



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101776684 A

(43) 申请公布日 2010.07.14

(21) 申请号 201010110564.2

(22) 申请日 2010.02.12

(71) 申请人 上海优你生物科技股份有限公司
地址 201602 上海市松江区林荫新路 1158 号

(72) 发明人 肖理文 胡佳骏 郭晓梅 李康
董国秀 蔡晓帆

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理
有限公司 11225

代理人 徐琳 朱梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种克伦特罗检测试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种克伦特罗检测试剂盒,其包括:包被了克伦特罗抗体的微量测试孔、克伦特罗标准溶液、清洗缓冲液、浓缩酶标记物、底物溶液A、底物溶液B、反应终止液和酶标稀释液。本发明还公开了使用上述试剂盒检测克伦特罗的方法,其包括以下步骤:检测样品的制备;使用本发明的试剂盒检测克伦特罗;和分析检测结果。本发明的克伦特罗检测试剂盒,除可用于尿液检测以外,同时着重于对血清样本的检测,使检验结果更准确、更稳定;也可以对饲料、肌肉、组织等样品进行检测。该试剂盒简化了样品处理方式,使用简便,省时省力省钱,整个操作过程不到40分钟,回收率为80%~120%,灵敏度可达到0.05ppb。

1. 一种克伦特罗检测试剂盒,其包括:
 - (1) 包被了克伦特罗抗体的微量测试孔;
 - (2) 克伦特罗标准溶液;
 - (3) 清洗缓冲液;
 - (4) 浓缩酶标记物;
 - (5) 底物溶液 A;
 - (6) 底物溶液 B;
 - (7) 反应终止液;和
 - (8) 酶标稀释液,

其中,将克伦特罗进行重氮化,再与牛血清白蛋白 BSA 进行偶氮连结,形成克伦特罗-BSA,作为制备多克隆抗体的免疫抗原,并且用该免疫抗原制备的多克隆抗体包被微量测试孔,以及

在酶标记物的制备中,将小分子克伦特罗先进行重氮化,再与辣根过氧化物酶 HRP 进行偶氮连接形成酶标抗原克伦特罗-HRP。

2. 根据权利要求 1 所述的克伦特罗检测试剂盒,其中,所述克伦特罗标准溶液浓度分别为 0ng/mL、0.1ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL。

3. 根据权利要求 1 所述的克伦特罗检测试剂盒,其中,所述浓缩酶标记物的浓度为 0.3 μ g/mL-1.0 μ g/mL。

4. 根据权利要求 1 所述的克伦特罗检测试剂盒,其中,所述包被了克伦特罗抗体的微量测试孔的制备过程中,克伦特罗抗体包被浓度为 0.1-1 μ g/mL,包被体积为 100 μ L。

5. 根据权利要求 1 所述的克伦特罗检测试剂盒,其中,所述清洗缓冲液为含有千分之五的吐温 20 的 0.05mol/L 的 PBS。

6. 根据权利要求 1 所述的克伦特罗检测试剂盒,其中,所述底物溶液 A 用一定浓度的柠檬酸缓冲液,调 pH 值至 4.5-5.0,加入千分之一至千分之五的 30%的 H₂O₂ 制得,而所述底物溶液 B 为 8mg/mL-16mg/mL 的四甲基联苯胺溶液,该溶液的溶剂为等体积混合的二甲亚砷和水。

7. 根据权利要求 1 所述的克伦特罗检测试剂盒,其中,所述反应终止液为 10%-15%的硫酸溶液。

8. 一种检测样品中残留的克伦特罗的方法,该方法包括以下步骤:

- (1) 检测样品的制备;
- (2) 使用权利要求 1~7 中任一项所述的试剂盒检测克伦特罗;和
- (3) 分析检测结果。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,向包被了克伦特罗抗体的微量测试孔中加入克伦特罗标准溶液或样品溶液和酶标克伦特罗溶液,竞争反应后,用清洗缓冲液洗板后加入等体积混合的底物溶液 A 和 B,显色,然后加入反应终止液终止,用酶标仪测定吸光度值,其中,所述酶标克伦特罗溶液为用所述酶标稀释液稀释浓缩酶标记物得到的溶液。

10. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述样品为尿液、血清、动物组织、器官或饲料。

一种克伦特罗检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,具体地,涉及一种检测尿液、动物组织(肌肉、心脏、肝脏)、血清、饲料等中的克伦特罗的酶联免疫试剂盒和其使用方法。

背景技术

[0002] 克伦特罗(Clenbuterol, CLE),俗称“瘦肉精”,化学名为“2-[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐”,药品名为“克喘素”是一种 β -兴奋剂。因其能改善脂肪型动物的肉与脂肪的比例,并能加速动物生长,而被广泛添加于动物饲料中,并且可以残留在动物的体内。经大量实验结果证实,克伦特罗的毒性并不很强,但因其半衰期长,在体内代谢慢等原因,人体对其的耐受量非常小,治疗用药时也都十分慎重,用量过大或无病用药则会导致肌肉震颤、心悸、战栗、头痛、恶心、呕吐等症状。由于这种药物对人有严重的副作用,轻则导致心跳及心率不正常,重则可引发心脏病。目前,我国已禁止其使用。而在生产上,一些不法生产者在育肥猪(60~70Kg以上)饲料中添加,连用至宰前。由于克伦特罗饲用浓度是治疗用量的10倍以上,停药期短(如果停药造成受体调节减弱,脂肪在皮下和内脏补偿性蓄积,瘦肉率下降),更重要的是它的化学结构比较稳定,因此在肝、肺等动物内脏器官残留量很大。另外,克伦特罗能耐受100℃高温,经126℃油煎5min才会破坏减半,常规烹调对肉食品中克伦特罗残留起不到破坏作用,因而人类食用后会发生中毒。

[0003] 早在上世纪80年代就有学者开始对于克伦特罗的定量检测和分析研究,上述分析技术发展至今已经20余年。通常,检测克伦特罗的主要方法有分光光度法、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、气相色谱-质谱(GC-MS)、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)等。这些方法由于仪器设备复杂、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等原因,不适合现场监控和大量样本筛查。

[0004] 1993年Boyd等人(D.Boyd, P. Shearan, J.P. Hopkins and M. O'Keefe. Application of matrix solid phase dispersion for the determination of clenbuterol in liver samples[J], Analytica Chimica Acta, 1993, 27(5): 221-226.)应用基质固相分散法与放免法结合对肝脏中克伦特罗残留作了检测。检测中用 ^3H 标记克伦特罗,检测限达0.5ng/g,回收率大于70%,上述方法的应用开创了免疫检测分析克伦特罗残留的先河。放免法检测克伦特罗残留具有很好的特异性和高度灵敏度。但由于对条件要求比较苛刻且放射性同位素对工作人员有一定伤害,因而限制了该法的广泛应用。

[0005] 随后发展起来的荧光免疫分析法(FIA)同放免法相比,克服了放免法中的核辐射缺点。Bacigalupo等(M.A. Bacigalupo, A. Lus, G. Meroni Dosis and E. Petruzzilli. Comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and immunoassay for clenbuterol[J]. Analyst, 1995, 120(8): 2269-2271.)利用单抗技术与荧光免疫分析技术检测了克伦特罗在牛尿中的残留,检测线性范围 $10 \sim 10^5$ pg,检测限10pg。与色谱法相比,荧光免疫法检测克伦特罗残留具有特异性高,稳定性好,对样品处理要求比较简单及一次可检测多个样品等优点。缺点是对温度的强烈依赖性和荧光强度取决于激发波长。

[0006] 标记免疫分析技术是“迈向 21 世纪的医学检验技术”之一,其发展趋势是:新标记物的发展与联合应用、单克隆以及基因工程抗体的应用及免疫放大技术,可明显提高检测特异性,敏感度可达 zepto(10^{-20})、yocto(10^{-24}) 水平,即可实现分子水平的检测。

[0007] 目前,检测克伦特罗较高效的免疫分析技术是 ELISA 技术。McConnell 等人 (McConnell R I, McCormick A, Lamont J V, et al. Development of an immunoaffinity column and an enzyme immunoassay for the screening of clenbuterol in meat samples and the practical application of this test in the screening of 1005 samples [J]. Food Agri Immunol, 1994, 6: 147-153.) 在 1994 年米用 ELISA 方法对 1005 份包括肝脏、肾脏、肌肉在内的组织样品进行了筛选实验。由于组织试样前处理采用了 IAC 分离技术,因此假阳性率极低。经过复核测定,仅有 4 份假阳性,假阳性率为 0.4%。其中检出的阴性样品有 982 份,阳性样品 23 份。

[0008] 1998 年陈继明等 (陈继明, 龚晓明, 陆承平. 兔异源蛋白与自身蛋白作为载体制备克伦特罗抗血清南京农业大学学报, 1998, 21 (3): 81-88.) 用 ELISA 方法检测了饲料、尿样与脏器中克伦特罗含量,检测范围为 $15.6 \mu\text{g/mL} \sim 1.90\text{ng/mL}$;回收率多在 85%。上述检测结果有较好的稳定性和较高的标准回归曲线,与用 HPLC 检测结果大体一致。

[0009] 目前,作为商品化的检测试剂盒来讲,英国的 Randox 公司和德国的 r-biopharm 公司均率先开发出了检测肉品、饲料中克伦特罗残留的 ELISA 试剂盒。中国在应用 ELISA 检测克伦特罗方面的研究起步相对国外稍晚些,但近几年取得了明显的进展。目前国内企业和研究单位已经开发成功自主知识产权的克伦特罗 ELISA 检测试剂盒,并在近期通过了农业部兽药残留试剂盒的备案审核。早在 2002 年叶妮等 (叶妮, 闫小峰. 国内外克伦特罗 ELISA 检测试剂盒评价中国兽药杂志, 2002, 36 (10): 25-28.) 对中国兽药监察所研制的试剂盒及国外快速检测试剂盒进行了测试,结果表明该试剂盒与德国 r-biopharm 公司生产的 CLE ELISA 检测试剂盒有相当的可比性,且检测水平相当。

[0010] 上述多种检测克伦特罗的方法中,色谱、质谱等方法的检测过程烦琐、检测时间长,需贵重仪器、常常作为高端实验室确证手段。但是,实验室确诊不能完全取代快速、便捷、高效的现场检测和大样本量、高通量的筛选。根据我国目前已经形成了一套兽药残留的监控检测技术,对于克伦特罗的监控过程包括了 ELISA 筛选, HPLC 或 GC-MS、HPLC-MS 定量, GC-MS 或 HPLC-MS/MS 确证。

[0011] 由此可见, ELISA 作为一种准确、灵敏性、高性价比的检测方法,是食品安全监测、兽药残留监测领域对“瘦肉精”进行高通量筛选的理想方法。

[0012] 本发明通过特有的免疫方案免疫动物制备具有高亲和力、高特异性的抗体克伦特罗抗体,并采用酶标记抗原,建立一种可以检测克伦特罗的高特异性、高亲和力、灵敏快速的直接竞争 ELISA 检测方法。相比其他产品,本方法具有操作更简便、时间更短、特异性更高等特点。

发明内容

[0013] 针对现有技术中存在的问题,本发明人进行了广泛深入的研究,并因此完成本发明。本发明主要是利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来进行的。首先在微孔板上包被克伦特罗特异性抗体,然后加入克伦特罗标准品或待检测样品,再加入酶标抗原,温

育后,用洗涤液洗板后分别加入底物液 A 和底物液 B,显色后,加入反应终止液,用酶标仪选择 450nm 波长读取吸光值,然后通过提供的软件对结果进行计算分析。

[0014] 在整个反应完成后,样品中克伦特罗含量越多,反应呈色就越浅;反之,样品中克伦特罗含量越少,则呈色越深。

[0015] 一方面,本发明提供了一种快速、结构简单、使用简便、价格便宜、灵敏度高及便于携带的用于检测克伦特罗的试剂盒。本发明的克伦特罗检测试剂盒包括以下物质:

[0016] (1) 包被了克伦特罗抗体的微量测试孔;

[0017] (2) 克伦特罗标准溶液;

[0018] (3) 清洗缓冲液;

[0019] (4) 浓缩酶标记物;

[0020] (5) 底物溶液 A;

[0021] (6) 底物溶液 B;

[0022] (7) 反应终止液;

[0023] (8) 酶标稀释液,

[0024] 其中,将克伦特罗进行重氮化,再与牛血清白蛋白 BSA 进行偶氮连结,形成克伦特罗-BSA,作为制备多克隆抗体的免疫抗原,并且用该免疫抗原制备的多克隆抗体包被微量测试孔,以及

[0025] 在酶标记物的制备中,将小分子克伦特罗先进行重氮化,再与辣根过氧化物酶 HRP 进行偶氮连接形成酶标抗原克伦特罗-HRP。

[0026] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,在包被了克伦特罗抗体的微量测试孔的制备过程中,克伦特罗抗体包被浓度为 0.1-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被体积为 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 小时后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。

[0027] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,克伦特罗标准溶液浓度分别为 0ng/mL、0.1ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL。

[0028] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,清洗缓冲液可为含有吐温 20 的 PBS,优选为含有千分之五的吐温 20 的 0.05mol/L 的 PBS。

[0029] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,浓缩酶标记物(酶标抗原)的浓度可为 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0030] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,底物液 A 液可为用一定浓度的柠檬酸缓冲液,调 pH 值至 4.5-5.0,加入千分之一至千分之五的 30% 的 H_2O_2 制得。

[0031] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,底物溶液 B 可为 8mg/mL-16mg/mL 的四甲基联苯胺溶液,该溶液的溶剂为等体积混合的二甲亚砷和水。

[0032] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,反应终止液可为 10% -15% 的硫酸溶液。

[0033] 本发明所述的克伦特罗检测试剂盒中,酶标稀释液可为 0.05mol/L 的 PBS 溶液。

[0034] 在本发明的一个实施方式中,提供了一种检测克伦特罗的试剂盒,该试剂盒包括以下各项:

[0035]

1	微量测试孔：	每条 8 孔, 每板 12 条	
2	克伦特罗标准溶液：	0ppb、0.1ppb、0.3ppb、0.9ppb、 2.7ppb、8.1ppb 各 1 瓶	1.5mL
3	20 倍清洗缓冲液：	1 瓶	25mL
4	20 倍浓缩酶标记物：	1 瓶	1mL
5	底物溶液 A：	1 瓶	8mL
6	底物溶液 B：	1 瓶	8mL
7	反应终止液：	1 瓶	8mL
8	酶标稀释液	1 瓶	15mL

[0036] 另一方面,本发明提供了使用所述试剂盒检测克伦特罗的方法,该方法包括:

[0037] 1、检测样品的制备;

[0038] 2、使用本发明的试剂盒检测克伦特罗;和

[0039] 3、分析检测结果。

[0040] 其中,使用本发明的试剂盒检测克伦特罗的方法包括:向包被了克伦特罗抗体的微量测试孔中加入克伦特罗标准溶液或样品溶液和酶标克伦特罗溶液,25℃竞争反应20min后,用清洗缓冲液洗板3次后加入等体积混合的底物溶液A和B,25℃下温育10min显色,然后加入反应终止液,用酶标仪选择450nm波长读数。

[0041] 计算方法:(1) 计算 B/B_0 值,用样品或标准液吸光度值(B)除以零标准吸光度值(B_0)再乘以100%。

[0042] (2) 以 B/B_0 值为纵坐标,以标样浓度的对数值为横坐标,做标准半对数曲线。

[0043] (3) 根据每个样品的 B/B_0 值就可从曲线上读出相对应样品的浓度。

[0044] (4) 有些样品经过了预先稀释,因此根据标准曲线所得出的样品浓度一定再要乘以其稀释倍数。

[0045] 本发明的克伦特罗检测试剂盒,除可用于尿液检测以外,同时着重于对血清样本的检测,使检验结果更准确、更稳定;也可以对饲料、肌肉、组织等样品进行检测。该试剂盒简化了样品处理方式,使用简便,省时省力省钱,整个操作过程不到40分钟,回收率为80%~120%,灵敏度可达到0.05ppb,是各类饲料企业、屠宰企业及各级政府检测机构的理想产品。

附图说明

[0046] 图 1 为克伦特罗检测的标准曲线。

具体实施方式

[0047] 下文中,将通过实施例详细描述本发明。但是,本发明的范围不仅仅限于实施例。

[0048] 实施例

[0049] 材料与仪器

[0050] 药品和耗材：

[0051]

药物名称	生产厂家	规格	批号
NaOH	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080125
HCL	国药集团化学试剂有限公司	AR	080101
NaNO ₂	国药集团化学试剂有限公司	AR	080103
牛血清白蛋白 (BSA)	SEEBIO 公司	-	0G2012A
盐酸克伦特罗	Sigma 公司	HPLC	067K0668
完全福氏佐剂	Sigma 公司	-	-
不完全福氏佐剂	Sigma 公司	-	-
H ₂ SO ₄	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080128
NaCL	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080104
KCL	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080110
KH ₂ PO ₄	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080106
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20071103

Na ₂ CO ₃	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20071203
NaHCO ₃	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080102
脱脂奶粉	BIOBASIC	高纯度	YY0526B408Y
Tween-20	BIOBASIC	-	YY0213B1008Y
NaAc ? H ₂ O	青析化工科技	AR	071104
柠檬酸	国药集团化学试剂有限公司	AR	T20071229
柠檬酸钠? H ₂ O	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080202
30% H ₂ O ₂	双俭精细化工	AR	20080105
四甲基联苯胺 (TMB)	BIOBASIC	-	YY0505B508Y
二甲亚砜	国药集团化学试剂有限公司	AR	F20080125
辣根过氧化物酶	BIOBASIC	-	LJ0527B508Y
PEG(分子量 8000)	Beyotime	-	ST483
卵清白蛋白 (OVA)	SEEBIO 公司	-	OG2012B
蒸馏水	上海知帮水处理有限公司	EW-1 特级蒸馏水	-
透析袋	上海绿鸟科技发展有限公司	截留分子量为 7000	-

[0052]

[0053]

[0054] 仪器：

[0055]

仪器名称	生产厂家	型号
摇床	ANRUI	TS-1
旋涡震荡	ANRUI	WH-1
酶标仪	BIO-RAD	MODEL680
恒温箱	中贤	DK-S420
过柱收集器	上海琪特分析仪器有限公司	BSZ-100-LCD

[0056] 实施例 1 主要材料的制备

[0057] 1、克伦特罗标准溶液的制备

[0058] 克伦特罗（以下简称 CLE）系列标准溶液 6 瓶，1mL/ 瓶。制备过程如下：

[0059] ●精确称取 CLE 标准品 10mg，用蒸馏水溶解，定容至 100mL，得到 100ppm CLE 标准溶液；

[0060] ●取 1.0mL100ppm 标准溶液稀释定容至 100mL，得到 1.0ppm CLE 标准溶液；

[0061] ●用 1.0ppm CLE 标准溶液准确稀释成 0.1ppb、0.3ppb、0.9ppb、2.7ppb、8.1ppb (0ng/mL、0.1ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL) 的系列标准溶液。

[0062] 2、克伦特罗免疫抗原与酶标抗原的制备

[0063] ●将 CLE 进行重氮化（段行信．实用精细有机合成手册 [M]．北京：化学工业出版社，2000），再与 BSA (Bovine serum albumin, 牛血清白蛋白 BSA) 蛋白进行偶氮连结，形成 CLE-BSA，作为制备多抗的免疫抗原；

[0064] ●酶标抗原 CLE-HRP：将小分子 CLE 先进行重氮化，再与辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 进行偶氮连接。

[0065] 3、克伦特罗多抗的制备

[0066] ●CLE-BSA 过柱（葡聚糖凝胶 G25）纯化，其中 BSA 含量有 9mg/mL；

[0067] ●初次免疫用 100-500 μg CLE-BSA 加入 1mL 福氏完全佐剂 (Freund' sComplete Adjuvant, FCA)，在家兔背部皮下注射 10 点每点 0.1mL；

[0068] ●每隔 4-6 个星期用 100-500 μg CLE-BSA 于福氏不完全佐剂 (Freund' sIncomplete Adjuvant, FIA) 中，在肌肉皮下静脉注射和脚趾皮下注射加强免疫 5 次，每次 1mL；

[0069] ●佐剂和 CLE-BSA 按照 1：1 的比例混合乳化。每只兔子每次免疫用 1mL 乳化完的抗原，CLE-BSA 含量 100-500 μg；分 10 个点打入，每个点 0.1mL。

[0070] ●最后一次免疫直接用 1mL 生理盐水稀释 100-500 μg CLE-BSA，静脉注射，10 天后颈部静脉取血，获得抗血清。

[0071] 4、克伦特罗抗体的检测

[0072]

免疫时间	免疫次数	效价	抑制 (0.1ppb)	抑制 (1ppb)
2007年9月9日	1	1 : 10 万	5%	21%
2007年10月1日	2	1 : 40 万	17%	58%
2007年10月22日	3	1 : 100 万	24%	79%
2007年11月13日	4	1 : 400 万	28%	87%
2007年12月4日	5	1 : 800 万	32%	94%

[0073]

[0074] 2007年12月25日第五次免疫后测定为合格(用间接法测定效价达到检测要求且通过直接竞争法测定灵敏度达到0.05ng/mL)可以取血。

[0075] 5、多克隆抗体的纯化

[0076] 1) 将上述经测定达到要求的兔血经4℃或室温离心13000r/min(20000×g), 30min, 收集上清;

[0077] 2) 取上清约20mL与等体积生理盐水混合后, 于搅拌下缓慢滴加40mL饱和硫酸氨溶液, 于4℃沉淀30min以上或过夜, 使蛋白充分沉淀;

[0078] 3) 13000r/min, 4℃离心10min, 弃上清;

[0079] 4) 用12mL生理盐水溶解沉淀, 同步骤(2)滴加8mL饱和硫酸铵溶液, 4℃静置1h;

[0080] 5) 重复步骤3)离心, 用13.3mL生理盐水溶解沉淀;

[0081] 6) 滴加6.6mL饱和硫酸氨溶液, 4℃静置1h;

[0082] 7) 重复步骤4)离心后所得沉淀物用少许盐水溶解沉淀, 并装入透析袋;

[0083] 8) 用大于20倍体积的PBS缓冲液于4℃透析, 更换透析液数次, 然后加入等体积甘油置-20℃保存。

[0084] 9) 多抗效价的测定: 采用间接ELISA法(Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development. S. S. D ESPHANDE. Chapman and Hall, New York, 1996.)测定多抗血清的效价。

[0085] 实施例2检测方法的建立

[0086] 1、包板多抗及克伦特罗-HRP最佳浓度的选择

[0087] 将上述制备的多抗做不同稀释后, 进行方阵滴定(Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development. S. S. D ESPHANDE. Chapman and Hall, New York, 1996.), 在用ELISA法测定一定浓度的克伦特罗中, 用酶标仪选择450nm波长时的吸光值在2.3-2.8时, 即为两个参数的最佳工作浓度。

[0088] 2、竞争ELISA法的建立及标准曲线的建立

[0089] 不同浓度的克伦特罗标准品含量的测定: 在确定了最优化的多抗包被浓度和CLE-HRP浓度的基础上, 用CLE标准品与CLE-HRP进行竞争ELISA。

[0090] 3、样品提取方法的研究情况

[0091] 3.1 待测物为尿液

[0092] 直接将尿液取 50 μ L 进行测试,如有混浊请先离心取上清液进行分析。

[0093] 3.2 待测物为血清

[0094] 抽取待验动物血液,离心或静置取其较透明之上层液(血清层)使用,注意不要有溶血。取 0.1mL 血清,加入 0.4mL 样品稀释液(0.05mol/L 的 PBS),涡旋 1 分钟,混匀。离心 10 分钟(3000rpm),取上清液 50 μ L 进行分析。

[0095] 3.3 待测物为肉类

[0096] 取 4g 已均质样品置入离心管中,再加入 6mL 0.01N HCl,涡旋 1 分钟。静置 30 分钟,离心 10 分钟(3000rpm),上清液与样品稀释液(0.05mol/L 的 PBS)进行 1 : 3(4 倍)稀释后,取 50 μ L 进行分析。

[0097] 3.4. 待测物为心、肝等器官

[0098] 取 4g 已均质样品置入离心管中,再加入 6mL 0.01N HCl,涡旋 1 分钟。以 80—100 $^{\circ}$ C 水浴加热约 3 分钟,离心 10 分钟(3000rpm)。上清液与样品稀释液(0.05mol/L 的 PBS)进行 1 : 3(4 倍)稀释后,取 50 μ L 进行分析。

[0099] 3.5. 待测物为饲料

[0100] 取 1g 已磨碎的待测饲料加入 5mL 0.01NHCl,震荡混合 1 分钟。3000 转离心 10 分钟后,取上清液 100 μ L,用样品稀释液(0.05mol/L 的 PBS)做 10 倍稀释。取 50 μ L 进行分析。

[0101] 4、理化方法的比较

[0102] 与气相色谱-质谱法(GC-MS)比对报告。

[0103] 实施例 3 克伦特罗检测试剂盒的制备

[0104] 1. 微量测试孔的包被

[0105] 将上述经硫酸铵法纯化后的抗体用 0.05mol/L、pH 为 9.6 的碳酸缓冲液稀释到浓度为 0.1 μ g/mL-1.0 μ g/mL,每孔 0.1mL 加入 96 孔微孔板,37 摄氏度孵育 2 小时后 4 摄氏度过夜。

[0106] 2. 制备 CLE-HRP

[0107] 采用重氮法将克伦特罗与辣根过氧化物酶按 10 : 1 摩尔比连接,4 摄氏度过夜后对 PBS 充分透析。根据偶联物的活性决定酶的工作浓度。

[0108] 实施例 4 克伦特罗检测试剂盒的组建

[0109] 组建克伦特罗检测试剂盒,使其包括以下组分:

[0110] (1) 包被了克伦特罗抗体的微量测试孔,每条 8 孔,每板 12 条;

[0111] (2) 克伦特罗标准溶液,浓度分别为 0ng/mL、0.1ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、2.7ng/mL、8.1ng/mL,每个浓度各 1 瓶;

[0112] (3) 20 倍清洗缓冲液,含有千分之五的吐温 20 的 0.05mol/L 的 PBS;

[0113] (4) 20 倍浓缩酶标记物,浓缩酶标记物(酶标抗原)的浓度为 0.3 μ g/ml-1.0 μ g/ml;

[0114] (5) 底物溶液 A,称取 NaAc \cdot H₂O 2.825g,柠檬酸 1.725g,柠檬酸钠 \cdot H₂O 2.95g,加蒸馏水溶解,用浓 HAc 调 pH 至 4.50 后加入 0.1-1.0mL 30% 的 H₂O₂,最后用 250mL 的容量

瓶定容即可；

[0115] (6) 底物溶液 B, 称取 TMB 20-200mg, 溶解于 125mL 的二甲亚砷中, 再加入蒸馏水定容至 250mL；

[0116] (7) 反应终止液, 用量筒量取浓硫酸 150mL, 在玻璃棒搅拌下缓慢加入 850mL 蒸馏水中；

[0117] (8) 酶标稀释液, 为 0.05mol/L 的 PBS 溶液。

[0118] 实施例 5 检测样品的制备 (样品前处理)

[0119] 1. 若待测物为尿液, 直接将尿液取 50 μ L 进行测试, 如有混浊请先离心取上清液进行分析。

[0120] 2. 若待测物为血清, 则用以下方法进行处理 (5 倍稀释)

[0121] 抽取待验动物血液, 离心或静置取其较透明之上层液 (血清层) 使用, 注意不要有溶血。

[0122] 取 0.1mL 血清, 加入 0.4mL 稀释液, 涡旋 1 分钟, 混匀。离心 10 分钟 (3000rpm), 取上清液 50 μ L 进行分析。

[0123] * 若需要 0.05ppb 的灵敏度, 则可直接取 1mL 血清进行管柱纯化, 详细方法见下文管柱纯化。

[0124] 3. 若待测物为肉类, 则用以下方法进行处理 (10 倍稀释)

[0125] 取 4g 已均质样品置入离心管中, 再加入 6mL 0.01N HCl, 涡旋 1 分钟。静置 30 分钟, 离心 10 分钟 (3000rpm), 上清液与稀释液进行 1 : 3 (4 倍) 稀释后, 取 50 μ L 进行分析。

[0126] * 若需要 0.05ppb 的灵敏度, 则可继续取稀释液 3mL 进行管柱纯化, 详细方法见下文管柱纯化。

[0127] 4. 若待测物为心、肝等器官, 则用以下方法进行处理 (10 倍稀释、煮沸) 取 4g 已均质样品置入离心管中, 再加入 6mL 0.01N HCl, 涡旋 1 分钟。以 80—100 $^{\circ}$ C 水浴加热约 3 分钟, 离心 10 分钟 (3000rpm)。上清液与稀释液进行 1 : 3 (4 倍) 稀释后, 取 50 μ L 进行分析。

[0128] * 若需要 0.05ppb 的灵敏度, 可继续取稀释液 3mL 进行管柱纯化, 详细方法见下文管柱纯化。

[0129] 5. 若待测物为饲料, 则用以下方法进行稀释 (50 倍稀释)

[0130] 取 1g 已磨碎的待测饲料加入 5mL 0.01NHCl, 震荡混合 1 分钟。3000 转离心 10 分钟后, 取上清液 100 μ L, 用稀释液做 10 倍稀释。取 50 μ L 进行分析。

[0131] 管柱纯化 (C18, 500mg 3mL)

[0132] 若利用 C-18 管柱进行样品纯化, 可提升敏感度至 0.05ppb, 方法如下：

[0133] 1. 以 10mL 甲醇洗涤管柱, 流速 3mL/分。

[0134] 2. 再以 10mL 蒸馏水洗涤管柱, 流速 3mL/分。

[0135] 3. 分析样品进入管柱 (血清加入 1mL, 肉类或内脏均质稀释后的上清液加入 3mL)。

(注)

[0136] 4. 以 10mL 蒸馏水洗管柱, 流速 3mL/分。

[0137] 5. 利用减压真空装置干燥管柱 10 分钟。

[0138] 6. 以 2mL CH_3CN 洗涤管柱, 流速 3mL/分。

- [0139] 7. 再利用减压真空装置干燥管柱 10 分钟。
- [0140] 8. 以 2mL 甲醇流出样品,流速 3mL/分。
- [0141] 9. 以 50℃氮气流吹干样品后,加入稀释液溶解样品。(样品若是血清,则加入 1mL 稀释液,样品若是肉类或是内脏类,则加入 300 μ L 稀释液)。
- [0142] 10. 取 100 μ L 进行分析。
- [0143] 注:**分析样品进管柱之前必须先用1N NaOH调整到pH 9.0~9.5间!**
- [0144] 实施例 6 使用本发明的试剂盒检测克伦特罗的操作步骤:
- [0145] 检测前:
- [0146] 使用本发明的试剂盒检测克伦特罗的方法包括:
- [0147] 1、将标准品 6 瓶、待测样品、20 倍浓缩清洗缓冲液、酶标记物、微孔测试板,置于室温下,回温 5 分钟。
- [0148] 2、清洗缓冲液的配制:用蒸馏水将 20 倍清洗缓冲液以 1 : 19 的比例稀释(即 1mL 浓缩液 +19mL 蒸馏水),作为微孔板清洗液。
- [0149] 3、酶标记物配制:利用酶标稀释液将 20 倍浓缩酶标记物以 1 : 19 的比例稀释(即 0.1mL 20 倍浓缩酶标记物 +1.9mL 酶标稀释液),即完成原倍酶标记物的配制。稀释后的酶标记物请尽快使用,若保存于 -20℃,保存期可达 1 个月,若保存于 4℃,请勿超过一个星期。
- [0150] 5、将剩余的微孔条放回铝箔袋中,以胶带封好储存于 4℃。
- [0151] 6、如要提高灵敏度可用酶标稀释液将标准液稀释一倍后使用。
- [0152] 检测时:
- [0153] 1、于适当微孔中分别加入 50 μ L 标准溶液(0,0.1,0.3,0.9,2.7 和 8.1ppb)。
- [0154] 2、在另外的微孔中加入 50 μ L 已完成前处理的样品溶液。
- [0155] 3、再于每一微孔中另再加入 100 μ L 已完全回溶的酶标记物。
- [0156] 4、轻敲盘子四周,使其充分混合后于室温下避光静置温育 30 分钟。
- [0157] 5、将微孔中的反应液甩掉,再将洗液加满每一微孔后甩掉,重复洗 3 次。
- [0158] 6、最后一次甩掉后,在吸水纸上拍干。
- [0159] 7、将底物 A 和 B 液等比例稀释,于每一微孔中加入混合好的底物溶液 100 μ L 后,轻敲盘子四周,使其充分混合。
- [0160] 8、于室温下避光静置温育 15 分钟。
- [0161] 9、于每一微孔中加入 50 μ L 反应终止液。
- [0162] 10、用酶标仪于波长 450nm 下判读。
- [0163] 实施例 7 判定
- [0164] 1. 计算 B/B₀ 值。用样品或标准液吸光度值(B)除以零标准吸光度值(B₀)再乘以 100%。
- [0165] 2. 以 B/B₀ 值为纵坐标,以标样浓度的对数值为横坐标,做标准半对数曲线。
- [0166] 3. 根据每个样品的 B/B₀ 值就可从曲线上读出相对应样品的浓度。
- [0167] 4. 有些样品经过了预先稀释,因此根据标准曲线所得出的样品浓度一定要再乘以其稀释倍数。标准曲线见图 1。
- [0168] 实验实施例
- [0169] 本试剂盒 1 至 6 号标准液为无色透明液体;酶标记物为蓝色带有絮状沉淀物液体;

底物 (A 液) 为粉红色澄清透明液体, 无沉淀和絮状物; 显色剂 (B) 液为无色澄清透明液体, 无沉淀和絮状物, 无蓝色趋向性变化; 反应终止液为澄清透明液体, 无沉淀和絮状物。

[0170] 实验实施例 1 灵敏度

[0171] 向包被了克伦特罗抗体的微量测试孔中加入 0ng/mL 克伦特罗标准溶液和酶标克伦特罗溶液, 25°C 竞争反应 20min 后, 用清洗缓冲液洗板 3 次后加入等体积混合的底物溶液 A 和 B, 25°C 下温育 10min 显色, 然后加入反应终止液, 用酶标仪选择 450nm 波长读数。

[0172] 上述制备的试剂盒的克伦特罗含量为 0ng/mL 的标准溶液 20 次测定 OD 值为:

[0173]

2.190	2.191	2.181	2.165	2.154	2.164	2.135	2.221	2.193	2.143
2.143	2.156	2.134	2.169	2.200	2.165	2.161	2.195	2.176	2.164

[0174] 平均值 $B_0 = \sum X_i / n$ ($i = 1 \sim n$)

[0175] 标准差 $SD = \{[n \sum X^2 - (\sum X)^2] / [n(n-1)]\}^{1/2}$

[0176] 灵敏度 $LOD = B_0 - 3SD$

[0177] $B_0 = 2.170$ $SD = 0.0106$ $LOD = 2.136$

[0178] 代入曲线计算得: 灵敏度 = 0.01ng/mL

[0179] 本试剂盒灵敏度在 0.05ng/mL 以内

[0180] $IC_{50} = 0.57ng/mL$

[0181] 平行 20 孔测定零值标准品的光吸收度值, 计算测定结果的平均值 (B) 与标准差 (SD)。灵敏度 $LOD = (B_0 - 3SD)$ 在标准曲线上所对应的浓度值。本试剂盒灵敏度为 0.1ppb 以内。

[0182] 实验实施例 2 特异性

[0183] 上述制备的克伦特罗试剂盒的特异性通过对相应的物质进行交叉反应性分析而得到。抗血清的抑制物分别用莱克多巴胺、沙丁胺醇等类似物, 以类似物在标准曲线上的实测浓度的回收率计算交叉反应率。

[0184] 向包被了克伦特罗抗体的微量测试孔中加入不同浓度的克伦特罗标准溶液或者其他相关物质的标准品溶液和酶标克伦特罗溶液, 25°C 竞争反应 20min 后, 用清洗缓冲液洗板 3 次后加入等体积混合的底物溶液 A 和 B, 25°C 下温育 10min 显色, 然后加入反应终止液, 用酶标仪选择 450nm 波长读数。

[0185]

标准及交叉物	五次平均 OD 值	实测浓度 ng/mL	交叉反应率 %
0	2.230	0	—
0.1ng/mL	1.765	0.1	—
0.3ng/mL	1.384	0.3	—

标准及交叉物	五次平均 OD 值	实测浓度 ng/mL	交叉反应率 %
0.9ng/mL	0.986	0.9	-
2.7ng/mL	0.663	2.7	-
8.1ng/mL	0.375	8.1	-
+5ng 沙丁胺醇	1.476	0.24	< 5%
+5ng 莱克多巴胺	2.285	< 0.01	< 0.01%
+5ng 甲硝达唑	2.240	< 0.01	< 0.01%
+5ng 丁二酸钠 -6 甲强的松龙	2.256	< 0.01	< 0.01%
+5ng 氯霉素	2.248	< 0.01	< 0.01%
+5ng 肾上腺素	2.343	< 0.01	< 0.01%
+5ng 脱羟肾上腺素	2.354	< 0.01	< 0.01%
+5ng 雌素酮	2.265	< 0.01	< 0.01%
+5ng 炔诺孕酮	2.274	< 0.01	< 0.01%
+5ng 奥喹多司	2.251	< 0.01	< 0.01%

[0186]

[0187] 结果显示本试剂盒与克伦特罗类似物的交叉反应：

[0188]

克伦特罗	100%
沙丁胺醇	< 5%
莱克多巴胺	< 0.01%

克伦特罗	100%
甲硝达唑	< 0.01%
丁二酸钠-6 甲强的松龙	< 0.01%
氯霉素	< 0.01%
肾上腺素	< 0.01%
脱羟肾上腺素	< 0.01%
雌素酮	< 0.01%
炔诺孕酮	< 0.01%
奥喹多司	< 0.01%

[0189] 实验实施例 3 精密度

[0190] 使用试剂盒批号为 :20080201, 20080202, 20080203 分别用三个批次的试剂盒, 进行相同的质控样品的检测。

[0191] 其中质控样品 1 为 1ng/mL, 质控样品 2 为 2ng/mL, 质控样品 3 为 5ng/mL 每份样品做 5 次重复。

[0192]

标准 ng/mL	CV1%	CV2%	CV3%	批间 CV%
0	-	-	-	-
0.1	7.5	7.0	8.3	16.6
0.3	5.1	5.2	6.6	14.2
0.9	5.3	6.7	3.4	12.9
2.7	4.9	5.6	5.8	10.2
8.1	3.1	4.7	3.6	7.7
样品 1	2.3	3.5	5.6	14.2

标准 ng/mL	CV1%	CV2%	CV3%	批间 CV%
样品 2	5.6	1.8	7.0	13.7
样品 3	1.7	4.5	3.3	13.7

[0193]

[0194] 结果显示本试剂盒批内 CV < 10%，批间 CV < 20%。体现了良好的精密度。

[0195] 实验实施例 4 本发明的试剂盒与气相色谱 - 质谱法 (GC 梭 S) 比对

[0196] GC-MS 法优点是把色谱高效快速的分离效果和质谱高灵敏度的定性分析有机合起来,能在多种残留物同时存在的情况下对某种特定的残留物进行定性、定量分析,而且具更高的检测极限。应用气相色谱 - 串联质谱法 (GC-MS-MS) 对牛、羊、猪组织中的 CLE 含量进行检测,最低检测限为 0.5ng/g;用 GC-MS 法 (E1 离子源) 检测猪尿中的 CLE,检测限为 0.5ng/mL;本次使用 GC-MS 法检测猪尿中的 CLE 含量与试剂盒经行比对。进行 30 个猪尿盲样进行测试。

[0197]

次数	标准品 1	标准品 2	标准品 3	标准品 4	标准品 5	标准品 6
1	2.163	1.658	1.254	0.910	0.623	0.393
2	2.161	1.636	1.260	0.902	0.611	0.397
平均值	2.162	1.647	1.258	0.906	0.617	0.395
CLE 含量 ppb	0	0.1	0.3	0.9	2.7	8.1

[0198]

猪尿样品	试剂盒 2 次平均 OD 值	试剂盒测出 CLE 含量 (ppb)	GC-MS 测出 CLE 含量 (ppb)
1	1.863	< 0.1ppb	无法测定
2	1.764	< 0.1ppb	无法测定
3	1.878	< 0.1ppb	无法测定
4	1.960	< 0.1ppb	无法测定
5	1.864	< 0.1ppb	无法测定

猪尿样品	试剂盒 2 次平均 OD 值	试剂盒测出 CLE 含量 (ppb)	GC-MS 测出 CLE 含量 (ppb)
6	1.684	< 0.1ppb	无法测定
7	1.975	< 0.1ppb	无法测定
8	1.842	< 0.1ppb	无法测定
9	1.899	< 0.1ppb	无法测定
10	1.940	< 0.1ppb	无法测定
11	1.781	< 0.1ppb	无法测定
12	1.897	< 0.1ppb	无法测定
13	2.094	< 0.1ppb	无法测定
14	1.024	0.73ppb	0.81ppb
15	1.966	< 0.1ppb	无法测定
16	2.008	< 0.1ppb	无法测定
17	1.700	< 0.1ppb	无法测定
18	1.012	0.76ppb	0.85ppb
19	1.921	< 0.1ppb	无法测定
20	1.876	< 0.1ppb	无法测定
21	1.932	< 0.1ppb	无法测定
22	1.772	< 0.1ppb	无法测定
23	1.658	< 0.1ppb	无法测定
24	0.942	0.97ppb	0.92ppb
25	1.883	< 0.1ppb	无法测定
26	1.693	< 0.1ppb	无法测定
27	1.943	< 0.1ppb	无法测定

猪尿样品	试剂盒 2 次平均 OD 值	试剂盒测出 CLE 含量 (ppb)	GC-MS 测出 CLE 含量 (ppb)
28	1.884	< 0.1ppb	无法测定
29	1.078	0.61ppb	0.54ppb
30	1.779	< 0.1ppb	无法测定

[0199]

[0200] 从以上数据,可以看出克伦特罗含量在 0.5ppb 以上本试剂盒所测定的结果与 GC-MS 所测定的结果基本一致,0.5ppb 以下时已经超出了 GC-MS 的检测下限,而本试剂盒仍然可以给出准确的结果。因此,本试剂盒完全可以取代 GC-MS 用于常规克伦特罗的检测。

[0201] 实验实施例 5 回收率

[0202] 在不同样品中添加不同浓度的 CLE 标准品溶液,然后采用本试剂盒提供的前处理方法和试剂进行检测,回收率=实测浓度 / 添加浓度 × 100%

	样品(添加克伦特罗浓度)	回收率%	样品(添加克伦特罗浓度)	回收率%
[0203]	肉类 (1.0 ppb)	90 ~ 120	血清 (1.25 ppb)	90 ~ 120
	肝 (2.5 ppb)	90 ~ 130	饲料 (2.0 ppb)	80 ~ 115
	尿	80~110		

[0204] 实验实施例 6 产品稳定性试验

[0205] 1、使用有效期实验

[0206] 使用本发明的试剂盒进行稳定性试验,2 ~ 8℃放置,分别于 0、1、2、3 月,及以后每 3 个月,测定 6 个标准点的 OD 值及计算阴性猪尿中添加 1ng、5ng 克伦特罗的回收率,并计算 IC50。(10 次重复平均值)

[0207]

当月			
标准 ng/mL	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底
0	2.209	0	-
0.1	1.632	0.1	-
0.3	1.292	0.3	-
0.9	0.923	0.9	-
2.7	0.612	2.7	-
8.1	0.371	8.1	-
尿样	2.134	0.02	-
尿样+1	0.932	1.02	0.97
尿样+5	0.492	4.60	4.55
IC50	0.57		

[0208]

标准 ng/mL	第一月			第二月		
	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底
0	2.193	0	-	2.201	0	-
0.1	1.624	0.1	-	1.693	0.1	-
0.3	1.301	0.3	-	1.298	0.3	-
0.9	0.930	0.9	-	0.921	0.9	-
2.7	0.623	2.7	-	0.633	2.7	-
8.1	0.381	8.1	-	0.372	8.1	-
尿样	2.133	0.02	-	2.192	0.02	-
尿样+1	0.910	1.12	1.10	0.933	1.06	1.04
尿样+5	0.488	4.88	4.86	0.443	5.42	5.40
IC50	0.58			0.61		

[0209]

标准 ng/mL	第三月			第六月		
	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底
0	2.182	0	-	2.176	0	-
0.1	1.653	0.1	-	1.594	0.1	-
0.3	1.245	0.3	-	1.192	0.3	-
0.9	0.934	0.9	-	0.903	0.9	-
2.7	0.602	2.7	-	0.594	2.7	-
8.1	0.343	8.1	-	0.323	8.1	-
尿样	2.101	0.02	-	2.003	0.02	-
尿样+1	0.945	0.93	0.91	0.904	0.96	0.94
尿样+5	0.465	4.69	4.67	0.432	4.98	4.96
IC50	0.57			0.50		

[0210]

标准 ng/mL	第九月			第十二月		
	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底	OD 值	含量 ng/mL	扣除本 底
0	2.021	0	-	1.943	0	-
0.1	1.502	0.1	-	1.402	0.1	-
0.3	1.121	0.3	-	1.012	0.3	-
0.9	0.889	0.9	-	0.798	0.9	-
2.7	0.543	2.7	-	0.496	2.7	-
8.1	0.298	8.1	-	0.234	8.1	-
尿样	1.802	0.03	-	1.783	0.02	-
尿样+1	0.814	1.11	1.08	0.754	1.03	1.01
尿样+5	0.423	4.67	4.64	0.336	5.14	5.12
IC50	0.54			0.44		

[0211] ■ 回收率：尿样品中大约 90 ~ 110%

[0212] ■ IC₅₀ = 0.54

[0213] 上述实验结果说明，该试剂盒在一年内不同月份检测，标准点 OD 数值、标准曲线形态、样品浓度、添加回收率均无显著性变化。体现了该试剂盒在正确保存条件下，实验数据良好的再现性。

[0214] 2、室温放置实验

[0215] 室温放置本发明的试剂盒, 室温 (25-28℃) 放置, 分别于 15 天、1 个月、2 个月后测定各标准浓度的 OD 值 (10 次重复的平均值)

[0216]

标准 ng/mL	当天	15 天	1 个月	2 个月
0	2.209	2.154	2.073	1.943
0.1	1.632	1.603	1.583	1.487
0.3	1.292	1.245	1.234	1.102
0.9	0.923	0.913	0.867	0.793
2.7	0.612	0.602	0.573	0.432
8.1	0.371	0.354	0.343	0.234
IC50	0.57	0.56	0.60	0.51

[0217]

[0218] 结果显示该试剂盒在室温 (25-28℃) 放置 2 个月内实验 OD 值及 IC₅₀ 无显著性变化。

[0219] 3、冻融实验

[0220] 使用本发明的试剂盒进行冻融实验, 将试剂盒组份置 -18℃ 三天, 解冻后测定各标准浓度的 OD 值 (10 次平均值)

[0221]

标准 ng/mL	第一天	第二天	第三天
0	2.102	2.032	1.976
0.1	1.596	1.543	1.497
0.3	1.254	1.198	1.077
0.9	0.901	0.865	0.794
2.7	0.606	0.574	0.501
8.1	0.365	0.324	0.258
IC50	0.62	0.60	0.50

[0222] 结果显示该试剂盒组分经冻融后 OD 值及 IC50 无显著性变化。

[0223] 4、37 摄氏度加速试验

[0224] 使用本发明的试剂盒进行加速试验,37℃放置,分别于 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、9 天、12 天 16 天、20 天后测定各标准浓度的 OD 值 (10 次重复的平均值)

[0225]

标准 ng/mL	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天
0	2.243	2.263	2.233	2.246	2.212	2.134
0.1	1.673	1.682	1.623	1.632	1.646	1.582
0.3	1.313	1.322	1.288	1.301	1.308	1.283
0.9	0.956	0.976	0.923	0.912	0.932	0.886
2.7	0.632	0.642	0.636	0.623	0.626	0.590
8.1	0.372	0.381	0.352	0.345	0.354	0.332
IC50	0.58	0.58	0.53	0.52	0.58	0.57

[0226]

标准 ng/mL	第九天	第十二天	第十六天	第二十天
0	2.054	2.023	2.012	2.002
0.1	1.553	1.534	1.512	1.501
0.3	1.232	1.212	1.194	1.183
0.9	0.854	0.823	0.802	0.794
2.7	0.543	0.512	0.492	0.463
8.1	0.321	0.302	0.293	0.274
IC50	0.58	0.56	0.54	0.52

[0227] 结果显示该试剂盒组分经 37 摄氏度后 OD 值及 IC50 无显著性变化。

[0228] 本发明的克伦特罗检测试剂盒灵敏度已达到国外进口产品的水平,且交叉反应低,反应时间短,稳定性好。

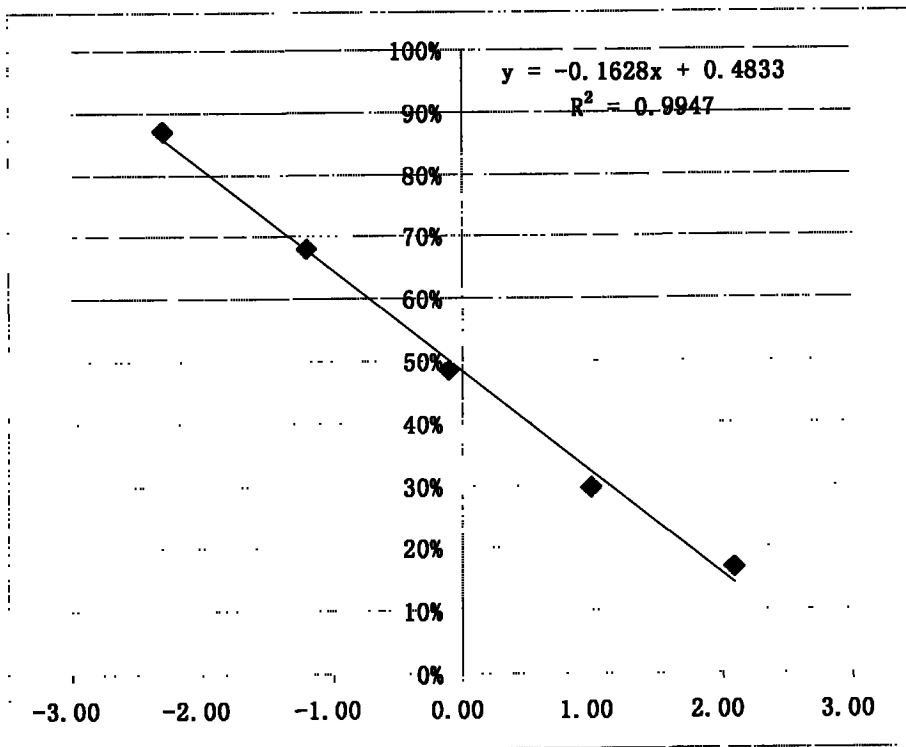


图 1

专利名称(译)	一种克伦特罗检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN101776684A	公开(公告)日	2010-07-14
申请号	CN201010110564.2	申请日	2010-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	上海优你生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海优你生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海优你生物科技股份有限公司		
[标]发明人	肖理文 胡佳骏 郭晓梅 李康 董国秀 蔡晓帆		
发明人	肖理文 胡佳骏 郭晓梅 李康 董国秀 蔡晓帆		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/31		
代理人(译)	徐琳 朱梅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种克伦特罗检测试剂盒，其包括：包被了克伦特罗抗体的微量测试孔、克伦特罗标准溶液、清洗缓冲液、浓缩酶标记物、底物溶液A、底物溶液B、反应终止液和酶标稀释液。本发明还公开了使用上述试剂盒检测克伦特罗的方法，其包括以下步骤：检测样品的制备；使用本发明的试剂盒检测克伦特罗；和分析检测结果。本发明的克伦特罗检测试剂盒，除可用于尿液检测以外，同时着重于对血清样本的检测，使检验结果更准确、更稳定；也可以对饲料、肌肉、组织等样品进行检测。该试剂盒简化了样品处理方式，使用简便，省时省力省钱，整个操作过程不到40分钟，回收率为80%~120%，灵敏度可达到0.05ppb。

样品(添加克伦特罗浓度)	回收率%	样品(添加克伦特罗浓度)	回收率%
肉类 (1.0 ppb)	90~120	血清 (1.25 ppb)	90~120
肝 (2.5 ppb)	90~130	饲料 (2.0 ppb)	80~115
尿	80~110		