

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610038011.4

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1811445A

[22] 申请日 2006.1.25

[21] 申请号 200610038011.4

[71] 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

[72] 发明人 刘曙照 陈小锋

[74] 专利代理机构 扬州苏中专利事务所

代理人 胡定华

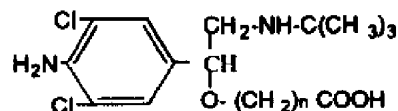
权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

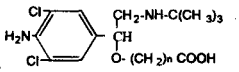
对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒

[57] 摘要

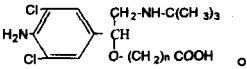
本发明公开了一种对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒，属于生物化学分析技术领域。以克伦特罗和卤代羧酸酯为起始原料合成半抗原(见化学式)($n = 1 - 5$)，将半抗原与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对克伦特罗具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记抗体或半抗原。用所述抗体或包被原包被微孔板，加入待测样品与酶标记物的混合液，克伦特罗、酶标记物与包被在微孔表面的抗体或包被原发生竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与样品中克伦特罗的含量成反比。运用该技术，制备用于饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗的快速检测试剂盒。



1、一种对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是以克伦特罗与卤代羧酸酯为起始原料合成突出克伦特罗

结构特征的半抗原 ，将半抗原与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对克伦特罗具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记抗体或半抗原，用所述包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品与酶标记物的混合液，克伦特罗、酶标记物与固相抗体或包被原发生竞争性结合；洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原或结合在包被原上的酶标抗体量成正比，与样品或标样中克伦特罗的含量成反比。

2、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述半抗原是以克伦特罗与卤代羧酸酯为起始原料

反应生成的衍生物，其分子结构式为 。

3、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述人工抗原是采用活性酯法或混合酸酐法将所述半抗原与蛋白质共价偶联而成。

4、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述抗体是以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、鼠等动物制备的对克伦特罗具有特异性亲合力的多克隆抗体或采用杂交瘤技术制备的对克伦特罗具有特异性亲合力的单克隆抗体。

5、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述酶标半抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将所

述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联而成。

6、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述酶标抗体是采用改良的过碘酸盐法将所述抗体与辣根过氧化物酶共价偶联而成或酶标二抗。

7、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是用所述抗体或包被原包被聚苯乙烯微孔板，以0.5%明胶封闭微孔表面未被吸附的位点。

8、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述酶的底物为过氧化脲或过氧化氢。

9、根据权利要求1所述对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术，其特征是所述显色剂为3',3',5',5'-四甲基联苯胺或邻苯二胺。

10、一种对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析检测试剂盒，其特征是由盒体及置于盒体内的可拆卸式聚苯乙烯微孔板、对克伦特罗具特异性亲合力的抗体或包被原、缓冲液、封闭液、克伦特罗标样、酶标记物、底物液、显色剂、终止液和使用说明书组成。

对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒

技术领域

本发明涉及对克伦特罗具特异性的竞争性酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒，主要应用于饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗的快速检测。

背景技术

克伦特罗 (Clenbuterol) 又名双氯醇胺，氨哮素，克喘素，是一种人工合成的 β_2 -肾上腺素受体激动剂，用于防治支气管哮喘、哮喘性慢性支气管炎及肺气肿等呼吸系统疾病。在兽医临床上，当其应用剂量达到治疗量的 5~10 倍、且应用时间较长时，能降低动物胴体脂肪沉积、增加肌肉的合成。因此又有“瘦肉精”之称。克伦特罗在动物体内吸收快、分布广、半衰期长、易积累，人在食用了残留有克伦特罗的肉品后可能引起心悸、震颤、头晕、头痛等症状甚至导致死亡。因此，必须加强饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗的监测。

目前，检测克伦特罗残留的方法主要有高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、毛细管电泳法和酶联免疫吸附分析法。采用仪器分析法需要昂贵的仪器设备、专业化的实验室和训练有素的专门人才，对样品前处理的要求高、过程复杂、速度慢、选择性差，难以适应大量样本和现场快速检测的要求。酶联免疫吸附分析技术具有灵敏度高、分析成本低、简便快捷、仪器设备简单等优点，适合于大批量样品的快速检测。但现有克伦特

罗酶联免疫吸附检测试剂盒的研制，由于人工抗原的合成是先将克伦特罗苯环上的氨基重氮化，然后在弱碱性条件下与蛋白质上的酪氨酸共价偶联，这样就造成了克伦特罗的特异性部分被蛋白质大分子掩盖，所获抗体与克伦特罗结构类似物有比较严重的交叉反应，在实际检测过程中经常出现假阳性，同时有一些阳性样品不能被确认。

发明内容

本发明的目的是提供一种对克伦特罗具有高选择性、高灵敏度，适合饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗快速检测的竞争性酶联免疫吸附分析技术。

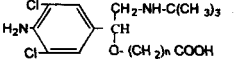
本发明的又一个目的是提供一种特异性强、灵敏度高、方便快捷、廉价高效，适合饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗现场快速检测的竞争性酶联免疫吸附检测试剂盒。

本发明的技术方案一：对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒，其特征是以克伦特罗与卤代羧酸酯为起始原料

合成突出克伦特罗结构特征的半抗原  (n=1-5)，将半抗原

与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对克伦特罗具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记抗体或半抗原，用所述包被原或抗体包被聚苯乙烯微孔板，加入待测样品（或克伦特罗标样）与酶标记物的混合液，克伦特罗、酶标记物与固相抗体或包被原发生竞争性结合；洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原或结合在包被原上的酶标抗体量成正比，与样品或标样中克伦特罗的含量成反比。

所述半抗原是以克伦特罗与卤代羧酸酯为起始原料反应生成的衍生

物，其分子结构式为  (n=1-5)。

所述人工抗原是采用活性酯法或混合酸酐法将所述半抗原与蛋白质共价偶联而成。

所述抗体是以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、鼠等动物制备的对克伦特罗具有特异性亲合力的多克隆抗体或采用杂交瘤技术制备的对克伦特罗具有特异性亲合力的单克隆抗体。

所述酶标半抗原是采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联而成。

所述酶标抗体是采用改良的过碘酸盐法将所述抗体与辣根过氧化物酶共价偶联而成或采用市售酶标二抗。

以所述抗体或包被原包被聚苯乙烯微孔板，以 0.5%明胶封闭微孔表面未被吸附的位点。

所述酶的底物为过氧化脲或过氧化氢。

所述显色剂为 3',3',5',5'-四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD)。

本发明的技术方案二：对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析检测试剂盒，其特征是由盒体及置于盒体内的可拆卸式聚苯乙烯微孔板、对克伦特罗具特异性亲合力的抗体或包被原、缓冲液、封闭液（也可事先将所述抗体或包被原包被在微孔板上并封闭后置盒体内）、克伦特罗标样、酶标记物、底物液、显色剂、终止液和使用说明书组成。

运用上述对克伦特罗具特异性的竞争性酶联免疫吸附分析技术，在盒内设置相关试剂与材料，制备免疫检测试剂盒，用于饲料、尿液、畜产品样本中残留克伦特罗的快速检测。试剂盒检测克伦特罗的线性浓度范围是

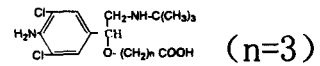
$10^{-3} \sim 10^0 \mu\text{g/mL}$, 检测限 $< 0.1 \text{ ng/mL}$ 。

本发明的科学性强、技术先进, 成本低, 应用方法简便。基本依据是小分子化合物免疫分析化学原理和技术。分子量小于 5000 道尔顿的化合物一般不具备免疫原性, 将突出克伦特罗分子结构特征的半抗原与蛋白质共价偶联制备人工抗原和包被原, 以人工抗原免疫动物产生对克伦特罗具特异性亲合力的抗体。小分子化合物虽然不具备免疫原性但具有反应原性, 能与相应抗体在离体条件下发生免疫结合并符合质量作用定律。以辣根过氧化物酶标记半抗原或抗体, 在包被有抗体或包被原的微孔板的孔中加入待测样品 (或克伦特罗标样) 与酶标记物的混合液, 克伦特罗、酶标记物与包被在微孔表面的抗体或包被原发生竞争性结合反应, 洗涤去除游离物后加入酶的底物和显色剂, 酶促显色反应的强度与结合在抗体或包被原上的酶标记物的量成正比, 与样品 (或标样) 中克伦特罗的含量成反比, 从而建立克伦特罗酶联免疫吸附分析技术。运用该技术, 在盒体内设置相关试剂与材料, 制备免疫检测试剂盒, 用于饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗的现场快速检测。通过参看说明书, 一般工作人员也可以进行现场检测分析, 便于推广使用。

具体实施方式

一、对克伦特罗具特异性的竞争性酶联免疫吸附分析技术实施例

1、将克伦特罗与 γ -溴代丁酸酯反应生成衍生物



以此作半抗原, 采用活性酯法或混合酸酐法与牛血清白蛋白、卵清蛋白等共价偶联合成人工抗原和包被原。

2、以所述人工抗原与适量弗氏佐剂混合乳化后免疫兔、羊、鼠等动物制备对克伦特罗具有特异性亲合力的多克隆抗体或采用杂交瘤技术制

备对克伦特罗具有特异性亲合力的单克隆抗体。

3、采用混合酸酐法或活性酯法将所述半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联制备酶标半抗原。

4、用所述抗体包被聚苯乙烯微孔板，以 0.5%明胶封闭微孔表面未吸附抗体的位点。

5、以过氧化脲或过氧化氢为酶的底物，以 3', 3', 5', 5' -四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD) 为显色剂。

6、在包被好抗体的微孔板的孔中加入待测样品 (或克伦特罗标样) 与酶标半抗原的混合液，克伦特罗、酶标半抗原与包被在微孔表面的抗体发生竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与结合在抗体上的酶标半抗原量成正比，与样品 (或标样) 中克伦特罗的含量成反比，据此建立对克伦特罗具特异性的固相直接竞争酶联免疫吸附分析技术，对待测样品中的残留克伦特罗进行定性定量快速检测。

二、对克伦特罗具特异性的竞争性酶联免疫吸附分析试剂盒制备实施例

1、微孔板的包被 将抗体用稀释 20 倍的缓冲液溶解成适当浓度，加入微孔板的孔中，100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 吸附过夜。去除孔中的溶液，拍干，加入封闭液 150 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C 封闭过夜或 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时。去除多余的封闭液，拍干，用稀释 20 倍的缓冲液洗 3 次，拍干，4 $^{\circ}$ C 条件下自然干燥，加干燥剂密封包装，4 $^{\circ}$ C 以下保存备用。也可将抗体、缓冲液、封闭液分别装入指定容器，置试剂盒内，由用户在使用前按使用说明自行包被。

2、标样溶液的配制 准确称取克伦特罗标样 0.0100g，溶于 100mL 甲醇，4 $^{\circ}$ C 保存。

3、酶标半抗原的制备 采用混合酸酐法或活性酯法将半抗原与辣根过氧化物酶共价偶联，透析去除游离的小分子化合物后保存于 50%的甘油中，包被抗体直接结合法测定酶标半抗原效价。制备试剂盒时将酶标半抗原用 50%甘油稀释至使用浓度的 100 倍，4℃以下保存。

4、缓冲液的配制 0.2mol/L NaH_2PO_4 280 mL 加 0.2mol/L Na_2HPO_4 720 mL、 NaN_3 0.5g 溶解混匀，4℃保存。

5、封闭液的配制 5.0g 明胶、0.5g NaN_3 溶于 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸盐缓冲液并定容至 1L，4℃保存。

6、底物液的配制 0.6g 过氧化脲溶于 1L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(5.2g 柠檬酸、18.4g 磷酸氢二钠溶于蒸馏水并定容至 1L)，4℃保存。

7、显色剂的配制 0.44g TMB 溶于 3.2mL 无水乙醇，用柠檬酸-磷酸盐缓冲液定容至 1L，充 N_2 或减压脱气，4℃保存。

8、终止液的配制 100mL 浓硫酸在搅拌下慢慢加入 800mL 蒸馏水中，冷却。

9、试剂分装 各种试剂按要求配制，测定合格后无菌分装。对克伦特罗具特异性亲合力的抗体适量/瓶、克伦特罗标样 0.1mL/瓶、酶标半抗原 0.1mL/瓶、缓冲液 10mL/瓶、封闭液 20mL/瓶、底物液 6mL/瓶、显色剂 6mL/瓶、终止液 6mL/瓶。分装后贴标签，注明批号和有效期，4℃保存。

10、试剂盒组装 分别将可拆卸微孔板 1 块，对克伦特罗具特异性亲合力的抗体、克伦特罗标样溶液、酶标半抗原、缓冲液、封闭液、底物液、显色剂、终止液各 1 瓶，使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。也可事先将抗体包被在微孔板上并封闭，置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装，4℃保存。

专利名称(译)	对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1811445A	公开(公告)日	2006-08-02
申请号	CN200610038011.4	申请日	2006-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	刘曙照 陈小锋		
发明人	刘曙照 陈小锋		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	胡定华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种对克伦特罗具特异性的酶联免疫吸附分析技术及其检测试剂盒，属于生物化学分析技术领域。以克伦特罗和卤代羧酸酯为起始原料合成半抗原(见化学式)($n = 1 - 5$)，将半抗原与不同蛋白质共价偶联分别合成人工抗原和包被原，以人工抗原免疫动物制备对克伦特罗具特异性亲合力的抗体，以辣根过氧化物酶标记抗体或半抗原。用所述抗体或包被原包被微孔板，加入待测样品与酶标记物的混合液，克伦特罗、酶标记物与包被在微孔表面的抗体或包被原发生竞争性结合，洗涤去除游离物，加入酶的底物和显色剂，酶促显色反应的强度与样品中克伦特罗的含量成反比。运用该技术，制备用于饲料、尿液、畜产品等样本中残留克伦特罗的快速检测试剂盒。