

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103235125 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201310121479. X

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 09

(71) 申请人 江西中德生物工程有限公司  
地址 330029 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 彭涛 杨万春 陈媛  
刘文娟

(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 33/577 (2006. 01)

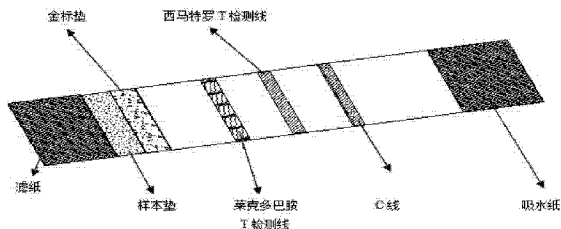
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条及其制备方法与用途

(57) 摘要

本发明提出了一种莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条及其制备方法,其中莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条包括: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滤纸、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中,所述金标垫上是含有胶体金标记的抗莱克多巴胺单克隆抗体和胶体金标记的西马特罗单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上进一步形成有两条检测线和一条质控线,所述检测线依次由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合的莱克多巴胺检测抗原线状点样和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的西马特罗检测抗原线状点样组成,所述质控线由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合和抗西马特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。利用该试纸条配合胶体金读取仪能有效的定量检测莱克多巴胺、西马特罗。



1. 一种莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条,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滤纸、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

其中,所述金标垫上是含有胶体金标记的抗莱克多巴胺单克隆抗体和胶体金标记的西马特罗单克隆抗体,

所述硝酸纤维素膜上进一步形成有两条检测线和一条质控线,

所述检测线依次由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合的莱克多巴胺检测抗原线状点样和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的西马特罗检测抗原线状点样组成,

所述质控线由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合和抗西马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 所述的莱克多巴胺、西马特罗二联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两条检测线和一条质控线;

制备金标垫;以及

组装试纸条,

其中,

用能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合的莱克多巴胺检测抗原和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的西马特罗检测抗原在所述硝酸纤维素膜上进行线状点样分别作为所述两条检测线;

用能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的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,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 20mm ~ 30mm 宽的尺寸剪裁;将经纯化浓度调整为 0.2mg/mL ~ 1.0mg/mL 的莱克多巴胺、西马特罗检测抗原,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 15mm ~ 18mm,两条检测线之间相隔 5mm;

将经纯化浓度调整为 0.5mg/mL ~ 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 11mm ~ 13mm;

将所述硝酸纤维素膜于 37 摄氏度烘干处理过夜后,在室温干燥的环境下保存。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,金标垫是通过下列步骤获得的:

分别选用能与莱克多巴胺、西马特罗检测抗原结合的莱克多巴胺和西马特罗单克隆抗体用胶体金标记;

把所述的用胶体金标记过的莱克多巴胺和西马特罗单克隆抗体混合后,喷在玻璃纤维膜上。

5. 一种采用如权利要求 1 所述的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸配胶体金读取仪定量检测的方法,其特征在于,包括下列步骤:

配制已知系列浓度的莱克多巴胺、西马特罗混合标准品并加入所述胶体金读取仪的样本孔中,

10 分钟后检测对应的光密度数值并建立标准曲线,

将含有检测样品的试纸条放入所述胶体金读取仪中，  
读取检测数值，以及  
通过所述标准曲线计算所述检测样品中莱克多巴胺、西马特罗含量。

## 莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条及其制备方法与用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域中涉及  $\beta_2$ -受体激动剂残留检测领域。具体而言,本发明涉及莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条及其制备方法与用途。

### 背景技术

[0002] 莱克多巴胺 (Ractopamine)、西马特罗 (Cimaterol) 都属于  $\beta_2$ -受体激动剂,近年来,很多不法商家将它们作为盐酸克伦特罗的替代品添加于动物饲料中,当长期用来饲喂动物时,莱克多巴胺、西马特罗对动物有营养再分配的作用,促进动物体内蛋白质沉积而抑制脂肪形成,从而显著提高动物胴体的瘦肉率。但莱克多巴胺、西马特罗在体内代谢缓慢、易聚积、药物残留率高,当人类食用残留该类药物的动物性食品后会产生中毒从而对人体健康产生相当的危害,通常表现为肌肉震颤、心悸、发烧、恶心呕吐等,严重的会昏迷甚至死亡。因此,许多国家已经禁止在动物饲料中添加  $\beta_2$ -兴奋剂,但是关于  $\beta_2$ -兴奋剂的食物安全事件时有发生。

[0003] 目前,国内外检测莱克多巴胺和西马特罗的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱质谱联用技术 (GC-MS)、液相色谱质谱联用技术 (LC-MS)、酶联免疫吸附法 (ELISA)。在食品安全检测中,往往先用 ELISA 进行初筛后,再对阳性样本用 HPLC 或 GC-MS、LC-MS 进行确证。但是上述方法所用的仪器设备昂贵复杂、成本高,同时需要对操作人员进行特殊培训,且实验结果不能立即显示,因此不适用于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象的快速在线检测和监控。

[0004] 胶体金试纸条是以胶体金作为免疫层析的指示物,其原理是以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物的受体(如抗体或抗原)发生高特异高亲和性的免疫反应,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域(检测带),通过直接运用可目测的胶体金标记物而得到直观的实验结果。虽然该方法快速方便,但是胶体金试纸条仍有以下缺点:

[0005] (1) 只有当金颗粒集聚到一定量 ( $10^7$  个 / $\text{mm}^2$ ) 时,才出现肉眼可见的紫红条带,且该颜色条带与背景对比度不大,从而限制了检测灵敏度。

[0006] (2) 样品基质效应明显,背景干扰大。

[0007] (3) 无法实现定量检测。

[0008] (4) 只能检测单个污染物

[0009] 此外,虽然现在也有单独检测莱克多巴胺的胶体金试纸条和西马特罗的检测卡,但是至今仍没有一种能同时定性且定量检测莱克多巴胺和西马特罗的产品。

[0010] 因此,目前对于同时定量检测莱克多巴胺与西马特罗的检测手段仍有待改进。

### 发明内容

[0011] 本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术问题之一。为此,本发明的一个目的

在于提出一种能有效检测莱克多巴胺和西马特罗的二联胶体金试纸条及其制备方法和用途。

[0012] 在本发明的第一方面,参考图 1,本发明提出了一种莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条,包括:

[0013] 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滤纸、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,

[0014] 其中,所述金标垫上是含有胶体金标记的抗莱克多巴胺单克隆抗体和胶体金标记的西马特罗单克隆抗体,

[0015] 所述硝酸纤维素膜上进一步形成有两条检测线和一条质控线,

[0016] 所述检测线依次由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合的莱克多巴胺检测抗原线状点样和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的西马特罗检测抗原线状点样组成,

[0017] 所述质控线由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合和抗西马特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。由此,可以有效地获得莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条,从而对样品中莱克多巴胺、西马特罗进行定量检测。

[0018] 在本发明的又一方面,本发明提出了一种制备前面所述的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条的方法,其包括下列步骤:

[0019] 制备硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜上形成有两条检测线和一条质控线;

[0020] 制备金标垫;以及

[0021] 组装试纸条,

[0022] 其中,

[0023] 用能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合的莱克多巴胺检测抗原和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的西马特罗检测抗原在所述硝酸纤维素膜上进行线状点样分别作为所述两条检测线;

[0024] 用能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的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。

[0025] 由此,通过本发明的方法,能有效制备前面所述的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条,从而对样品中莱克多巴胺、西马特罗进行定量检测。

[0026] 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 20mm ~ 30mm 宽的尺寸剪裁;将经纯化浓度调整为 0.2mg/mL ~ 1.0mg/mL 的莱克多巴胺、西马特罗检测抗原,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 15mm ~ 18mm,两条检测线之间相隔 5mm;将经纯化浓度调整为 0.5mg/mL ~ 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 11mm ~ 13mm;将所述硝酸纤维素膜于 37 摄氏度烘干处理过夜后,在室温干燥的环境下保存。由此,通过本发明实施例的方法,可以有效地制备大小均一、位置固定并且分别具有特定浓度抗原、抗体的检测线和质控线,从而获得具有检测线和质控线的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条,进而有效地对莱克多巴胺、西马特罗进行定量检测。

[0027] 根据本发明的实施例,金标垫是通过下列步骤获得的:分别选用能与莱克多巴胺、西马特罗检测抗原结合的莱克多巴胺和西马特罗单克隆抗体用胶体金标记;把所述的用胶体金标记过的莱克多巴胺和西马特罗单克隆抗体混合后,喷在玻璃纤维膜上。由此,通过

本发明实施例的方法,可以有效地制备具有能与莱克多巴胺、西马特罗检测抗原结合的莱克多巴胺和西马特罗单克隆抗体用胶体金标记的金标垫,从而获得具有金标垫的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条,进而有效地对莱克多巴胺、西马特罗进行定量检测。

[0028] 在本发明的另一方面,本发明提供了一种前面所述的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条检测莱克多巴胺、西马特罗的方法,包括以下步骤:配制已知系列浓度的莱克多巴胺、西马特罗混合标准品并加入所述胶体金读取仪的样本孔中,10 分钟后检测对应的光密度数值并建立标准曲线,将含有检测样品的试纸条放入所述胶体金读取仪中,读取检测数值,以及通过所述标准曲线计算所述检测样品中莱克多巴胺、西马特罗含量。由此,通过本发明所提供的方法,可以有效地制备采用该胶体金读取仪检测莱克多巴胺、西马特罗的校准曲线,从而配合本发明提供的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条有效地对莱克多巴胺、西马特罗进行定量检测。

[0029] 有益效果

[0030] 1、多残留监测:本发明采用莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条能根据 T 线和 C 线的显色情况同时监测样品中莱克多巴胺、西马特罗的污染情况。

[0031] 2、灵敏度高:本发明采用莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条配胶体金读取仪的方法,能通过仪器替代肉眼观察实验结果,克服了肉眼判断带来的误差,从而提高了检测灵敏度,本方法检测莱克多巴胺和西马特罗的灵敏度分别为 0.5ppb 和 1ppb。

[0032] 3、定量:本发明采用莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条配胶体金读取仪的方法,可以根据胶体金读取仪显示器上的显示数值,参照标准曲线即可分别得出被检样品中莱克多巴胺和西马特罗的含量。

[0033] 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

[0034] 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:

[0035] 图 1 是根据本发明实施例的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条的结构图;

[0036] 图 2 是根据本发明实施例的一种胶体金读取仪的示意图;

[0037] 图 3 是根据本发明实施例的定量检测莱克多巴胺、西马特罗流程图。

## 具体实施方式

[0038] 本实施例给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

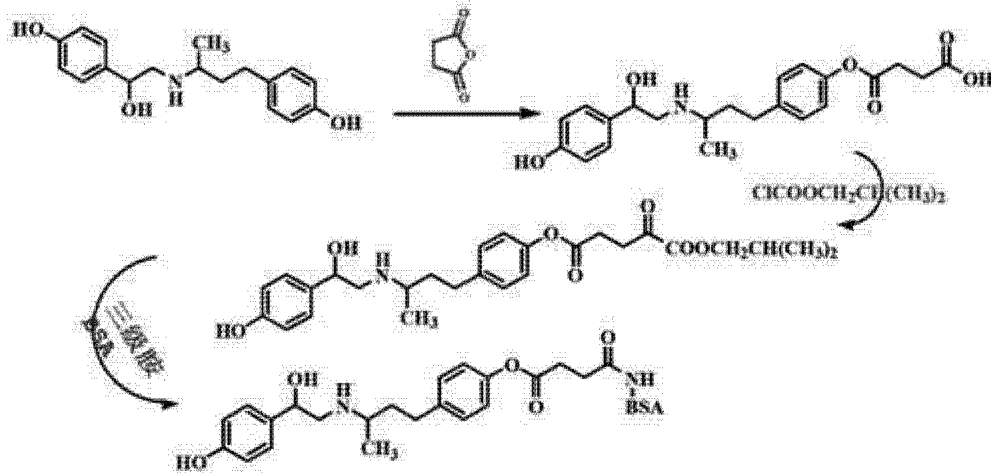
[0039] 实施例 1 免疫抗原的合成

[0040] 1.1 合成莱克多巴胺免疫抗原

[0041] 采用混合酸酐法制备莱克多巴胺-BSA 免疫抗原:称取莱克多巴胺 34mg 和 10mg 丁二酸酐在 2mL 吡啶中反应,室温下搅拌过夜,置于通风橱中将吡啶完全蒸发,此反应产物为莱克多巴胺-半丁二酸酐;将其溶于 2mL N,N-二甲基甲酰胺和 2mL 1,4-二氧六环混合物中,再加 26.2  $\mu$ L 的三正丁胺,在冰浴中搅拌 10 分钟,再加氯甲酸异丁酯 15L,室温反应,搅

拌 1 小时 ; 将此混合物逐滴加入预冷的蛋白溶液 (100mg BSA 溶解于 0. 1M 硼酸钠 pH8. 5), 室温反应过夜, 在 PBS 中透析 72 小时以上, 透析后即得到纯化的莱克多巴胺 -BSA 免疫抗原。

[0042]

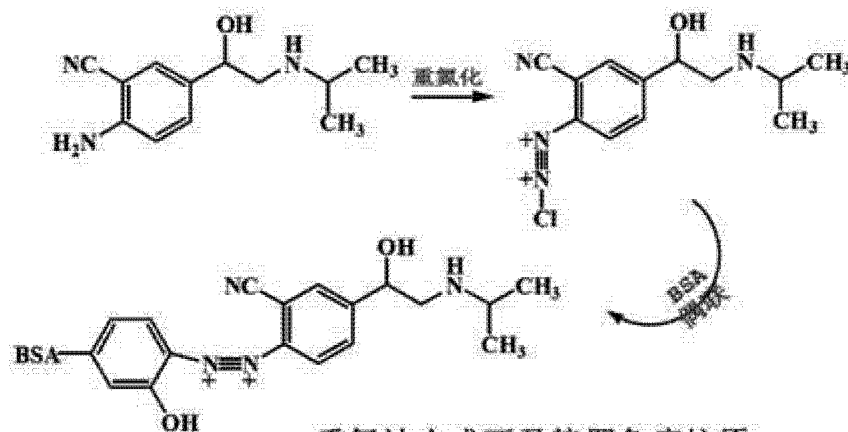


混合酸酐法合成莱克多巴胺免疫抗原

[0043] 1. 2 合成西马特罗免疫抗原

[0044] 采用重氮化法合成西马特罗 -BSA 免疫抗原 : 称取西马特罗 4. 0mg 于 10mL 锥形瓶中, 用 0. 1mol/L 的 HCl 溶液 1. 5mL 溶解, 冰浴冷却 ; 在避光条件下, 边搅拌边逐滴加入用灭菌双蒸水溶解的 1mol/L  $\text{NaNO}_2$  溶液适量 (淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色为宜) 后, 4 摄氏度条件下反应 6 小时即得重氮化西马特罗 ; 称取 10mg BSA 用 1mL PBS (pH7. 4) 溶解, 预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化西马特罗, 用 1mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至 8. 5 左右后, 4 摄氏度条件下过夜反应 ; 然后将反应产物在 4 摄氏度搅拌下用 PBS 透析 3 天, 每天换液 3 次, 透析后即得到纯化的西马特罗 -BSA 免疫抗原。

[0045]



重氮法合成西马特罗免疫抗原

[0046] 实施例 2 免疫原单克隆抗体的制备及效价检测

[0047] 2. 1 莱克多巴胺单克隆抗体的制备

[0048] 取 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 用 0. 1mL 莱克多巴胺 -BSA 与等体积完全福氏佐剂制成的乳剂, 腹腔注射法对每只小鼠进行初次免疫 ; 此后取同样剂量免疫原加不完全福氏佐剂, 同法每隔 1 个月加强免疫 1 次 ; 第 3、4 次免疫后 10 ~ 14 天用间接 ELISA 测定 抗体效价, 最后选择抗体效价高者进行细胞融合。在无菌条件下取免疫小鼠的脾细胞, 与 SP2/0 骨

髓瘤细胞融合按 5:1 比例融合后,加入 HAT 培养基,37 摄氏度、6%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;5 天后用新鲜 HAT 培养基换出一半的培养基,10 天后用 HT 培养基换出 HAT 培养基;每天观察杂交瘤细胞的生长情况,待其分布至孔底面积 10% 以上时,吸出上清液做抗体检测;用莱克多巴胺-BSA 作为检测抗原,间接 ELISA 试验筛选出选择强阳性、抑制效果好、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化,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,将杂交瘤细胞扩大培养以备单克隆抗体的制备。

[0049] 每只 BALB/c 小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡 0.5mL,7~14 天后腹腔注射经克隆化后的杂交瘤细胞 0.5mL ( $1 \sim 2 \times 10^6$ ),10 天后抽取腹水,用正辛酸-硫酸铵沉淀法来纯化腹水,经核酸-蛋白分析仪测定抗莱克多巴胺单克隆抗体的含量。

#### [0050] 2.2 莱克多巴胺单克隆抗体效价的测定

[0051] 采用间接 ELISA 方法测定抗莱克多巴胺单克隆抗体效价。用 0.05mol/L, pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释检测原至 10 μg/mL,再分别稀释至终浓度为 2.5 μg/mL、1 μg/mL、0.25 μg/mL、0.05 μg/mL 和 0.01 μg/mL,分别包被酶标板,每孔加入 100 μL,4 摄氏度包被过夜。用 0.01mol/L PBS250 μL 洗板两次。每孔加入 1% 明胶 360 μL,37 摄氏度孵育 1 小时后,拍干。用 0.01mol/L PBS 将抗莱克多巴胺单克隆抗体效价稀释 1000,再倍比稀释 6 个梯度至 128000 倍;将免疫前小鼠血清作为阴性对照;以 0.01mol/L PBS 作为空白对照。每孔各加入样本、阴性对照、空白对照各 100 μL,37 摄氏度孵育 0.5 小时。按 9:1 比例用 0.01mol/L PBS 稀释酶标记羊抗鼠二抗,取 100 μL 加入孔内,37 摄氏度孵育 0.5 小时。取 0.01mol/L PBS250 μL 洗板五次后,加入 100 μL TMB 显色液,37 摄氏度孵育 15 分钟,再加入 50 μL 2mol/L 硫酸溶液,用酶标仪测定 OD450 值。以与阴性对照孔 OD 值的比值(P/N)大于 2.1 且 OD 值大于 0.3 为限,作为判断为阳性或确定效价的临界点,结果表明,抗莱克多巴胺单克隆抗体效价大于 1:256000。

#### [0052] 2.3 西马特罗单克隆抗体的制备

[0053] 以重氮化法合成西马特罗-BSA 人工抗原并鉴定后免疫 4 只 6 周龄 BALB/C 小鼠,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,三天后脱颈致死小鼠,在无菌条件下取脾脏制备脾细胞,与生长旺盛的小鼠骨髓瘤细胞按 8:1 的比例混合于 50mL 离心管,加入 30mL 无血清 IPMI1640 培养基,1100r/min 离心 5 分钟弃上清,将细胞团轻轻振松,置于 37 摄氏度水浴中。把 1mL50%PEG-4000 缓缓加入细胞中,在 1 分钟内滴完,同时轻轻搅动底部沉淀,静置 1 分钟后,前 30 秒沿管壁缓慢匀速加入无血清培养基 1mL,后 30 秒加入 2mL,然后快速加入 27mL 终止融合过程,1100r/min 离心 5 分钟,弃上清,用 HAT 选择性培养基重悬后加到已铺有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,37 摄氏度、体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养。7 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,用间接 ELISA 法筛选,选择强阳性、抑制效果好、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化,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,将杂交瘤细胞扩大培养以备单克隆抗体的制备。

[0054] 采用体内诱生腹水法生产抗西马特罗单克隆抗体。选 4 只经产 BALB/C 小鼠,腹腔注射液体石蜡油 0.5mL/只,7 天后腹腔注射杂交瘤细胞  $3 \sim 5 \times 10^6$ /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-蛋白分析仪测定抗西马特罗单克隆抗体的含量。

#### [0055] 2.4 西马特罗单克隆抗体效价的测定

[0056] 采用间接 ELISA 方法测定抗西马特罗单克隆抗体效价。用 0.05mol/L, pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释检测原至 10  $\mu$ g/mL, 再分别稀释至终浓度为 2.5  $\mu$ g/mL、1  $\mu$ g/mL、0.25  $\mu$ g/mL、0.05  $\mu$ g/mL 和 0.01  $\mu$ g/mL, 分别包被酶标板, 每孔加入 100  $\mu$ L, 4 摄氏度包被过夜。用 0.01mol/L PBS250  $\mu$ L 洗板两次。每孔加入 1% 明胶 360  $\mu$ L, 37 摄氏度孵育 1 小时后, 拍干。用 0.01mol/L PBS 将抗西马特罗单克隆抗体效价稀释 1000, 再倍比稀释 6 个梯度至 128000 倍; 将免疫前小鼠血清作为阴性对照; 以 0.01mol/L PBS 作为空白对照。每孔各加入样本、阴性对照、空白对照各 100  $\mu$ L, 37 摄氏度孵育 0.5 小时。按 9:1 比例用 0.01mol/L PBS 稀释酶标记羊抗鼠二抗, 取 100  $\mu$ L 加入孔内, 37 摄氏度孵育 0.5 小时。取 0.01mol/L PBS250  $\mu$ L 洗板五次后, 加入 100  $\mu$ L TMB 显色液, 37 摄氏度孵育 15 分钟, 再加入 50  $\mu$ L 2mol/L 硫酸溶液, 用酶标仪测定 OD450 值。以与阴性对照孔 OD 值的比值(P/N) 大于 2.1 且 OD 值大于 0.3 为限, 作为判断为阳性或确定效价的临界点, 结果表明, 抗西马特罗单克隆抗体效价大于 1:128000。

#### [0057] 实施例 3 本发明中莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条的制备

##### [0058] 3.1 胶体金的制备

[0059] 制备免疫胶体金的基本原理是, 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。本发明采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 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 1.5mL, 金黄色的氯金酸在 2 分钟内变为紫红色, 关掉热源, 继续高速搅拌 10 分钟后, 调低转速至低档, 继续搅拌 1 小时, 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 525nm ~ 527nm 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 40nm。

##### [0060] 3.2 分别用胶体金标记莱克多巴胺和西马特罗的抗体

[0061] 用  $K_2CO_3$  溶液调节 60mL 胶体金溶液 pH 值至 6.0, 用恒速搅拌器均匀搅拌, 同时逐滴加入稀释浓度为 1.6  $\mu$ g/mL 的莱克多巴胺单克隆抗体 6mL 或稀释浓度为 1.5  $\mu$ g/mL 的西马特罗单克隆抗体 6mL, 1 小时后加入抗体量相当的 PEG, 充分反应 30 分钟后加入抗体量相当的 BSA, 加完后, 继续搅拌 30 分钟。在 9000rpm 下离心 30 分钟获得均一性金标抗体沉淀, 再加入 6mL PNPB 重悬备用。

##### [0062] 3.3 莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条快速检测卡的制备

[0063] 在 PVC 底板上, 依次将滤纸、样品、喷有胶体金标记的莱克多巴胺和西马特罗单克隆抗体混合物的金标垫、喷有莱克多巴胺检测抗原和西马特罗检测抗原两条检测线和一条驴抗小鼠 IgG 抗体质控线的 NC 膜和吸水纸相互叠合固定, 再切成试纸条, 装在塑料模块中, 制成胶体金快速检测卡。

#### [0064] 实施例 4 样品中莱克多巴胺、西马特罗残留的检测

##### [0065] 4.1 标准曲线的建立

[0066] 以莱克多巴胺、西马特罗混合标准品配制成已知的浓度系列, 将标准品滴加在制备的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条上, 10 分钟后在胶体金读取仪上检测, 测出浓度对应的光密度值, 然后以光密度值与阴性光密度值的比值为纵坐标, 对应浓度为横坐标

分别绘制出两条标准曲线。

#### [0067] 4.2 样品检测

[0068] 新鲜猪尿样恢复室温,直接加入样本孔,10 分钟后,如果 T 线和 C 线同时显示紫红色条带,表示检测结果为阴性;如果 C 线显色而 T 线不显色,表示检测结果是阳性;如果 T 线和 C 线同时都不显色,表示试纸条失效。将被检样品的检测卡放入胶体金读取仪中检测,最后根据检测样本的数据输出的数值,参照标准曲线即可分别得出检测样本中莱克多巴胺和西马特罗的含量。

#### [0069] 实施例 5 本发明中莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条的灵敏度实验

[0070] 通过实验得到,本发明中的莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条检测莱克多巴胺 和西马特罗的灵敏度分别为 0.5ppb 和 1ppb, CV 值小于 15%。

#### [0071] 实施例 6 本发明中莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条的特异性实验

[0072] 在阴性的猪尿中(ELISA 测定为阴性)分别加入去甲肾上腺素、肾上腺素、克伦特罗、沙丁胺醇和特布他林,使其终浓度为 1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL 尿液。用试纸条检测的标准方法检测,判断试纸条检测的特异性,每种浓度的猪尿样做 5 次重复。检测结果都为阴性,说明检测卡特异性较强。

#### [0073] 实施例 7 本发明中莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条的保质期实验

[0074] 用三批常规生产的产品分别做保质期实验,放置于室内室温环境保存,每各一个月取出 12 个卡检测,用质控尿样检测,分别做阴性、0.5ppb、1ppb、2ppb 样品,重复三次,扫描得出数据后和生产时的数据对照,观察保质期时间。阴性显色从 14 个月开始下降,在一年时间内产品品质无变化,从而确定保质期为一年。

[0075] 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。

[0076] 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。

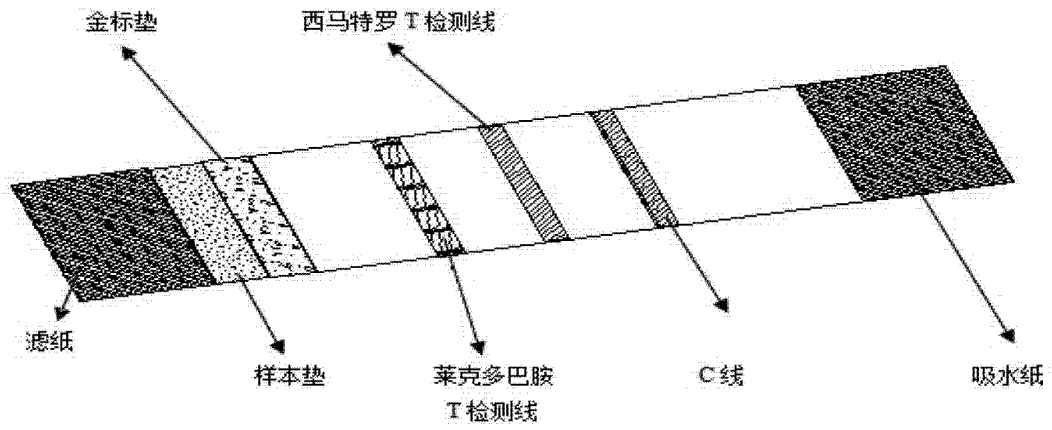


图 1

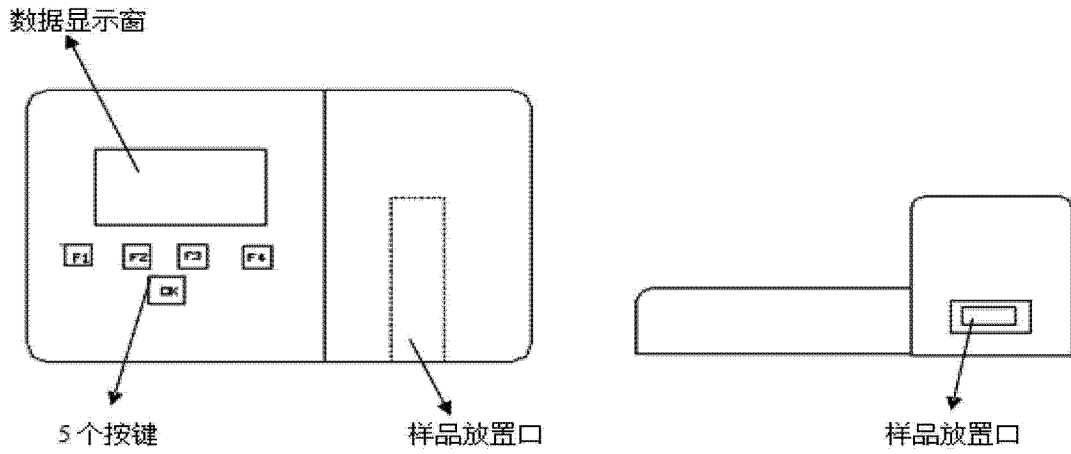


图 2

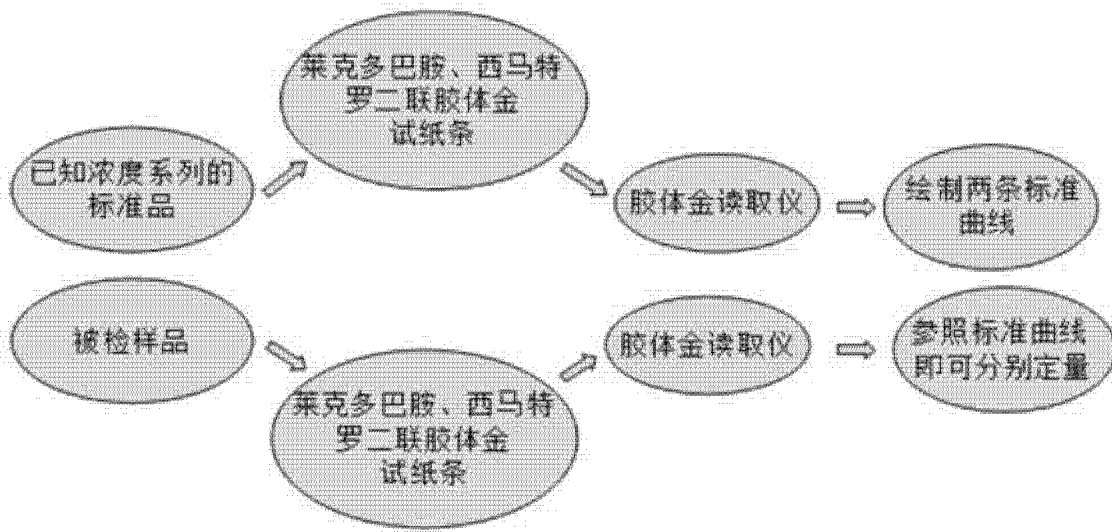


图 3

专利名称(译)	莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条及其制备方法与用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN103235125A</a>	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201310121479.X	申请日	2013-04-09
[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 彭涛 杨万春 陈媛 刘文娟		
发明人	赖卫华 彭涛 杨万春 陈媛 刘文娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	李志东		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提出了一种莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条及其制备方法，其中莱克多巴胺、西马特罗二联胶体金试纸条包括：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滤纸、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，其中，所述金标垫上是含有胶体金标记的抗莱克多巴胺单克隆抗体和胶体金标记的西马特罗单克隆抗体，所述硝酸纤维素膜上进一步形成有两条检测线和一条质控线，所述检测线依次由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合的莱克多巴胺检测抗原线状点样和能与抗西马特罗单克隆抗体结合的西马特罗检测抗原线状点样组成，所述质控线由能与抗莱克多巴胺单克隆抗体结合和抗西马特罗单克隆抗体结合的驴抗小白鼠抗体线状点样组成。利用该试纸配合胶体金读取仪能有效的定量检测莱克多巴胺、西马特罗。

