



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110283101 A

(43)申请公布日 2019.09.27

(21)申请号 201910487861.X

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2019.06.05

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 温氏食品集团股份有限公司

G01N 33/535(2006.01)

地址 527499 广东省云浮市新兴县新城镇
东堤北路9号

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/94(2006.01)

(72)发明人 钟翠丽 杨金易 曾道平 唐莲
邱远翠 管凤霞

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈嘉毅

(51)Int.Cl.

C07C 255/59(2006.01)

C07C 253/30(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

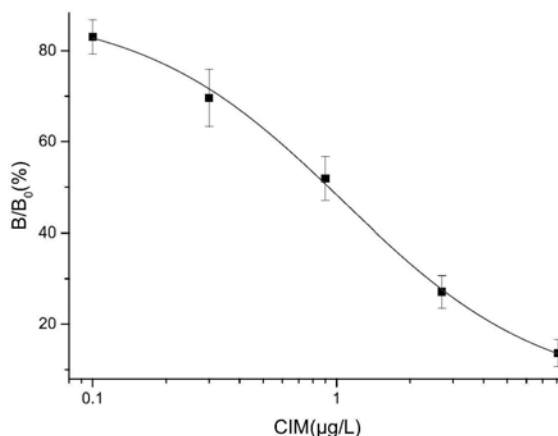
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

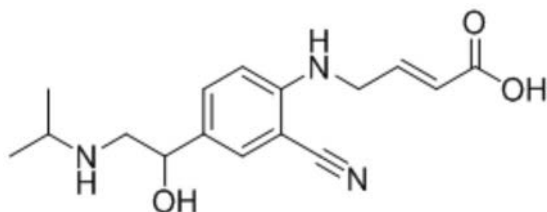
一种西马特罗半抗原、抗原及其化学发光酶联免疫检测试剂盒与应用

(57)摘要

本发明公开了一种西马特罗半抗原、抗原及其化学发光酶联免疫检测试剂盒与应用。本发明公开了西马特罗半抗原,同时也公开了相应的人工抗原和化学发光酶联免疫检测试剂盒及其应用。本发明提供的西马特罗半抗原与载体蛋白连接可以得到西马特罗抗原。所述西马特罗抗原可应用于制备西马特罗特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低。本发明化学发光酶联免疫检测试剂盒的检测范围为0.10~8.10 $\mu\text{g/L}$,灵敏度为0.51 $\mu\text{g/L}$,检出限为0.10 $\mu\text{g/L}$,回收率为80.81%~127.80%,检出限低、灵敏度高、稳定性好,成本低,速度快,非常适合大量样品的痕量分析与批量检测,具有重要的实际应用推广意义。



1. 一种西马特罗半抗原, 其特征在于, 为式 (I) 所示化合物:



式 (I)

2. 式 (I) 所示化合物的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

将西马特罗与4-溴丁烯酸加入N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶剂中, 搅拌溶解后加入无水碳酸钾, 50~60℃磁力搅拌反应2~4h; 分离纯化, 即可得到西马特罗半抗原; 优选地, 所述西马特罗、4-溴丁烯酸与无水碳酸钾的质量比为2~4:2~3:4~6。

3. 一种西马特罗抗原, 是将式 (I) 所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

4. 根据权利要求3所述西马特罗抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、鼠血清蛋白或兔血清蛋白。

5. 根据权利要求3或4所述西马特罗抗原的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

S1. 取西马特罗半抗原0.1~0.5mmol溶于N,N-二甲基甲酰胺中, 边搅拌边加入二环己基碳二亚胺 (DCC) 和N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 各0.2~1.0mmol, 4~8℃下搅拌反应12~24h, 离心取上清, 得到西马特罗半抗原反应液;

S2. 将载体蛋白溶0.1~0.3mol/L PBS中, 得到载体蛋白溶液;

S3. 搅拌条件下, 将西马特罗半抗原反应液逐滴加入载体蛋白溶液中, 4~8℃搅拌反应过夜;

S4. 离心取上清液, 用PBS于4℃条件透析2~3d, 期间每天换液2~3次, 得到西马特罗抗原。

6. 权利要求3或4所述西马特罗抗原在制备西马特罗特异性抗体中的应用。

7. 应用权利要求3或4所述西马特罗抗原制备得到的西马特罗特异性抗体。

8. 权利要求3或4所述西马特罗抗原、权利要求7所述特异性抗体在检测西马特罗中的应用。

9. 应用权利要求3或4所述西马特罗抗原、权利要求7所述特异性抗体制备得到的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

10. 权利要求9所述化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包括: 包被有西马特罗抗原的化学发光酶标板、西马特罗抗体、酶标二抗、西马特罗标准溶液、化学发光液和洗涤液;

优选地, 所述西马特罗抗原为西马特罗与牛血清白蛋白 (BSA) 的偶联物, 所述西马特罗抗原的包被浓度为10~46.67μg/L;

优选地, 西马特罗抗原的包被液由1.69~2g Na₂CO₃和2.95~4g NaHCO₃溶于1~1.5L去离子水中得到。

一种西马特罗半抗原、抗原及其化学发光酶联免疫检测试剂盒与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域。更具体地,涉及一种西马特罗半抗原、抗原及其化学发光酶联免疫检测试剂盒与应用。

背景技术

[0002] 西马特罗(Cimaterol, CIM), 分子式 $C_{12}H_{17}N_3O$, 属于一种 β -受体激动剂。在医学上, 西马特罗能调节交感神经兴奋、松弛气管平滑肌, 因此常用于治疗哮喘。此外, 研究表明, 西马特罗将对动物体内的营养进行再分配, 促进蛋白质沉积而抑制脂肪形成, 从而显著提高动物的瘦肉率。在动物生产中, 存在非法添加西马特罗的现象。西马特罗在动物体内代谢缓慢、作用时间久、性质稳定、药物残留率高, 通过动物体内长期蓄积与组织中, 对食用者的身体健康造成较大的危害, 甚至威胁生命安全。西马特罗作为新型“瘦肉精”物质, 检测手段滞后, 尤其缺乏快速检测产品。

[0003] 国家标准中检测西马特罗的主要方法有高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱法(GC)。采用色谱法进行检测, 成本高, 耗时长, 要达到较高的灵敏度, 通常需要加大样品称取量, 而氯霉素样品前处理多采用有机试剂萃取, 蒸干后复溶的方式, 加大样品量意味着萃取剂用量相应提高, 从而使前处理操作更为繁琐, 消耗时间延长, 而且因设备和维护费用高昂, 而且对仪器操作员的技术要求较高, 不适用于现场检测和监控, 如CN 103675145 A。色谱法尽管能达到大部分检测要求, 但无法应对大量样品现场快速检测的需求, 因而通常作为确证方法。而免疫分析法具有成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低等特点。因此在食品安全检测中, 往往先用免疫分析方法进行初筛后, 再对阳性样本用HPLC或GC进行确证。

[0004] 中国专利文献CN 103630689 A公开了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, 采用重氮化法合成西马特罗人工完全抗原, 该ELISA方法虽具有简单、快速、灵敏的特点, 也适宜大规模的筛查工作, 但其灵敏度有一定的制约。因此建立一种经济、方便、可靠、特异、敏感、快速、准确的定量检测动物性食品中西马特罗的方法, 具有相当的必要性。化学发光免疫分析法是将化学反光体系与免疫反应相结合, 用于检测微量抗原或抗体的一种标记免疫测定技术。其检测原理是: 固相载体表面的抗原和样品中相应抗原竞争性地与抗体结合, 再加入酶标二抗形成抗原抗体酶标复合物, 最后洗涤加入发光底物酶促发光, 通过检测发光强度值, 而抗原浓度与发光强度值呈负相关。此方法的突出优点为灵敏度高, 线性动力学范围宽, 光信号持续时间长, 分析方法简便快速, 结果稳定、误差小, 安全性好且使用期长。相比仪器分析方法的优势表现在: 能实现大批量现场检测, 且更经济、省时。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服上述现有技术的缺陷和不足, 提供一种西马特罗半抗

原。该半抗原具有准确、灵敏、快速、能够高通量检测西马特罗的优点,为西马特罗快速检测产品的开发提供了一定的理论指导,对食品安全监控具有重要意义。

[0006] 本发明的第二个目的是提供应用上述西马特罗半抗原制备得到的西马特罗抗原。

[0007] 本发明的第三个目的是提供上述西马特罗抗原在制备西马特罗特异性抗体中的应用。

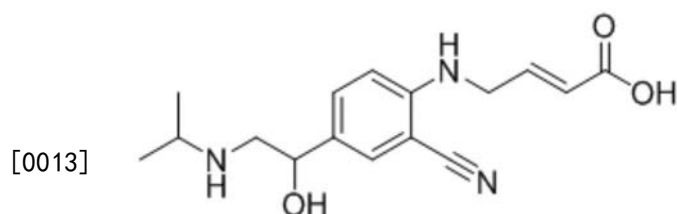
[0008] 本发明的第四个目的是提供应用上述西马特罗抗原制备得到的西马特罗特异性抗体及其制备方法。

[0009] 本发明的第五个目的是提供上述西马特罗特异性抗体在检测西马特罗中的应用。

[0010] 本发明的第六个目的是提供应用上述西马特罗抗原、西马特罗特异性抗体制备得到的化学发光酶联免疫试剂盒。

[0011] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0012] 一种西马特罗半抗原,为式(I)所示化合物:



式(I)

[0014] 本发明还公开了式(I)所示化合物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0015] 将西马特罗与4-溴丁烯酸加入N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂中,搅拌溶解后加入无水碳酸钾,50~60℃磁力搅拌反应2~4h;分离纯化,即可得到西马特罗半抗原。

[0016] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述西马特罗、4-溴丁烯酸与无水碳酸钾的质量比为2~4:2~3:4~6。

[0017] 更进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述西马特罗、4-溴丁烯酸与无水碳酸钾的质量比为3.5:2.86:5。

[0018] 本发明提供的西马特罗抗原,是将式(I)所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

[0019] 常用载体蛋白均可采用,如牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、人血清白蛋白(HSA)、鼠血清白蛋白(MSA)、甲状腺蛋白(TG)或血蓝蛋白(KLH)等。其中,牛血清白蛋白(BSA)的效果最佳。

[0020] 本发明还公开了所述西马特罗抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0021] S1.取西马特罗半抗原0.1~0.5mmol溶于N,N-二甲基甲酰胺中,边搅拌边加入二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)各0.2~1.0mmol,4~8℃下搅拌反应12~24h,离心取上清,得到西马特罗半抗原反应液;

[0022] S2.将载体蛋白溶0.1~0.3mol/L PBS中,得到载体蛋白溶液;

[0023] S3.搅拌条件下,将西马特罗半抗原反应液逐滴加入载体蛋白溶液中,4~8℃搅拌反应过夜;

[0024] S4.离心取上清液,用PBS于4℃条件透析2~3d,期间每天换液2~3次,得到西马特

罗抗原。

[0025] 所述西马特罗抗原可以作为免疫原制备西马特罗特异性抗体,也可以作为包被原制备化学发光酶标板。

[0026] 应用西马特罗抗原制备得到的特异性抗体具体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0027] 所述西马特罗抗原、所述特异性抗体均可应用于检测西马特罗。

[0028] 本发明还公开了应用所述西马特罗抗原、所述特异性抗体制备得到的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

[0029] 所述化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括:包被有西马特罗抗原的化学发光酶标板、西马特罗抗体、酶标二抗、西马特罗标准溶液、化学发光液和洗涤液。

[0030] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述西马特罗抗原为西马特罗与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物,所述西马特罗抗原的包被浓度为 $10\sim 46.67\mu\text{g/L}$ 。

[0031] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,西马特罗抗原的包被液由 $1.69\sim 2\text{g Na}_2\text{CO}_3$ 和 $2.95\sim 4\text{g NaHCO}_3$ 溶于 $1\sim 1.5\text{L}$ 去离子水中得到。

[0032] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述化学发光酶标板为可拆不透明白色发光板。

[0033] 所述化学发光酶标板是96孔可拆不透明酶标板,材质为聚苯乙烯,包被有能与抗西马特罗抗体特异性结合的西马特罗抗原,并封闭微孔表面未吸附西马特罗抗原的位点。

[0034] 所述包被有西马特罗抗原的化学发光酶标板的制备方法为:用包被液将西马特罗抗原按需要稀释,向发光板微孔中加入包被液,放入 37°C 环境进行孵育过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤,然后在每孔中加入封闭液, 37°C 孵育2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0035] 另外,可以作为固定西马特罗抗原固相载体的物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、硅橡胶、琼脂糖凝胶等均可作为固定西马特罗抗原固相载体。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

[0036] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述化学发光液由A液和B液组成,A液为将20mg对碘苯酚、8mg鲁米诺、1.21g Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至8.4得到;B液为将体积分数0.40% H_2O_2 、1.21g Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至7.0得到;使用时,将A液和B液按体积比1:1的比例混合。

[0037] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述洗涤液为20倍浓缩洗涤液,为含有体积浓度0.5% Tween20的pH为7.4的 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液;使用时用去离子水稀释成1倍洗涤液。

[0038] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所采用的酶标二抗为 1.00mg/mL 羊抗鼠IgG二抗,工作浓度为 0.67g/mL 。

[0039] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所采用的封闭液为将0.10g牛血清白蛋白(BSA)、5.00g甘氨酸、5.00g蔗糖溶于100mL PBS(0.01mol/L pH 7.4)溶液得到。

[0040] 进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述西马特罗标准溶液在使用时用 0.01mol/L 、pH 6.50的磷酸缓冲液(PB)将标准品溶液稀释成浓度为的一系列 $0.00\mu\text{g/L}$ 、 $0.10\mu\text{g/L}$ 、 $0.30\mu\text{g/L}$ 、 $0.90\mu\text{g/L}$ 、 $2.70\mu\text{g/L}$ 、 $8.10\mu\text{g/L}$ 西马特罗标准溶液。

[0041] 更进一步地,在本发明较佳的实施例中,所述磷酸缓冲液(PB)的配方为:分别称取

2.90g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和0.20g NaH_2PO_4 ,并加入去离子水定容至1L。

[0042] 所述西马特罗的化学发光酶联免疫检测试剂盒检测范围为0.10~8.10 $\mu\text{g/L}$,灵敏度0.51 $\mu\text{g/L}$,检出限为0.10 $\mu\text{g/L}$,回收率为80.81%~127.80%。

[0043] 本发明还提供了所述西马特罗化学发光酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包含如下步骤:

[0044] S1.将试剂盒从冷藏环境中取出,置于15~35 $^{\circ}\text{C}$ 平衡30~45min;

[0045] S2.取出化学发光酶标板,往标准孔中加入不同浓度的西马特罗标准溶液,样品孔中加入待测样品,然后每孔加入酶标二抗,再加入西马特罗抗体,盖上盖板膜振摇混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min;

[0046] S3.吸除板孔中的反应液,用稀释后20倍的洗涤液进行洗涤5次,将酶标板拍干;所述洗涤液为浓缩洗涤液稀释20倍得到;

[0047] S4.每孔加入化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,3min后测定各孔的发光强度值(RLU);

[0048] S5.检测结果的计算与分析:确定样品中西马特罗的含量。

[0049] 抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%),式中:B为不同浓度西马特罗的标准品溶液孔或待测样品孔的RLU; B_0 为0浓度西马特罗标准品溶液的RLU;

[0050] 以抑制率为纵坐标,西马特罗浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,从而确定样品中西马特罗的含量。

[0051] S2所述的待测样品可以为鸡肉/肝、猪肉/肝、虾、鱼等组织样品、以及饲料或尿液等样品。

[0052] 优选地,S2所述的待测样品为动物尿样。

[0053] 待测样品为动物尿样时,其前处理方法如下:

[0054] 取澄清透明的动物尿样待测,混作尿样则先4000~5000r/min离心5~10min后,再取上清液以待测。

[0055] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0056] 1.本发明所述西马特罗的化学发光酶联免疫检测试剂盒检测范围为0.10~8.10 $\mu\text{g/L}$,灵敏度0.51 $\mu\text{g/L}$,检出限为0.10 $\mu\text{g/L}$,回收率为80.81%~127.80%。该试剂盒检测快速、大大缩短了检测时间,不考虑检测人员技术水平的影响,整个检测过程仅仅需要20min左右即可完成,且检出限更低、灵敏度更高。同时,采用包被抗原的包被板大大提升了试剂盒的稳定性和精密度,检测更稳定、更准确。

[0057] 2.高灵敏度、高特异性:与现有的西马特罗的ELISA试剂盒相比,克服了试剂盒检测过程中易受到内源性酶干扰、吸光度的检测也易受到多种外在因素的影响的弊端,本发明采用高特异性、高亲合力的抗体,检测西马特罗的化学发光酶免疫试剂盒灵敏度更高,可达到0.51 $\mu\text{g/L}$ 。

[0058] 3.另外,本发明所述试剂盒采用化学发光方法,不使用ELISA试剂盒中的浓硫酸等有强腐蚀性的试剂、以及有强致癌性的底物,更加环保安全;且操作简单、成本低,适合大量样品或现场筛查的痕量分析与批量检测,具有重要的实际应用推广意义。

附图说明

[0059] 图1为西马特罗化学发光酶联免疫试剂盒的标准曲线。

[0060] 图2为西马特罗半抗原合成路线。

具体实施方式

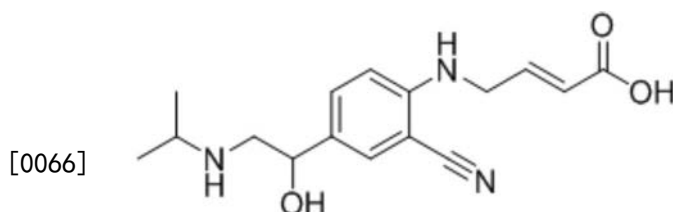
[0061] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0062] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0063] 实施例1西马特罗半抗原的制备

[0064] 称取3.50mg西马特罗与2.86mg 4-溴丁烯酸加入10mL DMF溶剂中,搅拌溶解后加入5mg无水碳酸钾,60℃磁力搅拌反应2h,将反应之后的溶液置于旋转蒸发仪蒸干后,柱色谱纯化,即可得到西马特罗半抗原CIM-CA。

[0065] 对所得的西马特罗半抗原进行质谱和核磁共振氢谱鉴定, $[M+H]^+ = 304.2$;结果显示,西马特罗半抗原合成成功,为式(I)所示化合物:



式(I)

[0067] 实施例2西马特罗人工抗原、包被原及特异性抗体的制备

[0068] (1) 西马特罗人工抗原的制备

[0069] 取上述西马特罗半抗原0.10mmol溶于0.50mL DMF中,边搅拌边加入DCC和NHS各0.20mmol,4℃下磁力搅拌反应12h,离心取上清,得到西马特罗半抗原反应液;称取载体蛋白BSA溶于4.00mL的0.10mol/L PBS (pH8.00) 中,得到载体蛋白溶液;搅拌条件下,将西马特罗半抗原反应液缓慢逐滴加入到载体蛋白溶液,4℃搅拌过夜;离心取上清液,用PBS于4℃下透析3d,每天换液2次,得到人工抗原(即免疫原),分装冻存于-20℃,备用。

[0070] (2) 西马特罗包被原的制备

[0071] 方法同人工抗原的制备方法。

[0072] (3) 西马特罗单克隆抗体的制备

[0073] 采用上述人工抗原免疫3只6~8周龄的雌性Balb/c小鼠。先将免疫原用生理盐水稀释成1.00mg/mL,按每只小鼠注射100μL的剂量,分别免疫4次。首次免疫加完全弗氏佐剂,皮下多点注射;两周后进行第二次免疫,免疫原加不完全弗氏佐剂,同样皮下多点注射进行加强免疫。此后每两周加强免疫一次,在第四次免疫后一周对小鼠进行剪尾收集血清,并使用ELISA测定抗血清滴度。在细胞融合前3d对产生最高滴度抗血清的小鼠进行加强免疫,直接腹腔注射0.50mL相应抗原(不加佐剂)。以10:1的比例将免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合,并在37℃,5%CO₂条件下的HAT培养基中培养。在融合后约7d后,用间接竞争

ELISA选择和标记效价高、抑制率高的阳性杂交瘤细胞。阳性细胞经有限稀释法亚克隆3次均为100%的阳性后,建立细胞株并冻存。并将杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔,制备腹水,使用Protein G亲和层析法纯化单抗备用。

[0074] (4) 包被原浓度与抗体浓度的优选

[0075] 1). 将7.00mg/mL的西马特罗抗原按照不同倍数稀释(如1:50000、1:100000、1:150000、1:200000),并纵向按150μL/孔包被至不透明白色发光板,4℃孵育过夜,用洗涤液洗涤两次,吸水纸上拍干。

[0076] 2). 加入封闭液170μL/孔进行封闭,37℃过夜,甩干放入烘箱。

[0077] 3). 加入50μL/孔PBS稀释的不同梯度的西马特罗标准品溶液。

[0078] 4). 加入50μL/孔酶标二抗,再加入50μL/孔用PBS稀释的不同梯度的西马特罗单克隆抗体(1:10000、1:50000、1:100000、1:150000),37℃孵育15min,洗板5次,吸水纸上拍干。

[0079] 5). 每孔分别加入化学发光液A液和B液各50μL,轻拍混匀,盖上盖板膜,3min后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU。以发光值随包被原浓度有明显梯度变化的包被抗原浓度和抗体稀释浓度为最佳浓度进行特异性测定。得到包被原最佳浓度为46.67μg/L,抗体稀释倍数为100000倍。

[0080] (5) 抗体灵敏度的测定

[0081] 以包被浓度为包被原最佳浓度为46.67μg/L,西马特罗单克隆抗体稀释100000倍后,进行抗体灵敏度的测定。

[0082] 1). 取96孔不透明白色发光板,将包被原用稀释液稀释至46.67μg/L,每孔加入150μL,4℃孵育过夜,用洗涤液洗涤两次,吸水纸上拍干

[0083] 2). 加入170μL/孔封闭液进行封闭,37℃过夜,甩干放入烘箱。

[0084] 3). 加入50μL/孔PB稀释的不同梯度的西马特罗标准品溶液。

[0085] 4). 依次加入50μL/孔酶标二抗和50μL/孔100000倍稀释的西马特罗抗体,37℃孵育15min,洗板5次,吸水纸上拍干。

[0086] 5). 每孔分别加入化学发光液A液和B液各50μL,轻拍混匀,盖上盖板膜,3min后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU。

[0087] 6). 结果以抑制率计算,抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%),B为不同标准浓度溶液竞争的发光值,B₀为不加标准品的发光值,计算IC₅₀为0.51μg/L,即西马特罗单克隆抗体的灵敏度。

[0088] 实施例3西马特罗化学发光酶联免疫试剂盒的制备

[0089] (1) 准备试剂

[0090] 1) 包被有西马特罗抗原的酶标板:96孔可拆酶标板,包被西马特罗抗原及封闭液,包被浓度为0.05mg/L。所述西马特罗抗原为西马特罗半抗原CIM-CA与BSA的偶联物。

[0091] 将包被抗原用包被液稀释至46.67μg/L,每孔内加入150μL包被液,4℃孵育过夜,倾去孔内液体,洗涤液洗涤2次,拍干。然后每孔中加入170μL封闭液,37℃孵育3h,倾去孔内液体,置于37℃烘箱中烘干后,用铝箔袋真空密封4℃保存。

[0092] 2) 西马特罗标准品溶液的配制:准确称取西马特罗标准品溶液,用色谱级甲醇稀释成1.00mg/mL,再用0.01mol/L PB缓冲液(配方为2.90g NaH₂PO₄ • 12H₂O、0.20g NaH₂PO₄,定容至1L)分别配制0.00μg/L、0.10μg/L、0.30μg/L、0.90μg/L、2.70μg/L、8.10μg/L西马特

罗溶液,4℃保存。

[0093] 3) 西马特罗单克隆抗体浓度为6.00mg/mL;其工作浓度为1:100000,用PBS进行稀释。

[0094] 4) 化学发光液:由A液和B液组成;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合。A液的配制方法为:将20.00mg对碘苯酚、8.00mg鲁米诺、1.21g Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至8.50;B液的配制方法为:将体积分数0.40% H₂O₂、1.21g Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至7.00。

[0095] 5) 20倍浓缩洗涤液;使用时用去离子水稀释成1倍洗涤液。

[0096] 6) 酶标二抗的配置:1.00mg/mL羊抗鼠IgG二抗稀释至0.67g/mL。

[0097] (2) 试剂分装

[0098] 将各试剂测定合格后无菌分装,已稀释的西马特罗标准品系列溶液1 mL/瓶,西马特罗抗体7mL/瓶,酶标二抗7mL/瓶,化学发光液A液7mL/瓶,化学发光液B液7mL/瓶,20倍浓缩洗涤液50mL/瓶。分装后贴标签,注明批号和有效期,4℃保存。

[0099] (3) 试剂盒的组装

[0100] 分别将上述包被有西马特罗抗原的化学发光酶标板1块,西马特罗抗体、酶标二抗、化学发光液A液、化学发光B液、20倍浓缩洗涤液各1瓶,西马特罗标准品溶液6瓶和使用说明书1份置于试剂盒内指定位置,试剂盒检验合格后封装,4℃保存。

[0101] 实施例4西马特罗化学发光酶联免疫检测试剂盒的应用

[0102] (1) 利用本发明实施例3的试剂盒进行检测

[0103] 1) 取出实施例3的试剂盒,置于室温(20~24℃)平衡30min以上,

[0104] 2) 取出化学发光酶标板,在标准孔加入50μL不同浓度的标准品溶液,样品孔加入50μL待测样品,然后每孔加入50μL酶标二抗,再加入50μL西马特罗抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇10min后,置于37℃孵育15min。

[0105] 3) 吸除板孔中的反应液,各孔加入洗涤液约300μL,静置20s左右,除去其中液体,如此共洗5次,最后一次将板拍干;也可用自动洗板机洗板5次,洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打(每轮洗板拍打3次),以保证完全除去孔中的液体。

[0106] 4) 每孔分别加入化学发光液A液和B液各50μL,轻拍混匀,盖上盖板膜,3min后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU,保存数据。

[0107] (2) 检测结果计算与分析

[0108] 抑制率(%) = $B/B_0 \times 100$ (%), 式中: B为不同浓度西马特罗的标准品溶液孔或待测样品孔的发光值; B₀为0浓度西马特罗标准品溶液发光值; 以抑制率为纵坐标, 西马特罗浓度的对数为横坐标绘制标准曲线, 以样品孔的吸光值代入上述标准曲线中求出待测样品中西马特罗的含量。不考虑检测人员操作熟练程度的影响, 整个检测过程仅仅需要20min内即可完成。检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。

[0109] (3) 标准曲线

[0110] 通过对标准品溶液的检测结果分析得到西马特罗标准曲线图(如附图1所示), 表明了本发明试剂盒对西马特罗的线性检测范围为0.10~8.10μg/L, 灵敏度为0.51μg/L, 检出限为0.10μg/L。

[0111] 实施例5西马特罗化学发光酶联免疫检测试剂盒的应用评价

[0112] (1) 试剂盒灵敏度和检测限

[0113] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为0.00~8.10 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 的浮动范围为0.46~0.89 $\mu\text{g/L}$;对20份样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光度值的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对动物尿样的检测限均为0.10 $\mu\text{g/L}$ 。

[0114] (2) 准确度和精密度试验

[0115] 向不含西马特罗的动物尿样中添加西马特罗标准品,使西马特罗标准品在样品中的终浓度分别为0.50 $\mu\text{g/L}$ 、1.00 $\mu\text{g/L}$ 、3.00 $\mu\text{g/L}$,将添加后的样品分别按照上述方法进行前处理,得到检测样本溶液。从三个不同批次的试剂盒中各抽取3个试剂盒进行检测,检测方法如上所述,每个实验重复4次,分别计算变异系数。其中:

[0116] 1) 以回收率作为准确度评价指标,其计算公式为:样品的添加浓度回收率的计算方法:平均回收率(RG) = 测定值与真实值的比值 $\times 100\%$ 。

[0117] 2) 变异系数的计算方法:变异系数(CV) = (各平行样本的标准差与各平行样本平均值的比值) $\times 100\%$;其中批内变异系数的计算方法:批内CV = 同一次测定中各平行样本的变异系数,取其平均值;批间变异系数的计算方法:批间CV = 同一样本在不同批次测定结果的变异系数,取其平均值。

[0118] 3) 结果见表1。实验结果表明:本发明的试剂盒的平均回收率在之间;批内、批间相对标准偏差均小于20%。

[0119] 表1准确度和精密度试验结果

	样品 种类	添加量 ($\mu\text{g/L}$)	平均检测值 $\pm$ 标准 差($\mu\text{g/L}$)	平均回收 率(%)	批内变异 (%)	批间变异 (%)
[0120]	动物 尿样	0.5	0.47 $\pm$ 0.07	94.19	15.88	15.23
		1	1.14 $\pm$ 0.08	113.60	7.32	2.15
		3	3.41 $\pm$ 0.21	113.73	6.02	5.07

[0121] (3) 试剂盒保存期的试验

[0122] 1) 将实施例3的试剂盒放置于2~8 $^{\circ}\text{C}$,分别取放置0、2、4、6、8、9、10、11和12个月的试剂盒,对西马特罗标准样品的发光值、 IC_{50} 、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0123] 2) 将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存的条件下放置12天,每天对西马特罗标准样品的发光值、 IC_{50} 、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0124] 3) 将试剂盒在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存12天,每天对西马特罗标准样品的发光值、 IC_{50} 、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

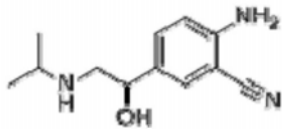
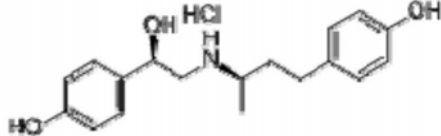
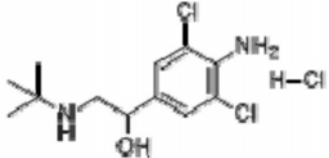
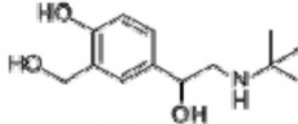
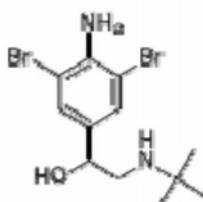
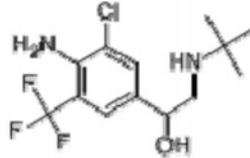
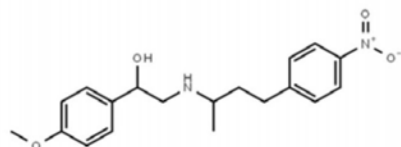
[0125] 结果表明,经过三种条件保存试验,该试剂盒各项指标完全符合要求,因此,从以上结果可得出试剂盒可以在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存12个月。

[0126] 从以上结果可得出,本发明的试剂盒可以在2~8℃至少可以保存一年。

[0127] (4) 交叉反应率试验

[0128] 选择与西马特罗结构或功能相似的其他药物进行交叉反应试验,通过各种药物的标准曲线分别得到IC₅₀和交叉反应率。与其他药物的交叉反应率越小,说明西马特罗化学发光检测试剂盒对西马特罗的检测特异性越好。结果见表2。

[0129] 表2西马特罗试剂盒交叉反应率

药物名称	结构式	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 (%)
西马特罗		0.84	100
盐酸莱克多巴胺		269.89	0.36
[0130] 盐酸克伦特罗		0.32	264
沙丁胺醇		10.59	7.91
溴布特罗		ND	≅0.01
马布特罗		ND	≅0.01
[0131] 苯乙醇胺 A		1.90	44.23

[0132] 2) 实验结果表明:与盐酸克伦特罗和苯乙醇胺A交叉反应率较高,因此不仅可应用于实际样品中西马特罗残留的筛查检测,还可以用于盐酸克伦特罗、苯乙醇胺A的检测;使用本发明得到的抗体建立化学发光酶联免疫检测试剂盒对动物尿样中兴奋剂类药物残留的快速检测具有很重要的现实意义。

[0133] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

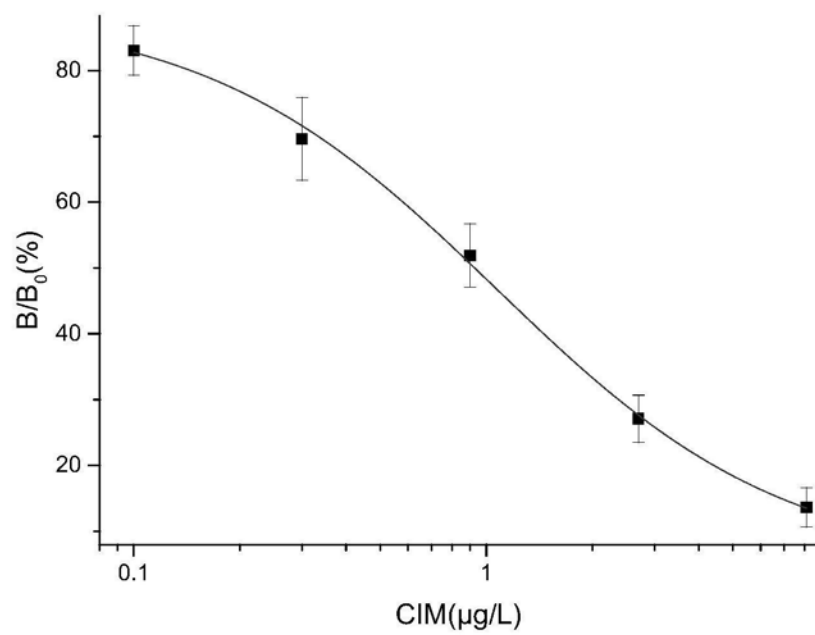


图1

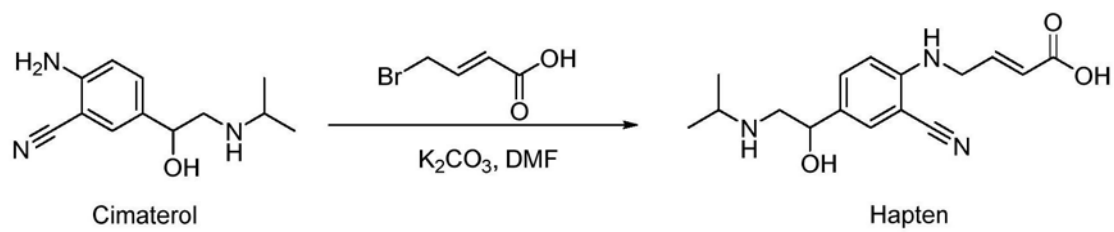


图2

专利名称(译)	一种西马特罗半抗原、抗原及其化学发光酶联免疫检测试剂盒与应用		
公开(公告)号	CN110283101A	公开(公告)日	2019-09-27
申请号	CN201910487861.X	申请日	2019-06-05
[标]发明人	钟翠丽 杨金易 曾道平 唐莲		
发明人	钟翠丽 杨金易 曾道平 唐莲 邱远翠 管凤霞		
IPC分类号	C07C255/59 C07C253/30 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/94		
CPC分类号	C07C255/59 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 C07K19/00 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/581 G01N33/94		
代理人(译)	陈嘉毅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种西马特罗半抗原、抗原及其化学发光酶联免疫检测试剂盒与应用。本发明公开了西马特罗半抗原，同时也公开了相应的人工抗原和化学发光酶联免疫检测试剂盒及其应用。本发明提供的西马特罗半抗原与载体蛋白连接可以得到西马特罗抗原。所述西马特罗抗原可应用于制备西马特罗特异性抗体。本发明制备方法简便可行、成本较低。本发明化学发光酶联免疫检测试剂盒的检测范围为0.10~8.10 μ g/L，灵敏度为0.51 μ g/L，检出限为0.10 μ g/L，回收率为80.81%~127.80%，检出限低、灵敏度高、稳定性好，成本低，速度快，非常适合大量样品的痕量分析与批量检测，具有重要的实际应用推广意义。

