

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510029002.4

[43] 公开日 2007年2月28日

[11] 公开号 CN 1920561A

[22] 申请日 2005.8.22

[21] 申请号 200510029002.4

[71] 申请人 上海市上海中学

地址 200231 上海市上中路 400 号

[72] 发明人 刘 见

[74] 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司

代理人 吕 伴

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法

[57] 摘要

一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法，其首先采取动物血液，分离血清制备全血清蛋白液；然后将制备的全血清蛋白液混入碳酸盐缓冲液中，然后加入偶氮液，制取载体联合物；再取载体联合物与佛氏完全佐剂放入灭菌青霉素瓶中，在混合器上振荡混合至完全乳白色，形成 CL 佛氏完全佐剂乳化液；另取载体联合物与佛氏不完全佐剂乳化；最后将制备的 CL 佛氏完全佐剂乳化液接种于动物免疫，免疫后 7 天进行第二次免疫 CL 佛氏不完全佐剂乳化液；10 天和 15 天分别采取动物血液，分离血清，获得抗体。本发明采用自身蛋白特别是全血清作 CL 的免疫载体，能使免疫动物产生 ELISA 效价最高达 4 万以上的特异性抗体；用该抗体建立免疫金试纸法快速检测尿样中的 CL，其灵敏度为 40ng/ml。

1、一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法，其特征在于：该方法具有以下步骤：

[1]、CL 抗原制备：

[1. 1]、载体材料的准备：采取动物血液，分离血清，制备全血清蛋白液；

[1. 2]、CL 的偶氮化与连接：将制备的全血清蛋白液混入 PH9.6 的碳酸盐缓冲液中，然后加入偶氮液，透析后离心去沉淀，上清用蒸馏水恢复或防入 40%聚乙二醇中并浓缩，制取载体联合物-40℃保存；

[1. 3]、乳化液的制备：取制备的载体联合物与佛氏完全佐剂放入灭菌青霉素瓶中，在混合器上振荡混合至完全乳白色，形成 CL 佛氏完全佐剂乳化液；另取载体联合物与佛氏不完全佐剂乳化；

[2]、抗体的制备：将制备的 CL 佛氏完全佐剂乳化液接种于动物免疫，免疫后 7 天进行第二次免疫 CL 佛氏不完全佐剂乳化液；10 天和 15 天分别采取动物血液，分离血清，获得抗体。

一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法

技术领域

本发明涉及一种抗体的制备方法，特别是一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法。

背景技术

现代畜牧业为人类提供了极其丰富的肉、禽、奶、蛋等营养价值高、品质优良的各类食品，为人类的物质生活、提高人们健康水平，延长人类寿命作出了很大贡献。与此同时，现代科学研究证明，由于畜牧业现代化，大量使用抗生素、激素以及其它合成药物，造成其他畜禽食品中，药物残留、激素残留等。通过食物链的传递，药物残留和激素残留物对人体健康和生命构成危险和损害，如癌症病人发病率增加，人类生育畸形比例增大，人体抗药性增强，青少年性早熟，中老年心血管疾病蔓延以及某些食物中毒等问题，往往与畜禽食品中的药物残留、激素残留密切相关。如盐酸克伦特罗（Clenbuterol），缩写为 CL，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。低剂量时主要用于防止人、畜的支气管哮喘和支气管痉挛、肺气肿等疾病。但应有严格的剂量限制。用量超标人体会产生心悸、呕吐、肌肉不自主地震颤等症状，甚至有生命危险。长期过量摄入会积蓄中毒，还有导致染色体畸变的可能。因其具有提高肌肉力量的作用，很早就有一些运动员非法使用该药，国际上早就禁止在饲料和畜牧生产中使用。若剂量增加到治疗量的 5-10 倍，则有使胴体的脂肪重新分布，促进蛋白质合成和促进生长作用，所以曾被用作畜禽饲料添加剂，添加到猪、牛、羊、兔、鸭、鹅等畜禽饲料中，以降低胴体脂肪含量，提高瘦肉率，促进生长，人在食用含有 CL 残留的畜禽肉、蛋、奶食品时，容易发生食物中毒事件。因此，欧美各国均禁止 CL 作为生长促进剂和饲料添加剂使用。我国农业部也正式下文严禁 CL 作为饲料添加剂使用。但是某些畜禽饲养户及养殖场在经济利益的驱动下，暗地里非法使用 CL 作为饲料添加剂，如用含有 CL 饲料饲养的猪，由于瘦肉率高，对顾客具有强大的吸引力，使其欺骗性和危害性更大，严重威胁人类健康。同时 CL 等 β -兴奋剂类药物也被国际奥委会公布为违禁药物。

当前对 CL 常用的检测方法主要有色谱技术和酶联免疫吸附试验等。色谱技术是国际上用于 CL 检测的常用经典技术，包括高效液相色谱（HPLC），液相色谱/质谱连用（LC/MS），气相色谱/质谱连用（GC/MS），气相色谱/傅立叶红外联用（GC/FTIR）等。目前香港及内地

研究单位多采用 GC/MS 和 HPLC 技术进行动物组织和毛发中 CL 的残留检测，应该说色谱技术对 CL 检测是非常有效、准确、敏感的。但待测样品需经一系列的预处理，繁琐费时，从样品预处理到得出检测结果至少需要 2 天时间；另外这种检测方法还需要价格昂贵的仪器设备，且需专业人员操作，每次只能检测一个样品，严重阻碍了这种检测方法的普及推广，更无法实现现场检测。ELISA，也是一种常用检测技术，已有商品化的试剂盒出售。是以竞争性酶联反应为检测原理，以 β -兴奋剂抗体包被酶标板，检测时将被检样品和酶标结合物同时加酶标板，反应后显色测 OD 值，OD 值愈低表示被检样品中含 CL 含量愈高。检测全过程约需 2-4 小时。ELISA 一次可检测多个样品，即可定性检测，也可定量检测。但存在着假阳性或假阴性问题。由于 ELISA 是一种敏感性很强的技术，不同人操作往往会出现不同结果，对结果判定需要有一定操作经验的专业人员，所以该检测方法也常常造成误检和漏检。同时， β -兴奋剂的种类较多，各药物之间也存在一定的抗原性差异，这也是造成漏检原因之一，加之检测时间较长，很难实施现场检测。

当人们食用了残留较高浓度的 CL 动物组织后，会出现心动过速，肌肉震颤，心悸和神经过敏等症状。例如 1997 年上半年，在我国香港 17 人食用含有 CL 的猪肺汤，出现手指震颤、头晕、心悸、口干、失眠、瘫痪等症状，引起香港特别行政区和我国政府高度重视。浙江、北京、广东、河南等地也发现多人由于吃残留盐酸克伦特罗（CL 瘦肉精）的猪肉造成食物中毒，引起农业部和当地政府的高度重视。各级食品检验部门和外贸出口单位，都加强对 CL 检测力度，以确保人民吃上放心肉。因此研制快速、简便、实用的检测方法势在必行。

目前在快速、简便、实用检测盐酸克伦特罗方面，有一些检测试剂条，如中国发明专利公开号为 CN1504750A 公开的“盐酸克伦特罗检测试剂条及其制造方法”和中国实用新型专利公开号为 CN2518108Y 公开的“盐酸克伦特罗快速检测试剂条”等等。这些检测试剂条所采用的抗体都是采用异源蛋白（BSA）作载体，抗体的 ELISA 效价不高。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法，以获得 ELISA 效价高的抗体，提高检测的灵敏度。

本发明所解决技术问题可以通过以下技术方案来实现：一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法，其特征在于：该方法具有以下步骤：

1、CL 抗原制备：

1. 1、载体材料的准备：采取动物血液，分离血清，制备全血清蛋白液；

1. 2、CL 的偶氮化与连接：将制备的全血清蛋白液混入 PH9.6 的碳酸盐缓冲液中，然后加入偶氮液，透析后离心去沉淀，上清用蒸馏水恢复或防入 40%聚乙二醇中并浓缩，制取载体联合物-40℃保存；

1. 3、乳化液的制备：取制备的载体联合物与佛氏完全佐剂放入灭菌青霉素瓶中，在混合器上振荡混合至完全乳白色，形成 CL 佛氏完全佐剂乳化液；另取载体联合物与佛氏不完全佐剂乳化；

2、抗体的制备：将制备的 CL 佛氏完全佐剂乳化液接种于动物免疫，免疫后 7 天进行第二次免疫 CL 佛氏不完全佐剂乳化液；10 天和 15 天分别采取动物血液，分离血清，获得抗体。

本发明采用自身蛋白特别是全血清作 CL 的免疫载体，能使免疫动物产生 ELISA 效价最高达 4 万以上的特异性抗体；用该抗体建立免疫金试纸法快速检测尿样中的 CL，其灵敏度为 40ng/ml。对 86 份 ELISA 检测阴性尿样和 42 份阳性尿样进行检测，其阴性符合率为 100%，阳性符合率为 95.2%，作为筛选性检测法具有推广应用价值。本发明对非法用药样品的检测结果可以与单抗免疫金试纸条的检测率相媲美。让人们真正能吃上放心肉、安全肉。

附图说明

图 1 是本发明具体实施方式中的金标试纸条操作法的示意图；

图 2 是本发明具体实施方式中的试纸测定结果示意图；

图 3 是本发明具体实施方式中的抗体效价判定的结果柱状图。

具体实施方式

以下结合选取自身蛋白制备“瘦肉精”载体抗原，免疫动物后产生高效价的特异性抗体，纯化抗体与胶体金结合成免疫金，制备成简易的检测试纸条。通过检测试纸条敏感性、保存期、操作方法对比、临床检测及与单抗金标试纸条平行检测等过程来对本发明进行详细地描述。

上述过程的技术路线如下：

A、抗体制备：“瘦肉精”+自身蛋白（白蛋白、全血清和血红蛋白）→载体“瘦肉精”

(抗原) →佐剂抗原制备→免疫兔子→采血测抗体效价(间接 ELISA 法)→分离血清→抗体纯化→抗体定量。

B、免疫金试纸条制备: 胶体金制备→胶体金标记(胶体金+抗体)→免疫金纯化→免疫金试纸条制备。

C、试纸条检测: 免疫金试纸条敏感性检测、保存期检测、金标抗体工作浓度选择、检测试验、检测方法比较; 单抗金标试纸条检测平行试验。

1. 材料与方法

1.1 CL 抗原制备

1.1.1 载体材料的准备: 取健康兔编号为 1-7 号, 其中 1-4 号分别采血分离血清, 将 1 号兔血清用硫酸铵盐析法提取白蛋白, 除盐。5 号兔取抗凝血, 离心沉淀红细胞后制备成血红蛋白液。以上各蛋白液用紫外分光光度法标定浓度后放 4℃ 备用。

1.1.2 CL 的偶氮化与连接: 参看《南京农业大学学报》, 1998, 21(4):83-86 “六种不同蛋白质载体制备克伦特罗抗血清的比较”, 具体过程是: 取 20mg CL (美国 Sigma 产品) 溶于 8ml 0.1mol/L 盐酸中, 然后加入 280mg 亚硝酸钠混合。取 7mgBSA (牛血清白蛋白, 上海伯奥生物科技有限公司, 批号 020806), 1 号兔 6.6mg 白蛋白液, 2、3、4 号兔分别为 7.3mg、7.5mg 和 21.8mg 全血清蛋白液, 5 号兔 6.1mg 血红蛋白液, 分别混入至总量 2ml 的 0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液中。分别取 CL 偶氮液 0.8ml (2mgCL) 加入 3、5 号兔的载体液中和 BSA 液中, 1、2、4 号兔载体液中分别加入偶氮液 1.2ml、1.2ml 和 2.4ml。透析后离心去沉淀, 上清用蒸馏水恢复或放入 40%聚乙二醇 12000 中浓缩至 3ml, -40℃ 保存。

1.1.3 载体联合物与佛氏佐剂混合: 各取载体联合物 1ml 与佛氏完全佐剂 (美国 Sigma 产品) 1ml 放入灭菌青霉素瓶中, 在混合器上振荡混合至完全乳白色。另 1.5ml 的联合液分别与佛氏不完全佐剂 (美国 Sigma 产品) 1.5ml 进行乳化。

1.2 抗 CL 抗体的制备

1.2.1 动物免疫: 将编号为 1-5 号的试验兔分别接种用自身蛋白作载体制备的 CL 佛氏完全佐剂乳化液 2ml, 皮下分点注射。6 号兔接种 BSA 作载体的乳化液。7 号兔为对照。免疫后 7 天进行第二次免疫 CL 佛氏不完全佐剂乳化液 3ml。10 天和 15 天分别采血分离血清并进行间接 ELISA 测定抗体效价。

1.2.2 间接 ELISA 检测抗 CL 抗体效价，检测方法参看《南京农业大学学报》，1998, 21(4):83-86 “六种不同蛋白质载体制备克伦特罗抗血清的比较”，

1.2.2.1 试剂按参考文献配制。其中兔全血清 CL 包被液自制，含蛋白 $60\mu\text{g}$ ，CL $10\mu\text{g}$ ；HRP-Protein A 购自卫生部上海生物制品研究所；被检血清用 0.01mol/L pH7.4PBS 稀释成 20、40、80、160、320、640、1280、2560、5120 和 10240 倍后测定。

1.2.2.2 试验步骤：抗原包被→封闭→洗涤→加被检血清→洗涤→加酶结合物→洗涤→加底物→加终止液→酶标仪用波长 490nm 进行测试纪录结果。同时用 1、5 号兔的自身蛋白和 BSA 进行包板，分别检测 1、5、6 号兔的抗载体效价。2、3、4 号兔的抗载体效价用琼脂扩散法 (AGP) 进行检测。

1.2.3 免疫球蛋白的纯化，按现有的纯化方法进行。

1.3 免疫胶体金制备

1.3.1 胶体金制备：取 0.01% 氯金酸水溶液 50ml ，加热煮沸，加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 1.5ml ，冷却后以蒸馏水恢复到原体积。金颗粒直径为 $8-10\text{nm}$ 。加 1% 柠檬酸三钠水溶液 1.25ml 则为直径 $18-20\text{nm}$ 的金颗粒。

1.3.2 胶体金标记：待胶体金抗体标记量标定后以 $10\%-20\%$ 过量计入。在搅拌下将胶体金和抗体混合，10 分钟后加入 BSA 作为稳定剂，终浓度为 0.1% 。

1.3.3 金标抗体的纯化：改用差速离心法。对 $8-10\text{nm}$ 金标抗体先 4°C 15000r/min 离心 10 分钟，去除沉淀，然后 4°C 45000r/min 45 分钟； $18-20\text{nm}$ 金标抗体先 4°C 8000r/min 离心 10 分钟，去除沉淀，然后 4°C 15000r/min 45 分钟。去上清，沉淀用 0.01mol/L pH7.2 含 0.1% BSA 的 PBS 溶液恢复体积。再离心一次。将金标抗体液稀释到 520nm 光吸收值为 1.5 后用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤 4°C 保存备用。

1.4 免疫金试纸条制备

1.4.1 材料：硝酸纤维素膜 (NAC 膜)：孔径 $5\mu\text{m}$ ，上海医药工业研究院产品。玻璃纤维纸：南京玻璃纤维设计研究院产品 80g/m^2 。吸水滤纸：采用上海造纸厂生产的滤纸。葡萄球菌 A 蛋白 (Protein A) 纯品：卫生部上海生物制品研究所。

1.4.2 层析膜的处理：将 NAC 膜按 $25\times 100\text{mm}$ 的尺寸裁剪，将载体 CL 和 Protein A 用 0.01mol/L pH7.4PBS 缓冲液调节其浓度至 1mg/ml ，用洁净的钢笔吸取该溶液，在 NAC 膜的固定位置用直尺配合划线，室温干燥 30 分钟，将此膜置于 0.01mol/L pH7.4 PBS 含 1% BSA 的缓冲液中浸泡 30 分钟，于 37°C 蒸发脱水 1 小时，干燥处保存。金标抗体玻璃纤维：在 5

×100mm 的玻璃纤维上滴加金标抗体，每 1cm²加 0.1ml，冷冻干燥后备用。试纸条的装配按参考文献进行^[9]。装配好的纸板按纵向剪切成宽度为 4mm 的条状，即得快速诊断试纸条。

1.5 检测方法

将试纸条平放在桌面上，直接滴入 2 滴（约 100 μl）尿液，或将试纸条加样端直接插入尿液，如图 1 所示。此时尿液在毛细管作用下向试纸条的另一端缓缓移行，将冻干的金标抗体溶解并带动它向前移行，约十分钟尿液即可到达吸水纸。如果尿液中含有 CL，它们将和载体 CL 在检测区（T）竞争有限的抗体结合位置。

如图 2 所示，当尿样中 CL 浓度达到一定量时，它将占据所有的抗体结合位点，因而阻止了载体 CL 与金标抗体的结合，这样检测区无颜色线条出现。CL 与金标抗体结合物继续运行到达质控线（C），与固定的 Protein A 结合，在 C 线处出现红色线表示阳性。反之尿液中无 CL，金标抗体与载体 CL 结合，在 T 线处出现红色线，为阴性。反应 10 分钟左右根据色带判定结果，如 T 线和 C 线均出现浅红色线条，则结果判定为弱阳性。如 T 线和 C 线均无颜色线条出现，则说明检测试纸条失效。

1.6 免疫金试纸条检测试验

1.6.1 敏感性试验：将 CL 纯品分别用蒸馏水和猪尿液稀释成每毫升含 10-320ng，用 8-10nm 与 18-20nm 金标抗体检测试纸条进行试验。

1.6.2 保存期试验：将装配好的免疫金试纸条（干燥包装）放入室温、4-8℃和-20℃冰箱保存 20、40、60、80 天后，每次取 3 条试纸对阳性样品进行检测。

1.6.3 金标抗体工作浓度选择：将 8-10nm 金标抗体稀释到 $A_{520nm}=1.0, 1.5, 2.0, 2.5$ ，分别制备成检测试纸条，对阳性样品进行检测。

1.6.4 检测试验：对采集的 86 份 ELISA 检测试剂盒（国产）为阴性和 42 份为阳性保存的样品进行检测。

1.6.5 操作方法比较试验：将被检样品定量滴加与直接吸入及在小试管中加样，检验其对试验结果的影响。（图 1）

1.7 单抗金标试纸条检测平行试验：将本试验研制的免疫金试纸条与上海赛群生物工程有限公司研制的金标检测试纸条（批号 040106）对 ELISA 检测为阳性的 20 份样品进行检测比较试验。

2 结果

2.1 兔抗 CL 血清效价测定结果：测定结果见表 1。效价判定以 OD 值 0.1 以上为阳性，

判定结果见表2和图3,4号兔免疫后15天血清中抗CL的抗体ELISA效价最高可达1:40960。

表1 间接ELISA检测血清抗CL效价 ($A_{490\text{ nm}}$ 值)

动物编号	血清稀释度									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
1 10天	0.87	0.66	0.79	0.61	0.32	0.21	0.11	0.03	0.00	0.01
15天	1.72	1.44	0.92	0.65	0.68	0.47	0.47	0.28	0.13	0.02
2 10天	0.97	0.97	0.68	0.60	0.32	0.27	0.12	0.04	0.00	0.00
15天	2.20	1.56	1.22	1.04	0.51	0.60	0.32	0.23	0.21	0.08
3 10天	1.87	1.07	0.83	0.97	0.78	0.53	0.29	0.21	0.01	0.04
15天	2.26	1.58	1.37	1.19	0.82	0.75	0.72	0.42	0.17	0.16
4 10天	2.76	2.32	2.10	1.83	1.56	1.21	0.97	0.71	0.56	0.18
15天	2.94	2.78	2.54	2.23	2.21	1.89	1.74	1.43	1.30	0.96
5 10天	1.02	0.86	0.33	0.15	0.06	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03
15天	2.26	1.47	0.99	1.01	0.74	0.37	0.14	0.05	0.01	0.02
6 10天	1.30	0.56	0.47	0.27	0.16	0.09	0.05	0.00	0.00	0.00
15天	1.51	1.19	1.15	0.78	0.42	0.34	0.31	0.10	0.01	0.00
7 对照	0.00	0.03	0.00	0.05	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00

注：4号兔1:40960其OD值为0.11

表2 间接ELISA检测血清抗CL抗体效价判定结果

兔号	1	2	3	4	5	6
免疫后10天效价	1280	1280	2560	10240	160	640
免疫后15天效价	5120	5120	10240	40960	1280	2560

2.2 血清中抗载体效价检测结果：效价判定以OD值0.1以上为阳性，判定结果见表3。6号兔抗BSA载体效价10天为1:320，15天为1:1280。1、5号兔无抗载体效价。2、3、4号兔AGP检测结果均为阴性。

表3 间接 ELISA 检测血清抗载体效价 ($A_{490\text{nm}}$ 值)

编号	血清稀释度										
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	
1	10天	0.08	0.08	0.06	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	15天	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03	0.04	0.05	0.02	0.06
5	10天	0.09	0.04	0.04	0.03	0.01	0.04	0.04	0.00	0.00	0.03
	15天	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.01	0.03	0.03	0.02
6	10天	0.99	0.60	0.41	0.20	0.11	0.06	0.02	0.00	0.00	0.00
	15天	1.47	1.41	0.61	0.47	0.26	0.21	0.10	0.05	0.00	0.00

2.3 试纸条敏感性检测试验结果:由表4可知8-10nm金标抗体的敏感性稍高于18-20nm的金标抗体,检测CL的灵敏度为40ng/ml。

表4 免疫金试纸条敏感性试验结果

CL含量 (ng)		10	20	40	80	160	320
8-10nm	蒸馏水稀释结果判定	-	-	±	+	+	+
	猪尿稀释结果判定	-	-	±	+	+	+
18-20nm	蒸馏水稀释结果判定	-	-	±	±	+	+
	猪尿稀释结果判定	-	-	±	±	+	+

注:“-”为阴性;“±”为弱阳性;“+”为阳性

2.4 试纸条保存期试验结果:具体结果见表5,如表中条件保存80天后,试纸条依然有效,保存期试验仍在继续进行。

表5 免疫金试纸条保存期试验结果

保存时间(天)	20	40	60	80
室温保存检测结果	+	+	+	+
4-8℃保存检测结果	+	+	+	+
-20℃保存检测结果	+	+	+	+

2.5 金标抗体工作浓度选择与检测方法比较试验结果: $A_{520\text{nm}}=1.5, 2.0, 2.5$ 不同稀释度的金标抗体制备的试纸条对阳性样品的测试结果无明显影响。当 $A_{520\text{nm}}=1.0$ 时,颜色明显偏

淡，判定结果困难。故金标抗体的工作浓度定为 $A_{520nm}=1.5$ 。

2.6 免疫金试纸条检测猪尿样结果：免疫金试纸条对保存样品进行检测，结果 86 份 ELISA 试剂盒检测阴性样品全为阴性，42 份阳性样品中 39 份为阳性，1 份为弱阳性，2 份阴性。两法阴性符合率为 100%。阳性符合率为 95.2%。

2.7 操作方法比较结果：被检阳性、阴性各 2 份样品定量滴加 100u1 与将试纸条的玻璃纤维端直接插入尿液，深度不超过 15mm，20 秒种后取出放于桌面，或将检测试纸条放入小试管直立，底部加入被检样品 100u1，10 分钟左右观察结果。以上三种方法其检验结果无差异。

2.8 平行试验结果：2 份 ELISA 法阳性、本试验研制试纸条未检出样品，单抗金标试纸条法检出 1 份为阳性，1 份为阴性。其余 18 份尿样均为阳性。

根据现有理论，CL 的免疫必须借助于大分子刺激机体，才能产生特异性免疫应答。试验结果证明自身蛋白作 CL 的载体免疫原性好于异源蛋白（BSA）。免疫后 15 天血清中抗 CL 的抗体 ELISA 效价最高可达 1：40960。不同自身蛋白载体制备的 CL 抗体效价不同。建立灵敏度高、特异性强的检测方法，获得高纯度的抗体是关键。自身蛋白做载体理论上不诱导机体产生针对载体本身的抗体。抗载体效价检测结果也证实了这一点，这样可以消除异源蛋白载体本身的干扰作用。本具体实施方式免疫免产生了效价高、特异性强的针对 CL 的抗体，这为免疫金试纸条的研制提供了良好的技术储备。试验表明，有限增加载体蛋白（全血清）和 CL 连接量，其抗体效价明显提高。

上述试纸条检测操作方法比较试验表明，定量加样与试纸直接插入尿样或在小试管中加样其检验结果无差异。在对检测方法进行了改进，提出了检测时将试纸条直立倒插于小试管中，并根据现场取样先后在试管上编号，加入尿样后用塞子封口，到时直接观察，这样既卫生便于操作又不污染环境。

为取得颗粒直径较为均一的金标抗体，可以将超速离心法进行适度改进，改为差速离心法，先用较高速离心去除较大金颗粒，再经高速或超速离心将金标抗体的溶胶颗粒沉降下来，要根据颗粒大小确定适当的转速和时间，否则由于较大离心力的作用，易发生胶体金颗粒凝集。

免疫金试纸法对 CL 检测最显著的特点（表 6）是简单快速；特异敏感；结果直观可靠；无需仪器设备，任何人不需培训根据说明书即可操作，将检测“瘦肉精”的筛选方法简化到了最为简便的程度，有很高的实用性、可靠性和稳定性，具有推广应用潜力。而部颁检

测法具有互补作用。该法与 ELISA 法相比省却了酶标的致癌性底物及终止液的步骤，安全无毒；利用质控点保证了整个检测过程的有效性。

表6 CL 检测方法比较

方法	仪器	检测成本	检测份数	检测时间	灵敏度	检测性质
气相色谱-质谱法	固定高档设备	300 元	单份	2-3 天	ng	定量
ELISA	移动	30 元	多份	2-3 小时	1ng	定性
免疫金试纸法	无	3 元	单份	10 分钟	40ng	定性

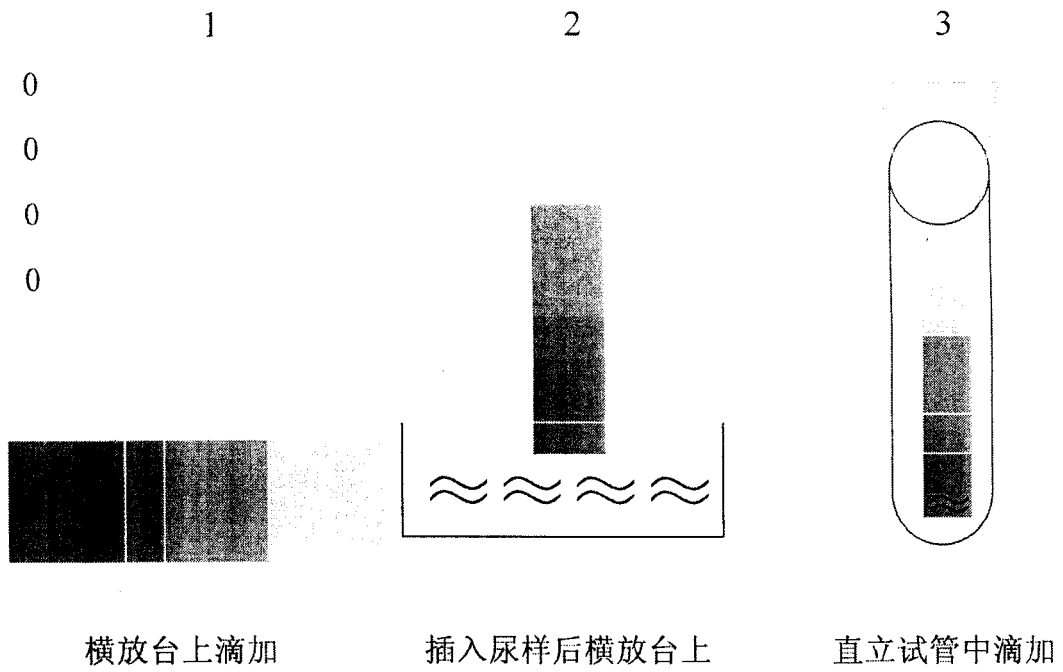


图 1

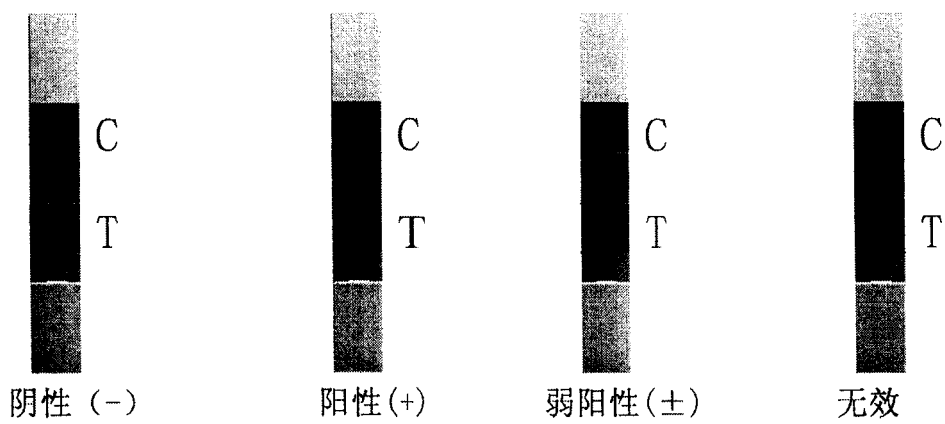


图 2

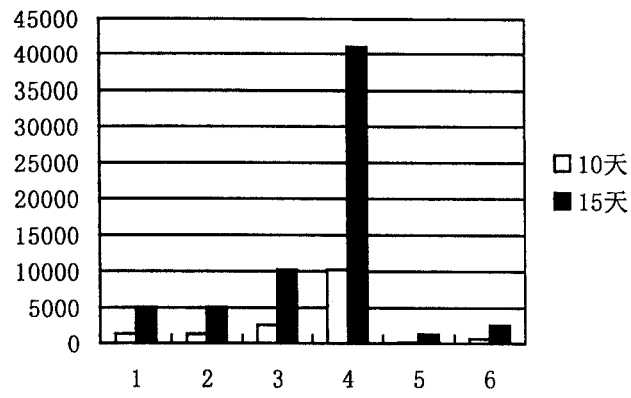


图 3

专利名称(译)	一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN1920561A	公开(公告)日	2007-02-28
申请号	CN200510029002.4	申请日	2005-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海市上海中学		
申请(专利权)人(译)	上海市上海中学		
当前申请(专利权)人(译)	上海市上海中学		
[标]发明人	刘见		
发明人	刘见		
IPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用以检测瘦肉精的抗体的制备方法，其首先采取动物血液，分离血清制备全血清蛋白液；然后将制备的全血清蛋白液混入碳酸盐缓冲液中，然后加入偶氮液，制取载体联合物；再取载体联合物与佛氏完全佐剂放入灭菌青霉素瓶中，在混合器上振荡混合至完全乳白色，形成CL佛氏完全佐剂乳化液；另取载体联合物与佛氏不完全佐剂乳化；最后将制备的CL佛氏完全佐剂乳化液接种于动物免疫，免疫后7天进行第二次免疫CL佛氏不完全佐剂乳化液；10天和15天分别采取动物血液，分离血清，获得抗体。本发明采用自身蛋白特别是全血清作CL的免疫载体，能使免疫动物产生ELISA效价最高达4万以上的特异性抗体；用该抗体建立免疫金试纸法快速检测尿样中的CL，其灵敏度为40ng/ml。

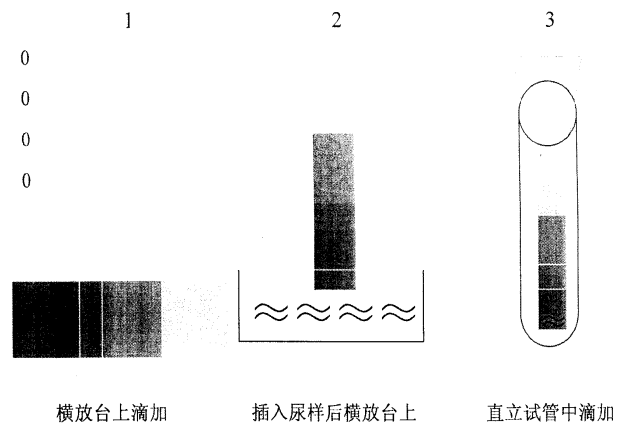


图 1