



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102967707 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 13

(21) 申请号 201210089130. 8

(22) 申请日 2012. 03. 30

(71) 申请人 无锡福阳生物科技有限公司

地址 214174 江苏省无锡市惠山区惠山大道  
1619 号

申请人 无锡市动物疫病预防控制中心

(72) 发明人 武爱波 范峰 刘木林 毛爱民

杨文杰 刘刚 陶海强 徐伟

钟国良

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

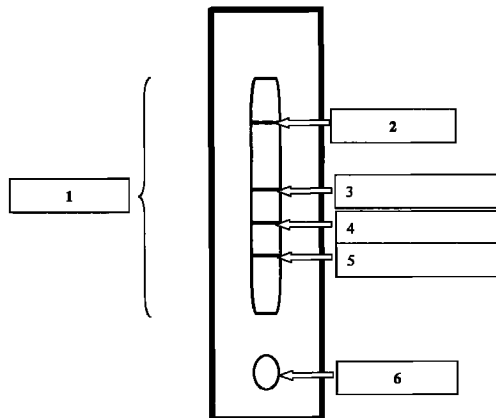
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种三联免疫胶体金速测卡及其制备、使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫金标速测卡,应用竞争抑制免疫层析的原理。检测时,首先向加样孔中加入待检样本,如果样本中含有待检测物质,则样本中的抗原在侧向移动的过程中与位于金标垫上的胶体金标记的特异性单克隆抗体结合,从而抑制了金标抗体和 NC 膜检测线上相应的抗原-BSA 偶联物的结合,则该检测线(T线)不显色,多余的金标单克隆抗体则与多余酶标记抗体结合,控制线(C线)显色;反之,检测线(T线)为酒红色,控制线(C线)显色。并应用其针对尿样、组织类等样品中“瘦肉精”类违禁药物残留的快速、现场和灵敏的检测。



1. 一种三联免疫胶体金速测卡及其制备方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

(1) 将莱克多巴胺-BSA、沙丁胺醇-BSA、盐酸克伦特罗-BSA 以及酶标记抗体分别固定于 NC 膜上;

(2) 在碱性条件下将胶体金颗粒与特异性单克隆抗体通过静电作用力相互结合;

(3) 速测卡的组装:以下均以加样孔作为试纸条的下方。首先将固定有特异性单克隆抗体的金标垫盖在 NC 膜的下方,其前沿搭在 NC 膜的底部 1mm-2mm 处;玻璃纤维膜大小为 4mm×15mm 盖在金标试纸条的下方 1mm-1.5mm 处,其前沿搭在金标垫的下部;吸收垫位于试纸条的最上方,其下部盖在 NC 膜的上方;

(4) 在上层的塑料板有两个的孔,分别为加样孔和结果观察孔;

在塑料卡条下方并排粘贴的样品垫和固定有胶体金标记的特异性单克隆抗体的金标垫、NC 膜以及吸收垫;

在 NC 膜上固定三种抗原-BSA、在金标垫上固定三种胶体金标记的单克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述的免疫金标速测卡的使用方法,其特征在于:首先于加样孔中加入 50  $\mu$  l 样品溶液并水平放置。样品溶液会沿样品垫渗透至胶体金标记抗体的试纸条,并与 NC 膜上的特异性抗原-BSA 竞争结合金标试纸条上的特异性单克隆抗体。8-10min 后,于结果观察孔中观察颜色变化,作出判断;如果只有控制线 C 线,没有相应的检测线 T 线,则表明为待检物质为阳性;既有控制线 C 线,又有相应的检测线 T 线,则表明待检物质为阴性。

## 一种三联免疫胶体金速测卡及其制备、使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物工程技术领域的速测卡及其使用方法,具体是一种同时检测瘦肉精(盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇)的三联免疫胶体金速测卡及其使用方法。

### 背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗(Clenbuterol)、莱克多巴胺(Ractopamine)、沙丁胺醇(Salbutamol)等 $\beta$ -肾上腺素受体激动剂由于能促进畜禽的生长,而后曾用于畜禽饲料添加剂,因为畜禽食用后在代谢过程中能够促进蛋白质的合成以及脂肪的降解,提高畜禽的瘦肉率。20世纪90年代,我国错误地将其作为科研成果开始以饲料添加剂引入并推广,被俗称为“瘦肉精”。该药易在畜禽体内特别是内脏中残留,特别是肺、肝、肾等内脏里,并通过食物链进入人体,其累积性残留随剂量和时间而增大;而且化学性质稳定,加热到172℃时才分解。因此,一般的烹调加热方法不能将其破坏掉。人食用含“瘦肉精”残留量高的肉制品和内脏后,就会引起中毒,出现全身肌肉颤抖、头晕、呕吐等中毒症状,严重危害人类健康,特别对于患有高血压、心脏病的人来说危险性就更大,直接危及生命安全。

[0003] 特别地,自从2011“双汇瘦肉精”事件爆发以来,全国范围内的猪肉制品都受到了不同程度地冲击,这不仅损害了消费者的权益,扰乱了社会的公信度,对我国食品安全整体形象也造成了极其恶劣的影响。

[0004] 目前,市场上检出的“瘦肉精”类违禁药物残留主要为盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇以及三种物质。据统计,我国2010年生猪存栏量为4.8亿头左右,出栏量为一亿头左右。对如此庞大数目的生猪养殖场、屠宰场等进行“瘦肉精”检测成了一项浩大的工程。一般常规的金标卡仅仅能一次检测一种“瘦肉精”类型,这严重阻碍了基层食品安全检测部门的大范围筛查。本发明提供了一种快速、现场、灵敏的检测三种主要“瘦肉精”违禁药物残留的方法,可以在同一条检测卡上同时检测盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇,为“瘦肉精”类违禁药物残留的快速筛查提供了一种低成本、高效的途径。

[0005] 以侧向流动为检测原理的金标卡检测方法已在我国畜禽产品检测实践中广泛应用。但未见针对同时检测盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等的快速检测试纸条的公开报道。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种制备同时检测盐酸克伦特罗、莱克多巴胺以及沙丁胺醇的金标卡检测方法,并应用其针对尿样、组织类等样品中“瘦肉精”类违禁药物残留的快速、现场和灵敏的检测。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的,本发明的制备方法包括以下步骤:

[0008] 1) 在上层的塑料板有两个的孔,分别为加样孔和观察孔,加样孔大小为3mm×7mm,观察孔大小为4mm×18mm。

[0009] 2) 在塑料板下方从加样孔往上依次为并排粘贴的玻璃纤维膜和的固定有胶体金

标记抗体的试纸条、NC膜、吸收垫。玻璃纤维膜大小为 $4\text{mm}\times 15\text{mm}$ ；金标记抗体试纸条大小为 $3\text{mm}\times 4\text{mm}$ ；NC膜大小为 $4\text{mm}\times 28\text{mm}$ ；吸收垫大小为 $4\text{mm}\times 19\text{mm}$ 。

[0010] 3) 金标垫上每种单克隆抗体的量为 $5\text{ng}-50\text{ng}$ ；NC膜上抗原-BSA的量为 $0.4\mu\text{g}-1.2\mu\text{g}$ 。

[0011] 4) 试纸条干燥温度为 $37^{\circ}\text{C}$ ，时间为 $30\text{min}$ 。

[0012] 本发明上述方法制备的盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇三联速测卡，实际猪尿和饲料样品以及肉样的快速检测具体步骤如下：首先于加样孔中加入 $50\mu\text{L}$ 样品溶液并水平放置。样品溶液会沿样品垫渗透至胶体金标记抗体的试纸条，并与NC膜上的特异性抗原竞争结合试纸条上固定的特异性单克隆抗体。8-10min后，于结果观察孔中观察颜色变化，作出判断。

[0013] 结果判断：完全阴性结果（出现1条C线+3条CLE/SAL/RAC的T线；阳性（+）：只要任何一条盐酸克伦特罗CLE/莱克多巴胺RAC/沙丁胺醇SAL的T线显色不明显或无显色。

[0014] 本发明制得的新型瘦肉精三联速测卡对猪肉制品、饲料样品以及尿样中的复杂基质具有较好的抗干扰效果，可广泛应用于三种“瘦肉精”违禁药物残留的快速检测。较现有的速测卡操作相此，具有以下特有优势。

[0015] (1) 同一张卡上能同时检测克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇三种“瘦肉精”类残留，而不是三张单种卡的简单物理性胶连，加样仅需1次，而且反应均在同一条件下进行。

[0016] (2) 样品前处理完全统一（克服了组织类样品检测中的不同处理方法），操作简单， $50\mu\text{L}$ 样品加样量即可。通常地，克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇单种卡在检测组织类样本时，样品前处理的程序是不一样的；如单种依次处理，存在时间长、操作繁琐等缺陷。

[0017] (3) 检测时间短（5-8min）、结果判定标准统一。完全阴性结果（出现1条C线+3条CLE/SAL/RAC的T线；阳性（+）：只要任何一条CLE/SAL/RAC的T线显色不明显或无显色。

[0018] 本发明提供的同时检测盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇的三联免疫胶体金速测卡可为实际检测部门提供了快速、现场和灵敏的检测方法，主要应用猪肉等组织类、饲料、猪尿等液体类样品等。

附图说明：

图1为三联免疫胶体金速测卡平面图

[0019] 1-结果观察孔；2-C线、控制线；3-RAC线；4-SAL线；5-CLE线；6-加样孔

具体实施方式

[0020] 结合本发明的内容提供以下实施例：

[0021] (1) “瘦肉精”三联速测卡的制作

[0022] 在上层的塑料板卡条上有两个孔，加样孔和观察孔，加样孔大小为 $3\text{mm}\times 7\text{mm}$ ，观察孔大小为 $4\text{mm}\times 18\text{mm}$ 。在塑料卡条下方并排粘贴的样品垫和固定有胶体金标记的特异性单克隆抗体的金标垫、NC膜以及吸收垫。在金标垫上固定 $25\text{ng}-50\text{ng}$ 三种单克隆抗体，NC膜

上固定 0.4 μg-1.2 μg 三种抗原 -BSA。然后置于 37℃ 真空干燥 30min。

[0023] (2) “瘦肉精”三联速测卡实际标准品效果评价

[0024] ①加样孔中加入 50 μL 空白样品液 (pH 7.4, 0.2mol/L PBS :8g 氯化钠、3.35g 十二水合磷酸氢二钠, 0.2g 磷酸二氢钾, 0.2g 氯化钾, 双蒸水溶解定容至 1L), 在室温条件下反应 8 分钟后在结果观察孔中观察显色结果。结果表明, 观察孔中呈现明显的酒红色的控制线 C 线和检测线 T1 线、T2 线、T3 线。

[0025] ②加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的盐酸克伦特罗标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线、检测线 T2 线、检测线 T3 线呈现酒红色, 检测线 T1 线无色。

[0026] ③加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线、检测线 T1 线、检测线 T3 线呈现酒红色, 检测线 T2 线无色。

[0027] ④加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的莱克多巴胺标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线、检测线 T1 线、检测线 T2 线呈现酒红色, 检测线 T3 线无色。

[0028] ⑤加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的莱克多巴胺标准品和 6ng/ml 的盐酸克伦特罗混合标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线、检测线 T2 线呈现酒红色, 检测线 T1 线、检测线 T3 线无色。

[0029] ⑥加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品和 6ng/ml 的莱克多巴胺混合标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线、检测线 T1 线呈现酒红色, 检测线 T2 线、检测线 T3 线无色。

[0030] ⑦加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品和 6ng/ml 的盐酸克伦特罗混合标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线、检测线 T3 线呈现酒红色, 检测线 T1 线、检测线 T2 线无色。

[0031] ⑧加样孔中加入 50 μL 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品和 6ng/ml 的盐酸克伦特罗和 6ng/ml 莱克多巴胺混合标准品 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线呈现酒红色, 检测线 T1 线、检测线 T2 线、检测线 T3 线均无色。

[0032] (3) 瘦肉精三联速测卡实际猪尿样品效果评价

[0033] ①加样孔中加入 50 μL 空白猪尿样本, 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中呈现明显的酒红色的控制线 C 线和检测线 T1 线、T2 线、T3 线。

[0034] ②加样孔中加入 50 μL 添加了 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品和 6ng/ml 的盐酸克伦特罗和 6ng/ml 莱克多巴胺混合标准品的猪尿样本 (采样同上的 PBS 溶液稀释配成), 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中控制线 C 线呈现酒红色, 检测线 T1 线、检测线 T2 线、检测线 T3 线均无色。

[0035] (4) 瘦肉精三联速测卡实际饲料样品效果评价

[0036] ①加样孔中加入 50 μL 空白饲料样本, 按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明, 观察孔中呈现明显的酒红色的控制线 C 线和检测线 T1 线、T2 线、T3 线。

[0037] ②加样孔中加入 50 μL 添加了 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品和 6ng/ml 的盐酸克伦特

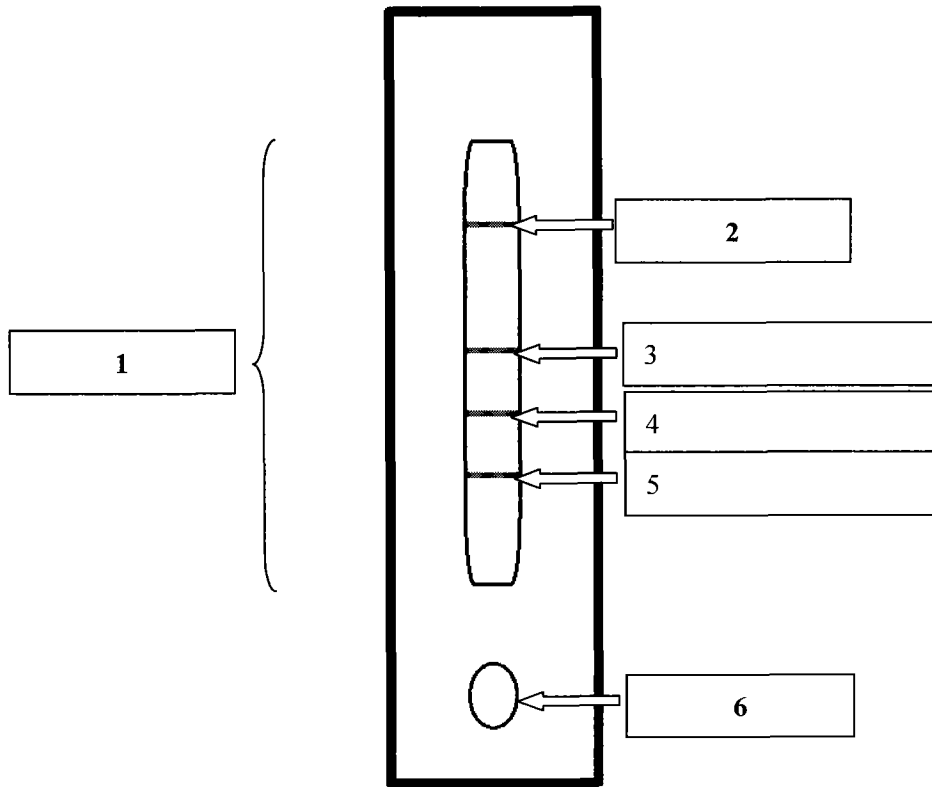
罗和 6ng/ml 莱克多巴胺混合标准品的饲料样本（采样同上的 PBS 溶液稀释配成），按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明，观察孔中控制线 C 线呈现酒红色，检测线 T1 线、检测线 T2 线、检测线 T3 线均无色。

[0038] (5) 瘦肉精三联速测卡实际肉样样品效果评价

[0039] ①加样孔中加入 50  $\mu$  L 空白肉样样本，按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明，观察孔中呈现明显的酒红色的控制线 C 线和检测线 T1 线、T2 线、T3 线。

[0040] ②加样孔中加入 50  $\mu$  L 添加了 6ng/ml 的沙丁胺醇标准品和 6ng/ml 的盐酸克伦特罗和 6ng/ml 莱克多巴胺混合标准品的肉样样本（采样同上的 PBS 溶液稀释配成），按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明，观察孔中控制线 C 线呈现酒红色，检测线 T1 线、检测线 T2 线、检测线 T3 线均无色。

[0041] 发明的专利保护范围内。



专利名称(译)	一种三联免疫胶体金速测卡及其制备、使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102967707A</a>	公开(公告)日	2013-03-13
申请号	CN201210089130.8	申请日	2012-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	无锡福阳生物科技有限公司 无锡市动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	无锡福阳生物科技有限公司 无锡市动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	无锡福阳生物科技有限公司 无锡市动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	武爱波 范峰 刘木林 毛爱民 杨文杰 刘刚 陶海强 徐伟 钟国良		
发明人	武爱波 范峰 刘木林 毛爱民 杨文杰 刘刚 陶海强 徐伟 钟国良		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫金标速测卡，应用竞争抑制免疫层析的原理。检测时，首先向加样孔中加入待检样本，如果样本中含有待检测物质，则样本中的抗原在侧向移动的过程中与位于金标垫上的胶体金标记的特异性单克隆抗体结合，从而抑制了金标抗体和NC膜检测线上相应的抗原-BSA偶联物的结合，则该检测线(T线)不显色，多余的金标单克隆抗体则与多余的酶标记抗体结合，控制线(C线)显色；反之，检测线(T线)为酒红色，控制线(C线)显色。并应用其针对尿样、组织类等样品中“瘦肉精”类违禁药物残留的快速、现场和灵敏的检测。

