

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710177137.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101173925A

[22] 申请日 2007.11.9

[21] 申请号 200710177137.4

[71] 申请人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
院10号房

共同申请人 北京望尔康泰生物技术有限公司

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟
赵正苗 吴小平 冯才茂 朱亮
朱颜

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 王朋飞

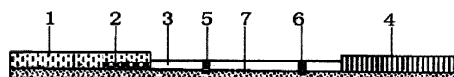
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测喹诺酮类药物残留的胶体金试纸卡

[57] 摘要

本发明提供了一种检测喹诺酮类药物的胶体金免疫试纸卡，包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬，在所述反应膜上具有包被喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区，所述结合物释放垫包被喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供了一种应用上述试纸卡检测喹诺酮类药物的方法，它包括步骤：首先进行样本前处理，然后用试纸卡进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的试纸卡可用于检测动物源性食品如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、尿液、蜂蜜中的喹诺酮类药物残留量，其操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低，能够现场监控，满足大量样本筛查的需要。



1、一种检测喹诺酮类药物的胶体金试纸卡，包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬，其特征在于所述反应膜上具有包被喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区，所述结合物释放垫包被喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物。

2、如权利要求 1 所述的胶体金试纸卡，其特征在于所述喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物由吡哌酸与 EDC 和对氨基苯乙酸反应得 8-乙基-5-氧代-5,8-二氢-2-(1-哌嗪基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺苯乙酸，然后与载体蛋白偶联得到。

3、如权利要求 1 或 2 所述的胶体金试纸卡，其特征在于所述喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物中的喹诺酮类药物单克隆抗体是，以 8-乙基-5-氧代-5,8-二氢-2-(1-哌嗪基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺苯乙酸与载体蛋白偶联得到偶联复合物作为免疫原制备获得。

4、如权利要求 1 或 2 所述的胶体金试纸卡，其特征在于所述喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物中的喹诺酮类药物单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 A-4-3 CGMCC No. 2066 分泌获得。

5、权利要求 1~4 任一项所述胶体金试纸卡在检测喹诺酮类药物中的应用。

6、一种制备权利要求 1~4 任一项所述胶体金试纸卡的方法，其包括步骤：

1) 制备包被喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫；

2) 制备具有包被喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区的反应膜；

3) 将 1) 和 2) 制备好的结合物释放垫、反应膜与样本垫、吸水垫和背衬组装成试纸卡。

7、一种检测样本中喹诺酮类药物残留的方法，其特征在于包括

步骤:

- 1) 样本前处理;
 - 2) 用权利要求 1~4 任意一项所述的试纸卡进行检测;
 - 3) 分析检测结果。
- 8、一种喹诺酮类药物的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-3 CGMCC No. 2066。

一种检测喹诺酮类药物残留的胶体金试纸卡

技术领域

本发明涉及兽药残留的免疫化学速测技术领域，更具体地涉及一种检测喹诺酮类药物残留的胶体金试纸卡，借助胶体金标记显色的免疫层析反应，快速检测喹诺酮类药物残留。

背景技术

喹诺酮类（quinolones, QNs）药物是近20年来迅速发展起来的一类十分重要的广谱抗生素。在化学结构上，本类药物属于吡酮酸衍生物（pyridonecarboxylic acids, PCAs），俗称“喹诺酮类”（QNs）。QNs抑制细菌DNA螺旋酶，抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透能力强，已成为兽医临床和水产养殖中最重要的抗感染药物之一，但由于其耐药性和潜在的致癌性引起广泛的关注。在组织中，恩诺沙星的标示残留物为恩诺沙星和环丙沙星，其中以肝脏组织和肾脏组织中的残留浓度最高，其次是鸡肉和脂肪附着的皮肤组织，恩诺沙星其代谢产物环丙沙星（CIF）仍具有生物活性。氧氟沙星（OFL）主要以原形药物的形式存在于组织中。培氟沙星（PEF）在体内代谢率接近100%，其代谢产物是诺氧沙星（NOR）。

目前QNs药物残留常用的检测方法有两种。一种是色谱分析，如高效液相色谱法（HPLC），由于复杂的仪器设备和繁琐的过程，不适合现场监控和大量样本筛查。另一种为免疫学方法，如酶联免疫吸附法（ELISA），它的缺点是检测时间长，费用较高，不利于在基层单位推广使用。而且，这两种方法都需要专业技术人员进行操作。

胶体金免疫层析（gold-immunochromatography assay, GIGA）是将胶体金作为示踪物应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标金技术。

发明内容

本发明的目的在于提供一种敏感度高、操作简单、成本低的 QNs 快速检测试纸卡。

5 本发明的试纸卡包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬，在所述反应膜上具有包被喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区，所述结合物释放垫包被喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物。

10 本发明将 QNs-载体蛋白偶联抗原固化于反应膜测试区内，并用胶体金标记 QNs 单克隆抗体，通过待测样本中的 QNs 和包被在反应膜上的 QNs-载体蛋白偶联物共同竞争 QNs 单克隆抗体-胶体金标记物，根据测试区条颜色深浅或有无红色条带来判断待测样本液中是否含有 QNs 残留。检测时，样本滴入试剂卡孔内，当 QNs 在样本中浓度低于 10ng/ml 时，胶体金抗体在层析过程中会被固定在反应膜上的 QNs 的偶联物结合，在测试区 (T) 和质控区 (C) 内各出现一条红
15 色条带。如果 QNs 在样本中浓度高于 10ng/ml 时，胶体金抗体与样本中的 QNs 全部结合，从而在(T)区内因为竞争反应不与喹诺酮偶联物结合而不出现红色条带。阴性样本在检测过程中由于缺少抗体抗原竞争反应，将会在 (T) 区与 (C) 区内出现红色条带。如图 2 所示。

20 阳性：当 (C) 区显示出红色条带，而 (T) 区不显色，判为阳性，表示 QNs 含量超过 10ng/ml，用 “+” 表示。

阴性：当 (C) 区显示出红色条带，(T) 区同时显示出红色条带，且 (T) 带颜色接近或浅于 (C) 带时，判为阴性，表示 QNs 含量小于 10ng/ml，用 “-” 表示。

25 无效：当 (C) 区不显示出红色条带，则无论 (T) 区显示出红色条带与否，该试纸卡判为无效。

本发明还提供了制备上述试纸卡的方法，其包括步骤：

1) 制备包被喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫；

2)制备具有包被喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠 IgG 的质控区的反应膜;

3)将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样本垫、吸水垫和背衬组装成试纸卡。

5 具体地说,其步骤包括:

(1)将 QNs 半抗原与载体蛋白偶联,形成 QNs 半抗原-载体蛋白偶联物;

(2)用 QNs 半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌 QNs 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(3)提取小鼠 IgG 免疫健康山羊,得到羊抗鼠 IgG 抗体;

(4)用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

(5)将制备的 QNs 单克隆抗体加入制备的胶体金中,得到 QNs 单克隆抗体-胶体金标记物;

15 (6)将结合物释放垫用含 0.1~0.5%酪蛋白的磷酸氢二钾和磷酸二氢钾混合缓冲液浸泡 30 秒,在 37℃烘 2h,然后将 QNs 单克隆抗体-胶体金标记物包被在结合物释放垫上;

(7)将 QNs-人血清白蛋白偶联物(HSA)包被在反应膜上构成测试区,并将羊抗鼠 IgG 包被在反应膜上构成质控区,用含 0.5%脱脂奶粉的封闭液进行封闭;

(8)将样本垫用含 0.1~0.5%鸡血清蛋白、0.5~1%吐温-80 的磷酸氢二钾和磷酸二氢钾混合缓冲液浸泡 2h,在 37℃烘 2h;

(9)在背衬上按顺序贴上反应膜、吸水垫、结合物释放垫和样本垫,将样本垫盖住结合物释放垫。最后切成 3mm 宽的小条,加塑料盒,真空包装。将样本垫盖住结合物释放垫可以延长检测结果观察时间,可使样本垫将检测液体充分吸收并与金标抗体充分反应,从而减少误差。

本发明试纸卡具有灵敏度高、操作简单、检测时间短、储存简单、保质期长成本低等优点，能够现场监控，适合大量样本筛查。

附图说明

图1为本发明检测试纸卡的组装示意图；

5 图2为本发明的检测结果分析示意图。

图中：1、样本垫；2、结合物释放垫；3、反应膜；4、吸水垫；5、测试区；6、质控区；7、背衬。

具体实施方式

下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解，这些实施
10 例仅用于说明本发明，而不用来限制本发明的范围。另外，本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰，这些改动或修饰同样应落入发明的保护范围。

实施例1 QNs检测试纸卡的制备

1、QNs半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

15 (1) QNs半抗原的制备

取吡啶酸（8-乙基-5-氧代-5,8-二氢-2-(1-哌嗪基)吡啶并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸）500mg溶于30ml水中，加入EDC 200mg室温反应1h，再加入对氨基苯乙酸150mg反应过夜。然后经酸洗提取出QNs半抗原，干燥得280mg，QNs半抗原即8-乙基-5-氧代-5,8-二氢-2-(1-哌嗪基)吡
20 啶并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺苯乙酸。

(2) QNs半抗原-人血清蛋白偶联物的合成

称取人血清白蛋白（HSA）90mg，加入10ml PBS溶解，冰浴搅拌下再加入10ml的N,N-二甲基酰胺（DMF），得HSA溶液。称取QNs半抗原7.8mg，溶于1.5ml DMF中，加入三丁胺8 μ L，混匀后再加入
25 氯甲酸异丁酯4.5 μ L，于4 $^{\circ}$ C下磁力搅拌25min。磁力搅拌下，将HSA溶液倒入QNs半抗原溶液中开始反应（此时反应液会变浑浊），用1mol/L的NaOH调节反应液pH值至8.3（反应液又变清澈）。磁力搅拌

下,置4℃冰箱反应4h,将最终反应液用0.01mol/L pH7.4的PBS透析两天,冷冻干燥,-6℃保存。

(3) QNs半抗原-牛血清蛋白的合成:

称取牛血清蛋白(BSA)70mg,溶解于25ml 0.05M pH7.4 PBS中,
5 再加入25ml的DMF。称取QNs半抗原7.8mg,溶于2mlDMF中。向QNs
半抗原溶液中加入三丁胺6.0μl,混匀后再加入氯甲酸异丁酯3.8μl,于
4℃下磁力搅拌25min。磁力搅拌下,将BSA溶液倒入QNs半抗原溶液
中开始反应(此时反应液会变浑浊),用1mol/L的NaOH调节反应液pH
值至9.0(反应液又变澄清)。磁力搅拌下,在4℃冰箱中反应4h。将
10 最终反应液用0.01mol/L pH7.4 PBS透析,冷冻干燥,-6℃保存。

(4) QNs半抗原-载体蛋白偶联物的鉴定

将载体蛋白、QNs半抗原、QNs-载体蛋白偶联物分别用pH7.4的
PBS配成0.5mg/ml的溶液,用0.01mol/L pH9的PBS调零,用紫外分光
光度计在波长200-800 nm范围内扫描,得到载体蛋白、QNs半抗原、
15 QNs半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线。三者出现不同的吸收曲线,
表明QNs与载体蛋白偶联成功。

2、QNs单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

将免疫原注入 Balb/c 小鼠体内,剂量为 90μg/只,使其产生多克
20 隆抗体。

(2) 细胞融合和克隆化

取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,
采用间接竞争 ELISA 法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀
释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细
25 胞株。取其中一效价较高杂交瘤细胞命名为 A-4-3,该细胞株已于 2007
年 05 月 28 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
(地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所),保藏号

为 CGMCC No. 2066。

(3) 细胞冻存和复苏

将 QNs 的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-3 用冻存液制成 1×10^6 个/ml 的细胞悬液，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

(4) 单克隆抗体的制备与纯化

将 Balb/c 小鼠腹腔注射灭菌石蜡油，剂量为 0.4ml/只，7 天后腹腔注射 QNs 的单克隆杂交瘤细胞株 A-4-3 5×10^5 个/只，7 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化，纯化后的腹水放入 -20℃ 环境中保存。

3、羊抗鼠抗抗体的制备：以山羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫，得到羊抗鼠抗抗体。

4、QNs 单克隆抗体-胶体金标记物的制备

(1) 胶体金的制备

用双蒸去离子水将 1% 氯金酸稀释成 0.01%，置磁力加热棒搅拌器上搅拌煮沸，每 100ml 0.01% 的氯金酸加入 2ml 1% 的柠檬酸三钠，继续煮沸，液体呈红色时停止加热，冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物，有效期为一个月。

(2) QNs 单克隆抗体-胶体金标记物的制备

在磁力搅拌下，用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.2，按 1~2μg/ml 抗体胶体金加入 QNs 单克隆抗体，继续搅拌混匀 30min，加入 10% BSA 至终浓度为 1%，静置 30min。12000rpm、4℃ 离心 30min，弃去上清液，沉淀用复溶缓冲液洗涤两次，用初始胶体金体积 1/20 的复溶缓冲液将沉淀重悬，置 4℃ 备用，保存 60 天。

复溶缓冲液：含牛血清白蛋白 (BSA) 0.02~0.1%，吐温-20 0.05~0.2%，维生素 C (Vit-C) 0.1%，0.02M pH9.0 的硼酸复溶缓冲液。

5、结合物释放垫的包被

- 将结合物释放垫放入含有 0.1~0.5%酪蛋白的磷酸氢二钾和磷酸二氢钾混合缓冲液浸湿 30 秒，37℃烘 2h 备用；用 Biodot 点膜仪将制备好的 QNs 单克隆抗体-胶体金标记物均匀包被在结合物释放垫上，每 5cm 结合物释放垫包被 9 μ l QNs 单克隆抗体-胶体金标记物，
- 5 真空干燥，真空封装，置 4℃备用。

6、反应膜的制备

将硝酸纤维素膜上分别包被 QNs-载体蛋白偶联物构成的测试区和羊抗鼠 IgG 构成的质控区，再用含 0.5% 的脱脂奶粉的封闭液进行封闭。

- 10 包被过程：用磷酸钾缓冲液（含 3%的甲醇）将 QNs-人血清白蛋白（HSA）偶联物稀释至 15 μ g/mL，用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为测试区，包被量为 0.7 μ g/cm²，测试区靠近结合物释放垫端，距结合物释放垫端约 8mm；用 0.01M 磷酸钾缓冲液(含 3%的甲醇) 将羊抗鼠 IgG 抗体稀释到 200 μ g/ml，用 Biodot 点膜仪将其
- 15 包被于纤维素膜作为质控区，包被量为 0.7 μ g/ml²，质控区靠近吸水垫，距吸水垫约 8mm，两线距离 5~8mm。37℃烘干，封装。

7、胶体金免疫试纸卡的组装

- 在 PVC 背衬上按顺序贴硝酸纤维素膜、吸水垫、结合物释放垫，最后贴样本垫，将样本垫盖住结合物释放垫。切成 3mm 宽的小条，
- 20 加塑料盒，真空包装。原包装应储存于 18~25℃，有效期一年。本发明的试纸卡将样本垫盖住结合物释放垫可以延长检测结果观察时间，样本垫也可以将检测液体充分吸收并与金标抗体完全接触、充分反应、减少误差。

实施例 2 样本中 QNs 残留的检测

- 25 1、样本前处理

（1）动物组织前处理（鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝）

称取 2.0 \pm 0.05g 匀质过的组织样本于离心管中，盖紧瓶盖。将装

有样本的离心管在微沸的水浴锅中水浴 10min, 吸取三滴以上煮出的溶液倒 1.5ml 的离心管中。如有明显黄色浑浊请离心, 然后使用上清液作为待测样本溶液。

(2) 鸡蛋样本的前处理

- 5 将鸡蛋样本匀浆, 称取 $2.0\pm 0.05\text{g}$ 于离心管中, 盖紧瓶盖。将装有样本的离心管在微沸的水浴锅中水浴 10min, 吸取三滴以上煮出的溶液倒 1.5ml 的离心管中。请使用上清液作为待测样本溶液。

(3) 尿液样本的前处理

- 尿样本: 一般可以直接检测, 当尿液呈浑浊状态时 3000~5000rpm
10 离心 5min 或采用滤纸过滤处理后, 再进行点样检测。

(4) 蜂蜜样本的前处理

称取 $2.0\pm 0.05\text{g}$ 蜂蜜置洁净的容器中, 加 4ml 的蒸馏水稀释即可。

2、用本发明的试纸卡进行检测

- 用滴管向试剂卡孔内滴加 3 滴样本, 5~8min 后观察结果。超过
15 10min, 则样本检测判读结果无效。

3、检测结果分析

- QNs 在样本中浓度高于 10ng/ml 时, 胶体金抗体与 QNs 全部结合, 从而在(T)区因为竞争反应不会与 QNs 偶联物结合而不出现红色条带。阴性样本在检测过程中由于缺少抗体抗原竞争反应, 将会在(T)
20 区与(C)区内出现红色条带。**阳性:** 当(C)区显示出红色条带, 而(T)区不显色时, 判为阳性, 用“+”表示。**阴性:** 当(C)区显示出红色条带, (T)区同时显示出红色条带时, 且(T)区颜色接近或浅于(C)区时, 判为阴性, 用“-”表示。**无效:** 当(C)区不显示出红色条带, 则无论(T)区显示出红色条带与否, 该试纸卡判为
25 无效。如图 2 所示。

实施例 3 样本检测实例

取已知 QNs 浓度大于 10ng/g 的鸡蛋、鸡肉、蜂蜜样本各 15 份和

各自的阴性样本各 15 份，每个样本重复检测 2 次，计算其阴阳性率。
结果如表 1、表 2 和表 3 所示。

表 1 鸡蛋样本阴阳性率检测

阴性 样本	样本 编号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
	检测 结果	-	-	-	-	-
	样本 编号	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10
	检测 结果	-	-	-	-	-
	样本 编号	样本 11	样本 12	样本 13	样本 14	样本 15
	检测 结果	-	-	-	-	-
阳 性 样 本 (>10 ng/g)	样本 编号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
	检测 结果	+	+	+	+	+
	样本 编号	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10
	检测 结果	+	+	+	+	+
	样本 编号	样本 11	样本 12	样本 13	样本 14	样本 15
	检测 结果	+	+	+	+	+

5

表 2 鸡肉样本阴阳性率检测

阴性 样本	样本 编号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
	检测 结果	-	-	-	-	-
	样本 编号	样本 6	样本 7	样本 8	样本 9	样本 10
	检测 结果	-	-	-	-	-
	样本 编号	样本 11	样本 12	样本 13	样本 14	样本 15
	检测 结果	-	-	-	-	-

	结果										
	样本编号	样本 1		样本 2		样本 3		样本 4		样本 5	
	检测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阳性样本(>10 ng/g)	样本编号	样本 6		样本 7		样本 8		样本 9		样本 10	
	检测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	样本编号	样本 11		样本 12		样本 13		样本 14		样本 15	
	检测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 3 蜂蜜样本阴阳性率检测

	样本编号	样本 1		样本 2		样本 3		样本 4		样本 5	
	检测结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阴性样本	样本编号	样本 6		样本 7		样本 8		样本 9		样本 10	
	检测结果	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	样本编号	样本 11		样本 12		样本 13		样本 14		样本 15	
	检测结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	样本编号	样本 1		样本 2		样本 3		样本 4		样本 5	
	检测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阳性样本(>10 ng/g)	样本编号	样本 6		样本 7		样本 8		样本 9		样本 10	
	检测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	样本编号	样本 11		样本 12		样本 13		样本 14		样本 15	
	检测结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

结果表明,鸡蛋、鸡肉、蜂蜜样本各15份和各自的阴性样本各15份,每个样本重复检测2次,鸡蛋中其阴阳性符合率均为100%,鸡肉其阴阳性符合率均为100%。蜂蜜中假阳性率7%以下,其阳性符合率

均为100%，阴性符合率均为93%以上。说明本发明的检测试纸卡完全可以作为常规方法用于市场上对QNs残留的快速检测。

实验例 1 敏感性和特异性试验

敏感性试验

5 将诺氟沙星的标准液稀释为 0、5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20ng/ml, 用本发明检测结果为: 滴试 0~8ng/ml 的标准液时, 试纸卡显示出肉眼可见的两条红色条带, 滴试 9ng/ml 的标准液时, 试纸卡也出现肉眼可见的两条红色条带, 但 (T) 区颜色很淡很模糊, 当滴试 10ng/ml 和 10ng/ml 以上的标准液时试纸卡(T) 10 区不显色, 试验结果表明本试纸卡检测 QNs 的灵敏度为 10 ng/ml。

特异性试验

本发明检测试纸卡的阳性检测浓度为 10ng/ml, 检测诺氟沙星药物及阴性标准品, 同样将依诺沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、达氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、噁喹酸、氟甲喹、麻保沙星、氨氟 15 沙星、双氟沙星、沙拉沙星按 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20ng/ml 进行稀释, 用本发明的试纸卡进行检测, 结果为: 依诺沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、达氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、噁喹酸、氟甲喹、麻保沙星、氨氟沙星、双氟 20 沙星、沙拉沙星分别在 11、10、10、12、11、10、11、12、11、12ng/ml 浓度时测试区不显, 双氟沙星、沙拉沙星在 20000、50000ng/ml 浓度时测试区不显, 通过计算可得出交叉反应率为: 90%、100%、100%、85%、90%、100%、90%、85%、90%、85%、100%、小于 1%、小于 1%。如表 4 所示。交叉反应越大, 说明此试纸卡对 QNs 检测的特异性就越好。

25

表 4 本发明试纸卡特异性试验结果

药物	交叉反应率 (%)
诺氟沙星	100%
依诺沙星	90%

	恩诺沙星	100%
	氧氟沙星	100%
	达氟沙星	85%
	培氟沙星	90%
5	环丙沙星	100%
	洛美沙星	90%
	噁喹酸	85%
	氟甲喹	90%
	麻保沙星	85%
10	氨氟沙星	100%
	双氟沙星	小于1%
	沙拉沙星	小于1%

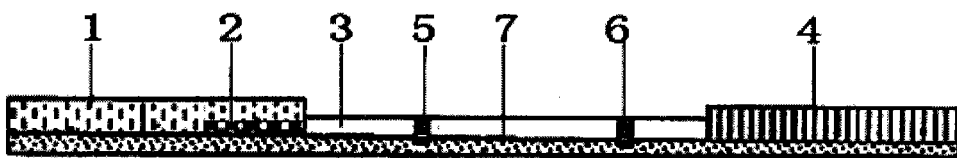


图 1

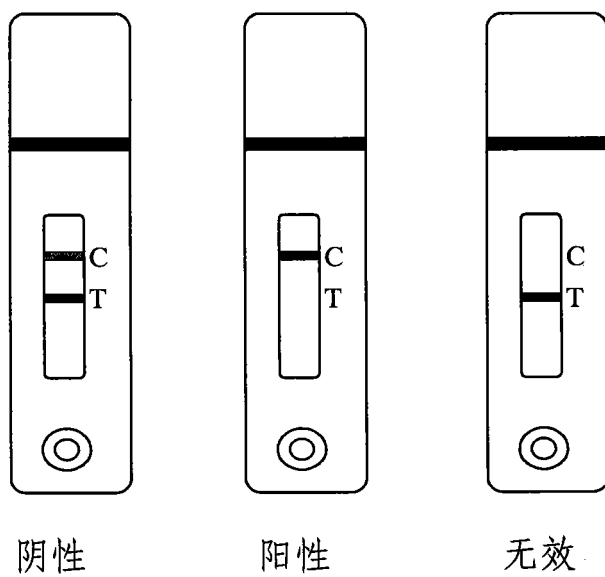


图 2

专利名称(译)	一种检测喹诺酮类药物残留的胶体金试纸卡		
公开(公告)号	CN101173925A	公开(公告)日	2008-05-07
申请号	CN200710177137.4	申请日	2007-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司 北京望尔康泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司 北京望尔康泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司 北京望尔康泰生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗 吴小平 冯才茂 朱亮 朱颜		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 赵正苗 吴小平 冯才茂 朱亮 朱颜		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532 C12N5/12		
代理人(译)	王朋飞		
其他公开文献	CN101173925B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测喹诺酮类药物的胶体金免疫试纸卡，包括反应膜、样本垫、结合物释放垫、吸水垫和背衬，在所述反应膜上具有包被喹诺酮类药物-载体蛋白偶联物的测试区和包被羊抗鼠IgG的质控区，所述结合物释放垫包被喹诺酮类药物单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供了一种应用上述试纸卡检测喹诺酮类药物的方法，它包括步骤：首先进行样本前处理，然后用试纸卡进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的试纸卡可用于检测动物源性食品如鸡肉、鸡肝、猪肉、猪肝、尿液、蜂蜜中的喹诺酮类药物残留量，其操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低，能够现场监控，满足大量样本筛查的需要。

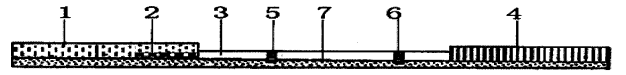


图 1

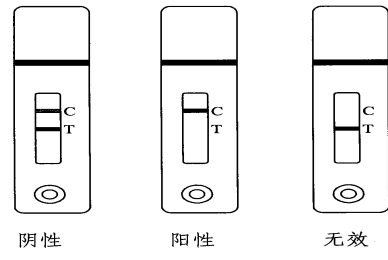


图 2