



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101955541 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010165190. 4 *C12N 15/63* (2006. 01)
(22) 申请日 2010. 05. 06 *C12N 1/15* (2006. 01)
(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司 *C12N 1/19* (2006. 01)
地址 100085 北京市海淀区上地开拓路 5 号 *C12N 1/21* (2006. 01)
中关村生物医药园 B 区 421 室 *C12N 5/10* (2006. 01)
(72) 发明人 沈建忠 江海洋 王战辉 吴小平 *G01N 33/53* (2006. 01)
李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 *G01N 33/577* (2006. 01)
王奇昌 杨光 王富伟 李艳伟
(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.
C07K 16/44 (2006. 01)
C12N 15/13 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页 序列表 2 页
附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体

(57) 摘要

本发明公开了一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体。该种单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 端起第 15-132 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 端起第 148-266 位氨基酸残基所示。本发明抗体的亲和常数为 $8.06 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量 (IC_{50}) 为 0.076ng/mL 。本发明为食品中克伦特罗残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对克伦特罗和沙丁胺醇的特异性好。另外,本发明试剂盒成本低廉。因此,本发明的抗体及试剂盒及检测方法在克伦特罗和沙丁胺醇的检测中将发挥重大作用。

1. 一种单链抗体,由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成,所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 15-132 位氨基酸残基所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 148-266 位氨基酸残基所示。

2. 根据权利要求 1 所述的单链抗体,其特征在于:所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 133-147 位氨基酸残基所示。

3. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体的编码基因。

4. 根据权利要求 3 所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 43-396 位核苷酸所示的 DNA 分子;

2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 442-798 位核苷酸所示的 DNA 分子;

3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 397-441 位核苷酸所示的 DNA 分子;

4) 序列表中序列 2 自 5' 末端起第 43-798 位核苷酸所示的 DNA 分子;

5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 或 4) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

5. 含有权利要求 3 或 4 所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒。

6. 权利要求 1 或 2 所述单链抗体在检测克伦特罗或沙丁胺醇中的应用。

7. 一种检测盐酸克伦特罗或沙丁胺醇的免疫试剂盒,为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒:

1) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和酶标记抗体;其中,所述偶联物作为包被原;

2) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体和抗体;其中,所述抗体作为包被原;

3) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原的酶标记物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体;其中,所述权利要求 1 或 2 所述单链抗体作为包被原;

4) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物、权利要求 1 或 2 所述单链抗体的酶标记物;其中,所述偶联物作为包被原。

8. 根据权利要求 7 所述的免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中包括克伦特罗标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液;所述克伦特罗标准品为盐酸克伦特罗;

所述克伦特罗标准品溶液为如下各浓度的溶液:0ng/L、50ng/L、150ng/L、450ng/L、1350ng/L 和 4050ng/L;

每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的:将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合,得到所述洗涤液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M-0.015M,具体为 0.01M, pH 值为 7.2-7.6,具体为 7.4;

所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的免疫试剂盒,其特征在于:所述克伦特罗半抗原与载体

蛋白的偶联物是按照如下方法制备得到的：将每 5mg 克伦特罗半抗原溶于 0.1M 盐酸水溶液中，得到克伦特罗半抗原的水溶液，并预冷至 0℃；向克伦特罗半抗原的水溶液中加入 10mg NaNO₂，4℃条件下搅拌 5h，形成溶液 I；将 20mg 载体蛋白溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中，得到载体蛋白的溶液；将载体蛋白的溶液加到溶液 I 中，4℃条件下搅拌 6h，得到所述克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物；

所述克伦特罗半抗原为盐酸克伦特罗；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。

10. 一种检测盐酸克伦特罗或沙丁胺醇的方法，包括如下步骤：

1) 将待测样品进行前处理，得到待测样本溶液；

2) 用权利要求 7-9 中任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测；

所述前处理的方法为下述 a)、b)、c) 和 d) 中的任一：

a) 所述待测样品为猪尿或血清样品；将所述猪尿或血清样品直接作为待测样本溶液，或将所述猪尿或血清样品离心或过滤，取上清液或滤液，得到待测样本溶液；

b) 所述待测样品为饲料；将每 1g 所述待测样品与 10mL 0.01M 盐酸水溶液混匀，调整 pH 值至 6.5 ~ 8，2000r/min 离心 5min，取 100 μL 上清液；将所述 100 μL 上清液与 400 μL 样品稀释液混匀，即得到待测样本溶液；

c) 所述待测样品为液态奶；将每 1mL 液态奶、2mL 蒸馏水和 100 μL 5M 盐酸水溶液混合，在 40℃保持 3 ~ 5min，2000r/min 离心 5min，取上清液，记作上清液 I；将所述上清液 I 与 100 μL 5M 氢氧化钠水溶液和 6.8mL 蒸馏水混合，2000r/min 离心 15min，取上清液，记作上清液 II；用 400 μL 样品稀释液稀释所述上清液 II，得到的溶液即为待测样本溶液；

d) 所述待测样品为猪肉或猪肝；将每 6g 所述待测样品的均质化组织与 12mL 3%（质量百分含量）的三氯乙酸水溶液混合，并颠倒混匀 30min，10000r/min 离心 5min 或 3000r/min 离心 10min，取上清液；将所述上清液与异丙醇和乙酸乙酯的混合溶液等体积比混合，振荡提取 20min，放置 2min，10000r/min 离心 5min 或 3000r/min 离心 10min，取 3mL 上层有机相，氮气吹干，用 1mL 样品稀释液溶解，得到的溶液即为所述待测样本溶液；所述异丙醇和乙酸乙酯的混合溶液中，异丙醇与乙酸乙酯的体积比为 4 : 6；

所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。

一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体。

背景技术

[0002] 克伦特罗 (Clenbuterol, CLE), 俗称瘦肉精, 是一种 β 兴奋剂。因其能改善脂肪型动物的肉与脂肪的比例, 并能加速动物生长, 而被广泛添加于动物饲料中, 并且可以残留在动物体内。然而这种药物对人有严重的副作用。轻则导致心跳及心律不正常, 重则可引发心脏病。目前, 我国及许多国家已禁止其作为饲料添加剂使用。

[0003] 在克伦特罗的检测方法方面, 目前最为常用的方法包括高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、液相色谱-质谱联用 (LC-MS)、酶联免疫吸附分析法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 等方法。HPLC 法具有检测精确度高、假阳性率低的优点, 主要缺点是仪器价格昂贵、操作比较繁琐, 耗时长, 检测费用昂贵; 且前期样品的萃取条件的选择也对检测灵敏度和准确性有较大影响。GC-MS 灵敏度很高, 假阳性率低。该方法的主要缺点是样品需要衍生化这样复杂的前期处理。LC-MS 的缺点与 GC-MS 一样, 操作步骤繁琐, 需要贵重仪器, 所以一般用作对阳性结果的确认手段。酶联免疫吸附分析法是当前应用最广、发展最快的免疫酶技术之一, 主要优点在于检测迅速, 样品前处理简单, 检测系统操作简单, 成本低, 同时便于进行大规模检测。化学发光免疫检测技术不同于酶联免疫吸附分析法, 它是化学发光法和免疫分析法结合的产物, 因此同时具有化学发光检测技术的高灵敏性和免疫分析技术的高特异性。化学发光免疫分析法的基本原理与 ELISA 相似, 不同之处在于酶标记物的反应体系是化学发光反应。

[0004] 目前, 用于免疫检测的抗体都是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体或多克隆抗体的制备必须通过细胞培养获得, 整个生产过程复杂, 消耗时间长, 费用高, 且不易进行操作。单链抗体是将抗体重链可变区和轻链可变区基因通过一个短肽链连接后融合表达出来的抗体片断, 具有分子量小、特异性高、结合力强、易于利用基因工程技术操作等优点。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种单链抗体及其编码基因。

[0006] 本发明所提供的单链抗体, 由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成, 所述重链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 15-132 位氨基酸残基所示, 所述轻链可变区的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 148-266 位氨基酸残基所示。

[0007] 上述单链抗体中, 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的氨基酸序列如序列 1 自 N 末端起第 133-147 位氨基酸残基所示。

[0008] 所述编码基因为如下 1)、2)、3)、4) 或 5) 所示:

[0009] 1) 所述重链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 43-396 位核苷酸所示的 DNA 分子;

[0010] 2) 所述轻链可变区的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 442-798 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0011] 3) 所述连接重链可变区和轻链可变区的短肽的编码基因为自序列表中序列 2 的 5' 末端起第 397-441 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0012] 4) 序列表中序列 2 自 5' 末端起第 43-798 位核苷酸所示的 DNA 分子；

[0013] 5) 在严格条件下与 1)、2) 或 3) 或 4) 限定的 DNA 序列杂交且具有相同功能的 DNA 分子。

[0014] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、重组菌、转基因细胞系和表达盒也属于本发明的保护范围。

[0015] 上述任一所述单链抗体在检测克伦特罗或沙丁胺醇中的应用也属于本发明的保护范围。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种检测克伦特罗或沙丁胺醇的免疫试剂盒。

[0017] 本发明所提供的检测克伦特罗或沙丁胺醇的免疫试剂盒, 为下述 1)、2)、3) 或 4) 中任一所述试剂盒：

[0018] 1) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体和酶标记抗抗体；其中, 所述偶联物作为包被原；

[0019] 2) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体和抗抗体；其中, 所述抗抗体作为包被原；

[0020] 3) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原的酶标记物、上述任一所述单链抗体；其中, 所述单链抗体作为包被原；

[0021] 4) 试剂盒中包括克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物、上述任一所述单链抗体的酶标记物；其中, 所述偶联物作为包被原。

[0022] 上述任一所述免疫试剂盒中, 所述试剂盒中包括克伦特罗标准品溶液、洗涤液和样品浓缩液；所述克伦特罗标准品为盐酸克伦特罗；

[0023] 所述克伦特罗标准品溶液为如下各浓度的溶液：0ng/L、50ng/L、150ng/L、450ng/L、1350ng/L 和 4050ng/L；

[0024] 每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20, 5g 叠氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合, 得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.005M-0.015M, 具体为 0.01M, pH 值为 7.2-7.6, 具体为 7.4；

[0025] 所述样品浓缩液为浓度为 0.03mol/L-0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液, 具体为 0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0026] 上述任一所述免疫试剂盒中, 所述克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物是按照如下方法制备得到的：将每 5mg 克伦特罗半抗原溶于 0.1M 盐酸水溶液中, 得到克伦特罗半抗原的水溶液, 并预冷至 0℃；向克伦特罗半抗原的水溶液中加入 10mg NaNO_2 , 4℃条件下搅拌 5h, 形成溶液 I；将 20mg 载体蛋白溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中, 得到载体蛋白的溶液；将载体蛋白的溶液加到溶液 I 中, 4℃条件下搅拌 6h, 得到所述克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物；

[0027] 所述克伦特罗半抗原为克伦特罗；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鼠血清蛋白、甲状腺蛋白、兔血清白蛋白、血蓝蛋白或卵清白蛋白；

- [0028] 所述抗体为鼠抗 HIS 标签单克隆抗体。
- [0029] 本发明的另一个目的是提供一种检测克伦特罗或沙丁胺醇的方法。
- [0030] 本发明所提供的检测克伦特罗或沙丁胺醇的方法,包括如下步骤:
- [0031] 1) 将待测样品进行前处理,得到待测样本溶液;
- [0032] 2) 用上述任一所述免疫试剂盒对所述待测样本溶液进行检测;
- [0033] 所述前处理的方法为下述 a)、b)、c) 和 d) 中的任一:
- [0034] a) 所述待测样品为猪尿或血清样品;将所述猪尿或血清样品直接作为待测样本溶液,或将所述猪尿或血清样品离心或过滤,取上清液或滤液,得到待测样本溶液;
- [0035] b) 所述待测样品为饲料;将每 1g 所述待测样品与 10mL 0.01M 盐酸水溶液混匀,调整 pH 值至 6.5 ~ 8,2000r/min 离心 5min,取 100 μ L 上清液;将所述 100 μ L 上清液与 400 μ L 样品稀释液混匀,即得到待测样本溶液;
- [0036] c) 所述待测样品为液态奶;将每 1mL 液态奶、2mL 蒸馏水和 100 μ L 5M 盐酸水溶液混合,在 40 $^{\circ}$ C 保持 3 ~ 5min,2000r/min 离心 5min,取上清液,记作上清液 I;将所述上清液 I 与 100 μ L 5M 氢氧化钠水溶液和 6.8mL 蒸馏水混合,2000r/min 离心 15min,取上清液,记作上清液 II;用 400 μ L 样品稀释液稀释所述上清液 II,得到的溶液即为待测样本溶液;
- [0037] d) 所述待测样品为猪肉或猪肝;将每 6g 所述待测样品的均质化组织与 12mL 3% (质量百分含量) 的三氯乙酸水溶液混合,并颠倒混匀 30min,10000r/min 离心 5min 或 3000r/min 离心 10min,取上清液;将所述上清液与异丙醇和乙酸乙酯的混合溶液等体积比混合,振荡提取 20min,放置 2min,10000r/min 离心 5min 或 3000r/min 离心 10min,取 3mL 上层有机相,氮气吹干,用 1mL 样品稀释液溶解,得到的溶液即为所述待测样本溶液;所述异丙醇和乙酸乙酯的混合溶液中,异丙醇与乙酸乙酯的体积比为 4 : 6;
- [0038] 所述样品稀释液为将所述样品浓缩液稀释 20 倍得到的。
- [0039] 上述试剂盒既可以为酶联免疫试剂盒,又可为发光免疫试剂盒,当为发光免疫试剂盒时,试剂盒中还包括底物显色液;所述底物显色液由 A 液和 B 液组成;A 液由 (1) 中所述物质 (即发光剂) 中的至少一种和 (2) 中所述物质 (即发光增强剂) 中的至少一种组成:(1) 鲁米诺、异鲁米诺和 4-氨基己基-N-乙基异鲁米诺,(2) 对-碘苯酚、邻-碘苯酚和对甲苯酚;B 液为过氧化氢溶液或尿素过氧化氢溶液。所述发光底物液分为 A 液和 B 液保存,在临用前按 1 : 1 混合使用。
- [0040] 上述试剂盒的检测原理如下:
- [0041] 当在酶标板微孔条上预包被克伦特罗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,再加入克伦特罗单链抗体溶液,样本中残留的克伦特罗或克伦特罗标准品与酶标板上包被的克伦特罗半抗原与载体蛋白的偶联物竞争克伦特罗单链抗体,加入酶标记二抗进行放大作用,催化底物发光,样本发光强度值与样本中克伦特罗的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中克伦特罗的含量。
- [0042] 当在酶标板微孔条上预包被二抗时,加入克伦特罗单链抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液,再加入酶标记克伦特罗半抗原溶液,样本中的克伦特罗或克伦特罗标准品与酶标记克伦特罗半抗原竞争克伦特罗特异性抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与样本中克伦特罗的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中克伦特罗的含量。
- [0043] 当在酶标板微孔条上预包被克伦特罗单链抗体时,加入样本溶液或标准品溶液

后,再加入酶标记克伦特罗半抗原溶液,样本中残留的克伦特罗或克伦特罗标准品与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的克伦特罗单链抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与克伦特罗的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中克伦特罗的含量。

[0044] 当在酶标板微孔条上预包被克伦特罗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,再加入酶标记克伦特罗单链抗体溶液,样本中的克伦特罗或克伦特罗标准品与酶标板上包被的克伦特罗抗原竞争克伦特罗单链抗体,用催化底物发光,样本发光强度值与样本中克伦特罗的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中克伦特罗的含量。

[0045] 本发明提供的试剂盒检测方法为:

[0046] 当包被原为克罗特伦偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标二抗,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0047] 当包被原为克伦特罗偶联抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0048] 当包被原为克伦特罗单链抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记克伦特罗半抗原,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值;

[0049] 当包被原为二抗时,向酶标板微孔中加入克伦特罗单链抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标克伦特罗半抗原,温育后洗涤拍干,催化底物发光、用化学发光检测仪测定发光强度值。

[0050] 本发明提供的检测结果分析过程为:

[0051] 以所获得的样品发光强度 (B) 与第一个标准 (0 标准) 的发光强度 (B_0) 的比值 (B/B_0) 为纵坐标,以 FB 标准品浓度的对数为横坐标,通过专业分析软件绘制标准曲线,并求出 IC_{50} ,以 20% 的抑制作为最低检测限。

[0052] 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。

[0053] 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,整个检测过程只需较短时间,1.5h 内即可以完成。

[0054] 本发明的单链抗体 (scFv) 是用基因工程方法将抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 通过一段连接肽 (Linker) 连接而成的重组抗体,是保持了亲本抗体的抗原亲和活性和特异性的最小功能性抗体片段,可通过基因工程技术体外表达得到,可在细菌中很经济地大规模生产,从而使得免疫检测抗体的生产变得非常容易、简便和经济,进而大大减少检测试剂的费用,比杂交瘤细胞培养得到单抗的方法要简单得多。本发明抗体的亲和常数为 $8.06 \times 10^9 L/mol$ 、半数抑制量 (IC_{50}) 为 0.076ng/mL。本发明为食品中克伦特罗残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。

[0055] 标准品精密度试验中,本发明试剂盒的每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数在 3.5%~8.2% 之间;样本准确度和精密度实验中,猪尿样品的添加回收率为 87.5%~95.5%;猪肉样品的添加回收率为 79.9%~92.6%。猪尿样品的批内变异系数为 4.8%~8.2%,批间变异系数为 10.9%~11.2%;猪肉样品的批内变异系数为 4.9%~9.1%,批间变异系数为 10.5%~11.1%。交叉反应检测实验中,本发明试剂盒对克伦特罗和沙丁胺醇

的特异性好。综上所述,本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对克伦特罗和沙丁胺醇的特异性好。另外,本发明试剂盒成本低廉。用本发明的试剂盒检测样品中克伦特罗和沙丁胺醇的含量,具有操作简便快捷、样品前处理简单的特点,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。因此,本发明的抗体及试剂盒及检测方法在克伦特罗和沙丁胺醇的检测中将发挥重大作用。

附图说明

[0056] 图 1 为克伦特罗试剂盒标准曲线。

[0057] 图 2 为克伦特罗单链抗体的 Western-Blotting 结果。

具体实施方式

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 实施例 1、抗体的制备及功能检测

[0061] 一、克伦特罗单链抗体的制备

[0062] (一) 抗体的筛选及改造

[0063] 取 6 个月雄性 Balb/c 小鼠, Trizol 一步法提取脾细胞总 RNA, 纯化得到 mRNA, 再逆转录得到 cDNA。使用 Oligo(dT) 引物, 以 cDNA 为模板分别扩增得到重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 基因, 经重迭延伸聚合酶链式反应 (SOE-PCR) 通过一段柔性肽段 ((Gly4Ser)₃-Linker) 将 VH、VL 装配为 scFv; 将酶切 scFv 连接入核糖体展示载体 (pRDV) 中, 通过 PCR 技术在 scFv 的 5' 端引入 T7 启动子和核糖体结合位点, 3' 端引入间隔区 to1A 序列而构建出核糖体展示模板, 通过体外表达得到 mRNA-核糖体-抗体三元复合物, 构建出单链抗体核糖体展示文库, 借助 ELISA 和 PCR 技术经四轮循环筛选出特异性克伦特罗单链抗体基因, 其中在第二轮循环时, 借助错配 PCR 和交替延伸 PCR 技术进行抗体改造, 并引入酶切位点。

[0064] 该单链抗体的编码基因序列如序列列表中序列 2 所示, 自序列 2 的 5' 末端起第 43-396 位核苷酸编码重链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 442-798 位核苷酸编码轻链可变区, 自序列 2 的 5' 末端起第 397-441 位核苷酸编码短肽。

[0065] 该单链抗体由重链可变区、连接所述重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区顺次连接组成。该抗体的氨基酸序列如序列列表中序列 1 所示, 自序列 1 的 N 端起第 15-132 位氨基酸残基为重链可变区的氨基酸序列, 自序列 1 的 N 端起第 148-266 位氨基酸残基为轻链可变区的氨基酸序列, 自序列 1 的 N 端起第 133-147 位氨基酸残基为短肽序列。

[0066] (二) 抗体的制备

[0067] 表达载体 pET20b 购自德国 NOVAGEN 公司; 大肠杆菌 BL21 购自德国 NOVAGEN 公司; 蛋白纯化用 HisLink™ Protein Purification Resin 购自美国 Promega 公司, 产品目录号为 V8823。

[0068] 合成序列列表中序列 2 自 5' 末端起第 43-798 位核苷酸所示基因, 并在两端引入酶切位点 Xba I 和 Not I, 用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切, 回收目的基因片段; 用限制性内切酶 Xba I 和 Not I 酶切表达载体 pET20b, 回收载体大片段; 连接, 连接产物转化大肠

杆菌,筛选培养,挑取单克隆;将单克隆接入液体培养基进一步培养,提取质粒,酶切和测序验证,结果测得的序列如序列表中序列 2 自 5' 末端起第 43-798 位核苷酸所示,表明重组载体中基因插入方向和序列均正确,将阳性重组载体记作重组表达载体 pET20b/ScFv。

[0069] 采用氯化钙法将重组表达载体 pET20b/ScFv 转化大肠杆菌 BL21,抗性筛选,经菌液 PCR 及质粒酶切验证,得到含有重组表达载体 pET20b/ScFv 的重组大肠杆菌,记作重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv。

[0070] 2×TY 培养液的组成:由胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl 和水组成,每 1 升 2×TY 培养液中胰蛋白胨的浓度为 1.6%、酵母提取物的浓度为 1%、NaCl 的浓度为 0.5%;各百分含量均为质量百分含量。

[0071] 含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液是按照如下方法得到的:向 2×TY 培养液中添加氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖,使氨苄青霉素在溶液中的终浓度为 100 μg/ml,使氯霉素在溶液中的终浓度为 34 μg/ml,使葡萄糖在溶液中的终浓度为 1% (质量百分含量)。

[0072] 发酵重组菌:将重组大肠杆菌 BL21/pET20b/ScFv 的单个阳性菌落接种至含氨苄青霉素、氯霉素和葡萄糖的 2×TY 培养液中,37℃ 振摇,至培养体系的 A_{600} 为 0.6 时,收集细菌;将细菌重悬于 2ml LB 液体培养基中,按 1:20 的体积比将菌悬液接种至 50ml 含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基中(含相同浓度抗生素的 LB 液体培养基的组成:氨苄青霉素、氯霉素、酵母提取物、蛋白胨、NaCl 和水组成;溶液中各成分的浓度为:酵母提取物 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 1%,氨苄青霉素 100 μg/ml,氯霉素 34 μg/ml),37℃ 振摇,至培养体系的 A_{600} 为 0.6 时,加 IPTG(0.7mmol/L) 诱导,30℃ 振摇 2.5h,在 4℃ 下 5000r/min 离心 10min,收获细菌。用洗涤液(将 20mmol Tris 和 0.15mol NaCl 用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升洗涤液)洗涤 1 次,加溶菌液(将 20mmol Tris、10ml Triton X-100、250 μmol PMSF、62.5×10⁴U 溶菌酶用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升溶菌液),30℃ 放置 15min,然后在冰上超声处理(输出功率 80%)10s,停 10s,反复 3 次,至细胞不再粘稠。在 4℃ 2000×g 离心 20min,分别收集上清及沉淀。将沉淀用结合缓冲液 I(将 20mmol Tris、0.5mol NaCl 和 5mmol 咪唑用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 I) 洗涤一次,而后,悬于结合缓冲液 II(将 20mmol Tris、0.5mol NaCl、5mmol 咪唑和 6mol 尿素用水溶解,用 HCL 调 PH 值至 8.0,再用水定容至 1L,得到 1 升结合缓冲液 II) 中,4℃,12000×g 离心 20min,收集上清,经 0.45mm 滤膜过滤,收集滤液,得到抗体的粗制液。

[0073] 纯化:利用表达载体上带有的组氨酸标签(His-tag) 标记通过亲和层析纯化单链抗体蛋白。将 HisLink™ Protein Purification Resin 装柱,以 10 倍柱体积的 binding buffer(将 100mmol HEPES、10mmol 咪唑和 500mmol NaCl 用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 binding buffer) 平衡纯化柱,取抗体的粗制液上样,然后用 5 倍柱体积的 wash buffer(将 100mmol HEPES、100mmol 咪唑和用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 wash buffer) 洗脱杂蛋白,最后用 10 倍柱体积的 elution buffer(将 100mmol HEPES、250mmol 咪唑用水溶解,再调节 pH 值至 7.5,然后用水定容至 1 升,得到 1 升 elution buffer) 洗脱目标蛋白,收集洗脱液,透析,得到纯化的抗体。

[0074] (三) 抗体的功能检测

[0075] 1、用 ELISA 方法,检测抗体的半抑制率 (IC_{50}) :

[0076] a、将实施例 2 中制备得到的偶联物 (CLE-OVA) 用包被缓冲液溶解,得到 CLE-OVA 的溶液 (该溶液中 CLE-OVA 的浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$)。包被缓冲液 :pH9.6、0.1mol/L 的碳酸钠缓冲液。

[0077] 向 96 孔板的孔中加入 CLE-OVA 的溶液, $100 \mu\text{L}$ 每孔, 37°C 温育 2h ;倾去包被液,用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次, $250 \mu\text{L}$ 每孔, 每次 30s, 甩干孔中液体 ;

[0078] b、然后向每孔中加入 $200 \mu\text{L}$ 2% BSA 封闭液, 37°C 温育 2h, 倾去孔内液体 ;用 PBST 溶液 (PBS+0.05% Tween20) 洗涤 3 次, $250 \mu\text{L}$ 每孔, 每次 30s, 甩干孔中液体。

[0079] c、向孔中加入单链抗体溶液和不同浓度的盐酸克伦特罗标准品溶液, 各 $50 \mu\text{L}$ 每孔, 37°C 孵育 1 小时。以只加入单链抗体溶液不加入盐酸克伦特罗标准品溶液的孔作阳性对照。

[0080] 单链抗体溶液的制备 :用样品稀释液稀释实验 (二) 中的纯化抗体得到溶液, 抗体在溶液中的浓度为 5ng/mL ;样品稀释液为 0.002mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0081] 不同浓度的盐酸克伦特罗溶液的制备 :用样品稀释液稀释盐酸克伦特罗得到溶液。

[0082] d、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次, $250 \mu\text{L}$ 每孔, 甩干孔中液体, 加入 HRP 标记的鼠抗 His 标签单克隆抗体, 37°C 孵育 1 小时 ;

[0083] e、用 PBST 溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 洗涤 3 次, $250 \mu\text{L}$ 每孔 ;加入 TMB 显色, 37°C 反应 10 分钟, 加入 2M 硫酸终止显色反应, 每孔 $50 \mu\text{L}$, 使用酶标仪进行读数。

[0084] 实验设 3 次重复。

[0085] 结果如下 :

[0086] 1) 吸光度值与每孔所加入的标准品溶液中盐酸克伦特罗的浓度成反比 ;证明, 所表达纯化得到的单链抗体具有针对盐酸克伦特罗的结合特异性, 并呈现线性关系, 说明该抗体可用于对盐酸克伦特罗的免疫检测。

[0087] 2) 半抑制率 (IC_{50}) :阳性对照孔 (即不添加盐酸克伦特罗标准品溶液的孔) 的吸光度值为 B_0 , 各实验孔的吸光度值为 B, 当 B/B_0 为 50% 时所对应的盐酸克伦特罗标准品溶液的浓度即为半抑制率 (IC_{50})。该单抗的半抑制率 (IC_{50}) 为 0.076ng/mL 。

[0088] 2、抗体的亲和常数测定

[0089] 方法 :取定量的一定稀释度的抗体, 分别加入逐渐增加的抗原里, 可使抗体的结合达到饱和, 以结合部分 (B) 为纵坐标, 抗原浓度 (mol/L) 为横坐标绘制饱和曲线, 求出抗体饱和程度为 50% 时的游离抗原浓度, 其倒数即为该抗体在此稀释度下的亲和常数。

[0090] 结果 :抗体的亲和常数为 $8.06 \times 10^9\text{L/mol}$ 。

[0091] 3、Western-Blotting :取纯化的单链抗体 $10 \mu\text{L}$ 加入等量的 $2 \times$ 上样缓冲液, 煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳 ;将切好的凝胶块、NC 膜和滤纸在转印缓冲液中浸泡, 并转入转印夹中, 200mA 恒流转印 1h。转印结束后, 取出 NC 膜以 10mL 3% 的 BSA (PBS 配制) 封闭 2h。取一与膜相当大小的塑料袋, 将膜放入其中, 加入 2mL 抗原溶液 (用 PBST 对克伦特罗 -HRP 按进行 1 : 2000 稀释), 封口。 4°C 过夜, 次日用 PBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 取一层保鲜膜, 加 1mL ECL 发光液 (等量 A、B 液混合), 将 NC 膜沥干洗液后, 靠胶的一面朝下, 浸入发光液中, 室温放置 1min, 用保鲜膜将 NC 膜包好, 靠胶的一面朝上, 放入暗匣中, 于暗

室中用 X 光片曝光。该试验结果在 30kD 处出现了特异性的蛋白条带（见图 2），与单链抗体
的大小相符，说明纯化后的单链抗体能够与克伦特罗特异性结合。图 2 中，泳道 1 表示蛋白
低分子量 Marker，泳道 2 表示克伦特罗单链抗体。

[0092] 同时以转入空载体 pET20b 的大肠杆菌 BL21 作为对照。对照 Western blot 未检
测出任何与克伦特罗结合的蛋白条带。

[0093] 实施例 2、化学发光免疫分析试剂盒及其制备与应用

[0094] 一、化学发光免疫分析试剂盒由下述物质组成：

[0095] 1、包被克伦特罗半抗原与载体蛋白偶联物的酶标板；

[0096] 2、克伦特罗单链抗体：抗体工作液的浓度为 5ng/mL，抗体工作液是用样品稀释液
稀释实施例 1 中的纯化抗体得到的；

[0097] 3、克伦特罗标准品：标准品溶液浓度分别为 0ng/L、50ng/L、150ng/L、450ng/L、
1350ng/L 和 4050ng/L；克伦特罗标准品为盐酸克伦特罗 (Clenbuterolhydrochloride)，购
自 Sigma-Aldrich 公司；产品目录号为 C275；用样品稀释液稀释成上述各浓度；

[0098] 4、酶标二抗：辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗 HIS 标签单克隆抗体；购自美国
Sigma-Aldrich 公司，产品目录号为 A7058。

[0099] 5、底物显色液：由 A 液和 B 液组成，A 液为鲁米诺与对 - 碘苯酚混合溶液，B 液为
过氧化氢水溶液；在该发光体系中加入增强剂对 - 碘苯酚可增加化学发光强度，并在较长
时间保持稳定，从而大大提高免疫分析的灵敏度。所述发光底物液分为 A 液和 B 液保存，在
临用前按 1：1 混合使用。

[0100] 6、洗涤液：每 1 升所述洗涤液是按照如下方法配制得到的：将 10ml 吐温 20、5g 叠
氮化钠和 990ml 磷酸盐缓冲液混合，得到所述洗涤液；所述磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M，
pH 值为 7.4；

[0101] 7、样品浓缩液：0.04mol/L 的磷酸盐缓冲液；将其进行 20 倍稀释，成为样品稀释液
后使用。

[0102] 二、试剂盒的制备

[0103] 半抗原为盐酸克伦特罗 (CLE)，盐酸克伦特罗 (CLE) 购自美国 Sigma-Aldrich 公
司，产品目录号为 C275。

[0104] 1、包被原及其制备

[0105] 用重氮化法将半抗原 CLE 偶联与载体蛋白 OVA 上，由于 CLE 具有芳伯氨基的半抗
原，在强酸和冷却条件下芳伯氨基生成亲电重氮盐，与载体蛋白中的强给电子基团发生
反应，生成重氮产物，形成包被抗原 CLE-OVA。制备过程如下：

[0106] 将 5mg 盐酸克伦特罗溶于 0.1M 盐酸水溶液中，得到盐酸克伦特罗的水溶液，并
预冷至 0℃；向克伦特罗的水溶液中加入 10mg NaNO_2 ，4℃ 条件下搅拌 5h，形成溶液 I；将
20mg OVA 溶于 0.1M 磷酸盐缓冲溶液中，得到 OVA 的溶液。将 OVA 的溶液加到溶液 I 中，4℃
条件下搅拌 6h，得到的溶液中含有克伦特罗与 OVA 的偶联物（记作 CLE-OVA）；用葡聚糖凝
胶 G-25 进行纯化后，测包被原的浓度，存于 4℃ 备用。

[0107] 2、包被有包被原的酶标板及其制备

[0108] 用包被缓冲液将步骤 1 制得的克伦特罗与载体蛋白的偶联物稀释成 5.0 $\mu\text{g/mL}$ ，
每孔加入 100 μL ，37℃ 温育 2h，倾去包被液，用洗涤液稀释 20 倍后洗涤 3 次，每次 30s，拍

干,然后在每孔中加入 200 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0109] 包被缓冲液 :pH9.6、0.05mol/L 的碳酸钠缓冲液 ;

[0110] 封闭液 :每 1 升封闭液按照如下方法配制 :将 5ml 马血清、1g 叠氮化钠、30g 酪蛋白混合,用磷酸盐缓冲液溶解并定容至 1000ml,得到封闭液 ;其中,磷酸盐缓冲液的浓度为 0.02M, pH 值为 7.2。

[0111] 三、试剂盒检测方法

[0112] (一) 样品前处理

[0113] (1) 猪尿和血清样品处理 :可以直接进行检测分析 ;或者在样品比较混浊时,2000r/min 离心 5min 或过滤,用上清液检测。

[0114] (2) 饲料样品处理 :将饲料样品粉碎,称取 1g 置于 50mL 试管中 ;加入 0.01M 盐酸 10mL,充分混匀 5min ;用盐酸或氢氧化钠溶液调整 pH 值在 6.5 ~ 8 的范围 ;2000r/min 离心 5min 或过滤 ;取 100 μ L 上清液加入 400 μ L 样品稀释液,混匀后取 50 μ L 用于检测。

[0115] (3) 液态奶样品处理 :称取 1mL 液态奶置于 10mL 离心管中,加入 2mL 蒸馏水 ;加 100 μ L 5M 盐酸 (至 pH 3.0),加温至 40 $^{\circ}$ C 3 ~ 5min 直到奶样变性,2000r/min 离心 5min,将上清液转移至另一只离心管中,加入 100 μ L (2 滴) 5M 氢氧化钠,加入蒸馏水 6.8mL,2000r/min 离心 15min,取 100 μ L 上清液用 400 μ L 样品稀释液稀释后取 50 μ L 用于检测。

[0116] (4) 猪肉、猪肝样品处理 :用超声仪或类似仪器将组织均质化,称取 6g 均质化后的样品置于 20mL 试管中,加 12mL 3% 的三氯乙酸,在旋涡振荡器上振荡 1min,颠倒混匀 30min,10000r/min 离心 5min 或 3000r/min 离心 10min,将 6mL 上清液转入 20mL 试管,加 6mL (异丙醇 + 乙酸乙酯,4+6) 振荡提取 20min,放置 2min,10000r/min 离心 5min 或 3000r/min 离心 10min,取 3mL 上层有机相,氮气吹干,用 1mL 样品稀释液充分溶解,取 50 μ L 用于检测。

[0117] (二) 用试剂盒检测

[0118] 1、标准曲线的制作

[0119] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入克伦特罗标准品溶液 50 μ L,再加入克伦特罗单链抗体工作液 50 μ 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 μ L 洗涤液,30s 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抗 HIS 抗体工作液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤,加入底物显色液用化学发光检测仪进行测定。

[0120] 用每个浓度的标准品溶液的发光强度平均值 (B) 与第一个标准品溶液 (0 标准) 的发光强度值 (B_0) 的比值 (B/B_0) 作为纵坐标,以克伦特罗标准品浓度 (μ g/L) 的对数为横坐标,绘制标准曲线,得到的标准曲线如图 1 所示。

[0121] 2、样品中克伦特罗浓度的测定

[0122] 向包被有包被原的酶标板微孔中加入检测样本溶液 50 μ L,再加入克伦特罗单链抗体工作液 50 μ 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 μ L 洗涤液,30s 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 HRP 标记的抗 HIS 抗体工作液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min,倒出孔中液体,重复洗涤步骤,加入底物显色液用化学发光检测仪进行测定。

[0123] 用每个检测样本溶液的发光强度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的发光强度值 (B_0) 的比值, 则可从标准曲线上读出检测样本溶液的吸光度值, 再根据标准品溶液的浓度值换算出样本溶液中克伦特罗的残留量。

[0124] 四、试剂盒的效果检测

[0125] (一) 标准品精密度试验

[0126] 用实验一中所述试剂盒进行检测, 检测方法如实验三中所述。从 3 个不同批次的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒 (即 10 个酶标板) 进行实验, 每个酶标板抽出 20 个微孔, 测定 $20 \mu\text{g/L}$ 的标准品的溶液的发光强度值, 计算变异系数, 结果见表 1。

[0127] 变异系数的计算方法: 变异系数 (CV) = 测定结果的标准差与其平均值的百分比。

[0128] 表 1 标准品精密度试验结果 (CV%)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0129]	NO. 1	4.8	3.9	7.5	4.3	6.1	6.7	4.2	5.1	3.5	7.2
	NO. 2	5.4	5.7	4.4	5.6	6.4	7.8	5.8	3.8	5.3	4.6
	NO. 3	4.7	6.0	7.4	5.2	8.2	3.7	6.7	4.5	6.5	4.3

[0130] 通过上述试验结果可以得出, 每批试剂盒各测定 10 次标准品变异系数在 3.5%~8.2% 之间。

[0131] (二) 样本准确度和精密度试验

[0132] 用实验一中所述试剂盒进行检测。

[0133] 向不含克伦特罗的样品 (猪尿和猪肉) 中添加克伦特罗标准品, 使克伦特罗标准品在样品中的终浓度分别为 200、500、1000ng/kg (ng/L); 将添加后的样品分别按照实验三中所述方法进行前处理, 得到检测样本溶液。

[0134] 从三个不同批次的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒进行检测, 每个实验重复 5 次, 分别计算变异系数。结果分别见表 2。

[0135] 回收率的计算方法: $RG = \text{测定值} / \text{真实值} \times 100\%$;

[0136] 变异系数的计算方法: $CV = (\text{各平行样本的标准差} / \text{各平行样本平均值的比值}) \times 100\%$;

[0137] 批内变异系数的计算方法: 批内 CV = 同一次测定中各平行样本的变异系数。

[0138] 批间变异系数的计算方法: 批间 CV = 同一样本在不同批次测定结果的变异系数, 取其平均值。

[0139] 表 2 准确度和精密度试验结果

[0140]

样品	添加浓度 1 (200)			添加浓度 2 (500)			添加浓度 3 (1000)		
	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV	平均 RG	批内 CV	批间 CV
猪尿 (ng/L)	87.5	7.9	11.2	95.5	8.2	13.1	89.6	7.5	10.9
	92.1	8.2		91.3	7.3		92.5	4.8	
	89.2	7.6		91.4	6.1		90.3	7.7	
猪肉 (ng/kg)	85.4	6.5	10.5	85.2	6.8	10.9	84.6	6.9	11.1
	92.6	9.1		81.3	7.5		84.2	6.4	
	88.1	4.9		79.9	6.9		87.5	8.9	

[0141] 结果表明,猪尿样品的添加回收率为 87.5%~95.5%;猪肉样品的添加回收率为 79.9%~92.6%,符合准确度的测定标准。猪尿样品的批内变异系数为 4.8%~8.2%,批间变异系数为 10.9%~13.1%;猪肉样品的批内变异系数为 4.9%~9.1%,批间变异系数为 10.5%~11.1%,符合精密度小于或等于 20%的规定。

[0142] (三) 交叉反应率试验:

[0143] 沙丁胺醇购自美国 Sigma-Aldrich 公司,产品目录号为 S5013。

[0144] 选择与克伦特罗类似结构的化合物和临床使用的代表兽药,测定交叉反应率。通过各种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类似物的交叉反应率。

[0145]

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

[0146] 结果如表 5 所示。

[0147] 表 3 试剂盒的特异性

	药物名称	交叉反应率 (%)
	盐酸克伦特罗	100.0
	沙丁胺醇	85.0
	特布他林	20.0
	西玛特罗	0.2
	维多洛尔	0.2
	莱克多巴胺	0.2
[0148]	普萘洛尔	<0.1
	阿替洛尔	<0.1
	间羟胺	<0.1
	拉贝洛尔	<0.1
	氧烯洛尔	<0.1
	异丙肾上腺素	<0.1
	肾上腺素	<0.1
	去甲肾上腺素	<0.1

[0149] 实验表明,本发明试剂盒对盐酸克伦特罗和沙丁胺醇的特异性好,即本发明试剂盒可以检测盐酸克伦特罗和沙丁胺醇。

[0150] (四) 试剂盒保存期试验

[0151] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8℃, 经过 12 个月的测定, 试剂盒的最大发光强度值 (零标准)、50% 抑制浓度、克伦特罗添加实际测定值均在正常范围之内。考虑到运输和使用过程中, 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 8 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒的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 8 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 12 个月以上。

序列表

<110> 北京维德维康生物技术有限公司

<120> 一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体

<160>2

<210>1

<211>266

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

Pro	Leu	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val
1				5					10					15	
Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Pro	Ser	Ser	Leu
			20					25					30		
Ser	His	Leu	Cys	Thr	Val	Arg	Leu	Phe	Ser	Ser	Thr	Arg	Leu	Ser	Ala
		35					40					45			
Ser	Ile	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp	Met	Ala
	50					55					60				
Tyr	Ser	Glu	Leu	Gln	Ile	Thr	Val	Gly	Ser	Tyr	His	Asn	Pro	Asn	Ser
65					70					75				80	
Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Ser	Ser	Ala	Ile
					85					90				95	
Leu	Asn	Ser	Asp	Cys	Thr	Val	Asn	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg
			100						105				110		
Tyr	Pro	Ser	Lys	Ala	Thr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu
		115						120				125			
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
		130					135					140			
Gly	Gly	Ser	Asp	Met	Gln	Met	Thr	Gln	Phe	Pro	Val	Pro	Cys	Cys	Ile
145					150					155				160	
Ser	Gly	Thr	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Lys	Pro	Val
					165					170				175	
Asn	Ser	Ser	Val	Ala	Ser	Ile	Met	His	Trp	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
			180							185				190	
Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Thr	Ser	Val	Gln	Lys	Thr	Leu
			195						200					205	

Gly Ser Leu Pro Gly Ser Val Ala Val Gly Leu Gly Gln Thr Ser Pro
 210 215 220
 Ser Thr Ser Ile Leu Trp Arg Arg Arg Met Leu Gln Pro Ile Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Glu Gly Ala Val His Ser Ser Arg Met Asp Gln Val Gly Thr
 245 250 255
 His Glu Cys Cys Arg Arg Gly Arg Lys Val
 260 265

<210>2

<211>798

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>2

cctttagttg ttcctttteta tgcggcccag cggccatgg cccaggtgca gctgaaggag 60
 tctgggcctg gcctggtgaa cttaccatcg tctctgtccc acctctgcac tgtcaggctc 120
 ttctcaagca cccgtttate ggcgtccate tggatccggc aatttccagg aaacaaactg 180
 gagtggatgg cctactcaga gctacaaata actgtcgggt catatcacia ccctaatagt 240
 cgaatctctg tcagtcgaga cacatecaag aaccagtctt ctgcaattct gaattctgac 300
 tgtacggtga acacagccac atatttctgt gcaagatata catcaaaagc tacgtttgac 360
 ctttggggcc aaggcaccac tctcactgtc tctcaggtg gcggcggtag cggcgggtggc 420
 ggttctggag gcggcgggtt tgatatgcag atgacacagt ttctgtccc ctgctgtata 480
 tctggcactg ggagggccac catctcatac gcaggcagca agcctgtcaa cagttctgta 540
 gctagtatta tgcaactgaa ccaacagaaa ccaggacagc caccagact cctcatctat 600
 ttactagcgc tccaaaagac tctgggggtc ctgccaggtt cagtggcagt gggctctggga 660
 cagacttcac cctcaacata catcctgtgg aggaggagga tgctgcaacc tattactgtc 720
 agcactgagg gagcggttca cagtteggag atggaccaag ttggaactca cgaatgctgt 780
 cgacgcggcc gcaaggtg 798

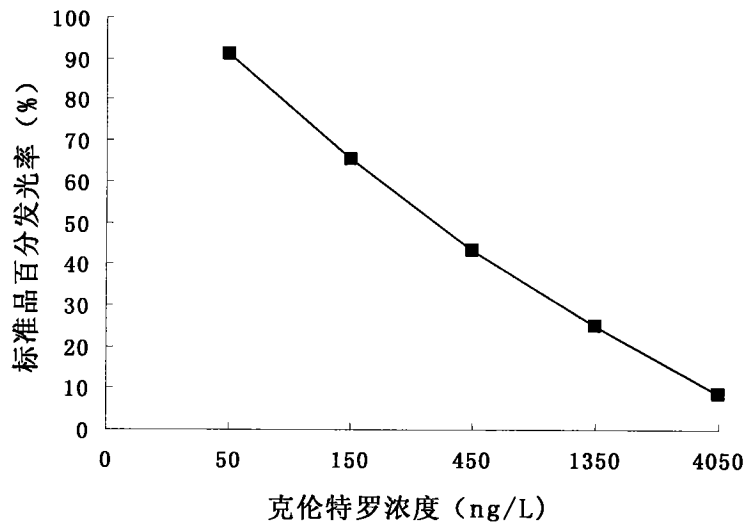


图 1

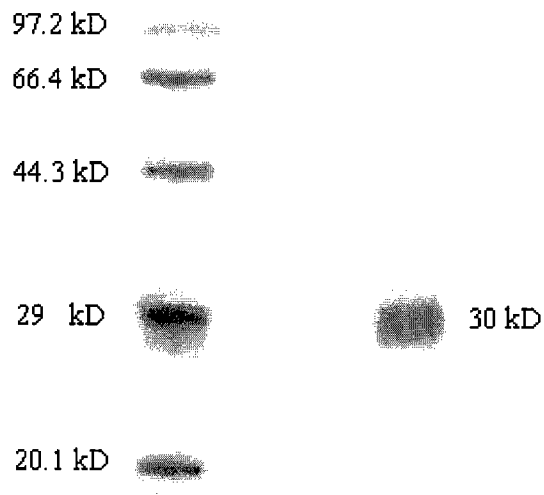


图 2

专利名称(译)	一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体		
公开(公告)号	CN101955541A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010165190.4	申请日	2010-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	沈建忠 江海洋 王战辉 吴小平 李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 王奇昌 杨光 王富伟 李艳伟		
发明人	沈建忠 江海洋 王战辉 吴小平 李杰超 徐飞 刘丹 王照鹏 王奇昌 杨光 王富伟 李艳伟		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101955541B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测克伦特罗的免疫试剂盒及其专用抗体。该种单链抗体，由重链可变区、连接重链可变区和轻链可变区的短肽、轻链可变区依次连接组成，所述重链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第15-132位氨基酸残基所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如序列1自N端起第148-266位氨基酸残基所示。本发明抗体的亲和常数 $8.06 \times 10^9 \text{L/mol}$ 、半数抑制量(IC50)为0.076ng/mL。本发明为食品中克伦特罗残留检测方法的建立提供高效价、高特异性的抗体来源。本发明试剂盒的灵敏度高、准确度高、精密度高、对克伦特罗和沙丁胺醇的特异性好。另外，本发明试剂盒成本低廉。因此，本发明的抗体及试剂盒及检测方法在克伦特罗和沙丁胺醇的检测中将发挥重大作用。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	NO.1	4.8	3.9	7.5	4.3	6.1	6.7	4.2	5.1	3.5	7.2
	NO.2	5.4	5.7	4.4	5.6	6.4	7.8	5.8	3.8	5.3	4.6
	NO.3	4.7	6.0	7.4	5.2	8.2	3.7	6.7	4.5	6.5	4.3