



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102520155 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 201110414539. 8

(22) 申请日 2011. 12. 13

(73) 专利权人 潍坊市康华生物技术有限公司  
地址 261000 山东省潍坊市经济开发区月河  
路 699 号

(72) 发明人 杨致亭 孙明强 陶德友 管廷武  
刘发新

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务有限公  
司 37205

代理人 李江

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101799469 A, 2010. 08. 11, 权利要求

1-4, 说明书第【0048】-【0056】段.

CN 1389730 A, 2003. 01. 08, 全文.

CN 1389730 A, 2003. 01. 08, 全文.

CN 102109516 A, 2011. 06. 29, 全文.

CN 102168072 A, 2011. 08. 31, 全文.

EP 1813285 A1, 2007. 08. 01, 全文.

CN 101368952 A, 2009. 02. 18, 全文.

CN 101955541 A, 2011. 01. 26, 全文.

审查员 李宏悦

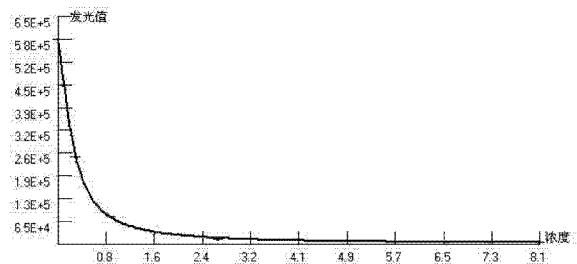
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

一种盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法, 所述试剂盒包括盒体、设在盒体内的盐酸克伦特罗酶标板, 以及盐酸克伦特罗标准溶液、盐酸克伦特罗酶结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物; 所述制备方法包括酶标板、标准溶液、结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物配制; 所述使用方法包括样品的制备、加样检测、检测结果分析; 本发明的优点在于: 分析结果灵敏、稳定、可靠, 该方法操作步骤少、样品前处理简便、所需设备易于普及, 能够用于猪肉中 CL 残留的测定, 灵敏度达 0. 03µg/kg, 且检测时间比 ELISA 法缩短了 30min, 能满足盐酸克伦特罗残留的快速检测要求。



1. 一种盐酸克伦特罗检测试剂盒,其特征在于:包括盒体、设在盒体内的盐酸克伦特罗酶标板,以及盐酸克伦特罗标准溶液、盐酸克伦特罗酶结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物;

所述酶标板的板孔包被有固相化的盐酸克伦特罗抗体;

所述盐酸克伦特罗标准溶液包括浓度依次为:0 ng/ml、0.1 ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗溶液;

所述盐酸克伦特罗酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的盐酸克伦特罗抗原;

所述稀释液为 pH=7.0 的 0.01M 的磷酸盐缓冲溶液;

所述浓缩洗涤液为含有体积分数 0.05% 的吐温-20、pH=7.5 浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液;

所述第一底物为每 250ml 含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g, pH=9.0 的溶液;

所述第二底物为每 250ml 含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25ml, pH=9.0 的溶液;

所述盐酸克伦特罗检测试剂盒按照以下方法使用:

#### (1) 样品的制备

##### 1.1 尿液样品

离心:清亮尿样可直接测定;如尿样浑浊,则需过滤或 3000r 离心 5min,取上清液 50  $\mu$ l 检测;检测稀释倍数:1;

##### 1.2 饲料样品

取 1g 均质化后的饲料样品于 50ml 试管中,加入 10ml 0.1M 的 HCl 溶液,用振荡器剧烈振荡 5min,3000r 离心 10min;取上述离心后的上清液 1ml 加入 20  $\mu$ l 1M 氢氧化钠溶液混匀;3000 r 离心 10 分钟;取 50  $\mu$ l 上清液用于检测,检测稀释倍数:10;

##### 1.3 肌肉、肝等组织

称取 3.0 $\pm$ 0.05g 均质化后的组织样本至 50ml 离心管中;加入 6ml 3% 的三氯乙酸,用振荡器振荡摇至均匀,颠倒混匀 10min;3000r 以上离心 10 分钟;将上述离心后的上清液取 3ml 转入 20ml 试管,加 3ml 异丙醇-乙酸乙酯混合液,体积比 2:3,震荡 10min,静置 5min;然后,3000r 以上离心 10 分钟;取 1.5ml 上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中,60 $^{\circ}$ C 氮气吹干;用 2ml 稀释液充分溶解;取 50  $\mu$ l 上清液用于检测,检测稀释倍数:4;

##### 1.4 肌肉蒸煮法

称取 10g 均质化后的肌肉样本于 50ml 离心管中;将离心液放入沸水浴中蒸 10min;水浴后取上层渗出液 1ml,直接取 50  $\mu$ l 用于检测,检测稀释倍数:1;

#### (2) 加样检测

将在冷藏环境中贮藏的试剂室温 25 $^{\circ}$ C 平衡;

2.1 将浓度分别为:0 ng/ml、0.1 ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中,每孔 50  $\mu$ l;

2.2 然后将 100  $\mu$ l 稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的 CL 抗原,1:2000 稀释倍数,加入到板孔底部,用震荡机震荡 30 秒,盖上封板膜,25 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;

2.3 用洗涤液洗涤,方法是向板孔中每孔注满洗涤液,停留 10 秒后吸尽拍干,重复 5 次;

2.4 第一底物和第二底物以体积比 1:1 混合均匀,加入到板孔中,每孔加入 50  $\mu$ l,震荡 20 秒;

2.5 震荡后 10 分钟测定结果,使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析;

### (3) 检测结果

根据各标准溶液发光值,借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合,坐标选择 X-Y,得标准曲线,根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度,然后乘上相应的稀释倍数,即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。

2. 如权利要求 1 所述的盐酸克伦特罗检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

#### (1) 盐酸克伦特罗酶标板的制备

1.1 包被液的配制:稀释配制 2 $\mu$ g/ml 的盐酸克伦特罗抗体溶液;

1.2 包被量:将酶标板的板孔加入上述制备的包被液 100 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C 包被 48 小时;

1.3 洗涤:将上述包被后的酶标板用浓缩洗涤液洗涤两次;

1.4 封闭:将上述洗涤后的酶标板板孔每孔加封闭液 130 $\mu$ l,室温 20-25 $^{\circ}$ C 封闭 3 小时;

1.5 干燥:将上述封闭后的酶标板板孔中的封闭液甩出,然后 18-25 $^{\circ}$ C 干燥 48 小时;

1.6 将上述干燥后的酶标板装入铝箔袋,封口,备用;

#### (2) 盐酸克伦特罗标准溶液的配制

2.1 制备浓度为 100 $\mu$ g/L 的盐酸克伦特罗溶液;-20 $^{\circ}$ C 避光保存;

2.2 配制 8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液;

2.3 将 8.1ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液用稀释液进行倍比稀释,依次配制 2.7 ng/ml、0.9 ng/ml、0.3 ng/ml、0.1 ng/ml 标准品溶液;0 ng/ml 为未添加盐酸克伦特罗的稀释液;

#### (3) 盐酸克伦特罗酶结合物的制备

用辣根过氧化物酶标记盐酸克伦特罗抗原,工作浓度为体积比 1: 2000,得到盐酸克伦特罗酶结合物;

#### (4) 稀释液的配制

配制 pH=7.0 的 0.01M PBS 溶液;

#### (5) 浓缩洗涤液的配制

配制含有体积分数 0.05% 吐温-20、pH=7.5、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液作为浓缩洗涤液;

#### (6) 第一底物的配制

称取 BSA 2.5g、Tris 1.5g,加入容量瓶;加水溶解,定容至 250ml;再用 HCl 调节 pH 至 9.0,完全混匀;再称取鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g,倒入上述容量瓶,充分溶解,摇匀;

#### (7) 第二底物的配制

称取 BSA 2.5g、Tris 1.5g,加入容量瓶;加水溶解,定容至 250ml;再用 HCl 调节 pH 至 9.0,完全混匀;取 0.25ml  $H_2O_2$  加入上述液体中,混匀。

## 一种盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法,具体地说是一种采用直接竞争化学发光免疫方法检测盐酸克伦特罗的试剂盒及其制备和使用方法,属于瘦肉精检测领域。

### 背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(clenbuterol hydrochloride,简称 CL)是一种  $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂,商品名为氨哮素、克喘素,是儿茶酚胺的一种衍生物,俗称“瘦肉精”。将一定量的CL添加到饲料中,能明显促进动物生长率和饲料转化率,促进动物脂肪分解,瘦肉率提高 10%左右。随着 CL 在畜牧生产中的应用,人们发现 CL 能在动物体内蓄积残留,导致食用中毒。CL 中毒会对人的身体健康造成严重的危害,其症状包括:血压升高、血管扩张、心跳加快、呼吸加剧、体温升高、肌肉颤抖、头痛、胸闷、神经过敏、肌肉疼痛、心悸、恶心、呕吐等。由于 CL 作为饲料添加剂的危害严重,上世纪 90 年代,欧洲等国家纷纷颁布法规,严禁将 CL 用作促生长剂。我国农业部在 1997 年 3 月(农牧发[1997] 3 号文)严令禁止肾上腺素在动物生产中的应用,但目前国内非法滥用的情况依然严重。

[0003] 目前检测 CL 的方法主要有 HPLC-MS(高效液相色谱-质谱)、GC-MS(气相色谱-质谱)和 ELISA(酶联免疫吸附法)法。HPLC-MS 和 GC-MS 两种方法所需的设备昂贵、操作复杂,通常作为定量和确证方法;ELISA 方法操作简单、快速,但其灵敏度低,适用于定性和半定量,通常用作大规模样品筛选。

[0004] 化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay,CLIA)是将免疫反应和化学发光反应相结合以检测抗原或抗体的免疫技术,它以化学发光物质或酶为标记物,直接标记在抗原或抗体上,免疫反应结束后,加入发光底物。利用发光信号检测仪测量发光强度,根据化学发光标记物与发光强度的关系计算出被测物的含量(Shelver 等,2002)。它同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的成本低、速度快、特异性强、样品与处理简单和选择性强等优点,非常适合快速检测。

[0005] 目前化学发光酶免疫分析技术在环境监测、食品安全、制药和临床医学等领域有较大发展。前人采用间接竞争化学发光酶免疫分析法对猪尿样中的 CL 进行检测,检测灵敏度分别为 0.08 $\mu$ g/L 和 0.01 $\mu$ g/L,但方法只限于猪尿样中 CL 的测定;有些采用间接竞争化学发光酶免疫法测定沙丁胺醇和 CL,但操作繁琐耗时。

### 发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明设计了盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法,该试剂盒能够对盐酸克伦特罗进行快速检测,且结果准确,误差小,检测灵敏度高,对检测设备要求低。

[0007] 本发明的技术方案为:

[0008] 一种盐酸克伦特罗检测试剂盒,包括盒体、设在盒体内的盐酸克伦特罗酶标板,以

及盐酸克伦特罗标准溶液、盐酸克伦特罗酶结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物；

[0009] 所述酶标板的板孔包被有固相化的盐酸克伦特罗抗体；

[0010] 所述盐酸克伦特罗标准溶液包括浓度依次为：0 ng/ml、0.1 ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗溶液；

[0011] 所述盐酸克伦特罗酶结合物，为辣根过氧化物酶标记的盐酸克伦特罗抗原；

[0012] 所述稀释液为 pH=7.0 的 0.01M 的磷酸盐缓冲溶液；

[0013] 所述浓缩洗涤液为含有体积分数 0.05% 的吐温 -20、PH=7.5 浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液；

[0014] 所述第一底物为每 250ml 含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g，pH=9.0 的溶液；

[0015] 所述第二底物为每 250ml 含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25ml，pH=9.0 的溶液。

[0016] 上述盐酸克伦特罗检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0017] (1) 盐酸克伦特罗酶标板的制备

[0018] 1.1 包被液的配制：稀释配制 2 $\mu$ g/ml 的盐酸克伦特罗抗体溶液；

[0019] 1.2 包被量：将酶标板的板孔加入上述制备的包被液 100 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 包被 48 小时；

[0020] 1.3 洗涤：将上述包被后的酶标板用浓缩洗涤液洗涤两次；

[0021] 1.4 封闭：将上述洗涤后的酶标板板孔每孔加封闭液 130 $\mu$ l，室温 20-25 $^{\circ}$ C 封闭 3 小时；

[0022] 1.5 干燥：将上述封闭后的酶标板板孔中的封闭液甩出，然后 18-25 $^{\circ}$ C 干燥 48 小时；

[0023] 1.6 将上述干燥后的酶标板装入铝箔袋，封口，备用。

[0024] (2) 盐酸克伦特罗标准溶液的配制

[0025] 2.1 制备浓度为 100 $\mu$ g/L 的盐酸克伦特罗溶液；-20 $^{\circ}$ C 避光保存；

[0026] 2.2 配制 8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液；

[0027] 2.3 将 8.1ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液用稀释液进行倍比稀释，依次配制 2.7 ng/ml、0.9 ng/ml、0.3 ng/ml、0.1 ng/ml 标准品溶液；0 ng/ml 为未添加盐酸克伦特罗的稀释液。

[0028] (3) 盐酸克伦特罗酶结合物的制备

[0029] 用辣根过氧化物酶标记盐酸克伦特罗抗原，工作浓度为体积比 1：2000，得到盐酸克伦特罗酶结合物。

[0030] (4) 稀释液的配制

[0031] 配制 pH=7.0 的 0.01M PBS 溶液。

[0032] (5) 浓缩洗涤液的配制

[0033] 配制含有体积分数 0.05% 吐温 -20、PH=7.5、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液作为浓缩洗涤液。

[0034] (6) 第一底物的配制

[0035] 称取 BSA 2.5g、Tris 1.5g，加入容量瓶；加水溶解，定容至 250ml；再用 HCl 调节

pH 至 9.0, 完全混匀; 再称取鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g, 倒入上述容量瓶, 充分溶解, 摇匀;

[0036] (7) 第二底物的配制

[0037] 称取 BSA 2.5g、Tris 1.5g, 加入容量瓶; 加水溶解, 定容至 250ml; 再用 HCl 调节 PH 至 9.0, 完全混匀; 取 0.25ml  $H_2O_2$  加入上述液体中, 混匀。

[0038] 上述盐酸克伦特罗检测试剂盒的使用方法, 包括以下步骤:

[0039] (1) 样品的制备

[0040] 1.1 尿液样品

[0041] 离心: 清亮尿样可直接测定; 如尿样浑浊, 则需过滤或 3000r 离心 5min, 取上清液 50  $\mu$ l 检测; 检测稀释倍数: 1;

[0042] 1.2 饲料样品

[0043] 取 1g 均质化后的饲料样品于 50ml 试管中, 加入 10ml 0.1M 的 HCl 溶液, 用振荡器剧烈振荡 5min, 3000r 离心 10min; 取上述离心后的上清液 1ml 加入 20  $\mu$ l 1M 氢氧化钠溶液混匀; 3000 r 离心 10 分钟; 取 50  $\mu$ l 上清液用于检测, 检测稀释倍数: 10;

[0044] 1.3 肌肉、肝等组织

[0045] 称取  $3.0 \pm 0.05$ g 均质化后的组织样本至 50ml 离心管中; 加入 6ml 3% 的三氯乙酸, 用振荡器振荡摇至均匀, 颠倒混匀 10min; 3000r 以上离心 10 分钟; 将上述离心后的上清液取 3ml 转入 20ml 试管, 加 3ml 异丙醇-乙酸乙酯混合液, 体积比 2:3, 震荡 10min, 静置 5min; 然后, 3000r 以上离心 10 分钟; 取 1.5ml 上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中, 60 $^{\circ}$ C 氮气吹干; 用 2ml 稀释液充分溶解; 取 50  $\mu$ l 上清液用于检测, 检测稀释倍数: 4;

[0046] 1.4 肌肉蒸煮法

[0047] 称取 10g 均质化后的肌肉样本于 50ml 离心管中; 将离心液放入沸水浴中蒸 10min; 水浴后取上层渗出液 1ml, 直接取 50  $\mu$ l 用于检测, 检测稀释倍数: 1;

[0048] (2) 加样检测步骤(室温 25 $^{\circ}$ C 条件下操作)

[0049] 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温 25 $^{\circ}$ C 平衡;

[0050] 2.1 将浓度分别为: 0 ng/ml、0.1 ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中, 每孔 50  $\mu$ l;

[0051] 2.2 然后将 100  $\mu$ l 稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的 CL 抗原, 1:2000 稀释倍数, 加入到板孔底部, 用震荡机震荡 30 秒, 盖上封板膜, 25 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;

[0052] 2.3 用洗涤液洗涤, 方法是向板孔中每孔注满洗涤液, 停留 10 秒后吸尽拍干, 重复 5 次;

[0053] 2.4 第一底物和第二底物以体积比 1:1 混合均匀, 加入到板孔中, 每孔加入 50  $\mu$ l, 震荡 20 秒;

[0054] 2.5 震荡后 10 分钟测定结果, 使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析。

[0055] (3) 检测结果

[0056] 根据各标准溶液发光值, 借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合, 坐标选择 X-Y, 得标准曲线, 根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度, 然后乘上相应的稀

释倍数,即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。

[0057] 本发明检测原理是采用直接竞争化学发光一步法进行检测,测定基础是抗原抗体反应。酶标板微孔包被有针对 CL 的抗体,反应过程中,样本中游离的 CL 与酶标记的 CL 竞争结合酶标板微孔中固相化的抗体,然后通过洗涤液的洗涤去除未结合酶标记的 CL,再加入发光底物,根据发光值与样品中的 CL 浓度成反比,从而得到被检测物质的含量。

[0058] 本发明的优点在于:本发明采用直接竞争化学发光免疫方法检测 CL 残留,样品系直接自己发光,不需要任何光源照射,免除了光源稳定性、光散射、光波选择器等各种可能因素给分析带来的影响,分析结果灵敏、稳定、可靠。另外,该方法操作步骤少、样品前处理简便、所需设备易于普及,能够用于猪肉中 CL 残留的测定,灵敏度达  $0.03\mu\text{g}/\text{kg}$ ,且检测时间比 ELISA 法缩短了 30 min,能满足盐酸克伦特罗残留的快速检测要求。

### 附图说明

[0059] 图 1 为本发明实施例的盐酸克伦特罗标准曲线图(相关系数  $r=0.9995$ )。

### 具体实施方式

[0060] 以下对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0061] 1、一种盐酸克伦特罗检测试剂盒,包括盒体、设在盒体内的盐酸克伦特罗酶标板,以及盐酸克伦特罗标准溶液、盐酸克伦特罗酶结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物;

[0062] 所述盐酸克伦特罗酶标板:为 96 孔/板(12 条  $\times$  8 孔)包被有固相化的盐酸克伦特罗抗体;

[0063] 所述盐酸克伦特罗标准品:6  $\times$  1ml/瓶,分别为浓度 0,0.1,0.3,0.9,2.7,8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液;

[0064] 盐酸克伦特罗酶结合物:为辣根过氧化物酶标记的盐酸克伦特罗抗原,工作浓度为体积比 1:2000,即 1 体积酶标抗原+2000 体积的酶稀释液,2 瓶(6ml/瓶)CL 酶结合物;

[0065] 稀释液:pH=7.0 的 0.01M 的磷酸盐缓冲溶液(PBS),1 瓶 40ml;

[0066] 第一底物:1 瓶 3ml,每 250ml 第一底物溶液含有 BSA (N, O- 双三甲硅基乙酰胺) 2.5g、Tris1.5g、鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g;

[0067] 第二底物:1 瓶 3ml,每 250ml 第二底物溶液含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25ml;

[0068] 在整个试剂盒内还包括用于防止潮湿的干燥剂,用于存放一次实验未用完板条的自封袋,用于实验时避光的封板膜说明书。

[0069] 2、上述盐酸克伦特罗检测试剂盒的制备方法,包括:

[0070] 2.1 盐酸克伦特罗酶标板的制备

[0071] 2.1.1 包被液的配制:用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液(例如配方:0.34g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0.57g  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ,定容至 100ml)将 3mg/ml 的盐酸克伦特罗抗体溶液稀释成  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ;

[0072] 2.1.2 包被量:将酶标板的板孔每孔加入上述制备的包被液  $100\mu\text{l}$ , $4^\circ\text{C}$  包被 48 小时;

[0073] 2.1.3 洗涤:将上述包被后的酶标板用浓缩洗涤液洗涤两次,方法为将浓缩洗涤液按 1:40 稀释,即 1 体积浓缩洗涤液 +39 体积蒸馏水,间隔 0 秒,在洁净纱布或吸水纸上拍干;

[0074] 2.1.4 封闭:将上述洗涤后的酶标板板孔每孔加封闭液 130 $\mu$ l,室温 20-25 $^{\circ}$ C 封闭 3 小时;封闭液组成配方为:NaHCO<sub>3</sub> 2.93g + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g + BSA 10g,纯水定容 1000ml;

[0075] 2.1.5 干燥:将上述封闭后的酶标板板孔中的封闭液甩出,然后 18-25 $^{\circ}$ C 干燥 48 小时;

[0076] 2.1.6 将上述干燥后的酶标板装入铝箔袋,真空包装机封口,备用。

[0077] 2.2 盐酸克伦特罗标准溶液的配制

[0078] 2.2.1 称取 0.01g 盐酸克伦特罗标准品,蒸馏水定容为 100ml,得到浓度为 100 $\mu$ g/L 的盐酸克伦特罗溶液,定为储备液 1;-20 $^{\circ}$ C 避光保存;

[0079] 2.2.2 根据需要用量,将储备液 1 用蒸馏水再稀释,使用移液器准确量取 810 $\mu$ l 盐酸克伦特罗储备液 1,用蒸馏水定容为 100ml,作为盐酸克伦特罗储备液 2,-20 $^{\circ}$ C 避光保存;

[0080] 2.2.3 量取 1ml 克伦特罗储备液 2,用稀释液定容为 100ml,得到 8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液;

[0081] 2.2.4 将 8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液进行倍比稀释,依次配制 2.7 ng/ml、0.9 ng/ml、0.3 ng/ml、0.1 ng/ml 标准品溶液;0 ng/ml 为未添加盐酸克伦特罗的稀释液。

[0082] 2.3 盐酸克伦特罗酶结合物的制备

[0083] 用辣根过氧化物酶标记盐酸克伦特罗抗原,工作浓度为体积比 1:2000,得到盐酸克伦特罗酶结合物。

[0084] 2.4 稀释液的配制

[0085] 用托盘天平准确称量 NaCl 7g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.8g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、KCl 0.2g、叠氮钠 0.1g 加入容量瓶;先加适量纯水,轻摇使之溶解完全;量取小牛血清 200ml 加入容量瓶,搅拌均匀,以纯水定容至 1000ml,即得 pH=7.0 的 0.01M PBS 溶液。

[0086] 2.5 浓缩洗涤液的配制

[0087] 配制含有体积分数 0.05% 吐温-20、pH=7.5、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液作为浓缩洗涤液。

[0088] 2.6 第一底物的配制

[0089] 用电子天平准确称取 BSA (N, O- 双三甲硅基乙酰胺) 2.5g、Tris 1.5g,加入容量瓶;加适量纯水,轻摇使之溶解完全,以纯水定容至 250ml;用 HCl 调节 pH 至 9.0,完全混匀;再用电子天平准确称取鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g,倒入容量瓶,充分溶解,摇匀。

[0090] 2.7 第二底物的配制

[0091] 用电子天平准确称取 BSA 2.5g、Tris 1.5g,加入容量瓶;加适量纯水,轻摇使之溶解完全,以纯水定容至 250ml;再用 HCl 调节 PH 至 9.0,完全混匀;用加样器取 0.25ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入上述液体中,混匀。

[0092] 3、上述盐酸克伦特罗检测试剂盒的参数要求

[0093] 3.1 最低检出量:

[0094] 重复测定零标准品 10 次,计算出发光值的均值( $\bar{x}$ )和标准差(s),将( $\bar{x}$ -2s)的值

带入反应曲线,计算出相应浓度值。

[0095] 结果:最低检出量为:0.03ng/ml(国家要求不高于0.4ng/ml)。

[0096]

表 1 试剂盒最低检测限的测定

零标准品 编号	1	2	3	4	5
发光值	682494	689162	718105	749345	736784
零标准品 编号	6	7	8	9	10
发光值	733482	708365	736044	745100	776761

[0097] 测定的零标准品的平均发光值  $\bar{x}$  = 727764.2,  $s$  = 28666.32, 将  $(\bar{x} - 2s)$  的值带入此次反应曲线, 得其最低检测限为: 0.03ng/ml。

[0098] 3.2 线性: 在 0ng/ml-8.1ng/ml 范围内, 借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合, 坐标选择 X-Y, 得标准曲线。标准曲线相关系数  $0.9994 \leq r \leq 1.000$  (均大于 0.9900)。

[0099] 3.3 准确度与精密度:

[0100] 用 3 个批次的试剂盒对猪尿空白添加样品进行测定, 添加浓度分别为 1 $\mu$ g/L、2 $\mu$ g/L, 每个浓度的样品做 6 个重复。计算添加回收率和批内变异系数, 统计 3 批次试剂盒的批间变异系数。

[0101] 平均回收率: 90 $\pm$ 15%, 批内差异 < 15%, 批间差异 < 20%。

[0102]

表 2 试剂盒检测猪尿中克伦特罗准确度和精密度

添加浓度	试验重复							平均回收率 %	标准差	批内 CV %	批间 CV %
1 $\mu$ g/L	实测值	0.88	0.97	0.94	1.04	1.05	0.98	97.7	6.34	6.50	6.26
	回收率%	88	97	94	104	105	98				
	实测值	0.87	0.95	0.98	0.89	1.02	1.06	96.2	7.35	7.65	
	回收率%	87	95	98	89	102	106				
	实测值	0.97	1.01	0.95	0.98	1.07	1.05	105	4.72	4.69	
	回收率%	97	101	95	98	107	105				
2 $\mu$ g/L	实测值	1.96	2.08	1.92	1.84	2.17	2.14	99.9	16.8	8.41	6.89
	回收率%	98	104	96	92	109	107				
	实测值	1.82	2.01	1.93	1.70	1.87	1.86	93.3	10.4	5.60	
	回收率%	91.0	101	96.5	85.0	93.5	93.0				
	实测值	1.80	2.00	1.97	2.20	1.90	1.89	98.0	13.7	6.97	
	回收率%	90.0	100	98.5	110	95.0	94.5				

[0103] 3.4 稳定性测试：

[0104] 37℃破坏 7 天，各项指标符合国家要求。具体结果见下表：

[0105]

表 3 37℃破坏 7 天试剂盒最低检测限的测定

零标准品编号	1	2	3	4	5
发光值	610478	702248	586704	605721	582649
零标准品编号	6	7	8	9	10
发光值	681578	670699	575609	622027	626935

[0106] 测定的零标准品的平均发光值  $\bar{x}$  = 626464.8,  $s$  = 44133.73, 将  $(\bar{x} - 2s)$  的值带入此次反应曲线, 得其最低检测限为 : 0.06ng/ml (符合国家要求)。

[0107]

表 4 37℃破坏 7 天试剂盒检测猪尿中克伦特罗准确度和精密度

添加浓度	试验重复							平均回收率 %	标准差	批内 CV %	批间 CV %
	实测值	0.98	1.10	0.85	0.91	0.87	0.98				
1 $\mu$ g/L	回收率%	98.0	110	85.0	91.0	87.0	98.0	94.8	9.20	9.70	8.31
	实测值	0.88	0.95	0.79	0.90	1.00	0.89				
	回收率%	88.0	95.0	79.0	90.0	100	89.0	90.2	7.08	7.85	
	实测值	1.01	0.85	0.91	0.76	0.71	0.92				
	回收率%	101	85.0	91.0	76.0	71.0	92.0	96.3	6.86	7.12	
	实测值	1.85	1.75	1.69	1.64	2.03	1.89				
2 $\mu$ g/L	回收率%	92.5	87.5	84.5	82.0	101.5	94.5	90.4	14.3	8.00	7.09
	实测值	1.75	2.10	1.98	1.79	2.01	1.98				
	回收率%	87.5	105.0	99.0	89.5	100.5	99.0	96.8	13.6	7.01	
	实测值	2.10	1.85	1.83	1.85	1.96	1.86				
	回收率%	105	92.5	91.5	92.5	98.0	93.0	95.4	10.5	5.48	
	实测值	1.85	1.75	1.69	1.64	2.03	1.89				

[0108] 试剂盒整体破坏 7 天后,进行四参数 Logistic 拟合,坐标选择 X-Y,得标准曲线,其相关系数 =0.9998 (大于 0.9900,符合国家要求)。

[0109] 4、上述盐酸克伦特罗检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0110] 4.1 样品的制备

[0111] 4.1.1 尿液样品

[0112] 离心:清亮尿样可直接测定;如尿样浑浊,则需过滤或 3000r 离心 5min,取上清液 50  $\mu$ l 检测;检测稀释倍数为:1;

[0113] 4.1.2 饲料样品

[0114] 取 1g 均质化后的饲料样品于 50ml 试管中,加入 10ml 0.1M 的 HCl 溶液(制备方法为量取 0.83ml 浓盐酸加去离子水混匀定容至 100ml),用振荡器剧烈振荡 5min,3000r 离心 10min;取上述离心后的上清液 1ml 加入 20  $\mu$ l 1M 氢氧化钠溶液混匀(制备方法为称取 4.0g 氢氧化钠加去离子水混匀溶解定容至 100ml)(混匀以后测定 pH 值,大约为 8);3000 r 离心 10 分钟;取 50  $\mu$ l 上清液用于检测,检测稀释倍数:10;

[0115] 4.1.3 肌肉、肝等组织

[0116] 称取 3.0 $\pm$ 0.05g 均质化后的组织样本至 50ml 离心管中;加入 6ml 3% 的三氯乙酸(制备方法为称 3 克三氯乙酸,加去离子水至 100ml),用振荡器振荡摇至均匀,颠倒混匀 10min;3000r 以上离心 10 分钟;将上述离心后的上清液取 3ml 转入 20ml 试管,加 3ml 异丙醇-乙酸乙酯混合液(2 体积异丙醇+3 体积乙酸乙酯,混匀),震荡 10min,静置 5min;然后,3000r 以上离心 10 分钟;取 1.5ml 上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中,60 $^{\circ}$ C

氮气吹干；用 2ml 稀释液充分溶解；取 50  $\mu$  l 上清液用于检测，检测稀释倍数：4；

[0117] 4.1.4 肌肉蒸煮法

[0118] 称取 10g 均质化后的肌肉样本于 50ml 离心管中；将离心液放入沸水浴中蒸 10min；水浴后取上层渗出液 1ml，直接取 50  $\mu$  l 用于检测，检测稀释倍数：1；

[0119] 4.2 加样检测(室温 25 $^{\circ}$ C 条件下操作)

[0120] 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温平衡；

[0121] 从铝箔袋中取出所需的微孔板条插入框架内，将不用的微孔条放回铝箔袋中；

[0122] 4.2.1 将浓度分别为：0 ng/ml、0.1 ng/ml、0.3 ng/ml、0.9 ng/ml、2.7 ng/ml、8.1 ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由底到高加入酶标板的板孔中，每孔 50  $\mu$  l；

[0123] 4.2.2 然后每孔加入 100  $\mu$  l 稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的 CL 抗原，1:2000 稀释倍数，加入到板孔底部，用震荡机震荡 30 秒，盖上封板膜，25 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟；

[0124] 4.2.3 用洗涤液洗涤，方法是向板孔中每孔注满洗涤液，停留 10 秒后吸尽拍干，重复 5 次；

[0125] 4.2.4 第一底物和第二底物以体积比 1:1 混合均匀，加入到板孔中，每孔加入 50  $\mu$  l，震荡 20 秒；

[0126] 4.2.5 震荡 10 分钟后测定结果，使用微孔板化学发光免疫分析仪(潍坊汉唐生物工程有限公司生产)及化学发光检测软件进行分析。

[0127] 4.3 检测结果

[0128] 根据各标准溶液发光值，借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合，坐标选择 X-Y，得标准曲线，如图 1 所示。根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度，然后乘上相应的稀释倍数，即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。判断阈值为 1ng/ml，大于或等于 1ng/ml 为阳性，小于 1ng/ml 为阴性。

[0129] 检测例：取猪尿实际样品 400 例(其中阴性 200 例，阳性 200 例)，使用本发明方法、HPLC-MS、GC-MS 和 ELISA 进行检测。检测结果见表 5：

[0130]

**表 5 CLIA 与 HPLC-MS、GC-MS 和 ELISA 实样检测结果比较**

检测方法	样本数(例)	t 值	p 值
HPLC-MS	400	0.232	> 0.05
CLIA	400		
GC-MS	400	0.298	> 0.05
CLIA	400		
ELISA	400	0.581	> 0.05
CLIA	400		

[0131] 结论：t 值 <  $t_{500}=1.965 < t_{0.05,399}$ ,  $P > 0.05$ , CLIA 与 HPLC-MS、GC-MS 和 ELISA 检测结果在  $\alpha =0.05$  水平差异无统计学意义，说明 CLIA 与 HPLC-MS、GC-MS 和 ELISA 检测结

果具有等效性。

[0132] 本发明方法与 HPLC-MS、GC-MS 和 ELISA 在检测设备价格、检测时间、灵敏度和误差方面的比较。如下表 6：

[0133]

**表 6 本发明方法与 HPLC-MS、GC-MS 和 ELISA 比较**

检测方法	检测灵敏度	检测误差	检测时间	检测设备
<b>HPLC-MS</b>	<b>0.5ng/ml</b>	误差小 常做定量、确证方法	步骤繁杂 检测时间长	设备昂贵
<b>GC-MS</b>	<b>0.5ng/ml</b>	误差小 常做定量、确证方法	步骤繁杂 检测时间长	设备昂贵
<b>ELISA</b>	<b>0.1ng/ml</b>	易出现假阳性	<b>1.5 小时</b>	设备简单
<b>CLIA</b>	<b>0.03ng/ml</b>	误差小	<b>50min</b>	设备简单 易于普及

[0134] 除非另有说明,本发明中所采用的百分数均为重量百分数。

[0135] 本发明各个实施例中,所用原料均为本领域生产中的常用原料,均可从市场中得到,且对于生产结果不会产生影响;在各工序中用到的仪器设备,均采用当前生产中所用的常规设备,并无特别之处。

[0136] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

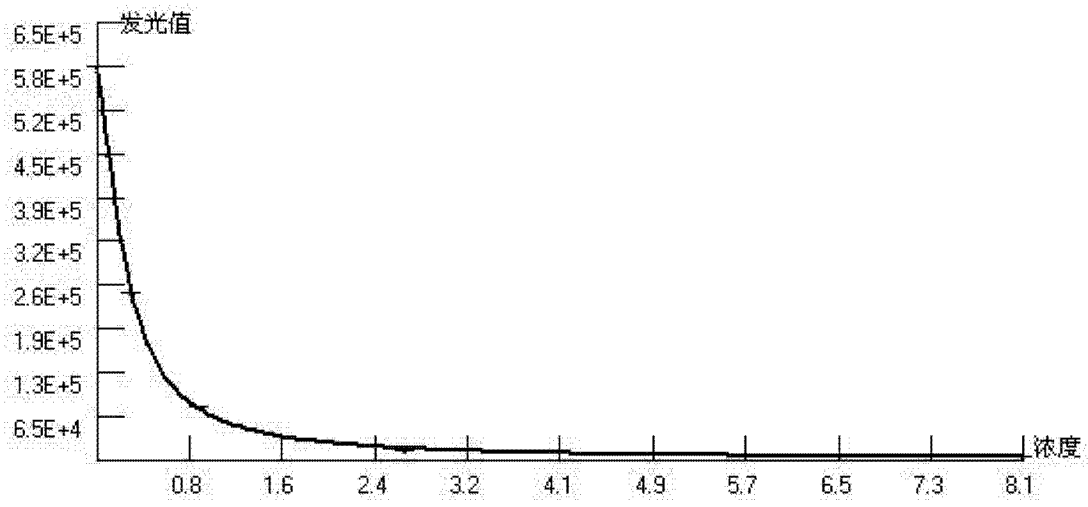


图 1

专利名称(译)	一种盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102520155B</a>	公开(公告)日	2013-11-06
申请号	CN201110414539.8	申请日	2011-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
[标]发明人	杨致亭 孙明强 陶德友 管廷武 刘发新		
发明人	杨致亭 孙明强 陶德友 管廷武 刘发新		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/535		
代理人(译)	李江		
其他公开文献	CN102520155A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种盐酸克伦特罗检测试剂盒及其制备和使用方法，所述试剂盒包括盒体、设在盒体内的盐酸克伦特罗酶标板，以及盐酸克伦特罗标准溶液、盐酸克伦特罗酶结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物；所述制备方法包括酶标板、标准溶液、结合物、稀释液、浓缩洗涤液、第一底物和第二底物配制；所述使用方法包括样品的制备、加样检测、检测结果分析；本发明的优点在于：分析结果灵敏、稳定、可靠，该方法操作步骤少、样品前处理简便、所需设备易于普及，能够用于猪肉中CL残留的测定，灵敏度达0.03 $\mu$ g/kg，且检测时间比ELISA法缩短了30min，能满足盐酸克伦特罗残留的快速检测要求。

