



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103235117 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201310128270. 6

(22) 申请日 2013. 04. 15

(71) 申请人 天津康利缘生物工程有限公司
地址 300382 天津市西青区精武镇大卷子工业园 28 号

(72) 发明人 钟凯

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司 12209

代理人 王来佳

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006. 01)

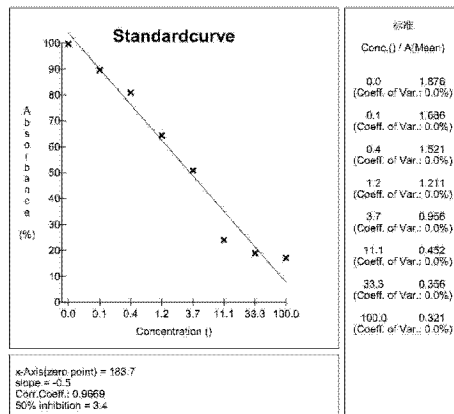
权利要求书2页 说明书20页 附图2页

(54) 发明名称

一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒及其使用方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及本发明涉及一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其组成成分及比例如下:包括包被板、校准品、酶标记物工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩洗涤液,浓缩提取液。本发明试剂盒的灵敏度为 0. 1ppb,精密度:批内变异系数(CV%), CV%<5%;批间变异系数(CV%), CV%<10%;准确度以回收率表示准确度,回收率应在 80%—110% 之间。IC50 范围:在 0. 3-0. 5ppb 之间,线性相关系数 |r| :不小于 0. 9900,具有使用范围广、使用方便、检测准确的优点。



1. 一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其特征在于:其组成成分及比例如下:
包括包被板、校准品、酶标记物工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩洗涤液,浓缩提取液;
所述包被板为孔底包被有抗沙丁胺醇多克隆抗体;包被量为 $5 \mu\text{g/mL}$,包被温度 4°C 过夜;
所述校准品为不同浓度的盐酸克伦特罗系列校准品;浓度为 0,0.1ppb,0.3ppb,0.9ppb,2.7ppb,8.1ppb;
所述酶标记物工作液为含有标记辣根过氧化物酶的沙丁胺醇半抗原,为过碘酸钠法将辣根过氧化物酶同沙丁胺醇半抗原结合;酶标记物用酶稀释液稀释;
所述底物液 A 为重量百分比为 0.07% 的过氧化氢脲溶液;
所述底物液 B 为重量百分比为 0.04% 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液;
所述终止液为 2M 硫酸;
所述的浓缩提取液为 0.2mol/L PH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液;
所述的浓缩洗涤液为含质量浓度为 1% 的吐温 20,0.2mol/l pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液。
2. 根据权利要求 1 所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标记物工作液为:用酶稀释液将标记辣根过氧化物酶的沙丁胺醇半抗原稀释,至沙丁胺醇半抗原:酶稀释液的体积比为 1:1000;酶稀释液为含质量浓度为 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。
3. 根据权利要求 1 所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述底物液 A 使用 0.1M 的醋酸-柠檬酸缓冲液稀释;所述底物液 B 使用 0.1M 的醋酸-柠檬酸缓冲液将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺稀释至 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的质量浓度为 0.04%。
4. 根据权利要求 1 所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为 20X 浓缩洗涤液,使用前按照 0.2M 磷酸盐吐温缓冲液:蒸馏水的体积比为 1:19 的比例稀释,混匀后使用;所述浓缩提取液 20X 浓缩提取液,使用前按照 0.2M PBS 磷酸盐缓冲液:蒸馏水的体积比为 1:19 的比例稀释,混匀后使用。
5. 根据权利要求 1 所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述包被板的包被步骤如下:
 - (1)抗体包被:用抗沙丁胺醇多克隆抗体最佳包被浓度包被酶标板,100uL/孔, 4°C 过夜,最佳包被量为 $5 \mu\text{g/mL}$,0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液作为稀释液用于包被固相载体;
 - (2)洗板:将孔内液体甩干,用洗涤液 250 μL /孔洗涤 4~5 次,每次间隔 10s,用吸水纸拍干;
 - (3)封闭:将由质量分数为 1% 的牛血清白蛋白和质量分数为 10% 的蔗糖的磷酸盐缓冲液组成的封闭液加入酶标板,200uL/孔, 37°C 温育 2 小时,将孔内液体甩干,拍干,真空干燥,加铝箔袋真空封装。
6. 如权利要求 1 至 5 任一项权利要求所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒在快速定量检测 β_2 -受体激动剂残留量中的应用。
7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于:所述 β_2 -受体激动剂来源于尿液、血清、肌肉组织、饲料或牛奶中。
8. 根据权利要求 6 或 7 所述的应用,其特征在于:所述检测 β_2 -受体激动剂的最低检

测限为 0.1ng/mL。

9. 一种如权利要求 1 至 5 任一项所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒的使用方法, 其特征在于: 步骤如下:

(1) 将所需试剂从冷藏环境中取出, 置于室温平衡 30min 以上, 摇匀;

(2) 取出微孔板, 将不用的微孔板放入铝铂袋, 保存于 2-8°C;

(3) 浓缩洗涤液在使用前回复到室温;

(4) 编号: 将样本和校准品对应微孔按序编号, 每个样本和校准品做平行, 并记录校准孔和样本孔所在的位置;

(5) 加校准品/样本: 加入校准品及样本各 50 μ L 到对应的微孔中, 随即加入酶标记物工作液 50 μ L/孔, 振荡混匀, 用封板膜封板后置 25°C 避光环境中反应 30min;

(6) 洗板: 揭开封板膜, 将孔内液体甩干, 用浓缩洗涤液 250 μ L/孔洗涤 4~5 次, 每次间隔 10s, 拍干;

(7) 显色: 底物 A 液和底物 B 液按体积比 1:1 混匀, 100 μ L/孔加入微孔板中, 振荡混匀, 用封板膜封板后, 置 25°C 避光环境中反应 15min;

(8) 测定: 加入终止液 50 μ L/孔, 轻轻振荡混匀, 设定酶标仪于 450nm 处, 测定每孔 OD 值;

(9) 结果: 所获得的校准品和样品吸光度值的平均值除以第一个校准的吸光度值再乘以 100, 即可检测得出 β_2 -受体激动剂剂量。

一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒及其使用方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于检测试剂盒领域,涉及瘦肉精检测试剂盒,尤其是一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒及其使用方法和应用。

背景技术

[0002] 近年来,随着畜牧业的发展,兽药的使用也日益广泛,已逐渐成为不可缺少的物质基础之一。包括 β_2 -受体激动剂在内的兽药在促生长、提高饲料转化率和利用率以及改善产品品质等方面确实起到了十分显著的作用。然而,在促进畜牧业发展的同时,兽药的使用无疑会导致药物本身及其代谢产物在动物体内的滞留或蓄积,并以残留的方式进入人体及生态系统,从而造成危害。动物源性食品安全问题,特别是滥用或非法使用兽药及违禁药品,使畜禽类产品残留兽药的问题日益突出,给人民健康造成了很大的威胁,并且已成为畜牧业发展的一个主要矛盾。随着我国加入世界贸易组织,今后发达国家低价格、低残留的动物源性食品势必大量涌入我国。如果不积极采取有效措施,不但我国的动物源性食品出口不畅,而且连在国内市场的地位也会受到严重冲击,将非常不利于养殖业的健康发展。

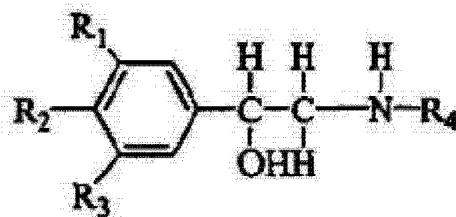
[0003] β_2 -受体激动剂,又称为 β_2 -兴奋剂,是一类人工合成苯乙胺类药物,常见的有克伦特罗、沙丁胺醇、妥布特罗、特布它林、非诺特罗、福莫特罗、拉贝特罗、莱克多巴胺、异丙喘宁等。 β_2 -受体激动剂具有促进肌肉生长、减少脂肪沉积、改善肉质作用,因此有一些饲料生产商与家畜生产者违禁使用该药品于家畜养殖中。由于 β_2 -受体激动剂在动物体内有较长的残留时间和短期内产生较大的残留量,特别是内脏中蓄积残留,通过食物链进入人体,会使一些易感人群,如老人、孕妇、心脏机能较差者产生较明显的中毒症状,严重危害人类健康,欧美等国立法禁止在家禽生产上使用,我国农业部也于 1997 年作出相同的规定。但在经济利益的驱使下,各国违法滥用现象仍较普遍。1990 年至 1995 年间意大利、法国和西班牙因食品克伦特罗污染发生的中毒事件超过 500 余起,我国也发生过中毒事件。

[0004] 为了保障我国动物食品的安全性,保护公众健康安全,建立有效快速的定量确证方法十分必要。

[0005] 1.1 β_2 -受体激动剂的结构

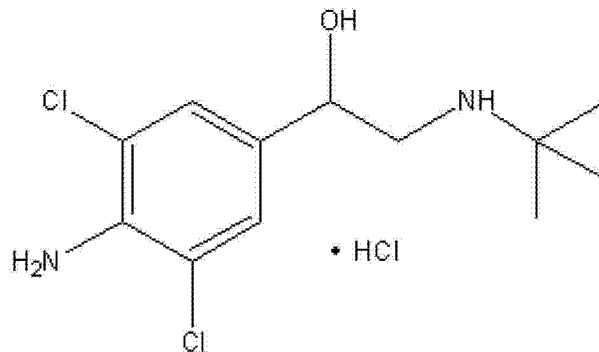
[0006] β_2 -受体激动剂具有苯乙醇胺结构母核,苯环上连接有碱性的 β -羟胺(仲胺)侧链,侧链的取代基通常为 N-叔丁基、N-异丙基或 N-烷基苯,能与无机酸或有机酸成盐。常见的有克伦特罗、沙丁胺醇、妥布特罗、特布它林、非诺特罗、福莫特罗、拉贝特罗、莱克多巴胺、异丙喘宁。其基本结构为:

[0007]



[0008] 按照苯环上取代基的差异,可将 β_2 -受体激动剂分为苯胺型和苯酚型。苯胺型结构中具有芳伯胺基,中等极性,芳伯胺基常被用于衍生化分析。典型的药有克伦特罗,其结构为:

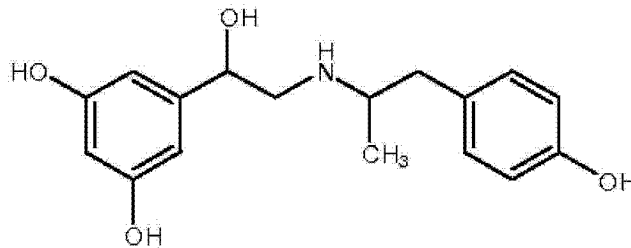
[0009]



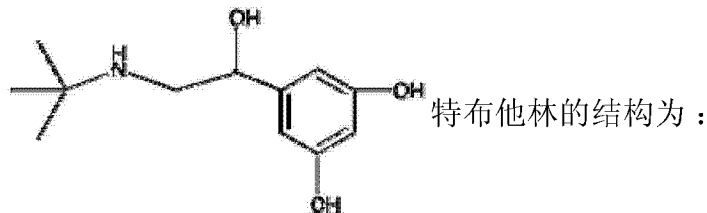
[0010] 苯酚型一般具有邻(间)苯二酚或苯酚结构,在C-3'、C-5'位上含有1或2个酚羟基。苯酚型又可以分为邻苯二酚(儿茶酚型,如肾上腺素),间苯二酚(雷索酚型,如非诺特罗、特布它林、异丙喘宁),水杨醇型(典型的药物有沙丁胺醇),其结构如下:

[0011] 非诺特罗的结构为:

[0012]

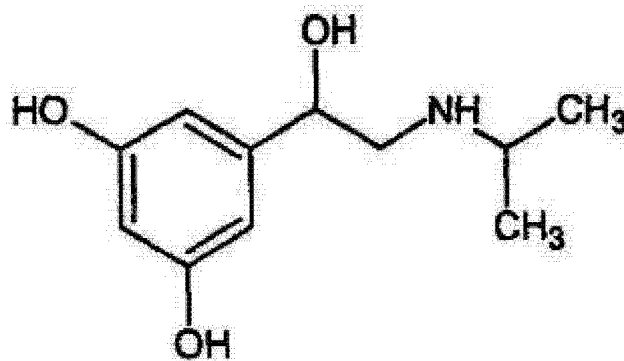


[0013]



[0014] 异丙喘宁的结构为:

[0015]



[0016] β_2 -受体激动剂属于拟肾上腺素药物,它可与靶组织细胞膜 β_2 -受体结合,激活腺苷酸环化酶,催化三磷酸腺苷转化为环一磷酸腺苷,从而诱发一系列酶的磷酸化过程和

生理效应。 β_2 -受体激动剂的生理效应:1)松弛支气管、子宫和肠壁平滑肌,增加心率。医学或兽医临床上主要用于扩张支气管和增加肺气量,可治疗支气管哮喘、阻塞性肺炎、平滑肌痉挛和休克等症,也用做牛、马产道松弛剂。2)再分配效应。 β_2 -受体激动剂可使多种动物(牛、猪、羊、家禽)体内营养成分由脂肪组织向肌肉组织转移,称为“再分配效应”,其结果是体内的脂肪分解代谢增强,蛋白质合成增加,能显著增重和提高饲料转化率。3)对神经系统的兴奋效应,因而可以作为一种运动兴奋剂。近年来,运动员使用该类药物的频率呈上升趋势。1992年国际奥委会开始将第一个 β_2 -受体激动剂克伦特罗列入了禁用药物表,在以后的几年里又陆续新增了几种该类物质。截至2004年1月,所有 β_2 -受体激动剂均已被禁用。

[0017] 1.2 β_2 -受体激动剂的滥用及对人的副作用

[0018] 1.2.1 在动物饲养中的滥用

[0019] 在畜牧业上, β_2 -受体激动剂可以作为一种瘦肉增长剂,可以促进家禽生长和改善肉质,具有诱人的经济利益。但是,用这类药物来喂牲畜,会在牲畜体内产生药物残留。人食用了带有药物残留的牲畜(特别是内脏)就可能危害人的健康,主要症状为:口干、头痛、头晕、心跳、手抖、浑身抽搐,对于高血压、心脏病患者危害更大,甚至危及生命。这是由于:1) β_2 -受体激动剂能加快脂肪分解,使更多的游离脂肪酸进入血液,降低了血管壁弹性,血脂血压升高,导致微循环膨胀而压迫周围神经末梢,引起头痛头晕。2)由于其降低了抑制肌肉兴奋性的 Mg^{2+} 浓度,导致生物电紊乱,病人的肌肉兴奋性增强,引起肌肉震颤,腓肠肌痉挛,呕吐和腹泻,同时心肌收缩加快,心率加快,易引起病人休克和高血压患者的死亡。

[0020] 国内外发生多起因使用 β_2 -受体激动剂喂养动物而中毒的事件。例如,1992年在西班牙的加泰罗尼亚,发生113例克伦特罗中毒事件,原因是食用了来源于克伦特罗饲养的牛的肝脏。再如,1996年8月在意大利的Caserta,62人因食用牛肉而中毒。科研人员用酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),在其食用的牛肉中检测了克伦特罗。类似的事件在法国也有出现。在荷兰,虽然克伦特罗已明令禁止使用,但在养殖的牛尿中可以经常检查克伦特罗。克伦特罗及其它的 β_2 -受体激动剂如沙丁胺醇、特布它林等在1985年被欧洲经济共同体国家禁止使用。我国农业部1997年3月11日严令禁止 β_2 -受体激动剂在畜牧业上的应用,单部分省市自90年代中期起就有克伦特罗中毒现象出现,此后呈发展趋势,较为严重的省市有广东、重庆、浙江、北京、上海等。2001年广州市共发生17起克伦特罗食物中毒,中毒人数106人。

[0021] 1.2.2 在体育界中的滥用

[0022] β_2 -受体激动剂经口服后,几乎100%被机体吸收。动物实验的研究表明,使用 β_2 -受体激动剂中的克伦特罗可以增加肌肉脂肪比并提高肌肉的力量。这个结果很自然地使热衷于在体育中使用药物的人士采用,于是便开始了其在体育中的滥用,其程度非常严重。运动员使用 β_2 -受体激动剂除了增强肌肉力量之外,还有对呼吸系统和神经系统的兴奋作用。

[0023] 自1992年起,国际奥委会医学委员会开始明确禁止在体育比赛及训练中口服或注射克伦特罗,作为治疗目的的喷雾和吸入也是不允许的。在以后的几年里又陆续新增了几种该类物质。截至2001年1月,所有 β_2 -受体激动剂均已被禁用。

[0024] 1.3 β_2 -受体激动剂最高残留量的规定

[0025] 由上可知, β_2 -受体激动剂严重危害人类健康, 各国对动物源性食品中的一些 β_2 -受体激动剂规定了最高残留量(Maximum Residue Limits, MRLs)。最高残留量是指允许在食品中药物或其它化学物质残留的最高量, 也可称为允许残留量。最高残留量属于国家公布的强制性标准, 决定了公众消费的安全性和生产用药的休药期, 其重要性是显而易见的。

[0026] β_2 -受体激动剂中克伦特罗是研究最多得, 欧美各国均禁止在畜牧业生产中使用。美国食品药品监督管理局和世界卫生组织建议克伦特罗在动物组织中的最高残留量见表 1。一些国家如荷兰、英国、中国执行克伦特罗最大残留量限制规定, 具体数值如表 2。但至今没有任何国家批准克伦特罗作为兽用饲料添加剂。我国也早在 1997 年发布的《允许作饲料药物添加剂的兽药品种使用规定》中将克伦特罗排除在外。

[0027] 表 1 美国食品药品监督管理局和世界卫生组织建议克伦特罗在动物组织中的最高残留量

[0028]

组织	最大残留量(ug/kg)
肉	0.2
肝	0.6
肾	0.6
脂肪	0.2
奶	0.05

[0029] 表 2 一些国家关于克伦特罗最高残留量的规定

[0030]

国家	组织	最大残留量
英国	食用组织	0.5ug/kg
荷兰	肝	1ug/kg
中国	猪尿	5ng/mL

[0031] 1.4 国内外 β_2 -受体激动剂分析现状

[0032] 1.4.1 β_2 -受体激动剂残留样品的前处理

[0033] 为满足残留检卡的需要, 近年来 β_2 -受体激动剂残留分析方法发展很快。 β_2 -受体激动剂残留测定的样本主要以尿液和肝、肾、肌肉等食用组织为主。样品前处理中, 酸碱液萃取、固相萃取和免疫亲和色谱为基本的提取净化方法。

[0034] 1.4.1.1 样品的水解

[0035] 除克伦特罗外, 其他 β_2 -受体激动剂在动物组织和生物样品中主要以硫酸酯合物或葡萄糖苷酸酯合物等形式存在。因此样品要先进行水解, 使待测物游离或从组织中释放

以进行后续的溶剂提取。尤其是苯酚型药物残留如沙丁胺醇、异丙喘宁的轭合物比例较高，必须水解后进行提取和净化。水解方法主要有酶水解法、酸水解和碱水解法。

[0036] (1) 酶水解法

[0037] 酶水解法常采用的水解酶主要有枯草杆菌蛋白酶、葡萄糖苷酸酶、硫酸酯酶、芳基硫酸酯酶。其中，葡萄糖苷酸酶、硫酸酯酶或它们的混合酶系是最常用的水解酶。水解条件对水解效率有显著影响。温度和 PH 值直接影响酶的活性，要严格控制。通常在样品中加入缓冲液调 PH 值至 5.2，然后用葡萄糖苷酸酶 / 硫酸酯酶在 55℃ 条件下水解 2h。水解完成后一般采用高温煮沸的方法将酶破坏。

[0038] (2) 酸水解法

[0039] 酸水解法一般在稀盐酸、稀硫酸或稀高氯酸溶液中进行。稀酸除具有水解轭合物的作用，还起到沉淀蛋白的作用。用稀酸水解轭合物时一般采用水浴超声辅助提取，然后在一定温度的水浴中水解 1h。因此，酸水解的过程也是提取过程。采用酸水解法提取的样品干扰物质少。

[0040] (3) 碱水解法

[0041] 碱水解法常用于毛发样品中轭合物的水解，一般操作比较简单。Fente 等用 1mol/L 的氢氧化钠溶液在 80℃ 下 1h 水解牛毛发，测定其中的 β_2 -受体激动剂残留。

[0042] 水解和提取通常同时进行，也可以先水解后提取或先提取后水解。

[0043] 1.4.1.2 样品的提取

[0044] (1) 溶剂萃取提取

[0045] 液体样品最常用的萃取技术之一是溶剂萃取，通常叫做液液萃取。液液萃取技术利用样品中不同组分在两种不混溶的溶液中溶解度或分配比的不同来达到分离、提取或纯化的目的。

[0046] 多数 β_2 -受体激动剂为中等极性的疏水性物质，呈弱碱性或弱酸性。采用极性有机溶剂、稀酸、缓冲液提取，经离心后作进一步净化。有机溶剂和 pH 值直接影响提取效率。Turberg 等用甲醇提取猪和火鸡组织中的雷托帕明，经液相色谱测定。

[0047] (2) 超临界流体萃取法 (Supercritical fluid extraction, SFE)

[0048] 超临界流体萃取法是利用超临界流体的溶剂能力与其密度的关系，即利用压力和温度对超临界流体溶解能力的影响而进行的。在超临界状态下，将超临界流体与待分离的物质接触，使其有选择性地按极性大小、沸点高低和分子量大小的成分依次萃取出来。目前研究较多的超临界流体是二氧化碳，其因具有无毒、不燃烧、对大部分物质不反应、价廉等优点，最为常用。Mandy 等采用 SFE 提取牛肝中的克伦特罗和沙丁胺醇，ELISA 测定。

[0049] (3) 其它样品提取技术

[0050] 一些新的样品处理技术也被用于 β_2 -受体激动剂残留的提取。Fente 等用双相渗析分离技术提取肝脏和牛毛发中的克伦特罗残留。该文采用长 25cm，离子交换面积为 196cm² 的渗析管，将预先湿润的装有提取溶剂叔丁基甲醚、二氯甲烷的渗析管置入匀浆后的组织样品中，在 37℃ 下以 150rpm/min 转速转动，连续渗析提取 4h，然后将渗析管中的溶液转入分液漏斗中，弃去水相，有机相经无水硫酸钠脱水后以氮气浓缩至干，衍生后进行气相色谱 - 质谱 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 测定。该提取方法集提取和净化于一体，简便快速，提取效率高。

[0051] 1.4.1.3 样品的净化

[0052] (1)液液萃取(Liquid liquid extraction, LIE)

[0053] 液液萃取(LIE)方法是一种初级的净化技术,液液萃取技术已经从简单的一步溶剂萃取发展到用复杂的多相分配体系提取和净化分析物,液液萃取分离方法可以减小蛋白质干扰。有时候为了提高检验方法的灵敏度,在液液萃取中,需要浓缩所分析的物质。

[0054] 在 β_2 -受体激动剂残留分析中液液萃取是一种常用的初步净化手段。样品经初步提取后,一般先调节样品的 pH 值,使其高于 β_2 -受体激动剂的 pKa,即 $\text{pH}>9$,然后用极性疏水溶剂萃取净化。使用混合溶剂萃取能获得更高的选择性。常用的萃取溶剂有乙酸乙酯-异丙醇、异辛烷-二氯甲烷、乙醚-二丁醇、正己烷-正丁基甲酯等。

[0055] (2)固相萃取(Solid phase extraction, SPE)

[0056] 固相萃取(SPE)是一种用途广泛而且越来越受欢迎的样品前处理技术,它建立在传统的液液萃取(LIE)基础之上,结合物质相互作用的相似相溶机理和目前广泛应用的高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱(Gas chromatography, GC)中的固定相基本知识逐渐发展起来的。使用固相萃取法能避免液液萃取所带来的许多问题,比如:不完全的相分离,较低的定量分析回收率,易碎的玻璃器皿和大量的有机废液。与液液萃取相比,固相萃取更有效,容易达到定量萃取,快速和自动化,同时也减少了溶剂用量和工作时间。所以 SPE 具有有机溶剂用量少、便捷、安全、高效等特点。

[0057] 固相萃取(SPE)通常用于液体样品的前处理,萃取富集其中的半挥发或不挥发性化合物,或是去除样品中对分离造成干扰的杂质,另外还可用于处理能预先溶解到溶剂中的固相样品。目前国内主要应用在水中多环芳烃和多氯联苯等有机物质分析,水果、蔬菜及食品中农药和除草剂残留分析,抗生素分析,临床药物分析等方面。固相萃取技术对分析物的萃取、浓缩和净化都非常好。固相萃取(SPE)根据其相似相溶机理可分为三种:反相 SPE、正相 SPE、离子交换 SPE。

[0058] SPE 是 β_2 -受体激动剂残留分析中应用最广泛的技术,在分析过程中采用不同的固相萃取柱来实现净化目的。在 β_2 -受体激动剂残留分析中使用的固相萃取柱种类繁多,如 C18 Bond Elut 柱、Chem Elut CE 1020 柱、强阳离子固相萃取柱(Strong cation exchange-solid phase extraction, SCX-SPE)、弱阳离子固相萃取柱(Weak cation exchange-solid phase extraction, WCX-SPE)、中性氧化铝柱、分子印迹高分子固相萃取柱、Extrelut™ 固相萃取柱等。其中 C18 羧酸键合的弱阳离子固相萃取柱兼有 C18 固相萃取柱和弱阳离子交换的特性,已经成为欧盟残留监控方法的重要净化手段。这些 SPE 柱的洗脱剂一般为 2%~3% 的氨-甲醇或氨-乙醇溶液。对于多残留组分或复杂样品一般采用组合 SPE 柱进行净化。Leyssens 等先将牛尿和猪肝以 Tris 缓冲液($\text{pH}=8$)匀浆,将匀浆液用枯草杆菌蛋白酶 A 酶解,调酶解液 $\text{pH}=9.8$ 后用正丁醇-乙酸乙酯(3:7)萃取,有机相浓缩复溶后用中性氧化铝柱进行初级净化,再调样品 $\text{pH}=6.0$,通过 Bond Elut Certif 柱,用含 2% 氨水的二氯甲烷-异丙醇(8:2)洗脱,净化效果良好,样品衍生后采用气质联用法(GC-MS)测定 β_2 -受体激动剂,不同残留组分的检测限在 0.5~5ng/g 之间。Philippe 等将 C18 Bond Elut 柱与强阳离子固相萃取柱(SCX-SPE)联合使用分离牛肉和猪肝中的克伦特罗,以液质联用法(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)测定,当加标水平为 0.4ng/g 时,回收率为 $63\pm 7\%$ 。

[0059] (3) 免疫亲和色谱(Immunoaffinity chromatography, IAC)

[0060] 免疫亲和色谱原理是将抗体固定在固相载体材料上,制成免疫亲和吸附剂,将样品溶液通过吸附剂,样品中的目标化合物因与抗体发生免疫亲和作用而被保留在固相吸附剂上。然后用缓冲液或有机溶剂作为洗脱剂洗脱固定相,使目标化合物从抗体上解离,从而使目标化合物被萃取和净化。由于免疫亲和作用具有很高的特异性,所以免疫亲和柱可以很方便地从复杂样品基质中分离其他萃取方法难以萃取的目标化合物。由于抗原-抗体反应具有高灵敏、高选择、高特异性等特点,可选择性吸附样液中的待测组分,而去除脂类、蛋白类、糖类等各类杂质,从而大大提高了样品的净化效果及检测灵敏度。IAC 以其高效选择性保留能力在 β_2 -受体激动剂残留的关键净化步骤,有时是惟一的净化方法。目前国外已有不少商品的 IAC 柱出售。这种小柱是将能与目标分析物结合的抗体事先固化在柱体上,经处理的样品上柱后,单组分 β_2 -受体激动剂或多组分 β_2 -受体激动剂与抗体结合保留在柱上,再经适当溶剂进行洗脱,达到较好的净化效果。Hassnoot 等首次使用 IAC 柱净化尿样或组织中的克伦特罗。Lawrence 等将样品提取液用弱阳离子交换 SPE 柱与 IAC 柱联用进行净化,用 2% 的氨-乙醇溶液洗脱克伦特罗,采用 HPLC 直接测定,检测限达 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。IAC 柱重复使用 10 次后未发现柱容量降低。与传统的 SPE 柱相比,利用抗原抗体结合机制进行净化的免疫亲和柱具有很好的选择性,净化效果好,可重复多次使用,但是 IAC 技术的主要局限性是消耗大量的纯化抗体,一般商品化的 IAC 柱价格昂贵,因此在 β_2 -受体激动剂残留分析中的分析成本比较高。

[0061] (4) 基质固相萃取技术(Matrix solid phase dispersion-extraction, MSPD)

[0062] 基质固相分散技术(MSPD)是由 Baeker 和 Long 等人提出的,基于 C18 填料键合相的疏水亲脂作用及其颗粒的机械分散效应设计的,集提取和净化于一体的样品快速处理技术。其基本操作是将试样直接与适量的固体基质(硅胶,florisil, C18, C8)研磨,混匀成半固体,装柱,选择合适的溶剂淋洗。基质固相萃取将样品的提取和净化一步完成,避免了样品的均化、转溶、乳化、浓缩造成的待测组分的损失,适用于各种分子结构和极性农药残留的提取净化。Horne 等^[33]采用此项技术提取牛肝样品的克伦特罗残留,将 0.5g 匀浆的牛肝样品与 2gC18 填料混合并研磨均匀,装柱,用 8mL 正己烷-乙醚(60:40)淋洗,以 8mL 甲醇洗脱克伦特罗,浓缩至干后以醋酸缓冲液复溶,放射免疫法测定。

[0063] (5) 柱切换技术

[0064] 近年来,许多学者在研究工作中利用了柱切换技术,生物样品不用溶剂而直接进行分析。这时 HPLC 仪器用来进行样品的制备(前处理)和分析,其色谱系统由一个预柱和一个分析柱组成。采用柱切换技术,在样品进入分析柱进行分离分析之前,将样品在预柱上进行痕量富集。样品进入预柱,预柱保留被测组分,而将杂质冲入废池,进一步冲洗预柱使样品更洁净,被测组分被反冲出预柱进入分析柱,用紫外法、荧光法或电化学法等进行最终定量。整个过程是自动化进行的,从开始进样直到数据、报告都由微处理器控制,这是一种连接柱的应用技术。即将液固提取微型柱作为预柱与 HPLC 仪连接,增加一个泵,先将样品流经预柱,使起到纯化与富集作用,再经分析柱,能提高分析的灵敏度。

[0065] Schmeer 等采用带 C18 预柱的 LC-MS 直接测定了人血浆中的沙丁胺醇。样品添加内标后进入预柱中,组分经过预柱富集后切换至流动相进行洗脱和测定,每个样品的分析时间只需 8min,定量限达 $0.2\text{ng}/\text{mL}$,变异系数小于 7%。类似的方法还用于血浆中特布它林

和菲诺特罗的分析。Oosterhuis B 和 Van C J^[34] 采用在线阳离子交换 SPE 柱(SCX)-反相 HPLC 测定了沙丁胺醇。

[0066] 1.4.2 β_2 -受体激动剂分析方法

[0067] 样品经过必要的提取和净化步骤后, β_2 -受体激动剂可以用薄层色谱(Thin layer chromatography, TLC)、毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)、液相色谱、免疫测定法筛选分离,用质谱进行确认。气相色谱-质谱(GC-MS),又称为气质联用是最常用的分析方法,但由于 β_2 -受体激动剂极性较强,通常需要进行适当的衍生反应才适应于气相色谱技术,所以近年来液相色谱-质谱方法(LC-MS),又称为液质联用已成为分析 β_2 -受体激动剂的主要定性定量分析方法。

[0068] 1.4.2.1 薄层色谱法

[0069] 薄层色谱法就是将适宜的固相涂布于玻璃板、塑料或铝基片上,成一均匀薄层。待点样、展开后,与适宜的对照物按同法所得的色谱图所对比,用以进行药品的鉴别、杂质检查或含量测定的方法。

[0070] 高效薄层色谱法主要作为 β_2 -受体激动剂的半定量或初筛方法。Sangiorgi^[36] 用 ELISA 先对样品中的克伦特罗进行筛选分析,对疑似阳性样品用 HPTLC 板展开,Bratton-Marshall 反应显色后检视,也可将斑点刮下再用 HPLC 或 GC-MS 进一步分析。同样的方法被用于尿液等样品中苯胺型 β_2 -受体激动剂的分析。沙丁胺醇被高效薄层色谱法展开后可转化成吡啶苯胺染料,在 650nm 下用微量光密度法检测。

[0071] 1.4.2.2 毛细管电泳法

[0072] 毛细管电泳法是近年来迅速发展起来的分离分析技术,其原理是根据不同组分在高压电场的作用下,迁移速率的不同而达到对组分的分离。毛细管电泳技术具有高分离效率,小进样量,分析速度快和低试剂耗费等优点,也在克伦特罗残留的测定中得到应用。Gausepohl 等用毛细管电泳方法测定了克伦特罗服药者的尿液。Toussaint 等采用等速毛细管区带电泳紫外检测器对克伦特罗进行了测定。由于电化学系统仪器和毛细管电泳仪均不是一般实验室常备检测仪器,因此在对大量样品测定方面应用并不十分广泛。

[0073] 1.4.2.3 高效液相色谱法

[0074] 反相高效液相色谱是 β_2 -受体激动剂残留测定的一种常用定量分析方法。通常采用 C18 分析柱,缓冲溶液和乙腈配制流动相,等度或梯度洗脱。有机改性剂和 pH 值是影响分离的主要因素。采用的检测器包括紫外吸收检测(Ultraviolet absorption detector, UVD)、光电二极管阵列检测器(Photo-diode array detector, PDA)、荧光检测器(Fluorescence detector, FLD)、电化学检测器(Electrochemical detector, ECD),检测限一般只能达到 1 ~ 100 μ g/kg。其中文献报道最多的是采用紫外检测器(UV),如 Lawrence 采用此法测定牛肝和鸡肉中的克伦特罗。提取液先后经 WCX-SPE 柱和 IAC 柱净化,于 245nm 检测,流动相为甲醇+10mmol/L 乙酸-乙酸铵(30:70)缓冲液(pH=4.6)。牛肝和鸡肉中 2ng/g 和 5ng/g 水平的添加回收率在 53% ~ 74% 之间。Tsai 等^[43] 采用 HPLC/PDA 测定血浆及组织中的克伦特罗、沙丁胺醇,检测波长分别为 210nm\196nm,回收率 62 ~ 786%,定量限为 100 μ g/kg。PDA 能得到完整的紫外吸收图谱,可以对组分峰的纯度进行判别,并对阳性结果进行初步确证。

[0075] 一些苯酚型 β_2 -受体激动剂具有荧光性质,可采用灵敏度和选择性更高的 FLD 进

行检测。Hashimoto 等用 HPLC/FLD 测定肌肉中的沙丁胺醇,激发波长为 225nm,发射波长为 310nm,定量限为 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率达 75 ~ 81%。

[0076] ECD 的灵敏度较高,但电极容易受到污染,从而影响到精密度,所以对电极的再生或平衡要求高。Turberg 等用电化学检测器测定猪组织中的雷托帕明,当电压为 +600mV 时定量限达 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率达 75 ~ 100%,变异系数 2 ~ 18%。

[0077] 1.4.2.4 气质联用分析法

[0078] 气相色谱-质谱(GC-MS)法不仅可以根据样品中待测组分在图谱上的保留时间,更主要是根据在此保留时间内残留 β_2 -受体激动剂裂解的特征离子碎片,由质谱仪按其分子量和分子结构对 β_2 -受体激动剂准确性,并以此作为定量的依据。GC-MS 是 β_2 -受体激动剂残留测定中最常用的定量和确证方法。由于 β_2 -受体激动剂的化学结构中具有不易气化的羟基和氨基,因此提取、净化处理后的样品需要进行衍生化,才能在气相色谱中进行测定。常用的衍生化试剂有 N-甲基-N-三甲基硅基-三氟乙酰胺和 N,O-双(三甲基硅基)-三氟乙酰胺。

[0079] Whaites 等采用 GC-MS 测定牛尿中克伦特罗残留,以 N-甲基-N-三甲基硅基-三氟乙酰胺为衍生化试剂,采用长度较短毛细管柱(BP5, 12.5m \times 0.22mm)和选择性离子监测模式(Selective ion monitoring, SIM),检出限为 0.07 $\mu\text{g}/\text{L}$;在加标水平为 1ng/g 和 0.2ng/g 时,回收率为 100%。Leysens 用 GC-MS 法对牛尿和牛肝中的 8 种 β_2 -受体激动剂残留进行了测定,检测限在 0.5 ~ 5ng/g 之间。如果采用负离子化学电离技术,配合氘代稳定性同位素稀释技术,其灵敏度将会得到更大的提高。

[0080] 1.4.2.5 液质联用分析法

[0081] GC-MS 灵敏度高,但需要繁琐的衍生化步骤;HPLC 虽然能直接分析,但多数检测器灵敏度偏低,并且无法进行确证。近年来 LC-MS 正逐渐成为测定 β_2 -受体激动剂的有力工具。

[0082] 随着 LC-MS 和 LC-MS/MS 的逐步普及, β_2 -受体激动剂残留分析测定方面的反应越来越多。Doerge 等用液质联用以大气压化学电离(Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)测定牛视网膜中的 β_2 -受体激动剂,样品经萃取分离后直接检测和确证。

[0083] 1.4.2.6 免疫分析法

[0084] 免疫分析法以抗体为核心试剂,利用抗原与抗体的特异性结合反应为基础的分析技术,包括荧光免疫分析法(Fluoroimmunoassay, FIA)、放射免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA),酶联免疫分析法。作为筛选方法,免疫分析法具有快速灵敏准确等特点。但对于定量和确证还要采用其他分析方法。

[0085] 酶联免疫法是免疫分析技术中最常见的分析方法。陈继明用酶联免疫吸附法测定饲料、尿样与脏器样品,该方法检测范围介于 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0086] 此外,放射免疫法、化学发光酶联免疫法等也在 β_2 -受体激动剂检测中得到应用。

[0087] 总之,在各种检测方法中,适合应用于大批检测样品的是 ELISA 检测方法,它具有快速、灵敏、操作简单和一次检测样品量大的特点,而且可以直接对尿液、血液样品进行检测,与 HPLC、GC/MS 有较高的相符率,而且非常适合活体动物的检测。而 HPLC 和 GC/MS 方法均需要昂贵的仪器、复杂的样品处理程序以及专门的操作技能,且比较费时,因此不适合用

做大批样品的检测,但其有效性、准确性和敏感性,使其仍有 ELISA 方法不能替代的优势。目前,进行检测时,一般应用 ELISA 试剂盒进行筛检,再用 HPLC 和 GC/MS 等方法对阳性样品进行确认,从而可确保检测结果的可靠性。

[0088] 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法作为一种筛选方法,具有简便、快速、灵敏、成本低的特点,因此,在现场监控和基层的大规模筛选检测中,免疫学检测方法具有更实际,有广阔的应用前景。

[0089] 通过检索,尚未发现与本发明专利申请相关的专利公开文献。

发明内容

[0090] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种使用范围广、使用方便、检测准确的 β_2 -受体激动剂联免疫试剂盒及其使用方法。

[0091] 本发明的目的是这样实现的:

[0092] 一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其组成成分及比例如下:

[0093] 包括包被板、校准品、酶标记物工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、浓缩洗涤液,浓缩提取液;

[0094] 所述包被板为孔底包被有抗沙丁胺醇多克隆抗体;包被量为 $5 \mu\text{g/mL}$,包被温度 4°C 过夜;

[0095] 所述校准品为不同浓度的盐酸克伦特罗系列校准品;浓度为 0, 0.1ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb;

[0096] 所述酶标记物工作液为含有标记辣根过氧化物酶的沙丁胺醇半抗原,为过碘酸钠法将辣根过氧化物酶同沙丁胺醇半抗原结合;酶标记物用酶稀释液稀释;

[0097] 所述底物液 A 为重量百分比为 0.07% 的过氧化氢脲溶液;

[0098] 所述底物液 B 为重量百分比为 0.04% 的 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺溶液;

[0099] 所述终止液为 2M 硫酸;

[0100] 所述的浓缩提取液为 0.2mol/L PH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液;

[0101] 所述的浓缩洗涤液为含质量浓度为 1% 的吐温 20, 0.2mol/lpH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0102] 而且,所述酶标记物工作液为:用酶稀释液将标记辣根过氧化物酶的沙丁胺醇半抗原稀释,至沙丁胺醇半抗原:酶稀释液的体积比为 1:1000;酶稀释液为含质量浓度为 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0103] 而且,所述底物液 A 使用 0.1M 的醋酸-柠檬酸缓冲液稀释;所述底物液 B 使用 0.1M 的醋酸-柠檬酸缓冲液将 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺稀释至 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺的质量浓度为 0.04%。

[0104] 而且,所述浓缩洗涤液为 20X 浓缩洗涤液,使用前按照 0.2M 磷酸盐吐温缓冲液:蒸馏水的体积比为 1:19 的比例稀释,混匀后使用;所述浓缩提取液 20X 浓缩提取液,使用前按照 0.2M PBS 磷酸盐缓冲液:蒸馏水的体积比为 1:19 的比例稀释,混匀后使用。

[0105] 而且,所述包被板的包被步骤如下:

[0106] (1)抗体包被:用抗沙丁胺醇多克隆抗体最佳包被浓度包被酶标板, $100\mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜,最佳包被量为 $5 \mu\text{g/mL}$, 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液作为稀释液用于包被固相载体;

[0107] (2)洗板 :将孔内液体甩干,用洗涤液 250 μ L/孔洗涤 4 ~ 5 次,每次间隔 10s,用吸水纸拍干 ;

[0108] (3)封闭 :将由质量分数为 1% 的牛血清白蛋白和质量分数为 10% 的蔗糖的磷酸盐缓冲液组成的封闭液加入酶标板,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时,将孔内液体甩干,拍干,真空干燥,加铝箔袋真空封装。

[0109] 如上所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒在快速定量检测 β_2 -受体激动剂残留量中的应用。

[0110] 而且,所述 β_2 -受体激动剂来源于尿液、血清、肌肉组织、饲料或牛奶中。

[0111] 而且,所述检测 β_2 -受体激动剂的最低检测限为 0.1ng/mL。

[0112] 如上所述的 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于:步骤如下:

[0113] (1)将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温平衡 30min 以上,摇匀 ;

[0114] (2)取出微孔板,将不用的微孔板放入铝箔袋,保存于 2-8 $^{\circ}$ C ;

[0115] (3)浓缩洗涤液在使用前回复到室温 ;

[0116] (4)编号 :将样本和校准品对应微孔按序编号,每个样本和校准品做平行,并记录校准孔和样本孔所在的位置 ;

[0117] (5)加校准品 / 样本 :加入校准品及样本各 50 μ L 到对应的微孔中,随即加入酶标记物工作液 50 μ L/孔,振荡混匀,用封板膜封板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30min ;

[0118] (6)洗板 :揭开封板膜,将孔内液体甩干,用浓缩洗涤液 250 μ L/孔洗涤 4 ~ 5 次,每次间隔 10s,拍干 ;

[0119] (7)显色 :底物 A 液和底物 B 液按体积比 1:1 混匀,100 μ L/孔加入微孔板中,振荡混匀,用封板膜封板后,置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 15min ;

[0120] (8)测定 :加入终止液 50 μ L/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450nm 处,测定每孔 OD 值 ;

[0121] (9)结果 :所获得的校准品和样品吸光度值的平均值除以第一个校准的吸光度值再乘以 100,即可检测得出 β_2 -受体激动剂剂量。

[0122] 本发明的优点和积极效果是 :

[0123] 1、本发明试剂盒的灵敏度为 0.1ppb,精密度 :批内变异系数(CV%),CV%<5% ;批间变异系数(CV%),CV%<10% ;准确度以回收率表示准确度,回收率应在 80%—110% 之间。IC50 范围 :在 0.3-0.5ppb 之间,线性相关系数 |r| :不小于 0.9900,具有使用范围广、使用方便、检测准确的优点。

[0124] 2、本发明试剂盒的制备方法成功地将沙丁胺醇抗原与载体蛋白 OVA,通过混合酸酐法使 SAL 与 OVA 偶联合成免疫抗原 SAL-OVA ;通过免疫绵羊和纯化技术得到了高纯度的多克隆抗体,并与 9 种 β_2 -受体激动剂均有交叉反应 ;采用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶和沙丁胺醇半抗原交联而成酶标记抗原,从而建立了一种简便、快速、灵敏的直接竞争法的试剂盒,试剂盒灵敏度 0.1ng/mL,而且方法简单、易于操作,成本低廉。

[0125] 3、本发明试剂盒的开发和建立,依托成熟的 ELISA 液体系统平台,经查阅大量的参考文献,并参考国内外同类试剂盒,经大量的实验和体系的优化,最终确立了试剂盒的生产和反应条件,可广泛地应用于尿液样或血清、肌肉或组织、饲料、牛奶等样品中 β_2 -受体

激动剂残留量的快速定量检测。

附图说明

[0126] 图 1 为本发明试剂盒以 β_2 -受体激动剂浓度为横坐标,不同浓度校准品 OD 值 B/B0 值为纵坐标,得出的标准曲线方程图;

[0127] 图 2 为本发明试剂盒以 β_2 -受体激动剂浓度为横坐标,以尿液为基质的不同浓度校准品 OD 值 B/B0 值为纵坐标,得出的标准曲线方程图。

具体实施方式

[0128] 下面结合实施例,对本发明进一步说明,下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0129] 本发明试剂盒通过混合酸酐法将沙丁胺醇(SAL)与卵清蛋白(OVA)合成免疫原,用偶联免疫原免疫绵羊制备多克隆抗体,并用硫酸铵沉淀法初步纯化,用亲和层析法进一步纯化用 ELISA 方法进行鉴定,酶标抗原采用高碘酸钠将辣根过氧化物酶和沙丁胺醇半抗原交联而成。用所得抗体和酶标抗原建立直接竞争酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测 β_2 -受体激动剂,最低检测限为 0.1ng/mL。

[0130] 本发明试剂盒的测定原理为:试剂盒采用直接竞争抑制 ELISA 方法,在酶标板微孔条上预包被抗体,样本中残留的 β_2 -受体激动剂和酶标抗原竞争抗沙丁胺醇抗体,用 TMB 底物显色,样本吸光度值与其所含残留物 β_2 -受体激动剂的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数即可得出样品中 β_2 -受体激动剂的含量。

[0131] 一、一种 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒,其组成如下:

[0132] 本试剂盒是由包被板、校准品、高浓度校准品、酶标记物工作液、底物液 A、底物液 B、终止液、20X 浓缩洗涤液,20X 浓缩提取液,具体见表 3。

[0133] 表 3 本发明试剂盒组成成分表

[0134]

名称	成分	说明
包被板	孔底包被有抗沙丁胺醇抗体	96孔酶标板×1块（包被有抗体）采用进口德国greiner, 包被量为5 μ g/mL, 包被温度4 $^{\circ}$ C过夜
校准品	分别含有不同浓度的系列校准品（盐酸克伦特罗）	六个浓度为：0ppb, 0.1ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb
高浓度校准品	用于添加回收试验（盐酸克伦特罗）	1mL/瓶 100ppb
酶标记物工作液	含有标记HRP的沙丁胺醇半抗原	过碘酸钠法将HRP(辣根过氧化物酶)与沙丁胺醇半抗原结合
底物液A	过氧化氢脲	0.07% 重量百分比
底物液B	TMB（3,3',5,5'-四甲基联苯胺）	0.04% 重量百分比
终止液	硫酸	2M
20X 浓缩洗涤液	20X浓缩洗涤液，使用前以蒸馏水按照1：19 的体积比稀释，混匀后使用。	0.2M PBST（磷酸盐吐温缓冲液）
20X 浓缩提取液	20X浓缩提取液，使用前以蒸馏水按照1：19 的体积比稀释，混匀后使用。	0.2M PBS（磷酸盐缓冲液）

[0135] 本发明试剂盒所涉及主要材料制备方法如下：

[0136] 1、酶结合物

[0137] 酶标抗原中的酶为辣根过氧化物酶(HRP),辣根过氧化物酶-沙丁胺醇标记物采用过碘酸钠法制备,步骤如下：

[0138] 1) 称取 5mgHRP 溶解于 0.5mL 蒸馏水中；

[0139] 2) 于上液中加入 0.5mL 新配的 0.1M NaIO₄ 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟；

[0140] 3) 将上述溶液装入透析袋(8000-12000Da)中,对 1mM 的醋酸钠缓冲液(pH4.4)透析,4 $^{\circ}$ C过夜；

[0141] 4) 加 0.2M 碳酸盐缓冲液,使以上醛化 HRP 的 pH 升高到 9.0 ~ 9.5,然后立即加入 5mg 沙丁胺醇抗体,室温避光轻轻搅拌 2 小时；

[0142] 5) 加 0.2mL 新配的 4mg / mL NaBH₄ 液,混匀,再置 4 $^{\circ}$ C,2 小时；

[0143] 6) 将上述液装入透析袋(8000-12000Da)中,对 0.15M pH7.4PBS 透析,4 $^{\circ}$ C过夜；

[0144] 7) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4 $^{\circ}$ C,1 小时；

[0145] 8) 3000rpm 离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 中；

[0146] 9) 将上述溶液装入透析袋中,对 0.15M PH7.4 的 PBS 缓冲盐水透析,去除铵离子后,10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,上清液即为辣根过氧化物酶-沙丁胺醇标记物的酶结合物,分装后,冰冻保存。

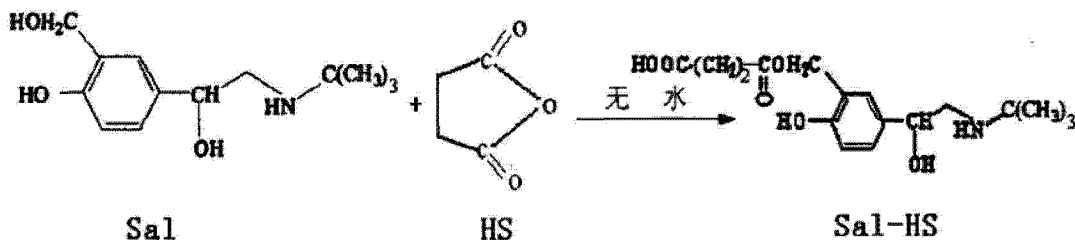
[0147] 2、免疫原

[0148] 免疫原的制备原理简述:沙丁胺醇(SAL)为小分子化合物,仅具有反应原性而缺乏免疫原性,属半抗原。半抗原与载体蛋白偶联形成的偶合物,不仅具有免疫原性,而且有其本身特异的反应原性。将沙丁胺醇抗原与载体蛋白 OVA,通过混合酸酐法使 SAL 与 OVA 偶联合成免疫抗原 SAL-OVA,纯化后进行紫外可见光吸收波长扫描和红外光谱鉴定是否偶联成功,成功即可作为免疫原。

[0149] 沙丁胺醇琥珀酸衍生物的合成:

[0150] 根据 Sal 三个羟基的活泼性不同,在无水条件下,Sal 酚羟基邻位的羟甲基可以与琥珀酸酐发生醇解反应,生成 Sal 的琥珀酸衍生物 (Sal-HS),反应式如下:

[0151]



[0152] 实验步骤如下:

[0153] (1)称取 100mgSal,溶解在 12.5mL 甲醇中;

[0154] (2)减压蒸馏(0.1mmHg,60℃)除去甲醇;

[0155] (3)残留物溶于 20mL 无水乙醇,并加入 45mg 琥珀酸酐,此时溶液出现混浊;

[0156] (4)室温搅拌反应 3h;

[0157] (5)将反应液离心(10000rpm,30min),收集沉淀;

[0158] (6)用无水乙醇反复清洗离心,得沉淀;

[0159] (7)抽滤;

[0160] (8)室温阴干,即得沙丁胺醇琥珀酸衍生物。

[0161] Sal-HS-OVA 的合成步骤如下所示:

[0162] (1)称取 40mg Sal-HS 溶解于一定量的三乙胺一二氧六环一二甲基甲酰胺(0.15/3.75/3.75V/V/V)混合溶液中,冰浴 30min;

[0163] (2)加入 4.875g 氯甲酸异丁酯,冰浴环境中搅拌反应 2h;

[0164] (3)称取 21mgOVA,将其充分溶解于 6mL 硼酸钠缓冲液(0.1mol/L,pH8.5)中;

[0165] (4)将配置好的 OVA 溶液逐滴加入到 Sal-HS 反应混合液中;

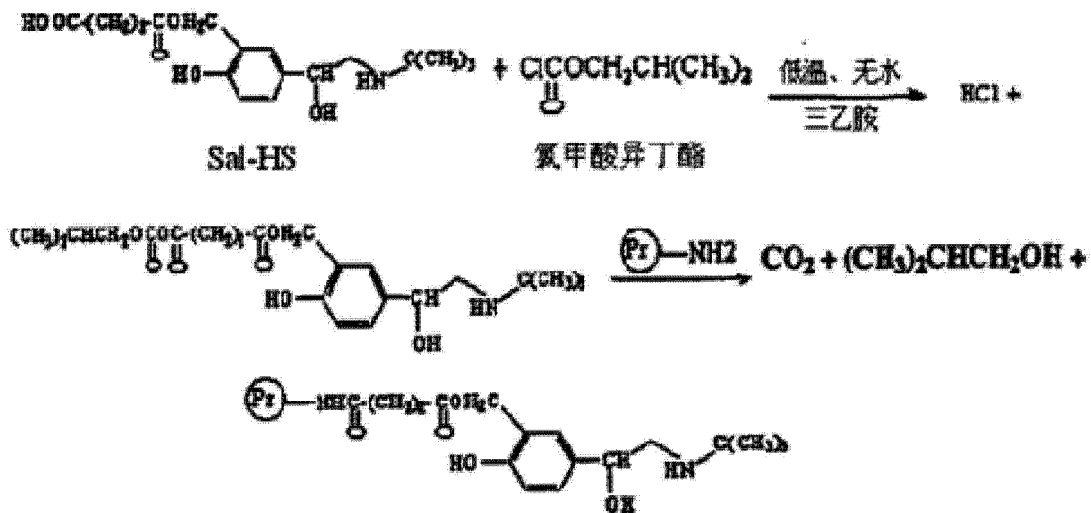
[0166] (5)反应混合物搅拌反应过夜,期间间歇对反应液 pH 进行监控,使其 pH 保持在 8.5;

[0167] (6)次日,将反应液对 0.01mol/L 的 PBS 溶液进行充分透析;

[0168] (7)透析 4 天后,将透析产物分装于 1.5mL 离心管中,置 -20℃ 冰箱中保存。

[0169] 反应式如下:

[0170]



[0171] 3、抗沙丁胺醇多克隆抗体的制备流程

[0172] 3.1 将上述合成的 SAL-OVA 作为免疫原，稀释成 1mg/mL，与福氏不完全佐剂等量混合，采用皮内注射接种绵羊，每四周免疫一次，每次免疫后 7 天采血清测试效价，观察抗血清效价增长情况，达到满意效价时，颈静脉采血分离抗血清。

[0173] 3.2 抗体的纯化

[0174] 3.2.1 粗提

[0175] 以饱和硫酸铵盐析法提纯血清中的抗体球蛋白，用层析柱进一步纯化，对磷酸盐缓冲液透析。吸取抗血清 10ml，平衡至室温，加入 10ml 的 0.01mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液，充分混匀，加入 250ml 的饱和硫酸铵溶液（以浓氨水调至 PH7.4），摇匀，4℃ 冰箱静置 3 小时，以 5000rpm 离心 30 分钟，去除上清液，加入 10ml 0.01mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液，溶解沉淀物，重复盐析两次。最终加入 10ml 0.01mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解免疫球蛋白 IgG 沉淀物，装入透析袋（8000-12000），对 1000ml 0.01mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液透析 24 小时，期间换液 3 次。

[0176] 3.2.2 过柱纯化

[0177] 1、DEAE-Sephadex

[0178] A-50 预处理：

[0179] 称 DEAE-SephadexA-50（下称 A-50）5g，悬于 500ml 蒸馏水内，1h 后倾去上层细粒。按每克 A-50 加 0.5mol/L NaOH15ml 的比例，将 A-50 浸泡于 0.5mol/L NaOH 液中，搅匀，静置 30min，装入布氏漏斗（垫有 2 层滤纸）中抽滤，并反复用蒸馏水抽洗至 pH 呈中性；再以 0.5mol/L HCl 同上操作过程处理，最后以 0.5mol/L NaOH 再处理一次。处理完后，将 A-50 浸泡于 0.1mol/L pH7.4PB 缓冲液中过夜。

[0180] 2、装柱

[0181] （1）将层析柱垂直固定于滴定架上，柱底垫一圆形尼龙纱，出水口接一乳胶或塑料管并关闭开关。

[0182] （2）将 0.1mol/L, pH7.4PB 沿玻璃棒倒入柱中至 1/4 高度，再倒入经预处理并以同上缓冲液调成稀糊状的 A-50。等 A-50 凝胶沉降 2 ~ 3cm 高时，开启出水口螺旋夹，控制流速 1mL/min，同时连续倒入糊状 A-50 凝胶至所需高度。

[0183] （3）关闭出水口，待 A-50 凝胶完全沉降后，柱面放一圆形滤纸片，以橡皮塞塞紧柱

上口。通过插入橡皮塞之针头及所连接的乳胶或塑料管与洗脱液瓶相连接。

[0184] 3、平衡

[0185] 启开出水口螺旋夹,控制流速 12 ~ 14 滴 /min。使约 2 倍床体积的洗脱液流出。并以 pH 计与电导仪分别测定洗脱液及流出液之 pH 值与离子强度,两者达到一致时关闭出水口,停止平衡。

[0186] 4、加样及洗脱

[0187] 启开上口橡皮塞入下口螺旋夹,使柱中液体缓慢滴出,当柱面液体与柱面相切时,立即关闭出水口,以毛细滴管沿柱壁加入样品(体积应 < 床体积 2%,蛋白浓度以 <100mg 为宜)。松开出水口螺旋夹使样品缓慢进入柱内,至与柱面相切时,立即关闭下口,以少量洗脱液洗柱壁 2 ~ 3 次;再放开出水口,使洗液进入床柱,随后立即于柱面上加入数毫升洗脱液,紧塞柱上口,使整个洗脱过程成一密闭系统。并控制流速 12 ~ 14 滴 /min。

[0188] 5、收集

[0189] 开始洗脱的同时就以试管进行收集。每管收集 3 ~ 5ml。共收集 10 ~ 15 管。

[0190] 6、测蛋白

[0191] 以 751 型紫外分光光度计分别测定每管 OD280nm, 与 OD260nm, 按公式计算各管蛋白含量。并以 OD280nm 为纵座标,以试管编号为横座标,绘制洗脱曲线。

[0192] 7、合并、浓缩

[0193] 将洗脱峰的上坡段与下坡段各管收集液分别进行合并,以 PEG (MW6000)浓缩至所需体积,加入 0.02%Na₃防腐,于 4℃ 保存备用。长期保存时应贮于 -20℃ 冰箱。

[0194] 4、试剂的配制

[0195] 4.1 标准溶液:准确称取盐酸克伦特罗 1mg,用无水甲醇配制成 1mg/mL 的母液,再用 PBS 稀释到最终所需的浓度(0.1ppb-8.1ppb),1ml/瓶灌装。

[0196] 4.2 酶标抗原溶液:用酶稀释液(含质量浓度为 1%BSA 的磷酸盐缓冲液)将酶标抗原稀释到 1:1000 (酶标抗原:酶稀释液的体积比),7ml/瓶灌装。

[0197] 4.3 底物液 A:用 0.1M 的醋酸-柠檬酸缓冲液将过氧化脲稀释到重量百分比为 0.07%,7ml/瓶灌装。

[0198] 4.4 底物液 B:用 0.1M 的醋酸-柠檬酸缓冲液将 TMB 稀释到重量百分比为 0.04%,7ml/瓶灌装。

[0199] 4.5 终止液:2M 硫酸,7ml/瓶灌装。

[0200] 4.6 洗涤液:取 50mL 浓缩洗涤液加入去离子水 950mL 稀释,混匀后使用,置 4℃ 保存。

[0201] 4.7 提取液:取 50mL 浓缩提取液加入去离子水 950mL 稀释,混匀后使用,置 4℃ 保存。

[0202] 4.8 包被板的包被步骤如下:

[0203] A) 包被:将抗体用最佳包被浓度包被酶标板,100uL/孔,4℃ 过夜,最佳包被量为 5 μg/mL,0.05M pH9.6CBS (碳酸盐缓冲液)作为稀释液用于包被固相载体。

[0204] B) 洗板:将孔内液体甩干,用洗涤液 250 μL/孔充分洗涤 4 ~ 5 次,每次间隔 10s,用吸水纸拍干。

[0205] C) 封闭:将质量分数为 1%BSA(牛血清白蛋白)和质量分数为 10% 的蔗糖(sucrose)

的磷酸盐缓冲液组成的封闭液加入酶标板,200uL/孔,37℃温育 2 小时,将孔内液体甩干,用吸水纸拍干,真空干燥,加铝箔袋真空封装。

[0206] 本发明的沙丁胺醇酶联免疫检测试剂盒分析性能如下：

[0207] 1、成品检定

[0208] 1.1 物理检查

[0209] 各组分应符合各自外观和感官要求,装量准确,位置摆放正确,组件齐全。标签清晰,完整,打印内容正确。

[0210] 1.2 实验检定

[0211] 1.2.1 灵敏度:以最低检测限表示。测定 20 孔零标准,记录测得的 OD 平均值,以能达到 20 份空白样品测定均值加 3 倍标准差时的样品最低药浓为检测限。

[0212] 1.2.2 准确性:回收率用添加法测定回收率,选定 1ppb、5ppb 两个添加浓度。每一浓度做 5 个平行样,每样作 2 孔,进行不少于 3 次重复试验,回收率在 80 ~ 110%。

[0213] 1.2.3 特异性:

[0214] 交叉反应

[0215] 克伦特罗 100%

[0216] 沙丁胺醇 100%

[0217] 溴代克伦特罗 150%

[0218] 溴布特罗 110%

[0219] 马布特罗 75%

[0220] 克伦潘特罗 65%

[0221] 马喷特罗 50%

[0222] 特普他林 35%

[0223] 卡布特罗 30%

[0224] 克伦丙罗 12%

[0225] 西马特罗 10%

[0226] 多巴酚丁胺 0.5%

[0227] 利托君 0.1%

[0228] 莱克多巴胺 0.01%。

[0229] 1.2.4 精密性:选用标准曲线 50% 抑制浓度(IC_{50})附近浓度的标准溶液重复测定。本试剂选用 5ppb 校准品重复测定。

[0230] 批内变异系数:CV<5%;

[0231] 批间变异系数:CV<10%。

[0232] 1.2.5 线性:对系列校准品进行测定,用 4p 模拟曲线作图,计算其 R 值, $R>0.9900$ 。

[0233] 1.2.6 稳定性:

[0234] 稳定性:37℃加速稳定实验应 5 天稳定。0 标准液的 OD 值、 IC_{50} 、代表浓度的添加回收率、质控品测定值均在允差范围内。

[0235] 2、保存及有效期:于 2-8℃干燥、避光保存,自检定合格之日起有效期为 6 个月。

[0236] 二、如上所述 β_2 -受体激动剂酶联免疫试剂盒检测 β_2 -受体激动剂的残留量检测样品处理:

[0237] 1、尿液或血清(稀释倍数:1)

[0238] 可以直接进行检测分析。若尿样呈浑浊状,4000 转/分钟,离心 5 分钟或过滤后取上清液检测。为了避免高背景值,可用提取液进行 5 倍稀释(1mL 尿样+4mL 提取液)。

[0239] 2、肌肉或组织

[0240] 方法 A:(稀释倍数:0.5)

[0241] (1)除去肌肉或组织中的脂肪。称取 $3 \pm 0.05\text{g}$ 匀质样品于 50mL 离心管中,加入 8mL 乙腈和 1mL 乙酸乙酯,最大转速涡旋振荡 10 分钟。室温 4000 转/分钟,离心 5 分钟;

[0242] (2)取上清液 6mL,60-70°C 减压蒸馏,或者 60-70°C 水浴氮气吹干;

[0243] (3)取 1mL 正己烷溶解干燥物,并加入 1mL 提取液,最大转速涡旋振荡 1 分钟。(如果出现乳化现象,同时下层水相量不足够检测,保证管子排气,85°C 水浴 3 分钟)。取 50 μ l 下层水相进行检测。

[0244] 方法 B:(稀释倍数:4)

[0245] (1)除去肌肉、肝脏或者肾脏中的脂肪,称取 $2 \pm 0.05\text{g}$ 均质后的样品于 10mL 离心管中,加 2mL 3% 三氯乙酸,振荡 10 分钟,室温 4000 转/分钟,离心 10 分钟。

[0246] (2)转移出上清液,用 0.05M NaOH 1:1 混匀(1mL 上清液+1mL 0.05M NaOH),取 50 μ l 进行检测。

[0247] 3、饲料

[0248] 方法 A:直接稀释方法(稀释倍数:10)

[0249] 用乳钵研碎饲料,称 1g 研碎的饲料样品加入 10mL 0.01M 的盐酸,充分混合 10 分钟。检查 pH 值是否在 6.5~8 之间,否则用氢氧化钠或盐酸调节。室温 4000 转/分钟,离心 5 分钟,转移出上清液(如上清液仍然浑浊可提高转速或用滤纸过滤。直接取上清液进行检测。

[0250] 方法 B:有机溶剂提取法(稀释倍数:1.0)

[0251] 使用适当匀浆器匀质样品。取 1.5g 匀质样品,加入 8mL 乙腈和 1mL 乙酸乙酯,最大转速涡旋振荡 10 分钟。室温 4000 转/分钟,离心 5 分钟,移取 6mL 上清液到另一新试管,60-70°C 减压蒸馏,或 60-70°C 水浴氮气吹干。取 1mL 正己烷溶解干燥物,并加入 1mL 提取液,最大转速涡旋振荡 1 分钟。室温 4000 转/分钟,离心 5 分钟,每孔取 50 μ l 下层水相进行检测。

[0252] 4、牛奶(稀释倍数:5)

[0253] 取 10mL 牛奶室温(20-25°C)4000 转/分钟,离心 10 分钟,吸除上层脂肪层。用提取液进行 1:4 稀释(1mL 牛奶+4mL 提取液),取 50 μ l 液体进行检测。

[0254] 注意样品的保存:

[0255] ---- 未处理的样品冷冻保存

[0256] ---- 处理后的样品最好立即测定,处理后样品可在 2~8°C 避光条件保存 24 小时。

[0257] 本试剂盒的使用方法如下:(室温 20-25°C 条件下操作)

[0258] 1、将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20-25°C)平衡 30min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

[0259] 2、取出需要数量的微孔板,将不用的微孔板放入铝铂袋,保存于 2-8°C;

[0260] 3、洗涤液在使用前也需回复到室温；

[0261] 4、编号：将样本和校准品对应微孔按序编号，每个样本和校准品做 2 孔平行，并记录校准孔和样本孔所在的位置；

[0262] 5、加校准品 / 样本：加入校准品及样本各 50 μ l 到对应的微孔中，随即加入酶标记物 50 μ l / 孔，轻轻振荡混匀，用封板膜封板后置 25℃ 避光环境中反应 30min；

[0263] 6、洗板：小心揭开封板膜，将孔内液体甩干，用洗涤液 250 μ l / 孔充分洗涤 4 - 5 次，每次间隔 10s，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用干净的枪头戳破）；

[0264] 7、显色：加入显色液（底物 A 液和底物 B 液 1:1 混匀）100 μ l / 孔，轻轻振荡混匀，用封板膜封板后，置 25℃ 避光环境中反应 15min；

[0265] 8、测定：加入终止液 50 μ l / 孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm 处（建议用双波长 450/630nm 检测，在 5min 内读完数据），测定每孔 OD 值。（若无酶标仪，则不加终止液用目测法可进行判定）；

[0266] 9、结果

[0267] 所获得的校准和样品吸光度值的平均值除以第一个校准（0 校准）的吸光度值再乘以 100。因此 0 校准等于 100% 并且以百分比的形式给出吸光度值。

[0268] 公式如下：

[0269] 校准的吸光度值（或样品）

[0270] -----x100=% 吸光度值

[0271] 0 校准的吸光度值

[0272] 计算的校准值绘成为一个对应 β₂- 受体激动剂浓度的半对数坐标系统曲线图，相对应每一个样品的浓度可以从校正曲线上读出。

[0273] 为了获得样品中的 β₂- 受体激动剂的实际浓度，从标准曲线上读出的浓度值必须乘以相对应的稀释系数。

[0274] 10) 本发明采用的直接抑制 ELISA 方法测定标准曲线的确定如下

[0275] 用抗 SAL 多克隆抗体对不同浓度的 β₂- 受体激动剂校准品进行抑制，以 100ppb 的校准品，进行 3 倍稀释，以 0.01M PBS 为基质。按照 ELISA 操作程序进行测定。以 β₂- 受体激动剂浓度为横坐标，不同浓度校准品 OD 值，B/B₀ 值为纵坐标，各 OD 值见表 4，得出标准曲线方程，见图 1。

[0276] 表 4 不同浓度校准品 OD 值

[0277]

浓度值	吸光度	项目名
100	0.321	OD
33.3	0.356	OD
11.1	0.452	OD
3.7	0.956	OD

1.23	1.211	OD
0.41	1.521	OD
0.137	1.686	OD
0.045	1.876	OD
0	1.871	OD

[0278] 试验结论：由图 1 可见，以 β_2 -受体激动剂浓度为横坐标，不同浓度校准品 OD 值 B/B0 值为纵坐标，得出标准曲线方程，为 $y=0.977x+0.0447$ ， R^2 为 0.9669，校准品在一定范围内成线性抑制。

[0279] 检测实例：

[0280] 本试剂盒可用于猪尿的直接检测，如果猪尿样品浑浊，应 4000 转 / 分钟，离心 5 分钟或过滤后取上清液检测。为了避免高背景值，可用样品提取液作 5 倍稀释。

[0281] 按照试剂盒的操作，对含有系列浓度 β_2 -受体激动剂校准品的进行多次试验，获得的竞争曲线见图 2，由图 2 可知该曲线成 S 型，线性范围在 0.1-100ppb 之间，当 β_2 -受体激动剂校准品浓度在 3.4ppb 时可产生 50% 抑制，线性相关系数为 0.9697，最低检出限 (IC10) 在 0.1ppb 左右，此结果表明，抗 SAL 多克隆抗体在尿液基质中也可呈现较好的亲和性。

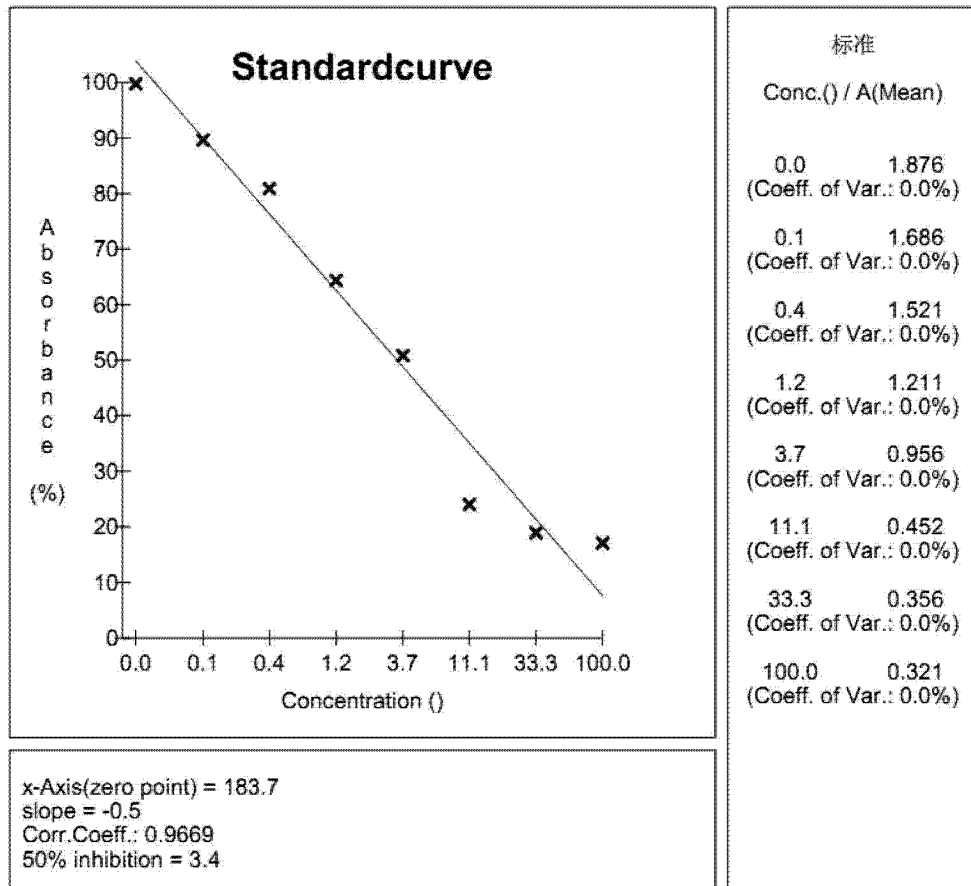


图 1

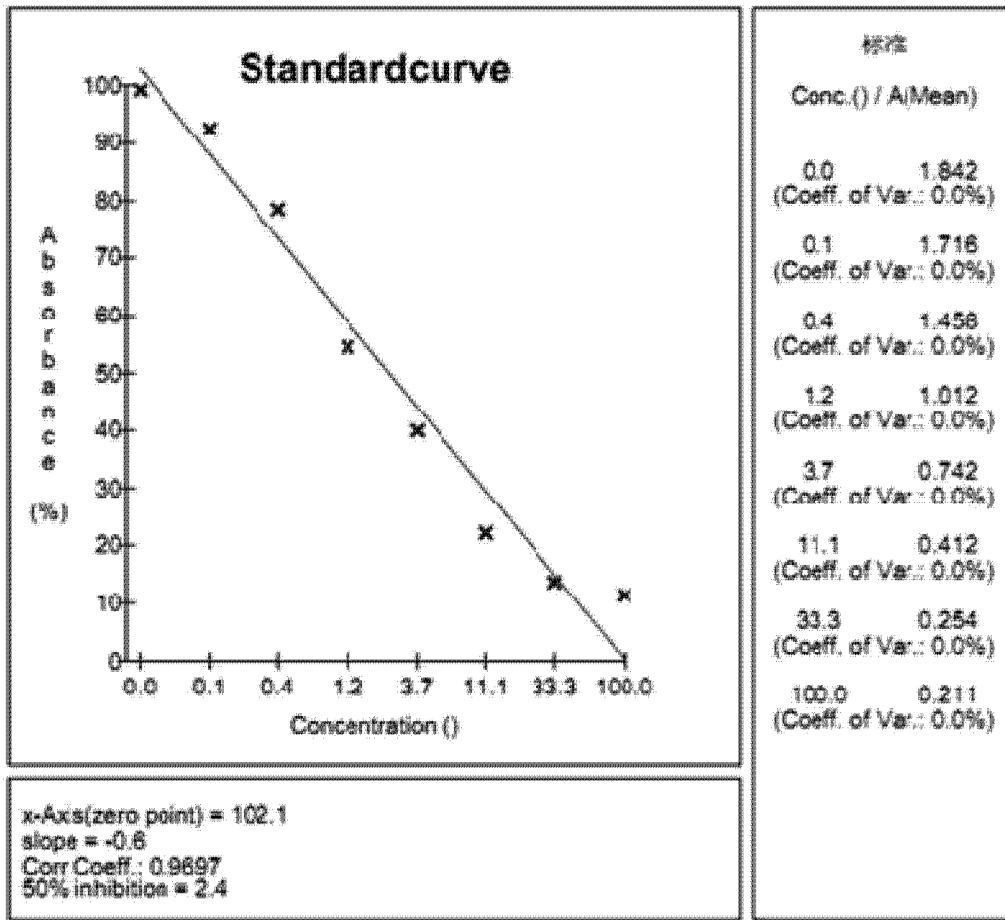


图 2

专利名称(译)	一种β2-受体激动剂酶联免疫试剂盒及其使用方法和应用		
公开(公告)号	CN103235117A	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201310128270.6	申请日	2013-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	天津康利缘生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津康利缘生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津康利缘生物工程有限公司		
[标]发明人	钟凯		
发明人	钟凯		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及本发明涉及一种β2-受体激动剂酶联免疫试剂盒，其组成成分及比例如下：包括包被板、校准品、酶标记物工作液、底物液A、底物液B、终止液、浓缩洗涤液，浓缩提取液。本发明试剂盒的灵敏度为0.1 ppb，精密度：批内变异系数 (CV%)，CV%<5%；批间变异系数 (CV%)，CV%<10%；准确度以回收率表示准确度，回收率应在80%—110%之间。IC50范围：在0.3-0.5ppb之间，线性相关系数|r|：不小于0.9900，具有使用范围广、使用方便、检测准确的优点。

