



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101710124 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200910200078.7

(22) 申请日 2009.12.08

(71) 申请人 上海海洋大学

地址 201306 上海市浦东新区临港新城沪城环路 999 号

(72) 发明人 杨先乐 黄宣运 胡鲲 姜有声
喻文娟 陈力 付乔芳

(74) 专利代理机构 上海智力专利商标事务所
31105

代理人 瞿承达 罗芳英

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/113(2006.01)

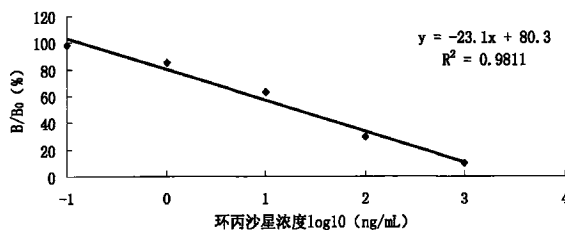
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒,该试剂盒主要包括:包被有环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物(CIP-OVA)的酶标板、环丙沙星单克隆抗体、环丙沙星(CIP)标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、洗液、终止液。本发明还公开了一种利用上述试剂盒检测水产品中环丙沙星残留的方法,它包括以下步骤:首先对样品进行前处理,然后利用试剂盒检测,最后分析实验结果。本发明提供的试剂盒操作简便、灵敏度高、特异性强,适合大规模的样品检测。



1. 一种用于检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒,其特征在于它包括下列组分:

- (1) 包被有环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物(CIP-OVA)的酶标板;
- (2) 环丙沙星单克隆抗体;
- (3) 环丙沙星(CIP)标准品溶液;
- (4) 酶标二抗;
- (5) 底物显色液;
- (6) 洗液;
- (7) 终止液。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述包被酶标板的包被原CIP-OVA,为环丙沙星与鸡卵血清白蛋白偶联物,其制备过程如下:

(1) 先将鸡卵血清白蛋白水溶液、环丙沙星水溶液、1-乙基-(3-甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐水溶液以摩尔比为1:340:7043混合,在室温下反应2小时;

(2) 将反应后的液体装入透析袋内,再放入1L磷酸缓冲液中透析48小时,每24小时换液一次;所述的磷酸缓冲液pH为5.0,浓度为0.01mol/L;所述的透析袋半周长为22mm,截留分子量为14000;

(3) 收集透析袋内的液体,在-20℃预冷冻2小时,然后在-50℃下冷冻干燥,制成环丙沙星包被原白色固体粉末。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的环丙沙星单克隆抗体是由杂交瘤细胞株JY-1(CCTCC NO. C200947)分泌获得。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的环丙沙星(CIP)标准品溶液的浓度为:0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1000ng/mL。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的底物显色液包括0.03%过氧化氢,1.5mg/mL的四甲基联苯胺和pH5.3的醋酸钠缓冲液。

6. 一种应用如权利要求1至5中任一所述的酶联免疫试剂盒检测水产品中环丙沙星残留的免疫学方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 样品前处理:取均质过的样品,加入乙腈作为提取液,捣碎匀浆,振荡离心后取上清液;往残渣中加入提取溶剂乙腈,重复上述操作1次,合并上清液,取一定量的上清液做分析;

(2) 样品检测:将处理过的样品上清液和环丙沙星标准溶液分别加入酶标板,同时加入权利要求3所述的环丙沙星单克隆抗体标准溶液;温育后洗涤拍干,加入酶标二抗;温育后洗涤拍干,加入显色液;温育后加入终止液,用酶标仪测定吸光度值;

(3) 结果分析:以标准溶液的抑制率 B/B_0 为纵坐标,以不同浓度环丙沙星的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,根据标准曲线计算得出样品中的环丙沙星浓度。

一种检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明属于生物工程技术领域，涉及一种检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒。

背景技术：

[0002] 环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP) 又称环丙氟哌酸，是第三代氟喹诺酮类药物。该药杀菌能力强、抗菌谱广曾被普遍的应用在水产动物的疾病治疗中。然而人类长期食用含环丙沙星残留的水产品会对健康造成损害，引发食源性疾病。目前，环丙沙星已经被欧盟、中国等列为水产养殖禁用药物。

[0003] 目前，环丙沙星的检测方法主要包括微生物法、高效液相色谱法、毛细管电泳法等。这些检测方法不仅需要以实验室平台为依托，还需要有专门的实验人员进行操作。其中微生物法虽然要求不高，但是检测的灵敏度达不到国家标准。高效液相色谱法、毛细管电泳法虽然灵敏度高，能够进行大规模检测，但是所花费的时间长、购买仪器的费用也非常的高一般在 30 万元以上。酶联免疫竞争法 (ELISA) 具有灵敏度高、操作简单、成本低、检测速度快等特点，因此利用酶联免疫竞争法 (ELISA) 建立灵敏度高、操作简单、能快速检测水产品中环丙沙星的试剂盒将有着十分广泛的应用前景。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种操作简单、价格低廉、灵敏快速的用于检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明的酶联免疫试剂盒包括：包被有环丙沙星 - 鸡卵血清白蛋白偶联物 (CIP-OVA) 的酶标板、环丙沙星单克隆抗体、环丙沙星 (CIP) 标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、洗液、终止液。

[0006] 所述包被酶标板的包被原 CIP-OVA，为环丙沙星与鸡卵血清白蛋白偶联物，制备过程如下：

[0007] (1) 先将鸡卵血清白蛋白水溶液、环丙沙星水溶液、1- 乙基 - (3- 甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐水溶液以摩尔比为 1 : 340 : 7043 混合，在室温下反应 2 小时；

[0008] (2) 将反应后的液体装入透析袋内，再放入 1L 磷酸缓冲液中透析 48 小时，每 24 小时换液一次；所述的磷酸缓冲液 pH 为 5.0，浓度为 0.01mol/L；所述的透析袋半周长为 22mm，截留分子量为 14000；

[0009] (3) 收集透析袋内的液体，在 -20℃ 预冷冻 2 小时，然后在 -50℃ 下冷冻干燥，制成环丙沙星包被原白色固体粉末。

[0010] 其中所述包被有环丙沙星 - 鸡卵血清白蛋白偶联物的酶标板，是将环丙沙星 - 鸡卵血清白蛋白偶联物用包被缓冲液 (pH9.6, 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液) 稀释到一定浓度后，加入酶标板 37℃, 1h, 再用 PBST (0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液加入 0.5% 的吐温 20) 洗涤，最后加入 1% 牛血清白蛋白溶液封闭过夜制得。

[0011] 其中所述的环丙沙星单克隆抗体是由杂交瘤细胞株 JY-1 (CCTCC NO. C200947) 分泌获得。

[0012] 所述的环丙沙星 (CIP) 标准品溶液的浓度为 :0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1000ng/mL。

[0013] 所述的底物显色液包括 0.03% 过氧化氢, 1.5mg/mL 的四甲基联苯胺和 pH5.3 的醋酸钠缓冲液。

[0014] 其中所述的洗液为含有 0.5% 吐温 20 的磷酸缓冲液。

[0015] 其中所述的终止液为 2mol/L 的硫酸。

[0016] 所述的酶联免疫试剂盒检测水产品中环丙沙星残留的免疫学方法, 其特征在于包括以下步骤:

[0017] (1) 样品前处理: 取均质过的样品, 加入乙腈作为提取液, 捣碎匀浆, 振荡离心后取上清液; 往残渣中加入提取溶剂乙腈, 重复上述操作 1 次, 合并上清液, 取一定量的上清液做分析;

[0018] (2) 样品检测: 将处理过的样品上清液和环丙沙星标准溶液分别加入酶标板, 同时加入权利要求 3 所述的环丙沙星单克隆抗体标准溶液; 温育后洗涤拍干, 加入酶标抗体; 温育后洗涤拍干, 加入显色液; 温育后加入终止液, 用酶标仪测定吸光度值;

[0019] (3) 结果分析: 以标准溶液的抑制率 B/B_0 为纵坐标, 以不同浓度环丙沙星的对数值为横坐标, 绘制标准抑制曲线, 根据标准曲线计算得出样品中的环丙沙星浓度。

[0020] 本发明的又一目的是提供一种能够用于检测水产品中环丙沙星残留的免疫学方法, 它包括以下步骤:

[0021] 1、样品前处理;

[0022] 2、样品检测;

[0023] 3、结果分析。

[0024] (1) 样品前处理 (鲫鱼、鲈鱼、鲑鱼、螃蟹、罗氏沼虾):

[0025] 取均质过的样品, 加入乙腈作为提取液, 高速组织捣碎机匀浆, 充分振荡离心后取上清液。往残渣中加入提取溶剂, 重复上述操作 1 次, 合并上清液, 取一定量的上清液做分析。

[0026] (2) 样品检测:

[0027] 将处理过的样品上清液和环丙沙星标准溶液分别加入酶标板, 同时加入环丙沙星单克隆抗体标准溶液; 温育后洗涤拍干, 加入酶标抗体; 温育后洗涤拍干, 加入显色液; 温育后加入终止液, 用酶标仪测定吸光度值。

[0028] (3) 结果分析:

[0029] 以标准溶液的抑制率 B/B_0 为纵坐标 (B 是环丙沙星不同标准浓度的 OD_{450} 值, B_0 是环丙沙星浓度为 0 时的 OD_{450} 值), 以不同浓度环丙沙星的对数值为横坐标, 绘制标准抑制曲线, 样品中的环丙沙星浓度可以根据标准曲线计算得出。

[0030] 本发明具有以下优点:

[0031] (1) 本发明的试剂盒灵敏度高, 最低检测限能够达到 1.02ng/mL, 与以往试剂盒比较灵敏度提高 1-10 倍。

[0032] (2) 本发明的试剂盒特异性强, 仅有恩诺沙星存在交叉反应, 对其它氟喹诺酮类药

物不存在交叉反应。

[0033] (3) 本发明的试剂盒所使用的单克隆抗体能够稀释 30000-200000 倍使用,与以往试剂盒所使用单克隆抗体的稀释倍数比较,提高了 10 倍以上,从而节约了成本。

[0034] (4) 本发明中的前处理方法,操作简单易于实施。

附图说明:

[0035] 图 1 为环丙沙星偶联物紫外扫描图。

[0036] 图 2 为试剂盒标准抑制曲线。

具体实施方式

[0037] (1) 本发明所用试剂:环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、培氟沙星,含量 $\geq 98.5\%$,购自浙江国邦药业有限公司;牛血清蛋白(BSA)、鸡卵血清白蛋白(OVA)、酶标板、HRP 羊抗鼠抗抗体、四甲基联苯胺、吐温 20 购于鼎国生物公司;乙基碳二亚胺(EDC),纯度 $\geq 99.3\%$,购自上海延长生化科技发展有限公司;1640 培养基(购自 GIBCO 公司);胎牛血清(购自 HYCLONE 公司);HAT(购自 GIBCO 公司);小牛血清(购自 HYCLONE 公司);二甲亚砷(购自 SIGMA 公司),其它化学试剂购于上海国药有限公司。

[0038] (2) Balb/c 小鼠,购自上海实验动物中心;SP2/0 骨髓瘤细胞,购自中科院细胞库。

[0039] 实施例一:免疫原——环丙沙星与牛血清白蛋白偶联物(CIP-BSA)的制备

[0040] 1、称取 8.5g 的氯化钠、2.85g 磷酸氢二钠、0.2g 氯化钾,0.27g 磷酸二氢钾加入 950mL 的蒸馏水,滴加盐酸调节 pH(酸碱度)至 5.0,再加入 50mL 的蒸馏水,配置成 1000mL,浓度为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液。

[0041] 2、称取 40mg 的牛血清白蛋白加入 5mL 的磷酸缓冲液(pH 为 5.0,含量为 0.01mol/L)制成 8mg/mL(0.12 μ mol/L)的牛血清白蛋白水溶液。

[0042] 3、称取 100mg 的环丙沙星加入 5mL 的磷酸缓冲液(pH 为 5.0,含量为 0.01mol/L)制成 20mg/mL(60.4 μ mol/L)的环丙沙星水溶液。

[0043] 4、称取 960mg 碳二亚胺加入 4mL 磷酸缓冲液(pH 为 5.0,含量为 0.01mol/L)制成 240mg/mL(1251.9 μ mol/L)的水溶液。

[0044] 5、在 1.5mL 的离心管中分别加入 8mg/mL(0.12 μ mol/L)的牛血清白蛋白水溶液、20mg/mL(60.4 μ mol/L)的环丙沙星水溶液、240mg/mL(1251.9 μ mol/L)的碳二亚胺水溶液各 0.25mL,再加入 0.25mL 的磷酸缓冲液(pH 为 5.0,含量为 0.01mol/L),在室温下反应 2 小时。

[0045] 6、将反应好的液体加入透析袋(半周长 22mm,截留分子量 14000)中再放入装有 1L 磷酸缓冲液(pH 为 5.0,含量为 0.01mol/L)的烧杯中,透析 48 小时,每 24 小时换液一次。

[0046] 7、将透析好的液体,在 -20°C 预冷冻 2 小时,然后在 -50°C 下冷冻干燥,制成免疫原白色固体粉末。

[0047] 实施例二:包被原——环丙沙星与鸡卵血清白蛋白偶联物(CIP-OVA)的制备

[0048] 1、称取 8.5g 的氯化钠、2.85g 磷酸氢二钠、0.2g 氯化钾,0.27g 磷酸二氢钾加入 950mL 的蒸馏水,滴加盐酸调节 pH(酸碱度)至 5.0,再加入 50mL 的蒸馏水,配置成 1000mL,浓度为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液。

[0049] 2、称取 40mg 的鸡卵血清白蛋白加入 5mL 的磷酸缓冲液 (pH 为 5.0, 含量为 0.01mol/L) 制成 8mg/mL (0.178 μ mol/L) 的鸡卵血清白蛋白水溶液。

[0050] 3、称取 100mg 的环丙沙星加入 5mL 的磷酸缓冲液 (pH 为 5.0, 含量为 0.01mol/L) 制成 20mg/mL (60.4 μ mol/L) 的环丙沙星水溶液。

[0051] 4、称取 960mg 碳二亚胺加入 4mL 磷酸缓冲液 (pH 为 5.0, 含量为 0.01mol/L) 制成 240mg/mL (1251.9 μ mol/L) 的水溶液。

[0052] 5、在 1.5mL 的离心管中分别加入 8mg/mL (0.178 μ mol/L) 的鸡卵血清白蛋白水溶液、20mg/mL (60.4 μ mol/L) 的环丙沙星水溶液、240mg/mL (1251.9 μ mol/L) 的碳二亚胺水溶液各 0.25mL, 再加入 0.25mL 的磷酸缓冲液 (pH 为 5.0, 含量为 0.01mol/L), 在室温下反应 2 小时。

[0053] 6、将反应好的液体加入透析袋 (半周长 22mm, 截留分子量 14000) 中再放入装有 1L 磷酸缓冲液 (pH 为 5.0, 含量为 0.01mol/L) 的烧杯中, 透析 48 小时, 每 24 小时换液一次。

[0054] 7、将透析好的液体, 在 -20°C 预冷冻 2 小时, 然后在 -50°C 下冷冻干燥, 制成包被原白色固体粉末。

[0055] 实施例三: 环丙沙星单克隆抗体的制备

[0056] 一、免疫

[0057] 将环丙沙星 - 牛血清白蛋白粉末用磷酸缓冲液 (pH 为 5.0, 含量为 0.01mol/L) 稀释成为 2mg/mL 免疫原溶液, 取 100 μ L 免疫原溶液 (2mg/mL) 加入 100 μ L 福氏完全佐剂, 充分混匀后, 取 4 周龄的 Balb/c 小鼠, 采用腹部注射, 进行免疫。

[0058] 免疫两周后, 取 100 μ L 免疫原溶液 (2mg/mL) 加入 100 μ L 福氏不完全佐剂, 充分混匀后, 采用腹部注射, 进行免疫。

[0059] 一周后, 取 100 μ L 免疫原溶液 (2mg/mL) 进行尾静脉加强免疫。

[0060] 十天后, 取 50 μ L 免疫原溶液 (2mg/mL) 进行尾静脉注射, 进行加强免疫。

[0061] 二、细胞融合及筛选

[0062] 1、骨髓瘤细胞的复苏及培养:

[0063] 融合前 10 天, 将冷冻的 SP2/0 骨髓瘤细胞从 -70°C 冰箱中取出, 立即放入 37°C 水浴融化, 1000 转 / 分钟离心 3 分钟, 加入 1640 (含 10% 胎牛血清) 培养液, 置 4.5% CO_2 培养箱内培养。处于对数生长期的瘤细胞浑圆, 透亮, 大小均一, 排列整齐, 呈半致密分布, 取处于对数生长期的骨髓瘤细胞供细胞融合用。

[0064] 2、融合:

[0065] (1) 在 Balb/c 小鼠最后一次免疫的第三天, 无菌取脾脏过 100 目网筛, 用 RPMI1640(-) 吹下形成单细胞悬液, 用于细胞融合。

[0066] (2) Balb/c 小鼠, 无菌取出胸腺后, 过 100 目网筛, 用 RPMI1640(-) 吹下形成单细胞悬液。

[0067] (3) 将脾细胞悬液和胸腺细胞悬液分别离心 3 分钟, 1000 转 / 分钟, 弃去上清液, 脾细胞沉淀用预热到 37°C 的 RPMI1640(-) 重悬, 胸腺细胞沉淀用少量预热到 37°C 的含 1% HAT 的 1640 (含 10% 胎牛血清) 选择性细胞培养液重悬。

[0068] (4) 取 3×10^7 个处于对数生长期的骨髓瘤细胞, 1000 转 / 分钟离心 3 分钟, 去上清液后, 沉淀用 RPMI1640(-) 重悬。

[0069] (5) 将脾细胞悬液与瘤细胞悬液混合均匀后,1000 转 / 分钟离心 3 分钟,完全吸去上清液,轻弹离心管底,使两种细胞沉淀充分混匀。

[0070] (6) 将离心管置于 37℃ 水浴中预热的盛水烧杯中,用吸管吸已经预热到 37℃ 的聚乙二醇溶液 1mL,将管尖插入管底,轻轻搅动细胞沉淀,并缓缓滴加聚乙二醇,在 1 分钟内加完。然后在 37℃ 水浴中静置 5 分钟。

[0071] (7) 滴加已经预热到 37℃ 的 RPMI1640(-) 液 40mL,前缓后快,然后 1000 转 / 分钟离心 5 分钟,弃去上清液。

[0072] (8) 将细胞沉淀用 3mL 预热到 37℃ 的 1640(含 10% 胎牛血清) 细胞培养液重悬,取 2mL 冻存于 -70℃ (9 份 1640(含 10% 胎牛血清)+1 份二甲亚砷),余细胞悬液里补加含有 1% HAT 的 1640(含 10% 胎牛血清) 选择性细胞培养液和小鼠胸腺细胞 40mL,混合均匀后每孔 100 μ L 滴加到 4 个 96 孔板内。培养于 CO₂ 浓度为 4.5% 和 37℃ 恒温恒湿条件下的 CO₂ 培养箱中。

[0073] (9) 细胞融合 2 周后,杂交瘤细胞群落长到占 96 孔培养板的孔底 1/3 时开始用间接酶联免疫法检测。选取阳性值大于阴性值 2 倍,且阳性值大于 0.5 以上的细胞孔进行克隆,采用有限稀释法对检测出的阳性杂交瘤细胞进行克隆,直到获得稳定分泌环丙沙星单克隆抗体的细胞株。选取其中一株细胞株命名为 JY-1 保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号:CCTCCNO. 200947。

[0074] 三、单克隆抗体的产生与纯化(原腹水制备)

[0075] 取 7 周的 Ba1b/c 小鼠,每只注射 0.5mL 的降植烷。一周后腹腔接种用无血清培养基稀释处于对数生长期的杂交瘤细胞,每只注射细胞数为 5×10^6 个,间隔 4 天后,观察小鼠腹水情况,待小鼠腹部膨大,精神变差,濒临死亡时,采集腹水。将腹水离心,取上清液,测定效价,分装保存在 -70℃。用硫酸铵沉淀法进行纯化,得到环丙沙星单克隆抗体。

[0076] 实施例四:检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒的组装

[0077] 1、试剂盒试剂的配制

[0078] (1) 磷酸缓冲液(PBS) 缓冲液:称取 8.5g 的氯化钠、2.85g 磷酸氢二钠、0.2g 氯化钾,0.27g 磷酸二氢钾加入 950mL 的蒸馏水,滴加盐酸调节 pH(酸碱度)至 7.4,再加入 50mL 的蒸馏水,配置成 1000mL,浓度为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液。

[0079] (2) 抗原包被液(CBS) 碳酸盐缓冲液:称取 1.59g 的碳酸钠,2.93g 的磷酸氢钠,加入蒸馏水 950mL,调节 pH(酸碱度)至 9.6 加蒸馏水至 1000mL。4 度保存。

[0080] (3) 封闭液:称取 1g 牛血清白蛋白,溶解于 100mL 的 PBS 中,混匀 4℃ 保存备用。

[0081] (4) 洗涤液:将 0.5mL 吐温 20 加入 1L 的 PBS 中,混匀,室温保存备用。

[0082] (5) 显色液:①四甲基联苯胺(TMB) 贮存液:称 150mg 的 TMB 粉末,加入 100mL 的二甲基亚砷配成 1.5mg/mL 的 TMB 贮存液,-20℃ 分装保存。②醋酸钠(NaAc) 缓冲液:称取 16.4g 的醋酸钠加入 950mL 的蒸馏水,用醋酸调节 pH 至 5.3,加蒸馏水至 1000mL。③0.03% 双氧水:吸取 1mL 的 30% 的双氧水加入 1L 的蒸馏水。④使用时显色液配方:TMB 贮存液:醋酸钠缓冲液:0.03% 双氧水的体积比为 1 : 4 : 5。

[0083] (6) 终止液(2M 硫酸):将 100mL 浓硫酸缓慢加入 900mL 蒸馏水中,室温保存备用。

[0084] 2、包被有环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物的酶标板的制备

[0085] (1) 将环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物用包被碳酸盐缓冲液稀释到 100ng/mL。

[0086] (2) 将稀释后的环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物加入酶标板(100 μ L/孔)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后,倒去包被液并用洗涤液洗涤 3 次,每次 3min,最后加入封闭液(200 μ L/孔)封闭过夜。

[0087] (3) 倒去封闭液并用洗液洗涤 3 次,每次 3min,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0088] 3、组建的环丙沙星检测试剂盒由下述部分组成:

[0089] (1) 包被有环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物的酶标板;

[0090] (2) 环丙沙星单克隆抗体;

[0091] (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0092] (4) 环丙沙星标准品溶液 5 瓶,浓度分别为:0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1000ng/mL;

[0093] (5) 显色 A 液:0.03%过氧化氢,显色 B 液:1.5mg/mL 的四甲基联苯胺,显色 C 液:醋酸钠缓冲液;

[0094] (6) 洗涤液;

[0095] (7) 终止液。

[0096] 实施例五:样品中环丙沙星残留的检测

[0097] 1、样品前处理(鲫鱼、鲈鱼、鲑鱼、螃蟹、罗氏沼虾)

[0098] 取 5g 的样品,加入 30mL 的乙腈作为提取液,高速组织捣碎机匀浆,充分振荡 15min,4500r/min 离心 15min,取上清液。往残渣中加入提取溶剂 30mL,重复上述操作 1 次,合并上清液,取 50 μ L 做分析。

[0099] 2、用试剂盒检测

[0100] (1) 取 50 μ L 的样品和 50 μ L 的标准品溶液分别加入包被有环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物的酶标板中,然后加入环丙沙星单克隆抗体工作液 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0101] (2) 倒出孔中液体,加入洗液(200 μ L/孔)洗涤 3 次,每次 3min,拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 小时。

[0102] (3) 倒出孔中液体,加入洗液(200 μ L/孔)洗涤 3 次,每次 3min,拍干。每孔加入显色 A 液 50 μ L,显色 B 液 10 μ L,显色 C 液 40 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟。

[0103] (4) 每孔加入 50 μ L 终止液,用酶标仪在 450nm 处读数(OD)。

[0104] 结果分析:以标准溶液的抑制率 B/B_0 为纵坐标(B 是环丙沙星不同标准浓度的 OD_{450} 值, B_0 是环丙沙星浓度为 0 时的 OD_{450} 值),以不同浓度环丙沙星的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线。样品中的环丙沙星浓度可以根据标准曲线计算得出。

[0105] 根据酶标板上的样品颜色的深浅,与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中环丙沙星的浓度范围。

[0106] 实施例六:特性鉴定

[0107] 为了验证本发明的有效性,进行了以下测定。

[0108] 一、免疫原、包被原的偶联鉴定

[0109] 通过紫外分光光度法对免疫原(CIP-BSA)及包被原(CIP-OVA)进行鉴定。

[0110] 在 250nm-350nm 间对 CIP、BSA、CIP-BSA、OVA、CIP-OVA 进行紫外扫描。结果发现 CIP 的峰值在 270nm,BSA 的峰值在 279nm,CIP-BSA 的峰值出现在 275nm,OVA 的峰值出现在 278nm,CIP-OVA 的峰值出现在 274nm,通过对比发现偶联物的峰值发生了迁移,从而证明了

偶联的成功。见图 1 为环丙沙星偶联物紫外扫描图。

[0111] 二、试剂盒竞争抑制曲线测定

[0112] 将环丙沙星标准品 (0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、100ng/mL、1000ng/mL) 和环丙沙星单克隆抗体工作液各 50 μ L 加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时, 洗板三次。加入酶标二抗 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 0.5 小时, 洗板三次。加入显色液, 显色 10 分钟, 酶标仪 $D_{450\text{nm}}$ 读数。

[0113] 结果见图 2, 得到线性方程为 $y = -23.1x + 80.3$, $R_2 = 0.9811$ 。通过计算得到的最低检测限为 1.02ng/mL。

[0114] 三、试剂盒特异性鉴定

[0115] 系列稀释环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、培氟沙星, 检测试剂盒的特异性。

[0116] 在试剂盒中加入检测药物、环丙沙星单克隆抗体工作液各 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时, 洗板三次。加入酶标二抗 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 0.5 小时, 洗板三次。加入显色液, 显色 10 分钟, 加入浓硫酸终止反应, 酶标仪 $D_{450\text{nm}}$ 读数。分别作抑制曲线, 根据拟合曲线计算半数抑制浓度。依据公式计算:

[0117] 交叉反应率 = IC_{50} 环丙沙星 / IC_{50} 被测组药物 $\times 100\%$

[0118] 结果表明: 恩诺沙星与环丙沙星存在 90% 的交叉反应, 而诺氟沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、培氟沙星与环丙沙星均无交叉反应。

[0119] 表 1 与其它药物的交叉反应表

[0120]

药物	交叉反应率 (%)
恩诺沙星	90
诺氟沙星	<0.01
氧氟沙星	<0.01
沙拉沙星	<0.01
培氟沙星	<0.01

[0121] 四、试剂盒的准确度实验

[0122] 取两个浓度的环丙沙星标准样, 对样品进行添加回收试验, 每个浓度做 4 个平行, 分别计算回收率。

[0123] 表 2 试剂盒回收率测定

[0124]

样品		鲫鱼		虾	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	50	10	50
回收率 (%)	1	86.9	98.3	87.3	97.4
	2	92.1	86.3	95.2	117.5
	3	103.3	97.3	86.2	104.5
	4	93.5	96.3	94.8	112.2
平均值		93.95	94.55	90.88	107.9

[0125] 结果表明:鲫鱼肌肉样品的添加回收率为 86.3%~103.3%,虾肌肉样品的添加回收率为 86.2%~117.5%。

[0126] 五、试剂盒精密度试验

[0127] 从 4 批试剂盒中各取 10 个试剂盒,每个试剂盒抽取 20 个微孔,测定 10ng/mL 标准溶液的吸光度值 (OD 值),计算变异系数。测定结果见表 3

[0128] 表 3 试剂盒精密度试验

[0129]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	02 批	5.3	6.8	7.2	9.3	8.1	9.2	6.3	6.7	8.2	6.2
	04 批	9.4	9.8	5.6	8.7	7.9	8.5	5.6	6.4	7.0	7.5
	07 批	6.8	7.3	5.3	8.2	6.4	7.5	4.7	7.4	7.6	8.3
	09 批	7.2	6.5	4.9	8.4	7.5	7.1	5.8	8.3	7.3	6.8

[0130] 结果测定范围在 4.7~9.8%之间,确定精密度的变异性系数范围 $\leq 10\%$ 。

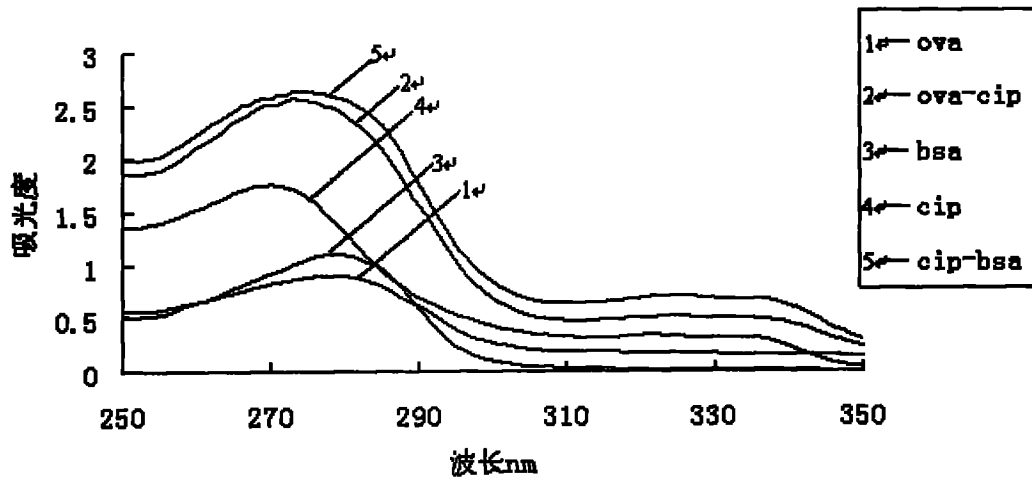


图 1

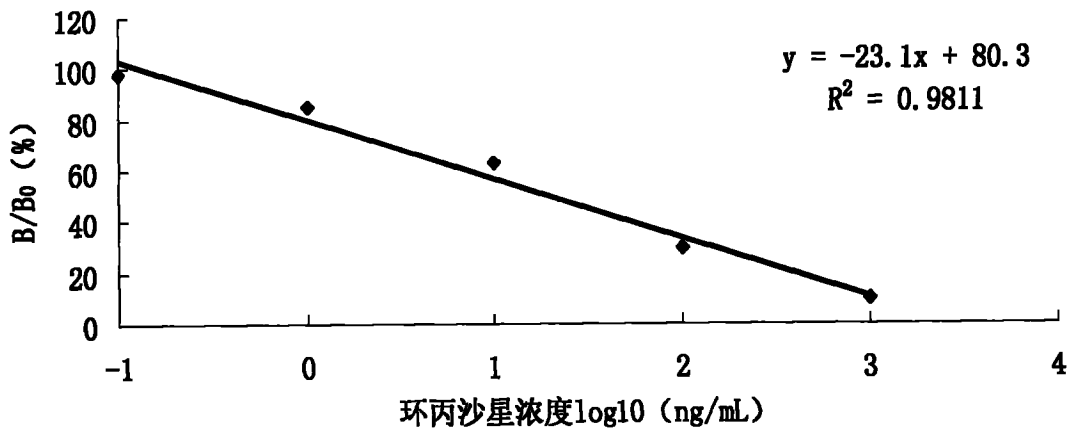


图 2

专利名称(译)	一种检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101710124A	公开(公告)日	2010-05-19
申请号	CN200910200078.7	申请日	2009-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
[标]发明人	杨先乐 黄宣运 胡鲲 姜有声 喻文娟 陈力 付乔芳		
发明人	杨先乐 黄宣运 胡鲲 姜有声 喻文娟 陈力 付乔芳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 C07K14/765 C07K1/113		
代理人(译)	罗芳英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测水产品中环丙沙星残留的酶联免疫试剂盒，该试剂盒主要包括：包被有环丙沙星-鸡卵血清白蛋白偶联物(CIP-OVA)的酶标板、环丙沙星单克隆抗体、环丙沙星(CIP)标准品溶液、酶标二抗、底物显色液、洗液、终止液。本发明还公开了一种利用上述试剂盒检测水产品中环丙沙星残留的方法，它包括以下步骤：首先对样品进行前处理，然后利用试剂盒检测，最后分析实验结果。本发明提供的试剂盒操作简便、灵敏度高、特异性强，适合大规模的样品检测。

