

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/558

G01N 33/577 G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02157708.0

[43] 公开日 2004 年 6 月 30 日

[11] 公开号 CN 1508545A

[22] 申请日 2002.12.17 [21] 申请号 02157708.0

[71] 申请人 湖州瑞泽生物技术有限公司

地址 313000 浙江省湖州市龙溪路 208 号

[72] 发明人 张少恩

[74] 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有限公司

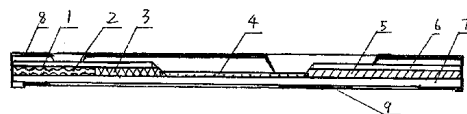
代理人 吴巧玲

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂，包括不干胶、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬，PVC 背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、不干胶，中间粘附硝酸纤维素膜层，另一端依次粘附吸水垫和不干胶，其特点是结合垫为由包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫，硝酸纤维素膜包为被了盐酸克伦特罗 - BSA 和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜。该检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测，全过程只需 30 分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。



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

1. 一种检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂,包括不干胶、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬,PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、不干胶,中间粘附硝酸纤维素膜层,另一端依次粘附吸水垫和PVC背衬,其特征结合垫为由包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫,硝酸纤维素膜包被了盐酸克伦特罗-BSA和羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜。

2. 根据权利要求1所述的免疫胶体金试剂的制备方法,其特征是:
(1)单克隆抗体:取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后,用盐酸克伦特罗-BSA注射BALB/C小鼠腹腔,收取腹水,以亲和层析法提纯单克隆抗体;
(2)胶体金:将100ml 0.01%氯化金用2ml 1%柠檬酸三钠还原成20nm~40nm的颗粒;
(3)单克隆抗体胶体金标记物:用上述0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的pH值调至8.2左右,将胶体金溶液与单克隆抗体按100ml胶体金溶液中加入0.5mg~1mg单克隆抗体的比例混合均匀,使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物,再通过纯化、浓缩后形成胶体金标记物;
(4)羊抗鼠IgG:用盐酸克伦特罗-BSA多次免疫小鼠,提取抗血清免疫山羊,纯化后得羊抗鼠IgG;
(5)将单克隆抗体金标记物喷涂在胶体金结合垫上,将盐酸克伦特罗-BSA和羊抗鼠IgG喷涂在硝酸纤维素膜上,在37℃干燥箱烘干。

3. 根据权利要求2所述的免疫胶体金试剂的制备方法,其特征是将单克隆抗体金标记物喷涂在胶体金结合垫上,将盐酸克伦特罗-BSA和羊抗鼠IgG喷涂在硝酸纤维素膜上,以低温真空干燥。

检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂及其制备方法

(一)技术领域：本发明涉及一种用免疫胶体金方法检测盐酸克伦特罗的试剂，还涉及该试剂的制备方法。

(二)背景技术：盐酸克伦特罗(Clenbuterol)，俗称瘦肉精，是一种人工合成的肾上腺素神经兴奋剂，属 β -兴奋剂类激素药物。如果用作畜禽饲料添加剂，则能降低胴体脂肪含量，提高瘦肉率，并促进畜禽生长。大量使用，则造成畜禽中药物残留，人食用含有盐酸克伦特罗残留的畜禽肉、蛋后，人体会产生心悸、呕吐、肌肉不自主震颤等中毒症状。

目前对盐酸克伦特罗常的检测方法为色谱法和酶联免疫吸附法。

1. 色谱技术对盐酸克伦特罗检测是非常有效、准确和敏感的，但也存在如下缺点：(1)待检测样品预处理程序繁琐费时，从样品预处理到得出检测结果至少需要 2 天；(2)对操作时使用的水及各种溶剂有着严格的要求；(3)需要经过专业培训的技术人员操作，操作人员要有丰富的相关经验，操作人员必须了解影响色谱分析的各种干扰因素，了解所使用的预处理方法的优缺点，才能获得可靠的分析结果；(4)需要昂贵的仪器设备辅助，难以在中小城市及中小企业中普及，更无法实现现场检测；(5)仪器保养的要求高，保养的好坏直接影响分析结果的准确性；(6)检测费用高。

2. 酶联免疫吸附法是以竞争性酶联反应为检测原理，以盐酸克伦特罗抗体包被酶标板，检测时将被检样品和酶标结合物同时加入酶标板，反应后通过显色测 OD 值。存在的缺点是：(1) 需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用，不利于在基层单位进行推广使用；(2) 检测操作人员需要经过专业培训；(3)操作过程相对比较复杂，检测所需时间比较长，全程需要 2h~4h；(4) 检测所需费用较高，不能实现单人份检测。

(三)发明内容：本发明的任务是解决上述存在的如检测时间长、不能现场检测、检测费用高等缺点，提供一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测的适用于盐酸克伦特罗检测的胶体金免疫层析试剂，并提供该试剂的制备方法。应用该试剂检测盐酸克伦特罗，全过程只需 30 分钟。

本发明的检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂，是由包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫、包被了盐酸克伦特罗-BSA 和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜、样品垫、吸水垫、不干胶、PVC 背衬（及塑料模具）等组成，在 PVC 背衬的一端依次粘附样品垫、结合垫、不干胶，中间粘附硝酸纤维素膜，另一端依次粘附吸水垫和不干胶。

制备本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂的方法是：

(1)单克隆抗体：取杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后，用盐酸克伦特罗-BSA 注射 BALB/C 小鼠腹腔，收取腹水，以亲和层析法提纯单克隆抗体；

(2)胶体金：将 100ml 0.01%氯化金用 2ml 1%柠檬酸三钠还原成 20nm~40nm 的颗粒；

(3)单克隆抗体胶体金标记物：用上述 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.2 左右，将胶体金溶液与单克隆抗体按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg~1mg 单克隆抗体的比例混合均匀，使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物，再通过纯化、浓缩后形成胶体金标记物；

(4) 羊抗鼠 IgG：用盐酸克伦特罗-BSA 多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊，纯化后得羊抗鼠 IgG；

(5)将单克隆抗体金标记物喷涂在胶体金结合垫上，将盐酸克伦特罗-BSA 和羊抗鼠 IgG 喷涂在硝酸纤维素膜上，在 37℃干燥箱烘干；

(6) 将硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫、不干胶等依次粘在 PVC 背衬上；

(7)将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试剂条。如果制作成试剂板则再将制成的试剂条装到一定大小的塑料盒内即可。

本发明的积极效果在于：

(1) 低价格：产品生产流程简单，生产成本低，检测的费用只需

气相色谱/液相色谱的 1/5~1/10, 比酶标试剂盒也要便宜得多(气相色谱/液相色谱通常检测一个样品需要 200 元~300 元, 酶标试剂盒通常一个样品检测也要 80 元~100 元, 而本发明制备的免疫胶体金试剂盒一般只需 20 元~50 元);

(2) 检测速度快: 全过程只需 30 分钟, 可以实现自我检测;

(3) 可以现场检测;

(4) 高质量: 本方法制备而成的试剂盒特异性好、灵敏度高、重复性好;

(5) 操作简便: 本方法制备而成的试剂盒以胶体金作为指示标记, 快速定性, 结果准确、快速, 操作简便, 无需冲洗过程和标准对照, 可分批或单个样品及时检测;

(6) 易于推广使用: 操作人员无需专业培训, 按说明书即可完成操作。

(四) 附图说明:

图 1 为本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂盒的剖示结构图, 图中 1. 不干胶 2. 样品垫 3. 结合垫 4. 硝酸纤维素膜 5. 吸水垫 6. 不干胶 7. PVC 背衬 8. 上盖 9. 盒底 10. 试剂盒(板)

图 2 为本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂条的正视结构图, 图中 15. 检测线 16. 质控线 17. 标记线

图 3 为本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂盒的正视结构图, 图中 8. 上盖 11. 加样孔 12. 显示窗

(五) 具体实施方案:

实施例 1:

图 1、图 2、图 3 所示的实施例: 图中 7 为 PVC 背衬; 2 为样品垫; 3 为结合垫, 该结合垫上包被了单克隆抗体胶体金标记物; 4 为硝酸纤维素膜, 该硝酸纤维素膜上包被了盐酸克伦特罗-BSA 和羊抗鼠 IgG; 5 为吸水垫, 由吸水材料如滤纸制成; 6 为起保护作用的不干胶。

在 PVC 背衬 7 的一端上(样品端)粘附样品垫 2、结合垫 3, 样品垫 2

和结合垫 3 为并列结构。在样品垫 2 和结合垫 3 上粘附保护层不干胶 1。在不干胶 1 上偏向样品垫 2 处印有标记线 17、箭头和 MARK 字样。

在 PVC 背衬 7 的中间粘附硝酸纤维素膜 4。在硝酸纤维素膜 4 上设置有羊抗鼠 IgG 质控线 16 和盐酸克伦特罗-BSA 检测线 15。

在 PVC 背衬 7 的另一端粘附吸水垫 5，在吸水垫 5 上粘附保护层不干胶 6。硝酸纤维素膜 4 的一端与结合垫 3 略交叉，另一端与吸水垫 5 略交叉。该试剂条可装入由塑料模具制成的试剂盒内，制成试剂盒 10，也叫试剂板，在试剂板 10 的上盖 8 上设有加样孔 11 和结果显示窗 12。

实施例 2

制备本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂条(盒)的方法

- 1) 单克隆抗体的制备：将杂交瘤细胞株在体外常规培养、传代后，用盐酸克伦特罗-BSA 注射 BALB/C 小鼠腹腔，收取腹水，以亲和层析法提纯单克隆抗体；
- 2) 羊抗鼠 IgG 的制备：用盐酸克伦特罗-BSA 多次免疫小鼠，提取抗血清免疫山羊，纯化后得羊抗鼠 IgG；
- 3) 胶体金的制备：将 100ml 0.01%氯化金用 2ml 1%柠檬酸三钠还原成 20nm~40nm 大小的颗粒；
- 4) 单克隆抗体胶体金标记物：用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.2 左右，将胶体金溶液与单克隆抗体按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg~1mg 单克隆抗体的比例混合均匀，使胶体金与抗体形成稳定的胶体金复合物，再通过多次离心、弃上清、清洗，再浓缩后形成抗体，冷藏备用；
- 5) 用 Biodot 点膜机将单克隆抗体胶体金标记物喷涂在胶体金结合垫上，用 Biodot 点膜机将盐酸克伦特罗-BSA 和羊抗鼠 IgG 喷涂在硝酸纤维素膜上，放在 37℃干燥箱里烘干，也可以采用低温真空干燥后备用；
- 6) 将硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫、不干胶等依次粘在 PVC 背衬上；
- 7) 用 Biodot 切割机将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试剂条。即制

成本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂条。如果将切好的试剂条装到一定大小的塑料模具内，即制成本发明检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂板(盒)。

实施例 3:

本发明制备的检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂条(板)的应用

(1) 待检样本采集：称取 5g ($\pm 0.1g$) 新鲜猪肉样品。

(2) 待检样本简单处理：将样品用小型绞肉机绞碎，放入 50ml 离心管中加入 10ml 甲醇，充分搅拌，振荡 20min，于 3000r/min 离心 10min，将上清液移出；残渣中再加入 10ml 甲醇，混匀后振荡 20min，于 3000r/min 离心 10min，合并上清液备用。

(3) 检测

a. 在检测前先将样本和试剂条(板)放在室温条件下放置一段时间(10 分钟)，使其恢复至室温；

b. 从铝箔袋中取出检测试剂条，按 MARK 线下箭头所示的方向将试剂条浸入样本溶液中，液面不得超过 MARK 线，5 秒~8 秒后取出，平放在操作台上；从铝箔袋中取出检测试剂板，平放在操作台上，往加样孔 11 中滴加 3 滴(约 120 μ l)待检测样品溶液；

c. 3 分钟~15 分钟内即可判断结果，30 分钟后判断的结果无效。

(3) 结果判断

如果样品中没有要检测的“瘦肉精”存在，则检测线处出现红色条带，同时质控线上也出现红色条带，此时结果为阴性；如果样品中存在要检测的“瘦肉精”，则检测线处无条带出现，但质控线上出现红色条带，此时结果为阳性。如果质控线上没有红色条带出现，则产品无效。

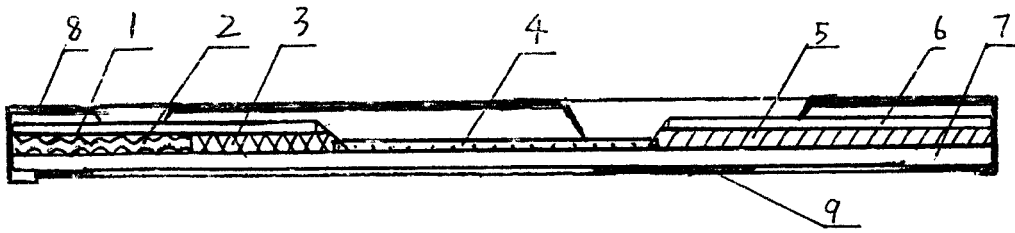


图 1

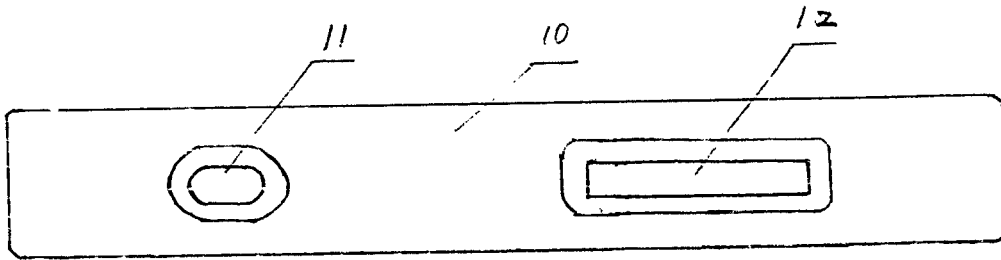


图 2

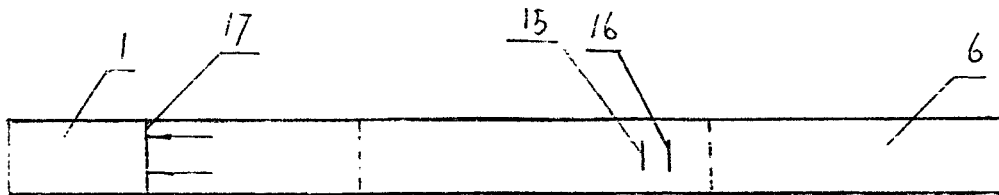


图 3

专利名称(译)	检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN1508545A	公开(公告)日	2004-06-30
申请号	CN02157708.0	申请日	2002-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	湖州瑞泽生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖州瑞泽生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖州瑞泽生物技术有限公司		
[标]发明人	张少恩		
发明人	张少恩		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	吴巧玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂，包括不干胶、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬，PVC背衬一端依次粘附样品垫、结合垫、不干胶，中间粘附硝酸纤维素膜层，另一端依次粘附吸水垫和PVC背衬，其特点是结合垫为由包被了单克隆抗体胶体金标记物的胶体金结合垫，硝酸纤维素膜包为被了盐酸克伦特罗 - BSA和羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜。该检测盐酸克伦特罗的免疫胶体金试剂是一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测，全过程只需30分钟，操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

