



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102288753 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201110119780. 8

(22) 申请日 2011. 05. 10

(71) 申请人 重庆市科学技术研究院

地址 401123 重庆市渝北区北部新区黄山大道中段杨柳路 2 号

(72) 发明人 乐涛 魏启明 何红秋 何亮

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所  
50211

代理人 郭云

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

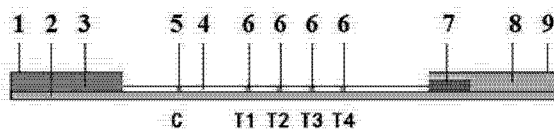
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条及其制备方法,硝酸纤维素膜(4)上包被有鼠抗鼠的 IgG 质控线和 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA 四条检测线;样品垫上包被有的抗 CTC、OTC、TC、DOX 药物单克隆抗体-胶体金标记物。本发明应用免疫学技术筛选出抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 药物的单克隆抗体,通过胶体金的制备及胶体金标记条件的探索研究,在应用抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 药物单克隆抗体和 GICA 技术研究建立抗四环素类药物单克隆抗体快速检测试纸条,并对其性能进行测定。试纸条检测范围较宽,假阳性低,检测灵敏、准确、可靠,适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏和肾脏等组织中 CTC、OTC、TC 和 DOX 四环素类药物残留的多联检测。



1. 一种快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条,包括背板(2)、吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)、结合垫(7)、样品垫(8),其特征在于:所述背板(2)上依次连续粘附有吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)、结合垫(7)和样品垫(8),所述样品垫(8)靠结合垫(7)一端搭接在结合垫(7)上,所述吸水垫(3)上表面吸附有手控区封膜(1),所述样品垫(8)上表面吸附有样品端封膜(9),所述硝酸纤维膜(4)上包被有兔抗鼠的IgG质控线(5)和CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA四条检测线(6);样品垫(8)上包被有所述的抗CTC、OTC、TC、DOX药物单克隆抗体-胶体金标记物。

2. 一种权利要求1所述快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于按如下步骤进行:

1) 将半抗原CTC、OTC、TC和DOX采用赫夫曼消除反应后,再与牛血清白蛋白偶联合成偶联物CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA和DOX-BSA;

2) 将合成的偶联物CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA和DOX-BSA免疫原免疫小鼠,通过细胞融合筛选得到分泌抗CTC、OTC、TC和DOX药物的单克隆抗体的细胞株,将细胞株注射小鼠腹腔,得到抗CTC、OTC、TC和DOX四株单克隆抗体;

3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

4) 提取小鼠IgG免疫健康家兔,得到兔抗鼠IgG抗体;

5) 将步骤2)制成的抗CTC、OTC、TC和DOX单克隆抗体加入步骤3)制备的胶体金中,得到抗CTC、OTC、TC和DOX单克隆抗体与-胶体金标记物;

6) 将抗CTC、OTC、TC和DOX单克隆抗体与-胶体金标记物包被在背板上;

7) 将步骤1)合成CTC、OTC、TC和DOX与BSA偶联合成偶联物CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA和DOX-BSA包被在硝酸纤维膜(4)得到检测线(6)四条,分别为T1、T2、T3和T4;

8) 将步骤4)制成的兔抗鼠IgG包被在硝酸纤维膜(4)得到质控线(5);9) 将手控区封膜(1)、吸水垫(3)、硝酸纤维膜(4)结合垫(7)、样品垫(8)和样品端封膜(9)依次粘贴在背板(2)上。

## 快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于兽药残留免疫学快速检测技术领域。具体涉及四环素类药物残留的多联检免疫层析快速检测胶体金试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 四环素类抗生素 (TCs), 包括: 四环素 (Tetracycline, TC)、金霉素 (Chlortetracycline, CTC)、土霉素 (Oxytetracycline, OTC)、多西环素 (Doxycycline, DOX) 等是放线菌属所产生的一类碱性广谱抗生素及半合成的抗生素, 它们均是氢化并四苯的衍生物, 具有共同的基本母核, 化学结构仅取代基有所不同。在实际工作中, 由于随意加大使用剂量和不遵守休药期, 造成四环素类药物在动物源性组织中残留。四环素类药物长期残留在动物组织中, 导致耐药菌在人类之间传播, 严重损害人体健康。很多国家和国际组织通过建立动物性食品中兽药残留的有效检测方法, 来控制药物残留问题。如, 我国和欧盟对四环素类药物在动物组织中残留最高残留限量 (MRL) 作了明确规定: 肌肉、肝脏和肾脏的 MRL 分别为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。为了控制兽药残留, 保障人类健康, 有必要建立一种快速、有效的残留检测方法对其残留进行监测。

[0003] 目前在动物性食品中四环素类药物的分析检测方法有很多, 包括高效液相色谱法、薄层色谱法、液相色谱-质谱联用法、微生物法、酶联免疫法。但微生物方法存在检测时间长、缺乏特异性, 容易导致假阳性和假阴性产生。仪器检测主要存在仪器购置费用昂贵、样品前处理复杂、程序繁琐费时、检测费用高、不能现场操作等缺陷, 所以在生产中应用受到限制。ELISA 方法灵敏度高、成本低, 在药物残留检测中应用也很广泛, 但该方法需要酶标仪等实验室设备, 分析时间长, 在应用中有局限性。近年来, 胶体金免疫层析技术 (GICA) 与目前普遍采用的标记免疫分析技术相比, 具有简便快速, 特异性强、敏感性高, 肉眼判断, 实验结果易保存, 无需特殊仪器设备等优点, 因此 GICA 技术在药物残留检测领域得到了广泛应用。目前还没有针对四环素、多西环素、金霉素和土霉素等药物残留多联检检测的免疫胶体金试纸条及其制备方法报道。发明内容

为解决以上技术问题, 本发明的目的在于提供一种特异性强、灵敏度高、且操作简单, 对样品简单处理即可同时检测 CTC、OTC、TC 和 DOX 4 种四环素类药物残留的 4 联检免疫胶体金试纸条。

[0004] 本发明目的之一是这样实现的:

一种快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条, 包括背板、吸水垫、硝酸纤维膜、结合垫、样品垫, 其特征在于: 所述背板上依次连续粘附有吸水垫、硝酸纤维膜、结合垫和样品垫, 所述样品垫靠结合垫一端搭接在结合垫上, 所述吸水垫上表面吸附有手控区封膜, 所述样品垫上表面吸附有样品端封膜, 所述硝酸纤维膜上包被有兔抗鼠的 IgG 质控线 (C) 和 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA 四条检测线, CTC-BSA 即 (T1)、OTC-BSA 即 (T2)、TC-BSA 即 (T3)、DOX-BSA 即 (T4); 样品垫 (8) 上包被有所述的抗

CTC、OTC、TC、DOX 药物单克隆抗体 - 胶体金标记物。

[0005] 本发明目的之二是这样实现的：

一种快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条的制备方法，其关键在于按如下步骤进行：

1) 将半抗原 CTC、OTC、TC 和 DOX 采用赫夫曼消除反应后，再与牛血清白蛋白偶联合成偶联物 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA 和 DOX-BSA；

2) 将合成的偶联物 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA 和 DOX-BSA 免疫原免疫小鼠，通过细胞融合筛选得到分泌抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 药物的单克隆抗体的细胞株，将细胞株注射小鼠腹腔，得到抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 四株单克隆抗体；

3) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；

4) 提取小鼠 IgG 免疫健康家兔，得到兔抗鼠 IgG 抗体；

5) 将步骤 2) 制成的抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 单克隆抗体加入步骤 3) 制备的胶体金中，得到抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 单克隆抗体与 - 胶体金标记物；

6) 将抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 单克隆抗体与 - 胶体金标记物包被在背板上；

7) 将步骤 1) 合成 CTC、OTC、TC 和 DOX 与 BSA 偶联合成偶联物 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA 和 DOX-BSA 包被在硝酸纤维膜得到检测线四条，分别为 T1、T2、T3 和 T4；

7) 将步骤 4) 制成的兔抗鼠 IgG 包被在硝酸纤维膜得到质控线(C)；8) 将手控区封膜、吸水垫、硝酸纤维素膜结合垫、样品垫和样品端封膜依次粘贴在背板上。

[0006] 本发明选用样品区的结合垫包被胶体金标记好的分别抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 药物的 4 株单克隆抗体，测试区的 4 条检测线分别为 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA 和 DOX-BSA，质控线为兔抗鼠 IgG。其反应原理为竞争法：将样品液滴加到试纸条样品垫上，样品在毛细管作用下沿试纸条泳动，当泳动至金标垫时，固态化的金标抗单抗迅速溶解释放，随样品一起沿试纸条泳动至检测线，若样品中含有 CTC、OTC、TC 和 DOX，CTC、OTC、TC 和 DOX 首先与金标抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 单抗发生免疫反应，形成免疫复合物，抑制金标抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 单抗与检测线(T1、T2、T3 和 T4) 包被的 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA 和 DOX-BSA 偶联物的结合，使检测线截获的金标抗体的量减少，T 线颜色变浅，当样品中 CTC、OTC、TC 和 DOX 的量足够大时，检测线将无颜色出现，金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获 C 线出现红色条带；反之，若样品中不含 CTC、OTC、TC 和 DOX，金标抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 单抗与包被于 NC 膜上的 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA 和 DOX-BSA 偶联物发生特异性免疫反应而被截获，在检测线位置(T1、T2、T3 和 T4) 形成红色条带，即阴性结果，部分金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获，形成红色条带。

[0007] 有益效果：本发明应用免疫学技术筛选出抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 药物的单克隆抗体，通过胶体金的制备及胶体金标记条件的探索研究，在应用抗 CTC、OTC、TC 和 DOX 药物单克隆抗体和 GICA 技术研究建立抗四环素类药物单克隆抗体快速检测试纸条，并对其性能进行测定。试纸条检测范围较宽，假阳性低，检测灵敏、准确、可靠，适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏和肾脏等组织中 CTC、OTC、TC 和 DOX 等四环素类药物残留的多联检测。

#### 附图说明

[0008] 图 1 为本发明胶体金免疫层析试纸条的结构示意图；

图 2 为本发明胶体金免疫层析试纸条检测结果对比图。

## 具体实施方式

### 实施例

#### [0009] 1、CTC、OTC、TC/DOX-载体蛋白偶联物的制备

本发明包被原 (CTC、OTC、TC、DOX-BSA) 合成方法。分别准确称取 CTC、OTC、TC、DOX 各 0.2mmol 溶解在 3mL 超纯水中,然后将 4 mL 溴水碱液加入 CTC/OTC/TC/DOX 溶液中,加热反应 2h,4℃预冷。在 4℃避光条件下向上述反应体系中缓慢滴加 1mol/L 的盐酸 0.6mL (调 pH 至 2),在冰水浴中,边搅拌边逐滴加入现配的 1mol/L  $\text{NaNO}_2$  0.3mL,加完后置于 4℃冰箱阴暗处孵育 6h。按照 20:1 摩尔比,将 340mg BSA ( $5 \times 10^{-6}$ mol) 溶于 5mLPBS,将偶氮化 CTC 慢慢滴入 BSA 溶液中,加完后在 4℃冰箱阴暗处孵育过夜。离心除去沉淀,取上清液用磷酸缓冲液 (PBS) 透析 3d,每 6h 更换透析液,将所得产物低压冻干,于 -20℃保存备用。

#### [0010] 2、抗 CTC、OTC、TC、DOX 单克隆抗体制备

##### 2.1 动物免疫

用实施例 1 制备的免疫原 (CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA) 分别免疫 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,每只小鼠的免疫剂量为 100  $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$ 。首次免疫,用无菌 0.01 mol/L pH7.4PBS 溶解免疫原,再与等量弗氏完全佐剂混合,完全乳化,颈背部皮下分 2~3 点注射;加强免疫,用 0.01 mol/L pH7.4PBS 溶解免疫原与等量弗氏不完全佐剂混合,充分乳化,小鼠腹腔注射。每次间隔 14~21 d,第 3 次免疫后 7~10 d 开始对免疫小鼠尾静脉采血,收集血清,用 ELISA 检测小鼠血清效价。末次免疫后间隔 4 周以上,在细胞融合前 3~4d,分别对腹腔注射 CTC、OTC、TC、DOX-BSA 抗原 100  $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}/$  只,注射后每天注意观察,保证融合前小鼠状态良好。

#### [0011] 2.2 CTC、OTC、TC、DOX 单克隆抗体制备

分离免疫小鼠的脾细胞,并进行匀浆制备免疫脾细胞。取 1 只免疫的 Balb/c 小鼠,从眼眶放血分离血清作为阴性血清,处死。小鼠用 75% 酒精中浸泡 5 min,进行整体消毒。将小鼠四肢固定,然后用镊子夹住小鼠下腹部皮肤,剪开一小口,再用镊子撕开皮肤,露出腹膜,在腹膜上用剪刀 (操作时要换一套镊子和剪刀) 剪一小口 (在腹部中央)。剪开腹膜 (换 1 套镊子和剪刀),露出脾脏,用镊子夹住脾脏 (再换 1 套器械),用剪刀将脾脏外膜剪破,然后放入事先灭菌的匀浆器中。加适量基础培养基 (RPMI-1640) 于匀浆器中,进行研磨,挤压出脾细胞,取出匀浆器的匀浆棒,再补加适量基础培养基 (RPMI-1640),静置 2 min,将上层细胞悬液吸取后,放入腹腔巨噬细胞离心管中,重复上述操作 1 次。1200 r/min 离心 10 min,除去上清。将  $10^8$  个免疫脾细胞与  $1 \sim 2 \times 10^7$  个 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:10 或 1:5 的比例加入 50 mL 离心管中,进行混匀,然后于 1500 r/min 水平离心 10 min,弃去上清。将离心管倒扣在灭菌的吸水纸上,把管中液体吸干。用手指或桌面轻轻敲击管底,让沉淀的细胞松动,再把离心管置于 37℃水浴锅中。在 1 min 内缓慢将 50%PEG 0.8 mL 滴入离心管中,边加边轻轻用吸管尖搅拌沉淀细胞。再继续搅拌 30 sec 后,静置 1 min,然后慢慢加入 40 mL 1640 基础培养基 (事先进行 37℃预温)。加基础培养基方法为:第 1 min 内逐滴滴入 1 mL,第 2 min 内加 2 mL,第 3 min 内加 3 mL,第 4 min 内加其余的 4 mL,在每次加培养基

时需缓慢加入,并轻轻地搅拌培养基,最后将剩余的 1640 培养基慢慢加入。1000 r/min 离心 5 min,除去上清。然后用 HAT 培养基悬浮混合的细胞,再加入饲养脾细胞。根据需要补加适量的 HAT 培养基,混合均匀,再将含有饲养细胞的细胞融合液滴加到 96 孔细胞培养板上,滴加量约为 150  $\mu$ L/孔。将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,进行培养。用建立的间接 ELISA 筛选阳性细胞克隆。选择强阳性集落生长的孔,用有限稀释法进行克隆。并对其他阳性孔,进行 24 孔扩大培养,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 对扩大培养孔的上清液进行检测,对间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 均为阳性孔的细胞进行液氮冷冻保存。通过融合检测,并进行 3 次亚克隆后获得杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过多次传代、冻存、复苏,杂交瘤细胞分泌抗体稳定。进行杂交瘤细胞染色体的计数,将每株杂交瘤细胞随机选择 20 个细胞,进行细胞染色体条数的计数,再计算细胞染色体条数的平均值。小鼠脾细胞染色体数为 40 条,SP2/0 细胞的染色体数目平均数为 62~68 条,而本试验获得的 20 株杂交瘤细胞染色体数目都在 92~103 条之间,平均为 97.8 条。本杂交瘤细胞染色体数目高于两亲本细胞的染色体数目,说明是两种细胞的杂交产物。取细胞株细胞分泌的培养上清液,进行 1:10 稀释后,用夹心 ELISA 方法测定抗体亚型,该细胞株分泌的抗体亚型为 IgG1。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化。该单克隆抗体可用于制备胶体金。

#### [0012] 2.3 兔抗鼠 IgG 抗体的制备

用 Balb/C 小鼠 IgG 免疫健康新西兰大白兔,制备高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清,采用饱和硫酸铵沉淀法对血清进行粗提,经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG。利用兔抗鼠 IgG 作为质控线。

#### [0013] 3、抗 CTC、OTC、TC、DOX 单克隆抗体-胶体金标记物的制备

##### 胶体金的制备

量取去离子水 100 mL,移入 500 mL 的平底烧瓶中,将烧瓶置于磁力搅拌器的加热套内,打开搅拌旋钮和加热旋钮,加热至沸腾。加入 1% HAuCl<sub>4</sub> 溶液 1.0 mL,继续加热 2 min,然后按表 5-1 所示体积一次性迅速加入 1% 柠檬酸三钠溶液,继续加热。待溶液变为亮红色或橙红色后,再继续加热搅拌 15 min。关掉加热旋钮,冷却至室温,过滤备用。

#### [0014] 3.2 抗 CTC、OTC、TC、DOX 单克隆抗体-胶体金标记物的制备与纯化

于 50 mL 的小烧杯中加入 30 mL 的胶体金,用 0.1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 适量调 pH 达到最佳标记 pH 值,在搅拌的状态下,缓慢加入一定量稀释好的抗 CTC、OTC、TC、DOX 单克隆抗体,继续搅拌 30 min;加 10% BSA 使其终浓度为 1%,搅拌 30 min;4 $^{\circ}$ C 放置 2 h 后,将以上胶体金标记物分装,以 2 000 r/min 离心 15 min,取上清,弃去沉淀;以 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,加入标记洗涤液到原体积;再次以 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,加入标记洗涤液到原体积;以 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀用 1.0 mL 标记洗涤液进行重悬,然后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

#### [0015] 金标垫的制备

分别剪取规格为 20 $\times$ 4 mm 的玻璃纤维棉,然后将上述 4 种金标抗体复合物溶液用 ZX1000 喷点平台系统均匀喷洒于玻璃纤维棉上,置于 37  $^{\circ}$ C 干燥 1 h,加入干燥剂密封保存,后置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱。

#### [0016] 硝酸纤维膜(NC 膜)的制备

将 NC 膜置于 ZX1000 喷点平台系统上,将浓度为 0.1 mg/mL 的完全抗原 CTC/OTC/TC/

DOX-BSA 放于贮存池 A,浓度为 0.5 mg/mL 的 GaMIgG 放于贮存池 B。将 NC 膜展平,放上压条,质控线与检测线位于膜的中间相距 0.5 cm,其距膜的边距为 0.75 cm。开机后,喷点平台系统将完全抗原 CTC/OTC/TC/DOX-BSA 和兔抗鼠 IgG 分别点射于 NC 膜上,形成 4 条检测线和 1 条质控线,置室温自然干燥后,加入干燥剂密封,置于 4 °C 保存,备用。

#### [0017] 检测试纸条的组装

将背板、样品端封膜(9)、结合垫、硝酸纤维膜(4)、吸水垫和手控区封膜(1) 组装到一起。将组装的半成品试纸条放入试纸条切割机槽内进行切割,然后将制备成品的试纸条注明生产时间和批次,置 4 °C 保存(密封)。

#### [0018] 4、检测 CTC/OTC/TC/DOX 的免疫胶体金试纸条的使用方法

##### 4.1 组织样品预处理

将猪肌肉、肝脏、肾脏等待检组织样品匀浆,取 2 g 加入 4 mL 乙酸乙酯振荡 2 min,室温 3000 r/min 离心 5 min,取 300  $\mu$ L 上层液体于 1.5 mL 离心管中 80°C 水浴蒸干(大约 30 min)或在氮气流下吹干,用 150  $\mu$ L 稀释液溶解残留物。

##### [0019] 4.2 检测结果判定

如图 1、图 2 所示,一种快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条,包括背板 2、吸水垫 3、硝酸纤维膜 4、结合垫 7、样品垫 8,所述背板 2 上依次连续粘附有吸水垫 3、硝酸纤维膜 4、结合垫 7 和样品垫 8,所述样品垫 8 靠结合垫 7 一端搭接在结合垫 7 上,所述吸水垫 3 上表面吸附有手控区封膜 1,所述样品垫 8 上表面吸附有样品端封膜 9,所述硝酸纤维膜 4 上包被有兔抗鼠的 IgG 质控线(C)5 和 CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA 四条检测线 6。其中质控线(C)5 靠近吸水垫 3,CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA 四条检测线 6 分别为 T1、T2、T3、T4。

[0020] NC 膜上包被有 CTC-BSA 偶联物、OTC-BSA 偶联物、TC-BSA 偶联物、DOX-BSA 偶联物和兔抗鼠 IgG,分别作为检测线(T1、T2、T3、T4)和质控线(C)。金标垫上分别涂布有固态化的金标抗 CTC、金标抗 OTC 单抗、金标抗 TC 单抗和金标抗 DOX 单抗的混合金标抗体作为示踪物。将样品液滴加到试纸条样品垫上,样品在毛细管作用下沿试纸条泳动,当泳动至金标垫时,固态化的金标抗单抗迅速溶解释放,随样品一起沿试纸条泳动至检测线,若样品中含有 CTC、TC、OTC、DOX 首先与金标抗 CTC、OTC、TC、DOX 单抗发生免疫反应,形成免疫复合物,抑制金标抗 CTC、OTC、TC、DOX 单抗与检测线(T1、T2、T3 和 T4)包被的 CTC、OTC、TC、DOX-BSA 偶联物的结合,使检测线截获的金标抗体的量减少,T 线颜色变浅,当样品中 CTC、OTC、TC、DOX 量足够大时,检测线将无颜色出现,金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获 C 线出现红色条带;反之,若样品中不含 CTC、OTC、TC、DOX,金标抗 CTC、OTC、TC、DOX 单抗与包被于 NC 膜上的 CTC、OTC、TC、DOX-BSA 偶联物发生特异性免疫反应而被截获,在检测线位置(T1、T2 和 T3)形成红色条带,即阴性结果,部分金标单抗穿过检测线与被包被于 C 线的兔抗鼠 IgG 截获,形成红色条带。

#### [0021] 5、本发明 CTC/OTC/TC/DOX 药物检测试纸条的应用、OTC、TC、DOX 残留 4 联检测试纸条的灵敏度测定

将 CTC、OTC、TC、DOX 配成浓度分别为 0、5、10、20、40、80  $\mu$ g/L 的标准品,分别加到试纸条的样品垫上,测试重复 8 次,静置试纸条反应 10 min,然后用 BioDot-TSR3000 读条仪扫描检测线的相对光密度值(G/Peak-ROD 值),机读结果见表 1。以不同浓度标准品与空白标

准品相对光密度值的百分率 (B/B<sub>0</sub>) 为纵坐标,以标准品不同浓度的常用对数值作为横坐标,绘制检测试纸条的标准曲线,求回归方程,进行相关回归分析,结果见表 1。G/Peak-ROD 值进行统计学分析,当 G/Peak-ROD 值与 0 ng/mL 的标准品检测线 G/Peak-ROD 值 (B/B<sub>0</sub>) 为 80% 时,为机读灵敏度,确定试纸条的检测限。目测检测方法建立:在有红色质控线出现的情况下,当试纸条与阴性对照试纸条检测线颜色相似红色条带时判为阴性;当试纸条检测线颜色明显浅于阴性对照试纸条检测线颜色时判为弱阳性;当试纸条检测线位置无红色条带出现时判为阳性。在试纸条没有出现红色质控线的情况下,说明试纸条已失效,此时不管检测线颜色的深浅和有无,检测结果都判为无效,应更换另一批次的试纸条重新检测。

[0022]

表 1 试纸条灵敏度试验

联检残留检测试纸条的特异性试验

以与四条检测线相对应的药物 CTC、OTC、TC 与 DOX 的交叉反应率为 100%,分别计算四环素类药物残留四联检胶体金免疫层析快速检测试纸条各检测线与其它四环素类药物的交叉反应率见表 2。从表中可以看出,四环素类药物残留四联检胶体金免疫层析快速检测试纸条与常用四环素类药物的交叉反应率,说明该试纸条可用于 CTC、OTC、TC 和 DOX 等四种四环素类药物残留检测。

[0023] 表 2 四环素类药物残留四联检试纸条与四环素类药物的交叉反应率

四环素类	交叉反应率(%)			
	CTC	OTC	TC	DOX
金霉素 (CTC)	100.00	<0.01	0.04	<0.01
土霉素 (OTC)	<0.01	100.00	<0.01	0.06
四环素(TC)	0.05	<0.01	100.00	<0.01
多西环素(DOX)	<0.01	0.08	<0.01	100



图 1

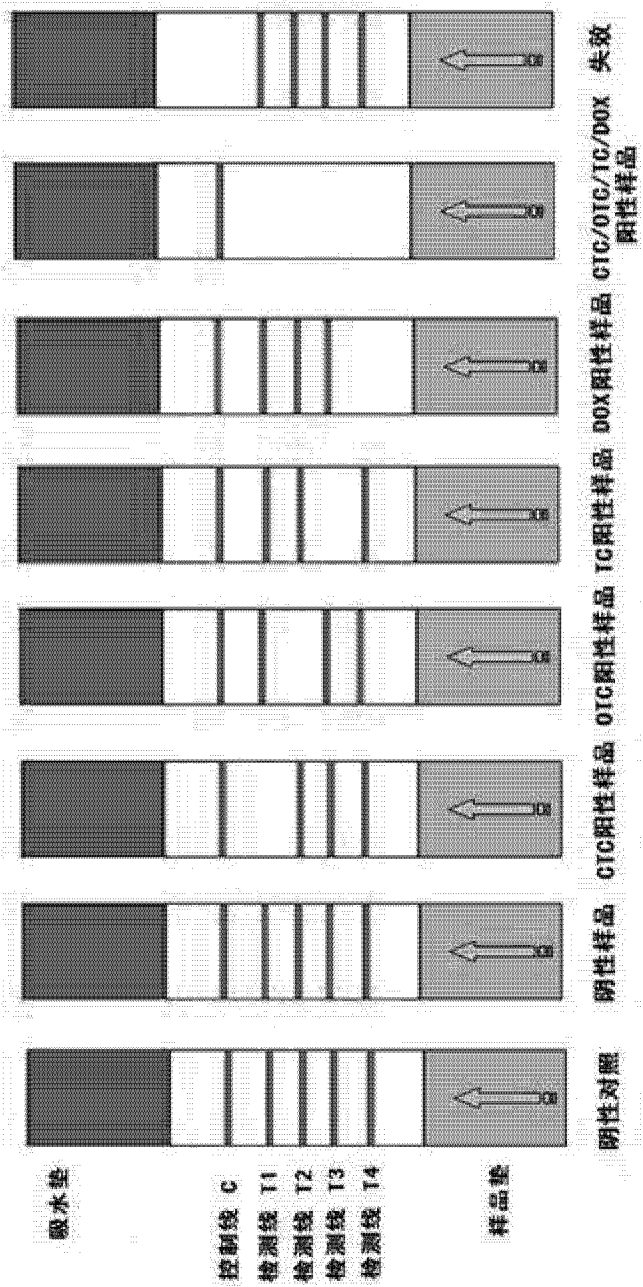


图 2

专利名称(译)	快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102288753A</a>	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201110119780.8	申请日	2011-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
[标]发明人	乐涛 魏启明 何红秋 何亮		
发明人	乐涛 魏启明 何红秋 何亮		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	郭云		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测四环素、金霉素、土霉素与多西环素残留的四联胶体金免疫层析试纸条及其制备方法，硝酸纤维素膜(4)上包被有兔抗鼠的IgG质控线和CTC-BSA、OTC-BSA、TC-BSA、DOX-BSA四条检测线；样品垫上包被有的抗CTC、OTC、TC、DOX药物单克隆抗体-胶体金标记物。本发明应用免疫学技术筛选出抗CTC、OTC、TC和DOX药物的单克隆抗体，通过胶体金的制备及胶体金标记条件的探索研究，在应用抗CTC、OTC、TC和DOX药物单克隆抗体和GICA技术研究建立抗四环素类药物单克隆抗体快速检测试纸条，并对其性能进行测定。试纸条检测范围较宽，假阳性低，检测灵敏、准确、可靠，适用于动物可食性组织如肌肉、肝脏和肾脏等组织中CTC、OTC、TC和DOX四环素类药物残留的多联检测。

