

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103149352 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201310045715.4

(22) 申请日 2013.02.05

(71) 申请人 江西中德生物工程有限公司

地址 江西省南昌市高新二路 18 号高新创业园 D 栋 203#

(72) 发明人 赖卫华 刘道峰 邓省亮

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所 (普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

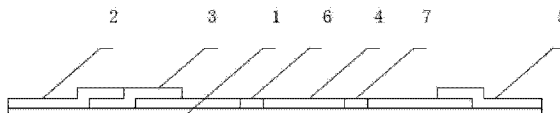
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

马布特罗胶体金试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种马布特罗胶体金试纸条及其制备方法,其中马布特罗胶体金试纸条包括:底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向,所述底板上依次形成有样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中,所述结合物垫上含有胶体金标记的抗马布特罗单克隆的抗体,所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线和质控线,所述检测线由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的马布特罗检测抗原线状点样组成,所述质控线由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。利用该试纸条能有效检测马布特罗。



1. 一种马布特罗胶体金试纸条,其特征在于,包括:

底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向,所述底板上依次形成有样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

其中,所述结合物垫上含有胶体金标记的抗马布特罗单克隆的抗体,

所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线和质控线,所述检测线由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的马布特罗检测抗原线状点样组成,所述质控线由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

2. 一种制备权利要求 1 所述的马布特罗胶体金试纸条的方法,其特征在于,包括下列步骤:

制备硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上形成有检测线和质控线;

制备结合物垫;以及

组装试纸条,

其中,

用能与抗马布特罗单克隆抗体结合的马布特罗检测抗原在所述硝酸纤维素膜上进行线状点样作为检测线;

用能与抗马布特罗单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体在所述硝酸纤维素膜上进行线状点样作为质控线。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,用于制备检测线的马布特罗检测抗原是通过下列方法获得的:

称取 50mg 马布特罗,用 10mL pH1.0 的蒸馏水将其溶解作为 A 液,称取 60mg 亚硝酸钠用 2mL 蒸馏水将其溶解作为 B 液,称取 232mg BSA,用 pH8.00.01M 的 PBS 溶解作为 C 液;

冰浴条件下把 B 液缓慢滴入 A 液中,4℃磁力搅拌反应 4 小时后,在冰浴条件下将其缓慢地加入 C 液中,加完后调 pH 至 8.0,室温磁力搅拌反应过夜;以及

最终产物用 0.01M pH7.4 的 PBS 透析除去杂质得到用于制备检测线的马布特罗偶联物。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,其特征是用于制备质控线的抗体是通过下列步骤获得的:

通过在驴体内注射小白鼠免疫球蛋白,并提取含抗体的血清经纯化后制得的,以便获得用于制备质控线的抗体。

5. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述检测线和质控线是通过下列步骤获得的:

将硝酸纤维素膜按 20~30mm 宽的尺寸剪裁;将经纯化浓度调整为 0.2~1.0mg/mL 的马布特罗检测抗原,在膜上线状点样作为检测线,其中,检测线点样位置离膜底边 15~18mm;

将经纯化浓度调整为 0.5~1.5mg/mL 的驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体,在膜上线状点样作为质控线,质控线点样位置离膜底边 11~13mm;

将所述硝酸纤维素膜室温干燥 30min,置于 1% 牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min,取出吸干水分,于 37 摄氏度下孵育 30min。

6. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,结合物垫是通过下列步骤获得的:

选用能与马布特罗结合的抗马布特罗单克隆抗体标记胶体金;以及

把经过标记的胶体金,分散在玻璃纤维纸上。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,用于标记胶体金的能与马布特罗结合的抗马布特罗单克隆抗体是通过下列步骤制备的:

按 Davis 的方法将马布特罗-蛋白复合体溶于同体积的磷酸生理盐水和完全佐剂中,免疫 BALB/C 小鼠,取小鼠脾脏与 SP2/0 小鼠骨髓细胞融合,融合细胞在选择性培养液中培养 7~14d,采用间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗体的杂交细胞株,杂交细胞株进行三次克隆化,将所产生的克隆细胞株注入小鼠腹腔产生腹水,经纯化后得到用于标记胶体金的能与马布特罗结合的抗马布特罗单克隆抗体。

## 马布特罗胶体金试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中涉及免疫胶体金和兽药残留检测领域。具体而言,本发明涉及马布特罗胶体金试纸条及其制备方法。

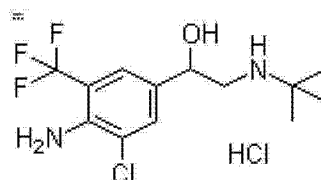
### 背景技术

[0002]  $\beta$ -兴奋剂( $\beta$ -agonist)全称 $\beta$ -肾上腺素受体激动剂( $\beta$ -adrenoceptor agonist),又叫 $\beta$ -激动剂,是一类化学结构和生理功能类似肾上腺素和去甲肾上腺素的苯乙胺类药物(phenethylamines, PEAs)。它能选择性地与细胞膜上的 $\beta$ -肾上腺素受体结合,起到调节交感神经兴奋、松弛气管平滑肌的功能,因此在临床上常用于人和动物哮喘类病症的治疗。但在高于治疗剂量长期服用时,能提高饲养动物的瘦肉率,导致饲养者经济效益提高,而且 $\beta$ -兴奋剂口服方式具有活性而适宜掺和于动物饲料中,所以一直以来被用作饲料添加剂,因为它能影响营养物质在动物体内的流向和重新分配,使体内的脂肪分解代谢增强、蛋白质合成增加,显著提高瘦肉率及减少脂肪率。

[0003] 但是激素类药物存在着潜在的生理毒性,易在动物组织,尤其是内脏中残留,当人类长期食用药物残留的动物性食品,会对人体产生一系列的危害,如导致肌肉兴奋性增强,肌肉震颤,重症者腓肠肌痉挛,同时引起心肌收缩加强,心率加快;使血管壁弹性降低,导致血压升高,微循环血管膨胀,压迫刺激周围的神经,表现为头晕头痛、呕吐和腹泻等症状;对体内的 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 和 $Mg^{2+}$ 等浓度的平衡产生破坏,导致细胞膜对离子通透性改变;对有心律失常、高血压、青光眼、糖尿病、甲状腺机能亢进、前列腺肥大等疾病的患者有较大的危害甚至危及生命。自1990年西班牙首次爆发消费者因食用残留有克伦特罗的牛肉导致中毒的严重事件以来,此类食品安全事件频繁发生。例如,2007年9月,上海市336人因食用了残留有克伦特罗的猪肉发生集体中毒事件,是上海市最大规模的克伦特罗中毒事件;2009年2月,广东省70多人因食用猪的内脏引起中毒。因此它的使用受到国际社会的限制,我国也以法律的形式禁止将其作为饲料药物添加剂使用。

[0004] 马布特罗是 $\beta$ -受体激动剂中的一种。一般以盐酸盐的形式存在,又名Broncholin,化学名为1-(3-氯-4-氨基-5-三氟甲基苯基)-2-叔丁胺基乙醇,分子式 $C_{13}H_{18}ClF_3N_2O$ ,分子量是347.20,沸点为375.9 $^{\circ}C$ 。临床上用于缓解由支气管哮喘、慢性支气管炎以及肺气肿的气道阻塞性障碍引起的呼吸困难等症状。它的分子结构式见如下:

[0005]



[0006] 马布特罗为 $\beta_2$ 受体激动药,动物试验表明,本品对 $\beta_2$ 受体的选择性及松弛支气管平滑肌作用较异丙肾上腺素、沙丁胺醇、丙卡特罗为强,有支气管扩张作用;对致敏豚鼠肺组织的抗原-抗体反应引起的组胺和SRS-A的释放具有剂量相关性抑制作用(体外),

而对大鼠被动皮肤以及皮内给予右旋糖酐后出现的过敏样反应,其抑制作用较异丙肾上腺素、沙丁胺醇、丙卡特罗强,支气管哮喘成年人口服本品 50  $\mu$ g,可抑制由变应原引起的速发型皮内反应,具有抗过敏作用;能使患实验性亚急性支气管炎的吐痰液粘度降低,使鸽的纤毛运动增加,可降低慢性支气管炎及支气管哮喘病人痰的粘度,增加纤毛运动,使粘痰易于排出,起到祛痰作用。但是过量连续使用可引起心律失常甚至心搏停止,还会表现为震颤、头痛、步履不稳、喘气、皮疹、瘙痒、口渴等症状。

[0007] 为了很好的监控  $\beta$ -受体激动剂药物残留,国内外研究建立的多种检测技术和方法,概括起来主要有两大类:一类是定量确证方法,主要有气相色谱质谱法、液相色谱串联质谱法等;还有一类就是快速筛选检测方法,主要有酶联免疫法、胶体金免疫检测法等。定量确证方法成本高,操作时间长,步骤多且复杂,因此无法实现真正意义上的现场检测。

[0008] 因此,目前对于马布特罗的检测手段仍有待改进。

### 发明内容

[0009] 本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术问题之一或至少提供一种有用的商业选择。为此,本发明的一个目的在于提出一种能有效检测马布特罗的试纸条和其制备方法。

[0010] 参考图 1,本发明提出了一种马布特罗胶体金试纸条,包括:

[0011] 底板 1,所述底板 1 具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向,所述底板上依次形成有样品垫 2、结合物垫 3、硝酸纤维素膜 4 和吸水垫 5,

[0012] 其中,所述结合物垫 3 上含有胶体金标记的抗马布特罗单克隆的抗体,

[0013] 所述硝酸纤维素膜 4 上进一步形成有检测线 6 和质控线 7,所述检测线 6 由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的马布特罗检测抗原线状点样组成,所述质控线 7 由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。

[0014] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种制备前面所述的马布特罗胶体金试纸条的方法,其包括下列步骤:

[0015] 制备硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上形成有检测线和质控线;

[0016] 制备结合物垫;以及

[0017] 组装试纸条,

[0018] 其中

[0019] 用能与抗马布特罗单克隆抗体结合的马布特罗检测抗原在所述硝酸纤维素膜上进行线状点样作为检测线;

[0020] 用能与抗马布特罗单克隆抗体结合驴抗小白鼠抗体在所述硝酸纤维素膜上进行线状点样作为质控线。

[0021] 由此,能有效制备前面所述的试纸条。

[0022] 根据本发明的实施例,用于制备检测线的马布特罗检测抗原是通过下列方法获得的:称取 50mg 马布特罗,用 10mL pH1.0 的蒸馏水将其溶解作为 A 液,称取 60mg 亚硝酸钠用 2mL 蒸馏水将其溶解作为 B 液,称取 232mg BSA,用 pH8.00.01M 的 PBS 溶解作为 C 液;冰浴条件下把 B 液缓慢滴入 A 液中,4 $^{\circ}$ C 磁力搅拌反应 4 小时后,在冰浴条件下将其缓慢地加入 C 液中,加完后调 pH 至 8.0,室温磁力搅拌反应过夜;以及最终产物用 0.01M pH7.4 的 PBS 透

析除去杂质得到用于制备检测线的马布特罗偶联物。

[0023] 根据本发明的实施例,用于制备质控线的抗体是通过下列步骤获得的:通过在驴体内注射小白鼠免疫球蛋白,并提取含抗体的血清经纯化后制得的,以便获得用于制备质控线的抗体。

[0024] 根据本发明的实施例,所述检测线和质控线是通过下列步骤获得的:将硝酸纤维素膜按 20~30mm 宽的尺寸剪裁;将经纯化浓度调整为 0.2~1.0mg/mL 的马布特罗检测抗原,在膜上线状点样作为检测线,其中,检测线点样位置离膜底边 15~18mm;将经纯化浓度调整为 0.5~1.5mg/mL 的驴抗小白鼠免疫球蛋白抗体,在膜上线状点样作为质控线,质控线点样位置离膜底边 11~13mm;将所述硝酸纤维素膜室温干燥 30min,置于 1% 牛血清白蛋白的生理盐水中浸泡 30min,取出吸干水分,于 37 摄氏度下孵育 30min。

[0025] 根据本发明的实施例,结合物垫是通过下列步骤获得的:选用能与马布特罗结合的抗马布特罗单克隆抗体标记胶体金;以及把经过标记的胶体金,分散在玻璃纤维纸上。

[0026] 根据本发明的实施例,用于标记胶体金的能与马布特罗结合的抗马布特罗单克隆抗体是通过下列步骤制备的:按 Davis 的方法将马布特罗-蛋白复合体溶于同体积的磷酸生理盐水和完全佐剂中,免疫 BALB/C 小鼠,取小鼠脾脏与 SP2/O 小鼠骨髓细胞融合,融合细胞在选择性培养液中培养 7~14 天,采用间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗体的杂交细胞株,杂交细胞株进行三次克隆化,将所产生的克隆细胞株注入小鼠腹腔产生腹水,经纯化后得到用于标记胶体金的能与马布特罗结合的抗马布特罗单克隆抗。

[0027] 为此,本发明提供了一种快速检测马布特罗残留的胶体金试纸条,所产生的单克隆抗体为特异性抗马布特罗单克隆抗体。所述的马布特罗单克隆抗体为马布特罗半抗原与载体蛋白偶联物作为免疫原通过免疫动物(例如兔、鼠)制得。所述的马布特罗半抗原是采用化学方法使其含有活性基团,所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白或钥孔铜兰蛋白(KLH)。所述的马布特罗-载体蛋白偶联物采用重氮法偶联得到。所述胶体金标记可以用商品化的氯金酸,通过产生的氯金酸与马布特罗单克隆抗体偶联制得。

[0028] 为方便现场检测和大量样本筛查,所述马布特罗的免疫胶体金试纸条包括:NC 膜、样品垫、胶金垫、吸水纸、柠檬酸三钠、PVC 背衬和结合垫,PVC 背衬一端依次黏附样品垫、胶体金结合垫、中间黏附 NC 膜层,另一端依次黏附吸水垫,所述吸水垫是胶体金结合垫包被了抗马布特罗特异性单克隆抗体-胶体金标记物,NC 膜上吸附了马布特罗-OVA 和羊或兔抗鼠 IgG。

[0029] 制备本发明检测尿液中马布特罗的免疫胶体金试剂方法为:

[0030] (1) 马布特罗全抗原合成将马布特罗半抗原与载体蛋白按重氮法合成马布特罗-载体蛋白偶联物,经分离纯化后得到马布特罗半抗原-载体蛋白偶联物;

[0031] (2) 单克隆抗体制备以半抗原-BSA 为免疫原多次免疫 Balb/c 纯系小鼠,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞体外融合产生杂交瘤细胞,经选择性培养基筛选获得阳性杂交瘤细胞株。将杂交瘤细胞株注入小鼠腹腔获取腹水或体外细胞培养收集上清液等方法,大量制备抗马布特罗单克隆抗体;

[0032] (3) 单克隆抗体胶体金标记用柠檬酸三钠等还原剂将氯金酸还原成 20~40nm 的胶体金颗粒;然后把胶体金与抗马布特罗单克隆抗体按 1:0.005~0.015(体积质量比)混匀,使其结合形成稳定的胶体金颗粒,经纯化和浓缩产生抗马布特罗单克隆抗体-胶体金标记

物；

[0033] (4) 羊（兔）抗鼠 IgG 制备将半抗原-OVA 多次免疫小鼠，获取抗血清，再免疫山羊或兔，经分离纯化后获得羊（兔）抗鼠 IgG；

[0034] (5) 胶体金结合垫的制备将马布特罗特异单克隆抗体-胶体金标记物包被在胶体金结合垫上，将马布特罗-OVA 偶联物和羊（兔）抗鼠 IgG 吸附在 NC 膜的检测区和控制区，在 37℃ 充分干燥；

[0035] (6) 胶体金试纸条组装：将 NC 膜、胶体金结合垫、样品垫和吸水垫等依次粘连在 PVC 背衬上，将粘好的 PVC 材料切成一定宽度的试纸条，最后组装到一定大小的塑料盒中即可。

[0036] 有益效果

[0037] 本发明的检测马布特罗免疫胶体金试纸条，采用直接竞争免疫法，以胶体金标记马布特罗特异单克隆抗体，能快速定性检测，结果准确，无需试剂洗涤和标准对照，能分批或单个样品及时检测。

[0038] 本发明的检测马布特罗免疫胶体金试纸条，使用原材料进行生产，产品生产流程简单，成本低。为使用者节省时间，降低因操作步骤冗繁造成的误差，试剂保存时间长、现场操作方便等优点。

[0039] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

#### 附图说明

[0040] 本发明的上述和 / 或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

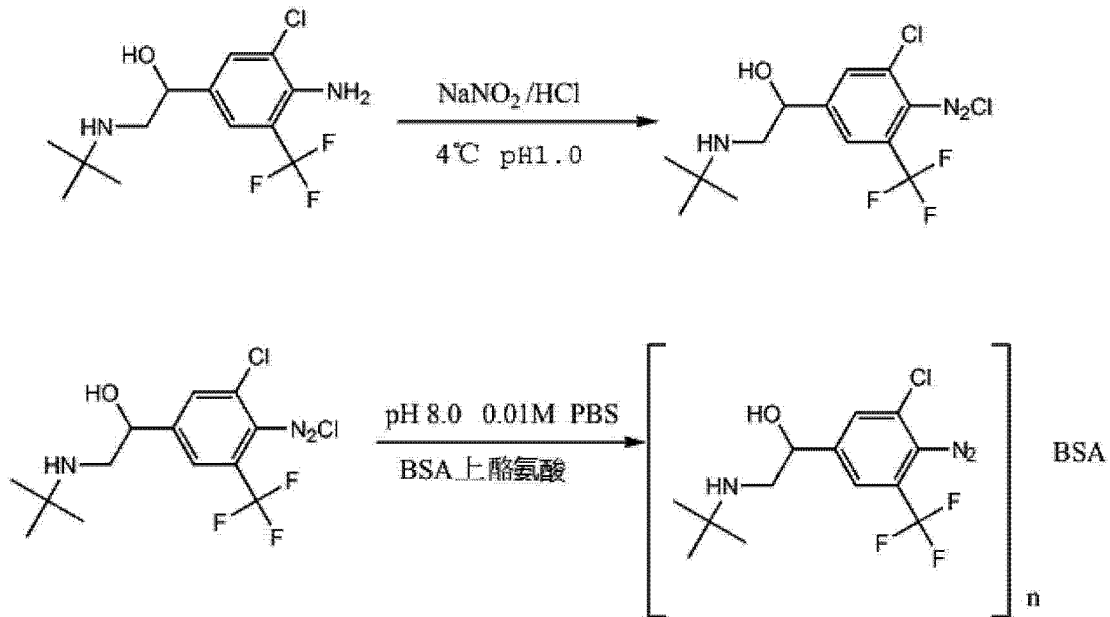
[0041] 图 1 是根据本发明一个实施例的马布特罗免疫胶体金试纸条的结构示意图。

#### 具体实施方式

[0042] 下面详细描述本发明的实施例，这些实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

[0043] 实施例 1 完全抗原（免疫原）合成

[0044]



[0045] A液:称取 50mg 马布特罗,用 10mL  $\text{pH} 1.0$  的蒸馏水将其溶解,B液:称取 60mg 亚硝酸钠用 2mL 蒸馏水将其溶解,C液:称取 232mg BSA,用  $\text{pH} 8.00$ ,  $0.01\text{M}$  的 PBS 溶解。冰浴条件下把 B 液缓慢滴入 A 液中, $4^\circ\text{C}$  磁力搅拌反应 4 小时后,在冰浴条件下将其缓慢地加入 C 液中,加完后调  $\text{pH}$  至 8.0。室温磁力搅拌反应过夜。最终产物用  $0.01\text{M}$   $\text{pH} 7.4$  的 PBS 透析除去杂质得到马布特罗偶联物。

[0046] 实施例 2 全抗原单克隆抗体的制备及效价检测

[0047] 2.1 单克隆抗体的制备

[0048] 以 BSA-半抗原为免疫原,免疫 4 只 BALB/C 小鼠,每只小鼠取  $100\ \mu\text{g}$  免疫原,与等体积弗氏完全佐剂混合乳化均匀,沿腹股沟注入腹腔膜内。4 个周后,加强免疫,剂量不变,佐剂改为弗氏不完全佐剂。加强免疫三次后,采血测效价,待血清效价不再上升,用两倍剂量的抗原不加佐剂免疫小鼠,三天后在无菌条件下取脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞按  $5\sim 10:1$  的比例混合于 50mL 离心管,加入 30mL 无血清 IPMI1640 培养基, $1200\text{r}/\text{min}$  离心 10min 弃上清,将细胞团轻轻振松,置于  $37^\circ\text{C}$  水浴中。把 1mL 50%PEG-4000 缓缓加入细胞中,在 1min 内滴完,同时轻轻搅动底部沉淀,静置 1min。沿管壁缓慢加入无血清培养基终止融合过程。前 30 秒缓慢匀速加入 1mL 后 30 秒加入 2mL,然后快速加入 27mL 无血清培养基, $1200\text{r}/\text{min}$  离心 10min,弃上清。融合后的细胞先在 HAT 选择性培养液中筛选,5 天后换成 HT 培养液,待孔内的杂交细胞数量达到 300 个以上时,用 ELISA 对细胞培养上清液进行复孔检测,次日重复检测已确定结果。将强阳性孔内的细胞用有限稀释法进行克隆培养,并跟踪记录,经 3 次以上的克隆培养和检测,均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞经过扩大培养,选 4 只经产 BALB/C 小鼠,腹腔注射液体石蜡油  $0.5\text{mL}/\text{只}$ ,7 天后腹腔注射杂交瘤细胞  $5\times 10^5\sim 10^6/\text{只}$ ,10 天后,待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水,经核酸蛋白紫外扫描仪蛋白分析初步判断得到的蛋白为 IgG 蛋白。

[0049] 2.2 检测抗体效价

[0050] 以  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度按每孔  $100\ \mu\text{L}$  包被酶标板, $4^\circ\text{C}$  包被过夜,洗涤 5 次,拍干,按每孔  $200\ \mu\text{L}$  封闭液  $4^\circ\text{C}$  下封闭 12h,洗涤 3 次,拍干。按每孔  $100\ \mu\text{L}$  加入抗血清稀释倍数为 2000、10000、250000、50000、250000、1250000,阴性血清及空白(不加抗血清,只加其稀释

液) 室温作用 30min, 洗涤五次, 拍干。加入每孔 100  $\mu$  L 酶标羊抗兔 (鼠) 抗体, 室温作用 30min, 洗涤五次, 拍干。加入每孔 100  $\mu$  L 显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光作用 15min。加入每孔 50  $\mu$  L 终止液终止反应, 酶标仪检测 A 值 (450nm)。以两倍于阴性血清 OD 值的血清 OD 值对应的抗血清稀释度为抗血清效价。检测结果见表 1:

[0051] 表 1 单克隆抗体效价检测结果

[0052]

稀释倍数	2000	10000	15000	30000	50000	250000	阴性血清	空白
OD <sub>1</sub> 值	0.988	0.692	0.415	0.324	0.317	0.362	0.172	0.024
OD <sub>2</sub> 值	0.975	0.673	0.442	0.398	0.365	0.354	0.207	0.020
OD <sub>3</sub> 值	1.136	0.943	0.754	0.503	0.387	0.351	0.193	0.032
OD <sub>4</sub> 值	0.982	0.669	0.411	0.376	0.344	0.351	0.223	0.030

[0053] 从表 1 的数据可以推断本发明制备的单克隆抗体的效价达 15000。

[0054] 实施例 3 本发明中胶体金试纸条的制备

[0055] 3.1 胶体金的制备

[0056] 免疫胶体金技术的基本原理是, 氯金酸在还原剂的作用下, 可聚合为一定大小的金颗粒, 形成带负电荷的、由于静电作用而稳定的疏水胶溶液。本公司采用柠檬酸三钠这种还原剂还原法制备胶体金, 具体过程如下: 取 0.01% 氯金酸 100mL 水溶液加热至沸, 搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7mL, 金黄色的氯金酸在 2 分钟内变为紫红色, 继续煮沸 15min, 冷却后用蒸馏水恢复原来的体积, 即为制备的胶体金溶液。此胶体金溶液是否符合生产需求, 除肉眼观察颜色需要为紫红色外, 还需要采用紫外可见分光光度计分析, 胶体金溶液需在可见区 535nm 有最高吸收峰, 同时, 电镜图显示制备的胶体金颗粒均一性较好、颗粒大小约在 40nm。

[0057] 3.2 胶体金标记抗体的制备

[0058] 调节胶体金溶液 pH 值至 8.2, 用恒速搅拌器均匀搅拌, 同时逐滴加入抗马布特罗的单克隆抗体, 并加入其它保护剂, 全部加完后, 继续搅拌 15 分钟。通过两次不同转速的离心获得均一性金标抗体沉淀。再加入重悬液, 混匀后移至干净烧杯中备用。

[0059] 3.3 马布特罗胶体金免疫层析快速检测试纸条的制备

[0060] 依次将吸水纸、喷有马布特罗-BSA (检测线) 和羊 (兔) 抗鼠 IgG (质控线) 的 NC 膜、喷有抗马布特罗抗体的金垫和样品垫相互叠合固定在 PVC 底板上, 再切成试纸条, 装在塑料模块中, 制成胶体金免疫层析快速检测卡。

[0061] 实施例 4 样品中马布特罗残留的检测

[0062] 抗体标记在胶体金颗粒上, 当加入尿液样本后, 胶体金和样本同时在 NC 膜上移动, 在移动的过程中, 样本中的马布特罗和标记在胶体金颗粒上的抗体特异性的反应, 当样本中的马布特罗含量低于试纸条的检测限时, 则免疫金颗粒会和喷在 NC 膜上的抗原线反应形成一条红色的检测线带, 反之, 则不能形成有色的检测线带。

[0063] 实施例 5 胶体金试纸条灵敏度试验

[0064] 取 3ng/mL 完全抑制产品, 在缓冲溶液与 5 个阴性样品中加入马布特罗标品, 使其终浓度分别为 0.1、1、2、3、4、5、6、7、10、30ng/mL。每种样品重复 5 次, 判断试纸条的检测灵敏度, 结果见下表:

[0065] 表 2 本发明采用单克隆抗体的胶体金试纸条灵敏度试验

[0066]

阴性处理溶液和马布特罗添加终浓度(ng/mL)	样品				
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号
阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
0.1	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
1	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
2	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
3	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
5	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
7	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
10	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
30	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性

[0067] 从以上结果可以看出,马布特罗胶体金免疫快速检测试纸条的检测阈值为 3ng/mL。

[0068] 实施例 6 本发明胶体金试纸条的特异性试验

[0069] 在阴性的水产品中(ELISA 测定为阴性)分别加入特布他林、沙丁胺醇、西马特罗、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克伦特罗、妥布特罗、喷布特罗,使其终浓度为 1、5、10、50、100、500ng/mL 水产品处理溶液。用试纸条检测的标准方法检测,判断试纸条检测的特异性,每种浓度的水产品处理样品做 5 次重复。

[0070] 表 3 马布特罗免疫胶体金试纸条特异性实验结果

[0071]

马布特罗结构类似物	马布特罗胶体金免疫快速检测试纸条检测结果					
	1ng/mL	5ng/mL	10ng/mL	50ng/mL	100ng/mL	500ng/mL
克伦特罗	阴性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
沙丁胺醇	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0072]

莱克多巴胺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
西马特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
特布他林	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
非诺特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
氯丙那林	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
妥布特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
喷布特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0073] 实验结果如表 3 所示,特布他林、沙丁胺醇、西马特罗、非诺特罗、氯丙那林、莱克多巴胺、克伦特罗、妥布特罗、喷布特罗这些结构类似物在马布特罗胶体金免疫快速检测试纸条中未产生交叉反应。

[0074] 实施例 7 胶体金试纸条的准确度试验

[0075] 马布特罗胶体金免疫快速检测试纸条是定性,而不是定量卡。该产品对凡是等于或超过 3ng/mL 的样品都表现为阳性。本检测卡的准确率大于 96%。

[0076] 实施例 8 胶体金试纸条保存期试验

[0077] 室温保存实验显示,马布特罗胶体金免疫快速检测试纸条保质期大于 12 个月。

[0078] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0079] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

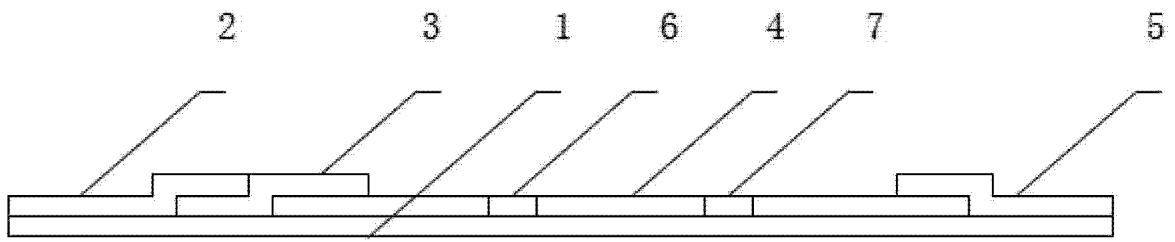


图 1

专利名称(译)	马布特罗胶体金试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103149352A</a>	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201310045715.4	申请日	2013-02-05
[标]申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江西中德生物工程有限公司		
[标]发明人	赖卫华 刘道峰 邓省亮		
发明人	赖卫华 刘道峰 邓省亮		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532 C07K14/765 C07K16/44		
代理人(译)	李志东		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提出了一种马布特罗胶体金试纸条及其制备方法，其中马布特罗胶体金试纸条包括：底板，所述底板具有第一端和第二端，并且沿所述第一端向第二端的方向，所述底板上依次形成有样品垫、结合物垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，其中，所述结合物垫上含有胶体金标记的抗马布特罗单克隆的抗体，所述硝酸纤维素膜上进一步形成有检测线和质控线，所述检测线由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的马布特罗检测抗原线状点样组成，所述质控线由能与抗马布特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。利用该试纸条能有效检测马布特罗。

