样本中是否含有MQCA残留,不需要酶标仪等昂贵的设备和仪器,适于推广应用;

[0036] (2) 与传统的胶体金免疫层析法相比,时间分辨荧光免疫分析法具有更高的灵敏度;

[0037] (3) 本发明的检测方法的检测限可以达到0.2 μ g/kg,持平或高于ELISA法,而且检测时间更短。

附图说明

[0038] 图1为本发明的快速检测试剂盒中的检测卡沿长度方向的剖视图。

[0039] 图2为本发明的快速检测试剂盒中的检测卡的俯视图。

[0040] 图3为本发明的快速检测试剂盒中的荧光试剂微孔的示意图。

[0041] 图4为BSA及MQCA-BSA的SDS-PAGE示意图,其中左侧样品为BSA,右侧样品为MQCA-BSA。

具体实施方式

[0042] 下面将结合附图和具体的实施例对本发明的技术方案做出进一步的阐述。除非另有说明以外,下列实施例中所使用的试剂、材料、仪器等均可通过常规商业手段获得。

[0043] 实施例一:快速检测试剂盒的构成。

[0044] 本发明的MQCA残留的快速检测试剂盒包括检测卡1和荧光试剂微孔2。

[0045] 如图1和图2所示,检测卡1包括外壳11、底板12、样品垫13、层析膜14和吸水垫15。

[0046] 底板12上依次固定有样品垫13、层析膜14和吸水垫15,样品垫13的始端与底板12的始端对齐,样品垫13的末端与层析膜14的始端相连,层析膜14的末端与吸水垫15的始端相连,吸水垫15的末端与底板12的末端对齐。

[0047] 层析膜14上设置有检测区141和质控区142,检测区141位于接近样品垫13的一侧并且包被有MQCA-载体蛋白偶联物(优选MQCA-牛血清白蛋白偶联物),质控区142位于远离样品垫13的一侧并且包被有羊抗鼠二抗,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。

[0048] 外壳11上设置有加样孔111和观察孔112,加样孔111位于样品垫13的上方,观察孔112位于层析膜14的上方,并且通过观察孔112能够观察到检测区141和质控区142。

[0049] 如图3所示,荧光试剂微孔2包括MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球21和用于容纳抗体标记的荧光微球的可密封容器22(优选采用锡箔纸不干胶进行密封的黑色不透光的96孔可拆酶标板)。

[0050] 实施例二:快速检测试剂盒的制备。

[0051] 1、MQCA-牛血清白蛋白偶联物(MQCA-BSA)的制备:

[0052] 分别称量MQCA(1.65mg,CAS:74003-63-7)、乙二胺(0.9 μ L)和BSA(20mg),磁力搅拌充分溶解于pH=4.5的0.05M MES缓冲液(4mL)中,然后在磁力搅拌条件下逐滴加入2%的EDC·HCl水溶液(0.5mL),室温避光搅拌过夜。收集反应后的溶液,6000rpm离心5min去除沉淀,上清装入处理好的透析袋中,在0.01M PBS中透析,每8h换液一次,总共换液6次。收集透析袋中液体,采用商品化BCA蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit)测定蛋白浓度,分装后于-20℃保存。

[0053] 采用SDS-PAGE进行MQCA-BSA的鉴定,分离胶5%,分离胶12%,其结果如图4所示。由图4可知,MQCA-BSA条带比BSA条带的分子量有所增大,证明MQCA-BSA制备成功。

[0054] 2、MQCA单克隆抗体的制备:

[0055] 将完全抗原作为免疫原来免疫Balb/C雌性小鼠。使用无菌生理盐水将完全抗原稀释至1mg/mL,取适量稀释液,与等体积的快速免疫佐剂混合,振荡均匀后,按照10 μ g/只的剂量进行肌肉单点注射。三周后,按照同样的剂量和方式进行第二次免疫,并于免疫后七天对小鼠进行尾部采血并检测效价。

[0056] 将采集的小鼠尾血分离血清后,采用间接ELISA和间接竞争ELISA测定血清的效价和抑制。选择效价高、抑制好的小鼠进行细胞融合。

[0057] 小鼠在最后一次免疫后18天冲击免疫,三天后通过无菌操作去除脾脏,制备脾单细胞悬液,按照10:1的比例与对数期生长的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞进行混合。离心去除上清液体,将细胞振散后,通过聚乙二醇法进行细胞融合。融合后第3天和第5天,分别进行

50%、90% HAT培养液换液,第7~9天进行细胞上清的筛选。挑选阳性的细胞上清,利用ELISA测定抑制情况,并选择抑制最好的细胞孔进行亚克隆。

[0058] 亚克隆采用有限稀释法,每孔0.5~2个细胞,重复三次亚克隆。第一次亚克隆使用HT培养液,后两次使用1640培养液,所有培养液中血清含量均为15%,最终得到所需的单克隆抗体细胞株。将得到的细胞株扩大培养后,冻存保种,其余细胞继续培养,通过体内腹水法制备单克隆抗体,采用辛酸硫酸铵法或蛋白G方法进行纯化。

[0059] 3、MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球的制备:

[0060] (1) 时间分辨荧光微球的选择:

[0061] 标记用的时间分辨荧光微球是内部包裹含钕配合物、外部修饰羧基官能团的聚苯乙烯微球,微球直径为100~300nm,激发波长为365nm,发射波长为610nm。

[0062] (2) 相关溶液的配制:

[0063] 活化缓冲液:pH=4.5的0.01M的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)。

[0064] 偶联缓冲液:pH=9.0的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0065] 封闭缓冲液:pH=7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)(内含100mg/mL的BSA)。

[0066] 储存缓冲液:pH=7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS)(内含0.2%wt的BSA和防腐剂(例如Proclin300、硫柳汞、叠氮化钠等))。

[0067] 活化剂:水溶性碳二亚胺(EDAC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。

[0068] 清洗液:pH=7.4的0.01M的磷酸盐缓冲液(内含0.2%wt的吐温-20)。

[0069] (3) 通过EDAC和NHS介导的微球表面羧基与蛋白表面氨基之间的酰胺化反应制备MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球,具体制备过程如下:

[0070] 取1mL时间分辨荧光微球的超纯水悬液(固体含量为1%wt,10mg),12000rpm离心5min,弃去上清,使用超纯水清洗3次,最终混悬于1.8mL活化缓冲液中,形成微球混悬液;使用活化缓冲液配制活化剂溶液,其中NHS的质量浓度为20mg/mL,EDAC的质量浓度为10mg/mL;各取100μL活化剂溶液滴加到微球混悬液中,振荡混匀,于37℃(或室温)旋转反应(活化)4h,12000rpm离心5min,弃去上清,使用超纯水清洗3次,最终混悬于0.8mL偶联缓冲液中,振荡混匀;加入100μLMQCA单克隆抗体溶液(蛋白浓度为1.5mg/mL),振荡混匀,于37℃(或室温)旋转反应(偶联)4h,加入100μL封闭缓冲液,于37℃(或室温)旋转(封闭)过夜,12000rpm离心5min,弃去上清,使用清洗液清洗3次,得到MQCA单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球。

[0071] (4) 荧光微球的鉴定:分别配置含有MQCA-BSA、BSA的pH=7.4的0.01MPBS的溶液,利用划膜仪将上述MQCA-BSA、BSA溶液包被在硝酸纤维素膜上的检测区(T线),包被量为1.0μL/cm;采用pH=7.4的0.01M PBS将羊抗鼠二抗(购自Jackson ImmunoResearch)稀释至0.2mg/mL,利用划膜仪将上述二抗稀释液包被在硝酸纤维素膜上的质控区(C线),包被量为1.0μL/cm。将包被后的硝酸纤维素膜于37℃干燥12h,即得测试用层析膜。将样品垫(玻璃棉)、层析膜、吸水垫(吸水纸)依次粘贴在PVC底板上,样品垫的始端与底板的始端对齐,样品垫的末端与层析膜的始端相连,层析膜的末端与吸水垫的始端相连,吸水垫的末端与底板的末端对齐,并且层析膜上的检测区位于接近样品垫的一端,质控区位于远离样品垫的一端。将由此形成的试纸条用裁条机裁切成宽度为4mm的小条,装入塑料卡壳中压实,即得检测卡。

[0072] 将制备的荧光微球,分别取5 μ L加入到空的微孔中,再加入pH=7.4的0.01M PBS溶液(150 μ L),混匀后吸出,加入到分别包被MQCA-BSA、BSA的检测卡中,5min后用紫外灯(365nm)照射观察。包被MQCA-BSA的检测卡,C/T线均有红色荧光,包被BSA的检测卡,只有C线有红色荧光,T线没有。由此可以证明,荧光微球标记成功。

[0073] 4、荧光试剂微孔的装配:

[0074] (1) 稀释液的配制:

[0075] 将磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、聚乙二醇-6000(PEG-6000)、蔗糖和吐温-20(Tween-20)溶解于超纯水中,得到稀释液,其中:磷酸二氢钾的质量浓度为0.27g/L,磷酸氢二钠的质量浓度为1.42g/L,氯化钠的质量浓度为8.0g/L,氯化钾的质量浓度为2.0g/L,聚乙二醇-6000的质量浓度为25g/L,蔗糖的质量浓度为50g/L,吐温-20的体积浓度为10mL/L。

[0076] (2) 抗体标记的荧光微球的稀释、冻干和封存:

[0077] 将单抗标记的荧光微球用稀释液分别稀释100倍后,利用八通道移液器加入到黑色不透光的96孔可拆酶标板的微孔中,每孔50 μ L。将已加入微球稀释液的可拆酶标板置于冻干机中,并按照表1中的冻干程序真空冻干,在干燥条件下利用锡箔纸不干胶密封,即得荧光试剂微孔。

[0078] 表1.微球稀释液的冻干程序

[0079]	阶段	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	变温时间 (min)	持续时间 (min)	真空度 (mbar)
	预冷	-35	30	150	—
	后箱预冷、抽真空	-50	—	20	0.30
	一次升华	-20	120	240	0.30
	二次升华	15	120	120	0.15

[0080] 5、层析膜的制备:

[0081] 采用pH=7.4的0.01MPBS将MQCA-牛血清白蛋白偶联物(MQCA-BSA)稀释至0.3mg/mL,利用划膜仪将上述MQCA-BSA稀释液包被在硝酸纤维素膜上的检测区(T线),包被量为1.0 μ L/cm;采用pH=7.4的0.01MPBS将羊抗鼠二抗稀释至0.2mg/mL,利用划膜仪将上述二抗稀释液包被在硝酸纤维素膜上的质控区(C线),包被量为1.0 μ L/cm。将包被后的硝酸纤维素膜于37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥12h,即得层析膜。

[0082] 6、检测卡的装配:

[0083] 将样品垫(玻璃棉)、层析膜、吸水垫(吸水纸)依次粘贴在PVC底板上,样品垫的始端与底板的始端对齐,样品垫的末端与层析膜的始端相连,层析膜的末端与吸水垫的始端相连,吸水垫的末端与底板的末端对齐,并且层析膜上的检测区位于接近样品垫的一端,质控区位于远离样品垫的一端。将由此形成的试纸条用裁条机裁切成宽度为4mm的小条,装入塑料卡壳中压实,即得检测卡。

[0084] 实施例三:快速检测试剂盒的应用。

[0085] 将待测的动物组织样品去除皮、脂肪,取精肉部分用均质器均质,称取2g并置于50mL离心管中,加入5mL乙酸乙酯和1mL去离子水,用振荡器振荡5min,再加入0.5mL硫酸

(2mol/L),振荡30s,4000rpm离心5min;吸取2mL上清液并置于7mL离心管中,于60℃氮气吹干,加入2mL正己烷和0.5mL复溶液(含0.5%v/v吐温-20的0.1M PBS),剧烈振荡30s,4000rpm离心1min或者静置,除去上层正己烷相,取0.15mL下层液体作为待测液。

[0086] 将待测液加入到荧光试剂微孔的96孔酶标板的微孔中,等待1min后用滴管将待测液与微孔中单抗标记的荧光微球充分混匀,再等2min后用滴管将微孔中的液体全部滴加至检测卡的加样孔中,然后开始计时,于室温反应5min后,插入手持式荧光检测卡读数仪判读。

[0087] 检测结果以检测线T与质控线C的荧光强度比值进行衡量。分别测定不同加标浓度,每种浓度各测定20份样本,其加标浓度与C/T的比值如表2所示。

[0088] 表2. 利用快速检测试剂盒检测动物组织样本的荧光检测结果

[0089]

加标浓度(μg/kg)	C/T均值	CV
0	0.50	0.6%
0.05	0.61	1.6%
0.1	0.75	1.2%
0.2	0.98	0.8%
0.3	1.18	0.8%
0.5	1.35	0.7%

[0090] 从表2中可以看出,随着加标浓度的升高,C/T呈逐渐升高趋势。考虑到仪器检测方法的灵敏度因素与实际需求,定义检测限为0.2μg/kg,检测限对应的C/T 95%可信区间为 0.75 ± 0.017 。荧光读数仪判读阈值设置为0.70,可以区分0.1以及0.2μg/kg的加标浓度。

[0091] 选择20份阴性结果和20份阳性(仪器检测含量高于0.2μg/kg)结果,使用荧光检测卡进行测试,测试结果显示:阴性样本100%符合,阳性样本100符合,假阳性率、假阴性率为0。

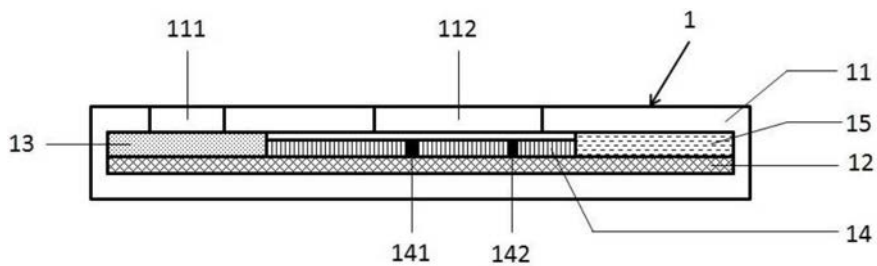


图1

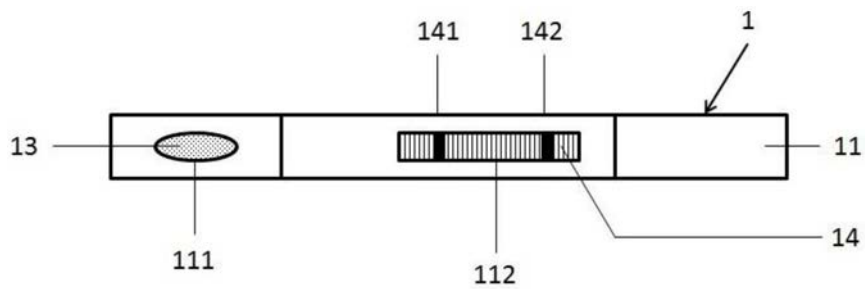


图2

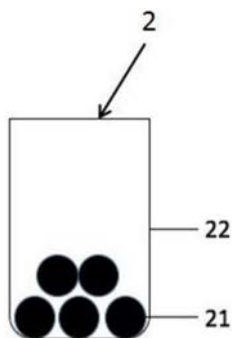


图3

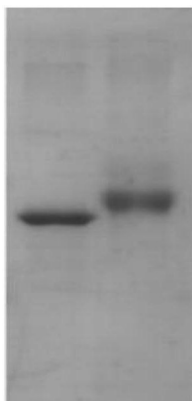


图4

专利名称(译)	一种3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108426996A	公开(公告)日	2018-08-21
申请号	CN2017110079789.8	申请日	2017-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	江苏美正生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏美正生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏美正生物科技有限公司		
[标]发明人	张勋 孙成 伦丽丽 李奇富		
发明人	张勋 孙成 伦丽丽 李奇富		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于荧光免疫分析技术领域，涉及一种3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的快速检测试剂盒及其制备方法和应用。该试剂盒包括检测卡和荧光试剂微孔，检测卡中的试纸条包括底板、样品垫、层析膜和吸水垫，层析膜的基材上设置有用于包被3-甲基喹噁啉-2-羧酸-载体蛋白偶联物的检测区和用于包被羊抗鼠二抗的质控区；荧光试剂微孔包括3-甲基喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体标记的时间分辨荧光微球和可密封容器。利用该试剂盒能够在较短时间内检测动物组织样本中是否含有3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留，不需要昂贵设备，适于推广。另外，检测方法灵敏度高，检测限可达0.2μg/kg，持平或高于ELISA法，而且检测时间更短。

