



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101710117 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200910232657.X

(22) 申请日 2009.12.04

(71) 申请人 江苏省微生物研究所有限责任公司  
地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号

(72) 发明人 陆茂林 李利东 宓晓黎 袁建兴  
黄丽俊 陈蕴

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

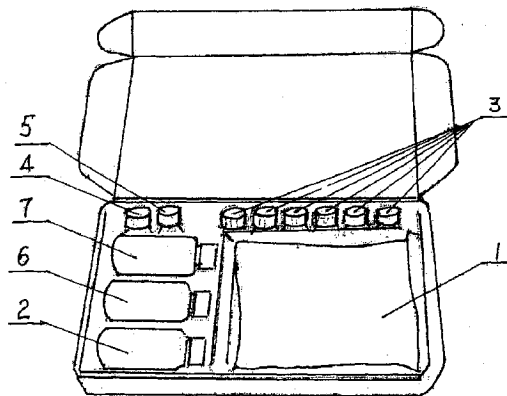
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种恩诺沙星的检测试剂盒及其检测方法

## (57) 摘要

一种检测恩诺沙星的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域，用于对动物源性食品、血液、尿液及饲料中恩诺沙星 (ENR) 含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用 TRFIA 检测 ENR，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 ENR-载体蛋白，加入 ENR 标准或样品，再加入 ENR 抗体。游离的 ENR 与微孔板上的 ENR-载体蛋白竞争 ENR 抗体，没有连接的 ENR 抗体被洗涤除去，加入  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps，荧光强度与样品中的 ENR 浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中 ENR 的含量。本发明提供的检测 ENR 试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到 0.01ng/mL 以上。



1. 一种检测恩诺沙星的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征是由多孔包被板(1),缓冲液(2),恩诺沙星标准溶液(3),恩诺沙星的抗体(4),铕标记的羊抗兔抗体(5),洗涤液(6)和增强液(7)所组成。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的包被板(1)包被固相抗原,用50mmol/L pH9.6  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ 的缓冲液将ENR-OVA稀释至10mg/L做为包被液,96或48孔微孔板各孔加100  $\mu\text{L}$ ,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去包被液,冲洗三次,加150  $\mu\text{L}$ 含3g/L OVA的上述缓冲液封闭,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-18 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的恩诺沙星标准溶液(3),从ENR纯品中稀释得到,稀释液为0.1mol/L pH7.5磷酸盐缓冲液,共6瓶,ENR浓度分别为:0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的恩诺沙星的抗体(4),用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂1.2mL混合2mg ENR-BSA,用匀浆器混合2小时,制得油包水抗原乳化剂,取600  $\mu\text{L}$ 制备好的油包水抗原乳化剂,在新西兰大白兔和BALB/c小白鼠身上多位点地进行皮下注射,在免疫3~4次后,可进行鉴定,血清和腹水合格后稀释、分装、冻干备用。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的铕标记的羊抗兔抗体(5),将购得的羊抗兔抗体,经PD-10柱转换缓冲条件至pH9.0,收集蛋白峰,取已转换的羊抗兔抗体加入 $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸,反应过夜,反应液经柱层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中的铕标记的羊抗兔抗体(5),取溶解于50mmol/L PBS pH7.0的5g/L羊抗兔抗体1mL~2mL,经PD-10柱转换缓冲条件,洗脱液为含0.155mol/L NaCl的50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  pH8.5~9.0缓冲液,收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量,用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至2g/L,取500  $\mu\text{L}$ ~1000  $\mu\text{L}$ 稀释后的羊抗兔抗体加入含0.2mg~0.4mg的 $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸的小瓶中,28 $^\circ\text{C}$ ~30 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌反应16小时,反应液经用80mmol/L Tris-HCl pH7.8缓冲液平衡的Sephadex-G50柱(1 $\times$ 40cm)层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用。

7. 一种用权利要求1所述的试剂盒检测恩诺沙星的方法,其特征是取包被有ENR-OVA的微孔包被板,加入ENR标准或处理好的样品到各自的微孔中,再加入ENR抗体,振荡反应,洗涤液洗涤,加铕标记的羊抗兔抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加增强液振荡后测量荧光强度cps,对照标准曲线计算样品中的ENR含量。

8. 根据权利要求8所述的检测恩诺沙星的方法,其操作为:取包被有ENR-OVA的微孔包被板,加入50  $\mu\text{L}$ 的ENR标准或处理好的样品到各自的微孔中,加50  $\mu\text{L}$ 以缓冲液(2)作稀释剂,1:20稀释ENR抗体,25 $^\circ\text{C}$ ~37 $^\circ\text{C}$ 振荡0.5~1小时,洗涤液洗三次,加以缓冲液(2)1:20稀释的100  $\mu\text{L}$   $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体,25 $^\circ\text{C}$ ~37 $^\circ\text{C}$ 振荡0.5~1小时,用洗涤液洗六次,加200  $\mu\text{L}$ 增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps,从标准曲线计算样品中的ENR含量。

## 一种恩诺沙星的检测试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR) 的检测试剂盒及其检测方法,属于时间分辨荧光免疫分析 (Time resolvedfluoroisnmunoassay, TRFIA) 技术领域,用于动物源性食品、血液、尿液及饲料中恩诺沙星药物残留量的检测。

### 背景技术

[0002] 恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR) 是人工合成喹诺酮类抗菌药,因其高效广谱、耐药菌少、在动物体内吸收快、分布广、生物利用度高、代谢快,是一种低毒、低蓄积药物,与其他抗菌药无交叉耐药性而被广泛应用于畜禽和水产养殖中感染性疾病的防治。恩诺沙星在畜禽养殖和水产养殖业中广泛应用,会随畜禽的排泄物进入土壤和水体环境,形成耐药菌,对生态环境造成影响。恩诺沙星虽然其毒性不强,但是人使用过量后,可引起机体胃肠道反应、致幼年动物关节病变。依据联合国粮农组织 (FAO) 及世界卫生组织 (WHO) 之评估,恩诺沙星对人体 ADI 值 (每日安全摄取量) 为 2kg 体重,以 60kg 成人计算,即每人每日安全摄取量为 120g/d。近年来,国内外有关食用动物和人类的耐喹诺酮菌株的发病率及种类的报道日渐上升,由于这类药易诱发细菌耐药性,有兽药残留动物源性食品被人类长期食用会出现蓄积中毒,从而可引起人畜关节软骨病、光敏反应、肝肾毒性及导致淋巴细胞染色体变异的基因毒性,及可引起人肌腱破裂。它作为一种人畜共用药,药物残留通过食物链对人体健康危害更大,不利于该类药物对人类疾病的治疗。因此世界各国十分重视此类药在动物性食品中的残留问题,加强了氟喹诺酮类药物监管力度。欧盟、美国、日本、中国等均对动物源性食品中环丙沙星最高残留限量都作了禁用或限用的规定。

[0003] 目前检测动物源性食品中恩诺沙星残留的主要方法有微生物法、四平板法、荧光法、高效液相色谱法 (HPLC)、液质联用法 (LC-MS)、毛细管电泳法和酶联免疫吸附法 (ELISA) 等。常用的恩诺沙星检测方法是色谱检测法和免疫学检测法。色谱检测法灵敏、准确,需要昂贵的仪器和专门的工作人员,而且样品处理较烦琐,其应用受到一定的限制,尤其是在基层大规模筛选和现场检测中更加突出。免疫学检测法灵敏、特异、快速、简便,克服了以上的不足,适合大规模筛选。

[0004] 时间分辨荧光免疫分析检测技术是近来发展迅速的高灵敏检测手段。TRFIA 其原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂,其一端和镧系元素结合,另一端和抗体 (抗原) 上的自由氨基连接,制成  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体 (抗原),它与待测样品中的抗原 (抗体) 结合成免疫复合物。理想情况下,测定复合物中镧系元素的荧光强度就能确定样品中抗原的含量,但实际上这种复合物的荧光强度相当弱,只有再加入一种增强溶液 (Enhancement solution),使镧系元素从复合物中解离下来,并与增强液中所含的  $\beta$ -奈甲酰三氟丙酮 ( $\beta$ -NTA) 重新形成微胶囊,在紫外光的激发下发射很强的荧光,增强效果上百万倍。用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,即可确定样品中抗原的量。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种恩诺沙星试剂盒及检测方法,用于定性或定量地检测物源性食品、血液、尿液及饲料中恩诺沙星的残留量;检测时间短、平均回收率高、批内、批间误差小,并具有简便、快速、准确的特点。

[0006] 本发明的技术方案:该检测恩诺沙星的试剂盒是由 1、多孔包被板,2、缓冲液,3、恩诺沙星标准溶液,4、恩诺沙星的抗体,5、铕标记的羊抗兔抗体,6、洗涤液,7、增强液所组成。

[0007] 本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 来检测 ENR。采用 TRFIA 的技术主要有两个方面:第一,特异性多克隆抗体的制备,利用抗原免疫家兔,获得含有抗体的血清,经过生化提纯分离免疫球蛋白;第二,  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体的制备。

[0008] 测定方法为:测定的基础是标记免疫反应。包被有 ENR-载体蛋白的微孔板,加入 ENR 标准溶液或样品处理液到各自的微孔中,再加入 ENR 抗体,振荡反应,游离的 ENR 与微孔板上的 ENR-载体蛋白竞争 ENR 抗体,洗涤液洗涤,没有连接的 ENR 抗体在洗涤步骤中被除去。加入  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外光的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中 ENR 的量。

[0009] 本发明的有益效果:该试剂盒结构简单,使用方便、廉价、灵敏度高,可以达到 0.01ng/mL 以上。

## 附图说明

[0010] 图 1:检测恩诺沙星检测试剂盒示意图。1、多孔包被板,2、缓冲液,3、恩诺沙星标准溶液,4、恩诺沙星的抗体,5、铕标记的羊抗兔抗体,6、洗涤液,7、增强液。

[0011] 图 2:ENR-TRFIA 标准曲线图。

## 具体实施方式

[0012] 实施例 1:制备试剂盒和动物源性食品检测

[0013] 免疫抗原的制备:

[0014] 本发明所述的人工免疫抗原为将恩诺沙星 (ENR) 采用混合酸酐法与大分子载体蛋白结合,以合成的 ENR-BSA 作为免疫抗原进行动物免疫。

[0015] 载体蛋白采用牛血清白蛋白 (BSA)。称取 30mg ~ 300mg 牛血清白蛋白,溶解于 50% 二氧六环水溶液 6mL ~ 10mL 中,调 pH 值为 9 ~ 10,为 A 液;称取 10mg ~ 40mg ENR,溶于 2mL 二氧六环中,置 4°C 10min,依次加入三正丁胺 20  $\mu$ L 和氯甲酸异丁酯 10  $\mu$ L,于 4°C 搅拌 30min,作为 B 液。将 A 液在 4°C 滴入 B 液,搅拌过夜。将反应液对蒸馏水透析 72 小时,期间换蒸馏水 5 次。或葡聚糖凝胶 G50 (Sephadex G50) 柱提纯,以 0.05mol/L pH8.0 碳酸盐缓冲溶液洗脱。收集透析纯化液或第 1 峰的柱洗脱液,分装保存于 -20°C 作免疫原用。

[0016] 恩诺沙星多克隆抗体的制备:

[0017] 将上述合成的恩诺沙星-牛血清白蛋白结合物 (ENR-BSA) 作免疫抗原,采用皮内或皮下多点注射方式,接种 1kg ~ 1.5kg 雄性新西兰兔;每隔 4 周免疫 1 次,第一次免疫时,在免疫原中加等量福氏完全佐剂混匀制成乳剂,以后免疫均加等量福氏不完全佐剂;自第

二次免疫开始,每次免疫后 8 ~ 10 天采血测试抗血清效价。观察抗血清效价增长情况,达满意效价时取全血,分离血清。

[0018] 抗血清经过 3 次硫酸铵沉淀后,再用层析柱分离纯化,对磷酸盐缓冲溶液透析。吸取抗血清 10mL,平衡至室温,加入等量的 0.01mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲溶液,充分混匀,加入 20mL 饱和硫酸铵溶液(以浓氨水调至 pH7.8),摇匀,4℃ 静止 1 小时后,以 5000 转 / 分钟离心 5 分钟,去上清液。沉淀物用 20mL 0.01mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲溶液溶解,然后加入 10mL 饱和硫酸铵溶液(pH7.8),摇匀,4℃ 静止 30 分钟后,以 5000 转 / 分钟离心 5 分钟,去上清液。重复盐析两次。最终以 2mL 0.01mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲溶液溶解免疫球蛋白 IgG 沉淀物,装入透析袋,对 2000mL 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲溶液透析 12 小时。将上述透析液,加入到约 25 克湿重的纤维素 DEAE-52(取纤维素 DEAE-52 干粉 10 克,用 500mL 0.01mol/L pH8.0 的磷酸盐缓冲溶液浸泡过夜,抽滤)中,4℃ 平衡 1 小时,每 10 分钟搅拌一次,倾入布氏漏斗中,用 pH8.0 的 0.2mol/L 磷酸盐缓冲溶液洗滤。收集滤液,再对 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲溶液透析 12 小时,最后加入适量甘油 -18℃ 保存。

[0019]  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体的制备:

[0020] 取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1mL ~ 2mL,经 PD-10 柱转换缓冲条件,洗脱液为含 0.15mol/L NaCl 的 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46 $A_{280}$ -0.74 $A_{260}$ ),用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500  $\mu\text{L}$  ~ 1000  $\mu\text{L}$  稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2mg ~ 0.4mg 的  $\text{Eu}^{3+}$ - $\text{N}_2$ -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸( $\text{Eu}^{3+}$ -DTTA)的小瓶中,30℃ 磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 S epharoseCL-6B 柱(1×40cm)层析, $A_{280}$  监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

[0021] 固相抗原包被板制备:

[0022] 将恩诺沙星-卵清白蛋白结合物(ENR-OVA)用 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  pH9.6 缓冲液稀释至 10mg/L 的包被液,96(或 48)孔微孔板各孔加 100  $\mu\text{L}$ ,4℃ 放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,加 150  $\mu\text{L}$  含 3g/L OVA 的上述缓冲液封闭,4℃ 放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置 -20℃ 冷冻保存。

[0023] 试剂的配制:

[0024] (1) 恩诺沙星(ENR)标准溶液:(0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mL, 1000ng/mL),从 ENR 纯品中稀释得到,稀释液为 0.1mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液。

[0025] (2) 缓冲液:8mmol/L NaCl、0.2% OVA、50  $\mu\text{mol/L}$  二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1mL/L Tween-80 和 0.1%  $\text{NaN}_3$  的 Tris-HCl pH7.8。

[0026] (3) 洗涤液:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

[0027] (4) 增强液的配制:1L pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮( $\beta$ -NTA),50  $\mu\text{mol}$  三正辛基氧化膦(TOPO),1mL 曲拉通 X-100(Triton X-100)。

[0028] 试剂盒提供的试剂:

[0029] 每一个盒中的试剂足够进行 96 个测量,盒中的材料如下:

[0030] (1) 1×96 孔板(8 条 × 12 孔,可以拆分为单孔)包被有 DES-OVA。

[0031] (2) 6×ENR 标准液,1.0mL/瓶,标准液浓度为:0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/

mL, 100ng/mL, 1000ng/mL。

[0032] (3) 1×ENR 抗体。

[0033] (4) 1×Eu<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体冻干品,用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0034] (5) 1×增强液:15mL。

[0035] (6) 1×洗涤液:30mL,用时以蒸馏水 1 : 25 稀释。

[0036] (7) 1×缓冲液:30mL。

[0037] 实验室应自备的试剂:

[0038] (1) 蒸馏水或去离子水;

[0039] (2) 乙腈;

[0040] (3) 二氯甲烷;

[0041] (4) 正己烷;

[0042] (5) 氢氧化钠溶液:0.1mol/L;

[0043] (6) 乙腈-0.1mol/L 氢氧化钠溶液:取无水乙腈 84mL 加入 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 16mL 混合均匀;

[0044] (7) 磷酸盐缓冲工作液:pH7.2,取 1.45g 磷酸氢二钠(含 12 个结晶水)、0.1g 磷酸二氢钾(无水)、8.0g 氯化钠,溶解于水中并定容至 1000mL。

[0045] 测定之前注意事项:

[0046] (1) 使用之前将所有试剂回升至室温(18℃~30℃)。

[0047] (2) 使用之后立即将所有试剂放回 2℃~8℃。

[0048] (3) 如果样品量大,建议使用多通道移液器。

[0049] (4) 在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖子盖住微孔。

[0050] (5) 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℃。

[0051] 具体检测步骤如下:

[0052] 称取猪肉试样 3.0g(精确至 0.01g),置于 50mL 离心管中,加入乙腈-0.1mol/L NaOH 溶液 9mL,充分混合 10min,4000r/min 以上、15℃离心 10min,取上清液 3mL,加入 0.02mol/L PB 缓冲液 3mL,加入二氯甲烷 8mL,充分混合 10min,4000r/min 以上、15℃离心 10min,去除上清液,取下层有机相 4mL 至干燥容器中,50℃氮气吹干,用缓冲工作液 1mL 溶解干燥的残留物,加入正己烷 1mL 混合 2min,4000r/min 以上、15℃离心 5min,轻吸掉上层和中间部分液体,取下层液 50 μL 用于分析。

[0053] 取 ENR-OVA 板条,加入 50 μL 的 ENR 标准或处理好的样品处理液到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1 : 20 稀释的 ENR 抗体 50 μL,25℃振荡 1 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1 : 20 稀释的 Eu<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体 100 μL,25℃振荡 1 小时,用洗涤液洗六次,加 200 μL 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 ENR 含量,见表 1 和图 2,该例样品溶液中 ENR 浓度为 0.23ng/mL。

[0054] 表 1

[0055]

ENR 标准溶液点							
ENR 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	猪肉 样品
荧光值 (cps)	904592	783472	662223	532183	395973	239612	721235

[0056] 实施实例 2 制备试剂盒

[0057] ENR-BSA 抗原制备：

[0058] 称取 12mg ENR、40mg N-羟基琥珀酰胺 (NHS)、35mg 碳二亚胺 (EDC) 溶于 N,N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 室温搅拌 24h, 制成 A 液; 称取 50mg BSA 溶于 3mL 0.01mol/mL pH7.4 PBS 中, 制成 B 液。将 A 液逐滴加入 B 液, 边加边搅拌, 室温反应 3h, 将反应液蒸馏水中透析 72 小时, 期间换蒸馏水 5 次。或经葡聚糖凝胶 G50 (Sephadex G50) 柱提纯, 以 0.05mol/L pH8.0 碳酸盐缓冲溶液洗脱。收集透析纯化液或第 1 峰的柱洗脱液, 分装保存于 -20℃ 作免疫原用。

[0059] 多克隆恩诺沙星抗体的制备: 与实施例 1 相同, 略。

[0060]  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体的制备: 与实施例 1 相同, 略。

[0061] 固相抗原包被板制备: 与实施例 1 相同。

[0062] 试剂的配制: 与实施例 1 相同。

[0063] 试剂盒提供的试剂: 与实施例 1 相同。

[0064] 实验室应自备的试剂: 与实施例 1 相同。

[0065] 测定之前注意事项: 同实施例 1。

[0066] 具体检测步骤: 同实施例 1。

[0067] 实施实例 3

[0068] 试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同, 用于检测蜂蜜样品。

[0069] 实验室应自备的试剂:

[0070] (1) 0.02mol/L 的 PB 缓冲液: 称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.16g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.87g 至容量瓶中, 加水溶解并定容至 1L;

[0071] (2) 二氯甲烷溶液;

[0072] (3) 0.02mol/L 的 PB 缓冲液: 称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.16g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.87g 至容量瓶中, 加水溶解并定容至 1L;

[0073] (4) 磷酸盐缓冲工作液: pH7.2, 取 1.45g 磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)、0.1g 磷酸二氢钾 (无水)、8.0g 氯化钠, 溶解于水中并定容至 1000mL。

[0074] 测定之前注意事项: 同实施例 1。

[0075] 具体检测步骤如下:

[0076] 准确称取  $1.0\text{g} \pm 0.01\text{g}$  蜂蜜试样于 50mL 离心管中, 加入 0.02mol/L 的 PB 缓冲液 2mL, 震荡至蜂蜜全部溶解, 加入二氯甲烷 8mL, 震荡提取 5min, 4000r/min 以上离心 5min, 轻吸掉上层液, 取下层有机相至干燥容器中, 50℃ 氮气吹干, 用缓冲工作液 1mL 溶解干燥的残留物, 再用缓冲液工作液按比例稀释, 取 50  $\mu\text{L}$  用于分析。

[0077] 取 ENR-OVA 板条, 加入 50  $\mu$  L 的 ENR 标准或处理好的样品处理液到各自的微孔中, 每个标准和样品必须使用新的吸头, 加缓冲液 1 : 20 稀释的 ENR 抗体 50  $\mu$  L, 25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时, 洗涤液洗三次, 加缓冲液 1 : 20 稀释的 EU<sup>3+</sup>- 羊抗兔抗体 100  $\mu$  L, 25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时, 用洗涤液洗六次, 加 200  $\mu$  L 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 ENR 含量, 见表 2 和图 2, 该例样品溶液中 ENR 浓度为 0.17ng/mL。

[0078] 表 2

[0079]

ENR 标准溶液点							
ENR 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	100	1000	蜂蜜 样品
荧光值 (cps)	904592	783472	662223	532183	395973	239612	733093

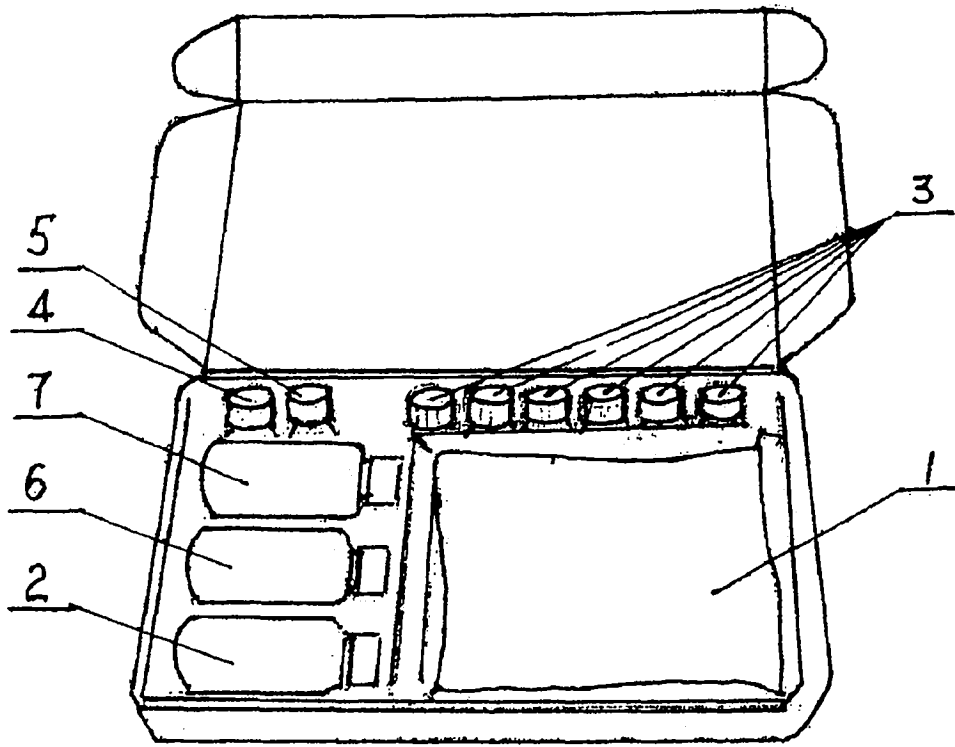


图 1

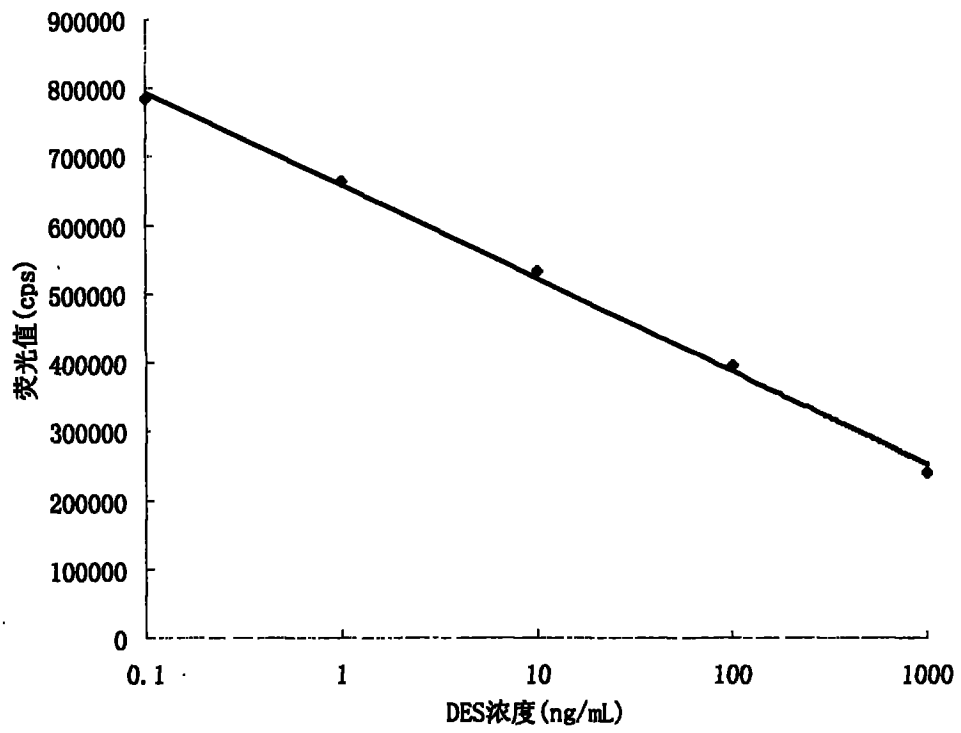


图 2

专利名称(译)	一种恩诺沙星的检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101710117A</a>	公开(公告)日	2010-05-19
申请号	CN200910232657.X	申请日	2009-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省微生物研究所有限责任公司		
[标]发明人	陆茂林 李利东 宓晓黎 袁建兴 黄丽俊 陈蕴		
发明人	陆茂林 李利东 宓晓黎 袁建兴 黄丽俊 陈蕴		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测恩诺沙星的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域，用于对动物源性食品、血液、尿液及饲料中恩诺沙星 (ENR) 含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用 TRFIA 检测 ENR，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 ENR-载体蛋白，加入 ENR 标准或样品，再加入 ENR 抗体。游离的 ENR 与微孔板上的 ENR-载体蛋白竞争 ENR 抗体，没有连接的 ENR 抗体被洗涤除去，加入 Eu<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的 Eu<sup>3+</sup>-羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps，荧光强度与样品中的 ENR 浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中 ENR 的含量。本发明提供的检测 ENR 试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，可以达到 0.01ng/mL 以上。

