



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102654500 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 05

(21) 申请号 201210153905. 3

(22) 申请日 2012. 05. 17

(71) 申请人 重庆市科学技术研究院

地址 401123 重庆市渝北区北部新区黄山大道中段杨柳路 2 号

(72) 发明人 乐涛 贾渝跃 何红秋 李滨  
牛小东 陈雍 王玉 段小炼  
秦建波

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所  
50211

代理人 郭云

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

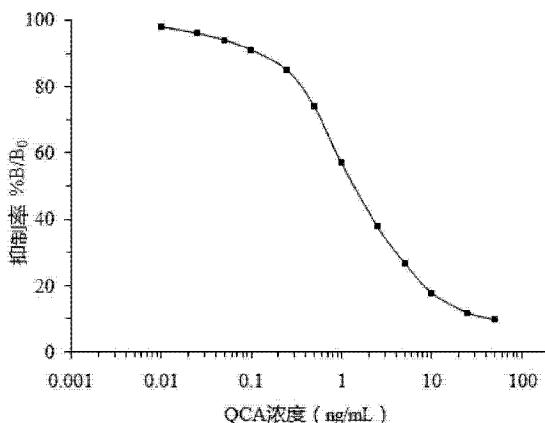
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种检测喹噁啉-2-羧酸的检测试剂盒及其方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒及其检测方法,由多孔包被板,缓冲液,喹噁啉-2-羧酸标准,喹噁啉-2-羧酸的抗体冻干品,销标记的羊抗鼠抗体,洗涤液和增强液所组成。通过测量荧光强度 cps,从标准曲线计算样品中的喹噁啉-2-羧酸含量。本发明具有结构简单、组装容易、耐腐蚀、重量轻、成本低、适用面广等特点,阀芯对中性能好,运动灵活可靠,能够起到良好的堵水效果。



1. 一种检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:由多孔包被板,缓冲液,喹噁啉-2-羧酸标准,喹噁啉-2-羧酸的抗体冻干品,钕标记的羊抗鼠抗体,洗涤液和增强液所组成。

2. 一种根据权利要求1所述检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒的检测方法,包括免疫原、包被原和单克隆抗体的制备以及样品前处理,其特征在于:

(1) 将喹噁啉-2-羧酸与牛血清白蛋白偶联,得到免疫原;

(2) 将喹噁啉-2-羧酸与卵清蛋白偶联,得到包被原;

(3) 用步骤(1)的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗QCA的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(4) 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用Protein G柱进行纯化,获得抗QCA的单克隆抗体IgG;

(5) 用步骤(2)的包被原包被固相载体;

(6) 将动物组织先经过酸解提取后,再过MAX柱净化,最后加入衍生试剂和催化剂进行处理,得到待测产物;

(7) 将步骤(6)的待检物进行测量荧光强度cps,对照标准曲线计算样品中的喹噁啉-2-羧酸含量。

3. 根据权利要求1所述检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的固相载体是多孔包被板,采用48或者96孔的多微孔包被板作为固相载体。

4. 根据权利要求1所述检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的衍生试剂是丁胺。

5. 根据权利要求1所述检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的催化剂是膦基磷酸二乙酯。

6. 根据权利要求1所述检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒的检测方法,其特征在于:所述步骤(6)和(7)具体为取包被有QCA-OVA的微孔包被板,加入50  $\mu$  l的QCA-ABA或处理好的样品到各自的微孔中,加50  $\mu$  l以缓冲液稀释的喹噁啉-2-羧酸抗体,25 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C振荡0.5~1小时,洗涤液洗三次,加以缓冲液稀释的100  $\mu$  l Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体,25 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C振荡0.5~1小时,用洗涤液洗六次,加200  $\mu$  l增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps,从标准曲线计算样品中的喹噁啉-2-羧酸含量。

## 一种检测喹噁啉-2-羧酸的检测试剂盒及其方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体的说,涉及一种检测喹噁啉-2-羧酸的检测试剂盒及其方法。

### 背景技术

[0002] 卡巴氧作为抗菌促生长剂,广泛应用于畜禽养殖,能促进动物生长、提高饲料转化率、预防和控制猪痢疾和细菌性肠炎。代谢研究和毒理学研究表明,卡巴氧在猪体内迅速转化成脱一氧和脱二氧化合物,其原形和脱氧化合物对人和动物有一定的毒性作用,主要表现为诱癌性、致突变作用、繁殖毒性。因此,1999年欧盟禁止卡巴氧在食品动物中应用,2001年加拿大也颁布法令禁止卡巴氧在市面上销售,2003年食品添加剂联合专家委员会(JECFA)对卡巴氧进行了再评价,委员会决定对卡巴氧撤销其最大残留限量(MRLs),该残留限量由JECFA于1999年规定,肌肉和肝脏分别为5和30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。喹噁啉-2-羧酸是卡巴氧在猪体内最稳定的代谢产物,被欧盟法定为卡巴氧在猪食用组织中的残留标识物。目前在动物性食品中喹噁啉-2-羧酸的分析检测方法有很多,包括高效液相色谱法(HPLC)、液质连用(LC-MS)、气质连用(GC-MS)和ELISA。仪器检测主要存在仪器购置费用昂贵、样品前处理复杂、程序繁琐费时、检测费用高、不能现场操作等缺陷,所以在生产中应用受到限制。

[0003] 而时间分辨荧光免疫分析法(TR-FIA)由于其特异性强、灵敏度高、操作简单、廉价,且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。目前还没有针对喹噁啉-2-羧酸残留检测的时间分辨荧光免疫分析法的专利和文献报道。

### 发明内容

[0004] 为解决以上技术问题,本发明的目的在于提供一种动物可食性组织中喹噁啉-2-羧酸残留的检测试剂盒。

[0005] 本发明的目的之二在于提供一种动物可食性组织中喹噁啉-2-羧酸残留的时间分辨荧光免疫检测方法。

[0006] 本发明目的之三是这样实现的:一种检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其关键在于由多孔包被板,缓冲液,喹噁啉-2-羧酸标准,喹噁啉-2-羧酸的抗体冻干品,标记的羊抗鼠抗体,洗涤液和增强液所组成。

[0007] 本发明目的之四是这样实现的:一种检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒的检测方法,包括免疫原、包被原和单克隆抗体的制备以及样品前处理,其关键在于:

[0008] (1) 将喹噁啉-2-羧酸与牛血清白蛋白偶联,得到免疫原;

[0009] (2) 将喹噁啉-2-羧酸与卵清蛋白偶联,得到包被原;

[0010] (3) 用步骤(1)的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗QCA的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0011] (4) 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用Protein G柱进行纯化,获得抗QCA的

单克隆抗体 IgG ;

[0012] (5) 用步骤(2)的包被原包被固相载体 ;

[0013] (6) 将动物组织先经过酸解提取后,再过 MAX 柱净化,最后加入衍生试剂和催化剂进行处理,得到待测产物 ;

[0014] (7) 将步骤(6)的待检物进行测量荧光强度 cps,对照标准曲线计算样品中的喹噁啉 -2- 羧酸含量。

[0015] 上述的固相载体是多孔包被板,采用 48 或者 96 孔的多微孔包被板作为固相载体。

[0016] 上述的衍生试剂是丁胺。

[0017] 上述的催化剂剂是膦基磷酸二乙酯。

[0018] 上述步骤(6)和(7)具体为取包被有 QCA-OVA 的微孔包被板,加入 50  $\mu$  l 的 QCA-ABA 或处理好的样品到各自的微孔中,加 50  $\mu$  l 以缓冲液稀释的喹噁啉 -2- 羧酸抗体, 25 $^{\circ}$ C ~37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5~1 小时,洗涤液洗三次,加以缓冲液稀释的 100  $\mu$  l  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗鼠抗体, 25 $^{\circ}$ C ~37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5~1 小时,用洗涤液洗六次,加 200  $\mu$  l 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps,从标准曲线计算样品中的喹噁啉 -2- 羧酸含量。

[0019] 本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析方法来检测喹噁啉 -2- 羧酸。采用时间分辨荧光免疫的技术主要有两个方面:第一,特异性单克隆抗体制备,用偶联的免疫原免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗 QCA 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用 Protein G 柱进行纯化,获得抗 QCA 的单克隆抗体 IgG。第二, $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体的制备。

[0020] 本发明测定方法:测定的基础是标记免疫反应。包被有 QCA-OVA 的多孔板,加入 QCA-ABA 或已处理好的样品到各自的微孔中,再加入抗喹噁啉 -2- 羧酸抗体,振荡反应,游离的喹噁啉 -2- 羧酸与微孔板上的 QCA-OVA 竞争喹噁啉 -2- 羧酸抗体,洗涤液洗涤,没有连接的喹噁啉 -2- 羧酸抗体在洗涤步骤中被除去。加入  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗鼠抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗鼠抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外光的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中喹噁啉 -2- 羧酸的量。

[0021] 有益效果:本发明检测方法不需要昂贵的仪器,样品前处理简单、能现场操作检测,应用广泛,同时具有检测特异性强、灵敏度高、操作简单、廉价,且特别适于大批量样品的检测等优点。

## 附图说明

[0022] 图 1 为本发明的喹噁啉 -2- 羧酸标准品与抗体的 TR-FIA 标准抑制曲线图。

## 实施例

[0023] 1 喹噁啉 -2- 羧酸(QCA- 载体蛋白偶联物的制备

[0024] 免疫原(QCA-BSA)的合成:准确称取喹噁啉 -2- 羧酸 348mg 溶解在 2mLN, N- 二甲基甲酰胺中,搅拌下逐滴加入  $\gamma$ -氨基丁酸溶液,搅拌反应 3h,调节反应液 pH10 左右。离心除掉沉淀物。将上述反应物逐滴加入 BSA 溶液中(340mgBSA 溶于 5mL 生理盐水),再加入 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS) 23mg, N, N- 二环己基碳二亚胺(DCC) 43. 4mg, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜,离心

除去沉淀,取上清液用磷酸缓冲液(PBS)透析 3d,每 6h 更换透析液,将所得产物低压冻干,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0025] 免疫原(QCA-OVA)的合成:准确称取喹噁啉-2-羧酸 348mg 溶解在 2mL N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌下逐滴加入  $\gamma$ -氨基丁酸溶液,搅拌反应 3h,调节反应液 pH10 左右。离心除掉沉淀物。将上述反应物逐滴加入 OVA 溶液中(230mg OVA 溶于 5mL 生理盐水),再加入 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 23mg, N,N-二环己基碳二亚胺(DCC) 43.4mg,  $4^{\circ}\text{C}$  反应过夜,离心除去沉淀,取上清液用磷酸缓冲液(PBS)透析 3d,每 6h 更换透析液,将所得产物低压冻干,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0026] 2 抗喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体制备

[0027] 2.1 动物免疫

[0028] 用实施例 1 制备的免疫原(QCA-BSA)分别免疫 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,每只小鼠的免疫剂量为  $100\ \mu\text{g}/0.2\text{mL}$ 。首次免疫,用无菌  $0.01\text{mol/L}$  pH7.4 PBS 溶解免疫原,再与等量弗氏完全佐剂混合,完全乳化,颈背部皮下分 2~3 点注射;加强免疫,用  $0.01\text{mol/L}$  pH7.4 PBS 溶解免疫原与等量弗氏不完全佐剂混合,充分乳化,小鼠腹腔注射。每次间隔 14~21d,第 3 次免疫后 7~10d 开始对免疫小鼠尾静脉采血,收集血清,用 ELISA 检测小鼠血清效价。末次免疫后间隔 4 周以上,在细胞融合前 3~4d,腹腔注射 QCA-BSA 抗原  $100\ \mu\text{g}/0.2\text{mL}$ /只,注射后每天注意观察,保证融合前小鼠状态良好。

[0029] 2.2 抗喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体制备

[0030] 分离免疫小鼠的脾细胞,并进行匀浆制备免疫脾细胞。取 1 只免疫的 Balb/c 小鼠,从眼眶放血分离血清作为阴性血清,处死。小鼠用 75% 酒精中浸泡 5min,进行整体消毒。将小鼠四肢固定,然后用镊子夹住小鼠下腹部皮肤,剪开一小口,再用镊子撕开皮肤,露出腹膜,在腹膜上用剪刀(操作时要换一套镊子和剪刀)剪一小口(在腹部中央)。剪开腹膜(换 1 套镊子和剪刀),露出脾脏,用镊子夹住脾脏(再换 1 套器械),用剪刀将脾脏外膜剪破,然后放入事先灭菌的匀浆器中。加适量基础培养基(RPMI-1640)于匀浆器中,进行研磨,挤压出脾细胞,取出匀浆器的匀浆棒,再补加适量基础培养基(RPMI-1640),静置 2min,将上层细胞悬液吸取后,放入腹腔巨噬细胞离心管中,重复上述操作 1 次。1200r/min 离心 10min,除去上清。将  $10^8$  个免疫脾细胞与  $1\sim 2\times 10^7$  个 SP2/0 骨髓瘤细胞按照 1:10 或 1:5 的比例加入 50mL 离心管中,进行混匀,然后于 1500r/min 水平离心 10min,弃去上清。将离心管倒扣在灭菌的吸水纸上,把管中液体吸干。用手指或桌面轻轻敲击管底,让沉淀的细胞松动,再把离心管置于  $37^{\circ}\text{C}$  水浴锅中。在 1min 内缓慢将 50%PEG 0.8mL 滴入离心管中,边加边轻轻用吸管尖搅拌沉淀细胞。再继续搅拌 30sec 后,静置 1min,然后慢慢加入 40mL 1640 基础培养基(事先进行  $37^{\circ}\text{C}$  预温)。加基础培养基方法为:第 1min 内逐滴滴入 1mL,第 2min 内加 2mL,第 3min 内加 3mL,第 4min 内加其余的 4mL,在每次加培养基时需缓慢加入,并轻轻地搅拌培养基,最后将剩余的 1640 培养基慢慢加入。1000r/min 离心 5min,除去上清。然后用 HAT 培养基悬浮混合的细胞,再加入饲养脾细胞。根据需要补加适量的 HAT 培养基,混合均匀,再将含有饲养细胞的细胞融合液滴加到 96 孔细胞培养板上,滴加量约为  $150\ \mu\text{L}$ /孔。将培养板置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,进行培养。用建立的间接 ELISA 筛选阳性细胞克隆。选择强阳性集落生长的孔,用有限稀释法进行克隆。并对其他阳性孔,进行 24 孔扩大培养,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 对扩大培养孔的上清液进

行检测,对间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 均为阳性孔的细胞进行液氮冷冻保存。通过融合检测,并进行 3 次亚克隆后获得杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过多次传代、冻存、复苏,杂交瘤细胞分泌抗体稳定。进行杂交瘤细胞染色体的计数,将每株杂交瘤细胞随机选择 20 个细胞,进行细胞染色体条数的计数,再计算细胞染色体条数的平均值。小鼠脾细胞染色体数为 40 条,SP2/0 细胞的染色体数目平均数为 62~68 条,而本试验获得的 20 株杂交瘤细胞染色体数目都在 92~103 条之间,平均为 97.8 条。本杂交瘤细胞染色体数目高于两亲本细胞的染色体数目,说明是两种细胞的杂交产物。取细胞株细胞分泌的培养上清液,进行 1 : 10 稀释后,用夹心 ELISA 方法测定抗体亚型,该细胞株分泌的抗体亚型为 IgG1。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化。该单克隆抗体可用于制备时间分辨荧光检测试剂盒。

#### [0031] 2.3 抗喹噁啉-2-羧酸单克隆抗体的纯化

[0032] 采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化:取小鼠腹水 10.0mL,加入等体积的巴比妥缓冲液,适量的二氧化硅混合,室温振荡 30min。室温静置 15min 后,取上清于洁净离心管中,4℃,1,800r/min 离心 20min;取上清液 18.0mL,加入 36.0mL 0.06mol/L 醋酸钠缓冲液,用 HCL 调 pH 值至 4.5,充分搅拌下在 30min 内缓慢加入辛酸 297  $\mu$ L;继续搅拌 10min,然后转入 4℃冰箱静置 2h,4℃,15,000r/min 离心 30min,上清液经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后体积为 50mL;加入 5.0mL 0.1mol/L 的磷酸缓冲液,用 NaOH 调 pH 值至 7.6,搅拌下缓缓加入硫酸铵至终浓度为 0.277g/mL;4℃冰箱静置 2h 后,4℃,12,000r/min 离心 30min,弃上清;沉淀用 5.0mL 0.1mol/L 的磷酸缓冲液重悬,装入透析袋,对 5,000mL 0.01mol/L pH7.2PBS 缓冲液充分透析后,再对 2,000mL 蒸馏水透析,最后对 3,000mL 三蒸去离子水透析;然后 4℃,12,000r/min 离心 30min,弃沉淀,收集上清液,测蛋白浓度。作 SDS-PAGE 电泳,鉴定单克隆抗体的纯度。

#### [0033] 2.3 兔抗鼠 IgG 抗体的制备

[0034] 用 Balb/C 小鼠 IgG 免疫健康新西兰大白兔,制备高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清,采用饱和硫酸铵沉淀法对血清进行粗提,经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG。

#### [0035] 3 组织样品预处理方法的建立

[0036] 取 2g 动物组织(肉、肝)均质物,加入 5% 偏磷酸 10% 甲醇溶液 5mL,振荡 2min,4800r/min 离心 10min,取上清液,再按上述步骤重复提取一次,合并两次提取液。在提取液中加入乙酸乙酯 6mL,振荡 2min,4800r/min 离心 10min,取上清液,重复萃取一次,合并乙酸乙酯层。加入 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液 5mL 反萃取,振荡 1min,提取下清液,再按上述步骤重复提取一次,合并水相。取 MAX 柱子(60mg,3mL)净化,活化 MAX 柱子(3mL 甲醇,3mL 水)。样品提取液全部流出后,分别用 0.05mol/L NaOH 溶液 3mL、甲醇 3mL 淋洗,除去杂质干扰。最后用 2% 甲酸甲醇溶液 3mL 洗脱,收集洗脱液,45℃左右后氮气吹干,加入 2mL 二氯甲烷溶解残渣。分别向试管加入稀释后的衍生化试剂盒催化剂各 10 $\mu$ L,置 37℃水浴锅避光反应 5h。反应完毕 47℃氮气吹干,向离心管中加入样本稀释液 2mL,振荡 30s,作为试样溶液,供时间分辨荧光检测方法测定。

#### [0037] 4 制备试剂盒和检测组织样品

#### [0038] 4.1 Eu<sup>3+</sup>-羊抗鼠抗体的制备

[0039] 取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g 羊抗鼠抗体 1-2mL,经 PD-10 柱转换缓冲条件,洗脱液为含 0.155mmol/L NaCl 的 50mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH8.5 缓冲液。收集蛋白

峰,经紫外吸收分析定量( $1.46A_{280}-0.74A_{260}$ ),用上述洗脱液稀释羊抗鼠抗体至 2g/L。取 500-1000  $\mu$ l 稀释后的羊抗鼠抗体加入含 0.2mg-0.4mg 的  $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸( $\text{Eu}^{3+}$ -DTTA)的小瓶中,30℃磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱(1×40cm)层析, $A_{280}$  监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

#### [0040] 4.2 包被板固相抗原制备

[0041] 将 QCA-OVA 用 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  pH9.6 缓冲液稀释至 1mg/L 的包被液,48(或 96)孔微孔板各孔加 100  $\mu$ l,4℃放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,加 150  $\mu$ l 含 3g/L BSA 的上述缓冲液封闭,4℃放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃冷冻保存。

#### [0042] 4.3 试剂的配制

[0043] (1) 标准喹噁啉-2-羧酸(QCA):将喹噁啉-2-羧酸标准品衍生化后,得到 QCA-ABA 稀释成为 0ng/mL,0.1ng/mL,0.5ng/mL,1ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,50ng/mL 系列浓度,从喹噁啉-2-羧酸纯品中稀释得到,稀释液为 0.1mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液。

[0044] (2) 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.2% OVA、50  $\mu$ mol/L 二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1ml/L Tween-80 和 0.1%  $\text{NaN}_3$  的 Tris-HCl pH7.8。

[0045] (3) 洗涤液:14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和 0.2%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

[0046] (4) 增强液的配制:1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15  $\mu$ mol  $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮( $\beta$ -NTA),50  $\mu$ mol 三正辛基氧化膦(TOPO),1ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100)。

#### [0047] 4.4 试剂盒提供的试剂

[0048] 每一个盒中的试剂足够进行 96 个测量,盒中的材料如下:

[0049] (1) 1×96 孔板(8 条×12 孔,可以拆分为单孔)包被有 QCA-OVA。

[0050] (2) 6×喹噁啉-2-羧酸标准液,1.0mg/mL/瓶。

[0051] (3) 1×喹噁啉-2-羧酸抗体冻干品,用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0052] (4) 1× $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗鼠抗体冻干品,用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0053] (5) 1×增强液:15mL。

[0054] (6) 1×洗涤液:30mL,用时以蒸馏水 1:25 稀释。

[0055] (7) 1×缓冲液:30mL。

#### [0056] 4.5 测定之前注意事项

[0057] (1) 使用之前将所有试剂回升至室温(18-30℃)。

[0058] (2) 使用之后立即将所有试剂放回 2℃-8℃。

[0059] (3) 如果样品量大建议使用多通道移液器。

[0060] (4) 在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖子盖住微孔。

[0061] (5) 取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于 2℃-8℃。

#### [0062] 4.6 具体检测步骤如下

[0063] 取 QCA-OVA 板条,加入 50  $\mu$ l 的喹噁啉-2-羧酸标准与  $\gamma$ -氨基丁酸的衍生物(QCA-ABA)或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1:5000 稀释的喹噁啉-2-羧酸抗体 50  $\mu$ l,37℃振荡 1 小时,洗涤液洗四次,加缓冲液

1 : 600 稀释的 Eu<sup>3+</sup>- 羊抗鼠抗体 100  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 振荡 45 分钟, 用洗涤液洗六次, 加 200  $\mu$  L 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准抑制曲线(附图 1) 计算样品中的喹噁啉-2- 羧酸含量。表 1 为试剂盒标准曲线抑制率测定值, 本试剂盒灵敏度 IC<sub>50</sub>=1. 48ng/mL, 在猪肌肉和猪肝脏检测线分别为 0. 26ng/g 和 0. 22ng/g。

[0064] 表 1, 试剂盒标准曲线的测定

[0065]

喹噁啉-2-羧酸浓度 (ng/mL)	50	25	10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.1	0
抑制率 B/B <sub>0</sub> (%)	10	12	18	27	38	57	74	85	91	100

[0066] 5 本发明试剂盒的考核与应用

[0067] 5. 1 特异性

[0068] 采用间接竞争测定, 按照常规方法计算抗体的交叉反应率, 以交叉反应率为指标判断抗体特异性。结果如表 2 所示, 抗体除了与 3- 甲基喹噁啉-2- 羧酸有 36. 8% 的交叉反应率, 与喹乙醇、卡巴氧、喹赛多、喹烯酮、丁胺、四环素、红霉素无交叉反应

[0069] 表 2 本发明抗体特异性试验结果

	Compound	Cross-reactivity (%)
[0070]	QCA	100
	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	36.8
	喹乙醇	<0.01
	卡巴氧	<0.01
[0071]	喹赛多	<0.01
	喹烯酮	<0.01
	丁胺	<0.01
	四环素	<0.01
	红霉素	<0.01

[0072] 5. 2. 准确度和精密度

[0073] 将 QCA 标准液添加到猪肌肉或肝脏组织中, 使其浓度为 2. 5ng/g, 10ng/g, 50ng/g, 每个浓度重复 8 次, 重复 8 天, 按照实施例 4 所述方法提取、净化、衍生, 采用时间分辨荧光免疫检测样品中的 QCA 浓度, 并计算回收率和变异系数(结果见表 3)。回收率均在 96. 1%~112. 2% 之间, 板内和板间变异系数 <20%。

[0074] 表 3 本发明方法的准确度和精密度 (n=8)。

[0075]

添加量 (ng g <sup>-1</sup> )	猪肉			猪肝		
	回收率 (%)	板内变异 CV%	板间变异 CV%	回收率 (%)	板内变 异 CV%	板间变异 CV%
2.5	108.4	12.7	13.6	112.2	13.2	16.5
10	103.7	14.2	15.3	105.6	12.1	14.8
50	98.8	8.4	10.2	96.1	9.6	11.5

[0076] 5.3. 本发明试剂盒的应用

[0077] 本试验选择 96 头 15kg 左右的长大二元杂交去势健康仔猪, 随机分为 2 组, 即对照组和试验组。对照组饲喂不含任何抗菌药物的饲料, 试验组饲喂含 50mg/kg 喹噁啉-2-羧酸的饲料。试验期间, 自由采食, 自由饮水。连续饲喂 7d 后, 试验组停止饲喂加药饲料。于停药后 0d、4d、10d、14d 分别屠宰试验组猪 2 头, 对照组也分别在停药 0d、4d、10d、14d 屠宰 1 头, 采肌肉和肝脏, 同时用试剂盒和液相 (HPLC) 法同步测定。测定结果见表 4。试验结果表明试纸具有更高的灵敏度, 可用于定量检测动物性食品中的喹噁啉-2-羧酸残留。表 4 本发明试剂盒和 HPLC 法对猪肉、猪肝中喹噁啉-2-羧酸药物残留测试比较

组 织	停 药 时 间 (days)	HPLC	TR-FIA
		平均值 ± 标准 差 (ng/g)	平均值 ± 标准 差 (ng/g)
肌 肉	0	8.1 ± 0.8	7.8 ± 0.3
	4	4.5 ± 0.6	4.3 ± 0.2
	10	1.8 ± 0.3	0
	14	0	0
肝 脏	0	83.2 ± 8.3	81.3 ± 4.1
	4	35.6 ± 7.3	31.3 ± 5.7
	10	14.6 ± 2.4	16.8 ± 2.6
	14	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.7

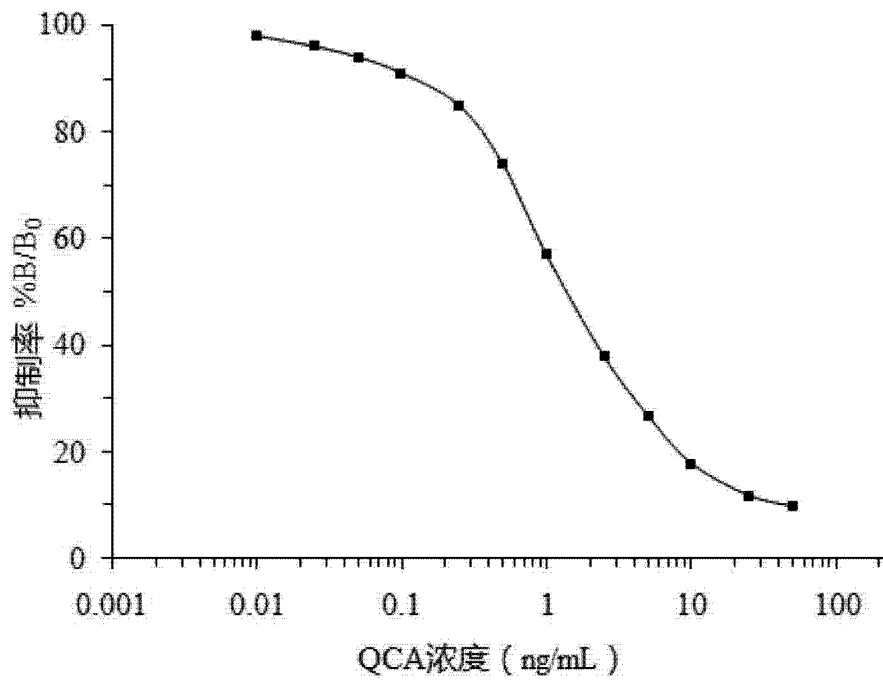


图 1

专利名称(译)	一种检测喹噁啉-2-羧酸的检测试剂盒及其方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102654500A</a>	公开(公告)日	2012-09-05
申请号	CN201210153905.3	申请日	2012-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	重庆市科学技术研究院		
[标]发明人	乐涛 贾渝跃 何红秋 李滨 牛小东 陈雍 王玉 段小炼 秦建波		
发明人	乐涛 贾渝跃 何红秋 李滨 牛小东 陈雍 王玉 段小炼 秦建波		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	郭云		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测喹噁啉-2-羧酸的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒及其检测方法，由多孔包被板，缓冲液，喹噁啉-2-羧酸标准，喹噁啉-2-羧酸的抗体冻干品，销标记的羊抗鼠抗体，洗涤液和增强液所组成。通过测量荧光强度cps，从标准曲线计算样品中的喹噁啉-2-羧酸含量。本发明具有结构简单、组装容易、耐腐蚀、重量轻、成本低、适用面广等特点，阀芯对中性能好，运动灵活可靠，能够起到良好的堵水效果。

