

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/558

G01N 33/531



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02139704. X

[43] 公开日 2003 年 3 月 19 日

[11] 公开号 CN 1403818A

[22] 申请日 2002.10.22 [21] 申请号 02139704. X

[71] 申请人 李文平

地址 410125 湖南省长沙市芙蓉区马坡岭省  
农科院内湖南农泰饲料有限公司

共同申请人 何湘蓉

[72] 发明人 李文平 何湘蓉

[74] 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所

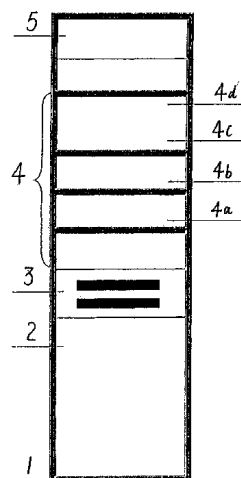
代理人 彭选明

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 半定量快速检测盐酸克伦特罗的胶体金试纸条及生产和使用方法

[57] 摘要

本发明涉及一步法半定量快速检测动物产品或饲料中盐酸克伦特罗的胶体金试纸条及其生产、使用方法。用胶体金标记盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物，均匀喷洒在玻璃纤维纸上，将抗盐酸克伦特罗—载体蛋白抗血清呈横条状多层次固定于层析膜上，使第一条抗体浓度刚好与胶体金所标记的载体蛋白偶联物完全中和。当检测样品为阴性时，检测试纸条只显示一条带，当检测样品中含有盐酸克伦特罗时，显示出多条带，条带越多，则样品中的盐酸克伦特罗浓度越高，因此根据条带的多少可判定待检样品中盐酸克伦特罗的含量。整个检测过程只需 5 分钟，准确率高，抗干扰性强，检测灵敏度和特异性均达 99% 以上。检测试剂条由底板、滤纸、玻璃纤维纸、硝酸纤维膜等制成。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种半定量快速检测盐酸克伦特罗的胶体金试纸条, 其特征在于它是由底板、玻璃纤维纸、免疫层析复合膜, 抗原标记的胶体金、抗盐酸克伦特罗血清及吸水纸组成。

2. 据权利要求 1 所述的胶体金试纸条, 其特征在于其免疫层析膜为硝酸纤维膜或醋酸纤维膜。

3. 半定量快速检测盐酸克伦特罗胶体金试纸条的生产方法, 其特征在于由下列过程与步骤组成:

(1) 重氮法、缩合剂法或戊二醛交联法中的任何一种偶联盐酸克伦特罗与载体蛋白, 形成偶联物做抗原用;

(2) 用抗原免疫的小白鼠脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞杂交融合, 制备杂交瘤细胞, 筛选能够稳定分泌抗盐酸克伦特罗单克隆抗体的细胞株, 制备抗盐酸克伦特罗单克隆抗体;

(3) 将胶体金标记的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物均匀喷涂于单位面积的玻璃纤维膜上;

(4) 将(2)中所述的单克隆抗体固定在单位面积的层析膜上;

(5) 组装盐酸克伦特罗一步法半定量快速检测试纸条, 该检测试纸自下而上依次包括: 样品吸收区, 可溶解的金标盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物区、三条固相化抗盐酸克伦特罗抗血清区、吸水片区等四个区。

4. 据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于半定量一步法胶体金试纸条中盐酸克伦特罗与载体蛋白偶联的方法为:

缩合剂法: CBL + mcKLH, CBL + OVA, CBL + BSA

戊二醛法: CBL + KLH, CBL + OVA, CBL + BSA

重氮法: CBL + KLH, CBL + OVA, CBL + BSA

5. 据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于与盐酸克伦特罗偶联的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)或钥孔蛾(KLH 或 mcKLH)。

6. 据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于金标盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物的制备方法为分别取半径为 15nm-40nm 的胶体金及相应量的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物, 在 PH7.2 的条件下通过搅拌振荡使其结合, 加 10% 的 BSA 作为稳定剂, 采用高速离心法除去游离未结合的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物及未充分稳定的胶体金颗粒和它们的凝集物, 在离心管底部深红色沉淀即为胶体金-盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物的复合物。

7. 据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于用于半定量一步法胶体金试纸条中抗盐酸克伦特罗单克隆抗体在胶体金检测试纸条的布阵方案: 固相化抗盐酸克伦特罗抗血清区的第一条血清抗体带与金标盐酸克伦特罗-载体蛋白呈一定的比例关系, 既第一条带中的抗体刚好与金标盐酸克伦特罗-载体蛋白完全中和, 若为阴性样品, 则呈现一条有颜色的条带, 同时本带还可作为检测对照带, 若没有一条颜色条带出现, 则说明本检测试纸条过期而不能使用, 固相化抗盐酸克伦特罗抗血清区的第二、三条血清抗体带可检测范围依次为 1ppb、10ppb、200ppb, 各血清带之间间隔为 2mm。

8. 半定量快速检测盐酸克伦特罗胶体金试纸条的使用方法, 其特征在于将胶体金试纸条插入检测样品中 5 分钟后, 根据检测试纸条上显示的条带数目来判定待检样品中盐酸克伦特罗的含量, 两条带以上为阳性既含量 >1ppb, 三条带者含量为 1-10ppb, 四条色带者含量为 >200ppb, 只有一条带者含量为阴性。

9. 据权利要求 8 所述的使用方法, 其特征在于检测组织样品时, 需用 A 溶液处理, 既将 A 溶液滴加于少量的瘦肉、肝脏或肾脏上, 2 分钟后将检测试纸插入待检样品中检测, 5 分钟后观测结果, A 溶液含有 SDS 成份, 可充分裂解待检组织样品细胞, 使组织中可能残留的盐酸克伦特罗充分释放。

10. 据权利要求 8 所述的使用方法, 其特征在于检测饲料样品时, 需加入装有 B 溶液的瓶中, 剧烈振荡后静置 5 分钟, 将试纸条插入溶液中进行检测, 5 分钟后观测结果, B 溶液含有吐温成份, 可充分溶解待检饲料样品中可能存在的盐酸克伦特罗。

## 半定量快速检测盐酸克伦特罗的胶体金试纸条及生产和使用方法

**技术领域：**本发明属免疫化学检测技术，具体来讲，是一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应，用以快速检测动物各种组织、尿液、体液及饲料中的盐酸克伦特罗的残留物的检测试纸及其制备使用方法。

**背景技术：**盐酸克伦特罗，俗称“瘦肉精”，商品名为氨哮素，其他的中文名还有盐酸双氨醇胺、克喘素、氨哮素、氨必妥、氨双氯喘通、氨双氯醇胺，它是肾上腺素类神经兴奋剂，属  $\beta$  -兴奋剂类激素。猪吃了含有这种药物的饲料能够改善养分的代谢途径，促进动物肌肉，特别是骨骼肌蛋白质的合成，抑制脂肪的积累，从而加速动物生长速度，提高瘦肉率。一般来说，饲料中添加适量的盐酸克伦特罗后，可使猪等畜禽生长速度、饲料耗化率、胴体瘦肉率提高 10% 以上。因此，将这种药物习惯上称作“瘦肉精”。但盐酸克伦特罗多在动物体内残留沉积而不被降解。人吃了含有盐酸克伦特罗的动物产品，往往出现中毒反应，出现肌肉震颤、心慌、战栗、头疼、恶心、呕吐等症状。特别是对高血压、心脏病、甲亢、前列腺肥大等疾病者危险更大。我国农业部早已明令禁止在饲料和畜牧生产中使用，但由于利益的驱动，盐酸克伦特罗以致在非法使用。1997 年以来，国内已发生百例中毒事件。

目前动物防疫、检疫部门正全力查验该违禁药物。盐酸克伦特罗的残留检测方法主要有两种：一种是色谱分析，如液相色谱、气-质联用色谱等，一种为免疫学方法，如 ELISA。第一种方法需要昂贵的色谱分析仪，并需专业人士操作，虽然检测准确，但检测周期相当长，不能满足快速检测需求。ELISA 方法也需要采集动物组织或尿液送至实验室，由实验室操作人员借助酶联免疫仪而对样品进行筛选，从抽样得到检测结果时间大约为一天。

**发明内容：**本发明的目的旨在建立一种能在现场进行快速检测的试纸条，本方法不仅特异性强，灵敏度高，而且不需要任何的辅助仪器，且检测时间仅需 5 分钟，满足了现场快速验放的需求。

本发明所依据的原理是通过待检样品中的盐酸克伦特罗与胶体金标记的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶合物和精确定量呈横条状分布于免疫层析膜上的盐酸克伦特罗单克隆抗体发生竞争性的结合,通过显示于免疫层析膜上的条纹数量,来判定待检样品中盐酸克伦特罗的含量。条纹数越多,待检样品中盐酸克伦特罗的含量越高。

本检测试剂条由底板、玻璃纤维纸、免疫层析复合膜即硝酸纤维膜或醋酸纤维膜、胶体金标记的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶合物、盐酸克伦特罗克隆抗体及吸水纸组成(见附图 1)。

与现有技术相比,本发明具有突出的优点和实用性:

1. 检测快速:检测时间只需 5 分钟,能够满足现场检测的需要。
2. 检测准确率高、特异性强:本反应与其他抗生素没有交叉反应,检测灵敏度能达到与 DLISA 基本相同的定量水平。
3. 携带方便,操作简便:本发明改变了对盐酸克伦特罗残留的检测必须由专业机构的专业人员才能进行检测的局限性。使各个猪场、菜市场、各级检验检疫所、出入境检验以及消费者均可即时进行检验。
4. 盐酸克伦特罗检测试纸条制备工艺简单,成本低。
5. 检测试纸条在常温下即可保存,无需特殊的设备和仪器。保存期可达 1 年,且检测重复性好。

**附图说明:**

附图 1: 半定量快速检测盐酸克伦特罗胶体金检测试纸条的结构图。

其中:

- 1 为底板;
- 2 为样品吸收区,由 3-6 层滤纸组成;
- 3 为 3 层玻璃纤维纸;
- 4 为免疫层析膜,可以是硝酸纤维膜或醋酸纤维膜;
- 4a 为第一条固相化抗盐酸克伦特罗抗血清;
- 4b 为第二条固相化抗盐酸克伦特罗抗血清;
- 4c 为第三条固相化抗盐酸克伦特罗抗血清;

4d 为第四条固相化抗盐酸克伦特罗抗血清；

5 为吸水片区，由 3—6 层滤纸组成；

以下结合实例介绍胶体金试纸条的生产方法和使用方法：

**具体实施方式：**

**实施例一**

半定量快速检测盐酸克伦特罗胶体金试纸条的生产方法：

#### 1. 盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物的制备

盐酸克伦特罗是小分子的有机物，为半抗原，在免疫动物之前必须与致免疫蛋白进行偶联，制备成全抗原，才可诱导动物产生免疫反应。进行偶联时采用了较为温和的重氮法、缩合剂法或戊二醛交联法中的任何一种偶联盐酸克伦特罗。载体蛋白为牛血清蛋白（BSA）、卵清蛋白（OVA）或钥孔蛾（KLH 或 mcKLH）中和任何一种。各种方法与载体的结合方式包括：

缩合剂法：CBL + mcKLH, CBL + OVA, CBL + BSA

戊二醛法：CBL + KLH, CBL + OVA, CBL + BSA

重氮法：CBL + KLH, CBL + OVA, CBL + BSA

制备好的偶联物必须经过严格的纯化，以去除游离的盐酸克伦特罗、游离的致免疫蛋白及其他杂质才能使用。以 Sephdex G-25 柱层析紫外检测仪检测，收集第一峰即可。

#### 2. 抗盐酸克伦特罗抗血清的制备

取健康的动物（羊、兔、豚鼠小白鼠等）作为免疫对象，将半抗原与载体蛋白偶联物和弗氏完全佐剂等体积混合，制成乳化的疫苗，在动物的颈、背和足掌等部位多点皮下注射进行初次免疫。10—30 天后，用弗氏不完全佐剂和所制备的疫苗进行等体积混合，对动物进行二次免疫，同时免疫剂量加大一倍。10—30 天后，再用弗氏不完全佐剂制备的疫苗加强免疫后测定血清的效价，第三次免疫后的第七天用琼脂双扩散实验进行血清效价测定，当抗原量在 0.5—1mg/ml 时，血清效价  $\geq 1:4-1:8$  时采集动物的血液，4℃ 冰箱过夜，分离血清。血清用 40% 的饱和硫酸铵沉淀，离心除去上清。用尽可能少的磷酸缓冲液进行溶解，透析后用 DE-52 离子交换树脂层析分离除去

其他血清蛋白而免疫球蛋白 IgG，毛细管电泳显示为均一产物。

### 3. 盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备

将盐酸克伦特罗—载体蛋白制备完全抗原，免疫小白鼠，取免疫小鼠的脾细胞与小白鼠骨髓瘤细胞杂交融合，制备杂交瘤细胞，筛选能够稳定分泌盐酸克伦特罗单克隆抗体的细胞株制备抗盐酸克伦特罗单克隆抗体并测定单抗的效价。

### 4. 胶体金标记盐酸克伦特罗—载体偶联物的方法

分别取半径为 15nm-40nm 的胶体金及其相应量的盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物，在 PH7.2 的条件下通过搅拌振荡使其结合，加 10% 的 BSA 作为稳定剂。采用高速离心法除去游离未结合的盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物及未充分稳定的胶体颗粒和其它凝聚物。在离心管底部深红色沉淀即为胶体金—盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物的复合物。

### 5. 将金标物喷涂于玻璃纤维层

用聚乙二醇洗涤胶体金—盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物的复合物，离心除去上清液，得深红色沉淀。纯化后的沉淀用缓冲液溶解，用喷涂设备涂于玻璃纤维纸上，真空抽干。

### 6. 免疫层析膜的包被

用纯化后制备成精确浓度的盐酸克伦特罗抗体溶液用特制得喷涂设备于硝酸纤维膜上划线，线的宽度为 1—1.5mm，每条线在 0.5cm 宽的硝酸纤维膜上的滴加量为 20  $\mu$ l。三条抗体线中的抗体溶液浓度按照由下至上的次序依次递增。第一条包被的抗体刚好与下面的胶体金—盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物的复合物完全发生中和。包被好的免疫层析膜用 10% BSA 溶液喷涂进行封闭。

### 7. 试纸条装备

塑料聚乙烯板作为支撑载体，由下及上是由 3—5 层滤纸组成的样品吸收区，其还具有过滤其他大分子杂质的作用。然后是由二层玻璃纤维层中间夹有一层吸附了胶体金所标记的盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物的玻璃纤维层。其次是硝酸纤维膜，在硝酸纤维膜与塑料聚乙烯板之间为一高分子材

料制成的背衬膜，来阻止粘合剂中的有机溶剂对硝酸纤维膜上所包被抗体的破坏。最上一层是吸水层，由 3—5 层滤纸组成，外面用胶带封住，成为手持部分。各层之间均有 1.5mm 左右的重叠交叉。

## 实施例二

胶体金试纸条的使用方法：

### 1. 对组织样品的检测

用 A 液滴加于少量的瘦肉、肝脏或肾脏上，2 分钟后将检测试纸插入待检样品中，5 分钟后观察结果：有两条带以上者为盐酸克伦特罗含量阳性既含量 $>1\text{ppb}$ ，三条带者含量为  $1-10\text{ppb}$ ，四条色带者含量为 $>200\text{ppb}$ 。只有一条带者为阴性。

### 2. 对饲料样品的检测

取少量的饲料，加入装 B 液的瓶中，剧烈振荡后静置 5 分钟，直接用试纸条进行检测，5 分钟后观测结果，判断标准同 1。

### 3. 对尿液样品的检测

将检测试纸条插入待检尿液中，5 分钟后观察结果。判断标准同 1。

### 4. 对阴性样品的检测

将检测试纸条插入待检样品中，平均 5 分钟后观察结果，只有一条带者为阴性。

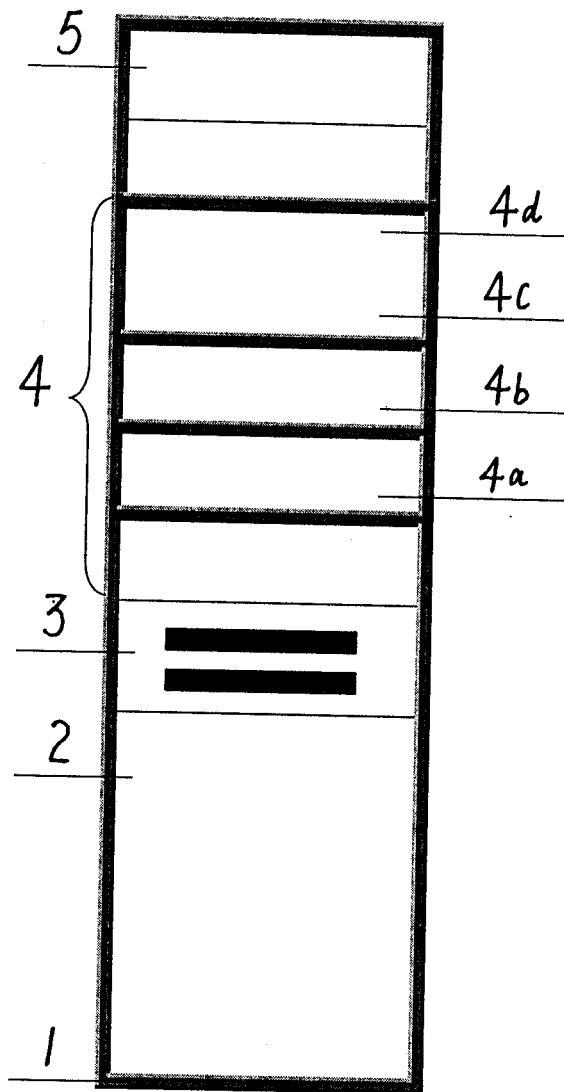


图 1

专利名称(译)	半定量快速检测盐酸克伦特罗的胶体金试纸条及生产和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1403818A</a>	公开(公告)日	2003-03-19
申请号	CN02139704.X	申请日	2002-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	李文平		
申请(专利权)人(译)	李文平		
当前申请(专利权)人(译)	李文平		
[标]发明人	李文平 何湘蓉		
发明人	李文平 何湘蓉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558		
代理人(译)	彭选明		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一步法半定量快速检测动物产品或饲料中盐酸克伦特罗的胶体金试纸条及其生产、使用方法。用胶体金标记盐酸克伦特罗—载体蛋白偶联物，均匀喷洒在玻璃纤维纸上，将抗盐酸克伦特罗—载体蛋白抗血清呈横条状多层次固定于层析膜上，使第一条抗体浓度刚好与胶体金所标记的载体蛋白偶联物完全中和。当检测样品为阴性时，检测试纸条只显示一条带，当检测样品中含有盐酸克伦特罗时，显示出多条带，条带越多，则样品中的盐酸克伦特罗浓度越高，因此根据条带的多少可判定待检样品中盐酸克伦特罗的含量。整个检测过程只需5分钟，准确率高，抗干扰性强，检测灵敏度和特异性均达99%以上。检测试剂条由底板、滤纸、玻璃纤维纸、硝酸纤维膜等制成。

