



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106841600 B

(45)授权公告日 2018.09.11

(21)申请号 201611231306.3

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2016.12.28

G01N 33/543(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106841600 A

(56)对比文件

CN 103091495 A,2013.05.08,

CN 103941000 A,2014.07.23,

CN 103323593 A,2013.09.25,

(43)申请公布日 2017.06.13

(73)专利权人 河南科技学院

地址 453000 河南省新乡市红旗区五一路
东段

审查员 贾静

(72)发明人 姜金庆 王亚楠 牛巧平 王金安

雷壮壮 牛琳琳 王靖文 周叶

吴世秀 刘长忠

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 王加贵

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

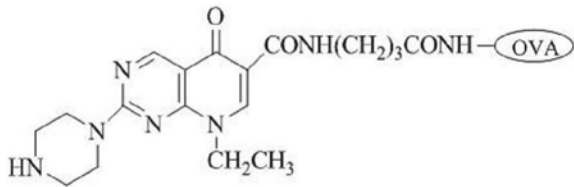
基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡

(57)摘要

本发明涉及基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡,属于免疫化学检测技术领域。本发明提供了基于培氟沙星类多克隆抗体的检测氟喹诺酮类药物的试纸卡,包括塑料盒体,所述塑料盒体一端设置有加样孔,设置在所述塑料盒体中的试纸条,所述试纸条包括支撑层,设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,所述检测线处设置有氟喹诺酮类药物包被抗原,所述质控线处设置有羊抗兔IgG,所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗培氟沙星类多克隆抗体。本发明提供的基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡操作简便,灵敏度高,特异性强,检测范围广,易于大范围推广应用。

1. 基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡, 包括塑料盒体, 所述塑料盒体一端设置有加样孔, 设置在所述塑料盒体中的试纸条, 所述试纸条包括支撑层, 设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫, 所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线, 所述检测线处设置有氟喹诺酮类药物包被抗原, 所述质控线处设置有羊抗兔IgG, 其特征在于, 所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗培氟沙星类多克隆抗体;

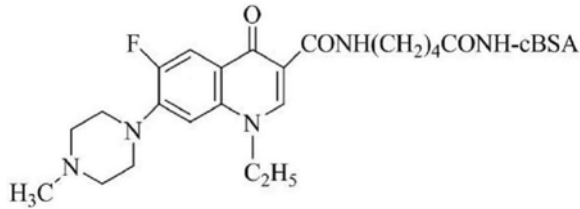
所述包被抗原为吡哌酸-鸡卵清白蛋白偶联物, 具有式I所示结构:



式 I;

式I中, OVA为鸡卵清白蛋白;

所述抗培氟沙星类多克隆抗体是由培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物免疫新西兰大白兔制备得到; 所述培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物具有式II所示结构:



式 II。

2. 根据权利要求1所述的试纸卡, 其特征在于, 所述包被抗原的浓度为0.1~0.2μg/ml。

3. 根据权利要求1所述的试纸卡, 其特征在于, 所述多克隆抗体的浓度为0.22~0.28mg/ml。

4. 权利要求1~3任意一项所述试纸卡在检测氟喹诺酮类药物残留中的应用, 所述氟喹诺酮类药物包括培氟沙星、恩诺沙星、达氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、二氟沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星、氟罗沙星、环丙沙星、沙拉沙星、马波沙星和依诺沙星的一种或多种。

基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫化学检测技术领域,具体涉及基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡。

背景技术

[0002] 氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones,FQs)是20世纪80年代之后研制并得到广泛应用的一类人工合成抗生素,具有良好的组织渗透性。氟喹诺酮类药物的作用机理是抑制细菌的DNA旋转酶,使酶不能在DNA双链上引入切口,破坏细菌的代谢和繁殖,达到迅速杀灭细菌的目的,其对革兰氏阳性和阴性杆菌、葡萄球菌和肺炎球菌均有很强的抗菌活性。最初这类药物用于治疗尿道感染,后来发展到治疗系统感染性疾病,主要用于泌尿系统感染、皮肤感染、呼吸道感染、消化道炎症、伤寒和败血症等疾病的治疗。由于它们具有吸收好、半衰期长、抗菌谱广、抗菌活性强、低毒高效、安全价廉,多数品种可以口服等许多优点,因此在临床中得到了广泛应用,并且在动物饲养中作为预防和治疗药物普遍使用,有时还作为饲料添加剂促进动物生长,提高生长速度与产量。

[0003] 氟喹诺酮类药物在兽医临床上长期和大量使用,必然会导致其在动物性食品中的残留,从而给食品卫生及人类健康带来潜在的危害。研究表明:长期使用氟喹诺酮类抗生素易导致动物群体体内致病菌产生耐药性,并且这种耐药性可能由动物微生物向人类病原菌传播;而且该类药物在动物体内代谢缓慢,人体摄入后,会对中枢神经系统及关节部位造成不良反应,严重时,可引起食用者产生远期毒性及潜在的致癌、致畸、致突变效应。因此,氟喹诺酮类药物残留问题越来越引起人们的广泛关注。我国以及世界卫生组织、欧盟、美国、日本等国家和组织都将氟喹诺酮类药物列入限制使用的兽药药物清单中,并制订出相应的最高残留限量(maximum residue limit,MRL)和休药期,而且加大了其残留监管力度。欧盟规定:动物肌肉、肝脏和肾脏中二氟沙星、恩诺沙星(恩诺沙星+环丙沙星)、沙拉沙星等氟喹诺酮类兽药最高残留量为0.01-1.9mg/kg;美国和加拿大规定:氟喹诺酮为养蜂业禁用药物,蜂王浆中各种氟喹诺酮类药物MRL为5 μ g/kg;日本2006年5月29日开始实施“肯定列表制度”后,除有暂定标准的药物如恩诺沙星、噁喹酸等外,其余FQs均按10 μ g/kg的“一律标准”;我国规定FQs在牛奶中的MRL分别为:恩诺沙星(恩诺沙星+环丙沙星)为100 μ g/L,达氟沙星为30 μ g/L,氟甲喹为50 μ g/L。2015年9月9号,中华人民共和国农业部公告(第2292号),自2016年12月31日起,停止经营、使用用于食品动物的洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星4种原料药的各种盐、酯及其各种制剂。

[0004] 国内外用于FQs药物残留检测的方法较多,主要包括高效液相法(HPLC)以及与此相关的HPLC-UV、HPLC-FD、HPLC-DVD、LC-MS/MS,LC-ESI-MS/MS,另外还有荧光光谱法、高效毛细管电泳法、薄层色谱法、ELISA、胶体金试纸、微生物学方法和电解分析法等。胶体金标记免疫分析法是近年来迅速发展的一种新型分析技术,其特点是简便快速、成本低、无污染、无需培训,非常适合于现场检测,与ELISA相比,具有样品前处理简单,显色时间短(3-5min),且所有试剂包含在一根试纸条上,无需仪器等优点,具有广阔的市场前景和应用价

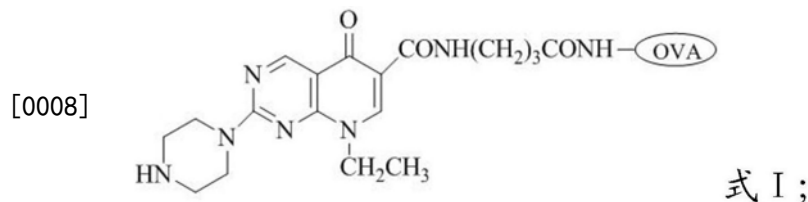
值。但目前，市场上销售的试纸卡同时检测的FQs兽药残留种类少，检测效率受到影响。因此，研制检测种类多的试纸卡对于保障动物性食品安全具有十分重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡，所述试纸卡操作简单、快速准确、灵敏度高、成本低、稳定性好，能够进行13种氟喹诺酮类药物的定性检测。

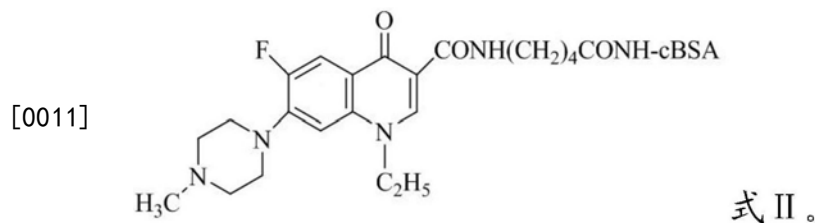
[0006] 本发明提供了一种基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡，包括塑料盒体，所述塑料盒体一端设置有加样孔，设置在所述塑料盒体中的试纸条，所述试纸条包括支撑层，设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，所述检测线处设置有氟喹诺酮类药物包被抗原，所述质控线处设置有羊抗兔IgG，其特征在于，所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗培氟沙星类多克隆抗体；

[0007] 所述包被抗原为吡哌酸-鸡卵清白蛋白偶联物，具有式I所示结构：



[0009] 式I中，OVA为鸡卵清白蛋白。

[0010] 优选的是，所述抗培氟沙星类多克隆抗体是由培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物免疫新西兰大白兔制备得到；所述培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物具有式II所示结构：



[0012] 优选的是，所述包被抗原的浓度为0.1~0.2μg/ml。

[0013] 优选的是，所述多克隆抗体的浓度为0.22~0.28mg/ml。

[0014] 本发明还提供了上述技术方案所述试纸卡在检测氟喹诺酮类药物残留中的应用，所述氟喹诺酮类药物包括培氟沙星、恩诺沙星、达氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、二氟沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星、氟罗沙星、环丙沙星、沙拉沙星、马波沙星和依诺沙星的一种或多种。

[0015] 本发明提供了基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡。利用本发明所述氟喹诺酮类药物包被抗原和胶体金标记的抗培氟沙星类多克隆抗体得到的检测试纸卡呈广谱特异性，能识别13种氟喹诺酮类药物残留，灵敏度高，特异性强，操作简单，方便快捷，成本低，易于大范围推广应用。

附图说明

[0016] 图1为本发明实施例7提供的基于培氟沙星类多克隆抗体制备得到的试纸卡的结

构示意图；

[0017] 图2为本发明实施例7提供的基于培氟沙星类多克隆抗体制备得到的试纸卡的侧视图；

[0018] 图3为本发明实施例7提供的基于培氟沙星类多克隆抗体制备得到的试纸卡的俯视图；

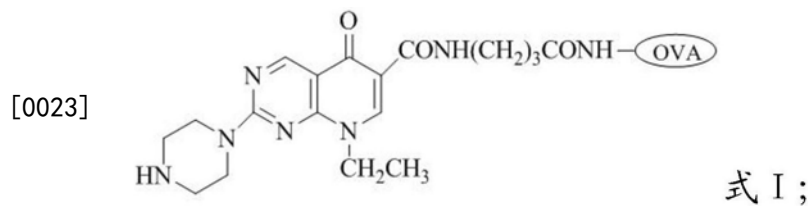
[0019] 图4为本发明实施例2提供的氟喹诺酮类药物包被抗原合成路线图；

[0020] 图5为本发明实施例1提供的培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物合成路线图。

具体实施方式

[0021] 本发明提供了基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡,包括塑料盒体,所述塑料盒体一端设置有加样孔,设置在所述塑料盒体中的试纸条,所述试纸条包括支撑层,设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线,所述检测线处设置有氟喹诺酮类药物包被抗原,所述质控线处设置有羊抗兔IgG,所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗培氟沙星类多克隆抗体；

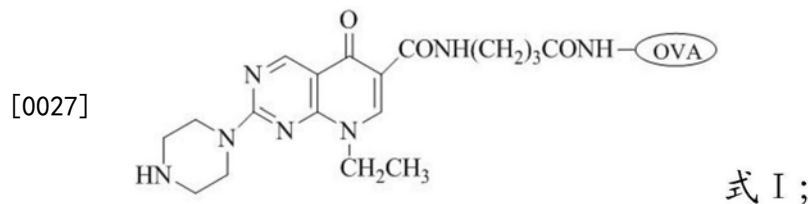
[0022] 所述包被抗原为吡哌酸-鸡卵清白蛋白偶联物,具有式I所示结构：



[0024] 式I中,OVA为鸡卵清白蛋白。

[0025] 所述试纸卡的结构如图1、图2和图3所示。其中:1为塑料盒体,2为试纸条,3为支撑层,4为样品垫,5为金标抗体结合垫,6为硝酸纤维素膜,7为吸收垫,8为加样孔,9为观察窗,10为质控线(C线),11为检测线(T线),12为胶膜,13为标记线。

[0026] 本发明提供了一种氟喹诺酮类药物包被抗原,为吡哌酸-鸡卵清白蛋白偶联物,具有式I所示结构：



[0028] 式I中,OVA为鸡卵清白蛋白。

[0029] 本发明还提供了上述技术方案所述包被抗原的制备方法,包括以下步骤：

[0030] 1) 将3-氨基丁酸溶于氢氧化钠溶液,得到3-氨基丁酸溶液；

[0031] 将吡哌酸溶于含N,N-二甲基甲酰胺的甲醇溶液中,得到吡哌酸溶液；

[0032] 将所述3-氨基丁酸溶液滴加到所述吡哌酸溶液中,进行碳链衍伸化反应1.5~3h；

[0033] 将所述反应得到的产物用乙酸乙酯萃取,将所述萃取得到的中间产物酸洗后用碳酸氢钠溶液反萃取,得到吡哌酸半抗原；

[0034] 2) 将所述步骤1)得到的吡哌酸半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,再与三乙胺混

合,4~8℃反应活化1~2h,得到吡哌酸半抗原反应液;

[0035] 将氯甲酸异丁酯与所述吡哌酸半抗原反应液混合,进行混合酸酐偶联反应1~2h,得到吡哌酸反应产物;

[0036] 3)将鸡卵清白蛋白溶于碳酸盐缓冲液中,再与N,N-二甲基甲酰胺反应0.5~1h,得到鸡卵清白蛋白溶液;

[0037] 4)将所述步骤2)得到的吡哌酸反应产物滴加到所述步骤3)得到的鸡卵清白蛋白溶液中,4~8℃反应5~8h后透析,得到包被抗原;

[0038] 所述步骤2)和步骤3)之间、步骤1)和步骤3)之间没有时间顺序的限制。

[0039] 本发明上述技术方案所述包被抗原的制备方法反应原理图如图4所示。

[0040] 本发明将3-氨基丁酸溶于氢氧化钠溶液,得到3-氨基丁酸溶液。所述3-氨基丁酸的溶解过程优选在冰浴搅拌的条件下进行,所述3-氨基丁酸溶液的pH值优选为8.5~10.5。用作溶剂的氢氧化钠溶液的浓度为0.01~0.02mol/L,所述3-氨基丁酸溶液的浓度优选为1~2mol/L,更优选为2mol/L。

[0041] 本发明将吡哌酸溶于含N,N-二甲基甲酰胺的甲醇溶液中,得到吡哌酸溶液。所述含N,N-二甲基甲酰胺的甲醇溶液中N,N-二甲基甲酰胺的体积百分含量为40~60%,更优选为50%。吡哌酸溶液的质量浓度为10~20mg/ml。

[0042] 得到3-氨基丁酸溶液和吡哌酸溶液后,本发明将所述3-氨基丁酸溶液滴加到所述吡哌酸溶液中,进行碳链衍伸化反应1.5~3h,更优选为2h。所述反应优选在搅拌条件下进行,所述搅拌的转速优选为50~200rpm。

[0043] 本发明将所述反应得到的产物用乙酸乙酯萃取,将所述萃取得到的的中间产物酸洗后用碳酸氢钠溶液反萃取,得到吡哌酸半抗原。在本发明中,所述酸洗优选采用稀盐酸,更优选为浓度为0.09~0.18mg/ml的稀盐酸。在本发明中,所述碳酸氢钠溶液的质量浓度优选为0.01~0.02mol/L;反萃取用反萃剂为质量浓度为2.1~4.2mg/ml的碳酸氢钠溶液进行,其产物提取到水相中。

[0044] 得到吡哌酸半抗原后,本发明将所述吡哌酸半抗原溶于N,N-二甲基甲酰胺中,再与三乙胺混合,4~8℃反应活化1~2h,得到吡哌酸半抗原反应液。在本发明中,所述反应温度优选为4℃,所述反应时间优选为1.5h。吡哌酸半抗原溶解后得到溶液的浓度为12~25mg/ml;在本发明中,所述吡哌酸半抗原的质量和三乙胺的体积比为(1.5~2.5)mg:1μL,更优选为1.8mg:1μL;

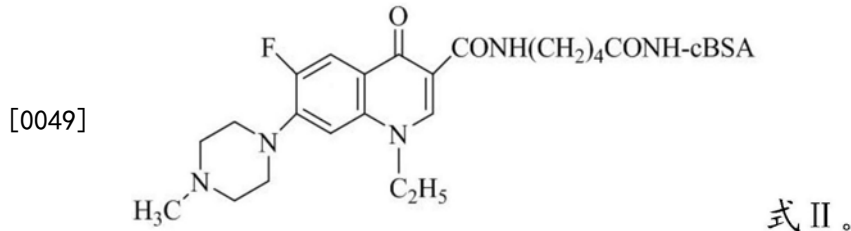
[0045] 得到吡哌酸半抗原反应液,本发明将氯甲酸异丁酯与所述吡哌酸半抗原反应液混合,进行混合酸酐偶联反应1~2h,更优选为1.2h,得到吡哌酸反应产物。在本发明中,所述吡哌酸半抗原的质量和氯甲酸异丁酯的体积比为(1.5~2.5)mg:3μL,更优选为1.8mg:3μL。反应温度2~8℃。

[0046] 本发明将鸡卵清白蛋白溶于碳酸盐缓冲液中,再与N,N-二甲基甲酰胺反应0.5~1h,得到鸡卵清白蛋白溶液。在本发明中,所述碳酸盐缓冲液的浓度优选为0.05mol/L,pH值优选为9.6。鸡卵清白蛋白在缓冲溶液中的浓度10~30mg/ml。所述鸡卵清白蛋白与N,N-二甲基甲酰胺优选在搅拌条件下进行,所述搅拌转速优选为50~200rpm。

[0047] 本发明将得到的吡哌酸反应产物滴加到鸡卵清白蛋白溶液中,4~8℃反应5~8h后透析,得到包被抗原。所述滴加反应优选搅拌的条件下进行。在本发明中,所述吡哌酸反

应产物的质量以吡哌酸半抗原计,与鸡卵清白蛋白的质量比为1:(2~3),更优选为9:22。所述透析优选为:将反应液装入透析袋,置于4℃的碳酸盐缓冲液中透析;所述透析的时间优选为4~6d,更优选为5d;本发明优选5~8h换液一次。所述透析后,本发明将透析后的反应液离心取上清,得到包被抗原。

[0048] 在本发明中,所述抗培氟沙星类多克隆抗体是由培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物免疫新西兰大白兔制备得到;所述培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物具有式II所示结构:



[0050] 在本发明中,所述培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0051] 对牛血清白蛋白进行活化;

[0052] 采用氨基戊酸对培氟沙星进行半抗原衍生化,得到培氟沙星半抗原衍生物;

[0053] 以所述活化后的牛血清白蛋白与培氟沙星半抗原衍生物为原料,采用碳二亚胺两步法合成培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物。

[0054] 本发明上述技术方案所述培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物的制备方法反应原理图如图5所示。

[0055] 本发明对牛血清白蛋白进行活化,得到活化后的牛血清白蛋白(cBSA)。本发明所述蛋白质活化,是为了封闭蛋白质上的羧基,提高其氨基偶联效率。如将BSA和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶于PBS缓冲液中,搅拌条件下,添加乙二胺溶液,37℃振荡反应1.5~3h;将得到的反应液用PBS缓冲液透析3~5d,得到活化的牛血清白蛋白;所述活化的BSA冻干保存,在本发明中,所述振荡反应的时间更优选为2h。本发明所述乙二胺溶液的溶剂为PBS缓冲液和N,N-二甲基甲酰胺的混合液。所述BSA、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和乙二胺的质量比优选为30~60:2~5:1,所述PBS缓冲液浓度为0.01mol/L,pH值为7.4;所述乙二胺溶液的滴加速率为30~100滴/min。所述搅拌的转速优选为50~200rpm。冻干保存的条件密闭条件下2~8℃冻存。

[0056] 本发明采用氨基戊酸对培氟沙星进行半抗原衍生化,本发明对所述衍生化的反应条件没有特殊的限定,采用本领域技术人员熟知的半抗原衍生化反应即可。如将培氟沙星甲磺酸二水化合物、N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶于N,N-二甲基甲酰胺中,室温下避光搅拌10~15h,离心取上清得到A液;将5-氨基戊酸盐酸盐溶于PBS缓冲液中,得到B液;搅拌状态下将所述B液缓慢滴入A液中,反应3~5h,离心取上清,调节pH值为10.0~12.0,弃沉淀,再调节pH值为4.0~6.0,收集沉淀,即得培氟沙星半抗原衍生物。所述培氟沙星甲磺酸二水化合物、N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的质量比优选为3:(0.8~1.4):(1.2~2.8);所述离心的转速优选为8000~10000rpm;所述pH调节用酸化剂优选为0.1mol/L的稀盐酸。

[0057] 本发明采用碳二亚胺两步法合成培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物,优选具体为:将培氟沙星半抗原衍生物溶于N,N-二甲基甲酰胺中,加入N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,避光振荡反应24h,得C液。将cBSA溶解于含50%DMF的PBS

磷酸盐缓冲溶液中,得D液。将C液逐滴缓慢加入到D液中,并不断震荡,加完后继续反应3h,获得培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物。

[0058] 在本发明中,所述包被抗原的浓度为0.1~0.2 μ g/ml。

[0059] 在本发明中,所述多克隆抗体的浓度为0.22~0.28mg/ml。

[0060] 本发明还提供了上述技术方案所述试纸卡在检测氟喹诺酮类药物残留中的应用,所述氟喹诺酮类药物包括培氟沙星、恩诺沙星、达氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、二氟沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星、氟罗沙星、环丙沙星、沙拉沙星、马波沙星和依诺沙星中的一种或多种。

[0061] 本发明对所述样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的制备没有特殊的限定,采用本领域技术人员熟知的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的制备方法即可。

[0062] 在本发明中,所述试纸卡检测原理如下:滴加样品液后,在吸收垫和硝酸纤维素膜的毛细作用下,样品溶液向上迁移,到达结合垫时,金标抗体将被溶解。当样品中含有氟喹诺酮类药物残留时,它们将和金标抗体结合,并一起向上迁移,到达固定有包被抗原的检测线位置时,包被抗原将和氟喹诺酮类药物竞争结合金标抗体上有限的抗原结合位点。样品中氟喹诺酮类药物残留含量越高,检测抗原和金标抗体结合数量就越少,T线显色就越弱;当样品中氟喹诺酮类药物残留含量高于一定数值时,包被抗原就无法和金标抗体结合,T线不显色。无论样品中是否氟喹诺酮类药物残留存在,过量的金标抗体或包被抗原与金标抗体的结合物都将和二抗GaRIgG结合,在C线形成红色。试纸卡以红色印迹线“|”或“||”作为检测线的阳性和阴性标记,即在硝酸纤维素膜上质控线(C线)显示一条红色“|”印迹时,表示被检测样品溶液呈阳性;若硝酸纤维素膜上质控线(C线)和检测线(T线)同时出现两条红色“||”印迹时,表示样品溶液呈阴性。

[0063] 本发明提供的试纸卡可用于氟喹诺酮类药物残留的检测,对待测样品的种类没有特殊的限制,可以为血样、尿样、蜂蜜或组织样品,具体的在所述检测前,待测样品进行前处理,所述前处理的过程优选包括:

[0064] (1) 动物尿样:新鲜尿样放于4 $^{\circ}$ C冰箱中待检,直接用于试纸卡检测;若尿液中有污染和混浊,5000r/min离心10min或过滤后检测。

[0065] (2) 动物血液:用加有肝素钠(20~30单位/ml血样)的离心管采集血液样本,5000r/min离心10min;取出血浆2ml加入干净的玻璃离心管中,再加入2ml乙腈-0.1M氢氧化钠溶液(体积比为40/60),用振荡器混匀5min后上样检测。

[0066] (3) 蜂蜜:取5.0g蜂蜜置于50mL聚苯乙烯离心管中,加入5mL PBS缓冲液,用振荡器振荡至蜂蜜全部溶解;然后加入乙腈-NaOH溶液10mL,充分混合10min,15 $^{\circ}$ C 3000r/min离心10min,取上层液体用于试纸卡检测。

[0067] (4) 动物组织:准确称取5g已绞碎的动物组织样品于50ml具拧盖的塑料离心管中。加入10ml乙腈-0.1M氢氧化钠溶液(体积比为40/60),充分混合10min,15 $^{\circ}$ C 3000r/min离心10min。取出2mL上清液,加入PBS缓冲液2mL混合均匀,上样检测。

[0068] 下面结合具体实施例对本发明所述的基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡做进一步详细的介绍,本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

[0069] 实施例1

[0070] 培氟沙星-牛血清白蛋白偶联物的合成,所述偶联物的合成流程图如图5所示。

[0071] (1) 称取培氟沙星甲磺酸二水化合物46.5mg (约0.1mmol), NHS 12mg (约0.1mmol) 和EDC 19.2mg (约0.1mmol) 溶于2mL的DMF,室温下避光搅拌12h。反应产物于8000r/min离心10min,取上清称为A液。5-氨基戊酸盐11mg (约0.1mmol) 溶于2mL PBS中,即B液。搅拌状态下将B液缓慢滴入A液中,反应4h,然后8000r/min离心10min,取上清液用饱和NaHCO₃调至偏碱性,弃沉淀。上清液再用稀盐酸(0.1mol/L)调至偏酸性,收集沉淀,即为培氟沙星半抗原衍生物。

[0072] (2) 将220mg BSA、11.6mg EDC溶于5mL PBS缓冲液中,搅拌条件下,缓慢加入7mg乙二胺溶液(溶于3mL PBS和DMF溶液的乙二胺溶液),37℃振荡反应2h。反应液用PBS透析4d,活化的BSA冻干保存,即为活化后的牛血清白蛋白。

[0073] (3) 取PEF半抗原衍生物32mg,用3mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)搅拌溶解后,加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 15mg和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl) 52mg,溶解后室温条件下避光,摇床振荡反应24h,称C液。将活化的cBSA溶解于含50%DMF的PBS磷酸盐缓冲溶液中,称D液。将C液逐滴缓慢加入到D液中,并不断震荡,加完后继续反应3h,获得PEF-cBSA免疫原。反应结束后将反应液装入透析袋,用PBS缓冲液透析6d,每天换液3次。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时分装于安瓿瓶中,-20℃保存。

[0074] 实施例2

[0075] 氟喹诺酮类药物包被抗原的制备,所述包被抗原的合成流程图如图4所示。

[0076] (1) 称取2mmol 3-氨基丁酸加入三角烧瓶中,然后用2mL氢氧化钠溶液调节pH值为9,冰浴搅拌;用含50%N,N-二甲基甲酰胺的甲醇溶解吡哌酸,搅拌状态下逐滴加入氨基丁酸-氢氧化钠溶液中,磁力搅拌反应2h;用乙酸乙酯萃取,稀盐酸洗涤,再用碳酸氢钠溶液反萃取,制得吡哌酸半抗原。

[0077] (2) 称取18mg吡哌酸半抗原溶解在2mLN,N-二甲基甲酰胺中,加入10μL三乙胺,4℃冰浴条件下反应1h。然后加入30μL氯甲酸异丁酯,继续搅拌反应1h。将44mg的鸡卵清白蛋白溶于2mL碳酸盐缓冲溶液中(CBS,0.05mol/L,pH 9.6),并加入2mL N,N-二甲基甲酰胺搅拌反应0.5h,得到鸡卵清白蛋白溶液。冰浴、搅拌条件下将吡哌酸反应产物逐滴加入鸡卵清白蛋白溶液中,加完后在4℃下振荡反应6h。反应液装入透析袋,CBS缓冲液4℃透析5d,6h换液1次,离心取上清,得吡哌酸-鸡卵清白蛋白包被抗原,-20℃冻存。

[0078] 实施例3

[0079] 培氟沙星类特异性多克隆抗体的制备

[0080] 所述的抗培氟沙星类特异性多克隆抗体的由培氟沙星-牛血清白蛋白(PEF-cBSA)偶联物免疫新西兰大白兔制备而来:

[0081] 用雌性新西兰大白兔2只,背皮下多点免疫法制备抗PEF多克隆抗体。首免用PBS稀释的免疫原与等体积氟氏完全佐剂完全乳化,以后每隔3w加强免疫一次,换用氟氏不完全佐剂乳化,免疫剂量为500μg/次,体积为0.5mL。每次免疫后8d耳缘静脉采血监测抗体效价,5免后10d心脏驱血收集抗血清,4℃过夜后离心(8000rpm,10min)。饱和硫酸铵盐析法纯化抗体,分别采用55%、33%、33%的饱和硫酸铵,分三次纯化血清,提取富含IgG的抗体,制得培氟沙星类特异性多克隆抗体。

[0082] 实施例4

[0083] 间接ELISA检测培氟沙星抗体效价

[0084] 用CBS稀释的PMA-OVA包被抗原包板,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C培养箱内温育2h。PBS-T洗板三次后用300 μ L/孔的封闭液37 $^{\circ}$ C封闭1h。再次洗板后加入用PBS倍比稀释的抗血清,每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C温育15min,PBST洗板三次。然后加入经稀释液1:1000倍稀释的GaMIgG-HRP,每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C温育25min,PBS-T洗板三次。加入60 μ L/孔新鲜配制的酶底物(A、B液),室温下显色15min,然后加入100 μ L/孔2M H₂SO₄终止酶促反应。反应设阴性对照(NC)和PBS空白对照(BC),每次检测三个重复。酶标仪测定每孔A₄₅₀值,以阳性/阴性(P/N) > 2.1,且P-N > 0.2为标准,培氟沙星抗体效价结果为1.28~2.56 $\times 10^4$ 。

[0085] 实施例5

[0086] 间接竞争ELISA(cielISA)检测培氟沙星抗体的灵敏度和特异性

[0087] 间接竞争ELISA(cielISA)操作程序:参照间接ELISA实验条件包板和封闭,然后加入50 μ L/孔不同浓度的PEF标准品或其它氟喹诺酮类药物标准品溶液,同时加入等体积适当稀释倍数的PEF多克隆抗体(PEF pAb),37 $^{\circ}$ C温育15min,其它操作同间接ELISA。以B/B₀值(B是不同浓度标准品时A₄₅₀值,B₀是不加标准品时A₄₅₀值)为纵坐标,以不同浓度标准品的对数值为横坐标,四参数曲线拟合建立cielISA标准曲线,进行相关分析。灵敏度用IC₅₀值表示,代表标准品的半数抑制浓度,线性范围表示最大信号值20-80%的抑制率(IC₂₀-IC₈₀),最低检测限(LOD)以IC₁₅值计算。

[0088] PEF pAb的交叉反应性决定了抗体的特异性。以氟喹诺酮类药物同类药物代替PEF标准溶液,进行交叉反应实验,计算公式是:(IC₅₀of PEF)/(IC₅₀of FQs) $\times 100$,CR越低,抗体特异性越强,结果见表1。由表1可知,PEF pAb呈现类特异性,与培氟沙星(100%)、恩诺沙星(94.9%)、达氟沙星(88.9%)、氧氟沙星(77.8%)、洛美沙星(75.7%)、二氟沙星(67.5%)、诺氟沙星(62.9%)、左氧氟沙星(58.9%)、氟罗沙星(47.9%)、环丙沙星(43.4%)、沙拉沙星(38.9%)、马波沙星(30.8%)和依诺沙星(27.3%)有较高的交叉反应率,这说明培氟沙星类特异性多克隆抗体可识别13种氟喹诺酮类药物兽药残留。

[0089] 表1培氟沙星类特异性多克隆抗体的交叉反应率

氟喹诺酮类药物	灵敏度 IC ₅₀ (ng/ml)	交叉反应率 CR (%)
培氟沙星	0.56	100
恩诺沙星	0.58	94.9
达氟沙星	0.63	88.9
氧氟沙星	0.72	77.8
洛美沙星	0.74	75.7
二氟沙星	0.83	67.5
[0090] 诺氟沙星	0.89	62.9
左氧氟沙星	0.95	58.9
氟罗沙星	1.17	47.9
环丙沙星	1.29	43.4
沙拉沙星	1.44	38.9
马波沙星	1.82	30.8
依诺沙星	2.05	27.3

[0091] 实施例6

[0092] 金标抗体的制备

[0093] 所述的胶体金标记的抗培氟沙星类特异性多克隆抗体 (PEF pAb), 由以下步骤实现:

[0094] (1) 胶体金溶液的制备: 取超纯水溶解的0.01% 氯金酸溶液100ml, 置电炉加热至沸腾, 3min后边搅拌, 边迅速加入1% 的柠檬酸三钠溶液2ml。继续加热, 溶液颜色由无色转为浅黄色, 最后变为橙红色时停止加热。冷却后用超纯水恢复至原体积, 进行透射电镜扫描, 鉴定胶体金质量及颗粒大小。胶体金悬液中加入最终质量浓度为0.05% 的叠氮钠 (NaN_3), 4℃ 冰箱中保存备用。

[0095] (2) 抗体预处理: 高浓度的抗体长时间冷冻保存会发生不同程度的聚集, 这些聚集物会影响标记的稳定性。因此标记前, 将抗培氟沙星类特异性多克隆抗体10000r/min, 4℃ 条件下离心30min, 弃沉淀, 上清液用0.01mol/L PBS稀释成1mg/ml。

[0096] (3) 待标pAb实际用量的确定: 酶标板用每孔50 μ l双蒸水铺底, 纵排加入倍比稀释的PEF pAb, 每孔50 μ l, 设空白对照 (BC)。用0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液至pH 9.0, 加入到酶标板中, 每孔50 μ l混匀。室温孵育15min后, 加入10%NaCl溶液100 μ l, 混匀, 静置。对照孔与pAb量不足以稳定金溶胶的各孔呈现由红变蓝的聚沉现象, 而pAb量达到或超过最低稳定量的各孔仍保持红色不变。选择不聚沉时pAb的最低量, 在此基础上增加20%, 即为待标PEF pAb的实际用量。

[0097] (4) 金标抗体的制备: 将事先确定的最佳标记PEF pAb的实际用量与胶体金偶联, 常温搅拌30min, 5000r/min离心20min, 弃上清后, 加入10%BSA硼酸钠溶液, 使BSA终浓度为1%作为稳定剂。金标抗体溶液10000r/min离心30min, 弃上清, 用20mmol/L的硼酸盐稀释液 (含1%BSA和0.1%叠氮钠) 将金标抗体恢复至原体积的1/10, 放置在4℃ 冰箱备用。

[0098] 实施例7

[0099] 试纸卡的生产 and 组装, 试纸卡的结构示意图如图1、图2和图3所示。其中: 1为塑料盒体, 2为试纸条, 3为支撑层, 4为样品垫, 5为金标抗体结合垫, 6为硝酸纤维素膜, 7为吸收垫, 8为加样孔, 9为观察窗, 10为质控线 (C线), 11为检测线 (T线), 12为胶膜, 13为标记线。

[0100] 硝酸纤维素膜 (NC膜) 的制备方法: 将硝酸纤维素膜置于X-only单向喷点仪平台上, 检测抗原放于A池, RaMIgG放于B池, 展平压紧, 开机后将PMA-OVA检测抗原和二抗分别点射于硝酸纤维素膜上, 形成检测线 (T线) 和质控线 (C线)。室温自然干燥后, 将其浸入封闭液 (质量浓度为1%的BSA的PBS缓冲液, pH 7.4) 中30min, 37℃ 烘干后, 加入干燥剂, 4℃ 密封保存。

[0101] 结合垫的制备方法: 将玻璃纤维棉裁成4mm宽的细条, 放入含质量浓度为5%的BSA, 质量浓度为2%的蔗糖, 质量浓度为0.8%的NaCl和质量浓度为0.05%的 NaN_3 的PBS处理液中20min, 37℃ 恒温烘干, 然后将金标抗体灌注已处理好的玻璃纤维棉上, 真空冻干4h, 即为结合垫。

[0102] 样品垫的制备方法: 玻璃纤维棉要用含质量浓度为2%的BSA, 质量浓度为1%的蔗糖, 质量浓度为0.5%的硼酸钠和质量浓度为0.1%的 NaN_3 的PBS处理后, 干燥备用, 即为样品垫。

[0103] 试纸卡的组装: 在支持板 (PVC板) 上, 将NC膜、结合垫、样品垫、吸收垫和胶膜等按一定工艺组装在一起, 用CM4000切割机制成4mm宽的试纸条。然后, 按一定工艺将试纸条封

装于带有加样孔和观察窗的特制的塑料盒体中,即为本发明的基于培氟沙星类特异性多克隆抗体的氟喹诺酮类药物多残留检测试纸卡。

[0104] 实施例8

[0105] 本发明的氟喹诺酮类药物多残留检测试纸卡在动物尿液中样品前处理及实际检测线

[0106] 采集新鲜尿液放于4℃冰箱中待检,一般不需特殊处理,可直接用于试纸卡检测;若尿液中有污染和混浊,5000r/min离心10min或过滤后检测。试纸卡识别尿液中氟喹诺酮类药物兽药残留的检测线分别为:培氟沙星(5ng/mL)、恩诺沙星(6ng/mL)、达氟沙星(7ng/mL)、氧氟沙星(8ng/mL)、洛美沙星(8ng/mL)、二氟沙星(10ng/mL)、诺氟沙星(10ng/mL)、左氧氟沙星(12ng/mL)、氟罗沙星(15ng/mL)、环丙沙星(15ng/mL)、沙拉沙星(16ng/mL)、马波沙星(20ng/mL)和依诺沙星(20ng/mL)。

[0107] 实施例9

[0108] 本发明的氟喹诺酮类药物多残留检测试纸卡在动物血液中样品前处理及实际检测线

[0109] 用加有肝素钠(20-30单位/mL血样)的离心管采集血液样本,5000r/min离心10min;取出血浆2mL加入干净的玻璃离心管中,再加入2mL乙腈,用振荡器混匀后上样检测。试纸卡识别血液中氟喹诺酮类药物兽药残留的检测线分别为:培氟沙星(10ng/mL)、恩诺沙星(12ng/mL)、达氟沙星(15ng/mL)、氧氟沙星(15ng/mL)、洛美沙星(15ng/mL)、二氟沙星(20ng/mL)、诺氟沙星(20ng/mL)、左氧氟沙星(25ng/mL)、氟罗沙星(30ng/mL)、环丙沙星(30ng/mL)、沙拉沙星(30ng/mL)、马波沙星(40ng/mL)和依诺沙星(40ng/mL)。

[0110] 实施例10

[0111] 本发明的氟喹诺酮类药物多残留检测试纸卡在动物组织中样品前处理及实际检测线

[0112] 用均浆器均质动物组织,取5.0g动物组织置于50mL具拧盖的塑料离心管中,加入10mL乙腈-0.1M氢氧化钠溶液(体积比为40/60),充分混合10min,15℃3000r/min离心10min。取出2mL上清液,加入PBS缓冲液2mL混合均匀,上样检测。试纸卡识别动物组织中氟喹诺酮类药物兽药残留的检测线分别为:培氟沙星(20ng/mL)、恩诺沙星(20ng/mL)、达氟沙星(25ng/mL)、氧氟沙星(30ng/mL)、洛美沙星(30ng/mL)、二氟沙星(40ng/mL)、诺氟沙星(40ng/mL)、左氧氟沙星(50ng/mL)、氟罗沙星(60ng/mL)、环丙沙星(40ng/mL)、沙拉沙星(60ng/mL)、马波沙星(80ng/mL)和依诺沙星(80ng/mL)。

[0113] 实施例11

[0114] 本发明的氟喹诺酮类药物多残留检测试纸卡在蜂蜜中样品前处理及实际检测线

[0115] 取5.0g蜂蜜置于50mL聚苯乙烯离心管中,加入5mL PBS缓冲液,用振荡器振荡至蜂蜜全部溶解;然后加入乙腈-NaOH溶液10mL,充分混合10min,15℃3000r/min离心10min,取上层液体用于试纸卡检测。试纸卡识别蜂蜜中氟喹诺酮类药物兽药残留的检测线分别为:培氟沙星(20ng/mL)、恩诺沙星(20ng/mL)、达氟沙星(25ng/mL)、氧氟沙星(30ng/mL)、洛美沙星(30ng/mL)、二氟沙星(40ng/mL)、诺氟沙星(40ng/mL)、左氧氟沙星(50ng/mL)、氟罗沙星(60ng/mL)、环丙沙星(40ng/mL)、沙拉沙星(60ng/mL)、马波沙星(80ng/mL)和依诺沙星(80ng/mL)。

[0116] 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。

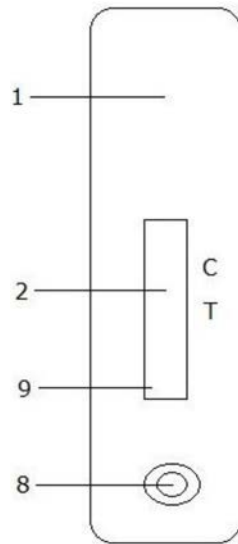


图1

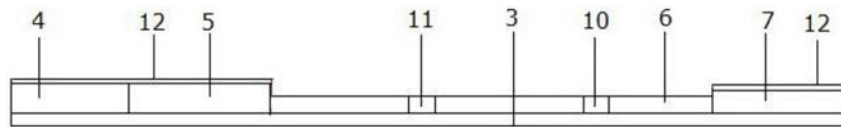


图2

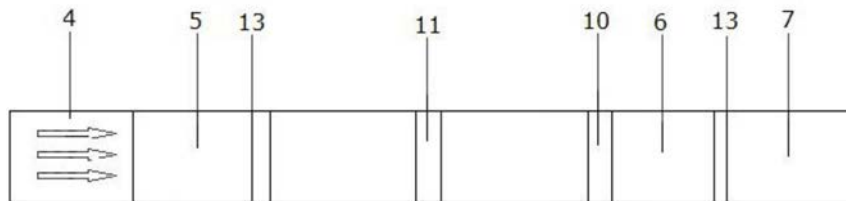


图3

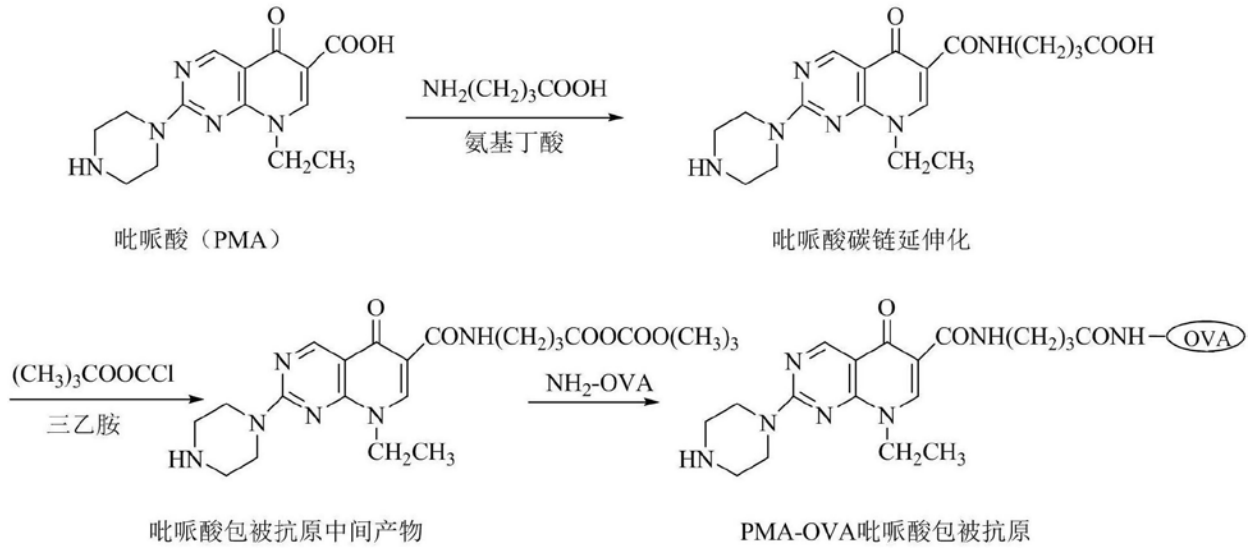


图4

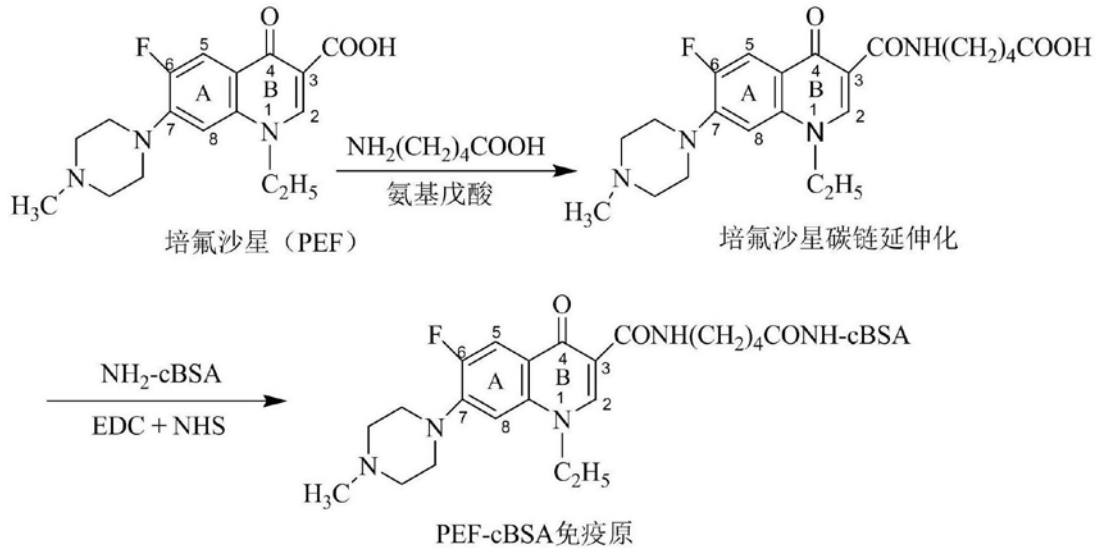
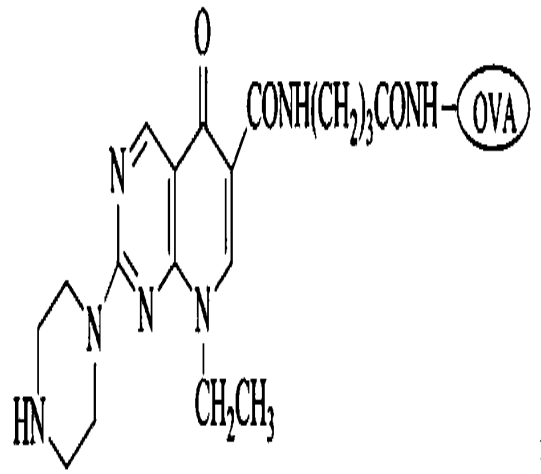


图5

专利名称(译)	基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡		
公开(公告)号	CN106841600B	公开(公告)日	2018-09-11
申请号	CN201611231306.3	申请日	2016-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	姜金庆 王亚楠 牛巧平 王金安 雷壮壮 牛琳琳 王靖文 周叶 吴世秀 刘长忠		
发明人	姜金庆 王亚楠 牛巧平 王金安 雷壮壮 牛琳琳 王靖文 周叶 吴世秀 刘长忠		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN106841600A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡，属于免疫化学检测技术领域。本发明提供了基于培氟沙星类多克隆抗体的检测氟喹诺酮类药物的试纸卡，包括塑料盒体，所述塑料盒体一端设置有加样孔，设置在所述塑料盒体中的试纸条，所述试纸条包括支撑层，设置在所述支撑层上的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线，所述检测线处设置有氟喹诺酮类药物包被抗原，所述质控线处设置有羊抗兔IgG，所述结合垫上灌注有胶体金标记的抗培氟沙星类多克隆抗体。本发明提供的基于培氟沙星类多克隆抗体检测氟喹诺酮类药物的试纸卡操作简便，灵敏度高，特异性强，检测范围广，易于大范围推广应用。



式 I;