



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103018447 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201110278960.0

(22) 申请日 2011.09.20

(73) 专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇国际信  
息产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 何方洋 冯才伟 孙震 张荃  
冯月君 李勇 刘琳 齐向武

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101592658 A, 2009.12.02,

CN 101241133 A, 2008.08.13,

CN 101290317 A, 2008.10.22,

孙海新等. 沙丁胺醇残留的酶联免疫检测方  
法的建立. 《中国动物检疫》. 2009, 第 26 卷 (第  
12 期),

Shi-Yuan Sheu et al. Screening of  
salbutamol residues in swine meat and

animal feed by an enzyme immunoassay in  
Taiwan. 《Analytica Chimica Acta》. 2009, 第  
645 卷

孟萌等. 以新型沙丁胺醇抗原为基础建  
立 ELISA 法测定沙丁胺醇残留量. 《药理学  
报》. 2010, 第 45 卷 (第 4 期),

审查员 王在竹

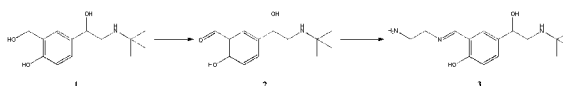
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

检测沙丁胺醇的酶联免疫试剂盒及其方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测沙丁胺醇的酶联免疫试  
剂盒及检测方法, 酶联免疫试剂盒包括: 包被有  
包被原的酶标板、沙丁胺醇特异性抗体、酶标记  
物、沙丁胺醇标准溶液、底物显色液、终止液、浓  
缩洗涤液、样本稀释液。本发明提供了一种沙丁  
胺醇酶联免疫试剂盒检测方法, 主要包括: 先进行  
样本前处理, 再用试剂盒进行检测, 最后分析检  
测结果。本发明的检测试剂盒可应用于动物组织  
(肌肉、肝脏)、尿液、饲料样本中沙丁胺醇的  
残留量的检测, 其操作简便、快速、准确、灵敏  
度高、费用低廉等, 适合大量样本的筛查和现  
场监控。



1. 一种沙丁胺醇酶联免疫检测试剂盒,其包括包被有包被原的酶标板、沙丁胺醇特异性抗体、酶标记物、沙丁胺醇标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液,所述酶标记物为酶标记抗抗体,所述包被原为沙丁胺醇药物抗原,沙丁胺醇药物抗原为沙丁胺醇半抗原与载体蛋白的偶联物,所述沙丁胺醇半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

(1) 取 1-3g 沙丁胺醇,溶于 20-50ml DMF 中,然后加入 10%摩尔当量的 TEMPO 和 10%摩尔当量的四丁基氯化铵,20-50ml 0.5M 的  $\text{NaHCO}_3$  水溶液,室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.1-1.5 摩尔当量的 NCS,室温反应 2-5 小时后,除去大部分溶剂,乙酸乙酯萃取,洗涤,干燥,除去溶剂后柱层析纯化,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物;

(2) 1-2g 步骤 (1) 所得沙丁胺醇单氧化物,溶于 20-30ml DMF 中,加入 2-5 摩尔当量的乙二胺,室温至 100°C 反应 5-20 小时,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物的乙二胺缩合产物。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的沙丁胺醇特异性抗体为沙丁胺醇药物单克隆抗体。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶;酶标记抗抗体是采用过碘酸钠法将标记酶与抗抗体偶联得到。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述底物显色液 A 液为过氧化脲溶液,底物显色液 B 液为四甲基联苯胺溶液,所述的终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸溶液。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液为含 1%吐温-20 的 0.15 ~ 0.2mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液,所述样本稀释液为含 0.5%吐温-20 的 0.02mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液。

8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述标准品溶液浓度分别为 0  $\mu\text{g/L}$ 、0.1  $\mu\text{g/L}$ 、0.3  $\mu\text{g/L}$ 、0.9  $\mu\text{g/L}$ 、2.7  $\mu\text{g/L}$ 、8.1  $\mu\text{g/L}$ 。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的沙丁胺醇酶联免疫检测试剂盒检测样本中沙丁胺醇残留的方法,主要步骤包括:

1) 将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液;

2) 用权利要求 1-8 任一项所述的沙丁胺醇酶联免疫检测试剂盒检测待测样本溶液;

3) 分析检测结果。

## 检测沙丁胺醇的酶联免疫试剂盒及其方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种检测动物组织(肌肉、肝脏)、尿液、饲料中沙丁胺醇的酶联免疫试剂盒及检测方法。

### 背景技术

[0002] 沙丁胺醇是一种强效选择性  $\beta$ -受体兴奋剂药物,临床上常用于治疗支气管哮喘、哮喘性支气管炎和肺气肿患者的支气管痉挛等呼吸系统疾病。因此药可以提高瘦肉率,减少脂肪沉积和促进动物生长,被一些畜牧养殖企业作为养殖促进剂非法使用。其残留量可导致人体肌肉震颤、心悸、神经过敏、头痛、目眩、恶心、呕吐、发烧、战栗等症状,对消费者的健康极有危害,我国农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》明确规定沙丁胺醇等  $\beta$ -兴奋剂被禁止所有用途,禁用所有食品动物。

[0003] 目前,对于的残留检测主要有高效液相色谱法、液相色谱~质谱联用分析法、气相色谱法、毛细管区带电泳法、酶联免疫测定法等检测方法,仪器检测方法具有检测精确度高的优点,但其仪器化程度高,样品处理较复杂、检测费用高等,不适合用作大批样品的检测,免疫学检测方法操作简单、快速、灵敏,可同时检测多数样品,是理想的快速筛选手段。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种沙丁胺醇酶联免疫试剂盒及其应用。

[0005] 一种沙丁胺醇酶联免疫检测试剂盒,其包括包被有包被原的酶标板、沙丁胺醇特异性抗体、酶标记物、沙丁胺醇标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液,所述包被原为沙丁胺醇药物抗原,所述酶标记物为酶标记抗体。

[0006] 本发明所提供的沙丁胺醇酶联免疫试剂盒,所述沙丁胺醇药物抗原为沙丁胺醇半抗原与载体蛋白的偶联物,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白。

[0007] 所述沙丁胺醇特异性抗体为沙丁胺醇单克隆抗体,是用沙丁胺醇免疫原免疫动物得到的。所述沙丁胺醇单克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体,所述沙丁胺醇单克隆抗体优选为沙丁胺醇鼠单克隆抗体。

[0008] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶,酶标记抗体是采用过碘酸钠法将标记酶与羊抗鼠抗体偶联得到。

[0009] 为了更方便的进行大量样本筛查和现场监控,所述试剂盒还包括:沙丁胺醇标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。

[0010] 所述标准品溶液为系列沙丁胺醇标准品溶液,1mL/瓶,浓度分别为  $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.1\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.3\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.9\ \mu\text{g/L}$ 、 $2.7\ \mu\text{g/L}$ 、 $8.1\ \mu\text{g/L}$ 。所述底物液 A 液为过氧化脲溶液,底物液 B 液为四甲基联苯胺溶液,所述的终止液为  $1\sim 2\text{mol/L}$  的硫酸溶液,所述浓缩洗涤液为含 1%吐温-20 的  $0.15\sim 0.2\text{mol/L}$  pH7.4 磷酸盐缓冲液,所述的样本稀释液为 pH 为 7.4 的  $0.02\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液中吐温-20 的含量为 0.5% 混合溶液配制而成的稀释液进行

稀释。

[0011] 其中所述酶标板在制备过程中所用到的包被缓冲液为 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。

[0012] 本发明酶标板的制备主要为:用包被缓冲液将包被原稀释成 0.2 ~ 0.3  $\mu\text{g/ml}$ ,每孔加入 150  $\mu\text{l}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  环境中避光孵育 2h 或 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,倾去孔中液体,洗涤液洗涤 1 ~ 2 次,拍干,每孔中加入 150  $\mu\text{l}$  封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 2h,倾去孔中液体拍干,用铝膜真空密闭保存。

[0013] 本发明中包被原和免疫原的合成过程为:

[0014] 1. 半抗原合成(合成路线如图 1)

[0015] (1) 取 1-3g 沙丁胺醇,溶于 20-50ml DMF 中,然后加入 10% 摩尔当量的 TEMPO 和 10% 摩尔当量的四丁基氯化铵,20-50ml 0.5M 的  $\text{NaHCO}_3$  水溶液,室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.1-1.5 摩尔当量的 NCS,室温反应 2-5 小时后,除去大部分溶剂,乙酸乙酯萃取,洗涤,干燥,除去溶剂后柱层析纯化,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物。

[0016] (2) 1-2g 步骤 (1) 所得沙丁胺醇氧化物,溶于 20-30ml DMF 中,加入 2-5 摩尔当量的乙二胺,室温至 100 $^{\circ}\text{C}$  反应 5-20 小时,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物的乙二胺缩合产物。

[0017] 2. 免疫原的合成

[0018] (1) 取沙丁胺醇半抗原 18mg 用 1.5ml 水溶解。

[0019] (2) 取 50% 的 GA8  $\mu\text{l}$  加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0020] (3) 取 BSA100mg 用 5.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0021] (4) 反应 24h 后加入 24mg  $\text{NaBH}_4$  反应 2h。

[0022] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得免疫原。

[0023] 3. 包被原的合成

[0024] (1) 取沙丁胺醇半抗原 15mg 用 1.5ml 水溶解。

[0025] (2) 取 50% 的 GA8  $\mu\text{l}$  加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0026] (3) 取 OVA30mg 用 4.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0027] (4) 反应 24h 后加入 24mg  $\text{NaBH}_4$  反应 2h。

[0028] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得包被原。

[0029] 4. 单克隆抗体的制备

[0030] 动物免疫:沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联物免疫 8-10 周龄 Balb/c 小鼠。

[0031] 细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇 (PEG) 4000 的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] 细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成  $1 \times 10^9$  个 /ml 的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0033] 本发明还提供了一种用沙丁胺醇酶联免疫试剂盒检测样本中沙丁胺醇残留的方法,采用本方法对动物组织、饲料、尿液样本中的沙丁胺醇进行定性或定量检测,样本前处理过程简单,能同时快速检测大批量样本,试剂盒具有很高的精确度和灵敏度,较低的操作技术要求和短暂的检测时间,检测样本量大等特点,主要步骤包括:

- [0034] 1) 将待测样本进行前处理,得到待测样本溶液;
- [0035] 2) 用酶联免疫试剂盒检测待测样本溶液;
- [0036] 3) 分析检测结果。

### 附图说明

[0037] 图 1 :沙丁胺醇半抗原合成图

[0038] 图 2 :沙丁胺醇标准曲线

### 具体实施方式

[0039] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,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。

[0040] 实施例一 :抗原、抗体及酶标记物的制备

[0041] 1. 沙丁胺醇半抗原的制备

[0042] (1) 取 1-3g 沙丁胺醇,溶于 20-50ml DMF 中,然后加入 10%摩尔当量的 TEMPO 和 10%摩尔当量的四丁基氯化铵,20-50ml 0.5M 的 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液,室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.1-1.5 摩尔当量的 NCS,室温反应 2-5 小时后,除去大部分溶剂,乙酸乙酯萃取,洗涤,干燥,除去溶剂后柱层析纯化,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物。

[0043] (2) 1-2g 步骤 (1) 所得沙丁胺醇氧化物,溶于 20-30ml DMF 中,加入 2-5 摩尔当量的乙二胺,室温至 100℃ 反应 5-20 小时,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物的乙二胺缩合产物。

[0044] 2. 免疫原的制备

[0045] (1) 取沙丁胺醇半抗原 18mg 用 1.5ml 水溶解。

[0046] (2) 取 50% 的 GA8  $\mu$ l 加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0047] (3) 取 BSA100mg 用 5.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0048] (4) 反应 24h 后加入 24mgNaBH<sub>4</sub>反应 2h。

[0049] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得免疫原。

[0050] 3. 包被原的制备

[0051] (1) 取沙丁胺醇半抗原 15mg 用 1.5ml 水溶解。

[0052] (2) 取 50% 的 GA8  $\mu$ l 加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0053] (3) 取 OVA30mg 用 4.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0054] (4) 反应 24h 后加入 24mgNaBH<sub>4</sub>反应 2h。

[0055] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得包被原。

[0056] 4. 酶标板的制备

[0057] 所述酶标板在制备过程中所用到的包被缓冲液为 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。

[0058] 本发明酶标板的制备主要为:用包被缓冲液将包被原稀释成 0.2 ~ 0.3  $\mu$ g/ml,每孔加入 150  $\mu$ l,37℃ 环境中避光孵育 2h 或 4℃ 过夜,倾去孔中液体,洗涤液洗涤 1 ~ 2 次,拍干,每孔中加入 150  $\mu$ l 封闭液,37℃ 避光孵育 2h,倾去孔中液体拍干,用铝膜真空密闭保存。

[0059] 5. 羊抗鼠抗抗体的制备

[0060] 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。

[0061] 6. 酶标记羊抗鼠抗抗体(酶标记抗抗体)的制备

[0062] 将辣根过氧化物酶与抗抗体采用改良后的过碘酸钠法进行偶联,省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少;辣根过氧化物酶:抗抗体的摩尔浓度比率为2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0063] 7. 单克隆抗体的制备方法

[0064] 动物免疫:沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联物免疫8-10周龄Ba1 b/c小鼠。

[0065] 细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇(PEG)4000的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0066] 经筛选得到沙丁胺醇单克隆杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株可以无限量的产生沙丁胺醇特异性抗体,该抗体特异性是针对沙丁胺醇的,灵敏度达到0.1 $\mu$ g/L。

[0067] 细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1\times 10^9$ 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37 $^{\circ}$ C水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0068] 实施例二:沙丁胺醇酶联免疫试剂盒各组分的组建

[0069] 组建沙丁胺醇酶联免疫试剂盒,包含下述各组分:

[0070] (1) 包被有包被原的酶标板。

[0071] (2) 酶标记抗抗体:辣根过氧化物酶-羊抗鼠抗抗体。

[0072] (3) 沙丁胺醇单克隆抗体工作液。

[0073] (4) 标准溶液:采用梯度稀释法配制标准品溶液,得到系列标准品6瓶,浓度分别为0 $\mu$ g/L、0.1 $\mu$ g/L、0.3 $\mu$ g/L、0.9 $\mu$ g/L、2.7 $\mu$ g/L、8.1 $\mu$ g/L,以及高浓度标准品100 $\mu$ g/L,1mL/瓶。

[0074] (5) 底物显色液A液为过氧化脲溶液,底物显色液B液为四甲基联苯胺溶液。

[0075] (6) 终止液为1~2mol/L的硫酸溶液。

[0076] (7) 浓缩洗涤液为含1%吐温-20的0.15~0.2mol/LpH7.4磷酸盐缓冲液。

[0077] (8) 样本稀释液为pH为7.4的0.02mol/L的磷酸盐缓冲液中吐温-20的含量为0.5%混合溶液配制而成的稀释液进行稀释。

[0078] 实施例三:检测样本中残留的沙丁胺醇

[0079] 1. 样本的前处理

[0080] (1) 组织、肝脏前处理方法

[0081] 称取2.0+0.05g均质物,加入2ml 3%三氯乙酸(称取15g三氯乙酸(固体),加入500ml去离子水溶解混匀),涡动5min,3000g以上,室温(20-25 $^{\circ}$ C/68-77 $^{\circ}$ F)离心5min。取上清液500 $\mu$ l,加入500 $\mu$ l样本稀释液,充分混匀(pH值应在7-9之间)。取50 $\mu$ l用于分析。

[0082] (2) 尿样的前处理方法

[0083] 取50ml清亮尿样直接测定(如尿样浑浊必须通过过滤或3000g以上,15 $^{\circ}$ C离心10min直至清亮),暂不使用的样本应冷冻保存。

[0084] (3) 饲料的前处理方法

[0085] 称取 1.0g 饲料样本, 加入 10ml 甲醇, 涡动 5min, 3000g 以上, 室温 (20-25°C /68-77° F) 离心 5min; 移取 1ml 上层有机相 (相当于 0.1g 样本) 至 10ml 玻璃管中, 于 50 ~ 60°C 氮气流下吹干; 加入 1ml 正己烷, 涡动 30s, 再加入 1ml 3% 三氯乙酸, 涡动 1min; 3000g 以上, 室温 (20-25°C /68-77° F) 离心 5min, 除去上层有机相, 取下层液体 150  $\mu$ l, 加入 450  $\mu$ l 样本稀释液, 充分混匀 (pH 值应在 7-9 之间)。取 50  $\mu$ l 用于分析。

## [0086] 2. 检测方法

[0087] (1) 准备: 使用之前将所有试剂和需用板条从冷藏环境中取出, 使温度回升至室温 (20-25°C), 使用之后立即将所有试剂放回 2-8°C。

[0088] (2) 加标准品 / 样本: 加标准品 / 样本 50  $\mu$ l 到对应的微孔中。

[0089] (3) 抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合: 将抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液按 10 : 1 体积比混合并混匀。(注: 此混合液不能保存, 混合均匀后立刻进行加样)

[0090] (4) 加抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合液: 加抗体工作液和酶标记抗抗体浓缩液的混合液 50  $\mu$ l / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中反应 30min。

[0091] (5) 洗板: 小心揭开盖板膜, 将孔内液体甩干, 用洗涤工作液 (用去离子水将 20 $\times$ 浓缩洗涤液按 1 : 19 体积比进行稀释) 250  $\mu$ l / 孔, 充分洗涤 4-5 次, 每次间隔 10s, 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)。

[0092] (6) 显色: 加入底物液 A 液 50  $\mu$ l / 孔, 再加底物液 B 液 50  $\mu$ l / 孔, 轻轻振荡混匀, 用盖板膜盖板后置 25°C 避光环境中显色 15min, 加入终止液 50  $\mu$ l / 孔, 轻轻振荡混匀。

[0093] (7) 测定: 酶标仪测定每孔的吸光度值, 设定酶标仪于 450nm 处 (建议用双波长 450/630nm 检测, 在 5min 内读完数据)。

## [0094] 3. 检测结果分析

[0095] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值, 再乘以 100%, 即得到百分吸光率。以沙丁胺醇标准品百分吸光率为纵坐标, 以沙丁胺醇标准品浓度 ( $\mu$ g/L) 的对数为横坐标, 绘制标准曲线图 (如图 2)。将样本的百分吸光率代入标准曲线中, 从标准曲线上读出样本所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中沙丁胺醇实际浓度。

[0096] 实施例四: 沙丁胺醇试剂盒灵敏度、特异性、精密度和准确度、保存期实验

### [0097] 1. 试剂盒灵敏度测定

[0098] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度试验, 试剂盒标准曲线最低点为 0.1  $\mu$ g/L, 标准曲线的范围为 0.1  $\mu$ g/L ~ 8.1  $\mu$ g/L, 在组织中沙丁胺醇检测限为 0.5  $\mu$ g/kg, 尿液中检测限为 0.3  $\mu$ g/L, 饲料中检测限为 5  $\mu$ g/kg。

### [0099] 2. 试剂盒准确度和精密度

[0100] 准确度是指测定值与真值间的符合程度, 试剂盒的准确度常用回收率表示; 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。分别向空白猪肉、猪肝、猪尿、饲料中添加沙丁胺醇至终浓度为 2  $\mu$ g/kg, 2  $\mu$ g/L, 2  $\mu$ g/L, 10  $\mu$ g/kg, 重复 5 次, 分别取三个批次的试剂盒计算变异系数, 结果见下表。

[0101] 表 1 试剂盒的准确度和精密度测定

[0102]

样本	猪肉			猪肝			猪尿			饲料		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
测定结果	1.56	1.62	2.05	1.65	1.63	1.62	1.35	1.33	1.58	8.96	7.63	9.35
	1.93	1.83	1.56	1.78	2.02	1.88	1.26	1.56	1.36	10.05	8.26	8.63
	1.86	1.96	1.72	1.46	1.85	1.79	1.59	1.60	1.52	9.68	7.86	7.96
	1.65	1.55	1.86	1.86	1.59	1.56	1.55	1.25	1.23	8.85	9.52	9.85
	1.86	2.03	1.62	1.95	1.92	1.96	1.36	1.38	1.45	7.55	8.61	7.86
变异系数cv%	8.9	11.6	11.2	11.0	10.3	9.6	9.9	10.6	9.6	10.7	8.9	9.9

[0103] 结果表明,向猪肉中添加至终浓度为  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率范围为  $77.5\% \sim 102.5\%$ ,向猪肝中添加至终浓度为  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率范围为  $73.0\% \sim 101.0\%$ ,向猪尿中添加至终浓度为  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率范围为  $61.5\% \sim 80.0\%$ ,向饲料中添加至终浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率范围为  $75.5\% \sim 100.5\%$ ,批内批间变异系数小于  $20\%$ ,符合《农业部文件》农医发[2005]17号附件2试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度和准确度的规定。

#### [0104] 3. 交叉反应率试验

[0105] 选择如下所示的沙丁胺醇、克仑特罗、莱克多巴胺3种药物按照常规方法分别测定交叉反应率,结果如表2所示。

[0106]

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起}50\%\text{抑制的沙丁胺醇浓度}}{\text{引起}50\%\text{抑制的沙丁胺醇类似物浓度}} \times 100\%$$

[0107] 表2试剂盒的特异性

[0108]

药物名称	交叉反应率(%)
沙丁胺醇	100
克仑特罗	1
莱克多巴胺	1

#### [0109] 4. 保存期实验

[0110] 试剂盒保存条件为  $2-8^{\circ}\text{C}$ ,经过12个月测定,试剂盒的最大吸光度值、 $\text{IC}_{50}$ 值、沙丁胺醇添加实际测定值均在正常范围之内。同时做加速老化和冷冻试验,将试剂盒放在  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 中6天,测定结果也表明试剂盒的各项指标正常。从以上结果得到沙丁胺醇试剂盒可以在  $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存12个月。

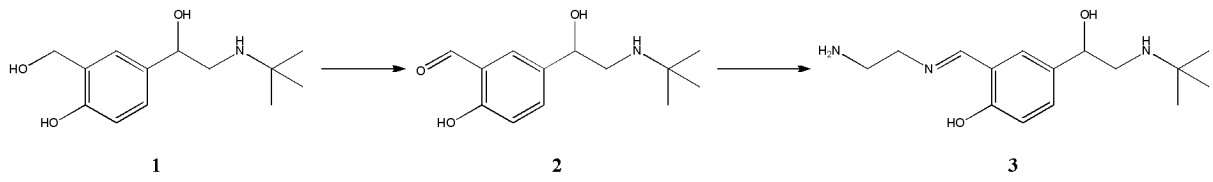


图 1

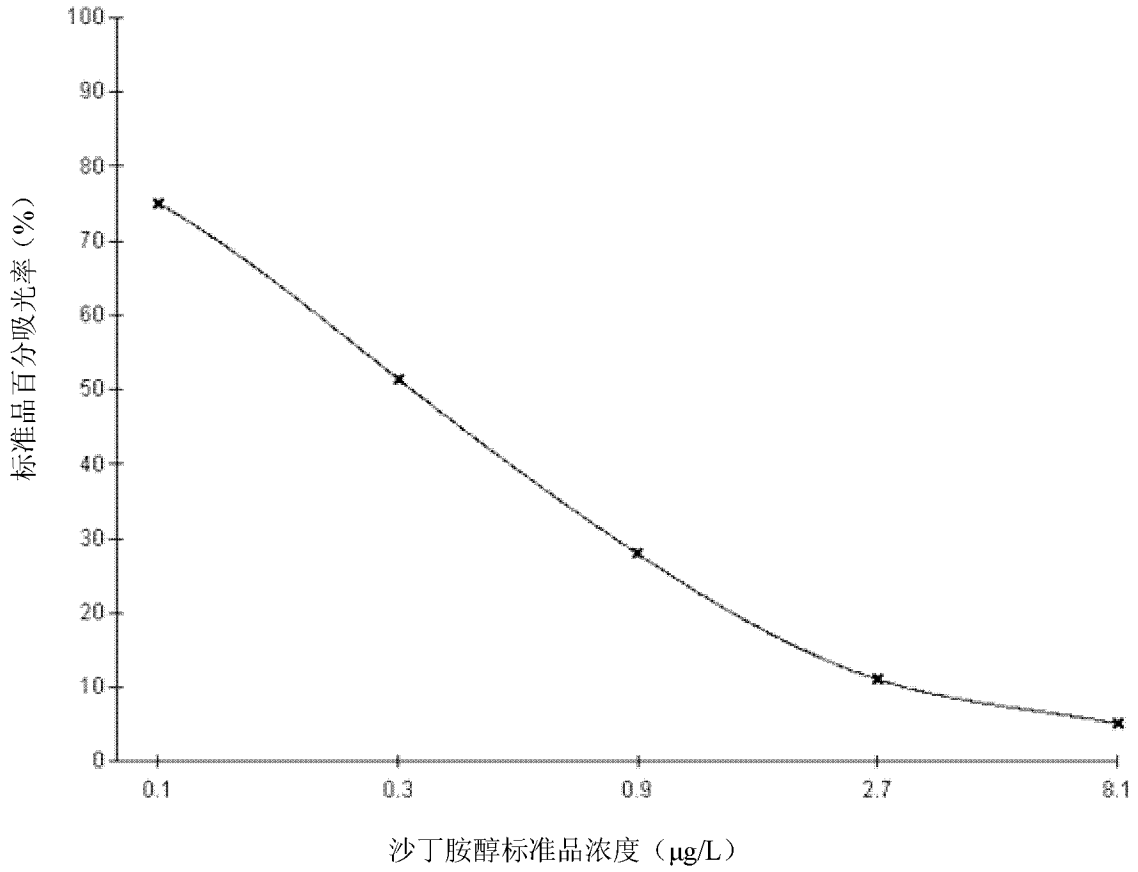


图 2

专利名称(译)	检测沙丁胺醇的酶联免疫试剂盒及其方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103018447B</a>	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201110278960.0	申请日	2011-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 冯才伟 孙震 张荃 冯月君 李勇 刘琳 齐向武		
发明人	何方洋 冯才伟 孙震 张荃 冯月君 李勇 刘琳 齐向武		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN103018447A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种检测沙丁胺醇的酶联免疫试剂盒及检测方法，酶联免疫试剂盒包括：包被有包被原的酶标板、沙丁胺醇特异性抗体、酶标记物、沙丁胺醇标准溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、样本稀释液。本发明提供了一种沙丁胺醇酶联免疫试剂盒检测方法，主要包括：先进行样本前处理，再用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明的检测试剂盒可应用于动物组织(肌肉、肝脏)、尿液、饲料样本中沙丁胺醇的残留量的检测，其操作简便、快速、准确、灵敏度高、费用低廉等，适合大量样本的筛查和现场监控。

