



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110702896 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910966460.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.10.12

G01N 33/58(2006.01)

(71)申请人 青海省动物疫病预防控制中心

地址 810008 青海省西宁市胜利路69号

申请人 北京维德维康生物技术有限公司

(72)发明人 王云平 张汉青 赵维章 刘河冰

马立才 张正英 刘海珍 张沛

黄文颖 郝云晴 都占林

(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 白艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

牦牛肉中喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫
层析定量检测方法

(57)摘要

本发明公开了牦牛肉中喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫层析定量检测方法。本发明提供了检测试剂卡,包括底板和放置在其上的样品垫、含有销微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫、含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜,和吸水垫。上述试剂卡中,所述抗喹诺酮类药物抗体为抗环丙沙星单克隆抗体;所述抗环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为1;所述抗环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为2。本发明通过建立时间分辨荧光免疫层析方法来检测牦牛肉中环丙沙星残留量,其灵敏度高于ELISA方法。

1. 一种喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫检测试剂卡, 包括底板和放置在其上的样品垫、含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫、含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜, 和吸水垫。

2. 根据权利要求1所述的试剂卡, 其特征在于: 所述抗喹诺酮类药物抗体为抗环丙沙星单克隆抗体;

所述抗环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为1;

所述抗环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为2。

3. 根据权利要求2所述的试剂卡, 其特征在于:

所述含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫为将钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液喷于释放垫上形成;

所述钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液的包被浓度为1.4mg/mL。

4. 根据权利要求3所述的试剂卡, 其特征在于: 所述钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液中, 所述抗环丙沙星抗体和钨微球的质量比为7:20;

或, 所述钨微球为200nm羧基化钨微球。

5. 根据权利要求1-4中任一所述的试剂卡, 其特征在于:

所述喹诺酮类药物检测线T由环丙沙星抗原或其溶液形成;

或, 所述环丙沙星抗原溶液的包被浓度具体为1.0mg/mL;

或, 所述质控线C由IgG抗体或IgG抗体溶液形成;

或, 所述IgG抗体溶液的包被浓度具体为0.875mg/mL;

或, 所述含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜为将所述环丙沙星抗原溶液包被在硝酸纤维素膜形成检测线T, 且将所述IgG抗体溶液包被在硝酸纤维素膜形成质控线C, 得到含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜。

6. 一种制备权利要求1-5中任一所述的试剂卡的方法, 包括如下步骤: 先制备含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫和制备含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜; 再将样品垫、所述含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫、所述含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜和吸水垫组装到底板上, 得到试剂卡;

所述含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫为将钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体溶液喷于释放垫上形成;

所述钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液的浓度为1.4mg/mL;

所述抗喹诺酮类药物抗体为抗环丙沙星单克隆抗体;

所述抗环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为1;

所述抗环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为2;

所述喹诺酮类药物检测线T由环丙沙星抗原或其溶液形成;

或, 所述环丙沙星抗原溶液的包被浓度具体为1.0mg/mL;

所述质控线C由IgG抗体或IgG抗体溶液形成;

或, 所述IgG抗体溶液的浓度具体为0.875mg/mL;

所述含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜为将所述环丙沙星抗原溶液包被在硝酸纤维素膜形成检测线T, 且将所述IgG抗体溶液包被在硝酸纤维素膜形成质控线C, 得到含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜。

7. 权利要求1-6中任一中的所述试剂卡在制备检测或辅助检测喹诺酮类药物产品中的应用;

或权利要求1-6中任一中的所述试剂卡在制备检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物产品中的应用;

或权利要求1-6中任一中的所述试剂卡在制备检测或辅助检测待测样品中喹诺酮类药物含量产品中的应用;

或权利要求1-6中任一中的所述试剂卡在检测或辅助检测喹诺酮类药物中的应用;

或权利要求1-6中任一中的所述试剂卡在检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物中的应用;

或权利要求1-6中任一中的所述试剂卡在检测或辅助检测待测样品中喹诺酮类药物含量中的应用;

或权利要求1-6中任一中的所述试剂卡中的钡微球标记的抗环丙沙星抗体在检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物或待测样品中喹诺酮类药物含量中的应用。

8. 一种检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物的方法, 包括如下步骤: 有机溶剂提取待测样品, 收集提取液; 再将所述提取液加入权利要求1-6中任一所述试剂卡的样品垫上, 反应, 再用荧光免疫定量分析仪检测反应的产物;

所述有机溶剂包括乙腈和正己烷;

若所述试剂卡的检测线T荧光信号值小于等于质控线C荧光信号值, 则待测样本中含有或候选含有喹诺酮类药物;

若所述试剂卡的检测线T荧光信号值大于质控线C荧光信号值, 则待测样本中不含有或候选不含有喹诺酮类药物。

9. 一种检测或辅助检测待测样品中喹诺酮类药物含量的方法, 包括如下步骤:

1) 制备标准曲线;

取与待测样品同样来源且无喹诺酮类药物的样本, 加入不同浓度的喹诺酮类药物, 有机溶剂提取所述样本, 收集含有不同浓度喹诺酮类药物的提取液; 所述有机溶剂包括乙腈和正己烷;

再将所述不同喹诺酮类药物浓度提取液加入权利要求1-6中任一中的所述试剂卡的样品垫上, 反应, 再用荧光免疫定量分析仪测试, 得到不同浓度的标准品溶液的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值;

以添加的喹诺酮类药物不同浓度为X轴, 对应的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值的比值为Y轴, 作标准曲线;

2) 有机溶剂提取待测样本, 收集待测样本提取液; 所述有机溶剂包括乙腈和正己烷;

再将所述待测样本提取液加入权利要求1-6中任一所述试剂卡的样品垫上, 反应, 再用荧光免疫定量分析仪检测反应的产物, 得到待测样本的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值;

将所述待测样本的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值代入所述1) 得到的标准曲线中, 得到待测样本中喹诺酮类药物含量。

10. 根据权利要求7所述的应用或权利要求8或9所述的方法, 其特征在于: 所述喹诺酮类药物为环丙沙星、噁喹酸、达氟沙星、诺氟沙星、氟甲喹、依诺沙星、恩诺沙星或氧氟沙星。

牦牛肉中喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫层析定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种牦牛肉中喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫层析定量检测方法。

背景技术

[0002] 牦牛是青藏高原特有的家畜品种之一。大多分布于高寒草原牧区,不仅是高寒草原藏民族及其他少数民族聚居区经济发展的基础和象征,而且已成为青藏高原地区畜牧业发展的独立板块。随着牦牛养殖规模的扩大,由于养殖户基本以牧民为主,知识水平较低、生态养殖观念较差,为控制牦牛疫病的发生,在养殖过程中就存在着养殖者乱用、滥用、长期或超量使用兽药,严重影响了牦牛肉的安全性。

[0003] 喹诺酮类(Quinolones,简称QNS)药物是人工合成的广谱抗生素,该类药物具有高效、低毒、广谱的特点,因而被广泛应用于畜牧、水产等养殖业的疾病防治。长期使用喹诺酮会导致药物残留和耐药性的产生,这些危害会通过动物源性食品危害人类的健康。因此欧盟、美国、日本已将喹诺酮类药物列为动物源性食品中残留检测的重点监控项目,美国FDA在2005年宣布禁止用于治疗家禽细菌感染的抗菌药物恩诺沙星的销售和使用,我国农业部在235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》规定环丙沙星、单诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、恶喹酸和氟甲喹7种喹诺酮类药物在动物肌肉组织中的最高残留限量为10~500 μ g/kg。

[0004] 目前喹诺酮类药物的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)、胶体金免疫层析法和酶联免疫吸附法(ELISA)等。色谱方法一般需要昂贵的仪器,检测成本高,且操作复杂不适合于基层检测。胶体金免疫层析法可以用于基层检测但不能定量,酶联免疫法能够定量检测但需要反应的时间过长,而且酶不稳定。

[0005] 时间分辨荧光免疫分析技术(Time-resolved fluoroimmunoassay,TRFIA)是近几年来发展起来的一种非同位素免疫分析技术,该技术操作简便、易实现自动化,可有效地排除非特异荧光的干扰,在分析灵敏度上有了很大的提高。该技术兼具了胶体金和ELISA的优点,克服了ELISA方法中酶不稳定的缺点,广泛应用于药物残留的检测当中。目前,还没有应用时间分辨免疫层析技术检测牦牛肉中喹诺酮类药物的报道。

发明内容

[0006] 为了检测牦牛肉中喹诺酮类药物残留,本发明提供如下技术方案:

[0007] 本发明一个目的是提供一种喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫检测试剂卡。

[0008] 本发明提供的检测试剂卡,包括底板和放置在其上的样品垫、含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫、含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜,和吸水垫。

[0009] 上述试剂卡中,所述抗喹诺酮类药物抗体为抗环丙沙星单克隆抗体;

[0010] 所述抗环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为1;

- [0011] 所述抗环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为2。
- [0012] 上述试剂卡中,所述含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫为将钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液喷于释放垫上形成;
- [0013] 所述钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液的包被浓度为1.4mg/mL。
- [0014] 上述试剂卡中,所述钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液中,所述抗环丙沙星抗体和钨微球的质量比为7:20;
- [0015] 或,所述钨微球为200nm羧基化钨微球。
- [0016] 上述试剂卡中,所述喹诺酮类药物检测线T由环丙沙星抗原或其溶液形成;
- [0017] 或,所述环丙沙星抗原溶液的包被浓度具体为1.0mg/mL;
- [0018] 或,所述质控线C由IgG抗体或IgG抗体溶液形成;
- [0019] 或,所述IgG抗体溶液的包被浓度具体为0.875mg/mL;
- [0020] 或,所述含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜为将所述环丙沙星抗原溶液包被在硝酸纤维素膜形成检测线T,且将所述IgG抗体溶液包被在硝酸纤维素膜形成质控线C,得到含有环丙沙星检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜。
- [0021] 本发明另一个目的是提供一种制备上述第一个目的试剂卡的方法。
- [0022] 本发明提供的方法,包括如下步骤:先制备含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫和制备含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜;再将样品垫、所述含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫、所述含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜和吸水垫组装到底板上,得到试剂卡;
- [0023] 所述含有钨微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫为将钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液喷于释放垫上形成;
- [0024] 所述钨微球标记的抗环丙沙星抗体溶液的浓度为1.4mg/mL;
- [0025] 所述抗喹诺酮类药物抗体为抗环丙沙星单克隆抗体;
- [0026] 所述抗环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为1;
- [0027] 所述抗环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为2;
- [0028] 所述喹诺酮类药物检测线T由环丙沙星抗原或其溶液形成;
- [0029] 或,所述环丙沙星抗原溶液的包被浓度具体为1.0mg/mL;
- [0030] 所述质控线C由IgG抗体或IgG抗体溶液形成;
- [0031] 或,所述IgG抗体溶液的浓度具体为0.875mg/mL;
- [0032] 所述含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜为将所述环丙沙星抗原溶液包被在硝酸纤维素膜形成检测线T,且将所述IgG抗体溶液包被在硝酸纤维素膜形成质控线C,得到含有喹诺酮类药物检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜。
- [0033] 上述第一个目的中的所述试剂卡在制备检测或辅助检测喹诺酮类药物产品中的应用也是本发明保护的范围;
- [0034] 或上述第一个目的中的所述试剂卡在制备检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物产品中的应用也是本发明保护的范围;
- [0035] 或上述第一个目的中的所述试剂卡在制备检测或辅助检测待测样品中喹诺酮类药物含量产品中的应用也是本发明保护的范围;
- [0036] 或上述第一个目的中的所述试剂卡在检测或辅助检测喹诺酮类药物中的应用也

是本发明保护的范围；

[0037] 或上述第一个目的中的所述试剂卡在检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物中的应用也是本发明保护的范围；

[0038] 或上述第一个目的中的所述试剂卡在检测或辅助检测待测样品中喹诺酮类药物含量中的应用也是本发明保护的范围；

[0039] 或上述第一个目的中的所述试剂卡中的钨微球标记的抗环丙沙星抗体在检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物或待测样品中喹诺酮类药物含量中的应用也是本发明保护的范围。

[0040] 本发明还有一个目的是提供如下方法：

[0041] 本发明提供一种检测或辅助检测待测样品中是否含有喹诺酮类药物的方法，包括如下步骤：有机溶剂提取待测样品，收集提取液；再将所述提取液加入上述试剂卡的样品垫上，反应，再用荧光免疫定量分析仪检测反应的产物；

[0042] 所述有机溶剂包括乙腈和正己烷；

[0043] 若所述试剂卡的检测线T荧光信号值小于等于质控线C荧光信号值，则待测样本中含有或候选含有喹诺酮类药物；

[0044] 若所述试剂卡的检测线T荧光信号值大于质控线C荧光信号值，则待测样本中不含有或候选不含有喹诺酮类药物。

[0045] 或，本发明提供了一种检测或辅助检测待测样品中喹诺酮类药物含量的方法，包括如下步骤：

[0046] 1) 制备标准曲线；

[0047] 取与待测样品同样来源且无喹诺酮类药物的样本（即喹诺酮类药物含量小于 $0.1\mu\text{g/kg}$ 的样本），加入不同浓度的喹诺酮类药物，有机溶剂提取所述样本，收集含有不同浓度喹诺酮类药物的提取液；所述有机溶剂包括乙腈和正己烷；

[0048] 再将所述不同喹诺酮类药物浓度提取液加入上述试剂卡的样品垫上，反应，再用荧光免疫定量分析仪测试，得到不同浓度的标准品溶液条件下试剂卡的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值；

[0049] 以添加的喹诺酮类药物不同浓度为X轴，对应的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值的比值为Y轴，作标准曲线；

[0050] 2) 有机溶剂提取待测样本，收集待测样本提取液；所述有机溶剂包括乙腈和正己烷；

[0051] 再将所述待测样本提取液加入上述试剂卡的样品垫上， 40°C 反应5min，再用荧光免疫定量分析仪检测反应的产物，得到待测样本的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值；

[0052] 将所述待测样本的检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值代入所述1)得到的标准曲线中，得到待测样本中喹诺酮类药物含量。

[0053] 上述方法中，所述有机溶剂提取样本包括如下步骤：取均质牦牛肉样本的可食用肌肉组织 $3\pm 0.05\text{g}$ ，再依次加入 $50\mu\text{L}$ 样品提取剂（ 0.1mol/L 硫酸水溶液）、 0.7g 样品纯化剂（中性氧化铝）和 6mL 乙腈，立即充分涡动5min；然后用离心机（ 4000g ），离心5min；取 3mL 上清液于新的 4mL 离心管中； 50°C 水浴中，氮气吹干；再加入 2mL 正己烷，充分涡动30s，最后加

入1mL样品稀释液(pH7.4 PBS),低速涡动30s;4000g以上,离心5min;完全弃去上层正己烷及中间层杂质;取100 μ L作为待测液。

[0054] 上述中,所述待测样本为食品动物组织样本;牦牛可食性肌肉组织;

[0055] 或,所述食品动物组织样本为家畜肉,在本发明的实施例中所述家畜肉具体为牦牛可食性肌肉组织。

[0056] 或,所述喹诺酮类药物为环丙沙星、噁喹酸、达氟沙星、诺氟沙星、氟甲喹、依诺沙星、恩诺沙星或氧氟沙星。

[0057] 本发明拟利用钬微球作为抗体标记物建立一种简单、快速、高灵敏的牦牛肉中喹诺酮类药物残留的荧光定量免疫层析检测方法,并对其灵敏度、准确性和精密度等指标进行评价,以期提供一种牦牛肉中环丙沙星残留量的快速检测方法。

[0058] 本发明通过建立时间分辨荧光免疫层析方法来检测牦牛肉中喹诺酮类药物的残留量,其灵敏度远大于ELISA方法。本发明对牦牛肉中喹诺酮类药物的定量检出限为0.5 μ g/kg,添加回收率为70.26-106.73%,变异系数为6.51-9.79%;实际检测样品中,TRFIA与LC-MS/MS方法检测结果符合。说明本发明建立的方法准确度、精密度、灵敏度均较高,可用于牦牛肉中喹诺酮类药物的检测。

附图说明

[0059] 图1为时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡结构示意图。

[0060] 图2为TRFIA检测环丙沙星的标准曲线。

[0061] 图3为环丙沙星时间分辨荧光免疫层析与LC-MS/MS检测结果。

具体实施方式

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 下述实施例中部分材料如下:

[0065] 微量移液器(德国Eppendorf)、天子天平(天津德安特传感技术有限公司)、冷冻离心机(德国Thermo Fisher Scientific)、超声波清洗仪KQ-100E(昆山市超声仪器有限公司)、液相色谱-串联质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、样品粉碎机(九阳JYL-C090);检测卡恒温孵育器(WH-400)和时间分辨荧光免疫定量分析仪(FQ-S2,365/610nm)由维德维康生物技术有限公司研制。

[0066] 甲醇、乙腈、磷酸氢二钾、盐酸、氢氧化钠、吐温20、乙酸乙酯和正己烷等购自国药集团化学试剂有限公司;牛血清蛋白(BSA)购自美国Amresco公司;200nm羧基化钬微球(365/610nm, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)购自美国Creative Diagnostics公司;硝酸纤维素膜(NC膜)购自美国Millipore公司;样品垫、吸收垫、PVC底板均购自上海良信科技有限公司。

[0067] 环丙沙星标准品购自美国Sigma公司,环丙沙星标准溶液配制:准确称取1.0mg环丙沙星标准品,用甲醇溶解并定容至10mL,配制成100ppm的环丙沙星标准溶液,于-20℃保存,备用。

[0068] 羊抗鼠二抗由北京维德维康生物技术有限公司获得。

[0069] 复溶液配制:(1)0.1M的Tris-HCl、0.5%BSA、0.5%Tween20、5%蔗糖、0.9%NaCl

再加上0.02%Proclin 300混合调节其pH为8.0。

[0070] 牦牛肉样品购自青海某农贸市场。

[0071] 实施例1、环丙沙星半抗原、人工抗原及单克隆抗体制备

[0072] 一、环丙沙星抗原

[0073] 1、环丙沙星半抗原的制备

[0074] 50mL圆底烧瓶中加入氯化亚砷15mL, 20℃磁力搅拌下分批加入环丙沙星原料药900mg, 50℃磁力搅拌3小时后60℃加压浓缩, 得环丙沙星中间体; 50mL圆底烧瓶中加入4-氨基丁酸650mg, THF30mL, 三乙胺836mg, 20℃磁力搅拌15min后滴加环丙沙星中间体10mL, 20℃磁力搅拌3小时后35℃减压浓缩, 残留物中加入30mL水, 1M盐酸调PH到7-7.5, 析出类白色固体, 过滤, 滤饼用10mL水洗, 收集滤饼50℃鼓风干燥5小时得到920mg环丙沙星半抗原。

[0075] 2、环丙沙星抗原的制备

[0076] 环丙沙星抗原的制备方法, 具体操作步骤包括:

[0077] ①称取上述1制备的环丙沙星半抗原12.5mg溶于2mL DMF, 加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC) 11mg, N-羟基丁二酰亚胺(NHS) 10mg, 室温搅拌反应2h;

[0078] ②称取BSA50mg, 溶于5mL 0.1M碳酸氢钠缓冲液;

[0079] ③将①制备的环丙沙星半抗原反应液逐滴加入到②制备的BSA溶液中, 室温搅拌反应过夜;

[0080] ④用PBS将③得到的反应液在4℃条件透析72h, 期间换透析液6次, 得到透析液;

[0081] ⑤将透析液在无菌条件下用0.22μm孔径的滤膜过滤, -20℃保存, 得到环丙沙星抗原, 为环丙沙星抗原。

[0082] 二、环丙沙星单克隆抗体的制备

[0083] ①取步骤一的2制备的环丙沙星抗原(环丙沙星-BSA), 按100μg/只, 以生理盐水溶解免疫原与弗氏完全佐剂等体积混匀, 颈背部皮下注射免疫6-8周龄Balb/c雌鼠, 初次免疫后第7、14、28天以免疫原与弗氏不完全佐剂等体积混匀, 各追加免疫一次, 融合前3天以免疫复合物100μg/只, 不加弗氏佐剂再追加免疫一次。

[0084] ②按常规方法进行, 取免疫小鼠的脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞(SP2/0)混合, 然后在45s内缓慢加入预热的融合剂(PEG4000)进行融合, 用HAT培养基悬浮均匀, 再加入适量的饲养细胞, 培养于96孔培养板, 于37℃, 5%CO₂培养箱中培养, 5天后用HT培养基半换液, 9天时候进行全换液。

[0085] ③细胞融合后, 待细胞长到培养孔面积的1/4时, 采用分步筛选法筛选杂交瘤细胞。初选采用间接ELISA方法, 以包被抗原(预先用方阵法常规滴定其最佳包被浓度和阳性血清稀释度)包被化学发光微孔板, 加入被测孔培养上清, 孵育, 清洗后加入羊抗鼠IgG-HRP和IgM-HRP, OPD进行显色反应。筛选出的阳性孔再用间接竞争ELISA方法筛选, 先将细胞上清与100μg/mL的环丙沙星等体积混合, 37℃水浴作用30min, 再加入到包被好的化学发光微孔板中。同时用PBS取代环丙沙星作对照, 其余步骤同上。若经环丙沙星阻断后的OD_{450nm}值下降到对照孔的50%以下, 则判为阳性, 经2~3次检测都为阳性的孔, 立即用有限稀释法进行亚克隆化。

[0086] ④将2-3次亚克隆建株后的杂交瘤细胞扩大培养, 收集上清液用间接ELISA测定效价, 冻存; 并取8-10周龄Balb/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.5mL/只, 7-10日后腹腔注射杂交瘤

细胞 $1-2 \times 10^6$ /只,7-10日后抽取小鼠腹水,纯化得到环丙沙星单克隆抗体。

[0087] 测序结果,环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表的序列1所示,环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表的序列2所示。

[0088] 三、单克隆抗体特异性分析

[0089] 选取目标物的结构类似物(表1所示)作为抑制剂,用ic-ELISA测定各抑制物的 IC_{50} ,以上述二制备的环丙沙星单克隆抗体对相应化合物的 IC_{50} 与对各抑制物的 IC_{50} 之比的百分数为其交叉反应率(CR%), $CR(\%) = (\text{目标化合物的 } IC_{50} / \text{类似物的 } IC_{50}) \times 100$ 。

[0090] 结果如表1所示,结果表明环丙沙星单克隆抗体可用于检测喹诺酮类药物包括噁喹酸、达氟沙星、诺氟沙星、氟甲喹、依诺沙星、恩诺沙星、氧氟沙星。

[0091] 表1为环丙沙星抗体与其他环丙沙星类药物交叉反应率试验

	药物名称	交叉反应率 (%)
	环丙沙星	100
	噁喹酸	45
	达氟沙星	110
[0092]	诺氟沙星	97
	氟甲喹	65
	依诺沙星	60
	恩诺沙星	80
	氧氟沙星	50

[0093] 实施例2、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡的制备及检测方法的建立

[0094] 一、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡的的制备

[0095] 1、羧基化钨微球的抗体标记

[0096] 本发明用的200nm羧基化时间分辨,抗体标记方法的基础之上,进行了优化,具体标记方法如下:

[0097] ①50 μ L羧基化钨微球(200nm羧基化钨微球(365/610nm, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$);浓度:1%,质量kg/体积L)中加入450 μ L活化缓冲液(0.05mol/L MES,pH 5.0),超声5min;②然后,向①处理后的溶液中依次加入EDC和NHS使其终浓度为均为1mM,室温振荡反应30min,15000g离心10min,弃去上清液;③将②得到的沉淀用500 μ L偶联缓冲液(0.04mol/L PB,pH 8.0)复溶,超声5min,加入20 μ L 3.5mg/mL环丙沙星单克隆抗体(单抗与微球的质量比7:20),室温水平摇床2h,15000g离心5min;④向③得到的沉淀中加入500 μ L封闭缓冲液(0.01mol/L PB,2% BSA,pH 8.0),4 $^{\circ}$ C振荡反应过夜;⑤将④得到的反应液以15000g离心5min,弃去上清,再次使用50 μ L复溶缓冲液复溶微球,超声仪超声3min,4 $^{\circ}$ C避光保存备用,得到羧基化钨微球标记的环丙沙星单抗(浓度为1.4mg/mL)。

[0098] 2、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡的的组装

[0099] 用划膜仪将实施例1的一得到环丙沙星抗原(6mg/m L,1:6稀释)和羊抗鼠IgG(17.5mg/mL,1:20稀释)包被于NC膜上分别作为检测线(T线,0.9 μ L/cm,环丙沙星抗原包被

浓度为1.0mg/mL)和质控线(C线,0.9 μ L/cm,羊抗鼠IgG包被浓度为0.875mg/mL),置于37℃烘箱中过夜干燥,得到含有环丙沙星检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜。

[0100] 将上述1制备的羧基化钨微球标记的环丙沙星单抗喷于释放垫(上海金标生物科技有限公司,SB08,300*200mm)上,喷量为2.8 μ L/cm,置于37℃烘箱中干燥2h,得到含有钨微球标记的抗环丙沙星抗体的释放垫。

[0101] 然后,将样品垫、含有钨微球标记的抗环丙沙星抗体的释放垫、含有环丙沙星检测线T和质控线C的硝酸纤维素膜、吸水垫(上海金标生物科技有限公司,CH37,300*46mm)依次粘PVC底板上,底板一端端头为吸水垫,另一端端头为样品垫,硝酸纤维素膜两端分别与吸水垫和钨微球标记的抗环丙沙星抗体的释放垫相互交叠连接,在钨微球标记的抗环丙沙星抗体的释放垫上压有样品垫,并用切割机切成3.90mm宽度的试纸条,得到喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡。

[0102] 二、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡检测方法的建立

[0103] 1、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡定性检测方法(TRFIA)的建立

[0104] 1)、样本提取

[0105] 牦牛肉均质,称取 3 ± 0.05 g均质后的样品置于50mL离心管中,依次加入50 μ L样品提取剂(0.1mol/L硫酸水溶液)、0.7g中性氧化铝和6mL乙腈,立即充分涡动5min;然后用离心机(4000g),离心5min;取3mL上清液于新的4mL离心管中;50℃水浴中,氮气吹干;再加入2mL正己烷,充分涡动30s,最后加入1mL样品稀释液(pH7.4 PBS:NaCl 8g,KCl 0.2g,Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g,KH₂PO₄ 0.24g,去离子水定容至1L),低速涡动30s;4000g以上,离心5min;完全弃去上层正己烷及中间层杂质;取100 μ L作为样本待测液。

[0106] 2)、检测步骤

[0107] 取100 μ L样本待测液滴加至上述一制备的喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡(图1)的样本垫上,40℃检测卡恒温孵育器中准确反应5min后,取出并使用荧光免疫定量分析仪检测。

[0108] 若检测线T荧光信号值小于等于质控线C荧光信号值,则待测样本中含有或候选含有喹诺酮类药物;

[0109] 若检测线T荧光信号值大于质控线C荧光信号值,则待测样本中不含有或候选不含有喹诺酮类药物。

[0110] 2、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡定量检测方法(TRFIA)的建立

[0111] 1)、标准曲线的绘制

[0112] 取牦牛肉阴性样品(LC-MS/MS检测不含有喹诺酮类药物,含量低于仪器法检出限),向其中分别添加喹诺酮类药物标准溶液(具体为环丙沙星标准溶液),使环丙沙星终浓度分别为:0.00 μ g/kg、0.25 μ g/kg、0.5 μ g/kg、1 μ g/kg、2 μ g/kg和4 μ g/kg充分混匀后,按照上述1中的方法进行样本提取,得到各个浓度样本的提取液。

[0113] 将上述各个浓度样本的提取液按照上述1的2)进行检测。每个浓度重复检测5次,取平均值。以样本中添加的环丙沙星终浓度为X轴,检测线T荧光信号值与质控线C荧光信号值的比值(T/C)为Y轴,用origin8.0(OriginLab Corp.,Northampton,MA,USA)做非线性拟合分析。通过测试数据的拟合表明,所建立的环丙沙星时间分辨荧光免疫层析定量检测方法对应牦牛肉样本的标准曲线为:

[0114] $Y=0.399+(7.393-0.399)/(1+(x/0.465)^{1.46})$, R^2 为0.9940(图2)。

[0115] 其中,X为环丙沙星浓度值,Y为T/C值。

[0116] $^{1.46}$ 表示1.46次方。

[0117] 2)、样本提取液

[0118] 按照上述1中的1)制备样本待测液。

[0119] 3)、检测

[0120] 取100 μ L样本待测液滴加至上述一制备的喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡中的样本垫上,40 $^{\circ}$ C检测卡恒温孵育器中准确反应5min后,取出并使用荧光免疫定量分析仪检测,得到T线荧光信号值与C线荧光信号值。

[0121] 将上述T线荧光信号值与C线荧光信号值的比值代入上述1)的标准曲线中,得到各个样本中喹诺酮类药物含量。

[0122] 三、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡的最低检测限

[0123] 牦牛肉阴性样品(LC-MS/MS检测阴性)各20份。

[0124] 按照上述二中的2的方法检测上述20份阴性样本中的喹诺酮类药物含量。分别计算环丙沙星含量的平均值和标准差:平均值加上9倍标准差,即为定量限。

[0125] 表2时间分辨荧光免疫层析法检出限验证(μ g/kg)

[0126]	样品	测定值(n=20)										平均	标准	定量
												值	差	限
[0127]		0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2			
	牦牛	666	078	222	731	093	603	614	594	616	547	0.25	0.02	0.49
	肉	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	78	65	63
		757	575	527	521	543	556	155	598	004	559			

[0128] 结果如表2所示,可以看出,以环丙沙星为对照物建立标准曲线得出的该药物最低检出限为0.4963 μ g/kg。为了保证结果的准确和可靠,将牦牛肉中环丙沙星的定量限定为0.5 μ g/kg。

[0129] 四、准确度和精密度

[0130] 分别牦牛肉阴性样品(LC-MS/MS检测喹诺酮类药物药物含量低于方法检测限)各20份,分别加入环丙沙星、噁喹酸、达氟沙星、诺氟沙星、氟甲喹、依诺沙星、恩诺沙星、氧氟沙星标准溶液,样品添加药物浓度为对应的定量限和2倍定量限,每个浓度梯度添加5个平行,计算样品添加回收率和批内、批间变异系数。

[0131] 按照上述二的方法检测,最后,依据添加回收数据对所建立时间分辨荧光免疫层析定量分析方法的准确度和精密度进行分析。

[0132] 结果如表3所示,本发明对牦牛肉中喹诺酮类药物的添加回收率为86.08-106.96%,批内、批间变异系数均小于15%,表明该方法具有较好的准确度和精密度。

[0133] 表3时间分辨荧光免疫层析在喹诺酮类药物样品中的准确度和精密度

样品	添加浓 度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	批次	批内			批间		
			平均值±标 准差 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	变异系 数 (%)	平均值±标 准差 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收 率 (%)	变异系 数 (%)
[0134] 环丙沙 星	0.5	第一批	0.44±0.03	88.48	6.15			
		第二批	0.45±0.03	89.32	6.38	0.44±0.03	87.32	6.39
		第三批	0.42±0.03	84.16	6.25			
	1.0	第一批	0.92±0.05	91.55	5.42			
		第二批	0.97±0.05	96.96	5.60	0.96±0.06	95.76	6.08
		第三批	0.99±0.05	98.76	5.50			
噻嗪酸	1.1	第一批	0.98±0.07	87.95	7.10	0.99±0.07	88.98	7.02

[0135]	达氟沙 星	2.2	第二批	1.02±0.08	92.18	7.50		
			第三批	0.96±0.06	86.82	6.29		
			第一批	2.18±0.19	98.30	8.81		
		0.45	第二批	2.06±0.19	92.85	9.00	2.08±0.19	93.83 8.92
			第三批	2.01±0.17	90.36	8.50		
			第一批	0.40±0.04	89.29	8.93		
		0.9	第二批	0.45±0.03	99.60	7.43	0.43±0.04	95.16 9.18
			第三批	0.43±0.04	96.58	9.16		
			第一批	0.95±0.08	106.06	8.58		
		0.52	第二批	0.89±0.08	98.93	9.00	0.92±0.08	102.1 8.61
			第三批	0.91±0.08	101.34	8.57	1	1
			第一批	0.55±0.05	105.56	8.89		
		1.04	第二批	0.49±0.03	94.06	7.01	0.53±0.05	102.1 9.32
			第三批	0.56±0.04	106.96	7.26	9	
			第一批	0.953±0.089	91.28	9.38		
		1.54	第二批	1.01±0.0818	96.89	8.12	0.99±0.08	94.74 8.41
			第三批	1.00±0.09	96.04	8.36		
			第一批	0.79±0.07	102.94	9.03		
	氟甲喹	0.77	第二批	0.71±0.07	92.34	9.86	0.76±0.08	98.99 10.01
			第三批	0.78±0.07	101.70	9.36		
			第一批	1.41±0.13	91.53	9.10		
依诺沙 星	1.66	0.83	第二批	1.33±0.12	86.08	8.75	1.41±0.13	91.88 9.36
			第三批	1.51±0.10	98.01	6.74		
			第一批	0.87±0.06	105.28	6.74		
	1.66	0.83	第二批	0.87±0.05	104.69	5.58	0.85±0.06	102.2 7.15
			第三批	0.80±0.06	96.70	6.96	2	
			第一批	1.65±0.11	99.51	6.55		
依诺沙 星	1.66	1.66	第二批	1.67±0.12	100.53	7.23	1.61±0.12	97.26 7.31
			第三批	1.52±0.08	91.73	5.32		

[0136]	恩诺沙 星	第一批	0.59±0.04	93.03	7.29		
		0.63 第二批	0.63±0.05	99.46	8.06	0.63±0.06	99.63 9.19
		第三批	0.67±0.05	106.41	7.92		
		第一批	1.13±0.10	90.06	8.65		
		1.26 第二批	1.25±0.12	99.53	9.23	1.17±0.12	92.57 10.01
		第三批	1.11±0.10	88.13	8.94		
	氧氟沙 星	第一批	0.97±0.07	97.24	7.68		
		1.0 第二批	0.98±0.06	98.42	6.55	0.98±0.07	97.86 6.80
		第三批	0.98±0.08	97.93	7.66		
		第一批	1.97±0.19	98.25	9.75		
		2.0 第二批	1.79±0.12	89.28	6.91	1.88±0.16	93.81 8.75
		第三批	1.89±0.15	93.91	7.94		

[0137] 回收率 = (平均值/添加浓度) × 100%

[0138] 变异系数 = (标准差/平均值) × 100%;

[0139] 五、喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡 (TRFIA) 检测与 LC-MS/MS 检测结果比较

[0140] 用上述二的方法 (TRFIA) 对牦牛肉样本 (共 100 份) 进行检测, 分别于 LC-MS/MS 的检测结果进行确证比较。有 91 份样品两种方法均未检测到, 将剩余 9 份阳性样本和可疑样品进行检测, 以 TRFIA 所测得喹诺酮类药物的浓度为 X 轴, LC-MS/MS 所测得喹诺酮类药物的浓度为 Y 轴, 绘制散点图。对两种方法的测定结果进行线性分析, 结果如图 3 所示, 回归方程为: $Y = 0.942 + 0.089x$, $R^2 = 0.9744$, 说明建立的 TRFIA 与 LC-MS/MS 检测结果具有良好的一致性。

[0141] 六、比较喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫快速检测试剂卡 (TRFIA) 检测方法和别的方法

[0142] 为了更加高效的对牦牛肉中喹诺酮类药物进行检测, 本文建立了时间分辨荧光免疫层析方法, 并与其它方法进行了比较, 比较结果如表 4 所示。

[0143] 表 4 环丙沙星检测方法比较

[0144]	检测方 法	标记物	目标物质	样本	检测限	参考文献
	TRFIA	时间分辨荧 光微球	QNs	牦牛肉	0.5 μg/kg	本发明的 方法
	UPLC-MS		QNs	牦牛肉	1.5 μg/kg	龙启萍等

						[1]
	免疫层析	胶体金	QNs	鱼、虾、蟹	0.3~ 5 μ g/kg	宗婧婧等 [2]
[0145]	免疫层析	胶体金	QNs	鱼、虾	2.0 μ g /kg	谢世红等 [3]
	ELISA	酶	QNs	鱼	1.0 μ g /kg	郑百芹等 [4]

[0146] 参考文献具体如下：

[0147] [1]龙启萍,曹海兰,吕东晋,等.超高效液相色谱-质谱串联法测定牦牛肉中11种喹诺酮类药物残留[J].医学动物防制,2018,34(06):570-573.

[0148] [2]宗婧婧,张小军,严忠雍,等.胶体金免疫层析法检测水产品中15种喹诺酮类药物[J].理化检验(化学分册),2018,v.54(05):101-105.

[0149] [3]谢世红,王伟萍,孟霞,等.喹诺酮类胶体金检测试剂板的研发及在水产品中的应用[J].江苏农业科学,2018(1):185-187.

[0150] [4]郑百芹,罗晓琴,冯才伟,等.一种喹诺酮类药物的酶联免疫快速检测试剂盒的研制[J].中国酿造,2014,33(02):130-133.

<400> 2

Leu	Pro	Ala	Val	Met	Leu	Ser	Thr	Pro	Lys	Leu	His	Ser	Pro	Cys	Leu
1				5					10					15	
Ser	Val	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Pro	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Thr	Thr
			20					25					30		
Ser	Thr	Tyr	Asn	Ser	Leu	His	Leu	Phe	Arg	Met	Val	Pro	Ala	Glu	Thr
			35				40						45		
Arg	Pro	Val	Ser	Lys	Ala	Pro	Asp	Leu	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser
		50				55					60				
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
65					70				75					80	
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro	Pro	Thr	Val	Ile	Gln	Thr	Leu	Thr	Lys
			100					105					110		
Ile	Val	Leu	Leu	Trp	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Asn	Met	Leu	Phe	Met	Phe
		115					120					125			
Glu	Arg	Gly	Ser	Glu	Gly	Leu	Gln	Phe	Ile	Ser	His	Ala	Glu	Gly	Lys
		130				135						140			
Tyr	Ser	His	Ala	Thr	Ala	His	Trp	Ser	Phe	Ile	Phe	Gly	Phe	Ile	Ala
145					150				155					160	
Thr	Ile	Thr	Ile	Cys	Lys	Gly	Ala	Leu	Pro	Glu	Ala	Arg	Lys		
				165					170						

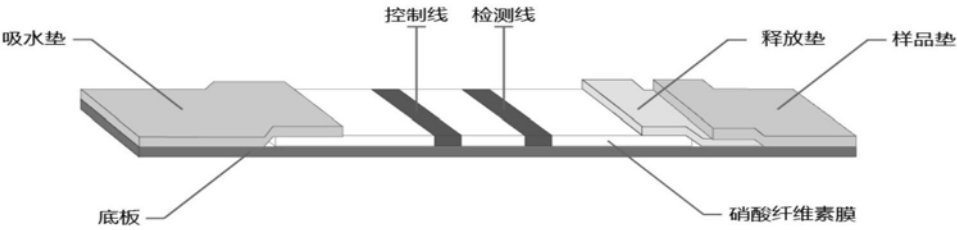


图1

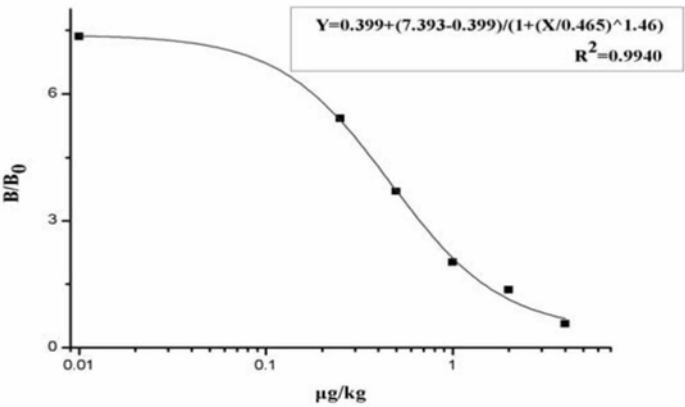


图2

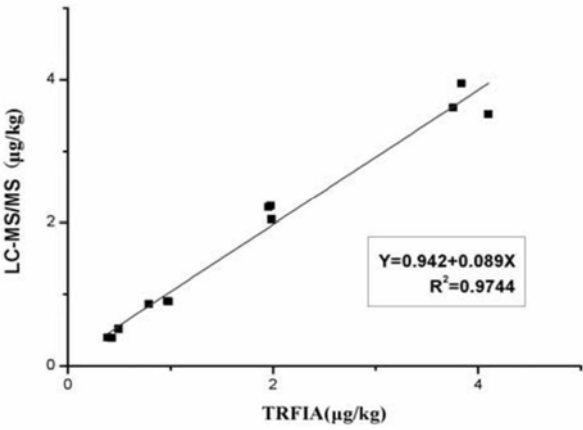


图3

专利名称(译)	牦牛肉中喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫层析定量检测方法		
公开(公告)号	CN110702896A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910966460.2	申请日	2019-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	王云平 张汉青 刘河冰 马立才 张正英 刘海珍 张沛 黄文颖 都占林		
发明人	王云平 张汉青 赵维章 刘河冰 马立才 张正英 刘海珍 张沛 黄文颖 郝云晴 都占林		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582		
代理人(译)	白艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了牦牛肉中喹诺酮类药物时间分辨荧光免疫层析定量检测方法。本发明提供了检测试剂卡，包括底板和放置在其上的样品垫、含有销微球标记的抗喹诺酮类药物抗体的释放垫、含有喹诺酮类药物检测线T以及质控线C的硝酸纤维素膜，和吸水垫。上述试剂卡中，所述抗喹诺酮类药物抗体为抗环丙沙星单克隆抗体；所述抗环丙沙星单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为1；所述抗环丙沙星单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为2。本发明通过建立时间分辨荧光免疫层析方法来检测牦牛肉中环丙沙星残留量，其灵敏度高于ELISA方法。

药物名称	交叉反应率(%)
环丙沙星	100
噁嗪酸	45
达氟沙星	110
诺氟沙星	97
氟甲喹	65
依诺沙星	60
恩诺沙星	80
氧氟沙星	50

