



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106093322 B

(45)授权公告日 2018.07.24

(21)申请号 201610604513.2

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2016.07.28

G01N 33/558(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/533(2006.01)

申请公布号 CN 106093322 A

审查员 刘迎鸣

(43)申请公布日 2016.11.09

(73)专利权人 广州万联生物科技有限公司

地址 510670 广东省广州市高新技术产业

开发区科学城掬泉路3号广州国际企

业孵化器E区E402号房

(72)发明人 杨金易 曾道平 朱彬

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限

公司 44102

代理人 陈卫

(51)Int.Cl.

G01N 33/02(2006.01)

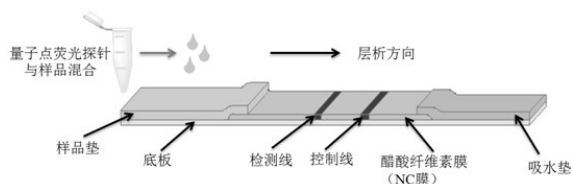
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法。是首先将量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体偶联,得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物,即为量子点荧光探针;再将该标记复合物作为量子点荧光探针与待测样品混匀孵育后,利用免疫层析试纸条进行 β -兴奋剂残留的检测。本发明能够实现多种 β -兴奋剂类药物的同时快速筛查,检测方法简便、快捷、结果准确、灵敏度高,可做定性、定量检测,价格低廉,适用范围广,具有很好的推广应用前景。



1. 一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法, 其特征在于, 是首先将量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体偶联, 得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物, 即为量子点荧光探针; 再将该标记复合物作为量子点荧光探针与待测样品混匀孵育后, 利用免疫层析试纸条进行 β -兴奋剂残留的检测;

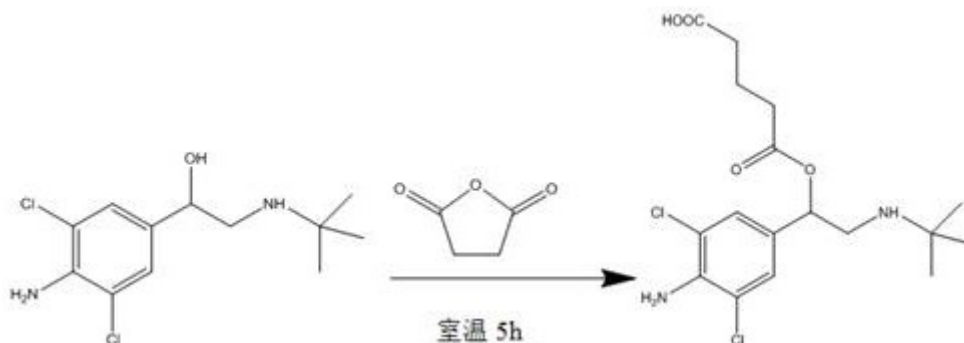
所述 β -兴奋剂单克隆抗体为 β -兴奋剂类广谱性单克隆抗体;

所述 β -兴奋剂类广谱性单克隆抗体的制备方法如下:

(1) 抗原的制备:

a. 半抗原的合成

将克伦特罗与戊二酸酐进行酰化反应, 使克伦特罗分子结构上的醇羟基酰化成为含有5个碳的羧基间隔臂, 并称之为 β -兴奋剂类药物半抗原;



b. 免疫原的制备

将 β -兴奋剂类药物半抗原与卵清蛋白偶联得到免疫原;

c. 包被原的制备

将 β -兴奋剂类药物半抗原和牛血清白蛋白采用混合酸酐法进行偶联得到包被原;

上述 β -兴奋剂的包被抗原为CL-BSA;

(2) 动物免疫: 将上述制备的人工抗原免疫Balb/C小鼠, 并采用间接ELISA方法测定其效价;

(3) 细胞融合: 采用PEG融合法将能分泌抗体的小鼠脾脏细胞与能无限繁殖的瘤细胞进行融合;

(4) 杂交瘤细胞筛选: 用间接ELISA检测培养液中的特异性抗体, 进行效价和抑制率的测定, 筛选出效价高和对药物抑制强的阳性杂交瘤细胞;

(5) 杂交瘤细胞亚克隆及建株: 利用有限稀释法进行亚克隆, 如此反复3~4轮, 得到能稳定分泌均一抗体的杂交瘤细胞株;

(6) 单克隆抗体制备: 采用动物体内诱生单克隆抗体法制备单抗。

2. 根据权利要求1所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法, 其特征在于, 所述量子点为水溶性羧基量子点。

3. 根据权利要求1所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法, 其特征在于, 所述量子点为水溶性羧基化核壳结构量子点, 核壳结构为CdTe/ZnS。

4. 根据权利要求1所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法, 其特征在于, 所述量子点荧光探针的制备方法如下:

S1. 取量子点溶解于磷酸盐缓冲液中, 加入偶联剂和N-羟基琥珀酰亚胺溶液, 室温搅拌

10~30min;所述偶联剂为1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;

S2.再加入 β -兴奋剂单克隆抗体,室温搅拌反应1~2h;

S3.继续加入10% BSA溶液封闭反应1h,将反应液以12000r/min离心40min;

S4.离心后去除上清液,用复溶液复溶沉淀,得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物。

5.根据权利要求4所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于,步骤S1所述量子点:偶联剂:N-羟基琥珀酰亚胺溶液的摩尔浓度比为1:3~6:13~17;步骤S1所述量子点与步骤S2所述 β -兴奋剂单克隆抗体的摩尔浓度比为1:3~6。

6.根据权利要求4所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于,步骤S4所述复溶液为0.01mol/L、pH 7.4的Tris-HCl,其中包括0.5%的Tween-20和0.5%的BSA。

7.根据权利要求1所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于,所述免疫层析试纸条包括底板、样品垫、反应膜、吸水垫,所述样品垫、反应膜和吸水垫依次贴附在底板上,所述反应膜上设置有包含 β -兴奋剂包被抗原的检测线和包含羊抗鼠IgG抗体的质控线,且检测线位于样品垫一侧,质控线位于吸水垫一侧;其中,所述 β -兴奋剂包被抗原为CL-BSA。

8.根据权利要求1所述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于,所述检测可为定性检测、半定量检测或定量检测,具体结果判定方法如下:

A.定性检测或半定量检测:采用紫外灯照射反应后的反应膜区域,通过肉眼观察条带发光情况,如果检测线出现荧光信号,判定该指标为阴性;如果检测线不出现荧光信号,判定该指标为阳性;同时,在任一情况,控制线不出现荧光信号则检测结果无效;

B.定量检测:配置一系列不同浓度的待测物质的标准曲线,然后利用荧光免疫层析读数仪分别进行检测,通过不同浓度的标准溶液对应的T/C值做标准曲线,再将待测样品进行同样处理,得到相应的T/C值,根据标准曲线得知样品中待测物质含量。

9.权利要求1~8任一所述 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法在检测 β -兴奋剂残留方面的应用。

一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全免疫检测技术领域。更具体地,涉及一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法。

背景技术

[0002] β -兴奋剂是一类化学结构和生理功能类似肾上腺素和去肾上腺素的苯乙胺类药物。 β -兴奋剂在临床上常用于防治人、畜的支气管痉挛和哮喘等病症。大剂量的 β -兴奋剂能影响营养物质在动物体内的重新分配,加快脂肪的分解代谢,增加蛋白质的合成,显著提高瘦肉率。因此, β -兴奋剂曾被作为饲料添加剂广泛用于畜牧生产中。但是, β -兴奋剂在动物内脏蓄积严重,能通过食物链进入人体,使人出现心悸、头晕、心律失常等症状,严重时甚至会导致死亡。我国农业部2002年发布的第235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》明确规定克伦特罗、沙丁胺醇、西马特罗及其盐、酯类不得检出。由于近年来世界各地陆续发生食用残留克伦特罗的动物性食品的中毒事件,使得各国均加强了对克伦特罗的监督检查,它的非法使用受到了极大的限制,不法分子不得不去寻找新的替代品。莱克多巴胺、沙丁胺醇等成为克伦特罗最常用替代品,而其他 β -兴奋剂如马布特罗和溴布特罗等在20世纪90年代后才上市,相对用得较少。

[0003] β -兴奋剂残留的检测一直是食品安全的重点,目前关于 β -兴奋剂的多残留检测方法很多,包括气相色谱-质谱联用(GC-MS)、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)、酶联免疫法(ELISA)等方法。虽然这些方法灵敏度高、特异性好、精确度高,但是这些方法需要专业实验人员、大型实验仪器和繁琐的样品预处理,难以满足高通量、现场快速检测的需要,很难适应许多场合快速检测的需要。近年来,免疫层析检测技术因其快速、方便,适用于现场筛查,被广泛应用于 β -兴奋剂类药物的快速检测。但是,目前已报道的免疫层析试纸条都只能检测一到两种 β -兴奋剂药物,不能同时对多种 β -兴奋剂进行筛查,而且只能实现定性检测,很难对检测样品进行定量分析。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足,提供一种检测限低、灵敏度高,能够实现对多种 β -兴奋剂类药物的同时快速筛查的方法;同时改进免疫层析系统,获得灵敏度高、稳定性好、低成本、可用于现场快速筛查测定食品中 β -兴奋剂类药物的检测方法。

[0005] 本发明的目的是提供一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法。

[0006] 本发明另一目的是提供所述方法在检测 β -兴奋剂残留方面的应用。

[0007] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0008] 一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,是首先将量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体偶联,得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物,即为量子点

荧光探针;再将该标记复合物作为量子点荧光探针与待测样品混匀孵育后,静置反应1min,利用免疫层析试纸条进行 β -兴奋剂残留的检测。

[0009] 优选地,所述量子点为水溶性羧基量子点。

[0010] 更优选地,所述量子点为水溶性羧基化核壳结构量子点,核壳结构为CdTe/ZnS。

[0011] 优选地,所述 β -兴奋剂单克隆抗体为 β -兴奋剂类广谱性单克隆抗体。

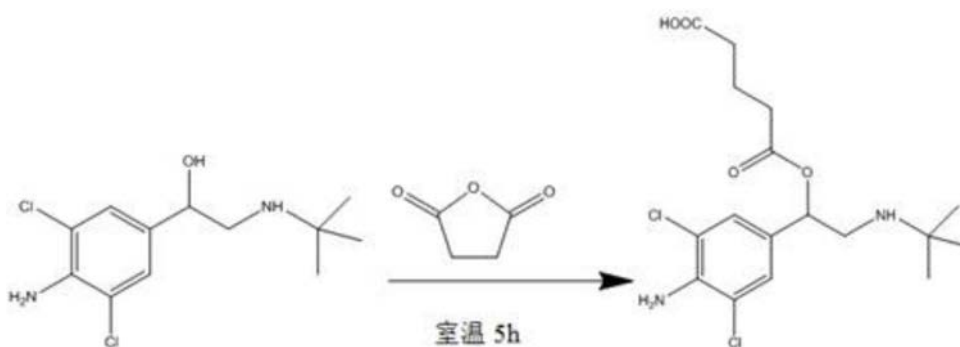
[0012] 更优选地,所述 β -兴奋剂类广谱性单克隆抗体的制备方法如下:

[0013] (1) 抗原的制备:

[0014] a. 半抗原的合成

[0015] 将克伦特罗与戊二酸酐进行酰化反应,使克伦特罗分子结构上的醇羟基酰化成为含有5个碳的羧基间隔臂,并称之为 β -兴奋剂类药物半抗原;

[0016]



[0017] b. 免疫原的制备

[0018] 将 β -兴奋剂类药物半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到免疫原;

[0019] c. 包被原的制备

[0020] 将 β -兴奋剂类药物半抗原和牛血清白蛋白(BSA)采用混合酸酐法进行偶联得到包被原;

[0021] 上述 β -兴奋剂的包被抗原为CL-BSA。

[0022] (2) 动物免疫:将上述制备的人工抗原免疫Ba1b/C小鼠,并采用间接ELISA方法测定其效价;

[0023] (3) 细胞融合:采用PEG融合法将能分泌抗体的小鼠脾脏细胞与能无限繁殖的瘤细胞进行融合;

[0024] (4) 杂交瘤细胞筛选:用间接ELISA检测培养液中的特异性抗体,进行效价和抑制率的测定,筛选出效价高和对药物抑制强的阳性杂交瘤细胞;

[0025] (5) 杂交瘤细胞亚克隆及建株:利用有限稀释法进行亚克隆,如此反复3~4轮,得到能稳定分泌均一抗体的杂交瘤细胞株;

[0026] (6) 单克隆抗体制备:采用动物体内诱生单克隆抗体法制备单抗。

[0027] 另外,作为一种优选的可实施方案,所述量子点荧光探针的制备方法如下:

[0028] S1.取量子点溶解于磷酸盐缓冲液中,加入偶联剂和N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS),室温搅拌10~30min;所述偶联剂为1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC);

[0029] S2.再加入 β -兴奋剂单克隆抗体,室温搅拌反应1~2h;

[0030] S3.继续加入10%BSA溶液封闭反应0.8~1.2h,将反应液以10000~14000r/min离

心30~50min;

[0031] S4.离心后去除上清液,用复溶液复溶沉淀,得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物,4℃避光保存。

[0032] 其中,优选地,步骤S1所述量子点:1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC):N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS)的摩尔浓度比为1:3~6:13~17。

[0033] 更优选地,步骤S1所述量子点:1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC):N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS)的摩尔浓度比为1:5:15。

[0034] 即量子点和偶联剂的最佳比例为: $n(QDs):n(EDC):n(NHS)=1:5$ 。

[0035] 优选地,步骤S1所述室温搅拌15min。

[0036] 优选地,步骤S1所述量子点与步骤S2所述 β -兴奋剂单克隆抗体摩尔浓度比为1:3~6。

[0037] 更优选地,步骤S1所述量子点:步骤S2所述 β -兴奋剂单克隆抗体=1:4。

[0038] 更优选地,步骤S2所述室温搅拌反应1.5h。

[0039] 另外,优选地,步骤S1所述磷酸盐缓冲液为0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液。

[0040] 优选地,所述量子点:磷酸盐缓冲液:10%BSA溶液的用量的体积比为1:150~170:15~25。

[0041] 更优选地,所述量子点:磷酸盐缓冲液:10%BSA溶液的用量的体积比为1:160:20。

[0042] 优选地,步骤S3所述封闭反应1h。

[0043] 优选地,步骤S3所述离心为12000r/min离心40min。

[0044] 优选地,步骤S4所述复溶液为0.01mol/L、pH 7.4的Tris-HCl,其中包括0.5%的Tween-20和0.5%的BSA。

[0045] 进一步地,所述免疫层析试纸条包括底板、样品垫、反应膜、吸水垫,所述样品垫、反应膜和吸水垫依次贴附在底板上,所述反应膜上设置有包含 β -兴奋剂包被抗原的检测线和包含羊抗鼠IgG抗体的质控线,且检测线位于样品垫一侧,质控线位于吸水垫一侧。

[0046] 其中,优选地,检测线上 β -兴奋剂包被抗原的浓度为0.85mg/mL,所述质控线上羊抗鼠IgG抗体的浓度为0.8mg/mL。

[0047] 优选地,所述检测线和质控线相隔5mm。

[0048] 即作为一种优选的可实施方案,所述检测线和质控线的制备:以硝酸纤维素膜为反应膜,将反应膜固定贴附在底板上,将 β -兴奋剂的包被抗原用包被溶液配制成0.85mg/mL,羊抗鼠IgG抗体(即为羊抗鼠IgG二抗)用包被溶液配制成0.8mg/mL,将 β -兴奋剂包被原和羊抗鼠IgG抗体喷涂在反应膜上相应的检测区和控制区形成检测线和质控线,检测线和质控线相隔5mm,放置于37℃烘箱中干燥2h后备用,其中包被溶液为0.01mol/L、pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)。

[0049] 优选地,所述 β -兴奋剂的包被抗原为CL-BSA。

[0050] 另外,优选地,所述底板为PVC。

[0051] 优选地,所述样品垫为玻璃纤维素膜。

[0052] 优选地,所述吸水垫为普通的吸水纸。

[0053] 优选地,所述反应膜为硝酸纤维素膜。

[0054] 更优选地,所述试纸条的宽度为4mm,样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫的宽度分别为

2.0cm、2.5cm、1.7cm,彼此搭接贴附在PVC底板上;其中,样品垫与硝酸纤维素膜的重合宽度为2mm,硝酸纤维素膜与样品垫的重合宽度为2mm。

[0055] 进一步地,本发明上述的 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,所述检测可为定性检测、半定量检测或定量检测,具体结果判定方法如下:

[0056] A. 定性检测或半定量检测:采用紫外灯照射反应后的反应膜区域,通过肉眼观察条带发光情况,如果检测线出现荧光信号,判定该指标为阴性;如果检测线不出现荧光信号,判定该指标为阳性;同时,在任一情况,控制线不出现荧光信号则检测结果无效;

[0057] B. 定量检测:配置一系列不同浓度的待测物质的标准曲线,然后利用荧光免疫层析读数仪分别进行检测,通过不同浓度的标准溶液对应的T/C值做标准曲线,再将待测样品进行同样处理,得到相应的T/C值,根据标准曲线得知样品中待测物质含量。

[0058] 本发明上述方法可对多种 β -兴奋剂类药物的同时快速筛查,因此,上述 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法在检测 β -兴奋剂残留方面的应用,也在本发明的保护范围之内。

[0059] 优选地,所述应用是指上述 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法在同时快速检测或筛查多种 β -兴奋剂残留方面的应用。

[0060] 其中,优选地,所述多种 β -兴奋剂为盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、马布特罗、溴布特罗、硫酸异丙肾上腺素或西马特罗中的任几种。

[0061] 本发明所用量子点具有特殊的表面效应和尺寸效应,使其具有独特光化学性质,如量子成率高、激发波长范围宽,发射波长窄且对称,斯托克斯位移大,因此可以采用同一激发光同时激发不同粒径的量子点进行多元检测。量子点的发射波长区间较大,可以跨越紫外到红外区间,且发射波长可以根据改变量子点的尺寸大小和化学组成来改变的。量子点的荧光强度高,稳定性好,荧光寿命长,经过多次激发都不会被光漂白和化学降解,且量子点有较好的生物相容性,适合作为荧光标记物。

[0062] 本发明具有以下有益效果:

[0063] 本发明提供一种 β -兴奋剂多残留量子点免疫层析试纸条,以及一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,利用量子点作为荧光探针,与免疫层析技术结合起来,可实现对多种 β -兴奋剂类药物的同时快速筛查。

[0064] 而且,量子点的荧光强度高,稳定性好,荧光寿命长,经过多次激发都不会被光漂白和化学降解,相比胶体金、有机荧光材料等,可以大大提高灵敏度。

[0065] 另外,本发明操作方便,结果准确,较好的解决了现有的检测方法只能同时检测一到两种 β -兴奋剂、稳定性差等问题。

[0066] 本发明能够实现对多种 β -兴奋剂类药物的同时快速筛查,检测方法简便、快捷、结果准确、灵敏度高,可做定性、定量检测,价格低廉,适用范围广,具有很好的推广应用前景。

附图说明

[0067] 图1为本发明 β -兴奋剂多残留量子点免疫层析试纸条结构示意图。

[0068] 图2为本发明 β -兴奋剂多残留量子点免疫层析试纸条竞争抑制曲线。

[0069] 图3为本发明 β -兴奋剂多残留量子点免疫层析试纸条免疫反应动力学曲线。

具体实施方式

[0070] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0071] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0072] 实施例1 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法

[0073] 一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法,包括以下步骤:

[0074] (1) 制备量子点荧光探针:取20 μ L量子点溶解于3.2mL 0.01mol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液中,加入偶联剂1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺溶液,室温搅拌15min,再加入50 μ g β -兴奋剂单克隆抗体,室温搅拌反应1.5h,继续加入0.4mL10%BSA溶液封闭反应1h,将反应溶液以12000r/min离心40min,去除上清液,用复溶液复溶沉淀,得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物,4 $^{\circ}$ C避光保存;

[0075] (2) 检测区和控制区的制备:以硝酸纤维素膜为反应膜,将反应膜固定贴附在底板上,将 β -兴奋剂的包被抗原用包被溶液配制成0.85mg/mL,羊抗鼠用包被溶液配制成0.8mg/mL,将 β -兴奋剂包被抗原和羊抗鼠IgG二抗喷涂在反应膜上相应的检测区和控制区,检测区和控制区相隔5mm,放置于37 $^{\circ}$ C烘箱中干燥2h后备用,其中包被溶液为0.01mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液。

[0076] (3) 在上述底板上依次贴附样品垫、步骤(2)中的反应膜、吸水垫,且检测线位于样品垫一侧,质控线位于吸水垫一侧,将试纸板切割成试纸条,将试纸条装于试纸条卡壳中,组成免疫层析试纸条;

[0077] (4) 定性或定量检测:将量子点荧光探针与样品混匀孵育,静置反应1min,吸取加入免疫层析试纸条的样品垫上进行检测;

[0078] A. 定性检测或半定量检测:采用紫外灯照射反应后的反应膜区域,通过肉眼观察条带发光情况,如果检测线出现荧光信号时判定该指标为阴性,不出现荧光信号时判定该指标为阳性,在任一情况,控制线不出现荧光信号则检测结果无效;

[0079] B. 定量检测:配置一系列不同浓度的待测物质的标准曲线,然后利用荧光免疫层析读数仪分别进行检测,通过不同浓度的标准溶液对应的T/C值做标准曲线,再将待测未知样品进行同样处理,得到相应的T/C值,根据标准曲线得知样品中待测物质含量。

[0080] 其中,所述的量子点为水溶性羧基化核壳结构量子点,核壳结构为CdTe/ZnS。

[0081] 其中,步骤(1)所述的偶联剂的量与量子点的摩尔浓度成比例, $n(QDs):n(EDC):n(NHS)=1:5:15$ 。

[0082] 其中,步骤(1)所述的复溶液为0.01mol/L、pH7.4的Tris-HCl,其中包括0.5% Tween-20和0.5%BSA。

[0083] 其中,所述的底板为PVC,样品垫为玻璃纤维素膜,吸水纸为普通的吸水纸。

[0084] 其中,所述的试纸条的宽度为4mm,样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫的宽度分别为2.0、2.5、1.7cm,彼此搭接贴附在PVC上;其中,样品垫与硝酸纤维素膜的重合宽度为2mm,硝酸纤维素膜与样品垫的重合宽度为2mm(如附图1所示)。

[0085] 另外,上述 β -兴奋剂单克隆抗体为 β -兴奋剂类广谱性单克隆抗体,具体制备方法

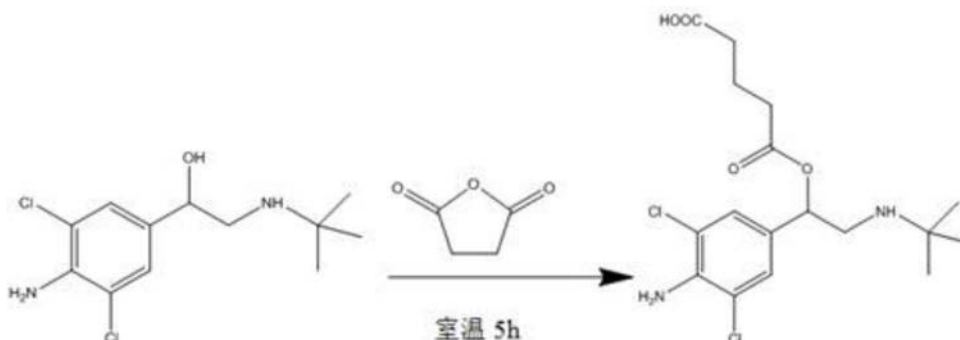
如下:

[0086] (1) 抗原的制备:

[0087] a. 半抗原的合成

[0088] 将克伦特罗与戊二酸酐进行酰化反应,使克伦特罗分子结构上的醇羟基酰化成为含有5个碳的羧基间隔臂,并称之为 β -兴奋剂类药物半抗原;

[0089]



[0090] b. 免疫原的制备

[0091] 将 β -兴奋剂类药物半抗原与卵清蛋白 (OVA) 偶联得到免疫原;

[0092] c. 包被原的制备

[0093] 将 β -兴奋剂类药物半抗原和牛血清白蛋白 (BSA) 采用混合酸酐法进行偶联得到包被原;

[0094] 上述 β -兴奋剂的包被抗原为CL-BSA。

[0095] (2) 动物免疫:将上述制备的人工抗原免疫Ba1b/C小鼠,并采用间接ELISA方法测定其效价;

[0096] (3) 细胞融合:采用PEG融合法将能分泌抗体的小鼠脾脏细胞与能无限繁殖的瘤细胞进行融合;

[0097] (4) 杂交瘤细胞筛选:用间接ELISA检测培养液中的特异性抗体,进行效价和抑制率的测定,筛选出效价高和对药物抑制强的阳性杂交瘤细胞;

[0098] (5) 杂交瘤细胞亚克隆及建株:利用有限稀释法进行亚克隆,如此反复3~4轮,得到能稳定分泌均一抗体的杂交瘤细胞株;

[0099] (6) 单克隆抗体制备:采用动物体内诱生单克隆抗体法制备单抗。

[0100] 本发明上述制备的量子点免疫层析试纸条能够同时检测多种 β -兴奋剂类药物。

[0101] 实施例2以标准品盐酸克伦特罗 (CL) 为例建立量子点免疫层析试纸条的标准曲线

[0102] 1、实验材料

[0103] (1) β -兴奋剂类广谱性单克隆抗体,制备方法同实施例1。

[0104] (2) 羊抗鼠IgG二抗为商业化试剂,购自广州优抗多生物技术有限公司。

[0105] 免疫层析试纸条的制备同实施例1。

[0106] 2、CL标准品溶液的配制,用Tris-HCl配制浓度分别为0、0.0156、0.0625、0.250、1.00、4.00、16.00和64.0 μ g/L的系列标准溶液,用于试纸条检测。

[0107] 3、试纸条的测定

[0108] 每个浓度重复检测3次,10min后用荧光免疫层析读数仪读取试纸条FI_T/FI_C比值。以FI_T/FI_C为纵坐标,以标准品浓度对数为横坐标,绘制试纸条竞争抑制曲线,计算试纸条

50%竞争抑制率浓度以及确定试纸条检测线性范围。

[0109] 4、结果如图2所示,量子点免疫层析试纸条的标准曲线的检测线性范围为(IC_{20} - IC_{80})为0.14~2.28 μ g/L,50%竞争抑制率浓度(IC_{50})为0.56 μ g/L,检出限(IC_{10})为0.06 μ g/L。

[0110] 实施例3量子点免疫层析试纸条的精密度

[0111] 1、以CL为例,分别以不同批次的试纸条测试不同CL含量的标准溶液,每个浓度重复检测3次,测量3个不同批次,计算出实际检出值。

[0112] 2、如表1所示,试纸条检测结果的批间、批内变异系数均小于15%,说明该方法的重复性良好。

[0113] 表1量子点免疫层析试纸条检测方法批内、批间变异

[0114]

CL 含量 (ng/mL)	批内		批间	
	检测值 ($\bar{X} \pm SD$) (ng/mL)	CV (%)	检测值 ($\bar{X} \pm SD$) (ng/mL)	CV (%)
0.25	0.22 $\pm$ 0.034	15.67	0.26 $\pm$ 0.033	12.71
0.5	0.56 $\pm$ 0.04	7.28	0.51 $\pm$ 0.043	8.34
1	0.85 $\pm$ 0.053	6.24	0.90 $\pm$ 0.090	10.00
2	1.86 $\pm$ 0.166	8.91	1.89 $\pm$ 0.143	7.54

[0115] 实施例4各种 β -兴奋剂药物的交叉率

[0116] 1、以CL的交叉反应率(CR)为100%,测定了10种结构功能类似的 β -兴奋剂的交叉反应率(CR),如表2所示,分别为:盐酸克伦特罗(Clenbuterol,CL)、沙丁胺醇(Salbutamol,SAL)、马布特罗(Mabuterol)、溴布特罗(Brombuterol)、西马特罗(Cimaterol)、氯丙那林(Clorprenaline)、硫酸异丙肾上腺素(Isoprenaline sulphate)、莱克多巴胺(Ractopamine)、盐酸肾上腺素(L-epinephrine hydrochloride)和重酒石酸去甲肾上腺素(L-noradrenaline bitartrate)。

[0117] 2、结果如表2所示,沙丁胺醇、马布特罗、溴布特罗、硫酸异丙肾上腺素、西马特罗对克伦特罗都有交叉率,说明此方法能够实现对多种 β -兴奋剂的同时快速筛查。

[0118] 表2交叉反应测定结果

[0119]

标准品	半抑制浓度 IC ₅₀ (μg/L)	交叉率 (100%) CR(%)	线性范围 (μg/L)
盐酸克伦特罗	0.56	100	0.14-2.28
沙丁胺醇	0.67	83.58	0.17-2.52
马布特罗	1.39	40.29	0.65-2.96
溴布特罗	2.09	26.79	0.82-5.30
氯丙那林	8.35	6.71	3.29~21.21
西马特罗	11.38	4.92	5.16~85.77
硫酸异丙肾上腺素	>1000	<0.05	-
莱克多巴胺	>1000	<0.05	-
盐酸肾上腺素	>1000	<0.05	-
重酒石酸去甲肾上腺素	>1000	<0.05	-

[0120] 实施例5以CL、SAL为例对量子点免疫层析试纸条准确性测定

[0121] 1、样品前处理

[0122] (1) 猪尿的前处理:取澄清透明的尿样备用,如有沉淀,离心取上清即可。

[0123] (2) 猪肉的前处理:采用文献方法,具体操作步骤如下:

[0124] 2g绞碎猪肉加入4mL 0.02mol/L HCl-2.8%NaCl提取液,组织均匀,13000r/min离心4min,取上清液。再加入4mL 0.02mol/L HCl-2.8%提取液二次提取,13000r/min离心4min。两次上清合并,用氢氧化钠溶液调节pH至7.0,13000r/min离心4min,上清液待检。

[0125] 2、结果如表3所示,所构建的量子点免疫层析试纸条对猪尿的回收率在83.6~102.19%之间,猪肉的回收率在64.27~87.98%之间,各个样品的变异系数均小于15%,说明该方法有较好的准确性。

[0126] 表3样品添加回收检测结果 (n=3)

[0127]

加标 种类	加标浓度 (μg/L)	猪尿			猪肉		
		检测值 (μg/L)	回收率 (%)	RSD (%)	检测值 (μg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
CL	1	0.92±0.116	91.77	12.60	0.64±0.062	64.27	9.62
	2	1.89±0.163	94.43	8.61	1.58±0.010	78.37	6.36
	3	2.92±0.164	97.21	5.64	2.64±0.265	87.98	10.04
SAL	1	0.84±0.035	83.6	4.19	0.68±0.083	67.97	12.22
	2	1.68±0.169	84.15	10.04	1.51±0.156	75.72	10.29
	3	3.07±0.268	102.19	8.74	2.47±0.132	82.29	5.34

[0128] 实施例6量子点荧光探针的制备条件优化——量子点和偶联剂用量比的优化

[0129] 1、参照实施例1,以不同梯度的量子点和偶联剂用量比为变量,其他条件同实施例

1,进行量子点荧光探针的制备,再进一步制备所述的免疫层析试纸条,观察试纸条T线的荧光强度。

[0130] 2、结果如表4所示,当量子点和偶联剂用量比的摩尔浓度比为1:3~6时,试纸条的性能较好,最佳摩尔浓度比为1:5。

[0131] 表4量子点和偶联剂用量比的优化

[0132]

QDs:EDC	1:0	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
荧光强度	-	+	+++	++	++	+

[0133] 实施例7量子点荧光探针的制备条件优化——量子点和 β -兴奋剂单克隆抗体用量比的优化

[0134] 1、参照实施例1,以不同梯度的量子点和 β -兴奋剂单克隆抗体用量比为变量,其他条件同实施例1,进行量子点荧光探针的制备,再进一步制备所述的免疫层析试纸条,观察试纸条T线的荧光强度。

[0135] 2、结果如表5所示,当量子点和 β -兴奋剂单克隆抗体摩尔浓度比为1:3~6时,试纸条的性能较好,最佳用量比为1:4。

[0136] 表5量子点和 β -兴奋剂单克隆抗体用量比的优化

[0137]

QDs:McAb	1:0.5	1:1	1:2	1:4	1:8
荧光强度	-	+	+	++	++

[0138] 实施例8量子点荧光探针的制备条件优化——标记缓冲液的优化

[0139] 1、参照实施例1,以不同标记缓冲液,其他条件同实施例1,进行量子点荧光探针的制备,再进一步制备所述的免疫层析试纸条,观察试纸条T线的荧光强度。

[0140] 2、结果如表6所示,当标记缓冲液为磷酸盐缓冲液时,试纸条的性能较好,其中最佳的标记缓冲液为0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液。

[0141] 表6标记缓冲液的优化

[0142]

缓冲液	BB	MES	PBS	PB	CB
荧光强度	++	++	+++	+	-

[0143] 实施例9棋盘法优化——QDs-mAbs用量体积和CL-BSA喷涂浓度

[0144] 1、参照实施例1,通过棋盘滴定实验确定最优的QDs-mAbs用量体积和CL-BSA喷涂浓度,选取阴性样本T、C线显色正常,阳性样本(c(CL)=0.5 μ g/L)抑制率最高为最优条件。其他条件同实施例1,再进一步制备所述的免疫层析试纸条进行 β -兴奋剂的制备。

[0145] 2、结果如表7所示,当QDs-mAbs的用量为3 μ L,CL-BSA喷涂浓度为0.85mg/mL时,试纸条在克伦特罗(CL)的标品浓度为0.5ng/mL时的抑制率达到54.98%,且试纸条T、C线的荧光强度相对较强。

[0146] 表7棋盘滴定优化QDs-mAbs体积和CL-BSA喷涂浓度(n=3)

[0147]

编号	QDs-mAbs 体积	CL-BSA 浓度	T 线荧光强度	C 线荧光强度	T/C 值	抑制率 (%)
1	3.5	1.13	1424	1108	1.29	41.47
2	3.5	0.85	1245	1134	1.10	44.18
3	3.5	0.68	1052	1290	0.82	47.61
4	3.0	1.13	1255	932	1.35	51.08
5	3.0	0.85	1148	1056	1.09	54.98
6	3.0	0.68	715	1104	0.64	55.24
7	2.5	1.13	1006	844	1.19	50.17
8	2.5	0.85	748	903	0.83	55.56
9	2.5	0.68	588	955	0.62	58.33

[0148] 实施例10 QDs试纸条免疫反应动力学分析

[0149] 1、QDs荧光免疫层析试纸条反应时间的确定是试纸条定量检测的前提。对QDs荧光免疫层析试纸条T、C线免疫反应动力学曲线进行测定,步骤如下:将50 μ L阴性质控滴加在试纸条的加样孔中,每隔1min用荧光免疫层析读数仪读取试纸条中T、C线的荧光值FI_T、FI_C及FI_T/FI_C值,并追踪记录30min。

[0150] 2、结果如图3所示,在25min内T、C线的荧光强度FI_T、FI_C随着时间延长不断升高,25min后趋于稳定;但FI_T/FI_C比值在10min之后就趋于稳定,且随后10~30min无明显变化,表明FI_T/FI_C值的定量方法能够在一定时间内消除免疫反应动力学的差异,缩短判读时间。因此,QDs荧光免疫层析试纸条定量检测时间为10min。

[0151] 实施例11质控线二抗的稀释倍数的优化

[0152] 1、参照实施例1,以不同的二抗羊抗鼠的稀释浓度为变量,其他条件同实施例1,制备所述的免疫层析试纸条,将T线和C线的颜色进行比较。

[0153] 2、结果显示,随着二抗浓度的增加,T线的浓度逐渐增加,当二抗浓度为0.8mg/mL时,C线与T线颜色一样深浅。因此,选择二抗浓度0.8mg/mL作为质控线二抗的最佳浓度。

[0154] 表8质控线二抗的浓度优化 (n=3)

[0155]	二 抗 浓 度 (mg/mL)	0.2	0.4	0.8	1.6
	FI _T /FI _C	2.38	1.62	1.08	0.64

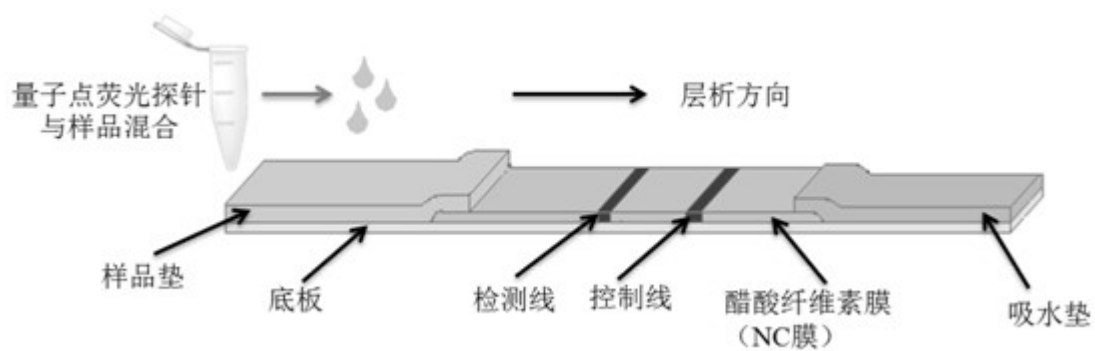


图1

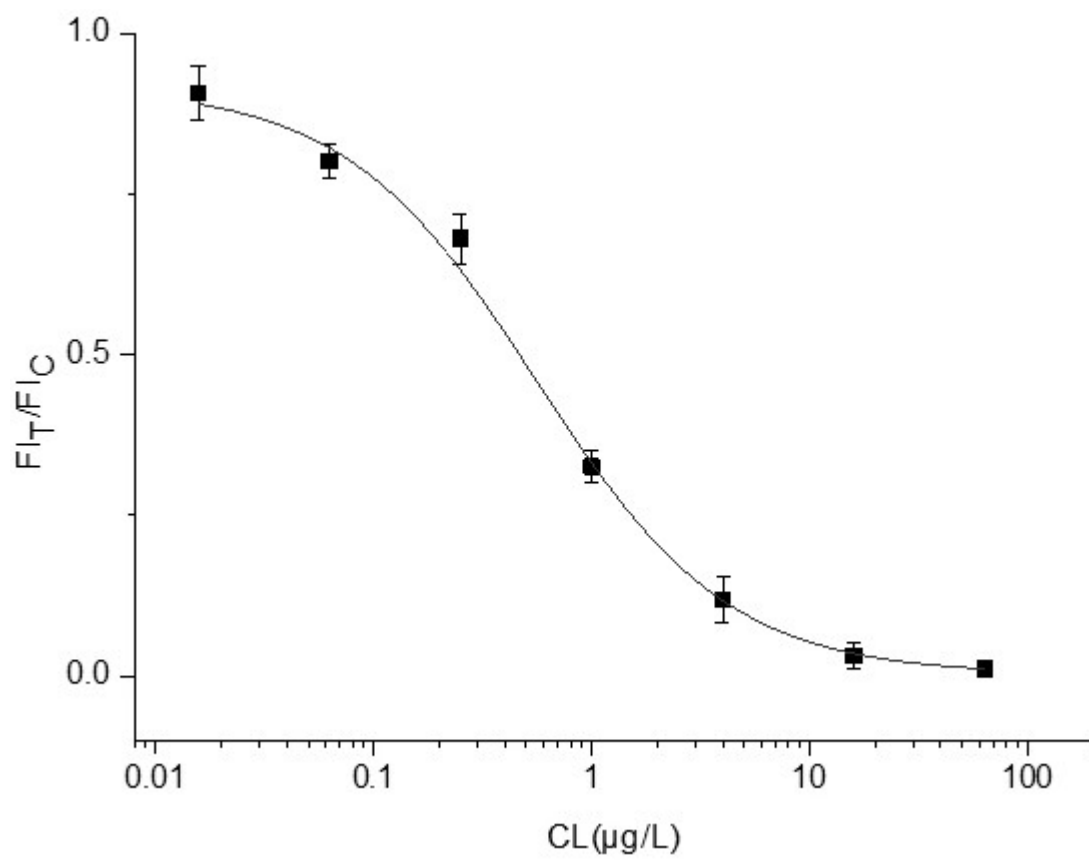


图2

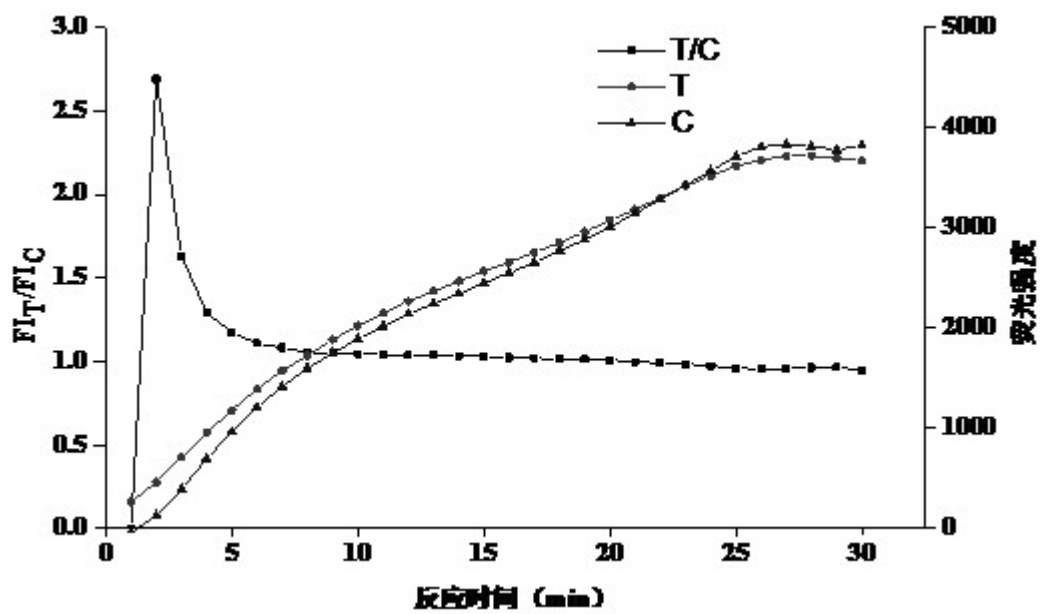


图3

专利名称(译)	一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法		
公开(公告)号	CN106093322B	公开(公告)日	2018-07-24
申请号	CN201610604513.2	申请日	2016-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州万联生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万联生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万联生物科技有限公司		
[标]发明人	杨金易 曾道平 朱彬		
发明人	杨金易 曾道平 朱彬		
IPC分类号	G01N33/02 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/02 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	陈卫		
其他公开文献	CN106093322A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种 β -兴奋剂多残留的量子点免疫层析试纸条快速检测方法。是首先将量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体偶联，得到量子点与 β -兴奋剂单克隆抗体的标记复合物，即为量子点荧光探针；再将该标记复合物作为量子点荧光探针与待测样品混匀孵育后，利用免疫层析试纸条进行 β -兴奋剂残留的检测。本发明能够实现对多种 β -兴奋剂类药物的同时快速筛查，检测方法简便、快捷、结果准确、灵敏度高，可做定性、定量检测，价格低廉，适用范围广，具有很好的推广应用前景。

