



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101955540 B

(45) 授权公告日 2012.10.24

(21) 申请号 201010165187.2

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2010.05.06

G01N 33/566 (2006.01)

(73) 专利权人 北京维德维康生物技术有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地开拓路5号
中关村生物医药园B区421室

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(72) 发明人 徐飞 温凯 吴小平 何丹婷
江海洋 李杰超 王战辉 李娜
杨丽丽

(56) 对比文件

CN 1974600 A, 2007.06.06, 全文.

CN 101059487 A, 2007.05.31, 全文.

审查员 吴永庆

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
11245
代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种喹诺酮药物抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种喹诺酮药物抗体及其应用。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第1-118位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第134-248位氨基酸残基所示。本发明试剂盒和胶体金试纸卡具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点;能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。因此,本发明的抗体、试剂盒、胶体金试纸及检测方法在喹诺酮药物的检测中将发挥重大作用。

1. 一种单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 1-121 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 137-249 位氨基酸残基所示;所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 122-136 位氨基酸残基所示。

2. 权利要求 1 所述单链抗体的编码基因。

3. 根据权利要求 2 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为序列表中序列 2 所示的 DNA 分子。

4. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组载体。

5. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的重组菌。

6. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的转基因细胞系。

7. 含有权利要求 2 或 3 所述编码基因的表达盒。

8. 权利要求 1 所述单链抗体在检测喹诺酮药物中的应用,所述喹诺酮药物为如下中的至少一种:环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星。

9. 一种检测喹诺酮药物的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒:

1) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 所述单链抗体和酶标记抗体;其中,所述偶联物作为包被原;

2) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原的酶标记物、权利要求 1 所述单链抗体和抗抗体;其中,所述抗抗体作为包被原;

3) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原的酶标记物、权利要求 1 所述单链抗体;其中,权利要求 1 所述单链抗体作为包被原;

4) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 所述单链抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。

10. 根据权利要求 9 所述的免疫试剂盒,其特征在于:

所述试剂盒中包括喹诺酮药物标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液;所述喹诺酮药物标准品为环丙沙星;

所述喹诺酮药物标准品溶液为如下各浓度的溶液 $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\ \mu\text{g/L}$ 、 $3\ \mu\text{g/L}$ 、 $9\ \mu\text{g/L}$ 、 $27\ \mu\text{g/L}$ 、 $81\ \mu\text{g/L}$;

每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M - 0.015M , pH 值为 7.2-7.6;

所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L - 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液;

所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的:将每 0.1mmol 喹诺酮药物半抗原和 0.12mmol NHS 溶解在 2ml DMF 和 HCl 的混合溶液中, DMF 和 HCl 的混合溶液中 DMF 与 HCl 的体积比为 1:1, 磁力搅拌, 得到溶液 I; 向所述溶液 I 中滴加 1ml DCC 和 DMF 的混合溶液, DCC 和 DMF 的混合溶液中 DCC 的浓度为 0.15mmol/ml , 25°C 搅拌 1h, 4°C 冰箱搅拌 12h, 离心, 取上清液; 将所述上清液逐滴加到 5ml 载体蛋白的溶液中, 25°C 搅拌 0.5h, 透析, 得到所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物; 所述载体蛋白的溶液按照如

下方法制备：用 pH 值为 8.0、浓度为 0.2mol/L 的碳酸缓冲液将 45mg 载体蛋白溶解，并定容至 5ml，得到所述载体蛋白的溶液；

所述喹诺酮药物半抗原为环丙沙星；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

11. 根据权利要求 10 所述的免疫试剂盒，其特征在于：所述洗涤液的所述配制方法中，所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M，pH 值为 7.4。

12. 根据权利要求 10 所述的免疫试剂盒，其特征在于：所述样品浓缩液为浓度为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

13. 一种检测喹诺酮药物的胶体金试纸，包括样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫，其依次连接；所述胶体金垫包被有胶体金标记的权利要求 1 所述单链抗体；所述反应膜上含有检测带和质控带，检测带位置包被有权利要求 10 中所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物，质控带位置包被有鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

14. 一种检测样品中喹诺酮药物的方法，包括如下步骤：

1) 将待测样品进行前处理，得到待测样本溶液；

2) 用权利要求 13 所述胶体金试纸对所述待测样本溶液进行检测；

所述前处理的方法为下述 b) 和 c) 中的任一：

b) 所述待测样品为畜禽的肉、畜禽的肝脏或水产；将每 1g 所述待测样品的匀浆组织与 4mL 0.02M、pH 7.4 的 PBS 缓冲液混合均匀，3000 转离心 5min，取上清液，即为待测样本溶液；

c) 所述待测样品为蜂蜜；将蜂蜜与提取剂混合，得到的混合溶液为待测样本溶液；具体为：将每 1g 蜂蜜与 4mL 提取剂混合均匀，得到的混合溶液即为待测样本溶液；每 1 升所述提取剂由 5ml Tween-20 和 995ml 0.02M 的 PBS 缓冲液组成，提取剂的 pH 值为 7.4；

所述喹诺酮药物为如下中的至少一种：环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星。

一种喹诺酮药物抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种喹诺酮药物抗体及其应用。

背景技术

[0002] 喹诺酮类 (4-quinolones, QNs), 又称吡酮酸类或吡啶酮酸类, 是一类合成抗菌药, 主要作用于革兰阴性菌。喹诺酮按发明先后及其抗菌性能的不同, 分为一、二、三、四代。第一代喹诺酮类, 具体品种有萘啶酸和吡咯酸等, 因抗菌谱及临床应用范围均较窄, 现已不使用。第二代喹诺酮类, 吡哌酸是国内主要应用品种, 在抗菌谱方面有所扩大, 但仅用于泌尿道和肠道感染, 目前已少用。第三代喹诺酮类有氟哌酸等一系列药物, 抗菌谱进一步扩大, 对葡萄球菌等革兰阳性菌也有抗菌作用, 对一些革兰阴性菌的抗菌作用则进一步加强。第四代喹诺酮类抗菌药包括恩诺沙星、诺氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、环丙沙星、麻保沙星、双氟沙星、单诺沙星、培氟沙星和罗氟沙星等, 已广泛应用于动物源性食品的生产中。

[0003] 随着氟喹诺酮类抗菌药在兽医临床和水产养殖中的应用, 其残留问题已引起广泛的关注。QNs 残留除了其毒副作用对人直接危害外, 更为严重的是其耐药菌株正逐年上升, 新开发的氟喹诺酮类药品的市场周期大大缩短。因此, 必须重视氟喹诺酮类药物在动物性食品中的残留问题。食品添加剂联合专家委员会和欧盟都对于 QNs 的 MRLs 作了规定。目前用于检测 QNs 残留的方法有: 微生物法、免疫分析法、高效液相色谱法 (LC)、液相色谱-质谱 (LC-MS) 法和酶联免疫吸附分析 (ELISA)。目前, 用于免疫检测的抗体都是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体或多克隆抗体的制备必须通过细胞培养获得, 整个生产过程复杂, 消耗时间长, 费用高, 且不易进行操作。单链抗体是将抗体重链可变区和轻链可变区基因通过一个短肽链连接后融合表达出来的抗体片断, 具有分子量小、特异性高、结合力强、易于利用基因工程技术操作等优点。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测喹诺酮药物的单链抗体及其编码基因。

[0005] 本发明所提供的单链抗体, 由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成, 所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 1-121 位氨基酸残基所示, 所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 137-249 位氨基酸残基所示。

[0006] 上述单链抗体中, 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 122-136 位氨基酸残基所示。

[0007] 所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

[0008] 1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 1-363 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0009] 2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 409-747 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0010] 3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 364-408 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0011] 4) 自序列表中序列 2 所示的 DNA 分子；

[0012] 5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 或 4) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

[0013] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒也属于本发明的保护范围。

[0014] 上述任一所述单链抗体在检测喹诺酮药物中的应用也属于本发明的保护范围；所述喹诺酮药物为如下中的至少一种：环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星。

[0015] 本发明的另一个目的是提供检测喹诺酮药物的免疫试剂盒。

[0016] 本发明所提供的检测喹诺酮药物的免疫试剂盒，为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒：

[0017] 1) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体和酶标记抗体；其中，所述偶联物作为包被原；

[0018] 2) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体和抗体；其中，所述抗体作为包被原；

[0019] 3) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体；其中，所述单链抗体作为包被原；

[0020] 4) 试剂盒中包括喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体的酶标记物；其中，所述偶联物作为包被原。

[0021] 上述任一所述免疫试剂盒中，所述试剂盒中包括喹诺酮药物标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液；所述喹诺酮药物标准品为环丙沙星；

[0022] 所述喹诺酮药物标准品溶液为如下各浓度的溶液 0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L；

[0023] 每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合，得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M-0.015M，具体为 0.01M，pH 值为 7.2-7.6，具体为 7.4；

[0024] 所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液，具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液；

[0025] 所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备的：将每 0.1mmol 喹诺酮药物半抗原和 0.12mmol NHS 溶解在 2mL DMF 和 HCl 的混合溶液中，DMF 和 HCl 的混合溶液中 DMF 与 HCl 的体积比为 1：1，磁力搅拌，得到溶液 1；向所述溶液 1 中滴加 1mL DCC 和 DMF 的混合溶液，DCC 和 DMF 的混合溶液中 DCC 的浓度为 0.15mmol/ml，25 $^{\circ}$ C 搅拌 1h，4 $^{\circ}$ C 冰箱搅拌 12h，离心，取上清液；将所述上清液逐滴加到 5mL 载体蛋白的溶液中，25 $^{\circ}$ C 搅拌 0.5h，透析，得到所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物；所述载体蛋白的溶液按照如下方法制备：用 pH 值为 8.0、浓度为 0.2mol/L 的碳酸缓冲液将 45mg 载体蛋白溶解，并定容至 5ml，得到所述载体蛋白的溶液；

[0026] 所述喹诺酮药物半抗原为环丙沙星；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋

白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

[0027] 所述抗抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

[0028] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

[0029] 本发明的另一个目的是提供一种检测喹诺酮药物的胶体金试纸。

[0030] 本发明所提供的检测喹诺酮药物的胶体金试纸,包括样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫,其依次连接;所述胶金垫包被有胶体金标记的上述任一所述单链抗体;所述反应垫上含有检测带和质控带,检测带位置包被有上述任一所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物,质控带位置包被有鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

[0031] 本发明的另一个目的是提供一种检测样品中喹诺酮药物的方法。

[0032] 本发明所提供的检测样品中喹诺酮药物的方法,为如下 I) 或 II) 所示:

[0033] I) 检测样品中喹诺酮药物的方法包括如下步骤:

[0034] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;

[0035] 2) 用上述任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;

[0036] 所述前处理的方法为下述 a)、b) 和 c) 中的任一:

[0037] a) 所述待测样品为畜禽的肉、畜禽的肝脏或水产;将每 3g 所述待测样品的均质样品与 9mL 乙腈和氢氧化钠水溶液的混合溶液混匀,4000r/min 离心 10min,取 4mL 上清液,加入 0.02mol/L PBS 缓冲液 4mL,再加入二氯甲烷 8mL,振荡 10min,4000r/min 离心 10min,取下层有机相 6mL,加入样品稀释液 0.5mL 和正己烷 1mL,涡动 2min,4000r/min 离心 10min,取下层清液,即得到待测样本溶液;所述乙腈和氢氧化钠水溶液的混合溶液中乙腈与氢氧化钠水溶液的体积比为 84 : 16,所述氢氧化钠水溶液中氢氧化钠的浓度为 0.1mol/L;

[0038] b) 所述待测样品为蛋;用乙腈对所述待测样品进行提取,离心,取上清液;将所述上清液脱脂,得到待测样本溶液;具体为:将每 2g 所述待测样品的均质样品与 8mL 乙腈振荡混合 5min,4000r/min 离心 5min,取上清液 2mL,氮气吹干,用 1mL 正己烷溶解,涡动 1min,加入样品稀释液 1mL,涡动 2min,4000r/min 离心 5min,取下层清液,即得到待测样本溶液;

[0039] c) 所述待测样品为蜂蜜;将每 1g 所述待测样品与 2mL PBS 缓冲溶液振荡混合 5min,再加入 8mL 二氯甲烷,振荡 5min,4000r/min 离心 5min,取下层有机相 4mL,氮气吹干,用 1mL 样品稀释液溶解,得到的溶液即为待测样本溶液;

[0040] II) 检测样品中喹诺酮药物的方法包括如下步骤:

[0041] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;

[0042] 2) 用上述任一所述胶体金试纸卡对所述待测样本溶液进行检测;

[0043] 所述前处理的方法为下述 a)、b) 和 c) 中的任一:

[0044] a) 所述待测样品为牛奶;将样品稀释液和牛奶混合,得到的混合溶液即为待测样本溶液;所述样品稀释液和牛奶的体积比为 (3-5) : 1 或 4 : 1;

[0045] b) 所述待测样品为畜禽的肉、畜禽的肝脏或水产;将每 1g 所述待测样品的匀浆组织与 4mL 0.02M、pH 7.4 的 PBS 缓冲液混合均匀,3000 转离心 5min,取上清液,即为待测样本溶液;

[0046] c) 所述待测样品为蜂蜜;将蜂蜜与提取剂混合,得到的混合溶液为待测样本溶液;具体为:将每 1g 蜂蜜与 4mL 提取剂混合均匀,得到的混合溶液即为待测样本溶液;每 1 升所述提取剂由 5mL Tween-20 和 995mL 0.02M 的 PBS 缓冲液组成,提取剂的 pH 值为 7.4;

[0047] 所述喹诺酮药物为如下中的至少一种：环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星；

[0048] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

[0049] 上述试剂盒既可以为酶联免疫试剂盒，又可为发光免疫试剂盒，当为酶联免疫试剂盒时，所述试剂盒中包括底物显色液；所述底物显色液由 A 液和 B 液组成，所述 A 液为浓度为 1.5% -2.5% 的过氧化脲的水溶液，B 液为浓度为 0.5% -1.5% 的四甲基联苯胺的水溶液；

[0050] 所述 A 液优选为浓度为 2% 的过氧化脲的水溶液，B 液优选为浓度为 1% 的四甲基联苯胺的水溶液。本发明的单链抗体 (scFv) 是用基因工程方法将抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 通过一段连接肽 (Linker) 连接而成的重组抗体，是保持了亲本抗体的抗原亲和活性和特异性的最小功能性抗体片段，可通过基因工程技术体外表达得到，可在细菌中很经济地大规模生产，从而使得免疫检测抗体的生产变得非常容易、简便和经济，进而大大减少检测试剂的费用，比杂交瘤细胞培养得到单抗的方法要简单得多。本发明抗体的亲和常数为 $3.74 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量 (IC_{50}) 为 1.5ng/mL。本发明为食品中喹诺酮药物残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。

[0051] 本发明试剂盒和胶体金试纸卡具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点；能同时快速检测大批量样品，可实现现场高通量快速检测。本发明试剂盒和胶体金试纸卡可以同时检测环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星、依诺沙星多种药物，将在喹诺酮类药物的检测中发挥重要作用。因此，本发明的抗体、试剂盒、胶体金试纸及检测方法在喹诺酮药物的检测中将发挥重大作用。

附图说明

[0052] 图 1 为试剂盒标准曲线。

具体实施方式

[0053] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0054] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0055] 实施例 1、抗体的制备及功能检测

[0056] 一、喹诺酮药物单链抗体的制备

[0057] (一) 抗体的筛选

[0058] 取 6 个月雄性 BaIb/c 小鼠，TrizoI 一步法提取脾细胞总 RNA，纯化得到 mRNA，再逆转录得到 cDNA。使用全套引物，以 cDNA 为模板分别扩增得到重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 基因，经叠加延伸聚合酶链式反应 (Overlap-PCR) 将 VH、VL 基因随机拼接为单链抗体基因 (ScFv)，然后将 ScFv 与载体 pCANTAB5E 连接得 pCANTAB5E/ScFv，并转化大肠杆菌 TG1，即得到鼠源非免疫单链抗体库。用 ELISA 方法筛选得到带有特异性的抗多种喹诺酮类药物的单链抗体的噬菌体颗粒，通过测序得到其相应的核苷酸序列。

[0059] 该单链抗体的编码基因序列如序列表中序列 2 所示，自序列 2 的 5' 末端起第 1-363 位核苷酸编码重链可变区，自序列 2 的 5' 末端起第 409-747 位核苷酸编码轻链可变

区,自序列 2 的 5' 末端起第 364-408 位核苷酸编码短肽。

[0060] 该单链抗体由重链可变区、连接所述重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区顺次连接组成。该抗体的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示,自序列 1 的 N 端起第 1-121 位氨基酸残基为重链可变区的氨基酸序列,自序列 1 的 N 端起第 137-249 位氨基酸残基为轻链可变区的氨基酸序列,自序列 1 的 N 端起第 122-136 位氨基酸残基为短肽序列。

[0061] (二) 抗体的制备

[0062] 表达载体 pET20b 购自德国 NOVAGEN 公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 购自德国 NOVAGEN 公司;蛋白纯化用 HisLink™ Protein Purification Resin 购自美国 Promega 公司,产品目录号为 V8823。

[0063] 合成序列表中序列 2 所示基因,并在两端引入酶切位点 Xba I 和 Not I,用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切,回收目的基因片段;用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切表达载体 pET20b,回收载体大片段;连接,连接产物转化大肠杆菌,筛选培养,挑取单克隆;将单克隆接入液体培养基进一步培养,提取质粒,酶切和测序验证,结果测得的序列如序列表中序列 2 所示,表明重组载体中基因插入方向和序列均正确,将阳性重组载体记作重组表达载体 pET20b/ScFv。

[0064] 采用氯化钙法将重组表达载体 pET20b/ScFv 转化大肠杆菌 BL21,抗性筛选,经菌液 PCR 及质粒酶切验证,得到含有重组表达载体 pET20b/ScFv 的重组大肠杆菌,记作重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv。

[0065] 2×TY 培养液的组成:由胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl 和水组成,每 1 升 2×TY 培养液中胰蛋白胨的浓度为 1.6%、酵母提取物的浓度为 1%、NaCl 的浓度为 0.5%;各百分含量均为质量百分含量。

[0066] 含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液是按照如下方法得到的:向 2×TY 培养液中添加氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖,使氨苄青霉素在溶液中的终浓度为 100 μg/ml,使氯霉素在溶液中的终浓度为 34 μg/ml,使葡萄糖在溶液中的终浓度为 1% (质量百分含量)。

[0067] 发酵重组菌:将重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv 的单个阳性菌落接种至含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液中,37℃ 振摇,至培养体系的 A_{600} 为 0.6 时,收集细菌;将细菌重悬于 2ml LB 液体培养基中,按 1:20 的体积比将菌悬液接种至 50ml 含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基中(含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基的组成:氨苄青霉素、氯霉素、酵母提取物、蛋白胨、NaCl 和水组成;溶液中各成分的浓度为:酵母提取物 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 1%,氨苄青霉素 100 μg/ml,氯霉素 34 μg/ml),37℃ 振摇,至培养体系的 A_{600} 为 0.6 时,加 IPTG (0.7mmol/L) 诱导,30℃ 振摇 2.5h,在 4℃ 下 5000r/min 离心 10min,收获细菌。用洗涤液(将 20mmol Tris 和 0.15mol NaCl 用水溶解,用 HCl 调 pH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升洗涤液)洗涤 1 次,加溶菌液(将 20mmol Tris、10ml Triton X-100、250 μmol PMSF、62.5×10⁴U 溶菌酶用水溶解,用 HCl 调 pH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升溶菌液),30℃ 放置 15min,然后在冰上超声处理(输出功率 80%)10s,停 10s,反复 3 次,至细胞不再粘稠。在 4℃ 2000×g 离心 20min,分别收集上清及沉淀。将沉淀用结合缓冲液 I(将 20mmol Tris、0.5mol NaCl 和 5mmol 咪唑用水溶解,用 HCl 调 pH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 I)洗涤一次,而后,悬于结合缓冲液 II(将 20mmol

Tris、0.5mol NaCl、5mmol 咪唑和 6mol 尿素用水溶解,用 HCl 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 II) 中,4℃,12000×g 离心 20min,收集上清,经 0.45mm 滤膜过滤,收集滤液,得到抗体的粗制液。

[0068] 纯化:利用表达载体上带有的组氨酸标签 (His-tag) 标记通过亲和层析纯化单链抗体蛋白。将 HisLink™ Protein Purification Resin 装柱,以 10 倍柱体积的 binding buffer (将 100mmol HEPES、10mmol 咪唑和 500mmol NaCl 用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 binding buffer) 平衡纯化柱,取抗体的粗制液上样,然后用 5 倍柱体积的 wash buffer (将 100mmol HEPES、100mmol 咪唑和用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 wash buffer) 洗脱杂蛋白,最后用 10 倍柱体积的 elution buffer (将 100mmol HEPES、250mmol 咪唑用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 elution buffer) 洗脱目标蛋白,收集洗脱液,透析,得到纯化的抗体。

[0069] 蛋白验证 Western blot:收集上述各阶段产物,进行 12% SDS-PAGE 电泳;将电泳条带印迹到 NC 膜上,再与 HRP 标记的环丙沙星杂交,检测发光条带。环丙沙星购自美国 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 33434

[0070] 同时以转入空载体 pET20b 的大肠杆菌 BL21 作为对照,并按照上述方法进行表达和纯化,和 Western blot 检测。

[0071] Western blot 检测结果表明:1) 实验组得到的蛋白具有与环丙沙星结合的功能,蛋白的分子量为 29kD,与预期的蛋白分子量一致,表明目的蛋白为与环丙沙星结合的抗体。2) 对照组没有检测到任何与环丙沙星结合的蛋白条带。

[0072] (三) 抗体的功能检测

[0073] 1、用 ELISA 方法,检测抗体的半抑制率 (IC_{50}):

[0074] a、将实施例 2 中制备得到的偶联物 (CIP-BSA) 用包被缓冲液溶解,得到 CIP-BSA 的溶液 (该溶液中 CIP-BSA 的浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。包被缓冲液:pH9.6、0.1mol/L 的碳酸钠缓冲液。

[0075] 向 96 孔板的孔中加入 CIP-BSA 的溶液,100 μL 每孔,37℃温育 2h;倾去包被液,用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔,每次 30s,甩干孔中液体;

[0076] b、然后向每孔中加入 200 μL 2% BSA 封闭液,37℃温育 2h,倾去孔内液体;用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔,每次 30s,甩干孔中液体。

[0077] c、向孔中加入单链抗体溶液和不同浓度的 CIP 标准品溶液,各 50 μL 每孔,37℃孵育 1 小时。以只加入单链抗体溶液不加入 CIP 标准品溶液的孔作阳性对照。

[0078] 单链抗体溶液的制备:用样品稀释液稀释实验 (二) 中的纯化抗体得到溶液,抗体在溶液中的浓度为 5ng/mL;样品稀释液为 0.002mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0079] 不同浓度的 CIP 溶液的制备:用样品稀释液稀释 CIP 得到溶液。

[0080] d、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔,甩干孔中液体,加入 HRP 标记的鼠抗 His 标签单克隆抗体,37℃孵育 1 小时;

[0081] e、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次,250 μL 每孔;加入 TMB 显色,37℃反应 10 分钟,加入 2M 硫酸终止显色反应,每孔 50 μL ,使用酶标仪进行读数。

[0082] 实验设 3 次重复。

[0083] 结果如下:

[0084] 1) 吸光度值与每孔所加入的标准品溶液中 CIP 的浓度成反比;证明,所表达纯化得到的单链抗体具有针对 CIP 的结合特异性,并呈现线性关系,说明该抗体可用于对 CIP 的免疫检测。

[0085] 2) 半抑制率 (IC_{50}):阳性对照孔(即不添加 CIP 标准品溶液的孔)的吸光度值为 B_0 ,各实验孔的吸光度值为 B,当 B/B_0 为 50% 时所对应的 CIP 标准品溶液的浓度即为半抑制率 (IC_{50})。该单抗的半抑制率 (IC_{50}) 为 1.5ng/mL。

[0086] 2、抗体的亲和常数测定

[0087] 方法:取定量的一定稀释度的抗体,分别加入逐渐增加的抗原里,可使抗体的结合达到饱和,以结合部分 (B) 为纵坐标,抗原浓度 (moI/L) 为横坐标绘制饱和曲线,求出抗体饱和程度为 50% 时的游离抗原浓度,其倒数即为该抗体在此稀释度下的亲和常数。

[0088] 结果:抗体的亲和常数为 3.74×10^9 L/moI。

[0089] 实施例 2、检测喹诺酮药物的酶联免疫试剂盒及其制备

[0090] 本实验中的样品稀释液:即为实验一种所述试剂盒中的样品稀释液。

[0091] 本实验中的洗板液:即为实验一种所述试剂盒中的洗涤液。

[0092] 一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成:

[0093] 1、包被环丙沙星与载体蛋白偶联物的酶标板;

[0094] 2、喹诺酮抗体:实施例 1 总所述单链抗体。抗体工作液的浓度为 5.0ng/mL,抗体工作液是用样品稀释液稀释实施例 1 中的纯化抗体得到的;

[0095] 3、喹诺酮标准品:喹诺酮标准品为环丙沙星 (CIP),标准品溶液浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \mu\text{g/L}$ 、 $3 \mu\text{g/L}$ 、 $9 \mu\text{g/L}$ 、 $27 \mu\text{g/L}$ 、 $81 \mu\text{g/L}$;环丙沙星 (CIP) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;产品目录号为 33434;用样品稀释液稀释成上述各浓度;

[0096] 4、酶标二抗:辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗 HIS 标签单克隆抗体;购自美国 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 A7058。

[0097] 5、底物显色液:由 A 液和 B 液组成,A 液为 2% 过氧化脲的水溶液,B 液为 1% 四甲基联苯胺的水溶液;

[0098] 6、终止液:0.2M 硫酸水溶液;

[0099] 7、洗涤液:每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将 10mI 吐温 20、5g 叠氮化钠和 990mI 磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M, pH 值为 7.4;

[0100] 8、样品浓缩液:0.04moI/L 的磷酸盐缓冲液;将其进行 20 倍稀释,成为样品稀释液后使用。

[0101] 二、试剂盒组分的制备

[0102] (一) 包被原的制备

[0103] 以环丙沙星 (CIP) 作为喹诺酮半抗原。载体蛋白为 BSA。

[0104] NHS 的全称为:N-羟基琥珀酰亚胺;DMF 的全称为:N,N-二甲基甲酰胺;DCC 的全称为:二环己基碳二亚胺;

[0105] 将 0.1mmoI 喹诺酮药物半抗原和 0.12mmoI NHS 溶解在 2mL DMF 和 HCl 的混合溶液中,DMF 和 HCl 的混合溶液中 DMF 与 HCl 的体积比为 1:1,磁力搅拌,得到溶液 I;向所述溶液 I 中滴加 1mL DCC 和 DMF 的混合溶液,DCC 和 DMF 的混合溶液中 DCC 的浓度为 0.15mmoI/

ml (DCC 为固体, 溶解于 DMF 中), 25℃ 搅拌 1h, 4℃ 冰箱搅拌 12h, 离心, 取上清液; 将所述上清液逐滴加到 5ml BSA 的溶液中, BSA 的溶液按照如下方法配制: 用 pH 值为 8.0、浓度为 0.2mol/L 的碳酸缓冲液将 45mg BSA 溶解, 并定容至 5ml, 25℃ 搅拌 0.5h, 透析, 得到所述环丙沙星与 BSA 的偶联物 (记作 CIP-BSA)。

[0106] (二) 包被有包被原的酶标板及其制备

[0107] 包被有合成抗原 CIP-BSA 的聚苯乙烯酶标板: 用 10mM 的碳酸盐溶液将抗原作 1 : 50000 倍稀释 (6.0 μg/mL), 包被 96 孔聚苯乙烯酶标板, 每孔 100 μL, 37℃ 温育 2h, 倾去包被液, 用洗板液稀释 20 倍后洗涤 3 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 200 μL 封闭液, 37℃ 温育 2h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0108] 包被缓冲液: pH9.6、0.05mol/L 的碳酸钠缓冲液;

[0109] 封闭液: 每 1 升封闭液按照如下方法配制: 将 5ml 马血清、1g 叠氮化钠、30g 酪蛋白混合, 用磷酸盐缓冲液溶解并定容至 1000ml, 得到封闭液; 其中, 磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M, pH 值为 7.2。

[0110] 三、试剂盒检测方法

[0111] (一) 样品前处理

[0112] 1、检测样本为畜禽的肉、畜禽的肝脏或水产: 取 3g 的均质样品分别加入乙腈-0.1mol/L 氢氧化钠水溶液 (84 : 16, V/V) 9mL, 振荡混合 10min, 4000r/min 离心 10min, 取 4mL 上清液, 加入 0.02mol/L PBS 缓冲液 4mL, 再加入二氯甲烷 8mL, 振荡 10min, 4000r/min 离心 10min, 取下层有机相 6mL, 氮气吹干; 加入样品稀释液 0.5mL, 加入正己烷 1mL, 涡动 2min, 4000r/min 离心 10min, 取下层清液 50 μL 进行检测。

[0113] 2、检测样本为鸡蛋: 取 2g 的均质样品, 加入 8mL 乙腈, 振荡混合 5min, 4000r/min 离心 5min, 取上清 2mL, 氮气吹干; 加入正己烷 1mL, 涡动 1min, 加入样品稀释液 1mL, 涡动 2min, 4000r/min 离心 5min, 取下层清液 50 μL 进行检测。

[0114] 3、检测样本为蜂蜜: 取 1g 的样品, 加入 PBS 缓冲溶液 2mL, 振荡混合 5min 后, 加入二氯甲烷 8mL, 振荡 5min, 4000r/min 离心 5min, 取下层有机相 4mL, 氮气吹干; 用 1mL 样品稀释液复溶, 取 50 μL 进行检测。

[0115] (二) 用试剂盒检测

[0116] 1、标准曲线的制作

[0117] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入环丙沙星标准品溶液 50 μL, 再加入环丙沙星单链抗体工作液 50 μL, 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μL 洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。加入酶标二抗工作液 100 μL, 37℃ 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤, 每孔加入底物显色液, 轻轻振荡混匀, 37℃ 恒温箱避光显色 15min, 每孔加入终止液 50 μL, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值。

[0118] 用每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B₀) 再乘以 100%, 得到百分吸光度值。以环丙沙星标准品浓度 (μg/L) 的半对数值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图。得到的标准曲线如图 1 所示。

[0119] 百分吸光度值 (%) = (B/B₀) × 100%

[0120] 2、样品中喹诺酮浓度的测定

[0121] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入检测样本溶液 50 μ L, 再加入喹诺酮抗体工作液 50 μ L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ L 洗涤液, 30s 后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的二抗工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤, 每孔加入混合底物显色液 100 μ L, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min, 每孔加入终止液 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪, 测定每孔吸光度值。

[0122] 结果判断: 用每个检测样本溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B_0) 再乘以 100%, 得到百分吸光度值。相对应每一个检测样本溶液的百分吸光度值, 则可从标准曲线上读出检测样本溶液的吸光度值, 再根据标准品溶液的浓度值换算出样本溶液中喹诺酮药物的残留量。

[0123] 四、试剂盒检测效果评价

[0124] (一) 准确度和精密度试验

[0125] 向不含喹诺酮药物的样品 (鸡肉、猪肉、鸡肝、鱼肉、虾肉及鸡蛋、蜂蜜) 中添加如下药物: 环丙沙星 (CIP); 使各添加药物在样品中的浓度为分别为 20、40、60 μ g/kg (或 μ g/L)。蜂蜜样品的添加浓度与鸡肉一致。

[0126] 将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理, 得到检测样本溶液。

[0127] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒进行检测, 每个实验重复 5 次, 分别计算变异系数。结果分别见表 1。

[0128] 表 1 精密度试验结果

[0129]

(%)	第 1 批	第 2 批	第 3 批
板内	3.5	4.9	4.6
批内	8.8	7.9	8.2
批间	10.2		

[0130] 板内变异系数的计算方法:

[0131] 板内变异系数 = 同一次测定的同一块板内某样本 (一般为中等水平) 重复测定次数所得结果的变异系数。

[0132] 批内变异系数的计算方法:

[0133] 批内变异系数 = 同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0134] 批间变异系数的计算方法:

[0135] 批间变异系数 = 同一样本在不同批次测定结果的变异系数, 取其平均值。

[0136] 结果表明: 所有样品的添加回收率在 82.6% ~ 99.5%, 批内变异系数在 8.2% ~ 8.8%, 批间变异系数在 6.5% ~ 10.5%。

[0137] (二) 试剂盒保存期

[0138] 试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}$ C, 经过 12 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制浓度、喹诺酮药物添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中, 会有非正常保存条件出现, 将试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 保存的条件下放置 8 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒的各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放

入 -20℃冰箱冷冻 8 天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8℃至少可以保存 12 个月以上。

[0139] (三) 交叉反应率试验:

[0140] 选择与环丙沙星结构相似的其他喹诺酮类药物,通过各种标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它类似物的交叉反应率:

[0141]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制的环丙沙星浓度}}{\text{引起50\%抑制的其他喹诺酮类药物浓度}} \times 100\%$$

[0142] 表 2 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
	环丙沙星	100.0
	恩诺沙星	95
[0143]	氧氟沙星	120
	诺氟沙星	170
	达氟沙星	89
	氟甲喹	85
	噁喹酸	95
	麻保沙星	85
	氨氟沙星	130
	培氟沙星	190
[0144]	依诺沙星	60
	二氟沙星	<1
	沙拉沙星	<1
	萘啶酸	<1

[0145] 实验表明,本发明试剂盒对环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星、依诺沙星的特异性好,即本发明试剂盒可以检测上述喹诺酮类药物。

[0146] 实施例 3、检测喹诺酮药物的试纸及其制备与应用

[0147] 一、试纸的结构

[0148] 所述试纸由样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫组成;

[0149] 所述样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫依次按顺序连接,样品吸收垫的末端与胶体金垫的始端相连,胶体金垫的末端与反应膜的始端相连,反应膜的末端与吸水垫的始端相连;

[0150] 所述胶体金垫上包被有胶体金标记的喹诺酮药物抗体;

[0151] 所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(C线)和质控区(T线)均为与所述试纸的长相垂直的条带状;检测区位于近于胶体金垫末端的一侧;质控区位于远离胶体金垫末端的一侧;检测区包被有包被原,质控区包被有鼠抗 HIS 标签单克隆抗体;

[0152] 样品吸收垫为纤维素滤膜,反应膜为硝酸纤维素膜(NC膜);吸水垫为吸水纸;胶体金垫为包被有胶体金标记的喹诺酮药物抗体的玻璃纤维膜;试纸顶端有样品孔。

[0153] 二、试纸的制备

[0154] (1) 胶体金标记抗体:

[0155] 胶体金溶液的制备:取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,持续搅拌的情况下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.5mL,继续搅拌加热 20min,溶液呈透亮的红色。室温冷却,用去离子水恢复到原体积,2-8℃ 保存。

[0156] 0.1mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH 8.2,将 10mL 胶体金溶液中加入 50mL 烧杯中,电磁搅拌器 250r/min 搅拌,逐滴加入 1mL 含 0.35mg 单链抗体溶液。逐滴加入 3mL 5% BSA,持续搅拌 10min。金标抗体溶液常温低速(1500r/min)离心 20min,弃去由凝聚的金颗粒形成的沉淀。红色上清溶液 2-8℃,11000r/min 离心 40min。溶液分为三层,透明上清,管底可流动的暗红色沉淀及管底壁上黑色致密的金颗粒层。将可流动的暗红色沉淀转移到另外一个离心管中,用含 1% BSA 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液混悬至原量。平衡过夜,同上重复离心 2 次。最后用 1% BSA 的 0.01mol/L PB(含 0.02% NaN_3) 将沉淀混悬为原体积的 1/40,2-8℃ 保存。

[0157] (2) 喷金:将胶体金标记的抗体喷到玻璃纤维上,制成胶体金垫;

[0158] (3) 喷膜:在反应膜上的 T 线和 C 线位置分别喷上包被原和鼠抗 HIS 标签单克隆抗体;

[0159] (4) 组装:将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜、吸水纸按常规方法进行组装,然后切条,将试纸卡装入塑料制卡中,形成试纸卡。

[0160] 三、用试纸进行检测

[0161] (1) 样品前处理及检测

[0162] 1、检测样本为新鲜牛奶:新鲜牛奶直接用样品稀释液进行稀释后检测,稀释 4 倍,混匀后滴加入 4 滴于样品孔中;

[0163] 2、检测样本为畜禽的肉、畜禽的肝脏或水产;称 1g 匀浆过的组织样品于 10mL 离心管中,加入 4mL PBS 缓冲液(0.02M, pH 7.4),振荡 5min 至混匀,3000 转离心 5min,用滴管吸取上清液逐滴加入 4 滴于样品孔中;

[0164] 3、检测样本为蜂蜜;取 1g 蜂蜜于 10mL 离心管中,加入 4mL 提取剂,振荡 5min 至混匀,滴加入 4 滴于样品孔中;5-10min 判断结果,15min 后的判断结果无效。每 1 升所述提取剂由 5ml Tween-20 和 995ml 0.02M 的 PBS 缓冲液组成,提取剂的 pH 值为 7.4。

[0165] (2) 结果判断

[0166] 阴性:C 线显色,T 线肉眼可见,无论颜色深浅均判为阴性。

[0167] 阳性 :C 线显色, T 线不显色, 判为阳性。

[0168] 无效 :C 线不显色, 无论 T 线是否显色, 该试纸卡均判为无效。

[0169] 四、试纸卡的效果

[0170] (1) 假阳性率

[0171] 取经 LC-MS/MS 确证的阴性牛奶、阴性蜂蜜和阴性猪肉各 50 份。编号为 1#-50#。将样品按照实验三中所述方法处理后分别用试纸卡进行检测, 分别计算假阳性率。

[0172] 结果 :在 50 份阴性猪肉样品测定中, 试纸卡检测出阳性样品分别为 2 份、3 份、3 份, 假阳性率为 4% -6%。在 50 份阴性牛奶样品测定中, 试纸卡检测出阳性样品分别为 2 份、2 份、3 份, 假阳性率为 4% -6%。在 50 份阴性蜂蜜样品测定中, 试纸卡检测出阳性样品分别为 1 份、3 份、3 份, 假阳性率为 2% -6%。

[0173] (2) 假阴性率

[0174] 取经 LC-MS/MS 确证的阴性牛奶、阴性蜂蜜和阴性猪肉样品各 110 份, 分别按规定的检测限浓度进行添加环丙沙星 (CIP)、恩诺沙星 (ENR)、氧氟沙星 (OFL)、诺氟沙星 (NOR)、达氟沙星 (DAN)、氟甲喹 (FLU)、噁喹酸 (OXO)、麻保沙星 (MAR)、氨氟沙星 (AM1)、培氟沙星 (PEF)、依诺沙星 (ENO), 每种药物添加各 10 份。将样品按照实验三中所述方法处理后分别用试纸卡进行检测, 分别计算假阴性率。

[0175] 结果 :在 110 份阳性猪肉样品测定中, 试纸卡检测出阴性样品为 0 份, 假阴性率为 0。在 110 份阴性牛奶样品测定中, 试纸卡检测出阴性样品为 0 份, 假阴性率为 0。在 110 份阴性蜂蜜样品测定中, 试纸卡检测出阴性样品为 0 份, 假阴性率为 0。

[0176] (3) 试纸卡保存期

[0177] 稳定性试验结果表明, 本试纸卡在 2-8℃或室温条件下阴凉干燥处可保存 1 年。

序列表

<110> 北京维德维康生物技术有限公司

<120> 一种喹诺酮药物抗体及其应用

<160>2

<210>1

<211>249

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

Gln	Val	His	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Ala	Leu	Val	Asn	Leu	Ser	1	5	10	15
Ser	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Ser	Thr	Ile	20	25	30	
Ser	Val	Glu	Ser	Tyr	Asp	His	Pro	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	35	40	45	
Lys	Leu	Glu	Trp	Met	Ala	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	His	Tyr	Ser	Ala	Tyr	50	55	60	
Ile	Leu	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Ser	Ser	65	70	75	80
Ala	Ile	Leu	Asn	Ser	Asp	Cys	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Gln	Asn	Ser	Lys	85	90	95	
Val	Glu	Tyr	Phe	Ser	Ala	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg	Asp	Thr	Ala	Lys	Ala	100	105	110	
Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	115	120	125	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Ser	His	Ser	Phe	Leu	Ser	130	135	140	
Pro	Ala	Val	Tyr	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Pro	Pro	Ser	His	Thr	Gln	Asp	145	150	155	160
Asp	Ser	Pro	Leu	Pro	Phe	Gly	Arg	Phe	Phe	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Gln	165	170	175	
Asp	Ser	His	Pro	Asp	Ser	Ser	Arg	Ser	Ile	Glu	Pro	Tyr	Arg	Ser	Asp	180	185	190	
Ser	Thr	Gly	Pro	Gln	Val	Gln	Trp	Gln	Trp	Val	Trp	Asp	Arg	Leu	His	195	200	205	

Pro Gln His Pro Ser Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Asn Leu Leu Leu
 210 215 220
 Trp His Gln Ala Tyr Leu Phe Asn Ile Tyr Ile Asp Thr Ile Met Asp
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Leu Thr Asn Ala Val Glu
 245

<210>2

<211>747

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>2

caggtgcatc tgctgaagga gggccaccgg gccttgggtga acttatcgtc tctgtcccac	60
ctctgcaactg tectgaggct cttctcaage accataagtg tcgagtcata tgaccaccct	120
tggatccggc aatttccagg aaacaaactg gagtggatgg ccaatgtgtc ctcagaacat	180
tactccgcgt acatactccg aatctctgtc agtcgagaca catccaagaa ccagtcttct	240
gcaattctga attctgactg tacgaacaca gccacacaaa atagtaaggt tgaatacttc	300
tctgcaagat ctcaatcaag agatacggcc aaggcaccac tctcactgtc tctcagggtg	360
gcggttggtg gcggttagcgg cgggtggcgg tctggaggcg gcggttcttg cagatcacac	420
agtttctctgt cccctgctgt atatctggca ctgggagggc caccatctca tacgcaggat	480
gatagtcctt tgccttttgg tcgattcttt ggaaccaaca gaaaccagga cagccacca	540
gactcctcgc gatctataga gccctacaga tcggacagta cgggtcccca ggttcagtgg	600
cagtgggtct gggacagact tcaccctcaa catccatcct gtggaggagg aggatgctgc	660
aacctattac tgtggcatca ggcctatcta ttcaacattt atatcgatac tattatggac	720
tccaagttac tcacgaatgc tgctcgag	747

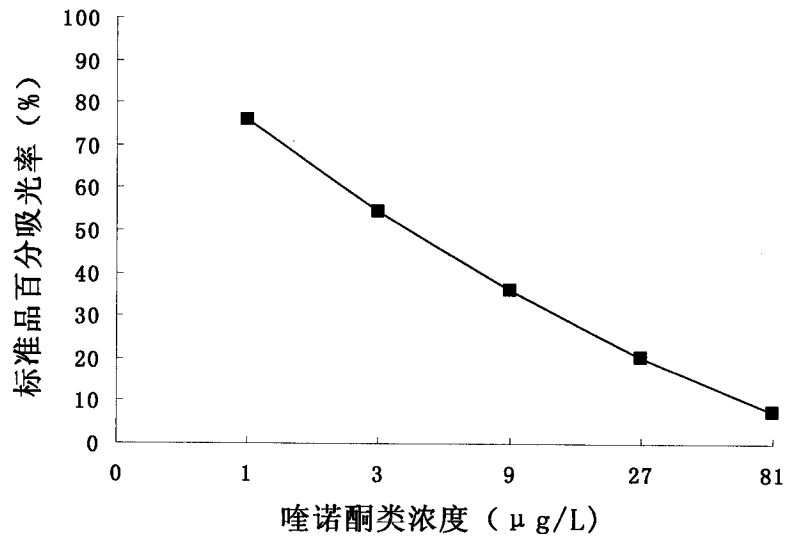


图 1

专利名称(译)	一种喹诺酮药物抗体及其应用		
公开(公告)号	CN101955540B	公开(公告)日	2012-10-24
申请号	CN201010165187.2	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	徐飞 温凯 吴小平 何丹婷 江海洋 李杰超 王战辉 李娜 杨丽丽		
发明人	徐飞 温凯 吴小平 何丹婷 江海洋 李杰超 王战辉 李娜 杨丽丽		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	吴永庆		
其他公开文献	CN101955540A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种喹诺酮药物抗体及其应用。该单链抗体由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成，所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第1-118位氨基酸残基所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第134-248位氨基酸残基所示。本发明试剂盒和胶体金试纸卡具有灵敏度高、准确度高、精密度高、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点；能同时快速检测大批量样品，可实现现场高通量快速检测。因此，本发明的抗体、试剂盒、胶体金试纸及检测方法在喹诺酮药物的检测中将发挥重大作用。

(%)	第1批	第2批	第3批
板内	3.5	4.9	4.6
批内	8.8	7.9	8.2
批间		10.2	