



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370843 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610717345.8

(22)申请日 2016.08.25

(71)申请人 陈军

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区
苏惠路98号

申请人 那晶晶

(72)发明人 陈军 那晶晶

(74)专利代理机构 苏州翔远专利代理事务所
(普通合伙) 32251

代理人 王华

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

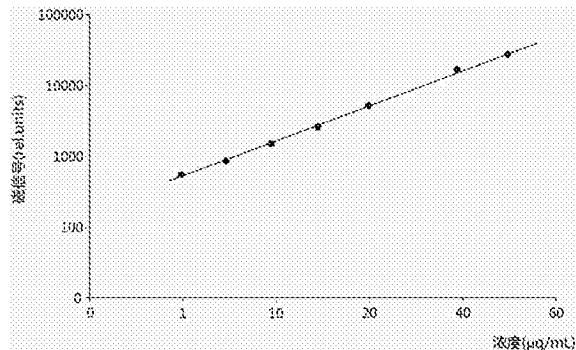
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

基于金磁免疫层析的瘦肉精快速测定方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于金磁免疫层析的瘦肉精快速测定方法，包括：纳米金磁颗粒与抗原的结合；试纸条的制备与组装；利用免疫层析试纸条对猪肉中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺进行定量检测，通过磁性阅读仪对试纸条上的磁信号进行采集，可对盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的含量进行定量检测。该检测方法较传统仪器分析方法更为简单快捷，且检测成本较低，有望进行大规模的推广应用。



1. 一种利用纳米金磁免疫层析法测定猪肉中瘦肉精含量的检测方法, 其特征在于所述方法包括以下步骤:

(1) 按照纳米金磁免疫层析法分别测定不同浓度的盐酸克伦特罗标准溶液和莱克多巴胺标准溶液, 获取磁性信号, 分别绘制盐酸克伦特罗标准曲线和莱克多巴胺标准曲线, 以及确定纳米金磁免疫层析法中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的检测灵敏度;

(2) 对实际猪肉样品按照纳米金磁免疫层析法进行检测, 通过盐酸克伦特罗标准曲线和莱克多巴胺标准曲线确定样品盐酸克伦特罗和莱克多巴胺含量。

2. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于所述方法中,

所述纳米金磁免疫层析法采用金磁侧向流层析试纸条, 所述金磁侧向流层析试纸条包括:

(1) 叠置在固相支持垫上的多孔滤膜, 其中所述多孔滤膜设置有沿液体流动方向而被物理性分离的检测区域和质控区域; 所述检测区域分别固定有盐酸克伦特罗-BSA偶联抗原和莱克多巴胺-BSA偶联抗原; 所述质控区域固定有质控试剂;

(2) 结合物释放垫, 与所述多孔滤膜流体连通, 且沉积有与液体样品接触后可释放的结合物探针, 其中所述结合物探针为金磁纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的单克隆抗体;

(3) 吸收垫, 用于收集流经所述检测和质控区域的所述液体。

3. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于所述方法中,

所述纳米金磁免疫层析法包括按照免疫层析法的步骤将金磁侧向流层析试纸条的样品端浸入样品液体中, 层析过程中待测物与层析材料上针对待测物的受体发生免疫反应, 免疫反应的复合物被富集或截留在检测区域, 然后通过磁性检测仪器获取磁性信号的步骤。

4. 根据权利要求3所述的检测方法, 其特征在于所述方法中,

所述的磁性检测仪器为磁性阅读仪。

5. 根据权利要求3所述的检测方法, 其特征在于所述方法中,

所述检测区域设置两个检测线, 其中T1线固定有盐酸克伦特罗-BSA偶联抗原, 用于检测盐酸克伦特罗; T2线固定有莱克多巴胺-BSA偶联抗原, 用于检测莱克多巴胺。

6. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述方法中,

金磁纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的单克隆抗体按照如下步骤进行制备:

1) γ -Fe₂O₃纳米颗粒制备: 以FeCl₃、FeCl₂为原料通过化学共沉淀法获取Fe₃O₄纳米颗粒; 清洗后将获得Fe₃O₄纳米颗粒分散在HNO₃溶液加热至90℃反应1小时, 反应完全后得到 γ -Fe₂O₃纳米颗粒;

2) 核壳结构的金磁纳米颗粒制备: 将制得的 γ -Fe₂O₃纳米颗粒分散在纯水中稀释至1.1mol/L; 在柠檬酸钠作为表面活性剂的条件下依次加入NH₂OH·HCl、氯金酸进行反应; 重复依次加入NH₂OH·HCl、氯金酸进行反应获得金磁纳米颗粒即Au/Fe₂O₃胶体颗粒;

3) 金磁纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的单克隆抗体制备: 将制备的金磁纳米颗粒, 用pH=7.4的PBS缓冲溶液润洗后, 纯化分离出金磁纳米颗粒, 然后在pH=7.4的PBS缓冲溶液中分散, 缓慢加入等摩尔比的盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体, 并震荡摇匀,

缓慢加入PEG20000,继续震荡20min,加入10%的牛血清蛋白溶液至终浓度为1%,磁性分离,弃上清,沉淀用pH=7.4的PBS缓冲溶液清洗,纯化分离,制得的金磁-盐酸克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体分散于pH=7.4的PBS缓冲溶液中,4℃保存。

7.根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述方法中,

金磁纳米颗粒是内层为 γ -Fe₂O₃,外层为Au包覆的核壳纳米复合材料;所述金磁纳米颗粒的粒径在20~80nm范围内;优选的,金磁纳米颗粒的粒径为50nm。

8.根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述方法步骤3)中,

所述的金磁纳米颗粒的分离纯化方式为磁性分离;优选的,所述的盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体与金磁复合材料分离纯化方式为磁性分离。

9.根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述方法中,

标准溶液是通过浓度为1mg/mL的标准储备液用PH=7.4的PBS缓冲溶液稀释配置而成;标准溶液的梯度浓度依次为1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、50 μ g/mL。

10.根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述方法步骤3)中,

所述测试样品进行检测前需要进行预处理,将猪肉样品用均质机5000r/min搅拌1分钟,称取绞碎后的样品0.5±0.05g于10mL塑料离心管中,向管中加入2mL提取液(pH=7.4的PBS缓冲溶液),涡旋1min,超声20min,置于离心机中8000r/min离心10min。

基于金磁免疫层析的瘦肉精快速测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物免疫检测领域,涉及一种通过金磁纳米免疫层析试纸条对肉制品中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的快速检测的快速检测方法。

背景技术

[0002] 免疫层析法 (immunochemical assay) 是20世纪90年代兴起的一种快速诊断技术,通过将免疫标记技术与层析技术结合,利用抗原抗体特异性反应形成免疫复合物,进而对待分析物实现定性/定量检测。免疫分析法主要是基于抗原抗体特异性结合的原理,利用标记示踪物与抗原或抗体形成复合物被截留而显色,由此实现对药物、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,具有高度选择性的免疫分析法具有快速、简便、廉价的特点,其专属性强、稳定性好,可满足高通量、低限量样品的初筛检测。免疫分析法作为常规实验室诊断的一次技术革命,自问世以来以其独特的优势而倍受青睐,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。目前,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,应用比较广泛的免疫检测技术主要有免疫巧光法、免疫层析法、酶联免疫法等。

[0003] 纳米颗粒作为载体的新型层析技术是近年来研究热点。免疫金标记技术 (immunogold labeling technique) 就是利用了纳米的显色特点结合免疫层析技术诊断特异性的待测物而发展起来的。纳米金本身胶体金颗粒具有高电子密度、高蛋白结合能力和易处理的性质,可与目标抗体蛋白通过吸附或共价偶联制备对应的免疫微球,基于局域表面等离子体共振效应以及电磁场耦合效应,标记物在相应的配体处大量聚集时可产生很强的显色反应,因而可用于金属离子、小分子、DNA、蛋白质及肿瘤细胞等目标物的快速免疫检测。但由于免疫胶体金共价偶联抗体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具体要求,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。

[0004] 金磁免疫层析技术结合了磁学、光学和免疫层析的优势,以纳米金磁复合微粒代替胶体金作为标记材料,利用磁性定量的特点弥补了胶体金标记免疫层析技术不能定量检测等缺陷。利用纳米金磁颗粒高特异性识别、高亲和吸附特点,免疫磁分离结合胶体金免疫层析技术能够将靶分子从成分复杂的生物体系中分离出来起到样品的浓缩作用,从而大大提高了检测的灵敏度和检出率。金磁免疫层析技术是免疫层析技术发展过程的一次飞跃,也是对磁性免疫层析技术的继承和发展,同时也充分体现了传统胶体金标记免疫层析技术操作简单、价格低廉等优点,拥有传统标记物所无法比拟的优势。目前,将金磁复合微粒用于免疫层析的相关研究已有报道,磁微粒利用已知的方法耦合到目标微粒,从而提供磁样品元件或磁耦合混合物。定量测量耦合到磁微粒的目标微粒以形成磁耦合复合样品的方法实现对目标物的检测,然而其用于瘦肉精中的定量检测尚鲜见报道。

[0005] 瘦肉精作为一种人工合成的 β 2-肾上腺素受体激动剂,在显著提高瘦肉率的同时也造成动物源性食品中瘦肉精的残留问题。有效的检测方法是控制瘦肉精滥用的关键之

一,因此有必要研发高灵敏的快速检测方法。目前,盐酸克伦特罗的常用检测方法主要有色谱方法、免疫学方法、电化学方法和传感器法等。传统的仪器分析方法由于样品前处理时间长、仪器设备昂贵、检测成本高、对技术人员的要求高等缺点,很难实现对样品中残留物的实时监测。以胶体金标记免疫分析为代表的新型标记免疫测定技术及由此衍生的实验方法以其特异灵敏、快速准确、操作简便、廉价高效、前处理简单以及无需特殊检测设备等优点成为兽药残留检测的重要工具,有些已在免疫学检验中得到了广泛的应用,有些尚处于研究和探索阶段。基于以上原因,本发明因此而来。

发明内容

[0006] 本申请旨在提供一种通过金磁纳米免疫层析试纸条对肉制品中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的快速检测的快速检测方法,以解决现有技术中的问题。

[0007] 为了实现上述目的,根据本申请的一个方面,提供了一种通过金磁纳米免疫层析试纸条对肉制品中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的快速检测的快速检测方法,包括以下步骤:

(1)按照纳米金磁免疫层析法分别测定不同浓度的盐酸克伦特罗标准溶液和莱克多巴胺标准溶液,获取磁性信号,分别绘制盐酸克伦特罗标准曲线和莱克多巴胺标准曲线,以及确定纳米金磁免疫层析法中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的检测灵敏度;

(2)对实际猪肉样品按照纳米金磁免疫层析法进行检测,通过盐酸克伦特罗标准曲线和莱克多巴胺标准曲线确定样品盐酸克伦特罗和莱克多巴胺含量。

[0008] 进一步的技术方案是,所述方法中,

所述纳米金磁免疫层析法采用金磁侧向流层析试纸条,所述金磁侧向流层析试纸条包括:

(1)叠置在固相支持垫上的多孔滤膜,其中所述多孔滤膜设置有沿液体流动方向而被物理性分离的检测区域和质控区域;所述检测区域分别固定有盐酸克伦特罗-BSA偶联抗原和莱克多巴胺-BSA偶联抗原;所述质控区域固定有质控试剂;

(2)结合物释放垫,与所述多孔滤膜流体连通,且沉积有与液体样品接触后可释放的结合物探针,其中所述结合物探针为金磁纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的单克隆抗体;

(3)吸收垫,用于收集流经所述检测和质控区域的所述液体。

[0009] 进一步的技术方案是,所述方法中,

所述纳米金磁免疫层析法包括按照免疫层析法的步骤将金磁侧向流层析试纸条的样品端浸入样品液体中,层析过程中待测物与层析材料上针对待测物的受体发生免疫反应,免疫反应的复合物被富集或截留在检测区域,然后通过磁性检测仪器获取磁性信号的步骤。

[0010] 进一步的技术方案是,所述方法中,

所述的磁性检测仪器为磁性阅读仪。

[0011] 进一步的技术方案是,所述方法中,

所述检测区域设置两个检测线,其中T1线固定有盐酸克伦特罗-BSA偶联抗原,用于检测盐酸克伦特罗;T2线固定有莱克多巴胺-BSA偶联抗原,用于检测莱克多巴胺。

[0012] 进一步的技术方案是，所述方法中，

金磁纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的单克隆抗体按照如下步骤进行制备：

1) γ -Fe₂O₃纳米颗粒制备：以FeCl₃、FeCl₂为原料通过化学共沉淀法获取Fe₃O₄纳米颗粒；清洗后将获得Fe₃O₄纳米颗粒分散在HNO₃溶液加热至90℃反应1小时，反应完全后得到 γ -Fe₂O₃纳米颗粒；

2) 核壳结构的金磁纳米颗粒制备：将制得的 γ -Fe₂O₃纳米颗粒分散在纯水中稀释至1.1mol/L；在柠檬酸钠作为表面活性剂的条件下依次加入NH₂OH·HCl、氯金酸进行反应；重复依次加入NH₂OH·HCl、氯金酸进行反应获得金磁纳米颗粒即Au/Fe₂O₃胶体颗粒；

3) 金磁纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的单克隆抗体制备：将制备的金磁纳米颗粒，用pH=7.4的PBS缓冲溶液润洗后，纯化分离出金磁纳米颗粒，然后在pH=7.4的PBS缓冲溶液中分散，缓慢加入等摩尔比的盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体，并震荡摇匀，缓慢加入PEG20000，继续震荡20min，加入10%的牛血清蛋白溶液至终浓度为1%，磁性分离，弃上清，沉淀用pH=7.4的PBS缓冲溶液清洗，纯化分离，制得的金磁-盐酸克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体分散于pH=7.4的PBS缓冲溶液中，4℃保存。

[0013] 进一步的技术方案是，所述方法中，

金磁纳米颗粒是内层为 γ -Fe₂O₃，外层为Au包覆的核壳纳米复合材料；所述金磁纳米颗粒的粒径在20~80nm范围内；优选的，金磁纳米颗粒的粒径为50nm。

[0014] 进一步的技术方案是，所述方法步骤3)中，

所述的金磁纳米颗粒的分离纯化方式为磁性分离；优选的，所述的盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体与金磁复合材料分离纯化方式为磁性分离。

[0015] 进一步的技术方案是，所述方法中，

标准溶液是通过浓度为1mg/mL的标准储备液用PH=7.4的PBS缓冲溶液稀释配置而成；标准溶液的梯度浓度依次为1μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、15μg/mL、20μg/mL、40μg/mL、50μg/mL。

[0016] 进一步的技术方案是，所述方法步骤3)中，

所述测试样品进行检测前需要进行预处理，将猪肉样品用均质机5000r/min搅拌1分钟，称取绞碎后的样品0.5±0.05g于10mL塑料离心管中，向管中加入2mL提取液(pH=7.4的PBS缓冲溶液)，涡旋1min，超声20min，置于离心机中8000r/min离心10min。

[0017] 采用上述方案后，本发明与现有技术相比较具有以下突出的优点和效果：

本发明利用纳米金磁复合微粒代替胶体质备免疫层析试纸条用以猪肉中莱克多巴胺和盐酸克伦特罗的定量检测，金磁纳米颗粒结合了纳米金显色、生物亲和性特点以及纳米磁珠的易于分离的特点，可通过磁性的测量来进行定量检测，大大缩短了检测成本和检测时间。该试纸条在保留了纳米金免疫层析试纸条优点的同时改善了其难以定量的不足，有望进一步改善传统的纳米金免疫层析技术，使免疫层析技术走向定量化、多元检测和广泛化应用，该研究有利于食品监管部门对猪肉进行现场监管和定量初筛，保障人民生活安全。

[0018]

附图说明

[0019] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本申请的进一步理解,本申请的示意性实施例及其说明用于解释本申请,并不构成对本申请的不当限定。在附图中:

图1示出了本申请一种典型实施方式提出的金磁侧向流层析试纸条的结构示意图。其中14:样品垫、13:结合垫、10:层析膜、12:吸水垫、11:支撑片、20:检测T1线、20*:检测T2线、21:质控C线。

[0020] 图2示出了本申请一种典型实施方式提出的金磁侧向流层析试纸条的结果判定图。其中a为盐酸克伦特罗和莱克多巴胺均检出;b为盐酸克伦特罗有检出;c为莱克多巴胺有检出。

[0021] 图3示出了本申请一种典型实施方式提出的磁信号和盐酸克伦特罗浓度曲线图。

[0022] 图4示出了本申请一种典型实施方式提出的磁信号和莱克多巴胺浓度曲线图。

[0023] 图5示出了本申请一种典型实施方式提出的盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体与金磁复合材料的微观结构图。

具体实施方式

[0024] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0025] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0026] 需要说明的是,本申请的说明书和权利要求书及上述附图中的术语“第一”、“第二”等是用于区别类似的对象,而不必用于描述特定的顺序或先后次序。应该理解这样使用的数据在适当情况下可以互换,以便这里描述的本申请的实施方式例如能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。此外,术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形,意图在于覆盖不排他的包含,例如,包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元,而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0027] 为了便于描述,在这里可以使用空间相对术语,如“在……之上”、“在……上方”、“在……上表面”、“上面的”等,用来描述如在图中所示的一个部件或者模块或特征与其他部件或者模块或特征的空间位置关系。应当理解的是,空间相对术语旨在包含除了部件或者模块在图中所描述的方位之外的在使用或操作中的不同方位。例如,如果附图中的部件或者模块被倒置,则描述为“在其他部件或者模块或构造上方”或“在其他部件或者模块或构造之上”的部件或者模块之后将被定位为“在其他部件或者模块或构造下方”或“在其他部件或者模块或构造之下”。因而,示例性术语“在……上方”可以包括“在……上方”和“在……下方”两种方位。该部件或者模块也可以其他不同方式定位(旋转90度或处于其他

方位),并且对这里所使用的空间相对描述作出相应解释。

[0028] 正如背景技术所介绍的,现有技术中的肉制品中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺缺乏有效的检测方法,传统的仪器分析方法由于样品前处理时间长、仪器设备昂贵、检测成本高、对技术人员的要求高等缺点。

[0029] 本发明提供一种用于肉制品中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的快速定量检测方法,可以通过磁性的测量来进行定量检测,大大缩短了检测成本和检测时间。

[0030] 本发明提供一种快速检测盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的免疫层析方法,所述方法包括如下步骤:

步骤1)制备 γ -Fe₂O₃纳米磁性颗粒,在磁性纳米颗粒表面包覆金层,形成粒径为50nm左右的金磁纳米颗粒,放至低温冰箱冷藏待用;

步骤2)将盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体(1:1)混合抗体与步骤1)制得的金磁颗粒溶液通过聚乙二醇长链分子进行包覆,得到金磁-盐酸克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体复合物,将制得的复合物于PH=7.4的PBS缓冲溶液中,4℃保存;

步骤3)将步骤2)中制得的复合纳米材料涂于试纸条结合垫上,将样品垫、结合垫、涂有盐酸克伦特罗BSA偶联抗原和莱克多巴胺BSA偶联抗原的层析膜及吸水垫依次黏贴在试纸条支撑片上,组装成检测试纸条。

[0031] 步骤4)用步骤3)制备的试纸条测定加标后空白缓冲溶液中的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺,利用磁性阅读仪磁性读取磁性型号,绘制曲线,确定检测灵敏度;

步骤5)对实际猪肉样品进行检测,通过盐酸克伦特罗和莱克多巴胺标准曲线分别确定样品盐酸克伦特罗和莱克多巴胺含量。

[0032] 所述检测的瘦肉精为盐酸克伦特罗和莱克多巴胺。

[0033] 所述的金磁纳米粒子为内层 γ -Fe₂O₃外层Au包覆的核壳纳米复合材料,粒径为50nm左右。

[0034] 所述的步骤2)中的盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体与金磁复合材料分离纯化方式为磁性分离。

[0035] 所述的步骤3)所述的试纸条分为两个检测线,T1线是由盐酸克伦特罗BSA偶联抗原形成,检测盐酸克伦特罗;T2线是由莱克多巴胺BSA偶联抗原形成,检测莱克多巴胺。

[0036] 所述的检测仪器为磁性阅读仪。在限定的位置(测试线)建立磁场,以免疫层析方式移动所述样品穿越磁场,激励磁微粒按模式分布并产生振荡;检测磁微粒振荡产生的磁场;以及建立振荡磁微粒数量的一个信号表示,使用合适的曲线拟合技术获得定量曲线。

实施例

[0037] 结合如下实施例对金磁免疫层析试纸条快速测定猪肉中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的方法进行进一步说明。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。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。如 γ -Fe₂O₃纳米颗粒也可商业购买,也可根据文献报道制备:Fang Bao, Jian-Lin Yao, Ren-Ao Gu. Synthesis of Magnetic Fe₂O₃/Au Core/Shell Nanoparticales for Bioseparation and Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy [J]. Langmuir. 2009, 25 (18), 10782-10787.

(1) Au/ Fe₂O₃金磁纳米颗粒制备如下：

将上述购买或制得的γ-Fe₂O₃纳米颗粒用纯水稀释至1.1mol/L,取1mL Fe₂O₃溶液与1mL 0.1mol/L的柠檬酸钠溶液混合搅拌10分钟,所得的混合物加纯水至20mL,向该溶液中加入1mL 80mmol/L的NH₂OH·HCl搅拌均匀,向该溶液中逐滴加入质量百分比为1%的氯金酸溶液2mL,搅拌50min。重复加入上述相同量的NH₂OH·HCl和氯金酸溶液3次,最终形成红褐色的胶体颗粒。该金磁颗粒粒径为50nm左右,置于4℃冰箱冷藏待用。

[0038] (2) 金磁-盐酸克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体制备如下：

取上述冷藏的金磁颗粒,用500μLPBS缓冲溶液(PH=7.4)润洗2-3次,磁铁分离纳米颗粒,用PH=7.4的PBS缓冲溶液500μL分散金磁颗粒,缓慢加入盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体(1:1)共400μL并摇匀,放入恒温摇床震荡(37℃,180rmp)20min,缓慢加入质量百分比为1%的PEG20000至终浓度为0.1%,继续震荡20min,加入质量百分比为10%的牛血清蛋白溶液至终浓度为1%,磁性分离,弃上清,沉淀用PH=7.4的PBS缓冲溶液清洗,磁性分离,制得的金磁-盐酸克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体分散于PH=7.4的PBS缓冲溶液中,4℃保存;如图5所示。

[0039] (3) 结合垫制备:将玻璃纤维滤纸裁成6mm宽的细条,放入含有1% BSA(质量百分比)和0.5% Tween20(质量百分比)的PBS缓冲溶液中浸泡30min,37℃烘干备用。将上述制备的金磁-抗体颗粒灌注于膜上,真空冻干4小时后备用。

[0040] (4) 层析膜的制备步骤如下:

用PH=7.4的PBS缓冲溶液将盐酸克伦特罗BSA偶联抗原和莱克多巴胺BSA偶联抗原稀释到200ug/mL,用点膜仪将其喷涂于醋酸纤维膜的T1和T2线上,喷涂量为1.0μL/cm。用PH=7.4的PBS缓冲溶液将羊抗鼠二抗稀释到200μg/mL,用点膜仪将其喷涂于醋酸纤维膜的C线上,喷涂量为1.0uL/cm。将制备好的层析膜置于37℃真空恒温干燥4h以上备用。

[0041] (5) 试纸条的组装:

如图1所示,将样品垫14、结合垫13、层析膜10及吸水垫12依次黏贴在试纸条支撑片11上。样品垫14的末端与结合垫13的始端相连,结合垫的末端与层析膜的始端相连,层析膜的末端与吸水垫的始端相连,组装好后全部黏贴到支撑板上,得到快速检测瘦肉精(盐酸克伦特罗和莱克多巴胺)的免疫层析试纸条即金磁侧向流层析试纸条。其中20为检测T1线,20*为检测T2线,21为质控C线。

[0042] (6) 盐酸克洛特罗和莱克多巴胺检测标准曲线绘制:

标准储备液的配置:分别准确称取盐酸克伦特罗和莱克多巴胺标准品,用PH=7.4的PBS缓冲溶液配置成浓度为1mg/mL的标准储备液。

[0043] 标准曲线配置:分别将盐酸克伦特罗和莱克多巴胺储备液用PH=7.4的PBS缓冲溶液稀释浓度为:1μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、15μg/mL、20μg/mL、40μg/mL、50μg/mL的标准曲线。

[0044] 取上述配置的标准系列200μL垂直滴在试纸条的加样区,液体通过层析作用向上流动,结合抗体的纳米金磁颗粒复溶后随着液体向试纸条上方流动,等待5-10min,试纸条分别在T1线、T2线和C线均出现棕红色条带。分别将T1线和T2线区域置于磁性测试仪测量磁性号,根据磁信号和样品浓度绘制标准曲线,盐酸克伦特罗标准曲线图见图3,莱克多巴胺标准曲线图见图4。

[0045] (7) 特异性检测:

以PH=7.4的PBS缓冲溶液配置15ug/mL的沙丁醇胺、盐酸多巴胺、西马特罗、盐酸多巴胺为待测样品,分别200 μ L垂直滴在试纸条的加样区,等待5-10min,用磁性阅读仪测试试纸条的检测区磁性信号。测试结果表明,上述几种物质在试纸条的C线均显示出红棕色,T区均未显色,且无磁信号,检测结果为阴性。表明上述几种物质对盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的检测无干扰。

[0046] (8) 实际样品检测:

取上述绞碎后的样品0.5±0.05g于10mL塑料离心管中,向管中加入2mL提取液(PH=7.4的PBS缓冲溶液),加入盐酸克伦特罗标准品使样品中的浓度为4.0 μ g/kg,涡旋1min,超声20min,置于离心机中8000r/min离心10min。取上清液200 μ L垂直滴在试纸条的加样区,液体通过层析作用向上流动,结合抗体的纳米金磁颗粒复溶后随着液体向试纸条上方流动,等待5-10min,试纸条在T1线和C线均出现一条棕红色条带,结果呈阳性。

[0047] 取上述绞碎后的样品0.5±0.05g于10mL塑料离心管中,向管中加入2mL提取液(PH=7.4的PBS缓冲溶液),加入莱克多巴胺标准品使样品中的浓度为4.0ug/kg,涡旋1min,超声20min,置于离心机中8000r/min离心10min。取上清液200 μ L垂直滴在试纸条的加样区,液体通过层析作用向上流动,结合抗体的纳米金磁颗粒复溶后随着液体向试纸条上方流动,等待5-10min,试纸条在T2线和C线均出现一条棕红色条带,结果呈阳性。

[0048] 如图2所示,测定结果可直接进行目测判定。(a)中样品盐酸克伦特罗、莱克多巴胺都有检出时,在检测T线(T1或T2)和质控C线都显示两条棕红色条带,(b)中样品中盐酸克伦特罗有检出时,在检测T线(T1或T2)和质控C线都显示1条棕红色条带,(c)样品呈阴性时只在质控C线显示一条棕红色条带。检测T线(T1和T2)和质控C线都未显示棕红色条带说明试纸条无效;当被测物质浓度较低,检测T线(T1或T2)显色不明显时可用磁性阅读仪进行判读,将试纸条检测部位插入到磁性阅读仪的读数区,磁性阅读仪会自动测试被测物的磁性号,通过仪器的显示屏显示T线区域磁性号的大小。借助于磁性阅读仪可对样品中的莱克多巴胺和盐酸克伦特罗进行定量检测,提高检测灵敏度。

[0049] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

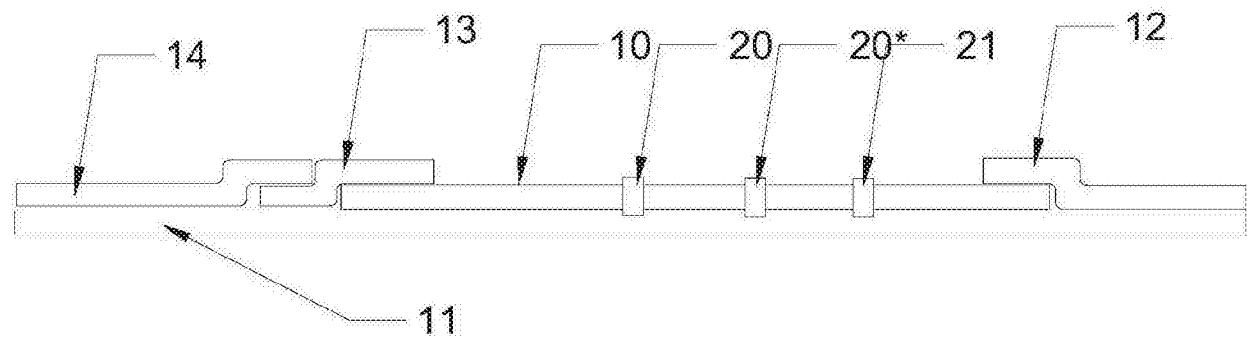


图1

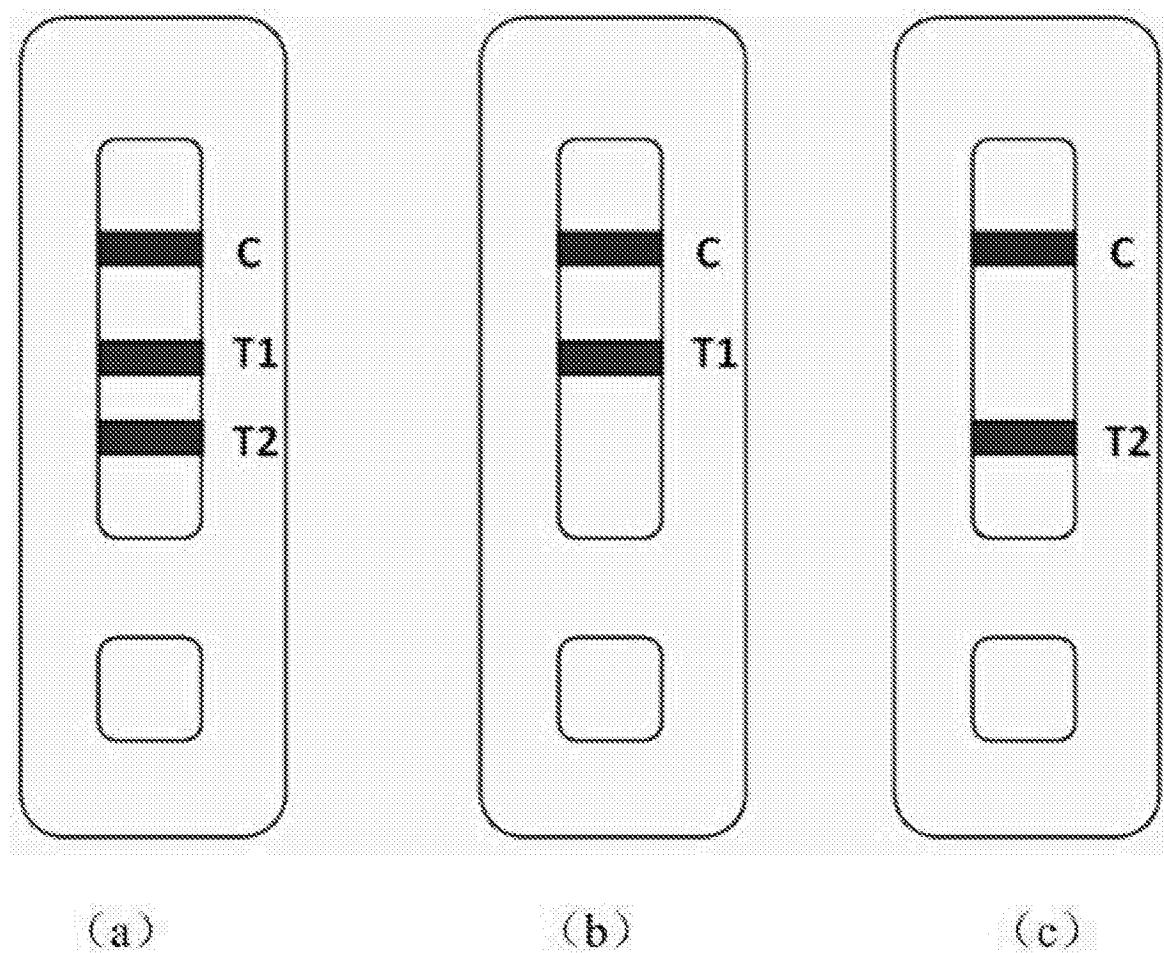


图2

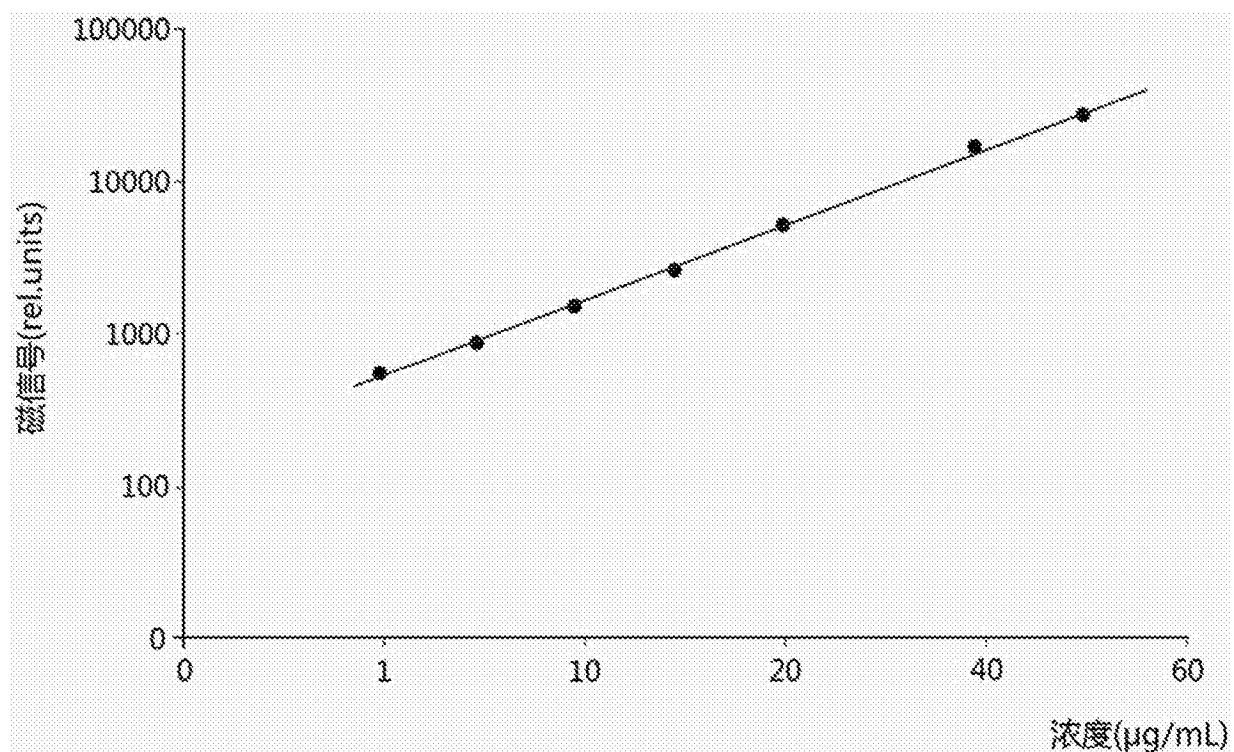


图3

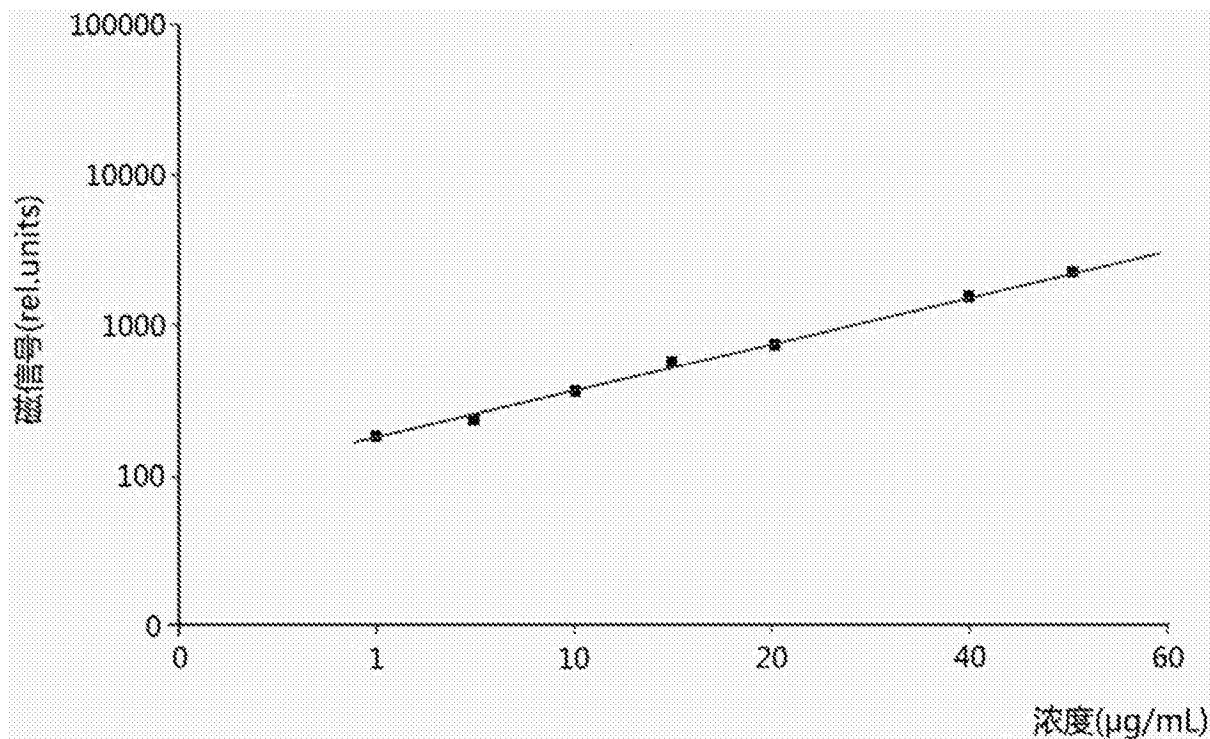


图4

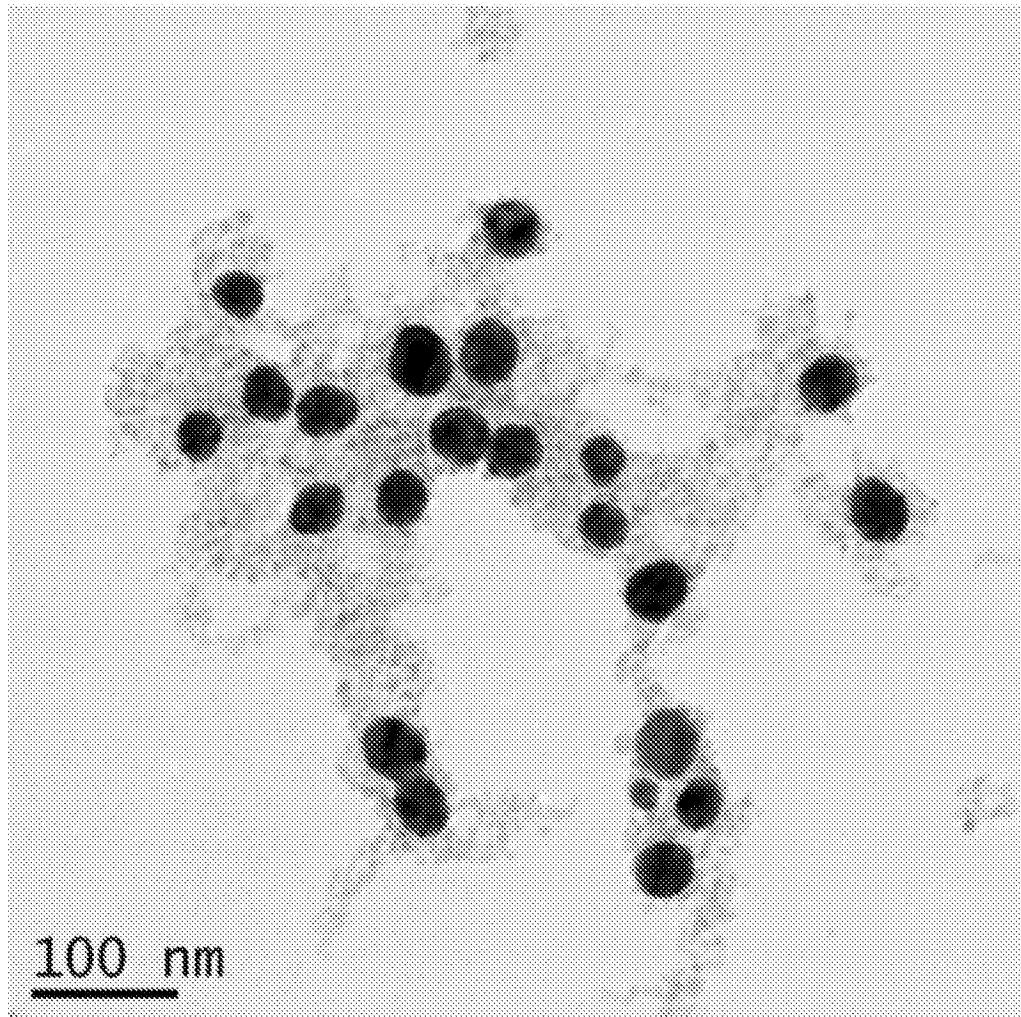


图5

专利名称(译)	基于金磁免疫层析的瘦肉精快速测定方法		
公开(公告)号	CN106370843A	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	CN201610717345.8	申请日	2016-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	陈军 那晶晶		
申请(专利权)人(译)	陈军 那晶晶		
当前申请(专利权)人(译)	陈军 那晶晶		
[标]发明人	陈军 那晶晶		
发明人	陈军 那晶晶		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/531 G01N33/54346 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	王华		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种基于金磁免疫层析的瘦肉精快速测定方法，包括：纳米金磁颗粒与抗原的结合；试纸条的制备与组装；利用免疫层析试纸条对猪肉中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺进行定量检测，通过磁性阅读仪对试纸条上的磁信号进行采集，可对盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的含量进行定量检测。该检测方法较传统仪器分析方法更为简单快捷，且检测成本较低，有望进行大规模的推广应用。

