



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106008700 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610406844.5

(22)申请日 2016.06.08

(71)申请人 河南工业大学

地址 450001 河南省郑州市高新区莲花街100号

(72)发明人 赵银丽 苏兰利 王金荣 赵红月 刘珍 黄进

(74)专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通合伙) 41113

代理人 林新园

(51)Int.Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/113(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

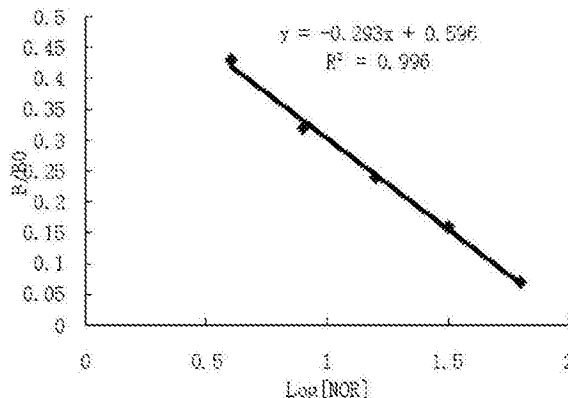
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用

(57)摘要

本发明公开了一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用。所述的试剂盒包括包被羊抗兔IgG的酶标板、抗氟喹诺酮类药物特异性抗体、氟喹诺酮类药物酶标半抗原、封闭液、洗涤液、底物液、终止液、氟喹诺酮类药物标准溶液。所述的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原是采用碳二亚胺一步法，将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联，使诺氟沙星的母环结构充分暴露，制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原。同时，本发明采用同样的方法合成诺氟沙星和辣根过氧化物酶的偶联物(NOR-HRP)，并结合多抗以及羊抗兔IgG，建立以羊抗兔IgG—多抗—NOR-HRP和氟喹诺酮类药物竞争ELISA的模式，实现对氟喹诺酮类药物的多残留检测。



1. 一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,其特征在於,所述的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原是采用碳二亚胺一步法,将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联,使诺氟沙星的母环结构充分暴露,制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原。

2. 一种如权利要求1所述的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原的制备方法,其特征在於,包括如下步骤:

(1)将6.6mg BSA和3mg EDC溶于2ml超纯水中,得到A液;

(2)将3.6mg诺氟沙星溶解于200 μ l DMF,得到B液;

(3)将B液加入A液中,室温避光磁力搅拌过夜,用pH7.2PBS透析3天,每天换液3次,收集透析液,3000r/min离心5min,收集上清液,真空冷冻干燥,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

3. 一种氟喹诺酮类药物酶标半抗原,其特征在於,所述的氟喹诺酮类药物酶标半抗原的制备方法,包括以下步骤:

(1)将4mg HRP和3mg EDC溶于2ml超纯水中,得到C液;

(2)将3.6mg诺氟沙星溶解于200 μ l DMF,得到D液;

(3)将D液加入C液中,室温避光磁力搅拌过夜,用pH7.2PBS透析3天,每天换液3次,收集透析液,3000r/min离心5min,收集上清液,真空冷冻干燥,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

4. 一种检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,其特征在於,所述的试剂盒包括包被羊抗兔IgG的酶标板、抗氟喹诺酮类药物特异性抗体、氟喹诺酮类药物酶标半抗原、封闭液、洗涤液、底物液、终止液、氟喹诺酮类药物标准溶液。

5. 根据权利要求4所述的检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,其特征在於,所述的抗氟喹诺酮类药物特异性抗体为抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,其特征在於,所述的抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

将氟喹诺酮类药物人工免疫抗原免疫新西兰白兔,每组3只,免疫剂量为每次500 μ g/只,背部皮下分点注射:首免,用PBS溶解氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,与等量FCA混合乳化;加强免疫,用PBS溶解氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,与等量FIA混合乳化;首免后15天进行,共免8次,每次间隔15天,最后一次免疫后10天兔耳缘静脉采血,分离血清,饱和硫酸铵盐析法纯化抗氟喹诺酮类的多克隆抗体,-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

7. 根据权利要求4所述的检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,其特征在於,所述的试剂盒还包括阴性对照和包被液。

8. 根据权利要求4所述的检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,其特征在於,所述的洗涤液为PBST洗涤缓冲液,即含质量分数0.05%的Tween-20的0.01mol/L、pH7.2磷酸盐缓冲液;封闭液为含质量分数5%猪血清的PBST;底物液为含TMB的底物溶液;包被液为0.05mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液;终止液为2mol/L H₂SO₄。

9. 根据权利要求4-8任一项所述的检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,其特征在於,所述的氟喹诺酮类药物包括诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、二氟沙星、达氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星、伊诺沙星、培氟沙星、氧氟沙星。

10. 一种如权利要求9所述的检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒在检测氟喹诺酮类药物残留方面的应用。

一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用,属于酶联免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 氟喹诺酮类药物(FQs)是一类具有6-氟-7-哌嗪-4-诺酮环结构(母核结构)的杀菌性抗菌药物,包括诺氟沙星(NOR)、环丙沙星、恩诺沙星、培氟沙星等,具有抗菌谱广,杀菌力强的优点,尤其是对革兰阴性杆菌具有很高的抗菌活性;另外,氟喹诺酮类药物还具有吸收快、体内分布广泛的优点,可治疗各个系统的感染性疾病。

[0003] 但是,随着氟喹诺酮类药物的滥用,氟喹诺酮类药物的残留已经严重危害到人体健康。2002年,我国规定了环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星等氟喹诺酮类药物在动物组织中的最高残留限量(MRL)为10-500 μ g/kg。

[0004] 目前,检测FQs残留的常用方法有色谱检测法和免疫学检测法。色谱检测方法需要昂贵的仪器和专门的工作人员,而且样品处理较烦琐,其应用受到一定的局限,尤其在基层大规模筛选和现场检测中的问题更加突出。免疫学检测方法灵敏、特异、快速、简便,克服了以上的不足,适合大规模筛选。

[0005] 姜金庆等报道的文献,采用碳二亚胺二步法合成环丙沙星人工抗原,免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,建立了检测环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星和培氟沙星4种氟喹诺酮类药物多残留的间接竞争ELISA。(姜金庆,杨雪峰,王自良.氟喹诺酮类药物多残留间接竞争ELISA检测方法的建立.中国预防兽医学报,2011,33(11):887-892.)。

[0006] 郑晓冬的发明专利(CN103592167A)公开了一种抗氟喹诺酮类兔单克隆抗体的制备方法及其用途。其选取氟喹诺酮类药物中的六种药物,利用半抗原的羧基与载体蛋白合成免疫抗原,其中环丙沙星,氧氟沙星,恩诺沙星的合成采用的是活性酯法,氟甲喹,达氟沙星,诺氟沙星采用的是氯甲酸异丁酯法。然后混和六种免疫抗原免疫兔子,再经过杂交瘤技术,得到抗氟喹诺酮类兔单克隆抗体。单抗对恩诺沙星、氧氟沙星、二氟沙星、培氟沙星、氟罗沙星、达氟沙星等氟喹诺酮类药物都有很好的检测效果。

[0007] 但是,从目前的文献报道来看,还没有对十种以上的氟喹诺酮类药物具有很好检测效果的试剂盒,因此从试剂盒的广谱度上进行完善,使试剂盒能够满足氟喹诺酮类药物多残留的检测具有重要的意义。

发明内容

[0008] 为了解决上述问题,本发明的目的是提供一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用,该人工免疫抗原是采用碳二亚胺一步法将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联,使诺氟沙星的母环结构充分暴露,制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原(NOR-BSA)。通过该抗原制备的抗氟喹

诺酮类多抗对诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、二氟沙星、达氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星、伊诺沙星、培氟沙星、氧氟沙星等10种氟喹诺酮类药物都有很好的检测效果。

[0009] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0010] 一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,所述的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原是采用碳二亚胺一步法,将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联,使诺氟沙星的母环结构充分暴露,制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原。

[0011] 一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0012] (1)将6.6mg BSA和3mg EDC溶于2ml超纯水中,得到A液;

[0013] (2)将3.6mg诺氟沙星溶解于200 μ l DMF,得到B液;

[0014] (3)将B液加入A液中,室温避光磁力搅拌过夜,用pH7.2PBS透析3天,每天换液3次,收集透析液,3000r/min离心5min,收集上清液,真空冷冻干燥,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0015] 一种氟喹诺酮类药物酶标半抗原,所述的氟喹诺酮类药物酶标半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1)将4mg HRP和3mg EDC溶于2ml超纯水中,得到C液;

[0017] (2)将3.6mg诺氟沙星溶解于200 μ l DMF,得到D液;

[0018] (3)将D液加入C液中,室温避光磁力搅拌过夜,用pH7.2PBS透析3天,每天换液3次,收集透析液,3000r/min离心5min,收集上清液,真空冷冻干燥,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0019] 一种检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒,所述的试剂盒包括包被羊抗兔IgG的酶标板、抗氟喹诺酮类药物特异性抗体、氟喹诺酮类药物酶标半抗原、封闭液、洗涤液、底物液、终止液、氟喹诺酮类药物标准溶液。

[0020] 所述的抗氟喹诺酮类药物特异性抗体为抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体。

[0021] 所述的抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0022] 将氟喹诺酮类药物人工免疫抗原免疫新西兰白兔,每组3只,免疫剂量为每次500 μ g/只,背部皮下分点注射:首免,用PBS溶解氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,与等量FCA混合乳化;加强免疫,用PBS溶解氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,与等量FIA混合乳化;首免后15天进行,共免8次,每次间隔15天,最后一次免疫后10天兔耳缘静脉采血,分离血清,饱和硫酸铵盐析法纯化抗氟喹诺酮类的多克隆抗体,-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

[0023] 所述的试剂盒还包括阴性对照和包被液。

[0024] 所述的洗涤液为PBST洗涤缓冲液,即含质量分数0.05%的Tween-20的0.01mol/L、pH7.2磷酸盐缓冲液;封闭液为含质量分数5%猪血清的PBST;底物液为含TMB的底物溶液;包被液为0.05mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液;终止液为2mol/L H₂SO₄。

[0025] 所述的氟喹诺酮类药物包括诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、二氟沙星、达氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星、伊诺沙星、培氟沙星、氧氟沙星。

[0026] 一种检测氟喹诺酮类药物残留的竞争ELISA试剂盒在检测氟喹诺酮类药物残留方面的应用。

[0027] 本发明的有益效果

[0028] 1、本发明采用碳二亚胺一步法将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联,使诺氟沙星的母环结构充分暴露,制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原(NOR-BSA)。同时,本发明利用该抗原免疫新西兰白兔制备抗氟喹诺酮类药物的多克

隆抗体,实验证明,本发明的抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体对诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、二氟沙星、达氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星、伊诺沙星、培氟沙星、氧氟沙星等10种氟喹诺酮类药物都有很好的检测效果。

[0029] 2、本发明采用同制备人工免疫抗原的方法合成诺氟沙星和辣根过氧化物酶的偶联物(NOR-HRP),并结合多抗以及羊抗兔1gG,建立以羊抗兔1gG—多抗—NOR-HRP和氟喹诺酮类药物竞争ELISA的模式,实现对氟喹诺酮类药物的多残留检测。

[0030] 3、本发明的试剂盒具有成本低、效率高、简单、快速、灵敏,可以同时实现10种氟喹诺酮类药物的残留检测,并且检测限低,符合国家的检测要求。实验证明,本发明的试剂盒的检出限为0.2 μ g/L,多抗对诺氟沙星的半数抑制浓度1C₅₀为2.1 μ g/L,竞争ELISA的线性检测范围为0.2~107.2 μ g/L。

附图说明

[0031] 图1为抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体对诺氟沙星的抑制曲线。

具体实施方式

[0032] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0033] 实施例1 氟喹诺酮类药物人工免疫抗原的制备

[0034] 本发明氟喹诺酮类药物人工免疫抗原是采用碳二亚胺一步法,将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联,使诺氟沙星的母环结构充分暴露,制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原(NOR-BSA),具体的制备方法包括如下步骤:

[0035] (1)将6.6mg牛血清白蛋白(BSA)和3mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)溶于2ml超纯水中,得到A液;

[0036] (2)将3.6mg诺氟沙星溶解于200 μ l二甲基甲酰胺(DMF),得到B液;

[0037] (3)将B液加入A液中,室温避光磁力搅拌过夜,用pH7.2PBS透析3天,每天换液3次,收集透析液,3000r/min离心5min,收集上清液,真空冷冻干燥,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0038] 实施例2 氟喹诺酮类药物酶标半抗原的制备

[0039] 本发明的氟喹诺酮类药物酶标半抗原(NOR-HRP)的制备方法,包括以下步骤:

[0040] (1)将4mg辣根过氧化物酶(HRP)和3mg EDC溶于2ml超纯水中,得到C液;

[0041] (2)将3.6mg诺氟沙星溶解于200 μ l DMF,得到D液;

[0042] (3)将D液加入C液中,室温避光磁力搅拌过夜,用pH7.2PBS透析3天,每天换液3次,收集透析液,3000r/min离心5min,收集上清液,真空冷冻干燥,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0043] 实施例3 抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体的制备

[0044] 本发明抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0045] 将氟喹诺酮类药物人工免疫抗原免疫新西兰白兔,每组3只,免疫剂量为每次500 μ g/只,背部皮下分点注射:首免,用PBS溶解氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,与等量FCA混合乳化;加强免疫,用PBS溶解氟喹诺酮类药物人工免疫抗原,与等量F1A混合乳化;首免后15天进行,共免8次,每次间隔15天,最后一次免疫后10天兔耳缘静脉采血,分离血清,饱和硫酸铵盐析法纯化抗氟喹诺酮类的多克隆抗体,-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

[0046] 实施例4 竞争ELISA试剂盒的组装

- [0047] 组装检测氟喹诺酮类药物的竞争ELISA试剂盒,具体如下:
- [0048] (1)包被羊抗兔IgG的酶标板;
- [0049] (2)氟喹诺酮类药物酶标半抗原;
- [0050] (3)抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体;
- [0051] (4)氟喹诺酮类药物标准溶液,浓度分别为64 μ g/L、32 μ g/L、16 μ g/L、8 μ g/L、4 μ g/L、2 μ g/L、1 μ g/L;氟喹诺酮类药物标准溶液也当作阳性对照;
- [0052] (5)阴性对照:0 μ g/L的标准品,也就是稀释标准品的PBS缓冲液;
- [0053] (6)洗涤液为PBST洗涤缓冲液,即含质量分数0.05%的Tween-20的0.01mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液;0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS):NaCl 8g,KCl 0.2g,Na₂HPO₄ 1.44g (Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.56g),KH₂PO₄ 0.2g,溶于双蒸水,并定容至1000mL;
- [0054] (7)底物液为含TMB底物溶液;
- [0055] 母液配方如下:
- [0056] A液:用0.1mol/L、pH 5.0醋酸钠/柠檬酸缓冲液加热溶解0.5g过氧化脲,再与0.08g非那西酞(预先加热溶于双蒸水)混合,再加入双蒸水定容至1000mL。
- [0057] B液:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)1.27g溶于500mL甲醇,再与500mL甘油混合。
- [0058] 使用前将A液和B液体积比1:1混合。
- [0059] (8)终止液为2mol/L H₂SO₄;
- [0060] (9)封闭液(SPBST)为含质量分数5%猪血清的PBST;
- [0061] (10)包被液(CBS)为0.05mol/L、pH9.6碳酸盐缓冲液:Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g,加双蒸水定容至1000mL。
- [0062] 实施例5 多抗和酶标半抗原工作浓度的确定
- [0063] 采用方阵滴定法确定竞争ELISA试剂盒中抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体和酶标半抗原工作浓度,包括如下步骤:
- [0064] (1)包被:将羊抗兔IgG用包被液稀释后,包被于酶标板;
- [0065] (2)封闭:用封闭液封闭;
- [0066] (3)加系列浓度(1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800)的抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体;
- [0067] (4)洗涤后,加入系列浓度(1:250、1:500、1:1000、1:2000)的酶标半抗原,使每个浓度的抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体均与不同浓度的酶标半抗原进行结合反应;
- [0068] (5)加底物液显色:加入新鲜配制的TMB底物溶液;
- [0069] (6)终止反应:加入终止液终止反应。
- [0070] (7)酶标仪读取各孔OD₄₅₀值,选择OD₄₅₀值为1.0左右时抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体和酶标半抗原的浓度为最佳工作浓度。方阵滴定结果显示,抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体的工作浓度为1:6400;NOR-HRP的工作浓度为1:500。
- [0071] 实施例6 竞争ELISA试剂盒的检测
- [0072] 本发明竞争ELISA试剂盒的检测方法,包括以下步骤:
- [0073] (1)包被:将羊抗兔IgG用包被液稀释后,包被于酶标板;羊抗兔IgG的质量浓度为4 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;PBST洗板,洗3次,每次浸泡3min;
- [0074] (2)封闭:用封闭液进行封闭;300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育1h,PBST洗板;

[0075] (3)加一抗:加入抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体;100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育30min, PBST洗板;

[0076] (4)加入酶标半抗原和竞争物:加入酶标半抗原(NOR-HRP),50 μ L/孔;再按照设定在每孔中分别加入浓度为64 μ g/L、32 μ g/L、16 μ g/L、8 μ g/L、4 μ g/L、2 μ g/L、1 μ g/L的氟喹诺酮类药物标准溶液、待测样品或阴性对照(0 μ g/L的标准品,也就是稀释标准品的PBS缓冲液),每孔均为50 μ L/孔;37 $^{\circ}$ C温育30min, PBST洗板;

[0077] (5)加底物液显色:加入新鲜配制的TMB底物溶液;100 μ L/孔,显色10min;

[0078] (6)终止反应:加入终止液终止反应,100 μ L/孔;

[0079] (7)结果判定:测定450nm波长下的OD值,与阴性对照相比,大于阴性对照OD值的2.1倍,即为阳性。

[0080] 以系列氟喹诺酮类药物标准溶液不同浓度对数值($\log C$)为横坐标,以多抗对不同浓度氟喹诺酮类药物标准溶液的抑制率 B/B_0 (B 是氟喹诺酮类药物不同浓度标准品的 OD_{450} 值, B_0 是氟喹诺酮类药物浓度0 μ g/L的 OD_{450} 值)为纵坐标绘制标准曲线,根据待测样品的抑制率计算氟喹诺酮类在待测样品中的含量,以20%的抑制率确定其检测限。

[0081] 实施例7 竞争ELISA试剂盒的检测方法

[0082] (1)样品溶液的制备:

[0083] 1g鸡肉样品用1ml提取物(甲醇:PBS=1:1)匀浆,在旋涡振荡器上混匀5s,然后用高速搅拌器剧烈搅拌10min,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心10min,取上清用PBS做1:10倍稀释后备用。

[0084] (2)包被:将羊抗兔IgG用包被液稀释后,包被于酶标板;羊抗兔IgG的质量浓度为4 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;PBST洗板,洗3次,每次浸泡3min;

[0085] (3)封闭:用封闭液进行封闭;300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育1h, PBST洗板;

[0086] (4)加一抗:加入抗氟喹诺酮类药物的多克隆抗体;100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C温育30min, PBST洗板;

[0087] (5)加入酶标半抗原和竞争物:加入酶标半抗原(NOR-HRP),50 μ L/孔;再按照设定在每孔中分别加入待测样品或阴性对照,每孔均为50 μ L/孔;37 $^{\circ}$ C温育30min, PBST洗板;

[0088] (6)加底物液显色:加入新鲜配制的TMB底物溶液;100 μ L/孔,显色10min;

[0089] (7)终止反应:加入终止液终止反应,100 μ L/孔。

[0090] (8)于酶标仪450nm波长下的测定OD值。计算其抑制百分率。

[0091] 同时,以系列浓度的NOR标准溶液替代样品溶液,重复上述步骤,计算抑制百分率。以抑制百分率 B/B_0 为纵坐标,诺氟沙星浓度对数值($\log C$)为横坐标,绘制标准曲线(图1),根据标准曲线计算样品中NOR的含量。

[0092] 多抗对NOR的抑制曲线如图1所示,回归方程 $Y = -0.293X + 0.596$,相关系数 $R^2 = 0.996$ 。以80%结合率为最低检出量,即抑制率为20%($1C_{20}$),则竞争ELISA试剂盒的最低检出限为0.2 μ g/L,多抗对NOR的半数抑制浓度 $1C_{50}$ 为2.1 μ g/L。竞争ELISA的线性检测范围为0.2~107.2 μ g/L。

[0093] 实施例8 竞争ELISA试剂盒的准确度测定

[0094] 取3个浓度的NOR样品进行添加回收实验,每个浓度做3个平行,分别计算回收率和变异系数CV%,结果见表1。由表1可见,鸡肉样的添加回收率在89.1%~94.8%,变异系数CV 3.31~5.79%,说明检测结果具有较高的准确度。

[0095] 表1 竞争ELISA试剂盒测定鸡肉样品中诺氟沙星含量回收率实验结果(n=3)

	样品	NOR 添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%	CV/%
[0096]	鸡肉	8	7.25±0.24	90.6±3.0	3.31
		32	28.5±1.65	89.1±5.16	5.79
		64	60.7±3.45	94.8±5.39	5.68

[0097] 实施例9 竞争ELISA试剂盒的交叉反应率测定

[0098] 测定本发明制备的多抗对10种氟喹诺酮类药物的交叉反应率和 $1C_{50}$,结果见表2。由表2可见,本发明制备的多抗对10种氟喹诺酮类药物的交叉反应率在66~100%之间,半数抑制浓度在2.1~3.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之间,可以实现对多种氟喹诺酮类药物的检测。

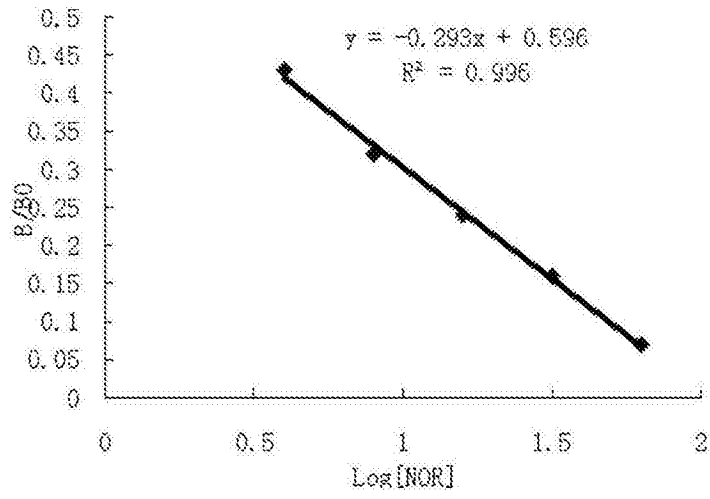
[0099] 表2 本发明制备的抗体对氟喹诺酮类药物的交叉反应率

	抑制物	半数抑制浓度 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{L}$)	交叉反应率/%
[0100]	诺氟沙星	2.1	100
	恩诺沙星	2.5	84
	环丙沙星	2.3	91
	达氟沙星	2.6	81
	二氟沙星	2.7	77
	氧氟沙星	2.6	81
	沙拉沙星	2.8	75
	伊诺沙星	2.6	81
	洛美沙星	2.8	75
	培氟沙星	3.2	66

[0101] 实施例10 竞争ELISA试剂盒的稳定性测定

[0102] 将试剂盒放置在2℃-8℃保存12个月,期间每隔1个月检测一次,测定试剂盒的 $1C_{50}$ 值、 OD_{max} 、回收率等各项参数均在正常范围内。同时将试剂盒放置在37℃和-20℃放置6天,每天检测一次,测定试剂盒的 $1C_{50}$ 值、 OD_{max} 、回收率等各项参数均在正常范围之内。

[0103] 从以上结果看出,三种条件保存试验,本试剂盒的各项指标均符合质量要求,因此,本发明的试剂盒可以在2℃-8℃保存至少12个月。



专利名称(译)	一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN106008700A	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610406844.5	申请日	2016-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	河南工业大学		
申请(专利权)人(译)	河南工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南工业大学		
[标]发明人	赵银丽 苏兰利 王金荣 赵红月 刘珍 黄进		
发明人	赵银丽 苏兰利 王金荣 赵红月 刘珍 黄进		
IPC分类号	C07K14/765 C07K1/113 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氟喹诺酮类药物人工免疫抗原、制备方法、酶标抗原、竞争ELISA试剂盒及应用。所述的试剂盒包括包被羊抗兔IgG的酶标板、抗氟喹诺酮类药物特异性抗体、氟喹诺酮类药物酶标半抗原、封闭液、洗涤液、底物液、终止液、氟喹诺酮类药物标准溶液。所述的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原是采用碳二亚胺一步法，将牛血清白蛋白的羧基与诺氟沙星7位哌嗪环上的氨基偶联，使诺氟沙星的母环结构充分暴露，制得具有母环结构的氟喹诺酮类药物人工免疫抗原。同时，本发明采用同样的方法合成诺氟沙星和辣根过氧化物酶的偶联物(NOR-HRP)，并结合多抗以及羊抗兔IgG，建立以羊抗兔IgG—多抗—NOR-HRP和氟喹诺酮类药物竞争ELISA的模式，实现对氟喹诺酮类药物的多残留检测。

