



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103439503 B

(45)授权公告日 2016.12.28

(21)申请号 201310333735.1

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2013.08.03

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103439503 A

CN 202814982 U, 2013.03.20,  
WO 99/64051 A1, 1999.12.16,  
CN 102618502 A, 2012.08.01,

(43)申请公布日 2013.12.11

刘兵. 司帕沙星和恩诺沙星抗血清制备及其  
ELIAS分析应用.《万方数据库》.2011,

(73)专利权人 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

刘兵. 司帕沙星和恩诺沙星抗血清制备及其  
ELIAS分析应用.《万方数据库》.2011,

(72)发明人 邓瑞广 张改平 胡晓飞 柴书军  
杨继飞 贾国超

贾国超 等. 司帕沙星人工抗原合成及鼠源  
多克隆抗血清的制备.《西北农业学报》.2013, 第  
22卷(第6期),

(74)专利代理机构 郑州金成知识产权事务所  
(普通合伙) 41121

审查员 段晓露

代理人 郭增欣

(51)Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

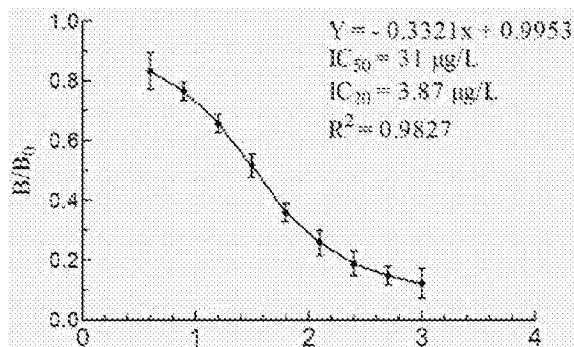
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(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、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体、包被司帕沙星人工合成抗原的酶标板、司帕沙星标准品溶液、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;

所述底物显色液由显色剂A过氧化氢和显色剂B邻苯二胺组成;所述洗涤液为含有0.05%-0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液,终止液为2mol/L的盐酸;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;

所述的司帕沙星人工合成抗原为司帕沙星与载体蛋白的偶联物,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5.1mg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;

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200 $\mu$ L,初次每只免疫剂量为30 $\mu$ g,其后3次的免疫剂量均为50 $\mu$ g/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F1A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,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300~500 $\mu$ L,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;

利用所述的试剂盒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,向包被司帕沙星人工合成抗原的酶标板孔中加入司帕沙星标准品溶液或样品溶液,再加入司帕沙星单克隆抗体,孵育后洗涤拍干,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体,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。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征是: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。

3. 一种权利要求1所述的检测司帕沙星的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;

所述的司帕沙星与载体蛋白的偶联物为司帕沙星人工合成抗原,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5.1mg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。

## 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100 $\mu$ g/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;

[0005] 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。

[0006] 本发明的技术方案:

[0007] 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。

[0008] 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。

[0009] 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

[0010] 2mol/L的盐酸。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 所述司帕沙星与载体蛋白的偶联物是由以下方法得到的:

[0014] (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;

[0015] (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;

[0016] (3)在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

[0017] (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。

[0018] 所述司帕沙星的单克隆抗体是由以下方法制备的:

[0019] (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200 $\mu$ L,初次每只免疫剂量为30 $\mu$ g,其后3次的免疫剂量均为50 $\mu$ g/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F1A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;

[0020] (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;

[0021] (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;

[0022] (4)单克隆抗体的制备 将BALB/C小腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量300~500 $\mu$ L,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。

[0023] 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;

[0024] 所述司帕沙星与载体蛋白偶联物的制备方法如下:

[0025] (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;

[0026] (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;

[0027] (3)在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜;

[0028] (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。

[0029] 一种检测样品中司帕沙星含量的方法,包括步骤:

[0030] (1)样品前处理;

[0031] (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;

[0032] (3)分析检测结果。

[0033] 本发明试剂盒的检测原理：

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 本发明的积极有益效果：

[0037] (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。

[0038] (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。

[0039] (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。

[0040] (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

[0041] 图1司帕沙星标准品的抑制浓度曲线(ug/L)。

[0042] 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

[0043] 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。

[0044] 实施例1 免疫原的合成及单克隆抗体的制备

[0045] 1.1 试剂与仪器

[0046] 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。

[0047] Bio-Rad imark 680型酶标仪、AE260电子天平，购自德国METTLER公司；H19321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。

[0048] 1.2 司帕沙星人工抗原的合成

[0049] (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；

[0050] (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；

[0051] (3)在室温磁力搅拌下,将A液逐滴加入B液中,4℃反应过夜；

[0052] (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。

[0053] 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。

[0054] 1.3 免疫及特异性抗体的制备

[0055] (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200 $\mu$ L,初次每只免疫剂量为30 $\mu$ g,其后3次免疫剂量均为50 $\mu$ g/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F1A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；

[0056] (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；

[0057] (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。

[0058] (4)单克隆抗体的制备

[0059] 单克隆抗体的大量制备采用体内诱生法生产:将BALB/C小腹腔内接种液体石蜡,每只小鼠接种量300~500 $\mu$ L,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。

[0060] 实施例2 免疫检测方法的建立

[0061] 2.1 ELISA方法确定最佳包被浓度

[0062] 将10 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、2 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、0.25 $\mu$ g/mL系列浓度的卵清蛋白-司帕沙星偶联物,以每孔50 $\mu$ L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50 $\mu$ L/孔,室温孵育30min,洗涤4次,立即加入50 $\mu$ L/孔的酶标羊抗鼠抗体。室温作用30min,洗涤4次,加显色液,50 $\mu$ L/孔,室温显色反应15min,加50 $\mu$ L/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1 $\mu$ g /mL。

[0063] 表1 不同包被浓度的OD值

包被浓度 $\mu$ g/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
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0064] 2.2间接ELISA检测抗体效价

[0065] 以1 $\mu$ 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。

[0066] 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

[0067] 2.3 间接竞争ELISA检测抗体特异性

[0068] ELISA操作方法同2.1。区别是每孔加入50 $\mu$ l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 $1C_{50}$ 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)。

[0069] 表3 抗体特异性检测结果

[0070]

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

[0071] 由表3可得,司帕沙星抗体 $1C_{50}$ 值在30  $\mu$ g/L左右,表明司帕沙星抗体具有良好的特异性。

[0072] 实施例3 检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒的组建

[0073] 组建司帕沙星的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0074] (1) 包被司帕沙星人工合成抗原的酶标板;

[0075] (2) 2mL、 $8 \times 10^4$ 倍的抗司帕沙星的单克隆抗体;

[0076] (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0077] (4) 司帕沙星标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu$ g/L、10 $\mu$ g /L、20 $\mu$ g /L、30 $\mu$ g /L、50 $\mu$ g /L、100 $\mu$ g /L;

[0078] (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。

[0079] (6) 洗涤液为含0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

[0080] (7) 浓缩样品稀释液为0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

[0081] (8) 终止液为2mol/L的盐酸溶液。

[0082] 实施例4 检测司帕沙星的酶联免疫试剂盒的组建

[0083] 组建司帕沙星的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0084] (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板;

[0085] (2) 2mL、 $8 \times 10^4$ 倍的的抗司帕沙星的单克隆抗体;

[0086] (3) 用辣根过氧化物酶标记的司帕沙星;

[0087] (4) 司帕沙星标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu$ g/L、10 $\mu$ g/L、20 $\mu$ g/L、30 $\mu$ g/L、50 $\mu$ g / L、100 $\mu$ g/L;

[0088] (5) 底物显色液A为过氧化脲,底物显色液B为邻苯二胺;

[0089] (6) 洗涤液为含0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

[0090] (7) 浓缩样品稀释液为0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

[0091] (8) 终止液为2mol/L的盐酸溶液。

[0092] 实施例5 司帕沙星酶联免疫试剂盒的检测方法

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 实施例6 试剂盒的精密度试验

[0098] 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。

[0099] 实施例7 试剂盒的回收率试验

[0100] 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%。

[0101] 实施例8 试剂盒保存期试验

[0102] 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。

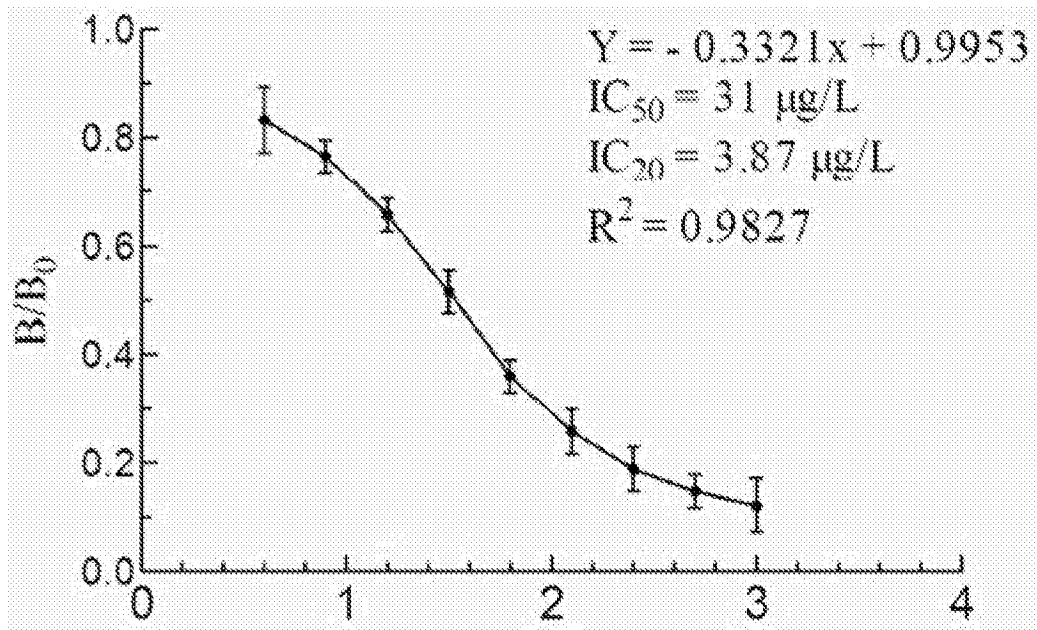


图1

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="#">CN103439503B</a>	公开(公告)日	2016-12-28
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 张改平 胡晓飞 柴书军 杨继飞 贾国超		
发明人	邓瑞广 张改平 胡晓飞 柴书军 杨继飞 贾国超		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN103439503A		
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。

