



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108169482 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201711380913.0

(22)申请日 2017.12.20

(71)申请人 河南联博生物科技有限公司

地址 450000 河南省郑州市花园路85号新  
闻大厦商务楼天福座18层

(72)发明人 刘昊旻 王威风 郑蓬举 张倩茹  
苟丽丽

(74)专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通  
合伙) 41113

代理人 聂永杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂

(57)摘要

本发明之目的是提供一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂,包括试剂R1、试剂R2和标准品;试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷(Tris)、聚乙二醇6000、抗克伦特罗单抗交联胶乳、牛血清白蛋白(BSA)、Proclin300,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;本发明组方科学合理,易生产制备,使用方便、安全、准确,可有效用于快速检测食品中的克伦特罗,确保食品安全,经济和社会效益显著。

1. 一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂,其特征是:包括试剂R1、试剂R2和标准品;

所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057-24.23 g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物 0.2-1.1g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至 1000ml制成;其中,克伦特罗-牛血清白蛋白复合物的制备方法是:称取100mg盐酸克伦特罗纯品,溶于2ml 1mol/ml HCL,再加入5ml蒸馏水,随后加入3ml 0.2 mol/ml亚硝酸钠;震荡混匀,反应4h,再加入50mg亚硫酸铵,终止反应;成重氮化的盐酸克伦特罗,将重氮化的盐酸克伦特罗逐滴加入溶解于10ml蒸馏水中的50mg牛血清白蛋白,用浓度1M 氢氧化钠调节反应液pH至7.5;反应液4°C下搅拌反应48h,反应完成后,置于浓度0.01mol/l磷酸缓冲盐溶液(PBS)中透析48h,每4h换磷酸缓冲盐溶液(PBS)一次,透析后反应物即为克伦特罗-牛血清白蛋白复合物-试剂R1;

所述试剂R2是由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057-24.23 g、聚乙二醇6000 10-30 g、抗克伦特罗单抗交联胶乳 100-600mg、牛血清白蛋白(BSA)10-30 g、

Proclin300 1-5 ml,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至 1000ml制成;其中,抗克伦特罗单抗交联胶乳的制备方法是:(1)活化羧基:称取羧基胶乳颗粒20-200mg,胶乳颗粒直径50-500nm,溶于pH6.5,50mM 10ml 2-吗啡乙磺酸(MES)中,成胶乳溶液,称取交联剂EDC 20mg、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)20mg依次加入上述胶乳溶液中震荡活化反应1h,得活化胶乳颗粒,在22000rpm下离心40分钟,弃去上清液,沉淀使用pH6.5、浓度50mM的2-吗啡乙磺酸(MES) 10ml复溶,重复离心二次;沉淀溶于10ml 0.01M pH7.2磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,成活化胶乳;(2)活化胶乳每毫升中加入400μg抗克伦特罗单克隆抗体,室温搅拌下反应4小时;随后每毫升加入质量浓度10%的牛血清白蛋白(BSA)溶液500μl,继续室温搅拌反应2小时;20000rpm下离心40分钟;去上清,沉淀用pH 7.2 Tris-HCL缓冲液复溶,制成抗克伦特罗单抗交联胶乳;

所述标准品制备方法是:(1)pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)的配制:分别称取磷酸氢二钠1.44g,磷酸二氢钾 0.24g,氯化钠8 g,氯化钾0.2g,用蒸馏水溶解、混匀,定容至1000ml,调pH值至7.4,备用;(2)标准品的配制:将纯度99.5%的盐酸克伦特罗(购自中国药品生物制品鉴定所对照品)1mg,用pH7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)完全溶解后,定容至浓度100μg/ml;取10μL,浓度为100μg/ml克伦特罗标准品,用pH7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至浓度100ng/ml;取3mL,浓度为100ng/ml盐酸克伦特罗溶液,用pH7.4 的浓度为0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至浓度3.0ng/ml的标准品。

2. 根据权利要求1所述的胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂,其特征是:所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物 0.2g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至 1000ml制成;所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057 g、聚乙二醇6000 10g、抗克伦特罗单抗交联胶乳 100mg、牛血清白蛋白(BSA)10g、Proclin300 1ml,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至 1000ml制成。

3. 根据权利要求1所述的胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂,其特征是:所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)12.114g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物 0.4g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;

所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷(Tris)12.114g、聚乙二醇6000 20g、抗克伦特罗单抗交联胶乳 300mg、牛血清白蛋白(BSA)20g、Proclin300 2ml,用HCL调PH至7.2,加蒸馏水

定容至1000ml制成。

4. 根据权利要求1所述的胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂,其特征是:所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris )24.23g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物 1.1g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;

所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷(Tris )24.23g、聚乙二醇6000 30g、抗克伦特罗单抗交联胶乳 600mg、牛血清白蛋白(BSA)30g、Proclin300 5ml,用HCL调PH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成。

## 一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测,特别是一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂。

### 背景技术

[0002] 克伦特罗(clenbuterol,CLB),是1972年发现的天然儿茶酚胺衍生合成化合物,分子式为C<sub>12</sub>-H<sub>18</sub>-Cl<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>-O,分子量为313.5,为白色或类白色的结晶粉末,无臭、味苦,熔点161℃,溶于水、乙醇,微溶于丙酮,不溶于乙醚。学名盐酸克伦特罗;是一种平喘药,药品名为“克喘素、舒喘宁、双氯醇胺”等。克伦特罗化学结构稳定,在体内不会被破坏分解。常规烹调对克伦特罗残留起不到破坏作用,有研究显示,克伦特罗可耐受100℃以上高温不被破坏。

[0003] 克伦特罗作为β受体激动剂,除具有平喘作用外,其副作用可加速体内脂肪分解,使体内游离脂肪酸增加,导致摄入的能量不再形成脂肪贮存于体内,而是合成蛋白质,同时克伦特罗能抑制蛋白质分解,促使胰岛素释放和糖原分解加强,因此克伦特罗具有营养重分配的作用。动物食入后,脂肪在体内沉积减少,且提高了胴体的瘦肉率,一般可使猪的瘦肉增加约10%左右,肉鸡约为5%~10%,肉鸭增加13.2%~21.04%,牛羊更高,故俗称为“瘦肉精”。

[0004] 因为克伦特罗在体内不会分解,动物食用克伦特罗后,会在内脏和组织中形成严重的蓄积性残留,据关于研究,动物体内残留浓度由大到小依次为:眼组织、肺、肝、肾、脾、肌肉或脂肪。Smith(1997)报道牛以3mg/kg口服已标记的克伦特罗,给药后48h,放射性残留最高的组织是肺,其次是肝和肾,其脂肪组织放射性残留为1.1mg/kg,在肝、肾残留更高,在肝脏中总残留超过脂肪的4倍,骨骼肌的总残留浓度为肝脏的1/15,与脂肪组织的残留大致相同。

[0005] 克伦特罗对畜体的影响,克伦特罗是一种激素类物质,不是兽药和饲料添加剂,在饲料中非法添加克伦特罗,严重危害畜产品安全和畜牧业健康发展。饲料中的克伦特罗通过动物循环系统发生作用,使气管扩张,并极大地影响肌肉蛋白质代谢、脂肪代谢及肝脏中的糖代谢,影响动物正常的生长发育。在大鼠、猪和肉用犊牛试验中证实,动物食用克伦特罗导致热量损失及心脏容量的减少和使皮肤变薄,进而导致动物器官萎缩特别是肝和肺的萎缩。此外克伦特罗对糖代谢的影响明显,肌肉中糖酵解作用不足,从而使肌肉pH值过高,使猪肉品质下降,口感明显变差。长期连续添加克伦特罗,可使猪出现异常表现,如后肢发软,肌肉震颤,心率加快。屠宰时可见肉色深、肉质坚硬、干燥。

[0006] 克伦特罗对人的危害,由于克伦特罗化学结构稳定,在体内不会被破坏分解。常规烹调对克伦特罗残留起不到破坏作用。使食用者产生综合性的食物中毒。进入人体后,对人的心脏有很大的刺激作用,产生心悸、心慌;对神经系统的刺激,产生恶心、呕吐、头晕、乏力和肌肉颤动、手抖甚至不能站立等现象;原有心律失常、高血压、冠心病、甲状腺功能亢进、前列腺肥大等疾病的患者,更容易发生心动过速、室性早搏、心电图示S-T段压低与T波倒置

等现象；与糖皮质激素合用，可引起低血钾，从而导致心律失常，长期食用还会导致染色体畸变，诱发恶性肿瘤，严重的可以致人死亡。

[0007] 2002年，农业部、原卫生部、原国家药品监督管理局联合发布《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》(农业部公告第176号)禁止使用克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等“瘦肉精”类物质在动物养殖中的使用。2011年12月5日，工信部、农业部、商务部、原卫生部、国家工商行政管理总局、国家质量监督检验检疫总局六部委发布联合公告(2011年第41号)，要求即日起在我国境内禁止生产和销售克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇。

[0008] 目前我国检测饲料、猪肌肉及其脏器、猪尿中克伦特罗的常规方法是酶联免疫(ELISA)法、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MSIMS)、气相色谱-质谱法(GC-MS)和胶体金免疫层析法。

[0009] 酶联免疫(ELISA)法定量检测克伦特罗其主要工作原理如下：利用免疫学竞争法的原理，固相载体微孔板上包被有克伦特罗蛋白偶联物，加入待测克伦特罗标准品或样品溶液及特异性的抗克伦特罗的抗体，包被在微孔板上的克伦特罗蛋白偶联物和标准品或样品中的克伦特罗竞争性地与抗体结合；再加入酶标二抗，形成抗原抗体复合物；洗涤后加入显色剂，结合的酶将无色的显色剂转化为蓝色的产物；加入反应终止液后使颜色由蓝色变为黄色；在450nm波长进行检测，样品中的克伦特罗浓度与吸收光强度成反比。该方法操作步骤多，反应时间长，检测费用昂贵，不适于分析大批量的样品。

[0010] 高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MSIMS)定量检测克伦特罗其主要工作原理如下：试样中的克伦特罗残留物经酶解，离心后将上清液调pH，用异丙醇-乙酸乙酯提取，再用MCX柱子净化，吹干浓缩后用高效液相色谱-串联质谱法测定，同位素内标法定量。其中需要使用高效液相色谱仪(配荧光检测器)、冷冻离心机、振荡器、涡旋混合器、分析天平、旋转蒸发器、氮吹仪一系列仪器设备。克伦特罗对照溶液和试液分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积进行计算样品含量。该方法操作步骤繁琐，反应时间长，需要大量精密仪器和化学试剂，对试验人员要求高，检测费用昂贵，仅适合实验室定量分析使用，不适于大批量的样品分析和基层实验室使用。

[0011] 气相色谱-质谱法(GC-MS)定量检测克伦特罗的主要工作原理如下：试样中呈结合态的克伦特罗残留物在乙酸铵缓冲液中经酶解后成游离状态，调节提取液pH，然后用乙酸乙酯和异丙醇混合溶剂萃取，萃取液旋转蒸干后用乙酸铵缓冲液溶解，过阳离子交换柱。净化后的样品氮气吹干后用双三甲基三氟乙酰氨(BSTFA)衍生，然后选择离子模式进行在气相色谱-质谱仪上进行测定，同位素内标法定量。该方法操作步骤繁琐，反应时间长，需要使用精密仪器，对试验人员要求高，检测费用昂贵，仅适合实验室定量分析使用，不适于大批量的样品分析和基层实验室使用。

[0012] 胶体金免疫层析方法(CIA)检测克伦特罗的主要工作原理：采用胶体金免疫层析技术和竞争抑制原理，将胶体金颗粒与包括抗原、抗体在内的蛋白质标记形成胶体金免疫复合物的技术。检测时，样品中的克伦特罗在流动过程中与胶体金标记的特异性克伦特罗抗体结合，抑制了克伦特罗抗体与固相载体膜上的克伦特罗-BSA偶联物的结合，如果样品中含有克伦特罗时，则检测线T在规定时间内不显颜色，结果为阳性，反之，若检测线T显红色色带，结果为阴性。无论样品中克伦特罗浓度高低，C线均显红色色带。该方法操作方便，检测时间短，但是，只能对样品进行定性检测，不能实现对样品定量检测和动态监测，满足

不了对克伦特罗检测的实际需要。

### 发明内容

[0013] 针对上述情况,为克服现有技术之缺陷,本发明之目的是提供一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂,可有效解决快速、准确,动态方便的检测食品中是否含有克伦特罗,确保食品安全的问题。

[0014] 本发明解决的技术方案是,本发明试剂包括试剂R1、试剂R2和标准品;

[0015] 所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057-24.23g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物0.2-1.1g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;其中,克伦特罗-牛血清白蛋白复合物的制备方法是:称取100mg盐酸克伦特罗纯品,溶于2ml 1mol/ml HCL,再加入5ml蒸馏水,随后加入3ml 0.2mol/ml亚硝酸钠;震荡混匀,反应4h,再加入50mg亚硫酸铵,终止反应;成重氮化的盐酸克伦特罗,将重氮化的盐酸克伦特罗逐滴加入溶解于10ml蒸馏水中的50mg牛血清白蛋白,用浓度1M氢氧化钠调节反应液pH至7.5;反应液4℃下搅拌反应48h,反应完成后,置于浓度0.01mol/l磷酸缓冲盐溶液(PBS)中透析48h,每4h换磷酸缓冲盐溶液(PBS)一次,透析后反应物即为克伦特罗-牛血清白蛋白复合物-试剂R1;

[0016] 所述试剂R2是由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057-24.23g、聚乙二醇600010-30g、抗克伦特罗单抗交联胶乳100-600mg、牛血清白蛋白(BSA)10-30g、Proclin300 1-5ml,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;其中,抗克伦特罗单抗交联胶乳的制备方法是:(1)活化羧基:称取羧基胶乳颗粒20-200mg,胶乳颗粒直径50-500nm,溶于pH6.5,50mM 10ml 2-吗啡乙磺酸(MES)中,成胶乳溶液,称取交联剂EDC 20mg、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)20mg依次加入上述胶乳溶液中震荡活化反应1h,得活化胶乳颗粒,在22000rpm下离心40分钟,弃去上清液,沉淀使用pH6.5、浓度50mM的2-吗啡乙磺酸(MES)10ml复溶,重复离心二次;沉淀溶于10ml 0.01M pH7.2磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,成活化胶乳;(2)活化胶乳每毫升中加入400μg抗克伦特罗单克隆抗体,室温搅拌下反应4小时;随后每毫升加入质量浓度10%的牛血清白蛋白(BSA)溶液500μl,继续室温搅拌反应2小时;20000rpm下离心40分钟;去上清,沉淀用pH 7.2Tris-HCL缓冲液复溶,制成抗克伦特罗单抗交联胶乳;

[0017] 所述标准品制备方法是:(1) pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)的配制:分别称取磷酸氢二钠1.44g,磷酸二氢钾0.24g,氯化钠8g,氯化钾0.2g,用蒸馏水溶解、混匀,定容至1000ml,调pH值至7.4,备用;(2)标准品的配制:将纯度99.5%的盐酸克伦特罗(购自中国药品生物制品鉴定所对照品)1mg,用pH7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)完全溶解后,定容至浓度100μg/ml;取10μL,浓度为100μg/ml克伦特罗标准品,用pH7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至浓度100ng/ml;取3mL,浓度100ng/ml盐酸克伦特罗溶液,用pH7.4的浓度为0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至浓度3.0ng/ml的标准品。

[0018] 本发明组方科学合理,易生产制备,使用方便、安全、准确,可有效用于快速检测食品中的克伦特罗,确保食品安全,经济和社会效益显著。

### 具体实施方式

[0019] 以下结合具体情况和实施例对本发明的具体实施方式做详细说明。

[0020] 本发明在具体实施中可由以下实施例给出:

[0021] 实施例1:本发明试剂包括试剂R1、试剂R2和标准品;

[0022] 所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物0.2g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;其中,克伦特罗-牛血清白蛋白复合物的制备方法是:称取100mg盐酸克伦特罗纯品,溶于2ml 1mol/ml HCL,再加入5ml蒸馏水,随后加入3ml0.2mol/ml亚硝酸钠;震荡混匀,反应4h,再加入50mg亚硫酸铵,终止反应;成重氮化的盐酸克伦特罗,将重氮化的盐酸克伦特罗逐滴加入溶解于10ml蒸馏水中的50mg牛血清白蛋白,用浓度1M氢氧化钠调节反应液pH至7.5;反应液4℃下搅拌反应48h,反应完成后,置于浓度0.01mol/l磷酸缓冲盐溶液(PBS)中透析48h,每4h换磷酸缓冲盐溶液(PBS)一次,透析后反应物即为克伦特罗-牛血清白蛋白复合物-试剂R1;

[0023] 所述试剂R2是由三羟甲基氨基甲烷(Tris)6.057g、聚乙二醇6000 10g、抗克伦特罗单抗交联胶乳100mg、牛血清白蛋白(BSA)10g、Proclin300 1ml,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;其中,抗克伦特罗单抗交联胶乳的制备方法是:(1)活化羧基:称取羧基胶乳颗粒20mg,胶乳颗粒直径120nm,溶于pH6.5,50mM 10ml 2-吗啡乙磺酸(MES)中,成胶乳溶液,称取交联剂EDC 20mg、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)20mg依次加入上述胶乳溶液中震荡活化反应1h,得活化胶乳颗粒,在22000rpm下离心40分钟,弃去上清液,沉淀使用pH6.5、浓度50mM的2-吗啡乙磺酸(MES)10ml复溶,重复离心二次;沉淀溶于10ml 0.01M pH7.2磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,成活化胶乳;(2)活化胶乳每毫升中加入400μg抗克伦特罗单克隆抗体,室温搅拌下反应4小时;随后每毫升加入质量浓度10%的牛血清白蛋白(BSA)溶液500μl,继续室温搅拌反应2小时;20000rpm下离心40分钟;去上清,沉淀用pH 7.2Tris-HCL缓冲液复溶,制成抗克伦特罗单抗交联胶乳;

[0024] 所述标准品制备方法是:(1) pH 7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)的配制:分别称取磷酸氢二钠1.44g,磷酸二氢钾0.24g,氯化钠8g,氯化钾0.2g,用蒸馏水溶解、混匀,定容至1000ml,调pH值至7.4,备用;(2)标准品的配制:将纯度99.5%的盐酸克伦特罗(购自中国药品生物制品鉴定所对照品)1mg,用pH7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)完全溶解后,定容至浓度100μg/ml;取10μL,浓度为100μg/ml克伦特罗标准品,用pH7.4 0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至浓度100ng/ml;取3mL,浓度100ng/ml盐酸克伦特罗溶液,用pH7.4的浓度为0.01M磷酸缓冲盐溶液(PBS)定容至浓度3.0ng/ml的标准品。

[0025] 实施例2:所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)12.114g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物0.4g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;

[0026] 所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷(Tris)12.114g、聚乙二醇600020g、抗克伦特罗单抗交联胶乳300mg、牛血清白蛋白(BSA)20g、Proclin3002ml,用HCL调PH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;

[0027] 制备方法同实施例1。

[0028] 实施例3:所述试剂R1由三羟甲基氨基甲烷(Tris)24.23g、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物1.1g,用HCL调pH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;

[0029] 所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷(Tris)24.23g、聚乙二醇600030g、抗克伦特罗单抗交联胶乳600mg、牛血清白蛋白(BSA)30g、Proclin3005ml,用HCL调PH至7.2,加蒸馏水定容至1000ml制成;

[0030] 制备方法同实施例1。

[0031] 本发明的使用情况是：使用半自动生化分析仪或全自动生化分析仪进行检测。基本参数如下：反应温度37℃；比色杯光径1.0cm；主波长570nm，副波长800nm；反应时间8分钟；待测物品和标准品量10u1；所说的样品为饲料、猪肌肉及其脏器、猪尿，所说的标准品为纯度达99.5%盐酸克伦特罗纯品。

[0032] 首先使用梯度稀释的系列标准品做标准曲线，取10u1待测物品溶液加试剂R1 150u1混匀，37℃孵育3-5分钟后，加试剂R2 50u1混匀，37℃孵育30秒后读取吸光度值A1，3分钟后读取吸光度值A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。以空白管调零读取各管吸光度。

[0033] 试验结果的计算：

待测物品  $\Delta A$

[0034] 待测物品 CLB 浓度 (ng/ml) =  $\frac{\text{待测物品 } \Delta A}{\text{标准品 } \Delta A} \times \text{标准品浓度}$

标准品  $\Delta A$

[0035] 注：待测物品溶液  $\Delta A$ ：以空白管吸光度为对照的待测物品溶液管吸光度

[0036] 标准品  $\Delta A$ ：以空白管吸光度为对照的标准品管吸光度

[0037] 本发明的测量原理是：纳米胶乳颗粒包被的是克伦特罗单克隆抗体，在液相中与一定量的克伦特罗-牛血清白蛋白抗原发生抗原抗体反应，形成不溶性的免疫复合物，进一步产生浊度。该浊度在波长570nm可被检测到，在全自动生化分析仪上该浊度变化表现为相应的吸光度变化值。由于竞争原理，所形成的吸光度变化值与无被测物质时相比下降，在竞争法中吸光度的变化值与被测物质克伦特罗含量负相关，使用已知浓度的标准品绘制标准曲线，则可根据被测标本的反应吸光度变化计算出其含量。

[0038] 试剂性能稳定可靠，并经试验得到了充分证明，有关试验情况如下：

[0039] 试剂性能测试

[0040] 试验质控品

[0041] 水平质控品I：靶值：0.50ng/ml，允许范围：0.475~0.625ng/ml

[0042] 水平质控品II：靶值：2.0ng/ml，允许范围：1.8~2.2ng/ml

[0043] 仪器：HITICH 7060全自动生化分析仪

[0044] 准确度试验

[0045] 用水平质控品进行测试，重复检测3次，取测试结果均值 (M)，按下列公式计算相对偏差 (B)。

$$[0046] \quad B = \frac{M - T}{T} \times 100\%$$

[0047] 式中：

[0048] M—测试结果均值；

[0049] T—有证参考物质标志值，或各浓度动物源样品定值。

[0050] 测定准确度结果如下表：

[0051] 水平质控品I测定结果：靶值：0.50ng/ml，允许范围：0.375~0.625ng/ml

[0052]

测定值 (ng/ml)			M (ng/ml)	T (ng/ml)	M-T	相对偏差 B(%)
0.47	0.49	0.51	0.49	0.50	-0.01	2.00%

[0053] 水平质控品II测定结果:靶值:2.0ng/ml,允许范围:1.8~2.2ng/ml

[0054]

测定值 (ng/ml)			M (ng/ml)	T (ng/ml)	M-T	相对偏差 B(%)
1.98	2.02	2.04	2.01	2.0	0.01	0.5%

[0055] 精密度(变异系数CV)试验

[0056] 取本发明试剂,对水平质控品II:2.0ng/ml进行10次重复测定,然后计算测定值的均数 $\bar{X}$ 、测定值的标准差S与测定值的变异系数CV值,其公式如下:

[0057] 
$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

[0058] 式中:

[0059]  $\bar{X}$ —为测定值的平均数;

[0060] S—为测定值的标准差;

[0061] CV—为测定值的变异系数。

[0062] 试剂测定结果如下表:

[0063] 水平质控品II:靶值:2.0ng/ml,允许范围::1.8~2.2ng/ml

[0064]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV
ng/ml	1.97	2.03	1.99	1.97	2.01	1.97	2.02	2.00	2.00	2.02	2.00	0.021	1.05%

[0065] 线性试验

[0066] 取CLB浓度为10ng/ml猪尿标本,用生理盐水作梯度稀释,稀释比例为0.05ng/mL、0.10ng/mL、0.50ng/mL、1.5ng/mL、3.0ng/mL。将系列稀释样品和生理盐水进行测定,每点测定3次,取平均值,对系列6点的实测平均值与相应理论值作回归分析,结果见下表

[0067] 线性试验结果

	1	2	3	4	5	6
理论值 (ng/ml)	0.00	0.05	0.10	0.50	1.50	3.00
[0068] 实测均值 (ng/ml)	0.00	0.06	0.11	0.48	1.39	3.15
回归方程	$Y=-0.0226+1.0341X$					
相关系数	$r=0.9982$					

[0069] 线性试验结果

	1	2	3	4	5	6
理论值 (ng/ml)	0.00	0.05	0.10	0.50	1.50	3.00
[0070] 吸光度均值 ( $\Delta$ A)	0.892	0.857	0.80 4	0.67 4	0.415	0.125
回归方程	$Y=0.8670-0.3727x+0.0421x^2$					
相关系数	$r=0.9980$					

[0071] 以上结果表明CLB胶乳增强免疫比浊法在0.05-3.0ng/ml范围内线性关系良好。

[0072] 临床对比试验

[0073] 同时用本发明试剂与现有的德国拜发R-Biopharm公司克伦特罗酶联免疫试剂盒检测20份猪尿标本,数据和统计结果如下:

[0074] 原始试验数据记录表

[0075]

标本编号	拜发试剂结果 (ng/ml)	本试剂结果 (ng/ml)	标本编号	拜发试剂结果 (ng/ml)	本试剂结果 (ng/ml)
01	0.05	0.07	11	3.09	3.21
02	0.17	0.16	12	5.06	5.04
03	0.22	0.21	13	4.81	4.77
04	0.40	0.43	14	4.30	4.45
05	0.27	0.24	15	7.28	7.12
06	0.17	0.16	16	4.41	4.41
07	0.05	0.05	17	5.72	5.73
08	0.36	0.40	18	4.70	4.75
09	0.51	0.52	19	6.28	6.27
10	0.18	0.18	20	5.35	5.66

[0076] 本发明试剂测定结果与德国拜发R-Biopharm公司克伦特罗酶联免疫试剂盒对照结果的相关系数 $r=0.9982$ 。

[0077] 本发明具有以下突出的有益技术效果:

[0078] (1) 本发明选择交联克伦特罗-牛血清白蛋白合成人工抗原为反应抗原,该抗原与抗克伦特罗单抗有良好的反应性,具有准确性好,准确性高达99.8%以上,特异性高。

[0079] (2) 本发明选择纳米胶乳颗粒直径在50~500nm作为克伦特罗单克隆抗体的包被载体,它能够通过特定的交联技术高效交联克伦特罗单克隆抗体,从而完成特异性的抗原抗体反应。

[0080] (3) 本发明选择Tris-HCL缓冲液,使整个配方处于一种极其稳定的状态,提高了试剂的稳定性。

[0081] (4) 本发明中选取聚乙二醇6000作为促凝剂,也是反应的促凝剂,它提高检测的灵敏度,促进样本中的抗原与结合有克伦特罗单克隆抗体的纳米胶乳微粒产生特异性的抗原抗体反应。

[0082] (5) 本发明中选取稳定性较强,不易分解的Proclin300作为防腐剂,有效的避免了试剂在存储过程中细菌生长的问题,从而保证了试剂的稳定性。

[0083] (6) 本发明中选取牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂,从而保证羧基胶乳交联克伦特罗单克隆抗体的稳定性。

[0084] (7) 采用本发明的方法定量检测克伦特罗,检测时间仅需8分钟,速度快,成本低,成本可降低50%以上。

[0085] 综上所述,本发明胶乳增强免疫比浊法测定克伦特罗试剂与其它检测方法试剂相比,本发明的试剂具有试剂可定型定量动态监测、检测时间短、仅需8min,准确率高达99.8%以上,保存期长,又降低了成本,成本降低50%以上,且易生产,性能稳定,测试准确,可定量,无环境污染,操作更简便,使用样品量小,可用于检测动物肉类、血清、分泌物和饲料等样品中的克伦特罗含量,是定量测定克伦特罗试剂上的创新,经济和社会效益巨大。

专利名称(译)	一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN108169482A</a>	公开(公告)日	2018-06-15
申请号	CN2017111380913.0	申请日	2017-12-20
[标]发明人	刘昊旻 王威风 郑蓬举 张倩茹 苟丽丽		
发明人	刘昊旻 王威风 郑蓬举 张倩茹 苟丽丽		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
代理人(译)	聂永杰		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明之目的是提供一种胶乳增强免疫比浊法定量检测克伦特罗的试剂，包括试剂R1、试剂R2和标准品；试剂R1由三羟甲基氨基甲烷 ( Tris )、克伦特罗-牛血清白蛋白复合物，用HCL调pH至7.2，加蒸馏水定容至1000ml制成；所述试剂R2由三羟甲基氨基甲烷 ( Tris )、聚乙二醇6000、抗克伦特罗单抗交联胶乳、牛血清白蛋白 ( BSA )、Proclin300，用HCL调pH至7.2，加蒸馏水定容至1000ml制成；本发明组方科学合理，易生产制备，使用方便、安全、准确，可有效用于快速检测食品中的克伦特罗，确保食品安全，经济和社会效益显著。

$$\text{待测物品 CLB 浓度 (ng/ml)} = \frac{\text{待测物品 } \Delta A}{\text{标准品 } \Delta A} \times \text{标准品浓度}$$