



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109116027 A

(43)申请公布日 2019.01.01

(21)申请号 201810905409.6

(22)申请日 2018.08.09

(71)申请人 江西中德生物工程股份有限公司

地址 330000 江西省南昌市青山湖区南昌
高新技术产业开发区京东大道698号
创业大厦C区401

(72)发明人 陈媛 赖卫华 罗凯 刘文娟
伍燕华

(74)专利代理机构 南昌大牛专利代理事务所
(普通合伙) 36135

代理人 喻莎

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

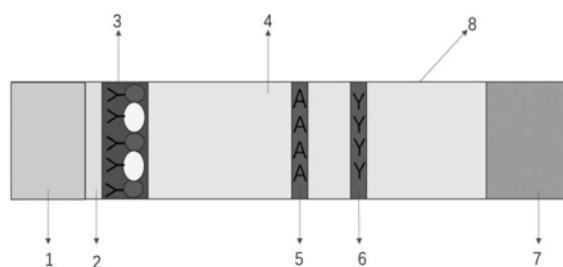
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法,在底板上依次地搭接粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物和胶体金-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述的硝酸纤维素膜上包被有盐酸克伦特罗偶联抗原作为检测线和包被有抗鼠抗体作为质控线。检测线显色比质控线显色浅,则样本中盐酸克伦特罗含量大于0.5ng/mL,定性判断为阳性。定性判断为阳性的试纸条,直接插入荧光读取仪中,读取仪将荧光微球显色体系的荧光信号数值化,实现定量检测。本发明主要用于食品安全检测中盐酸克伦特罗的定性与定量检测。



1. 一种检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:包括底板,以及在底板上依次地搭接粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其中所述的玻璃纤维垫上喷涂有荧光微球和胶体金分别标记了盐酸克伦特罗单抗的复合物,所述的硝酸纤维素膜上包被有盐酸克伦特罗人工抗原作为检测线和包被有山羊抗小鼠抗体作为质控线;

所述时间分辨荧光微球是直径为 $0.01\sim 10\mu\text{m}$ 的采用较长荧光半衰期的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的特殊微球,其表面连接有活性基团;所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺杂物以及量子点;

所述的胶体金颗粒是直径为 $10\sim 100\text{nm}$ 的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

2. 如权利要求1所述的一种检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:制备方法包括如下的步骤:

(1)硝酸纤维素膜的制备

①制备盐酸克伦特罗人工抗原

为了制备硝酸纤维素膜,首先将盐酸克伦特罗标准品与蛋白大分子通过共价偶联法制备质控区所需的人工抗原,偶联方法为:重氮法;偶联蛋白可选:牛血清白蛋白和卵清蛋白;

②检测线和质控线的制备

分别将盐酸克伦特罗人工抗原和山羊抗小鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上,制成检测线和质控线;用 $0.01\sim 0.1\text{M}$ pH 7.0的PBS(磷酸盐缓冲溶液)分别调节包被物浓度为 $0.1\sim 5.0\text{mg/mL}$,喷膜量为 $0.74\mu\text{L/cm}$,检测线喷涂盐酸克伦特罗人工抗原,质控线喷涂抗鼠抗体,两区相隔 5mm ; 37°C 烘干过夜处理后,室温干燥的环境下保存备用;

(2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球通过共价偶联标记盐酸克伦特罗单抗:取荧光微球超声 1min ,再用 0.01M pH 6.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 0.1mg/mL ,然后加入对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)使EDC终浓度为 $20\sim 100\text{mg/mL}$,振荡混匀后,室温反应 30min ,在该荧光微球中加入 $5\sim 50\mu\text{g}$ 的盐酸克伦特罗单克隆抗体使其终浓度为 $10\mu\text{g/mL}$,充分混合后,室温搅拌反应 $1\sim 4\text{h}$,然后加入牛血清白蛋白(BSA)使其终浓度为 1% ,室温反应 1h ,然后在 $6000\times g$ 离心 $5\sim 15\text{min}$,沉淀用 0.01M pH 7.0的磷酸盐缓冲液(其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20)复溶为起始体积,于 4°C 保存待用;

②胶体金颗粒通过电荷作用和范德华力标记盐酸克伦特罗单抗:取胶体金(粒径 $10\sim 100\text{nm}$)用 0.02M 的碳酸钾溶液调节pH为 8.2 ,加入 $5\sim 50\mu\text{g}$ 的盐酸克伦特罗单克隆抗体使其终浓度为 $50\mu\text{g/mL}$,充分混合后,室温搅拌反应 $1\sim 4\text{h}$,然后加入牛血清白蛋白使其终浓度为 1% ,室温反应 1h ,在 $5000\times g$ 离心 $5\sim 15\text{min}$,沉淀用 0.01M pH 8.2的磷酸盐缓冲液(其中包含 5% 蔗糖和 0.05% Tween-20)复溶,复溶后体积为起始体积的十分之一,于 4°C 保存待用;

③荧光微球和胶体金抗体标记复合物按照相互影响趋势而确定的比例混合,然后用BIODOT Dispensing System喷涂至玻璃纤维膜上, 25°C 真空干燥 $1\sim 2\text{h}$,置于室温干燥的环境下备用;

(3)试纸条的组装

在底板上依次搭接地粘贴下述材料:

①滤纸;

②样本垫;

③喷涂有荧光微球-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物和胶体金-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫;

④盐酸克伦特罗人工抗原作为检测线和山羊抗小鼠抗体作为质控线的硝酸纤维素膜;

⑤吸水纸;

即组装成本发明的盐酸克伦特罗荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。

3. 如权利要求2所述的一种检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:制备方法包括如下的步骤:

(1) 硝酸纤维素膜的制备

①制备盐酸克伦特罗人工抗原(CLE-BSA)

偶联方法为重氮法,偶联蛋白为牛血清白蛋白,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到CLE-BSA;

②检测线和质控线的制备

CLE-BSA偶联物和山羊抗小鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.05M pH 7.2的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释CLE-BSA偶联物使其浓度为0.2mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;用0.05M pH 7.2的PBS稀释山羊抗小鼠抗体使其浓度为0.6mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两条线的喷膜量均为0.74 μ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用;

(2) 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

①荧光微球标记盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1min,用0.01M pH 6.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后加入EDC使EDC终浓度为30mg/mL,振荡混匀后,室温孵育30min后,加入盐酸克伦特罗单克隆抗体使其终浓度为10 μ g/mL,充分混合后,室温搅拌反应3h,然后加入牛血清白蛋白(BSA)使其终浓度为1%,室温反应1h,6000 \times g离心力离心15min,沉淀用0.01M pH 7.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为起始体积后,于4 $^{\circ}$ C保存待用;

②胶体金标记盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(粒径30nm),用0.02M的碳酸钾溶液调节胶体金的pH为8.2,加入盐酸克伦特罗单克隆抗体使其终浓度为50 μ g/mL,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,室温反应1h,5000 \times g离心力离心15min,沉淀用0.01M pH 8.2的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20)复溶为1/10起始体积后,于4 $^{\circ}$ C保存待用;

③荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为30ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30 \times 0.8cm的玻璃纤维膜上,25 $^{\circ}$ C真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用;检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.1、0.3、0.9、1.5、2.7ng/mL, R^2 为0.9918, IC_{50} 为0.3ng/mL,线性回归方程式为: $y = -0.1505x + 0.1932$;

(3) 组装试纸条

①滤纸和样本垫规格为1 \times 30cm;

②喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维,规格为0.8 \times 30cm;

- ③已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为 $2.5 \times 30\text{cm}$;
- ④吸水纸,规格为 $1.2 \times 30\text{cm}$;
- ⑤PVC底板,规格为 $5.5 \times 30\text{cm}$;

将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成 $4 \times 55\text{mm}$ 的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为6个月。

4.如权利要求1-3任一项所述的一种检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光微球免疫层析试纸条检测样本中盐酸克伦特罗的方法,包括如下的步骤:

- ①在试纸加样孔中加入 $110\mu\text{L}$ 样本,反应 10min ;
- ②目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;
- ③如果检测线显色比质控线显色深,则样本中盐酸克伦特罗的含量小于 0.5ng/mL ,定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中盐酸克伦特罗含量大于 0.5ng/mL ,定性判断为阳性;
- ④根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中盐酸克伦特罗的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全中兽药残留检测领域,具体涉及一种可以同时定性并定量检测样品中克伦特罗的时间分辨荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗 (Clenbuterol Hydrochloride, CLE) 是一种人工合成的 β -肾上腺素兴奋剂,具有扩张支气管的作用,常用来防治哮喘、肺气肿等肺部疾病。但当其应用剂量达到治疗量的5-10倍时,可使肌肉合成增加,脂肪沉积减少,因此俗称为“瘦肉精”。在畜牧业生产中一些非法使用者将其作为一种生长促进剂添加到动物饲料中,增加瘦肉的生长比率,同时也造成动物食品中瘦肉精的残留。当人们食用含有盐酸克伦特罗残留的食品后会出现一系列的中毒症状,如头晕,乏力。急性中毒症状有心悸,面颈、四肢肌肉颤动,本身有心脏病等基础性疾病的人群在食用有盐酸克伦特罗残留的食品后更容易发生心动过速等反应,造成支气管扩张作用减弱及持续时间缩短,严重的中毒甚至可以造成死亡。

[0003] 盐酸克伦特罗国内外主要采用GC-MS, LC-MS, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 和胶体金标记免疫层析试纸条等技术来实现定性和定量检测。目前我国国标GB/T5009.192-2003对动物性食品中克伦特罗的检出限三种方法 (GC-MS、HPLC、ELISA) 均为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。GC-MS、LC-MS和ELISA方法均需借助昂贵而复杂的仪器和设备来完成检测,成本高,并且需要高水平的专业人员进行操作,实验结果耗时较长,无法实现现场检测,因此不适合于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象的快速在线检测和监控。

[0004] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它通常以条状纤维层析材料为固相,通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动,通过抗原抗体结合的免疫反应原理,层析过程中免疫复合物被富集或截留在层析材料的一定区域 (检测线),通过酶反应或直接运用可目测的标记物 (如胶体金) 而得到直观的实验结果 (如检测线出现不同颜色的条带);而游离标记物则越过检测线,达到与结合标记物自动分离之目的。免疫层析技术常见的目测标记载体有胶体金、乳胶、胶体硒等,其中运用最成功的标记物为胶体金。但是,胶体金免疫层析试纸条存在以下缺陷:

[0005] (1)一般试纸条均为通过肉眼观察结果进行定性分析,无法实现精准的定量检测;

[0006] (2)不同的材料基质效应明显,样本背景干扰较大,易产生假阳性结果;

[0007] (3)检测的阳性结果无法保存,通常超过判断时间后,结果不再准确可靠。

[0008] 市场为了满足对样本进行定量检测的需求,各种基于不同标记物的定量检测试纸条也层出不穷,一般目前的定量检测试纸条,都是单一的标记物标记抗体后,通过小型仪器读取显色信号值,再通过绘制标准曲线进行定量检测。目前基于不同元素标记物的荧光免疫层析方法也已经出现,并获得高灵敏度,但是该定量检测方法也存在以下缺陷:

[0009] (1)实际检测中,阴性结果所占比率很高,但该方法所有试纸条均需要用仪器读取,

否则不能得到结果,在做大批量样本检测时,耗时较长!

[0010] (2)定量检测中,检测部门仍然需要一个阈值来区分阴性和阳性,所以数据处理量较大;

[0011] (3)单一的荧光微球试纸条灵敏度较高,但在实际应用中,较高的灵敏度其检测线性范围则较窄,样本定量浓度范围并不适合实际中的检测需求。

发明内容

[0012] 本发明的一个目的是针对上述现有技术缺陷,提供一种灵敏度高、检测时间短、操作简便并能同时实现定性和定量检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。

[0013] 本发明的另一个目的是提供上述试纸条的制备方法。

[0014] 为了实现上述目的本发明采取的一个技术方案是:

[0015] 提供一种检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。它包括底板,以及在底板上依次地搭接粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其中所述的玻璃纤维垫上喷涂有荧光微球和胶体金分别标记了盐酸克伦特罗单抗的复合物,所述的硝酸纤维素膜上包被有盐酸克伦特罗人工抗原作为检测线和包被有山羊抗小鼠抗体作为质控线。

[0016] 所述时间分辨荧光微球是直径为 $0.01\sim 10\mu\text{m}$ 的采用较长荧光半衰期的稀土离子作为标记物来制备的包裹荧光物质的特殊微球,其表面连接有活性基团;所述荧光物质包括有机或无机的荧光物质或多种荧光物质的掺杂物以及量子点。

[0017] 所述的胶体金颗粒是直径为 $10\sim 100\text{nm}$ 的采用柠檬酸三钠还原氯金酸来制备的金颗粒,其表面带有负电荷,可以与蛋白质进行偶联。

[0018] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的方法,它包括如下的步骤:

[0019] (1)硝酸纤维素膜的制备

[0020] ①制备盐酸克伦特罗人工抗原

[0021] 为了制备硝酸纤维素膜,首先将盐酸克伦特罗标准品与蛋白大分子通过共价偶联法制备质控区所需的人工抗原,偶联方法为:重氮法。偶联蛋白可选:牛血清白蛋白和卵清蛋白。

[0022] ②检测线和质控线的制备

[0023] 分别将盐酸克伦特罗人工抗原和山羊抗小鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上,制成检测线和质控线。用 $0.01\sim 0.1\text{M}$ pH 7.0的PBS(磷酸盐缓冲溶液)分别调节包被物浓度为 $0.1\sim 5.0\text{mg/mL}$,喷膜量为 $0.74\mu\text{L/cm}$,检测线喷涂盐酸克伦特罗人工抗原,质控线喷涂抗鼠抗体,两区相隔 5mm ; 37°C 烘干过夜处理后,室温干燥的环境下保存备用。

[0024] (2)荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0025] ①荧光微球通过共价偶联标记盐酸克伦特罗单抗:取荧光微球超声 1min ,再用 0.01M pH 6.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为 0.1mg/mL ,然后加入对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)使EDC终浓度为 $20\sim 100\text{mg/mL}$,振荡混匀后,室温反应 30min ,在该荧光微球中加入 $5\sim 50\mu\text{g}$ 的盐酸克伦特罗单抗使其终浓度为 $10\mu\text{g/mL}$,充分混合后,室温搅拌反应 1

~4h, 然后加入牛血清白蛋白 (BSA) 使其终浓度为1%, 室温反应1h, 然后在6000×g离心5~15min, 沉淀用0.01M pH 7.0的磷酸盐缓冲液 (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶为起始体积, 于4℃保存待用。

[0026] ②胶体金颗粒通过电荷作用和范德华力标记盐酸克伦特罗单抗: 取胶体金 (粒径10~100nm) 用0.02M的碳酸钾溶液调节pH为8.2, 加入5~50μg的盐酸克伦特罗单抗使其终浓度为50μg/mL, 充分混合后, 室温搅拌反应1~4h, 然后加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%, 室温反应1h, 在5000×g离心5~15min, 沉淀用0.01M pH 8.2的磷酸盐缓冲液 (其中包含5%蔗糖和0.05%Tween-20) 复溶, 复溶后体积为起始体积的十分之一, 于4℃保存待用。

[0027] ③荧光微球和胶体金抗体标记复合物按照相互影响趋势而确定的比例混合, 然后用BIODOT Dispensing System喷涂至玻璃纤维膜上, 25℃真空干燥1~2h, 置于室温干燥的环境下备用。

[0028] (3)试纸条的组装

[0029] 在底板上依次搭接地粘贴下述材料:

[0030] ①滤纸;

[0031] ②样本垫;

[0032] ③喷涂有荧光微球-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物和胶体金-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫;

[0033] ④盐酸克伦特罗人工抗原作为检测线和山羊抗小鼠抗体作为质控线的硝酸纤维素膜;

[0034] ⑤吸水纸。

[0035] 即组装成本发明的盐酸克伦特罗荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条。

[0036] 用上述的荧光微球免疫层析试纸条检测样本中盐酸克伦特罗的方法, 包括如下的步骤:

[0037] ①在试纸加样孔中加入110μL样本, 反应10min;

[0038] ②目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0039] ③如果检测线显色比质控线显色深, 则样本中盐酸克伦特罗的含量小于0.5ng/mL, 定性判断为阴性, 反之, 如果检测线显色比质控线显色浅, 或者检测线没有显示红色条带, 则样本中盐酸克伦特罗含量大于0.5ng/mL, 定性判断为阳性。

[0040] ④根据胶体金红色条带显示的结果, 如果样本为阳性时, 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口, 检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示, 根据仪器中已经录入的标准曲线, 即可计算出样本中盐酸克伦特罗的含量, 实现阳性样本的定量检测, 胶体金显色后, 在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0041] 特别说明: 荧光微球-胶体金复合物垫的制备过程中, 荧光微球和胶体金抗体标记复合物的混合比例并不是通过简单的试验就能得出的, 胶体金的显色强弱因为光覆盖和光散射的原因会对荧光微球的显色造成影响, 且其对荧光微球阴性和阳性结果的影响关系并不相同。本专利正是发现和掌握了胶体金和荧光微球之间的影响关系, 确定了荧光微球和胶体金抗体标记复合物的最佳混合比例, 才能成功的将两者混合为一个体系进行试纸条的制备, 两者的影响关系具体见实施例。

[0042] 本发明的有益效果是：

[0043] 1. 双显色体系对样本中的盐酸克伦特罗同时实现定性和定量检测：本方法在一张试纸条上，先通过胶体金显色系统，目测检测线和质控线红色条带的深浅来进行定性检测。如果胶体金显示为阳性样本时，再通过荧光微球读取仪对荧光显色系统进行读取，得到阳性样本的准确浓度，实现定量检测。一张试纸条同时实现两种检测功能，样本结果在检测中得到双体系验证，结果更加可靠。

[0044] 2. 在实际应用中，阴性样本的占有比率是最大的，检测大批量样本时，先通过目测排除阴性结果，可以大大节约检测时间！阳性结果又可以进行再次精确定量，实现结果数据化和方便保存。

[0045] 3. 荧光微球表面携带活性化学基团，抗体标记使用的是化学偶联方法，形成抗体与微球的稳固结合，可以避免样本中基质的干扰，能较大程度排除单纯胶体金检测体系中的假阳性结果。

附图说明

[0046] 图1是盐酸克伦特罗荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条结构示意图；

[0047] 图2是盐酸克伦特罗荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条检测原理图；

[0048] 图3是盐酸克伦特罗荧光微球复合物浓度对胶体金显色体系的影响；

[0049] 图4是盐酸克伦特罗胶体金复合物浓度对荧光微球显色体系的影响；

[0050] 图1中，样本垫1、滤纸2、荧光微球-胶体金抗体复合物垫3、NC膜4、检测线5、质控线6、吸水纸7、PVC底板8。

[0051] 如图1所示，该免疫层析试纸条的构成为：在PVC底板8上，依次搭接地粘贴喷涂有检测线5和质控线6的NC膜4、喷涂有荧光微球-胶体金抗体复合物的金垫3、样本垫1、滤纸2和吸水纸7，粘贴好后通过切条机切成 $4 \times 55\text{mm}$ 的试纸条，装入塑料卡壳中，即为一张完整的检测试纸条。

[0052] 如图2所示，检测原理如下：样本加入试纸条后，样本如果是阴性（盐酸克伦特罗含量小于 0.5ng/mL ），样本随层析方向层析，结合垫上的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到检测线位置，两种标记物质与检测线上的盐酸克伦特罗偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物，胶体金在检测线上聚集并显示出现红色条带，且该条带显色比质控线深；部分未与偶联抗原结合的荧光微球和胶体金抗体复合物涌动到质控线位置，抗鼠二抗可以和鼠源性单抗发生结合从而质控线也显示红色条带，该条带显色比检测线浅，通过肉眼可以直接判断为阴性结果。样本如果是阳性，则样本中的盐酸克伦特罗先与荧光微球和胶体金抗体复合物结合，结合了盐酸克伦特罗的荧光微球和胶体金抗体复合物不能再和检测线上的盐酸克伦特罗偶联抗原结合，则检测线胶体金显色变浅或消失，通过与质控线对照，如果检测线显色比质控线浅，则肉眼判断为阳性，再用荧光微球读取仪读取荧光微球在检测线和质控线上的荧光强度，通过数据分析，得出阳性样本中盐酸克伦特罗的具体浓度。本检测体系中，荧光微球显色体系和胶体金显色体系原理一致，胶体金显色体系用来进行定性检测，荧光微球显色体系用来进行定量检测。

[0053] 如图3所示,盐酸克伦特罗荧光微球复合物的浓度增加,对胶体金显色体系基本没有影响,标准曲线基本可以拟合,证明在双系统中,胶体金显色体系的颜色不会被荧光微球系统干扰,从原理上看,胶体金显色系统是显示肉眼可见的红色条带,而微球显色系统需要激发波长激发后才能够显色,其对胶体金的目测结果影响是较小的,另一方面,荧光微球所偶联的抗体量是胶体金偶联抗体量的五分之一,因此,其对胶体金阳性结果的影响也不大。

[0054] 如图4所示,盐酸克伦特罗胶体金复合物的浓度增加,对荧光微球的显色和灵敏度有较大影响,随着胶体金复合物浓度的不断上升,荧光微球的阴性显色逐渐下降,呈现正相关关系,但是其对阳性的影响,和阴性结果却不一致,从阳性单独的数据来看,阳性结果的灵敏度并没有发生较大改变,但是因为阴性结果的变化,导致标准曲线发生灵敏度和线性检测范围的差异,从而改变了荧光微球检测体系的定量范围。根据试验发现的影响特点,并引入胶体金系统后,我们通过大量实验得到了一条检测灵敏度、定量范围和线性回归数据都较好,且能与胶体金目测体系相配合的荧光微球复合物的参数条件。

具体实施方式

[0055] 实施例1:检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球和胶体金抗体标记复合物最优比例)

[0056] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0057] 1. 硝酸纤维素膜的制备

[0058] (1) 制备盐酸克伦特罗人工抗原(CLE-BSA)

[0059] 偶联方法为重氮法,偶联蛋白为牛血清白蛋白,偶联比为1:10-1:100,偶联后透析纯化,得到CLE-BSA。

[0060] (2) 检测线和质控线的制备

[0061] CLE-BSA偶联物和山羊抗小鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.05M pH 7.2的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释CLE-BSA偶联物使其浓度为0.2mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;用0.05M pH 7.2的PBS稀释山羊抗小鼠抗体使其浓度为0.6mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷膜量均为0.74 μ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0062] 2. 荧光微球-胶体金复合物垫的制备

[0063] (1) 荧光微球标记盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备:取1mg荧光微球超声1分钟,用0.01M pH 6.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后加入EDC使EDC终浓度为30mg/mL,振荡混匀后,室温孵育30min后,加入盐酸克伦特罗单克隆抗体使其终浓度为10 μ g/mL,充分混合后,室温搅拌反应3h,然后加入牛血清白蛋白(BSA)使其终浓度为1%,室温反应1h,6000 \times g离心力离心15min,沉淀用0.01M pH 7.0的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05% Tween-20)复溶为起始体积后,于4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0064] (2) 胶体金标记盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备:取40mL胶体金(粒径30nm),用0.02M的碳酸钾溶液调节胶体金的pH为8.2,加入盐酸克伦特罗单克隆抗体使其终浓度为50 μ g/mL,充分混合后,室温搅拌反应1h,加入牛血清白蛋白使其终浓度为1%,室温反应1h,5000 \times g离心力离心15min,沉淀用0.01M pH 8.2的PBS(其中包含5%蔗糖和0.05% Tween-20)复溶为1/10起始体积后,于4 $^{\circ}$ C保存待用。

[0065] (3)荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金标记抗体量为30ng/条、荧光微球标记抗体量为3ng/条的浓度来进行结合垫的喷涂,喷涂至30×0.8cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.1、0.3、0.9、1.5、2.7ng/mL, R^2 为0.9918, IC_{50} 为0.3ng/mL,线性回归方程式为: $y=-0.1505x+0.1932$ 。

[0066] 3. 组装试纸条

[0067] (1)滤纸和样本垫规格为1×30cm;

[0068] (2)喷涂有荧光微球-胶体金复合物的玻璃纤维,规格为0.8×30cm;

[0069] (3)已喷好检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5×30cm;

[0070] (4)吸水纸,规格为1.2×30cm;

[0071] (5)PVC底板,规格为5.5×30cm。

[0072] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4×55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为6个月。

[0073] 二、定性并定量检测样本中的盐酸克伦特罗

[0074] 1. 在试纸条加样孔中加入110μL样本,反应10min;

[0075] 2. 目测试纸条检测线和质控线出现的红色条带情况;

[0076] 3. 如果检测线显色比质控线显色深,则样本中盐酸克伦特罗的含量小于0.5ng/mL,定性判断为阴性,反之,如果检测线显色比质控线显色浅,或者检测线没有显示红色条带,则样本中盐酸克伦特罗含量大于0.5ng/mL,定性判断为阳性。

[0077] 4. 根据胶体金红色条带显示的结果,如果样本为阳性时,将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中盐酸克伦特罗的含量,实现阳性样本的定量检测,胶体金显色后,在20分钟内读取的荧光数据均有效。

[0078] 5. 样本验证:实验过程中,以盐酸克伦特罗标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、0.2、0.53、1.1、3ng/mL),用本方法检测,完全符合确证样本结果,具体数据见表2。

[0079] 实施例2:检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(荧光微球标记复合物占比上升)

[0080] 与实施例1的不同之处在于:

[0081] (1) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金抗体量为30ng/条、荧光微球抗体量为6ng/条的标记物浓度来进行结合垫的喷涂。喷涂至30×0.8cm的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。荧光微球定量检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.1、0.3、0.9、1.5、2.7ng/mL, R^2 为0.9058, IC_{50} 为0.33ng/mL,线性较差。胶体金目测检测结果正常。

[0082] (2) 组装试纸条:试验中同实施例1,但不形成产品,不进行保存试验。

[0083] (3) 样本验证:实验过程中,以盐酸克伦特罗标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入

仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、0.2、0.53、1.1、3ng/mL),用本方法检测,荧光微球检测出现1例假阴性结果,数据见表2。

[0084] 其余同实施例1。

[0085] 实施例3:检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条的制备(胶体金标记复合物占比上升)

[0086] 与实施例1的不同之处在于:

[0087] (1) 荧光微球抗体复合物和胶体金抗体复合物制备完成后,按照每张试纸条中不同标记物上的抗体量来计算,精确到胶体金抗体量为50ng/条、荧光微球抗体量为3ng/条的标记物浓度来进行结合垫的喷涂。喷涂至 $30 \times 0.8\text{cm}$ 的玻璃纤维膜上,25℃真空干燥1~2h,放于干燥柜中备用。荧光微球定量检测结果为:该条件下标准曲线浓度为:0、0.1、0.3、0.9、1.5、2.7ng/mL, R^2 为0.9694, IC_{50} 为1ng/mL,线性较差。胶体金目测检测结果灵敏度也下降,0.5ng/mL阳性结果出现一定比例假阴性结果。

[0088] (2) 组装试纸条:试验中同实施例1,但不形成产品,不进行保存试验。

[0089] (3) 样本验证:实验过程中,以盐酸克伦特罗标准品配制已知系列浓度的样品,测出其对应的荧光强度的数值,从而根据这一系列数值与对应浓度建立的标准曲线已经录入仪器中。对5个已知浓度猪尿样进行检测(该已知尿样样本经GC-MS法定量为0、0.2、0.53、1.1、3ng/mL),用本方法检测,出现1例假阴性结果,数据见表2。

[0090] 其余同实施例1。

[0091] 实施例结果分析:

[0092] 从三个实施例中可以得知,胶体金免疫检测体系和荧光微球免疫检测体系两者合并为一套检测系统时,并不是简单的按照一定的比例进行混合,本发明进行了大量的研究来摸索和掌握两套体系合并后的关键影响因素,从图3和图4可以看出,胶体金抗体复合物的用量是一个关键因素,其对荧光微球体系有着重大的影响,而且对荧光微球阴性和阳性的影响趋势并不一致。在进行了大量的验证试验后,找到最主要的影响因素为:胶体金标记抗体的浓度、胶体金显色后对荧光微球检测条带的光覆盖程度、荧光微球抗体标记复合物的浓度、抗原浓度。以上任何一个因素的变化,均能影响本实验的最终结果,特别是荧光微球体系的检测线性范围比较难掌握,因为在单独的体系中,荧光微球体系的检测灵敏度比胶体金体系高,检测线性范围比胶体金体系窄,如何改变荧光微球的检测线性范围成为本发明的关键,相关影响因素结果可以见表1。在研究中发现,并不能通过增加荧光微球上标记的抗体量来实现这一目标,通过计算两种标记物上的抗体分子数量,发现标记抗体量如果超过样本中抗原分子数量,那么在阳性结果的检测中,就会出现互相干扰的现象,只有保证两者抗体数量小于靶标分子数量时,两套检测体系才能独立并同时存在,在发现和掌握其影响规律后,本发明确定了最优的条件配比,得到既能满足胶体金目测系统要求,又能同时满足荧光微球定量系的检测限和较好线性范围的条件。按照最优参数和相互的影响关系,我们制备了三种不同的双系统试纸条,并用5个已经通过GC-MS确证的样本来检测试纸条的可靠性(具体数据见表2),根据试验结果可以看出,只有按照最优的条件制备的试纸条(实施例1为最优条件),其检测结果与确证结果才完全符合,另外两个有一定偏差的条件制备出的试纸条,都存在一定比例的假阴性。

[0093] 表1试纸条中胶体金抗体用量差异表

[0094]

胶体金抗体复合物用量 (ng/条)	IC ₅₀ (ng/mL)	R ²	线性范围 (ng/mL)
0	0.03	0.9508	0.01-0.9
2	0.05	0.9506	0.01-0.9
5	0.31	0.9698	0.1-0.9
10	0.21	0.9731	0.1-0.9
20	0.21	0.9768	0.1-0.9
30	0.33	0.9969	0.1-2.7
40	0.16	0.9868	0.1-0.9
50	1	0.9694	0.1-2.7

[0095] 表2三个实施例检测结果比对

[0096]

样本 编号	GC-MS (ng/mL)	实施例 1 结果		实施例 2 结果		实施例 3 结果	
		胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)	胶体金	荧光微球 (ng/mL)
1	0	阴性	0	阴性	0	阴性	0
2	0.2	阴性	0.16	阴性	0.11	阴性	0.09
3	0.53	阳性	0.55	阳性	0.25	弱阳性	0.17
4	1.1	阳性	1	阳性	0.83	阳性	0.76
5	3	阳性	2.87	阳性	2	阳性	1.98

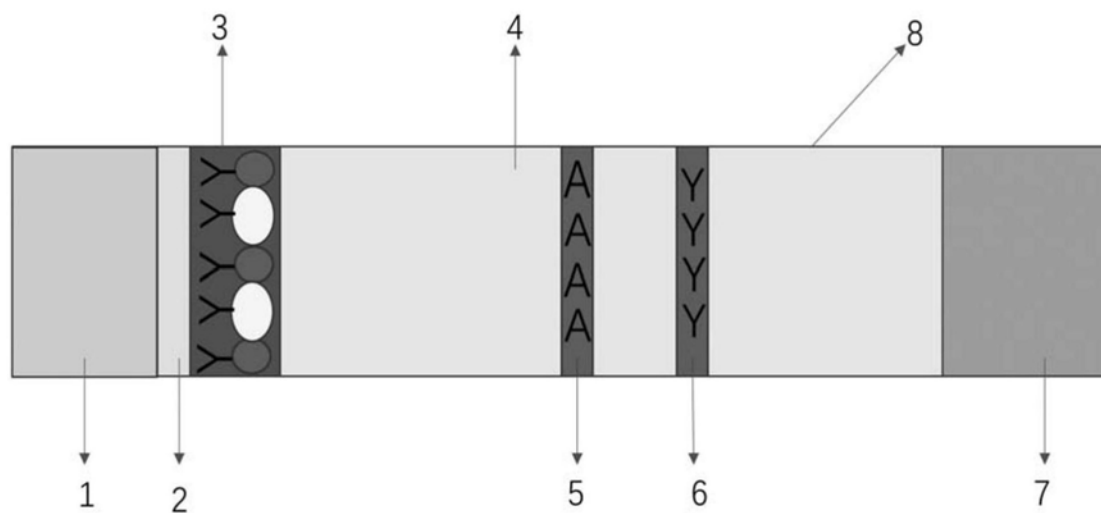


图1

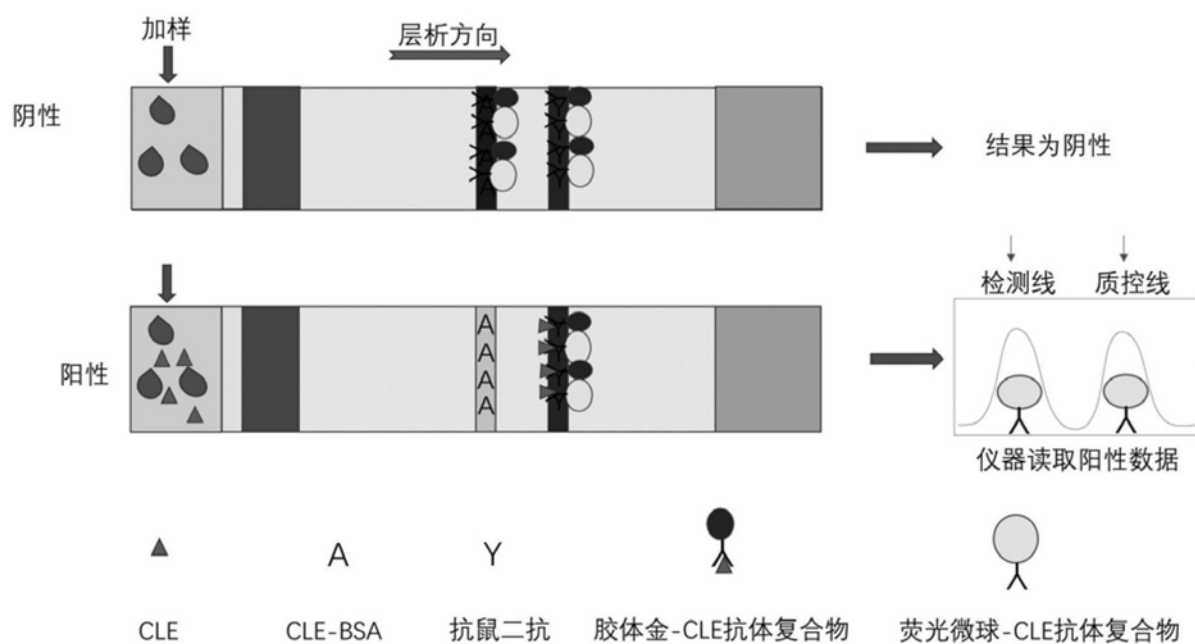


图2

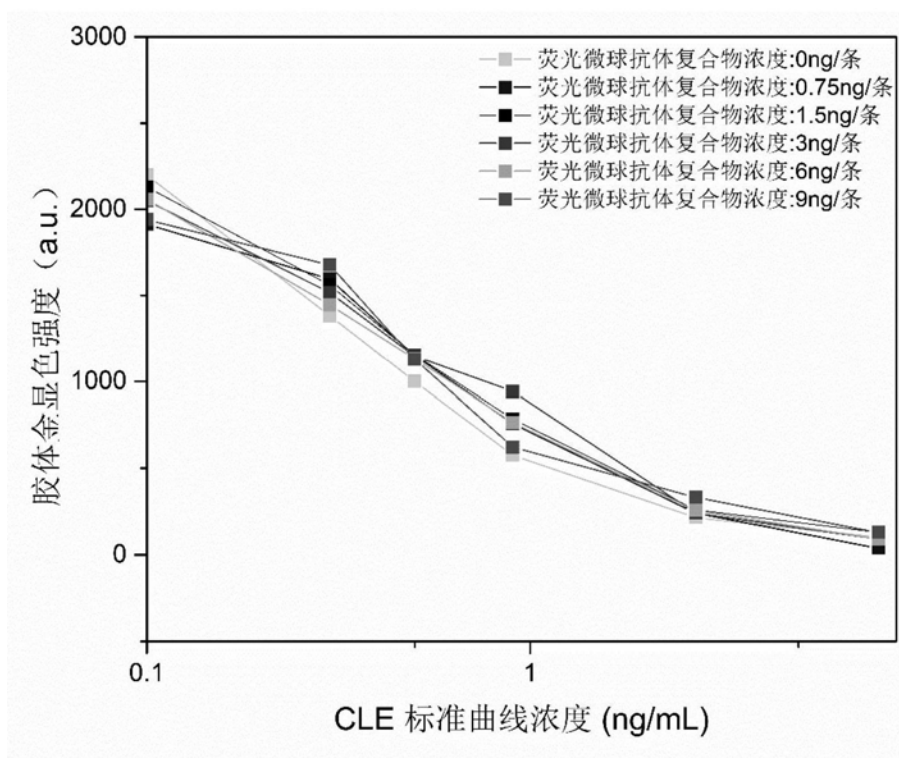


图3

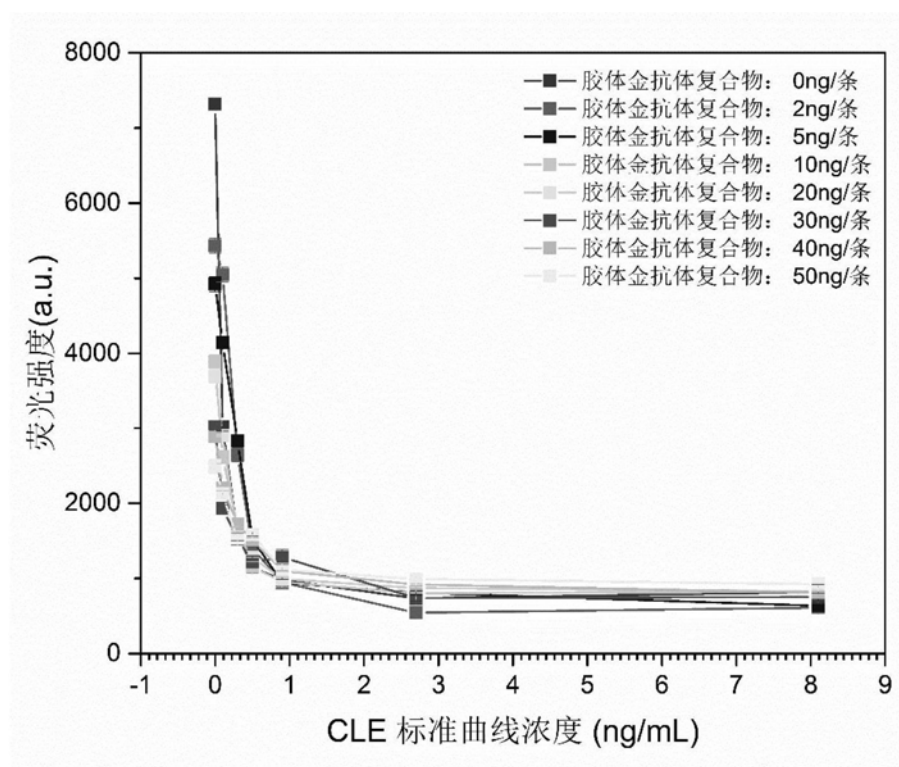


图4

专利名称(译)	检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN109116027A	公开(公告)日	2019-01-01
申请号	CN201810905409.6	申请日	2018-08-09
[标]发明人	陈媛 赖卫华 罗凯 刘文娟		
发明人	陈媛 赖卫华 罗凯 刘文娟 伍燕华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了检测盐酸克伦特罗的荧光微球-胶体金双显色定性定量免疫层析试纸条及其制备方法，在底板上依次地搭接粘贴滤纸、样本垫、喷涂有荧光微球-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物和胶体金-盐酸克伦特罗单克隆抗体复合物的玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述的硝酸纤维素膜上包被有盐酸克伦特罗偶联抗原作为检测线和包被有抗鼠抗体作为质控线。检测线显色比质控线显色浅，则样本中盐酸克伦特罗含量大于0.5ng/mL，定性判断为阳性。定性判断为阳性的试纸条，直接插入荧光读取仪中，读取仪将荧光微球显色体系的荧光信号数值化，实现定量检测。本发明主要用于食品安全检测中盐酸克伦特罗的定性与定量检测。

