



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1811436 B

(45) 授权公告日 2010.04.21

(21) 申请号 200610007255.6

(22) 申请日 2006.02.16

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 1610 2006.02.09

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 史为民
丁双阳 冯才伟 江海洋 吴小平

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

(56) 对比文件

CN 2634479 Y, 2004.08.18, 全文.

WO 03012138 A1, 2003.02.13, 全文.

郑晶, 黄晓蓉 等. 鳗鱼中恩诺沙星残

留量的酶联免疫检测方法. 食品科学 25
10. 2004, 25(10), 247-250.

蔡勤仁, 曾振灵 等. 恩诺沙星单克
隆抗体的制备及鉴定. 中国农业科学 37
7. 2004, 37(7), 1060-1064.

钟映梅, 张秀英 等. 动物性食品钟氟喹
诺酮类药物的残留分析. 中国兽药杂志 38
8. 2004, 38(8), 29-32.

审查员 王丽华

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测恩诺沙星的方法及其专用酶联免疫
试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测恩诺沙星的方法及其
专用酶联免疫试剂盒。该检测恩诺沙星的酶联免
疫试剂盒,包括恩诺沙星特异性抗体及包被有包
被原的酶标板和酶标记物、恩诺沙星标准品溶液、
底物显示液、终止液、浓缩复溶液;所述包被原为
恩诺沙星抗体;所述酶标记物为酶标恩诺沙星
抗原。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度
高、能够现场监控且适合大量样本的定性、定量检
测动物组织如动物组织、血清血浆、水产品等样品
中恩诺沙星残留量。

1. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,包括恩诺沙星特异性抗体、包被有抗抗体的酶联板和酶标记物;所述恩诺沙星特异性抗体为恩诺沙星的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-4CGMCC No. 1610 分泌的单克隆抗体;所述酶标记物为酶标恩诺沙星半抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括恩诺沙星标准品溶液、显色剂、浓缩洗涤液、终止液、浓缩复溶液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体。

4. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为 0.01M, pH 7.4, 含有 0.8%~1.2%吐温 80 和 0.5%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液;所述终止液为 1~2mol/L 的硫酸、盐酸或氢氧化钠溶液;所述封闭液为含有 3-10%的牛血清,2%酪蛋白的磷酸盐缓冲液;所述百分含量均为质量百分含量。

5. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:当标记酶为辣根过氧化物酶时,显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1-2mol/L 的硫酸;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液,终止液为 1-2mol/L 氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩复溶液为 0.01M-0.05M 含有 1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量。

7. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述包被有抗抗体的酶联板所用的包被缓冲液为 pH 9.60.05mol/L 碳酸盐缓冲液。

8. 一种检测恩诺沙星的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

肌肉、肝脏:称 2.0g 均质物,加入含有体积比为 84:16 乙腈和 0.1MNaOH 溶液 10ml 混匀,3000g 以上,15°C 离心 10min,取出 5ml 上清液,加入 2ml 磷酸盐缓冲液,混合均匀,加入二氯甲烷 5ml,混匀,3000g 以上,15°C 离心 10min,去上层液,取下层有机相液体,50°C 旋转蒸发至干或者氮气吹干;然后用 0.6ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物,加入正己烷 1ml 混匀,3000g 以上,15°C 离心 10min,吸掉上层有机相和中间部分液体,取下层 50 μ l 加入 150 μ l 稀释 1 倍的浓缩复溶液混匀即可分析;

水产品:水产品样本的提取与肌肉、肝脏样本的提取方法相同,如在两相之间出现太多的泡沫或胶状物,难以取出足够的下层提取液,应将样品瓶放在 80°C 水浴中 5min 后再离心;

血浆:取血浆 1ml,加入 3ml 乙腈混匀,3000g 以上,15°C 离心 10min,取上清,加入 1ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液,混匀,再加入二氯甲烷 4ml,混匀,再在 3000g,15°C 离心 10min,去上层液体,取下层有机相,50°C 旋转蒸发至干或氮气吹干,用 0.6ml 稀释 1 倍的的浓缩复溶液溶解,加入 1ml 正己烷混匀,3000g,15°C 离心 10min,吸掉上层有机相和中间白色杂质,取下层 50 μ l 加入 150 μ l 稀释 1 倍的浓缩复溶液混匀即可分析;

上述过程中,所述浓缩复溶液为 0.01M-0.05M 含有 1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;所述百分含量为质量百分含量;

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒检测样品。

一种检测恩诺沙星的方法及其专用酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测恩诺沙星的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR) 是氟喹酮类抗生素, 具有下列特性: 由于独特的化学结构, 使其成为兽医临床药物中十分重要的抗生素。恩诺沙星对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和支原体类病原菌均具有广谱抗菌活性, 在一定的浓度下对细菌支原体也具有杀菌作用, 还能杀死对抗生素具有抗药力的细菌, 例如抗 β -乳酸菌素、氨基糖苷等。恩诺沙星因其具有独特的作用, 自 80 年代开始就被广泛的应用于动物和鱼虾类的疾病的预防和治疗。但最近的研究发现, 凡使用过恩诺沙星的动物, 在一定时期内其产品都有残留, 因其具有神经毒性和肾脏毒性, 所以在动物食品中残留会对人类健康造成威胁和影响, 欧美国家及我国均要求对其限量使用。2002 年 12 月我国农业部公告第 235 号文规定在所有食品动物的肌肉、脂肪中最高残留限量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, 在所有食品动物的肝、肾中最高残留限量为 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此, 恩诺沙星已经列为兽药残留监控的重点。

[0003] 检测恩诺沙星残留量的化学方法主要有薄层色谱法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气-质联机 (GC/MS)、液-质联机 (HPLC/MS)、毛细管电泳 (CE) 等, 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。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种检测恩诺沙星的方法及其专用酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒, 包括恩诺沙星特异性抗体、包被有抗抗体的酶联板和酶标记物; 所述酶标记物为酶标恩诺沙星半抗原。

[0006] 所述恩诺沙星半抗原是将恩诺沙星和 8-氨基辛酸通过酰化方法得到的。

[0007] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 其中优选碱性磷酸酯酶; 碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星半抗原可将碱性磷酸酯酶与恩诺沙星半抗原通过戊二醛法或过碘酸钠法将酶交联在恩诺沙星半抗原上。

[0008] 所述恩诺沙星特异性抗体可为恩诺沙星单克隆抗体或恩诺沙星多克隆抗体; 它们均是用恩诺沙星半抗原与载体蛋白采用氯甲酸异丁酯法或水溶性碳二亚氨基法偶联得到的偶联物作为免疫原得到的; 所述恩诺沙星多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体, 所述恩诺沙星单克隆抗体优选为恩诺沙星鼠单克隆抗体, 所述恩诺沙星多克隆抗体优选为恩诺沙星兔多克隆抗体。

[0009] 所述恩诺沙星鼠单克隆抗体优选为恩诺沙星的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-4CGMCC No. 1610 分泌的单克隆抗体。

[0010] 所述恩诺沙星的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-4 CGMCC No. 1610 已于 2006 年 2 月 9 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 (简称 CGMCC)。

[0011] 以上抗体均可以用恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原按混合酸酐

法制备。所述载体蛋白可为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白 (BCG)、牛血清白蛋白、兔血清蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白等常用载体蛋白；所述恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物可通过将恩诺沙星半抗原和载体蛋白用混合酸酐法进行偶联得到。

[0012] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括恩诺沙星标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

[0013] 所述浓缩洗涤液为 0.01M, pH 7.4, 含有 0.8%~1.2%吐温 80 和 0.5%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液。

[0014] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成,显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1~2mol/L 硫酸;当标记酶为碱性磷酸酯酶时,显示液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液,终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0015] 所述浓缩复溶液为含 0.01M-0.05M 含有 1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0016] 其中制备酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液为包被缓冲液为 pH 9.6, 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液;所用的封闭液含有 3~10%小牛血清,2%酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0017] 包被抗抗体的载体物质可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等,载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

[0018] 本发明提供的检测恩诺沙星的方法,包括以下步骤:

[0019] 1) 样品前处理:

[0020] 动物组织(鸡肉、鸡肝):称 2.0g 均质物,加入含有乙腈 -0.1MNaOH($V_{\text{乙腈}} : V_{\text{NaOH}} = 84 : 16$) 溶液 10ml 混匀,3000g 以上,15℃离心 10min,取出 5ml 上清液,加入 2ml 磷酸盐缓冲液,混合均匀,加入二氯甲烷 5ml,混匀,3000g 以上,15℃离心 10min,去上层液,取下层有机相液体,50℃旋转蒸发至干或者氮气吹干;然后用 0.6ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物,加入正己烷 1ml 混匀,3000g 以上,15℃离心 10min,吸掉上层有机相和中间部分液体,取下层 50 μ l 加入 150 μ l 稀释了的浓缩复溶液(按 $V_{\text{浓缩复溶液}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$ 稀释)混匀即可分析。

[0021] 水产品:水产品样本的提取等同于鸡肉提取方法,如在两相之间出现太多的泡沫或胶状物,难以取出足够的下层提取液,应将样品瓶放在 80℃水浴中 5min 后再离心。

[0022] 血浆:用加有肝素钠(20-30 单位/ml 血)的离心管采集血样本,血样本室温静置 1h,待析出血浆后 3000g,15℃离心 10 分钟,取出血浆 1ml,加入 3ml 乙腈混匀,3000g 以上,15℃离心 10min,取上清,加入 1ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液,混匀,再加入二氯甲烷 4ml,混匀,再在 3000g,15℃离心 10min,去上层液体,取下层有机相,50℃旋转蒸发至干或氮气吹干,用 0.6ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解,加入 1ml 正己烷混匀,3000g,15℃离心 10min,吸掉上层有机相和中间白色杂质,取下层 50 μ l 加入 150 μ l 稀释了的浓缩复溶液(按 $V_{\text{浓缩复溶液}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$ 稀释)混匀即可分析。

[0023] 2) 利用上述的检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒检测样品;

[0024] 3) 分析检测结果。

[0025] 恩诺沙星是小分子物质,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。本发明将恩诺沙星和 8-氨基辛酸合成恩诺沙星半抗原,给恩诺沙星接出了一个含 8 个碳的间隔臂,这样突出了恩诺沙星分子结构中的特征基团——(4-乙基)-1-哌嗪基,使制备的恩诺沙星抗体对恩诺沙星的特异性很高。半抗原与载体蛋白的结合比例过低或过高都对免疫不利,半抗原与 OVA、RSA 和 MSA 的结合摩尔比分别为 12 : 1、17 : 1 和 17 : 1。

[0026] 本发明的试剂盒可定性、定量检测动物组织、血清、水产品等样品中恩诺沙星的残留量。本发明的检测原理是微孔条上包被抗体时,加入恩诺沙星抗体工作液后使得抗体充分的结合在抗抗体上,再加入系列标准品或样品溶液和酶标抗原,样品中残留的恩诺沙星和酶标抗原竞争抗恩诺沙星抗体,显色;显色终止后用酶标仪将波长设定在 400nm,测定每孔吸光度值(OD 值),样本吸光度值与其残留物恩诺沙星的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出相应残留物恩诺沙星的含量。也可根据酶标板上的样品溶液颜色的深浅,与系列浓度的恩诺沙星标准液颜色比较判断样品中恩诺沙星的浓度范围。

[0027] 本发明检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中恩诺沙星的残留量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品;采用高特异性的恩诺沙星单克隆抗体,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,节省操作时间,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利,检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。本发明的试剂盒将在恩诺沙星的检测中发挥重要作用。本发明的方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测。

附图说明

[0028] 图 1 为以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒检测恩诺沙星含量的标准曲线图

具体实施方式

[0029] 下述实施例的方法如无特别说明,均为常规方法。

[0030] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0031] 实施例 1、以抗抗体为包被原的酶联免疫试剂盒的制备及其检测方法

[0032] 以抗抗体的偶联物为包被原的酶联免疫试剂盒包括:

[0033] (1) 包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板;

[0034] (2) 碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星半抗原工作液(用含有 0.05%甘油的水溶液稀释的碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星半抗原),8ml/瓶,1 瓶。

[0035] (3) 恩诺沙星标准品溶液:恩诺沙星系列标准溶液 6 瓶,0 μ g/L,0.5 μ g/L,1.5 μ g/L,4.5 μ g/L,13.5 μ g/L,40.5 μ g/L,3ml/瓶。所用的恩诺沙星药物稀释液为含 0.1-0.5% N' N-二甲基甲酰胺(DMF)的磷酸盐缓冲液。

[0036] (4) 显色液为 4-硝基酚磷酸盐缓冲液,8ml/瓶,1 瓶。

[0037] (5) 恩诺沙星鼠单克隆抗体工作液:将恩诺沙星的单克隆杂交瘤细胞株 A-2-4CGMCC No. 1610 分泌的单克隆抗体用含有 2%小牛血清稀释成蛋白浓度为 2.0 μ g/L,8ml/瓶,1 瓶。

[0038] (6) 浓缩洗涤液:浓缩洗涤液:含有 0.01M pH 7.4,含有 0.8%~1.2%吐温 80 和

0.5%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液。40ml/瓶,1瓶。为正常使用浓度的20倍。

[0039] (7) 终止液:1-2mol/L 氢氧化钠,8ml/瓶,1瓶。

[0040] (8) 浓缩复溶液:0.03M 含有1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液,30ml/瓶,1瓶。为正常使用浓度的2倍。

[0041] (9) 包被缓冲液:包被缓冲液:pH 9.6 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0042] (10) 封闭液:含3-10%小牛血清,2%酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0043] 其中,抗抗体包被的酶标板、恩诺沙星特异性抗体、碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星半抗原的制备方法如下:

[0044] 一、酶标板的制备

[0045] 1、包被原的制备:以鼠源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到羊抗鼠抗体。

[0046] 2、包被有羊抗鼠抗体的酶标板制备方法:用包被缓冲液将羊抗鼠抗体稀释成0.1-1 μ g/ml,每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育2h或4 $^{\circ}$ C过夜,倾去包被液,用稀释20倍的浓缩洗涤液洗涤3次,每次30秒,拍干,然后在每孔中加入200 μ l封闭液,37 $^{\circ}$ C温育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0047] 二、恩诺沙星鼠单克隆抗体制备

[0048] 免疫原:将半抗原和甲状腺蛋白(BCG)等载体蛋白混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到免疫原。

[0049] 免疫原的具体制备方法:恩诺沙星是小分子物质,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。因此将恩诺沙星和8-氨基辛酸合成恩诺沙星半抗原,给恩诺沙星接出了一个含8个碳的间隔臂,这样突出了恩诺沙星分子结构中的特征基团——(4-乙基)-1-哌嗪基,使制备的恩诺沙星抗体对恩诺沙星的特异性很高。

[0050] 动物免疫程序:采用Balb/c小鼠作为免疫动物,以恩诺沙星半抗原与甲状腺蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为80-100 μ g/只,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔2-3周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,四免后腹腔加强免疫一次,3天后取脾细胞。

[0051] 细胞融合与克隆化:取免疫BALB/c小鼠脾细胞,按5-10:1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,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株-恩诺沙星的单克隆杂交瘤细胞株A-2-4 CGMCC No. 1610分泌的单克隆抗体。

[0052] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成1-5 $\times 10^6$ 个/ml的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0053] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5ml/只,7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞5 $\times 10^5$ -10 6 个/只,7-10天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,小瓶分装,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0054] 三、酶标半抗原的制备

[0055] 恩诺沙星半抗原的合成方法:

[0056] 恩诺沙星半抗原的制备原理:将恩诺沙星和 8-氨基辛酸合成恩诺沙星半抗原。给恩诺沙星接出了一个含 8 个碳的间隔臂,这样突出了恩诺沙星分子结构中的特征基团——(4-乙基)-1-哌嗪基。使制备的恩诺沙星抗体对恩诺沙星的特异性很高。

[0057] 其半抗原的制备的过程为:取 200mg 恩诺沙星和 100mg 8-氨基辛酸和 50mgNHS(N-羟基琥珀酰亚胺,活化酯)用水搅拌反应过夜。

[0058] 酶标半抗原的制备:将恩诺沙星半抗原与碱性磷酸酯酶采用戊二醛法进行偶联,得到碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星抗原。

[0059] 具体的酶标半抗原的制备如下:取 200mg 恩诺沙星半抗原和 200mg 碱性磷酸酯酶和 100 μ l 戊二醛,用水搅拌反应过夜。

[0060] 利用该试剂盒检测样品中残留的恩诺沙星的方法如下:

[0061] 一、样品前处理

[0062] 动物组织(鸡肉、鸡肝):称 2.0g 均质物,加入含有乙腈和 0.1M NaOH($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{NaOH}}=84:16$)溶液 10ml 混匀,3000g 以上,15 $^{\circ}$ C 离心 10min。取出 5ml 上清液,加入 2ml 磷酸盐缓冲液,混合均匀,加入二氯甲烷 5ml,混匀,3000g 以上,15 $^{\circ}$ C 离心 10min。去上层液,取下层有机相液体,50 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至干或者氮气吹干;然后用 0.6ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解干燥的残留物,加入正己烷 1ml 混匀,3000g 以上,15 $^{\circ}$ C 离心 10min,吸掉上层有机相和中间部分液体,取下层 50 μ l 加入 150 μ l 稀释 1 倍的浓缩复溶液(按 $V_{\text{浓缩复溶液}}:V_{\text{水}}=1:1$ 稀释)混匀即可分析。

[0063] 水产品:水产品样本的提取等同于鸡肉提取方法,如在两相之间出现太多的泡沫或胶状物,难以取出足够的下层提取液,应将样品瓶放在 80 $^{\circ}$ C 水浴中 5min 后再离心。

[0064] 血浆:用加有肝素钠(20-30 单位/ml 血)的离心管采集血样本,血样本室温静置 1h,待析出血浆后 3000g,15 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟,取出血浆 1ml,加入 3ml 乙腈混匀,3000g 以上,15 $^{\circ}$ C 离心 10min,取上清,加入 1ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液,混匀,再加入二氯甲烷 4ml,混匀,再在 3000g,15 $^{\circ}$ C 离心 10min,去上层液体,取下层有机相,50 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至干或氮气吹干,用 0.6ml 稀释 1 倍的浓缩复溶液溶解,加入 1ml 正己烷混匀,3000g,15 $^{\circ}$ C 离心 10min。吸掉上层有机相和中间白色杂质,取下层 50 μ l 加入 150 μ l 稀释了的浓缩复溶液(按 $V_{\text{浓缩复溶液}}:V_{\text{水}}=1:1$ 稀释)混匀即可分析。

[0065] 二、检测方法

[0066] 向包被有羊抗鼠抗抗体的酶标板微孔中加入恩诺沙星鼠单克隆抗体工作液 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 30min。倒出孔中液体,每孔加入稀释 20 倍的浓缩洗涤液 250 μ l,15-30s 后倒出孔中液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干。加入系列标准品溶液或样品溶液 50 μ l,同时加入碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星半抗原工作液 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 30min。取出酶标板,如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 4-硝基酚磷酸盐缓冲液 50 μ l,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15~30min。每孔加入终止液 50 μ l,轻轻振荡混匀,用酶标仪,测定每孔吸光度值(OD 值)。

[0067] 三、结果分析

[0068] 所获得的每个浓度标准溶液或样本吸光度值的平均值(B)除以第一个标准(O 标准)的吸光度值(B_0)再乘以 100%,即百分吸光度值。

[0069]

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

[0070] 公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。以恩诺沙星浓度的自然对数值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图, 如图 1 所示。相对应每一个样品中恩诺沙星的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法, 计算出样本溶液中恩诺沙星的浓度。利用计算机专业软件, 更便于大量样品的快速分析。整个检测过程只需 1.5 小时就可以完成, 最低检测限为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。

[0071] 实施例 2、恩诺沙星酶联免疫试剂盒的精密度、准确度和保存期实验

[0072] 1. 标准品溶液精密度试验

[0073] 从实施例 1 制备的酶联免疫试剂盒中取三批 02、06、和 10, 从三批中各取 10 个试剂盒, 从每个酶标板中, 各抽出 20 个微孔, 测定 $4.0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值 (OD 值), 计算变异系数。用该方法考察板内精密度。测定结果见表 1。结果表明, 三批试剂盒, 标准精密度的测定范围在 4.80% -9.11% 之间, 因此确定精密度范围均小于 25%。

[0074] 表 1 标准可重复性试验 (CV%)

[0075]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	02批	4.80	5.25	5.04	8.81	7.11	6.54	6.23	6.51	6.44	9.11
	06批	7.78	7.35	7.88	6.98	7.74	7.31	7.69	8.01	8.22	7.01
	10批	6.23	6.55	7.01	6.25	7.22	6.89	6.45	6.21	5.99	6.45

[0076] 2. 样品可重复性试验

[0077] 每个样本按 $10 \mu\text{g/kg}$ 浓度的恩诺沙星标准品进行添加, 分别取实施例 1 制备的三个不同批次的试剂盒各三个, 每个浓度重复 5 次, 分别计算变异系数。见表 2- 表 6。

[0078] 表 2 鸡肉样品可重复性试验

[0079]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
0506008	10.2	11.0	9.5	8.8	9.2	8.9
	8.3	7.2	8.6	7.1	6.1	13.4
	7.3	6.5	6.0	7.6	8.9	15.3
0507003	8.9	9.4	9.8	8.8	6.2	16.3
	7.7	7.2	6.8	6.0	7.9	10.6
	10.2	7.9	9.8	11.0	9.9	12.2
0507009	6.3	6.5	7.8	8.5	9.8	18.6
	8.9	8.6	9.7	6.5	9.8	15.3
	10.5	10.9	9.0	8.7	10.0	9.6

[0080] 表 3 虾样品可重复性试验

[0081]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
0506008	9.5	6.2	8.2	9.9	6.8	19.9
	9.5	6.5	8.5	7.6	6.9	15.5
	9.9	9.7	10	7.9	11.2	12.1
0507003	10.2	9.5	8.9	10.1	7.8	10.6
	8.6	11.0	9.8	6.9	9.9	16.8
	9.4	6.8	6.2	6.0	7.9	19.3
0507009	9.9	7.9	8.6	10.9	8.8	12.8
	9.3	8.0	7.9	9.1	6.1	15.7
	8.9	7.6	6.0	6.9	6.9	14.8

[0082] 表4 鱼样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
0506008	8.1	6.9	7.2	9.0	8.2	10.6
	9.2	9.6	8.3	8.6	9.9	7.3
	6.3	6.4	6.8	7.2	7.1	5.9
0507003	7.3	9.8	7.6	10.1	6.8	18.2
	9.6	10.3	9.2	11.2	8.5	10.6
	6.8	8.5	6.0	8.4	6.1	17.0
0507009	7.2	6.3	6.7	5.2	7.2	12.7
	8.9	9.3	9.8	10.2	7.9	9.6
	6.4	7.6	8.2	7.8	6.3	11.8

[0083]

[0084] 表5 鸡肝样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	0506008	6.9	6.2	7.2	8.2	7.5
11.2		9.2	7.7	8.2	7.4	17.5
6.9		8.1	8.5	7.4	11.1	19.4
0507003	9.8	10.1	9.9	7.3	7.1	16.9
	6.2	7.2	6.9	7.8	6.9	8.2
	10.2	10.9	9.2	11	9.3	8.4
0507009	9.3	7.9	7.6	8.9	6.8	12.4
	6.4	6.7	7.6	8.8	6.2	15.0
	8.8	9.5	10.5	7.3	6.3	19.8

[0085] 表 6 鸡血样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	0506008	6.3	8.5	9.4	8.9	6.2
11.1		10.3	7.1	9.0	10.6	16.7
9.4		9.3	6.6	9.8	9.5	14.6
0507003	6.7	7.5	6.4	6.5	8.2	10.9
	9.2	8.7	6.1	8.4	7.1	16.0
	8.5	9.2	7.3	7.5	6.1	15.3
0507009	8	7.2	9.2	6.3	6.8	15.1
	7.4	6.4	6.3	8.5	6.8	12.7
	9.9	9.4	9.8	8.5	6.2	17.5

[0088] 结果表明鸡肉样本变异系数均低于 20%，鱼样本的变异系数均低于 20%，虾样本的变异系数均低于 20%，鸡肝样本的变异系数均低于 20%，鸡血样本的变异系数均低于 20%。

[0089] 3、试剂盒的准确度

[0090] 取两个浓度的恩诺沙星标准品溶液分别为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ 和 $20 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ ，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，具体方法如实施例 1 中样品前处理步骤，分别计算准确度。表 7 试剂盒的准确度

样本		鸡肉		鸡肝	
添加浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	20	10	20
准确度%	1	83.4	82.4	96.8	68.4
	2	76.4	89.5	87.3	92.4
	3	69.8	74.9	73.4	78.4
	4	92.5	98.2	68.4	83.4
平均值%		80.5	86.2	81.4	80.6
样本		鱼		虾	
添加浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10	20	10	20
准确度%	1	83.4	112.7	67.4	82.1
	2	85.2	86.4	106.5	99.7
	3	93.4	93.5	93.4	83.4
	4	102.5	67.8	110.8	73.4
平均值%		91.1	90.1	94.5	84.6
样本		鸡血			
添加浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)		10		20	
准确度%	1	83.4		76.5	
	2	98.7		93.4	
	3	69.5		74.8	
	4	103.5		81.9	
平均值%		88.7		81.6	

[0091]

[0092] 结果表明鸡肉样品添加准确度在 69.8% -98.2% 之间, 鸡肝样品添加准确度在 68.4% -96.8% 之间, 鱼样品添加准确度在 67.8% -112.7% 之间, 虾样品添加准确度在 67.4% -110.8% 之间, 鸡血样品添加准确度在 69.5% -103.5% 之间。

[0093] 4、试剂盒保存期试验

[0094] 试剂盒保存条件为 2-8℃, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制浓度、恩诺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℃ 保存的条件下放置 6 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入 -20℃ 冰箱冷冻 5 天, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8℃ 至少可以保存 6 个月以上。

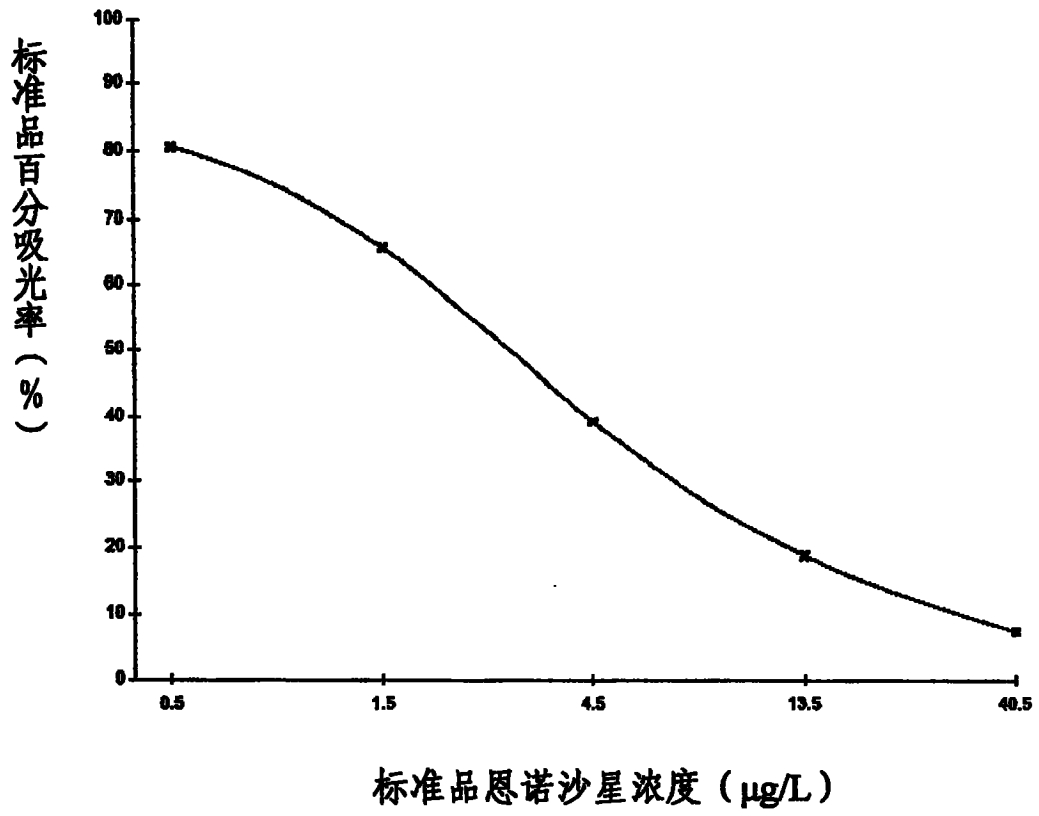


图 1

专利名称(译)	一种检测恩诺沙星的方法及其专用酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN1811436B	公开(公告)日	2010-04-21
申请号	CN200610007255.6	申请日	2006-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 史为民 丁双阳 冯才伟 江海洋 吴小平		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 史为民 丁双阳 冯才伟 江海洋 吴小平		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN1811436A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测恩诺沙星的方法及其专用酶联免疫试剂盒。该检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒，包括恩诺沙星特异性抗体及包被有包被原的酶标板和酶标记物、恩诺沙星标准品溶液、底物显示液、终止液、浓缩复溶液；所述包被原为恩诺沙星抗体；所述酶标记物为酶标恩诺沙星抗原。本发明的方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的定性、定量检测动物组织如动物组织、血清血浆、水产品等样品中恩诺沙星残留量。

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$