



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103630689 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 12

(21) 申请号 201310641664. 1

(22) 申请日 2013. 12. 03

(71) 申请人 河北省科学院生物研究所

地址 050081 河北省石家庄市友谊南大街  
46 号

(72) 发明人 李春生 李君华 吴萌 程华

李亚璞 陈英珠 张小兵 董超

(74) 专利代理机构 河北东尚律师事务所 13124

代理人 李国聪

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用,属生物技术领域。该酶联免疫试剂盒含有包被有西马特罗药物抗原的酶标板、西马特罗药物单克隆抗体、酶标记物、西马特罗标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。该酶联免疫试剂盒的应用,主要包括的步骤为:样品前处理、操作方法及结果分析。本发明所述的检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒可用于动物组织(肌肉、肝脏)、尿液、饲料中西马特罗残留的检测,前处理无需配备特殊的仪器,具有操作简单、快速,精密度、准确度、灵敏度高,特异性高等特点,适合大量样本的筛查和现场监控。

1. 一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒,其特征在于,它含有:包被有西马特罗药物抗原的酶标板、西马特罗药物单克隆抗体、酶标记物、西马特罗标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述西马特罗药物抗原包括免疫原与检测原,其为由西马特罗与载体蛋白采用重氮化法合成的偶联物,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清白蛋白、免疫血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;所述酶标记物为酶标记抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体;所述酶标记物中的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

3. 根据权利要求2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述西马特罗药物免疫原使用牛血清白蛋白为载体;所述西马特罗药物检测原使用卵清蛋白为载体。

4. 根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述西马特罗药物单克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体;其由西马特罗药物抗原免疫得到。

5. 根据权利要求4所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述西马特罗药物单克隆抗体为西马特罗药物鼠源单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶标记抗抗体为酶标记羊抗鼠抗抗体,其采用碘酸钠法将标记酶与羊抗鼠抗抗体偶联得到。

7. 根据权利要求6所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述西马特罗标准品溶液的浓度分别为0ug/L、0.1ug/L、0.3ug/L、0.9ug/L、2.7ug/L、8.1ug/L;所述底物显色液由底物A和底物B组成,底物A为过氧化氢或过氧化脲,底物B为邻苯二胺或四甲基联苯胺,底物A和底物B按1:1混混合均匀;所述终止液为1-2mol/L的硫酸溶液;所述浓缩洗涤液为含有1%吐温-20的0.2mol/L PH7.4的磷酸缓冲液;所述样本稀释液为含有0.1-5%脱脂奶粉的0.02mol/L PH7.4的磷酸缓冲液。

8. 一种制备权利要求1至7任一权利要求所述的酶联免疫试剂盒制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 西马特罗药物抗原工作液的制备方法包括如下步骤:

(a) CIM重氮化:称取西马特罗3.5mg置于10ml螺口瓶中,用1ml0.1mol/L HCL溶解,冰浴冷却后,避光,边搅拌边逐滴加灭菌双蒸水至溶解并与已预冷的1mol/L NaNO<sub>2</sub>溶液适量,4℃条件下反应6h,得重氮化CIM溶液备用,其中已预冷的1mol/L NaNO<sub>2</sub>溶液适量为淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色;

(b) 免疫原的合成:称取10mg的BSA溶于pH值7.4的1ml0.1mol/L预冷的PBS中,再将步骤(1)所得的重氮化CIM溶液向其中滴加,边滴加边搅拌,用1mol/LNaOH溶液调pH值至8.5,4℃条件下反应12h,反应物4℃搅拌下用0.01mol/L PBS透析3d,每天换液3次,得CIM-BSA溶液;

(c) 检测原的合成:称取8mg的OVA溶于pH值7.4的1ml0.1mol/L预冷的PBS中,再将步骤(1)所得的重氮化CIM溶液向其中滴加,边滴加边搅拌,用1mol/LNaOH调pH值至8.5,4℃条件下反应12h,反应物4℃搅拌下用0.01mol/L PBS透析3d,每天换液3次,得CIM-OVA溶液;

(2) 包被有西马特罗药物抗原的酶标板的制备方法包括如下步骤:

(a) 用包被缓冲液将西马特罗药物抗原工作液稀释成0.25mg/ml,100ul/孔加入到酶

标板孔内；

(b) 4℃过夜或 37℃孵育 2h, 倾去孔中液体, 洗涤液洗涤 4-5 次, 拍干；

(c) 加入含有 10% 小牛血清的封闭液缓冲液, 200u1/ 孔, 37℃孵育 2h；

(d) 倾去孔中液体, 拍干, 室温在真空干燥箱中抽干 5h, 用铝箔袋真空塑封, 即得包被有西马特罗药物抗原的酶标板；

其中, 所述包被缓冲液为 pH9.6 的 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液, 封闭缓冲液为 10% 的小牛血清溶液；

(3) 西马特罗药物单克隆抗体工作液的制备方法包括如下步骤：

(a) 动物免疫 : 选择载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原, 免疫 6-8 周龄的雌性 B1ab/c 小鼠, 间隔 2 周免疫 1 次, 三次免疫后断尾取血测定效价和抑制率, 选择结果最佳的小鼠准备融合；

(b) 细胞融合 : 取步骤(1) 选定的小鼠的脾细胞和本实验室保存的 SP2/0 细胞进行融合, 间接 ELISA 法测定上清液选取阳性高的孔, 通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆, 直至建立产生单一抗西马特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

(c) 单克隆抗体的大量制备 : 选取个体较大的雌性 B1ab/c 小鼠, 采用体内诱生腹水法, 大量制备腹水, 并通过辛酸 - 硫酸铵沉淀纯化腹水, 分成小管, -20℃保存；

(4) 辣根过氧化物酶 - 羊抗鼠抗抗体, 即酶标记物工作液的制备方法包括如下步骤：

(a) 羊抗鼠抗抗体的制备 : 以羊为免疫动物, 以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊, 得到羊抗鼠抗抗体；

(b) 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备 : 将辣根过氧化物酶与羊抗鼠抗抗体采用碘酸钠法进行偶联；

(5) 组建西马特罗酶联免疫检测试剂盒, 包括下述各组分：

(a) 包被有西马特罗药物抗原的酶标板；

(b) 西马特罗药物单克隆抗体工作液；

(c) 酶标记抗抗体 : 辣根过氧化物酶 - 羊抗鼠抗抗体；

(d) 西马特罗标准品溶液 : 采用梯度稀释法配制西马特罗标准品溶液, 1ml/ 瓶, 浓度分别为 0ug/L、0.1ug/L、0.3ug/L、0.9ug/L、2.7ug/L、8.1ug/L；

(e) 底物显色液 A 液为过氧化脲溶液, 底物显色液 B 液为四甲基联苯胺(TMB) 溶液；

(f) 终止液为 1-2mol/L 的硫酸溶液；

(g) 浓缩洗涤液为含有 1% 吐温 -20 的 0.2mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液；

(h) 样本稀释液为含有 0.1-5% 脱脂奶粉的 0.02mol/L PH7.4 的磷酸缓冲液。

9. 一种制备权利要求 1 至 7 任一权利要求所述的酶联免疫试剂盒在用于检测西马特罗药物残留中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的在用于检测西马特罗药物残留中的应用, 其特征在于, 包括如下步骤：

(1) 样品前处理

(a) 肉类、肝脏、肾脏样品组织的前处理

将样品组织除去脂肪后匀浆, 称取 2g 匀质物, 加入 2ml 13% 三氯乙酸水溶液, 涡旋振荡 5min, 室温下 3000g 离心 5min, 取上清 0.5ml 加入 0.5ml 样本稀释液, 充分混匀 pH 值在 7-9；

取 50u1 进行检测；

或，

(b) 尿样前处理

将尿样 3000rpm 离心 5min 至清亮，取上清 50u1 进行检测；

或，

(c) 饲料前处理

称取 1.0g 饲料样本，加入 10ml 甲醇，涡动 5min，室温下 3000g 离心 5min，移取 1ml 上层有机相至 10ml 玻璃管中，于 50-60℃ 下氮气吹干，加入 1ml 正己烷，涡动 30s，再加入 1ml 3% 三氯乙酸水溶液，涡动 1min，室温下 3000g 离心 5min，除去上层有机相，取下层液体 150u1，加入 450u1 样本稀释液，充分混匀 pH 值在 7-9；取 50u1 进行检测；

(2) 按酶联免疫试剂盒说明，使用试剂盒进行检测

取出酶联免疫试剂盒，试剂恢复至室温，在室内放置 30min 以上；按需要取出板条，放置在酶标板上；按需要的量将西马特罗药物单克隆抗体工作液和酶标记抗抗体工作液按 5:1 比例混合；向孔内依次加入标准品或待测样品 50u1、西马特罗药物单克隆抗体工作液和酶标记抗抗体工作液的混合液 50u1，轻轻振荡混匀，25℃ 避光孵育 30min；将孔内液体甩干，用洗涤工作液 250u1/孔，洗涤 4 次，拍干；将显色液 A 和显色液 B 按 1:1 比例混合，100u1/孔加入显色，25℃ 避光孵育 15min；加终止液 50u1 终止反应，酶标仪 450nm 下采用双波长 450nm/630nm 测定，根据标准曲线进行定量或定性；

(3) 分析检测结果

(a) 定量分析：分别计算标准品和待测样品的平均吸光度值，标准品或样品的吸光度值(B) 除以 0 标准品的吸光度值再乘以 100%，即为百分吸光度值，百分吸光度值 =  $(B/B_0) \times 100\%$ ；以百分吸光度值为纵坐标，标准浓度的对数为横坐标，绘制标准曲线；将待测样本的百分吸光度值代入标准曲线，即可求出对应的浓度，再乘以稀释倍数即为样本的实际残留；

(b) 定性分析：用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较，即可得出待测样本的浓度范围，测试范围为 0.1ug/ml-8.1ug/ml。

## 一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用,尤其涉及一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用,属生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 西马特罗 (Cimaterol, CIM) 又名喜马特罗,塞曼特罗,属于苯乙胺类药物的一种,是一种强效选择性 B<sub>2</sub>-受体激动剂,临床上主要用于扩张气管和增加肺通气量,用于治疗哮喘、阻塞性肺炎、平滑肌痉挛和休克等疾病。因此药可以提高瘦肉率,减少脂肪沉积和促进动物生长,故常被作为饲料添加剂非法用于动物源性食品生产中。长期使用可能造成 CIM 在可食动物组织内蓄积性残留,进入人体后可引起心悸、肌肉震颤、疼痛、神经症状、头晕头痛、恶心呕吐、发热寒战等临床症状,特别对心脏病、糖尿病和高血压等病人危害更大。鉴于 CIM 的明显危害,我国禁止 CIM 在畜禽生产中应用,并规定在所有的动物可食组织中不得检出。

[0003] 目前,对于西马特罗的残留检测主要有高效液相色谱法 (HPLC)、薄层层析法 (TLC),液相色谱-质谱联用法 (LC-MS)、气相色谱-质谱联用法 (GC-MS),高效毛细管区带电泳法 (CZE)、免疫测定法等。仪器检测方法具有灵敏、准确,但样品处理繁琐费时,成本高,而且需要有经过专门训练的专业人员来操作复杂的仪器设备,无法应用于现场检测,因此限制了其广泛应用。免疫分析技术具有敏感、特异、快速且一次能检测大量样品的特点,检测精度可达 ng/g 级,是理想的快速筛查方法。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术之缺陷提供一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒,该酶联免疫试剂盒具有灵敏度、精密度、准确度高,特异性高,稳定性好储存时间长,操作简单,快速,适合大批量样品初筛的优点。此外,本发明进一步提供该检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒的制备方法与应用。

[0005] 本发明所述技术问题是由以下技术方案实现的。

[0006] 一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒,它含有包被有西马特罗药物抗原的酶标板、西马特罗药物单克隆抗体、酶标记物、西马特罗标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。

[0007] 上述酶联免疫试剂盒,所述西马特罗药物抗原包括免疫原与检测原,其为由西马特罗与载体蛋白采用重氮化法合成的偶联物,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清白蛋白、免疫血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白,免疫原优选载体为牛血清白蛋白,检测原优选载体为卵清蛋白;所述酶标记物为酶标记抗原、酶标记抗体或酶标记抗体;所述酶标记物中的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

[0008] 上述酶联免疫试剂盒,所述西马特罗药物单克隆抗体为鼠源、马源、羊源、兔源或

豚鼠源抗体,优选西马特罗药物鼠源单克隆抗体;其由西马特罗药物抗原免疫得到。

[0009] 上述酶联免疫试剂盒,所述酶标记抗体为酶标记羊抗鼠抗体,其采用碘酸钠法将标记酶与山羊抗鼠抗体偶联得到。

[0010] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述酶联免疫试剂盒还包括西马特罗标准液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液,且均以工作液形式提供。

[0011] 上述酶联免疫试剂盒,所述西马特罗标准品溶液的浓度分别为 0ug/L、0.1ug/L、0.3ug/L、0.9ug/L、2.7ug/L、8.1ug/L;所述底物显色液由底物 A 和底物 B 组成,底物 A 为过氧化氢或过氧化脲,底物 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺,底物 A 和底物 B 按 1:1 混混合均匀;所述终止液为 1-2mol/L 的硫酸溶液;所述浓缩洗液为含有 1% 吐温-20 的 0.2mol/L PH7.4 的磷酸缓冲液;所述样本稀释液为含有 0.1-5% 脱脂奶粉的 0.02mol/L PH7.4 的磷酸缓冲液。

[0012] 本发明所述的酶联免疫试剂盒制备方法,包括如下步骤:

[0013] (1) 西马特罗药物抗原工作液的制备方法包括如下步骤:

[0014] (a) 西马特罗重氮化:称取西马特罗 3.5mg 置于 10ml 螺口瓶中,用 1ml 0.1mol/L HCL 溶解,冰浴冷却后,避光,边搅拌边逐滴加灭菌双蒸水至溶解并与已预冷的 1mol/L  $\text{NaNO}_2$  溶液适量,4°C 条件下反应 6h,得重氮化西马特罗溶液备用,其中已预冷的 1mol/L  $\text{NaNO}_2$  溶液适量为淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色;

[0015] (b) 免疫原的合成:称取 10mg 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 pH 值 7.4 的 1ml 0.1mol/L 预冷的 PBS 中,再将步骤 (1) 所得的重氮化西马特罗溶液向其中滴加,边滴加边搅拌,用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 8.5,4°C 条件下反应 12h,反应物 4°C 搅拌下用 0.01mol/L PBS 透析 3d,每天换液 3 次,得 CIM-BSA 溶液;

[0016] (c) 检测原的合成:称取 8mg 的卵清蛋白 (OVA) 溶于 pH 值 7.4 的 1ml 0.1mol/L 预冷的 PBS 中,再将步骤 (1) 所得的重氮化西马特罗溶液向其中滴加,边滴加边搅拌,用 1mol/L NaOH 调 pH 值至 8.5,4°C 条件下反应 12h,反应物 4°C 搅拌下用 0.01mol/L PBS 透析 3d,每天换液 3 次,得 CIM-OVA 溶液;

[0017] (2) 包被有西马特罗药物抗原的酶标板的制备包括如下步骤:

[0018] (a) 用包被缓冲液将西马特罗药物抗原溶液稀释成 0.25mg/ml,100u1/孔加入到酶标板孔内;

[0019] (b) 4°C 过夜或 37°C 孵育 2h,倾去孔中液体,洗涤液洗涤 4-5 次,拍干;

[0020] (c) 加入含有 10% 小牛血清的封闭液缓冲液,200u1/孔,37°C 孵育 2h;

[0021] (d) 倾去孔中液体,拍干,室温在真空干燥箱中抽干 5h,用铝箔袋真空塑封,即得包被有西马特罗药物抗原的酶标板;

[0022] 其中,所述包被缓冲液为 pH9.6 的 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液,封闭缓冲液为 10% 的小牛血清溶液;

[0023] (3) 西马特罗药物单克隆抗体工作液的制备方法包括如下步骤:

[0024] (a) 动物免疫:选择载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原,免疫 6-8 周龄的雌性 Blab/c 小鼠,间隔 2 周免疫 1 次,三次免疫后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0025] (b) 细胞融合:取步骤 (1) 选定的小鼠的脾细胞和本实验室保存的 SP2/0 细胞进行

融合,间接 ELISA 法测定上清液选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生单一抗西马特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0026] (c) 单克隆抗体的大量制备:选取个体较大的雌性 B1ab/c 小鼠,采用体内诱生腹水法,大量制备腹水,并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,分成小管,-20℃保存;

[0027] (4) 辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体,即酶标记物浓缩工作液的制备方法包括如下步骤:

[0028] (a) 羊抗鼠抗抗体的制备:以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0029] (b) 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备:将辣根过氧化物酶与羊抗鼠抗抗体采用碘酸钠法进行偶联;

[0030] (5) 组建用于检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒,包括下述各组分:

[0031] (a) 包被有西马特罗药物抗原的酶标板;

[0032] (b) 西马特罗药物单克隆抗体工作液;

[0033] (c) 酶标记抗抗体:辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体;

[0034] (d) 西马特罗标准品溶液:采用梯度稀释法配制西马特罗标准品溶液,1ml/瓶,浓度分别为 0ug/L、0.1ug/L、0.3ug/L、0.9ug/L、2.7ug/L、8.1ug/L;

[0035] (e) 底物显色液 A 液为过氧化脲溶液,底物显色液 B 液为四甲基联苯胺(TMB)溶液;

[0036] (f) 终止液为 1-2mol/L 的硫酸溶液;

[0037] (g) 浓缩洗涤液为含有 1%吐温-20 的 0.2mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液;

[0038] (h) 样本稀释液为含有 0.1-5%脱脂奶粉的 0.02mol/L PH7.4 的磷酸缓冲液。

[0039] 上述酶联免疫试剂盒在用于检测西马特罗药物残留中的应用。

[0040] 上述在用于检测西马特罗药物残留中的应用,包括如下步骤:

[0041] (1) 样品前处理

[0042] (a) 肉类、肝脏、肾脏样品组织的前处理

[0043] 将样品组织除去脂肪后匀浆,称取 2g 匀质物,加入 2ml3%三氯乙酸水溶液,涡旋振荡 5min,室温(20-25℃)下 3000g 离心 5min,取上清 0.5ml 加入 0.5ml 样本稀释液,充分混匀 pH 值在 7-9;取 50ul 进行检测;

[0044] 或,

[0045] (b) 尿样前处理

[0046] 将尿样 3000rpm 离心 5min 至清亮,取上清 50ul 进行检测;

[0047] 或,

[0048] (c) 饲料前处理

[0049] 称取 1.0g 饲料样本,加入 10ml 甲醇,涡动 5min,室温(20-25℃)下 3000g 离心 5min,移取 1ml 上层有机相至 10ml 玻璃管中,于 50-60℃下氮气吹干,加入 1ml 正己烷,涡动 30s,再加入 1ml3%三氯乙酸水溶液,涡动 1min,室温(20-25℃)下 3000g 离心 5min,除去上层有机相,取下层液体 150ul,加入 450ul 样本稀释液,充分混匀 pH 值在 7-9;取 50ul 进行检测;

[0050] (2) 按酶联免疫试剂盒说明,使用试剂盒进行检测

[0051] 取出酶联免疫试剂盒,试剂恢复至室温(20-25℃),在室内放置 30min 以上;按需要取出板条,放置在酶标板上;按需要的量将西马特罗药物单克隆抗体工作液和酶标记抗体工作液按 5:1 比例混合;向孔内依次加入标准品或待测样品 50ul、西马特罗药物单克隆抗体工作液和酶标记抗体工作液的混合液 50ul,轻轻振荡混匀,25℃避光孵育 30min;将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水将 20× 浓缩洗涤液 20 倍稀释)250ul/孔,洗涤 4 次,拍干;将显色液 A 和显色液 B 按 1:1 比例混合,100ul/孔加入显色,25℃避光孵育 15min;加终止液 50ul 终止反应,酶标仪 450nm 下采用双波长 450nm/630nm 测定,根据标准曲线进行定量或定性。

[0052] (3) 分析检测结果

[0053] (a) 定量分析:分别计算标准品和待测样品的平均吸光度值,标准品或样品的吸光度值(B)除以 0 标准品的吸光度值再乘以 100%,即为百分吸光度值,百分吸光度值 =  $(B/B_0) \times 100\%$ 。以百分吸光度值为纵坐标,标准浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线。将待测样本的百分吸光度值代入标准曲线,即可求出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样本的实际残留。

[0054] (b) 定性分析:用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较,即可得出待测样本的浓度范围,测试范围为 0.1ug/ml-8.1ug/ml。

[0055] 本发明所述的酶联免疫试剂盒检测原理为微孔条上包被有西马特罗偶联抗原,当加入待测样本时,待测样本中残留的西马特罗与预包被的偶联抗原竞争西马特罗特异性抗体,同时加入酶标物,显色后终止,吸光度值与待测样品中西马特罗残留含量呈负相关。本发明所述的酶联免疫试剂盒的曲线范围在 0.1-8.1ug/L 范围内;猪肉组织中西马特罗回收率分别为 95.03±7.5、85.57±8.63、76.17±9.45,批内变异系数均在 10.24% 以下,批间变异系数均在 12.5% 以下;尿液中西马特罗回收率分别为 98.24±9.69、83.81±8.6、82.66±9.57,批内变异系数均在 10.73% 以下,批间变异系数均在 11.6% 以下;饲料中西马特罗回收率分别为 81.05±7.05、76.97±6.12、83.58±5.44,批内变异系数均在 8.13% 以下,批间变异系数均在 8.7% 以下;因此,针对猪肉组织、尿液、饲料的添加回收率实验,回收率均在 67%-107% 之间,批内、批间变异系数均在 15% 以下,符合《农业部文件》农医发[2005]17 号文件中规定的试剂盒备案参考评判标准中的精密度和准确度规定。此外,通过测定西马特罗、克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、异丙肾上腺素、去甲肾上腺素等几种药物的交叉反应率,显示本发明所述的酶联免疫试剂盒的特异性非常之高;通过将酶联免疫试剂盒放置在 2℃-8℃ 保存 12 个月,期间每隔 1 个月检测一次,测定试剂盒的 IC50 值、ODmax、回收率等各项参数,结果显示各参数均在正常范围内,同时将试剂盒放置在 37℃ 和 -20℃ 放置 6 天,每天检测一次,测定试剂盒的 IC50%、ODmax、回收率等各项参数均在正常范围之内,因此,此试剂盒可以在 2℃-8℃ 保存至少 12 个月。

## 附图说明

[0056] 图 1 本发明所述酶联免疫试剂盒的西马特罗标准曲线图

## 具体实施方式

[0057] 下面结合具体的实例来进一步阐述本发明。应理解,这些实例仅用于说明本发明,

而不用来限制本发明的范围。

[0058] 实施例一 本发明所述西马特罗药物抗原的制备

[0059] (1)西马特罗重氮化:称取 CIM3.5mg 置于 10ml 螺口瓶中,用 1ml0.1mol/L HCL 溶解,冰浴冷却后,避光,边搅拌边逐滴加入灭菌双蒸水至溶解并与已预冷的 1mol/L NaNO<sub>2</sub> 溶液适量(淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色为宜),4℃ 条件下反应 6h,得重氮化 CIM;

[0060] (2)免疫原的合成:称取 10mg 的 BSA 溶于 1ml0.1mol/L 预冷的 PBS 中(pH 值 7.4),再用(1)所得溶液向其中滴加,边滴加边搅拌。用 1mol/LNaOH 调 pH 值至 8.5 左右,4℃ 条件下反应 12h,反应物 4℃ 搅拌下用 0.01mol/L PBS 透析 3d,每天换液 3 次,得 CIM-BSA;

[0061] (3)检测原的合成:称取 8mg 的 OVA 溶于 1ml0.1mol/L 预冷的 PBS 中(pH 值 7.4),再用(1)所得溶液向其中滴加,边滴加边搅拌。用 1mol/LNaOH 调 pH 值至 8.5 左右,4℃ 条件下反应 12h,反应物 4℃ 搅拌下用 0.01mol/L PBS 透析 3d,每天换液 3 次,得 CIM-OVA。

[0062] 实施例二 本发明所述包被有西马特罗药物抗原的酶标板的制备

[0063] 用 PH9.6 的碳酸盐缓冲液将西马特罗药物抗原稀释成 0.25mg/ml,100u1/孔加入到酶标板孔上,其中西马特罗药物抗原包括免疫原、检测原,免疫原牛血清白蛋白为载体,检测原卵清蛋白为载体;4℃ 过夜或 37℃ 孵育 2h,洗涤 4-5 次,拍干;加入含有 10% 小牛血清的封闭缓冲液,200u1/孔,37℃ 孵育 2h;室温在真空干燥箱中抽干 5h,用铝箔袋真空塑封。

[0064] 实施例三 本发明所述西马特罗药物单克隆抗体的制备

[0065] (1)动物免疫:载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原免疫 6-8 周龄的雌性 B1ab/c 小鼠,间隔 2 周免疫 1 次,三免后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0066] (2)细胞融合:取小鼠的脾细胞和本实验室保存的 SP2/0 细胞,进行融合,间接 ELISA 法测定上清选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生单一抗西马特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0067] (3)单克隆抗体的大量制备:选取个体较大的雌性 B1ab/c 小鼠,采用体内诱生腹水法,大量制备腹水,并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,分成小管,-20℃ 保存。

[0068] 实施例四 本发明所述酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

[0069] 羊抗鼠抗抗体的制备:以羊为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0070] 酶标记羊抗鼠抗抗体(酶标记抗抗体)的制备:将辣根过氧化物酶与羊抗鼠抗抗体采用碘酸钠法进行偶联。

[0071] 实施例五 本发明所述用于检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒的组建

[0072] 组建西马特罗酶联免疫检测试剂盒,包括下述各组分:

[0073] (1)包被有西马特罗酶药物抗原的酶标板;

[0074] (2)西马特罗药物单克隆抗体工作液;

[0075] (3)酶标记抗抗体:辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体;

[0076] (4)西马特罗标准品溶液:采用梯度稀释法配制西马特罗标准品溶液,1ml/瓶,浓度分别为 0ug/L、0.1ug/L、0.3ug/L、0.9ug/L、2.7ug/L、8.1ug/L;

[0077] (5)底物显色液 A 液为过氧化脲溶液,底物显色液 B 液为四甲基联苯胺(TMB)溶液;

[0078] (6) 终止液为 1-2mol/L 的硫酸溶液；

[0079] (7) 浓缩洗涤液为含有 1% 吐温 -20 的 0.2mol/L PH7.4 的磷酸盐缓冲液；

[0080] (8) 样本稀释液为含有 0.1-5% 脱脂奶粉的 0.02mol/L PH7.4 的磷酸缓冲液。

[0081] 实施例六 使用本发明所述的酶联免疫试剂盒检测样本中残留的西马特罗

[0082] 1、样本的前处理

[0083] (1) 肉类、肝脏、肾脏等组织的前处理

[0084] 将样品组织除去脂肪后匀浆,称取 2g 匀质物,加入 2ml3% 三氯乙酸(称取 15g 三氯乙酸,加入 500ml 去离子水溶解混匀),涡旋振荡 5min,室温(20-25℃)下 3000g 离心 5min。取上清 0.5ml 加入 0.5ml 样本稀释液,充分混匀(pH 值在 7-9 之间)。取 50ul 进行检测。

[0085] (2) 尿样前处理

[0086] 将尿样 3000rpm 离心 5min 至清亮,取上清 50ul 进行检测。

[0087] (3) 饲料前处理

[0088] 称取 1.0g 饲料样本,加入 10ml 甲醇,涡动 5min,室温(20-25℃)下 3000g 离心 5min。移取 1ml 上层有机相至 10ml 玻璃管中,于 50-60℃下氮气吹干。加入 1ml 正己烷,涡动 30s,再加入 1ml3% 三氯乙酸,涡动 1min。室温(20-25℃)下 3000g 离心 5min,除去上层有机相,取下层液体 150ul,加入 450ul 样本稀释液,充分混匀(pH 值在 7-9 之间)。取 50ul 进行检测。

[0089] 2、检测方法

[0090] (1) 取出酶联免疫试剂盒,试剂恢复至室温(20-25℃),至少在室内放置 30min；

[0091] (2) 按需要取出板条,放置在酶标板上；

[0092] (3) 按需要的量将西马特罗药物单克隆抗体工作液和酶标记抗抗体工作液按 5:1 比例混合；

[0093] (4) 向孔内依次加入标准品(或待测样品) 50ul、西马特罗药物单克隆抗体工作液和酶标记抗抗体工作液的混合液 50ul,轻轻振荡混匀,25℃避光孵育 30min；

[0094] (5) 将孔内液体甩干,用洗涤工作液(用去离子水将 20× 浓缩洗涤液 20 倍稀释) 250ul/孔,洗涤 4 次,拍干；

[0095] (6) 将显色液 A 和显色液 B 按 1:1 比例混合,100ul/孔加入显色,25℃避光孵育 15min；

[0096] (7) 加终止液 50ul 终止反应,酶标仪 450nm 下测定(建议采用双波长 450/630 测定),根据标准曲线进行定量或定性。

[0097] 3、检测结果

[0098] (1) 定量分析:分别计算标准品和待测样品的平均吸光度值,标准品或样品的吸光度值(B)除以 0 标准品的吸光度值再乘以 100%,即为百分吸光度值,百分吸光度值 =  $(B/B_0) \times 100\%$ 。以百分吸光度值为纵坐标,标准浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线。将待测样本的百分吸光度值代入标准曲线,即可求出对应的浓度,再乘以稀释倍数即为样本的实际残留。

[0099] (2) 定性分析:用待测样本的平均吸光度值和标准品的吸光度值相比较,即可得出待测样本的浓度范围。

[0100] 检测结果也可以用专业的计算机软件进行计算,测试范围为 0.1ug/ml-8.1ug/ml。

[0101] 实施例七 试剂盒灵敏度、特异性、精密度、准确度和保质期实验

[0102] 1、试剂盒灵敏度测定

[0103] 灵敏度以最低检测限(mg/kg 或 ug/kg)表示。分别测定 20 份鸡肉组织、猪肉组织、猪肝、猪尿、饲料等空白样品,及 20 份西马特罗标准品。求  $(B/B_0)\%$  值的平均值(X) 和标准差(SD),从标准曲线上求出  $X-2SD$  值对应的标准品浓度,作为各样本的最低检测限。

[0104] 试剂盒的曲线范围在 0.1-8.1ug/L 范围内(见图 1),组织中西马特罗检测限为 0.5ug/L,尿液中检测限为 0.3ug/L,饲料中检测限为 3.0ug/L。

[0105] 2、试剂盒准确度及精确度测定

[0106] 准确度是指测定值与真实值间的符合程度,常用回收率表示;精密度是反应测定方法对某一特定样本多次测定所得结果的重复程度,常用变异系数表示。从检测合格的试剂盒中选取同一批次和不同批次的酶标板,在猪肉组织和尿液中添加终浓度为 0.9ug/L、2.7ug/L、8.1ug/L 的西马特罗标准品,饲料样本中添加终浓度为 5ug/L、6.5ug/L、8.1ug/L 的西马特罗标准品,根据以上所述的处理方法提取,同一批次、不同批次分别重复 5 次,测定批内、批间变异系数及回收率。结果见表 1、表 2 和表 3。

[0107] 表 1 猪肉组织批内、批间变异系数及回收率测定

[0108]

样品	添加浓度 (ug/L)	回收率	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
组织	0.9	94.62±9.66	95.03±7.5	7.04%	7.90%
		100.83±4.74			
		90.63±6.12			
	2.7	90.92±5.53	85.57±8.63	7.85%	10%
		98.14±7.37			
		81.52±5.12			
		86.29±8.63			
		84.45±4.06			
		93.16±9.45			
	8.1	82.43±6.62	76.17±9.45	10.24%	12.50%
		74.21±8.27			
		71.02±6.14			
		83.01±10.4			
		80.01±6.25			
		72.608±8.16			

[0109] 表 1 为猪肉组织中西马特罗添加回收率和变异系数。结果表明,在 3 个添加浓度下,对应的猪肉组织中西马特罗回收率分别为 95.03±7.5、85.57±8.63、76.17±9.45,批内变异系数均在 10.24% 以下,批间变异系数均在 12.5% 以下。

[0110] 表 2 尿液批内、批间变异系数及回收率测定

[0111]

样品	添加浓度 (ug/L)	回收率	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
尿液	0.9	100.56±7.14	98.24±9.69	7.36%	9.86%
		107.12±4.49			
		102.53±3.75			
		90.5±11.42			
		90.53±8.36			
	2.7	93.43±4.99	83.81±8.6	8.75%	10.30%
		80.41±8.4			
		81.73±6.35			
		78.68±7.95			
		84.81±8.66			
	8.1	82.39±7.71	82.66±9.57	10.73%	11.60%
		85.11±9.22			
		77.98±9.96			
		75.65±9.64			
		92.18±7.35			

[0112] 表 2 为尿液中西马特罗添加回收率和变异系数。结果表明,在 3 个添加浓度下,对应的尿液中西马特罗回收率分别为 98.24±9.69、83.81±8.6、82.66±9.57,批内变异系数均在 10.73% 以下,批间变异系数均在 11.6% 以下。

[0113] 表 3 饲料批内、批间变异系数及回收率测定

[0114]

样品	添加浓度 (ug/L)	回收率	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
饲料	5	84.97±8.42	81.05±7.05	8.13%	8.70%
		79.94±7.49			
		77.69±5.31			
		77.8±7.94			
		84.86±3.71			
	6.5	78.02±5.97	76.97±6.12	8.45%	7.90%
		77.17±8.56			
		73.43±5.23			
		77.2±5.23			
		79.02±7.61			
	8.1	84.05±6.07	83.58±5.44	6.88%	6.50%
		79.53±7.14			
		85.39±5.38			
		86.35±3.87			
		82.6±6.07			

[0115] 表 3 为饲料中西马特罗添加回收率和变异系数。结果表明,在 3 个添加浓度下,对应的饲料中西马特罗回收率分别为 81.05±7.05、76.97±6.12、83.58±5.44,批内变异系数均在 8.13% 以下,批间变异系数均在 8.7% 以下。

[0116] 综上所述,针对猪肉组织、尿液、饲料的添加回收率实验,回收率均在 67%–107% 之间,批内、批间变异系数均在 15% 以下,符合《农业部文件》农医发 [2005]17 号文件中规定

的试剂盒备案参考评判标准中的精密度和准确度规定。

[0117] 3、交叉反应率测定

[0118] 选择如下所示西马特罗、克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、异丙肾上腺素、去甲肾上腺素等几种药物按照常规方法测定交叉反应率,结果如表 4 所示。

[0119] 交叉反应率  $CR = (\text{沙丁胺醇的 } IC_{50} / \text{各结构类似物的 } IC_{50}) \times 100 \%$

[0120] 表 4 试剂盒的交叉反应性

[0121]

化合物	IC50/ng/ml	交叉反应率/%
西马特罗	0.6	100
盐酸克伦特罗	>2.00×10 <sup>4</sup>	< 0.01
莱克多巴胺	>2.00×10 <sup>4</sup>	< 0.01
沙丁胺醇	>2.00×10 <sup>4</sup>	< 0.01
异丙肾上腺素	>2.00×10 <sup>4</sup>	< 0.01
去甲肾上腺素	>2.00×10 <sup>4</sup>	< 0.01

[0122] 4、试剂盒保存期实验

[0123] 将试剂盒放置在 2℃ -8℃ 保存 12 个月,期间每隔 1 个月检测一次,测定试剂盒的 IC50 值、OD<sub>max</sub>、回收率等各项参数均在正常范围内。同时将试剂盒放置在 37℃ 和 -20℃ 放置 6 天,每天检测一次,测定试剂盒的 IC50%、OD<sub>max</sub>、回收率等各项参数均在正常范围之内。

[0124] 从以上结果看出,三种条件保存试验,本试剂盒的各项指标均符合质量要求,因此,此试剂盒可以在 2℃ -8℃ 保存至少 12 个月。

[0125] 上述实施例只为说明本发明的技术构思和优点,本发明也可以具有其它的形式变化,如本领域技术人员所熟知,上述实施例仅仅起到对上述发明保护范围内的示范作用,对本领域普通技术人员来说,在本发明所限定的保护范围内还有很多常规变形和其它实施例,这些变形和实施例都将在本发明待批的保护范围之内。

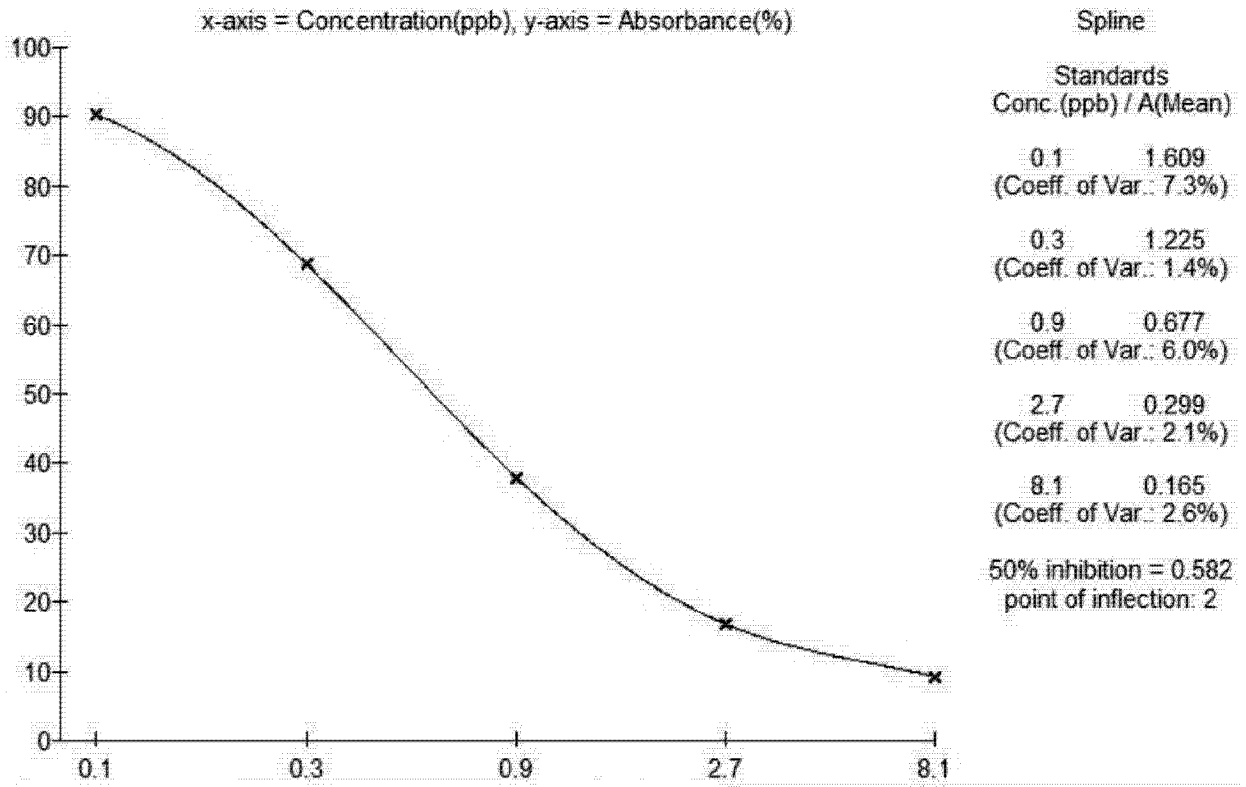


图 1

专利名称(译)	一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103630689A</a>	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201310641664.1	申请日	2013-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所		
[标]发明人	李春生 李君华 吴萌 程华 李亚璞 陈英珠 张小兵 董超		
发明人	李春生 李君华 吴萌 程华 李亚璞 陈英珠 张小兵 董超		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N1/28		
CPC分类号	G01N1/28 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	李国聪		
其他公开文献	CN103630689B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	样品	添加浓度 (ug/L)	回收率	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
本发明涉及一种检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒及其制备方法与应用，属生物技术领域。该酶联免疫试剂盒含有包被有西马特罗药物抗原的酶标板、西马特罗药物单克隆抗体、酶标记物、西马特罗标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。该酶联免疫试剂盒的应用，主要包括的步骤为：样品前处理、操作方法及结果分析。本发明所述的检测西马特罗药物残留的酶联免疫试剂盒可用于动物组织（肌肉、肝脏）、尿液、饲料中西马特罗残留的检测，前处理无需配备特殊的仪器，具有操作简单、快速，精密度、准确度、灵敏度高，特异性高等特点，适合大量样本的筛查和现场监控。	0.9		94.62±9.66	95.03±7.5	7.04%	7.90%
			100.83±4.74			
			90.63±6.12			
			90.92±5.53			
			98.14±7.37			
	2.7		81.52±5.12	85.57±8.63	7.85%	10%
			86.29±8.63			
			84.45±4.06			
			93.16±9.45			
	8.1		82.43±6.62	76.17±9.45	10.24%	12.50%
			74.21±8.27			
			71.02±6.14			
			83.01±10.4			
			80.01±6.25			
		72.608±8.16				