



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107942052 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201710909320.2

(22)申请日 2017.09.29

(71)申请人 杭州南开日新生物技术有限公司

地址 311215 浙江省杭州市萧山区民和路
481号联合中心南区B座10楼

(72)发明人 王振国 王伟萍 罗南

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288

代理人 胡拥军

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/94(2006.01)

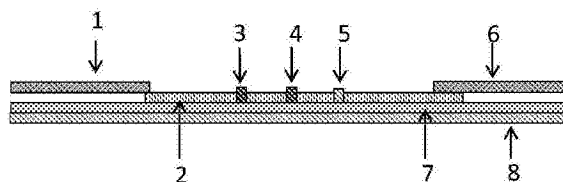
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒
及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,包括试剂条和金标微孔,试剂条包括底板,在底板上依次设置的层析膜、层析膜两端设有样品垫、吸水垫,层析膜上设有质控线C线和检测线, C线包被有羊抗鼠IgG抗体,检测线包括T₁线、T₂线, T₁线为莱克多巴胺检测线,包被有莱克多巴胺抗原, T₂线为沙丁胺醇、克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、西布特罗、氯丙那林、西马特罗检测线, T₂线上包被有 β -兴奋剂抗原, C线、T₁线、T₂线呈与试纸条长相垂直的三条平行带,金标微孔中含有胶体金标记的 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体,针对生乳和鲜奶这一特殊对象,一次性可检十种药物,扩大了检测范围,防止漏检,且灵敏度高,稳定性好。



1. 一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,其特征在于,包括试剂条和金标微孔,所述试剂条包括底板,在所述底板上依次设置的层析膜、所述层析膜两端设有样品垫、吸水垫、所述层析膜上设有质控线C线和检测线,所述C线包被有羊抗鼠IgG抗体,所述检测线包括T₁线、T₂线,所述T₁线为莱克多巴胺检测线,包被有莱克多巴胺抗原,所述T₂线为沙丁胺醇、克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、西布特罗、氯丙那林、西马特罗检测线,T₂线上包被有 β -兴奋剂抗原,所述C线、T₁线、T₂线呈与试纸条长相垂直的三条平行带,所述金标微孔中含有胶体金标记的 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,其特征在于,所述的样品垫为玻璃纤维膜经浸渍处理后烘干得到。

3. 根据权利要求1所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,其特征在于,所述的层析膜为硝酸纤维素膜。

4. 根据权利要求1所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,其特征在于,所述的吸水垫为滤纸。

5. 根据权利要求1所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,其特征在于,所述莱克多巴胺单克隆抗体通过莱克多巴胺抗原免疫小鼠得到;所述 β -兴奋剂多克隆抗体通过 β -兴奋剂抗原免疫家兔得到;所述羊抗鼠IgG抗体通过鼠源抗体免疫羊得到。

6. 根据权利要求1所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,其特征在于,所述莱克多巴胺抗原是莱克多巴胺半抗原与牛血清白蛋白的偶联物,所述 β -兴奋剂抗原是具有苯乙醇胺母核结构的半抗原与牛血清白蛋白的偶联物。

7. 一种如权利要求1-6任一项所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒的制备方法,其特征在于,包含以下步骤:

1) 胶体金溶液的制备:取1%的氯金酸溶液用双蒸水稀释100倍,加热搅拌煮沸,加入1%的柠檬酸三钠,继续加热搅拌至溶液颜色变红,停止加热,冷却至室温,得到胶体金溶液;

2) 胶体金标记物的制备:向步骤1)所得胶体金溶液中加入 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体,再加入5%的牛血清白蛋白,离心后,取沉淀物加入pH 7.4的PBS缓冲液,再次离心,得到沉淀物,继续上述操作2-4次,将沉淀物用含2%BSA的PBS缓冲液溶解,过滤得到胶体金标记物,将胶体金标记物加入微孔中,冻干后得到金标微孔;

3) 质控线和检测线的制备:将羊抗鼠IgG抗体包被于层析膜上形成质控线,将莱克多巴胺抗原包被于层析膜上形成T₁检测线,将 β -兴奋剂抗原包被于层析膜上形成T₂检测线;

4) 试剂条的组装:将样品垫、处理后的层析膜、吸水垫依次黏贴于底板上,组成试剂条卡,用切割机将卡片分切成试纸条,干燥后即得试剂条。

8. 根据权利要求7所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒的制备方法,其特征在于,所述羊抗鼠IgG抗体通过点膜仪包被于层析膜上形成质控线。

9. 根据权利要求7所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒的制备方法,其特征在于,所述层析膜与样品垫相邻部分有 $2\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ 的重叠。

10. 根据权利要求7所述一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒的制备方法,其特征在于,所述层析膜与吸水垫相邻部分有 $2\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ 的重叠。

一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全快速检测技术,尤其涉及一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 随着人们生活水平的提高,动物源食品中的药物残留日益受到国际社会的重视。 β -兴奋剂是一类化学合成的苯乙醇胺类衍生物,在临床上常用于人和动物哮喘类病症的治疗,在高于治疗剂量连续食用时可使动物体内的脂肪组织转化为肌肉组织,提高动物的瘦肉率,促进动物生长。常见的 β -兴奋剂有莱克多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、西布特罗、氯丙那林、西马特罗等十余种。动物长期使用 β -兴奋剂后,可在体内形成残留,通过食物链直接危害人体健康。欧美等发达国家已相继全面禁止使用 β -兴奋剂类药物,为使 β -兴奋剂类药物问题得到有效监控,符合限量标准,养殖场、大型食品流通领域等努力寻求可行的检测方法,致力于开发 β -兴奋剂类药物残留的检测方法和仪器。目前生乳和鲜奶中 β -兴奋剂类药物的检测方法主要有酶联免疫法、毛细管电泳法、色谱法等,这些检测方法存在各种各样的缺陷,如酶联免疫法稳定性不高,因为酶易受环境影响,时间长,需要特殊仪器,成本较高;毛细管电泳法灵敏度低,分析时间长;色谱法操作过程繁琐,因为需要昂贵的设备和专业的技术人员,检测成本较高;因此,在实践中有必要建立一种敏感度高、操作简单、成本低、检测药物种类多、适合大规模推广的检测方法。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,针对生乳和鲜奶这一特殊对象,采用金标微孔方式,一次性可检十种药物,扩大了检测范围,防止漏检,且灵敏度高,稳定性好,成本低,操作简单,检测过程只需8-10分钟,可满足现场快速检测的需求。

[0004] 本发明的目的之二在于提供上述检测 β -兴奋剂类药物的试剂盒的制备方法,其具有制备方法简便,适合工业量产的特点。

[0005] 本发明的目的之一采用如下技术方案实现:

[0006] 一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒,包括试剂条和金标微孔,所述试剂条包括底板,在所述底板上依次设置的层析膜、所述层析膜两端设有样品垫、吸水垫、所述层析膜上设有质控线C线和检测线,所述C线包被有羊抗鼠IgG抗体,所述检测线包括T₁线、T₂线,所述T₁线为莱克多巴胺检测线,包被有莱克多巴胺抗原,所述T₂线为沙丁胺醇、克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、西布特罗、氯丙那林、西马特罗检测线,T₂线上包被有 β -兴奋剂抗原,所述C线、T₁线、T₂线呈与试纸条长相垂直的三条平行带,所述金标微孔中含有胶体金标记的 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体。

[0007] 进一步的,所述的样品垫为玻璃纤维膜经浸渍处理后烘干得到。

[0008] 进一步的,所述的层析膜为硝酸纤维素膜。

[0009] 进一步的,所述的吸水垫为滤纸。

[0010] 进一步的,所述莱克多巴胺单克隆抗体通过莱克多巴胺抗原免疫小鼠得到; β -兴奋剂多克隆抗体通过 β -兴奋剂抗原免疫家兔得到;羊抗鼠 IgG 抗体通过鼠源抗体免疫羊得到。

[0011] 进一步的,所述莱克多巴胺抗原是莱克多巴胺半抗原与牛血清白蛋白的偶联物,所述 β -兴奋剂抗原是具有苯乙醇胺母核结构的半抗原与牛血清白蛋白的偶联物。

[0012] 本发明的目的之二采用如下技术方案实现:

[0013] 一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒的制备方法,包含以下步骤:

[0014] 1) 胶体金溶液的制备:取1%的氯金酸溶液用双蒸水稀释100倍,加热搅拌煮沸,加入1%的柠檬酸三钠,继续加热搅拌至溶液颜色变红,停止加热,冷却至室温,得到胶体金溶液;

[0015] 2) 胶体金标记物的制备:向步骤1) 所得胶体金溶液中加入 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体,再加入5%的牛血清白蛋白,离心后,取沉淀物加入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液,再次离心,得到沉淀物,继续上述操作2-4次,将沉淀物用含2% BSA 的 PBS 缓冲液溶解,过滤得到胶体金标记物,将胶体金标记物加入微孔中,冻干后得到金标微孔;

[0016] 3) 质控线和检测线的制备:将羊抗鼠 IgG 抗体包被于层析膜上形成质控线,将莱克多巴胺抗原包被于层析膜上形成 T₁ 检测线,将 β -兴奋剂抗原包被于层析膜上形成 T₂ 检测线;

[0017] 4) 试剂条的组装:将样品垫、处理后的层析膜、吸水垫依次黏贴于底板上,组成试剂条卡,用切割机将卡片分切成试纸裸条,干燥后即得试剂条。

[0018] 进一步的,所述羊抗鼠 IgG 抗体通过点膜仪包被于层析膜上形成质控线。

[0019] 进一步的,所述层析膜与样品垫相邻部分有 $2\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ 的重叠。

[0020] 进一步的,所述层析膜与吸水垫相邻部分有 $2\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ 的重叠。

[0021] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0022] 1、能够同时检测出十种 β -兴奋剂类药物,降低了漏检可能会带来的风险;

[0023] 2、由于抗体的结构差异,将莱克多巴胺单独列出,使检出限更好;

[0024] 3、操作简单,采用金标微孔方式,奶样无需稀释,可以直接进行检测,检测过程只需8-10分钟,且携带方便,可满足现场快速检测的需求;

[0025] 4、灵敏度高,试剂条无壳体,检测样品直接接触样品吸收垫,层析速度较快,充分反应后,减少了误差,大大提高了灵敏度;

[0026] 5、特异性强,与多种其它药物均无交叉反应,稳定性好,且成本低,具有很好的经济效益。

附图说明

[0027] 图1为本发明试剂条结构示意图;

[0028] 图2为金标微孔示意图;

[0029] 图3为试剂条结果判读示意图。

[0030] 图中:1、样品垫;2、层析膜;3、T₂线;4、T₁线;5、C线;6、吸水垫;7、不干胶;8、底板;9、微孔;10、胶体金标记结合物。

具体实施方式

[0031] 下面,结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述,需要说明的是,在不相冲突的前提下,以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

[0032] 实施例1一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒

[0033] 1) 胶体金溶液的制备:取1%的氯金酸溶液用双蒸水稀释100倍,加热搅拌煮沸,加入1%的柠檬酸三钠,继续加热搅拌至溶液颜色变红,停止加热,冷却至室温,得到胶体金溶液。

[0034] 2) 胶体金标记物的制备:边搅拌边向胶体金溶液中加入 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体,再加入5%的牛血清白蛋白,离心15min后,取沉淀物加入pH 7.4的PBS缓冲液,离心15min,得到沉淀物,继续上述操作2-4次,将沉淀物用含2%BSA的PBS缓冲液溶解,过滤得到胶体金标记物,将胶体金标记物加入微孔中,冻干后得到金标微孔,如图2所示。

[0035] 3) 质控线和检测线的制备:用点膜仪将羊抗鼠IgG抗体包被于层析膜上形成质控线,将莱克多巴胺抗原包被于层析膜上形成T1检测线,将 β -兴奋剂抗原包被于层析膜上形成T2检测线,上述莱克多巴胺抗原是莱克多巴胺半抗原与牛血清白蛋白的偶联物, β -兴奋剂抗原是具有苯乙醇胺母核结构的半抗原与牛血清白蛋白的偶联物;莱克多巴胺单克隆抗体通过莱克多巴胺抗原免疫小鼠得到; β -兴奋剂多克隆抗体通过 β -兴奋剂抗原免疫家兔得到;羊抗鼠IgG抗体通过鼠源抗体免疫羊得到。

[0036] 4) 试剂条的组装:将样品垫、处理后的层析膜、吸水垫依次黏贴于底板上,相邻各部分有 $2\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ 的重叠,组成试剂裸条卡,用切割机将卡片分切成试纸裸条,干燥后即得试剂条,如图1所示。

[0037] 实施例2用上述 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒检测生乳和鲜奶中莱克多巴胺残留的操作方法:

[0038] 1) 取100 μL 奶样加入到金标微孔中,置于50 $^{\circ}\text{C}$ 温育器上温育5min,用小滴管吹打完全溶解孔内红色物质;

[0039] 2) 将试剂条插入到金标微孔中,温育5min;

[0040] 3) 从金标微孔中取出试剂条,直接目测试剂条颜色强度,或者用配套的胶体金读数仪判读;

[0041] 4) 结果判读

[0042] 如图3中a所示:阴性(-):T1线显色比C线显色深或一样深,为阴性,表示样本中莱克多巴胺药物残留浓度低于检出限或无莱克多巴胺药物残留。

[0043] 阳性(+):T1线显色比C线显色浅或T1线无显色,表示样本中莱克多巴胺药物残留浓度高于或等于检出限,且T1线相比C线显色越浅,表示样本中莱克多巴胺药物含量越高。

[0044] 实施例3用上述 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒检测生乳和鲜奶中沙丁胺醇残留的操作方法

[0045] 1) 取100 μL 奶样加入到金标微孔中,置于50 $^{\circ}\text{C}$ 温育器上温育5min,用小滴管吹打完全溶解孔内红色物质;

[0046] 2) 将试剂条插入到金标微孔中,温育5min;

[0047] 3) 从金标微孔中取出试剂条,直接目测试剂条颜色强度,或者用配套的胶体金读数仪判读;

[0048] 4) 结果判读

[0049] 如图3中b所示:阴性(-):T2线显色比C线显色深或一样深,表示样本中沙丁胺醇药物残留浓度低于检出限或无沙丁胺醇药物残留。

[0050] 阳性(+):T2线显色比C线显色浅或T2线无显色,表示样本中沙丁胺醇药物残留浓度高于或等于检出限,且T2线相比C线显色越浅,表示样本中沙丁胺醇药物含量越高。

[0051] 克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、西布特罗、氯丙那林、西马特罗等药物的检测方法与实施例2、实施例3类似,不再一一举例。

[0052] 实施例4检出限试验

[0053] 取空白样品和十种 β -兴奋剂类药物不同添加浓度样品各3份,用试剂盒进行检测,检测结果见表1。

[0054] 表1检出限检测结果

[0055]

药物名称	添标浓度 (ppb)								
	0	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	0.6
莱克多巴胺	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
沙丁胺醇	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
克伦特罗	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
溴布特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
妥布特罗	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
马布特罗	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
特布他林	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
西布特罗	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
氯丙那林	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性
西马特罗	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	弱阳性	阳性	阳性

[0056] 结果表明,莱克多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布

他林、西布特罗、氯丙那林和西马特罗的检出限分别为0.2ppb、0.15ppb、0.2ppb、0.3ppb、0.2ppb、0.2ppb、0.2ppb、0.2ppb、0.5ppb、0.5ppb。

[0057] 实施例5假阴性率试验

[0058] 分别取20份已知含十种β-兴奋剂类药物的阳性样品,用试剂盒进行检测,检测结果见表2,结果表明,用试剂盒检测阳性样品时,其结果均为阳性,假阴性率为0%。

[0059] 表2假阴性率检测结果

[0060]

药物名称	莱克多巴胺	沙丁胺醇	克伦特罗	溴布特罗	妥布特罗	马布特罗	特布他林	西布特罗	氯丙那林	西马特罗
检测结果	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性

[0061] 实施例6假阳性率试验

[0062] 取50份已知阴性样品,用试剂盒进行检测,检测结果见表3,结果表明,用试剂盒检测阴性样品时,有1份阳性结果,假阳性率为2%。

[0063] 表3假阳性率检测结果

[0064]

样品	检测结果									
阴性样品	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阳性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

[0065] 实施例7特异性试验

[0066] 分别取5份浓度为50ppb的磺胺嘧啶、诺氟沙星、链霉素、四环素和氯霉素药物的阳性样品,用试剂盒进行检测,检测结果见表4,结果表明,本试剂盒对磺胺嘧啶、诺氟沙星、链霉素、四环素和氯霉素药物均无交叉反应,即特异性强。

[0067] 表4特异性检测结果

[0068]

药物名称	磺胺嘧啶	诺氟沙星	链霉素	四环素	氯霉素
------	------	------	-----	-----	-----

检测结果	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
------	----	----	----	----	----

[0069] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

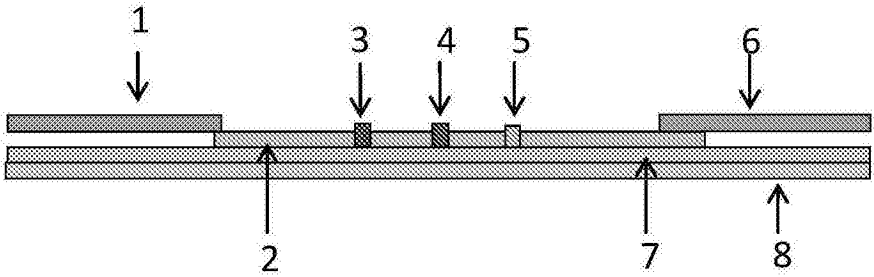


图1

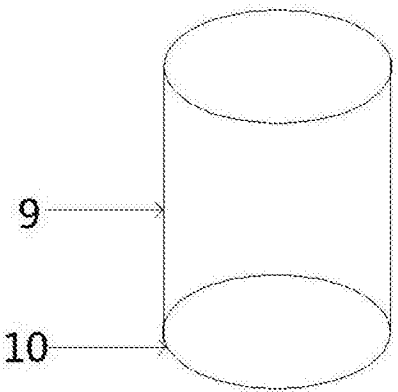


图2

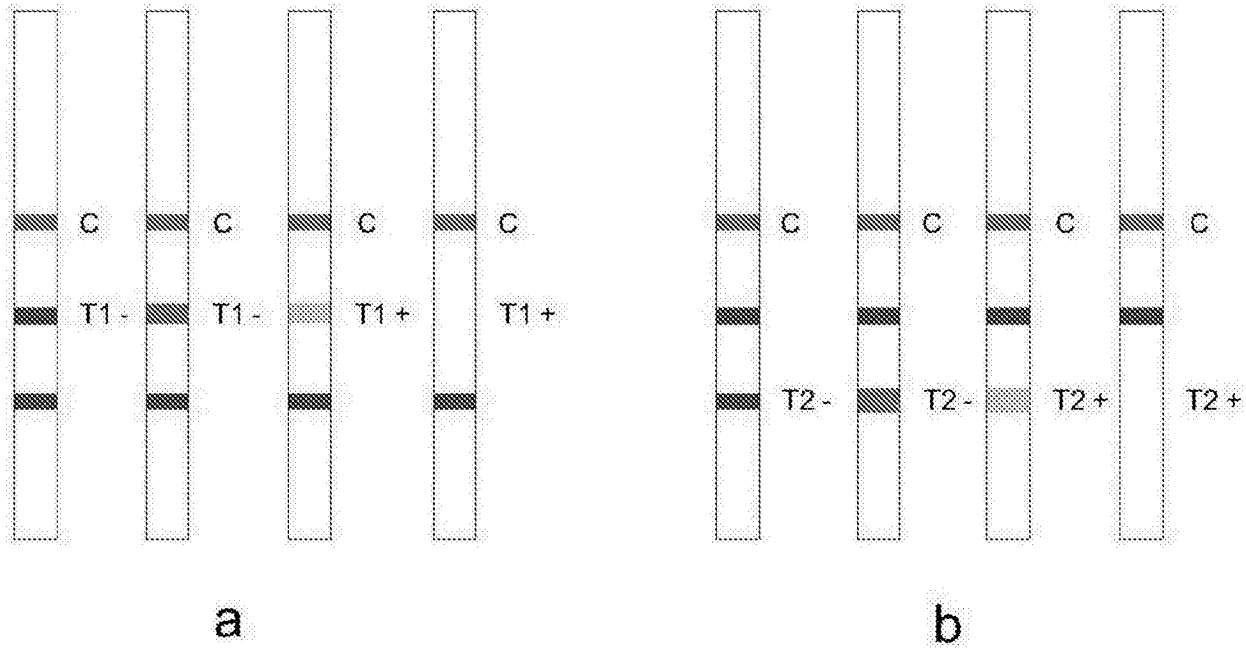


图3

专利名称(译)	一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107942052A	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN2017110909320.2	申请日	2017-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州南开日新生物技术有限公司		
[标]发明人	王振国 王伟萍 罗南		
发明人	王振国 王伟萍 罗南		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/9406		
代理人(译)	胡拥军		
其他公开文献	CN107942052B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测 β -兴奋剂类药物的胶体金试剂盒，包括试剂条和金标微孔，试剂条包括底板，在底板上依次设置的层析膜、层析膜两端设有样品垫、吸水垫、层析膜上设有质控线C线和检测线，C线包被有羊抗鼠IgG抗体，检测线包括T1线、T2线，T1线为莱克多巴胺检测线，包被有莱克多巴胺抗原，T2线为沙丁胺醇、克伦特罗、溴布特罗、妥布特罗、马布特罗、特布他林、西布特罗、氯丙那林、西马特罗检测线，T2线上包被有 β -兴奋剂抗原，C线、T1线、T2线呈与试纸条长相垂直的三条平行带，金标微孔中含有胶体金标记的 β -兴奋剂多克隆抗体和莱克多巴胺单克隆抗体，针对生乳和鲜奶这一特殊对象，一次性可检十种药物，扩大了检测范围，防止漏检，且灵敏度高，稳定性好。

