



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1945331 B

(45) 授权公告日 2011.06.08

(21) 申请号 200610113903.6

(22) 申请日 2006.10.20

(73) 专利权人 邹明强

地址 100025 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号中国检验检疫科学研究院

(72) 发明人 邹明强 李锦丰 高海霞

(74) 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司 11241

代理人 赵天真

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/546(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1563990 A, 2005.01.12, 权利要求 1-3, 说明书第 3-6 页实施例.

CN 1563989 A, 2005.01.12, 说明书实施例

1、2.

CN 1515909 A, 2004.07.28, 权利要求 4、7, 说明书第 5 页 5-12 行.

CN 1825118 A, 2006.08.30, 说明书第 3 页 1-7 行, 第 6-7 页.

牟颖, 金钦汉. 荧光编码微球-流式细胞和生化分析技术及其最新发展. 生命科学仪器. 2003, 1(1), 第 34 页第 2 栏, 图 2A.

韩鹤友, 游子涵, 李庆, 陈浩. 化学发光联用技术在兽药残留分析中的应用进展. 分析科学学报. 2005, 21(5), 第 553 页 32-41 行.

审查员 田丰

权利要求书 3 页 说明书 13 页

(54) 发明名称

同步检测多种小分子化合物的试剂的制备及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供一种同步检测多种小分子化合物的试剂的制备方法及其使用方法。制备步骤如下：制备编码微球试剂；制备小分子化合物抗体探针-荧光量子点抗体探针、荧光量子点二抗探针、荧光染料抗体探针或荧光染料二抗探针之一。本发明的使用方法-检测小分子化合物的方法：抗体探针直接法、抗体探针间接法。采用本发明制备的试剂或本发明提供的试剂盒可用于食品、农产品、活体动物及人体中兽药、农药、违禁药物、滥用药物等中的小分子化合物的检测，重复性好、灵敏度高；简便、快速、能进行现场；试剂耗量小，测试成本低廉；可多靶标同步分析；易于普及推广；从而达到对有害物质能及时发现和监控管理。

1. 一种同步检测多种小分子化合物的试剂盒：

1) 检测小分子化合物的试剂盒配置如下试剂：

(1) 需检测的每种小分子化合物编码微球试剂 10ml, 其中编码微球之间至少粒径、荧光颜色或荧光强度之一有区别；

(2) 需检测的每种小分子化合物荧光量子点抗体探针或荧光量子点二抗探针 1ml；或需检测的每种小分子化合物单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体 1ml、其对应的荧光染料抗体探针或荧光染料二抗探针 1ml；

(3) 需检测的小分子化合物抗原标准浓度试剂各 1ml；

(4) PBS 缓冲液 200ml；

2) 其他：

标准曲线图 1 份；容量为 1.5ml 的离心管 100 个；量程分别为 1-10 μ l、10-100 μ l、20-200 μ l 移液枪各一把及配套枪头各 1000 个；锡箔 1 卷、涡旋振荡器 1 台；离心机 1 台、流式细胞仪 1 台及流式细胞仪上样用试管 100 个；

3) 试剂盒中配置的编码微球试剂、荧光量子点抗体探针、荧光量子点二抗探针、荧光染料抗体探针或荧光染料二抗探针的制备方法分别如下：

A 制备编码微球试剂：

(1) 制备小分子化合物全抗原：使小分子化合物通过化学反应与牛血清蛋白或卵清蛋白载体进行蛋白偶联，得到小分子化合物全抗原；小分子化合物为孔雀石绿、结晶紫、盐酸克伦特罗、氯霉素、莱克多巴胺、沙丁胺醇、硝基咪唑类兽药代谢物、磺胺、链霉素、甲胺磷、对硫磷、甲萘威、甲霜灵或吗啡之一；用分光光度计测定制备好的小分子化合物全抗原的浓度，用摩尔浓度为 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液稀释到质量浓度为 1mg/ml；

(2) 配制磷酸盐 - 氢氧化钠缓冲溶液：用当量浓度为 5N 的氢氧化钠水溶液调节摩尔浓度为 0.1M 的 NaH_2PO_4 水溶液的酸度，使 pH = 6.0-6.5；

(3) 微球活化：取 1-5 μ l 颗粒直径为 3-10 μ m、荧光颜色为红、橙、黄或绿之一及荧光强度为 1 至 8 级之一的聚苯乙烯荧光微球，先放入超声波清洗器中超声 30s，然后放入涡旋振荡器中振荡 10s，再加入离心管中，再加入 200-500 μ l 上述磷酸盐 - 氢氧化钠缓冲溶液，混合均匀；经 3,000rpm 离心 20 分钟，倒掉废液；然后每次用 200 μ l 磷酸盐 - 氢氧化钠缓冲溶液洗涤，洗涤 2-3 次；再加入 80-300 μ l 上述磷酸盐 - 氢氧化钠缓冲溶液、5-20 μ l 质量浓度为 50mg/ml 的 NHS 和 5-20 μ l 质量浓度为 50mg/ml 的 EDC，避光摇振 20min；经 3,000rpm 离心 20 分钟，倒掉废液；然后每次用 200 μ l 摩尔浓度为 0.01M、pH = 7.4 的 PBS 洗涤，洗涤 2-3 次，再溶于 50-300 μ l 摩尔浓度为 0.01M、pH = 7.4 的 PBS 溶液中，得到活化微球液；

(4) 小分子化合物全抗原在微球上的固定化：取上述活化微球液 80-100 μ l，加入到离心管中，再加入 10-20 μ l 上述制备的质量浓度为 1mg/ml 的小分子化合物全抗原，避光摇振 0.5-2 小时，经 3,000rpm 离心 20 分钟，倒掉废液；得到已固定化小分子化合物全抗原的微球；

(5) 配制封闭液：用摩尔浓度为 0.01M、pH = 7.4 的 PBS 溶解 BSA 使其重量百分比浓度为 2-10%；再加入 NaN_3 使重量百分比浓度为 0.02-0.03%，混合均匀，得到封闭液；

(6) 已固定化小分子化合物全抗原的微球的封闭：向上述已固定化小分子化合物全抗原的微球中加入 200 μ l 上述封闭液，然后放入涡旋振荡器中振荡 10s，避光摇振 1-2 小时，

于 4℃ 放置 10-15 小时,使微球封闭;再每次用 100-200 μ l 封闭液洗,洗涤 2 次,用摩尔浓度为 0.01M、pH = 7.4 的 PBS 定容至 100-200 μ l,即制得编码微球试剂;

B 制备荧光量子点抗体探针:

(1) 基于上述小分子化合物全抗原,对小鼠或大鼠利用杂交瘤技术通过细胞融合,克隆筛选小分子化合物单克隆抗体;或者用制得的小分子化合物全抗原分别免疫兔、羊或鸡,制备筛选特异性好的小分子化合物多克隆抗体;

(2) 用硫酸铵分级沉淀法和柱层析分离提纯技术分别对上述小分子化合物单克隆抗体或小分子化合物多克隆抗体进行纯化,用分光光度计测定纯化后小分子化合物单克隆抗体或小分子化合物多克隆抗体的质量浓度;

(3) 制备荧光量子点抗体探针:用摩尔浓度为 0.1M、pH = 7.4 的 Na_3PO_4 溶液溶解上述纯化后的小分子化合物单克隆抗体或小分子化合物多克隆抗体,使其质量浓度为 10mg/ml,得到小分子化合物抗体溶液;取 2ml 小分子化合物抗体溶液,加入在水相合成的摩尔浓度为 0.00125mol/L CdTe 量子点溶液 0.5-2ml,混合均匀后,再加入质量浓度为 0.6mg/ml 的 EDC 1ml,将反应体系用摩尔浓度为 0.01M、pH = 7.4 的 Na_3PO_4 溶液补足至 5ml,室温下避光反应 2h;在 4℃ 条件下,用 400ml 摩尔浓度为 0.01M 的 Na_3PO_4 、摩尔浓度为 0.15M 的 NaCl、pH 7.4 的透析液对反应液进行透析,透析袋截流量为 10000-30000,每 6h 换一次透析液,共计 30h;得到荧光量子点抗体探针;

C 制备荧光量子点二抗探针:用抗小鼠、大鼠、兔、羊或鸡之一 IgG 抗体替换上述小分子化合物的单克隆抗体或小分子化合物的特异性好的多克隆抗体,其余步骤按制备荧光量子点抗体探针的步骤操作,即可制得荧光量子点二抗探针;

D 制备荧光染料抗体探针:PE 或 FITC 荧光染料对上述小分子化合物的单克隆抗体或小分子化合物的特异性好的多克隆抗体,进行标记,标记步骤如下:

(1) 抗体、PE 或 FITC 的预处理:

① 将上述 5mg 小分子化合物的单克隆抗体或小分子化合物的特异性好的多克隆抗体每次用 400ml 含质量百分比浓度为 0.05% 的 NaN_3 、pH7.2、摩尔浓度为 10mM 的 PBS 缓冲液进行透析,透析 3-4 次,其间更换缓冲液,每次透析时间为 3-4 小时,最后一次透析过夜;

② 将 5mg PE 或 FITC 每次用 400ml 含摩尔浓度为 50mM 的 NaH_2PO_4 、摩尔浓度为 2mM 的 EDTA、pH 7.0 缓冲液进行透析,透析 3-4 次,其间更换缓冲液,每次透析时间为 3-4 小时,最后一次透析过夜;

③ 上述透析后的抗体、PE 或 FITC 分别经 10,000rpm,4℃ 离心 10 分钟去除沉淀;用分光光度计分别测定抗体、PE 或 FITC 的质量浓度;

(2) PE 或 FITC 的衍生化

① 取 Sephadex G-25 层析柱,用 5 倍柱床体积含摩尔浓度为 50mM 的 MES、摩尔浓度为 2mM 的 EDTA、pH 6.0 的交换缓冲液平衡;

② 按照每 mg 上述经透析 PE 或 FITC 中加入 10-13 μ l 的摩尔浓度为 10mg/ml 的 SMCC 的 DMSO 溶液的比例加入 SMCC,室温避光摇振反应 60min;加入平衡后的 SephadexG-25 层析柱中去除游离的 SMCC,收集 PE 或 FITC,得到衍生化的 PE 或 FITC;用分光光度计测定衍生化的 PE 或 FITC 质量浓度;

(3) 抗体的还原

① Sephadex G-25 层析柱用 5 倍柱床体积含摩尔浓度为 50mM 的 MES、摩尔浓度为 2mM 的 EDTA、pH 6.0 的交换缓冲液平衡；

②按照每 ml 上述经透析的抗体溶液中加入 20 μ l 的摩尔浓度为 1M 的 DTT 的比例加入 DTT, 室温避光振荡反应 30min ;加入平衡后的 Sephadex G-25 层析柱中去除游离的 DTT, 收集抗体部分, 得到还原后的抗体 ;用分光光度计测定抗体质量浓度 ;

(4) PE 或 FITC 和抗体的共价交联

①将上述还原后的抗体按照 1 个 IgG 分子结合 1-3 个 PE 或 FITC 分子的比例

逐滴加入到上述衍生化的 PE 或 FITC 中, 边加边搅动 ;室温避光振荡反应 2 小时 ;得到 PE- 抗体或 FITC- 抗体 ;用分光光度计测定 PE- 抗体或 FITC- 抗体质量浓度 ;

②向每 mg 上述 PE- 抗体或 FITC- 抗体中加入 0.34 μ l 浓度为 10mg/ml 的 NEM 的 DMSO 溶液的比例加入 NEM 进行封闭, 室温避光振荡反应 20min ;然后置蛋白截流量为 30,000 的浓缩器中浓缩 ;浓缩比为 3-4 : 1 ;

(5) 凝胶分离纯化

① Sephacryl S-300 层析柱用 5 倍柱床体积含摩尔浓度为 10mM 的 PBS、摩尔浓度为 1M 的 Urea 尿素、质量百分比浓度为 0.05% 的 NaN_3 、pH7.2 缓冲液平衡, 其中柱体包裹锡箔纸进行避光 ;

②利用经缓冲液平衡的 Sephacryl S-300 层析柱对上述浓缩后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体进行纯化, 根据洗脱曲线收合格格的标记产品, 得到纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体 ;

③将上述纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体分别每次用 400ml 含质量百分比浓度为 0.05% 的 NaN_3 、pH7.4、摩尔浓度为 100mM 的 PBS 缓冲液进行透析, 透析 3-4 次, 其间更换缓冲液, 每次透析时间为 3-4 小时, 最后一次透析过夜 ;然后置蛋白截流量为 30,000 的浓缩器中浓缩 ;浓缩比为 3-4 : 1, 得到纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体的浓缩液 ;

④将上述纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体的浓缩液分别经 10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟去除沉淀, 制得 PE- 抗体探针和 FITC- 抗体探针 ;

E 制备荧光染料二抗探针 :用抗小鼠、大鼠、兔、羊或鸡之一 IgG 抗体替小分子化合物的单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体, 其余步骤按制备荧光染料抗体探针中步骤进行操作, 即可制得荧光染料二抗探针。

2. 如权利要求 1 所述同步检测多种小分子化合物的试剂盒, 其特征在于, 制备编码微球试剂步骤中, 其中第 5 步, 使 BSA 的重量百分比浓度为 5% -10% ;其中第 6 步, 每次用 150 μ l -200 μ l 封闭液洗 2 次。

3. 如权利要求 2 所述同步检测多种小分子化合物的试剂盒, 其特征在于, 制备荧光量子点抗体探针、荧光量子点二抗探针步骤中, 加入在水相合成的摩尔浓度为 0.00125mol/L CdTe 量子点溶液 1ml-2ml ;透析袋蛋白截流量为 20000-30000。

4. 如权利要求 3 所述同步检测多种小分子化合物的试剂盒, 其特征在于, 制备荧光染料抗体探针、荧光染料二抗探针步骤中, 还原后的抗体按照 1 个 IgG 分子结合 1-2 个 PE 或 FITC 分子的比例逐滴加入 ;浓缩比例为 3.5-4 : 1。

同步检测多种小分子化合物的试剂的制备及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂的制备方法,尤其涉及一种同步检测多种小分子化合物的试剂的制备方法,还涉及这种试剂的使用方法。

背景技术

[0002] 兽药、农药、食品添加剂、霉菌毒素等残留严重威胁到人民的健康和生命安全,氯霉素、盐酸克伦特罗、己烯雌酚、硝基呋喃类和孔雀石绿等是重点监控对象。此外,违禁药物、滥用药物如吗啡等的危害极其严重。对上述这些危害物进行及时、准确、便捷的检测,是保护人类健康及生命安全、维护社会安定的关键之一。

[0003] 上述危害物均属小分子化合物,常规的检测方法主要分为理化分析方法和免疫分析方法两类。理化分析方法有气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、毛细管区带电泳技术(CZE)、质谱(MS)、串联质谱(MS-MS)以及各方法之间的联用技术等,其中以色谱法及其联用技术为常用。免疫分析方法包括放射免疫法(RIA)、酶联免疫法(ELISA)、荧光免疫法(FIA)等,以酶联免疫法(ELISA)常见。理化分析方法,尤其是联用技术可以进行准确的定性及定量分析,但操作步骤复杂,检测周期冗长,仪器价格昂贵,难于普及推广,更不能进行现场、快速检测,不利于及时发现和监控管理。而免疫分析方法,尤其酶联免疫法(ELISA),是近几年发展起来并应用广泛的快速筛查分析方法,具有快速、特异性好等优点,但灵敏度不够高、信息量低、只能进行单目标检测。

[0004] 随着对残留指标限量值的逐步降低,高灵敏度的检测技术更凸显重要。在要求高灵敏度的同时,多靶标同步分析技术也越来越显得重要。

[0005] 荧光染色的聚合物微球可以进行光学编码并作为诊断试剂而应用于双抗体夹心模式的免疫分析,最初使用流式细胞仪进行分析,这种方法也属于流式细胞术(Flow cytometry, FCM)的一种。将不同颜色(或亮度)的微球作为载体,通过物理吸附或共价结合方式使之与抗体(捕获抗体)结合,用来特异性识别待测抗原,用荧光素标记的针对同一待测抗原的抗体(检测抗体)作为探针以实现定量检测。用不同的微球对不同种捕获抗体进行光学编码,将微球混合在同一体系中则可同时进行多靶标分析,特异性强,可实现快速诊断。J. Dasso 等人做了 ELISA 方法和编码微球流式分析方法的比较,结果都表明编码微球分析方法重复性更好、有更广泛的动力学测定范围、敏感性更高,所需时间和样品量更少([1]RAYMOND E.

[0006] BIAGINI, DEBORAH L. SAMMONS, JEROME P. SMITH, et al. [J]. Clinical and diagnostic laboratory immunology, Jan. 2004, P:50-55; [2] JOSEPH DASSO, JULIET LEE, HANH BACH, et al. [J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 263:23-33)。X. Yan 等人使用两种不同的类似的荧光编码微球方法,实现了 A 型和 B 型流感病毒的同时检测,重复性好、敏感性高、试剂耗量小、实验成本低([3]XIAOMEI YAN, ERIKA G. SCHIEKE, KAREN M. GRACE, et al. [J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 284:27-38)。Richard T. Carson 等人在 100 μ L 体系中定量检测 15 种细胞因子,获得了满意效果,而 100 μ L 体

系仅够 ELISA 方法检测一种细胞因子 ([4]RICHARD T. CAISON, DARIO A. A. VIGNALI. [J]. Journal of Immunological Methods, 1999, 227 :41-52)。20 世纪 90 年代中期美国 Luminex 公司开发出基于流式编码微球检测的小型专用仪器、控制软件及配套试剂,形成了悬浮芯片技术 (Suspension chip) 或液相芯片 (LiquiChip) 技术,大大延伸了流式的检测平台。

[0007] 然而,只具有抗原性但没有免疫原性的小分子化合物,如农药、兽药、食品添加剂、霉菌毒素、违禁药物等,只具有一个可与抗体结合的位点,不能发生双抗体夹心式的免疫反应。因此上述编码微球的流式细胞术、悬浮芯片技术或液相芯片技术,不能用于只具有抗原性但没有免疫原性的小分子化合物的检测。目前对属小分子化合物,如农药、兽药、食品添加剂、霉菌毒素、违禁药物等危害物检测时所采用的常见方法如,GC、HPLC、TLC、CZE、MS、MS-MS 等,存在着仪器价格昂贵,操作步骤复杂,检测周期冗长,难于普及推广,更不能进行现场、快速检测,不利于及时发现和监控管理的问题。对小分子化合物的检测如何实现重复性好、敏感性高、试剂耗量小、实验成本低、多靶标同步分析、能进行现场、快速检测、易于普及推,从而达到对有害物质能及时发现和监控管理,是目前急需解决的技术问题。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种同步检测多种小分子化合物的试剂的制备方法及其使用方法。采用本发明同步检测多种小分子化合物的试剂的制备方法制备的试剂,对小分子化合物的检测重复性好、敏感性高、试剂耗量小、实验成本低、可多靶标同步分析;能进行现场、快速检测、易于普及推广;从而达到对属小分子化合物有害物质能及时发现和监控管理,克服了目前对小分子化合物检测存在的问题。

[0009] 同步检测多种小分子化合物的试剂包括编码微球试剂和小分子化合物抗体探针,其中小分子化合物抗体探针为荧光量子点(量子点是一种荧光纳米颗粒,随粒径大小的不同可具备不同的荧光颜色)抗体探针、荧光量子点二抗探针、荧光染料抗体探针或荧光染料二抗探针之一。

[0010] 同步检测多种小分子化合物的试剂的制备方法,其步骤如下:

[0011] 1. 制备编码微球试剂

[0012] 1) 小分子化合物全抗原的制备:使小分子化合物通过化学反应与牛血清蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)载体进行蛋白偶联,得到小分子化合物全抗原;小分子化合物为孔雀石绿、结晶紫、盐酸克伦特罗、氯霉素、莱克多巴胺、沙丁胺醇、硝基咪唑类兽药代谢物(AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM)、磺胺、链霉素、甲胺磷、对硫磷、甲萘威、甲霜灵或吗啡之一;用分光光度计测定制备好的小分子化合物全抗原的浓度,用摩尔浓度为 0.01M、PH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution-PBS,下文中的 PBS 都为此种磷酸盐缓冲溶液)稀释到质量浓度为 1mg/ml;

[0013] 2) 磷酸盐-氢氧化钠缓冲溶液的配制:用当量浓度为 5 N 的氢氧化钠水溶液调节摩尔浓度为 0.1M 的 NaH_2PO_3 水溶液的酸度,使 pH = 6.0-6.5;

[0014] 3) 微球活化:取 1-5 μL 颗粒直径为 3-10 μm 、荧光颜色为红、橙、黄或绿之一及荧光强度为 1 至 8 级之一的聚苯乙烯荧光微球,先放入超声波清洗器中超声 30s,然后放入涡旋振荡器中振荡 10s,上述再加入到一个离心管中,再加入 200-500 μL 上述 200-500 μL 上述磷酸盐-氢氧化钠缓冲溶液,混合均匀;经 3,000rpm 离心 20 分钟后倒掉废液,然后每次

用 200 μ L 磷酸盐-氢氧化钠缓冲溶液洗涤,洗涤 2-3 次,(洗涤即为混合均匀后经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃倒掉废液);再加入 80-300 μ L 上述磷酸盐-氢氧化钠缓冲溶液、5-20 μ L 质量浓度为 50mg/ml 的 N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt,NHS)和 5-20 μ L 质量浓度为 50mg/ml 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride,EDC],避光摇振 20min(即用锡箔包裹离心管在涡旋振荡器中低速振荡,以下避光摇振过程皆按此操作);经 3,000rpm 离心 20 分钟后倒掉废液,然后每次用 200 μ L 摩尔浓度为 0.01M、PH = 7.4 的 PBS 洗涤,洗涤 2-3 次,再溶于 50-300 μ L 摩尔浓度为 0.01M、PH = 7.4 的 PBS 溶液中,得到活化微球液;

[0015] 4) 小分子化合物全抗原在微球上的固定化:取上述活化微球液 80-100 μ L,加入到离心管中,再加入 10-20 μ L 质量浓度为 1mg/mL 上述制备的小分子化合物全抗原,避光摇振 0.5-2 小时,经 3,000rpm 离心 20 分钟,倒掉废液;得到已固定化小分子化合物全抗原的微球;

[0016] 5) 配制封闭液:用摩尔浓度为 0.01M、PH = 7.4 的 PBS 溶解牛血清蛋白(BSA)使其重量百分比浓度为 2-10%;再加入叠氮化钠(NaN_3)使重量百分比浓度为 0.02-0.03%,混合均匀,得到封闭液;溶解后牛血清蛋白(BSA)的优选重量百分比浓度为 5%-10%;

[0017] 6) 已固定化小分子化合物全抗原的微球的封闭:向上述已固定化小分子化合物全抗原的微球中加入 200 μ L 上述封闭液,然后放入涡旋振荡器中振荡 10s,避光摇振 1-2 小时,于 4 $^{\circ}$ C 放置 10-15 小时使微球封闭;再每次用 100-200 μ L 封闭液洗涤,洗涤 2 次,用摩尔浓度为 0.01M、PH = 7.4 的 PBS 定容至 100-200 μ L,即制得编码微球试剂;每次用封闭液洗涤时,优选用量为 150-200 μ L。

[0018] 2. 制备小分子化合物抗体探针

[0019] 1) 制备荧光量子点抗体探针

[0020] a 基于上述小分子化合物全抗原,对小鼠或大鼠利用杂交瘤技术通过细胞融合,克隆筛选小分子化合物单克隆抗体;或者用制得的小分子化合物全抗原分别免疫兔、羊或鸡,制备筛选特异性好的小分子化合物多克隆抗体;

[0021] b 用硫酸铵分级沉淀法和柱层析分离提纯技术分别对上述小分子化合物单克隆抗体或小分子化合物多克隆抗体进行纯化,用分光光度计测定纯化后小分子化合物单克隆抗体或小分子化合物多克隆抗体的质量浓度;

[0022] c 制备荧光量子点抗体探针:用摩尔浓度为 0.1M、pH = 7.4 的 Na_3PO_4 溶液溶解上述纯化后的小分子化合物单克隆抗体或小分子化合物多克隆抗体,使其质量浓度为 10mg/mL,得到小分子化合物抗体溶液;取 2mL 小分子化合物抗体溶液,加入在水相合成的摩尔浓度为 0.00125mol/L CdTe(碲化镉)量子点溶液 0.5-2mL,混合均匀后,再加入质量浓度为 0.6mg/ml 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 1mL,将反应体系用摩尔浓度为 0.01M、PH = 7.4 的 Na_3PO_4 溶液补足至 5mL,室温下避光摇振反应 2h;在 4 $^{\circ}$ C 条件下,用 400mL 摩尔浓度为 0.01M 的 Na_3PO_4 、摩尔浓度为 0.15M 的 NaCl、pH7.4 的透析液对反应液进行透析,透析袋截流量为 10000-30000,每 6h 换一次透析液,共计 30h;得到荧光量子点抗体探针;加入在水相合成的摩尔浓度为 0.00125mol/L CdTe(碲化镉)量子点溶液的优选体积为 1mL-2mL;

[0023] 2) 制备荧光量子点二抗探针 :用抗小鼠、大鼠、兔、羊或鸡之一的 IgG 抗体替换上述小分子化合物的单克隆抗体或小分子化合物的特异性好的多克隆抗体,其余步骤按制备荧光量子点抗体探针的步骤操作,即可制得荧光量子点二抗探针 ;

[0024] 3) 制备荧光染料抗体探针 :用藻红蛋白 (PE)、异硫氰酸荧光素 (FITC) 荧光染料对上述小分子化合物的单克隆抗体或小分子化合物的特异性好的多克隆抗体,进行标记,标记步骤如下 :

[0025] (1) 抗体、藻红蛋白 (PE) 或异硫氰酸荧光素 (FITC) 的预处理

[0026] ①将上述 5mg 小分子化合物的单克隆抗体或小分子化合物的特异性好的多克隆抗体每次用 400ml 含质量百分比浓度为 0.05% 的 NaN_3 , pH7.2、摩尔浓度为 10mM 的 PBS 缓冲液进行透析,透析 3-4 次,其间更换缓冲液,每次透析时间为 3-4 小时,最后一次透析过夜 ;

[0027] ②将 5mg PE 或 FITC 每次用 400ml 含摩尔浓度为 50 mM 的 NaH_2PO_4 、摩尔浓度为 2mM 的乙二胺四乙酸 (EDTA)、pH7.0 缓冲液进行透析,透析 3-4 次,其间更换缓冲液,每次透析时间为 3-4 小时,最后一次透析过夜 ;

[0028] ③上述透析后的抗体、PE 或 FITC 分别经 10,000rpm, 4°C 离心 10 分钟去除沉淀 ;用分光光度计分别测定抗体、PE 或 FITC 的质量浓度 ;

[0029] (2) PE 或 FITC 的衍生化 :

[0030] ①取 Sephadex G-25 层析柱,用 5 倍柱床体积含摩尔浓度为 50mM 的 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸 (MES)、摩尔浓度为 2mM 的 EDTA、pH6.0 的交换缓冲液平衡 ;

[0031] ②按照每 mg 上述经透析 PE 或 FITC 中加入 10-13 μL 的摩尔浓度为 10mg/mL 的琥珀酰亚胺-4-(N- 甲基马来酰亚胺) 环己烷-1- 碳酸酯 (SMCC) 的无水二甲基亚砜 (DMSO) 溶液的比例加入 SMCC,室温避光摇振反应 60min ;加入平衡后的 Sephadex G-25 层析柱中去除游离的 SMCC,收集 PE 或 FITC,得到衍生化的 PE 或 FITC ;用分光光度计测定衍生化的 PE 或 FITC 质量浓度 ;

[0032] (3) 抗体的还原

[0033] ① Sephadex G-25 层析柱用 5 倍柱床体积含摩尔浓度为 50mM 的 MES、摩尔浓度为 2mM 的 EDTA、pH6.0 的交换缓冲液平衡 ;

[0034] ②按照每 mL 上述经透析的抗体溶液中加入 20 μL 的摩尔浓度为 1M 的二硫苏糖醇 (DTT) 的比例加入 DTT,室温避光摇振反应 30min ;加入平衡后的 Sephadex G-25 层析柱中去除游离的 DTT,收集抗体部分,得到还原后的抗体 ;用分光光度计测定抗体质量浓度 ;

[0035] (4) PE 或 FITC 和抗体的共价交联

[0036] ①将上述还原后的抗体按照 1 个 IgG 分子结合 1-3 个 PE 或 FITC 分子的比例逐渐加入到上述衍生化的 PE 或 FITC 中,边加边搅动 ;室温避光振荡反应 2 小时 ;得到 PE- 抗体或 FITC- 抗体 ;用分光光度计测定 PE- 抗体或 FITC- 抗体质量浓度 ;1 个 IgG 分子结合 PE 或 FITC 分子的优选比例为 1-2 个 ;

[0037] ②向每 mg 上述 PE- 抗体或 FITC- 抗体中加入 0.34 μL 摩尔浓度为 10mg/mL 的 N- 乙基顺丁烯二酰亚胺 (NEM) 的 DMSO 溶液的比例加入 NEM 进行封闭,室温避光摇振反应 20min ;然后置蛋白截流量为 30,000 的浓缩器中浓缩 ;浓缩比为 3-4 : 1 ;浓缩的优选比为 3.5-4 : 1 ;

[0038] (5) 凝胶分离纯化

[0039] ① Sephacryl S-300 层析柱用 5 倍柱床体积含摩尔浓度为 10mM 的 PBS、摩尔浓度为 1M 的 Urea 尿素、质量百分比浓度为 0.05% 的 NaN_3 、pH7.2 缓冲液平衡,其中柱体包裹锡箔纸进行避光;

[0040] ② 利用经缓冲液平衡的 Sephacryl S-300 层析柱对上述浓缩后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体进行纯化,根据洗脱曲线收集合格的标记产品,得到纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体;

[0041] ③ 将上述纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体分别每次用 400ml 含质量百分比浓度为 0.05% 的 NaN_3 、pH7.4、摩尔浓度为 100mM 的 PBS 缓冲液进行透析,透析 3-4 次,其间更换缓冲液,每次透析时间为 3-4 小时,最后一次透析过夜;然后置蛋白截流量为 30,000 的浓缩器中浓缩;浓缩比为 3-4 : 1,得到纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体的浓缩液;浓缩的优选比为 3.5-4 : 1;

[0042] ④ 将上述纯化后的 PE- 抗体或 FITC- 抗体的浓缩液分别经 10,000rpm, 4°C 离心 10 分钟去除沉淀,制得 PE- 抗体探针或 FITC- 抗体探针;

[0043] 4) 制备荧光染料二抗探针:用抗小鼠、大鼠、兔、羊、鸡 IgG 抗体替小分子化合物的单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体,其余步骤按制备荧光染料抗体探针中步骤进行操作,即可制得荧光染料二抗探针。

[0044] 同步检测多种小分子化合物的试剂的使用方法即采用同步检测多种小分子化合物的试剂检测小分子化合物的方法为抗体探针直接法、抗体探针间接法;检测步骤如下:

[0045] 1. 抗体探针直接法

[0046] 1) 分别取含有孔雀石绿、结晶紫、盐酸克伦特罗、氯霉素、莱克多巴胺、沙丁胺醇、硝基咪唑类兽药代谢物 (AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM)、磺胺、链霉素、甲胺磷、对硫磷、甲萘威、甲霜灵或吗啡之一的待测小分子化合物的样本提取液各 100 μL ,加入离心管中,分别加入与待测小分子化合物对应的上述编码微球试剂 30-100 μL ,再分别加入与待测小分子化合物对应的上述荧光量子点抗体探针或 PE、FITC 荧光染料抗体探针 3-10 μL ,避光摇振 0.5-2 小时,使其发生免疫反应,生成编码微球-荧光量子点抗体探针复合物或编码微球-荧光染料抗体探针复合物;

[0047] 2) 将上述编码微球-荧光量子点抗体探针复合物或编码微球-荧光染料抗体探针复合物分别经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,分别每次用 200 μL PBS 洗 2 次,送入流式细胞仪进行检测;

[0048] 采用流式技术使复合物呈单列顺序逐个地通过检测区,当编码微球及荧光量子点抗体探针或荧光染料抗体探针的两种信号同时被检测时为有效测试信号,该信号通过软件的门技术记录下来,当存在待测小分子化合物时,待测小分子化合物和编码微球包被的蛋白偶联抗原与探针发生竞争性免疫反应,致使复合物上探针的荧光量子点或荧光染料荧光信号降低,降低的程度与待测小分子化合物的量呈有规律的相关性,用待测小分子化合物抗原系列标准质量浓度溶液分别建立待测小分子化合物定量检测直接法的模型,依据分别建立的模型对待测小分子化合物进行单一的或同时对多种小分子化合物定量检测。小分子化合物抗原系列标准质量浓度溶液的配制:用 PBS 缓冲溶液对质量浓度为 1mg/ml 的小分子化合物抗原进行倍比稀释,得到一系列如质量浓度为 0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml 及 8.1ng/ml 的小分子化合物抗原标准质量浓度溶液。

[0049] 2. 抗体探针间接法

[0050] 1) 分别取含有孔雀石绿、结晶紫、盐酸克伦特罗、氯霉素、莱克多巴胺、沙丁胺醇、硝基咪唑类兽药代谢物 (AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM)、磺胺、链霉素、甲胺磷、对硫磷、甲萘威、甲霜灵或吗啡之一的待测小分子化合物的样本提取液各 100 μ L, 加入离心管中, 分别加入与待测小分子化合物对应的上述编码微球试剂 30-100 μ L, 再分别加入待测小分子化合物的上述单克隆抗体或待测小分子化合物的特异性好的多克隆抗体 3-10 μ L, 避光摇振 0.5-2 小时, 使其发生免疫反应, 生成编码微球-抗体复合物;

[0051] 2) 将上述编码微球-抗体复合物分别经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液, 每次分别用 200 μ L PBS 洗涤, 洗涤 2 次, 除去未与编码微球试剂结合的抗体; 再分别加入 30-100 μ L 与待测小分子化合物抗体对应的荧光量子点二抗探针或荧光染料二抗探针, 避光摇振 0.5-1 小时使免疫反应完全, 生成编码微球-抗体-荧光量子点二抗探针或编码微球-抗体-荧光染料二抗探针复合物, 送入流式细胞仪进行检测。

[0052] 抗体探针间接法采用与直接法相同的检测方式建立小分子化合物定量检测抗体探针间接法的模型, 依据分别建立的模型对待测小分子化合物进行单一的或同时对多种小分子化合物定量检测。

[0053] 以上所述直接法及间接法均通过微球的颜色、亮度或粒径大小的区别进行光学编码, 而其颜色、亮度或粒径的不同将在流式细胞仪上一一显现出来, 例如, 不同颜色的微球在仪器上将有不同的 PMT (光电倍增管) 检测器收集到光电信号、不同亮度的微球在仪器上的荧光光谱上将出现不同的峰、不同粒径的微球则在仪器上将显现在不同的区域位置, 而这种不同都可以同时通过仪器将其区分开进行识别; 通过仪器光学测量实现对多个小分子化合物的识别, 相当于给每种小分子化合物贴上了标签, 可进行定性检测, 也可进行定量检测;

[0054] 本发明是基于流式技术竞争性免疫检测小分子化合物抗原的方法。以荧光聚合物微球为载体通过与蛋白偶联小分子化合物结合制得相应编码微球试剂。用荧光量子点或 PE、FITC 荧光染料标记经纯化的小分子化合物单克隆抗体及多克隆抗体或者与小分子化合物抗体对应的 IgG 抗体 (二抗) 而制得相应的特异性荧光探针。利用直接法或间接法建立检测模型, 采用流式技术控制微球复合物呈单列逐个顺序通过检测区; 利用微球颜色、亮度或粒径大小的区别对微球进行光学编码, 与荧光量子点探针或 PE、FITC 的荧光染料探针组合, 当某种编码微球和与其组合的某种颜色的荧光量子点探针或荧光染料探针信号同时被检测到时即可特定地识别一种小分子化合物, 多种小分子化合物的编码微球试剂及其荧光量子点或荧光染料探针组合起来可组合成多种识别靶标, 因此可进行多种小分子化合物同步定性及定量检测。

[0055] 本发明公开的用于多种小分子化合物同步检测的试剂盒 (满足 100 次实验量) 包括: 一种或多种不同小分子化合物编码微球试剂、一种或多种不同小分子化合物抗体荧光探针或一种或多种不同小分子化合物抗体及其对应的荧光二抗探针、一种或多种不同小分子抗原系列标准质量浓度溶液、PBS 缓冲液; 标准曲线图; 器材由容量为 1.5ml 的离心管、量程分别为 1-10 μ L、10-100 μ L、20-200 μ L 移液枪及其所需配套枪头、锡箔、涡旋振荡器、离心机、流式细胞仪上样用试管及检测专用仪器流式细胞仪组成。

[0056] 本发明提供的试剂盒可用于食品、农产品、活体动物及人体中兽药、农药、违禁药

物、滥用药物中的小分子化合物的检测,灵敏度高、简便、快速、成本低廉。

[0057] 本发明所使用的检测仪器包括: 流式细胞仪、悬浮式(液相)芯片检测系统及微流控芯片流式细胞仪。其中悬浮式(液相)芯片检测仪是基于流式编码微球检测的小型专用仪器,能够满足多种小分子化合物的同步检测,但其功能上目前只能对红色荧光微球进行分析,微流控芯片流式细胞仪是结合流式细胞术及微流控芯片技术研发的小型化流式细胞仪,具有小型化、低成本特点,因此便于携带,在基层现场实施检测。

[0058] 本发明所需的试剂、仪器、设备均可在市场购买。

具体实施方式

[0059] 实施例 1 用于多种小分子化合物同步检测的试剂盒所需试剂的配制

[0060] 1. 按上述方法制备编码微球试剂,其中第 3 步,取颗粒直径为 $3\mu\text{m}$ 、荧光强度为 2 级、荧光颜色为红、橙、黄或绿色的聚苯乙烯荧光微球各 $1\mu\text{L}$;或取颗粒直径为 $10\mu\text{m}$ 、荧光颜色为绿色、荧光强度为 1、2、4、5、6 或 8 级的聚苯乙烯荧光微球各 $5\mu\text{L}$;或取荧光颜色为红色、荧光强度为 3 级、颗粒直径为 $4、5、6、8、9\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯荧光微球各 $3\mu\text{L}$;其中第 5 步,使 BSA 的重量百分比浓度为 2%、5% 或 10%;其中第 6 步,每次用 $100\mu\text{L}$ 、 $150\mu\text{L}$ 或 $200\mu\text{L}$ 封闭液洗 2 次。

[0061] 2. 按上述方法制备荧光量子点抗体探针,其中第 3 步,加入在水相合成的摩尔浓度为 0.00125mol/L CdTe 量子点溶液 0.5mL 、 1mL 或 2mL ;透析袋蛋白截流量为 10000、20000 或 30000。

[0062] 3. 按上述方法制备荧光量子点二抗探针,其中第 3 步、加入在水相合成的摩尔浓度为 0.00125mol/L CdTe 量子点溶液 0.5mL 、 1mL 或 2mL ;透析袋蛋白截流量为 10000、20000 或 30000。

[0063] 4. 按上述方法制备荧光染料抗体探针,其中第 4 步,按照 1 个 IgG 分子结合 1 个、2 个或 3 个 PE 或 FITC 分子的比例;浓缩比例为 3 : 1、3.5 : 1 或 4 : 1;其中第 5 步,浓缩比例为 3 : 1、3.5 : 1 或 4 : 1。

[0064] 5. 按上述方法制备荧光染料二抗探针,其中第 4 步,还原后的抗体按照 1 个 IgG 分子结合 1 个、2 个或 3 个 PE 或 FITC 分子的比例逐滴加入;浓缩比例为 3 : 1、3.5 : 1 或 4 : 1;其中第 5 步,浓缩比例为 3 : 1、3.5 : 1 或 4 : 1。

[0065] 实施例 2 同步检测多种小分子化合物的试剂盒的装配(可测试 100 次)

[0066] 1. 一种或多种不同小分子化合物编码微球试剂:

[0067] 用于某一种小分子化合物检测的试剂盒,配这种小分子化合物编码微球试剂 100 次实验所需量 10mL ,如孔雀石绿检测试剂盒配有孔雀石绿编码微球试剂 10mL ,以上试剂皆 4°C 保存。

[0068] 用于多种小分子化合物同步检测的试剂盒,分别配每种小分子化合物编码微球试剂 100 次实验所需量 10mL ,试剂盒里面的编码微球之间至少粒径、荧光颜色或荧光强度之一有区别,如对盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、氯霉素同时检测,配盐酸克伦特罗的粒径为 $3\mu\text{m}$ 、红色荧光、荧光强度为 1 级的编码微球试剂 10mL 、莱克多巴胺的粒径为 $3\mu\text{m}$ 、红色荧光、荧光强度为 8 级的编码微球试剂 10mL ,氯霉素的粒径为 $3\mu\text{m}$ 、橙色荧光、荧光强度为 8 级的编码微球试剂 10mL ;或盐酸克伦特罗的粒径为 $3\mu\text{m}$ 、红色荧光、荧光强度为 5 级的编码微球试剂

剂 10mL、莱克多巴胺的粒径为 10 μm 、红色荧光、荧光强度为 5 级的编码微球试剂 10mL, 氯霉素的粒径为 7 μm 、绿色荧光、荧光强度为 8 级的编码微球试剂 10mL ;或盐酸克伦特罗的粒径为 5 μm 、红色荧光、荧光强度为 6 级的编码微球试剂 10mL、莱克多巴胺的粒径为 5 μm 、绿色荧光、荧光强度为 3 级的编码微球试剂 10mL, 氯霉素的粒径为 5 μm 、绿色荧光、荧光强度为 8 级的编码微球试剂 10mL, 以上试剂皆 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 ;

[0069] 2. 一种或多种不同小分子化合物抗体荧光探针或一种或多种不同小分子化合物抗体及其对应的荧光二抗探针 :

[0070] 用于某一种小分子化合物直接法检测的试剂盒, 配这种小分子化合物抗体荧光量子点探针或荧光染料探针 100 次实验所需量 1mL, 如孔雀石绿直接法检测的试剂盒, 配有孔雀石绿单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体的荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL, 以上试剂皆 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0071] 用于某一种小分子化合物间接法检测的试剂盒, 配这种小分子化合物单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体 100 次实验所需量 1mL、其对应的荧光量子点二抗探针或荧光染料二抗探针 100 次实验所需量 1mL, 如孔雀石绿间接法检测试剂盒配有由小鼠制得的孔雀石绿单克隆抗体 1mL、羊抗小鼠二抗荧光量子点探针或羊抗小鼠二抗荧光染料探针 1mL, 以上试剂皆 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0072] 用于多种小分子化合物直接法检测的试剂盒, 分别配每种小分子化合物抗体荧光量子点探针或荧光染料探针 100 次实验所需量 1mL, 如盐酸克伦特罗、莱克多巴胺和氯霉素直接法同时检测试剂盒里面配备盐酸克伦特罗单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL、莱克多巴胺单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL 和氯霉素单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL, 以上试剂皆 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0073] 用于多种小分子化合物间接法检测的试剂盒, 分别配每种小分子化合物的单克隆抗体或特异性好的多克隆抗体 100 次实验所需量 1mL、其对应的二抗荧光量子点探针或荧光染料探针 100 次实验所需量 1mL, 如盐酸克伦特罗、莱克多巴胺和氯霉素间接法同时检测的试剂盒里面配备由小鼠制得的盐酸克伦特罗单克隆抗体 1mL、由兔制得的莱克多巴胺多克隆抗体 1mL、由小鼠制得的氯霉素单克隆抗体 1mL, 对应由小鼠制得的盐酸克伦特罗单克隆抗体的羊抗小鼠二抗荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL、对应由兔制得的莱克多巴胺多克隆抗体的羊抗兔二抗荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL 和对应由小鼠制得的氯霉素单克隆抗体的羊抗小鼠二抗荧光量子点探针或荧光染料探针 1mL ;以上试剂皆 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 ;

[0074] 3. 一种或多种不同小分子化合物抗原系列标准浓度溶液 :

[0075] 单个小分子化合物检测试剂盒, 配所需检测的小分子化合物抗原标准质量浓度试剂 10 次实验所需量 1mL ;如检测孔雀石绿试剂盒配有系列质量浓度为 0ng/ml、0. 1ng/ml、0. 3ng/ml、0. 9ng/ml、2. 7ng/ml 及 8. 1ng/ml 的孔雀石绿抗原标准质量浓度试剂每种 1ml ;以上试剂皆 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 ;

[0076] 多种小分子化合物检测试剂盒, 配所需检测的小分子化合物抗原标准质量浓度试剂 ;如同时检测克伦特罗、莱克多巴胺和氯霉素试剂盒里面配有系列质量浓度为 0ng/ml、0. 1ng/ml、0. 3ng/ml、0. 9ng/ml、2. 7ng/ml 及 8. 1ng/ml 的克伦特罗抗原标准质量浓度试剂每种 1ml、系列质量浓度为 0ng/ml、0. 06ng/ml、0. 2ng/ml、0. 6ng/ml、1. 8ng/ml 及 5. 4ng/ml

ml 的莱克多巴胺抗原标准质量浓度试剂每种 1ml 和系列质量浓度为 0ng/ml、0.05ng/ml、0.2ng/ml、0.8ng/ml、3.2ng/ml 及 12.8ng/ml 的氯霉素抗原标准质量浓度试剂每种 1ml；以上试剂皆 4℃ 保存；

[0077] 4. PBS 缓冲液 100 次实验所需量 200mL, 4℃ 保存。

[0078] 5. 其他：

[0079] 标准曲线图 1 份；容量为 1.5ml 的离心管 100 个；量程分别为 1-10 μ L、10-100 μ L、20-200 μ L 移液枪各一把及配套枪头各 1000 个；锡箔 1 卷、涡旋振荡器 1 台；离心机 1 台、流式细胞仪 1 台及流式细胞仪上样用试管 100 个；

[0080] 实施例 3

[0081] 同步检测多种小分子化合物的试剂盒的使用方法—抗体探针直接法检测单个小分子化合物，例如要检测样品中盐酸克伦特罗的含量：

[0082] a. 试剂盒中配的标准曲线的绘制

[0083] 1) 分别取 100 μ L 质量浓度为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml 及 8.1ng/ml 盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液于离心管中，分别加入粒径为 4 μ m、红色荧光，荧光强度为 3 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 100 μ L，再分别加入 10 μ L 盐酸克伦特罗单克隆抗体绿色荧光量子点探针，避光摇振 0.5 小时使其发生竞争性免疫反应，生成编码微球—荧光量子点抗体探针复合物；

[0084] 2) 经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液，每次用 200 μ L PBS 洗 2 次，转入到流式细胞仪检测试管中待测；

[0085] 3) 上仪器进行检测，利用流式细胞仪中能对多种颜色同时分析，再利用仪器信号收集分析软件，对红色荧光与绿色荧光所收集到的信号做双参图，由图所得到的双阳性即判定为结合上了抗体，得到的数据同盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液作图，绘制出标准曲线。

[0086] b. 检测样品

[0087] 1) 取 100 μ L 待测样本提取液于离心管中，加粒径为 4 μ m、红色荧光，荧光强度为 3 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 100 μ L 于容量为 1.5ml 的离心管中，再加入盐酸克伦特罗单克隆抗体绿色量子点荧光探针 10 μ L，避光摇振 1 小时，使其发生免疫反应，生成编码微球—荧光量子点抗体探针复合物；

[0088] 2) 将上述编码微球—荧光量子点探针复合物经 3,000 rpm 离心 20 分钟后弃废液，每次用 200 μ L PBS 洗 2 次，转入到流式细胞仪检测试管中待测；

[0089] 3) 上仪器进行检测，得到的数据与标准曲线进行对比，以确定待测样本提取液中盐酸克伦特罗抗原的质量浓度，从而得到样品的检测结果。

[0090] 实施例 4

[0091] 同步检测多种小分子化合物的试剂盒的使用方法—抗体探针直接法同时检测多种小分子化合物，例如要同时检测样品中盐酸克伦特罗、莱克多巴胺与氯霉素的含量：

[0092] a. 试剂盒中配的标准曲线的绘制：

[0093] 1) 分别取 100 μ L 质量浓度为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml 及 8.1ng/ml 的盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液于离心管中，分别加入粒径为 4 μ m、红色荧光，荧光强度为 3 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂

100 μ L,再分别加入盐酸克伦特罗单克隆抗体FITC染料绿色荧光探针 10 μ L,避光摇振 2 小时使其发生竞争性免疫反应;生成编码微球-荧光染料抗体探针复合物;

[0094] 2) 将上述编码微球-荧光染料抗体探针复合物分别经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次,再分别转入到流式细胞仪检测试管中待测;

[0095] 3) 上仪器进行检测,利用流式细胞仪中能对多种颜色同时分析,再利用仪器信号收集分析软件,对红色荧光与绿色荧光所收集到的信号做双参图,由图所得到的双阳性即判定为结合上了抗体,得到的数据同盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液作图,绘制出盐酸克伦特罗抗原质量浓度标准曲线。

[0096] 同理用莱克多巴胺抗原系列标准质量浓度溶液、粒径为 5 μ m、橙色荧光、荧光强度为 6 级的活化微球液固定化莱克多巴胺全抗原得的编码微球试剂及其单克隆抗体 FITC 染料绿色荧光探针发生竞争性免疫反应,经仪器进行检测,绘制出莱克多巴胺抗原质量浓度标准曲线。

[0097] 同理用氯霉素抗原系列标准质量浓度溶液、粒径为 4 μ m、红色荧光、荧光强度为 6 级的活化微球液固定化氯霉素全抗原制得的编码微球试剂及其特异性好的多克隆抗体 PE 染料橙色荧光探针发生竞争性免疫反应,经仪器进行检测绘制出氯霉素抗原质量浓度的标准曲线。

[0098] b. 样品的检测:

[0099] 1) 取 100 μ L 待测样本提取液于离心管中,加入粒径为 4 μ m、红色荧光、荧光强度为 3 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 30 μ L 于离心管中;再加入粒径为 5 μ m、橙色荧光、荧光强度为 6 级的活化微球液固定化莱克多巴胺全抗原得的编码微球试剂 30 μ L 及粒径为 4 μ m、红色荧光、荧光强度为 6 级的活化微球液固定化氯霉素全抗原制得的编码微球试剂 30 μ L;然后再加入盐酸克伦特罗单克隆抗体 FITC 染料绿色荧光探针、莱克多巴胺单克隆抗体 FITC 染料绿色荧光探针及氯霉素特异性好的多克隆抗体 PE 染料橙色荧光探针各 3 μ L,避光摇振 1 小时使其发生竞争性免疫反应,生成编码微球-荧光染料抗体探针复合物;

[0100] 2) 将上述编码微球-荧光染料抗体探针复合物分别经 3,000 rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次,再分别转入到流式细胞仪检测试管中待测。

[0101] 3) 上仪器进行检测,利用流式细胞仪中能对多种颜色同时分析,再利用仪器信号收集分析软件,且由于盐酸克伦特罗编码微球的红色荧光强度为 3 级与氯霉素编码微球的 6 级红色荧光强度不同,其在红色荧光通道所收集到的信号将是由 2 个不同的峰组成,对不同的峰作门即可得到 1 张代表盐酸克伦特罗由红色荧光与绿色荧光所收集到的信号作出的双参图及 1 张代表氯霉素由红色荧光与橙色荧光所收集到的信号作出的双参图,由图所得到的双阳性即判定是否结合上了盐酸克伦特罗抗体或者氯霉素抗体,得到的数据与标准曲线进行对比,以确定待测样本提取液中盐酸克伦特罗抗原及氯霉素抗原的质量浓度;同时由于莱克多巴胺编码微球的粒径 5 μ m 与盐酸克伦特罗编码微球及氯霉素编码微球粒径为 4 μ m 不同,且莱克多巴胺编码微球的橙色荧光与盐酸克伦特罗编码微球及氯霉素编码微球的红色荧光不同所以可得到 1 张代表莱克多巴胺的由橙色荧光与绿色荧光所收集到的信号做出的双参图,由图所得到的双阳性即判定是否结合上了莱克多巴胺,得到的数据与标准曲线进行对比,以确定待测样本提取液中莱克多巴胺抗原的质量浓度;从而得到样品的

检测结果。

[0102] 实施例 5

[0103] 同步检测多种小分子化合物的试剂盒的使用方法 - 抗体探针间接法检测单个小分子化合物,例如要检测样品中盐酸克伦特罗的含量:

[0104] a. 试剂盒中配的标准曲线的绘制:

[0105] 1) 分别取 100 μ L 质量浓度为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml 及 8.1ng/ml 盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液于离心管中,分别加入粒径为 4 μ m、绿色荧光,荧光强度为 3 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 100 μ L,再分别加入 10 μ L 盐酸克伦特罗单克隆抗体,避光摇振 0.5 小时使其发生竞争性免疫反应,生成编码微球 - 抗体复合物;

[0106] 2) 将上述编码微球 - 抗体复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次;

[0107] 3) 再加入 100 μ L 橙色 PE 染料标记的对应盐酸克伦特罗单克隆抗体的二抗探针,避光摇振 0.5 小时使其发生竞争性免疫反应;生成编码微球 - 抗体 - 荧光染料二抗探针复合物;

[0108] 4) 将上述编码微球 - 抗体 - 荧光染料二抗探针复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次,转入到流式细胞仪检测试管中待测;

[0109] 5) 上仪器进行检测,利用流式细胞仪中能对多种颜色同时分析,再利用仪器信号收集分析软件,对绿色荧光与橙色荧光所收集到的信号做双参图,由图所得到的双阳性即判定为结合上了抗体,得到的数据同盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液作图,绘制出标准曲线。

[0110] b. 检测样品

[0111] 1) 取 100 μ L 待测样本提取液于离心管中,加入粒径 4 μ m 的绿色荧光,荧光强度为 3 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 100 μ L,再加入盐酸克伦特罗单克隆抗体 10 μ L,避光摇振 2 小时,使其发生免疫反应;生成编码微球 - 抗体复合物;

[0112] 2) 将上述编码微球 - 抗体复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次;

[0113] 3) 再加入 100 μ L 橙色 PE 染料标记的对应盐酸克伦特罗单克隆抗体的二抗探针,避光摇振 1 小时使其发生竞争性免疫反应,生成编码微球 - 抗体 - 荧光染料二抗探针复合物;

[0114] 4) 将上述编码微球 - 抗体 - 荧光染料二抗探针复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次,转入到流式细胞仪检测试管中待测;

[0115] 5) 上仪器进行检测,得到的数据与标准曲线进行对比,以确定待测样本提取液中盐酸克伦特罗抗原的质量浓度,从而得到样品的检测结果。

[0116] 实施例 6

[0117] 同步检测多种小分子化合物的试剂盒的使用方法 - 抗体探针间接法检测多个小分子化合物,例如要同时检测样品中盐酸克伦特罗、莱克多巴胺与氯霉素的含量时;

[0118] a. 标准曲线的绘制

[0119] 1) 分别取 100 μ L 质量浓度为 0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml 及 8.1ng/ml 盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液于离心管中,分别加入粒径为 3 μ m、红色荧光、荧光强度为 1 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 100 μ L,再分别加入 10 μ L 盐酸克伦特罗单克隆抗体,避光摇振 1 小时使其发生竞争性免疫反应,生成编码微球-抗体复合物;

[0120] 2) 将上述编码微球-抗体复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次;

[0121] 3) 再加入 100 μ L 绿色荧光量子点标记的对应盐酸克伦特罗单克隆抗体的二抗探针,避光摇振 0.5 小时使其发生竞争性免疫反应生成编码微球-抗体-荧光量子点二抗探针复合物;

[0122] 4) 将上述编码微球-抗体-荧光量子点二抗探针复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次,转入到流式细胞仪检测试管中待测;

[0123] 5) 上仪器进行检测,利用流式细胞仪中能对多种颜色同时分析,再利用仪器信号收集分析软件,对红色荧光与绿色荧光所收集到的信号做双参图,由图所得到的双阳性即判定为结合上了抗体,得到的数据同盐酸克伦特罗抗原系列标准质量浓度溶液作图,绘制出标准曲线;

[0124] 同理绘制出用粒径为 10 μ m、橙色荧光、荧光强度为 8 级的活化微球液固定化莱克多巴胺全抗原得的编码微球试剂、莱克多巴胺特异性好的多克隆抗体和红色荧光量子点标记的对应莱克多巴胺多克隆抗体的二抗探针发生竞争性免疫反应,经仪器进行检测绘制出莱克多巴胺抗原质量浓度的标准曲线;

[0125] 同理绘制出用粒径为 3 μ m、红色荧光、荧光强度为 8 级的活化微球液固定化氯霉素全抗原得的编码微球试剂、氯霉素单克隆抗体和绿色荧光量子点标记的对应氯霉素单克隆抗体的二抗探针发生竞争性免疫反应,经仪器进行检测绘制出氯霉素抗原质量浓度的标准曲线;

[0126] b. 检测样品

[0127] 1) 取 100 μ L 待测样本提取液于离心管中,加入粒径为 3 μ m、红色荧光、荧光强度为 1 级的活化微球液固定化盐酸克伦特罗全抗原制得的编码微球试剂 30 μ L、粒径为 10 μ m、橙色荧光、荧光强度为 8 级的活化微球液固定化莱克多巴胺全抗原得的编码微球试剂 30 μ L 及粒径为 3 μ m 的红色荧光,荧光强度为 8 级的活化微球液固定化氯霉素全抗原制得的编码微球试剂 30 μ L,再加入盐酸克伦特罗单克隆抗体、莱克多巴胺特异性好的多克隆抗体及氯霉素单克隆抗体各 3 μ L,避光摇振 2 小时使其发生竞争性免疫反应,生成编码微球-抗体复合物;

[0128] 2) 将上述编码微球-抗体复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次;

[0129] 3) 再加入 30 μ L 绿色荧光量子点标记对应盐酸克伦特罗单克隆抗体的二抗探针、30 μ L 红色荧光量子点标记对应莱克多巴胺多克隆抗体的二抗探针及 30 μ L 绿色荧光量子点标记对应氯霉素单克隆抗体的二抗探针,避光摇振 1 小时使其发生竞争性免疫反应生成编码微球-抗体-荧光量子点二抗探针复合物;

[0130] 4) 将上述编码微球-抗体-荧光量子点二抗探针复合物经 3,000rpm 离心 20 分钟

后弃废液,每次用 200 μ L PBS 洗 2 次,转入到流式细胞仪检测试管中待测;

[0131] 5) 上仪器进行检测,利用流式细胞仪中能对多种颜色同时分析,再利用仪器信号收集分析软件,且由于盐酸克伦特罗编码微球的红色荧光强度为 1 级与氯霉素编码微球的 8 级红色荧光强度不同,其在红色荧光通道所收集的信号将是由 2 个不同的峰组成,对不同的峰作门即可得到 2 张不同的分别代表盐酸克伦特罗及氯霉素由红色荧光与绿色荧光所收集到的信号作出的双参图,由图所得到的双阳性即判定是否结合上了盐酸克伦特罗抗体或者氯霉素抗体,得到的数据与标准曲线进行对比,以确定待测样本提取液中盐酸克伦特罗抗原及氯霉素抗原的质量浓度,同时由于莱克多巴胺编码微球的粒径 8 μ m 与盐酸克伦特罗编码微球及氯霉素编码微球粒径 3 μ m 不同,且莱克多巴胺编码微球的橙色荧光与盐酸克伦特罗编码微球及氯霉素编码微球的红色荧光不同所以可得到 1 张代表莱克多巴胺的由橙色荧光与红色荧光所收集到的信号做出的双参图,由图所得到的双阳性即判定是否结合上了莱克多巴胺,得到的数据与标准曲线进行对比,以确定待测样本提取液中莱克多巴胺抗原的质量浓度;从而得到样品的检测结果。

专利名称(译)	同步检测多种小分子化合物的试剂的制备及其使用方法		
公开(公告)号	CN1945331B	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	CN200610113903.6	申请日	2006-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	邹明强		
申请(专利权)人(译)	邹明强		
当前申请(专利权)人(译)	邹明强		
[标]发明人	邹明强 李锦丰 高海霞		
发明人	邹明强 李锦丰 高海霞		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/577 G01N33/546		
审查员(译)	田丰		
其他公开文献	CN1945331A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种同步检测多种小分子化合物的试剂的制备方法及其使用方法。制备步骤如下：制备编码微球试剂；制备小分子化合物抗体探针-荧光量子点抗体探针、荧光量子点二抗探针、荧光染料抗体探针或荧光染料二抗探针之一。本发明的使用方法-检测小分子化合物的方法：抗体探针直接法、抗体探针间接法。采用本发明制备的试剂或本发明提供的试剂盒可用于食品、农产品、活体动物及人体中兽药、农药、违禁药物、滥用药物等中的小分子化合物的检测，重复性好、灵敏度高；简便、快速、能进行现场；试剂耗量小，测试成本低廉；可多靶标同步分析；易于普及推广；从而达到对有害物质能及时发现和监控管理。