

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/543

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02137941.6

[43] 公开日 2003 年 1 月 8 日

[11] 公开号 CN 1389730A

[22] 申请日 2002.7.12 [21] 申请号 02137941.6

[71] 申请人 江南大学

地址 214036 江苏省无锡市惠河路 170 号

[72] 发明人 胥传来 李相前 邵蔚蓝

徐保国 丁宏标 詹 斌

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利事务所

代理人 时旭丹

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种盐酸克伦特罗酶免疫检测试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

一种盐酸克伦特罗 (CLB) 酶免疫检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。本发明配制的试剂盒,采取酶免疫吸附 (ELISA) 竞争法检测 CLB,利用 CLB 和卵清蛋白 (OA) 偶连物,作为 CLB 抗原免疫家兔或小鼠,获得含有 CLB 抗体的多克隆或单克隆 CLB 抗血清,经分离、提纯、稀释后包被在酶标板上,温育、洗涤,加入样品稀释液及酶标抗原,使两者进行反应、洗涤,加酶底物显色。本发明样品前处理简单,是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法,尤其适用于肉制品的 CLB 残留检测。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种盐酸克伦特罗 (CLB) 酶免疫检测试剂盒, 其特征在于由盒体 (1), 酶标板 (2), A 试剂瓶 (标准 CLB 试剂) (3), B 试剂瓶 (稀释液) (4), C 试剂瓶 (酶标抗原试剂) (5), D 试剂瓶 (酶标抗原稀释液) (6), E 试剂瓶 (含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体) (7), F 试剂瓶 (邻苯二胺 OPD 试剂) (8), G 试剂瓶 (醋酸钠-柠檬酸缓冲液) (9), H 试剂瓶 (H_2O_2 溶液) (10), I 试剂瓶 (硫酸溶液) (11), 海绵托架 (12) 所组成, 海绵托架 (12) 内装有上述 A、B、C、D、E、F、G、H、I 试剂瓶, 海绵托架 (12) 及酶标板 (2) 均安放在盒体 (1) 内。

2、按照权利要求 1 所述的盐酸克伦特罗 (CLB) 酶免疫检测试剂盒, 其特征在于所述的海绵托架 (12) 上制有孔和凹槽。

3、按照权利要求 1 所述的盐酸克伦特罗 (CLB) 酶免疫检测试剂盒, 其特征在于所述的酶标板 (2) 有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成。

4、一种用盐酸克伦特罗 (CLB) 酶免疫检测试剂盒检测盐酸克伦特罗的方法, 先进行样品处理, 直接取猪尿样, 或取组织样品, 可分别取自猪的肝、肺、肌肉、心、肾各组织样品各 10g, 或某一组织样品 50g, 加入 50ml 0.1mol/L HCL 均浆, 冻融两次, 离心取上清, 用 10mol/l NaOH 调节 PH 至 11, 再加入异丁醇 30ml, 振荡 30min, 静置 4h, 定量吸取异丁醇, 水浴蒸干, 再加 1ml 磷酸盐 (PBS) 溶液 (0.01mol/L, PH7.4) 溶解析出物, 冻存待测, 其特征在于首先将多克隆 (或单克隆) CLB 抗体包被在酶标板上, 酶标板放在 4°C 冰箱过夜, 再进行试剂及酶底物混合液的配制, 在 A 试剂 (标准 CLB) 中加 20-30ml B 试剂混匀, 在 C 试剂 (酶标抗原) 中加入 10-20ml D 试剂, 溶解混匀, 在 2-8°C 下保存, 用 E 试剂加入蒸馏水配制成 E 洗涤液, 用 E 洗涤液洗酶标板 2-4 次, 洗液不得溢出, 每次间隔 0.5-1.5 分钟, 用吸水纸拍干, 在酶标板小孔中加入配制好的试剂及样品稀释液进行竞争免疫反应, 在 37-38°C 放置 1.5h, 再用 E 洗涤液洗板 4-6 次, 每次间隔 1-2min, 拍干, 再加入酶底物混合液, 混匀, 在 37-38°C 避光作用 13-18 分钟, 显色, 最后加入 I 终止液 (硫酸溶液) 中止反应, 用酶标仪测定 A_{490nm} 值。

5、按照权利要求 4 所述的检测盐酸克伦特罗的方法, 其特征在于所述的 C 试剂 (酶标抗原试剂) 为酶标羊抗兔抗体 (SABC, 上海) 或酶标猪抗兔抗体 (Sigma, USA), B 试剂 (稀释液) 为 PBST 溶液 (含 10g/L OA, 0.01mol/L, PH7.4),

D 试剂(酶标抗原稀释液)为 PBS 溶液(含 1%明胶, 0.01mol/L, PH7.4)。

6、按照权利要求 4 所述的检测盐酸克伦特罗的方法, 其特征在于所述的酶底物混合液, 采用 G 试剂(醋酸钠-柠檬酸缓冲液)和 F 试剂(邻苯二胺)按 G:F=7-9: 3-1, 和每 ml 此稀释液加 14 μ l H 试剂(H_2O_2)混合配制而成, 临用前半小时内配制。

一种盐酸克伦特罗酶免疫检测试剂盒及其检测方法

技术领域

一种盐酸克伦特罗（CLB）酶免疫检测试剂盒及其检测方法，用于对动物源食品，尤其是猪肉制品中盐酸克伦特罗（CLB）含量的检测。属于酶免疫分析技术领域。

背景技术

盐酸克伦特罗俗称“瘦肉精”，是 β -兴奋剂的一种。化学名为2-[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐。药品名为“克喘素”。CLB最早作为止喘药使用。20世纪70年代末，美国等发达国家开始了将CLB用作“营养重分配剂”及“促生长剂”的实用性研究，80年代被广泛应用到畜禽生产中，近年来动物性产品中CLB残留对人类健康造成的危害和对生态食物链造成的破坏已经引起高度重视，1986年开始，欧美等发达国家已严禁畜牧生产中应用CLB，中国农业部和国家经贸委、国家出入境检验检疫局也高度重视，多次发文严厉打击非法使用CLB药品的违法行为。此后情况虽有好转，但仍有人在偷偷使用。市场抽查结果表明，“瘦肉精”检出率仍相当高，个别地区达20%以上。由此可以看出，养猪业使用“瘦肉精”问题的严重性。

目前，检测CLB残留的方法主要有高效液相色谱法（HPLC），气相色谱-质谱法（CG-MS），毛细管区带电泳法（CE）和免疫分析技术（IA）。

HPLC法和CG-MS法测定CLB残留，优点是检测精确度高，但缺点是检测时间长，过程繁琐，难于操作，需贵重仪器，价格昂贵。检测CLB较高效的酶免疫分析技术是ELISA技术。目前，英国的Randox Laboratories Ltd和德国的rbiopharm公司均开发出了检测肉品、饲料中CLB残留的ELISA试剂盒，而中国在应用EIA检测CLB的研究起步较晚，我国目前在进出口检疫中应用的 β -兴奋剂检测试剂盒完全依赖进口，国内虽已开展了ELISA检测的研究，但还没有形成试剂盒，因而无法推广应用。因此，研制CLB的ELISA检测试剂盒，对CLB残留进行检测具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

本发明目的在于提供一种灵敏度高，结构简单，使用方便，价格便宜，

携带方便的盐酸克伦特罗酶免疫检测试剂盒。

本发明的另一目的是提供一种样品前处理简单，而且简便、快速、灵敏、准确、廉价的利用本试剂盒检测盐酸克伦特罗残留的检测方法。

本发明试剂盒主要由盒体(1)，酶标板(2)，A试剂瓶(标准 CLB 试剂)(3)，B试剂瓶(稀释液)(4)，C试剂瓶(酶标抗原试剂)(5)，D试剂瓶(酶标抗原稀释液)(6)，E试剂瓶(含吐温-20的磷酸盐 PBS 固体)(7)，F试剂瓶(邻苯二胺 OPD 试剂)(8)，G试剂瓶(醋酸钠-柠檬酸缓冲液)(9)，H试剂瓶(H_2O_2 溶液)(10)，I试剂瓶(硫酸溶液)(11)，海绵托架(12)所组成，海绵托架(12)上制有孔和凹槽，上述 A、B、C、D、E、F、G、H、I 试剂瓶安放在海绵托架的孔和凹槽内，海绵托架(12)及酶标板(2)安放在盒体(1)内。酶标板有塑料支架和各自分开的带孔穴的塑料条组成。

本发明主要采用酶联免疫吸附(ELISA)竞争法来检测 CLB，采用 ELISA 竞争法的技术，包括特异性抗体(多克隆或单克隆)的制备；将 CLB 苯环上的氨基和蛋白质的酚羟基邻位用偶氮方法相连，再免疫家兔或小鼠，制备 CLB 抗血清，具体制备方法为：

一、CLB 多克隆抗血清的制备

1、CLB 与蛋白质载体连接：常用载体有牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OA)，将 CLB 苯环上的氨基和蛋白质载体的酚羟基邻位用预冷的 HCL 和 $NaNO_2$ 偶氮方法相连。

2、免疫用抗原：免疫剂量每次为 1mg/ml OA-CLB (或 BSA-CLB) 首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化，加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化。

3、动物免疫：将新西兰白兔饲养数周后接种免疫，每次免疫间隔 4 周，一共免疫 5 次，再后一次不加佐剂直接肌肉注射，7 天后采血检测。

4、采血：最后一次加强免疫后，7 天后采血，测定血清抗体效价后，颈动脉放血。

5、分离血清

以 30-60%的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 CLB 抗体的溶液。

二、单克隆 CLB 抗体的制备

1、CLB 与蛋白质载体连接，同前述。

2、动物免疫

采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物、免疫抗原剂量为 $50 \mu g(0.1ml)$ 加等体

积完全福氏佐剂乳化，进行首次免疫。一月后，取同样量免疫抗原加不完全福氏佐剂，乳化，进行加强免疫，再过一月后同法再次进行加强免疫，二免后 10 天采血，测定抗体效价，取脾细胞。

3、细胞融合

脾细胞按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合。

4、杂交瘤细胞克隆化

采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，直至得到完全同质的单克隆抗体和隐定的单克隆杂交瘤细胞株。

5、单克隆抗体的保存

在液氮-20℃下保存，使用时 37℃水浴快速解冻。

6、单克隆抗体大量生长及提纯，在小鼠腹腔内注射一定量的杂交瘤细胞，采集腹水，经 HPLC 提纯后小瓶分装待用。

检测样品的处理：

1) 尿样，可直接取自猪尿样

2) 组织样品，可分别取自猪的肝、肺、肌肉、心、肾等每种组织样品各称取 10g，或某一组织样品 50g，加入 50ml、0.1mol/L HCL 匀浆，冻融两次，离心取上清，用 10mol/L NaOH 调节 PH 值到 11，再加入异丁醇 30ml，振荡 30min，静置 4h，定量吸取异丁醇，水浴蒸干，再加入 1ml 磷酸盐溶液 (PBS) (0.01mol/L, PH7.4) 溶解析出物，冻存待测。

检测方法：将多克隆（或单克隆）CLB 抗体包被在酶标板上，酶标板放在 4℃左右冰箱过夜。再进行试剂及酶底物混合液的配制。在 A 试剂（标准 CLB）中加 20-30ml B 试剂（稀释液）混匀，在 C 试剂（酶标抗原）中加入 10-20ml D 试剂（酶标抗原稀释液），溶解、混匀，在 2-8℃下保存，用 E 试剂（PBST）加入蒸馏水配制成 E 洗涤液，用 E 洗涤液洗酶标板 2-4 次，洗液不得溢出，每次间隔 0.5-1.5 分钟，用吸水纸拍干，在酶标板小孔中加入配制好的试剂（参考孔）及样品稀释液（测定孔）进行竞争免疫反应，在 37-38℃放置 1.5h，再用 E 洗涤液洗板 4-6 次，每次间隔 1-2min，拍干，再加入酶底物混合液，混匀，在 37-38℃避光作用 13-18 分钟，显色，最后加入 I 终止液（硫酸溶液）中止反应，用酶标仪测定 A_{490nm} 值，参考孔由于酶标抗原与抗体充分结合，故底物显色较深，测定孔则随酶标抗原和待测抗原两者与抗体竞争结合的结果而异，显色深浅与待测抗原量呈负相关，根据参考孔与测定孔 A_{490nm} 值之差，计算检品中待测抗原含量。

C 试剂（酶标抗原试剂）为酶标羊抗兔抗体（SABC 上海）或酶标猪抗兔抗体（Sigma. USA），B 试剂（稀释液）为 PBST 溶液（含 10g/L OA 卵清蛋白，0.01mol/L, PH7.4），D 试剂瓶（酶标抗原稀释液）为 PBS 溶液（含 1%明胶，0.01mol/L, PH7.4）。

酶底物混合液，采用 G 试剂（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）和 F 试剂（邻苯二胺）按 G：F=7-9：3-1 稀释和每 ml 此稀释液加 14 μ l H 试剂（H₂O₂）混合配制而成，临用前半小时内配制。

本发明的优点是样品前处理简单，利用本试剂盒检测 CLB 残留，是简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法。最低检测限达 100ng/kg。

附图说明：

图 1 试剂盒的直观示意图

图 2 酶标板的直观示意图

图中：盒体（1）、酶标板（2），A 试剂瓶（标准 CLB 试剂）（3），B 试剂瓶（稀释液）（4），C 试剂瓶（酶标抗原试剂）（5），D 试剂瓶（酶标抗原稀释液）（6），E 试剂瓶（含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体）（7），F 试剂瓶（邻苯二胺 OPD 试剂）（8），G 试剂瓶（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）（9），H 试剂瓶（H₂O₂ 溶液）（10），I 试剂瓶（硫酸溶液）（11），海绵托架（12），试剂盒应放在 2-8℃ 贮存，忌 0℃ 下冻存，有效期为 12 个月。

具体实施方式

实施例 1

采用按照前述方法制备的单克隆 CLB 抗血清包被在酶标板上，放入 4℃ 冰箱过夜。

1、按照前述方法，进行样品处理。

2、试剂配制。

1) 标准 CLB 试剂：CLB 加 20ml B 试剂（稀释液）混匀。

2) 酶标抗原试剂：C 试剂加 10ml D 试剂（酶标抗原稀释液）溶解、混匀。

3) E 洗涤液配制：在含 0.1%吐温-20（Tween-20）的磷酸盐（PBS）的 E 试剂中加入 200ml 蒸馏水配制 E 洗涤液，用于酶标板洗涤。

4) 底物混合液配制：根据每次所需用量，用 F 试剂（邻苯二胺）和 G 试剂（醋酸钠-柠檬酸缓冲液）按 G：F=7-9：3-1 的比例稀释 F 试剂，再按每 ml 此稀释液需加入 14 μ l 的双氧水 H 试剂，配制成底物混合液，临用前

半小时内配制。

3、将试剂盒平衡至室温。

4、用 E 洗涤液洗酶标板 2 次，洗液不得溢出；每次间隙 0.5 分钟，放在吸水纸上拍干。

5、加反应物进行反应，按下表所列，依次加入配制好的试剂及待测样品稀释液，1-3 号孔为标准对照孔，4-12 号孔为样品测定孔，每批测定时，可以每孔置一只待测样品，也可几只孔置同一只待测样品，进行平行测定，也可用另一根酶标板同时检测，其 1-12 孔扩大均为样品孔，这可视具体待测样品的数目多少而灵活决定。

次序	加入量	孔号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	25 μ l	B	A	B	……稀释后样品液……								
2		摇均											
3	25 μ l	C	C	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4		摇均											

按上表在 4-12 样品测定孔中，先后加入待测抗原和酶标抗原，而在 1-3 标准对照孔中，仅加或不加酶标抗原。

6、反应：在 37℃ 温育放置 1.5 小时。

7、洗涤显色：用 E 洗涤液洗酶标板 4 次，拍干，每孔加入 50 μ l 底物混合液，摇匀，在 37° 温育 15 分钟，显色。

8、终止，加入 I 终止液（硫酸溶液）2mol/L：50 μ l/孔。

9、测定：先比较 1-3 号孔颜色，1 号孔最深，2 号孔次之，3 号孔接近无色，说明标准正确。

目视法：比较样品孔与 2 号孔颜色，若比 2 号孔颜色浅，则为阳性，反之为阴性。若颜色与 2 号孔接近。则用酶标仪测 A_{490nm} 。

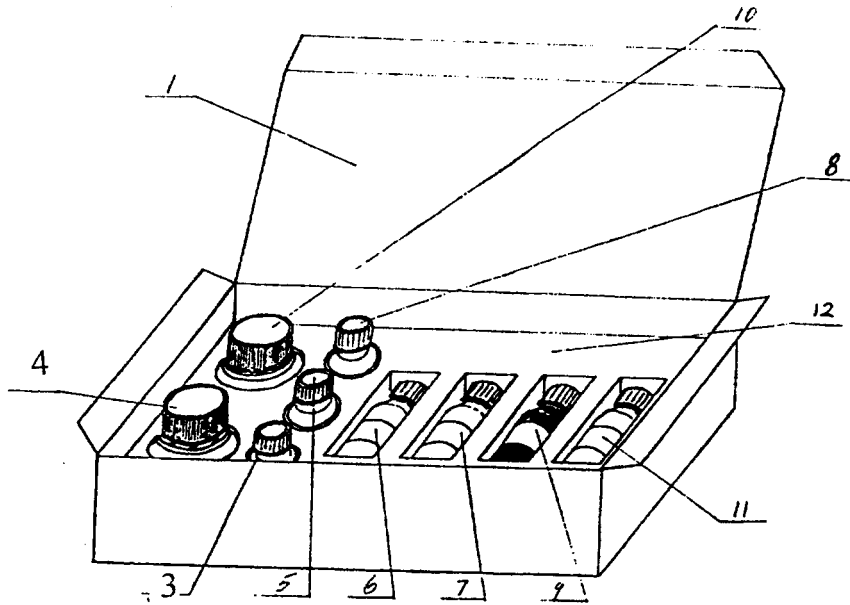


图 1

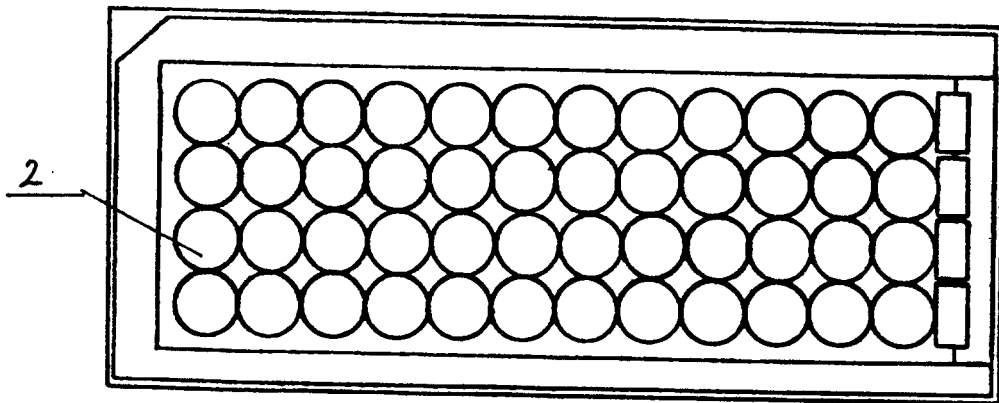


图 2

专利名称(译)	一种盐酸克伦特罗酶免疫检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1389730A	公开(公告)日	2003-01-08
申请号	CN02137941.6	申请日	2002-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 李相前 邵蔚蓝 徐保国 丁宏标 詹斌		
发明人	胥传来 李相前 邵蔚蓝 徐保国 丁宏标 詹斌		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种盐酸克伦特罗(CLB)酶免疫检测试剂盒及其检测方法,属于酶免疫分析技术领域。本发明配制的试剂盒,采取酶免疫吸附(ELISA)竞争法检测CLB,利用CLB和卵清蛋白(OA)偶连物,作为CLB抗原免疫家兔或小鼠,获得含有CLB抗体的多克隆或单克隆CLB抗血清,经分离、提纯、稀释后包被在酶标板上,温育、洗涤,加入样品稀释液及酶标抗原,使两者进行反应、洗涤,加酶底物显色。本发明样品前处理简单,是一种简便、快速、灵敏、准确、廉价的检测方法,尤其适用于肉制品的CLB残留检测。

