



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133306 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910383880.8

(22)申请日 2019.05.09

(71)申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 吴小胜 何方洋 朱亮亮 贾芳芳
王兆芹 万宇平 曹东山 韩光耀

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

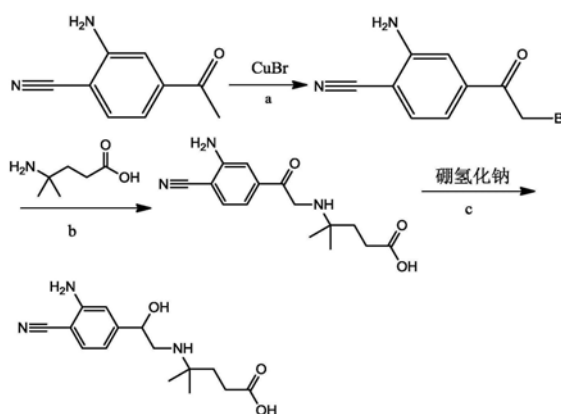
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

检测西马特罗的酶联免疫试剂盒及其应用

(57)摘要

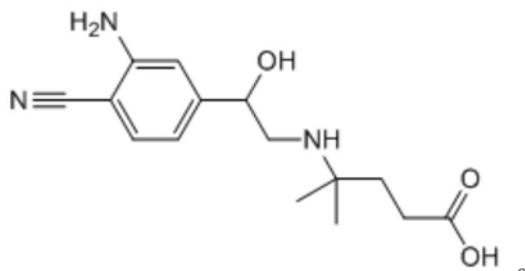
本发明提供了一种检测西马特罗的酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、西马特罗标准品溶液、西马特罗抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液,所述包被原为西马特罗偶联抗原,所述酶结合物为酶标记的西马特罗抗体,所述西马特罗抗体是由免疫原免疫动物得到的。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测西马特罗的方法,它包括:首先进行样品前处理,然后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测动物组织和猪尿样本中西马特罗的含量,其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测西马特罗的酶联免疫试剂盒,其特征在于包括:包被有包被原的酶标板、西马特罗标准品溶液、西马特罗抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液,所述包被原为西马特罗偶联抗原,所述酶结合物为酶标记的西马特罗抗体,所述西马特罗抗体是由免疫原免疫动物得到的。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述西马特罗偶联抗原是由西马特罗半抗原与载体蛋白偶联得到,所述西马特罗半抗原是由苄腈-4乙酰基-2-氨与溴化铜等物质经过一系列化学反应得到的。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于所述西马特罗半抗原的分子结构式为:



4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述西马特罗特异性抗体是以西马特罗偶联抗原作为免疫原制备获得,所述西马特罗特异性抗体为西马特罗单克隆抗体或西马特罗多克隆抗体。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述免疫原的制备方法如下:

取丙酸西马特罗半抗原产物5.8mg,加DMF1ml溶解,加EDC11mg,加NHS7mg,室温反应2h,得到半抗原活化液A液;取血蓝蛋白(KLH) 20mg,加3ml PB缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃反应8h,0.02M PB缓冲液透析纯化三天,每天换液三次,得到西马特罗-KLH偶联物免疫原,分装,-20℃保存备用。

6. 一种检测样品中西马特罗含量的方法,包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用权利要求1~5任一项所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

检测西马特罗的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测西马特罗的酶联免疫试剂盒,可定性、定量检测动物组织和猪尿中西马特罗药物的残留量。

背景技术

[0002] 西马特罗属于 $\beta 2$ 型受体激动剂,该药物被列入国务院食品安全委员会办公室《“瘦肉精”专项整治方案》(食安办(2011)14号)规定的“瘦肉精”品种目录。不法养殖户将西马特罗添加到动物饮用水或饲料中,用来增加动物的瘦肉率,因此,对于西马特罗这种新型“瘦肉精”,农业部明确该药物禁用于养殖动物。

[0003] 目前,常用检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法等。由于以上方法均需先进检测仪器、检测费用昂贵、步骤繁琐、耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适用于基层企事业单位的大通量快速筛查检测。本发明应用酶联免疫法,测定动物组织和猪尿中西马特罗药物的残留量,具有检测限低、特异性强、操作简便、检测速度快、检测成本低,非常容易推广等优点。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种能够检测动物组织和猪尿中西马特罗药物残留量的酶联免疫试剂盒,并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

[0005] 本发明试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、西马特罗标准品溶液、西马特罗抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液,所述包被原为西马特罗偶联抗原,所述酶结合物为酶标记的西马特罗抗体。

[0006] 所述西马特罗偶联抗原是由西马特罗半抗原与载体蛋白偶联得到,所述西马特罗半抗原是由苄腈-4乙酰基-2-氨与溴化铜等物质经过一系列化学反应得到,所述载体蛋白为鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、猪尿白蛋白、兔血清蛋白、人血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或纤维蛋白原。

[0007] 所述西马特罗特异性抗体是以西马特罗偶联抗原作为免疫原制备获得,所述西马特罗特异性抗体可为西马特罗单克隆抗体或西马特罗多克隆抗体,其中优选西马特罗单克隆抗体。

[0008] 所述酶结合物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;酶结合物是由酶和西马特罗抗体偶联得到的。

[0009] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括西马特罗标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液。

[0010] 所述西马特罗标准品溶液6瓶,浓度分别为 $0\mu\text{g/L}$, $0.1\mu\text{g/L}$, $0.3\mu\text{g/L}$, $0.9\mu\text{g/L}$, $2.7\mu\text{g/L}$, $8.1\mu\text{g/L}$ 。

[0011] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,A

为过氧化氢或过氧化脲,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2mol/L的硫酸溶液或盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述终止液为1~2mol/L氢氧化钠溶液。

[0012] 所述洗涤液优选为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0013] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6,0.05mol/L的碳酸盐缓冲液,封闭液为pH值为7.1~7.5,含有1%~3%酪蛋白、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比。

[0014] 本发明中酶标板的制备过程为:用包被缓冲液将包被原稀释成20μg/mL,每孔加入100μl,25℃避光孵育2h或4℃过夜,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入150~200μl封闭液,25℃避光孵育1~2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0015] 本发明的检测原理为:

[0016] 本试剂盒采用直接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的西马特罗和酶标板微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗西马特罗的酶结合物,用TMB底物显色,样本吸光度值与其所含残留物西马特罗的含量成负相关,与标准曲线比较,再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样本中西马特罗的残留量。

[0017] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测西马特罗的方法,它包括步骤:

[0018] (1) 样品前处理;

[0019] (2) 用试剂盒进行检测;

[0020] (3) 分析检测结果。

[0021] 本发明检测西马特罗的酶联免疫试剂盒主要采用ELISA方法定性或定量检测样品中西马特罗的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0022] 图1:西马特罗半抗原合成路线图

具体实施方式

[0023] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0024] 实施例1试剂盒组分的制备

[0025] 1、西马特罗半抗原的制备

[0026] a:取苕腈-4乙酰基-2-氨1.0g,加60ml三氯甲烷溶解,加溴化铜1.41g,加热回流反应4h,停止反应,加水50ml,震荡,静置分层,分去水相,有机相蒸干,正己烷/二氯甲烷(3/1,v/v) 70ml,重结晶,得到α-溴代-3-氰基-4-氨基苯乙酮1.3g,收率87.25%;

[0027] b:取 α -溴代-3-氰基-4-氨基苯乙酮1.3g,加乙腈80ml溶解,加KOH0.46g,碘化钠0.21g,搅拌,加4-氨基-4-甲基戊酸0.86g,加热,回流反应12h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加水80ml,加1mol/L盐酸调节PH值到6,乙酸乙酯100ml $\times$ 3,萃取三次,合并有机相,浓缩蒸干,二氯甲烷/环己烷(v/v,1/3) 90ml重结晶,得到丙酸西马特罗酮基中间产物1.2g,收率76.4%;

[0028] c:取丙酸西马特罗酮基中间产物1.2g,加甲醇60ml溶解,冷却到0-5℃,在搅拌下,加硼氢化钠0.31g,搅拌2h,停止反应,恢复到室温,旋蒸,除去甲醇,加水100ml,加1mol/L盐酸调节PH值到6,加100ml乙酸乙酯萃取,有机相水洗,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/甲醇(v/v,10/1)洗脱分离,得到丙酸西马特罗半抗原产物0.91g,收率75.8%。

[0029] 2、抗原的制备

[0030] 免疫原制备——西马特罗半抗原与血蓝蛋白(KLH)偶联得到免疫原。

[0031] 取丙酸西马特罗半抗原产物5.8mg,加DMF1ml溶解,加EDC11mg,加NHS7mg,室温反应2h,得到半抗原活化液A液;取血蓝蛋白(KLH) 20mg,加3ml PB缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃反应8h,0.02M PB缓冲液透析纯化三天,每天换液三次,得到西马特罗-KLH偶联物免疫原,分装,-20℃保存备用。

[0032] 包被原制备——西马特罗半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原。

[0033] 取丙酸西马特罗半抗原产物6.4mg,加DMF1ml溶解,加EDC13mg,加NHS9mg,室温反应2h,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA) 50mg,加6ml PB缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃反应8h,0.02M PB缓冲液透析纯化三天,每天换液三次,得到西马特罗-OVA偶联物包被原,分装,-20℃保存备用。

[0034] 3、西马特罗单克隆抗体的制备

[0035] 动物免疫:将上述步骤得到的免疫原注入到Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 μ g/只,使其产生抗血清。

[0036] 细胞融合和克隆化:小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按8:1(数量配比)比例与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,直到得到分泌西马特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0037] 细胞冻存和复苏:将单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0038] 单克隆抗体的生产与纯化:将Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,-20℃保存。

[0039] 4、酶结合物的制备

[0040] 以山羊作为免疫动物,以西马特罗单克隆抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫,得到西马特罗抗体。将西马特罗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联得到酶结合物。

[0041] 5、酶标板的制备

[0042] 用包被缓冲液将包被原稀释成20 μ g/mL,每孔加入100 μ l,25℃避光孵育2h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30s,拍干,然后在每孔中加入200 μ l封闭液,25℃避光孵育2h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0043] 实施例2检测西马特罗的酶联免疫试剂盒的组建

[0044] 组建检测西马特罗的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0045] (1) 包被西马特罗偶联抗原的酶标板;

[0046] (2) 西马特罗标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μ g/L,0.1 μ g/L,0.3 μ g/L,0.9 μ g/L,2.7 μ g/L,8.1 μ g/L;

[0047] (3) 用辣根过氧化物酶标记的西马特罗抗体;

[0048] (4) 底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;

[0049] (5) 终止液为2mol/L硫酸;

[0050] (6) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0051] 实施例3动物组织和猪尿中西马特罗的检测

[0052] 1、用试剂盒检测

[0053] 将样本和标准品对应微孔按序编号,每个样本和标准品做2孔平行,并记录标准孔和样本孔所在的位置。根据需要量将酶结合物浓缩液用酶结合物稀释液按1:10体积比进行稀释(即1份酶结合物浓缩液加入10份酶结合物稀释液,现配现用)。加入标准品/样本50 μ l到对应的微孔中,然后加入酶结合物工作液50 μ l/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min。将孔内液体甩干,加入洗涤工作液250 μ l/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10s,泼掉板孔内洗涤液,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破)。加入底物液A液50 μ l/孔,再加入底物液B液50 μ l/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应15min。加入终止液50 μ l/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450nm处,测定每孔OD值。

[0054] 2、检测结果分析

[0055] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%,得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标,以西马特罗标准品浓度(μ g/L)的对数为横坐标,绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中西马特罗的实际浓度。

[0056] 实施例4西马特罗技术参数的确定试验

[0057] 1、试剂盒灵敏度和检测限

[0058] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为0.1~8.1 μ g/L,IC₅₀(50%抑制浓度)浮动范围为0.43~0.72 μ g/L;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对动物组织和猪尿中西马特罗的检测限分别为0.4 μ g/kg、0.3 μ g/kg。

[0059] 2、样本精密度和准确度试验

[0060] 以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%)=实际测定值/理论值 $\times$ 100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差RSD%=SD/X $\times$ 100%,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0061] 按0.8 μ g/kg、1.2 μ g/kg两个浓度的西马特罗对动物组织样品进行添加回收测定,

按0.6μg/kg、1.2μg/kg两个浓度的西马特罗对猪尿样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0062] 表1动物组织和猪尿样本精密度及准确度试验

[0063]

西马特罗	添加浓度(μg/kg)	平均回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
动物组织	0.8	87.3	7.9	9.5
	1.2	106.8	9.1	9.7
猪尿	0.6	91.4	8.4	9.3
	1.2	117.5	7.2	8.6

[0064] 按0.8μg/kg、1.2μg/kg两个浓度的西马特罗对动物组织样品进行添加回收测定,按0.6μg/kg、1.2μg/kg两个浓度的西马特罗对猪尿样品进行添加回收测定,平均回收率分别为87.3%~106.8%,91.4%~117.5%;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0065] 3、试剂盒稳定性试验

[0066] 试剂盒保存条件为2~8℃,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、西马特罗添加实际测定值均在正常范围之内。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℃保存条件下放置7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7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℃至少保存12个月以上。

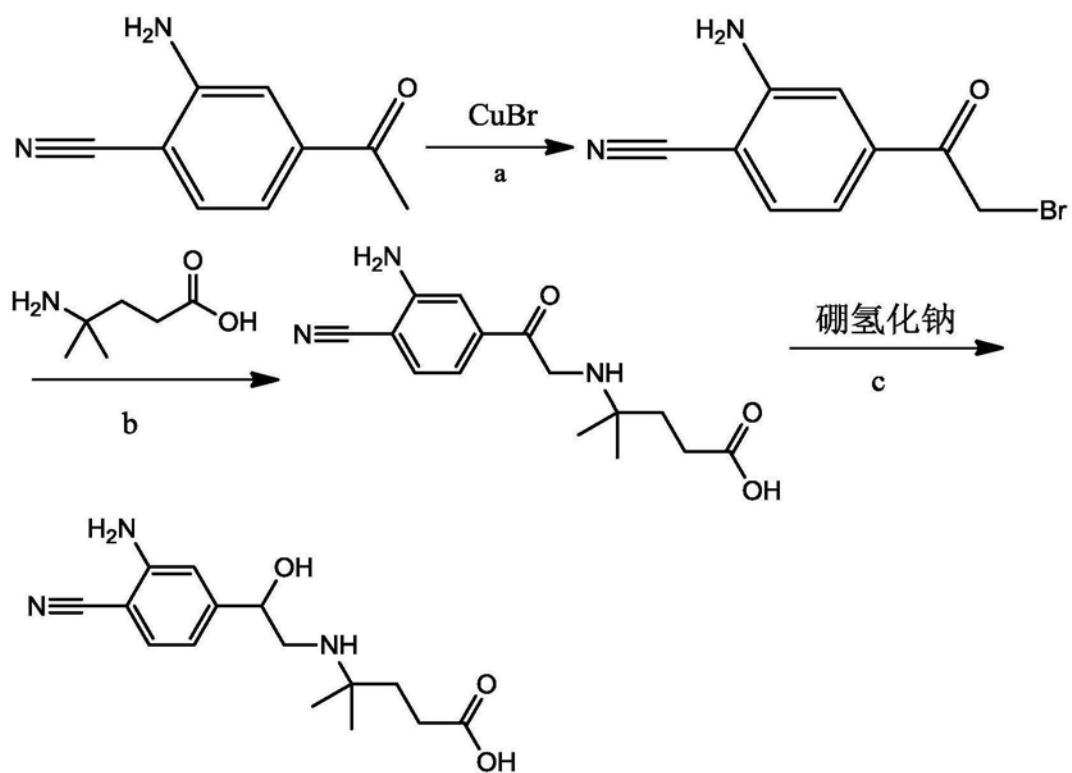


图1

专利名称(译)	检测西马特罗的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110133306A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910383880.8	申请日	2019-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	吴小胜 何方洋 朱亮亮 贾芳芳 王兆芹 万宇平 曹东山 韩光耀		
发明人	吴小胜 何方洋 朱亮亮 贾芳芳 王兆芹 万宇平 曹东山 韩光耀		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/9433		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测西马特罗的酶联免疫试剂盒，它包括：包被有包被原的酶标板、西马特罗标准品溶液、西马特罗抗体、酶结合物浓缩液、酶结合物稀释液、底物显色液、终止液、洗涤液，所述包被原为西马特罗偶联抗原，所述酶结合物为酶标记的西马特罗抗体，所述西马特罗抗体是由免疫原免疫动物得到的。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测西马特罗的方法，它包括：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测动物组织和猪尿样本中西马特罗的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。

