



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103018452 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201110279100. 9

(22) 申请日 2011. 09. 20

(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 冯才伟 罗晓琴 朱亮亮 崔海峰

汤庆彩 崔彦虎 张荃

其他发明人请求不公开姓名

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡及检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和背衬。在所述反应膜上有包被有沙丁胺醇-载体蛋白偶联物构成的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体构成的质控线,结合物释放垫包被有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供了一种应用上述沙丁胺醇胶体金试纸卡检测沙丁胺醇药物的方法。本发明所提供的试纸卡可用于检测尿液、猪肉、鸡肉、鱼、虾、饲料样品中沙丁胺醇药物残留,具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低,适合大量样本的筛查和现场监控。

1. 一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和 PVC 底板,其特征在于所述反应膜上有包被有沙丁胺醇-载体蛋白偶联物构成的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体构成的质控线,所述结合物释放垫包被有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物。

2. 如权利要求 1 所述的胶体金试纸卡,其特征在于所述的沙丁胺醇-载体蛋白偶联物由沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联得到;所述的沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物中的沙丁胺醇单克隆抗体由沙丁胺醇-载体蛋白偶联物作为免疫原免疫动物获得;所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;所述羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体免疫羊得到的。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的胶体金试纸卡,其特征在于所述的沙丁胺醇半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

(1) 取 1-3g 沙丁胺醇,溶于 20-50ml DMF 中,然后加入 10%摩尔当量的 TEMPO 和 10%摩尔当量的四丁基氯化铵,20-50ml 0.5M 的 NaHCO_3 水溶液,室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.1-1.5 摩尔当量的 NCS,室温反应 2-5 小时后,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,为沙丁胺醇单氧化物。

(2) 1-2g 步骤 (1) 所得沙丁胺醇氧化物,溶于 20-30ml DMF 中,加入 2-5 摩尔当量的乙二胺,室温至 100°C 反应 5-20 小时,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物的乙二胺缩合产物,即为沙丁胺醇半抗原。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的胶体金试纸卡,其特征在于所述沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物中的沙丁胺醇单克隆抗体。

5. 如权利要求 1~4 所述的胶体金试纸卡,其特征在于所述的结合物释放垫的部分区域被覆盖于样品吸收垫之下。

6. 一种权利要求 1~5 所述的胶体金试纸卡的制备方法,主要包括如下步骤:

(1) 制备包被有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

(2) 制备具有包被有沙丁胺醇-载体蛋白偶联物构成的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 构成的质控线的反应膜;

(3) 将 (1) 和 (2) 制备好的结合物释放垫、反应膜与样本吸收垫、吸水垫和背衬组装成试纸卡。

7. 一种应用权利要求 1~6 任一项所述的沙丁胺醇胶体金试纸卡检测沙丁胺醇药物的方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 样品的前处理;

(2) 用胶体金试纸卡进行检测;

(3) 分析检测结果。

一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡及检测方法。

背景技术

[0002] 沙丁胺醇是一种强效选择性 β -受体兴奋剂药物,临床上常用于治疗支气管哮喘、哮喘性支气管炎和肺气肿患者的支气管痉挛等呼吸系统疾病。因此药可以提高瘦肉率,减少脂肪沉积和促进动物生长,被一些畜牧养殖企业作为养殖促进剂非法使用。其残留量可导致人体肌肉震颤、心悸、神经过敏、头痛、目眩、恶心、呕吐、发烧、战栗等症状,对消费者的健康极有危害,我国农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》明确规定沙丁胺醇等 β -兴奋剂被禁止所有用途,禁用所有食品动物。

[0003] 目前,对于沙丁胺醇的残留检测主要有高效液相色谱法、液相色谱~质谱联用分析法、气相色谱法、毛细管区带电泳法、免疫测定法等检测方法,仪器检测方法具有检测精确度高的优点,但其仪器化程度高,样品处理较复杂、检测费用高等,不适合用作大批样品的检测,免疫学检测方法操作简单、快速、灵敏,可同时检测多数样品,是理想的快速筛选手段。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种操作简单、成本低的沙丁胺醇药物残留检测胶体金试纸卡及其检测方法。

[0005] 本发明所提供的检测沙丁胺醇药物残留的胶体金试纸卡,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和 PVC 底板,所述反应膜上有包被有沙丁胺醇-载体蛋白偶联物构成的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体构成的质控线,所述结合物释放垫包被有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物。

[0006] 上述反应膜上检测线处包被的沙丁胺醇-载体蛋白偶联物由沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联得到;所述的沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物中的沙丁胺醇单克隆抗体由沙丁胺醇-载体蛋白偶联物作为免疫原免疫动物获得;所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、鼠血清蛋白、兔血清蛋白、甲状腺蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或人血清白蛋白;所述羊抗鼠抗抗体是将鼠源抗体免疫羊得到的。

[0007] 本发明中包被原、免疫原、单克隆抗体的合成过程为:

[0008] 1. 半抗原合成

[0009] (1) 取 1-3g 沙丁胺醇,溶于 20-50ml DMF 中,然后加入 10%摩尔当量的 TEMPO 和 10%摩尔当量的四丁基氯化铵,20-50ml 0.5M 的 NaHCO_3 水溶液,室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.1-1.5 摩尔当量的 NCS,室温反应 2-5 小时后,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,为沙丁胺醇单氧化物。

[0010] (2) 1-2g 步骤 (1) 所得沙丁胺醇氧化物,溶于 20-30ml DMF 中,加入 2-5 摩尔当量的乙二胺,室温至 100℃ 反应 5-20 小时,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为沙

丁胺醇单氧化物的乙二胺缩合产物,即为沙丁胺醇半抗原。

[0011] 2. 免疫原的合成

[0012] (1) 取沙丁胺醇半抗原 18mg 用 1.5ml 水溶解。

[0013] (2) 取 50% 的 GA8 μ l 加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0014] (3) 取 BSA100mg 用 5.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0015] (4) 反应 24h 后加入 24mgNaBH₄ 反应 2h。

[0016] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得免疫原。

[0017] 3. 包被原的合成

[0018] (1) 取沙丁胺醇半抗原 15mg 用 1.5ml 水溶解。

[0019] (2) 取 50% 的 GA8 μ l 加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0020] (3) 取 OVA30mg 用 4.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0021] (4) 反应 24h 后加入 24mgNaBH₄ 反应 2h。

[0022] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得包被原。

[0023] 4. 单克隆抗体的制备

[0024] 动物免疫:沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联物免疫 8-10 周龄 Ba1 b/c 小鼠。

[0025] 细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇 (PEG) 4000 的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0026] 本发明提供了一种制备上述胶体金试纸卡的方法,主要包括如下步骤:

[0027] (1) 制备包被有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0028] (2) 制备具有包被有沙丁胺醇-载体蛋白偶联物构成的检测线和包被有羊抗鼠 IgG 构成的质控线的反应膜;

[0029] (3) 将 (1) 和 (2) 制备好的结合物释放垫、反应膜与样本吸收垫、吸水垫和背衬组装成试纸卡。

[0030] 具体的说,步骤包括:

[0031] 1) 制备获得沙丁胺醇半抗原;

[0032] 2) 将沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联,制备沙丁胺醇包被原和免疫原;

[0033] 3) 用沙丁胺醇免疫原免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌沙丁胺醇单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0034] 4) 提取小鼠 IgG 免疫健康山羊,得到羊抗鼠 IgG 抗体;

[0035] 5) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0036] 6) 将制备的沙丁胺醇单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物;

[0037] 7) 将结合物释放垫浸泡于含有牛血清白蛋白(牛血清白蛋白在缓冲液中的浓度为 0.5%) 和 pH7.2, 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液中浸湿 1h, 37°C 烘 3h 备用,然后将沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物包被到结合物释放垫上;

[0038] 8) 将沙丁胺醇-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线;

[0039] 9) 将样品吸收垫置于 pH 为 7.2, 含小牛血清 2%, 1% 活性剂, 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液浸泡 2h, 37°C 下烘干 2h 后备用;

[0040] 10) 将上述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序黏贴在 PVC 底板上;结合物释放垫从起始端有 1/3 区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与 PVC 底板的始端对齐,吸水垫的末端与 PVC 底板的末端对齐;所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(T)线和质控区(C)线均为与所述试纸的长相垂直的条状带;检测区位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控区位于远离结合物释放垫的末端的一侧;将试纸用机器切成 3mm 宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡,2~8℃条件下保存 12 个月。

[0041] 本发明还提供了一种应用上述胶体金试纸卡检测沙丁胺醇的方法,包括的步骤有:

[0042] (1) 样品的前处理

[0043] 尿液样品:尿液样品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,尿样在 2-8℃冷藏可保存 4 小时,长期保存需冷冻 -20℃,严禁反复冻融。检测前尿样需回温到室温,如尿样浑浊,需 3000rpm 以上离心 5min 后检测。

[0044] 猪肉、鸡肉、鱼肉、虾等组织:取去脂肪组织样品于均质器中均质 1min(10000rpm),称取一定量(1.0g)均质的组织样品到 4ml 离心管中,加入样品提取液(含 0.8%的氯化钠的 pH7.2 的 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液)200 μl,涡动 1min;放入 80-100℃水中水浴 15min,取出冷却至室温,待检。

[0045] 饲料:研碎饲料样品,称取 1.0g 饲料样品到 4ml 离心管中,加入 1ml 乙腈,涡动 1min,静置 5min;移取 50 μl 上清液至 150 μl 样本稀释液(pH7.2,0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液)中混匀待检。

[0046] (2) 用胶体金试纸卡检测

[0047] 用吸管吸取待检样品溶液垂直滴加 3~4 滴(约 80 μl)于加样孔,反应 10min,根据示意图判定结果。

[0048] (3) 分析检测结果

[0049] 本发明将沙丁胺醇-载体蛋白偶联抗原固化于反应膜上检测线处,结合物释放垫上含有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物,在层析过程中样品中残留的沙丁胺醇药物和反应膜上预包被的偶联抗原竞争胶体金标记的沙丁胺醇单克隆抗体,通过检测线是否显色判断样品中是否有沙丁胺醇药物的残留,当检测线(T线)和质控线(C线)都显色时为阴性,当检测线不显色,质控线显色时为阳性,如图 2。

[0050] 阴性(-):T线和C线都显色,表示样品中沙丁胺醇浓度低于检测限,如图 2(a)。

[0051] 阳性(+):T线无显色C线显色,表示样品中沙丁胺醇浓度高于检测限,如图 2(b)。

[0052] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸卡已变质失效,如图 2(c)。在此情况下,应再次仔细阅读说明书,并用新的试纸卡重新测试。

[0053] 本发明的胶体金试纸卡采用的样品前处理方法省时、简便,有效地降低了前处理工作量,整体地提高了检测效率,胶体金试纸卡具有特异性高、灵敏度高、操作简单、检测时间短等特点,能够对大批量样品进行定性筛查。

附图说明

[0054] 图 1:本发明胶体金试纸卡的组装示意图

[0055] 图 2 :本发明的检测结果分析示意图

具体实施方式

[0056] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0057] 实施例一沙丁胺醇胶体金试纸卡的制备

[0058] 1. 沙丁胺醇半抗原的制备

[0059] (1) 取 1-3g 沙丁胺醇,溶于 20-50ml DMF 中,然后加入 10%摩尔当量的 TEMPO 和 10%摩尔当量的四丁基氯化铵,20-50ml 0.5M 的 NaHCO₃ 水溶液,室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.1-1.5 摩尔当量的 NCS,室温反应 2-5 小时后,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,为沙丁胺醇单氧化物。

[0060] (2) 1-2g 步骤 (1) 所得沙丁胺醇氧化物,溶于 20-30ml DMF 中,加入 2-5 摩尔当量的乙二胺,室温至 100°C 反应 5-20 小时,除去溶剂,乙醇-水中重结晶,得到白色固体,为沙丁胺醇单氧化物的乙二胺缩合产物,即为沙丁胺醇半抗原。

[0061] 2. 免疫原的制备

[0062] (1) 取沙丁胺醇半抗原 18mg 用 1.5ml 水溶解。

[0063] (2) 取 50%的 GA8 μ l 加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0064] (3) 取 BSA100mg 用 5.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0065] (4) 反应 24h 后加入 24mgNaBH₄ 反应 2h。

[0066] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得免疫原。

[0067] 3. 包被原的制备

[0068] (1) 取沙丁胺醇半抗原 15mg 用 1.5ml 水溶解。

[0069] (2) 取 50%的 GA8 μ l 加入 (1) 中,室温下搅拌反应 18h。

[0070] (3) 取 OVA30mg 用 4.5ml 水稀释后加入上述溶液中。

[0071] (4) 反应 24h 后加入 24mgNaBH₄ 反应 2h。

[0072] (5) 用三蒸水透析 48 小时,即得包被原。

[0073] 4. 单克隆抗体的制备方法

[0074] 动物免疫 :沙丁胺醇半抗原与载体蛋白偶联物免疫 8-10 周龄 Bal b/c 小鼠。

[0075] 细胞融合与克隆化 :取免疫后的鼠脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇 (PEG) 4000 的作用下融合,筛选获得能稳定分泌抗沙丁胺醇单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0076] 经筛选得到对沙丁胺醇单克隆杂交瘤细胞株。沙丁胺醇单克隆杂交瘤细胞株可以无限量地产生沙丁胺醇特异性抗体,该抗体特异性是针对沙丁胺醇的。

[0077] 5. 羊抗鼠抗抗体的制备

[0078] 以鼠源抗体为免疫原,以羊为免疫动物,免疫原免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗抗体。

[0079] 6. 沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0080] (1) 胶体金的制备

[0081] 用双蒸去离子水将 1%氯金酸(购于 sigma 公司,产品目录号 T09041) 稀释

成 0.01% (质量百分含量), 取 100ml 置于锥形瓶中, 用恒温电磁搅拌器加热至沸腾, 在持续高温、持续搅拌下加入 2.5ml 1% 柠檬酸三钠 (购于广州化学试剂厂, 产品目录号 BG11-AR-01KG), 继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止, 冷却至室温后用去离子水恢复到原体积, 4℃ 保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。

[0082] (2) 金标抗体的制备

[0083] 在磁力搅拌下, 用 0.1mol/L 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.2, 按每毫升胶体金溶液中加入 50 ~ 100 μg 抗体的标准向胶体金溶液中加入上述沙丁胺醇单克隆抗体, 继续搅拌混匀 10min, 加入 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 使其在胶体金溶液中的终浓度为 1% (体积百分含量), 静置 10min。12000rpm, 4℃ 离心 60min, 弃上清液, 沉淀用复溶缓冲液洗涤两次, 用体积为初始胶体金体积 1/10 的复溶缓冲液将沉淀重悬, 得到的沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物溶液的浓度为 50 μg/ml, 置 4℃ 备用。

[0084] 复溶缓冲液: 含牛血清白蛋白 (BSA) 0.1% ~ 0.3% (体积百分含量)、吐温-80 0.05% ~ 0.2% (质量百分含量)、pH7.2 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0085] 7. 沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物包被到结合物释放垫

[0086] 将结合物释放垫浸泡于含有牛血清白蛋白 (牛血清白蛋白在缓冲液中的浓度为 0.5%) 和 pH7.2, 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液中浸湿 1h, 37℃ 烘 3h 备用, 用 Isoflow 点膜仪将制备好的沙丁胺醇胶体金标记抗体均匀包被在结合物释放垫上, 每 1cm 结合物释放垫包被 0.01ml 沙丁胺醇金标记抗体后, 置于 37℃ 环境中 60min 后取出, 置于 4℃ 环境中保存备用。

[0087] 8. 反应膜的制备

[0088] 将沙丁胺醇-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线, 将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0089] 包被过程: 用磷酸缓冲液将沙丁胺醇-卵清蛋白偶联物稀释到 10mg/mL, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区 (T 线), 包被量为 1.0 μg/cm²; 用 0.01mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠 IgG 抗体稀释到 200 μg/ml, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区 (C 线), 包被量为 1.0 μg/cm²。将包被好的反应膜置于 37℃ 条件下干燥 2h, 备用。

[0090] 9. 样品吸收垫的制备

[0091] 将样品吸收垫置于含牛血清白蛋白 (牛血清白蛋白在缓冲液中的终浓度为 0.5% (体积百分含量))、pH7.2、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中浸泡 2h, 37℃ 烘 2h 备用。

[0092] 10. 胶体金试纸卡的组装

[0093] 将上述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序黏贴在 PVC 底板上; 结合物释放垫从起始端有 1/3 区域被样品吸收垫覆盖, 结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接, 反应膜的末端与吸水垫的始端相连, 样品吸收垫的始端与 PVC 底板的始端对其, 吸水垫的末端与 PVC 底板的始端对齐, 吸水垫的末端与 PVC 底板的末端对齐; 所述反应膜上有检测区和质控区, 检测区 (T) 线和质控区 (C) 线均为与所述试纸的长相垂直的条状带; 检测区位于靠近结合物释放垫的末端的一侧; 质控区位于远离结合物释放垫的末端的一侧; 将试纸用机器切成 3mm 宽的小条, 装在特制的塑料制卡中, 形成试纸卡, 2 ~ 8℃ 条件下保存 12 个月。

[0094] 实施例二样品中沙丁胺醇残留的检测

[0095] 1. 样品的前处理

[0096] 尿液样品：尿液样品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，尿样在 2-8℃ 冷藏可保存 4 小时，长期保存需冷冻 -20℃，严禁反复冻融。检测前尿样需回温到室温，如尿样浑浊，需 3000rpm 以上离心 5min 后检测。

[0097] 猪肉、鸡肉、鱼肉、虾等组织：取去脂肪组织样品于均质器中均质 1min (10000rpm)，称取一定量 (1.0g) 均质的组织样品到 4ml 离心管中，加入样品提取液 200 μl，涡动 1min；放入 80-100℃ 水中水浴 15min，取出冷却至室温，待检。

[0098] 饲料：研碎饲料样品，称取 1.0g 饲料样品到 4ml 离心管中，加入 1ml 乙腈，涡动 1min，静置 5min；移取 50 μl 上清液至 150 μl 样本稀释液中混匀待检。

[0099] 2. 用胶体金试纸卡检测

[0100] 用吸管吸取待检样品溶液垂直滴加 3~4 滴 (约 80 μl) 于加样孔，反应 10min，根据示意图判定结果。

[0101] 3. 分析检测结果

[0102] 阴性 (-)：T 线和 C 线都显色，表示样品中沙丁胺醇浓度低于检测限，如图 2(a)。

[0103] 阳性 (+)：T 线无显色 C 线显色，表示样品中沙丁胺醇浓度高于检测限，如图 2(b)。

[0104] 无效：未出现 C 线，表明不正确的操作过程或试纸卡已变质失效，如图 2(c)。在此情况下，应再次仔细阅读说明书，并用新的试纸卡重新测试。

[0105] 实施例三样品检测实例

[0106] 1. 检测限试验

[0107] 分别取空白猪尿、猪肉、鸡肉、鱼肉、虾、饲料样品，在空白猪尿样品中添加沙丁胺醇至终浓度为 3、5、10 μg/L，在空白猪肉、鸡肉、鱼肉、虾样品中添加沙丁胺醇至终浓度为 10、20、40 μg/kg，在空白饲料样品中添加沙丁胺醇至终浓度为 15、30、60 μg/kg，取胶体金试纸卡进行检测，每个样本重复测定三次。

[0108] 用胶体金试纸卡检测猪尿样品时，当猪尿样品中沙丁胺醇添加浓度为 3 μg/L 时，试纸卡上显示出肉眼可见的两条红色条线，呈阴性；当猪尿样品中沙丁胺醇添加浓度为 5、10 μg/L 时，试纸卡质控区显色，但检测区不显色，呈阳性，表明本试纸卡对猪尿样品中沙丁胺醇检测限为 5 μg/L。

[0109] 用胶体金试纸卡检测猪肉、鸡肉、鱼肉、虾样品时，当样品中沙丁胺醇添加浓度为 10 μg/kg 时，试纸卡上显示出肉眼可见的两条红色条线，呈阴性；当样品中沙丁胺醇添加浓度为 20、40 μg/kg 时，试纸卡质控区显色，但检测区不显色，呈阳性，表明本试纸卡对猪肉样品中沙丁胺醇检测限为 20 μg/kg。

[0110] 用胶体金试纸卡检测饲料样品时，当饲料样品中沙丁胺醇添加浓度为 15 μg/kg 时，试纸卡上显示出肉眼可见的两条红色条线，呈阴性；当饲料样品中沙丁胺醇添加浓度为 30、60 μg/kg 时，试纸卡质控区显色，但检测区不显色，呈阳性，表明本试纸卡对饲料样品中沙丁胺醇检测限为 30 μg/kg。

[0111] 2. 假阳性率、假阴性率试验

[0112] 取已知沙丁胺醇含量大于 5 μg/L 的猪尿阳性样品和阴性样品各 20 份，沙丁胺醇含量大于 20 μg/kg 的猪肉、鸡肉、鱼肉、虾阳性样品和阴性样品各 20 份，沙丁胺醇含量大于 30 μg/kg 的饲料阳性样品和阴性样品各 20 份，用三批试纸卡进行检测，计算其阴阳性率。

结果见表 1、表 2。

[0113] 表 1、检测阳性样品结果

[0114]

浓度 批次	阳性样本					
	猪尿 (20 份)	猪肉 (20 份)	鸡肉 (20 份)	鱼肉 (20 份)	虾 (20 份)	饲料 (20 份)
1	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性
2	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性
3	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性	20 份阳性

[0115] 表 2、检测阴性样品结果

[0116]

浓度 批次	阴性样本					
	猪尿 (20 份)	猪肉 (20 份)	鸡肉 (20 份)	鱼肉 (20 份)	虾 (20 份)	饲料 (20 份)
1	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性
2	20 份阴性	19 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性
3	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性	20 份阴性

[0117] 结果表明：用 3 个批次生产的试剂盒检测阳性样品时，结果全为阳性，可知阳性样本符合率为 100%，假阴性率为 0。检测 20 份阴性猪尿、鸡肉、鱼肉、虾、饲料样品时，结果全为阴性，可知阴性符合率为 100%，假阳性率为 0。检测 20 份阴性猪肉样本时，结果出现了 1 份阳性，可知阴性符合率为 98%，假阳性率为 2%。本发明的检测沙丁胺醇的胶体金试纸卡可以对沙丁胺醇残留进行快速检测。

[0118] 3. 特异性试验

[0119] 特异性常用交叉反应率表示，是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。将常检的其他药物莱克多巴胺、群勃龙醋酸酯、磺胺类、氯霉素、大环内酯类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、氟喹诺酮类、四环素类药物用 pH7.2、0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液进行稀释，用沙丁胺醇胶体金试纸卡进行检测。结果显示，用该胶体金试纸卡检测莱克多巴胺、群勃龙醋酸酯、磺胺类、氯霉素、大环内酯类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、氟喹诺酮类、四环素类药物时，试纸卡质控区和检测区均显色，说明本试纸卡对这些药物无交叉反应。

[0120] 4. 保存期实验

[0121] 分别随机抽取足量的试纸卡置于 4℃、25℃、30℃ 条件下保存，在第 0～15 个月时，分别测定空白猪尿、猪肉、饲料样品各 20 份；测定 5 μ g/L 沙丁胺醇标准品添加的猪尿样品 20 份；20 μ g/kg 沙丁胺醇标准品添加的猪肉样品各 20 份；30 μ g/kg 沙丁胺醇标准品添加的饲料样品各 20 份，结果显示试纸卡在分别置于 4℃、25℃、30℃ 时，从生产之日起，第 12 个月，各项指标均符合规定，到 13 个月时，试纸卡检测出现了少量的失效的现象，从上述结果中可以得出沙丁胺醇胶体金试纸卡在 4～30℃ 条件下可以保存 12 个月。

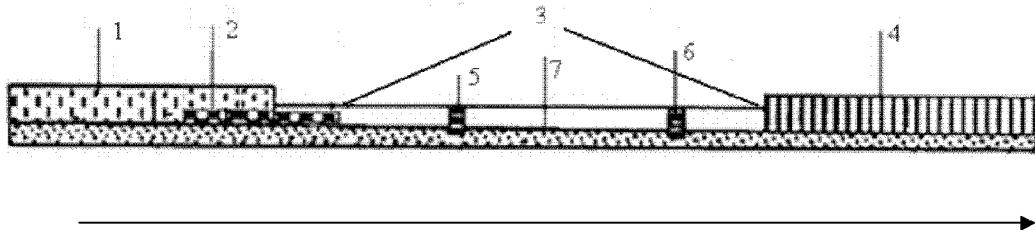


图 1

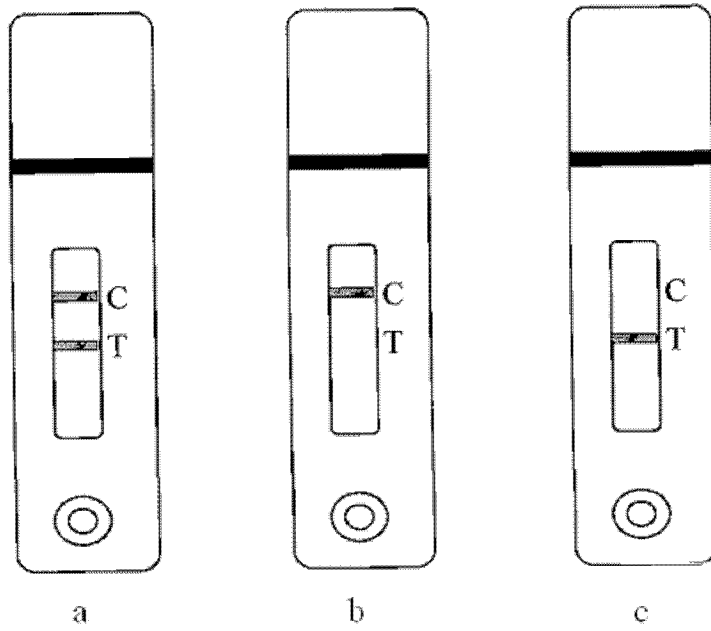


图 2

专利名称(译)	一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡及检测方法		
公开(公告)号	CN103018452A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201110279100.9	申请日	2011-09-20
[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	冯才伟 罗晓琴 朱亮亮 崔海峰 汤庆彩 崔彦虎 张荃 其他发明人请求不公开姓名		
发明人	冯才伟 罗晓琴 朱亮亮 崔海峰 汤庆彩 崔彦虎 张荃 其他发明人请求不公开姓名		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
其他公开文献	CN103018452B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测沙丁胺醇药物的胶体金试纸卡，包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和背衬。在所述反应膜上有包被有沙丁胺醇-载体蛋白偶联物构成的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体构成的质控线，结合物释放垫包被有沙丁胺醇单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供了一种应用上述沙丁胺醇胶体金试纸卡检测沙丁胺醇药物的方法。本发明所提供的试纸卡可用于检测尿液、猪肉、鸡肉、鱼、虾、饲料样品中沙丁胺醇药物残留，具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低，适合大量样本的筛查和现场监控。