



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110045113 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201910367839.1

(22)申请日 2019.05.05

(71)申请人 中国农业科学院烟草研究所

地址 266000 山东省青岛市崂山区科苑经
四路11号

申请人 福建省烟草公司三明市公司

(72)发明人 方松 张义志 孙鹏 林智慧

梁颁捷 材建麒 邱军 孔凡玉

(74)专利代理机构 北京汇捷知识产权代理事务
所(普通合伙) 11531

代理人 马金华

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法

(57)摘要

本发明公开了一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法,包括材料与试剂准备,缓冲溶液制备,仪器选择,制备Eu³⁺标记的山羊抗兔抗体,在CBS中用涂层抗原覆盖微孔板并孵育,用OVA在TBS中培养以阻断微孔板,加入甲醇标准溶液和PBS稀释的多克隆抗体,加入在PBS中稀释的Eu³⁺标记抗体孵育,添加增强溶液,机械振荡后,用微量滴定仪在340nm激发波长、615nm发射波长、延迟时间100 μ s、400 μ s窗口时间下测定荧光强度。本发明的有益效果是方法具有较高的灵敏度和检测能力,该方法重现性好,回收率高,可满足残留分析的要求。

1. 一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法,其特征在于包括以下步骤:

1. 材料与试剂:

95%纯度的SAL沙丁胺醇,牛血清白蛋白BSA,卵清蛋白OVA,亲和纯化山羊抗兔抗体,3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB、聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯TWEEN-20,异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铈DTTA-Eu³⁺;

缓冲溶液:阻隔缓冲液,磷酸盐缓冲液PBS,0.01mol/L,pH=7.4;包衣缓冲液,碳酸盐缓冲液CBS,0.05mol/L,pH=9.6;Tris-HCl缓冲液TBS,0.05mol/L,pH=7.8,含0.01%氯化钠;PBS,含0.05%吐温-20PBST;TMB溶液,含0.4mmol/L,TMB,柠檬酸缓冲液中含3mmol/L H₂O₂,pH=5.0;增强液0.1mol/L,含15μmol/Lβ-萘三氟丙酮和0.1%Triton X-100的双邻苯二甲酸钾缓冲液,pH=3.2;土样提取液9mL0.2mol/LHCl甲醇,v:v,1:4;1mL乙酸铅饱和溶液;

仪器:免疫微孔洗板机,96孔,并使用M200时间分辨荧光测定仪测量荧光,离心机离心,使用配有Orbitrap MS的ACQUITYUPLC系统检测TRFIA;Eu³⁺标记抗体的制备:

制备Eu³⁺标记的山羊抗兔抗体,将0.25mg山羊抗兔抗体和0.1mg DTTA-Eu³⁺分别溶解于0.1mL CBS缓冲液0.05mol/L,pH=8.5中,然后将两种溶液混合,在4℃下搅拌24小时,用TBS透析72h,每8h更换一次,检测透析液的荧光信号,确保透析完成,透析后,在Eu³⁺标记抗体中加入等量的甘油和0.1%的BSA,并在-20℃下保存;

2. TRFIA方法步骤:

在CBS中用涂层抗原100uL/孔覆盖微孔板并孵育2h,用PBST清洗微孔板,然后用1%的OVA在TBS,每孔200uL中培养0.5小时,以阻断微孔板,再经过一个洗涤步骤,加入10%甲醇、0.2mol/LNa⁺和pH=7.5的样品或标准溶液和PBS稀释的多克隆抗体,50uL/孔,含钠离子和pH值的PBS,将微孔板孵育0.5小时,再次洗涤,加入在PBS中稀释的Eu³⁺标记抗体,100uL/孔,孵育1h,所有孵育在37℃进行,每个洗涤步骤重复5次,再次清洗微孔板后,添加增强溶液200uL/孔,机械振荡8min后,用微量滴定仪在340nm激发波长、615nm发射波长、延迟时间100μs、400μs窗口时间下测定荧光强度。

一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学测定技术领域,涉及一种高灵敏度时间分辨荧光免疫分析法测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法。

背景技术

[0002] 兽药在保护畜牧养殖业中发挥着重要作用。然而,兽药和饲料添加剂的广泛使用已成为环境污染和危害人类健康的重要因素(Bártíková等,2016;Emanuela等,2019)。沙丁胺醇(salbutamol,SAL),一种肾上腺素受体激动剂,在家畜生产中经常被作为“瘦肉剂”非法滥用。研究表明SAL对人的心脏、肝脏和肾脏有一定的毒性(Susan,1994;Khirani等,2016年)。虽然SAL在许多国家已被严格禁止用作促进生长的饲料添加剂,但它仍然被广泛用作临床药物(zhang等,2017;Marchant-Forde等,2012)。此外,SAL还可以通过动物粪便和尿液进入生态环境,造成环境污染,并可能通过食物链进入人体。作为一种污染物,SAL广泛存在于环境中(Andrea等,2016),特别在一些水质中,其浓度甚至高达0.47 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Jonathan,Nikolaos,2006)。因此,有必要建立一种合适的检测方法来监测环境中的SAL。

[0003] 目前,已开发的检测SAL的分析方法有仪器测量(Rosales-Conrado等,2013;Zhang等,2012;Yang等,2012年)、生物传感器(Wang等,2013;Li等,2013;Wang等,2015)。仪器测量成本高、耗时长,不适合分析大量样品。生物传感器具有较低的检测限,但其稳定性和再现性相对较差。免疫分析是一种快速、低成本和高通量的分析方法,已成功应用于检测SAL(Li等,2013;Gao等,2014;Lei等,2015)。然而,这些免疫分析主要集中于动物产品、饲料和尿液中的SAL检测,很少应用于环境样本(Xu等,2015;Li等,2017)。此外,环境中的SAL通常处于痕量水平,因此检测方法需要更高的灵敏度以满足环境监测的需要。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法,本发明的有益效果是方法具有较高的灵敏度和检测能力,该方法重现性好,回收率高,可满足残留分析的要求。

[0005] 本发明所采用的技术方案是按照以下步骤进行:

[0006] 1.材料与试剂:

[0007] 95%纯度的沙丁胺醇SAL,牛血清蛋白BSA,卵清蛋白OVA,亲和纯化山羊抗兔抗体,3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB、聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯TWEN-20,异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铕DTTA-Eu³⁺。

[0008] 缓冲溶液:封闭缓冲液,磷酸盐缓冲液PBS,0.01mol/L,pH=7.4;包被缓冲液,碳酸盐缓冲液CBS,0.05mol/L,pH=9.6;Tris-HCl缓冲液TBS,0.05mol/L,pH=7.8,含0.01%氯化钠;PBS,含0.05%吐温-20PBST;TMB溶液,含0.4mmol/L,TMB,柠檬酸缓冲液,含3mmol/LH₂O₂,pH=5.0;荧光增强液,0.1mol/L,含15 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -萘三氟丙酮和0.1%Triton X-100的双邻苯二甲酸钾缓冲液,pH=3.2;土样提取液,9mL的0.2mol/LHCl-甲醇,v:v,1:4和1mL乙

酸铅饱和溶液；

[0009] 仪器：免疫微孔洗板机，96孔，并使用M200时间分辨荧光测定仪测定荧光，离心机离心，使用配有Orbitrap MS的ACQUITYUPLC进行样品验证；

[0010] 1.1. Eu³⁺标记抗体的制备：

[0011] 制备Eu³⁺标记的山羊抗兔抗体步骤如下：将0.25mg山羊抗兔抗体和0.1mgDTTA-Eu³⁺分别溶解于0.1mL CBS缓冲液0.05mol/L (pH=8.5)中，然后将两种溶液混合，在4℃下搅拌24小时，用TBS透析72h，每8h更换一次，检测透析液的荧光信号，确保透析完成，透析后，在Eu³⁺标记抗体中加入等量的甘油和0.1%的BSA，并在-20℃下保存；

[0012] 1.2. TRFIA方法步骤：

[0013] 在CBS中用包被抗原100uL/孔覆盖微孔板并孵育2h，用PBST清洗微孔板，然后用1%的OVA在TBS，每孔200uL中培养0.5小时，以封闭微孔板，再经过一个洗涤步骤，加入50uL/孔的10%甲醇、0.2mol/LNa⁺和pH=7.5的样品或标准溶液和PBS稀释的多克隆抗体，将微孔板孵育0.5小时，再次洗涤，加入在PBS中稀释的Eu³⁺标记抗体，100uL/孔，孵育1h，所有孵育在37℃进行，每个洗涤步骤重复5次，再次清洗微孔板后，添加荧光增强液200uL/孔，机械振荡8min后，用微量滴定仪在340nm激发波长、615nm发射波长、延迟时间100μs、400μs窗口时间下测定荧光强度。

[0014] 对分析参数包衣抗原、抗体、Eu³⁺标记抗体、甲醇、Na⁺浓度和pH值进行优化。确定最佳分析参数的主要标准是达到较低的IC₅₀值和较高的F_{max}/IC₅₀比值 (F_{max}: 无SAL的荧光信号)。在优化确定了最佳实验参数后，用SAL浓度和F/F₀(%)值绘制标准曲线。F和F₀分别是SAL的荧光值和无SAL的荧光值。采用四参数逻辑方程计算了TRFIA的检测性能参数。

具体实施方式

[0015] 下面结合具体实施方式对本发明进行详细说明。

[0016] 1. 材料与方法

[0017] 1.1材料与方法

[0018] 95%纯度的SAL及其类似物购自国家标准物质认证研究中心(北京)。牛血清白蛋白(BSA)，卵清蛋白(OVA)，亲和纯化山羊抗兔抗体，3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯(TWEN-20)购自Sigma化学公司(上海)。异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铕(DTTA-Eu³⁺)购自天津无线医学院(天津)。荧光增强液购自江苏核医学研究所(无锡)。

[0019] 缓冲溶液：封闭缓冲液，磷酸盐缓冲液PBS，0.01mol/L，pH=7.4；包被缓冲液，碳酸盐缓冲液CBS，0.05mol/L，pH=9.6；Tris-HCl缓冲液TBS，0.05mol/L，pH=7.8，含0.01%氯化钠；PBS，含0.05%吐温-20PBST；TMB溶液，含0.4mmol/L，TMB，柠檬酸缓冲液，含3mmol/LH₂O₂，pH=5.0；荧光增强液，0.1mol/L，含15μmol/Lβ-萘三氟丙酮和0.1%Triton X-100的双邻苯二甲酸钾缓冲液，pH=3.2；土样提取液，9mL的0.2mol/LHCl-甲醇，v:v，1:4和1mL乙酸铅饱和溶液。

[0020] 1.2仪器

[0021] 使用免疫微孔洗板机(96孔道，Thermo，美国)，并使用M200时间分辨荧光测定仪(Tecan，瑞士)测量荧光。使用Allegra TM 64R离心机(贝克曼，美国)离心。使用配有

Orbitrap MS (AB Sciex,美国)的ACQUITY UPLC系统进行样品验证。

[0022] 1.3 Eu^{3+} 标记抗体的制备

[0023] 制备 Eu^{3+} 标记的山羊抗兔抗体:将0.25mg山羊抗兔抗体和0.1mg的DTTA- Eu^{3+} 分别溶解于0.1mL的CBS缓冲液(0.05mol/L, pH=8.5)中。然后将两种溶液混合,在4℃下搅拌24小时。用TBS透析72h,每8h更换一次,检测透析液的荧光信号,确保透析完成。透析后,在 Eu^{3+} 标记抗体中加入等量的甘油和0.1%的BSA,并在-20℃下保存。

[0024] 1.4 TRFIA(时间分辨荧光分析法)方法步骤

[0025] 在CBS中用涂层抗原(100uL/孔)覆盖微孔板并孵育2h。用PBST清洗微孔板,然后用1%的OVA在TBS(每孔200uL)中培养0.5小时,以阻断微孔板。再经过一个洗涤步骤,加入10%甲醇、0.2mol/L Na^+ 和pH=7.5的样品或标准溶液和PBS稀释的多克隆抗体(50uL/孔,含不同钠离子浓度和pH值的PBS)。

[0026] 将微孔板孵育0.5小时,再次洗涤。加入在PBS中稀释的 Eu^{3+} 标记抗体(100uL/孔),孵育1h,所有孵育在37℃进行,每个洗涤步骤重复5次。再次清洗微孔板后,添加增强溶液(200uL/孔)。机械振荡8min后,用微量测定仪在340nm激发波长、615nm发射波长、延迟时间100 μs 、400 μs 的窗口时间下测定荧光强度。

[0027] 对分析参数包衣抗原、抗体、 Eu^{3+} 标记抗体、甲醇、 Na^+ 浓度和pH值进行优化。确定最佳分析参数的主要标准是达到较低的 IC_{50} 值和较高的 $F_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 比值(F_{max} :无SAL的荧光信号)。在优化确定了最佳实验参数后,用SAL浓度和 F/F_0 (%)值绘制标准曲线。 F 和 F_0 分别是SAL的荧光值和无SAL的荧光值。采用四参数逻辑方程计算了TRFIA的检测性能参数。

[0028] 测定结果:半抑制浓度(IC_{50})和检出限(LOD, IC_{10})分别为0.11 $\mu\text{g}/\text{L}$,0.66ng/L。对河流水、水田水、牲畜废水、菜地土、稻田土等各种环境样品进行加标,其回收率为86.98-106.75%,标准差(RSDS)为2.4-13.5%。此外,与UPLC-MS/MS的分析结果相比,本实验所建立的TRFIA分析结果表现优异。与我们报道的酶联免疫吸附试验相比,TRFIA的 IC_{50} 和LOD分别提高了4倍和31倍。与大多数其他典型方法相比,TRFIA对SAL的检测也具有很好的灵敏度,并且操作简便,用机溶剂用量少,成本低。以上结果表明,该方法可用于环境样品中微量SAL的快速、灵敏监测。方法的主要检测指标-灵敏度比其他常规免疫分析方法较低,可用于环境痕量沙丁胺醇检测,并且比其他仪器方法操作更加简便,有机溶剂用量少,成本低。

[0029] 以上所述仅是对本发明的较佳实施方式而已,并非对本发明作任何形式上的限制,凡是依据本发明的技术实质对以上实施方式所做的任何简单修改,等同变化与修饰,均属于本发明技术方案的范围。

专利名称(译)	一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法		
公开(公告)号	CN110045113A	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201910367839.1	申请日	2019-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院烟草研究所 福建省烟草公司三明市公司		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院烟草研究所 福建省烟草公司三明市公司		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院烟草研究所 福建省烟草公司三明市公司		
[标]发明人	方松 张义志 孙鹏 林智慧 梁颁捷 邱军 孔凡玉		
发明人	方松 张义志 孙鹏 林智慧 梁颁捷 材建麒 邱军 孔凡玉		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/643 G01N33/533 G01N33/543 G01N2021/6439		
代理人(译)	马金华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定环境样品中痕量沙丁胺醇的方法，包括材料与试剂准备，缓冲溶液制备，仪器选择，制备Eu3+标记的山羊抗兔抗体，在CBS中用涂层抗原覆盖微孔板并孵育，用OVA在TBS中培养以阻断微孔板，加入甲醇标准溶液和PBS稀释的多克隆抗体，加入在PBS中稀释的Eu3+标记抗体孵育，添加增强溶液，机械振荡后，用微量测定仪在340nm激发波长、615nm发射波长、延迟时间100 μ s、400 μ s窗口时间下测定荧光强度。本发明的有益效果是方法具有较高的灵敏度和检测能力，该方法重现性好，回收率高，可满足残留分析的要求。