



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101915845 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010244260.5

(22) 申请日 2010.08.03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3776 2010.04.12

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王战辉 沈建忠 张素霞 史为民

吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

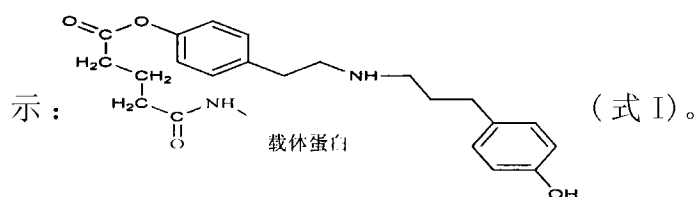
(54) 发明名称

一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。本发明提供的检测莱克多巴胺的化学发光免疫试剂盒,包括莱克多巴胺特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物。本发明的检测方法,具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点,能够现场监控且适合大量样本的筛查。

1. 一种检测莱克多巴胺的化学发光免疫试剂盒,包括莱克多巴胺特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示:



2. 根据权利要求 1 所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗抗体;

所述试剂盒由莱克多巴胺特异性抗体、包被原、标准品溶液、发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗抗体组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:所述莱克多巴胺特异性抗体为莱克多巴胺单克隆抗体或莱克多巴胺多克隆抗体,所述莱克多巴胺单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC 分泌的抗体。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.1\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.5\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\ \mu\text{g/L}$ 、 $10\ \mu\text{g/L}$ 或 $100\ \mu\text{g/L}$,所述标准品为莱克多巴胺;

所述发光液由 A 液和 B 液组成,发光液 A 液为过氧化氢;发光液 B 液为鲁米诺溶液;

所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮化钠和 100mL 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液;

所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液;

所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

所述封闭液是将 0.01g 叠氮化钠、10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L、pH 值为 7.4 磷酸盐溶液混合得到的溶液。

所述酶标抗抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体。

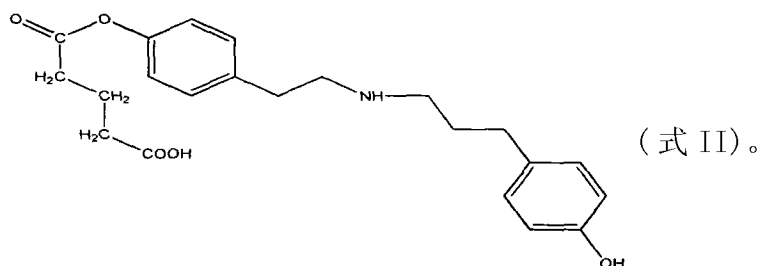
5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述包被原是按照如下方法制备得到的:I、将每 34mg 莱克多巴胺半抗原、15mg 琥珀酸酐、2mL 二甲基甲酰胺和 1mL 吡啶混合,25℃搅拌 12 小时,将得到的产物干燥,得到残留物;II、将 26.2 μL 三乙胺与所述残留物混合,得到混合物,将混合物在 0℃条件下搅拌 10min;III、向步骤 II 得到的产物中加入 15 μL 氯甲酸异丁酯,25℃搅拌 1h,得到的产物溶液记作溶液 A;

IV、将 40mg 载体蛋白溶于 10mL 0.1M、pH 8.5 的硼酸钠溶液中,得到的产物溶液记作溶液 B;

V、将溶液 A 加入到溶液 B 中,25℃下反应 12 小时,将得到的产物透析,得到所述包被原;

所述莱克多巴胺半抗原的结构式如式 II 所示:



6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:所述莱克多巴胺半抗原为莱克多巴胺。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的化学发光免疫试剂盒,其特征在于:

所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白,优选为卵清蛋白。

8. 一种检测莱克多巴胺的方法,包括以下步骤:

1) 样品前处理:

将每 2g 动物组织匀浆,与 10mL 甲醇混合,旋涡振荡 1min,以 3000g 的速度离心 5min,将 1mL 上清液氮气干燥,再加入 1mL 复溶液溶解,再向其中加入 1mL 正己烷混合,3000g 离心 5min,取下层溶液即为待测样本溶液;所述动物组织为猪肉或者猪肝;

或:取每 10mL 猪尿以 3000g 离心 5min,取上清液,用复溶液稀释 10 倍后获得待测样本溶液;

所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的;

2) 利用权利要求 1-7 中任一所述的检测莱克多巴胺的化学发光免疫试剂盒检测步骤 1) 中的样本溶液。

9. 由保藏号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC 分泌的莱克多巴胺单克隆抗体。

10. 保藏号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC。

一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 目前动物性食品安全已成为全世界关注的焦点,其中兽药残留问题是影响动物性食品安全的最主要因素之一,由于动物样本成分复杂,待测物浓度较低,而且大多数取样量很少,这就对分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。化学发光免疫分析(Chemiluminescence analysis, CLIA) 技术将高灵敏的化学发光技术与高特异性的免疫反应结合起来,具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、操作简便、不需要十分昂贵的仪器设备等特点。CLIA 不需要外来光源,具有比荧光免疫分析更高的信噪比,比常规的酶联免疫吸附检测方法的抗背景干扰能力强,其灵敏度比 ELISA 高 1 至 2 个数量级,检测范围可达 6 个数量级,自动化程度高,提高了分析方法的精密度,CLIA 已经成为一种先进的痕量或超痕量物质的检测技术。CLIA 在兽医学、医学、食品分析等方面将会有更广阔的应用前景。

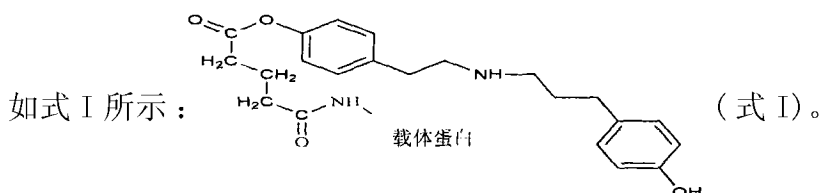
[0003] 莱克多巴胺(Ractopamine, RAC) 是一种苯乙醇胺类 β -肾上腺素受体激动剂,具有松弛支气管平滑肌的作用,主要用于治疗猪、牛等的支气管哮喘等疾病。当使用量为临床治疗剂量的 5-10 倍时,具有促进蛋白质合成和脂肪分解的作用,可显著体高胴体瘦肉率和饲料报酬,且对猪的饲养效应尤为明显。但是,莱克多巴胺毒副作用较大,当累计摄入量超过一定值时,会导致人、畜肌肉震颤、心动过速、心律失常等中毒症状,欧盟和中国等国家均禁止其作为饲料添加剂使用,但在畜牧生产上的常有非法应用的情况,导致其在畜禽产品中残留,危害公众健康。

[0004] 动物组织中莱克多巴胺残留的检测方法主要采用气相色谱法、液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-联质谱法、酶联免疫法等。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。

[0006] 本发明提供的检测莱克多巴胺的化学发光免疫试剂盒,包括莱克多巴胺特异性抗体、包被原和标准品溶液;所述包被原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式



[0007] 所述试剂盒还包括发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗体;

[0008] 所述试剂盒由莱克多巴胺特异性抗体、包被原、标准品溶液、发光液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液、包被缓冲液、封闭液和酶标抗体组成。

[0009] 所述莱克多巴胺特异性抗体为莱克多巴胺单克隆抗体或莱克多巴胺多克隆抗体,所述莱克多巴胺单克隆抗体是由保藏号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC 分泌的抗体。

[0010] 所述标准品溶液中标准品的浓度为 $0\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 或 $100\mu\text{g/L}$,所述标准品为莱克多巴胺;

[0011] 所述发光液由 A 液和 B 液组成,发光液 A 液为过氧化氢;发光液 B 液为鲁米诺溶液;

[0012] 所述浓缩洗涤液是将 0.05g 叠氮化钠和 100mL 浓度为 0.02M 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到溶液;

[0013] 所述浓缩复溶液是将 0.1g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.05mol/L 、 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到的溶液;

[0014] 所述包被缓冲液是 pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

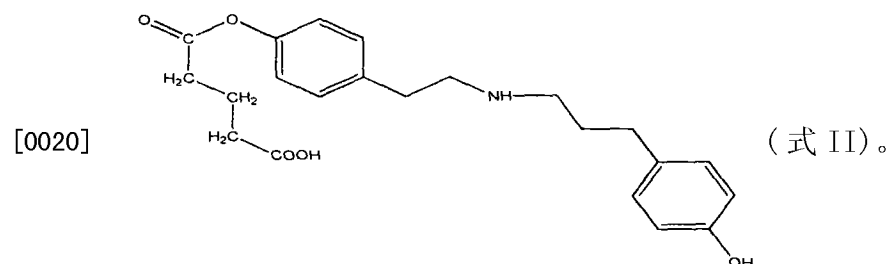
[0015] 所述封闭液是将 0.01g 叠氮化钠、 10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L 、 pH 值为 7.4 磷酸盐溶液混合得到的溶液。

[0016] 所述包被原是按照如下方法制备得到的:所述包被原是按照如下方法制备得到的:I、将每 34mg 莱克多巴胺半抗原、 15mg 琥珀酸酐、 2mL 二甲基甲酰胺和 1mL 吡啶混合, 25°C 搅拌 12 小时,将得到的产物干燥,得到残留物;II、将 $26.2\mu\text{L}$ 三乙胺与所述残留物混合,得到混合物,将混合物在 0°C 条件下搅拌 10min ;III、向步骤 II 得到的产物中加入 $15\mu\text{L}$ 氯甲酸异丁酯, 25°C 搅拌 1h ,得到的产物溶液记作溶液 A;

[0017] IV、将 40mg 载体蛋白溶于 10mL 0.1M 、 pH 8.5 的硼酸钠溶液中,得到的产物溶液记作溶液 B;

[0018] V、将溶液 A 加入到溶液 B 中, 25°C 下反应 12 小时,将得到的产物透析,得到所述包被原;

[0019] 所述莱克多巴胺半抗原的结构式如式 II 所示:



[0021] 所述莱克多巴胺半抗原为莱克多巴胺。

[0022] 所述载体蛋白为鼠血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白或血蓝蛋白,优选为卵清蛋白;

[0023] 所述酶标记抗抗体为酶标记羊抗鼠抗抗体。

[0024] 本发明的另一个目的是提供一种检测莱克多巴胺的方法。

[0025] 本发明提供的方法包括以下步骤:

[0026] 1) 样品前处理:

[0027] 将每 2g 动物组织匀浆,与 10mL 甲醇混合,旋涡振荡 1min ,以 3000g 的速度离心 5min ,将 1mL 上清液氮气干燥,再加入 1mL 复溶液溶解,再向其中加入 1mL 正己烷混合,

3000g 离心 5min, 取下层溶液即为待测样本溶液; 所述动物组织为猪肉或者猪肝;

[0028] 或: 取每 10mL 猪尿以 3000g 离心 5min, 取上清液, 用复溶液稀释 10 倍后获得待测样本溶液;

[0029] 所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的;

[0030] 2) 利用上述的检测莱克多巴胺的化学发光免疫试剂盒检测步骤 1) 中的样本溶液。

[0031] 由保藏号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC 分泌的莱克多巴胺单克隆抗体也是本发明保护的范围。

[0032] 保藏号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC 也是本发明保护的范围。该细胞株为对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC, 均于 2010 年 4 月 12 日保藏保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏编号为 CGMCC NO. 3776。

[0033] 莱克多巴胺的通用名称为莱克多巴胺, 化学名称为 4-[3-[2-羟基-2-(4-羟基苯基)-乙基]氨基丁基]苯酚盐酸盐。

[0034] 本发明的实验证明, 本发明制备的化学发光免疫试剂盒主要采用间接竞争 CLIA 方法定性或定量检测莱克多巴胺的残留量, 该试剂盒的主要内容物采用了方便使用的工作液形式, 工作液保存性及稳定性好; 利用本发明试剂盒检测莱克多巴胺的残留量的方法, 可用于检测动物组织如猪肉、猪肝、猪尿等样品中莱克多巴胺的残留量, 具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点, 能够现场监控且适合大量样本的筛查。因此本发明检测方法及其专用试剂盒将在动物源性食品中莱克多巴胺的残留检测中发挥重要作用。

附图说明

[0035] 图 1 为莱克多巴胺标准曲线图。

具体实施方式

[0036] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0037] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0038] 下述实施例中各试剂盒的检测原理如下:

[0039] 当在化学发光板微孔上预包被莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物时, 加入样本溶液或标准品溶液后, 再加入莱克多巴胺抗体溶液, 样本中残留的莱克多巴胺或莱克多巴胺标准品与化学发光板上包被的莱克多巴胺偶联抗原竞争莱克多巴胺抗体, 加入酶标记抗抗体进行放大作用, 加入发光液反应, 样本发光强度值与样本中莱克多巴胺的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中莱克多巴胺的残留量。

[0040] 实施例 1、化学发光免疫试剂盒的制备及其检测方法

[0041] 一、化学发光免疫试剂盒包括:

[0042] (1) 将包被原溶解于包被缓冲液中得到的, 其中包被原在包被原溶液中的浓度为

0.08 μ g/mL ;包被原为莱克多巴胺半抗原与卵清蛋白的偶联物。

[0043] (2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体工作液 :用稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体得到的,稀释度为 1 : 1000 ;

[0044] 稀释液为 50mL 牛血清白蛋白和 950mL 磷酸盐缓冲液混合得到 ;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M, pH 值为 7.4。

[0045] 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 产品目录号为 115-035-003。

[0046] (3) 莱克多巴胺标准品溶液 :将标准品溶于稀释液中得到的,其中标准品在莱克多巴胺标准品溶液的浓度分别为 0 μ g/L, 0.1 μ g/L, 0.5 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L, 100 μ g/L, 稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液。莱克多巴胺标准品为莱克多巴胺,购自 Dr.Ehrenstorfer GmbH,产品货号为 C 16805000。

[0047] (4) 发光液 :发光液由 A 液和 B 液组成,发光液 A 液为过氧化氢,8mL/ 瓶,1 瓶 ;发光液 B 液为鲁米诺溶液,8mL/ 瓶,1 瓶。

[0048] (5) 莱克多巴胺单克隆抗体工作液 :将单抗溶于稀释液中得到的,单抗与稀释液的配比为 1 : 2000。单克隆抗体由保藏编号为 CGMCC No. 3776 的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC 产生。

[0049] 稀释液为 25g 酪蛋白、0.03g 叠氮化钠和 1000mL 磷酸盐缓冲液混合得到。

[0050] (6) 浓缩洗涤液 :将 0.05g 叠氮化钠与 100mL 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合得到。

[0051] (7) 浓缩复溶液 :将 0.1g 牛血清白蛋白与 100mL 浓度为 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液混合而成。400mL/ 瓶,1 瓶。

[0052] (8) 包被缓冲液 :pH 值为 9.6 的浓度为 0.03mol/L 的碳酸盐缓冲液。

[0053] (9) 封闭液 :将 0.01g 叠氮化钠、10g 牛血清白蛋白和 100mL 浓度为 0.03mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐溶液混合而成。

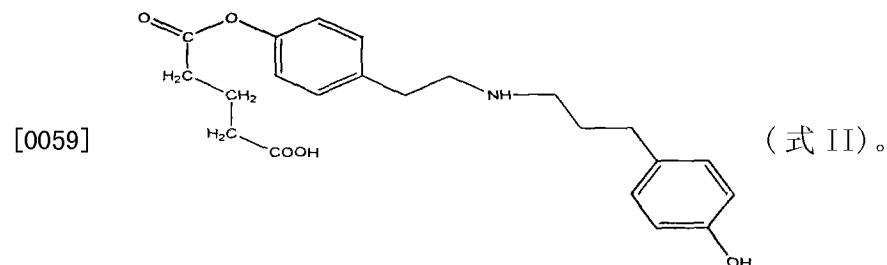
[0054] 二、试剂盒的制备

[0055] 1、化学发光板的制备 :

[0056] (1) 莱克多巴胺半抗原 :

[0057] 莱克多巴胺结构中含有羟基,可以与载体蛋白质直接偶联,因此不用进行结构改造,可以直接作为半抗原。

[0058] 所述莱克多巴胺半抗原的结构式如式 II 所示 :



[0060] (2) 包被原的制备 :采用琥珀酸酐法将莱克多巴胺半抗原和卵清蛋白偶联得到包被原。

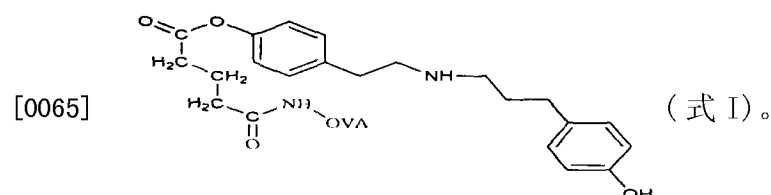
[0061] a、将 34mg 莱克多巴胺、15mg 琥珀酸酐、2mL 二甲基甲酰胺和 1mL 吡啶混合,25℃下

搅拌 12 小时,同时进行氮吹;再向残留物中加入 26.2 μ L 三乙胺得到混合物,将混合物在 0℃条件下搅拌 10min;然后加入 15 μ L 氯甲酸异丁酯,25℃搅拌 1h,得到活化 RAC 溶液;

[0062] b、将活化 RAC 溶液逐滴加入到预先冷冻的蛋白溶液,置于 25℃下反应 12 小时,然后在浓度为 0.1M、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液中透析 3 天,得到包被原,所述蛋白溶液为将 40mg 卵清蛋白 OVA 溶于 10mL 浓度为 0.1M、pH 为 8.5 的硼酸钠溶液得到的蛋白溶液。

[0063] 用包被缓冲液将步骤 (2) 得到的包被原 (即莱克多巴胺半抗原 (莱克多巴胺) 和卵清蛋白偶联物) 稀释成 0.08 μ g/mL,每孔加入 100 μ L,37℃温育 2h,倾去包被液,用稀释 20 倍的洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后在每孔中加入 150 μ L 封闭液,37℃温育 1h,倾去孔内液体,干燥后获得包被有包被原的化学发光板,用铝膜真空密封保存。

[0064] 所述包被原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物,其结构式如式 I 所示:



[0066] 2、莱克多巴胺单克隆抗体的制备:

[0067] (1) 免疫原合成:

[0068] 将莱克多巴胺半抗原和牛血清白蛋白通过琥珀酸酐法偶联得到免疫原。

[0069] 具体制备过程如下:与包被原的制备方法相同,不同的是将卵清蛋白替换为牛血清白蛋白 BSA。

[0070] (2) 动物免疫与细胞融合

[0071] 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以步骤 2 的 (1) 获得的免疫原进行免疫,免疫剂量为 100 μ g/只,首免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 2-3 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,四免后腹腔加强免疫一次,3 天后取脾细胞。

[0072] 取免疫 BALB/c 小鼠脾细胞,按 5 : 1 比例 (数量配比) 与 SP2/0 骨髓瘤细胞 (融合)。采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为 RAC。

[0073] 经筛选得到能稳定分泌莱克多巴胺单克隆抗体的对莱克多巴胺的单克隆杂交瘤细胞株 RAC,已于 2010 年 4 月 12 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 3776。

[0074] (3) 细胞冻存和复苏:将上述单克隆杂交瘤细胞株 RAC CGMCC No. 3776 用冻存液制成 5×10^6 个/mL 的细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0075] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0076] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在 37℃条件下进行培养,用下述辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0077] 所述细胞培养基为向 RPMI-1640 培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠得到的细胞培养基,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (体积百分含量),使碳酸氢钠在细胞

培养基中的终浓度为 0.2% (质量百分含量);所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0078] 辛酸-饱和硫酸铵法 1) 50% 饱和度盐析:取上述细胞培养液 5mL,加等量 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS(1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g,12 水合磷酸氢二钠 2.86g,氯化钾 0.2g,氯化钠 8.8g) 混匀,然后逐渐滴加等体积的饱和硫酸铵 (pH7.4) 溶液 (使硫酸铵溶液的饱和度达到 50%),边加边搅拌,室温放置 30min,3000g 离心 30min,弃上清液留沉淀。2) 33% 饱和度盐析:在步骤 1) 得到的沉淀中分别加入 5mL 0.01mol/L PBS(1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g,12 水合磷酸氢二钠 2.86g,氯化钾 0.2g,氯化钠 8.8g) 溶解沉淀,再加饱和硫酸铵溶液达到 33% 饱和度,边加边搅拌,室温放置 30min,弃上清液留沉淀。重复操作 2 次。3) 脱盐:取 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS(1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g,12 水合磷酸氢二钠 2.86g,氯化钾 0.2g,氯化钠 8.8g) 溶解步骤 2) 得到的沉淀,装于透析袋中,悬于盛有 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS(1L 溶液中含有磷酸二氢钾 0.27g,12 水合磷酸氢二钠 2.86g,氯化钾 0.2g,氯化钠 8.8g) 的烧杯中脱盐,放置于 4℃,每天换液 3-4 次,1% BaCl₂ 检测直至透析液中无硫酸根离子为止。4) 透析完毕,3000g 离心 5min,取上清液得到纯化的莱克多巴胺单克隆抗体,-20℃冰箱保存。

[0079] 三、用步骤一所述试剂盒检测样品中残留的莱克多巴胺的方法

[0080] 方法如下:

[0081] 1、样品前处理

[0082] 样品为猪肉、猪肝、猪尿等样本。

[0083] 将 2g 动物组织匀浆,与 10mL 甲醇混合,旋涡振荡 1min,以 3000g 的速度离心 5min,将 1mL 上清液氮气干燥,再加入 1mL 复溶液溶解,再向其中加入 1mL 正己烷混合,3000g 离心 5min,取下层溶液即为待测样本溶液;进行试验分析。

[0084] 或:取 10mL 猪尿以 3000g 离心 5min,取 200 μL 上清液,用复溶液稀释 10 倍后获得待测样本溶液;进行试验分析;所述复溶液为将所述浓缩复溶液用 0.05mol/L、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍得到的。

[0085] 2、检测

[0086] 向步骤一获得的包被有包被原 (莱克多巴胺半抗原与卵清蛋白偶联物) 的化学发光板微孔中加入莱克多巴胺标准品溶液或样本溶液 50 μL,再加入莱克多巴胺单克隆抗体工作液 50 μL,用盖板膜封板,37℃恒温箱中反应 30min;倒出孔中液体,每孔加入 250 μL 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;每孔加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体工作液 100μL,37℃恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤;每孔加入发光液 A 液过氧化氢,发光液 B 液鲁米诺溶液,用化学发光免疫分析仪,测定每孔发光强度值。

[0087] 3、结果分析

[0088] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值 (B) 除以第一个标准溶液 (0 标准) 的发光强度值 (B0) 再乘以 100%,即百分发光值。计算公式为:

[0089] 百分发光值 (%) = (B/B0) × 100%

[0090] 以莱克多巴胺标准品溶液的浓度 (μg/L) 的半对数值为 X 轴,百分发光值为 Y 轴,绘制标准曲线图 (图 1)。用同样的办法计算样品溶液的百分发光值,相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中莱克多巴胺的残留量。本发明中检测结果的分析也可以

采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析,整个检测过程只需 1.5 小时可以完成。

[0091] 按照上述方法获得三批试剂盒(01 批、02 批、03 批)。

[0092] 实施例 2、试剂盒灵敏度、准确度和保存期试验

[0093] 一、试剂盒灵敏度实验

[0094] 对零标准溶液(即稀释液为 pH7.4、0.05M 的磷酸盐缓冲液)进行 20 次检测,测定结果的平均值加上 3 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。

[0095] 表 1 零标准测定结果统计表 $\mu\text{g/L}$

[0096]

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.06	0.07	0.08	0.06	0.07	0.05	0.06	0.05
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.04	0.05	0.08	0.08	0.06	0.06	0.06	0.07
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.06	0.07	0.04	0.06	0.06	0.01	0.1	

[0097] 由表 1 可知,试剂盒的最低检测限为 $0.1 \mu\text{g/L}$ 。

[0098] 二、标准品精密度试验:

[0099] 从实施例 1 中所述的三批试剂盒(01 批、02 批、03 批)中每批抽取 10 个试剂盒,测定 $1 \mu\text{g/L}$ 标准品溶液的发光强度值,计算变异系数。检测方法与实施例 1 中实验三所述一致。

[0100] 实验设 3 次重复,结果如表 2 所示,表明变异系数范围在 5.2%~15.1%之间,符合精密度小于或等于 20%的规定。

[0101] 表 2 标准可重复性试验(CV%)

[0102]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV% 01 批	11.6	13.2	8.9	5.2	12.7	14.8	10.8	9.5	6.6	7.8
02 批	6.9	10.4	11.7	5.8	7.7	11.3	12.5	15.1	5.9	10.3
03 批	12.2	10.3	9.6	8.7	11.5	7.9	10.7	11.2	6.4	9.6

[0103]

[0104] 三、样本精密度和准确度试验

[0105] 1、样品精密度试验:

[0106] 将不含莱克多巴胺的猪肉、猪肝、猪尿按照实施例 1 的方法进行样品前处理后,添加莱克多巴胺标准品,使其在检测样品中的终浓度为 $2 \mu\text{g/kg}$ 。从实施例 1 中所述的三批试剂盒(01 批、02 批、03 批)中每批抽取 3 个试剂盒,进行实验,每个实验重复 5 次,分别计算变异系数,结果如表 3-5 所示(各表中的数值为 5 次重复的平均值)。结果表明猪肉、猪肝、猪尿样本的变异系数均小于 20%,符合了《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四点精密度和准确度的精密度标准。

[0107] 表 3 猪肉样本可重复性试验

[0108]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	1.2	1.4	1.3	1.5	1.1	12.2
	1.1	1.2	1.6	1.7	1.5	18.2
	1.6	1.5	1.4	1.4	1.3	7.9
02	1.6	1.2	1.9	1.4	1.6	16.9
	1.4	1.2	1.5	1.3	1.6	11.3
	1.7	1.9	1.3	1.6	1.4	15.1
03	1.2	1.4	1.7	1.4	1.3	13.4
	1.5	1.6	1.4	1.2	1.7	13
	1.2	1.6	1.3	1.7	1.4	14.4

[0109] 表 4 猪肝样本可重复性试验

[0110]

批号	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)					变异系数 CV%
01	1.4	1.3	1.7	1.2	1.8	17.5
	1.6	1.7	1.4	1.5	1.3	10.5
	1.5	1.6	1.4	1.3	1.5	7.8
02	1.2	1.3	1.6	1.5	1.8	16.1
	1.2	1.3	1.3	1.2	1.5	9.4
	1.2	1.4	1.8	1.5	1.4	15
03	1.5	1.3	1.6	1.2	1.4	11.3
	1.6	1.7	1.2	1.4	1.3	14.4
	1.8	1.5	1.5	1.4	1.3	12.5

[0111] 表 5 猪尿样本可重复性试验

[0112]

批号	实测值 (μg/L)					变异系数 CV%
01	1.9	1.4	1.3	1.5	1.8	16.4
	1.1	1.3	1.6	1.4	1.5	13.9
	1.4	1.3	1.5	1.3	1.2	8.5
02	1.3	1.4	1.2	1.5	1.6	11.3
	1.6	1.4	1.5	1.8	1.4	10.9
	1.7	1.3	1.2	1.6	1.5	14.2
03	1.3	1.2	1.4	1.3	1.2	6.5
	1.7	1.3	1.5	1.5	1.6	9.7
	1.5	1.2	1.4	1.2	1.1	12.8

[0113] 2、样本准确度试验

[0114] 将不含莱克多巴胺的猪肉、猪肝、猪尿按照实施例 1 中所述的样品前处理方法进行处理,然后向每种组织中加入莱克多巴胺标准品溶液,使其终浓度分别为 $5 \mu\text{g/kg(L)}$ 和 $20 \mu\text{g/kg(L)}$;然后用实施例 1 中所述的试剂盒检测猪肉、猪肝、猪尿中莱克多巴胺,每个浓度做 4 个平行,分别计算准确度(准确度=实测值/添加值)。结果如表 6 所示,表明各样本以 $5 \mu\text{g/kg(L)}$ 、 $20 \mu\text{g/kg(L)}$ 莱克多巴胺添加回收率均在 65.2% -87.8%之间。

[0115] 表 6 试剂盒的准确度

[0116]

样本		猪肉		猪肝		猪尿	
添加浓度 (μg/kg)		5	20	5	20	5	20
准确度%	1	87.2	72.3	65.2	79.5	83.9	74.2
	2	74.6	78.5	80.1	76.8	75.2	80.3
	3	69.7	81.2	72.7	70.5	76.4	72.5
	4	87.8	85.6	70.3	68.4	72.3	76.6
平均值%		79.8	79.4	72.1	73.8	77.0	75.9

[0117] 四、交叉反应率试验

[0118] 选择与莱克多巴胺有类似结构和类似功能的 7 种药物测定交叉反应率。通过各种药物的标准曲线分别得到其 50%抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应越小,那么此试剂盒对莱克多巴胺的检测特异性就越好。

[0119] 交叉反应率(%) = (抑制 50%莱克多巴胺的浓度 / 抑制 50%的莱克多巴胺类似物浓度) * 100%

[0120] 表 7 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
[0121]	莱克多巴胺	100
	沙丁胺醇	0.2
	特布他林	0.2
	西玛特罗	0.2
	维多洛尔	0.2
	克伦特罗	0.2
	普萘洛尔	<0.1
	阿替洛尔	<0.1

[0122] 实验结果表明,本发明所研制的试剂盒对莱克多巴胺的特异性好。

[0123] 五、试剂盒保存期试验

[0124] 试剂盒保存条件为 2-8℃,保存 6 个月后,测定试剂盒的 50%抑制浓度、莱克多巴胺实际添加测定,结果表明试剂盒的 50%抑制浓度均在正常范围之内。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℃至少可以保存 6 个月以上。

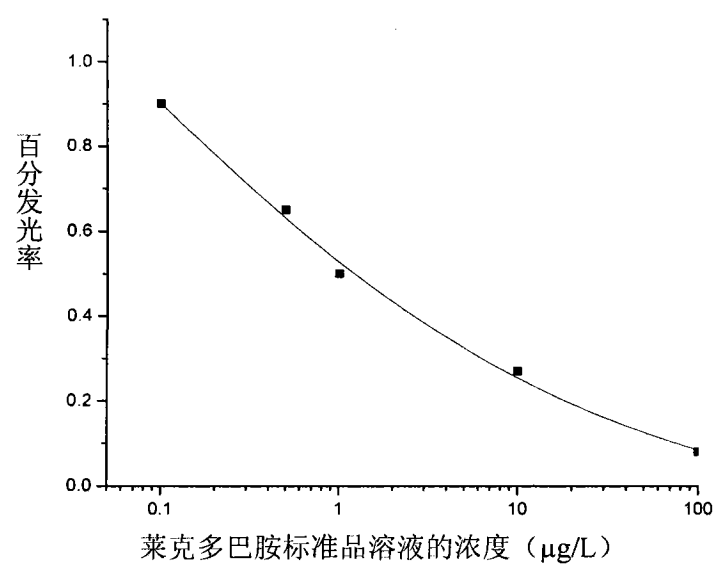


图 1

专利名称(译)	一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101915845A	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN201010244260.5	申请日	2010-08-03
[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	王战辉 沈建忠 张素霞 史为民 吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生		
发明人	王战辉 沈建忠 张素霞 史为民 吴聪明 程林丽 曹兴元 汤树生		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76 C07K16/44 C12N5/20 C12R1/91		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测莱克多巴胺的方法及其专用化学发光免疫试剂盒。本发明提供的检测莱克多巴胺的化学发光免疫试剂盒，包括莱克多巴胺特异性抗体、包被原和标准品溶液；所述包被原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物。本发明的检测方法，具有样品前处理过程简单、操作简便、费用低廉、特异性高、灵敏度高、精确度高等特点，能够现场监控且适合大量样本的筛查。

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8
测定值	0.06	0.07	0.08	0.06	0.07	0.05	0.06	0.05
样品号	9	10	11	12	13	14	15	16
测定值	0.04	0.05	0.08	0.08	0.06	0.06	0.06	0.07
样品号	17	18	19	20	平均值	标准差	最低检测限	
测定值	0.06	0.07	0.04	0.06	0.06	0.01	0.1	