



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101893621 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 201010230789. 1

(22) 申请日 2010. 07. 14

(71) 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路 20 号

(72) 发明人 黄飏 赵莉莉 张珏 张艺 周彬

陈蕴 金坚

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

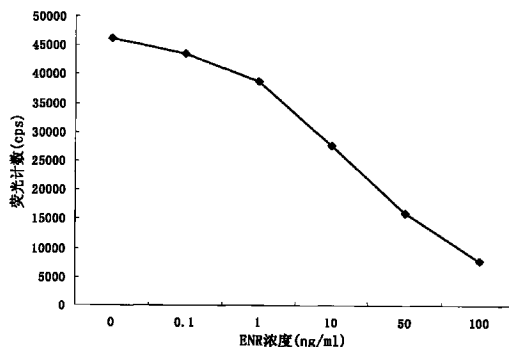
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种检测恩诺沙星的光激化学发光免疫分析法及其试剂盒

(57) 摘要

一种检测恩诺沙星的光激化学发光免疫分析法及其试剂盒,属于光激化学发光免疫分析(LICLIA)技术领域。本发明试剂盒,测定基础是均相标记免疫反应。首先由包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入微孔板,然后顺序加入 ENR 标准或样品、兔抗 ENR 抗体、生物素化羊抗兔抗体避光反应,再加入包被有链霉亲和素的感光微粒孵育后检测。发光微粒上的 ENR-OVA 与 ENR 竞争连接到 ENR 抗体,再与生物素化羊抗兔抗体及包被有链霉亲和素的感光微粒形成复合体,光激发下,通过单线态离子氧的产生和传递,将能量传递给发光微粒产生荧光,用光激化学发光检测仪检测光信号,光信号强度与样品中 ENR 浓度成反比,对照标准曲线测得样品中 ENR 的含量。该检测 ENR 试剂盒结构简单,操作简便、检测时间短、灵敏度高。



1. 一种检测恩诺沙星 ENR 的光激化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于由白色不透明微孔板 (1),恩诺沙星标准品 (2), 包被有 ENR-OVA 的发光微粒 (3), 兔抗 ENR 抗体冻干品 (4), 生物素化羊抗兔抗体冻干品 (5), 和包被有链霉亲和素的感光微粒 (6) 组成。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于包被有 ENR-OVA 的发光微粒 (3) 的制备:在离心管中加入 1mg 发光微粒,加入 12.5 μ L 1% Tween-20,0.05mg ENR-OVA 人工抗原, 10 μ L 的 25mg/mL 硼氢化氰钠溶液,用 0.1M、pH6.0 的 2-(N-吗啉)乙磺酸缓冲液将体积补充到 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光振荡反应 48 小时,加入 10 μ L 0.3M、pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐溶液封闭未结合位点,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 小时,离心纯化,洗去未反应的试剂后,分离得到包被有 ENR-OVA 的发光微粒,稀释后备用。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于 ENR 标准品 (2) 的配制:ENR 标准品浓度分别为:0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,50ng/mL,100ng/mL,从 ENR 纯品中稀释得到,稀释液为蒸馏水。

4. 一种用权利要求 1 所述的试剂盒检测 ENR 的方法,其特征在于取包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 ENR 标准或处理好的样品到各自的微孔中,然后各孔顺序加入兔抗 ENR 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应;接着暗处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应,反应后检测光信号,对照标准曲线计算被测样品中的 ENR 含量。

5. 根据权利要求 4 所述的检测 ENR 的方法,其特征在于操作为:

取 20 μ L 包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板;加入 20 μ L 的 ENR 标准或处理好的样品到各自的微孔中;加 20 μ L 兔抗 ENR 抗体;继续加入 20 μ L 生物素化羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟;暗处加 175 μ L 包被有链霉亲和素的感光微粒,37 $^{\circ}$ C 暗处孵育 15 分钟,反应后在光激化学发光检测仪上检测光信号,从标准曲线计算被测样品中的 ENR 含量。

一种检测恩诺沙星的光激化学发光免疫分析法及其试剂盒

技术领域

[0001] 一种检测恩诺沙星 (ENR) 的试剂盒及其检测方法,属于光激化学发光免疫分析 (LICLIA) 技术领域,用于对鱼、肉及其制品中 ENR 含量的检测。

背景技术

[0002] 恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR),又名恩氟喹林羧酸,为一类人工合成的新型的抗菌药物,和其代谢物环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP) 是 20 世纪 80 年代以来出现的抗菌谱更广、抗菌作用更强的第三代氟喹诺酮类药物 (FQNs) 之一。该类药物在细菌体内通过抑制拓扑异构酶 II 和拓扑异构酶 IV 来抑制 DNA 的复制而起到杀灭细菌作用,在医学和兽医学中很快取得广泛应用。但长期用药所产生的不良反应、在畜禽产品中的残留、耐药性的增加以及在环境中的生态效应等方面已引起广泛关注。2003 年初,日本在我国出口烤鳗中检出恩诺沙星,并利用其食品卫生法中“动物源性食品中不得含有合成抗生素”的规定,使我国出口烤鳗受阻。因此,我国及日本从 2003 年起加强了出口日本鳗鱼及其制品恩诺沙星残留检测。

[0003] 目前对于恩诺沙星的检测多采用高效液相色谱法 (HPLC) 或液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 等理化检测方法,但这些方法所需设备昂贵、操作繁琐且灵敏度有限。近年来关于免疫分析的方法也有报道,应用最广的为酶联免疫法,但由于酶联免疫法检测范围有限,且标记物酶易失活,底物见光易分解,受环境影响较大,一定程度上限制了它的应用。

[0004] 光激化学发光免疫分析 (LICLIA) 是以纳米级高分子微粒为基础的新一代化学发光技术,该项技术将被广泛地应用于研究生物分子的相互作用。其主要原理是由光激发产生的均相化学发光技术。它具有快速、均相 (免冲洗)、高灵敏和操作简单的特点。LICLIA 试剂由含有感光化合物的感光微粒和含有发光化合物的发光微粒组成,微粒直径约 188nm,表面覆盖多糖水凝胶。水凝胶能减少非特异性结合,同时,增加微粒的悬浮性。微粒通过水凝胶表面的功能团与生物分子共价连接。纳米级微粒大大增加了反应的表面积,每个微粒的表面包被着成百上千个生物分子,可捕获目标分子。

[0005] LICLIA 技术的核心原理是单线态氧的产生和传递。在受到红色激光 (680nm) 照射后,感光微粒能使周围环境中的氧转化为单线态氧,单线态氧的生存时间仅为 4 微秒。短暂的生存时间决定了单线态氧的传播直径很小 (约为 200nm)。如果发光微粒在 200nm 直径范围之内,就能接受单线态氧,发出高能级的光 (520nm-620nm) 从而产生信号。相反,如果在 200nm 直径范围内没有发光微粒,单线态氧就会回落到基态氧而没有信号产生。这种依赖于两种微粒相互接近的化学能量传递是 LICLIA 均相反应的基础。通常在该反应体系中,微粒的浓度是很低的。两种微粒相互随机碰撞的几率很低,因此,反应体系的本底非常微弱。但通过包被在微粒表面的生物分子相互作用拉近两个微粒的距离,例如形成免疫夹心复合物,就能产生能量的有效传递并发出光信号。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测 ENR 的试剂盒及其检测方法,用于对鱼、肉及其

制品中 ENR 含量的检测。

[0007] 本发明的技术方案：一种检测恩诺沙星 ENR 的光激化学发光免疫分析试剂盒，由白色不透明微孔板 (1)，恩诺沙星标准 (2)，连接恩诺沙星人工抗原的发光微粒 (3)，兔抗恩诺沙星抗体冻干品 (4)，生物素化羊抗兔抗体冻干品 (5)，和包被有链霉亲和素的感光微粒 (6) 组成。

[0008] 包被有 ENR-OVA 的发光微粒 (3) 的制备：在离心管中加入 1mg 发光微粒，加入 12.5 μ L 1% Tween-20, 0.05mg ENR-OVA 人工抗原, 10 μ L 的 25mg/mL 硼氢化氰钠溶液, 用 0.1M、pH6.0 的 2-(N-吗啉) 乙磺酸缓冲液将体积补充到 200 μ L, 37°C 避光振荡反应 48 小时, 加入 10 μ L 0.3M、pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐溶液封闭未结合位点, 37°C 避光孵育 1 小时, 离心纯化, 洗去未反应的试剂后, 分离得到包被有 ENR-OVA 的发光微粒, 稀释后备用。

[0009] ENR 标准品 (2) 的配制：ENR 标准品浓度分别为：0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 从 ENR 纯品中稀释得到, 稀释液为蒸馏水。

[0010] 用所述的试剂盒检测 ENR 的方法：取包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板；加入 ENR 标准或处理好的样品到各自的微孔中, 然后各孔顺序加入兔抗 ENR 抗体、生物素化羊抗兔抗体进行标记免疫反应；接着暗处加入包被有链霉亲和素的感光微粒进行反应, 反应后检测光信号, 对照标准曲线计算被测样品中的 ENR 含量。

[0011] 所述的检测 ENR 的方法, 操作为：

[0012] 取 20 μ L 包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板；加入 20 μ L 的 ENR 标准或处理好的样品到各自的微孔中；加 20 μ L 兔抗 ENR 抗体；继续加入 20 μ L 生物素化羊抗兔抗体, 37°C 孵育 15 分钟；暗处加 175 μ L 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37°C 暗处孵育 15 分钟, 反应后在光激化学发光检测仪上检测光信号, 从标准曲线计算被测样品中的 ENR 含量。

[0013] 本发明的有益效果：该试剂盒结构简单, 操作简便、检测时间短、灵敏度高。

附图说明

[0014] 图 1：检测恩诺沙星的试剂盒示意图。1、白色不透明微孔板, 2、ENR 标准, 3、连接 ENR-OVA 的发光微粒, 4、兔抗恩诺沙星抗体冻干品, 5、生物素化羊抗兔抗体冻干品, 6、包被有链霉亲和素的感光微粒。

[0015] 图 2：ENR-LICLIA 反应示意图。

[0016] 图 3：ENR-LICLIA 标准曲线图。

具体实施方式

[0017] 实施例 1 制备试剂盒和检测鳗鱼样品

[0018] 包被有 ENR-OVA 人工抗原的发光微粒制备：

[0019] 在离心管中加入 1mg 发光微粒, 加入 12.5 μ L 1% Tween-20, 0.05mg ENR-OVA 人工抗原, 10 μ L 的 25mg/mL 硼氢化氰钠溶液, 用 0.1M、pH6.0 的 2-(N-吗啉) 乙磺酸 (MES) 缓冲液将体积补充到 200 μ L, 37°C 避光振荡反应 48 小时。加入 10 μ L 0.3M pH 5.0 的羧甲氧基胺半盐酸盐 (CMO) 溶液封闭未结合位点, 37°C 避光孵育 1 小时后离心, 分离得到已连接 ENR-OVA 的发光微粒, 稀释后备用。

[0020] 试剂的配制：

[0021] 标准 ENR 试剂的配制：标准 ENR :0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 从 ENR 纯品中稀释得到, 稀释液为蒸馏水。

[0022] 试剂盒的组成：

[0023] (1)、白色不透明微孔板 (12 条 ×8 孔, 可以拆分为单孔)。

[0024] (2)、1× 包被有 ENR-OVA 人工抗原的发光微粒 :2mL。

[0025] (3)、6×ENR 标准液, 1.0mL/ 瓶, ENR 标准液浓度为 :0, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL。

[0026] (4)、1×ENR 抗体冻干品, 用时 2mL 蒸馏水溶解。

[0027] (5)、1× 生物素化羊抗兔抗体冻干品, 用时 2mL 蒸馏水溶解。

[0028] (6)、1× 包被有链霉亲和素的感光微粒 :20mL。

[0029] 测定时注意事项

[0030] 1、使用之前将所有试剂回升至室温 (18-30℃)。

[0031] 2、使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。

[0032] 3、在所有恒温孵育过程中, 避免光线照射, 用盖子盖住微孔。

[0033] 具体检测步骤如下：称取 $4g \pm 0.04g$ 鳗鱼试样置于 50mL 离心管中, 加乙腈 -0.1mol/L 氢氧化钠溶液 (84+16, v/v) 12mL, 振荡混合 5min, 4000r/min 离心 5min; 移取上清液 6mL 于 50mL 离心管中, 加 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 6mL, 再加二氯甲烷 7mL, 震荡 5min, 4000r/min 离心 5min, 取下层有机相 6mL 于 10mL 试管中, 于 50℃ 水浴下氮气吹干; 加 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5mL, 涡动混匀 2min, 加正己烷 1mL, 涡动混匀 30s, 4000r/min 离心 5min; 取下层清液 50 μ L 分析。

[0034] 取 20 μ L 包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板; 加入 20 μ L 的 ENR 标准或处理好的样品到各自的微孔中; 加 20 μ L ENR 抗体; 继续加入 20 μ L 生物素化羊抗兔抗体, 37℃ 孵育 15 分钟; 暗处加 175 μ L 包被有链霉亲和素的感光微粒, 37℃ 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号, 从标准曲线计算样品中的 ENR 含量。结果见表 1, 由标准曲线求得该例样品所含 ENR 浓度为 0.13ng/mL。

[0035] 表 1

[0036]

ENR 标准点							样品
ENR 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	50	100	鳗鱼
荧光计数 (cps)	46128	43568	38754	27678	15945	7865	43275

[0037] 实施例 2 鸡肉样品测定

[0038] 试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同, 用于检测鸡肉样品。

[0039] 具体检测步骤如下：称取 $3g \pm 0.03g$ 鸡肉试样于 50mL 离心管中, 加乙腈 -0.1mol/L 氢氧化钠溶液 (84+16, v/v) 9mL, 振荡混合 10min, 4000r/min 离心 10min; 移取上清液 4mL 于 50mL 离心管中, 加 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 4mL, 再加二氯甲烷 8mL, 振荡 10min, 4000r/min 离心 10min, 取下层有机相 6mL 于 10mL 试管中, 于 50℃ 水浴下氮气吹干; 加 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5mL, 涡动 2min 溶解残留物, 加正己烷 1mL, 涡动 2min, 4000r/min 离心 5min;

取下层清液 50 μ L 分析。

[0040] 取 20 μ L 包被有 ENR-OVA 的发光微粒加入到白色不透明微孔板；加入 20 μ L 的 ENR 标准或处理好的样品到各自的微孔中；加 20 μ L ENR 抗体；继续加入 20 μ L 生物素化羊抗兔抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟；暗处加 175 μ L 包被有链霉亲和素的感光微粒，37 $^{\circ}$ C 暗处孵育 15 分钟后在光激化学发光检测仪上检测光信号，从标准曲线计算样品中的 ENR 含量。结果见表 2，由标准曲线求得该例样品所含 ENR 浓度为 0.062ng/mL。

[0041] 表 2

[0042]

ENR 标准点							样品
ENR 浓度 (ng/mL)	0	0.1	1	10	50	100	鸡肉
荧光计数 (cps)	46128	43568	38754	27678	15945	7865	44589

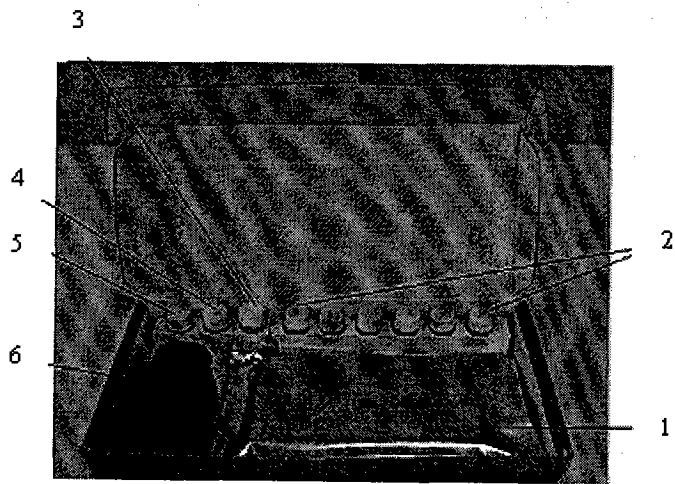


图 1

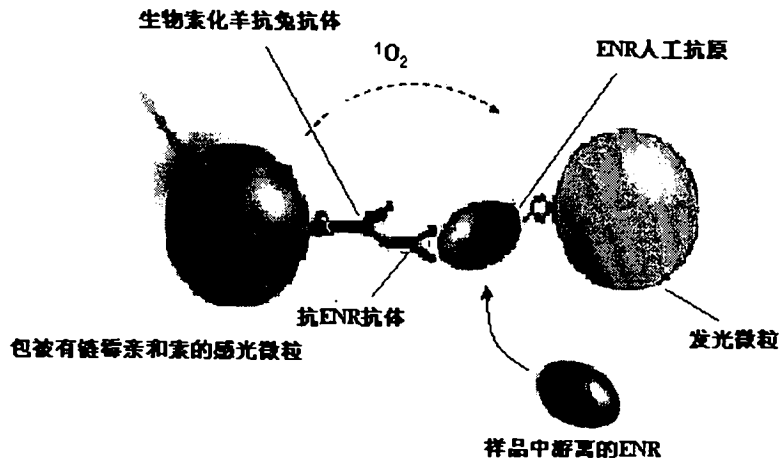


图 2

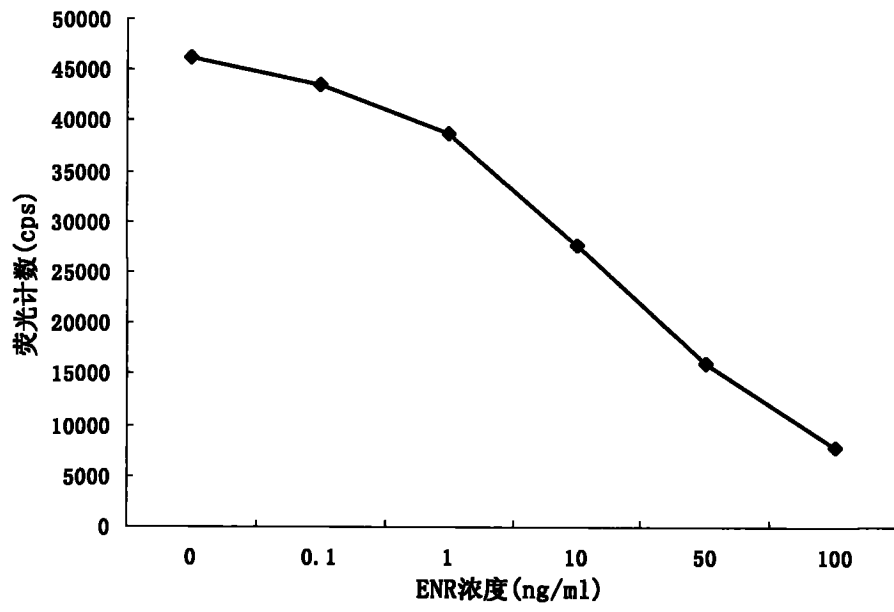


图 3

专利名称(译)	一种检测恩诺沙星的光激化学发光免疫分析法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN101893621A	公开(公告)日	2010-11-24
申请号	CN201010230789.1	申请日	2010-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
[标]发明人	黄飏 赵莉莉 张珏 张艺 周彬 陈蕴 金坚		
发明人	黄飏 赵莉莉 张珏 张艺 周彬 陈蕴 金坚		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测恩诺沙星的光激化学发光免疫分析法及其试剂盒，属于光激化学发光免疫分析(LICLIA)技术领域。本发明试剂盒，测定基础是均相标记免疫反应。首先由包被有ENR-OVA的发光微粒加入微孔板，然后顺序加入ENR标准或样品、兔抗ENR抗体、生物素化羊抗兔抗体避光反应，再加入包被有链霉亲和素的感光微粒孵育后检测。发光微粒上的ENR-OVA与ENR竞争连接到ENR抗体，再与生物素化羊抗兔抗体及包被有链霉亲和素的感光微粒形成复合体，光激发下，通过单线态离子氧的产生和传递，将能量传递给发光微粒产生荧光，用光激化学发光检测仪检测光信号，光信号强度与样品中ENR浓度成反比，对照标准曲线测得样品中ENR的含量。该检测ENR试剂盒结构简单，操作简便、检测时间短、灵敏度高。

