



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101713778 A

(43) 申请公布日 2010.05.26

(21) 申请号 200910232655.0

(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 宓晓黎 李利东 黄丽俊  
李英 张六六 储敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

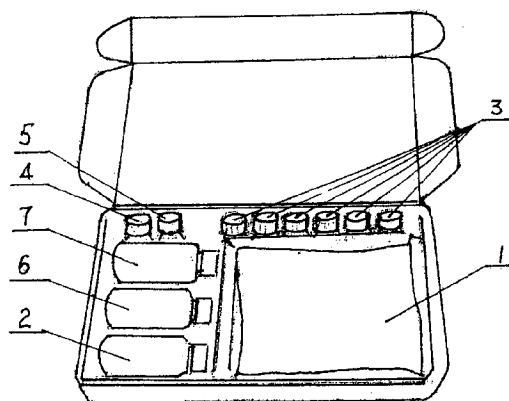
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种环丙沙星的检测试剂盒及其检测方法

## (57) 摘要

一种检测环丙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、尿液及饲料中环丙沙星 (CIP) 含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用 TRFIA 检测 CIP，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有 CIP-载体蛋白，加入 CIP 标准或样品，再加入 CIP 抗体。游离的 CIP 与微孔板上的 CIP-载体蛋白竞争 CIP 抗体，没有连接的 CIP 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 CIP 浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中 CIP 的含量。本发明提供的检测 CIP 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. 一种检测环丙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),环丙沙星标准溶液(3),环丙沙星的抗体(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 CIP-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,其中的环丙沙星标准溶液(3),从 CIP 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,CIP 浓度分别为:0ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,60ng/mL,100ng/mL。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中的环丙沙星的抗体(4),用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2mL 混合 2mg CIP-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  $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸}$ ,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  $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸}$  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所述的试剂盒检测环丙沙星的方法,其特征是取包被有 CIP-OVA 的微孔包被板,加入 CIP 标准溶液或样品处理液到各自的微孔中,再加入 CIP 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 CIP 含量。

8. 根据权利要求8所述的检测环丙沙星的方法,其操作为:取包被有 CIP-OVA 的微孔包被板,加入 50  $\mu\text{L}$  的 CIP 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 CIP 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 CIP 的含量。

## 一种环丙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环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP) 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、尿液及饲料中环丙沙星药物残留量的检测。

### 背景技术

[0002] 环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP), 又称环丙氟哌酸, 属于第三代喹诺酮类抗菌合成药物, 其抗菌谱广、抗菌活性强, 是现在临床应用的氟喹诺酮类药物中抗菌活性最强的药物之一, 已广泛应用于人类临床和畜牧养殖业。由于这类药易诱发细菌耐药性, 长期应用会出现蓄积中毒, 从而可引起关节软骨病、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, 以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。因此加强对该药在动物性食品中的残留检测和监督就显得非常必要。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环丙沙星残留的主要方法有微生物法、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。常用的环丙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环丙沙星检测试剂盒及检测方法, 用于定性或定量地检测动物源性食品、血液、尿液及饲料中环丙沙星的残留量; 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: 该环丙沙星检测试剂盒是由 1、多孔包被板, 2、缓冲液, 3、环丙沙星标准溶液, 4、环丙沙星抗体, 5、铕标记羊抗兔抗体, 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 CIP。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，利用人工抗原免疫家兔，获得含有抗体的血清，经过生化提纯分离免疫球蛋白；第二，Eu<sup>3+</sup> 标记羊抗兔抗体的制备。

[0008] 测定方法为：测定的基础是标记免疫反应。包被有 CIP- 载体蛋白的微孔板，加入 CIP 标准溶液或样品处理液到各自的微孔中、再加入 CIP 抗体，振荡反应，游离的 CIP 与微孔板上的 CIP- 载体蛋白竞争 CIP 抗体，洗涤液洗涤，没有连接的 CIP 抗体在洗涤步骤中被除去。加入 Eu<sup>3+</sup>- 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 Eu<sup>3+</sup>- 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 CIP 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：环丙沙星检测试剂盒示意图。1、多孔包被板，2、缓冲液，3、环丙沙星标准溶液，4、环丙沙星抗体，5、铕标记羊抗兔抗体，6、洗涤液，7、增强液。

[0011] 图 2：CIP-TRFIA 标准曲线图。

### 具体实施方式

[0012] 实施例 1：试剂盒的制备和动物源性食品检测

[0013] 免疫抗原的制备：

[0014] 本发明所述的免疫抗原为将环丙沙星采用混合酸酐法与大分子载体蛋白结合，以合成的 CIP-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 CIP，溶于 2mL 二氧六环中，置 4℃ 10min，依次加入三正丁胺 20 μL 和氯甲酸异丁酯 10 μL，于 4℃ 搅拌 30min，作为 B 液。将 A 液在 4℃ 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℃ 作免疫原用。

[0016] 环丙沙星多克隆抗体的制备：

[0017] 将上述合成的环丙沙星-牛血清白蛋白结合物 (CIP-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，在免疫原中加等量弗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 ( $1.46A_{280}$ - $0.74A_{260}$ ),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 SepharoseCL-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] 将环丙沙星-卵清白蛋白结合物 (CIP-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,洗涤三次,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) 环丙沙星标准溶液:(0ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,60ng/mL,100ng/mL),从 CIP 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: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  $\mu\text{mol}$  三正辛基氧化磷 (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 CIP-OVA。

[0031] (2) 6×CIP 标准溶液,1.0mL/瓶,标准溶液浓度为:0ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,60ng/mL,100ng/mL。

[0032] (3) 1×CIP 抗体,用时 0.5mL 蒸馏水溶解。

[0033] (4) 1× $\text{Eu}^{3+}$ -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) 二氯甲烷；
- [0040] (3) 正己烷；
- [0041] (4) 0.1mol/L 氢氧化钠溶液；
- [0042] (5) 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；
- [0043] (6) 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，溶解于水中并定溶至 1000mL。
- [0044] 测定之前注意事项：
- [0045] (1) 使用之前将所有试剂回升至室温（18℃～30℃）。
- [0046] (2) 使用之后立即将所有试剂放回 2℃～8℃。
- [0047] (3) 如果样品量大，建议使用多通道移液器。
- [0048] (4) 在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，用盖子盖住微孔。
- [0049] (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℃。
- [0050] 具体检测步骤如下：
- [0051] 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，3800r/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，3800r/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，3800r/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。
- [0052] 取 CIP-OVA 板条，加入 50 μL 的 CIP 标准溶液或样品处理液的到各自的微孔中，每个标准和样品溶液必须使用新的吸头，加缓冲液 1：20 稀释的 CIP 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。根据标准曲线计算样品中的 CIP 含量，见表 1，该例的样品处理液中 CIP 浓度为 3.28ng/mL。
- [0053] 表 1
- [0054]

CIP 标准溶液点							
CIP 浓度 (ng/mL)	0	5	10	20	60	100	猪肉 样品
荧光值 (cps)	620445	498754	418407	361147	246081	187262	558012

- [0055] 实施实例 2 试剂盒的制备
- [0056] CIP-BSA 抗原制备：
- [0057] 称取 12mg CIP 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℃ 作免疫抗原用。

[0058] 多克隆环丙沙星抗体的制备: 与实施例 1 相同。

[0059]  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体的制备: 与实施例 1 相同。

[0060] 固相抗原制备: 与实施例 1 相同。

[0061] 试剂的配制: 与实施例 1 相同。

[0062] 试剂盒提供的试剂: 与实施例 1 相同。

[0063] 实验室应自备的试剂: 与实施例 1 相同。

[0064] 测定之前注意事项: 同实施例 1。

[0065] 具体检测步骤: 同实施例 1。

[0066] 实施实例 3

[0067] 试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同, 用于检测蜂蜜样品。

[0068] 实验室应自备的试剂:

[0069] (1) 蒸馏水或去离子水;

[0070] (2) 二氯甲烷;

[0071] (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;

[0072] (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。

[0073] 测定之前注意事项: 同实施例 1。

[0074] 具体检测步骤如下:

[0075] 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, 3800r/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, 再用缓冲工作液按比例稀释, 取 50  $\mu\text{L}$  用于分析。

[0076] 取 CIP-OVA 板条, 加入 50  $\mu\text{L}$  的 CIP 标准溶液或样品处理液到各自的微孔中, 每个标准和样品溶液必须使用新的吸头, 加缓冲液 1:20 稀释的 CIP 抗体 50  $\mu\text{L}$ , 25℃ 振荡 1 小时, 洗涤液洗三次, 加缓冲液 1:20 稀释的  $\text{Eu}^{3+}$ -羊抗兔抗体 100  $\mu\text{L}$ , 25℃ 振荡 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。从标准曲线计算样品中的 CIP 含量, 见表 2 和图 2, 该例的样品溶液中 CIP 浓度为 2.42ng/mL。

[0077] 表 2

[0078]

CIP 标准溶液点							
CIP 浓度 (ng/mL)	0	5	10	20	60	100	蜂蜜 样品
荧光值 (cps)	611448	485858	414752	337493	252898	200623	542768

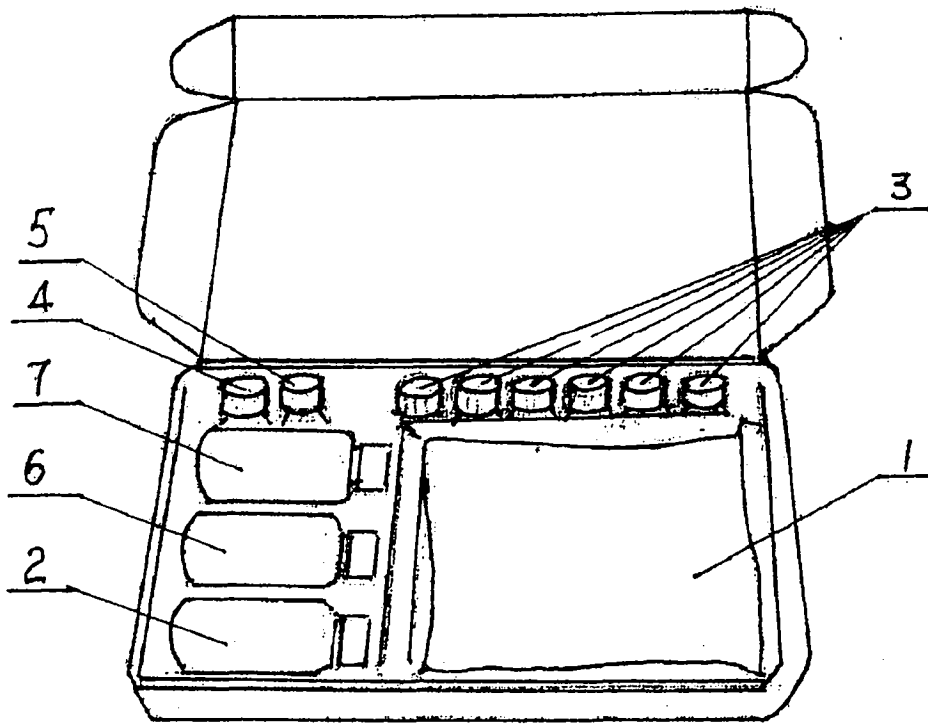


图 1

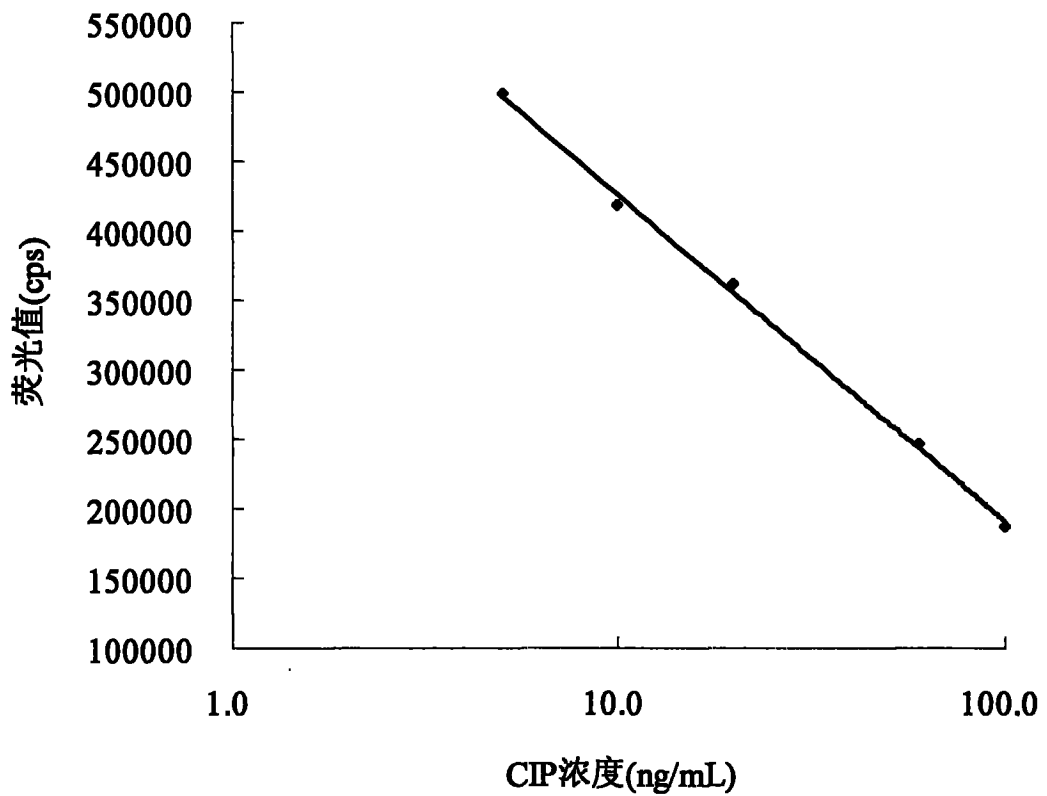


图 2

专利名称(译)	一种环丙沙星的检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101713778A</a>	公开(公告)日	2010-05-26
申请号	CN200910232655.0	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 宓晓黎 李利东 黄丽俊 李英 张六六 储敏		
发明人	陆茂林 宓晓黎 李利东 黄丽俊 李英 张六六 储敏		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种检测环丙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、尿液及饲料中环丙沙星(CIP)含量的检测。本发明配制的试剂盒，采用TRFIA检测CIP，测定的基础是标记免疫反应。微孔板包被有CIP-载体蛋白，加入CIP标准或样品，再加入CIP抗体。游离的CIP与微孔板上的CIP-载体蛋白竞争CIP抗体，没有连接的CIP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CIP浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中CIP的含量。本发明提供的检测CIP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。

