



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101929998 A

(43) 申请公布日 2010.12.29

(21) 申请号 200910033482.X

(22) 申请日 2009.06.22

(71) 申请人 常州赛德瑞尔生物科技有限公司

地址 213200 江苏省金坛市金坛经济开发区
中兴路 89 号

(72) 发明人 王国洪 王志洪

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

C07C 211/52 (2006.01)

C07C 215/60 (2006.01)

C07D 251/54 (2006.01)

C07C 251/30 (2006.01)

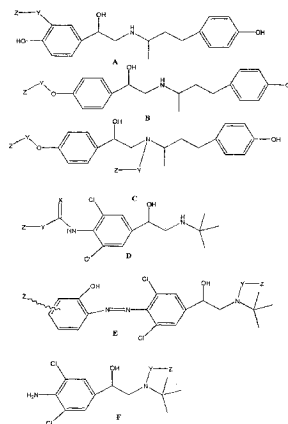
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

食品安全快速均相免疫检测试剂

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种均相免疫检测试剂,本发明采用利用均相酶免放大反应的方法测定动物体液和组织萃取液中有害物质残留量,能对有害物质残留包括常用有机小分子药品和违禁药品,包含盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、三聚氰胺、孔雀石绿、苯二氮卓、三环类抗抑郁药和各种抗菌素类药物进行检测,具有十分广泛的应用前景和社会意义。本发明中开发的产品不仅灵敏度高,而且可以同时检测上百个化合物及代谢产物,检测快速、准确,检测数据可自动处理、打印,也可连接互联网实现同步监控。



1. 一种均相的免疫检测试剂,其特征在于利用均相的免放大反应的方法测定动物体液和组织萃取液中有害物质残留量。

2. 根据权利 1 所述的均相免疫检测试剂,其特征在于所指的均相免放大反应是指待测的样品和试剂均为液相,测定过程中不存在分离步骤,样品与抗体反应后再加入标记的抗原进行反应。

3. 根据权利 1 所述的均相免疫检测试剂,其特征在于所指的动物体液和组织可包括动物尿液、血液、动物内脏或肌肉等的体液和组织;

4. 根据权利 1 所述的均相免疫检测试剂,其特征在于所指的有害物质残留包括常用有机小分子药品和违禁药品,包含盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、三聚氰胺、孔雀石绿、苯二氮卓、三环类抗抑郁药和各种抗菌素类药物。

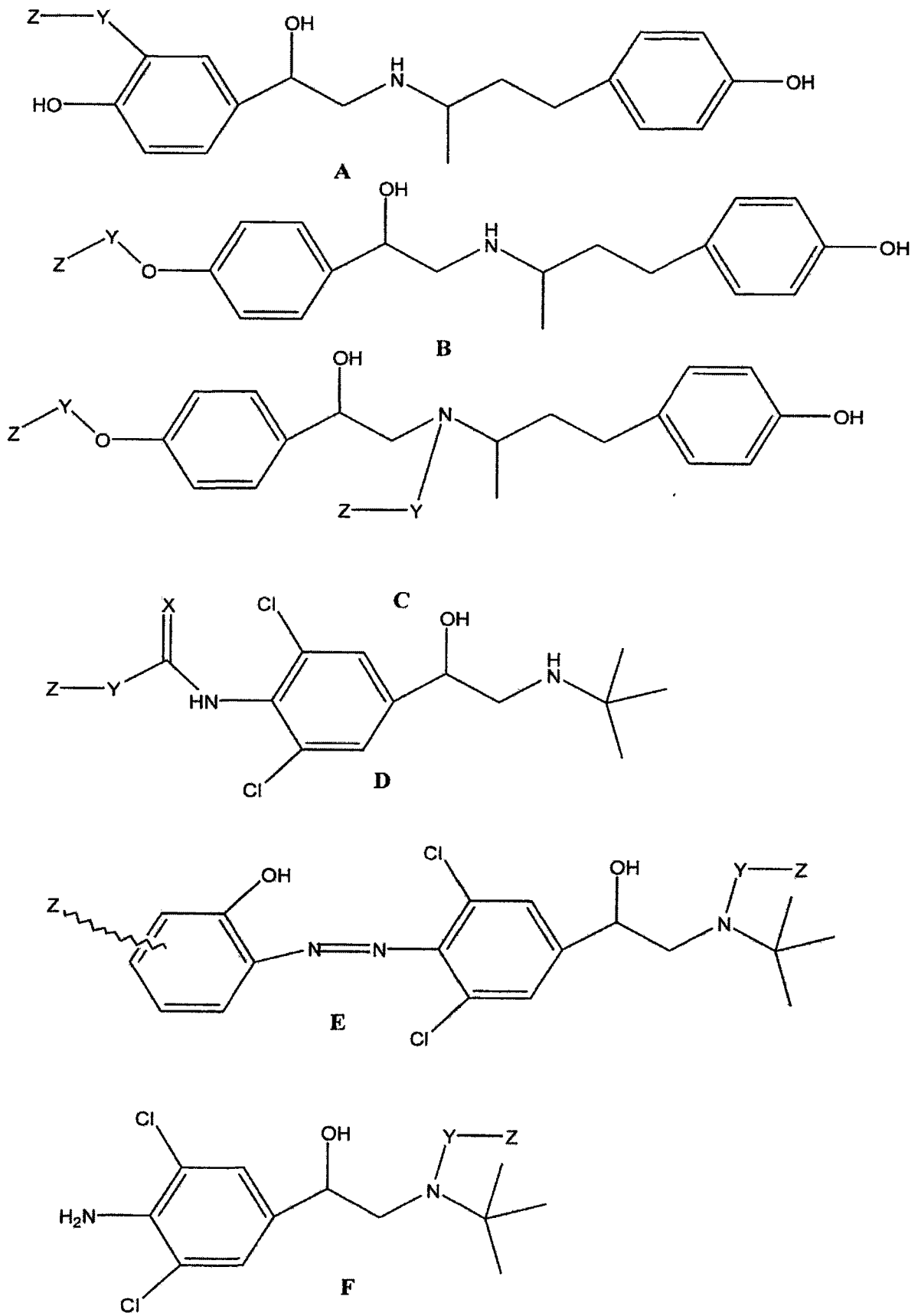
5. 根据权利 1 所述的均相的免疫检测试剂,其特征在于由于以下部分组成,由分析的样品和针对目标分析物(原药或药物主要代谢物)的单克隆或多克隆抗体(试剂 A)以及原药或药物主要代谢物与标记抗原如特定酶(G6PDH)标记的抗原(试剂 B),其标记物可以是除酶以外的化学发光物或其它标记物,如胶体金、乳胶颗粒、染料等。

6. 根据权利 1 所述的均相的免疫检测试剂,其特征在于由以下的化合物所获得的抗体和标记的物用于均相免疫反应中。

7. 根据权利 1 所述的均相的免疫检测试剂,其特征在于均相酶联放大技术产品中所用的缓冲液包括常用磷酸盐(PBS)、Tris、HEPES 等缓冲液。

8. 根据权利 1 所述的均相的免疫检测试剂,其特征在于所用的半抗原连接到大分子上,方法包括常用的重氮法、酸酐法、活化酯法等。

9. 根据权利 1 所述的均相的免疫检测试剂,其特征在于分子式为:



食品安全快速均相免疫检测试剂

所属技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种食品安全检测试剂。

背景技术

[0002] 我国卫生部和农业部已制定了一系列农药残留限量(大约 136 种)和相应的 123 种农药检验方法,颁布了农药多残留检测方法(包括有机氯、有机磷、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类近 50 种农药)。但我国仍缺乏自主研发的系统的多残留、大通量的均相酶免放大技术产品。

[0003] 免疫检测方法是目前检测小分子化学药物的最快速方法,据欧共体对 2000 多个实验室(包括法证实验室、临床实验室、研究机构、参照实验室)进行的调查,筛选实验采用免疫法的占 89.6%、理化色谱法的只有 10.4%,而且免疫法的采用还处于快速上升势态。

[0004] 传统的免疫快速检测产品(放免法、酶联法、胶体金法)都需要将标记的抗原或抗体(探针)和游离(探针)的抗原或抗体进行分离,才能通过肉眼或仪器读取结果,所需时间长、操作步骤多、系统误差大。反应过程见以下方程式:

[0005] $Ab(\text{抗体}) + Ag(\text{待测物}) + Ag^*(\text{标记抗原}) \rightarrow Ab-Ag + Ab-Ag^* + Ag^* + Ag$

[0006] 需要分离步骤的原因是:用胶体金、同位素或 HRP 酶标记的探针本身理化性质在反应中没有变化,仪器无法区分游离的探针(Ag^*)和与抗体结合的探针($Ab-Ag^*$),必须通过层析、沉淀或洗涤方法将 Ag^* 除去后,才能准确测量 $Ab-Ag^*$ 的浓度,从而估算出待测物(Ag)的浓度。

[0007] 均相免疫技术应用的标记物,理化性质在与抗体结合后发生改变,无需分离就可直接读取溶液中 $[Ag^*]$ 或 $[Ab-Ag^*]$ 浓度来推算出待测物 Ag 的浓度。该技术(EMIT)及产品是集现代有机合成化学、免疫化学、分子生物学和全自动智能性生化分析仪器为一体的高科技产业,在测定速度、准确性和可靠性方面均比胶体金法和 ELISA 方法先进得多。

[0008] 均相免疫放大技术可用于标记的物质有:酶、凝胶颗粒、化学发光物、荧光物质以及胶体金等。例如:EMIT 是利用酶标记物与相应的抗原或抗体结合后,标记酶的活性会发生改变,不用分离结合和游离酶标记物,通过测定标记酶的活性改变,而确定抗原或抗体的含量。基本原理:半抗原与酶结合成酶标半抗原,保留半抗原和酶的活性。酶标半抗原与抗体结合后,所标的酶与抗体密切接触,使酶的活性中心受影响而活性被压制(如附图 1)。而游离的酶标半抗原仍保持酶的活性(如附图 3),通过测定标记酶的活性,确定与抗体结合的样本中半抗原的量(如附图 2),而间接确定样本中药物的含量。

[0009] EMIT 试剂盒中的主要试剂为:①、抗体/酶的底物,②、酶标半抗原,检测对象为标本中的半抗原。试剂盒的工作原理为:当试剂①、②与标本混合后,标本中的待测物与酶标半抗原竞争性地与试剂中的抗体相结合。在反应后酶活力大小与标本中的待测物浓度呈一定的比例,从酶活力的测定结果就可推算出标本中待测物的量。该技术目前主要用于小分子激素和有机化合物(如药物及其代谢物)的测定。虽然此技术已用于测定常用小分子药物,尤其是滥用毒品。但由于测定灵敏度的限制,还没有任何有关技术用于食品中有毒有害

物质（如：农兽药）残留的检测报道。

[0010] 均相免疫分析方法速度快、操作简单、单一性好、系统误差小于 1%，灵敏度比化学显色法高，均相免疫技术已广泛应用于违禁药品的大通量检测，对于大部分毒品检测的准确性和灵敏度都超过 95%，已成为欧美国家大型检测中心的必备技术和试剂。但用于食品中有毒有害物质的检测尚未见报道。其原因在于传统的 EMIT 技术的检测灵敏度还达不到 1ng/ml。

[0011] 食品安全检测要求残留药物的含量检测达到极高的灵敏度，而且快速、简便、定量。市售的胶体金试纸只能定性检测，ELISA 试剂盒的检测结果受环境和操作者技能影响，传统的 EMIT 试剂盒的灵敏度较低。

[0012] 发明目的

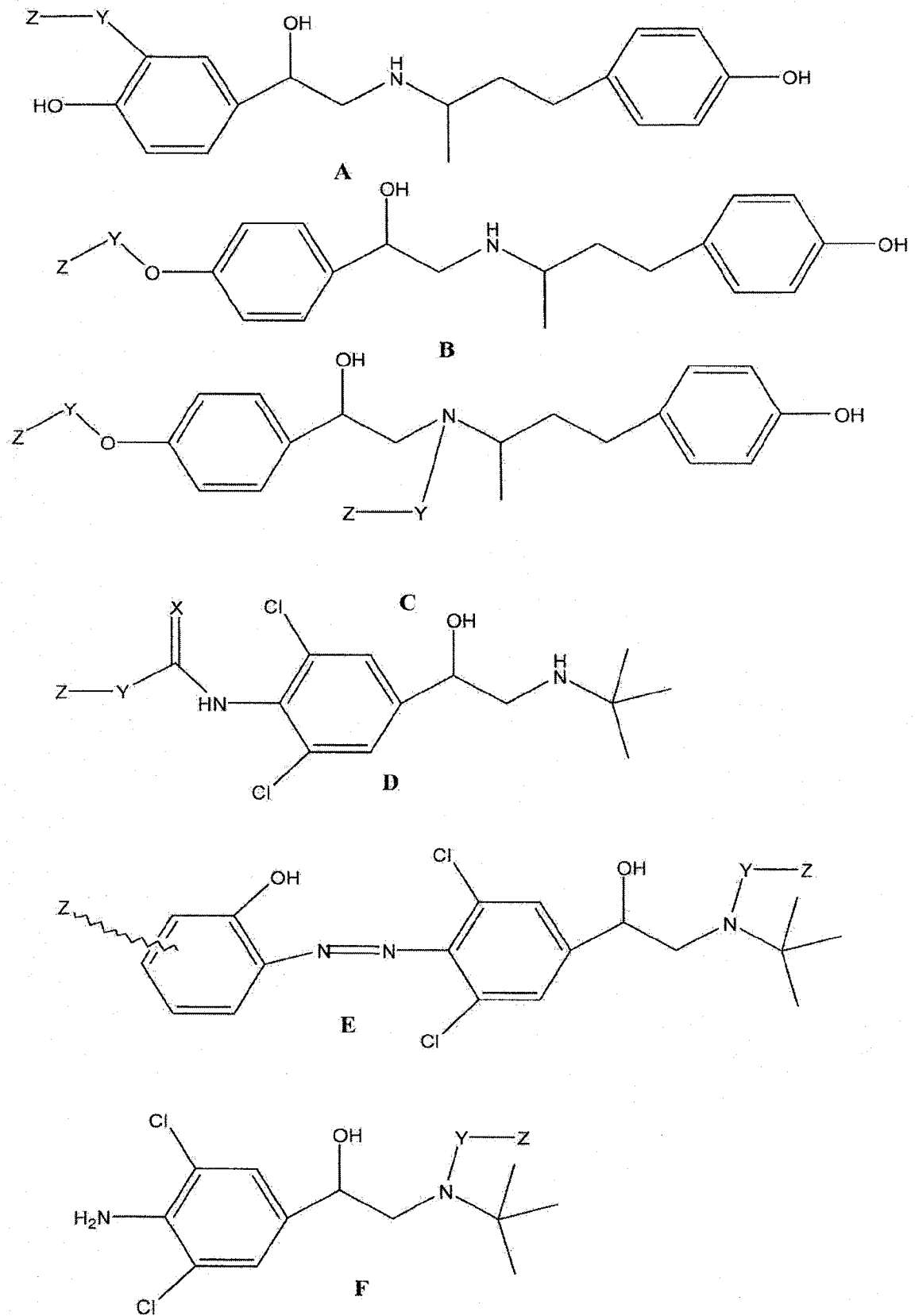
[0013] 本发明的目的是通过对传统均相酶免放大技术的改良，提供一系列满足检测要求的有害物质残留均相免疫检测试剂盒。

发明内容

[0014] 本发明的构思是这样的：

[0015] 利用均相酶免放大反应的方法测定动物体液和组织萃取液中有害物质残留量；其中所指的均相酶免放大反应是指待测的样品和试剂均为液相，测定过程中不存在分离步骤，样品与抗体反应后再加入标记的抗原进行反应。其中所指的动物体液和组织可包括动物尿液、血液、动物内脏或肌肉等；所指的有害物质残留包括常用有机小分子药品和违禁药品，包含盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、三聚氰胺、孔雀石绿、苯二氮卓、三环类抗抑郁药和各种抗菌素类药物。均相酶免放大反应是由针对目标分析物（原药或药物主要代谢物）的单克隆或多克隆抗体（试剂 A）以及原药或药物主要代谢物与标记抗原如特定酶（G6PDH）标记的抗原（试剂 B），其标记物也可以是除酶以外的化学发光物或其它标记物，如胶体金、乳胶颗粒、染料等。由以下的化合物所获得的抗体和标记的物用于均相免疫反应中。均相酶联放大技术产品中所用的缓冲液包括常用磷酸盐（PBS）、Tris、HEPES 等缓冲液。所用的半抗原连接到大分子上，方法包括常用的重氮法、酸酐法、活化酯法等。其分子式：

[0016]



[0017] 有益效果

[0018] 由于开发的食品安全中各类农兽药有害残留 EMIT 快速高通量检测试剂盒,采用

自有知识产权的酶标记反应技术,检测准确度和效率相比之前的筛查方法有极大的提高;结合全自动化智能性生化分析仪的高灵敏度及高速性,可实现每天 1 万份的快速高通量检测。每份样本可同时检测高达上百种药物及其代谢产物,这是任何其它方法无法代替的,已成为发展现代分析仪器的一个重要发展方向之一。应用领域广,集高度并行性、特异性强、精确度高、检测速度快、高通量检测等优点于一体;在实际应用中可以大大降低劳动强度和提高工作效率,节省能源及成本等,解决传统方法耗时长、精度低。另外,开发的技术平台是与国际相接轨的,达到了国际领先水平,更重要的是该技术平台还可用于人体唾液、尿液、头发中微量毒品检测,具有十分广泛的应用前景和社会意义。本发明中开发的产品不仅灵敏度高,而且可以同时检测上百个化合物及代谢产物,检测快速、准确,检测数据可自动处理、打印,也可连接互联网实现同步监控。

附图说明

- [0019] 图 1 为与抗体结合后的酶标记半抗原图;
- [0020] 图 2 为与抗体结合后的样本中半抗原图;
- [0021] 图 3 为游离酶标半抗原图;
- [0022] 图 4 为反应式原理图;
- [0023] 图 5 实施例一莱克多巴胺试剂盒检测标准曲线图;
- [0024] 图 6 实施例二克伦特罗试剂盒检测标准曲线图;
- [0025] 图 7 实施例三苯二氮卓 EMIT 检测标准曲线图。

实施例

[0026] 具体实施方式下面对本发明作进一步的说明。

[0027] 实施例一:莱克多巴胺均相酶免放大技术产品

[0028] 1 半抗原的制备

[0029] 将 0.8g 莱克多巴胺与 0.3g 醋酸酐溶于 20ml 四氢呋喃中,加入 0.5ml 二乙胺后,加热回流 12 小时。在减压下除取溶剂后,加入 10ml 盐酸溶液 (0.1N),用 30ml 乙酸乙酯萃取目标半抗原。除去乙酸乙酯后,所得半固态物 (0.75g) 溶于 10ml 甲醇中。直接用于下一步完全抗原的合成。

[0030] 2 抗原的合成

[0031] 取上述甲醇溶液 1ml (75mg 半抗原),减压除去溶剂,剩余物溶于 0.5ml 二甲酰胺 (DMF) 中,加入 0.1g DCC 和 0.03g 氮羟基丁二酰胺,室温下反应 2 小时后,将反应物分批加到 5ml 蛋白质如 BSA (0.3g) 或 BTG、KLH 磷酸盐缓冲液中 (pH 7.5)。所得溶液在室温下反应 12 小时,4℃透析 (4×4L)。然后溶于 250ml 中性磷酸盐缓冲液 (0.1M, pH 7.0) 中。

[0032] 3 抗体制备

[0033] 将所得完全抗原按常规方法接种实验动物 (兔),加强免疫后取抗血清。

[0034] 4 酶标抗原的制备

[0035] 从抗原的合成中所制得的活化的莱克多巴胺半抗原 10mg 溶于 0.2ml 的 DMF 溶剂中。称取 G6PDH 酶 10mg,溶于 1ml 磷酸盐缓冲液 (0.1M) 中。混合上述两溶液,室温下搅拌 2 小时,再透析 2 天 (4×4L)。

[0036] 5 均相酶联试剂的制备

[0037] 1) RA 试剂的制备

[0038] 将抗体制备中所制得的抗体加到 0.01M 的 Tris 缓冲液 (pH5.5), 其中含有 0.2% 的酶底物 NAD。抗体与缓冲液的比例可从 1 : 50 到 1 : 10000。

[0039] 2) RE 试剂的制备

[0040] 将酶标抗原的制备中所制得的莱克多巴胺酶结合物加入到 0.1M 的 Tris 缓冲液 (pH7.5 ~ 8.5), 其中含有 0.1% 的 BSA。酶联物稀释比例可从 1 : 100 到 1 : 10000。调节抗体和酶联结合物在缓冲液中的浓度, 以便优化测定工作曲线范围。

[0041] 6 猪尿中莱克多巴胺含量的测定

[0042] 取 20ml 猪尿与 50 ~ 150ml 的 RA 试剂在 20 ~ 37°C 下反应 1 至 10 分钟, 加入 RE 试剂 (50 ~ 150 μ l), 测定 340nm 处的吸光度变化。以下数据是由全自动生化仪 Olympus 400E 所测得的数据:

[0043] 莱克多巴胺试剂盒检测结果表

[0044]

ng/ml	Δ mA/Min
0	0
1	80
2	120
4	160

[0045] 实施例二: 盐酸克伦特罗均相酶免放大技术产品

[0046] 1 半抗原和全抗原的制备

[0047] 方法同实施例一半抗原的制备和实施例一抗原的合成。

[0048] 2 抗体制备

[0049] 将所得完全抗原按常规方法接种实验动物 (兔), 加强免疫后取抗血清。

[0050] 3 酶标抗原的制备

[0051] 方法同实施例一酶标抗原的制备。

[0052] 4 均相酶联试剂的制备

[0053] 方法同实施例一均相酶联试剂的制备。

[0054] 5 猪尿中克伦特罗含量的测定

[0055] 操作过程同实施例一。以下数据是由全自动生化仪 Olympus 400E 所测得的数据:

[0056] 克伦特罗试剂盒检测结果

[0057]

ng/ml	Δ mA/Min.
0	0
2	120
5	210
20	420

[0058] 实施例三：苯二氮卓类化合物均相酶免放大技术产品

[0059] 本专利首次报道检测灵敏度达 1ng/ml 苯二氮卓类均相酶免放大技术产品，而传统方法只能达到 10ng/ml 左右。本专利使用一种人工合成的改良的特异 G6PDH 酶，成功将检测灵敏度提高了 10 倍左右，其检测数据如下（全自动生化仪 Olympus 400E）：

[0060] 苯二氮卓 EMIT 检测结果表

[0061]

ng/ml	Δ mA/Min
0	0
2	90
4	150
10	210

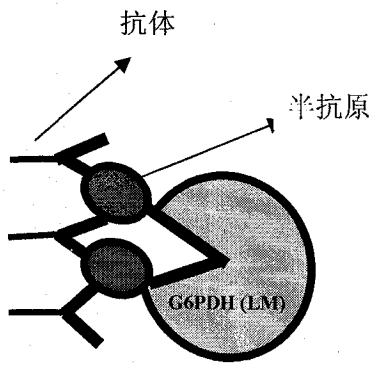


图 1

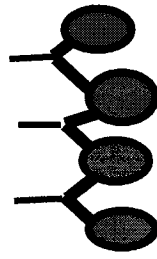


图 2

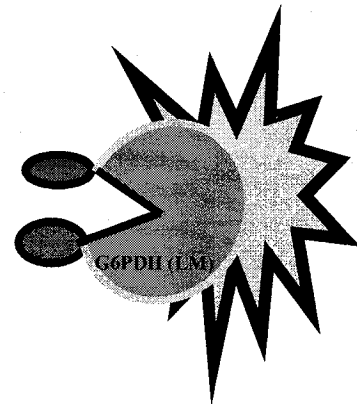


图 3

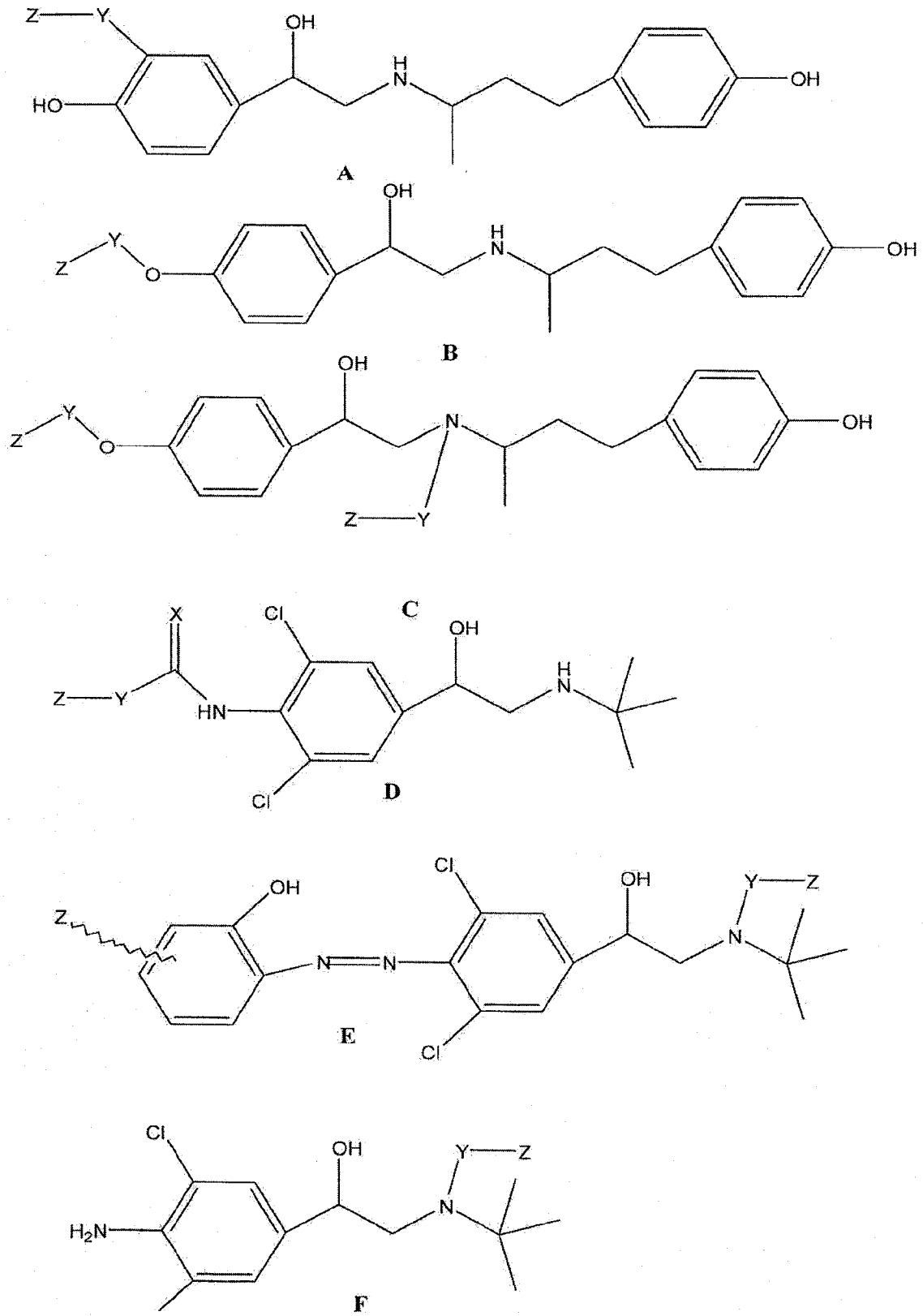


图 4

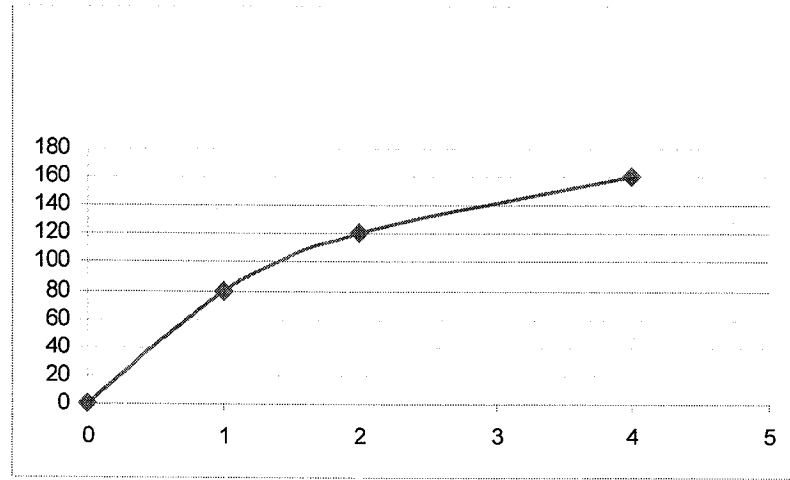


图 5

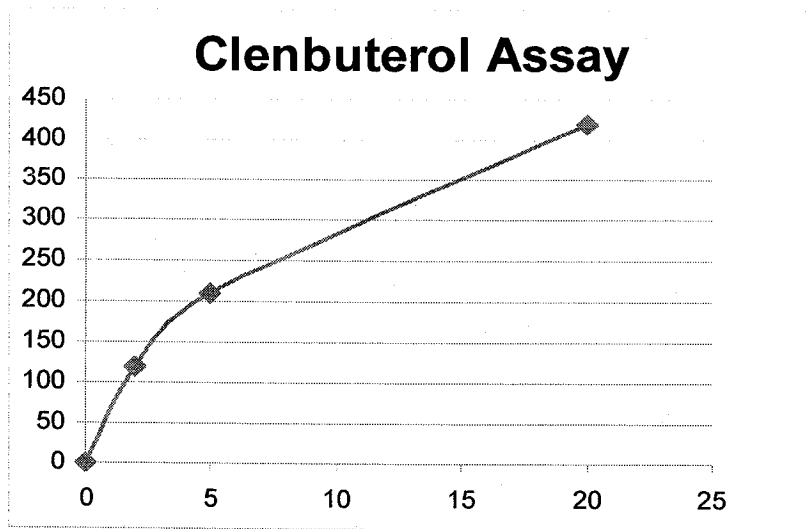


图 6

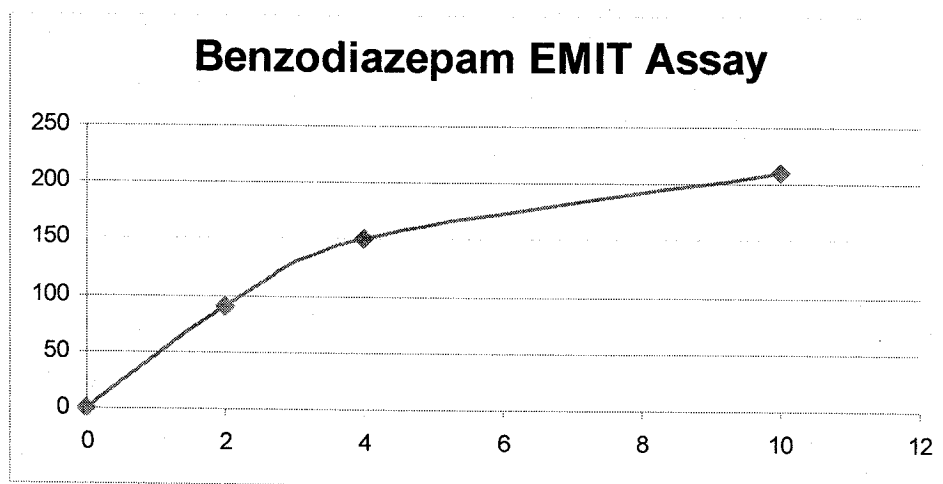


图 7

专利名称(译)	食品安全快速均相免疫检测试剂		
公开(公告)号	CN101929998A	公开(公告)日	2010-12-29
申请号	CN200910033482.X	申请日	2009-06-22
[标]发明人	王国洪 王志洪		
发明人	王国洪 王志洪		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N21/31 C07C211/52 C07C215/60 C07D251/54 C07C251/30		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，特别涉及一种均相免疫检测试剂，本发明采用利用均相酶免放大反应的方法测定动物体液和组织萃取液中有害物质残留量，能对有害物质残留包括常用有机小分子药品和违禁药品，包含盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、三聚氰胺、孔雀石绿、苯二氮卓、三环类抗抑郁药和各种抗菌素类药物进行检测，具有十分广泛的应用前景和社会意义。本发明中开发的产品不仅灵敏度高，而且可以同时检测上百个化合物及代谢产物，检测快速、准确，检测数据可自动处理、打印，也可连接互联网实现同步监控。

