



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792226 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201210432887. 2

(22) 申请日 2012. 11. 03

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 洪霞

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有苯乙醇胺 A-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、苯乙醇胺 A 标准品、苯乙醇胺 A-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩稀释液、浓缩洗涤液组成。所述苯乙醇胺 A-载体蛋白偶联物是将苯乙醇胺 A 与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,浓缩洗涤液含有 0.05% 吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较,本发明的试剂盒具有更高的灵敏度,且检测时间短、费用低,可用于动物尿液、血样、组织及内脏等样品中苯乙醇胺 A 的残留量检测。

1. 一种检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在於试剂盒中的以下成份:

(1) 包被有苯乙醇胺 A- 载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板;所述苯乙醇胺 A- 载体蛋白偶联物是将苯乙醇胺 A 与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白;

(2) 苯乙醇胺 A 标准品;

(3) 苯乙醇胺 A- 过氧化物酶标记抗体:该成分为用过氧化物酶标记的苯乙醇胺 A 抗体,所述苯乙醇胺 A 抗体为单克隆抗体;

(4) 发光底物液:该发光底物液是以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液,分为 A 液和 B 液保存,在使用前按 1:1 混合使用;其中 A 液为发光增强剂加鲁米诺货发光增强剂加异鲁米诺, B 液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液;

(5) 2 倍浓缩稀释液;

(6) 20 倍浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求 1 的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述不透明白色酶标板为 96 孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

3. 根据权利要求 1 的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述苯乙醇胺 A 标准品的浓度为 0.04~31.25  $\mu\text{g}/\text{L}$  的浓度区间。

4. 根据权利要求 1 的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述苯乙醇胺 A- 过氧化物酶标记抗体工作液是用抗体稀释液稀释成 1:20000 比例;

根据权利要求 1 的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺货异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

5. 根据权利要求 1 的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述 2 倍浓缩稀释液,其成分为 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl 缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液,使用前请按 1:1 稀释(1 份浓缩样品稀释液+1 份去离子水)。

6. 根据权利要求 1 的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其中,所述 20 倍浓缩洗涤液,其包含 0.05% 吐温-20, 0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间,使用前请按 1:19 稀释(1 份浓缩稀释液+19 份去离子水)。

## 检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,用于检测动物源性食品中如动物组织、内脏、血液、尿液和饲料、饲料原料中的苯乙醇胺 A 含量或残留量。属于免疫学检测领域。

### 背景技术

[0002] 苯乙醇胺 A (Phenylethylamine, PEA) 又称为克伦巴胺,学名为 2-[4-(4-硝基苯基)丁基-2-基氨基]-1-甲氧基苯乙醇,是一种人工合成的化学物质。有刺激动物生长,加强蛋白质在动物体内沉积,提高基础代谢水平,使体脂趋于分解等作用,也可促进猪生长速度加快、使其皮红毛亮、瘦肉率提高。人食用含这种瘦肉精的肉后,会出现恶心、头晕、四肢无力、手颤等中毒症状,甚至诱发高血压、心脏病等,长期食用则有可能导致染色体畸变,诱发恶性肿瘤。

[0003] 苯乙醇胺 A 被农业部第 1519 号公告列为“禁止在和动物饮水中使用的物质”,最早是在四川省被检测出来——去年 9 月四川省广安市广安区枣山镇畜牧兽医站对某养猪场例行违禁药物监测中,用莱克多巴胺测试卡分别检测母猪、仔猪和育肥猪尿液,发现该场育肥猪尿检呈阳性,之后确认是新型添加物苯乙醇胺 A,12 月农业部发布了第 1519 号公告,禁止了这一化学品的使用,为今后严肃查处在饲料生产、经营、使用和动物饮水违禁添加苯乙醇胺 A 等物质的违法行为提供了依据。

[0004] 在苯乙醇胺 A 的检测方法方面,目前最为常用的方法包括高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、液相色谱-质谱联用 (LC-MS)、酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 等方法。高效液相色谱法 (HPLC) 具有检测精确度高、假阳性率低的特点;高效液相色谱法 (HPLC) 的主要缺点是仪器价格昂贵、操作比较繁琐,耗时长,检测成本高。气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 法灵敏度高,假阳性率低;但该方法样品需要衍生化处理,造成实验结果会有偏差。液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 可对尿液、血液、毛发等样品进行检测,但同上面的方法类似,实验操作步骤繁琐,检测成本高。酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 是当前应用最广的检测技术之一,主要优点在于检测速度快,样品前处理简单,操作简单,检测成本低,同时便于用于大批量样品的检测。

[0005] 化学发光免疫检测技术是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光检测技术的高灵敏性和免疫分析技术的高特异性。本发明通过特有的免疫动物制备具有高亲和力、高特异性的苯乙醇胺 A 抗体,并采用酶标记抗体,建立一种可以检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫试剂盒。本方法具有操作简便、快捷,灵敏度高、特异性好等特点。

### 发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题,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实现的。化学发光免疫分析是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中苯乙醇

胺 A 含量越高,反应体系中发光强度越弱;反之,样品中苯乙醇胺 A 含量越少,发光强度越高。

[0007] 本发明是一种检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于含有以下成份:

1、包被有苯乙醇胺 A-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板;所述苯乙醇胺 A-载体蛋白偶联物是将苯乙醇胺 A 与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、鸡蛋白蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白;

2、苯乙醇胺 A 标准品;

3、苯乙醇胺 A-过氧化物酶标记抗体:该成分为用过氧化物酶标记的苯乙醇胺 A 抗体,所述苯乙醇胺 A 抗体为单克隆抗体或多克隆抗体;

4、发光底物液:该发光底物液是以鲁米诺异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液,分为 A 液和 B 液保存,在使用前按 1:1 混合使用;其中 A 液位发光增强剂加鲁米诺异鲁米诺, B 液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液;

5、2 倍浓缩稀释液;

6、20 倍浓缩洗涤液。

[0008] 本发明中,所述的不透明白色酶标板为 96 孔的可拆卸或不可拆卸的不透明白色酶标板。

[0009] 本发明中,所述的苯乙醇胺 A 标准品,由一系列不同浓度的苯乙醇胺 A 标准品组成,浓度为 0.04~31.25  $\mu\text{g/L}$  的浓度区间。

[0010] 本发明中,所述的苯乙醇胺 A-过氧化物酶标记抗体为用过氧化物酶标记的苯乙醇胺 A 抗体,如辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的苯乙醇胺 A 抗体。

[0011] 本发明中,所述的发光底物液为商品化的任一种以鲁米诺异鲁米诺为发光剂的化学发光底物液。

[0012] 本发明中,所述所述 2 倍浓缩稀释液,其成分为 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液、甘氨酸-HCl 缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液,使用前请按 1:1 稀释(1 份浓缩样品稀释液+1 份去离子水)。

[0013] 本发明中,所述 20 倍浓缩洗涤液,其包含 0.05% 吐温-20, 0.01mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间,使用前请按 1:19 稀释(1 份浓缩稀释液+19 份去离子水)。

[0014] 本发明的苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒应用于苯乙醇胺 A 的检测时,检测步骤为:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,氮气吹干并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$ )平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被苯乙醇胺 A 抗原的酶标板,加标准品/待测样品 50  $\mu\text{L}$ /孔到对应的微孔中,标准品和样品每个浓度做两个平行实验;

(4) 加入苯乙醇胺 A 抗体工作液,50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$  避光环境中反应 45 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu\text{L}$ /孔,充分洗涤 4~5 次,每

次间隔 10 s,用吸水纸拍干(拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破);

(6) 加入发光底物液混合液(A液与B液在使用前按1:1混合)100 μL/孔,轻轻振荡混匀,混合好后在化学发光检测仪内检测发光强度(RLU);

(7) 检测结果的计算:用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式:

$$\text{相对发光强度} = \text{RLU} / \text{RLU}_{\text{max}}$$

式中:

RLU= 标准(或样品)溶液的发光强度值;

RLU<sub>max</sub>= 空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0015] 将计算的相对发光强度值对应苯乙醇胺A(μg/L)的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的苯乙醇胺A浓度根据其RLU值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品处理中有稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。即为样本中苯乙醇胺A的实际浓度。

[0016] 本发明的试剂盒可用于动物尿液、血样、组织及内脏等样品中苯乙醇胺A的残留量检测。与现有的其它检测苯乙醇胺A残留量的实验方法比较,本发明的试剂盒有以下优点:

(1) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比色谱方法(高效液相、液质联用、气质联用)、毛细管电泳方法更为快速简便,所需仪器更为简单,检测成本更为低廉,同时具有高通量的特点;

(2) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,比ELISA方法更为灵敏,可以检测出更低浓度和含量的苯乙醇胺A残留,同时线性范围更宽;

(3) 采用化学发光免疫法的本发明试剂盒,减少了二抗的使用环节,从而缩短了检测时间;不透明白色酶标板增加了化学发光检测仪灵敏度。另外,用苯乙醇胺A-载体蛋白偶联物而非苯乙醇胺A抗体来包被不透明白色酶标板,减少了苯乙醇胺A抗体的不稳定性,保证了试剂盒的长期有效性。

## 具体实施方式

[0017] 以下通过具体的实施例对本发明作进一步描述。这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

### [0018] 实施例1

#### 1、试剂盒各组分的制备

(1) 苯乙醇胺A半抗原的制备:将苯乙醇胺A酸化,在4℃无光低温环境中与亚硝酸钠作用,生成含重氮基正离子的中间体。重氮化的苯乙醇胺A作为半抗原,用于后面合成免疫抗原与包被抗原;

(2) 苯乙醇胺A-牛血清白蛋白(BSA)免疫原的制备:将苯乙醇胺A与牛血清白蛋白(BSA)采用重氮化法进行偶联得到免疫抗原;

(3) 苯乙醇胺A-卵血清白蛋白(OVA)包被抗原的制备:将苯乙醇胺A与卵血清白蛋白(OVA)采用重氮化法进行偶联得到包被抗原;

(4) 苯乙醇胺A-过氧化物酶标记抗体的制备:对6~8周龄的雌性BALB/c小鼠(体重

18~20 g),大剂量免疫方案为,首次免疫用 160  $\mu\text{g}$  苯乙醇胺 A-BSA 与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。3 周后,再用 80  $\mu\text{g}$  苯乙醇胺 A-BSA 与等量弗氏完全佐剂混匀,皮下注射。此后每隔 3 周用 80  $\mu\text{g}$  苯乙醇胺 A-BSA 与等量弗氏完全佐剂混匀,腹腔注射。最后一次脾内免疫 80  $\mu\text{g}$  苯乙醇胺 A-BSA 作为加强免疫。三天后处死小鼠,取其脾脏,与骨髓瘤细胞融合。用间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞。通过小鼠腹腔注射杂交瘤细胞来大量制备小鼠腹水,腹水经过过滤、离心初步纯化后,采用辛酸法和亲和层析法纯化腹水,再经透析得到纯化的苯乙醇胺 A 单克隆抗体。苯乙醇胺 A 单克隆抗体与辣根过氧化物酶偶联,从而得到苯乙醇胺 A-过氧化物酶标记抗体;

(5) 包被有苯乙醇胺 A-OVA 偶联物的不透明白色酶标板制备:用缓冲液将苯乙醇胺 A-OVA 偶联物稀释后用于包被不透明白色酶标板的检测孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后用 PBST 缓冲液洗涤,然后加入 180  $\mu\text{L}$  封闭液(5%脱脂奶粉溶液),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5 h,倾去孔内液体,吸水纸拍干后密封保存。

#### [0019] 2、检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒的组建

组建的检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分:

(1) 96 孔不透明白色酶标板(8 孔  $\times$  12 条)包被有苯乙醇胺 A-OVA 偶联物,用铝箔袋真空密封包装;

(2) 苯乙醇胺 A 标准溶液 6 瓶,浓度分别为:

0 ng/mL、0.05 ng/mL、0.15 ng/mL、0.45 ng/mL、1.35 ng/mL、4.05 ng/mL;

(3) 苯乙醇胺 A-辣根过氧化物酶标记抗体溶液;

(4) 发光底物 A 液(鲁米诺及增强剂),发光底物 B 液(尿素过氧化氢);

(5) 2 倍浓缩样品稀释液。使用前请按 1:1 稀释(1 份浓缩稀释液+1 份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为 0.05 mol/L, pH 7.4 的 PBST 缓冲液;

(6) 20 倍浓缩洗涤液。使用前请按 1:19 稀释(1 份浓缩稀释液+19 份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为 pH 值范围 7.0-7.5 之间,含 0.05% 吐温-20, 0.01 mol/L 的 PBST 缓冲液。

#### [0020] 3、苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒的试用

##### 1) 样品的前处理

##### I、尿样(猪尿)

取待检尿样,若样品比较混浊时,可 5000 r/min 以上,离心 5 min 或过滤;

##### II、血清(猪、牛等)

取待检血清样,若样品比较混浊时,可 5000 r/min 以上,离心 5 min 或过滤;

##### III、猪肉、猪肝(新鲜组织)

a. 准确称取  $2.0 \pm 0.05\text{g}$  匀浆样品至 50 mL 离心管中;

b. 先加入 3% 三氯乙酸 4 mL,用涡旋仪涡动至均匀后再加入 2 mL 乙腈并充分振荡摇匀;

c. 4000 r/min 离心 10 min;

d. 取上清液 3 mL 至另一离心管中,向其内加入 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 400  $\mu\text{L}$ ,并混匀(调节 pH 值至  $9.8 \pm 0.2$ );

e. 加入 5 mL 乙酸乙酯,振荡 30 s, 4000 r/min 离心 5~10 min;取 3 mL 上层液体于

50~60℃氮气流下吹干；

- f. 加入 1 mL 稀释后的样品稀释液并充分振荡摇匀；
- g. 取 50 μL 用于分析。

#### [0021] 2) 化学发光免疫检测试剂盒

将标准和试样所需数量的孔条插入微孔板框架中,记录标准和样品的位置。于适当微孔中分别加入 50 μL/孔苯乙醇胺 A 标准溶液和待测样品。加入 50 μL/孔苯乙醇胺 A-辣根过氧化物酶标记抗体到每一个微孔中,充分混合后于室温下避光静置温育 45 min。将孔内液体甩干,用洗涤工作液充分洗涤 4~5 次。完全除去孔中的液体,用吸水纸拍干,加入发光底物液混合液(A液与B液在使用前按 1:1 混合) 100 μL/孔。混合好后立即在化学发光检测仪内检测发光强度(RLU)。

#### [0022] 3) 检测结果的计算分析

用所获得的标准溶液和试样溶液发光值与空白溶液的比值进行计算。见下式：

$$\text{相对发光强度} = \text{RLU} / \text{RLU}_{\text{max}}$$

式中：

RLU= 标准(或样品)溶液的发光强度值；

RLU<sub>max</sub>= 空白(浓度为 0 的标准溶液)的发光强度值。

[0023] 将计算的相对发光强度值对应苯乙醇胺 A(μg/L)的自然对数作半对数坐标系统曲线图。各待测样品的苯乙醇胺 A 浓度根据其 RLU 值在标准曲线上查出,或通过标准曲线相应的方程计算得出。如样品经过了预先稀释,应根据标准曲线所得出的样品浓度要再乘以其稀释倍数。

#### [0024] 实施例 2

检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分：

(1)96 孔不透明白色酶标板(8 孔 × 12 条) 包被有苯乙醇胺 A-鼠血清白蛋白偶联物,用铝箔袋真空密封包装；

(2) 苯乙醇胺 A 标准溶液 6 瓶,浓度分别为：

0 ng/mL、0.05 ng/mL、0.25 ng/mL、1.25 ng/mL、6.25 ng/mL、31.25 ng/mL；

(3) 苯乙醇胺 A-辣根过氧化物酶标记抗体溶液；

(4) 发光底物 A 液(鲁米诺及增强剂),发光底物 B 液(尿素过氧化氢)；

(5) 2 倍浓缩样品稀释液。使用前请按 1:1 稀释(1 份浓缩稀释液+1 份去离子水)成为工作样品稀释液,其稀释后的工作样品稀释液为 0.05 mol/L, pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液；

(6) 20 倍浓缩洗涤液。使用前请按 1:19 稀释(1 份浓缩稀释液+19 份去离子水)成为工作洗涤液,其稀释后的工作洗涤液为 pH 值范围 7.0-7.5 之间,含 0.05% 吐温-20, 0.01mol/L 的 PBST 缓冲液。

#### [0025] 实施例 3

检测苯乙醇胺 A 的化学发光免疫检测试剂盒,包含了以下组成部分：

(1)96 孔不透明白色酶标板(8 孔 × 12 条) 包被有苯乙醇胺 A-鸡蛋白蛋白偶联物,用铝箔袋真空密封包装；

(2) 苯乙醇胺 A 标准溶液 6 瓶,浓度分别为：

0 ng/mL、0.04 ng/mL、0.2ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、25.0 ng/mL；

- (3) 苯乙醇胺 A- 辣根过氧化物酶标记抗体溶液；
- (4) 发光底物 A 液(鲁米诺及增强剂), 发光底物 B 液(尿素过氧化氢)；
- (5) 2 倍浓缩样品稀释液。使用前请按 1 :1 稀释(1 份浓缩稀释液 +1 份去离子水)成为工作样品稀释液, 其稀释后的工作样品稀释液为 0.05 mol/L, pH 7.4 的甘氨酸 -HCl 缓冲液；
- (6) 20 倍浓缩洗涤液。使用前请按 1 :19 稀释(1 份浓缩稀释液 +19 份去离子水)成为工作洗涤液, 其稀释后的工作洗涤液为 pH 值范围 7.0-7.5 之间, 含 0.05% 吐温 -20, 0.01mol/L 的 PBST 缓冲液。

专利名称(译)	检测苯乙醇胺A的化学发光免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN103792226A</a>	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210432887.2	申请日	2012-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 洪霞		
发明人	杜道林 洪霞		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种检测苯乙醇胺A的化学发光免疫检测试剂盒，属于免疫学检测领域。本发明的试剂盒由包被有苯乙醇胺A-载体蛋白偶联物的不透明白色酶标板、苯乙醇胺A标准品、苯乙醇胺A-过氧化物酶标记抗体工作液、发光底物液、浓缩稀释液、浓缩洗涤液组成。所述苯乙醇胺A-载体蛋白偶联物是将苯乙醇胺A与载体蛋白通过混合酸酐法或碳二亚胺法偶联得到，浓缩洗涤液含有0.05%吐温-20。与传统的酶联免疫吸附分析法比较，本发明的试剂盒具有更高的灵敏度，且检测时间短、费用低，可用于动物尿液、血样、组织及内脏等样品中苯乙醇胺A的残留量检测。