



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808921 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201210438110. 7

(22) 申请日 2012. 11. 06

(71) 申请人 江苏维赛科技生物发展有限公司

地址 212009 江苏省镇江市丁卯经十五路国家科技核心区 99 号 B11 栋 3 层

(72) 发明人 杜道林 洪霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

G01N 1/28 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒及其使用方法,属于酶联免疫吸附分析方法技术领域。所述试剂盒包括:包被齐帕特罗抗原的酶标板、齐帕特罗标准品工作液、齐帕特罗抗体工作液、齐帕特罗酶标二抗工作液、底物液、终止液、浓缩洗涤液和浓缩样品稀释液。本发明的试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)方法,标准品或待测样本残留的齐帕特罗和酶标板上预包被的抗原共同竞争齐帕特罗抗体。该方法可以用于直接检测动物源性食品、尿样、动物组织和血清样品中的齐帕特罗,具有方便、快速、灵敏等特点,适用于大批量样品检测,本试剂盒灵敏度 0.1ng/mL。

1. 一种检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒,其特征在于包括酶标板 96 孔、齐帕特罗标准品工作液、齐帕特罗抗体工作液、齐帕特罗酶标二抗工作液、底物液、终止液、浓缩洗涤液和浓缩样品稀释液;

其中,所述酶标板是包被齐帕特罗抗原的酶标板,齐帕特罗抗原是用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液稀释成 1:8000 比例,100  $\mu\text{L}$ /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ ,2h,取出 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜;取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300  $\mu\text{L}$ /孔,洗板 3 次,1min/次;然后加入 0.5% BSA 封闭,150  $\mu\text{L}$ /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2h;取出酶标板甩掉板内液体,用洁净的毛巾包裹后拍干板内残留液体;将拍干后的酶标板整齐地摆放置 GMP 车间恒温 25 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;抽检要求板内孔与孔之间,板间的 OD 值变异系数均小于 10%;检验合格后将酶标板密封后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

其中,所述齐帕特罗标准品的浓度分别为 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL;

其中,所述齐帕特罗抗体工作液是用抗体稀释液稀释成 1:10000 比例;

所述齐帕特罗酶标二抗工作液是用酶标二抗稀释液稀释成 1:2000 比例;

所述底物液包含 0.05 mol/L 的  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mol/L 的一水柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、0.2 mmol/L 的 3,3,5,5-四甲基联苯胺-、0.5 mmol/L 的过氧化氢脲和 5% 的 N,N-二甲基甲酰胺;

所述终止液是 2 mol/L 的硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );

所述浓缩洗涤液是 20 倍浓缩洗涤液,其包含 0.05% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间;

所述浓缩样品稀释液是 2 倍浓缩稀释液,其成分为 0.01 mol/L, pH7.4 磷酸盐 PBS 缓冲液。

2. 权利要求 1 所述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,氮气吹干并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被齐帕特罗抗原的酶标板,加标准品/样本 50  $\mu\text{L}$ /孔到对应的微孔中;

(4) 加入齐帕特罗抗体工作液,50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu\text{L}$ /孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,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;

(6) 加入齐帕特罗酶标二抗 100  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min,取出重复洗板步骤(5);

(7) 加入底物液 100  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 15 ~ 20 min;

(8) 加入终止液 50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值,在 5min 内读完数据;

(9) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中齐帕特罗的含量。

3. 根据权利要求 2 所述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于其中在步骤(3)中,齐帕特罗标准品和处理好的样品同时添加到对应微孔中。

4. 根据权利要求 2 所述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于其中所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

尿样取待检尿样,若样品比较混浊时,可 5000 r/min 以上,离心 5 min 或过滤。

5. 根据权利要求 2 所述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于其中所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

血清取待检血清样,若样品比较混浊时,可 5000 r/min 以上,离心 5 min 或过滤。

6. 根据权利要求 2 所述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于其中所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

对于猪肉、猪肝

准确称取  $2.0 \pm 0.05$  g 匀浆样品至 50 mL 离心管中;

(1) 先加入 3% 三氯乙酸 4 mL,用涡旋仪涡动至均匀后再加入 2mL 乙腈并充分振荡摇匀;

(2) 4000 r/min 离心 10 min;

(3) 取上清液 3mL 至另一离心管中,向其内加入 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 400  $\mu\text{L}$ ,并混匀调节 pH 值至  $9.8 \pm 0.2$ ;

(4) 加入 5 mL 乙酸乙酯,振荡 30 s,4000 r/min 离心 5~10 min;取 3 mL 上层液体于  $50 \sim 60^\circ\text{C}$  氮气流下吹干;

(5) 加入 1 mL 稀释后的样品稀释液并充分振荡摇匀;

(6) 取 50  $\mu\text{L}$  用于分析。

7. 根据权利要求 6 所述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于其中的样品稀释液用去离子水将齐帕特罗浓缩样品稀释液按 1:1 体积比进行稀释,即:1 份齐帕特罗浓缩样品稀释液 +1 份去离子水。

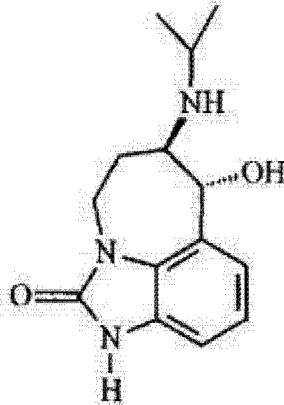
## 检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种检测动物组织及其代谢物中齐帕特罗的酶联免疫试剂盒及其检测方法,属于酶联免疫吸附分析方法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)技术领域。本发明涉及用于检测动物源食品、血液及尿液中残留的齐帕特罗的含量的酶联免疫试剂盒及使用该试剂盒的检测方法。

### 背景技术

[0002]  $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂能增加肌肉/脂肪比,此类物质被用于动物养殖中时,可明显提高饲养动物瘦肉率。但大量使用或长期超量使用,且不遵守安全停药期,则会在饲养动物组织中蓄积,人食用了这种动物组织后会引起中毒甚至死亡,因此很多国家和国际组织已经禁止这类化合物用于食品动物饲养。齐帕特罗(Zilpaterol)是一种新型 $\beta_2$ -肾上腺素能激动剂,其化学结构(见式1)与常见的苯胺类-肾上腺素类激动剂(克仑特罗和沙丁胺醇)和苯酚类 $\beta$ -肾上腺素类激动剂(莱克多巴胺)是完全不同的,它的作用效果相当于克仑特罗的十分之一,但比莱克多巴胺更有效。在墨西哥和南非齐帕特罗被允许作为宰杀期牛的饲料添加剂使用,但是在欧盟被明令禁止使用。



[0003] 式 1 齐帕特罗的化学结构

目前,欧盟国家对齐帕特罗使用和动物组织中残留方面的研究较多实验方法涉及气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱-串联质谱法等。气质联用法均需要对样品进行衍生,操作步骤多,实验时间长,而高效液相色谱-串联质谱法对仪器设备要求高,通常需要利用氘代内标物质,实验步骤较复杂。因此,建立一种简单、快速、准确、可靠的检测方法,对齐帕特罗的使用进行监控是非常必要的。本发明的目的是研制一种更适合企业进行现场检测且快捷简便、成本低廉的定性检测方法。

[0004] 现有技术对于齐帕特罗的检测主要是高效液相色谱-串联质谱法、高效液相色谱法等检测方法,但这些方法的检测过程繁琐、检测时间长,需要的设备昂贵,操作复杂,难于推广。根据我国目前已经形成的一套兽药残留监控检测技术,ELISA作为一种准确、灵敏性、高性价比的检测方法,是食品安全监测、兽药残留监测领域进行筛选的理想方法。本发明通

过特有的免疫动物制备具有高亲和力、高特异性的齐帕特罗抗体,建立一种可以检测齐帕特罗的间接竞争ELISA检测方法。本方法具有操作简便、快捷,灵敏度高、特异性好等特点。

## 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题:提供一种能够快速且准确的检测出残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒。本发明所要解决的另一个技术问题是提供一种操作简单、耗时短、检测灵敏度高且适用于大批量样品检测的检测残留齐帕特罗的方法。

[0006] 为解决所述技术问题,经过大量实验研究分析,本发明提供了以下技术方案来解决所述技术问题:

一种检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒,包括酶标板 96 孔、齐帕特罗标准品工作液各 1 mL、齐帕特罗抗体工作液 7 mL、齐帕特罗酶标二抗工作液 12 mL、底物液 12 mL、终止液 7 mL、浓缩洗涤液 40 mL 和浓缩样品稀释液 40 mL;

其中,所述酶标板是包被齐帕特罗抗原的酶标板,齐帕特罗抗原是用 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液(CBS)稀释成 1:8000 比例,100  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C,2h,取出 4 $^{\circ}$ C 放置过夜;取出酶标板甩掉板内液体,用稀释后的浓缩洗涤液 300  $\mu$ L/孔,洗板 3 次,1min/次;然后加入 0.5% BSA 封闭,150  $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 放置 2 h;取出酶标板甩掉板内液体,用洁净的毛巾包裹后拍干板内残留液体;将拍干后的酶标板整齐地摆放置 GMP 车间恒温(25 $^{\circ}$ C)晾干;抽检要求板内孔与孔之间,板间的 OD 值变异系数均小于 10%;检验合格后将酶标板密封后置 4 $^{\circ}$ C 下保存;

其中,所述齐帕特罗标准品的浓度分别为 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL;

其中,所述齐帕特罗抗体工作液是用抗体稀释液稀释成 1:10000 比例;

所述齐帕特罗酶标二抗工作液是用酶标二抗稀释液稀释成 1:2000 比例;

所述底物液包含 0.05 mol/L 的  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mol/L 的一水柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、0.2 mmol/L 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、0.5 mmol/L 的过氧化氢脲和 5% 的 N,N'-二甲基甲酰胺;

所述终止液是 2 mol/L 的硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );

所述浓缩洗涤液是 20 倍浓缩洗涤液,其包含 0.05% 吐温-20,0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间;

所述浓缩样品稀释液是 2 倍浓缩稀释液,其成分为 0.01 mol/L, pH7.4 磷酸盐 PBS 缓冲液;

上述检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的使用方法,该方法包括以下步骤:

(1) 预处理待测样品,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品,氮气吹干并将其复溶于样品稀释液工作液中;

(2) 将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20 ~ 25 $^{\circ}$ C)平衡 30 min 以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀;

(3) 取包被齐帕特罗抗原的酶标板,加标准品/样本 50  $\mu$ L/孔到对应的微孔中;

(4) 加入齐帕特罗抗体工作液,50  $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}$ C 避光环境中反应 30 min;

(5) 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 250  $\mu\text{L}$ /孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,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);

(6) 加入齐帕特罗酶标二抗 100  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 30 min,取出重复洗板步骤 5;

(7) 加入底物液 100  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 15~20 min;

(8) 加入终止液 50  $\mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于 450 nm 处或双波长 450/630 nm 检测,测定每孔吸光度值(请在 5min 内读完数据);

(9) 以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中齐帕特罗的含量;

其中在步骤 (3) 中,齐帕特罗标准品和处理好的样品同时添加到对应微孔中。

[0007] 其中所述处理后的样品是经过以下处理的样品:

#### I、尿样(猪尿)

取待检尿样,若样品比较混浊时,可 5000 r/min 以上,离心 5 min 或过滤;

#### II、血清(猪、牛等)

取待检血清样,若样品比较混浊时,可 5000 r/min 以上,离心 5 min 或过滤;

#### III、猪肉、猪肝(新鲜组织)

(1) 准确称取  $2.0 \pm 0.05$  g 匀浆样品至 50 mL 离心管中;

(2) 先加入 3% 三氯乙酸 4 mL,用涡旋仪涡动至均匀后再加入 2mL 乙腈并充分振荡摇匀;

(3) 4000 r/min 离心 10 min;

(4) 取上清液 3mL 至另一离心管中,向其内加入 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 400  $\mu\text{L}$ ,并混匀(调节 pH 值至  $9.8 \pm 0.2$ );

(5) 加入 5 mL 乙酸乙酯,振荡 30 s,4000 r/min 离心 5~10 min;取 3 mL 上层液体于 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干;

(6) 加入 1 mL 稀释后的样品稀释液并充分振荡摇匀;

(7) 取 50  $\mu\text{L}$  用于分析。

[0008] 其中,在步骤 III 中的样品稀释液用去离子水将齐帕特罗浓缩样品稀释液 (2 $\times$ ) 按 1:1 体积比进行稀释,即:1 份齐帕特罗浓缩样品稀释液 (2 $\times$ )+1 份去离子水。

[0009] 本发明采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法来检测齐帕特罗。用于检测残留的齐帕特罗的酶联免疫试剂盒的测定原理:样品中的齐帕特罗与酶标板上固定的抗原特异性竞争体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中齐帕特罗的含量。如果样品中的齐帕特罗含量少,显色深;反之,则显色浅。本发明的试剂盒具有方便、快速、灵敏等特点,适用于大批量样品检测。

## 附图说明

[0010] 图 1 是齐帕特罗标准品的标准曲线。

## 具体实施方式

[0011] 以下采用更具体的实施方式或实施例来描述本发明,但是本发明的保护范围并不打算限制于此处所述的具体实施方式或实施例。

[0012] 本发明方法采用酶联免疫吸附试验(ELISA)来检测齐帕特罗。该测定方法的原理为:基于样品中的齐帕特罗与酶标板上固定的抗原特异性竞争体,加入酶标二抗,与抗体反应,通过酶催化显色剂显色,根据显色的深浅来判断样品中齐帕特罗的含量。样本吸光值与其所含残留物齐帕特罗的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中齐帕特罗的残留量。

[0013] 根据本发明的一种优选实施方式,本发明方法的操作步骤为:

取包被有齐帕特罗抗原的96孔板,加齐帕特罗标准品和处理好的样品50 μL/孔到对应的微孔中;加入齐帕特罗抗体工作液,50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μL/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干;加入齐帕特罗酶标二抗100 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30 min,取出重复洗板如上;加入底物液100 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15~20 min;加入终止液50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处或双波长450/630 nm检测,测定每孔吸光度值;以标准品测试的吸光度值与标准品的浓度对数值绘制标准曲线,对照标准曲线计算样品中齐帕特罗的含量。

[0014] 根据本发明的一种优选实施方式,本发明方法首先将待测样品进行预处理,即将待测试的样品处理为液体样品,或者用有机溶剂提取待测样品并将其溶于样品稀释液中。

[0015] 本发明的试剂盒或检测方法可以检测各种动物源性食品或者动物排泄物,如动物组织(猪、牛、鸡等)、饲料、尿液、血清等以及其它动物源性食品或物质。以下列举几种样品的预处理方法:

#### I、尿样(猪尿)

取待检尿样,若样品比较混浊时,可5000 r/min以上,离心5 min或过滤;

#### II、血清(猪、牛等)

取待检血清样,若样品比较混浊时,可5000 r/min以上,离心5 min或过滤;

#### III、猪肉、猪肝(新鲜组织)

(1) 准确称取 $2.0 \pm 0.05$ g匀浆样品至50 mL离心管中;

(2) 先加入3%三氯乙酸4 mL,用涡旋仪涡动至均匀后再加入2 mL乙腈并充分振荡摇匀;

(3) 4000 r/min离心10 min;

(4) 取上清液3 mL至另一离心管中,向其内加入1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液400 μL,并混匀(调节pH值至 $9.8 \pm 0.2$ );

(5) 加入5 mL乙酸乙酯,振荡30 s,4000 r/min离心5~10 min;取3 mL上层液体于50~60℃氮气流下吹干;

(6) 加入1 mL稀释后的样品稀释液并充分振荡摇匀;

(7) 取50 μL用于分析。

[0016] 本发明用于检测残留的齐帕特罗,该酶联免疫试剂盒可以用于直接检测动物源性食品、尿样、动物组织和血清样品中的齐帕特罗,具有方便、快速、灵敏等特点,适用于大批

量样品检测,本试剂盒具有极高的灵敏度(0.1 ng/mL)。

## 实施例

### [0017] 实施例 1 制备齐帕特罗-ELISA 试剂盒

齐帕特罗是小分子半抗原,仅有反应原性,却没有免疫原性,需要大分子物质结合后才能用于免疫动物制备抗体。

[0018] 齐帕特罗药物属于小分子物质,为半抗原,仅有反应原性,却没有免疫原性,需与大分子载体蛋白连接方有免疫原性。取齐帕特罗,对其分子结构中的氨基活性基团进行改造,与载体蛋白相偶联,制备针对齐帕特罗的公共抗原。本研究采用了齐帕特罗做为半抗原与载体蛋白(BSA 等)通过碳二亚胺法制备了人工抗原。

### [0019] 齐帕特罗-BSA 抗原的制备:

将齐帕特罗半抗原与载体蛋白BSA按11:1的结合比混合在0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)中,然后加入入碳二亚胺,搅拌1~2h,置室温反应24h,最后用0.15 mol/L pH 7.6的PBS透析两天,除去未反应的半抗原,即可得到齐帕特罗-BSA结合物。

### [0020] 抗齐帕特罗抗体的制备:

选用3月龄健康大白兔,通过三次免疫,每次齐帕特罗-BSA免疫原用量为50 μg/0.05 mL,每次免疫间隔时间为2周。初次免疫分别将免疫抗原与费氏佐剂及不安全佐剂等量混合,颈部皮下多点注射,二次、三次免疫直接注入腹腔。融合前3天每只小鼠腹腔注入25 μg齐帕特罗-BSA进行加强免疫,免疫后第6 d耳静脉取血,采用间接竞争ELISA法测定效价。取得较高效价后用半抗原直接在大腿肌肉注射,8 d后颈动脉采全血,分离抗血清,采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,制成冻干粉后于-20℃保存备用。

### [0021] 酶标齐帕特罗的制备:

将25%戊二醛用0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CBS)稀释至5%,称取5 mg HRP溶于0.5 mL 5%的戊二醛,37℃水浴结合2 h;加入0.15 mol/L NaCl 1.0 mL,充分混匀后,置4℃预冷10 min;加入无水乙醇2.4 mL,颠倒混合,立即1000 r/min离心10 min;弃掉上清,沉淀用冷的75%乙醇洗一次,将离心管倒置,风干;加入0.05 mol/L pH 9.6的CBS 0.5 mL溶解沉淀物;将5 mg齐帕特罗抗体溶于0.5 mL 0.15 mol/L NaCl,再与醛化HRP溶液混合;加入1.0 mol/L pH 9.6的CBS溶液,调节pH至9.0~9.5,于4℃下,电磁搅拌结合24 h;加入0.1 mL 0.15 mol/L 赖氨酸,以封闭残留的醛基,终止反应,放置于4℃下2 h;将反应物通过Sephadex G-200凝胶柱,用PBS洗脱,收集第一洗脱峰;或将反应物装入透析袋,用0.01 mol/L pH7.2 PBS,4℃透析过夜并收集;即为酶标记抗体(齐帕特罗-HRP)。

### [0022] 包被板的制备:

用包被缓冲液(CBS)将包被抗原稀释成1:8000浓度,100 μL/孔,放置于37℃孵育2h,取出4℃放置过夜;取出酶标板甩掉板内液体,用洗涤液(PBST)300 μL/孔,洗板2次,30 s/次;加入0.5%BSA,1500 μL/孔,37℃放置2h;甩掉板内液体,用洗涤液(PBST)300 μL/孔,洗板4~5次。真空抽干,将该包被板密封后置于4℃下保存。

### [0023] 试剂的配制:

(1)6种齐帕特罗标准品,其齐帕特罗浓度分别为0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL,它们是用1.0 mol/L pH 7.4的PBS稀释液进行相应比例稀

释制备得到的；

(2) 浓缩样品稀释液 (8) 是 2 倍浓缩稀释液,其成分为 0.01 mol/L, pH7.4 磷酸盐 PBS 缓冲液；

(3) 浓缩洗涤液是 20 倍浓缩洗涤液,其包含 0.05% 吐温 -20, 0.01 mol/L 的 PBST, pH 值范围 7.0-7.5 之间；

(4) 底物液包含 0.05 mol/L 的  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mol/L 的一水柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、0.2 mmol/L 的 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB)、0.5 mmol/L 的过氧化氢脲和 5% 的 N, N-二甲基甲酰胺；

(5) 终止液是 2 mol/L 的硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )；

根据本发明的一种实施方式,基于上述制备的试剂,本发明的用于检测残留的齐帕特罗的酶联免疫试剂盒包括如下材料：

(1) 96 孔酶标板 ×1 块 (包被有偶联抗原)；

(2) 标准液 ×6 瓶 : (1mL/ 瓶) 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL；

(3) 高浓度标准品 : (1mL/ 瓶) 100 ng/mL；

(4) 酶标二抗 12 mL；

(5) 抗体浓缩液 0.8 mL；

(6) 底物液 14 mL；

(7) 终止液 7 mL；

(8) 20× 浓缩洗涤液 40 mL；

(9) 2× 浓缩样品稀释液 50 mL。

[0024] 使用本试剂盒时的注意事项：

(1) 室温低于 20℃ 或试剂及样本没有回到室温 (20 ~ 25℃) 会导致所有标准的 OD 值偏低；

(2) 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况,则会出现标准曲线不成线性,重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作；

(3) 每加一种试剂前需将其摇匀；

(4) 反应终止液为 2M 盐酸,避免接触皮肤；

(5) 不要使用过了有效日期的试剂盒；也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂,掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低；不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂；

(6) 储存条件：保存试剂盒于 2 ~ 8℃,不要冷冻,将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感,因此要避免直接暴露在光线下；

(7) 试剂变质的迹象：发色试剂有任何颜色表明发色剂变质,应当弃之。0 标准的吸光度 (450/630 nm) 值小于 0.5 ( $A_{450 \text{ nm}} < 0.5$ ) 时,表示试剂可能变质,请勿使用；

(8) 该试剂盒最佳反应温度为 25℃,温度过高或过低将导致检测吸光度值和灵敏度发生变化。

[0025] 检测结果计算与分析：

用上述制备的试剂盒中的 6 种齐帕特罗标准品浓度 0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、

0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL, 在 450/630 nm 处测量吸光度值。

[0026] 百分吸光率的计算, 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值 (双孔) 除以第一个标准 (0 标准) 的吸光度值, 再乘以 100%, 即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = B/B_0 \times 100\%$$

其中 B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值,  $B_0$ —0ppb 标准溶液的平均吸光度值。

[0027] 以标准品百分吸光率为纵坐标, 以齐帕特罗标准品浓度 (ppb) 的半对数为横坐标绘制标准曲线, 求出直线方程。标准曲线见附图 1。 $Y = -19.150X + 101.65$ ,  $R^2 = 0.9977$ 。将样本的  $B/B_0$  值代入标准曲线中, 从标准曲线上读出所对应样本的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中齐帕特罗的实际浓度。

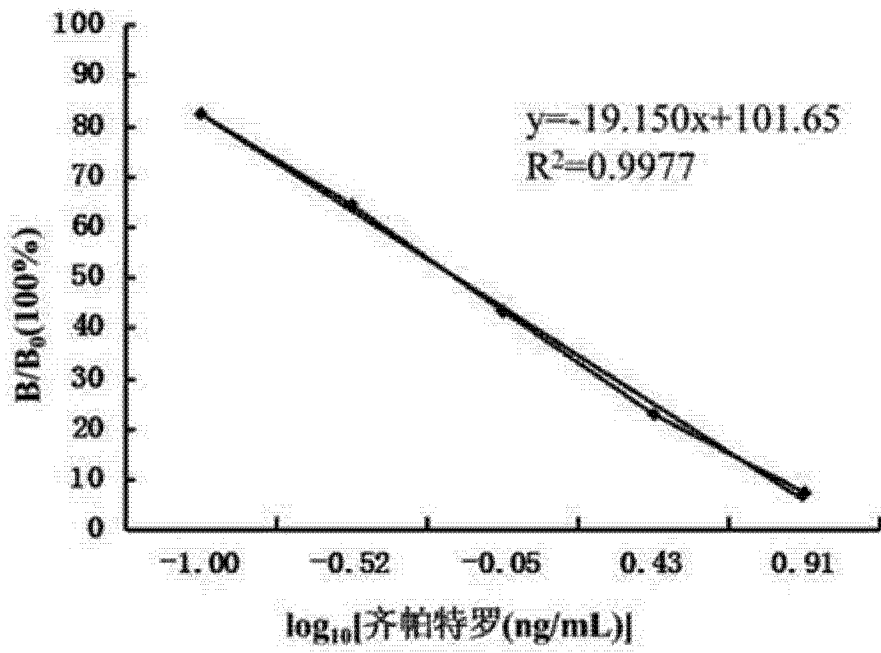


图 1

专利名称(译)	检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103808921A</a>	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201210438110.7	申请日	2012-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏维赛科技生物发展有限公司		
[标]发明人	杜道林 洪霞		
发明人	杜道林 洪霞		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/31 G01N1/28		
CPC分类号	G01N33/9433 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了检测残留齐帕特罗的酶联免疫试剂盒及其使用方法，属于酶联免疫吸附分析方法技术领域。所述试剂盒包括：包被齐帕特罗抗原的酶标板、齐帕特罗标准品工作液、齐帕特罗抗体工作液、齐帕特罗酶标二抗工作液、底物液、终止液、浓缩洗涤液和浓缩样品稀释液。本发明的试剂盒采用间接竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)方法，标准品或待测样本残留的齐帕特罗和酶标板上预包被的抗原共同竞争齐帕特罗抗体。该方法可以用于直接检测动物源性食品、尿样、动物组织和血清样品中的齐帕特罗，具有方便、快速、灵敏等特点，适用于大批量样品检测，本试剂盒灵敏度0.1ng/mL。

