



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646381 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201810675916.5

(22)申请日 2018.06.27

(71)申请人 北京中龙益诚科技有限公司

地址 100166 北京市丰台区五里店北里一
区4号楼3A10

(72)发明人 苏晖 翟俊辉 闫安 张腾

(51)Int.Cl.

G01N 21/552(2014.01)

G01N 33/53(2006.01)

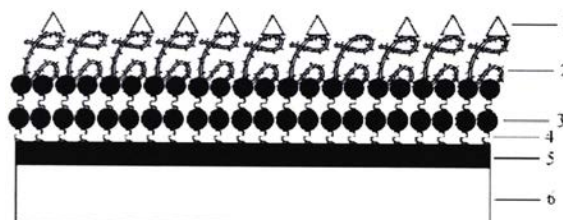
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种检测猪尿中 β 2受体兴奋剂的表面等离子体共振免疫方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用表面等离子体共振(SPR)免疫方法检测猪尿中 β 2受体兴奋剂,包括苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗,其技术特点在于将牛血清白蛋白(BSA)偶联的相应半抗原包被到纳米金传感芯片表面,根据免疫原理,通过竞争抑制法结合SPR技术实现对猪尿中两种 β 2受体兴奋剂的定量检测。该方法具有高灵敏度,高准确性的特点,可以实现免标记,实时动态检测。为猪尿中 β 2受体兴奋剂的检测提供了新方法。



1. 一种利用表面等离子共振免疫方法定量检测猪尿中的 $\beta 2$ 受体兴奋剂,包括苯乙醇胺A和盐酸克伦特罗,其特征包括以下步骤:

S1、芯片的包被:在2片纳米金生物芯片上分别滴加1mg/mL~2mg/mL的苯乙醇胺A-BSA溶液,1mg/mL~2mg/mL盐酸克伦特罗-BSA溶液,37℃孵育1h,用去离子水冲洗,氮气吹干;滴加脱脂奶粉进行封闭,37℃孵育1h,用去离子水冲洗,氮气吹干,制备成苯乙醇胺A检测芯片、盐酸克伦特罗检测芯片,备用;

S2、样品前处理方法:取空白猪尿在室温、5000×g条件下离心10min,取上清液;

S3、标准品溶液的配制:分别准确称取苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗,先用终体积10%的乙醇溶解样品,再加0.01M终体积90%的PBS溶解配制成1mg/mL的标准储备液,由1mg/mL的标准储备液加0.01M PBS逐级稀释得到不同梯度标准溶液;

S4、表面等离子共振方法检测;

(1) 苯乙醇胺A的检测:将2.0ng/mL,25ng/mL,50ng/mL,100ng/mL的苯乙醇胺A的标准溶液与等体积的抗体溶液混合,37℃孵育0.5h,备用,使苯乙醇胺A的终浓度为1.0ng/mL,12.5ng/mL,25ng/mL,50ng/mL。将包被好的芯片装入SPR生化分析仪流通槽,通入0.01M PBS作为仪器运行缓冲液,将苯乙醇胺A的标准溶液与抗体的混合液通入流通池中进行竞争免疫结合反应,记录仪器的响应值(RU),将标准品样品浓度与所对应的仪器响应值(RU)做标准曲线,获得浓度与RU的线性方程。

(2) 盐酸克伦特罗的检测:将0ng/mL,0.64ng/mL,1.3ng/mL,2.5ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL的盐酸克伦特罗的标准溶液与等体积的抗体溶液混合,37℃孵育0.5h,备用,使盐酸克伦特罗的终浓度为0ng/mL,0.32ng/mL,0.63ng/mL,1.25ng/mL,2.5ng/mL,5ng/mL,10ng/mL。将包被好的芯片装入SPR生化分析仪流通槽,通入0.01M PBS作为仪器运行缓冲液,将盐酸克伦特罗标准溶液与抗体的混合液通入流通池中进行竞争免疫结合反应,记录仪器的响应值(RU),将标准品样品浓度与所对应的仪器响应值(RU)做标准曲线,获得浓度与RU的线性方程。

S5、再生:用再生液洗脱芯片表面结合的抗体,实现芯片再生,用0.01M PBS冲洗至基线稳定,进行下一次测定

S6、定量检测猪尿中的 $\beta 2$ 受体兴奋剂:

分别将一定量苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗添加到猪尿中,按照步骤S2的方法进行样品前处理,按照步骤S4的方法对实际样品进行检测,记录仪器响应值(RU),通过步骤S4所得到的线性方程,换算出猪尿样品中的实际浓度,实现对猪尿中的 $\beta 2$ 受体兴奋剂的定量检测。

2. 根据权利要求1所述的一种定量检测猪尿中 $\beta 2$ 受体兴奋剂,包括苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:步骤S1中苯乙醇胺A-BSA溶液,盐酸克伦特罗-BSA溶液的体积都为40 μ L,苯乙醇胺A-BSA浓度为1mg/mL,盐酸克伦特罗-BSA的浓度为2mg/mL,脱脂奶粉的体积为100 μ L,质量浓度(M/V)为4%。

3. 根据权利要求1所述的一种定量检测猪尿中的 $\beta 2$ 受体兴奋剂的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:步骤S4中表面等离子共振生化分析仪为本公司自主研发,型号为YC-SPR-A1, $\beta 2$ 受体兴奋剂标准溶液分别与相应的等体积抗体溶液混合后,苯乙醇胺A的终浓度为1.0ng/mL,12.5ng/mL,25ng/mL,50ng/mL,盐酸克伦特罗的终浓度为0ng/mL,0.32ng/mL,0.63ng/mL,1.25ng/mL,2.5ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,苯乙醇胺A抗体浓度为15 μ g/mL,盐酸克

伦特罗的抗体浓度为30 μ g/mL,进样体积都为200 μ L,进样时间都为10min。

4.根据权利要求1所述的一种定量检测猪尿中的两种 β 2受体兴奋剂的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:步骤S5中再生液为0.1M的氢氧化钠溶液,进样体积为100 μ L,进样时间为15s,0.01M PBS冲洗时间为1min,冲洗流速为400 μ L/min。

5.根据权利要求1所述的一种定量检测猪尿中的两种 β 2受体兴奋剂的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:步骤S6中添加到猪尿样品中的苯乙醇胺A的终浓度为5ng/mL,10ng/mL,20ng/mL,盐酸克伦特罗的终浓度都为为1ng/mL,2ng/mL,5ng/mL。

一种检测猪尿中 $\beta 2$ 受体兴奋剂的表面等离子体共振免疫方法

技术领域

[0001] 本发明涉及光学传感器和免疫分析技术领域,具体是一种在检测猪尿中有害物的表面等离子体共振的方法,用于苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗的定量检测。

背景技术

[0002] 表面等离子体共振 (SPR) 是一种物理光学现象,20世纪90年代后发展成为一种研究生物分子相互作用的新技术。该技术原理是在传感芯片表面固定一层生物分子,当待测样品流过芯片表面时,样品中与芯片表面生物分子相互作用的分子结合在一起而引起金属膜表面折射率或厚度的变化,最终表现为SPR 共振角度的变化,据此可以获得目标分析物的浓度、亲和力、动力学常数和特异性等信息。

[0003] 苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗都是 $\beta 2$ 受体兴奋剂,若用于养殖业可对食品安全、人和动物的健康,乃至生态环境造成一定威胁,许多国家和组织都禁止在养殖业使用 $\beta 2$ 受体兴奋剂,目前我国也禁止使用所有的 $\beta 2$ 受体兴奋剂。因此,快速准确定量检测猪尿中的 $\beta 2$ 兴奋剂对食品安全有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种操作简便、准确度和灵敏度高、可重复的表面等离子体共振免疫方法,以用于检测猪尿中的 $\beta 2$ 受体兴奋剂。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] S1、芯片的包被:在2片纳米金生物芯片上分别滴加1mg/mL~2mg/mL的苯乙醇胺A-BSA溶液,1mg/mL~2mg/mL盐酸克伦特罗-BSA溶液溶液,37℃孵育1h,用去离子水冲洗,氮气吹干;滴加脱脂奶粉进行封闭,37℃孵育1h,用去离子水冲洗,氮气吹干,制备成苯乙醇胺A检测芯片和盐酸克伦特罗检测芯片,备用;

[0007] S2、样品前处理方法:取空白猪尿在室温、5000×g条件下离心10min,取上清液;

[0008] S3、标准溶液的配制:分别准确称取苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗,先用乙腈(终体积10%)溶解样品,再加0.01M PBS(终体积90%)溶解配制成1mg/mL 的标准储备液。由1mg/mL 的标准储备液加0.01M PBS逐级稀释得到不同梯度标准溶液;

[0009] S4、表面等离子共振方法检测:

[0010] 苯乙醇胺A的检测:将S1中包被好的苯乙醇胺A芯片装入SPR生化分析仪流通槽,通入0.01M PBS作为仪器运行缓冲液,将S3中浓度分别为2.0ng/mL, 25ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL的苯乙醇胺A与等体积的相对应抗体溶液混合, 37℃孵育0.5h,使苯乙醇胺A的终浓度为1.0ng/mL,12.5ng/mL,25ng/mL, 50ng/mL。将苯乙醇胺A和相应抗体的混合液通入流通池中进行竞争免疫结合反应,记录仪器的响应值(RU),将标准品样品浓度与所对应的仪器响应值(RU) 做标准曲线,获得浓度与RU的线性方程。

[0011] 盐酸克伦特罗的检测:将S1中包被好的盐酸克伦特罗芯片装入SPR生化分析仪流通槽,通入0.01M PBS作为仪器运行缓冲液,将S3中浓度分别为 0ng/mL,0.64ng/mL,1.3ng/

mL, 2.5ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 20ng/mL的盐酸克伦特罗与等体积的相对应抗体溶液混合, 37℃孵育0.5h, 使盐酸克伦特罗的终浓度为0ng/mL, 0.32ng/mL, 0.63ng/mL, 1.25ng/mL, 2.5ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL。将盐酸克伦特罗和相应抗体的混合液通入流通池中进行竞争免疫结合反应, 记录仪器的响应值(RU), 将标准品样品浓度与所对应的仪器响应值(RU) 做标准曲线, 获得浓度与RU的线性方程。

[0012] S5再生: 用再生液洗脱芯片表面结合的抗体, 实现芯片再生, 用0.01M PBS 冲洗至基线稳定, 进行下一次测定;

[0013] S6定量分析检测猪尿样品中的 β 2受体兴奋剂: 分别将一定量苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗添加到空白猪尿中, 按照S2的方法进行样品前处理, 按照S4的方法对实际样品进行检测, 记录仪器响应值(RU), 通过S4所得到的线性方程, 换算出猪尿样品中的实际浓度, 实现对猪尿中的两种 β 2受体兴奋剂的定量检测。

[0014] 步骤S1中的纳米金生物芯片为本公司的发明专利(专利号: ZL20141069155.9), 苯乙醇胺A-BSA溶液, 盐酸克伦特罗-BSA溶液的体积都为40 μ L, 苯乙醇胺A-BSA溶液浓度为1mg/mL, 盐酸克伦特罗-BSA浓度为 2mg/mL, 脱脂奶粉的体积为100 μ L, 质量浓度(M/V) 为4%。

[0015] 步骤S3标准品先用乙腈助溶, 再用0.01M PBS定容。

[0016] 步骤S4所用的表面等离子共振生化分析仪为本公司自主研发, 型号为 YC-SPR-A1, 不同浓度梯度的标准溶液与等体积的抗体溶液混合后, 苯乙醇胺A其终浓度为1.0ng/mL, 12.5ng/mL, 25ng/mL, 50ng/mL, 盐酸克伦特罗的终浓度为0ng/mL, 0.32ng/mL, 0.63ng/mL, 1.25ng/mL, 2.5ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 苯乙醇胺A抗体浓度都为15 μ g/mL, 盐酸克伦特罗的抗体浓度为30 μ g/mL, 进样体积为200 μ L, 进样时间为10min。

[0017] 步骤S5再生液为0.1M的氢氧化钠溶液, 进样体积为100 μ L, 进样时间为 15s, 0.01M PBS冲洗时间为1min, 冲洗流速为400 μ L/min。

[0018] 步骤S5中添加到猪尿样品中的苯乙醇胺A的终浓度为5ng/mL, 10ng/mL, 20ng/mL, 盐酸克伦特罗的终浓度都为1ng/mL, 2ng/mL, 5ng/mL。

[0019] 本发明的方法可以定量检测猪尿中的两种 β 2受体兴奋剂, 具有高灵敏性和准确性, 实验操作简便, 检测抗体和抗原免于标记, 可以实现样品的实时动态检测, 并且该方法的芯片可再生性能好, 可重复利用。为猪尿中的 β 2受体兴奋剂的检测提供了一种快速, 简便且灵敏度高的检测方法。

附图说明

[0020] 图1是生物传感芯片的结构示意图;

[0021] 图2是检测苯乙醇胺A的标准曲线图;

[0022] 图3是检测盐酸克伦特罗的标准曲线图;

[0023] 图1中: 1-有害物抗原、2-脱脂奶粉、3-纳米金、4-L-半胱氨酸、5-金膜、6-玻璃基质;

具体实施方式

[0024] 下面将结合本发明实施例, 对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,

显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0025] 本发明检测猪尿中的苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗的操作方法,具体步骤如下:

[0026] (1) 芯片包被过程:

[0027] 在2片纳米金生物芯片上分别滴加40 μ L,浓度为2.0mg/mL的盐酸克伦特罗-BSA溶液浓度为2.0mg/mL的,苯乙醇胺A-BSA溶液浓度为1mg/mL,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用去离子水冲洗,氮气吹干;滴加100 μ L,质量浓度(M/V)为4%的脱脂奶粉溶液进行封闭,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用去离子水冲洗,氮气吹干,备用。

[0028] (2) 样品前处理:

[0029] 取空白猪尿在室温、5000 $\times$ g条件下离心10min,取上清液。

[0030] (3) 仪器检测方法

[0031] 以苯乙醇胺A的检测为例:

[0032] 1) 将包被好的生物传感芯片插入SPR生化分析仪检测通道;

[0033] 用0.01M PBS配制一系列不同浓度的苯乙醇胺A标准品溶液,然后与15 μ g/mL的抗体溶液等体积(1:1,V/V)混合,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h,混合溶液中苯乙醇胺A最终质量浓度为(1.0ng/mL,12.5ng/mL,25ng/mL,50ng/mL);进样体积 200 μ L,进样流速20 μ L/min,进样时间为10min,记录仪器响应值(RU),以响应值(RU)为横坐标,以苯乙醇胺A的浓度为纵坐标绘制标准曲线。

[0034] 往SPR生化分析仪检测通道通入0.1M氢氧化钠溶液,进样体积为100 μ L,进样时间为15s,0.01M PBS冲洗时间为1min,冲洗流速为400 μ L/min。

[0035] (4) 定量检测实际样品中的苯乙醇胺A:

[0036] 将苯乙醇胺A添加到猪尿样品中,进行样品前处理,使添加的苯乙醇胺A 的终浓度为5ng/mL,10g/mL,20ng/mL,跟抗体混合孵育后,跟标准样品一样的进样参数进行进样,记录仪器响应值(RU),通过标准曲线方程,换算出猪尿样品中的实际浓度,计算回收率。

[0037] 盐酸克伦特罗的检测方法与苯乙醇胺A相似,盐酸克伦特罗添加抗体的浓度为30 μ g/mL,其的标准品终浓度为0ng/mL,0.32ng/mL,0.63ng/mL,1.25ng/mL, 2.5ng/mL,5ng/mL,10ng/mL,添加到猪尿样品中的盐酸克伦特罗的终浓度为 1ng/mL,2ng/mL,5ng/mL。。

[0038] (5) 实验结果

[0039] 1) 本发明方法得到苯乙醇胺A性方程为 $y = -2.754x + 77.86$,拟合曲线的相关系数 R^2 为0.976,LOD(Limit of detection)值为1.6ng/mL,线性检测范围为1~50ng/mL。

[0040] 表1表示猪尿中苯乙醇胺A三个添加浓度的回收率结果

[0041]

加标浓度 (ng/mL)	平均测定值浓度 (ng/mL)	回收率	批内变异系数 (%)
5	5.11	102.2%	1.4
10	9.59	95.9%%	0.3
20	18.42	92.1%	1.6

[0042] 2) 本发明方法得到盐酸克伦特罗的拟合方程为 $y=0.23x^2-10.03x+81.89$, 拟合曲线的相关系数 R^2 为0.999, LOD (Limit of detection) 值为1.03ng/mL, 通过拟合方程可以得出IC50为4.84ng/mL, 线性检测范围为1.68~8.09ng/mL。

[0043] 表2表示猪尿中盐酸克伦特罗三个添加浓度的回收率结果

[0044]

添加量 / (ng/mL)	平均测定值 / (μg/kg)	回收率 /%	变异系数 (%)	
			批内	批间
1	1.07±0.04	107.00	3.96	8.63
2	2.03±0.03	101.50	3.13	6.04
5	4.91±0.03	98.20	2.49	4.45

[0045] 本发明方法可以定量检测猪尿中两种β2受体兴奋剂, 能够实时监测反应过程, 具有高灵敏度准确度。本方法反应时间短, 无毒无污染, 便于推广且芯片再生性能好, 可多次重复使用, 保存时间长; 在定量检测中具有准确度高, 实时监测等优势。表面等离子体共振免疫法为检测猪尿中的β2受体兴奋剂提供了一种快速, 简便的方法。

[0046] 对于本领域技术人员而言, 显然本发明不限于上述示范性实施例的细节, 而且在本发明的精神或基本特征的情况下, 能够以其他的具体形式实现本发明。因此, 无论从哪一点来看, 均应将实施例看作是示范性的, 而且是非限制性的, 本发明范围由所附权利要求而不是上述说明限定, 因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0047] 此外, 应当理解, 虽然本发明按照实施方式加以描述, 但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案, 说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见, 本领域技术人员应当将说明书作为一个整体, 各实施例中的技术方案也可以经适当组合, 形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

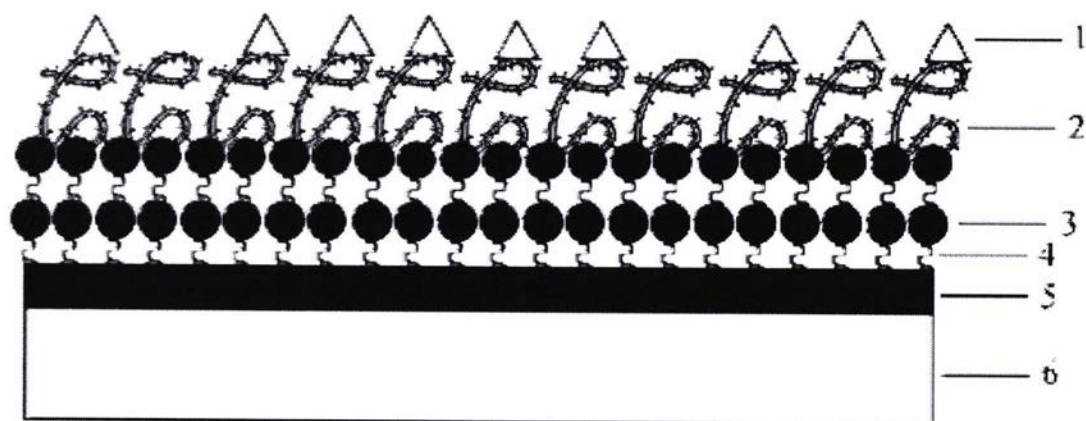


图1

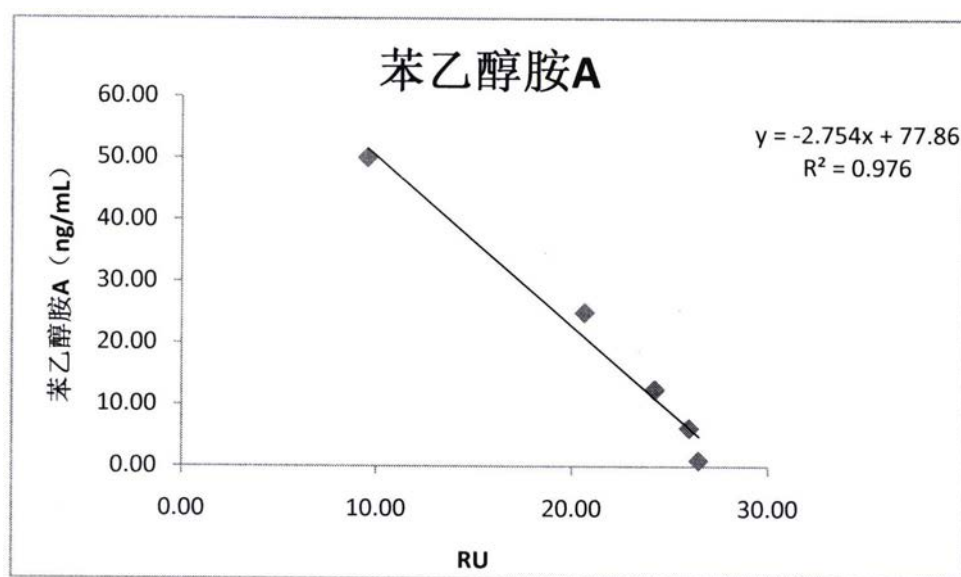


图2

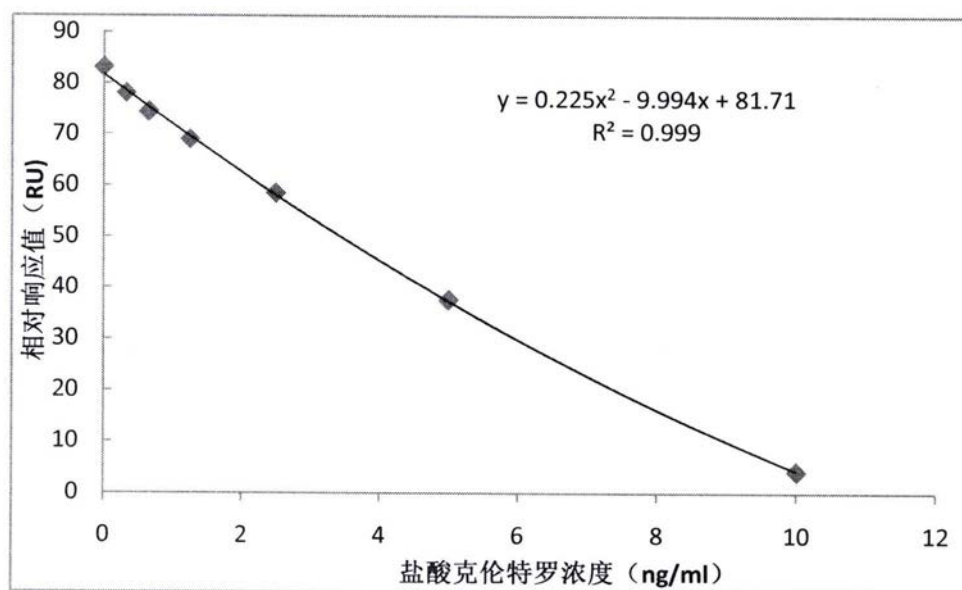


图3

专利名称(译)	一种检测猪尿中 $\beta 2$ 受体兴奋剂的表面等离子体共振免疫方法		
公开(公告)号	CN110646381A	公开(公告)日	2020-01-03
申请号	CN201810675916.5	申请日	2018-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京中龙益诚科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京中龙益诚科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中龙益诚科技有限公司		
[标]发明人	苏晖 翟俊辉 闫安 张腾		
发明人	苏晖 翟俊辉 闫安 张腾		
IPC分类号	G01N21/552 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/553 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用表面等离子体共振(SPR)免疫方法检测猪尿中 $\beta 2$ 受体兴奋剂，包括苯乙醇胺A、盐酸克伦特罗，其技术特点在于将牛血清白蛋白(BSA)偶联的相应半抗原包被到纳米金传感芯片表面，根据免疫原理，通过竞争抑制法结合SPR技术实现对猪尿中两种 $\beta 2$ 受体兴奋剂的定量检测。该方法具有高灵敏度，高准确性的特点，可以实现免标记，实时动态检测。为猪尿中 $\beta 2$ 受体兴奋剂的检测提供了新方法。

