



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111366693 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 201811588563.1

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司  
地址 212009 江苏省镇江市丁卯新区国家  
科技园B11栋3楼

(72)发明人 洪霞 杜霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/02(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测恩诺沙星的ELISA试剂盒的制备

(57)摘要

一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及检测方法,所述的试剂盒由带有微孔的包被板,恩诺沙星标准品,抗恩诺沙星的包被抗体,恩诺沙星酶标抗原,浓缩洗涤液,显色液A,显色液B和终止液组成;取包被抗恩诺沙星抗原的微孔包被板,加入恩诺沙星标准品或处理好的样品到各自的微孔中,同时加入恩诺沙星抗体工作液,再加入恩诺沙星酶,震荡反应,洗涤液洗涤,经底物显色,样本吸光值与其含有的恩诺沙星量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中恩诺沙星的含量。

1. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,其特征在于:它由带有微孔的包被板,恩诺沙星标准品,抗恩诺沙星的包被抗原,恩诺沙星酶标抗体,浓缩洗涤液,显色液 A,显色液 B 和终止液组成;所述的包被板配置有采用 1%明胶作为封闭液,抗体的稀释液选用0.15 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液,所述的浓缩洗涤液为含有 0.07%~ 0.1%吐温的 Tris-HCL缓冲溶液,显色液 A 为柠檬酸和柠檬酸钠缓冲溶液,显色液 B 为四甲基联苯胺和二甲基亚砷、含甘油的溶液,所述的终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述的恩诺沙星标准品,是从干粉中稀释得到,稀释液为0.15mol/L的磷酸盐缓冲溶液,共6瓶,恩诺沙星浓度分别为:0 ng/mL,0.1 ng/mL,0.3 ng/mL,0.9 ng/mL,2.7 ng/mL,8.1 ng/mL。

3. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,其特征在于:取包被有恩诺沙星抗原的微孔包被板,加入 50  $\mu$ L恩诺沙星标准品和处理好的样品到各自的微孔中,同时加入50  $\mu$ L 恩诺沙星抗体,震荡混匀,25 $^{\circ}$ C反应30min 左右,洗涤液洗涤五次,然后再加入150  $\mu$ L酶,25 $^{\circ}$ C反应30min,洗涤液洗涤5次加50  $\mu$ L显色液A和50  $\mu$ L显色液B,25 $^{\circ}$ C孵育15分钟后加终止液 50  $\mu$ L,在450nm-630nm处测量吸光值(OD值),对照标准曲线计算样品中的恩诺沙星含量。

4. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述的样品处理是根据猪肉、猪肝、虾、鱼、甲鱼、鸡肉、鸡蛋这些样品选择优化的前处理方法,包括:样品切碎、研磨、有机溶剂的提取、取上清、吹干,复溶,提取等。

5. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,包括恩诺沙星特异性抗体、包被有抗抗体的酶联板和酶标记物;所述恩诺沙星特异性抗体为恩诺沙星的单克隆杂交瘤细胞株A-2-4CCMCC No.1610分泌的单克隆抗体;所述酶标记物为酶标恩诺沙星半抗原。

6. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述抗抗体为羊抗鼠或羊抗兔抗抗体。

7. 一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为0.01mol, pH 7.4,含有0.8%—1.2%吐温80和0.5%硫柳汞防腐剂的磷酸盐缓冲液;所述终止液为1—2mol/L的硫酸、盐酸或氢氧化钠溶液;所述封闭液为含有3-10%的牛血清,2%酪蛋白的磷酸盐缓冲液;所述百分含量均为质量百分含量。

## 一种检测恩诺沙星的ELISA试剂盒的制备

### 技术领域

[0001] 一种快速高效检测食品中抗生素恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及其检测方法,属于酶联免疫分析(ELISA)技术领域,主要用于食品中恩诺沙星残留的检测。

### 背景技术

[0002] 恩诺沙星是氟喹诺酮类抗生素,具有下列特性:由于独特的化学结构,使其成为兽医临床药物中十分重要的抗生素。恩诺沙星对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和支原体类病原菌均具有广谱抗菌活性,在一定的浓度下对细菌支原体也具有杀菌作用,还能杀死对抗生素具有抗药力的细菌,例如抗 $\beta$ -乳酸菌素、氨基糖苷等。恩诺沙星因其具有独特的作用,自80年代开始就被广泛的应用于动物和鱼虾类的疾病的预防和治疗。但最近的研究发现,凡使用过恩诺沙星的动物,在一定时期内其产品都有残留,因其具有神经毒性和肾脏毒性,所以在动物食品中残留会对人类健康造成威胁和影响,欧美国家及我国均要求对其限量使用。2002年12月我国农业部公告第235号文规定在所有食品动物的肌肉、脂肪中最高残留限量为100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,在所有食品动物的肝、肾中最高残留限量为200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此,恩诺沙星已经列为兽药残留监控的重点。检测恩诺沙星残留量的化学方法主要有薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、气-质联机(GC/MS)、液-质联机(HPLC/MS)、毛细管电泳(CE)等,由于复杂的仪器设备和繁琐的过程,不适合现场监控和大量样本筛查。

[0003] 免疫分析技术以其抗原抗体反应的高度专一性,以及测定方法简单、快速、灵敏度高、费用低和适于现场大批量样品筛选等优点,在农兽药残留分析中展示了广泛的应用前景。随着农药残留免疫学检测技术不断被完善和商品化,免疫学检测技术会成为食品农兽药残留和食品安全质量控制的有效快速检测手段。基于目前兽药残留诊断试剂的研究现状,及时开发出优于目前的、快速灵敏的检测试剂可谓是当务之急。虽然农兽药残留分析的方法虽然有很多,但是利用免疫学技术进行分析是特异性最好、检测时间最短的方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种高效快速检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及检测方法,主要用于食品检测行业中恩诺沙星含量的检测。

[0005] 本发明的技术方案是:该检测恩诺沙星的试剂盒是由 96 微孔的包被板,恩诺沙星标准品,抗恩诺沙星的包被抗体,酶标记的恩诺沙星抗原,浓缩洗涤液,显色液 A,显色液 B 和终止液组成;所述的包被板配置有采用 1%明胶作为封闭液,抗体的稀释液选用 0.15mol/L 的磷酸盐缓冲溶液,所述的浓缩洗涤液为含有 0.07%~0.1%吐温的 Tris-HCL缓冲溶液,显色液 A 为柠檬酸和柠檬酸钠缓冲溶液,显色液 B 为四甲基联苯胺和二甲基亚砷、含甘油的溶液,所述的终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0006] 所述恩诺沙星半抗原是将恩诺沙星和8-氨基辛酸通过酞化方一法得到的。

[0007] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,其中优选碱性磷酸酯酶;碱性磷酸酯酶标记的恩诺沙星半抗原可将碱性磷酸酯酶与恩诺沙星半抗原通过戊二醛

法或过碘酸钠法将酶交联在恩诺沙星半抗原上。

#### [0008] 单克隆抗体的制备

动物免疫：

采用BABL/C小鼠作为免疫动物，免疫原是恩诺沙星-BSA，免疫剂量是50-100 $\mu$ g/只，第一次用免疫原与等量弗氏完全佐剂混合乳化，腹腔注射，剂量为100  $\mu$ g/0.2mL/只；3周后用免疫原与等量弗氏不完全佐剂混合乳化进行第二次免疫注射，剂量为50 $\mu$ g/0.2mL/只，间隔2周后，以不完全佐剂乳化的抗原进行第三次免疫注射，剂量为50 $\mu$ g/0.2mL/只。

#### [0009] 筛选动物免疫血清：

以上免疫小鼠在第三次免疫后7-10天后用ELISA法测血清效价，同时利用间接竞争ELISA法检测血清对恩诺沙星的抑制效果。选取血清效价高的小鼠进行加强免疫，免疫三天后取脾脏。

#### [0010] 制备杂交瘤细胞：

取上述免疫BABL/C小鼠的脾细胞，以50%的PEG4000作融合剂，将免疫脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按5:1的比例进行细胞融合。采用间接ELISA检测细胞上清，筛选出阳性克隆，对阳性克隆进一步用间接竞争ELISA法检测，仍为阳性者利用有限稀释法进行亚克隆，经3次亚克隆以后，检测有单克隆生长孔的细胞培养上清，阳性率达到100%，得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0011] 所述的恩诺沙星标准品，是从干粉中稀释得到，稀释液为0.15mol/L的磷酸盐缓冲溶液，共6瓶，恩诺沙星浓度分别为：0 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.9 ng/mL, 2.7 ng/mL, 8.1 ng/mL。所述的抗恩诺沙星包被抗体为多克隆抗体，它们均是用恩诺沙星半抗原与载体蛋白的偶联物作为免疫原得到的；所述的恩诺沙星半抗原是将恩诺沙星和EDC法作用得到的；所述的载体蛋白为匙孔蓝蛋白。

[0012] 本发明优选的检测恩诺沙星的方法是：取包被有恩诺沙星抗原的微孔包被板，加入50  $\mu$ L恩诺沙星标准品和处理好的样品到各自的微孔中，同时加入50  $\mu$ L恩诺沙星抗体，震荡混匀，25 $^{\circ}$ C反应30min左右，洗涤液洗涤五次，然后再加入150  $\mu$ L酶，25 $^{\circ}$ C反应30min，洗涤液洗涤5次加50  $\mu$ L显色液A和50 $\mu$ L显色液B，25 $^{\circ}$ C孵育15分钟后加终止液，在450nm/630nm处测量吸光值(OD值)，对照标准曲线计算样品中的恩诺沙星含量。

[0013] 本发明所述的样品处理是根据猪肉、猪肝、虾、鱼、甲鱼、鸡肉、鸡蛋这些样品选择优化的前处理方法，包括：样品切碎、研磨后各称取5g样本于50mL离心管中，再加入乙腈10mL，充分振荡混匀5分钟，4500转离心5分钟。取上清液2mL于15mL离心管中50 $^{\circ}$ C氮气吹干。加1mL正己烷，振荡10秒，再加入2mL PBS，振荡2分钟，4500转离心5分钟，去除上层有机相，取1.5mL左右下层液于离心管中备用。

[0014] 本发明的有益效果：该试剂盒结构简单，组成成分少、使用方便、廉价、灵敏度高。

#### [0015] 酶联免疫检测试剂盒的结果分析：

标准曲线绘制，以标准品浓度自然对数为X轴，吸光值为Y轴制作而成的曲线图。

[0016] 分别对0 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.9 ng/mL, 2.7 ng/mL, 8.1 ng/mL的标准品进行检测，每个浓度做3个平行，取平均值，以标准品浓度自然对数为X轴，吸光值为Y轴，做标准曲线，计算其变异系数。

## 附图说明

[0017] 图1为恩诺沙星标准曲线。

## 具体实施方式

[0018] 本发明所述的检测恩诺沙星的试剂盒,它是由 96 微孔的包被板,恩诺沙星标准品,抗恩诺沙星的包被抗体,酶标记的恩诺沙星抗原,浓缩洗涤液,显色液 A,显色液 B 和终止液组成。

[0019] 试剂的配制:

(1) 恩诺沙星标准品: (0 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.9 ng/mL, 2.7 ng/mL, 8.1 ng/mL) 从恩诺沙星高标中稀释得到, 稀释液为甲醇:水体积比为4 : 6。

[0020] (2) 洗涤液: 14.5 mmol/L NaCl、0.2 ml/L Tween-80和0.2 %NaN<sub>3</sub>的50 mmol/L Tris-HCl pH7.8。

[0021] (3) 显色液A: 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25.7 mL, 0.1 M柠檬酸24.3 mL和30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mL。

[0022] (4) 显色液B: 称取5 mg四甲基联苯二胺(TMB)加入2.5 mL无水乙醇中,可加热至37 °C~40 °C直到TMB完全溶解。

[0023] (5) 终止液: 2 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

(6) 样品复溶液: 用去离子水将2×浓缩样品复溶液按1:1体积比进行稀释(1份2×浓缩样品复溶液+1份去离子水)用于提取样本的稀释。

[0024] (7) 洗涤工作液: 用去离子水将20×浓缩洗涤液按1:19体积比进行稀释(1份10×浓缩洗涤液+9份去离子水)用于酶标板的洗涤。

[0025] (8) 0.05 M PBS: 称取12.9 g十二水合磷酸氢二钠和2.18 g二水合磷酸二氢钠用去离子水溶解定容至1L。

[0026] 实验室应自备的试剂

甲醇、乙腈、正己烷、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、去离子水

每一个盒中的试剂足够进行96个样本测试量, 试剂盒的成分如下:

(1) 1x96孔板(8条x 12孔, 可以拆分为单孔) 包被有恩诺沙星抗原。

[0027] (2) 6瓶恩诺沙星标准液, 1.0 mL/瓶, 标准液浓度为: 0 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.9 ng/mL, 2.7 ng/mL, 8.1 ng/mL。

[0028] (3) 恩诺沙星抗体工作液: 7mL。

[0029] (4) 恩诺沙星酶标记物: 12 mL。

[0030] (5) 洗涤液: 30 mL, 用时以蒸馏水1 : 20稀释。

[0031] (6) 显色液A: 7 mL。

[0032] (7) 显色液B: 7 mL。

[0033] (8) 终止液: 7 mL。

[0034] 包被板固相抗原制备:

使用含恩诺沙星抗原的50 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH9.6缓冲液稀释至10 mg/L的包被液进行包被, 96 孔微孔板各孔加100 μL, 37°C下避光孵育2 h, 弃去包被液, 洗涤2次, 加入150 μL含3% BSA的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液封闭, 37°C下避光孵育1.5 h, 弃去封闭液, 晾干,

板条密封后置-4℃冷冻保存。

[0035] 测定之前注意事项

1、使用之前将所有试剂和需用微孔板回升至室温。

[0036] 2、使用之后立即将所有试剂放回2~8℃。

[0037] 3、在使用中不要让微孔干燥。

[0038] 4、在ELISA分析中的重复性,很大程度上取决于洗板的一致性,正确的洗板操作是ELISA测定程序中的要点。

[0039] 5、在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖板膜盖住微孔板。

[0040] 6、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℃。

[0041] 实施例1:检测牛肉、猪肉、鸡肉、猪肝、鸡肝样品。

[0042] 前处理:

1、准确称取 $1\pm 0.01$  g均质后的样品于离心管中;

2、加入0.5 mL样品复溶液,充分涡动20 s;

3、再加入4.5 mL乙腈,立即涡动至组织完全分散;

4、室温( $25\pm 2^\circ\text{C}$ )下,摇床300 rpm振摇20 min;

5、4000 r/min以上,离心10 min;

6、取1 mL上清于离心管中;

7、50~60℃水浴中,氮气吹干;

8、加入2 mL正己烷,充分涡动20 s,再加入1 mL样品复溶液,低速涡动10 s;4000 r/min以上,离心5 min,完全弃去上层正己烷及中间层杂质;

9、鸡肉、猪肉样品,直接取50  $\mu\text{L}$ 进行检测;

10、牛肉、猪肝、鸡肝样品,取100  $\mu\text{L}$ 与100  $\mu\text{L}$ 样品复溶液,充分涡动20 s后,取50  $\mu\text{L}$ 进行检测。

[0043] 检测:

1、将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温( $20\sim 25^\circ\text{C}$ )平衡30min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

[0044] 2、加标准品/样品:加标准品/样品50  $\mu\text{L}$ /孔到对应的微孔中,然后加入恩诺沙星抗体试剂50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min。

[0045] 3、洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250  $\mu\text{L}$ /孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。

[0046] 4、加酶标物:加入恩诺沙星酶标物150  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min,取出重复洗板步骤3。

[0047] 5、显色:加入底物液A液50  $\mu\text{L}$ /孔,再加底物液B液50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温避光环境反应20~30 min。

[0048] 6、测定:加入终止液50 $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处(建议用双波长450/630 nm检测,请在5min内读完数据),测定每孔OD值。根据标准曲线计算牛奶样本中恩诺沙星含量。

[0049] 实施例2:检测鱼肉、虾肉样品。

[0050] 前处理:

- 1、准确称取 $1\pm 0.01$  g均质后的样品于50 mL离心管中;
- 2、加入2 mL样品复溶液,充分涡动1 min使组织分散;
- 3、加入8 mL乙腈,立即涡动至组织完全分散;
- 4、室温( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )下,摇床300 rpm振摇20 min;4000 r/min以上,离心10 min;
- 5、取1 mL上清于新的离心管中;50~60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,氮气吹干;
- 6、加入2 mL正己烷,充分涡动20 s,再加入1 mL样品复溶液,低速涡动30 s;
- 7、4000 r/min以上,离心5 min,完全弃去上层正己烷及中间层杂质;
- 8、取50  $\mu\text{L}$ 下层水相进行检测。

[0051] 检测:具体检测步骤同实施例1

实施例3:检测牛奶样品。

[0052] 前处理:

- 1、取纯牛奶样品,充分平衡至室温( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ );
- 2、取50  $\mu\text{L}$ 于离心管中,加入450  $\mu\text{L}$ 样品复溶液,充分涡动20 s;
- 3、取50  $\mu\text{L}$ 进行检测。

[0053] 检测:具体检测步骤同实施例1。

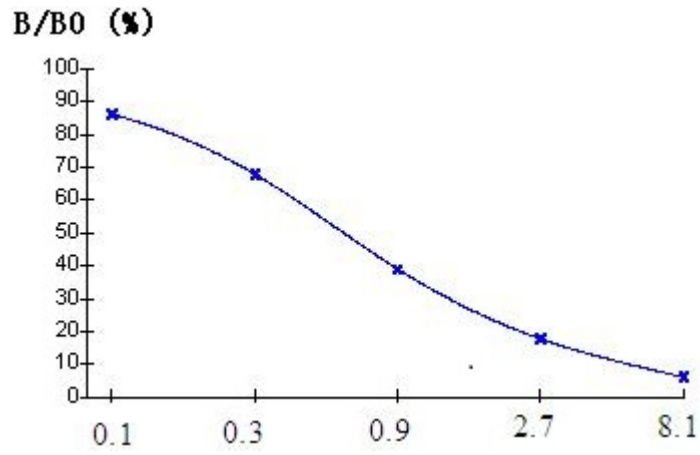


图1

专利名称(译)	一种检测恩诺沙星的ELISA试剂盒的制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN111366693A</a>	公开(公告)日	2020-07-03
申请号	CN201811588563.1	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	洪霞 杜霞		
发明人	洪霞 杜霞		
IPC分类号	G01N33/02 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测恩诺沙星的酶联免疫试剂盒及检测方法，所述的试剂盒由带有微孔的包被板，恩诺沙星标准品，抗恩诺沙星的包被抗体，恩诺沙星酶标抗原，浓缩洗涤液，显色液A，显色液B和终止液组成；取包被抗恩诺沙星抗原的微孔包被板，加入恩诺沙星标准品或处理好的样品到各自的微孔中，同时加入恩诺沙星抗体工作液，再加入恩诺沙星酶，震荡反应，洗涤液洗涤，经底物显色，样本吸光值与其含有的恩诺沙星量成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中恩诺沙星的含量。

