

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/549 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710023330.2

[43] 公开日 2007年11月21日

[11] 公开号 CN 101074954A

[22] 申请日 2007.6.7

[21] 申请号 200710023330.2

[71] 申请人 盛青松

地址 214058 江苏省无锡市北塘区凤翔路118号黄巷医院内申瑞生物制品有限公司

[72] 发明人 盛青松

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 曹祖良

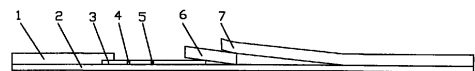
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

盐酸克伦特罗快速检测试剂盒及其制造方法

[57] 摘要

本发明涉及一种盐酸克伦特罗快速检测试剂盒以及该试剂盒的制造方法，在检测试剂盒的检测单元中包含用于支撑整个检测系统的塑料外壳、支撑反应体系的 PVC 板条、用于提供层析系统的吸水纸、用于吸附反应物的硝酸纤维素膜和玻璃纤维、反应物(包括盐酸克伦特罗 - BSA 偶联物，抗猪 IgG 抗体、结合染料的盐酸克伦特罗 - BSA 抗体、等等)。在整个试剂盒内还包括用于防止潮湿的干燥剂。本发明的试剂盒检测速度快，并且在检测过程中不需要任何辅助设备，检测成本低廉，不需要投入大量昂贵的检测设备。这使得现场快速检测成为可能并将成为限制盐酸克伦特罗滥用的有力手段。



1、一种盐酸克伦特罗快速检测试剂盒，其特征是：在检测试剂盒中包含用于支撑整个检测系统的塑料外壳、位于外壳内的用于支撑反应体系的PVC板条，在PVC板条上设置用于提供层析系统的吸水纸及用于吸附反应物的硝酸纤维素膜和玻璃纤维及反应物；所述反应物包括盐酸克伦特罗-BSA 0.5~1.5mg/l，抗猪-IgG 抗体 0.8~2mg/l、盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物 0.5~2mg/l。

2、根据权利要求1所述的盐酸克伦特罗快速检测试剂盒，其特征是：在PVC板条(2)上设置两条吸水纸(1)与(7)，在两条吸水纸(1)、(7)之间的PVC板条(2)上设置硝酸纤维素膜(3)，该硝酸纤维素膜的一端与一条吸水纸(1)接触，另一端与位于PVC板条(1)上的玻璃纤维(6)接触，该玻璃纤维(6)的另一端与另一条吸水纸(7)接触，在硝酸纤维素膜上吸附有相互隔开的盐酸克伦特罗-BSA 抗体(4)与抗猪-IgG 抗体(5)。

3、权利要求1所述的盐酸克伦特罗快速检测试剂盒的制造方法，其特征是：该方法包含如下步骤：

(一) 反应物制备

A、抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体的制备：将盐酸克伦特罗-BSA 复合物与佐剂按照 10: 1~15: 1 的比例混合，然后对动物进行免疫注射，共进行 2~4 次免疫注射；最后取动物血清，用硫酸沉淀法取得盐酸克伦特罗-BSA 抗体；

B、抗猪 IgG 抗体的制备：将猪 IgG 与佐剂按照 10: 1~15: 1 的比例混合，然后对动物进行免疫注射，共进行 2~4 次免疫注射，最后取动物血清，用硫酸沉淀法取得抗猪 IgG 抗体；

C、抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的制备：将盐酸克伦特罗-BSA 抗体与生物染料按照 1: 1~1: 8 的比例进行混合，形成混合物，再搅拌 5~20 小时后离心，使混合后的盐酸克伦特罗-BSA 抗体与生物染料沉淀，然后取沉淀物用蒸馏水稀释至溶液状态；

(二) 试剂盒制备

A、反应物的包被与吸附；

(a) 盐酸克伦特罗-BSA 的包被与干燥：将盐酸克伦特罗-BSA 按照 0.5~1.5mg/l 的浓度喷涂到硝酸纤维素膜上；然后通风晾干；

(b) 抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的吸附与干燥：将盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物按照 0.5~2mg/l 的浓度，按照 1mL/cm² 的用量使之吸附在玻璃纤维上，干燥密封保存；

(c) 抗猪-IgG 抗体的包被与干燥：将抗猪-IgG 抗体按照 0.8~2mg/l 的浓度喷涂到硝酸纤维素膜上，然后通风晾干；

(d) 辅材的封闭与处理：用 5~20g/l 的浓度的脱脂奶粉溶液浸泡上下端吸水纸，通风晾干；

B、反应体系的组装与切割

(a) 将带有盐酸克伦特罗-BSA 和抗猪-IgG 抗体的硝酸纤维素膜(3) 粘贴到用于支撑整个反应体系的 PVC 板条(2) 上，同时将吸附有盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的玻璃纤维(6) 与硝酸纤维素膜(3) 相连形成一个桥式结构；

(b) 在抗猪-IgG 抗体端的 PVC 板条(2) 上粘贴吸水纸，另一端也粘贴吸水纸，形成联通的吸水桥式结构，保证毛细管虹吸作用的形成；

(c) 用切纸刀将板条按照需要切割成试剂条；

C、试剂盒的组装和分装

将切割好的试剂条装入塑料壳，封闭成型；

将封闭成型的试剂按照包装规格进行分装。

盐酸克伦特罗快速检测试剂盒及其制造方法

技术领域

本发明涉及一种快速检测家畜体内盐酸克伦特罗含量的试剂盒以及该试剂盒的制造方法。

背景技术

盐酸克伦特罗（HCl-clenbuterol）简称克伦特罗，商品名称为克喘素、息喘宁、舒喘宁、平喘素、安喘素及瘦肉精，是选择性 β_2 -肾上腺素受体激动剂。它是白色或类白色的结晶性粉末，无臭，味苦，具有调节动物神经兴奋及其体内营养素重分配的功能。其化学性质稳定，加热至 172℃ 时才分解，一般方法不能将其破坏。肠道吸收快，作用时间持久，药理作用强。畜种作用范围广泛、药效强劲、选择性高、易吸收、固定难分解、溶化。

克伦特罗开始使用是作为治疗哮喘的兽药，它可引起交感神经兴奋，在治疗剂量下，能强而持久地松弛支气管平滑肌，从而治疗哮喘。后来在猪、牛、羊等肉畜饲料中添加应用，减缓或减少脂肪沉积，增加肌肉蛋白沉积，使营养重新分配，从而改善肉畜胴体品质（提高瘦肉率、减少脂肪率）。克伦特罗能激动脂肪组织的 β -肾上腺素受体，使脂肪激酶活化，促进甘油三酯分解成游离脂肪酸和甘油，动物体内脂肪动用产热，基础代谢水平提高。

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家畜肉出现中毒。Zimmer（1976）证实人内服 20 μ g 的 14C-盐酸克伦特罗，峰浓度时，血浆中克伦特罗原形药占总的 14C-盐酸克伦特罗的 75%。克伦特罗内服生物利用度高的事实对估计消费者食用了含有克伦特罗的组织，从中获得的克伦特罗的量很重要。引起人中毒的动物组织含有克伦特罗原形药的量差异很大。Martinez-Navarro(1990)报道犊牛肝中克伦特罗原形药的残留量为 161~291 ppb，Pulce 等（1991）报道犊牛肝中克伦特罗的残留量为 375~500 ppb，Salleras 等（1995）报道犊牛肝中克伦特罗的残留量为 19~5395 ppb。此外，Maistro 等（1995）报道犊牛肌肉中克伦特罗的残留量为 500 ppb。

盐酸克伦特罗的应用对动物有害，在饲用初期会在短期内出现如下症状：血压升高、血管扩张、心率加快、呼吸加剧、体温上升、心脏和肾脏负担加重等剧烈反应，并出现采食下降、行为动作失调、神经紧张不安甚至全身震

颤等症状。而且动物长期饲用会使机体内部受体数目减少，失去对盐酸克伦特罗的敏感性，导致动物自身促肌肉生长效应逐渐丧失，只有连续使用才会保持已获得的效果。虽然定期停药可恢复机体对盐酸克伦特罗的敏感性，但它使已获得的效果迅速丢失，直接损伤肉畜的机体。

人食用了含有克喘素等盐酸克伦特罗残留的肉食，会出现类似于动物甚至比动物更严重的症状。它可引起血压升高、血管扩张、心跳加快、呼吸加剧、体温升高、肌肉颤抖，使患者产生头痛、胸闷、神经过敏、肌肉痛疼、心悸、恶心、呕吐等症状。更为严重的是它可诱发和加重心率失常病人的病情，引起心室早搏，四肢、脸、颈部骨骼肌震颤。另外还引起代谢紊乱，产生酮体，对糖尿病人可发生酸中毒或酮中毒。盐酸克伦特罗对人体危害的持续时间较长，虽然目前未有中毒患者死亡的报道，但给患者的精神、健康及正常生活工作造成了严重危害。

我国政府严令申明不得在家畜的饲料及其他添加物中使用盐酸克伦特罗，并且通过相关政策手段对相关领域进行行政干预和抽检。

发明内容

本发明的目的是克服现有检测技术中存在的不足，提供一种操作简单、方便，不需要依靠专业仪器和专业人士就能定性检测家畜体内盐酸克伦特罗含量水平的试剂盒。

本发明的另一目的则是提供一种上述试剂盒的制备方法。

按照本发明提供的技术方案，在检测试剂盒中包含用于支撑整个检测系统的塑料外壳、位于外壳内的用于支撑反应体系的 PVC 板条，在 PVC 板条上设置用于提供层析系统的吸水纸及用于吸附反应物的硝酸纤维素膜和玻璃纤维及反应物；所述反应物包括盐酸克伦特罗-BSA 0.5~1.5mg/l，抗猪-IgG 抗体 0.8~2mg/l、盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物 0.5~2mg/l。

在 PVC 板条上设置两条吸水纸，在两条吸水纸之间的 PVC 板条上设置硝酸纤维素膜，该硝酸纤维素膜的一端与一条吸水纸接触，另一端与位于 PVC 板条上的玻璃纤维接触，该玻璃纤维的另一端与另一条吸水纸接触，在硝酸纤维素膜上吸附有相互隔开的盐酸克伦特罗-BSA 抗体与抗猪-IgG 抗体。

盐酸克伦特罗快速检测试剂盒的制造方法包含如下步骤：

(一) 反应物制备

A、抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体的制备：将盐酸克伦特罗-BSA 复合物

与佐剂按照 10: 1~15: 1 的比例混合, 然后对动物进行免疫注射, 共进行 2~4 次免疫注射; 最后取动物血清, 用硫酸沉淀法取得盐酸克伦特罗-BSA 抗体;

B、抗猪 IgG 抗体的制备: 将猪 IgG 与佐剂按照 10: 1~15: 1 的比例混合, 然后对动物进行免疫注射, 共进行 2~4 次免疫注射, 最后取动物血清, 用硫酸沉淀法取得抗猪 IgG 抗体;

C、抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的制备: 将盐酸克伦特罗-BSA 抗体与生物染料按照 1: 1~1: 8 的比例进行混合, 形成混合物, 再搅拌 5~20 小时后离心, 使混合后的盐酸克伦特罗-BSA 抗体与生物染料沉淀, 然后取沉淀物用蒸馏水稀释至溶液状态;

(二) 试剂盒制备

A、反应物的包被与吸附;

(a) 盐酸克伦特罗-BSA 的包被与干燥: 将盐酸克伦特罗-BSA 按照 0.5~1.5mg/l 的浓度喷涂到硝酸纤维素膜上; 然后通风晾干;

(b) 抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的吸附与干燥: 将盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物按照 0.5~2mg/l 的浓度, 按照 1mL/cm² 的用量使之吸附在玻璃纤维上, 干燥密封保存;

(c) 抗猪-IgG 抗体的包被与干燥: 将抗猪-IgG 抗体按照 0.8~2mg/l 的浓度喷涂到硝酸纤维素膜上, 然后通风晾干;

(d) 辅材的封闭与处理: 用 5~20g/l 的浓度的脱脂奶粉溶液浸泡上下端吸水纸, 通风晾干;

B、反应体系的组装与切割

(a) 将带有盐酸克伦特罗-BSA 和抗猪-IgG 抗体的硝酸纤维素膜 (3) 粘贴到用于支撑整个反应体系的 PVC 板条 (2) 上, 同时将吸附有盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的玻璃纤维 (6) 与硝酸纤维素膜 (3) 相连形成一个桥式结构;

(b) 在抗猪-IgG 抗体端的 PVC 板条 (2) 上粘贴吸水纸, 另一端也粘贴吸水纸, 形成联通的吸水桥式结构, 保证毛细管虹吸作用的形成;

(c) 用切纸刀将板条按照需要切割成试剂条;

C、试剂盒的组装和分装

将切割好的试剂条装入塑料壳, 封闭成型;

将封闭成型的试剂按照包装规格进行分装。

可以特异性地定性检测被检测样本中盐酸克伦特罗的含量, 无需任何辅

助设备。

本发明利用免疫学的原理，利用盐酸克伦特罗-BSA 及其偶联物抗体的特点，迅速检测样品中盐酸克伦特罗的含量以达到快速检测的目的。整个现场检测只需 5 分钟，并且在检测过程中不需要任何辅助设备，这使得现场快速检测成为可能。

附图说明

图 1 为试剂盒结构图。

具体实施方式

在检测试剂盒中包含用于支撑整个检测系统的塑料外壳、位于外壳内的用于支撑反应体系的 PVC 板条，在 PVC 板条上设置用于提供层析系统的吸水纸及用于吸附反应物的硝酸纤维素膜和玻璃纤维及反应物；所述反应物包括盐酸克伦特罗-BSA 0.5~1.5mg/l，抗猪-IgG 抗体 0.8~2mg/l、盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物 0.5~2mg/l。

在 PVC 板条 2 上设置两条吸水纸 1 与 7，在两条吸水纸 1、7 之间的 PVC 板条 2 上设置硝酸纤维素膜 3，该硝酸纤维素膜的一端与一条吸水纸 1 接触，另一端与位于 PVC 板条 1 上的玻璃纤维 6 接触，该玻璃纤维 6 的另一端与另一条吸水纸 7 接触，在硝酸纤维素膜上吸附有相互隔开的盐酸克伦特罗-BSA 抗体 4 与抗猪-IgG 抗体 5。

下面结合具体实施例对本发明作进一步地说明。

（一）反应物制备

1、抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体的制备：将盐酸克伦特罗-BSA 复合物与佐剂按照 10：1~15：1 的比例混合，然后对动物进行免疫注射，共进行 3 次免疫。最后取动物血清，用硫酸沉淀法取得盐酸克伦特罗-BSA 抗体。

2、抗猪 IgG 抗体的制备：将猪 IgG 与佐剂按照 10：1~15：1 的比例混合，然后对动物进行免疫注射，共进行 3 次免疫，最后取动物血清，用硫酸沉淀法取得抗猪 IgG 抗体。

3、抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的制备：将盐酸克伦特罗-BSA 抗体与染料按照 1：1~1：8 的比例进行混合，搅拌过夜后高速离心，取沉淀用蒸馏水复融。

（二）试剂盒的制备

1、反应物的包被与吸附

（1）盐酸克伦特罗-BSA 的包被与干燥：将盐酸克伦特罗-BSA 按照

0.5~1.5mg/l 的浓度喷涂到硝酸纤维素膜上。然后通风晾干。

(2) 抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物的吸附与干燥：将盐酸克伦特罗-BSA 抗体-染料复合物按照 0.5~2mg/l 的浓度，按照 1mL 每平方厘米的用量使之吸附在玻璃纤维上，抽干密封保存。

(3) 抗猪-IgG 抗体的包被与干燥：将抗猪-IgG 抗体按照 0.8~2mg/l 的浓度喷涂到硝酸纤维素膜上，然后通风晾干。

(4) 辅材的封闭与处理：用 5~20/l 的浓度的奶粉溶液浸泡上下端吸水纸，通风晾干。

2、反应体系的组装与切割

(1) 将带有盐酸克伦特罗-BSA 和抗猪-IgG 抗体的硝酸纤维素膜粘贴到用于支撑整个反应体系的 PVC 板条上，同时将吸附有抗盐酸克伦特罗-BSA 抗体的玻璃纤维与硝酸纤维素膜相连形成一个桥式结构。

(2) 在抗猪-IgG 抗体端的 PVC 板条上粘贴吸水纸，另一端也粘贴吸水纸，形成联通的吸水桥式结构，保证毛细管虹吸作用的形成。

(3) 用切纸刀将板条按照需要切割成试剂条。

3、试剂盒的组装和分装

(1) 将切割好的试剂条装入塑料壳，封闭成型。

(2) 将封闭成型的试剂按照包装规格进行分装。

用本发明的方法制造的试剂盒，因各种物质都预先被固相化，所以在规定条件下可以保存 18 个月，适合大规模推荐使用。

操作过程如下：

按照被检测对象的标本不同而分为下面两种：

A、针对被检测的猪的尿液检测：

(1)、将测试板按照需要数量取出，待用；

(2)、取被检测样本 100ul，直接垂直滴加在下端样品孔内；

(3)、5 分钟后在测试窗内观察结果，10min 后判断结果无效；

(4)、结果判断：如果在观察窗内出现两条色带，则被测样品为阴性，不含有盐酸克伦特罗；如果在观察窗内只出现一条色带或者下端色带很弱，则被测样品为阳性，含有盐酸克伦特罗；如果观察窗内不出现任何色带，则该反应为无效反应，需重新进行检测。

B、针对被检测的猪的组织（包括精肉、肾脏、肝脏、肺脏）的检测：

(1) 将测试板按照需要数量取出，待用；

(2) 取被检测样本若干, 将肉及内脏样本剪碎, 装入 1.5ml 的离心管中, 盖紧管盖。

(3) 90℃以上加热 10-15 分钟, 取出。水浴为本试验推荐加热方式。

(4) 从原包装铝箔袋中取出检测卡, 在一小时内使用。

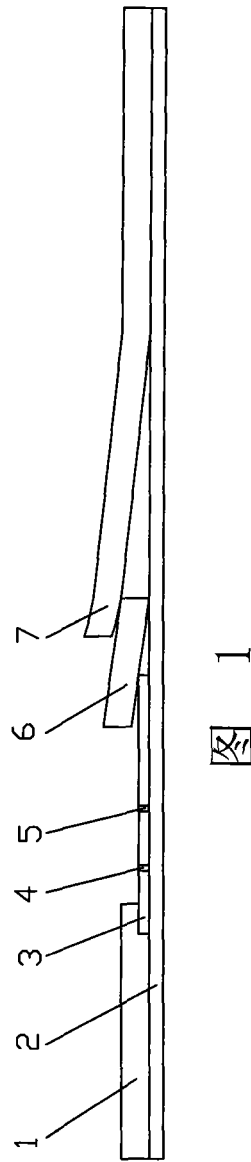
(5) 将检测卡平放, 用塑料吸管垂直滴加 1 滴无气泡冷却样本渗出液(约 20-30ul)于加样孔, 5 秒钟后再加入展开液 2-3 滴(约 60-80ul)。

(6) 反应 5 分钟判定结果。10 分钟后判断结果无效。

(7) 结果判断: 如果在观察窗内出现两条色带, 则被测样品为阴性, 不含有盐酸克伦特罗; 如果在观察窗内只出现一条色带或者下端色带很弱, 则被测样品为阳性, 含有盐酸克伦特罗; 如果观察窗内不出现任何色带, 则该反应为无效反应, 需重新进行检测。

本发明的试剂盒为一次性检测用耗材, 属于快速定性检测。盐酸克伦特罗的含量范围不能高于 3PPM。

本检测试剂盒对于快速判断被检测样本中是否含有盐酸克伦特罗或者被检测的生猪是否使用盐酸克伦特罗喂养, 对于限制盐酸克伦特罗的滥用具有重要的判断价值。



专利名称(译)	盐酸克伦特罗快速检测试剂盒及其制造方法		
公开(公告)号	CN101074954A	公开(公告)日	2007-11-21
申请号	CN200710023330.2	申请日	2007-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	盛青松		
申请(专利权)人(译)	盛青松		
当前申请(专利权)人(译)	盛青松		
[标]发明人	盛青松		
发明人	盛青松		
IPC分类号	G01N33/549 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种盐酸克伦特罗快速检测试剂盒以及该试剂盒的制造方法，在检测试剂盒的检测单元中包含用于支撑整个检测系统的塑料外壳、支撑反应体系的PVC板条、用于提供层析系统的吸水纸、用于吸附反应物的硝酸纤维素膜和玻璃纤维、反应物(包括盐酸克伦特罗 - BSA偶联物，抗猪IgG抗体、结合染料的盐酸克伦特罗 - BSA抗体、等等)。在整个试剂盒内还包括用于防止潮湿的干燥剂。本发明的试剂盒检测速度快，并且在检测过程中不需要任何辅助设备，检测成本低廉，不需要投入大量昂贵的检测设备。这使得现场快速检测成为可能并将成为限制盐酸克伦特罗滥用的有力手段。

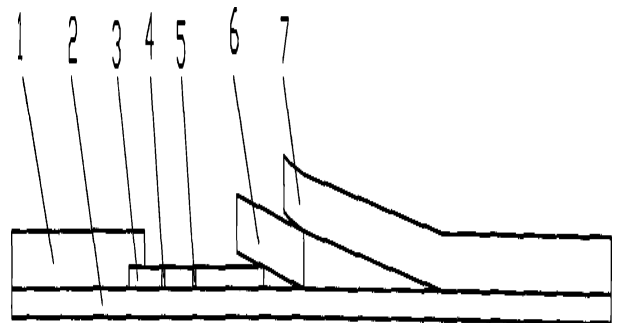


图 1