



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101241134 B

(45) 授权公告日 2012.05.30

(21) 申请号 200810025906.3

(22) 申请日 2008.01.18

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山

(72) 发明人 孙远明 杨金易 雷红涛 沈玉栋

肖治理 王弘 张挺

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司

公司 44102

代理人 林丽明 任重

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1766630 A, 2006.05.03, 摘要、权利要求 1-10.

CN 1687783 A, 2005.10.26, 全文.

郑怀竟、韩松. ELISA 的原理和类型.《临床检

验 ELISA 指南》.北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1994,第 17 页倒数第 1 段、第 18 页图 2-4.

于洪侠等. 莱克多巴胺人工抗原的合成与鉴定.《中国兽医科学》.2005,第 35 卷(第 12 期),1000-1003.

李亚琳等. 酶联免疫法测定猪肉组织中莱克多巴胺的残留量.《动物保健》.2005,(第 12 期),37-38.

审查员 张小勇

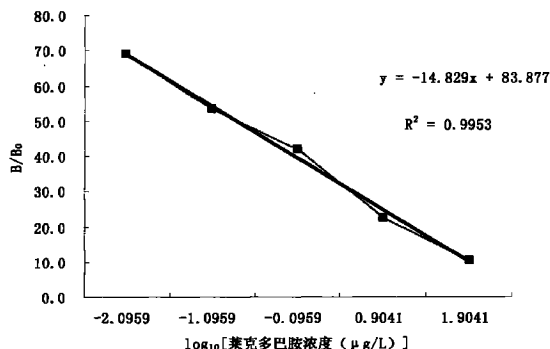
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒,包括包被莱克多巴胺抗原的酶标板、酶标记莱克多巴胺抗体工作液、莱克多巴胺标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液和样品稀释浓缩液。本发明同时公开了应用上述试剂盒检测莱克多巴胺残留的方法,包括进行样品的前处理,利用试剂盒进行检测,结果的处理与分析等步骤。本发明提供的检测莱克多巴胺的试剂盒采用直接竞争酶联免疫吸附分析技术,灵敏度高、稳定性好,大大简化了操作步骤和反应时间,减少了因操作复杂引起的误差,降低了成本,非常适合大量样品的筛查,具有重要的现实意义。



1. 一种检测莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒,其特征在于包含下列成分:

- (1) 包被了莱克多巴胺抗原的酶标板;
- (2) 酶标记莱克多巴胺抗体工作液;
- (3) 莱克多巴胺标准溶液;
- (4) 底物液;
- (5) 底物缓冲液;
- (6) 反应终止液;
- (7) 浓缩洗涤液;
- (8) 样品稀释浓缩液;

其中,所述酶标板采用 96 或 40 孔酶标板,包被有能与抗莱克多巴胺抗体特异结合的莱克多巴胺抗原,并封闭微孔表面未吸附莱克多巴胺抗原的位点;所述莱克多巴胺抗原是使用碳二亚胺法、活泼酯法或混合酸酐法将莱克多巴胺半抗原与载体蛋白进行偶联得到;

所述酶标记莱克多巴胺抗体工作液是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与莱克多巴胺抗体进行偶联得到,所述标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取的碱性磷酸酯酶;所述莱克多巴胺抗体为鼠单克隆抗体、兔多克隆抗体或基因工程抗体的任意一种;

当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物液为含有 3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液;

当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5%吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L。

3. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述样品稀释浓缩液为 pH7.4~8.0、0.1~0.25mol/L、含有 50%甲醇的磷酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于所述莱克多巴胺标准溶液的浓度分别为:8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L 和 0 μ g/L。

5. 一种权利要求 1 所述酶联免疫试剂盒的使用方法,其特征在于包括以下步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 使用试剂盒进行检测;
- (3) 结果处理与分析;

其中步骤 (2) 包括以下步骤:

- (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温平衡;
- (2) 将标准品或待测样品加入已经包被有莱克多巴胺抗原的酶标板孔内,然后每孔加入酶标记物,轻拍混匀,孵育;
- (3) 洗涤;
- (4) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液,轻拍混匀,避光孵育;
- (5) 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,酶标仪测定各孔吸光值。

检测莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术领域,具体涉及一种检测动物源性食品中莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 莱克多巴胺 (Ractopamine),属于 β 2- 肾上腺素能激动剂 (BAA) 的一种,与“瘦肉精”同属儿茶酚胺类 (肾上腺素和去甲肾上腺素) 物质。早在 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,就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。其中,莱克多巴胺、克伦特罗因其口服效率高在生产中使用最为广泛。

[0003] 近年来,莱克多巴胺、克伦特罗被大量添加到饲料中以提高脂肪型动物的瘦肉率和加速动物生长,但因其添加剂量较大,在动物体内高残留而给消费者带来危害。例如: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的牛肝而集体中毒的事件;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、肌肉痛、目眩、恶心、呕吐、发烧、战栗等,且有心脏病史的人对食物残留 β 2- 肾上腺素能激动剂更为敏感 (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、克伦特罗的非法使用。

[0004] 目前,许多国家已经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)。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应用,最高残留限量规定为 1ng/g (肝组织) 或 1ng/mL (尿液)。

[0005] 虽然,国家将 β 2- 肾上腺素能激动剂列为严重危害人民身体健康的违禁药品,禁止生产和使用,但是非法使用现象仍较严重,因食用含有 β 2- 肾上腺素能激动剂的肉类、动物内脏而引发中毒的事件时有发生,例如:2001 年,连续发生了广东河源、广东信宜、浙江、上海等地十几起上百人集体中毒的事件。

[0006] 近年来,国家加大了对克伦特罗非法使用的打击力度,将其作为动物屠宰前后的必检项目,如果检出阳性,整批销毁,且莱克多巴胺价格远低于克伦特罗,使得许多不法分子不用克伦特罗而改用莱克多巴胺,据相关检测部门报告,近年来克伦特罗的使用量有下降的趋势,但莱克多巴胺的使用量却在增加。因此,建立准确、灵敏、快速、简便的检测方法对及时、有效的监测莱克多巴胺的非法使用具有巨大的意义。

[0007] 通常,检测莱克多巴胺的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC),气相色谱 - 质谱法 (GC-MS),毛细管区带电泳法 (CE) 和免疫分析技术 (IA) 等等。HPLC 法与 GC-MS 法是莱克多巴胺残留检测的确证方法,其优点是检测精确度高,但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等而阻碍其推广应用,而酶联免疫分析 (ELISA) 快速检测技术因成

本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低,现已成为常用的筛选方法。

[0008] 目前国内外已有商品化的莱克多巴胺 ELISA 检测试剂盒(德国 Rbiopharm, 英国 Randox Laboratories Ltd, 北京望尔公司试剂盒等),但是由于设计原理的问题国内外现有产品普遍存在稳定性差、检测步骤复杂等缺点。例如德国 Rbiopharm 与英国 Randox Laboratories Ltd 产品的设计原理为在微孔条上包被有针对莱克多巴胺抗体的羊抗体,莱克多巴胺抗体被加入,经过孵育及洗涤步骤后,再加入莱克多巴胺酶标记物,标准或样品溶液,莱克多巴胺与莱克多巴胺酶标记物竞争莱克多巴胺抗体,没有连接的莱克多巴胺酶标记物在洗涤步骤中被除去,然后显色定量。操作步骤至少需要 7 步。国内望尔公司产品采用间接竞争 ELISA 法,在微孔条上预包被上偶联抗原,加入样本与莱克多巴胺抗体,样本中的克仑特罗将和微孔条上预包被偶联抗原竞争克仑特罗抗体,经过孵育及洗涤步骤,然后加入酶标记物,再经过孵育及洗涤步骤后显色定量,操作步骤至少为 8 步,另外还需专门配制洗涤液,而且反应必须在 37℃ 环境中进行。

[0009] 另外,检索相关专利发现,中国专利《一种检测动物源性食品中莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒》(申请号 200510086776.0)中提到一种莱克多巴胺酶联免疫检测方法及其试剂盒,此专利中提到的酶联免疫检测方法为酶标板包被有莱克多巴胺抗原,加入待检样品与莱克多巴胺单克隆抗体或多克隆抗体反应,洗板,再加入酶标记抗体反应,洗涤后,加入底物显色,终止后,读数;或者是酶标板包被有抗体,首先加入莱克多巴胺单抗或多克隆抗体反应,洗板,然后加入样品与酶标记莱克多巴胺抗原竞争反应,洗涤后,加入底物显色,终止后,读数;两种方法均为间接竞争 ELISA,操作复杂、步骤多,生产与保存成本高,很难满足实际应用的需求。

[0010] 中国专利《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》(申请号 200510071059.0)中提到一种莱克多巴胺酶联免疫检测方法及其试剂盒,此专利中提到的酶联免疫检测方法是样品先采用免疫亲和层析纯化后,加入到包被有莱克多巴胺抗体的酶标板中反应,洗涤后,加入酶标记抗原反应,洗涤后,显色,终止,读数;此方法首先样品要过亲和层析柱进行纯化和富集,操作复杂、步骤多,且检测模式为间接竞争 ELISA,检测步骤繁琐,而且包被抗体的酶标板保存期短,因此很难满足实际高通量检测的需要。

[0011] 总之,国内外现有莱克多巴胺采用的酶联免疫检测方法复杂、繁琐,很难应用于实践,且现有产品由于普遍存在稳定性差、样品前处理及检测步骤复杂、设备条件要求较高、价格昂贵等不足,严重影响了莱克多巴胺残留检测与监控,因此研制稳定性高、操作简单、设备要求低、廉价的莱克多巴胺 ELISA 试剂盒具有非常重要的经济和社会意义。

发明内容

[0012] 本发明的目的是针对现有莱克多巴胺检测技术的不足,提供一种高特异性、高灵敏度、价格低廉、操作简单,能大批量快速检测莱克多巴胺的酶联免疫检测试剂盒。

[0013] 本发明的另一目的是提供利用所述酶联免疫试剂盒检测莱克多巴胺残留的方法。

[0014] 为了实现上述目的,本发明采用如下测定原理:首先将莱克多巴胺抗原包被于固相载体,例如酶标板上,然后加入标样或待测样品,再加入酶标记莱克多巴胺抗体,包被抗原与待测样品中的莱克多巴胺竞争酶标抗体,待测样品莱克多巴胺含量高时,则与固相抗原结合的酶标抗体就少,反之结合在固相抗原上的酶标抗体就多,反应后加入底物进行显

色加以测定,当酶标抗体量一定时,加入的待测样品含莱克多巴胺越多,与固相抗原结合酶标抗体就越少,发色反应减弱,百分吸光度值低,反之,则发色反应增强,百分吸光度增高,因而根据百分吸光度值与莱克多巴胺浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,再根据莱克多巴胺的标准曲线和待检样品的百分吸光度值,即可推算出待测样品中莱克多巴胺的浓度。

[0015] 本发明的的具体技术方案是:

[0016] 提供一种检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒,包括:

[0017] (1) 包被了莱克多巴胺抗原的酶标板;

[0018] (2) 酶标记莱克多巴胺抗体工作液;

[0019] (3) 莱克多巴胺标准溶液;

[0020] (4) 底物液;

[0021] (5) 底物缓冲液;

[0022] (6) 反应终止液;

[0023] (7) 浓缩洗涤液;

[0024] (8) 样品稀释浓缩液。

[0025] 所述酶标板是 96 孔或 40 孔酶标板,酶标板孔内包被有能与抗莱克多巴胺抗体特异结合的莱克多巴胺抗原,其是使用碳二亚胺法 (EDC)、活泼酯法 (DCC、NHS)、混合酸酐法 (氯甲酸异丁酯) 将莱克多巴胺与载体蛋白偶联得到的,所用的包被液为 pH9.6、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,含 1~2g 碳酸钠、2~4g 碳酸氢钠和双蒸水 1L,封闭液为 1~5% 脱脂奶粉溶液。

[0026] 所述莱克多巴胺抗体的制备过程中,所用的免疫原为采用活泼酯法 (DCC、NHS) 或混合酸酐法 (氯甲酸异丁酯) 将莱克多巴胺半抗原与载体蛋白共价偶联合成得到的,以免疫抗原免疫兔子或小鼠,制备莱克多巴胺多克隆抗体、利用杂交瘤技术制备莱克多巴胺单克隆抗体或利用基因工程方法制备基因工程抗体。收集抗血清、腹水、发酵液等,用辛酸硫酸铵沉淀纯化或过亲和层析柱进行纯化。

[0027] 所述酶标记莱克多巴胺抗体工作液为采用戊二醛法或过碘酸盐氧化法将酶与莱克多巴胺抗体进行偶联得到的。所用标记酶可为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,本发明优选为辣根过氧化物酶,且采用改良后的过碘酸盐氧化法进行标记,提高了标记效率,节省了酶与抗体的用量,保证标记后酶与抗体具有良好的活性。

[0028] 所述莱克多巴胺标准溶液的浓度为: 8.1 $\mu\text{g/L}$ 、2.7 $\mu\text{g/L}$ 、0.9 $\mu\text{g/L}$ 、0.3 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 和 0 $\mu\text{g/L}$ 。

[0029] 所述底物显色液当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物液为含有 3,3,5,5-四甲基联苯胺 (TMB) 或邻苯二胺 (OPD) 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液;

[0030] 当标记酶为细菌提取的碱性磷酸酯酶时,所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液,所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲溶液,所述终止液为 1~2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液。

[0031] 所述浓缩洗涤液为含 0.5~1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,

浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍。

[0032] 所述样品稀释浓缩液为 pH7.4 ~ 8.0、0.1 ~ 0.25mol/L、含有 50% 甲醇的磷酸盐缓冲液,为正常使用浓度的 5 ~ 15 倍。

[0033] 可以作为固定莱克多巴胺抗原的载体的物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

[0034] 本发明所述抗原抗体的制备方法具体陈述如下:

[0035] (1) 抗原的合成

[0036] 半抗原的合成:

[0037] 将莱克多巴胺采用氯乙酸钠进行卤代反应,把莱克多巴胺分子上的羟基取代,合成含有 2 个碳的羧基间隔臂的莱克多巴胺半抗原;或将顺丁烯二酸酐与莱克多巴胺中的氨基进行酰化反应,合成含有 4 个碳的羧基间隔臂的莱克多巴胺半抗原。

[0038] 本发明将含有 2 个碳的羧基间隔臂的半抗原用于免疫原的制备,将含有 4 个碳的羧基间隔臂的半抗原用于包被原的制备;因为免疫原与包被原采用不同的半抗原结构将更有利于提高检测的灵敏度。

[0039] 包被原和免疫原的合成:

[0040] 将莱克多巴胺半抗原和牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)等载体蛋白,通过碳二亚胺法(EDC)、活泼酯法(DCC、NHS)、混合酸酐法(氯甲酸异丁酯)进行偶联得到包被抗原与免疫原。免疫原与包被原通过柱层析进行纯化,纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0041] (2) 莱克多巴胺单克隆抗体的制备

[0042] 动物免疫:以含有 2 个碳的羧基间隔臂的半抗原与载体蛋白偶联物为免疫原对 Balb/c 小鼠进行间隔免疫,间接 ELISA 检测并得到血液里含有莱克多巴胺特异性抗体的小鼠脾脏。

[0043] 细胞融合与克隆:取产生特异性抗体的 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 融合,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法或显微克隆法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0044] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,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。

[0045] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭茵石蜡油,7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7 ~ 10 天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸胺法或亲和层析法进行腹水纯化,纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定,小瓶分装,-20℃ 保存。

[0046] (3) 莱克多巴胺兔多克隆抗体的制备

[0047] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以莱克多巴胺与载体蛋白偶联物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫,多次免疫后测定血清抗体效价,心脏采血,经硫酸胺分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0048] (4) 莱克多巴胺基因工程抗体的制备

[0049] 基因工程抗体主要指小分子抗体,包括:Fab(由完整的轻链和 Fd 构成),Fv(由 VH

和 VL 构成), ScFv(单链抗体, VH 和 VL 之间由一条连接肽连接而成), 单域抗体(仅由 VH 组成) 等经基因工程技术改造后的抗体。

[0050] 制备方法为: 提取莱克多巴胺单克隆细胞或经莱克多巴胺免疫原免疫后的小鼠脾细胞的 RNA, 反转录为 cDNA, 设计抗体轻重链扩增引物, 利用 PCR 技术扩增出抗体的轻重链基因, 插入适当的表达质粒, 在大肠杆菌中表达, 利用免疫亲和方法进行纯化, 纯度由 SDS-PAGE 电泳鉴定。

[0051] 其中, 酶标记莱克多巴胺抗体的制备:

[0052] 将莱克多巴胺抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为:

[0053] ①溶解 5mg HRP 于 1mL 超纯水中, 加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75 μ L, 置室温或 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 20min 或 30min。

[0054] ②反应完后装入透析袋, 0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 期间需更换透析液几次。

[0055] ③将抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL, 另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中, 置室温或 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 2h。

[0056] ④加入 100 μ L 4mg/mL 硼氢化钠, 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 2h。

[0057] ⑤对 0.01mol/L PBS 透析过夜, 加入保存液 -20 $^{\circ}$ C 保藏备用。

[0058] 其中, 酶标板的制备方法为:

[0059] 用包被缓冲液将莱克多巴胺抗原按需要稀释, 向酶联板微孔中加入抗原稀释液, 放入 37 $^{\circ}$ C 环境进行孵育, 再放入 4 $^{\circ}$ C 环境中过夜孵育, 得到的酶联板的稳定性好, 倾去包被液, 用洗涤液洗涤, 然后在每孔中加入封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0060] 本发明还提供了利用上述酶联免疫试剂盒进行动物源性食品中莱克多巴胺检测的方法, 包括以下步骤:

[0061] (1) 样品前处理;

[0062] (2) 使用试剂盒检测;

[0063] (3) 结果处理与分析。

[0064] 本发明提供待测样品前处理方法为:

[0065] a. 尿液样本处理

[0066] 清澈尿液样品可以直接进行检测分析。若尿样呈浑浊状, 2000g 离心 5min 或过滤, 用上清液检测。

[0067] b. 饲料

[0068] 将饲料粉碎, 称取 2g 置于 50mL 试管中, 加入 12mL10% 氨化甲醇 (pH9 ~ 10 的氨水溶液 9 份 + 甲醇 1 份), 充分混匀振荡 1 ~ 2min。加入 9mL 乙酸乙酯, 振荡 20min。5000rpm(4000g) 离心 10min。取有机相 500 μ L 于另一试管中, 用氮气吹干。加入样品稀释液 500 μ L 稀释后直接检测。稀释倍数 10 应在结果计算中考虑。

[0069] c. 组织例如肌肉、肝脏或肾脏等

[0070] 将组织破碎, 用超声仪或类似仪器将组织均质化, 称取 2g 均质化后的组织样本置

于可密封的试管中,加 10mL 纯甲醇,涡旋混匀 5min。10000g 离心 5min 或 3000g 离心 20min,取上清。沉淀中再加入 10mL 纯甲醇,涡旋混匀后离心(离心方法同上),取上清。混匀两次离心上清,取出 10mL 用氮气吹干。取 1mL 样品稀释液重新充分溶解后用于检测,溶解后立即进行分析检测。稀释倍数为 1。

[0071] 使用试剂盒检测的步骤为:

[0072] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温平衡;

[0073] (2) 将标准品或待测样品加入已经包被有莱克多巴胺抗原的酶标板孔内,然后每孔加入酶标记物,轻拍混匀,孵育;

[0074] (3) 洗涤;

[0075] (4) 每孔加入等量的底物缓冲液与底物液,轻拍混匀,避光孵育;

[0076] (5) 每孔加入反应终止液,混合均匀,在波长 450nm 或 492nm 下,以空气为空白,酶标仪测定各孔吸光值;

[0077] 本发明提供检测结果处理与分析方法为:

[0078] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值,以百分吸光度值为纵坐标,莱克多巴胺标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值,根据方程式求出对应样品的莱克多巴胺浓度。所述百分吸光度值的计算式为:

[0079] 百分吸光度值 (%) = $(B/B_0) \times 100$

[0080] 其中,B 为标准溶液或样品的平均吸光值, B_0 为 $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。

[0081] 检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析,对莱克多巴胺线性检测范围为 $0.1 \sim 8.1 \mu\text{g/L}$,检测限为 $0.1 \mu\text{g/L}$,整个检测过程只需 35min 就可以完成。

[0082] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0083] 本发明的试剂盒采用直接竞争 ELISA 检测模式,采用高特异性、高亲和力的抗体,减少了操作步骤,提高了检测的灵敏度、准确度;采用包被抗原进行酶标板的包被,相对于抗体包被,更有利于达到较好的包被效果与较长的保存时间,从而提高了试剂盒检测的精密度与稳定性;另外本试剂盒利用酶标记抗体技术,将酶直接标记于莱克多巴胺特异性抗体上,将莱克多巴胺特异性抗体与酶两种最重要的反应物合二为一,不仅大大简化了操作步骤和反应时间,减少了因操作复杂引起的误差,而且无需在试剂盒内再配置抗体,同时也节约了莱克多巴胺特异性抗体与酶的用量,从而大大降低了试剂盒的成本。基于以上优点本试剂盒非常适用于莱克多巴胺残留的痕量分析与批量检测,具有重要的现实意义。

附图说明

[0084] 图 1 为标准曲线。

具体实施方式

[0085] 实施例 1 抗原的制备

[0086] 莱克多巴胺抗原的制备:

[0087] a. 将 $50 \mu\text{mol/L}$ 莱克多巴胺半抗原溶解在 1mL 的 DMF 中,然后在该溶液中加入等摩尔的 DCC 和 NHS,让其在室温下反应过夜;

[0088] b. 离心,取上清液 800 μ L,缓慢加入到 4mL 15mg/mL 的 BSA 或 OVA 载体蛋白碳酸缓冲溶液中,然后在磁力搅拌下反应 4h;

[0089] c. 待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析 2 次,然后用 0.8%生理盐水透析,得产物;

[0090] d. 采用紫外扫描测定结合比,最后将抗原浓缩保存或冻干保存得到莱克多巴胺免疫原和包被原,分装保存于 -20°C 的冰箱中。

[0091] 实施例 2 抗体的制备

[0092] 莱克多巴胺鼠单克隆抗体制备:

[0093] 动物免疫程序:采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以莱克多巴胺半抗原与牛血清白蛋白偶联物为免疫原,免疫剂量为 60 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,腹腔注射,间隔 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。

[0094] 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞,按 4 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争酶联免疫方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用显微克隆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。

[0095] 细胞冻存和复苏:取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个 /mL 的细胞悬液,分装于冻存管,在 -70°C 超低温冰箱中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37°C 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0096] 单克隆抗体的制备与纯化:采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠 (8 周龄) 腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个 / 只,14 天后采集腹水。用免疫层析法进行腹水纯化,小瓶分装, -20°C 保存。

[0097] 实施例 3 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的提取

[0098] 1、辣根过氧化物酶的提取

[0099] a. 水提取:称取 20 千克已洗干净的鲜辣根或辣根皮,切成小块,在粉碎机中绞碎。碎渣浆加 10 千克水在低温下搅拌浸提 8 小时,以 3000 转 / 分速度离心 10 分钟,收集上清液。

[0100] b. 硫酸铵分级分离:每升滤液加 226 克硫酸铵粉末,边加边搅拌,置室温下过夜。次日吸取上清液,再按每升上清液加 258 克硫酸铵粉末,随加随搅拌,待硫酸铵完全溶解后,置冷室过夜。次日吸去上清液,沉淀部分在冷冻离心机中以 13000 转 / 分离心 20 分钟,弃去上清液,收集沉淀。将沉淀溶于 200 ~ 300 毫升蒸馏水中,分装于透析袋中,在流动水中透析 1 ~ 2 天,直至透出的水加入氯化钡溶液无沉淀生成为止。然后再在蒸馏水中透析 8 小时。合并透析液,在冷冻离心机中以 4000 转 / 分离心 15 分钟,收集上清液。

[0101] c. 丙酮分级分离:将上清液倒入烧杯并置冰盐浴中,在不断搅拌下,用滴管沿杯壁加入等体积预冷至 -15°C 的丙酮,在冷冻离心机中以 4000 转 / 分离心 15 分钟,收集上清液,再加入原上清液体积 0.8 倍的 -15°C 丙酮,离心 (条件同上) 收集沉淀。将沉淀溶于少量蒸馏水中,透析 (方法同上) 除去丙酮,即得粗 HRP。

[0102] d. 精制:每升粗酶液加入 1 毫升 1 摩尔硫酸锌溶液,在冷冻离心机中以 5000 转 / 分离心 10 分钟,收集上清液,分装于透析袋内,于流水中透析除硫酸锌,约需 1 天,然后在蒸馏水中透析 8 小时。将透析液合并,进行真空干燥即得精制 HRP。产品呈米黄色纤维状松软

物。

[0103] 2、碱性磷酸酶

[0104] 利用产生碱性磷酸酯酶的 E. Coli 1,317 菌株发酵培养,发酵液经离心(8000r/min,10min)后,沉淀的菌体经 5×10^{-4} M EDTA-0.03M pH 8.0 Tris-0.5M 蔗糖高渗液处理后用溶菌酶破壁,上清酶液经 DEAE 纤维素搅拌吸附和洗脱,热处理和 Sephadex G-100 分子筛层析纯化。

[0105] 实施例 4 酶标记莱克多巴胺抗体的制备

[0106] 辣根过氧化物酶 HRP 标记莱克多巴胺抗体的制备采用过碘酸盐氧化法,具体方法为:

[0107] a. 溶解 5mg HRP 于 1mL 超纯水中,加入新配置的 0.1mol/L 过碘酸钠 75 μ L,置室温或 4°C 冰箱反应 20min 或 30min。

[0108] b. 反应完后装入透析袋,0.001mol/L pH4.0 醋酸缓冲溶液 4°C 透析过夜,期间需更换透析液几次。

[0109] c. 将莱克多巴胺抗体用 0.1mol/L 碳酸缓冲液稀释至 10mg/mL,另外用 0.1mol/L 碳酸缓冲液将活化好的 HRP 的溶液 pH 调至 9.5。将 0.5mL 抗体加入 HRP 溶液中,置室温或 4°C 冰箱反应 2h。

[0110] d. 加入 100 μ L 4mg/mL 硼氢化钠,4°C 冰箱反应 2h。

[0111] e. 对 0.01mol/L PBS 透析过夜,加入保存液 -20°C 保藏备用。

[0112] 实施例 5 酶联免疫试剂盒组分的配制

[0113] (1) 浓缩洗涤缓冲液的配制:含 0.5 ~ 1.5% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 pH7.4,浓度为 0.1mol/L,为正常使用浓度的 15 ~ 25 倍。

[0114] (2) 样品稀释浓缩液的配制:pH7.4 ~ 8.0、0.1 ~ 0.25mol/L、含有 50% 甲醇的磷酸盐缓冲液,为正常使用浓度的 5 ~ 15 倍。

[0115] (3) 封闭液的配制:脱脂奶粉 1.0 ~ 5.0g 溶于 100mL 蒸馏水。

[0116] (4) 底物缓冲液的配制:30% 过氧化氢 30 μ L 溶于 19mL 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中 4°C 保存,磷酸-柠檬酸缓冲液配制:0.2M Na_2HPO_4 25.7mL,0.1M 柠檬酸 24.3mL,加蒸馏水 50mL。

[0117] (5) 底物液的配制:将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 80mg 溶于 10mL pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液中,4°C 保存,磷酸-柠檬酸缓冲液的配制:0.2M Na_2HPO_4 25.7mL,0.1M 柠檬酸 24.3mL,加蒸馏水 50mL。

[0118] (6) 酶标板微孔板的包被:包被抗原用 pH9.6,0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液,缓冲溶液含 1 ~ 2g 碳酸钠、2 ~ 4g 碳酸氢钠和双蒸水 1L,稀释成 0.1 ~ 5 μ g/mL,在酶标板的每孔加 100 μ L,37°C 包被 1h 后 4°C 下包被过夜,倾去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,拍干,然后在每孔中加入 200 μ L 1.0 ~ 5.0% 脱脂奶粉,放入 37°C 温箱中 1h 后用 PBST 洗涤 3 次,干燥后封入铝箔袋中 4°C 保存。

[0119] (7) 莱克多巴胺标准溶液的配制:准确称取莱克多巴胺标样 8.1mg,溶于 0.1L 缓冲液中,然后用缓冲液稀释分别配制 8.1 μ g/L、2.7 μ g/L、0.9 μ g/L、0.3 μ g/L、0.1 μ g/L 莱克多巴胺溶液,另外缓冲液配制 0 μ g/L 对照样,4°C 保存。

[0120] (8) 试剂分装:各种试剂按要求配制,测定合格后无菌分装。酶标记莱克多巴胺抗

体工作液 7mL/ 瓶, 莱克多巴胺标准样品 1mL/ 瓶, 底物液 7mL/ 瓶, 底物缓冲液 7mL/ 瓶, 终止液 7mL/ 瓶, 浓缩洗液 50mL/ 瓶, 浓缩样品稀释液 50mL/ 瓶。分装后贴标签, 注明批号和有效期, 4℃ 保存。

[0121] (9) 试剂盒的组装: 分别将可拆卸包被好包被抗原的微孔板 1 块, 酶标记莱克多巴胺抗体工作液、底物液、底物缓冲液、终止液、浓缩洗液、浓缩样品稀释液各 1 瓶, 莱克多巴胺标准溶液 6 瓶, 使用说明书 1 份置试剂盒内指定位置。试剂盒检验合格后封装, 4℃ 保存。

[0122] 实施例 6 酶联免疫试剂盒组分的配制

[0123] 实验步骤同实施例 5, 不同的是采用细菌提取的碱性磷酸酯酶为标记酶, 所述底物液为对硝基磷酸盐缓冲液, 所述底物缓冲液为含有过氧化氢或过氧化脲的 pH5.0 磷酸 - 柠檬酸缓冲溶液, 所述终止液为 1 ~ 2mol/L 硫酸溶液或 2mol/L 的氢氧化钠溶液, 按照实验室常规方法配制。

[0124] 实施例 7 组建检测莱克多巴胺的酶联免疫试剂盒, 包含下述组分:

[0125] (1) 包被莱克多巴胺抗原的 96 孔酶标板; 或根据产品规格的需要选用 40 孔酶标板;

[0126] (2) 辣根过氧化物酶标记莱克多巴胺单克隆抗体, 7mL/ 瓶;

[0127] (3) 莱克多巴胺标准品溶液 6 瓶, 浓度分别为 0 μg/L、0.1 μg/L、0.3 μg/L、0.9 μg/L、2.7 μg/L 和 8.1 μg/L, 1mL/ 瓶;

[0128] (4) 底物缓冲液, 7mL/ 瓶;

[0129] (5) 底物液, 7mL/ 瓶;

[0130] (6) 终止液, 7mL/ 瓶;

[0131] (7) 浓缩洗涤液, 50mL/ 瓶;

[0132] (8) 浓缩样品稀释液, 50mL/ 瓶;

[0133] (9) 使用说明书, 1 份;

[0134] (10) 盖板膜, 2 张;

[0135] (11) 自封袋 (含干燥剂), 1 个。

[0136] 实施例 8 待测样品前处理

[0137] (1) 尿液样本处理

[0138] 清澈尿液样品可以直接进行检测分析。若尿样呈浑浊状, 2000g 离心 5min 或过滤, 用上清液检测。

[0139] (2) 饲料

[0140] 将饲料粉碎, 称取 2g 置于 50mL 试管中, 加入 12mL10% 氨化甲醇 (pH9 ~ 10 的氨水溶液 9 份 + 甲醇 1 份), 充分混匀振荡 1 ~ 2min。加入 9mL 乙酸乙酯, 振荡 20min。5000rpm (4000g) 离心 10min。取有机相 500 μL 于另一试管中, 用氮气吹干。加入样品稀释液 500 μL 稀释后直接检测。稀释倍数 10 在结果计算中考虑。

[0141] (3) 组织, 例如肌肉、肝脏或肾脏等。

[0142] 将组织破碎, 用超声仪或类似仪器将组织均质化, 称取 2g 均质化后的组织样本置于可密封的试管中, 加 10mL 纯甲醇, 涡旋混匀 5min。10000g 离心 5min 或 3000g 离心 20min, 取上清。沉淀中再加入 10mL 纯甲醇, 涡旋混匀后离心 (离心方法同上), 取上清。混匀两次离心上清, 取出 10mL 用氮气吹干。取 1mL 样品稀释液重新充分溶解后用于检测, 溶解后立

即进行分析检测。稀释倍数为 1。

[0143] 实施例 9 试剂盒的检测方法

[0144] (1) 将试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温,即 20 ~ 24℃,平衡 30min 以上,将足够标准和样品所用数量的条板固定于支架,标准和样品做两个平行实验,按顺序编号。

[0145] (2) 在标准品孔加入 50 μL 标准品,样品孔加入 50 μL 待测样品。然后每孔加入 50 μL 酶标记物,轻拍混匀。盖上盖板膜,在室温孵育 20min。

[0146] (3) 倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打,每轮洗板拍打 3 次,以保证完全除去孔中的液体。用 250 μL 蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中的液体,再重复操作 3 遍。

[0147] (4) 每孔加入 100 μL 显色液(将底物缓冲液与底物液等体积混合),轻拍混匀,盖上盖板膜,暗处室温孵育 15min。

[0148] (5) 加入 50 μL 反应终止液到微孔中。混合好在波长 450nm 或 492nm,以空气为空白,测定各孔吸光值,必须在加入终止液后 60min 内读取吸光值。

[0149] 检测结果计算与分析:

[0150] 以所获标准样品吸光值的平均值计算百分吸光度值,以百分吸光度值为纵坐标,莱克多巴胺标准溶液浓度的半对数为横坐标绘制标准曲线,求出直线方程。见附图 1。Y = -14.829X+83.877 ;R² = 0.9953。用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值,根据方程式求出对应样品的莱克多巴胺浓度。所述百分吸光度值的计算式为:

[0151] 百分吸光度值(%) = (B/B₀) × 100

[0152] 其中,B 为标准溶液或样品的平均吸光值,B₀ 为 0 μg/L 标准溶液的平均吸光度值。

[0153] 检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析,对莱克多巴胺线性检测范围为 0.1 ~ 8.1 μg/L,检测限为 0.1 μg/L,整个检测过程只需 35min 就可以完成。

[0154] 实施例 10 试剂盒精密度与准确度试验

[0155] 1、标准品溶液重复性试验

[0156] 从 3 批按照实施例 4(6) 中的方法制备的酶标板中,各抽出 20 个微孔,测定 0.9 μg/L 标准溶液的吸光度值(OD 值),重复 20 次,计算变异系数 CV%,结果见表 1。

[0157] 表 1 标准品溶液重复性试验

[0158]

样品	浓度 μg/L	第 1 批	第 2 批	第 3 批	批间 CV%
		CV%	CV%	CV%	
标准品	0.9	4.2	3.9	4.9	7.8

[0159] 结果表明试剂盒标准品检测的批内变异系数范围在 3.9 ~ 4.9% 之间,批间变异系数为 7.8%。

[0160] 2、样本重复性与准确度试验

[0161] 准确度是指测得值与真值的符合程度,在 ELISA 测定中,准确度常以回收率表示,精密度常以变异系数来表示。在空白猪尿、猪肝中,将莱克多巴胺添加至终浓度为 1 μg/L(μg/kg)、5 μg/L(μg/kg),在空白饲料中,将莱克多巴胺添加至终浓度为 50 μg/kg、

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每个浓度各 10 个平行, 测定 3 批。计算平均值、添加回收率及批内与批间变异系数。结果见表 2。

[0162] 表 2 样本重复性与准确度试验结果

[0163]

样品	添加浓度 $\mu\text{g}/\text{L}$	含量	第 1 批 回收率%	CV%	含量	第 2 批 回收率%	CV%	含量	第 3 批 回收率%	CV%	批间 CV%
尿样	1	0.91	91.0	5.9	1.05	105	7.4	0.91	91.0	7.3	14.2
	5	5.25	105	6.3	4.65	93.0	6.8	5.15	103	7.8	15.7
肝样	1	0.92	92.0	7.4	0.86	86.0	7.4	0.83	83.0	6.9	17.6
	5	4.8	96.0	8.3	4.45	89.0	8.3	4.83	96.5	8.7	18.2
饲料	50	41.0	82.0	8.4	41.5	83.0	8.4	40.5	81.0	8.8	18.1
	100	86.0	86.0	8.7	89.0	89.0	8.9	89.5	89.5	9.1	18.3

[0164] 结果表明尿样、猪肝、饲料样本的添加回收率在 81.0 ~ 105% 之间, 批内变异系数在 5.9 ~ 9.1% 之间, 批间变异系数在 14.2 ~ 18.3% 之间。

[0165] 实施例 11 保存期试验

[0166] (1) 将试剂盒放置于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$, 分别取 0、2、4、6、8、9、10、11 和 12 个月的试剂盒, 对莱克多巴胺标准样品 (0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0167] (2) 将试剂盒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存的条件下放置 12 天, 每天对莱克多巴胺标准样品 (0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0168] (3) 将试剂盒在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 12 天, 每天对莱克多巴胺标准样品 (0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的吸光度值、50% 抑制浓度、添加回收率、批内变异系数各参数进行测定。

[0169] 从结果可看出, 经过三种条件保存试验, 莱克多巴胺标准样品

[0170] (0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的吸光度值下降小于 5%, 且 OD 不低于 1.5; 50% 抑制率在 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之间; 添加回收率在 80 ~ 110% 之间; 批内变异系数小于 10%; 各项指标均符合质量要求, 因此, 试剂盒可以在 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存 12 个月。

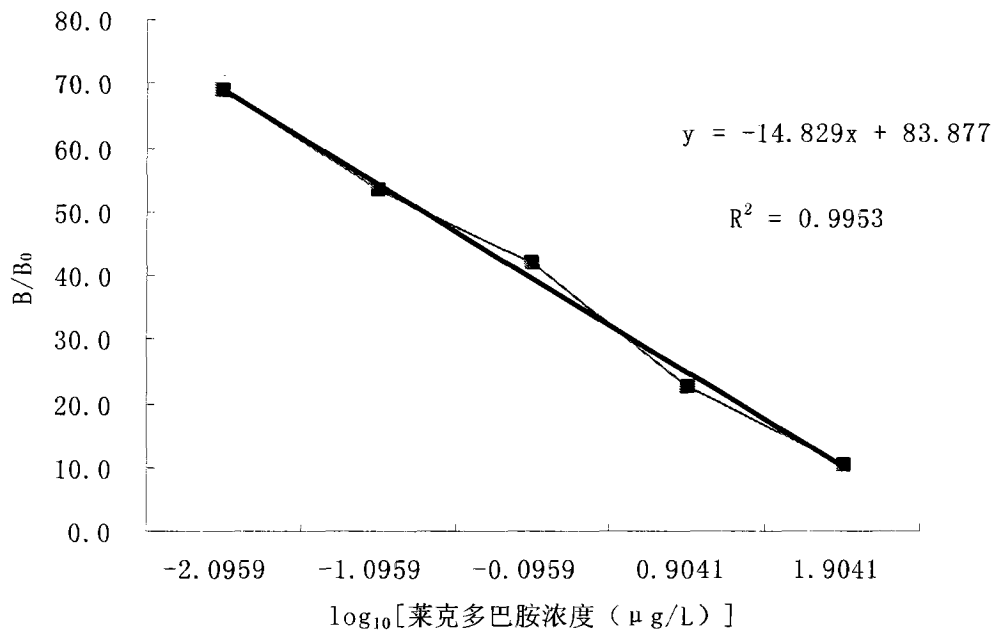


图 1

专利名称(译)	检测莱克多巴胺残留的酶联免疫试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN101241134B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200810025906.3	申请日	2008-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙远明 杨金易 雷红涛 沈玉栋 肖治理 王弘 张挺		
发明人	孙远明 杨金易 雷红涛 沈玉栋 肖治理 王弘 张挺		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	林丽明 任重		
审查员(译)	张小勇		
其他公开文献	CN101241134A		
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酶联免疫试剂盒，包括包被莱克多巴胺抗原的酶标板、酶标记莱克多巴胺抗体工作液、莱克多巴胺标准溶液、底物液、底物缓冲液、反应终止液、浓缩洗涤液和样品稀释浓缩液。本发明同时公开了应用上述试剂盒检测莱克多巴胺残留的方法，包括进行样品的前处理，利用试剂盒进行检测，结果的处理与分析等步骤。本发明提供的检测莱克多巴胺的试剂盒采用直接竞争酶联免疫吸附分析技术，灵敏度高、稳定性好，大大简化了操作步骤和反应时间，减少了因操作复杂引起的误差，降低了成本，非常适合大量样品的筛查，具有重要的现实意义。

