



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725142 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201811606861.9

G01N 21/78(2006.01)

(22)申请日 2018.12.27

(71)申请人 国家食品安全风险评估中心

地址 100022 北京市朝阳区广渠路37号院2
号楼

申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

(72)发明人 骆鹏杰 陈霞 王紫菲 陈银辉
李敬光 赵云峰

(74)专利代理机构 北京华进京联知识产权代理
有限公司 11606

代理人 黎艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂
盒及应用和检测方法

(57)摘要

一种检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫
试剂盒及应用和检测方法,酶联免疫试剂盒包
括:包被有包被抗原的酶标板、氟喹诺酮类标准
品溶液、氟喹诺酮类抗体工作液、酶标二抗工作
液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓
缩洗涤液;所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧
化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底
物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止
液为2mol/L的硫酸的水溶液;所述浓缩稀释液为
磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液为磷酸盐吐温缓
冲液。如此,通过采用间接竞争酶联分析法来对
动物源食品进行氟喹诺酮类药物残留检测,样品
处理过程及检测过程都相对较为简单,通过酶标
仪就可以完成大批量样品的检测。

1. 一种检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括:酶标板、氟喹诺酮类标准品溶液、氟喹诺酮类抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液;

所述酶标板包被有氟喹诺酮类包被抗原;

所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;

所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;

所述终止液为2mol/L的硫酸的水溶液;

所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液;

所述浓缩洗涤液包括磷酸盐吐温缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液包括0.5%吐温-20和0.01mol/L的磷酸盐缓冲液,所述浓缩洗涤液的pH值范围为7.0-7.5,所述浓缩洗涤液用于稀释十倍使用。

3. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述氟喹诺酮类标准品溶液的浓度分别为0 μ g/L、0.05 μ g/L、0.15 μ g/L、0.45 μ g/L、1.35 μ g/L和4.05 μ g/L。

4. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述浓缩稀释液为0.1mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5,所述浓缩稀释液用于稀释十倍使用。

5. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗工作液由酶标二抗加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到。

6. 根据权利要求5所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗通过将羊抗鼠抗体与辣根过氧化物酶采用过碘酸钠改良法进行偶联得到。

7. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述氟喹诺酮类抗体工作液为采用氟喹诺酮类包被抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:10000比例制备得到。

8. 如权利要求1至7任一项中所述的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒在动物源食品检测领域的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述动物源食品包括:蜂蜜、牛奶和动物组织,所述动物组织包括鱼肉、虾肉、牛肉、猪肉、鸡肉、猪肝和鸡肝。

10. 一种动物源食品的氟喹诺酮类药物残留的检测方法,其特征在于,采用如权利要求1至7任一项中所述的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒进行检测。

检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及应用和检测方法

技术领域

[0001] 本申请涉及动物源食品兽药残留检测技术领域,特别是涉及一种检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 喹诺酮类药物是一类十分重要的广谱抗生素,能抑制细菌DNA回旋酶的作用,造成细菌DNA的不可逆损害,进而达到抗菌的效果。早些年由于其高效、低毒、组织穿透力强,已成为兽医临床和水产养殖中最重要的抗感染药物之一,被大量用于治疗、预防和促生长。然而由于喹诺酮类药物的耐药性和潜在的致癌性引起广泛的关注。氟喹诺酮类药物的广泛应用,极大地提高了动物性食品的数量和质量,但某些养殖人员为了谋取利益,过量使用药物,导致动物性食品中氟喹诺酮类药物残留问题不断加重。人们长期食用氟喹诺酮类药物残留超标的动物性食品,相当于摄入低剂量的氟喹诺酮类药物。此外,最近的文献(Jo Marchant, et al. When antibiotics turn toxic: Commonly prescribed drugs called fluoroquinolones cause rare, disabling side effects. Researchers are struggling to work out why. Nature. Mar 2018.)表明,氟喹诺酮对人类的健康具有极大的安全风险,可能会造成肌腱断裂,且容易造成不可逆神经损伤风险,健康人群因为轻微疾病而服用了氟喹诺酮类药物,然后发展为残疾和潜在不可逆病症;氟喹诺酮类药物在严重不良反应报告中的致残比例明显高于其它抗生素。虽然不良反应病例仅占实际情况的1-10%,但依然使得动物源食品中的喹诺酮类药物的检测工作面临极大挑战。然而,目前的喹诺酮类药物的检测方法,主要是液相色谱、荧光免疫分析等,检测过程较为繁琐麻烦,且检测时间较长。目前,急需方便、快速的检测手段,以对现场大批量样品进行检测。

发明内容

[0003] 基于此,有必要提供一种能够适用于大批量样品检测以及检测过程较为简单的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及检测方法。

[0004] 一种检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,包括:酶标板、氟喹诺酮类标准品溶液、氟喹诺酮类抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液;

[0005] 所述酶标板包被有氟喹诺酮类包被抗原;

[0006] 所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;

[0007] 所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;

[0008] 所述终止液为2mol/L的硫酸的水溶液;

[0009] 所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液;

[0010] 所述浓缩洗涤液为磷酸盐吐温缓冲液。

[0011] 在其中一个实施例中,所述浓缩洗涤液包括0.5%吐温-20和0.01mol/L的磷酸盐

缓冲液(PBST),所述浓缩洗涤液的pH值范围7.0-7.5,所述浓缩洗涤液用于稀释十倍使用。

[0012] 在其中一个实施例中,所述氟喹诺酮类标准品溶液的浓度分别为0 μ g/L、0.05 μ g/L、0.15 μ g/L、0.45 μ g/L、1.35 μ g/L和4.05 μ g/L。

[0013] 在其中一个实施例中,所述浓缩稀释液为0.1mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5,所述浓缩稀释液用于稀释十倍使用。

[0014] 在其中一个实施例中,所述酶标二抗工作液由酶标二抗加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到。

[0015] 在其中一个实施例中,所述酶标二抗通过将羊抗鼠抗体与辣根过氧化物酶采用过碘酸钠改良法进行偶联得到。

[0016] 在其中一个实施例中,所述氟喹诺酮类抗体工作液为采用氟喹诺酮类包被抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:10000比例制备得到。

[0017] 如上任一实施例中所述的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒在动物源食品检测领域的应用。

[0018] 在其中一个实施例中,所述动物源食品包括:蜂蜜、牛奶和动物组织,所述动物组织包括鱼肉、虾肉、牛肉、猪肉、鸡肉、猪肝和鸡肝。

[0019] 一种动物源食品的氟喹诺酮类药物残留的检测方法,采用如上任一实施例中所述的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒进行检测。

[0020] 上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,通过采用间接竞争酶联分析法来对动物源食品进行氟喹诺酮类药物残留检测,相对于传统的液相色谱、荧光免疫分析等检测方法,采用上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒的检测方法,样品处理过程及检测过程都相对较为简单,通过酶标仪就可以完成大批量样品的检测。通过采用以过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液为底物液A,通过采用四甲基联苯二胺的乙醇溶液为底物液B,在酶标二抗的作用下整体反应液呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色,显色的深浅与标准品或样品中氟喹诺酮类的含量成反比例关系,通过采用该方法可直接用于检测动物源食品中氟喹诺酮类的含量。因而,可以较好地进行定量分析。

具体实施方式

[0021] 为了便于理解本申请,为使本申请的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面对本申请的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本申请,给出了本申请的较佳实施方式。但是,本申请可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施方式。相反地,提供这些实施方式的目的是使对本申请的公开内容理解的更加透彻全面。本申请能够以很多不同于在此描述的其它方式来实现,本领域技术人员可以在不违背本申请内涵的情况下做类似改进,因此本申请不受下面公开的具体实施例的限制。此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本申请的描述中,“多个”的含义是至少两个,例如两个,三个等,除非另有明确具体的限定。在本申请的描述中,“若干”的含义是至少一个,例如一个,两个等,除非另有明确具体的限定。除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中所使用的术语只

是为了描述具体的实施方式的目的,不是旨在于限制本申请。本文所使用的术语“及/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0022] 一实施例中,一种检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,包括:包被有氟喹诺酮类包被抗原的酶标板、氟喹诺酮类标准品溶液、氟喹诺酮类抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液。

[0023] 一实施例中,氟喹诺酮类包被抗原包被酶标板过程如下:用0.05mol/L的pH为9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)作为包被液,将氟喹诺酮类包被抗原稀释成氟喹诺酮类包被抗原的浓度为25微克/毫升。取96孔酶标板,每孔中加入包被液100微升/孔,37℃孵育2h,避光,取出酶标板倒掉板酶标内液体,加入稀释10倍后的浓缩洗液300微升/孔,洗板2次,30秒/次,然后加入0.5%牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)封闭,150微升/孔,37℃放置1.5h,弃去封闭液直接拍干,拍干后的酶标板在25℃下晾干,然后将酶标板放置于4℃条件下保存。在其中一实施例中,将包被液孵育过程中,也可以采用4℃避光孵育过夜。

[0024] 本实施例中,所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液;所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液;所述终止液为2mol/L的硫酸的水溶液,即硫酸溶解于水形成的溶液,其中,硫酸的浓度为2mol/L;所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液;例如,所述浓缩稀释液为0.1mol/L的PBS,pH值范围7.0-7.5,所述浓缩稀释液用于稀释十倍使用。例如,所述浓缩洗涤液为磷酸盐吐温缓冲液。例如,所述浓缩洗涤液包括0.5%吐温-20和0.01mol/L的PBS,或者说,所述浓缩洗涤液为包括0.5%吐温-20的0.01mol/L的PBST,其中,所述浓缩洗涤液的pH值范围7.0-7.5,所述浓缩洗涤液用于稀释十倍使用。例如,所述氟喹诺酮类标准品溶液的浓度分别为0μg/L、0.05μg/L、0.15μg/L、0.45μg/L、1.35μg/L和4.05μg/L。

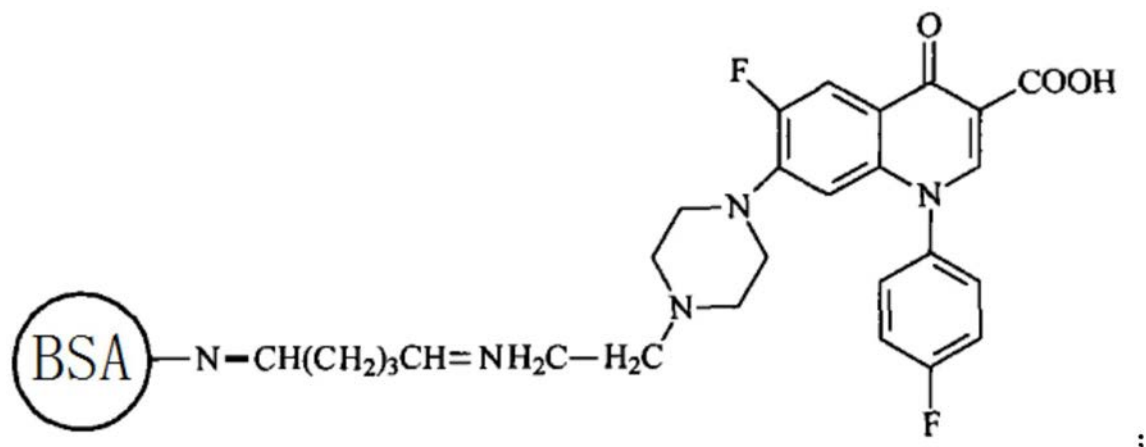
[0025] 上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,通过采用间接竞争酶联分析法来对动物源食品进行氟喹诺酮类药物残留检测,相对于传统的液相色谱、荧光免疫分析等检测方法,采用上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒的检测方法,样品处理过程及检测过程都相对较为简单,通过酶标仪就可以完成大批量样品的检测。通过采用以过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液为底物液A,通过采用四甲基联苯二胺的乙醇溶液为底物液B,在酶标二抗的作用下整体反应液呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色,显色的深浅与标准品或样品中氟喹诺酮类的含量成反比例关系,通过采用该方法可直接用于检测动物源食品中氟喹诺酮类的含量。因而,可以较好地进行定量分析。

[0026] 在其中一个实施例中,所述酶标二抗工作液由酶标二抗加抗体稀释液按1:2000稀释制备得到。例如,所述酶标二抗通过将羊抗鼠抗体与辣根过氧化物酶采用过碘酸钠改良法进行偶联得到。当然,酶标二抗也可以通过市售购买得到。

[0027] 在其中一个实施例中,所述氟喹诺酮类抗体工作液为采用氟喹诺酮类包被抗原免疫小鼠得到单克隆抗体,用抗体稀释液稀释成1:10000比例制备得到。经测定,得到的单克隆抗体对沙拉沙星的半数抑制量为17.5ng/mL,最低检测限为1.7ng/mL。

[0028] 一实施例中,所述氟喹诺酮类包被抗原为氟喹诺酮抗原和牛血清蛋白偶联得到;所述氟喹诺酮类包被抗原分子式如下:

[0029]



[0030] 式中,BSA(Albumin from bovine serum)即为牛血清蛋白。通过采用氟喹诺酮抗原和牛血清蛋白偶联得到的氟喹诺酮类包被抗原,其灵敏度较好,且准确地和精确度都较高,能够提高检测的准确率。

[0031] 需要说明的是,本实施例中的氟喹诺酮抗原,可以通过市售购买得到。当然,也可以根据上述分子式找合成公司合成。一实施例中,氟喹诺酮抗原采用氟喹诺酮抗原的制备方法制备得到。例如,氟喹诺酮抗原的制备方法为将盐酸沙拉沙星(CAS:91296-87-6)和2-氯乙胺($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)反应制备得到。例如,氟喹诺酮抗原的制备方法包括如下步骤:

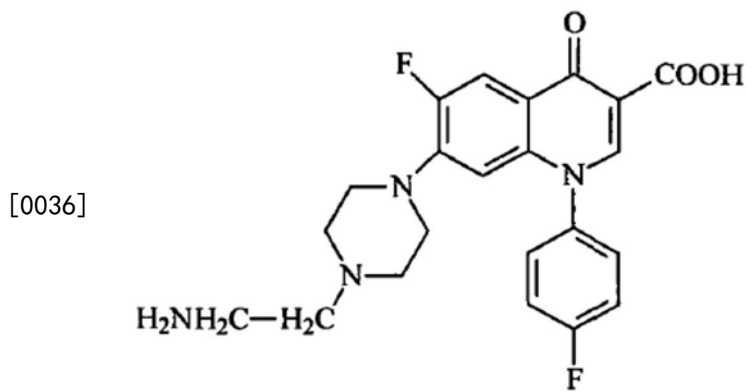
[0032] S110:将2.5毫摩尔的盐酸沙拉沙星标准品用30毫升的双蒸水溶解后,制备得到盐酸沙拉沙星溶液;

[0033] 本实施例中,通过采用双蒸水来溶解盐酸沙拉沙星,能够降低水中杂质对后续抗原的影响。例如,盐酸沙拉沙星标准品为德国Dr.Ehrenstorfer公司生产,其货号为C16908000。例如,本实施例中,通过加入0.1摩尔/升的氢氧化钠溶液助溶。例如,氢氧化钠为分析纯,其溶解的水溶液为双蒸水。例如,所述步骤S110具体为:将30毫升双蒸水加热至 $80.5^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$,然后开启磁力搅拌器进行搅拌,搅拌速率为70转/分钟至75转/分钟,加入2.5毫摩尔的盐酸沙拉沙星标准品,滴加0.1摩尔/升的氢氧化钠溶液直至pH为8.0,得到盐酸沙拉沙星溶液。如此,本实施例中,通过加入0.1摩尔/升的氢氧化钠溶液,预先将pH控制为7.8,便于后续盐酸沙拉沙星与2-氯乙胺进行反应,有利于提高产物产率。经过申请人研究发现,通过预先将pH控制为7.8,控制搅拌速率为70转/分钟至75转/分钟,通过控制反应温度为 $80.5^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$,以及通过将2.5毫摩尔的盐酸沙拉沙星标准品用30毫升的双蒸水溶解时,能够明显提高盐酸沙拉沙星和2-氯乙胺制备得到的氟喹诺酮抗原的产率,其为理论产率的94.5%以上。理论产率即为根据盐酸沙拉沙星和2-氯乙胺的化学反应式计算得到的理论差率。而不在上述参数范围时,产率仅为理论产率的82%至87%。申请人推测, 80.5°C 的温度控制或者说 80.4 至 80.6°C 的温度控制对反应尤为重要。通过选择控温精度为 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 的恒温磁力搅拌器能够较好地提高氟喹诺酮抗原的产率。

[0034] S120:向盐酸沙拉沙星溶液中加入2.5毫摩尔2-氯乙胺,反应温度为 $80.5^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$,反应时间为110分钟,制备得到反应液。

[0035] 需要说明的是,本实施例中,需要继续上述搅拌操作,即控制磁力搅拌器继续搅拌,搅拌速率为70转/分钟至75转/分钟。通过预先将盐酸沙拉沙星溶液的pH控制为7.8,由

于2-氯乙胺呈现一定的弱碱性,在加入2.5毫摩尔2-氯乙胺后,能够使得整体反应液的pH为8.0至8.1左右。通过向盐酸沙拉沙星溶液中加入2.5毫摩尔2-氯乙胺,能够制备得到氟喹诺酮抗原,其分子式如下:



[0037] S130:将反应液的温度降温到60摄氏度,加入0.1摩尔/升的盐酸调节pH至6.0,析出固体,将该固体采用滤纸抽滤并水洗,95摄氏度干燥1小时后,即制备得到氟喹诺酮抗原。需要说明的是,在实际操作中,质控时可通过质谱鉴定是否偶联成功。

[0038] 上述氟喹诺酮抗原的制备方法,能够较好地制备得到氟喹诺酮抗原。尤其是将反应温度控制为80.5摄氏度(±0.1摄氏度),能够较好地提高其产率。

[0039] 一实施例中,采用如上任一实施例中所述的氟喹诺酮抗原和牛血清蛋白偶联得到氟喹诺酮类包被抗原的过程如下:

[0040] 称取60毫克的牛血清蛋白,溶解于2毫升磷酸盐缓冲液(PBS)中,得到牛血清蛋白溶液;

[0041] 取48毫摩尔的氟喹诺酮抗原,溶解于4毫升的氮,氮-二甲基甲酰胺中,得到氟喹诺酮抗原溶液;

[0042] 将牛血清蛋白溶液和氟喹诺酮抗原溶液混合均匀后,得到混合液;

[0043] 向混合液中加入25wt%的戊二醛水溶液24微升,室温反应4.5小时,得到反应液;3800转/分钟离心6分钟;取上清置于透析袋中,以PBS为透析液放置于4摄氏度的冰箱中透析65小时至70小时,将透析袋中的液体浓缩后,即制备得到氟喹诺酮类包被抗原。其中,透析袋的分子截流量为五万道尔顿。

[0044] 如此,能够较好地制备得到氟喹诺酮类包被抗原。需要说明的是,质控时可通过紫外扫描和红外光谱仪鉴定是否偶联成功。例如,氮,氮-二甲基甲酰胺为N,N-二甲基甲酰胺。

[0045] 又一实施例中,氟喹诺酮类包被抗原采用如下制备方法制备得到:将5mg活化蛋白cBSA溶于3mL含76wt%N,N-二甲基甲酰胺的0.02mol/L的pH为7.4的PB(磷酸缓冲液)中,然后加入20mg的环丙沙星、10mg的N-羟基琥珀酰亚胺和10mg的碳二亚胺($C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$),4℃搅拌过夜,得到反应液。将反应液置于透析袋中于0.02mol/L的pH为7.4的PB中透析3天,然后将透析液进行冷冻干燥即制备得到本实施例中的氟喹诺酮类包被抗原。例如,所述活化蛋白cBSA(cationic bovine serum albumin,也叫阳离子牛血清白蛋白)为蛋白BSA(牛血清白蛋白)与乙二胺联结而得到。如此,制备得到的氟喹诺酮类包被抗原包被效果好,其检测灵敏度较高。

[0046] 又一实施例中,氟喹诺酮类包被抗原采用如下制备方法制备得到:(1)取100μL的

氟喹诺酮标准品与等摩尔的二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺溶于100 μ L无水四氢呋喃(THF)中,室温避光搅拌30min,反应液于4000r/min离心15min后取上清,并以无水四氢呋喃洗涤固体3次,将上述清液合并后抽真空使其干燥,待无水四氢呋喃挥发完全后,残留物溶于200 μ L的N,N-二甲基甲酰胺中,得到第一溶液;(2)将10mg的蛋白cBSA完全溶于300 μ L的0.13mol/L的pH为9.6的NaHCO₃溶液中,得到第二溶液;(3)将第一溶液缓慢滴加到第二溶液中,缓慢搅拌反应2h,然后装透析袋于PBS中透析72h。最后收集透析液并真空冻干干燥,即为本实施例中制备得到的氟喹诺酮类包被抗原,将其置于-20℃储存备。如此,制备得到的氟喹诺酮类包被抗原包被效果好,其检测灵敏度较高。

[0047] 上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,通过采用间接竞争酶联分析法来对动物源食品进行氟喹诺酮类药物残留检测,相对于传统的液相色谱、荧光免疫分析等检测方法,采用上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒的检测方法,样品处理过程及检测过程都相对较为简单,通过酶标仪就可以完成大批量样品的检测。通过采用以过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液为底物液A,通过采用四甲基联苯二胺的乙醇溶液为底物液B,在酶标二抗的作用下整体反应液呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色,显色的深浅与标准品或样品中氟喹诺酮类的含量成反比例关系,通过采用该方法可直接用于检测动物源食品中氟喹诺酮类的含量。因而,可以较好地定量分析。此外,通过采用氟喹诺酮抗原和牛血清蛋白偶联得到的氟喹诺酮类包被抗原,其灵敏度较好,且准确地和精确度都较高,能够提高检测的准确率。

[0048] 如上任一实施例中所述的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒在动物源食品检测领域的应用。

[0049] 在其中一个实施例中,所述动物源食品包括:蜂蜜、牛奶和动物组织,所述动物组织包括鱼肉、虾肉、牛肉、猪肉、鸡肉、猪肝和鸡肝。

[0050] 一种动物源食品的氟喹诺酮类药物残留的检测方法,采用如上任一实施例中所述的检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒进行检测。

[0051] 一实施例中,检测方法如下:预处理待测样本,取包被有氟喹诺酮类包被抗原的酶标板,按序分别加入氟喹诺酮类标准品溶液/样本、酶标二抗工作液、氟喹诺酮类抗体工作液各50 μ L/孔到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置室温25℃避光环境中反应30min,将孔内液体甩干,用洗涤工作液充分洗涤4~5次,每次间隔10s,拍干后加入底物液A50 μ L/孔,底物液B 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15~20min,加入终止液50微升/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处或双波长450/630nm检测,测定每孔吸光度值,需要在5min内读完数据,然后以的标准品浓度(ppb)的对数为横坐标,标准品百分吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线,对照标准曲线计算样本中氟喹诺酮类药物残留的含量。

[0052] 本发明的氟喹诺酮类检测的酶联免疫试剂盒,其检测灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的检测。检测氟喹诺酮类总残的酶联免疫试剂盒的原理是固相间接竞争酶联免疫反应,把提取的样品、酶标二抗工作液和抗体工作液加入对应的酶标板微孔中,孵育一段时间后,洗板加入底物液A、底物液B,在酶的作用下显色剂呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色。显色的深浅与标准品或样品中氟喹诺酮类总残的含量成反比例关系。该方法可直接用于检测动物源食品中氟喹诺酮类总残的含量,即总残留的含量。

[0053] 下面给出具体实施例继续对本发明的动物源食品的氟喹诺酮类药物残留的检测方法予以说明。

[0054] 具体实施例

[0055] 1、酶联免疫试剂盒的试剂盒组成：

[0056] 1.1喹诺酮工作液：喹诺酮类标准品浓度为0ppb、0.3ppb、0.9ppb、2.7ppb、8.1ppb、24.3ppb；

[0057] 1.2喹诺酮类高浓度标准品：1瓶，1ppm (2mL)；

[0058] 1.3喹诺酮类酶标板：1块 (8孔×12条)；

[0059] 1.4喹诺酮类抗体工作液：1瓶 (7mL)；

[0060] 1.5酶标Ⅱ抗工作液：1瓶 (7mL)；

[0061] 1.6浓缩样品稀释液：1瓶 (4×, 30mL)；即4瓶，每瓶30ml，下同。

[0062] 1.7浓缩洗涤液：1瓶 (20×, 40mL)；

[0063] 1.8底物液A、底物液B各1瓶 (7mL)；

[0064] 1.9终止液：1瓶 (7mL)；

[0065] 需要说明的是，本实施例中的酶标板中的氟喹诺酮类包被抗原的制备方法如下：

(1) 取100μL的氟喹诺酮标准品与等摩尔的二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺溶于100μL无水四氢呋喃(THF)中，室温避光搅拌30min，反应液于4000r/min离心15min后取上清，并以无水四氢呋喃洗涤固体3次，将上述清液合并后抽真空使其干燥，待无水四氢呋喃挥发完全后，残留物溶于200μL的N,N-二甲基甲酰胺中，得到第一溶液；(2) 将10mg的蛋白cBSA完全溶于300μL的0.13mol/L的pH为9.6的NaHCO₃溶液中，得到第二溶液；(3) 将第一溶液缓慢滴加到第二溶液中，缓慢搅拌反应2h，然后装透析袋于PBS中透析72h。最后收集透析液并真空冻干干燥，即为本实施例中制备得到的氟喹诺酮类包被抗原。

[0066] 2、检测需要的设备和其它试剂

[0067] 2.1需要的设备

[0068] 2.1.1酶标仪，检测波长450nm，参考波长630nm。

[0069] 2.1.2均质器；

[0070] 2.1.3天平，精度0.01g；

[0071] 2.1.4离心机；

[0072] 2.1.5氮吹仪；

[0073] 2.1.6摇床；

[0074] 2.1.7旋涡振荡器；

[0075] 2.1.8微量移液器；

[0076] 2.1.9计时器；

[0077] 2.2其它试剂；

[0078] 2.2.1乙腈(分析纯)；

[0079] 2.2.2正己烷(分析纯)；

[0080] 3、贮存

[0081] 试剂盒贮存于2~8℃，切勿冷冻。未使用完的微孔板条应密封，2~8℃保存。

[0082] 4、工作液准备

- [0083] 4.1样品稀释液:用去离子水按1:10 (1份浓缩液+9份去离子水) 稀释。
- [0084] 4.2洗涤工作液:用去离子水按1:10 (1份浓缩液+9份去离子水) 稀释。
- [0085] 5、样品前处理
- [0086] 5.1蜂蜜和组织(鱼肉、虾肉、牛肉、猪肉、鸡肉、猪肝、鸡肝)。
- [0087] 5.1.1准确称取 1 ± 0.01 g均质后的样品于离心管中。
- [0088] 5.1.2加入0.5mL样品稀释液,充分涡动20s;
- [0089] 5.1.3再加入4.5mL乙腈,立即涡动至组织完全分散;
- [0090] 5.1.4室温 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) 下,摇床300rpm振摇20min;
- [0091] 5.1.5 4000g离心10min;
- [0092] 5.1.6取1mL上清于离心管中;
- [0093] 5.1.7、50~60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,氮气吹干;
- [0094] 5.1.8加入2mL正己烷,充分涡动20s,再加入1mL样品稀释液,低速涡动10s;
- [0095] 5.1.9、4000g以上,离心5min,完全弃去上层正己烷及中间层杂质;
- [0096] 5.1.10鱼肉、虾肉、鸡肉、猪肉和蜂蜜样品,直接取50 μL 进行检测;牛肉、猪肝、鸡肝样品,取100 μL 与100 μL 样品稀释液,充分涡动20s后,取50 μL 进行检测。
- [0097] 5.2纯牛奶
- [0098] 5.2.1取纯牛奶样品,充分平衡至室温 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) ;
- [0099] 5.2.2取50 μL 于离心管中,加入450 μL 样品稀释液,充分涡动20s;
- [0100] 5.2.3取50 μL 进行检测。
- [0101] 6、检测
- [0102] 6.1将所需的酶标板条插入酶标板架上,未使用的酶标板条用自封袋密封后,立即保存于2-8 $^{\circ}\text{C}$ 环境中,并记录下各标准品和样品的位置,建议均做平行实验;
- [0103] 6.2将50 μL 各标准品工作液/样品溶液分别加入对应的标准品/样品孔中;
- [0104] 6.3在每个板孔中加入50 μL 酶标 II 抗工作液;
- [0105] 6.4再在每个板孔中加入50 μL 抗体工作液;
- [0106] 注意:标准品、II 抗、抗体加样一定要按顺序。
- [0107] 6.5盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) ,避光反应40min;
- [0108] 6.6揭开盖板膜;
- [0109] 6.7倒掉板孔中液体,在每孔加入260 μL 洗涤工作液,浸泡30s;
- [0110] 6.8再重复上一步骤3次;
- [0111] 6.9倒掉板孔中液体,将酶标板倒置于吸水纸上,拍干;
- [0112] 6.10立即在每孔中加入100 μL A、B混合液。需要说明的是:底物液A、底物液B按体积1:1混合,必须充分混匀,混合液在5min内使用,避免使用金属容器盛装和搅拌试剂;
- [0113] 6.11盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下 ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) ,避光反应15~20min;
- [0114] 6.12揭开盖板膜,在各板孔中加入50 μL 终止液轻轻振荡酶标板10s,充分混匀;
- [0115] 6.13用酶标仪在双波长450nm、630nm下检测吸光度,结果在终止后5min内读取。
- [0116] 7、计算

[0117] 7.1各标准品(或样品)的平均吸光度值,除以零标(浓度为0ppb的标准品)吸光度值,乘以100,可以得到各标准品对应的吸光度的百分比。

[0118] 7.2将各标准品所得值输入半对数系统中,对应各标准品浓度可以拟合标准曲线。

[0119] 7.3将样品吸光度的百分比代入标准曲线,可得出样品对应的浓度,再乘以相应样品的稀释倍数,方得样品中实际药物含量。

[0120] 7.4按照前述的前处理方法,各样品稀释系数如下:

[0121] 蜂蜜、鱼肉、虾肉、鸡肉、猪肉……………5

[0122] 牛肉、猪肝、鸡肝、纯牛奶……………10

[0123] 即,各样品按照上述样品稀释系数为稀释倍数来稀释。

[0124] 8、特异性

[0125] 本申请的酶联免疫试剂盒的特异性是通过与相应的物质进行交叉反应试验来确定的,结果如下:

[0126] 环丙沙星……………约100.0%;

[0127] 噁喹酸……………约409.0%;

[0128] 依诺沙星……………约149.8%;

[0129] 氟甲喹……………约131.6%;

[0130] 洛美沙星……………约130.0%;

[0131] 达氟沙星……………约129.5%;

[0132] 诺氟沙星……………约116.3%;

[0133] 培氟沙星……………约92.7%;

[0134] 恩诺沙星……………约90.1%;

[0135] 奥比沙星……………约63.7%;

[0136] 氧氟沙星……………约58.0%;

[0137] 麻保沙星……………约42.4%;

[0138] 司帕沙星……………约14.4%。

[0139] 9、重要参数

[0140] 9.1灵敏度为0.3ppb,标准曲线范围为0.3ppb~24.3ppb。

[0141] 9.2 B0吸光度最佳值应大于0.8。

[0142] 9.3板内误差小于5%,板间误差小于10%。

[0143] 9.4加标回收率80±20%。

[0144] 9.5喹诺酮类药物最低检测限:

[0145] 蜂蜜、鱼肉、虾肉、鸡肉、猪肉、牛肉:

[0146] 噁喹酸、依诺沙星、氟甲喹、达氟沙星、诺氟沙星……………约1ppb;

[0147] 环丙沙星、培氟沙星、恩诺沙星……………约2ppb;

[0148] 洛美沙星……………约1.5ppb;

[0149] 奥比沙星……………约3ppb;

[0150] 氧氟沙星……………约4ppb;

[0151] 麻保沙星……………约5ppb;

[0152] 司帕沙星……………约14ppb。

- [0153] 猪肝、鸡肝：
- [0154] 噁喹酸、依诺沙星、氟甲喹、达氟沙星、诺氟沙星·····约2ppb；
- [0155] 环丙沙星、培氟沙星、恩诺沙星·····约4ppb；
- [0156] 洛美沙星·····约3ppb；
- [0157] 奥比沙星·····约6ppb；
- [0158] 氧氟沙星·····约8ppb；
- [0159] 麻保沙星·····约10ppb；
- [0160] 司帕沙星·····约28ppb。
- [0161] 纯牛奶：
- [0162] 噁喹酸、依诺沙星、氟甲喹、达氟沙星、诺氟沙星·····约5ppb；
- [0163] 环丙沙星、培氟沙星、恩诺沙星·····约10ppb；
- [0164] 洛美沙星·····约7.5ppb；
- [0165] 奥比沙星·····约15ppb；
- [0166] 氧氟沙星·····约20ppb；
- [0167] 麻保沙星·····约25ppb；
- [0168] 司帕沙星·····约70ppb。

[0169] 上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒,通过采用间接竞争酶联分析法来对动物源食品进行氟喹诺酮类药物残留检测,相对于传统的液相色谱、荧光免疫分析等检测方法,采用上述检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒的检测方法,样品处理过程及检测过程都相对较为简单,通过酶标仪就可以完成大批量样品的检测。通过采用以过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液为底物液A,通过采用四甲基联苯二胺的乙醇溶液为底物液B,在酶标二抗的作用下整体反应液呈现蓝色,加入终止液,颜色由蓝色变为黄色,显色的深浅与标准品或样品中氟喹诺酮类的含量成反比例关系,通过采用该方法可直接用于检测动物源食品中氟喹诺酮类的含量。因而,可以较好地进行定量分析。此外,通过采用氟喹诺酮抗原和牛血清蛋白偶联得到的氟喹诺酮类包被抗原,其灵敏度较好,且准确地和精确度都较高,能够提高检测的准确率。

[0170] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。需要说明的是,本申请的“一实施例中”、“例如”、“又如”等,旨在对本申请进行举例说明,而不是用于限制本申请。以上所述实施例仅表达了本申请的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本申请专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本申请的保护范围。因此,本专利的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及应用和检测方法		
公开(公告)号	CN109725142A	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201811606861.9	申请日	2018-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	国家食品安全风险评估中心 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	骆鹏杰 陈霞 王紫菲 陈银辉 李敬光 赵云峰		
发明人	骆鹏杰 陈霞 王紫菲 陈银辉 李敬光 赵云峰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/78		
代理人(译)	黎艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测氟喹诺酮类药物残留的酶联免疫试剂盒及应用和检测方法，酶联免疫试剂盒包括：包被有包被抗原的酶标板、氟喹诺酮类标准品溶液、氟喹诺酮类抗体工作液、酶标二抗工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩稀释液和浓缩洗涤液；所述底物液A为含有0.5mmol/L的过氧化氢酶的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液；所述底物液B为四甲基联苯二胺的乙醇溶液；所述终止液为2mol/L的硫酸的水溶液；所述浓缩稀释液为磷酸盐缓冲液；所述浓缩洗涤液为磷酸盐吐温缓冲液。如此，通过采用间接竞争酶联分析法来对动物源食品进行氟喹诺酮类药物残留检测，样品处理过程及检测过程都相对较为简单，通过酶标仪就可以完成大批量样品的检测。

