

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810028632.3

[43] 公开日 2008年10月22日

[11] 公开号 CN 101290315A

[22] 申请日 2008.6.6

[21] 申请号 200810028632.3

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山 483 号

[72] 发明人 孙远明 杨金易 王 弘 雷红涛
沈玉栋 潘 科 肖治理 柳春红
梁 燕 刘细霞

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 林丽明 任重

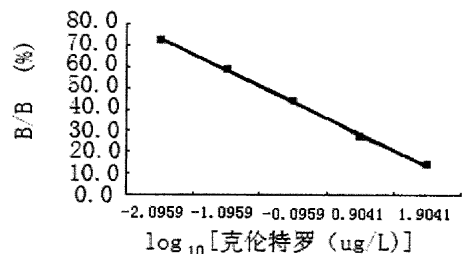
权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种克伦特罗的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种克伦特罗的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法。检测方法包括将克伦特罗抗原包被于固相载体上、加入标样或待测样品，再加入克伦特罗双功能基因工程抗体，反应后加入底物液进行显色，测定百分吸光度、根据克伦特罗的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克伦特罗的浓度等步骤；本发明同时公开了实现所述检测方法的试剂盒及试剂盒的制备方法。本发明采用克伦特罗双功能基因工程抗体与直接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，且降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。



1、一种克伦特罗的酶联免疫检测方法，其特征在于包括以下步骤：

- (1) 将克伦特罗抗原包被于固相载体上；
- (2) 加入标样或待测样品，再加入克伦特罗双功能基因工程抗体，反应后加入底物液进行显色，测定百分吸光度；
- (3) 根据百分吸光度值与克伦特罗浓度之间的半对数关系作图得标准曲线，根据克伦特罗的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克伦特罗的浓度。

2、根据权利要求 1 所述克伦特罗的酶联免疫检测方法，其特征在于步骤 (1) 所述固相载体为 96 孔或 40 孔聚苯乙烯酶标板，包被有能与克伦特罗双功能基因工程抗体特异结合的克伦特罗抗原，并封闭微孔表面未吸附位点；所述克伦特罗双功能基因工程抗体为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶克伦特罗双功能基因工程抗体，基因工程抗体为 Fab、Fv、ScFv 或单域抗体。

3、一种实现权利要求 1 所述克伦特罗的酶联免疫检测方法的试剂盒，其特征在于包含下列成分：

- (1) 试剂盒箱体；
- (2) 包被克伦特罗抗原的酶标板，1 块；
- (3) 克伦特罗双功能基因工程抗体工作液，1 瓶；
- (4) 克伦特罗标准品溶液，共 6 瓶；
- (5) 底物液，1 瓶；

- (6) 底物缓冲液, 1 瓶;
- (7) 终止液, 1 瓶;
- (8) 浓缩洗涤液, 1 瓶;
- (9) 使用说明书, 1 份;
- (10) 盖板膜, 2 张;
- (11) 含干燥剂的自封袋, 1 个。

4、根据权利要求 3 所述的试剂盒, 其特征在于当酶为辣根过氧化物酶时, 所述底物液为含有 3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液、所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液、所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液; 当酶为碱性磷酸酯酶时, 底物液为 pH9.8 的 4-硝基酚磷酸钠盐二乙醇胺溶液、终止液为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

5、根据权利要求 3 所述的试剂盒, 其特征在于所述 6 瓶克伦特罗标准品溶液浓度分别为 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L 和 8.1 μ g/L; 所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液, 磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.4, 浓度为 0.1mol/L; 所述克伦特罗双功能基因工程抗体工作液体积为 7mL; 克伦特罗标准品溶液 1mL/瓶; 底物液体积为 7mL; 底物缓冲液体积为 7mL; 终止液体积为 7mL; 浓缩洗涤液体积为 50mL。

6、根据权利要求 3 所述的试剂盒, 其特征在于所述盒体为硬纸盒; 酶标板是 96 孔的聚苯乙烯酶标板, 放于铝铂袋内; 盖板膜是不透明塑料贴纸; 标准溶液、克伦特罗双功能基因工程抗体、底物液、

底物缓冲液、终止液和浓缩洗涤液采用不同颜色盖的透明塑料瓶分装；盒内设有内垫，内垫为塑料泡沫材料制成，设有下凹瓶位。

7、一种权利要求 3 所述试剂盒的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

- (1) 制备克伦特罗基因工程抗体；
- (2) 制备酶标板；
- (3) 按照要求配制所需溶液并分装；
- (4) 组装试剂盒。

8、根据权利要求 7 所述制备方法，其特征在于步骤（1）所述制备克伦特罗基因工程抗体包括以下步骤：

(a) 提取克伦特罗单克隆细胞或经克伦特罗免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链与连接肽的扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因并将其连接起来，将其插入适当的表达质粒，在大肠杆菌中表达，利用免疫亲和方法进行纯化；

(b) 以重组噬菌体阳性克隆质粒为模板，PCR 扩增抗克伦特罗基因工程抗体片段；经酶切，纯化，亚克隆到携带辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 AP 基因的载体 pPhoA(+), 转化大肠杆菌，抗性筛选，获得重组大肠杆菌阳性克隆；诱导双功能基因抗体表达，得到克伦特罗双功能基因工程抗体。

9、根据权利要求 8 所述制备方法，其特征在于所述扩增引物为：

V_H(Back):5'-TTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCCAGGTS

MARCTGCAGSAGTCWGG-3’;

V_H(For):5’-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGTCCACCTG
AGGAGACGGTGAC CGTGGTGCC-3’;

V_L(Back):5’-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCG
GACATTGAG CTC ACC CAG TCTCCA-3’;

V_L(For):5’-GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCAGCT
TGGTCCC-3’;

R₁: 5’-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3’;

R₂: 5’-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC-3’;

其中引物 V_H(Back)含 Sfi I 酶切位点, V_H(For)含(Gly₄Ser)₃ 连接肽部分序列; V_L(For)含 Not I 酶切位点, V_L(Back)含(Gly₄Ser)₃ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 V_H(For)部分序列相重叠; R₁, R₂ 为载体特异性引物, 用于插入片段的 PCR 鉴定。

10、根据权利要求 7 所述制备方法, 其特征在于步骤 (2) 所述制备酶标板的方法是用包被缓冲液将克伦特罗抗原按需要稀释, 向酶标板微孔中加入抗原稀释液, 放入 37℃ 环境进行孵育, 再放入 4℃ 环境中过夜孵育; 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 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。

一种克伦特罗的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明属于检测技术领域，具体涉及一种动物源性食品中克伦特罗残留的双功能基因工程抗体免疫检测方法及实现所述检测方法的试剂盒和试剂盒的制备方法。

背景技术

克伦特罗(Clenbuterol, CBL), 属于 β 2-肾上腺素能激动剂(BAA)的一种, 属儿茶酚胺类(肾上腺素和去甲肾上腺素)物质。早在 70 年代初期, 儿茶酚胺类物质及其类似物改善机体营养调配和胴体组成的能力, 就由美国氰胺公司研究部所认识。随后便大规模用于畜禽生产以提高瘦肉率, 减少脂肪沉积, 及增加产奶量等。其中, 克伦特罗、莱克多巴胺等因其口服效率高在生产中使用最为广泛。

近年来, 克伦特罗被大量添加到饲料中以提高脂肪型动物的瘦肉率和加速动物生长, 但因其添加剂量较大, 在动物体内高残留而给消费者带来危害。例如: 1989 年, 西班牙中部发生 135 人因食用含 β 2-肾上腺素能激动剂残留的牛肝而集体中毒的事件; 1990—1991 年, 法国里昂地区有 8 个家庭因食用残留 β 2-肾上腺素能激动剂的牛肝而集体中毒; 1996 年, 仅意大利就发生 62 起因食用残留有 β 2-肾上腺素能激动剂的牛肉和牛肝而集体中毒的事件; 中毒症状有肌肉震颤、心悸、神经过敏、头痛、肌肉痛、目眩、恶心、呕吐、发烧、战栗等, 且有心脏病史的人对食物残留 β 2-肾上腺素能激动剂更为敏感(尹靖

东等, 1998)。因此, 欧盟采取了严密的措施, 通过一系列法规条例严格控制克伦特罗的非法使用。

目前, 许多国家已经对克伦特罗提出了最高残留限量, 如英国在动物可食性组织的最大残留为 0.5ng/g, 荷兰规定肝组织最大残留量为 1ng/g (G.A.Mitchell, et al, 1998)。我国农业部 1997 年 3 月[农牧发(1997) 13 号文]严令禁止 β 2-肾上腺素能激动剂在动物生产中应用, 最高残留限量规定为 1ng/g (肝组织) 或 1ng/mL (尿液)。

虽然, 国家将 β 2-肾上腺素能激动剂列为严重危害人民身体健康的违禁药品, 禁止生产和使用, 但是非法使用现象仍较严重, 因食用含有 β 2-肾上腺素能激动剂的肉类、动物内脏而引发中毒的事件时有发生, 例如: 2001 年, 连续发生了广东河源、广东信宜、浙江、上海等地十几起上百人集体中毒的事件。因此, 建立准确、灵敏、快速、简便的检测方法对及时、有效的监测克伦特罗的非法使用具有巨大的意义。

通常, 检测克伦特罗的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC), 气相色谱-质谱法 (GC-MS), 毛细管区带电泳法 (CE) 和免疫分析技术 (IA) 等等。HPLC 法与 GC-MS 法是克伦特罗残留检测的确证方法, 其优点是检测精确度高, 但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等而阻碍其推广应用, 而酶联免疫分析 (ELISA) 快速检测技术因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低, 现已成为常用的筛选方法。

酶联免疫分析技术的基本原理就是利用酶标记的抗原或抗体之

间的反应，通过酶作用底物的显色以对抗体或抗原进行分析。显然，在对抗原分子检测时，抗体本身以及酶标抗体的质量是保证该检测手段实施的关键。在以往对CBL的免疫法检测中，采用的是多克隆抗体或单克隆抗体。多抗较易获得但特异性不高，有研究者已报道抗CBL多克隆抗体中因存在不同IgG亚型，从而对CBL及载体蛋白BSA表现出不同的绑定能力。而单克隆抗体则不存在该问题，但值得注意的是，采用杂交瘤细胞培养进行单克隆抗体（McAb）周期长、产量低（产量平均只有10~100mg/L）。另外，无论是多克隆抗体还是单克隆抗体，在采用酶联免疫分析时都要对其进行酶的体外标记过程，将不可避免地存在以下缺点：1）化学共价交联过程对酶和抗体造成一定的变性，从而影响活性；2）酶标抗体批次产物的不均一性导致在使用前需对其进行校正；3）酶与抗体偶联前后产物都需要进行纯化，步骤繁琐。近年来，我国加大了对克伦特罗非法使用的打击力度，把其作为动物屠宰前后的必检项目，但我国自行生产的ELISA试剂盒在灵敏度及数量上都无法满足实际需要，仅深圳市每年进口克伦特罗ELISA试剂盒一项费用达几百万元。由于试剂盒价格高，每个样品检测成本在几十元以上。因此，建立有效、实际的抗体及酶标抗体获得方法是进一步实现CBL快速检测需要解决的核心问题。

重组抗体技术引发了免疫检测技术的革命，尤其是噬菌体表面呈现技术的出现，使获得具有理想抗原亲和性及特异性的基因工程抗体成为可能。其优点在于能够将全套抗体可变区基因组装到表达载体内形成噬菌体抗体库，通过“吸附-洗脱-扩增”的富集过程，极为有效

地从噬菌体抗体库中筛选出特异性抗体的可变区基因，便于进一步的基因操作。基于此的双功能基因工程抗体，就是指在DNA水平上把一种抗体片段的基因与其他功能分子如酶等的基因片段通过重组进行融合表达的抗体分子复合蛋白。该抗体不仅具有基因工程抗体分子量小，特异性高的特点，而且保持了酶特异性结合底物的活性；更值得注意的是，双功能基因工程抗体能够在各种表达系统中表达，并且可通过基因工程技术进行大量生产，对培养基无特殊要求，发酵密度高、发酵周期短、操作简便，整体费用较低，这就为双功能基因工程抗体在各相关领域中的实际应用从根本上提供了保障。

本申请人在申请号为 200610036447.X 的专利申请中公开了一种检测克伦特罗酶联免疫试剂盒及其检测方法与检测前动物组织的制样方法，但并没有实现利用其双功能基因工程抗体免疫进行残留检测，现有技术中也没有见到相关报道。本申请人期望利用噬菌体表面呈现技术获得抗克伦特罗抗体基因，通过重组构建抗克伦特罗双功能基因工程抗体表达载体，采用分子生物学、细胞生物学与生物分离相结合的方法，实现抗克伦特罗双功能基因工程抗体在大肠杆菌中的高效表达及分离纯化，并将其替代体外酶标多克隆/单克隆抗体用于酶免疫法分析克伦特罗。这是将酶免疫检测技术进一步应用于小分子农、兽药残留的快速检测的一种新途径，对我国建立有效、实际的克伦特罗快速检测、加大对克伦特罗非法使用的打击力度有着重要的意义。

发明内容

本发明的一个目的是针对现有克伦特罗检测技术的不足，提供一种高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单，能大批量快速检测克伦特罗的双功能基因工程抗体免疫检测方法。

本发明的另一个目的是提供实现所述检测方法的试剂盒以及所述试剂盒的制备方法。

本发明的目的通过以下技术方案来予以实现：

提供一种克伦特罗的双功能基因工程抗体免疫检测方法，包括以下步骤：

- (1) 将克伦特罗抗原包被于固相载体上；
- (2) 加入标样或待测样品，再加入克伦特罗双功能基因工程抗体，反应后加入底物液进行显色，测定百分吸光度；
- (3) 根据百分吸光度值与克伦特罗浓度之间的半对数关系作图得标准曲线，根据克伦特罗的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克伦特罗的浓度。

本发明测定原理如下：首先将克伦特罗抗原包被于固相载体（例如酶标板）上，然后加入标样或待测样品，再加入克伦特罗双功能基因工程抗体，采用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶基因工程抗体，包被抗原与待测样品中的克伦特罗竞争双功能基因工程抗体，待测样品克伦特罗含量高时，则与固相抗原结合的双功能基因工程抗体就少，反之结合在固相抗原上的双功能基因工程抗体就多，反应后加入底物进行显色加以测定，当双功能基因工程抗体量一定时，加入的待测样品含克伦特罗越多，与固相抗原结合的双功能基因工程抗体就越少，发

色反应减弱，百分吸光度值低，反之，则发色反应增强，百分吸光度增高，因而根据百分吸光度值与克伦特罗浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线，再根据克伦特罗的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，即可推算出待测样品中克伦特罗的浓度。

可以作为步骤（1）所述固相载体的物质较多，例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等，该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。本发明优选的固相载体为 96 孔或 40 孔聚苯乙烯酶标板，酶标板包被有能与克伦特罗双功能基因工程抗体特异结合的克伦特罗抗原，并封闭微孔表面未吸附位点；所用的包被液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液，碳酸盐缓冲溶液含 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠，双蒸水 1L，封闭液为 1~5% 脱脂奶粉溶液。所述克伦特罗双功能基因工程抗体是利用基因工程方法制备辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶克伦特罗基因工程抗体，抗体可为 Fab（由完整的轻链和 Fd 构成）、Fv（由 VH 和 VL 构成），ScFv（单链抗体，VH 和 VL 之间由一条连接肽连接而成）、单域抗体（仅由 VH 组成），大量表达，收集发酵液，用亲和层析方法进行纯化。

本发明同时提供一种实现所述克伦特罗的双功能基因工程抗体免疫检测方法的试剂盒，包含下列成分：

- （1）试剂盒盒体；
- （2）包被克伦特罗抗原的酶标板，1 块；
- （3）克伦特罗双功能基因工程抗体工作液，1 瓶；

- (4) 克伦特罗标准品溶液，共 6 瓶；
- (5) 底物液，1 瓶；
- (6) 底物缓冲液，1 瓶；
- (7) 终止液，1 瓶；
- (8) 浓缩洗涤液，1 瓶；
- (9) 使用说明书，1 份；
- (10) 盖板膜，2 张；
- (11) 含干燥剂的自封袋，1 个。

当酶为辣根过氧化物酶时，所述底物液为含有 3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液、所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液、所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液；当酶为碱性磷酸酯酶时，底物液为 pH9.8 的 4-硝基酚磷酸钠盐（PNPP）二乙醇胺溶液，终止液为 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

所述 6 瓶克伦特罗标准品溶液浓度分别为 0 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.9 $\mu\text{g/L}$ 、2.7 $\mu\text{g/L}$ 和 8.1 $\mu\text{g/L}$ ；所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.4，浓度为 0.1mol/L，为现有常规方法使用浓度的 15~25 倍；所述克伦特罗双功能基因工程抗体工作液体积为 7mL；克伦特罗标准品溶液 1mL/瓶；底物液体积为 7mL；底物缓冲液体积为 7mL；终止液体积为 7mL；浓缩洗涤液体积为 50mL。

所述盒体为硬纸盒；酶标板是 96 孔的聚苯乙烯酶标板，放于铝

铂袋内；盖板膜是不透明塑料贴纸；标准溶液、克伦特罗双功能基因工程抗体、底物液、底物缓冲液、终止液和浓缩洗涤液采用不同颜色盖的透明塑料瓶分装，例如标准溶液均用红色盖的透明塑料瓶，克伦特罗双功能基因工程抗体用绿色盖的透明塑料瓶，底物液用黑色盖透明塑料瓶，底物缓冲液用白色盖透明塑料瓶，终止液用黄色盖透明塑料瓶，浓缩洗涤液用白色透明盖透明塑料瓶；盒内设有内垫，内垫为塑料泡沫材料制成，设有下凹瓶位。

本发明所述试剂盒的制备方法包括以下步骤：

- (1) 制备克伦特罗基因工程抗体；
- (2) 制备酶标板；
- (3) 按照要求配制所需溶液并分装；
- (4) 组装试剂盒。

步骤(1)所述制备克伦特罗基因工程抗体包括以下步骤：

(a) 提取克伦特罗单克隆细胞或经克伦特罗免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA，反转录为 cDNA，设计抗体轻重链与连接肽的扩增引物，利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因并将其连接起来，将其插入适当的表达质粒，在大肠杆菌中表达，利用免疫亲和方法进行纯化，纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定；

(b) 以重组噬菌体阳性克隆质粒为模板，PCR 扩增抗克伦特罗基因工程抗体片段；经酶切，纯化，亚克隆到携带辣根过氧化物酶 HRP 或碱性磷酸酶 AP 基因的载体 pPhoA(+), 转化大肠杆菌，抗性筛选，获得重组大肠杆菌阳性克隆；诱导双功能基因抗体的表达；优

化表达条件、高效表达沙丁胺醇双功能基因工程抗体。

得到克伦特罗双功能基因工程抗体。

所述扩增引物为：

$V_H(\text{Back}):5'-\text{TTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCCAGGTS}$
 $\text{MARCTGCAGSAGTCWGG}-3'$;

$V_H(\text{For}):5'-\text{GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGTCCACCTG}$
 $\text{AGGAGACGGTGAC CGTGGTGCC}-3'$;

$V_L(\text{Back}):5'-\text{TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCG}$
 $\text{GACATTGAG CTC ACC CAG TCTCCA}-3'$;

$V_L(\text{For}):5'-\text{GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCAGCT}$
 $\text{TGGTCCC}-3'$;

$R_1: 5'-\text{CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC}-3'$;

$R_2: 5'-\text{CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC}-3'$;

其中引物 $V_H(\text{Back})$ 含 Sfi I 酶切位点, $V_H(\text{For})$ 含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽部分序列; $V_L(\text{For})$ 含 Not I 酶切位点, $V_L(\text{Back})$ 含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 $V_H(\text{For})$ 部分序列相重叠; R_1 , R_2 为载体特异性引物, 用于插入片段的 PCR 鉴定。

步骤 (2) 所述制备酶标板的方法是用包被缓冲液将克伦特罗抗原按需要稀释, 向酶标板微孔中加入抗原稀释液, 放入 37℃ 环境进行孵育, 再放入 4℃ 环境中过夜孵育; 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 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。

本发明试剂盒最低检测限为 0.1ng/mL，回收率为 95±15%，批内变异系数小于 10%，同莱克多巴胺、沙丁胺醇、马布特罗、特普他林、肾上腺素、去甲肾上腺素等结构类似物的交叉反应均小于 0.01%，试剂盒可以在 2~8℃ 保存 12 个月。

本发明的有益效果是：

(1) 本发明提供了将酶免疫检测技术进一步应用于克伦特罗残留的快速检测的新方法，避免传统化学共价交联过程对酶和抗体造成的变性，可以很好保持两者的活性；避免了酶标抗体批次产物的不均一性导致的批间差异；减少了酶与抗体偶联前后产物纯化的步骤从而减少了检测成本；

(2) 双功能基因工程抗体能够在各种表达系统中表达，并且可通过基因工程技术进行大量生产，对培养基无特殊要求，发酵密度高、发酵周期短，可降低制造成本；

(3) 本发明提供的试剂盒采用直接竞争 ELISA 检测模式，减少了操作步骤，提高了检测的灵敏度、准确度；采用包被抗原进行酶标板的包被，相对于抗体包被，更有利于达到较好的包被效果与较长的保存时间，从而提高了试剂盒检测的精密度、准确度与稳定性。

基于以上优点本试剂盒非常适用于克伦特罗残留的痕量分析与批量检测，具有重要的现实意义。

附图说明

图 1 为标准曲线

图 2 为试剂盒的直观示意图

图 3 为酶标板外观示意图

图 4 为酶标板

图 5 为试剂瓶示意图

图 6 为试剂盒包装材料

图 7 试剂盒附件

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例来进一步详细说明本发明。

实施例 1 克伦特罗双功能基因工程抗体的制备

设计简并引物：

$V_H(\text{Back}):5' \text{-TTACTCGCGGCCAGCCGCCATGGCCCAGGTS}$
 $\text{MARCTGCAGSAGTCWGG-3}'$

$V_H(\text{For}):5' \text{-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGTCCACCTG}$
 $\text{AGGAGACGGTGAC CGTGGTGCC-3}'$

$V_L(\text{Back}):5' \text{-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGGGATCG}$
 $\text{GACATTGAG CTC ACC CAG TCTCCA-3}'$

$V_L(\text{For}):5' \text{-GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTTATTTCAGCT}$
 $\text{TGGTCCC-3}'$

$R_1: 5' \text{-CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3}'$

$R_2: 5' \text{-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC-3}'$

其中引物 $V_H(\text{Back})$ 含 Sfi I 酶切位点, $V_H(\text{For})$ 含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽部分序列; $V_L(\text{For})$ 含 Not I 酶切位点, $V_L(\text{Back})$ 含 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 $V_H(\text{For})$ 部分序列相重叠。 R_1 , R_2 为载

体特异性引物，用于插入片段的 PCR 鉴定。

以合成的 CBL 人工抗原对动物进行了免疫，检测血清效价滴度达到要求；取致敏动物脾脏，提取总 RNA，利用设计的简并引物经 RT-PCR 成功扩增出了免疫小鼠的全套轻、重链可变区基因，轻链的扩增条件为：94 °C×5 min 变性，加入 1 μL 高保真 Pfu 酶 (2.5U)，进行以下循环：94 °C×30 s，54 °C×1 min，72 °C×1 min，共 25 个循环，最后 72 °C 延伸 10 min。重链的扩增条件为：94 °C×5 min 变性，加入 1 μL 高保真 Pfu 酶 (2.5U)，进行以下循环：94 °C×30 s，60 °C×1 min，72 °C×1 min，共 30 个循环，最后 72 °C 延伸 10 min。V_H 基因片段大小约为 350 bp，V_L 基因片段大小为 320bp。以扩增出的 V_H、V_L 片段互为模板，采用含 (Gly₄Ser)₃ 连接肽的接头引物，重叠延伸 PCR 法合成抗体基因片段，并采用两条含 Bgl I 及 Not I 酶切位点的上下游引物对 scFv 进行二次 PCR 扩增，条件为 94 °C×5 min 预变性，加 0.5 μL 高保真 Pfu 酶，进行以下循环：94 °C×45 s，50 °C×1 min，72 °C×1 min，共 30 个循环，72 °C 延伸 10 min，得到 760 bp 的全长抗体基因片段。将抗体片段用 Bgl I 及 Not I 双酶切后，与载体 pCANTAB5E 连接，转化大肠杆菌 TG1，用辅助噬菌体 M₁₃KO₇ 进行超感染，构建噬菌体抗体库。抗体库库容约为 1.6×10⁴。采用固相抗原法，以 CBL-OVA 为包被抗原，对噬菌体抗体库进行亲和富集，经 ELISA 筛选出 15 个阳性重组噬菌体克隆。

将筛选出具有抗体活性的阳性克隆提取质粒，将质粒用 Bgl I 及 Not I 双酶切后与经相同酶切的载体 pPhoA(+)连接，连接产物转化大

肠杆菌抗性筛选阳性克隆，并经过酶切、PCR 鉴定。从上面鉴定为阳性的克隆中提取质粒 DNA，转化琥珀终止非抑制型大肠杆菌 HB2151，IPTG 诱导抗 CBL 双功能抗体进行可溶性表达。采用渗透休克法提取了菌体细胞周质腔中的可溶性双功能抗体，并对培养上清及周质腔提取物中表达的抗体进行 SDS-PAGE，Western-Blotting 及 ELISA 鉴定，并利用亲和层析对其进行纯化。

实施例 2 酶联免疫试剂盒组分的配制

(1) 浓缩洗涤缓冲液的配制：含 0.5~1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液，缓冲液 pH 值为 7.4，浓度为 0.1mol/L，为现有常规方法使用浓度的 15~25 倍。

(2) 封闭液的配制：脱脂奶粉 1.0~5.0 g 溶于 100mL 蒸馏水。

(3) 底物缓冲液的配制：30%过氧化氢 30 μ L 溶于 19mL 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 保存。磷酸-柠檬酸缓冲液采用 0.2M Na_2HPO_4 25.7mL、0.1M 柠檬酸 24.3mL、加蒸馏水 50mL 配制而成。

(4) 底物液的配制：当酶为辣根过氧化物酶（HRP）时底物液是将 3,3,5,5-四甲基联苯胺（TMB）80mg 溶于 10mL pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 保存。所述的磷酸-柠檬酸缓冲液采用 0.2M Na_2HPO_4 25.7mL、0.1M 柠檬酸 24.3mL、加蒸馏水 50mL 配制而成。当酶为碱性磷酸酶（AP）时底物液是将 4-硝基酚磷酸钠盐（PNPP）100 mg 溶解于 100 mL pH9.8 的二乙醇胺缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 保存。二乙醇胺缓冲液采用二乙醇胺 97 mL、叠氮钠 0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中，用浓盐酸调节 pH 值至 9.8，并储存于 4 $^{\circ}$ C。

(5) 酶标板微孔板的包被：包被抗原用 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液稀释成 0.1~5 μ g/mL, 在酶标板的每孔加 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 包被 1h 后 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜, 倾去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 拍干, 然后在每孔中加入 200 μ L 1.0~5.0% 脱脂奶粉, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次, 干燥后封入铝箔袋中 4 $^{\circ}$ C 保存。碳酸盐缓冲溶液采用 1~2g 碳酸钠和 2~4g 碳酸氢钠溶于双蒸水 1L 配制而成。

(6) 克伦特罗标准溶液的配制：准确称取克伦特罗标样 8.1mg, 溶于 0.1L 缓冲液中, 然后用缓冲液稀释分别配制 8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L 克伦特罗溶液, 另外缓冲液配制 0 μ g/L 对照, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(7) 试剂分装：各种试剂按要求配制, 测定合格后无菌分装。克伦特罗双功能基因工程抗体工作液 7mL/瓶, 克伦特罗标准样品 1mL/瓶, 底物液 7mL/瓶, 底物缓冲液 7mL/瓶, 终止液 7mL/瓶, 浓缩洗液 50mL/瓶, 浓缩样品稀释液 50mL/瓶。分装后贴标签, 注明批号和有效期, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(8) 试剂盒的组装：分别将可拆卸包被好包被抗原的微孔板 1 块, 克伦特罗双功能基因工程抗体工作液、底物液、底物缓冲液、终止液、浓缩洗液、浓缩样品稀释液各 1 瓶, 克伦特罗标准溶液 6 瓶, 使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装, 4 $^{\circ}$ C 保存。

实施例 3 检测克伦特罗的酶联免疫试剂盒的组建

组建的检测克伦特罗的酶联免疫试剂盒结构如附图 2~附图 7 所

示，除了试剂盒盒体外，其包含下述组分：

- (1) 包被克伦特罗抗原的酶标板，96孔；
- (2) 克伦特罗双功能基因工程抗体工作液，7mL/瓶；
- (3) 克伦特罗标准品溶液6瓶，浓度分别为0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L、8.1 μ g/L，1mL/瓶；
- (4) 底物液，7mL/瓶；
- (5) 底物缓冲液，7mL/瓶；
- (6) 终止液，7mL/瓶；
- (7) 浓缩洗涤液，50mL/瓶；
- (8) 使用说明书，1份；
- (9) 盖板膜，2张；
- (10) 自封袋（含干燥剂），1个。

附图2中1：克伦特罗标准溶液；2：克伦特罗双功能基因工程抗体工作液；3：包被了克伦特罗抗原的酶标板；4：使用说明书；5：20倍浓缩洗涤液；6：底物缓冲液；7：底物液；8：终止液；9：自封袋；10：盖板膜；附图3中11：铝箔袋；附图4中12：96孔酶标板板框；13：96孔可拆酶标条；附图5中14：20倍浓缩洗涤液（透明白盖）；15：酶标记物（绿盖）；16：底物液（黑盖）；17：底物缓冲液（白盖）；18：终止液（黄盖）；19：标准溶液（6瓶红盖）；附图6中20：标准品凹孔；21：终止液凹孔；22：底物液凹孔；23：底物缓冲液凹孔；24：酶标记物凹孔；25：20倍浓缩液凹孔；26：外包装纸盒；附图7试剂盒附件中27：盖板膜（2个）；28：自封袋

(带干燥剂); 29: 说明书。

实施例 4 试剂盒用于检测克伦特罗的实验

一、样品前处理

(1) 尿液样本处理

清澈尿液样品可以直接进行检测分析。若尿样呈浑浊状，2000g 离心 5min 或过滤，用上清液检测。

(2) 饲料

用研钵研碎饲料样品，称取 2.0g 研碎的样品，加入 2mL 1mol/L HCl，加入 16mL 去离子水均质；涡旋混匀 5min 后，放振荡器上振荡 15min；以 2000r/min 离心 20min，转移出上清液并加入 2mL 1mol/L NaOH 至上清液中混合，检查 pH 值是否在 6.5~7.5 之间，若没在此范围应检查溶液是否配错，加以校正；以 2000r/min 离心 20min，转移出上清液，如果上清液仍然浑浊可适当提高转速或用滤纸过滤；用去离子水 10 倍稀释上清液，稀释方法是加 100 μ L 清液到 900 μ L 蒸馏水中，并且混合均匀；取 50 μ L 进行分析。

(3) 组织，例如肌肉、肝脏、肾脏等

将动物组织样品用组织捣碎器捣碎，或用刀剁碎（可剁碎至成浆状）；称取 5 \pm 0.05g 样品装入 15mL 离心管中或其他容器，加入 5mL 蒸馏水，混匀；沸水浴中煮 10~15min；在 4000g 或更大离心力下离心 10~15min，或过滤；离心后的上清液或过滤后的澄清滤液作为样品提取液，取 50 μ L 进行分析。样品提取液于 4 $^{\circ}$ C 条件下可保存 24h。

二、试剂盒的检测方法

(1) 将试剂盒从冷藏环境中取出，置于室温（20~24℃）平衡30min以上，将足够标准和样品所用数量的条板固定于支架，标准和样品做两个平行实验，按顺序编号。

(2) 在标准品孔加入 50μL 标准品，样品孔加入 50μL 待测样品。然后每孔加入 50μL 双功能抗体，轻拍混匀。盖上盖板膜，在室温孵育 20min。

(3) 倒出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打（每轮洗板拍打 3 次）以保证完全除去孔中的液体。用 250μL 蒸馏水充入孔中，再次倒掉微孔中的液体，再重复操作 3 遍。

(4) 每孔加入 100μL 显色液，轻拍混匀，盖上盖板膜，暗处室温孵育 15min。

(5) 加入 50μL 反应终止液到微孔中。混合好在波长 450nm，以空气为空白，测定各孔吸光值，必须在加入终止液后 60min 内读取吸光值。

三、检测结果计算与分析：

以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值，以百分吸光度值为纵坐标，克伦特罗标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线，求出直线方程为 $y = -14.951x + 88.156$ ， $R^2 = 0.998$ 。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值，根据方程式求出对应样品的克伦特罗浓度。所述百分吸光度值的计算式为：

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

其中，**B** 为标准溶液或样品的平均吸光值，**B₀** 为 0 μg/L 标准溶

液的平均吸光度值。

检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析,对克伦特罗线性检测范围为 0.1~8.1 $\mu\text{g/L}$, 检测限为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 整个检测过程只需 35min 就可以完成。

实施例 5 试剂盒精密度与准确度试验

1、 标准品溶液重复性试验

从 3 批按照实施例 2 (6) 中的方法制备的酶标板中, 各抽出 20 个微孔, 测定 0.9 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的吸光度值 (OD 值), 重复 20 次, 计算变异系数 CV%, 结果见表 1。

表 1 标准品溶液重复性试验

样品	浓度 $\mu\text{g/L}$	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.9	3.1	3.3	4.2	8.1

结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 3.1~4.2% 之间, 批间变异系数为 8.1%。

2、 样本重复性与准确度试验

准确度是指测得值与真值的符合程度, 在 ELISA 测定中, 准确度常以回收率表示, 精密度常以变异系数来表示。在空白猪尿、猪肝中, 将克伦特罗添加至终浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)、5 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$), 在空白饲料中, 将克伦特罗添加至终浓度为 50 $\mu\text{g/kg}$ 、100 $\mu\text{g/kg}$, 每个浓度各 10 个平行, 测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

表 2 样本重复性与准确度试验结果

样品	添加 浓度 μg/L	第 1 批			第 2 批			第 3 批			批间	
		含量	回收 率%	CV%	含量	回收 率%	CV%	含量	回收 率%	CV%	CV%	
尿样	1	0.90	90.0	3.1	1.03	103	5.9	0.82	82.0	3.8	11.9	
	5	4.76	95.2	4.2	4.32	86.4	5.4	5.40	108	6.7	14.3	
肝样	1	0.934	93.4	5.1	0.81	81.0	5.6	0.85	85.0	7.8	16.8	
	5	4.61	92.2	7.9	4.17	83.4	7.5	4.68	93.6	8.9	17.5	
饲料	50	42.7	85.4	7.6	40.6	81.2	8.9	44.5	89.0	8.7	18.5	
	100	81.3	81.3	6.7	83.7	83.7	6.6	85.2	85.2	7.5	17.7	

结果表明尿样、猪肝、饲料样本的添加回收率在 81.0~108% 之间，批内变异系数在 3.1~8.9% 之间，批间变异系数在 11.9~17.7% 之间。

实施例 6 试剂盒保存期试验

(1) 将试剂盒放置于 2~8℃，分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒，对克伦特罗标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

(2) 将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 12 天，每天对克伦特罗标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

(3) 将试剂盒在 -20℃ 冰箱保存 12 天，每天对克伦特罗标准样品 (0.1 μg/L) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

从结果可看出，经过三种条件保存试验，克伦特罗标准样品（0.1 $\mu\text{g/L}$ ）的吸光度值下降小于 5%，且 OD 不低于 1.5；50%抑制率在 0.7~1.0 $\mu\text{g/L}$ 之间；添加回收率在 80~110%之间；批内变异系数小于 10%；各项指标均符合质量要求，因此，试剂盒可以在 2~8℃保存 12 个月。

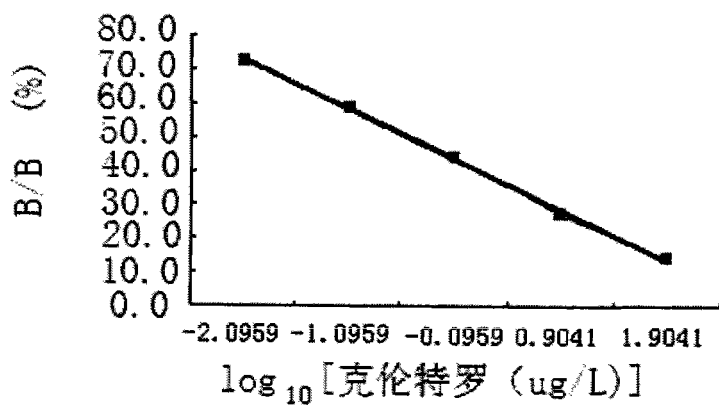


图 1

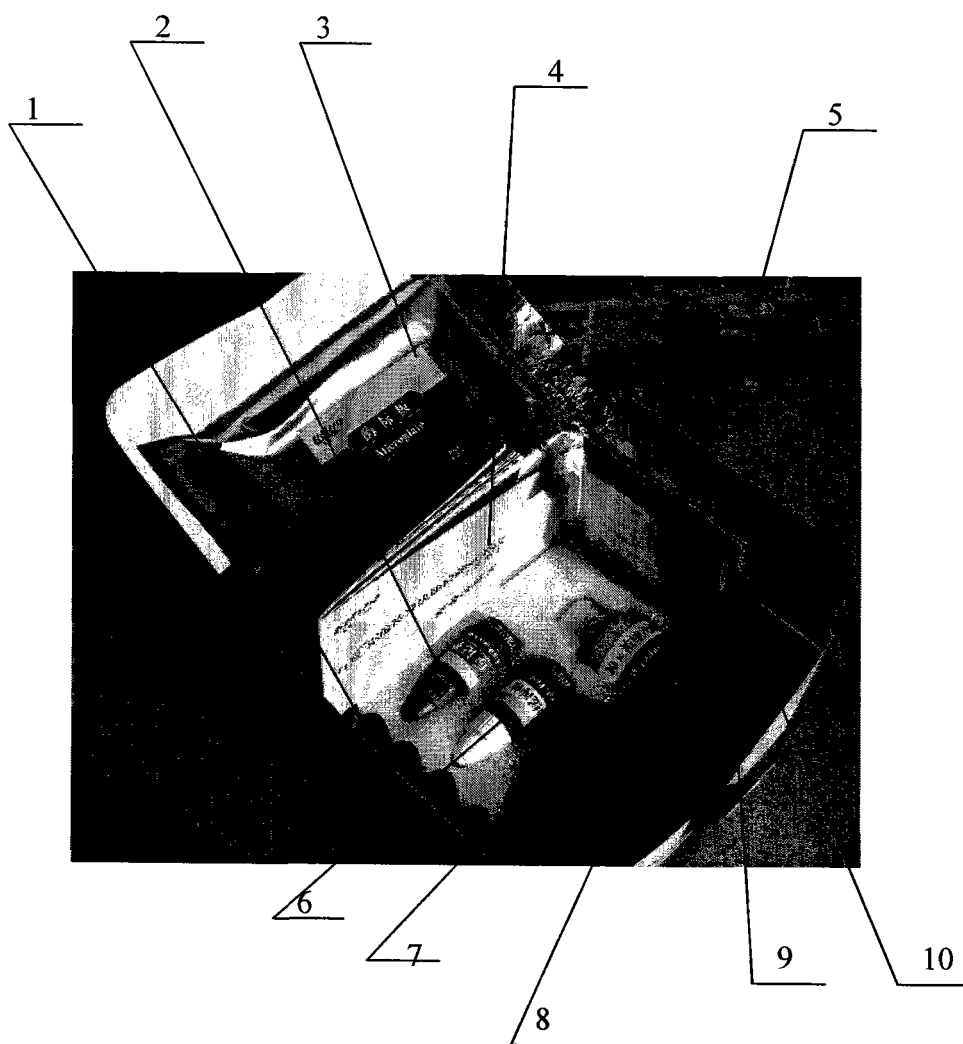


图 2

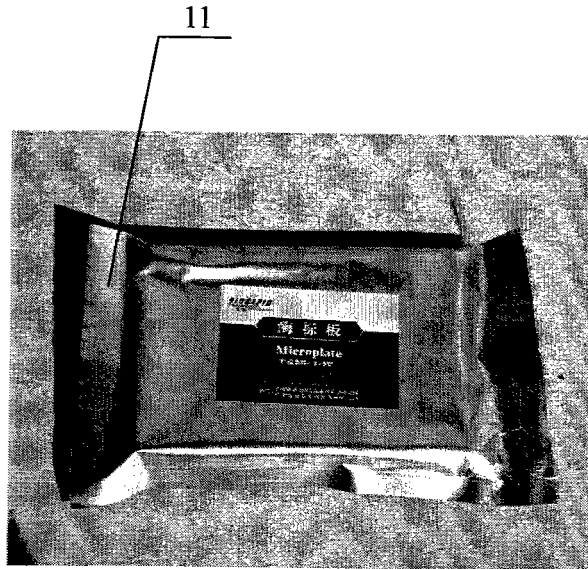


图 3

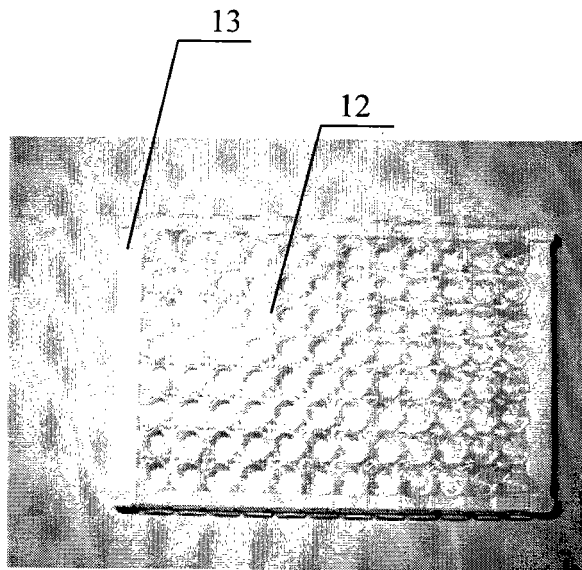


图 4

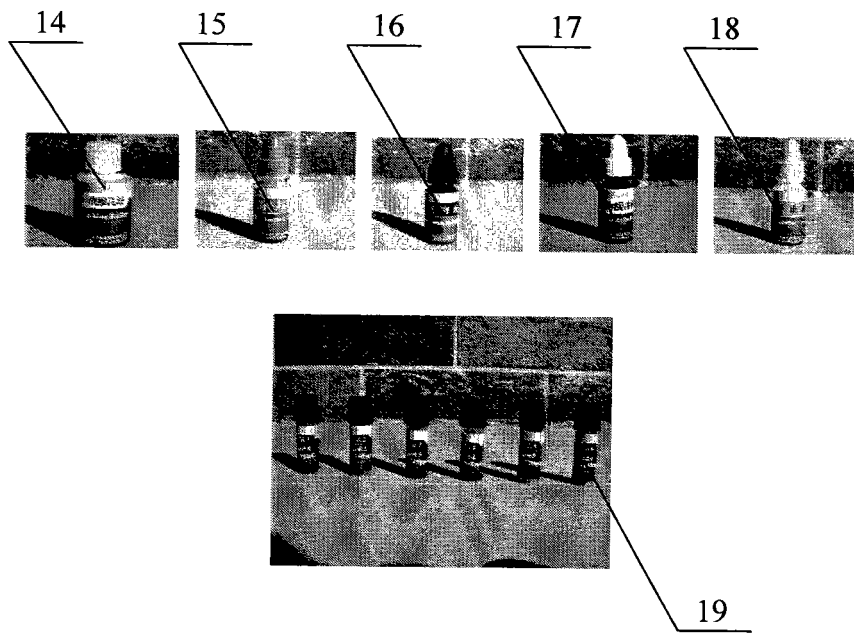


图 5

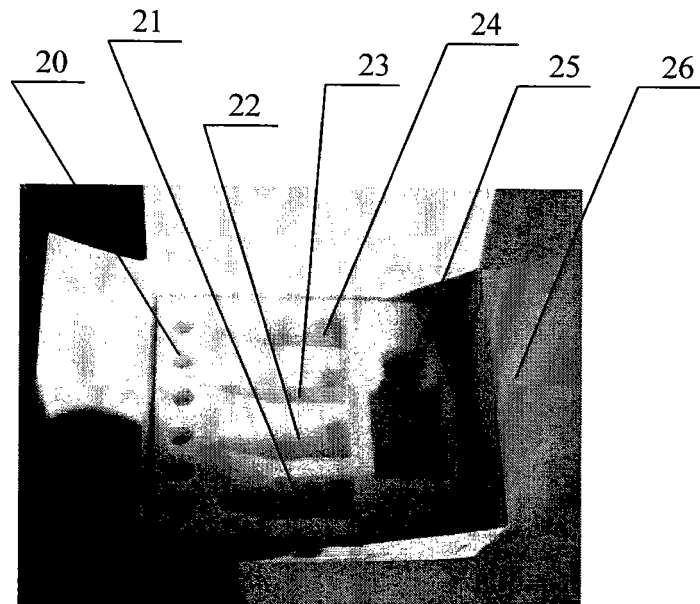


图 6

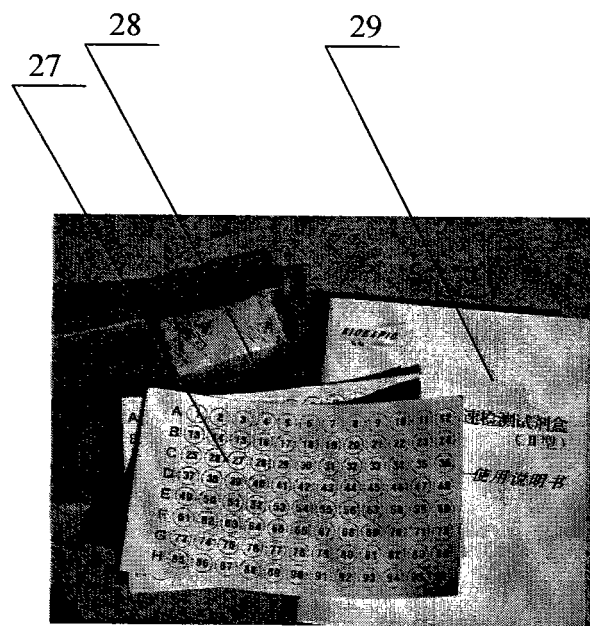


图 7

专利名称(译)	一种克伦特罗的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101290315A	公开(公告)日	2008-10-22
申请号	CN200810028632.3	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 杨金易 王弘 雷红涛 沈玉栋 潘科 肖治理 柳春红 梁燕 刘细霞		
发明人	孙远明 杨金易 王弘 雷红涛 沈玉栋 潘科 肖治理 柳春红 梁燕 刘细霞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/25 G01N33/543		
代理人(译)	林丽明 任重		
其他公开文献	CN101290315B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种克伦特罗的酶联免疫检测方法和试剂盒及其制备方法。检测方法包括将克伦特罗抗原包被于固相载体上、加入标样或待测样品，再加入克伦特罗双功能基因工程抗体，反应后加入底物液进行显色，测定百分吸光度、根据克伦特罗的标准曲线和待检样品的百分吸光度值，推算出待测样品中克伦特罗的浓度等步骤；本发明同时公开了实现所述检测方法的试剂盒及试剂盒的制备方法。本发明采用克伦特罗双功能基因工程抗体与直接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，且降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。

