



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104535759 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201510029262. 5

(22) 申请日 2015. 01. 21

(71) 申请人 渤海大学

地址 121000 辽宁省锦州市松山新区科技路
19 号

(72) 发明人 汤轶伟 高子媛 励建荣 闫俊宇
兰建兴 魏立巧 李译 高静纹

(74) 专利代理机构 沈阳智龙专利事务所(普通
合伙) 21115

代理人 宋铁军 周楠

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

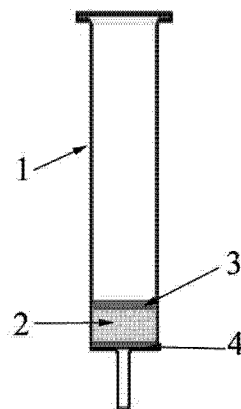
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

盐酸克伦特罗仿生免疫柱及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种盐酸克伦特罗仿生免疫柱及其检测方法,该仿生免疫柱包括固相萃取柱、测试层、筛板、固相萃取小柱转接头和注射器;其检测步骤是:活化,上样,洗柱,加入酶标记物,洗柱,显色。根据测试层的颜色深浅定性或半定量样品中的盐酸克伦特罗含量。该仿生免疫柱制备简单、操作方便、成本低廉、特异性好、不需要专业培训,检测结果清晰易辨别,易于推广,适宜现场检测。



1. 盐酸克伦特罗仿生免疫柱, 其特征在于: 包括固相萃取柱(1)、测试层(2)、筛板、固相萃取小柱转接头(5)和注射器(6); 固相萃取柱(1)与注射器(6)通过固相萃取小柱转接头(5)连接, 筛板分为上筛板(3)和下筛板(4), 固相萃取柱(1)内部为测试层(2), 测试层(2)的顶端装上有筛板(3), 底端装有下列筛板(4); 测试层(2)为盐酸克伦特罗仿生抗体和石英砂的均匀混合物。

2. 根据权利要求1所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱, 其特征在于: 固相萃取柱(1)的体积为3mL; 筛板为聚丙烯筛板, 筛板的孔径为20微米。

3. 根据权利要求1所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱, 其特征在于: 石英砂为100目。

4. 根据权利要求1所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱, 其特征在于: 盐酸克伦特罗仿生抗体为通过分子印迹技术制备的分子印迹聚合物, 所述分子印迹技术为共价键聚合技术或非共价键聚合技术。

5. 一种如权利要求1所述盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法, 其特征在于: 该方法步骤如下:

(1) 活化: 磷酸盐缓冲液(PBS)活化;

(2) 上样: 将盐酸克伦特罗溶液或样品溶液用移液器注入固相萃取柱, 利用注射器的空气压力将样品溶液压到测试层;

(3) 洗柱: 用含有吐温的PBS溶液洗柱;

(4) 加入酶标探针;

(5) 洗柱: 用含有吐温的PBS溶液洗柱;

(6) 显色: 加入TMB单成分显色剂显色, 最后根据测试层颜色深浅判断溶液中盐酸克伦特罗的浓度, 颜色越浅, 表明样品中盐酸克伦特罗的含量越多。

6. 根据权利要求5所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法, 其特征在于: 步骤(1)活化时所用的PBS的pH值为7.4, 活化所用的体积为1mL。

7. 根据权利要求5所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法, 其特征在于: 步骤(2)中上样用盐酸克伦特罗溶液为甲醇溶液, 体积为1mL, 吸附时间为3分钟。

8. 根据权利要求5所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法, 其特征在于: 步骤(3)中洗柱用的PBS溶液含有体积百分比0.5%的吐温20, 用量为1mL。

9. 根据权利要求5所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法, 其特征在于: 步骤(4)加入的酶标探针为盐酸克伦特罗辣根过氧化物酶标记物, 用量为1mL 2000倍稀释的PBS, 吸附时间为4分钟。

10. 根据权利要求5所述的盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法, 其特征在于: 步骤(5)所用PBS为含有体积百分比0.5%的吐温20, 用量为4mL; 步骤(6)TMB单成分显色剂的用量为400 μ L, 显色时间为4分钟。

盐酸克伦特罗仿生免疫柱及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物、材料、生物检测等交叉领域,特别是涉及一种盐酸克伦特罗仿生免疫柱及其检测方法。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(Clenbuterol, CLB)是一种肾上腺类神经兴奋剂,临床上曾用于防治支气管哮喘、慢性支气管炎等病症。CLB是“瘦肉精”的一种,生物利用率高,能够改变动物体内的代谢途径,促进肌肉和骨骼中蛋白质的合成,加快生长速度,改善胴体品质,增加瘦肉率。但是,CLB易于在动物体内蓄积,在肺、肝、肾等脏器及肌肉和脂肪组织中的残留量较大,残留时间较长,且可通过食物链在人体内蓄积,对机体产生毒副作用,主要表现为心律失常、肌肉震颤、头晕、乏力等,严重的可危及生命。我国和欧盟等大多数国家都严禁CLB在畜禽养殖中应用。

[0003] 盐酸克伦特罗的检测方法主要有仪器方法(高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等)和免疫分析方法(ELISA、胶体金试纸条等)。仪器分析法是一种准确、灵敏的检测方法,但是需要昂贵的仪器和专业的操作人员、不适合大量样品的检测。免疫分析方法,具有灵敏、快速、操作简单,以及单次检测样品量大,对于液体样品可直接检测,与仪器检测方法具有较好的一致性。但是该方法中抗体制备周期较长,不易保存,需要试验动物等。

发明内容

[0004] 发明目的

针对现有技术的上述不足,本发明旨在提出一种操作简单、特异性强、成本低廉、可通过颜色变化半定量样品中盐酸克伦特罗含量的仿生免疫柱及其检测方法。

[0005] 技术方案

本发明是通过以下技术方案来实现的:

盐酸克伦特罗仿生免疫柱,其特征在于:包括固相萃取柱、测试层、筛板、固相萃取小柱转接头和注射器;固相萃取柱与注射器通过固相萃取小柱转接头连接,筛板分为上筛板和下筛板,固相萃取柱内部为测试层,测试层的顶端装有上筛板,底端装有以下筛板;测试层为盐酸克伦特罗仿生抗体和石英砂的均匀混合物。

[0006] 固相萃取柱的体积为3mL;筛板为聚丙烯筛板,筛板的孔径为20微米。

[0007] 石英砂为100目。

[0008] 盐酸克伦特罗仿生抗体为通过分子印迹技术制备的分子印迹聚合物,所述分子印迹技术为共价键聚合技术或非共价键聚合技术。

[0009] 一种如上所述盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法,其特征在于:该方法步骤如下:

(1)活化:磷酸盐缓冲液(PBS)活化;

(2)上样:将盐酸克伦特罗溶液或样品溶液用移液器注入固相萃取柱,利用注射器的空

气压力将样品溶液压到测试层；

(3) 洗柱：用含有吐温的 PBS 溶液洗柱；

(4) 加入酶标探针；

(5) 洗柱：用含有吐温的 PBS 溶液洗柱；

(6) 显色：加入 TMB 单成分显色剂显色，最后根据测试层颜色深浅判断溶液中盐酸克伦特罗的浓度，颜色越浅，表明样品中盐酸克伦特罗的含量越多。

[0010] 步骤(1)活化时所用的 PBS 的 pH 值为 7.4，活化所用的体积为 1mL。

[0011] 步骤(2)中上样用盐酸克伦特罗溶液为甲醇溶液，体积为 1mL，吸附时间为 3 分钟。

[0012] 步骤(3)中洗柱用的 PBS 溶液含有体积百分比 0.5% 的吐温 20，用量为 1mL。

[0013] 步骤(4)加入的酶标探针为盐酸克伦特罗辣根过氧化物酶标记物，用量为 1mL 2000 倍稀释的 PBS，吸附时间为 4 分钟。

[0014] 步骤(5)所用 PBS 为含有体积百分比 0.5% 的吐温 20，用量为 4mL。

[0015] 步骤(6) TMB 单成分显色剂的用量为 400 μ L，显色时间为 4 分钟。

[0016] 优点及效果

本发明具有如下优点及有益效果：

本发明制备的盐酸克伦特罗仿生免疫柱制备简单、其检测时间短、检测成本低、可通过颜色深浅半定量样品中盐酸克伦特罗的含量，对提高食品安全水平具有重要意义。

附图说明

[0017] 图 1 为本发明盐酸克伦特罗仿生免疫柱的示意图。

[0018] 图 2 为各部分连接好的盐酸克伦特罗仿生免疫柱示意图。

[0019] 参考图片是本发明的不同盐酸克伦特罗浓度仿生免疫柱检测结果颜色变化图；1-4 号柱盐酸克伦特罗的浓度分别为 0、10、100、1000 μ g/L。

[0020] 附图标记说明：

1 为固相萃取柱；2 为盐酸克伦特罗分子印迹仿生抗体与石英砂的均匀混合物；3 为固相萃取柱的上筛板，4 为固相萃取柱的下筛板；5 为固相萃取小柱转接头；6 为注射器；7 为活塞柄。

具体实施方式

[0021] 下面参照附图对本发明进行详细的说明：

本发明是一种盐酸克伦特罗仿生免疫柱，其特征在于：包括固相萃取柱 1、测试层 2、筛板、固相萃取小柱转接头 5 和注射器 6；固相萃取柱 1 与注射器 6 通过固相萃取小柱转接头 5 连接，注射器 6 上方还设有活塞柄 7，筛板分为上筛板 3 和下筛板 4，固相萃取柱 1 内部为测试层 2，测试层 2 的顶端装有上筛板 3，底端装有下列筛板 4；测试层 2 为盐酸克伦特罗仿生抗体和石英砂的均匀混合物。

[0022] 固相萃取柱 1 的体积为 3mL；筛板为聚丙烯筛板，筛板的孔径为 20 微米。

[0023] 石英砂为 100 目。

[0024] 盐酸克伦特罗仿生抗体为通过分子印迹技术制备的分子印迹聚合物，所述分子印迹技术为共价键聚合技术或非共价键聚合技术。

[0025] 一种如上所述盐酸克伦特罗仿生免疫柱的检测方法,其特征在于:该方法步骤如下:

(1) 活化:磷酸盐缓冲液(PBS)活化;

(2) 上样:将盐酸克伦特罗溶液或样品溶液用移液器注入固相萃取柱,利用注射器的空气压力将样品溶液压到测试层;

(3) 洗柱:用含有吐温的 PBS 溶液洗柱;

(4) 加入酶标探针;

(5) 洗柱:用含有吐温的 PBS 溶液洗柱;

(6) 显色:加入 TMB 单成分显色剂显色,最后根据测试层颜色深浅判断溶液中盐酸克伦特罗的浓度,颜色越浅,表明样品中盐酸克伦特罗的含量越多。

[0026] 步骤(1)活化时所用的 PBS 的 pH 值为 7.4,活化所用的体积为 1mL。

[0027] 步骤(2)中上样用盐酸克伦特罗溶液为甲醇溶液,体积为 1mL,吸附时间为 3 分钟。

[0028] 步骤(3)中洗柱用的 PBS 溶液含有体积百分比 0.5% 的吐温 20,用量为 1mL。

[0029] 步骤(4)加入的酶标探针为盐酸克伦特罗辣根过氧化物酶标记物,用量为 1mL 2000 倍稀释的 PBS,吸附时间为 4 分钟。

[0030] 步骤(5)所用 PBS 为含有体积百分比 0.5% 的吐温 20,用量为 4mL;步骤(6)TMB 单成分显色剂的用量为 400 μ L,显色时间为 4 分钟。

[0031] 下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。

[0032] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0033] 实施例 1

盐酸克伦特罗仿生免疫柱的构成(如图 2 所示)包括固相萃取柱 1、筛板(上筛板 3、下筛板 4)、固相萃取小柱转接头 5、注射器 6、测试层 2,所述测试层为盐酸克伦特罗仿生抗体和石英砂的均匀混合物。

[0034] 将所述的下筛板 4,测试层 2,上筛板 3 依次装入固相萃取柱 1 中。

[0035] 所述的固相萃取柱体积为 3mL,筛板为聚丙烯筛板,筛板的孔径为 20 微米。

[0036] 所述的注射器为医用 5mL 注射器。

[0037] 所述的石英砂为 100 目石英砂。

[0038] 所述的固相萃取小柱转接头为月旭科技(上海)股份有限公司购买。

[0039] 盐酸克伦特罗仿生抗体制备

通过共价法制备盐酸克伦特罗仿生抗体,具体步骤为:取 1 mmol CLB 衍生物置于圆底烧瓶中,然后加入 5ml 甲醇-乙酸乙酯混合溶液(3:2, V:V)中,待全部溶解后,加入 2 mmol 交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯、30mg 引发剂偶氮二异丁腈,待固体全部溶解后,氮吹 5min 除氧,然后密封圆底烧瓶,将其置于 70 °C 水浴条件下聚合 48 h。聚合反应结束后,用研钵将聚合物仿生抗体研至颗粒状,然后置于真空干燥箱中 45 °C 干燥过夜。将干燥后的 1g 聚合物仿生抗体用 200 mL 盐酸(3 mol/L)与甲醇的混合溶液(10:1, V:V)超声洗脱 72 h,然后再用甲醇-冰乙酸混合溶液(9:1, V:V)索氏提取盐酸克伦特罗分子,直至无盐酸克伦特罗检出为止。洗脱完毕后的聚合物仿生抗体在真空干燥箱中干燥后备用。

[0040] 盐酸克伦特罗衍生物的制备

取 10 mmol 盐酸克伦特罗溶于 50mL 二氯甲烷中,向溶液中加入 40 mmol 三乙胺后,滴

加 20 mmol 甲基丙烯酰氯, 室温反应过夜。反应结束后, 用饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 分出有机相后, 水相用二氯甲烷重复洗 2 次后, 合并分离出的所有有机相, 用无水硫酸钠干燥后, 用旋转蒸发器减压去除有机溶剂, 残余物以石油醚 - 乙酸乙酯 (3:1, V:V) 为淋洗液用硅胶柱 (硅胶直径为 200~300 目) 提纯后得到产物 CLB 衍生物。

[0041] 测试层制备

将 10 mg 盐酸克伦特罗仿生抗体与 0.2g 石英砂混合均匀后装入固相萃取柱。

[0042] 酶标探针制备

采用 EDC 法制备盐酸克伦特罗 - 辣根过氧化物酶酶标探针。

[0043] 检测限确定

(1) 活化: 取制备好的仿生免疫柱, 用 1 mL pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液对柱进行活化。

[0044] (2) 上样: 用移液器将 1mL 不同浓度的盐酸克伦特罗甲醇溶液 (0、10、100、1000 $\mu\text{g/L}$) 注入固相萃取柱, 然后通过固相萃取小柱转接头连接注射器和固相萃取柱, 推动注射器的活塞柄, 通过空气压力将样品溶液固定于测试层, 保持 3 分钟。时间结束后将样品溶液排出固相萃取柱。

[0045] (3) 洗柱: 用 1mL 含有 0.5% (体积百分数) 吐温 20 的 PBS 洗涤测试层。

[0046] (4) 加入酶标探针: 加入 1mL 辣根过氧化物酶标记的盐酸克伦特罗 PBS 溶液 (1:2000, 体积比) 于测试层, 并保持 4 分钟, 然后通过注射器将其排出固相萃取柱。

[0047] (5) 洗柱: 用 1mL \times 4 (洗柱 4 次) 的含有 0.5% (体积百分数) 吐温 20 的 PBS 洗柱。

[0048] (6) 显色: 加入 400 μL TMB 单成分显色剂于测试层, 保持 4 分钟后观察颜色深浅, 4-5 分钟判断结果, 超过 7 分钟, 结果无效。

[0049] 根据测试层颜色深浅判断上样溶剂中盐酸克伦特罗的含量, 测试层颜色越浅表明上样溶液中盐酸克伦特罗的浓度越高。结果 (见参考图片) 为, 当盐酸克伦特罗标准品浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时, 测试层有颜色, 呈阴性; 当盐酸克伦特罗标准品浓度为 100、1000 $\mu\text{g/L}$ 时, 测试层没有颜色, 显阳性, 表明本盐酸克伦特罗仿生免疫检测柱对盐酸克伦特罗的检测限为 100 $\mu\text{g/L}$ 。

[0050] 特异性试验

用制备的仿生免疫检测柱检测 100 $\mu\text{g/L}$ 和 1000 $\mu\text{g/L}$ 的盐酸克伦特罗及结构类似物特布他林、异丙肾上腺素、沙丁胺醇, 结果见表 1。

表 1 盐酸克伦特罗及结构类似物交叉反应		
药物名称	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$
盐酸克伦特罗	+++	+++
特布他林	---	---
异丙肾上腺素	---	---
沙丁胺醇	---	---

[0051] 注：阳性结果(+)：目测测试层没有颜色；阴性结果(-)：测试区有颜色。

[0052] 特异性试验结果表明，这种盐酸克伦特罗仿生免疫柱具有较好的特异性。

[0053] 实施例 2

采用非共价法制备盐酸克伦特罗仿生抗体，其他条件同实施例 1。

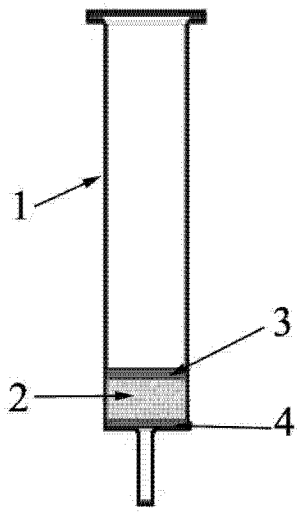


图 1

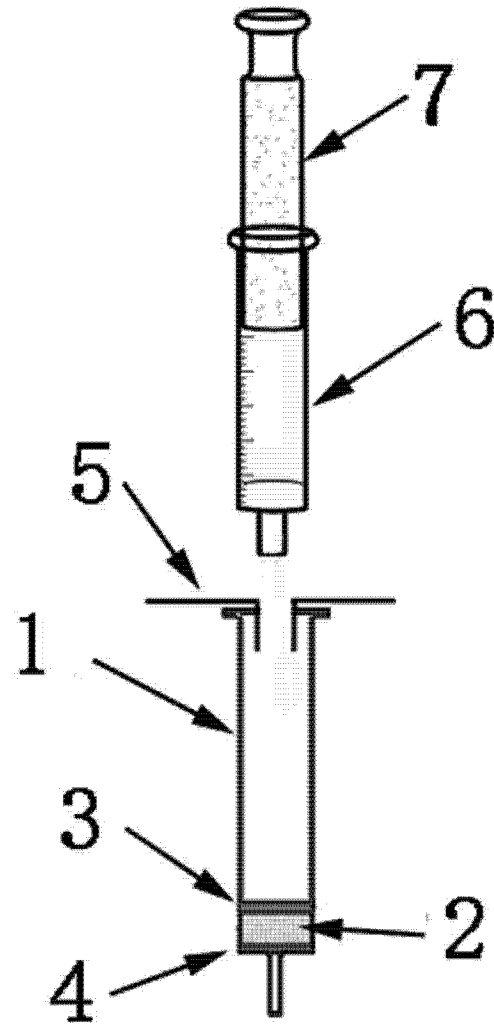


图 2

专利名称(译)	盐酸克伦特罗仿生免疫柱及其检测方法		
公开(公告)号	CN104535759A	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201510029262.5	申请日	2015-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	渤海大学		
申请(专利权)人(译)	渤海大学		
当前申请(专利权)人(译)	渤海大学		
[标]发明人	汤轶伟 高子媛 励建荣 闫俊宇 兰建兴 魏立巧 李译 高静纹		
发明人	汤轶伟 高子媛 励建荣 闫俊宇 兰建兴 魏立巧 李译 高静纹		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	宋铁军 周楠		
其他公开文献	CN104535759B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种盐酸克伦特罗仿生免疫柱及其检测方法，该仿生免疫柱包括固相萃取柱、测试层、筛板、固相萃取小柱转接头和注射器；其检测步骤是：活化，上样，洗柱，加入酶标记物，洗柱，显色。根据测试层的颜色深浅定性或半定量样品中的盐酸克伦特罗含量。该仿生免疫柱制备简单、操作方便、成本低廉、特异性好、不需要专业培训，检测结果清晰易辨别，易于推广，适宜现场检测。

