



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106680489 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201611046382.7

(22)申请日 2016.11.22

(71)申请人 云南辉瑞贝尔生物科技有限公司
地址 653100 云南省玉溪市高新区抚仙路
86号科技园孵化楼(C座)二楼

(72)发明人 杨绍元 杨少琼

(74)专利代理机构 江苏爱信律师事务所 32241
代理人 唐小红

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条及制备方法。本发明试纸条由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上组成,所述反应膜上有检测区和质控区,结合物释放垫上包被有 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物,检测区包被有 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体,所述检测区和质控区呈与试纸条长相垂直的两个平行条带。用本发明试纸条检测 β -兴奋剂类药物的方法检测灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单直观、检测时间短、适用范围广等优点。

1. 一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条,由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上组成,所述反应膜上有检测区和质控区,其特征在于结合物释放垫上包被有 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物,检测区包被有 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体,所述检测区和质控区呈与试纸条长相垂直的两个平行条带。

2. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述样品吸收垫覆盖在结合物释放垫的前端1/3处。

3. 如权利要求1或2所述的试纸条,其特征在于所述 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物由 β -兴奋剂类药物半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白。

4. 如权利要求3所述的试纸条,其特征在于所述 β -兴奋剂类药物半抗原是由克伦特罗与琥珀酸酐通过反应得到。

5. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物中的 β -兴奋剂类药物特异性抗体是以 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述 β -兴奋剂类药物特异性抗体为 β -兴奋剂类药物多克隆抗体。

6. 一种制备权利要求1-5任一项所述的试纸条方法,其包括以下主要步骤:

1) 制备包被有 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;制备具有包被 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被抗抗体的质控区的反应膜;

2) 将样品吸收垫,1)步骤制备好的结合物释放垫,反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上组装成试纸条。

7. 如权利要求6所述的制备试纸条的方法,其特征在于将制备好的试纸条设置塑料外盒,塑料外盒上对应样品吸收垫的上方设置有加样孔,塑料外盒上对应检测区和质控区上方设置有观察窗口。

一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条及制备方法。

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 -兴奋剂有克伦特罗、西马特罗、马布特罗、克伦丙罗、塞布特罗、溴布特罗等十余种。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,2002年我国农业部下文严禁所有食品动物使用克伦特罗、沙丁胺醇、西马特罗及其盐、酯及制剂。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。

[0003] 目前 β -兴奋剂类药物的检测方法主要有理化方法和免疫学检测方法,理化检测方法主要有液相色谱、气相色谱法、色谱/质谱联用等,这些检测方法存在检测成本高,检测设备复杂,对检测人员的要求高,耗时长等缺点,目前常用的免疫学检测方法主要为酶免检测法等,此类检测还是存在检测费用还是较高,检测 β -兴奋剂类药物种类偏少。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

[0004] 本发明的一个目的是提供一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条。

[0005] 一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条,由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上组成,所述反应膜上有检测区和质控区,结合物释放垫上包被有 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物,检测区包被有 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物,质控区包被有抗抗体,所述检测区和质控区呈与试纸条长相垂直的两个平行条带。

[0006] 所述样品吸收垫覆盖在结合物释放垫的前端1/3处。

[0007] 所述 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物由 β -兴奋剂类药物半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白、血蓝蛋白。

[0008] 所述 β -兴奋剂类药物半抗原是由克伦特罗与琥珀酸酐通过反应得到。

[0009] β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物中的 β -兴奋剂类药物特异性抗体是以 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述 β -兴奋剂类药物特异性抗体为 β -兴奋剂类药物多克隆抗体。

[0010] 本发明的另一个目的是提供了一种制备上述试纸条的方法,其包括以下步骤:

[0011] 1) 制备包被有 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0012] 2) 制备具有包被 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被抗抗体的质控区的反应膜;

[0013] 3) 将样品吸收垫,1) 步骤制备好的结合物释放垫,2) 步骤制备好的反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上组装成试纸条。

[0014] 还可以在制备好的试纸条外设置塑料外盒,塑料外盒上对应样品吸收垫的上方设置有加样孔,塑料外盒上对应检测区和质控区上方设置有观察窗口。

[0015] 本发明的试剂试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单直观、检测时间短、适用范围广等优点,采用本发明 β -兴奋剂类药物抗体,也保证了检测结果的可靠性。

附图说明

[0016] 图1为试纸条剖面结构示意图;

[0017] 1-样品吸收垫;2-结合物释放垫;3-反应膜;4-吸收垫;5-检测区;6-质控区;7-底板

[0018] 图2为 β -兴奋剂类药物半抗原合成图;

[0019] 图3为 β -兴奋剂类药物半抗原鉴定氢谱图。

具体实施方式

[0020] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0021] 实施例1、检测 β -兴奋剂类药物的试纸条的制备

[0022] 试纸条的制备方法主要包括如下步骤:

[0023] 1) 制备包被有 β -兴奋剂类药物多克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;制备具有包被 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0024] 2) 样品吸收垫,1) 步骤制备好的结合物释放垫,反应膜、吸水垫、底板组装成试纸条。

[0025] 下面分步详细叙述:

[0026] (一) 各部件的制备

[0027] 1、 β -兴奋剂类药物半抗原的合成

[0028] β -兴奋剂类药物是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。本发明选用克伦特罗为原料合成 β -兴奋剂类药物的半抗原,将克伦特罗与琥珀酸酐进行反应得到 β -兴奋剂类药物半抗原,合成技术路线图见图2,具体如下:

[0029] 称取0.5-3g克伦特罗溶于经干燥后的四氢呋喃溶液中,通氮气保护,加入0.25-1.4g琥珀酸酐常温搅拌溶解,加入0.1-1g DMAP固体进行催化反应,用TLC薄层板监测反应进行,直至没有原料或原料点很浅,停止反应,硅胶柱净化,浓缩得产物即为 β -兴奋剂类药物半抗原,半抗原鉴定氢谱图见图3。

[0030] 2、免疫原(β -兴奋剂类药物半抗原-牛血清白蛋白)的制备

[0031] β -兴奋剂类药物半抗原与牛血清白蛋白反应合成免疫原,具体如下:

[0032] 1) 将上述步骤得到的35mg β -兴奋剂类药物半抗原溶于2.5mL二氧六烷、200 μ L 5%

盐酸、30 μ L三正丁胺的混合物中,再加入25 μ L氯甲酸异丁酯,4 $^{\circ}$ C搅拌反应30min,此为A液。将50mg牛血清白蛋白溶于5mL 1mol/L碳酸氢钠溶液中,此为B液。

[0033] 2)将A液缓慢滴加到B液中,4 $^{\circ}$ C搅拌反应过夜,然后将反应液装入透析袋,在4 $^{\circ}$ C用PBS溶液透析3天。透析液经冷冻干燥,得到免疫原。

[0034] 3、包被原的制备

[0035] 用 β -兴奋剂类药物半抗原与血蓝蛋白进行偶联得到,方法同免疫原合成。

[0036] 4、免疫原、包被原的合成鉴定

[0037] 将载体蛋白、 β -兴奋剂类药物半抗原、 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物用pH7.2的PBS配成0.5mg/ml的溶液,以0.01mol/L pH7.2PBS调零,用紫外分光光度计在波长200-800nm范围内扫描,得到载体蛋白、 β -兴奋剂类药物半抗原、 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物的吸收曲线。三者出现不同的吸收曲线,表明 β -兴奋剂类药物半抗原与载体蛋白偶联成功。

[0038] 5、 β -兴奋剂类药物多克隆抗体的制备

[0039] 取新西兰大白兔,用含有免疫原即 β -兴奋剂类药物半抗原-牛血清白蛋白偶联物进行皮下注射,免疫剂量300-500 μ g/只,第3周加强免疫一次,共免疫4次,最后一次免疫后一周,得到多克隆抗体血清。

[0040] 6、羊抗兔抗抗体的制备:以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0041] 7、 β -兴奋剂类药物多克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0042] (1)胶体金的制备

[0043] 用去离子水将1%氯金酸稀释成0.01% (质量百分含量),置磁力加热搅拌器上搅拌煮沸,每100ml 0.01%氯金酸加入2.5ml 1%柠檬酸三钠,继续搅拌加热反应至液体呈红色时停止加热,冷却至室温后补足失水。

[0044] (2) β -兴奋剂类药物多克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0045] 在磁力搅拌下,用0.2mol/L碳酸钾调胶体金的pH值至7.2,按40-80 μ g抗体/ml胶体金的标准向胶体金溶液中加入上述 β -兴奋剂类药物多克隆抗体,继续搅拌混匀30min,加入10%牛血清白蛋白至其在胶体金溶液中的终浓度为1%,静置10min。12000rpm、4 $^{\circ}$ C离心20min,弃上清液,沉淀用缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/20的复溶缓冲液将沉淀重悬,置于4 $^{\circ}$ C环境下备用。复溶缓冲液为含酪蛋白0.1-0.2% (体积百分含量)、吐温-80 0.05-0.15% (体积百分含量)的0.01mol/L、pH7.2的磷酸盐溶液。

[0046] 8、结合物释放垫的制备

[0047] 将结合物释放垫浸泡于含有牛血清白蛋白0.5% (体积百分含量),pH为7.2,0.1mol/L的磷酸盐缓冲液中,浸湿40min,37 $^{\circ}$ C烘干1.5h。按照每1cm均匀喷涂0.01ml,用喷雾仪将上述制备的 β -兴奋剂类药物多克隆抗体-胶体金标记物喷涂至结合物释放垫后,置于37 $^{\circ}$ C环境下干燥1.5h取出备用。

[0048] 9、样品吸收垫的制备:将样品吸收垫置于含牛血清白蛋白0.5% (体积百分含量),pH为7.2、0.1mol/L磷酸盐缓冲液浸泡1h,37 $^{\circ}$ C烘2h备用。

[0049] 10、反应膜的制备

[0050] 用0.01mol/L、pH 7.2磷酸缓冲液将 β -兴奋剂类药物半抗原-卵清蛋白偶联物稀释

到10mg/mL,用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区,包被量为 $1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$;用 $0.01\text{mol}/\text{L}$ 、pH 7.4磷酸盐缓冲液将羊抗兔抗抗体稀释到 $150\mu\text{g}/\text{ml}$,用点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区,包被量为 $1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。将包被好的反应膜置于 37°C 条件下干燥3h,备用。

[0051] (二) 各部件的组装

[0052] 1、试纸条的组装

[0053] 1) 将所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序黏贴在pvc底板上;样品吸收垫覆盖在结合物释放垫的前端1/3处,结合物释放垫的末端与反应膜的始端相连,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与pvc底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐;检测区和质控区呈与试纸条长相垂直的两个平行条带,检测区位于靠近结合物释放垫的一侧,质控区位于远离结合物释放垫的一侧。样品吸收垫为吸滤纸;吸水垫为吸水纸;结合物释放垫为玻璃棉;反应膜为硝酸纤维素膜。

[0054] 2) 将试纸条切成2-4mm宽的小条,加塑料外盒,塑料外盒上对应样品吸收垫的上方设置有加样孔,塑料外盒上对应检测区和质控区上方设置有观察窗口。

[0055] 3) 将上述步骤组装得到试纸条,在 $4\sim 30^\circ\text{C}$ 的环境中储存,有效期12个月。

[0056] 实施例2、试纸条的应用

[0057] 用实施例1中所述是试纸条检测猪尿液中 β -兴奋剂类药物

[0058] 1、检测方法

[0059] 用一次性吸管向加样孔中滴加需检测的样品溶液2-3滴,反应5min,观看结果。

[0060] 2、检测结果判定

[0061] 本试纸条将待检猪尿液样品滴加于加样孔,待猪尿液样品与结合物释放垫中的金标抗体结合后一起向反应膜扩散,反应5min;若待检样品液中 β -兴奋剂类药物的含量高,则扩散过程中待测样品液中的 β -兴奋剂类药物可与金标抗体相结合,进而完全封闭金标抗体上 β -兴奋剂类药物的抗原结合点,阻止金标抗体与反应膜上 β -兴奋剂类药物半抗原-卵清蛋白偶联物结合,检测区不能显色,而抗抗体则可与金标抗体结合,质控区显色;若待检样品液中 β -兴奋剂类药物的含量低或者无,则金标抗体上的抗原结合位点不能被封闭,进而金标抗体会与反应膜上 β -兴奋剂类药物半抗原-卵清蛋白偶联抗原结合,检测区显色,同时抗抗体也可与金标抗体结合,质控区显色。如果质控区不显色,则试纸条失效。

[0062] 阳性:当质控区(C)显示出红色条带,而检测区(T)不显色时,判为阳性。

[0063] 阴性:当质控区(C)显示出红色条带,检测区(T)同时也显示出红色条带,判为阴性。

[0064] 无效:当质控区(C)不显示出红色条带,则无论测试区(T)显示出红色条带与否,该试纸判为无效。

[0065] 3、检测限试验

[0066] 将克伦特罗、赛布特罗、克伦丙罗、西马特罗、溴氯布特罗、溴布特罗、马布特罗、班布特罗,稀释成如下不同浓度: $0、0.5、1、2\text{ng}/\text{mL}$ 克伦特罗、赛布特罗、克伦丙罗; $0、1、2、4\text{ng}/\text{mL}$ 的溴氯布特罗、溴布特罗、马布特罗; $0、1.5、3、6\text{ng}/\text{mL}$ 西马特罗、班布特罗;所用的稀释液为pH为7.2、 $0.2\text{mol}/\text{L}$ 的磷酸盐缓冲液。

[0067] 用试纸条进行检测。用一次性吸管,每次向加样孔中滴加含有以下浓度标准品的

猪尿液样品2—3滴,反应5min后,将试纸插入检测,结果为:当滴试0、0.5ng/mL克伦特罗、赛布特罗、克伦丙罗;0、1ng/mL的溴氯布特罗、溴布特罗、马布特罗;0、1.5ng/mL西马特罗、班布特罗时,试纸条检测区和质控区均显红色,检测结果呈阴性;当滴试1、2ng/mL克伦特罗、赛布特罗、克伦丙罗;2、4ng/mL的溴氯布特罗、溴布特罗、马布特罗;3、6ng/mL西马特罗、班布特罗时,试纸条检测区不显色,质控区显红色,检测结果呈阳性。本试纸条对克伦特罗、赛布特罗、克伦丙罗检测限为1ng/mL,对溴氯布特罗、溴布特罗、马布特罗检测限为2ng/mL,对西马特罗、班布特罗检测限为3ng/mL。

[0068] 4、特异性试验

[0069] 特异性常用交叉反应率表示,是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。将猪尿液中常检的其他药物(氯霉素、三聚氰胺、磺胺类药物、莱克多巴胺、沙丁胺醇)用pH为7.2、0.2mol/L的磷酸盐缓冲液进行稀释。用实施例1中所述的试纸条进行检测,结果显示氯霉素、三聚氰胺、磺胺类、莱克多巴胺、沙丁胺醇药物在500 μ g/L浓度时,试纸条质控区和检测区均显色,可以得出本试纸条未对这些药物发生交叉反应。

[0070] 5、假阴性率和假阳性率试验

[0071] 取已知克伦特罗含量大于1ng/mL的猪尿液阳性样品50份和浓度小于1ng/mL的猪尿液阴性样品50份,用3个批次生产的试纸条分别进行检测,计算其阴阳性率,结果见表1、表2。

[0072] 表1、检测阳性样品结果

[0073]

批次	阳性猪尿液样品 (50份)
1	50份阳性
2	50份阳性
3	50份阳性

[0074] 表2、检测阴性样品结果

[0075]

批次	阴性猪尿液样品 (50份)
1	49份阴性,1份阳性
2	50份全为阴性,
3	50份全为阴性

[0076] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性猪尿液样品时,阳性符合率为100%;检测50份阴性猪尿液样品时,有一批阴性符合率为98%,其余两批阴性符合率为100%。本发明的试纸条完全可以做为常规方法用于对猪尿液中 β -兴奋剂类药物进行快速检测。

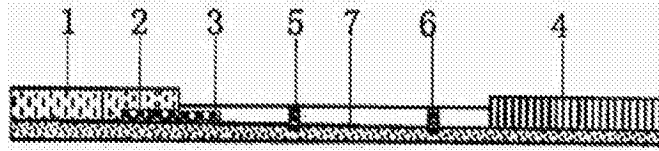


图1

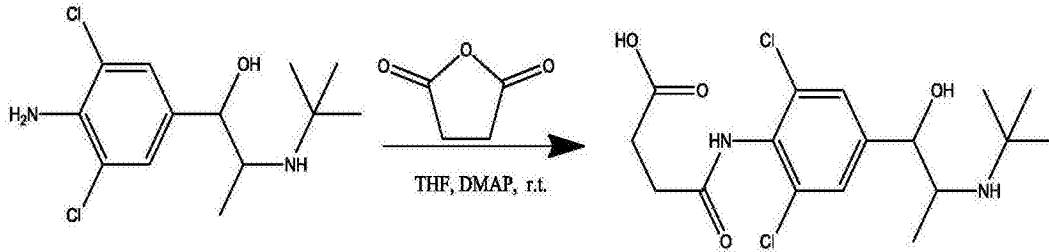
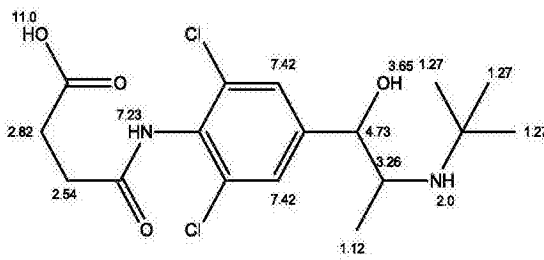


图2

ChemNMR ¹H Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

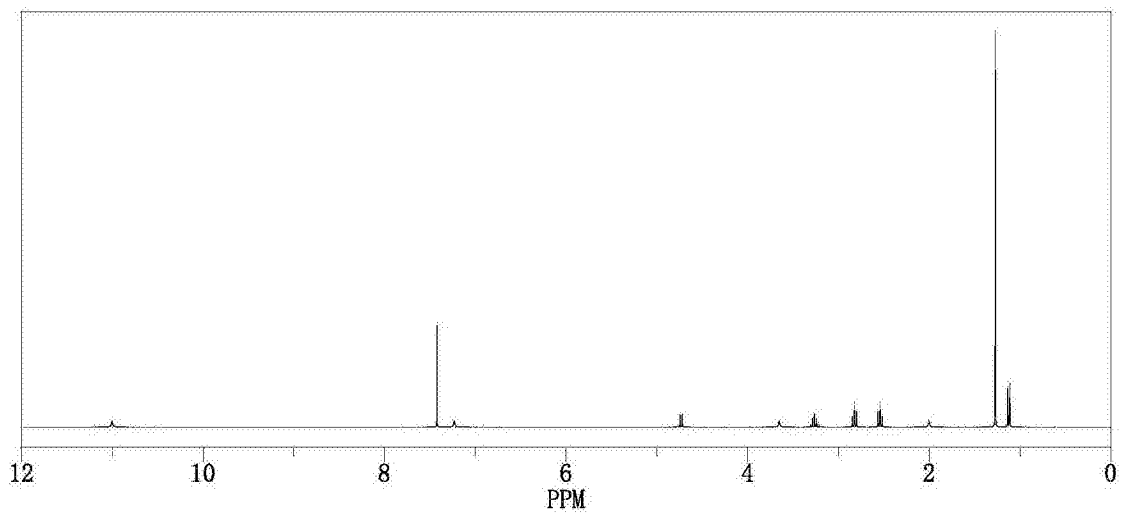


图3

专利名称(译)	一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN106680489A	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201611046382.7	申请日	2016-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	云南辉瑞贝尔生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	云南辉瑞贝尔生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	云南辉瑞贝尔生物科技有限公司		
[标]发明人	杨绍元 杨少琼		
发明人	杨绍元 杨少琼		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
代理人(译)	唐小红		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测 β -兴奋剂类药物的试纸条及制备方法。本发明试纸条由样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上组成，所述反应膜上有检测区和质控区，结合物释放垫上包被有 β -兴奋剂类药物特异性抗体-胶体金标记物，检测区包被有 β -兴奋剂类药物半抗原-载体蛋白偶联物，质控区包被有抗抗体，所述检测区和质控区呈与试纸条长相垂直的两个平行条带。用本发明试纸条检测 β -兴奋剂类药物的方法检测灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单直观、检测时间短、适用范围广等优点。

