



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106771273 B

(45)授权公告日 2018.02.13

(21)申请号 201611143061.9

(22)申请日 2016.12.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106771273 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(83)生物保藏信息
CCTCC NO: C2016182 2016.10.26

(73)专利权人 河北省科学院生物研究所
地址 050051 河北省石家庄市友谊南大街
46号2号楼509

专利权人 石家庄科品生物技术有限公司

(72)发明人 李春生 李玉静 刘静静 吴萌
李亚璞 程华 陈英珠

(74)专利代理机构 河北东尚律师事务所 13124
代理人 李国聪

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

CN 202196068 U,2012.04.18,

CN 101446588 A,2009.06.03,

CN 104569408 A,2015.04.29,

CN 104569408 A,2015.04.29,

CN 101597330 A,2009.12.09,

CN 102768278 A,2012.11.07,

CN 202196068 U,2012.04.18,

审查员 王丽华

权利要求书3页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种检测福莫特罗胶体金免疫层析试纸条
及制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测福莫特罗的胶体金层析试纸条及其制备方法与应用,属于免疫学技术领域和兽药残留分析技术领域。该试纸条结构包括底板、样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫,试纸条两端设有保护膜,所述样品垫、胶体金垫、包被膜、吸水垫依次粘贴于底板上;胶体金垫上包被有胶体金标记的能识别福莫特罗的单克隆抗体;包被膜上设有偶联福莫特罗的载体蛋白溶液印制的隐形检测线,以及用羊抗小鼠IgG溶液印制的隐形质控线。本发明的胶体金层析检测试纸条具有便捷、快速、直观、时效性强等特点,适用范围广,成本低,便于推广应用。

1. 一种检测福莫特罗胶体金免疫层析试纸条,其特征在于,该检测试纸条由底板、样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫组成,试纸两端设有保护膜;所述样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫依次粘贴于底板上;其中胶体金垫为吸附有胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体,包被膜上含有用福莫特罗偶联载体蛋白的预包被检测线T线,用羊抗或兔抗小鼠IgG溶液预包被的质控线C线,两条线竖直平行排列;所述底板为PVC条;所述样品垫和胶体金垫由玻璃纤维棉制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成;所述包被膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜;所述保护膜为不透明的胶膜;所述福莫特罗单克隆抗体为鼠源单克隆抗体,由CCTCC NO: C2016182的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6产生;该杂交瘤细胞株被命名为杂交瘤细胞株Formoterol-3E6,于2016年10月26日送交中国典型培养物保藏中心保藏,保藏号为CCTCC NO: C2016182;所述福莫特罗单克隆抗体由福莫特罗抗原产生,该福莫特罗抗原为由福莫特罗与载体蛋白采用碳化二亚胺法合成的偶联物,包括免疫原与检测原;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清白蛋白、免疫血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;所述福莫特罗免疫原使用牛血清白蛋白为载体;所述福莫特罗检测原使用卵清蛋白为载体。

2. 如权利要求1所述检测福莫特罗胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备福莫特罗抗原工作液:

(a) 活化对氨基苯甲酸的制备:称取6mg亚硝酸钠,溶于0.35mL蒸馏水中,然后称取10mg对氨基苯甲酸,溶于1.1mL 1mol/L的盐酸中,冰浴搅拌,将上述亚硝酸钠溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1h,得到活化对氨基苯甲酸;

(b) 带有羧基的福莫特罗活性中间体的制备:称取福莫特罗30mg溶于5mL、0.05mol/L冰冷的硼砂缓冲溶液中,所述硼砂缓冲溶液pH=9并且含0.15mol/L的氯化钠,冰浴搅拌,将此溶液逐滴加入到活化对氨基苯甲酸溶液中,4℃避光反应3h,得到带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液;

(c) 免疫原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/LNaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h;称取BSA 200mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次;透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存;标记为Formoterol-BSA;

(d) 检测原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/LNaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h;称取OVA 150mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次;透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存;标记为Formoterol-OVA;

(2) 制备福莫特罗单克隆抗体工作液:

(a) 动物免疫:选择载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原,免疫6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,间隔2周免疫1次,三次免疫后测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

(b) 细胞融合:取步骤(a)选定的小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,间接ELISA法测定上清液选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生

单一抗福莫特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

(c) 单克隆抗体的大量制备：选取个体较大的雌性Blab/c小鼠，采用体内诱生腹水法，大量制备腹水，并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水，分成小管，-20℃保存，得福莫特罗单克隆抗体；

(3) 制备胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体：

将待标记的福莫特罗单克隆抗体溶液10000r/min离心30min，取胶体金溶液10mL，用0.1mol/LK₂CO₃溶液调节胶体金溶液的pH值至8.2；取等量福莫特罗单克隆抗体溶液，磁力搅拌下与胶体金溶液混合，室温孵育15min，10000r/min离心30min，弃上清，将所得沉淀用每升含10g BSA、0.5g叠氮钠、浓度为0.02mol/L的Na₂B₄O₇溶液稀释，即获得胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体，4℃保存备用；

(4) 胶体金垫制备：按规格截取玻璃纤维棉，将胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体用喷金仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上，37℃干燥1h，密封，4℃保存备用；

(5) 检测线和质控线的制备：将福莫特罗抗原放于喷金仪贮存池A，羊抗小鼠IgG溶液放于贮存池B，开机分别点射于膜中央，形成间距0.5cm的直线式隐形检测线和隐形质控线，自然干燥，密封，4℃保存备用；

(6) 试纸条组装：将样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫按顺序依次粘贴于底板上，并在试纸条两端的表面粘贴保护膜，在切槽机上切割成试纸条。

3. 如权利要求1所述的胶体金层析试纸条在用于检测动物组织、尿液和饲料中福莫特罗的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 样品前处理

(a) 尿样：取尿样室温5000rpm离心5min，取上清100μL用样品稀释液稀释4倍，取上清进行检测；

(b) 肉类、肾脏、肝脏组织：称取肉样组织2.0g±0.05g，加入5mL乙酸乙酯，振荡1min，5000rpm离心10min；移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中，水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取，合并有机相氮气吹干；加入1mL复溶工作液溶解，取50μL用于分析；

(c) 饲料：称取饲料2.0g±0.05g，加入5mL乙酸乙酯，振荡1min，5000rpm离心10min；移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中，水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取，合并有机相氮气吹干；加入1mL复溶工作液溶解，取50μL用于分析；

(2) 用胶体金层析试纸条检测

从包装中取出所述检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条，将样品端插入待测样品液中，插入深度不超过标记线，10-20秒钟取出检测试纸条，水平放置，3-5分钟观察判定检测结果，10分钟以后结果无效；

(3) 结果判定

(a) 阳性：如果包被膜上对应的质控区C位置显示一条棕红色线，检测区T位置不显示棕红色线，表示检测结果为阳性，说明在待测样品中含有福莫特罗；

(b) 阴性：如果在包被膜上T、C位置显示有两天棕红色线，表示结果为阴性，说明在待测样品中不含福莫特罗；

(c) 失效：当质控区C不显示出棕红色条带，则无论检测区T显示出棕红色条带与否该试

纸均判为无效。

一种检测福莫特罗胶体金免疫层析试纸条及制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法与应用,其特别适于动物组织中福莫特罗残留的检测,属于免疫学技术领域和兽药残留分析技术领域。

背景技术

[0002] 福莫特罗(Formoterol)是由日本山之内制药株式会社中央研究所开发的第三代 β 2-肾上腺素受体激动剂平喘药物,具有支气管扩张作用,还有抗过敏和抑制水肿的作用,可用于治疗慢性支气管哮喘、夜间哮喘、运动性哮喘、慢性阻塞性肺病以及儿童非哮喘性呼吸道疾病。近年来,随着我国对食品安全监管力度的加强,对违禁使用兽药的监管力度逐渐加大,滥用违禁兽药的现象有所控制,但是出现了使用生物活性相似的替代品代替重点监管兽药的新现象。新型“瘦肉精”福莫特罗与克伦特罗等三种常用“瘦肉精”物质具有同样的促进生长、增加瘦肉率的作用,2002年农业部1519号条例规定食品动物禁止使用 β 激动剂类药物作为饲料添加剂。福莫特罗检测手段滞后,尤其是快速检测产品缺乏,国家及各省市正在加紧建立新型“瘦肉精”物质的确证方法,同时也急需适合批量、快速筛选的检测产品,满足政府和企业的需要。

[0003] 目前有关福莫特罗残留的检测技术主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)及免疫分析技术,前三种方法灵敏、准确,但操作繁琐,对实验设备和技术要求较高,不适合大批量样品的快速检测。免疫分析方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)和胶体金免疫层析法(GICA),具有灵敏度高、特异性好、成本低、操作方便等特点,适于大批量样品筛选。GICA作为一种新的免疫学检测方法,既有免疫学方法的特异性,又有简便快速、不需仪器的特点,其在医学、动植物检疫、食品检测等多领域已得到了广泛应用。开发福莫特罗胶体金试纸条有助于福莫特罗残留快速、准确的检测,有效遏制其在水产品中的违规使用及残留超标问题,提高人民群众水产品餐桌质量安全水平。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术缺陷提供一种检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条,该胶体金免疫层析试纸条具有操作简单,快速,适合大批量样品初筛的优点。此外,本发明进一步提供该检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条的制备方法与应用。

[0005] 本发明所述技术问题是由以下技术方案实现的。

[0006] 一种检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条,该检测试纸条由底板、样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫组成,试纸两端设有保护膜,所述样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫依次粘贴于底板上;其中胶体金垫为吸附有胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体,包被膜上含有用福莫特罗偶联载体蛋白的预包被检测线(T线),用羊抗或兔抗小鼠IgG溶液预包被的

质控线(C线),两条线竖直平行排列。

[0007] 上述胶体金免疫层析试纸条,福莫特罗单克隆抗体为鼠源单克隆抗体,由CCTCC NO:C2016182的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6产生。该杂交瘤细胞株被命名为杂交瘤细胞株Formoterol-3E6,于2016年10月26日送交中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏号为CCTCC NO:C2016182。

[0008] 上述胶体金免疫层析试纸条,所述福莫特罗单克隆抗体由福莫特罗抗原产生,其为由福莫特罗与载体蛋白采用碳二亚胺法合成的偶联物,包括免疫原与检测原;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清白蛋白、免疫血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;免疫原优选载体为牛血清白蛋白,检测原优选载体为卵清蛋白;

[0009] 上述胶体金免疫层析试纸条,所述底板为PVC条或其它不吸水的硬质材料;所述样品垫和胶体金垫由玻璃纤维棉制成;所述吸水垫由吸水滤纸制成;所述包被膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜;所述保护膜为不透明的胶膜。

[0010] 本发明所述的胶体金层析试纸条制备方法,包括如下步骤:

[0011] (1) 制备福莫特罗抗原工作液:

[0012] (a) 活化对氨基苯甲酸的制备:称取6mg亚硝酸钠,溶在0.35mL蒸馏水中,然后称取10mg对氨基苯甲酸,溶入1.1mL 1mol/L的盐酸中,冰浴搅拌,将上述亚硝酸钠溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1h,得到活化对氨基苯甲酸;

[0013] (b) 带有羧基的福莫特罗活性中间体的制备:称取福莫特罗30mg溶在5mL、0.05mol/L冰冷的硼砂缓冲溶液中(pH=9,含0.15mol/L的氯化钠),冰浴搅拌,将此溶液逐滴加入到活化对氨基苯甲酸溶液中,4℃避光反应3h,得到带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液;

[0014] (c) 免疫原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取BSA 200mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存。标记为Formoterol-BSA;

[0015] (d) 检测原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取OVA 150mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4℃透析72h,然后改用蒸馏水4℃透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20℃保存。标记为Formoterol-OVA。

[0016] (2) 制备福莫特罗单克隆抗体工作液:

[0017] (a) 动物免疫:选择载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原,免疫6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,间隔2周免疫1次,3次免疫后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0018] (b) 细胞融合:取步骤(a)选定的小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞进行融合,间接ELISA法测定上清液选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立

产生单一抗福莫特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

[0019] (c) 单克隆抗体的大量制备：选取个体较大的雌性Balb/c小鼠，采用体内诱生腹水法，大量制备腹水，并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水，分成小管，-20℃保存，得福莫特罗单克隆抗体；

[0020] (3) 制备胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体：

[0021] 将待标记的福莫特罗单克隆抗体溶液10000r/min离心30min，取胶体金溶液10mL，用0.1mol/L K₂CO₃溶液调节胶体金溶液的pH值至8.2；取等量福莫特罗单克隆抗体溶液，磁力搅拌下与胶体金溶液混合，室温孵育15min，10000r/min离心30min，弃上清，将所得沉淀用每升含10g BSA、0.5g叠氮钠、浓度为0.02mol/L的Na₂B₄O₇溶液稀释，即获得胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体，4℃保存备用；

[0022] (4) 胶体金垫制备：按规格裁取玻璃纤维棉，将胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体用喷金仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上，37℃干燥1h，密封，4℃保存备用；

[0023] (5) 检测线和质控线的制备：将福莫特罗抗原放于喷金仪贮存池A，羊抗小鼠IgG溶液放于贮存池B，开机分别点射于膜中央，形成间距0.5cm的直线式隐形检测线和隐形质控线，自然干燥，密封，4℃保存备用；

[0024] (6) 试纸条组装：将样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫按顺序依次粘贴于底板上，并在试纸条两端的表面粘贴保护膜，在切槽机上切割成试纸条。

[0025] 上述胶体金层析试纸条在用于检测动物组织、尿液和饲料中福莫特罗中的应用。

[0026] 上述在用于检测福莫特罗的应用，包括如下步骤：

[0027] (1) 样品前处理

[0028] (a) 尿样：取尿样室温5000rpm离心5min，取上清100μL用样品稀释液稀释4倍，取上清进行检测；

[0029] (b) (肉类、肾脏、肝脏等) 组织：称取肉样组织2.0g±0.05g，加入5mL乙酸乙酯，振荡1min，5000rpm离心10min；移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中，水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取，合并有机相氮气吹干；加入1mL复溶工作液溶解，取50μL用于分析；

[0030] (c) 饲料：称取饲料2.0g±0.05g，加入5mL乙酸乙酯，振荡1min，5000rpm离心10min；移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中，水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取，合并有机相氮气吹干；加入1mL复溶工作液溶解，取50μL用于分析。

[0031] (2) 用胶体金层析试纸条检测

[0032] 从包装中取出所述检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条，将样品端插入待测样品液中，插入深度不超过标记线，约10-20秒钟取出检测试纸条，水平放置，3-5分钟观察判定检测结果，10分钟以后结果无效；

[0033] (3) 结果判定

[0034] (a) 阳性如果包被膜上对应的质控区C位置显示一条棕红色线，检测区T位置不显示棕红色线，表示检测结果为阳性，说明在待测样品中含有福莫特罗；

[0035] (b) 阴性如果在包被膜上T、C位置显示有两天棕红色线，表示结果为阴性，说明在待测样品中不含福莫特罗；

[0036] (c) 失效当质控区C不显示出棕红色条带，则无论检测区T显示出棕红色条带与否该试纸均判为无效。

[0037] 本发明的福莫特罗胶体金层析试纸条的检测限为4 μ g/L,与其他几种 β 激动剂类药物(苯乙醇胺A、沙丁胺醇、妥布特罗、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、西马特罗)均不存在交叉反应,对样品的检测与高效液相色谱结果一致。用本发明胶体金层析试纸条检测福莫特罗的方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0038] 图1本发明所述福莫特罗单克隆抗体亲和力测定图

[0039] 图2本发明所述福莫特罗单克隆抗体亚型测定图

[0040] 图3本发明所述福莫特罗胶体金层析试纸条试纸剖面结构示意图

[0041] 图4本发明所述福莫特罗胶体金层析试纸条试纸俯视结构示意图

[0042] 图5本发明所述福莫特罗胶体金层析试纸条试纸结果判定图

[0043] 本发明所述的抗福莫特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株Formoterol-3E6,已于2016年10月26日送交中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址:武汉大学,中国典型培养物保藏中心,邮编:430072)保藏,保藏编号CCTCC NO:C2016182。

具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明,所列举的实施例不对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

[0045] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0046] 实施例一本发明所述福莫特罗抗原的制备

[0047] (1)活化对氨基苯甲酸的制备:称取6mg亚硝酸钠,溶在0.35mL蒸馏水中,然后称取10mg对氨基苯甲酸,溶入1.1mL 1mol/L的盐酸中,冰浴搅拌,将上述亚硝酸钠溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中,避光反应1h,得到活化对氨基苯甲酸;

[0048] (2)带有羧基的福莫特罗活性中间体的制备:称取福莫特罗30mg溶在5mL、0.05mol/L冰冷的硼砂缓冲溶液中(pH=9,含0.15mol/L的氯化钠),冰浴搅拌,将此溶液逐滴加入到活化对氨基苯甲酸溶液中,4 $^{\circ}$ C避光反应3h,得到带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液;

[0049] (3)免疫原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取BSA 200mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4 $^{\circ}$ C透析72h,然后改用蒸馏水4 $^{\circ}$ C透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20 $^{\circ}$ C保存。标记为Formoterol-BSA;

[0050] (4)检测原的合成:在上述带有羧基的福莫特罗活性中间体溶液中加入0.1mol/L NaOH调pH至7.4,将EDC 140mg、NHS 60mg溶解在2mL PBS中,少量多次加到溶液中室温搅拌3h。称取OVA 150mg溶解在1mL 0.01mol/L的PBS中,边搅拌边加入上述溶液中,反应过夜后,将偶联物溶液转移至透析袋,在PBS缓冲液中4 $^{\circ}$ C透析72h,然后改用蒸馏水4 $^{\circ}$ C透析48h,每天换液2次。透析后的溶液于6000rpm离心30min,取上清-20 $^{\circ}$ C保存。标记为Formoterol-OVA。

[0051] 实施例二本发明所述福莫特罗单克隆抗体的制备

[0052] (1) 动物免疫:载体蛋白为牛血清白蛋白的免疫原免疫6-8周龄的雌性Balb/c小鼠,间隔2周免疫1次,3次免疫后断尾取血测定效价和抑制率,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0053] (2) 细胞融合:取小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞,进行融合,间接ELISA法测定上清选取阳性高的孔,通过有限稀释法对阳性孔进行亚克隆,直至建立产生单一抗福莫特罗的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0054] (3) 单克隆抗体的大量制备:选取个体较大的雌性Balb/c小鼠,采用体内诱生腹水法,大量制备腹水,并通过辛酸-硫酸铵沉淀纯化腹水,分成小管,-20℃保存,得福莫特罗单克隆抗体。

[0055] 实施例三本发明所述福莫特罗单克隆抗体特性鉴定

[0056] 1、亲和力测定

[0057] 采用非竞争酶联免疫法测定福莫特罗单克隆抗体的亲和常数,结果如图1所示,亲和常数 $K_a=7.24 \times 10^8 \text{L/mol}$ 。

[0058] 2、亚型测定

[0059] 采用购自Sigma公司的鼠源单抗亚型鉴定试剂盒进行亚型测定,结果见图2所示,福莫特罗单克隆抗体亚型为IgG1。

[0060] 3、效价测定

[0061] 以1:40000稀释包被原包被检测板,将纯化后的单克隆抗体进行1:2000,1:4000,1:8000,……1:1024000稀释,加入到酶标板孔内,反应后加入HRP标记的羊抗鼠二抗,最后用TMB显色,结果显示纯化后的福莫特罗单克隆抗体浓度为1mg/ml时的效价达1:512000。实施例四本发明所述检测福莫特罗的胶体金层析试纸条

[0062] 1、胶体金液制备:取100mL蒸馏水,煮沸5min,加入质量浓度为1%的氯金酸1mL和质量浓度为1%的柠檬酸三钠溶液1.5mL,继续搅拌加热,溶液最终经过灰色、酒红色至呈透亮的红色,冷却到室温,分别通过目测法、紫外分光光度法进行质量鉴定,合格的胶体金溶液4℃避光保存;

[0063] 2、胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体的制备:将待标记的福莫特罗单克隆抗体溶液10000r/min离心30min,取胶体金溶液10mL,用0.1mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的pH值至8.2;取等量福莫特罗单克隆抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育15min,10000r/min离心30min,弃上清,将所得沉淀用每升含10g BSA、0.5g叠氮钠、浓度为0.02mol/L的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液稀释,即获得胶体金标记的福莫特罗单克隆抗体,4℃保存备用;

[0064] 3、胶体金垫制备:按规格裁取玻璃纤维棉,将金标抗体用喷金仪均匀喷洒于玻璃纤维棉上,37℃干燥1h,密封,4℃保存备用;

[0065] 4、检测线和质控线的制备:将福莫特罗抗原放于喷金仪贮存池A,羊抗小鼠IgG溶液放于贮存池B,开机分别点射于膜中央,形成间距0.5cm的直线式隐形检测线T线和隐形质控线C线,自然干燥,密封,4℃保存备用;

[0066] 5、试纸条组装:将样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫按顺序依次粘贴于底板上,并在试纸条两端的表面粘贴保护膜,在切槽机上切割成试纸条。

[0067] 6、福莫特罗胶体金层析试纸条的结构,参见图3、图4。图中底板1用PVC板制成,样

品垫2用玻璃纤维棉制成,胶体金垫3上吸附有抗福莫特罗单克隆抗体,包被膜4采用硝酸纤维素膜,吸水垫7用吸水滤纸制成,将编号2、3、4、7各层从右至左依次粘贴固定在底板1上,彼此交界处纤维互相交叉渗透。在包被膜4上设有隐形检测线5和隐形质控线6,隐形检测线用偶联福莫特罗的鸡卵白蛋白(OVA)溶液印制,隐形质控线用羊抗小鼠IgG抗体溶液印制,两条印迹平行排列成“||”。8为覆盖在样品垫2和胶体金垫3上面的样品端保护膜,9为覆盖在吸水垫7上面的手柄端保护膜,在样品标记线右侧的保护膜上印有箭头及MAX字样。

[0068] 实施例五本发明所述胶体金层析试纸条检测样品中福莫特罗

[0069] (1) 样品前处理

[0070] (a) 尿样:取尿样室温5000rpm离心5min,取上清100 μ L用样品稀释液稀释4倍,取上清进行检测;

[0071] (b) (肉类、肾脏、肝脏等)组织:称取肉样组织2.0g \pm 0.05g,加入5mL乙酸乙酯,振荡1min,5000rpm离心10min;移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中,水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取,合并有机相氮气吹干;加入1mL复溶工作液溶解,取50 μ L用于分析;

[0072] (c) 饲料:称取饲料2.0g \pm 0.05g,加入5mL乙酸乙酯,振荡1min,5000rpm离心10min;移取上层乙酸乙酯层溶液于另一离心管中,水相再用5mL乙酸乙酯重复萃取,合并有机相氮气吹干;加入1mL复溶工作液溶解,取50 μ L用于分析。

[0073] (2) 用胶体金层析试纸条检测

[0074] 从包装中取出所述检测福莫特罗的胶体金免疫层析试纸条,将样品端插入待测样品液中,插入深度不超过标记线,约10-20秒钟取出检测试纸条,水平放置,3-5分钟观察判定检测结果,10分钟以后结果无效。

[0075] (3) 结果判定

[0076] 如图5所示,a为阳性,包被膜上对应的质控区C位置显示一条棕红色线,检测区T位置不显示棕红色线,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有福莫特罗;b为阴性,在包被膜上T、C位置显示有两天棕红色线,表示结果为阴性,说明在待测样品中不含福莫特罗;c、d为失效,当质控区C不显示出棕红色条带,则无论检测区T显示出棕红色条带与否该试纸均判为无效。

[0077] 实施例六本发明所述福莫特罗胶体金层析试纸条性能检测

[0078] 1、灵敏度

[0079] 将1mg/mL福莫特罗(1mg福莫特罗溶于1mL甲醇)用PBS分别稀释为0、1、2、3、4、5、10 μ g/L的一系列标准溶液,再分别取90 μ L上述标准溶液滴在试纸条的样品垫上,3min后观察试纸条的显色情况。

[0080] 当福莫特罗添加浓度为3 μ g/L时,T线相对于0 μ g/L时的T线的颜色变浅,而当福莫特罗的添加浓度为4 μ g/L时,T线消线,说明胶体金试纸条的检测限为4 μ g/L。

[0081] 2、特异性

[0082] 选取5种 β 受体激动剂(苯乙醇胺A、沙丁胺醇、妥布特罗、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、西马特罗)测试,观察试纸条显色效果。

[0083] 将苯乙醇胺A、沙丁胺醇、妥布特罗、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、西马特罗母液分别用0.01mol/L、PH7.4的PBS稀释至50 μ g/L,滴加到试纸条的样品孔,检测结果显示,制备的福莫特罗胶体金试纸条与其他几种 β 受体激动剂不存在交叉反应。

[0084] 3、准确性

[0085] 随机选取8份猪肉样品,作为供试试样。每份样品分别用HPLC法和本研究制备的福莫特罗胶体金检测试纸条进行检测,比较检测结果。

[0086] 8份猪肉样品经高效液相色谱检测,其中6份样品未检出福莫特罗残留,4号样品检测出福莫特罗含量2.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$,5号样品检测出福莫特罗含量1.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这些样品同时用福莫特罗胶体金试纸条检测,结果与HPLC法完全符合,见表1。

[0087] 表1福莫特罗胶体金试纸条与高效液相色谱法检测结果比较

[0088]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
方法								
HPLC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	未检出	未检出	未检出	2.14	1.53	未检出	未检出	未检出
ICA	—	—	—	+	+	—	—	—

[0089] 注:“+”表示阳性,“—”表示阴性。

[0090] 上述实施例只为说明本发明的技术构思和优点,本发明也可以具有其它的形式变化,如本领域技术人员所熟知,上述实施例仅仅起到对上述发明保护范围内的示范作用,对本领域普通技术人员来说,在本发明所限定的保护范围内还有很多常规变形和其它实施例,这些变形和实施例都将在本发明待批的保护范围之内。

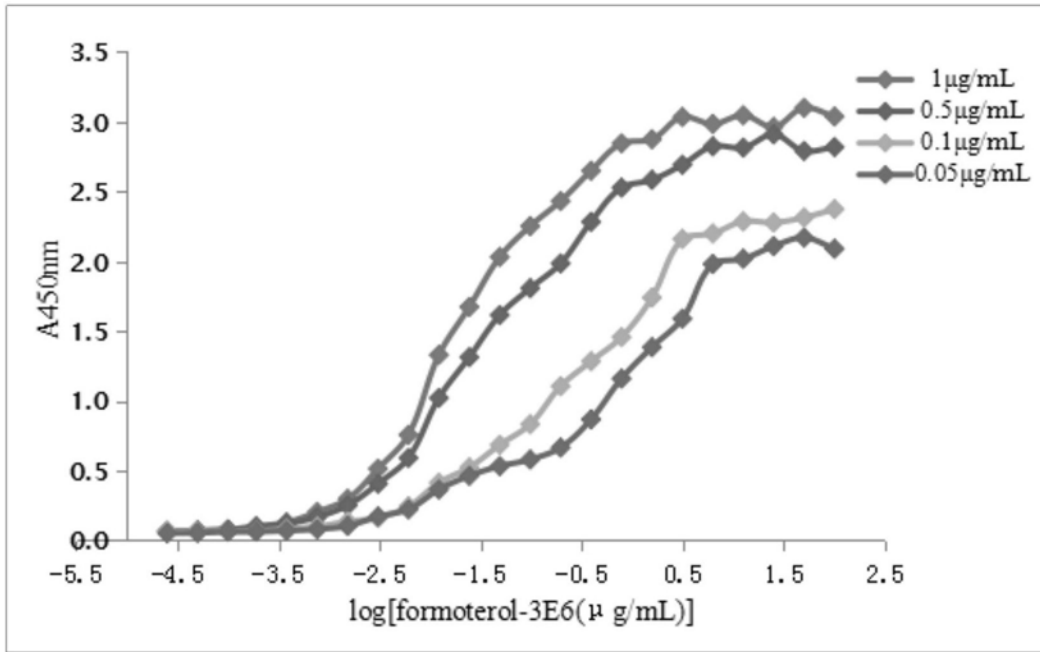


图1

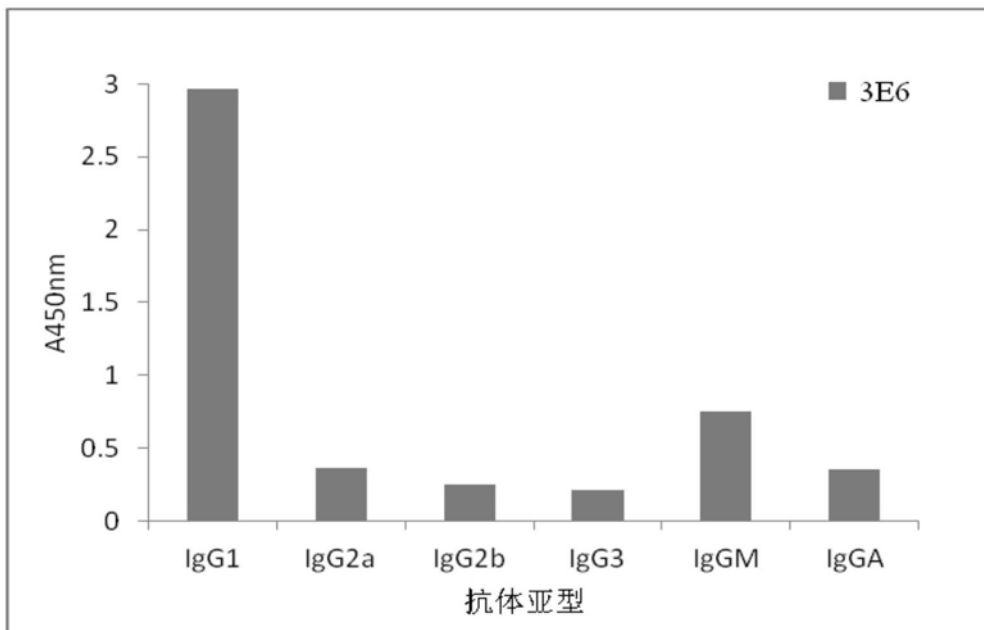


图2

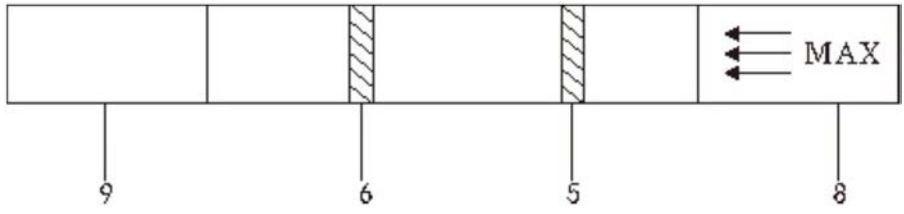


图3

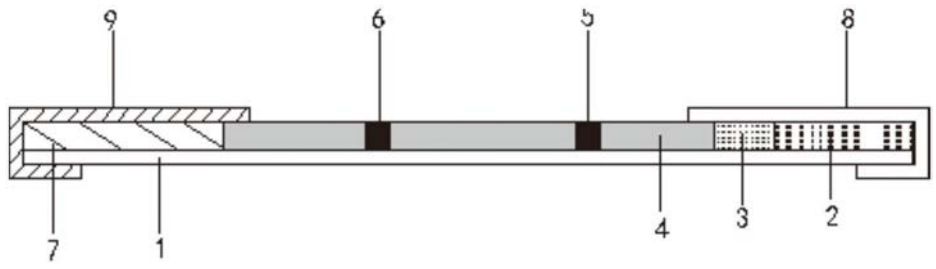


图4

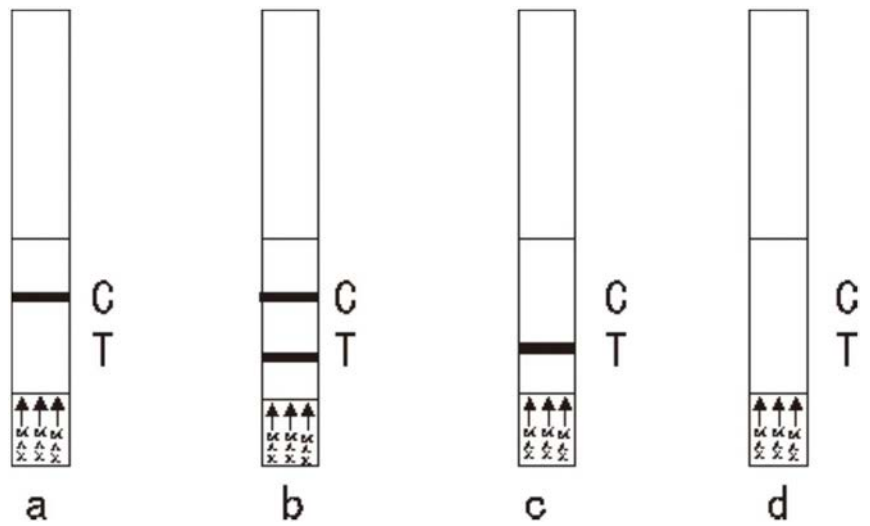


图5

专利名称(译)	一种检测福莫特罗胶体金免疫层析试纸条及制备方法与应用		
公开(公告)号	CN106771273B	公开(公告)日	2018-02-13
申请号	CN201611143061.9	申请日	2016-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所 石家庄科品生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所 石家庄科品生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河北省科学院生物研究所 石家庄科品生物技术有限公司		
[标]发明人	李春生 李玉静 刘静静 吴萌 李亚璞 程华 陈英珠		
发明人	李春生 李玉静 刘静静 吴萌 李亚璞 程华 陈英珠		
IPC分类号	G01N33/94 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/9433 G01N2800/122		
代理人(译)	李国聪		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN106771273A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测福莫特罗的胶体金层析试纸条及其制备方法与应用，属于免疫学技术领域和兽药残留分析技术领域。该试纸条结构包括底板、样品垫、胶体金垫、包被膜和吸水垫，试纸条两端设有保护膜，所述样品垫、胶体金垫、包被膜、吸水垫依次粘贴于底板上；胶体金垫上包被有胶体金标记的能识别福莫特罗的单克隆抗体；包被膜上设有偶联福莫特罗的载体蛋白溶液印制的隐形检测线，以及用羊抗小鼠IgG溶液印制的隐形质控线。本发明的胶体金层析检测试纸条具有便捷、快速、直观、时效性强等特点，适用范围广，成本低，便于推广应用。

方法 \ 编号	1	2	3	4	5	6	7	8
HPLC (µg/kg)	未检出	未检出	未检出	2.14	1.53	未检出	未检出	未检出
ICA	-	-	-	+	+	-	-	-