



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102023210 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 200910092065. 2

C09K 11/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 09. 21

(71) 申请人 北京中德大地食品安全技术开发有
限责任公司

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街甲
8号威地科技大厦 107 室

(72) 发明人 陈雪岚 杨晓慧 熊勇华 赖卫华
魏华 李林

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 33/566 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

C09K 11/06 (2006. 01)

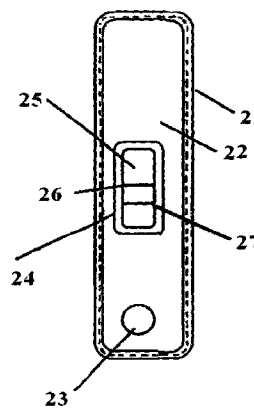
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。其构成依次包括滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球标记的抗体;所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区;所述的检测区喷有恩诺沙星与载体蛋白质的偶联物;所述的质控区喷有抗鼠抗体。本发明以二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子为标记,采用竞争阻断模式的免疫层析技术,实现恩诺沙星快速免疫分析。在检测过程中,采用荧光微球最佳激发光源进行激发,发射出的荧光通过滤光片装置后用肉眼观察检测线是否有荧光物质,本发明具有灵敏度高、检测快速、操作方便、经济实用特点。



1. 一种检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：用于检测恩诺沙星的试纸条。所述试纸条包括：在底板上依次搭接地粘贴的滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸；所述的玻璃纤维膜上喷涂有抗恩诺沙星抗体与荧光微球偶联物；所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区，其硝酸纤维素膜上的检测区喷涂有载体蛋白质与恩诺沙星的偶联抗原；所述试纸条的质控区固定有抗鼠抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述荧光微球是直径为 $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ 的用二氧化硅包裹荧光物质的微球，其表面连接有活性基团，或与链霉素亲和素偶联；所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺和物及量子点。

3. 根据权利要求2所述的检测的恩诺沙星荧光微球免疫层析检测卡，其特征在于：所述的活性基团为 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{SH}$ ；所述的荧光物质为菲咯啉联钋有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、3,6-二乙氧基荧烷、3-二乙基氨基-7-(2'-氯苯胺基)荧烷、洛丹明B、洛丹明110、洛丹明123和洛丹明10、1,8-萘二酰亚胺4-位被烷氧基或芳氧基取代的荧光物质、1,8-萘二酰亚胺中引入磺酸基、羧基和季铵盐水溶性基团的荧光染料、1,8-萘酸酐与邻苯二胺缩合所得到的匹苾酮类荧光材料、三氟甲醛香豆素、双荧光团香豆素、1,2,3,3'-四甲基吡啶基团香豆素有机荧光染料或多种荧光物质的掺和物及量子点。

4. 根据权利要求1所述的检测恩诺沙星荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，免疫层析试纸条制备步骤包括：

(1) 荧光微球垫的制备：用市售的荧光微球标记抗恩诺沙星抗体，并将其喷涂在玻璃纤维膜上得到荧光微球垫；

(2) 检测区和质控区的制备：将载体蛋白质与恩诺沙星的偶联抗原喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围，制成检测区；将抗鼠抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围，制成质控区；

(3) 组装和剪切：在粘性底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球标记抗体的玻璃纤维膜、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水纸，并剪切成所需的宽度即成为免疫层析试纸条；

按照上述步骤制得检测恩诺沙星试纸条。

5. 根据权利要求4所述的检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，所述荧光微球标记抗体的制备方法如下：

取荧光微球在 $1000 \times g$ 离心 $10 \sim 15\text{min}$ ，离心后收集沉淀，用 0.01M pH 4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $\text{OD}_{450} = 0.2$ ，然后分别加入 $20 \sim 100\text{mg/ml}$ 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 $100 \mu\text{l}$ ， $2 \sim 20\text{mg/ml}$ 氮羟基琥珀酰亚胺 $100 \mu\text{l}$ ，再加入 0.01M pH 4.8的硼酸盐缓冲液，振荡混匀，室温孵育 $10 \sim 30\text{min}$ 后， $1000 \times g$ 离心 $5 \sim 15\text{min}$ ，沉淀用 0.01M pH 7~8的硼酸盐缓冲液重悬，并调节微球浓度为 OD_{450} 在 $0.2 \sim 1.0$ ，在 0.1ml 的该荧光微球中加入 $1 \sim 10 \mu\text{g}$ 抗恩诺沙星抗体，充分混匀后，室温搅拌反应 $1 \sim 4\text{h}$ ，超纯水离心洗涤 $2 \sim 5$ 次，用 0.01M pH 7.2磷酸盐缓冲液复溶沉淀至起始体积后，用BIODOT操作平台喷涂至玻璃纤维膜上， 25°C 真空干燥 $1 \sim 2\text{h}$ ，置于干燥环境中备用。

6. 根据权利要求4所述的检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特

征在于，所述硝酸纤维素膜上检测区和质控区的制备方法如下：

用 0.01M pH 7.4 磷酸盐缓冲液分别调节载体蛋白质和恩诺沙星的偶联抗原和抗鼠抗体的浓度为 0.5 ~ 8.0mg/ml，喷膜量为 0.7 μ l/cm，检测区喷涂载体蛋白质和恩诺沙星的偶联抗原，质控区喷涂抗鼠抗体，两区相隔 5mm，质控区距离硝酸纤维素膜一端 2mm，37°C 烘干过夜后，在室温干燥环境下保存备用。

7. 根据权利要求 4 所述的检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，其特征在于，免疫层析检测卡的制备方法如下：

将试纸条固定在底卡上，试纸条表面用面卡压紧，所述面卡上预留加样孔和观察窗，加样孔的位置与试纸条的样本垫对应，观察窗的位置与试纸条的硝酸纤维素膜对应，所述底卡和面卡为塑料卡。

8. 用权利要求 1、2 或 3 所述的检测卡定性检测恩诺沙星的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 在免疫层析检测卡的加样孔中加入待检样本，反应 3 ~ 20min 后，将检测卡放入简易荧光分析仪窗口检测；

(2) 荧光微球在激发光源下，发出强烈的荧光条带；

(3) 发射的荧光经滤除杂光后，用肉眼观察是否有荧光信号；当样本中不含有被检测物质时，检测区和质控区均出现一条荧光条带，即检测样本为阴性；当样本中含有过量被检测物质时，检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为阳性。

检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域，具体地说是涉及一种利用荧光微球免疫层析技术定性检测恩诺沙星的检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR) 又名乙基环丙沙星，为第一个畜禽专用的氟喹诺酮类药物，1983年由德国拜耳公司首先研发成功，我国于1994年投放市场。因其能抑制细菌 DNA 螺旋酶，抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透力强，已成为兽医临床和水产养殖中最重要的抗感染药物之一，被大量用于治疗、预防疾病和促进生长。该药内服及肌肉注射吸收迅速，且在体内代谢为同样具有抗菌活性的环丙沙星，代谢物生成及消除均缓慢，分布广泛。但人类食用被此药物污染的动物食品后，可导致机体内正常菌群产生耐药性，引起人体中毒或过敏反应，影响体内核酸的合成，具有潜在的致癌性。美国、欧盟以及我国都对恩诺沙星的使用进行了严格控制。美国禁止使用恩诺沙星于畜禽养殖；欧盟法规中明确规定恩诺沙星检测标准为：鱼肉和脂肪部分为 0.1mg/kg，肝、肾部分为 0.2mg/kg。

[0003] 目前，针对恩诺沙星的检测和监控方法包括确证法和筛查法两大类。确证法主要包括高效液相色谱、气相色谱、逆流色谱、离子色谱、离子阱质谱、等离子质谱、液质或气质联用等利用高端设备为辅助手段的方法。以上方法虽然敏感、特异、稳定，但是存在检测时间长，一般条件下检测通量不高，同时需要昂贵的设备支撑，因此确证法大多用于有疑问事件的仲裁；筛查方法一般是指快速检测方法。ELISA(酶联免疫吸附测定)以及胶体金免疫层析法是目前国际公认的主流技术，这两种方法具有检测速度快，价格便宜，操作简单等优点，是目前国内外检测的主要监控方法。但 ELISA 检测仍需专业人员，且需要较长的时间显示结果；胶体金法一般情况下对恩诺沙星能进行定性分析，检测时间比较短(10-15min)。目前国内使用的快速试剂，不管采用何种原理，由于其灵敏性限制，不能将样品进行多倍稀释，以至于样品中的干扰成分比较多，导致实际样品检测过程中会产生假阴性或假阳性现象。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是针对上述现有技术的不足之处，提供一种灵敏度高、操作简便、检测快速、价格低廉的检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡；本发明的另一个目的是提供上述检测卡的制备方法。

[0005] 为了实现上述目的本发明采取的一个技术方案是：

[0006] 提供一种检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡，该检测卡为单卡型，由一张免疫层析试纸条、底卡及面卡构成。免疫层析试纸条是在底板上依次搭接地粘贴滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、NC膜(硝酸纤维素膜)和吸水纸而制成的，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球，所述的NC膜上固定有检测区和质控区；所述玻璃纤维膜上喷涂

的荧光微球为荧光微球标记的抗恩诺沙星抗体，所述硝酸纤维素膜上检测区喷涂有载体蛋白质与恩诺沙星的偶联抗原，所述质控区都固定有抗鼠抗体。

[0007] 所述荧光微球是直径为 $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ 的用二氧化硅包裹荧光物质的微球，其表面连接有活性基团，或与链霉亲和素偶联；所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺和物以及量子点。

[0008] 所述的活性基团为 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{SH}$ ；所述的荧光物质为菲咯啉联苂有机染料、异硫氰根荧光素、异硫氰根罗丹明、6-羧基荧光素酰胺酯、3,6-二乙氧基苂烷、3-二乙基氨基-7-(2'-氯苯胺基)苂烷、洛丹明B、洛丹明110、洛丹明123和洛丹明10、1,8-萘二酰亚胺4-位被烷氧基或芳氧基取代的荧光物质、1,8-萘二酰亚胺中引入磺酸基、羧基和季铵盐水溶性基团的荧光染料、1,8-萘酸酐与邻苯二胺缩合所得到的匹苂酮类荧光材料、三氟甲醛香豆素、双荧光团香豆素、1,2,3,3'-四甲基吲哚基团香豆素有机荧光染料或多种荧光物质的掺和物以及量子点。

[0009] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡的制备方法，具体包括以下步骤：

[0010] 1. 免疫层析试纸条的制备

[0011] (1) 荧光微球垫的制备

[0012] 用荧光微球标记抗体，并将其喷涂在玻璃纤维膜上。

[0013] 取市售的荧光微球在 $1000 \times g$ 离心 $10 \sim 15\text{min}$ ，收集沉淀，用 0.01M pH 4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $\text{OD}_{450} = 0.2$ ，然后分别加入 $20 \sim 100\text{mg/ml}$ 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC) $100 \mu\text{l}$ ， $2 \sim 20\text{mg/ml}$ 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS) $100 \mu\text{l}$ ，再加入 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液，振荡混匀，室温孵育 $10 \sim 30\text{min}$ 后， $1000 \times g$ 离心 $5 \sim 15\text{min}$ ，沉淀用 0.01M pH 7~8 的硼酸盐缓冲液重悬，并调节微球浓度为 OD_{450} 为 $0.2 \sim 1.0$ ，在 0.1ml 的该荧光微球中加入 $1 \sim 10 \mu\text{g}$ 抗恩诺沙星抗体，充分混匀后，室温搅拌反应 $1 \sim 4\text{h}$ ，超纯水离心洗涤 $2 \sim 5$ 次，沉淀用 0.01M pH 7.2PBS (磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05% Tween-20) 复溶沉淀至起始体积后，用 BIODOT 操作平台喷涂至玻璃纤维膜上， 25°C 真空干燥 $1 \sim 2\text{h}$ ，放于干燥环境备用。

[0014] (2) 检测区和质控区的制备

[0015] 分别将载体蛋白质和恩诺沙星的偶联抗原，抗鼠抗体喷到硝酸纤维素膜上，制成检测区和质控区；所述的载体蛋白是牛血清白蛋白或卵清白蛋白。

[0016] 用 0.01M pH 7.4PBS (磷酸盐缓冲液，其中包含 5%蔗糖和 0.05%吐温-20) 分别调节偶联抗原和抗鼠抗体的浓度为 $0.5 \sim 8.0\text{mg/ml}$ ，喷膜量为 $0.7 \mu\text{L/cm}$ ，检测区喷涂偶联抗原，质控区喷涂抗鼠抗体，两区相隔 5mm ，质控区距离 NC 膜一端 2mm ， 37°C 烘干过夜后，在室温干燥环境下保存备用。

[0017] (3) 组装和剪切

[0018] 在粘性底板上依次搭接地粘贴：滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜及吸水纸，并剪切成适当宽度即成为免疫层析试纸条。

[0019] 2. 免疫层析试纸条的组装

[0020] 将根据上述方法制备的恩诺沙星试纸条固定在底卡上，然后在试纸条表面用面卡压紧，即成为免疫层析检测卡。底卡和面卡一般为塑料卡，底卡能使试纸条上的样

本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸紧密结合，面卡可保护试纸条，使其不受损坏。面卡上预留加样孔和观察窗各两个，加样孔的位置与试纸条的样本垫对应，观察窗的位置与试纸条的硝酸纤维素膜对应。

[0021] 用上述的荧光微球免疫层析检测卡定性检测恩诺沙星，包括以下步骤：

[0022] (1) 免疫层析检测卡的加样孔中加入待检样本，反应 3 ~ 20min 后，将检测卡放入检测窗口；

[0023] (2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源下，发出强烈的荧光条带；

[0024] (3) 发射的荧光经滤除杂光后，用肉眼观察是否有荧光信号；当样本中不含有被检测物质时，检测区和质控区均出现一条荧光条带，即检测样本为阴性；当样本中含有过量被检测物质时，检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为阳性。

[0025] 当样本中含有不过量被检测物质时，检测区有一条弱荧光条带，质控区有一条荧光条带，检测样本即为弱阳性。

[0026] 本发明的优点如下：

[0027] 1. 荧光物质被入射光激发后，返回基态时发射出荧光，可以在与激发光源垂直的方向进行检测，因此荧光不受来自激发光本底的干扰，灵敏度大大提高，其灵敏度是用传统染料和有色标记物质检测方法的 10 ~ 1000 倍。另外，荧光标记检测方法还具有操作简便，检测快速，价格低廉等优点；

[0028] 2. 荧光微球是核壳双结构，克服了常规荧光微球的染料泄露，抗溶液干扰能力差等缺点，增加了荧光微球的稳定性和荧光寿命；

[0029] 3. 荧光微球表面修饰活性基团，采用化学偶联方法来标记抗体或抗原，形成抗体或抗原与微球的稳定结合；

[0030] 4. 通过简易的滤光片装置能够实现对恩诺沙星的定性检测。

[0031] 用本发明的方法制备的荧光微球免疫层析检测卡来测试 100 例已知注射恩诺沙星的鸡肉样，准确率均达到 100%，表明本发明提供的荧光微球免疫层析法结果准确，检测快速，操作简便，灵敏度高。本发明检测的样本包括水产品和畜禽类的肉、肝和肾等。

附图说明

[0032] 图 1 是免疫层析试纸条的结构示意图；

[0033] 图 2 是免疫层析检测卡的结构示意图；

[0034] 图 3 是荧光微球免疫层析检测卡检测原理图。

[0035] 如图 1 所示，该免疫层析试纸条的构成为：在粘性底板 18 上，依次搭接地粘贴滤纸 11、样本垫 12、喷涂有荧光微球标记的抗恩诺沙星抗体的玻璃纤维膜 13、喷涂有恩诺沙星偶联抗原的检测区 15 和喷涂有抗鼠抗体的质控区 16 的硝酸纤维素膜 14 和吸水纸 17，检测区 15 和质控区 16 相隔 5mm，质控区距离 NC 膜一端 2mm。

[0036] 如图 2 所示，该免疫层析检测卡是单卡型的，由检测恩诺沙星免疫层析试纸条固定在底卡 21 上而形成，具体构造包括底卡 21、面卡 22、加样孔 23、观察窗 24、NC 膜

25、质控区 26、检测区 27。

[0037] 如图 1、2 和 3 所示，检测原理如下：在检测卡的加样孔 23 中加入待检样本，样本溶解玻璃纤维膜 13 上喷涂的荧光微球标记的抗恩诺沙星抗体，通过毛细作用在玻璃纤维膜 13 上向前泳动，同时样本中的恩诺沙星与相应的荧光微球标记物反应；反应液经过检测区 15 时，与检测区 15 的喷涂物反应，并富积在检测区 15；将检测卡放入检测窗口 31，待检样本 33 在光源 32 激发下，发射的荧光 34 通过单色滤光片 35 过滤后，通过观察窗口 36 在检测区 15 观察是否有的荧光条带，质控区不管样本是阴性还是阳性都会出现荧光条带。检测区 15 若无荧光条带，样本是阳性，检测区 15 若有荧光条带，样本是阴性。

[0038] 如图 3 所示，荧光微球免疫层析定性检测恩诺沙星的检测步骤如下：

[0039] (1) 在检测卡的加样孔中滴加待检样本，反应 3 ~ 20min 后，将其放入检测窗口 31；

[0040] (2) 检测区和质控区被截留的荧光微球 33 在最佳激发光源 32 激发下，发出荧光 33 通过单色滤光片 34，在观察窗口 35 判断样本的阴阳性。所述的最佳激发光源指在 400-460nm 激发光源激发下，荧光微球能发出最强的荧光。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明，但不作为对本发明的限定。

[0042] 实施例 1

[0043] 1、荧光微球标记物的制备 (EDC 法)：

[0044] 荧光微球标记抗恩诺沙星抗体的制备：取 1mg 包裹异硫氰根罗丹明有机染料的荧光微球在 $1000\times g$ 离心 10min，收集沉淀，用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $OD_{450} = 0.2$ ，然后加入 $90\ \mu l$ 50mg/ml EDC， $150\ \mu l$ 5mg/ml NHS，振荡混匀，室温孵育 20min 后， $1000\times g$ 离心 5min，沉淀用 0.01M pH4.8 的硼酸盐缓冲液溶解，并调节微球浓度为 OD_{450} 为 0.5。在 0.1ml OD_{450} 为 0.5 的该荧光微球中加入 $1\ \mu g$ 抗恩诺沙星抗体，充分混匀后，室温搅拌反应 3h，用超纯水洗涤离心 3 次后，用 0.01M pH 7.2 的 PBS (其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20) 重悬沉淀至起始体积后，即为制备好的荧光微球标记的抗恩诺沙星抗体。

[0045] 2、荧光微球垫的制备：

[0046] 用 BIODOT 喷点仪，将荧光微球标记的抗恩诺沙星抗体喷涂至玻璃纤维膜上，喷膜量均为 $4\ \mu l/cm$ ，玻璃纤维膜大小为 $30\times 0.8cm$ ， $25^{\circ}C$ 真空干燥 1 ~ 2h，置于干燥环境中备用。

[0047] 3、NC 膜的制备：

[0048] 将牛血清白蛋白与恩诺沙星的偶联抗原和抗鼠抗体喷涂到硝酸纤维素膜上：用 0.01M pH7.4PBS (磷酸盐缓冲液，其中包含 5% 蔗糖和 0.05% 吐温-20) 将牛血清白蛋白与恩诺沙星的偶联抗原的浓度调节为 1mg/ml，将其喷涂在硝酸纤维素膜上形成检测区；用 0.01M pH 7.2PBS (磷酸盐缓冲液，其中包含 5% 蔗糖和 0.05% 吐温-20) 调节抗鼠抗体的浓度为 1mg/ml，将其喷涂在硝酸纤维素膜上形成质控区。两区的喷膜量均为 $0.7\ \mu L/cm$ ，两区相隔 5mm，质控区距离 NC 膜一端 2mm， $37^{\circ}C$ 烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用；

[0049] 4、荧光微球免疫层析检测卡的制备：

[0050] 组装试纸条 A：在塑料底板上依次搭接地粘贴：(1) 滤纸和样本垫，样本垫为一种经过 1-5% Tween-20 浸泡处理的玻璃纤维膜；(2) 喷涂有荧光微球标记抗恩诺沙星抗体的玻璃纤维膜；(3) 喷涂有牛血清白蛋白与恩诺沙星的偶联抗原作为检测区和抗鼠抗体作为质控区的硝酸纤维素膜；(4) 吸水纸，组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即成为免疫层析试纸条。

[0051] 把免疫层析试纸条固定在塑料底卡上，试纸条表面用面卡压紧，面卡在对应每张试纸条的样本垫和硝酸纤维素膜的部位分别预留加样孔和观察窗，制成的免疫层析检测卡可用来检测恩诺沙星。该检测卡组装好后装入铝箔袋中，加入干燥剂后封口保存，于室温干燥环境下至少可以保存一年。

[0052] 5、荧光微球免疫层析定性检测恩诺沙星的检测步骤如下：

[0053] (1) 平放检测卡，待测鸡肉提取液样品平衡至室温后，在检测卡的加样孔中滴加样品 80 μ l，于室温下反应 10min 后，将检测卡放入检测窗口；

[0054] (2) 检测区和质控区被截留的荧光微球在最佳激发光源激发下，发出荧光通过单色滤光片，在观察窗口观察，若试纸条检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断样品为阳性。若试纸条检测区有荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断样品为阴性。

[0055] 实施例 2

[0056] 本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同，不同点在于：

[0057] 载体蛋白选用卵清白蛋白，标记载体荧光微球为量子点-二氧化硅核壳双结构微球。

[0058] 用上述荧光微球免疫层析检测卡定性检测恩诺沙星包括以下步骤：

[0059] (1) 平放检测卡，待测鸡肝脏提取液样平衡至室温后，在检测卡的加样孔中加入样品 90 μ l，于室温下反应 15min，将检测卡放入检测窗口；

[0060] (2) 截留在检测区和质控区的荧光微球在最佳激发光源的激发下，发出强烈的荧光；在观察窗口观察，若试纸条检测区有荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断样品为阴性；若试纸条检测区无荧光条带，质控区有一条荧光条带，判断样品为阳性。

[0061] 实施例 3

[0062] 本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同，不同点在于：1、标记载体荧光微球为异硫氰根荧光素-二氧化硅核双结构微球，且其表面修饰的是链霉亲和素。2、抗恩诺沙星抗体可采用 EDC 方法与生物素偶联，EDC 方法与实施例 1 基本相同。

[0063] 以上所述的实施例，只是本发明较优选的具体实施方式的一种，本领域的技术人员在本发明技术方案范围内进行的通常变化和替换都应包含在本发明的保护范围。

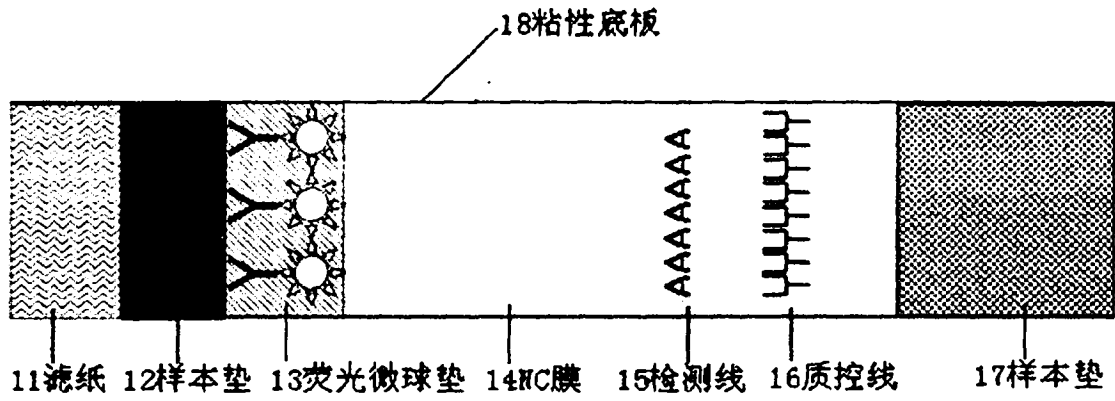


图 1

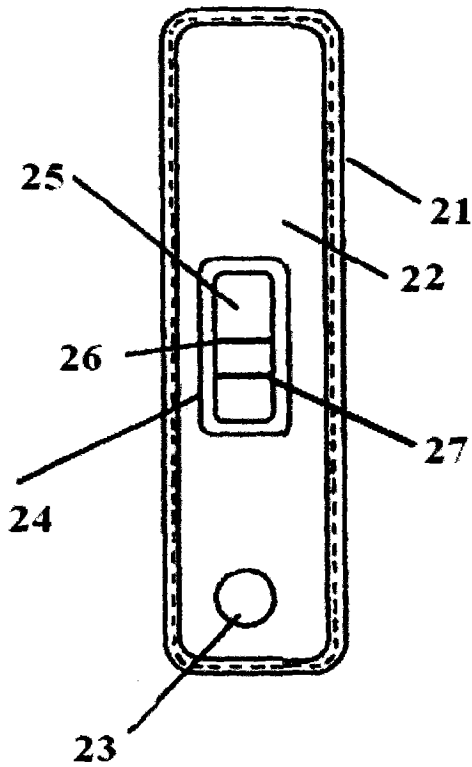


图 2

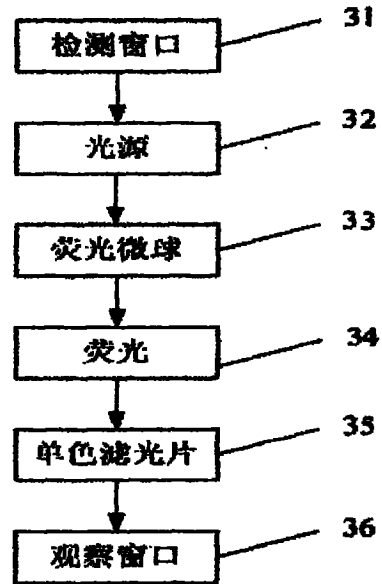


图 3

专利名称(译)	检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN102023210A	公开(公告)日	2011-04-20
申请号	CN200910092065.2	申请日	2009-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中德大地食品安全技术开发有限责任公司		
[标]发明人	陈雪岚 杨晓慧 熊勇华 赖卫华 魏华 李林		
发明人	陈雪岚 杨晓慧 熊勇华 赖卫华 魏华 李林		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/566 G01N33/52 C09K11/06 C09K11/08		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测恩诺沙星的荧光微球免疫层析检测卡及其制备方法。其构成依次包括滤纸、样本垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的玻璃纤维膜上喷涂有荧光微球标记的抗体；所述的硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区；所述的检测区喷有恩诺沙星与载体蛋白质的偶联物；所述的质控区喷有抗鼠抗体。本发明以二氧化硅与荧光物质复合的核壳双结构发光纳米粒子为标记，采用竞争阻断模式的免疫层析技术，实现恩诺沙星快速免疫分析。在检测过程中，采用荧光微球最佳激发光源进行激发，发射出的荧光通过滤光片装置后用肉眼观察检测线是否有荧光物质，本发明具有灵敏度高、检测快速、操作方便、经济实用特点。

