



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110672843 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201911042760.8

(22)申请日 2019.10.30

(71)申请人 南京海关动植物与食品检测中心

地址 210019 江苏省南京市建邺区创智路
39号

(72)发明人 王毅谦 陈雷 龙云凤 柳菡

张晓燕 李静静 蒋鲁岩 沈伟健

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 吕纪涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

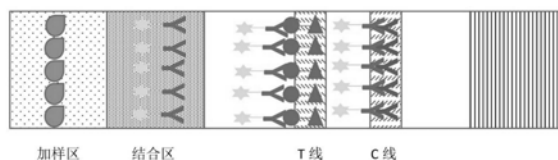
权利要求书2页 说明书15页 附图4页

(54)发明名称

一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条,属于免疫学检测技术领域,包括检测磺胺二甲基嘧啶试纸条、检测磺胺嘧啶试纸条、检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条、检测磺胺甲氧嗪试纸条和检测磺胺喹噁啉试纸条。采用定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条能够快速定量检测样品中的磺胺类物质,检测限低、灵敏度高和重复性好。



1. 一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 包括检测磺胺二甲基嘧啶试纸条、检测磺胺嘧啶试纸条、检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条、检测磺胺甲氧嗪试纸条和检测磺胺喹噁啉试纸条;

所述检测磺胺二甲基嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区, 所述检测区顺次包括检测线和质控线, 所述检测线包被有抗原SM₂-BSA, 所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SM₂-Ab;

所述检测磺胺嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区, 所述检测区顺次包括检测线和质控线, 所述检测线包被有抗原SD-BSA, 所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SD-Ab;

所述检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区, 所述检测区顺次包括检测线和质控线, 所述检测线包被有抗原SMM-BSA, 所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMM-Ab;

所述检测磺胺甲氧嗪试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区, 所述检测区顺次包括检测线和质控线, 所述检测线包被有抗原SMZ-BSA, 所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMP-Ab;

所述检测磺胺喹噁啉试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区, 所述检测区顺次包括检测线和质控线, 所述检测线包被有抗原SQX-BSA, 所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SQX-Ab。

2. 根据权利要求1所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述抗原SM₂-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗原SM₂-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

所述抗体Eu-SM₂-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗体Eu-SM₂-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

3. 根据权利要求1所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述抗原SD-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗原SD-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

所述抗体Eu-SD-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗体Eu-SD-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

4. 根据权利要求1所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述抗原SMM-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗原SMM-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

所述抗体Eu-SMM-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗体Eu-SMM-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

5. 根据权利要求1所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述抗原SMZ-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗原SMZ-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

所述抗体Eu-SMZ-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗体Eu-SMZ-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

6. 根据权利要求1所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述抗原SQX-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗原SQX-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

所述抗体Eu-SQX-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL, 所述抗体Eu-SQX-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

7. 根据权利要求1所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述质控线包被

有羊抗鼠 IgG, 所述羊抗鼠 IgG 的喷涂浓度为 0.5~1.5mg/mL, 所述羊抗鼠 IgG 的喷涂用量为 1.5~2.5 μ L/cm。

8. 根据权利要求 1 所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述检测线与质控线的距离为 8~12mm。

9. 根据权利要求 1 所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述 Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质为铕;

所述 Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团为聚苯乙烯-羧基。

10. 根据权利要求 1 所述的五联时间分辨荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述 Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径为 90~110nm;

所述 Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长为 340~360nm;

所述 Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长为 610~630nm。

一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测技术领域,尤其涉及一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条。

背景技术

[0002] 磺胺类药物(Sulfonamides,SAs)是一种人工合成的具有广谱抗菌作用的药物,SAs的抗菌作用机制为与对氨基苯甲酸(PABA)竞争性联合二氢叶酸合成酶,改变细菌核蛋白合成,干扰敏感菌的叶酸代谢而抑制细菌生长繁殖。磺胺类药物化学结构的母核结构为对氨基苯基苯磺酰胺(磺胺)。磺胺类药物的抗菌谱较广,性质稳定,使用方便,价格低廉易获得,是畜禽抗感染用的重要药物。

[0003] 磺胺类药物被吸收后分布于全身各组织中,其中血液、肝脏、肾脏含量较高,磺胺类药物主要经过肝脏代谢,主要经过肾脏排泄。

[0004] 人可食用事物中磺胺类药物残留超标可引起过敏反应,主要表现为皮炎、白细胞减少、皮疹、溶血性贫血、发烧;毒性反应,主要表现为头疼、恶心、腰部钝痛并伴有突发性少尿;抗药性,表现为抗生素无法抑制细菌生长;“三致作用”,主要表现为基因突变或染色体突变引起致癌、致突变、致畸,发生认同潜在危害。农业部2005年起,把食品中磺胺类药物残留作为重点关注,美国及欧盟等国家规定动物性食品中总磺胺及单个磺胺药的最高限量为0.1mg/kg。

[0005] 目前,磺胺类药物的检测有毛细管电泳法(CE),薄层色谱法(TLC),气相色谱法(GC),高效液相色谱法(HPLC),气质联用法(GC-MS),液质联用法(LC-MS),反射性免疫法(RIA),酶联免疫吸附法(ELISA),胶体金免疫层析法(GICA)等。GC法和HPLC法涉及的检测方法灵敏度高,但需要较为贵重的仪器和检测成本不能够扩大应用。ELISA法和GICA法等方法,操作较为简单便捷但稳定性差,重复性低。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条,能够快速定量检测样品中的磺胺类物质。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0008] 本发明提供了一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条,包括检测磺胺二甲基嘧啶试纸条、检测磺胺嘧啶试纸条、检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条、检测磺胺甲氧嘧啶试纸条和检测磺胺喹噁啉试纸条;

[0009] 所述检测磺胺二甲基嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SM₂-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SM₂-Ab;

[0010] 所述检测磺胺嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包

括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SD-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SD-Ab;

[0011] 所述检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SMM-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMM-Ab;

[0012] 所述检测磺胺甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SMZ-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMP-Ab;

[0013] 所述检测磺胺喹噁啉试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SQX-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SQX-Ab。

[0014] 优选的,所述抗原SM₂-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗原SM₂-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

[0015] 所述抗体Eu-SM₂-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗体Eu-SM₂-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

[0016] 优选的,所述抗原SD-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗原SD-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

[0017] 所述抗体Eu-SD-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗体Eu-SD-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

[0018] 优选的,所述抗原SMM-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗原SMM-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

[0019] 所述抗体Eu-SMM-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗体Eu-SMM-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

[0020] 优选的,所述抗原SMZ-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗原SMZ-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

[0021] 所述抗体Eu-SMZ-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗体Eu-SMZ-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

[0022] 优选的,所述抗原SQX-BSA的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗原SQX-BSA的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm;

[0023] 所述抗体Eu-SQX-Ab的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述抗体Eu-SQX-Ab的喷涂用量为4.5~5.5μL/cm。

[0024] 优选的,所述质控线包被有羊抗鼠IgG,所述羊抗鼠IgG的喷涂浓度为0.5~1.5mg/mL,所述羊抗鼠IgG的喷涂用量为1.5~2.5μL/cm。

[0025] 优选的,所述检测线与质控线的距离为8~12mm。

[0026] 优选的,Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质为铕;

[0027] 所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团为聚苯乙烯-羧基。

[0028] 优选的,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径为90~110nm;

[0029] 所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长为340~360nm;

[0030] 所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长为610~630nm。

[0031] 本发明提供了一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条。将待检样品液滴于加样区,在毛细层析的作用下流动至结合区上,待检样品液中若含有磺胺类药物(SM₂、SDM、SD、SMM、SMD、SMP、SQX),流至结合区与Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的特异抗体发生免疫反应后形成荧光复合物,随后一起迁移到检测区上,到达检测线时未结合的Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的特异抗体与检测线包被的磺胺类药物人工抗原结合形成荧光复合物并富集截留于检测线处(样品中磺胺类药物含量多时,检测线富集的荧光复合物少,荧光强度低;样品中磺胺类药物含量少时,检测线富集的荧光复合物多,荧光强度高),到达质控线时Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的特异抗体与质控线包被的羊抗鼠IgG结合并富集截留于质控线处,在免疫荧光分析仪中检测获得检测结果,达到快速、定量检测的目的。

附图说明

- [0032] 图1为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺二甲基嘧啶(SM₂)检测标准曲线;
- [0033] 图2为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺二甲氧嘧啶(SDM)检测标准曲线;
- [0034] 图3为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺嘧啶(SD)检测标准曲线;
- [0035] 图4为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺间甲氧嘧啶(SMM)检测标准曲线;
- [0036] 图5为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺对甲氧嘧啶(SDM)检测标准曲线;
- [0037] 图6为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺甲氧嗪(SMP)检测标准曲线;
- [0038] 图7为实施例4中的时间分辨荧光免疫层析试剂条磺胺喹噁啉(SQX)检测标准曲线;
- [0039] 图8为时间分辨荧光免疫层析试剂条原理图(试剂条试剂分区);
- [0040] 图9为时间分辨荧光免疫层析试剂条原理图(阴性样本检测结果);
- [0041] 图10为为时间分辨荧光免疫层析试剂条原理图(阳性样本检测结果)。

具体实施方式

[0042] 本发明提供了一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条,包括检测磺胺二甲基嘧啶试纸条、检测磺胺嘧啶试纸条、检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条、检测磺胺甲氧嗪试纸条和检测磺胺喹噁啉试纸条;

[0043] 所述检测磺胺二甲基嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SM₂-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SM₂-Ab;

[0044] 所述检测磺胺嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SD-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SD-Ab;

[0045] 所述检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SMM-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMM-Ab;

[0046] 所述检测磺胺甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SMZ-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMP-Ab;

[0047] 所述检测磺胺喹噁啉试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SQX-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SQX-Ab。

[0048] 在本发明中,所述检测磺胺二甲基嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SM₂-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SM₂-Ab。

[0049] 在本发明中,所述抗原SM₂-BSA的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗原SM₂-BSA的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm;更优选为2μL/cm。在本发明中,所述抗原SM₂-BSA优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1%BSA。本发明对所述抗原SM₂-BSA的制备没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0050] 在本发明中,所述抗体Eu-SM₂-Ab的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗体Eu-SM₂-Ab的喷涂用量优选为4.5~5.5μL/cm,更优选为5μL/cm。在本发明中,所述抗体Eu-SM₂-Ab优选溶于抗体稀释液后再进行喷涂,所述抗体稀释液包含0.01M PBS、0.5%PVA、5%蔗糖和1%BSA。在本发明中,所述抗体Eu-SM₂-Ab可特异性结合磺胺二甲基嘧啶(SM₂)和/或磺胺二甲氧嘧啶(SDM)。本发明对所述抗体Eu-SM₂-Ab的制备方法没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0051] 在本发明中,所述质控线优选包被有羊抗鼠IgG,所述羊抗鼠IgG的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述羊抗鼠IgG的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm,更优选为2μL/cm。在本发明中,所述羊抗鼠IgG优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1%BSA。本发明对所述羊抗鼠IgG的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。

[0052] 在本发明中,所述检测线与质控线的距离优选为8~12mm,更优选为10mm。

[0053] 在本发明中,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质优选为铕,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团优选为聚苯乙烯-羧基;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径优选为90~110nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长优选为340~360nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长优选为610~630nm。

[0054] 在本发明中,所述检测磺胺二甲基嘧啶试纸条的制备方法优选包括:

[0055] 将玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中,取出干燥后,得到干燥膜,将所述Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SM₂-Ab喷涂于干燥膜上,得到结合垫;

[0056] 将玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中,取出干燥后,得到样品垫;

[0057] 在硝酸纤维素膜上划检测线和质控线,在检测线上包被抗原SM₂-BSA,在质控线上包被羊抗鼠IgG,得到检测垫;

[0058] 将所述样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫顺次搭接在底板上,得到检测磺胺二甲基

嘧啶试纸条。在本发明中,所述检测区优选顺次包括检测垫和吸水垫。

[0059] 在本发明中,所述结合垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1% Tween-20、0.5% PVA、5% 蔗糖和1% BSA。在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中的浸泡条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。

[0060] 在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中的条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。在本发明中,所述样品垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1% Tween-20和1% BSA。

[0061] 在本发明中,所述吸水垫优选为吸水纸。本发明对所述底板的材质没有特殊限定,采用常规制作试纸条使用的底板材质即可。

[0062] 在本发明中,所述检测磺胺嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SD-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SD-Ab。

[0063] 在本发明中,所述抗原SD-BSA的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗原SD-BSA的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm;更优选为2μL/cm。在本发明中,所述抗原SD-BSA优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5% 蔗糖和1% BSA。本发明对所述抗原SD-BSA的制备没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0064] 在本发明中,所述抗体Eu-SD-Ab的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗体Eu-SD-Ab的喷涂用量优选为4.5~5.5μL/cm,更优选为5μL/cm。在本发明中,所述抗体Eu-SD-Ab优选溶于抗体稀释液后再进行喷涂,所述抗体稀释液包括0.01M PBS、0.5% PVA、5% 蔗糖和1% BSA。在本发明中,所述抗体Eu-SD-Ab可特异性结合磺胺嘧啶(SD)。本发明对所述抗体Eu-SD-Ab的制备方法没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0065] 在本发明中,所述质控线优选包被有羊抗鼠IgG,所述羊抗鼠IgG的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述羊抗鼠IgG的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm,更优选为2μL/cm。在本发明中,所述羊抗鼠IgG优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5% 蔗糖和1% BSA。本发明对所述羊抗鼠IgG的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。

[0066] 在本发明中,所述检测线与质控线的距离优选为8~12mm,更优选为10mm。

[0067] 在本发明中,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质优选为铕,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团优选为聚苯乙烯-羧基;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径优选为90~110nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长优选为340~360nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长优选为610~630nm。

[0068] 在本发明中,所述检测磺胺嘧啶试纸条的制备方法优选包括:

[0069] 将玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中,取出干燥后,得到干燥膜,将所述Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SD-Ab喷涂于干燥膜上,得到结合垫;

[0070] 将玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中,取出干燥后,得到样品垫;

[0071] 在硝酸纤维素膜上划检测线和质控线,在检测线上包被抗原SD-BSA,在质控线上包被羊抗鼠IgG,得到检测垫;

[0072] 将所述样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫顺次搭接在底板上,得到检测磺胺嘧啶试

纸条。在本发明中,所述检测区优选顺次包括检测垫和吸水垫。

[0073] 在本发明中,所述结合垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1% Tween-20、0.5% PVA、5%蔗糖和1% BSA。在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中的浸泡条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。

[0074] 在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中的条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。在本发明中,所述样品垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1% Tween-20和1% BSA。

[0075] 在本发明中,所述吸水垫优选为吸水纸。本发明对所述底板的材质没有特殊限定,采用常规制作试纸条使用的底板材质即可。

[0076] 在本发明中,所述检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SMM-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMM-Ab。

[0077] 在本发明中,所述抗原SMM-BSA的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗原SMM-BSA的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm;更优选为2μL/cm。在本发明中,所述抗原SMM-BSA优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01MPBS、5%蔗糖和1% BSA。本发明对所述抗原SMM-BSA的制备没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0078] 在本发明中,所述抗体Eu-SMM-Ab的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗体Eu-SMM-Ab的喷涂用量优选为4.5~5.5μL/cm,更优选为5μL/cm。在本发明中,所述抗体Eu-SMM-Ab优选溶于抗体稀释液后再进行喷涂,所述抗体稀释液包含0.01M PBS、0.5% PVA、5%蔗糖和1% BSA。在本发明中,所述抗体Eu-SMM-Ab可特异性结合磺胺间甲氧嘧啶(SMM)和/或磺胺对甲氧嘧啶(SMD)。本发明对所述抗体Eu-SMM-Ab的制备方法没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0079] 在本发明中,所述质控线优选包被有羊抗鼠IgG,所述羊抗鼠IgG的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述羊抗鼠IgG的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm,更优选为2μL/cm。在本发明中,所述羊抗鼠IgG优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1% BSA。本发明对所述羊抗鼠IgG的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。

[0080] 在本发明中,所述检测线与质控线的距离优选为8~12mm,更优选为10mm。

[0081] 在本发明中,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质优选为铕,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团优选为聚苯乙烯-羧基;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径优选为90~110nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长优选为340~360nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长优选为610~630nm。

[0082] 在本发明中,所述检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条的制备方法优选包括:

[0083] 将玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中,取出干燥后,得到干燥膜,将所述Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMM-Ab喷涂于干燥膜上,得到结合垫;

[0084] 将玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中,取出干燥后,得到样品垫;

[0085] 在硝酸纤维素膜上划检测线和质控线,在检测线上包被抗原SMM-BSA,在质控线上包被羊抗鼠IgG,得到检测垫;

[0086] 将所述样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫顺次搭接在底板上,得到检测磺胺甲氧嘧啶试纸条。在本发明中,所述检测区优选顺次包括检测垫和吸水垫。

[0087] 在本发明中,所述结合垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1%Tween-20、0.5%PVA、5%蔗糖和1%BSA。在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中的浸泡条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。

[0088] 在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中的条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。在本发明中,所述样品垫处理液优选包含0.1MTris-HCl、0.1%Tween-20和1%BSA。

[0089] 在本发明中,所述吸水垫优选为吸水纸。本发明对所述底板的材质没有特殊限定,采用常规制作试纸条使用的底板材质即可。

[0090] 在本发明中,所述检测磺胺甲氧嘧啶试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SMZ-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMP-Ab。

[0091] 在本发明中,所述抗原SMZ-BSA的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗原SMZ-BSA的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm;更优选为2μL/cm。在本发明中,所述抗原SMZ-BSA优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1%BSA。本发明对所述抗原SMZ-BSA的制备没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0092] 在本发明中,所述抗体Eu-SMP-Ab的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗体Eu-SMP-Ab的喷涂用量优选为4.5~5.5μL/cm,更优选为5μL/cm。在本发明中,所述抗体Eu-SMP-Ab优选溶于抗体稀释液后再进行喷涂,所述抗体稀释液包含0.01M PBS、0.5%PVA、5%蔗糖和1%BSA。在本发明中,所述抗体Eu-SMP-Ab可特异性结合磺胺甲氧嘧啶(SMP)。本发明对所述抗体Eu-SMP-Ab的制备方法没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0093] 在本发明中,所述质控线优选包被有羊抗鼠IgG,所述羊抗鼠IgG的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述羊抗鼠IgG的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm,更优选为2μL/cm。在本发明中,所述羊抗鼠IgG优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1%BSA。本发明对所述羊抗鼠IgG的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。

[0094] 在本发明中,所述检测线与质控线的距离优选为8~12mm,更优选为10mm。

[0095] 在本发明中,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质优选为铕,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团优选为聚苯乙烯-羧基;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径优选为90~110nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长优选为340~360nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长优选为610~630nm。

[0096] 在本发明中,所述检测磺胺甲氧嘧啶试纸条的制备方法优选包括:

[0097] 将玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中,取出干燥后,得到干燥膜,将所述Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SMP-Ab喷涂于干燥膜上,得到结合垫;

[0098] 将玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中,取出干燥后,得到样品垫;

[0099] 在硝酸纤维素膜上划检测线和质控线,在检测线上包被抗原SMZ-BSA,在质控线上

包被羊抗鼠IgG,得到检测垫;

[0100] 将所述样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫顺次搭接在底板上,得到检测磺胺甲氧嗪试纸条。在本发明中,所述检测区优选顺次包括检测垫和吸水垫。

[0101] 在本发明中,所述结合垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1%Tween-20、0.5%PVA、5%蔗糖和1%BSA。在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中的浸泡条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。

[0102] 在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中的条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。在本发明中,所述样品垫处理液优选包含0.1MTris-HCl、0.1%Tween-20和1%BSA。

[0103] 在本发明中,所述吸水垫优选为吸水纸。本发明对所述底板的材质没有特殊限定,采用常规制作试纸条使用的底板材质即可。

[0104] 在本发明中,所述检测磺胺喹噁啉试纸条顺次包括加样区、结合区和检测区,所述检测区顺次包括检测线和质控线,所述检测线包被有抗原SQX-BSA,所述结合区平铺有Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SQX-Ab。

[0105] 在本发明中,所述抗原SQX-BSA的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗原SQX-BSA的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm;更优选为2μL/cm。在本发明中,所述抗原SQX-BSA优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1%BSA。本发明对所述抗原SQX-BSA的制备没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0106] 在本发明中,所述抗体Eu-SQX-Ab的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述抗体Eu-SQX-Ab的喷涂用量优选为4.5~5.5μL/cm,更优选为5μL/cm。在本发明中,所述抗体Eu-SQX-Ab优选溶于抗体稀释液后再进行喷涂,所述抗体稀释液包含0.01M PBS、0.5%PVA、5%蔗糖和1%BSA。在本发明中,所述抗体Eu-SQX-Ab可特异性结合磺胺喹噁啉(SQX)。本发明对所述抗体Eu-SQX-Ab的制备方法没有特殊限定,采用常规制备方法制备即可。

[0107] 在本发明中,所述质控线优选包被有羊抗鼠IgG,所述羊抗鼠IgG的喷涂浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL;所述羊抗鼠IgG的喷涂用量优选为1.5~2.5μL/cm,更优选为2μL/cm。在本发明中,所述羊抗鼠IgG优选溶于稀释液后再进行喷涂,所述稀释液包含0.01M PBS、5%蔗糖和1%BSA。本发明对所述羊抗鼠IgG的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。

[0108] 在本发明中,所述检测线与质控线的距离优选为8~12mm,更优选为10mm。

[0109] 在本发明中,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发光物质优选为铕,所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的表面基团优选为聚苯乙烯-羧基;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的粒径优选为90~110nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的激发光波长优选为340~360nm;所述Eu-时间分辨荧光纳米微球的发射光波长优选为610~630nm。

[0110] 在本发明中,所述检测磺胺喹噁啉试纸条的制备方法优选包括:

[0111] 将玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中,取出干燥后,得到干燥膜,将所述Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体Eu-SQX-Ab喷涂于干燥膜上,得到结合垫;

[0112] 将玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中,取出干燥后,得到样品垫;

[0113] 在硝酸纤维素膜上划检测线和质控线,在检测线上包被抗原SQX-BSA,在质控线上包被羊抗鼠IgG,得到检测垫;

[0114] 将所述样品垫、结合垫、检测垫和吸水垫顺次搭接在底板上,得到检测磺胺喹噁啉试纸条。在本发明中,所述检测区优选顺次包括检测垫和吸水垫。

[0115] 在本发明中,所述结合垫处理液优选包含0.1M Tris-HCl、0.1%Tween-20、0.5%PVA、5%蔗糖和1%BSA。在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于结合垫处理液中的浸泡条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。

[0116] 在本发明中,所述玻璃纤维素膜浸泡于样品垫处理液中的条件优选包括:4℃下浸泡14h后过夜。在本发明中,所述干燥的时间优选为2h,所述干燥的温度优选为37℃。在本发明中,所述样品垫处理液优选包含0.1MTris-HCl、0.1%Tween-20和1%BSA。

[0117] 在本发明中,所述吸水垫优选为吸水纸。本发明对所述底板的材质没有特殊限定,采用常规制作试纸条使用的底板材质即可。

[0118] 在本发明中,所述五联时间分辨荧光免疫试纸条的制备方法优选包括:将所述检测磺胺二甲基嘧啶试纸条、检测磺胺嘧啶试纸条、检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条、检测磺胺甲氧嗪试纸条和检测磺胺喹噁啉试纸条并排搭接,得到。

[0119] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0120] 实施例1

[0121] 人工抗原制备

[0122] 采用了重氮法将磺胺类药物与载体蛋白进行偶联。人工抗原制备如下表1所示:

[0123] 表1人工抗原制备

[0124]	磺胺类药物	人工抗原 A (偶联人血清白蛋白)	人工抗原 B (偶联牛血清白蛋白)
	磺胺二甲基嘧啶 (SM ₂)	SM ₂ -HSA	SM ₂ -BSA
	磺胺嘧啶 (SD)	SD-HSA	SD-BSA
	磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)	SMM-HSA	SMM-BSA
	磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)	SMD-HSA	SMD-BSA
	磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)	SDM-HSA	SDM-BSA
	磺胺甲氧嗪 (SMP)	SMP-HSA	SMP-BSA
	磺胺喹噁啉 (SQX)	SQA-HSA	SQA-BSA

[0125] 1. 溶液配制

[0126] (a) NaOH溶液:浓度为0.2mol/L;

[0127] (b) NaNO₂溶液:质量分数为1%;

[0128] (c) HCl溶液:浓度为0.2mol/L;

[0129] (d) BSA溶液:100mg BSA溶于10mL 0.01mol/L的PBS (pH为7.4);

[0130] (e) HSA溶液:50mg HSA溶于10mL 0.01mol/L的PBS (pH为7.4)。

[0131] 2. 小分子偶联载体蛋白

- [0132] (1) 称取适量磺胺类药物溶于1mL (a) 中 (等摩尔量) ;
[0133] (2) 将500μL (b) 加入至 (1) 中的磺胺类药物溶液中, 4℃水浴预冷;
[0134] (3) 将 (2) 中溶液避光搅拌下滴加至1.5mL (c) 中, 4℃水浴, 反应3h;
[0135] (4) 将 (d) / (e) 置于4℃水浴预冷;
[0136] (5) 将 (4) 滴加至 (3) , 调节pH为8.0, 4℃反应过夜;
[0137] (6) 将 (5) 所得反应产物于PBS中透析72h;
[0138] (7) 将透析产物分装于-20℃保存。

[0139] 实施例2

[0140] 抗体制备

[0141] 1. 动物免疫:

[0142] 选取6-8周龄的雌性Balb/c小鼠为免疫对象, 初次免疫前每只小鼠尾静脉采血, 初次免疫时腹腔注射乳化后免疫原200μL (人工抗原A加完全佐剂); 在初免后第14天、第28天以相同方法进行第二次和第三次免疫 (人工抗原A加不完全佐剂), 在第三次免疫后第5天对每只小鼠进行眼眶采血取血清评估抗体效价, 在第三次免疫后第七天进行加强免疫, 尾静脉注射免疫原100μL, 加强免疫后第3天取脾淋巴细胞和Sp2/0 (5:1的混合比例) 进行细胞融合, 融合采用PEG法。融合完成后用HAT培养基选择性培养。

[0143] 2. 亚克隆:

[0144] 采用有限稀释法进行亚克隆。饲养细胞铺于96孔板中, 将阳性孔中的杂交瘤细胞, 计数, 用HT培养基稀释成3个浓度, 铺96孔板, 每个浓度2列, 使得每孔中细胞为1个/孔、3个/孔、10个/孔, 置于37℃, 5%CO₂培养箱中培养7-10天, 选择阳性最强的孔连续进行2-3次亚克隆, 进行转孔扩大培养。

[0145] 3. 单抗制备

[0146] 单抗制备采用了体内法即小鼠腹腔接种法, 采取小鼠腹腔的腹水, 获得的抗体浓度高。取10周龄的Balb/c雌性小鼠, 小鼠腹腔注射500μL已灭菌的液体石蜡。杂交瘤细胞经过收集离心, 腹腔注射 2×10^6 个细胞/只小鼠。约1周左右小鼠腹部明显隆起, 用注射器针头从腹腔采腹水。

[0147] 4. 抗体纯化

[0148] 采用了Protein G亲和层析柱进行抗体的纯化。用等体积的结合缓冲液稀释腹水, 开始过柱, 待样本完全流出, 用适量结合缓冲液过柱, 待液体完全流出用适量洗脱液过柱, 同时用装有适量体积中和液的小离心管中和所接收的洗脱液, 用考马斯亮蓝检测, 收集蓝色较深的离心管抗体, 装于透析袋中, 透析3天, 透析结束后检测蛋白浓度, 置于-20℃保存。

[0149] 所制备的抗体如下表2所示:

[0150] 表2制备的抗体

[0151] 磺胺类药物	免疫原	制备单抗
磺胺二甲基嘧啶 (SM ₂)	SM ₂ -HSA	SM ₂ -mAb
磺胺嘧啶 (SD)	SD-HSA	SD-mAb
磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)	SMM-HSA	SMM-mAb
磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)	SMD-HSA	SMD-mAb
磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)	SDM-HSA	SDM-mAb

磺胺甲氧嗪 (SMP)	SMP-HSA	SMP-mAb
磺胺喹噁啉 (SQX)	SQA-HSA	SQA-mAb

[0152] 实施例3

[0153] 测定磺胺类药物残留的五联时间分辨荧光免疫层析试剂条的Eu-时间分辨荧光纳米微球标记的抗体的制备步骤如下:

[0154] 1. 溶液配制

[0155] (a) MES溶液:浓度为50mmol/L, pH为6.5

[0156] (b) EDC溶液:浓度为1mg/mL

[0157] (c) 海藻糖溶液:含量为40%

[0158] (d) 封闭液:10g BSA溶于100mL 0.01mol/L的PBS (pH为7.4)

[0159] (e) 保存液:0.1M Tris-HCl, 1%BSA, 40%海藻糖, pH7.5

[0160] 2. 荧光微球偶联抗体

[0161] (1) 活化:取100 μ L时间分辨荧光微球加入1mL (a) 溶液和100 μ L (b) 溶液, 反应30min, 加入溶液 (c) 200 μ L。

[0162] (2) 离心:将溶液 (1) 10000rpm离心20min, 弃上清, 沉淀用1mLPBS溶液重悬获得活化后的荧光微球溶液。

[0163] (3) 偶联:将0.5mg抗体加入溶液 (2) 中, 加入溶液 (c) 100 μ L, 室温反应2.5h。

[0164] (4) 离心:将溶液 (3) 10000rpm离心20min。

[0165] (5) 封闭:将 (4) 所获得的沉淀用重悬于1mL溶液 (d), 室温反应2.5h。

[0166] (6) 保存:将溶液 (5) 10000rpm离心20min, 弃上清, 沉淀用溶液 (e) 重悬保存备用

[0167] 本发明涉及的测定磺胺类药物残留的五联时间分辨荧光免疫层析试剂条的制备步骤如下:

[0168] 1. 配制相关溶液:

[0169] ①样品垫处理液为0.1M Tris-HCl, 0.1%Tween-20, 1%BSA。

[0170] ②结合垫处理液为:0.1M Tris-HCl, 0.1%Tween-20, 0.5%PVA, 5%蔗糖, 1%BSA。

[0171] ③荧光抗原稀释液:0.01M PBS, 0.5%PVA, 5%蔗糖, 1%BSA。

[0172] ④T线、C线稀释液:0.01M PBS, 5%蔗糖, 1%BSA。

[0173] 2. 样品垫制备:将20mm宽的样品垫浸泡于样品垫处理液中, 4℃条件下浸泡14小时过夜, 取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥2小时, 室温干燥条件下保存。

[0174] 3. 结合垫制备:将10mm宽的结合垫浸泡于结合垫处理液中, 4℃条件下浸泡14小时过夜, 取出后置于37℃恒温干燥箱中干燥2小时, 室温干燥条件下保存。用时间分辨荧光微球抗体稀释液浓度为1mg/mL喷膜于结合垫上, 用量为5 μ L/cm。

[0175] 4. T线、C线划线:取30mm宽的NC膜上划T线, C线, T线和C线的距离为10mm, T线上包被有抗磺胺类药物单抗, 用稀释液调整浓度为1mg/mL, 用量为2 μ L/cm, C线上包被有羊抗鼠IgG, 用稀释液调整浓度为1mg/mL, 用量为2 μ L/cm。

[0176] 实施例4

[0177] 检测食品中磺胺类药物残留的五联时间分辨荧光免疫层析试剂条的性能分析

[0178] 用磺胺二甲基嘧啶 (SM₂)、磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)、磺胺嘧啶 (SD)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)、磺胺甲氧嗪 (SMP)、磺胺喹噁啉 (SQX) 配置一系列浓度梯度的

标准液 (1号-7号) : 0ng/mL、6.25ng/mL、12.5ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL 取50μL滴加到对应检测免疫荧光试剂条上的样本窗,随后用检测仪读取T线和C线的荧光强度,C线呈现荧光说明检测系统正常,将各标准液T线荧光强度计为 F_i ,以0ng/mL浓度点3次荧光强度测定值的均值计为 F_0 。

[0179] 1. 标准曲线

[0180] 分别将各试剂条 F_i/F_0 及对应的抗原浓度做拟合曲线。

[0181] 表2各独立试剂条系列标准液测定值

[0182]

标准液	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号
浓度 ng/mL	0	6.25	12.5	25	50	100	200
F_i/F_0	99.4	86.3	70.8	46.4	28.4	17.6	9.9

[0183]

(SM ₂)							
F_i/F_0 (SDM)	98.3	80.2	73.4	53.4	29.1	15.2	11.8
F_i/F_0 (SD)	98.1	80.5	66.2	40.8	24.6	15.2	8.8
F_i/F_0 (SMM)	99.5	79.4	62.3	44.7	22.7	12.9	9.2
F_i/F_0 (SMD)	95.9	79.9	69.4	57.8	33.6	18.7	13.1
F_i/F_0 (SMP)	98.9	81.5	69.4	48.3	26.7	14.2	9.5
F_i/F_0 (SQX)	99.3	75.8	65.4	49.1	25.8	12.7	7.9

[0184] 2. 检测限

[0185] 以各试剂条检测值 F_i/F_0 为0.9时所对应的浓度值为检测限

[0186] 表4各独立试剂条检测限 (ng/mL)

[0187]

试剂条	(A)	(A)	(B)	(C)	(C)	(D)	(E)
项目	SM ₂	SDM	SD	SMM	SMD	SMP	SQX
检测限	4.79	3.79	3.46	3.17	2.45	3.77	2.48

[0188] 3. 敏感度

[0189] 以各试剂条检测值 F_i/F_0 为0.5时所对应的浓度值为敏感度

[0190] 表5各独立试剂条敏感度

[0191]	试剂条	(A)	(A)	(B)	(C)	(C)	(D)	(E)
	项目	SM ₂	SDM	SD	SMM	SMD	SMP	SQX
	敏感度	23.35	26.00	19.66	19.30	28.68	22.96	21.55

[0192] 4. 重复性

[0193] 用磺胺二甲基嘧啶 (SM₂)、磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)、磺胺嘧啶 (SD)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)、磺胺甲氧嘧啶 (SMP)、磺胺喹噁啉 (SQX) 配置重复性监测浓度点: 50ng/mL, 100ng/mL, 取50μL滴加到对应检测免疫荧光试剂条上的样本窗, 重复检测5次, 计算Fi/F0, 计算变异系数CV值。

[0194] 表6各独立试剂条重复性

[0195]	试剂条	磺胺类药物	检测浓度点 CV(%) 50ng/mL	检测浓度点 CV(%) 100ng/mL
	(A)	SM ₂	4.6	3.7
	(A)	SDM	3.6	5.3
	(B)	SD	5.7	4.4
	(C)	SMM	4.8	4.2
	(C)	SMD	3.9	5.9
	(D)	SMP	4.5	6.4
	(E)	SQX	3.3	5.9

[0196] 5. 交叉反应性

[0197] 用磺胺二甲基嘧啶 (SM₂)、磺胺二甲氧嘧啶 (SDM)、磺胺嘧啶 (SD)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)、磺胺甲氧嘧啶 (SMP)、磺胺喹噁啉 (SQX) 配置一系列浓度梯度的标准液: 0ng/mL, 6.25ng/mL, 12.5ng/mL, 25ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 200ng/mL 取50μL滴加到对应检测免疫荧光试剂条上的样本窗, 随后用检测仪读取T线, 将各标准液T线荧光强度计为Fi, 以0ng/mL浓度点3次荧光强度测定值的均值计为F0, 以各试剂条检测值Fi/F0为0.5时所对应的浓度值为敏感度, 以各试剂条对所有磺胺类药物检测的敏感度的比值为交叉反应性。

[0198] 表7各独立试剂条对磺胺类药物的交叉反应性

[0199]	试剂条	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
	SM ₂	100%	<1%	1.2%	<1%	<1%
	SDM	98%	1.4%	<1%	<1%	<1%
	SD	1.4%	100%	1.8%	<1%	<1%
	SMM	2.1%	<1%	99%	<1%	<1%
	SMD	<1%	1.7%	98%	<1%	<1%
	SMP	<1%	<1%	<1%	100%	<1%
	SQX	<1%	<1%	<1%	<1%	100%

[0200] 实施案5

[0201] 样品添加回收率实验

[0202] 动物肉类样品:取1.0g研磨后的鸡肉、猪肉、鱼肉样本于离心管中,加入4mL乙腈,涡旋振荡5min,4000rpm离心5min,取上清1.25mL,55℃下氮气吹干,加入1mL正己烷,涡旋振荡30s,加入1mLPBS涡旋振荡1min,4000rpm离心10min,取下层液相检测。

[0203] 鸡蛋样品:鸡蛋去壳均质,取1.0g于离心管中,加5mLPBS,轻摇20min,4000rpm离心50min,取上清液检测。

[0204] 添加回收样品制备:取一定量的磺胺二甲基嘧啶(SM₂)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺对甲氧嘧啶(SMD)、磺胺甲氧嘧啶(SMP)、磺胺喹噁啉(SQX)加入上述样品溶液中作为添加回收样品用于检测。

[0205] 取50μL样品滴加到对应检测免疫荧光试剂条上的样本窗,随后用检测仪读取T线,将各标准液T线荧光强度计为F_i,以0ng/mL浓度点3次荧光强度测定值的均值计为F₀,计算各试剂条样品检测值F_i/F₀,根据标准曲线计算浓度值。添加回收样品浓度值与未添加样品浓度值差值和添加量的比值为添加回收率,各样品的添加回收率如表8所示。

[0206] 表8各独立试剂条各样品的添加回收率

[0207]

样品	组别	未添加	添加浓度 1 (20ng/mL)			添加浓度 2 (100ng/mL)		
			测定 均值	回收率	SD	测定 均值	回收率	SD
鸡肉	SM ₂	2.87	19.79	98.95%	1.91	99.67	99.67%	8.65
	SDM	1.81	19.92	99.58%	1.57	97.42	97.42%	6.52
	SD	2.5	19.90	99.52%	1.05	104.81	104.81%	4.82
	SMM	3.47	19.93	99.67%	1.86	103.36	103.36%	5.94
	SMD	1.87	20.72	103.58%	0.49	96.98	96.98%	4.22
	SMP	2.96	20.63	103.17%	0.76	99.70	99.70%	3.04

[0208]

	SQX	2.66	20.26	101.32%	1.14	104.21	104.21%	4.44
猪肉	SM ₂	1.79	19.43	97.17%	0.97	96.85	96.85%	5.30
	SDM	3.91	20.09	100.45%	1.35	99.01	99.01%	8.15
	SD	2.11	19.44	97.18%	0.67	96.57	96.57%	4.88
	SMM	3.06	20.74	103.72%	1.05	96.85	96.85%	9.31
	SMD	2.12	19.13	95.67%	1.10	100.13	100.13%	7.66
	SMP	1.61	20.76	103.78%	0.70	104.02	104.02%	5.68
	SQX	1.62	19.28	96.42%	1.57	103.24	103.24%	0.86
鱼肉	SM ₂	2.95	20.01	100.05%	0.85	97.26	97.26%	5.61
	SDM	1.95	19.32	96.62%	0.22	100.56	100.56%	8.21
	SD	2.89	19.45	97.27%	1.27	99.38	99.38%	3.31
	SMM	3.79	19.72	98.60%	1.23	98.86	98.86%	7.55
	SMD	3.76	21.06	105.30%	0.81	105.43	105.43%	4.88
	SMP	2.97	19.87	99.35%	1.14	100.21	100.21%	1.73
	SQX	1.75	20.46	102.30%	1.65	97.37	97.37%	6.59
鸡蛋	SM ₂	0	20.91	104.57%	2.46	103.43	103.43%	7.21
	SDM	0	19.84	99.22%	1.36	102.19	102.19%	6.81
	SD	0	21.12	105.60%	0.67	98.05	98.05%	4.44
	SMM	0	20.20	101.02%	1.58	95.65	95.65%	2.93
	SMD	0	18.63	93.13%	0.22	99.52	99.52%	7.91
	SMP	0	18.88	94.40%	0.67	96.42	96.42%	7.43
	SQX	0	19.51	97.55%	1.73	100.28	100.28%	6.59

[0209] 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。

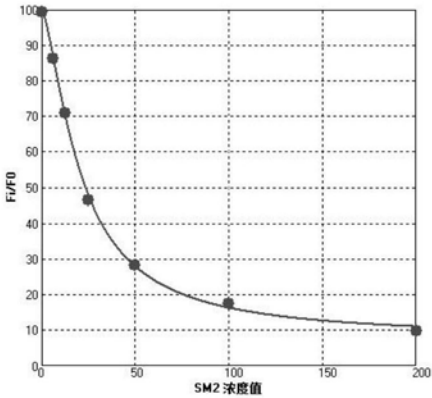


图1

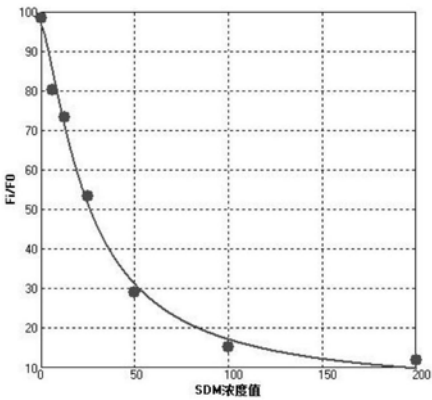


图2

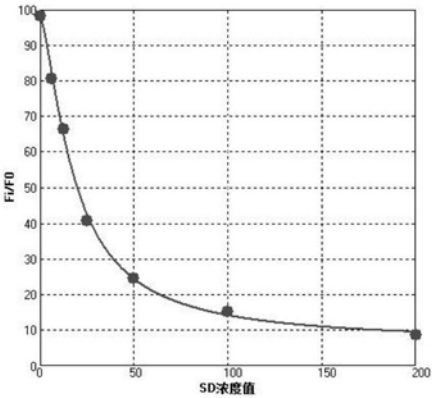


图3

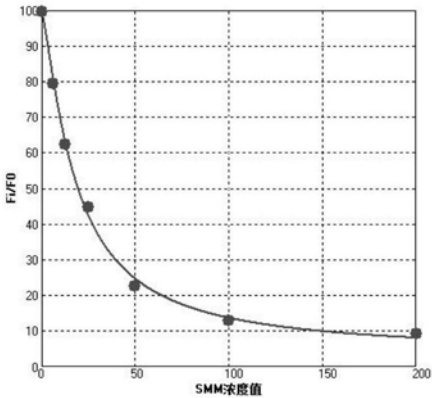


图4

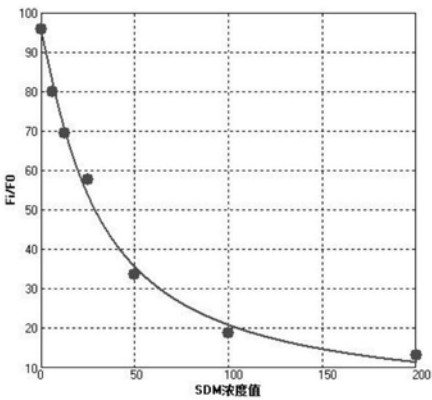


图5

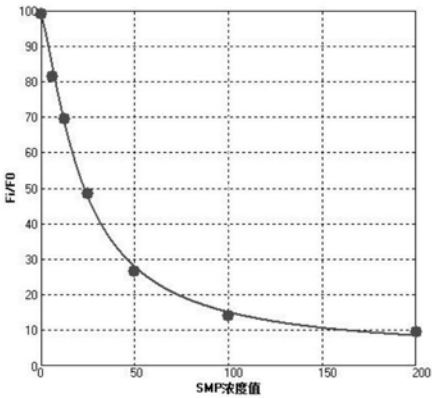


图6

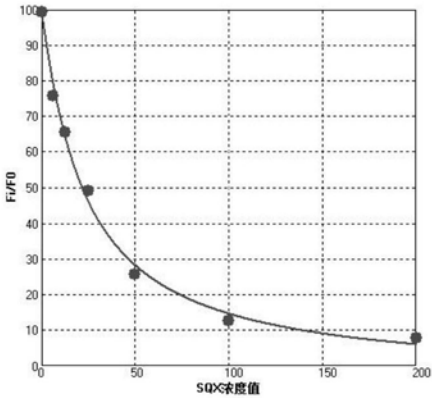


图7

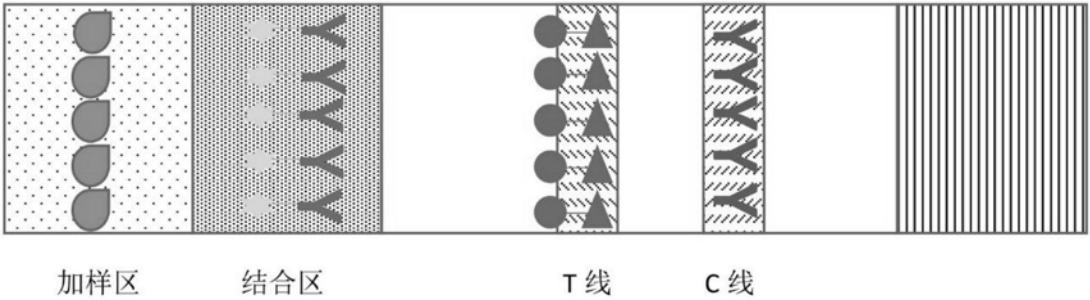


图8

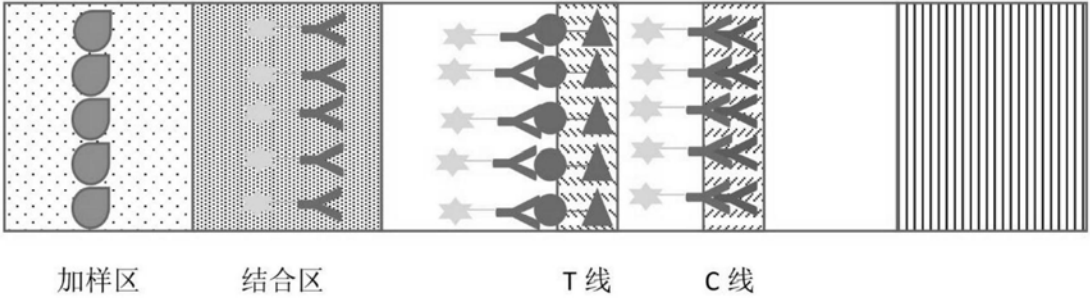


图9

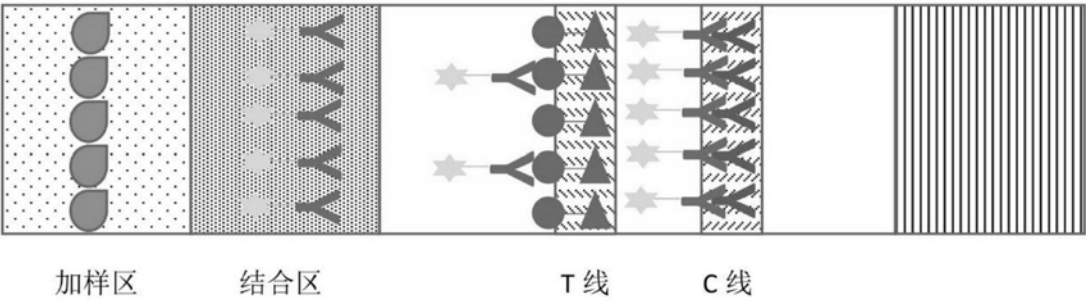


图10

专利名称(译)	一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条		
公开(公告)号	CN110672843A	公开(公告)日	2020-01-10
申请号	CN201911042760.8	申请日	2019-10-30
[标]发明人	王毅谦 陈雷 龙云凤 柳茵 张晓燕 李静静 蒋鲁岩 沈伟健		
发明人	王毅谦 陈雷 龙云凤 柳茵 张晓燕 李静静 蒋鲁岩 沈伟健		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条，属于免疫学检测技术领域，包括检测磺胺二甲基嘧啶试纸条、检测磺胺嘧啶试纸条、检测磺胺间甲氧嘧啶试纸条、检测磺胺甲氧嘧啶试纸条和检测磺胺喹噁啉试纸条。采用定量测定磺胺类药物的五联时间分辨荧光免疫试纸条能够快速定量检测样品中的磺胺类物质，检测限低、灵敏度高和重复性好。

