

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103439503 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201310333735. 1

(22) 申请日 2013. 08. 03

(71) 申请人 河南省农业科学院

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路  
116 号

(72) 发明人 邓瑞广 张改平 胡晓飞 柴书军  
杨继飞 贾国超

(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 33/535(2006. 01)

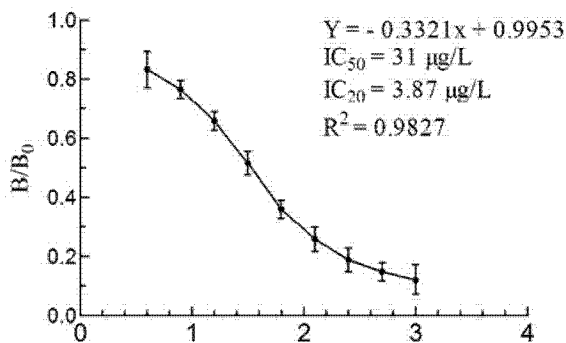
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

司帕沙星的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

(57) 摘要

本发明公开一种检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒,包括盒体,盒体内设有司帕沙星特异性抗体、司帕沙星与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被司帕沙星抗原或特异性抗体的酶标板、司帕沙星标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液;司帕沙星特异性抗体为司帕沙星的单克隆抗体。本发明的司帕沙星酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便、价格低廉;检测时对样品的前处理要求低且处理过程简单,能同时快速用于大批样品的筛查;与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。



1. 一种检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒,包括盒体,其特征在于:盒体内设有司帕沙星特异性抗体、司帕沙星与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被司帕沙星抗原或特异性抗体的酶标板、司帕沙星标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液;所述司帕沙星特异性抗体为司帕沙星的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔铜蓝蛋白; 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶或羊抗鼠 IgG 抗体。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述的洗涤液为含有 0.05%-0.5% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液,所述终止液为 2mol/L 的盐酸。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述的底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成,显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

5. 根据权利要求1-4 任一项所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述试剂盒还包括浓缩样品稀释液,浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;

用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

6. 根据权利要求1-4 任一项所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述司帕沙星与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的:

(1)称取 3mg 的司帕沙星、3mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 3mg 的 N, N- 二环己基碳二亚胺溶于 1mL DMF 溶剂中,室温下反应 3 小时,得到 A 液;

(2)称取 5.1 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL、0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液;

(3)在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃ 反应过夜;

(4)反应液用 PBS 透析 3 天,换液 3 次/天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到司帕沙星与载体蛋白的偶联物,贮藏于 -20℃,备用。

7. 根据权利要求1-4 任一项所述的酶联免疫试剂盒,其特征是:所述司帕沙星的单克隆抗体是由以下方法制备的:

(1)免疫 以 SPFX-BSA 为免疫原,取 SPF 级 6-7 周龄 BALB/c 雌性小鼠进行免疫,每只 200μL,初次每只免疫剂量为 30μg,其后 3 次的免疫剂量均为 50μg/只;采用背部皮下 4-6 点注射,初免用 SPFX-BSA 的 PBS 溶液与等体积 FCA 混合乳化后免疫;20d 后用 SPFX-BSA 的 PBS 溶液与等体积 FIA 混合乳化后加强免疫,免疫间隔 3 周,第五次免疫后进行细胞融合;

(2)细胞融合 将 NS0 骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:5 的比例在 PEG 的作用下融合,然后置于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,5 天后用 HT 培养基半量换液,8 天后检测细胞上清,筛选阳性孔;

(3)杂交瘤细胞的筛选 细胞融合后,取各孔细胞上清,用 PBS 稀释 5 倍后用间接 ELISA 测定效价,用小鼠血清作阳性对照,挑选阳性孔,使用间接竞争 ELISA 法测定敏感性,选取效价高于或等于对照孔的细胞孔,转入 24 孔细胞板中进行扩大培养,待细胞长至底部一半以上时,再次测定效价和敏感性,进行敏感性测定,选取敏感性最高的孔进行亚克隆;

(4)单克隆抗体的制备 将 BALB/C 小鼠腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量 300 ~ 500μL,将筛选出的单克隆细胞株转入细胞培养瓶中进行扩大培养,待细胞保持对数增长的时候用无血清培养基稀释,将  $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^7$  个克隆化的阳性细胞注入小鼠体内,

观察小鼠腹水生产情况,当小鼠腹部出现明显肿大且腹部皮肤紧绷时即可采集腹水,然后3000r/min离心5min,吸取上清除去细胞及杂质,得到司帕沙星的单克隆抗体。

8. 一种权利要求1的检测司帕沙星酶联免疫试剂盒的组建方法,其特征在于:该方法包括盒体内的司帕沙星单克隆抗体的制备;司帕沙星与载体蛋白偶联物的制备;

所述司帕沙星与载体蛋白偶联物的制备方法如下:

(1)称取2mg的司帕沙星、2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和2mg的N,N-二环己基碳二亚胺溶于1mL DMF溶剂中,室温下反应3小时,得到A液;

(2)称取5.1 mg的牛血清白蛋白溶于2mL、0.01 mol/L pH 7.4的PBS缓冲液中,得到B液;

(3)在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

(4)反应液用PBS透析3天,换液3次/天;透析完成后,4000r/min离心5min,取上清液,得到司帕沙星与载体蛋白的偶联物,贮藏于-20℃,备用。

9. 一种检测样品中司帕沙星含量的方法,包括步骤:

(1)样品前处理;

(2)用权利要求1-7任一项所述的试剂盒进行检测,向包被有司帕沙星抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入司帕沙星单克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测吸光度值;

(3)分析检测结果。

## 司帕沙星的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到酶联免疫和食品添加剂残留检测领域。特别是涉及一种用于食品中司帕沙星残留检测的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法。

### 背景技术

[0002] 司帕沙星(Sparfloxacin, SPFX), 分子式  $C_{19}H_{22}F_2N_4O_3$ ; 相对分子质量 392.41; 熔点 137-141℃; 外观为黄色结晶或结晶性粉末; 脂溶性, 略溶于冰醋酸、氯仿, 微溶于甲醇、乙醇, 几乎不溶于乙醚和水; 对光、热稳定。SPFX 在我国被广泛应用于畜牧、水产养殖、兽医等行业, 但其有一定的毒副作用, 主要包括胃肠道反应、中枢神经毒性和光毒性等。近年来, 由于使用不当导致的动物性食品药物残留和耐药性问题, 以及水、土壤污染环境等问题已引起大众普遍关注。我国农业部制定的《2013 年动物及动物产品兽药残留监控计划》中明确规定了司帕沙星的残留监控指标以及最大残留限量, 猪肉和鸡肝等最大残留限量为 100μg/kg。

[0003] 目前用于司帕沙星残留检测的方法较多, 如高效液相色谱法(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)、荧光探针法、薄层色谱扫描法、酶联免疫吸附实验(ELISA)等。但常用的理化分析方法需要昂贵的仪器设备、熟练的专业人员等条件, 而且操作过程复杂, 检测时间较长, 故限制了其应用范围, 难以在生产实际中推广应用。

### 发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题: 克服背景技术中的问题, 提供一种特异、灵敏、快速、简便的快速检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒;

还提供了司帕沙星的酶联免疫试剂盒的组建方法和检测方法。

[0005] 本发明的技术方案:

一种检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒, 包括盒体, 盒体内设有司帕沙星特异性抗体、司帕沙星与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被司帕沙星抗原或特异性抗体的酶标板、司帕沙星标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液; 所述司帕沙星特异性抗体为司帕沙星的单克隆抗体。

[0006] 所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白或钥孔铜蓝蛋白; 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶或羊抗鼠 IgG 抗体。

[0007] 所述的洗涤液为含有 0.05%-0.5% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液, 所述终止液为 2mol/L 的盐酸。

[0008] 所述的底物显色液由显色剂 A 和显色剂 B 组成, 显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲, 显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺。

[0009] 所述试剂盒还包括浓缩样品稀释液, 浓缩样品稀释液为含 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液; 用于制备所述酶标板的固相材料为聚苯乙烯、聚乙烯或聚丙烯。

[0010] 所述司帕沙星与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的：

(1)称取 3mg 的司帕沙星、3mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 3mg 的 N, N- 二环己基碳二亚胺溶于 1mL DMF 溶剂中,室温下反应 3 小时,得到 A 液；

(2)称取 5.1 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL、0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液；

(3)在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应过夜；

(4)反应液用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天 ;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到司帕沙星与载体蛋白的偶联物,贮藏于 -20℃,备用。

[0011] 所述司帕沙星的单克隆抗体是由以下方法制备的：

(1)免疫 以 SPFX-BSA 为免疫原,取 SPF 级 6-7 周龄 BALB/c 雌性小鼠进行免疫,每只 200μL,初次每只免疫剂量为 30μg,其后 3 次的免疫剂量均为 50μg/ 只 ;采用背部皮下 4-6 点注射,初免用 SPFX-BSA 的 PBS 溶液与等体积 FCA 混合乳化后免疫 ;20d 后用 SPFX-BSA 的 PBS 溶液与等体积 FIA 混合乳化后加强免疫,免疫间隔 3 周,第五次免疫后进行细胞融合；

(2)细胞融合 将 NS0 骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:5 的比例在 PEG 的作用下融合,然后置于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,5 天后用 HT 培养基半量换液,8 天后检测细胞上清,筛选阳性孔；

(3)杂交瘤细胞的筛选 细胞融合后,取各孔细胞上清,用 PBS 稀释 5 倍后用间接 ELISA 测定效价,用小鼠血清作阳性对照,挑选阳性孔,使用间接竞争 ELISA 法测定敏感性,选取效价高于或等于对照孔的细胞孔,转入 24 孔细胞板中进行扩大培养,待细胞长至底部一半以上时,再次测定效价和敏感性,进行敏感性测定,选取敏感性最高的孔进行亚克隆；

(4)单克隆抗体的制备 将 BALB/C 小鼠腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量 300 ~ 500μL,将筛选出的单克隆细胞株转入细胞培养瓶中进行扩大培养,待细胞保持对数增长的时候用无血清培养基稀释,将  $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^7$  个克隆化的阳性细胞注入小鼠体内,观察小鼠腹水生产情况,当小鼠腹部出现明显肿大且腹部皮肤紧绷时即可采集腹水,然后 3000r/min 离心 5min,吸取上清除去细胞及杂质,得到司帕沙星的单克隆抗体。

[0012] 一种检测司帕沙星酶联免疫试剂盒的组建方法,包括盒体内的司帕沙星单克隆抗体的制备 ;司帕沙星与载体蛋白偶联物的制备；

所述司帕沙星与载体蛋白偶联物的制备方法如下：

(1)称取 2mg 的司帕沙星、2mg 的 N- 羟基琥珀酰亚胺和 2mg 的 N, N- 二环己基碳二亚胺溶于 1mL DMF 溶剂中,室温下反应 3 小时,得到 A 液；

(2)称取 5.1 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL、0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到 B 液；

(3)在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应过夜；

(4)反应液用 PBS 透析 3 天,换液 3 次 / 天 ;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到司帕沙星与载体蛋白的偶联物,贮藏于 -20℃,备用。

[0013] 一种检测样品中司帕沙星含量的方法,包括步骤：

(1)样品前处理；

(2)用所述的试剂盒进行检测,向包被有司帕沙星抗原的酶标板孔中加入标准品或样品溶液,再加入司帕沙星单克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入酶标记二抗,孵育后洗涤拍干,

显色、终止,用酶标仪测吸光度值;

(3) 分析检测结果。

[0014] 本发明试剂盒的检测原理:

本发明采用 DCC 法合成司帕沙星人工抗原,制备的司帕沙星抗体能与司帕沙星发生特异性结合,从而达到检测食品中司帕沙星残留的目的。

[0015] 将司帕沙星抗原吸附于固相载体上,加入样本或司帕沙星标准品溶液,并加入抗司帕沙星的司帕沙星单克隆抗体工作液,待测样品中司帕沙星与固相载体上包被的司帕沙星抗原竞争司帕沙星抗体,再加入酶标记抗体进行酶活性的放大作用,显色后终止,测定样品吸光度值,该值与样品中司帕沙星的量呈负相关,通过标准曲线比较即可得出司帕沙星的浓度范围。

[0016] 本发明的积极有益效果:

(1) 本发明的司帕沙星酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便、价格低廉;与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

[0017] (2) 本发明的试剂盒采用间接竞争酶联免疫测定法定性或定量样品中司帕沙星的含量,对样品的前处理要求低且处理过程简单,能同时快速用于大批样品的筛查。

[0018] (3) 本发明的试剂盒检测操作步骤较少,节省检测时间,降低操作误差。

[0019] (4) 本发明基于抗原抗体免疫反应的免疫学快速检测技术进行检测,为司帕沙星残留检测提供一个新途径,该方法稳定性好,可在违禁食品成分司帕沙星的检测中发挥重要作用。

## 附图说明

[0020] 图 1 司帕沙星标准品的抑制浓度曲线(ug/L)。

[0021] 该图说明标抗司帕沙星抗体进行标准品抑制的线性关系良好( $R^2=0.9827$ ),其半数抑制浓度为 31ug/L。

## 具体实施方式

[0022] 为进一步理解本发明提供了以下实施例,但并不表示对本发明内容的任何限制。如没有特别说明,其中的百分含量均为重量含量。

[0023] 实施例 1 免疫原的合成及单克隆抗体的制备

### 1.1 试剂与仪器

司帕沙星购自 Sigma 公司,N,N-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺购自上海化学试剂公司,牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂来自 Pierce 产品。

[0024] Bio-Rad imark 680 型酶标仪、AE260 电子天平,购自德国 METTLER 公司; HI9321 酸度计,美国 HANNA 公司;手持式匀浆器,购自德国 IKA 公司;93-3 定时恒温双向磁力搅拌器,购自上海亚荣生化仪器厂。

[0025] 1.2 司帕沙星人工抗原的合成

(1)称取 3mg 的司帕沙星、3mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺和 3mg 的 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 1mL DMF 溶剂中,室温下反应 3 小时,得到 A 液;

(2)称取 5.1 mg 的牛血清白蛋白溶于 2mL、0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,得到

B 液；

(3) 在室温磁力搅拌下,将 A 液逐滴加入 B 液中,4℃反应过夜；

(4) 反应液用 PBS 透析 3 天,换液 3 次/天;透析完成后,4000r/min 离心 5min,取上清液,得到司帕沙星与载体蛋白的偶联物,贮藏于 -20℃,备用。

[0026] 通过紫外扫描鉴定偶联物。具体操作:将司帕沙星和牛血清白蛋白溶于 PBS 缓冲液(0.01M, pH7.4)中,浓度为 1mg/mL;将偶联物同样用 PBS 缓冲液(0.01M, pH7.4)稀释,使其浓度与牛血清白蛋白浓度接近。在 200-400nm 间扫描这三种溶液,得出各物质的紫外扫描波谱。通过紫外扫描波谱鉴定人工合成抗原是否偶联成功。

[0027] 1.3 免疫及特异性抗体的制备

(1) 免疫 以 SPFX-BSA 为免疫原,取 SPF 级 6-7 周龄 BALB/c 雌性小鼠进行免疫,每只 200μL,初次每只免疫剂量为 30μg,其后 3 次免疫剂量均为 50μg/只;采用背部皮下 4-6 点注射,初免用 SPFX-BSA 的 PBS 溶液与等体积 FCA 混合乳化后免疫;20d 后用 SPFX-BSA 的 PBS 溶液与等体积 FIA 混合乳化后加强免疫,免疫间隔 3 周,第五次免疫后进行细胞融合;

(2) 细胞融合 将 NS0 骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:5 的比例在 PEG 的作用下融合,然后置于 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,5 天后用 HT 培养基半量换液,8 天后检测细胞上清,筛选阳性孔;

(3) 杂交瘤细胞的筛选 细胞融合后,待其长势良好时取各孔细胞上清,PBS 稀释 5 倍后用间接 ELISA 测定效价,用小鼠血清作阳性对照,挑选效价较好的阳性孔,使用间接竞争 ELISA 测定敏感性,综合考虑选取效价高而且敏感性又好的细胞孔(效价高于或等于对照孔),转入 24 孔细胞板中进行扩大培养,待细胞长至底部一半以上时,再次测定效价和敏感性,选择敏感性较好细胞进行亚克隆。

[0028] (4) 单克隆抗体的制备

单克隆抗体的大量制备采用体内诱生法生产:将 BALB/C 小鼠腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量 300 ~ 500μL,将筛选出的单克隆细胞株转入细胞培养瓶中进行扩大培养,待细胞保持对数增长的时候用无血清培养基稀释,将大约  $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^7$  个克隆化的阳性细胞注入小鼠体内。几天后观察小鼠腹水生产情况,当小鼠腹部出现明显肿大且腹部皮肤紧绷时即可采集腹水,然后 3000r/min 离心 5min,吸取上清除去细胞及杂质,将腹水存放于 -20℃,备用。

[0029] 实施例 2 免疫检测方法的建立

2.1 ELISA 方法确定最佳包被浓度

将 10μg/mL、5μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL、0.25μg/mL 系列浓度的卵清蛋白-司帕沙星偶联物,以每孔 50μL 的用量包被酶标板,4℃包被 2h,洗涤 4 次,拍干,加入封闭液,4℃封闭 24h,再洗涤 4 次,拍干。加入  $1:8 \times 10^4$  稀释的抗血清 50μL/孔,室温孵育 30min,洗涤 4 次,立即加入 50μL/孔的酶标羊抗鼠抗体。室温作用 30min,洗涤 4 次,加显色液,50μL/孔,室温显色反应 15min,加 50μL/孔终止液终止反应,用酶标仪(450nm)检测 A 值。同时设置空白对照孔(不加抗体,只加其稀释液)和平行重复孔,取 OD 值为 1.0 左右的包被浓度为最佳浓度,实验数据见表 1。由表 1 可确定,最佳包被浓度为 1μg/mL。

[0030] 表 1 不同包被浓度的 OD 值

|            |    |   |   |   |     |      |    |
|------------|----|---|---|---|-----|------|----|
| 包被浓度 μg/mL | 10 | 5 | 3 | 1 | 0.5 | 0.25 | 空白 |
|------------|----|---|---|---|-----|------|----|

|      |       |       |       |       |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 值 | 2.624 | 2.366 | 1.677 | 1.036 | 0.723 | 0.347 | 0.031 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

## 2.2 间接 ELISA 检测抗体效价

以  $1\mu\text{g/mL}$  浓度包被酶标板,从  $8\times 10^4$  倍开始倍比稀释抗体,按上述 2.1 的 ELISA 步骤操作。检查抗体 OD 值等于两倍于阴性血清 OD 值的孔,其对应的抗体稀释度为抗体效价,其效价检测结果见表 2。从表 2 可以确定本发明制备的抗血清的效价在  $2.56\times 10^6$  以上。

[0031] 表 2 抗血清效价检测结果

|      |                |                 |                 |                 |                  |                  |       |       |
|------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------|-------|
| 稀释倍数 | $8\times 10^4$ | $16\times 10^4$ | $32\times 10^4$ | $64\times 10^4$ | $128\times 10^4$ | $256\times 10^4$ | 阴性血清  | 空白    |
| OD 值 | 1.978          | 1.623           | 1.208           | 0.832           | 0.535            | 0.256            | 0.104 | 0.037 |

## 2.3 间接竞争 ELISA 检测抗体特异性

ELISA 操作方法同 2.1。区别是每孔加入 50u1 不同浓度的司帕沙星与卵清蛋白-司帕沙星偶联物竞争抗体,随后加入抗体,得出不同的 OD 值。根据 2.1 的结果,所用抗体的最佳浓度为  $8\times 10^4$ ,同时设置平行重复孔和空白对照孔。以 0 抑制孔的 OD 值为最大值  $B_0$ ,其他抑制浓度孔 OD 值为 B,  $B/B_0=50\%$  时对应的司帕沙星浓度为此抗体的  $IC_{50}$  值。抗体特异性检测结果见表 3,用所得数据绘制司帕沙星抑制曲线(图 1)。

[0032] 表 3 抗体特异性检测结果

|                              |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 司帕沙星抑制浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 7.5   | 15    | 30    | 60    | 90    | 180   |
| OD 值                         | 1.623 | 1.260 | 0.543 | 0.220 | 0.140 | 0.092 |

由表 3 可得,司帕沙星抗体  $IC_{50}$  值在 30  $\mu\text{g/L}$  左右,表明司帕沙星抗体具有良好的特异性。

[0033] 实施例 3 检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒的组建

组建司帕沙星的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被司帕沙星人工合成抗原的酶标板;
- (2) 2mL、 $8\times 10^4$  倍的抗司帕沙星的单克隆抗体;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (4) 司帕沙星标准品溶液 6 瓶,浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $20\mu\text{g/L}$ 、 $30\mu\text{g/L}$ 、 $50\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ ;

(5) 底物显色液 A 为过氧化脲,底物显色液 B 为四甲基联苯胺;显色剂 A 要与显色剂 B 进行等比量混匀。

[0034] (6) 洗涤液为含 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;

(7) 浓缩样品稀释液为 0.1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;

(8) 终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。

[0035] 实施例 4 检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒的组建

组建司帕沙星的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板;
- (2) 2mL、 $8\times 10^4$  倍的抗司帕沙星的单克隆抗体;
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的司帕沙星;
- (4) 司帕沙星标准品溶液 6 瓶,浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $20\mu\text{g/L}$ 、 $30\mu\text{g/L}$ 、 $50\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ ;

100 $\mu$ g/L；

- (5) 底物显色液 A 为过氧化脲,底物显色液 B 为邻苯二胺；
- (6) 洗涤液为含 0.5% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液；
- (7) 浓缩样品稀释液为 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液；
- (8) 终止液为 2mol/L 的盐酸溶液。

#### [0036] 实施例 5 司帕沙星酶联免疫试剂盒的检测方法

样品前处理:称取 5g 猪肉溶于 40mL 离心管中,加入 20ml 样品稀释液(0.01% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液),充分震荡 30min,5000r/min 离心 10min,取上清 5mL。

[0037] 检测方法:向司帕沙星-卵清蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品或样品溶液 50 $\mu$ L,再加入抗体工作液 50 $\mu$ L,室温反应 30min,倒出孔中液体,每孔加入 250 $\mu$ L 经 10 倍稀释的洗涤液,30s 后倒出孔中液体,共洗板 4 次,拍干。每孔加入酶标记抗体 50 $\mu$ L,避光室温孵育 30min,加底物过氧化脲(显色液 A)50 $\mu$ L、底物四甲基联苯胺(显色液 B)50 $\mu$ L,混匀,避光室温显色 15min,加入 50 $\mu$ L/孔的终止液,用酶标仪测定吸光度值。

[0038] 结果分析:计算百分比吸光度值并绘制标准曲线,相对应每一个样品的司帕沙星浓度可以从标准曲线上读出,也可以用回归方程法计算出样品中司帕沙星的含量。

利用专业电脑软件便于大量样品的快速分析,根据酶标板上样本显色深浅和系列浓度标准溶液颜色的比较,可以判断样本中司帕沙星的浓度范围。

#### [0039] 实施例 6 试剂盒的精密度试验

本实验为标准可复性试验。从制备的酶标板中各取 10 个孔,测定 50 $\mu$ g/L 的标准溶液的 OD 值,重复 3 次,计算变异系数 CV%。结果表明,变异系数范围在 4.5-7.1 之间,符合变异系数小于 20% 的规定,说明本试剂盒标准品的精密度达到要求。

#### [0040] 实施例 7 试剂盒的回收率试验

取两个浓度的司帕沙星标样,对样品进行添加回收实验,每个浓度做 3 个平行,分别计算回收率。结果表明其回收率为 79%-88%。

#### [0041] 实施例 8 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}$ C,经过 6 个月的测定,试剂盒的最大吸光度值、50% 抑制浓度、司帕沙星添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中会有非正常保存条件出现,将试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C 保存条件下分别放置 5 天,进行加速老化试验,结果表明各项指标符合要求。从以上结果可以得出试剂盒可以在 2-8 $^{\circ}$ C 条件下保存 6 个月以上。

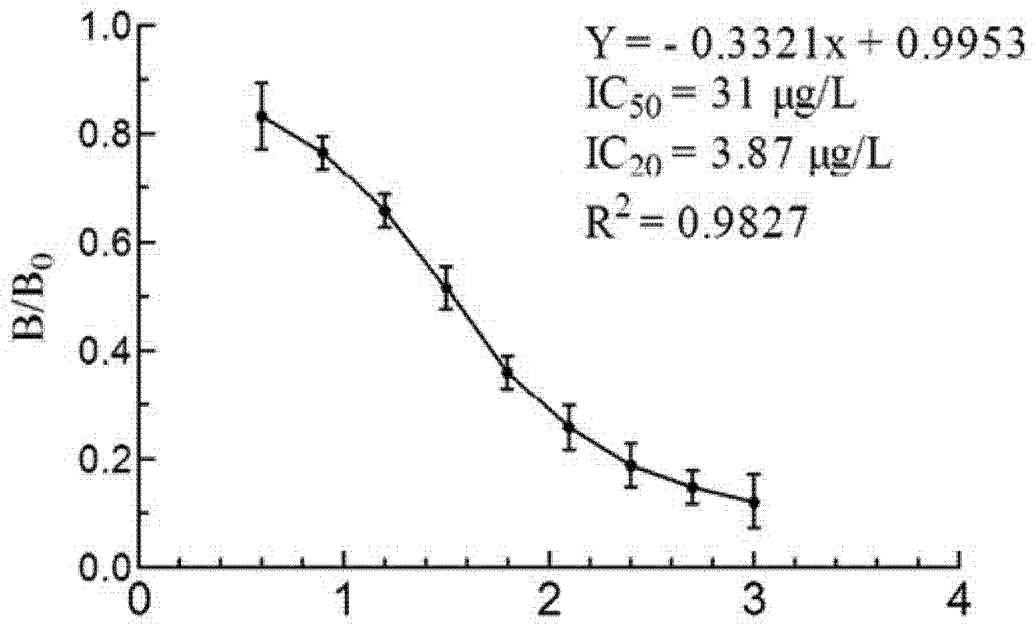


图 1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 司帕沙星的酶联免疫试剂盒及其组建和检测方法                          |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN103439503A</a>                   | 公开(公告)日 | 2013-12-11 |
| 申请号            | CN201310333735.1                               | 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         | 邓瑞广<br>张改平<br>胡晓飞<br>柴书军<br>杨继飞<br>贾国超         |         |            |
| 发明人            | 邓瑞广<br>张改平<br>胡晓飞<br>柴书军<br>杨继飞<br>贾国超         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/535                          |         |            |
| 其他公开文献         | CN103439503B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开一种检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒，包括盒体，盒体内设有司帕沙星特异性抗体、司帕沙星与载体蛋白的偶联物和酶标二抗、包被司帕沙星抗原或特异性抗体的酶标板、司帕沙星标准溶液、底物显色液、洗涤液、终止液；司帕沙星特异性抗体为司帕沙星的单克隆抗体。本发明的司帕沙星酶联免疫试剂盒中主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便、价格低廉；检测时对样品的前处理要求低且处理过程简单，能同时快速用于大批样品的筛查；与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高等特点。

