



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103575889 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201210275185. 8

(22) 申请日 2012. 08. 03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6234 2012. 06. 19

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际信
息产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 何方洋 万宇平 付军权 杨秀贤
邵小雪 蒲小容 李勇 石丽丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

C12N 5/20(2006. 01)

C12R 1/91(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测万古霉素的试纸条及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测万古霉素的试纸条及方法。试纸条包括微孔试剂和试纸,所述微孔试剂中冻干有胶体金标记的万古霉素特异性抗体,所述万古霉素特异性抗体为万古霉素单克隆抗体;所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜、底板依次连接组成,所述反应膜上包括检测区和质控区,检测区包被有万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体。用本发明试纸条检测万古霉素的方法简便、快速、直观、准确、便于携带、适用范围广、成本低、易推广使用。

1. 一种检测万古霉素的试纸条,其特征在于包括试纸和微孔试剂,所述试纸包括反应膜、样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板,所述反应膜上有检测区和质控区,检测区包被有万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有羊抗鼠抗抗体,所述微孔试剂上冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物。

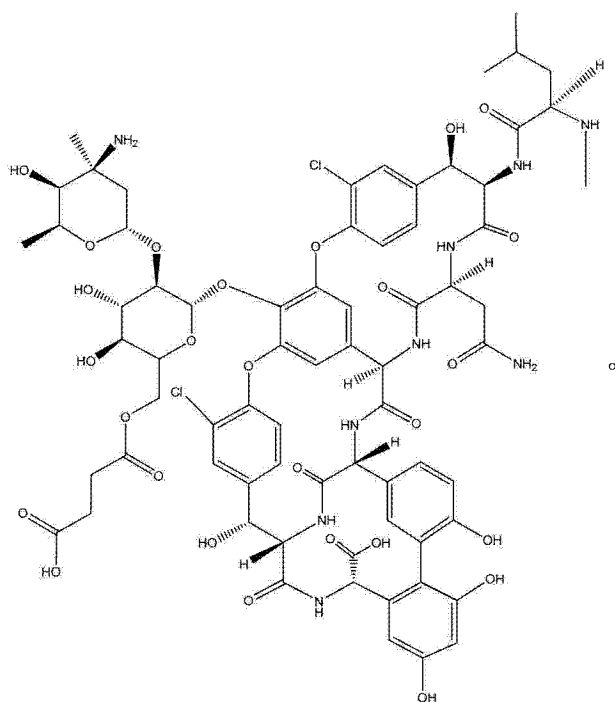
2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述试纸由样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次黏贴在底板上组成,所述微孔试剂上具有微孔塞。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的试纸条,其特征在于所述样品吸收垫上粘贴有保护膜,为检测端,上面有MAX标记线。

4. 根据权利要求3所述的试纸条,其特征在于所述检测区位于近于有MAX标记的保护膜的一端,所述质控区位于远离有MAX标记的保护膜的一端。

5. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物由万古霉素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

6. 根据权利要求1或5任一项所述的试纸条,其特征在于所述万古霉素半抗原是由万古霉素与琥珀酸酐反应得到,分子结构式为:



7. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物中的万古霉素单克隆抗体是以万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

8. 根据权利要求7所述的万古霉素单克隆抗体,其特征在于是由万古霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株E-1-3 CGMCC No. 6234分泌获得。

9. 一种制备权利要求1-7任一项所述试纸条的方法,其包括步骤:

1) 制备冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

2) 制备具有包被万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

3) 将2)制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸;

4)将 1)和 3)制备好的冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试纸条。

10. 一种检测牛奶样本中万古霉素残留的方法,其包括步骤:

1)用权利要求 1-7 任一项所述的试纸条进行检测;

2)分析检测结果。

一种检测万古霉素的试纸条及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测万古霉素的试纸条及方法,具体涉及一种用于检测万古霉素的胶体金试纸条,其特别适于牛奶中万古霉素残留的检测。

技术背景

[0002] 万古霉素(vancomycin, VCM),又名凡古霉素、凡可霉素,是一种多肽类抗生素,分子式为 $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$,分子量 1485.72。通常以盐酸盐形式存在,为白色至淡棕色粉末,无臭,味苦。在水中易溶,在甲醇中微溶,在丙酮、丁醇或乙醚中不溶,在溶液中能被多种重金属盐类沉淀。万古霉素,作为一种从微生物 *Streptomyces orientalis* 分离得到的多肽类抗生素,它对革兰氏阳性菌有很好的抑制作用,但因其不能穿透外部的渗透屏障,它对革兰氏阴性菌没有疗效。

[0003] 多肽类抗生素是由不同类型的氨基酸缩合而成的小分子肽类,主要用于促进动物生长及治疗畜禽疾病。目前,多肽类抗生素被广泛用于家禽、猪、牛等饲料添加剂和兽药。常用的多肽类抗生素包括粘杆菌素、杆菌肽、维吉尼霉素及万古霉素等。然而,随着多肽类抗生素的广泛使用,滥用及不遵守休药期等现象时有发生。药物将可能通过食物链的传递进入人体,危害人体健康。如果长期暴露,还会增加细菌的抗药性,具有潜在的健康风险和生态风险。多肽类抗生素可分别抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、绿脓杆菌、真菌、病毒、螺旋体、原虫的感染,特别是对牛乳腺炎等疾病有较好的疗效。目前,欧盟、日本、美国、澳大利亚等均已制定牛奶中多种多肽类抗生素的限量。其中,欧盟对杆菌肽 A 及粘杆菌素的限量分别为 100 和 50 $\mu\text{g/kg}$;日本对杆菌肽 A、维吉尼霉素、万古霉素、粘杆菌素的限量分别为 400、100、10 和 10 $\mu\text{g/kg}$ 。而我国也于近年制定了牛奶中杆菌肽 A 及粘杆菌素的限量,分别为 500 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 。关于多肽类抗生素的检测方法逐渐引起了关注。

[0004] 目前,多肽类抗生素检测方法包括微生物法、免疫分析法、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法等,但这些方法均存在灵敏度低等问题,无法满足检出限要求;而单独检测万古霉素的方法包括高效液相色谱法、分光光度法、荧光偏振免疫分析法、毛细管电泳法、微生物分析法和薄层色谱法,其中。微生物法检测耗时长,缺乏特异性,且所用细菌对不同种类的抗菌药物敏感性存在差异,易导致假阴性和假阳性产生;仪器分析法样品前处理过程复杂,仪器化程度高且价格昂贵,分析速度慢,仅适用于样品的确证分析,不适合大批量样品的筛选及现场检测。并且关于牛奶中万古霉素检测的研究尚未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种检测万古霉素的试纸条。

[0006] 本发明所提供的试纸条包括微孔试剂和试纸,微孔试剂具有微孔塞,试纸包括底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜,其依次连接;所述微孔试剂中冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物;反应膜上包括检测区和质控区,检测区包被万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被羊抗鼠抗抗体。

[0007] 所述万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物是由万古霉素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述万古霉素半抗原是由万古霉素与琥珀酸酐反应得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0008] 所述万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物中的万古霉素单克隆抗体是以万古霉素半抗原-载体蛋白作为免疫原制备获得,由万古霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株 E-1-3 CGMCC No. 6234 分泌获得。

[0009] 所述样品吸收垫上粘贴有保护膜,为检测端,上面有 MAX 标记线。

[0010] 所述检测区位于近于有 MAX 标记的保护膜的一端,所述质控区位于远离有 MAX 标记的保护膜的一端。

[0011] 所述底板可为 PVC 底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫可为吸滤纸或滤油纸;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜;所述保护膜为 PE 材质保护膜。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法,其包括步骤:

[0013] 1) 制备冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

[0014] 2) 制备具有包被万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0015] 3) 将 2) 制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸;

[0016] 4) 将 1) 和 3) 制备好的冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试纸条。

[0017] 具体地说,步骤包括:

[0018] 1) 将万古霉素与琥珀酸酐反应,制备万古霉素半抗原;

[0019] 2) 将万古霉素半抗原与载体蛋白偶联,制备万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物;

[0020] 3) 用万古霉素半抗原-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,得到分泌万古霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0021] 4) 提取小鼠 IgG 免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0022] 5) 分别将万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测区(T)和质控区(C);

[0023] 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0024] 7) 将制备的万古霉素单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物;

[0025] 8) 将万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物冻干在微孔试剂中后,将微孔试剂加上微孔塞;

[0026] 9) 将样品吸收垫用含 0.5% 牛血清白蛋白(体积百分含量)、pH 为 7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液浸泡 2h,37℃ 下烘干 2h;

[0027] 10) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、反应膜、吸水垫和保护膜;

[0028] 11) 将制备好的微孔试剂和试纸组装成试纸条,2~8℃ 条件下保存 12 个月。

[0029] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述试纸条检测牛奶中万古霉素残留的方法,它包括步骤:

[0030] (1) 用试纸条进行检测;

[0031] (2) 分析检测结果。

[0032] 本发明试纸条的检测原理：将待检牛奶样本滴加于微孔试剂中，混匀后，孵育 5min，将试纸标有 MAX 标记线端向下，插入孵育后的微孔试剂中，待检样品液与微孔中的金标抗体结合后一起向反应膜扩散；若待检样品液中万古霉素的含量高，则扩散过程中待检样品液中的万古霉素可与金标抗体相结合，进而完全封闭金标抗体上万古霉素的抗原结合点，阻止金标抗体与反应膜上万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物结合，检测区不显色，而抗抗体则可与金标抗体结合，质控区显色；若待检样品液中万古霉素的含量低或无，则金标抗体上的抗原结合位点不能被封闭，进而金标抗体会与反应膜上万古霉素半抗原-载体蛋白偶联抗原结合，检测区显色，同时抗抗体也可与金标抗体结合，质控区显色。如果质控区不显色，则试纸失效。如图 4 所示。

[0033] 阳性：当质控区(C) 显示出红色条带，而检测区(T) 不显色时，判为阳性。

[0034] 阴性：当质控区(C) 显示出红色条带，检测区(T) 同时也显示出红色条带，判为阴性。

[0035] 无效：当质控区(C) 不显示出红色条带，则无论检测区(T) 显示出红色条带与否，该试纸均判为无效。

[0036] 本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。其中，采用高特异性的万古霉素单克隆抗体，保证了检测结果的可靠性；将金标抗体冻干在微孔试剂中，在检测过程中，能够使金标抗体与待检样品液充分接触，充分反应，从而减少误差，增加整个体系的反应灵敏度。用本发明试纸条检测万古霉素的方法，简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0037] 图 1 为试纸剖面结构示意图。

[0038] 图 2 为试纸俯视图。

[0039] 图 3 为微孔试剂图。

[0040] 图 4 为试纸检测结果判定图。

具体实施方式

[0041] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0042] 实施例 1 检测万古霉素的试纸条的构成

[0043] 一、试纸(图 1)

[0044] 所述试纸是由底板、样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜组成；

[0045] 所述样品吸收垫 1、反应膜 2、吸水垫 3 和保护膜 7 依次按顺序粘贴在底板 6 上，样品吸收垫的末端与反应膜相连，反应膜的末端与吸水垫相连，样品吸收垫的始端与底板的始端对齐，吸水垫的末端与底板的末端对齐；

[0046] 所述试纸粘贴有保护膜，保护膜 7 覆盖在样品吸收垫上，为检测端，上面印有 MAX 字样(图 2)；

[0047] 所述反应膜上有检测区 4 和质控区 5，均呈与所述试纸的长相垂直的条带状，检测区位于近于有 MAX 标记的保护膜的一端，质控区位于远离有 MAX 标记的保护膜的一端，检测

区包被有万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物(万古霉素半抗原-卵清蛋白的偶联物),质控区包被有羊抗鼠抗抗体;

[0048] 所述底板为PVC底板;所述样品吸收垫为吸滤纸;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜;所述保护膜为PE材质保护膜。

[0049] 二、微孔试剂(图3)

[0050] 所述微孔试剂8上冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物;所述微孔试剂具有微孔塞9。

[0051] 将上述试纸与微孔试剂组装成试纸条,在2~8℃环境中保存,有效期12个月。

[0052] 实施例2 实施例1中所述试纸条的制备方法

[0053] 一、试纸条的制备

[0054] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0055] 1)制备冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂;

[0056] 2)制备具有包被万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0057] 3)将2)制备好的反应膜与样品吸收垫、吸水垫、保护膜、底板组装成试纸;

[0058] 4)将1)和3)制备好的冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸组装成试纸条。

[0059] 下面分步详细叙述:

[0060] (一)各部件的制备

[0061] 1. 万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0062] 万古霉素是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0063] (1)万古霉素半抗原的制备

[0064] 0.50g 万古霉素、0.40 琥珀酸酐和 2ml 吡啶在 10ml 二甲基亚砜(DMSO)中的混合液,在 80℃下搅拌反应 10h,蒸除溶剂,柱层析后在乙醇-水体系中重结晶得到万古霉素单琥珀酸酰胺,即为万古霉素半抗原。

[0065] (2)免疫原的制备——万古霉素半抗原与牛血清白蛋白偶联物合成

[0066] 取 15mg 半抗原,溶解于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中,取碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺各 30mg 用 0.2ml 水充分溶解后加入半抗原溶液中,室温下搅拌 24h,即可得到反应液 A;称取牛血清白蛋白 50mg,使之充分溶解在 3.8ml PBS (pH 7.2)中,将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌 24h,用 0.01mol/L PBS 4℃透析 3d,每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20℃保存备用。

[0067] (3)包被原的制备——万古霉素半抗原与卵清蛋白偶联物合成

[0068] 取 15mg 半抗原,溶解于 1ml N,N-二甲基甲酰胺中,取碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺各 30mg 用 0.2ml 水充分溶解后加入半抗原溶液中,室温下搅拌 24h,即可得到反应液 A;称取卵清蛋白 50mg,使之充分溶解在 3.8ml PBS (pH 7.2)中,将反应液 A 逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌 24h,用 0.01mol/L PBS 4℃透析 3d,每天换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20℃保存备用。

[0069] (4)万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的鉴定

[0070] 将万古霉素半抗原、载体蛋白、万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物用 pH7.4 的 PBS 配成 0.5mg/ml 的溶液,以 0.01mol/L pH7.4 PBS 调零,用紫外分光光度计在波长 200~800nm 范围内扫描,得到万古霉素半抗原、载体蛋白、万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线。三者出现不同的吸收曲线,表明万古霉素半抗原与载体蛋白偶联成功。

[0071] 2. 万古霉素单克隆抗体的制备

[0072] (1) 动物免疫

[0073] 将步骤 1 得到的免疫原注入 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 150 μ g/只,使其产生抗血清。

[0074] (2) 细胞融合和克隆化

[0075] 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 8:1 (数量配比) 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争 ELISA 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,直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并意外发现,其中一株效价显著高于其它杂交瘤细胞株,将该万古霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株命名为 E-1-3,该细胞株已于 2012 年 6 月 19 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:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所),保藏号为 CGMCC No. 6234。

[0076] (3) 细胞冻存和复苏

[0077] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 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。

[0078] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0079] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在 37℃ 条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃ 保存。

[0080] 所述细胞培养基为向 RPMI1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (质量百分含量),使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量);所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0081] 3. 羊抗鼠抗抗体的制备

[0082] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0083] 4. 万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0084] (1) 胶体金的制备

[0085] 用双蒸去离子水将 1% 氯金酸稀释成 0.01% (质量百分含量),取 100ml 置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入 2.5ml 1% 柠檬酸三钠,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃ 保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0086] (2) 万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0087] 在磁力搅拌下,用 0.2mol/L 碳酸钾溶液调胶体金的 pH 至 7.2,按每毫升胶体金溶液中加入 50~100 μ g 的标准向胶体金溶液中加入上述万古霉素单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置 10min,加入 10% 牛血清白蛋白(BSA),使其在胶体金溶液中的终浓度为 1% (体积百分含量),静置 10min。12000r/min,4℃ 离心 40min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积 1/10 的复溶缓冲液将沉淀重悬,置 4℃ 备用。

[0088] 复溶缓冲液：含牛血清白蛋白 0.1%~0.3%（体积百分含量）、吐温-80 0.05%~0.2%（质量百分含量）、pH7.2 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0089] 5. 将万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物冻干到微孔试剂上

[0090] 向微孔试剂微孔板中加入 100 μ l 万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物，放入冷冻干燥机中，在冷阱温度为 -50℃ 条件下，预冻 3h 后，再真空干燥 15h，即可取出，得到冻干有万古霉素单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂，密封保存。

[0091] 6. 样品吸收垫的制备

[0092] 将样品吸收垫置于含 0.5% 牛血清白蛋白（体积百分含量）、pH7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中浸泡 2h，37℃ 烘 2h 备用。

[0093] 7. 反应膜的制备

[0094] 包被过程：用磷酸缓冲液将万古霉素半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到 10mg/ml，用 Isoflow 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区(T)，包被量为 1.0 μ g/cm²；用 0.01mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠 IgG 抗体稀释到 200 μ g/ml，用 Isoflow 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区(C)，包被量为 1.0 μ g/cm²。将包被好的反应膜置于 37℃ 条件下干燥 2h，备用。

[0095] (二) 各部件的组装

[0096] 1. 试纸的组装

[0097] 将所述样品吸收垫、反应膜、吸水垫、保护膜依次按顺序粘贴在所述底板上；样品吸收垫的末端与反应膜的始端相连，反应膜的末端与吸水垫的始端相连，样品吸收垫的始端与底板的始端对齐，吸水垫的末端与底板的末端对齐；在组装好的试纸上粘贴保护膜，保护膜上印有 MAX 标记线的一端粘贴在样品吸收垫上。

[0098] 2. 试纸条的组装

[0099] 将上述步骤 1 得到的试纸与微孔试剂组装成试纸条，在 2~8℃ 的环境中贮存，有效期 12 个月。

[0100] 实施例 3 牛奶中万古霉素的检测

[0101] 1. 用试纸条检测

[0102] 从原包装（若低温存放需要预先平衡至室温）中取出所需数目的微孔试剂和试纸，并做好标记；吸取待检牛奶溶液，用微量移液器移取 200 μ l 于微孔中，缓慢抽吸且充分与微孔中试剂混匀；室温（20-25℃）孵育 5min 后，将标记好的试纸插入微孔中——印有“MAX”线端朝下，使之充分浸入溶液中；再次室温（20-25℃）孵育 5min，取出试纸，判定结果。

[0103] 3. 检测结果分析

[0104] 阳性：当质控区(C)显示出红色条带，而检测区(T)不显色时，判为阳性，如图 4a 所示；

[0105] 阴性：当质控区(C)显示出红色条带，检测区(T)同时也显示出红色条带，判为阴性，如图 4b 所示；

[0106] 无效：当质控区(C)不显示出红色条带，则无论检测区(T)显示出红色条带与否，该试纸均判为无效，如图 4c、4d 所示。

[0107] 实施例 4 试纸条技术参数的确定

[0108] 1. 灵敏度试验

[0109] 将万古霉素标准品稀释成 25、50、100 $\mu\text{g/L}$, 所用稀释液为 pH7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0110] 用试纸条进行检测, 结果为: 万古霉素标准品浓度为 25 $\mu\text{g/L}$ 时, 试纸上显示出肉眼可见的两条红色条带, 呈阴性; 万古霉素标准品浓度为 50、100 $\mu\text{g/L}$ 时, 试纸质控区显色, 但检测区不显色, 呈阳性, 表明本试纸条检测万古霉素的灵敏度为 50 $\mu\text{g/L}$ 。

[0111] 2. 假阳性率、假阴性率试验

[0112] 取已知万古霉素含量大于 50 $\mu\text{g/L}$ 的牛奶阳性样本 20 份和浓度小于 50 $\mu\text{g/L}$ 的牛奶阴性样本 20 份, 用 3 个批次生产的试纸条分别进行检测, 计算其阴阳性率。结果见表 1、表 2。

[0113] 表 1 检测阳性样本结果

批次	浓度	阳性牛奶样本 (20 份)
[0114]	1	20 份阳性
	2	20 份阳性
	3	20 份阳性

[0115] 表 2 检测阴性样本结果

批次	浓度	阴性牛奶样本 (20 份)
[0116]	1	20 份阴性
	2	20 份阴性
	3	20 份阴性

[0117] 结果表明: 用 3 个批次生产的试纸条检测阳性牛奶样本时, 结果全为阳性, 可知阳性符合率为 100%, 假阴性率为 0; 检测 20 份阴性牛奶样本时, 结果全为阴性, 可知阴性符合率为 100%, 假阳性率为 0。说明本发明的检测万古霉素的试纸条可以对牛奶样本中万古霉素残留进行快速检测。

[0118] 3. 特异性试验

[0119] 本试纸条对万古霉素的检测灵敏度为 50 $\mu\text{g/L}$, 将其他多肽类抗生素的药物(杆菌肽 A、维吉尼霉素、粘杆菌素等)用 pH7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液进行稀释, 用实施例 1 中所述的试纸条进行检测。结果显示, 用该试纸条检测 500 $\mu\text{g/L}$ 杆菌肽 A、维吉尼霉素、粘杆菌素等其他多肽类抗生素时, 试纸质控区和检测区均显色, 说明本试纸条对这些药物无交叉反应。

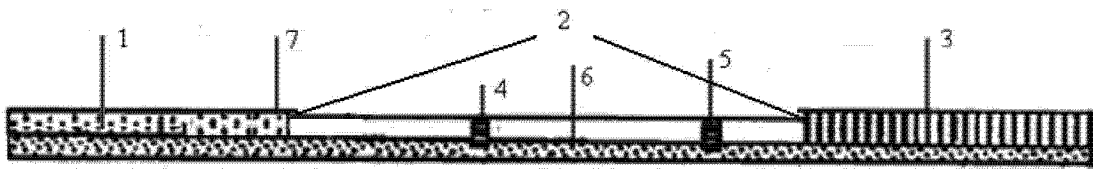


图 1

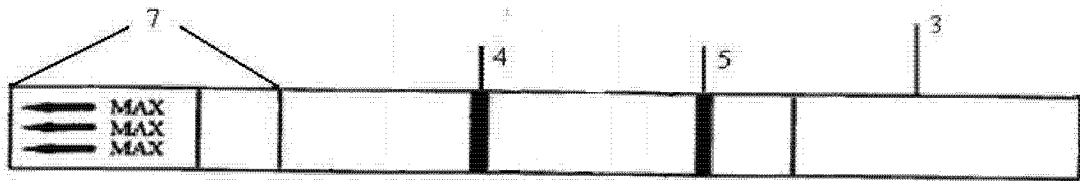


图 2

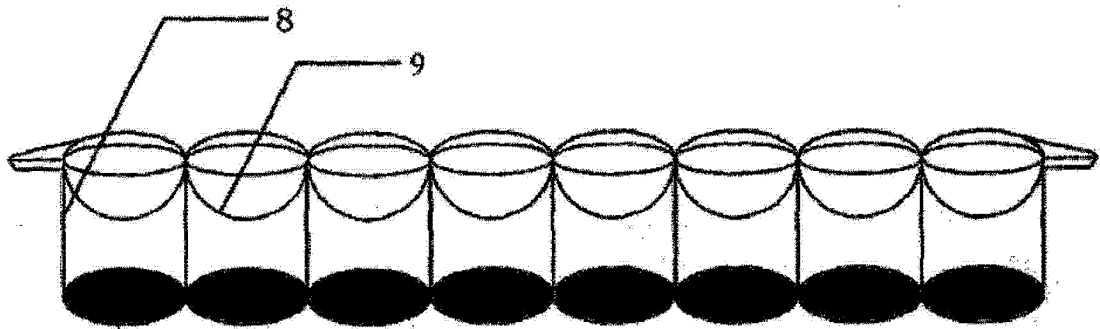


图 3

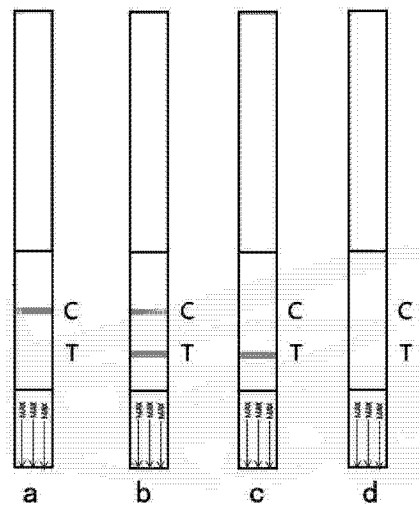


图 4