



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107478850 A

(43)申请公布日 2017.12.15

(21)申请号 201710553195.6

(22)申请日 2017.07.07

(71)申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠
城路3号

(72)发明人 张道宏 黄琼 王建龙 补彤

闫灵芝 赵兵欣 窦磊娜 赵东阳

(74)专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务
所 61216

代理人 孙雅静

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条
及应用

(57)摘要

本发明公开了一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条及应用,通过构建一种细菌作为信号载体的新型探针,可以实现丰富的纳米金(AuNPs)标记极其有限量的抗体(Ab),这是提高竞争性免疫检测灵敏度的关键所在。本发明构建的免疫层析试纸条对克伦特罗的视觉检测限(VDL)为0.1ng/mL,比传统试纸条提高了20倍的灵敏度。得益于表面丰富的活性位点和独特的生物相容性,细菌将成为信号富集的有前景的载体,这项作为免疫层析测定的信号放大和性能改进开辟了新的途径,有利于进一步扩展免疫传感器的应用。

1. 一种生物探针,其特征在于,包括抗体、信号载体和信号物,信号物承载在信号载体的表面,抗体与信号物结合;抗体为盐酸克伦特罗单克隆抗体,信号载体为大肠杆菌,信号物为纳米金。

2. 如权利要求1所述的生物探针,其特征在于,纳米金的粒径为15~20nm,大肠杆菌为无毒埃希氏大肠杆菌。

3. 如权利要求1或2所述的生物探针,其特征在于,制备该生物探针的方法包括将纳米金负载在大肠杆菌表面,然后将盐酸克伦特罗单克隆抗体与大肠杆菌表面上负载的纳米金结合即得。

4. 如权利要求1或2所述的生物探针,其特征在于,制备该生物探针的方法包括:

(1) 制备菌金复合物溶液:包括将大肠杆菌与纳米金混合后孵育得到菌金复合物溶液、纳米金在大肠杆菌表面生长得到菌金复合物溶液或硫醇化的大肠杆菌与纳米金通过特异性共价键巯基偶联得到菌金复合物溶液,菌金复合物溶液中每毫升纳米金含有 10^8 CFU的大肠杆菌;

(2) 制备生物探针:将盐酸克伦特罗单克隆抗体与菌金复合物溶液混合,使盐酸克伦特罗单克隆抗体与大肠杆菌表面上分布的纳米金结合即得。

5. 如权利要求4所述的生物探针,其特征在于,所述的步骤(2)中,盐酸克伦特罗单克隆抗体与菌金复合物溶液的混合比为 $1\mu\text{g}:1\text{mL}$,且菌金复合物溶液的 $\text{pH}=8.5\sim 9.5$ 。

6. 一种检测盐酸克伦特罗的试纸条,其特征在于,该试纸条上载有权利要求1-4任一权利要求所述的生物探针。

7. 如权利要求6所述的检测盐酸克伦特罗的试纸条,其特征在于,所述的试纸条包括衬板,衬板上贴有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的一端覆盖吸水垫,硝酸纤维素膜的另一端依次覆盖样品垫和结合垫,硝酸纤维素膜的非覆盖面上沿横向设置检测线和控制线,结合垫上载有权利要求1-5任一权利要求所述的生物探针。

8. 如权利要求7所述的检测盐酸克伦特罗的试纸条,其特征在于,结合垫上载有权利要求1-5任一权利要求所述的生物探针的制备方法包括:结合垫经封闭液封闭后,将权利要求1-5任一权利要求所述的生物探针以 $8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的速率喷到结合垫上即得;

0.5mg/mL克伦特罗-牛血清白蛋白偶联物以 $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的划线速率涂覆在检测线上得检测线,0.5mg/mL羊抗鼠免疫球蛋白以 $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的划线速率涂覆在控制线上为控制线。

9. 权利要求1-5任一权利要求所述的生物探针用于检测饲料、牛奶或猪尿液中的盐酸克伦特罗的应用。

10. 权利要求6-8任一权利要求所述的检测盐酸克伦特罗的试纸条用于检测饲料、牛奶或猪尿液中的盐酸克伦特罗的应用。

一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条及应用,具体涉及一种用细菌富集金纳米粒子并标记单克隆抗体的探针,使用了该探针的试纸条,及其用于快速检测盐酸克伦特罗的应用。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗是一种人工合成的 β -肾上腺受体激动剂,具有扩张支气管的作用,被用于治疗哮喘,支气管痉挛,肺气肿和其他肺部疾病。后来人们发现,当施用剂量为治疗剂量的5-10倍时,对动物机体具有重新分配营养,促进肌肉生长和抑制脂肪合成的功能。因此,它在过去的几年中常被用作畜牧业的饲料添加剂。研究发现,该药物由于其稳定的化学性质可长期蓄积在动物体内。当人类摄入残留有盐酸克伦特罗的畜产品后,会产生急性中毒症状,还会损害肾脏,甚至危及生命。因此,许多国家已经明确禁止克伦特罗作为生长促进剂。目前针对这一禁用兽药,研究者们开发了各种分析技术,包括高效液相色谱(HPLC),气相色谱-质谱(GC-MS),液相色谱串联质谱(LC-MS),毛细管电泳,电化学传感器和酶联免疫吸附检测(ELISA)。虽然这些方法灵敏且可靠,但它们需要昂贵的仪器和复杂的操作,因此不适合畜产品的现场快速筛查。

[0003] 免疫层析检测(ICA),也称为横向流生物传感器,具备良好的特异性,稳定性,快速性,便携性,易于操作和低成本的优点,是最常见的床旁测试或现场快速筛查手段。目前,免疫层析检测已经广泛应用于生物标志物,致病微生物,毒素,药物和化学污染物的分析。然而,相对较低的灵敏度是最突出的缺点,特别是使用常规传统的胶体金作为信号标签,使得该传感器不能满足痕量分析的需要。最近研究者们提出了各种策略和先进技术来提高灵敏度,包括引入新的信号物如量子点,上转换荧光体,模拟酶等,开发信号放大系统,如金银增强,双荧光,双金增强等,设计新的微纳流体方案,以及结合编程的阅读仪器等。

[0004] 尽管这些方法成功地表现出更好的分析性能,但事实上,在类似克伦特罗的小分子的竞争性免疫学测定中,灵敏性主要由信号强度和抗体浓度这两个因素决定,大多数研究致力于前者,仅有少数研究集中在后者以实现更高的检测能力。根据竞争反应的原理,只有限量的抗体可以引发游离的分析物与固定化的抗原之间高效的竞争。减少抗体的使用量可以促成激烈的竞争,导致了信号强度和分析物浓度的响应关系越灵敏。但另一方面,较少量的抗体会导致较弱的信号强度,这不仅会导致结果的判断困难,甚至导致分析失败。因此,如何在检测过程中提供足够信号的同时,减少抗体的使用量是一个关键问题。

发明内容

[0005] 针对现有技术中的缺陷和不足,本发明为了解决免疫层析检测低灵敏度的问题,构建了一个新型的载体来富集信号物,在保证信号物强度的同时,降低了抗体用量,从而提高分析系统的灵敏度,这对于监控肉蛋奶类食品中的盐酸克伦特罗具有很重要的意义和应用价值,即包括一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条及应用。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采取的技术方案包括:

[0007] 一种生物探针,包括抗体、信号载体和信号物,信号物承载在信号载体的表面,抗体与信号物结合;抗体为盐酸克伦特罗单克隆抗体,信号载体为大肠杆菌,信号物为纳米金。

[0008] 具体的,纳米金的粒径为15~20nm,大肠杆菌为无毒埃希氏大肠杆菌。

[0009] 更具体的,制备该生物探针的方法包括将纳米金负载在大肠杆菌表面,然后将盐酸克伦特罗单克隆抗体与大肠杆菌表面上负载的纳米金结合即得。

[0010] 详细的,制备该生物探针的方法包括:

[0011] (1) 制备菌金复合物溶液:包括将大肠杆菌与纳米金混合后孵育得到菌金复合物溶液、纳米金在大肠杆菌表面生长得到菌金复合物溶液或硫醇化的大肠杆菌与纳米金通过特异性共价键巯基偶联得到菌金复合物溶液,菌金复合物溶液中每毫升纳米金含有 10^8 CFU的大肠杆菌;

[0012] (2) 制备生物探针:将盐酸克伦特罗单克隆抗体与菌金复合物溶液混合,使盐酸克伦特罗单克隆抗体与大肠杆菌表面上分布的纳米金结合即得。

[0013] 最好的,所述的步骤(2)中,盐酸克伦特罗单克隆抗体与菌金复合物溶液的混合比为 $1\mu\text{g}:1\text{mL}$,且菌金复合物溶液的 $\text{pH}=8.5\sim 9.5$ 。

[0014] 一种检测盐酸克伦特罗的试纸条,该试纸条上载有所述的生物探针。

[0015] 具体的,所述的试纸条包括衬板,衬板上贴有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的一端覆盖吸水垫,硝酸纤维素膜的另一端依次覆盖样品垫和结合垫,硝酸纤维素膜的非覆盖面上沿横向设置检测线和控制线,结合垫上载有权利要求1-5任一权利要求所述的生物探针。

[0016] 详细的,结合垫上载有所述的生物探针的制备方法包括:结合垫经封闭液封闭后,将所述的生物探针以 $8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的速率喷到结合垫上即得;

[0017] $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 克伦特罗-牛血清白蛋白偶联物以 $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的划线速率涂覆在检测线上得检测线, $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 羊抗鼠免疫球蛋白以 $0.8\mu\text{L}/\text{cm}$ 的划线速率涂覆在控制线上为控制线。

[0018] 所述的生物探针用于检测饲料、牛奶或猪尿液中的盐酸克伦特罗的应用。

[0019] 所述的检测盐酸克伦特罗的试纸条用于检测饲料、牛奶或猪尿液中的盐酸克伦特罗的应用。

[0020] 与现有技术相比,其优点与积极效果在于:

[0021] 首次在免疫检测中将细菌作为信号载体以构建探针,控制非常有限量的抗体是提高灵敏度的关键,这项作为饲料、牛奶和猪尿液的实际样品检测盐酸克伦特罗开发了便宜,灵敏,便携和快速读出的分析系统;

[0022] 本发明构建的免疫层析试纸条对克伦特罗的视觉检测限(VDL)为 $0.1\text{ng}/\text{mL}$,比传统试纸条提高了20倍的灵敏度。得益于表面丰富的活性位点和独特的生物相容性,细菌将成为信号富集的有前景的载体,这项作为免疫层析测定的信号放大和性能改进开辟了新的途径,有利于进一步扩展免疫传感器的应用。

附图说明

[0023] 图1为本发明的三种方法构建细菌负载信号的示意图;

[0024] 图2为本发明的免疫层析试纸条组装示意图及原理示意图;

[0025] 图3为实施例3的结果判定图；

[0026] 图4为实施例4的结果判定图；

[0027] 下面结合说明书附图和具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

具体实施方式

[0028] 本发明为了解决免疫层析检测低灵敏度的这个问题,构建了一个新型的信号载体来富集信号物,在保证信号物强度的同时,降低了抗体用量,从而提高分析系统的灵敏度,这对于监控肉蛋奶类食品中的盐酸克伦特罗具有很重要的意义和应用价值。为了获得最佳的测定性能,发明人挑选了最合适的作为信号载体的细菌菌种,研究了信号载体偶联信号物的最佳制备方法,并确定了最优的分析条件。最终制得的试纸条用于检测盐酸克伦特罗,特别是对饲料、牛奶或猪尿液中的盐酸克伦特罗的检测应用,具有可靠、灵敏、稳定、便携、快速和操作简单的特点。

[0029] 作为新型信号载体,细菌不仅具有适当的尺寸(1-3 μm),良好的均匀性,分散性和稳定性,而且是纯天然的有机体,具备独特的生物相容性,对抗体具有更好的保护作用。另外,由于细菌表面上具有丰富的多糖和蛋白质等多种组分,它们可以提供足够的官能团以利于活化和修饰,所以赋予了它超高的纳米信号负载能力。与纳米二氧化硅,单壁碳纳米管,石墨烯纳米片,碳纳米球和二硫化钼纳米片相比,细菌只需要通过培养就可获得,避免了复杂的化学合成,这可以简化生产并确保均匀性和批次之间的一致性。本发明选用的非食源性病原菌的埃希氏大肠杆菌作为信号载体,它属于革兰氏阴性菌,该菌还是常用的基因工程菌。相对比代表革兰氏阳性菌的乳酸杆菌,这种棒杆状的革兰氏阴性菌因细胞壁成分丰富,更适宜富集信号作为载体。

[0030] 信号载体溶液的制备:大肠杆菌在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在液体培养基中培养24h,用0.5%福尔马林(w/v)灭活24h,并用超纯水通过离心(5000rpm,10min)洗涤。之后,将细菌浓度调节至 10^8CFU/mL 。

[0031] 胶体金通常作为试纸条的标签,因为它呈现明亮的酒红色,具备稳定的化学性质和良好的生物相容性,而被广泛用于生物标签,所以本文选择纳米金作为信号物,具体的,信号物为柠檬酸三钠还原氯金酸得到的纳米金。纳米金(AuNPs)是根据先前报道的方法制备的,由柠檬酸钠还原氯金酸得到金纳米粒子,纳米金的粒径为15~20nm。

[0032] 信号物溶液的制备:在锥形烧瓶中,将100mL超纯水加热至沸点,向其中加入1mL的1%氯金酸。然后,在剧烈搅拌下,迅速加入4mL新制备的1%柠檬酸三钠。10min后,溶液的颜色趋向于稳定的酒红色,这表明形成了纳米金,再继续加热15min使其稳定并成熟。在室温自然冷却后,用超纯水将胶体金溶液调节至初始体积,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。应该注意的是,使用前,将玻璃器皿浸泡在王水中2h以上以清洗内壁,然后用超纯水洗涤3次以除去王水,并在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥,确保能合成纳米粒子。

[0033] 见图1,信号载体与信号物通过三种方法可制备得到Bacteria@Au信号聚集体,包括直接孵育细菌和纳米金的混合溶液(直接孵育,图中的a),纳米金在细菌表面生长(表面生长,图中的b)以及硫醇化的细菌与纳米金之间的特异性共价键(巯基偶联,图中的c)。通过这三种方法制备的信号聚集体的最终浓度为 10^8CFU/mL Au (表示每毫升纳米金溶液的细菌含量为 10^8CFU ,纳米金是0.01%HAuCl₄(w/v)的氯金酸还原得到的15~20nm纳米颗粒)。

[0034] 直接孵育:温和搅拌下,取1mL细菌溶液(10^9 CFU/mL)加入到pH调节过的胶体金溶液(10mL, pH=8.5~9.5)中,使得最终浓度为 10^8 CFU/mL Au,室温下连续搅拌30min,使其完全结合,然后置于4℃以备后用;

[0035] 表面生长:首先,将1mL浓度为 10^9 CFU/mL的细菌溶液与10mL的0.01%HAuCl₄溶液混合,并在室温下温育30min。此后,如前所述合成AuNPs的方法,能够自然生长在细菌表面。

[0036] 巯基偶联:巯基乙酸(1-10μL)的羧基通过1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)(3mg)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(3mg)溶解于5mLPBS中活化30min。然后将1mL细菌(10^9 CFU/mL)加入到5mL活化的巯基乙酸溶液中并再孵育30min。整个过程在通风橱中运行。通过在细菌表面上的蛋白质的氨基与巯基乙酸的羧基之间形成酰胺键。将硫醇化细菌用超纯水洗涤三次以除去有机溶剂和活化剂,然后以 10^8 CFU/mL Au的最终浓度重悬浮在信号物溶液中。

[0037] 本发明所用的针对盐酸克伦特罗的单克隆抗体是申请人课题组通过采用细胞融合技术筛选阳性细胞,诱导小鼠腹腔大量生产而得到的。参考Zhang Daohong等人在刊物《Analytical Chimica Acta》第635卷第63-69页题目为“Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure”一文中记载的方法制备得到的:将盐酸克伦特罗人工抗原即市售盐酸克伦特罗CL-牛血清白蛋白的偶联物(CL-BSA)免疫雌性Balb/c小鼠以诱导抗克伦特罗的抗血清产生,然后取小鼠的脾脏细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行细胞融合,间接ELISA和间接竞争ELISA筛选得到能够产生目的抗体的杂交瘤细胞,并进行单克隆化扩大培养。将得到的细胞注射到雌性Balb/c小鼠的腹腔中,该小鼠提前一周注射了0.5mL弗氏不完全佐剂。几天后,收集腹水,用辛酸-硫酸铵法纯化抗体并冻干。将一部分抗体以浓度为1mg/mL溶解在10mM磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4)中备用。

[0038] 生物探针的制备:将1μL盐酸克伦特罗抗体溶液(1mg/mL)加入到1mL调节过pH(pH=8.5~9.5)的信号聚集体溶液中,搅拌1h,使抗体与细菌表面上分布的AuNPs结合。然后,将最终浓度为1%的BSA加入混合物中,在4℃下再孵育2h以封闭AuNPs表面上的多余位点。最后,通过离心(10,000rpm, 30min)收集得到的产物以除去过量的BSA,然后用100μL含有2mM硼砂,0.1%PEG-20,000和0.02%NaN₃(均为w/v)的保存溶液重悬浮。得到的生物探针溶液在4℃保存,可以保持稳定性和生物活性备用。

[0039] 得到新型的生物探针,再制备出免疫层析试纸条。见图2,试纸条由五部分构成,依次将硝酸纤维素膜、结合垫、品垫和吸收垫贴至衬板上,其中硝酸纤维素膜上划线包被有克伦特罗-牛血清白蛋白偶联物(CL-BSA)和羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)分别做检测线(T)和控制线(C)。

[0040] 该试纸条的工作原理为:非蛋白质小分子化合物的免疫测定是基于竞争原理,即样品中的分析物与固定在检测线上的抗原竞争结合信号标记的抗体。测试区域的颜色强度取决于信号材料的积累。在检测过程中,随着样品中克伦特罗浓度的增加,可以被更多的探针捕获,使得更少的探针与检测线上抗原的结合,从而检测线逐渐褪色,直到完全消失。无论样品中克伦特罗浓度如何,过量的探针都会与控制线上的羊抗鼠免疫球蛋白结合,使得控制线总是显红色的。我们构建的新探针,满足了大量信号标记极其有限的抗体,因此在相同的信号材料显色效果下,新的探针需要更少的抗体,对于竞争性免疫测定,这是提高灵敏

度的关键。当检测到弱阳性样品时,普通的金标抗体探针没有被完全竞争,剩余的可以被检测线上的抗原结合,显示出红色呈阴性结果,表现为阴性测试结果。本发明的试纸条,较少抗体很容易被分析物充分结合,在检测线上没有信号显示,代表阳性结果。这表明新探针的灵敏度远远优于传统探针试纸条的灵敏度。

[0041] 实施例1:新探针Bacteria@Au-Ab的制备方法

[0042] 新探针Bacteria@Au-Ab的制备方法,包括以下步骤:

[0043] 1、探针原材料的制备

[0044] 大肠杆菌在37℃下在液体培养基中培养24h,用0.5%福尔马林(w/v)灭活24h,并用超纯水通过离心(5000rpm,10min)洗涤。之后,将细菌浓度调节至 10^8 CFU/mL。

[0045] 对于抗克伦特罗单克隆抗体(mAb)的产生,将盐酸克伦特罗人工抗原即市售盐酸克伦特罗CL-牛血清白蛋白的偶联物(CL-BSA)免疫雌性Balb/c小鼠以诱导抗克伦特罗的抗血清产生,然后取小鼠的脾脏细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行细胞融合,间接ELISA和间接竞争ELISA筛选得到能够产生目的抗体的杂交瘤细胞,并进行单克隆化扩大培养。将得到的细胞注射到雌性Balb/c小鼠的腹腔中,小鼠提前一周注射了0.5mL弗氏不完全佐剂。几天后,收集腹水,用辛酸-硫酸铵法纯化抗体并冻干。将一部分抗体以浓度为1mg/mL溶解在10mM磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4)中备用。

[0046] 纳米金(AuNPs)是根据先前报道的方法制备的,由柠檬酸钠还原氯金酸得到金纳米粒子。在锥形烧瓶中,将100mL超纯水加热至沸点,向其中加入1mL的1%氯金酸。然后,在剧烈搅拌下,迅速加入4mL新制备的1%柠檬酸三钠。10min后,溶液的颜色趋向于稳定的酒红色,这表明形成了纳米金,再继续加热15min使其稳定并成熟。在室温自然冷却后,用超纯水将胶体金溶液调节至初始体积,然后在4℃下保存备用。应该注意的是,使用前,将玻璃器皿浸泡在王水中2h以上以清洗内壁,然后用超纯水洗涤3次以除去王水,并在60℃下干燥,确保能合成纳米粒子。

[0047] 2、细菌偶联纳米金复合物的制备

[0048] 见图1,信号载体与信号物通过三种方法可制备得到Bacteria@Au信号聚集体,包括直接孵育细菌和纳米金的混合溶液(直接孵育,图中的a),纳米金在细菌表面生长(表面生长,图中的b)以及硫醇化的细菌与纳米金之间的特异性共价键(巯基偶联,图中的c)。通过这三种方法制备的信号聚集体的最终浓度为 10^8 CFU/mL Au(表示每毫升纳米金溶液的细菌含量为 10^8 CFU,纳米金是0.01%HAuCl₄(w/v)的氯金酸还原得到的15-20nm纳米颗粒)。直接孵育:温和搅拌下,取1mL细菌溶液(10^9 CFU/mL)加入到pH调节过的胶体金溶液(10mL, pH8.5-9.5)中,使得最终浓度为 10^8 CFU/mL Au,室温下连续搅拌30min,使其完全结合,然后置于4℃以备后用;

[0049] 表面生长:首先,将1mL浓度为 10^9 CFU/mL的细菌溶液与10mL的0.01%HAuCl₄溶液混合,并在室温下温育30min。此后,如前所述合成AuNPs的方法,能够自然生长在细菌表面。

[0050] 巯基偶联:巯基乙酸(1-10μL)的羧基通过1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)(3mg)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(3mg)溶解于5mLPBS中活化30min。然后将1mL细菌(10^9 CFU/mL)加入到5mL活化的巯基乙酸溶液中并再孵育30min。整个过程在通风橱中运行。通过在细菌表面上的蛋白质的氨基与巯基乙酸的羧基之间形成酰胺键。将硫醇化细菌用超纯水洗涤三次以除去有机溶剂和活化剂,然后以 10^8 CFU/mL Au的最终浓度重悬浮在信

号物溶液中。

[0051] 3、信号团偶联抗体

[0052] 将1 μ L盐酸克伦特罗抗体溶液(1mg/mL)加入到1mL调节过pH(pH8.5–9.5)的信号聚集体溶液中,搅拌1h,使抗体与细菌表面上分布的AuNPs结合。然后,将最终浓度为1%的BSA加入混合物中,在4 $^{\circ}$ C下再孵育2h以封闭AuNPs表面上的多余位点。最后,通过离心(10,000rpm,30min)收集得到的产物以除去过量的BSA,然后用100 μ L含有2mM硼砂,0.1%PEG-20,000和0.02%NaN₃(均为w/v)的保存溶液重悬浮。得到的生物探针溶液在4 $^{\circ}$ C保存,可以保持稳定性和生物活性备用。

[0053] 下述实施例2–4使用的检测盐酸克伦特罗的探针为实施例1制备得到的。

[0054] 实施例2:快速检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸条的制备

[0055] 快速检测盐酸克伦特罗的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0056] 免疫层析试纸条传感器由五部分组成,包括基板,硝化纤维(NC)膜,结合垫,样品垫和吸收垫。首先,将由玻璃纤维制成的结合垫和样品垫浸泡在含有2%BSA,1%蔗糖和0.02%NaN₃的PBS中,以封闭微孔,并在37 $^{\circ}$ C下干燥过夜。接下来,将探针溶液以8 μ L/cm的速率喷到结合垫上,并用真空冷冻干燥机干燥以防止抗体失活。然后将0.5mg/mL抗原(CL-BSA)和0.5mg/mL羊抗鼠免疫球蛋白分别以0.8 μ L/cm的划线速率涂覆在NC膜上作为检测(T)线和控制(C)线。这些参数是基于优化结果获得的。最后,将NC膜,结合垫,样品垫和吸收垫依次连接到基板上,重叠1–2mm。然后将组装的条板切成试纸,然后在干燥器中室温条件下储存直至使用。见图2。

[0057] 实施例3:快速检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸条的性能评价

[0058] 如上所述的快速检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸条的性能评价,

[0059] 将克伦特罗标准品溶于10mM PBS(pH7.4)中,连续稀释使浓度为20至0.05ng/mL范围不同浓度的测试溶液,PBS为空白对照。将测试条的样品垫浸入100 μ L测试溶液中,免疫层析之后,在15min内观察可视结果。对于灵敏度评估,这些标准溶液分别通过普通试纸条和新开发的试纸条检测。当通过肉眼观察到T线明显比阴性对照条浅时,相应的最小克伦特罗浓度定义为视觉检测限(VDL),当T线完全消失时,考虑相应的最小浓度作为阈值浓度。特异性用克伦特罗类似物的交叉反应性评价,包括浓度为10,20和50ng/mL的莱克多巴胺和沙丁胺醇。

[0060] 检测结果:见图3,传统试纸条(a)和新开发的试纸条(b)的检测结果,VDL分别为2ng/mL和0.1ng/mL,表明灵敏度提高了20倍。使T线完全消失的阈值浓度分别为8ng/mL和2ng/mL。因此,新开发的试纸条不仅具有较高的灵敏度,而且具有更广泛的检测范围。对于特异性评估,同时检测不同浓度水平的盐酸克伦特罗,莱克多巴胺和沙丁胺醇。如图3c所示,开发的试纸条不与其它结构类似物交叉反应,表现出对克伦特罗良好的特异性反应。

[0061] 实施例4:快速检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸条的应用

[0062] 如上所述的快速检测盐酸克伦特罗的免疫层析试纸条的应用,

[0063] 饲料、牛奶和猪尿作为实际样品。通过HPLC鉴定的这三种阴性样品分别加入盐酸克伦特罗,以达到50至0.05ng/mL(或ng/g)的连续浓度。充分混合后,加标样品在4 $^{\circ}$ C保持过夜。然后根据以前报道的方法,将5g研磨过的饲料超声溶解于10mLPBS中以提取盐酸克伦特罗。10,000rpm离心5min后,分析收集的上清液。对于牛奶样品,取5mL加入到20mLPBS中,并

充分混合以进行测试。添加的猪尿直接用作测试溶液,无需任何处理。以PBS为空白对照,将测试条的样品垫浸入100 μ L测试溶液中,经毛细作用,样品流过试纸条,在15min内可以得到可视化结果。

[0064] 检测结果:见图4,饲料、牛奶和猪尿检测溶液中开发条的VDL分别为0.2ng/g, 0.5ng/mL和0.1ng/mL。三种实际样品的检测灵敏度结果经换算后与标准盐酸克仑特罗溶液一致,说明样品基质对试纸条试验的分析能力没有影响或影响不大。因此,由于优异的灵敏度,特异性和适用性,开发的ICA可以很好地满足在实际样品中快速筛选克仑特罗的需要。

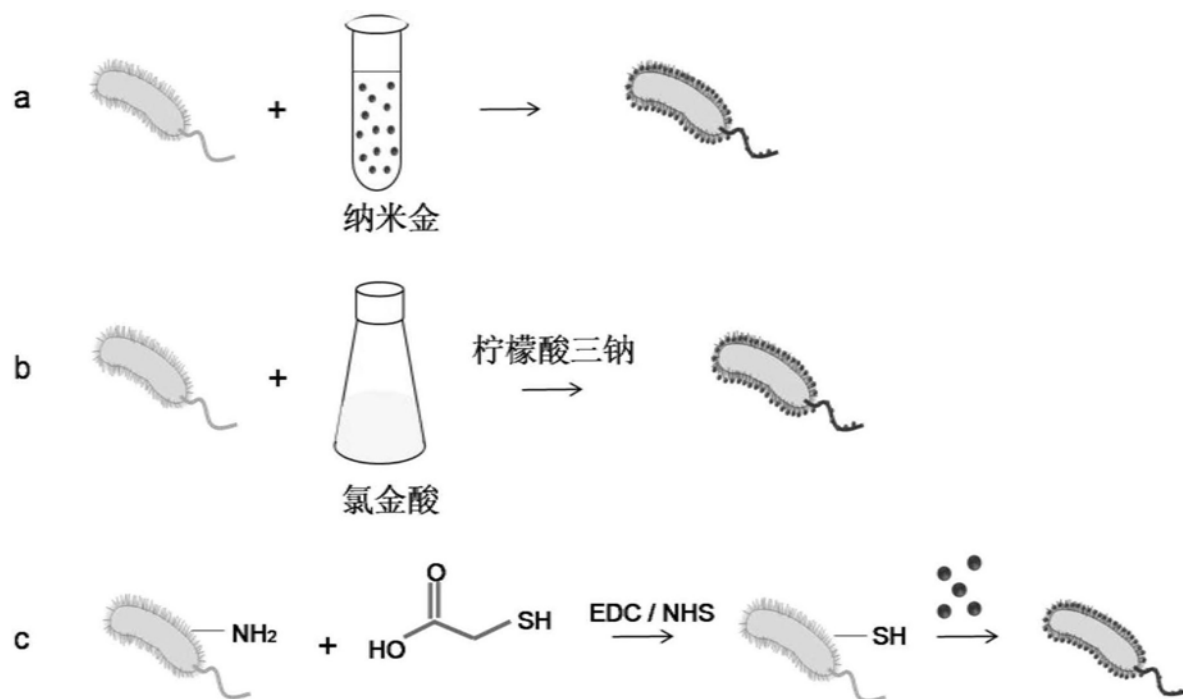


图1

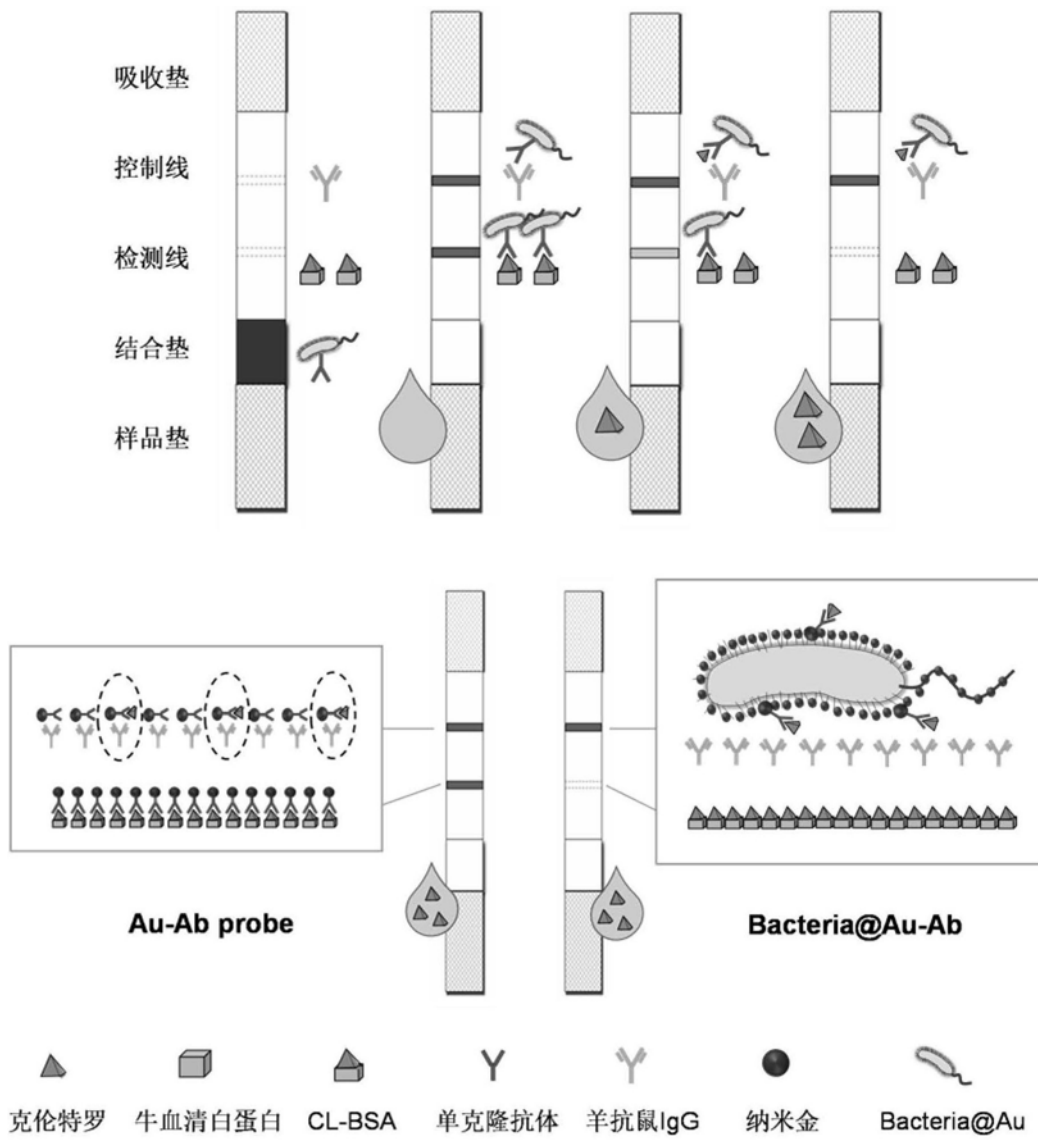


图2

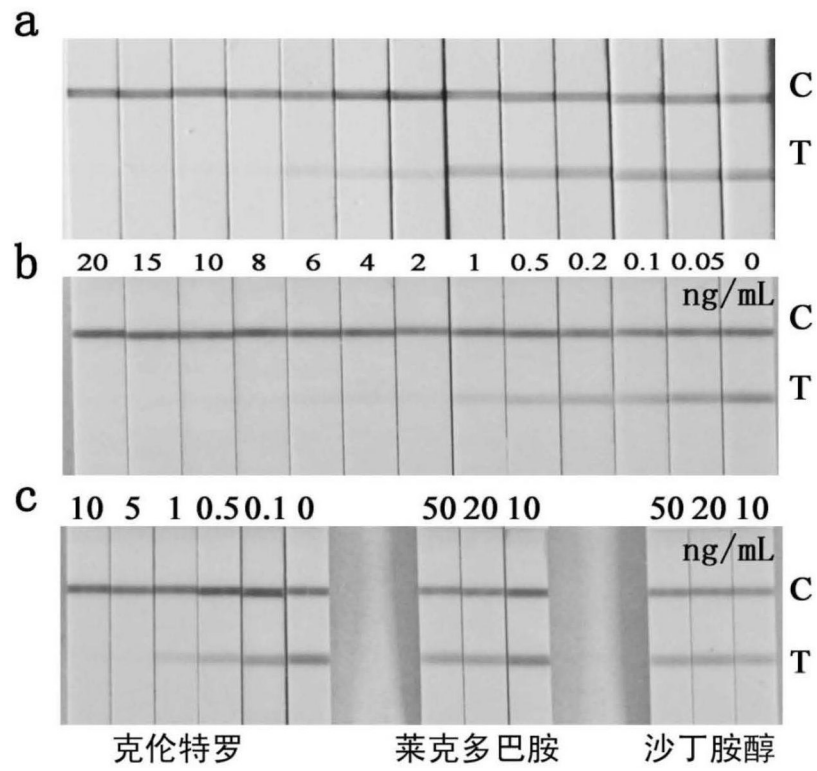


图3

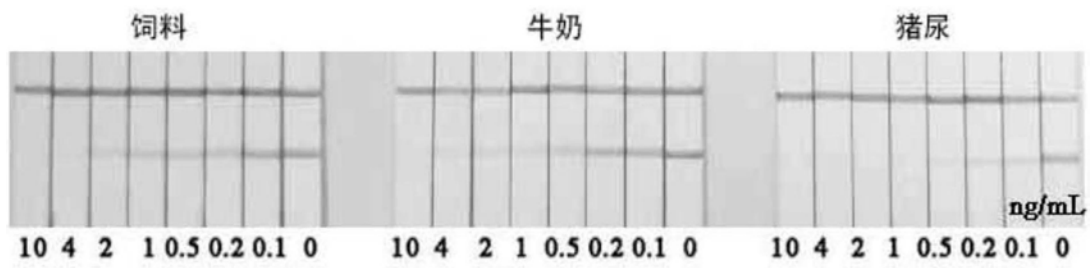


图4

专利名称(译)	一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条及应用		
公开(公告)号	CN107478850A	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN2017110553195.6	申请日	2017-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学		
申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	西北农林科技大学		
[标]发明人	张道宏 黄琼 王建龙 补彤 闫灵芝 赵兵欣 窦磊娜 赵东阳		
发明人	张道宏 黄琼 王建龙 补彤 闫灵芝 赵兵欣 窦磊娜 赵东阳		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/74		
代理人(译)	孙雅静		
其他公开文献	CN107478850B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种生物探针、检测盐酸克伦特罗的试纸条及应用，通过构建一种细菌作为信号载体的新型探针，可以实现丰富的纳米金(AuNPs)标记极其有限的抗体(Ab)，这是提高竞争性免疫检测灵敏度的关键所在。本发明构建的免疫层析试纸条对克伦特罗的视觉检测限(VDL)为0.1 ng/mL，比传统试纸条提高了20倍的灵敏度。得益于表面丰富的活性位点和独特的生物相容性，细菌将成为信号富集的有前景的载体，这项工作作为免疫层析测定的信号放大和性能改进开辟了新的途径，有利于进一步扩展免疫传感器的应用。

