



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102928597 B

(45) 授权公告日 2015.06.10

(21) 申请号 201210421847.8

(22) 申请日 2012.10.30

(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4层B421室

(72) 发明人 吴小平 王世恩 杨铮 何丹婷
苏丽芳 李淑芳

(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.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1673745 A, 2005.09.28,

CN 101955536 A, 2011.01.26, 权利要求7、

8、10,说明书第0016-0049段.

CN 102128891 A, 2011.07.20, 全文.

JP S62170850 A, 1987.07.27, 全文.

CN 101955540 A, 2011.01.26,

CN 102079788 A, 2011.06.01,

CN 101915844 A, 2010.12.15, 全文.

Javier Adrian, et al.. A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and beta-lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors.. 《Anal Bioanal Chem》. 2008, 第391卷(第5期), 第1703-1712页.

审查员 张绚

权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的 ELISA 方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的 ELISA 方法及其试剂盒。本发明所提供的试剂盒是以磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原,以磺胺药物的特异性抗体和喹诺酮药物的特异性抗体的混合物为检测抗体,以辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物的特异性抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物的特异性抗体的抗抗体为酶标二抗。本发明的方法是使用所述试剂盒并在显色时先用碱性磷酸酶的底物显色再用辣根过氧化物酶的底物显色,可一次同时检出磺胺和喹诺酮药物。本发明可用于食品生产企业的自我质量控制,食品安全监督和检测机构的常规筛查,还可用于科研中动物药理和毒理学研究的辅助手段。

CN 102928597 B

1. 一种同时检测磺胺药物和喹诺酮药物的酶联免疫试剂盒,包括包被原、检测抗体、酶标抗体、6个标准品溶液、样品稀释液、样品提取液、浓缩洗涤液、底物显色液、终止液;

所述包被原为磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物的混合物;

所述检测抗体为磺胺药物的特异性抗体和喹诺酮药物的特异性抗体的混合物;

所述酶标抗体为如下1)或2)的酶标记的抗抗体组合物:

1) 辣根过氧化物酶标记的抗所述磺胺药物的特异性抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗所述喹诺酮药物的特异性抗体的抗抗体;

2) 辣根过氧化物酶标记的抗所述喹诺酮药物的特异性抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗所述磺胺药物的特异性抗体的抗抗体;

所述磺胺药物半抗原为包被浓度为 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 的磺胺二甲基嘧啶半抗原;喹诺酮药物半抗原为包被浓度为 $0.08 \mu\text{g/ml}$ 的诺氟沙星半抗原;

磺胺药物的特异性抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3393 的磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs 分泌产生;

喹诺酮药物的特异性抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3779 的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 分泌产生;

所述6个标准品溶液的溶剂为 PBS 缓冲液,溶质为磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星;所述溶质在所述6个标准品溶液中的浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 和 $0 \mu\text{g/L}$, $0.5 \mu\text{g/L}$ 和 $0.3 \mu\text{g/L}$, $1.5 \mu\text{g/L}$ 和 $0.9 \mu\text{g/L}$, $4.5 \mu\text{g/L}$ 和 $2.7 \mu\text{g/L}$, $13.5 \mu\text{g/L}$ 和 $8.1 \mu\text{g/L}$, $40.5 \mu\text{g/L}$ 和 $24.3 \mu\text{g/L}$;所述 PBS 缓冲液的溶剂为水,溶质为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾和氯化钠,所述溶质在所述 PBS 缓冲液中的浓度分别为 0.27g/L 、 1.13g/L 、 0.2g/L 和 8.8g/L , pH 值为 7.4;

所述样品稀释液为所述 PBS 缓冲液;

所述样品提取液的溶剂为所述 PBS 缓冲液,溶质为吐温 20,所述溶质在所述样品提取液中的浓度为 2mL/L ;

所述浓缩洗涤液的溶剂为所述 PBS 缓冲液,溶质为吐温 20 和叠氮化钠,所述溶质在所述浓缩洗涤液中的浓度分别为 10mL/L 和 5g/L ;

所述底物显色液为独立包装的底物显色液 A、独立包装的底物显色液 B 和独立包装的底物显色液 C;所述底物显色液 A 为 2g/mL 过氧化脲水溶液;所述底物显色液 B 为 1g/mL 四甲基联苯胺水溶液;所述底物显色液 C 为 0.05mol/L 对硝基磷酸苯酯水溶液;

所述终止液为独立包装的终止液 A 和独立包装的终止液 B;所述终止液 A 为 0.2mol/L 的磷酸氢二钠水溶液;所述终止液 B 为 1.0mol/L 的硫酸水溶液。

2. 一种同时检测样品中残留磺胺药物和喹诺酮药物的方法,包括如下步骤:

1) 对样品进行前处理;

2) 用权利要求 1 所述试剂盒进行检测;

3) 分析检测结果。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:所述用试剂盒进行检测包括如下步骤:向包被有所述磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物的酶标板中加入标准品溶液或所述样品的溶液;再加入磺胺药物的特异性抗体和喹诺酮

药物的特异性抗体；温育后洗涤拍干，加入所述酶标记抗抗体组合物，先用碱性磷酸酶的底物显色、终止并用酶标仪测定吸光值；再用辣根过氧化物酶的底物显色、终止并用酶标仪测定吸光值。

同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的 ELISA 方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的 ELISA 方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 磺胺类药,英文名称为 Sulfonamides,是通过人工合成的氨基磺胺衍生物,主要用于预防和治疗细菌感染性疾病。代表药物有:磺胺二甲基嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺甲基异恶唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉等。磺胺类药物一般为白色或淡黄色结晶性粉末,遇光易变质,颜色逐渐变深,大多数本类药物不易在水中溶解,但易溶于稀碱。形成钠盐后易溶于水,其水溶液呈强碱性。磺胺类药物能抑制革兰氏阳性菌及一些阴性菌,可以治疗多种细菌感染,在兽医临床上广泛应用于治疗由敏感细菌感染的各种畜禽疾病。主要是通过干扰细菌的叶酸代谢而抑制细菌的生长繁殖。有些细菌生长时需要的一种“生长物质”——对氨基甲酸(PABA),而磺胺类药的化学结构与氨基苯甲酸很像,它可以与氨基甲酸竞争二氢叶酸合成酶,妨碍二氢叶酸的生成从而最终影响细菌核蛋白的合成,从而抑制细菌的生长繁殖。

[0003] 由于磺胺类药物在体内的作用和代谢时间较长,通过任何途径摄入的磺胺都有可能蓄积在人体内。蓄积浓度超过一定值时,就会对人体造成损害。短时间大剂量或长时间小剂量的刺激可分别引起急性或慢性中毒,影响机体的泌尿、免疫系统,破坏肌肉、肾脏和甲状腺等组织,如诱发人的甲状腺癌等。另外,人体内长期存在磺胺会导致许多细菌对磺胺类药物产生抗药性。因此,国际食品法典委员会(CAC)和许多国家规定,动物性食品中磺胺类总量的最大残留限量(MRL)为 0.1mg/kg。

[0004] 喹诺酮类(Quinolones, QNs),是一类人工合成的含 4-喹诺酮基本结构,对细菌 DNA 螺旋酶具有选择性抑制的抗生素。1962 年最早的喹诺酮类药物萘啶酸首先用于临床,由于其抗菌谱窄、口服吸收差、副作用高等原因现在已很少使用。当前应用的喹诺酮大多为含有氟原子的氟喹诺酮类。这类药物抗菌谱广,对革兰氏染色呈阴性杆菌活性较高,对其他抗生素耐药的细菌也具有较好的抗菌作用,无交叉耐药性;在体内分布广,体内和组织中药物浓度高;口服吸收好,半衰期长,使用方便;与头孢菌素类药物相比,抗菌作用相似,但价格便宜。目前在兽医临床上常用的药物主要有诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星、氟甲喹等十几种,随着应用的增加,其各种毒副作用也逐渐显现出来,主要体现在头晕、低血糖、恶心、胃肠道症状、中枢神经系统和过敏反应。特别是近几年,严重的不良反应发生率约为 1.6%—1.8%,引起了全世界的关注。为了保障动物源性食品的安全,欧盟、美国及我国等很多国家都对喹诺酮类药物在动物源性食品中残留制定了最大残留限量(MRL)。我国农业部文件(农质发【2009】3 号文件)中规定了 2009 年我国畜禽产品监测项目,禽肉中 4 种喹诺酮类药物残留是重要的监测项目之一。

[0005] 现有的磺胺和喹诺酮药物的检测方法多为色谱法,这些方法的灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响较大,再者这些方法需要复杂的仪器,过程繁琐,不适应现场大量样本的筛查,且目前现有的快速检测产品存在一定的局限性,无法同时检测磺胺和喹诺酮类物质的残留。本检测方法简便、灵敏,可同时检测数十个甚至上百个样品,不需要昂贵的仪

器设备和专业的分析人员,特别适合企业进行现场监测,易于推广。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种同时检测磺胺药物和喹诺酮药物的酶联免疫试剂盒,包括包被原、检测抗体和酶标抗体;

[0007] 所述包被原为磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物的混合物、

[0008] 所述检测抗体为磺胺药物的特异性抗体和喹诺酮药物的特异性抗体的混合物;

[0009] 所述酶标抗体为如下 1) 或 2) 的酶标记的抗抗体组合物:

[0010] 1) 辣根过氧化物酶标记的抗所述磺胺药物的特异性抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗所述喹诺酮药物的特异性抗体的抗抗体;

[0011] 2) 辣根过氧化物酶标记的抗所述喹诺酮药物的特异性抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗所述磺胺药物的特异性抗体的抗抗体。

[0012] 在上述试剂盒中,所述磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物包被于同一酶标板上,也可以分别独立包装,在使用时包被于同一酶标板上。

[0013] 在上述试剂盒中,所述磺胺药物的特异性抗体和所述喹诺酮药物的特异性抗体混合包装于同一溶液中,也可以分别独立包装,在使用时混合加入。

[0014] 在上述试剂盒中,所述酶标记的抗抗体组合物混合包装于同一溶液中,也可以分别独立包装,在使用时混合加入。

[0015] 在上述试剂盒中,所述磺胺药物的特异性抗体为所述磺胺药物的单克隆抗体;和/或,所述喹诺酮药物的特异性抗体为所述喹诺酮药物的单克隆抗体。

[0016] 在上述试剂盒中,所述磺胺药物的单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3393 的磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs 分泌产生,对磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪和磺胺对甲氧嘧啶有交叉反应;

[0017] 和/或,所述喹诺酮药物的单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3779 的诺氟沙星单克隆抗体杂交瘤细胞株 QNs 分泌产生,对诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、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有交叉反应。

[0018] 在上述试剂盒中,所述磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物为磺胺二甲基嘧啶半抗原与卵清蛋白的偶联物,所述喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物为诺氟沙星半抗原与卵清蛋白的偶联物。

[0019] 在上述试剂盒中,还含有 6 种标准品溶液,所述 6 种标准品溶液的溶剂为 PBS 缓冲液,溶质为磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星;所述溶质在所述 6 种标准品溶液中的浓度分别为 $0\ \mu\text{g/L}$ 和 $0\ \mu\text{g/L}$, $0.5\ \mu\text{g/L}$ 和 $0.3\ \mu\text{g/L}$, $1.5\ \mu\text{g/L}$ 和 $0.9\ \mu\text{g/L}$, $4.5\ \mu\text{g/L}$ 和 $2.7\ \mu\text{g/L}$, $13.5\ \mu\text{g/L}$ 和 $8.1\ \mu\text{g/L}$, $40.5\ \mu\text{g/L}$ 和 $24.3\ \mu\text{g/L}$;所述 PBS 缓冲液的溶剂为水,溶质为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾和氯化钠,所述溶质在所述 PBS 缓冲液中的浓度分别为 0.27g/L 、 1.13g/L 、 0.2g/L 和 8.8g/L , pH 值为 7.4。

[0020] 在上述试剂盒中,还可含有样品稀释液和/或样品提取液和/或浓缩洗涤液和/

或底物显色液和 / 或终止液 ;

[0021] 所述样品稀释液为 PBS 缓冲液 ;

[0022] 所述样品提取液的溶剂为所述 PBS 缓冲液, 溶质为吐温 20, 所述溶质在所述样品提取液中的浓度为 2mL/L ;

[0023] 所述浓缩洗涤液的溶剂为所述 PBS 缓冲液, 溶质为吐温 20 和叠氮化钠, 所述溶质在所述浓缩洗涤液中的浓度分别为 10mL/L 和 5g/L ;

[0024] 所述底物显色液为独立包装的底物显色液 A 和独立包装的底物显色液 B 和 / 或独立包装的底物显色液 C ; 所述底物显色液 A 为 2g/mL 过氧化脲水溶液 ; 所述底物显色液 B 为 1g/mL 四甲基联苯胺水溶液 ; 所述底物显色液 C 为 0.05mol/L 对硝基磷酸苯酯水溶液 ;

[0025] 所述终止液为独立包装的终止液 A 和 / 或独立包装的终止液 B ; 所述终止液 A 为 0.2mol/L 的磷酸氢二钠水溶液 ; 所述终止液 B 为 1.0mol/L 的硫酸水溶液。

[0026] 本发明的另一个目的是提供一种同时检测样品中磺胺药物和喹诺酮药物的方法, 包括如下步骤 :

[0027] 1) 对样品进行前处理获得所述样品的溶液 ;

[0028] 2) 用上述任一所述试剂盒进行检测 ;

[0029] 3) 分析检测结果。

[0030] 在上述方法中, 所述用试剂盒进行检测包括如下步骤 : 向包被有所述磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物的酶标板中加入标准品溶液或所述样品的溶液 ; 再加入含磺胺药物的特异性抗体和喹诺酮药物的特异性抗体的溶液 ; 温育后洗涤拍干, 加入所述酶标记抗抗体组合物, 先用碱性磷酸酶的底物显色、终止并用酶标仪测定吸光值 ; 再用辣根过氧化物酶的底物显色、终止并用酶标仪测定吸光值。

[0031] 在上述方法中, 所述对样品进行前处理根据样品的不同, 前处理方法不同, 具体如下 :

[0032] 1) 当所述样品为肉样或鸡蛋时, 所述前处理包括将所述样品均质后与样品提取液混合离心后, 取上清获得所述样品的溶液 ; 所述混合的比例具体可为每克所述样品与 20 毫升所述样品提取液混合 ;

[0033] 2) 当所述样品为牛奶时, 所述前处理包括将所述样品离心后的中间层液体与样品稀释液混合, 获得所述样品的溶液 ; 所述混合的比例具体可为每毫升所述中间层液体与 4 毫升所述样品稀释液混合。

[0034] 在上述方法中, 所述样品提取液的溶剂为所述 PBS 缓冲液, 溶质为吐温 20, 所述溶质在所述样品提取液中的浓度为 2mL/L ;

[0035] 所述样品稀释液为 PBS 缓冲液, 溶剂为水, 溶质为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾和氯化钠, 所述溶质在所述 PBS 缓冲液中的浓度分别为 0.27g/L、1.13g/L、0.2g/L 和 8.8g/L, pH 值为 7.4。

[0036] 本发明试剂盒检测的原理 : 一种可同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的双色联合的间接竞争 ELISA 法, 此法以磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物与喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物混合并包被酶标板, 以磺胺药物单克隆抗体及喹诺酮药物单克隆抗体的混合液作为第一抗体, 以标记有辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体及标记有碱性磷酸酶 (AP) 的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体的混合液作为第二抗体, 进

行显色反应时首先加入 AP 的底物对硝基磷酸苯酯,用 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4 终止反应,并测 405nm 处吸光度值,以检测喹诺酮类药物,而后用缓冲溶液洗酶标板 1 次,再加入 HRP 的底物四甲基联苯胺,以 1.0mol/L H_2SO_4 终止反应,测 450nm 处吸光度值,以检测磺胺药物;也可以根据显色的深浅来判断样品中磺胺药物和喹诺酮药物的含量,如果样品中的游离磺胺药物和喹诺酮药物的量少,显色深,反之,则显色浅。以此种方法进行的磺胺药物和喹诺酮药物的检测,其结果互不干扰。

[0037] 实验证明,本发明试剂盒可检出待测样品中的磺胺药物有磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉、磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪或磺胺对甲氧嘧啶,喹诺酮药物有诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、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;可检测的样品包括猪肉、鸡肉、牛肉、鱼肉、虾肉、鸡蛋和牛奶,检测猪肉、鸡肉、牛肉、鱼肉和虾肉中磺胺药物的最低检测限为 1ng/g,鸡蛋为 5ng/g,牛奶为 5ng/mL;检测猪肉、鸡肉、牛肉、鱼肉和虾肉中喹诺酮药物的最低检测限为 1ng/g,鸡蛋为 2.5ng/g,牛奶为 5ng/mL,变异系数均小于 20%,稳定性很好。本发明的试剂盒及方法可用于食品生产企业的自我质量控制,食品安全监督和检测机构的常规筛查,还可用于科研中动物药理和毒理学研究的辅助手段。

附图说明

[0038] 图 1 为实施例 1 试剂盒检测磺胺二甲基嘧啶含量的标准曲线。其中,横坐标为各标准品溶液中磺胺二甲基嘧啶浓度($\mu\text{g/L}$),纵坐标为百分吸光度值(%)。

[0039] 图 2 为实施例 1 试剂盒检测诺氟沙星含量的标准曲线。其中,横坐标为各标准品溶液中诺氟沙星浓度($\mu\text{g/L}$),纵坐标为百分吸光度值(%)。

具体实施方式

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 下述实施例中所用的药物购自 Sigma-Aldrich。

[0043] 下述实施例如无特别说明,所用的 PBS 缓冲液组成如下:溶剂为水,溶质为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾和氯化钠,所述溶质在所述 PBS 缓冲液中的浓度分别为 0.27g/L、1.13g/L、0.2g/L 和 8.8g/L, pH 值为 7.4。

[0044] 实施例 1、制备同时检测磺胺和喹诺酮药物的酶联免疫试剂盒

[0045] 该试剂盒组成如下:酶标板(同时包被磺胺药物与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物)、抗体工作液(含磺胺药物单克隆抗体和喹诺酮药物单克隆抗体)、酶标抗抗体工作液(含辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体)、浓缩洗涤液、样品稀释液、样品提取液、含不同梯度浓度磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星的标准品溶液 1-6、底物显色液 A、底物显色液 B、底物显色液 C、终止液 A 和终止液 B。

[0046] 制备方法如下:

[0047] 一、酶标板的制备

[0048] 1、磺胺二甲基嘧啶(SM_2)包被原的制备

[0049] 以磺胺二甲基嘧啶(SM₂)作为磺胺二甲基嘧啶半抗原。

[0050] 1)取 104mg 磺胺二甲基嘧啶(SM₂),加入 8mL 0.25mol/L 的硫酸水溶液中,置于 4℃ 冰箱,形成溶液 I (含 SM₂);

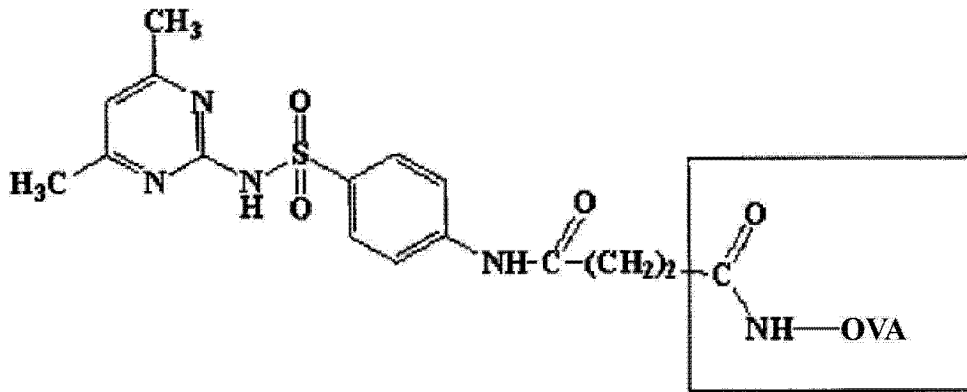
[0051] 2)取 200mg 的卵清蛋白(OVA)溶于 8mL 的 Na₂CO₃溶液中(pH=10),置于 4℃ 冰箱,形成溶液 II (含 OVA);

[0052] 3)取 38mg NaNO₂加入 2mL 水,得到溶液 III (含 NaNO₂);

[0053] 4)将溶液 III (含 NaNO₂)缓慢加入到溶液 I (含 SM₂)中,在此过程中,溶液 I (含 SM₂)置于碎冰中,大概 15min,得到溶液 IV (含 SM₂-NaNO₂混合物);

[0054] 5)将溶液 IV (含 SM₂-NaNO₂混合物)缓慢加入到溶液 II (含 OVA)的烧杯中,并摇动烧杯,此时有红色物生成;6min 后,将烧杯置于磁力搅拌器上,室温慢速搅拌,继续加溶液 IV (含 SM₂-NaNO₂混合物);在搅拌过程中,检测 pH 值,使之保持在 9-10 之间,最终溶液变成暗红色液体;室温继续搅拌 4h;装入透析袋,生理盐水透析。得到磺胺二甲基嘧啶与卵清蛋白的偶联物,即为磺胺二甲基嘧啶(SM₂)包被原,其结构式如式 I 所示。

[0055]



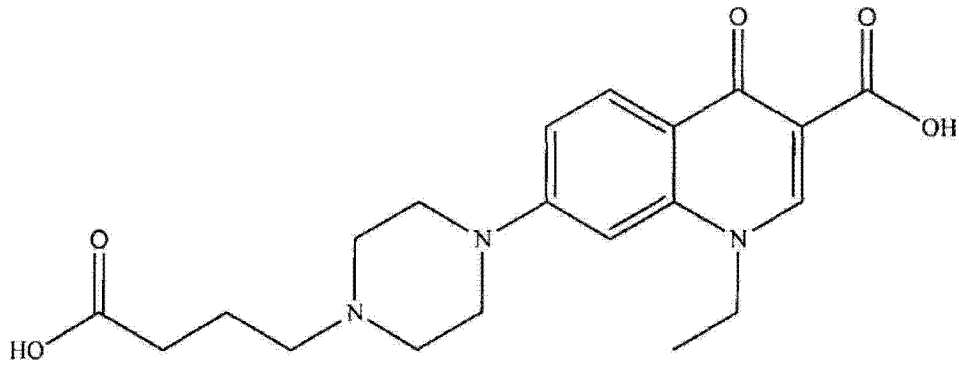
(式 I)

[0056] 2、诺氟沙星(NOR)包被原的制备

[0057] 1) 诺氟沙星(NOR)的哌嗪环仲氨基与 4-溴丁酸乙酯结合来制备 NOR 半抗原:将 320mg NOR 与 143 μL 4-溴丁酸乙酯共溶于 100mL 二甲基亚砜中,再加入 700mg 碳酸钾和 30mg 碘化钠,70℃ 回流 3 天,再静置 1 天;然后加水 400mL,用 100mL 2× 乙酸乙酯萃取,萃取相经水洗涤、无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压蒸干,得浅黄色粘稠状液体。

[0058] 酯的碱性水解:在上述黄色粘稠状液体中加入 1M 氢氧化钠 2mL,再加入 500 μL 乙醇助溶,70℃ 反应 8h (溶液由浑浊变为浅黄色澄清液体,说明水解成功),用盐酸调节 pH 为 7 左右。用氮气吹干上述溶液,冷冻干燥过夜,得到诺氟沙星半抗原,其结构式如式 II 所示。

[0059]

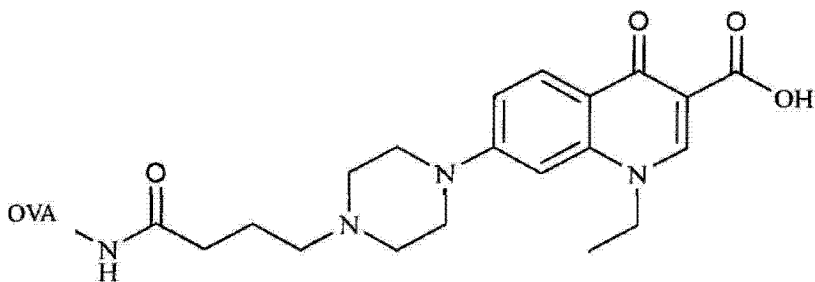


(式II)

[0060] 2) 包被原的制备:采用活性酯法将诺氟沙星半抗原和卵清蛋白(OVA)偶联,得到诺氟沙星(NOR)包被原,具体步骤如下:

[0061] 70mg 卵清蛋白(OVA)溶于 1mL 0.01M PBS 缓冲液(pH7.2)中,再加入 30mg EDC, 25℃搅拌 8h,称为 A 液。将步骤 1)获得的 40mg 诺氟沙星半抗原溶于 1mL 0.01M PBS 缓冲液(pH7.2)中,称为 B 液。将 B 液加入到 A 液中得到混合物。将混合物 25℃搅拌反应 12h。反应后的溶液转移到透析袋中,用 0.01M PBS 缓冲液(pH7.2)透析 3 天,期间换 3 次透析液。透析后,离心除去残余的沉淀,取上清液得到诺氟沙星(NOR)包被原(-20℃保存),其结构式如式III所示。

[0062]



(式III)

[0063] 3、酶标板的制备

[0064] 用包被缓冲液将步骤 1 和步骤 2 得到的包被原分别稀释成 10.0 μg/mL 和 0.08 μg/mL,每孔加入 2 种包被原各 50 μL,37℃温育 2h,倾去包被液,用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后每孔加入 150 μL 封闭液,37℃温育 1h,倾去孔内液体,干燥后获得包被有两种包被原(磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物)的酶标板,用铝膜真空密封保存。

[0065] 包被缓冲液:pH9.6、0.03mol/L 的碳酸钠缓冲液;

[0066] 封闭液:含有 0.5% 马血清、1%叠氮化钠和 3% 酪蛋白的磷酸盐缓冲溶液。

[0067] 二、抗体工作液的制备

[0068] 1、磺胺药物的单克隆抗体由 2009 年 11 月 3 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编 100101)保藏编号为 CGMCC No. 3393 的磺胺类单克隆抗体杂交瘤细胞株 SAs 分泌产生。

[0069] 2、喹诺酮药物的单克隆抗体由 2010 年 4 月 12 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编 100101)保藏编号为 CGMCC No. 3779 的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 分泌产生。

[0070] 3、单克隆抗体的纯化

[0071] 分别取液氮冻存的上述杂交瘤细胞株 SAs CGMCC No. 3393 和杂交瘤细胞株 QNs CGMCC No. 3779 的细胞悬液进行纯化, 获得纯化的磺胺药物的单克隆抗体或喹诺酮药物的单克隆抗体, 具体步骤如下:

[0072] a) 取液氮冻存的杂交瘤细胞株的细胞悬液, 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] b) 增量培养法将经步骤 1) 培养的杂交瘤细胞置于细胞培养基中, 在 37℃ 条件下进行培养, 用下述辛酸 - 饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化, 得到单克隆抗体, -20℃ 保存。

[0074] 所述细胞培养基为向 RPMI-1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠得到的细胞培养基, 是小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (体积百分含量), 使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量); 所述细胞培养基的 pH 为 7.4;

[0075] 所述辛酸 - 饱和硫酸铵法: 1) 50% 饱和度盐析: 取上述细胞培养基 5mL, 加等体积的 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液混匀, 然后逐渐滴加等体积的饱和硫酸铵 (pH7.4) 溶液 (使硫酸铵溶液的饱和度达到 50%), 边加边搅拌, 室温放置 30min, 3000g 离心 30min, 弃上清液留沉淀。2) 33% 饱和度盐析: 在步骤 1) 得到的沉淀中分别加入 5mL 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液溶解沉淀, 再加饱和硫酸铵溶液达到 33% 饱和度, 边加边搅拌, 室温放置 30min, 弃上清液留沉淀。重复操作 2 次。3) 脱盐: 取 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液溶解步骤 2) 得到的沉淀, 装于透析袋中, 悬于盛有 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液的烧杯中脱盐, 放置于 4℃, 每天换液 3-4 次, 1%BaCl₂ 检测直至透析液中无硫酸银离子为止。4) 透析完毕, 3000g 离心 5min, 取上清得到纯化的磺胺药物的单克隆抗体或喹诺酮药物的单克隆抗体。

[0076] 利用棋盘法进行单抗效价的测定, 结果表明: 磺胺药物单克隆抗体的效价为 3.5×10^6 , 半数抑制量 (IC₅₀) 为 2.5 μg/L; 喹诺酮药物的单克隆抗体的效价为 1.6×10^7 , 半数抑制量 (IC₅₀) 为 1.0 μg/L。

[0077] 4、抗体工作液的制备

[0078] 将步骤 3 获得的磺胺药物的单克隆抗体和喹诺酮药物的单克隆抗体用抗体稀释液稀释 1000 倍, 获得同时含有磺胺药物的单克隆抗体和喹诺酮药物的单克隆抗体的抗体工作液。

[0079] 所述抗体稀释液是含 3% 小牛血清的柠檬酸盐缓冲液 (0.05-0.1mol/L, pH 8.2)。

[0080] 三、酶标抗抗体工作液的制备

[0081] 1、制备抗抗体

[0082] 分别以步骤二中 3 获得的磺胺药物的单克隆抗体和喹诺酮药物的单克隆抗体为免疫原, 以山羊为免疫动物, 分别得到抗磺胺药物的单克隆抗体的羊抗鼠抗抗体和抗喹诺酮药物的单克隆抗体的羊抗鼠抗抗体。

[0083] 2、制备辣根过氧化物酶标记的抗抗体

[0084] 采用改良的过碘酸钠法将步骤 1 得到的抗磺胺药物的单克隆抗体的抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联, 步骤如下:

[0085] 取 8mg 辣根过氧化物酶 (天津希恩思生化科技有限公司, 编号 A-08011) 溶解于 2mL 蒸馏水中; 加入现配制的 100mmol/L NaIO₄ 溶液 0.4mL, 室温搅拌反应 20min; 用 1mmol/

L 醋酸盐缓冲液于 4℃ 透析过夜；除去多余的 NaIO_4 ，同时使自身偶联的酶还原；加入 40 μL 醋酸盐缓冲液 (pH8.6, 0.5mol/L) 和 2.0mL 含有 16mg 抗磺胺药物的单克隆抗体的抗抗体的磷酸盐缓冲液 (pH8.6, 5mol/L)，室温搅拌反应 4 小时；加入 0.1mL 现配制的 1mol/L NaBH_4 水溶液，4℃ 反应 4 小时，以还原 Schiff 碱；纯化保存。

[0086] 3、制备碱性磷酸酶标记的抗抗体

[0087] 采用戊二醛交联法将步骤 1 得到的抗喹诺酮药物的单克隆抗体的抗抗体与碱性磷酸酶 (AP) 进行偶联，步骤如下：

[0088] 取 1mL 含 2 ~ 5mg 步骤 1 得到的抗喹诺酮药物的单克隆抗体的抗抗体的磷酸盐缓冲液 (pH8.6, 5mol/L)，加入碱性磷酸酶 AP (天津希恩思生化科技有限公司，编号 A-08012) 5mg 溶解；用 0.01mol/L、pH 7.2PBS 4℃ 透析 18h，换液 3 次；加入 2.5% 戊二醛 20 μL ，室温放置 2h；用 0.01mol/L、pH7.2 PBS 4℃ 透析过夜，换液 3 次；用 0.05mol/L、pH8.0 Tris-HCl 缓冲液 4℃ 透析过夜，换液 3 次；用含 0.2% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.02% NaN_3 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 4mL，再加入 1/3 体积的纯甘油，4℃ 分装保存。

[0089] 4、酶标抗抗体工作液的制备

[0090] 将步骤 3 获得的辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物的单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物的单克隆抗体的抗抗体用抗抗体稀释液稀释 500 倍，获得同时含有辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物的单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物的单克隆抗体的抗抗体的酶标抗抗体工作液；

[0091] 所述抗抗体稀释液是含 3% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 (5mol/L, pH8.6)。

[0092] 四、标准品溶液的制备

[0093] 含不同梯度浓度磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星的标准品溶液 1-6 的溶剂为 PBS 缓冲液，溶质及其浓度为磺胺二甲基嘧啶 0-40.5 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 0-24.3 $\mu\text{g/L}$ ，具体如下：

[0094] 标准品溶液 1 为含磺胺二甲基嘧啶 0 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 0 $\mu\text{g/L}$ 的 PBS 缓冲液；

[0095] 标准品溶液 2 为含磺胺二甲基嘧啶 0.5 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 0.3 $\mu\text{g/L}$ 的 PBS 缓冲液；

[0096] 标准品溶液 3 为含磺胺二甲基嘧啶 1.5 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 0.9 $\mu\text{g/L}$ 的 PBS 缓冲液；

[0097] 标准品溶液 4 为含磺胺二甲基嘧啶 4.5 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 2.7 $\mu\text{g/L}$ 的 PBS 缓冲液；

[0098] 标准品溶液 5 为含磺胺二甲基嘧啶 13.5 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 8.1 $\mu\text{g/L}$ 的 PBS 缓冲液；

[0099] 标准品溶液 6 为含磺胺二甲基嘧啶 40.5 $\mu\text{g/L}$ 和诺氟沙星 24.3 $\mu\text{g/L}$ 的 PBS 缓冲液。

[0100] 五、其它试剂的制备

[0101] 样品稀释液：为 PBS 缓冲液；

[0102] 样品提取液：溶剂为 PBS 缓冲液，溶质为吐温 20，所述溶质在所述样品提取液中的浓度为 2mL/L；

[0103] 浓缩洗涤液：溶剂为 PBS 缓冲液，溶质为吐温 20 和叠氮化钠，所述溶质在所述浓缩洗涤液中的浓度分别为 10mL/L 和 5g/L；

- [0104] 底物显色液 A :浓度为 2g/mL 的过氧化脲水溶液 ;
- [0105] 底物显色液 B :浓度为 1g/mL 的四甲基联苯胺水溶液 ;
- [0106] 底物显色液 C :浓度为 0.05mol/L 的对硝基磷酸苯酯水溶液 ;
- [0107] 终止液 A :浓度为 0.2mol/L 的磷酸氢二钠水溶液 ;
- [0108] 终止液 B :浓度为 1.0mol/L 的硫酸水溶液。
- [0109] 实施例 2、实施例 1 试剂盒的使用方法
- [0110] 一、样品的前处理
- [0111] 1、肉样或鸡蛋检测样本溶液的获得 :准确称取 1 ± 0.01 g 均质后的肉样或鸡蛋样品于 50mL 离心管中 ;加入 20mL 样品提取液 ;室温 (23-27℃) 下,高速涡动 1min ;4000g 以上,离心 10min ;取 50 μ L 上清即可进行分析。
- [0112] 2、牛奶检测样本溶液的获得 :取牛奶样本 3000g 以上离心 10min,轻吸中间层,用样品稀释液稀释 5 倍,取 50 μ L 即可进行分析。
- [0113] 二、使用实施例 1 试剂盒检测
- [0114] 1、取酶标板(同时包被磺胺药物与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物)插入酶标板架上,并记录下各标准品和样品的位置,每个样品做 3 个平行,未使用的酶标板条用自封袋密封后,立即保存于 2-8℃ 环境中 ;
- [0115] 2、将 50 μ L 各标准品溶液或样品溶液分别加入对应的标准品或样品孔中 ;
- [0116] 3、在每个板孔中加入 50 μ L 抗体工作液(含磺胺药物的单克隆抗体和喹诺酮药物的单克隆抗体) ;
- [0117] 4、盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板 10s,充分混匀,室温 (23-27℃) 避光反应 30min ;
- [0118] 5、揭开盖板膜,倒掉板孔中液体,每孔加入 260 μ L 洗涤工作液(浓缩洗涤液用去离子水稀释 20 倍),浸泡 15-30s ;重复 3 次 ;
- [0119] 6、倒掉板孔中液体,将酶标板倒置于吸水纸上,拍干 ;
- [0120] 7、立即在各板孔中加入 100 μ L 酶标抗体工作液(含辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体) ;盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板 10s,充分混匀,室温 (25 \pm 2℃),避光反应 30min ;
- [0121] 8、重复步骤 5-6 ;
- [0122] 9、立即在每孔中加入 100 μ L 底物显色液 C (浓度为 0.05mol/L 的对硝基磷酸苯酯水溶液) ;盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板 10s,充分混匀,室温下 (25 \pm 2℃),避光反应 15-20min ;
- [0123] 10、揭开盖板膜,在各板孔中加入 50 μ L 终止液 A(浓度为 0.2mol/L 的磷酸氢二钠水溶液),轻轻振荡酶标板 10s,充分混匀 ;
- [0124] 11、用酶标仪在 405nm 下检测吸光度值(记为 B1),在 5min 内读取,以检测喹诺酮药物总量 ;
- [0125] 12、弃去孔内液体,用洗涤工作液(浓缩洗涤液用去离子水稀释 20 倍)洗酶标板 4 次 ;
- [0126] 13、加入 100 μ L 辣根过氧化物酶的底物显色液 [即底物显色液 A (浓度为 2g/mL 的过氧化脲水溶液)和底物显色液 B (浓度为 1g/mL 的四甲基联苯胺水溶液)按体积 1:1 混合,必须充分混匀,混合液在 5min 内使用,避免使用金属盛装、搅拌试剂] ;盖好盖板膜,轻

轻振荡酶标板 10s,充分混匀,室温下(25±2℃),避光反应 15-20min;

[0127] 14、揭开盖板膜,加入 50 μL 终止液 B(浓度为 1.0mol/L 的硫酸水溶液),轻轻振荡酶标板 10s,充分混匀;

[0128] 15、用酶标仪在测 450nm 下检测吸光度值(记为 B2),在 5min 内读取,以检测磺胺类药物总量。

[0129] 三、分析检测结果

[0130] 1、计算百分吸光度值

[0131] 将各标准品溶液(或样品溶液)的平均吸光度值 B1 和 B2,除以标准品溶液 1 的吸光度值 B₀,乘以 100%,得到百分吸光度值(%)。

[0132] 2、制作标准曲线

[0133] 以各标准品溶液中磺胺二甲基嘧啶浓度(μg/L)为横坐标,相应的百分吸光度值(%)为纵坐标,绘制标准曲线图。得到的标准曲线如图 1 所示。

[0134] 以各标准品溶液中诺氟沙星浓度(μg/L)为横坐标,相应的百分吸光度值(%)为纵坐标,绘制标准曲线图。得到的标准曲线如图 2 所示。

[0135] 3、计算样品中磺胺类药物和喹诺酮药物的含量

[0136] 将各样品的百分吸光度值(%)代入步骤 2 相应的标准曲线中,得出各样品中磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星的浓度,再乘以相应样品的稀释倍数,即可得到样品中磺胺类药物和喹诺酮类药物的含量。

[0137] 实施例 3、实施例 1 试剂盒的特异性、灵敏度和精密度检测

[0138] 一、特异性检测(交叉反应率)

[0139] 1、在实施例 1 试剂盒的酶标板中每孔加入 50 μL 磺胺二甲基嘧啶的结构类似物标准品溶液(溶剂为 PBS 缓冲液,磺胺二甲基嘧啶的结构类似物的浓度分别为 0.5 μg/L、1.5 μg/L、4.5 μg/L、13.5 μg/L、40.5 μg/L,将只加入 PBS 缓冲液的孔作为对照孔)或诺氟沙星的结构类似物标准品溶液(溶剂为 PBS 缓冲液,诺氟沙星的结构类似物的浓度分别为 0.3 μg/L、0.9 μg/L、2.7 μg/L、8.1 μg/L、24.3 μg/L,将只加入 PBS 缓冲液的孔作为对照孔),每个浓度设置 3 个复孔。磺胺二甲基嘧啶的结构类似物和喹诺酮的结构类似物如表 1 所示。

[0140] 2、同实施例 2 步骤二中的步骤 3 至步骤 15,其中,记录磺胺二甲基嘧啶的结构类似物标准品溶液经实施例 1 试剂盒检测获得的吸光度值 B2,记录诺氟沙星的结构类似物标准品溶液经实施例 1 试剂盒检测获得的吸光度值 B1。

[0141] 3、将采用各个浓度的结构类似物得到的对应的吸光值(三个复孔的平均值)除以对照孔的吸光值再乘以 100 作为纵坐标,以各个标准品溶液中的结构类似物浓度(μg/L)的半对数值为横坐标绘制曲线图。对照曲线图,得到纵坐标数值等于 50% 时对应的结构类似物浓度(μg/L),即结构类似物的 IC₅₀值。

[0142] 用下式分别计算实施例 1 试剂盒对磺胺二甲基嘧啶和喹诺酮结构类似物的交叉反应率,结果如表 1 所示。

[0143]

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{检测磺胺二甲基嘧啶的IC}_{50}\text{值}}{\text{检测磺胺二甲基嘧啶结构类似物的IC}_{50}\text{值}} \times 100\%$$

[0144]

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{检测喹诺酮的IC}_{50}\text{值}}{\text{检测喹诺酮结构类似物的IC}_{50}\text{值}} \times 100\%$$

[0145] 对照 A :将步骤 1 中实施例 1 试剂盒的酶标板替换为只包被磺胺二甲基嘧啶半抗原和载体蛋白的偶联物的酶标板,将抗体工作液中的两种单克隆抗体(含磺胺药物单克隆抗体和喹诺酮药物单克隆抗体)替换为含磺胺药物单克隆抗体,将酶标抗抗体工作液中的两种抗抗体(辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体)替换为辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体作为单独检测磺胺二甲基嘧啶的结构类似物交叉反应率的对照。结果如表 1 所示。

[0146] 对照 B :将步骤 1 中实施例 1 试剂盒的酶标板替换为只包被诺氟沙星半抗原和载体蛋白的偶联物的酶标板,将抗体工作液中的两种单克隆抗体(含磺胺药物单克隆抗体和喹诺酮药物单克隆抗体)替换为含喹诺酮药物单克隆抗体,将酶标抗抗体工作液中的两种抗抗体(辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体)替换为碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体作为单独检测诺氟沙星的结构类似物交叉反应率的对照。结果如表 1 所示。

[0147] 表 1. 实施例 1 试剂盒及对照的交叉反应率结果

[0148]

磺胺药物	购买途径	交叉反应率 (%)	
		实施例 1 试剂盒	对照 A
磺胺二甲基嘧啶 (SM2)	Sigma-Aldrich(货号: S6256)	100	100
磺胺甲恶唑 (SMZ)	梯希爱 (货号: S0361)	150	140
磺胺甲嘧啶 (SM1)	Sigma-Aldrich (货号: S8876)	200	210
磺胺间二甲氧嘧啶 (SDM)	Sigma-Aldrich (货号: S7385)	180	190
磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)	梯希爱 (货号: S0592)	310	300
磺胺喹恶啉 (SQX)	Sigma-Aldrich (货号: 45662)	210	200
磺胺嘧啶 (SD)	Sigma-Aldrich (货号: S8626)	470	480
磺胺甲氧哒嗪 (SMP)	Sigma-Aldrich (货号: S7257)	260	270
磺胺对甲氧嘧啶 (SMD)	Sigma-Aldrich (货号: S0383)	320	310
磺胺噻唑 (ST)	Sigma-Aldrich (货号: S9876)	23	20
磺胺醋酰 (SA)	Sigma-Aldrich (货号: 86020)	15	12
磺胺吡啶 (SPD)	Sigma-Aldrich (货号: S6252)	3	4
喹诺酮药物	购买途径	交叉反应率 (%)	
		实施例 1 试剂盒	对照 B
诺氟沙星	Sigma-Aldrich (货号: N9890)	100	100
环丙沙星	Sigma-Aldrich (货号: 32982)	170	160

[0149]

恩诺沙星	Sigma-Aldrich (货号: 17849)	95	100
氧氟沙星	Sigma-Aldrich (货号: 32436)	120	110
达氟沙星	Sigma-Aldrich (货号: 33700)	89	90
氟甲喹	Sigma-Aldrich (货号: F7016)	85	90
恶喹酸	Sigma-Aldrich (货号: BCR725)	95	100
麻保沙星	Sigma-Aldrich (货号: 34039)	85	90
氨氟沙星	湖北福德化工有限公司	130	120
培氟沙星	Sigma-Aldrich (货号: 32551)	190	200
依诺沙星	Sigma-Aldrich (货号: E3764)	60	50
二氟沙星	Sigma-Aldrich (货号: 33984)	<1	<1
沙拉沙星	Sigma-Aldrich (货号: 33497)	<1	<1
萘啶酸	Sigma-Aldrich (货号: N8878)	<1	<1

[0150] 二、对不同样品的灵敏度检测

[0151] 1、实施例 1 试剂盒

[0152] 取不含磺胺药物和喹诺酮药物的肉样(鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉和虾肉)、鸡蛋和牛奶,分别按照实施例 2 步骤一中的相应方法进行处理,获得肉样、鸡蛋和牛奶的样品溶液,对样品溶液进行 20 次检测,测定的标准值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0153] 结果:实施例 1 试剂盒检测磺胺药物的最低检测限肉样(鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉或虾肉)为 1ng/g,鸡蛋为 5ng/g,牛奶为 5ng/mL;喹诺酮药物的最低检测限肉样为 1ng/g,鸡蛋为 2.5ng/g,牛奶为 5ng/mL。

[0154] 2、对照 A

[0155] 将步骤 1 中实施例 1 试剂盒的酶标板替换为只包被磺胺二甲基嘧啶半抗原和载体蛋白的偶联物的酶标板,将抗体工作液中的两种单克隆抗体(含磺胺药物单克隆抗体和喹诺酮药物单克隆抗体)替换为含磺胺药物单克隆抗体,将酶标抗抗体工作液中的两种抗抗体(辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体)替换为辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体作为单独检测步骤 1 中各样品中磺胺药物的对照。

[0156] 结果:检测磺胺药物的最低检测限肉样(鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉或虾肉)为 1ng/g,鸡蛋为 5ng/g 和牛奶为 5ng/mL。

[0157] 3、对照 B

[0158] 将步骤 1 中实施例 1 试剂盒的酶标板替换为只包被诺氟沙星半抗原和载体蛋白的偶联物的酶标板,抗体工作液中的两种单克隆抗体(含磺胺药物单克隆抗体和喹诺酮药物单克隆抗体)替换为含喹诺酮药物单克隆抗体,将酶标抗抗体工作液中的两种抗抗体(辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物单克隆抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体)替换为碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物单克隆抗体的抗抗体作为单独检测步骤 1 中各样品中喹诺酮药物的对照。

[0159] 结果:喹诺酮药物的最低检测限肉样(鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉或虾肉)为 1ng/g,鸡

蛋为 3ng/g,牛奶为 4ng/mL。

[0160] 三、精密度检测

[0161] 1、标准溶液的精密度检测

[0162] 从 3 个不同批次的实施例 1 试剂盒中各抽取 10 个试剂盒,每个酶标板随机取 20 个微孔,按照实施例 2 的方法测定标准溶液(含 4.5 μg/L 磺胺二甲基嘧啶和 2.7 μg/L 诺氟沙星)的吸光度值,计算变异系数。实验设三次重复,结果如表 2 所示,结果表明,磺胺药物的变异系数范围在 5.5-16.3% 之间,喹诺酮药物的变异系数在 5.3%-14.6% 之间,符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0163] 变异系数(CV)=(测定结果的标准差/测定结果的平均值)×100%

[0164] 表 2. 实施例 1 试剂盒的可重复性检测(CV, %)

[0165]

试剂盒		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
批次 1	磺胺	7.9	8.2	11.2	16.3	13.4	9.8	10.5	11.2	13.1	14.1
	喹诺酮	6.9	10.8	9.7	12.1	10.2	6.5	7.9	5.3	9.1	11.2
批次 2	磺胺	8.5	7.9	5.5	6.8	11.1	10.2	15.5	12.0	14.0	8.8
	喹诺酮	7.3	8.9	11.3	6.7	8.4	12.4	10.7	9.6	8.4	9.6
批次 3	磺胺	6.8	7.2	10.5	6.5	12.3	9.2	15.1	10.2	13.1	8.6
	喹诺酮	10.1	8.2	6.4	14.6	11.8	9.7	7.5	8.3	11.5	8.8

[0166] 2、不同样品的精密度检测

[0167] 将不含磺胺药物和喹诺酮药物的肉样、鸡蛋和牛奶分别按照实施例 2 步骤一的相应方法进行处理后获得样品溶液,添加磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星,使二者的终浓度都为 10 μg/kg (或 μg/L)。从 3 个不同批次的实施例 1 试剂盒中各抽取 3 个试剂盒(即 3 个酶标板),每个实验重复 5 次,按照实施例 2 的方法获得各样品的吸光度值,计算变异系数。结果如表 3- 表 5 所示,猪肉、牛肉、鱼肉和虾肉的结果与鸡肉的结果无显著差异。

[0168] 表 3. 鸡肉的精密度试验(添加浓度 10 μg/kg)

[0169]

批次-药物	实测值 (μg/kg)	CV%
-------	-------------	-----

[0170]

1-磺胺	8.4	7.7	8.2	8.5	7.1	7.3
	8.4	8.4	7.7	8.6	7.2	7.3
	8.9	8.4	9.1	9.4	9.1	4.1
2-磺胺	6.9	7.2	7.9	7.0	7.2	5.4
	7.2	8.4	7.7	6.8	8.2	8.7
	7.9	9.1	7.9	7.2	8.5	8.8
3-磺胺	7.5	8.4	7.0	8.4	8.9	9.6
	8.4	7.9	8.9	8.9	7.2	8.8
	6.5	7.9	7.2	7.3	8.2	8.9
1-喹诺酮	8.1	8.9	9.4	7.7	9.5	9.1
	9.3	8.6	7.5	8.3	9.2	8.5
	7.6	8.7	9.5	9.2	7.7	10.1
2-喹诺酮	8.3	9.4	7.8	8.4	8.9	7.1
	7.6	8.5	9.4	7.5	9.7	11.8
	8.1	7.6	9.5	9.1	8.6	8.9
3-喹诺酮	8.3	8.7	7.6	9.7	9.2	9.3
	7.9	8.8	8.3	9.4	7.8	7.9
	9.3	8.6	7.8	9.3	8.8	7.1

[0171] 表 4. 鸡蛋的精密度试验(添加浓度 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$)

[0172]

批次-药物	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					CV%
1-磺胺	9.1	8.5	8.2	7.3	7.5	9.1
	8.8	8.1	8.5	7.9	8.6	4.4
	9.2	9.5	8.5	7.9	8.8	7.1
2-磺胺	9.0	7.9	8.1	9.2	8.5	6.6
	8.4	8.6	9.2	8.3	7.8	6.0
	6.9	7.7	8.5	8.3	8.7	9.1
3-磺胺	8.5	9.1	9.5	9.3	8.1	6.6
	8.0	7.7	9.5	8.5	8.8	8.3
	8.4	8.3	9.1	7.8	9.2	6.8
1-喹诺酮	8.0	7.0	8.3	8.8	7.5	8.6
	9.5	7.9	8.8	9.5	8.3	8.2
	9.3	8.5	9.5	8.3	8.8	5.9
2-喹诺酮	8.3	8.0	9.5	7.8	8.8	8.2
	7.8	7.0	7.8	9.2	7.5	10.5
	6.5	7.2	7.6	8.3	6.9	9.2
3-喹诺酮	8.0	7.0	8.3	8.8	7.5	8.6
	9.5	7.3	8.8	9.5	8.3	10.9
	7.5	6.8	8.5	8.8	7.0	11.6

[0173] 表 5 牛奶的精密度试验结果(添加浓度 $10 \mu\text{g}/\text{L}$)

[0174]

批次-药物	实测值 ($\mu\text{g}/\text{L}$)					CV%
1-磺胺	9.3	8.5	9.5	8.3	8.8	5.9
	8.3	8.0	9.5	7.8	8.8	8.2
	7.8	7.0	7.8	8.5	7.5	7.0
2-磺胺	6.9	7.2	6.8	8.3	8.2	9.4
	8.0	7.5	8.3	8.8	7.5	6.6
	9.5	8.2	8.8	9.5	8.3	7.2

[0175]

3-磺胺	7.8	7.0	8.5	8.8	7.3	9.5
	8.0	8.0	9.3	7.3	8.8	9.3
	9.3	7.5	7.8	7.5	8.5	9.4
1-喹诺酮	7.9	8.3	8.9	9.3	9.4	7.4
	9.1	7.8	8.6	7.9	8.4	6.4
	9.7	7.5	9.1	8.5	7.9	10.4
2-喹诺酮	8.1	8.3	7.8	9.4	9.2	8.2
	7.9	7.8	8.5	9.9	9.0	10.0
	9.7	9.2	8.4	7.8	8.6	8.4
3-喹诺酮	7.9	8.5	8.7	9.4	9.2	6.8
	8.5	8.9	9.7	7.9	8.3	7.9
	8.5	8.7	9.3	9.1	8.0	5.9

[0176] 四、准确率的测定

[0177] 向不含磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星的样品(牛奶、鸡肉、鸡蛋)中分别添加不同浓度的磺胺二甲基嘧啶和诺氟沙星,使磺胺二甲基嘧啶在样品(牛奶、鸡肉、鸡蛋)中的终浓度分别为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (L)、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (L),诺氟沙星的终浓度分别为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (L)、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (L);按照实施例 2 步骤一的相应方法进行处理后获得样品溶液,分别使用实施例 1 试剂盒,按照实施例 2 的方法进行检测。每个浓度做 4 个平行,分别计算回收率(回收率 = 实测值 / 添加值)。结果见表 6、表 7,猪肉、牛肉、鱼肉和虾肉的结果与鸡肉的结果无显著差异。

[0178] 表 6. 实施例 1 试剂盒的磺胺二甲基嘧啶样本回收率测定

样品		牛奶 ($\mu\text{g}/\text{L}$)		鸡肉 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		鸡蛋 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
添加浓度		10.0	20.0	10.0	20.0	10.0	20.0	
[0179]	回收率 (%)	重复 1	84.3	89.2	85.2	72.6	82.6	79.5
		重复 2	92.1	81.6	90.5	79.5	91.5	85.2
		重复 3	89.7	86.5	90.0	85.1	101.2	98.5
		重复 4	92.1	84.7	82.3	85.3	89.5	94.1
平均值		89.6	85.5	87.0	80.6	91.2	89.3	

[0180] 表 6 结果表明,牛奶样品磺胺二甲基嘧啶的添加回收率在 81.6%–92.1% 之间;鸡肉样品的磺胺二甲基嘧啶的添加回收率在 72.6%–90.5% 之间;鸡蛋样品的磺胺二甲基嘧啶的添加回收率在 79.5%–101.2% 之间。

[0181] 表 7. 实施例 1 试剂盒的诺氟沙星样本回收率测定

样品		牛奶 ($\mu\text{g}/\text{L}$)		鸡肉 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		鸡蛋 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
添加浓度		20.0	100.0	20.0	100.0	20.0	100.0	
[0182]	回收率 (%)	重复 1	82.6	92.1	80.8	94.5	90.8	83.4
		重复 2	96.5	82.1	75.2	83.4	79.6	99.1

[0183]	重复 3	71.1	70.4	87.4	87.6	97.2	85.2
	重复 4	86.5	84.2	76.3	81.7	85.6	78.9
	平均值	84.2	82.2	79.9	86.8	88.3	86.7

[0184] 表 7 结果表明,牛奶样品诺氟沙星的添加回收率在 70.4%–96.5% 之间;鸡肉样品诺氟沙星的添加回收率在 75.2%–94.5% 之间,鸡蛋样品诺氟沙星的添加回收率在 78.9%–99.1% 之间。

[0185] 五、试剂盒的保存期试验

[0186] 实施例 1 试剂盒的保存条件为 2–8℃,经过 12 个月的测定,试剂盒的最大吸光度(零标准)、50% 抑制浓度、磺胺药物和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℃ 条件下放置 8 天,进行加速老化试验,结果表明该试剂盒的上述步骤一至四的各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒在 –20℃ 条件下放置 8 天,上述步骤一至四的各项指标完全符合要求。从以上结果可以得出,实施例 1 的试剂盒可以在 2–8℃ 至少保存 12 个月。

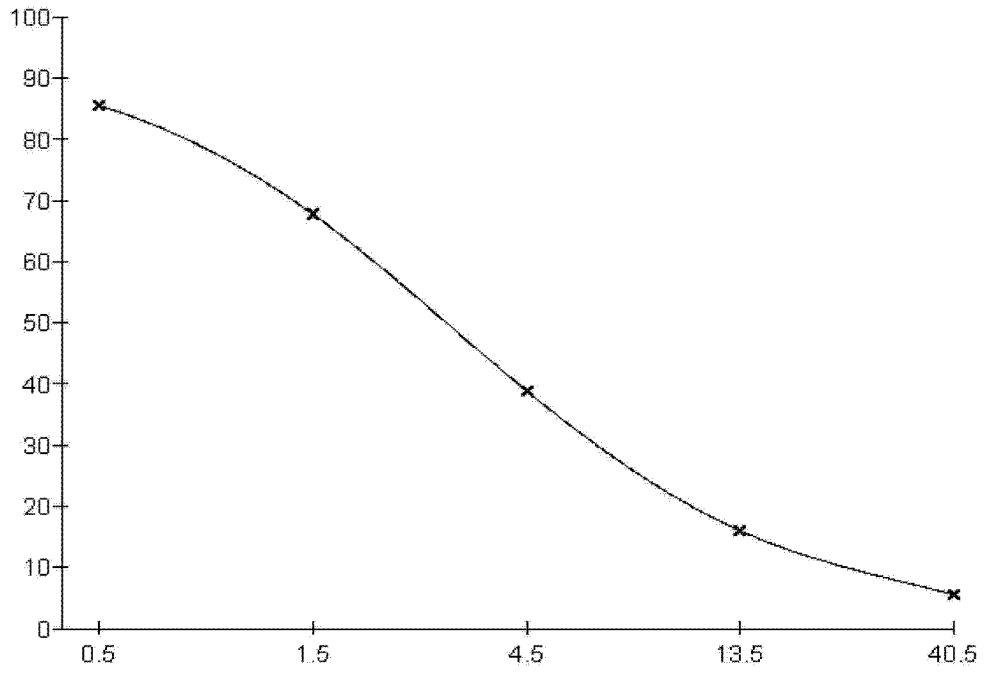


图 1

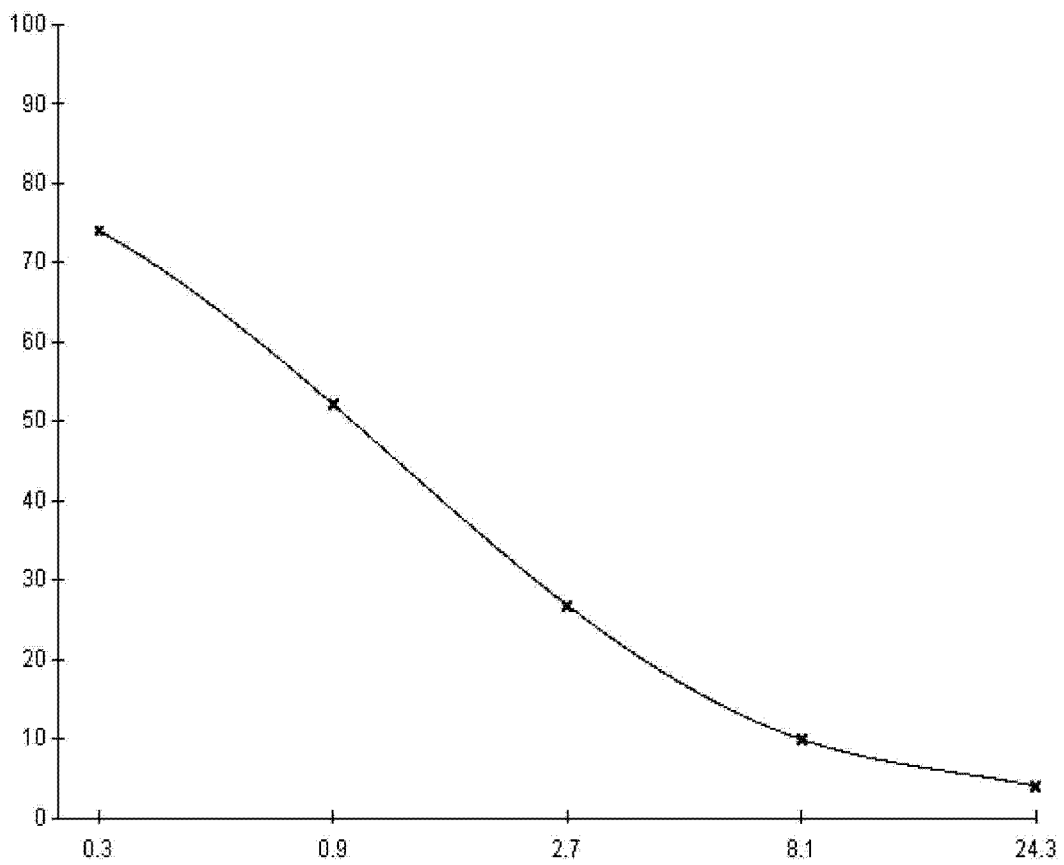
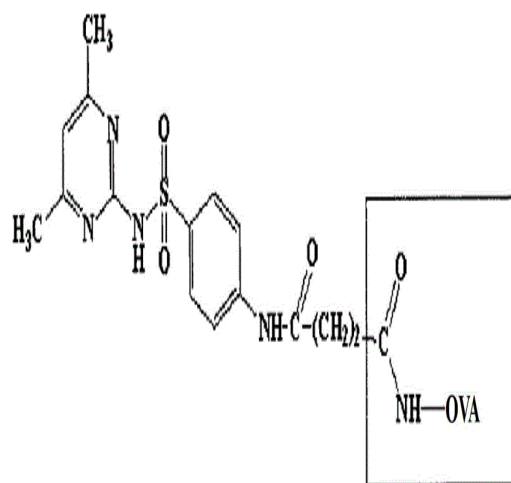


图 2

专利名称(译)	同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的ELISA方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN102928597B	公开(公告)日	2015-06-10
申请号	CN201210421847.8	申请日	2012-10-30
[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	吴小平 王世恩 杨铮 何丹婷 苏丽芳 李淑芳		
发明人	吴小平 王世恩 杨铮 何丹婷 苏丽芳 李淑芳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
代理人(译)	关畅		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN102928597A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种同时检测磺胺类和喹诺酮类药物的ELISA方法及其试剂盒。本发明所提供的试剂盒是以磺胺药物半抗原与载体蛋白的偶联物和喹诺酮药物半抗原与载体蛋白的偶联物为包被原，以磺胺药物的特异性抗体和喹诺酮药物的特异性抗体的混合物为检测抗体，以辣根过氧化物酶标记的抗磺胺药物的特异性抗体的抗抗体和碱性磷酸酶标记的抗喹诺酮药物的特异性抗体的抗抗体为酶标二抗。本发明的方法是使用所述试剂盒并在显色时先用碱性磷酸酶的底物显色再用辣根过氧化物酶的底物显色，可一次同时检出磺胺和喹诺酮药物。本发明可用于食品生产企业的自我质量控制，食品安全监督和检测机构的常规筛查，还可用于科研中动物药理和毒理学研究的辅助手段。



(式I)