



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106434566 B

(45)授权公告日 2019.05.17

(21)申请号 201610486494.8

(22)申请日 2016.06.28

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106434566 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(83)生物保藏信息  
CCTCC NO.C2015221 2015.12.07

(73)专利权人 苏州大学  
地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱  
路199号

(72)发明人 吴康 宋学宏 杨彩根

(74)专利代理机构 南京利丰知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 32256  
代理人 王锋

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12R 1/90(2006.01)

审查员 冯娟

权利要求书1页 说明书17页 附图12页

(54)发明名称

抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗和应用

(57)摘要

本发明公开了抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗和应用。本发明所述的细胞株保藏编号:CCTCC NO.C2015221。本发明提供的该株可稳定分泌产生针对氟喹诺酮类药物单克隆抗体,间接ELISA试验所述抗体对环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星等药物检测具有高灵敏度和强通用性,再将其应用于其他免疫检测产品如免疫金标卡、免疫亲和层析色谱胶等制备中,其产品对目标物检测同样具有高灵敏度、高选择性、强富集性和强通用性,可广泛应用于农业、食品、环境领域中主要氟喹诺酮类药物痕量残留定性以及半定量分析。

1. 分泌抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 其特征在于, 保藏编号为CCTCC NO.C2015221。

2. 保藏编号为CCTCC NO.C2015221的杂交瘤细胞株在氟喹诺酮类药物残留样本检测中应用; 所述氟喹诺酮类药物为恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星和/或沙拉沙星。

3. 抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体, 其特征在于, 由保藏编号为CCTCC NO.C2015221的杂交瘤细胞株分泌产生。

4. 保藏编号为CCTCC NO.C2015221的杂交瘤细胞株分泌产生的抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体在氟喹诺酮类药物残留样本的ELISA检测以及制备氟喹诺酮类药物残留免疫检测产品中的应用; 所述氟喹诺酮类药物为恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星和/或沙拉沙星。

5. 根据权利要求4所述应用, 其特征在于, 所述免疫检测产品为免疫金标卡、免疫亲和层析色谱胶或由该胶预填装的免疫亲和层析色谱柱。

## 抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的单抗和应用。

### 背景技术

[0002] 氟喹诺酮类药物作为人工合成抗生素类药物,以抗菌能力强、机体利用率高、与其它种类抗生素对细菌无交叉耐药性等优点广泛应用于医学(作为一线抗菌药应用于临床)、农副水产品(作为畜禽水产动物的重要抗菌药用于预防以及治疗细菌性疾病)生产中,当前氟喹诺酮类抗菌药在食品样本中呈多组分混合高残留趋势,更为忧虑的是相关制药企业、医院和农副水产品生产企业中上述抗生素在环境中扩散造成土壤和地表水源中极微量残留对人类健康构成巨大潜在威胁,因此对氟喹诺酮类药物残留检测、监控不仅有待测样本面多量广的需求(要求对待测样本高通量快速定性筛查),同时有经快速定性检测定性为阳性样本精确定量分析需求,更有ppt (pg/ml (g)) 级的极微量残留待测样本经高倍富集后的精确定量测定需求。综合各领域氟喹诺酮类药物使用情况目前需检测残留主要对象以恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、双氟沙星(达氟沙星)等。

[0003] 依据目前多种氟喹诺酮类药物残留检测技术特点与应用范围,免疫检测方法已成为其残留高通量快速定性筛查或半定量分析不可替代的技术手段。目前对氟喹诺酮类药物残留快速定性筛查以及半定量分析主要采用间接竞争ELISA和免疫金标卡二种检测模式,二种模式中尽管免疫金标卡灵敏度略低于间接竞争ELISA试验灵敏度(综合现有文献:免疫金标卡检测限(T线完全消失)约为间接竞争ELISA的 $IC_{50}$ 值5-10倍),但免疫金标卡以便于保存、试验时间短(5-10min可判读结果)、试验结果直观(可用肉眼直接观察,无需借助任何仪器设备分析)等优点备受基层检测用户青睐,占氟喹诺酮药物快检市场大部分份额。

[0004] 目前商业化氟喹诺酮类药物快检金标卡存在二大缺陷:

[0005] 1、检测限偏低:商品化金标卡氟喹诺酮药物单组分检测限(T线完全消失)约为10ppb,而农业部对上述8种药物最低残留标准为:30-100ppb,以该标准用 $5-10 \times$ 体积缓冲液制备待测样本匀浆上清,不对目标物富集前提下,其含量极有可能已低于该检测限,无法对待测样本进行有效定性筛查,改用小于 $5 \times$ 体积缓冲液制备待测样本匀浆上清不仅不利于待测样本中目标物充分释放影响检测准确性出现假阴性导致漏检,同时极有可能因样本基质含量过高干扰抗体对目标物识别影响检测特异性出现假阳性导致错检,因而免疫金标卡单组分检测限应小于等于3ppb才能充分满足用户实际需求;

[0006] 2、通用性不强:赵银丽等在文献中报道利用自主制备恩诺沙星强特异性单克隆抗体作标记抗体研制金标卡其对恩诺沙星的检测限(T线完全消失)小于等于3ppb,并以鸡肌肉作模式基质恩诺沙星外标掺入回收试验获得了良好的回收结果,但因与其他喹诺酮药物无交叉反应,仅能作恩诺沙星单组分残留强特异性分析,更为不利的是恩诺沙星经体内代

谢部分转化为环丙沙星,利用该免疫金标卡无法准确测定恩诺沙星给药后体内恩诺沙星和环丙沙星混合残留,其他氟喹诺酮类药物如诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星等目标物的免疫检测产品亦有一些零星报道,但多以其目标物强特异性等特点更适合单组分测定。而食品样本中氟喹诺酮药物的残留呈多组分混合残留的趋势,因而无法用单一抗体免疫检测产品对多组分残留同时作定性或半定量分析。

## 发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗,使得所述杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体对目标物的检测具有更高的灵敏度。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供抗氟喹诺酮类药物单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗,使得所述杂交瘤细胞株产生的簇特异性单克隆抗体对多种氟喹诺酮类药物识别与结合有良好免疫交叉性,能够同时检测恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星等。

[0009] 本发明另一个目的在于提供抗氟喹诺酮类药物单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗在检测氟喹诺酮类药物残留样本的ELISA检测以及制备氟喹诺酮类药物残留免疫检测产品中的应用。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0011] 抗氟喹诺酮类药物单克隆抗体杂交瘤细胞株,保藏编号为CCTCC NO.C2015221,命名为杂交瘤细胞株11F10,并于2015年12月7日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址为武汉市武昌珞珈山武汉大学内。

[0012] 同时,本发明还提供一种抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体,由保藏编号为CCTCC NO.C2015221的杂交瘤细胞株分泌产生。制备抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体可采用本技术领域常规方法,如用杂交瘤细胞株通过体内诱生方式获取小鼠腹水来大量生产高浓度该单抗蛋白样本,具体可参照如下方法:

[0013] 从液氮罐中取冻存杂交瘤细胞株-11F10,用10%FBS+RPMI-1640细胞培养液复苏于标准细胞培养瓶中,于5%CO<sub>2</sub> 37℃培养箱中培养,2-3d按1:3-5分瓶传代,待细胞处于对数生长期收集细胞,低速离心去除培养液,用无血清培养基悬浮细胞用于小鼠接种;

[0014] 按0.5ml/只腹腔注射Ba1b/c八周龄雄鼠,致敏7天后,再按 $1-2 \times 10^6$ /只杂交瘤细胞腹腔注射上述致敏鼠,7-10天后采集腹水,1000r/min离心10min去除腹水中细胞,取上清12000r/min离心30min以去除腹水中细胞碎片,取上清以OD<sub>280</sub>和OD<sub>260</sub>值初步标定总蛋白含量,取少许作单抗的评估、一部分用于下一步抗体纯化,其余部分分装-80℃冻存储用。

[0015] 本发明按照上述方法获得的诱生腹水样本经protein G resin一步法过滤洗脱等步骤获纯化抗体蛋白,SDS-PAGE电泳鉴定结果显示:腹水纯化物仅有含50Kd(抗体重链)和25Kd(抗体轻链)二条明显蛋白条带,无其他杂蛋白带,表明通过本发明杂交瘤细胞株诱生腹水样本经亲和层析法可获得高纯度单抗蛋白(纯度大于等于99%),可以满足制备实用型免疫金标卡和免疫亲和层析胶中检测抗体需求。

[0016] 针对现有氟喹诺酮类药物免疫检测金标卡检测灵敏度低(单组分T线消失约

10ppb)、通用性差不能充分满足现有食品等待测样本快速定性筛查需求技术现状,本发明从恩诺沙星作半抗原制备的几株单克隆杂交瘤细胞株中通过间接竞争ELISA试验选出一株细胞株-11F10,其分泌针对氟喹诺酮类药物簇特异性单抗具有高灵敏度、强通用性。具体地,所述单抗对诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星有极高检测灵敏度( $IC_{50}$ :0.292-0.561ng/ml),其它四种药物与原始半抗原-恩诺沙星有良好免疫交叉性(交叉率大于50%)。不仅如此,该单抗还对食品和医药领域使用频率极高另一种氟喹诺酮药物-氧氟沙星有较高亲和力( $IC_{50}$ 为1.592ng/ml),可部分作为氧氟沙星专用检测试剂盒替代品用于氧氟沙星初步筛查;该单克隆抗体对洛美沙星、沙拉沙星有一定亲和力( $IC_{50}$ 分别为6.573,7.321ng/ml)。由此可知,本发明所述单抗在极高灵敏度下可同时测定五种氟喹诺酮药物、在高灵敏度下可同时测定六种氟喹诺酮药物,在一般灵敏度下可同时测定八种氟喹诺酮药物。

[0017] 基于以上本发明所述抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体的有益效果,本发明提供了所述杂交瘤细胞及其产生的单克隆抗体在检测氟喹诺酮类药物的间接竞争ELISA试剂盒以及制备检测氟喹诺酮类药物的其他免疫检测产品中的应用;其中,所述氟喹诺酮类药物优选为恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星和/或沙拉沙星。

[0018] 本发明所述检测氟喹诺酮类药物的其他免疫检测产品优选为免疫金标卡、免疫亲和层析色谱胶或由此预填装的免疫亲和层析色谱柱。

[0019] 在免疫金标卡制备中,本发明优选通过碳二亚胺法或混合酸酐法二种偶联方式将恩诺沙星标样与阳离子化高纯度牛血清白蛋白(cBSA)偶联制备出偶联物作为包被抗原做测试线(T线),以山羊抗小鼠IgG二抗包被作质控线,即对照线(C线),供装配免疫金标卡选择使用;同时,将本发明所述单抗以胶体金作标记并喷涂于结合垫(胶金垫)上。本发明采用柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒,并采用系列稀释浓度单抗蛋白加固定量胶体金微孔孵育法进行优化标记配比。其他诸如样品垫、层析膜(NC膜)、吸收垫、支持底板等均可以参照现有常规金标卡的制备,本发明所述免疫金标卡结构示意图参见图1。

[0020] 在免疫亲和层析色谱胶的制备中,本发明通过纯化单抗蛋白样本与CNBr-activated Sepharose-4B化学交联-即固相化抗体而获得,而所述免疫亲和层析色谱柱IAC(immunoaffinity chromatography cartridges)是将所述免疫亲和层析色谱胶预填充于层析专用柱床中而获得。

[0021] 由于本发明经间接竞争ELISA试验所述单克隆抗体所具备的上述优异特性,使得本发明所述的免疫金标卡、免疫亲和层析色谱胶以及由此预填装的免疫亲和层析色谱柱同样具有较优的性能。本发明免疫金标卡对环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星单组分标样检测限(T线完全消失)小于等于3ppb,对氧氟沙星检测限小于等于20ppb,对洛美沙星、沙拉沙星检测限小于等于100ppb,同时用上述检测限小于等于3ppb五种药物的三组分随机组合混标物(单组分均为1ppb,总浓度为3ppb)均能使T线消失说明该单抗对上述药物之间识别以及与之结合无干扰效应,同时有对基质强抗干扰力(以猪肉作模式基质作单组分外标与单组分标样有良好相关性)等特点。

[0022] 所述免疫亲和层析色谱胶或由此填装免疫亲和层析色谱柱具有目标物高选择性(于温和液相反应体系中强选择性将目标物固相化实现与待测样本中液相基质高效分离)、

目标物强富集性(利用对目标物高亲和力的固相化抗体将大体积液相样本中极微量目标物迅速固相化实现目标物高倍率富集)、针对多种目标物的强通用性(在结合容量范围内固相化抗体能同时结合多种,至少是本发明提及8种氟喹诺酮类药物);

[0023] 获取免疫亲和层析色谱胶或由此填装成免疫亲和层析色谱柱产品 后,根据待测样本中目标物初步估计含量以及HPLC-FLD有效检测范围,分装出二种规格产品供用户选择使用:

[0024] 1、针对小体积高含量目标物残留(目标物单组分达ppb级)样本:采用待测样本匀浆上清与免疫亲和层析胶共同孵育结合-离心洗涤-加等体积或小于原体积但能满足上机体积的洗脱液孵育洗脱-离心获取洗脱液样本直接上机测定等步骤。该处理方式主要发挥免疫亲和层析胶对目标物强大选择性,以固-液二相分离方式将待测样本中基质去除,获取高纯度目标物供机测。该方式主要适用于食品待测样本或其他氟喹诺酮类药物高残留样本(ppb级)的测定;

[0025] 2、针对大体积低含量目标物残留(目标物单组分为ppt级)样本:采用大体积待测样本上清上免疫亲和层析胶柱(IAC cartridges)过滤结合-充分洗涤-取下层析胶加小体积洗脱液孵育洗脱-离心获取洗脱液上清样本-上机测定等步骤。该处理方式主要是发挥IAC对目标物强大亲和力,将大体积样本中极微量目标物充分富集于亲和层析胶中,再用小体积洗脱液将结合目标物充分洗脱,获取高富集倍率高纯度目标物样本供机测,该方式主要适用于环境(地表水、地下水、土壤等)中极微量氟喹诺酮类样本的检测。

[0026] 由以上技术方案可知,本发明提供的杂交瘤细胞株可稳定分泌氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体,所述抗体与环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星等药物结合具有高灵敏度和强通用性,可应用于氟喹诺酮类药物检测产品如免疫金标卡、免疫亲和层析色谱胶/免疫亲和层析预装柱的制备中,所制备的检测产品对目标物结合同样具有高灵敏度、高选择性、强富集性和强通用性,可广泛应用于农业、食品以及环境领域中主要氟喹诺酮类药物痕量残留定性以及半定量分析。

[0027] 生物保藏信息说明

[0028] 用于保藏的杂交瘤细胞株-11F10的分类命名为:氟喹诺酮药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0029] 保藏单位全称:中国典型培养物保藏中心;

[0030] 保藏单位简称:CCTCC

[0031] 保藏单位地址:武汉市武昌珞珈山武汉大学内;

[0032] 保藏日期:2015年12月7日;

[0033] 保藏编号:CCTCC NO.C2015221。

## 附图说明

[0034] 图1所示为本发明所述免疫金标卡结构示意图;

[0035] 图2所示为本发明中单抗纯化后的SDS-PAGE电泳图;图中泳道1为蛋白分子量Marker;泳道2为杂交瘤细胞株-11F10诱生腹水;泳道3为3×稀释的杂交瘤细胞株-11F10诱生腹水;泳道4为纯化单抗蛋白;

[0036] 图3所示为两种偶联法合成恩诺沙星偶联物紫外检测图;

[0037] 图4所示为八种氟喹诺酮药物间接竞争ELISA的抑制曲线,各曲线从左到右依次为诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星;

[0038] 图5所示为胶体金颗粒紫外可见连续扫描图;

[0039] 图6所示为胶体金颗粒透射电镜观察图;

[0040] 图7所示为胶体金粒径分布柱形图;

[0041] 图8所示为免疫金标卡对恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星的单组分标样检测结果图;图中1-7分别表示0、0.03、0.1、0.3、1、3、10ppb浓度;

[0042] 图9所示为免疫金标卡对氧氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星的单组分标样检测结果图;

[0043] 图10所示为免疫金标卡对恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星五种氟喹诺酮类药物三组分等浓度混标物检测结果图;图中第一组为空白对照,第2-11组依次为如下组合:

[0044] 恩诺沙星+环丙沙星+诺氟沙星;恩诺沙星+环丙沙星+培氟沙星;恩诺沙星+环丙沙星+依诺沙星;恩诺沙星+诺氟沙星+培氟沙星;恩诺沙星+诺氟沙星+依诺沙星;恩诺沙星+培氟沙星+依诺沙星;环丙沙星+诺氟沙星+培氟沙星;环丙沙星+诺氟沙星+依诺沙星;诺氟沙星+培氟沙星+依诺沙星;环丙沙星+培氟沙星+依诺沙星;

[0045] 图11所示为不同储存期的免疫金标卡对恩诺沙星检测结果图;图中1-4分别表示0、1、3、10ng/ml浓度;

[0046] 图12所示为25、50、100ng/ml环丙沙星经免疫亲和层析洗脱样本的HPLC-FLD检测图;

[0047] 图13所示为25、50、100ng/ml恩诺沙星经免疫亲和层析洗脱样本的HPLC-FLD检测图;

[0048] 图14所示为25、50、100ng/ml诺氟沙星经免疫亲和层析洗脱样本的HPLC-FLD检测图;

[0049] 图15所示为25、50、100ng/ml沙拉沙星经免疫亲和层析洗脱样本的HPLC-FLD检测图;

[0050] 图16所示为环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星和沙拉沙星免疫亲和层析回收率曲线图,图中4种药物的回收率为三次独立重复试验而获得;

[0051] 图17所示为恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星掺入胎牛血清样本免疫亲和层析回收率柱形图,图中5种药物的回收率为三次独立重复试验而获得;

[0052] 图18所示为恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星标样以及同处理掺入5%胎牛血清样本经免疫亲和层析洗脱液的HPLC-FLD检测图;

[0053] 图19所示为浓度分别为50pg/ml恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星药物100ml混合液经免疫亲和层析柱浓缩后洗脱样本的HPLC-FLD检测图;

[0054] 图20所示为恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星五种混标物经免疫亲和层析高倍富集后的回收率。

#### 具体实施方式:

[0055] 本发明公开了抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的

单抗和应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0056] 本发明在免疫金标卡的制备中,优选通过碳二亚胺偶联法或混合酸酐法二种偶联方式将恩诺沙星标样与高纯度阳离子化牛血清白蛋白(cBSA)偶联制备出偶联物为包被抗原作测试线(T线),两种方法参考如下:

[0057] 1、碳二亚胺偶联法

[0058] 先将乙二胺(EDA)与牛血清白蛋白混合溶解于0.01M PBS (pH7.0)液中,在化学偶联剂-二环乙基碳二亚胺(EDC)作用下,封闭牛血清白蛋白分子中-COOH残基,经透析去除过量的EDA和EDC,获得阳离子化的牛血清白蛋白(cBSA)作为蛋白载体。

[0059] 将恩诺沙星(EF)标样溶解在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、EDC室温条件下避光反应过夜,形成活化酯;低速离心取上清与上述cBSA液混合,混合液保持33%DMF,室温避光振荡反应过夜,高速离心取上清置于透析袋中,冰水浴(0-4℃)下在33%DMF/0.01M PBS (pH 7.0)溶液中进行透析。每4小时换一次透析液,每换一次DMF浓度递减5%,重复六次后,加无DMF 0.01M PBS (pH 7.0)继续透析过夜后,将反应液从透析袋中小心转移至样品瓶中封口,于-80℃预冷冻后并冷冻干燥得白色固体粉末EF-cBSA。紫外可见光谱测定偶联比。

[0060] 2、混合酸酐法

[0061] 精确称取一定量恩诺沙星(EF)标样,溶于一定量DMF中,室温下加正三丁胺,摇匀后加氯甲酸异丁酯,室温避光搅拌反应1h,得恩诺沙星反应液,精确称取一定量BSA溶于碳酸盐缓冲液CBS (pH9.6)。将恩诺沙星反应液滴加至BSA液中,室温下搅拌反应3h,分别用100×CBS透析24h,每4h换液一次,再用PBS透析2d,取少许进行紫外分光(测200-400nm峰),其余部分制备成冻干粉,并估算出盐份比。

[0062] 本发明采用柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒,即在氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)水溶液中滴加柠檬酸三钠(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O)溶液经还原获取胶体金颗粒,再经0.22μm微孔膜过滤去除大颗粒,通过优化反应条件获取粒径约为20nm均一胶体金颗粒,离心取沉淀备用。

[0063] 本发明采用系列稀释单抗蛋白加固定量胶体金微孔孵育法,并以反应孔不出现蛋白聚沉同时胶体金仍保持红色不变的最高稀释度为标准标定待标单抗蛋白与胶体金最适标记浓度,以上述蛋白与胶体金合适的比例按实际需要进行单抗与胶体金标记,标记后的单抗胶体金探针悬浮于胶体金缓冲液中。

[0064] 本发明在免疫亲和层析色谱胶以及由此预装色谱柱的制备中,所需用于交联的高纯度单克隆抗体蛋白可通过如下方式获得:

[0065] 杂交瘤细胞细胞株-11F10体内诱生腹水作样本,经protein G resin纯化获取洗脱部分收集液,各加1/10×体积1M Tris-Cl (pH8.5)中和后,蛋白含量检测试剂盒测定蛋白浓度大于等于2mg/ml以及经SDS-PAGE电泳鉴定抗体纯度大于等于99%(蛋白电泳图谱中仅有50kd和25kd二条蛋白带)作为合格单抗蛋白纯品,合并上述合格收集液样本,经0.01M PBS (pH7.4)反透析24h后,再用0.1M NaHCO<sub>3</sub>,0.5M NaCl (pH 8.3)反透析24h,该样本作单抗

样本准备液与CNBr-activated Sepharose-4B化学交联。

[0066] 单克隆抗体纯化蛋白与一定量CNBr-activated Sepharose-4B按GE公司提供标准方法将抗体蛋白化学交联于Sepharose-4B小珠上,具体如下:

[0067] 称取适量CNBr-activated Sepharose-4B powder,经1mM HCl溶胀-淘洗等步骤后,用0.1M NaHCO<sub>3</sub>/0.5M NaCl (pH 8.3) 淘洗一次,低速离心去除上清液按2mg单抗纯化蛋白/ml胶用上述的单抗样本准备液与 该胶进行化学交联,交联后离心取上清测定蛋白含量分析交联效果,交联后胶体再经-封闭-二种缓冲液交替淘洗等步骤后,最终将交联胶悬浮于10×体积0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl (pH8.3) 液中,于4℃保存备用。

[0068] 下面就本发明提供的抗氟喹诺酮类药物单克隆抗体杂交瘤细胞及其产生的单抗和应用做进一步说明。

[0069] 实施例1:本发明所述单克隆抗体样本的体内诱生

[0070] 1、杂交瘤细胞株-11F10复苏与增殖

[0071] 从液氮罐中取杂交瘤细胞株-11F10冻存管,于37℃水浴中迅速融化,600r/min离心5min,弃上清,加新鲜15%FBS/RPMI-1640培养液悬浮细胞,各补加上述培养液至5ml后,种植于50ml细胞培养瓶中,置二氧化碳培养箱培养,待细胞生长至30%密度后半换液,待细胞生长60%左右(处于对数生长期)传代,每隔2-3天按1:3-4传代一次。

[0072] 2、单抗蛋白的体内诱生与腹水获取

[0073] 在体内种植杂交瘤细胞前7-10d,取12只8周龄雄性BALB/c鼠按0.5ml/只腹腔注射降植烷,注射后精心饲养备用。

[0074] 取上述处于对数生长期细胞培养瓶,轻轻拍打细胞瓶壁使细胞脱落,计数后将细胞悬液转至50ml离心管中,600r/min离心12min,弃培养液,加等体积无血清RPMI-1640重悬细胞,再离心一次弃RPMI-1640,按 $1\sim 2\times 10^6/0.5\text{ml}$ 用无血清RPMI-1640重悬细胞备用。

[0075] 致敏7-10天后,按 $1\sim 2\times 10^6$ 个杂交瘤细胞/只腹腔注射上述致敏鼠,7~10天后采集腹水,1000rpm离心10min,以去除腹水中细胞,取上清后12000rpm离心30min,以去除腹水中细胞碎片,再取上清,紫外分光光度计分别测OD<sub>280</sub>和OD<sub>260</sub>值,按 $1.51\times \text{OD}_{280}-0.73\times \text{OD}_{260}$ 公式粗估其总蛋白量,并将上述腹水分成三份,一分用作间接竞争ELISA测定,一分用于抗体蛋白的纯化,其余-20℃冻存备用。

[0076] 注射杂交瘤细胞株-11F10 7~10天后,从12只诱生鼠中共采集腹水约30ml,经紫外分光光度计分别测OD<sub>280</sub>和OD<sub>260</sub>值,按 $1.51\times \text{OD}_{280}-0.73\times \text{OD}_{260}$ 公式其总蛋白含量约为50mg/ml。

[0077] 实施例2:本发明所述单克隆抗体蛋白的纯化

[0078] 冰水浴预冷0.01M PBS (pH 8.0) 4×稀释腹水作准备液。按50mg总蛋白:1ml Protein G Resin将该胶填充于层析用小柱(10ml)中,用50×于柱床体积的预冷0.01M PBS (pH 8.0)平衡层析柱后,室温下准备液经Protein G Resin柱自然流速过滤五次,使腹水中的单克隆抗体蛋白充分与蛋白G特异性结合,再用50×于柱床体积的预冷0.01M PBS (pH 8.0)液充分淋洗层析柱,以去除粘附于层析胶中的杂蛋白。

[0079] 每1.5ml EP管预加入100μl 1M Tris-Cl (pH 9.6),上述处理层析柱中加入冰冷0.1M Glycine-HCl (pH 2.7)洗脱,滤液按0.9ml/管分部收集,收集管各取少许滤液用测量OD<sub>280</sub>蛋白峰,合并蛋白峰管,合并液置于透析袋中,于冰冷0.01M PBS (pH 7.4)液中透析过

夜。再取少许SDS-PAGE电泳鉴定,其余部分分装-80℃冻存备用。

[0080] 按照上述方法,用20ml 11F10株诱生腹水作原料,经5次protein G resin一步法纯化共获23.5ml纯化蛋白洗脱液,经0.01M PBS (pH7.4)透析后获得25.8ml蛋白悬液,经Bradford法鉴定其蛋白含量为3.05mg/ml,即共获得78.6mg单克隆抗体纯化蛋白。经SDS-PAGE电泳鉴定(见图2),结果显示腹水纯化物仅有含50Kd(抗体重链)和25Kd(抗体轻链)二条明显蛋白条带,无其他杂蛋白带,表明本发明已经获得高纯度单抗蛋白(纯度大于等于99%),可以满足制备实用型免疫金标卡和免疫亲和层析胶中检测抗体需求。

[0081] 实施例3:用于免疫胶体金检测卡(金标卡)和建立间接竞争ELISA的包被抗原(EF-cBSA偶联物)制备

[0082] 1、恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联(碳二亚胺偶联法,用于间接竞争ELISA包被抗原)

[0083] 载体蛋白的封闭:将20 $\mu$ l乙二胺,23.6mg BSA,25.6mg EDC,依次溶于1mL 0.01M PBS (pH7.0)中,振荡过夜(20℃,110r/min),0.01M PBS (pH7.0)透析24h备用。

[0084] 偶联:称取15.3mg EF(恩诺沙星),5.2mg NHS,9.3mg EDC溶于500 $\mu$ l DMF,室温避光振荡过夜(20℃,110r/min),3000r/min离心5min,取100 $\mu$ l上清加入2ml含5mg上述蛋白中(含33%DMF/0.01PBS (pH7.0)配制),室温避光振荡过夜(20℃,110r/min),3000r/min离心5min,取上清于透析袋中,分别用100 $\times$ 体积冰冷33%、28%、23%、18%、13%DMF/PBS各透析4h后,再用0.01M PBS (pH7.0)透析过夜。取少许进行紫外分光(测200-400nm峰)和SDS-PAGE电泳鉴定,其余部分制备成冻干粉。

[0085] 2、恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联(混合酸酐法,于免疫金标卡中作包被抗原)

[0086] 精确称取10.8mg EF标样,溶于600 $\mu$ l DMF中,室温下加入9 $\mu$ l正三丁胺,摇匀后加入6 $\mu$ l氯甲酸异丁酯,室温避光搅拌反应1h,得恩诺沙星反应液,精确称取19.8mg BSA溶于6ml CBS(0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH9.6))。将恩诺沙星反应液滴加BSA液中,室温下搅拌反应3h,分别用100 $\times$ CBS透析24h,每4h换液一次,再用PBS透析2d,取少许进行紫外分光(测200-400nm峰)和SDS-PAGE电泳鉴定,其余部分制备成冻干粉,并估算出盐份比。

[0087] 3、恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联物紫外分析

[0088] 通过1中的碳二亚胺偶联法,共获得约100mg(以蛋白含量计)恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联物的冻干粉,经波长240-400nm紫外连续检测,偶联物在278nm处(与纯蛋白峰对比前置)和330-350nm处均有明显的吸收峰,见图3的碳二亚胺法偶联物紫外检测曲线;通过2中的混合酸酐法共获得约20mg(以蛋白含量计)恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联物的冻干粉,经连续波长紫外检测,偶联物在278nm处(与纯蛋白比前置)和330-350nm处均有明显的吸收峰,见图3的混合酸酐法偶联物紫外检测曲线;阳离子化BSA在330-350nm处无有明显恩诺沙星特征吸收峰在278nm处有明显的蛋白特征峰级,见图3的牛血清白蛋白检测线;而二种偶联方式获偶联物均有恩诺沙星特征吸收峰;该结果表明通过上述二种偶联法恩诺沙星均已成功偶联在蛋白分子上,经 $[OD_{278}/BSA分子量]/[OD_{334}/(3.4 \times ENF分子量)]$ 公式计算:二种偶联法获得偶联物的恩诺沙星与BSA摩尔比分别为13:1和15:1,已满足后续免疫试验包被抗原的需求。

[0089] 实施例4:诱生腹水样本对恩诺沙星亲和力以及对恩诺沙星类似物免疫交叉性分析

- [0090] 1、棋盘ELISA (checker-board ELISA) 标定包被抗原工作浓度和腹水工作稀释度
- [0091] (1) 包被缓冲液:0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  (pH 9.6) :1.59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,2.93g  $\text{NaHCO}_3$ 加三蒸水至1000ml。
- [0092] (2) 抗原包被:EF-cBSA (碳二亚胺合成法合成偶联比为13:1) 用包被液稀释成9,3,1,0.333,0.111,0.037,0.012 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后并分别包被于ELISA板的A-G line (100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ), 同法将3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  cBSA包被于该板的H line作对照,于37 $^\circ\text{C}$ 湿孵1-1.5h后,置4 $^\circ\text{C}$ 冰箱湿孵过夜。
- [0093] (3) 0.01MPBS (pH7.4) :2.9009g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,0.2964g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,8.5g NaCl加三蒸水至1000ml。
- [0094] (4) 封闭液:1%OVA/0.01MPBS (pH7.4)。
- [0095] (5) 洗涤:取包被板甩干,PBST洗涤3次 (300 $\mu\text{l}/\text{well}$ ), 拍干。
- [0096] (6) 封闭:按340 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加封闭液,于37 $^\circ\text{C}$ 湿孵2.5h。
- [0097] (7) PBST:0.01M PBS (pH 7.4) 加入0.05%Tween20,混匀。
- [0098] (8) 一抗稀释液:0.1%OVA/PBS。
- [0099] (9) 抗体稀释:用一抗稀释液将腹水样本分别稀释成:1:10000,20000,40000,80000,160000五个稀释度,同时设1:10000溴泊特罗单抗诱生腹水 (由本校化学化工材料学院邓安平教授提供) 平行对照,分别加于ELISA板的1-2,3-4,5-6,7-8,9-10,11-12列中。
- [0100] (10) 将板取出,甩干,用PBST洗涤3次,拍干。
- [0101] (11) 加入100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 一抗孵育液,37 $^\circ\text{C}$ 湿孵2h。
- [0102] (12) 二抗孵育液:用0.1%OVA/PBS液按1:500稀释酶标二抗 (辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG (H+L) 二抗)。
- [0103] (13) 取出板,甩干,用PBST洗涤5次,拍干。
- [0104] (14) 按100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加二抗孵育液,37 $^\circ\text{C}$ 湿孵1.5h。
- [0105] (15) ELISA显色液:4.86ml 0.1M Citric acid液与5.14ml 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 液混合,加6mg OPD充分溶解后再加20 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,避光备用。
- [0106] (16) 取出板,甩干,4次PBST洗涤+2次PBS洗涤。
- [0107] (17) 显色:甩干后,按100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加上述显色液,避光显色3min,每孔加50 $\mu\text{l}$  2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 终止反应。
- [0108] 2、间接竞争ELISA测定腹水样本对恩诺沙星亲和力以及对恩诺沙星结构类似物免疫交叉率
- [0109] (1) 碳酸盐缓冲溶液的配制:同1中;
- [0110] (2) 抗原包被:以上述间接ELISA试验标定工作浓度的EF-cBSA再包被于4块酶标板的A-G line孔中 (100 $\mu\text{l}/\text{well}$ )。包被抗原对照:同浓度cBSA包被酶标板的H line (100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ),37 $^\circ\text{C}$ 湿孵1-1.5h再置4 $^\circ\text{C}$ 湿孵过夜。
- [0111] (3) 洗涤、封闭、再洗涤同上。
- [0112] (4) 抗体与游离半抗原的预结合:
- [0113] A:0.2%OVA/PBS将腹水样本稀释成1/2 $\times$ 标定稀释度作为工作浓度抗体备用。
- [0114] B:精确称取恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星等八种标样,用0.03M NaOH分别稀释成100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为储存液备用。
- [0115] C:取5 $\times$ 6支1.5ml EP管,上述储存液用0.01M PBS (pH 7.4) 将前五种药物分别稀

释成0.2、0.6、1.8、5.4、16.2、48.6ng/ml六个稀释度；再取3×6支1.5ml EP管，并将上述储存液用0.01M PBS (pH 7.4) 将后三种药物分别稀释成1.8、5.4、16.2、48.6、145.8、437.4ng/ml六个稀释度；每种药各浓度点按0.35ml/管分别加上述6支EP管中，另取一支15ml离心管中加5.5ml 0.01M PBS (pH 7.4)，加完后每支离心管中均加等体积的上述工作稀释度抗体。

[0116] D: 上述的离心管于室温振荡 (50-100r/min) 孵育一小时。

[0117] (5) 一抗孵育: 将上述含游离上述8种药物单组分竞争抗原一抗 孵育液的六支试管一一对应加上上述酶标板的A-F line (100μl/well) × (1-6列或7-12列) 的孔中 (每个处理6个复孔)，酶标板的G\H line孔中加PBS液处理一抗孵育液。37℃湿孵2h。

[0118] (6) 一抗孵育后的洗涤、二抗孵育、洗涤、显色同上述间接ELISA方法。

[0119] 结果分析: 酶标仪读每孔OD<sub>490</sub>值，按同栏的6个复孔求平均值 (注: 异常值予以剔除)，A-G栏的平均值均减去H栏 (调零孔) 平均值后作为各栏去除本底值后的实际值，将竞争抗原各浓度点处理栏实际值命名为B，无竞争抗原G栏实际值命名为B<sub>0</sub>，每栏的抑制率按:  $(B_0 - B) / B_0 \times 100\%$  计算，再以每栏竞争抗原的浓度作自变量，每栏的抑制率作因变量绘制抑制曲线，插入法求出IC<sub>20</sub>、IC<sub>50</sub>、IC<sub>80</sub>三个关键浓度点，其中IC<sub>50</sub>代表抗体对待测竞争样本的检测灵敏度，IC<sub>20</sub>代表抗体对待测竞争样本的最高检测限，IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>代表该抗体对待测竞争样本的有效检测浓度范围，再按  $(IC_{50 \text{ of enrofloxacin}}) / (IC_{50 \text{ of enrofloxacin analog}}) \times 100\%$  求其他7种药物与恩诺沙星免疫交叉率，待测竞争样本主要技术参数见表1，相关抑制曲线图见图4。

[0120] 表1八种氟喹诺酮药物间接竞争ELISA试验主要技术参数

[0121]

竞争物	IC <sub>20</sub> -IC <sub>80</sub> (ng/ml)	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	与恩诺沙星免疫交叉率
诺氟沙星	0.064±0.003--2.35±0.121	0.293±0.009	121.16%
恩诺沙星	0.083±0.004--2.53±0.135	0.355±0.011	100%
环丙沙星	0.095±0.005--2.73±0.131	0.451±0.016	78.71%
培氟沙星	0.098±0.006--2.83±0.138	0.473±0.019	75.05%
依诺沙星	0.099±0.006--2.71±0.136	0.561±0.023	63.28%
氧氟沙星	0.283±0.031--23.55±1.587	1.592±0.089	22.30%
洛美沙星	1.55±0.126--71.34±3.126	6.573±0.368	5.40%
沙拉沙星	1.83±0.154--80.68±4.138	7.321±0.453	4.85%

[0122] 在棋盘ELISA中，以恩诺沙星与阳离子化牛血清白蛋白偶联物 (碳二亚胺合成法) 作包被抗原，阳离子化牛血清白蛋白作包被抗原阴性对照；11F10细胞诱生腹水作试验一抗，溴布特罗单抗杂交瘤细胞诱生 腹水作阴性一抗对照，其结果显示: 1μg/ml牛血清白蛋白包被抗原对照组与1:10000溴布特罗的诱生腹水作一抗对照组的OD<sub>490</sub>均小于等于0.05，该结果表明试验系统无非特异性反应，其他试验组的OD<sub>490</sub>值与包被抗原以及一抗的稀释度均呈强浓度依赖性，原始数据限于篇幅未详细列出，从中选取OD<sub>490</sub>值为2.0-2.5的包被抗原浓度与一抗稀释度分别为: 0.111μg/ml和1:80000作工作浓度和一抗稀释度用于竞争ELISA试验。

[0123] 以上述工作浓度包被抗原包被酶标板，用1:80000腹水做一抗与上述系列浓度的八种氟喹诺酮药物标样分别孵育后作竞争ELISA试验后得各浓度OD<sub>490</sub>平均值 (三次独立试

验),按  $(B_0-B)/B_0 \times 100\%$  公式得每种药物各浓度点抑制率,以浓度作横坐标,抑制率作纵坐标得每种竞争物标准抑制曲线结果见图4;按插入法得每种药物20%–80%抑制率( $IC_{20}$ – $IC_{80}$ )的有效抑制浓度范围,得每种药物半抑制浓度( $IC_{50}$ 代表系统对该药物检测灵敏度),以  $(IC_{50\text{of enrofloxacin}}/IC_{50\text{of enrofloxacin analog}}) \times 100\%$  得七种氟喹诺酮药物与恩诺沙星免疫交叉率,上述三大技术参数指标见上表1,从表1和图4得出:

[0124] 1.该单克隆抗体对诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、培氟沙星、依诺沙星有极高检测灵敏度( $IC_{50}$ 从0.292–0.561ng/ml),该四种药物与恩诺沙星有良好免疫交叉性(交叉率大于50%),该结果为下一步研制高灵敏度上述几种氟喹诺酮类药物强通用性其他形式免疫检测产品提供了极其重要的试验数据。

[0125] 2.该单克隆抗体对食品和医药领域使用频率极高另一种氟喹诺酮药物–氧氟沙星有较高亲和力( $IC_{50}$ 为1.592ng/ml)可部分作为氧氟沙星专用检测试剂盒替代品用于氧氟沙星初步筛查。

[0126] 3.该单克隆抗体对洛美沙星、沙拉沙星有一定亲和力( $IC_{50}$ 分别为6.573,7.321ng/ml)。

[0127] 4.该单抗检测通用性较高:极高灵敏度可同时测定五种氟喹诺酮药物、高灵敏度可同时测定六种氟喹诺酮药物,一般灵敏度可同时测定八种氟喹诺酮药物。

[0128] 实施例5:胶体金的制备与质量分析

[0129] 1、胶体金的制备

[0130] 取1% $H AuCl_4$ (由氯金酸加三蒸水配制)溶液0.5ml加入到49.5mL超纯水中,所得氯金酸溶液浓度为0.01%,置于带冷凝装置(避免由于水的蒸发导致氯金酸溶液浓度降低)的三角烧瓶中加热至沸腾,在磁力恒温搅拌器加热搅拌下快速加入1%的柠檬酸三钠溶液1.25mL,继续加热直至溶液呈葡萄酒色。冷却后置于棕色瓶中4℃冰箱保存。

[0131] 2、胶体金的质量评估

[0132] 制备出的胶体金颗粒是胶体性质,大小在15–30nm之间,微小的金颗粒稳定均匀地分散在液体中,成为胶体金溶液,见清凉透明胶体金颗粒悬液。

[0133] 在遴选出一种优质单抗作检测抗体以及合适半抗原蛋白偶联物作检测抗原后,免疫检测金标卡的稳定性和检测灵敏度取决于另一个重要因素即制备胶体金粒径和颗粒均一性,本发明采用粒径约为20nm作为原料制备单克隆抗体金标探针,按100ml 0.01% $H AuCl_4$ 加1.5ml 1%柠檬酸钠比例经经典还原法得胶体金取少许进行400–900nm可见光连续扫描结果见图5,透射电镜鉴定见图6,不同粒径相对数量见图7,扫描图显示该胶体金液在522nm处有明显吸收峰初步说明胶体金液中大多数颗粒的粒径在20nm,透射电镜显示金颗粒饱满均匀,粒径统计分析粒径20nm颗粒数约占60%,粒径为18nm和22nm颗粒数之和大约占30%,粒径为16nm和24nm颗粒数之和大约占10%。

[0134] 通过图5–7表明本发明已获得了粒径合适,大小较均一胶体金的颗粒,满足了下一步单克隆抗体胶体金探针的制备。

[0135] 实施例6:金标抗体的制备

[0136] 1、纯化抗体蛋白的预处理

[0137] 取本发明纯化单抗蛋白于透析袋(7500–14000MW)中,于5mM NaCl (pH 7.0)溶液4℃透析过夜(每4–6h换液一次),透析后的蛋白用0.22 $\mu$ M微孔滤膜过滤,过滤后于4℃保存备

用。

### [0138] 2、最佳标记量的确定

[0139] 取8支EP管各加1ml实施例5胶体金悬液后,将上述单克隆抗体蛋白用5mM NaCl (pH 7.0) 溶液分别稀释成0、10、15、20、25、30、35、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,各取蛋白稀释液0.1ml分别加入胶体金液EP管中,5min后加入0.1ml 10%NaCl溶液,混匀后静置2h观察,并以稳定1ml胶体金溶液红色不变的最低蛋白质用量,即为该单抗蛋白的最低用量。

### [0140] 3、单抗蛋白的胶体金标记

[0141] 用0.1M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调节金溶胶pH至8.2,取10ml已调pH值的金溶胶中加入最佳标记量的单抗蛋白液(体积约20 $\mu\text{L}$ ),搅拌15min,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜后,加入0.5ml 5%BSA溶液封闭,3000r/min离心30min,去除粒径较大的颗粒,取上清14000r/min离心30min后取沉淀,将沉淀物重悬为原体积的十分之一制成探针,4 $^\circ\text{C}$ 保存待用。

### [0142] 实施例7:免疫金标卡的组装

[0143] 实用型免疫金标卡组件包括:(1)样品垫、(2)结合垫(胶体金垫)、(3)层析膜(硝酸纤维素膜)、(4)吸收垫、(5)支持底板(PVC底板)、(6)外包装塑料盒

[0144] (1)样品垫:选用了上海杰一生物有限公司提供的Ahlstrom8964(25 $\times$ 30cm)型玻璃纤维,用试纸条展开剂将样品垫37 $^\circ\text{C}$ 封闭2-3h,干燥备用。

[0145] (2)结合垫(胶体金垫):选用上海杰一生物有限公司公司提供的Ahlstrom 8964(25 $\times$ 30cm)型玻璃纤维,将上述胶体金标记的单克隆抗体蛋白液均匀地喷涂在4mm宽的玻璃纤维膜上,室温干燥,干燥后至密封塑料中,于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

[0146] (3)层析膜(硝酸纤维素膜):选用Whatman公司提供硝酸纤维素膜(Immunopore RP,25mm $\times$ 50m)作试验用膜。0.01M  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH9.6)分别将恩诺沙星牛血清白蛋白偶联物(混合酸酐法合成)和山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体稀释成1mg/ml,置BioDotXYZ3050三维喷点平台上,用BioJet Quanti300非接触微量喷头将上述二种试液均匀平行地喷洒在NC膜上并分别标记为T/C线。37 $^\circ\text{C}$ 培养箱干燥后,放至密封塑料中,于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

[0147] (4)吸收垫:选用上海杰一生物有限公司提供(H5072,20 $\times$ 30cm)吸收垫,用试纸条切割机切成宽度为5mm长型小条,放至密封塑料中。

[0148] (5)支持底板:选用上海杰一生物有限公司公司提供DB—6免疫金标卡专用PVC板作支持底板(6cm $\times$ 30cm)。

[0149] (6)外包装塑料盒:选用上海捷宁生物有限公司提供C-9-1型免疫金标卡专用包装塑料盒作外包装。

[0150] 将上述各部件按照图1所示进行有序安装。

### [0151] 实施例8:免疫金标卡对氟喹诺酮药物单组分检测灵敏度的分析

[0152] 分别精确称取恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星各1mg,用0.03M NaOH分别配制1mg/ml储存液,并于4 $^\circ\text{C}$ 保存备用(有效期为1个月)。分别取一部分用0.03M NaOH再分别配制500ng/ml作工作储存液,再用0.01MPBS (pH7.4)液将每种药工作储存液分别配制成:0、0.1、0.3、1、3、10、30、100ng/ml (ppb)七个稀释度分别滴加于制备的免疫金标卡加样孔中(200 $\mu\text{l}$ /孔),用实施例7免疫金标卡对每个浓度点药物进行层析测定,10min后观察实验结果并拍照记录,结果见图8和图9。

[0153] 以本发明单抗纯化蛋白与胶体金交联制备的金标抗体作测试抗体,以混合酸酐法

合成的恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联物作检测抗原,以山羊抗小鼠IgG二抗作质控包被物组装实用型金标检测卡对八种氟喹诺酮药物单组分检测灵敏度测试显示:浓度为3ng/ml的恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星的单组分竞争物均能使检测线(T线)完全消失,说明该免疫金标卡对上述五种药物的检测限均小于等于3ng/ml,其中诺氟沙星检测灵敏度最高,1ng/ml诺氟沙星作竞争物能使检测线完全消失说明该金标卡对诺氟沙星的检测限已达到小于等于1ng/ml,结果见图8。

[0154] 30ng/ml沙拉沙星作竞争物检测线完全消失说明该卡对沙拉沙星的检测限小于等于30ng/ml;10和100ng/ml的氧氟沙星和洛美沙星分别作竞争物检测线大部分和完全消失说明该卡对氧氟沙星的检测限在10-100ng/ml,结果见图9。

[0155] 实施例9:免疫金标卡对几种氟喹诺酮药三组分混标药物检测灵敏度的分析

[0156] 将恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星中作三种药物等浓度任意组合(共计10种组合)混合,每个组合按总浓度计为3ng/ml,每个组合中单个组分浓度为1ng/ml,按实施例8同样的方法进行层析测定与记录,结果见图10。

[0157] 由图10可见,未加竞争物的空白对照组(第一组)免疫金标卡的T线和C线均有明显的杂交信号说明该金标卡工作正常,单克隆抗体的金标探针能捕捉到恩诺沙星与牛血清白蛋白偶联物同时亦能被山羊抗小鼠IgG二抗所捕捉。

[0158] 各试验组(共十种组合,第2-11组)的竞争物均能完全竞争金标抗体探针与恩诺沙星偶联物的结合使T线完全消失,该结果说明该金标卡总浓度为3ng/ml的上述五种氟喹诺酮药物三组分等浓度混标物的检测线小于等于3ng/ml,结合实施例8单组份试验结果说明该金标卡对上述五种氟喹诺酮药物的识别不存在相互干扰效应而为叠加效应,且灵敏度极高。

[0159] 实施例10:免疫金标卡抗基质干扰能力的分析

[0160] 以猪肉和猪尿为模式基质,恩诺沙星标样做标准掺入物通过回收率分析该金标卡的抗基质干扰能力,结果见表2。

[0161] 表2金标卡对恩诺沙星外标猪肉猪尿样本的检测

[0162]

加标基质与标准液对照	加标浓度 ng/ml	信号强度
猪肉	0	++++
	0.1	+++
	0.5	++

[0163]

	1	+
猪尿	0	++++
	0.1	+++
	0.5	++
	1	+
	0	++++
0.01MPBS(pH7.4)	0.1	+++
	0.5	++
	1	+
	0	++++

[0164] 表2显示:以猪肉、猪尿为基质,恩诺沙星外标后,其检测信号强度与外标目标物呈强浓度依赖性,与标准液中同浓度点外标目标物抑制信号强度基本一致,该结果表明免疫金标卡有强抗基质干扰力,为免疫金标卡的实际应用提供了有力试验依据。

[0165] 实施例11:免疫金标卡稳定性检测

[0166] 取4℃干燥保存一、三个月后的免疫金标卡按实施例8同样的方法中的恩诺沙星系列浓度竞争物进行层析测定并与实施例8中对应试验结果进行比较,分析金标卡的稳定性,结果见图11。

[0167] 图11显示储存1、3月的金标卡与现装配金标卡检测灵敏度无明显差异说明该金标卡有良好的稳定性。

[0168] 实施例12:单克隆抗体蛋白与Sepharose™ 4B化学交联

[0169] 1、交联前单克隆抗体蛋白预处理

[0170] 取约40mg上述单克隆抗体蛋白纯化物(浓度大于等于2mg/ml,纯度大于等于99%)置于透析袋(7500-14000MW)中,于100-200×0.1MNaHCO<sub>3</sub>/0.5M NaCl (pH 8.3)溶液4℃透析过夜(每4-6h换液一次),透析后蛋白用0.22μm微孔滤膜过滤,过滤后于4℃保存备用。

[0171] 2、交联前CNBr-activated Sepharose 4B预处理

[0172] 分别称取二份3g CNBr-activated Sepharose 4B冻干粉于2支50ml 离心管(corning公司产品),每支离心管加30ml 1mM HCl室温于摆床中轻轻摆动溶胀1h,室温2000r/min 10min弃上清,同法离心洗涤重复8-10次充分去除该胶中未交联的其他小分子化学试剂,30ml 0.1M NaHCO<sub>3</sub>/0.5M NaCl (pH 8.3)离心洗涤一次,取沉淀胶备用。

[0173] 3、单抗蛋白与Sepharose 4B化学交联

[0174] 将上述预处理的单抗蛋白液分成二等份分别加入含处理Sepharose4B胶的2支50ml离心管中,盖好盖并用parafilm膜封口,置于摆床中室温摆动孵育1h,室温2000r/min 10min弃上清,从该上清中取少许以Bradford蛋白浓度检测试剂盒检测其蛋白浓度分析单抗蛋白与Sepharose 4B胶化学交联的效果。每支离心管加30ml 0.1M NaHCO<sub>3</sub>/0.5M NaCl (pH 8.3)溶液,置于摆床中室温摆动孵育10min,室温2000r/min 10min弃上清,再用该液重复上述步骤离心洗涤5-6次以充分去除未交联的蛋白,取沉淀胶。

[0175] 取上述沉淀胶,每支离心管加入30ml 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 置于摆床中室温摆动孵育2h以充分封闭Sepharose 4B胶中未与蛋白交联的活化基团,室温2000r/min离心10min,取沉淀胶。

[0176] 取沉淀胶,每支离心管分别用30ml 0.1M HAC-NaAC/0.5M NaCl (pH4.0) 和0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl (pH 8.0) 二种缓冲液交替离心洗涤三个循环后,将胶重悬于30ml 0.1M Tris-HCl/0.5M NaCl (pH 8.0) 液补加0.02%NaN<sub>3</sub>,于4℃保存备用。

[0177] 实施例13:免疫亲和层析胶对4种氟喹诺酮药物单组分结合测定

[0178] 取上述恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星储存液,用0.01M PBS (pH 7.2) 将每种药物分别稀释成:25、50、100ng/ml三个浓度点于1.5ml EP管中(1ml/管),另取4×3支1.5ml EP管,每管均加入500μl免疫亲和层析胶悬液(免疫亲和层析胶实际体积约为50μl),0.01M PBS (pH 7.2) 离心洗涤二次尽量吸干残液,分别将每种药物各浓度点的稀释管液一一对应移入含免疫层析胶EP管中,各浓度点结合胶轻轻悬浮后于摆床室温摆动孵育1h,1000r/min离心10min弃上清,0.01M PBS (pH 7.2) 离心洗涤5-6次后,0.9%NaCl离心洗涤2次,尽量吸干胶中残液,每只EP管中分别加1ml 0.1M HAC-HCl (pH2.3) 重悬结合胶并于摆床室温摆动孵育15min,1000r/min离心10min,另取4×3支1.5ml EP管,各取上述离心洗脱液850μl一一对应移入的新EP管,每管补加150μl色谱级乙腈充分混匀,作待测样本直接上HPLC-FLD定量测定验证每种药物各浓度点回收率。

[0179] 经间接竞争ELISA证实本发明单抗能有效识别八种氟喹诺酮药物后,本实施例选用食品(尤其是畜禽水产品)样本中出现残留频率较高的恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星等四种氟喹诺酮药物作目标物验证本发明免疫亲和层析胶对氟喹诺酮药物单组分的结合性能。以不同浓度上述四种药物单组分免疫亲和层析洗脱物作样本,通过目前公认检测精确度和灵敏度俱佳的高效液相色谱法(配荧光检测器)HPLC-FLD加以验证,结果显示:

[0180] 1、四种药物单组分标样的免疫亲和层析洗脱样本经HPLC-FLD检测其目标峰明确清晰、无其他非相关分子杂峰,其中环丙沙星、诺氟沙星和沙拉沙星样本中检测到少量或极少量的恩诺沙星特征峰(初步怀疑标样中混有少量的恩诺沙星),见四种药物回收样本的色谱图,即图12-15,该结果表明免疫亲和层析胶对上述四种药物均有良好选择性捕捉能力。

[0181] 2、25、50、100ng/ml的诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星三种药物样本回收率均大于等于65%,其中诺氟沙星的回收率最高分别为82.17%、77.69%、75.79%,而沙拉沙星回收率最低分别为:54.15%、47.98%、45.58%结果见图16(注:考虑到洗涤等处理过程中免疫亲和层析胶有少部分损失,实际的回收率高于测得的回收率),该结果与本发明间接竞争ELISA测定的该单克隆抗体对四种药物的亲和力相吻合。

[0182] 实施例14:免疫亲和层析胶抗基质干扰能力的测定

[0183] 用0.01MPBS (pH7.4) 将胎牛血清作10×稀释后分别加至二支1.5EP管中(0.5ml/支),用0.01M PBS (pH7.4) 将恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、达氟沙星等五种药物储存液稀释成浓度均为100ng/ml的混合液,取0.5ml混合液加至含0.5ml 10×稀释胎牛血清液的一支EP管中作氟喹诺酮药物掺入胎牛血清试液;取0.5ml混合液加等体积0.01M PBS (pH7.4) 于一支EP管中作氟喹诺酮药物标准混合试液;另一支含0.5ml胎牛血清10×稀释液EP管中加等体积0.01M PBS (pH7.4) 作空白对照试液;于摆床上室温摆动孵育1h。另新

取三支EP管分别加入1ml上述IAC胶悬液,0.01M PBS (pH7.4) 离心淘洗三次,尽量吸尽残液,分别将上述三种试液加入该三支EP管中,于摆床上室温摆动孵育1h,离心去除试液,0.01M PBS (pH7.4) 离心淘洗胶五次,0.9%NaCl离心淘洗胶二次后尽量吸尽残液,分别加入1ml 0.1M HAC-HCl (pH2.2) 液,于摆床上室温摆动孵育15min,1000r/min离心5min,分别取850 $\mu$ l 上清一一对应加至新的三支1.5EP管中,每管分别补加150 $\mu$ l 色谱级乙腈混匀,过0.22 $\mu$ m滤膜后分别进样作HPLC-FLD定量分析。

[0184] 为了进一步验证本发明的免疫亲和层析胶对氟喹诺酮类药物多组分混标物结合力以及该层析胶抗基质干扰能力,发明人以单组分均为50ng/ml的恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星(上述五种氟喹诺酮类药物多以单组分或多组分的形式残留于动物源食品样本中,具有很强代表性)的五组份混标物作目标物,再以5%胎牛血清作模式基质掺入上述五组份混标物,通过五组份药物的0.01M PBS缓冲液组的各组份回收率作指标分析免疫层析胶对氟喹诺酮类药物混标物捕捉力,再比较0.01MPBS组与5%胎牛血清组的各种药物回收率分析免疫层析胶抗干扰能力,二组处理洗脱物经HPLC-FLD检测显示(见图17和图18):

[0185] 1、二组试样洗脱物的各组分均能被色谱柱有效分离,各组分信号响应良好,目标峰明确清晰、无其他非相关分子杂峰,见五种药物回收样本色谱图,而空白对照组无任何的目标药物信号峰。该结果表明免疫亲和层析胶对上述五种药物混标物的单组分均有选择性捕捉能力。

[0186] 2、0.01M PBS组中的诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星三种药物的回收率大于等于55%,其中诺氟沙星的回收率最高为63.32%,沙拉沙星的回收率为25.39%,达氟沙星回收率仅为5.29%,该结果与本发明中的间接ELISA测得对各种药物的亲和力以及上述四种药物单组分免疫亲和层析回收率的试验结果有良好的相关性。

[0187] 3、与0.01M PBS组相比,5%胎牛血清组的五种药物回收率均有显著地提高:

[0188] 诺氟沙星由63.32%提高到82.97%二者相比回收率提高了30.31%;

[0189] 恩诺沙星由55.73%提高到70.50%二者相比回收率提高了26.53%;

[0190] 环丙沙星由54.76%提高到70.16%二者相比回收率提高了28.12%;

[0191] 沙拉沙星由25.39%提高到31.83%二者相比回收率提高了25.36%;

[0192] 达氟沙星由5.29%提高到6.37%二者相比回收率提高了20.42%;

[0193] 该结果表明:5%胎牛血清作模式基质不仅没有干扰免疫亲和层析胶对氟喹诺酮类药物目标物识别与捕捉,反而显著提高了该层析胶/珠对目标物识别与捕捉能力,初步推测牛血清对免疫亲和层析胶有良好封闭作用,可能有大大降低了固相抗体分子空间排阻效应,从而提高了抗体对目标抗原的识别与结合力。

[0194] 更为重要的是,通过牛血清对免疫亲和层析胶预封闭处理,将恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星等三种食品样本重要残留目标物的回收率提高到大于等于70%,可虑到样本洗涤时部分结合胶丢失,实际回收率接近甚至超过80%,为该免疫亲和层析胶由试验型转化为实际应用型提供了良好的优化方法。

[0195] 实施例15:免疫亲和层析柱对目标物富集能力的测定

[0196] 取一支5ml亲和层析专用柱床,用Tewater充分洗涤后,将3ml免疫亲和层析胶悬液装柱于柱床中,100ml 0.01M PBS (pH7.4) 平衡柱后备用,用0.01M PBS (pH7.4) 液将恩诺沙

星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、达氟沙星等五种药物储存液稀释成浓度均为50pg/ml的100ml 混合液作试液,将该液于层析柱中过滤五次,再用100ml 0.01M PBS (pH7.4) 洗涤该柱,再用0.01M PBS (pH7.4) 将胶悬浮全部收集于5ml离心管中,用0.9%NaCl离心淘洗胶二次,尽量吸干残液,加1.5ml0.1M HAC-HCl (pH2.3) 重悬结合胶并于摆床室温摆动孵育15min,1000r/min离心10min,取850 $\mu$ l洗脱液于一支1.5mlEP管中,补加150 $\mu$ l色谱级乙腈充分混匀,过0.22 $\mu$ m滤膜进样作HPLC-FLD定量分析。

[0197] 随着氟喹诺酮类药物在地表水和土壤中pg/ml (g) 级极微量残留构成对人体与动植物潜在危害越来越受到各国政府与相关部门关注,尽管对其残留限目前没有统一国际标准,而瑞典等发达国家有一定标准并规定单组分不得超过50pg/ml (g),国内地表水与土壤中氟喹诺酮类药物残留状况更不容乐观。应用HPLC-FLD检测技术对其精确定量测定势在必行,如何将大体积样本中极微量氟喹诺酮药物目标物富集至HPLC-FLD仪信号响应水平(其检测限约为500pg/ml) 成为开展该工作最大技术瓶颈,为此本发明在证实上述免疫亲和层析胶/珠能同时捕捉几种氟喹诺酮药物(见实施例14)的基础上,以浓度分别为50pg/ml (该浓度是依据瑞典的地表水氟喹诺酮残留限而定) 上述五种氟喹诺酮药物的100ml混标物作模式样本,经上述免疫亲和层析柱凝胶过滤-收集结合胶-加小体积洗脱液洗脱获取上述五种药物洗脱样本,再经HPLC-FLD检测结果显示(见图19和20):

[0198] 经该免疫层析柱(IAC Cartridge) 富集:五种药物均达到HPL-FLD仪信号响应水平,目标峰明确清晰、无其他非相关分子杂峰,表明本发明免疫亲和层析柱对HPLC-FLD仪信号响应水平低于10 $\times$ 左右的五种氟喹诺酮药物的混标物。

[0199] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

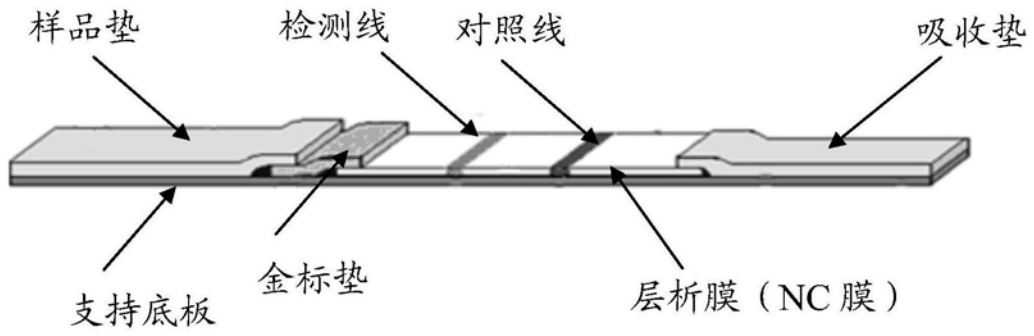


图1

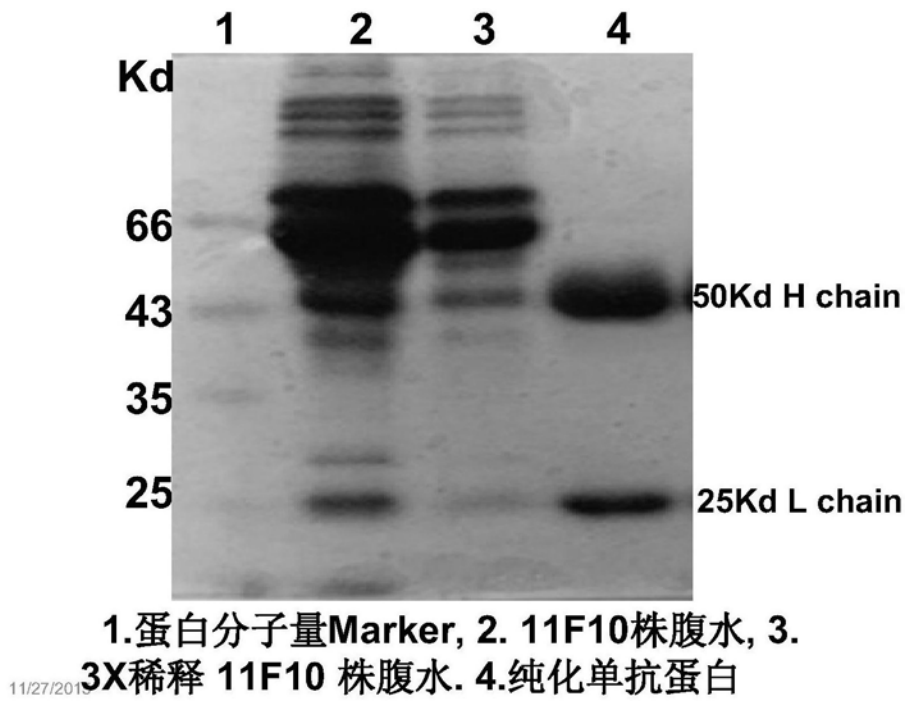


图2

### 二种偶联法合成恩诺沙星偶联物紫外检测图

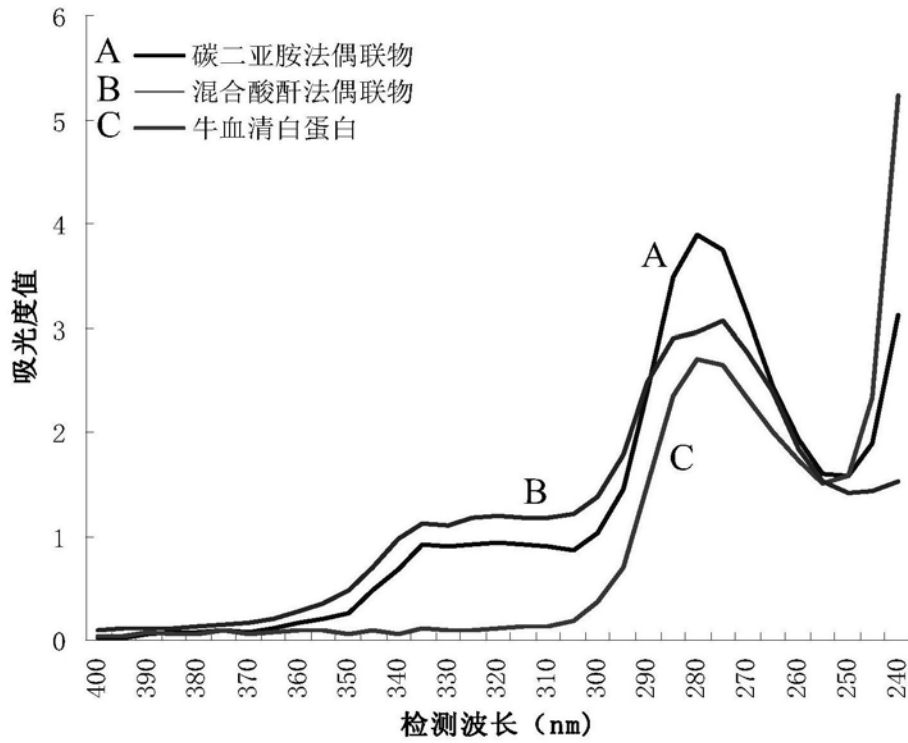


图3

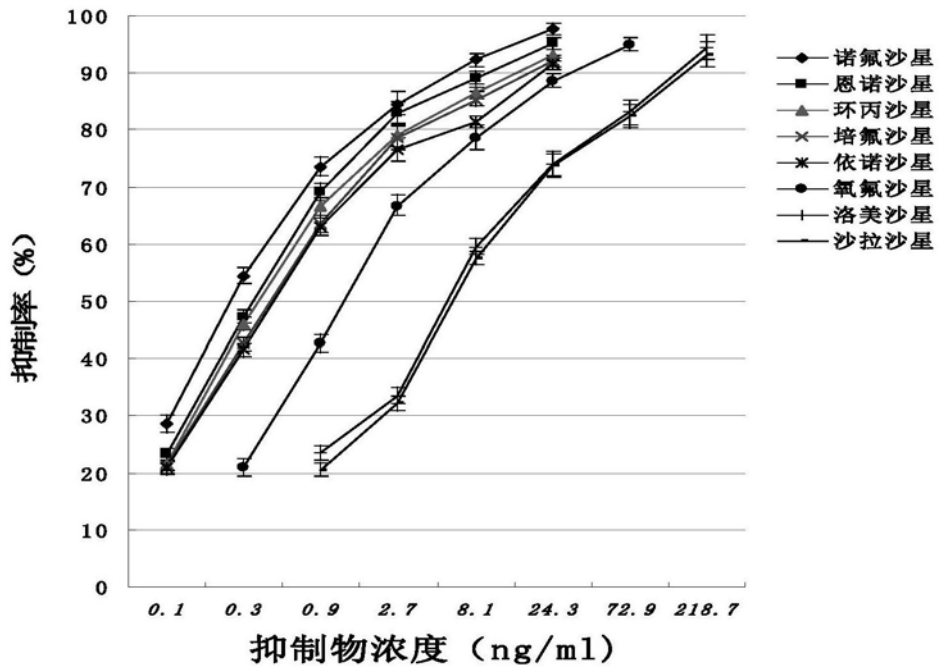


图4

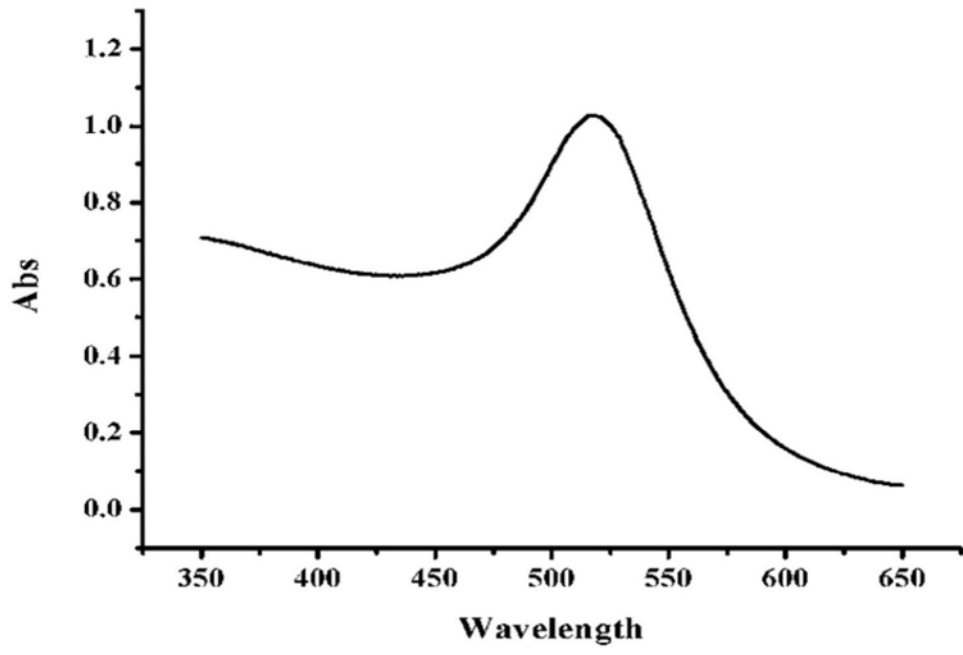


图5

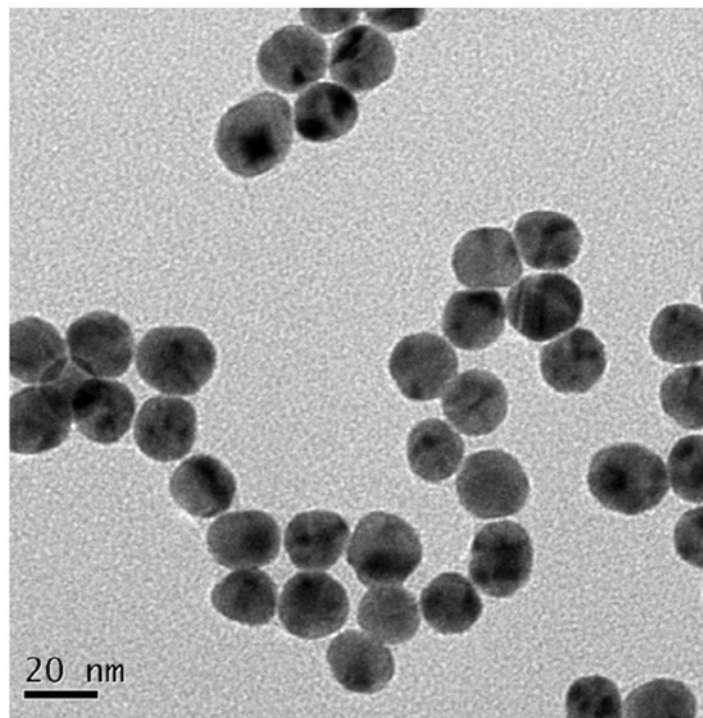


图6

### 胶体金粒径大小分布

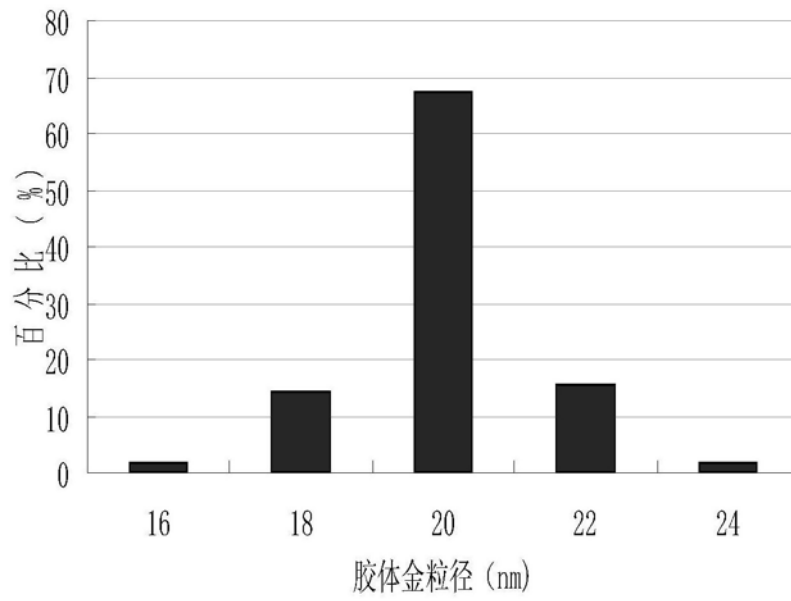


图7

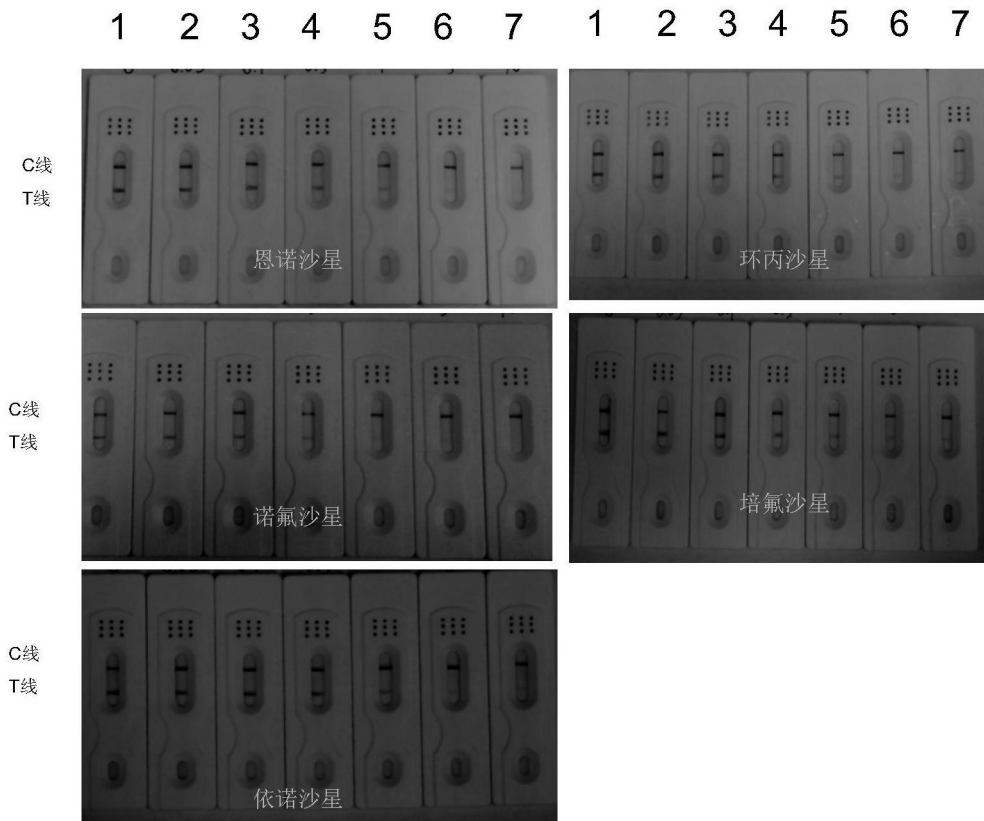


图8

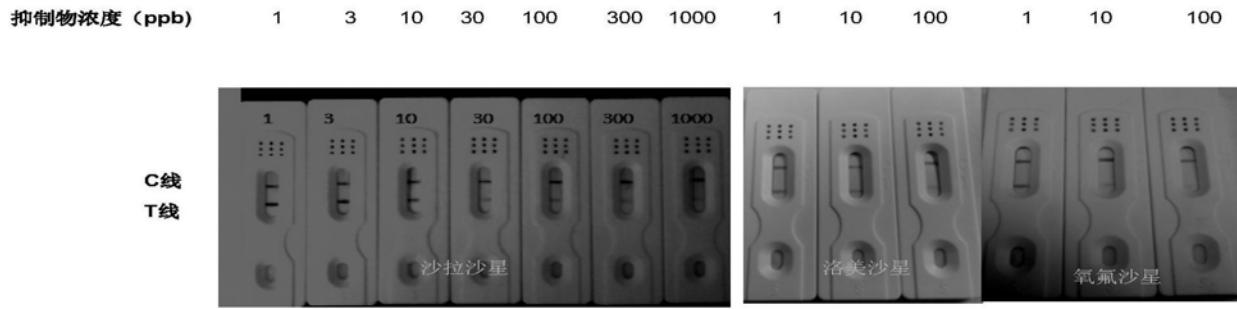


图9

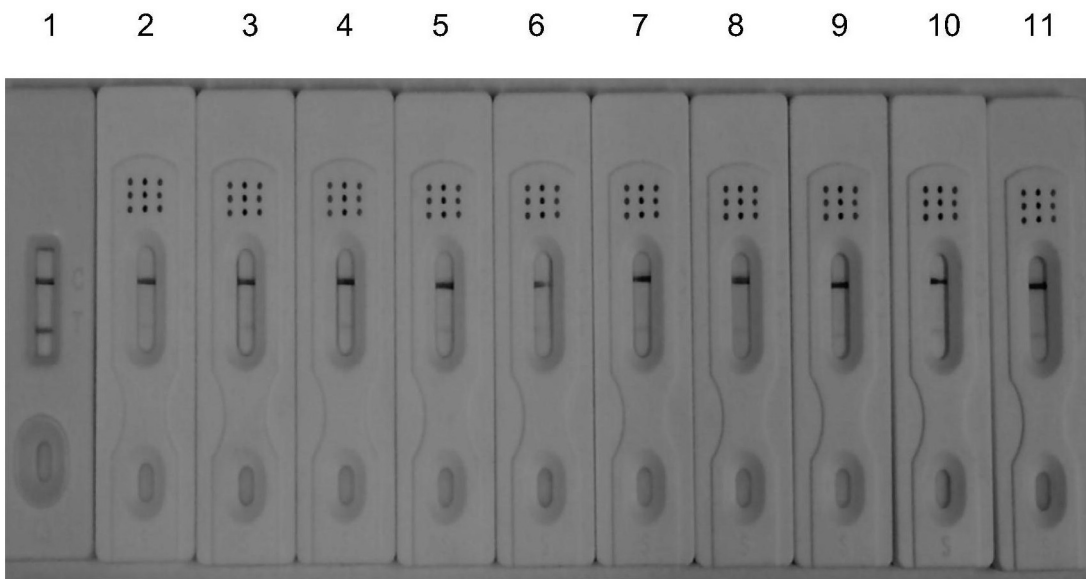


图10

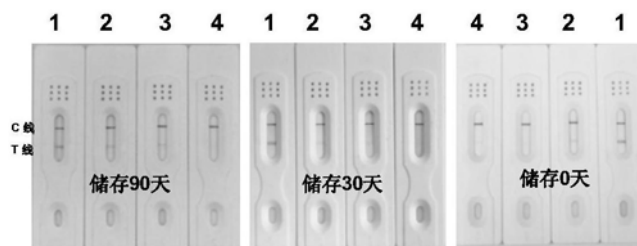
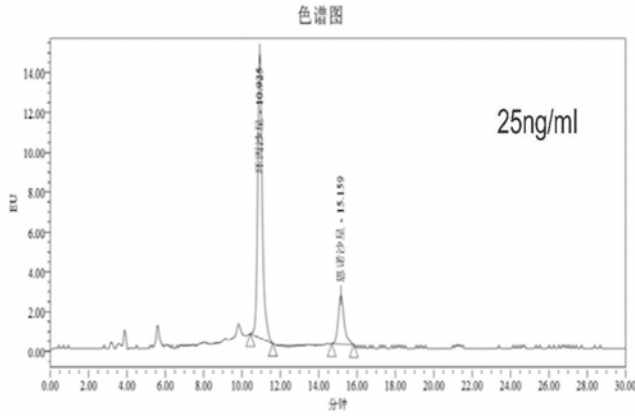
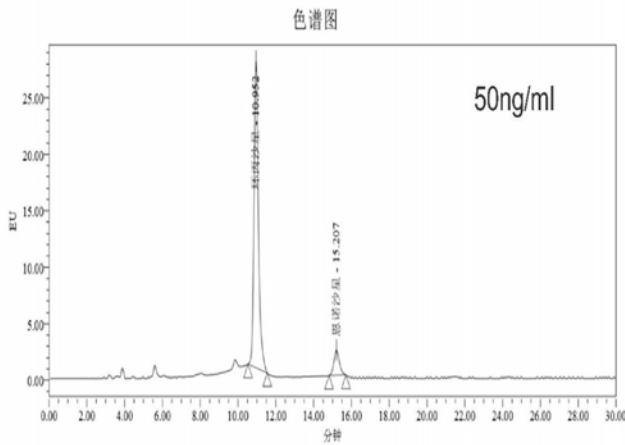


图11



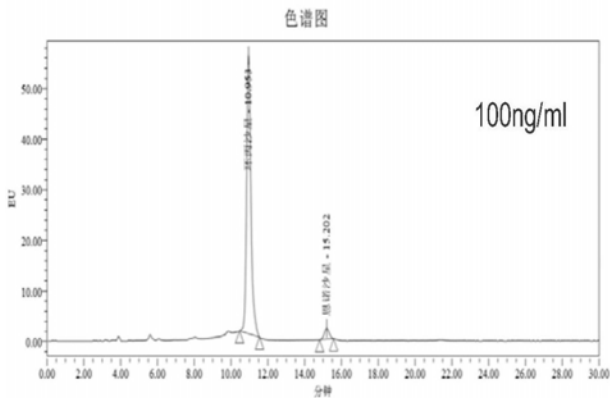
峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	10.925	2363960	142683	14.88765	ng/mL
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.159	525838	24410	1.81638	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				



峰结果

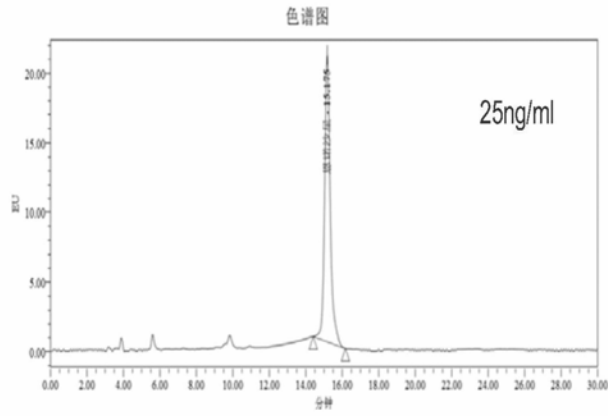
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	10.952	4419207	271767	27.75014	ng/mL
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.207	451424	22277	1.56573	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				



峰结果

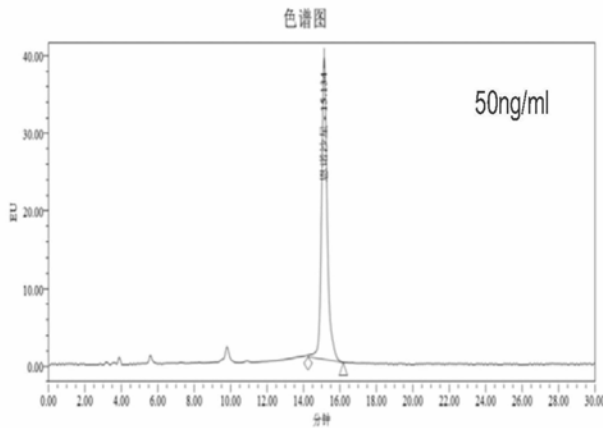
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	10.953	9008050	550665	56.46882	ng/mL
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.202	408336	21708	1.42059	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				

图12



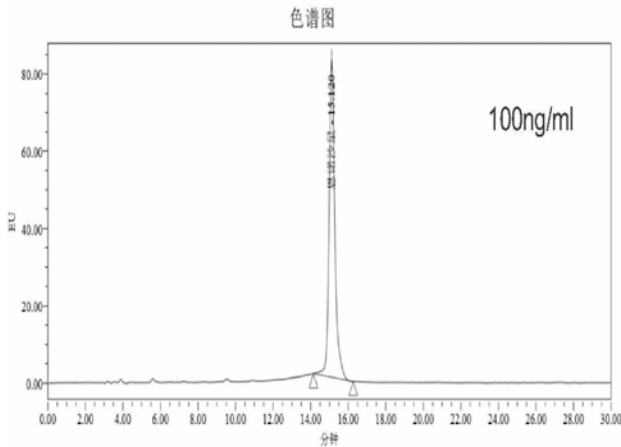
峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.175	4442889	205973	15.01029	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				



峰结果

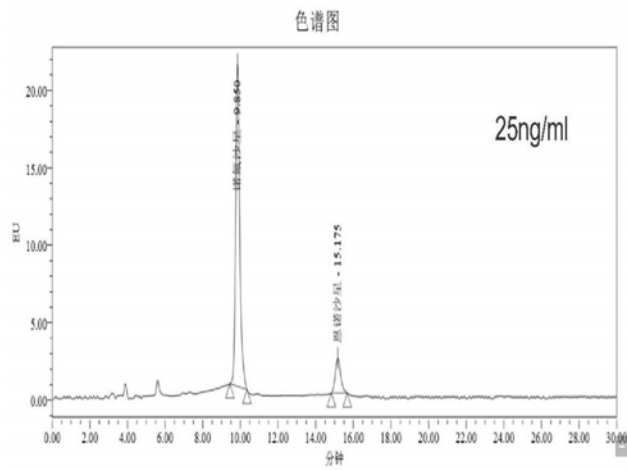
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.134	8451256	388226	28.51178	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				



峰结果

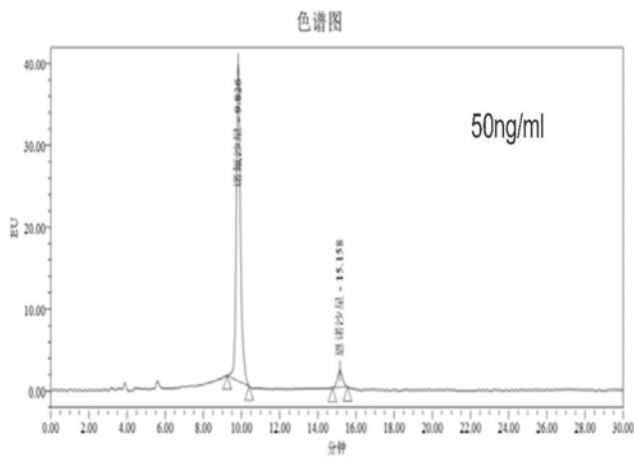
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.120	17540897	822401	59.12866	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				

图13



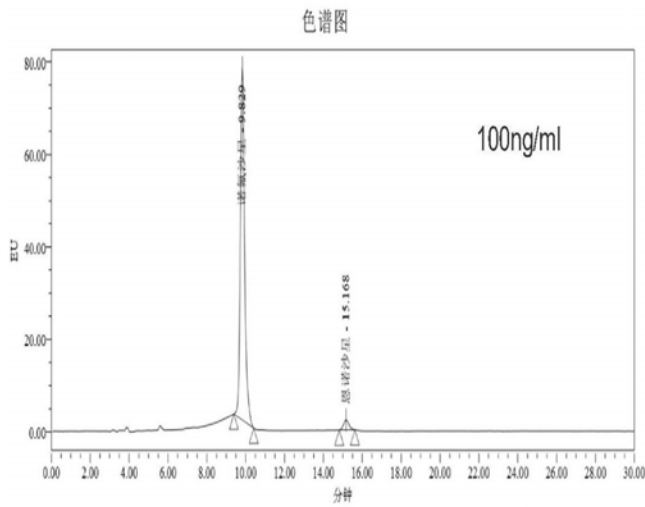
峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.850	3129447	207662	17.46033	ng/mL
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.175	438883	22378	1.52349	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				



峰结果

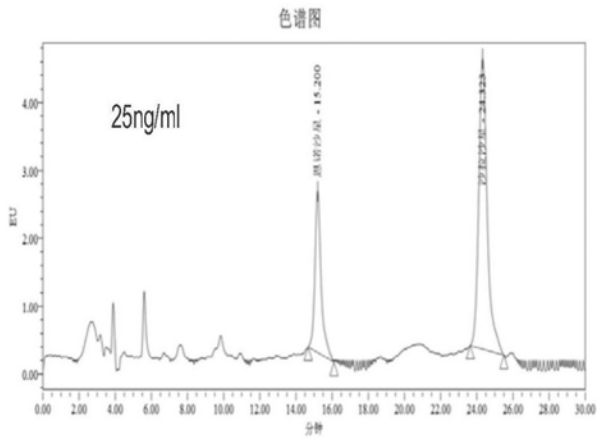
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.826	5937516	387258	33.01976	ng/mL
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.158	388301	20376	1.35311	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				



峰结果

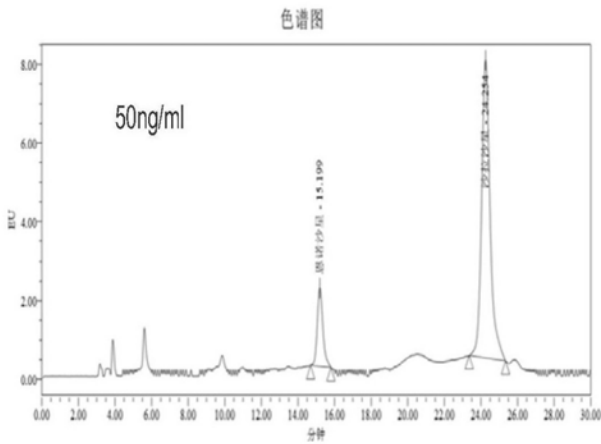
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.829	11605045	760871	64.42337	ng/mL
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.168	421524	21582	1.46502	ng/mL
5 沙拉沙星	24.537				

图14



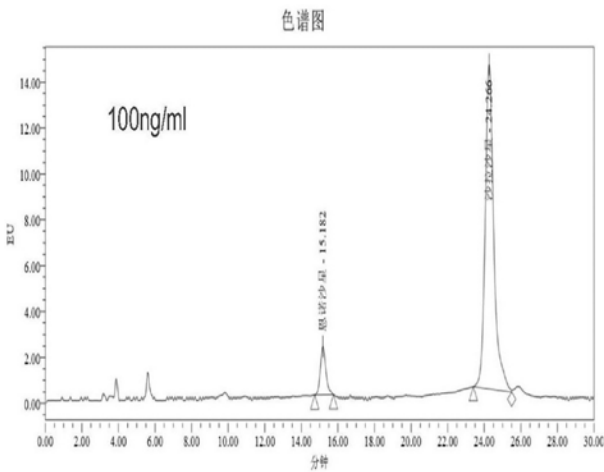
峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.200	572318	23790	1.97294	ng/mL
5 沙拉沙星	24.323	1391960	42790	11.50779	ng/mL



峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.199	425765	19922	1.47930	ng/mL
5 沙拉沙星	24.254	2432109	75589	20.39137	ng/mL



峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.908				
2 环丙沙星	11.027				
3 达氟沙星	13.173				
4 恩诺沙星	15.182	440513	20989	1.52898	ng/mL
5 沙拉沙星	24.266	4580769	141439	38.74238	ng/mL

图15

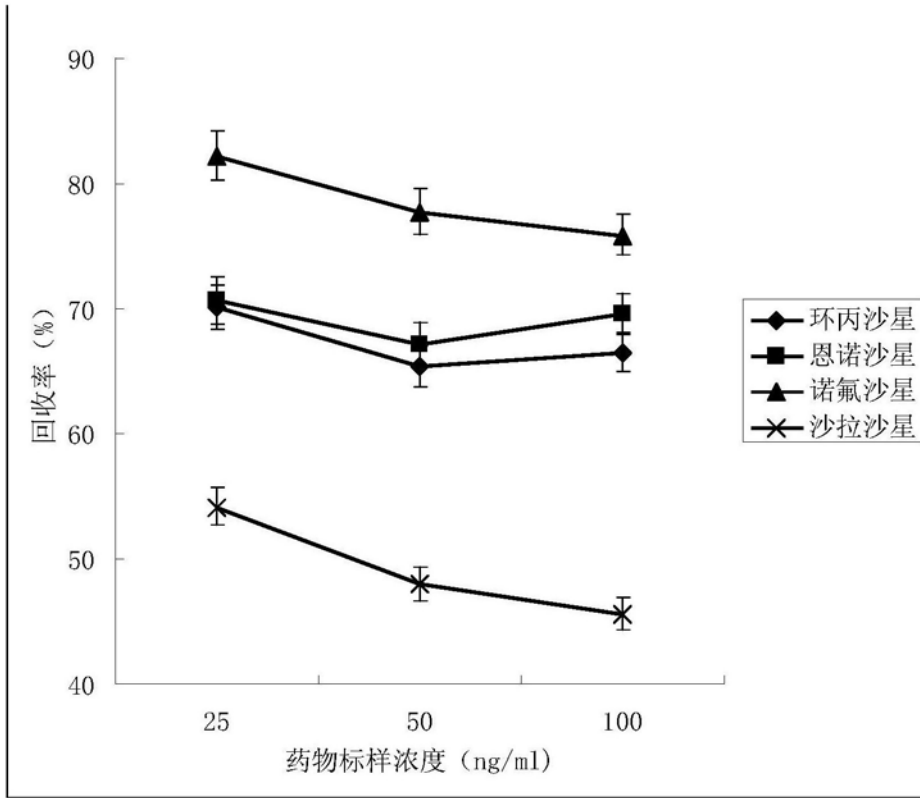


图16

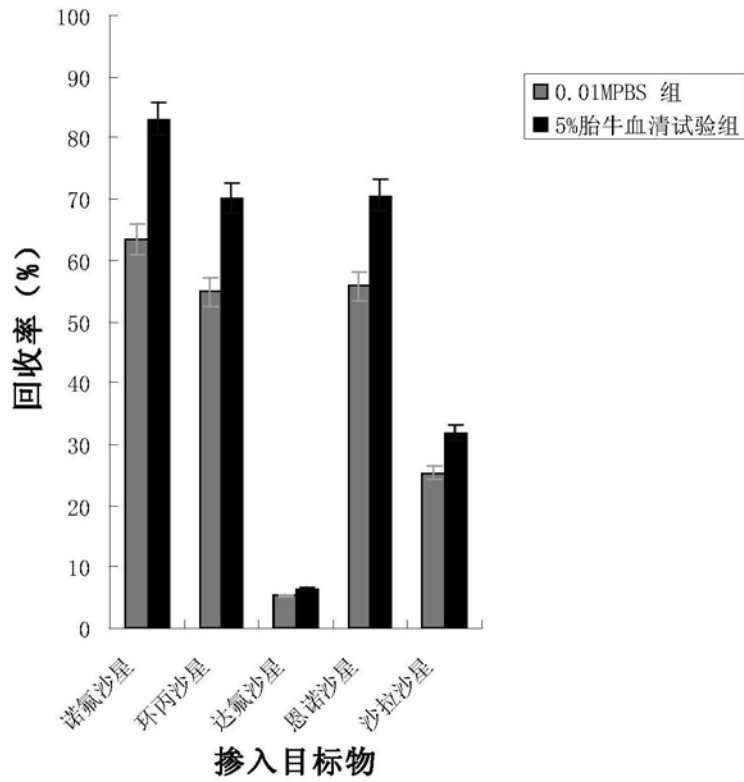
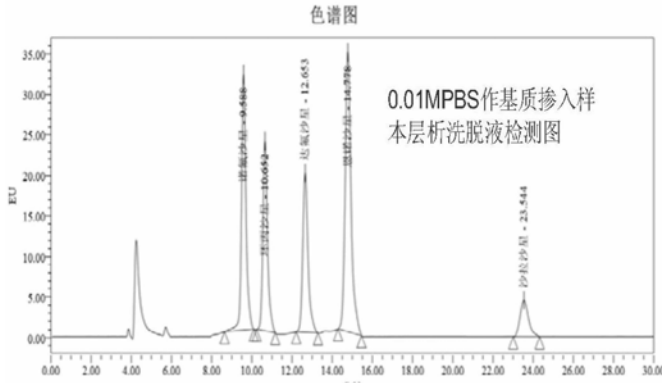
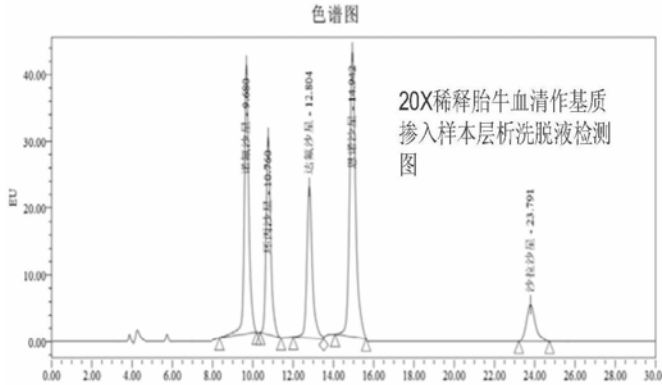


图17



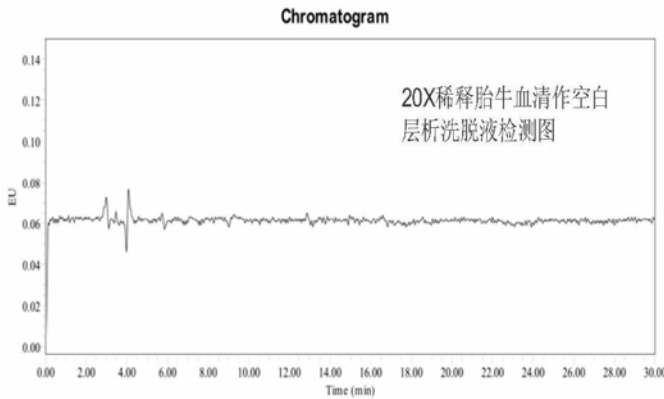
峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.588	4835085	315880	26.91122	ng/mL
2 环丙沙星	10.652	3704035	234093	23.27433	ng/mL
3 达氟沙星	12.653	3549596	196290	2.24754	ng/mL
4 恩诺沙星	14.778	7018078	344647	23.68437	ng/mL
5 沙拉沙星	23.544	1307847	44633	10.78941	ng/mL



峰结果

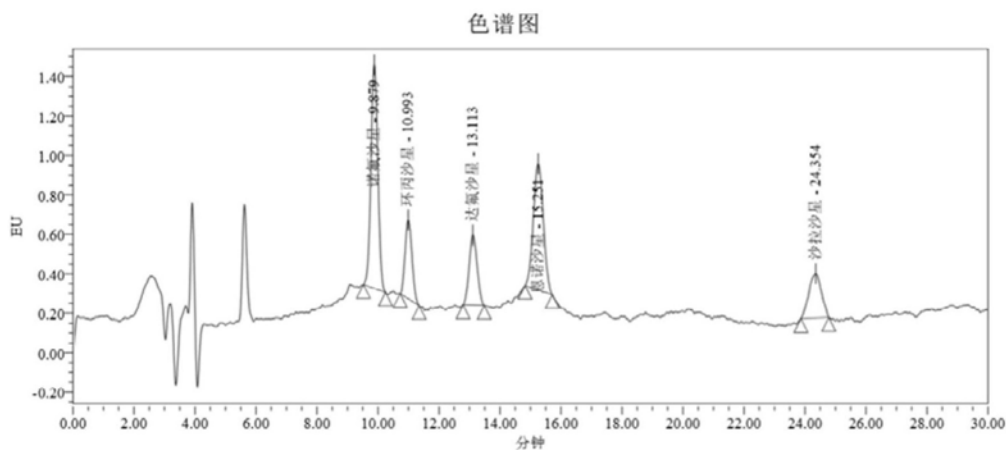
名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 诺氟沙星	9.680	6342533	402801	35.26394	ng/mL
2 环丙沙星	10.760	4749892	296095	29.81969	ng/mL
3 达氟沙星	12.804	4293360	225994	2.70737	ng/mL
4 恩诺沙星	14.942	8882908	426327	29.96572	ng/mL
5 沙拉沙星	23.791	1628647	54033	13.52926	ng/mL



峰结果

名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1 环丙沙星	11.010				
2 达氟沙星	13.144				
3 恩诺沙星	15.286				
4 沙拉沙星	24.420				

图18



峰结果

	名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1	诺氟沙星	9.879	178044	11335	4.18592	ng/mL
2	环丙沙星	10.993	63335	3989	1.71856	ng/mL
3	达氟沙星	13.113	64557	3553	0.25290	ng/mL
4	恩诺沙星	15.251	146060	6400	1.35171	ng/mL
5	沙拉沙星	24.354	64078	2257	2.36976	ng/mL

图19

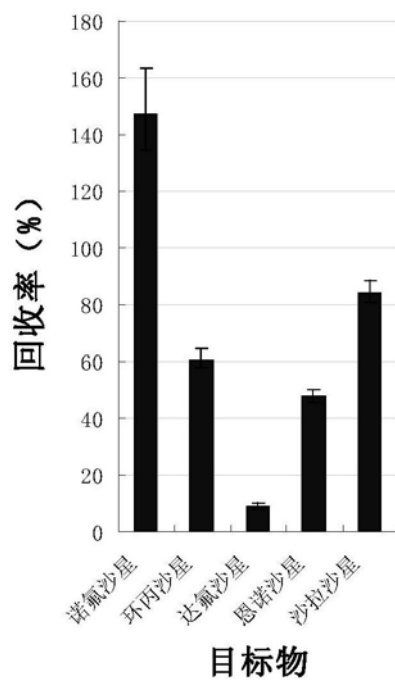


图20

专利名称(译)	抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN106434566B</a>	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201610486494.8	申请日	2016-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	吴康 宋学宏 杨彩根		
发明人	吴康 宋学宏 杨彩根		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/531 C12R1/90		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/531 G01N33/577 G01N2430/00		
代理人(译)	王锋		
审查员(译)	冯娟		
其他公开文献	CN106434566A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了抗氟喹诺酮类药物簇特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株及其产生的单抗和应用。本发明所述的细胞株保藏编号：CCTCC NO. C2015221。本发明提供的该株可稳定分泌产生针对氟喹诺酮类药物单克隆抗体，间接ELISA试验所述抗体对环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星等药物检测具有高灵敏度和强通用性，再将其应用于其他免疫检测产品如免疫金标卡、免疫亲和层析色谱胶等制备中，其产品对目标物检测同样具有高灵敏度、高选择性、强富集性和强通用性，可广泛应用于农业、食品、环境领域中主要氟喹诺酮类药物痕量残留定性以及半定量分析。

加标基质与标准液对照	加标浓度 ng/ml	信号强度
猪肉	0	+++
	0.1	++
	0.5	+