



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106568943 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201611027948.1

(22)申请日 2016.11.22

(71)申请人 百奥森(江苏)食品安全科技有限公司

地址 214070 江苏省无锡市滴翠路100号创意园三期A幢303

(72)发明人 周朱晨 张根义 胡彬 张进  
吴念绮 周合

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,包括:1)莱克多巴胺校准品;2)莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂;3)酶结合物;4)化学发光底物;5)清洗液。本发明通过莱克多巴胺与固相载体直接稳定连接的方法,既可保证与固相载体连接的稳定性、又能保证莱克多巴胺分子得到充分暴露,同时还通过引入磁性微粒扩大有效反应面积,建立了灵敏度更高、反应时间更短的莱克多巴胺化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒可适用于各种发光检测仪器。

1. 一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,其特征在于,包括:1) 莱克多巴胺校准品;2) 莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂;3) 酶结合物;4) 化学发光底物;5) 清洗液。

2. 根据权利要求1所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,其特征在于,所述的莱克多巴胺标准品的浓度梯度为0ng/ml、0.04ng/ml、0.12ng/ml、0.36ng/ml、1.08ng/ml、3.24ng/ml。

3. 根据权利要求1所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,其特征在于,所述的莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂的主要成份是莱克多巴胺偶联氨基磁珠连接物;所述的氨基磁珠的粒径为2~4 $\mu$ m,表面活性基团为氨基(-NH<sub>2</sub>)。

4. 根据权利要求1所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,其特征在于,所述的酶结合物的主要成份是碱性磷酸酶标记的莱克多巴胺结合蛋白。

5. 根据权利要求1所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,其特征在于,所述的化学发光底物的主要成份是(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐)。

6. 根据权利要求1~5任一所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 配制莱克多巴胺校准品;

2) 将莱克多巴胺连接到氨基磁珠上制备连接物,用磁珠缓冲液稀释连接物到一定浓度,制备出连接物试剂;

3) 用酶标记莱克多巴胺结合蛋白,制备酶结合物;

4) 配制化学发光底物;

5) 配制清洗液;

6) 分装以上各试剂,组成成品。

7. 根据权利要求6所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂的制备,包括以下步骤:

1) 准确称取莱克多巴胺6mg,溶解于纯水中,终浓度为3mg/ml,得到莱克多巴胺溶液;

2) 配制pH值7.0的30mmol/L的磷酸盐缓冲液:称取NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.8g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3g、氯化钠3.4g,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠或碳酸氢钠将pH值调节至7.0±0.1,定容至1000ml后复测pH值,使之处于7.0±0.1,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8℃保存;

3) 配制6mg/ml的磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷,用二甲基亚砷溶解;

4) 往莱克多巴胺溶液中加入85 $\mu$ L的6mg/ml的磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷进行活化,20~22℃反应45分钟,反应过程中充分混匀;

5) 量取8mg氨基磁珠,将氨基磁珠放置于磁架上静置2分钟,移除上清,用pH=7.0的30mmol/L磷酸盐缓冲液洗涤三次后加入磷酸盐缓冲液保存,使磁珠浓度为25mg/ml;

6) 将活化后的莱克多巴胺溶液加入清洗后的氨基磁珠中,并将反应液中磁珠浓度调整为6mg/ml,20~22℃反应40分钟,反应过程中充分混匀;

7) 配制磁珠缓冲液:称取13g Tris碱、10g氯化钠、0.4ml吐温-20、1.2g Proclin-300,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至7.2±0.1;加入1.2g干酪素钠,定容至1000ml后复测pH值,使之处于7.2±0.1,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8℃保存;

8) 反应完成后移除上清,用30mmol/L磷酸盐缓冲液洗涤三次后加入1ml磁珠缓冲液进

行保存;使用时用磁珠缓冲液稀释成浓度为0.03mg/ml的工作液。

8. 根据权利要求6所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的酶结合物的制备,包括以下步骤:

1) 取碱性磷酸酶1.5mg,将浓度调整为8mg/ml;

2) 称取6mg磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷,用二甲基亚砜进行溶解,终浓度为16mg/ml,加入5 $\mu$ L至碱性磷酸酶中,20~22 $^{\circ}$ C反应10分钟;

3) 用分子筛层析法根据分子量的差别对反应混合物进行纯化,收集活化后的碱性磷酸酶溶液;

4) 取纯品莱克多巴胺结合蛋白0.6mg,加入活化后的碱性磷酸酶缓冲液中,2~8 $^{\circ}$ C反应5小时,最后用分子筛层析法将酶标记的莱克多巴胺结合蛋白提纯出来;

5) 酶结合物缓冲液配制:称取14g三羟甲基氨基甲烷、8g氯化钠、7g甘油、0.4g Proclin-300,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ;加入12g兔血清白蛋白,定容至1000ml后复测pH值,使之处于 $7.2 \pm 0.1$ ,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存;

6) 将结合物用酶结合物缓冲液稀释至酶标记的莱克多巴胺结合蛋白浓度为3 $\mu$ g/ml即为工作液。

9. 根据权利要求6所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的化学发光底物的配制,包括:准确称取3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐0.6g、三羟甲基氨基甲烷20g、氯化钠80g、十六烷基三甲基氯化铵0.022g,纯化水定容至1000ml,调整化学发光底物溶液pH值为 $9.4 \pm 0.05$ 。

10. 根据权利要求6所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的清洗液的配制,包括:称取1.2g三羟甲基氨基甲烷、8g氯化钠、0.8g吐温-20,加入纯化水900ml,混匀至各试剂溶解,用2mol/L柠檬酸钠溶液调整溶液pH值到 $7.8 \pm 0.1$ ,补加纯化水定容至1000ml,过滤后混匀待用。

## 一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品检测技术领域,具体是一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 莱克多巴胺(Ractopamin)属于 $\beta$ -兴奋剂。 $\beta$ -兴奋剂是营养重分配剂的一种,是一类结构和功能类似肾上腺素和去甲肾上腺素的苯乙醇胺类衍生物,它能改善脂肪型动物的肉与脂肪的比例,降低酮体脂肪含量,提高瘦肉率,并能加速动物生长,而被添加于动物饲料中。常见的 $\beta$ 2-兴奋剂有克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇等。随着我国对克伦特罗(俗称“瘦肉精”)监管力度的加大,克伦特罗的使用逐渐减少,其他 $\beta$ 2-兴奋剂的使用逐渐增加。由于莱克多巴胺有类似于克伦特罗的作用,在动物组织中残留,从而对人体产生不利影响,所以我国禁止莱克多巴胺其作为饲料添加剂使用。

[0003] 在莱克多巴胺的检测方法方面,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)、毛细管电泳、酶联免疫吸附分析法(enzymelinkedimmunosorbentassay,ELISA)等方法。这些方法虽然能够实现莱克多巴胺的精确检测,但其灵敏度、反应效率均有一定的不足。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种灵敏度更高、反应时间短的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,包括:1)莱克多巴胺校准品;2)莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂;3)酶结合物;4)化学发光底物;5)清洗液。

[0006] 所述的莱克多巴胺标准品的浓度梯度为0ng/ml、0.04ng/ml、0.12ng/ml、0.36ng/ml、1.08ng/ml、3.24ng/ml。

[0007] 所述的莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂的主要成份是莱克多巴胺偶联氨基磁珠连接物;所述的氨基磁珠的粒径为2~4 $\mu$ m,表面活性基团为氨基(-NH<sub>2</sub>)。

[0008] 所述的酶结合物的主要成份是碱性磷酸酶标记的莱克多巴胺结合蛋白。

[0009] 所述的化学发光底物的主要成份是(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐)。

[0010] 所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

- 1)配制莱克多巴胺校准品;
- 2)将莱克多巴胺连接到氨基磁珠上制备连接物,用磁珠缓冲液稀释连接物到一定浓度,制备出连接物试剂;
- 3)用酶标记莱克多巴胺结合蛋白,制备酶结合物;
- 4)配制化学发光底物;
- 5)配制清洗液;

6) 分装以上各试剂,组成成品。

[0011] 作为本发明进一步的方案:所述的莱克多巴胺校准品的配制,包括以下步骤:

1) 校准品缓冲液的配制:称取6g Tris碱、10g氯化钠(NaCl)、0.8g Proclin-300,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ;加入6g兔血清白蛋白,定容至1000ml后复测pH值,使之处于 $7.2 \pm 0.1$ ,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存;

2) 将莱克多巴胺纯品粉末用校准品缓冲液溶解,配制成为10ng/ml的浓溶液,随后依次稀释出5个浓度,分别为:0.04ng/ml、0.12ng/ml、0.36ng/ml、1.08ng/ml、3.24ng/ml;加上0点,共6个浓度的校准品梯度值。

[0012] 作为本发明进一步的方案:所述的莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂的制备,包括以下步骤:

1) 准确称取莱克多巴胺6mg,溶解于纯水中,终浓度为3mg/ml,得到莱克多巴胺溶液;

2) 配制pH值7.0的30mmol/L的磷酸盐缓冲液:称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3g、氯化钠(NaCl) 3.4g,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠或碳酸氢钠将pH值调节至 $7.0 \pm 0.1$ ,定容至1000ml后复测pH值,使之处于 $7.0 \pm 0.1$ ,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存;

3) 配制6mg/ml的磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷(SMCC),用二甲基亚砜(DMSO)溶解;

4) 往莱克多巴胺溶液中加入85 $\mu$ L的6mg/ml的磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷(SMCC)进行活化,20~22 $^{\circ}$ C反应45分钟,反应过程中充分混匀;

5) 量取8mg氨基磁珠,将氨基磁珠放置于磁架上静置2分钟,移除上清,用pH=7.0的30mmol/L磷酸盐缓冲液洗涤三次后加入磷酸盐缓冲液保存,使磁珠浓度为25mg/ml;

6) 将活化后的莱克多巴胺溶液加入清洗后的氨基磁珠中,并将反应液中磁珠浓度调整为6mg/ml,20~22 $^{\circ}$ C反应40分钟,反应过程中充分混匀;

7) 配制磁珠缓冲液:称取13g Tris碱、10g氯化钠(NaCl)、0.4ml吐温-20、1.2g Proclin-300,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ;加入1.2g干酪素钠,定容至1000ml后复测pH值,使之处于 $7.2 \pm 0.1$ ,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存;

8) 反应完成后移除上清,用30mmol/L磷酸盐缓冲液洗涤三次后加入1ml磁珠缓冲液进行保存;使用时用磁珠缓冲液稀释成浓度为0.03mg/ml的工作液。

[0013] 作为本发明进一步的方案:所述的酶结合物的制备,包括以下步骤:

1) 取碱性磷酸酶1.5mg,将浓度调整为8mg/ml;

2) 称取6mg磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷(SMCC),用二甲基亚砜(DMSO)进行溶解,终浓度为16mg/ml,加入5 $\mu$ L至碱性磷酸酶中,20~22 $^{\circ}$ C反应10分钟;

3) 用分子筛层析法根据分子量的差别对反应混合物进行纯化,收集活化后的碱性磷酸酶溶液;

4) 取纯品莱克多巴胺结合蛋白0.6mg,加入活化后的碱性磷酸酶缓冲液中,2~8 $^{\circ}$ C反应5小时,最后用分子筛层析法将酶标记的莱克多巴胺结合蛋白提纯出来;

5) 酶结合物缓冲液配制:称取14g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、8g氯化钠(NaCl)、7g甘油、0.4g Proclin-300,加入900ml纯化水,用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ;加入12g兔血清白蛋白,定容至1000ml后复测pH值,使之处于 $7.2 \pm 0.1$ ,0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存;

6) 将结合物用酶结合物缓冲液稀释至酶标记的莱克多巴胺结合蛋白浓度为 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 即为工作液。

[0014] 作为本发明进一步的方案:所述的化学发光底物的配制,包括:准确称取3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐(AMPPD)0.6g、三羟甲基氨基甲烷(Tris)20g、氯化钠(NaCl)80g、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)0.022g,纯化水定容至1000ml,调整化学发光底物溶液pH值为 $9.4\pm 0.05$ 。本化学发光底物为针对碱性磷酸酶的环境二氧乙烷类底物,需要在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存,用时缓慢混匀。

[0015] 作为本发明进一步的方案:所述的清洗液的配制,包括:称取1.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、8g氯化钠(NaCl)、0.8g吐温-20,加入纯化水约900ml,混匀至各试剂溶解,用2mol/L柠檬酸钠溶液调整溶液pH值到 $7.8\pm 0.1$ ,补加纯化水定容至1000ml,过滤后混匀待用。

[0016] 利用所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒进行检测的方法,步骤为:

- (1) 向平底试管中加入 $40\mu\text{L}$ 样本或者校准品;
- (2) 向平底试管中加入 $40\mu\text{L}$ 磁分离试剂;
- (3) 向平底试管中加入 $50\mu\text{L}$ 莱克多巴胺结合蛋白碱性磷酸酶结合物;
- (4) 将平底试管放置在涡旋混匀仪上混匀30秒,然后置于 $37^{\circ}\text{C}$ 反应25分钟;
- (5) 将平底试管放置在磁架上静置2分钟后倒掉上清,拍干,加入清洗液 $600\mu\text{L}$ ,混匀20秒;
- (6) 重复步骤(5)两次;
- (7) 将拍干的平底试管放入免疫分析仪中进行检测。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明通过莱克多巴胺与固相载体直接稳定连接的方法,既可保证与固相载体连接的稳定性、又能保证莱克多巴胺分子得到充分暴露,同时还通过引入磁性微粒扩大有效反应面积,建立了灵敏度更高、反应时间更短的莱克多巴胺化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒可适用于各种发光检测仪器。

## 具体实施方式

[0018] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

### [0019] 实施例1

本发明实施例中,一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒,包括:1) 莱克多巴胺校准品; 2) 莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂; 3) 酶结合物; 4) 化学发光底物; 5) 清洗液。莱克多巴胺标准品的浓度梯度为 $0\text{ng}/\text{ml}$ 、 $0.04\text{ng}/\text{ml}$ 、 $0.12\text{ng}/\text{ml}$ 、 $0.36\text{ng}/\text{ml}$ 、 $1.08\text{ng}/\text{ml}$ 、 $3.24\text{ng}/\text{ml}$ 。莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂的主要成份是莱克多巴胺偶联氨基磁珠连接物。氨基磁珠的粒径为 $2\sim 4\mu\text{m}$ ,表面活性基团为氨基( $-\text{NH}_2$ )。酶结合物的主要成份是碱性磷酸酶标记的莱克多巴胺结合蛋白。化学发光底物的主要成份是(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐)。

[0020] 所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

1) 配制莱克多巴胺校准品, 包括: 校准品缓冲液的配制: 称取6g Tris碱、10g氯化钠(NaCl)、0.8g Proclin-300, 加入900ml纯化水, 用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ; 加入6g兔血清白蛋白, 定容至1000ml后复测pH值, 使之处于 $7.2 \pm 0.1$ , 0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存; 将莱克多巴胺纯品粉末用校准品缓冲液溶解, 配制成为10ng/ml的浓溶液, 随后依次稀释出5个浓度, 分别为: 0.04ng/ml、0.12ng/ml、0.36ng/ml、1.08ng/ml、3.24ng/ml; 加上0点, 共6个浓度的校准品梯度值;

2) 将莱克多巴胺连接到氨基磁珠上制备连接物, 用磁珠缓冲液稀释连接物到一定浓度, 制备出连接物试剂, 包括: 准确称取莱克多巴胺6mg, 溶解于纯水中, 终浓度为3mg/ml, 得到莱克多巴胺溶液; 配制pH值7.0的30mmol/L的磷酸盐缓冲液: 称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3g、氯化钠(NaCl) 3.4g, 加入900ml纯化水, 用2mol/L柠檬酸钠或碳酸氢钠将pH值调节至 $7.0 \pm 0.1$ , 定容至1000ml后复测pH值, 使之处于 $7.0 \pm 0.1$ , 0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存; 配制6mg/ml的磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷(SMCC), 用二甲基亚砜(DMSO)溶解; 往莱克多巴胺溶液中加入85 $\mu$ L的6mg/ml的磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷(SMCC)进行活化, 20~22 $^{\circ}$ C反应45分钟, 反应过程中充分混匀; 量取8mg氨基磁珠, 将氨基磁珠放置于磁架上静置2分钟, 移除上清, 用pH=7.0的30mmol/L磷酸盐缓冲液洗涤三次后加入磷酸盐缓冲液保存, 使磁珠浓度为25mg/ml; 将活化后的莱克多巴胺溶液加入清洗后的氨基磁珠中, 并将反应液中磁珠浓度调整为6mg/ml, 20~22 $^{\circ}$ C反应40分钟, 反应过程中充分混匀; 配制磁珠缓冲液: 称取13g Tris碱、10g氯化钠(NaCl)、0.4ml吐温-20、1.2g Proclin-300, 加入900ml纯化水, 用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ; 加入1.2g干酪素钠, 定容至1000ml后复测pH值, 使之处于 $7.2 \pm 0.1$ , 0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存; 反应完成后移除上清, 用30mmol/L磷酸盐缓冲液洗涤三次后加入1ml磁珠缓冲液进行保存; 使用时用磁珠缓冲液稀释成浓度为0.03mg/ml的工作液;

3) 用酶标记莱克多巴胺结合蛋白, 制备酶结合物, 包括: 取碱性磷酸酶1.5mg, 将浓度调整为8mg/ml; 称取6mg磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷(SMCC), 用二甲基亚砜(DMSO)进行溶解, 终浓度为16mg/ml, 加入5 $\mu$ L至碱性磷酸酶中, 20~22 $^{\circ}$ C反应10分钟; 用分子筛层析法根据分子量的差别对反应混合物进行纯化, 收集活化后的碱性磷酸酶溶液; 取纯品莱克多巴胺结合蛋白0.6mg, 加入活化后的碱性磷酸酶缓冲液中, 2~8 $^{\circ}$ C反应5小时, 最后用分子筛层析法将酶标记的莱克多巴胺结合蛋白提纯出来; 酶结合物缓冲液配制: 称取14g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、8g氯化钠(NaCl)、7g甘油、0.4g Proclin-300, 加入900ml纯化水, 用2mol/L柠檬酸钠将pH值调节至 $7.2 \pm 0.1$ ; 加入12g兔血清白蛋白, 定容至1000ml后复测pH值, 使之处于 $7.2 \pm 0.1$ , 0.22 $\mu$ m过滤后于2~8 $^{\circ}$ C保存; 将结合物用酶结合物缓冲液稀释至酶标记的莱克多巴胺结合蛋白浓度为3 $\mu$ g/ml即为工作液;

4) 配制化学发光底物, 包括: 准确称取3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧化环乙烷二钠盐(AMPPD) 0.6g、三羟甲基氨基甲烷(Tris) 20g、氯化钠(NaCl) 80g、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC) 0.022g, 纯化水定容至1000ml, 调整化学发光底物溶液pH值为 $9.4 \pm 0.05$ ; 本化学发光底物为针对碱性磷酸酶的环二氧化乙烷类底物, 需要在2~8 $^{\circ}$ C条件下避光保存, 用时缓慢混匀;

5) 配制清洗液, 包括: 称取1.2g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、8g氯化钠(NaCl)、0.8g吐温-20, 加入纯化水约900ml, 混匀至各试剂溶解, 用2mol/L柠檬酸钠溶液调整溶液pH值到 $7.8 \pm$

0.1,补加纯化水定容至1000ml,过滤后混匀待用;

6)分装以上各试剂,组成成品。

[0021] 利用所述的食品中莱克多巴胺的检测试剂盒进行检测的方法,步骤为:

(1)向平底试管中加入40 $\mu$ L样本或者校准品;

(2)向平底试管中加入40 $\mu$ L磁分离试剂;

(3)向平底试管中加入50 $\mu$ L莱克多巴胺结合蛋白碱性磷酸酶结合物;

(4)将平底试管放置在涡旋混匀仪上混匀30秒,然后置于37 $^{\circ}$ C反应25分钟;

(5)将平底试管放置在磁架上静置2分钟后倒掉上清,拍干,加入清洗液600 $\mu$ L,混匀20秒;

(6)重复步骤(5)两次;

(7)将拍干的平底试管放入免疫分析仪中进行检测。

[0022] 检测结果的判断:将所获得的标准品和样品发光强度值的平均值除以第一个标准(0标准)的发光强度值再乘以100,以抑制率为纵坐标,莱克多巴胺浓度的对数为横坐标作标准曲线,每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出。

[0023] 相对发光强度(%)= $RLU/RLU_0$ ,RLU是标准品或者样品溶液测定的发光强度,RLU<sub>0</sub>是空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0024] 试剂盒的准确度和精密度

准确度是指测定值与真值间的符合程度,试剂盒准确度常用回收率表示。精密度又称可重复性,常用变异系数表示。

[0025] 按照样品前处理方法,以0.1ng/ml、0.2ng/ml两个浓度的莱克多巴胺分别对牛奶、奶粉样品进行添加回收,每种样品每个浓度测定5个平行,用三批试剂盒进行测定,计算样品的回收率及精密度。实验结果显示,牛奶样品中莱克多巴胺的添加回收率范围在87.1~101.2%,奶粉样品中莱克多巴胺的添加回收率范围在82.9~98.5%。批内和批间变异系数均小于10%。

[0026] 试剂盒的特异性

以莱克多巴胺作为标准,设莱克多巴胺的交叉反应率为100%,用于抗体交叉反应性研究的药物均为与莱克多巴胺结构或者功能相似的药物:克仑特罗、沙丁胺醇。按试剂盒步骤操作,但加入的竞争物分别为莱克多巴胺、克仑特罗、沙丁胺醇,制作抑制曲线,根据线性方程计算各竞争物50%抑制浓度(1C<sub>50</sub>)。交叉反应率(%CR)即为抗体对莱克多巴胺的1C<sub>50</sub>与抗体对莱克多巴胺竞争物的1C<sub>50</sub>之比的百分数。结果显示,克仑特罗、沙丁胺醇的交叉反应率均<1%,说明该试剂盒具有良好的特异性。

[0027] 本发明通过莱克多巴胺与固相载体直接稳定连接的方法,既可保证与固相载体连接的稳定性、又能保证莱克多巴胺分子得到充分暴露,同时还通过引入磁性微粒扩大有效反应面积,建立了灵敏度更高、反应时间更短的莱克多巴胺化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒可适用于各种发光检测仪器。

[0028] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有

变化囊括在本发明内。

[0029] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106568943A</a>	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201611027948.1	申请日	2016-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	百奥森江苏食品安全科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
[标]发明人	周朱晨 张根义 胡彬 张进 吴念绮 周合		
发明人	周朱晨 张根义 胡彬 张进 吴念绮 周合		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种食品中莱克多巴胺的检测试剂盒，包括：1) 莱克多巴胺校准品；2) 莱克多巴胺-氨基磁珠连接物试剂；3) 酶结合物；4) 化学发光底物；5) 清洗液。本发明通过莱克多巴胺与固相载体直接稳定连接的方法，既可保证与固相载体连接的稳定性、又能保证莱克多巴胺分子得到充分暴露，同时还通过引入磁性微粒扩大有效反应面积，建立了灵敏度更高、反应时间更短的莱克多巴胺化学发光免疫检测试剂盒，该试剂盒可适用于各种发光检测仪器。