



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849467 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201410052593. 6

(22) 申请日 2014. 02. 15

(71) 申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 何方洋 冯才伟 罗晓琴 万宇平
朱亮亮 杨学林 冯月君 龙光宗

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

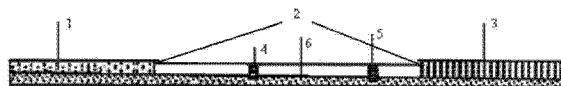
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条及其制备方法和应用

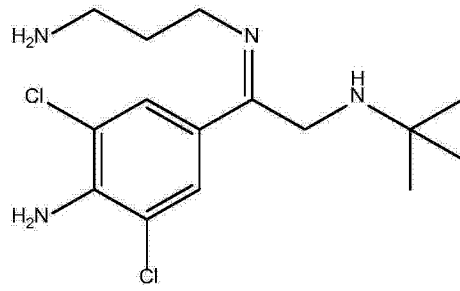
(57) 摘要

本发明公开了一种检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条及其制备方法和应用。试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,样品结合垫上包埋有荧光微球标记的抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区,检测区喷涂有盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物,质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体。本发明主要用于盐酸克仑特罗残留的检测,具有灵敏度高、检测快速、操作方便、经济实用等优点。



1. 一种检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条,其特征在于包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品结合垫上包埋有荧光微球标记的抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区,检测区喷涂有盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物,质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物是由盐酸克仑特罗半抗原与载体蛋白偶联得到,所述盐酸克仑特罗半抗原是由盐酸克仑特罗经氯铬酸吡啶氧化后,再与丙二胺反应得到,分子结构式为:



所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

3. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述荧光微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有一COOH基团,所述荧光物质为异硫氰酸荧光素。

4. 一种权利要求1-3任一项所述的检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于包括步骤:

1) 样品结合垫的制备:用市售的荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将样品结合垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴包埋有荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体的样品结合垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为荧光微球免疫层析试纸条。

5. 一种权利要求1-3任一项所述的检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条在检测盐酸克仑特罗中的应用,其特征在于包括步骤:

1) 样品前处理;

2) 用权利要求1-3任一项所述的荧光微球免疫层析试纸条进行检测;

3) 用荧光检测仪分析检测结果。

检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全中兽药检测领域,具体涉及一种检测样品中盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

技术背景

[0002] 克仑特罗(Clebuterol)是一种属于苯胺类的 β -受体激动剂,主要以盐酸盐形式存在,具有重新分配机体营养、抑制脂肪沉积、提高蛋白质含量、增加酮体瘦肉率、改善肉质以及促进动物生长的作用。因此,近年来在经济利益的驱使下,大量克仑特罗被滥用于畜牧业和养殖业。人体摄入 CL 的量过大时,会导致一系列不良反应,主要有肌肉震颤、心跳和呼吸加快等,严重的会危害生命。鉴于此,许多国家已经禁止将克仑特罗作为饲料及饲料添加剂使用,我国农业部也于 2002 年明确将其列入《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》。

[0003] 目前,检测盐酸克仑特罗比较经典的方法有高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC),这些都是比较传统的方法,也是目前的确证方法。另外,目前常用的还有酶联免疫法(ELISA)。但由于以上方法均需先进检测仪器、检测费用昂贵、步骤繁琐、耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适用于基层企事业单位的大通量快速筛查检测。胶体金免疫层析法具有检测速度快、价格便宜、操作简单等优点,是目前国内外检测盐酸克仑特罗的主要监控方法,但仍存在一些缺陷,如稳定性较差、灵敏度较低、无法实现定量检测、基质效应明显背景干扰大,且颜色单一,难以实现多检和联检。

[0004] 荧光微球免疫层析技术是继胶体金免疫层析技术后,在荧光染料标记技术上发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合,与胶体金免疫层析技术一样具有快速、操作简便等优点。但是相比胶体金等传统标记物,荧光微球的发光强度可以随激发光的强度增强而增强,所以荧光微球标记有望提高免疫层析技术的检测限;而在微球壳结构的作用下,荧光微球具有相对稳定的形态结构,粒度均一、单分散性好、稳定性好、发光效率高、重复性好,有较好的生物相容性;且形成微球后染料荧光猝灭大大减少,发射强而稳定,且基本不受外界环境介质变化的影响。因此相比上述检测方法,荧光微球免疫层析技术同时具有检测灵敏度高、操作简便、稳定性好的优点。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是针对上述现有技术的缺陷,提供一种灵敏度高、操作简便、检测快速、价格低廉的检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条;本发明的另一个目的是提供上述试纸条的制备方法;本发明的再一个目的是提供上述试纸条在检测盐酸克仑特罗中的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采取的一个技术方案是:

[0007] 提供一种检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条,它包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品结合垫上包埋有荧光微球标记的抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区,检测区喷涂有盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物,质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体。

[0008] 所述盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物由盐酸克仑特罗半抗原与载体蛋白偶联得到,所述盐酸克仑特罗半抗原是由盐酸克仑特罗经氯铬酸吡啶氧化后,再与丙二胺反应得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0009] 所述荧光微球是直径为 100 ~ 300nm 的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有一COOH 基团,所述荧光物质为异硫氰酸荧光素。

[0010] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条的方法,它包括如下步骤:

[0011] 1) 样品结合垫的制备:用市售的荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将样品结合垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

[0012] 2) 硝酸纤维素膜的制备:将盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

[0013] 3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴包埋有荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体的样品结合垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为荧光微球免疫层析试纸条。

[0014] 具体地说,步骤包括:

[0015] 1) 将盐酸克仑特罗经氯铬酸吡啶氧化后,再与丙二胺反应,制备盐酸克仑特罗半抗原;

[0016] 2) 将盐酸克仑特罗半抗原与载体蛋白偶联,制备盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物;

[0017] 3) 用盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌盐酸克仑特罗单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0018] 4) 提取小鼠 IgG 免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0019] 5) 分别将盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜的检测区范围(T)和质控区范围(C);

[0020] 6) 将样品结合垫用含牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲体系中的终浓度为 0.5% 体积百分含量)、pH7.2、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液均匀浸泡 2h,37℃ 下烘干 2h;

[0021] 7) 用市售的荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将 6) 处理过的样品结合垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后备用;

[0022] 8) 在底板上依次搭接地粘贴包埋有荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体的样品结合垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为荧光微球免疫层析试纸条。

[0023] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条在检测盐酸克仑特罗中的应用,它包括如下步骤:

- [0024] 1) 样品前处理；
- [0025] 2) 用所述的检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条进行检测；
- [0026] 3) 用荧光检测仪分析检测结果。
- [0027] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果：
- [0028] (1) 特异性强、灵敏度高：本试纸条采用将荧光微球标记的抗盐酸克仑特罗单克隆抗体包埋在样品结合垫上,具有亲水性佳、可大容量吸附抗体偶联物、迅速重湿润、抗体结合物释放充分、性能好、释放快、形态好等优势,从而减少误差,降低成本,增加整个体系的反应灵敏度；
- [0029] (2) 荧光微球表面包裹了聚苯乙烯,实现了对荧光物质异硫氰酸荧光素的保护,减少了外界环境的干扰,增加了荧光微球的稳定性及荧光寿命；
- [0030] (3) 荧光微球表面修饰活性基团—COOH,采用化学偶联的方法来标记抗体,形成抗体与微球的稳定结合。

附图说明

- [0031] 图 1 为荧光微球免疫层析试纸条剖面结构示意图；
- [0032] 图 2 为荧光微球免疫层析试纸条俯视图；
- [0033] 图 3 为盐酸克仑特罗半抗原合成路线图；
- [0034] 图 4 为盐酸克仑特罗半抗原核磁共振氢谱图。

具体实施方式

- [0035] 下面结合实施例及附图对本发明做进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。
- [0036] 实施例 1 检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条的构成
- [0037] 一、试纸条(图 1、图 2)
- [0038] 所述试纸条是由底板、样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成；
- [0039] 所述样品结合垫 1、硝酸纤维素膜 2 和吸水垫 3 依次按顺序搭接粘贴在底板 6 上,样品结合垫的末端与硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品结合垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐；
- [0040] 所述硝酸纤维素膜上固定有检测区 4 和质控区 5,检测区喷涂有盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物(盐酸克仑特罗半抗原-卵清蛋白偶联物),质控区喷涂有羊抗鼠抗体；
- [0041] 所述底板为 PVC 底板；所述样品结合垫为玻璃棉；所述吸水垫为吸水纸。
- [0042] 实施例 2 检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条的制备
- [0043] 检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条的制备方法主要包括以下步骤：
- [0044] 1) 样品结合垫的制备：用市售的荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将样品结合垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备；
- [0045] 2) 硝酸纤维素膜的制备：将盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区；将羊抗鼠抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范

围,制成质控区;

[0046] 3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴包埋有荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体的样品结合垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为荧光微球免疫层析试纸条。

[0047] 下面分步详细叙述:

[0048] (一) 各部件的制备

[0049] 1、盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

[0050] 盐酸克仑特罗是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0051] (1) 盐酸克仑特罗半抗原的制备(图3)

[0052] 步骤一:取 1.4g 盐酸克仑特罗,溶于 25mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,0℃下分 3 次加入 1.8g 氯铬酸吡啶(PCC),逐步升温到室温,继续反应 3h 后,除去大部分溶剂,乙酸乙酯萃取,洗涤,干燥,除去溶剂后柱层析纯化,得到白色固体,为盐酸克仑特罗氧化物;

[0053] 步骤二:取 1.0g 步骤一所得的盐酸克仑特罗氧化物,溶于 20mL DMF 中,加入 1mL 丙二胺,60℃反应 10h,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为盐酸克仑特罗的丙二胺单缩合物,即为盐酸克仑特罗半抗原。

[0054] 取上述产物经核磁共振氢谱测定,如图 4 所示,1.8~3.7ppm 之间增加的 3 组丙二胺片段亚甲基信号峰,说明半抗原合成成功。

[0055] (2) 免疫原的制备

[0056] 取牛血清白蛋白(BSA)50mg 用 4mL 水溶解;取碳化二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)各 50mg 用 2mL 水溶解完全后加入蛋白溶液中,室温搅拌反应 30min,即可得到反应液 A;取半抗原 15mg 用 2mL DMF 溶解后,缓慢加入到反应液 A 中,室温搅拌反应 24h;用 0.02mol/L 的 PBS 透析 3d,每天更换 3 次透析液,以除去未反应的小分子物质;分装,于 -20℃保存备用。

[0057] (3) 包被原的制备

[0058] 制备方法同免疫原的制备,将 BSA 替换为卵清蛋白(OVA)即得包被原。

[0059] (4) 盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物的鉴定

[0060] 将盐酸克仑特罗半抗原、载体蛋白、盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物用 pH7.4 的 PBS 缓冲液配成 0.5mg/mL 的溶液,以 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液调零,用紫外分光光度计在波长 200~800nm 范围内扫描,得到盐酸克仑特罗半抗原、载体蛋白、盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线。三者出现不同的吸收曲线,表明盐酸克仑特罗半抗原与载体蛋白偶联成功。

[0061] 2、盐酸克仑特罗单克隆抗体的制备

[0062] (1) 动物免疫

[0063] 将步骤 1 得到的免疫原注入 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为 150 μg/只,使其产生抗血清。

[0064] (2) 细胞融合和克隆化

[0065] 取产生特异性抗体的 Balb/c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP20 融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得

到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0066] (3) 细胞冻存和复苏

[0067] 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入 37℃ 水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0068] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0069] 采用体内诱生法,将 Balb/c 小鼠(8 周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7 ~ 14 天后腹腔注射杂交瘤细胞,7 ~ 10 天后采集腹水。经辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经 SDS-PAGE 电泳鉴定,小瓶分装, -20℃ 保存。

[0070] 3、羊抗鼠抗抗体的制备

[0071] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0072] 4、荧光微球标记抗盐酸克仑特罗单克隆抗体的制备

[0073] (1) 活化:取市售的内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液 100 μ L 混悬于 900 μ L 活化缓冲液中,于 4℃ 10000r/min 离心 10min 后弃上清,重悬微球于 1mL 活化缓冲液中,以此法洗涤微球 2 次,加入适量活化剂,混匀后室温震荡活化 10min;

[0074] (2) 偶联:将(1)所述混悬液于 4℃ 10000r/min 离心 10min 后弃上清,重悬于偶联缓冲液中,以此法洗涤微球 2 次,加入 10 ~ 20 μ L 抗盐酸克仑特罗单克隆抗体溶液(蛋白浓度 1mg/mL),混匀后室温震荡偶联 120min;

[0075] (3) 封闭:将(2)所述混悬液于 4℃ 10000r/min 离心 10min 后弃上清,重悬于封闭缓冲液中,以此法洗涤微球 1 次,混匀后室温震荡封闭 30min;

[0076] (4) 贮存:将(3)所述混悬液于 4℃ 10000r/min 离心 10min 后弃上清,重悬于贮存缓冲液中,以此法洗涤微球 1 次,混匀后于 4℃ 避光保存。

[0077] 所述活化缓冲液为 pH5.5 ~ 6.5、0.05mol/L 的 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸(MES) 缓冲液。

[0078] 所述活化剂为水溶性碳二亚胺,其中摩尔质量比 EDC : NHS : COOH=(1.5 ~ 3) : (8 ~ 20) : 1,临用前用活化缓冲液稀释至所需浓度。

[0079] 所述偶联缓冲液为 pH7.5 ~ 8.5、0.05mol/L 的硼酸盐缓冲液(避免使用存在游离胺的溶剂)。

[0080] 所述封闭缓冲液为含 0.1 ~ 0.4mol/L 伯胺(盐酸羟胺、乙醇胺或氨基乙醇)、1% ~ 10%BSA 的 pH7.4 的 PB 缓冲液。

[0081] 所述贮存缓冲液为含 0.01%Na₃N₂、0.1%BSA 的 pH7.4 的 PB 缓冲液。

[0082] 5、样品结合垫的制备

[0083] (1) 将样品结合垫用含牛血清白蛋白(BSA 在缓冲体系中的终浓度为 0.5% 体积百分含量)、pH7.2、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液均匀浸泡 2h,37℃ 下烘干 2h;

[0084] (2) 将贮存的荧光微球标记的抗盐酸克仑特罗单克隆抗体以贮存缓冲液稀释后,将(1)处理过的样品结合垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后备用。

[0085] 6、硝酸纤维素(NC)膜的制备

[0086] 用 0.05mol/L、pH7.2 的 PBS 缓冲液将盐酸克仑特罗半抗原 - 卵清蛋白偶联物稀释

到 100 μ g/mL,用 Isoflow 点膜仪将其喷涂于 NC 膜上的检测区(T),喷膜量为 1.0 μ L/cm;用 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到 200 μ g/mL,用 Isoflow 点膜仪将其喷涂于 NC 膜上的质控区(C),喷膜量为 1.0 μ L/cm。将制备好的 NC 膜置于 37 $^{\circ}$ C 条件下干燥 2h,备用。

[0087] (二) 试纸条的组装

[0088] 将样品结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,样品结合垫的末端与硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品结合垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成 3.96mm 宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡。盐酸克仑特罗荧光微球免疫层析试纸卡在 2~8 $^{\circ}$ C 阴凉避光干燥保存,有效期为 12 个月。

[0089] 实施例 3 检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条的应用

[0090] 1、样品前处理

[0091] (1) 尿液样本

[0092] 取清亮尿液样本直接测定,样本必须收集在洁净干燥、不含任何防腐剂的塑料尿杯或玻璃容器中;若不能及时送检,在 2~8 $^{\circ}$ C 冷藏可保存 24h,若长期保存需置于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻,切忌反复冻融。

[0093] (2) 动物组织样本

[0094] 取已去脂肪的动物组织样本于均质器中 10000r/min 均质 1min;称取 2.0g \pm 0.05g 均质好的组织样本至 4mL 聚苯乙烯离心管中,加入 500 μ L 样本提取液(0.35mol/L 的 PB 缓冲液),涡动 1min;放入 80 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 10min 后,4000r/min 离心 5min,冷却至室温,待检。

[0095] 2、用试纸条检测

[0096] 吸取 100 μ L 待检样本溶液垂直滴加于试纸卡加样孔中,液体流动时开始计时,反应 10min;将试纸卡插入 KFT-100A 型荧光检测仪的承载器中,通过触摸显示屏选择待检项目,按下“开始检测”按键,荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试;通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

[0097] 3、检测结果分析

[0098] 测试完成后,仪器将根据检测得到的荧光信号的强弱,自动计算出尿液、动物组织样本中盐酸克仑特罗的浓度值,并根据预设的阈值给出阴阳性判断。

[0099] 阴性(-):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阴性,表示样本中不含有盐酸克仑特罗或其浓度低于检测限。

[0100] 阳性(+):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阳性,表示样本中盐酸克仑特罗浓度等于或高于检测限。

[0101] 无效:若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0102] 实施例 4 检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条技术参数的确定

[0103] 1、灵敏度试验

[0104] 将盐酸克仑特罗标准品分别稀释成 0.5、1、2 μ g/L,所用稀释液为 pH7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0105] 用荧光微球免疫层析试纸条进行检测,结果为:盐酸克仑特罗标准品浓度为

0.5 $\mu\text{g/L}$ 时, 荧光检测仪检测为阴性; 盐酸克仑特罗标准品浓度为 1、2 $\mu\text{g/L}$ 时, 荧光检测仪检测为阳性, 表明本试纸条检测盐酸克仑特罗的灵敏度为 1 $\mu\text{g/L}$ 。

[0106] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0107] 取已知盐酸克仑特罗含量大于 1 $\mu\text{g/L}$ 的阳性猪尿样本和阳性猪肉样本各 20 份, 浓度小于 1 $\mu\text{g/L}$ 的阴性猪尿样本和阴性猪肉样本各 20 份, 用 3 个批次生产的荧光微球免疫层析试纸条分别进行检测, 计算其阴阳性率。结果见表 1。

[0108] 表 1 检测阳性、阴性样本结果

[0109]

浓度 批次	阳性猪尿样本 (20 份)	阴性猪尿样本 (20 份)	阳性猪肉样本 (20 份)	阴性猪肉样本 (20 份)
1	20 份阳性	20 份阴性	20 份阳性	20 份阴性
2	20 份阳性	20 份阴性	20 份阳性	20 份阴性
3	20 份阳性	20 份阴性	20 份阳性	20 份阴性

[0110] 结果表明: 用 3 个批次生产的试纸条检测阳性样本时, 结果全为阳性, 可知阳性符合率为 100%, 假阴性率为 0; 检测阴性样本时, 结果全为阴性, 可知阴性符合率为 100%, 假阳性率为 0。说明本发明的检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条可以对动物尿液和动物组织中盐酸克仑特罗残留进行快速检测。

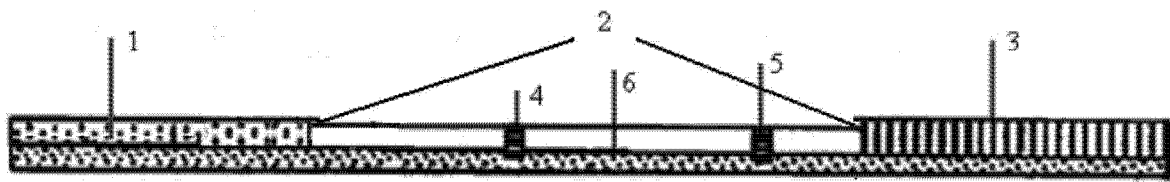


图 1

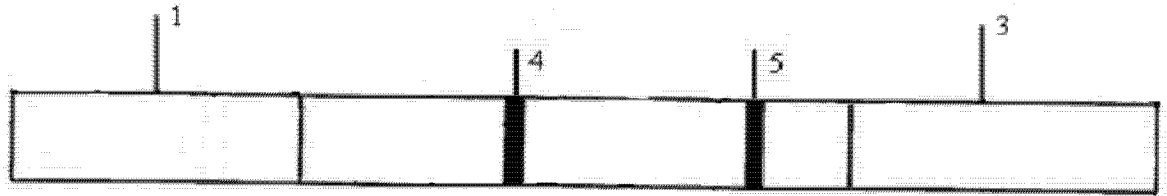


图 2

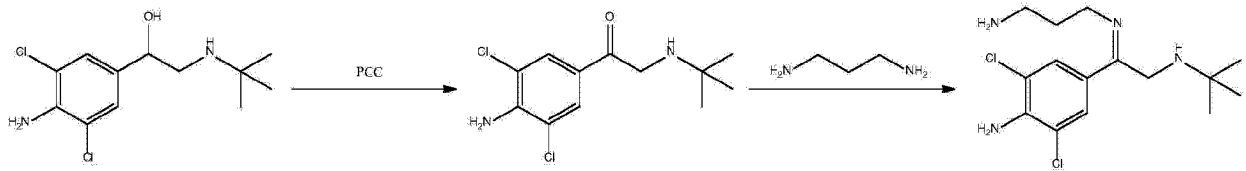


图 3

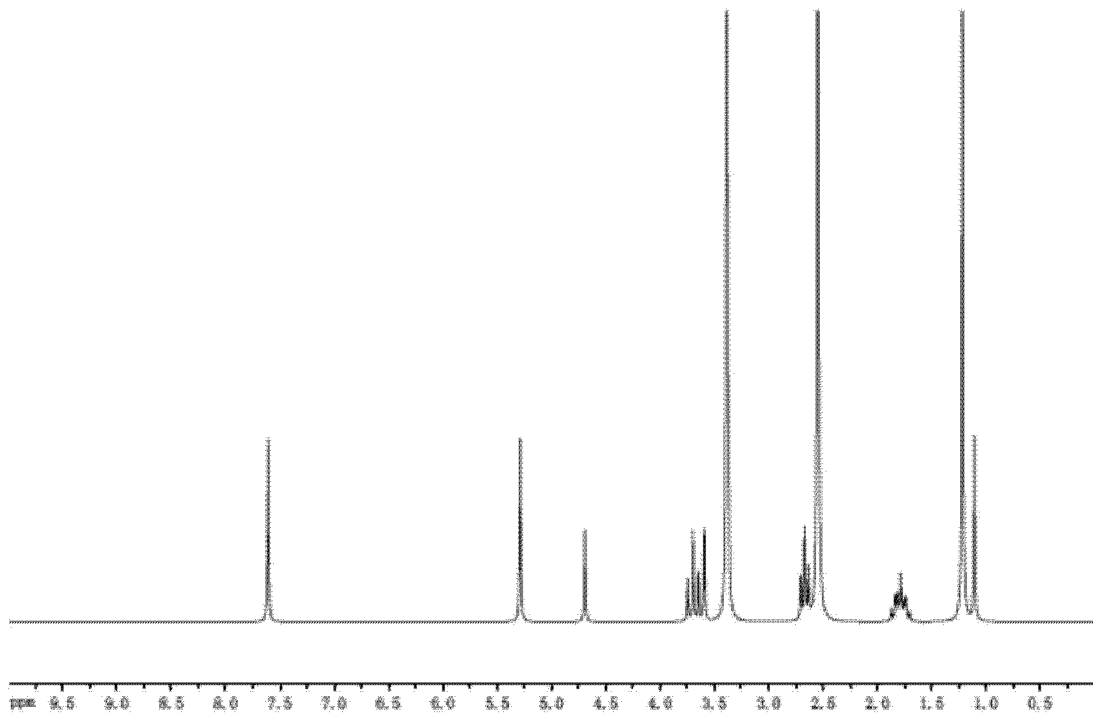


图 4

专利名称(译)	检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104849467A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201410052593.6	申请日	2014-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京勤邦生物技术有限公司		
[标]发明人	何方洋 冯才伟 罗晓琴 万宇平 朱亮亮 杨学林 冯月君 龙光宗		
发明人	何方洋 冯才伟 罗晓琴 万宇平 朱亮亮 杨学林 冯月君 龙光宗		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/582		
其他公开文献	CN104849467B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测盐酸克仑特罗残留的荧光微球免疫层析试纸条及其制备方法和应用。试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，样品结合垫上包埋有荧光微球标记的抗盐酸克仑特罗单克隆抗体，硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区，检测区喷涂有盐酸克仑特罗半抗原-载体蛋白偶联物，质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体。本发明主要用于盐酸克仑特罗残留的检测，具有灵敏度高、检测快速、操作方便、经济实用等优点。

