

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02153852.2

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1300584C

[22] 申请日 2002.12.5 [21] 申请号 02153852.2
[73] 专利权人 国家饲料质量监督检验中心(北京)
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12 号国家饲料质量监督检验中心
[72] 发明人 杨曙明 宋荣许 雷
[56] 参考文献
CN1153908A 1997.7.9
AU3574093A 1993.10.5
JP57192867A 1982.11.27
审查员 刘 铭

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

盐酸克伦特罗检测试剂条及其制造方法

[57] 摘要

本发明公开了盐酸克伦特罗检测试剂条及其制造方法，目的是提供一种能够快速半定量检测盐酸克伦特罗是否存在的试剂条及其制造方法。检测盐酸克伦特罗的试剂条，包括设有凹槽的吸附板，在所述吸附板的凹槽内吸附有带固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的载体膜，所述载体膜上放置有带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫；所述试剂条还包括一个装有底物和显色剂的遮光容器。本发明的产品为一次性检测工具，属于快速微量检测，CBL 的检测限为 1ng/ml，对于控制瘦肉精等违禁药物的非法使用具有重要的价值。

1、一种检测盐酸克伦特罗的试剂条，它包括设有凹槽的吸附板，其特征在于：在所述吸附板的凹槽内吸附有带固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的偏二氟乙烯载体膜，所述载体膜上放置有带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫；所述试剂条还包括一个装有底物和显色剂的遮光容器；所述制备带有固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的偏二氟乙烯载体膜的步骤是：

1) 以 100%甲醇浸润偏二氟乙烯膜 10-30 秒，50：50 甲醇/PBS 混合液浸润 5-10 分钟，0.2mol，pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液平衡 30 分钟；

2) 盐酸克伦特罗抗体的贮备液加蔗糖和 PVP 保护液后稀释至 2ng/ul；

3) 将抗体液点加到偏二氟乙烯膜上；

4) 待膜彻底干后放入含 4%戊二醛的固定液中，38℃浸泡 10-20 分钟；

5) 在含 3%脱脂乳的 PBS 缓冲液中浸泡 10 分钟，取出后用 PBS 冲洗 2 次，置于室温下晾干。

2、根据权利要求 1 所述的试剂条，其特征在于：所述试剂条还包括比色卡。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂条，其特征在于：所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶；所述释放垫为玻璃纤维膜。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂条，其特征在于：所述遮光容器为棕色毛细管。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂条，其特征在于：所述底物为过氧化氢；所述显色剂为四甲基联苯胺。

6、一种生产检测盐酸克伦特罗的试剂条的方法，包括以下步骤：

1) 获得抗盐酸克伦特罗的抗体；

2) 制备带有固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的偏二氟乙烯载体膜，包括：(1) 以 100%甲醇浸润偏二氟乙烯膜 10-30 秒，50：50 甲醇/PBS 混合液浸润 5-10 分钟，0.2mol pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液平衡 30 分钟；

(2) 盐酸克伦特罗抗体的贮备液加蔗糖和 PVP 保护液后稀释至 2ng/ul；

(3) 将抗体液点加到偏二氟乙烯膜上；

(4) 待膜彻底干后放入含 4%戊二醛的固定液中，38℃浸泡 10-20 分钟；

(5) 在含 3%脱脂乳的 PBS 缓冲液中浸泡 10 分钟，取出后用 PBS 冲洗 2 次，置于室温下晾干；

3) 制备带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫；

- 4) 将载体膜贴附在用常规方法生产的吸附板上;
- 5) 吸附板、释放垫及装有底物和显色剂的遮光容器共同包装。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述获得抗盐酸克伦特罗的抗体的步骤为：将盐酸克伦特罗重氮化后与 BSA 偶联，偶联的比例为 12：1；用该偶联物免疫动物，并自动物的血清中获得抗体。

8、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶；所述制备带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫的步骤是：

- 1) 盐酸克伦特罗重氮化后与辣根过氧化物酶偶联，偶联的比例为 7：1；
- 2) 用 0.2%土温 20 或 0.2%PVA 喷涂或浸润 10-20 分钟表面经聚丙烯处理的玻璃纤维膜载体；

3) 盐酸克伦特罗辣根过氧化物酶偶联物的贮备液加 4%蔗糖和 5%PVP 保护液后稀释至 3ng/u1，点加到玻璃纤维膜上，室温下晾干得到释放垫。

9、根据权利要求 6 或 7 或 8 所述的方法，其特征在于：所述底物为过氧化氢；所述显色剂为四甲基联苯胺。

盐酸克伦特罗检测试剂条及其制造方法

技术领域

本发明涉及一种检测试剂条及其制造方法，特别是涉及一种检测盐酸克伦特罗的试剂条及其制造方法。

背景技术

盐酸克伦特罗（CBL）俗称“瘦肉精”，是一种 β -兴奋剂类药物，具有促进动物生长，提高畜禽瘦肉比的作用。盐酸克伦特罗进入猪体后，代谢时间长，性质稳定，易在动物组织中形成残留，主要残存在肝脏、肺、眼球等部位。当人们食用含“瘦肉精”超标的动物性食品一定量后，会出现不同程度的震颤、心慌、头痛、恶心、呕吐、代谢紊乱等中毒症状。盐酸克伦特罗本身及其代谢物残留的特殊毒性及其致癌、致畸胎、致突变作用，已被大量的试验研究和追踪调查所证明，引起了世界各国的高度警惕。我国饲料中非法使用这些激素类药物的问题也很严重。我国政府已明令禁止用盐酸克伦特罗作为饲料添加剂。我国在 2001 年制定了“饲料中盐酸克伦特罗的测定气相色谱-质谱法”、“动物组织中盐酸克伦特罗的测定气相色谱-质谱法”等农业部行业标准，在分析技术上为我国对盐酸克伦特罗的管理提供了技术保证。但是，这些检测方法需要大型精密仪器，而且分析程序需要 30 个小时左右。即使是快速的检测方法如酶联免疫吸附试验法（ELISA），也需要在实验室内进行分析，完成一次检测需要 2 小时，无法做到现场检测，成本也高。

发明内容

本发明的目的是提供一种能够快速半定量检测盐酸克伦特罗是否存在的试剂条。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：一种检测盐酸克伦特罗的试剂条，它包括设有凹槽的吸附板，在所述吸附板的凹槽内吸附有带固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的载体膜，所述载体膜上放置有带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫；所述试剂条还包括一个装有底物和显色剂的遮光容器。

为了方便比色，所述试剂条还包括比色卡。

所述载体膜优选为偏二氟乙烯膜；所述过氧化物酶优选为辣根过氧化物酶；所述释放垫优选为玻璃纤维膜。所述遮光容器优选为棕色毛细管。

所述底物优选为过氧化氢；所述显色剂优选为四甲基联苯胺。

本发明的第二个目的是提供一种生产检测盐酸克伦特罗的试剂条的方法。

一种生产检测盐酸克伦特罗的试剂条的方法，包括以下步骤：

- 1) 获得抗盐酸克伦特罗的抗体;
- 2) 制备带有固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的载体膜;
- 3) 制备带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫;
- 4) 将载体膜贴附在用常规方法生产的吸附板上;
- 5) 吸附板、释放垫及装有底物和显色剂的遮光容器共同包装。

在上述生产过程中,所述获得抗盐酸克伦特罗的抗体的步骤为:将盐酸克伦特罗重氮化后与 BSA 偶联,偶联的比例为 12:1;用该偶联物免疫动物,并自动物的血清中获得抗体。

所述制备带有固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的载体膜的步骤是:

- 1) 以 100%甲醇浸润偏二氟乙烯膜 10-30 秒,50:50 甲醇/PBS 混合液浸润 5-10 分钟,0.2mol 的 PBS 缓冲液(pH 为 7.4)平衡 30 分钟;
- 2) 盐酸克伦特罗抗体的贮备液加蔗糖和 PVP 保护液后稀释至 2ng/ul;
- 3) 将抗体液点加到偏二氟乙烯膜上;
- 4) 待膜彻底干后放入含 4%戊二醛的固定液中,38℃浸泡 10-20 分钟;
- 5) 在含 3%脱脂乳的 PBS 缓冲液中浸泡 10 分钟,取出后用 PBS 冲洗 2 次,置于室温下晾干。

所述制备带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫的步骤是:

- 1) 盐酸克伦特罗重氮化后与辣根过氧化物酶偶联,偶联的比例为 7:1;
- 2) 用 0.2%土温 20、0.2%PVA 等释放促进剂喷涂、或浸润 10-20 分钟表面经聚丙烯处理的玻璃纤维膜载体;
- 3) 盐酸克伦特罗辣根过氧化物酶偶联物的贮备液加 4%蔗糖和 5%PVP 保护液后稀释至 3ng/ul,点加到玻璃纤维膜上,室温下晾干得到释放垫。

本发明巧妙地利用 ELISA 的原理,并创造性地将抗体和竞争物均固相化,使半定量检测盐酸克伦特罗的过程大大简化,检测过程只需 17 分钟,而且在检测过程中不需要任何仪器设备,使盐酸克伦特罗的现场快速检测成为了可能。

用本发明的方法制造的试剂条,固相化的 CBL 抗体活性可保存 4 个月,酶标记 CBL 在 50 秒内释放率达于 85%,干燥情况下,酶标记 CBL 的活性保存期达到 3 个月,既确保了反应的灵敏快速,又方便了使用者,可以做到一次购买,较长时间地使用,节约开支降低成本,符合市场竞争的需要。

本发明的产品为一次性检测工具,属于快速微量检测,CBL 的检测限为 1ng/ml,对于控制瘦肉精等违禁药物的非法使用具有重要的价值。

下面结合附图对本发明的产品及制造方法做进一步说明。

附图说明

图 1 为本发明试剂条的结构示意图。

图 2 为本发明试剂条载体膜在不同样品作用下的反应。

具体实施方式

实施例 1、检测盐酸克伦特罗试剂条的结构

如图 1 所示,本发明检测盐酸克伦特罗的试剂条包括设有凹槽 2 的塑料吸附板 1,在吸附板 1 的凹槽 2 内吸附固定有带固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的偏二氟乙烯载体膜 3,载体膜 3 上放置有带有盐酸克伦特罗与辣根过氧化物酶偶联物的玻璃纤维膜释放垫 4;一个装有过氧化氢底物和显色剂四甲基联苯胺的棕色毛细管 6;在塑料吸附板 1 上粘贴有比色卡 5。

在本实施例中,吸附板 1 也可以是其它材料制成的,如树脂、玻璃等。

本发明试剂条的工作原理是,样品滴加在释放垫 4 上,释放垫中的盐酸克伦特罗与辣根过氧化物酶偶联物及样品中的标的物与抗体发生竞争反应,样品中含 CBL 越多,与抗体结合的盐酸克伦特罗-辣根过氧化物酶偶联物越少,反之亦然。洗膜后,与抗体复合的辣根过氧化物酶促使过氧化氢底物还原,并与显色剂发生显色反应。观察载体膜的颜色变化,便可知样品中是否含有 CBL。如图 2 所示,C 的样品不含 CBL,呈现蓝色,为阴性;B 的样品中含有少于 1ng/ml 的 CBL,呈现蓝色,但颜色稍淡,也为阴性;A 的样品中含有多于 1ng/ml 的 CBL,不显色,为阳性。

实施例 2、检测盐酸克伦特罗试剂条的制备

一、CBL 抗体的获得和纯化

- 1、CBL 重氮化后与 BSA 偶联,偶联的比例为 12: 1;
- 2、偶联产物经过透析去除游离的小分子 CBL、经过亲和柱分离出没有结合 CBL 的游离 BSA,获得纯化的 CBL-BSA 产物,该产物中的 CBL 浓度为原浓度的 10 倍;
- 3、用该偶联产物,经免疫程序(一次全免疫、三次强化)从兔中获得抗血清,该抗血清经 CBL 的 ELISA 试剂盒(CBL 浓度为 1ng/ml)检验,效价为 1: 10000;
- 4、抗血清经亲和净化后,获得纯化抗体备用。

二、CBL 抗体固相化的构建

1、选择用强疏水的偏二氟乙烯膜(简称为 PVDF,孔径为 0.45um)为载体,使用前分别以 100%甲醇浸润 10-30 秒、50:50 甲醇/PBS 混合液浸润 5-10 分钟、0.2mol 的 PBS 缓冲液(pH 为 7.4)平衡 30 分钟;

2、CBL 抗体的贮备液加 3-5%的蔗糖和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)保护液后稀释至 2ng/ul,用移液枪将 2ul 该抗体液分次点加到直径为 3-4mm 的 PVDF 膜上;

3、待膜彻底干后放入含 4%戊二醛的固定液，38℃浸泡 10-20 分钟，后在含 3%脱脂乳的 PBS 缓冲液中浸泡 10 分钟，取出后移 PBS 冲洗 2 次，置于室温下晾干待用。

三、辣根过氧化物酶偶联 CBL 的获得和纯化

1、CBL 重氮化后与辣根过氧化物酶偶联，偶联的比例为 7: 1;

2、偶联产物经过透析去除游离的小分子 CBL、经过亲和柱分离出没有结合 CBL 的游离辣根过氧化物酶，获得纯化的 CBL-辣根过氧化物酶产物，该产物中的 CBL 浓度经 ELISA 试剂盒检测，为原浓度的 5 倍。

四、辣根过氧化物酶偶联 CBL 固相载体的构建

1、选择用表面经聚乙烯醇 (PVA) 处理的玻璃纤维膜为载体。该载体在使用前分别用 0.2%土温 20、0.2%PVA 等释放促进剂喷涂、或浸润 10-20 分钟;

2、CBL 辣根过氧化物酶的贮备液加 4%蔗糖和 5%PVP 等的保护液后稀释至 3ng/ul, 用移液枪将 3ul 该抗体液分次点加到直径为 3-4mm 的玻璃纤维膜上，置于室温下晾干即为 CBL 与辣根过氧化物酶偶联物的释放垫，待用。

五、制备试剂条

1、将载体膜贴附在用常规方法生产的塑料吸附板上，为了方便比色，在塑料吸附板上还应粘贴上阴性及阳性对照比色卡;

2、释放垫放置在载体膜上，过氧化氢底物及显色剂四甲基联苯胺封装在棕色毛细管内。

3、吸附板、释放垫及毛细管共同包装得到试剂条产品。

实施例 3、用本发明的试剂条检测尿样中是否含有 CBL

1、试剂条撕去封口膜待用。

2、取尿液 30ul，缓慢滴加在释放垫上，轻轻晃动后用镊子将释放垫去掉，反应 10 分钟。

3、用 100ul 水分别洗载体膜 3 次，每次 1 分钟。

4、打开毛细管，加底物和显色剂 10ul，4 分钟后判断出现的色斑。

5、结果判定：蓝色为阴性（即低于 1ppb），浅蓝色或无色为阳性（即高于 1ppb）。

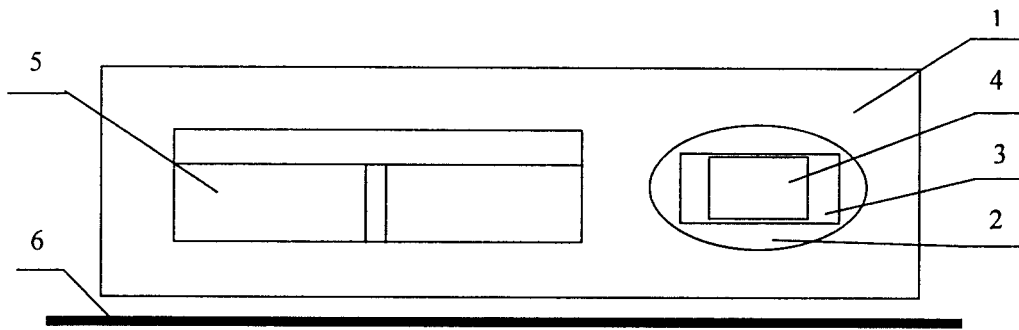


图 1

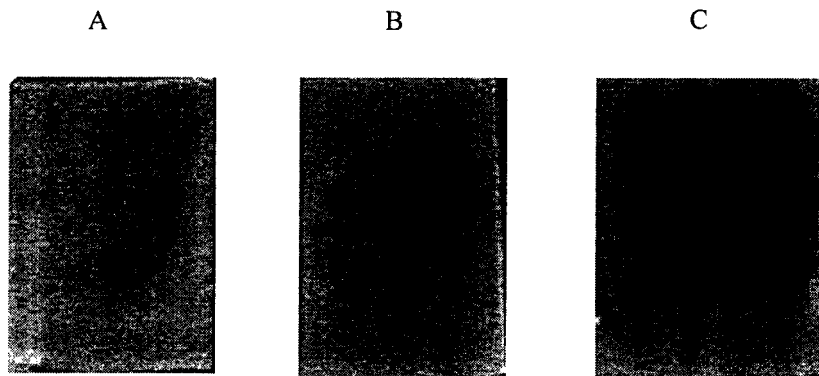


图 2

专利名称(译)	盐酸克伦特罗检测试剂条及其制造方法		
公开(公告)号	CN1300584C	公开(公告)日	2007-02-14
申请号	CN02153852.2	申请日	2002-12-05
[标]发明人	杨曙明 宋荣 许雷		
发明人	杨曙明 宋荣 许雷		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/94 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1504750A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了盐酸克伦特罗检测试剂条及其制造方法，目的是提供一种能够快速半定量检测盐酸克伦特罗是否存在的试剂条及其制造方法。检测盐酸克伦特罗的试剂条，包括设有凹槽的吸附板，在所述吸附板的凹槽内吸附有带固化相抗盐酸克伦特罗的抗体的载体膜，所述载体膜上放置有带有盐酸克伦特罗与过氧化物酶偶联物的释放垫；所述试剂条还包括一个装有底物和显色剂的遮光容器。本发明的产品为一次性检测工具，属于快速微量检测，CBL的检测限为1ng/ml，对于控制瘦肉精等违禁药物的非法使用具有重要的价值。

