



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102323406 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110322371. 8

(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 刘晓云 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 33/52 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

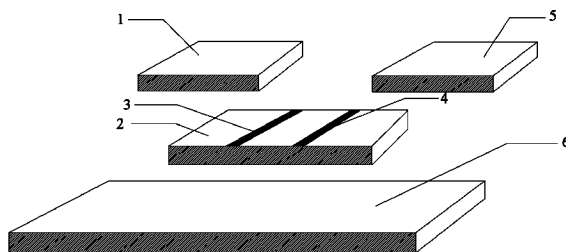
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

荧光定量检测莱克多巴胺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莱克多巴胺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 RCT-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 RCT 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. 一种荧光定量检测莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,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 RCT-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 RCT 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莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,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 0.2 ~ 4mg/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莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,其特征是,所述硝酸纤维素包被膜检测区, RCT-BSA 偶联物的包被液浓度为 0.2 ~ 4mg/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莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,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 ~ 1.5mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm; RCT-BSA 偶联物的包被液浓度为 1 ~ 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莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,其特征是,所述荧光标记液中的荧光标记 RCT 抗体的浓度为 2 ~ 5ug/ml,荧光标记兔 IgG 的浓度为 2 ~ 5ug/ml。

6. 根据权利要求 5 所述的荧光定量检测莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,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 18-22mg 的荧光素或 480-520mg 荧光胶乳标记物与 50mg RCT 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 18-22mg 的荧光素或 480-520mg 荧光胶乳标记物与 65mg RCT 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 45mg RCT 抗体或兔 IgG,用 pH8.0 ~ pH9.6 碳酸缓冲液溶解或悬浮 18-22mg 荧光素或 480-520mg 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。

荧光定量检测莱克多巴胺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莱克多巴胺(RCT)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] 常见的兴奋剂有克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等,克仑特罗俗称“瘦肉精”。随着中国对克仑特罗监管力度的加大,莱克多巴胺的使用逐渐减少,其他 β -兴奋剂的使用逐渐增加。莱克多巴胺是美国最新研制出的一种 β -兴奋剂,1999年12月美国食品与药品管理局(FDA)批准莱克多巴胺可以使用在猪养殖,莱克多巴胺也是欧盟唯一允许使用的 β -兴奋剂。中国也有研制专利报道,莱克多巴胺正作为克仑特罗的替代品被广泛使用。但中国农业部、卫生部、国家药品监督管理局明文禁止莱克多巴胺用于动物养殖,因此开发莱克多巴胺的快速、准确的测定试剂盒是当务之急。

[0003] 在现有技术中,张漫、罗晓琴等(《动物保健》2006年09期,《莱克多巴胺残留检测方法》)认为在莱克多巴胺的残留检测方法中,酶联免疫方法是目前最理想的检测方法,具有快速、简便、操作简单以及一次检测样品量大的特点,可以直接对尿液、饲料样品进行检测。

[0004] 申请号为200510071059.0的发明专利,涉及一种莱克多巴胺检测方法,是利用免疫亲和层析柱及酶联免疫吸附的方法来检测食品中的莱克多巴胺残留,首先通过合成抗原、包被抗原、动物免疫、抗体纯化等步骤制备多克隆抗体,再将此抗体交联到琼脂糖凝胶上,制备免疫亲和层析柱。被检样品处理后,通过亲和柱以富集其中的莱克多巴胺,收集亲和柱的洗脱液进行酶联免疫吸附检测,以确定其中的莱克多巴胺的含量。

[0005] 但是上述两种方法均是液相检测,溶液操作,以吸光度来定量检测莱克多巴胺,不便于在现场大规模筛查和地域偏远不发达的地区使用。

[0006] 申请号为200520136528.8,发明名称为莱克多巴胺胶体金免疫层析检测试纸的实用新型专利,是由吸收层、胶体金标记层、检测反应层以及吸水层依次设置在背衬上组成。但是以胶体金法检测,缺点是灵敏性较差,检测限较难质控。另外,使用标记垫固相反应的缺点为:生产工艺复杂化,且每次反应的结果均有较大的出入,误差较大,影响检测结果的灵敏性和精确度。

发明内容

[0007] 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定量检测莱克多巴胺的免疫层析试剂盒。

[0008] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案:

[0009] 一种荧光定量检测莱克多巴胺(RCT)的免疫层析试剂盒,该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 RCT-BSA 偶联物(莱克多巴胺-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 RCT 抗体(莱克多巴胺抗体)和荧光标记兔 IgG。

[0010] 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。

[0011] 优选地,所述硝酸纤维素包被膜检测区(T区),RCT-BSA 偶联物的包被液浓度为 0.2 ~ 4mg/ml,用量为 90 μ l/27-35cm。

[0012] 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 ~ 1.5mg/ml;RCT-BSA 偶联物的包被液浓度为 1 ~ 2mg/ml。

[0013] 优选地,所述荧光标记液中的荧光标记 RCT 抗体的浓度为 2 ~ 5ug/ml,荧光标记兔 IgG 的浓度为 2 ~ 5ug/ml。使用时,采用相同的浓度。所述荧光标记液的激发波长(Ex)310 ~ 550nm,发射波长为 340 ~ 620nm。

[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 18-22mg 的荧光素或 480-520mg 荧光胶乳标记物与 50mgRCT 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 18-22mg 的荧光素或 480-520mg mg 荧光胶乳标记物与 65mgRCT 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 45mg RCT 抗体或兔 IgG,用 pH8.0 ~ pH9.6 碳酸缓冲液溶解或悬浮 18-22mg 荧光素或 480-520mg 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,用上述碳酸缓冲液透析过夜,用荧光保护剂复溶。

[0023] 本发明所述的莱克多巴胺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 RCT 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 RCT 抗体可与尿液中的 RCT 结合,形成复合物;而包被在硝酸纤维素膜上检测区(T)的 RCT-BSA 偶联物也竞争结合荧光标记 RCT 抗体。当含 RCT 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 RCT 量越多,可与 T 区 RCT-BSA 偶联物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 RCT 含量。

[0024] 本发明的莱克多巴胺免疫层析试纸条与 GC/MS、HPLC 等色谱仪器以及酶免法检测莱克多巴胺相比,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] 本发明的莱克多巴胺层析试剂盒,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 秒就能对莱克多巴胺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莱克多巴胺残留;莱克多巴胺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(80u1),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莱克多巴胺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莱克多巴胺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莱克多巴胺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。

[0030] 在本发明实施例中,所采用的 RCT 抗体为常规单克隆抗体技术制备的单抗,所采用的 RCT-BSA 偶联物(即莱克多巴胺抗原)即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,荧光定量检测莱克多巴胺免疫层析试剂盒,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 上而构成,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 0.5mg/ml RCT-BSA 偶联物(即莱克多巴胺抗原)包被液,使用量为 90u1/27cm。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 90u1/27cm。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 50mg RCT 抗体或 50mg 兔 IgG 混合后,边搅

拌边缓慢加入 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-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 RCT 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,荧光定量检测莱克多巴胺免疫层析试剂盒,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 1mg/ml RCT-BSA 偶联物(即莱克多巴胺抗原)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。

[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 65mg RCT 抗体或 65mg 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 RCT 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 5ug/ml,分装备用。

[0046] 实施例三

[0047] 在该实施例中,荧光定量检测莱克多巴胺免疫层析试剂盒,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 1.5mg/ml RCT-BSA 偶联物(即莱克多巴胺抗原)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 2mg/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 45mg RCT 抗体或 45mg 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 RCT 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 3ug/ml,分装备用。

[0053] 本发明所述的莱克多巴胺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莱克多巴胺的免疫层析试剂盒,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莱克多巴胺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莱克多巴胺的免疫层析试纸条的检测区和质控区,该荧光定量检测莱克多巴胺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 ~ 150ul 的样本(尿样/提取液)与荧光标记液等量混合,混匀后吸取 50 ~ 150ul,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 所述的定量莱克多巴胺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 范围内测定莱克多巴胺的准确性高:定量曲线线性系数均大于 0.99,样本中含 1ppb 与 2ppb 浓度的莱克多巴胺其准确度为 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 (北京望尔生物技术有限公司)
曲线线性系数	-	0.998	0.994	0.997	0.99
1ppb 浓度的 莱克多巴胺 准确度	-	84%-106.8%	90.3%-117.5%	85%-116%	70%~90%
2ppb 浓度的 莱克多巴胺 准确度	-	87%-107.0%	91%-110%	82%-106%	70%~90%
检出限	3ppb~5ppb	0.5 ppb	0.2 ppb	0.2 ppb	0.5ppb

[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。

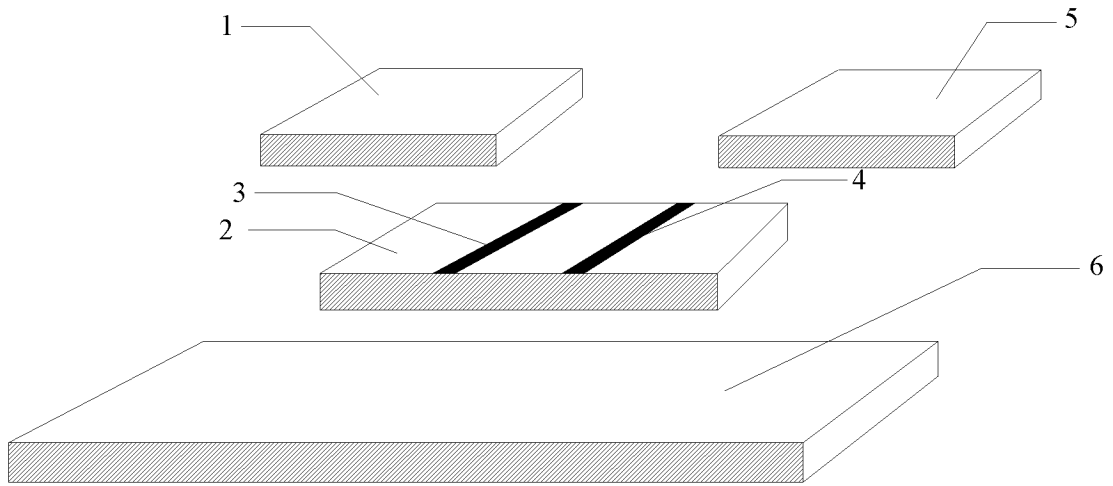


图 1

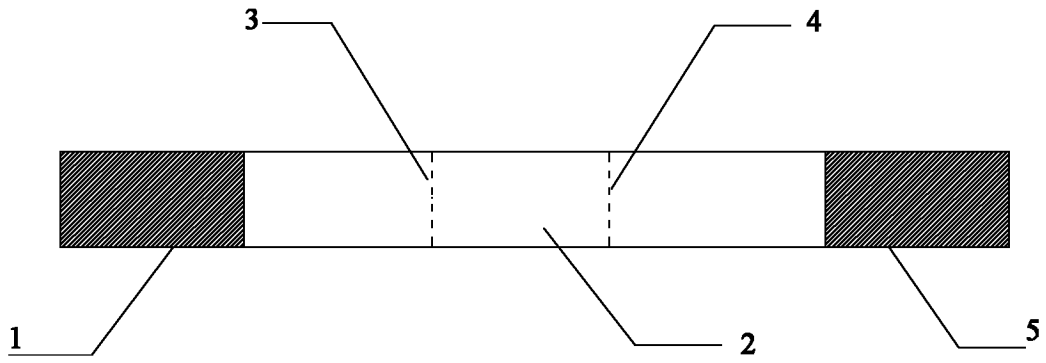


图 2

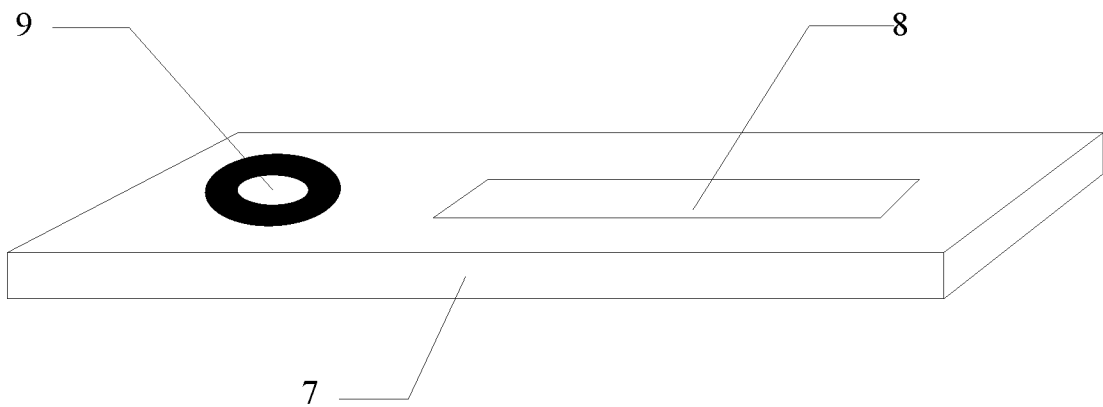


图 3

专利名称(译)	荧光定量检测莱克多巴胺的试剂盒和荧光标记液的制备方法		
公开(公告)号	CN102323406A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN201110322371.8	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 刘晓云 唐海波		
发明人	王继华 刘晓云 唐海波		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/52 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莱克多巴胺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RCT-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RCT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。

