



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102230936 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 02

(21) 申请号 201110157580. 1

(22) 申请日 2011. 06. 13

(71) 申请人 清华大学深圳研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学
城清华校区 L 楼 407 室

(72) 发明人 马岚 卢体康 秦智锋 袁航
吴峰

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸及其制备方法。本发明提供的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸,包括含有超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的样品垫、连接于所述样品垫一端的硝酸纤维素膜、连接于所述硝酸纤维素膜另一端的吸水垫;所述硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线含有莱克多巴胺抗原,所述质控线含有能与所述莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体。本发明的实验证明,用本发明提供的试纸检测莱克多巴胺,灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。

1. 一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸,包括含有超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的样品垫、连接于所述样品垫一端的反应垫、连接于所述反应垫另一端的吸水垫;所述反应垫包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线含有莱克多巴胺抗原,所述质控线含有能与所述莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体。

2. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于:

所述反应垫为硝酸纤维素膜;

所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体为莱克多巴胺抗体和超顺磁性复合粒子的肽键共价结合形成的聚合体;

所述莱克多巴胺抗体为莱克多巴胺单克隆抗体或莱克多巴胺多克隆抗体,所述莱克多巴胺抗体具体为莱克多巴胺单克隆抗体;

所述莱克多巴胺抗原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物;

所述载体蛋白与莱克多巴胺半抗原的偶联比为1:8~1:10,具体为1:10;

所述与所述莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体为羊抗鼠IgG抗体;

所述莱克多巴胺抗原和所述羊抗鼠IgG抗体的浓度均为1mg/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的试纸,其特征在于:

所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体按照如下方法制备:

1) 将每2.5mg超顺磁性复合粒子、0.96mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、1.15mg N-羟基丁二酰亚胺和1ml浓度为0.1M、pH值为4.7的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液混匀,反应,得到活化后磁性粒子;

2) 将每2.5mg步骤1)得到活化后磁性粒子、0.15mg莱克多巴胺抗体和0.8ml浓度为50mM pH为8.5的硼砂缓冲液混匀、反应,得到含有偶联后磁性粒子的反应液;

3) 向步骤2)得到的反应液中加入BSA混匀得到混合液、反应,得到含有封闭后磁性粒子的反应液;

所述BSA在所述混合液中的浓度为5% (质量百分含量)。

所述莱克多巴胺抗原按照如下方法制备:

A) 取每0.68g莱克多巴胺、42.5ml吡啶、0.24g丁二酸酐混匀,回流、去吡啶,得到莱克多巴胺丁二酸酐酰化物;

B) 取每40ml N,N-二甲基甲酰胺与40ml二氧六环混合,得到混合液a;

C) 将每8ml步骤A)得到的莱克多巴胺丁二酸酐酰化物和52.4 μ l三丁基正胺混合,再加入30 μ l氯甲酸异丁酯反应,得到活化后莱克多巴胺;

D) 取每100mg载体蛋白溶解于10ml 0.1mol/L, pH为8.5的硼酸钠溶液,得到载体蛋白硼酸钠溶液;

E) 将每10ml步骤D)得到的载体蛋白硼酸钠溶液加入8.082ml步骤C)得到的活化后莱克多巴胺反应,得到反应液b。

4. 根据权利要求1-3中任一所述的试纸,其特征在于:

所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的制备方法中:

步骤1)中,反应温度为37 $^{\circ}$ C,反应时间为0.5h;

步骤2)中,反应温度为25 $^{\circ}$ C,反应时间为3.5h;

步骤3)中,反应温度为37 $^{\circ}$ C,反应时间为0.5h。

所述莱克多巴胺抗原的制备方法中：

步骤 A) 中，所述回流温度为 50℃，所述回流时间为 24h；所述去除吡啶采用在 50℃ 进行减压蒸馏 24h；

步骤 C) 中，所述混合的温度为 4℃，所述混合的时间为 15min，所述反应的温度为 25℃，所述反应的时间为 1h；

步骤 E) 中，所述反应温度为 4℃，所述反应时间为 12h。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的试纸，其特征在于：

所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的制备方法中：

在所述步骤 3) 后，还包括将所述含有封闭后磁性粒子的反应液中的封闭后磁性粒子进行洗涤、悬浮，得到超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的步骤，所述洗涤液和悬浮液均为浓度为 0.02M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液。

所述莱克多巴胺抗原的制备方法中，

在所述步骤 E) 后还包括将步骤 E) 得到的反应液 b 透析、纯化、冻干，得到莱克多巴胺抗原。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的试纸，其特征在于：

所述莱克多巴胺半抗原为莱克多巴胺；

所述载体蛋白为 BSA；

所述超顺磁性复合粒子为 Fe_3O_4 纳米粒子；

所述超顺磁性复合粒子的粒径为 60 ~ 300nm，所述粒径具体为 80 ~ 200nm，所述粒径尤其优选为 100nm；

所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度为 30 ~ 80emu/g，对应的外磁场响应速度为 20 ~ 100 秒，所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度具体为 35 ~ 70emu/g，对应的外磁场响应速度为 20 ~ 50 秒，所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度尤其优选为 40emu/g，对应的外磁场响应速度为 20 秒；所述超顺磁性复合粒子表面的羧基含量为 50 ~ 500 $\mu\text{mol/g}$ ，所述超顺磁性复合粒子表面的羧基含量具体为 50 ~ 300 $\mu\text{mol/g}$ ，所述超顺磁性复合粒子表面的羧基含量尤其优选为 80 $\mu\text{mol/g}$ ；

所述莱克多巴胺抗体亲和常数为 $10^6 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ ；所述莱克多巴胺抗体亲和常数具体为 $10^7 \sim 10^8\text{M}^{-1}$ ；所述莱克多巴胺抗体亲和常数尤其优选为 10^8M^{-1} 。

7. 一种制备检测莱克多巴胺的免疫层析试纸的方法，包括如下步骤：

I、分别制备样品垫和含有检测线和质控线的反应垫；

II、将步骤 I 得到的样品垫、步骤 I 得到的含有检测线和质控线的反应垫与吸水垫依次粘贴到背板上，得到检测莱克多巴胺的免疫层析试纸；

所述含有检测线和质控线的反应垫按照如下方法制备：将权利要求 1-6 中试纸中的所述莱克多巴胺抗原和权利要求 1-6 中试纸中的所述与莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体分别喷在反应垫的两端不同区域，形成检测线和质控线，得到含有检测线和质控线的反应垫；

所述样品垫按照如下方法制备：将权利要求 1-6 中试纸中的所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体喷到玻璃纤维纸上，得到样品垫。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：

在所述样品垫制备方法中：在将所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体喷到所述玻璃纤维纸上前，还包括预处理所述玻璃纤维纸和预处理所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的步骤：

所述预处理所述玻璃纤维纸为将所述玻璃纤维纸在缓冲液中浸泡 1 小时，

所述缓冲液按照如下方法制备：将每 2ml TritonX100、10g BSA、50g 蔗糖和 950ml 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液混合得到缓冲液，调 pH 到 7.4，并定容到 1000ml。

所述浸泡的时间为 1 小时，浸泡的温度为 37℃；

所述预处理所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体为将所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体稀释，所述稀释倍数为 50 倍；

所述反应垫为硝酸纤维素膜。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其特征在于：

在步骤 I 后，步骤 II 前，还包括干燥步骤 I 得到的样品垫与步骤 I 得到的含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜的步骤。

10. 权利要求 1-6 任一所述试纸在检测样品中残留莱克多巴胺中的应用，所述样品具体为动物组织样本、动物尿样、饲料、蜂蜜或牛奶样本，所述样品尤其具体为猪尿。

一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及莱克多巴胺残留物的检测试剂,具体涉及一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 莱克多巴胺 (Ractopamine, RAC) 属于 β -兴奋剂,近年来被非法添加到饲料中以提高脂肪型动物的瘦肉率和加速动物生长,因其添加剂量是治疗剂量的 5-10 倍,以至于在动物体内残留量高而给消费者带来危害。目前现场筛查用检测试剂多用莱克多巴胺胶体金试纸进行检测,但因其灵敏度低不能很好满足要求,因此需要开发可在现场更为准确和快速的检测方法。

[0003] 基于抗原-抗体免疫学反应的侧流免疫层析检测技术 (LFIA) 是 20 世纪 90 年代初发展起来的新兴技术,因其快捷方便的特性,非常适宜用于现场的快速监测。但目前该类技术多采用胶体金作为信号标记分子,受其灵敏度等的限制,只能用于定性检测。

[0004] 超顺磁性复合粒子具有良好的磁学特性,由于其受背景干扰小,特别适宜于不含磁性物质的生物样品的检测。胶体金和荧光标记分子用于侧流免疫层析检测时,只可在其检测区膜表面观测到约 10% 的信号分子强度,而用超顺磁性复合粒子作为标记材料,则可检测到检测区膜三维立体结构中的所有磁信号分子,可极大提高灵敏度,并可用对应的磁信号检测仪达到定量测定,因此,超顺磁性复合粒子是近年来在 LFIA 中受到关注的材料。

[0005] 然而,目前报道的生物检测用磁性纳米复合粒子多采用化学法如共沉淀法先制备得到有机相的磁性纳米粒子后,再采用硅 (SiO_2) 或聚苯乙烯、聚丙烯酸、明胶等高分子材料对其表面进行稳定化包覆修饰,以得到稳定的、水溶性的磁性标记材料。但这些制备修饰方法往往较为繁琐复杂,得到的超顺磁性复合粒子在尺寸大小、生物相容性、饱和磁强度、外磁场响应速度、稳定性和标记效率等方面不能同时满足 LFIA 的要求;其尺寸多在 200 ~ 300nm 之间,由于磁珠颗粒偏大,在试纸上的泳动时间较慢,显色时间较长;而太小的粒子又无法提供足够的磁共振信号;另外还有生物相容性不稳定、磁珠容易聚合等问题;这些不足限制了超顺磁性复合粒子在 LFIA 中的应用。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸。

[0007] 本发明提供的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸,包括含有超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的样品垫、连接于所述样品垫一端的反应垫、连接于所述反应垫另一端的吸水垫;所述反应垫包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线含有莱克多巴胺抗原,所述质控线含有能与所述莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体。

[0008] 所述反应垫为硝酸纤维素膜;

[0009] 所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体为将莱克多巴胺抗体和超顺磁性复合粒子的以肽键共价结合形成的聚合物;

[0010] 所述莱克多巴胺抗体为莱克多巴胺单克隆抗体或莱克多巴胺多克隆抗体,所述莱克多巴胺抗体具体为莱克多巴胺单克隆抗体(广州市江森生物科技有限公司,JS-23-0004);

[0011] 所述莱克多巴胺抗原为莱克多巴胺半抗原与载体蛋白的偶联物;小分子抗原物质与载体蛋白偶联时,每个载体蛋白分子上所连接的半抗原的平均数目称为偶联比或结合比。为达到载体蛋白与NC膜的良好结合,同时又能最大程度地保证莱克多巴胺半抗原空间位点的延展,选择合适的偶联比是非常重要的。偶联比的大小与半抗原功能基团的活性、位阻、反应投料比及反应条件有关。一般通过调节半抗原与载体的摩尔比、反应环境pH值、温度、离子强度等来控制偶联比。

[0012] 所述载体蛋白与所述莱克多巴胺半抗原的偶联比为1:8~1:10,适于抗原的包被和莱克多巴胺半抗原空间位点的延展,所述载体蛋白与所述莱克多巴胺半抗原的偶联比具体为1:10;

[0013] 所述与莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体为羊抗鼠IgG抗体;

[0014] 所述莱克多巴胺抗原和所述羊抗鼠IgG抗体的浓度均为1mg/ml。

[0015] 所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体按照如下方法制备:

[0016] 1) 将每2.5mg超顺磁性复合粒子、0.96mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、1.15mg N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和1ml浓度为0.1M、pH值为4.7的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液(称取1.066g MES、0.45g NaCl溶于50ml纯水,调pH至4.7)混匀,反应,得到活化后磁性粒子;

[0017] 2) 将每2.5mg步骤1)得到活化后磁性粒子、0.15mg莱克多巴胺抗体和0.8ml浓度为50mM pH为8.5的硼砂缓冲液混匀、反应,得到含有偶联后磁性粒子的反应液;

[0018] 3) 向步骤2)得到的反应液中加入BSA混匀得到混合液、反应,得到含有封闭后磁性粒子的反应液;

[0019] 所述BSA在所述混合液中的浓度为5%(质量百分含量)。

[0020] 所述莱克多巴胺抗原按照如下方法制备:

[0021] A) 取每0.68g莱克多巴胺、42.5ml吡啶、0.24g丁二酸酐混匀,回流、去吡啶,得到莱克多巴胺丁二酸酐酰化物;

[0022] B) 取每40mlN,N-二甲基甲酰胺与40ml二氧六环混合,得到混合液a;

[0023] C) 将每8ml步骤A)得到的莱克多巴胺丁二酸酐酰化物和52.4 μ l三丁基正胺混合,再加入30 μ l氯甲酸异丁酯反应,得到活化后莱克多巴胺;

[0024] D) 取每100mg载体蛋白溶解于10ml 0.1mol/L, pH为8.5的硼酸钠溶液,得到载体蛋白硼酸钠溶液;

[0025] E) 将每10ml步骤D)得到的载体蛋白硼酸钠溶液加入8.082ml步骤C)得到的活化后莱克多巴胺反应,得到反应液b。

[0026] 所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的制备方法中:

[0027] 步骤1)中,反应温度为37 $^{\circ}$ C,反应时间为0.5h;

[0028] 步骤2)中,反应温度为25 $^{\circ}$ C,反应时间为3.5h;

[0029] 步骤3)中,反应温度为37 $^{\circ}$ C,反应时间为0.5h。

[0030] 所述莱克多巴胺抗原的制备方法中:

[0031] 步骤 A) 中,所述回流温度为 50℃,所述回流时间为 24h;所述去除吡啶采用在 50℃进行减压蒸馏 24h;

[0032] 步骤 C) 中,所述混合的温度为 4℃,所述混合的时间为 15min,所述反应的温度为 25℃,所述反应的时间为 1h;

[0033] 步骤 E) 中,所述反应温度为 4℃,所述反应时间为 12h。

[0034] 所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的制备方法中:

[0035] 在所述步骤 3) 后,还包括将所述含有封闭后磁性粒子的反应液中的封闭后磁性粒子进行洗涤、悬浮,得到超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的步骤,所述洗涤液和悬浮液均为 0.02M pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液。

[0036] 所述莱克多巴胺抗原的制备方法中,

[0037] 在所述步骤 E) 后还包括将步骤 E) 得到的反应液 b 透析、纯化、冻干,得到莱克多巴胺抗原。

[0038] 所述透析液为浓度为 0.02mol/L、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液,透析时间为 48h,每 6h 更换一次透析液。

[0039] 所述纯化采用的纯化柱为 Sephadex G-25。

[0040] 所述莱克多巴胺半抗原为莱克多巴胺;

[0041] 所述载体蛋白为 BSA;

[0042] 由于莱克多巴胺是小分子物质,其分子表面特性不利于与反应区即 NC 膜的直接结合,需要将其与载体蛋白进行偶联后才能借助于载体蛋白的表面特性而达成与 NC 膜的良好结合。可用作载体蛋白的有各种动物的血清白蛋白,如牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)、人血清白蛋白 (Human Serum Albumin, HSA),还有钥孔血蓝蛋白 (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH)、甲状腺球蛋白、兔血清白蛋白 (RSA)、卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA)、纤维蛋白原或兔和鸡的丙种球蛋白等。研究发现,BSA 理化性质稳定,赖氨酸含量高,自由氨基多,在不同的 pH 和离子强度下均有较大的溶解度,在含有有机溶剂(如吡啶、DMF 等)的情况下均可和半抗原进行偶联,且在偶联后仍保持可溶状态,是作为载体蛋白的极佳选择,故本发明选用 BSA 作为偶联蛋白。

[0043] 所述超顺磁性复合粒子为 Fe_3O_4 纳米粒子;

[0044] 由于该超顺磁性复合粒子要由上述反应板中的样品垫泳动至反应板中间的测试区实现抗原-抗体的特异结合和标记反应,其粒径太大($> 300\text{nm}$) 在试纸上的泳动时间长,显色时间慢;在偶联时较容易发生聚集,并容易产生非特异反应;粒径太小则磁强度又往往不够。

[0045] 所述超顺磁性复合粒子的粒径为 60 ~ 300nm,所述粒径具体为 80 ~ 200nm,所述粒径尤其优选为 100nm;其粒径的偏差 (CV) 在 10 ~ 30% 之间,较好为 10 ~ 20% 之间,优选 15%。

[0046] 超顺磁性复合粒子的饱和磁强度及其外磁场响应速度直接决定了检测灵敏度及其精确性的高低,传统方法制备的超顺磁性复合粒子的饱和磁强度通常都 $< 30\text{emu/g}$,外磁场响应速度则在 100 ~ 200 秒。为提高其灵敏度及准确性,所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度和强度为 30 ~ 80emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 ~ 100 秒,所述超顺磁性复合粒子的磁饱和强度具体为 35 ~ 70emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 ~ 50 秒,所述超顺磁性复合

粒子的磁饱和强度尤其优选为 40emu/g, 对应的外磁场响应速度为 20 秒 ;

[0047] 为用于莱克多巴胺残留物检测, 超顺磁性复合粒子表面需带有易于与莱克多巴胺抗体偶联的基团, 这些基团可以是羧基、氨基等基团, 优化的基团是带羧基的表面官能团, 通常采用化学方法连接抗体, 即用 EDC 和 NHS 活化超顺磁性复合粒子后, 再与抗体发生羧合反应而完成偶联反应。在将莱克多巴胺抗体和超顺磁性复合粒子的以肽键共价结合形成的聚合物前, 还包括将超顺磁性复合粒子表面官能团即羧基的活化的步骤。超顺磁性复合粒子表面的羧基含量不同会影响到检测的灵敏度, 为提高灵敏度, 所述官能团具体为羧基, 所述羧基的含量为 50 ~ 500 $\mu\text{mol/g}$, 所述羧基的含量具体为 50 ~ 300 $\mu\text{mol/g}$, 所述羧基的含量尤其优选为 80 $\mu\text{mol/g}$;

[0048] 在免疫检测中, 抗体的性能指标对于检测的准确性至关重要, 通常而言, 特异性强、亲和力高的抗体, 可以显著地提高检测的准确性。研究发现, 为提高灵敏度, 所述莱克多巴胺抗体亲和常数为 $10^6 \sim 10^8\text{M}^{-1}$; 所述莱克多巴胺抗体亲和常数具体为 $10^7 \sim 10^8\text{M}^{-1}$; 所述莱克多巴胺抗体亲和常数尤其优选为 10^8M^{-1} 。

[0049] 本发明的另一个目的是提供一种制备检测莱克多巴胺的免疫层析试纸的方法。

[0050] 本发明提供的方法包括如下步骤 :

[0051] I、分别制备样品垫和含有检测线和质控线的反应垫 ;

[0052] II、将步骤 I 得到的样品垫、步骤 I 得到的含有检测线和质控线的反应垫与吸水垫依次粘贴到背板上, 得到检测莱克多巴胺的免疫层析试纸 ;

[0053] 所述含有检测线和质控线的反应垫按照如下方法制备 : 将所述莱克多巴胺抗原和所述与莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体分别喷在反应垫的两端不同区域, 形成检测线和质控线, 得到含有检测线和质控线的反应垫 ;

[0054] 所述样品垫按照如下方法制备 : 将所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体喷到玻璃纤维纸上, 得到样品垫。

[0055] 在所述样品垫制备方法中 : 在将所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体喷到所述玻璃纤维纸上前, 还包括预处理所述玻璃纤维纸和预处理所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的步骤 :

[0056] 所述预处理所述玻璃纤维纸为将所述玻璃纤维纸在缓冲液中浸泡 1 小时,

[0057] 所述缓冲液按照如下方法制备 : 将每 2ml TritonX100、10g BSA、50g 蔗糖和 950ml 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液混合得到缓冲液, 调 pH 到 7.4, 并定容到 1000ml。

[0058] 所述浸泡的时间为 1 小时, 浸泡的温度为 37 $^{\circ}\text{C}$;

[0059] 所述预处理所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体为将所述超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体稀释, 所述稀释倍数为 50 倍。所述稀释液为预处理玻璃纤维纸中所用的缓冲液。

[0060] 所述反应垫为硝酸纤维素膜。

[0061] 在步骤 I 后, 步骤 II 前, 还包括干燥步骤 I 得到的样品垫与步骤 I 得到的含有检测线和质控线的硝酸纤维素膜的步骤。

[0062] 所述试纸在检测样品中残留莱克多巴胺中的应用也是本发明保护的范围, 所述样品具体为动物组织样本、动物尿样、饲料、蜂蜜或牛奶样本, 所述样品尤其具体为猪尿。

[0063] 本发明的技术原理 :

[0064] 本发明的莱克多巴胺检测试剂与超顺磁性复合粒子标记的免疫层析检测技术相关,是采用超顺磁性复合粒子作为标记材料,进行快速免疫层析测定的一类方法,该技术整合了磁性纳米材料化学合成、标记技术、测流免疫层析技术等相关领域的研究。

[0065] 本发明之所以能检测莱克多巴胺,在于采用了一种基于超顺磁性复合粒子标记的测流免疫层析检测的方法,即将莱克多巴胺抗原和抗鼠 IgG 抗体分别喷涂于位于反应板中间的测试区(由硝酸纤维素膜即 NC 膜构成)的测试线(T 线)和质控线(C 线)处,反应板下端的样品垫上喷涂超顺磁性复合粒子标记的抗莱克多巴胺抗体,反应板上端则连接有吸水垫,整个反应板的构成如图 1 所示。基于测流免疫层析的原理,加入待测样品后,样品中的莱克多巴胺与 T 线处喷涂的莱克多巴胺抗原竞争结合磁标莱克多巴胺抗体,在 T 线处形成抗原-抗体二元磁标免疫复合物,多余的磁标莱克多巴胺抗体则在 C 线处与抗鼠 IgG 形成的磁标免疫复合物。用磁性试纸判读仪测定 T 线处超顺磁性微球的磁强强度,通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果,C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0066] 其具体的技术步骤包括:

[0067] (一)超顺磁性复合粒子标记探针的制备

[0068] 采用适合的纳米超顺磁性复合粒子,活化其表面的羧基后,采用化学偶联的方式将莱克多巴胺抗体定向连接到该超顺磁性复合粒子表面。

[0069] (二)测试区 T 线和 C 线处抗原/抗体的包被

[0070] 采用专门的喷膜仪器,于测试区的 T 线处喷涂莱克多巴胺抗原,于 C 线处喷涂抗鼠 IgG 抗体。

[0071] (三)样品垫处标记探针的包被

[0072] 采用专门的喷涂仪器,于样品垫特定位置处喷涂超顺磁性微球标记的抗莱克多巴胺抗体。

[0073] (四)反应板的组装成型

[0074] 按照反应板的结构图(见图 1)要求,于塑料支撑背板中间粘贴作为测试区的硝酸纤维素(NC)膜,于 NC 膜的 T 线端粘贴样品垫,C 线端粘贴吸水垫。在其上面粘贴透明保护膜。采用专门的试纸分切机,将整块反应板分切为一定宽带的纸条,用装有干燥剂的专门的铝箔袋进行包装。

[0075] (五)抗原-抗体磁标免疫复合物的形成

[0076] 于上述组装成型的反应板的加样孔处加入待测样品,样品中的莱克多巴胺与 T 线处喷涂的莱克多巴胺抗原竞争结合磁标莱克多巴胺抗体,在 T 线处形成抗原-抗体二元磁标免疫复合物,多余的磁标莱克多巴胺抗体则在 C 线处与抗鼠 IgG 形成的磁标免疫复合物。

[0077] (六)磁标免疫复合物磁场强度检测

[0078] 用磁性试纸判读仪测定 T 线处超顺磁性微球的磁场强度,通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果,C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0079] 本发明采用的超顺磁性复合粒子是购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 MP-2(聚马来酸十六醇酯(PMAH)修饰的水溶性纳米晶 TEM 照片见图 2),所采用的制备方法是将用化学法制得的油溶性 Fe_3O_4 溶解在有机试剂中得到溶液 A,将双亲性齐聚物溶于 3 次蒸馏水中并调节 pH 为 8~10 得溶液 B,常温下将溶液 B 注入溶液 A 中,混合液进行充分搅拌并使有机溶剂挥发,进行离心分离,将离心分离的产物干燥后即可得水溶性的超顺磁

性复合粒子。用该法制备获得的磁性粒子饱和磁强度高、磁响应快、磁珠尺寸均匀、单分散性好、稳定性强、涌动时间短,可很好地满足 LFIA 的检测要求。

[0080] 所述的抗原-抗体磁标免疫复合物,是指加入检测样品后,经竞争结合,在 T 线处形成的莱克多巴胺抗原-磁标莱克多巴胺抗体免疫复合物,以及在 C 线处形成的抗鼠 IgG 二抗抗体-磁标莱克多巴胺抗体免疫复合物。

[0081] 所述的磁标免疫复合物的磁场强度,是指在 T 线和 C 线处分别滞留的结合磁珠的数量用美国 Quantum Dot 的超顺磁共振检测仪 MAR 测定后所得到的数值。通过优化竞争反应的条件,研究发现,经大量测定不同来源如尿样、血液及组织样品提取液等的正常样本,可确定出各不同来源正常样本的测定均值,以此作为临界值 (cutoff) 来确定 T 线检测样本的阳性或阴性结果。C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0082] 莱克多巴胺的化学名称为 4-[3-[2-羟基-2-(4-羟基苯基)-乙基]氨基丁基]苯酚。

[0083] 本发明的实验证明,通过对超顺磁性复合粒子、莱克多巴胺抗原和莱克多巴胺抗体分子特性的研究,通过对多种超顺磁性复合粒子制备、包覆及表面修饰条件的优化,选择适合的超顺磁性复合粒子与特异性的抗体进行定向共价化学偶联,获得功能性的磁性标记探针,并通过优化竞争性免疫反应的各种条件,达到对莱克多巴胺残留药物的客观检测,实现了对莱克多巴胺残留药物的快速和高灵敏测定。具有如下优点:灵敏度高、特异性强、快速、简便,可实现客观化测定。

附图说明

[0084] 图 1 为磁性试纸结构示意图

[0085] 图 2 为水溶性超顺磁性复合粒子电镜图

[0086] 图 3 为莱克多巴胺磁性试纸检测值与浓度标准曲线图

具体实施方式

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 实施例 1、莱克多巴胺残留物磁性标记快速检测试纸的制备

[0090] (一) 超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的制备

[0091] 采用粒径为 100nm、磁饱和强度为 40emu/g,对应的外磁场响应速度为 20 秒、表面羧基含量为 $80 \mu\text{mol/g}$ 的超顺磁性复合粒子(超顺磁性 Fe_3O_4 纳米粒子)(购自深圳市泰勒斯科科技有限公司,产品目录号为 MP-2) 标记莱克多巴胺抗体。

[0092] 具体方法是:

[0093] 1) 取 2.5mg 的上述磁性粒子用 0.1M 的 MES 缓冲液(称取 1.066g MES、0.45g NaCl 溶于 50ml 纯水,调 pH 至 4.7) 洗涤并用 0.4T 的磁架分离富集后,用 1ml 浓度为 0.1M、pH 值为 4.7 的 MES 缓冲液重悬,加入 0.96mg(终浓度为 5mM) 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC) 和 1.15mg(终浓度为 10mM) N-羟基丁二酰亚胺(NHS) 于其中。反应温度为 37°C ,反应半小时后,得到活化后磁性粒子;

[0094] 2) 用 50mM pH = 8.5 的硼砂缓冲液洗涤,取 0.15mg 莱克多巴胺单克隆抗体(广州

市江森生物科技有限公司, JS-23-0004, 莱克多巴胺抗体效价 10^6 , 莱克多巴胺抗体亲和常数为 $10^8 M^{-1}$) 和 2.5mg 活化后磁性粒子混合到 0.8ml 50mM pH = 8.5 的硼砂缓冲液 (称取 1.9g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 溶于 100ml 纯水, 调 pH 至 8.5) 中充分混匀。室温 (25°C) 下反应 3.5 小时, 让抗体和磁性粒子形成稳定的肽键共价结合, 得到含有偶联后磁性粒子的反应液;

[0095] 3) 反应结束后, 向步骤 2) 得到的反应液中加入终浓度为 5% (质量百分含量) 的 BSA (Sigma-aldrich, 85041C) 对剩余活性氨基位点进行封闭, 反应在 37°C 下进行 0.5 小时, 得到含有封闭后磁性粒子的反应液; 完成后, 用 pH = 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液 (称取 2.3g Na_2HPO_4 、0.524g NaH_2PO_4 、 H_2O 、8.77g NaCl 溶于 1L 纯水, 调 pH 至 7.4) 洗涤, 重悬后 4°C 保存待用, 得到超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体。

[0096] (二) 莱克多巴胺抗原的合成

[0097] 莱克多巴胺半抗原为莱克多巴胺 (北京恒元启天化工技术研究院, 30230CDCT-C16805000)。

[0098] RAC-BSA 抗原的合成具体步骤如下:

[0099] 1) 称取 0.68g 约 2mmol 莱克多巴胺于三口烧瓶中, 加入 42.5ml 吡啶在搅拌作用下升温到 50°C, 待温度稳定后, 加入 0.24g 约 2mmol 丁二酸酐, 回流反应 24h, 每 6 小时取样进行 TLC 检测, 反应结束后将所得淡黄色产物在 50°C 进行减压蒸馏 24h, 除去大部分吡啶, 用氮气将所得糖稀状产物中剩余吡啶吹干, 此时所得产物为莱克多巴胺丁二酸酐酰化物 RAC-HS;

[0100] 2) 取 40ml DMF (N, N-二甲基甲酰胺) 与 40ml 二氧六环配制成 1:1 两亲溶液, 用于溶解上述制备好的 RAC-HS, 并保存于 4°C 备用;

[0101] 3) 取制备好的 RAC-HS 溶液 8ml, 加入 52.4 μ l (约 0.2mmol) 三丁基正胺做缚酸剂在 4°C 下搅拌 15min, 加入氯甲酸异丁酯 30 μ l (约 2mmol) 在室温 (25°C) 下搅拌活化 1h, 得到活化后莱克多巴胺;

[0102] 4) 取 100mg BSA 溶解于 10ml 0.1mol/L, pH 为 8.5 的硼酸钠溶液, 得到 BSA 硼酸钠溶液;

[0103] 5) 将 10ml 步骤 4) 得到的 BSA 硼酸钠溶液在冰浴 (4°C) 下通过分液漏斗缓慢逐滴加入 8.082ml 步骤 3) 所得的用氯甲酸异丁酯活化好的 RAC-HS 溶液中并且搅拌反应 12h;

[0104] 5) 将所得产物于 0.02mol/L, pH 为 7.4 的 PBS 溶液中 4°C 透析 48h, 每 6h 更换一次透析液, 除去未反应的小分子, 用 Sephadex G-25 (GE Healthcare, 17-0034-01) 过柱纯化, 制得 RAC-BSA, 并用冻干机冻干, 于 -20°C 保存。

[0105] (三) 莱克多巴胺磁标快速检测试纸的制备

[0106] 采用 0.02M PBS (pH = 7.4) 缓冲液, 将羊抗鼠 IgG 抗体 (长沙博优生物科技有限公司, ABGAM-0500) 和上述 (二) 得到的莱克多巴胺抗原的浓度均配制为浓度 1mg/ml, 选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet 喷头将羊抗鼠 IgG 抗体喷至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的控制线 (Control Line, C 线) 位置, 将上述 (二) 得到的莱克多巴胺抗原喷至检测线 (Test Line, T 线) 位置, 于相对湿度为 10% 以下的干燥车间进行抽湿 4 小时后干燥待用。用含 2% TritonX100、1% BSA、1% 蔗糖的 0.02M PBS (pH = 7.4) 溶液浸泡玻璃纤维纸 1 小时, 浸泡的温度为 37°C, 于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后, 用上述膜处理缓冲液按 50 倍稀释顺磁性复合粒子标记的莱克多巴胺抗体后, 采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的

AirJet 喷头将此稀释磁标抗体喷涂至上述处理过的玻璃纤维素膜上制备形成样品垫,于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的 NC 膜、磁垫、吸水纸、背板和保护膜按图 1 所示进行搭配组装后,采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 5mm/ 条的宽度,装入检测用夹片待用,得到检测莱克多巴胺的免疫层析试纸。

[0107] 该试纸的结果示意图如图 1 所示。

[0108] 实施例 2、莱克多巴胺残留物的免疫层析试纸灵敏度、交叉反应和准确度的检测

[0109] 1、灵敏度的测定

[0110] 称取适量莱克多巴胺(北京恒元启天化工技术研究院,产品目录号:30230CDCT-C16805000),以甲醇配制为 100ug/ml 的标准储备溶液。用 0.02M 的 PBS(pH = 7.4) 稀释配制为 0、0.005、0.01、0.05、0.1、1、5、10ug/L 的标准溶液,分别加入由实施例 1 得到的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸中,并采用超顺磁共振检测仪 MAR(MagnaBioSciences,8094-101-01 & 8094-101-02) 读取。检测步骤:检测前先将待检测样品恢复室温(25℃),用精确移液器取待检测样品 100 μl 垂直缓慢滴入磁性试纸条的加样端,然后滴入 50ul 冲洗液(0.02M, pH 7.4, PBS),20 分钟后用 MAR 进行测试。

[0111] 其检测结果如下表 1 所示。从检测结果数据中可以发现莱克多巴胺浓度为 0.005ug/L 时检测值与 0ug/L 时的检测值有交叉,当浓度为 0.01ug/L 时检测值与 0ug/L 值可以完全区分开,且浓度曲线 $R^2 = 0.9929$,线性较好,说明试纸的检测灵敏度能达到 0.01ug/L。

[0112] 莱克多巴胺磁性试纸检测值与浓度曲线图如图 3 所示。

[0113] 表 1 莱克多巴胺不同浓度样品的磁性试纸检测值

[0114]

		莱克多巴胺浓度(ug/L)								
		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
检测值	测试 1	561.90	544.80	471.50	387.50	332.70	229.60	164.50	61.00	38.60
	测试 2	523.40	536.40	464.70	411.30	345.60	236.50	154.70	55.60	44.80
	平均值	542.65	540.60	468.10	399.40	339.15	233.05	159.60	58.30	41.70

[0115] 2、交叉反应的测定

[0116] 选择多巴酚丁胺(Sigma-aldrich, D0676-10MG)、盐酸多巴胺(北京恒元启天化工技术研究院,13203 NIC-100070)、盐酸克伦特罗(北京恒元启天化工技术研究院,30229 CDCT-C11668550)和沙丁胺醇(北京恒元启天化工技术研究院,30252CDCT-C16903000)4 种药物,分别配成系列浓度,用由实施例 1 的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸进行检测。计算各竞争物的 IC50,用以下公式分别计算这 5 种药物与 CAP 磁性试纸的交叉反应率。计算公式为:交叉反应率(%) = $[IC50(CAP)/IC50(待测药物)] \times 100$ 。

[0117] 测定及计算结果如表 2 所示。结果显示莱克多巴胺磁性试纸对其余 4 种交叉反应率都小于 0.1%。

[0118] 表 2 莱克多巴胺磁性试纸与其它药物的交叉反应

药物名称	交叉反应率%
莱克多巴胺	100
多巴酚丁胺	<0.1
[0119] 盐酸多巴胺	<0.1
盐酸克伦特罗	<0.1
沙丁胺醇	<0.1

[0120] 3、准确性和回收率的测定

[0121] 3.1 尿液试样：

[0122] 澄清的尿液可直接用于检测，若尿液混浊需要先离心（4000g）10min，取上清进行检测。

[0123] 3.2 准确性的测定方法

[0124] 待测猪尿样品 60 份由深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心提供，且已知其中 55 份（编号为 1-55）为阴性样品，5 份（编号为 56-60）为阳性样品。用由实施例 1 得到的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸与英国 Randox 公司 ELISA 试剂盒同时检测 60 份样品，用磁性试纸判读仪测定 T 线处超顺磁性微球的磁场强度，通过与设定的阈值比对而确定其阳性或阴性结果，C 线测定结果则作为该测定方法的质控内标。

[0125] 阈值小于 480 的为阳性，阈值大于 480 的为阴性。

[0126] 3.3 准确性的测定

[0127] 由实施例 1 得到的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸的检测结果为编号为 1-55 的样品为阴性，其阈值分别为 545.9、550.8、531.2、532.4、541.3、552.6、530.7、526.9、561.4、528.2、535.8、544.1、546.7、556.3、550.5、524.4、528.6、534.9、530.2、544.5、542.1、555.4、538.6、531.3、541.4、539.7、543.8、527.5、525.6、549.8、541.8、536.2、544.7、560.8、528.8、546.1、547.4、534.5、538.3、556.8、529.5、547.9、543.2、536.7、527.9、533.8、545.6、531.3、532.9、552.3、545.7、534.6、533.8、528.5、555.1。

[0128] 编号为 56-60 的样品为阳性，其阈值分别为 341.2、243.3、165.2、110.8、61.4。

[0129] 英国 Randox 公司 ELISA 试剂盒的检测结果与上述试纸检测结果一致。

[0130] 说明本发明的试纸检测正确。

[0131] 3.4 回收率的测定方法

[0132] 将上述检测阴性的编号 1-10 的 10 份样品混合后，配制添加不同浓度的莱克多巴胺标准液（0.1、0.5、1、2、5ug/L）。添加样品每个测试 5 次，并计算回收率。

[0133] 3.5 回收率的测定

[0134] 回收率测定结果见表 3，莱克多巴胺添加到猪尿中的回收率为 91.8%~101.1%，平均回收率 94.86%，变异系数 7.06%~10.89%，平均变异系数 9.09%，准确度较好。

[0135] 表 3 回收率测定

[0136]

RAC 添 加 量 (ug/L)	n	RAC 检测值 ($\bar{X} \pm SD$) ug/L	回收率 (%)	CV (%)
0.1	5	0.093±0.01	93	10.89
0.5	5	0.46±0.05	91.8	10.68
1	5	0.92±0.086	92.4	9.36
2	5	2.02±0.15	101.1	7.43
5	5	4.8±0.34	96	7.06
平均值			94.86	9.09

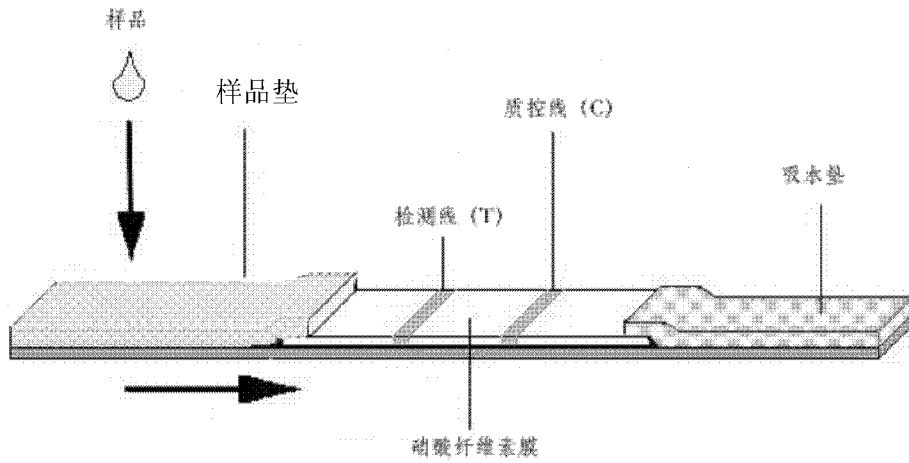


图 1

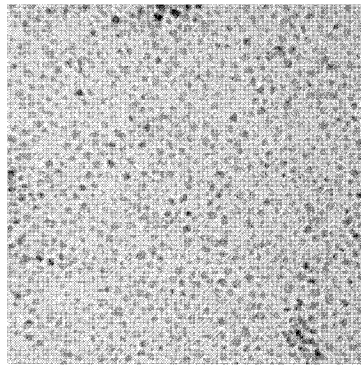


图 2

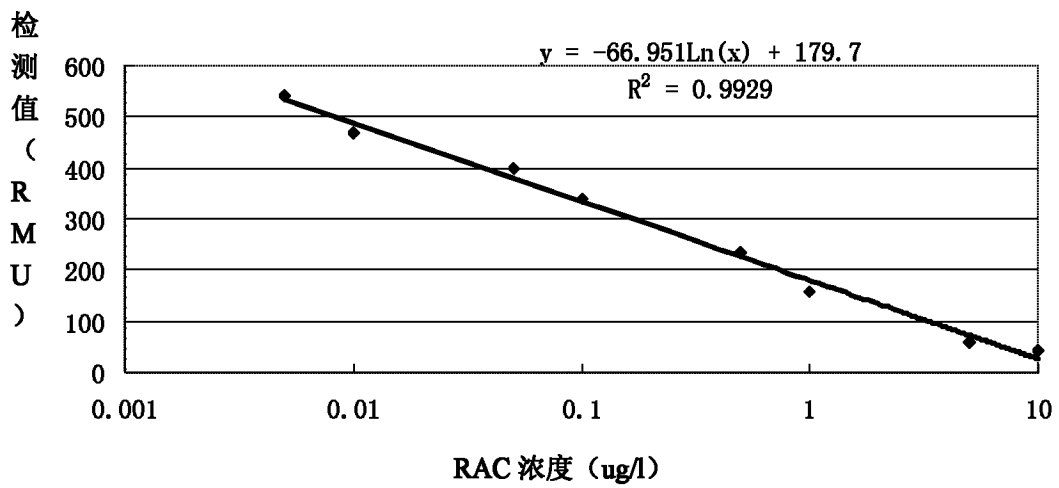


图 3

专利名称(译)	一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN102230936A	公开(公告)日	2011-11-02
申请号	CN201110157580.1	申请日	2011-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
[标]发明人	马岚 卢体康 秦智锋 袁航 吴峰		
发明人	马岚 卢体康 秦智锋 袁航 吴峰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/544		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN102230936B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测莱克多巴胺的免疫层析试纸及其制备方法。本发明提供的检测莱克多巴胺的免疫层析试纸，包括含有超顺磁性复合粒子标记莱克多巴胺抗体的样品垫、连接于所述样品垫一端的硝酸纤维素膜、连接于所述硝酸纤维素膜另一端的吸水垫；所述硝酸纤维素膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线含有莱克多巴胺抗原，所述质控线含有能与所述莱克多巴胺抗体特异结合的抗抗体。本发明的实验证明，用本发明提供的试纸检测莱克多巴胺，灵敏度高、特异性强、快速、简便，可实现客观化测定。

		莱克多巴胺浓度(ng/L)								
		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
检测值	测试1	561.90	544.80	471.50	387.50	332.70	229.60	164.50	61.00	38.60
	测试2	523.40	536.40	464.70	411.30	345.60	236.50	154.70	55.60	44.80
	平均值	542.65	540.60	468.10	399.40	339.15	233.05	159.60	58.30	41.70