



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109187948 B

(45) 授权公告日 2021.10.29

(21) 申请号 201810940145.8

(22) 申请日 2018.08.17

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109187948 A

(43) 申请公布日 2019.01.11

(73) 专利权人 郑州大学

地址 450000 河南省郑州市高新区科学大道100号

(72) 发明人 张改平 王爱萍 周景明 牛艳

陈玉梅 崔惠芳 刘燕凯 张静

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所

(普通合伙) 41122

代理人 张爱军 徐文婷

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101776689 A, 2010.07.14

CN 103941000 A, 2014.07.23

CN 102766211 A, 2012.11.07

CN 106573927 A, 2017.04.19

CN 105439955 A, 2016.03.30

CN 103472231 A, 2013.12.25

CN 105572363 A, 2016.05.11

CN 1764375 A, 2006.04.26

AU 2006302237 C1, 2012.11.08

CN 102297970 A, 2011.12.28

CN 101210918 A, 2008.07.02

Weilin L. Shelper. "Generation of antibody and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the feed additive roxarsone".《Food and Agricultural Immunology》.2011,第22卷(第2期),

Nicholas C Lloyd 等. "Substituted phenylarsonic acids structures and spectroscopy".《Journal of Organometallic Chemistry》.2008,第693卷(第14期),

Dapeng Peng 等. Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked.《Food Chemistry》.2015,第197卷

审查员 石维平

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

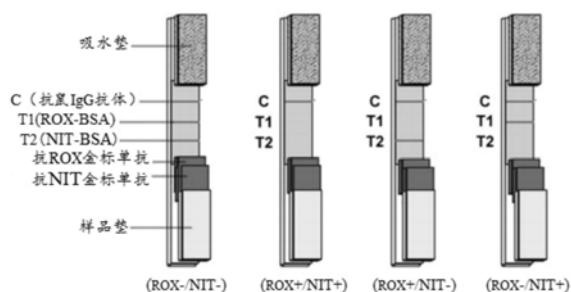
(54) 发明名称

一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸

(57) 摘要

本发明公开了一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸,该试纸包括抗洛克沙肿的单克隆抗体以及抗硝苯肿酸的单克隆抗体,能够同时检测洛克沙肿和硝苯肿酸。本发明在抗体制备时,分别采用洛克沙肿(ROX)、硝苯肿酸(NIT)作为半抗原,将其硝基还原后改造成氨基,进而与载体蛋白的氨基进行偶联,研制出洛克沙肿、硝苯肿酸人工抗原,该免疫原ROX-BSA、NIT-BSA具有更加良好的免疫原性。获得的两种单抗均具备高特异性,高亲和力和高敏感性的优点,为制备洛克沙肿、硝苯肿酸双联检测试纸奠定基础。与现有的

高效液相色谱检测技术相比,本发明的免疫层析试纸具有简便、快速、灵敏、准确、高通量等优点,可实现现场实时检测。



1. 一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 洛克沙肿ROX和硝苯肿酸NIT人工完全抗原的合成

以洛克沙肿和硝苯肿酸作为半抗原,对洛克沙肿和硝苯肿酸的硝基进行改造,将硝基还原后改造成氨基,得到改造后的3-氨基-4-羟基苯肿酸和4-氨基苯肿酸;通过重氮化法将改造后的3-氨基-4-羟基苯肿酸和4-氨基苯肿酸分别与载体蛋白BSA进行偶联,合成ROX-BSA 和NIT-BSA;

(2) 单克隆抗体的制备

将合成的ROX-BSA 和NIT-BSA分别免疫小鼠,并进行细胞融合、亚克隆,体内诱生腹水及单抗的纯化,得到抗ROX单克隆抗体和抗NIT单克隆抗体;

(3) 兔抗小鼠IgG的制备

以纯化小鼠IgG免疫健康新西兰兔,制备兔抗小鼠IgG;

(4) 金标抗体的制备

以柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金,并分别标记步骤(2)制备的抗ROX单克隆抗体和抗NIT单克隆抗体;

(5) 试纸的研制

(a) 将ROX-BSA、NIT-BSA和兔抗小鼠IgG分别喷点于硝酸纤维素检测膜中央,形成检测线T1、T2和质控线C印迹,制得检测膜;

(b) 将金标抗体喷点于玻璃棉,制得结合垫;

(c) 制备样品垫、吸水垫和支撑板,将检测膜、结合垫、样品垫、吸水垫依次组装在支撑板上;

所述洛克沙肿和硝苯肿酸半抗原改造的具体方法为:称取13.1g 洛克沙肿或硝苯肿酸溶解在100mL浓度为1mol/L的NaOH水溶液中,在冰/水混合物中不断搅拌,冷却至0℃;加入30.25g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 搅拌,溶液沸腾,颜色由橙色变至浅黄色时,加入12mL浓HCl,继续保持在0℃,直到发泡停止,产物从溶液中沉淀,过滤后收集沉淀用冰水洗涤两次,得到奶油色固体,即为3-氨基-4-羟基苯肿酸粗产物或4-氨基苯肿酸粗产物,真空干燥;将6g 3-氨基-4-羟基苯肿酸粗产物或4-氨基苯肿酸粗产物溶于25mL H_2O 和2mL浓盐酸的混合物中并搅拌15min后过滤,向滤液中加入25% (w/v) 乙酸钠溶液直至溶液呈刚果红,将溶液在4℃冷却20min,产生沉淀,过滤后收集沉淀并在真空下干燥,得到纯化的3-氨基-4-羟基苯肿酸晶体或4-氨基苯肿酸晶体,即改造后的洛克沙肿半抗原或硝苯肿酸半抗原。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述抗ROX单克隆抗体属于IgG1,K型;效价为 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为1.08 ng/mL。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述抗NIT单克隆抗体属于IgG2b,K型;效价为 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为2.31 ng/mL。

4. 一种如权利要求1所述的试纸在检测洛克沙肿和硝苯肿酸残留中的应用。

一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸,具体涉及一种人工改造洛克沙肿和硝苯肿酸半抗原的方法,一种能识别洛克沙肿的特异性单克隆抗体和一种能识别硝苯肿酸的特异性单克隆抗体,以及所制备的同步检测洛克沙肿和硝苯肿酸的胶体金免疫层析双联试纸,属于兽药残留分析和免疫学技术领域。

背景技术

[0002] 洛克沙肿、硝苯肿酸都属于有机肿类兽药,具有苯肿酸的基本结构,对多种肠道致病菌有较强的抑制和杀灭作用,能够促进畜禽生长,提高饲料转化率,促进畜色素沉积,并对防止猪腹泻、鸡球虫、黑头病有良好的效果,在畜牧生产中广泛用作猪和鸡的饲料添加剂。

[0003] 有机肿类为一种毒性很低的化合物,吸收率低,代谢和排泄快,组织中残留较少,毒副作用表现为食欲不振、体重减轻、神经麻痹、共济失调和腹泻,有时出现各种类型的皮炎,甚至有可能使部分家畜死亡。由于肿类兽药在畜禽养殖中广泛使用,大量的含砷化合物进入环境中,造成土壤和水体污染,含砷化合物在环境中有较强的蓄积、迁移和转化能力,进入食物链后,直接或间接对人类健康造成危害。因此有机肿制剂可能对动物产品质量安全、公共卫生安全和生态安全存在风险隐患。鉴于此我国农业部2638号公告根据《兽药管理条例》第六十九条规定,决定停止在食品动物中使用喹乙醇、氨苯肿酸、洛克沙肿等3种兽药。

[0004] 目前,检测洛克沙肿、硝苯肿酸残留量的方法主要是色谱分析法,如高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS),色谱分析法虽然灵敏、准确、分离度高并且可进行多残留检测的定性、定量研究,但是需要昂贵的仪器、繁琐的前处理、熟练的专业操作员。如果采用仪器分析法进行大批量样品的检测,其成本将非常高,而且在目前的国家检测机构中大部分只有省级才配备有精密的分析仪器,因此需要建立一个从筛选到确证的检测体系。有关有机肿的残留确证方法已经相对完善,但可用于大批量样品初筛的检测方法研究较少,免疫学检测法尤其是胶体金检测试纸具有快速、灵敏度高、操作简单、适应性强、高通量等优点,适合高通量样品筛选,因此对于快速检测洛克沙肿和硝苯肿酸在动物饲料、土壤或可食性动物组织中的残留,胶体金检测试纸更具优势。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸,该试纸具有简便、快速、灵敏、准确等优点,可实现现场实时检测。

[0006] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种人工改造洛克沙肿和硝苯肿酸半抗原的方法,以洛克沙肿和硝苯肿酸作为半抗原,对洛克沙肿和硝苯肿酸的硝基进行改造,将硝基还原后改造成氨基,具体方法为:称取13.1g洛克沙肿或硝苯肿酸溶解在100mL浓度为1mol/L的NaOH水溶液中,在冰/水混合物

中不断搅拌,冷却至0℃;加入30.25g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 搅拌,溶液沸腾,颜色由橙色变至浅黄色时,加入12mL浓HCl,继续保持在0℃,直到发泡停止,产物从溶液中沉淀,过滤后收集沉淀用冰水洗涤两次,得到奶油色固体,即为3-氨基-4-羟基苯肿酸粗产物,真空干燥;将6g粗产物溶于25mL H_2O 和2mL浓盐酸的混合物中并搅拌15min后过滤,向滤液中加入25% (w/v) 乙酸钠溶液直至溶液呈刚果红,将溶液在4℃冷却20min,产生沉淀,过滤后收集沉淀并在真空下干燥,得到纯化的3-氨基-4-羟基苯肿酸晶体或4-氨基苯肿酸晶体,即改造后的洛克沙肿半抗原或硝苯肿酸半抗原。

[0008] 一种抗洛克沙肿的单克隆抗体的制备方法为:先通过重氮化法将改造后的3-氨基-4-羟基苯肿酸与载体蛋白BSA进行偶联,合成ROX-BSA;再将合成的ROX-BSA免疫小鼠,并进行细胞融合、亚克隆,体内诱生腹水及单抗的纯化,得到抗ROX单克隆抗体。

[0009] 抗ROX单克隆抗体属于IgG1,K型;效价为 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为1.08ng/mL。

[0010] 一种抗硝苯肿酸的单克隆抗体的制备方法为:先通过重氮化法将改造后的4-氨基苯肿酸与载体蛋白BSA进行偶联,合成NIT-BSA;再将合成的NIT-BSA免疫小鼠,并进行细胞融合、亚克隆,体内诱生腹水及单抗的纯化,得到抗NIT单克隆抗体。

[0011] 抗NIT单克隆抗体属于IgG2b,K型;效价为 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为2.31ng/mL。

[0012] 一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸,包括抗洛克沙肿单克隆抗体,以及抗硝苯肿酸单克隆抗体。

[0013] 一种双联试纸在检测洛克沙肿和硝苯肿酸残留中的应用。

[0014] 一种洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1) 洛克沙肿和硝苯肿酸人工完全抗原的合成

[0016] 通过重氮化法将权利要求1改造后的3-氨基-4-羟基苯肿酸和4-氨基苯肿酸分别与载体蛋白BSA进行偶联,合成ROX-BSA和NIT-BSA;

[0017] (2) 单克隆抗体的制备

[0018] 将合成的ROX-BSA和NIT-BSA分别免疫小鼠,并进行细胞融合、亚克隆,体内诱生腹水及单抗的纯化,得到抗ROX单克隆抗体和抗NIT单克隆抗体;

[0019] (3) 兔抗小鼠IgG的制备

[0020] 以纯化小鼠IgG免疫健康新西兰兔,制备兔抗小鼠IgG;

[0021] (4) 金标抗体的制备

[0022] 以柠檬酸三钠还原氯金酸法制备胶体金,并分别标记步骤(2)制备的抗ROX单克隆抗体和抗NIT单克隆抗体;

[0023] (5) 试纸的研制

[0024] (a) 将ROX-BSA、NIT-BSA和兔抗小鼠IgG分别喷点于硝酸纤维素检测膜中央,形成检测线T1、T2和质控线C印迹,制得检测膜;

[0025] (b) 将金标抗体喷点于玻璃棉,制得结合垫;

[0026] (c) 制备样品垫、吸水垫和支撑板,将检测膜、结合垫、样品垫、吸水垫依次组装在支撑板上。

[0027] 抗ROX单克隆抗体属于IgG1,K型;效价为 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为1.08ng/mL;抗NIT单克隆抗体属于IgG2b,K型;效价为 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为2.31ng/mL。

[0028] 本发明有益效果:

[0029] 1、本发明在抗体制备时,分别采用洛克沙肿(ROX)、硝苯肿酸(NIT)作为半抗原,对其基团进行改造,其中,当对洛克沙肿的羟基进行改造后,发现其免疫小鼠产生的抗体没有抑制,说明羟基是活性位点,不能改造,因此本发明对ROX和NIT的硝基进行改造,将硝基还原后改造成氨基,进而与载体蛋白的氨基进行偶联,研制出洛克沙肿、硝苯肿酸人工抗原,该免疫抗原ROX-BSA、NIT-BSA免疫小鼠后得到的抗体具有较好的效价和抑制,说明其具有更加良好的免疫原性。且获得的两种单抗均具备高特异性,高亲和力和高敏感性的优点,为制备洛克沙肿、硝苯肿酸双联检测试纸奠定基础。

[0030] 2、本发明建立的胶体金免疫层析双联试纸能同时检测洛克沙肿和硝苯肿酸,一次测定即可检出洛克沙肿和硝苯肿酸在动物饲料中含量或可食性动物组织中的残留,可以节省对样品的分析次数,具有更好的经济价值。

[0031] 3、本发明的胶体金免疫层析双联试纸适用的检测样品包括动物饲料、动物肌肉组织,本发明涉及的样品处理方法简单,易操作,样品处理所用的主要有机试剂为乙酸乙酯,对操作者身体健康危害相对较小。

[0032] 4、与现有的高效液相色谱检测技术相比,本发明的胶体金免疫层析双联试纸具有快速、特异、灵敏、准确、高通量,简便、成本低廉等优点。

附图说明

[0033] 以下结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0034] 图1为本发明洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸的结构示意图。

[0035] 图2为本发明双联检测试纸与HPLC法对比检测样品中的ROX和NIT。

具体实施方式

[0036] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0037] 本发明洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸的制备方法包括:(1)洛克沙肿和硝苯肿酸人工完全抗原的合成;(2)单克隆抗体的制备;(3)兔抗小鼠IgG的制备;(4)金标抗体的制备;(5)试纸的研制。

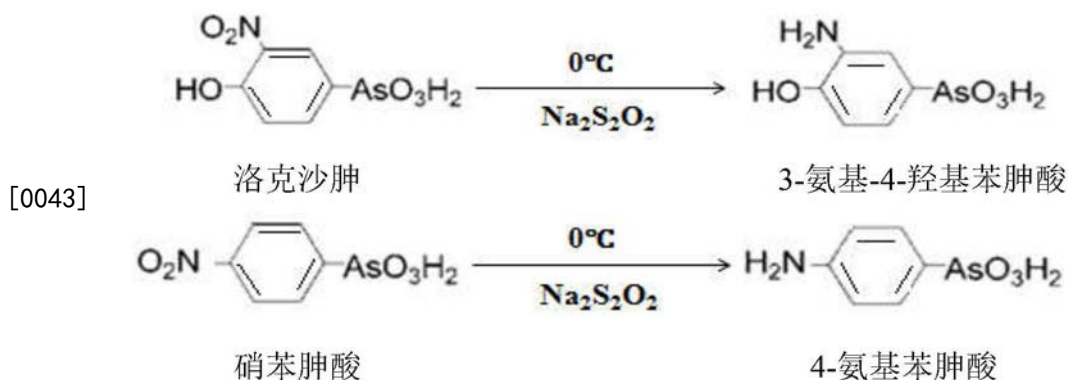
[0038] 实施例1、洛克沙肿和硝苯肿酸人工完全抗原的合成

[0039] 1.1洛克沙肿(ROX)和硝苯肿酸(NIT)半抗原的分子改造

[0040] 称取13.1g洛克沙肿溶解在100mL浓度为1mol/L的NaOH水溶液中,在冰/水混合物中不断搅拌,冷却至0℃;加入30.25g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 搅拌,溶液沸腾,颜色由橙色变至浅黄色时,加入12mL浓HCl,继续保持在0℃,直到发泡停止,产物从溶液中沉淀,过滤后收集沉淀用冰冷水洗两次,得到奶油色固体,即为3-氨基-4-羟基苯肿酸粗产物,真空干燥;将6g粗产物溶于25mL H_2O 和2mL浓盐酸的混合物中并搅拌15min后过滤,向滤液中加入25% (w/v) 乙酸钠溶液直至溶液呈刚果红,将溶液在4℃冷却20min,产生沉淀,过滤后收集沉淀并在真空下干燥,得到纯化的3-氨基-4-羟基苯肿酸晶体。

[0041] 同样的方法对硝苯肿酸进行改造得到4-氨基苯肿酸。

[0042] 反应式如下:



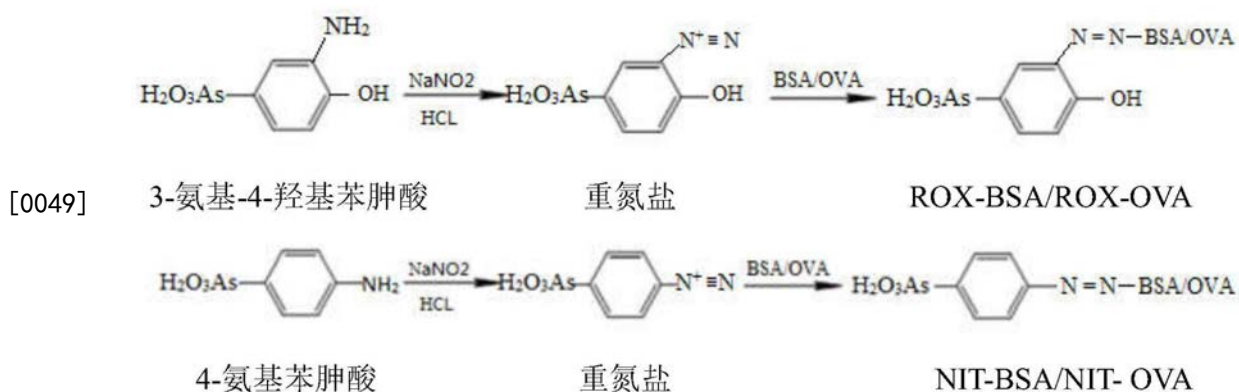
[0044] 1.2洛克沙肿和硝苯胂酸人工完全抗原的合成

[0045] 通过重氮化法将改造后的3-氨基-4-羟基苯胂酸和4-氨基苯胂酸分别与载体蛋白(BSA、OVA)进行偶联,分别合成免疫原ROX-BSA 和NIT-BSA,包被原ROX-OVA和NIT-OVA。

[0046] 称取20mg 3-氨基-4-羟基苯胂酸溶解于1mL 0.1M HCl中,调其pH=1~2,4℃缓慢加入100mg/mL NaNO₂溶液至淀粉碘化钾试纸变黑紫色,冰浴避光搅拌反应45min后将其分为A、B两份。分别取10mg BSA和20mg OVA溶解于10mL的碳酸盐缓冲液,用1M NaOH调整pH=9~10,冰浴中将上述A液和B液分别缓慢滴加到BSA溶液和OVA溶液,并不断调整pH=8~9,4℃反应过夜。反应完毕后,在4℃条件下,用PBS缓冲液透析3d,每天更换透析液3~6次,即得偶联物ROX-BSA和ROX-OVA。离心后取上清冷冻干燥,置-20℃保存。

[0047] 同样的方法制备NIT-BSA和NIT-OVA。

[0048] 反应式如下:



[0050] 实施例2、单克隆抗体的制备

[0051] 2.1动物免疫

[0052] 将实施例1制备的免疫原ROX-BSA分别加入弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂乳化制成弗氏完全佐剂免疫原和弗氏不完全佐剂免疫原(其中ROX-BSA与弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂体积比均为1:1)。通过背部皮下多点注射的方法,用ROX-BSA弗氏完全佐剂免疫原免疫3只6~8周龄的雌性BALB/c小鼠(购自郑州大学医学院动物实验中心),10μg/只;在首次免疫21天和42天后分别用ROX-BSA弗氏不完全佐剂免疫原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫;细胞融合前3~4天,通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的ROX-BSA对BALB/c小鼠进行超强免疫,免疫剂量是20μg/只。最后一次加强免疫后一周,分别对3只小鼠进行剪尾采血,然后通过间接ELISA法和间接竞争ELISA法分别对3只小鼠多抗血清的效价和敏感性进行测定。其中1号鼠的免疫效果最好,其效价可达到1:51200,半数抑制浓度IC₅₀

为0.9ng/mL,因此,下一步选择1号鼠进行融合。

[0053] 同样的方法利用实施例1制备的免疫原NIT-BSA进行动物免疫,经过4次免疫后采用间接ELISA法和间接竞争ELISA法分别对3只小鼠多抗血清的效价和敏感性进行测定。其中3号鼠的免疫效果最好,其效价可达到1:51200,半数抑制浓度 IC_{50} 为1.2ng/mL,因此,下一步选择3号鼠进行融合。

[0054] 2.2细胞融合和亚克隆

[0055] 抗ROX杂交瘤细胞株的建立:对1号小鼠进行超强免疫后第3天,采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用HAT选择培养基进行筛选,分装在铺有饲养细胞的96孔细胞培养板,置37℃、5%CO₂培养箱内培养,10天后,以ROX-OVA作为包被原,通过间接ELISA法对长有杂交瘤细胞的孔进行阳性筛选,再通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,直到获得能稳定分泌抗ROX单克隆抗体的杂交瘤细胞株(命名为5F7)。

[0056] 抗NIT杂交瘤细胞株的建立:同样的方法,选择3号小鼠通过按照上述方法进行细胞融合、亚克隆,最终获得能稳定分泌抗NIT单克隆抗体的杂交瘤细胞株(命名为1D9)。

[0057] 2.3单抗腹水的制备及鉴定

[0058] 选择2只经产的雌性BALB/c小鼠,腹腔内注射500μL灭菌石蜡。一周后,分别向2只小鼠腹腔内注射5F7和1D9杂交瘤细胞株,每只注射量为 2×10^5 个细胞。一周后,待小鼠腹部膨大后分别抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法分别对腹水中两种单抗进行纯化。

[0059] 分别通过间接ELISA法和间接竞争ELISA法对纯化后的两种单抗腹水的效价和敏感性进行测定,结果显示5F7单抗的效价可以达到 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为1.08ng/mL;1D9单抗的效价可以达到 $1:2.048 \times 10^6$, IC_{50} 为2.31ng/mL。亚型鉴定结果显示5F7单抗属于IgG1,K型;1D9单抗属于IgG2b,K型。

[0060] 实施例3、兔抗小鼠IgG的制备

[0061] 以纯化小鼠IgG免疫2.0kg左右健康新西兰兔,首次免疫以弗氏完全佐剂乳化抗原,皮下多点注射50μg/只,每次加强免疫间隔3周,以弗氏不完全佐剂乳化抗原肌肉注射,最后一次加强免疫2周后,以琼脂扩散试验(AGP)测定免疫血清抗体效价高于1:40时,采集高免兔全血,分离血清,以辛酸-硫酸铵法纯化兔抗小鼠IgG。

[0062] 实施例4、金标抗体的制备

[0063] 4.1胶体金的制备

[0064] 取100mL超纯水置于500mL洁净的锥形瓶,加入1mL 1% (w/v) 氯金酸溶液煮沸;在搅拌状态下迅速加入新鲜配制的1mL 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液,煮沸约3min至溶液颜色由黄色变为紫红色,继续煮沸2min;待溶液冷却至室温,补超纯水至100mL,以0.2mol/LK₂CO₃调pH至9.0,4℃避光保存备用。

[0065] 4.2最适标记蛋白浓度测定

[0066] 分别取待标记抗ROX、NIT单抗IgG用20mmol/L硼酸钠溶液(pH 8.0)4℃过夜透析。在微孔板中以25μL超纯水1:2、1:4、1:8……分别倍比稀释待标记ROX、NIT单抗;各孔加入125μL胶体金溶液,室温静置5min;加入1250μL 1mol/L NaCl溶液;各孔颜色随蛋白浓度的降低而由红色变为蓝色。以颜色未变蓝的单抗最高稀释度的蛋白浓度为胶体金最适标记浓度,胶体金标记时,蛋白浓度增加20%。

[0067] 4.3单克隆抗体的胶体金标记

[0068] 取2mL 最适蛋白浓度的待标记单抗IgG,加入10mL胶体金溶液(pH 9.0),迅速混匀,室温作用10min~15min;加入混合液体积10%的含10% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)的20mmol/L硼酸钠溶液,迅速混匀,室温作用10min~15min;4℃、15000g离心30min,小心移去上清;以含1% (w/v) BSA 的20mmol/L硼酸钠溶液重悬沉淀,同上离心,弃上清;重复洗涤1次,以1mL含1% (w/v) BSA的20mmol/L硼酸钠溶液重悬沉淀,4℃保存备用。

[0069] 实施例5、试纸的研制

[0070] 5.1检测膜的制备

[0071] 将硝酸纤维素检测膜置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;用PBS缓冲液分别将NIT-BSA、ROX-BSA人工抗原和兔抗小鼠IgG抗体稀释至1mg/mL,经0.22μm滤膜过滤后,以1μL/cm分别将NIT-BSA、ROX-BSA人工抗原溶液和兔抗小鼠IgG抗体溶液喷点于硝酸纤维素检测膜中央,形成检测线(T1线、T2线)和质控线(C线)印迹;检测线与检测线、检测线与质控线相距0.5cm;将检测膜置42℃干燥箱30min或室温自然干燥后,于4℃干燥密闭保存。

[0072] 5.2结合垫的制备

[0073] 将玻璃棉置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定;取1mL金标抗体加入2mL含2% (w/v) BSA、3% (w/v) 蔗糖、0.6mol/L NaCl、0.2%Tween 20 (v/v) 和0.1% (w/v) 叠氮钠的20mmol/L硼酸钠溶液(pH 8.0)中;以15μL/cm将金标抗体溶液喷点于玻璃棉,置50℃干燥箱干燥30min后,置于塑料袋中,加干燥剂4℃密闭保存备用。

[0074] 5.3样品垫的制备

[0075] 以含0.1mol/L NaCl、0.2%Tween 20 (v/v) 和0.1% (w/v) 叠氮钠的PBS (pH 7.2) 溶液浸泡玻璃棉条;置50℃干燥箱干燥30min后,置于塑料袋中,加干燥剂室温密闭保存备用。

5.4吸水垫的制备

[0076] 将吸水垫置于塑料袋中,加干燥剂室温密闭保存备用。

[0077] 5.5支撑板的制备

[0078] 将双面胶贴于PVC支撑板,制备支撑板。

[0079] 5.6试纸的组装

[0080] 利用LM5000试纸装配仪或手工将上述材料装配成试纸板。先将检测膜粘贴于支撑板中央,然后将分别含有抗ROX金标抗体和抗NIT金标抗体的结合垫和样品垫依次粘贴于检测膜的样品端,各层间重叠1mm~2mm,再将吸水垫粘贴于检测膜的另一端,与检测膜重叠1mm~2mm(如图1)。

[0081] 检测原理:

[0082] 洛克沙肿和硝苯肿酸双联检测试纸应用洛克沙肿和硝苯肿酸两种单克隆抗体,根据现代免疫学技术和层析技术设计组装,待测样品在层析过程中,样品中的洛克沙肿和硝苯肿酸分别与硝酸纤维素检测膜上的2条检测线(T1线和T2线)上的洛克沙肿-蛋白偶联物和硝苯肿酸-蛋白偶联物竞争各自的金标特异性单克隆抗体。以试纸上T1线和T2线的颜色变化与质控线(C线)比较判定样品中的洛克沙肿和硝苯肿酸含量。

[0083] 实施例6、检测方法

[0084] 4.1样品的预处理

[0085] (1)猪尿的预处理

[0086] 取待测猪尿5mL,3500rpm离心10min,取上清供检测备用。

[0087] (2) 鸡、猪组织样品的预处理

[0088] 将待检组织样品匀浆后,取5g匀浆组织加入10mL的乙酸乙酯,涡旋仪上涡旋振荡10min,3500rpm离心10min,取上清,用氮气吹干。最后用5mL PBS缓冲液(0.01M pH7.4)溶解残留物。

[0089] (3) 鸡、猪饲料样品的预处理

[0090] 将待检饲料样品研磨成粉末后,取5g饲料粉末加入10mL的乙酸乙酯,涡旋仪上涡旋振荡10min,3500rpm离心10min,取上清,用氮气吹干。最后用5mL PBS缓冲液(0.01M pH7.4)溶解残留物。

[0091] (4) 土壤样品的预处理

[0092] 采集养殖场土壤样品,自然风干后压碎,捡出石子及动植物残渣,研碎后100目滤网将其筛滤,称取筛滤后的土壤5g加入10mL的乙酸乙酯,涡旋仪上涡旋振荡10min,3500rpm离心10min,取上清,用氮气吹干。最后用5mL PBS缓冲液(0.01M pH7.4)溶解残留物。

[0093] 4.2检测

[0094] 取待检样品100μL加入微孔板中,将胶体金免疫层析双联试纸样品端浸入待检样品溶液中10s~20s;取出试纸水平放置5min~10min观察结果。

[0095] 4.3结果判定

[0096] 如图1所示,试纸显现三条红棕色条带(T1、T2检测线和C质控线)为阴性,表示待检测组织中ROX阴性,NIT阴性(ROX-/NIT-);

[0097] 仅显现一条红棕色条带(C质控线)为阳性,表示待检样品中同时含有ROX和NIT残留(ROX+/NIT+);

[0098] 试纸显现两条红棕色条带(T2检测线和C质控线),表示待检样品中ROX阳性,NIT阴性(ROX+/NIT-);

[0099] 试纸显现两条红棕色条带(T1检测线和C质控线),表示待检样品中ROX阴性,NIT阳性(ROX-/NIT+);

[0100] 试纸未显现任何条带表明检测操作不当或试纸失效,需另取检测试纸重新检测。

[0101] 仅肉眼观察即可实现ROX及NIT的半定量检测,借助BioDot-TSR3000读条仪扫描试纸T线的灰度既可以实现定量检测。

[0102] 实施例7、双联检测试纸性能的测试

[0103] 1、双联检测试纸特异性的鉴定

[0104] 选择有机肿类添加剂洛克沙肿、硝苯肿酸、卡巴肿、阿散酸、苯肿酸标准品,用PBS将这五种标品分别稀释成10ng/mL的溶液,按照上述检测方法进行特异性鉴定。鉴定结果显示双联试纸只对洛克沙肿和硝苯肿酸特异性反应。

[0105] 2、双联检测试纸灵敏度的鉴定

[0106] 用PBS将ROX、NIT标准品分别稀释到浓度为0、1、2、3、4、5ng/mL,制备同时含ROX/NIT 0/0、0/1、1/2、2/3、3/4、4/5ng/mL的溶液,然后用双联试纸检测,每个样品重复测定3次,10min内读取结果,观察能使T1线消失的ROX的最小浓度,及使T2线消失的NIT的最小浓度为试纸的检测限,即灵敏度。结果显示双联试纸对ROX的检测限为2ng/mL,对NIT的检测限为3ng/mL。

[0107] 3、双联检测试纸稳定性检测

[0108] 由于试纸稳定性较好,常规情况下可储存1年以上,为了缩短试纸保质期的测定时间,本试验采用加速稳定试验来评价双联检测试纸的稳定性,选择45℃条件下保存试纸,试验基于阿伦尼乌斯公式推算出不同温度与加速试验天数的关系,45℃下保存37.5d相当于室温25℃下保存1年。所以本试验取同一批试纸于45℃条件下避光保存,分别在第0、10、20、30、40、50d取出试纸,用试纸检测分别检测50份阴性样品及50份含ROX 2ng/mL及NIT3ng/mL的阳性样品,观察试纸阴性样品T线显色情况及试纸出现的假阴率及假阳性率,从而判定试纸的保质期。从结果可以看出,试纸在45℃条件下40d内没有观察到假阳性及假阴性,T线显色正常,而45℃条件下保存到第50d后试纸显色变弱,说明试纸的稳定性变差,所以试纸对应的常温(25℃左右)下保质期应该定为1年,但应注意保存条件需要干燥避光。

[0109] 4、双联检测试纸检测天然样品

[0110] 取经HPLC检测过的10份猪尿样品、10份鸡组织样品、10份猪组织样品、10份鸡饲料样品、10份猪饲料样品、10份土壤样品(检测靶标为ROX和NIT,且附有HPLC检测结果),同时用ROX和NIT双联试纸检测样品,且用试纸扫描仪扫描灰度,计算样品中ROX和NIT的含量,每个样品重复测定3次求平均值。用每份样品中HPLC法检测的浓度为横坐标,以试纸检测的浓度为纵坐标绘制散点图,生成回归曲线,以回归曲线的 R^2 来评价两种检测方法得到的检测结果的相关性,从而评价试纸是否可以用于检测样品中ROX和NIT的残留检测。结果显示试纸检测的60份样品中20份样品呈现ROX阳性,29份样品呈现NIT阳性。根据HPLC结果绘制散点图(图2)。在检测样品中ROX和NIT含量的HPLC法与试纸法检测结果的 R^2 分别为0.9742和0.9554,均大于0.9000,说明两种方法检测的结果的相关性较好,其对应的回归线斜率分别为0.9303及0.9312,结果均小于1,说明试纸检测方法所测得的结果要比HPLC稍微偏低。综上所述,该双联检测试纸可以用于动物饲料、可食性动物组织或土壤样品中ROX和NIT残留的快速检测,且结果准确可靠。

[0111] 以上所述仅为本发明最佳的实施例,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

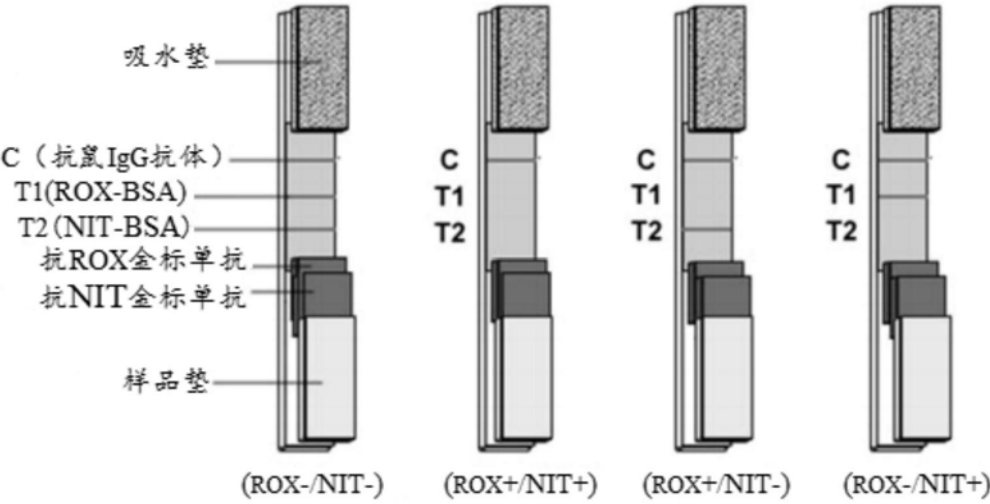


图1

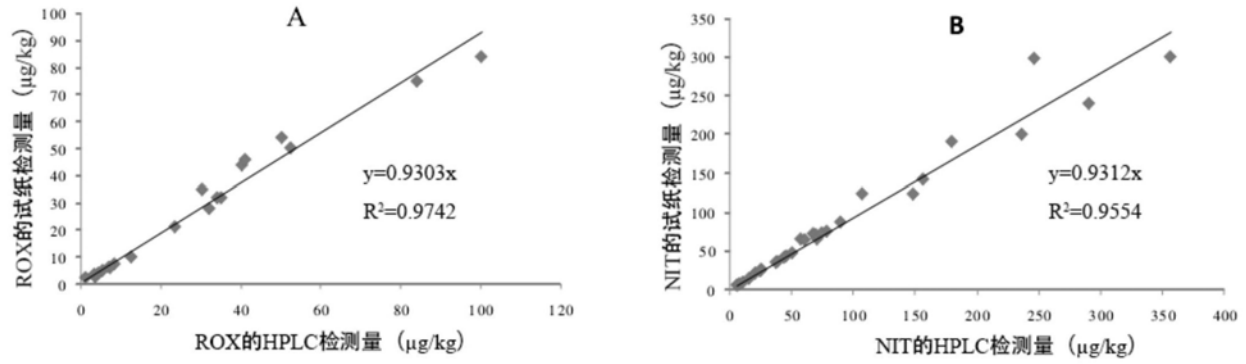


图2