



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107515299 A

(43)申请公布日 2017.12.26

(21)申请号 201710552301.9

G01N 33/64(2006.01)

(22)申请日 2017.07.07

(71)申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠
城路3号

(72)发明人 张道宏 窦磊娜 王建龙 补彤
黄琼 闫灵芝 赵兵欣 赵东阳

(74)专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务
所 61216

代理人 孙雅静

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/15(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及其
应用

(57)摘要

本发明公开了一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及其应用,将纳米金标记的抗呋喃唑酮的抗体作为检测探针,纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G作为增强探针,两种探针同时喷在同一个疏水垫上,随着样品溶液的流动,先后洗脱下来,双探针随即在抗体和二抗的结合下使金聚合在一起,形成复杂的网状结构,后随着毛细管作用向前流动,在T线形成清晰的红色条带,起到信号放大的作用,同时,显著减少抗体的用量,从而引发更激烈的竞争反应,提高灵敏度。

1. 一种生物探针,其特征在于,包括检测探针和增强探针,所述的检测探针为纳米金标记的呋喃唑酮单克隆抗体,所述的增强探针为纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G。

2. 如权利要求1所述的生物探针,其特征在于,检测探针与增强探针的体积比为4~6:5~7。

3. 如权利要求1或2所述的生物探针,其特征在于,所述的纳米金的粒径为15~20nm;

纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:5~9;

纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:3~7。

4. 如权利要求1或2所述的生物探针,其特征在于,纳米金标记的呋喃唑酮单克隆抗体采用不饱和标记法制备得到,纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G采用不饱和标记法制备得到;

纳米金的粒径为15~20nm;

纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:5~9;

纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:3~7。

5. 一种检测呋喃唑酮的试纸条,其特征在于,所述的试纸条上载有权利要求1-4所述的任一生物探针。

6. 如权利要求5所述的检测呋喃唑酮的试纸条,其特征在于,所述的试纸条包括衬板,衬板上贴有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的一端覆盖吸水垫,硝酸纤维素膜的另一端依次覆盖样品垫和结合垫,硝酸纤维素膜的非覆盖面上沿横向设置检测线,检测线包被有CPAOZ-BSA,结合垫上载有权利要求1-4所述的任一生物探针。

7. 如权利要求6所述的检测呋喃唑酮的试纸条,其特征在于,结合垫上载有权利要求1-4所述的任一生物探针的制备方法包括:将结合垫经封闭液浸渍封闭后,在结合垫上以5 μ L/cm的速率喷涂检测探针,在结合垫上以6 μ L/cm的速率喷涂增强探针。

8. 如权利要求6所述的检测呋喃唑酮的试纸条,其特征在于,检测线包被有CPAOZ-BSA的制备方法包括:0.5mg/mL的CPAOZ-BSA包被液以0.2 μ L/cm的包被量包被于硝酸纤维素膜的检测线上。

9. 权利要求1-4任一所述的生物探针用于检测呋喃唑酮的应用。

10. 权利要求5-8任一所述的检测呋喃唑酮的试纸条用于检测奶粉中呋喃唑酮的应用。

一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明属生物检测领域,具体涉及一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 呋喃唑酮,是硝基呋喃抗生素中最常用的一种(其余主要包括呋喃西林,呋喃它酮和呋喃妥因),其在体内代谢迅速,半衰期短,母体药物不能稳定存在。然而,呋喃唑酮的代谢产物3-氨基-2-恶唑酮(AOZ)可以与组织中蛋白质紧密结合,以结合态的形式稳定存在于机体内,且残留的时间越长,此类药物产生的毒性越强。

[0003] 由于呋喃唑酮抗生素价格低廉,且对细菌、原虫等病原体和真菌均有杀灭作用,因此被广泛运用于牲畜和水产品中,以治疗和预防由细菌、原生物引起的各种胃肠感染,也作为家畜生长促进剂。但由于其原药及其代谢物对人体有潜在的致癌、致畸副作用,各个国家在牲畜副食品生产过程中已禁止此类药物使用。因此加强对畜产品、水产品及饲料中呋喃唑酮抗生素残留的检测、特别是速测,以便及时了解和掌握食品及饲料的卫生信息,是增强食品安全性的一个重要环节。

[0004] 由于呋喃唑酮在体内代谢很快,因此对其残留状况的分析以其代谢物AOZ为标准,而AOZ作为小分子不能产生免疫反应,则将其衍生物作为检测的目标物。目前检测呋喃唑酮残留常用的方法有高效液相色谱法(HPLC),液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)、酶联免疫试验法(ELISA),而免疫层析试纸条作为近年来极受关注的新型检测方法,克服了原有方法的缺点,不需要昂贵的实验室仪器和专业的操作人员,具有特异性强、灵敏度高、成本低、对实验人员和环境的污染危害小、适于现场批量检测等优点,具有极大的应用价值和前景。由于呋喃唑酮代谢物检测所用竞争性免疫层析试纸条要经过复杂的衍生过程和高质量的抗体,因此目前用免疫层析试纸条检测呋喃唑酮的研究很少。目前,存在的用免疫层析试纸条检测呋喃唑酮的研究有:

[0005] 2016年Tao Le,Yong Xie,Liqian Zhu,and Lei Zhang小组用量子点标记的抗体作为信号探针检测呋喃唑酮代谢物,其用肉眼观察的检测线大于 $10\mu\text{g/L}$ 。2017年,该小组用胶体金标记的抗体作为信号探针检测呋喃唑酮代谢物,其可视化的检测线为 $10\mu\text{g/L}$ 。

[0006] 近年来,有研究致力于替换标记物来提高检测灵敏度,但新型的标记材料(荧光微球、量子点、磁珠、石墨烯等)通常制备过程复杂,与抗体偶联条件不好控制,且有的材料需要信号读出设备,皆不适于现场检测。另一方面,传统的胶体金试纸条达不到很高的灵敏度,不能够很好地满足当前更加严格的呋喃唑酮限量标准的检测需求。但是,涉及到现场检测,胶体金仍然拥有绝对优势。因此,研究建立一种在胶体金的基础上放大信号,并且针对呋喃唑酮抗生素残留具有高灵敏度的免疫层析试纸条,这对现场检测和监控畜产品中的呋喃唑酮具有很重要的意义和应用价值。

发明内容

[0007] 针对现有技术中的缺陷和不足,本发明的目的是提供一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及应用,该生物探针能显著减少抗体的用量,从而引发更激烈的竞争反应,提高灵敏度,使呋喃唑酮的可视化检测线达到0.3ng/mL。

[0008] 为达到上述目的,本发明采取的技术方案包括:

[0009] 一种生物探针,包括检测探针和增强探针,所述的检测探针为纳米金标记的呋喃唑酮单克隆抗体,所述的增强探针为纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G。

[0010] 具体的,检测探针与增强探针的体积比为4~6:5~7,最好的,检测探针与增强探针的体积比为5:6。

[0011] 再具体的,所述的纳米金的粒径为15~20nm;纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:5~9;最好的,纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:7;

[0012] 纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:3~7,最好的,纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:5。

[0013] 进一步的,纳米金标记的呋喃唑酮单克隆抗体采用不饱和标记法制备得到,纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G采用不饱和标记法制备得到;纳米金的粒径为15~20nm;纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:5~9;纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:3~7。

[0014] 一种检测呋喃唑酮的试纸条,所述的试纸条上载有所述的任一生物探针。

[0015] 具体的,所述的试纸条包括衬板,衬板上贴有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的一端覆盖吸水垫,硝酸纤维素膜的另一端依次覆盖样品垫和结合垫,硝酸纤维素膜的非覆盖面上沿横向设置检测线,检测线包被有CPAOZ-BSA,结合垫上载有权利要求1-4所述的任一生物探针。

[0016] 进一步的,结合垫上载有权利要求1-4所述的任一生物探针的制备方法包括:将结合垫经封闭液浸渍封闭后,在结合垫上以5 μ L/cm的速率喷涂检测探针,在结合垫上以6 μ L/cm的速率喷涂增强探针。

[0017] 再进一步的,检测线包被有CPAOZ-BSA的制备方法包括:0.5mg/mL的CPAOZ-BSA包被液以0.2 μ L/cm的包被量包被于硝酸纤维素膜的检测线上。

[0018] 任一所述的生物探针用于检测呋喃唑酮的应用。

[0019] 任一所述的检测呋喃唑酮的试纸条用于检测奶粉中呋喃唑酮的应用。

[0020] 与现有技术相比,其优点与积极效果在于:

[0021] (1)灵敏度高。本发明在传统胶体金试纸条的基础上,引入了金标二抗作为增强探针,由于单抗和二抗的特异性识别作用,两种探针会结合在一起,从而使大量的纳米金颗粒聚集在一起,形成网状结构,从而在检测线上形成更清晰的红色条带,起到放大信号的作用。

[0022] (2)抗体用量少。本发明采用的双探针增强信号,可以显著减少抗体的用量,抗体用量的进一步减少将引发游离分析物与固定抗原之间对有限的抗体结合位点更加激烈的竞争,从而带来分析物与信号强度之间更敏感的程度-反应关系。

[0023] (3)操作简便。本发明采用的双探针均喷于同一个结合垫上,无需添加额外的试剂和操作,从而使分析过程快速、简便,且节省成本,可实现对呋喃唑酮代谢物的高灵敏度现场检测。因此可作为小型化、便携式的现场快速检测器件,特别是在临床诊断、食品卫生、环

境监测及生物化学等领域有很好的应用前景。

附图说明

- [0024] 图1是本发明免疫层析试纸条构型图；
[0025] 图2是本发明免疫层析试纸条增强原理图；
[0026] 图3是本发明制备的免疫层析试纸条检测阳性样品过程图；
[0027] 图4是本发明制备的免疫层析试纸条检测阴性样品过程图；
[0028] 图5是本发明制备的免疫层析试纸条检测奶粉样品灵敏度；
[0029] 图6是本发明制备的免疫层析试纸条与传统的胶体金试纸条灵敏度对比；
[0030] 图7是对本发明制备的免疫层析试纸条进行验证；
[0031] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步的详细说明。

具体实施方式

[0032] 本发明的生物探针包括使用纳米金标记的呋喃唑酮单克隆抗体(单抗)作为检测探针,纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G(二抗)作为增强探针,两种探针均喷在同一个结合垫上,硝酸纤维膜上只包被检测线;由于单抗和二抗的特异性结合,两种探针结合在一起,从而其上的纳米金聚集在一起,一个金标单抗可以结合好几个金标二抗,一个金标二抗又可以结合好几个金标单抗,从而形成巨大的网状结构,聚集更多的纳米金,会在检测线(T)上形成更清晰的红色条带。

[0033] 呋喃唑酮单克隆抗体可以为现有技术中已有的单抗,最好为申请人课题组自己研发的高灵敏度呋喃唑酮单克隆抗体,与其余三种主要硝基呋喃抗生素无交叉反应。呋喃唑酮单克隆抗体是按照Zhang Daohong等人在刊物《Analytical Chimica Acta》第635卷第63-69页题目为“Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure”一文中记载的方法制备得到的:将抗呋喃唑酮细胞注射与小鼠腹部,诱导其产生呋喃唑酮代谢物的抗血清,后对其腹水进行采集,用辛酸硫酸铵法进行纯化,用聚丙烯凝胶酰胺电泳对纯化结果进行鉴定,以得到高特异性的单克隆抗体。

[0034] 具体的,检测探针与增强探针的体积比为4~6:5~7,最好的,检测探针与增强探针的体积比为5:6。

[0035] 再具体的,所述的纳米金的粒径为15~20nm;纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:5~9;最好的,纳米金与抗呋喃唑酮单克隆抗体的体积比为1000:7;

[0036] 纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:3~7,最好的,纳米金与羊抗鼠免疫球蛋白G的体积比为1000:5。

[0037] 见图2,其工作原理为:将金标单抗和金标二抗两种金标探针均喷于同一个结合垫上,当样品溶液加入到试纸条下端的样品垫上后,样品溶液通过毛细管作用沿试纸条向吸水垫方向移动,移动至结合垫时,两种金标探针先后被溶解,并在抗体和二抗的特异性结合下形成网状结构,随着样品溶液一起向吸水垫方向移动。当样品中含有目标物时,其将和结合垫上洗脱下来的金标单抗结合并一同向上泳动,到达固定着抗原的检测线时,固定抗原将和目标物竞争结合金标单抗上有限的抗原结合位点,样品中呋喃唑酮代谢物含量越高,

检测线上的固定抗原能够结合的金标探针将越少,形成的显色带颜色越浅。当固定抗原所结合的金标探针少于一定的数量时,检测线处将不会有红色线条出现。无论样品中是否含有呋喃唑酮,未被检测线截获的金标探针形成的网状结构或其与呋喃唑酮代谢物的结合物将继续移动至吸水垫,所以样品中不含呋喃唑酮(阴性)时为一条红色条带,含有一定量呋喃唑酮(阳性)时为比对照浅的红色条带或者没有红色条带。

[0038] 实施例1:

[0039] 呋喃唑酮单克隆抗体的制备方法

[0040] 呋喃唑酮单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0041] 1.腹水采集:

[0042] 提前培养呋喃唑酮细胞,待细胞长至良好状态时,将细胞株注射预先用液体石蜡处理过的BALB/c小鼠,待小鼠腹部明显涨大时,收集该小鼠的腹水。

[0043] 2.抗体纯化:

[0044] 采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,具体操作为:腹水用双层滤纸过滤,4℃,12000r/min离心15min,吸取上清。所得腹水上清与4倍体积的醋酸盐缓冲液混合,搅拌下缓慢加入正辛酸33μL/mL腹水,室温混合30min,4℃静置2h。之后4℃,12000r/min离心30min,弃沉淀。上清用双层滤纸过滤后,加入1/10滤液体积的0.1mol/L pH值7.4的磷酸盐缓冲液,用2mol/L氢氧化钠溶液调混合液pH值至7.4。上清4℃预冷,缓慢加入硫酸铵至硫酸铵终浓度为0.277g/mL,4℃静置2h。再4℃,12000r/min离心30min,弃上清。所得沉淀用1/10原腹水体积的0.01mol/L磷酸盐缓冲液重悬,装入透析袋,用纯水透析。将充分透析好的蛋白溶液置-80℃冰箱冷冻,之后用冷冻干燥机冻干,收集冻干粉,即得纯化好的抗呋喃唑酮单克隆抗体,将抗体置-20℃冰箱中备用。

[0045] 醋酸盐缓冲液为0.29g醋酸钠,0.141mL醋酸加水定容至100mL所得。

[0046] 0.1mol/L的磷酸盐缓冲液为0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,磷酸二氢钾0.02g加水定容至100mL所得。所述的用2mol/L氢氧化钠溶液为80g氢氧化钠加水定容至1000mL所得。

[0047] 3.单克隆抗体的性质鉴定:

[0048] 用间接竞争ELISA法鉴定其对呋喃唑酮代谢物的灵敏度及交叉反应率。用聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化效果进行鉴定。

[0049] 下述实施例2-6使用的抗呋喃唑酮单克隆抗体为实施例1制备得到的。

[0050] 实施例2:

[0051] 纳米金溶液是采用柠檬酸钠还原法制备的。其具体方法为:取96mL蒸馏水于锥形瓶中,加热煮沸后,在加热且磁性搅拌的状态下,先后加入1mLHAuCl₄和4mL柠檬酸三钠溶液,观察颜色变化,从蓝到紫再到红,待溶液变为红色后,继续在搅拌状态下加热10min。溶液在室温下冷却后,在容量瓶中用蒸馏水定容至100mL,置4℃冰箱备用。纳米金的粒径为15~20nm。

[0052] 检测探针的制备方法包括:

[0053] 量取50.0mL的纳米金溶液,用0.1mol/L碳酸钾溶液调节溶液pH值为5.5;在搅拌的状态下缓慢加入0.35mL 1mg/mL的呋喃唑酮单克隆抗体溶液,继续搅拌30min;加入10%牛血清白蛋白溶液至其终浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,

取上清液,弃沉淀;将上清液12,000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12,000r/min离心30min,弃去上清液,用标记洗涤保存液重悬,分别得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

[0054] 增强探针的制备方法包括:

[0055] 量取50.0mL的纳米金溶液,用0.1mol/L碳酸钾溶液调节溶液pH值为5.5;在搅拌的状态下缓慢加入0.25mL 1mg/mL的羊抗鼠免疫球蛋白G溶液,继续搅拌30min;加入10%牛血清白蛋白溶液至其终浓度为1%,继续搅拌30min;于4℃放置2h后,1500r/min离心15min,取上清液,弃沉淀;将上清液12,000r/min离心30min,弃去上清液,加入50.0mL标记洗涤保存液;再以12,000r/min离心30min,弃去上清液,用标记洗涤保存液重悬,分别得到5.0mL浓缩物,置4℃冰箱备用;

[0056] 0.1mol/L碳酸钾溶液为:13.8g碳酸钾溶于纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得;1mg/mL呋喃唑酮代谢物单克隆抗体溶液为1mg呋喃唑酮代谢物单克隆抗体溶解在1mL纯水中制成;10%牛血清白蛋白溶液为10g牛血清白蛋白溶解在100mL纯水中,0.22μm滤膜过滤所得;标记洗涤保存液为:2.0g聚乙二醇-20000,0.2g叠氮钠,0.1235g硼酸,纯水定容至1000mL,0.22μm滤膜过滤所得;

[0057] 实施例3:

[0058] 快速检测呋喃唑酮代谢物免疫层析试纸条的制备

[0059] 快速检测呋喃唑酮代谢物的高灵敏度免疫层析试纸条,见图1,其设置有衬板,衬板上从上到下依次贴附有吸水垫、硝酸纤维素膜、含有两种金标抗体(金标单抗和金标二抗)的结合垫、样品垫,其中,硝酸纤维素膜上横向设置检测线,检测线包被有呋喃唑酮代谢物-牛血清白蛋白偶联物(CPAOZ-BSA)。

[0060] 快速检测呋喃唑酮代谢物高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0061] 1) 吸水垫的制备

[0062] 将吸水纸剪裁成长18mm宽3mm的规格,即得吸水垫

[0063] 2) 硝酸纤维素膜的制备

[0064] 检测线的包被:

[0065] 将呋喃唑酮代谢物衍生物CPAOZ-牛血清白蛋白的偶联物(CPAOZ-BSA)配制成0.5mg/mL的溶液;用划线方式将其以2μL/cm的包被量横向包被于距硝酸纤维素膜上沿30mm的位置,然后于37℃条件下干燥15min。

[0066] 3) 样品垫的制备:将玻璃纤维膜剪裁成长8mm宽3mm的规格,放入封闭液A中浸湿,于37℃条件下干燥10-16h,得样品垫,然后置干燥器中室温保存;

[0067] 所述的封闭液A为1g牛血清白蛋白,2g蔗糖,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,0.02g磷酸二氢钾加水定容至100mL所得。

[0068] 4) 结合垫的制备:将玻璃纤维膜剪裁成长15mm宽3mm的规格,放入封闭液B中浸湿,取出,于37℃条件下干燥10-16h,用点喷方式将两种纳米金探针溶液横向喷涂于干燥好的结合垫上,检测探针溶液的速率为5μL/cm,增强探针溶液的速率为6μL/cm,然后真空冷冻干燥3h,置干燥器中室温保存;

[0069] 所述的封闭液B为1g牛血清白蛋白,0.1mL曲拉通X-100,0.3g聚乙烯吡咯烷酮,2g蔗糖,0.02g叠氮化钠,0.8g氯化钠,0.29g十二水磷酸氢二钠,0.02g氯化钾,磷酸二氢钾

0.02g加水定容至100mL所得。

[0070] 5) 试纸条的组装: 首先将硝酸纤维素膜贴附于衬板上, 然后样品垫压结合垫1-3mm, 结合垫压硝酸纤维素膜1-3mm, 吸水垫压硝酸纤维素膜1-3mm依次贴附于衬板上, 即得快速检测呋喃唑酮代谢物的免疫层析试纸条, 见图1。

[0071] 实施例4:

[0072] 将实施例3制得的免疫层析试纸条用于检测奶粉样品中呋喃唑酮代谢物的应用, 包括以下步骤:

[0073] 称取1g脱脂奶粉样品于10mL离心管中, 用8mL超纯水溶解。然后在样品中加入不同浓度的呋喃唑酮代谢物标准溶液, 将混合物在室温下涡旋混合。然后, 将200 μ L溶有对羧基苯甲醛(0.05M)的二甲基亚砷加入到样品中, 并将每个样品在37 $^{\circ}$ C下孵育16h。然后将衍生的样品以10,000rpm离心10min, 收集上清液, 取100 μ L样品溶液做为检测液置于离心管中, 将试纸条的样品垫一端插入离心管中, 同时取100 μ L未添加呋喃唑酮代谢物的奶粉样品作为阴性对照液, 10min后读取结果。

[0074] 检测结果: 检测试纸条的检测线不显色或颜色比对照试纸条检测线颜色浅, 均判为阳性, 见图3, 而检测线颜色与对照试纸条颜色一致时, 判为阴性, 见图4。结果表明, 该试纸条灵敏度能达到0.3ng/mL, 见图5。

[0075] 实施例5:

[0076] 为了证明本发明使用的免疫层析试纸条比传统的胶体金试纸条更灵敏, 本发明人还做了以下对比实验:

[0077] 于实施例3制备的免疫层析试纸条的制备过程不同的是在结合垫处只喷有金标单抗, 在硝酸纤维素膜上还横向设置质控线(C), 包被物为羊抗鼠免疫球蛋白G, 浓度为1mg/mL, 速率为1 μ L/cm);

[0078] 将实施例3和实施例5制备的试纸条都用来检测呋喃唑酮标准溶液, 实施例3制备的试纸条检测的呋喃唑酮代谢物的浓度设置为0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 3ng/mL, 实施例5制备的试纸条检测的呋喃唑酮代谢物的浓度设置为0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7ng/mL, 各反应10min后, 肉眼观察检测线和质控线显色强度, 并记录结果;

[0079] 见图6, 传统的胶体金试纸条其检测限为1ng/mL, 消线浓度为5ng/mL, 而本发明使用的免疫层析试纸条检测限为0.3ng/mL, 消线浓度为1ng/mL。上述结果说明, 本发明使用的免疫层析试纸条的灵敏度相较于传统的试纸条提高了5倍。

[0080] 实施例6:

[0081] 为了证明本发明使用的免疫层析试纸条有效, 本发明人还做了以下实验:

[0082] 在实施例3制备的免疫层析试纸条的基础上, 在硝酸纤维素膜上横向设置质控线, 质控线上的包被物为羊抗鼠免疫球蛋白G, 浓度为1mg/mL, 喷量为1 μ L/cm;

[0083] 将呋喃唑酮代谢物标准溶液用PBS配制成1ng/mL, 取100 μ L置于离心管中, 将实施例6制备的试纸条的样品垫一端插入离心管中, 10min后观察结果;

[0084] 同时以PBS作为阴性对照;

[0085] 实验结果见图7, 阴性对照时, 质控线和检测线均有明显的红色条带, 当呋喃唑酮代谢物浓度为1ng/mL, 质控线有清晰的红色条带, 检测线没有, 结果表明, 本发明研制的免疫层析试纸条是有效的。

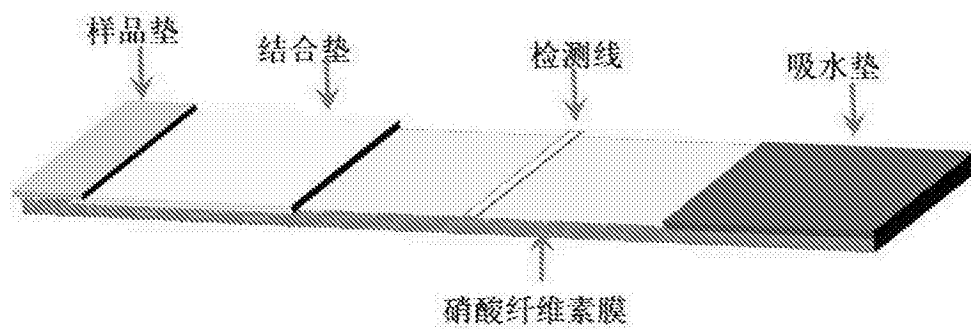


图1

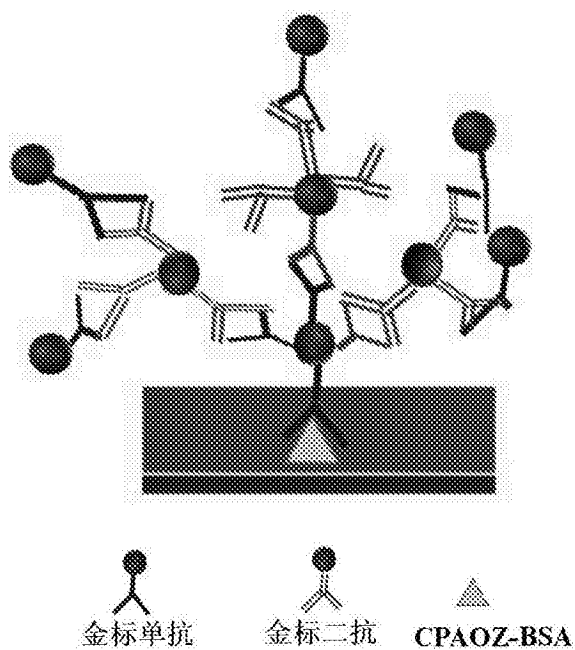


图2

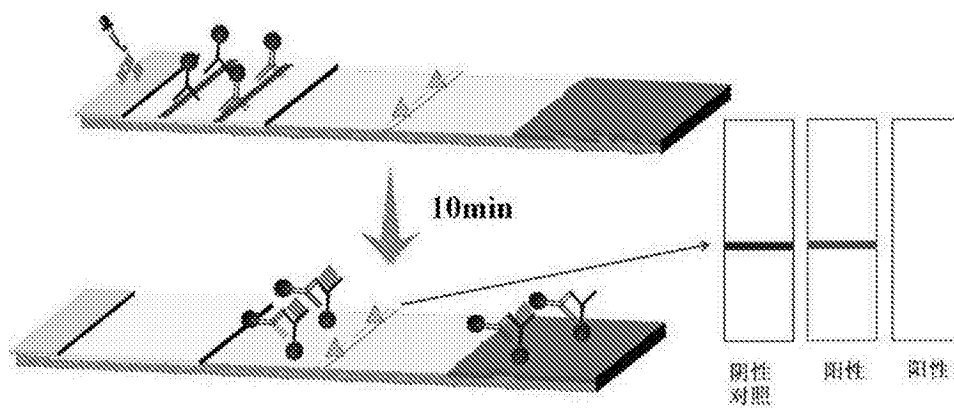


图3

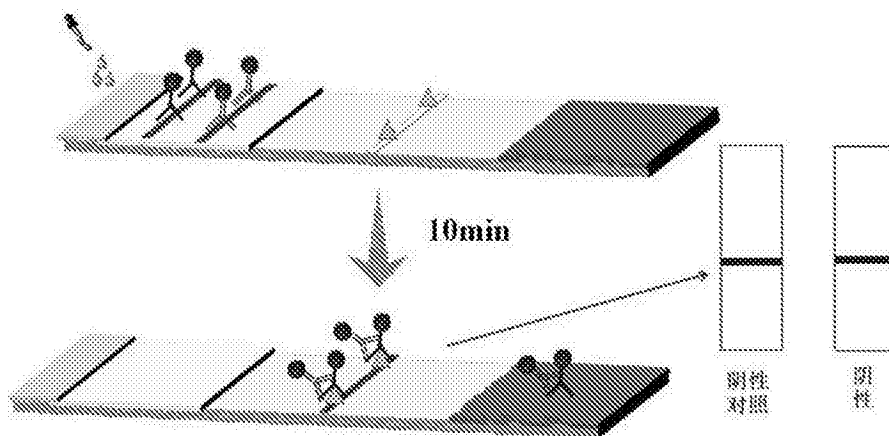


图4

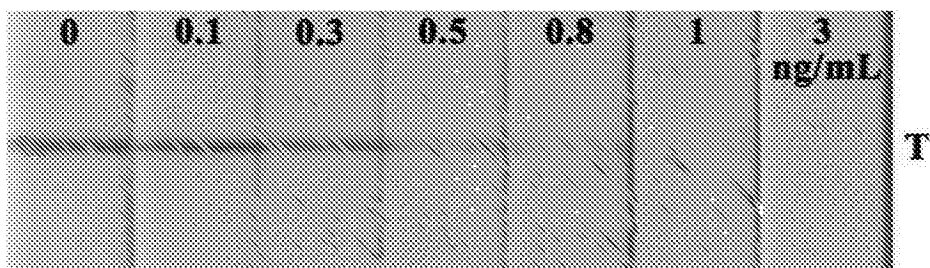


图5

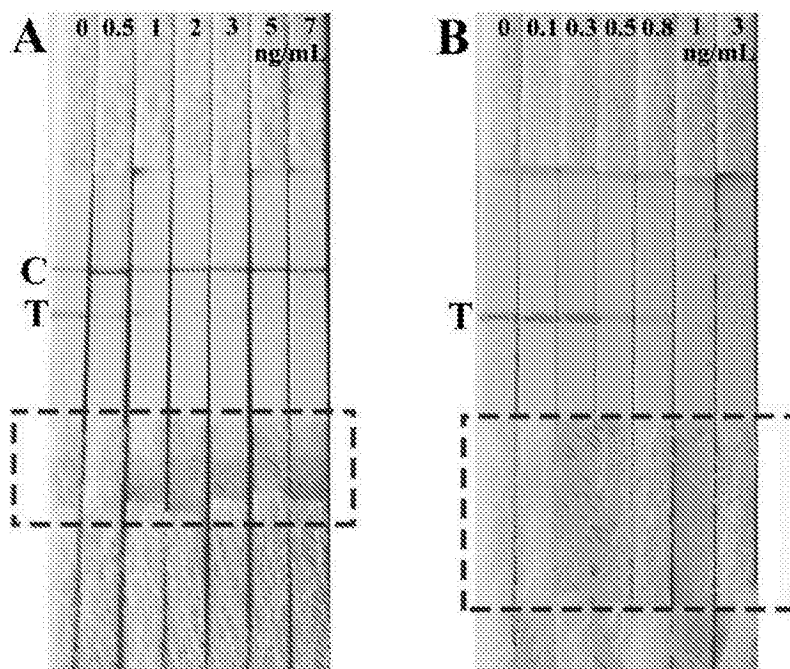


图6

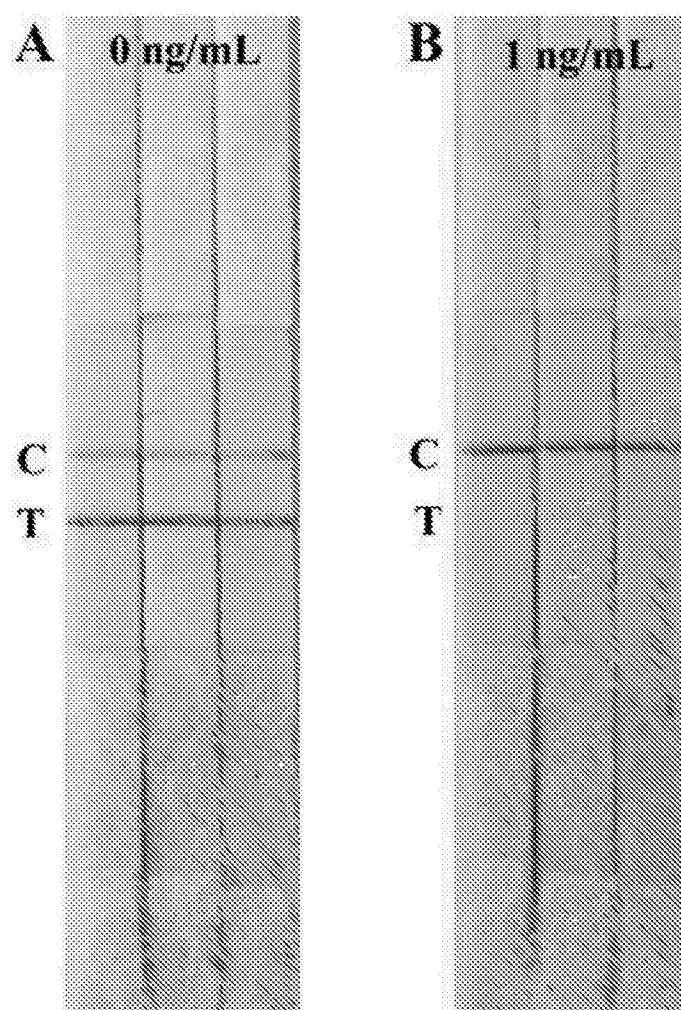


图7

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN107515299A | 公开(公告)日 | 2017-12-26 |
| 申请号 | CN201710552301.9 | 申请日 | 2017-07-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 西北农林科技大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 西北农林科技大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 西北农林科技大学 | | |
| [标]发明人 | 张道宏 窦磊娜 王建龙 补彤 黄琼 闫灵芝 赵兵欣 赵东阳 | | |
| 发明人 | 张道宏 窦磊娜 王建龙 补彤 黄琼 闫灵芝 赵兵欣 赵东阳 | | |
| IPC分类号 | G01N33/558 G01N33/577 G01N33/532 G01N33/15 G01N33/64 | | |
| CPC分类号 | G01N33/558 G01N33/532 G01N33/577 G01N33/64 G01N33/94 G01N33/9446 | | |
| 代理人(译) | 孙雅静 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种生物探针、检测呋喃唑酮的试纸条及其应用，将纳米金标记的抗呋喃唑酮的抗体作为检测探针，纳米金标记的羊抗鼠免疫球蛋白G作为增强探针，两种探针同时喷在同一个疏水垫上，随着样品溶液的流动，先后洗脱下来，双探针随即在抗体和二抗的结合下使金聚合在一起，形成复杂的网状结构，后随着毛细管作用向前流动，在T线形成清晰的红色条带，起到信号放大的作用，同时，显著减少抗体的用量，从而引发更激烈的竞争反应，提高灵敏度。

