



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109085351 A

(43)申请公布日 2018.12.25

(21)申请号 201811031572.0

(22)申请日 2018.09.05

(71)申请人 顾娟红

地址 215000 江苏省苏州市吴中区吴中大道1368号检测中心

申请人 陈军 张嵘

(72)发明人 顾娟红 陈军 张嵘

(74)专利代理机构 苏州翔远专利代理事务所  
(普通合伙) 32251

代理人 王华

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

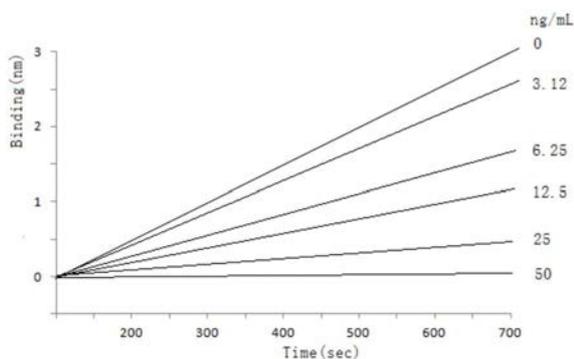
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

## (54)发明名称

一种快速检测恩诺沙星残留的方法

## (57)摘要

本发明公开了一种快速检测恩诺沙星残留的方法,属于检验技术领域。本发明以恩诺沙星为母体与载体蛋白质直接偶联后修饰多模光纤探头作为生物传感器,利用干涉原理,实现对液体样品中恩诺沙星的检测,通过被配置为基于从检测单元输出的电信号确定生物材料的浓度的信号处理器检测和识别待测样品溶液中是否存在目标物以及浓度信息,由此实现对目标物的检测。该检测方法较传统仪器分析方法更为简单快捷,且检测成本较低,其中,非标记方法检测的灵敏性在12.5ng/ml左右,金标记检测方法的灵敏性可以达到2.7ng/ml左右。



1. 一种快速检测恩诺沙星残留的方法,其特征在于:包括下列步骤:

第一步:包被原制备

将恩诺沙星加入二甲基甲酰胺,超声溶解后用冷乙醇冷却得到恩诺沙星的二甲基甲酰胺溶液,再将三乙胺和氯甲酸异丁醋加入到所述恩诺沙星的二甲基甲酰胺溶液中,室温搅拌反应;再将牛血清白蛋白的碳酸缓冲液溶液逐滴加入,继续搅拌反应5~7h;然后将反应液装入透析袋,在4℃条件下,用生理盐水溶液透析45~50h,换生理盐水溶液6次,透析结束后将透析液过0.2μm的滤膜,得到的滤液即为包被原;

第二步:免疫原制备

将恩诺沙星加入二甲基甲酰胺,超声溶解后将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺加入其中,室温反应过夜得到第一溶液;卵清蛋白溶解于碳酸溶液,然后逐滴加入到所述第一溶液中,继续搅拌3~5h;然后将反应产物用生理盐水透析45~50h,将透析液过0.2μm的滤膜,得到的滤液即为免疫原;

第三步:光纤传感器抗包被原修饰

将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶液中,室温静置4~6min,然后将光纤生物传感器末端没入15%蔗糖中,室温静置0.5~1.5min,然后室温晾干,置于2~8℃干燥保存备用;

第四步:光纤传感器抗原包被修饰

将APS光纤传感器末端没入包被原溶液中,室温静置5min;再将APS光纤生物传感器末端没入质量分数为15%的蔗糖水溶液中,室温静置1min,然后室温晾干后置于2~8℃干燥条件下保存,备用;

第五步:抗体用量确定

将恩诺沙星-BSA偶联物用磷酸盐缓冲液稀释20倍,取200μL于微孔板的第2列;将喹诺酮抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释至30、10和3.3μg/mL,分别取200μL于微孔板的第4列;往微孔板第1列中加入200μL水,往第3列加入200μL PBS-BSA;用APS探头进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

第五步:体系的建立

采用10μg/mL的喹诺酮抗体作为检测抗体浓度,用磷酸缓冲盐溶液将恩诺沙星标准品至稀释100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56和0ng/ml,取200μL梯度稀释的标准品加入微孔板的第4列中,往微孔板的第1、2、3列中依次加入200μL水、200μL 20倍稀释的恩诺沙星-BSA偶联物、200μL PBS-BSA进行检测;检测流程如下:第一列30s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

第六步:非标记检测

平衡:将光纤传感器末端没入阴性待检液体中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测液体中300s;阴性待检液体包含:200μL的待检液体和50μl磷酸盐缓冲液;待测液体包含200μL待测样品、50μL磷酸盐缓冲液和2μg喹诺酮抗体;

第七步:金标记检测

平衡:将光纤传感器末端没入待检液体中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测奶液中600s;所述待检液体包含200μl待检液体、50μL缓冲液和5μL金标BSA;所述待测奶液包含200μL待测牛奶、50μL缓冲液和5μL金标喹诺酮抗体。

2. 根据权利要求1所述的快速检测恩诺沙星残留的方法,其特征在于:非标记方法检测的灵敏性在12~13ng/ml,金标记检测方法的灵敏性可达到2~3ng/ml。

3. 根据权利要求1所述的快速检测恩诺沙星残留的方法,其特征在于:第六步中的待检液体为不含恩诺沙星的与待测样品相同种类的材料。

4. 根据权利要求1所述的快速检测恩诺沙星残留的方法,其特征在于:第七步中的待检液体为不含恩诺沙星的牛奶。

## 一种快速检测恩诺沙星残留的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学检测技术领域,具体涉及一种快速检测恩诺沙星残留的方法,特别涉及一种基于光纤生物传感器的生物膜层光学干涉技术的恩诺沙星残留的快速检测方法。

### 背景技术

[0002] 恩诺沙星是常用的一种喹诺酮类抗生素。喹诺酮类抗生素是分子基本骨架均为氮(杂)双并环结构的一大类抗生素,如较为常用的诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星,以及新发展的加替沙星与莫昔沙星等。喹诺酮类抗生素是一类人畜通用的药物。因其具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性和毒副作用小等特点,被广泛应用于畜牧、水产等养殖业中。由于喹诺酮类药物在动物机体组织中的残留,人类长期食用含较低浓度QNs药物的动物性食品等,容易诱导耐药性的传递而影响该类药物的临床疗效,并可能产生不良反应。随着喹诺酮类药物在临床上应用研究和毒理学研究的深入,由其残留问题引起的食品安全问题已引起各国食品安全管理部门及国际组织的广泛关注。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂专家联席会议、欧盟都已制定了多种喹诺酮类药物在动物组织中的最高残留限量。美国FDA于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。因此建立牛奶等食品中喹诺酮类抗生素残留的快速检测方法成为目前亟待解决的问题。

[0003] 目前,针对喹诺酮类抗生素残留的检测方法,有微生物法、酶联免疫法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱/质谱联用法和毛细管电泳法等。仪器分析法需要昂贵的仪器设备和专门的技术人员、且费用昂贵、检测时间长;酶联免疫检测法如ELISA、试纸条等具有操作简便、快速、灵敏度高、成本低等特点,适于大量样品的检测,目前备受人们的青睐。

[0004] 免疫学检测方法的灵敏度高及特异性较强,但相应抗体的研发时间长而成本高,且重复性及稳定性较差。传感器方法是近些年发展起来的新型检测技术,基于生物学原理的传感器使以生物活性物质作为传感器的识别原件,与样品中的待测物质发生特异性反应,通过适当的换能器将这些反应(形成复合物、发色、发光等)转换成可以输出检测的信号(电压、频率等),可实现对待测物的定性和定量检测。

[0005] 光纤传感器是一类在物理或化学激励下产生光学特性变化,引起光纤中传播光束的特征参量,如强度、波长、相位、偏振态等的改变,并为与光纤相连接的各种检测器件所响应的装置。生物膜干涉技术基于光吸收、荧光和光反射原理,通过蛋白分子结合到传感器上的差异,导致可见光在传感器膜面上形成的干涉光谱位移差异,通过检测这种位移变化间接反映蛋白分子的浓度。因此,开发基于生物膜干涉技术的恩诺沙星检测方法有助于快速检测动物源性食品中恩诺沙星残留。

### 发明内容

[0006] 本发明目的在于提供一种快速检测恩诺沙星残留的方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供的技术方案是:一种快速检测恩诺沙星残留的方法,包括下列步骤:

[0008] 第一步:包被原制备

[0009] 将恩诺沙星加入二甲基甲酰胺,超声溶解后用冷乙醇冷却得到恩诺沙星的二甲基甲酰胺溶液,再将三乙胺和氯甲酸异丁醋加入到所述恩诺沙星的二甲基甲酰胺溶液中,室温搅拌反应;再将牛血清白蛋白的碳酸缓冲液溶液逐滴加入,继续搅拌反应5~7h;然后将反应液装入透析袋,在4℃条件下,用生理盐水溶液透析45~50h,换生理盐水溶液6次,透析结束后将透析液过0.2μm的滤膜,得到的滤液即为包被原;

[0010] 第二步:免疫原制备

[0011] 将恩诺沙星加入二甲基甲酰胺,超声溶解后将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺加入其中,室温反应过夜得到第一溶液;卵清蛋白溶解于碳酸溶液,然后逐滴加入到所述第一溶液中,继续搅拌3~5h;然后将反应产物用生理盐水透析45~50h,将透析液过0.2μm的滤膜,得到的滤液即为免疫原;

[0012] 第三步:光纤传感器抗包被原修饰

[0013] 将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶液中,室温静置4~6min,然后将光纤生物传感器末端没入15%蔗糖中,室温静置0.5~1.5min,然后室温晾干,置于2~8℃干燥保存备用;

[0014] 第四步:光纤传感器抗原包被修饰

[0015] 将APS光纤传感器末端没入包被原溶液中,室温静置5min;再将APS光纤生物传感器末端没入质量分数为15%的蔗糖水溶液中,室温静置1min,然后室温晾干后置于2~8℃干燥条件下保存,备用;

[0016] 第五步:抗体用量确定

[0017] 将恩诺沙星-BSA偶联物用磷酸盐缓冲液稀释20倍,取200μL于微孔板的第2列;将喹诺酮抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释至30、10和3.3μg/mL,分别取200μL于微孔板的第4列;往微孔板第1列中加入200μL水,往第3列加入200μL PBS-BSA;用APS探头进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

[0018] 第五步:体系的建立

[0019] 采用10μg/mL的喹诺酮抗体作为检测抗体浓度,用磷酸缓冲盐溶液将恩诺沙星标准品至稀释100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56和0ng/ml,取200μL梯度稀释的标准品加入微孔板的第4列中,往微孔板的第1、2、3列中依次加入200μL水、200μL 20倍稀释的恩诺沙星-BSA偶联物、200μL PBS-BSA进行检测;检测流程如下:第一列30s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

[0020] 第六步:非标记检测

[0021] 平衡:将光纤传感器末端没入阴性待检液体中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测液体中300s;阴性待检液体包含:200μL的待检液体和50μL磷酸盐缓冲液;待测液体包含200μL待测样品、50μL磷酸盐缓冲液和2μg喹诺酮抗体;

[0022] 第七步:金标记检测

[0023] 平衡:将光纤传感器末端没入待检液体中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测奶液中600s;所述待检液体包含200μL待检液体、50μL缓冲液和5μL金标BSA;所述待测奶液

包含200 $\mu$ L待测牛奶、50 $\mu$ L缓冲液和5 $\mu$ L金标喹诺酮抗体。

[0024] 优选的技术方案为：非标记方法检测的灵敏性在12~13ng/ml，金标记检测方法的灵敏性可达到2~3ng/ml。

[0025] 优选的技术方案为：第六步中的待检液体为不含恩诺沙星的与待测样品相同种类的材料。

[0026] 优选的技术方案为：第七步中的待检液体为不含恩诺沙星的牛奶。

### 附图说明

[0027] 图1是金标记BLI检测喹诺酮类抗生素实验结果。

[0028] 由于上述技术方案运用，本发明与现有技术相比具有的优点是：

[0029] 以恩诺沙星-BSA或金标喹诺酮类抗生素受体偶联物修饰光纤探头表面，再由光纤光谱分析装置检测和识别待测样品中是否存在目标物以及浓度信息，实现样品中恩诺沙星等喹诺酮类抗生素的定量检测。该方法大大缩短了检测成本和检测时间，具有良好重现性和自动化、高通量等优势，有望进一步改善生物传感器免疫分析技术，使其走向定量化、多元检测和广泛化应用。

### 具体实施方式

[0030] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0031] 结合如下实施例对光学生物传感器测定动物源性食品的方法进行进一步说明。

[0032] 实施例一：一种快速检测恩诺沙星残留的方法

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 恩诺沙星-BSA包被原制备如下：称取100mg恩诺沙星，加入10mL DMF，超声溶解，然后用冷乙醇冷却溶液；将30ml三乙胺和40 $\mu$ L氯甲酸异丁醋加入到上述溶液中，室温搅拌反应20min；再将3mL浓度为5mg/mL BSA的碳酸缓冲液(pH 9.6)溶液逐滴加入到ENR溶液中，继续搅拌反应6h；然后将反应液装入透析袋，在4 $^{\circ}$ C用生理盐水溶液透析48h，换水6次。将透析液过0.2 $\mu$ m的滤膜，-20 $^{\circ}$ C保存。获得包被原。

[0038] 恩诺沙星-OVA包被抗原制备如下：将15mg恩诺沙星超声溶解于5ml DMF中；将20mg EDC和20mg NHS加入到上述ENR溶液中，室温反应过夜；15mg OVA溶解于5ml碳酸溶液中(pH 8.0)，逐滴加入到上述溶液中，继续搅拌4h；然后将反应产物用生理盐水透析48h，将透析液过0.2 $\mu$ m的滤膜，-20 $^{\circ}$ C保存。

[0039] 恩诺沙星抗体的制备如下：小鼠腹腔注射12~14mL降植烷，7~10d后再注入 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个经融合筛选所获强抑制的杂交瘤细胞，7 $\times$ 10d后收集腹水，离心取上清，备用。

[0040] 光纤传感器抗包被原修饰将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶液中，室温静置5min。再将光纤生物传感器没入15%蔗糖中，室温静置1min。室温晾干，置于2~8

℃干燥保存,备用。

[0041] 非标记检测将恩诺沙星-BSA偶联物用1×PB (pH 7.4) 稀释20倍,取200μL于微孔板中(第2列);用巴氏杀菌奶将喹诺酮类抗生素抗体稀释成10μg/mL将恩诺沙星受体(2mg/mL)用巴氏杀菌奶稀释60倍,然后用该液体稀释恩诺沙星标准品至50、25、12.5、6.25、3.12、1.56和0ng/ml,分别取200μL于微孔板中(第4列);往微孔板第1列中加入200μL水,往第3列加入200μL 1×PBS-BSA (pH 7.4,0.2%BSA);用APS探头进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s。

[0042] 金标记检测①抗体-胶体金偶联物的制备向1mL胶体金中加入不同量的抗体,涡旋混匀,室温静置15min,加入100μL 10%BSA,室温封闭颗粒15min,10000rpm离心10min,弃掉上层清液,加入90μL PB (pH7.4),重悬颗粒,备用。②检测平衡:将光纤传感器末端没入待检液体中(200μl待检液体+50μL缓冲液+5μL金标BSA)中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测奶液(200μL待测牛奶+50μL缓冲液+5μL金标抗体)中600s。③再生将光纤生物传感器探头底部没入Gly/DMF(4倍体积的0.1M甘氨酸(pH 3)与1倍体积的DMF混合)30s。④洗涤用PBS (pH 7.4)洗涤探头底部一次。

[0043] 通过光谱仪读取信号,绘制曲线,确定检测灵敏度,获得定性结果和定量结果。结果见表1,所得结果优于胶体金免疫层析试纸条方法。

[0044] 表1金标记BLI及胶体金免疫层析试纸条检测牛乳中喹诺酮类抗生素残留的灵敏性实验结果(单位:ng/ml)。

[0045]

喹诺酮类抗生素	金标记 BLI	胶体金免疫层析试纸条	喹诺酮类抗生素	金标记生物膜干涉技术	胶体金免疫层析试纸条
恩诺沙星	1.56	2	诺氟沙星	0.62	2.5
达氟沙星	3.12	12.5	环丙沙星	1	4
氧氟沙星	2	8	沙拉沙星	1	4
马波沙星	1.5	6	双氟沙星	1	4
氟甲喹	6.25	25			

[0046] 实施例二:一种快速检测恩诺沙星残留的方法

[0047] 一种快速检测恩诺沙星的光学免疫分析方法,所述方法主要包括以下步骤:

[0048] 步骤(1)制备恩诺沙星-BSA称取100mg恩诺沙星,加入10mL DMF,超声溶解,然后用冷乙醇冷却溶液;将30ml三乙胺和40μL氯甲酸异丁醋加入到上述溶液中,室温搅拌反应20min;再将3mL浓度为5mg/mL的BSA碳酸缓冲液(pH 9.6)溶液逐滴加入到ENR溶液中,继续搅拌反应6h;然后将反应液装入透析袋,在4℃用生理盐水溶液透析48h,换水6次。将透析液过0.2μm的滤膜,-20℃保存。获得包被原。

[0049] 步骤(2)免疫原制备将15mg恩诺沙星超声溶解于5ml DMF中;将20mg EDC和20mg NHS加入到上述ENR溶液中,室温反应过夜;15mg OVA溶解于5ml碳酸溶液中(pH8.0),逐滴加入到上述溶液中,继续搅拌4h;然后将反应产物用生理盐水透析48h,将透析液过0.2μm的滤膜,-20℃保存。

[0050] 步骤(3)光纤传感器抗包被原修饰将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶

液中,室温静置5min。再将光纤生物传感器没入15%蔗糖中,室温静置1min。室温晾干,置于2~8℃干燥保存,备用。

[0051] 步骤(4)抗体用量确定将恩诺沙星-BSA偶联物用PBS稀释20倍,取200 $\mu$ L于微孔板中;将喹诺酮抗体用PBS稀释至30、10和3.3 $\mu$ g/mL,分别取200 $\mu$ L于微孔板中;往微孔板第1列中加入200 $\mu$ L水,往第3列加入200 $\mu$ L PBS-BSA;用APS探头进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s。

[0052] 步骤(5)体系的建立采用10 $\mu$ g/mL的喹诺酮抗体作为检测抗体浓度。用PBS将恩诺沙星标准品至稀释100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56和0ng/ml。取200 $\mu$ L梯度稀释的标准品加入微孔板中,往第1、2、3列中依次加入200 $\mu$ L水、200 $\mu$ L 20倍稀释的恩诺沙星-BSA偶联物、200 $\mu$ L PBS-BSA进行检测。检测流程如下:第一列30s,第2列60s;第3列60s;第4列300s。

[0053] 步骤(6)非标记检测①平衡:将光纤传感器末端没入阴性待检液体(200 $\mu$ L待检液体+50 $\mu$ L缓冲液)中120s;②检测:将光纤传感器末端没入待测液体中(200 $\mu$ L待测样品+50 $\mu$ L缓冲液+2 $\mu$ g抗体)中300s。非标记方法检测的灵敏度为12.5ng/ml左右。

[0054] 步骤(7)金标记检测①平衡:将光纤传感器末端没入待检液体中(200 $\mu$ L待检液体+50 $\mu$ L缓冲液+5 $\mu$ L金标BSA)中120s;②检测:将光纤传感器末端没入待测奶液(200 $\mu$ L待测牛奶+50 $\mu$ L缓冲液+5 $\mu$ L金标抗体)中600s。金标记方法检测的灵敏度为2.7ng/ml左右。结果如图1所示。

[0055] 灵敏性测试用金标记BLI检测和胶体金加有不同浓度的标准喹诺酮类抗生素的牛奶(预先用标准方法测定恩诺沙星呈阴性)。两种检测方法的结果如表1所示。

[0056] 特异性实验用所建立的方法检测加标浓度为1000ng/ml的黄曲霉毒素M1、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、泰乐菌素、氯霉素和三聚氰胺,检测结果均为阴性。

[0057] 基质的影响评价分别用6份原奶、6份来自不同批次的巴氏杀菌奶倍比稀释恩诺沙星标准品,分别采用金标记检测方式进行检测,灵敏性稳定达到2.7ng/ml。

[0058] 传感器再生评价具体步骤:①再生:将包被有恩诺沙星-BSA的光纤生物传感器探头底部没入Gly/DMF(4倍体积的0.1M甘氨酸(pH 3)与1倍体积的DMF混合)30s。②洗涤:用PBS(pH 7.4)洗涤探头底部一次。③平衡:将光纤传感器末端没入奶液中(200 $\mu$ L10%奶粉+50 $\mu$ L反应液+5 $\mu$ L金标BSA)中120s。④检测:每再生一次,用再生后的探头检测浓度为25和0ng/ml的恩诺沙星标准品(恩诺沙星检测阴性巴氏杀菌奶稀释)。实验表明,包被有恩诺沙星-BSA的光纤传感器用pH1.7的甘氨酸可再生5次。

[0059] 本发明提供了一种可快速测定动物源性食品中恩诺沙星残留的光学免疫分析检测方法,所述检测的目标物为恩诺沙星,所述的检测仪器为光纤光谱分析装置,通过在光线传感器探头表面修饰固定一层喹诺酮类抗生素特异性抗体,建立了检测样品中目标物的非标记/金标测试方法,使用合适的曲线拟合技术获得定量曲线,实现目标物的定量。

[0060] 实施例三:一种快速检测恩诺沙星残留的方法

[0061] 一种快速检测恩诺沙星残留的方法,包括下列步骤:

[0062] 第一步:包被原制备

[0063] 将恩诺沙星加入二甲基甲酰胺,超声溶解后用冷乙醇冷却得到恩诺沙星的二甲基甲酰胺溶液,再将三乙胺和氯甲酸异丁醋加入到所述恩诺沙星的二甲基甲酰胺溶液中,室温搅拌反应;再将牛血清白蛋白的碳酸缓冲液溶液逐滴加入,继续搅拌反应5~7h;然后将

反应液装入透析袋,在4℃条件下,用生理盐水溶液透析45~50h,换生理盐水溶液6次,透析结束后将透析液过0.2μm的滤膜,得到的滤液即为包被原;

[0064] 第二步:免疫原制备

[0065] 将恩诺沙星加入二甲基甲酰胺,超声溶解后将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺加入其中,室温反应过夜得到第一溶液;卵清蛋白溶解于碳酸溶液,然后逐滴加入到所述第一溶液中,继续搅拌3~5h;然后将反应产物用生理盐水透析45~50h,将透析液过0.2μm的滤膜,得到的滤液即为免疫原;

[0066] 第三步:光纤传感器抗包被原修饰

[0067] 将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶液中,室温静置6min,然后将光纤生物传感器末端没入15%蔗糖中,室温静置1.5min,然后室温晾干,置于8℃干燥保存备用;

[0068] 第四步:光纤传感器抗原包被修饰

[0069] 将APS光纤传感器末端没入包被原溶液中,室温静置5min;再将APS光纤生物传感器末端没入质量分数为15%的蔗糖水溶液中,室温静置1min,然后室温晾干后置于8℃干燥条件下保存,备用;

[0070] 第五步:抗体用量确定

[0071] 将恩诺沙星-BSA偶联物用磷酸盐缓冲液稀释20倍,取200μL于微孔板的第2列;将喹诺酮抗体用磷酸缓冲盐溶液稀释至30、10和3.3μg/mL,分别取200μL于微孔板的第4列;往微孔板第1列中加入200μL水,往第3列加入200μL PBS-BSA;用APS探头进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

[0072] 第五步:体系的建立

[0073] 采用10μg/mL的喹诺酮抗体作为检测抗体浓度,用磷酸缓冲盐溶液将恩诺沙星标准品至稀释100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56和0ng/ml,取200μL梯度稀释的标准品加入微孔板的第4列中,往微孔板的第1、2、3列中依次加入200μL水、200μL 20倍稀释的恩诺沙星-BSA偶联物、200μL PBS-BSA进行检测;检测流程如下:第一列30s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

[0074] 第六步:非标记检测

[0075] 平衡:将光纤传感器末端没入阴性待检液体中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测液体中300s;阴性待检液体包含:200μL的待检液体和50μL磷酸盐缓冲液;待测液体包含200μL待测样品、50μL磷酸盐缓冲液和2μg喹诺酮抗体;

[0076] 第七步:金标记检测

[0077] 平衡:将光纤传感器末端没入待检液体中120s;检测:将光纤传感器末端没入待测奶液中600s;所述待检液体包含200μL待检液体、50μL缓冲液和5μL金标BSA;所述待测奶液包含200μL待测牛奶、50μL缓冲液和5μL金标喹诺酮抗体。

[0078] 非标记方法检测的灵敏性在13ng/ml,金标记检测方法的灵敏性可达到3ng/ml。

[0079] 第六步中的待检液体为不含恩诺沙星的与待测样品相同种类的材料。

[0080] 第七步中的待检液体为不含恩诺沙星的牛奶。

[0081] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完

成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

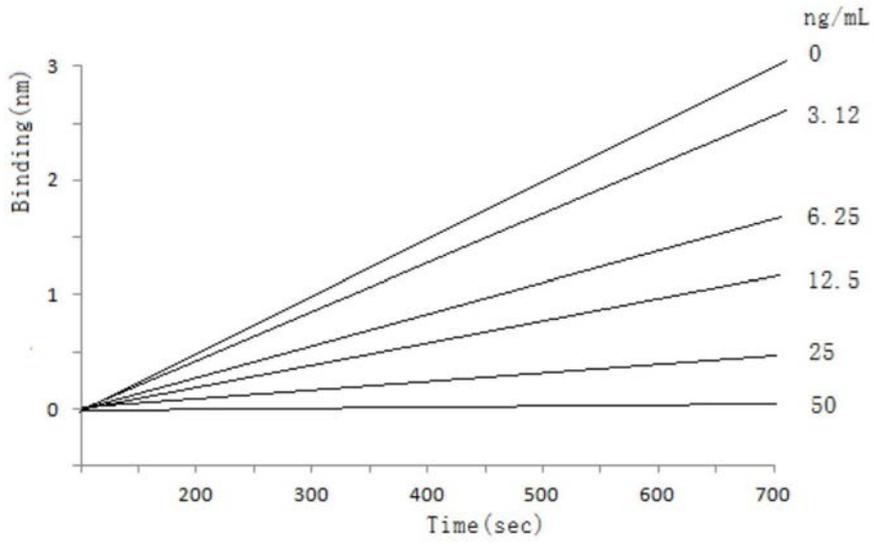


图1

专利名称(译)	一种快速检测恩诺沙星残留的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109085351A</a>	公开(公告)日	2018-12-25
申请号	CN201811031572.0	申请日	2018-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	顾娟红 陈军 张嵘		
申请(专利权)人(译)	顾娟红 陈军 张嵘		
当前申请(专利权)人(译)	顾娟红 陈军 张嵘		
[标]发明人	顾娟红 陈军 张嵘		
发明人	顾娟红 陈军 张嵘		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	王华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测恩诺沙星残留的方法，属于检验技术领域。本发明以恩诺沙星为母体与载体蛋白质直接偶联后修饰多模光纤探头作为生物传感器，利用干涉原理，实现对液体样品中恩诺沙星的检测，通过被配置为基于从检测单元输出的电信号确定生物材料的浓度的信号处理器检测和识别待测样品溶液中是否存在目标物以及浓度信息，由此实现对目标物的检测。该检测方法较传统仪器分析方法更为简单快捷，且检测成本较低，其中，非标记方法检测的灵敏性在12.5ng/ml左右，金标记检测方法的灵敏性可以达到2.7ng/ml左右。

