



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110873791 A

(43)申请公布日 2020.03.10

(21)申请号 201810995627.3

(22)申请日 2018.08.29

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号  
中国农业大学西校区

(72)发明人 江海洋 沈建忠 郑丕苗 吴聪明  
丁双阳 王战辉 柯跃斌 温凯  
曾于洋 梁德媚

(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 陈晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析试纸条及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析试纸条及其应用。所述试纸条包括铺有荧光的PVC塑料背板、PVC底板、硝酸纤维素膜、样品垫和吸水纸五部分。本发明还公开了双标记胶体金探针，所述双标记胶体金探针是由金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体和金纳米颗粒标记的链霉亲和素组成，利用生物素-链霉亲和素分子之间超强的亲和力实现信号放大。本发明的荧光胶体金免疫层析试纸条在检测前利用免疫磁性微球对样本进行前处理，在外加磁场中可高效快速分离富集目标物。本发明试纸条稳定性好，灵敏度高，不受基质干扰，能够实现对样本的快速定性或定量检测，且操作步骤简便、可控性强，具有良好的应用前景。

1. 一种试剂盒,其包括试纸条和双标记胶体金探针;

所述双标记胶体金探针由金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体和金纳米颗粒标记的链霉亲和素组成;

所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线和质控线的包被膜,以及吸水垫组成;所述包被膜与所述基底层之间设有荧光背板;

所述检测线和所述质控线相互分离;

所述检测线处包被有目标物抗原;所述抗目标物的抗体能够特异性结合所述目标物抗原;

所述质控线处包被有抗所述抗目标物的抗体的抗体;

所述检测线位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端;

所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

所述金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体中,所述金纳米颗粒与生物素化的抗目标物的抗体的质量比为(300~1000):1;

或,所述金纳米颗粒标记的链霉亲和素中,所述金纳米颗粒与链霉亲和素的质量比为(50~500):1;

或,所述抗目标物的抗体为抗目标物的单克隆抗体或多克隆抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:

所述抗目标物的抗体为抗目标物的单克隆抗体;

或,所述抗所述抗目标物的抗体的抗体为羊抗鼠IgG;

或,所述金纳米颗粒的粒径为30nm;

或,所述基底层的材料为聚氯乙烯;

或,所述荧光背板为表面喷涂有荧光的PVC塑料板;

或,所述样品垫为玻璃纤维素膜;

或,所述包被膜为硝酸纤维素膜;

或,所述检测线与所述质控线之间的距离为3mm。

4. 权利要求1-3任一所述的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:分别制备权利要求1-3任一所述的试剂盒中的试纸条和双标记胶体金探针;

制备所述试纸条的方法包括如下步骤:

I、分别制备所述样品垫、所述设有检测线和质控线的包被膜,以及所述吸水垫;

II、在所述基底层的中部覆盖所述荧光背板,然后将步骤I得到的设有检测线和质控线的包被膜覆盖在所述荧光背板上,再将步骤I得到的所述样品垫和步骤I得到的所述吸水垫分别搭接于所述包被膜的两端,得到所述试纸条;

所述设有检测线和质控线的包被膜按照如下方法制备:将权利要求1-3中所述的目标物抗原和权利要求1-3中所述的羊抗鼠IgG分别喷涂在所述包被膜的检测线区域和质控线区域,形成所述检测线和所述质控线,得到所述设有检测线和质控线的包被膜;

制备所述双标记胶体金探针的方法为权利要求1-3中所述的金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体和金纳米颗粒标记的链霉亲和素的制备方法。

5. 权利要求1-3任一所述的试剂盒或权利要求4所述的制备方法在检测目标物中的应

用；

或，权利要求1-3任一所述的试剂盒或权利要求4所述的制备方法在检测待测样本中是否含有目标物中的应用；

或，权利要求1-3任一所述的试剂盒或权利要求4所述的制备方法在检测待测样本中目标物含量中的应用。

6. 一种检测待测样本中是否含有目标物的方法，包括如下步骤：

(c1) 将待测样本用免疫磁性微球进行富集，得到富集后的样本；

(c2) 向富集后的样本中加入权利要求1-3中任一所述的双标记胶体金探针，得到混合溶液；

(c3) 将所述混合溶液孵育3min，然后加入权利要求1-3中任一所述的试纸条的样品垫上，层析10min后，观察检测线和质控线的显色情况；

若C线和T线均显红色，则所述待测样本中不含有目标物或候选不含有目标物；

若C线显红色，T线不显色，则所述待测样本中含有目标物或候选含有目标物。

7. 一种检测待测样本中目标物含量的方法，包括如下步骤：

(d1) 绘制标准曲线

配制系列浓度的目标物标准品溶液，将所得的若干份含有不同浓度的标准品溶液分别用免疫磁性微球进行富集，得到富集后的样本；将所述富集后的样本分别与权利要求1-3中任一所述的双标记胶体金探针混匀，得到混合溶液；将所述混合溶液孵育3min，然后加入权利要求1-3中任一所述的试纸条的样品垫上，层析10min后，使用荧光读取仪测定空白背板的荧光强度和T线的荧光强度；以所述目标物的标准品溶液的浓度为横坐标，以所述空白背板的荧光强度和所述T线的荧光强度的比值为纵坐标绘制标准曲线图，得到标准曲线方程；

(d2) 待测样本检测

将待测样本用免疫磁性微球进行富集，得到富集后的样本；将所述富集后的样本分别与权利要求1-3中任一所述的双标记胶体金探针混匀，得到混合溶液；将所述混合溶液孵育3min，然后加入权利要求1-3中任一所述的试纸条的样品垫上，层析10min后，使用荧光读取仪测定空白背板的荧光强度和T线的荧光强度，得到空白背板的荧光强度和T线的荧光强度的比值并代入步骤d1) 所得标准曲线方程，计算得到所述待测样本中的目标物含量。

8. 根据权利要求6或7所述的方法，其特征在于：所述免疫磁性微球的制备方法包括如下步骤：

(1) 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球悬浮液与壳聚糖悬浮液混匀，依次经过干燥和高温煅烧，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球；

(2) 将所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球与抗目标物的抗体偶联，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球偶联抗体，即为所述免疫磁性微球；

(a1) 将含有目标物的待测样本加入含有所述免疫磁性微球的离心管中进行吸附反应；

(a2) 将步骤(a1)得到的离心管在磁场作用下进行磁分离，弃去反应液并加入洗涤液进行洗涤；

(a3) 向步骤(a2)得到的离心管中加入样本稀释液，加热，在磁场作用下进行磁分离，收集上清液，实现目标物的富集。

9. 权利要求8中所述的免疫磁性微球。

10. 权利要求9所述的免疫磁性微球在富集目标物中的应用；  
或, 权利要求9所述的免疫磁性微球在制备富集目标物的产品中的应用。

## 一种基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析试纸条及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和生物医学技术领域,具体涉及一种基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析试纸条及其应用。

### 背景技术

[0002] 随着我国加入世贸组织,人们对食品由需求型逐步向质量型转变。有害物质残留问题已成为世界各国食品安全检测的重要指标,我国政府虽然也制定了一系列法律法规和技术标准限制有害物质残留的标准,但加强残留检测,建立残留检测体系,向社会提供安全卫生的食品,保护人类健康势在必行。

[0003] 目前对有害物质残留的检测主要是利用仪器和快速检测试纸条等方法。仪器方法主要有气相色谱法、气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱及液相色谱-质谱联用法,由于仪器方法价格高昂,检测人员技术要求过高,检测过程繁琐,操作不易推广等限制,使得简便、低廉、快速的免疫层析技术发展迅猛,在食品安全、医学诊断、环境监测等领域得到了广泛的应用。其中,基于胶体金为标记物的免疫层析技术是运用最成功最广泛的一种快速筛查手段,但因不同地区、品种、时间的样本中基质干扰较为严重,使得检测试纸条的准确度,重复性不容乐观;而且试纸条检测结果的稳定性,灵敏度仍然有待改进。

### 发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种试剂盒。

[0005] 本发明提供的试剂盒包括试纸条和双标记胶体金探针;

[0006] 所述双标记胶体金探针由金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体和金纳米颗粒标记的链霉亲和素组成;

[0007] 所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线和质控线的包被膜,以及吸水垫组成;所述包被膜与所述基底层之间设有荧光背板;

[0008] 所述检测线和所述质控线相互分离;

[0009] 所述检测线处包被有目标物抗原;所述抗目标物的抗体能够特异性结合所述目标物抗原;

[0010] 所述质控线处包被有抗所述抗目标物的抗体的抗体;

[0011] 所述检测线位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端;

[0012] 所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

[0013] 上述试剂盒中,所述金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体中,所述金纳米颗粒与生物素化的抗目标物的抗体的质量比可为(300~1000):1;具体可为500:1。

[0014] 所述金纳米颗粒标记的链霉亲和素中,所述金纳米颗粒与链霉亲和素的质量比可为(50~500):1;具体可为100:1。

[0015] 所述抗目标物的抗体为抗目标物的单克隆抗体或多克隆抗体。

- [0016] 所述检测线处包被有目标物抗原与BSA载体蛋白的偶联物。
- [0017] 所述金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体的制备方法如下：
- [0018] m1) 生物素化抗目标物的抗体溶液的制备：将氨基化生物素加入到抗目标物的抗体溶液中，反应1h后用透析膜透析，然后从透析袋中吸出生物素化抗体，并用PBS溶液调整生物素化抗体的浓度，得到所述生物素化抗目标物的抗体溶液。
- [0019] m2) 金颗粒溶液的制备：取去离子水置于锥形瓶中煮沸，加入氯金酸溶液和柠檬酸三钠溶液，继续煮沸，当颜色变为酒红色时冷却至室温，得到所述金颗粒溶液。
- [0020] m3) 将所述生物素化抗目标物的抗体溶液加入到所述金颗粒溶液中，室温孵育，然后用BSA溶液作为封闭液，室温封闭。
- [0021] m4) 高速离心除去游离未结合的生物素化抗目标物的抗体，然后用重悬液进行重悬，得到所述金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体。
- [0022] 所述金纳米颗粒标记的链霉亲和素的制备方法如下：
- [0023] n1) 将链霉亲和素加入所述金颗粒溶液中，边加边搅拌，之后立刻加入NaHCO<sub>3</sub>溶液，室温孵育10min，然后用PEG 6000稳定金纳米颗粒。
- [0024] n2) 离心除去游离未结合的链霉亲和素，然后用重悬液进行重悬，得到所述金纳米颗粒标记的链霉亲和素。
- [0025] 进一步地，所述抗目标物的抗体为抗目标物的单克隆抗体；
- [0026] 所述抗所述抗目标物的抗体的抗体为羊抗鼠IgG；
- [0027] 所述金纳米颗粒的粒径为30nm；
- [0028] 所述基底层的材料为聚氯乙烯；
- [0029] 所述荧光背板为表面喷涂有荧光的PVC塑料板；
- [0030] 所述样品垫为玻璃纤维素膜；
- [0031] 所述包被膜为硝酸纤维素膜；
- [0032] 所述检测线与所述质控线之间的距离为3mm。
- [0033] 本发明另一个目的是提供上述试剂盒的制备方法。
- [0034] 本发明提供的上述试剂盒的制备方法包括如下步骤：分别制备上述试剂盒中的试纸条和双标记胶体金探针；
- [0035] 制备所述试纸条的方法包括如下步骤：
- [0036] I、分别制备所述样品垫、所述设有检测线和质控线的包被膜，以及所述吸水垫；
- [0037] II、在所述基底层的中部覆盖所述荧光背板，然后将步骤I得到的设有检测线和质控线的包被膜覆盖在所述荧光背板上，再将步骤I得到的所述样品垫和步骤I得到的所述吸水垫分别依次搭接于所述包被膜的两端，得到所述试纸条；
- [0038] 所述设有检测线和质控线的包被膜按照如下方法制备：将上述目标物抗原和上述羊抗鼠IgG分别喷涂在所述包被膜的检测线区域和质控线区域，形成所述检测线和所述质控线，得到所述设有检测线和质控线的包被膜；
- [0039] 制备所述双标记胶体金探针的方法为上述金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体和金纳米颗粒标记的链霉亲和素的制备方法。
- [0040] 本发明又有一个目的是提供上述试剂盒或上述制备方法的新用途。
- [0041] 本发明提供了上述试剂盒或上述制备方法在检测目标物中的应用。

[0042] 本发明还提供了上述试剂盒或上述制备方法在检测待测样本中是否含有目标物中的应用。

[0043] 本发明还提供了上述试剂盒或上述制备方法在检测待测样本中目标物含量中的应用。

[0044] 本发明还有一个目的是提供一种检测待测样本中是否含有目标物的方法。

[0045] 本发明提供的检测待测样本中是否含有目标物的方法包括如下步骤：

[0046] (c1) 将待测样本用免疫磁性微球进行富集，得到富集后的样本；

[0047] (c2) 向富集后的样本中加入权利要求1-3中任一所述的双标记胶体金探针，得到混合溶液；

[0048] (c3) 将所述混合溶液孵育3min，然后加入上述试纸条的样品垫上，层析10min后，观察检测线和质控线的显色情况；

[0049] 若C线和T线均显红色，则所述待测样本中不含有目标物或候选不含有目标物；

[0050] 若C线显红色，T线不显色，则所述待测样本中含有目标物或候选含有目标物。

[0051] 在实际应用中，若待测样本中没有目标物，只有固定化的目标物抗原与GNPs-mAb-生物素化合物反应，则T和C两条线都会呈现红色；相反，若待测样本中有目标物，则目标物与分布于硝酸纤维素膜上的目标物抗原发生竞争性结合。因此，样品中目标物含量越多，T线的颜色越来越淡。

[0052] 本发明还有一个目的是提供一种检测待测样本中目标物含量的方法。

[0053] 本发明提供的检测待测样本中目标物含量的方法包括如下步骤：

[0054] (d1) 绘制标准曲线

[0055] 配制系列浓度的目标物标准品溶液，将所得的若干份含有不同浓度的标准品溶液分别用免疫磁性微球进行富集，得到富集后的样本；将所述富集后的样本分别与上述双标记胶体金探针混匀，得到混合溶液；将所述混合溶液孵育3min，然后加入上述试纸条的样品垫上，层析10min后，使用荧光读取仪测定空白背板的荧光强度和T线的荧光强度；以所述目标物的标准品溶液的浓度为横坐标，以所述空白背板的荧光强度和所述T线的荧光强度的比值为纵坐标绘制标准曲线图，得到标准曲线方程；

[0056] (d2) 待测样本检测

[0057] 将待测样本用免疫磁性微球进行富集，得到富集后的样本；将所述富集后的样本分别与上述双标记胶体金探针混匀，得到混合溶液；将所述混合溶液孵育3min，然后加入上述试纸条的样品垫上，层析10min后，使用荧光读取仪测定空白背板的荧光强度和T线的荧光强度，得到空白背板的荧光强度和T线的荧光强度的比值并代入步骤d1) 所得标准曲线方程，计算得到所述待测样本中的目标物含量。

[0058] 上述方法中，所述免疫磁性微球的制备方法包括如下步骤：

[0059] (1) 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球悬浮液与壳聚糖悬浮液混匀，依次经过干燥和高温煅烧，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球；

[0060] (2) 将所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球与抗目标物的抗体偶联，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球偶联抗体，即为所述免疫磁性微球。

[0061] 进一步地，所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球悬浮液是将 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球与水混匀后得到的溶液；所述壳聚糖悬浮液是将壳聚糖与稀醋酸溶液混匀后得到的溶液；所述 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球悬浮液

和所述壳聚糖悬浮液按照体积比为4:1的比例混匀。

[0062] 所述干燥的方法为通过喷雾干燥机喷雾干燥;所述干燥的时间为24h。

[0063] 所述高温煅烧的条件为在氮气条件下800℃高温煅烧4h。

[0064] 所述偶联的方法如下:

[0065] (f1) 在抗目标物的抗体溶液中加入EDC和NHS,摇床反应15min进行活化,得到活化后的抗目标物的抗体溶液。

[0066] (f2) 将所述Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@壳聚糖免疫磁性微球加入所述活化后的抗目标物的抗体溶液中,摇床反应30min,每隔10min混匀一次,得到偶联物。

[0067] 所述抗目标物的抗体与所述Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@壳聚糖磁性微球的质量比为1:50。

[0068] 所述Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@壳聚糖磁性微球偶联抗体还包括洗涤和重悬的步骤。

[0069] 所述洗涤的次数为5次。

[0070] 所述重悬使用的溶液为0.01M的磷酸缓冲液溶液。

[0071] 用所述免疫磁性微球富集所述目标物的方法包括如下步骤:

[0072] (a1) 将含有目标物的待测样本加入含有所述免疫磁性微球的离心管中进行吸附反应;

[0073] (a2) 将步骤(a1)得到的离心管在磁场作用下进行磁分离,弃去反应液并加入洗涤液进行洗涤;

[0074] (a3) 向步骤(a2)得到的离心管中加入样本稀释液,加热,在磁场作用下进行磁分离,收集上清液,实现目标物的富集。

[0075] 进一步地,所述(a1)中,所述吸附反应的时间为10min;

[0076] 所述(a2)中,所述磁分离的时间为60s;所述洗涤的次数为3次;

[0077] 所述(a3)中,所述加热条件为100℃加热3min。

[0078] 本发明最后一个目的是提供上述方法中的免疫磁性微球。

[0079] 上述免疫磁性微球在富集目标物中的应用也属于本发明的保护范围。

[0080] 上述免疫磁性微球在制备富集目标物的产品中的应用也属于本发明的保护范围。

[0081] 上述试剂盒或方法或应用中,所述目标物为盐酸克伦特罗。

[0082] 本发明的有益效果如下:1) 本发明将金纳米颗粒分别偶联生物素化抗体和链霉亲和素(简称双标记),利用了生物素和链霉亲和素分子间超强的亲和力,实现胶体金的大量富集,在减少抗体用量的同时,提高了检测灵敏度。2) 本发明制备了免疫磁性微球,该免疫磁性微球能够特异性识别各类样本中相应的目标物,在外加磁场中高效快速分离富集净化样品。用该免疫磁性微球对待测样本进行前处理,可减少不同样本所产生的基质干扰,提高了检测灵敏度。3) 本发明使用了铺有荧光的背板材料,通过胶体金对背板荧光进行遮挡,间接检测背板的荧光强度,减少了因溶液pH、温度、湿度等因素造成的荧光淬灭,提高了检测的稳定性。本发明提供的基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析技术可对样品中的目标物进行快速检测,具有稳定性好,灵敏度高,操作简便,可控性强等优点。该检测方法适用于各类食品安全领域对怀疑对象的快速检测。

## 附图说明

[0083] 图1为本发明免疫磁性微球前处理示意图。1、样本中待测物;2、特异性单克隆抗

体;3、免疫磁性微球。

[0084] 图2为本发明检测目标物的胶体金试纸条的结构示意图。4、包被原(T线);5、羊抗鼠二抗(C线);6、NC膜;7、荧光背板;8、样品垫;9、吸收垫;10、PVC底板。

[0085] 图3为本发明的胶体金试纸条的原理示意图。2、特异性单克隆抗体;4、包被原(T线);5、羊抗鼠二抗(C线);6、NC膜;7、荧光背板;8、样品垫;9、吸收垫;10、PVC底板;11、胶体金;12、链霉亲和素;13、生物素。

[0086] 图4为本发明为检测免疫磁性微球前处理和未处理过的猪尿样本标准曲线。

## 具体实施方式

[0087] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0088] 下述实施例中的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球采用溶剂热法合成, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球及具体合成方法均记载于文献“Synthesis and characterization of magnetically separable Ag nanoparticles decorated mesoporous  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @carbon with antibacterial and catalytic properties[J].Yu Q,Fu A,Li H,et al.Colloids&Surfaces A Physicochemical&Engineering Aspects,2014,457(1):288-296.”中,公众可从申请人(中国农业大学)处获得,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0089] 下述实施例中的EDC和NHS均为阿拉丁试剂有限公司的产品。

[0090] 实施例1:免疫磁性微球的制备及其在富集猪尿样本中盐酸克伦特罗中的应用

[0091] 一、免疫磁性微球的制备

[0092] 1、悬浮液A的制备

[0093] 称取0.1g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性微球加入20mL蒸馏水,超声30min后形成悬浮液A。

[0094] 2、悬浮液B的制备

[0095] 将0.8g壳聚糖(购自百灵威科技有限公司,脱乙酰度:95%)溶于15mL体积分数为2%的稀醋酸溶液中,得到质量分数为2%的均匀悬浮液B。

[0096] 3、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球的制备

[0097] 将悬浮液A和悬浮液B按照体积比为4:1的比例混匀,搅拌1h,通过喷雾干燥机喷雾干燥24h,然后在氮气条件下800℃高温煅烧4h,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球。

[0098] 4、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖磁性微球偶联抗体

[0099] (1) 在1mL浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液(盐酸克伦特罗单克隆抗体购自北京维德维康生物技术有限公司,CL-1F8-F9)中加入1 $\mu\text{g}$  EDC和1 $\mu\text{g}$  NHS,摇床反应15min进行活化,得到活化后的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液。

[0100] (2) 然后将步骤3制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖免疫磁性微球加入活化的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液中,盐酸克伦特罗单克隆抗体与 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @壳聚糖免疫磁性微球的投料质量比为1:50。摇床反应30min,每隔10min混匀一次,得到偶联物。

[0101] 5、洗涤、重悬

[0102] 用5mL洗涤液(浓度为0.02M的PB溶液)洗涤步骤4制备的偶联物5遍;然后用6mL 0.01M磷酸缓冲液溶液(pH 7.0)进行重悬,得到浓度为20 $\mu$ g/mg的免疫磁性微球溶液,其含有特异性的免疫磁性微球。

[0103] 二、免疫磁性微球在富集猪尿样本中盐酸克伦特罗中的应用

[0104] 1、吸附

[0105] 用移液器取样本上清(猪尿样本1600 $\mu$ L)至预封装免疫磁性微球的4mL离心管中,充分混匀,室温反应10min。

[0106] 2、洗涤

[0107] 将离心管放于磁力架上磁力吸附60s(简称磁性分离),弃去反应液,并向离心管中加入1mL洗涤液(浓度为0.02M的PB溶液),轻轻振荡十次,磁性分离,弃去洗涤液。

[0108] 3、洗脱

[0109] 向离心管中立即加入400 $\mu$ L样本稀释液(浓度为0.02M的PB溶液),混匀,将离心管放于干式恒温器上100 $^{\circ}$ C加热3min,磁性分离,收集上清液,最终获得净化和富集的样本提取液。

[0110] 实施例2:双标记间接背景荧光胶体金试纸条的制备

[0111] 一、双标记胶体金的制备

[0112] 1、胶体金-盐酸克伦特罗单克隆抗体-生物素(GNPs-盐酸克伦特罗抗体-生物素)的制备

[0113] (1)生物素化盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液的制备

[0114] 将浓度为3.8mg/ml的氨基化生物素(购自SIGMA公司)加入到1mg的盐酸克伦特罗单克隆抗体中,旋转反应1h后,用透析膜(8k MWCO)透析三次,buffer(pH7.4)配方如下:50mM PB、75mM NaCl,每次2L透析3h以上。之后用移液器从透析袋中小心吸出生物素化抗体,用浓度为50mM的PBS溶液调整生物素化抗体的浓度,得到浓度为2.3mg/ml的生物素化盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液。

[0115] (2)金颗粒溶液的制备

[0116] 取50mL去离子水置于200mL洁净的锥形瓶中煮沸,加入1mL 1%氯金酸溶液(sigma)及1mL 1%柠檬酸三钠溶液,继续煮沸3min,当颜色变为酒红色时冷却至室温备用。

[0117] (3)将2.3 $\mu$ g步骤(1)制备的生物素化盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液加入到1mL步骤(2)制备的金颗粒溶液中,室温孵育,然后用质量分数为10%的BSA溶液作为封闭液,室温封闭。

[0118] (4)完成步骤(3)后,高速离心除去游离未结合的盐酸克伦特罗单克隆抗体-生物素,然后用重悬液(含0.5%吐温20、2%蔗糖的0.01M PBS)进行重悬,得到200 $\mu$ L浓度为0.46mg/mL的胶体金-盐酸克伦特罗单克隆抗体-生物素(GNPs-盐酸克伦特罗抗体-生物素)溶液。

[0119] 2、胶体金-链霉亲和素(GNPs-链霉亲和素)的制备

[0120] (1)将200 $\mu$ L浓度为1mg/mL链霉亲和素加入到1mL步骤1(2)制备的金颗粒溶液中,边加边搅拌,之后立刻加入200 $\mu$ L 1M NaHCO<sub>3</sub>溶液,室温孵育10min,然后用200 $\mu$ L 2%的PEG 6000稳定金纳米颗粒。

[0121] (2)完成步骤(1)后,10000g,4 $^{\circ}$ C离心30min,除去游离未结合的链霉亲和素,然后

用200 $\mu$ L重悬液(含0.02%PEG 6000的0.1M PBS)进行重悬,得到浓度为1mg/mL的胶体金-链霉亲和素(GNPs-链霉亲和素)溶液。

#### [0122] 二、检测线和质控线的制备

[0123] 用0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.0)分别将BSA蛋白与盐酸克伦特罗抗原偶联物(BSA蛋白与盐酸克伦特罗抗原偶联物是委托北京维德维康生物技术有限公司制备得到的)和羊抗鼠IgG(购自Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.,产品目录号为125229)稀释至浓度分别为0.6mg/ml和0.3mg/ml,然后用划膜仪以0.75 $\mu$ L/cm的喷速依次喷涂硝酸纤维素膜(NC膜)上的检测线和质控线位置,检测线和质控线间距为3mm。将划好的NC膜放置在37 $^{\circ}$ C烘箱中过夜。

#### [0124] 三、试纸条组装

[0125] 本发明的试纸条包括荧光背板、PVC底板、硝酸纤维素膜、样品垫和吸水纸五部分。具体制备方法如下:

[0126] 1、将PVC底板(购自上海金标生物科技有限公司,产品目录号为SMNF31-40)的中部覆盖荧光背板(荧光背板为表面喷涂有荧光的PVC塑料板,委托上海鑫谱生物科技有限公司制备得到),然后在荧光背板上覆盖设有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,然后将样品垫(玻璃纤维素膜)和吸水纸分别依次搭接于硝酸纤维素膜的两端。样品垫和吸水垫在两端各压住NC膜2mm。

[0127] 2、将处理好的大板用切条机切成宽度为4.72mm的试纸条,安装在塑料卡壳里组装成检测卡,再置于干燥封闭的铝箔袋里,备用。

[0128] 本发明胶体金免疫层析试纸条的结构示意图如图2所示。检测原理如图3所示。

#### [0129] 实施例3:盐酸克伦特罗的定量和定性检测

##### [0130] 一、盐酸克伦特罗的定性检测方法

[0131] 1、将待测样本使用实施例1中的免疫磁性微球进行富集净化,得到处理后的样本。

[0132] 2、将150 $\mu$ L的处理后的样本与3 $\mu$ L实施例2步骤一的1制备的GNPs-盐酸克伦特罗抗体-生物素溶液和3 $\mu$ L实施例2步骤一的2制备的GNPs-链霉亲和素溶液混匀,室温孵育3min,得到混合溶液。

[0133] 3、取120 $\mu$ L混合溶液滴在试纸条的样品垫上。10min后通过肉眼定性观察。

[0134] 若C线和T线均显红色,则待测样本中不含有盐酸克伦特罗;

[0135] 若C线显红色,T线不显色,则待测样本中含有盐酸克伦特罗。

##### [0136] 二、盐酸克伦特罗的定量检测方法

###### [0137] 1、标准曲线的绘制

[0138] (1)分别以含有不同浓度0.015 $\mu$ g/L,0.031 $\mu$ g/L,0.062 $\mu$ g/L,0.12 $\mu$ g/L,1.25 $\mu$ g/L,0.5 $\mu$ g/L,1 $\mu$ g/L的盐酸克伦特罗标准品的溶液作为待测样本。

[0139] (2)将待测样本使用实施例1中的免疫磁性微球进行富集净化,得到处理后的样本(前处理样本)。同时以不做任何处理的待测样本作为对照(未前处理样本)。

[0140] (3)将150 $\mu$ L处理后的样本与3 $\mu$ L实施例2步骤一的1制备的GNPs-盐酸克伦特罗抗体-生物素溶液和3 $\mu$ L实施例2步骤一的2制备的GNPs-链霉亲和素溶液混匀,室温孵育3min,得到混合溶液。

[0141] (4)取120 $\mu$ L混合溶液滴在试纸条的样品垫上。10min后利用荧光免疫定量分析仪

FQ-S2测定质控线和检测线的荧光强度。设定空白背板的荧光读数为 $F_0$ , T线位置的荧光读数为 $F_T$ ,  $F_0$ 为没有被胶体金遮住的T线与C线间空白部分的平均荧光强度,  $F_T$ 为T线上被胶体金遮住的荧光强度。以 $F_0/F_T$ 为纵坐标, 以标准品溶液中盐酸克伦特罗的浓度为横坐标建立标准曲线(图4), 得到标准曲线方程。

[0142] 2、待测样本中盐酸克伦特罗含量检测

[0143] (1) 将待测样本使用实施例1中的免疫磁性微球进行富集净化, 得到处理后的样本。

[0144] (2) 将150 $\mu$ L处理后的样本与3 $\mu$ L实施例2步骤一的1制备的GNPs-盐酸克伦特罗抗体-生物素溶液和3 $\mu$ L实施例2步骤一的2制备的GNPs-链霉亲和素溶液混匀, 室温孵育3min, 得到混合溶液。

[0145] (3) 取120 $\mu$ L混合溶液滴在试纸条的样品垫上。10min后利用荧光免疫定量分析仪FQ-S2测定质控线和检测线的荧光强度, 并计算 $F_0/F_T$ 。将待测样本的 $F_0/F_T$ 带入步骤1中的标准曲线方程中, 计算得到待测样本中盐酸克伦特罗的含量。

[0146] 实施例4: 基于双标记间接背景荧光胶体金试纸条的应用

[0147] 一、待测样本的制备

[0148] 将盐酸克伦特罗标准品与经鉴定盐酸克伦特罗阴性的新鲜猪尿样本混匀, 得到不同浓度(0.04 $\mu$ g/L, 0.10 $\mu$ g/L, 0.15 $\mu$ g/L, 0.30 $\mu$ g/L)的盐酸克伦特罗溶液, 将其作为待测样本。

[0149] 二、待测样本的检测

[0150] 1、分别将各个待测样本使用实施例1中的免疫磁性微球进行富集净化, 得到处理后的样本(前处理样本)。

[0151] 2、将150 $\mu$ L的前处理样本与3 $\mu$ L实施例2步骤一的1制备的GNPs-盐酸克伦特罗抗体-生物素溶液和3 $\mu$ L实施例2步骤一的2制备的GNPs-链霉亲和素溶液混匀, 室温孵育3min, 得到混合溶液。

[0152] 3、取120 $\mu$ L混合溶液滴在试纸条的样品垫上。10min后利用荧光免疫定量分析仪FQ-S2测定质控线和检测线的荧光强度, 并计算得到 $F_0/F_T$ , 然后将其代入标准曲线(图4), 并计算回收率和变异系数。回收率(%) = (检测浓度/添加浓度)  $\times$  100%; 变异系数CV = 标准偏差/平均数。

[0153] 结果如表1所示。根据肉眼观察得到的消线值为1ppb, 最低检测限可达0.02ppb, 回收率为81%~115%, 变异系数小于5.99%。

[0154] 表1、盐酸克伦特罗标准品检测结果

	盐酸克伦特罗浓度 (ng/mL)		回收率 (%)	变异系数 (%)
	添加浓度	检测浓度		
[0155]	0.04	0.04	108	5.59
	0.1	0.11	115	5.99
	0.15	0.12	81	3.07
	0.3	0.37	92	5.06

[0156] 实施例5:盐酸克伦特罗试纸条的特异性检测

[0157] 一、待测样本的制备

[0158] 将如下肾上腺素受体激动剂:盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、西马特罗、特布他林、莱克多巴胺、维多洛尔、普萘洛尔、大叶醇、阿替洛尔、奥沙洛尔、齐帕特罗、肾上腺素和苯乙胺A分别添加至经免疫磁性微球处理过的猪尿样本中,分别得到含有如下不同浓度:0 $\mu$ g/L,1.2 $\mu$ g/L,3.5 $\mu$ g/L,6.2 $\mu$ g/L,12.5 $\mu$ g/L,25 $\mu$ g/L,50 $\mu$ g/L,100 $\mu$ g/L的肾上腺素受体激动剂的待测样本溶液。

[0159] 二、待测样本的检测

[0160] 使用实施例2的胶体金试纸条按照实施例3中的盐酸克伦特罗定量检测方法检测各个待测样本溶液中的盐酸克伦特罗,通过计算交叉反应率来评估其特异性。交叉反应率CR(%)=(盐酸克伦特罗IC<sub>50</sub>/其他受体激动剂的IC<sub>50</sub>) $\times$ 100%。

[0161] 结果如表2所示。本发明的盐酸克伦特罗试纸条与沙丁胺醇和西马特罗的交叉反应率分别为0.59%和3.5%,与其他肾上腺素类受体激动剂均无交叉反应。

[0162] 表2、盐酸克伦特罗和其他肾上腺素受体激动剂的交叉反应

[0163]

激动剂	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/L)	交叉反应率 (%)
盐酸克伦特罗	0.03	100
沙丁胺醇	17	0.59
西马特罗	3.5	3.5
莱克多巴胺	>2000	<0.1
维多洛尔	>2000	<0.1
普萘洛尔	>2000	<0.1
大叶醇	>2000	<0.1
阿替洛尔	>2000	<0.1
奥沙洛尔	>2000	<0.1
齐帕特罗	>2000	<0.1
肾上腺素	>2000	<0.1
苯乙胺A	>2000	<0.1

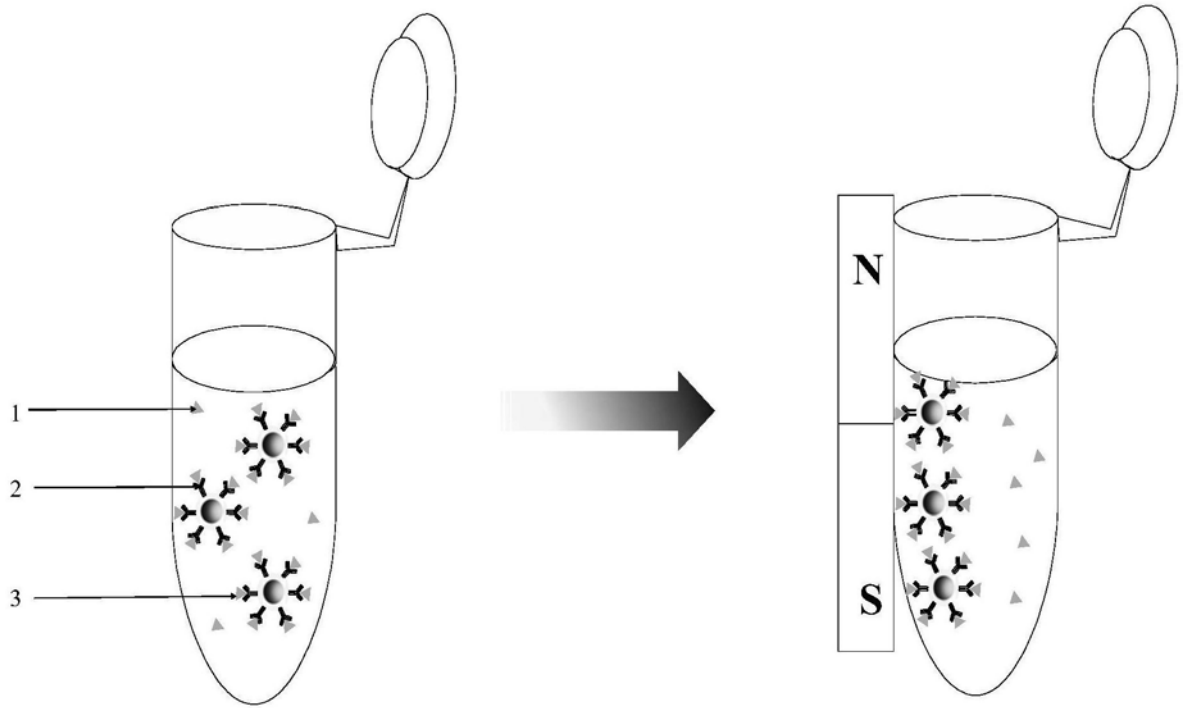
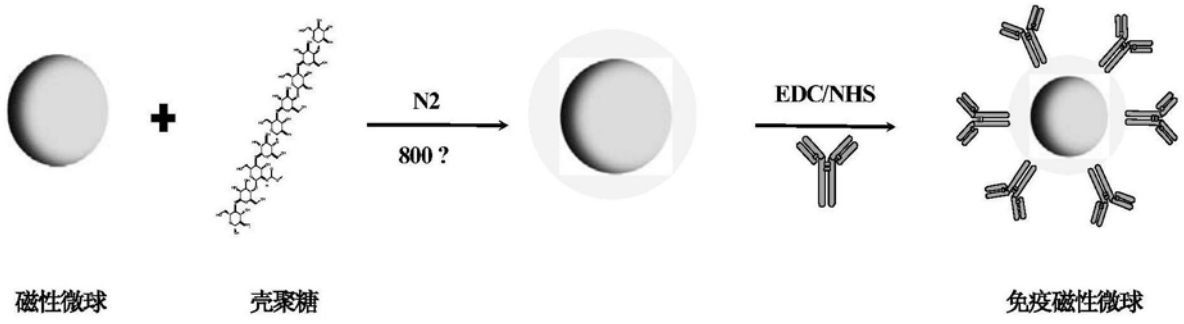


图1

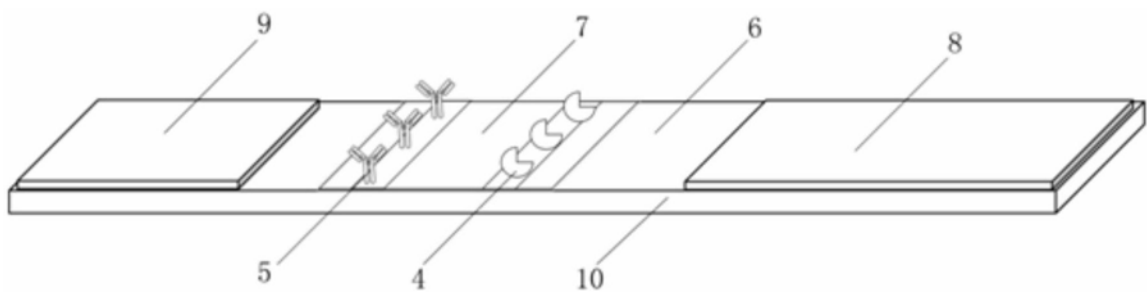


图2

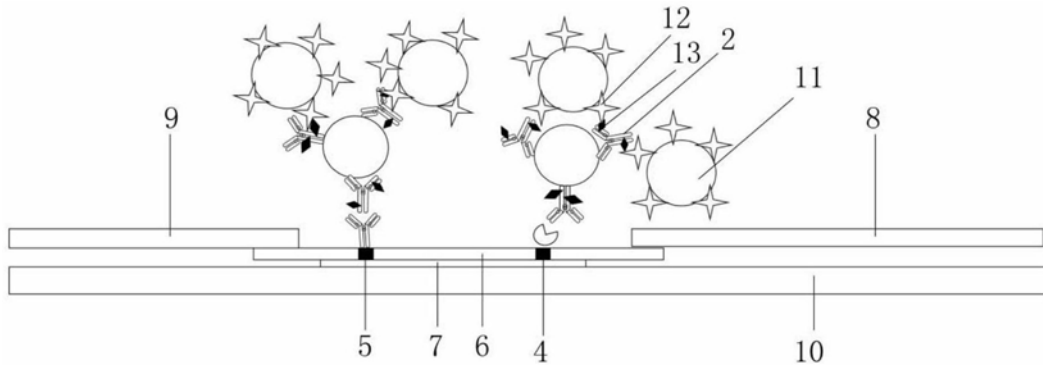


图3

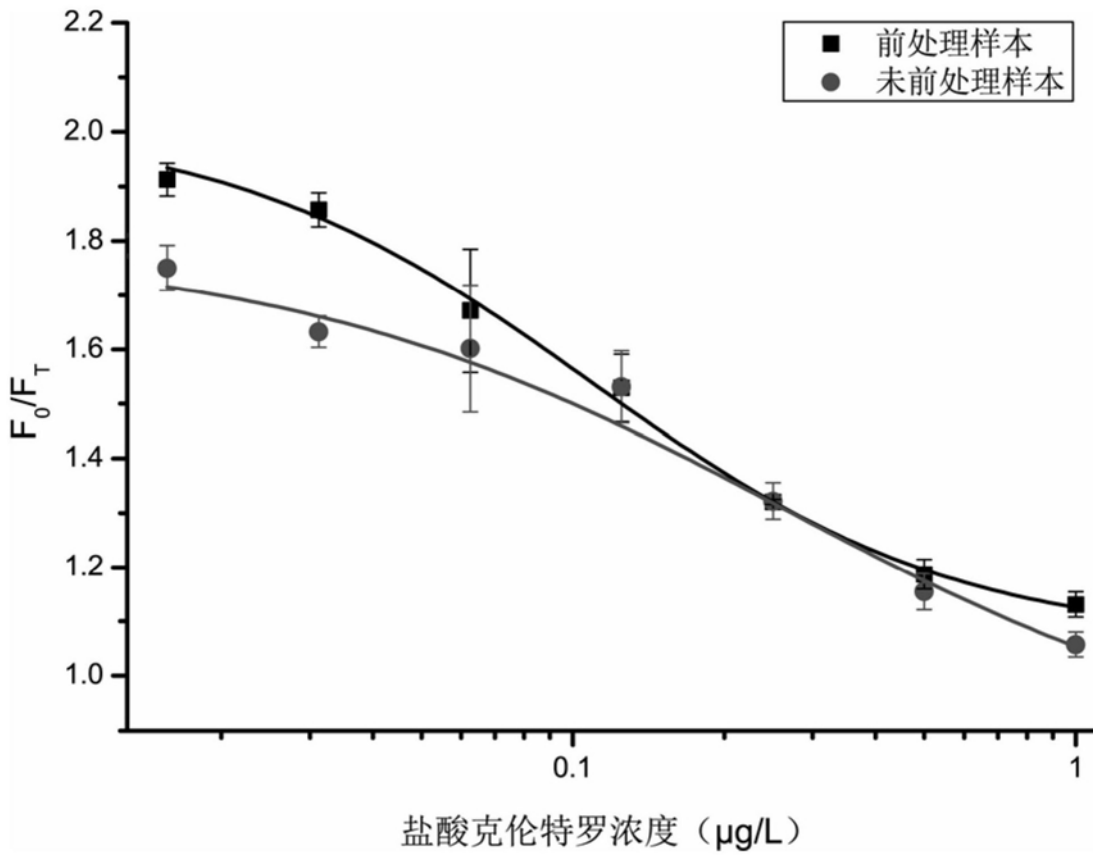


图4

专利名称(译)	一种基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析试纸条及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110873791A</a>	公开(公告)日	2020-03-10
申请号	CN201810995627.3	申请日	2018-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	江海洋 沈建忠 吴聪明 丁双阳 王战辉 柯跃斌 温凯 梁德媚		
发明人	江海洋 沈建忠 郑丕苗 吴聪明 丁双阳 王战辉 柯跃斌 温凯 曾于洋 梁德媚		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	关畅 陈晓庆		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于双标记信号放大的间接背景荧光胶体金免疫层析试纸条及其应用。所述试纸条包括铺有荧光的PVC塑料背板、PVC底板、硝酸纤维素膜、样品垫和吸水纸五部分。本发明还公开了双标记胶体金探针，所述双标记胶体金探针是由金纳米颗粒标记的生物素化的抗目标物的抗体和金纳米颗粒标记的链霉亲和素组成，利用生物素-链霉亲和素分子之间超强的亲和力实现信号放大。本发明的荧光胶体金免疫层析试纸条在检测前利用免疫磁性微球对样本进行前处理，在外加磁场中可高效快速分离富集目标物。本发明试纸条稳定性好，灵敏度高，不受基质干扰，能够实现快速定性或定量检测，且操作步骤简便、可控性强，具有良好的应用前景。

盐酸克伦特罗浓度 (ng/mL)		回收率 (%)	变异系数 (%)
添加浓度	检测浓度		
0.04	0.04	108	5.59
0.1	0.11	115	5.99
0.15	0.12	81	3.07
0.3	0.37	92	5.06