

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102507928 A

(43) 申请公布日 2012. 06. 20

(21) 申请号 201110322296. 5

(22) 申请日 2011. 10. 21

(71) 申请人 广州万孚生物技术有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城荔
枝山路 8 号

(72) 发明人 王继华 彭运平 唐海波

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 万志香 曾旻辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

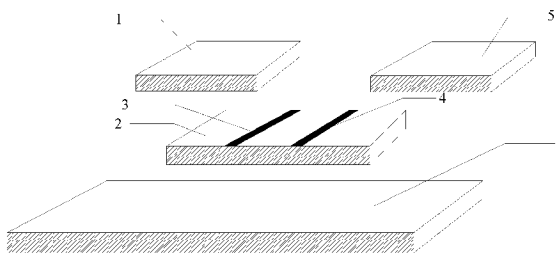
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

荧光定量检测克伦特罗的试剂盒和荧光标记液的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒以及荧光标记液的制备方法, 该试剂盒包括有试纸条和荧光标记液, 所述试纸条由样品垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成; 所述硝酸纤维素包被膜包括检测区和质控区; 所述检测区包被有 CLB-BSA 偶联物, 所述质控区包被抗兔 IgG; 所述荧光标记液中含有荧光标记 CLB 抗体和荧光标记兔 IgG。与免疫胶体金标记试纸条相比, 本发明具有灵敏度更高、准确定量等优点, 而操作比酶联法更加快速和简便。



1. 一种荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,其特征是,该试剂盒包括有试纸条和荧光标记液,所述试纸条由样品垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成;所述硝酸纤维素包被膜包括检测区和质控区;所述检测区包被有 CLB-BSA 偶联物,所述质控区包被抗兔 IgG;所述荧光标记液中含有荧光标记 CLB 抗体和荧光标记兔 IgG。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,其特征是,所述硝酸纤维素包被膜质控区,抗兔 IgG 的包被液浓度为 0.3 ~ 3mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm。

3. 根据权利要求 1 所述的荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,其特征是,所述硝酸纤维素包被膜检测区,CLB-BSA 偶联物的包被液浓度为 0.3-3mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,其特征是,所述硝酸纤维素包被膜质控区,抗兔 IgG 的包被液浓度为 0.5 ~ 2.0mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm;CLB-BSA 偶联物的包被液浓度为 0.8 ~ 2mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm。

5. 根据权利要求 1-3 任一项所述的荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,其特征是,所述荧光标记液中的荧光标记 CLB 抗体的浓度为 0.5-2ug/ml,荧光标记兔 IgG 的浓度为 0.5-2ug/ml。

6. 根据权利要求 5 所述的荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,其特征是,所述荧光标记液的激发波长为 310 ~ 550nm,发射波长为 340 ~ 620nm。

7. 一种荧光标记液的制备方法,其特征是,其步骤如下:

A. 含羧基的荧光素或荧光胶乳标记液的制备方法

将 15-20mg 的荧光素或 450-500mg 荧光胶乳标记物与 70mgCLB 抗体或兔 IgG 混合后,边搅拌边缓慢加入 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,使其整个反应体系中 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺含量为 0.1-0.3mg,N-羟基琥珀酰亚胺的含量为 0.1-0.2mg,在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 避光反应过夜;去除杂质,用荧光保护剂复溶;或

B. 含氨基的荧光素或荧光胶乳标记液的制备方法

将 15-20mg 的荧光素或 450-500mg 荧光胶乳标记物与 75mgCLB 抗体或兔 IgG 混合后,置于 4 ~ 40 $^{\circ}$ C,调节体系 pH6.8 ~ 9.0,一边搅拌一边缓慢加入 0.2 ~ 1%戊二醛;反应 2 ~ 5 小时,去除杂质,用荧光保护剂复溶;或

C. 含硫碳酰胺键的荧光素或荧光胶乳标记液的制备方法

用 pH8.0 ~ pH9.6 碳酸缓冲液分别溶解 65mg CLB 抗体或兔 IgG,用 pH8.0 ~ pH9.6 碳酸缓冲液溶解或悬浮 15-20mg 荧光素或 450-500mg 荧光胶乳;边搅拌边将上述溶解的荧光素或荧光胶乳渐渐加入球蛋白溶液中,加完后,继续避光搅拌 10-14 小时,结合完毕后,装入透析袋中,用上述碳酸缓冲盐水透析过夜,用荧光保护剂复溶。

荧光定量检测克伦特罗的试剂盒和荧光标记液的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体地说,本发明涉及一种荧光定量检测克伦特罗(CLB)的免疫层析检测试剂盒和荧光标记液的制备方法。

背景技术

[0002] 克伦特罗是一种平喘药,该药物既不是兽药,也不是饲料添加剂,而是肾上腺类神经兴奋剂。克伦特罗在家畜和人体内吸收好,而且与其它 β -兴奋剂相比,它的生物利用度高,以至食用了含有克伦特罗的猪肉出现中毒。

[0003] 目前克伦特罗的检测方法主要有4种,分别是试纸条速测法、酶联免疫吸附测定法,气相色谱-质谱法和高效液相色谱法。酶联免疫吸附测定法、气相色谱-质谱法和高效液相色谱法可以定量检测,但所需仪器设备昂贵不便于基层采用。试纸条法操作简便、敏感灵敏度高,检出率达90%以上可用于现场快速诊断。

[0004] 申请号为200920108545.9的发明专利,涉及一种检测动物源食品中克伦特罗含量的酶联免疫试剂盒。该试剂盒组成包括:96孔酶标板、酶标二抗、克伦特罗抗体工作液、克伦特罗6个浓度的标准品溶液、底物显色液、终止液、浓缩洗涤液、高浓度标准品、盖板膜、自封袋、说明书和质检报告。采用间接竞争ELISA方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的克伦特罗将与微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗克伦特罗抗体,加入酶标二抗后,用TMB底物显色,样本吸光度值与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中克伦特罗的残留量。与仪器分析技术相比具有使用方便、高灵敏度等特点,可在动物源性食品中克伦特罗的残留量检测中发挥重要作用。

[0005] 申请号为CN02153852.2的发明专利,提供一种能够快速半定量检测盐酸克伦特罗是否存在的试剂条及其制造方法。检测盐酸克伦特罗的试剂条,包括设有凹槽的吸附板,在所述吸附板的凹槽内吸附有带固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的载体膜,所述载体膜上放置有带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫;所述试剂条还包括一个装有底物和显色剂的遮光容器。本发明的产品为一次性用检测工具,属于快速微量检测,CBL的检测限为1ng/ml,对于控制瘦肉精等违禁药物的非法使用具有重要的价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服上述现有技术的缺陷,提供一种成本低廉、操作简便、灵敏性高的一种荧光检测克伦特罗试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0008] 一种荧光定量检测克伦特罗(CLB)免疫层析试剂盒,试剂盒包括试纸条和荧光标记液,所述试纸条由样品垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成;所述硝酸纤维素包被膜包括检测区(T区)和质控区(C区);所述检测区包被有CLB-BSA偶联物(克伦特罗-牛血清白蛋白偶联物),所述质控区包被抗兔IgG;所述荧光标记液中含有荧光标记CLB抗体和荧光标记兔IgG。

[0009] 优选地,所述硝酸纤维素包被膜质控区(C区),抗兔 IgG 的包被液浓度为 0.2 ~ 4mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm。

[0010] 优选地,所述硝酸纤维素包被膜检测区(T区),克伦特罗偶联物的包被液浓度为 0.2 ~ 4mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm。

[0011] 更优选地,所述硝酸纤维素包被膜质控区,抗兔 IgG 的包被液浓度为 0.5 ~ 2.0mg/ml ;CLB-BSA 偶联物的包被液浓度为 0.8 ~ 2mg/ml。

[0012] 优选地,所述荧光标记液中的荧光标记 CLB 抗体的浓度为 0.5-2ug/ml,荧光标记兔 IgG 的浓度为 0.5-2ug/ml。使用时,采用相同的浓度使检测效果更好。所述荧光标记液的激发波长(Ex)为 310 ~ 550nm,发射波长(Em)为 340 ~ 620nm。

[0013] 所述荧光标记液为荧光素与蛋白的标记物或带有荧光胶乳与蛋白的标记物,其中所使用的荧光素为异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、藻红蛋白、多甲藻绿素蛋白、镧系螯合物、羧基荧光素、香豆素等其中的一种或几种。

[0014] 本发明另一发明目的是提供了一种上述荧光标记液的制备方法。

[0015] 具体采取了以下技术方案:

[0016] 所述荧光标记液的制备方法,其步骤如下:

[0017] A. 含羧基的荧光素或荧光胶乳标记液的制备方法

[0018] 将 15-20mg 的荧光素或 450-500mg 荧光胶乳标记物与 70mgCLB 抗体或兔 IgG 混合后,边搅拌边缓慢加入 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),使其整个反应体系中 EDC 的含量为 0.1-0.3mg, N-羟基琥珀酰亚胺的含量为 0.1-0.2mg,在低温下 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 避光反应过夜;用透析或其他方法去除杂质,用荧光保护剂复溶;或

[0019] B. 含氨基的荧光素或荧光胶乳标记液的制备方法

[0020] 将 15-20mg 的荧光素或 450-500mg mg 荧光胶乳标记物与 75mgCLB 抗体或兔 IgG 混合后,置于 4 ~ 40 $^{\circ}$ C 环境,调节体系 pH6.8 ~ 9.0,一边搅拌一边缓慢加入 0.2 ~ 1%戊二醛;反应 2 ~ 5 小时,透析或其他方法去除杂质,用荧光保护剂复溶;或

[0021] C. 含硫碳酰胺键的荧光素或荧光胶乳标记液的制备方法

[0022] 用 pH8.0 ~ pH9.6 碳酸缓冲液分别溶解 65mg CLB 抗体或兔 IgG,用 pH8.0 ~ pH9.6 碳酸缓冲液溶解或悬浮 15-20mg 荧光素或 450-500mg 荧光胶乳;边搅拌边将上述溶解的荧光素或荧光胶乳渐渐加入球蛋白溶液中,加完后,继续避光搅拌 10-14 小时,结合完毕后,装入透析袋中,用上述碳酸缓冲盐水透析过夜,用荧光保护剂复溶。

[0023] 本发明所述的克伦特罗的免疫层析试纸盒的检测原理是竞争法,荧光素分子或荧光胶乳微粒与 CLB 抗体共价结合。将检测样本(尿样或提取液)加入荧光标记物中,其荧光标记 CLB 抗体可与尿液中的 CLB 结合,形成复合物;而包被在硝酸纤维素膜上检测区(T)的 CLB-BSA 偶联物(CLB 抗原)也竞争结合荧光标记 CLB 抗体。当含 CLB 样本与荧光标记物混合后滴加至试纸条的上,在层析作用下混合液沿着硝酸纤维素膜向前移动,样本中所含 CLB 量越多,可与 T 区 CLB-BSA 偶联物(CLB 抗原)结合的荧光标记的抗体越少,从而使 T 区测得荧光检出值降低。通过荧光检测仪扫描 T 区荧光信号强度,可检测出样本中 CLB 含量。

[0024] 本发明的克伦特罗免疫层析试纸条与 GC/MS、HPLC 等色谱仪器以及酶免法检测克伦特罗相比,具有简便(简单操作一步完成)、适合不同数量样本检测和快速(15 分钟左右

即可有结果)等优点;与免疫胶体金标记试纸条相比,本发明具有灵敏度更高、准确定量等优点。

[0025] 本发明的克伦特罗层析试剂盒,采用荧光标记液与样本预先混合的方法,使反应与信号释放更加均一,与其他层析法相比,其批量生产的精密度和准确度达到最好效果。在荧光定量检测仪上可以达到仅 10 秒就能对克伦特罗进行灵敏的定量测定,更快更精确的测定动物组织中所含的克伦特罗残留;克伦特罗层析试纸条具有良好的准确度(回收率为 80% -110%),定量偏差 20%以内)和高灵敏度(灵敏度达 0.2ug/kg),需要的样品量少(80ul),操作非常简便。

附图说明

[0026] 图 1 是本发明的所述荧光定量检测克伦特罗层析试剂盒中试纸条的结构示意图;

[0027] 图 2 是本发明的所述荧光定量检测克伦特罗层析试剂盒中试纸条的结构示意图;

[0028] 图 3 是本发明的所述荧光定量检测克伦特罗层析试剂盒中用于放置试纸条的检测卡的结构示意图。

具体实施方式

[0029] 本发明所采用荧光标记液为荧光素与蛋白的标记物或带有荧光胶乳与蛋白的标记物,其中所使用的荧光素为异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、藻红蛋白、多甲藻绿素蛋白、镧系螯合物、羧基荧光素等其中的一种或几种。

[0030] 在本发明实施例中,所采用的 CLB 抗体为常规单克隆抗体技术制备的单抗,所采用的 CLB-BSA 偶联物(即克伦特罗抗原)是利用常规化学合成方法得到,利用竞争法的原理检测标本。

[0031] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0032] 实施例一

[0033] 在该实施例中,荧光定量检测克伦特罗免疫层析试剂盒,包括有试纸条和荧光标记液。

[0034] 其中,按试纸条的常规方法,试纸条由样品垫 1、包括检测区(T区)3和质控区(C区)4的硝酸纤维素包被膜 2、吸水纸 5 依次相互搭接地粘贴在底板 6 上构成,如图 1 和图 2 所示。

[0035] 在该实施例中,包被膜的检测区 T 线处用 0.8mg/ml CLB-BSA 偶联物(即克伦特罗抗原)包被液,使用量为 90ul/27cm。在包被膜的质控区 C 线处使用浓度为 0.5mg/ml 的抗兔 IgG 进行包被,使用量同为 90ul/27cm。用于结合荧光标记的兔 IgG,用于检测试纸条的有效性。

[0036] 在该实施例中,荧光标记液受 310nm 激发,发射波长为 340nm。在该实施例中,荧光标记液的制备采用含羧基的荧光胶乳标记物(本实施例用到的荧光素为 7-羟基香豆素胶乳)的制备方法(A),步骤如下:

[0037] 将 500mg 的 7-羟基香豆素胶乳分别与 70mg CLB 抗体或 70mg 兔 IgG 混合后,边搅拌边缓慢加入 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),使其整个反应体系中 EDC 的含量为 0.2mg, NHS 含量为 0.1mg,在低温下 2~8℃避光

反应过夜。用透析或其他方法去除杂质,用荧光保护剂复溶。

[0038] 将上述制备好的荧光胶乳微粒标记的 CLB 抗体和荧光胶乳微粒标记兔 IgG 按适当比例混合,以使两种抗体浓度分别都为 2ug/ml,分装备用。

[0039] 实施例二

[0040] 在该实施例中,荧光定量检测克伦特罗免疫层析试剂盒,包括试纸条和荧光标记液。

[0041] 其中,试纸条由样品垫、包括检测区(T区)和质控区(C区)的纤维素包被膜、吸水纸按试纸条的常规方法依次相互搭接地粘贴在底板上。

[0042] 在该实施例中,包被膜的检测区 T 线处用 2.0mg/ml CLB-BSA 偶联物(即克伦特罗抗原)包被液,使用量为 90ul/35cm。在包被膜的质控区 C 线处使用浓度为 2.0mg/ml 的抗兔 IgG 进行包被,使用量同为 90ul/35cm,用于结合荧光标记的兔 IgG,用于检测试纸条的有效性。

[0043] 在该实施例中,荧光标记液受 550nm 激发后,发射波长为 620nm。在该实施例中,荧光标记液的制备采用含氨基的荧光胶乳标记物(本实施例用到的荧光素为四甲基异硫氰酸罗丹明胶乳)的制备方法,步骤如下:

[0044] 将 500mg 荧光胶乳标记物分别与 75mg CLB 抗体或 75mg 兔 IgG 混合后,置于 4~40℃ 环境,调节体系 pH7.0~8.5,一边搅拌一边缓慢加入 0.4~0.6% 戊二醛;反应 2~5 小时,透析或其他方法去除杂质,用荧光保护剂复溶。

[0045] 将上述制备好的荧光胶乳微粒标记的 CLB 抗体和荧光胶乳微粒标记兔 IgG 按适当比例混合,以致两种抗体浓度分别都为 0.5ug/ml,分装备用。

[0046] 实施例三

[0047] 在该实施例中,荧光定量检测克伦特罗免疫层析试剂盒,包括试纸条和荧光标记液。

[0048] 其中,试纸条由样品垫、包括检测区(T区)和质控区(C区)的纤维素包被膜、吸水纸按试纸条的常规方法依次相互搭接地粘贴在底板上。

[0049] 在该实施例中,包被膜的检测区 T 线处用 1mg/ml CLB-BSA 偶联物(即克伦特罗抗原)包被液,使用量为 90ul/35cm。在包被膜的质控区 C 线处使用浓度为 1mg/ml 的抗兔 IgG 进行包被,使用量同为 90ul/35cm。用于结合荧光标记的兔 IgG,用于检测试纸条的有效性。

[0050] 在该实施例中,荧光标记液受 490nm 激发,发射波长为 530nm。在该实施例中,荧光标记液的制备采用含硫碳酰氨基的荧光素(本实施例用到的荧光素为异硫氰酸荧光素)的制备方法,步骤如下:

[0051] 用 pH8.0~pH9.6 碳酸缓冲液分别溶解 65mg CLB 抗体或 65mg 兔 IgG,用 pH8.0~pH9.6 碳酸缓冲液溶解或悬浮 20mg 异硫氰酸荧光素;边搅拌边将上述的异硫氰酸荧光素渐加入球蛋白溶液中,加完后,继续避光搅拌 12h 左右,结合完毕后,装入透析袋中,用上述碳酸缓冲液在低温下透析过夜,用荧光保护剂复溶。

[0052] 将上述制备好的荧光物标记的 CLB 抗体和荧光胶乳微粒标记兔 IgG 按适当比例混合,以致两种抗体浓度分别都为 1ug/ml,分装备用。

[0053] 本发明所述的克伦特罗免疫层析检测试剂盒,在具体实例中,半成品通过以下工序组装而成:由样品垫、包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上,构成试纸条,可再用现有技

术中的卡外壳7(如图3所示),固定成检测卡,所述卡外壳涂有可供荧光仪扫描识别的产品信息喷码。与写入信息的ID芯片(现有技术中的ID芯片采用的定量计算公式为检测信号值与计算浓度的半对数直线方程式或其他计算方程式,可自动进行结果判定)。分装好的荧光标记液和其他配件组装成试剂盒。

[0054] 本发明所述荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒,在使用时,组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料卡外壳(检测卡)中,塑料上壳设有两个开孔,加样孔9和显示窗8,加样孔9对应于所述的荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试纸条样品垫,结果显示窗8对应于所述荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试纸条的检测区和质控区,该荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试纸条可以从该塑料外壳中取出。

[0055] 用来测试免疫层析试纸条的荧光定量光谱检测系统(免疫荧光检测仪),主要包含荧光光源系统、检测系统及自动软件分析控制系统。

[0056] 本发明的一个实施例中,检测样本需要通过以下操作:吸取50~150u1的样本(尿样/提取液)与荧光标记液等量混合,混匀后吸取50~150u1,往水平放置检测卡加样孔加入,不要带入气泡,开始层析反应。反应15分钟,由荧光检测仪读取测试结果。

[0057] 本发明的实施例1-3所述的定量克伦特罗免疫层析检测试剂盒与免疫荧光检测仪对200例样本(尿样/提取液)的测定结果比较表明:在0.2ppb~5ppb范围内测定克伦特罗的准确性高;定量曲线线性系数均大于0.99,样本中含1ppb与2ppb浓度的克伦特罗其准确度为80%~120%,试剂盒检出限为0.2ppb。相对一般采用的胶体金法(定性)和酶联免疫检测法检测试剂盒的检测结果具有更好的灵敏度和特异性。具体如下表。

[0058]

	胶体金法 (R-Biopharm 德国拜发公司)	实施例1	实施例2	实施例3	ELISA 法 (R-Biopharm 德国拜发公司)
曲线线性系数	-	0.998	0.994	0.997	0.99
1ppb 浓度的克伦特罗准确度	定性	85%-105%	93%-114%	80%-107%	80%-120%
2ppb 浓度的克伦特罗准确度	定性	92%-113%	85%-116%	100%-119%	80%-120%
检出限	3ppb-5ppb	0.3 ppb	0.2 ppb	0.2 ppb	<0.1ppb

[0059] 以上是针对本发明的可行实施例的具体说明,但该实施例并非用以限制本发明的

专利范围,凡未脱离本发明技艺精神所为的等效实施或变更,均应包含于本发明的专利范围中。

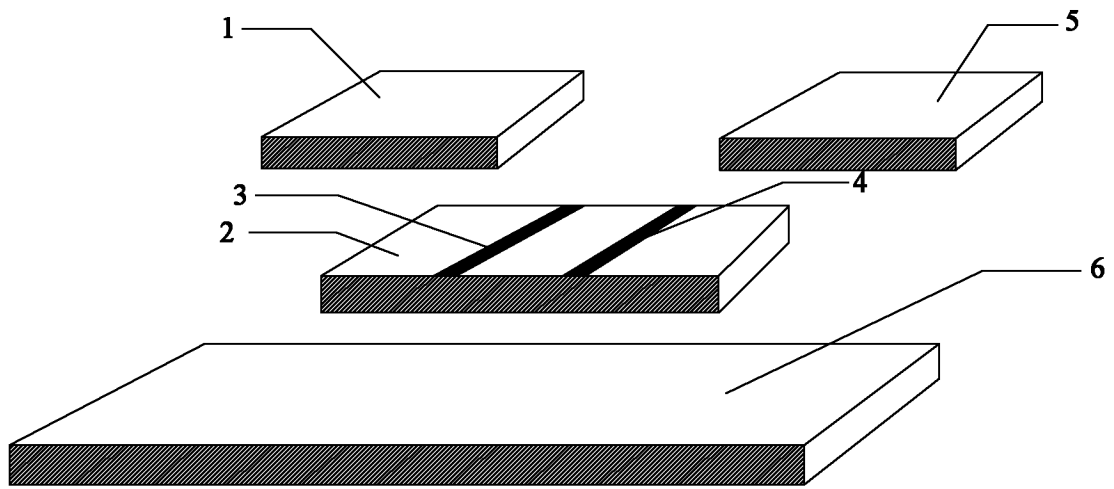


图 1

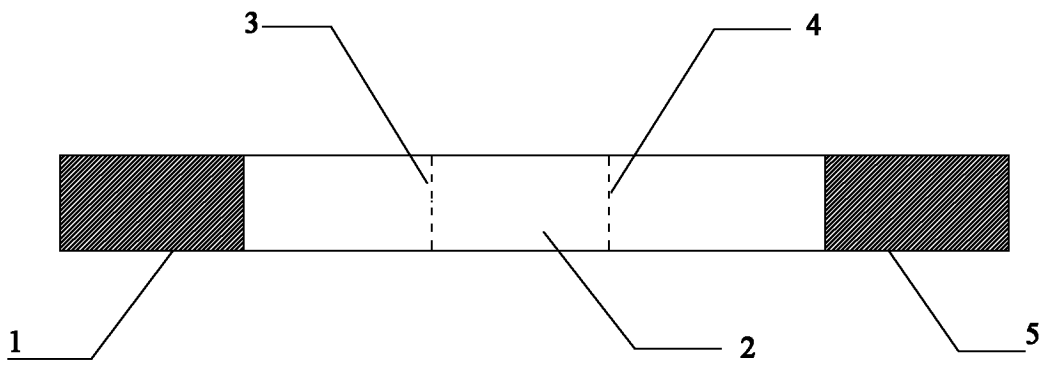


图 2

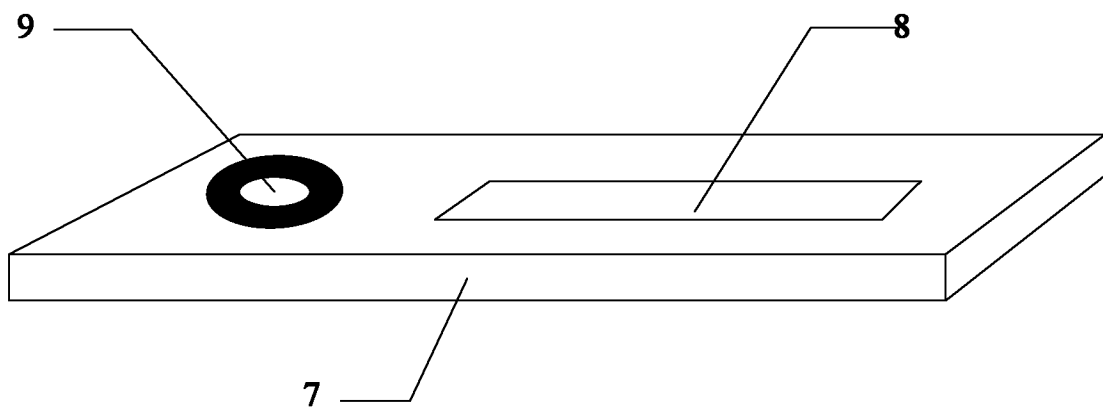


图 3

专利名称(译)	荧光定量检测克伦特罗的试剂盒和荧光标记液的制备方法		
公开(公告)号	CN102507928A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110322296.5	申请日	2011-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
[标]发明人	王继华 彭运平 唐海波		
发明人	王继华 彭运平 唐海波		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种荧光定量检测克伦特罗的免疫层析试剂盒以及荧光标记液的制备方法，该试剂盒包括有试纸条和荧光标记液，所述试纸条由样品垫、硝酸纤维素包被膜、吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成；所述硝酸纤维素包被膜包括检测区和质控区；所述检测区包被有CLB-BSA偶联物，所述质控区包被抗兔IgG；所述荧光标记液中含有荧光标记CLB抗体和荧光标记兔IgG。与免疫胶体金标记试纸条相比，本发明具有灵敏度更高、准确定量等优点，而操作比酶联法更加快速和简便。

