



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105315165 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410361049. X

G01N 33/543(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 28

(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

地址 100095 北京市海淀区北清路 156 号中
关村环保科技示范园地锦路 9 号院 3 号
楼

(72) 发明人 温凯 吴小平 王照鹏 王文珺
王世恩 李向梅 陈银辉 苏丽芳
姚琳 许舒婷

(51) Int. Cl.

C07C 217/62(2006. 01)

C07C 213/06(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/77(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

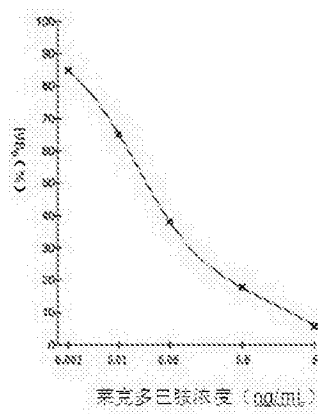
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

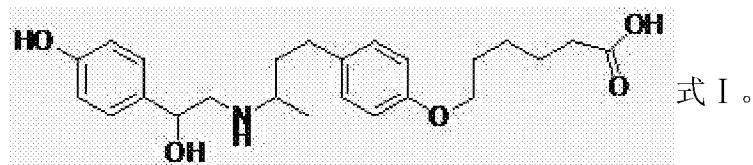
莱克多巴胺半抗原和抗原的制备方法及其在
量子点免疫荧光试剂盒中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种莱克多巴胺半抗原,相应的人工抗原和量子点标记的抗体,同时本发明也公开了所述莱克多巴胺半抗原,相应的人工抗原和量子点标记抗体的制备方法及其应用。本发明提供的莱克多巴胺半抗原与载体蛋白连接可以得到莱克多巴胺抗原。所述莱克多巴胺抗原可应用于制备莱克多巴胺特异性抗体。本发明还保护一种用于检测莱克多巴胺的量子点免疫荧光试剂盒。本发明提供的试剂盒操作简便、特异性好、灵敏度高,各项性能优良,非常适于推广应用。



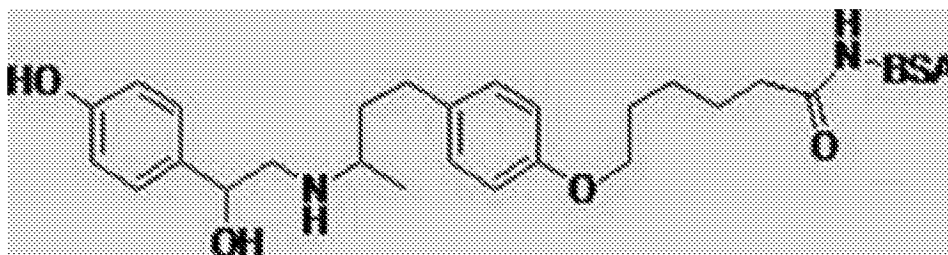
1. 一种莱克多巴胺半抗原, 为式 I 所示化合物:



2. 本发明还保护式 I 所示化合物的制备方法, 包括如下步骤:

取 500mg 莱克多巴胺, 溶于 45ml 甲醇中, 加入 348.8mg 6-溴己酸和 233mg 氢氧化钾, 加热至 80 度回流反应 40~72 小时, 点板确定原料大部分转化; 减压浓缩; 使用 15ml 复溶, 使用制备薄层色谱板分离纯化, 展开剂 DCM:ME=4:1, 以莱克多巴胺标准定位, 取比其极性大的点, 使用甲醇提取, 浓缩即得 RAC-BBAR, 得到的干物质即为半抗原。

3. 一种莱克多巴胺抗原, 是将式 I 所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。



4. 根据权利要求 3 所述莱克多巴胺抗原, 其特征在于, 所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白。

5. 本发明还保护权利要求 3 所述的莱克多巴胺抗原的制备方法, 包括如下步骤:

取 RAC-BBAR 半抗原 160mg 溶于 10.7ml DMF 中, 搅拌使之充分溶解, 加入 EDC 221.75mg 和 NHS 191.4mg, 室温反应 3h; 称取 144.1mg BSA 溶于 15ml 0.1M 碳酸缓冲溶液 (pH=9.6) 中, 搅拌 10min, 充分溶解; 将步骤 1 的活化液 3.6ml, 在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中, 边加边搅拌, 室温磁力搅拌 (400rpm) 反应 24h; 将反应产物装入一个蒸馏水冲洗干净的透析袋 (15cm), 1L PB (1×, pH7.2) 室温搅拌 (100rpm) 透析 3d, 每天换液 3 次 (早中晚各一次), 共计换液 9 次, 将透析产物 4500rpm 离心 6min, 0.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃ 保存备用。

6. 权利要求 3 或 4 所述莱克多巴胺抗原在制备莱克多巴胺特异性抗体中的应用。

7. 应用权利要求 3 或 4 所述莱克多巴胺抗原制备得到的量子点标记的特异性抗体。

8. 权利要求 3 或 4 所述莱克多巴胺抗原、权利要求 7 所述特异性抗体在检测莱克多巴胺中的应用。

9. 应用权利要求 3 或 4 所述莱克多巴胺抗原、权利要求 7 所述特异性抗体制备得到的量子点免疫荧光试剂盒。

10. 权利要求 9 所述量子点免疫荧光试剂盒, 其特征在于, 它包括: 包被有莱克多巴胺抗原的微孔板、莱克多巴胺标准溶液、稀释液、浓缩洗涤液、抗体工作液。

莱克多巴胺半抗原和抗原的制备方法及其在量子点免疫荧光试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原、抗原及其制备方法和应用,具体涉及一种莱克多巴胺半抗原和抗原的制备方法及其在量子点免疫荧光试剂盒中的应用,用于检测动物组织和尿液中的莱克多巴胺残留量,属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 莱克多巴胺是一种医药原料,具有广泛的生理效应,可用于治疗充血性心力衰竭症的强心药,且常用于支气管哮喘、支气管痉挛和产科疾病的治疗。当其用量增加到临床用量的 5-10 倍时,可增加肌肉生长,减少脂肪蓄积,是良好的营养分配剂和生长促进剂。美国 FDA 在 2000 年批准,可以用于动物营养重新配剂,广泛地用于畜牧业和养殖业。可以同时提高动物的日增重,提高饲料利用率,提高动物的蛋白质含量。但是其在动物体内的残留一旦经食物链进入人体,会对食用者产生巨大危害,特别对心脏病、糖尿病、高血压、甲亢、青光眼、前列腺肥大等病人危害更大,甚至死亡,如瘦肉精(莱克多巴胺是“瘦肉精药物”中的一种)在上海曾经引发几百人的中毒事件;在台湾由于从美国进口的猪肉里含有瘦肉精,几乎挑起一场政治争端。目前我国禁止将 β -激动剂等药物作为动物促生长剂使用。但长期以来,各种因非法使用 β -激动剂而造成的中毒事件时有发生。为打击非法用药,保护消费者的健康与安全,迫切需要健全相关的检测方法。

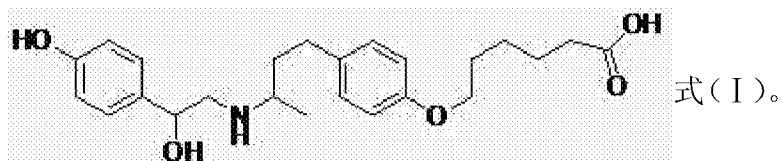
[0003] 目前,兽药残留检测常用的方法有气相色谱、高效液相色谱以及气质联用等理化分析方法。虽然这些方法特异性强、灵敏度高,但是样品前处理操作步骤繁琐,成本较高,也不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析鉴于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足,在莱克多巴胺的残留检测中起着越来越重要的作用。

[0004] 影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的特异性与亲和性,这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构,因此免疫半抗原的分子设计与合成是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础和最关键的步骤。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种莱克多巴胺半抗原和抗原的制备方法及其在量子点免疫荧光试剂盒中的应用。

[0006] 本发明提供的莱克多巴胺半抗原,为式(I)所示的化合物;



本发明还公开了式 I 所示化合物的制备方法,包括如下步骤:

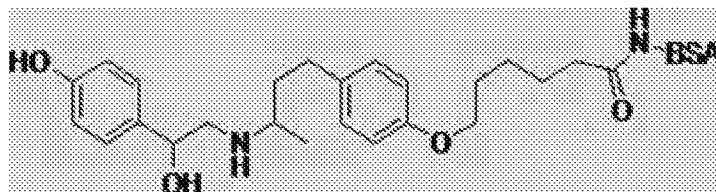
1、取 500mg 莱克多巴胺，溶于 45ml 甲醇中，加入 348.8mg 6-溴己酸和 233mg 氢氧化钾，加热至 80 度回流反应 40~72 小时。点板确定原料大部分转化。

[0007] 2、减压浓缩。使用 15ml 复溶，使用制备薄层色谱板分离纯化，展开剂 DCM:ME=4:1，以莱克多巴胺标准定位，取比其极性大的点，使用甲醇提取，浓缩即得 RAC-BBAR。

[0008] 本发明提供的莱克多巴胺抗原，是将式 I 所示化合物和载体蛋白偶联得到的偶联物。

[0009] 常用载体蛋白均可采用，如牛血清白蛋白(BSA)，卵清蛋白(OVA)，人血清白蛋白(HSA)，鼠血清白蛋白(MSA)，甲状腺蛋白(TG)或血蓝蛋白(KLH)等。

[0010] 所述式 I 所示化合物与 BSA 偶联得到的莱克多巴胺抗原的结构见式 II：



本发明还公开了所述莱克多巴胺抗原的制备方法，包括如下步骤：

1、取 RAC-BBAR 半抗原 160mg 溶于 10.7ml DMF 中，搅拌使之充分溶解。加入 EDC 221.75mg 和 NHS 191.4mg，室温反应 3h。

[0011] 2、称取 144.1mg BSA 溶于 15ml 0.1M 碳酸缓冲溶液(pH=9.6)中，搅拌 10min，充分溶解。

[0012] 3、将步骤 1 的活化液 3.6ml，在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中，边加边搅拌，室温磁力搅拌(400rpm)反应 24h。

[0013] 4、将反应产物装入一个蒸馏水冲洗干净的透析袋(15cm)，1L PB(1×, pH7.2)室温搅拌(100rpm)透析 3d，每天换液 3 次(早中晚各一次)，共计换液 9 次，将透析产物 4500rpm 离心 6min，0.5ml/管分装，将抗原编号，-20℃保存备用。

[0014] OVA 代替 BSA，同法制备可得包被原。

[0015] 所述莱克多巴胺抗原可以作为免疫原制备莱克多巴胺特异性抗体，也可以作为包被原制备微孔板。

[0016] 应用莱克多巴胺抗原制备得到的特异性抗体具体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0017] 所述莱克多巴胺抗原、所述特异性抗体均可应用于检测莱克多巴胺。

[0018] 本发明还保护一种用于检测莱克多巴胺的量子点免疫荧光试剂盒，包括量子点标记的所述抗体。

[0019] “量子点标记的所述抗体”的制备方法具体如下：

①取 2.5mg 量子点，用 pH4.7、0.1M 的 MES 缓冲液洗涤，然后用 1ml pH4.7、0.1M 的 MES 缓冲液重悬，加入 0.96mg EDC 和 1.15mg NHS，37℃反应 30 分钟，20000rpm 离心 5min，收集沉淀，即为活化后的量子点；

②取步骤①得到的活化后的量子点，用 pH8.5、50mM 的硼砂缓冲液洗涤，然后将 2.5mg 活化后量子点、所述抗体(蛋白质含量为 0.15mg)和 pH8.5、50mM 的硼砂缓冲液混匀(总体积为 0.8ml)，25℃反应 3.5 小时；

③取完成步骤②的液相，加入 BSA 并使其质量百分含量为 5%，37℃反应 30 分钟，20000rpm 离心 5min，收集沉淀，用 pH7.4、0.02M 的 PBS 缓冲液洗涤，用 1ml pH7.4、0.02M 的

PBS 缓冲液重悬；

④取步骤③得到的液相，用 pH7.4、0.02M 的 PBS 缓冲液稀释至 150000 倍体积。

[0020] 所述量子点荧光免疫试剂盒，包括：包被有莱克多巴胺抗原的微孔板、抗体工作液、莱克多巴胺标准溶液、稀释液、浓缩洗涤液等。

[0021] 本发明还保护以上所述试剂盒在检测待测样本中是否含有莱克多巴胺中的应用。

[0022] 本发明依靠免疫学、免疫化学基本原理和残留分析技术手段，设计、合成小分子目标分析物半抗原，并与载体蛋白偶联，制备有效人工抗原，免疫动物制备针对小分子分析物的特异性抗体。利用抗原抗体的特异性免疫学反应，定量的检测样品中微量小分子目标分析物。本发明制备方法简便可行、成本较低，半抗原产率较高。本发明克服了现有检测技术中对莱克多巴胺样品预处理复杂、耗时、且需要大量有机溶剂萃取，以及在检测过程中要用到精密昂贵的检测仪器而不适于推广使用等缺点。本发明的莱克多巴胺抗原，通过免疫动物可产生了针对莱克多巴胺的特异性抗体，用于快速检测食品中的莱克多巴胺残留，具有操作简单、快速，处理样品量大，灵敏度高，特异性强等诸多优点。

附图说明

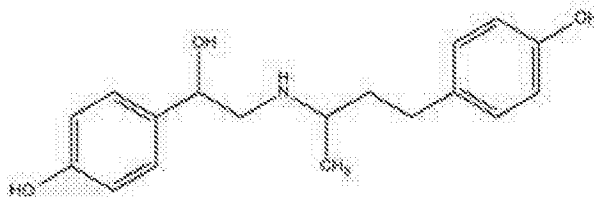
[0023] 图 1 为量子点的扫描图。

[0024] 图 2 为莱克多巴胺量子点免疫荧光试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0025] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。实施例 1 中的搅拌都是采用磁力搅拌器进行的，所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0026] 莱克多巴胺的结构式如下：



实施例 1、免疫原和包被原的制备

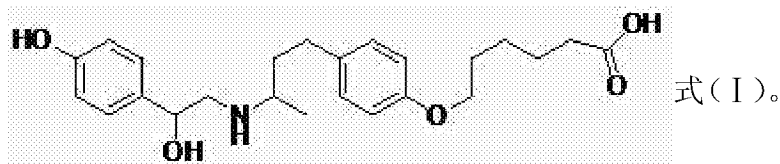
一、半抗原的制备

1、取 500mg 莱克多巴胺，溶于 45ml 甲醇中，加入 348.8mg 6-溴己酸和 233mg 氢氧化钾，加热至 80 度回流反应 40~72 小时。点板确定原料大部分转化。

[0027] 2、减压浓缩。使用 15ml 复溶，使用制备薄层色谱板分离纯化，展开剂 DCM:ME=4:1，以莱克多巴胺标准定位，取比其极性大的点，使用甲醇提取，浓缩即得 RAC-BBAR，得到的干物质即为半抗原。

[0028] 半抗原的结构式见式(I)。

[0029]



[0030] 二、免疫原的制备

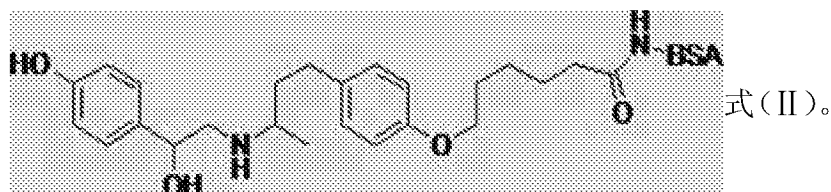
1、取 RAC-BHAR 半抗原 160mg 溶于 10.7ml DMF 中, 搅拌使之充分溶解。加入 EDC 221.75mg 和 NHS 191.4mg, 室温反应 3h。

[0031] 2、称取 144.1mg BSA 溶于 15ml 0.1M 碳酸缓冲溶液 (pH=9.6) 中, 搅拌 10min, 充分溶解。

[0032] 3、将步骤 1 的活化液 3.6ml, 在冰水浴环境下逐滴加入到蛋白溶液中, 边加边搅拌, 室温磁力搅拌 (400rpm) 反应 24h。

[0033] 4、将反应产物装入一个蒸馏水冲洗干净的透析袋 (15cm), 1L PB (1×, pH7.2) 室温搅拌 (100rpm) 透析 3d, 每天换液 3 次 (早中晚各一次), 共计换液 9 次, 将透析产物 4500rpm 离心 6min, 0.5ml/管分装, 将抗原编号, -20℃ 保存备用。

[0034] 免疫原的结构式见式 (II)



[0035] 三、包被原的制备

用 OVA 代替 BSA, 其它同步骤二, 得到包被原溶液。

[0036] 实施例 2、多克隆抗体的制备

取实施例 1 制备的免疫原溶液, 采用 pH7.4、0.01M 的 PBS 缓冲液稀释, 得到免疫原稀释液, 用于多克隆抗体的制备。采用新西兰大白兔作为免疫动物。

[0037] 免疫过程如下 (免疫剂量以蛋白量计):

首次免疫: 将免疫原稀释液与等体积的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂, 颈背部皮下多点注射, 免疫剂量为 1mg/kg · b. w. ;

加强免疫: 首次免疫 4 周后、8 周后和 12 周后, 各进行一次加强免疫, 将免疫原稀释液与等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化, 颈背部皮下多点注射, 单次免疫剂量为 1mg/kg · b. w. ;

末次免疫: 首次免疫 16 周后进行末次免疫, 直接颈背部皮下多点注射免疫原稀释液, 免疫剂量为 1mg/kg · b. w. 。

[0038] 末次免疫 1 周后, 采血并分离血清, 即为免疫原对应的多克隆抗体 (简称多克隆抗体甲)。

[0039] 实施例 3、量子点免疫荧光检测试剂盒的组装

量子点购自深圳市泰勒、斯科技有限公司, 产品目录号为 TLS[®]LumiQD[™]20。该量子点的表征如下: 粒径为 20nm、粒径的 CV 为 15%, 量子产率为 60%, 表面羧基含量为 5×10^3 mmol/mg, 水溶性, CdSe/ZnS 核壳结构, 激发光波长为 345nm, 发射波长是 620nm; 红色荧光量子点。量子点的扫描图如图 1 所示。量子点上的羧基与蛋白质上的氨基形成肽键并连接起来。

[0040] 量子点免疫荧光检测试剂盒包括如下组件：

1、包被了包被原的微孔板

取实施例 1 制备的包被原溶液，用包被缓冲液稀释（包被缓冲液即 pH9.6、0.05M 的碳酸盐缓冲液），得到蛋白浓度为 5ng/mL 的包被原稀释液。将 10g 牛血清白蛋白、0.1mL proclin 300 和 1000mL pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液混合，得到封闭液。

[0041] (1) 将包被原稀释液加入微孔板（100 μ L/孔），37℃ 孵育 16 小时。

[0042] (2) 完成步骤（1）后，倾去孔内的液体，洗涤，拍干。

[0043] (3) 完成步骤（2）后，每孔加入 200 μ L 封闭液，37℃ 温育 2h。

[0044] (4) 完成步骤（3）后，倾去孔内的液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0045] 2、量子点标记的多克隆抗体工作液

①取 2.5mg 量子点，用 pH4.7、0.1M 的 MES 缓冲液洗涤，然后用 1mL pH4.7、0.1M 的 MES 缓冲液重悬，加入 0.96mg EDC 和 1.15mg NHS，37℃ 反应 30 分钟，20000rpm 离心 5min，收集沉淀，即为活化后的量子点。

[0046] ②取步骤①得到的活化后的量子点，用 pH8.5、50mM 的硼砂缓冲液洗涤，然后将 2.5mg 活化后量子点、实施例 2 制备的多克隆抗体甲（蛋白质含量为 0.15mg）和 pH8.5、50mM 的硼砂缓冲液混匀（总体积为 0.8mL），25℃ 反应 3.5 小时（多克隆抗体和量子点形成稳定的肽键共价结合）。

[0047] ③取完成步骤②的液相，加入 BSA 并使其质量百分含量为 5%（目的是对剩余活性氨基位点进行封闭），37℃ 反应 30 分钟，20000rpm 离心 5min，收集沉淀，用 pH7.4、0.02M 的 PBS 缓冲液洗涤，用 1mL pH7.4、0.02M 的 PBS 缓冲液重悬，4℃ 保存待用。

[0048] ④取步骤③得到的液相，用 pH7.4、0.02M 的 PBS 缓冲液稀释至 150000 倍体积，得到一抗工作液甲。

[0049] 3、标准品溶液

将莱克多巴胺溶于 pH7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液，分别得到浓度为 0.002ng/mL、0.01ng/mL、0.05ng/mL、0.5ng/mL 和 5ng/mL 的标准品溶液。将 pH7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液作为标准品溶液的阴性对照溶液，称为 0 溶液。

[0050] 4、稀释液

pH7.4、0.02M 的 PBS 缓冲液。

[0051] 5、20 $\times$ 浓缩洗涤液

将 1000mL 磷酸盐缓冲液（pH7.4、0.5M）与 1mL proclin 300 混合，得到 20 $\times$ 浓缩洗涤液（将 20 $\times$ 浓缩洗涤液用水稀释至 20 倍体积，即为洗涤液）。

[0052] 实施例 4、量子点免疫荧光检测试剂盒的使用方法

向包被了包被原的微孔板中加入标准品溶液或待测样本溶液 50 μ L，一抗工作液加 50 μ L，室温反应 30min，弃上清，洗涤 3 次（每次洗涤过程均如下：每孔中加入 250 μ L 洗涤液，30 秒后弃上清），用吸水纸拍干，用荧光酶标仪检测其荧光强度数值。荧光酶标仪设置为激发波长 345nm，发射波长 620nm。每个浓度的标准品溶液的发光强度的平均值（B）除以 0 溶液的发光强度值（B₀），再乘以 100%，即结合率。计算公式：结合率（%）=B/B₀×100%。以标准品溶液中的莱克多巴胺浓度（ng/mL）为 X 轴，B/B₀ 为 Y 轴，绘制标准曲线图（见图 2）。根据标准曲线的回归方程可以求出待测样本溶液中莱克多巴胺的浓度。本发明中检测结果的

分析可以利用专业软件,可以实现大量样本的快速分析,整个检测过程只需 60 分钟就可以完成。结合率(B/B_0)为 50% 时对应的标准品溶液中的莱克多巴胺浓度即为 IC_{50} 值。根据标准曲线图, $IC_{50}=0.028\text{ng/mL}$ 。

[0053] 试剂盒的检测原理:当在微孔板上预包被半抗原与载体蛋白的偶联物时,加入样本溶液,随后加入量子点标记的抗体,样本中残留的莱克多巴胺与微孔板上包被的包被原竞争结合量子点标记的抗体,样本荧光强度与样本中莱克多巴胺含量成负相关,

与标准曲线比较即可得出样本中莱克多巴胺的残留量。

[0054] 实施例 5、量子点免疫荧光检测试剂盒的特异性

分别检测 4 种待测药物(与莱克多巴胺结构或功能类似的 4 种药物)与莱克多巴胺的交叉反应率。

[0055] 1、将待测药物溶于 pH7.4、0.02M 的磷酸盐缓冲液,得到不同浓度的溶液。

[0056] 2、向包被了包被原的微孔板中加入步骤 1 制备的溶液 $50\mu\text{L}$,一抗工作液加 $50\mu\text{L}$,室温反应 30min,弃上清,洗涤 3 次(每次洗涤过程均如下:每孔中加入 $250\mu\text{L}$ 洗涤液,30 秒后弃上清),用吸水纸拍干,用荧光酶标仪检测其荧光强度数值。荧光酶标仪设置为激发波长 345nm,发射波长 620nm。

[0057] 交叉反应率($\%$)=(莱克多巴胺的 IC_{50} 值 / 待测药物的 IC_{50} 值) $\times 100\%$ 。结果见表 1。试剂盒的特异性良好。

[0058] 表 1 交叉反应率结果

药物名称	购买途径	交叉反应率($\%$)
莱克多巴胺	中国兽药监察所	100
沙丁胺醇	中国兽药监察所	<0.1
克伦特罗	中国兽药监察所	<0.1
溴布特罗	中国兽药监察所	<0.1
西马特罗	中国兽药监察所	<0.1

实施例 6、试剂盒的灵敏度、精密度、准确度

一、样本前处理的方法(制备空白样本)

尿样(如猪尿):取不含莱克多巴胺的尿样,澄清的尿液可直接用于检测,若尿液混浊需先 $3000g$ 离心 5min,取 $50\mu\text{L}$ 上清液用于分析。

[0059] 肌肉组织或内脏组织(如猪肉或猪肝):称取 5g 不含莱克多巴胺的肌肉或内脏,加入 10mL 0.1mol/L 盐酸水溶液匀浆,然后 80°C 水浴中孵育 30 分钟,冷却后 $3000g$ 离心 15min,将 2mL 上清液用 1M NaOH 水溶液调 pH 值为 7-9,取 $50\mu\text{L}$ 用于检测。

[0060] 二、试剂盒保存期实验

试剂盒保存条件为 $2-8^{\circ}\text{C}$,保存 6 个月后,测定莱克多巴胺的 IC_{50} 值。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°C 保存条件下放置 6 天,进行热加速实验。结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。

[0061] 表 2 低温保存实验结果

时间(d)	0	10	20	30	60	90	120	150	180
IC ₅₀ (ng/mL)	0.025	0.027	0.026	0.027	0.029	0.030	0.031	0.032	0.033

表 3 热加速实验

时间 (d)	1	2	3	4	5	6
IC ₅₀ (ng/mL)	0.025	0.031	0.033	0.029	0.028	0.026

三、灵敏度、精密度、准确度

1、灵敏度

以最低检测限作为本发明试剂盒的灵敏度指标。取 20 份空白样本,检测信号值,计算空白样本荧光强度的平均值,并将此平均值带入标准曲线得到对应的待测物浓度,计算各对应浓度值的标准差(SD),由平均值加三倍标准差即为该样本的最低检测限,结果见表 4。

[0062] 表 4 莱克多巴胺在猪尿和猪肉中的最低检测限

组织样品	空白样本的平均测定值(ng/mL, ng/g, n=20)	SD (n=20)	LOD (ng/mL, ng/g)
猪尿	0.007	0.003	0.016
猪肉	0.009	0.004	0.021

2、精密度

从三批试剂盒(01 批、02 批、03 批)中每批抽取五个试剂盒,测定 0.2ng/mL、0.5ng/mL 两个浓度(即在猪尿空白样本中加入莱克多巴胺),每个浓度设置 5 个平行,重复 5 次,根据标准曲线,算出各个 RLU 对应的浓度值,并计算板内板间变异系数,结果见表 5,批内批间变异都 < 15%,说明试剂盒的精密性良好。

[0063] 表 5 试剂盒的精密度

RAC (ng /ml)	批次	测定值	板内变异系数 (CV%, n=5)	平均测定值	板间变异系数 (CV%, n=5)	平均测定值	批间变异系数 (CV%, n=5)
0.2	01	0.152	7.32	0.186	8.16	0.185	12.6%
		0.185	3.12				
		0.195	4.16				
		0.187	3.67				
		0.212	6.73				
	02	0.168	1.33	0.192	6.68		
		0.218	2.65				
		0.189	3.36				
		0.196	6.89				
		0.188	8.16				
	03	0.183	6.65	0.176	8.86		
		0.152	4.56				
		0.208	6.87				
		0.163	5.56				
		0.175	6.43				
0.5	01	0.416	3.26	0.431	5.58	0.465	15.51
		0.425	4.46				
		0.402	4.39				
		0.517	5.49				
		0.396	6.62				
	02	0.422	2.88	0.466	6.17		
		0.522	4.23				
		0.409	6.07				
		0.468	5.17				
		0.509	5.64				
	03	0.455	7.14	0.497	5.17		
		0.389	6.01				
		0.565	3.68				
		0.493	6.90				
		0.582	3.83				

3、准确度

试剂盒的添加实验反映其准确度。在猪尿空白样本中加入莱克多巴胺,使其浓度为 0.2ng/ml 或 0.5ng/ml。猪肉空白样本中加入莱克多巴胺,使其浓度为 0.3ng/ml 或 0.5ng/ml。每个浓度 5 个平行。样本处理后,测定莱克多巴胺的浓度,同时考虑稀释倍数,代入标准曲线计算回收率,同时计算变异系数(三个批次的试剂盒)。结果见表 6 和表 7。

[0064] 表 6 猪尿中莱克多巴胺添加回收率与变异系数

RAC (ng/ml)	回收率 (%)	批内变异系数 (CV, %)	平均回收率 (%)	批间变异系数 (CV, %)
0.2	92.3	13.5	84.2	12.8
	88.8	11.6		
	79.5	14.4		
0.5	108.2	15.2	96.7	13.6
	100.5	8.6		
	81.5	12.6		

表 7 猪肉中莱克多巴胺添加回收率与变异系数

RAC (ng/ml)	回收率 (%)	批内变异系数 (CV, %)	平均回收率 (%)	批间变异系数 (CV, %)
0.3	75.8	12.3	87.6	15.9
	86.7	15.7		
	98.5	14.2		
0.5	95.3	12.9	99.4	11.8
	97.5	13.8		
	105.5	9.1		

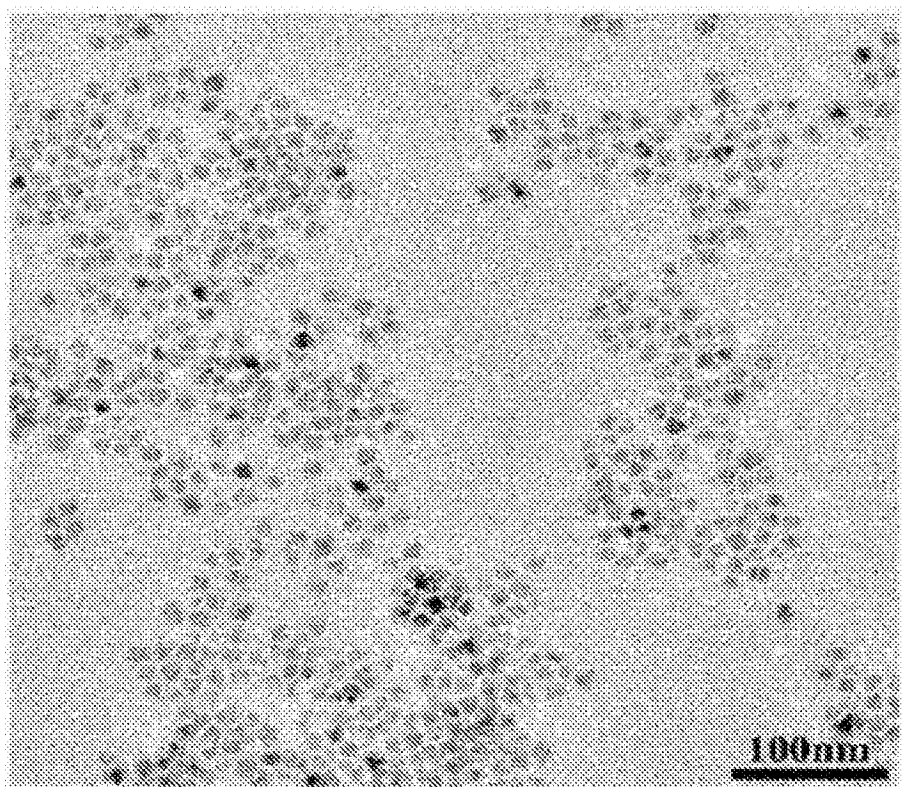


图 1

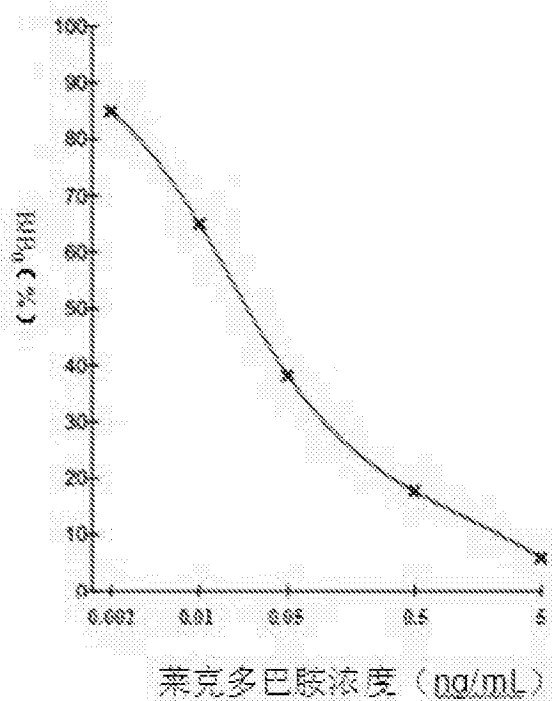


图 2

专利名称(译)	莱克多巴胺半抗原和抗原的制备方法及其在量子点免疫荧光试剂盒中的应用		
公开(公告)号	CN105315165A	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410361049.X	申请日	2014-07-28
[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	温凯 吴小平 王照鹏 王文珺 王世恩 李向梅 陈银辉 苏丽芳 姚琳 许舒婷		
发明人	温凯 吴小平 王照鹏 王文珺 王世恩 李向梅 陈银辉 苏丽芳 姚琳 许舒婷		
IPC分类号	C07C217/62 C07C213/06 C07K14/765 C07K14/77 C07K1/107 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/543		
其他公开文献	CN105315165B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种莱克多巴胺半抗原，相应的人工抗原和量子点标记的抗体，同时本发明也公开了所述莱克多巴胺半抗原，相应的人工抗原和量子点标记抗体的制备方法及其应用。本发明提供的莱克多巴胺半抗原与载体蛋白连接可以得到莱克多巴胺抗原。所述莱克多巴胺抗原可应用于制备莱克多巴胺特异性抗体。本发明还保护一种用于检测莱克多巴胺的量子点免疫荧光试剂盒。本发明提供的试剂盒操作简便、特异性好、灵敏度高，各项性能优良，非常适于推广应用。

