



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918860 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810901217.8

(22)申请日 2018.08.09

(71)申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 赖卫华 陈媛 彭娟 章刚钢  
黄震 邢克宇 熊勇华 魏华  
许恒毅

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

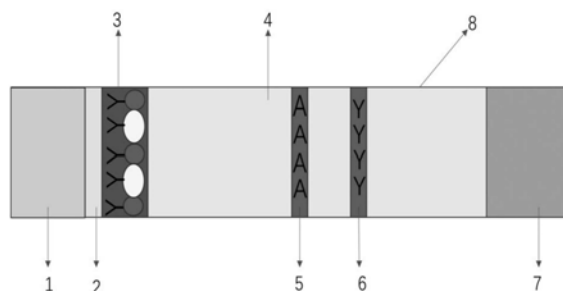
权利要求书6页 说明书29页 附图10页

(54)发明名称

检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法,在底板上依次地搭接粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球-抗生素单克隆抗体复合物和胶体金-抗生素单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的硝酸纤维素膜上包被有抗生素偶联抗原作为检测线和包被有抗鼠抗体作为质控线。检测线显色比质控线显色浅,则样本中抗生素定性判断为阳性,阳性试纸条直接插入荧光读取仪中,读取仪将荧光微球显色体系的荧光信号数值化,实现定量检测。本发明主要用于食品安全检测中抗生素的定性与定量检测。



1. 一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:包括底板,以及在底板上依次地搭接粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其中所述的玻璃纤维垫上喷涂有荧光微球和胶体金分别标记了抗生素单抗的复合物,所述的硝酸纤维素膜上包被有抗生素人工抗原作为检测线和包被有山羊抗小鼠抗体作为质控线;

所述时间分辨荧光微球是直径为 $0.01\sim 10\mu\text{m}$ 的采用较长荧光半衰期的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的特殊微球,其表面连接有活性基团;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杂物以及量子点;

所述的胶体金颗粒是直径为 $10\sim 100\text{nm}$ 的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联;

所述的抗生素抗体与标记物偶联的标记终浓度范围为 $0.5\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$ ,抗生素偶联蛋白质的偶联比范围为 $1:10\sim 1:100$ ,偶联抗原的喷膜浓度范围为 $0.1\sim 10\text{mg}/\text{mL}$ ;

所述的荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物,在每张试纸条中不同标记物上的抗体量范围为 $1\sim 100\text{ng}/\text{条}$ 。

2. 如权利要求1所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:制备方法包括如下的步骤:

(1)硝酸纤维素膜的制备

①制备氯霉素人工抗原(CAP-BSA)

偶联方法为活泼脂法,偶联比为 $1:10\sim 1:100$ ,偶联后透析纯化,得到CAP-BSA;

②检测线和质控线的制备

CAP-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用 $0.01\text{M}$  pH 7.5的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释CAP-BSA偶联物的浓度为 $0.6\text{mg}/\text{mL}$ ,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为 $0.6\text{mg}/\text{mL}$ ,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜体积均为 $0.74\mu\text{L}/\text{cm}$ ,检测线与膜顶边间隔 $10\text{mm}$ ,两线中间间隔 $5\text{mm}$ , $37^\circ\text{C}$ 烘干过夜,放置于干燥柜中保存备用;

(2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球标记氯霉素单克隆抗体的制备:取 $1\text{mg}$ 荧光微球超声 $1\text{min}$ ,用pH 8.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $0.05\text{mg}/\text{mL}$ ,然后分别加入 $10\text{mg}/\text{mL}$ 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)  $300\mu\text{L}$ 和 $20\text{mg}/\text{mL}$ 氮羟基琥珀酰亚胺(NHS)  $100\mu\text{L}$ (用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育 $30\text{min}$ 后, $1\text{mL}$ 荧光微球中加入 $8\mu\text{g}$ 氯霉素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应 $3\text{h}$ , $6000\times\text{g}$ 离心力离心 $20\text{min}$ ,超纯水离心洗涤3次,沉淀用 $0.03\text{M}$  pH 8.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用;

②胶体金标记氯霉素单克隆抗体的制备:取 $40\text{mL}$ 胶体金( $35\text{nm}$ 粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为7.4,加入 $60\mu\text{g}$ 氯霉素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应 $1\text{h}$ ,加入1%的牛血清白蛋白 $4\text{mL}$ ,封闭反应 $30\text{min}$ , $5000\times\text{g}$ 离心力离心 $20\text{min}$ ,超纯水离心洗涤3次,沉淀用 $0.01\text{M}$  pH 7.4的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为 $1/10$ 起始体积后待用;

③荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为 $40\text{ng}/\text{条}$ 、荧光微球标记抗体量为 $6\text{ng}/\text{条}$ 的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至 $30\times 0.8\text{cm}$ 的玻璃纤维膜上, $25^\circ\text{C}$ 真空干燥 $1\sim 2\text{h}$ ,放于

干燥柜中备用；

(3) 组装试纸条

- ① 滤纸和样本垫规格为 $1 \times 30\text{cm}$ ；
- ② 喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维，规格为 $0.8 \times 30\text{cm}$ ；
- ③ 已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜，规格为 $2.5 \times 30\text{cm}$ ；
- ④ 吸水纸，规格为 $1.2 \times 30\text{cm}$ ；
- ⑤ PVC底板，规格为 $5.5 \times 30\text{cm}$ ；

将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴，组装好后用切刀裁切成 $4 \times 55\text{mm}$ 的试纸条，装入塑料卡壳中，压紧后装入铝箔袋，加入干燥剂后，封口保存，室温环境保质期为12个月。

3. 如权利要求1所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条，其特征在于：制备方法包括如下的步骤：

(1) 硝酸纤维素膜的制备

① 制备磺胺二甲嘧啶人工抗原 (SM2-BSA)

偶联方法为活泼脂法，偶联比为 $1:10-1:100$ ，偶联后透析纯化，得到SM2-BSA；

② 检测线和质控线的制备

SM2-BSA偶联物和抗兔抗体包被到硝酸纤维素膜上：用 $0.01\text{M}$  pH 7.0的PBS (磷酸盐缓冲液) 稀释SM2-BSA偶联物的浓度为 $0.3\text{mg/mL}$ ，所得的溶液在膜上喷涂作为检测线；稀释抗兔抗体的浓度为 $0.7\text{mg/mL}$ ，所得的溶液在膜上喷涂作为质控线，两线的喷膜量均为 $0.74\mu\text{L/cm}$ ，检测线与膜顶边间隔 $10\text{mm}$ ，两线中间间隔 $5\text{mm}$ ， $37^\circ\text{C}$ 烘干过夜，放置于干燥柜中保存备用；

(2) 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

① 荧光微球标记磺胺类多克隆抗体的制备：取 $1\text{mg}$ 荧光微球超声 $1\text{min}$ ，用pH 6.5的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 $0.1\text{mg/mL}$ ，然后分别加入 $10\text{mg/mL}$ 对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC)  $300\mu\text{L}$ 和 $20\text{mg/mL}$ 氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS)  $100\mu\text{L}$  (用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解)，振荡混匀后，室温孵育 $30\text{min}$ 后， $1\text{mL}$ 荧光微球中加入 $15\mu\text{g}$ 磺胺类多克隆抗体，充分混合后，室温搅拌反应 $3\text{h}$ ， $6000 \times g$ 离心力离心 $20\text{min}$ ，超纯水离心洗涤3次，沉淀用 $0.01\text{M}$  pH6.5的PBS (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶为起始体积后待用；

② 胶体金标记磺胺类多克隆抗体的制备：取 $40\text{mL}$ 胶体金 ( $40\text{nm}$ 粒径)，用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为6.2，加入 $120\mu\text{g}$ 磺胺类多克隆抗体，充分混合后，室温搅拌反应 $1\text{h}$ ，加入1%的牛血清白蛋白 $4\text{mL}$ ，封闭反应 $30\text{min}$ ， $5000 \times g$ 离心力离心 $20\text{min}$ ，超纯水离心洗涤3次，沉淀用 $0.01\text{M}$  pH6.2的PBS (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶为 $1/10$ 起始体积后待用；

③ 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后，按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算，精确到胶体金标记抗体量为 $20\text{ng/条}$ 、荧光微球标记抗体量为 $3\text{ng/条}$ 的浓度来进行结合垫的喷涂，喷涂至 $30 \times 0.8\text{cm}$ 的玻璃纤维膜上， $25^\circ\text{C}$ 真空干燥 $1 \sim 2\text{h}$ ，放于干燥柜中备用；

(3) 组装试纸条：同权利要求2中试纸条组装步骤。

4. 如权利要求1所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条，其特征在于：制备方法包括如下的步骤：

## (1)硝酸纤维素膜的制备

①制备 $\beta$ -内酰胺类抗生素人工抗原(以青霉素G为半抗原制备)

偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:50-1:100,偶联后透析纯化,得到青霉素G-BSA;

## ②检测线和质控线的制备

青霉素G-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.4的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释青霉素G-BSA偶联物的浓度为1.2mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1.5mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜量均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用;

## (2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球标记 $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1min,用pH7.4的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后分别加入60mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)300 $\mu$ L和30mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS)100 $\mu$ L(用pH 7.4的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入15 $\mu$ g $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.4的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用;

②胶体金标记 $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为7.4,加入80 $\mu$ g $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入10%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.4的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用;

③荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为20ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用;

(3)组装试纸条:同权利要求2中试纸条组装步骤。

5.如权利要求1所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:制备方法包括如下的步骤:

## (1)硝酸纤维素膜的制备

## ①制备恩诺沙星人工抗原(ENR-BSA)

偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到ENR-BSA;

## ②检测线和质控线的制备

ENR-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.5的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释ENR-BSA偶联物的浓度为1.7mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1.5mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为质控线,两线的喷膜体积均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用;

## (2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球标记恩诺沙星单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1min,用pH 8.5的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后分别加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L(用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入35 $\mu$ g恩诺沙星单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH8.5的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用;

②胶体金标记恩诺沙星单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为8.0,加入120 $\mu$ g恩诺沙星单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入1%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 8.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用;

③荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为50ng/条、荧光微球标记抗体量为7ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用;

(3)组装试纸条:同权利要求2中试纸条组装步骤。

6.如权利要求1所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:制备方法包括如下的步骤:

(1)硝酸纤维素膜的制备

①制备卡那霉素人工抗原(KAN-BSA)

偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到KAN-BSA;

②检测线和质控线的制备

KAN-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 6.0的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释KAN-BSA偶联物的浓度为1mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1.5mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜量均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用;

(2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球标记卡那霉素单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1min,用pH 6.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后分别加入30mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L和50mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS) 100 $\mu$ L(用pH6.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入12 $\mu$ g卡那霉素单克隆抗体,充分混合后室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.05M pH6.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用;

②胶体金标记卡那霉素单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为6.0,加入120 $\mu$ g卡那霉素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入10%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 6.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用;

③荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为40ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30×0.8cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用;

(3)组装试纸条:同权利要求2中试纸条组装步骤。

7.如权利要求1所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:制备方法包括如下的步骤:

(1)硝酸纤维素膜的制备

①制备四环素人工抗原(TC-BSA)

偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到TC-BSA;

②检测线和质控线的制备

TC-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 6.0的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释TC-BSA偶联物的浓度为1mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为质控线,两线的喷膜体积均为0.74μL/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37℃烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用;

(2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球标记四环素单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1min,用pH 7.2的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.05mg/mL,然后分别加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300μL和20mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS) 100μL(用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入13μg四环素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000×g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.2的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用;

②胶体金标记四环素单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为7.5,加入50μg四环素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入1%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000×g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.5的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用;

③荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为18ng/条、荧光微球标记抗体量为8ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30×0.8cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用;

(3)组装试纸条:同权利要求2中试纸条组装步骤。

8.如权利要求1-7任一项所述的一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:将其用于检测样本中抗生素的方法,包括如下的步骤:

①在试纸加样孔中加入110μL已提取样本,反应10min;

②目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

③如果检测线显色比质控线显色深,则样本中抗生素定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则定性判断为阳性;

④根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经

录入的标准曲线,即可计算出样本中抗生素的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

## 检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全中抗生素残留检测领域,具体涉及一种可以同时定性并定量检测样品中抗生素的时间分辨荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 抗生素(antibiotics)是由微生物或高等动植物在生活过程中所产生的具有抗病原体或其它活性的一类次级代谢产物,能干扰其他生活细胞发育功能的化学物质。主要用于治疗各种细菌感染或致病微生物感染类疾病,但是滥用抗生素会导致肝肾功能损害、菌群失调、抗生素相关性腹泻,以及细菌的耐药性增加、二重感染,甚至是延误病情导致死亡等严重不良反应的发生。

[0003] 氯霉素(Chloramphenicol,简称CAP)是由委内瑞拉链霉菌的培养液中提取出来的一种抗生素类药物,属于广谱抗生素,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用。并且具有吸收良好、价格便宜、抑菌性强和体内分布广泛等特点,因而被广泛应用于水产动物疾病防控。但是,毒理学研究表明,氯霉素可抑制骨髓细胞内线粒体蛋白质的合成,对人和动物骨髓细胞和肝细胞产生毒性作用,能引起再生障碍性贫血,并伴有白细胞和血小板减少现象,新生儿、早产儿灰色综合症等,还会诱发致病菌的耐药性,其在养殖业生产中的过量使用还会对食用者造成过敏、机体正常菌群失调和诱发癌症等危害,严重威胁人类的健康,美国、欧盟、日本等很多国家均禁止使用氯霉素。农业部在2002年发布的第235号公告《动物源性食品中兽药最高残留限量》中明确规定禁止氯霉素在所有可食动物中使用,在所有的可食动物组织中,不得有氯霉素检出。

[0004] 磺胺类药物是一种广谱抗菌药,在兽医临床上广泛应用于治疗由敏感细菌感染各种畜禽疾病,其中磺胺二甲嘧啶(Sulfadimidine,简称SM2)最为常用,其具有预防和抑制细菌感染性疾病的作用,同时也是动物的生长促进剂。适用于治疗溶血性链球菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌等感染疾病,药效持久。用作饲料添加剂,用于防治葡萄球菌及溶血性链球菌等的感染,即主要治疗禽霍乱、禽伤寒、鸡球虫病等。动物饲养过程中若长期使用抗生素类药物,会使动物体内致病细菌产生耐药,给动物疾病检疫与防治带来不利影响,且会使药物残留在动物体内。磺胺类药物残留期长,在畜禽等动物源性食品中的残留,严重危害食品安全与公众健康。我国GB29694-2013标准中对猪肉和鸡肉中13种磺胺二甲嘧啶药物HPLC方法的检测限设定为5 $\mu$ g/kg,定量限为10 $\mu$ g/kg。

[0005]  $\beta$ -内酰胺类抗生素( $\beta$ -lactams)是指化学结构中具有 $\beta$ -内酰胺环的一大类抗生素,包括临床最常用的青霉素与头孢菌素,以及新发展的头霉素类、硫霉素类、单环 $\beta$ -内酰胺类等其他非典型 $\beta$ -内酰胺类抗生素。此类抗生素具有杀菌活性强、毒性低、适应症广及临床疗效好的优点。其中青霉素G是最早应用于临床的抗生素,由于它具有杀菌力强、毒性低、价格低廉、使用方便等优点,迄今仍是处理敏感菌所致各种感染的首选药物。这类抗生素在

饲养业常出现非法滥用的情况,我国农业部印发2017年动物及产品兽药残留监控计划的通知中附件4《兽药残留检测方法 & 限量》中明确规定这类抗生素在牛奶中的限量为:青霉素G 4 $\mu$ g/kg、阿莫西林和氨苄西林10 $\mu$ g/kg。

[0006] 恩诺沙星 (Enrofloxacin, 简称ENR) 为广谱杀菌药,对支原体有特效。可作为动物用药品,属广效性抑菌剂,对于革兰氏阳性菌、阴性菌及霉形体具有抑菌作用,曾被使用于养殖鱼类之弧菌症及大肠杆菌症疾病的控制。本品对革兰氏阴性菌有很强的杀灭作用,对革兰氏阳性菌也有良好的抗菌作用,口服吸收好,血药浓度高且稳定,能广泛分布于组织中,其代谢产物为环丙沙星,仍有强大抗菌作用。几乎对水生动物所有病原菌的抗菌活性均较强。我国农业部第235号公告中明确规定动物性食品(肌肉)和奶制品中恩诺沙星(环丙沙星)检出限为100 $\mu$ g/kg。

[0007] 卡那霉素 (Kanamycin, 简称KAN) 是由链霉素菌 *Streptomyces Kanamyceticus* 所产生的抗生素,属于氨基糖苷类抗菌素。它主要通过跟细菌的30s核糖体RNA相互作用抑制其蛋白质合成而起到杀菌作用,对常见的致病菌,如大肠杆菌、结核杆菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阴性菌有很强的抑制作用。由于价格低廉且抗菌性广,卡那霉素作为兽药被广泛使用,然而,由于操作不当或监管不力,实际生产中,卡那霉素被滥用或在饲料中被过量使用,造成其在动物源性食品中存在残留。过量的卡那霉素给人体带来的副作用包括肾毒性、造血系统毒性、过敏性等。卡那霉素对婴幼儿有很强的耳毒性,会导致婴幼儿耳蜗细胞凋亡,严重者会导致听力丧失。因此,动物源性食品中卡那霉素残留的快速定量检测对于保障食品安全非常重要。我国GB/T22969-2008标准中用液相色谱串联质谱法对牛奶中的卡那霉素检测限为10 $\mu$ g/kg。

[0008] 四环素 (Tetracycline, 简称TC) 抗生素是20世纪40年代发现的一类具有菲烷母核的广谱抗生素,该类抗生素广泛应用于革兰阳性和阴性细菌、细胞内支原体、衣原体和立克次氏体引起的感染。此外,包括美国在内的一些国家,四环素还被大量用作生长促进剂投喂给动物。随着临床上四环素类抗生素耐药菌的大量产生及对其不良反应的深入了解,四环素的使用已经逐步退出市场,我国农业部第235号公告中明确规定动物食品(肌肉)中四环素检出限为100 $\mu$ g/kg。

[0009] 抗生素在国内外主要采用GC-MS, LC-MS, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 和胶体金标记免疫层析试纸条等技术来实现定性和定量检测。GC-MS、LC-MS和ELISA方法均需借助昂贵而复杂的仪器和设备来完成检测,成本高,并且需要高水平的专业人员来进行操作,实验结果耗时较长,无法实现现场检测,因此不适合于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象的快速在线检测和监控。所以市场急需建立更准确、快速、简单、检测限低和可以现场即时检测的分析方法以此来满足日益增长的检测需求。目前免疫学检测法是检测抗生素最重要的快速检测方法之一,越来越广泛地应用于基层一线。

[0010] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,通过抗原抗体结合的免疫反应原理,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测线),通过酶反应或直接运用可目测的标记物(如胶体金)而得到直观的实验结果(如检测线出现不同颜色的条带)。而游离标记物则越过检测线,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的目测标记载体有胶体金、乳胶、胶体硒等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但

是,胶体金免疫层析试纸条存在以下缺陷:

[0011] (1)一般试纸条均为通过肉眼观察结果进行定性分析,无法实现精准的定量检测。

[0012] (2)不同的材料基质效应明显,样本背景干扰较大,易产生假阳性结果。

[0013] (3)检测的阳性结果无法保存,通常超过判断时间后,结果不再准确可靠。

[0014] 市场为了满足对样本进行定量检测的需求,各种基于不同标记物的定量检测试纸条也层出不穷,一般目前的定量检测试纸条,都是单一的标记物标记抗体后,通过小型仪器读取显色信号值,再通过绘制标准曲线进行定量检测。目前基于不同元素标记物的荧光免疫层析方法也已经出现,并获得高灵敏度,但是该定量检测方法也存在以下缺陷:

[0015] (1)实际检测中,阴性结果所占比率很高,但该方法所有试纸条均需要用仪器读取,否则不能得到结果,在做大批量样本检测时,耗时较长!

[0016] (2)定量检测中,检测部门仍然需要一个阈值来区分阴性和阳性,所以数据处理量较大。

[0017] (3)单一的荧光微球试纸条灵敏度较高,但在实际应用中,较高的灵敏度其检测线性范围则较窄,样本定量浓度范围并不适合实际中的检测需求。

## 发明内容

[0018] 本发明的一个目的是针对上述现有技术缺陷,提供一种灵敏度高、检测时间短、操作简便并能同时实现定性和定量检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。

[0019] 本发明的另一个目的是提供上述试纸条的制备方法。

[0020] 为了实现上述目的本发明采取的一个技术方案是:

[0021] 提供一种检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。它包括底板,以及在底板上依次地搭接粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其中所述的玻璃纤维垫上喷涂有荧光微球和胶体金分别标记了抗生素单抗的复合物,所述的硝酸纤维素膜上包被有抗生素人工抗原作为检测线和包被有山羊抗小鼠抗体作为质控线。

[0022] 所述时间分辨荧光微球是直径为 $0.01\sim 10\mu\text{m}$ 的采用较长荧光半衰期的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的特殊微球,其表面连接有活性基团;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杂物以及量子点。

[0023] 所述的胶体金颗粒是直径为 $10\sim 100\text{nm}$ 的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

[0024] 所述的抗生素抗体与标记物偶联的标记终浓度范围为 $0.5\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$ ,抗生素偶联蛋白质的偶联比范围为 $1:10\sim 1:100$ ,偶联抗原的喷膜浓度范围为 $0.1\sim 10\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0025] 所述的荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物,在每张试纸条中不同标记物上的抗体量范围为 $1\sim 100\text{ng}/\text{条}$ ;

[0026] 所述的抗生素包括但不限于:氯霉素、磺胺类、 $\beta$ -内酰胺类、恩诺沙星、卡那霉素、四环素等。

[0027] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的方法,它包括如下的步骤:

[0028] (1)硝酸纤维素膜的制备

[0029] ①制备抗生素人工抗原

[0030] 将抗生素标准品与蛋白大分子通过共价偶联法制备质控区所需的人工抗原,偶联方法有:活泼脂法、混合酸酐法、碳二亚胺法。偶联蛋白可选:牛血清白蛋白和卵清蛋白。偶联比范围为:1:10~1:100。

[0031] ②检测线和质控线的制备

[0032] 分别将抗生素人工抗原和山羊抗小鼠抗体(或羊抗兔多抗)包被到硝酸纤维素膜上,制成检测线和质控线。用0.01~0.1M的PBS(pH范围为5.0~9.0)分别调节包被物浓度为0.1~10mg/mL,喷膜量为0.74 $\mu$ L/cm,检测线喷涂抗生素人工抗原,质控线喷涂抗鼠抗体,两区相隔5mm;37 $^{\circ}$ C烘干过夜处理后,室温干燥的环境下保存备用。

[0033] (2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0034] ①荧光微球通过共价偶联标记抗生素单抗(或多抗):取荧光微球超声1min,再用0.01~0.5M pH 5.0~9.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.01~1mg/mL,然后加入对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)使EDC终浓度为0.1~100mg/mL,振荡混匀后,室温反应30min,在该荧光微球中加入0.5~200 $\mu$ g的抗生素单抗(或多抗),充分混合后,室温搅拌反应1~4h,然后加入牛血清白蛋白(BSA)使其终浓度为1%,室温反应1h,然后在6000 $\times$ g离心5~15min,沉淀用相应浓度和pH值的缓冲液(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积,于4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0035] ②胶体金颗粒通过电荷作用和范德华力标记抗生素单抗(或多抗):取胶体金用0.02M的碳酸钾溶液调节pH为5.0~9.0,加入0.5~200 $\mu$ g的抗生素单抗(或多抗),充分混合后,室温搅拌反应1~4h,然后加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,室温反应1h,在5000 $\times$ g离心5~15min,沉淀用相应浓度和pH值的缓冲液(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶,复溶后体积为起始体积的十分之一,于4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0036] ③荧光微球和胶体金抗体标记复合物按照相互影响趋势而确定的比例混合,然后用BIODOT Dispensing System喷涂至玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,置于室温干燥的环境下备用。

[0037] (3)试纸条的组装

[0038] 在底板上依次搭接地粘贴下述材料:

[0039] ①滤纸;

[0040] ②样本垫;

[0041] ③喷涂有荧光微球-抗生素单克隆抗体复合物和胶体金-抗生素单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫;

[0042] ④抗生素人工抗原作为检测线和山羊抗小鼠抗体作为质控线的硝酸纤维素膜;

[0043] ⑤吸水纸。

[0044] 即组装成本发明的抗生素荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。

[0045] 用上述的荧光微球免疫层析试纸条检测样本中抗生素的方法,包括如下的步骤:

[0046] ①在试纸加样孔中加入110 $\mu$ L已提取样本,反应10min;

[0047] ②目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0048] ③如果检测线显色比质控线显色深,则样本中抗生素定性判断为阴性,反之,如果

检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中真菌素定性判断为阳性;

[0049] ④根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中抗生素的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0050] 特别说明:荧光微球-胶体金复合物垫的制备过程中,荧光微球和胶体金抗体标记复合物的混合比例并不是通过简单的试验就能得出的,胶体金的显色强弱因为光覆盖和光散射的原因会对荧光微球的显色造成影响,且其对荧光微球阴性和阳性结果的影响关系并不相同。本专利正是发现和掌握了胶体金和荧光微球之间的影响关系,确定了荧光微球和胶体金抗体标记复合物的最佳混合比例,才能成功的将两者混合为一个体系进行试纸条的制备,两者的影响关系具体见实施例。

[0051] 本发明的有益效果是:

[0052] 1. 双显色体系对样本中的抗生素同时实现定性和定量检测:本方法在一张试纸条上,先通过胶体金显色系统,目测检测线和质控线红色条带的深浅来进行定性检测。如果胶体金显示为阳性样本时,再通过荧光微球读取仪对荧光显色系统进行读取,得到阳性样本的准确浓度,实现定量检测。一张试纸条同时实现两种检测功能,样本结果在检测中得到双体系验证,结果更加可靠。

[0053] 2. 在实际应用中,阴性样本的占有比率是最大的,检测大批量样本时,先通过目测排除阴性结果,可以大大节约检测时间!阳性结果又可以进行再次精确定量,实现结果数据化和方便保存。

[0054] 3. 荧光微球表面携带活性化学基团,抗体标记使用的是化学偶联方法,形成抗体与微球的稳固结合,可以避免样本中基质的干扰,能较大程度排除单纯胶体金检测体系中的假阳性结果。

## 附图说明

[0055] 图1是抗生素荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条结构示意图;

[0056] 图2是氯霉素荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图;

[0057] 图3是氯霉素荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响;

[0058] 图4是氯霉素胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响;

[0059] 图5是 $\beta$ -内酰胺类荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图;

[0060] 图6是 $\beta$ -内酰胺类荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响;

[0061] 图7是 $\beta$ -内酰胺类胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响;

[0062] 图8是磺胺类荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图;

[0063] 图9是磺胺类荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响;

[0064] 图10是磺胺类胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响;

[0065] 图11是恩诺沙星荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图;

[0066] 图12是恩诺沙星荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响;

[0067] 图13是恩诺沙星胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响;

[0068] 图14是卡那霉素荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图；

[0069] 图15是卡那霉素荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响；

[0070] 图16是卡那霉素胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响；

[0071] 图17是四环素荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图；

[0072] 图18是四环素荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响；

[0073] 图19是四环素胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响。

[0074] 图1中,样本垫1、滤纸2、荧光微球-胶体金抗体复合物垫3、NC膜4、检测线5、质控线6、吸水纸7、PVC底板8。

[0075] 如图1所示,该类免疫层析试纸条的构成为:在PVC底板8上,依次搭接地粘贴喷涂有检测线5和质控线6的NC膜4、喷涂有荧光微球-胶体金抗体复合物的金垫3、样本垫1、滤纸2和吸水纸7,粘贴好后通过切条机切成 $4 \times 55\text{mm}$ 的试纸条,装入塑料卡壳中,即为一张完整的检测试纸条。

[0076] 如图2所示,检测原理如下:样本加入试纸条后,样本如果是阴性(氯霉素含量小于 $0.1\text{ng/mL}$ ),样本随层析方向层析,结合垫上的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到检测线位置,两种标记物质与检测线上的氯霉素偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带,且该条带显色比质控线深;部分未与偶联抗原结合的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置,抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带,该条带显色比检测线浅,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的氯霉素先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合,结合了氯霉素的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的氯霉素偶联抗原结合,则检测线胶体金显色变浅或消失,通过与质控线对照,如果检测线显色比质控线浅,则肉眼判断为阳性,再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度,通过数据分析,得出阳性样本中氯霉素的具体浓度。本检测体系中,荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0077] 如图3所示,氯霉素荧光微球复合物的浓度增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光微球系统干扰,从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发波长激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的,另一方面,荧光微球所偶联的抗体量远小于胶体金偶联的抗体量,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0078] 如图4所示,氯霉素胶体金复合物的浓度增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致,从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致标准曲线发生灵敏度和线性检测范围的差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据这个发现的影响和特点,并引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

[0079] 如图5所示,检测原理如下:样本加入试纸条后,样本如果是阴性(磺胺类药物含量小于 $5\text{ng/mL}$ ),样本随层析方向层析,结合垫上的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到检测

线位置,两种标记物质与检测线上的磺胺二甲嘧啶偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带,且该条带显色比质控线深;部分未与偶联抗原结合的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置,羊抗兔二抗可以和兔源性多抗发生结合从而质控线也显示红色条带,该条带显色比检测线浅,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的磺胺类药物先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合,结合了磺胺二甲嘧啶的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的磺胺二甲嘧啶偶联抗原结合,则检测线胶体金显色变浅或消失,通过与质控线对照,如果检测线显色比质控线浅,则肉眼判断为阳性,再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度,通过数据分析,得出阳性样本中磺胺类药物的具体浓度。本检测体系中,荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0080] 如图6所示,磺胺二甲嘧啶荧光微球复合物的浓度增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光微球系统干扰,从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发波长激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的,另一方面,荧光微球所偶联的抗体量远小于胶体金偶联的抗体量,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0081] 如图7所示,磺胺二甲嘧啶胶体金复合物的浓度增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致,从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致标准曲线发生灵敏度和线性检测范围的差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据这个发现的影响和特点,并引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

[0082] 如图8所示,检测原理如下:样本加入试纸条后,样本如果是阴性( $\beta$ -内酰胺类抗生素含量小于相关检测限),样本随层析方向层析,结合垫上的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到检测线位置,两种标记物质与检测线上的 $\beta$ -内酰胺类抗生素偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带,且该条带显色比质控线深;部分未与偶联抗原结合的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置,抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带,该条带显色比检测线浅,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的 $\beta$ -内酰胺类抗生素先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合,结合了 $\beta$ -内酰胺类抗生素的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的 $\beta$ -内酰胺类抗生素偶联抗原结合,则检测线胶体金显色变浅或消失,通过与质控线对照,如果检测线显色比质控线浅,则肉眼判断为阳性,再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度,通过数据分析,得出阳性样本中 $\beta$ -内酰胺类抗生素的具体浓度。本检测体系中,荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0083] 如图9所示, $\beta$ -内酰胺类抗生素荧光微球复合物的浓度增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光

微球系统干扰,从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发波长激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的,另一方面,荧光微球所偶联的抗体量远小于胶体金偶联的抗体量,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0084] 如图10所示, $\beta$ -内酰胺类抗生素胶体金复合物的浓度增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致,从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致标准曲线发生灵敏度和线性检测范围的差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据这个发现的影响和特点,并引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

[0085] 如图11所示,检测原理如下:样本加入试纸条后,样本如果是阴性(恩诺沙星含量小于100ng/mL),样本随层析方向层析,结合垫上的荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物涌动到检测线位置,两种标记物质与检测线上的恩诺沙星偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带,且该条带显色比质控线深;部分未与偶联抗原结合的荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置,抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带,该条带显色比检测线浅,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的恩诺沙星先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合,结合了恩诺沙星的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的恩诺沙星偶联抗原结合,则检测线胶体金显色变浅或消失,通过与质控线对照,如果检测线显色比质控线浅,则肉眼判断为阳性,再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度,通过数据分析,得出阳性样本中恩诺沙星的具体浓度。本检测体系中,荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0086] 如图12所示,恩诺沙星荧光微球复合物浓度的增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光微球系统干扰。从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发光激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的,另一方面,荧光微球所偶联的抗体量远小于胶体金偶联的抗体量,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0087] 如图13所示,恩诺沙星胶体金复合物浓度的增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致。从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致由标准曲线得到的灵敏度和线性检测范围有所差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据这个现象的影响和特点,并引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

[0088] 如图14所示,检测原理如下:样本加入试纸条后,样本如果是阴性(卡那霉素含量小于10ng/mL),样本随层析方向层析,结合垫上的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到检测线位置,两种标记物质与检测线上的卡那霉素偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带,且该条带显色

比质控线深;部分未与偶联抗原结合的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置,抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带,该条带显色比检测线浅,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的卡那霉素先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合,结合了卡那霉素的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的卡那霉素偶联抗原结合,则检测线胶体金显色变浅或消失,通过与质控线对照,如果检测线显色比质控线浅,则肉眼判断为阳性,再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度,通过数据分析,得出阳性样本中卡那霉素的具体浓度。本检测体系中,荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0089] 如图15所示,卡那霉素荧光微球复合物的浓度增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光微球系统干扰,从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发波长激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的,另一方面,荧光微球所偶联的抗体量远小于胶体金偶联的抗体量,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0090] 如图16所示,卡那霉素胶体金复合物的浓度增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致,从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致标准曲线发生灵敏度和线性检测范围的差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据这个发现的影响和特点,并引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

[0091] 如图17所示,检测原理如下:样本加入试纸条后,样本如果是阴性(四环素含量小于100ng/mL),样本随层析方向层析,结合垫上的荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物涌动到检测线位置,两种标记物质与检测线上的四环素偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物,胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带,且该条带显色比质控线深;部分未与偶联抗原结合的荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置,抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带,该条带显色比检测线浅,通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性,则样本中的四环素先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合,结合了四环素的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的四环素偶联抗原结合,则检测线胶体金显色变浅或消失,通过与质控线对照,如果检测线显色比质控线浅,则肉眼判断为阳性,再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度,通过数据分析,得出阳性样本中四环素的具体浓度。本检测体系中,荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致,胶体金显色体系用来进行定性检测,荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0092] 如图18所示,四环素荧光微球复合物浓度的增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光微球系统干扰。从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发光激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的;另一方面,荧光微球所偶联的抗体量远小于胶体金偶联的抗体量,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0093] 如图19所示,四环素胶体金复合物浓度的增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致。从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致由标准曲线得到的灵敏度和线性检测范围有所差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据这个现象的影响和特点,在引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

## 具体实施方式

[0094] 氯霉素实施例(1-3)

[0095] 实施例1:检测氯霉素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0096] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0097] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0098] (1) 制备氯霉素人工抗原(CAP-BSA)

[0099] 偶联方法为活泼脂法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到CAP-BSA。

[0100] (2) 检测线和质控线的制备

[0101] CAP-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.5的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释CAP-BSA偶联物的浓度为0.6mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为0.6mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜体积均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干过夜,放置于干燥柜中保存备用。

[0102] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0103] (1) 荧光微球标记氯霉素单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1min,用pH 8.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.05mg/mL,然后分别加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L和20mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS) 100 $\mu$ L(用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入8 $\mu$ g氯霉素单克隆抗体,充分混合后室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.03M pH8.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用。

[0104] (2) 胶体金标记氯霉素单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为7.4,加入60 $\mu$ g氯霉素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入1%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.4的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用。

[0105] (3) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为40ng/条、荧光微球标记抗体量为6ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.01、0.03、0.05、0.1、0.3ng/mL, $R^2$ 为0.9969, $IC_{50}$ 为0.05ng/mL,线性回归方程式为: $y = -2189.97x + -1056.99$ 。

[0106] 3. 组装试纸条

[0107] (1)滤纸和样本垫规格为 $1 \times 30\text{cm}$ ;

[0108] (2)喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维,规格为 $0.8 \times 30\text{cm}$ ;

[0109] (3)已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为 $2.5 \times 30\text{cm}$ ;

[0110] (4)吸水纸,规格为 $1.2 \times 30\text{cm}$ ;

[0111] (5)PVC底板,规格为 $5.5 \times 30\text{cm}$ 。

[0112] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成 $4 \times 55\text{mm}$ 的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为12个月。

[0113] 二、定性并定量检测样本中的氯霉素

[0114] 1. 在试纸条加样孔中加入 $110\mu\text{L}$ 样本,反应 $10\text{min}$ ;

[0115] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0116] 3. 如果检测线显色比质控线显色深,则样本中氯霉素的含量小于 $0.1\text{ng/mL}$ ,定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中氯霉素含量大于 $0.1\text{ng/mL}$ ,定性判断为阳性;

[0117] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中氯霉素的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0118] 5. 样本验证:实验过程中,以氯霉素标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为 $0$ 、 $0.03$ 、 $0.05$ 、 $0.10$ 、 $0.18\text{ng/mL}$ ),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表2。

[0119] 实施例2:检测氯霉素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球标记复合物占比上升)

[0120] 与实施例1不同之处在于:

[0121] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为 $40\text{ng/条}$ 、荧光微球标记抗体量为 $10\text{ng/条}$ 的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至 $30 \times 0.8\text{cm}$ 的玻璃纤维膜上, $25^\circ\text{C}$ 真空干燥 $1 \sim 2\text{h}$ ,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为: $0$ 、 $0.01$ 、 $0.03$ 、 $0.05$ 、 $0.1$ 、 $0.3\text{ng/mL}$ , $R^2$ 为 $0.9176$ , $\text{IC}_{50}$ 为 $0.17\text{ng/mL}$ ,线性较差。胶体金目测检测结果正常。

[0122] (2)组装试纸条:试验中同实施例1,但不形成产品,不进行保存试验。

[0123] (3)样本验证:实验过程中,以氯霉素标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为 $0$ 、 $0.03$ 、 $0.05$ 、 $0.10$ 、 $0.18\text{ng/mL}$ ),用本方法检测,荧光微球检测出现1例假阴性结果,数据见表2。

[0124] 其余同实施例1。

[0125] 实施例3:检测氯霉素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)

[0126] 与实施例1不同之处在于：

[0127] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后，按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算，精确到胶体金标记抗体量为60ng/条、荧光微球标记抗体量为6ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂，喷涂至30×0.8cm的玻璃纤维膜上，25℃真空干燥1~2h，放于干燥柜中备用。检测结果为：该条件下标准曲线浓度为：0、0.01、0.03、0.05、0.1、0.3ng/mL， $R^2$ 为0.9287， $IC_{50}$ 为0.12ng/mL，线性较差。胶体金灵敏度下降，约为0.3ng/mL左右。

[0128] (2)组装试纸条：试验中同实施例1，但不形成产品，不进行保存试验。

[0129] (3)样本验证：实验过程中，以氯霉素标准品配制已知系列浓度的样品，测出其对应的荧光强度的数值，从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测（该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、0.03、0.05、0.10、0.18ng/mL），用本方法检测，胶体金出现2例假阴性结果，荧光微球出现1例假阴性结果，数据见表2。

[0130] 其余同实施例1。

[0131] 实施例结果分析：

[0132] 从三个实施例中可以得知，胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时，并不是简单的按照一定的比例进行混合，本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素，从图3和图4可以看出，胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素，其对荧光微球体系有着重大的影响，而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后，找到最主要的影响因素为：胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化，均能影响本实验的最终结果，特别是荧光微球体系的检测线性范围比较难掌握，因为在单独的体系中，荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高，检测线性范围比胶体金体系窄，如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键，相关影响因素结果可以见表1。在研究中发现，并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标，通过计算两种标记物上的抗体分子数量，发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量，那么在阳性结果的检测中，就会出现互相干扰的现象，只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时，两套检测体系才能独立并同时存在，在发现和掌握其影响规律后，本发明确定了最优的条件配比，得到既能满足胶体金目测系统要求，又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关系，我们制备了三种不同的双系统试纸条，并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的可靠性（具体数据见表2），根据试验结果可以看出，只有按照最优的条件制备的试纸条（实施例1为最优条件），其检测结果与确证结果才完全符合，另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条，都存在一定比例的假阴性。

[0133] 表1试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0134]

胶体金抗体用量 (ng/条)	$IC_{50}$ (ng/mL)	$R^2$	检测线性范围 (ng/mL)
0	0.01	0.8729	0.005-0.05
10	0.02	0.8189	0.005-0.05

20	0.01	0.9018	0.005-0.05
30	0.03	0.9287	0.01-0.3
40	0.05	0.9969	0.01-0.3
50	0.05	0.9065	0.01-0.3
60	0.12	0.9287	0.03-0.3
70	0.09	0.9251	0.03-0.3

[0135] 表2三个实施例检测结果比对

[0136]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例 1 结果		实施例 2 结果		实施例 3 结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)
1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	0.03	阴性	0.03	阴性	0	阴性	0.01
3	0.05	阴性	0.04	阴性	0.01	阴性	0.03
4	0.1	阳性	0.12	阳性	0.06	阴性	0.81
5	0.18	阳性	0.22	阳性	0.1	阴性	0.12

[0137] 磺胺类实施例 (4-6)

[0138] 实施例4:检测磺胺类药物的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0139] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0140] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0141] (1) 制备磺胺二甲嘧啶人工抗原(SM2-BSA)

[0142] 偶联方法为活泼脂法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到SM2-BSA。

[0143] (2) 检测线和质控线的制备

[0144] SM2-BSA偶联物和抗兔抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.0的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释SM2-BSA偶联物的浓度为0.3mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗兔抗体的浓度为0.7mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜量均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干过夜,放置于干燥柜中保存备用。

[0145] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0146] (1) 荧光微球标记磺胺类多克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1分钟,用pH 6.5的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后分别加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲氨基丙碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L和20mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS) 100 $\mu$ L(用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入15 $\mu$ g磺胺类多克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH6.5的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用。

[0147] (2)胶体金标记磺胺类多克隆抗体的制备:取40mL胶体金(40nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为6.2,加入120 $\mu$ g磺胺类多克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入1%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH6.2的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用。

[0148] (3)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为20ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、1、3、9、27、81ng/mL, $R^2$ 为0.9808, $IC_{50}$ 为3.6ng/mL,线性回归方程式为: $y=-1598.13x+3041.41$ 。

[0149] 3. 组装试纸条

[0150] (1)滤纸和样本垫规格为1 $\times$ 30cm;

[0151] (2)喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维,规格为0.8 $\times$ 30cm;

[0152] (3)已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5 $\times$ 30cm;

[0153] (4)吸水纸,规格为1.2 $\times$ 30cm;

[0154] (5)PVC底板,规格为5.5 $\times$ 30cm。

[0155] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4 $\times$ 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为12个月。

[0156] 二、定性并定量检测样本中的磺胺类药物

[0157] 1. 在试纸条加样孔中加入110 $\mu$ L样本,反应10min;

[0158] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0159] 3. 如果检测线显色比质控线显色深,则样本中磺胺类药物的含量小于5ng/mL,定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中磺胺类药物的含量大于5ng/mL,定性判断为阳性;

[0160] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中磺胺类药物的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0161] 5. 样本验证:实验过程中,以磺胺二甲嘧啶标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0、2.4、5.6、11.3、15.8ng/mL),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表4。

[0162] 实施例5:检测磺胺类药物的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球标记复合物占比上升)

[0163] 与实施例4不同之处在于:

[0164] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为20ng/条、荧光微球标记抗体量为6ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~

2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、1、3、9、27、81ng/mL, $R^2$ 为0.9100, $IC_{50}$ 为4.2ng/mL,线性较差。胶体金目测检测结果正常。

[0165] (2)组装试纸条:试验中同实施例4,但不形成产品,不进行保存试验。

[0166] (3)样本验证:实验过程中,以磺胺二甲嘧啶标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、2.4、5.6、11.3、15.8ng/mL),用本方法检测,荧光微球检测出现1例假阴性结果,数据见表4。

[0167] 其余同实施例4。

[0168] 实施例6:检测磺胺类药物的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)

[0169] 与实施例4不同之处在于:

[0170] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为30ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至 $30 \times 0.8$ cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、1、3、9、27、81ng/mL, $R^2$ 为0.8991, $IC_{50}$ 为3.9ng/mL,线性较差。胶体金灵敏度下降,约为8ng/mL左右。

[0171] (2)组装试纸条:试验中同实施例4,但不形成产品,不进行保存试验。

[0172] (3)样本验证:实验过程中,以磺胺二甲嘧啶标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、2.4、5.6、11.3、15.8ng/mL),用本方法检测,胶体金出现1例假阴性结果,荧光微球出现1例假阴性结果,数据见表4。

[0173] 其余同实施例4。

[0174] 实施例结果分析:

[0175] 从三个实施例中可以得知,胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时,并不是简单的按照一定的比例进行混合,本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素,从图6和图7可以看出,胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素,其对荧光微球体系有着重大的影响,而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后,找到最主要的影响因素为:胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化,均能影响本实验的最终结果,特别是荧光微球体系的检测线性范围比较难掌握,因为在单独的体系中,荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高,检测线性范围比胶体金体系窄,如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键,相关影响因素结果可以见表3。在研究中发现,并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标,通过计算两种标记物上的抗体分子数量,发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量,那么在阳性结果的检测中,就会出现互相干扰的现象,只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时,两套检测体系才能独立并同时存在,在发现和掌握其影响规律后,本发明确定了最优的条件配比,得到既能满足胶体金目测系统要求,又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关

系,我们制备了三种不同的双系统试纸条,并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的可靠性(具体数据见表4),根据试验结果可以看出,只有按照最优的条件制备的试纸条(实施例4为最优条件),其检测结果与确证结果才完全符合,另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条,都存在一定比例的假阴性。

[0176] 表3试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0177]

胶体金抗体用量 (ng/条)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	R <sup>2</sup>	检测线性范围 (ng/mL)
0	0.6	0.9191	0.1-5
5	0.8	0.9011	0.1-5
10	1.7	0.8910	0.1-5
20	3.6	0.9808	1-81
30	4.2	0.9129	1-81
40	3.9	0.8991	1-27

[0178] 表4三个实施例检测结果比对

[0179]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例 4 结果		实施例 5 结果		实施例 6 结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)

[0180]

1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	2.4	阴性	2.0	阴性	1.7	阴性	1.8
3	5.6	阳性	5.1	阳性	4.8	阴性	4.4
4	11.3	阳性	12.0	阳性	10.2	阳性	9.9
5	15.8	阳性	14.3	阳性	13.7	阳性	13.6

[0181] β-内酰胺类实施例(7-9)

[0182] 实施例7:检测β-内酰胺类抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0183] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0184] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0185] (1) 制备β-内酰胺类抗生素人工抗原(以青霉素G为半抗原制备)

[0186] 偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:50-1:100,偶联后透析纯化,得到青霉素G-BSA。

[0187] (2) 检测线和质控线的制备

[0188] 青霉素G-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH7.4的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释青霉素G-BSA偶联物的浓度为1.2mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1.5mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜量均为0.74μL/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37℃烘干12小时,放置于干燥

柜中保存备用。

[0189] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0190] (1) 荧光微球标记 $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体的制备: 取1mg荧光微球超声1分钟, 用pH 7.4的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL, 然后分别加入60mg/mL对乙基-N, N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC) 300 $\mu$ L和30mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 100 $\mu$ L (用pH 7.4的硼酸盐缓冲液溶解), 振荡混匀后, 室温孵育30min后, 1mL荧光微球中加入15 $\mu$ g $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体, 充分混合后, 室温搅拌反应3h, 6000 $\times$ g离心力离心20min, 超纯水离心洗涤3次, 沉淀用0.01M pH 7.4的PBS (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶为起始体积后待用。

[0191] (2) 胶体金标记 $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体的制备: 取40mL胶体金 (35nm粒径), 用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为7.4, 加入80 $\mu$ g $\beta$ -内酰胺类抗生素单克隆抗体, 充分混合后, 室温搅拌反应1h, 加入10%的牛血清白蛋白4mL, 封闭反应30min, 5000 $\times$ g离心力离心20min, 超纯水离心洗涤3次, 沉淀用0.01M pH 7.4的PBS (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶为1/10起始体积后待用。

[0192] (3) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后, 按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算, 精确到胶体金标记抗体量为20ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂, 喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上, 25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h, 放于干燥柜中备用。检测结果为: 该条件下标准曲线浓度为: 0、0.5、1、2、4、8ng/mL,  $R^2$ 为0.9928,  $IC_{50}$ 为2.1ng/mL, 线性回归方程式为:  $y = -1891.11x + 2109.21$ 。

[0193] 3. 组装试纸条

[0194] (1) 滤纸和样本垫规格为1 $\times$ 30cm;

[0195] (2) 喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维, 规格为0.8 $\times$ 30cm;

[0196] (3) 已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜, 规格为2.5 $\times$ 30cm;

[0197] (4) 吸水纸, 规格为1.2 $\times$ 30cm;

[0198] (5) PVC底板, 规格为5.5 $\times$ 30cm。

[0199] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴, 组装好后用切刀裁切成4 $\times$ 55mm的试纸条, 装入塑料卡壳中, 压紧后装入铝箔袋, 加入干燥剂后, 封口保存, 室温环境保质期为12个月。

[0200] 二、定性并定量检测样本中的 $\beta$ -内酰胺类抗生素

[0201] 1. 在试纸条加样孔中加入110 $\mu$ L样本, 反应10min;

[0202] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0203] 3. 如果检测线显色比质控线显色深, 则样本中 $\beta$ -内酰胺类抗生素的含量小于相关检测限, 定性判断为阴性, 反之, 如果检测线显色比质控线显色浅, 或者检测线没有显示红色条带, 则样本中 $\beta$ -内酰胺类抗生素含量大于相关检测限, 定性判断为阳性;

[0204] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果, 如果样本为阳性时, 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口, 检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示, 根据仪器中已经录入的标准曲线, 即可计算出样本中 $\beta$ -内酰胺类抗生素的含量, 实现阳性样本的定量检测, 胶体金显色后, 在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0205] 5. 样本验证: 实验过程中, 以 $\beta$ -内酰胺类抗生素标准品配制已知系列浓度的样品,

测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量青霉素G为0、1.1、5、7.2、10.7ng/mL),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表6。

[0206] 实施例8:检测 $\beta$ -内酰胺类抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球标记复合物占比上升)

[0207] 与实施例7不同之处在于:

[0208] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为20ng/条、荧光微球标记抗体量为6ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至 $30 \times 0.8$ cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.5、1、2、4、8ng/mL, $R^2$ 为0.9130, $IC_{50}$ 为2.7ng/mL线性较差。胶体金目测检测结果正常。

[0209] (2)组装试纸条:试验中同实施例7,但不形成产品,不进行保存试验。

[0210] (3)样本验证:实验过程中,以 $\beta$ -内酰胺类抗生素标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量青霉素G为0、1.1、5、7.2、10.7ng/mL),用本方法检测,荧光微球检测出现1例假阴性结果,数据见表6。

[0211] 其余同实施例7。

[0212] 实施例9:检测 $\beta$ -内酰胺类抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)

[0213] 与实施例7不同之处在于:

[0214] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为30ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至 $30 \times 0.8$ cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.5、1、2、4、8ng/mL, $R^2$ 为0.8999, $IC_{50}$ 为1.9ng/mL。胶体金目测检测结果正常。

[0215] (2)组装试纸条:试验中同实施例7,但不形成产品,不进行保存试验。

[0216] (3)样本验证:实验过程中,以 $\beta$ -内酰胺类抗生素标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量青霉素G为0、1.1、5、7.2、10.7ng/mL),用本方法检测,荧光微球检测出现1例假阴性结果,数据见表6。

[0217] 其余同实施例7。

[0218] 实施例结果分析:

[0219] 从三个实施例中可以得知,胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时,并不是简单的按照一定的比例进行混合,本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素,从图9和图10可以看出,胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素,其对荧光微球体系有着重大的影响,而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后,找到最主要的影响因素为:胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化,均能影响本实验的最终结果,特别是荧光微

球体系的检测线性范围比较难掌握,因为在单独的体系中,荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高,检测线性范围比胶体金体系窄,如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键,相关影响因素结果可以见表5。在研究中发现,并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标,通过计算两种标记物上的抗体分子数量,发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量,那么在阳性结果的检测中,就会出现互相干扰的现象,只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时,两套检测体系才能独立并同时存在,在发现和掌握其影响规律后,本发明确定了最优的条件配比,得到既能满足胶体金目测系统要求,又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关系,我们制备了三种不同的双系统试纸条,并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的可靠性(具体数据见表6),根据试验结果可以看出,只有按照最优的条件制备的试纸条(实施例7为最优条件),其检测结果与确证结果才完全符合,另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条,都存在一定比例的假阴性。

[0220] 表5试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0221]

胶体金抗体用量(ng/条)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	R <sup>2</sup>	检测线性范围 (ng/mL)
0	0.1	0.8922	0.05-2

[0222]

5	0.3	0.9198	0.05-2
10	1.1	0.9210	0.5-8
20	2.1	0.9928	0.5-8
30	1.7	0.8762	0.5-8
40	2.7	0.8999	0.5-4

[0223] 表6三个实施例检测结果比对

[0224]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例7结果		实施例8结果		实施例9结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)
1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	1.1	阴性	0.8	阴性	0.6	阴性	0.4
3	5	阳性	4.3	阳性	3.7	阳性	3.2
4	7.2	阳性	6.9	阳性	6.0	阳性	5.8
5	10.7	阳性	9.1	阳性	7.3	阳性	8.2

[0225] 恩诺沙星实施例(10-12)

[0226] 实施例10:检测恩诺沙星(环丙沙星)的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0227] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0228] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0229] (1) 制备恩诺沙星人工抗原(ENR-BSA)

[0230] 偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到ENR-BSA。

[0231] (2) 检测线和质控线的制备

[0232] ENR-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.5的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释ENR-BSA偶联物的浓度为1.7mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1.5mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为质控线,两线的喷膜体积均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0233] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0234] (1) 荧光微球标记恩诺沙星单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1分钟,用pH 8.5的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后分别加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L(用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入35 $\mu$ g恩诺沙星单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 8.5的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用。

[0235] (2) 胶体金标记恩诺沙星单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为8.0,加入120 $\mu$ g恩诺沙星单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入1%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 8.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用。

[0236] (3) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为50ng/条、荧光微球标记抗体量为7ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、10、50、100、200、500ng/mL, $R^2$ 为0.9893, $IC_{50}$ 为53.6ng/mL,线性回归方程式为: $y = -1768.23x + 2651.90$ 。

[0237] 3. 组装试纸条

[0238] (1) 滤纸和样本垫规格为1 $\times$ 30cm;

[0239] (2) 喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维,规格为0.8 $\times$ 30cm;

[0240] (3) 已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5 $\times$ 30cm;

[0241] (4) 吸水纸,规格为1.2 $\times$ 30cm;

[0242] (5) PVC底板,规格为5.5 $\times$ 30cm。

[0243] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4 $\times$ 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为12个月。

[0244] 二、定性并定量检测样本中的恩诺沙星(环丙沙星)

- [0245] 1. 在试纸条加样孔中加入110 $\mu$ L样本,反应10min;
- [0246] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;
- [0247] 3. 如果检测线显色比质控线显色深,则样本中恩诺沙星(环丙沙星)的含量小于100ng/mL,定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中恩诺沙星(环丙沙星)含量大于100ng/mL,定性判断为阳性;
- [0248] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中恩诺沙星(环丙沙星)的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。
- [0249] 5. 样本验证:实验过程中,以恩诺沙星标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而将这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线录入仪器中。对5个已知浓度样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0、19、68、137、200ng/mL),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表8。
- [0250] 其余同实施例10。
- [0251] 实施例11:检测恩诺沙星(环丙沙星)的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球标记复合物占比上升)
- [0252] 与实施例10不同之处在于:
- [0253] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为50ng/条、荧光微球标记抗体量为14ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、10、50、100、200、500ng/mL, $R^2$ 为0.9098, $IC_{50}$ 为61.8ng/mL,线性较一般。胶体金目测检测结果正常。
- [0254] (2)组装试纸条:试验中同实施例10,但不形成产品,不进行保存试验。
- [0255] (3)样本验证:实验过程中,以恩诺沙星标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而将这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线录入仪器中。对5个已知浓度样本进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0、19、68、137、200ng/mL),用本方法检测,回收率较低,数据见表8。其余同实施例10。
- [0256] 实施例12:检测恩诺沙星(环丙沙星)的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)
- [0257] 与实施例10不同之处在于:
- [0258] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为70ng/条、荧光微球标记抗体量为7ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、10、50、100、200、500ng/mL, $R^2$ 为0.8993, $IC_{50}$ 为58.9ng/mL,线性较差。
- [0259] (2)组装试纸条:试验中同实施例10,但不形成产品,不进行保存试验。
- [0260] (3)样本验证:实验过程中,以恩诺沙星标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而将这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线录入仪器中。对5个已知浓度样本进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0、19、68、137、200ng/mL),用本方法

检测, 荧光微球出现1例假阴性结果, 数据见表8。其余同实施例10。

[0261] 实施例结果分析:

[0262] 从三个实施例中可以得知, 胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时, 并不是简单地按照一定的比例进行混合, 本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素, 从图12和图13可以看出, 胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素, 其对荧光微球体系有着重大的影响, 而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后, 找到最主要的影响因素为: 胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化, 均能影响本实验的最终结果, 特别是荧光微球体系的检测线性范围比较难掌握, 因为在单独的体系中, 荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高, 检测线性范围比胶体金体系窄, 如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键, 相关影响因素结果见表7。在研究中发现, 并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标, 通过计算两种标记物上的抗体分子数量, 发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量, 那么在阳性结果的检测中, 就会出现互相干扰的现象, 只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时, 两套检测体系才能独立并同时存在, 在发现和掌握其影响规律后, 本发明确定了最优的条件配比, 得到既能满足胶体金目测系统要求, 又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关系, 我们制备了三种不同的双系统试纸条, 并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的可靠性(具体数据见表8), 根据试验结果可以看出, 只有按照最优的条件制备的试纸条(实施例10为最优条件), 其检测结果与确证结果才完全符合, 另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条, 都存在一定比例的假阴性。

[0263] 表7试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0264]

胶体金抗体用量 (ng/条)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	R <sup>2</sup>	检测线性范围 (ng/mL)
0	2.8	0.9075	1-20
10	23.1	0.8937	10-100
30	29.8	0.8291	10-100
50	48.9	0.9097	10-200
70	53.6	0.9893	10-500
90	57.2	0.8976	10-500
110	58.9	0.8993	10-200

[0265] 表8三个实施例检测结果比对

[0266]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例 10 结果		实施例 11 结果		实施例 12 结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)
1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	19	阴性	17	阴性	12	阴性	14
3	68	阴性	62	阴性	52	阴性	42
4	137	阳性	121	阳性	117	阳性	98
5	200	阳性	193	阳性	183	阳性	142

[0267] 卡那霉素实施例(13-15)

[0268] 实施例13:检测卡那霉素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0269] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0270] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0271] (1) 制备卡那霉素人工抗原(KAN-BSA)

[0272] 偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到KAN-BSA。

[0273] (2) 检测线和质控线的制备

[0274] KAN-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 6.0的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释KAN-BSA偶联物的浓度为1mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1.5mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜量均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0275] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0276] (1) 荧光微球标记卡那霉素单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1分钟,用pH 6.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后分别加入30mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L和50mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS) 100 $\mu$ L(用pH6.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入12 $\mu$ g卡那霉素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.05M pH6.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用。[0277] (2) 胶体金标记卡那霉素单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶液调节胶体金的pH为6.0,加入120 $\mu$ g卡那霉素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入10%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 6.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用。[0278] (3) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为40ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~

2h, 放于干燥柜中备用。检测结果为: 该条件下标准曲线浓度为: 0、1、5、25、50、100ng/mL,  $R^2$  为 0.9901,  $IC_{50}$  为 5.7ng/mL, 线性回归方程式为:  $y = -1303.80x + 2929.73$ 。

[0279] 3. 组装试纸条

[0280] (1) 滤纸和样本垫规格为  $1 \times 30$ cm;

[0281] (2) 喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维, 规格为  $0.8 \times 30$ cm;

[0282] (3) 已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜, 规格为  $2.5 \times 30$ cm;

[0283] (4) 吸水纸, 规格为  $1.2 \times 30$ cm;

[0284] (5) PVC 底板, 规格为  $5.5 \times 30$ cm。

[0285] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴, 组装好后用切刀裁切成  $4 \times 55$ mm 的试纸条, 装入塑料卡壳中, 压紧后装入铝箔袋, 加入干燥剂后, 封口保存, 室温环境保质期为 12 个月。

[0286] 二、定性并定量检测样本中的卡那霉素

[0287] 1. 在试纸条加样孔中加入  $110 \mu\text{L}$  样本, 反应 10min;

[0288] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0289] 3. 如果检测线显色比质控线显色深, 则样本中卡那霉素的含量小于  $10 \text{ng/mL}$ , 定性判断为阴性, 反之, 如果检测线显色比质控线显色浅, 或者检测线没有显示红色条带, 则样本中卡那霉素含量大于  $10 \text{ng/mL}$ , 定性判断为阳性;

[0290] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果, 如果样本为阳性时, 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口, 检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示, 根据仪器中已经录入的标准曲线, 即可计算出样本中卡那霉素的含量, 实现阳性样本的定量检测, 胶体金显色后, 在 20 分钟内读取的荧光数据均有效。

[0291] 5. 样本验证: 实验过程中, 以卡那霉素标准品配制已知系列浓度的样品, 测出其对应的荧光强度的数值, 从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对 5 个已知浓度样进行检测 (该已知样本经 GC-MS 法定量为 0、1.5、5.9、12.4、33ng/mL), 用本方法检测, 完全符合确证样本结果, 具体数据见表 10。

[0292] 实施例 14: 检测卡那霉素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备 (荧光微球标记复合物占比上升)

[0293] 与实施例 13 不同之处在于:

[0294] (1) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后, 按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算, 精确到胶体金标记抗体量为  $40 \text{ng/条}$ 、荧光微球标记抗体量为  $6 \text{ng/条}$  的浓度来进行结合垫的喷涂, 喷涂至  $30 \times 0.8$ cm 的玻璃纤维膜上,  $25^\circ\text{C}$  真空干燥 1~2h, 放于干燥柜中备用。检测结果为: 该条件下标准曲线浓度为: 0、1、5、25、50、100ng/mL,  $R^2$  为 0.8209,  $IC_{50}$  为  $6.4 \text{ng/mL}$ , 线性较差。胶体金目测检测结果正常。

[0295] (2) 组装试纸条: 试验中同实施例 13, 但不形成产品, 不进行保存试验。

[0296] (3) 样本验证: 实验过程中, 以卡那霉素标准品配制已知系列浓度的样品, 测出其对应的荧光强度的数值, 从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对 5 个已知浓度猪尿样进行检测 (该已知尿样样本经 GC-MS 法定量为 0、1.5、5.9、12.4、33ng/mL), 用本方法检测, 荧光微球检测出现 1 例假阴性结果, 数据见表 10。

[0297] 其余同实施例 13。

[0298] 实施例15:检测卡那霉素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)

[0299] 与实施例13不同之处在于:

[0300] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为60ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30×0.8cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、1、5、25、50、100ng/mL,  $R^2$ 为0.8991,  $IC_{50}$ 为4.2ng/mL,线性较差。

[0301] (2)组装试纸条:试验中同实施例13,但不形成产品,不进行保存试验。

[0302] (3)样本验证:实验过程中,以卡那霉素标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、1.5、5.9、12.4、33ng/mL),用本方法检测,胶体金出现1例假阴性结果,数据见表10。

[0303] 其余同实施例13。

[0304] 实施例结果分析:

[0305] 从三个实施例中可以得知,胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时,并不是简单的按照一定的比例进行混合,本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素,从图15和图16可以看出,胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素,其对荧光微球体系有着重大的影响,而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后,找到最主要的影响因素为:胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化,均能影响本实验的最终结果,特别是荧光微球体系的检测线性范围比较难掌握,因为在单独的体系中,荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高,检测线性范围比胶体金体系窄,如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键,相关影响因素结果可以见表9。在研究中发现,并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标,通过计算两种标记物上的抗体分子数量,发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量,那么在阳性结果的检测中,就会出现互相干扰的现象,只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时,两套检测体系才能独立并同时存在,在发现和掌握其影响规律后,本发明确定了最优的条件配比,得到既能满足胶体金目测系统要求,又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关系,我们制备了三种不同的双系统试纸条,并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的可靠性(具体数据见表10),根据试验结果可以看出,只有按照最优的条件制备的试纸条(实施例13为最优条件),其检测结果与确证结果才完全符合,另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条,都存在一定比例的假阴性。

[0306] 表9试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0307]

胶体金抗体用量 (ng/条)	$IC_{50}$ (ng/mL)	$R^2$	检测线性范围 (ng/mL)
0	0.9	0.8676	0.1-5
20	2.1	0.8991	1-25

40	5.7	0.9901	1-100
50	4.5	0.8964	1-50
60	4.2	0.9109	1-50
70	5.9	0.9111	1-50

[0308] 表10三个实施例检测结果比对

[0309]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例 13 结果		实施例 14 结果		实施例 15 结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)
1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	1.5	阴性	1.01	阴性	1.1	阴性	1.2

[0310]

3	5.9	阴性	5.1	阴性	4.8	阴性	4.1
4	12.4	阳性	11.8	阳性	9.5	阴性	10.3
5	33	阳性	29.8	阳性	29.3	阳性	27.3

[0311] 四环素实施例(16-18)

[0312] 实施例16:检测四环素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0313] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0314] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0315] (1) 制备四环素人工抗原(TC-BSA)

[0316] 偶联方法为碳二亚胺法,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到TC-BSA。

[0317] (2) 检测线和质控线的制备

[0318] TC-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 6.0的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释TC-BSA偶联物的浓度为1mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为1mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为质控线,两线的喷膜体积均为0.74 $\mu$ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0319] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0320] (1) 荧光微球标记四环素单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1分钟,用pH 7.2的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.05mg/mL,然后分别加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 300 $\mu$ L和20mg/mL氮羟基琥珀酰亚胺(NHS) 100 $\mu$ L(用pH 8.0的硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,室温孵育30min后,1mL荧光微球中加入13 $\mu$ g四环素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应3h,6000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.2的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后待用。

[0321] (2) 胶体金标记四环素单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(35nm粒径),用碳酸钾溶

液调节胶体金的pH为7.5,加入50 $\mu$ g四环素单克隆抗体,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入1%的牛血清白蛋白4mL,封闭反应30min,5000 $\times$ g离心力离心20min,超纯水离心洗涤3次,沉淀用0.01M pH 7.5的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后待用。

[0322] (3)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为18ng/条、荧光微球标记抗体量为8ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、10、50、100、200、500ng/mL, $R^2$ 为0.9899, $IC_{50}$ 为60.2ng/mL,线性回归方程式为: $y=-1876.89x+2429.28$ 。

[0323] 3. 组装试纸条

[0324] (1)滤纸和样本垫规格为1 $\times$ 30cm;

[0325] (2)喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维,规格为0.8 $\times$ 30cm;

[0326] (3)已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5 $\times$ 30cm;

[0327] (4)吸水纸,规格为1.2 $\times$ 30cm;

[0328] (5)PVC底板,规格为5.5 $\times$ 30cm。

[0329] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4 $\times$ 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为12个月。

[0330] 二、定性并定量检测样本中的四环素

[0331] 1. 在试纸条加样孔中加入110 $\mu$ L样本,反应10min;

[0332] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0333] 3. 如果检测线显色比质控线显色深,则样本中四环素的含量小于100ng/mL,定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中四环素含量大于100ng/mL,定性判断为阳性;

[0334] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中四环素的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0335] 5. 样本验证:实验过程中,以四环素标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而将这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线录入仪器中。对5个已知浓度样进行检测(该已知样本经GC-MS法定量为0.39、117、157、349ng/mL),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表12。

[0336] 其余同实施例16。

[0337] 实施例17:检测四环素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球标记复合物占比上升)

[0338] 与实施例16不同之处在于:

[0339] (1)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为18ng/条、荧光微球标记抗体量为16ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 $\times$ 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~

2h, 放于干燥柜中备用。检测结果为: 该条件下标准曲线浓度为: 0、10、50、100、200、500ng/mL,  $R^2$ 为0.9327,  $IC_{50}$ 为70ng/mL, 线性较一般。胶体金目测检测结果正常。

[0340] (2) 组装试纸条: 试验中同实施例16, 但不形成产品, 不进行保存试验。

[0341] (3) 样本验证: 实验过程中, 以四环素标准品配制已知系列浓度的样品, 测出其对应的荧光强度的数值, 从而将这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、39、117、157、349ng/mL), 用本方法检测, 荧光微球检测出现1例假阴性结果, 数据见表12。

[0342] 其余同实施例16。

[0343] 实施例18: 检测四环素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)

[0344] 与实施例16不同之处在于:

[0345] (1) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后, 按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算, 精确到胶体金标记抗体量为28ng/条、荧光微球标记抗体量为8ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂, 喷涂至 $30 \times 0.8$ cm的玻璃纤维膜上,  $25^\circ\text{C}$ 真空干燥1~2h, 放于干燥柜中备用。检测结果为: 该条件下标准曲线浓度为: 0、10、50、100、200、500ng/mL,  $R^2$ 为0.8769,  $IC_{50}$ 为53.5ng/mL, 线性较差。

[0346] (2) 组装试纸条: 试验中同实施例16, 但不形成产品, 不进行保存试验。

[0347] (3) 样本验证: 实验过程中, 以四环素标准品配制已知系列浓度的样品, 测出其对应的荧光强度的数值, 从而将这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、39、117、157、349ng/mL), 用本方法检测, 荧光微球出现1例假阴性结果, 数据见表12。

[0348] 其余同实施例16。

[0349] 实施例结果分析:

[0350] 从三个实施例中可以得知, 胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时, 并不是简单地按照一定的比例进行混合, 本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素, 从图18和图19可以看出, 胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素, 其对荧光微球体系有着重大的影响, 而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后, 找到最主要的影响因素为: 胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化, 均能影响本实验的最终结果, 特别是荧光微球体系的检测线性范围比较难掌握, 因为在单独的体系中, 荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高, 检测线性范围比胶体金体系窄, 如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键, 相关影响因素结果见表11。在研究中发现, 并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标, 通过计算两种标记物上的抗体分子数量, 发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量, 那么在阳性结果的检测中, 就会出现互相干扰的现象, 只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时, 两套检测体系才能独立并同时存在, 在发现和掌握其影响规律后, 本发明确定了最优的条件配比, 得到既能满足胶体金目测系统要求, 又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关系, 我们制备了三种不同的双系统试纸条, 并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的

可靠性(数据见表12),根据试验结果可以看出,只有按照最优的条件制备的试纸条(实施例16为最优条件),其检测结果与确证结果才完全符合,另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条,都存在一定比例的假阴性。

[0351] 表11试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0352]

胶体金抗体用量(ng/条)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	R <sup>2</sup>	检测线性范围(ng/mL)
0	2.8	0.8875	1-20
6	15.1	0.9187	10-100
10	36.4	0.8911	10-100

[0353]

14	52.8	0.9109	10-200
18	60.2	0.9899	10-500
22	62.9	0.9061	10-500
26	53.5	0.8769	10-200

[0354] 表12三个实施例检测结果比对

[0355]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例 16 结果		实施例 17 结果		实施例 18 结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)
1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	39	阴性	28	阴性	26	阴性	21
3	117	阳性	102	阳性	98	阳性	94
4	157	阳性	129	阳性	119	阳性	106
5	349	阳性	310	阳性	299	阳性	301

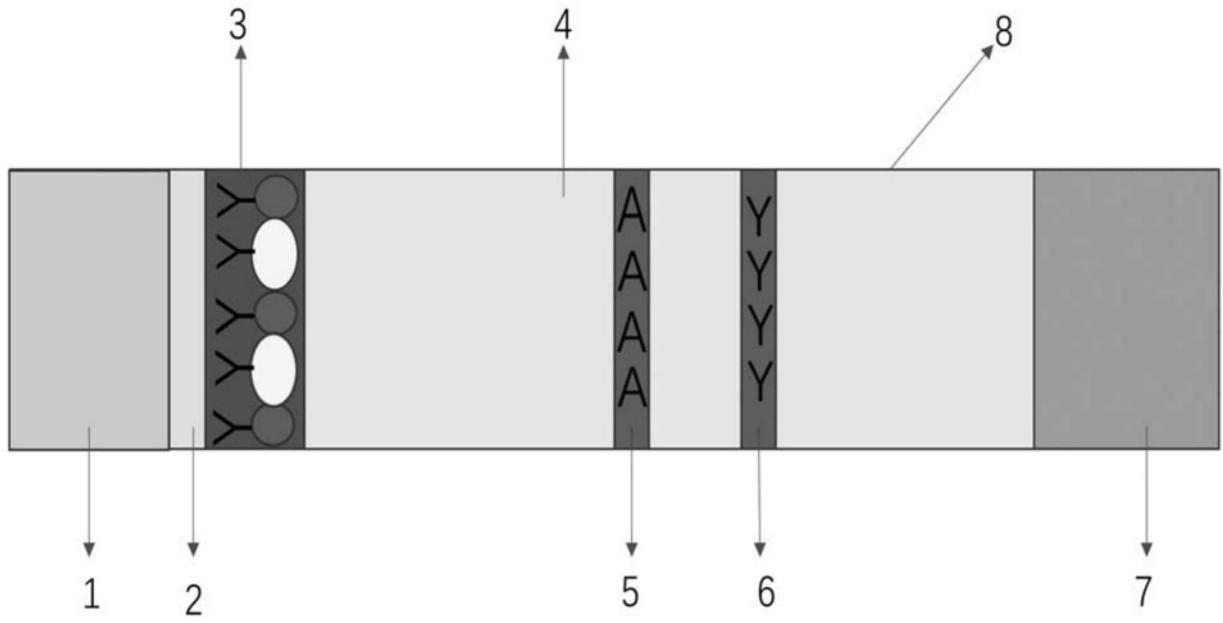


图1

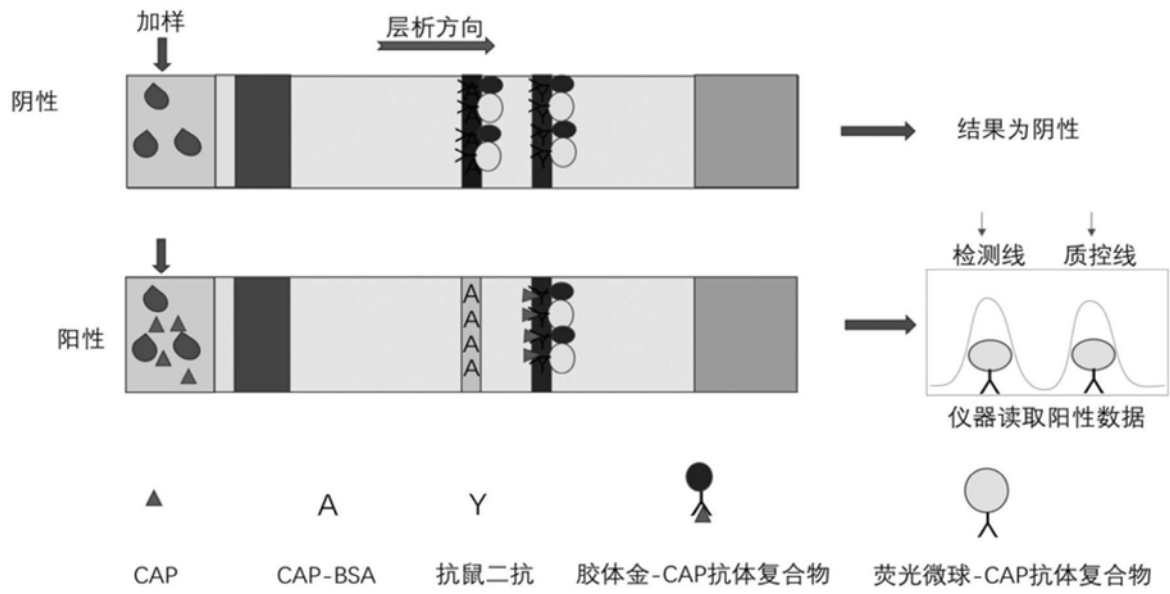


图2

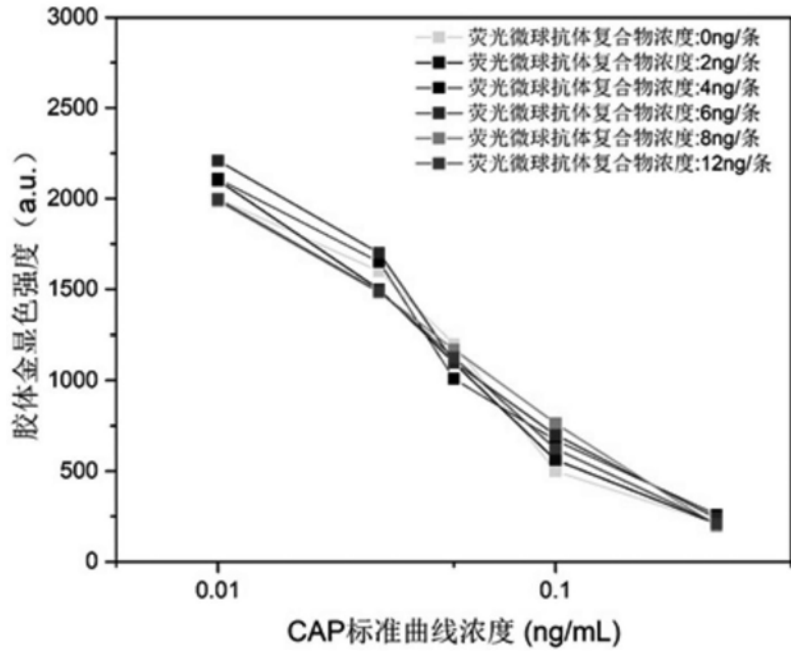


图3

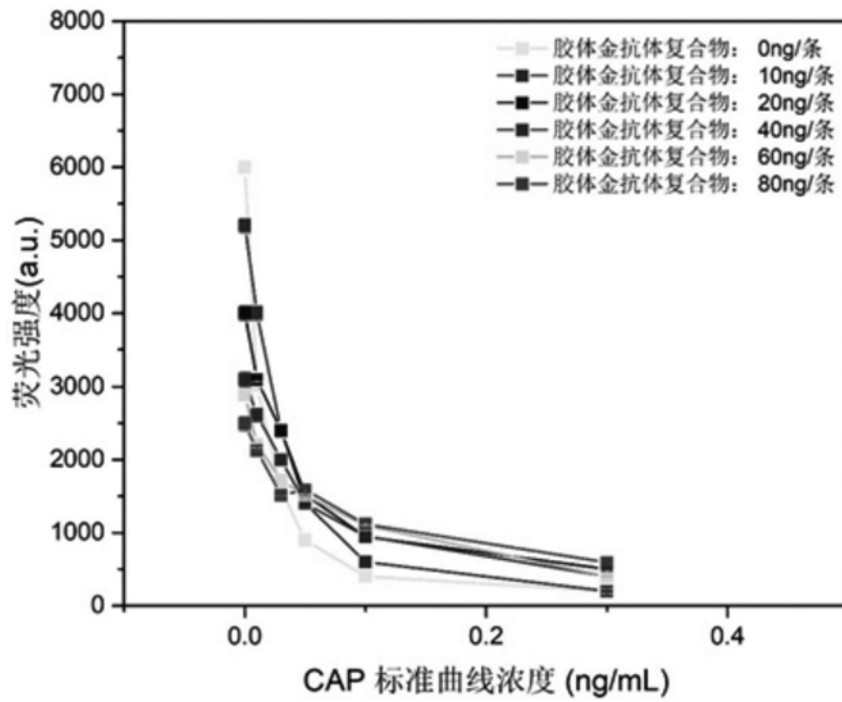


图4

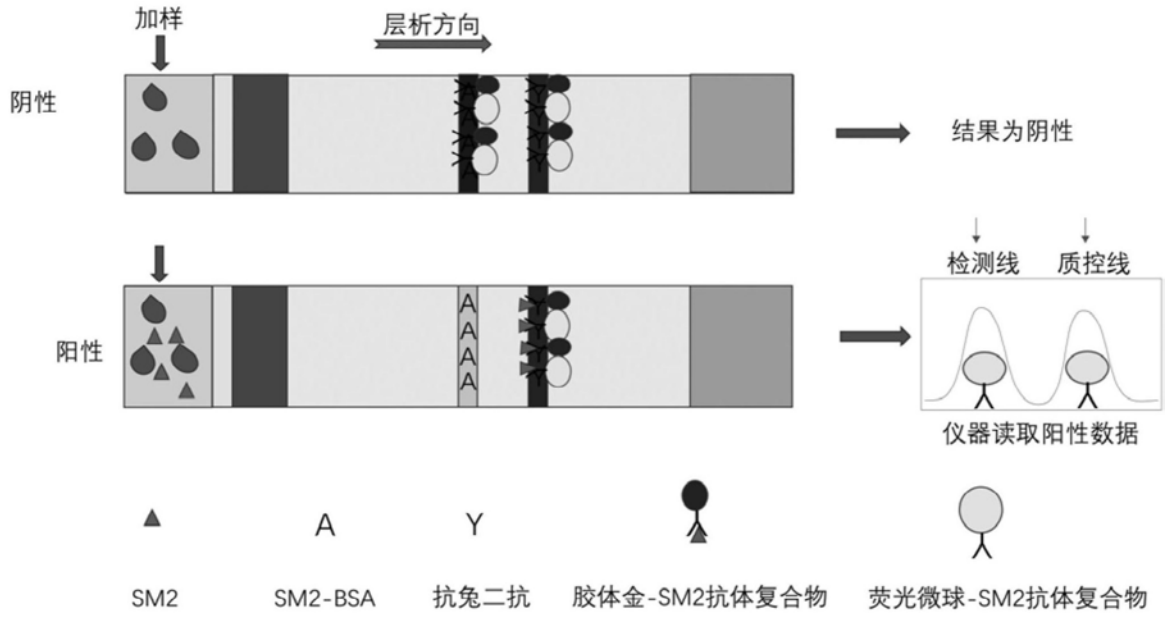


图5

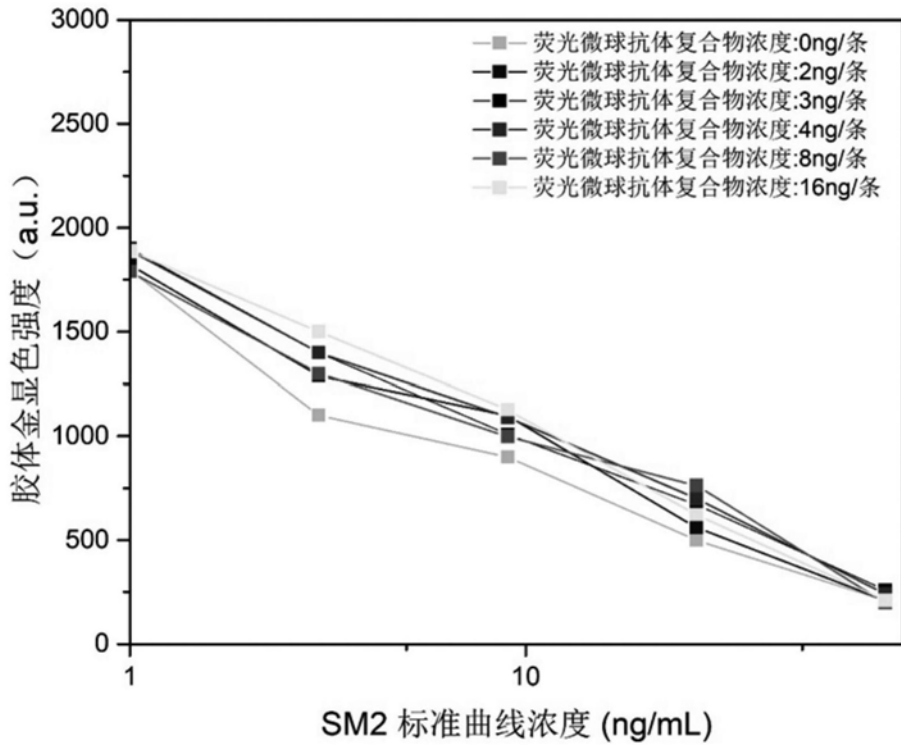


图6

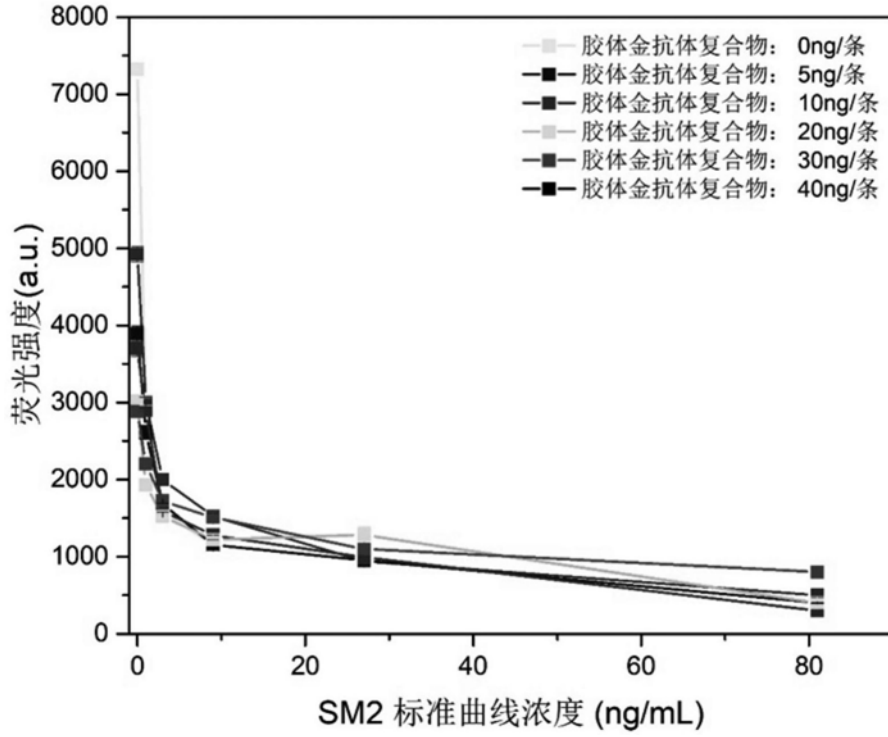


图7

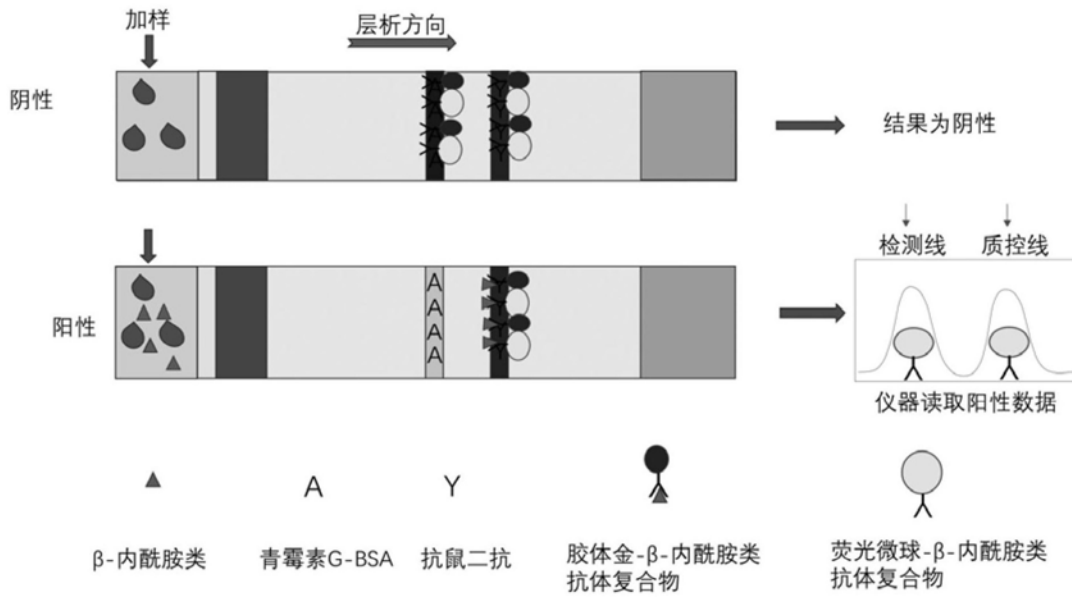


图8

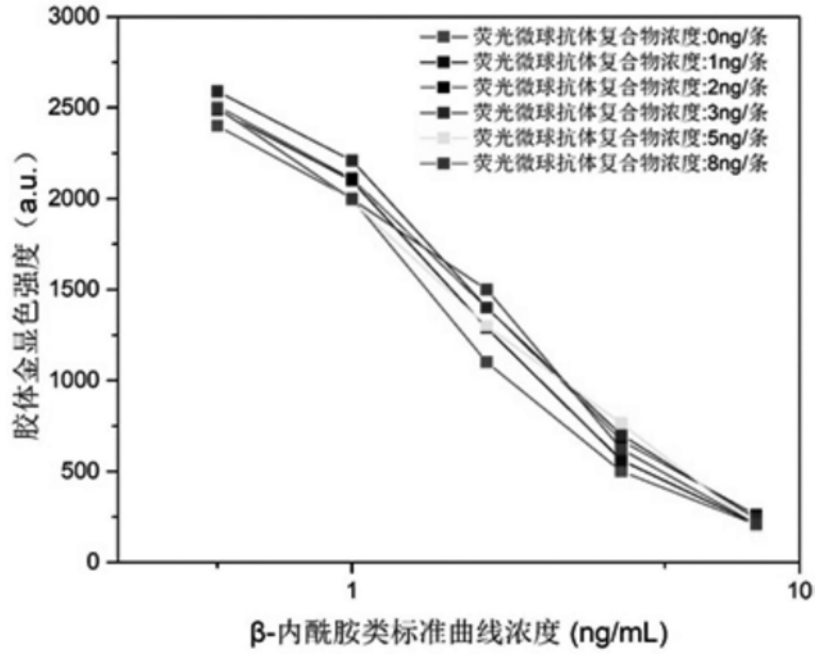


图9

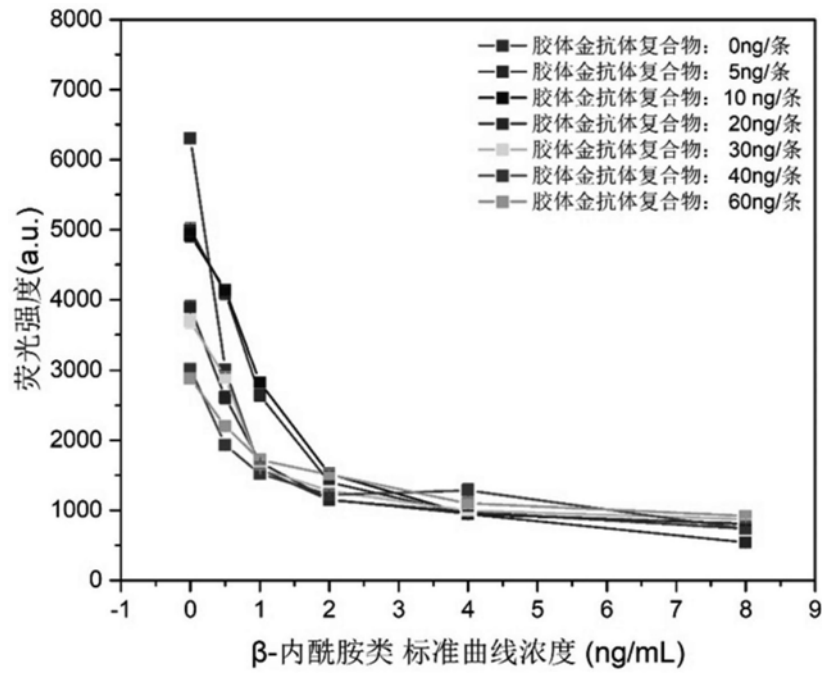


图10

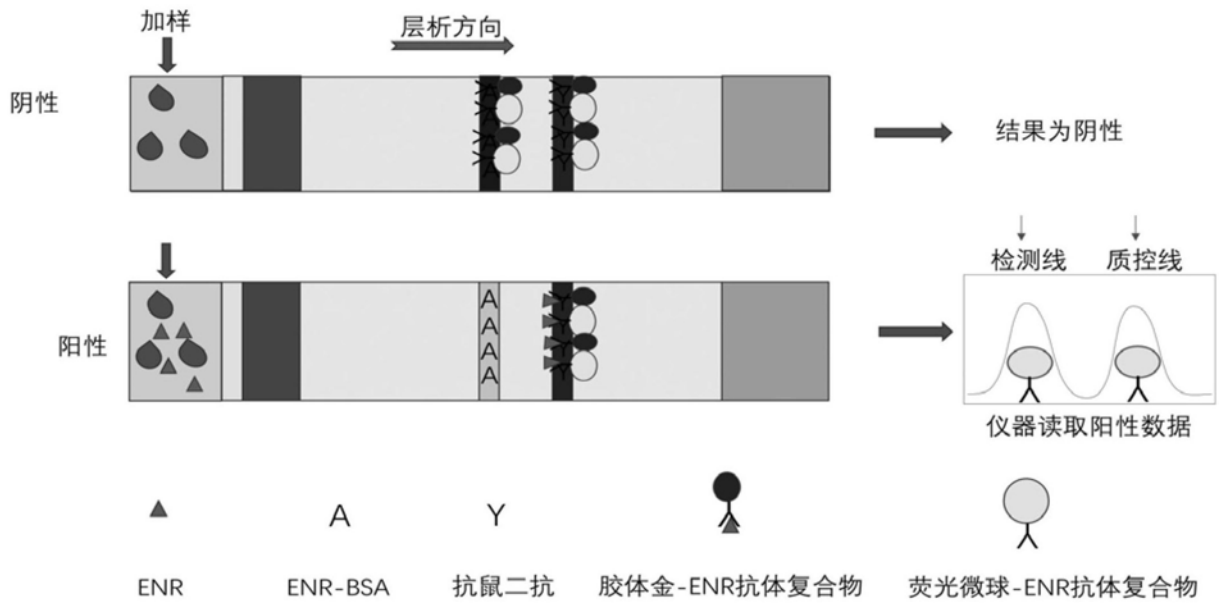


图11

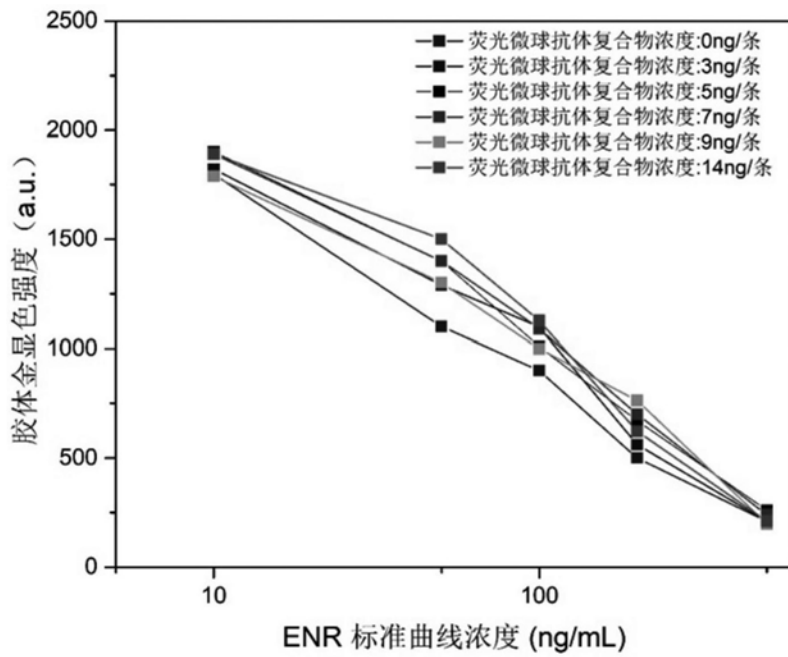


图12

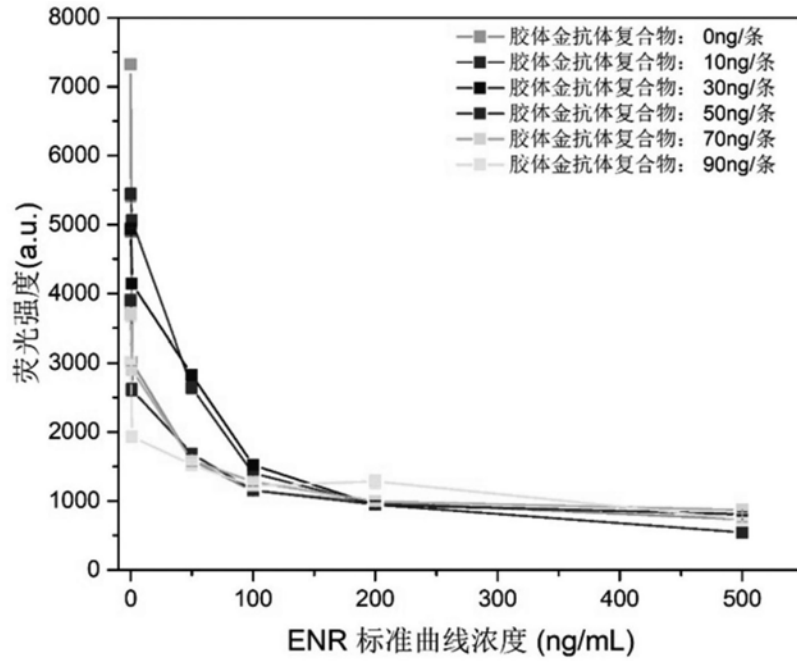


图13

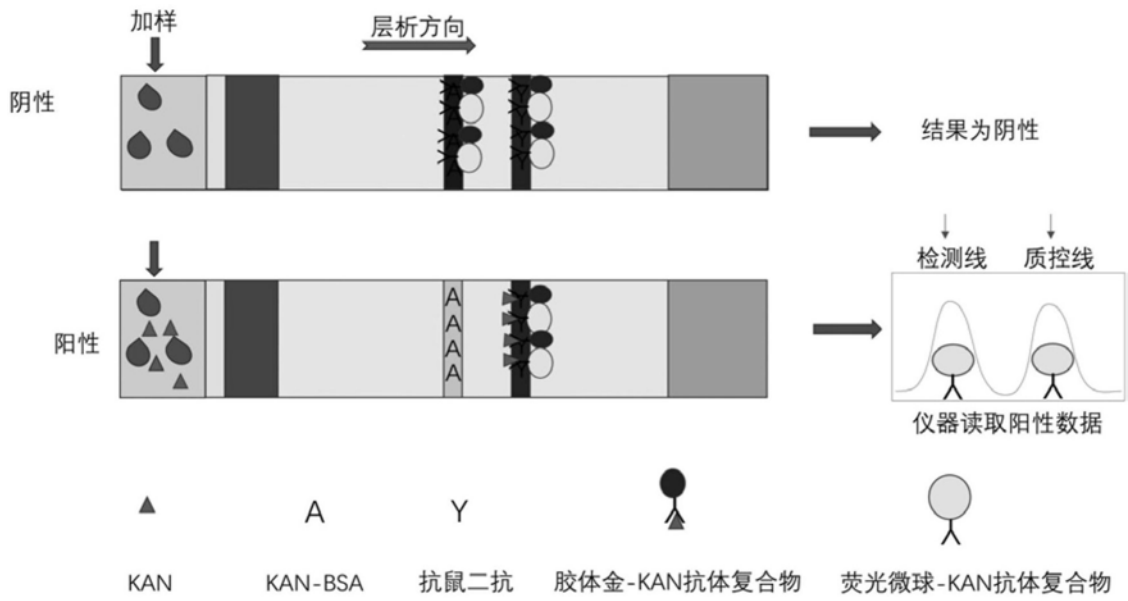


图14

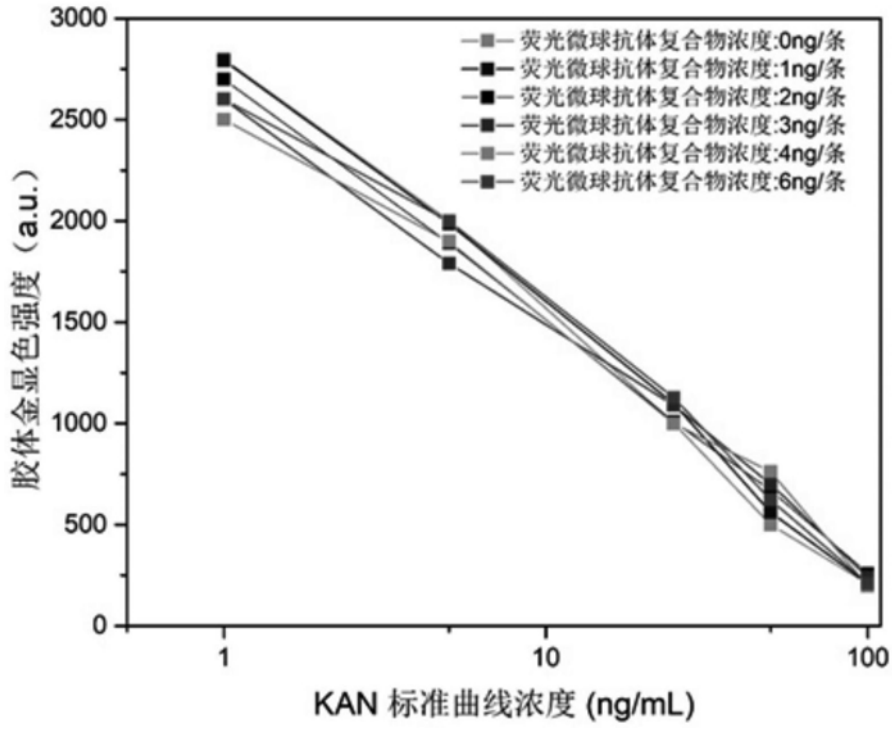


图15

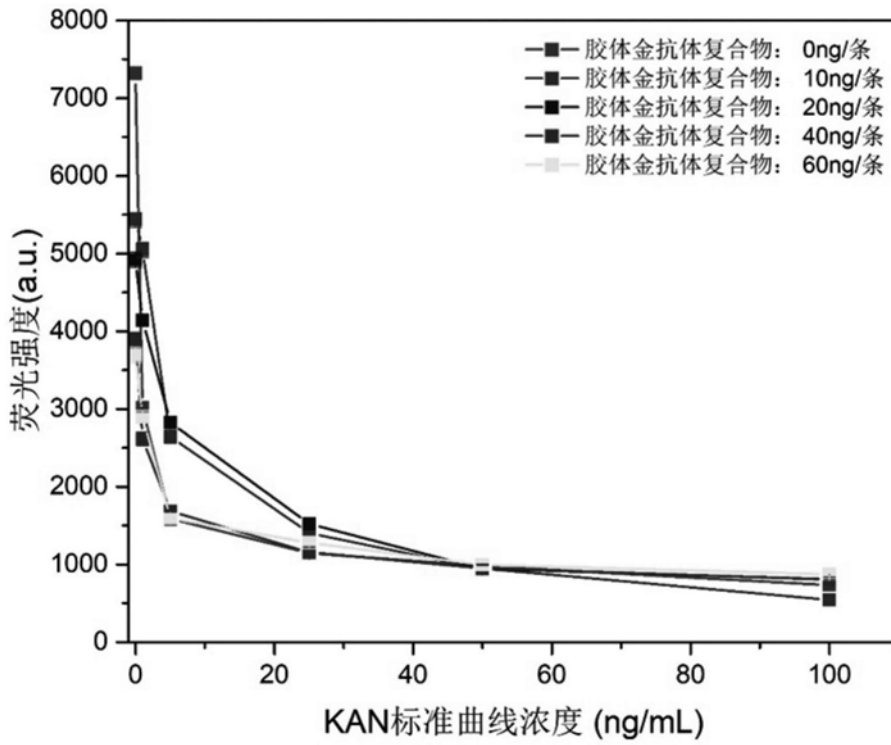


图16

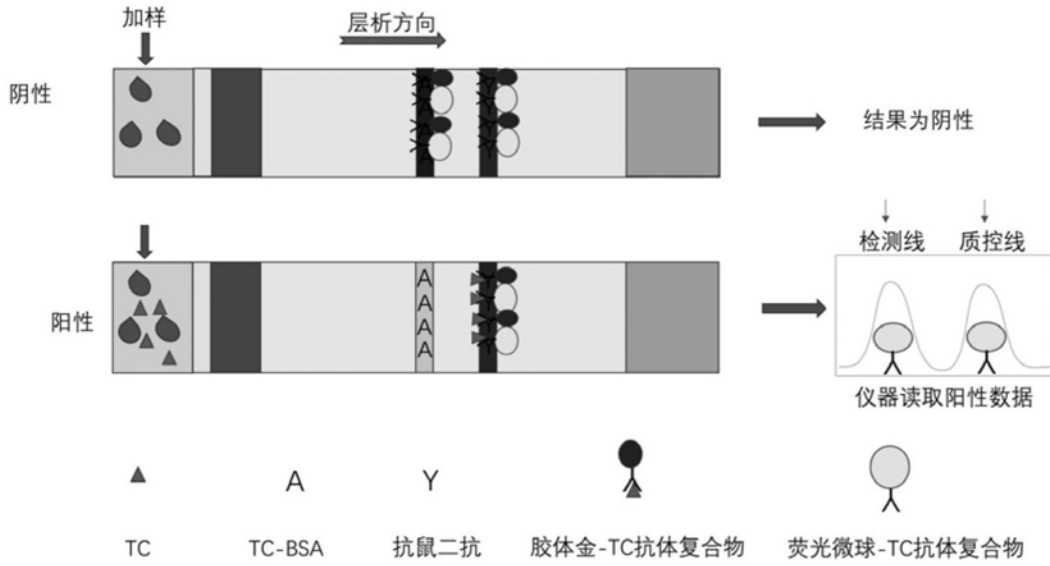


图17

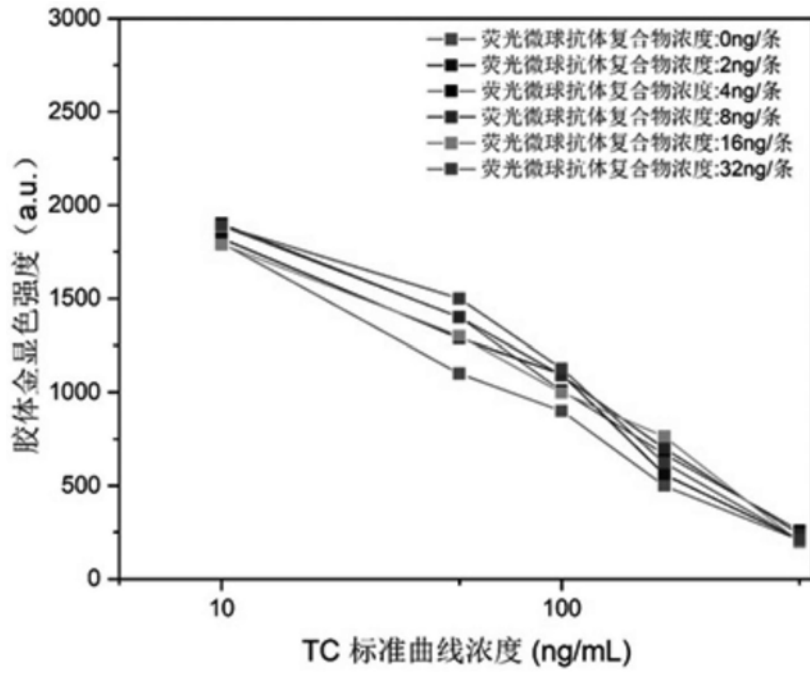


图18

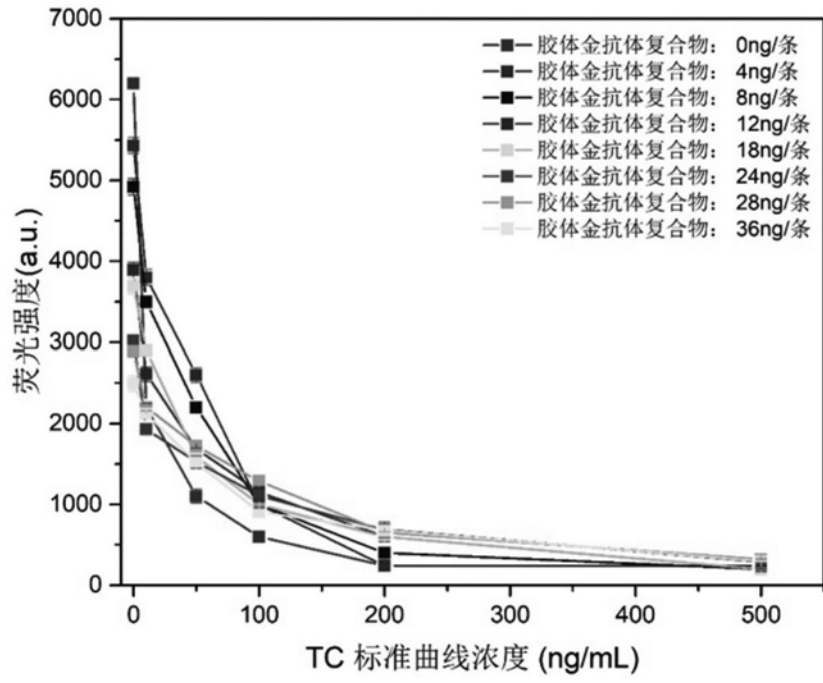


图19

专利名称(译)	检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108918860A</a>	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810901217.8	申请日	2018-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	赖卫华 陈媛 彭娟 章刚钢 黄震 邢克宇 熊勇华 魏华 许恒毅		
发明人	赖卫华 陈媛 彭娟 章刚钢 黄震 邢克宇 熊勇华 魏华 许恒毅		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了检测抗生素的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法，在底板上依次地搭接粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球-抗生素单克隆抗体复合物和胶体金-抗生素单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的硝酸纤维素膜上包被有抗生素偶联抗原作为检测线和包被有抗鼠抗体作为质控线。检测线显色比质控线显色浅，则样本中抗生素定性判断为阳性，阳性试纸条直接插入荧光读取仪中，读取仪将荧光微球显色体系的荧光信号数值化，实现定量检测。本发明主要用于食品安全检测中抗生素的定性与定量检测。

