

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/532

G01N 33/558

G01N 33/543

G01N 33/577



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03153346.9

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1232825C

[22] 申请日 2003.8.11 [21] 申请号 03153346.9

[71] 专利权人 江西中德生物工程有限公司

地址 330029 江西省南昌市高新一路建昌工业园区海外大厦南 210

[72] 发明人 陈高明 李 林

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限公司

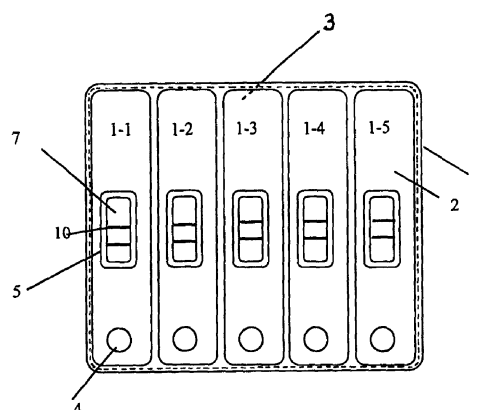
代理人 何文彬

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 4 页

[54] 发明名称 检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸及其检测方法

[57] 摘要

本发明涉及检测盐酸克伦特罗 (clenbuterol, Cl) 的参比免疫层析试纸及其检测方法。该试纸包括两种形式：A. 试纸由底卡、面卡和参比免疫层析试纸组成，面卡上预留加样孔和观察窗；B. 试纸由底卡、面卡、参比免疫层析试纸和样品杯组成，面卡上预留观察窗。单元试纸条的层析膜上有 1-4 条盐酸克伦特罗抗体或盐酸克伦特罗载体蛋白偶联物线状点样的检测线；示踪粒子结合垫上有示踪粒子标记盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物的结合物或示踪粒子标记盐酸克伦特罗抗体的结合物。本发明的试纸结构简单、使用方便、保存时间长，检测步骤少、快速、准确，适合于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象样品的 Cl 进行非批量、多个样品的现场快速筛查和监控。



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

1. 检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸，其特征在于它是以下 A、B 二种形式之一：

A. 试纸由底卡(1)、面卡(2)和参比免疫层析试纸芯(3)组成，其中由 2-10 条单元试纸条并排组成的参比免疫层析试纸芯(3)固定在底卡和面卡之间，面卡上预留加样孔(4)和观察窗(5)，加样孔的位置与单元试纸条的样品垫(6)对应，观察窗的位置与单元试纸条的层析膜(7)对应；

B. 试纸由底卡(1)、面卡(2)、参比免疫层析试纸芯(3)和样品杯(8)组成，其中由 2-10 条单元试纸条并排组成的参比免疫层析试纸芯(3)固定在底卡和面卡之间，单元试纸条的样品垫(6)伸出底卡和面卡之外，面卡上预留观察窗(5)，观察窗的位置与单元试纸条的层析膜(7)对应，样品杯位于参比免疫层析试纸芯之下，每个样品杯的位置与每条单元试纸条对应；

单元试纸条的层析膜(7)上有 1-4 条用盐酸克伦特罗抗体(9)线状点样的检测线(10)，单元试纸条的示踪粒子结合垫(11)上有示踪粒子标记的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物(12)的结合物(13)；或者，单元试纸条的层析膜上有 1-4 条盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物(12)线状点样的检测线(10)，单元试纸条的示踪粒子结合垫(11)上有示踪粒子标记的盐酸克伦特罗抗体(9)的结合物(14)。

2. 根据权利要求 1 所述的检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸，其特征在于单元试纸条上的盐酸克伦特罗抗体线状点样的检测线，或盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物线状点样的检测线为 1-2 条。

3. 一种用权利要求 1 所述的检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸检测盐酸克伦特罗的方法，其特征在于它包括按以下顺序进行的步骤：

[1] 样品处理；

[2] 在形式 A 的参比免疫层析试纸芯的加样孔(4)上分别加入盐酸克伦特罗标准和样本，加入盐酸克伦特罗标准与加入样本的单元试纸条数为任意比例；或者，将形式 B 的

参比免疫层析试纸芯的单元试纸条的样品垫(6)插入对应的样品杯(8)中,在样品杯(8)中原加有盐酸克伦特罗标准和样本,加入盐酸克伦特罗标准与加入样本的样品杯数为任意比例;

[3]用以下两种方法中的任何一种检测样本中盐酸克伦特罗的浓度:

①比较在相同的位置,样本单元试纸条与标准单元试纸条出现条带的时间,样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比某标准单元试纸条出现的时间晚,则样本内盐酸克伦特罗浓度大于某标准浓度;

②在相同时间内,比较样本单元试纸条和标准单元试纸条出现的条带颜色的深浅,在相同时间内,样本单元试纸条在相同位置出现条带的颜色比某标准单元试纸条出现的颜色浅,则样本内盐酸克伦特罗浓度大于某标准浓度。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中盐酸克伦特罗的检测下限为 1 ng/ml 。

检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸及其检测方法

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体地说是涉及检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸及其检测方法。

背景技术

盐酸克伦特罗 (clenbuterol, C1) (俗称“瘦肉精”), 化学名称为 α -[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐, 又名双氯胺、氯哮素、克喘宁, 为 β -肾上腺素激动剂的一种。用 C1 喂养生猪, 可提高瘦肉率, 但人食用含 C1 过量的肉品, 会出现心率过速、心悸、肌肉震颤等心血管系统和神经系统的不良反应, 严重危害人体健康。农业部、对外贸易经济合作部和国家出入境检验检疫局等部门多次发文严令禁止在动物生产中使用 β -肾上腺素激动剂。但国内部分地区仍存在非法生产、使用“瘦肉精”等 β -激动剂类产品的现象, 并发生多起中毒事件。许多国家对饲料和食品中的 C1 实施了严格的监控。在养殖场, C1 监测最经常采集的活体样品是尿液, 其它易于采集的有效样品如血浆, 奶, 粪便和饲料也被经常使用。

目前, 测定 C1 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)、酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 和放射免疫测定法 (RIA) 等。目前免疫测定法、ELISA 和 GC-MS 的灵敏度能较好地满足 C1 残留分析要求, 应用较多, 检测限通常低于 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 前者是主要的筛选方法, 后者则是成熟的确证方法。由于以上方法均需借助高档的仪器和设备, 成本高, 同时对操作人员需要特殊培训, 实验结果无法立即显示。因此不适合于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象的快速筛查和监控。

ELISA 检测 C1 已有多篇文献报道, 目前公开的专利为“一种盐酸克伦特罗酶免疫检测试剂盒及其检测方法”(申请号, 02137941.6)。

免疫层析是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析

方式，它通常以条状纤维层析材料为固相，通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动，并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体（如抗体或抗原）发生高特异、高亲和性的免疫反应。层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域（检测线），通过酶反应、或直接利用可目测的标记物（如胶体金）所看到的直观的实验现象（如显色）而获得测定结果。而游离标记物（即未与待测物结合的标记物）则越过检测带，达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金、乳胶、胶体硒、明胶等，其中运用最成功的标记物为胶体金。

免疫层析用于测定 C1，目前公开的相关专利如下：

①样本中的 C1/层析膜上的 C1 共同竞争示踪粒子标记的限量抗体，通过检测条带出现与否判断结果。如本发明人先前公开的发明专利“一种免疫层析一步法检测 β -肾上腺素激动剂类药物的方法及试纸的制备”（申请号，02131321.0）。另外，发明专利“盐酸克伦特罗快速检测试纸条”（申请号，02101928.2）和实用新型专利“盐酸克伦特罗快速检测试纸条”（申请号，02202033.0）也用了类似的方法。

②样本中的 C1/示踪粒子标记的 C1 共同竞争层析膜上的限量抗体，通过检测条带出现与否判断结果。例如，公开的实用新型专利“盐酸克伦特罗快速检测试纸条（II）”（申请号，02228104.5）。

③样本中的 C1/示踪粒子标记的 C1 共同竞争层析膜上的限量抗体，通过检测条带出现的条数判断结果。例如，公开的专利“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”（申请号，02139704.X）。

上述 3 种免疫层析检测模式有一个共同的特点，就是用于定量时没有标准品作参照，必需通过检测体系中加入 C1/抗 C1 抗体的量或选择严格的检测材料，通过控制检测灵敏度的方法来定量。由此产生的缺点为：生产工艺复杂化，或定量的准确性随着保存时间的延长而发生变化。另外，上述 3 种免疫层析检测模式不能同时检测多个样本，检测模式 1 和 2 不能对盐酸克伦特罗具体含量作一个初步判断。而 ELISA 检测 C1 操作复杂，检测步骤多，需要的试剂多，不

能常温保存，只能批量检测，不适合于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象的快速筛查和监控。因此，迫切需要有一种简单、快速、便于保存、适合于非批量、多个样品现场筛查C1的检测试纸，并建立其检测的方法。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中存在的不足之处，而提供一种结构简单、使用方便、保存时间长、可在并排的2-10张单元试纸条上分别加入样本和标准品而同时进行非批量、多个样品检测的一种检测盐酸克伦特罗(clenbuterol, C1)浓度的参比免疫层析试纸。

本发明的另一个目的是提供一种步骤简单、快速、灵敏、准确的利用本发明的参比免疫试纸检测盐酸克伦特罗的方法。

本发明的目的通过以下的方案来实现：

制备检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸，它是以下A、B两种形式之一：

A. 试纸由底卡、面卡和参比免疫层析试纸芯组成，其中由2-10条单元试纸条并排组成的参比免疫层析试纸芯固定在底卡和面卡之间，面卡上预留加样孔和观察窗，加样孔的位置与单元试纸条的样品垫对应，观察窗的位置与单元试纸条的层析膜对应；

B. 试纸由底卡、面卡、参比免疫层析试纸芯和样品杯组成其中由2-10条单元试纸条并排组成的参比免疫层析试纸芯固定在底卡和面卡之间，单元试纸条的样品垫伸出底卡和面卡之外，面卡上预留观察窗，观察窗的位置与单元试纸条的层析膜对应，样品杯位于参比免疫层析试纸芯之下，每个样品杯的位置与每条单元试纸条对应。

单元试纸条的层析膜上有1-4条盐酸克伦特罗抗体线状点样的检测线，单元试纸条的示踪粒子结合垫上有示踪粒子标记的盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物的结合物；或者，单元试纸条的层析膜上有1-4条盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物线状点样的检测线，示踪粒子结合垫上有示踪粒子标记的盐酸克伦特罗抗体的结合物。单元试纸条层析膜上的盐酸克伦特罗抗体线状点样的检测线或盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物线状点样的检测线优选为1-2条。

用本发明的检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸检测盐酸克伦特罗的方法，包括按以下顺序进行的步骤：

[1] 样品处理；

[2] 在形式 A 的参比免疫层析试纸芯的加样孔上分别加入盐酸克伦特罗标准和样本，加入 C1 标准与加入样本的单元试纸条数为任意比例；或者，将形式 B 的参比免疫层析试纸芯的单元试纸条的样品垫插入对应的样品杯中，样品杯中原来加有盐酸克伦特罗标准和样本加入盐酸克伦特罗标准与加入样本的样品杯数为任意比例；

[3] 用以下两种方法中的任何一种检测样本中盐酸克伦特罗的浓度：

① 比较在相同的位置，样本单元试纸条与标准单元试纸条出现条带的时间，样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比某标准单元试纸条出现的时间晚，则样本内盐酸克伦特罗浓度大于某标准浓度；

② 在相同时间内，比较样本单元试纸条和标准单元试纸条出现的条带颜色的深浅，在相同时间内，样本单元试纸条在相同位置出现条带的颜色比某标准单元试纸条出现的颜色浅，则样本内盐酸克伦特罗浓度大于某标准浓度。

用本发明的方法检测盐酸克伦特罗时，其检测下限为 1 ng/ml 。

本发明的检测盐酸克伦特罗参比免疫层析试纸制作方法如下：

[1] 单元试纸的制作

单元试纸条的层析膜上的检测线用以下的模式 1 或模式 2 制备：

模式 1：用抗盐酸克伦特罗抗体 (Clenbutero Antibody, C1-Ab) 在层析膜上线状点样作为检测线。将硝酸纤维素膜 (NC 膜) 按 $10-35\text{ mm}$ 宽的尺寸剪裁。C1-Ab 用缓冲液充分透析后，将浓度调整为 $0.01-5\text{ mg/ml}$ ，在膜上分别线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 $4-16\text{ mm}$ ，两条检测线之间的距离为 $2-12\text{ mm}$ 。

模式 2：用盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物 (Clenbuterol-carrier protein, C1-Cp) 在层析膜上线状点样作为检测线。将 NC 膜按 $10-35\text{ mm}$ 宽的尺寸剪裁。C1-Cp 溶液用缓冲液充分透析后，将浓度调整为

0.01-5mg/ml, 在膜上分别线状点样作为检测线, 检测线点样位置离膜底边 4-16mm, 两条检测线之间的距离为 2-12 mm。

根据层析的原理, 层析的距离离加样孔越远, 层析的速度越慢, 分辨率越高。本发明利用了层析的原理, 采用多条层析膜检测线, 以提高分辨率, 本发明根据被测样品中 C1 含量的范围, 采用的层析膜检测线为 1-4 条, 优选为 1-2 条。

单元试纸条的示踪粒子结合物垫用以下的模式 3 或模式 4 制备:

模式 3: 用示踪粒子标记的 C1-Cp 结合物分散在玻璃纤维纸上, 作为示踪粒子结合物垫;

模式 4: 用示踪粒子标记的 C1-Ab 结合物分散在玻璃纤维纸上, 作为示踪粒子结合物垫。

制备示踪粒子结合物垫的示踪粒子选自: 胶体金颗粒、胶体硒颗粒、乳胶颗粒, 其制备和标记方法如下:

(a) 胶体金颗粒:

胶体金溶胶制备: 取 0.01% 四氯化金水溶液 200ml, 加热至沸腾, 加入 1-20ml 1% 柠檬酸钠水溶液, 煮沸 5min, 出现橙红色, 胶体金颗粒直径由电镜测定为 10-80nm;

胶体金标记 C1-Cp/C1-Ab: 取 50ml 胶体金, 用 0.1mol/L 碳酸钾调 pH (标记 C1-Cp 选用 pH6.0-7.5, 标记 C1-Ab 选用 pH7.5-9.0), 搅拌下将胶体金溶胶和 C1-Cp/C1-Ab 混合, 再加入聚乙二醇水溶液, 使其终浓度为 0.05%。将粗制品在 4,000-20,000 × g 下离心 45min, 沉淀用生理盐水混悬至 1.5ml, 4℃ 保存。

(b) 胶体硒颗粒:

胶体硒溶胶制备: 在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550ml 和聚丙烯酸 5-20g, 通氮室温搅拌并加入水合肼 40-100ml, 继续搅拌 10-30 分钟。将亚硒酸 5-15g 溶解于 280ml 水中, 室温搅拌下滴入反应混合液得到 50-250nm 红色硒溶胶。

胶体硒标记 C1-Cp/C1-Ab: C1-Cp/C1-Ab 用 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(标记 C1-Cp 选用 pH6.0-7.5, 标记 C1-Ab 选用 pH7.5-9.0)配成 1-8mg/ml 浓度溶液,

取 25 μ l 加入 25ml 硒溶胶中，室温搅拌 10 分钟后加 1ml 1% 的 PEG 8000，混匀，于 4℃ 以 3,000-10,000rpm 离心 5 分钟，得到松软的红色沉淀，用含 0.05%NaN₃ 的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液。

(c) 乳胶颗粒：

彩色乳胶颗粒购自 Bangs Laboratories 公司。

乳胶颗粒标记 Cl-Cp/Cl-Ab：用磷酸盐缓冲液将乳胶稀释到 1% 浓度，搅拌下加入一定量的 Cl-Cp/Cl-Ab 溶液，室温搅拌 30 分钟后于 37℃ 水浴保温 60 分钟，4℃ 放置 4-5 小时。15,000rpm 离心 30 分钟，用适量磷酸盐缓冲液重悬。

单元试纸用以下的模式 5 或模式 6 组装，其中的衬垫为涂布粘胶的塑料板或纸板：

模式 5：参照图 3，在衬垫上先加上用模式 1 制备检测线的层析膜、然后向下依次加上用模式 3 制备的示踪粒子结合物垫、样品垫、最后在层析膜之上加上吸水垫；

模式 6：参照图 4，在衬垫上先加上用模式 2 制备检测线的层析膜、然后向下依次加上用模式 4 制备的示踪粒子结合物垫、样品垫、最后在层析膜之上加上吸水垫。

试纸组装完成后剪切成适当宽度，即为单元试纸条。

[2] 参比免疫层析试纸的制作

把 2-10 张单元试纸条并排固定在底卡上，形成参比免疫层析试纸芯，底卡一般为塑料卡，它能使衬垫上的层析膜、示踪粒子结合物垫、样品垫和吸水垫紧密结合，并排的单元试纸条的表面用面卡压紧，面卡一般也为塑料卡，它可保护试纸，使其不受损坏。根据本发明的参比免疫层析试纸适用于非批量、多个样品测定的特征，选用 2-10 张单元试纸条为合适。

用以下的模式 7 或模式 8 制作检测盐酸克罗特伦的参比免疫层析试纸：

模式 7：参照图 1，将单元试纸条固定在底卡上，形成参比免疫层析试纸芯，试纸表面用面卡压紧，面卡上预留加样孔和观察窗；加样孔的位置与单元试纸条的样品垫对应，观察窗的位置与单元试纸条的层析膜对应。检测时从加样孔加样，结果从观察窗读取。

模式 8：参照图 2，参比免疫层析试纸分为上、下两部分，上部为并排的单元试纸条，下部为样品杯，单元试纸条样品垫以上的部分固定在底卡上，试纸表面用面卡压紧，样品垫伸出底卡和面卡之外，面卡上对应于层析膜的位置预留观察窗。检测时在样品杯中分别装入 C1 标准品和样本，伸出底卡和面卡的样本垫同时插入下部的样品杯中，结果从观察窗读取。

本发明的检测盐酸克伦特罗参比免疫层析试纸检测盐酸克伦特罗的方法如下：

[1]待检样品的处理：

1) 尿样无需处理：

取适量尿样直接进行试验（尿样混浊时建议离心或过滤）。

2) 低脂肪含量的肝、肉、组织：

取绞碎的样品 5g，加入 5mM HCl 25ml 摇动作用 1.5h 使其充分匀浆；取 6g 匀浆（相当于 1.0 肝）置于离心管中离心，取上清液置另一离心管，加入 1M NaOH 300 μ l 混合作用 15 分钟，加 0.5M KH₂PO₄ (pH3.0) 45ml，迅速混匀，4 $^{\circ}$ C 下至少放置 1.5 小时或过夜处理。4000 \times g 离心 1 分钟或 10-15 $^{\circ}$ C 高速离心，取上清液（几乎清亮），平衡至室温。

3) 高脂肪肉类组织：

取绞碎样品 5 克加入 PH8.5，50mM Tris 缓冲液 25ml，振荡作用 0.5 小时使其充分匀浆；加入 15ml 正庚烷，振荡 5 分钟，4000 \times g 或 10-15 $^{\circ}$ C 高速离心 5 分钟，用灭菌吸管移去上层庚烷液和 中层脂肪液；用 15ml 正庚烷重复提取一次，于水溶性肉匀浆中加入 0.5ml HCl，振荡 1 小时；取 6 克肉匀浆（相当于 1.0g 肉或组织）离心，上清液置另一离心管，加入 1M NaOH 300 μ l 混合作用 15 分钟；加 0.5M KH₂PO₄ (pH3.0) 45ml，迅速混匀，4 $^{\circ}$ C 下至少放置 1.5 小时或过夜处理。4000 \times g 离心 1 分钟或 10-15 $^{\circ}$ C 高速离心，取上清液（几乎清亮），平衡至室温。

5) 饲料样品处理方法

用乳钵研碎饲料样品，称 2.0g 研碎的饲料样品，加入 2ml 1M HCl，加入 16ml 双蒸水。旋流 3 分钟，放振荡器上振荡 15 分钟。2000rpm 离心 20 分钟，转移出上清液并加入 2ml 1M NaOH 至上清液中混合，检查 pH 值是否在 6.5-7.5 之间。2000rpm 离心 20 分钟，转移出上清液。

(如果上清液仍然浑浊可提高转速或用滤纸过滤)。用双蒸水将上清液稀释 10 倍(加 100 μ l 上清液到 900 μ l 双蒸水中并且混合好)，此时样品总的稀释倍数为 100。取适量的稀释上清液进行检测。

[2] 加样：

在参比免疫层析试纸的结构为模式 7 的场合，在 2-10 张单元条试纸条的加样孔上分别加入 C1 标准和样本，加入 C1 标准与加入样本的单元试纸条数为任意比例；在参比免疫层析试纸的结构为模式 8 的场合，在 2-10 个样品杯中分别加入 C1 标准和样本，加入 C1 标准与加入样本的样品杯数为任意比例，然后将伸出底卡和面卡外的单元试纸条的样品垫插入样品杯内进行测试。

[3] 检测：

加样后，按照下述两种检测方式，根据检测线出现时间，或一定时间内检测线的颜色差异来判断结果。

① 样本单元试纸条在相同位置出现条带的时间比某标准单元试纸条出现的时间晚，则样品内 C1 浓度大于某标准浓度。

② 在相同时间内，样本单元试纸条在相同位置出现条带的颜色比某标准单元试纸条出现的颜色浅，则样品内 C1 浓度大于某标准浓度。

本发明同以往检测 C1 的方法，特别是 ELISA 相比有如下优点：

① 操作简便，只需 1-2 个操作步骤；

② 检测速度快，5-15 分钟即可得到结果；

③ 可单份测定也可数份同时测定、室温保存、保存时间长，并可随身携带。

本发明同以往检测 C1 的方法，特别是免疫层析法相比

有如下优点：

- ①用标准单元试纸条作参照，不需要额外的质控线抗体（抗示踪粒子标记物抗体）；
- ②定量的准确性随着保存时间的增长不会发生变化；
- ③检测方式灵活，可根据检测线出现时间或一定时间检测线的颜色差异来判断结果；
- ④可加入一个 C1 标准，也可同时作几个 C1 标准；
- ⑤可检测一个样本，也可同时检测数个样本。

本发明可应用于检测猪尿、人尿、奶制品、粪便、饲料、肉类食品、动物内脏等的 C1 浓度。本发明的试纸的使用单位主要为医院、公检法部门、运动员兴奋剂检测部门、防疫站等国家监测部门等，个人也可使用。

附图说明

图 1. 是参比免疫层析试纸（模式 7）的结构示意图。

图中：1. 底卡；2. 面卡；3. 参比免疫层析试纸芯；4. 加样孔；5. 观察窗；7. 层析膜；10. 检测线；1-1、1-2、1-3、1-4、1-5 为单元试纸条。

图 2. 是参比免疫层析试纸（模式 8）的结构示意图。

图中：1. 底卡；2. 面卡；3. 参比免疫层析试纸芯；5. 观察窗；6. 样品垫；7. 层析膜；10. 检测线；2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 为单元试纸条；8-1、8-2、8-3、8-4、8-5 为样品杯。

图 3. 是参比免疫层析（模式 5）试纸芯的结构示意图。

图中：6. 样品垫；7. 层析膜；9. C1-Ab；10. 检测线；11. 示踪粒子结合物垫；12. C1-Cp 偶联物；13 示踪粒子标记 C1-Cp 偶联物结合物；15. 吸水垫。

图 4. 是参比免疫层析（模式 6）试纸芯的结构示意图。

图中：6. 样品垫；7. 层析膜；9. C1-Ab；10. 检测线；11. 示踪粒子结合物垫；12. C1-Cp 偶联物；14. 示踪粒子标记 C1-Ab 结合物；15. 吸水垫。

本发明的参比免疫层析试纸利用样本中的 C1/示踪粒子标记的 C1 共同竞争层析膜上的限量抗体，或样本中的 C1/层析膜上的 C1 共同竞争示踪粒子标记的限量抗体，根据检测线出现时间，或一定时间内检测线的颜色差异来检测样品中 C1 的原理说明如下：

参照图 3，在样品垫上滴加样本或 C1 标准后，样本或 C1 标准向吸水垫端扩散，使示踪粒子结合物垫上的示踪粒子标记 C1-Cp 偶联物结合物进入样本或 C1 标准的液相，并与其一起向吸水垫端扩散，在层析膜上，样本或 C1 标准中的 C1 与示踪粒子结合物中的 C1-Cp 竞争，阻止示踪粒子结合物和 C1-Ab 的反应。由于扩散速度较快，反应是动态且不完全的。在参比单元试纸条的样品垫上加入 C1 标准后，标准中的 C1 和示踪粒子结合物上的标记 C1 比例是一定的，因此，标准品阻止示踪粒子结合物和 C1-Ab 的反应的速率一定，检测线出现可见颜色所需的时间也就一定。在检测单元试纸条的样品垫上同时加入样本，如果样本中的 C1 浓度大于标准，样本中 C1 阻止示踪粒子结合物的 C1-Cp 和 C1-Ab 反应的速率增大，检测线上的 C1-Ab 富集示踪粒子结合物至可见颜色所需的时间也增加；或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的浅。反之，如果样本中的 C1 浓度小于标准，检测线上的 C1-Ab 富集示踪粒子结合物至可见颜色所需的时间减少；或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的深。根据可见颜色出现的先后，或同一时间内出现的条带的颜色深浅便可判断样本中的 C1 浓度大于或小于标准。

参照图 4，在样品垫上滴加样本或 C1 标准，样本或 C1 标准向吸水垫端扩散，使示踪粒子结合物垫上的示踪粒子结合物进入样本或 C1 标准的液相，并与其一起向吸水垫端扩散，在层析膜上，样本或 C1 标准中的 C1 与检测线上的 C1-Cp 竞争，阻止检测线上的 C1-Cp 和示踪粒子结合物的反应。由于扩散速度较快，反应是动态且不完全的。在参比单元试纸条的样品垫上加入 C1 标准后，标准中的 C1 阻止检测线中的 C1 和示踪粒子结合物反应的速率是一定的，检测线出现可见颜色所需的时间也就一定。在检测单元试纸条的样品垫上同时加入样本，如果样本中的 C1 浓度大于标准，样本中 C1 阻止检测线中的 C1-Cp 和示踪粒子结合物中的 C1-Ab 反应的速率增大，检测线上 C1-Cp 富集示踪粒子结合物至可见颜色所需的时间增加。或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条

的浅。反之，如果样本中的 Cl 浓度小于标准，检测线上 Cl-Cp 富集示踪粒子结合物至可见颜色所需的时间减少。或者，在一定的时间内，检测单元试纸条的检测线条带颜色比参比单元试纸条的深。根据可见颜色出现的先后，或同一时间内出现的条带的颜色深浅便可判断样本中的 Cl 浓度大于或小于标准。

具体实施方式

实施例一：胶体硒参比免疫层析试纸检测尿液的盐酸克伦特罗浓度

1. 单元试纸的制作

[1] 硝酸纤维素层析膜（NC 膜）检测线 10 的制备：

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。盐酸克伦特罗—载体蛋白（Clenbuterol-carrier protein, Cl-Cp）12 的溶液用磷酸盐缓冲液充分透析后，将浓度调整为 1mg/ml，在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 8mm，检测线为 1 条。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min，再置于 1% 牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min，取出吸干水分，于 37℃ 保温 30min，置室温干燥处密封储藏。

[2] 胶体硒结合物垫 11 的制备：

① 胶体硒溶胶制备：在 1 升容量的四颈圆底烧瓶内加入去离子水 550ml 和聚丙烯酸 10g，通氮室温搅拌并加入水合肼 69.5ml，继续搅拌 20 分钟。将 9.63g 亚硒酸溶解于 280ml 水中，室温搅拌下滴入反应混合液内，得到颗粒直为 120nm 的红色硒溶胶。

② 胶体硒标记抗盐酸克伦特罗抗体（clenbuterol antibody, Cl-Ab）9: IgG 型 Cl-Ab 用 20mmol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液配成浓度为 4.6mg/ml 的溶液，取 25μl 加入 pH7.3 的 25ml 硒溶胶中，室温搅拌 10 分钟后加 1% PEG 8000 1ml，混匀，于 4℃ 下，以 5,000rpm 离心 5 分钟，得到松软的红色沉淀，用含 0.05% NaN₃ 的磷酸盐缓冲液配成 1ml 悬液。

③ 将胶体硒标记的 Cl-Ab 结合物 13 分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

[3] 单元试纸的组装：

在衬垫上先加上有 C1-C_p 检测线的 NC 膜 7、然后向下依次加上胶体硒结合物垫 11、样品垫 6、最后在 NC 膜之上加上吸水垫 15。

[4] 单元试纸条的剪切：

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把 10 张单元试纸条并排安装在塑料底卡 1 上，即成为参比免疫层析试纸芯 3，试纸表面用面卡 2 压紧，同时使单元试纸条的样品垫 6 伸出底卡和面卡之外，面卡上对应单元试纸条层析膜 7 的部位预留观察窗 5。试纸下部是和上部单元试纸条位置对应的样品杯 8。

3. 检测方法

在 2 个样品杯中分别加入浓度为 0 和 10ng/ml 的 C1 标准品，其余 8 个加入尿液样本，把上部单元试纸条的样品垫 6 平行插入下部的样品杯中，用以下方式判断结果。

① 反应 15min，观测条带颜色深浅。标准 0ng/ml 单元试纸出现红色条带，标准 10ng/ml 单元试纸出现较弱的浅红色条带。如果尿样单元试纸不出现条带则 C1 浓度大于 10ng/ml；如果尿样单元试纸出现浅红色条带颜色在 0 和 10ng/ml 标准单元试纸之间，则 C1 浓度在 0 和 10ng/ml 之间；如果尿样单元试纸条带颜色和 0ng/ml 标准单元试纸条带颜色一致，则结果为阴性。

② 反应 5min 左右，标准 0ng/ml 单元试纸刚出现较弱红色条带，10ng/ml 单元试纸不出现条带，同时观测尿样单元试纸，如果出现条带为阴性，不出现条带为阳性。

实施例二：胶体金参比免疫层析试纸检测猪肝脏样品中盐酸克伦特罗浓度

1. 单元试纸的制作

[1] NC 膜检测线 10 的制备：

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。C1-Ab 9 用磷酸盐缓冲液充分透析后，将浓度调整为 0.1mg/ml，在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 8mm，检测线为 1 条，两条检测线之间的距离为 6mm。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30min，再置于 1%牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡

30 min, 取出吸干水分, 于 37℃ 保温 30 min, 置室温干燥处密封储藏。

[2] 胶体金结合物垫的制备:

① 胶体金溶胶制备: 取 0.01% 四氯化金水溶液 200 ml, 加热至沸腾, 加入 2 ml 1% 柠檬酸钠水溶液, 煮沸 5 min, 出现橙红色, 胶体金颗粒直径为 35-45 nm;

② 胶体金标记 Cl-Cp 12: Cl-Cp 的载体蛋白选用牛血清白蛋白, 取 50 ml 胶体金, 用 0.1 mol/L 碳酸钾调 pH 到 6.5, 搅拌下加入亲和纯化的 Cl-Cp 5 ml, 再加入聚乙二醇水溶液, 使其终浓度为 0.05%。将粗制品在 12000 × g 下离心 45 min, 沉淀用生理盐水混悬至 1.5 ml 并稀释到 OD₅₂₀ 为 3, 4℃ 保存。

③ 将胶体金标记的 Cl-Cp 结合物 14 分散在厚度为 1 mm 的玻璃纤维纸上, 冻干密封干燥保存。

[3] 单元试纸的组装:

在衬垫上先加上有 Cl-Ab 检测线的 NC 膜 7、然后向下依次加上胶体金结合物垫 11、样品垫 6、最后在 NC 膜之上加上吸水垫 15。

[4] 单元试纸条的剪切:

单元试纸组装完成后剪切成 4 mm 的宽度, 即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把 3 张单元试纸条并排安装在塑料底卡 1 上, 即成为参比免疫层析试纸芯 3, 试纸表面用面卡 2 压紧, 面卡在对应单元试纸的样品垫 6 和层析膜 7 的部位分别预留加样孔 4 和观察窗 5。

3. 检测方法

猪肝脏样本按本说明书所述方法处理, 得到的上清液作为检测样, 检测时在加样孔 4 中分别加入 0 ng/ml、5 ng/ml Cl 标准品和检测样, 结果从观察窗读取, 用以下方式判断结果。

① 反应 15 min, 观测条带颜色的深浅。此时 0 ng/ml、5 ng/ml Cl 标准单元试纸均出现条带, 如检测单元试纸不出现条带, 或条带颜色比 5 ng/ml Cl 标准单元试纸的浅, 则检测样的 Cl > 5 ng/ml; 如检测单元试纸出现的条带颜色

比 5 ng/ml C1 标准单元试纸的深，但比 0 ng/ml 的浅，则检测样的 C1 在 0 ng/ml 和 5 ng/ml 之间。

② 反应 5-10 min，观测条带出现先后。0 ng/ml、5 ng/ml 标准单元试纸出现检测线时未见检测单元条带，则检测样的 C1 > 5 ng/ml；0 ng/ml 标准单元出现检测线时未见 5 ng/ml 标准单元和检测单元出现条带，则检测样的 C1 在 0 ng/ml 和 5 ng/ml 之间。

实施例三：胶体金参比免疫层析试纸检测猪肉样本中盐酸克伦特罗浓度

除检测线为 C1-Cp，检测线为 2 条以外，1. 单元试纸的制作、2. 参比免疫层析试纸制作同实施例二。

3. 检测方法：

猪肉样本按本说明书所述方法处理，得到的上清液作为检测样，检测时在加样孔 4 中分别加入 0 ng/ml、1 ng/ml C1 标准品和检测样，结果从观察窗读取，用以下方式判断结果。

① 反应 15 min，观测条带颜色的深浅。此时 0 ng/ml、1 ng/ml C1 标准单元试纸均出现条带，如检测单元试纸不出现条带，或条带颜色比 1 ng/ml C1 标准单元试纸的浅，则检测样的 C1 > 1 ng/ml；如检测单元试纸出现的条带颜色比 1 ng/ml C1 标准单元试纸的深，但比 0 ng/ml 的浅，则检测样的 C1 在 0 ng/ml 和 1 ng/ml 之间；检测单元试纸出现的条带颜色与 0 ng/ml 标准单元试纸的颜色无明显差异，则检测样的 C1 为阴性。

② 反应 5-10 min，标准单元试纸和检测单元试纸出现的检测线为以下情况时，检测样的 C1 > 1 ng/ml：0 ng/ml 标准单元出现第一条线，1 ng/ml 标准单元和检测单元未出现条带；0 ng/ml 标准单元出现第一、第二条线，1 ng/ml 标准单元出现第一条线，检测单元未出现条带；0 ng/ml 标准单元、1 ng/ml 标准单元均出现第一、第二条线，检测单元出现第一条线。标准单元试纸和检测单元试纸出现的检测线为以下情况时，检测样的 C1 在 0 ng/ml 和 1 ng/ml 之间：0 ng/ml 标准单元、及检测单元均出现第一条线，但 1 ng/ml 标准单元未出现条带；0 ng/ml 标准单元出现第一、第二条线，检测单元出现第一条线但 1 ng/ml 标准单元未出

现条带；0 ng/ml 标准单元检测单元均出现第一、第二条线，1 ng/ml 标准单元均出现第一条线。

检测单元试纸出现的条带数和颜色与 0 ng/ml 标准单元试纸的颜色无明显差异，则检测样的 C1 为阴性。

实施例四：乳胶参比免疫层析试纸检测饲料样本中盐酸克伦特罗浓度

1. 单元试纸的制作

[1] NC 膜 7 上检测线 10 的制备：

将 NC 膜按 25mm 宽的尺寸剪裁。C1-Ab 9 用磷酸盐缓冲液充分透析后，将浓度调整为 0.05 mg/ml，在膜上线状点样作为检测线，检测线点样位置离膜底边 6mm，检测线为 4 条，两条检测线之间的距离为 2.5 mm。点样后的 NC 膜在室温下干燥 30 min，再置于 1% 牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30 min，取出吸干水分，于 37℃ 保温 30 min，置室温干燥处密封储藏。

[2] 乳胶结合物垫的制备：

① 乳胶标记 C1-Cp：彩色乳胶颗粒购自 Bangs Laboratories 公司，C1-Cp 的载体蛋白选用牛血清白蛋白。取 100ml 用磷酸盐缓冲液稀释到浓度为 1% 的乳胶，搅拌下加入 500 μg 的 C1-Cp 溶液，室温搅拌 30 分钟后于 37℃ 水浴保温 60 分钟，4℃ 放置 4-5 小时。15,000 rpm 离心 30 分钟，用适量磷酸盐缓冲液重悬。

② 将乳胶标记的 C1-Cp 结合物 14 分散在厚度为 1mm 的玻璃纤维纸上，冻干密封干燥保存。

[3] 单元试纸的组装：

在衬垫上先加上有 C1-Ab 检测线 10 的层析膜 7、然后向下依次加上胶体金结合物垫 11、样品垫 6、最后在层析膜之上加上吸水垫 15。

[4] 单元试纸条的剪切：

单元试纸组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即为单元试纸条。

2. 参比免疫层析试纸制作

把 4 张单元试纸条并排安装在塑料底卡 1 上，即成为参比免疫层析试纸芯 3，试纸表面用面卡 2 压紧，面卡在对应单元试纸的样品垫 6 和层析膜 7 的部位分别预留加样孔 4

和观察窗 5。

3. 检测流程。

饲料样本处理按本说明书所述方法处理，所得的上清液作为检测样。

检测时在加样孔 4 中分别加入 0 ng/ml Cl 标准品和检样，结果从观察窗读取，用以下方式判断结果。

① 反应 15 min ，观测条带颜色深浅。强阳性 ($>10\text{ ng/ml}$)：标准单元试纸出现条带，检测单元试纸不出现条带。阳性 ($>5\text{ ng/ml}$)：标准单元试纸和检测单元试纸均出现第一条检测线，标准单元试纸出现第二条检测线而检测单元试纸不出现。弱阳性 ($>1\text{ ng/ml}$)：标准单元试纸和检测单元试纸均出现第一、第二条检测线，标准单元试纸出现第三条检测线而检测单元试纸不出现。弱阳性 ($>0.5\text{ ng/ml}$)：标准单元试纸和检测单元试纸均出现第一、第二、第三条检测线，标准单元试纸出现第四条检测线而检测单元试纸不出现。阴性 (0 ng/ml)：标准单元试纸和检测单元试纸出现 2 条检测线颜色无明显差异。

② 反应 $5-10\text{ min}$ ，观测条带出现先后。阳性 ($>5\text{ ng/ml}$)：标准单元出现第一条检测线时未见检测单元条带；阳性 ($>2\text{ ng/ml}$)：标准单元出现第二条检测线时未见检测单元第二条带。弱阳性 ($>1\text{ ng/ml}$)：标准单元出现第三条检测线时未见检测单元第三条带。弱阳性 ($>0.5\text{ ng/ml}$)：标准单元出现第四条检测线时未见检测单元第四条带。阴性 (0 ng/ml)：标准单元和检测单元条带出现无差异。

本发明方法用于生物样品中盐酸克伦特罗的定量检测。

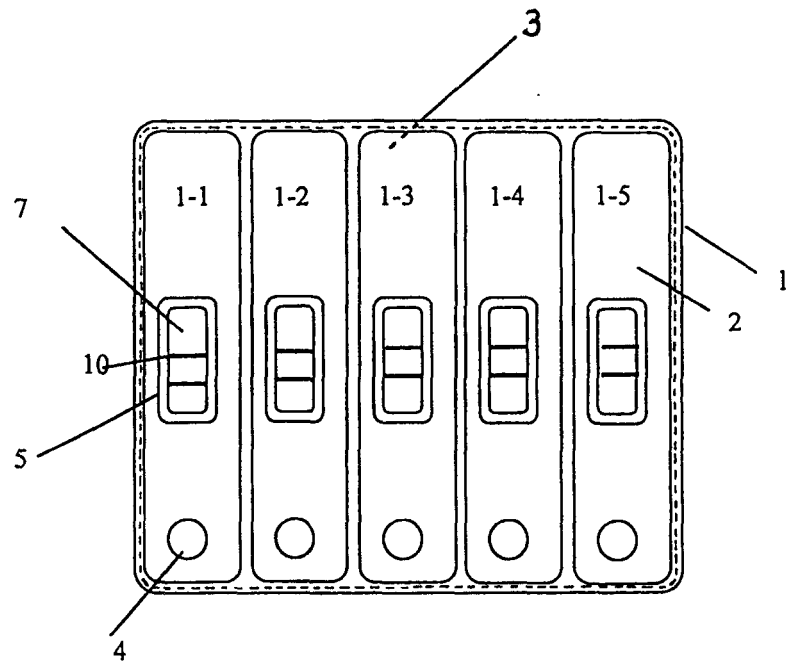


图 1

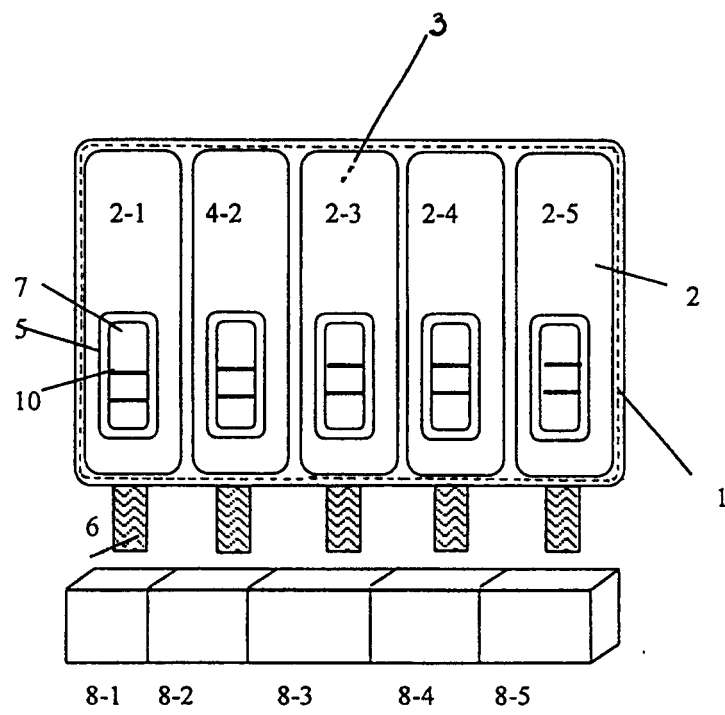


图 2

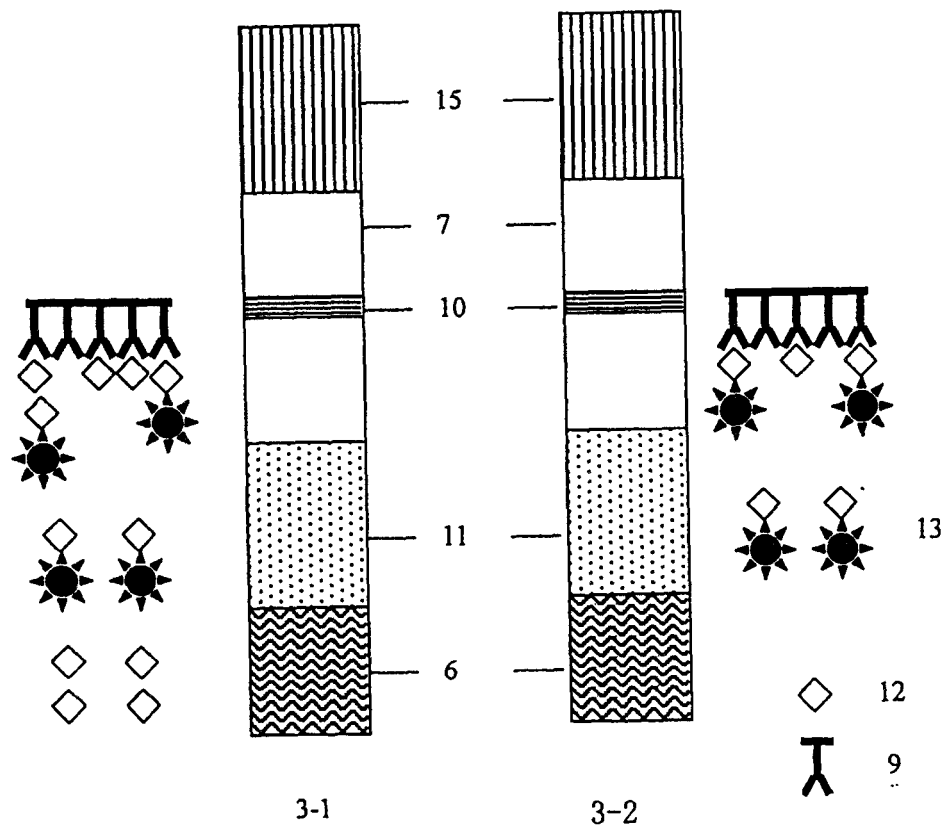


图 3

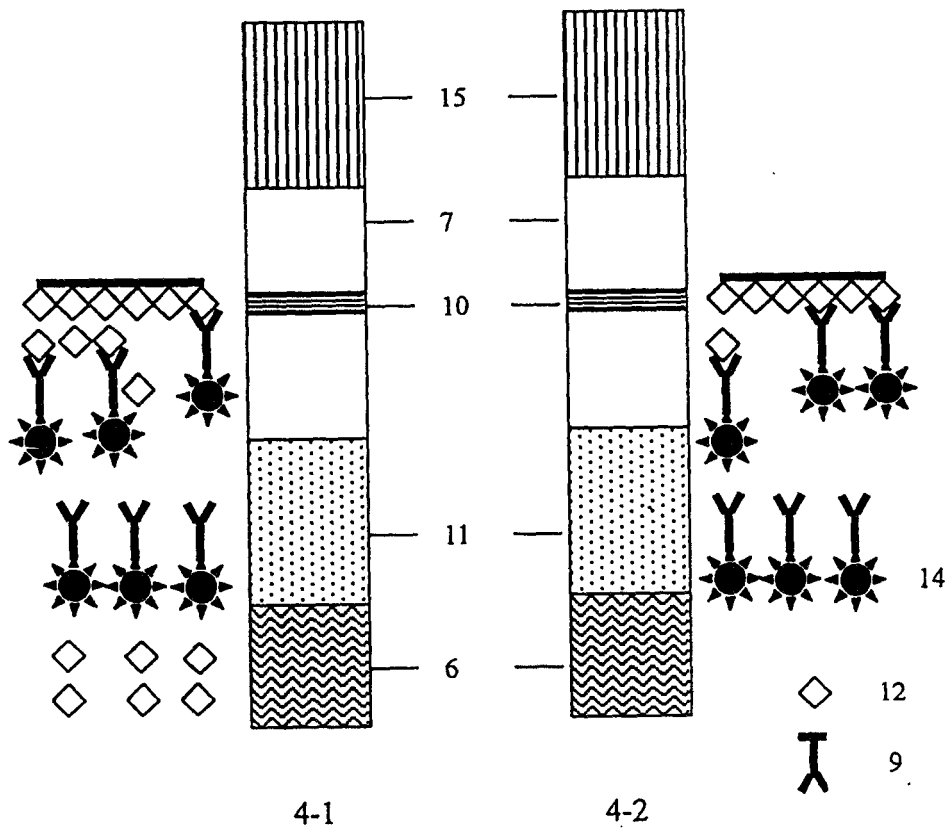


图 4

专利名称(译)	检测盐酸克伦特罗的参比免疫层析试纸及其检测方法		
公开(公告)号	CN1232825C	公开(公告)日	2005-12-21
申请号	CN03153346.9	申请日	2003-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
[标]发明人	陈高明 李林		
发明人	陈高明 李林		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	何文彬		
其他公开文献	CN1484031A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测盐酸克伦特罗(clenbuterol, Cl)的参比免疫层析试纸及其检测方法。该试纸包括两种形式：A.试纸由底卡、面卡和参比免疫层析试纸组成，面卡上预留加样孔和观察窗；B.试纸由底卡、面卡、参比免疫层析试纸和样品杯组成，面卡上预留观察窗。单元试纸条的层析膜上有1-4条盐酸克伦特罗抗体或盐酸克伦特罗载体蛋白偶联物线状点样的检测线；示踪粒子结合垫上有示踪粒子标记盐酸克伦特罗-载体蛋白偶联物的结合物或示踪粒子标记盐酸克伦特罗抗体的结合物。本发明的试纸结构简单、使用方便、保存时间长，检测步骤少、快速、准确，适合于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象样品的Cl进行非批量、多个样品的现场快速筛查和监控。

