

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510097304.5

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1793927A

[22] 申请日 2005.12.31

[21] 申请号 200510097304.5

[71] 申请人 江南大学

地址 214036 江苏省无锡市惠河路170号

[72] 发明人 金坚 时瑾 黄飏 张莲芬
许赣荣 宓晓黎

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹

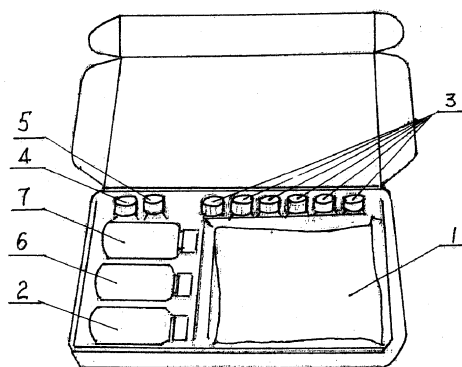
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其检测方法

[57] 摘要

一种检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 技术领域，用于对动物性食品、血液及尿液中盐酸克伦特罗 (CBL) 含量的检测。本发明配制的试剂盒，微孔板包被有 CBL - OVA，加入 CBL 标准或样品，再加入 CBL 抗体。游离的 CBL 与微孔板上的 CBL - OVA 竞争 CBL 抗体，没有连接的 CBL 抗体被洗涤除去，加入 EU^{3+} - 羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的 EU^{3+} - 羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度 cps，荧光强度与样品中的 CBL 浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中 CBL 的含量。本发明提供的检测 CBL 试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，最低检测浓度为小于 0.05ng/ml，相应的最低检测量为小于 25ng/kg。



1.一种检测盐酸克伦特罗的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征是由96或48孔包被板(1),缓冲液(2),盐酸克伦特罗标准(3),盐酸克伦特罗的抗体冻干品(4),钨标记的羊抗兔抗体(5),洗涤液(6)和增强液(7)所组成;

包被板(1):包被固相抗原,用50mmol/L pH9.6 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 的缓冲液将盐酸克伦特罗-卵清蛋白稀释至1mg/L作为包被液,96或48孔微孔板各孔加100 μl ,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去包被液,冲洗三次,加200 μl 含质量浓度0.2%明胶的50mmol/L pH7.2的Tris-HCl的缓冲液封闭,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存;

缓冲液(2):8mmol/L NaCl、质量浓度0.1%明胶、50 $\mu\text{mol/L}$ 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80和含质量浓度0.1% NaN_3 的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

盐酸克伦特罗标准(3):共6瓶;盐酸克伦特罗浓度分别为:0ng/ml,0.05ng/ml,0.25ng/ml,1ng/ml,5ng/ml,25ng/ml,稀释液为pH7.4 10mmol/L的PBS;

盐酸克伦特罗的抗体冻干品(4):用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂1.2ml混合2mg盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白,用匀浆器混合2小时,制得油包水抗原乳化剂,取600 μl 制备好的油包水抗原乳化剂,在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射,在免疫3~4次后,血清进行鉴定,合格后稀释、分装、冻干备用;

钨标记的羊抗兔抗体(5):取溶解于50mmol/L PBS pH7.0的5g/L羊抗兔抗体1-2ml,经PD-10柱转换缓冲条件,洗脱液为含0.155mol/L NaCl的50mmol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ pH8.5-9.0缓冲液,收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量,用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至2g/L,取500-1000 μl 稀释后的羊抗兔抗体加入含0.2-0.4mg的 $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸}$ 的小瓶中,28-30 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌反应16-20小时,反应液经用80mmol/L Tris-HCl pH7.8缓冲液平衡的1 \times 40cm Sephadex-G50柱层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用;

洗涤液(6):14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80和含质量浓度0.2% NaN_3 的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

增强液(7):1升pH3.2邻苯二甲酸氢钾缓冲液含15 μmol β -萘甲酰三氟丙酮,50 μmol 三正辛基氧化膦和1ml曲拉通X-100。

2.一种用权利要求1所述试剂盒检测盐酸克伦特罗的方法,其特征是取包被有盐酸克伦特罗-卵清蛋白的微孔包被板,加入盐酸克伦特罗标准或已处理好的样品到各自的微孔中,再加入盐酸克伦特罗抗体,振荡反应,洗涤液洗涤,加钨标记的羊抗兔抗体,进行标记免疫反应,洗涤液洗涤,加增强液振荡后测量荧光强度cps,对照标准曲线计算样品中盐酸克伦特罗的含量。

3.根据权利要求2所述的检测盐酸克伦特罗的方法,其特征是操作过程为:取

包被有盐酸克伦特罗-卵清蛋白的微孔包被板，加入 50 μ l 的盐酸克伦特罗标准或已处理好的样品到各自的微孔中，加用缓冲液（2）作稀释剂，1：20 稀释 20 倍后的 50 μ l 盐酸克伦特罗抗体，25-37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5-1 小时，洗涤液洗三次，加用缓冲液（2）1：20 稀释 20 倍后的 100 μ l EU³⁺-羊抗兔抗体，25-37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5-1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps，对照标准曲线计算样品中盐酸克伦特罗的含量。

4.根据权利要求 2 或 3 所述的检测盐酸克伦特罗的方法，其特征是其中的样品处理，动物组织样品处理：参照 GB/T5009.192-2003；血液样品处理：取 0.5ml 血液加 0.5ml pH7.4 10mmol/L 的 PBS 进行稀释，备用；尿液样品处理：清亮猪尿样用 pH7.4 10mmol/L 的 PBS 进行稀释 10 倍以上，备用，若尿样混浊一定要过滤或离心，取滤液或上清液稀释后备用。

一种检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其检测方法

技术领域

一种检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析（TRFIA）技术领域，用于对动物性食品、血液及尿液中盐酸克伦特罗（简称 CBL）含量的检测。

背景技术

盐酸克伦特罗（CBL）是一种 β -2 肾上腺素受体激动剂，临床上作为支气管解痉药物，对支气管平滑肌 β -2 受体具有兴奋作用。有研究显示盐酸克伦特罗能增强脂解和减慢蛋白质分解代谢，所以若在畜牧生产中大剂量使用，可明显提高饲料转化率和瘦肉率，因此又被称为瘦肉精。但如果使用剂量过大，则会对动物和人(间接)的肝脏、肾脏等器官产生相当大的毒害作用，出现心跳加速，头晕，心悸，呼吸困难，肌肉震颤，头疼等中毒症状。盐酸克伦特罗还可通过胎盘屏障进入胎儿体内产生蓄积，从而对子代产生严重的危害。

欧盟于 1996 年禁止在畜牧生产中使用该药(EC Directive 96/22/EC)，我国农业部也于 1997 年作出相同规定。尽管如此，由于经济利益的驱使，目前在畜牧生产中使用盐酸克伦特罗这一现象仍有发生，每年都发生大规模中毒事件。盐酸克伦特罗的污染引起了人们对食品安全性的恐慌。当前，造成瘦肉精屡禁不止的原因之一就是国内外检测盐酸克伦特罗的方法、手段还不完善，存在的问题主要有：灵敏度不高，准确度不够；特异性差，技术复杂，不能普及到基层。

目前盐酸克伦特罗的检测方法主要有：色谱技术和免疫分析技术。色谱技术(HPLC、GC-MS、LC-MS)由于费时，花费多，在实际应用中受到一定限制，通常作为确定性的定量检验方法；免疫分析技术(ELISA)是常用的现场抽样快速筛选检验方法，目前，我国进出口检验检疫，兽医卫生部门及屠宰场多采用德国 R-Biopharm，英国 Randox 等公司生产的盐酸克伦特罗 ELISA 检测试剂盒，但由于进口试剂盒价格昂贵，在一定程度上限制了它的使用范围。国产 ELISA 试剂盒普遍存在灵敏度不够、假阳性率高、不稳定等诸多问题。

时间分辨荧光免疫分析法（TRFIA）是上世纪八十年代初发展起来的新的免疫测定技术。时间分辨荧光免疫分析法其原理是利用具有双功能基团结构的螯合剂，其一端和镧系元素结合，另一端和抗体分子上的自由氨基联接，制成 Eu^{3+} 标记抗体，它与待测样品中的抗原结合成免疫复合物。理想情况下，测定复合物中镧系元素的荧光强度就能确定样品中抗原的量，但实际上这种复合物的荧光强度相当弱，只有

再加入一种增强溶液(Enhancement solution),使镧系元素从复合物中解离下来,并与增强液中所含的 β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA)重新形成微胶囊,在紫外等光的激发下发射很强的荧光,增强效果上百万倍。用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps,即可确定样品中抗原的量。

发明内容

本发明的目的在于提供一种检测CBL的试剂盒及其检测方法,用于对动物性食品、血液及尿液中CBL含量的检测。

本发明的技术方案:该检测CBL的试剂盒是由1.96或48孔包被板,2.缓冲液,3.盐酸克伦特罗标准,4.盐酸克伦特罗的抗体冻干品,5.铕标记的羊抗兔抗体,6.洗涤液,7.增强液所组成。

包被板(1):包被固相抗原,用50mmol/L pH9.6 Na_2CO_3 - NaHCO_3 的缓冲液将盐酸克伦特罗-卵清蛋白稀释至1mg/L作为包被液,96或48孔微孔板各孔加100 μ l,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去包被液,冲洗三次,加200 μ l含质量浓度0.2%明胶的50mmol/L pH7.2的Tris-HCl的缓冲液封闭,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜,弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20 $^\circ\text{C}$ 冷冻保存;

缓冲液(2):8mmol/L NaCl、质量浓度0.1%明胶、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80和含质量浓度0.1% NaN_3 的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

盐酸克伦特罗标准(3):共6瓶,盐酸克伦特罗浓度分别为:0ng/ml,0.05ng/ml,0.25ng/ml,1ng/ml,5ng/ml,25ng/ml,稀释液为pH7.4 10mmol/L的PBS;

盐酸克伦特罗的抗体冻干品(4):用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂1.2ml混合2mg盐酸克伦特罗-牛血清白蛋白,用匀浆器混合2小时,制得油包水抗原乳化剂,取600 μ l制备好的油包水抗原乳化剂,在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射,在免疫3~4次后,血清进行鉴定,合格后稀释、分装、冻干备用;

铕标记的羊抗兔抗体(5):取溶解于50mmol/L PBS pH7.0的5g/L羊抗兔抗体1-2ml,经PD-10柱转换缓冲条件,洗脱液为含0.155mol/L NaCl的50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH8.5-9.0缓冲液,收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量,用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至2g/L,取500-1000 μ l稀释后的羊抗兔抗体加入含0.2-0.4mg的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸的小瓶中,28-30 $^\circ\text{C}$ 磁力搅拌反应16-20小时,反应液经用80mmol/L Tris-HCl pH7.8缓冲液平衡的1 \times 40cm Sephadex-G50柱层析,收集蛋白峰,稀释、分装备用;

洗涤液(6):14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80和含质量浓度0.2% NaN_3 的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

增强液(7):1升pH3.2邻苯二甲酸氢钾缓冲液含15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮,50 μ mol三正辛基氧化膦和1ml曲拉通X-100。

本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)来检测CBL。采用TRFIA的技术主要有两个方面:特异性多克隆抗体的制备,利用抗原免疫家兔,获得含有抗

体的血清，经过生化提纯分离免疫球蛋白；第二，EU³⁺标记抗体的制备。

测定方法为：测定的基础是标记免疫反应。包被有CBL-OVA的微孔板，加入CBL标准或已处理好的样品到各自的微孔中、再加入CBL抗体，振荡反应，游离的CBL与微孔板上的CBL-OVA竞争CBL抗体，洗涤液洗涤，没有连接的CBL抗体在洗涤步骤中被除去。加入EU³⁺-羊抗兔抗体，进行标记免疫反应，再用洗涤液洗涤，反应后没有连接的EU³⁺-羊抗兔抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后，在紫外光的激发下发射很强的荧光，用时间分辨荧光仪测量其荧光强度cps，荧光强度与样品中的CBL浓度成反比，对照标准曲线计算样品中的盐酸克伦特罗含量。

其操作为：取包被有盐酸克伦特罗-卵清蛋白的微孔包被板，加入 50 μ l 的盐酸克伦特罗标准或已处理好的样品到各自的微孔中，加用缓冲液（2）作稀释剂，1：20 稀释 20 倍后的 50 μ l 盐酸克伦特罗抗体，25-37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5-1 小时，洗涤液洗三次，加用缓冲液（2）1：20 稀释 20 倍后的 100 μ l EU³⁺-羊抗兔抗体，25-37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5-1 小时，用洗涤液洗六次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量荧光强度 cps，对照标准曲线计算样品中盐酸克伦特罗的含量。

样品处理，动物组织样品处理：参照 GB/T5009.192-2003；血液样品处理：取 0.5ml 血液加 0.5ml pH7.4 10mmol/L 的 PBS 进行稀释，备用；尿液样品处理：清亮猪尿样用 pH7.4 10mmol/L 的 PBS 进行稀释 10 倍以上，备用，若尿样混浊一定要过滤或离心，取滤液或上清液稀释后备用。

本发明的有益效果：该试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，最低检测浓度为小于 0.05ng/ml，相应的最低检测量为小于 25ng/kg。

附图说明

图 1：检测盐酸克伦特罗的试剂盒示意图。1.96 或 48 孔包被板，2.缓冲液，3.盐酸克伦特罗标准，4.盐酸克伦特罗的抗体冻干品，5.铕标记的羊抗兔抗体，6.洗涤液，7.增强液。

图 2：CBL-TRFLIA 标准曲线图。

具体实施方式

实施例 1 制备试剂盒和检测肝脏样品

CBL 是典型的半抗原，故在免疫反应中具有反应原性，但需与大分子物质结合后才有免疫原性，CBL 中的羧基为活性基团，可与蛋白质的氨基结合。因此可用重氮偶合法，使 CBL 与大分子蛋白牛血清白蛋白（BSA）结合，以合成的 CBL-BSA 作为人工合成的免疫抗原进行动物免疫。

CBL-BSA 抗原的制备：3-6mg CBL 溶于 100mmol/L 预冷的 HCl 中，缓慢滴加 1mol/L 亚硝酸钠溶液，用 KI 淀粉试纸检验至试纸变为深紫色时停止，得到重氮化衍生物。称取 10-20mg BSA 溶于 pH9.6 50mmol/L 的碳酸盐缓冲液中。将重氮化的 CBL 慢慢滴入 BSA 溶液中，用 1mol/L NaOH 调节 pH 维持在 9.0~9.5，滴加结束后，继续反应 4 小时，在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中用 pH7.4 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液（PBS）

透析两天，得到 CBL-BSA 结合物进行紫外扫描检测，合格后分装备用。

多克隆盐酸克伦特罗抗体的制备：

1. 选取 4 周大的，体重约 1.5Kg 的健康新西兰大白兔。CBL 是一种半抗原，将 CBL 和 BSA 相连接作为抗原。

2 油包水抗原乳化剂的制备：用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.2ml 混合 2mg CBL-BSA，用匀浆器混合 2 小时制得油包水抗原乳化剂。将制好的乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中，一油滴状态能完整地停留在水面上，而不扩散，表明是稳定的。

3. 免疫兔子及抽血：先将兔子背部的毛小心剪去，然后取 600 μ l 制备好的油包水抗原乳化剂，在新西兰大白兔身上多位点地进行皮下注射，使抗原能缓慢扩散，每隔 1~2 周免疫一次，共需六次，在免疫 3~4 次后，从兔子的耳缘静脉抽血约 1 ml，离心 10min 后，得血清可进行鉴定。合格后稀释、分装、冻干备用。

Eu³⁺-羊抗兔抗体的制备：

取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1-2ml，经 PD-10 柱转换缓冲条件，洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量 (1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀)，用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500-1000 μ l 稀释后的羊抗兔抗体加入含 0.2-0.4mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 的小瓶中，30℃ 磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1 \times 40cm) 层析，A₂₈₀ 监测收集蛋白峰，稀释分装备用。

包被板固相抗原制备：

用 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH9.6 缓冲液将 CBL-BSA 稀释至 1mg/L 作为包被液，96 (或 48) 孔微孔板各孔加 100 μ l，4℃ 放置过夜。弃去包被液，冲洗三次，加 200 μ l 含质量浓度 0.2% 明胶的 50mmol/L pH7.2 的 Tris-HCl 的缓冲液封闭，4℃ 放置过夜。弃去封闭液，真空抽干，板条密封后置 -20℃ 冷冻保存。

试剂的配制：

(1) 盐酸克伦特罗标准，共 6 瓶，浓度分别为：0ng/ml，0.05ng/ml，0.25ng/ml，1ng/ml，5ng/ml，25ng/ml，稀释液为 pH7.4 10mmol/L 的 PBS。

(2) 缓冲液：8mmol/L NaCl、质量浓度 0.1% 明胶、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和含质量浓度 0.1% NaN₃ 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

(3) 洗涤液：14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-80 和含质量浓度 0.2% NaN₃ 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。

(4) 增强液的配制：1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮 (β -NTA)，50 μ mol 三正辛基氧化膦 (TOPO)，1ml 曲拉通 X-100 (Triton X-100)。

试剂盒提供的试剂

每一个盒中的试剂足够进行 96 个测量，盒中的材料如下：

- (1).1 × 96 孔板（8 条 × 12 孔，可以拆分为单孔）包被有 CBL-OVA。
- (2).6 × CBL 标准液, 1.0ml/瓶,标准液浓度为：0, 0.05, 0.25, 1, 5, 25ng/ml。
- (3).1 × CBL 抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。
- (4).1 × EU³⁺-羊抗兔抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。
- (5).1 × 增强液：15ml。
- (6).1 × 洗涤液：30 ml，用时以蒸馏水 1：25 稀释。
- (7).1 × 缓冲液：30 ml，

实验室应自备的试剂

高氯酸

异丙醇

乙酸乙酯

高氯酸溶液（0.1mol/L）

氢氧化钠溶液（1mol/L）

PBS 缓冲液（pH7.4, 0.01 mol/L）

异丙醇+乙酸乙酯（体积比 40+60）

蒸馏水或去离子水。

测定之前注意事项

1. 使用之前将所有试剂回升至室温(18-30℃)。
2. 使用之后立即将所有试剂放回 2-8 ℃。
3. 如果样品量大建议使用多通道移液器。
4. 在所有恒温孵育过程中,避免光线照射,用盖子盖住微孔。
5. 取出需用数量的微孔板及框架,将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封,保存于 2-8℃。

具体检测步骤如下：

先将样品进行处理：动物组织样品处理，参照 GB/T5009.192-2003。称取肝脏样品 10g(精确到 0.01g),用 20mL0.1mol/L 高氯酸溶液匀浆,置于磨口玻璃离心管中,然后置于超声波清洗器中超声 20min,取出置于 80℃水浴中加热 30min,取出冷却后离心（4500r/min）15min。倾出上清液,沉淀用 5mL0.1mol/L 高氯酸溶液洗涤,再离心,将两次的上清液合并。用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 9.5±0.1,若有沉淀产生,再离心（4500r/min）10min,将上清液转移至磨口玻璃离心管中,加入 8g 氯化钠,混匀,加入 25mL 异丙醇+乙酸乙酯（体积比 40+60）,置于振荡器上振荡萃取 20min。萃取完毕,放置 5min（若有乳化层稍离心一下）。用吸管小心将上层有机相移至旋转蒸发瓶中,用 20 mL 异丙醇+乙酸乙酯（40+60）再重复萃取一次,合并有机相,于 60℃在旋转蒸发器上浓缩至近干。用 1mL pH7.4 10mmol/LPBS 缓冲液充分溶解残留物。经针筒式微孔过滤膜过滤,洗涤三次后完全转移至 5mL 玻璃离心管中,并用 pH7.4 10mmol/LPBS 缓冲液定容至刻度,备用。

取 CBL-OVA 板条, 加入 50 μ l 的 CBL 标准或处理好的样品到各自的微孔中, 每个标准和样品必须使用新的吸头, 加缓冲液 1: 20 稀释的 CBL 抗体 50 μ l, 移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体, 25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时, 洗涤液洗三次, 加缓冲液 1: 20 稀释的 Eu^{3+} -羊抗兔抗体 100 μ l, 25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时, 用洗涤液洗六次, 加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 CBL 含量, 见表 1 和图 2, 该例的样品中 CBL 浓度为 0.09ng/ml。

表 1

CBL 标准点							
CB 浓度 (ng/ml)	0	0.05	0.25	1	5	25	肝脏样品
荧光值 (cps)	1584332	1422259	1296643	1029912	724388	364570	1388136

实施例 2 制备试剂盒

CBL-BSA 抗原的制备: 同实施例 1。

多克隆盐酸克伦特罗抗体的制备: 同实施例 1。

Eu^{3+} -羊抗兔抗体的制备:

取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 1ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH9.0 缓冲液。收集蛋白峰, 经紫外吸收分析定量 (1.46 A_{280} -0.74 A_{260}), 用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 500 μ l 加入含 0.2mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu^{3+} -DTTA) 的小瓶中, 28 $^{\circ}$ C 磁力搅拌反应 16 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱 (1 \times 40cm) 层析, 收集蛋白峰, 稀释分装备用。

包被板固相抗原制备: 同实例 1。

试剂的配制:

1. 盐酸克伦特罗标准: 0ng/ml, 0.05ng/ml, 0.25g/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 25ng/ml。
2. 缓冲液: 8mmol/L NaCl、质量浓度 0.1% 明胶、50 μ mol/L 二乙烯三胺五乙酸、0.1ml/L Tween-80 和含质量浓度 0.1% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8
3. 洗涤液: 14.5mmol/L NaCl、0.2ml/L Tween-20 和含质量浓度 0.2% NaN_3 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8。
4. 增强液的配制: 1 升 pH3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含 15 μ mol β -NTA, 50 μ mol TOPO, 1ml Triton X-100。

试剂盒提供的试剂

每一个盒中的试剂足够进行 48 个测量, 盒中的材料如下:

- (1). 1 \times 48 孔板 (4 条 X 12 孔, 可以拆分为单孔) 包被有 CBL-OVA。
- (2). 6 \times CBL 标准液, 1.0ml/瓶, 标准液浓度为: 0, 0.05, 0.25, 1, 5, 25ng/ml。
- (3). 1 \times CBL 抗体冻干品, 用时 0.5ml 蒸馏水溶解。

(4).1 × EU³⁺-羊抗兔抗体冻干品，用时 0.5ml 蒸馏水溶解。

(5).1 × 增强液：15ml。

(6).1 × 洗涤液：30 ml，用时以蒸馏水 1：25 稀释。

(7).1 × 缓冲液：30 ml。

实施例 3 制备试剂盒

CBL-BSA 抗原的制备：6mgCBL 溶于 100mmol/L 预冷的 HCl 中，缓慢滴加 1mol/L 亚硝酸钠溶液，用 KI 淀粉试纸检验至试纸变为深紫色时停止，得到重氮化衍生物。称取 20mgBSA 溶于 pH9.6 50mmol/L 的碳酸盐缓冲液中。将重氮化的 CBL 慢慢滴入 BSA 溶液中，用 1mol/LNaOH 调节 pH 维持在 9.0~9.5，滴加结束后，继续反应 4 小时，在 4℃ 冰箱中用 pH7.4 10 mmol/L 的 PBS 透析两天，得到 CBL-BSA 结合物进行紫外扫描检测，合格后分装备用。

多克隆盐酸克伦特罗抗体的制备与实施例 1 相同，略。

Eu³⁺-羊抗兔抗体的制备：

取溶解于 50mmol/L PBS pH7.0 的 5g/L 羊抗兔抗体 2ml，经 PD-10 柱转换缓冲条件，洗脱液为含 0.155mol/L NaCl 的 50mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH8.5 缓冲液。收集蛋白峰，经紫外吸收分析定量（1.46A₂₈₀-0.74A₂₆₀），用上述洗脱液稀释羊抗兔抗体至 2g/L。取 1000 μl 加入含 0.4mg 的 Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu³⁺-DTTA)的小瓶中，30℃磁力搅拌反应 20 小时。反应液经用 80mmol/L Tris-HCl pH7.8 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱（1×40cm）层析，A₂₈₀ 监测收集蛋白峰，稀释分装备用。

固相抗原制备与实施例 1 相同。

试剂的配制与实施例 1 相同。

试剂盒提供的试剂与实施例1相同。

实验室应自备的试剂与实施例 1 相同。

测定之前注意事项同实施例 1。

具体检测步骤同实施例 1。

实施例 4

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同，用于检测肌肉样品。

具体检测步骤如下：

先将样品进行处理：称取肌肉样品 10g(精确到 0.01g)，用 20mL0.1mol/L 高氯酸溶液匀浆，置于磨口玻璃离心管中，然后置于超声波清洗器中超声 20min，取出置于 80℃水浴中加热 30min，取出冷却后离心（4500r/min）15min。倾出上清液，沉淀用 5mL0.1mol/L 高氯酸溶液洗涤，再离心，将两次的上清液合并。用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 9.5±0.1，若有沉淀产生，再离心（4500r/min）10min，将上清液转移至磨口玻璃离心管中，加入 8g 氯化钠，混匀，加入 25mL 异丙醇+乙酸乙酯（40+60），置于振荡器上振荡提取 20min。提取完毕，放置 5min（若有乳化层稍

离心一下)。用吸管小心将上层有机相移至旋转蒸发瓶中,用 20 mL 异丙醇+乙酸乙酯(40+60)再重复萃取一次,合并有机相,于 60℃在旋转蒸发器上浓缩至近干。用 1mL pH7.4 0.01mol/LPBS 缓冲液充分溶解残留物。经针筒式微孔过滤膜过滤,洗涤三次后完全转移至 5mL 玻璃离心管中,并用 pH7.4 0.01mol/LPBS 缓冲液定容至刻度,备用。

取 CBL-OVA 板条,加入 50 μ l 的 CBL 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1:20 稀释的 CBL 抗体 50 μ l,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,37℃振荡 0.5 小时,洗涤液洗三次,加缓冲液 1:20 稀释的 EU³⁺-羊抗兔抗体 100 μ l,37℃振荡 0.5 小时,用洗涤液洗六次,加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 CBL 含量,见表 2 和图 2,该例的样品中 CBL 浓度为 0.03 ng/ml。

表 2

CBL 标准点							
CBL 浓度(ng/ml)	0	0.05	0.25	1	5	25	肌肉样品
荧光值 (cps)	1584332	1422259	1296643	1029912	724388	364570	1442482

实施例 5

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同,用于检测血液样品。

具体检测步骤如下:

先将血液样品进行处理:取 0.5ml 血液加 0.5ml pH7.4 10mmol/L 的 PBS 进行稀释,备用。

取 CBL-OVA 板条,加入 50 μ l 的 CBL 标准或处理好的样品到各自的微孔中,每个标准和样品必须使用新的吸头,加缓冲液 1:20 稀释的 CBL 抗体 50 μ l,移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体,25℃振荡 1 小时,洗涤液洗 3 次,加缓冲液 1:20 稀释的 EU³⁺-羊抗兔抗体 100 μ l,37℃振荡 0.5 小时,用洗涤液洗 6 次,加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 CBL 含量,见表 3 和图 2,该例的样品中 CBL 浓度为 2.01 ng/ml。

表 3

CBL 标准点							
CBL 浓度 (ng/ml)	0	0.05	0.25	1	5	25	血液样品
荧光值 (cps)	1584332	1422259	1296643	1029912	724388	364570	906071

实施例 6

试剂盒提供的试剂与实施例 1 相同,用于检测尿液样品。

具体检测步骤如下：

先将尿液样品进行处理：清亮猪尿液用 pH7.4 10 mmol/L 的 PBS 进行稀释 10 倍以上，备用。若尿样混浊一定要过滤或离心，取滤液或上清液稀释后备用。

取 CBL-OVA 板条，加入 50 μ l 的 CBL 标准或处理好的样品到各自的微孔中，每个标准和样品必须使用新的吸头，加缓冲液 1: 20 稀释的 CBL 抗体 50 μ l，移液器管尖千万不要接触到放进孔中的液体，25 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时，洗涤液洗 3 次，加缓冲液 1: 20 稀释的 EU³⁺-羊抗兔抗体 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 振荡 0.5 小时，用洗涤液洗 6 次，加 200 μ l 增强液振荡 5 分钟后测量。从标准曲线计算样品中的 CBL 含量，见表 4 和图 2，该例的样品中 CBL 浓度为 0.47ng/ml。

表 4

CBL 标准点							
CBL 浓度 (ng/ml)	0	0.05	0.25	1	5	25	尿液样品
荧光值 (cps)	1584332	1422259	1296643	1029912	724388	364570	1183804

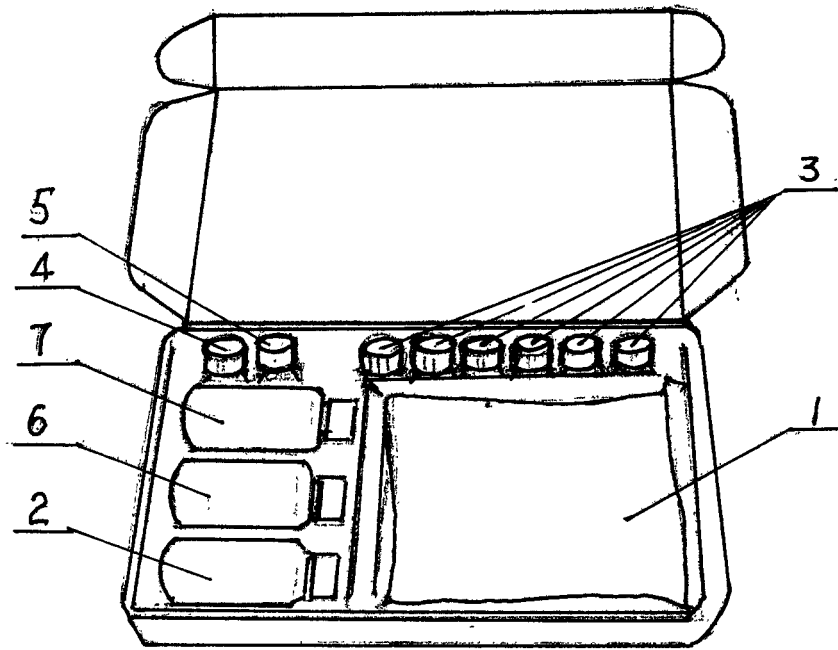


图 1

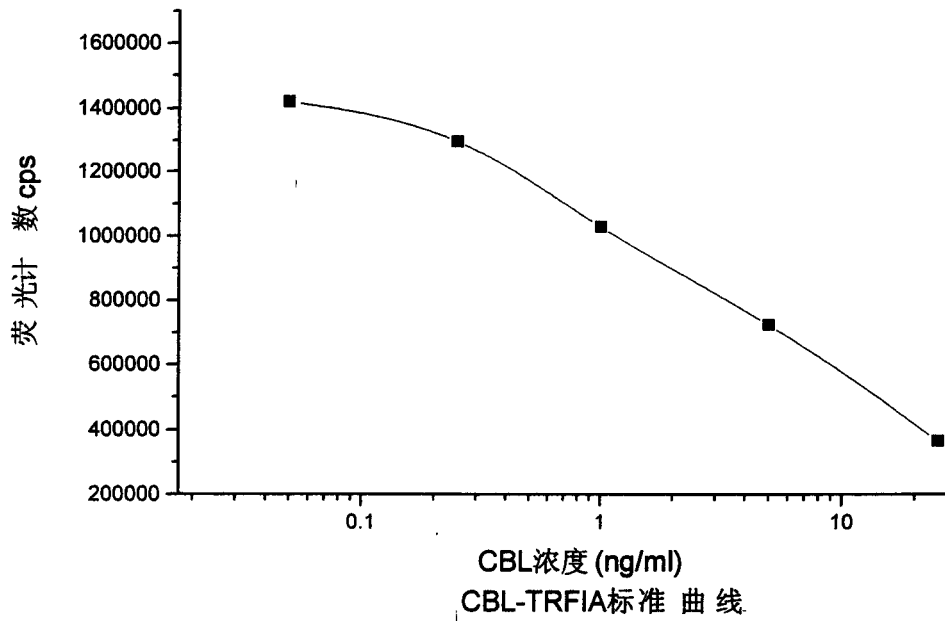


图 2

专利名称(译)	一种检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN1793927A	公开(公告)日	2006-06-28
申请号	CN200510097304.5	申请日	2005-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	金坚 时瑾 黄飏 张莲芬 许贇荣 宓晓黎		
发明人	金坚 时瑾 黄飏 张莲芬 许贇荣 宓晓黎		
IPC分类号	G01N33/543 G01N21/76 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其检测方法，属于时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术领域，用于对动物性食品、血液及尿液中盐酸克伦特罗(CBL)含量的检测。本发明配制的试剂盒，微孔板包被有CBL - OVA，加入CBL标准或样品，再加入CBL抗体。游离的CBL与微孔板上的CBL - OVA竞争CBL抗体，没有连接的CBL抗体被洗涤除去，加入EU3+ - 羊抗兔抗体，标记免疫反应后没有连接的EU3+ - 羊抗兔抗体被洗涤除去。加增强液后，用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps，荧光强度与样品中的CBL浓度成反比，对照标准曲线即可确定被测样品中CBL的含量。本发明提供的检测CBL试剂盒结构简单，使用方便、廉价、灵敏度高，最低检测浓度为小于0.05ng/ml，相应的最低检测量为小于25ng/kg。

