

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510071059.0

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1687783A

[22] 申请日 2005.5.24

[21] 申请号 200510071059.0

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区圆明园西路 2 号
中国农业大学

[72] 发明人 黄昆仑 许文涛 邓爱科 罗云波

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 司君智

权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称 莱克多巴胺的亲合层析 - 酶联免疫检测方法及其专用试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种莱克多巴胺 RCT 的检测方法,更确切地说它是利用免疫亲和层析柱及酶联免疫吸附方法来检测食品中的莱克多巴胺残留,属于免疫学和食品安全检测技术领域。本发明的方法是:首先通过合成免疫抗原,包被抗原,动物免疫,抗体纯化等步骤制备多克隆抗体,再将此抗体交联到琼脂糖凝胶上,制备免疫亲和层析柱。被检样品经处理后,通过亲和柱以富集其中的莱克多巴胺;收集亲和柱的洗脱液进行酶联免疫吸附检测,以确定其中的莱克多巴胺含量。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种利用免疫亲和层析和酶联免疫吸附检测样品中莱克多巴胺 RCT 的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 RCT 混合，制备酶标抗原；

(3) 制备 RCT 抗体；

(4) 制备偶联 RCT 抗体的凝胶；

(5) 包被酶标板；

(6) 免疫亲和层析纯化：将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品过柱，洗脱，收集洗脱液；

(7) 酶联免疫吸附检测：将洗脱液加入经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；显色、终止；用酶标仪读取 OD 值；

(8) 绘制标准曲线；

(9) 根据标准曲线对洗脱液中的 RCT 含量进行定量计算。

2、根据权利要求 1 所述方法，其中样品前处理采用称取动物制品，加入 HCl 匀浆，冻融，离心取上清，加入 NaOH 调解 pH 值至 11，加入异丁醇，振荡，静置，定量吸取异丁醇，水浴蒸干，再加入磷酸盐溶液溶解析出物，冻存待测；或取动物尿液，离心去除杂质，取上清待测。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其中制备酶标抗原采用将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 RCT 混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点；其中制备 RCT 抗体采用将 RCT 与牛血清白蛋白 BSA 或与卵清白蛋白 OVA 偶联作为抗原，制备多克隆 RCT 抗体或单克隆 RCT 抗体。

4、根据权利要求3所述的方法，其中制备多克隆 RCT 抗体的方法采用将新西兰白兔接种免疫，免疫抗原为 BSA-RCT 或 OVA-RCT，放血；分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 RCT 抗体的溶液，冻存储用；其中制备单克隆 RCT 抗体的方法采用将小鼠接种免疫，免疫抗原为 BSA-RCT 或 OVA-RCT，采血，测定抗体效价，取脾细胞；将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合；筛选杂交瘤细胞，获得完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；在小鼠腹腔内注射杂交瘤细胞，采集腹水，经提纯后待用。

5、根据权利要求1所述的方法，其中制备偶联 RCT 抗体的凝胶采用先活化凝胶；将活化后的凝胶与 RCT 抗体振荡混匀；离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体；依次用不同 pH 梯度溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液淋洗，冷藏保存备用。

6、根据权利要求1所述的方法，其中包被酶标板采用将 RCT 抗体包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干。

7、根据权利要求1所述的方法，其中免疫亲和层析纯化采用将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品，循环过柱，用甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱液。

8、根据权利要求1所述的方法，其中酶联免疫吸附检测采用将样品洗脱液加在包被后的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；继而加入底物混合液显色；终止反应；用酶标仪读取 OD 值。

9、一种用于权利要求 1-8 所述任一方法的试剂盒，其特征在于它包括：

A 试剂：标准 RCT 试剂；

C 试剂：酶标抗原试剂；

K 试剂：偶联 RCT 抗体的凝胶；

包被 RCT 抗体的酶标板。

10、根据权利要求 9 所述的试剂盒，其特征在于它还包括：

B 试剂：稀释液；

D 试剂：酶标抗原稀释液

E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；

F 试剂：邻苯二胺试剂；

G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；

H 试剂：30% H_2O_2 ；

I 试剂：硫酸溶液；

J 试剂：甘氨酸溶液。

莱克多巴胺的亲层析-酶联免疫检测方法及其专用试剂盒

技术领域

本发明属于免疫分析技术领域。具体而言，涉及一种莱克多巴胺（RCT）亲和层析-酶联免疫检测方法及其专用检测试剂盒。

背景技术

莱克多巴胺（Ractopamine）是 β 2-肾上腺素能激动剂（BAA）成员之一，与“瘦肉精”同属儿茶酚胺类（肾上腺素和去甲肾上腺素 BAA）物质。早在本世纪50年代末期就发现，儿茶酚胺类（肾上腺素和去甲肾上腺素）能刺激脂肪组织释放脂肪酸，并增加蛋白质沉积，但直到70年代初期，儿茶酚胺类物质及其类似物改善机体营养调配和胴体组成的能力，才首先由美国氰胺公司研究部所认识。随后便大规模用于畜禽生产以提高瘦肉率，减少脂肪沉积，及增加产奶量等。

BAA 用作营养重分配剂的实用性开发研究始于70年代末期。二十几年来，以美国几家大公司和研究室为首，已开发出数百种结构类似药，经过对大鼠、牛、绵羊、猪、禽等的数百次逾万头（只）动物试验，筛选出促生长作用较强的BAA 十余种。其中实用型BAA 有莱克多巴胺（ractopamine）、克仑特罗(clenbuterol)、沙丁胺醇(salbutamol)、赛曼特罗(cimaterol)、吡啶甲醇类、脱脂BAA。其中莱克多巴胺、克仑特罗、沙丁胺醇因其口服效率高在生产中常用。

据Kuiper(1998)综述，1989年，西班牙中部发生135人因食用含 β 2-肾上腺素能激动剂残留物的牛肝而集体中毒的事件；1992年西班牙北部又有232人因同样原因而集体中毒；1995年西班牙的巴塞罗那地区发生15起 β 2-肾上腺素能激动剂中毒事件；1990-1991年，法国里昂地区有8个家庭因食用残留 β 2-肾上腺素能激动剂的牛肝而集体中毒；1996年，仅意大利就发生62起因食用残留有 β 2-肾上腺素能激动剂的牛肉和牛肝而集体中毒的事件；中毒症状有肌肉震颤、

心悸、神经过敏、头痛、肌肉疼、目晕、恶心、呕吐、发烧、战栗。进食40小时后病人尿中仍可检出 β 2-肾上腺素能激动剂。有心脏病史的人对食物残留 β 2-肾上腺素能激动剂尤为敏感(尹靖东等,1998)。因此欧盟采取了严密的措施,通过一系列法规条例严格控制莱克多巴胺、克仑特罗进入市场。除特殊情况外任何动物体内有 β 2-肾上腺素能激动剂残留都是违法的。

目前许多国家对莱克多巴胺提出了最高残留限量,如英国在动物可食性组织的最大残留量为0.5ng/g,荷兰规定肝组织最大残留量为1ng/g(G.A.Mitchell, et al,1998)。而我国也规定为1ng/g(肝组织)或1ng/ml(尿液)。

我国农业部1997年3月[农牧发(1997)]3号文严令禁止 β 2-肾上腺素能激动剂在动物生产中的应用。但由于资金、技术等方面的原因,滥用 β 2-肾上腺素能激动剂的行为一直未能得到有效的遏止,2001年,连续发生了广东河源、广东信宜、浙江等地十几起上百人集体中毒的事件。

因此,需建立一种灵敏、特异、操作简单、适于大批量样品筛选的检测方法,才能对莱克多巴胺、克仑特罗类物质的非法使用进行及时、有效的监测。

目前的检测方法主要有高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)和气相色谱-质谱联用法(GC-MS)。这些仪器分析技术一般耗时,昂贵,大批量检测困难,操作繁琐,均不能适应市场监督需要快速、简便、价廉的要求。

发明内容

本发明目的在于提供一种样品前处理简单,灵敏度高,特异性强,快速高效,适于大批量样品筛选的莱克多巴胺检测方法,并开发结构简单,使用方便,价格便宜,便于携带的莱克多巴胺检测试剂盒。

发明人主要采用亲和层析-酶联免疫吸附方法(IAC-ELISA)检

测 RCT；先利用免疫亲和层析方法将检测样品中的 RCT 加以富集纯化，再通过酶联免疫吸附方法对其进行定量检测；完成了本发明。

本发明提供了一种利用免疫亲和层析和酶联免疫吸附检测样品中莱克多巴胺 RCT 的方法，包括步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 RCT 混合，制备酶标抗原；
- (3) 制备 RCT 抗体；
- (4) 制备偶联 RCT 抗体的凝胶；
- (5) 包被酶标板；
- (6) 免疫亲和层析纯化：将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品过柱，洗脱，收集洗脱液；
- (7) 酶联免疫吸附检测：将洗脱液加入经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；显色、终止；用酶标仪读取 OD 值；
- (8) 绘制标准曲线；
- (9) 根据标准曲线对洗脱液中的 RCT 含量进行定量计算。

优选地，样品前处理采用称取动物制品，加入 HCl 匀浆，冻融，离心取上清，加入 NaOH 调解 pH 值至 11，加入异丁醇，振荡，静置，定量吸取异丁醇，水浴蒸干，再加入磷酸盐溶液溶解析出物，冻存待测；或取动物尿液，离心去除杂质，取上清待测。

优选地，制备酶标抗原采用将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 RCT 混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点；其中制备 RCT 抗体采用将 RCT 与牛血清白蛋白 BSA 或与卵清白蛋白 OVA 偶联作为抗原，制备多克隆 RCT 抗体或单克隆 RCT 抗体。

优选地，制备多克隆 RCT 抗体的方法采用将新西兰白兔接种免

疫，免疫抗原为 BSA-RCT 或 OVA-RCT，放血；分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 RCT 抗体的溶液，冻存储用。

优选地，制备单克隆 RCT 抗体的方法采用将小鼠接种免疫，免疫抗原为 BSA-RCT 或 OVA-RCT，采血，测定抗体效价，取脾细胞；将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合；筛选杂交瘤细胞，获得完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；在小鼠腹腔内注射杂交瘤细胞，采集腹水，经提纯后待用。

优选地，制备偶联 RCT 抗体的凝胶采用先活化凝胶；将活化后的凝胶与 RCT 抗体振荡混匀；离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体；依次用不同 pH 梯度溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液淋洗，冷藏保存备用。

优选地，包被酶标板采用将 RCT 抗体包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干。

优选地，免疫亲和层析纯化采用将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品，循环过柱，用甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱液。

优选地，酶联免疫吸附检测采用将样品洗脱液加在包被后的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；继而加入底物混合液显色；终止反应；用酶标仪读取 OD 值。

本发明还提供了一种用于所述方法的试剂盒，其特征在于它包括：

- A 试剂：标准 RCT 试剂；
- C 试剂：酶标抗原试剂；
- K 试剂：偶联 RCT 抗体的凝胶；
包被 RCT 抗体的酶标板。

优选地，所述的试剂盒还包括：

- B 试剂：稀释液；

D 试剂：酶标抗原稀释液

E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；

F 试剂：邻苯二胺试剂；

G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；

H 试剂：30% H_2O_2 ；

I 试剂：硫酸溶液；

J 试剂：甘氨酸溶液。

本发明技术方案详述如下：

1、样品前处理：

动物制品(包括肝、肺、心、肾、肌肉)称取 10g,加入 50ml 0.1mol/L HCl 进行组织匀浆，冻融两次，离心取上清，用 10mol/L NaOH 调节 pH 值到 11，再加入异丁醇 30 ml，振荡 30min，静置 4h，定量吸取异丁醇，水浴蒸干，再加入 1 ml 磷酸盐溶液 (PBS,0.01mol/L, pH7.4) 溶解析出物，冻存待测；

动物尿样，离心去除杂质后，取上清待测。

2、制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 RCT 混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点；

3、制备 RCT 抗体

将 RCT 与牛血清白蛋白 BSA 或与卵清白蛋白 OVA 偶联作为抗原，制备多克隆 RCT 抗体或单克隆 RCT 抗体；

其中制备多克隆 RCT 抗体的方法：

将 RCT 与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联或与卵清白蛋白 (OVA) 偶联制备抗原；免疫剂量每次 1mg/ml BSA-RCT 或 OVA-RCT，首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化，加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化；将新西兰白兔饲养数周后接种免疫，每次免疫间隔两周，一共免疫 5 次。在最后一次直接肌肉注射，一周后采血检测抗体效价。之后

颈动脉放血；以 30%-60%的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 RCT 抗体的溶液；-70℃保存备用。

其中制备单克隆 RCT 抗体的方法：

将 RCT 与牛血清白蛋白（BSA）偶联或与卵清白蛋白（OVA）偶联制备抗原；采用小鼠作为免疫动物，免疫抗原剂量为 50ug(0.1ml)加等体积的完全福式佐剂乳化，进行首次免疫；一月后，取同等量免疫抗原加不完全福式佐剂，乳化，进行加强免疫，二免后，十天采血，测定抗体效价，取脾细胞；将脾细胞按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合；采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；在小鼠腹腔内注射一定量的杂交瘤细胞，采集腹水，经提纯后待用。

4、制备偶联抗体的 sepharose-4B 凝胶

用溴化氰 CNBr 活化 sepharose-4B 琼脂糖凝胶；并用低浓度 HCl 溶液反复洗涤凝胶；在偶联抗体前先用磷酸缓冲液平衡 sepharose-4B 凝胶；将凝胶与适当稀释的 RCT 抗体振荡混匀，使抗体吸附到活化的 sepharose-4B 凝胶颗粒上；离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体；依次用不同 pH 溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液（加入 0.02%NaN₃）淋洗，4℃保存备用。

5、配制试剂

标准 RCT 试剂：RCT 标准品加稀释液（PBS 磷酸缓冲溶液 pH 7.4）混匀，配成梯度溶液。

酶标抗原试剂：酶标抗原加 10ml 酶标抗原稀释液（PBS 磷酸缓冲溶液，含 1%的明胶，pH 7.4）溶解，混匀。

洗涤液配制：在含有 0.1%吐温-20 的磷酸盐（PBS）固体中加入 200 ml 蒸馏水配制洗涤液，用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制：用 20 ml 醋酸钠-柠檬酸缓冲液稀释 40mg 邻苯二胺，再加入 6ul 30%H₂O₂，配制成底物混合液，现用现配。

6、包被酶标板：将 RCT 抗体（单克隆抗体或多克隆抗体）包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干；将抗体包被在酶标板上，100ul/孔，放入 4℃ 冰箱过夜。再加入洗涤液，250ul/孔，洗涤 3 次，每次 3 min；放在吸水纸上拍干。

7、取 5 ml 偶联抗体 sepharose-4B 凝胶装柱，先加入洗涤液平衡，直至流出液的 OD 280 值小于 0.5。再加入等体积待测样品溶液，4℃ 循环过柱。之后用 0.1 mol/L pH 2.5 甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱液。

8、在酶标板中加入待测样品洗脱液和 RCT 标准溶液；37℃ 温育 0.5h；之后洗涤拍干；加入 100ul 酶标抗原溶液，37℃ 温育 0.5h；洗涤拍干；每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；每孔加入 50ul 终止液（硫酸溶液）；酶标仪读取各孔 OD 值。

9、绘制标准曲线：用 RCT 标准品所获各梯度溶液 OD 值，绘制标准曲线；

10、根据标准曲线对样品洗脱液中的 RCT 含量进行定量计算。

结果判定：标准对照孔的 OD 值随着 RCT 浓度的下降而升高，将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较，若 OD 值相同则被检样品中的 RCT 含量与对应标准溶液的 RCT 浓度相同。

本发明 RCT 检测试剂盒的组建：

试剂盒包含：包被 RCT 抗体的酶标板；A 试剂：标准 RCT 试剂；B 试剂：稀释液；C 试剂：酶标抗原试剂；D 试剂：酶标抗原稀释液；E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；F 试剂：邻苯二胺试剂；G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；H 试剂：30% H_2O_2 ；I 试剂：硫酸溶液；J 试剂：甘氨酸溶液；K 试剂：偶联抗体 sepharose-4B 凝胶。

其中 RCT 抗体可以是多克隆 RCT 抗体或单克隆 RCT 抗体。

酶联免疫吸附检测法(ELISA) 是一种快速检测方法,不需要复杂的仪器设备,灵敏度高,特异性强,样品前处理简单,非常适合大量样品的检测,便于现场监控。目前已经广泛应用于各个研究领域。免疫亲

和层析纯化技术 (IAC) 是一种富集纯化物质的高效技术, IAC 与 ELISA 的结合大大的提高了检测的灵敏度。

用 ELISA 方法实现了对莱克多巴胺的检测, 该项研究填补了国内该领域的研究空白. 最后创造性将 IAC 技术与 ELISA 技术结合起来实现了莱克多巴胺的特异性检测。

使用 IAC-ELISA 检测技术对样品中的莱克多巴胺可以达到 1 ng/mL 的检测限。

本发明所述方法优点如下:

- 1、灵敏度高, 检测限低, 回收率高, 结果重复性好;
- 2、特异性强: IAC 和 ELISA 方法均建立在抗体和抗原的特异性结合, 且所得抗体交叉反应率极低;
- 3、检测成本低廉, 无需大型仪器设备, 适于推广;
- 4、样品预处理简单, 无需无菌化处理, 样品提取方便快捷;
- 5、通过酶标仪判读, 结果具有客观性和不可更改性;
- 6、简单易行, 操作人员只需最基本的实验知识, 可标准化为产品;
- 7、检测时间短, 整个操作过程不到 2.5 个小时;
- 8、可以进行大批量检测。

附图说明

图 1: 多克隆抗体检测 RCT 的标准曲线图。

图 2: 单克隆抗体检测 RCT 的标准曲线图。

具体实施方式

下面结合具体实例, 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于限制本发明的范围。

实施例 1:

1、样品前处理:

猪肉制品(包括肝、肺、心、肾、肌肉)称取 10g, 加入 50ml 0.1mol/L

HCl 进行组织匀浆，冻融两次，离心取上清，用 10mol/L NaOH 调节 pH 值到 11，再加入异丁醇 30 ml，振荡 30min，静置 4h，定量吸取异丁醇，水浴蒸干，再加入 1 ml 磷酸盐溶液（PBS,0.01mol/L, pH7.4）溶解析出物，冻存待测；

猪尿样，离心去除杂质后，取上清待测。

2、制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 RCT 混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点；

3、制备 RCT 抗体

将 RCT 与牛血清白蛋白 BSA 偶联制备抗原；免疫剂量每次 1mg/ml BSA-RCT，首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化，加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化；将新西兰白兔饲养数周后接种免疫，每次免疫间隔两周，一共免疫 5 次。在最后一次直接肌肉注射，一周后采血检测抗体效价。之后颈动脉放血；以 30%-60%的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 RCT 抗体的溶液；-70℃保存备用。

4、制备偶联抗体的 sepharose-4B 凝胶

用 CNBr 活化 sepharose-4B 凝胶；并用低浓度 HCl 溶液反复洗涤凝胶；在偶联抗体前先用磷酸缓冲液平衡 sepharose-4B 凝胶；将凝胶与适当稀释的多克隆 RCT 抗体振荡混匀，使抗体吸附到活化的 sepharose-4B 凝胶颗粒上；离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体；依次用不同 pH 溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液（加入 0.02%NaN₃）淋洗，4℃保存备用。

5、配制试剂

标准 RCT 试剂：RCT 标准品加稀释液（PBS 磷酸缓冲溶液，pH 7.4）混匀，配成梯度溶液。

酶标抗原试剂：酶标抗原加 10ml 酶标抗原稀释液（PBS 磷酸缓

冲溶液,含 1%的明胶, pH 7.4) 溶解, 混匀。

洗涤液配制: 在含有 0.1%吐温-20 的磷酸盐 (PBS) 固体中加入 200 ml 蒸馏水配制洗涤液, 用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制: 用 20 ml 醋酸钠-柠檬酸缓冲液稀释 40mg 邻苯二胺, 再加入 6ul 30% H_2O_2 , 配制成底物混合液, 现用现配。

6、包被酶标板: 将 RCT 多克隆抗体包被在酶标板上, 冷藏过夜; 洗涤拍干; 将抗体包被在酶标板上, 100ul/孔, 放入 4℃ 冰箱过夜。再加入洗涤液, 250ul/孔, 洗涤 3 次, 每次 3 min; 放在吸水纸上拍干。

7、取 5 ml 偶联抗体 sepharose-4B 凝胶装柱, 先加入洗涤液平衡, 直至流出液的 OD 280 值小于 0.5。再加入等体积待测样品溶液, 4℃ 循环过柱。之后用 0.1 mol/L pH 2.5 甘氨酸溶液洗脱, 收集洗脱液。

8、在酶标板中加入待测样品洗脱液和 RCT 标准溶液; 37℃ 温育 0.5h; 之后洗涤拍干; 加入 100ul 酶标抗原溶液, 37℃ 温育 0.5h; 洗涤拍干; 每孔加入 150ul 底物混合液, 室温显色 15min; 每孔加入 50ul 终止液 (硫酸溶液); 酶标仪读取各孔 OD 值。

9、绘制标准曲线: 用 RCT 标准品所获各梯度溶液 OD 值, 绘制标准曲线; 结果见图 1。

10、根据标准曲线对样品洗脱液中的 RCT 含量进行定量计算。

结果判定: 标准对照孔的 OD 值随着 RCT 浓度的下降而升高, 将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较, 若 OD 值相同则被检样品中的 RCT 含量与对应标准溶液的 RCT 浓度相同, 检测结果如下:

样品	肌肉	肝	肾	尿
检测结果 (ng/mL)	5.4	8.7	7.5	4.8

实施例 2:

RCT 检测试剂盒的组建:

试剂盒包含: 包被单克隆 RCT 抗体的酶标板; A 试剂: 标准 RCT 试剂; B 试剂: 稀释液; C 试剂: 酶标抗原试剂; D 试剂: 酶标抗原稀释液; E 试剂: 含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体; F 试剂: 邻苯二胺试剂; G 试剂: 醋酸钠-柠檬酸缓冲液; H 试剂: 30% H_2O_2); I 试剂: 硫酸溶液; J 试剂: 甘氨酸溶液; K 试剂: 偶联单克隆 RCT 抗体的 sepharose-4B 凝胶。

实施例 3:

RCT 检测试剂盒的组建:

试剂盒包含: 包被多克隆 RCT 抗体的酶标板; A 试剂: 标准 RCT 试剂; B 试剂: 稀释液; C 试剂: 酶标抗原试剂; D 试剂: 酶标抗原稀释液; E 试剂: 含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体; F 试剂: 邻苯二胺试剂; G 试剂: 醋酸钠-柠檬酸缓冲液; H 试剂: 30% H_2O_2); I 试剂: 硫酸溶液; J 试剂: 甘氨酸溶液; K 试剂: 偶联多克隆 RCT 抗体的 sepharose-4B 凝胶。

实施例 4: 应用实施例 2 试剂盒检测

以猪肉制品和猪尿样 RCT 的检测为例, 说明试剂盒的具体检测步骤。

1、 样品前处理:

称取猪肉制品(包括肝, 肺, 心, 肾, 肌肉) 10g, 加入 50ml, 0.1mol/L HCl 进行组织匀浆, 冻融两次, 离心取上清, 用 10mol/L NaOH 调节 pH 值到 11, 再加入异丁醇 30 ml, 振荡 30min, 静置 4h, 定量吸取异丁醇, 水浴蒸干, 再加入 1 ml 磷酸盐溶液 (PBS, 0.01mol/L, pH7.4) 溶解析出物, 冻存待测。

猪尿样, 离心去除杂质后, 取上清待测。

2、 试剂的配制

标准 RCT 试剂: A 试剂加 B 试剂混匀, 配成梯度溶液。

酶标抗原试剂：C 试剂加 10ml D 试剂溶解，混匀。

E 洗涤液配制：在 E 试剂中加入 200 ml 蒸馏水配制 E 洗涤液，用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制：用 20 ml G 试剂稀释 40mg F 试剂，再加入 6ul H 试剂，配制成底物混合液，现用现配。

3、取 5 ml K 试剂装柱，先加入 E 洗涤液平衡，直至流出液的 OD₂₈₀ 值小于 0.5。再加入等体积待测样品溶液，4℃循环过柱。之后用 J 试剂洗脱，收集洗脱液。

4、在包被单克隆 RCT 抗体的酶标板中加入待测样品洗脱液和 RCT 标准溶液；37℃温育 0.5h；之后洗涤拍干。

酶标板，第 1 排标准对照，在前 11 孔加入 RCT 梯度溶液，加入量 100ul，第 12 孔加入空白对照。其余各孔则加入待测的样品洗脱液，加入量 100ul。

5、加入 100ul 酶标抗原溶液，37℃温育 0.5h；洗涤拍干；每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；每孔加入 50ul I 试剂终止；酶标仪读取各孔 OD 值。

6、绘制标准曲线：用 RCT 标准品所获各梯度溶液 OD 值，绘制标准曲线；此方法的检测限为 0.2ng/mL。结果如图 2。

7、根据标准曲线对样品洗脱液中的 RCT 含量进行定量计算。

结果判定：标准对照孔的 OD 值随着 RCT 浓度的下降而升高，第 12 孔 OD 值应最高；将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较，若 OD 值相同则被检样品中的 RCT 含量与对应标准溶液的 RCT 浓度相同，检测结果如下：

样品	肌肉	肝	肾	尿
检测结果 (ng/mL)	5.8	9.1	7.9	5.2

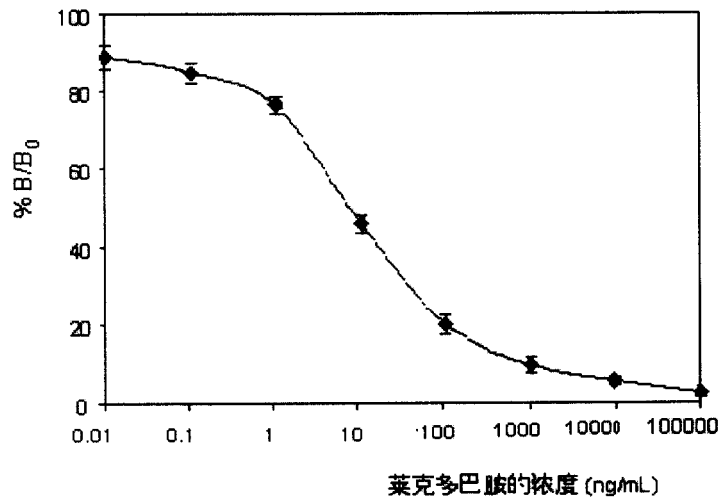


图 1

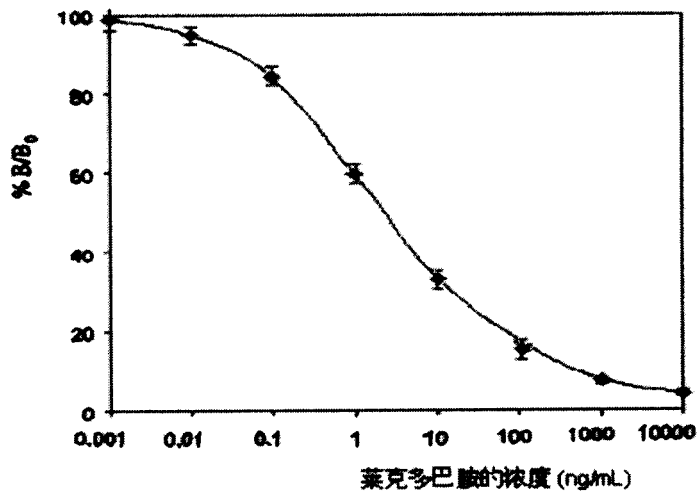


图 2

专利名称(译)	莱克多巴胺的亲和层析 - 酶联免疫检测方法及其专用试剂盒		
公开(公告)号	CN1687783A	公开(公告)日	2005-10-26
申请号	CN200510071059.0	申请日	2005-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	黄昆仑 许文涛 邓爱科 罗云波		
发明人	黄昆仑 许文涛 邓爱科 罗云波		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种莱克多巴胺RCT的检测方法，更确切地说它是利用免疫亲和层析柱及酶联免疫吸附方法来检测食品中的莱克多巴胺残留，属于免疫学和食品安全检测技术领域。本发明的方法是：首先通过合成免疫抗原，包被抗原，动物免疫，抗体纯化等步骤制备多克隆抗体，再将此抗体交联到琼脂糖凝胶上，制备免疫亲和层析柱。被检样品经处理后，通过亲和柱以富集其中的莱克多巴胺；收集亲和柱的洗脱液进行酶联免疫吸附检测，以确定其中的莱克多巴胺含量。

