



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103439504 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201310334327. 8

CN 202814981 U, 2013. 03. 20,

(22) 申请日 2013. 08. 03

CN 202814986 U, 2013. 03. 20,

(73) 专利权人 河南省农业科学院

Wei Sheng et al. Enzyme-linked  
immunosorbent assay and colloidal  
gold-based immunochromatographic assay  
for several (fluoro)quinolones in milk.

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路  
116 号

《Microchim Acta》. 2011, 第 173 卷 (第 3-4 期),

(72) 发明人 胡晓飞 张改平 邓瑞广 杨艳艳  
柴书军

审查员 李倩

(74) 专利代理机构 郑州金成知识产权事务所  
(普通合伙) 41121

代理人 郭增欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101315351 A, 2008. 12. 03,

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

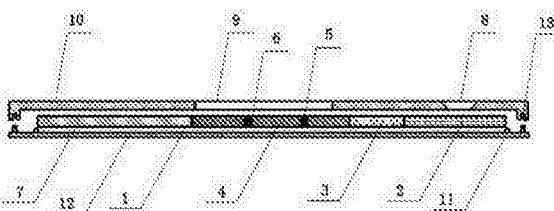
CN 101983971 A, 2011. 03. 09,

(54) 发明名称

快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸及其制备  
方法

(57) 摘要

本发明公开一种快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸底层为支撑层, 中间层为吸附层, 保护层固定在吸附层上, 吸附层从测试端依次为吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层, 其中纤维素膜层上有用偶联氟罗沙星的载体蛋白溶液印制的检测印迹, 用羊抗小鼠 IgG 抗体溶液印制的对照印迹, 金标抗体为胶体金标记的氟罗沙星单克隆抗体。本发明的免疫层析试纸主要用于食品中氟罗沙星的快速检测, 结构简单, 特异性强, 灵敏度和准确度高, 操作简便, 适用范围广, 价格低廉, 易于推广应用, 具有较好的社会和经济价值。



1. 一种快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸,底层为支撑层,中间层为吸附层,保护层固定在吸附层上,其特征是:吸附层从测试端依次为吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层,其中在纤维素膜层上设有偶联氟罗沙星的载体蛋白印制的检测印迹和用羊抗小鼠 IgG 抗体印制的对照印迹;所述金标抗体纤维层中的金标抗体为胶体金标记的抗氟罗沙星单克隆抗体;

所述偶联氟罗沙星的载体蛋白是通过以下方法得到的:

将 5.3 mg 氟罗沙星、3.1 mg DCC 和 1.7 mg NHS 先后溶于 1.0 mL DMF 溶液中,室温避光搅拌 4 h,充分反应后得到 A 液;称取 9.5 mg BSA 溶于 2 mL PBS 缓冲液中,得到 B 液;在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应 9 h 后用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天,透析完成后,4000rpm 离心 5min,取上清液,得到偶联氟罗沙星的载体蛋白,贮藏于 -20℃,备用;

所述胶体金标记的抗氟罗沙星单克隆抗体是通过以下方法制备的:

沸腾的 200mL 0.01 ~ 0.02% 氯金酸溶液中加入新鲜配制的 1% 柠檬酸钠 8mL,获得直径 15~20nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH 值至 8.5 ~ 9.5,置 2 ~ 8℃ 保存,备用;以 1:2000 的标记比将待标记的氟罗沙星单克隆抗体加入 pH 8.5 ~ 9.5 的金溶胶中,标记 10min 后,加入 20% 的 PEG10000 至终浓度为 0.05%,4℃、1500 ~ 3000rpm 离心 20min,除去未结合的胶体金颗粒,4℃、15000rpm 离心 1h,弃上清,获得初步纯化的金标抗体蛋白混合物,再用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析进行分离纯化,获得胶体金标记的氟罗沙星抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其特征是:所述纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其特征是:所述吸附纤维层用聚偏二氟乙烯膜、尼龙膜、玻璃纤维棉或聚酯膜制成;吸水材料层用吸水滤纸制成,支撑层用不吸水的韧性材料制成;金标抗体纤维层用吸附氟罗沙星的金标抗体玻璃纤维棉制成。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其特征是:所述偶联氟罗沙星的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其特征是:所述检测印迹和对照印迹为平行排列的“| |”直线式印迹、“十”字型排列印迹、“— —”字型排列印迹、“— +”字型排列印迹、“+ +”字型排列印迹或 “+ —”字型排列印迹。

6. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其特征是:在吸附纤维层、金标抗体纤维层和吸水材料层上覆盖有保护膜,在吸附纤维层与金标抗体纤维层交界处对应的保护膜上偏向吸附纤维层一侧 0.3~0.6cm 处印制有样品标记线。

7. 权利要求 1 所述快速检测氟罗沙星免疫层析试纸的制备方法,其特征是:该方法包括以下步骤:

(1) 氟罗沙星载体蛋白偶联物的制备

将 5.3 mg 氟罗沙星、3.1 mg DCC 和 1.7 mg NHS 先后溶于 1.0 mL DMF 溶液中,室温避光搅拌 4 h,充分反应后得到 A 液;称取 9.5 mg BSA 溶于 2 mL PBS 缓冲液中,得到 B 液;室温磁力搅拌下将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应 9 h,用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天,透析完成后,4000rpm 离心 5min,取上清液,得到偶联氟罗沙星的载体蛋白,贮藏于 -20℃,备用;

(2) 抗氟罗沙星单克隆抗体的制备;

(3) 氟罗沙星金标抗体的制备；

(4) 羊抗小鼠 IgG 抗体的制备；

用所得的氟罗沙星载体蛋白偶联物在纤维素膜层上制成检测印迹，用羊抗小鼠 IgG 抗体在纤维素膜层上制备对照印迹；氟罗沙星金标抗体用于制备金标抗体纤维层，然后依次将支撑层、吸附层和保护层组装成免疫层析试纸。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法，其特征是：所述氟罗沙星金标抗体的制备方法如下：

沸腾的 200mL 0.01 ~ 0.02% 氯金酸溶液中加入新鲜配制的 1% 柠檬酸钠 8mL，获得直径 15~20nm 的胶体金溶液，用 0.1mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH 值至 8.5 ~ 9.5，置 2 ~ 8℃ 保存，备用；以 1:2000 的标记比将待标记的氟罗沙星单克隆抗体加入 pH 8.5 ~ 9.5 的金溶胶中，标记 10min 后，加入 20% 的 PEG10000 至终浓度为 0.05%，4℃、1500 ~ 3000rpm 离心 20min，除去未结合的胶体金颗粒，4℃、15000rpm 离心 1h，弃上清，获得初步纯化的金标抗体蛋白混合物，再用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析进行分离纯化，获得胶体金标记的氟罗沙星抗体。

9. 根据权利要求 7 所述的制备方法，其特征是：所述纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成；所述吸附纤维层用聚偏二氟乙烯膜、尼龙膜、玻璃纤维棉或聚酯膜制成；吸水材料层用吸水滤纸制成，支撑层用不吸水的韧性材料制成；金标抗体纤维层用吸附氟罗沙星的金标抗体玻璃纤维棉制成；偶联氟罗沙星的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

## 快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学检测领域,涉及一种快速检测氟罗沙星残留的免疫胶体金免疫层析试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 氟罗沙星(Fleroxacin, FLE),其化学名为6,8-二氟-1-(2-氟乙基)1,4-二氢-7-(4-甲基-1-哌嗪基)-4-氧-3-喹啉羧酸,分子式为C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>,分子量为369.34,为广谱类抗菌药物,特别是对革兰氏阴性菌有很强的抗菌活性,具有用量少,抗菌效果好等优点。但其对人体有一定的毒副作用,主要包括胃肠道反应、肝肾毒性以及肌肉骨骼等副作用。我国农业部制定的《2013年度动物及动物产品兽药残留监控计划》中明确规定了氟喹诺酮类药物的残留监控指标以及最大残留限量。尽管我国兽药残留限量参照国际和发达国家标准制定,并且兽药使用都有休药期规定,但从根本上解决动物性食品兽药残留超标问题仍存在较大难度。因此急需建立快速、灵敏、有效的氟罗沙星残留检测方法。

[0003] 目前国内外检测氟罗沙星残留的方法主要采用理化分析方法,包括高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱/质谱联用分析法(LC/MS)、气相色谱/质谱联用分析法(GC/MS)等,这些方法检测非常有效、准确和敏感,但也存在一定的缺陷,如待检测样品预处理过程复杂,繁琐费时;需要昂贵的仪器设备,推广使用受到一定限制;对专业人员素质要求高;仪器保养要求高,保养的好坏直接影响分析结果的准确性;检测费用高,无法进行现场检测和大规模批量检测,时效性较差。

[0004] 免疫学检测法具有半定量和一定的定量能力,可以提供待测物的初步信息,该法灵敏度较高,精确性好,分析过程相对简单,用作氟罗沙星筛查有独特优势,是需要优先发展的检测技术,急待研究解决。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题:提供一种特异性强、灵敏度高、操作简便、精准快速的用于检测氟罗沙星残留的免疫层析试纸及其制备方法。

[0006] 本发明的技术方案:

[0007] 一种快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸,底层为支撑层,中间层为吸附层,保护层固定在吸附层上,吸附层从测试端依次为吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层,其中在纤维素膜层上设有偶联氟罗沙星的载体蛋白印制的检测印迹和用羊抗小鼠 IgG 抗体印制的对照印迹;所述金标抗体纤维层中的金标抗体为胶体金标记的抗氟罗沙星单克隆抗体。

[0008] 所述偶联氟罗沙星的载体蛋白是通过以下方法得到的:

[0009] 将5.3 mg 氟罗沙星、3.1 mg DCC 和 1.7 mg NHS 先后溶于1.0 mL DMF 溶液中,室温避光搅拌4 h,充分反应后得到A液;称取9.5 mg BSA溶于2 mL PBS缓冲液中,得到B液;在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应9 h后用PBS透析3天,换液3次/天,

透析完成后,4000rpm 离心 5min,取上清液,得到偶联氟罗沙星的载体蛋白,贮藏于 -20℃,备用。

[0010] 所述纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成。

[0011] 所述吸附纤维层用聚偏二氟乙烯膜、尼龙膜、玻璃纤维棉或聚酯膜制成;吸水材料层用吸水滤纸制成,支撑层用不吸水的韧性材料制成;金标抗体纤维层用吸附氟罗沙星的金标抗体玻璃纤维棉制成。

[0012] 所述偶联氟罗沙星的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

[0013] 所述检测印迹和对照印迹为平行排列的“| |”直线式印迹、“十十”字型排列印迹、“丁丁”字型排列印迹、“土土”字型排列印迹、“卜卜”字型排列印迹或“十一”字型排列印迹。

[0014] 在吸附纤维层、金标抗体纤维层和吸水材料层上覆盖有保护膜,在吸附纤维层与金标抗体纤维层交界处对应的保护膜上偏向吸附纤维层一侧 0.3-0.6cm 处印制有样品标记线。

[0015] 所述快速检测氟罗沙星免疫层析试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 氟罗沙星载体蛋白偶联物的制备

[0017] 将 5.3 mg 氟罗沙星、3.1 mg DCC 和 1.7 mg NHS 先后溶于 1.0 mL DMF 溶液中,室温避光搅拌 4 h,充分反应后得到 A 液;称取 9.5 mg BSA 溶于 2 mL PBS 缓冲液中,得到 B 液;室温磁力搅拌下将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应 9 h,用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天,透析完成后,4000rpm 离心 5min,取上清液,得到偶联氟罗沙星的载体蛋白,贮藏于 -20℃,备用;

[0018] (2) 抗氟罗沙星单克隆抗体的制备;

[0019] (3) 氟罗沙星金标抗体的制备;

[0020] (4) 羊抗小鼠 IgG 抗体的制备;

[0021] 用所得的氟罗沙星载体蛋白偶联物在纤维素膜层上制成检测印迹,用羊抗小鼠 IgG 抗体在纤维素膜层上制备对照印迹;氟罗沙星金标抗体用于制备金标抗体纤维层,然后依次将支撑层、吸附层和保护层组装成免疫层析试纸。

[0022] 本发明的免疫层析试纸具有以下优点:

[0023] ① 特异性强,灵敏度高。本发明免疫层析试纸以胶体金标记高亲和力的单克隆抗体为基础制备而成,金标抗体中金颗粒与抗体分子之间无共价键形成,二者通过异性电荷间的范德华力相结合,胶体金标记对单克隆抗体的特异性和亲和力影响很小,且具有较高的标记率。因此,免疫层析试纸具有较强的特异性和较高的灵敏度,可检测到 15 ng/g 的微量氟罗沙星。本发明在保障食品安全、保护消费者健康方面具有极其重要的意义。

[0024] ② 简便、快速。使用本发明免疫层析试纸,无需其它任何试剂和仪器,可现场操作。只需将免疫层析试纸插入被检样品中 10 ~ 20 秒钟,取出后 5 分钟内即可判定检测结果。

[0025] ③ 结果显示形象、直观、准确。免疫层析试纸以显示棕红色“|”(或“十”、“丁”、“土”、“卜”、“十一”)印迹作为检测结果阳性和阴性标记,即在纤维素膜上显示一条棕红色“|”印迹,表示被检样品中含有氟罗沙星,显示两条棕红色“| |”印迹,表示被检样品中不含氟

罗沙星。结果判定形象、直观、准确,简单明了,不易出现假阳性和假阴性等人为误判。

[0026] ④ 节省费用。使用快速检测免疫层析试纸,无需另配仪器设备和其它试剂,可随时随地进行检测,费用低廉,能节省大量贵重仪器和设备费用。

[0027] ⑤ 适用范围广,便于推广应用。操作简便,能满足不同层次人员的需要,该免疫层析试纸具有广阔的市场前景和明显的经济效益以及社会效益。

[0028] ⑥ 存储方便,保质期长。免疫层析试纸存储方便,且其对存储温度要求不高,在4-8℃下有效期可保持一年,室温下有效保质期可达到六个月。

## 附图说明

[0029] 图1为本发明试纸条的俯视结构示意图。

[0030] 图2为图1试纸条的侧面结构示意图。

[0031] 图中,1为支撑层,2为吸附纤维层,3为金标抗体纤维层,4为纤维素膜层,5为吸水材料层,6为检测印迹,7为对照印迹,8-1为测试端保护膜,8-2为手柄端保护膜,9为样品标记线。

## 具体实施方式

[0032] 实施例一:快速检测微量氟罗沙星的免疫层析试纸及制备方法,参见图1、图2。图中支撑层1用塑胶薄片条制成,吸附纤维层2用玻璃纤维棉制成,金标抗体纤维层3上吸附有抗氟罗沙星的单克隆抗体,纤维素膜层4采用硝酸纤维素膜,吸水材料层5用吸水滤纸制成,将编号2、3、4、5各层从右至左依次粘贴固定在支撑层1上,彼此交界处纤维互相交叉渗透。在纤维素膜层4上设有检测印迹6和对照印迹7,检测印迹用偶联氟罗沙星的牛血清白蛋白(BSA)溶液印制而成,对照印迹用羊抗小鼠IgG抗体溶液印制,两条印迹平行排列形成印迹带“| |”。8-1为覆盖在吸附纤维层2和金标抗体纤维层3上面的测试端保护膜(白色),8-2为覆盖在吸水材料层5上面的手柄端保护膜(如黄色),9为样品标记线,即在吸附纤维层2与金标抗体纤维层3交界处,对应的白色保护膜偏向吸附纤维层2一侧约0.5cm处印制的标记线,在样品标记线右侧的保护膜上印有箭头及max字样。

[0033] 待测样品溶液的制备及检测步骤:

[0034] 检测鸡肌肉:将样品切成块,捣碎,4000r/min离心5min,吸取上层汁液作为待测样品;

[0035] 操作方法:将免疫层析试纸测试端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,约10~20秒钟取出免疫层析试纸,水平放置,5分钟内观察并判定检测结果。

[0036] 结果判定:(a) 阳性 如果在纤维素膜层上显示一条棕红色印迹带“|”,表示检测结果为阳性,说明待测样品含有氟罗沙星;(b) 阴性 如果在纤维素膜层上显示两条棕红色印迹带“| |”,检测结果为阴性,说明待测样品中不含氟罗沙星;(c) 失效 如果在纤维素膜层上没有棕红色带显示,则表明免疫层析试纸已失效。

[0037] 本发明的敏感性和检测限检测:配制共8个浓度为0、5、10、15、20、40、80和160μg/L的氟罗沙星标准溶液,按照检测试纸操作要求进行检测,每个浓度设6个重复,根据试验结果判断检测试纸的敏感性和检测限。试验结果表明,本试纸检测限为15ng/g。

[0038] 要制成快速检测微量氟罗沙星免疫层析试纸,首先制备偶联氟罗沙星载体蛋白和氟罗沙星金标抗体,从而制备检测印迹和金标抗体纤维层;其次制备羊抗小鼠 IgG 抗体,用于制备对照印迹。

[0039] (1) 氟罗沙星载体蛋白偶联物抗原的制备

[0040] 采用 DCC 法,将氟罗沙星与载体蛋白进行偶联,制备人工合成抗原,其具体步骤为:准确称取 5.3 mg 氟罗沙星、3.1 mg DCC (N,N'-二环己基碳二亚胺) 和 1.7 mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺),先后溶于 1.0 mL DMF 溶液中,室温避光搅拌 4 h,进行充分的化学反应,反应液为 A 液;称取 9.5 mg BSA 溶于 2 mL PBS 缓冲液中,得到 B 液;在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应 9 h 后用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天,透析完成后,4000rpm 离心 5min,取上清液,得到偶联氟罗沙星的载体蛋白,贮藏于 -20℃,备用;

[0041] (2) 抗氟罗沙星单克隆抗体的制备

[0042] 单抗制备:用制备的氟罗沙星载体蛋白偶联物以 30 $\mu$ g ~ 50 $\mu$ g/ 只的用量免疫 6 ~ 8 周龄 Balb/C 小鼠 3 ~ 4 次,每次免疫间隔时间 3 ~ 5 周,确定抗体效价符合要求后进行超强免疫,并在融合之前检测其抑制价,之后 3 ~ 4 天将免疫小鼠眶下窦采血,分离阳性血清;脱颈致死,用 75% 的酒精浸泡小鼠 5 ~ 10min 消毒体表,无菌取其脾脏,将脾脏剪碎并研磨,经 120 目尼龙纱布过滤,1000rpm 离心 10min,收集脾细胞。将  $1 \times 10^8$  的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合,1000rpm 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀物于 37℃ 水浴中缓缓加入 0.7 ~ 1.0mL 的 50%PEG4000,1min 内加完,前 30 秒加 0.1 ~ 0.3mL,中间 15 秒加 0.2 ~ 0.4mL,最后 15 秒加完;然后缓缓加入无血清 1640 培养基 15mL,以终止 PEG 的作用,37℃ 水浴 5 ~ 10 min,1000rpm 离心 10min 弃上清,将细胞沉淀物重悬于 HAT 选择培养基中,并加入 96 孔细胞培养板中(8 ~ 10 块),100 $\mu$ L ~ 200 $\mu$ L / 孔,置于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。培养 10 ~ 14 天,用间接 ELISA 法进行阳性孔筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 3 ~ 6 次有限稀释克隆化(直到细胞克隆为单克隆,检测各个克隆孔效价、抑制价基本一致),而后扩大培养,建立杂交瘤细胞株。所制备的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体可特异地与氟罗沙星反应,亲和力常数达到 10<sup>10</sup>~10<sup>12</sup>,轻链亚型为  $\kappa$  或  $\lambda$ ,重链亚型为 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>,针对氟罗沙星特异抗原决定簇的单克隆抗体,用于制备金标抗体玻璃纤维棉。

[0043] (3) 氟罗沙星金标抗体和金标抗体玻璃纤维棉的制备

[0044] 采用柠檬酸钠还原法制备胶体金溶液。在沸腾的 200mL 0.01 ~ 0.02% 氯金酸溶液中加入新鲜配制的 1% 柠檬酸钠 8mL,获得直径约 15nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH 值至 8.5 ~ 9.5,置于 2 ~ 8℃ 保存备用。以 1:2000 的标记比将待标记的氟罗沙星单克隆抗体加入 pH8.5 ~ 9.5 的金溶胶中,标记 10min 后,加入 20% 的 PEG10000 至终浓度为 0.05%,4℃、1500 ~ 3000rpm 离心 20min,除去未结合的胶体金颗粒,4℃、15000rpm 离心 1h,弃上清,获初步纯化的金标抗体蛋白混合物,再用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析进行分离纯化,获得氟罗沙星胶体金标记抗体。将 1:100 ~ 500 稀释的胶体金标记抗体吸附于精制玻璃纤维棉中,4℃ 低温真空干燥,制备氟罗沙星金标抗体玻璃纤维棉。

[0045] (4) 氟罗沙星免疫层析试纸的检测反应原理

[0046] 当氟罗沙星免疫层析试纸的测试端插入待测样品溶液后,待测溶液通过虹吸作用带动待测氟罗沙星及金标抗体玻璃纤维棉中的金标抗体一起向纤维素膜层扩散,并最终渗

入手柄端的吸水材料层。在扩散过程中,待测氟罗沙星可与金标抗体纤维层中的金标抗体相结合,进而封闭金标抗体上氟罗沙星的抗原结合点,阻止金标抗体与纤维素膜上偶联氟罗沙星载体蛋白的检测印迹结合,免疫层析试纸上无法显示检测印迹,而羊抗小鼠 IgG 抗体则可与金标抗体结合,形成棕红色对照印迹带“+”,即一条棕红色带“+”印迹为阳性表示。反之样品溶液中若无氟罗沙星,则不能阻止金标抗体与纤维素膜上偶联氟罗沙星载体蛋白的检测印迹结合,免疫层析试纸显示棕红色检测印迹带“+”;同样羊抗抗小鼠 IgG 抗体也能与金标抗体结合,显示棕红色对照印迹带“+”,形成两条棕红色带“++”为阴性表示。如果纤维素膜上没有棕红色带显示,则表明免疫层析试纸已失效。

[0047] 实施例二:免疫层析试纸和实施例一基本相同,不同之处在于:吸附纤维层用尼龙膜制成,纤维素膜层采用纯纤维素膜,检测印迹带和隐形对照印迹带均为“十”,覆盖在吸水材料层上面的手柄端保护膜为兰色。

[0048] 待测样品为鸡肝,可将样品切成块,捣碎,然后进行离心,4000r/min 离心 5min,吸取上层汁液作为待测样品;

[0049] 结果判定:(a) 阳性 如果在纤维素膜上显示有一条棕红色印迹带“十”,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有氟罗沙星;(b) 阴性 如果在纤维素膜上显示有两条棕红色印迹带“十”,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中不含氟罗沙星;(c) 失效 如果在纤维素膜上没有棕红色带显示,则表明免疫层析试纸已失效。

[0050] 实施例三:免疫层析试纸和实施例一基本相同,不同之处在于:吸附纤维层用聚偏二氟乙烯膜(PVDF)制成,偶联氟罗沙星的载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白(OVA),隐形对照印迹带用羊抗小鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上印迹制成,纤维素膜层采用羧化纤维素膜,覆盖在吸水材料层上面的手柄端保护膜为绿色,检测印迹和对照印迹带均为“十”。

[0051] 结果判定:(a) 阳性 如果在纤维素膜上显示有一条棕红色印迹带“十”,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有氟罗沙星;(b) 阴性 如果在纤维素膜上显示有两条棕红色印迹带“十”,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中不含氟罗沙星;(c) 失效 如果在纤维素膜上没有棕红色带显示,则表明免疫层析试纸已失效。检测样品和制备、操作方法同实施例一。

[0052] 实施例四:免疫层析试纸和实施例一基本相同,不同之处在于:吸附纤维层用聚酯膜制成,纤维素膜层采用羧化纤维素膜,偶联氟罗沙星载体蛋白溶液为血蓝蛋白(KLH)。检测印迹和隐形对照印迹均为“十”。制备、操作方法和结果判定方法同实施例一。

[0053] 实施例五:免疫层析试纸结构和实施例一基本相同,不同之处在于:隐形对照印迹带用羊抗鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上印迹制成,吸附纤维层用尼龙膜制成。检测印迹带和隐形对照印迹带均为“十”。制备、检测样品、结果判定和操作方法同实施例一。

[0054] 实施例六:和实施例一基本相同,不同之处在于:氟罗沙星金标抗体纤维层吸附有抗氟罗沙星单克隆抗体,检测样品为鸡肝。检测印迹带和隐形对照印迹带均为“十”。

[0055] 实施例七:和实施例一基本相同,不同之处在于:氟罗沙星金标抗体纤维层吸附有抗氟罗沙星多克隆抗体,检测样品为鸡肝。

[0056] 实施例八:和实施例一基本相同,不同之处在于:偶联氟罗沙星载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白(OVA),检测样品、结果判定和操作方法同实施例一。

[0057] 实施例九:和实施例一基本相同,不同之处在于:偶联氟罗沙星载体蛋白溶液为

血蓝蛋白(KLH),检测样品、结果判定和操作方法同实施例一。

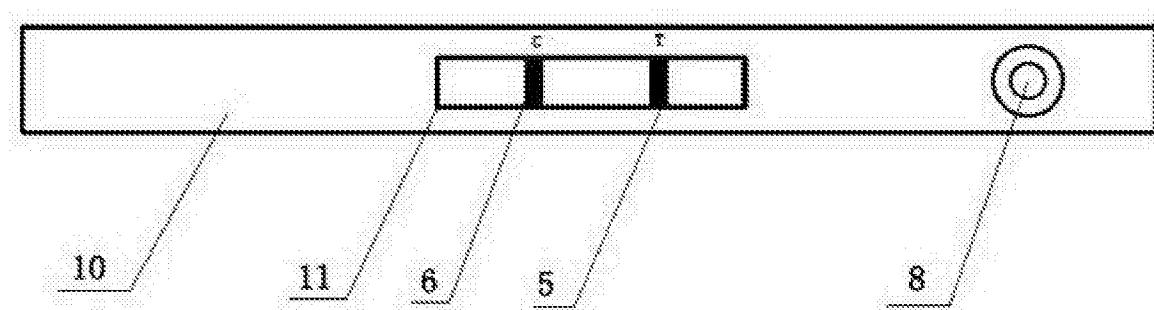


图 1

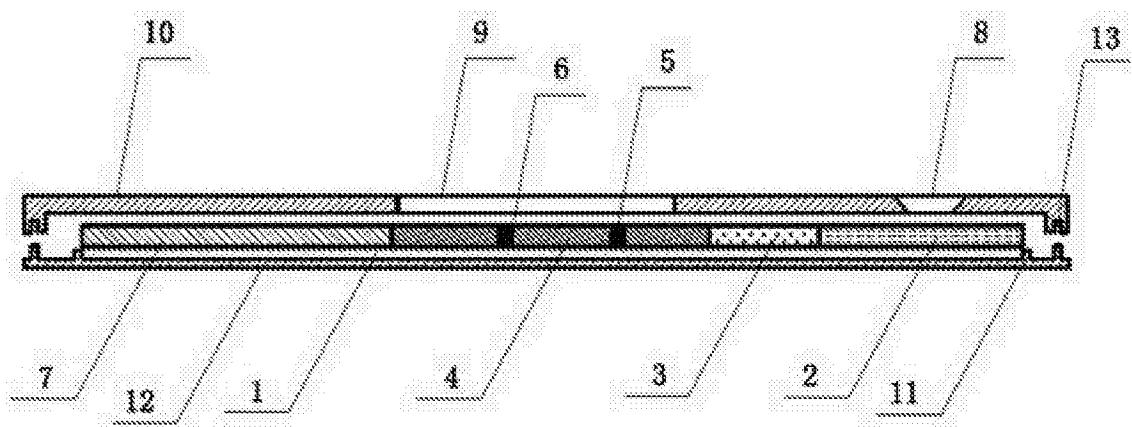


图 2

专利名称(译)	快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103439504B</a>	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201310334327.8	申请日	2013-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	胡骁飞 张改平 邓瑞广		
发明人	胡骁飞 张改平 邓瑞广 杨艳艳 柴书军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN103439504A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开一种快速检测氟罗沙星的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸底层为支撑层，中间层为吸附层，保护层固定在吸附层上，吸附层从测试端依次为吸附纤维层、金标抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层，其中纤维素膜层上有用偶联氟罗沙星的载体蛋白溶液印制的检测印迹，用羊抗小鼠IgG抗体溶液印制的对照印迹，金标抗体为胶体金标记的氟罗沙星单克隆抗体。本发明的免疫层析试纸主要用于食品中氟罗沙星的快速检测，结构简单，特异性强，灵敏度和准确度高，操作简便，适用范围广，价格低廉，易于推广应用，具有较好的社会和经济价值。

