

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710150283.8

[43] 公开日 2008年4月16日

[11] 公开号 CN 101162230A

[22] 申请日 2007.11.22

[21] 申请号 200710150283.8

[71] 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市经济技术开发区第十三大街29号

[72] 发明人 王 硕 王忠斌 张 燕

[74] 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司
代理人 王来佳

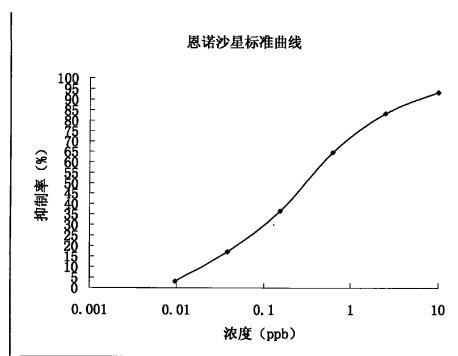
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

本发明属于免疫分析技术领域的一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒，该试剂盒由包被板和试剂组构成，其中该试剂组的组成为：(1)缓冲液；(2)底物A；(3)底物B；(4)洗涤液；(5)终止液；(6)恩诺沙星标准液；(7)酶标记恩诺沙星抗原溶液；包被板的微孔中包被有多克隆恩诺沙星抗体。本发明具有操作简单、检测灵敏度高、特异性强、准确性好、检测成本低等特点，而且适用范围较广，既有经济效益又有社会效益，是一种创新性较高且具有良好的应用前景的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒。



1.一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒，试剂盒由试剂组和包被板构成，其特征在于：

(1).试剂组

①. 缓冲液：为磷酸盐缓冲液，pH 7.4，使用时用二次水按 1：5 稀释；

②. 底物 A：为含过氧化氢脲的醋酸钠缓冲液；

③. 底物 B：为含 3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯 TMB 的二甲基亚砷溶液；

④. 洗涤液：为含 2.5%吐温的磷酸盐缓冲液；使用时用二次水按照 1：5 稀释；

⑤. 终止液：为 1.25mol/L 硫酸；

⑥. 恩诺沙星标准液：其恩诺沙星标准溶液浓度为 100 μ g/L，使用时用缓冲液稀释后，再按 1：4 稀释六个梯度；

⑦. 酶标记恩诺沙星抗原溶液：为恩诺沙星-辣根过氧化物酶连接物 ENF-HRP，使用时用缓冲液按照 1：20 万倍稀释；

(2).包被板

包被板的微孔中包被有多克隆恩诺沙星抗体，并采用 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液将该多克隆恩诺沙星抗体稀释作为包被液，向包被板中微孔的每个孔加入包被液，在室温放置过夜或者 35～40 $^\circ\text{C}$ 恒温温育 2～3 小时，洗涤液洗涤三次除去包被液，加入冻干液封闭 0.8～1.2 小时，洗涤液洗涤四次后，冻干，3～5 $^\circ\text{C}$ 保存。

2.根据权利要求 1 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒，其特征在于：所述的包被板为 96 孔或 48 孔微孔板，所述的缓冲液 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的 pH 值为 9.6。

3.根据权利要求 1 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒，其特征在于：所述的包被板微孔中的多克隆恩诺沙星抗体是选用雌性大白兔进行人工合成抗原 ENF-KLH 的五次免疫，三次免疫后 10 天由兔子的耳缘静脉采集血液离心获得抗血清进行效价检测，末次免疫后采用颈动脉采血法对动物采全血，经离心处理后收集全部血清，采取免疫亲和层析法进行抗体纯化，所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4 $^\circ\text{C}$ 储存备用。

4.根据权利要求 3 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂

盒,其特征在于:所述的人工合成抗原 ENF-KLH 为将恩诺沙星, N-羟基琥珀酰亚胺和 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,铝膜包裹 360° 室温摇动 4~6 小时,离心除去沉淀,在冰浴条件下将上层活化酯溶液缓慢加入到溶有 KLH 的碳酸氢钠溶液中,4°C 下将反应液 360° 摇匀反应过夜,然后将反应液装入透析袋,4°C 下磷酸盐缓冲液中透析,然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度加入叠氮钠,分装,-20°C 保存。

5.根据权利要求 1 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒,其特征在于:所述的包被板中的冻干液为含脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液。

6.根据权利要求 1 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒,其特征在于:所述的连接物 ENF-HRP 为将恩诺沙星、N-羟基琥珀酰亚胺、N, N' -二环己基碳二亚胺溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,铝膜包裹 360° 室温摇动 4~6 小时,离心取上清液;将辣根过氧化物酶 HRP 溶解于碳酸氢钠溶液中,将恩诺沙星半抗原反应液在冰浴下滴加入 HRP 溶液中,滴加完全后 4°C 下将反应液 360° 摇匀反应过夜,最后将所有反应液放入透析袋中用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 72 h。

7.一种如权利要求 1 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒的检测方法,其特征在于:检测方法包括以下步骤:

(1).在温度为 10~30°C 时进行样品前处理,得到样品提取液;

(2).打开试剂盒取出包被板,分别将各种浓度的恩诺沙星标准液和样品提取液加入到包被板各自的微孔中,并且双孔平行加样,然后再在各种浓度恩诺沙星标准液和样品提取液各自的微孔中加入酶标抗原溶液,震荡混匀 2~8min,室温反应 0.8~1.5 小时;

(3).用洗涤液洗包被板 3~4 次,将孔内液体甩掉,用吸水纸扣干,加入底物 A 和底物 B 的混合液,室温下反应 0.4~0.6 小时;

(4).向各微孔中加入终止液,终止反应,用酶标仪读取吸光度值,根据各种浓度恩诺沙星标准液的吸光度值绘制恩诺沙星的标准曲线图,对照恩诺沙星的标准曲线图得到样品提取液中恩诺沙星的含量。

8.根据权利要求 7 所述的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒的检测方法,其特征在于:所述的底物 A 和底物 B 的混合液的配比为 14.6:0.45。

9.根据权利要求7所述的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒的检测方法，其特征在于：取样品加入萃取液，振荡器混匀2min，离心，取部分上清液用磷酸盐缓冲液稀释。

10.根据权利要求9所述的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒的检测方法，其特征在于：所述的萃取液为乙腈：0.1M氢氧化钠按体积比为4：1的混合溶液。

定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒及其检测方法

技术领域

本发明属于免疫分析技术领域，尤其是一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒及其检测方法。

背景技术

恩诺沙星 (Enrofloxacin) 又名乙基环丙沙星，化学结构为 ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$)，分子量为 359.1646。恩诺沙星可引起神经中毒、肾功能损伤、过敏反应、幼畜关节炎等毒副作用，其在动物性食品中的残留直接威胁到人类身体健康。其残留除了其毒副作用对人类的直接危害外，更为严重的是动物性食品中残留较低浓度的药物容易诱导人类致病菌产生耐药性，从而不利于该类药物对人类疾病的治疗，因此必须十分重视恩诺沙星在动物性食品中的残留问题。近年来恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在兽医和人医临床上应用时所产生的不良反应和耐药性报道越来越多。由于恩诺沙星的耐药性和潜在的致癌性，国外及我国均制定了在组织中的最高残留限量为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。美国 FDA 规定恩诺沙星禁用于食品动物；欧盟 (EC) 规定恩诺沙星在牛、猪、家禽的肝、肾、肌肉中最高残留限量 (MRL) 为 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ ；世界卫生组织 (WHO) 推荐的恩诺沙星 MRL 为 $40\mu\text{g}/\text{kg}$ ；香港地区规定恩诺沙星 MRL 为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ；我国规定恩诺沙星在蛋、奶中的 MRL 为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前对恩诺沙星的检测方法主要包括：作为初筛方法的微生物抑制实验和免疫方法，薄层色谱 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气质联用法 (GC/MS)、荧光分光光度法、酶联免疫法 (ELISA)。其中，国内外研究与应用较多的是 HPLC 法，但是这种方法前处理过程繁琐，操作复杂，而且通常需要专业人员进行操作，仪器设备昂贵，检测过程耗时且费用较高，不适于大量样品的现场快速检测。酶联免疫测定法 ELISA 由于其特异性强，灵敏度高，准确性好，操作简便，适于大批量样品的检测等优点越来越受到人们的青睐。由于 ELISA 的技术条件要求低、操作简便、易商品化、经济实惠，是食品中兽药残留首选的快速检测方法。本课题拟研究建立恩诺沙星酶联免疫检测方法，这对完善我国食品检测体系，保障食品安全具有重要意义。

酶联免疫吸附剂测定 (enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA)的基本原理是:将酶与抗原或抗体用交联剂结合起来,此种酶标记抗原或抗体与待测样品中相应抗体或抗原发生特异反应,并牢固结合,在加入相应的酶的底物时,底物被酶催化生成呈色产物,可根据呈色物的有无和呈色深浅作定性或定量观察。由于此技术是建立在抗原抗体反应和酶的高效催化作用的基础上,故而该技术具有检测灵敏度高、特异性强、准确性好等特点。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种操作简单、检测灵敏度高、特异性强、准确性好、检测成本低的定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒及其检测方法。

本发明是通过以下技术方案来实现的:

一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒,试剂盒由试剂组和包被板构成,其中:

(1).试剂组

①.缓冲液:为磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 使用时用二次水按 1:5 稀释;

②.底物 A:为含过氧化氢脲的醋酸钠缓冲液;

③.底物 B:为含 3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯 TMB 的二甲基亚砷溶液;

④.洗涤液:为含 2.5%吐温的磷酸盐缓冲液;使用时用二次水按照 1:5 稀释;

⑤.终止液:为 1.25mol/L 硫酸;

⑥.恩诺沙星标准液:其恩诺沙星标准溶液浓度为 100 μ g/L,使用时用缓冲液稀释后,再按 1:4 稀释六个梯度;

⑦.酶标记恩诺沙星抗原溶液:为恩诺沙星-辣根过氧化物酶连接物 ENF-HRP,使用时用缓冲液按照 1:20 万倍稀释;

(2).包被板

包被板的微孔中包被有多克隆恩诺沙星抗体,并采用 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的缓冲液将该多克隆恩诺沙星抗体稀释作为包被液,向包被板中微孔的每个孔加入包被液,在室温放置过夜或者 35~40 $^\circ\text{C}$ 恒温温育 2~3 小时,洗涤液洗涤三次除去包被液,加入冻干液封闭 0.8~1.2 小时,洗涤液洗涤四次后,冻干,3~5 $^\circ\text{C}$ 保存。

而且,所述的包被板为 96 孔或 48 孔微孔板,所述的缓冲液 Na_2CO_3 — NaHCO_3 的 pH 值为 9.6。

而且,所述的包被板微孔中的多克隆恩诺沙星抗体是选用雌性大白兔进行人工合成抗原 ENF-KLH 的五次免疫,三次免疫后 10 天由兔子的耳缘静脉采集血液离心获得抗血清进行效价检测,末次免疫后采用颈动脉采血法对动物采全血,经离心处理后收集全部血清,采取免疫亲和层析法进行抗体纯化,所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4℃ 储存备用。

而且,所述的人工合成抗原 ENF-KLH 为将恩诺沙星, N-羟基琥珀酰亚胺和 N,N-二环己基碳二亚胺溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,铝膜包裹 360° 室温摇动 4~6 小时,离心除去沉淀,在冰浴条件下将上层活化酯溶液缓慢加入到溶有 KLH 的碳酸氢钠溶液中,4℃ 下将反应液 360° 摇匀反应过夜,然后将反应液装入透析袋,4℃ 下磷酸盐缓冲液中透析,然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度加入叠氮钠,分装,-20℃ 保存。

而且,所述的包被板中的冻干液为含脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液。

而且,所述的连接物 ENF-HRP 为将恩诺沙星、N-羟基琥珀酰亚胺、N, N' -二环己基碳二亚胺溶于 N,N-二甲基甲酰胺中,铝膜包裹 360° 室温摇动 4~6 小时,离心取上清液;将辣根过氧化物酶 HRP 溶解于碳酸氢钠溶液中,将恩诺沙星半抗原反应液在冰浴下滴加入 HRP 溶液中,滴加完全后 4℃ 下将反应液 360° 摇匀反应过夜,最后将所有反应液放入透析袋中用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 72 h。

一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒的检测方法,其检测方法包括以下步骤:

- (1).在温度为 10~30℃ 时进行样品前处理,得到样品提取液;
- (2).打开试剂盒取出包被板,分别将各种浓度的恩诺沙星标准液和样品提取液加入到包被板各自的微孔中,并且双孔平行加样,然后再在各种浓度恩诺沙星标准液和样品提取液各自的微孔中加入酶标抗原溶液,震荡混匀 2~8min,室温反应 0.8~1.5 小时;
- (3).用洗涤液洗包被板 3~4 次,将孔内液体甩掉,用吸水纸扣干,加入底物 A 和底物 B 的混合液,室温下反应 0.4~0.6 小时;
- (4).向各微孔中加入终止液,终止反应,用酶标仪读取吸光度值,根据各种浓度恩诺沙星标准液的吸光度值绘制恩诺沙星的标准曲

线图，对照恩诺沙星的标准曲线图得到样品提取液中恩诺沙星的含量。

而且，所述的底物 A 和底物 B 的混合液的配比为 14.6:0.45。

而且，取样品加入萃取液，振荡器混匀 2min，离心，取部分上清液用磷酸盐缓冲液稀释。

而且，所述的萃取液为乙腈：0.1M 氢氧化钠按体积比为 4：1 的混合溶液。

本发明的有益效果和优点是：

1.本发明具有操作简单、检测灵敏度高、特异性强、准确性好、检测成本低等特点，而且适用范围较广。主要适用于食品和肉类中的恩诺沙星含量的定量检测。其抗体具有良好的广谱性和灵敏度，所得抗体和酶标抗原稳定，具有常温保藏时间长的优点。

2.本发明提供的快速检测方法操作简便、快速，完成全部检测操作过程只需几小时，而且检测的精确度可达 90%以上，检测灵敏度可以达到 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级非常适合现场检测的需要。由于抗体和酶标抗原，在常温下可以保藏 1 周、酶标抗原包备的酶标板在 4℃ 下可以保藏 6 个月以上，从而为进行大规模样品的集中检测，提供了极大的方便。

3.本发明成本低廉、检测效率高、操作简便，既有经济效益又有社会效益，是一种创新性较高的具有良好的应用前景的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒及其检测方法。

附图说明

图 1 本发明恩诺沙星-ELISA 标准曲线图。

具体实施方式

本发明通过以下实施例进一步详述，下述实施例是说明性的，不是限定性的，不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

本发明为定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒，由包被板和试剂组构成，其中该试剂组的组成为：

(1)缓冲液：为磷酸盐缓冲液，pH 7.4，使用时用二次水按 1：5 稀释；

(2)底物 A：为含过氧化氢脲的醋酸钠缓冲液；

(3)底物 B：为含 3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯 TMB 的二甲基亚砷溶液；

(4)洗涤液：为含 2.5%吐温的磷酸盐缓冲液；使用时用二次水按照 1：5 稀释；

(5)终止液：为 1.25mol/L 硫酸；

(6)恩诺沙星标准液：其恩诺沙星标准溶液浓度为 100 μ g/L，使用时缓冲液稀释至 10 μ g/L 后，再按 1：4 稀释六个梯度；

(7)酶标记恩诺沙星抗原溶液：为恩诺沙星-辣根过氧化物酶连接物（ENF-HRP），使用时用缓冲液按照 1：20 万倍稀释。

一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒的检测方法：包括以下步骤：

(1).在温度为 10~30 $^{\circ}$ C 时进行样品前处理，得到样品提取液；

(2).打开试剂盒取出包被板，分别将各种不同浓度的恩诺沙星标准液和样品提取液加入到包被板各自的微孔中，并且双孔平行加样，然后再在各种不同浓度恩诺沙星标准液和样品提取液各自的微孔中加入酶标抗原溶液，震荡混匀 5min，室温反应 0.8~1.5 小时；

(3).用洗涤液洗包被板 3~4 次，将孔内液体甩掉，用吸水纸扣干，加入底物 A 和底物 B 的混合液，室温下反应 0.4~0.6 小时；

(4).向各微孔中加入终止液，终止反应，用酶标仪读取吸光度值，根据各种不同浓度恩诺沙星标准液的吸光度值绘制恩诺沙星的标准曲线图，对照恩诺沙星的标准曲线图得到样品提取液中恩诺沙星的含量。

下面通过一具体实例，对本发明的效果进行叙述。

检测鸡肉样品中恩诺沙星的含量：

(1).样品前处理：分别取鸡肉样品各 4g，加入 10 mL 萃取液（乙腈：0.1M 氢氧化钠按体积 4：1），振荡器混匀 2 分钟，提取后经过离心（15 $^{\circ}$ C，3500g，10 分钟），取部分上清液用磷酸盐缓冲液 20 倍稀释；

(2).打开试剂盒取出包被板，分别将 100 μ L 恩诺沙星梯度稀释的标准液和 100 μ L 样品提取液双孔平行加样加入到包被板各自的微孔中，然后再在恩诺沙星标准液和样品提取液各自的微孔中各加入 100 μ L 1：20 万倍稀释的酶标抗原溶液，震荡均匀 5 分钟，室温反应 1 h；

(3).用洗涤液洗板 3 次；将孔中液体甩掉，用吸水纸扣干，在每孔中加入 150 μ L 底物 A 和底物 B 的混合液，室温下反应 0.5 小时；

(4).向样品提取液和恩诺沙星标准液各自的微孔中加入 50 μ L 终止液，进行终止反应，在双波长方式(450-650 nm)下用酶标仪读取吸光度值，绘制恩诺沙星的标准曲线图，对照恩诺沙星的标准曲线图得到样品提取液中恩诺沙星的含量。

(5)结果的计算

1) 计算抑制率值

按公式 (A) 计算不同浓度恩诺沙星对抗原抗体结合反应的抑制率:

$$IC\% = \left[1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \right] \times 100 \dots\dots\dots (A)$$

式中:

IC% —— 恩诺沙星对抗原抗体结合反应的抑制率;

A —— 450nm 吸光值与 650nm 吸光值的差值;

A 样品 —— 恩诺沙星标准液或样液的平均吸光度值;

A 空白 —— 不加入酶标及恩诺沙星标准液的平均吸光度值。

2) 绘制标准曲线

以抑制率为纵坐标, 恩诺沙星浓度对数为横坐标绘制校正曲线。每次试验均应重新绘制标准曲线, 见图 1。

3) 结果计算

从 图 1 绘制的标准曲线上读取样液抑制率所对应的恩诺沙星浓度 (C), 按公式(B)计算试样中的恩诺沙星残留量:

$$X = C \times R \dots\dots\dots (B)$$

式中:

X —— 试样中恩诺沙星残留量, 单位为微克每千克 (μg/kg);

C —— 根据样品孔的抑制率查得试样中恩诺沙星浓度, 单位为微克每升 (μg/L);

R —— 换算系数, 例如鸡肉为 50。

加标试验:

在加标试验中, 分别向样品中添加不同浓度的恩诺沙星, 将加标样品充分混匀, 室温静置过夜。其余处理过程同上。在对鸡肉样品的检测中, 分别在 10、20 和 40μg/kg 水平进行加标回收试验, 其回收率为 82%和 72.5%和 79.25%。

人工合成恩诺沙星抗原溶液制备:

分别精确称取恩诺沙星 0.02~0.03mmol, 0.02~0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺和 0.05~0.07mmol N,N-二环己基碳二亚胺溶于 150μL N,N-二甲基甲酰胺中, 铝膜包裹 360° 室温摇动 4-6 小时, 离心 (5℃, 10000g, 5 分钟) 除去沉淀, 在冰浴条件下将上层活

化酯溶液缓慢加入到 3mL 溶有 10mgKLH 的碳酸氢钠（130 mmol/L, pH=8.1）溶液中，4℃下将反应液 360° 摇匀反应过夜，然后将反应液装入透析袋，4℃下、pH=7.4 的 0.01 mol/mL 的磷酸盐缓冲液中透析，然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度加入 0.1%（W/V）叠氮钠，分装，-20℃保存。

酶标记恩诺沙星抗原溶液制备：

分别精确称取恩诺沙星半抗原 0.02~0.03mmol 溶于 150μL N,N-二甲基甲酰胺（DMF）中，加入 0.02~0.04mmol N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和 0.05~0.07mmol N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)，铝膜包裹 360° 室温摇动 4-6 小时，有混浊物产生、离心（5℃，10000g，5 分钟）除去沉淀，在冰浴条件下将上层活化酯溶液缓慢加入到 3mL 溶有 10mgHRP 的碳酸氢钠（130 mmol/L, pH=8.1）溶液中，放于 4℃下搅拌反应过夜，然后将反应液装入透析袋，4℃下、pH=7.4 的 0.01 mol/mL 的磷酸盐缓冲液中透析，然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积，测定浓度加入硫柳汞，4℃保存

包被板的制备：

多克隆恩诺沙星抗体包被于微孔板中，用 pH9.6 Na₂CO₃—NaHCO₃ 的缓冲液将多克隆恩诺沙星抗体稀释为 1μg/100μL 作为包被液，96 孔微孔板每孔各加入 100μL，室温放置过夜或者 37℃ 恒温温育 2~3 小时，洗涤液洗涤三次除去包被液，加入 200μL 冻干液封闭 1 小时，洗涤液洗涤四次后，冻干，4℃保存。

恩诺沙星是一种小分子半抗原，分子量为 359.16，只有反应原性而无免疫原性，需要与载体蛋白偶联后才能使动物产生免疫应答。本试验以合成的恩诺沙星-kLH 作为免疫原进行动物免疫。

多克隆恩诺沙星抗体的制备：

1、免疫动物选择日本大耳白兔 3 只，月龄 3 个月，体重 1.5 公斤左右，分别编号为 1 号、2 号和 3 号。免疫采取皮下和肌肉注射法共同进行。

2、免疫程序：初次免疫：为提高抗原的免疫性，采用由弗氏完全佐剂乳化的免疫原，剂量为 1mg（溶于 1 mL 0.9%的 NaCl 和 1 mL 的弗氏完全佐剂）。加强免疫：初次免疫后第 14 天进行加强免疫，剂量为 0.5 mg（溶于 1 mL 0.9%的 NaCl 及 1 mL 的弗氏不完全佐剂）。以后每隔 30 天加强免疫一次，共免疫 6 次。从第 2 次加强免疫开始，每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定和亲和力测定。末

次免疫后采用颈动脉采血法对动物采全血，经离心处理后收集全部血清，采取免疫亲和层析法进行抗体纯化，所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4℃ 储存备用。

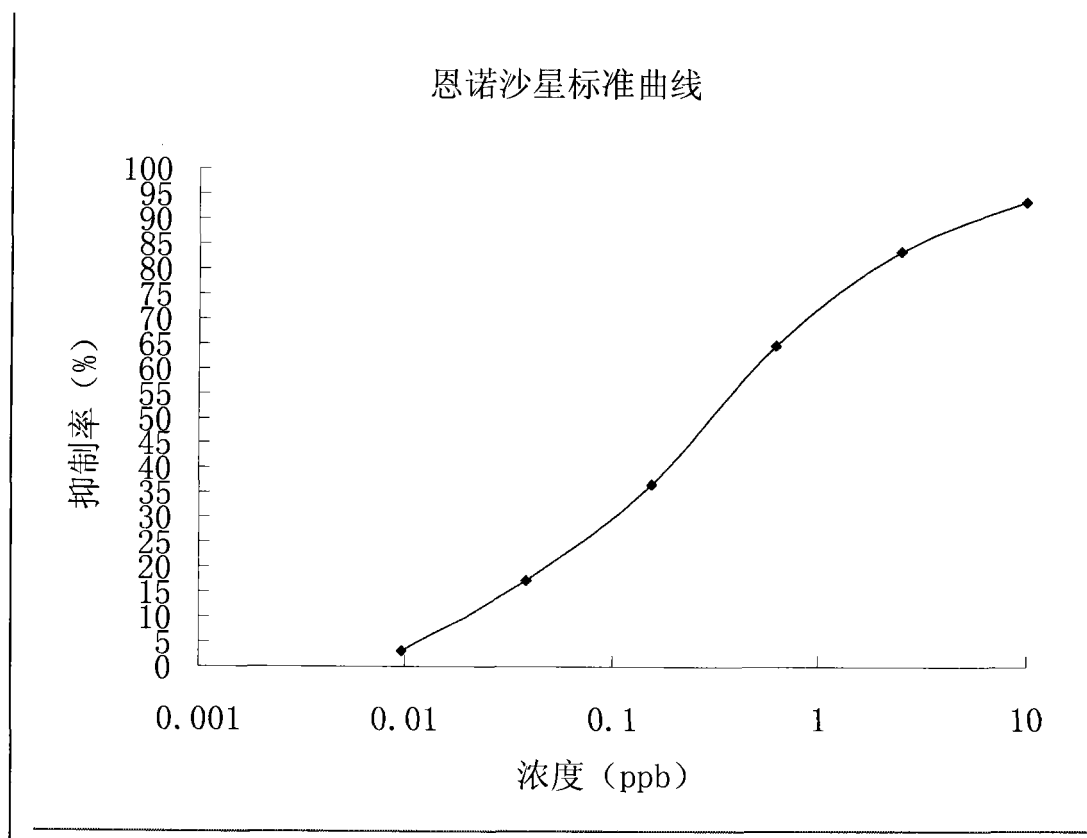


图 1

专利名称(译)	定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN101162230A	公开(公告)日	2008-04-16
申请号	CN200710150283.8	申请日	2007-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王硕 王忠斌 张燕		
发明人	王硕 王忠斌 张燕		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析技术领域的一种定量检测食品中恩诺沙星含量的试剂盒，该试剂盒由包被板和试剂组构成，其中该试剂组的组成为：(1)缓冲液；(2)底物A；(3)底物B；(4)洗涤液；(5)终止液；(6)恩诺沙星标准液；(7)酶标记恩诺沙星抗原溶液；包被板的微孔中包被有多克隆恩诺沙星抗体。本发明具有操作简单、检测灵敏度高、特异性强、准确性好、检测成本低等特点，而且适用范围较广，既有经济效益又有社会效益，是一种创新性较高且具有良好的应用前景的定量检测食品中恩诺沙星含量试剂盒。

