



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102230937 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 02

(21) 申请号 201110163903. 8

G01N 33/558 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 17

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/566 (2006. 01)

(71) 申请人 河南省农业科学院

地址 450002 河南省郑州市金水区农业路 1 号

(72) 发明人 职爱民 胡晓飞 张改平 邓瑞广
李孟顺 杨继飞 刘庆堂 赵东
邢广旭 柴书军 杨艳艳 李青梅
滕蔓

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限公司 41111

代理人 张爱军

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

瘦肉精多残留联检试纸卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种“瘦肉精”多残留分析的金标层析检测试纸卡,包括塑料支撑物和试纸芯,试纸芯由样品垫、金标物结合垫、层析膜和吸水垫依次粘贴到衬板上制成,金标物结合垫为吸附有二~五种混合金标抗体的玻璃纤维棉,金标抗体为胶体金标记的抗瘦肉精的单克隆抗体或多克隆抗体,检测线为二~五条相应的瘦肉精-载体蛋白结合抗原,对照线为羊抗或兔抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗载体蛋白 IgG 抗体印制而成,检测线和对照线沿层析膜横向平行排列。本发明特异性强,敏感性高,最低检出限可达到 1ppb,实现了“瘦肉精”多残留金标层析的快速检测,用同一试纸卡一次加样,可同时检测多种“瘦肉精”残留物,大大节省了检测时间,在提高工作效率的同时节省了检测成本。



1. 一种瘦肉精多残留联检试纸卡,包括塑料支撑物和试纸芯,塑料支撑物包括底座和面板,其中底座上设有安装试纸芯的固定槽,面板上设有加样孔和结果显示窗,试纸芯由样品垫、金标物结合垫、层析膜和吸水垫依次粘贴到衬板上制成,层析膜上设有检测线 and 对照线,其特征是:所述金标物结合垫为吸附有二~五种混合金标抗体的玻璃纤维棉,金标抗体为胶体金标记的抗瘦肉精的单克隆抗体或多克隆抗体,检测线为二~五条相应的瘦肉精-载体蛋白结合抗原或人工合成的模拟结合抗原,对照线为羊抗或兔抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗载体蛋白 IgG 抗体印制而成,检测线和对照线沿层析膜横向平行排列。

2. 根据权利要求 1 所述的试纸卡,其特征是:所述金标抗体和相应的瘦肉精-载体蛋白结合抗原或人工合成的模拟结合抗原为:第一组:金标抗盐酸克伦特罗 CL 抗体,检测线为 CL-载体蛋白结合抗原;第二组:金标抗莱克多巴胺 RAC 抗体,检测线为 RAC-载体蛋白结合抗原;第三组:金标抗沙丁胺醇 SAL 抗体,检测线为 SAL-载体蛋白结合抗原;第四组:金标特步特林 TBL 抗体,检测线为 TBL-载体蛋白结合抗原;第五组:金标抗西马特罗 CIM 抗体,检测线为 CIM-载体蛋白结合抗原;采用其中的二组、三组、四组或五组,分别组成二联检试纸卡、三联检试纸卡、四联检试纸卡或五联检试纸卡。

3. 根据权利要求 1 所述的试纸卡,其特征是:所述吸水垫采用滤纸、海绵或无纺布制作,所述衬板用不吸水的硬质塑胶条制作,所述样品垫采用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制作;层析膜采用尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜制成,对照线采用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白、人血清白蛋白或钥孔血蓝蛋白。

4. 权利要求 1 所述的瘦肉精多残留联检试纸卡的制备方法,包括瘦肉精-载体蛋白结合抗原的制备、瘦肉精金标物的制备、IgG 抗体的制备、试纸芯的制备,其特征是:所述瘦肉精-载体蛋白结合抗原包括以下瘦肉精金标抗体和相应的结合抗原,第一组:金标抗盐酸克伦特罗抗体,检测线为 CL-载体蛋白结合抗原;第二组:金标抗莱克多巴胺抗体,检测线为 RAC-载体蛋白结合抗原;第三组:金标抗沙丁胺醇抗体,检测线为 SAL-载体蛋白结合抗原;第四组:金标特步特林抗体,检测线为 TBL-载体蛋白结合抗原;第五组:金标抗西马特罗抗体,检测线为 CIM-载体蛋白结合抗原。

5. 权利要求 4 所述的制备方法,其特征是:所述 CL-载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤:在 0~4℃冰浴条件下,称取 5~15mg CL 溶于 1~3mL、0.1mol/L 的稀盐酸中,搅拌下滴加浓度为 10% 的 NaNO_2 溶液,反应 2~4h,得到反应液;称取 5-10mg 载体蛋白溶于 1-3mLPBS 液中,搅拌下缓慢加入所述反应液中,调节 pH 至 8.5~9.5,0~4℃搅拌、过夜;收集反应液于透析袋中,在 4℃下用 PBS 透析 3~5 天,每天更换透析液 2~3 次,最后得到所述 CL-载体蛋白结合抗原。

6. 根据权利要求 4 所述的试纸卡,其特征是:所述 RAC-载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤:称取 5~20mg 的载体蛋白置于螺口瓶中,用双蒸水溶解,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 10.8,加入 1,4-丁二醇二缩水甘油醚,氮气保护下室温避光搅拌 24 h,得活化的载体蛋白溶液;称取 15~20mg TBL 溶于 2-5ml、1 mol/L 的 NaOH 中,搅拌下缓缓加入所述载体蛋白溶液中,氮气保护下搅拌 20 h,反应产物用 PBS 透析 3 天,每天换液 3~6 次,透析后得到纯化的 RAC-载体蛋白结合抗原。

7. 根据权利要求 4 所述的试纸卡,其特征是:所述 SAL-载体蛋白结合抗原制备时包

括以下步骤:将 80-100mg 硫酸沙丁胺醇加入甲醇中,室温下搅拌使之溶解,加入 40-60mg 琥珀酸酐,搅拌下反应 72h;将反应后的溶液放在通风橱中 12h,使甲醇挥发完全,然后放入真空干燥箱中烘干,得到沙丁胺醇琥珀酸衍生物;称取该衍生物 20-30 mg 溶于 pH 为 4.8 的 tris-HCL 缓冲液中,加入碳二亚胺 30 ~ 40mg,搅拌反应 12h,得反应液;称取载体蛋白 20-30mg 溶于 2-5mL 的 tris-HCL 缓冲液中,得到载体蛋白溶液;将所述载体蛋白溶液逐滴加入所述反应液中,室温下搅拌反应 24h;反应结束后装入透析袋中 4℃ PBS 透析 72h,换液 6 ~ 9 次,即得到 SAL- 载体蛋白结合抗原。

8. 根据权利要求 4 所述的试纸卡,其特征是:所述 TBL- 载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤:称取 20 ~ 30mg 的载体蛋白置于螺口瓶中,用双蒸水溶解,用 NaOH 溶液调节 pH 值至 10.8,加入 1,4-BDDE 12 μ L,氮气保护下室温避光搅拌 20 h,得到活化的载体蛋白溶液;称取 10 ~ 20mg TBL 溶于 1-5ml、1 mol/L 的 NaOH 溶液中,搅拌下缓缓加入所述载体蛋白溶液中,氮气保护下室温避光搅拌 20h,产物在 4℃ 下搅拌用 PBS 透析 3 天,每天换液 3 ~ 6 次,透析后得到纯化的 TBL- 载体蛋白结合抗原。

9. 根据权利要求 4 所述的试纸卡,其特征是:所述 CIM- 载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤:称取 3.5 ~ 10mg 的 CIM 置于螺口瓶中,用 0.1 mol/L 的 HCL 溶解,冰浴冷却后,搅拌下逐滴加入 NaNO₂ 溶液,用淀粉碘化钾试纸检验呈蓝黑色停止滴加 NaNO₂ 溶液,4℃ 条件下反应 6 h,得重氮化的 CIM;称取 10 ~ 30mg 载体蛋白溶于 1-5mL pH 为 7.4 的 PBS 溶液中,预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化的 CIM,用 NaOH 调节 PH 至 8.5 ~ 9.5,4℃ 过夜反应;产物在 4℃ 搅拌下用 PBS 透析 3 天,每天换液 3 次,透析后得到纯化的 CIM- 载体蛋白结合抗原。

10. 根据权利要求 4-9 任一项所述的制备方法,其特征是:所述载体蛋白结合抗原为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白、人血清白蛋白或钥孔血蓝蛋白。

瘦肉精多残留联检试纸卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速检测微量“瘦肉精”的器具,特别是涉及一种“瘦肉精”多残留分析的金标层析检测试纸卡及其制备方法。

背景技术

[0002] “瘦肉精”是指一类药物,任何能够促进瘦肉生长、减少脂肪沉积的物质都可以叫做“瘦肉精”,包括“克伦特罗”(Clenbuterol, CL),盐酸克伦特罗是其盐酸盐,“莱克多巴胺”(Ractopamine, RAC,也译为雷托巴胺)、“沙丁胺醇”(Salbutamol, SAL)、“特布他林”(Terbutaline, TBL)和“西马特罗”(Cimaterol, CIM)等。“瘦肉精”在肉用动物生产中剂量为治疗量的5-10倍时,具有促进肌肉发育和脂肪分解作用,可以提高肉用动物胴体瘦肉率。因为消费者对瘦肉的特殊偏好,瘦肉产出率高的猪可以卖个好价钱,添加“瘦肉精”给养殖户带来了额外收益。因此,受不法利益的驱使,养殖户常在养殖环节添加“瘦肉精”到动物饲料中去。

[0003] 但是“瘦肉精”是一种选择性 β_2 -肾上腺素受体激动剂,副作用极大,当摄入量较大时会造成心血管系统的损害和出现严重的神经症状。当人们食用了含“瘦肉精”残留的动物内脏和肉品后,会造成急性或慢性食肉中毒,危害消费者的健康安全。目前为止没有一个国家批准“盐酸克伦特罗”可用于动物生产中,但长期以来一直存在着非法使用,在世界各地造成严重食物中毒的事件并不鲜见。在我国北京、香港、上海、浙江、广东、山东、河北、广西、黑龙江和安徽等地也出现了“瘦肉精”的中毒事件,极大地威胁着消费者的身心健康。因国家对盐酸克伦特罗的严格管控,现在出现了“莱克多巴胺”、“沙丁胺醇”等所谓的“新型瘦肉精”产品。

[0004] 用于“瘦肉精”残留检测的方法较多,(1)理化分析方法,如高压液相色谱仪(High performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱(Gas chromatography, GC)、薄层层析(Thin-layer chromatography, TLC)、毛细管区域电泳法(Capillary zone electrophoresis, CE)等;(2)免疫分析法,如放射免疫法(Radio-immunoassay, RIA)、酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等;(3)生物测定法,如微生物学测定法(microbiological assays, MA)、放射受体测定法(receptor assays, RA)等。但这些方法有的需要昂贵的仪器设备,需要熟练的专业人员操作,操作过程复杂,需要时间较长,限制了其应用范围,难以在生产实际中推广应用。免疫试纸法具有半定量和一定的定量能力,可以提供待测物的初步信息,该法灵敏度高,分析过程简单,用作“瘦肉精”的筛查有独特的优势,是需要优先发展的检测技术,但目前“瘦肉精”多残留试纸检测技术在国内外尚属空白,急待研究解决。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题:提供一种适用于现场检测的特异、敏感、快速和简便的瘦肉精多残留联检试纸卡及其制备方法。

[0006] 本发明的技术方案：

一种瘦肉精多残留联检试纸卡，包括塑料支撑物和试纸芯，塑料支撑物包括底座和面板，其中底座上设有安装试纸芯的固定槽，面板上设有加样孔和结果显示窗，试纸芯由样品垫、金标物结合垫、层析膜和吸水垫依次粘贴到衬板上制成，层析膜上设有检测线和对照线，所述金标物结合垫为吸附有二~五种混合金标抗体的玻璃纤维棉，金标抗体为胶体金标记的抗瘦肉精的单克隆抗体或多克隆抗体，检测线为二~五条相应的瘦肉精-载体蛋白结合抗原或人工合成的模拟结合抗原，对照线为羊抗或兔抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG 或兔抗载体蛋白 IgG 抗体印制而成，检测线和对照线沿层析膜横向平行排列。

[0007] 所述金标抗体和相应的瘦肉精-载体蛋白结合抗原或人工合成的模拟结合抗原为：第一组：金标抗盐酸克伦特罗 CL 抗体，检测线为 CL-载体蛋白结合抗原；第二组：金标抗莱克多巴胺 RAC 抗体，检测线为 RAC-载体蛋白结合抗原；第三组：金标抗沙丁胺醇 SAL 抗体，检测线为 SAL-载体蛋白结合抗原；第四组：金标特步特林 TBL 抗体，检测线为 TBL-载体蛋白结合抗原；第五组：金标抗西马特罗 CIM 抗体，检测线为 CIM-载体蛋白结合抗原；采用其中的二组、三组、四组或五组，分别组成二联检试纸卡、三联检试纸卡、四联检试纸卡或五联检试纸卡。

[0008] 所述吸水垫采用滤纸、海绵或无纺布制作，所述衬板用不吸水的硬质塑胶条制作，所述样品垫采用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制作；层析膜采用尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜、硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜制成，对照线采用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成；所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白、人血清白蛋白或钥孔血蓝蛋白。

[0009] 所述的瘦肉精多残留联检试纸卡的制备方法，包括瘦肉精-载体蛋白结合抗原的制备、瘦肉精金标物的制备、IgG 抗体的制备、试纸芯的制备，其特征是：所述瘦肉精-载体蛋白结合抗原包括以下瘦肉精金标抗体和相应的结合抗原，第一组：金标抗盐酸克伦特罗抗体，检测线为 CL-载体蛋白结合抗原；第二组：金标抗莱克多巴胺抗体，检测线为 RAC-载体蛋白结合抗原；第三组：金标抗沙丁胺醇抗体，检测线为 SAL-载体蛋白结合抗原；第四组：金标特步特林抗体，检测线为 TBL-载体蛋白结合抗原；第五组：金标抗西马特罗抗体，检测线为 CIM-载体蛋白结合抗原。

[0010] 所述 CL-载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤：在 0~4℃冰浴条件下，称取 5~15mg CL 溶于 1~3mL、0.1mol/L 的稀盐酸中，搅拌下滴加浓度为 10% 的 NaNO₂ 溶液，反应 2~4h，得到反应液；称取 5-10mg 载体蛋白溶于 1-3mLPBS 液中，搅拌下缓慢加入所述反应液中，调节 pH 至 8.5~9.5，0~4℃搅拌、过夜；收集反应液于透析袋中，在 4℃下用 PBS 透析 3~5 天，每天更换透析液 2~3 次，最后得到所述 CL-载体蛋白结合抗原。

[0011] 所述 RAC-载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤：

称取 5~20mg 的载体蛋白置于螺口瓶中，用双蒸水溶解，用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 10.8，加入 1,4-丁二醇二缩水甘油醚，氮气保护下室温避光搅拌 24 h，得活化的载体蛋白溶液；称取 15~20mg TBL 溶于 2-5ml、1 mol/L 的 NaOH 中，搅拌下缓缓加入所述载体蛋白溶液中，氮气保护下搅拌 20 h，反应产物用 PBS 透析 3 天，每天换液 3~6 次，透析后得到纯化的 RAC-载体蛋白结合抗原。

[0012] 所述 SAL-载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤：

将 80-100mg 硫酸沙丁胺醇加入甲醇中,室温下搅拌使之溶解,加入 40-60mg 琥珀酸酐,搅拌下反应 72h;将反应后的溶液放在通风橱中 12h,使甲醇挥发完全,然后放入真空干燥箱中烘干,得到沙丁胺醇琥珀酸衍生物;称取该衍生物 20-30 mg 溶于 pH 为 4.8 的 tris-HCL 缓冲液中,加入碳二亚胺 30 ~ 40mg,搅拌反应 12h,得反应液;称取载体蛋白 20-30mg 溶于 2-5mL 的 tris-HCL 缓冲液中,得到载体蛋白溶液;将所述载体蛋白溶液逐滴加入所述反应液中,室温下搅拌反应 24h;反应结束后装入透析袋中 4℃ PBS 透析 72h,换液 6 ~ 9 次,即得到 SAL- 载体蛋白结合抗原。

[0013] 所述 TBL- 载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤:

称取 20 ~ 30mg 的载体蛋白置于螺口瓶中,用双蒸水溶解,用 NaOH 溶液调节 pH 值至 10.8,加入 1,4-BDDE 12 μ L,氮气保护下室温避光搅拌 20 h,得到活化的载体蛋白溶液;称取 10 ~ 20mg TBL 溶于 1-5ml、1 mol/L 的 NaOH 溶液中,搅拌下缓缓加入所述载体蛋白溶液中,氮气保护下室温避光搅拌 20h,产物在 4℃ 下搅拌用 PBS 透析 3 天,每天换液 3 ~ 6 次,透析后得到纯化的 TBL- 载体蛋白结合抗原。

[0014] 所述 CIM- 载体蛋白结合抗原制备时包括以下步骤:

称取 3.5 ~ 10mg 的 CIM 置于螺口瓶中,用 0.1 mol/L 的 HCL 溶解,冰浴冷却后,搅拌下逐滴加入 NaNO₂ 溶液,用淀粉碘化钾试纸检验呈蓝黑色停止滴加 NaNO₂ 溶液,4℃ 条件下反应 6 h,得重氮化的 CIM;称取 10 ~ 30mg 载体蛋白溶于 1-5mL pH 为 7.4 的 PBS 溶液中,预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化的 CIM,用 NaOH 调节 PH 至 8.5 ~ 9.5,4℃ 过夜反应;产物在 4℃ 搅拌下用 PBS 透析 3 天,每天换液 3 次,透析后得到纯化的 CIM- 载体蛋白结合抗原。

[0015] 本发明的积极有益效果:

本发明的瘦肉精多联金标层析检测试纸卡具有以下突出优点:

① 试纸卡特异性强,敏感性高,最低检出限可达到 1ppb,符合我国瘦肉精的限量检测要求。

[0016] ② 试纸卡实现了“瘦肉精”多残留金标层析的快速检测,用同一试纸卡一次加样,可同时检测多种“瘦肉精”残留物,克服了常规单项检测试纸卡一次只能检测一种药物的不足,实现了较高通量的检测,大大节省了检测时间,在提高工作效率的同时节省了检测成本。

[0017] ③ 使用该试纸卡时,无需其它额外试剂和仪器,用于现场检测在 5min 内即可判定检测结果,简便、快速。

[0018] ④ 使用该试纸卡以棕红色线条“|”显示检测结果,判定依据形象、直观,简单明了,不易出现人为误判。

[0019] ⑤ 本发明的试纸卡可节省检测费用,适用范围广。使用该试纸卡比用仪器分析和常规单项检测试纸条的费用大幅下降;同时该试纸卡适用范围广,可满足不同层次人员的需要,包括专业检验、海关检疫、卫生检疫、质量监测、加工企业和养殖场户等,可保持对非法添加瘦肉精的威慑,保障食品安全,便于推广应用。

附图说明

[0020] 图 1、试纸芯侧视结构示意图。

- [0021] 图 2、试纸芯俯视结构示意图。
 [0022] 图 3、二项联检试纸卡面板构造俯视图。
 [0023] 图 4、试纸卡底座构造示意图。
 [0024] 图 5、三项联检试纸芯俯视结构示意图。
 [0025] 图 6、三项联检试纸卡面板构造俯视图。
 [0026] 图 7、五项联检试纸芯俯视结构示意图。
 [0027] 图 8、五项联检试纸卡面板构造俯视图。
 [0028] 图中,1:衬板; 2:样品垫; 3:金标物结合垫; 4:层析膜; 5:吸水垫; 6:对照线; 7:检测线; 8:加样孔; 9:显示窗; 10:面板; 11:底座; 12:固定槽。

具体实施方式

[0029] 在制备“瘦肉精”多残留联检层析试纸卡时,需要先制备某种“瘦肉精”-载体蛋白结合抗原、“瘦肉精”金标物,制备羊抗或兔抗小鼠 IgG 抗体或羊抗兔 IgG 抗体,或兔抗载体蛋白 IgG 抗体,进而制备成试纸芯,并安装在塑料壳底座的固定槽中,最后和面板嵌合在一起。

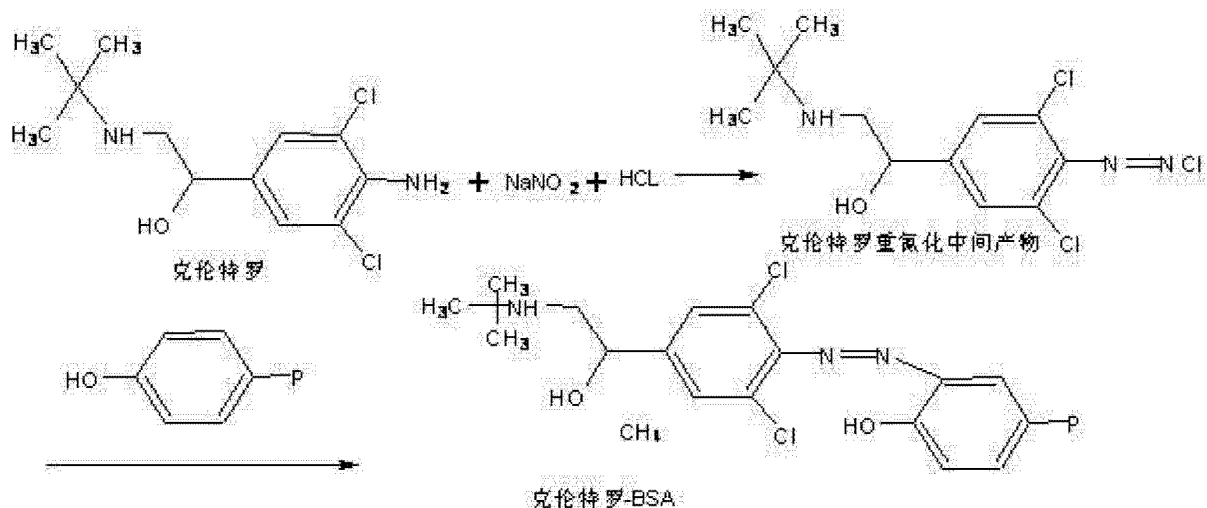
[0030] 1. “瘦肉精”-载体蛋白结合抗原的制备

1.1 采用重氮化法制备 CL-载体蛋白结合抗原

以 BSA 为载体蛋白,简述制备过程。重氮化法制备 CL-BSA,冰浴条件下(0~4℃)称取 CL 5mg,将其溶于 1mL pH 值≈1 的 0.1mol/L 稀盐酸中,搅拌下滴加 0.3~0.5mL 浓度为 10% 的 NaNO₂ 溶液,反应 2~4h;称取 BSA 5mg 溶于 1mL PBS 液中,搅拌条件下将其缓慢加入 NaNO₂ 溶液中,用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 8.5 左右,0~4℃ 搅拌反应过夜。收集反应液装入透析袋中,4℃ 下用 0.1mol/L (pH 7.4) 的 PBS 透析 3~5 天,每天更换透析液 2~3 次;最后收集透析好的人工结合抗原 CL-BSA,保存于 -20℃ 冰箱,备用。

[0031] 同法,用 OVA、HAS 或 KLH 替代 BSA,制得人工结合抗原 CL-OVA、CL-HAS 或 CL-KLH。

[0032] 制备 CL-BSA 时的反应过程如下:



1.2 采用 BDDE 法制备 RAC-载体蛋白结合抗原。

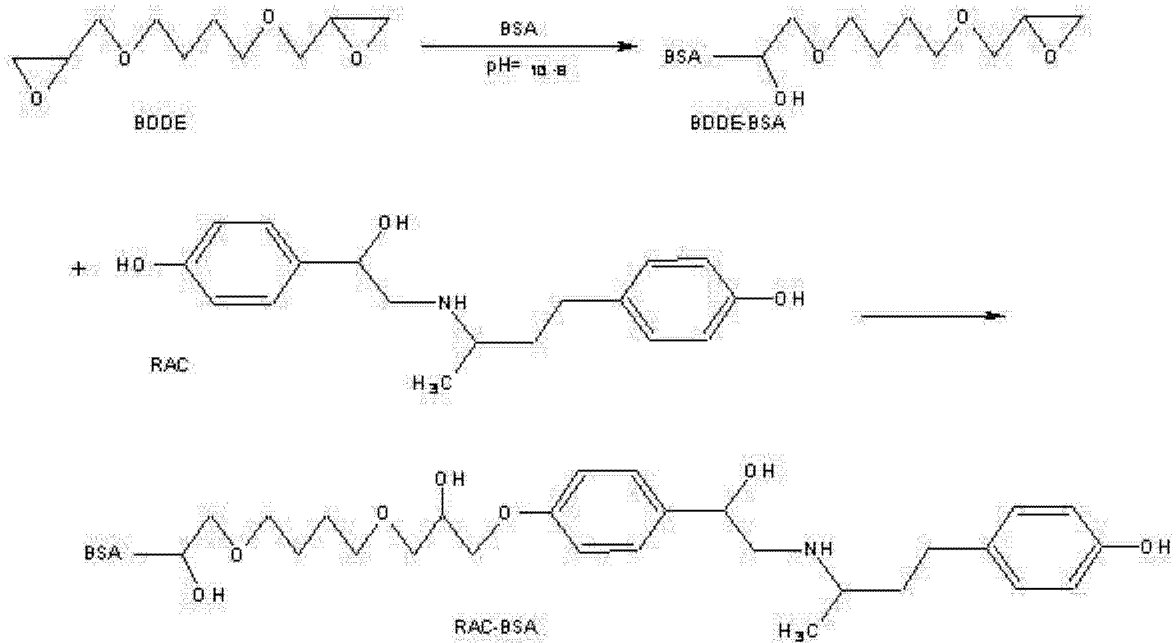
[0033] 采用 BDDE 合成 BSA-RAC 结合抗原,具体方法如下:称取 20 mg BSA 置于 10 mL 螺口瓶中,用 2 ml 双蒸水(DDW)溶解,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 10.8,加入 BDDE,氮气

保护下室温避光搅拌 24 h, 得活化的 BSA。

[0034] 称取 15 mg 的 TBL 溶于 2 ml、1 mol/L 的 NaOH 中(适当 DMF 助溶), 搅拌条件下缓缓加入活化的 BSA 溶液中, 氮气保护下室温避光搅拌 20 h, 反应产物在 4 °C 搅拌下用 PBS 透析 3 天, 每天换液 3~6 次, 透析后得到纯化的 RAC-BSA。

[0035] 同法, 用 OVA、HAS 或 KLH 替代 BSA, 制得人工结合抗原 RAC-OVA、RAC-HAS 或 RAC-KLH。

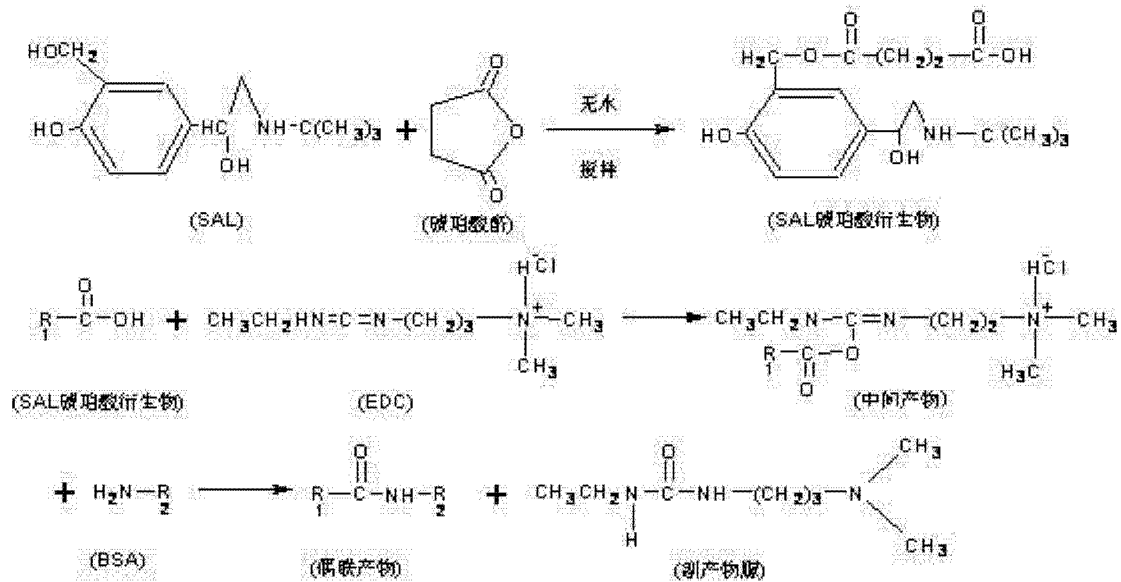
[0036] 制备 RAC-BSA 时的反应过程如下：



1.3 EDC 法制备 SAL-载体蛋白结合抗原

将 80mg 硫酸沙丁胺醇加入 10mL 甲醇中, 室温下磁力搅拌使之溶解, 加入 45mg 琥珀酸酐, 磁力搅拌使之反应 72h; 将反应后的溶液放在通风橱中, 使甲醇挥发 12h, 再放入真空干燥箱中烘干, 即得沙丁胺醇琥珀酸衍生物 (SAL-HS)。

[0037] 称取 SAL-HS 20 mg 溶于 2mL PH 为 4.8 的 tris-HCL 缓冲液中, 加入 EDC 40mg, 搅拌反应 12h; 称取 BSA 20mg 溶于 2mL tris-HCL 缓冲液中, 将 BSA 溶液逐滴加入上述反应液中, 室温下磁力搅拌反应 24h。反应结束后, 装入透析袋 4°C 透析 72h, 期间用 0.01mol/L、pH 为 7.4 的 PBS 溶液换液 6~9 次, 即得免疫抗原 SAL-BSA。同法, 用 OVA、HAS 或 KLH 替代 BSA, 制得人工结合抗原 SAL-OVA、SAL-HAS 或 SAL-KLH。制备 SAL-BSA 时的反应过程如下：

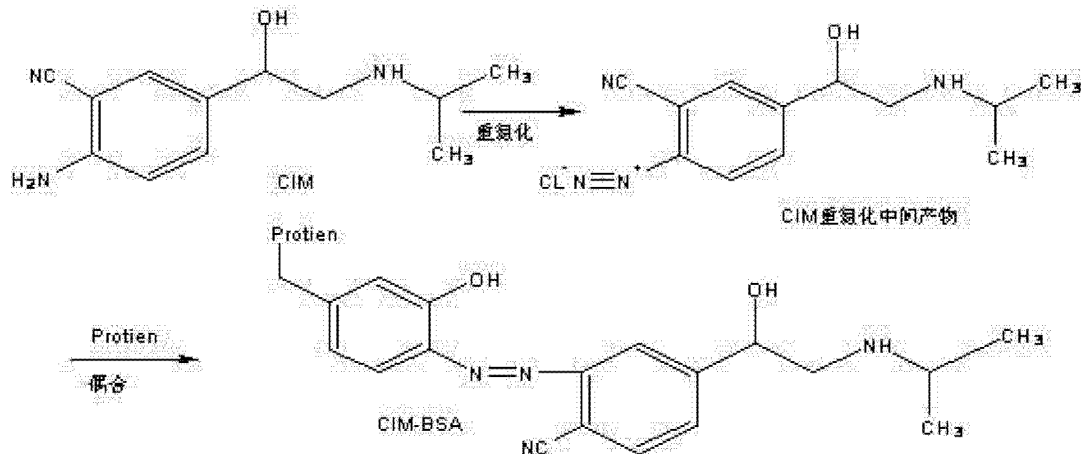


1.4 采用重氮化法合成 CIM- 载体蛋白结合抗原

称取 3.5 mg 的 CIM 置于 10 mL 螺口瓶中,用 1 mL 0.1 mol/L 的 HCl 溶解,冰浴冷却后,避光边搅拌边逐滴加入灭菌双蒸水溶解已预冷的 1 mol/L NaNO_2 溶液适量(以淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色为宜),4°C 条件下反应 6 h,得重氮化的 CIM。称取 10 mg BSA 溶于 1 mL PBS(pH=7.4)中,预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化的 CIM,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 PH 至 8.5 左右,4°C 过夜反应。反应产物在 4°C 搅拌下用 PBS 透析 3d,每天换液 3 次,透析后得到纯化的 CIM-BSA。

[0038] 同法,用 OVA、HAS 或 KLH 替代 BSA,制得人工结合抗原 CIM-OVA、CIM-HAS 或 CIM-KLH。

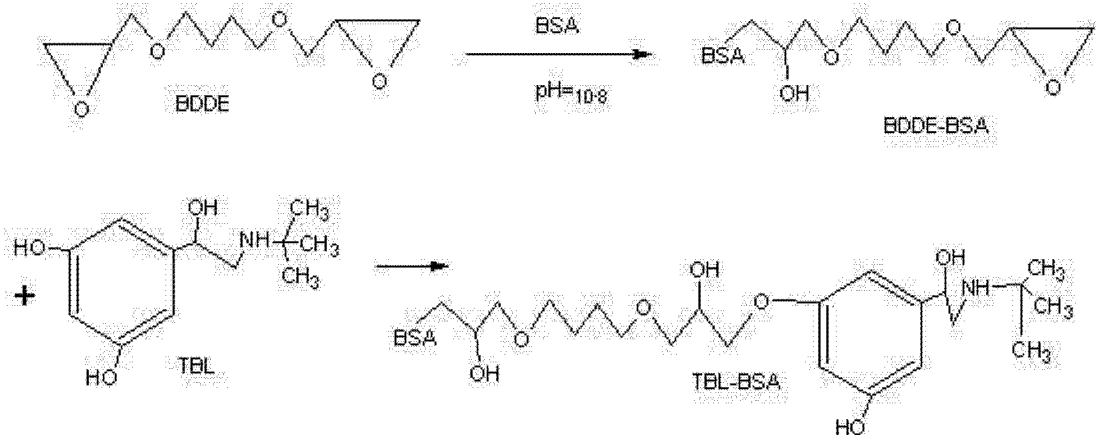
[0039] 制备 CIM-BSA 时的反应过程如下:



1.5 采用 BDDE 法制备 TBL- 载体蛋白结合抗原

采用 BDDE 法合成 BSA-TBL 完全抗原,具体方法如下:称取 30 mg 的 BSA 置于 10 ml 螺口瓶中,用 1 ml 双蒸水(DDW)溶解,1 mol/L NaOH 调节 pH 至 10.8,加入 1,4 丁二醚,氮气保护下室温避光搅拌 20 h,得活化的 BSA;称取 12 mg TBL 溶于 1 ml、1 mol/L NaOH 溶液中,搅拌下缓缓加入活化的 BSA 溶液,氮气保护下室温避光搅拌 20 h,反应产物在 4 °C 搅拌下用 PBS 透析 3 天,每天换液 3~6 次,透析后得到纯化的 TBL-BSA。同法,用 OVA、HAS 或 KLH 替代 BSA,制得人工结合抗原 TBL-OVA、TBL-HAS 或 TBL-KLH。

[0040] 制备 TBL-BSA 时的反应过程如下：



2、抗某种“瘦肉精”多克隆抗体或单克隆抗体的制备

多抗制备(以兔抗鼠为例):以 CL 为例,用 CL- 载体蛋白结合抗原免疫新西兰白兔,免疫剂量为 200 ~ 500 μ g / 次,背部皮下分 4 ~ 6 点注射。首免,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)溶解 CL- 载体蛋白结合抗原,与等量弗氏完全佐剂(FCA)混合,充分乳化;加强免疫,用无菌 PBS 溶解 CL- 载体蛋白结合抗原,与等量弗氏不完全佐剂(FIA)混合,充分乳化,首免后 2 ~ 3 周进行,连续免疫 4 ~ 5 次,每次间隔 2 ~ 3 周,最后一次免疫后 10 ~ 15 天,以阻断 ELISA 法测定其效价达到 10^5 以上时,采血并分离收集高免血清;饱和硫酸铵盐析法提取 IgG 抗体,置于 -20°C 冻存备用。

[0041] 单抗制备:以 CL 为例,用 CL- 载体蛋白结合抗原按 50 ~ 100 μ g/ 只的剂量免疫 8 周龄 BALB/c 小鼠 3 ~ 4 次,每次免疫间隔时间 3 ~ 5 周,最后一次超强免疫后 3 ~ 4 天,无菌取其脾细胞并与 NS0 骨髓瘤细胞杂交融合,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中,培养 10 ~ 14 天,用间接 ELISA 方法选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化,而后扩大培养,建立杂交瘤细胞株,其分泌的单克隆抗体可特异地与 CL 反应。以体内诱生法进行单抗制备,以辛酸-硫酸铵法提纯单抗,置 -20°C 冻存备用。

[0042] 上述方法可用于任何一种“瘦肉精”单克隆抗体或多克隆抗体的制备。

[0043] 3、金标物结合垫的制备

① 金标抗体结合垫的制备：

柠檬酸钠还原法为例,首先制备胶体金溶液:在沸腾的 200ml 0.01 ~ 0.02% 氯金酸溶液中加入新鲜配制的 1% 柠檬酸钠 8ml,获得直径约 15nm 的胶体金溶液,用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 调 pH 值至 8.5 ~ 9.5,置 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存备用;以 1:2000 的标记比将待标记的单克隆抗体或多克隆抗体加入 pH8.5 ~ 9.5 的金溶胶中,标记 10min 后,加入 20% 的 PEG10000 至终浓度为 0.05%, 4°C 、1500 ~ 2000rpm 离心 20min,除去未结合的胶体金颗粒, 4°C 、15000rpm 离心 1h,弃上清,获初步纯化的金标抗体蛋白,再用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析进行分离纯化,获得胶体金标记抗体。将 1:100 ~ 500 稀释的胶体金标记抗体(单克隆抗体或多克隆抗体)吸附于精制玻璃纤维棉中, 4°C 低温真空干燥,制备金标抗体结合垫。

[0044] 上述方法可用于任何一种“瘦肉精”金标抗体结合垫的制备。

[0045] ② 金标抗原结合垫的制备:参照金标抗体结合垫的制备方法进行,以“瘦肉精”- 载体蛋白结合抗原替代抗“瘦肉精”抗体,将胶体金 pH 值调为 6.0 ~ 7.0 即可。

[0046] 4、羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体的制备

以饱和硫酸铵盐析法提取“瘦肉精”阴性小鼠血清 IgG (或阴性兔血清 IgG), 用小鼠血清(或兔血清) IgG 以 50 ~ 100 μ g/kg 体重的剂量经皮下和肌肉注射健康山羊或家兔 3 ~ 4 次, 末次注射 10 天后, 测定其血清琼扩效价达到 1:40 以上时, 心脏或动脉采血, 分离收集高免血清, 以饱和硫酸铵盐析法或硫酸钠法等提取羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体(方法与提取小鼠血清 IgG 相同, 不再重述), 置于 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0047] 5、兔抗载体蛋白 IgG 抗体的制备

用载体蛋白 BSA 免疫新西兰白兔, 免疫剂量为 200 ~ 500 μ g / 次, 背部皮下分 4 ~ 6 点注射。首免, 用无菌 PBS 溶解 BSA, 与等量 FCA 混合, 充分乳化; 加强免疫, 用无菌 PBS 溶解 BSA, 与等量 FIA 混合, 充分乳化, 首免后 2 ~ 3 周进行, 连续免疫 3 ~ 4 次, 每次间隔 2 ~ 3 周, 末次免疫后 10 ~ 15 天, 测定其血清琼扩效价达到 10⁵ 以上时, 采血并分离收集高免血清。以饱和硫酸铵盐析法提取抗 BSA 抗体, 置 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0048] 同法制备抗 OVA 抗体、抗 HSA 抗体、抗 KLH 抗体。

[0049] 6、试纸卡检测反应原理

由于胶体金标记对象不同, 其检测反应原理稍有差异。

[0050] 当胶体金标记物是抗体时, 加入待测样品溶液后, 待测溶液通过虹吸作用带动待测物及金标物结合垫中的金标抗体一起向层析膜扩散; 在扩散过程中待测药物可与金标抗体相结合, 从而封闭了金标抗体上的结合位点, 阻止金标抗体被层析膜上的结合抗原检测线拦截, 检测线不显示, 而羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体则可拦截金标抗体, 显示一条棕红色对照线“|”, 为阳性表示; 否则, 样品溶液中无待测药物时, 则不能阻止金标抗体被层析膜上的结合抗原检测线拦截, 显示棕红色检测线“|”, 但羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体也拦截金标抗体, 显示棕红色对照线“|”, 为阴性表示; 如果层析膜上没有棕红色线显示, 则表明试纸卡已失效。

[0051] 当胶体金标记物是结合抗原时, 加入待测样品溶液后, 样品溶液通过虹吸作用带动待测药物及金标物结合垫中的金标结合抗原一起向层析膜扩散, 样品中的游离待测药物和抗体竞争性结合, 阻止金标结合抗原与层析膜上的抗体检测线结合, 检测线不显示, 而抗载体蛋白抗体则可拦截金标结合抗原, 显示一条棕红色对照线“|”, 为阳性表示; 否则, 样品溶液中无待测药物时, 金标结合抗原到达层析膜上的检测线时即被相应的检测线抗体拦截, 显示棕红色检测线“|”, 同时抗载体蛋白抗体也可拦截金标结合抗原, 显示棕红色对照线“|”, 为阴性表示; 如果层析膜上没有棕红色线显示, 则表明试纸卡已失效。

[0052] 实施例一: “瘦肉精”二项联检金标层析试纸卡。

[0053] 在得到瘦肉精-载体蛋白结合抗原、瘦肉精金标物和 IgG 抗体的基础上, 组装得到本发明的试纸卡(以盐酸克伦特罗和莱克多巴胺二联检为例)。

[0054] 试纸卡塑料壳包括底座 11 和面板 10, 底座上设有安装试纸芯的固定槽 12, 面板上设有加样孔 8 和显示窗 9, 显示窗旁边设有 T₁、T₂ 和 C 标识, 参见图 1-4。

[0055] 试纸芯的构造: 衬板 1 用硬质塑胶条制成; 样品垫 2 用玻璃纤维棉制成; 金标物结合垫 3 为吸附有胶体金标记的抗 CL 和抗 RAC 单克隆抗体的玻璃纤维棉; 层析膜 4 用硝酸纤维素膜, 其上分别用偶联 CL-载体蛋白和 RAC-载体蛋白的结合抗原制备两条检测线 7 (隐形), 载体蛋白为牛血清白蛋白。两条检测线由样品端依次排列, 用羊抗小鼠 IgG 抗体制备

对照线 6 (隐形), 对照线 6 采用硝酸纤维素膜; 检测线和对照线平行排列成“| | |”; 吸水垫 5 用吸水滤纸制成。将样品垫、金标物结合垫、层析膜、吸水垫依次相互搭接并粘贴固定在衬板上, 组装成 CL 和 RAC 联检试纸芯。

[0056] 将试纸芯安装在底座 11 上的固定槽 12 内, 样品垫和层析膜分别与面板上的加样孔和显示窗相对应, 两条隐形检测线和隐形对照线分别与显示窗旁边的 T_1 、 T_2 和 C 相对应, 嵌合面板后即制成试纸卡。

[0057] 检测样品: 检测样品可为尿样。

[0058] 检测样品制备: 尿样无需特殊处理, 如过于浑浊, 静置后离心取上清即可。

[0059] 操作方法: 检测时, 将试纸卡平放, 从加样孔滴加待测样品, 1 ~ 5min 内从显示窗判定检测结果。

[0060] 结果判定: 如只有 C 位置隐形对照线处显示一条棕红色线“|”, 表示 CL 和 RAC 检测结果均为阳性, 说明在待测样品中含有这两种待测药物; 如在 T_1 和 C 位置显示两条棕红色线“| |”时, 表示 CL 检测结果为阳性, RAC 检测结果为阴性, 说明在待测样品中含 CL 而不含 RAC; 如在 T_2 和 C 位置显示两条棕红色线“| |”, 表示 CL 检测结果为阳性, RAC 检测结果为阴性, 说明在待测样品中含 CL 而不含 RAC; 如在 T_1 、 T_2 和 C 位置显示三条棕红色线“| | |”, 表示 CL 和 RAC 检测结果均为阴性, 说明在待测样品中不含 CL 和 RAC; 如在层析膜上没有棕红色线显示, 则表明试纸卡已失效。

[0061] 实施例二: “瘦肉精”二项联检金标层析试纸卡(以盐酸克伦特罗和莱克多巴胺二联检为例)

试纸卡结构和实施例一基本相同, 不同之处在于: 样品垫采用尼龙膜制成; 用抗 CL 和抗 RAC 的多克隆抗体替代抗 CL 和抗 RAC 的单克隆抗体, 制备金标结合垫; 层析膜用尼龙膜制成, 用羊抗兔 IgG 抗体替代羊抗鼠 IgG 抗体在层析膜上制备隐形对照线“|”, 对照线采用纯纤维素膜制成; 其它如检测样品制备、操作方法和结果判定等均同实施例一, 不再赘述。

[0062] 实施例三: “瘦肉精”二项联检金标层析试纸卡(以盐酸克伦特罗和莱克多巴胺二联检为例)。

[0063] 试纸卡结构和实施例一基本相同, 不同之处在于: 样品垫采用聚偏二氟乙烯膜制成; 用 CL-载体蛋白和 RAC-载体蛋白结合抗原替代抗 CL 和抗 RAC 的单克隆抗体, 制备金标结合垫; 层析膜用聚偏二氟乙烯膜, 用兔抗载体蛋白 IgG 抗体替代羊抗鼠 IgG 抗体在层析膜上制备隐形对照线“|”, 对照线采用羧化纤维素膜制成; 其它如检测样品制备、操作方法和结果判定等均同实施例一, 不再赘述。

[0064] 实施例四: “瘦肉精”三项联检金标层析试纸卡(以盐酸克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇三联检为例)。

[0065] 试纸卡塑料壳的构造包括底座和面板, 底座设有安装试纸芯的固定槽, 面板上设有加样孔和显示窗, 显示窗旁边设有 T_1 、 T_2 、 T_3 和 C 标识。参见图 5-6。

[0066] 试纸芯的构造: 衬板用硬质塑胶条制成; 样品垫采用聚酯膜制成; 金标物结合垫为吸附有胶体金标记的抗 CL、抗 RAC 和抗 SAL 单克隆抗体的玻璃纤维棉; 层析膜用醋酸纤维素膜, 其上分别用偶联 CL-载体蛋白、RAC-载体蛋白和 SAL-载体蛋白结合抗原制备的三条隐形检测线“|”, 所述载体蛋白为鸡卵清白蛋白。三条隐形检测线由样品端依次排列, 用兔抗小鼠 IgG 抗体制备隐形对照线“|”, 对照线采用纯纤维素膜, 三条检测线和对照线平

行排列组合成“||||”；吸水垫用吸水滤纸制成。将样品垫、金标物结合垫、层析膜、吸水垫依次相互搭接粘贴固定在衬板上，组装成 CL、RAC 和 SAL 联检试纸芯。将试纸芯安装在底座的固定槽内，试纸芯的样品垫和层析膜分别与面板上的加样孔和显示窗相对应，层析膜上的三条检测线 and 对照线分别与显示窗旁边的 T₁、T₂、T₃ 和 C 相对应，嵌合面板后制成试纸卡。

[0067] 其它包括检测样品制备和操作方法均同实施例一，不再赘述。

[0068] 结果判定：如只有 C 位置显示 1 条棕红色线“|”时，表示 CL、RAC 和 SAL 检测结果均为阳性，说明在待测样品中含这 3 种待测药物；如显示 1 条棕红色 T 线和 1 条棕红色 C 线“||”时，表示 2 种药物检测结果为阳性，另外 1 种药物检测结果为阴性，说明在待测样品中含对应的 2 种药物而不含另外 1 种药物；如显示 2 条棕红色 T 线和 1 条棕红色 C 线“|||”时，表示 1 种药物检测结果为阳性，另外 2 种药物检测结果为阴性，说明在待测样品中含 1 种药物而不含另外 2 种药物；如显示 3 条棕红色 T 线和 1 条棕红色 C 线“||||”时，表示 3 种药物检测结果均为阴性；如在层析膜上没有棕红色线显示，则表明试纸卡已失效。

[0069] 实施例五：“瘦肉精”三项联检金标层析试纸卡（以克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇三联检试纸为例）

试纸卡构造和实施例四基本相同，不同之处在于：样品垫采用玻璃纤维棉制成；用抗 CL、抗 RAC 和抗 SAL 的多克隆抗体替代抗 CL、抗 RAC 和抗 SAL 的单克隆抗体，制备金标结合垫；用羊抗兔 IgG 抗体替代兔抗鼠 IgG 抗体在层析膜上制备隐形对照线“|”。

[0070] 其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均同实施例四，不再重述。

[0071] 实施例六：“瘦肉精”三项联检金标层析试纸卡（以克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇三联检试纸为例）。

[0072] 试纸卡构造和实施例四基本相同，不同之处在于：用 CL-载体蛋白、RAC-载体蛋白和 SAL-载体蛋白结合抗原替代抗 CL、抗 RAC 和抗 SAL 的单克隆抗体，制备金标结合垫；用兔抗载体蛋白 IgG 抗体替代兔抗鼠 IgG 抗体在层析膜上制备隐形对照线“|”。

[0073] 其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均同实施例四，不再重述。

[0074] 实施例七：“瘦肉精”五项联检金标层析试纸卡

试纸卡塑料壳的构造包括底座和面板，底座上设有安装试纸芯的固定槽，面板上设有加样孔和显示窗，显示窗旁设有 T₁、T₂、T₃、T₄、T₅ 和 C 标识。参见图 7-8。

[0075] 试纸芯的构造：衬板用硬质塑胶条制成；样品垫用玻璃纤维棉制成；金标物结合垫为吸附有胶体金标记的抗 CL、抗 RAC、抗 SAL、抗 CML 和抗 TBL 单克隆抗体的玻璃纤维棉；层析膜用硝酸纤维素膜，其上分别用偶联 CL-载体蛋白、RAC-载体蛋白、SAL-载体蛋白、CML-载体蛋白和 TBL-载体蛋白结合抗原制备的隐形检测线“|”，载体蛋白为人血清白蛋白或钥孔血蓝蛋白。

[0076] 五条检测线由样品端依次排列，用羊抗兔 IgG 抗体制备隐形对照线“|”，对照线采用羧化纤维素膜，六条线平行排列组合成“|||||”；吸水垫用吸水滤纸制成。将样品垫、金标物结合垫、层析膜、吸水垫依次相互搭接粘贴固定在衬板上，组装成 CL、RAC、SAL、CML 和 TBL 联检试纸芯。将试纸芯安装在底座的固定槽内，试纸芯的样品垫和层析膜分别与面板上加样孔和显示窗相对应，层析膜上的五条检测线和对照线分别与显示窗旁边的 T₁、

T₂、T₃、T₄、T₅ 和 C 相对应, 嵌合面板后制成试纸卡。

[0077] 其它包括检测样品制备和操作方法均同实施例一, 不再赘述。

[0078] 结果判定: 若 C 位置不显示 1 条棕红色线“|”时, 表示本次检测无效; C 位置显示 1 条棕红色线“|”时, 表示本次检测有效, 并且 T₁、T₂、T₃、T₄、T₅ 哪一条显色即表示对应的那种待测物在本次检测中未检出, 不显色的即表示对应的那种待测物在本次检测中被检出, 结果为阳性。如此可在一次测定中判断五种被检物的阴阳性, 即五联检试纸卡。

[0079] 实施例八: 瘦肉精五项联检金标层析试纸卡

试纸卡构造和实施例七基本相同, 不同之处在于: 用抗 CL、抗 RAC、抗 SAL、抗 CML 和抗 TBL 的多克隆抗体替代抗抗 CL、抗 RAC、抗 SAL、抗 CML 和抗 TBL 的单克隆抗体, 制备金标结合垫; 用兔抗鼠 IgG 抗体替代羊抗兔 IgG 抗体在层析膜上制备隐形对照线“|”。

[0080] 其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均同实施例七, 不再赘述。

[0081] 实施例九: 瘦肉精五项联检金标层析试纸卡

试纸卡构造和实施例七基本相同, 不同之处在于: 用 CL- 载体蛋白、RAC- 载体蛋白、SAL- 载体蛋白、CML- 载体蛋白和 TBL- 载体蛋白结合抗原替代抗 CL、抗 RAC、抗 SAL、抗 CML 和抗 TBL 的单克隆抗体, 制备金标结合垫; 用兔抗载体蛋白 IgG 抗体替代羊抗兔 IgG 抗体在层析膜上制备隐形对照线“|”。

[0082] 其它包括检测样品制备、操作方法和结果判定等均同实施例七, 不再赘述。

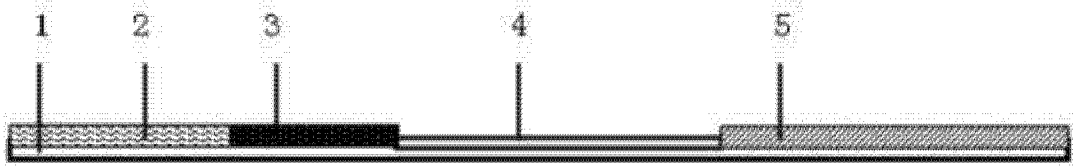


图 1

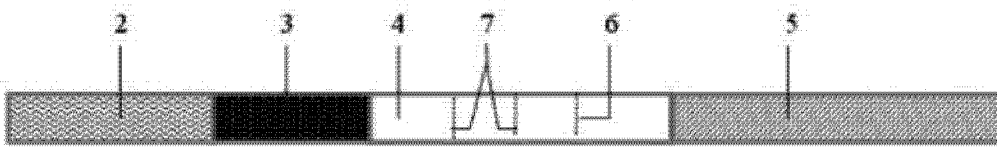


图 2

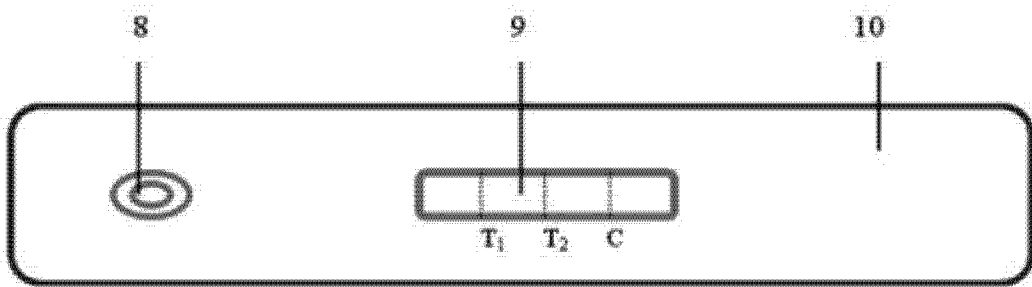


图 3

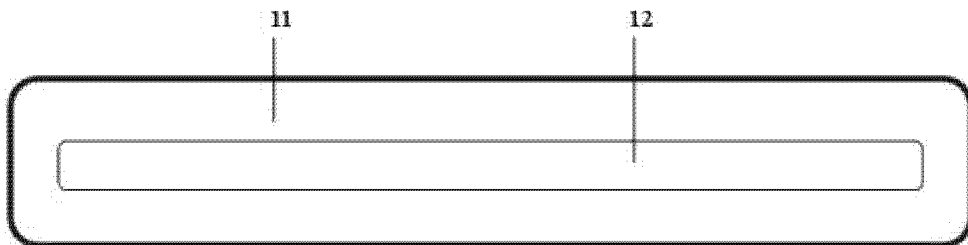


图 4

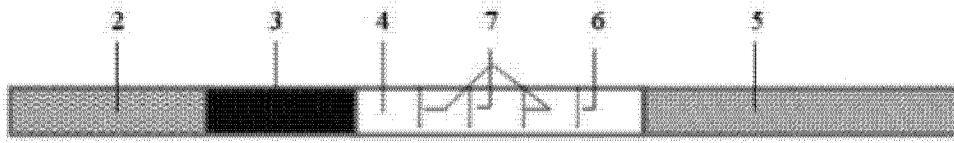


图 5

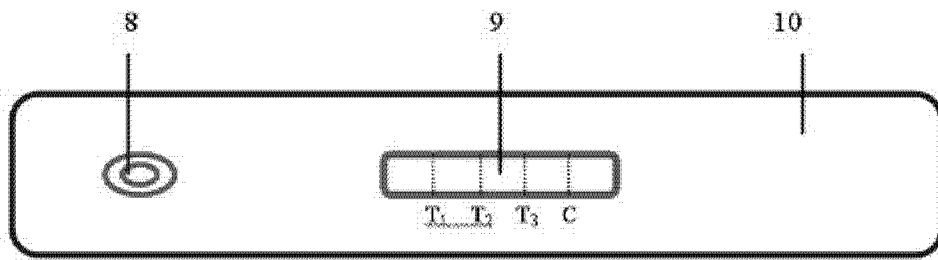


图 6

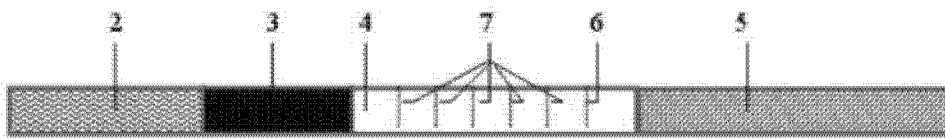


图 7

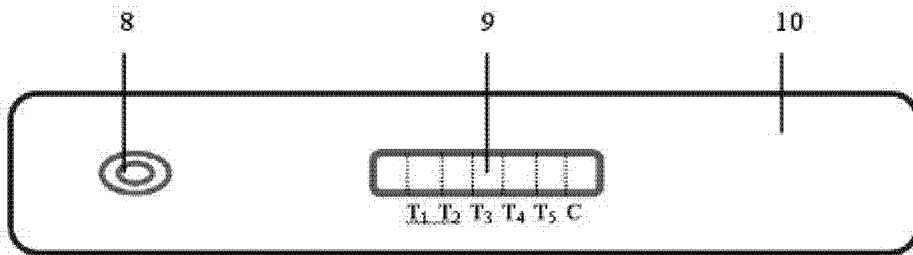


图 8

专利名称(译)	瘦肉精多残留联检试纸卡及其制备方法		
公开(公告)号	CN102230937A	公开(公告)日	2011-11-02
申请号	CN201110163903.8	申请日	2011-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	职爱民 胡晓飞 张改平 邓瑞广 李孟顺 杨继飞 刘庆堂 赵东 邢广旭 柴书军 杨艳艳 李青梅 滕蔓		
发明人	职爱民 胡晓飞 张改平 邓瑞广 李孟顺 杨继飞 刘庆堂 赵东 邢广旭 柴书军 杨艳艳 李青梅 滕蔓		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/566		
代理人(译)	张爱军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种“瘦肉精”多残留分析的金标层析检测试纸卡，包括塑料支撑物和试纸芯，试纸芯由样品垫、金标物结合垫、层析膜和吸水垫依次粘贴到衬板上制成，金标物结合垫为吸附有二~五种混合金标抗体的玻璃纤维棉，金标抗体为胶体金标记的抗瘦肉精的单克隆抗体或多克隆抗体，检测线为二~五条相应的瘦肉精-载体蛋白结合抗原，对照线为羊抗或兔抗小鼠IgG、羊抗兔IgG或兔抗载体蛋白IgG抗体印制而成，检测线 and 对照线沿层析膜横向平行排列。本发明特异性强，敏感性高，最低检出限可达到1ppb，实现了“瘦肉精”多残留金标层析的快速检测，用同一试纸卡一次加样，可同时检测多种“瘦肉精”残留物，大大节省了检测时间，在提高工作效率的同时节省了检测成本。

