

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510086769.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1766617A

[22] 申请日 2005.11.3

[21] 申请号 200510086769.0

[71] 申请人 北京望尔生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号  
中国农业大学西区动医学院国家兽药  
安全评价中心

[72] 发明人 沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平  
吴小平 冯才茂 汪善良 李军  
赵正苗 张照亮 史为民 张素霞  
丁双阳 罗晓琴 孙倩

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司  
代理人 向华

权利要求书2页 说明书13页 附图1页

## [54] 发明名称

检测  $\beta$  - 兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒及其方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种检测  $\beta$  - 兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒，它包括：包被了  $\beta$  - 兴奋剂类药物抗原的酶标板、酶标抗体、克伦特罗的标准品溶液、底物显色液、 $\beta$  - 兴奋剂类药物抗体工作液、浓缩洗涤液、终止液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测  $\beta$  - 兴奋剂类药物的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明的检测  $\beta$  - 兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒能同时快速检测大量样品，检验方法方便易行，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点。

- 1、一种检测  $\beta$ -兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒，其特征在于它包括：
- (1) 包被了  $\beta$ -兴奋剂类药物抗原的酶标板；
  - (2) 酶标抗抗体；
  - 5 (3) 克伦特罗标准品溶液；
  - (4) 底物显色液；
  - (5)  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体工作液；
  - (6) 浓缩洗涤液；
  - (7) 终止液；
  - 10 (8) 浓缩复溶液。
- 2、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的酶标板在制备过程中，所用的包被原是将  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和载体蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到的，载体蛋白可为卵清蛋白、兔血清白蛋白或鼠血清白蛋白。
- 15 3、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的酶标抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶交联在抗抗体上得到的。
- 4、如权利要求 3 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶。
- 5、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的克伦特罗的  
20 标准品溶液浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.3\mu\text{g/L}$ 、 $0.9\mu\text{g/L}$ 、 $2.7\mu\text{g/L}$ 、 $8.1\mu\text{g/L}$ 。
- 6、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于：当标记酶为辣根过氧化物酶时，底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为  $1\sim 2\text{mol/L}$  的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止  
25 液为  $2\text{mol/L}$  的氢氧化钠；浓缩洗涤液为含有  $0.8\sim 1.2\%$  吐温 20 的磷酸盐缓冲液；浓缩复溶液为  $0.01\text{M}\sim 0.05\text{M}$  含  $1\%$  酪蛋白的磷酸盐缓冲液。
- 7、如权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于所述的  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体的浓度为  $0.5\sim 5.0\mu\text{g/L}$ 。

8、一种检测样品中残留的  $\beta$ -兴奋剂类药物的方法，其特征在于包括以下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 任一权利要求 1-7 所述的试剂盒进行检测；
- 5 (3) 分析检测结果。

9、如权利要求 8 所述的方法，其中试剂盒检测方法为向包被有  $\beta$ -兴奋剂类药物抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液和加入抗体工作液，温育后洗涤拍干，然后加入酶标抗抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

## 检测 $\beta$ -兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒及其方法

### 技术领域

本发明涉及兽药残留检测分析技术领域，具体地，涉及一种检测尿液、  
5 动物组织（肌肉、肝脏）、饲料中 $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒及方法。

### 背景技术

沙丁胺醇（Salbutamol）和克仑特罗（Clenbuterol）均属于 $\beta$ -受体激动药，  
临床主要用于治疗支气管哮喘；此类药物还可以作为牛、羊、猪、禽等的促  
10 生剂，曾一度被广泛应用于兽禽生产。但由于 $\beta$ -兴奋剂容易在动物肝脏中积  
聚残留，并可以通过食物链进入人体，严重危害人体的健康，所以欧共体国  
家已将此类药物划为禁用。因此加强对动物食品中 $\beta$ -兴奋剂残留的检测是必  
要的。

检测 $\beta$ -兴奋剂残留量的化学方法主要有薄层色谱法（TLC）、气相色谱  
法（GC）、高效液相色谱法（HPLC）、气-质联机（GC/MS）、液-质联机  
15 （HPLC/MS）等，由于复杂的仪器设备和繁琐的过程，不适合现场监控和大  
量样本筛查。

### 发明内容

#### （一）要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种结构简单、使用方便、价格便宜、便于携带的  
20 用于动物源性食品中 $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒及方法。

#### （二）技术方案

本发明为一种检测 $\beta$ -兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒，其特征在于包括  
以下物质：

- 25 （1）包被了 $\beta$ -兴奋剂类药物抗原的酶标板；
- （2）酶标抗抗体；
- （3）克仑特罗标准品溶液；
- （4）底物显色液；

(5)  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体工作液;

(6) 浓缩洗涤液;

(7) 终止液;

(8) 浓缩复溶液。

5 本发明所述的酶联免疫试剂盒中, 酶标板在制备过程中, 所用的包被原是将  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和载体蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到的, 载体蛋白为卵清蛋白、兔血清白蛋白或鼠血清白蛋白。

本发明所述的酶联免疫试剂盒中, 酶标抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶交联在抗抗体上得到的。

10 本发明所述的酶联免疫试剂盒中, 标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶, 所用的抗抗体为羊抗兔抗抗体。

本发明所述的酶联免疫试剂盒中, 克伦特罗的标准品溶液浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.3\mu\text{g/L}$ 、 $0.9\mu\text{g/L}$ 、 $2.7\mu\text{g/L}$ 、 $8.1\mu\text{g/L}$ 。

15 本发明所述的酶联免疫试剂盒中, 当标记酶为辣根过氧化物酶时底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲、底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺、终止液为  $1\sim 2\text{mol/L}$  的硫酸或盐酸缓冲液; 当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为  $2\text{mol/L}$  的氢氧化钠; 浓缩洗涤液为含有  $0.8\sim 1.2\%$  吐温 20 的磷酸盐缓冲液; 浓缩复溶液为  $0.01\text{M}\sim 0.05\text{M}$  含  $1\%$  酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

20 本发明所述的酶联免疫试剂盒中,  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体的浓度为  $0.5\sim 5.0\mu\text{g/L}$ 。

本发明还提供了一种检测样品中残留的  $\beta$ -兴奋剂类药物的方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 样品前处理;

25 (2) 用试剂盒进行检测;

(3) 分析检测结果。

其中试剂盒检测方法为向包被有  $\beta$ -兴奋剂类药物抗原的酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液和加入抗体工作液, 温育后洗涤拍干, 然后加入酶

标抗体，温育后洗涤拍干，显色、终止，用酶标仪测定吸光度值。

所获得的每个浓度标准溶液或样本吸光度值的平均值(B)除以第一个标准(0标准)的吸光度值( $B_0$ )再乘以100%，即百分吸光度值。

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

5 公式中B为样本溶液的平均吸光度值， $B_0$ 为 $0\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。以克伦特罗浓度的半对数值为X轴，百分吸光度值为Y轴，绘制标准曲线图，相对应每一个样品中残留的克伦特罗的浓度可以从标准曲线上读出，再根据样本中残留的克伦特罗实际浓度利用交叉反应率计算出其它 $\beta$ -兴奋剂类药物的实际浓度。

10 半抗原的合成 以克伦特罗为中间体，用琥珀酸酐进行酰化反应，把克伦特罗分子结构上的醇羟基酰化成为含有4个碳的羧基间隔臂，制备成 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原。

免疫原 将 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与甲状腺蛋白(BCG)采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)、混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)或活性酯法(DCC、NHS)进行偶联得到免疫原。

15 包被原 将 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和兔血清白蛋白(RSA)、卵清蛋白或鼠血清白蛋白采用水溶性碳化二亚胺法(EDC)、混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)、活性酯法(DCC、NHS)进行偶联得到包被原。

本发明的抗体制备过程如下：

20 a.  $\beta$ -兴奋剂类药物兔多克隆抗体制备

采用新西兰大白兔作为免疫动物，以 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原，免疫剂量为 $1\text{mg/kg}$ ，首次免疫时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔3-4周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫5次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫7-10天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

25 b. 抗抗体的制备 以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到羊抗兔抗抗体。

c. 酶标抗抗体的制备 酶标抗抗体的制备是将辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶采用过碘酸钠法或戊二醛法与羊抗兔抗抗体偶联并纯化提取，得到酶标抗抗体。

酶标板制备方法：

5 用包被缓冲液（pH9.6，0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液）将  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和载体蛋白偶联物稀释成 0.1-1 $\mu$ g/mL，每孔加入 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 温育 2h 并 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150-200 $\mu$ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

10 本发明的检测原理为：采用间接竞争 ELISA 的方法，在微孔条上预包被偶联  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和载体蛋白的偶联物，向微孔中加入样本溶液或系列标准品溶液和  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体工作液，样本中的残留物克伦特罗将和微孔条上预包被的偶联抗原竞争  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体，加入酶标抗抗体后，显色；显色终止后用酶标仪测定每孔吸光度值（OD 值），样本吸光度值与其所含残留物克伦特罗的含量呈负相关，与标准曲线比较即可得出相应残留物  
15 克伦特罗的含量，再根据得到的克伦特罗的含量利用交叉反应率将其他  $\beta$ -兴奋剂类药物计算出来。也可根据酶标板上的样品颜色的深浅，与系列浓度的克伦特罗的标准品液颜色的比较可判断样品的浓度范围。也可以用回归方程法，计算出样本溶液浓度。利用计算机专业软件，更便于大量样品的快速分  
20 析。

样品前处理方法：

a. 动物组织：3.0g 粉碎的组织样品，加入 15mL 乙腈 - HCl 溶液混合，充分振荡 10min，以达到均质的目的，10-15 $^{\circ}$ C，3000g 以上离心 10min。取上清 5mL，加入 0.1M HCl 5mL，混合后加入 6mL 正己烷充分混合 2min，10-15  
25  $^{\circ}$ C 3000g 以上离心 5min。去除正己烷相，加 1mL 1M NaOH 混合后加入 6mL 三氯甲烷，充分振荡 10min，10-15 $^{\circ}$ C 5000g 离心 10min。取下层相，减压抽干或氮气吹干，取 1mL 再加 1mL 复溶液溶解干燥残留物，取 20 $\mu$ L 进行分析。

b. 饲料：称取 2g 匀浆后的样品，再向样品中加甲醇-乙醇 6mL 混合物，

取上清液 2mL 加入二氯甲烷 8mL 混匀，静置分层，取下层 50℃减压蒸干，用 1mL 复溶液溶解干燥残留物，取 20 $\mu$ L 进行分析。

c. 尿样：直接取 20 $\mu$ L 清亮的尿液用试剂盒进行分析。

### (三) 有益效果

- 5 本发明的检测  $\beta$ -兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测动物组织（肌肉、肌肝）、尿液及饲料等样品中  $\beta$ -兴奋剂类药物的残留量；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批样品。

10 所用免疫原的载体蛋白为甲状腺蛋白，那是因为非自身产生的抗体，即越是和机体（被免疫的动物）本身差异越大得非自身大分子物质越能很好得产生抗体。采用  $\beta$ -兴奋剂类药物多克隆抗体，主要试剂以工作液形式提供，使用方便，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点，将在食品和饲料  $\beta$ -兴奋剂类药物残留量的检测中发挥重要作用。

### 附图说明

- 15 图 1:  $\beta$ -兴奋剂检测标准曲线图。

### 具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

### 实施例 1 试剂盒组分的制备

#### 20 1、抗原制备

a. 半抗原的合成 以克伦特罗为中间体，用琥珀酸酐进行酰化反应，把克伦特罗分子结构上的醇羟基酰化成为含有 4 个碳的羧基间隔臂制备成  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原。

25 b. 免疫原 将  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和甲状腺蛋白（BCG）采用混合酸酐法（氯甲酸异丁酯）进行偶联得到免疫原。

免疫原的制备过程：取  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原 2g 溶于 20mL，0.5M 的氢氧化钠溶液中，再取 1.5g 碳化二亚胺溶于 5mL 纯水中加到  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原溶液中室温搅拌反应 2 小时，取载体蛋白 20g 溶于 75mL pH9.6 碳酸盐

缓冲液中，再将甲状腺蛋白（BCG）滴加到 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原溶液中 4℃搅拌过夜。将反应完的人工抗原对 0.1M 的磷酸盐缓冲液透析 7 天，每天换液 3 次。最后将抗原浓缩或冻干保存。

5 c. 包被原 将 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原和人血清白蛋白(HSA)采用混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到包被原。

## 2、抗体制备

### a. $\beta$ -兴奋剂类药物兔多克隆抗体制备

10 采用新西兰大白兔作为免疫动物，以 $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与甲状腺蛋白（BCG）偶联物为免疫原，免疫剂量为 1mg/kg，首次免疫时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，颈背部皮下多点注射，间隔 4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫一次，共免疫 5 次，最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血，测定血清抗体效价，心脏采血，用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

15 b. 抗抗体的制备 以兔源抗体为免疫原对无病原体山羊进行免疫得到羊抗兔抗抗体。

c. 酶标抗抗体的制备 将辣根过氧化物酶采用戊二醛法与羊抗兔抗抗体偶联并纯化提取，得到酶标抗抗体。

酶标抗抗体的制备过程：

20 (1) 称取辣根过氧化物酶 25mg 溶于 1.25% 戊二醛溶液中，于室温静置过夜。

(2) 反应后的酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1mL/分钟，收集棕色流出液，以聚乙二醇浓缩至 5mL。放置 25mL 小烧杯中，缓慢搅拌。

(3) 称取 12.5mg 用生理盐水稀释至 5mL，搅拌下逐滴加入酶溶液中。

25 (4) 用 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25mL，继续搅拌 3 小时。

(5) 加 0.2M 赖氨酸 0.25mL，混匀后，置室温 2 小时。

(6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃ 1 小时。

(7) 3000rpm 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最

后沉淀物溶于少量 0.15M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中。

(8) 将溶液装入透析袋中, 对 0.15M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液水透析, 去除铵离子后(用萘氏试剂检测), 10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 分装后, 冰冻保存。

### 5 3、酶标板的制备

用包被缓冲液 (pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液) 将  $\beta$ -兴奋剂类药物和人血清白蛋白偶联物稀释成  $1\mu\text{g/mL}$ , 每孔加入  $100\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 2h 或  $4^\circ\text{C}$  过夜, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 30 秒, 拍干, 然后在每孔中加入  $200\mu\text{L}$  封闭液 (含有 2% 山羊血清、5% 牛血清的溶液),  $37^\circ\text{C}$  温育 2h, 10 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

### 实施例 2 检测 $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒的组建

组建检测  $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被了克伦特罗与人血清白蛋白(HSA)偶联物的酶标板;
- 15 (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体;
- (3) 克伦特罗标准品溶液, 浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.3\mu\text{g/L}$ 、 $0.9\mu\text{g/L}$ 、 $2.7\mu\text{g/L}$ 、 $8.1\mu\text{g/L}$ ;
- (4) 底物显色液 A 液为过氧化氢, 底物显色液 B 液为邻苯二胺;
- (5)  $\beta$ -兴奋剂类药物兔多克隆抗体工作液的浓度为  $0.5\mu\text{g/L}$ ;
- 20 (6) 浓缩洗涤液 0.8%吐温 20 的磷酸盐缓冲液 ( $0.01\text{M}$ ,  $\text{PH}7.4$ );
- (7) 终止液为  $1\text{mol/L}$  盐酸;
- (8) 浓缩复溶液为  $0.01\text{M}$  含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

### 实施例 3 检测 $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒的组建

25 组建检测  $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:

- (1) 包被了  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联物的酶标板;
- (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体;

- (3) 克伦特罗标准品溶液, 浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.3\mu\text{g/L}$ 、 $0.9\mu\text{g/L}$ 、 $2.7\mu\text{g/L}$ 、 $8.1\mu\text{g/L}$ ;
- (4) 底物显色液 A 液为过氧化脲, 底物显色液 B 液为四甲基联苯胺;
- (5)  $\beta$ -兴奋剂类药物兔多克隆抗体工作液的浓度为  $5.0\mu\text{g/L}$ ;
- 5 (6) 浓缩洗涤液是 1.2% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液;
- (7) 终止液为  $2\text{mol/L}$  硫酸;
- (8) 浓缩复溶液为  $0.05\text{M}$  含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

### 实施例 3 检测 $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒的组建

- 10 组建检测  $\beta$ -兴奋剂的酶联免疫试剂盒, 使其包含下述组分:
- (1) 包被了  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与人血清白蛋白 (HSA) 偶联物的酶标板;
- (2) 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔抗抗体;
- (3) 克伦特罗标准品溶液, 浓度分别为  $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.3\mu\text{g/L}$ 、 $0.9\mu\text{g/L}$ 、  
15  $2.7\mu\text{g/L}$ 、 $8.1\mu\text{g/L}$ ;
- (4) 底物液为对硝基磷酸盐缓冲液;
- (5)  $\beta$ -兴奋剂类药物抗体工作液的浓度为  $5.0\mu\text{g/L}$ ;
- (6) 浓缩洗涤液是 1.2% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液;
- (7) 终止液为  $2\text{mol/L}$  NaOH 缓冲液;
- 20 (8) 浓缩复溶液为  $0.05\text{M}$  含有 1% 酪蛋白的磷酸盐缓冲液。

### 实施例 4 检测猪肉中残留的 $\beta$ -兴奋剂类药物

#### (1) 样品前处理

- 25 动物组织:  $3.0\text{g}$  粉碎的组织样品(低脂), 加入  $15\text{mL}$  乙腈 - HCl 溶液混合, 充分振荡  $10\text{min}$ , 以达到均质的目的,  $10^\circ\text{C}$ ,  $4000\text{g}$  离心  $10\text{min}$ 。取上清  $5\text{mL}$ , 加入  $0.1\text{MHCl}$   $5\text{mL}$ , 混合后加入  $6\text{mL}$  正己烷充分混合  $2\text{min}$ ,  $15^\circ\text{C}$   $4000\text{g}$  离心  $5\text{min}$ 。去除正己烷相, 加  $1\text{mL}$   $1\text{M}$  NaOH 混合后加入  $6\text{mL}$  三氯甲烷, 充分振荡  $10\text{min}$ ,  $10\text{-}15^\circ\text{C}$   $5000\text{g}$  离心  $10\text{min}$ 。取下层相, 减压抽干或氮气吹干,

加 1mL 复溶液溶解干燥残留物，取 20 $\mu$ L 用试剂盒进行分析。

### (2) 用试剂盒检测

向  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准溶液或样品溶液（各 2 孔）20 $\mu$ L，然后加入  $\beta$ -兴奋剂类药物  
5 抗体工作液 80  $\mu$ L，用盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体，  
每孔加入 250 $\mu$ L 洗涤液，30 秒后倒出孔中液体，如此重复操作共洗板 5 次，  
用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液 100 $\mu$ L，用  
盖板膜封板，37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min。取出酶标板，如前述洗板 5 次。每  
10 孔加入底物显色液 A 液 50 $\mu$ L，再加 B 液 50 $\mu$ L，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温箱  
避光显色 15min。每孔加入终止液 50 $\mu$ L，轻轻振荡混匀，用酶标仪测定每孔  
吸光度值（OD 值）。

### (3) 结果分析

计算百分吸光度值，绘制标准曲线：

所获得的每个浓度标准溶液或样本吸光度值的平均值（B）除以第一个标  
15 准（0 标准）的吸光度值（B<sub>0</sub>）再乘以 100%，即百分吸光度值。

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

公式中 B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值，B<sub>0</sub> 为 0 $\mu$ g/L 标准溶液  
的平均吸光度值。以克伦特罗浓度的自然对数值为 X 轴，百分吸光度值为 Y  
轴，绘制标准曲线图，如附图 1 所示，相对应每一个样品中残留的克伦特罗  
20 的浓度可以从标准曲线上读出，再根据克伦特罗的残留量利用交叉反应率计  
算其他  $\beta$ -兴奋剂类药物的残留量。

## 实施例5 检测饲料中的 $\beta$ -兴奋剂

### 1、样品前处理：

25 饲料：称取 2g 匀浆后的样品，再向样品中加甲醇-乙醇 6mL 混合物，取  
上清液 2mL 加入二氯甲烷 8mL 混匀，静置分层，取下层 50 $^{\circ}$ C 减压蒸干，用  
1mL 复溶液溶解干燥残留物，取 20 $\mu$ L 进行分析。

### 2、用试剂盒检测

向  $\beta$ -兴奋剂类药物半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联物包被的酶标板微孔中加系列标准溶液或样品溶液(各2孔) 20 $\mu$ L, 然后加入  $\beta$ -兴奋剂类药物多克隆抗体工作液 80  $\mu$ L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C恒温箱中反应 30min。倒出孔中液体, 每孔加入 250 $\mu$ L 洗涤液, 30 秒后倒出孔中液体, 如此重复操作共洗板 5 次, 用吸水纸拍干。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗抗体工作液 100 $\mu$ L, 用盖板膜封板, 37 $^{\circ}$ C恒温箱中反应 30min。取出酶标板, 如前述洗板 5 次。每孔加入底物显色液 A 液 50 $\mu$ L, 再加 B 液 50 $\mu$ L, 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C恒温箱避光显色 30min。每孔加入终止液 50 $\mu$ L, 轻轻振荡混匀, 用酶标仪测定每孔吸光度值(OD 值)。

### 10 (3) 结果分析

同实施例 4(3)。

### 实施例6 检测尿液中的 $\beta$ -兴奋剂

样品前处理: 直接取 20 $\mu$ L 尿样本用试剂盒进行分析。

15 试剂盒检测及结果分析方法同实施例 4。

### 实施例7 试剂盒精密度、准确度和保存期试验

#### (1) 试剂盒精密度试验

标准可重复性试验: 分别从三批试剂盒中抽取 10 个试剂盒, 每个试剂盒取出 20 微孔, 测定 4.5 $\mu$ g/L 标准溶液的吸光度值并计算变异系数, 测定结果见表 1。

表 1 标准可重复性试验 (CV%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01 批	7.2	8.9	7.6	6.9	8.8	10.3	11.6	8.7	9.4	8.6
CV% 03 批	6.6	10.3	10.9	11.2	10.8	10.6	9.8	9.6	7.6	6.9
06 批	8.8	8.9	7.6	6.5	10.3	10.9	8.3	8.1	7.6	7.3

三批试剂盒 10 次标准变异系数测定范围在 6.5%~11.6%之间, 因此符合

精密度小于或等于 20%的规定，说明本试剂盒标准品精密度达到了《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 4 点精密度和准确度的精密度标准。

5 样本可重复性试验：取克伦特罗标准品对样本进行添加，分别取三个不同批次的试剂盒各三个，每个浓度重复5次，分别计算变异系数。

表 2 猪肉样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
0506004	0.6	0.6	0.7	0.6	0.8	13.5
	0.6	0.8	0.9	1.0	0.8	18.0
	0.8	0.9	1.1	0.7	0.9	16.8
0507001	0.6	0.6	0.7	0.9	0.8	18.1
	0.6	0.8	0.7	0.9	0.6	18.1
	0.6	0.6	0.7	0.8	0.6	13.6
0507005	0.6	0.6	0.7	0.8	0.6	13.6
	0.6	0.6	0.8	0.7	0.6	13.6
	1.0	0.9	0.7	0.8	0.9	13.3

表 3 猪尿样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )					变异系数 CV%
0506004	0.7	0.6	0.8	0.9	0.8	15.0
	0.6	0.8	0.7	0.9	1.0	19.7
	1.1	0.7	0.7	0.7	0.9	21.8
0507001	0.8	1.2	0.7	0.9	0.8	21.8

	0.7	0.8	0.7	0.9	0.7	11.7
	0.9	0.8	0.7	1.1	0.8	17.6
	0.7	0.9	0.8	0.8	0.9	10.2
0507005	0.7	0.9	0.8	1.2	0.8	21.8
	0.7	0.6	0.8	0.7	0.9	15.4

表4 饲料样品可重复性试验

批号	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					变异系数 CV%
	90.1	93.1	123.4	108.2	137.7	18.3
0506004	94.5	82.5	82.5	102.3	132.4	20.8
	104.6	159.2	128.5	137.4	129.6	14.9
	92.4	92.4	82.5	129.5	83.4	20.1
0507001	85.4	102.3	82.5	86.7	82.1	9.5
	102.3	142.5	159.2	128.4	143.4	15.8
	94.5	133.5	129.5	102.3	83.5	20.2
0507005	84.2	83.4	120.3	86.7	86.2	17.1
	98.2	82.4	89.7	82.4	142.3	25.3

结果表明猪肉样品的变异系数均小于 20%，猪尿样品的变异系数均小于 21%，饲料样品的变异系数均小于 22%，符合了变异系数小于 35%的规定，说明本试剂盒样本测定的精密度达到了《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 4 点精密度和准确度的精密度标准。

#### (2) 准确度的试验

取两个浓度的克伦特罗标准品溶液，分别为 $1\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ 和 $2\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ ，分别对样品进行添加回收试验，每个浓度做4个平行，分别计算回收率。

表5 试剂盒的准确度

添加浓度 (µg/kg(L))	猪尿		蜂蜜		鸡肉	
	1	2	1	2	1	2
回收率%	82.1	65.8	123.1	82.7	93.4	79.3
	79.6	70.9	87.2	79.8	83.5	97.3
	93.4	86.4	93.4	105.7	107.4	107.4
	108.5	93.4	76.5	87.3	96.8	116.3
平均值	90.9	79.1	95.0	88.8	95.2	100.0

结果表明猪尿添加的回收率在 65.8%~108.5%之间, 蜂蜜添加回收率在 76.5%~123.1%之间, 鸡肉中添加回收率在 79.3%~116.3%之间。

### (3) 特异性

- 5 特异性用交叉反应率来表示, 交叉反应率是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。交叉反应率小, 可证明抗体的特异性高。

选择与克伦特罗同类似结构和类似功能的四种药物, 将不同浓度的克伦特罗类似物, 替代克伦特罗标准溶液, 测定其标准曲线, 并计算 IC<sub>50</sub> 抑制浓度, 计算交叉反应率。

$$10 \quad \text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\%抑制克伦特罗的浓度}}{\text{引起 50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$

表6 交叉反应

药物名称	交叉反应率 (%)
沙丁胺醇	100
克伦特罗	27

### (4) 试剂盒保存期试验

- 15 试剂盒保存期条件为 2-8℃, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制浓度、克伦特罗药物添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中, 会有非正常保存条件出现, 将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 6 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入 -20℃ 冰箱冷冻 5 天, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2-8
- 20 ℃ 保存 6 个月以上。

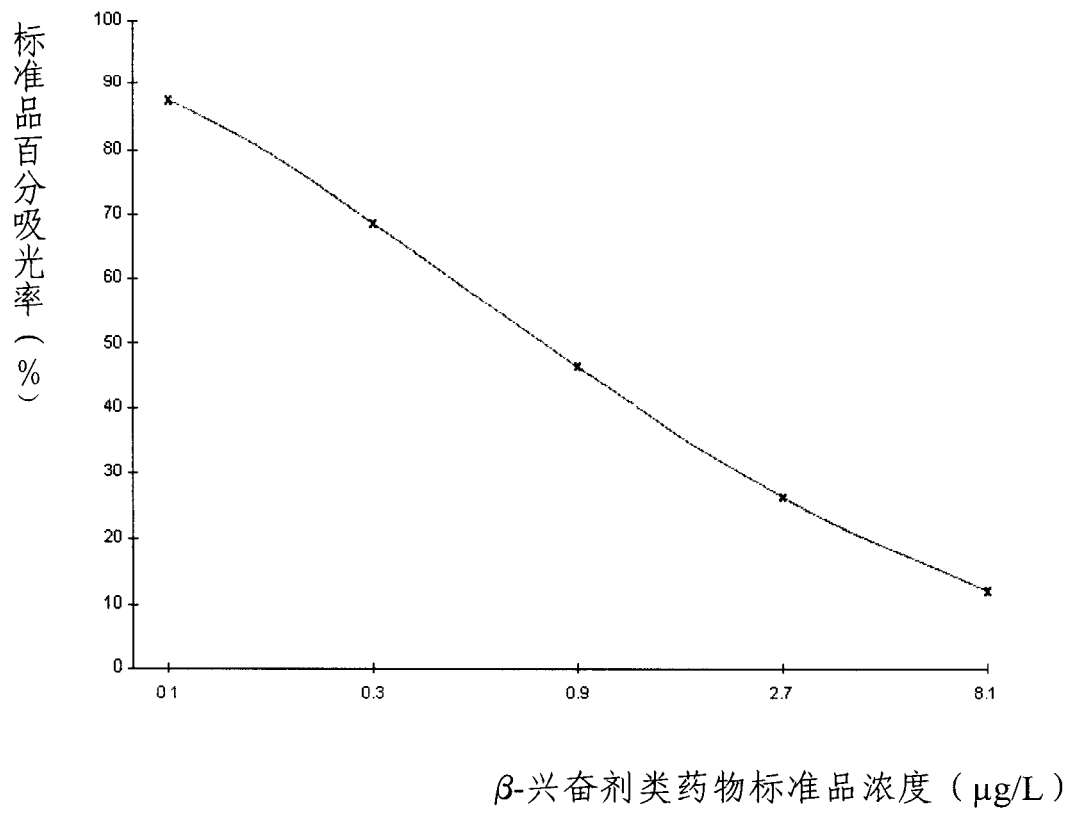


图 1

专利名称(译)	检测 $\beta$ - 兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒及其方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1766617A</a>	公开(公告)日	2006-05-03
申请号	CN200510086769.0	申请日	2005-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
发明人	沈建忠 何方洋 冯才伟 万宇平 吴小平 冯才茂 汪善良 李军 赵正苗 张照亮 史为民 张素霞 丁双阳 罗晓琴 孙倩		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/52 G01N33/535		
代理人(译)	向华		
其他公开文献	CN100501404C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种检测 $\beta$  - 兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒，它包括：包被了 $\beta$  - 兴奋剂类药物抗原的酶标板、酶标抗体、克伦特罗的标准品溶液、底物显色液、 $\beta$  - 兴奋剂类药物抗体工作液、浓缩洗涤液、终止液和浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶

联免疫试剂盒检测β - 兴奋剂类药物的方法，它包括以下步骤：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明的检测β - 兴奋剂类药物的酶联免疫试剂盒能同时快速检测大量样品，检验方法方便易行，具有高特异性、高灵敏度、高精度、高准确度等特点。

$$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起50\%抑制克伦特罗的浓度}}{\text{引起50\%抑制的类似物浓度}} \times 100\%$$