



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107688091 A

(43)申请公布日 2018.02.13

(21)申请号 201710797243.6

(22)申请日 2017.09.06

(71)申请人 上海容晖生物科技有限公司
地址 200233 上海市徐汇区银都路466号2
号楼3楼

申请人 上海市动物疫病预防控制中心

(72)发明人 王学生 黄华 黄士新 顾欣
李丹妮 严凤 吴剑平 潘娟
张婧

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

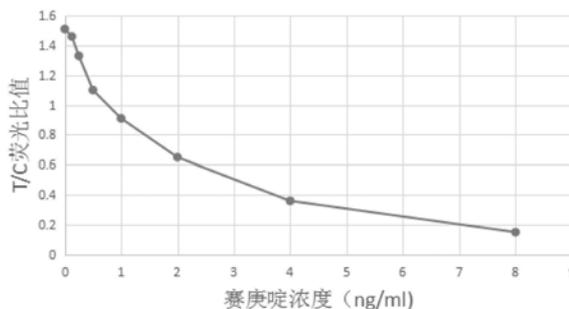
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条及其制备方法,属于体外检测技术领域。本发明提供的免疫定量试纸条根据免疫竞争反应原理,建立了一种适用于动物尿液、组织中检测赛庚啉残留的快速荧光免疫检测试剂,检测过程中通过荧光检测仪定量测试剂上荧光值,来测得检测样品中此药物的残留。此试剂盒具有操作简单、灵敏度高、定量、特异性好及检测时间短等优点,适合基层和现场快速检测,检测结果通过检测仪器保存、打印及互联网传递监督部门,以加强对现场监控。



1. 一种快速检测赛庚啶的免疫定量试纸条,包括底板,所述底板由下向上依次设置有样品吸收区、固相标记抗体区、反应区和吸水区,其特征在于,所述反应区设有检测线T和质控线C;所述检测线T处包被有赛庚啶完全抗原,所述质控线C处包被有羊抗鼠IgG;所述固相标记抗体区固定有荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体;

所述赛庚啶完全抗原包被的质量浓度为0.2~0.5mg/ml;

荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体的包被质量浓度为0.1%~0.3%。

2. 根据权利要求1所述的免疫定量试纸条,其特征在于,所述荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体为每毫升0.1%的荧光乳胶中包含抗体的质量为40~60 μ g。

3. 根据权利要求1所述的免疫定量试纸条,其特征在于,荧光乳胶颗粒包括荧光剂和乳胶颗粒;所述荧光剂为稀土元素铕元素。

4. 根据权利要求1~3任意一项所述的免疫定量试纸条,其特征在于,所述荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体是将荧光乳胶颗粒与抗赛庚啶抗体通过酰胺键连接得到。

5. 根据权利要求1所述的免疫定量试纸条,其特征在于,所述检测线T处赛庚啶完全抗原的质量浓度为0.3~0.4mg/ml。

6. 根据权利要求5所述的免疫定量试纸条,其特征在于,所述赛庚啶完全抗原由赛庚啶和偶联蛋白通过偶联剂偶联连接得到;所述偶联蛋白包括牛血清白蛋白或卵白蛋白;所述偶联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

7. 权利要求1~6任意一项所述快速检测赛庚啶的免疫定量试纸条的制备方法,其特征在于,包括下列步骤:

1) 将荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体溶解于缓冲液中,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体涂在固相标记抗体区,喷涂后的固相标记抗体区放在相对湿度小于20%和30~38 $^{\circ}$ C的环境中干燥7~9h;

2) 将赛庚啶完全抗原溶液划线于反应区形成检测线T线,将羊抗鼠IgG溶液划线于反应区形成质控线C线,将划线的反应区置放在相对湿度小于20%和30~38 $^{\circ}$ C的环境中干燥7~9小时;

3) 将所述步骤2)得到的反应区固定底板中央,硝酸纤维膜的一端依次贴固相标记抗体区和样品吸收区,反应区的另一端贴吸水区,切割成条,得到免疫定量试纸条;

其中步骤1)和步骤2)没有时间顺序的限制。

8. 根据权利要求7所述制备方法,其特征在于,所述缓冲液为含质量浓度为1%的BSA,摩尔浓度为10mmol/L、pH值为7.2的PBS溶液。

一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断试剂技术领域,尤其涉及一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 赛庚啉(Cyproheptadine,CHD)是一种抗组胺药物,也是一种使H1受体拮抗药,即神经兴奋剂,在临床上用于荨麻疹、过敏性和支气管哮喘等疾病的治疗。赛庚啉具有抗5-羟色胺的作用,可抑制下丘脑的饱觉中枢而刺激食欲增加体重,在畜禽养殖中含有赛庚啉的饲料可以促进畜禽类生长和瘦肉率。农业部2010年发布了1519号公告,向社会公布了禁止在饲料、动物饮水和畜禽水产养殖过程中使用的药物和物质清单,赛庚啉已明确被列入其中。

[0003] 近年来由于国家对瘦肉精类药物的监管力度不断加大,在利欲驱动下不法分子盯上了既便宜又有促进生长功能的赛庚啉,将它用作为瘦肉精的替代品,在动物饲料和动物饮水中非法添加此药物,由于积累造成动物源性的食品中含有它的残留,人们食用这些食品,会产生乏力、瞌睡、头晕、镇静、呼吸抑制等,由此将对人体的健康产生很大危害。加强对饲料、经济动物尿样的赛庚啉残留检测是保障食品安全重要手段,目前检测食品中赛庚啉残留的方法,主要是液相色谱一串联质谱法(LC/MS/MS),该方法灵敏度较高,但检测时间长、操作较繁琐、检测成本高,此法仅适合有条件的实验室进行,不适用于养殖业和现场快速筛查。

[0004] 虽然ELISA检测也能够达到准确检测的目的,但ELISA耗时且需专业人员和在实验室中进行,不能满足快速检测的要求。近年来,检测赛庚啉标记物的免疫检测方法有金标法,所述方法虽然具有快速、准确的特点,但是检测灵敏度不能满足高灵敏度检测的要求。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种快速检测赛庚啉的免疫检测定量试纸条,使该定量试纸条具有较高的灵敏度和准确的检测结果,同时能完成定性和定量的检测。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条,包括底板,所述底板由下向上依次设置有样品吸收区、固相标记抗体区、反应区和吸水区,所述反应区设有检测线T和质控线C;所述检测线T包被有赛庚啉完全抗原,所述质控线C包被有羊抗鼠IgG;所述固相标记抗体区固定有荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啉抗体;

[0008] 所述赛庚啉完全抗原包被的质量浓度为0.2~0.5mg/ml;

[0009] 荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啉抗体包被的质量浓度0.1~0.3%。

[0010] 优选的,所述荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啉抗体为每毫升0.1%的荧光乳胶中包含抗体的质量为40~60 μ g。

[0011] 优选的,荧光乳胶颗粒中荧光剂为稀土元素铕元素。

[0012] 优选的, 荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体是将荧光乳胶颗粒与抗赛庚啶抗体通过酰胺键连接。

[0013] 优选的, 所述检测线T上赛庚啶完全抗原的包被的质量浓度为0.3~0.4mg/ml。

[0014] 优选的, 赛庚啶完全抗原由赛庚啶和偶联蛋白通过偶联剂偶联连接得到; 所述偶联蛋白包括牛血清白蛋白或卵白蛋白; 所述偶联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺。

[0015] 本发明还提供了一种所述快速检测赛庚啶的免疫定量试纸条的制备方法, 包括下列步骤:

[0016] 1) 将荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体溶解于缓冲液中, 得到稀释的标记抗体, 将所述稀释的标记抗体喷涂在固相标记抗体区, 喷涂后的标记抗体区进行放在相对湿度小于20%和30~38℃的环境中干燥7~9小时;

[0017] 2) 将赛庚啶完全抗原溶液划线于反应区形成检测线T线, 将羊抗鼠IgG溶液划线于反应区的质控区形成质控线C线, 将划线的反应区放在相对湿度小于20%和30~38℃的环境中干燥7~9小时;

[0018] 3) 将所述步骤2) 得到的反应区贴固定底板中央, 反应区的一端依次贴固相标记抗体区和样品吸收区, 反应区的另一端再贴上吸水区, 切割成条, 得到免疫定量试纸条;

[0019] 其中步骤1) 和步骤2) 没有时间顺序的限制。

[0020] 优选的, 所述缓冲液为含质量浓度为1% BSA的摩尔浓度为10mM、pH值7.2的PBS溶液。

[0021] 本发明提供一种快速检测赛庚啶的免疫定量试纸条, 采用免疫竞争法原理检测赛庚啶, 通过赛庚啶抗体的荧光标记, 检测过程中借助荧光仪定量检测荧光值, 来测得检测样品中赛庚啶的残留。所述免疫定量试纸条便于携带和保存; 操作简单, 方法稳定, 可单个测试, 且在10min之内完成测试。本发明所述免疫定量试纸条检测赛庚啶的浓度, 结果表明所述免疫定量试纸条的灵敏度为0.2ppb, 线性范围为0~8ppb, 而金标法目前检测灵敏度在5~10ppb范围内, ELISA可以做到0.2ppb左右, 但ELISA耗时且需专业人员和在实验室中进行, 不能满足快速检测的要求。同时本发明适用单一检测, 还适用于大批量筛查和现场检测。

附图说明

[0022] 图1为本发明所述免疫定量试纸卡的结构示意图;

[0023] 图2为实施例3中绘制得到的标准曲线。

具体实施方式

[0024] 本发明提供了一种快速检测赛庚啶的免疫定量试纸条, 包括底板, 在所述底板的表面由下向上依次设置有样品吸收区、固相标记抗体区、反应区和吸水区, 所述反应区设有检测线T和质控线C; 所述检测线T包被有赛庚啶完全抗原, 所述质控线C包被有羊抗鼠IgG; 所述固相标记抗体区固定有荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体;

[0025] 所述赛庚啶完全抗原包被的质量浓度为0.2~0.5mg/ml;

[0026] 荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体包被的质量浓度为0.1~0.3%。

[0027] 本发明采用免疫竞争法原理检测赛庚啶,所述免疫定量试纸条具有检测结果准确、灵敏度高的特点,且便于携带和保存;操作简单,方法稳定,可单个测试,且在10min之内完成测试。具有定量检测的优点,检测结果通过检测仪器保存、打印及互联网传递监督部门,以加强对现场监控和现场处理。

[0028] 本发明所述免疫定量试纸条的结构示意图如图1所示。其中1、处理过样品垫;2、固相标记抗体区;3、检测线T;4、质控线C;5、硝酸纤维素膜;6、吸水纸;7、PVC底板;8、纸条试卡;9、加样孔;10、检察窗。

[0029] 本发明提供的免疫定量试纸条包括底板。本发明对所述底板的材质、尺寸和来源没有特殊的限制,采用本领域技术人员熟知的用于免疫定量试纸条中的底板即可。在本发明中,所述底板的材质优选为塑料或胶片材料。本发明实施例中所用的底板为PVC板,为市售商品。

[0030] 本发明提供的免疫定量试纸条包括设置在所述底板表面位于最底端的样品吸收区。在本发明中,所述样品吸收区的材料优选为玻璃纤维。本发明对所述玻璃纤维的来源没有任何限制,本领域技术人员所熟知的玻璃纤维即可。本发明对所述样品吸收区粘贴在底板的下端,将所述样品吸收区的下边缘与底板下边缘平齐。样品吸收区大约占底板长度的四分之一。

[0031] 本发明提供的免疫定量试纸条包括设置在底板上的固相标记抗体区,所述固相标记抗体区位于样品吸收区上方,并且所述固相标记抗体区与样品吸收区重叠1.5mm设置。在本发明中,所述固相标记抗体区的材料优选为玻璃纤维或聚酯膜,更优选为聚酯膜。本发明对所述玻璃纤维或聚酯膜的来源没有任何限制,本领域技术人员所熟知的玻璃纤维或聚酯膜即可。

[0032] 在本发明中,所述固相标记抗体区固定有荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体,所述荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体为每毫升0.1%的荧光乳胶中包含抗体的质量为40~60 μ g,更优选为50 μ g。荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体优选是通过荧光乳胶颗粒与抗赛庚啶抗体通过酰胺键连接。荧光乳胶颗粒中荧光剂优选为稀土元素铕元素。所述荧光乳胶颗粒的来源没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的荧光乳胶颗粒即可。

[0033] 本发明提供的免疫定量试纸条包括设置在所述底板上的反应区,所述反应区紧邻所述固相标记抗体区,位于所述固相标记抗体区的上方,并且所述反应区和所述固相标记抗体区重叠1.5mm。在本发明中,所述反应区的材料优选为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。本发明对所述硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜的来源没有任何限制,本领域技术人员所熟知的硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜即可。

[0034] 在本发明中,所述反应区设置有检测线T和质控线C。在本发明中,所述检测线T和质控线C的间距优选为5mm,所述检测线T位于质控线C的下面,所述检测线T靠近固相标记抗体区,所述质控线C靠近吸水区段。所述质控线C与吸水区的间距优选为3mm。所述检测线C上羊抗鼠IgG的包被质量浓度为0.8~1.2mg/ml,更优选为1.0mg/ml。所述羊抗鼠IgG的溶剂为含2%蔗糖的0.01M pH7.2磷酸盐缓冲液。

[0035] 本发明对所述检测线T的条数为一条。所述检测线T上赛庚啶完全抗原的包被的质量浓度为0.2~0.5mg/ml,优选为0.3~0.4mg/ml。赛庚啶完全抗原由赛庚啶和偶联蛋白通过偶联剂偶联连接得到;所述偶联蛋白包括牛血清白蛋白或卵白蛋白;所述偶联剂为1-乙

基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。所述赛庚啶完全抗原溶液的溶剂为含2%蔗糖的摩尔浓度为0.01mol/L, pH值为7.2的磷酸盐缓冲液。

[0036] 本发明提供的免疫定量试纸条包括设置在所述底板上的吸水区,所述吸水区紧邻反应区,设置在所述反应区的上方,与反应区有重叠1.5mm,并且所述反应区与底板的上边缘平齐。在本发明中,所述吸水区的材料优选为吸水纸或滤纸。本发明对所述吸水纸的来源没有任何限制,本领域技术人员所熟知的吸水纸即可。

[0037] 本发明提供免疫定量试纸条优选还包括盛装检测条的塑料壳。在本发明中,所述塑料壳包括底盖和与所述底盖配合的顶盖,所述底盖有宽度与定量试纸条对应的凹槽,凹槽的大小与定量试纸条的长度和宽度吻合,所述顶盖上设置有与反应区和样品添加区大小相同的孔洞,形成检察窗和加样孔,以便操作者通过荧光仪检测检测结果。

[0038] 本发明提供的上述技术方案所述免疫定量试纸条的制备方法,包括下列步骤:

[0039] 1) 将荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体溶解于缓冲液中,得到稀释的标记抗体,将所述稀释的标记抗体喷涂在固相标记抗体区,喷涂后的标记抗体区放在相对湿度小于20%和30~38℃的环境中干燥7~9小时;

[0040] 2) 将赛庚啶完全抗原溶液划线于硝酸纤维膜的检测区形成检测线T线,将羊抗鼠IgG溶液划线于硝酸纤维膜的质控区形成质控线C线,将划线的硝酸纤维膜放在相对湿度小于20%和30~38℃的环境中干燥7~9小时;

[0041] 3) 将划线的硝酸纤维膜贴固定底板中央,硝酸纤维膜的一端依次贴固相标记抗体区和样品吸收区,反应区另一端再贴上吸水区,切割成条,得到免疫定量试纸条;

[0042] 其中步骤1)和步骤2)没有时间顺序的限制。

[0043] 本发明将荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体溶解于缓冲液中,将得到的稀释的标记抗体喷涂在固相标记抗体区,喷涂后的标记抗体区进行干燥。

[0044] 本发明中,所述缓冲液包括质量浓度为0.5%BSA、质量浓度为4%蔗糖和体积浓度为0.5%吐温-20的摩尔浓度为10mmol/L, pH值为7.4的磷酸盐缓冲溶液。所述稀释后标记抗体的质量浓度优选为0.1%~0.3%,更优选为0.2%。稀释前抗体的浓度是0.5~1%。

[0045] 在本发明中,荧光乳胶颗粒标记的抗赛庚啶抗体的制备方法优选包括以下步骤:

[0046] ①将表面带有羧基的钨乳胶微球与2-吗啉乙磺酸(MES)溶液混合洗涤,固液分离,得到洗涤后的表面带有羧基的钨乳胶微球;

[0047] ②将洗涤后的表面带有羧基的钨乳胶微球与2-吗啉乙磺酸溶液混合重悬,得到重悬液;

[0048] ③将所述重悬液与N-羟基丁二酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)混合活化50min~1.5h,第二次固液分离,得到固相组分;

[0049] ④将所述固相组分用2-吗啉乙磺酸溶液重悬,得到的重悬液与赛庚啶抗体混合反应1.5~2.5h,第三次固液分离,得到标记钨乳胶微球的抗体。

[0050] 本发明中,所述混合洗涤过程中,10mmol的2-吗啉乙磺酸溶液中钨乳胶微球质量浓度为0.1~0.2%,更优选为0.15%。所述表面带有羧基的钨乳胶微球的粒径优选为200nm。所述钨乳胶微球在可见光下肉眼看为乳白色,购自Thermo Fisher。

[0051] 本发明中,所述活化的时间优选为1h。活化过程中,钨乳胶微球与N-羟基丁二酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)的质量比为1:0.15:0.15。

- [0052] 本发明中,所述重悬液与赛庚啶抗体的反应时间优选为2h。
- [0053] 本发明中,所述固液分离、第二次固液分离和第三次固液分离优选为离心。所述离心的转速优选为14000rpm。所述离心的时间优选为10~15min。
- [0054] 本发明中,重悬的方法优选采用超声重悬。所述超声的功率优选为1800w。所述超声时间优选为1min,间隔5s。
- [0055] 本发明中,第④步骤中混合物经第三次固液分离后优选还包括:将标记钨乳胶微球的抗体采用稀释液稀释成质量浓度为0.5%的溶液并超声重悬。
- [0056] 本发明中所述稀释液优选为包含质量浓度为0.1~0.2%BSA的摩尔浓度为10mmol/L,pH值为7.2的PBS。所述BSA的质量浓度更优选为0.15%。
- [0057] 本发明中,得到稀释的标记抗体后,本发明将稀释的标记抗体固定在固相标记抗体区上,得到喷涂有标记抗体的固相标记抗体区。所述喷涂优选为涂铺、手动涂布或仪器喷涂。
- [0058] 本发明实施例中固定的方法是将稀释的标记抗体喷涂在固相标记抗体区上,所述主要机器喷涂或手工涂铺。得到喷涂后的固相标记抗体区后,将喷涂后的固相标记抗体区在烘房环境下进行干燥,得到固相标记抗体区。在本发明中,所述干燥的温度优选为30~38℃,更优选为37℃,相对湿度≤20%,干燥时间优选为7~9h。
- [0059] 本发明将赛庚啶完全抗原溶液划线于反应区上形成检测线T线,将羊抗鼠IgG溶液划线于反应区上形成质控线C线,得到划线的反应区。本发明对所述划线的方式并没有限制,采用本领域技术人员熟知的标记抗体喷涂方式即可。本发明实施例中划线采用划线仪进行划线,所述划线仪的型号为HM3230,购自哈尔滨德远科技开发有限公司。所述包被液喷涂量优选为每2cm宽、长30cm硝酸纤维素膜条上喷涂24 μ l。
- [0060] 本发明中,赛庚啶完全抗原溶液的制备方法包括以下步骤:
- [0061] I.用赛庚啶盐酸盐和4-溴丁酸发生取代反应,得到N-丁酸赛庚啶(CHD-COOH);
- [0062] II.将所述CHD-COOH和载体蛋白进行在EDC下偶联,得到赛庚啶完全抗原溶液。
- [0063] 本发明中,所述赛庚啶盐酸盐和4-溴丁酸的摩尔比优选为1:1.5,甲醇中回流,反应的温度为65~70℃,更优选为68℃;反应的时间优选为4~6h,更优选为5h。
- [0064] 本发明中,所述偶联载体优选为BSA或OVA。所述偶联的温度优选为20~30℃,更优选为23~27℃,最优选为25℃。
- [0065] 得到固相标记抗体区和反应区后,本发明将样品吸收区、固相标记抗体区、反应区和吸水区进行裁剪后固定在底板上,得到组装的底板。
- [0066] 本发明对所述组装优选为先在底板由下而上依次粘贴样品吸收区、固相标记抗体区、反应区、吸水区,所述粘贴使所述各区的交叠1.5~2mm。
- [0067] 得到组装的底板后,本发明将组装的底板进行切条,得到免疫定量试纸条。本发明对所述切条的方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的切条方法即可。本发明实施例中切条采用切条机切条,所述切条机型号为ZQ4200,购自上海金标生物有限公司。
- [0068] 本发明中,所述切条的宽度优选为2.5~5mm,更优选为3mm。
- [0069] 本发明中,所述切条放置底盖,然后将所述底盖配合的顶盖盖在底盖上,得到检测卡。
- [0070] 本发明中,所述试纸条使用时,所述检测线T的显色情况用荧光检测仪测定的数据

得到定量检测结果。根据预设的标准曲线对照获得检测样品的定量值。

[0071] 本发明中,所述样品吸收区吸收的待检测样品优选为血液、血清、血浆或尿液。所述血液的来源没有限制,采用本领域技术人员所熟知的血液或血清、血浆即可。所述尿液的来源没有限制,采用本领域技术人员所熟知的尿液即可。

[0072] 本发明中,所述免疫定量试纸条的使用方法没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的检测方法即可。本发明实施例中,将检测样品滴加到试纸条的样品吸收区,静置5~10min后,将检测试卡插入荧光读数仪进行测量其荧光值,得到测定结果。

[0073] 下面结合实施例对本发明提供的快速检测赛庚啶免疫定量试纸条及其制备方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0074] 实施例1

[0075] 抗体抗原制备

[0076] 1、赛庚啶完全抗原的制备

[0077] 赛庚啶盐酸盐(CHDNHCl)和4-溴丁酸结合成CHD-COOH,CHD-COOH载体蛋白偶联形成完全抗原。CHDNHCl 30mg于三口反瓶,加入2ml甲醇加入200 μ l吡啶,加热回流滴加23mg 4-溴丁酸,回流4-5小时,加3ml去离子水用苯提取,旋转蒸发去苯液,得30mg白色固体即接臂的半抗原CHD-COOH。将10mg半抗原CHD-COOH、8mgNHS和10mg EDC溶于DMF中,4 $^{\circ}$ C搅拌过夜。次日,先将30mg BSA(或OVA)溶于3ml 0.02mol/L的磷酸氢二钠溶液中,并将上反应液逐滴加入,搅拌6h。装入透析袋,用10mM的PBS透析,并换液2次,得到赛庚啶完全抗原。

[0078] 2、赛庚啶抗体的制备

[0079] 将免疫抗原按50 μ g/ml的剂量与等体弗氏佐剂充分乳化后腹部皮下多点注射免疫4只6-8周龄雄性BALB/C小鼠,免疫7-10天,尾静脉采血,间接ELISA检测血清效价。将免疫效果较好的小鼠脾脏与骨髓瘤细胞SP2/0通过PEG介导融合,间接ELISA筛选阳性克隆;阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株,细胞株扩大培养后,接种经降植烷致敏BALB/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水。腹水经硫酸铵粗纯化,再辛酸硫酸铵纯化,得相应单克隆抗体。

[0080] 实施例2

[0081] 赛庚啶制备层析检测试剂卡

[0082] 1、包裹Eu³⁺的荧光乳胶标记赛庚啶抗体:取100 μ l质量浓度为1%的粒径为200nm表面带有羧基的钡乳胶微球,加900 μ l 0.01M MES pH 6.1洗涤,14000rpm离心10min,弃上清。加1ml 0.01M MES pH6.1超声重悬,加15 μ l10mg/ml的NHS(N-羟基丁二酰亚胺)和15 μ l 10mg/ml的EDC.HCl(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐),室温下活化反应1小时,14000rpm离心10min,弃上清。用1ml 0.01M MES pH6.1超声重悬,加入赛庚啶抗体0.06mg混匀,室温(25-30 $^{\circ}$ C)反应2h。标记后的乳胶以14000rpm离心30min,弃上清。加入1ml 0.01M pH6.1含0.2%BSA的MES超声重悬,在室温下封闭2小时,14000rpm离心,10分钟,弃上清,用0.2ml 10mM pH7.2 PBS含0.1%BSA稀释液超声重悬乳胶微粒,即浓度为0.5%标记荧光乳胶。

[0083] 2、乳胶荧光标记垫的制备:

[0084] 将制备的标记荧光乳胶用含0.5%BSA、4%蔗糖和0.5%吐温-20表面活性剂的pH7.4的10mM磷酸盐缓冲溶液稀释,配成0.1%浓度,均匀地包被在聚酯膜上,包被好的标记

结合垫在37℃,相对湿度小于20%干燥室干燥8小时。

[0085] 3、硝酸纤维素膜检测区和对照区的制备

[0086] 在硝酸纤维素膜的检测区上包被浓度0.4mg/ml含2%蔗糖的0.01M pH7.2磷酸盐缓冲液中的CHD-BSA(赛庚啶-牛血清白蛋白)偶联物,同时在对照区包被浓度为0.8mg/ml含2%蔗糖的0.01M pH7.2磷酸盐缓冲的羊抗鼠IgG,包被量为每30cm长的硝酸纤维素膜喷24μl,在37℃,相对湿度小于20%干燥室干燥9小时。

[0087] 4、样品垫的制备

[0088] 按下表1配方(按质量百分比计算)配制,均匀铺在样品处理垫上并维持在37℃,相对湿度小于20%干燥。

[0089] 表1 样品垫处理液配方

[0090]

名称	含量
胆酸钠	0.5%
S17	1%
S9	0.3%

[0091] S17(Rhodasurf ON-870,RHODIA,INC),S9(Tetronic-1037,RHODIA,INC)。

[0092] 5、测试卡组装

[0093] 包被CHD-BSA偶联物和羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜、吸水纸、荧光乳胶标记垫、样品垫依次贴在PVC板上组成测试条,并装卡中,如图1所示,将试卡装入铝箔袋中封好组成完整的测试卡。

[0094] 实施例3

[0095] 样品检测

[0096] A. 标准曲线建立

[0097] 配制1.0ml浓度为8ng/ml的赛庚啶的0.01M pH7.2的PBS溶液,取500u1用PBS进行倍比稀释获得不同浓度的赛庚啶溶液,(8.00,4.00,2.00,1.00,0.5,0.25,0.125,0.00ng/ml)以PBS为空白对照。取100u1标准品直接加至试条或试卡的样品垫上,室温下反应8分钟,再将检测卡插入荧光读数仪进行检测T和C区的荧光值。

[0098] B. 数据处理

[0099] 获得T线和C线的荧光值后,计算出T/C比值(见表2),以样品浓度为X轴,T/C比值为Y轴作曲线图。

[0100] 表2 不同样品浓度下T/C比值统计结果

[0101]

浓度 (ng/ml)	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
T/C	1.51	1.46	1.33	1.1	0.91	0.65	0.36	0.15

[0102] 以T/C比值为纵坐标,赛庚啶质量浓度的对数为横坐标作图得良好的线性关系,线性回归方程为 $Y = -0.754X + 0.854$, $R^2 = 0.99$ 。

[0103] C. 检测步骤:

[0104] 取出试剂,平放在桌面上。

[0105] 用移液枪吸取100u1待检样品,滴加样孔中,并开始计时;

[0106] 在室温反应8min,再将检测试卡插入荧光读数仪进行测量其荧光值,得到测定结果。

[0107] D. 检测灵敏度:

[0108] 可以检测到0.2ppb,线性范围为0~8ppb。

[0109] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

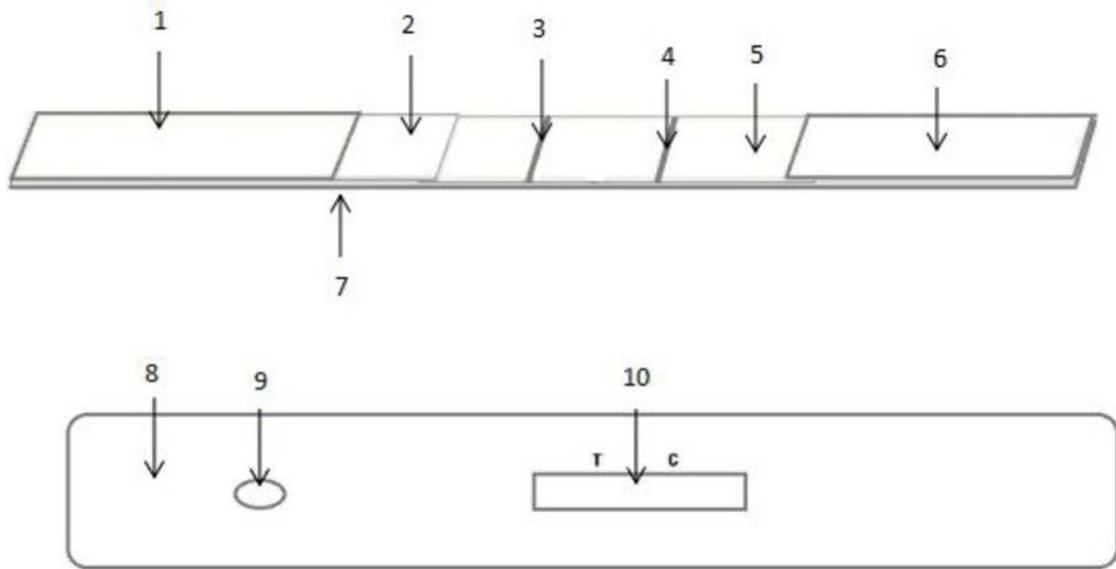


图1

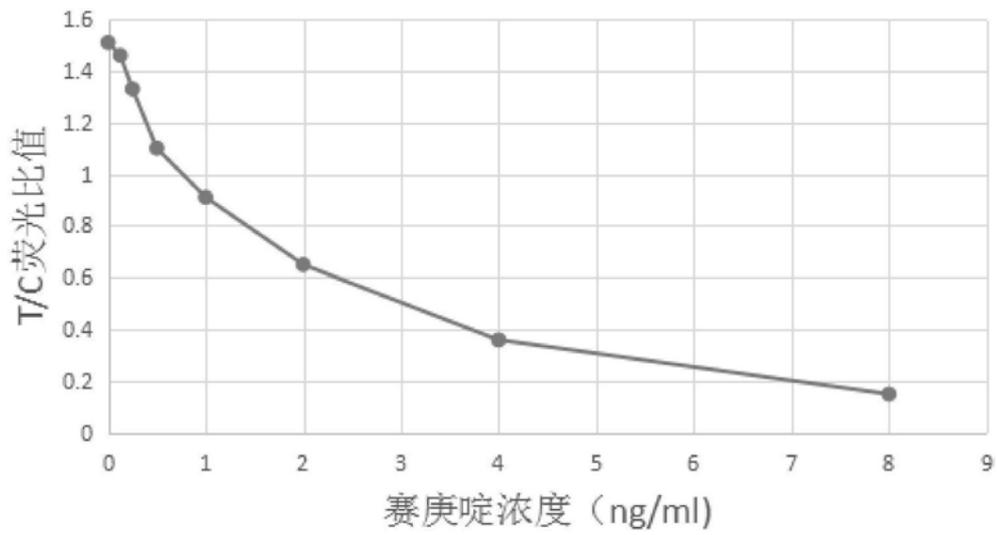


图2

专利名称(译)	一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN107688091A	公开(公告)日	2018-02-13
申请号	CN2017110797243.6	申请日	2017-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海市动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	上海市动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	上海市动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	王学生 黄华 黄土新 顾欣 李丹妮 严凤 吴剑平 潘娟 张婧		
发明人	王学生 黄华 黄土新 顾欣 李丹妮 严凤 吴剑平 潘娟 张婧		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/54306		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种快速检测赛庚啉的免疫定量试纸条及其制备方法，属于体外检测技术领域。本发明提供的免疫定量试纸条根据免疫竞争反应原理，建立了一种适用于动物尿液、组织中检测赛庚啉残留的快速荧光免疫检测试剂，检测过程中通过荧光检测仪定量测试剂上荧光值，来测得检测样品中此药物的残留。此试剂盒具有操作简单、灵敏度高、定量、特异性好及检测时间短等优点，适合基层和现场快速检测，检测结果通过检测仪器保存、打印及互联网传递监督部门，以加强对现场监控。

