



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104610079 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201410539759. 7

(74) 专利代理机构 湖州金卫知识产权代理事务所 (普通合伙) 33232

(22) 申请日 2014. 10. 13

代理人 赵卫康

(71) 申请人 湖州海创生物科技有限公司

地址 313000 浙江省湖州市湖州经济技术开发区红丰路 1366 号 3 幢 5 楼 (湖州市经济开发区南太湖科创中心)

申请人 中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心

(51) Int. Cl.

C07C 229/14(2006. 01)

C07C 227/16(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(72) 发明人 刘继斌 杨志行 郭彦飞 文明

张乐 朱冰美 俞燕 黄昌妹

王滔 叶渭龙 吴婉欣 池剑

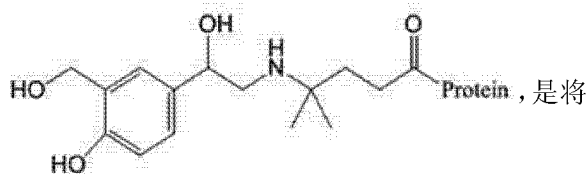
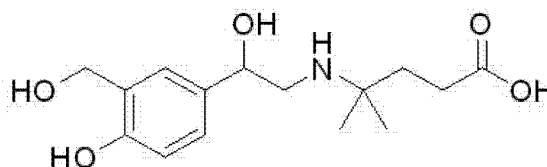
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种沙丁胺醇半抗原衍生物、沙丁胺醇人工抗原及其制备方法和应用

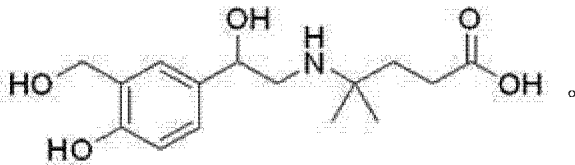
(57) 摘要

本发明涉及生物化工生物检测技术领域,具体涉及一种沙丁胺醇半抗原衍生物、沙丁胺醇人工抗原及其合成方法和在荧光免疫层析法检测沙丁胺醇中的应用。本发明提供了沙丁胺醇半抗原衍生物结构式为图示。该衍生物结构在沙丁胺醇的三个甲基一端引入一个羧基活性官能团结构,最大限度的暴露了沙丁胺醇的特异性的苯环附属结构,同时具有可以与载体蛋白偶联的官能团。沙丁胺醇人工抗原结构式

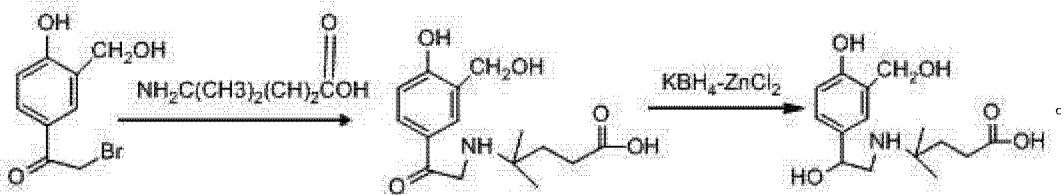


沙丁胺醇半抗原衍生物与载体蛋白偶联的得到偶联物,其中所述载体蛋白 protein 为牛血清蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA);本发明建立了荧光免疫层析法检测沙丁胺醇的方法,操作简单、检测时间短、成本低、特异性高、重复性好。

1. 一种沙丁胺醇半抗原衍生物,其特征在於:所述沙丁胺醇半抗原衍生物适用于制备沙丁胺醇人工抗原,所述沙丁胺醇半抗原衍生物的化学结构式为:



2. 一种如权利要求 1 所述沙丁胺醇半抗原衍生物的制备方法,其特征在於:以化合物 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]-乙-1-酮为原料,通过两步反应制备,其制备路径为:

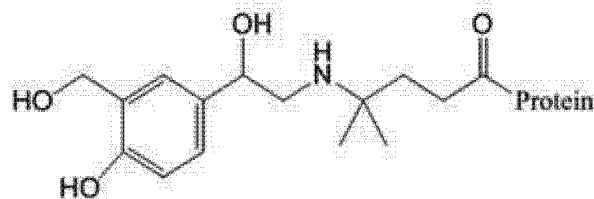


3. 一种如权利要求 1 所述沙丁胺醇半抗原衍生物的制备方法,其特征在於:所述反应条件具体为:

S1. 称取化合物 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]-乙-1-酮 0.015-0.0028mol, 加入饱和甲醇钠作为溶剂,在冰水浴条件下加入 0.01-0.03mol 的 4-氨基-4-甲基-戊酸后,常温反应 1-2h,结晶、过滤、洗涤干燥得到第一白色固体 4-[[2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)-2-氧代乙基]氨基]-4-甲基戊酸;

S2. 将 S1 中得到的白色固体 0.001-0.003mol 溶于 20ml 乙醇中,依次加入 0.001-0.003mol 95-98wt% 的 KBH4 和 0.001-0.003mol ZnCl2,常温反应 12-18h 后,过滤;滤液浓缩,异丙醇洗涤,得到第二白色固体特异性沙丁胺醇半抗原衍生物。

4. 一种由权利要求 1 所述沙丁胺醇半抗原衍生物制备得到的沙丁胺醇人工抗原,其特征在於:所述沙丁胺醇人工抗原化学结构式为:



所述 protein 即载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

5. 一种如权利要求 3 所述沙丁胺醇人工抗原的制备方法,其特征在於:所述沙丁胺醇人工抗原是利用碳二亚胺法将所述沙丁胺醇半抗原衍生物与载体蛋白偶联得到,包括以下步骤:

P1、将所述沙丁胺醇半抗原衍生物溶解于 DMSO 中得到衍生化合物溶液;

P2、向 P1 中先加入 EDCI-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,再加入 NHS N-羟基琥珀酰亚胺均匀混合后反应 15-60 分钟;

P3、将 P2 中所得到的反应液在 25-30℃ 加入到含有载体蛋白的溶液中进行偶联反应 1-5 小时,其中所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;

P4、将 P3 所得反应液进行透析,收集透析液获得沙丁胺醇人工抗原。

6. 根据权利要求 4 所述制备方法,其特征在于:所述步骤 P3 中所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;所述载体蛋白为牛血清白蛋白时,衍生化合物与牛血清白蛋白的摩尔比为 45~60:1,且合成的人工抗原为沙丁胺醇免疫原;载体蛋白为卵清蛋白时,衍生化合物与卵清蛋白的摩尔比为 35~50:1,且合成的人工抗原为包被原。

7. 根据权利要求 5 所述制备方法,其特征在于:所述步骤 P2 中所述 EDC 和 NHS 溶于 DMF 或 DMSO 中,且 EDC、NHS 和所述沙丁胺醇半抗原衍生物的摩尔用量比为 1~2:1~1.5:1~2。

8. 根据权利要求 5 所述制备方法,其特征在于:所述步骤 P3 中所述载体蛋白溶液的缓冲液为 0.1mol/L 的 NaHCO₃ 缓冲液;P4 中所述透析液为 0.01mol/L、PH 为 7.2~7.9 的磷酸缓冲液。

9. 一种权利要求 4 所述沙丁胺醇人工抗原在沙丁胺醇荧光免疫层析检测方法中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述沙丁胺醇人工抗原在沙丁胺醇荧光免疫层析检测方法中的应用,其特征在于,所述检测方法包括如下步骤:

P11. 利用所述沙丁胺醇免疫原免疫动物制备抗体;

P12. 细胞融合和筛选;

P13. 腹水制备和抗体纯化;

P14. 将步骤 P 13 中得到的抗体和抗兔 IgG 二抗分别进行荧光染料标记,并配制成检测分析液;

P15. 将所述沙丁胺醇包被原和兔 IgG 抗体分别喷涂于硝酸纤维素膜条上的前后两端制备检测线和质控线,其中靠近吸水纸端为前端,靠近样品垫为后端;

P16. 将玻璃纤维样品垫、步骤 P15 中所述含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、吸水纸和 PVC 黑色地板组装成免疫层析试纸条;

P17. 将步骤 P16 中所述试纸条切割适当宽度装入塑料卡盒中,与步骤 P14 中所述检测分析液配套使用在荧光免疫层析检测仪上检测。

一种沙丁胺醇半抗原衍生物、沙丁胺醇人工抗原及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化工生物检测技术领域,具体地,涉及一种沙丁胺醇半抗原衍生物、沙丁胺醇人工抗原及其合成方法和在荧光免疫层析法检测沙丁胺醇中的应用。

背景技术

[0002] 随着社会的发展和进步,人们生活水平不断地提高,对健康饮食越来越重视。食品安全问题,特别是食品中的兽药残留问题越来越引起人们的高度重视。要提高禽畜产品的安全,除了严格控制和有效的管理之外,对添加剂以及兽药等有毒化学物质残留的监控是至关重要的,因此,科学准确的兽药残留检测方法是动物源食品安全与否的重要保障。

[0003] 沙丁胺醇 (salbutamol, Sal), 又名咳喘宁, 是一种 β -肾上腺素受体激动剂, 临床上广泛用于治疗支气管哮喘。同时, 沙丁胺醇有促进蛋白质合成、增加动物胴体瘦肉率, 营养再分配、提高饲料转化率的作用, 常被非法作为饲料添加剂用于畜产品的生产, 但是其残留对人类健康存在潜在危害。欧盟、美国、中国等国家和地区都先后立法禁止在畜禽生产中使用促动物生长的 β -兴奋剂作为饲料添加剂。由于沙丁胺醇检测手段研究的相对滞后, 而又与克仑特罗具有同样的促生长效果, 正逐步取代克仑特罗, 成为不法分子谋取经济利益的新手段。因此, 建立快速、简单、方便、有效的检测 SAL 的方法, 对确保食品安全具有重要意义。

[0004] 目前, 国家标准和行业标准中对饲料及动物源性食品中沙丁胺醇残留的检测常采用 HPLC 和 GC-MS 法。虽然此方法特异性强、灵敏度高、精确, 但是样本前处理操作步骤繁琐, 成本高, 再加上设备昂贵、花费大、操作技能要求高等原因而不适合大批量样品的筛选检测。免疫分析法(如酶联免疫法、胶体金法以及荧光免疫层析法), 由于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便分析样本大等优点弥补了理化分析的不足, 在 β -兴奋剂的残留检测中起着越来越重要的作用。酶联免疫吸附测定法可同时检测多个样品, 具有灵敏、特异性强等优点, 但是不适用于现场检测。胶体金法和荧光免疫层析法操作简单、快速、无需大型检测仪器设备, 更适用于现场及时检测, 是快速检测发展的趋势。

[0005] 影响免疫分析法检测质量的根本原因是抗体的特异性与亲和性, 这些性质又取决于免疫半抗原的分子结构, 所以免疫半抗原分子设计与合成是产生特异性抗体和建立小分子药物残留快速检测技术最关键的步骤。

[0006] CN102617516A (2012-8-1)公开了一种沙丁胺醇人工抗原及其制备的抗体, 然而该方法中所用的免疫半抗原的分子结构和人工抗原制备仍有待改进。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一是提供一种沙丁胺醇半抗原衍生物。

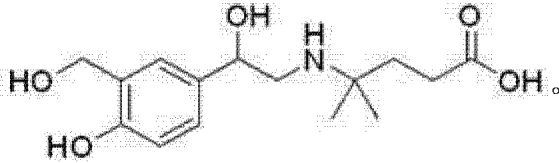
[0008] 本发明的目的之二是提供一种所述沙丁胺醇半抗原衍生物的制备方法。

[0009] 本发明的目的之三是提供一种沙丁胺醇人工抗原。

[0010] 本发明的目的之四是提供一种所述沙丁胺醇人工抗原的制备方法。

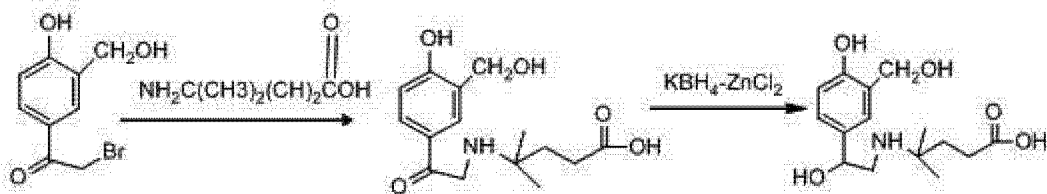
[0011] 本发明的目的之五是提供一种所述沙丁胺醇人工抗原在荧光免疫层析法检测沙丁胺醇中的应用。

[0012] 本发明提供了一种沙丁胺醇半抗原衍生化合物，其化学结构式为：



[0013] 所述沙丁胺醇半抗原衍生化合物是根据沙丁胺醇结构定向合成的衍生物，考虑到沙丁胺醇与克伦特罗结构上的相似，所以选择与克伦特罗结构相似的一端设计引入羧基活性官能团结构，最大程度地保留并暴露了沙丁胺醇与克伦特罗有差异的且免疫原性大的部分，同时具有与载体蛋白偶联的活性基团。

[0014] 本发明还保护所述沙丁胺醇半抗原衍生化合物的制备方法，其特征在于，以化合物 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]-乙-1-酮(CAS:62932-94-9)为原料，通过两步反应制备，其制备路径如下：



作为优选，所述反应条件具体为：

S1. 称取化合物 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]-乙-1-酮 0.015-0.0028mol，加入饱和甲醇钠作为溶剂，在冰水浴条件下加入 0.01-0.03mol 的 4-氨基-4-甲基-戊酸后，常温反应 1-2h，结晶、过滤、洗涤干燥得到第一白色固体 4-[2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)-2-氧代乙基]氨基]-4-甲基戊酸；

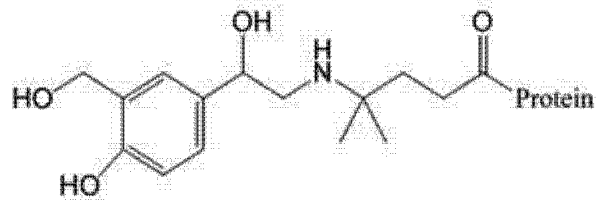
S2. 将 S1 中得到的白色固体 0.001-0.003mol 溶于 20ml 乙醇中，依次加入 0.001-0.003mol 95-98wt% 的 KBH_4 和 0.001-0.003mol ZnCl_2 ，常温反应 12-18h 后，过滤；滤液浓缩，异丙醇洗涤，得到第二白色固体特异性沙丁胺醇半抗原衍生物。

[0015] 更优选地，所述反应条件具体为：

S1. 称取化合物 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]-乙-1-酮 0.02mol，加入饱和甲醇钠作为溶剂，在冰水浴条件下加入 0.02mol 的 4-氨基-4-甲基-戊酸后，常温反应 1-2h，结晶、过滤、洗涤干燥得到白色固体 4-[2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)-2-氧代乙基]氨基]-4-甲基戊酸；

S2. 将 S1 中得到的白色固体 0.002mol 溶于 20ml 乙醇中，依次加入 0.002mol 95% 的 KBH_4 和 0.002mol ZnCl_2 ，常温反应 15h 后，过滤；滤液浓缩，异丙醇洗涤，得到白色固体特异性沙丁胺醇半抗原衍生物。

[0016] 一种沙丁胺醇人工抗原，所述沙丁胺醇人工抗原是由所述沙丁胺醇半抗原衍生化合物制备得到的，其化学结构式为



所述 protein 即载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0017] 一种利用所述沙丁胺醇半抗原衍生化合物制备如权利要求 3 所述沙丁胺醇人工抗原的方法,其是利用碳二亚胺法将所述沙丁胺醇半抗原衍生化合物与载体蛋白偶联得到,包括以下步骤:

P1、将所述沙丁胺醇半抗原衍生物溶解于 DMSO 中得到衍生化合物溶液;

P2、向 P1 中先加入 EDC1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,再加入 NHS N-羟基琥珀酰亚胺均匀混合后反应 15-60 分钟;

P3、将 P2 中所得到的反应液在 25-30℃ 加入到含有载体蛋白的溶液中进行偶联反应 1-5 小时,其中所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;

P4、将 P3 所得反应液进行透析,收集透析液获得沙丁胺醇人工抗原。

[0018] 作为优选,所述步骤 P3 中所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;所述载体蛋白为牛血清白蛋白时,衍生化合物与牛血清白蛋白的摩尔比为 45~60:1,且合成的人工抗原为沙丁胺醇免疫原;载体蛋白为卵清蛋白时,衍生化合物与卵清蛋白的摩尔比为 35~50:1,且合成的人工抗原为包被原。

[0019] 作为优选,所述步骤 P2 中所述 EDC 和 NHS 溶于 DMF 或 DMSO 中,且 EDC、NHS 和衍生化合物摩尔用量比为 1~2:1~1.5:1~2。

[0020] 作为优选,所述步骤 P3 中所述载体蛋白溶液的缓冲液为 0.1mol/L 的 NaHCO_3 缓冲液;P4 中所述透析液为 0.01mol/L、PH 为 7.2~7.9 的磷酸缓冲液。所述 NaHCO_3 缓冲液的配制方法是:称取 8.4g NaHCO_3 ,溶于定容至 1000ml 超纯水中,调节 PH 至 7.4;磷酸缓冲液:称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:0.3g, NaCl :9g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$:0.3g 定容至 1000ml,调节 PH 为 7.1~7.8。

[0021] 本发明还保护上述所述沙丁胺醇人工抗原在沙丁胺醇特异性抗体制备中的应用;所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0022] 本发明还保护所述沙丁胺醇人工抗原在沙丁胺醇荧光免疫层析检测方法中的应用。

[0023] 作为优选,所述检测方法包括如下步骤:

P11. 利用所述沙丁胺醇免疫原免疫动物制备抗体;

P12. 细胞融合和筛选;

P13. 腹水制备和抗体纯化;

P14. 将步骤 P13 中得到的抗体和抗兔 IgG 二抗分别进行荧光染料标记,并配制成检测分析液;

P15. 将所述沙丁胺醇包被原和兔 IgG 抗体分别喷涂于硝酸纤维素膜条上的前后两端制备检测线和质控线,其中靠近吸水纸端为前端,靠近样品垫为后端;

P16. 将玻璃纤维样品垫、步骤 P15 中所述含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜、吸水

纸和 PVC 黑色地板组装成免疫层析试纸条；

P17. 将步骤 P16 中所述试纸条切割适当宽度装入塑料卡盒中,与步骤 P14 中所述检测分析液配套使用在荧光免疫层析检测仪上检测。

[0024] 本发明的优点及特点；

本发明提供了一种定向合成的沙丁胺醇衍生化合物,根据沙丁胺醇和克隆特罗的结构特征,在其结构相同的一端(烷基端)定向衍生出活性官能团结构(羧基),最大程度的保留暴露了二者的特异性结构和免疫性强的结构(即苯环端的结构部分);基于本发明的人工抗原制备方法,利用如上所述沙丁胺醇衍生化合物制备得到特异性的沙丁胺醇人工抗原;将所述特异性人工抗原制备出特异性抗体,建立了以如上所述的人工抗原以及抗体为原料的荧光免疫层析法检测沙丁胺醇的方法。

[0025] 本发明抗原和抗体原料都属于自制,原料成本大大降低,且抗原以及抗体特异性强,结合荧光免疫层析技术建立高特异性和高灵敏度的沙丁胺醇快速检测方法。

附图说明

[0026] 图 1 是沙丁胺醇衍生化合物结构式；

图 2 是沙丁胺醇人工抗原结构式；

图 3 是沙丁胺醇和克伦特罗结构式比对示意图；

图 4 是沙丁胺醇人工抗原、BSA 以及沙丁胺醇衍生物的紫外扫描图；

图 5 是装塑料卡的沙丁胺醇荧光免疫层析检测卡的结构；图 6 是带有塑料卡盒的沙丁胺醇荧光免疫层析检测卡结构；

图 7 是荧光免疫层析法检测沙丁胺醇标准品抑制曲线图；

图 8 是沙丁胺醇荧光免疫层析检测阴性结果图谱；

图 9 是沙丁胺醇荧光免疫层析检测阳性结果图谱。

[0027]

具体实施方式

[0028] 下面是结合附图进一步详细说明本发明。除特殊说明外,本发明在实施例中所用试剂盒原料均为常规试剂。

[0029] 实施例 1

沙丁胺醇衍生化合物的定向合成：

S1. 称取化合物 2-溴-1-[4-羟基-3-(羟甲基)苯基]-乙-1-酮(CAS:62932-94-9)中淡黄色固体 4.9g(0.02mol)于 50ml 三口瓶中,加入 20ml 饱和甲醇钠作为溶剂,在冰水浴条件下加入 2.63g(0.02mol)4-氨基-4-甲基-戊酸(进口品牌)后,常温反应 1-2h,结晶、过滤、洗涤干燥得到白色固体,即:4-[2-(4-羟基-3-(羟甲基)苯基)-2-氧代乙基]氨基-4-甲基戊酸。

[0030] S2. 将 S1 中得到的白色固体 0.59g(0.002mol)溶于 20ml 乙醇中,依次加入 0.11g(0.002mol)95%的 KBH_4 , 0.27g(0.002mol) ZnCl_2 , 常温反应 15h 后,过滤。滤液浓缩,异丙醇洗涤,得到白色固体,即:为沙丁胺醇衍生化合物。

[0031] 实施例 2

沙丁胺醇人工抗原(免疫原和包被原)的制备:

称取 40mg 沙丁胺醇衍生化合物,溶解于 2ml DMF 中,形成 20mg/ml 的终浓度,取其中 90ul 与 6ul EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(100mg/ml)混合,再加入 10ul NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)(50mg/ml),均匀混合后在搅拌条件下反应 15~60min。

[0032] 将上述反应混合液离心(1600rpm)后加入到 1ml 6mg/mlBSA 溶液中(或加入到 1ml 4.5mg/mlOVA 溶液中)在 25~30℃搅拌条件下偶联反应 1~5h 后,用磷酸缓冲液透析 4 次,12h 换一次液。收集透析液,用美国伯乐(BIO-RAD)公司的 Quick Start Bradford Protein Assay Kit 测定免疫原和包被原的浓度分别为 5.4mg/ml 和 3.8mg/ml。得到的沙丁胺醇人工抗原(免疫原和包被原)结构式如图 2 所示。图 2 中 protein 为 BSA 或 OVA。

[0033] 所述 BSA 溶液(或 OVA 溶液)配制方法:称取 60mg BSA (或 45mg OVA)溶于 10ml 的 0.1mol/L 的 NaHCO₃缓冲液;

所述 NaHCO₃缓冲液制备方法:称取 8.4g NaHCO₃,溶于定容至 1000ml 超纯水中,调节 PH 至 7.1~7.9;

所述磷酸缓冲液制备方法:称取二水合磷酸二氢钠:0.3g, NaCl :9g,十二水合磷酸氢二钠:0.3g 定容至 1000ml,调节 PH 为 7.3~7.8。

[0034] 沙丁胺醇人工抗原(偶联物)、BSA 以及沙丁胺醇衍生物紫外扫描图见附图 4 所示,沙丁胺醇衍生物最大吸收峰在 274nm,BSA 吸收峰在 278nm,偶联物的吸收峰在 276nm 处(BSA 以及偶联物得蛋白浓度均为 1.5mg/ml)且峰值高于 BSA,说明偶联成功。

[0035] 实施例 3

沙丁胺醇人工抗原的应用:

P11. 免疫动物

将实施例 2 中得到的沙丁胺醇免疫原(SAL-BSA)稀释成 0.2mg/ml,取 500ul 免疫原与等体积的弗氏完全佐剂混合后,乳化完全,免疫 BALB/c 小鼠,在小鼠背部皮下及足部进行注射免疫。第一次免疫用完全弗氏佐剂,之后用不完全弗氏佐剂。第四次免疫后一周眼眶取血,分离血清,测抗沙丁胺醇抗体的效价。经 ELISA 检测,小鼠四次免疫后的抗体效价为 1:436,000。

[0036] P12. 细胞融合和筛选

四次免疫后的小鼠经腹腔注射约 100 μg 免疫原再次加强免疫,3 天后,取该小鼠脾脏用于融合。取 SP2/0 细胞与脾细胞混合,加入无血清培养液,离心(1500rpm,3min),取沉淀细胞,逐滴加入 1ml 50% 聚乙二醇 4000,静置 90 秒。然后逐滴加入 37℃预温的无血清培养液 10ml,静置 5min。融合后细胞悬液离心(1000rpm,3min),用完全培养液,接种于加有饲养层细胞的 96 孔板内,每孔 2×10⁴/ml 骨髓瘤细胞。置 37℃,5% CO₂培养箱内培养两天,加入 2×HAT 的完全培养液,使孔内终浓度为 1×HAT。待杂交瘤细胞集落长至孔底 1/10-1/5 面积的时候,即用 ELISA 方法筛选融合细胞抗体阳性孔。

[0037] P13. 腹水制备和抗体纯化

取 BALB/c 小鼠,于腹腔注射 0.5ml 石蜡油,7 天后,腹腔注射 0.5ml 1×10⁶ 阳性杂交瘤细胞。观察小鼠生长情况,7 天左右可见腹部隆起,及时采集腹水。利用亲和层析技术(Protein G Resin 亲和纯化)纯化得到高纯度的单克隆抗体,蛋白量为 4mg。

[0038] P14. 检测分析液制备

a. 分别荧光标记上述 P13 中得到的单克隆抗体和抗兔 IgG 抗体。

[0039] b. 用含有 BSA 的磷酸缓冲液将荧光标记后的抗体稀释配制成检测分析液。

[0040] P15. 沙丁胺醇荧光免疫层析试纸卡制备

a. 用包被缓冲液（磷酸缓冲液）分别将将实施例 2 中得到的沙丁胺醇包被原（SAL-OVA）和兔抗体 IgG 稀释到适当浓度（0.4-3.0 mg/ml）。在 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 的温度下，将稀释后的 SAL-OVA 和兔抗体 IgG 均匀喷于硝酸纤维膜上（分别形成检测线和质控线），在 12%-30% 的湿度条件下烘干 5~8 小时左右，干燥保存备用；

b. 在黑色 PVC 基片上分别依次粘贴步骤 a 所得到的包被好的硝酸纤维素膜、玻璃纤维纸和吸水纸形成检测卡（图 5），按照要求切割成适当宽度。其中 1：黑色 PVC 基片；2：吸水纸；3：硝酸纤维素膜；4：玻璃纤维；5：质控线带（C 线）；6：检测线带（T 线）

c. 将步骤 b 所得到的检测卡装入卡盒的下盖中，盖上上盖，形成完整的带卡盒检测卡（图 6）。其中，11：下盖；12：上盖；13：加样窗口；14：玻璃纤维；15：检测窗口；16：质控线带（C 线）；17：检测线带（T 线）；18：硝酸纤维素膜；19：沙丁胺醇项目标志（SAL）；110：条形码识别区域。

[0041] P16. 检测

取 100uL 样本与 100uL 的检测分析液均匀混合后，取 100uL 加入到检测卡的加样窗口，反应 5-10min 后，在 FCR 荧光免疫分析仪（由湖州海创生物科技有限公司生产）上检测，根据样本的 T 线信号值与 C 线信号比值（T/C 值）与 Cutoff 值比对判断阴阳性结果。

[0042] P17. 荧光免疫层析法检测沙丁胺醇的灵敏度

将空白尿液中添加沙丁胺醇标准品（购自德国 DR 公司），配置成 0ng/ml、0.25ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、4ng/ml、8ng/ml 系列浓度样品。将上述系列浓度样品按照 P16 中的步骤进行检测，每个样品重复 3 次，检测的实验结果如表 1 所示，根据表 1 数据以 SAL 浓度为横坐标，T/C 值为纵坐标绘制标准曲线（四参数回归法回归）如图 7 所示。图 7 中曲线对应的方程如表 2 所示，计算得 $IC_{50}=0.86\text{ng/ml}$ 。

[0043] 表 1 荧光免疫层析法检测不同浓度克伦特罗样本

SAL 浓度 (ng/ml)	T/C 值
0	3.86
0.25	3.23
0.5	2.79
1.0	1.58
2.0	0.71
4.0	0.29
8.0	0.08

表 2 抑制曲线所对应的方程

四参数 Logistic 曲线拟合		
方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$		
A	=	3.816
B	=	1.638
C	=	0.0.837
D	=	- 0.009
r^2	=	0.997

将 0ng/ml 样品重复检测 10 次,分别计算其 T/C 值的平均值(X)、标准偏差(SD)以及精密度(CV 值)。灵敏度的计算方式为,X-2*SD 的 T/C 值在图 7 的标准曲线里所对应的 SAL 浓度值。

[0044] 表 3 荧光免疫层析法重复检测 0ng/ml 克伦特罗样本结果

检测重复次数	10个0ng/ml 重复 T/C 值
1	3.86
2	3.94
3	3.66
4	3.91
5	3.64
6	3.70
7	3.78
8	3.69
9	3.82
10	3.87
平均值 (X)	3.79
标准差 (SD)	0.10
X-2*SD	3.58

将表 3 数据中的 X-2*SD 的 T/C 值作为 y 值代入图 6 标准曲线对应的方程中 (方程 : $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$) 的到的 x 值为 0.15ng/ml, 即灵敏度为 0.15ng/ml。

P18. 沙丁胺醇荧光免疫层析检测试纸卡检测原理

采用竞争法检测,样品中的沙丁胺醇抗原和检测线(T线)上的沙丁胺醇抗原(包被原)竞争结合检测分析液中的荧光标记的抗沙丁胺醇抗体。当样本中抗原浓度很低时,检测线上结合的荧光抗体增多,进而检测线上的荧光信号就强,因此,检测线(T线)荧光信号与质控线(C线)上荧光信号的比值(T/C值)就大;反之,样本中沙丁胺醇抗原浓度较高时,T/C值就很小。所以,样本中沙丁胺醇含量越高,T/C值越低。根据 T/C 值与 Cut off 值的比较判断检测结果的阴阳性。

[0045] 如图 8 和 9 所示,分别是沙丁胺醇荧光免疫层析法检测的阴性和阳性结果图谱。由图可以看出,与阴性样本检测结果图谱相对比,阳性样本检测结果图谱中 T 线峰值远远小于阴性样本的峰值。阴性和阳性样本区分明显。

[0046] P19. 荧光免疫层析法检测沙丁胺醇的交叉反应

将几种常见的 β_2 受体激动剂分别用阴性猪尿配置成 30ng/ml 的样本,进行荧光免疫层析检测,与正常阴性尿样以及 Cutoff 值相比都呈现阴性结果。检测结果如表 4 所示:

表 4 常见 $\beta 2$ 受体激动剂的荧光免疫层析检测结果

添加样本	(TC 值)	Cutoff 值	结果
阴性尿样 (未添加)	2.53	0.35~0.78	—
克伦特罗 Clenbuterol	2.37	0.35~0.78	—
莱克多巴胺 Ractopamine	2.61	0.35~0.78	—
特布他林 Terbutaline	2.21	0.35~0.78	—
马布特罗 Mabuterol	1.76	0.35~0.78	—
妥洛特罗 Tulobuterol	1.55	0.35~0.78	—
马哧特罗 Mapenterol	1.87	0.35~0.78	—
吡布特罗 Pirbuterol	2.42	0.35~0.78	—
西马特罗 Cimaterol	2.67	0.35~0.78	—

注:Cut off 值为 1ng/ml 沙丁胺醇所对应的 T/C 值加上 2 倍 SD 范围。即:0.35~0.78。
“—”标示阴性。

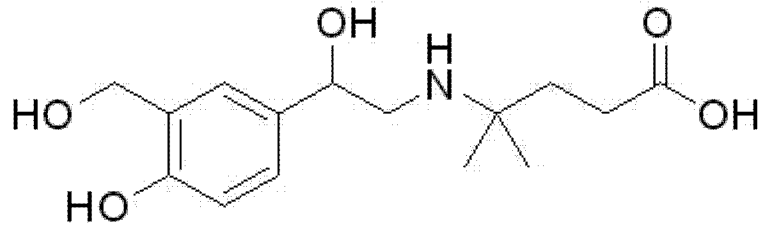


图 1

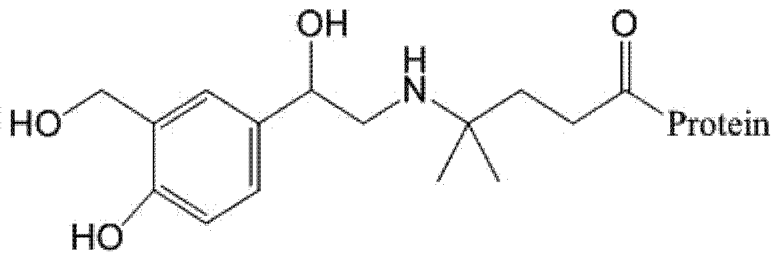
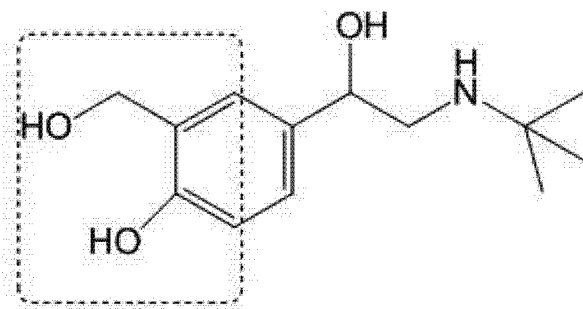
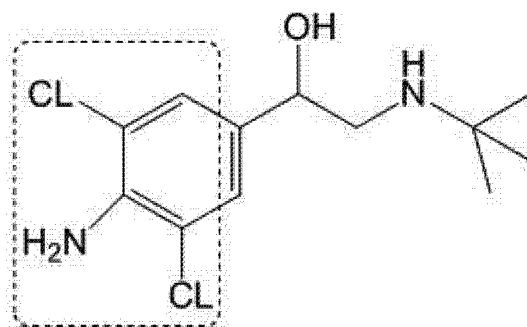


图 2



(A) 沙丁胺醇结构式



(B) 克伦特罗结构式

图 3

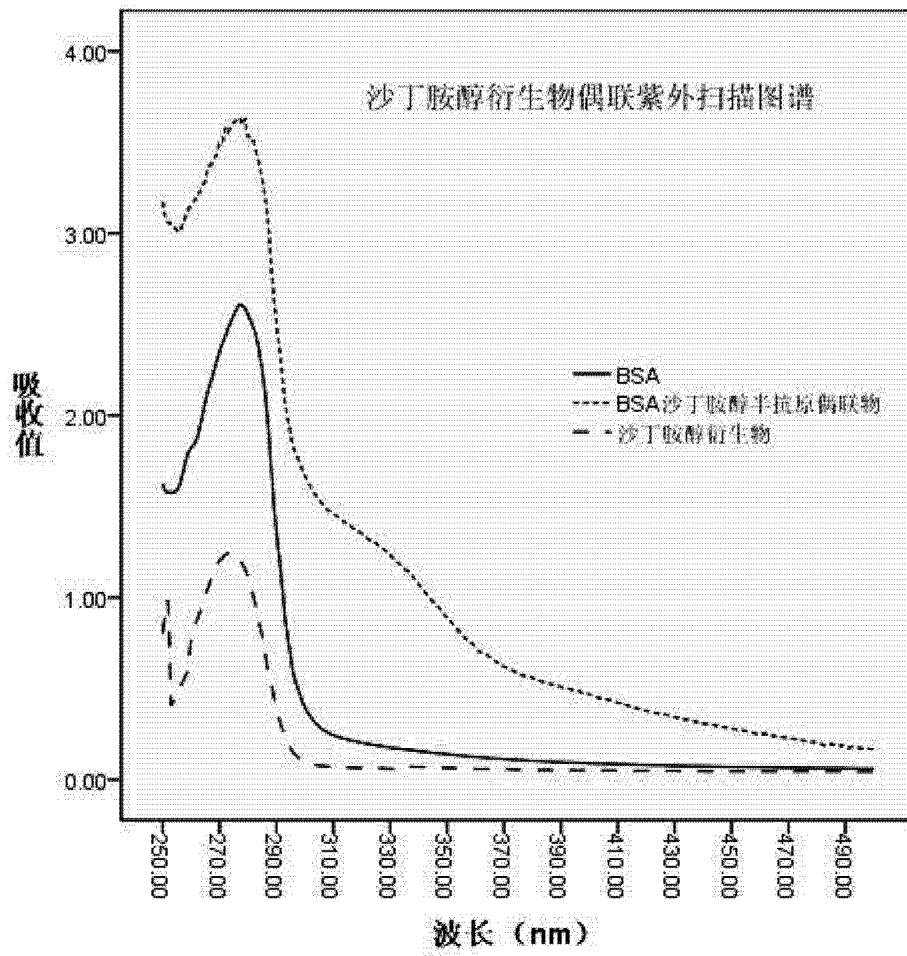


图 4

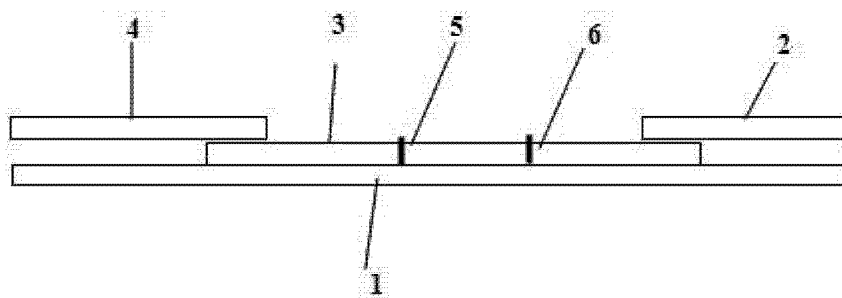


图 5

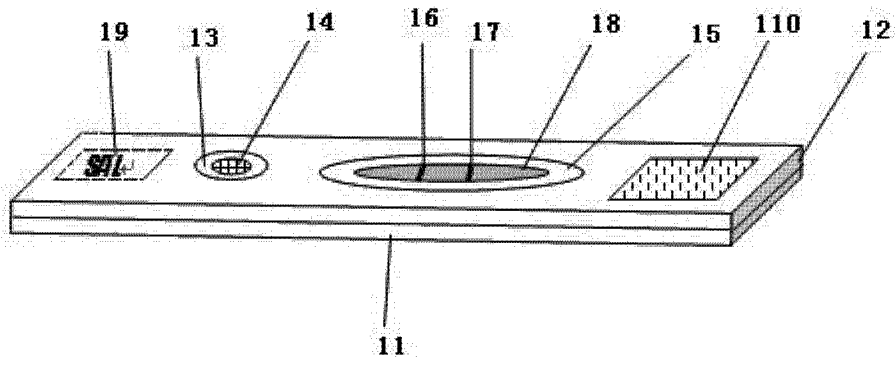


图 6

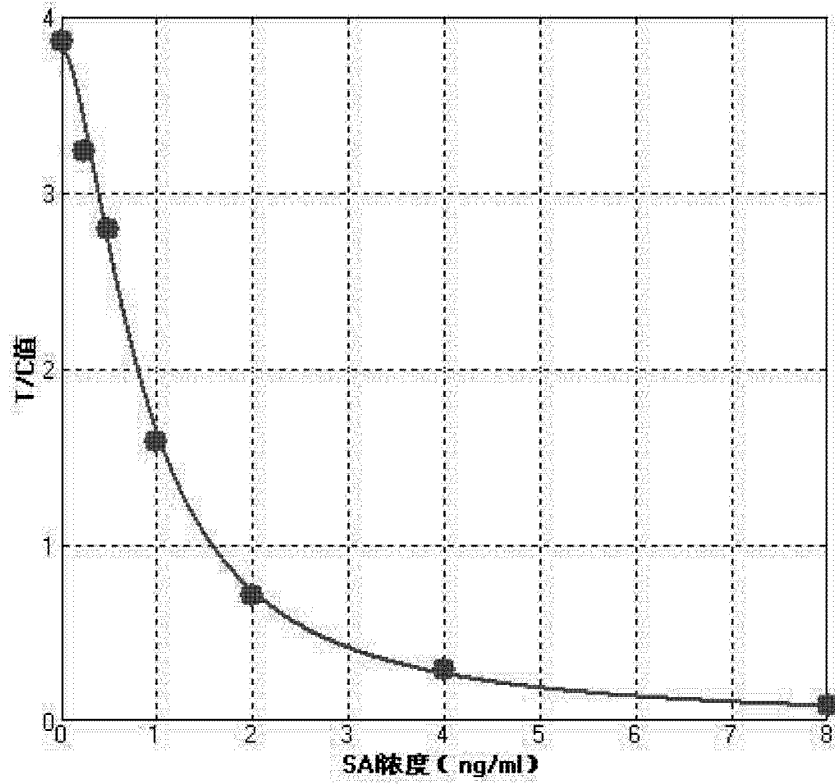


图 7

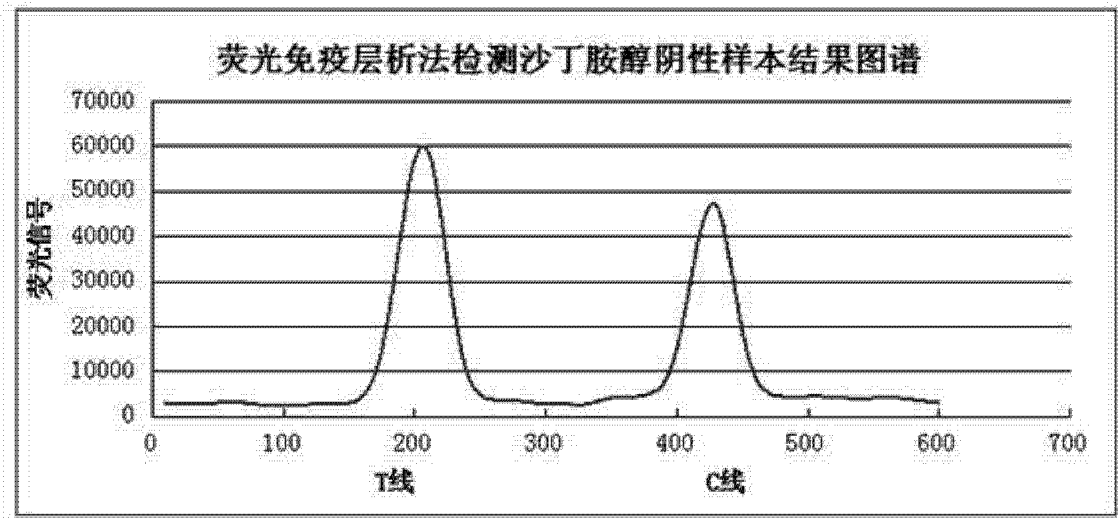


图 8

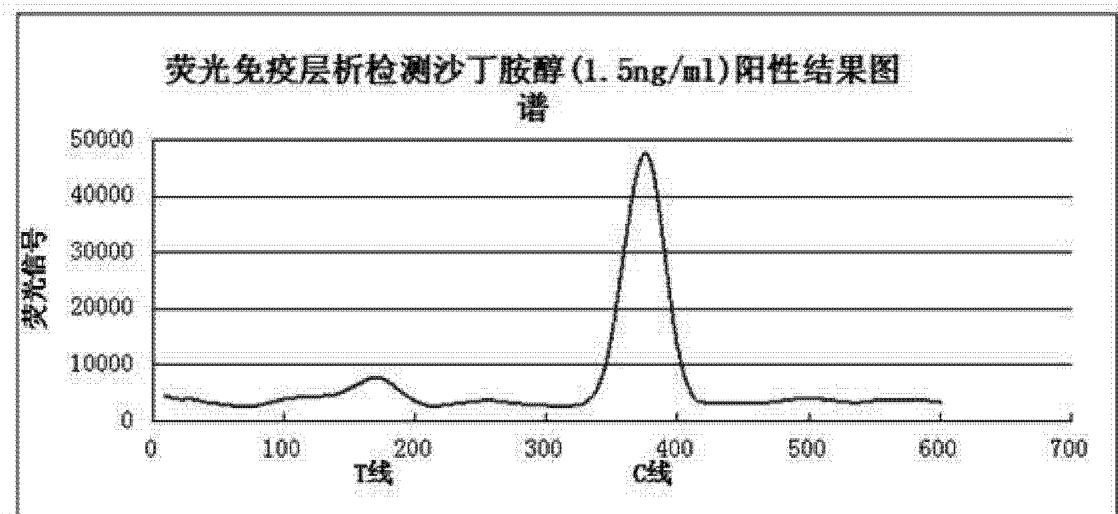


图 9

专利名称(译)	一种沙丁胺醇半抗原衍生物、沙丁胺醇人工抗原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104610079A	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201410539759.7	申请日	2014-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心		
[标]发明人	刘继斌 杨志行 郭彦飞 文明 张乐 朱冰美 俞燕 黄昌妹 王滔 叶渭龙 吴婉欣 池剑		
发明人	刘继斌 杨志行 郭彦飞 文明 张乐 朱冰美 俞燕 黄昌妹 王滔 叶渭龙 吴婉欣 池剑		
IPC分类号	C07C229/14 C07C227/16 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 G01N33/558 G01N33/533		
其他公开文献	CN104610079B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物化工生物检测技术领域，具体涉及一种沙丁胺醇半抗原衍生物、沙丁胺醇人工抗原及其合成方法和在荧光免疫层析法检测沙丁胺醇中的应用。本发明提供了沙丁胺醇半抗原衍生物结构式为图示。该衍生物结构在沙丁胺醇的三个甲基一端引入一个羧基活性官能团结构，最大限度的暴露了沙丁胺醇的特异性的苯环附属结构，同时具有可以与载体蛋白偶联的官能团。沙丁胺醇人工抗原结构式，是将沙丁胺醇半抗原衍生物与载体蛋白偶联的到得偶联物，其中所述载体蛋白protein为牛血清蛋白（BSA）或卵清蛋白（OVA）；本发明建立了荧光免疫层析法检测沙丁胺醇的方法，操作简单、检测时间短、成本低、特异性高、重复性好。

