



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101915844 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010244086.4

C12R 1/91 (2006.01)

(22) 申请日 2010.08.03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3779 2010.04.12

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 吴聪明 沈建忠 张素霞 王战辉

史为民 程林丽 曹兴元 汤树生

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

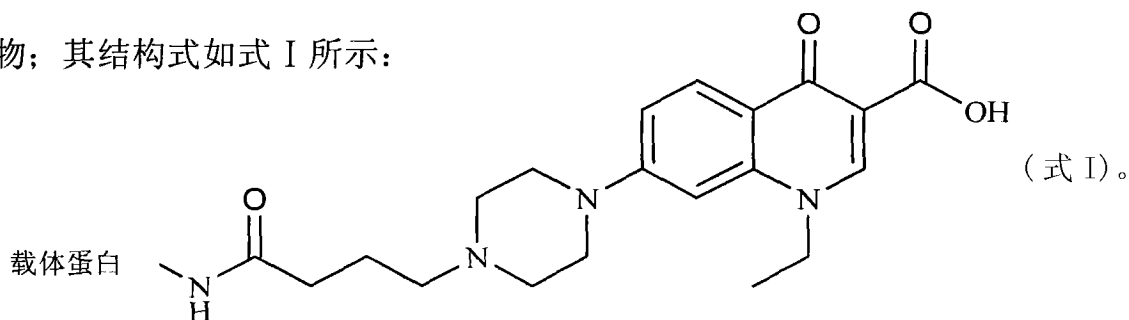
(54) 发明名称

一种检测喹诺酮类化合物的方法及其专用量子点荧光免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测喹诺酮类化合物的方法及其专用量子点荧光免疫试剂盒。本发明提供的检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒,包括喹诺酮类化合物特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为喹诺酮类化合物半抗原与载体蛋白的偶联物。本发明的实验证明,本发明的试剂盒具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点,能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒,包括喹诺酮类化合物特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为喹诺酮类化合物半抗原与载体蛋白的偶联物;其结构式如式 I 所示:



2. 根据权利要求 1 所述的量子点荧光免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和量子点标记抗抗体;

所述试剂盒由喹诺酮类化合物特异性抗体、包被原、标准品溶液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和量子点标记抗抗体组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的量子点荧光免疫试剂盒,其特征在于:

所述喹诺酮类化合物特异性抗体为诺氟沙星单克隆抗体或诺氟沙星多克隆抗体,所述诺氟沙星单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物(恩诺沙星、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星)都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 分泌的抗体。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的量子点荧光免疫试剂盒,其特征在于:

所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1.5 \mu\text{g/L}$ 、 $4.5 \mu\text{g/L}$ 、 $22.5 \mu\text{g/L}$ 或 $112.5 \mu\text{g/L}$,所述标准品为诺氟沙星;

所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮化钠和 100mL 浓度为 0.02M 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液;

所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液;

所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液;

所述封闭液是将 0.01g 叠氮化钠、 10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L 、 pH 值为 7.4 磷酸盐溶液混合得到的溶液。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的量子点荧光免疫试剂盒,其特征在于:

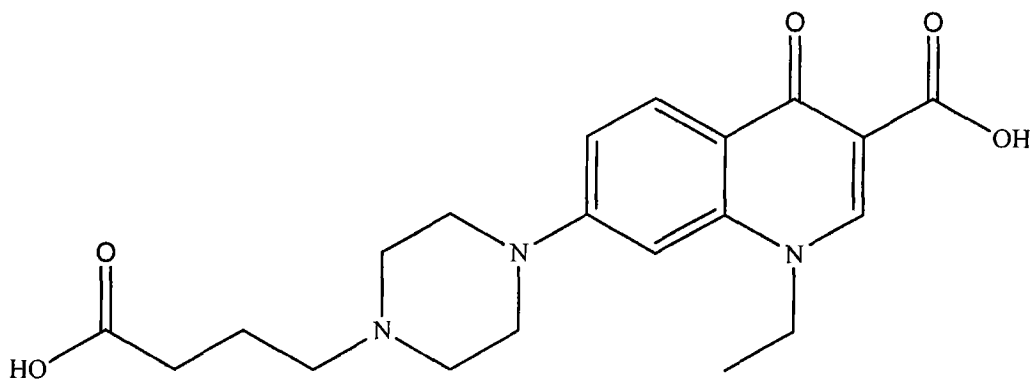
所述包被原是按照如下方法制备得到的:

将每 70mg 载体蛋白溶于 1mL 0.01M PBS 缓冲液中,再加入 30mg 乙基二甲氨基碳化二亚胺, 25°C 搅拌 8h ,称为 A 液;

将 40mg 喹诺酮类化合物半抗原溶于 1mL 0.01M PBS 缓冲液,称为 B 液;

将 B 液加入到 A 液中, 25°C 搅拌反应 12h ,将得到的产物透析,得到所述包被原;

所述喹诺酮化合物半抗原的结构式如式 II 所示:



(式 II)。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的量子点荧光免疫试剂盒,其特征在于:

所述喹诺酮化合物半抗原是按照如下方法制备得到的:I、将每 320mg 喹诺酮化合物与 143 μ L 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 $^{\circ}$ C 回流提取 3 天,再静置 1 天;II、用乙酸乙酯对步骤 I 得到的产物进行萃取,取有机相,将有机相干燥,得固体残留物;III、将固体残留物加到 2mL 1M 氢氧化钠水溶液和 500 μ L 乙醇中,70 $^{\circ}$ C 反应 8h,得到喹诺酮半抗原。

7. 根据权利要求 1-6 中任一所述的量子点荧光免疫试剂盒,其特征在于:

所述量子点标记抗抗体为量子点 QD650 标记羊抗鼠抗抗体;

所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白,优选为卵清蛋白;

所述喹诺酮类化合物为环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星或依诺沙星。

8. 一种检测喹诺酮类化合物的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

将每 1g 动物组织匀浆后,加入 4mL 乙腈-0.1M 氢氧化钠混合溶液,混匀;以 3000g 的速度离心 10min;取 2mL 上清液氮气吹干,加入 1mL 复溶液溶解干燥的残留物,再加入 1mL 正己烷充分混合,3000g 离心 5min,取下层溶液用复溶液稀释 2 倍获得样本溶液,所述动物组织为猪肉或鸡肉;所述乙腈-0.1M 氢氧化钠混合溶液是由体积比为 84:16 的乙腈和浓度为 0.1M 氢氧化钠水溶液混合得到;所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的;

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒检测步骤 1) 中的样本溶液;

所述喹诺酮类化合物为环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星或依诺沙星。

9. 由保藏号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 分泌的喹诺酮类化合物单克隆抗体。

10. 保藏号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs。

一种检测喹诺酮类化合物的方法及其专用量子点荧光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测喹诺酮类化合物的方法及其专用量子点荧光免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 目前其中兽药残留问题是影响动物性食品安全的最主要因素之一,由于动物样本成分复杂,待测物浓度较低,而且大多数取样量很少,这就对分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。量子点 (Quantum dot, QD) 由于具有独特的光学和电学性质,使其荧光免疫分析中得到越来越多的应用,作为荧光探针, QD 的光学特性比在免疫荧光分析法中经常采用的传统发色团如罗丹明 6G 或其它有机染料分子有明显的优越性 QD 的激发光谱宽,且连续分布,而发射光谱呈对称分布且宽度窄,荧光发射波长可通过改变量子点的大小而加以调节,因而不同大小的半导体量子点能被单一波长的光激发而发出不同颜色的荧光。量子点可持续发光,其荧光寿命可达染料分子的 100 倍以上,比常规的酶联免疫吸附检测方法的抗背景干扰能力强,自动化程度高,提高了分析方法的精密度,在兽医学、医学、食品分析等方面将会有更广阔的应用前景。

[0003] 喹诺酮类化合物 (Quinolones, FQs) 是一类人工合成的新型抗菌药,因其抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性、毒副作用小等特点,广泛用于人类和动物多种感染性疾病的治疗。但该类药物的长期和广泛应用会造成畜产品的药物残留,并会导致许多细菌对喹诺酮类化合物产生耐药性,不仅给人类健康带来极大的危害,同时也影响了畜牧业的发展。因此,我国农业部第 235 号文件规定其残留限量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。但由于在畜牧生产中不合理使用现象严重,使其在动物性食品中残留引起生态环境污染和人类健康危害的潜在威胁已倍受关注。动物组织中喹诺酮类化合物残留的检测方法主要采用液相色谱法、液相色谱-联质谱法、酶联免疫法等。

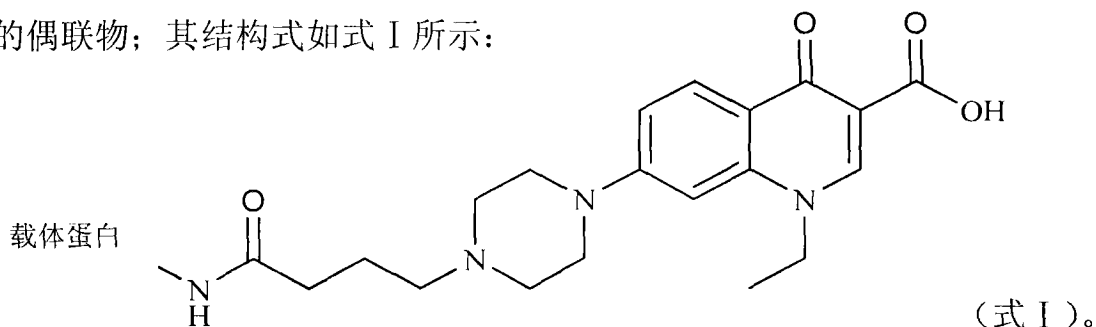
发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒。

[0005] 本发明提供的检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒,包括喹诺酮类化合物特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为喹诺酮类化合物半抗原与载体蛋

[0006]

白的偶联物;其结构式如式 I 所示:



[0007] 所述试剂盒还包括浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和量子点标记抗体；

[0008] 所述试剂盒由喹诺酮类化合物特异性抗体、包被原、标准品溶液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和量子点标记抗体组成。

[0009] 所述喹诺酮类化合物特异性抗体为诺氟沙星单克隆抗体或诺氟沙星多克隆抗体，所述诺氟沙星单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物（恩诺沙星、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星）都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 分泌的抗体。

[0010] 所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.5\ \mu\text{g/L}$ 、 $1.5\ \mu\text{g/L}$ 、 $4.5\ \mu\text{g/L}$ 、 $22.5\ \mu\text{g/L}$ 或 $112.5\ \mu\text{g/L}$ ，所述标准品为诺氟沙星；

[0011] 所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮化钠和 100mL 浓度为 0.02M 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液；

[0012] 所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液；

[0013] 所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0014] 所述封闭液是将 0.01g 叠氮化钠、 10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L 、 pH 值为 7.4 磷酸盐溶液混合得到的溶液。

[0015] 所述包被原是按照如下方法制备得到的：

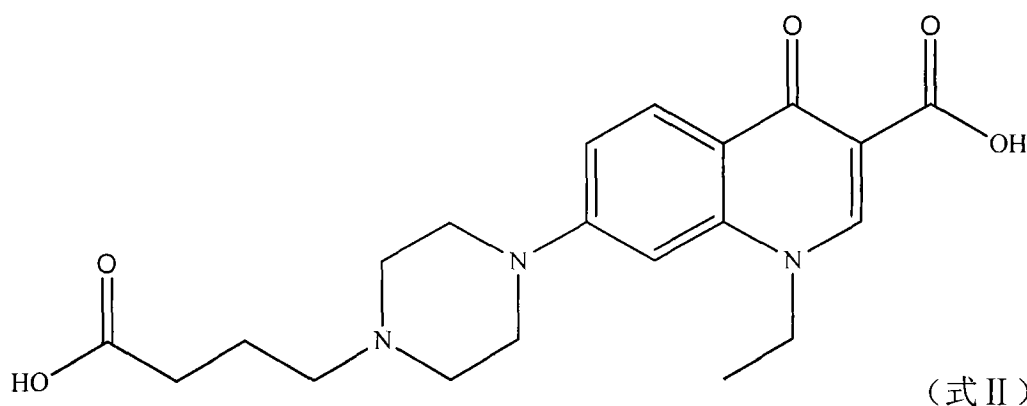
[0016] 将每 70mg 载体蛋白溶于 1mL 0.01M PBS 缓冲液中，再加入 30mg EDC（乙基二甲氨基碳化二亚胺）， 25°C 搅拌 8h ，称为 A 液；

[0017] 将 40mg 喹诺酮类化合物半抗原溶于 1mL 0.01M PBS 缓冲液，称为 B 液；

[0018] 将 B 液加入到 A 液中， 25°C 搅拌反应 12h ，将得到的产物透析，得到所述包被原。

[0019] 所述喹诺酮化合物半抗原的结构式如式 II 所示：

[0020]



[0021] 所述喹诺酮化合物半抗原是按照如下方法制备得到的：I、将每 320mg 诺氟沙星与 $143\ \mu\text{L}$ 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°C 回流提取 3 天，再静置 1 天；II、用乙酸乙酯对步骤 I 得到的产物进行萃取，取有机相，将有机相干燥，得固体残留物；III、将固体残留物加到 2mL 1M 氢氧化钠水溶液和 $500\ \mu\text{L}$ 乙醇中， 70°C 反应 8h ，得到喹诺酮半抗原。

[0022] 所述量子点标记抗体为量子点 QD650 标记羊抗鼠抗体；所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白，优选为卵清蛋白；

[0023] 所述喹诺酮类化合物为环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星或依诺沙星。

[0024] 本发明的另一个目的是提供一种检测喹诺酮类化合物的方法。

[0025] 本发明提供的检测喹诺酮类化合物的方法包括以下步骤：

[0026] 1) 样品前处理：

[0027] 将每 1g 动物组织匀浆后，加入 4mL 乙腈 -0.1M 氢氧化钠混合溶液，混匀；以 3000g 的速度离心 10min；取 2mL 上清液氮气吹干，加入 1mL 复溶液溶解干燥的残留物，再加入 1mL 正己烷充分混合，3000g 离心 5min，取下层溶液用复溶液稀释 2 倍获得样本溶液，所述动物组织为猪肉或鸡肉；所述乙腈 -0.1M 氢氧化钠混合溶液是由体积比为 84 : 16 的乙腈和浓度为 0.1M 氢氧化钠水溶液混合得到；所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的；

[0028] 2) 利用上述的检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒检测步骤 1 中的样本溶液；所述喹诺酮类化合物为环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星或依诺沙星。

[0029] 由保藏号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 分泌的喹诺酮类化合物单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0030] 保藏号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs 也属于本发明的保护范围。该细胞株已于 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），保藏号为 CGMCCNo. 3779。

[0031] 诺氟沙星的通用名称为诺氟沙星，化学名称为 1- 乙基 -6- 氟 -1,4- 二氢 -4- 氧代 -7-(1- 哌嗪基) -3- 喹啉羧酸。

[0032] 本发明的实验证明，本发明的量子点荧光免疫试剂盒主要采用间接竞争方法定性或定量检测喹诺酮类化合物的残留量，该试剂盒试剂盒的主要内容物采用了方便使用的工作液形式，工作液保存性及稳定性好；利用本发明试剂盒检测喹诺酮类化合物的残留量的方法，可用于检测动物组织如猪肉、鸡肉等样品中喹诺酮类化合物的残留量，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。因此本发明检测方法及其专用试剂盒将在动物源性食品中喹诺酮类化合物的残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0033] 图 1 为喹诺酮类化合物标准曲线图

具体实施方式

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 下述实施例各试剂盒的检测原理如下：

[0037] 当在量子点荧光板微孔上预包被喹诺酮类化合物半抗原与载体蛋白的偶联物时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入喹诺酮类化合物抗体溶液，样本中残留的喹诺酮类

化合物或喹诺酮类化合物标准品与量子点荧光板上包被的喹诺酮类化合物偶联抗原竞争喹诺酮类化合物抗体,加入量子点标记抗体,用荧光酶标仪检测荧光强度,样本荧光强度值与样本中喹诺酮类化合物的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中喹诺酮类化合物的残留量。

[0038] 实施例 1、量子点荧光免疫试剂盒的制备及其检测方法

[0039] 一、量子点荧光免疫试剂盒包括：

[0040] (1) 包被原溶液：将包被原溶解于包被缓冲液中得到的,其中包被原在包被原溶液中的浓度为 $0.08 \mu\text{g/mL}$;包被原为喹诺酮类化合物半抗原与牛血清白蛋白偶联物；

[0041] (2) 量子点标记的羊抗鼠抗体工作液：

[0042] 用稀释液稀释量子点标记的羊抗鼠抗体得到的,稀释度为 1 : 500 ;

[0043] 稀释液为 50mL 牛血清白蛋白和 950mL 磷酸盐缓冲液混合得到 ;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M, pH 值为 7.4。

[0044] 羊抗鼠抗体购自北京博奥森,产品目录号为 bs-0295G。

[0045] (3) 诺氟沙星标准品溶液：

[0046] 将标准品溶于稀释液中得到的,其中标准品在诺氟沙星标准品溶液的浓度分别为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 、 $1.5 \mu\text{g/L}$ 、 $4.5 \mu\text{g/L}$ 、 $22.5 \mu\text{g/L}$ 或 $112.5 \mu\text{g/L}$, 稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。

[0047] 诺氟沙星标准品为诺氟沙星,购自中国药品生物制品检定所,产品目录号为 130450-200705。

[0048] (4) 喹诺酮类化合物单克隆抗体工作液：

[0049] 将单抗溶于稀释液中得到的,单抗与稀释液的配比为 1 : 1000 ;

[0050] 单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3779 的对 11 种喹诺酮类化合物都有交叉反应的喹诺酮甲基异恶唑单克隆杂交瘤细胞株 QNs 产生。

[0051] 稀释液为 25g 酪蛋白、0.03g 叠氮化钠和 1000mL 磷酸盐缓冲液混合得到。

[0052] (6) 浓缩洗涤液：将 0.05g 叠氮化钠与 100mL 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到。

[0053] (7) 浓缩复溶液：将 0.1g 牛血清白蛋白与 100mL 浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合而成。400mL/ 瓶,1 瓶。

[0054] (8) 包被缓冲液：pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0055] (9) 封闭液：将 0.01g 叠氮化钠、10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐溶液混合而成。

[0056] 二、试剂盒的制备

[0057] 1、量子点荧光板的制备：

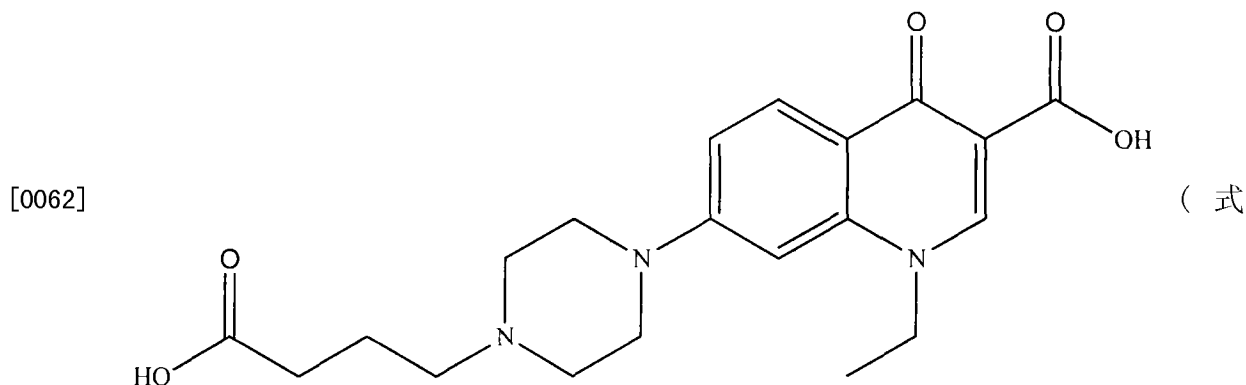
[0058] (1) 喹诺酮类化合物半抗原的合成：

[0059] 诺氟沙星 (Norfloxacin, 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 $143 \mu\text{L}$ 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 $2 \times$ 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。

[0060] 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 $500 \mu\text{L}$

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。

[0061] 所述诺氟沙星半抗原的结构式如式 II 所示:

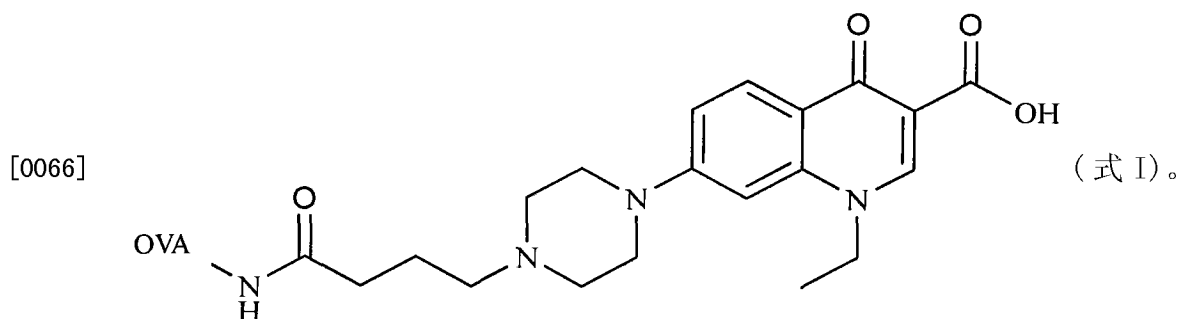


II)。

[0063] (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)偶联得到包被原。

[0064] 70mg 卵清蛋白溶于 1mL 0.01M PBS 中,再加入 30mgEDC,25℃搅拌 8h,称为 A 液。将上述获得的 40mg 诺氟沙星半抗原溶于 1mL 0.01M PBS,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 pH 7.2 的 PBS 透析 3 天,期间应换 3 次透析液。透析后,离心除去残余的沉淀,取上清液得到包被原,分装后 -20℃保存。

[0065] 所述包被原为喹诺酮类化合物半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示:



[0067] (3) 量子点荧光板的制备:

[0068] 用包被缓冲液将步骤(2)得到包被原(即诺氟沙星半抗原和卵清蛋白偶联物)稀释成 0.08 μg/mL,每孔加入 100 μl,37℃温育 2h,倾去包被液,用稀释 20 倍的洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150 μl 封闭液,37℃温育 1h,倾去孔内液体,干燥后包被有包被原的量子点荧光板,用铝膜真空密封保存。

[0069] 2、喹诺酮类化合物单克隆抗体的制备:

[0070] (1) 免疫原合成:

[0071] 将诺氟沙星半抗原和牛血清白蛋白通过活性酯法偶联得到免疫原。

[0072] 具体制备过程如下:与包被原的制备方法相同,不同的是将卵清蛋白(OVA)替换为牛血清白蛋白 BSA。

[0073] (2) 动物免疫与细胞融合

[0074] 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以步骤 2 的 (1) 获得的免疫原进行免疫,免疫剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{只}$,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。

[0075] 取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞,按 5 : 1 比例 (数量配比) 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,将此细胞株命名为 QNs。

[0076] 经筛选得到对 11 种喹诺酮类化合物 (恩诺沙星、氧氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星) 都有交叉反应的诺氟沙星单克隆杂交瘤细胞株 QNs,该细胞株已于 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),保藏号为 CGMCC No. 3779。

[0077] (3) 细胞冻存和复苏:取单克隆杂交瘤细胞株 QNs CGMCC No. 3779 用冻存液制成 5×10^6 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°C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0078] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0079] 增量培养法:将上述培养的杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在 37°C 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°C 保存。

[0080] 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,使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。

[0081] 辛酸-饱和硫酸铵法 1) 50% 饱和度盐析:取上述细胞培养液 5mL,加等量 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 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 0.01mol/L PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 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 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 溶解步骤 2) 得到的沉淀,装于透析袋中,悬于盛有 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS (1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g, 12 水合磷酸氢二钠 2.86g, 氯化钾 0.2g, 氯化钠 8.8g) 的烧杯中脱盐,放置于 4°C ,每天换液 3-4 次,1% BaCl_2 检测直至透析液中无硫酸根离子为止。4) 透析完毕,3000g 离心 5min,取上清液得到纯化的诺氟沙星单克隆抗体, -20°C 冰箱保存。

[0082] 3、量子点与羊抗鼠抗体的制备:

[0083] 表面氨基 ($-\text{NH}_2$) 修饰的水溶性量子点 QD650 购自北京中科物源,产品目录号为 W-4007-650;羊抗鼠抗体购自北京博奥森,产品目录号为 bs-0259G;

[0084] (1) 活化量子点:表面氨基 ($-\text{NH}_2$) 修饰的水溶性 QD650 经 $20 \mu\text{l}$ 偶联剂 SMCC (琥珀酰亚胺 4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷) 活化,形成活性表面,得到活化的量子

点。凝胶柱去除过量的 SMCC。

[0085] (2) 还原羊抗鼠抗体：羊抗鼠抗体 2mL 中加入还原剂 DTT 25 μ l (dithiothreitol, 二硫苏糖醇), 断开二硫键形成的巯基。凝胶柱去除 DTT。

[0086] (3) 将活化的量子点和还原的羊抗鼠抗体混合, 37°C 反应 1 小时, 10 μ l beta- 巯基乙醇终止反应, 形成量子点标记的羊抗鼠抗体。

[0087] 三、用步骤一所述试剂盒检测样品中残留的喹诺酮类化合物方法

[0088] 方法如下：

[0089] 1、样品前处理

[0090] 样品为猪肉、鸡肉等组织样本。

[0091] 将 1g 动物组织匀浆后, 加入 4mL 乙腈 -0.1M 氢氧化钠混合溶液, 混匀; 以 3000g 的速度离心 10min; 取 2mL 上清液氮气吹干, 加入 1mL 复溶液溶解干燥的残留物, 再加入 1mL 正己烷充分混合, 3000g 离心 5min, 取下层溶液用复溶液稀释倍数 2 获得样本溶液, 进行试验分析; 所述乙腈 -0.1M 氢氧化钠混合溶液是由体积比为 84 : 16 的乙腈和浓度为 0.1M 氢氧化钠水溶液混合得到; 所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的。

[0092] 2、检测

[0093] 向步骤一获得包被有包被原 (诺氟沙星半抗原与卵清蛋白偶联物) 的量子点荧光板微孔中加入诺氟沙星标准品溶液或样本溶液 50 μ l, 再加入诺氟沙星单克隆抗体工作液 50 μ l, 用盖板膜封板, 37°C 恒温箱中反应 30min; 倒出孔中液体, 每孔加入 250 μ l 洗涤液, 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干; 每孔加入量子点标记的羊抗鼠抗体工作液 100 μ l, 37°C 恒温箱中反应 30min, 倒出孔中液体, 重复洗涤步骤; 用荧光酶标仪, 测定每孔荧光强度值。

[0094] 3、结果分析

[0095] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的荧光强度平均值 (B) 除以第一个标准溶液 (0 标准) 的荧光强度值 (B0) 再乘以 100%, 即百分荧光值。计算公式为：

[0096] 百分荧光值 (%) = (B/B0) \times 100%

[0097] 以诺氟沙星标准品溶液的浓度 (μ g/L) 的半对数值为 X 轴, 百分荧光值为 Y 轴, 绘制标准曲线图 (图 1)。用同样的办法计算样品溶液的百分荧光值, 相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中喹诺酮类化合物的残留量。本发明中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。本发明中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。

[0098] 按照上述方法获得三批试剂盒 (01 批、02 批、03 批)。

[0099] 实施例 2、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

[0100] 一、试剂盒灵敏度实验

[0101] 对零标准溶液 (即稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液) 进行 20 次检测, 测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0102] 表 1 零标准测定结果统计表 μ g/L

[0103]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.2	0.1	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.1	0.2	0.4	0.2	0.23	0.09	0.5	

[0104] 由表 1 可知,试剂盒的最低检测限为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。

[0105] 二、标准品精密度试验:

[0106] 从实施例 1 中所述的三批试剂盒 (01 批、02 批、03 批) 中每批抽取 10 个试剂盒,测定 $4.5 \mu\text{g/L}$ 标准品溶液的发光强度值,计算变异系数。检测方法与实施例 1 中实验三所述一致。

[0107] 实验设 3 次重复,结果如表 2 所示,表明变异系数范围在 $5.3\% \sim 14.6\%$ 之间,符合精密度小于或等于 20% 的规定。

[0108] 表 2 标准可重复性试验 (CV%)

[0109]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	6.9	10.8	9.7	12.1	10.2	6.5	7.9	5.3	9.1	11.2
CV% 02 批	7.3	8.9	11.3	6.7	8.4	12.4	10.7	9.6	8.4	9.6
03 批	10.1	8.2	6.4	14.6	11.8	9.7	7.5	8.3	11.5	8.8

[0110] 三、样本精密度和准确度试验

[0111] 1、样品精密度试验:

[0112] 将不含喹诺酮类化合物的猪肉、鸡肉按照实施例 1 的方法进行样品前处理后,添加诺氟沙星标准品,使其终浓度为 $10 \mu\text{g/kg}$ 。从实施例 1 中所述的三批试剂盒 (01 批、02 批、03 批) 中每批抽取 3 个试剂盒,进行实验,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数,结果如表 3-4 所示。结果表明猪肉、鸡肉样本的变异系数均小于 20% ,符合了《农业部文件》农医发【2005】17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准。

[0113] 表 3 猪肉样本可重复性试验

[0114]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	7.9	8.3	8.9	9.3	9.4	7.4
	9.1	7.8	8.6	7.9	8.4	6.4

[0115]

	9.7	7.5	9.1	8.5	7.9	10.4
	8.1	8.3	7.8	9.4	9.2	8.2
02	7.9	7.8	8.5	9.9	9.0	10.0
	9.7	9.2	8.4	7.8	8.6	8.4
	7.9	8.5	8.7	9.4	9.2	6.8
03	8.5	8.9	9.7	7.9	8.3	7.9
	8.5	8.7	9.3	9.1	8.0	5.9

[0116] 表 4 鸡肉样本可重复性试验

[0117]

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数 CV%
	8.1	8.9	9.4	7.7	9.5	9.1
01	9.3	8.6	7.5	8.3	9.2	8.5
	7.6	8.7	9.5	9.2	7.7	10.1
	8.3	9.4	7.8	8.4	8.9	7.1
02	7.6	8.5	9.4	7.5	9.7	11.8
	8.1	7.6	9.5	9.1	8.6	8.9
	8.3	8.7	7.6	9.7	9.2	9.3
03	7.9	8.8	8.3	9.4	7.8	7.9
	9.3	8.6	7.8	9.3	8.8	7.1

[0118] 2、样本准确度试验

[0119] 将不含喹诺酮类化合物的猪肉、鸡肉按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理,然后向每种组织中加入诺氟沙星标准品,使其终浓度分别为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$;然后用实施例 1 中所述的试剂盒检测猪肉、鸡肉中喹诺酮类化合物,每个浓度做 4 个平行,分别计算准确度(准确度=实测值/添加值)。结果如表 5 所示,表明各样本以 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 诺氟沙星添加回收率均在 75.2% -99.1% 之间。

[0120] 表 5 试剂盒的准确度

样本		猪肉		鸡肉	
添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		20	100	20	100
[0121] 准确度%	1	85.6	78.9	80.8	94.5
	2	90.8	83.4	75.2	83.4
	3	79.6	99.1	87.4	87.6
	4	97.2	85.2	76.3	81.7
平均值%		88.3	86.7	79.9	86.8

[0122] 四、交叉反应率试验

[0123] 选择与喹诺酮类化合物有类似结构和类似功能的 13 种药物测定交叉反应率。通过各种药物的标准曲线分别得到其 50% 抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应越小, 那么此试剂盒对喹诺酮类化合物的检测特异性就越好。交叉反应率 (%) = (抑制 50% 诺氟沙星的浓度 / 抑制 50% 的喹诺酮类化合物类似物浓度) * 100%

[0124] 表 6 试剂盒的特异性

药物名称	交叉反应率 (%)
环丙沙星	100
恩诺沙星	95
氧氟沙星	120
诺氟沙星	170
达氟沙星	89
氟甲喹	85
[0125] 噁喹酸	95
麻保沙星	85
氨氟沙星	130
培氟沙星	190
依诺沙星	60
二氟沙星	<1
沙拉沙星	<1
萘啶酸	<1

[0126] 实验结果表明, 本发明所研制的试剂盒对环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、达氟沙星、氟甲喹、噁喹酸、麻保沙星、氨氟沙星、培氟沙星和依诺沙星的特异性好。

[0127] 五、试剂盒保存期试验

[0128] 试剂盒保存条件为 2-8°C, 保存 6 个月后, 测定试剂盒的 50% 抑制浓度、喹诺酮类

化合物实际添加测定,结果表明试剂盒的 50%抑制浓度均在正常范围之内。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 37℃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℃至少可以保存 6 个月以上。

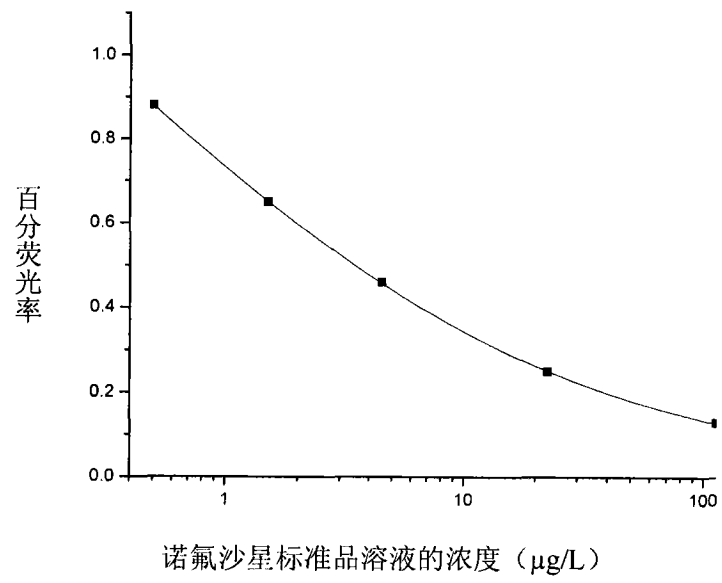


图 1

专利名称(译)	一种检测喹诺酮类化合物的方法及其专用量子点荧光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101915844A	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN201010244086.4	申请日	2010-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	吴聪明 沈建忠 张素霞 王战辉 史为民 程林丽 曹兴元 汤树生		
发明人	吴聪明 沈建忠 张素霞 王战辉 史为民 程林丽 曹兴元 汤树生		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 C07K16/44 C12N5/20 C12R1/91		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101915844B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测喹诺酮类化合物的方法及其专用量子点荧光免疫试剂盒。本发明提供的检测喹诺酮类化合物的量子点荧光免疫试剂盒，包括喹诺酮类化合物特异性抗体、包被原和标准品溶液；所述包被原为喹诺酮类化合物半抗原与载体蛋白的偶联物。本发明的实验证明，本发明的试剂盒具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。

白的偶联物；其结构式如式I所示：

