



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109490537 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811531767.1

(22)申请日 2018.12.14

(71)申请人 武汉上成生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物创新园B8栋三楼C344

(72)发明人 陈建军 刘洁 钟银 谢应松

库珊珊 马艳 绍琴

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司

公司 32224

代理人 徐瑛 祝蓉蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

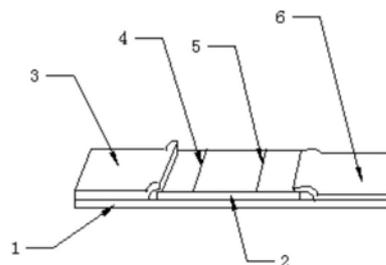
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种瘦肉精试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开一种瘦肉精试纸条及其制备方法,包括反应垫、硝酸纤维素膜、检测线、质控线、吸收垫、PVC板;在PVC板上铺设硝酸纤维素膜,检测线和质控线包被在硝酸纤维素膜上,吸收垫和反应垫设置在硝酸纤维素膜上方的两侧,吸收垫靠近质控线一端,反应垫靠近检测线;所述反应垫为带有金标克伦特罗抗体的玻璃纤维,所述检测线上包被有克伦特罗抗原,所述质控线上包被有羊抗鼠IgG多抗,以反应垫代替传统的结合垫和样品垫,去除了多次预处理结合垫和样品垫的过程,减少人工处理样品垫和结合垫造成的批内差。



1. 一种瘦肉精试纸条,其特征在于,包括反应垫、硝酸纤维素膜、检测线、质控线、吸收垫、PVC板;

在PVC板上铺设硝酸纤维素膜,检测线和质控线包被在硝酸纤维素膜上,吸收垫和反应垫设置在硝酸纤维素膜上方的两侧,吸收垫靠近质控线一端,反应垫靠近检测线;

所述反应垫为带有金标克伦特罗抗体的玻璃纤维,所述检测线上包被有克伦特罗抗原,所述质控线上包被有羊抗鼠IgG多抗。

2. 如权利要求1所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 胶体金的制备;
- (2) 胶体金-抗体复合物的制备;
- (3) 反应垫的制备;
- (4) 检测线、质控线的制备;
- (5) 试纸条的组装;
- (6) 试纸条切条及内包装。

3. 如权利要求2所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)的具体步骤为:

取100ml 1%HAuCl₄边搅拌边加热至沸腾,磁力搅拌下迅速加入1%的Na₃C₆H₅O₇溶液1.2ml,待溶液呈蓝紫色,继续加热至溶液变为酒红色为止,将制备好的胶体金冷却至室温,放置于4℃避光保存。

4. 如权利要求2所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)的具体步骤为:

用0.1mol/L的K₂CO₃溶液调节所述步骤(1)中制备的胶体金溶液pH值至8.5,每1ml胶体金溶液中加入的克伦特罗抗体溶液为1.2ug,混匀,室温静置15min后,加入10ml的10%牛血清白蛋白,混匀,室温静置20min后,离心,弃上清;用20ml含有质量终浓度为0.2%BSA、0.5%吐温-20、1%聚乙烯吡咯烷酮的PH8.5的Tris溶液复溶沉淀,即为胶体金-抗体复合物,4℃避光保存备用。

5. 如权利要求2所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)的具体步骤为:

在温度20-28℃,湿度≤40%的条件下,将所述步骤(2)中制备的胶体金-抗体复合物溶液以2.5ul/mm喷至玻璃纤维上,37°干燥,即为反应垫,密封室温保存。

6. 如权利要求2所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)的具体步骤为:

在37℃,湿度≤30%的条件下,将克伦特罗抗原用PBS稀释至0.1mg/ml,以0.1ul/mm,50mm/s的参数包喷涂于硝酸纤维素膜上作为检测线;将羊抗鼠IgG多抗用PBS稀释至0.5mg/ml,以0.5ul/mm,50mm/s的参数喷涂于NC膜作为质控线,两线间距3-4mm宽,两线分别和膜的上下边沿距离7-9mm,37℃烘烤18-20小时,密封干燥室温保存。

7. 如权利要求2所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(5)的具体步骤为:

在温度20-28℃,湿度≤30%的条件下,按照由下至上:反应垫、硝酸纤维素膜、吸收垫的顺序进行组装,反应垫和硝酸纤维素膜的重叠长度1-2mm,吸收垫和硝酸纤维素膜的重叠

长度1-2mm,反应垫和吸收垫与PVC板的上下边沿对齐。

8.如权利要求2所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法,其特征在于,所述步骤(6)的具体步骤为:

在温度为20-28℃,湿度≤30%的条件下,将所述步骤(5)中组装好的试纸条放入切条机中,按试纸宽度0.3cm,速度100次/分钟进行切条,在同样的温度及湿度情况下将切好的试纸条装入卡壳中,并逐个放入印有标签的内包袋里,一并装入干燥剂,封口,打码。

一种瘦肉精试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物免疫检测领域,具体涉及一种瘦肉精试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗 (Clenbuterol Hydrochloride), 又称瘦肉精, 是饲料和养殖生产禁止使用的 β -兴奋剂类药品, 这种药品在畜产品中残留积蓄, 通过食物链导致人类产生急性中毒和其他影响, 是被全面禁止用作食用动物的促生长剂。根据农业部“食品动物禁用的兽药及其它化合物清单”规定, 在10-9ppb数量级上不得检出。目前检测中使用较多的是酶联免疫法 (ELISA) 试剂盒, 它具有抗原-抗体特异反应性, 能够定性被测样品结果, 即不出现假阴性和尽可能少的假阳性, 该法通常作为大量样品的筛选检测, 需要酶标仪、离心机及分析天平等仪器, 分析和测定步骤都较繁琐。对于定性或定量分析检测有多种方法和技术, 如应用两种以上检测原理的高效液相色谱法HPLC或气相色谱法GC, 或带连字符 (hyphenated) 检测技术, 即色谱与质谱联用技术-GC-MS或LC-MSn, 由此得到待测化合物结构本质质谱图。但该方法需要大型仪器, 需要特殊场地和专业人员, 分析费用高, 前处理比较费时。

[0003] 免疫层析测定法出现于20世纪80年代初期, 由该技术制成的免疫层析试纸条通常由以下几部分组成: 底板及粘贴在底板上的样品垫、结合垫、纤维素膜、吸收垫等。是将免疫标记技术与层析技术结合的一种新型检测技术, 它利用抗原抗体特异性反应形成免疫复合物, 进而对待分析物进行定量检测的一种具有高度选择性的分析方法, 免疫分析法可以实现对药物、微生物、蛋白类物质、细胞因子及核酸等微量物质的检测, 相较于其它检测技术具有: 快速、简便、廉价的特点, 其专属性强、稳定性好, 能够满足高通量、低限量样品的初筛检测的特点。免疫分析法自问世以来, 发展迅速以其独特的优势倍受人们青睐, 目前它已成为常规实验室诊断的一次技术革命, 推动了环境、食品等检测领域以及其它一些尖端科技的发展。

[0004] 以胶体金为代表的层析技术已发展了20多年, 目前仍然广泛应用, 免疫金标记技术 (immunogold labeling technique) 主要利用了胶体金颗粒具有高电子密度的特性, 在金标蛋白结合处, 在显微镜下可见黑褐色颗粒, 当这些标记物在相应的配体处大量聚集时, 肉眼可见红色或粉红色斑点, 因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法。但由于其只能用于定性或半定量的检测, 难以满足检测指标定量化的要求, 同时检测结果靠肉眼判断, 特别是在检测结果呈弱阳性时, 极易造成人为漏检现象, 因此存在灵敏度较低等问题, 需要进一步完善。目前, 研究新型免疫层析技术以替代和完善胶体金免疫层析技术的不足已成为研究热点, 新型免疫层析技术不存在胶体金需大量聚集才能显色的缺点, 其以特有的光电磁信号放大系统提高检测灵敏度, 减少样品的本底干扰, 拥有传统标记物所无法比拟的优势, 免疫层析技术正朝着定量、高灵敏度、多标记检测等方向发展。

[0005] 免疫试纸法具有定性和半定量能力, 可以提供待测物的初步信息, 并且灵敏度高、检测快速、操作简单, 非常适合用于瘦肉精的筛查。比如中国专利号CN 200620019375.3公开的“盐酸克伦特罗胶体金法检测试纸”和CN200610010727.3公开的“盐酸克伦特罗胶体金

法检测试纸及制备方法”可以实现对盐酸克伦特罗的半定量快速检测；中国专利号CN201110433726.0公开的“用双指示线免疫层析半定量诊断莱克多巴胺的方法”可以实现对莱克多巴胺的半定量快速检测；中国专利号CN 201120070997.X公开的“一种瘦肉精分型检测试纸”可以实现对莱克多巴胺和盐酸克伦特罗的同时分组分检测；中国专利号CN 201120205560.2公开的“瘦肉精多残留联检试纸卡”和CN 201110163903.8公开的“瘦肉精多残留联检试纸卡及其制备方法”可以实现对莱克多巴胺、盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、特步特林和西马特罗中的两种到五种瘦肉精组分的的同时检测。

[0006] 但是以上这些试纸条在制备过程中均需要对结合垫和样品垫进行预处理，容易造成批内差，且过多的裁剪、处理，耗费人力成本和时间。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术存在的问题，提供一种瘦肉精试纸条及其制备方法

[0008] 为实现上述目的，本发明采用的技术方案是：

[0009] 一种瘦肉精试纸条，包括反应垫、硝酸纤维素膜、检测线、质控线、吸收垫、PVC板；

[0010] 在PVC板上铺设硝酸纤维素膜，检测线和质控线包被在硝酸纤维素膜上，吸收垫和反应垫设置在硝酸纤维素膜上方的两侧，吸收垫靠近质控线一端，反应垫靠近检测线；

[0011] 所述反应垫为带有金标克伦特罗抗体的玻璃纤维，所述检测线上包被有克伦特罗抗原，所述质控线上包被有羊抗鼠IgG多抗。

[0012] 以带有金标克伦特罗抗体的玻璃纤维反应垫代替原有的金标结合垫和样品垫，并且反应垫不用预处理，将金标克伦特罗抗体直接用反应垫的处理液重悬后用喷金滑膜仪喷在反应垫上，这样处理液可以更均匀的分布在反应垫上，减少人工处理样本垫和金标垫造成的批内差。

[0013] 进一步的，所述的一种瘦肉精试纸条的制备方法包括以下步骤：

[0014] (1) 胶体金的制备；

[0015] (2) 胶体金-抗体复合物的制备；

[0016] (3) 反应垫的制备；

[0017] (4) 检测线、质控线的制备；

[0018] (5) 试纸条的组装；

[0019] (6) 试纸条切条及内包装。

[0020] 进一步的，所述步骤(1)的具体步骤为：

[0021] 取100ml 1%HAuCl₄边搅拌边加热至沸腾，磁力搅拌下迅速加入1%的Na₃C₆H₅O₇溶液1.2ml，待溶液呈蓝紫色，继续加热至溶液变为酒红色为止，将制备好的胶体金冷却至室温，放置于4℃避光保存。

[0022] 进一步的，所述步骤(2)的具体步骤为：

[0023] 用0.1mol/L的K₂CO₃溶液调节所述步骤(1)中制备的胶体金溶液pH值至8.5，每1ml胶体金溶液中加入的克伦特罗抗体溶液为1.2ug，混匀，室温静置15min后，加入10ml的10%牛血清白蛋白，混匀，室温静置20min后，离心，弃上清；用20ml含有质量终浓度为0.2%BSA、0.5%吐温-20、1%聚乙烯吡咯烷酮的PH8.5的Tris溶液复溶沉淀，即为胶体金-抗体复合物，4℃避光保存备用。

[0024] 进一步的,所述步骤(3)的具体步骤为:

[0025] 在温度20-28℃,湿度≤40%的条件下,将所述步骤(2)中制备的胶体金-抗体复合物溶液以2.5ul/mm喷至玻璃纤维上,37°干燥,即为反应垫,密封室温保存。

[0026] 进一步的,所述步骤(4)的具体步骤为:

[0027] 在37℃,湿度≤30%的条件下,将克伦特罗抗原用PBS稀释至0.1mg/ml,以0.1ul/mm,50mm/s的参数包喷涂于硝酸纤维素膜上作为检测线;将羊抗鼠IgG多抗用PBS稀释至0.5mg/ml,以0.5ul/mm,50mm/s的参数喷涂于NC膜作为质控线,两线间距3-4mm宽,两线分别和膜的上下边沿距离7-9mm,37℃烘烤18-20小时,密封干燥室温保存。

[0028] 进一步的,所述步骤(5)的具体步骤为:

[0029] 在温度20-28℃,湿度≤30%的条件下,按照由下至上:反应垫、硝酸纤维素膜、吸收垫的顺序进行组装,反应垫和硝酸纤维素膜的重叠长度1-2mm,吸收垫和硝酸纤维素膜的重叠长度1-2mm,反应垫和吸收垫与PVC板的上下边沿对齐。

[0030] 在温度为20-28℃,湿度≤30%的条件下,将所述步骤(5)中组装好的试纸条放入切条机中,按试纸宽度0.3cm,速度100次/分钟进行切条,在同样的温度及湿度情况下将切好的试纸条装入卡壳中,并逐个放入印有标签的内包装袋里,一并装入干燥剂,封口,打码。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0032] (1) 结合垫和样品垫合并为反应垫,这样减少裁剪、处理和贴板中生产中过多的工序造成的人力成本和时间。

[0033] (2) 反应垫不用预处理,将金标抗体直接用反应垫的处理液重悬后用喷金滑膜仪喷在反应垫上,这样处理液可以更均匀的分布在反应垫上,减少人工处理样本垫和金标垫造成的批内差。

附图说明

[0034] 图1为本发明一种瘦肉精试纸条结构示意图;

[0035] 图中:1、PVC板;2、硝酸纤维素膜;3、反应垫;4、检测线;5、质控线;6、吸收垫。

具体实施方式

[0036] 下面将结合本发明中的附图,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0037] 实施例1:

[0038] 如图1所示,一种瘦肉精试纸条,包括反应垫3、硝酸纤维素膜2、检测线4、质控线5、吸收垫6、PVC板1;在PVC板1上铺设硝酸纤维素膜2,检测线4和质控线5包被在硝酸纤维素膜2上,吸收垫6和反应垫3设置在硝酸纤维素膜2上方的两侧,吸收垫6靠近质控线5一端,反应垫3靠近检测线4;所述反应垫3为带有金标克伦特罗抗体的玻璃纤维,所述检测线4上包被有克伦特罗抗原,所述质控线5上包被有羊抗鼠IgG多抗。以带有金标克伦特罗抗体的玻璃纤维反应垫3代替原有的金标结合垫和样品垫,并且反应垫3不用预处理,将金标克伦特罗抗体直接用反应垫3的处理液重悬后用喷金滑膜仪喷在反应垫3上,这样处理液可以更均匀

的分布在反应垫3上,减少人工处理样本垫和金标垫造成的批内差。

[0039] 具体的制备过程如下:

[0040] (1) 胶体金的制备

[0041] 取100ml 1%HAuCl₄边搅拌边加热至沸腾,磁力搅拌下迅速加入1%的Na₃C₆H₅O₇溶液1.2ml,待溶液呈蓝紫色,继续加热至溶液变为酒红色为止,将制备好的胶体金冷却至室温,放置于4℃避光保存。

[0042] (2) 胶体金-抗体复合物的制备

[0043] 取100ml胶体金,用300ul 0.1mol/L的K₂CO₃溶液调节pH值至8.5,加入120ug克伦特罗抗体溶液,混匀,室温静置15min后,加入10ml的10%牛血清白蛋白,混匀,室温静置20min后,10000rpm离心20分钟,弃上清;用20ml含有质量终浓度为0.2%BSA、0.5%吐温-20、1%聚乙烯吡咯烷酮的PH8.5的Tris溶液复溶沉淀,即为胶体金-抗体复合物,4℃避光保存备用。

[0044] (3) 反应垫3的制备

[0045] 在温度20-28℃,湿度≤40%的条件下,将所述步骤(2)中制备的胶体金-抗体复合物溶液以2.5ul/mm喷至宽2.5cm*30cm的玻璃纤维上,37°干燥18小时,即为反应垫3,密封室温保存。

[0046] (4) 检测线4、质控线5的制备

[0047] 在37℃,湿度≤30%的条件下,将克伦特罗抗原用PBS稀释至0.1mg/ml,以0.1ul/mm,50mm/s的参数包喷涂于硝酸纤维素膜上作为检测线4;将羊抗鼠IgG多抗用PBS稀释至0.5mg/ml,以0.5ul/mm,50mm/s的参数喷涂于NC膜作为质控线5,两线间距3-4mm宽,两线分别和膜的上下边沿距离7-9mm,37℃烘烤18小时密封干燥室温保存。

[0048] (5) 试纸条的组装

[0049] 在温度20-28℃,湿度≤30%的条件下,按照由下至上:反应垫3、硝酸纤维素膜2、吸收垫6的顺序进行组装,反应垫3和硝酸纤维素膜2的重叠长度1-2mm,吸收垫6和硝酸纤维素膜2的重叠长度1-2mm,反应垫3和吸收垫6与PVC板的上下边沿对齐。

[0050] (6) 试纸条切条及内包装

[0051] 在温度为20-28℃,湿度≤30%的条件下,将所述步骤(5)中组装好的试纸条放入切条机中,按试纸宽度0.3cm,速度100次/分钟进行切条,在同样的温度及湿度情况下将切好的试纸条装入卡壳中,并逐个放入印有标签的内包装袋里,一并装入干燥剂,封口,打码。

[0052] 上述制备的一种瘦肉精试纸条的使用步骤:

[0053] 取用本单位检测的阴性猪肉样品,将样品用均质机5000r/min搅拌1分钟,称取绞碎后的样品0.5±0.05g于离心管中,加入0.2ml含有质量终浓度为0.2%BSA、0.5%吐温-20、1%聚乙烯吡咯烷酮的PH8.5 20mM Tris缓冲液,混合均匀,超声10min,6000r/min离心10min,取200μL上清液垂直滴在反应垫3上,等待5-10min,在质控线5和检测线4均出现一条酒红色条带,结果呈阴性。

[0054] 取上述绞碎的样品0.5±0.05g于离心管中,加入盐酸克伦特罗标准品使样品中的浓度为4.0μg/kg,混合均匀,超声10min,6000r/min离心10min,取200μL上清液垂直滴在反应垫3上,等待5-10min,只在质控线5出现酒红色条带,结果呈阳性。

[0055] 【结果判定】

[0056] 阳性:当质控线5显示出酒红色条带,而检测线4不显色时;或者当质控线5显示出酒红色条带,检测线4显示颜色明显浅于质控线5时判为阳性。

[0057] 阴性:当质控线5显示出酒红色条带,检测线4同时显示出酒红色条带,且检测线4颜色接近质控线5或者深于质控线5时,判为阴性。

[0058] 无效:当质控线5不显示出酒红色条带,则无论检测线4显示出酒红色条带与否,该试纸条判为无效。

[0059] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

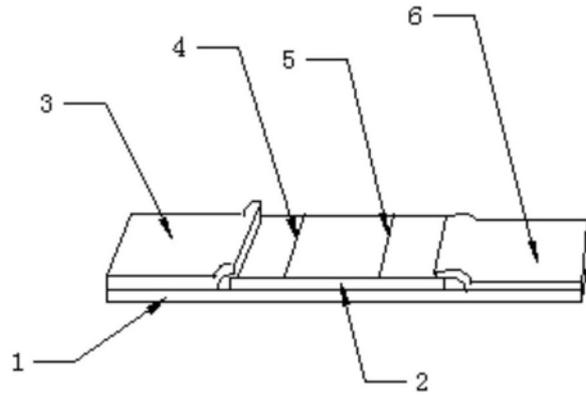


图1