



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101995468 A

(43) 申请公布日 2011.03.30

(21) 申请号 201010268985.8

C12N 15/70(2006.01)

(22) 申请日 2010.08.31

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 孙远明 王弘 徐振林 雷红涛
沈玉栋 杨金易

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

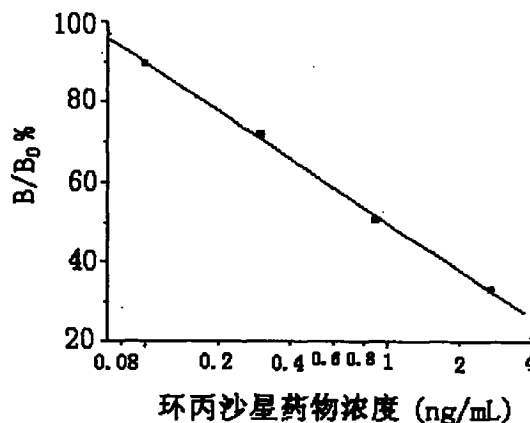
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒及其检测方法。本发明所述试剂盒包被有环丙沙星抗原的酶标板，镧系元素标记羊抗兔或羊抗鼠抗体、环丙沙星抗体等。本发明还公开了应用上述试剂盒检测环丙沙星残留的方法。本发明提供的检测环丙沙星的试剂盒采用间接竞争时间分辨免疫分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。



1. 一种检测环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒,其特征包括包被了环丙沙星抗原的酶标板、环丙沙星抗体、镧系元素标记羊抗兔或羊抗鼠抗体;所述镧系元素为 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 或 Sm^{3+} 。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征包括所述环丙沙星抗原是将环丙沙星和载体蛋白偶联得到;所述环丙沙星抗体包括单克隆抗体、兔多克隆抗体或基因工程抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征包括还包括环丙沙星标准溶液、增强液、浓缩洗涤液和样品稀释浓缩液。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征包括所述环丙沙星标准溶液是以浓度为 $1000 \mu\text{g/L}$ 的环丙沙星配成的浓度梯度为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $0.3 \mu\text{g/L}$ 、 $0.9 \mu\text{g/L}$ 、 $2.7 \mu\text{g/L}$ 、 $8.1 \mu\text{g/L}$ 的环丙沙星标准品溶液。

5. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征包括所述增强液包括 β -二酮体、三辛基氧化磷(TOPO)、Triton X-100、冰醋酸和 pH 值为 2.0 ~ 3.2 的邻苯二甲酸氢钾。

6. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征包括所述浓缩洗液包括 0.5 ~ 1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.4,浓度为 0.1mol/L ;所述浓缩稀释液为 pH 值 7.4 ~ 8.0、 $0.1 \sim 0.25 \text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液。

7. 根据权利要求 1 所述的时间分辨免疫分析试剂盒,其特征包括所述酶标板是 96/40 孔酶标板,且空白板的荧光值低于 1000。

8. 一种环丙沙星的检测方法,其特征包括以下步骤:

- (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;
- (3) 结果处理与分析。

9. 根据权利要求 8 所述的检测方法,其特征包括所述样品前处理为:

(1) 蜂蜜:

称取样品 3g,加入 3mL 蒸馏水,振荡均匀,加入 6mL 乙酸乙酯,振荡 15min,5000r/min 离心 10min,吸取上层 2mL 旋转蒸干,加入 1mL 正己烷溶解干燥物,再加入 1mL PBS 溶液复溶,除去上层正己烷相,下层清夜 $50 \mu\text{L}$ 待测;

或 (2) 禽蛋:

称取样品 3g,加入乙腈-水溶液 6mL,振荡 10min,5000r/min 离心 10min,取上层 2mL,加入 2mL 乙酸乙酯,振荡 15min,5000r/min 离心 10min,吸取全部上层溶液,旋转蒸干,加入 1mL 正己烷溶解干燥物,再加入 1mL PBS 溶液复溶,除去上层正己烷相,下层清夜 $50 \mu\text{L}$ 待测;

或 (3) 组织:

所述组织包括肌肉、肝脏或肾脏;称取样品 3g,加入 PBS 3mL,振荡 10min,5000r/min 离心 10min,取上层 2mL 加入等量正己烷,轻轻混匀,5000r/min 离心 10min,取下层清夜 $50 \mu\text{L}$ 待测。

10. 根据权利要求 5 所述的检测方法,其特征包括以下步骤:

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于 $20 \sim 24^\circ\text{C}$ 环境中平衡不少于 30min,将酶标板条固定,做平行实验,按顺序编号;

(2) 在标准品孔加入 $50 \mu\text{L}$ 标准溶液,样品孔加入 $50 \mu\text{L}$ 待测样品,然后每孔加入

50 μ L 环丙沙星抗体工作液,混匀;振荡反应;

(3) 步骤(2)所述振荡反应洗板,拍干,每孔加入 100 μ L 镧系元素标二抗工作液,振荡反应;

(4) 步骤(2)所述振荡反应洗板,拍干,每孔加入 200 μ L 增强液,混匀,避光室温轻拍振荡;

(5) 用时间分辨免疫分析检测仪测定各孔荧光值;

(6) 根据标准溶液荧光值与浓度半对数做标准曲线,根据标准曲线与样品溶液荧光值计算样品浓度。

环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,涉及一种化学品污染残留的检测试剂盒及其制备方法,具体涉及一种检测环丙沙星残留的时间分辨免疫分析试剂盒及其制备方法。

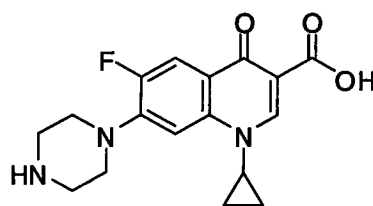
背景技术

[0002] 食品安全是关系到广大人民的日常生活的一件大事。食品安全问题主要包括食品中的物理危害、化学危害和微生物危害等几个因素,其中化学危害主要包括兽药残留、农药残留、重金属、环境有害物等。

[0003] 联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 残留联合立法委员会将兽药残留定义为:动物产品的任何可食部分所含兽药的母体化合物及其代谢物,以及兽药有关的杂质。兽药残留已成为困扰全世界食品安全的难题,也是各国用以设置贸易壁垒的最主要的手段之一。

[0004] 环丙沙星 (Enrofloxacin) 为一类人工合成的新型杀菌性抗菌药物,其抗菌谱广、抗菌活性强,在临床和兽医临床上得到广泛应用。然而环丙沙星在兽医临床应用时所产生的耐药性、残留毒性对人体的不良反应已引起广泛关注,其残留通过食物链积累会对人类健康造成危害并使细菌产生抗药性。欧盟、美国、日本、中国均对环丙沙星此类抗生素做了限量或禁用。由于动物性食品中的兽药残留问题越来越受到国际社会的关注,世界各国均加强了对国际贸易中动物性食品中兽药残留的检测。因此,为了保证动物性食品的安全,保障消费者健康,促进国际贸易的顺利开展,建立动物性食品中环丙沙星的检测标准具有重要的意义。其结构式如下:

[0005]



[0006] 现今,国内外已经建立了许多方法检测动物性食品中残留的环丙沙星,包括微生物检测法、HPLC法、MS法和LC-MS、免疫分析等方法。其中微生物检测法的检测限常高于药物的最大残留量,不够灵敏,且难以用于样品的定性。仪器方法准确、灵敏,但是由于价格昂贵、时间长、技术要求高等原因从而限制其应用于大批量样品的筛选。目前常用的免疫分析方法有酶联免疫免疫分析 (ELISA)、化学发光免疫分析 (CLIA)、时间分辨免疫分析 (TRFIA) 方法,其中时间分辨免疫分析 (TRFIA) 具有灵敏度高、快速、特异性强、稳定性好、操作简便、分析结果准确等优点,是目前最具有潜力的免疫分析方法之一。

[0007] 时间分辨免疫分析 (TRFIA) 和通常的普通的荧光分析原理基本相同,只是 TRFIA 采用了一种特殊的标记物标记蛋白质、多肽、激素、抗体、核酸探针或生物活性细胞,待反应体系发生后,用时间分辨荧光仪测定最后产物中的荧光强度,根据荧光强度和相对荧光强

度比值,判断反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。

[0008] 时间分辨免疫分析 (TRFIA) 是以镧系元素如铕 (Eu)、钐 (Sm)、镝 (Dy)、铽 (Te) 等稀土离子为标记物,稀土离子需通过双功能螯合剂的桥联作用才能标记抗原或抗体,双功能螯合剂的一端与 Eu^{3+} 等连接,另一端同抗原或抗体分子上的氨基连接。常用的螯合剂有 N_2 -[p-异硫氰酸-苯基]-二乙烯三胺四醋酸 (DTTA)、异硫氰酸-苯基-EDTA 及环化二乙烯三胺五醋酸酐 (cDPTA) 等,它们含有带氨基羧酸或带异硫氰酸基羧酸等活性基团,有很强的螯合稀土元素的能力。

[0009] 时间分辨免疫分析 (TRFIA) 根据免疫分析方法模式的不同可以分为竞争法和夹心法两种。

[0010] (1) 竞争法:主要用于小分子抗原、半抗原及一些抗体的检测。包括直接竞争法或间接竞争法,直接竞争法一般在微孔板预先包被第二抗体,先加入一定量的第一抗体和样品,孵育洗涤后再加入 Eu^{3+} 标记的小分子抗原竞争结合第一抗体。间接竞争法一般在微孔板预先包被抗原,加入一定量的第一抗体和样品,孵育洗涤后再加入 Eu^{3+} 标记的第二抗体进行示踪。而在一些抗体的检测中,标记抗体和样品中的抗体通过竞争结合一定量的中和抗原来进行分析的。最后,通过孵育洗涤加入增强溶液,所测得的荧光强度与样品的含量成反比,标准曲线为竞争抑制曲线。

[0011] (2) 夹心法:用于大分子生物活性物质的检测,该分析的微孔板包被一株抗体,稀土离子标记另一株抗体,最后形成抗体-抗原-抗体-标记物复合物,所测得的荧光强度与样品的含量成正比,标准曲线为饱和平衡曲线。

[0012] 近年来时间分辨免疫分析 (TRFIA) 以其特出的优点逐渐为人们所重视,目前,该技术已不局限于临床诊断领域,而渗透到生物学研究的各个领域。它是目前最灵敏的超微量分析技术之一,其灵敏度高达 10^{-19}mol/L ,较放射性免疫分析 (RIA) 的 10^{-16}mol/L 高出 3 个数量级。

[0013] 但目前尚无采用时间分辨免疫分析法检测环丙沙星的相关技术报道,更没有一种适合进行环丙沙星时间分辨免疫分析检测的试剂盒,以便于实现高灵敏度、操作简单的大批量快速检测。

发明内容

[0014] 本发明的一个目的是克服现有技术的不足,提供一种检测环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒。

[0015] 本发明的另一个目的是提供所述检测环丙沙星残留的方法,高灵敏度、操作简单,能大批量快速检测。

[0016] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现:

[0017] 提供一种检测环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒,包括包被了环丙沙星抗原的酶标板、环丙沙星抗体、镧系元素标记羊抗兔或羊抗鼠抗体 (二抗);所述镧系元素包括 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 或 Sm^{3+} 等稀土元素。

[0018] 所述环丙沙星抗原是将环丙沙星和牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、钥孔血蓝蛋白 (KLH) 等载体蛋白,通过碳二亚胺法 (EDC)、活泼酯法 (DCC、NHS)、混合酸酐法 (氯甲酸异丁酯) 进行偶联得到包被抗原与免疫原。免疫原与包被原通过柱层析进行纯化,

纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0019] 所述环丙沙星抗体包括单克隆抗体、兔多克隆抗体或基因工程抗体。

[0020] 所述单克隆抗体经动物免疫、细胞融合与克隆、细胞冻存和复苏及体内诱生法制备得到；所述动物免疫是以环丙沙星与载体蛋白偶联物为免疫原对 Ba1b/c 小鼠进行间隔免疫，间接免疫分析检测并得到血液里含有环丙沙星特异性抗体的小鼠脾脏。所述细胞融合与克隆是取产生特异性抗体的 Ba1b/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 融合，采用间接竞争时间分辨免疫分析方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化，得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。所述细胞冻存和复苏是取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液，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℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。所述单克隆抗体的制备与纯化是采用体内诱生法，将 Ba1b/c 小鼠（8 周龄）腹腔注入灭菌石蜡油，7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7 ~ 10 天后采集腹水。经辛酸 - 饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化，纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定，小瓶分装，-20℃ 保存。

[0021] 所述环丙沙星兔多克隆抗体是采用新西兰大白兔作为免疫动物，以环丙沙星与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸胺分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0022] 所述环丙沙星基因工程抗体是指小分子抗体，包括：Fab（由完整的轻链和 Fd 构成），Fv（由 V_H 和 V_L 构成），ScFv（单链抗体， V_H 和 V_L 之间由一条连接肽连接而成），单域抗体（仅由 V_H 组成）等经基因工程技术改造后的抗体。

[0023] 制备方法为：提取环丙沙星单克隆细胞或经环丙沙星免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因，插入适当的表达质粒，在大肠杆菌中表达，利用免疫亲和方法进行纯化，纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0024] 所述镧系元素标记羊抗兔或羊抗鼠抗体的制备，以 Eu^{3+} 标羊抗兔为例，取溶解于 0.05mol/L PBS pH7.4 的 5mg/mL 羊抗鼠 IgG 1ml，经 PD-10 柱转换缓冲盐条件，洗脱液为 50mmol/L pH 9.6 $NaCO_3$ - $NaHCO_3$ 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至 2mg/mL。取 500 μ L 稀释后的羊抗鼠 IgG 加入含 0.2mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙酸烯三胺四乙酸（ Eu^{3+} -DTTA）的棕色小瓶中，置于 28℃ 恒温烘箱中反应 48h，反应液用 50mmol/L Tris-HCl pH 7.8 缓冲液平衡的 SepharoseCL-6B（1 \times 30cm）层析，测定每管的荧光计数值，检测稀释后的第一个计数峰，稀释后备用。

[0025] 标记率 = 标记个数 / IgG 分子数

[0026] 为了方便现场操作和批量检测，所述试剂盒还可以包括环丙沙星标准溶液、增强液、浓缩洗涤液、样品稀释浓缩液。

[0027] 优选地，还可以包括盒体、包被缓冲液、洗涤缓冲液、封闭液和盖板膜。

[0028] 所述环丙沙星标准溶液是以浓度为 1000 μ g/L 的环丙沙星作为贮备液，使用前再配成浓度梯度为 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 μ g/L 的环丙沙星标准品溶液；

[0029] 所述增强液包括 β -二酮体、三辛基氧化磷（TOPO）、TritonX-100、冰醋酸和邻苯二甲酸氢钾（pH 值为 2.0 ~ 3.2）；将 6mL 冰醋酸用 0.1mol/L 的邻苯二甲酸氢钾调 pH 值至

3. 2, 加入 $15 \mu\text{mol}$ β -二酮体 (β -NTA), $50 \mu\text{mol}$ 三辛基氧化膦, 1mL Triton X-100, 加三蒸水定容至 1L 。

[0030] 所述浓缩洗液包括 $0.5 \sim 1.5\%$ (体积比浓度) 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.4 , 0.1mol/L), 为常规使用浓度的 $15 \sim 25$ 倍。

[0031] 所述浓缩稀释液 pH 值 $7.4 \sim 8.0$, $0.1 \sim 0.25\text{mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 为常规使用浓度的 $5 \sim 15$ 倍。

[0032] 所述酶标板是 $96/40$ 孔酶标板, 包被有能与抗环丙沙星抗体特异结合的环丙沙星抗原, 并封闭微孔表面未吸附位点; 所述封闭液包括溶于 PBS 的脱脂奶粉溶液 (5g 脱脂奶粉 : 100mL PBS) 和以稀释液稀释至终浓度 3% (体积比浓度) 的小牛血清 3mL (灭活)。

[0033] 本发明同时提供了检测环丙沙星残留的方法, 包括以下步骤:

[0034] (1) 样品前处理;

[0035] a. 蜂蜜

[0036] 称取样品 3g , 加入 3mL 蒸馏水, 振荡均匀, 加入 6mL 乙酸乙酯, 振荡 15min 。 5000r/min 离心 10min , 吸取上层 2mL 旋转蒸干。加入 1mL 正己烷溶解干燥物, 再加入 1mL PBS 溶液复溶, 除去上层正己烷相, 下层清液 $50 \mu\text{L}$ 待测;

[0037] b. 禽蛋

[0038] 称取样品 3g , 加入乙腈-水溶液 ($80 : 20$) 6mL , 振荡 10min , 5000r/min 离心 10min , 取上层 2mL , 加入 2mL 乙酸乙酯, 振荡 15min , 5000r/min 离心 10min , 吸取全部上层溶液, 旋转蒸干。加入 1mL 正己烷溶解干燥物, 再加入 1mL PBS 溶液复溶。除去上层正己烷相, 下层清液 $50 \mu\text{L}$ 待测,

[0039] c. 组织 (检测用肌肉、肝脏或肾脏等)

[0040] 称取样品 3g , 加入 PBS 3mL , 振荡 10min , 5000r/min 离心 10min , 取上层 2mL 加入等量正己烷, 轻轻混匀, 5000r/min 离心 10min , 取下层清液 $50 \mu\text{L}$ 待测。

[0041] (2) 利用本发明试剂盒对标准溶液和样品进行检测。

[0042] (3) 根据标准曲线与样品溶液荧光值计算样品浓度。

[0043] 本发明主要试剂以工作液的形式提供, 节省操作时间, 所述检测具体包括以下步骤:

[0044] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出, 置于 $20 \sim 24^\circ\text{C}$ 环境中平衡不少于 30min , 将酶标板条固定, 做两个平行实验, 按顺序编号;

[0045] (2) 在标准品孔加入 $50 \mu\text{L}$ 标准溶液, 样品孔加入 $50 \mu\text{L}$ 待测样品, 然后每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 环丙沙星单克隆抗体工作液, 混匀; 振荡反应 45min ;

[0046] (3) 待反应后洗板六次, 并在吸水纸上拍干, 以保证完全除去孔中的液体。每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 钨标二抗工作液, 振荡反应 45min ;

[0047] (4) 待反应后洗板六次, 并在吸水纸上拍干, 以保证完全除去孔中的液体。每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 增强液, 混匀, 避光室温轻拍振荡 5min ;

[0048] (5) 用时间分辨免疫分析 (TRFIA) 检测仪测定各孔荧光值;

[0049] (6) 根据标准溶液荧光值与浓度半对数做标准曲线, 根据标准曲线与样品溶液荧光值计算样品浓度。

[0050] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分荧光值, 以百分荧光值为纵坐标, 环丙

沙星标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分荧光值,根据方程式求出对应样品的环丙沙星浓度。所述百分荧光值的计算式为:

[0051] 百分荧光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100$

[0052] 其中, B 为标准溶液或样品的平均荧光值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均荧光值。

[0053] 检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。

[0054] 本发明的有益效果:

[0055] 本发明采用镧系元素作标记物, DTTA 为螯合剂,建立了对环丙沙星的定量分析方法,此法操作流程短、简单、快速,精密度和准确度均较好,样品前处理简单。尤其是采用铕 (Eu^{3+}) 作标记物, DTTA 为螯合剂,效果好,成本低。

[0056] 本发明采取密封保存的方式保证所述酶标板的空白板的荧光值低于 1000,保证没有稀土元素的污染。

[0057] 浓缩洗涤液为含 0.5 ~ 1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4, 0.1mol/L), 为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍;所述样品稀释浓缩液为 pH7.4 ~ 8.0、0.1 ~ 0.25mol/L 的磷酸盐缓冲液,为正常使用浓度的 5 ~ 15 倍,减少体积,方便在试剂盒中配备。

[0058] 本发明使用酸性增强液,使铕离子 (Eu^{3+}) 从螯合物中解离下来,游离的 Eu^{3+} 在三辛基氧化膦协同下,重新与 β -二酮体形成一种新的能够高效率地接受激发光的螯合物。在激发光激发下,铕离子获能,经过电子跃迁并返回基态,便可发射出极强的荧光信号,在时间分辨免疫 (TRFIA) 分析仪上读出其荧光值,其灵敏度可达 $16 \times 10^{-18} \text{molEu}^{3+}$ 。

[0059] 本发明对环丙沙星线性检测范围为 $0.1 \sim 8.1 \mu\text{g/L}$,检测限可达到 $0.1 \mu\text{g/L}$,整个检测过程仅需 2h 就可以完成。

附图说明

[0060] 图 1 标准曲线

具体实施方式

[0061] 下面结合附图和具体实施例进一步详细说明本发明。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0062] 实施例 1 抗原的制备

[0063] 环丙沙星抗原的制备:

[0064] a. 将 $50 \mu\text{mol/L}$ 环丙沙星溶解在 1mL 的 DMF 中,然后在该溶液中加入等摩尔的 DCC 和 NHS,让其在室温下反应过夜;

[0065] b. 离心,取上清液 $800 \mu\text{L}$,缓慢加入到 4mL 15mg/mL 的 BSA 或 OVA 载体蛋白碳酸缓冲溶液中,然后在磁力搅拌下反应 4h;

[0066] c. 待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析 2 次,然后用 0.8% 生理盐水透析,得产物;

[0067] d. 采用紫外扫描测定结合比 (陈新建等,1998),最后将抗原浓缩保存或冻干保存得到环丙沙星免疫原和包被原,分装保存于 -20°C 的冰箱中。

[0068] 实施例 2 抗体的制备

[0069] 环丙沙星兔单克隆抗体制备：

[0070] 动物免疫：以环丙沙星与载体蛋白偶联物为免疫原对 Ba1b/c 小鼠进行间隔免疫，间接免疫分析检测并得到血液里含有环丙沙星特异性抗体的小鼠脾脏。

[0071] 细胞融合与克隆：取产生特异性抗体的 Ba1b/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化，得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0072] 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℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

[0073] 单克隆抗体的制备与纯化：采用体内诱生法，将 Ba1b/c 小鼠（8 周龄）腹腔注入灭菌石蜡油，7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7 ~ 10 天后采集腹水。经辛酸 - 饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化，纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定，小瓶分装，-20℃ 保存。

[0074] (3) 环丙沙星兔多克隆抗体的制备

[0075] 采用新西兰大白兔作为免疫动物，以环丙沙星与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸胺分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0076] (4) 环丙沙星基因工程抗体的制备

[0077] 所述恩诺沙星基因工程抗体是指小分子抗体，包括：Fab（由完整的轻链和 Fd 构成），Fv（由 V_H 和 V_L 构成），ScFv（单链抗体， V_H 和 V_L 之间由一条连接肽连接而成），单域抗体（仅由 V_H 组成）等经基因工程技术改造后的抗体。

[0078] 制备方法为：提取环丙沙星单克隆细胞或经环丙沙星免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因，插入适当的表达质粒（TG1 菌株，市购），在大肠杆菌中表达，利用免疫亲和方法进行纯化，纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0079] 其中 V_H (Back)、 V_H (For) 两条引物用于扩增抗体重链可变区基因 V_H ； V_L (Back)、 V_L (For) 两条引物用于扩增抗体轻链可变区基因 V_L ；Linker1、Linker2 两条引物作为接头引物用于重叠延伸 PCR 法拼接 V_H 、 V_L 基因片段成 scFv 基因片段，此接头引物内含编码连接肽 $(Gly_4Ser)_3$ 基因片段，5' 端与 V_H 片段端 3' 互补，3' 端与 V_L 片段 5' 端互补。RS(Back)、RS(For) 两条引物用于二次 PCR 扩增全长 scFv 基因片段，同时引入 BgI 及 Not I 酶切位点。R1、R2 两条引物为载体上引物，用于载体插入片段的 PCR 鉴定。

[0080] V_H (Back) 5' -CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG-3'

[0081] V_H (For) 5' -TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT GCC-3'

[0082] V_L (Back) 5' -GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3'

[0083] V_L (For) 5' -CCG TTT TAT TTC CAG CCT GGT CCC-3'

[0084] Linker1 5' -GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA

[0085] GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GG-3'

[0086] Linker2 5' -TGG AGA CTG AGT GAG CTC GAT GTC CGATCC GCC

[0087] ACC GCC AGA GCC ACC TCC GCC-3'

[0088] RS(Back) 5' \square -GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG

[0089] (含 Bgl I 位点)GCC CAG GTC AAA CTG CAG GAG TCA GG-3' \square

[0090] RS(For) 5' \square -GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC

[0091] (含 Not I 位点)CAG CCT GGT CCC-3' \square

[0092] R1 5' \square -CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3' \square

[0093] R2 5' \square -CGA TCT AAA GTT TTG TCG TCT TTC C-3' \square

[0094] V_L 的扩增条件:反应溶液涡旋混匀,短暂离心后,进行 PCR 扩增反应,反应过程及条件为:94°C \times 5min 变性,加入 1 μ L 高保真 Pfu 酶 (2.5U),进行以下循环:94°C \times 30s, 54°C \times 1min, 72°C \times 1min,共 25 个循环,最后 72°C 延伸 10min。反应完毕后, V_L 反应产物取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

[0095] V_H 的扩增条件:反应溶液涡旋混匀,短暂离心后,进行 PCR 扩增反应,反应过程及条件为:94°C \times 5min 变性,加入 1 μ L 高保真 Pfu 酶 (2.5U),进行以下循环:94°C \times 30s, 60°C \times 1min, 72°C \times 1min,共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10min。反应完毕后, V_H 反应产物取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

[0096] (1) scFv 基因片段拼接及 PCR 扩增:

[0097] 重叠延伸反应

[0098] 首先按以下反应体系进行 linker 的预拼接:

[0099] Linker1 引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L

[0100] Linker2 引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L

[0101] 10 \times PCR Buffer 5 μ L

[0102] dNTP (2.5mmol/L) 4 μ L

[0103] 去离子水 4.5 μ L

[0104] _____

[0105] 总体积 44.5 μ L

[0106] 反应溶液涡旋混匀,短暂离心。于 PCR 仪上 94°C \times 5min 预变性,加入 0.5 μ L 高保真 Pfu 酶,进行以下循环:94°C \times 45s, 50°C \times 1min, 72°C \times 1min,共 3 个循环。

[0107] 在上面体系中补加 V_H , V_L 进行 scFv 的拼接:

[0108] V_H 纯化产物 (50ng) 3 μ L

[0109] V_L 纯化产物 (50ng) 2.5 μ L

[0110] Linker 预拼接溶液 44.5 μ L

[0111] _____

[0112] 总体积 50 μ L

[0113] 先后将 V_H , V_L 加入后,用枪轻轻混匀。于 PCR 仪上 94°C \times 5min 预变性,补加 0.5 μ L 高保真 Pfu 酶,进行以下循环:94°C \times 45s, 50°C \times 1min, 72°C \times 1min,共 30 个循环,72°C 延伸 10min。

[0114] (2) scFv 基因的 PCR 扩增

[0115] 采用以下反应体系:

[0116] 拼接产物 4 μ L

[0117] 5 \times PCR Buffer 10 μ L

[0118]	dNTP (2.5mmol/L)	4 μ L
[0119]	RS(Back) 引物 (10 μ mol/L)	1 μ L
[0120]	RS(For) 引物 (10 μ mol/L)	1 μ L
[0121]	无菌纯水	30 μ L
[0122]	<hr/>	
[0123]	总体积	50 μ L

[0124] 混合均匀,短暂离心后,于 PCR 仪上,94 $^{\circ}$ C \times 2min 预变性,加入 0.5 μ L 高保真 Pfu 酶,进行以下循环:94 $^{\circ}$ C \times 45s,60 $^{\circ}$ C \times 1min,72 $^{\circ}$ C \times 1min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取 5 μ L 反应产物进行电泳检测。

[0125] 实施例 3Eu³⁺ 标记羊抗鼠的制备和纯化

[0126] 取溶解于 0.05mol/L PBS pH7.4 的 5mg/mL 羊抗鼠 IgG 1ml,经 PD-10 柱转换缓冲盐条件,洗脱液为 50mmol/L pH 9.6NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量 (1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀),用上述洗脱液稀释羊抗鼠至 1mg/mL。取 500 μ L 稀释后的羊抗鼠 IgG 加入含 0.2mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙酸烯三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 的棕色小瓶中,置于 28 $^{\circ}$ C 恒温烘箱中反应 48h,反应液用 50mmol/L Tris-HCl pH 7.8 缓冲液平衡的 SepharoseCL-6B (1 \times 30cm) 层析,测定每管的荧光计数值,检测稀释后的第一个计数峰,稀释后备用。

[0127] 标记率 = 标记个数 / IgG 分子数

[0128] 实施例 4 时间分辨免疫分析试剂盒组分的配制

[0129] (1) 浓缩洗涤缓冲液的配制:含 0.5 ~ 1.5% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4, 0.1mol/L),为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍。

[0130] (2) 样品稀释浓缩液的配制:pH7.4 ~ 8.0、0.1~0.25mol/L、含有的磷酸盐缓冲液,为正常使用浓度的 5 ~ 15 倍。

[0131] (3) 封闭液的配制:脱脂奶粉 1.0 ~ 5.0g 溶于 100mL 蒸馏水。

[0132] (4) 增强液的配制:6mL 冰醋酸用 0.1mol/L 的邻苯二甲酸氢钾调 pH 值至 3.2,加入 15 μ mol \square -二酮体 (\square -NTA),50 μ mol 三辛基氧化磷 (TOPO),1mL Triton X-100,加三蒸水定容至 1L。

[0133] (5) 酶标板微孔板的包被:包被抗原用 pH9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液 (含 1 ~ 2g 碳酸钠和 2 ~ 4g 碳酸氢钠,双蒸水 1L) 稀释成 0.1 ~ 5 μ g/mL,在酶标板的每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 包被 1h 后 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,拍干,然后在每孔中加入 200 μ L1.0 ~ 5.0% 脱脂奶粉,放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次,干燥后封入铝箔袋中 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0134] (6) 环丙沙星标准溶液的配制:准确称取环丙沙星标样 8.1mg,溶于 0.1L 缓冲液中,然后用缓冲液稀释分别配制 8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L 环丙沙星溶液,另外缓冲液配制 0 μ g/L 对照样,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0135] (8) 试剂分装:各种试剂按要求配制,测定合格后无菌分装环丙沙星抗体工作液 7mL/瓶,环丙沙星标准样品 1mL/瓶,二抗工作液 10mL/瓶,增强液 20mL/瓶,环丙沙星标准溶液 6 瓶,浓缩洗液 50mL/瓶,浓缩样品稀释液 50mL/瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0136] (9) 试剂盒的组装:分别将可拆卸包被好包被抗原的微孔板 1 块,环丙沙星抗体工作液、二抗工作液、增强液、浓缩洗液、浓缩样品稀释液各 1 瓶,环丙沙星标准溶液 6 瓶,使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装,4℃保存。

[0137] 实施例 5 检测环丙沙星的时间分辨免疫分析试剂盒的组建检测环丙沙星的时间分辨免疫分析试剂盒,包括包被了环丙沙星抗原的酶标板、环丙沙星抗体、镧系元素标记羊抗兔或羊抗鼠抗体,其他工作液可以在检验室配备。

[0138] 如果为了大批量快速的检测样品中环丙沙星,组建的检测恩诺沙星的时间分辨免疫分析试剂盒包括下述组分:

[0139] (1) 包被环丙沙星抗原的酶标板,96 孔;

[0140] (2) 环丙沙星单克隆抗体,7mL/瓶;

[0141] (3) 镧标二抗工作液,10mL/瓶;

[0142] (4) 环丙沙星标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0 μg/L、0.1 μg/L、0.3 μg/L、0.9 μg/L、2.7 μg/L、8.1 μg/L,1mL/瓶;

[0143] (5) 增强液,7mL/瓶;

[0144] (6) 浓缩洗涤液,50mL/瓶;

[0145] (7) 浓缩样品稀释液,50mL/瓶;

[0146] (8) 使用说明书,1 份;

[0147] (9) 盖板膜,2 张;

[0148] (10) 自封袋(含干燥剂),1 个。

[0149] 本发明的检测环丙沙星残留的荧光免疫分析试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0150] (1) 包被了环丙沙星抗原的酶标板的制备方法:将 CIP-OVA 以包被缓冲液稀释为 100 μg/L,向酶标板微孔中加入抗原 100 μL,放入 4℃冰箱中包被过夜,室温平衡后洗板两次,以脱脂奶粉封闭液(250 μL)37℃封闭 1h,洗板三次,用无尘吸水纸上拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。固定环丙沙星抗原载体为以下物质中的一种,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。

[0151] (2) 环丙沙星抗体稀释液的制备方法:将环丙沙星所用的免疫原为采用活泼酯法(DCC、NHS)或混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)将环丙沙星与载体蛋白共价偶联合成得到的,以免疫抗原免疫兔子或小鼠,制备环丙沙星多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备环丙沙星单克隆抗体或利用基因工程方法制备基因工程抗体。收集抗血清、腹水、发酵液等,用辛酸硫酸铵沉淀纯化或过亲和层析柱进行纯化。

[0152] 抗体用辛酸-硫酸铵法纯化后,用 PBS 稀释成 1mg/mL 分装备用。

[0153] (3) Eu³⁺ 标羊抗鼠的制备方法:取溶解于 0.05mmol/L PBS pH7.4 的 6mg/mL 羊抗鼠 IgG0.1ml,经 PD-10 柱转换缓冲盐条件,洗脱液为 50mmol/L pH 9.6NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀),用上述洗脱液稀释羊抗鼠至 1mg/mL。取 500 μL 稀释后的羊抗鼠 IgG 加入含 0.4mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙酸烯三胺四乙酸(Eu³⁺-DTTA)的棕色小瓶中,置于 28℃恒温烘箱中反应 48h,反应液用 50mmol/L Tris-HCl pH 7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B(1×30cm)层析,测定每管的荧光计数值,检测稀释后的第一个计数峰,稀释后备用。标记率=标记个数/IgG 分子数

[0154] (4) 环丙沙星标准溶液的配制:以浓度为 1000 μg/L 的环丙沙星作为贮备液,使用

前再配成浓度梯度为 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 $\mu\text{g/L}$ 的环丙沙星标准品工作液；

[0155] (5) 增强液的配制：6mL 冰醋酸用 0.1mol/L 的邻苯二甲酸氢钾调 pH 值至 3.2，加入 15 μmol \square -二酮体 (\square -NTA)，50 μmol 三辛基氧化膦 (TOPO)，1mL Triton X-100，加三蒸水定容至 1L。

[0156] (6) 包被缓冲液的配制：取 Na_2CO_3 0.375g， NaHCO_3 0.732g， NaCl 2.250g， NaN_3 0.100g，加蒸馏水至 250mL，得 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液。

[0157] (7) 洗涤缓冲液 (PBST) 的配制：取 KH_2PO_4 0.4g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g， NaCl 16.0g， KCl 0.4g，Tween-20 1.0mL，加蒸馏水至 2000mL。

[0158] (8) 封闭液：1) 脱脂奶粉 5g 溶于 100mL PBS；2) 小牛血清 3mL (灭活)，以稀释液稀释至终浓度 3%。

[0159] (9) 稀释液 (50mmol/L Tris-HCl, pH 7.85)：取 Tris-base 6.4g， NaCl 9.0g， NaN_3 0.4g，以浓 HCl (12M) 调整其 pH 值为 7.85，加蒸馏水定容至 1L。

[0160] 实施例 6 样品前处理

[0161] a. 蜂蜜

[0162] 称取样品 3g，加入 3mL 蒸馏水，振荡均匀，加入 6mL 乙酸乙酯，振荡 15min。5000r/min 离心 10min。吸取上层 2mL 旋转蒸干。加入 1mL 正己烷溶解干燥物，再加入 1mL PBS (pH 值 7.4, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液) 溶液复溶。除去上层正己烷相，下层清夜 50 μL 待测。

[0163] b. 禽蛋

[0164] 称取样品 3g，加入乙腈-水溶液 (体积比 80 : 20) 6mL，振荡 10min。5000r/min 离心 10min。取上层 2mL，加入 2mL 乙酸乙酯，振荡 15min。5000r/min 离心 10min，吸取全部上层溶液，旋转蒸干。加入 1mL 正己烷溶解干燥物，再加入 1mL PBS 溶液复溶。除去上层正己烷相，下层清夜 50 μL 待测。

[0165] c. 组织 (检测用肌肉、肝脏或肾脏等)

[0166] 称取样品 3g，加入 PBS 3mL，振荡 10min。5000r/min 离心 10min。取上层 2mL 加入等量正己烷，轻轻混匀，5000r/min 离心 10min。取下层清夜 50 μL 待测。

[0167] 实施例 7 试剂盒的检测方法

[0168] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出，置于 20 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$ 环境中平衡不少于 30min，将酶标板条固定，做两个平行实验，按顺序编号。

[0169] (2) 在标准品孔加入 50 μL 标准溶液，样品孔加入 50 μL 待测样品，然后每孔加入 50 μL 环丙沙星单克隆抗体工作液，混匀；振荡反应 45min。

[0170] (3) 待反应后洗板六次，并在吸水纸上拍干，以保证完全除去孔中的液体。每孔加入 100 μL 铕标二抗工作液，振荡反应 45min。

[0171] (4) 待反应后洗板六次，并在吸水纸上拍干，以保证完全除去孔中的液体。每孔加入 200 μL 增强液，混匀，避光室温轻拍振荡 5min。

[0172] (5) 用 TRFIA 检测仪测定各孔荧光值。

[0173] (6) 根据标准溶液荧光值与浓度半对数做标准曲线，根据标准曲线与样品溶液荧光值计算样品浓度。

[0174] 以所获标准样品荧光值的平均值计算百分荧光值，以百分荧光值为纵坐标，环丙沙星标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出直线方程，见附图 1 所示，直线方

程 $y = 67.184 - 56.17x$, $R^2 = 0.99246$ 。用同样的方法计算样品溶液的百分荧光值,根据方程式求出对应样品的环丙沙星浓度。所述百分荧光值的计算式为:

[0175] 百分荧光值 (%) = $(B/B_0) \times 100$

[0176] 其中, B 为标准溶液或样品的平均荧光值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均荧光值。

[0177] 检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析,对环丙沙星线性检测范围为 $0.1 \sim 8.1 \mu\text{g/L}$,检测限为 $0.1 \mu\text{g/L}$,整个检测过程只需 2h 就可以完成。

[0178] 实施例 8 试剂盒精密度与准确度试验

[0179] 1、标准品溶液重复性试验

[0180] 从 3 批按照实施例 4 中的方法制备的酶标板中,各抽出 20 个微孔,测定 $0.9 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的荧光值 (CPS 值),重复 20 次,计算变异系数 CV%,结果见表 1。

[0181] 表 1 标准品溶液重复性试验

样品	浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.9	3.2	4.8	2.9	7.6

[0183] 结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 $2.9 \sim 4.8\%$ 之间,批间变异系数为 7.6% 。

[0184] 2、样本重复性与准确度试验

[0185] 准确度是指测得值与真值的符合程度,在免疫分析测定中,准确度常以回收率表示,精密度常以变异系数来表示。在空白蜂蜜、禽蛋、组织 (鸡肉) 中,将环丙沙星添加至终浓度为 $10 \mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)、 $15 \mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$),每个浓度各 10 个平行,测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

[0186] 表 2 样本重复性与准确度试验结果

[0187]

样品	添加浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批			第 2 批			第 3 批			批间 CV%
		含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	含量	回收率%	CV%	
蜂蜜	10	8.1	81	4.9	10.65	106	6.4	9.1	91.0	7.3	14.2
	15	15.05	100	7.3	16.20	108	6.8	15.15	101	7.8	15.7
禽蛋	10	9.2	92.0	7.4	8.7	87.0	7.4	8.9	89.0	6.9	17.6
	15	14.1	94.0	7.3	14.45	96.3	8.3	14.83	98.8	8.7	18.2
组织 (鸡肉)	10	11.0	110	8.4	10.5	105	9.4	9.5	95	8.8	18.1
	15	14	93.3	8.7	13.8.0	92.0	8.9	15.5	100.3	9.1	18.5

[0188] 结果表明蜂蜜、禽蛋、组织样本的添加回收率在 $81.0 \sim 110\%$ 之间,批内变异系数在 $4.9 \sim 9.1\%$ 之间,批间变异系数在 $14.2 \sim 18.5\%$ 之间。

[0189] 实施例 9 保存期试验

[0190] (1) 将试剂盒放置于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$, 分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒, 对环丙沙星标准样品 ($0.1 \mu\text{g/L}$) 的荧光值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0191] (2) 将试剂盒在 37°C 保存的条件下放置 12 天, 每天对环丙沙星标准样品 ($0.1 \mu\text{g/L}$) 的荧光值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0192] (3) 将试剂盒在 -20°C 冰箱保存 12 天, 每天对环丙沙星标准样品 ($0.1 \mu\text{g/L}$) 的荧光值、50%抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0193] 从结果可看出, 经过三种条件保存试验, 环丙沙星标准样品 ($0.1 \mu\text{g/L}$) 的荧光值下降小于 5%, 且 CPS 不低于 100000; 50%抑制率在 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{g/L}$ 之间; 添加回收率在 80 ~ 110% 之间; 批内变异系数小于 10%; 各项指标均符合质量要求, 因此, 试剂盒可以在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 12 个月。

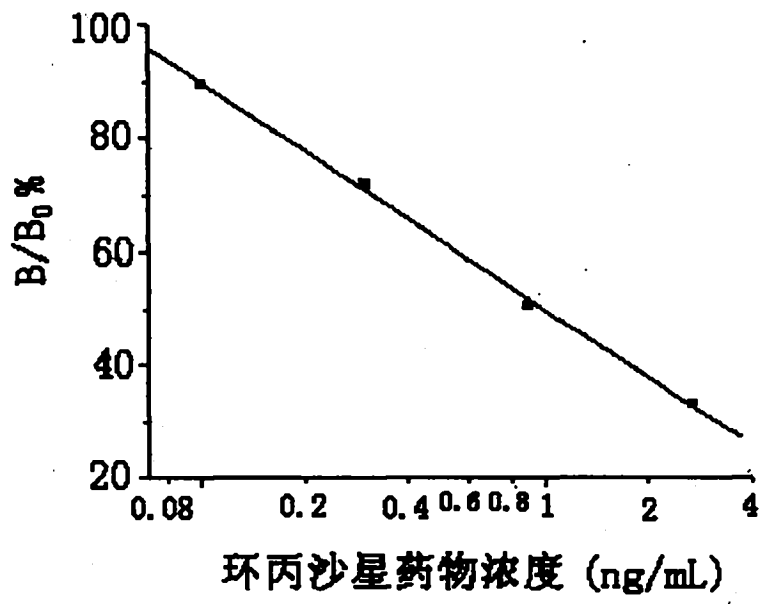


图 1

专利名称(译)	环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN101995468A	公开(公告)日	2011-03-30
申请号	CN201010268985.8	申请日	2010-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 王弘 徐振林 雷红涛 沈玉栋 杨金易		
发明人	孙远明 王弘 徐振林 雷红涛 沈玉栋 杨金易		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/64 C07K16/44 C07K16/06 C12N15/12 C12N15/70		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种环丙沙星残留的时间分辨免疫分析检测试剂盒及其检测方法。本发明所述试剂盒包被有环丙沙星抗原的酶标板，镧系元素标记羊抗兔或羊抗鼠抗体、环丙沙星抗体等。本发明还公开了应用上述试剂盒检测环丙沙星残留的方法。本发明提供的检测环丙沙星的试剂盒采用间接竞争时间分辨免疫分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。

