



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277700 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201410238706. 1

(22) 申请日 2014. 06. 02

(71) 申请人 北京纳达康生物科技有限公司
地址 100085 北京市海淀区上地信息路 11
号彩虹大厦北楼西一层 102 室

(72) 发明人 金伟 李娟娟 陈建军 计梦琴
吴曼丽 杨海

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

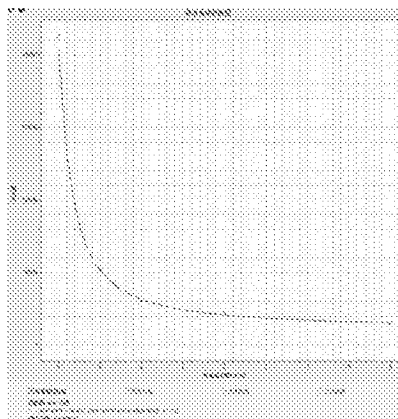
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测克伦特罗的化学发光免疫分析试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测克伦特罗残留量的磁微粒化学发光检测试剂盒和检测方法。该试剂盒组成包括以下成分：克伦特罗标准品、磁分离试剂、酶标记克伦特罗使用液、浓缩样品稀释液、浓缩清洗液和发光底物溶液。采用直接竞争法，在磁性微球上偶联有克伦特罗抗原，样本中残留的克伦特罗和磁性微球上固定的克伦特罗竞争结合碱性磷酸酶标记的克伦特罗抗体，加入发光底物，测量各管发光值，样本中发光值与标准曲线比较计算对应的浓度值再乘以样本前处理的稀释倍数即可得到样本中克伦特罗的残留量。还可与全自动化学发光免疫检测仪配套使用从而实现动物组织中克伦特罗残留检测的自动化。



1. 一种检测克伦特罗的化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于,包括磁微粒试剂;克伦特罗标准品;克伦特罗抗体;清洗浓缩液;发光底物溶液;样本稀释液;

所述的磁微粒试剂为连接克伦特罗完全抗原的磁微粒溶液;

所述的标准品为含有已知浓度克伦特罗抗原的缓冲液;

所述的克伦特罗抗体为碱性磷酸酶标记的克伦特罗单克隆抗体;

所述的清洗浓缩液是含有 Tris 和表面活性剂的缓冲液;

所述的发光底物溶液是含有 APS 发光液的缓冲液。

2. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述的磁微粒试剂采用EDC法活化磁微粒后与克伦特罗完全抗原按质量比200:1混合,即可将磁微粒与克伦特罗完全抗原偶联。

3. 根据权利要求1所述试剂盒,其特征在于,所述的克伦特罗抗体采用SMCC和DTT分别活化碱性磷酸酶和克伦特罗单克隆抗体后按摩尔比1:1混合,并用凝胶层析分离纯化即可将碱性磷酸酶与克伦特罗单克隆抗体偶联。

4. 使用权利要求1所述的试剂盒检测克伦特罗含量的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 取多支平底试管,在每一平底试管中加入50 μ L 克伦特罗标准品、30 μ L 磁微粒试剂、50 μ L 克伦特罗抗体,充分混匀,37 $^{\circ}$ C温育15分钟;

2) 将平底试管在磁分离器上静置2分钟,然后倾倒入清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入300 μ L 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置2分钟,然后倾倒入清液,将试管和磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;重复2次;

3) 每个平底试管中加入100 μ L 发光底物溶液,在化学发光仪上测定每管的发光值;

4) 据测定的发光值和对应的克伦特罗标准品浓度,绘制标准曲线;

5) 在平底试管中,加入50 μ L 克伦特罗待测样本、30 μ L 磁微粒试剂、50 μ L 克伦特罗抗体,充分混匀,37 $^{\circ}$ C温育15分钟;

6) 重复步骤(2)和(3)的操作,然后根据标准曲线得到待测样品中测克伦特罗浓度。

一种检测克伦特罗的化学发光免疫分析试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及检测动物组织、尿液、饲料等样本中克伦特罗含量的化学发光免疫分析试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 克伦特罗 (Clenbuterol, CLE) 是一种 β 2- 肾上腺素兴奋剂,其化学性质稳定,易被机体吸收,能持久引起交感神经兴奋,并使脂肪激酶活化,减缓或减少脂肪沉积,增加肌肉组织沉积,使营养重新分配,从而改善肉畜胴体品质,提高瘦肉率,但该药物在体内排泄速率慢,易蓄积在动物内脏、脂肪等组织中,人食用含有该药物残留的动物产品后易引起中毒,对肝、肾等内脏器官产生毒害,同时出现心悸、头痛、目眩、恶心、呕吐、心率加快、肌肉震颤等症状,严重者甚至死亡,研究表明如果长期食用,还可导致染色体畸变,诱发恶性肿瘤。因此,发明一种灵敏度高,操作简便,费用较低的分析方法和试剂,对于国内食品安全是很有意义的。

[0003] 化学发光免疫检测技术是上世纪 80 年代继酶联免疫技术和放免技术之后发展起来的新兴技术,相对于后两者化学发光免疫技术具有高灵敏度、高特异性、操作简便、快速、标记结合物稳定,同时无放射性同位素损伤和污染等特点,因此近年来在免疫检测分析中被广泛推广使用。

发明内容

[0004] 本发明需要解决的技术问题在于提供一种克伦特罗定量检测试剂盒及其检测方法,采用该试剂盒进行克伦特罗检测具有较高的灵敏度和特异性,操作简便、检测时间更短。

[0005] 本发明提供了克伦特罗化学发光免疫分析试剂盒,该试剂盒包括:磁微粒试剂、克伦特罗标准品、克伦特罗抗体、清洗浓缩液、发光底物溶液和样本稀释液。

[0006] 所述的磁微粒试剂为连接克伦特罗完全抗原的磁微粒溶液;

所述的标准品为含有已知浓度克伦特罗抗原的缓冲液;

所述的克伦特罗抗体为碱性磷酸酶标记的克伦特罗单克隆抗体;

所述的清洗浓缩液是含有 Tris 和表面活性剂的缓冲液;

所述的发光底物溶液是含有 APS 发光液的缓冲液;

本发明提供检测克伦特罗的样品前处理方法,具体如下:

尿样: 取待测尿样离心,5000rpm,10 分钟,取 50 μ l 上清液体待测。最终检测结果乘以稀释倍数 1。

[0007] 组织样品: 取 1.0g 粉碎的样品与 4.0ml 乙腈和 1.0ml 乙酸乙酯混合均匀;强力振荡 3 分钟;5000rpm 离心 10 分钟;取 1ml 上清液,60 $^{\circ}$ C 氮气吹干;加入 1ml 样品稀释液,混匀,再加入 1ml 正己烷,混匀;5000rpm 离心 10 分钟;取 50 μ l 下层液体待测。最终检测结果乘以稀释倍数 5。

[0008] 饲料样本:取 1.0g 粉碎的样品与 5.0mL 乙腈混合均匀;强力振荡 3 分钟;
5000rpm 离心 10 分钟;取 1.0mL 上清液,60℃氮气吹干;加入 1ml 样品稀释液,混匀,再加入 1ml 正己烷,混匀;5000rpm 离心 10 分钟;取 50ul 下层液体待测。

[0009] 最终检测结果乘以稀释倍数 5。

[0010] 本发明的检测方法如下:

1) 取多支平底试管,在每一平底试管中加入 50 μ L 克伦特罗标准品、30 μ L 磁微粒试剂、50 μ L 克伦特罗抗体,充分混匀,37℃温育 15 分钟。

[0011] 2) 将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入 300 μ L 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后倾倒上清液,将试管和磁分离一同倒置在吸水纸上拍干;重复 2 次。

[0012] 3) 每个平底试管中加入 100 μ L 发光底物溶液,在化学发光仪上测定每管的发光值。

[0013] 4) 据测定的发光值和对应的克伦特罗标准品浓度,绘制标准曲线。

[0014] 5) 在平底试管中,加入 50 μ L 克伦特罗待测样本、30 μ L 磁微粒试剂、50 μ L 克伦特罗抗体,充分混匀,37℃温育 15 分钟。

[0015] 6) 重复步骤(2)和(3)的操作,然后根据标准曲线得到待测样品中测克伦特罗浓度。

[0016] 本发明具有以下优点:

1、使用磁珠为固相替代酶标板,反应更充分和迅速,缩短了反应时间,降低了非特异吸附。

[0017] 2、使用碱性磷酸酶标记单克隆抗体,稳定性和亲和力更高,提高了试剂盒性能。

[0018] 3、使用化学发光底物溶液,使检测的灵敏度得到了提高,而且线性范围更宽。

[0019] 4、本方法的建立可以为其他试剂盒的开发提供一种方便、高灵敏度、准确性和稳定性的免疫检测方法。

[0020] 本发明的主要创新之处在于:

1、本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,与酶联免疫技术相比,本发明试剂盒具有更高的检测灵敏度和特异性,并达到了较佳的性能参数。

[0021] 2、试剂盒中磁微粒试剂、酶标抗体、标准品、发光底物溶液及样本稀释液均是直接使用液,试剂盒使用更方便。

[0022] 3、本发明的检测克伦特罗的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒主要采用竞争法定量检测动物尿液、组织及饲料样品中克伦特罗的含量;能快速、高通量检测大批样品,采用了高特异的单克隆抗体和超顺磁、高分散、比表面积大的磁微粒子,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利,与市场上的酶联免疫试剂盒等相比,线性范围宽,适用于大批量样品筛选的定量。

附图说明

[0023] 图 1 为本发明的克伦特罗化学发光免疫检测标准曲线,其中,横坐标为克伦特罗的浓度,纵坐标为相对发光强度。

具体实施方式

[0024] 实施例 1

一、磁珠缓冲液配制操作规程,以配制 1L 为例:

- 1、根据配制量,选择合适容器,加入 0.7kg 700mL 超纯水;
- 2、称取 Tris 6.02g, NaN_3 0.99g 于容器中,混匀,室温搅拌 2 小时;
- 3、检测溶液 pH,应在 10 左右;
- 4、调节 pH 值为 8.0;
- 5、量取 Tween-20 2.76mL;称取硫酸新霉素 0.99g;四环素 0.03g;BSA 4.97g 于容器中,搅拌 1 小时,调 pH 值至 8.0 ± 0.05 ;
- 6、定容至 1L,调 pH 值至 8.0 ± 0.05 ;
- 7、用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,4°C 保存。

[0025] 二、磁微粒试剂的制备过程

将直径为 $0.1 \mu\text{m}$ 的四氧化三铁磁性微球用 EDC 进行活化,室温振荡 15 分钟,用 0.01mol/L pH7.4 PBS 缓冲液清洗三次后重悬,使磁性微球浓度为 50-100mg/mL;然后,每毫升悬液中加入克伦特罗完全抗原 $500 \mu\text{g}$,37°C 混匀温育 3-6 小时;用 0.01mol/L pH7.4 PBS 缓冲液清洗三次,用 1%BSA 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液于 37°C 封闭 1.5 小时;最后用 0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl 或 PBS 缓冲液清洗三次,并用上述磁珠缓冲液配制成一定浓度的工作液。

[0026] 实施例 2 碱性磷酸酶 AP 与克伦特罗完全抗体的偶联

使用 SMCC 活化剂对碱性磷酸酶进行活化;使用 DTT 对克伦特罗单克隆抗体进行还原;将还原的克伦特罗单克隆抗体和活化后的碱性磷酸酶按摩尔比 1:1 进行混合,即可将碱性磷酸酶和克伦特罗单克隆抗体连接。

[0027] 实施例 3

标准品的配制:

1、最高浓度点为 a,目标点浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8,配制 b 体积溶液时,需要加入原料的体积如下表:

浓度	加入标准品稀释液体积	加入 a 体积
1	$b-1 \times b/a$	$1 \times b/a$
2	$b-2 \times b/a$	$2 \times b/a$
3	$b-3 \times b/a$	$3 \times b/a$
4	$b-4 \times b/a$	$4 \times b/a$
5	$b-5 \times b/a$	$5 \times b/a$
6	$b-6 \times b/a$	$6 \times b/a$
7	$b-7 \times b/a$	$7 \times b/a$
8	$b-8 \times b/a$	$8 \times b/a$

2、克伦特罗测定试剂盒克伦特罗标准品(浓度为 100ng/mL)用样本稀释液(具体配方见实施例 4)配制成浓度点为 0、0.05、0.2、0.5、1、4、8、16ng/mL。

[0028] 3、完全溶解后,贴好标签与 2-8°C 保存,有效期为 12 个月。

[0029] 实施例 4

一、清洗浓缩液配制操作规程:以配制 1L 为例:

- 1、根据配制量,选择合适的容器,加入超纯水 700mL,称取 Tris 12.11g;NaCl 312.43g;Tween-20 7.74g;
- 2、室温搅拌至完全溶解,调 pH 至 8.6 ± 0.05 ;超纯水定容至 1L,0.22 μm 滤膜过滤;
- 3、使用时用超纯水进行 15 倍稀释。

[0030] 二、发光底物溶液配制操作规程:以配制 1L 为例:

- 1、根据配置量选择合适的容器,称取 Tris 36.36g;Na₂SO₃ 10mg;SDS 1.0g;光泽精 3.27mg;Tween-20 0.31mL,调 pH 至 9.3;用超纯水定容至 1L;0.22 μm 滤膜过滤;
- 2、测试两次平均发光值在 1000 以下即为合格,否则需重新配制。

[0031] 三、样本稀释液配制操作规程:以配制 1L 为例:

- 1、根据配制量,选择合适的容器,加入超纯水 700mL,称取 Tris 6.06g;NaCl 56.0g;
- 2、室温搅拌至完全溶解,调 pH 至 8.6 ± 0.05 ;超纯水定容至 1L,0.22 μm 滤膜过滤。

[0032] 实施例 5

克伦特罗磁微粒化学发光免疫检测:

操作步骤:

[1] 在每一平底试管中加入 50 μL 克伦特罗标准品、30 μL 磁微粒试剂、50 μL 克伦特罗抗体,充分混匀,37°C 温育 15 分钟;

[2] 将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入 300 μL 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后倾倒上清液,将试管和磁分离一同倒置在吸水纸上拍干;重复 2 次;

[3] 每个试管中加入 100 μL 发光底物;

[4] 在化学发光仪上测定每管的发光值。

[0033] 根据检测结果和对应的浓度,绘制标准曲线见图 1。

[0034] 对零标准点进行 20 次重复测试,取零标准点测定的平均值加上 2 倍的标准偏差,即为其灵敏度。本方法的灵敏度为 0.05ng/mL。

[0035] 实施例 6 精密度和准确度测定:

精密度又称可重复性,常用变异系数表示;准确度指测定值与真实值之间的符合程度,常用回收率表示。

[0036] 以 0.2ng/g (mL)、1ng/g (mL) 两个浓度的克伦特罗分别对猪尿、猪肝、猪肉、饲料进行添加回收,每种样本每个浓度各三个平行,用三批试剂盒分别进行测定。

[0037] 测试过程如下:

[1] 在每一平底试管中加入 50 μL 克伦特罗待测样本、30 μL 磁微粒试剂、50 μL 克伦特罗抗体,充分混匀,37°C 温育 15 分钟;

[2] 将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后倾倒上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入 300 μL 清洗液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置 2 分钟,然后倾倒上清液,将试管和磁分离一同倒置在吸水纸上拍干;重复 2 次;

[3] 每个试管中加入 100 μL 发光底物溶液;

[4] 在化学发光仪上测定每管的发光值,然后根据标准曲线确定待测样本中克伦特罗

浓度。

[0038] 根据测量结果计算样本的平均回收率及精密度,结果如下表:

样品	添加浓度 (ng/g; ng/mL)	检测浓度 平均值 (ng/g; ng/mL)	平均回收 率(%) (n=3)	批内变异系 数(%) (n=3)	批间变异系 数(%) (n=3)
猪尿	0.2	0.207	88.5	7.9	9.2
	1	1.166	113.6	9.6	9.9
猪肉	0.2	0.283	106.3	9.1	10.1
	1	1.007	93.7	9.8	11.3
猪肝	0.2	0.298	113.8	8.3	10.5
	1	1.161	109.1	9.4	10.8
饲料	0.2	0.216	83.2	10.1	12.9
	1	0.975	92.5	9.6	11.7

从表中可知,猪尿、猪肉、猪肝、饲料样品中克伦特罗两个浓度添加的平均回收率范围在 83.2-113.8%;批内批间变异系数均小于 13%。

[0039] 特异性:测定高浓度的交叉反应物质,结果如下:

潜在交叉反应物	检测结果	交叉反应率
沙丁胺醇 50ng/mL	0.46ng/mL	<1%
莱克多巴胺 50ng/mL	0.73ng/mL	1.5%

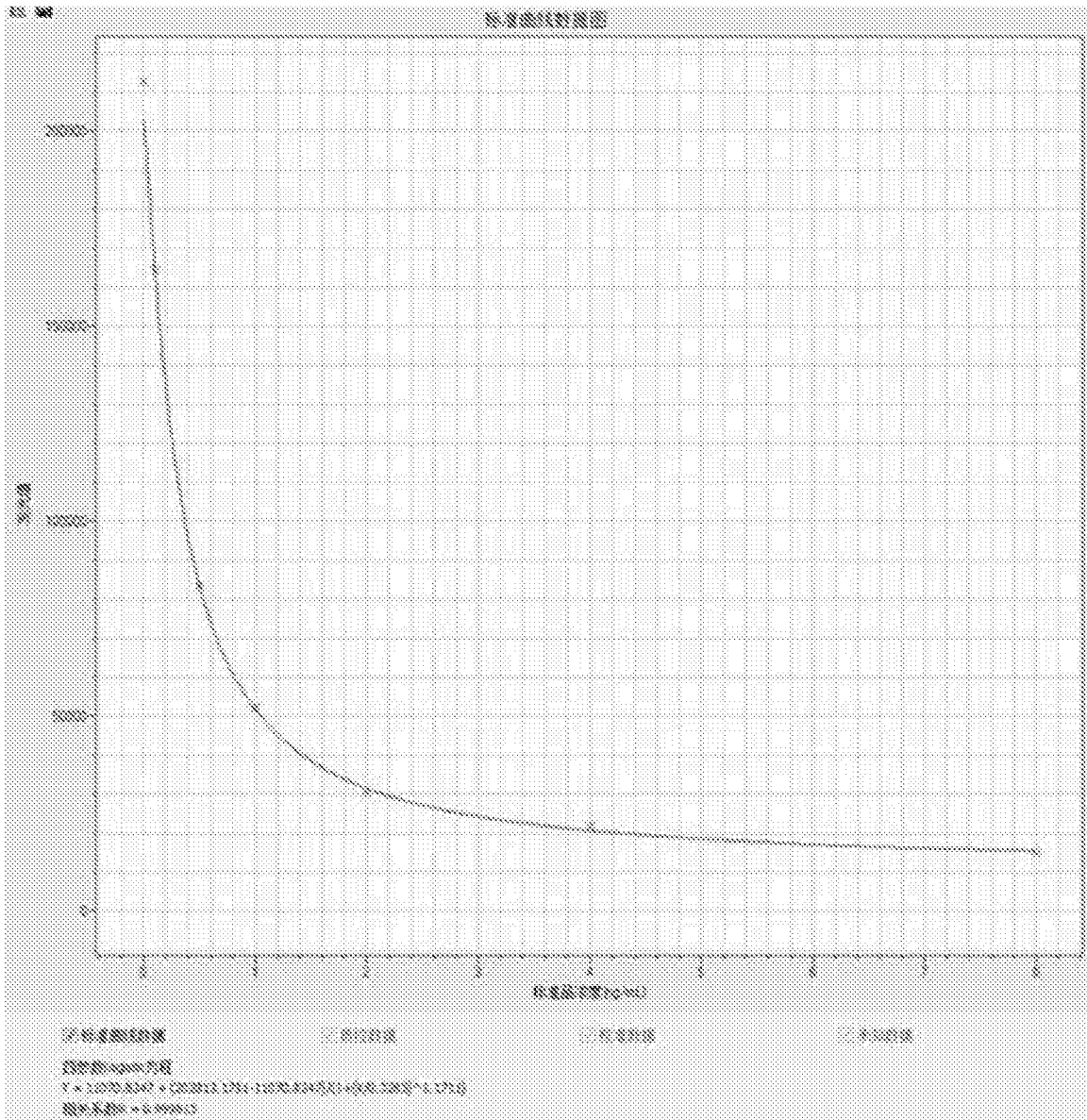


图 1

专利名称(译)	一种检测克伦特罗的化学发光免疫分析试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN105277700A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410238706.1	申请日	2014-06-02
[标]发明人	金伟 李娟娟 陈建军 计梦琴 吴曼丽 杨海		
发明人	金伟 李娟娟 陈建军 计梦琴 吴曼丽 杨海		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测克伦特罗残留量的磁微粒化学发光检测试剂盒和检测方法。该试剂盒组成包括以下成分：克伦特罗标准品、磁分离试剂、酶标记克伦特罗使用液、浓缩样品稀释液、浓缩清洗液和发光底物溶液。采用直接竞争法，在磁性微球上偶联有克伦特罗抗原，样本中残留的克伦特罗和磁性微球上固定的克伦特罗竞争结合碱性磷酸酶标记的克伦特罗抗体，加入发光底物，测量各管发光值，样本中发光值与标准曲线比较计算对应的浓度值再乘以样本前处理的稀释倍数即可得到样本中克伦特罗的残留量。还可与全自动化学发光免疫检测仪配套使用从而实现动物组织中克伦特罗残留检测的自动化。

