

[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 200510086776.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月17日

[11] 授权公告号 CN 100501410C

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086776.0

[73] 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号
中国农业大学西区动医学院国家兽药安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟
吴小平 冯才茂 汪善良 李军
赵正苗 张照亮 张素霞 史为民
丁双阳 罗晓琴 孙倩

[56] 参考文献

US6274334B1 2001.8.14

莱克多巴胺残留检测方法研究进展. 于洪侠等. 中国兽医杂志, 第38卷第11期. 2004

莱克多巴胺单克隆抗体的研制. 张雨梅等. 扬州大学学报, 第25卷第3期. 2004

猪肝和猪尿中沙丁胺醇和克伦特罗残留的酶联免疫吸附检测法研究. 王建平等. 畜牧兽医学报, 第36卷第4期. 2005

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 向华

权利要求书2页 说明书15页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒, 还提供了使用该试剂盒对预处理的动物源性食品进行莱克多巴胺残留检测的方法。该试剂盒组成为: 包被了莱克多巴胺抗原或抗抗体的酶标板、莱克多巴胺鼠单克隆抗体或多克隆抗体工作液、酶标记的抗抗体或酶标记的莱克多巴胺抗原、莱克多巴胺标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测莱克多巴胺药物的方法, 它包括以下步骤: 首先进行样品前处理, 然后用试剂盒进行检测, 最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

1、一种用于检测动物源性食品中莱克多巴胺的试剂盒，其特征在于它包含下列成分：

- (1) 包被了莱克多巴胺抗原或抗抗体的酶标板；
- (2) 莱克多巴胺抗体；
- (3) 酶标记物；
- (4) 莱克多巴胺标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 浓缩洗涤液；
- (7) 浓缩复溶液；
- (8) 终止液，

其中，所述莱克多巴胺抗原是通过将莱克多巴胺采用氯乙酸钠进行卤代反应，把莱克多巴胺分子上的羟基取代，合成含有2个碳的羧基间隔臂制备成莱克多巴胺的半抗原，再将所述半抗原与载体蛋白偶联获得；所述抗体是通过所述抗原制备获得。

2、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于所述抗体是以羊为免疫动物，以鼠源性抗体或兔源性抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫得到的羊抗鼠抗体或羊抗兔抗体。

3、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于莱克多巴胺抗体为鼠单克隆抗体或兔多克隆抗体。

4、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于酶标记物是酶标记的羊抗鼠抗体、羊抗兔抗体或酶标记的莱克多巴胺抗原，酶标记抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与抗体进行偶联得到的，酶标记抗原是采用混合酸酐法将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶与莱克多巴胺半抗原进行偶联得到。

5、如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于浓缩洗涤液为含有

0.8 ~ 1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为 pH8.0 ~ 8.6、0.1 ~ 0.2 mol/L、含 50%甲醇的磷酸盐缓冲液；当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠。

6、如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：莱克多巴胺抗体的蛋白浓度为 0.5 ~ 5.0 μ g/L。

7、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：莱克多巴胺标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L。

8、一种检测样品中莱克多巴胺残留的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 用权利要求 1 ~ 7 任一所述的试剂盒进行检测；

(3) 分析检测结果。

9、如权利要求 8 所述的方法，其中试剂盒检测为向包被有莱克多巴胺抗原的酶标板微孔中加入标准品或样品溶液，再加入莱克多巴胺抗体，温育后洗涤拍干，加入酶标记抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

10、如权利要求 8 所述的方法，其中试剂盒检测为向包被有抗抗体的酶标板微孔中加入莱克多巴胺抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标记莱克多巴胺抗原和标准品或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫学检测领域，具体地说，提供一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

背景技术

莱克多巴胺（Ractopamine）是一种苯乙醇胺类药物。用于畜牧渔业，它是一种“营养再分配剂”，属于 β 兴奋剂，莱克多巴胺做为“瘦肉精”的替代品效果好，经济回报高，使用普遍；用于医药，它是一种强心药，可用于治疗肥胖症和肌肉萎缩症。但人累计摄入量超过一定值，或实用莱克多巴胺高残留在内脏组织时，出现中毒反应，症状表现为骨骼肌收缩增加，破坏快缩肌纤维与慢缩肌纤维之间的融合，引发肌肉震颤，四肢和面部的肌肉尤为明显，其它中毒症状包括心动过速、心率失常、腹痛、肌肉疼痛、恶心和晕眩等，因此我国禁止使用，我国农业部第176号公告规定莱克多巴胺为禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物。因此，检测莱克多巴胺在动物性食品中的残留量是非常必要的。

目前，常用于莱克多巴胺残留检测的方法主要有微生物法和仪器分析法。微生物检测法虽然经济、操作简便，但在样本中有其他微生物抑制剂存在时，其灵敏度和特异性受到限制；高效液相色谱分析法、气谱、气质联机等单纯的仪器分析方法，虽然灵敏度高，但样本前处理及测定操作烦琐，费用高，不适宜于大量样本筛查，可以作为残留的确证分析。

发明内容

（一）要解决的技术问题

本发明目的在于提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的用于动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒，并提供一种高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量检测方法。

（二）技术方案

本发明所提供的酶联免疫试剂盒包括：

- (1) 包被了莱克多巴胺抗原或抗抗体的酶标板；
- (2) 莱克多巴胺抗体；
- (3) 酶标记物；
- (4) 莱克多巴胺标准品溶液；
- (5) 底物显色液；
- (6) 浓缩洗涤液；
- (7) 浓缩复溶液；
- (8) 终止液。

其中所述的包被了莱克多巴胺抗原的酶标板在制备的过程中，所用的包被原是使用活性酯法(DCC、NHS)将莱克多巴胺与载体蛋白偶联得到的；包被的抗抗体可为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体；所用的包被液是 pH 值 9.6、0.05 ~ 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液，所用的封闭液是含有 3 ~ 10%小牛血清的溶液。

其中所述的莱克多巴胺抗体在制备过程中，所用的免疫原是采用活性酯法(DCC、NHS)将莱克多巴胺与载体蛋白进行偶联得到的，所用的抗体稀释液是 pH 值 8.2、0.05 ~ 0.1mol/L、含有 3 ~ 5%小牛血清的磷酸盐缓冲液。本发明所述试剂盒中莱克多巴胺抗体的蛋白浓度为 0.5 ~ 5.0 μ g/L。

酶标记物为酶标记抗抗体或酶标记莱克多巴胺抗原，酶标记抗抗体为酶标记羊抗鼠抗抗体或酶标记羊抗兔抗抗体，酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的，酶标记莱克多巴胺抗原是采用混合酸酐法将标记酶与莱克多巴胺半抗原进行偶联得到的。所用标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶，本发明优选为辣根过氧化物酶。辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与抗抗体或莱克多巴胺抗原进行偶联，如戊二醛法，过碘酸钠法等，本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良，使其省时、降低辣根过氧化物酶（HRP）与抗抗体或莱克多巴胺抗原的浓度比率，节省了原材料。

其中所述标准溶液的浓度为：0 ~ 40.5 μ g/L，可选择 0 μ g/L、0.5 μ g/L、

1.5 $\mu\text{g/L}$ 、4.5 $\mu\text{g/L}$ 、13.5 $\mu\text{g/L}$ 、40.5 $\mu\text{g/L}$ 。

其中所述的底物显色液是当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液。

其中所述的浓缩洗涤液为含有 0.8~1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液。

其中所述的浓缩复溶液为含 50%甲醇、pH8.0~8.6、0.1~0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

其中所述的终止液为 1~2mol/L 的硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液。

可作为固定莱克多巴胺偶联抗原或抗抗体载体的物质很多，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。

本发明还提供了使用上述试剂盒定性、定量检测动物源性食品中莱克多巴胺残留量的方法，它包括以下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 用试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

优选地，样品处理方法为：

a、猪尿

尿样用 NaOH 溶液调节 pH 至 10~11 后，加入无水 Na_2SO_4 ，再加入乙酸乙酯-丙酮，振荡后离心（或静置分层）。取有机相在氮气流下吹干。用稀释的复溶液溶解。

b、组织

称取组织，先加入无水乙腈，再加入无水 Na_2SO_4 。充分振荡。取上清液，氮气流下吹干。加入缓冲液混合，加入异丁醇和无水 Na_2SO_4 ，振荡萃取，离心，取出上层有机相，氮气流下吹干。用稀释的复溶液溶解即可进行分析。

c、饲料样本

准确称取饲料于离心管中。加入甲醇和乙醇，充分振荡，离心。取上清，氮气流下吹干。加入二氯甲烷，溶解残留物，再加入缓冲液充分混合，离心，取

上层液加入已经稀释了的复溶液，即可进行分析。

优选地，其中试剂盒检测是向包被有莱克多巴胺偶联抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液，再加入莱克多巴胺抗体，温育后洗涤拍干，加入酶标记抗抗体后显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。或者，是向包被有抗抗体的酶标板微孔中加入莱克多巴胺抗体，温育后洗涤拍干，再加入酶标莱克多巴胺抗原和标准品溶液或样品溶液，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

优选地，检测结果分析过程为：用所获得的每个浓度的标准溶液的吸光度平均值（ B ）除以第一个标准溶液（0标准）的吸光度值（ B_0 ）再乘以100%，即百分吸光度值。计算公式为：

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

公式中 B 为标准溶液的平均吸光度值， B_0 为 $0\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。以莱克多巴胺浓度的自然对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y 轴，绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值，相对应每一个样品中莱克多巴胺的浓度则可从标准曲线上读出，根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中莱克多巴胺的浓度范围。

优选地，检测结果的分析也可以采用回归方程法，计算出样品溶液浓度。

优选地，检测结果的分析还可以利用计算机专业软件，此法更便于大量样品的快速分析，整个检测过程只需 1.5 小时可以完成，最低检测限为 $0.5\mu\text{g/L}$ 。

其中，抗原及抗体的制备方法为：

（1）抗原的合成

半抗原的合成：

将莱克多巴胺采用氯乙酸钠合成莱克多巴胺半抗原，采用氯乙酸钠进行卤代反应，把莱克多巴胺分子上的羟基取代，合成含有 2 个碳的羧基间隔臂制备成莱克多巴胺的半抗原。

包被原和免疫原的合成：

将莱克多巴胺半抗原和牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、甲状腺蛋白 (BCG) 等载体蛋白, 分别采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)、混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)、活性酯法(DCC、NHS)进行偶联得到包被原和免疫原。

通常免疫原的纯度要求较高, 免疫原的纯度越高, 制备的抗体特异性越强, 至少要达到 90%以上, 本发明合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 98.5%。

(2) 酶标记抗抗体的制备

将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4:1; 由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点, 这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各分子的桥梁, 降低了酶标记物的酶活性, 使制备的偶联物中混有许多聚合体, 为了解决这个问题, 我们将传统的方法进行了改良, 即:

- 1) 省去了氨基的封闭过程, 因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。
- 2) 降低了辣根过氧化物酶: 抗抗体的摩尔浓度比率至 2:1, 改良后的方法比传统的方法简便, 对酶的活性的损失减少。

(3) 酶标记莱克多巴胺抗原的制备

采用混合酸酐法将辣根过氧化物酶与莱克多巴胺半抗原偶联得到酶标记莱克多巴胺抗原。

(4) 莱克多巴胺单克隆抗体的制备

动物免疫程序: 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物, 以莱克多巴胺与载体蛋白偶联物为免疫原对小鼠进行免疫, 可以得到血液里含有莱克多巴胺特异性抗体的小鼠脾脏。

细胞融合与克隆化: 取免疫 Balb/c 小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液, 筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 得到单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

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℃ 水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

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，7~14 天后腹腔注射杂交瘤细胞，7~10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装，-20℃ 保存。

（5）莱克多巴胺兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以莱克多巴胺与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫，多次免疫后测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

其中所用试剂的配制方法为：

- a. 莱克多巴胺标准溶液：莱克多巴胺系列标准溶液 6 瓶，0 μ g/L, 0.5 μ g/L, 1.5 μ g/L, 4.5 μ g/L, 13.5 μ g/L, 40.5 μ g/L;
- b. 包被缓冲液：pH 9.6, 0.05 ~ 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液；
- c. 封闭液：含 3 ~ 10%小牛血清的溶液；
- d. 浓缩洗涤液：含 0.8 ~ 1.2%吐温 20 的磷酸盐缓冲液（pH7.4 , 0.012mol/L），为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍；
- e. 酶标记物：酶标记抗体或酶标记莱克多巴胺抗原；
- f. 底物显色液 A 液：过氧化氢或过氧化脲；
- g. 底物显色液 B 液：邻苯二胺（OPD）或四甲基联苯胺（TMB）；
- h. 底物显色液对硝基磷酸盐缓冲液：pH 8.1、含有 MgCl₂ 0.01% 100mmol Tris-HCl；
- i. 终止液：1 ~ 2mol/L 硫酸、盐酸或 2mol/L 氢氧化钠缓冲液；
- j. 浓缩复溶液：pH8.0 ~ 8.6、0.1 ~ 0.2 mol/L、含 50%甲醇的磷酸盐缓冲液，为正常使用浓度的 5 ~ 10 倍；
- k. 缓冲液：含 48%无水碳酸钠和 15%氯化钠的去离子水溶液。

其中酶标板的制备方法为：

（1）用包被缓冲液将莱克多巴胺与载体蛋白偶联物稀释，向酶联板微孔中加入抗原稀释液，放入 37℃ 环境进行孵育，再放入 4℃ 环境过夜（得到

的酶联板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37℃孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

(2) 用包被缓冲液将抗抗体稀释, 向酶联板微孔中加入抗抗体稀释液, 放入 37℃环境进行孵育, 放入 4℃环境过夜(得到的酶联板的稳定性好), 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37℃孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

本发明试剂盒的检测原理为:

(1) 将莱克多巴胺抗原吸附于固相载体上, 加入样本或莱克多巴胺标准品溶液并加入莱克多巴胺抗体工作液, 待测样品中残留的莱克多巴胺和固相载体上包被的莱克多巴胺抗原竞争莱克多巴胺抗体, 再加入酶标记抗抗体进行酶活性的放大作用, 显色后终止, 测定样品的吸光度值, 该值与样品中莱克多巴胺残留量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出莱克多巴胺浓度范围。

(2) 将抗抗体吸附于固相载体上, 加入莱克多巴胺特异性抗体工作液, 再加入酶标记莱克多巴胺抗原并加入样本或莱克多巴胺标准品溶液, 待测样品中残留的莱克多巴胺与酶标记莱克多巴胺抗原竞争莱克多巴胺抗体, 显色后终止, 测定样品的吸光度值, 该值与样品中莱克多巴胺残留量呈负相关, 与标准曲线比较即可得出莱克多巴胺浓度范围。

(三) 有益效果

本发明检测莱克多巴胺的试剂盒主要采用间接竞争酶联免疫测定方法定性或定量检测猪肉、尿样、饲料等样品中莱克多巴胺的残留量; 对样品的前处理要求低, 样品前处理过程简单, 能同时快速检测大批样品。

本发明该试剂盒采用高特异性的莱克多巴胺单克隆抗体或多克隆抗体, 主要试剂以工作液形式提供, 可以减少试剂盒的操作步骤, 为使用者节省时间并降低因操作步骤冗繁造成的误差, 本发明具有灵敏度高、特异性强、高精度、高准确度、对仪器设备要求低、试剂保存时间长、自动化程度高、无放射性同位素污染的等优点, 可在动物性食品莱克多巴胺残留检测中发挥重要作用。

附图说明

图1 莱克多巴胺检测标准曲线图。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1 试剂盒组分的制备

1、抗原的合成

a. 取莱克多巴胺半抗原 2 g 溶于 20ml, 0.5M 的氢氧化钠溶液中。

b. 取 2 g 氮羟基琥珀酰甲胺溶于 8ml 纯水并加到莱克多巴胺半抗原溶液中，室温搅拌反应 2.5 小时。

c. 取人血清白蛋白(HSA)或甲状腺蛋白(BCG)载体蛋白 22g 溶于 75ml pH9 碳酸盐缓冲液中。

d. 将载体蛋白滴加到半抗原溶液中 4℃搅拌过夜。

e. 将合成的人工抗原用 0.2M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3~4 次。最后将抗原浓缩保存或冻干保存得到莱克多巴胺免疫原和包被原。

通常免疫原的纯度要求较高，免疫原的纯度越高，制备的抗体特异性越强，至少要达到 90%以上，本发明合成的免疫原采用免疫电泳测定其纯度为 98.5%。

2、酶标记抗抗体的制备

将抗抗体与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联，采用的方法是改良的过碘酸钠法，方法如下：

a. 8mg 辣根过氧化物酶溶解于 2mL 蒸馏水中。

b. 加入现配制的 100mmol/L NaIO₄ 溶液 0.4mL，室温搅拌反应 20 分钟。

c. 用 1mmol/L 醋酸盐缓冲液于 4℃透析过夜，除去多余的 NaIO₄，同时使自身偶联的酶还原。

d. 加入 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH8.6) 40μl 和含有 16mg IgG 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.6、5mol/L) 2.0mL，室温搅拌反应 4 小时。

e. 加入现配制的 NaBH₄ 水溶液 (1mol/L) 0.1mL，4℃反应 4 小时，以还

原 Schiff 碱。

f. 纯化保存。

3、莱克多巴胺鼠单克隆抗体制备

动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以莱克多巴胺与人血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 $80\mu\text{g}$ /只，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，四免后腹腔加强免疫一次，3 天后取脾细胞。

细胞融合与克隆化：取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞，按 5: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合，采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液，筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

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 5×10^6 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。

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，10 天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只，10 天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化，小瓶分装， -20°C 保存。

4、莱克多巴胺兔多克隆抗体的制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以莱克多巴胺与人血清白蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 $1\text{mg}/\text{kg}$ ，首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 3~4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

5、酶标板的制备

用包被缓冲液将莱克多巴胺与甲状腺蛋白偶联物稀释成 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔加入 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 温育 2h，放入 4°C 环境过夜（得到的酶联板的稳定性好），

倾去包被液，用洗涤液洗涤2次，每次1min，拍干，然后在每孔中加入150 μ l封闭液，37 $^{\circ}$ C温育2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例2 检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被莱克多巴胺抗原的酶标板；
- (2) 蛋白浓度为0.5 μ g/L的莱克多巴胺鼠单克隆抗体；
- (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体；
- (4) 莱克多巴胺标准品溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L；
- (5) 底物显色液A液为过氧化氢，底物显色液B液为邻苯二胺；
- (6) 浓缩洗涤液为含0.8%吐温20的磷酸盐缓冲液；
- (7) 复溶液为含50%甲醇、pH8.0、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液；
- (8) 终止液为1mol/L的硫酸溶液。

实施例3 检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒，使其包含下述组分：

- (1) 包被羊抗鼠抗抗体的酶标板；
- (2) 蛋白浓度为5.0 μ g/L的莱克多巴胺单克隆抗体；
- (3) 用碱性磷酸酯酶标记的莱克多巴胺；
- (4) 莱克多巴胺标准品溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L、0.5 μ g/L、1.5 μ g/L、4.5 μ g/L、13.5 μ g/L、40.5 μ g/L；
- (5) 底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液；
- (6) 浓缩洗涤液为含1.2%吐温20的磷酸盐缓冲液；
- (7) 复溶液为含50%甲醇、pH8.6、0.2mol/L的磷酸盐缓冲液；
- (8) 终止液为2mol/L的氢氧化钠溶液。

实施例 4 样品中莱克多巴胺残留的检测

1、样品前处理

a、猪尿

1ml 尿样用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 10 后,加入 1g 无水 Na_2SO_4 ,再加 3ml 乙酸乙酯-丙酮 (V/V =3: 1), 振荡后 3000rpm、15℃ 以上离心 5min (或静置分层)。取 1.5ml 有机相在氮气流下吹干。用 1ml 已稀释了的复溶液溶解,取 50 μl 进行分析。

b、组织

称取组织 3g \pm 0.1g, 先加入无水乙腈 9ml 再加入 2g 无水 Na_2SO_4 。充分振荡 10min。取上清液 4ml, 氮气流下吹干。加入 1ml 正己烷振荡溶解, 再加入用 1ml 已稀释了的复溶液混合振荡 1 min, 3000g 以上离心 5min, 去掉上层有机相。取样本提取液 100 μl +100 μl 复溶稀释液后, 取 50 μl 进行分析。

c、饲料样本

准确称取 2.0 \pm 0.1g 饲料于 40ml 离心管中。加入 10ml 甲醇:乙醇 (V/V =1:1), 充分振荡 10min, 4000rpm 离心 10min。取上清 2ml, 氮气吹干。加入 1ml 二氯甲烷, 溶解残留物, 再加入 1ml 复溶液, 充分混合 5min, 10000rpm 离心 10min, 取上层液, 用复溶液稀释后取 50 μl 进行分析。

2、用试剂盒进行检测

向莱克多巴胺与甲状腺蛋白偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准品或样品溶液 50 μl , 再加入抗体工作液 50 μl , 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体, 每孔加入 250 μl 稀释了的洗涤液 (pH7.4、0.01M、含 0.8%吐温的磷酸盐缓冲液), 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。每孔加入酶标记抗抗体 100 μl 用盖板膜封板, 37℃ 恒温箱中反应 30min。底物显色液 A 液 (过氧化氢) 50 μl , 再加 B 液 (邻苯二胺) 50 μl , 轻轻振荡混匀, 37℃ 恒温箱避光显色 15~30min。每孔加入终止液 (2mol/L 硫酸) 50 μl , 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值 (OD 值)。

结果分析:

计算百分吸光度值并绘制标准曲线, 相对应每一个样品中莱克多巴胺的

浓度可以从标准曲线上读出。也可以用回归方程法，计算出在样本中莱克多巴胺的残留量。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分析。

根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的标准溶液颜色的比较可判断样品中莱克多巴胺的浓度范围。

实验例 1 试剂盒精密度试验

1、标准可重复性试验

从每批按照实施例 2 (3) 中的方法制备的酶联板中，各抽出 10 个微孔，测定 4.5 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值 (OD 值)，重复 3 次，计算变异系数 CV%，结果见表 1。

表1 标准可重复性试验

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01批	5.6	4.9	6.2	6.3	6.5	6.1	7.5	6.1	6.3	6.6
	03批	5.8	7.3	5.6	5.6	5.1	6.3	5.1	4.6	5.5	8.1
	06批	5.6	5.4	6.2	6.6	5.9	7.2	6.0	6.2	5.8	5.7

结果表明变异系数范围在 4.6~8.1% 之间，符合了变异系数小于 20% 的规定，说明本试剂盒标准品精密度达到了《农业部文件》农医发[2005]17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第 4 点精密度和准确度的精密度标准。

2、样本可重复性试验

以 2.5 $\mu\text{g/kg}$ 浓度的莱克多巴胺对尿液和猪肉进行添加，以 100 $\mu\text{g/kg}$ 浓度的莱克多巴胺对饲料进行添加，添加到样品中，分别取三个不同批次的试剂盒各五个，每个浓度重复 5 次，分别计算变异系数，结果见表 2~4。

表2 尿液样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	2	2.3	2	2.2	2.3	7.0
	1.8	1.6	1.5	1.5	1.7	8.1
	1.8	1.8	1.7	1.9	2	6.2

03	2.1	2.6	2.3	2.2	2.3	8.1
	1.8	1.6	1.5	1.7	1.7	6.9
	1.5	1.6	1.9	1.8	1.9	10.4
06	1.9	1.6	1.6	1.8	1.8	7.7
	1.9	1.4	1.8	1.7	1.8	11.2
	2.2	2	2.1	2.2	2.2	4.2

表3 猪肉样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	1.8	1.7	1.7	1.9	1.6	6.6
	1.7	1.6	1.6	1.5	1.4	7.3
	1.6	1.6	1.7	1.6	1.8	5.4
03	1.7	1.7	2.0	1.8	1.9	7.2
	1.6	1.9	1.9	2.1	1.9	9.5
	1.6	2	1.7	1.8	1.7	8.6
06	1.8	1.9	1.6	1.6	1.5	9.8
	1.9	2.0	1.7	1.9	1.8	6.1
	1.7	1.8	1.8	1.9	2.0	6.2

表4 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					变异系数CV%
01	76.5	72.3	86.5	70.4	68.4	9.6
	73.4	60.4	71.5	72.3	77.1	8.8
	73.5	64.8	76.4	67.2	75.1	7.2
03	78.5	68.5	78.4	65.7	75.6	8.0
	76.4	60.4	83.5	64.4	89.5	16.5
	79.5	68.5	83.4	64.2	86.4	12.6
06	73.4	54.3	79.5	60.4	89.4	19.9
	76.5	58.4	82.5	62.3	76.5	14.5
	86.4	60.2	72.5	63.4	86.4	16.8

结果表明尿样本变异系数均低于 15%，猪肉样本的变异系数均低于 10%，饲料样本的变异系数均小于 20%，符合了变异系数小于 20%的《农业部文件》农医发[2005]17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第 4 点精密度和准确度的精密度规定。

实验例 2 试剂盒的准确度试验

取两个浓度的莱克多巴胺标样，对样品进行添加回收试验，每个浓度做 4 个平行，分别计算回收率，结果见表 5。

表5 准确度测定试验

样本		猪肉		猪肝	
添加浓度 (μg/kg)		2	10	2	10
回收率%	1	76.5	65.8	89.8	82.9
	2	80.3	73.2	87.2	78.5
	3	75.6	79.5	71.6	72.6
	4	68.9	62.4	80.4	86.5
平均值		75.3	70.2	79.9	80.1
CV%		6.3	10.9	9.4	7.5
样本		尿液		饲料	
添加浓度 (μg/kg)		2	10	100	200
回收率%	79.8	75.8	69.8	82.7	82.7
	87.2	73.2	77.1	75.5	75.5
	90.6	81.5	71.2	72.7	72.7
	85.4	72.4	70.5	86.1	86.1
平均值		85.7	75.7	79.4	81.5
CV%		5.3	5.43	9.4	7.5

结果表明猪肉，猪肝添加的回收率在 62.4~89.8%之间，尿液添加回收率在 72.4~90.6%之间，饲料中添加回收率在 69.8~86.1%之间。

实验例 3 试剂盒保存期试验

试剂盒保存条件为 2~8℃，经过 6 个月的测定，试剂盒的最大吸光度值

(零标准)、50%抑制浓度、莱克多巴胺添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37℃保存的条件下放置6天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20℃冰箱冷冻5天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8℃保存6个月以上。

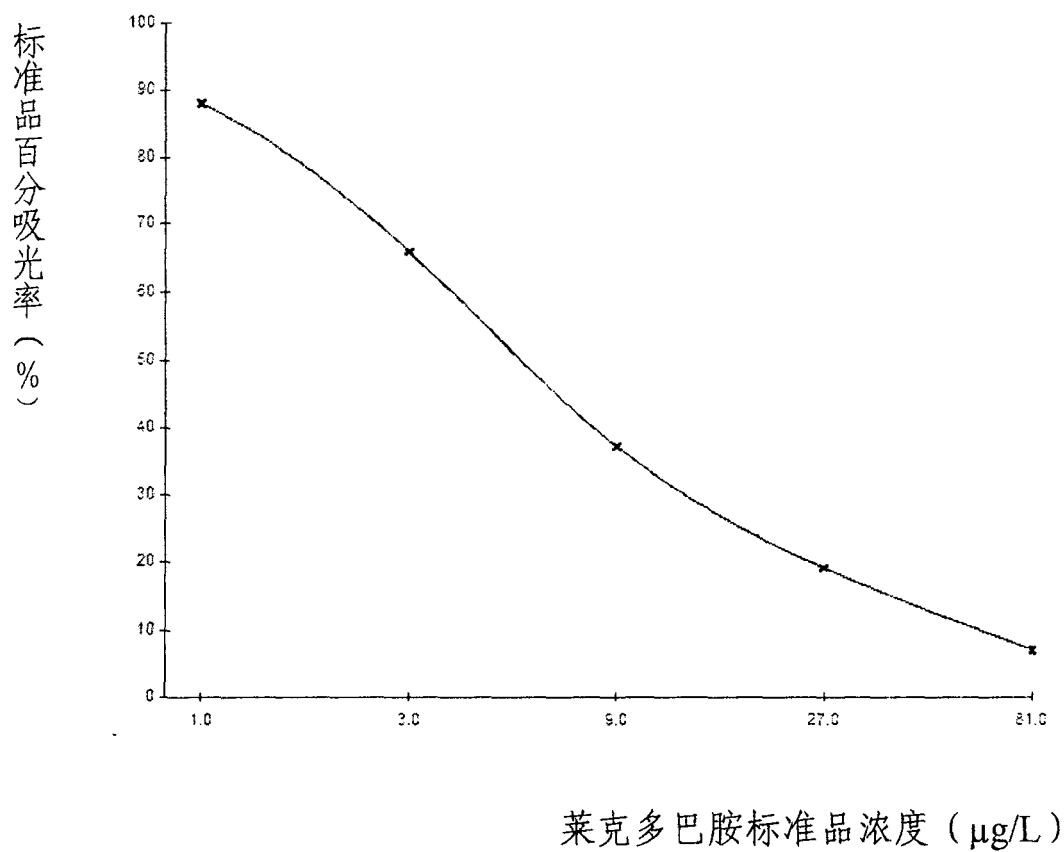


图 1

专利名称(译)	一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN100501410C	公开(公告)日	2009-06-17
申请号	CN200510086776.0	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 张素霞 史为民 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 万宇平 冯才伟 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 张素霞 史为民 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN1766630A		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明公开了一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒，还提供了使用该试剂盒对预处理的动物源性食品进行莱克多巴胺残留检测的方法。该试剂盒组成为：包被了莱克多巴胺抗原或抗体的酶标板、莱克多巴胺鼠单克隆抗体或多克隆抗体工作液、酶标记的抗抗体或酶标记的莱克多巴胺抗原、莱克多巴胺标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测莱克多巴胺药物的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的检测动物组织中莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒及检测方法操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本筛查。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01批	5.6	4.9	6.2	6.3	6.5	6.1	7.5	6.1	6.3	6.6
	03批	5.8	7.3	5.6	5.6	5.1	6.3	5.1	4.6	5.5	8.1
	06批	5.6	5.4	6.2	6.6	5.9	7.2	6.0	6.2	5.8	5.7