

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410046567.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年2月20日

[11] 授权公告号 CN 100370256C

[22] 申请日 2004.6.11

[21] 申请号 200410046567.9

[73] 专利权人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街  
乙8号

[72] 发明人 刘智宏 郭文林 叶妮 黄齐颐  
郭筱华

[56] 参考文献

US5660995A 1997.8.26

CN1403814A 2003.3.19

CN1435693A 2003.8.13

盐酸克仑特罗检测试剂盒的研制. 肖国平等. 检验检疫科学, 第14卷第1期. 2004

应用 ELISA 检测肉猪尿液中盐酸克仑特罗方法的研究. 杨兴武等. 黑龙江畜牧兽医, 第5期. 2003

审查员 邢维玲

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书1页 说明书6页

[54] 发明名称

一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒,包括包被的二抗、克仑特罗特异性抗体和酶标克仑特罗。本发明的检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,尿样离心后可直接检测,检测快速,时间约为1.5小时;标准曲线中有 $1\mu\text{g/L}$ 这一浓度点,实现了定性与定量一体化;最低检测限达 $0.1\mu\text{g/L}$ ,该试剂盒与其它 $\beta$ 兴奋剂交叉率很低,仅与沙丁胺醇有3.6%的交叉反应,具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点,可在动物性食品克仑特罗残留检测中发挥重要作用。

1、一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒，由包被了二抗的固相载体，蛋白浓度为5-500mg/L的克仑特罗鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体，浓度分别为0、0.1、0.3、1、3、9 $\mu$ g/L的克仑特罗系列浓度标准溶液，含有5-500mg/L的克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物的酶标克仑特罗浓缩液，0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液，0.1-10mg/mL的四甲基联苯胺溶液，0.1M pH5.0的柠檬酸缓冲液和1-2mol/L的硫酸或盐酸终止液组成；所述包被了二抗的固相载体是用下述方法制备的：用0.05M pH9.6碳酸盐包被缓冲液将羊抗兔IgG或羊抗鼠IgG稀释成0.1-5 $\mu$ g/ml，每孔加入100 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C过夜，倾去包被缓冲液，用0.05%吐温的0.05M pH7.2磷酸盐缓冲液洗涤3次，每次30秒，拍干，然后在每孔中加入含5%脱脂牛奶0.05M磷酸盐缓冲液250 $\mu$ l，室温温育1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

2、根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述克仑特罗单克隆抗体或克仑特罗多克隆抗体是用克仑特罗与载体蛋白的偶联物作为免疫原制备得到的。

3、根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兔血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白或血兰蛋白。

## 一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒

### 技术领域

本发明涉及酶联免疫和兽药残留检测分析技术领域中的一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

克仑特罗又称咳喘素，是一种  $\beta$ -兴奋剂。克仑特罗进入体内后能够改变养分的代谢途径，促进动物肌肉，特别是骨骼肌中蛋白质的合成，抑制脂肪的合成和积累，从而改善胴体品质，使生长速度加快，瘦肉相对增加，所以，称它为“瘦肉精”。在可食用动物的饲养中国内外均有非法使用该药物提高经济效益的现象，然而长期使用会使该药物蓄积在可食用动物的组织中，人食用该组织后，会产生骨骼肌震颤、心跳过速、头痛等一系列不良反应，严重的甚至危及生命。因此欧美各国均禁止在畜牧业生产上使用克仑特罗，我国也严禁将克仑特罗用于所有食用动物中并将其列为兽药残留监控的重点。我国《动物性食品中兽药最高残留限量》中规定克仑特罗为不得检出药物。

现已报道的克仑特罗残留量分析方法主要有气相色谱-质谱联用法、高效液相-串联质谱法以及试纸条检测法，其中，气相色谱-质谱联用法已经列为行业或国家标准。气相色谱-质谱联用法、高效液相-串联质谱法虽然可以进行定量分析，但需要经过繁琐的样品前处理过程，仪器设备昂贵，很难用于大量样品的检测；而试纸条检测法的灵敏度达不到检测要求。

### 发明创造内容

本发明的目的是提供一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒。

本发明所提供的检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗、克仑特罗特异性抗体和酶标克仑特罗。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括 A, B, C, D, E, F 试剂液、G 试剂液、H 试剂液、I 试剂液、J 试剂液、K 试剂液、L 试剂液。

所述 A, B, C, D, E, F 试剂液为克仑特罗系列浓度标准溶液。

所述 G 试剂液为酶标克仑特罗浓缩液。

所述 H 试剂液为克仑特罗抗体浓缩液。

所述 I 试剂液为磷酸盐缓冲液。

所述 J 试剂液为四甲基联苯胺。

所述 K 试剂液为柠檬酸缓冲液。

所述 L 试剂液为终止液。

其中, 所述克仑特罗特异性抗体可为克仑特罗单克隆抗体或克仑特罗多克隆抗体; 所述克仑特罗单克隆抗体或多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、猪源、兔源和豚鼠源抗体, 所述克仑特罗单克隆抗体优选为克仑特罗鼠单克隆抗体, 所述克仑特罗多克隆抗体优选为克仑特罗兔多克隆抗体。

以上抗体均可以用克仑特罗与载体蛋白的偶联物作为免疫原按常规方法制备。

所述载体蛋白可为牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、卵清蛋白(OVA)、兔血清白蛋白(RSA)、甲状腺球蛋白(TG)、或血兰蛋白(KLH)等常用载体蛋白; 所述克仑特罗与载体蛋白的偶联物可通过将克仑特罗和载体蛋白用戊二醛法、高碘酸钠法或重氮法进行偶联得到。

所述标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶, 优选为辣根过氧化物酶。辣根过氧化物酶可通过戊二醛法、高碘酸钠法或重氮法标记于克仑特罗上。所述二抗可为抗鼠或抗兔抗体, 优选为羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG。

可作为固定所述二抗的载体的物质很多, 如聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以是试管、微量反应板凹孔、小珠、小圆片等。

本发明的检测原理为将二抗吸附于固相载体上, 加入样品和酶标克仑特罗, 再加入克仑特罗特异性抗体, 待测样品中残留的克仑特罗和酶标克仑特罗竞争特异性抗体, 显色后终止, 测定样品吸光值, 该值与样品中克仑特罗残留量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出克仑特罗的含量。同时根据酶标板上的样品颜色的深浅, 与系列浓度的克仑特罗标准溶液颜色的比较可判断样品的浓度范围。

本发明的检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒主要采用 ELISA 竞争方法定性或定量检测动物组织(猪、鸡、牛、羊的肌肉组织及肝脏、肾脏尿等)、尿样等样品中克仑特罗的残留量; 对样品的前处理要求低, 样品前处理过程简单, 尿样离心后可直接检测, 检测快速, 时间约为 1.5 小时; 标准曲线中有  $1\mu\text{g/L}$  这一浓度点, 实现了定性与定量一体化; 最低检测限达  $0.1\mu\text{g/L}$ , 该试剂盒与其它  $\beta$  兴奋剂交叉率很低, 仅与沙丁胺醇有 3.6% 的交叉反应, 具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点, 可在动物性食品克仑特罗残留检测中发挥重要作用。

## **具体实施方式**

### **实施例 1、克仑特罗抗原及抗体的制备**

#### **(1) 克仑特罗抗原的合成**

以人血清白蛋白为载体，克仑特罗为半抗原，用重氮化法、戊二醛法、多元酸酐法或 EDC 法将克仑特罗偶联在人血清白蛋白上，得到克仑特罗抗原。

### (2) 克仑特罗兔多克隆抗体的制备

采用日本大耳兔作为免疫动物，以步骤(1)中合成的抗原为免疫原，免疫剂量每次为 2mg/mL 免疫抗原，首次免疫用 2mL 完全福氏佐剂乳化，四周后加强免疫用 2mL 不完全福氏佐剂乳化。每次加强免疫间隔 2 周，共免疫 5-10 次，最后一次不加免疫佐剂直接肌肉注射，7 天后采血检测，测定血清抗体效价后，颈动脉放血，提取血清，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

### (3) 克仑特罗单克隆抗体制备

采用 BALB/C 小鼠作为免疫动物，以步骤(1)中合成的抗原为免疫原，剂量为 50  $\mu$ g (0.1mL) 加等体积完全福氏佐剂乳化，进行首次皮下多点注射免疫。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，再过一月后免疫抗原不加佐剂腹腔注射进行加强免疫，之后 5 天采血，测定抗体效价。取脾细胞按 4:1 比例与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合。采用有限稀释或软琼脂平板法筛选杂交瘤细胞，得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

**细胞冻存和复苏** 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  个/mL 的细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管，立即放入 37°C 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。定期检查细胞的活性和分泌抗体的稳定性。

### 单克隆抗体的制备与纯化

采用体内诱生法，将 BALB/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油 0.5ml/只，7-14 天后腹腔注射杂交瘤细胞  $5 \times 10^5$ - $10^6$  个/只，7-10 天后采集腹水。经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化，小瓶分装，-20°C 保存。

### (4) 克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物的制备

用重氮化法、戊二醛法、多元酸酐法或 EDC 法将克仑特罗标记于辣根过氧化物酶上，获得克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物，克仑特罗残留检测灵敏度(即 50% 抑制浓度)小于或等于 1 $\mu$ g/kg。

### (5) 二抗的制备

以羊作为免疫动物，以鼠或兔 IgG 为免疫原进行免疫，得到羊抗鼠或羊抗兔抗体。具体方法如下：将经硫酸铵沉淀法纯化的兔或鼠免疫球蛋白用等量福氏完全佐剂乳化后，肌肉、皮下、皮内多点免疫成年绵羊，免疫剂量为 10mg 蛋白/只，一月后，用半量的兔或鼠免疫球蛋白加入福氏不完全佐剂肌肉、皮下或皮内注射绵羊，

之后，每两周加强免疫一次。琼扩效价达 1: 32 以上时，采血，分离血清，用硫酸铵沉淀法粗提后，用免疫亲和柱层析法提取羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG，得到纯化的羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG。

## 实施例 2、检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒

### 1、检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒的结构

该试剂盒主要由盒体，酶标板，A, B, C, D, E, F 试剂液（克仑特罗系列浓度标准溶液）、G 试剂液（克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物浓缩液）、H 试剂液（克仑特罗抗体浓缩液）、I 试剂液（磷酸盐缓冲液）；J 试剂液（四甲基联苯胺）；K 试剂液（柠檬酸缓冲液）；L 试剂液（终止液）；盖板膜和托架组成。上述试剂液存放在试剂瓶中。托架内装有上述 A, B, C, D, E, F, G, H, J 试剂瓶。托架，酶标板、盖板膜、I 试剂瓶、K 试剂瓶和 L 试剂瓶均安装在盒体内。酶标板由塑料支架和各自分开的带孔的塑料条组成。

### 2、所用试剂的配制

A, B, C, D, E, F 试剂液为克仑特罗系列浓度标准溶液，其浓度分别为 0、0.1、0.3、1、3、9  $\mu\text{g/L}$ 。

G 试剂液为克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物浓缩液，含有 5-500mg/L 的克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物。

H 试剂液为克仑特罗抗体浓缩液，含有蛋白浓度为 5-500mg/L 的克仑特罗鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

I 试剂液为 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液。

J 试剂液为 0.1-10mg/mL 四甲基联苯胺溶液。

K 试剂液为 0.1M pH5.0 柠檬酸缓冲液。

L 试剂液为终止液，1-2mol/L 硫酸或盐酸。

### 3、酶标板的制备

用包被缓冲液（0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液）将羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG 稀释成 0.1-5  $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 100  $\mu\text{l}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$  过夜，倾去包被缓冲液，用 0.05% 吐温的 0.05M pH7.2 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加 5% 脱脂牛奶 0.05M 磷酸盐缓冲液 250  $\mu\text{l}$ ，室温温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

## 实施例 3、样品的前处理及检测

1、猪尿：冻融后离心取上清，直接检测。

2、猪肝

### (1) 提取

称取绞碎组织1.0g, 置于离心管中, 加50mmol/L盐酸5mL, 振荡1.5h, 于10-15℃以5000r/min或更高的速度离心15min, 上清液转至另一离心管中。加入1mol/L氢氧化钠溶液300μL, 混匀。振摇15min, 加500mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH3.0) 4mL, 混匀, 4℃放置1.5h或过夜。再以5000r/min或更高的速度10-15℃离心15min, 取清亮的上清液备用。

### (2) 净化

C<sub>18</sub>固相萃取柱依次用无水甲醇3mL、50mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH3.0) 2mL预洗。取全部备用液过柱, 用50mmol/L磷酸二氢钾缓冲液2mL淋洗, 挤干。用无水甲醇2mL洗脱, 收集洗脱液, 在50-60℃中用氮气或空气吹干。残渣用水1.0mL溶解(如有沉淀用5000r/min以上的速度离心), 上清作为供试试料。

## 3、检测

检测前将试剂盒恢复室温(18℃-30℃), 用试剂液H和I配成抗体溶液, 分别在酶联板微孔中加入20μl A, B, C, D, E, F试剂液和试样溶液, 然后每微孔中加入100μl抗体溶液, 18℃-30℃孵育30min。用去离子水洗酶标板3次, 拍干。用试剂液G和I配成酶结合物溶液, 然后每微孔中加入100μl酶结合物溶液, 盖上盖板膜, 18℃-30℃孵育30min。再用去离子水洗酶标板3次, 拍干, 用J试剂液与K试剂液配制底物混合液(0.1%四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液), 取100μl加入酶标板小孔后混匀, 避光显色约15min, 最后加入M终止液(2mol/L硫酸), 用酶标仪测定450nm处A<sub>450</sub>值。按下

$$\text{百分吸光度值} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

式计算百分吸光度值:

(B—为标准溶液或样品的平均吸光度值; B<sub>0</sub>—为0浓度的标准溶液平均吸光度值。)

以标准溶液中克仑特罗浓度的对数为X轴, 百分吸光度值为Y轴, 绘制标准曲线, 从标准曲线上计算出试样溶液中克仑特罗浓度。

### 实施例4、试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度

该试剂盒的二抗为羊抗兔 IgG 抗体, 克仑特罗特异性抗体为克仑特罗兔多克隆抗体, 酶标克仑特罗为克仑特罗-辣根过氧化物酶结合物。

#### 1、灵敏度

按常规方法进行了试剂盒灵敏度试验, 结果表明标准曲线范围为0.1μg/L-9μg/L, 其中包含1μg/L这一临界浓度点; 试剂盒的最低检测限为0.1μg/L,

在猪尿和猪肝等样品中检测限 $\leq 1.0\mu\text{g/L}$  (kg)。

## 2、特异性测定

选择与克仑特罗结构和功能类似的八种药物，分别测定交叉反应率。结果如表 1 所示，表明该试剂盒与其它  $\beta$  兴奋剂交叉率很低，仅与沙丁胺醇有 3.6% 的交叉反应，样品的测定结果能代表克仑特罗残留量。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制克仑特罗的浓度}}{\text{引起 50\%抑制的类似物浓度}} \times 100$$

表 1. 交叉反应

药物名称	交叉反应率%
克仑特罗	100
沙丁胺醇	3.6
班布特罗	2.2
福莫特罗	<0.1
盐酸丙卡特罗	<0.1
茶碱	<0.1
盐酸麻黄碱	<0.1
盐酸肾上腺素	<0.1
3,5- (N,N-二甲氨基甲酰氧基) 苯乙酮	<0.1

## 3、准确度、精密度测定

分别在空白猪尿、猪肝中添加克仑特罗标准液至终浓度为  $1.0\mu\text{g/L}$  和  $2.0\mu\text{g/L}$ 。各浓度分别制备样品 5 份，然后分别测定其含量，重复 3 次。结果表明在猪肝中， $1\mu\text{g/kg}$  添加浓度的回收率为 40%~110%；在猪尿中， $1\mu\text{g/L}$  添加浓度的回收率为 60%~120%；在空白添加添加猪肝和猪尿样品中，批内变异系数  $CV \leq 20\%$ ，批间变异系数  $CV \leq 25\%$ 。

专利名称(译)	一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN100370256C</a>	公开(公告)日	2008-02-20
申请号	CN200410046567.9	申请日	2004-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	刘智宏 郭文林 叶妮 黄齐颐 郭筱华		
发明人	刘智宏 郭文林 叶妮 黄齐颐 郭筱华		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/535 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1707266A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒。本发明所提供的检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒，包括包被的二抗、克仑特罗特异性抗体和酶标克仑特罗。本发明的检测克仑特罗的酶联免疫试剂盒对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，尿样离心后可直接检测，检测快速，时间约为1.5小时；标准曲线中有1μg/L这一浓度点，实现了定性与定量一体化；最低检测限达0.1μg/L，该试剂盒与其它β兴奋剂交叉率很低，仅与沙丁胺醇有3.6%的交叉反应，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，可在动物性食品克仑特罗残留检测中发挥重要作用。

$$\text{百分吸光度值} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$