



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107991487 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201711220850.2

(22)申请日 2017.11.29

(71)申请人 洛阳现代生物技术研究有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛龙区科技园
开元大道西S8号

(72)发明人 李秀梅 杨志 耿玉静 张小飞
杨二霞 姬应宾

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 张随

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

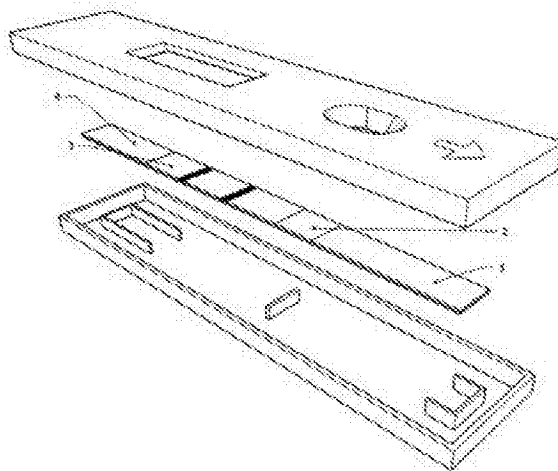
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法,属于免疫学检测领域,试纸卡包括卡壳和试纸条,试纸条包括底板及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫;检测垫为设有质控线C、检测线T的硝酸纤维素膜,质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体,检测线T包被恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物;结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的恩诺沙星单克隆抗体的玻璃纤维素膜;样品垫是经样品处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜;底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸。本发明制备的试纸卡稳定性好、灵敏度高、特异性强,可检测出16种喹诺酮类抗生素,并可通过荧光信号对恩诺沙星达到快速定量和批量检测的目的。



1. 一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤一、检测垫的制备:制备浓度为0.8mg/mL的羊抗鼠单克隆抗体包被液,浓度为0.4 mg/mL的恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物包被液,将两种包被液各自单独吸至划膜机管线中,均按照0.8 μ L/cm在硝酸纤维素膜上依次划出质控线C和检测线T,其中,羊抗鼠单克隆抗体包被液划出质控线C,恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物包被液划出检测线T,将经划线的硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中干燥3-4 h,制得检测垫;

步骤二、结合垫的制备:将荧光微球分散液置于离心管中,加入MES缓冲液,在超声条件下混匀,离心弃上清收集微球沉淀,重复此步骤以清洗微球,将微球沉淀溶解于MES缓冲液中,混匀,加入EDC溶液,22-25 $^{\circ}$ C避光活化,离心弃上清,加MES缓冲液,超声打散微球,离心弃上清,加入硼酸缓冲液,超声打散,加入恩诺沙星单克隆抗体,避光反应,加入甘氨酸溶液,避光反应30 min,再加入BSA溶液,避光反应30 min,完成封闭,离心复溶,形成荧光微球-抗体复合物溶液,将荧光微球-抗体复合物溶液喷至玻璃纤维素膜上,干燥,制得结合垫;

步骤三、样品垫的制备:将玻璃纤维素膜平铺放入配置好的样品垫处理液中,浸泡0.5 h,放入37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,干燥8-10 h,制得样品垫,所述样品垫处理液为pH 7.4的PBS,其中含有的成分及其浓度分别为:质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.5%的PVP-K30,质量分数为0.5%的PEG-20000,质量分数为0.1%的PEG-6000,质量分数为0.3%的干酪素,体积分数为0.5%的Tween 20,质量分数为0.1%的S9,质量分数为0.1%的S17和质量分数为0.1%的S21;

步骤四、试纸卡的组装:以PVC板为底板,将样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫依次搭接粘贴在底板上,每个相邻处搭接时有1-2 mm重叠,并使检测垫上的检测线T靠近样品垫一侧、质控线C靠近吸水垫一侧,用切条机将贴好的PVC板切成条状,形成试纸条,将试纸条与卡壳组合,形成试纸卡,密封保存。

2. 如权利要求1所述的一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于:步骤二所述荧光微球的粒径为200 nm。

3. 如权利要求1所述的一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于:步骤二所述荧光微球-抗体复合物溶液中,恩诺沙星单克隆抗体的浓度为3 μ g/mL。

4. 如权利要求1-3任意一种所述的方法制备的检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡,其特征在于:试纸卡包括卡壳和设在卡壳内的试纸条,试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫;所述检测垫为设有质控线C、检测线T的硝酸纤维素膜,质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体,检测线T包被恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物;所述结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的恩诺沙星单克隆抗体的玻璃纤维素膜;所述底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸。

5. 如权利要求4所述的一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡,其特征在于:所述卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座,卡座内设有固定试纸条的卡槽,卡盖上对应于检测垫的区域设有视窗,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔。

6. 利用如权利要求5所述的荧光微球免疫试纸卡检测喹诺酮类抗生素的方法,其特征

在于:具体操作如下:

样品处理:称取经均质的固态样品置于离心管中,加入70%的乙酸乙酯溶液,振荡器剧烈震荡至少5 min,离心取上清,用氮吹仪吹干,形成凝结物,加入样品稀释液将凝结物溶解并稀释,得样品检测液;或将液态样品直接经样品稀释液稀释,得样品检测液;

测定:将样品检测液滴加到试纸卡的加样孔内,反应5 min,将试纸卡插入便携式荧光免疫分析仪中,读取T/C值,根据浓度标准曲线,计算得到对应样品中所检喹诺酮类抗生素的浓度。

7.如权利要求6所述的利用荧光微球免疫试纸卡检测喹诺酮类抗生素的方法,其特征在于:所述样品稀释液为浓度0.02 mol/L的PBS溶液,其中含有体积分数为0.5%的甲醇。

一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,主要涉及一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法。

背景技术

[0002] 喹诺酮类抗生素是一类人畜通用的药物,它是以细菌的DNA超螺旋酶为靶,妨碍此酶发挥超螺旋作用,造成细菌DNA的不可逆损害,使细菌细胞不再分裂。因其具有广谱抗菌性、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性和毒副作用小等特点,被广泛应用于畜牧、水产等养殖业的动物疾病预防和治疗中。随着动物养殖规模的不断扩大,养殖过程中盲目、过量使用抗生素导致动物源性食品中残留喹诺酮类药物,人食用后将对该药的严重抗药性,时刻威胁着人类健康。

[0003] 目前有关喹诺酮类抗生素的检测方法是高效液相色谱法,此方法虽然灵敏度高、稳定,但因成本高、操作繁琐、检测周期长,仅适用于检测机构而无法应用于基层单位。另外荧光光谱、毛细管电泳等方法也有报道应用于检测喹诺酮类抗生素,但灵敏度不如免疫学检测方法。以简便快捷为优势的免疫检测技术是市场上应用最广泛的,其中,将荧光微球作为示踪物的免疫标记技术是本领域当前的研究热点。荧光微球是指荧光物质经过包埋、共价键连接等方式引入有机或无机纳米粒子中,纳米材料的包裹使其具有很好的稳定性。与应用广泛的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒比较,荧光微球免疫层析技术无需配备酶标仪,操作简便,更加快捷。相比同类型的胶体金免疫层析技术,包埋大量荧光分子而使其具有更高的灵敏度;同时荧光信号通过荧光分析仪器检测能达到快速定量的效果。但是,如何利用荧光微球免疫层析技术检测或制备检测产品检测喹诺酮类抗生素残留至今并无文献明确记载,利用一种检测产品同时检测多种喹诺酮抗生素更是空白。

发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明的目的在于提供一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法。该试剂盒能同时检测到16种喹诺酮类抗生素,且灵敏性好、特异性高、稳定性强,能不依赖实验室仪器和条件直接在户外或基层快速鉴定。

[0005] 一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、检测垫的制备:制备浓度为0.8mg/mL的羊抗鼠单克隆抗体包被液,浓度为0.4mg/mL的恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物包被液,将两种包被液各自单独吸至划膜机管线中,均按照0.8 μ L/cm在硝酸纤维素膜上依次划出质控线C和检测线T,其中,羊抗鼠单克隆抗体包被液划出质控线C,恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物包被液划出检测线T,将经划线的硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中干燥3-4h,制得检测垫。

[0006] 步骤二、结合垫的制备:将荧光微球分散液置于离心管中,加入MES缓冲液,在超声条件下混匀,离心弃上清收集微球沉淀,重复此步骤以清洗微球,将微球沉淀溶解于MES缓

冲液中,混匀,加入EDC溶液,22-25℃避光活化,离心弃上清,加MES缓冲液,超声打散微球,离心弃上清,加入硼酸缓冲液,超声打散,加入恩诺沙星单克隆抗体,避光反应,加入甘氨酸溶液,避光反应30min,再加入BSA溶液,避光反应30min,完成封闭,离心复溶,形成荧光微球-抗体复合物溶液,将荧光微球-抗体复合物溶液喷至玻璃纤维素膜上,干燥,制得结合垫。

[0007] 步骤三、样品垫的制备:将玻璃纤维素膜平铺放入配置好的样品垫处理液中,浸泡0.5h,放入37℃鼓风干燥箱中,干燥8-10h,制得样品垫,所述样品垫处理液为pH 7.4的PBS,其中含有的成分及其浓度分别为:质量分数为0.5%的蔗糖,质量分数为0.5%的PVP-K30,质量分数为0.5%的PEG-20000,质量分数为0.1%的PEG-6000,质量分数为0.3%的干酪素,体积分数为0.5%的Tween 20,质量分数为0.1%的S9,质量分数为0.1%的S17和质量分数为0.1%的S21。

[0008] 步骤四、试纸卡的组装:以PVC板为底板,将样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫依次搭接粘贴在底板上,每个相邻处搭接时有1-2mm重叠,并使检测垫上的检测线T靠近样品垫一侧、质控线C靠近吸水垫一侧,用切条机将贴好的PVC板切成条状,形成试纸条,将试纸条与卡壳组合,形成试纸卡,密封保存。

[0009] 进一步的,步骤二所述荧光微球的粒径为200nm。

[0010] 进一步的,步骤二所述荧光微球-抗体复合物溶液中,恩诺沙星单克隆抗体的浓度为3 μ g/mL。

[0011] 本发明还保护一种采用上述方法制备的检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡,所述试纸卡包括卡壳和设在卡壳内的试纸条,试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫;所述检测垫为设有质控线C、检测线T的硝酸纤维素膜,质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体,检测线T包被恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物;所述结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的恩诺沙星单克隆抗体的玻璃纤维素膜;所述底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸。

[0012] 进一步的,所述卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座,卡座内设有固定试纸条的卡槽,卡盖上对应于检测垫的区域设有视窗,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔。

[0013] 本发明进一步保护利用上述荧光微球免疫试纸卡检测喹诺酮类抗生素的方法,具体操作如下:

样品处理:称取经均质的固态样品置于离心管中,加入70%的乙酸乙酯溶液,振荡器剧烈震荡至少5min,离心取上清,用氮吹仪吹干,形成凝结物,加入样品稀释液将凝结物溶解并稀释,得样品检测液;或将液态样品直接经样品稀释液稀释,得样品检测液;

测定:将样品检测液滴加到试纸卡的加样孔内,反应5min,将试纸卡插入便携式荧光免疫分析仪中,读取T/C值,根据浓度标准曲线,计算得到对应样品中所检喹诺酮类抗生素的浓度。

[0014] 进一步的,所述样品稀释液为浓度0.02mol/L的PBS溶液,其中含有体积分数为0.5%的甲醇。

[0015] 本发明所述试纸卡检测喹诺酮类抗生素的原理是:将含有待测抗生素的样品滴加在加样区,样品中的小分子抗生素与结合垫中的荧光微球-恩诺沙星单克隆抗体复合物特异性结合并通过毛细作用向吸水垫一侧层析,当到达固定着抗原的检测线后,检测线上的

抗原与样品中的抗生素竞争抗体上的结合位点,而多余的荧光微球标记物继续向前层析,与固定在质控线的羊抗鼠单抗结合。反应结束后,用紫外光源对检测垫扫描,检测线T和质控线C的荧光微球发出高强度荧光。另外荧光微球中稀土元素的荧光衰变时间相比普通荧光团长,是其103~106倍。通过延缓测量时间,待样品基质中自然发光的短寿命荧光全部衰变后,再测量稀土元素的特异性荧光,达到完全消除本底干扰的效果,实现高信噪比。

[0016] 本发明的有益效果:

1、本发明所述试纸卡是基于荧光微球制备的,利用抗生素分子与荧光微球标记的抗体复合物结合,进而检测线上的抗原与喹诺酮类抗生素分子竞争抗体上的结合位点,荧光微球发出高强度荧光,通过荧光信号的强弱和标准曲线实现对喹诺酮类抗生素的定量检测,相较于ELISA试剂盒、胶体金免疫试纸条或其它普通荧光免疫层析技术,本发明所述试纸卡的灵敏性要高出2-3个数量级,其次,带有羧基团的荧光微球与抗体以共价键相连,稳定性更高。另外,本发明所述试纸卡除具有一般试纸条检测方便等的优点外,其可检测16种喹诺酮类抗生素,相比于ELISA试剂盒检测时间,全程仅需10min,大大提高了检测效率、节省成本,非常适用于现场快速筛查,为喹诺酮类抗生素残留的检测提供了一种切实有效的技术手段。

[0017] 2、本发明所述在试纸卡的制备过程中,各部件的制备方法决定了其的检测灵敏性或稳定性等特性,其中,在结合垫制备中,EDC处理以活化微球表面羧基基团,促进其与抗体的结合,再相继加入甘氨酸和BSA进行二次封闭,能够避免非特异性反应对检测结果的干扰,在样品垫制备中,样品垫处理液中包含多种成分,不同浓度的成分之间协同作用,使浸泡处理后的样品垫在保证流动性的同时,均一性和稳定性均较好,提高免疫效果,为准确、灵敏地检测样品中喹诺酮类抗生素的含量奠定了基础。

附图说明

[0018] 图1为本发明试纸条及卡壳结构示意图,其中:1、样品垫,2、结合垫,3、检测垫,4、吸水垫;

图2为恩诺沙星标准曲线图。

具体实施方式

[0019] 下面通过具体的实施例对本发明做进一步的解释说明。

[0020] 实施例一、试纸条制备

制备过程包括:荧光微球-抗体复合物的制备、结合垫的制备、样品垫制备、检测垫的制备以及试纸条的组装。

[0021] 1、荧光微球-抗体复合物的制备:

(1) 清洗:取50 μ L荧光微球至1.5mL离心管中,加入1mL 0.01M MES缓冲液中,震荡混匀,15000r/min离心15min,弃上清,加入1mL 0.01M MES缓冲液,超声打散微球,重复此步骤三次,已达到清洗微球的目的,

(2) 活化:向清洗后的1mL微球液中,加入250 μ L EDC溶液,避光活化2h,15000r/min离心15min,弃上清,加入1mL 0.01M MES缓冲液,超声打散微球,15000r/min离心15min,弃上清,

(3) 标记:加入1mL 0.05M硼酸盐缓冲液,超声打散,加入10 μ g恩诺沙星单克隆抗体,混

匀,避光反应2h,

(4) 封闭1:加入100 μ L1M甘氨酸溶液,避光反应30min,

(5) 封闭2:加入100 μ L10%BSA溶液,避光反应30min,

(6) 离心复溶:15000r/min离心15min,弃上清,加入100 μ L稀释液,超声打散微球,制备成荧光微球-抗体复合物溶液。

[0022] 其中,所用荧光微球的粒径为200nm;吸收波长为365nm,检测波长是610nm。

[0023] 2、结合垫的制备:

将上述制备的荧光微球-抗体复合物溶液按照3 μ L/cm喷至玻璃纤维素膜上,37 $^{\circ}$ C干燥3-4h即为所述结合垫,干燥后的结合垫放入干燥器中备用。

[0024] 3、样品垫制备:

(1) 配置pH 7.4的PBS:称取8g NaCl,5.8g Na₂HPO₄,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄溶于1L纯化水中,调节pH至7.4,

(2) 配置样品垫处理液:准确称取5g蔗糖,5g PVP-K30,5g PEG-20000,1g PEG-6000,3g 干酪素,1g S9,1g S17,1g S21,5mL Tween-20,至1L pH 7.4的PBS中,磁力搅拌器上混匀,得样品垫处理液,备用。其中,所述S9为Tetronic 1307是一种两性表面活性剂,所述S17为Ohodasurf ON-870,是一种乳化剂,所述S21为BR1J 35,是一种非离子表面活性剂。S9、S17和S21添加至所述样品垫处理液后,较一般处理方法的免疫效果好,

(3) 样品垫的处理:将玻璃纤维素膜装于自封袋中,按80mL/张加入上述制备的样品垫处理液,浸泡30min,

(4) 样品垫的干燥:将充分浸泡过的玻璃纤维素膜放入37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,干燥8-10h,得样品垫,将样品垫放入干燥器中待用。

[0025] 4、检测垫的制备:

(1) 质控线包被液的制备:将羊抗鼠单抗用包被工作液稀释成0.8mg/mL,

(2) 检测线包被液的制备:将恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物用包被工作液稀释至0.4mg/mL,

(3) 包被膜:将上述两种包被液分别倒吸至划膜机管线中,均按照0.8 μ L/cm、依次划出质控线C、检测线T,两条线之间的间距为4-5mm,然后放入37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,干燥3-4h,即制备成检测垫,放入干燥器中待用。所述检测垫是样品中有效成分与固定在膜上的活性物质发生特异性结合的区域。

[0026] 5、试纸条的组装:

以不吸水的PVC胶粘板为底板,将样品垫、样品结合垫、检测垫和吸水垫依次搭接粘贴在底板上,各组分在相邻处有1-2mm重叠,用切条机将贴好的PVC板切成3mm宽的试纸条,通过卡座内的卡槽与卡座组合,卡座与卡盖扣合形成试纸卡。其中,卡盖上对应检测垫的区域设有视窗,检测垫上的T线靠近样品垫一侧、对应的卡盖上的视窗侧边上有“T”标志,质控线C线靠近吸水垫一侧,对应的卡盖上的视窗侧边上有“C”标志,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔,加样孔侧边上有“S”标识,如图1所示。所述吸水垫为吸水滤纸,吸水滤纸裁切成长30cm,宽1.9-2.1cm。所述吸水垫具有虹吸效果。

[0027] 所述卡盖的规格为70mm*20mm*5mm,卡盖中心的视窗大小为16mm*3mm。

[0028] 实施例二、标准曲线的绘制

1、标准品的配置：

用0.1M pH 7.4的PBS将恩诺沙星标准品梯度稀释成5ppb,10ppb,20ppb,40ppb,80ppb,

2、读数：

分别取50 μ L上述标准品点卡,反应5min后,在便携式荧光免疫分析仪对应卡槽进行读数,读数结果见下表1所示：

标品浓度 (ppb)	0	5	10	20	40	80
T/C 值 恩诺沙星	2.044	1.210	0.502	0.253	0.061	0.005

3、计算方法的验证：

(1) 四参数法,将恩诺沙星曲线相应参数输入便携式荧光免疫分析仪后,在标准曲线范围内选择5ppb和20ppb配置标准品,点卡,反应5min,读得两个浓度分别是2.454ppb和0.885ppb,

(2) 分段线性,将恩诺沙星标准曲线相应参数输入便携式荧光免疫分析仪后,在标准曲线范围内选择5ppb和20ppb配置标准品,点卡,反应5min,读得两个浓度分别是4.891ppb和19.990ppb,

通过两组数据对比,可得出的结论是,样品浓度的计算方法应该选择分段线性。

[0029] (4) 标准曲线的验证及绘制:将步骤2中读数值输入回归/拟合计算程序,绘制曲线图,如图2所示。

[0030] 实施例三、以检测肉制品中喹诺酮类抗生素为例,比较荧光微球试纸条和胶体金试纸条的灵敏度

1、用均质器均质新鲜猪肉样品；

2、称取两份 5.0 ± 0.05 g研碎的样品至两个50mL聚苯乙烯离心管中,分别加入25mL 70%乙酸乙酯,其中管2加入10ng恩诺沙星,用振荡器剧烈振荡5min;

3、将振荡均匀后的样品置于离心机,6000r/min离心5min;

4、取1mL离心后上清液用氮吹仪吹干,吹干后准确加入1mL样品稀释液将凝结物充分溶解即得样品提取液;所述样品稀释液为pH7.4、0.05mol/L的PBS;

5、用样品稀释液按1:9比例稀释(例:100 μ L样品提取液+900 μ L样品稀释液);

6、分别取管1中稀释后液体50 μ L和管2中稀释后液体50 μ L分别滴加卡1和卡2,计时反应5min;

7、将卡1插入便携式荧光免疫分析仪卡槽中读数,显示浓度值是0,将卡2插入便携式荧光免疫分析仪卡槽中读数,显示恩诺沙星浓度值是1.964ng/mL;

8、与胶体金检测卡的比较:将管1、管2中处理好的稀释液分别加入喹诺酮类抗生素胶体金检测卡1和检测卡2,反应10min。结果:胶体金卡1出线两条线,呈现阴性结果,胶体金卡2出现两条线,呈现阴性结果。

[0031] 上述实验结果进一步验证,荧光微球试纸条的敏感性较胶体金试纸条高。

[0032] 实施例四、比较荧光微球标记恩诺沙星单克隆抗体复合物与胶体金标记恩诺沙星单克隆抗体复合物的稳定性

1、将制备好的胶体金-恩诺沙星单克隆抗体复合物的结合垫与荧光微球-恩诺沙星单克隆抗体复合物的结合垫均放置37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中,

2、在第3天,5天,1周,2周,4周,8周,12周,20周,36周,48周时分别对阴性样本和阳性样本进行检测,观察其稳定性,

3、检验结果如下表2所示:

检测时间	胶体金-恩诺沙星抗体复合物		荧光微球-恩诺沙星抗体复合物	
	阴性	阳性 (50ppb)	阴性	阳性 (50ppb)
3天	正常	消线	0	49.5 ppb
5天	正常	消线	0	49.3 ppb
1周	正常	消线	0	49 ppb
2周	正常	消线	0	49.5 ppb
4周	正常	消线	0	49.6 ppb
8周	正常	消线	0	49.6 ppb
12周	检测线变弱	消线	0	49.5 ppb
20周	检测线不显色	/	0	49.5 ppb
36周	检测线不显色	/	0.1ppb	50 ppb
48周	检测线不显色	/	0.2ppb	50 ppb

由上表2可得出结论:荧光微球标记抗体复合物的稳定性较胶体金标记抗体复合物的强。

[0033] 实施例五、交叉反应实验

选择诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、氧氟沙星、达氟沙星、洛美沙星、麻保沙星、氟甲喹、恶喹酸、二氟沙星、沙拉沙星、那氟沙星、奥比沙星和洛美沙星15种喹诺酮类药物;选择磺胺嘧啶、氨苄青霉素、链霉素、红霉素、四环素、氯霉素和呋喃西林7种不属于喹诺酮类的抗生素,按照实施例三的试纸条使用方法分别测定交叉反应率。结果显示,以恩诺沙星标准曲线为荧光检测仪内置曲线测定其他15种喹诺酮类药物的交叉反应率均高于50%;另外7种其他类药物均无交叉反应,特异性强。由此可知,本发明制备的荧光微球免疫试纸卡出可对恩诺沙星进行检测外,还可测定出待测样品中诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、氧氟沙星、达氟沙星、洛美沙星、麻保沙星、氟甲喹、恶喹酸、二氟沙星、沙拉沙星、那氟沙星、奥比沙星和洛美沙星15种喹诺酮类抗生素残留。

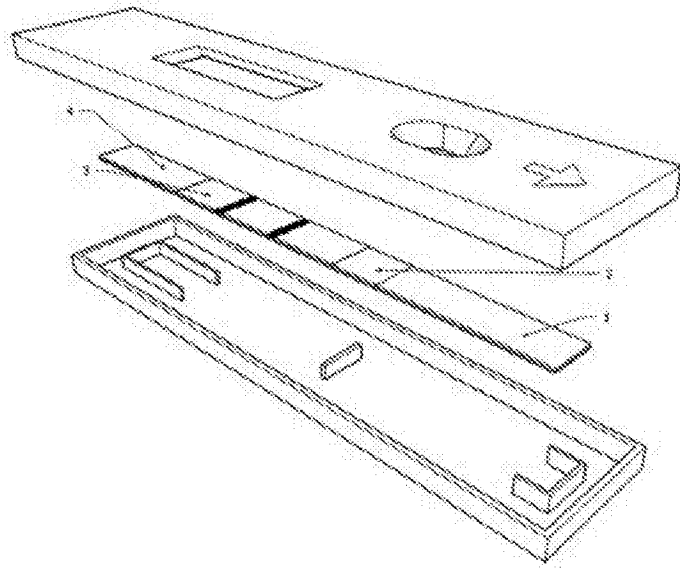


图1

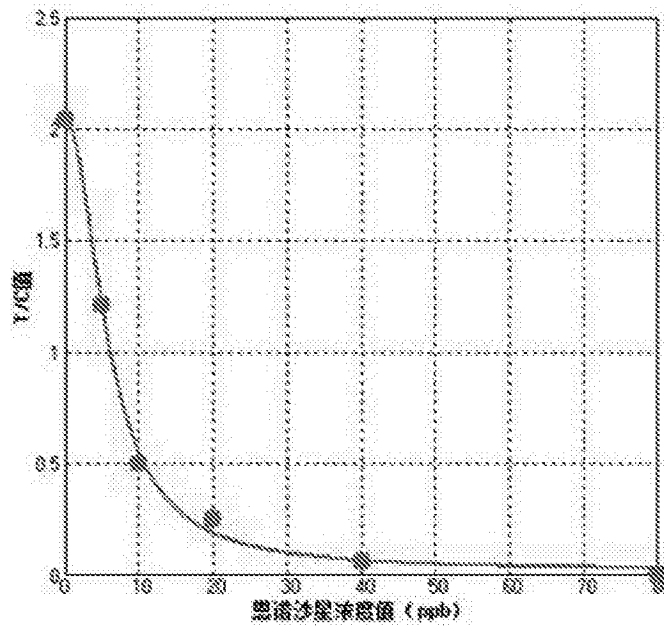


图2

专利名称(译)	一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法		
公开(公告)号	CN107991487A	公开(公告)日	2018-05-04
申请号	CN201711220850.2	申请日	2017-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
[标]发明人	李秀梅 杨志 耿玉静 张小飞 杨二霞 姬应宾		
发明人	李秀梅 杨志 耿玉静 张小飞 杨二霞 姬应宾		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/9446 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/585		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测喹诺酮类抗生素的荧光微球免疫试纸卡、制备及检测方法，属于免疫学检测领域，试纸卡包括卡壳和试纸条，试纸条包括底板及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、结合垫和样品垫；检测垫为设有质控线C、检测线T的硝酸纤维素膜，质控线C包被羊抗鼠单克隆抗体，检测线T包被恩诺沙星-牛血清白蛋白偶联物；结合垫为包埋时间分辨荧光微球标记的恩诺沙星单克隆抗体的玻璃纤维素膜；样品垫是经样品处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜；底板为不吸水的PVC板，吸水垫为吸水滤纸。本发明制备的试纸卡稳定性好、灵敏度高、特异性强，可检测出16种喹诺酮类抗生素，并可通过荧光信号对恩诺沙星达到快速定量和批量检测的目的。

