



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107884567 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201711296696.7

(22)申请日 2017.12.08

(71)申请人 广州源起健康科技有限公司
地址 510530 广东省广州市广州高新技术
产业开发区瑞泰路2号

(72)发明人 李根平

(74)专利代理机构 广州市深研专利事务所
44229

代理人 姜若天

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

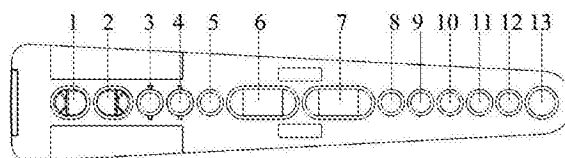
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测克伦特罗的磁珠时间分辨荧光免疫试剂盒,该试剂盒由BSA-CBL包被磁珠、荧光物质标记CBL抗体、洗涤液、增强液和克伦特罗标准品溶液组成。本试剂盒的灵敏度可以达到0.1ppb,精密度高,与克伦特罗结构和功能类似物无交叉反应。本发明所述的定量检测克伦特罗磁珠时间分辨荧光免疫试剂盒与胶体金免疫层析法、荧光免疫层析法等方法相比,具有灵敏度高,更准确的优点;相比HPLC、GC/MS、ELISA检测时间短,价格低廉、可以实现大量样本现场检测。



1. 一种磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于包括BSA-CBL包被磁珠、荧光物质标记CBL抗体、洗涤液、增强液和克伦特罗标准品溶液。

2. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的BSA-CBL包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μ m的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,所述磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种。

3. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的荧光物质为镧系螯合物;荧光物质的激发波长为300~350nm,发射波长为500~650nm。

4. 如权利要求3所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的荧光物质为由铈、钐、铽或镱组成的螯合物。

5. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的洗涤液配方为:0.08~0.12% Tween-20,0.05% ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液。

6. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的增强液配方为:0.03%乙酸钠、0.0001~0.0005% β -NTA、0.0024% TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

7. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的克伦特罗标准品溶液共6瓶,浓度分别为0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L、8.1 μ g/L。

8. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的BSA-CBL包被磁珠的制备方法:将羧基磁珠放到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入30 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和30 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应0.5~1小时;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入BSA-CBL,室温持续旋转孵育30~240分钟;将磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有1%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联BSA-CBL的活化羧基位点,反应30~60min;将磁珠置于磁力架上,弃上清,加入100 μ L免疫磁珠保存液。

9. 如权利要求1所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的免疫磁珠保存液为含5%BSA,5%蔗糖,0.1%Tween-20和0.1%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

10. 如权利要求4所述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,其特征在于,所述的荧光物质标记CBL抗体铈标抗体的制备方法为:将CBL单克隆抗体置于30KD超滤离心管,离心,弃去滤液;加入标记缓冲液,离心,弃去滤液,重复此操作4~5次;将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体,加入标记缓冲液,静置,再将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体;按照质量比铈螯合物DTPA-Eu=5:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应;用SepHadexTM G-50葡聚糖凝胶柱纯化铈标CBL抗体,然后加入铈标抗体保存剂,使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,储存备用;

或者所述的荧光物质标记CBL抗体钐标抗体的制备方法为:取出CBL单克隆抗体置于

30KD超滤离心管,离心,弃去滤液;加入标记缓冲液,离心,弃去滤液;重复此操作4~5次;将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体;按照质量比抗体:钐螯合物=4:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~20小时;用SepHdex™ G-50葡聚糖凝胶柱纯化钐标CBL抗体,然后加入钐标抗体保存剂,使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,储存备用。

一种磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及食品安全检测领域,具体地说,本发明涉及一种磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗的试剂盒。

[0003]

背景技术

[0004] 克伦特罗(Clenbuterol, CBL)是一种 β -肾上腺素受体激动剂,主要以盐酸盐形式存在,在饲料中添加克伦特罗,可促进动物生长,抑制脂肪沉积、提高蛋白质含量、增加酮体瘦肉率、改善肉质等作用。因此,近年来在经济利益的驱使下,不法分子将大量克伦特罗用于畜牧业和养殖业。人体摄入过多的CBL会导致一系列不良反应,主要有肌肉震颤、心跳和呼吸加快等,严重的会危及生命。鉴于此,许多国家已经禁止将克伦特罗作为饲料及饲料添加剂使用,我国农业部也于2002年明确将其列入《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》,并规定在动物性食品中不得检出CBL。

[0005] 目前克伦特罗的检测方法主要有5种:气相色谱-质谱联用法(GC/MS),高效液相色谱法(HPLC),酶联免疫分析法,胶体金免疫层析法、荧光免疫层析法;GC/MS可用于饲料、血液、组织中盐酸克伦特罗的分析,检测限为0.5 ppb,与高效液相色谱法相比,检测灵敏度更高,假阳性率更低。因此,中国、欧盟及美国等国家将气相色谱-质谱联用法定为检测盐酸克伦特罗的确证性方法。HPLC具有检测精确度高、假阳性率低的特点,其最低检测限为1~15ppb,国内已将高效液相色谱法作为检测盐酸克伦特罗残留的半确证性方法。前述两种检测方法缺点是检测过程烦琐、检测时间长,需贵重仪器、难于操作、价格昂贵。酶联免疫法具有检测准确、灵敏度高、仪器设备简单等优点,但检测时间长、操作烦琐不能实现现场快速检测。胶体金和荧光免疫层析试剂具有操作简便、快速、试剂安全、不需要特殊仪器和设备等优点,但存在准确度不高,灵敏度低等缺点。

[0006]

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服上述技术缺陷,提供一种成本低廉、操作简单、准确、灵敏的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

一种磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,包括BSA-CBL包被磁珠、荧光物质标记CBL抗体、洗涤液、增强液和克伦特罗标准品溶液。

[0009] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的BSA-CBL包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μ m的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,所述磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种。

[0010] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的荧光物质为镧系螯合物。所述的荧光物质为由铕(Eu^{3+})、钐(Sm^{3+})、铽(Tb^{3+})或镝(Dy^{3+})等稀土元素组成的螯合物。所述荧光物质的激发波长为300~350nm,发射波长为500~650nm。

[0011] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的洗涤液配方为:0.08~1.2% Tween-20,0.05% ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液。

[0012] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的增强液配方为:0.03%乙酸钠、0.0001~0.0005% β -NTA、0.0024% TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

[0013] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的克伦特罗标准品溶液共6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 $\mu\text{g/L}$ 。

[0014] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的BSA-CBL包被磁珠的制备方法:将羧基磁珠放到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入30 μL 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和30 μL 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应0.5~1小时;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入BSA-CBL,室温持续旋转孵育30~240分钟;将磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有1%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联BSA-CBL的活化羧基位点,反应30~60min;将磁珠置于磁力架上,弃上清,加入100 μL 免疫磁珠保存液。

[0015] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的免疫磁珠保存液为含5%BSA,5%蔗糖,0.1%Tween-20和0.1%聚乙烯吡咯烷酮的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0016] 在上述的磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒中,所述的荧光物质标记CBL抗体之铕标抗体制备方法为:将CBL单克隆抗体置于30KD超滤离心管,离心,弃去滤液;加入标记缓冲液,离心,弃去滤液,重复此操作4~5次;将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体,加入标记缓冲液,静置,再将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体;按照质量比CBL单克隆抗体:铕螯合物DTTA-Eu=5:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~20小时;用SepHadexTM G-50葡聚糖凝胶柱纯化铕标CBL抗体,然后加入铕标抗体保存剂,使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μm 滤膜过滤,储存备用;

或者所述的荧光物质标记CBL抗体之钐标抗体的制备方法为:取出CBL单克隆抗体置于30KD超滤离心管,离心,弃去滤液;加入标记缓冲液,离心,弃去滤液;重复此操作4~5次;将离心管滤膜反转,离心,收集浓缩的抗体;按照质量比抗体:钐螯合物=4:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~20小时;用SepHadexTM G-50葡聚糖凝胶柱纯化钐标CBL抗体,然后加入钐标抗体保存剂,使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μm 滤膜过滤,储存备用。

[0017] 本发明所述的检测克伦特罗试剂盒的检测原理为竞争法,试剂条的反应孔中预装有BSA-CBL免疫磁珠,测试时,先将待测样本(尿液或提取液)或标准品加到试剂的反应孔中,再加入荧光物质标记的克伦特罗单克隆抗体。经过室温孵育,待测样本中的克伦特罗与磁珠包被的BSA-CBL竞争结合荧光物质标记的克伦特罗单抗。洗涤后,没有与标记抗体结合

的待测样品中的克伦特罗被洗去,再加入增强液,在激发光的作用下,荧光物质发射一定波长的光信号,被免疫荧光检测仪识别,样本中CBL越多,磁珠包被的BSA-CBL结合的荧光物质标记的克伦特罗单抗越少,由于荧光信号强度与样本中克伦特罗浓度成反比关系,将克伦特罗浓度与荧光信号值拟合剂量-反应曲线,即可按此测值得到未知样本中克伦特罗的浓度。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

(1)包被粒径均匀、磁性强的磁珠代替传统的ELISA板式反应和层析法的物理吸附反应方式,因磁珠具有更大的结合面积与能在液相中分散而充分反应,大大提高检测范围,缩短反应时间,提高灵敏度,有望对动物源食品中克伦特罗的残留检测发挥重要作用。由于磁珠与抗原或抗体为共价偶联,克服了物理吸附的不稳定性,因此免疫磁珠保存时间久且更稳定。

[0019] (2)采用时间分辨荧光免疫分析技术,采用镧系螯合物铕、铽、钐、镱作为标记物,其具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱,有利于降低本底,提高灵敏度;紫外光激发具有较高量子产率、较大Stokes位移,避免激发光谱和荧光发射光谱以及生物基质发射的光谱重合,荧光衰变时间长等优点,比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0020] (3)配套全自动检测仪器,实现现场自动化操作,可同时检测一份或多份样本,操作简便快速(20分钟即可出结果)、价格低廉。

[0021]

附图说明

[0022] 图1是磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒利用试剂条进行检测,试剂条结构的俯视示意图。

[0023] 图2是磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒利用试剂条进行检测,试剂条结构的示意图。

[0024] 1、测试孔1,2、测试孔2,3、标记物1,4、标记物2,5、标记物稀释液,6、洗液,7、洗液,8、样本稀释液1,9、样本稀释液2,12、增强液,10、11、13均为预备孔。

[0025]

具体实施方式

[0026] 本发明的BSA-CBL包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μm 的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠有羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠等其中的一种或几种。

[0027] 本发明所述的荧光物质为镧系螯合物,主要有铕(Eu^{3+})、钐(Sm^{3+})、铽(Tb^{3+})、镱(Dy^{3+})等稀土元素组成的螯合物。

[0028] 本发明中所采用的CBL抗体为常规单克隆抗体技术制备的单抗,所采用的BSA-CBL是利用常规化学方法合成得到。

[0029] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0030] 实施例1

磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,包括BSA-CBL包被磁珠、荧光物质标记CBL抗体、洗涤液、增强液和克伦特罗标准品溶液。

[0031] 将试剂盒采用试剂条来进行检测,试剂条由测试孔1(BSA-CBL包被羧基磁珠)、标记物孔3(钕标CBL抗体)、洗液孔6与7、增强液孔12组成;试剂条的结构如图1和图2所示。

[0032] 该磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒的制备过程如下,其中

(1)BSA-CBL包被磁珠的制备:

①洗涤磁珠

吸取1mg 直径1 μ m羧基磁珠到1.5mI离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1mI 0.05M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)洗涤磁珠3~5次。

[0033] ②磁珠活化

向上述洗涤好的磁珠中加入1mI 0.05M pH6.0的MES,加入30 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液(EDC)和30 μ L 50mg/mI N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温震荡反应0.5~1小时。

[0034] ③BSA-CBL与磁珠的偶联

上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入0.05~1mg BSA-CBL,室温持续旋转孵育30~240分钟,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度。

[0035] ④封闭

上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠。加入含有1%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联BSA-CBL的活化羧基位点,反应30~60min。

[0036] ⑤储存

上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入100 μ L免疫磁珠保存液。

[0037] 所述的保存液为含5%(w/v) BSA,5% (w/v)蔗糖,0.1%(v/v) Tween-20和0.1% (w/v)聚乙烯吡咯烷酮的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0038] 将上述制备好的免疫磁珠稀释,使BSA-CBL的终浓度为0.0025~0.0080g/L,分装至试剂条第1孔(测试孔1)中。

[0039] (2)钕标抗体的制备方法:

①钕标记抗体的合成

A.取出0.5mg CBL单克隆抗体置于30KD超滤离心管,8000rpm离心6min,弃去滤液。

[0040] B.加入标记缓冲液(0.1M pH9.0碳酸盐缓冲液)200 μ L,8000rpm离心6min,弃去滤液。重复此操作4~5次。

[0041] C.将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的抗体。加入100 μ L标记缓冲液,静置3~5min,再将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的抗体。

[0042] D.按照质量比抗体:钕螯合物DTPA-Eu=5:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~20小时。

[0043] ②钕标记抗体的纯化

用SepHadex TM G-50葡聚糖凝胶柱纯化钕标CBL抗体,然后加入钕标抗体保存剂(10%(w/v)BSA+5%(w/v)ProcIn300),使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22 μ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C储存备用。

[0044] 将上述制备好的钋标CBL抗体按一定比例稀释,使钋标CBL的终浓度为0.005~0.010g/L,分装至试剂条第3孔(标记物1)中。

[0045] 所述的荧光物质钋的激发波长为340nm,发射波长为615nm。

[0046] (3)洗涤液的制备方法:

配制含有0.8~1.2%(v/v) Tween-20,0.05%(v/v) ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液,将配制好的溶液以900 μ L/孔分装至洗液孔6和7中。

[0047] (4)增强液的制备方法:

配制含有0.03%(w/v) 乙酸钠、0.0001~0.0005%(w/v) β -NTA、0.0024% (w/v) TOPO、0.08%(v/v) 醋酸、0.1%(v/v) 无水乙醇、0.05%(v/v) 的Triton X-100的水溶液。将配制好的溶液以300 μ L/孔分装至试剂条第12孔(增强液孔)。

[0048] (5)克伦特罗标准品溶液制备方法:

所述的克伦特罗标准品溶液共6瓶,浓度分别为0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L、8.1 μ g/L。

[0049]

实施例2

磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒,包括BSA-CBL包被磁珠、荧光物质标记CBL抗体、洗涤液、增强液和克伦特罗标准品溶液。

[0050] 将试剂盒采用试剂条来进行检测,试剂条由第2孔(测试孔2)(BSA-CBL包被氨基磁珠)、第4孔(标记物孔4)(钋标CBL抗体)、洗涤液孔6与7、增强液孔组成,如图1和图2所示。

[0051] 该磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒的制备过程如下,其中

(1)BSA-CBL包被磁珠的制备:

①洗涤磁珠

吸取1mg 2 μ m氨基磁珠到1.5mL离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1mL 0.01M pH6.0的吡啶洗涤磁珠3~5次。

[0052] ②磁珠活化

在上述洗涤好的磁珠中加入1mL 0.01M pH6.0的吡啶,重悬磁珠,加入100 μ L 25%戊二醛溶液,室温震荡反应2~3小时。

[0053] ③BSA-CBL与磁珠的偶联

上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入1mL pH10.0 碳酸盐缓冲液,重悬磁珠,再加入0.05~1mg BSA-CBL,室温持续旋转孵育16~20小时,反应时间取决于配位基与浓度。

[0054] ④封闭

然后置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠。加入0.1M pH 8.0的甘氨酸缓冲液,封闭未偶联BSA-CBL的活化氨基位点,反应30~60min。

[0055] ⑤储存

上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入100 μ L免疫磁珠保存液。

[0056] 所述的保存液为含8% BSA,5% 海藻糖和0.1% Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0057] 将上述制备好的免疫磁珠按一定比例稀释,使BSA-CBL的终浓度为0.005g/L分装

至试剂条第2孔(测试孔2)中。

[0058] (2) 钐标抗体的制备方法如下:

①钐标记抗体的合成

A. 取出0.4mg CBL单克隆抗体置于30KD超滤离心管,8000rpm离心6min,弃去滤液。

[0059] B. 加入标记缓冲液(0.1M PH9.0碳酸盐缓冲液)200uI,8000rpm离心6min,弃去滤液。重复此操作4~5次。

[0060] C. 将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的抗体。

[0061] D. 按照质量比抗体:钐螯合物=4:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~20小时。

[0062] ②钐标记抗体的纯化

用SepHadex TM G-50葡聚糖凝胶柱纯化钐标CBL抗体,然后加入钐标抗体保存剂(8%BSA+5%ProcIn300),使BSA和ProcIn300终浓度为0.2%,经0.22μm滤膜过滤,4℃储存备用。

[0063] 将上述制备好的钐标CBL抗体按一定比例稀释,分装至试剂条第4孔(标记物2)中。

[0064] 所述的荧光物质钐的激发波长为340nm,发射波长为640nm。

[0065] (3) 洗涤液的制备方法:

配制含有0.8~1.2%(v/v) Tween-20,0.05%(v/v) ProcIn300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-HCl缓冲液,将配制好的溶液以900μL/孔分装至洗液孔6和7中。

[0066] (4) 增强液的制备方法:

配制含有0.06%(w/v) 乙酸钠、0.0001~0.0005%(w/v) β-NTA、0.0024% (w/v) TOPO、0.09%(v/v) 醋酸、0.1%(v/v) 无水乙醇、0.05%(v/v) 的Triton X-100的水溶液。将配制好的溶液以300μL/孔分装至试剂条第12孔(增强液孔)。

[0067] (5) 克伦特罗标准品溶液制备方法:

所述的克伦特罗标准品溶液共6瓶,浓度分别为0μg/L、0.1μg/L、0.3μg/L、0.9μg/L、2.7μg/L、8.1μg/L。

[0068] 实施例3 试剂条的制作与检测

本实施例中的试剂条,半成品通过以下工序组装而成:在第1或2、3或4、6、7、12分别分装50μLBSA-CBL包被磁珠、200μL钐标记物、900μL洗液、900μL洗液、300μL增强液,然后用封膜机封口,所述的封板膜上涂有可供全自动荧光检测分析仪扫描识别的产品信息标识包括企业标准曲线、批次、生产日期、有效期。成品试剂条、分装好的克伦特罗标准溶液与其他配件组装成试剂盒。

[0069] 样本检测:

①加样

将待测样本或者克伦特罗标准品放入全自动仪器的装载系统,将试剂条插入试剂条卡槽,仪器自动识别封板膜的产品信息。在试剂条1或2中加入100μL待测样本或标准品,然后加入荧光标记物100μL。

[0070] ②孵育

加样完成后37℃震荡孵育15min。

[0071] ③洗涤

孵育完成后,仪器自动洗孔5次,每次洗液200μL/孔。

[0072] ④加入增强液

洗涤完成后,加入增强液100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育3min。

[0073] ⑤检测

试剂条被推入暗室,仪器自动检测并出结果。

[0074]

实施例4 本发明的试剂盒的特异性实验

以克伦特罗作为标准,设克伦特罗的交叉反应率为100%,用于试剂盒交叉反应性研究的药物均为与克伦特罗结构或者功能相似的竞争药物:沙丁胺醇、莱克多巴胺、西马特罗、氯丙那林、妥布特罗、喷布特罗、硫酸特布他林。在待测样品中分别添加上述8种药物(包括克伦特罗)浓度为6 μ g/L,按试剂盒步骤操作,检测结果列于表1。从表1可以看出,本试剂盒对克伦特罗具有较高的特异性,对与克伦特罗结构或者功能相似的竞争药物均无交叉反应。

[0075]

表1试剂盒特异性实验

药物名称	交叉反应率
克伦特罗	100%
沙丁胺醇	0
莱克多巴胺	0
西马特罗	0
氯丙那林	0
妥布特罗	0
喷布特罗	0
硫酸特布他林	0

用来测试试剂条的全自动磁珠时间分辨荧光免疫分析仪包含样本装载系统、条码读取系统、加样系统、温育系统、荧光光源检测系统及自动软件分析控制系统。

[0076] 本发明所述的磁珠时间分辨荧光免疫检测试剂盒,检测样本时只需将试剂条插入全自动仪器中,仪器自动完成加样、孵育、磁分离、检测过程,全程只需要20min即可以读取检测报告。

[0077] 本发明检测尿样或者组织提取液,其灵敏度可以达到0.1ppb,变异系数在5%以内,比胶体金、荧光免疫层析试剂灵敏度更高,更准确。相比HPLC、GC/MS、ELISA检测时间短,价格低廉、可以实现大量样本现场检测。

[0078] 实施例5

为了更好的说明本发明的有益效果,下面给出采用本发明提供的检测试剂与GC/MS、HPLC、酶联免疫分析法、胶体金法、普通荧光免疫层析法在检测克伦特罗时的结果对比如下表2:

表2不同克伦特罗检测方法性能比较

检测方法	所需仪器	检测时间	灵敏度	精密度
GC/MS	气相色谱-质谱联用仪	3~4小时	0.5ppb	变异系数 \leq 20%
HPLC	高效液相色谱仪	3~4小时	0.5ppb	变异系数 \leq 20%
酶联免疫分析法	酶标仪	2小时	0.3ppb	变异系数 \leq 15%

胶体金法	肉眼或胶体金读卡仪	10~20分钟	1ppb	变异系数 \leq 20%
普通荧光免疫层析法	荧光读卡仪	15~20分钟	0.3ppb	变异系数 \leq 15%
本发明试剂盒提供的方法	全自动时间分辨荧光免疫分析仪	20分钟	0.1ppb	变异系数 \leq 5%

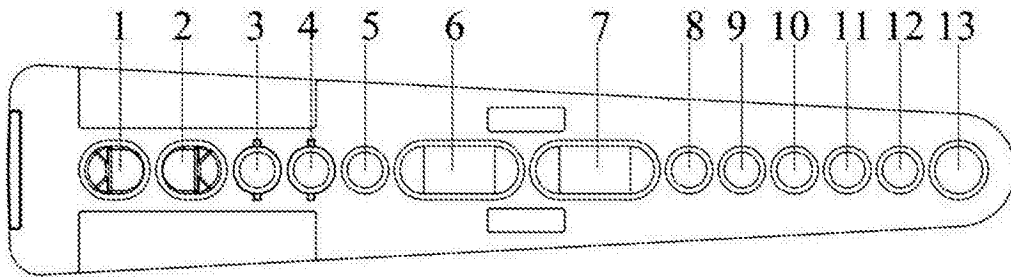


图1

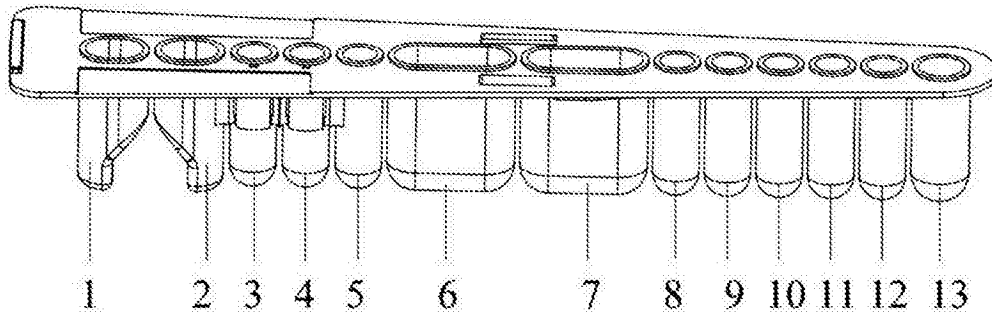


图2

专利名称(译)	一种磁珠时间分辨荧光免疫定量检测克伦特罗试剂盒		
公开(公告)号	CN107884567A	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN2017111296696.7	申请日	2017-12-08
[标]发明人	李根平		
发明人	李根平		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/577		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测克伦特罗的磁珠时间分辨荧光免疫试剂盒，该试剂盒由BSA-CBL包被磁珠、荧光物质标记CBL抗体、洗涤液、增强液和克伦特罗标准品溶液组成。本试剂盒的灵敏度可以达到0.1ppb，精密度高，与克伦特罗结构和功能类似物无交叉反应。本发明所述的定量检测克伦特罗磁珠时间分辨荧光免疫试剂盒与胶体金免疫层析法、荧光免疫层析法等方法相比，具有灵敏度高，更准确的优点；相比HPLC、GC/MS、ELISA检测时间短，价格低廉、可以实现大量样本现场检测。

