



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103091495 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201310014748. 2

(22) 申请日 2013. 01. 16

(73) 专利权人 河南知微生物工程有限公司

地址 453000 河南省新乡市凤泉区团结路北  
段王氏集团

专利权人 河南科技学院

(72) 发明人 姜金庆 陈俊杰 张晓建 李桂平

杨志 孟晓梅 原小燕 栗克文

周丽霞 杜同亮

(74) 专利代理机构 新乡市平原专利有限责任公  
司 41107

代理人 于兆惠

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

(续)

(56) 对比文件

CN 1403815 A, 2003. 03. 19,

CN 102618502 A, 2012. 08. 01,

CN 102269763 A, 2011. 12. 07,

CN 1547015 A, 2004. 11. 17,

CN 101710123 A, 2010. 05. 19,

CN 101710124 A, 2010. 05. 19,

CN 101983971 A, 2011. 03. 09,

CN 102766212 A, 2012. 11. 07,

CN 102827076 A, 2012. 12. 19,

CN 102269765 A, 2011. 12. 07,

CN 102323415 A, 2012. 01. 18,

CN 101968488 A, 2011. 02. 09,

CN 102269763 A, 2011. 12. 07,

CN 102608331 A, 2012. 07. 25,

CN 102338802 A, 2012. 02. 01,

冯婷婷. 氟喹诺酮类药物胶体金试纸的研  
制. 《中国畜牧兽医》. 2012, 第 39 卷 (第 9 期),  
第 54-58 页.冯婷婷. 氟喹诺酮类药物胶体金试纸的研  
制. 《中国畜牧兽医》. 2012, 第 39 卷 (第 9 期),  
第 54-58 页.Zhanhui Wang et al.. Development of a  
Monoclonal Antibody-Based Broad-Specificity  
ELISA for Fluoroquinolone Antibiotics  
in Foods and Molecular Modeling Studies  
of Cross-Reactive Compounds. 《Analytical  
Chemistry》. 2007, 第 79 卷 (第 12  
期), 4471-4483.

YAN ZHU et al.. Development of an

(续)

审查员 周洋

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

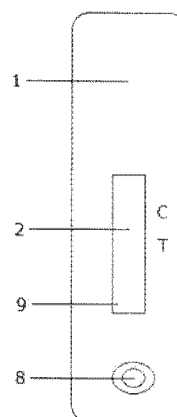
(54) 发明名称

一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡及  
其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡及其制备方法。本发明的技术方案要点为：一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡，包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条，所述试纸条的底层为支撑层，该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述的硝酸纤维素膜上有诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物溶液印制的检测线和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线，所述的结合垫上灌注有胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物

类特异性单克隆抗体。本发明还公开了该氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的制备方法。本发明操作简单、快速准确、灵敏度高、成本低、稳定性好，可进行批量检测。



[ 转续页 ]

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*G01N 33/531* (2006.01)

(56) 对比文件

Immunochromatography Strip for the Rapid Detection of 12 Fluoroquinolones in Chicken Muscle and Liver. 《Journal of agricultural and food chemistry》.2008, 第 56 卷 (第 14 期), 5469-5474.

YAN ZHU et al..Development of an Immunochromatography Strip for the Rapid Detection of 12 Fluoroquinolones in Chicken Muscle and Liver. 《Journal of agricultural and food chemistry》.2008, 第 56 卷 (第 14 期), 5469-5474.

周大勇 等. 诺氟沙星与牛血清白蛋白及卵清蛋白结合物的合成. 《上海水产大学学报》.2002, 第 11 卷 (第 4 期), 第 362-366 页.

1. 一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,其特征在于:所述的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条,所述试纸条的底层为支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的塑料盒体上开有加样孔和观察窗,该加样孔的位置与试纸条上的样品垫位置相对应,观察窗与试纸条上的硝酸纤维素膜位置相对应,所述的硝酸纤维素膜上有诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物溶液印制的检测线和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线,所述的金标抗体结合垫上灌注有胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体,该金标抗体结合垫的制备方法为:将玻璃纤维棉裁成 4mm 宽的细条,放入含有质量浓度为 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  $\text{NaN}_3$  的 PBS 缓冲液中 20min, 37℃ 恒温烘干,然后将胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体灌注到已处理好的玻璃纤维棉上,真空冻干 4h,即制得金标抗体结合垫,其中胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体是由环丙沙星-牛血清白蛋白偶联物免疫 Balb/C 小鼠制备而来的,所述的环丙沙星-牛血清白蛋白偶联物的制备过程具体包括以下步骤:

(1)载体蛋白的活化:将 200mg BSA、11.2mg EDC 溶于 4mL PBS 缓冲液中,搅拌条件下,缓慢加入 6mg 乙二胺,37℃ 振荡反应 2h,反应液用 PBS 缓冲液透析 3d,活化的载体蛋白 BSA 冻干保存;

(2)环丙沙星衍生化:称取环丙沙星 38.6mg、NHS 12mg 和 EDC 19.2mg 溶于 2mL N,N-二甲基甲酰胺中,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,取氨基丁酸 10mg 溶于 2mL PBS 缓冲液中,即 B 液,搅拌状态下将 B 液滴入 A 液中,反应 4h,然后于 8000r/min 离心 10min,取上清液用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液调至偏碱性,弃沉淀,上清液再用摩尔浓度为 0.1mol/L 的稀盐酸调至偏酸性,收集沉淀,即制得环丙沙星半抗原衍生物;

(3)免疫原的合成:采用优化的 EDC 两步法合成 CIP-BSA 免疫原,将 35mg 衍生化的 CIP 用 3mL N,N-二甲基甲酰胺溶解后,加入 12mg NHS 和 38mg EDC,37℃ 条件下避光反应 24h,离心后取上清液逐滴加入到 4mL 含 60mg 活化载体蛋白 BSA 的 PBS 缓冲液中,37℃ 条件下避光振荡反应 4h,反应完成后先用蒸馏水透析 3d,再用 PBS 缓冲液透析 3d,紫外扫描透析液无小分子吸收峰时即制得环丙沙星-牛血清白蛋白偶联物,将免疫原分装于安瓿瓶中, -20℃ 保存。

2. 根据权利要求 1 所述的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,其特征在于所述样品垫的制备方法为:将玻璃纤维棉用含有质量浓度为 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  $\text{NaN}_3$  的 PBS 缓冲液处理后,干燥备用,即为样品垫。

3. 根据权利要求 1 所述的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,其特征在于所述硝酸纤维素膜的制备方法为: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,开机后将抗原和二抗分别点射于硝酸纤维素膜上,形成检测线和质控线,室温自然干燥后,将其浸入 BSA 质量浓度为 1% 的 PBS 缓冲液, pH 值为 7.4 的封闭液中 30 min, 37℃ 烘干后,加入干燥剂, 4℃ 密封保存,所述诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物的制备方法为:将 36mg 诺氟沙星溶解于 2mL DMF 和 2mL 二氧六环中, 4℃ 预冷 30min, 加入 20  $\mu\text{L}$  三丁胺,冰浴 10min 后加入 40  $\mu\text{L}$  氯甲酸异丁酯,反应 60min,即 A 液,将 40mg 鸡卵清白蛋白溶解于 5mL pH 值为 9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的缓冲溶液中,即 B 液,将 A 液逐滴加入到 B

液中,避光振荡反应 4h,反应完成后先用蒸馏水透析 3d,再用 PBS 缓冲液透析 3d,紫外扫描透析液无小分子吸收峰时分装于安瓿瓶中,-20℃冻干保存。

4. 根据权利要求 1 所述的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,其特征在于所述吸收垫的制备方法为:将以植物长纤维为原材料制作的纯白滤纸用切割机切成 4mm 宽的细条,并用胶膜进行一侧封闭,干燥备用,即为吸收垫。

5. 根据权利要求 1 所述的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,其特征在于:所述的氟喹诺酮类药物为环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、培氟沙星、依诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、洛美沙星和麻保沙星中的至少一种。

## 一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学检测技术领域,具体涉及一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡及其制备方法。

### 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,它们是在第一代萘啶酸和第二代吡哌酸的基础上,在喹诺酮萘啶环的 6 号位引入氟原子,7 号位上连接哌嗪环而开发出的第三代喹诺酮药物,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  $0.01 \sim 1.9 \text{ mg/kg}$ ;美国 and 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  $5 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ;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  $10 \text{ } \mu\text{g/kg}$  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  $100 \text{ } \mu\text{g/L}$ ,达氟沙星为  $30 \text{ } \mu\text{g/L}$ ,氟甲喹为  $50 \text{ } \mu\text{g/L}$ 。

[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。理化分析方法灵敏度高,但需要昂贵的仪器设备,繁琐复杂的操作程序,相对费时且检测费用较高,不适合批量样品的筛选。ELISA 方法灵敏度高,特异性强,测定方法简单快速,可同时筛选大量样品。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(3-5 min),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。目前,市场上销售的试纸卡多用来检测某一具体的药物,尚未见到能够同时检测多种 FQs 兽药残留的试纸卡。

[0005] 因此,研制快速、灵敏、高效的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡对于保障动物性食品安全具有十分重要的意义。

[0006] 发明内容

[0007] 本发明解决的技术问题是提供了一种操作简便、快速准确、灵敏度高、成本低廉、稳定性好且可进行批量检测的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,该试纸卡能够同时检测环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、培氟沙星、依诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、洛美沙星和麻保沙星等 9 种氟喹诺酮类药物残留。

[0008] 本发明解决的另一个技术问题是提供了一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的制备方法。

[0009] 本发明的技术方案是:一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,其特征在于:所述的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条,所述试纸条的底层为支撑层,该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,所述的塑料盒体上开有加样孔和观察窗,该加样孔的位置与试纸条上的样品垫位置相对应,观察窗与试纸条上的硝酸纤维素膜位置相对应,所述的硝酸纤维素膜上有诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物溶液印制的检测线和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线,所述的结合垫上灌注有胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体。

[0010] 本发明所述的支撑层为 PVC 板。本发明所述的吸收垫是以植物长纤维为原材料制成的纯白滤纸。本发明所述的样品垫和金标抗体结合垫是由玻璃纤维棉制作而成的。本发明所述的样品垫和金标抗体结合垫的叠压宽度为 2 mm,吸收垫与硝酸纤维素膜的叠压宽度为 2 mm。本发明所述的样品垫、金标抗体结合垫和吸收垫上方覆盖有胶膜保护层。本发明所述的硝酸纤维素膜两端分界处有标记线。

[0011] 本发明所述的氟喹诺酮类药物为环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、培氟沙星、依诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星、洛美沙星和麻保沙星中的至少一种。

[0012] 本发明所述的胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体是由环丙沙星-牛血清白蛋白偶联物免疫 Balb/C 小鼠制备而来的。

[0013] 一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的制备方法,其特征在于:首先将样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫按照由左到右的顺序附着于支撑层上,所述的硝酸纤维素膜上有诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物溶液印制的检测线和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线,然后用切割机制成试纸条,然后将试纸条封装于带有加样孔和观察窗的塑料盒体内,这样就制得了氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡。

[0014] 本发明所述的样品垫的制备方法为:将玻璃纤维棉用含有质量浓度为 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  $\text{NaN}_3$  的 PBS 缓冲液处理后,干燥备用,即为样品垫。

[0015] 本发明所述的金标抗体结合垫的制备方法为:将玻璃纤维棉裁成 4 mm 宽的细条,

放入含有质量浓度为 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  $\text{NaN}_3$  的 PBS 缓冲液中 20 min, 37 °C 恒温烘干, 然后将金标抗体灌注于已处理好的玻璃纤维棉上, 真空冻干 4 h, 即为金标抗体结合垫。

[0016] 本发明所述的硝酸纤维素膜的制备方法为: 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, 开机后将抗原和二抗分别点射于硝酸纤维素膜上, 形成检测线和质控线, 室温自然干燥后, 将其浸入 BSA 质量浓度为 1% 的 PBS 缓冲液, pH 值为 7.4 的封闭液中 30 min, 37 °C 烘干后, 加入干燥剂, 4 °C 密封保存。

[0017] 本发明所述的诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物的制备方法为: 将 36 mg 诺氟沙星溶解于 2 mL DMF 和 2 mL 二氧六环中, 4 °C 预冷 30 min, 加入 20  $\mu\text{L}$  三丁胺, 冰浴 10 min 后加入 40  $\mu\text{L}$  氯甲酸异丁酯, 反应 60 min, 即 A 液, 将 40 mg 鸡卵清白蛋白溶解于 5 mL pH 为 9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的缓冲溶液, 即 B 液, 将 A 液逐滴加入到 B 液中, 避光振荡反应 4 h, 反应完成后先用蒸馏水透析 3 d, 再用 PBS 缓冲液透析 3 d, 紫外扫描透析液无小分子吸收峰时分装于安瓿瓶中, -20 °C 冻干保存。

[0018] 本发明所述的吸收垫的制备方法为: 将以植物长纤维为原材料制作的纯白滤纸用切割机切成 4 mm 宽的细条, 并用胶膜进行一侧封闭, 干燥备用, 即为吸收垫。

[0019] 本发明的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡具有如下优点:

[0020] (1) 广谱特异性, 能检测 9 种 FQs 兽药残留。氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡以胶体金标记高亲和力的抗 FQs 类特异性单克隆抗体制备而成, 金标抗体中金颗粒与抗体分子通过异性电荷间范德华力相结合, 胶体金对单克隆抗体的特异性和亲和力影响很小。因此, 快速检测试纸卡能识别多种 FQs 兽药残留, 其在 PBS 缓冲液中的灵敏度分别为: 环丙沙星 (5 ng/mL)、诺氟沙星 (5 ng/mL)、恩诺沙星 (5 ng/mL)、培氟沙星 (6 ng/mL)、依诺沙星 (6 ng/mL)、沙拉沙星 (8 ng/mL)、氧氟沙星 (8 ng/mL)、洛美沙星 (10 ng/mL) 和麻保沙星 (10 ng/mL);

[0021] (2) 操作简单、方便快捷。使用快速检测试纸卡时无需其它任何试剂, 只要将处理后的样品溶液用滴管滴入试纸卡加样孔内 3~4 滴, 3~5 min 即可观察结果;

[0022] (3) 检测结果形象、直观。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。结果形象直观, 简单准确, 不容易出现误判;

[0023] (4) 胶膜的使用可以延长检测结果观察时间, 试纸卡稳定性好。本试纸卡样品吸收垫将检测溶液完全吸收, 使之与偶联垫上金标抗体充分反应, 可以有效减少误差率; 还可以防止外界杂质干扰, 影响金标抗体与检测抗原的结合;

[0024] (5) 成本低、投资少。使用本发明试纸卡, 不需要另配复杂的仪器设备和昂贵的试剂, 现场检测一步到位, 成本低廉, 见效快;

[0025] (6) 易于大范围推广应用。本试纸卡操作简单, 适合不同类别的人员使用, 如实验室检测、海关检疫、卫生监督、规模养殖及个体生产等, 具有广阔的市场前景和较大的经济效益和社会效益。

## 附图说明

[0026] 图 1 为本发明的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的结构示意图 ;图 2 为本发明的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡中试纸条的侧视图 ;图 3 为本发明的氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡中试纸条的俯视图。

[0027] 图面说明 :1、塑料盒体、2、试纸条、3、支撑层、4、样品垫、5、金标抗体结合垫、6、硝酸纤维素膜(NC 膜)、7、吸收垫、8、加样孔、9、观察窗、10、质控线(C 线)、11、检测线(T 线)、12、胶膜、13、标记线。

### 具体实施方式

[0028] 结合附图详细描述实施例。一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡,包括塑料盒体 1 和封装于塑料盒体 1 内的试纸条 2,所述的试纸条 2 的底层为支撑层 3,该支撑层 3 上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫 4、金标抗体结合垫 5、硝酸纤维素膜 6 和吸收垫 7,所述的塑料盒体 1 上开有加样孔 8 和观察窗 9,该加样孔 8 的位置与试纸条 2 上的样品垫 4 位置相对应,观察窗 9 与试纸条 2 上的硝酸纤维素膜 6 位置相对应,所述的硝酸纤维素膜 6 上有诺氟沙星—鸡卵清白蛋白(NOR—OVA)偶联物溶液印制的检测线(T 线)11 和羊抗鼠 IgG 溶液印制的质控线(C 线)10,两者间距 5 mm,其中诺氟沙星—鸡卵清白蛋白偶联物溶液印制的检测线(T 线)11 位于靠近样品垫 4 的一侧,所述的结合垫 5 上灌注有胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体。

[0029] 本发明所述的支撑层 3 是由聚氯乙烯树脂与稳定剂及辅料配合制成的 PVC 板。本发明所述的吸收垫 7 是由吸水能力极强的植物长纤维为原材料制成的纯白滤纸。本发明所述的样品垫 4 和金标抗体结合垫 5 是由玻璃纤维棉制作而成的。本发明所述的样品垫 4 和金标抗体结合垫 5 的叠压宽度为 2 mm,吸收垫 7 与硝酸纤维素膜 6 的叠压宽度为 2 mm。本发明所述的样品垫 4、金标抗体结合垫 5 和吸收垫 7 上方覆盖有胶膜保护层 12。本发明所述的硝酸纤维素膜 6 两端分界处有标记线 13。

[0030] 一、本发明氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的制备方法 :

[0031] 1、所述的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体由环丙沙星—牛血清白蛋白(CIP—BSA)偶联物免疫 Balb/C 小鼠制备而来,由以下步骤实现 :

[0032] (1)载体蛋白的活化 :将 200 mg BSA、11.2 mg EDC 溶于 4 mL PBS 缓冲液中,搅拌条件下,缓慢加入 6 mg 乙二胺(溶于 4 mL PBS),37 °C 振荡反应 2 h。反应液用 PBS 透析 3 d,活化的载体蛋白 BSA 冻干保存。

[0033] (2)环丙沙星衍生化 :称取环丙沙星 38.6 mg (约 0.1 mmol),NHS 12 mg (约 0.1 mmol)和 EDC 19.2 mg (约 0.1 mmol)溶于 2 mL 的 DMF,室温下避光搅拌 12 h。反应产物于 8000 r/min 离心 10 min,取上清称为 A 液。氨基丁酸 10 mg (约 0.1 mmol)溶于 2 mL PBS 中,即 B 液。搅拌状态下将 B 液缓慢滴入 A 液中,反应 4 h,然后 8000 r/min 离心 10 min,取上清液用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 调至偏碱性,弃沉淀。上清液再用稀盐酸(0.1 mol/L)调至偏酸性,收集沉淀,即为环丙沙星半抗原衍生物。

[0034] (3)免疫原的合成 :采用优化的 EDC 两步法合成 CIP-BSA 免疫原。将 35 mg 衍生化的 CIP 用 3 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解后,加入 12 mg NHS 和 38 mg EDC,37 °C 条件下避光反应 24 h。离心后取上清液逐滴加入到 4 mL 含 60 mg 活化 BSA 的 PBS 缓冲液中,37 °C 条件下避光振荡反应 4 h。反应完成后先用蒸馏水透析 3 d,再用 PBS 透析 3 d,紫

外扫描透析液无小分子吸收峰时,将免疫原分装于安瓿瓶中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

[0035] (4) 小鼠免疫:用 CIP-BSA 免疫 8~10 周龄雌性 Balb/C 小鼠 5 只,剂量为  $60\ \mu\text{g}$ /只,体积为 0.2 mL。首免用 PBS 稀释的免疫原与等体积 FCA 完全乳化,以后每隔 3 w 加强免疫一次,换用 FIA 乳化。免疫 5 次后断尾采血分离血清,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选效价高,抑制效果好的小鼠作为融合备用鼠。融合前 3 d 超免小鼠,尾静脉和腹腔各注射  $60\ \mu\text{g}$  免疫原。

[0036] (5) 细胞融合:融合前 4~5 d 用含有 8-氮鸟嘌呤的完全培养基(含 15%FBS 的 RPMI-1640)传代培养 NS0 细胞;前 1 d 用 HAT 培养滋养细胞;融合时眶下窦采血,脱颈致死小鼠。无菌取脾脏制备脾细胞,在 PEG-1500 作用下与 NS0 细胞融合(细胞数量比约为 10:1),将融合后的细胞悬液加入到已铺有滋养细胞的 96 孔细胞板中, HAT 培养。

[0037] (6) 类特异性单克隆细胞株的筛选:融合后 10~14 d 用间接 ELISA 和 ciELISA 筛选强阳性、抑制率高、生长状态好的杂交瘤细胞株,用有限稀释法进行 3 次亚克隆。然后用 FQs 标准品溶液筛选灵敏度高、呈类特异性的单克隆源细胞株,共取得 5 株。其中, C1E6 细胞株灵敏度最高,识别 FQs 标准品种类最多,其抗体特异性结果见表一。

[0038] 表一 C1E6 细胞株抗体特异性

[0039]

| FQs 化合物 | 灵敏度 $\text{IC}_{50}$ (ng/mL) | 交叉反应率 CR (%) |
|---------|------------------------------|--------------|
| 环丙沙星    | 0.21                         | 100          |
| 诺氟沙星    | 0.23                         | 91.3         |
| 恩诺沙星    | 0.24                         | 87.5         |
| 培氟沙星    | 0.26                         | 80.8         |
| 依诺沙星    | 0.27                         | 77.8         |
| 沙拉沙星    | 0.31                         | 67.7         |
| 氧氟沙星    | 0.33                         | 63.6         |
| 洛美沙星    | 0.45                         | 46.7         |
| 麻保沙星    | 0.47                         | 44.7         |
| 达氟沙得    | > 2100                       | < 0.01       |
| 氟甲喹     | > 2100                       | < 0.01       |

[0040] (7) 类特异性单克隆抗体的制备:将 C1E6 细胞株转移到 24 孔细胞板及 50 mL 细胞瓶中扩大培养。筛选的杂交瘤细胞浓度达到约  $10^7/\text{mL}$  时,向 10 d 前经液体石蜡处理过的经产母鼠腹腔内注射单克隆细胞  $10^8$ /只。 $10\sim 12$  d 后抽取腹水,饱和硫酸铵法纯化抗 FQs 类特异性单克隆抗体,进行胶体金标记。

[0041] 2、所述的胶体金标记类特异性单克隆抗体,由以下步骤实现:

[0042] (1) 胶体金溶液的制备:取超纯水溶解的 0.01% 氯金酸溶液 100 mL,置电炉加热至沸腾,3 min 后边搅拌,边迅速加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 2 mL。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 ( $\text{NaN}_3$ ),  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

[0043] (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,将抗氟喹诺酮类药物(FQs)类特异性单克隆抗体  $10000\ \text{r/min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下离心 30 min,弃沉淀,上清液用 0.01 mol/L PBS 稀释成 1 mg/mL。

[0044] (3) 待标 mAb 实际用量的确定:酶标板用每孔 50  $\mu\text{L}$  双蒸水铺底,纵排加入倍比

稀释的 CIP mAb, 每孔 50  $\mu$ L, 设空白对照(BC)。用 0.1 mol/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  $\mu$ L 混匀。室温孵育 15 min 后, 加入 10% NaCl 溶液 100  $\mu$ L, 混匀, 静置。对照孔与 mAb 量不足以稳定金溶胶的各孔呈现由红变蓝的聚沉现象, 而 mAb 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 mAb 的最低量, 在此基础上增加 20%, 即为待标 mAb 的实际用量。

[0045] (4) 胶体金标记类特异性单克隆抗体: 将事先确定的最佳标记蛋白量与胶体金偶联, 常温搅拌 30 min, 5000 r/min 离心 20 min, 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 10000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 用 20 mmol/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  $^{\circ}C$  冰箱备用。

[0046] 3、所述的诺氟沙星-鸡卵清白蛋白(NOR-OVA) 偶联物由以下方式实现: 将 36 mg NOR 溶解于 2 mL DMF 和 2 mL 二氧六环中, 4  $^{\circ}C$  预冷 30 min, 加入 20  $\mu$ L 三丁胺, 冰浴 10 min 后加入 40  $\mu$ L 氯甲酸异丁酯, 反应 60 min, 即 A 液。将 40 mg OVA 溶解于 5 mL pH 9.6 的  $Na_2CO_3$  缓冲溶液, 即 B 液。将 A 液逐滴加入到 B 液中, 避光振荡反应 4 h。反应完成后先用蒸馏水透析 3 d, 再用 PBS 透析 3 d, 紫外扫描透析液无小分子吸收峰时分装于安瓿瓶中, -20  $^{\circ}C$  冻干保存。

[0047] 4、所述的硝酸纤维素膜(NC 膜) 的制备方法, 其特征在于: 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 30 min, 37  $^{\circ}C$  烘干后, 加入干燥剂, 4  $^{\circ}C$  密封保存。

[0048] 5、所述的结合垫的制备方法, 其特征在于: 将玻璃纤维棉裁成 4 mm 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 20 min, 37  $^{\circ}C$  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 4 h, 即为结合垫。

[0049] 6、所述的样品垫的制备方法, 其特征在于: 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。

[0050] 7、所述的试纸卡的组装, 其特征在于: 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 4 mm 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, 即为本发明氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡。

[0051] 二、本发明氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的检测原理:

[0052] 试纸卡根据抗原抗体竞争性免疫层析原理设计。滴加样品液后, 在吸收垫和 NC 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 FQs 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 NOR-OVA 的检测线位置时, 检测抗原将和 FQs 药物竞争结合金标抗体上有限的抗原结合位点。样品中 FQs 药物含量越高, 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 FQs 药物高于一定数值时, 检测抗原就无法和金标抗体结合, T 线不显色。无论样品中是否有 FQs 药物存在, 过

量的金标抗体或检测抗原与金标抗体的结合物都将和二抗 RaMIgG 结合,在 C 线形成红色。

[0053] 三、本发明氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡样品前处理及实际检测线:

[0054] (1) 动物尿样:采集新鲜尿样放于 4 °C 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,5000 r/min 离心 10 min 或过滤后检测。试纸卡识别尿样中 FQs 兽药残留的灵敏度分别为:环丙沙星(5 ng/mL)、诺氟沙星(5 ng/mL)、恩诺沙星(5 ng/mL)、培氟沙星(6 ng/mL)、依诺沙星(6 ng/mL)、沙拉沙星(8 ng/mL)、氧氟沙星(8 ng/mL)、洛美沙星(10 ng/mL)和麻保沙星(10 ng/mL)。

[0055] (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,5000 r/min 离心 10 min;取出血浆 2 mL 加入干净的玻璃离心管中,再加入 2 mL 乙腈,用振荡器混匀后上样检测。试纸卡识别血液中 FQs 兽药残留的灵敏度分别为:环丙沙星(10 ng/mL)、诺氟沙星(10 ng/mL)、恩诺沙星(10 ng/mL)、培氟沙星(12 ng/mL)、依诺沙星(12 ng/mL)、沙拉沙星(16 ng/mL)、氧氟沙星(16 ng/mL)、洛美沙星(20 ng/mL)和麻保沙星(20 ng/mL)。

[0056] (3) 动物组织:用均浆器均质肉样组织,取 5.0 g 肉样置于 50 mL 离心管中,加入乙腈-NaOH 溶液 10 mL,充分混合 10 min,15°C 3000 r/min 离心 10 min。取出 2 mL 上清液,加入 PBS 缓冲液 2 mL 混合均匀,上样检测。试纸卡识别动物组织中 FQs 兽药残留的灵敏度分别为:环丙沙星(20 ng/mL)、诺氟沙星(20 ng/mL)、恩诺沙星(20 ng/mL)、培氟沙星(24 ng/mL)、依诺沙星(24 ng/mL)、沙拉沙星(32 ng/mL)、氧氟沙星(32 ng/mL)、洛美沙星(40 ng/mL)和麻保沙星(40 ng/mL)。

[0057] (4) 蜂蜜样品:取 5.0 g 蜂蜜置于 50 mL 聚苯乙烯离心管中,加入 5 mL 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 10 mL,充分混合 10 min,15°C 3000 r/min 离心 10 min,取上层液体用于试纸卡检测。试纸卡识别蜂蜜中 FQs 兽药残留的灵敏度分别为:环丙沙星(20 ng/mL)、诺氟沙星(20 ng/mL)、恩诺沙星(20 ng/mL)、培氟沙星(24 ng/mL)、依诺沙星(24 ng/mL)、沙拉沙星(32 ng/mL)、氧氟沙星(32 ng/mL)、洛美沙星(40 ng/mL)和麻保沙星(40 ng/mL)。

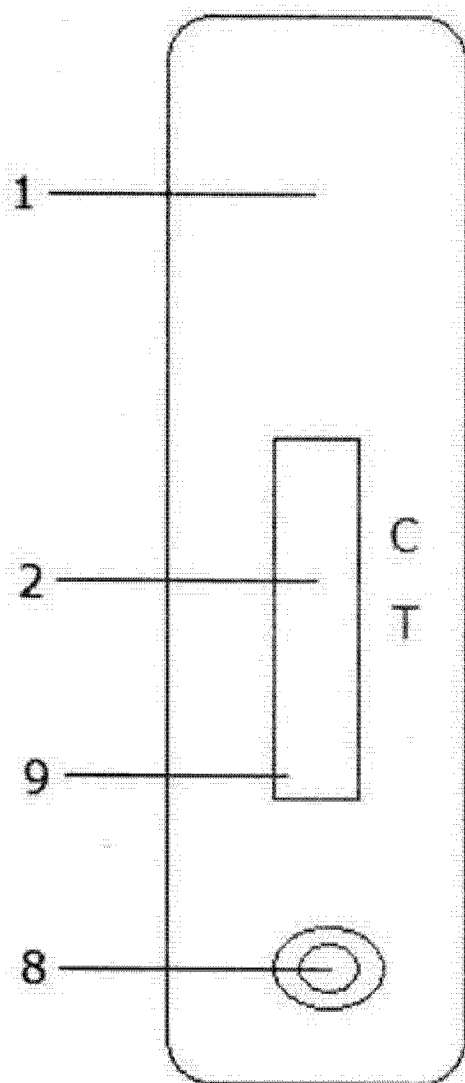


图 1

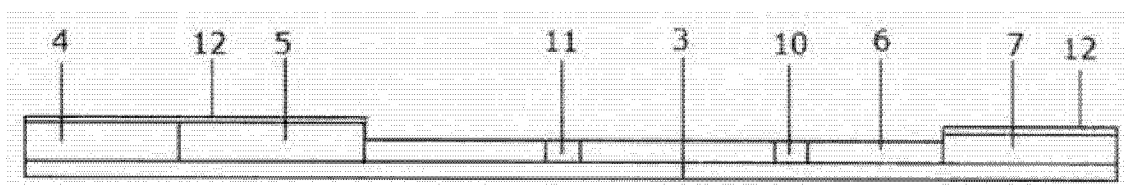


图 2

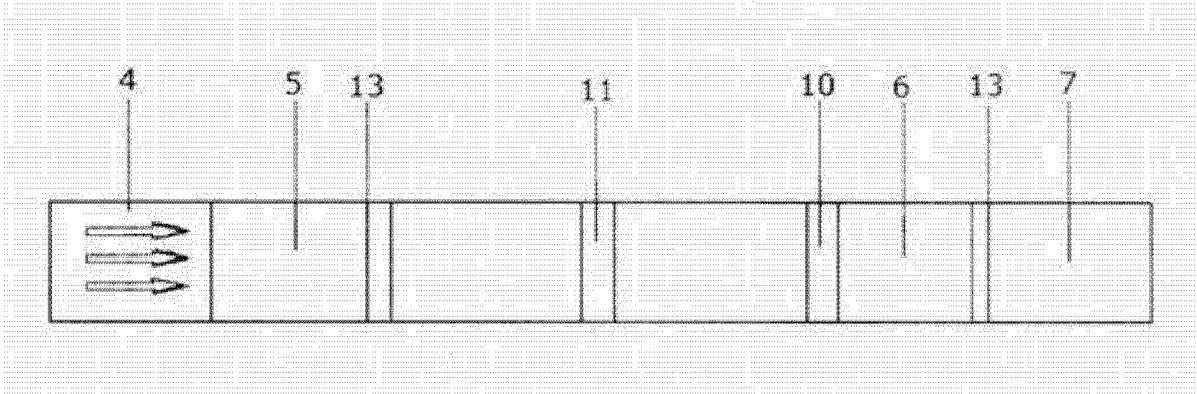


图 3

|                |                                                                   |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡及其制备方法                                          |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN103091495B</a>                                      | 公开(公告)日 | 2014-11-05 |
| 申请号            | CN201310014748.2                                                  | 申请日     | 2013-01-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 河南知微生物工程有限公司<br>河南科技学院                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 河南知微生物工程有限公司<br>河南科技学院                                            |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 河南知微生物工程有限公司<br>河南科技学院                                            |         |            |
| [标]发明人         | 姜金庆<br>陈俊杰<br>张晓建<br>李桂平<br>杨志<br>孟晓梅<br>原小燕<br>栗克文<br>周丽霞<br>杜同亮 |         |            |
| 发明人            | 姜金庆<br>陈俊杰<br>张晓建<br>李桂平<br>杨志<br>孟晓梅<br>原小燕<br>栗克文<br>周丽霞<br>杜同亮 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N21/78 G01N33/531                                   |         |            |
| 审查员(译)         | 周洋                                                                |         |            |
| 其他公开文献         | CN103091495A                                                      |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                    |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡及其制备方法。本发明的技术方案要点为：一种氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡，包括塑料盒体和封装于塑料盒体内的试纸条，所述试纸条的底层为支撑层，该支撑层上由左到右依次附着有紧密相连的样品垫、金标抗体结合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫，所述的硝酸纤维素膜上有诺氟沙星-鸡卵清白蛋白偶联物溶液印制的检测线和羊抗鼠IgG溶液印制的质控线，所述的结合垫上灌注有胶体金标记的抗氟喹诺酮类药物类特异性单克隆抗体。本发明还公开了该氟喹诺酮类药物残留快速检测试纸卡的制备方法。本发明操作简单、快速准确、灵敏度高、成本低、稳定性好，可进行批量检测。

