

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510086779.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月8日

[11] 授权公告号 CN 100476439C

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086779.4

[73] 专利权人 北京望尔生物技术有限公司
地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西区动医学院国家兽药安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟
吴小平 冯才茂 汪善良 李军
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞
丁双阳 罗晓琴 孙倩

[56] 参考文献
WO02093162A2 2002.11.21
CN1547015A 2004.11.17

Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. S. Bucknall, J. Silverlight, N. Coldham. Food Additives and Contaminants, Vol. 20 No. 3. 2003

动物性食品中氟喹诺酮类药物的残留分析. 钟映梅, 张秀英, 张峻峰. 中国兽药杂志, 第38卷第8期. 2004

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 向华

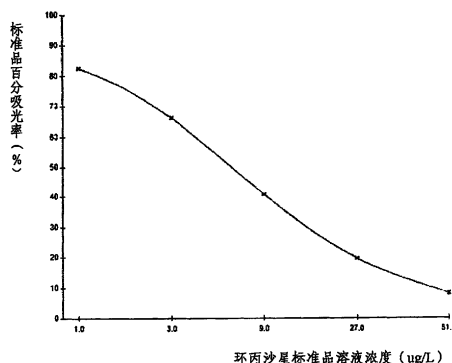
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测动物源性食品中氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测动物源性食品中氟喹酮类药物的试剂盒, 是用酶联免疫方法对预处理的动物组织(包括肌肉、肝脏)、虾、鱼和血液制品进行检测。该酶联免疫试剂盒包括包被氟喹酮类药物抗原的酶标板、酶标抗体、环丙沙星标准品溶液、底物显色液、氟喹酮类药物抗体、浓缩洗涤液、终止液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测氟喹酮类药物的方法, 它包括以下步骤: 首先进行样品前处理, 然后用试剂盒进行检测, 最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中氟喹酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。



1、一种用于检测氟喹酮类药物的酶联免疫反应试剂盒，其特征在于它包含下列组分：

- (1) 包被了氟喹酮类药物抗原的酶标板；
- (2) 酶标抗抗体；
- (3) 环丙沙星标准品溶液；
- (4) 底物显色液；
- (5) 氟喹酮类药物抗体；
- (6) 浓缩洗涤液；
- (7) 终止液；
- (8) 浓缩复溶液，

其中，所述氟喹酮类药物抗原是通过将环丙沙星的末端亚胺结构用丁二酸酐接出一个间隔臂得到半抗原，将所述半抗原与载体蛋白偶联得到；所述氟喹酮类药物抗体是通过所述抗原制备获得。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于酶标抗抗体是辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠抗抗体，所述抗抗体是以羊作为免疫动物，以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于浓缩洗涤液为含有 0.8~1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为 0.01~0.05mol/L、含 1%明胶的磷酸盐缓冲液；当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于氟喹酮类药物抗体的蛋白浓度为 0.5~5.0 μ g/L。

5、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于环丙沙星标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L 和 81 μ g/L。

6、一种检测样品中氟喹酮类药物残留的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1~5 之任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

7、如权利要求 6 所述的方法，其中试剂盒检测为向酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液，再加入环丙沙星抗体，温育后洗涤拍干，加入酶标记抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

一种检测动物源性食品中氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及一种检测动物源性食品包括动物组织（肌肉、肝脏）、虾、鱼和血制品中氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

背景技术

氟喹酮类抗菌药（又称为喹诺酮类抗菌药，QNS），其抗菌谱广、抗菌作用强，现已成为畜禽业和水产养殖业中最重要的抗生素之一。但由于氟喹酮类药物残留引起耐药性和潜在致癌性，欧盟、日本及我国均制定了其在食品中的最高残留量。氟喹酮类药物的残留检测已成为我国鳊鱼出口到日本的一个必检项目。

组织中氟喹酮类药物的残留标示物为恩诺沙星和环丙沙星，以肝脏组织和肾脏组织中残留浓度最高，其次是肌肉和脂肪附着的皮肤组织。其中恩诺沙星及环丙沙星代谢产物（CIF）仍具有生物活性；氧氟沙星（OFL）主要以原药的形式存在于组织中；培氟沙星（PEF）在体内代谢率相当高，接近100%，其代谢产物是诺氟沙星（NOR）。

检测氟喹酮类药物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。

发明内容

（一）要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利的用于动物源性食品中氟喹酮类药物检测的酶联免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛查的定性、定量检测方法。

（二）技术方案

本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括下列成分：

- (1) 包被了氟喹酮类药物抗原的酶标板;
- (2) 酶标抗抗体;
- (3) 环丙沙星标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- (5) 氟喹酮类药物抗体;
- (6) 浓缩洗涤液;
- (7) 终止液;
- (8) 浓缩复溶液。

本发明中所指的氟喹酮类药物包括恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星等具有共同分子骨架药理活性的药物。

其中所述包被了氟喹酮类药物抗原的酶标板在制备的过程中,所用的包被原是采用混合酸酐法将氟喹酮类药物半抗原与载体蛋白进行偶联得到的;所用的包被缓冲液是 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液;包被的过程中所用的封闭液为 pH7.4、0.01mol/L、含 20%新生牛血清和 0.05%吐温 20 的磷酸缓冲液;所用的氟喹酮类药物半抗原是以氟喹酮类药物环丙沙星为中间体采用丁二酸酐法合成的;包被原所用的蛋白载体可以为牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清白蛋白(OVA)、甲状腺蛋白(BCG),其中优选卵清白蛋白为包被原载体蛋白。

其中所述酶标抗抗体的标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,本发明优选辣根过氧化物酶,可采用戊二醛法或过碘酸钠法将辣根过氧化物酶与抗抗体进行偶联。所述抗抗体是以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到。本发明优选改良的过碘酸钠法将辣根过氧化物酶与抗抗体偶联,其优点是:传统的过碘酸钠法中需采用二硝基氟苯封闭辣根过氧化物酶上残留的 α -和 ϵ -氨基以避免酶分子之间的交联。本发明改用在低 pH 下使 NaIO_4 氧化辣根过氧化物酶,从而省去了二硝基氟苯封闭辣根过氧化物酶步骤。辣根过氧化物酶经 NaIO_4 氧化后形成的醛化酶可与抗体分子的氨基相连,形成斯夫氏砷,后者可进一步用 NaBH_4 (或乙醇胺)还原生成稳定的酶标记抗抗体。

其中所述氟喹酮类药物抗体在制备过程中，所用的免疫原是采用混合酸酐法将氟喹酮类药物半抗原与载体蛋白进行偶联得到的；免疫原蛋白载体可以为卵清白蛋白（OVA）、兔血清白蛋白(RSA)、鼠血清白蛋白(MSA)或甲状腺蛋白（BCG），其中优选为甲状腺蛋白，其优点为：甲状腺蛋白与被免疫动物之间蛋白关系较远，且结构复杂，故免疫原性好，能诱导较强的免疫应答。使用的氟喹酮类药物抗体蛋白浓度为 0.5 ~ 5.0 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述环丙沙星药物标准品溶液的浓度为 0 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、9 $\mu\text{g/L}$ 、27 $\mu\text{g/L}$ 和 81 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述显色剂：当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液。

其中所述浓缩洗涤液为含有 0.8 ~ 1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液。

其中所述终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠。

其中所述复溶液为 0.01 ~ 0.05mol/L、含 1%明胶的磷酸盐缓冲液。磷酸盐缓冲液中加入一定量的明胶其优点为：减少抗原、抗体的非特异性吸附，从而增加了抗原、抗体的结合率。

可作为固定氟喹酮类药物与载体蛋白偶联物的载体物质很多，如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。其中优选为聚苯乙烯制成的微量反应板凹孔，其优点为：聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能，抗原吸附其上后还是保留原来的免疫活性，空白值低，孔底透明度高，各板之间、同一板各孔之间性能相近。与聚苯乙烯类似的聚氯乙烯，作为固相载体，质软板薄，可剪裁，价廉，但是光泽度不如聚苯乙烯，孔底不如聚苯乙烯平整，且空白值也高，所以固相载体优选为聚苯乙烯。

本发明还提供了使用上述试剂盒定性、定量检测动物组织（肌肉、肝脏）、鱼、虾和血清等样品中氟喹酮类药物残留量的方法，它包括以下步骤：

（1）样品前处理；

(2) 用试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

优选地, 样品处理方法为:

a、动物组织(肌肉、肝脏)、鱼、虾等的处理:

称取均质过的样品与乙腈-NaOH 溶液充分混合; 离心, 取上层液体加入复溶液和正己烷, 充分混合后静置分层; 弃去上层并加入二氯甲烷充分混合, 离心后取下层有机相, 蒸发至干或用氮气吹干; 用复溶液溶解干燥的残留物后加入正己烷充分混合; 离心, 取下层液体加入等体积复溶液即可进行分析。

b、血样的处理:

取血样, 室温静置, 待析出血浆后离心; 取血浆加入无水乙腈充分混合, 离心后取上清液加入复溶液并混匀; 加入二氯甲烷, 充分混匀后离心; 取下层有机相, 蒸发至干或用氮气吹干; 用复溶液溶解干燥的残留物后加入正己烷充分混合; 离心, 除去上层有机相和中间白色杂质; 取下层液体加入等体积复溶液即可进行分析。

优选地, 试剂盒检测方法为: 向酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液, 再加入氟喹酮类药物抗体, 温育后洗涤拍干, 再加入酶标抗抗体, 温育后洗涤拍干, 显色、终止, 用酶标仪测定吸光度值。

优选地, 检测结果分析过程为: 用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值(B)除以第一个标准溶液(0标准)的吸光度值(B_0)再乘以100%, 即百分吸光度值。计算公式为:

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = (B/B_0) \times 100\%$$

公式中 B 为标准溶液的平均吸光度值, B_0 为 $0\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。以环丙沙星药物浓度的自然对数值为 X 轴, 百分吸光度值为 Y 轴, 绘制标准曲线图。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值, 相对应每一个样品中环丙沙星的浓度则可从标准曲线上读出, 根据酶标板上的样品颜色的深浅, 与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中环丙沙星的浓度范围, 根据样品中环丙沙星的残留量利用交叉反应率计算出其它氟喹酮类药物在样本中的残留量。

优选地，检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。

优选地，检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需 1.5 小时可以完成，最低检测限量为 $0.5\mu\text{g/L}$ 。

其中，抗原及抗体的制备方法为：

(1) 抗原的合成

半抗原合成：将氟喹酮类药物中间体环丙沙星和丁二酸酐合成氟喹酮半抗原。其制备原理：由于氟喹酮类药物中含有酮基，使其与 O-（羧甲基）羟基反应，生成带有羧基的半抗原衍生物，从而在分子中引入羧基。

如其制备过程可为：

1、在 70%乙醇中，加入 O-（羧甲基）羟基和酮基的半抗原，使其浓度分别为 10mmol/L 和 4mmol/L 。

2、回流加热 90min。

3、旋转蒸发，减少容积，然后加水后以二氯甲烷提取。

4、用水洗涤二氯甲烷提取物，用 Na_2SO_4 干燥成白色粉末。

其优点：将环丙沙星中间体的末端亚胺用丁二酸酐酰化，接出一个含 4 个碳的间隔臂，突出了氟喹酮类药物半抗原决定簇的特征结构。这有助于制出针对氟喹酮类药物特异性单克隆抗体。

免疫原：将氟喹酮类药物半抗原与卵清白蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白或甲状腺蛋白采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到免疫原。

包被原：将氟喹酮类药物半抗原与血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白或鼠血清白蛋白采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到包被原。

(2) 氟喹酮类药物鼠源性单克隆抗体制备

动物免疫程序：以氟喹酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对 Balb/c 小鼠进行免疫，免疫剂量为 $80\sim 100\mu\text{g/只}$ ，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 2~3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 5~10:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争 ELISA 法测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 直至得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

细胞冻存和复苏: 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液, 分装于冻存管, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 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。

单克隆抗体的制备与纯化: 采用体内诱生法, 将 Balb/c 小鼠 (8 周龄) 腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只, 7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ 个/只, 7~10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 小瓶分装, -20℃ 保存。

(3) 抗抗体的制备

以羊作为免疫动物, 以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫, 得到羊抗鼠抗抗体。

(4) 酶标抗抗体制备

将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶采用过碘酸钠法或戊二醛法与羊抗鼠抗抗体偶联并纯化提取, 得到酶标抗抗体。

其中所用试剂的配制方法为:

a. 环丙沙星标准品溶液: 浓度分别为 0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L、81 μ g/L;

b. 包被缓冲液: pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液;

c. 封闭液: pH7.4、0.01mol/L、含 20% 新生牛血清、0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液;

d. 浓缩洗涤液: 含 0.8~1.2% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4、0.01M), 为正常使用浓度的 15~25 倍;

e. 氟喹酮类药物抗体工作液: 将抗体用含有 5% N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 的磷酸盐缓冲液稀释成蛋白浓度为 0.5~5.0 μ g/L;

f. 酶标记物工作液: 酶标记抗抗体工作液的浓度为 0.1~2.0 μ g/L;

- g. 底物显色液 A 液: 过氧化氢或过氧化脲;
- h. 底物显色液 B 液: 邻苯二胺 (OPD) 或四甲基联苯胺 (TMB);
- i. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液: pH 8.1、含有 MgCl_2 0.01% 100mmol Tris-HCl;
- j. 终止液: 1~2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液;
- k. 浓缩复溶液: 0.01~0.05M、含 1%明胶的磷酸盐缓冲液为正常使用浓度的 2~3 倍。

其中,包被氟喹酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板制备方法为:用包被缓冲液将氟喹酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物稀释成 0.1~1 $\mu\text{g/ml}$,每孔加入 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2h 并 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤 3 次,每次 30s,拍干,然后在每孔中加入 150~200 μl 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1~2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

本发明试剂盒的检测原理为:采用间接竞争 ELISA 的方法,在微孔条上预包被偶联氟喹酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物,加入环丙沙星系列标准品或样品溶液再加入氟喹酮类药物抗体,孵育洗涤后,样本中残留的环丙沙星将和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗氟喹酮类药物的抗体,加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用,显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值,样品吸光度值与环丙沙星残留量呈负相关,与标准曲线比较即可得出相应残留物环丙沙星的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅,与系列浓度的环丙沙星的标准液颜色的比较可判断样品的浓度范围。再根据环丙沙星残留量利用交叉反应率计算样本中含有其它氟喹酮类药物残留的浓度。

(三) 有益效果

本发明的检测氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒可检测动物组织(肌肉、肝脏)、鱼、虾和血清等样品中氟喹酮类药物的残留量,对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批样品。

本发明采用高特异性的氟喹酮类药物单克隆抗体,主要试剂以工作液、浓缩液或冻干粉等形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点,将在食品和饲料的氟喹酮类药物残留量检测中

发挥重要作用。

附图说明

图 1 为氟喹酮类药物检测标准曲线图。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1 检测氟喹酮类药物残留量的酶联免疫试剂盒的组分制备

1. 抗原的合成

a. 半抗原的合成：以氟喹酮类药物环丙沙星为中间体采用丁二酸酐法合成氟喹酮类药物半抗原，制备过程为：

(1) 在 70% 200mL 乙醇中，加入带有 O-（羧甲基）羟基和酮基的环丙沙星半抗原，使其浓度分别为 10mmol/L 和 4mmol/L；

(2) 回流加热 90min；

(3) 旋转蒸发，减少容积，然后加水至 50mL，二氯甲烷提取；

(4) 用水洗涤二氯甲烷提取物，用 NaSO₄ 干燥成白色粉末。

b. 免疫原合成：将氟喹酮类药物半抗原和甲状腺蛋白分别采用混合酸酐法进行偶联得到免疫原，制备过程为：

(1) 取氟喹酮类药物半抗原 2 g 溶于 30ml,50%的 N,N'-二甲基甲酰胺溶液中；

(2) 再取 0.5ml 氯甲酸异丁酯溶于 5ml 无水二噁烷中，加入到半抗原溶液中室温搅拌反应 4 小时，取甲状腺蛋白 32g 溶于 70ml pH9.6 碳酸盐缓冲液中，再将甲状腺蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜；

(3) 将合成的人工抗原用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次，最后将抗原浓缩保存或冻干保存。

c. 包被原合成：将氟喹酮类药物半抗原和卵清白蛋白，采用混合酸酐法进行偶联得到包被原，制备过程为：

(1) 取氟喹酮类药物半抗原 2 g 溶于 20ml、0.5M 的氢氧化钠溶液中，再取 2 g 羧琥珀酰亚胺（NHS）活性酯溶于 8ml 纯水中，加入到半抗原溶液中室温搅拌反应 2.5h；

(2) 取载体蛋白 22g 溶于 75ml pH9.0 的碳酸盐缓冲液中, 再将卵清白蛋白滴加到半抗原中 4℃ 搅拌过夜;

(3) 将合成的人工抗原用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天, 每天换液 3~4 次。最后将抗原浓缩保存或冻干保存。

2. 氟喹酮类药物鼠源性单克隆抗体制备

动物免疫程序: 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 以氟喹酮类药物半抗原与甲状腺蛋白偶联物为免疫原, 免疫剂量为 100 μ g/只, 首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 间隔 2 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化, 加强免疫一次, 四免后腹腔加强免疫一次, 3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞, 按 8: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

细胞冻存和复苏: 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 4 \times 10⁶ 个/ml 的细胞悬液, 分装于冻存管, 在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管, 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。

单克隆抗体的制备与纯化: 采用体内诱生法, 将 Balb/c 小鼠 (8 周龄) 腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只, 10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 8 \times 10⁵ 个/只, 8 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化, 小瓶分装, -20℃ 保存。

3. 羊抗鼠抗抗体的制备

以羊为免疫动物, 以鼠源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫, 得到羊抗鼠抗抗体。

4. 酶标抗抗体制备

采用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶与羊抗鼠抗抗体偶联并纯化提取, 得到酶标抗抗体。标记过程为:

(1) 称取 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶解于 1ml 蒸馏水中。

(2) 加入 0.2ml 新配的 0.1M NaIO₄ 溶液, 室温下避光搅拌 20min。

(3) 将溶液装入透析袋中, 用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析, 4℃ 过夜。

(4) 加 20 μ l 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液, 使溶液的 pH 升高到 9.0~9.5, 然后立即加入 10mg IgG(抗体)或 5mg 葡萄球菌蛋白 A, 在 1ml 0.01M 的碳酸盐缓冲液中, 室温避光轻轻搅拌 2h。

(5) 加 0.1ml 新配的 4mg/ml NaBH₄液, 混匀, 4℃ 静置 2 小时。

(6) 将上述液装入透析袋中, 用 0.15M、pH7.4 磷酸缓冲液透析, 4℃ 过夜。

(7) 置 4℃ 环境慢慢搅拌, 逐滴加入等体积饱和硫酸铵。

(8) 3000rpm 离心半小时, 弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次, 最后沉淀物溶于少量 pH7.4、0.15M 的磷酸缓冲液中。

(9) 将上述溶液装入透析袋中, 用 pH7.4、0.15M 的磷酸盐缓冲溶液透析, 去除铵离子后(用萘氏试剂检测), 10,000rpm 离心 30min 去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 分装后, 冰冻保存。

5. 酶标板的制备

用包被缓冲液将氟喹酮类药物半抗原与卵清白蛋白偶联物稀释成 0.6 μ g/ml, 每孔加入 100 μ l, 37℃ 温育 2h, 并 4℃ 过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 30s, 拍干, 然后在每孔中加入 150 μ l 封闭液, 37℃ 温育 1.5h, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 2 检测氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被氟喹酮类药物抗原的酶标板;
- (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (3) 环丙沙星标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L 和 81 μ g/L;
- (4) 显色液 A 液为过氧化氢, 显色液 B 液为邻苯二胺;
- (5) 蛋白浓度为 0.5 μ g/L 的氟喹酮类药物抗体工作液;

- (6) 浓缩洗涤液为含0.8%吐温20的磷酸盐缓冲液;
- (7) 终止液为1mol/L的硫酸溶液;
- (8) 浓缩复溶液为0.01M、含1%明胶的磷酸盐缓冲液。

实施例 3 检测氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

- (1) 包被氟喹酮类药物抗原的酶标板;
- (2) 用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗抗体;
- (3) 环丙沙星标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μ g/L、1 μ g/L、3 μ g/L、9 μ g/L、27 μ g/L和81 μ g/L;
- (4) 底物液为对硝基磷酸盐缓冲液;
- (5) 蛋白浓度为5.0 μ g/L的氟喹酮类药物抗体工作液;
- (6) 浓缩洗涤液为含1.2%吐温20的磷酸盐缓冲液;
- (7) 终止液为2mol/L的氢氧化钠溶液;
- (8) 浓缩复溶液为0.01M、含1%明胶的磷酸盐缓冲液。

实施例 4 样品中氟喹酮类药物残留的检测

1. 样品前处理

(1) 肌肉或肝脏

a、称 2.0g 均质过的鸡肉样本于 50ml 离心管中,加入乙腈-NaOH 溶液 10ml。充分上下混合 10min, 10000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 10min, 取上层液相 5ml。

b、加入 5ml 的缓冲液,再加入正己烷 4ml,混合 2min,静置分层后,去除上层。

c、加入二氯甲烷 8ml,充分混匀 10min, 5000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 10min。

d、去上层,取下层有机相到干燥瓶中,50 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至干或氮气吹干。

e、用 0.6ml 稀释好的复溶液溶解干燥的残留物,加入正己烷 1ml 混合 2min,取出, 10000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 5min。

f、轻吸掉上层有机相和中间部份液体,取下层 50 μ l 滴加稀释好的复溶

液 50 μ l 混匀，取 50 μ l 分析。

(2) 虾样本的提取等同于鸡肉提取方法。

在上述 f 步骤中，如果在两相之间出现太多的泡沫或胶状物，难以取出足够的下层提取液，应将样品瓶放在 80 $^{\circ}$ C 水浴中 5min 后再离心。

(3) 鸡血浆样本的处理

a、用加有肝素钠（25 单位/ml 血）的离心管采集鸡血样本，采血注射器也用肝素钠润洗，血样本室温静置 1h，待析出血浆后，8000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 10min，取出血浆 1ml。

b、无水乙腈 4ml 充分上下混合 10min，10000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 10min。

c、移上清至另一离心管中，加入 2ml 缓冲液，混匀。

d、加入二氯甲烷 5ml，充分混匀 10min，5000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 10min。去上层，取下层有机相到干燥瓶中，50 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至干或氮气吹干。

e、用 0.6ml 缓冲液溶解干燥的残留物，加入正己烷 1ml 混合 2min，取出 10000rpm、15 $^{\circ}$ C 离心 5min。

f、轻吸掉上层有机相和中间白色杂质，取下层 50 μ l 和 50 μ l 稀释好的复溶液混匀，取 50 μ l 可分析。

2. 用试剂盒检测

(1) 向氟喹酮类药物半抗原与卵清白蛋白偶联物包被酶标板微孔中加系列标准溶液或样品溶液 50 μ l，然后加入氟喹酮单克隆抗体工作液 50 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。

(2) 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羊抗鼠抗抗体工作液 100 μ l，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。

(3) 取出酶标板，如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 A 液 50 μ l，再加 B 液 50 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min。

(4) 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（OD 值）。

结果分析：计算百分吸光度值并绘制标准曲线，相对应每一个样品中环

丙沙星的浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出样本中环丙沙星的浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。

根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中环丙沙星的浓度范围，再根据环丙沙星残留量利用交叉反应率计算样本中含有其它氟喹酮类药物残留的浓度。

实验例 1 试剂盒精密度试验

标准品可重复性：

从三批试剂盒中各取 10 个试剂盒，每块酶联板中抽出 20 个微孔，测定 9 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值（OD 值），计算变异系数。测定结果见表 1。

表 1 标准品可重复性试验

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CV% | 01 批 | 5.6 | 6.7 | 4.5 | 6.7 | 7.5 | 5.2 | 7.3 | 6.2 | 5.5 | 6.1 |
| | 03 批 | 8.2 | 8.1 | 6.6 | 7.2 | 5.5 | 7.2 | 6.7 | 7.8 | 6.2 | 5.9 |
| | 06 批 | 7.7 | 7.1 | 7.9 | 8.3 | 6.3 | 6.6 | 9.5 | 5.9 | 7.1 | 8.2 |

结果测定范围在 5.2~9.5% 之间，确定精密度的变异系数范围为 $\leq 10\%$ 。

样品可重复性：

取环丙沙星标样，添加到样品中，分别取三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数，结果见表 2~5。

表 2 鸡肉样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g/kg}$) | | | | | 变异系数 CV% |
|---------|--------------------------|------|------|------|------|----------|
| 0506012 | 10.5 | 11.2 | 14.5 | 12.8 | 13.5 | 13.1 |
| | 13.5 | 11.9 | 15.6 | 14.2 | 13.9 | 9.6 |
| | 12.7 | 12.6 | 13.4 | 12.9 | 13.6 | 3.4 |
| 0507004 | 14.6 | 12.8 | 12.0 | 13.6 | 11.2 | 10.4 |
| | 13.4 | 12.9 | 14.7 | 13.6 | 12.8 | 5.6 |
| | 13.4 | 12.6 | 13.8 | 12.6 | 14.6 | 6.3 |
| 0507010 | 12.6 | 13.5 | 14.2 | 13.8 | 12.6 | 5.4 |
| | 12.8 | 13.6 | 12.3 | 13.2 | 11.5 | 6.4 |
| | 13.7 | 12.8 | 14.8 | 13.4 | 12.2 | 7.3 |

表3 鸡肝样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 变异系数 CV% |
|---------|---------------------------------|------|------|------|------|----------|
| 0506012 | 12.6 | 14.5 | 13.5 | 13.8 | 12.9 | 5.6 |
| | 12.6 | 13.9 | 10.7 | 14.6 | 11.4 | 13.0 |
| | 13.6 | 12.4 | 14.6 | 12.3 | 12.7 | 7.4 |
| 0507004 | 13.4 | 12.6 | 13.8 | 14.0 | 12.9 | 4.4 |
| | 13.7 | 14.2 | 13.8 | 12.6 | 13.5 | 4.4 |
| | 13.8 | 15.4 | 12.9 | 13.7 | 12.4 | 8.4 |
| 0507010 | 13.4 | 14.6 | 12.8 | 13.2 | 15.0 | 6.9 |
| | 13.5 | 14.5 | 12.7 | 13.8 | 11.8 | 7.8 |
| | 13.4 | 14.6 | 12.6 | 13.8 | 12.7 | 6.2 |

表4 虾中样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 变异系数 CV% |
|---------|---------------------------------|------|------|------|------|----------|
| 0506012 | 11.6 | 13.5 | 14.2 | 12.8 | 13.5 | 7.5 |
| | 12.6 | 12.0 | 13.4 | 13.8 | 14.3 | 7.0 |
| | 13.6 | 12.7 | 13.8 | 12.9 | 14.3 | 4.9 |
| 0507004 | 14.2 | 13.6 | 12.8 | 11.3 | 13.6 | 8.6 |
| | 11.4 | 13.9 | 14.3 | 13.5 | 12.7 | 8.7 |
| | 13.5 | 14.0 | 12.6 | 12.7 | 13.8 | 4.8 |
| 0507010 | 13.4 | 12.6 | 13.8 | 10.8 | 14.4 | 12.4 |
| | 13.8 | 14.4 | 11.5 | 12.7 | 13.2 | 8.4 |
| | 13.4 | 14.7 | 12.9 | 11.0 | 13.9 | 10.5 |

表5 血浆样品可重复性试验

| 批号 | 实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | 变异系数 CV% |
|---------|---------------------------------|------|------|------|------|----------|
| 0506012 | 13.5 | 12.0 | 11.3 | 13.0 | 14.7 | 10.2 |
| | 13.5 | 12.4 | 12.9 | 10.3 | 14.8 | 12.6 |
| | 13.4 | 12.8 | 13.6 | 13.5 | 14.0 | 3.2 |
| 0507004 | 13.7 | 12.6 | 14.5 | 13.8 | 12.9 | 5.6 |
| | 14.6 | 12.3 | 11.2 | 13.2 | 13.8 | 10.1 |
| | 14.6 | 12.6 | 12.8 | 14.7 | 13.2 | 7.3 |
| 0507010 | 13.7 | 13.4 | 14.6 | 13.5 | 14.9 | 4.8 |
| | 12.4 | 12.8 | 14.8 | 13.2 | 13.9 | 7.0 |
| | 13.7 | 12.9 | 13.4 | 12.6 | 13.8 | 3.8 |

结果表明鸡肉样品的变异系数均小于 15%，鸡肝样品的变异系数均小于 15%，虾样品的变异系数均小于 15%，血浆样品的变异系数均小于 15%。

实验例 2 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的环丙沙星标样，对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，分别计算回收率。

表6 准确度试验

| 样本 | | 鸡肉 | | 鸡肝 | |
|----------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|
| 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | 10 | 50 | 10 | 50 |
| 回收率% | 1 | 86.4 | 112.3 | 87.4 | 82.4 |
| | 2 | 92.5 | 84.2 | 95.2 | 89.5 |
| | 3 | 102.7 | 82.4 | 79.5 | 93.4 |
| | 4 | 89.4 | 97.2 | 102.3 | 112.7 |
| 平均值 | | 92.7 | 94.0 | 91.1 | 94.5 |
| 样本 | | 虾 | | 血浆 | |
| 添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | 10 | 50 | 10 | 50 |
| 回收率% | 1 | 82.1 | 100.9 | 97.3 | 114.2 |
| | 2 | 79.5 | 86.7 | 120.7 | 87.4 |
| | 3 | 69.5 | 79.5 | 87.4 | 76.5 |
| | 4 | 96.5 | 93.2 | 102.7 | 94.5 |
| 平均值 | | 81.9 | 90.0 | 102.0 | 93.1 |

结果表明鸡肉、鸡肝样本的添加回收率为 79.5 ~ 112.7%；虾样本添加回收率 69.5 ~ 100.9%；血浆样本的添加回收率为 87.4 ~ 114.2%。

实验例 3 试剂盒的特异性试验

特异性用交叉反应率来表示，交叉反应率是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。

选择与环丙沙星同类似结构和类似功能的五种药物，将不同浓度的环丙沙星类似物，替代环丙沙星标准溶液，测定其标准曲线，并计算 IC_{50} 抑制浓度，计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制环丙沙星浓度}}{\text{引起 50\%抑制氟喹酮类药物浓度}} \times 100\%$$

表 7 交叉反应

| 药物名称 | 交叉反应率 (%) |
|------|-----------|
| 恩诺沙星 | 83.3 |
| 环丙沙星 | 100 |
| 诺氟沙星 | 166.7 |
| 氧氟沙星 | 125 |
| 洛美沙星 | 76.9 |

在得知样本中环丙沙星残留量的情况下根据上面交叉反应率计算其它氟喹酮类药物的残留量。

实验例 4 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2~8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值（零标准）、50%抑制浓度、氟喹酮类药物添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中，会有非正常保存条件出现，将试剂盒在 25℃保存的条件下放置 6 天，进行加速老化实验，结果表明该试剂盒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 5 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℃保存 6 个月以上。

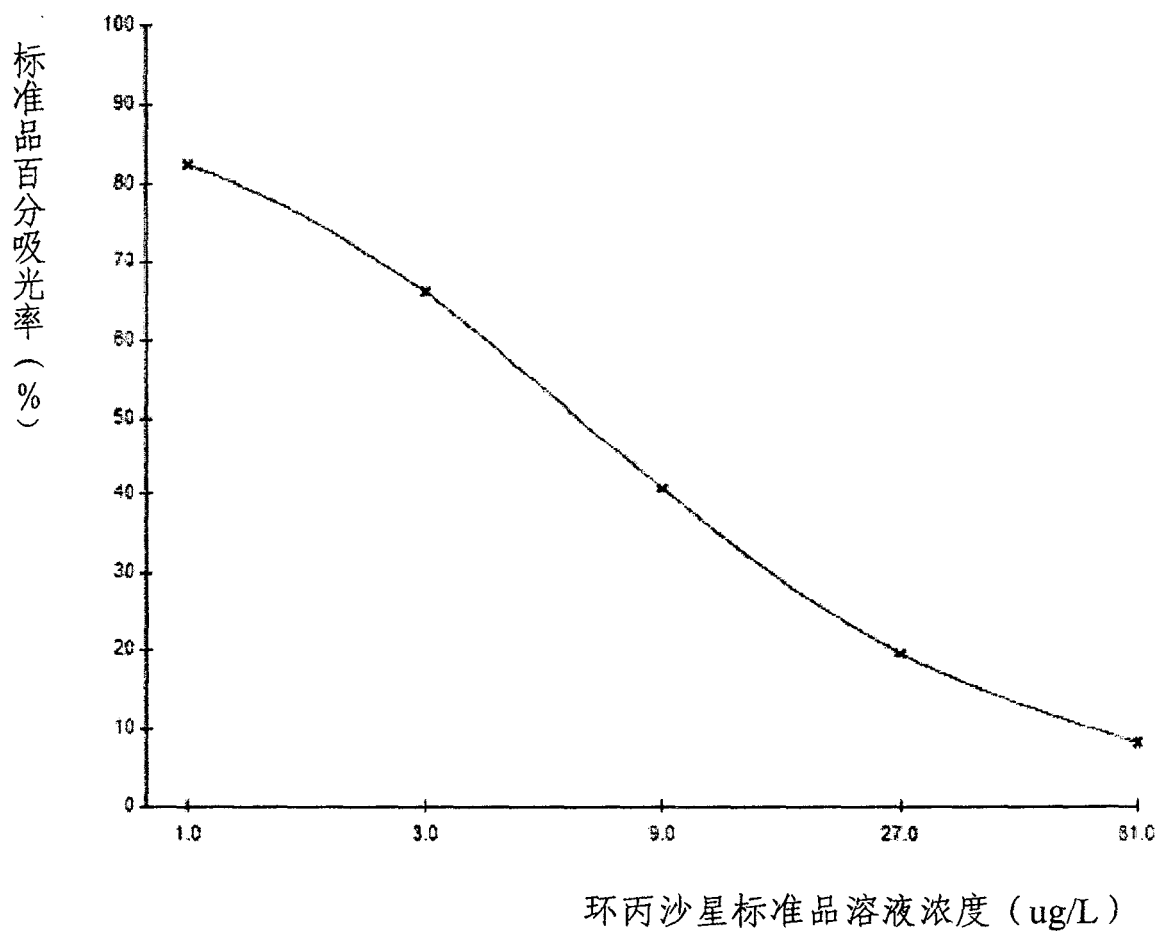


图 1

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测动物源性食品中氟喹酮类药物的酶联免疫试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN100476439C | 公开(公告)日 | 2009-04-08 |
| 申请号 | CN200510086779.4 | 申请日 | 2005-11-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京望尔生物技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 北京望尔生物技术有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 北京望尔生物技术有限公司 | | |
| [标]发明人 | 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩 | | |
| 发明人 | 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535 | | |
| 代理人(译) | 向华 | | |
| 审查员(译) | 吴江明 | | |
| 其他公开文献 | CN1766632A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |
| 摘要(译) | | | |

本发明提供了一种用于检测动物源性食品中氟喹酮类药物的试剂盒，是用酶联免疫方法对预处理的动物组织(包括肌肉、肝脏)、虾、鱼和血液制品进行检测。该酶联免疫试剂盒包括包被氟喹酮类药物抗原的酶标板、酶标抗体、环丙沙星标准品溶液、底物显色液、氟喹酮类药物抗体、浓缩洗涤液、终止液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测氟喹酮类药物的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中氟喹酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

