



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108107202 A

(43)申请公布日 2018.06.01

(21)申请号 201711449167.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.12.27

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 石家庄市畜产品质量监测中心

地址 050041 河北省石家庄市长安区义西街3号

申请人 杭州南开日新生物技术有限公司

(72)发明人 李云 赵义良 桑丽雅 呼秀智
陈笑笑 刘松雁 陈青舟 薛占永
宋瑞 何立宁 赵兴鑫 王志恒
杨洁 高红梅 张蕾 肖妙
胡叶军 平夏婷

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

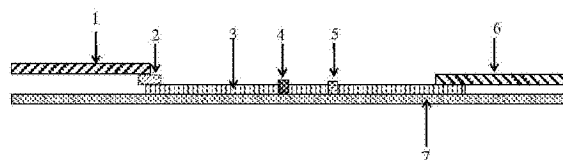
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物检测领域,特别涉及一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法。该试纸条包括底板和底板上依次紧密连接的样品垫、荧光微球垫、反应膜、吸水垫;其中,荧光微球垫上包被有抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球;反应膜上设有检测线和质控线,检测线上包被有孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物,质控线上包被羊抗鼠IgG二抗。本发明的试纸条能够快速定量检测孔雀石绿,且检出限低、稳定性好,操作更加简便,尤其适合大量样本的快速检测,有效地解决了现有技术检测方法操作繁琐、检测时间长的问题,适宜推广使用。



1. 一种时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括底板(7)和底板(7)上依次紧密连接的样品垫(1)、荧光微球垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(6);

所述荧光微球垫(2)上包被有抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球;所述反应膜(3)上设有检测线(4)和质控线(5);所述检测线(4)上包被有孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物,所述质控线(5)上包被羊抗鼠IgG二抗。

2. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的终浓度为0.5~1mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物的终浓度为0.2~0.5mg/mL;所述羊抗鼠IgG的终浓度为0.2~0.8mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球由5~15mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺和2~8mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺将抗孔雀石绿单克隆抗体偶联至时间分辨荧光微球制备得到。

5. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述时间分辨荧光微球的直径为100nm~1000nm。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述时间分辨荧光微球载有镧系元素或其螯合物,所述镧系元素优选为钐、铕或铽。

7. 权利要求1~6任一项所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括:

步骤1:荧光微球垫(2)的制备:用N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺将抗孔雀石绿单克隆抗体偶联至羧基修饰的荧光微球上,制备得到抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球,用喷膜仪将其均匀喷涂于结合垫上,制备得到荧光微球垫;

步骤2:反应膜(3)的制备:制备孔雀石绿-BSA偶联物,将孔雀石绿-BSA偶联物、羊抗鼠IgG包被到反应膜上,分别作为检测线、质控线;

步骤3:组装试纸条:以PVC胶板为背底,按照样品垫(1)、荧光微球垫(2)、反应膜(3)和吸水垫(6)的顺序依次粘贴,切条,得到时间分辨荧光免疫层析试纸条。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤1所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的制备中,所述抗孔雀石绿单克隆抗体的浓度为0.125~0.5mg/mL;所述荧光微球的浓度为0.125~0.5mg/mL。

9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤1中所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球先用稀释液稀释,再用喷膜仪将其均匀喷涂于结合垫上;所述稀释液为包含Triton X-100表明活性剂、BSA蛋白和海藻糖的PBS缓冲液,优选为包含1%Triton X-100、0.5%BSA、0.5%海藻糖的0.1mol/L pH 7.4的PBS缓冲液。

10. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,步骤1中所述荧光微球垫(2)包被的抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的终浓度为0.5~1mg/mL。

一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别涉及一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 孔雀石绿、结晶紫属于三苯甲烷类染料,可用作杀菌、驱虫剂,是药用染料中抗菌效力较强的一类。由于孔雀石绿和结晶紫具有潜在的致癌性,已被许多国家禁用,但是目前还存在非法使用的现象,因此很有必要加强对于该药的检验监测。

[0003] 传统的用于检测孔雀石绿的方法主要有两种:色谱分析法和酶联免疫法。色谱分析法虽然灵敏、准确,但样品前处理繁琐、检测时间长、耗资大、技术性要求高,且要有昂贵的仪器,不适合大量样品的检测。关于酶联免疫法,申请号为201210045217.5的一篇中国专利公开了一种能同时检测孔雀石绿、无色孔雀石绿和无色结晶紫的酶联免疫试方法。该方法相对色谱分析法而言,操作简便一些,但同样具有检测时间长、操作繁琐、费用较高的特点,而且检测限较高,仍然不利于推广使用。

[0004] 时间分辨荧光是对荧光物质在不同时间的荧光强度和量子效率发生变化急剧变化的过程进行扫描,被广泛应用于蛋白质及聚合物等领域。时间分辨荧光分析法(TRFIA)是在此基础上进一步结合高特异性免疫反应发展的一种非放射性微量分析方法。

[0005] 上海执诚生物科技股份有限公司于2015年授权的《一种时间分辨荧光免疫层析即时定量检测试剂盒方法》将凝胶包裹的含镧系元素的乳胶用于标记抗体,并公开了乳胶微粒的大小、抗体与乳胶配比、测试条组件及用途。其在实施例具体公开了含镧的荧光乳胶微粒的制备、凝胶(氨基葡聚糖)包裹荧光微粒的制备、凝胶包裹的荧光微粒标记的特异性的抗体的制备以及免疫层析试剂板的制备。该发明将凝胶包裹的含镧系元素的乳胶用于标记抗体技术,因需要凝胶包裹荧光乳胶存在操作繁琐的缺点,同时检测时间较长需要在样品滴加后反应15min。

[0006] 天水师范学院于2017年授权的《检测恩诺沙星残留时间分辨荧光免疫分析试纸的制备方法》将 En^{3+} 用于标记抗恩诺沙星单抗作为示踪。具体公开了对恩诺沙星人工抗原制备方法、抗恩诺沙星单抗制备方法、时间分辨荧光制备方法(柠檬酸钠还原法)、时间分辨荧光单抗制备、试纸条制备及外观组成。该发明采用 Eu^{3+} 标记抗恩诺沙星单抗作为示踪,因采用柠檬酸三钠还原法自制荧光微粒,粒径统一度较差,导致灵敏度和批次产品稳定性均有影响。

[0007] 目前,仍未见将时间分辨荧光分析法用于孔雀石绿检测的相关报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种检出限低、稳定性好、能够快速定量检测孔雀石绿的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法。

[0009] 本发明提供了一种时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括、底板(7)和、底板(7)上依

次紧密连接的样品垫(1)、荧光微球垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(6)；

[0010] 所述荧光微球垫(2)上包被有抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球；所述反应膜(3)上设有检测线(4)和质控线(5)；所述检测线(4)上包被有孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物，所述质控线上包被羊抗鼠IgG二抗。

[0011] 本发明所述的试纸条，其中，底板(7)优选为PVC底板；样品垫(1)的材质为玻璃纤维；所述荧光微球垫(2)的材质为玻璃纤维或聚酯膜；所述时间分辨荧光微球的材质可以为聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯或二氧化硅；所述反应膜(3)为硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、尼龙膜和聚四氟乙烯膜中的一种；所述吸水垫(6)为滤纸。

[0012] 作为优选，所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的终浓度为0.5~1mg/mL。

[0013] 本发明的试纸条中，检测线上包被的人工抗原孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物为待测样品中的抗原分子(孔雀石绿)的竞争性抗原，当待测样品中不含有孔雀石绿时，标记有抗体的时间分辨荧光微球在经过检测线时，与检测线上的人工抗原孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物结合，形成人工抗原-抗体复合物。随着层析作用，在经过质控线时，标记有一抗的时间分辨荧光微球和质控线上的二抗结合，形成一抗-二抗复合物。截留在质控线和检测线上的荧光微球在300~400nm光源激发下，发出荧光。

[0014] 当待测样品中含有孔雀石绿时，待测样品中的抗原分子通过层析作用与标记有抗体的时间分辨荧光微球结合，形成抗原-一抗复合物；在经过检测线时，未结合抗原的时间分辨荧光微球与检测线上的人工抗原孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物结合，形成人工抗原-抗体复合物。在层析过程中，抗原-一抗复合物、未结合抗原的时间分辨荧光微球分别和质控线上的二抗结合，分别形成抗原-一抗-二抗复合物、一抗-二抗复合物。截留在质控线和检测线上的荧光微球在300~400nm光源激发下，发出荧光。

[0015] 根据荧光强度，对孔雀石绿进行定性、定量检测。

[0016] 其中，采用本发明试纸条定性检测孔雀石绿的方法，包括：

[0017] (1) 将样本进行前处理得到待测样本液；

[0018] (2) 在本发明试纸条上滴加待测样本液，反应5~8min，将试纸条放入简易荧光检测仪检测窗口；

[0019] (3) 截留在检测线和质控线的荧光微球在300~400nm光源激发下，发出荧光。

[0020] 定性检测结果的读取方法：当样本中不含孔雀石绿或者孔雀石绿的含量低于检测限时，试纸条上的检测线荧光强与质控线相近或更强，检测结果为阴性；当样本中孔雀石绿含量高于检测限时，试纸条上的质控线荧光强度高于检测线荧光强度，检测结果为阳性。

[0021] 本发明经过长期地研究发现，本发明试纸条上的荧光显色情况，即T/C值，与抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的浓度呈现一定的相关性。其中，T为检测线的荧光值，C为质控线的荧光值。本发明通过在荧光微球垫上包被终浓度为0.5~1mg/mL的抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球，制得的试纸条符合上述阴性、阳性结果的判断标准，且准确性高，同时还具有检出限低、稳定性好的特点。

[0022] 本发明试纸条还可用于定量检测孔雀石绿，检测方法包括：

[0023] (1) 将样本进行前处理得到待测样本液；

[0024] (2) 在本发明试纸条上滴加待测样本液，反应5~8min，将试纸条放入荧光层析检

测仪检测窗口；

[0025] (3) 截留在检测线和质控线的荧光微球在300~400nm光源激发下，发出荧光；

[0026] (4) 荧光强度通过荧光层析检测仪进行信号转换，最后以数字显示待测浓度；配制一系列从0开始的不同浓度(x)的添加孔雀石绿标准品的样本(浓度设置5个以上)，进行前处理后得到加标样品液，用同一批次的试纸条检测加标样品液，得到检测线与质控线荧光强度比值(y)，绘制孔雀石绿浓度与荧光强度数值关系的标准曲线 $\lg x = a(y/y_0) + b$ ，其中 y_0 代表浓度为0时的检测线与质控线荧光强度比值。

[0027] (5) 根据检测样本的显示数值以及上述标准曲线，得出检测样本中孔雀石绿的含量。

[0028] 作为优选，所述孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物的终浓度为0.2~0.5mg/mL；所述羊抗鼠IgG的终浓度为0.2~0.8mg/mL。

[0029] 在本发明提供的具体实施例中，所述孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物的终浓度为0.33mg/mL；所述羊抗鼠IgG的终浓度为0.5mg/mL。

[0030] 作为优选，本发明所述试纸条中，所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球由5~15mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺和2~8mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺将抗孔雀石绿单克隆抗体偶联至时间分辨荧光微球制备得到。

[0031] 其中，所述时间分辨荧光微球的直径优选为100nm~1000nm，在本发明提供的具体实施例中，所述时间分辨荧光微球的直径为200nm或300nm。

[0032] 其中，本发明所述时间分辨荧光微球载有时间分辨的镧系元素或其螯合物，其中，镧系元素优选为钐、铕或铽。

[0033] 本发明还提供了上述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法，包括：

[0034] 步骤1：荧光微球垫(2)的制备：用N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺将抗孔雀石绿单克隆抗体偶联至羧基修饰的荧光微球上，制备得到抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球，用喷膜仪将其均匀喷涂于结合垫上，制备得到荧光微球垫。

[0035] 步骤2：反应膜(3)的制备：制备孔雀石绿-BSA偶联物，将孔雀石绿-BSA偶联物、羊抗鼠IgG包被到反应膜上，分别作为检测线(4)、质控线(5)。

[0036] 步骤3：组装试纸条：以底板为背底，按照样品垫、荧光微球垫、反应膜和吸水垫的顺序依次粘贴，切条，得到时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0037] 作为优选，步骤1所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的制备中，所述抗孔雀石绿单克隆抗体的浓度为0.125~0.5mg/mL；所述荧光微球的浓度为：0.125~0.5mg/mL。

[0038] 在本发明提供的一个具体实施例中，步骤1所述抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球的制备中，所述抗孔雀石绿单克隆抗体的浓度为0.25mg/mL；所述荧光微球的浓度为：0.125mg/mL。

[0039] 作为优选，步骤1中，所述荧光微球垫包被的抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球用稀释液稀释到终浓度为0.5~1mg/mL，然后喷涂于结合垫上，制备得到荧光微球垫。

[0040] 在本发明提供的一些具体实施例中，步骤1中所述荧光微球垫包被的抗孔雀石绿

单克隆抗体-时间分辨荧光微球的终浓度为0.5mg/mL或1mg/mL。

[0041] 本发明对稀释液的成分进行了优化,考察了稀释液的组成成分和浓度对显色的影响。稀释液的组分包括:PBS缓冲液、Triton X-100表明活性剂、BSA蛋白和海藻糖。BSA主要起到封闭单抗剩余的反应位点的作用,提高时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体与样品中的MG结合的特异性。海藻糖主要起到对单抗的保护作用,因为海藻糖在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境下能在细胞表面形成独特的保护膜,有效地保护蛋白质分子不变性失活。经研究发现,PBS浓度为0.1mol/L,Triton X-100质量分数为1.00%,BSA质量分数为0.50%,海藻糖质量分数为0.50%时,T线显色最为清晰,T/C(阴性对照)与T/C(0.5μg/LMG)的数值对比最明显。因此,本发明在制备荧光微球垫中,对抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球进行稀释时,采用的稀释液为包含1%Triton X-100、0.5%BSA、0.5%海藻糖的0.1mol/L pH7.4的PBS缓冲液。

[0042] 本发明提供的时间分辨荧光免疫层析试纸条,还包括塑料盒盖、塑料底座。按照上述步骤组装试纸条,切条后装入塑料盒盖中制成时间分辨荧光免疫层析试纸条,再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存,于室温干燥的环境保存备用。

[0043] 与现有技术相比检测方法相比,本发明的试纸条具有如下优势:

[0044] 1、稳定性好,本发明采用时间分辨荧光微球进行抗体的标记,荧光半衰期长,产品稳定性较好。

[0045] 2、检出限低,荧光物质被特定波长激发后,发生斯托克斯位移效应,能在较大波长发射荧光,因此荧光不受外来激发光本底的干扰。本发明试纸条的检测限达到0.5μg/kg,实现了孔雀石绿的精确检测。

[0046] 3、快速检测,采用直接标记抗体的方式,操作流程更简单;样品滴加后5~8min即可获得结果,弥补了传统检验方法耗时长、特异性差的不足,特别适合大量样本快速筛查。

[0047] 4、操作简便,本发明试纸条使用操作简便,不需要专业人员操作。

附图说明

[0048] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0049] 图1为本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条的结构示意图;

[0050] 其中,1示样品垫,2示荧光微球垫,3示反应膜,4示检测线,5示质控线,6示吸水垫,7示PVC底板。

[0051] 图2为本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条的俯视图;

[0052] 其中,8示加样孔,4示检测线,5示质控线,9示观察窗。

[0053] 图3为本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条的定性检测流程图;

[0054] 其中,10为简易荧光检测仪的检测窗口;11为LED激发光源,12为荧光微球;LED激发光源使荧光微球产生荧光;13为单色滤光片,将固定荧光波长范围,消除其他杂光影响,便于检测;9为观察窗,从中直接观察检测线、质控线荧光强度。

[0055] 图4为本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条结果读取示意图,其中T为检测线,C为

质控线;图4-a中T线荧光强度比C线强或者一样强,为阴性;图4-b中T线没有荧光或荧光强度比C线弱,为阳性;图4-c中C线消失,为无效。

具体实施方式

[0056] 本发明公开了一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0057] 对所公开的实施例的说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

[0058] 本发明提供的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法中,采用的试剂、材料、仪器皆为普通市售品,皆可于市场购得。

[0059] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0060] 实施例1本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备

[0061] (1) 样品垫处理

[0062] 将样品垫用1%BSA(w/v),1%Tween-20的(w/v)PEG4000的PBS(0.015M,pH=7.4)均匀浸泡2h,37℃下烘干2h,放置于干燥环境保存备用。

[0063] (2) 荧光微球垫的制备

[0064] ①抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球储备液的制备

[0065] 取市售取1%(v/v)的羧基微球1mL,12000g离心20min,弃上清;使用0.05M pH6.0 4-吗啉乙磺酸(MES)清洗1次,8℃12000g离心20min,除上清液。最终将10mg羧基微球悬浮在800μL的0.05M pH6.0MES缓冲液中得到终浓度为12.5mg/mL的微球母液;

[0066] 使用0.05M pH6.0MES缓冲液配制N-羟基丁二酰亚胺(NHS,10mg/mL),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDAC,5mg/mL)各取100μL滴加到微球母液中,终浓度是NHS(0.5~1mg/mL)EDAC(0.2~0.4mg/mL),振荡混匀;37℃或室温旋转反应1h;8℃12000g离心20min,除上清液,去离子水清洗微球2次;加入50mL 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES,0.05M,pH8.0)到微球中,振荡混匀10~30s,加入0.5mg/mL抗孔雀石绿单克隆抗体100μL,混匀后,室温振荡反应2h。

[0067] 加入100μL牛血清白蛋白(BSA,20mg/mL)封闭,4℃过夜旋转稳定,8℃12000g离心20min,除去上清液,用清洗液(0.05M PBS,0.2%Tween-20,pH 7.4)清洗微球;加入1mL 0.05M PBS缓冲液(1%Triton X-100,0.2%BSA,pH 7.4)得到时间分辨荧光微球-抗孔雀石绿单克隆抗体储备液,放置于4℃下保存。

[0068] ②荧光微球垫的喷膜

[0069] 将步骤①制备的时间分辨荧光微球-抗孔雀石绿单克隆抗体储备液用0.05M PBS缓冲液稀释到1mg/mL,用定量喷膜仪以3μL/cm的流速均匀喷涂于结合垫上,37℃烘干,4℃避

光干燥保存。

[0070] (3) 反应膜的制备:

[0071] ①制备孔雀石绿-BSA偶联物人工抗原;

[0072] 孔雀石绿衍生化:取对羧基苯甲醛1.8g (0.01mol), N,N-二甲基苯胺7.2mL (0.05mol), 在无水氯化锌和无水乙醇条件下, 90℃反应过夜, 得到羧基化的隐性孔雀石绿; 再在氧化剂双氧水作用下得到羧基化孔雀石绿;

[0073] 使用碳二亚胺法将羧基化孔雀石绿上的-COOH与载体蛋白上的-NH₂进行偶联:取羧基化的孔雀石绿37.4mg (0.1mmol) 溶于2mL二甲基酰胺中, 磁力搅拌下加入30.9mg (0.15mmol) N,N-二乙基碳二亚胺和17.25mg (0.15mmol) N-羟基琥珀酰亚胺, 于4℃下反应过夜。4000rpm离心10min, 取上清液为A。取BSA 135mg (0.002mmol) 溶于pH=8.0的PBS缓冲液中为B液。磁力搅拌下将A液倒入B液, 4℃下反应过夜。4000rpm离心10min, 取上清液置于透析袋中4℃下用PBS缓冲液透析一周, 得到孔雀石绿-BSA偶联物人工抗原, 于-20℃下保存。

[0074] ②检测线与质控线的制备

[0075] 用pH=7.4的0.015M PBS将孔雀石绿-BSA偶联物稀释至0.33mg/mL, 将羊抗鼠IgG稀释至0.5mg/mL, 并用点膜仪以3μL/cm的流速分别喷于反应膜上, 分别作为检测线4和质控线5, 在37℃烘箱干燥72h后密封干燥储存。

[0076] (4) 试纸条的组装

[0077] 以PVC底板为背底, 将样品垫、荧光微球垫、反应膜和吸水垫按顺序粘贴到大卡上。其中, 反应膜上的检测线靠近荧光微球垫一端。用切割机将贴好的大卡切割成3.00mm宽的条, 装入塑料盒盖中制成时间分辨荧光免疫层析试纸条, 再放入带干燥剂的铝箔袋中密闭储存, 于室温干燥的环境保存备用。

[0078] 参见图1, 本发明制备得到的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 包括底板7和底板7上依次紧密连接的样品垫1、荧光微球垫2、反应膜3、吸水垫6; 荧光微球垫2上包被有抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球; 反应膜3上设有检测线4和质控线5; 其中, 检测线4上包被有孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物, 质控线5上包被羊抗鼠IgG二抗。

[0079] 参见图2, 为本发明制备得到的时间分辨荧光免疫层析试纸条的俯视图。其中, 8示加样孔, 4示检测线, 5示质控线, 9示观察窗。

[0080] 参见图3, 本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条的定性检测流程图, 其中, 10为简易荧光检测仪的检测窗口; 11为LED激发光源, 12为荧光微球; LED激发光源使荧光微球产生荧光; 13为单色滤光片, 将固定荧光波长范围, 消除其他杂光影响, 便于检测; 9为观察窗, 从中直接观察检测线、质控线荧光强度。

[0081] 图4为本发明时间分辨荧光免疫层析试纸条结果读取示意图, 其中T为检测线, C为质控线; 图4-a中T线荧光强度比C线强或者一样强, 经简易荧光检测仪检测T线与C线的荧光值大小, 得到T/C值大于等于1, 为阴性; 图4-b中T线没有荧光或荧光强度比C线弱, 经简易荧光检测仪检测T线与C线的荧光值大小, 得到T/C值小于1, 为阳性; 图4-c中C线消失, 为无效。

[0082] 其中, T线没有荧光的情况为: 荧光微球垫上的抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球与待测样品中的孔雀石绿全部结合, 在经过检测线时, 没有荧光微球被截留, 因此在光源激发下没有产生荧光, 而与待测样品中的孔雀石绿结合的荧光微球在层析作用下,

经过质控线时,与包被在质控线上的二抗结合,在光源激发下产生荧光。此时观察到的为图4-b中T线没有荧光的情况。

[0083] 实施例2本发明试纸条的灵敏度

[0084] 鱼肉样品前处理方法:取鱼肉样品的可食用肌肉部分,用均质机均质。称取2g均质后样品于15mL离心管中;移取1mL混合提取液(对甲基苯磺酸0.2g,盐酸羟胺0.1g,乙酸铵0.2g,加蒸馏水溶解,定容至500mL,用4moI/L氢氧化钠溶液调整pH至4.5)加入到离心管中,振荡30s,将2g中性氧化铝加入到离心管中,剧烈振荡2min;室温下4000r/min离心5min;取3mL上清液于新的5mL离心管中,振荡1min,室温下4000r/min离心1min,弃去上清液;取2mL下层液于5mL离心管中,移取1mL二氯甲烷加入到离心管中,振荡1min,室温下4000r/min离心1min;弃去上层液体,取1mL下层液体于玻璃试管中,加入100 μ L 1%的重铬酸钾溶液,在60℃的水浴或者空气吹干仪中,用氮气或空气吹干;向吹干的试管中加入0.3mL 0.05% Tween-20, pH=7.4的PBST缓冲液,冲洗溶解试管内壁上残留物,得到处理后的待测样本液。

[0085] 将空白鱼肉样品和0.25 μ g/kg、0.5 μ g/kg、1.0 μ g/kg、2.0 μ g/kg、4.0 μ g/kg孔雀石绿加标鱼肉样品各10份,经上述方法前处理得到待测样本液,将待测样本滴加到实施例1制备的时间分辨荧光免疫层析试纸条的样品垫上,反应5~8min,然后将试纸条放入简易荧光检测仪检测窗口,在300~400nm光源激发下,观察结果。

[0086] 同时采用孔雀石绿胶体金免疫层析试纸条(生产商:杭州南开日新生物技术有限公司、生产批号:170928NK880)进行检测,经胶体金读数仪得到实验结果。实施例1制备的时间分辨荧光免疫层析试纸条与南开日新牌胶体金免疫层析试纸条的实验结果见表1。

[0087] 表1检出限测试结果

[0088]

实验组	MG浓度(μ g/kg)	实施例1的试纸条T/C	胶体金试纸条T/C
1	0	1.99	1.60
2	0.25	1.44	1.56
3	0.5	0.90	1.41
4	1.0	0.71	0.91
5	2.0	0.38	0.42
6	4.0	0.16	0.24

[0089] 结果表明,采用本发明实施例1的试纸条检测时,孔雀石绿浓度为0.5 μ g/kg下T/C值小于1,为阳性,最低检出限为0.5 μ g/kg。胶体金试纸条在1.0 μ g/kg浓度下T/C值小于1,为阳性,最低检出限为1 μ g/kg。

[0090] 实施例3本发明试纸条的精密度

[0091] 采用本发明实施例1的时间分辨荧光免疫层析试纸条对50份经高效液相串联质谱检测为MG阴性的鱼肉样品进行检测,室温条件下按照本发明采用定性检测方法进行检测,肉眼观测进行判断。实验结果如表2所示。

[0092] 表2检测结果

[0093]

样品	实验结果									
阴性鱼肉	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[0094] 实验结果超出检出限 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的为“+”，未超出检出限 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的为“—”。

[0095] 根据表2的结果可以看出，在50份阴性样品中，本发明试纸条检测出阴性结果48份，假阳性结果2份，假阳性率为4%，准确率为96%。

[0096] 同时，采用本发明实施例1的时间分辨荧光免疫层析试纸条对 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 鱼肉加标样品各30份的鱼肉样品进行检测，室温条件下按照本发明采用定性检测方法进行检测，肉眼观测进行判断。

[0097] 其中，判断标准为：当样本中不含孔雀石绿或者孔雀石绿的含量低于最低检测限时，试纸条上的检测线荧光强与质控线相近或更强，检测结果为阴性；当样本中孔雀石绿含量高于检测限时，试纸条上的质控线荧光强度高于检测线荧光强度，检测结果为阳性。实验结果如表3所示。

[0098] 表3检测结果

[0099]

样品浓度	实验结果									
$0.5\mu\text{g}/\text{kg}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$1.0\mu\text{g}/\text{kg}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0100] 实验结果超出检出限 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的为“+”，未超出检出限 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 的为“—”。

[0101] 根据表3可以看出，在60份阳性样品中，采用本发明试纸条的检测出阳性结果59份，假阳性结果1份，假阴性率为1.7%，准确率为98.3%。

[0102] 实施例4抗孔雀石绿单克隆抗体与荧光微球的偶联比例优化

[0103] 取1mL浓度为 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.25\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.125\text{mg}/\text{mL}$ 的荧光微球，调溶液pH到6.0，加入EDAC(终浓度为 $0.5\text{mg}/\text{mL}$)和NHS(终浓度为 $0.2\text{mg}/\text{mL}$)，室温振荡反应30min后， 8°C 12000g离心20min，弃上清液，加入1mL PBS缓冲液(0.01M pH 7.4)，混匀后加入 $100\mu\text{L}$ 浓度为 $0.125\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.25\text{mg}/\text{mL}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 的抗孔雀石绿单克隆抗体，振荡混匀10s； 37°C 或室温振

荡反应2h,加入100 μ L牛血清白蛋白(BSA,20mg/mL)封闭,4 $^{\circ}$ C过夜振荡反应,8 $^{\circ}$ C 12000g离心20min,除去上清液,用清洗液(0.05M PBS,0.2%Tween-20,pH 7.4)清洗微球;加入适量0.05M PBS缓冲液(1%Triton X-100,0.2%BSA,pH 7.4)使时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体终浓度为0.1mg/mL,放置于4 $^{\circ}$ C下保存。

[0104] 采用优化后的NHS、EDAC浓度(分别为10mg/mL、4mg/mL),其余按照实施例一的方法制备,得到检测孔雀石绿的时间分辨荧光微球免疫层析试纸条。取0.015M PBS缓冲液(1% Triton X-100,pH=7.4)为阴性对照,每组实验重复5次。实验结果如表4所示。

[0105] 表4抗MG单克隆抗体与荧光微球的偶联比例的优化实验结果

[0106]

实验组	抗MG单克隆抗体浓度 (mg/mL)	荧光微球浓度 (mg/mL)	T线读数 (阴性对照)	T线读数 (0.5 μ g/mL MG)	T线差值
1	0.125	0.125	1968	920	1048
2		0.25	1043	410	633
3		0.5	570	202	368
4	0.25	0.125	2936	2123	813
5		0.25	1893	1031	862
6		0.5	983	397	586
7	0.5	0.125	3289	2556	733
8		0.25	1956	1023	933

[0107]

9		0.5	1019	402	617
---	--	-----	------	-----	-----

[0108] 由表4的结果可以看出,抗MG单克隆抗体浓度为0.25mg/mL,荧光微球浓度为0.125mg/mL时,阴性和阳性的差异最大,选用该条件为优化后实验条件。

[0109] 实施例5荧光微球垫上抗孔雀石绿单克隆抗体-荧光微球的用量优化

[0110] 将时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体储液用0.1M PBS缓冲液(1%Triton X-100,0.2%BSA,pH 7.4)稀释到0.1mg/mL、0.25mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL,用定量喷膜仪以3 μ L/cm的流速均匀喷涂于结合垫上,37 $^{\circ}$ C烘干,4 $^{\circ}$ C避光干燥保存。

[0111] 采用10mg/mL NHS、4mg/mL EDAC,选用抗MG单克隆抗体浓度为0.25mg/mL,荧光微球浓度为0.125mg/mL,其余按照实施例1的方法制备,得到检测孔雀石绿的时间分辨荧光微球免疫层析试纸条。取0.015M PBS缓冲液(1%Triton X-100,pH=7.4)为阴性对照,取0.5 μ g/L孔雀石绿溶液为阳性对照,每组实验重复3次。实验结果如表5所示。

[0112] 表5试纸条上时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体浓度优化实验结果

[0113]

实验组	时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体浓度 (mg/mL)	T线读数 (阴性对照)	T/C (阴性对照)	T/C (0.5 μ g/L MG)
1	0.1	790	0.64	0.26
2	0.25	1934	0.71	0.31
3	0.5	3894	1.05	0.36
4	1.0	4266	1.68	0.58

[0114] 实验结果表明,阴性对照的T/C值与时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体浓度正相关。根据表5的数据可以看出,时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体浓度为0.5~1mg/mL时,符合阴性实验和阳性实验结果的判断标准。

[0115] 实施例6不同EDAC、NHS用量的优化

[0116] NHS使用0.05M pH6.0MES缓冲液配制5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL的NHS缓冲液,EDAC使用0.05M pH6.0MES缓冲液配制2mg/mL、4mg/mL、6mg/mL的EDAC缓冲液。分别取100 μ L,加入到800 μ L微球母液(12.5mg/mL)中,振荡混匀;37 $^{\circ}$ C旋转反应1h;8 $^{\circ}$ C 12000g离心20min,除上清液,去离子水清洗微球2次;加入1mL 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES, 0.05M,pH8.0)到微球中,振荡混匀。

[0117] 其余按照实施例1的方法制备,得到检测孔雀石绿的时间分辨荧光微球免疫层析试纸条。取0.015M PBS缓冲液(1%Triton X-100,pH=7.4)为阴性对照,取0.5 μ g/L孔雀石绿溶液为阳性对照,每组实验重复3次。实验结果如表6所示。

[0118] 表6EDAC、NHS优化实验结果

[0119]

实验组	NHS (mg)	EDAC (mg/)	T线读数 (阴性对照)	T/C (阴性对照)	T/C (0.5 μ g/L MG)
1	5	2	1266	1.10	0.39
2		4	1497	1.09	0.31
3		8	1543	1.06	0.36
4	10	2	2349	1.12	0.28
5		4	2790	1.08	0.23
6		8	2688	1.03	0.22
7	15	2	2347	1.07	0.25
8		4	2814	1.15	0.23
9		8	2773	1.20	0.21

[0120] 实验结果表明,随着NHS、EDAC浓度的增加,T线显色大体呈递增趋势。其中阴性对照的T/C值表明,实验结果稳定;0.5 μ g/L的MG阳性对照,随着浓度的增加,T/C值减小,T线显

色减弱。在NHS浓度为10mg/mL,EDAC浓度为4mg/mL时,阳性对照显色梯度较好,试剂用量较少。因此,选用NHS浓度为10mg/mL,EDAC浓度为4mg/mL为优化后实验条件。

[0121] 实施例7缓冲液、表明活性剂种类的优化

[0122] 本实施例对时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体的稀释液中的缓冲液与表明活性剂进行优化。考察了浓度为0.1mol/L的3种缓冲液(包括PBS、Tris-HCl和硼砂),以及质量分数为1%的3种表面活性剂(包括Tween-20、Tween-80和Triton X-100)对试纸条的检测结果的影响。采用优化后的NHS、EDAC浓度(分别为10mg/mL、4mg/mL),选用抗MG单克隆抗体浓度为0.25mg/mL,荧光微球浓度为0.125mg/mL,荧光微球垫上时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体浓度为0.5mg/mL,其余按照实施例1的方法制备试纸条。取0.015M PBS缓冲液(1% Triton X-100,pH=7.4)为阴性对照,取0.5 μ g/L孔雀石绿溶液为阳性对照,每组实验重复3次。实验结果如表7所示。

[0123] 表7缓冲液与表明活性剂优化实验

[0124]

实验组	缓冲液	表明活性剂	T线读数(阴性对照)	T/C(阴性对照)	T/C(0.5 μ g/L MG)
1	PBS	Tween-20	1860	1.01	0.42
2		Tween-80	1923	1.07	0.52
3		Triton X-100	3565	1.85	0.47
4	Tris	Tween-20	1960	1.01	0.58
5		Tween-80	2988	1.15	0.54
6		Triton X-100	3012	1.74	0.59
7	硼砂	Tween-20	1730	1.03	0.72
8		Tween-80	1964	1.16	0.72
9		Triton X-100	3206	1.36	0.99

[0125] 实验结果表明,在缓冲液为PBS,表面活性剂为Triton X-100时,T线的读数较高,显色清晰,T/C阴性对照数值与T/C(0.5 μ g/L MG)数值对比最明显,因此,确定稀释液中的缓冲液为PBS,表面活性剂为Triton X-100。

[0126] 实施例8稀释液成分分配比优化实验

[0127] 对时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体的稀释液中的PBS缓冲液、TritonX-100表明活性剂、BSA蛋白和海藻糖成分的优化,建立了四因素三水平的正交试验。采用优化后的NHS、EDAC浓度(分别为10mg/mL、4mg/mL),选用抗MG单克隆抗体浓度为0.25mg/mL,荧光微球浓度为0.125mg/mL,荧光微球垫上时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体浓度为0.5mg/mL,其余按照实施例1的方法制备试纸条。试验对比各稀释液保存时间分辨荧光微球-抗MG单克隆抗体的稳定性,标记物制备完成后使用稀释液稀释,放置1h后喷到结合垫上,烘干后测试。取0.015M PBS缓冲液(1%Triton X-100,pH=7.4)为阴性对照,取0.5 μ g/L孔雀石绿溶液为阳性对照,每组实验重复3次。实验结果如表8所示。

[0128] 表8微球-单抗稀释液各组分浓度对检测结果的影响

[0129]

实验组	PBS (mol/L)	Triton X-100(%)	BSA(%)	海藻糖(%)	T 线读数 (阴性对 照)	T/C(阴 性对照)	T/C (0.5 μg/L MG)
1	0.05	0.50	0.10	0.50	3055	1.59	0.52
2	0.05	1.00	0.20	1.00	2833	1.71	0.67
3	0.05	2.00	0.50	2.00	2796	1.39	0.45
4	0.10	0.50	0.20	2.00	2403	1.37	0.55
5	0.10	1.00	0.50	0.50	3960	1.96	0.55
6	0.10	2.00	0.10	1.00	3681	1.81	0.47
7	0.15	0.50	0.50	1.00	1849	1.67	0.79
8	0.15	1.00	0.10	2.00	1736	1.84	0.92
9	0.15	2.00	0.20	0.50	2350	1.52	0.87

[0130] 实验表明,PBS浓度为0.1mol/L,Triton X-100质量分数为1.00%,BSA质量分数为0.50%,海藻糖质量分数为0.50%时,T线显色最为清晰,T/C(阴性对照)与T/C(0.5μg/L MG)的数值对比最明显。因此,将稀释液确定为:0.1mol/L PBS缓冲液(1%Triton X-100,0.5%BSA,0.5%海藻糖),pH 7.4。

[0131] 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。

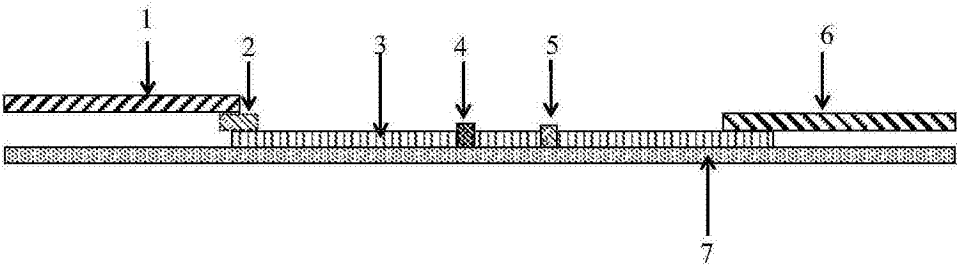


图1

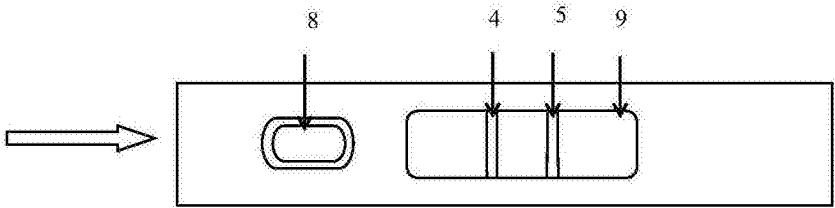


图2

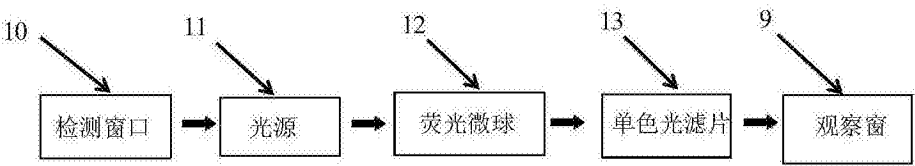


图3

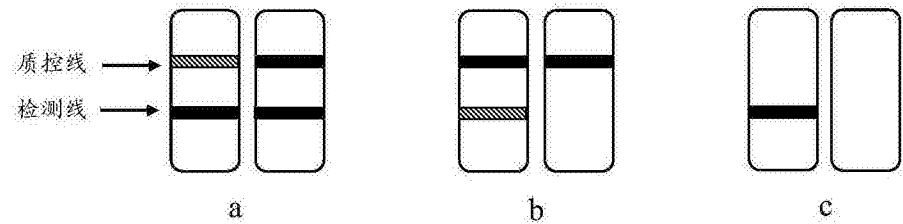


图4

专利名称(译)	一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN108107202A	公开(公告)日	2018-06-01
申请号	CN201711449167.6	申请日	2017-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
[标]发明人	李云 赵义良 桑丽雅 呼秀智 陈笑笑 刘松雁 陈青舟 薛占永 宋瑞 何立宁 赵兴鑫 王志恒 杨洁 高红梅 张蕾 肖妙 胡叶军 平夏婷		
发明人	李云 赵义良 桑丽雅 呼秀智 陈笑笑 刘松雁 陈青舟 薛占永 宋瑞 何立宁 赵兴鑫 王志恒 杨洁 高红梅 张蕾 肖妙 胡叶军 平夏婷		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物检测领域，特别涉及一种时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法。该试纸条包括底板和底板上依次紧密连接的样品垫、荧光微球垫、反应膜、吸水垫；其中，荧光微球垫上包被有抗孔雀石绿单克隆抗体-时间分辨荧光微球；反应膜上设有检测线和质控线，检测线上包被有孔雀石绿-牛血清白蛋白偶联物，质控线上包被羊抗鼠IgG二抗。本发明的试纸条能够快速定量检测孔雀石绿，且检出限低、稳定性好，操作更加简便，尤其适合大量样本的快速检测，有效地解决了现有技术检测方法操作繁琐、检测时间长的问题，适宜推广使用。

