



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108845125 A

(43)申请公布日 2018. 11. 20

(21)申请号 201810656686.8

(22)申请日 2018.06.24

(71)申请人 沭阳康源泰博生物科技有限公司

地址 223600 江苏省宿迁市沭阳县学院路
高创园3楼

(72)发明人 张波 张学记 郝日沫 王鹏
雷少军 张二林 孙晓帅

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/94(2006.01)

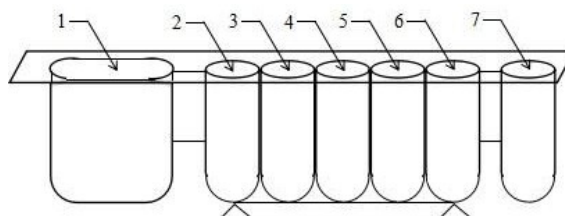
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒的制备及应用,该试剂盒主要由样本仓、试剂仓、清洗仓、洗脱仓等几个部分组成。该操作方法高效快速、操作简单、不需要大型仪器及特殊培训的专业操作人员,样品不需要特殊前处理,可广泛应用于动物组织、水产品、肉制品等产品中盐酸克伦特罗的富集与分离,对低于检测极限的盐酸克伦特罗样品,通过免疫磁珠的富集作用以及免疫磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大,反应更加彻底,从而能够改变检测极限,提高检测的灵敏度,避免漏检的现象。



1. 一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于,包括以下步骤:该试剂盒由样本仓、试剂仓、清洗仓、洗脱仓等几个部分组成;

样本仓用于放置样本的前处理溶液,试剂仓用于放置免疫磁珠,免疫磁珠上偶联了盐酸克伦特罗抗体,清洗仓用于放置清洗液清洗,洗脱仓主要用于洗脱反应结合物;

步骤主要包括以下:

(1) 免疫磁珠的捕获收集样本

首先将样本前处理溶液放于样本仓中,抗盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠放入试剂仓,旋转混匀,然后将免疫磁珠加入到样本仓中,旋转重悬,37℃下旋转捕获30min,以实现最大程度地捕获样本中的盐酸克伦特罗,磁分离,弃去上清液;将捕获过样本的免疫磁珠在清洗仓中使用清洗液清洗,轻摇重悬,磁分离,弃上清;此过程可重复2-3次;

免疫磁珠捕获盐酸克伦特罗完成后,再经磁分离,从而实现盐酸克伦特罗样本的富集净化;去除磁分离后的上清,沉淀即为捕获了盐酸克伦特罗的免疫磁珠;

(2) 免疫磁珠的洗脱

将步骤(1)中得到的免疫磁珠中在洗脱仓中加入洗脱液进行洗脱,室温震荡几秒钟,磁分离,上清液即为富集净化后的盐酸克伦特罗样本,可用于后续的测定。

2. 根据权利要求1所述的一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于所述的免疫磁珠富集净化盐酸克伦特罗的最佳反应条件为,37℃下,pH7.4,0.02mol/L的含甲醇10%的PBS缓冲液中旋转捕获30min。

3. 根据权利要求1所述的一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于所述的采用的捕获缓冲液优选为pH7.4,0.02mol/L的含甲醇10%的PBS缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于所述的洗脱液采用无水甲醇,免疫磁珠在洗脱液中的浓度采用5-10mg/mL;室温震荡1-5分钟为宜。

5. 根据权利要求1所述的一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于优选地,步骤(1)中抗盐酸克伦特罗抗体特异性免疫磁珠的具体制备方法为:

S1清洗:分别取0.4mg磁珠于2mL离心管中,使用200μL PBT(0.02mol/L,pH7.4,含0.05% Tween-20)清洗2次,洗涤后用250μL PBS缓冲液(0.02mol/L,pH7.4)超声分散重悬;

S2活化:分别加入200μL用PBS缓冲液(0.02mol/L,pH7.4)配制的EDC和NHS,37℃活化2h,保持悬浮状态;

S3偶联:磁分离,吸去上清液,同上PBT缓冲液洗涤三次,超声重悬;

再分别将200μg的抗盐酸克伦特罗抗体加入到已活化的磁珠中,37℃偶联反应5h,15 r/min旋转保持悬浮状态;

S4封闭:磁分离,取出上清液,加入100μL的乙醇胺溶液和BSA封闭液,37℃封闭2h,保持悬浮状态;

S5保存:用PBT洗涤磁珠3次,磁分离,弃上清液,用250μL PBS缓冲液(0.02mol/L,pH7.4,含0.02%NaN₃和0.5%BSA)重悬,于4℃保存;

优选地,上述步骤中所述的活化剂为EDC和NHS,浓度均为1-5mg/mL,用活化缓冲液溶解;

优选地,上述制备免疫磁珠的方法中,偶联缓冲液优选pH7.4,0.02mol/L的PBS缓冲液;

洗涤液优选含0.05%Tween-20的pH7.4,0.02mol/L的PBT缓冲液;活化剂以PB缓冲液配制;封闭液优选以PBS缓冲液配制的5%BSA溶液。

6.根据权利要求1所述的一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于所述的免疫磁珠通过化学偶联法将磁性微球表面修饰上活性基团,如氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)或环氧基等,采用的化学试剂为EDC和NHS,浓度均为1-5mg/mL。

7.根据权利要求1所述的一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,其特征在于所述的免疫磁珠偶联的偶联了盐酸克伦特罗抗体为盐酸克伦特罗单克隆抗体、盐酸克伦特罗多克隆抗体。

一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于分析检测领域,具体涉及一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(俗称瘦肉精)为一种人工合成的 β 肾上腺素兴奋剂,具有扩张支气管的作用,常用来防治哮喘、肺气肿等肺部疾病。当其应用剂量达到治疗量的5~10倍时,具有能量重分配作用,可使肌肉合成增加,脂肪沉积减少,因此俗称为“瘦肉精”。在畜牧业生产中一些非法使用者将其作为一种生长促进剂添加到动物饲料中,用以改善胴体的品质,同时也造成食品中盐酸克伦特罗的残留,尤其是在猪的肝脏等内脏器官残留较高,食用后直接危害人体健康。其主要危害是:出现肌肉振颤、头疼、恶心、呕吐等症状,特别是对高血压、心脏病、甲亢和前列腺肥大等疾病患者危害更大,严重的可导致死亡。我国禁止在畜牧业中使用盐酸克伦特罗。

[0003] 目前,免疫检测方法是使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗原或抗体)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅做定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的灵敏度。但是,目前所用的固相载体存在问题有:批间差异不易控制,包装操作繁复,自动化程度不高,不适宜大批量样本的操作。

[0004] 免疫磁珠是由作为载体的磁性微球和免疫配基结合而成的纳米级材料。磁性微球载体通常是带有氨基、羧基、羟基或巯基等化学官能团的磁珠,该官能团与不同的免疫配基如活性蛋白、抗体、抗原、亲和素、生物素等结合形成免疫磁珠。磁性微球载体具有超顺磁性特点,可使免疫磁珠置于磁场时,显示其磁性,从磁场移出时,磁性消除,免疫磁珠重新分散。包被抗体的免疫磁珠作为固相载体,其上的抗体与相应抗原发生特异性结合形成抗原-抗体-磁珠复合物,这种复合物在磁场作用下,迅速向磁场移动,使复合物与其他物质分离,达到分离特异性抗原的目的,这种分离方法具有检测速度快、特异性高、灵敏度高、重复性好等优势。免疫磁珠的磁分离方法可重复性好,操作简单,不需昂贵的仪器设备,不影响被分离生物材料的生物学性状和功能,并由于磁珠特殊的性能,可以将免疫检测实现自动化,用于大规模样本的检测,其反应动力学较传统免疫检测方法快,并且具有更大的固相结合表面。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了弥补现有技术存在的不足,提供一种用于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,用于样本中盐酸克伦特罗富集与净化,以解决盐酸克伦特罗样本样品净化分离操作复杂、分离效率低的等技术问题。免疫磁珠经过适量活化剂(EDC-NHS

组合)处理后,使得磁珠表面带有亲和配基,通过亲和层析法与盐酸克伦特罗抗体在合适的反应条件下进行偶联,得到富集盐酸克伦特罗抗体特异性免疫磁珠,使用盐酸克伦特罗抗体特异性免疫磁珠对盐酸克伦特罗的溶液进行吸附,以富集和纯化样本中盐酸克伦特罗,以便后续的测量。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,该试剂盒由样本仓、试剂仓、清洗仓、洗脱仓等几个部分组成。样本仓用于放置样本的前处理溶液,试剂仓用于放置免疫磁珠,免疫磁珠上偶联了盐酸克伦特罗抗体,清洗仓用于放置清洗液清洗,洗脱仓主要用于洗脱结合物。

[0007] 基于上述免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒,主要包括以下:

(1) 首先将样本前处理溶液放于样本仓中,抗盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠放入试剂仓,旋转混匀,然后将免疫磁珠加入到样本仓中,旋转重悬,37℃下旋转捕获30min,以实现最大程度地捕获样本中的盐酸克伦特罗,磁分离,弃去上清液;将捕获过样本的免疫磁珠在清洗仓中使用清洗液清洗,轻摇重悬,磁分离,弃上清;此过程可重复2-3次。免疫磁珠捕获盐酸克伦特罗完成后,再经磁分离,从而实现盐酸克伦特罗样本的富集净化;去除磁分离后的上清,沉淀即为捕获了盐酸克伦特罗的免疫磁珠;

(2) 免疫磁珠的洗脱

将步骤(1)中得到的免疫磁珠在洗脱仓中加入洗脱液进行洗脱,室温震荡几秒钟,磁分离,上清液即为富集净化后的盐酸克伦特罗样本;

上述步骤中,优选地,免疫磁珠富集净化盐酸克伦特罗的最佳反应条件为,37℃下,pH7.4,0.02mol/L的含甲醇10%的PBS缓冲液中旋转捕获30min;

上述步骤中,优选地,采用的捕获缓冲液优选为pH7.4,0.02mol/L的含甲醇10%的PBS缓冲液;

上述步骤中,优选地,采用的清洗液为pH7.4 PBS缓冲液;

上述步骤中,优选地,洗脱液采用无水甲醇,免疫磁珠在洗脱液中的浓度采用5-10mg/mL;室温震荡1-5分钟为宜;

优选地,步骤(1)中抗盐酸克伦特罗抗体特异性免疫磁珠的具体制备方法为:

S1清洗:分别取0.4mg磁珠于2mL离心管中,使用200μL PBT(0.02mol/L,pH7.4,含0.05% Tween-20)清洗2次,洗涤后用250μL PBS缓冲液(0.02mol/L,pH7.4)超声分散重悬;

S2活化:分别加入200μL用PBS缓冲液(0.02mol/L,pH7.4)配制的EDC和NHS,37℃活化2h,保持悬浮状态;

S3偶联:磁分离,吸去上清液,同上PBT缓冲液洗涤三次,超声重悬。再分别将200μg的抗盐酸克伦特罗抗体加入到已活化的磁珠中,37℃偶联反应5h,15 r/min旋转保持悬浮状态;

S4封闭:磁分离,取出上清液,加入100μL的乙醇胺溶液和BSA封闭液,37℃封闭2h,保持悬浮状态;

S5保存:用PBT洗涤磁珠3次,磁分离,弃上清液,用250μLPB缓冲液(0.02mol/L,pH7.4,含0.02%NaN₃和0.5%BSA)重悬,于4℃保存;

优选地,上述步骤中所述的活化剂为EDC和NHS,浓度均为1-5mg/mL,用活化缓冲液溶解;

优选地,上述制备免疫磁珠的方法中,偶联缓冲液优选pH7.4,0.02mol/L的PBS缓冲液;洗涤液优选含0.05%Tween-20的pH7.4,0.02mol/L的PBT缓冲液;活化剂以PB缓冲液配制;封闭液优选以PBS缓冲液配制的5%BSA溶液。

[0008] 本发明相对于现有技术的有益效果是:

1. 本发明利用抗盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠富集盐酸克伦特罗,可在短时间迅速、有选择地分离内将样品中的盐酸克伦特罗富集与纯化,避免了大量使用有机溶剂,有效地减少了背景物质的干扰,提高了检测的准确性和精准性;
2. 应用免疫磁珠技术,无需提取后进行纯化步骤,该操作简便,方便可行;
3. 该操作不需要大型仪器和特殊培训的专业人员,样品不需要特殊前处理,可广泛应用于饲料、肉制品、动物组织中的盐酸克伦特罗的纯化、富集与分离。

附图说明

[0009] 附图1 一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒的结构示意图

附图标记说明 1-样本仓,2-试剂仓,3-清洗仓,4-清洗仓,5-清洗仓,6-清洗仓,7-洗脱仓。

具体实施方式

[0010] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围,本发明具体实施方式如下。

[0011] 实施例1

一、抗盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中,加入活化缓冲液洗涤磁珠,反复三次,每次间隔3分钟,除去活化缓冲液后加入活化剂EDC和NHS各200 μ L,混匀,于37 $^{\circ}$ C旋转孵育2小时,进行磁珠活化;
2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍,每次间隔3分钟,加入盐酸克伦特罗抗体,混匀,于37 $^{\circ}$ C孵育3小时,制备成盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠;
3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次,每次间隔3分钟。用封闭液于37 $^{\circ}$ C孵育2小时,置于保存缓冲液中4 $^{\circ}$ C保存待用;

二、抗盐酸克伦特罗免疫磁珠对动物组织样品中盐酸克伦特罗富集的应用:

1. 将动物组织样品用肉搅碎机捣碎,或用刀剁碎(浆状);
2. 称取5.0 g捣碎的组织样品,装入5 mL的冷冻管中,拧紧管盖(不要让水进入管子内);
3. 将装有样品的冷冻管在沸水中煮10分钟后(肉熟透为准)取出冷却至室温备用。制成样品匀液,放入样本仓;
4. 将免疫磁珠加入合适浓度的样品中,充分混匀后于37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,作用完毕后,置于磁力架上捕获磁珠,除去上清液,于清洗仓用缓冲液清洗3次,于洗脱仓以无水甲醇解离出免疫磁珠上的盐酸克伦特罗,将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩,所得样即为纯化后的盐酸克伦特罗(样品冻存,留待利用ELISA对盐酸克伦特罗进行鉴定检测)。

[0012] 实施例2

一、抗盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中, 加入活化缓冲液洗涤磁珠, 反复三次, 每次间隔5分钟, 除去活化缓冲液后加入活化剂EDC和NHS各180 μ L, 混匀, 于37 $^{\circ}$ C旋转孵育2小时, 进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍, 每次间隔3分钟, 加入盐酸克伦特罗抗体, 混匀, 于37 $^{\circ}$ C孵育3小时, 制备成盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔3分钟。用封闭液于37 $^{\circ}$ C孵育2小时, 置于保存缓冲液中4 $^{\circ}$ C保存待用;

二、抗盐酸克伦特罗免疫磁珠对饲料样品中盐酸克伦特罗富集的应用:

1、称取2.0 g粉碎的饲料样品, 装入5 mL的离心管中, 加入一定的样品稀释液, 放于震荡器震荡10分钟, 离心取上清液;

2、将免疫磁珠加入合适浓度的样品中, 充分混匀后于37 $^{\circ}$ C孵育30分钟, 作用完毕后, 置于磁力架上捕获磁珠, 除去上清液, 于清洗仓用缓冲液清洗2次, 于洗脱仓以无水甲醇解离出免疫磁珠上的盐酸克伦特罗, 将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩, 所得样即为纯化后的盐酸克伦特罗(样品冻存, 留待利用ELISA对盐酸克伦特罗进行鉴定检测)。

[0013] 实施例3

一、抗盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠的制备:

1. 取磁珠放入离心管中, 加入活化缓冲液洗涤磁珠, 反复三次, 每次间隔4分钟, 除去活化缓冲液后加入活化剂EDC和NHS各250 μ L, 混匀, 于37 $^{\circ}$ C旋转孵育4小时, 进行磁珠活化;

2. 用偶联缓冲液洗涤磁珠三遍, 每次间隔4分钟, 加入盐酸克伦特罗抗体, 混匀, 于37 $^{\circ}$ C孵育4小时, 制备成盐酸克伦特罗抗体免疫磁珠;

3. 用洗涤缓冲液洗涤免疫磁珠反复三次, 每次间隔4分钟。用封闭液于37 $^{\circ}$ C孵育4小时, 置于保存缓冲液中4 $^{\circ}$ C保存待用;

二、抗盐酸克伦特罗免疫磁珠对样品中盐酸克伦特罗富集的应用:

1、将动物组织样品用肉搅碎机捣碎, 或用手剁碎(浆状);

2、称取5.0 g捣碎的组织样品, 装入5 mL的冷冻管中, 拧紧管盖(不要让水进入管子内);

3、将装有样品的冷冻管在沸水中煮10分钟后(肉熟透为准)取出冷却至室温备用。制成样品匀液, 放入样本仓;

4、将免疫磁珠加入合适浓度的样品中, 充分混匀后于37 $^{\circ}$ C孵育2小时, 作用完毕后, 置于磁力架上捕获磁珠, 除去上清液, 于清洗仓用缓冲液清洗3次, 于洗脱仓以无水甲醇解离出免疫磁珠上的, 将得到的甲醇洗脱液氮吹浓缩, 所得样即为纯化后的盐酸克伦特罗(样品冻存, 留待利用ELISA对盐酸克伦特罗进行鉴定检测)。

[0014] 以上所述实施例的各个技术特征可以进行任意的组合, 为使描述简洁, 未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合均进行描述, 然而, 只要认为这些技术特征的组合不存在矛盾, 都应认为是本说明书记载的范围。

[0015] 以上的实施例仅表达了本发明的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但并不能因此而理解对专利范围的限制, 应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都是属于本发明的保护范围。

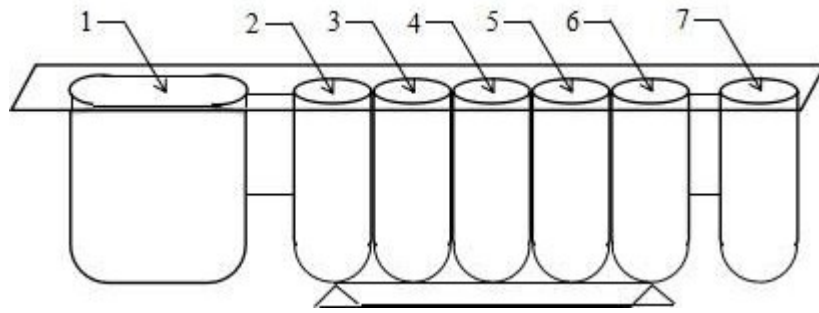


图1

专利名称(译)	一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒		
公开(公告)号	CN108845125A	公开(公告)日	2018-11-20
申请号	CN201810656686.8	申请日	2018-06-24
[标]发明人	张波 张学记 郝日沫 王鹏 雷少军 张二林 孙骁帅		
发明人	张波 张学记 郝日沫 王鹏 雷少军 张二林 孙骁帅		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/531 G01N33/54346 G01N33/9433 G01N2333/001		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于免疫磁珠的盐酸克伦特罗样本前处理试剂盒的制备及应用，该试剂盒主要由样本仓、试剂仓、清洗仓、洗脱仓等几个部分组成。该操作方法高效快速、操作简单、不需要大型仪器及特殊培训的专业操作人员，样品不需要特殊前处理，可广泛应用于动物组织、水产品、肉制品等产品中盐酸克伦特罗的富集与分离，对低于检测极限的盐酸克伦特罗样品，通过免疫磁珠的富集作用以及免疫磁珠在液体中充分扩散使得结合表面积扩大，反应更加彻底，从而能够改变检测极限，提高检测的灵敏度，避免漏检的现象。

