



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107167615 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710343657.1

(22)申请日 2017.05.16

(71)申请人 河南大学

地址 475004 河南省开封市明伦街85号

(72)发明人 马远方 王志增 靖静 郭亚飞

陶宁亚 张贝 刘广超 李淑莲

张军 柴立辉

(74)专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限公司

41119

代理人 牛爱周

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

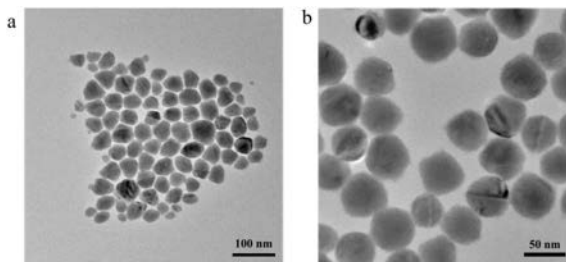
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒、胶体硒标记物、检测卡及其制备方法、应用

(57)摘要

本发明涉及一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒、胶体硒标记物、检测卡及其制备方法、应用,属于生物学免疫层析检测方法技术领域。本发明的胶体硒由胶体硒颗粒溶液和模板制成,该模板是SDS和PEG,其中PEG和SDS的摩尔比为10-80:1,制得的胶体硒为36nm左右的分散均匀的球形颗粒,颗粒均匀、形状规则,颗粒溶液清澈透亮,重悬特性好,用于侧向层析时分离效果好。采用该胶体硒制得的检测卡检测时具有灵敏、稳定、快速等优势,与传统的胶体金检测卡相比,原料价格便宜,制备方法简便成本更加经济。



1. 一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒,其特征在于:以PEG、SDS为模板,亚硒酸、维生素C为反应原料制成,所述PEG和SDS的摩尔比为10-80:1。

2. 根据权利要求1所述的胶体硒,其特征在于:所述PEG、SDS、亚硒酸、维生素C的摩尔比为50-400:5:2:8-16。

3. 如权利要求1或2所述的胶体硒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

1) 将PEG溶于水中,分散均匀,得PEG溶液;

2) 将SDS溶于PEG溶液中,分散均匀,得模板溶液;

3) 将亚硒酸溶于模板溶液中,分散均匀,得亚硒酸模板溶液;

4) 将维生素C溶于亚硒酸模板溶液中,分散均匀,即得。

4. 采用如权利要求1所述的胶体硒制备的胶体硒标记物,其特征在于:所述胶体硒由盐酸克伦特罗抗体标记。

5. 根据权利要求4所述的胶体硒标记物的制备方法,其特征在于:将所述胶体硒调pH值至7.0-8.0,加入盐酸克伦特罗抗体,混匀;然后加入BSA,混匀;离心,弃上清,用复溶液重悬沉淀,混匀后再次离心,弃上清,用工作液重悬沉淀,即得。

6. 采用如权利要求4所述的胶体硒标记物的检测卡,包括样品垫、结合垫、反应垫、吸水垫及支撑板,其特征在于:所述结合垫上固定有所述胶体硒标记物。

7. 根据权利要求6所述的检测卡,其特征在于:所述结合垫设置在反应垫的前端,样品垫设置在结合垫的前端,吸水垫设置在反应垫的后端,样品垫、结合垫、反应垫、吸水垫依次设置后固定在支撑板上。

8. 根据权利要求6所述的检测卡,其特征在于:所述结合垫由包括如下步骤的方法制得:将所述胶体硒标记物均匀铺在玻璃纤维膜上,于37℃干燥2.5-4.5h,即得。

9. 根据权利要求6所述的检测卡的制备方法,其特征在于:先将反应垫预制在支撑板上;将结合垫搭接在反应垫的前端,压住反应垫,同时将结合垫固定在支撑板上;再将样品垫搭接在结合垫的前端,压住结合垫,同时将样品垫固定在支撑板上;最后将吸水垫搭接在反应垫的后端,压住反应垫,同时将吸水垫固定在支撑板上,即得。

10. 如权利要求1或2所述的胶体硒、权利要求4所述的胶体硒标记物、权利要求6或7所述的检测卡在检测盐酸克伦特罗及其类似物中的应用。

## 一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒、胶体硒标记物、检测卡及其制备方法、应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒、胶体硒标记物、检测卡及其制备方法、应用,属于生物学免疫层析检测方法技术领域。

### 背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗属于 $\beta_2$ -肾上腺素受体激动剂的一种,临床上主要用于支气管哮喘的治疗,它可以促进动物体内脂肪的分解,蛋白质的合成,加快生长速率,提高瘦肉比率。所以曾被用作动物饲料添加剂,以提高瘦肉比例,也称“瘦肉精”。食用含盐酸克伦特罗的肉类后,将会严重损害人们的身体健康,产生头晕、乏力、心悸等症状,严重者可导致死亡。因此,中国、美国、欧洲等众多国家都明令禁止在动物饲料中添加盐酸克伦特罗等“瘦肉精”。

[0003] 随着瘦肉精等 $\beta$ -肾上腺激素的产量不断增加,这类药物可能会进入到市场上的减肥产品及人们的日常食物中,因此需要高效快速的检测手段实现该类药物残留的监控。目前已有的关于检测盐酸克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇等 $\beta$ -肾上腺激素的检测方法有液相色谱法、气相色谱法、液质联用等定量方法,但是这些检测技术都需要借助昂贵的大型仪器设备与专业技术人员才能得到可靠的结果,并不适用于经济欠发达地区以及家庭自检。因此,简单、经济、准确的POCT检测技术近年来倍受青睐。目前POCT的检测装置主要有检测试纸、侧向层析试纸条、微流控芯片技术等;有小型便携式仪器,也有微型台式分析仪。

[0004] 目前市场上各类生物公司生产的盐酸克伦特罗侧向层析试纸条种类繁多,主要以胶体金标记为主。目前采用胶体金研制出的试纸条灵敏度范围为3-5ng/mL,检测多以猪尿液为主,对控制含有CLE猪肉流入市场较为有效。公开号为CN102967707A的中国发明专利公开了一种三联免疫金标速测卡,该检测卡采用胶体金标记盐酸克伦特罗抗体,但是胶体金的制备相对复杂,原料价格昂贵。因此,我们仍需找到一种制备更加简单,成本更加经济的纳米标记材料。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒。

[0006] 本发明还提供了上述胶体硒的制备方法。

[0007] 本发明还提供了采用上述胶体硒的胶体硒标记物。

[0008] 本发明还提供了上述胶体硒标记物的制备方法。

[0009] 本发明还提供了采用上述胶体硒标记物的检测卡。

[0010] 本发明还提供了上述检测卡的制备方法。

[0011] 本发明还提供了上述胶体硒、胶体硒标记物、检测卡的应用。

[0012] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0013] 一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒,以PEG、SDS为模板,亚硒酸、维生素C为反应原料制成,所述PEG和SDS的摩尔比为10-80:1。

- [0014] 优选的,所述PEG和SDS的摩尔比为20:1。
- [0015] 所述PEG、SDS、亚硒酸、维生素C的摩尔比为50-400:5:2:8-16。
- [0016] 优选的,所述PEG、SDS、亚硒酸、维生素C的摩尔比为100:5:2:16。
- [0017] 在制备胶体硒时,所述PEG的加入浓度为0.05-0.4mmol/mL,优选为0.1mmol/mL。
- [0018] 所述胶体硒的粒度为32-40nm。
- [0019] 本发明的胶体硒主要由胶体硒颗粒和模板制成,该模板是SDS和PEG,其中SDS和PEG的配比合理,使得制得的胶体硒为32-40nm左右的分散均匀的球形颗粒,颗粒均匀、形状规则,颗粒溶液清澈透亮,重悬特性好,用于侧向层析时分离效果好。
- [0020] 上述的胶体硒的制备方法,包括如下步骤:
- [0021] 1) 将PEG溶于水中,分散均匀,得PEG溶液;
- [0022] 2) 将SDS溶于PEG溶液中,分散均匀,得模板溶液;
- [0023] 3) 将亚硒酸溶于模板溶液中,分散均匀,得亚硒酸模板溶液;
- [0024] 4) 将维生素C溶于亚硒酸模板溶液中,分散均匀,即得。
- [0025] 步骤1)、2)、3)、4)中可采用机械搅拌的方式使溶液分散均匀。如在100rpm转速下搅拌10-20min。
- [0026] 本发明的胶体硒的制备方法,高效、简便、经济,适合工业化生产。
- [0027] 胶体硒标记物,所述胶体硒由盐酸克伦特罗抗体标记。
- [0028] 所述盐酸克伦特罗抗体为鼠来源的单克隆抗体或多克隆抗体。
- [0029] 所述盐酸克伦特罗单克隆抗体可采用市售商品,如购自洛阳佰奥通实验材料中心。
- [0030] 上述的胶体硒标记物的制备方法,将所述胶体硒调pH值至7.0-8.0,然后加入盐酸克伦特罗抗体,混匀以封闭标记;然后加入BSA,混匀以封闭胶体硒上的裸露位点;离心,弃上清,用复溶液重悬沉淀,混匀后再次离心,弃上清,用工作液重悬沉淀,即得。
- [0031] 所述混匀是在室温下20rpm震荡5-30min。
- [0032] 所述离心是在转速10000rpm下离心10min。
- [0033] 采用碳酸钾溶液调节所述胶体硒的pH值。
- [0034] 所述复溶液为Tween-20质量含量为0.05%的10mM PBS溶液。PBS溶液的pH为7.2。
- [0035] 所述复溶液的加入量为离心前溶液体积的0.9-1.1倍。
- [0036] 所述工作液为Tween-20质量含量为0.05%、海藻糖质量含量为5%、牛血清白蛋白质量含量为0.5%的10mM PBS溶液。PBS溶液的pH为7.2。
- [0037] 所述工作液的加入量为离心前溶液体积的1/7-1/11倍。
- [0038] 本发明的胶体硒标记物由胶体硒和盐酸克伦特罗单克隆抗体制得,胶体硒跟抗体的结合,是通过半胱氨酸的SH-,疏水作用,分子间吸引和范德华力等非共价键结合,具有可以标记其他抗原或抗体的特点,能够用来检测盐酸克伦特罗;其制备方法简便易操作,该胶体硒标记物用于盐酸克伦特罗检测时,灵敏度高、特异性强、稳定性好。
- [0039] 采用上述胶体硒标记物的检测卡,包括样品垫、反应垫、结合垫、吸水垫及支撑板,所述结合垫上固定有所述胶体硒标记物。
- [0040] 上述的检测卡中,所述结合垫设置在反应垫的前端,样品垫设置在结合垫的前端,吸水垫设置在反应垫的后端,样品垫、结合垫、反应垫、吸水垫依次设置后固定在支撑板上。

[0041] 所述样品垫由如下方法制得：将玻璃纤维膜浸泡在样品垫处理液中3-7min，弃去多余液体，置于37℃干燥10-14h，即得。

[0042] 所述样品垫处理液为Tween-20质量含量为1%、牛血清质量含量为5%的10mM PBS液。PBS溶液的pH为7.2。

[0043] 所述反应垫预制在支撑板上，具体由如下方法制得：将硝酸纤维素膜贴在支撑板的中间位置；用PBS将CLE-BSA稀释为0.05mg/mL，作为检测线包被原，用喷金划膜仪以0.5-1.5μL/cm划至硝酸纤维素膜前端；用PBS把二抗稀释为0.4-0.6mg/mL，作为质控线包被原，用喷金划膜仪以0.5-1.5μL/cm划至硝酸纤维素膜后端；于37℃干燥2.5-3.5h，即得。

[0044] 当胶体硒标记的抗体为鼠来源的盐酸克伦特罗抗体单克隆抗体时，所述二抗为抗鼠IgG。例如山羊抗鼠IgG、家兔抗鼠IgG。

[0045] 检测线包被的盐酸克伦特罗抗原在合成时的载体可以采用牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵清蛋白或多聚赖氨酸。

[0046] 所述结合垫由如下方法制得：将所述胶体硒标记物均匀铺在玻璃纤维膜上，于37℃干燥2.5-4.5h，即得。

[0047] 上述的检测卡的制备方法，先将反应垫预制在支撑板上；将结合垫搭接在反应垫的前端，压住反应垫，同时将结合垫固定在支撑板上；再将样品垫搭接在结合垫的前端，压住结合垫，同时将样品垫固定在支撑板上；最后将吸水垫搭接在反应垫的后端，压住反应垫，同时将吸水垫固定在支撑板上，即得。

[0048] 具体的，结合垫压住反应垫1.5~2.5mm，样品垫压住结合垫1.5~2.5mm，吸水垫压住反应垫1.5~2.5mm。

[0049] 本发明的用于盐酸克伦特罗检测的检测卡采用由SDS和PEG做模板的胶体硒作为侧向分离载体，该胶体硒应澄清透亮且具备良好的分离特性及重悬特性；检测时具有灵敏、稳定、快速等优势，与传统的胶体金检测卡相比，原料价格便宜，制备方法简便成本更加经济。

[0050] 上述胶体硒、胶体硒标记物、检测卡在检测盐酸克伦特罗及其类似物中的应用。

[0051] 本发明的有益效果是：

[0052] 1) 本发明的用于盐酸克伦特罗的胶体硒检测卡，具有特异性强，检测时间短等优点，可以广泛应用于盐酸克伦特罗的家庭自检；

[0053] 2) 本发明的检测卡操作简便，不需要专业人员操作、不需要特殊仪器、设备，可现场操作，检测成本低；

[0054] 3) 本发明检测卡对样品垫与硒标结合垫进行了前处理，使得样品垫与硒标结合垫具有优异的吸水能力及释放能力，进而大大提高了检测能力；

[0055] 4) 本发明的检测卡在胶体硒标记抗体时最佳蛋白标记量采用了与胶体金标记抗体比较对照性能的实验方法，确定了最佳的抗体标记浓度，在提高检测的灵敏度的同时，节省了抗体使用量；

[0056] 5) 本发明提供的胶体硒具有均匀、球形、粒径适宜且重悬性能良好，制备简单、价格低廉的优势和特点。

## 附图说明

- [0057] 图1为实施例1中制得的检测卡示意图；
- [0058] 图2为实施例1制得的检测卡检测结果对比图；
- [0059] 图3为实施例1制得的检测卡检测样品时的检测图；
- [0060] 图4为对比例1-3和实施例1制得的胶体硒、胶体硒标记物制备时离心后和重悬后直观图；
- [0061] 图5为对比例2和实施例1制得的胶体硒电镜结果图；
- [0062] 图6为实施例1及对比例4的检测卡及试剂盒灵敏度检测图；
- [0063] 图7为实施例1及对比例5的检测卡灵敏度检测图；
- [0064] 图8为实施例1制得的检测卡特异性检测图；
- [0065] 图9为实施例1制得的检测卡稳定性检测图。

### 具体实施方式

[0066] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的详细说明。

[0067] 以下实施例及对比例中的CLE-BSA、CLE-Ab购自洛阳佰奥通实验材料中心。

[0068] 所述复溶液为Tween-20质量含量为0.05%的10mM PBS溶液；PBS溶液的pH为7.2。所述工作液为Tween-20质量含量为0.05%、海藻糖质量含量为5%、牛血清白蛋白质量含量为0.5%的10mM PBS溶液；PBS溶液的pH为7.2。所述样品垫处理液为Tween-20质量含量为1%、牛血清质量含量为5%的10mM PBS液；PBS溶液的pH为7.2。

[0069] 实施例1

[0070] 本实施例中的用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒由以下方法制得：

[0071] 1) 取16mL超纯水置于50mL小烧杯中，加入1mL的2mol/L的PEG，室温搅拌20min，分散均匀，得PEG溶液；

[0072] 2) 将1mL的0.1mol/L的SDS溶于PEG溶液中，室温搅拌20min，分散均匀，得模板溶液；

[0073] 3) 将1mL的0.04mol/L的亚硒酸溶于模板溶液中，室温搅拌20min，分散均匀，得亚硒酸模板溶液；

[0074] 4) 将1mL的0.32mol/L的维生素C溶于亚硒酸模板溶液中，室温搅拌20min，分散均匀，即得。

[0075] 本实施例的胶体硒标记物由以下方法制得：

[0076] 1) 取1mL上述的胶体硒，加入10.5 $\mu$ L的1mol/L的碳酸钾溶液调节pH至7.5，然后加入2 $\mu$ L的抗CLE-Ab (1mg/mL，洛阳佰奥通实验材料中心)，室温混匀30min，使单克隆抗体充分的结合到胶体硒颗粒上；

[0077] 2) 然后加入0.01gBSA，室温混匀20min，封闭胶体硒纳米颗粒上的裸露位点；

[0078] 3) 然后10000rpm离心10min，小心弃去上清，用1mL复溶液重悬沉淀，室温混匀5min；再次10000rpm离心5-15min，铺垫用枪尖小心弃上清，用120 $\mu$ L工作液重悬沉淀，即得。

[0079] 本实施例的检测卡由以下方法制得：

[0080] 1) 样品垫的制备：把GF-08玻璃纤维膜裁剪成(220mm $\times$ 100mm)，浸泡在样品垫处理液中5min，弃去多余液体，置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中干燥12h，取出，放入自封袋中备用；

[0081] 2) 反应垫的制备：把NC膜裁剪为25mm $\times$ 100mm的规格，贴在PVC板的中间位置；用

PBS (pH为7.2)把CLE-BSA(洛阳佰奥通实验材料中心)稀释为0.05mg/mL,作为T线包被原;用PBS把羊抗鼠IgG稀释为0.5mg/mL;作为C线包被原;用喷金划膜仪以1 $\mu$ L/cm划膜,置于37 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱干燥3h,取出放入自封袋,备用;

[0082] 3) 结合垫的制备:将上述制备的胶体硒标记物均匀的铺在GF-06玻璃纤维膜上(2.8mm $\times$ 75mm);在温度为37 $^{\circ}$ C的鼓风干燥箱中干燥3h,使标记单抗的胶体硒粒子固化在玻璃纤维膜上,取出放入自封袋,加入干燥剂,密封保存;

[0083] 4) 将制备好的结合垫贴在已制好的反应垫的前端,压反应垫1mm,同时将结合垫固定在检测卡底板上;再将样品垫贴在结合垫的前端,压住结合垫2mm,同时将样品垫固定在检测卡底板上;最后将吸水纸(180mm $\times$ 100mm)贴在PVC板的末端,压住反应垫2mm,同时将吸水纸固定在检测卡地板上;将组装好的检测卡放入切条机中,切成4mm宽的试剂条,放入卡壳中,即得。

[0084] 本实施例制得的检测卡如图1所示,1为支撑板PVC板;2为样品垫;3为硒标结合垫,4为反应垫,41为检测线,42为质控线,5为吸水垫。

[0085] 本发明的盐酸克伦特罗胶体硒检测试剂卡结果判定方法如图2所示:其中1为质控线,2为检测线;a显示两条带均显色,则被检样品中不含或者含有少量盐酸克伦特罗;b显示质控线显色,检测线不显色,说明样品中含有过量的盐酸克伦特罗;c显示质控线不显色的情况,则检测卡失效。

[0086] 当盐酸克伦特罗胶体硒快速检测检测卡的质控线和检测线均显色时,则被检样品中不含或者含有灵敏度以内的盐酸克伦特罗;当盐酸克伦特罗胶体硒快速检测检测卡的质控线显色,而检测线不显色时,则被检样品中含有灵敏度以上的盐酸克伦特罗;无论检测线显色与否,只要质控线不显色,则盐酸克伦特罗胶体硒快速检测检测卡检测无效。

[0087] 实施例2

[0088] 本实施例中的用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒由以下方法制得:

[0089] 1) 取16mL超纯水置于50mL小烧杯中,加入1mL的8mol/L的PEG,室温搅拌15min,得PEG溶液;

[0090] 2) 将1mL的0.1mol/L的SDS溶于PEG溶液中,室温搅拌15min,得模板溶液;

[0091] 3) 将1mL的0.04mol/L的的亚硒酸溶于模板溶液中,室温搅拌15min,得亚硒酸模板溶液;

[0092] 4) 将1mL的0.32mol/L的维生素C溶于亚硒酸模板溶液中,室温搅拌15-25min,即得。

[0093] 本实施例中的胶体硒标记物和检测卡制备方法同实施例1。

[0094] 实施例3

[0095] 本实施例中的用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒由以下方法制得:

[0096] 1) 取16mL超纯水置于50mL小烧杯中,加入1mL的1mol/L的PEG,室温搅拌10min,得PEG溶液;

[0097] 2) 将1mL的0.1mol/L的SDS溶于PEG溶液中,室温搅拌10min,得模板溶液;

[0098] 3) 将1mL的0.04mol/L的的亚硒酸溶于模板溶液中,室温搅拌10min,得亚硒酸模板溶液;

[0099] 4) 将1mL的0.16mol/L的维生素C溶于亚硒酸模板溶液中,室温搅拌15-25min,即

得。

[0100] 本实施例中的胶体硒标记物和检测卡制备方法同实施例1。

[0101] 实施例4

[0102] 实施例1中的盐酸克伦特罗胶体硒检测卡在实际样本中的检测：

[0103] 从某猪场随机抽取了18份猪尿样本，用ELISA试剂盒检测后，这18份样品的CLE含量均低于0.3ng/mL，对于试剂盒3ng/mL的检测限，其结果均为阴性。图3显示了18份猪尿样本的检测结果，均为阴性，与ELISA检测结果符合率为100%。

[0104] 结论：以SDS和PEG制备的胶体硒可用于竞争法-盐酸克伦特罗检测卡的制备，灵敏度达到行业最低检出限3ng/mL，特异性、稳定性都较好，检测效果与成品试剂盒相当；该检测卡特异性强、灵敏度高、检测速度快、操作简便、携带容易、无需特殊设备、成本低廉、无需专业培训、结果清晰易辨、适合于家庭自检。

[0105] 对比例1

[0106] 本对比例中的用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒由以下方法制得：

[0107] 1) 取17mL超纯水置于50mL小烧杯中，加入10%明胶1mL，室温搅拌10min；

[0108] 2) 然后加入0.04mol/L亚硒酸1mL，室温搅拌20min；

[0109] 3) 然后加入0.32mol/L Vc 1mL，室温搅拌20min。

[0110] 本对比例中的胶体硒标记物和检测卡制备方法同实施例1。

[0111] 对比例2

[0112] 本对比例中的用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒由以下方法制得：

[0113] 1) 取17mL超纯水置于50mL小烧杯中，加入100mmol/L SDS 1mL，室温搅拌5min；

[0114] 2) 然后加入0.04mol/L亚硒酸1mL，室温搅拌20min；

[0115] 3) 然后加入0.32mol/L Vc 1mL，室温搅拌20min。

[0116] 本对比例中的胶体硒标记物和检测卡制备方法同实施例1。

[0117] 对比例3

[0118] 本对比例中的用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒由以下方法制得：

[0119] 1) 取17mL超纯水置于50mL小烧杯中，加入2mol/L PEG 1mL，室温搅拌10min；

[0120] 2) 加入0.04mol/L亚硒酸1mL，室温搅拌20min；

[0121] 3) 加入0.32mol/L Vc 1mL，室温搅拌20min。

[0122] 本对比例中的胶体硒标记物和检测卡制备方法同实施例1。

[0123] 对比例4

[0124] 本对比例为市售的盐酸克伦特罗胶体金试剂盒，购自洛阳莱普生信息科技有限公司，生产批号：G150910，灵敏度为3ng/mL。

[0125] 对比例5

[0126] 本对比例中的盐酸克伦特罗胶体金检测卡中胶体金的制备方法为：

[0127] 1) 将1g氯金酸倒入干净的烧杯中，用少量超纯水溶解后转移至容量瓶，并将烧杯用超纯水清洗干净，洗液倒入容量瓶并用超纯水定容至100mL，配成1%的氯金酸溶液；避光，4℃闭光、冷藏备用；

[0128] 2) 取一干净胶体金制备装置中的三向烧瓶，依次加入纯水99mL、1%氯金酸溶液1mL到250mL烧杯中，配成0.01%氯金酸溶液；

[0129] 3) 开启温控器用该装置对氯金酸溶液加热直至沸腾,立即加入1%的柠檬酸三钠溶液,继续加热煮沸5min 10s,冷却至室温;通过调整柠檬酸钠溶液的体积来控制胶体金颗粒的大小;

[0130] 4) 通过紫外扫描仪观察其最大吸收波长;

[0131] 5) 通过透射电镜观察其粒径大小和均匀度。

[0132] 标记抗体时,采用2 $\mu$ g或3 $\mu$ g的CLE-Ab标记1mL胶体金。检测卡其余制备方法同实施例1。

[0133] 试验例1

[0134] (一) 将对比例1-3及实施例1制得胶体硒拍照后观察:

[0135] 结果如图4中a所示,1-4的模板分别为明胶、SDS、PEG、SDS和PEG,从图中可以看出对比例1采用明胶制得的胶体硒和对比例2采用SDS制得的胶体硒直观上看稍浑浊;对比例3采用PEG制得的胶体硒非常浑浊;实施例1中采用SDS和PEG制得的胶体硒清澈透明。

[0136] (二) 将对比例1-3及实施例1胶体硒标记物制备过程中首次离心后的溶液拍照观察:

[0137] 结果如图4中b所示,1-4的模板分别为明胶、SDS、PEG、SDS和PEG,从图中可以看出对比例1采用明胶时离心后分离效果最差,固液分离不完全;对比例2采用SDS时离心后分离效果稍差,固液分离不完全;对比例3采用PEG时离心后分离效果也较差,固液分离不完全;实施例1中采用SDS和PEG时离心后上清清澈透明,无红色,固液分离完全。

[0138] (三) 将对比例1-3及实施例1胶体硒标记物制备过程中首次重悬后的溶液拍照观察:

[0139] 结果如图4中c所示,1-4的模板分别为明胶、SDS、PEG、SDS和PEG,从图中可以看出对比例1采用明胶和对比例2采用SDS时首次重悬后重悬效果稍差;对比例3采用PEG时重悬后重悬效果很差;实施例1中采用SDS和PEG时重悬后溶液均匀,重悬性较好。

[0140] 综上可知,本发明制得的胶体硒清澈透明,制得的胶体硒标记物,容易离心,重悬性能好,制备容易,适用于盐酸克伦特罗的检测。

[0141] (四) 实施例1和对比例2制得的胶体硒进行电镜观察

[0142] 结果如图5所示,a图为对比例2,b图为实施例1;从图中可以看出本发明实施例制得的胶体硒颗粒均匀,形状规则。

[0143] 试验例2

[0144] (一) 实施例1的检测卡的灵敏度试验

[0145] 将CLE标准品用阴性猪尿液分别稀释成浓度为0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL的标准溶液,阴性对照为不加CLE标准品的阴性猪尿液;然后将100 $\mu$ L不同浓度的标准溶液分别滴加入实施例1及对比例4-6中的试剂盒及检测卡中,观察结果。检测卡中T检测线与C质控线均显色的为阴性;仅C质控线一条线显色的为阳性。检出阳性结果的最低标准液浓度即为该检测卡的灵敏度。

[0146] 实施例1的检测卡检测结果如图6中a图所示,1-5为0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL的CLE标准溶液检测结果,6为阴性对照。结果明显可辨,随着样品中盐酸克伦特罗含量的增加,T带显色逐渐变弱,当样品中CLE的含量达到3ng/mL时,T检测线不显色,即灵敏度为3ng/mL。

[0147] 对比例4的试剂盒检测结果如图6中b图所示,1-5为0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL的CLE标准溶液检测结果,6为阴性对照。结果明显可辨,随着样品中盐酸克伦特罗含量的增加,T带显色逐渐变弱,当样品中CLE的含量达到3ng/mL时,T检测线不显色,即灵敏度为3ng/mL。

[0148] 对比例5检测卡检测结果如图7所示。图7-a与7-b显示了标记量均为2 $\mu$ g/mL时制备的胶体硒与胶体金CLE检测卡检测效果。阴性时,胶体金检测卡T检测线显色有些弱,整体灵敏度与胶体硒检测卡一致;图7-c为标记量为3 $\mu$ g/mL的胶体金检测卡,阴性时,T检测线显色较强,但是其灵敏度没有7-a胶体硒检测卡高。

[0149] 上述结果表明,本发明的胶体硒检测卡的灵敏度较高,已达到市售标准。

[0150] (二) 实施例1的检测卡的特异性试验

[0151] 用阴性猪尿液分别配制1 $\mu$ g/mL的盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸多巴胺、盐酸肾上腺素标准溶液,用于实施例1检测卡的特异性检测,每个标准溶液检测3次,一共进行3批次实验重复。

[0152] 检测结果如图8所示,C,控制线;T,检测线;其中a图中1阴性对照(不加CLE标准品的阴性猪尿液),2-6分别为1 $\mu$ g/mL的盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、盐酸多巴胺、盐酸肾上腺素;b图为CLE与沙丁胺醇的分子结构图;c图中1为阴性对照,2-6分别为(100,200,400,500,1000)ng/mL的沙丁胺醇。

[0153] CLE胶体硒检测卡与沙丁胺醇存在交叉反应,当沙丁胺醇浓度超过500ng/mL时,出现假阳性反应,这与宋春美(基于荧光纳米颗粒标记的盐酸克伦特罗荧光免疫层析试纸研究,江南大学,2013,博士学位论文)报道结果一致。这主要是由于沙丁胺醇与盐酸克伦特罗在结构上具有高度相似性(如图8的b所示),交叉反应可能是由于相似的功能基团诱导了针对同样抗原表位的抗体的产生,导致了检测中假阳性结果的出现。而检测莱克多巴胺、盐酸肾上腺素与盐酸多巴胺时,都不存在交叉反应,证明了该检测卡的特异性良好。

[0154] (二) 实施例1的检测卡的稳定性试验

[0155] 将同一批次的胶体硒检测卡分别封装于自封袋中,加入干燥剂,分别保存在4 $^{\circ}$ C,25 $^{\circ}$ C与37 $^{\circ}$ C。每周抽出一批进行灵敏度检测,每组设3个重复,一共进行3批实验。

[0156] 将CLE胶体硒检测卡放入自封袋中密封,分别置于4 $^{\circ}$ C,25 $^{\circ}$ C与37 $^{\circ}$ C的环境中保存,60天后取出这些检测卡检测其灵敏度的变化,用以估计盐酸克伦特罗胶体硒检测卡的稳定性。

[0157] 结果如图9所示,a图为4 $^{\circ}$ C保存的胶体硒检测卡60天后其灵敏度检测结果,1为阴性对照,2-4为3次重复实验;b图为25 $^{\circ}$ C保存的胶体硒检测卡60天后其灵敏度检测结果,1为阴性对照,2-4为3次重复实验;c图为37 $^{\circ}$ C保存的胶体硒检测卡60天后其灵敏度检测结果,1为阴性对照,2-4为3次重复实验;结果显示,置于4 $^{\circ}$ C,25 $^{\circ}$ C与37 $^{\circ}$ C的胶体硒检测卡60天后其灵敏度仍为3ng/mL,尤其是37 $^{\circ}$ C破坏性保存后,该检测卡的灵敏度仍没有改变,证明其稳定性良好。

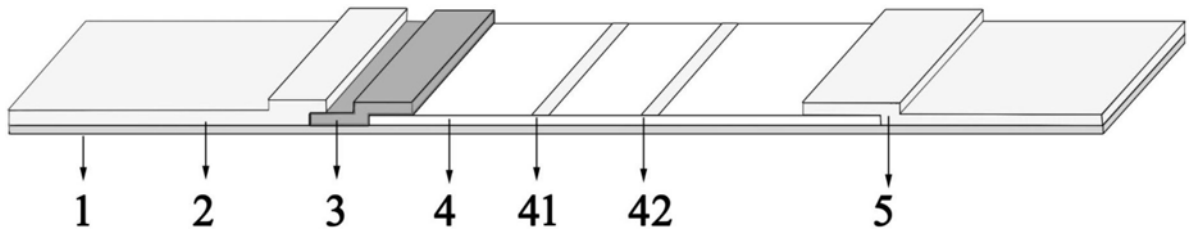


图1

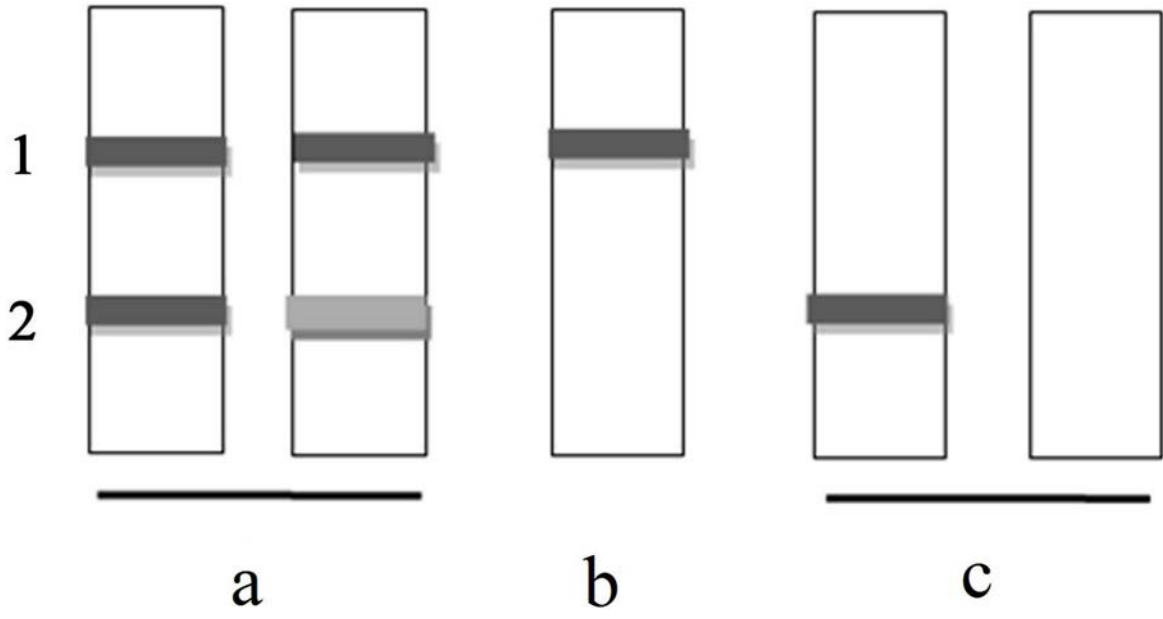


图2

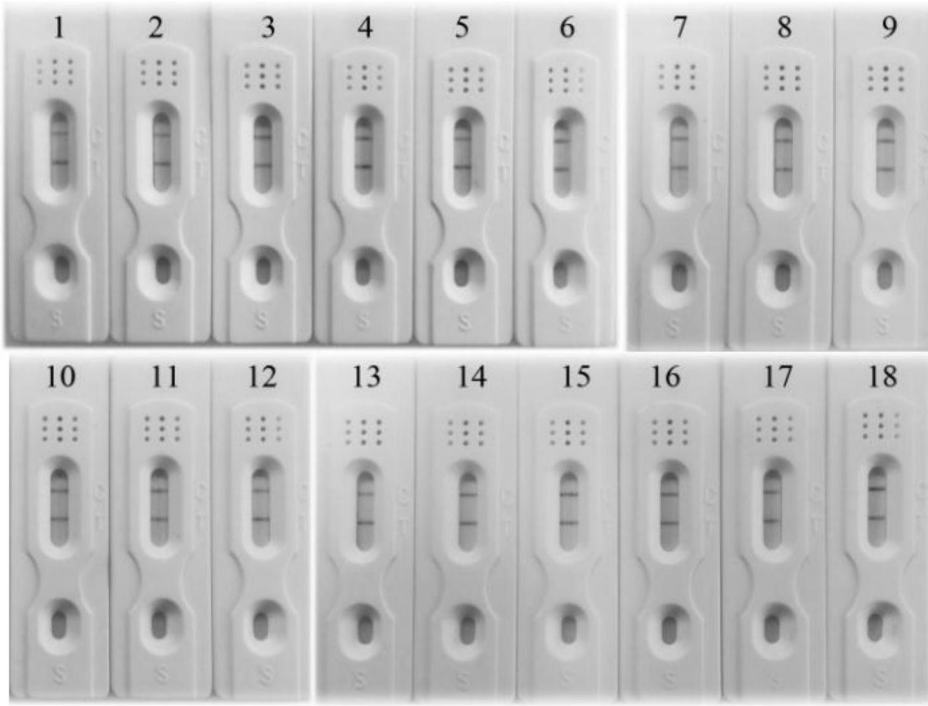


图3

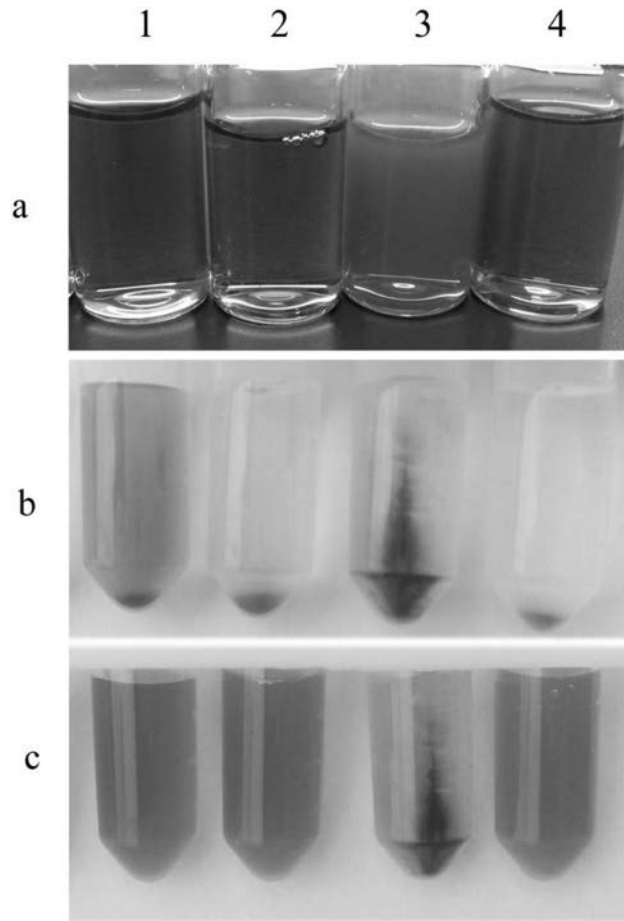


图4

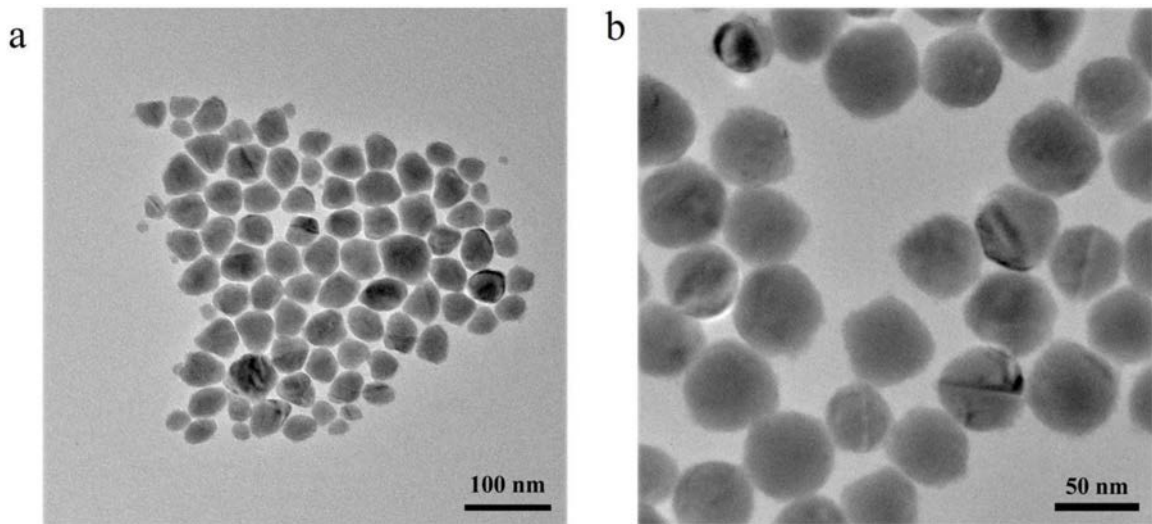


图5

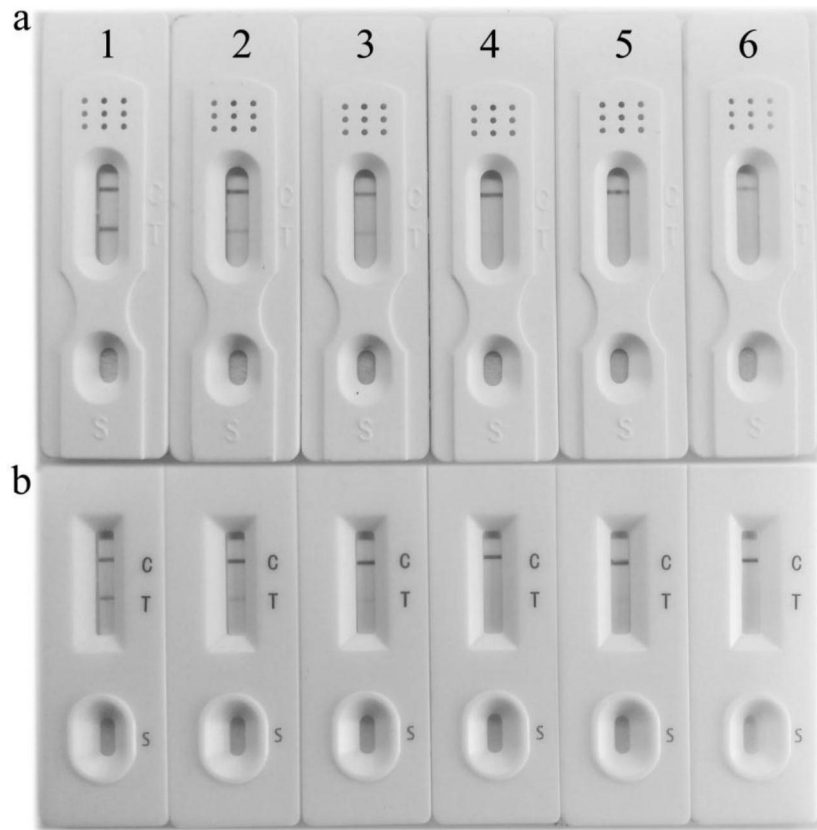


图6

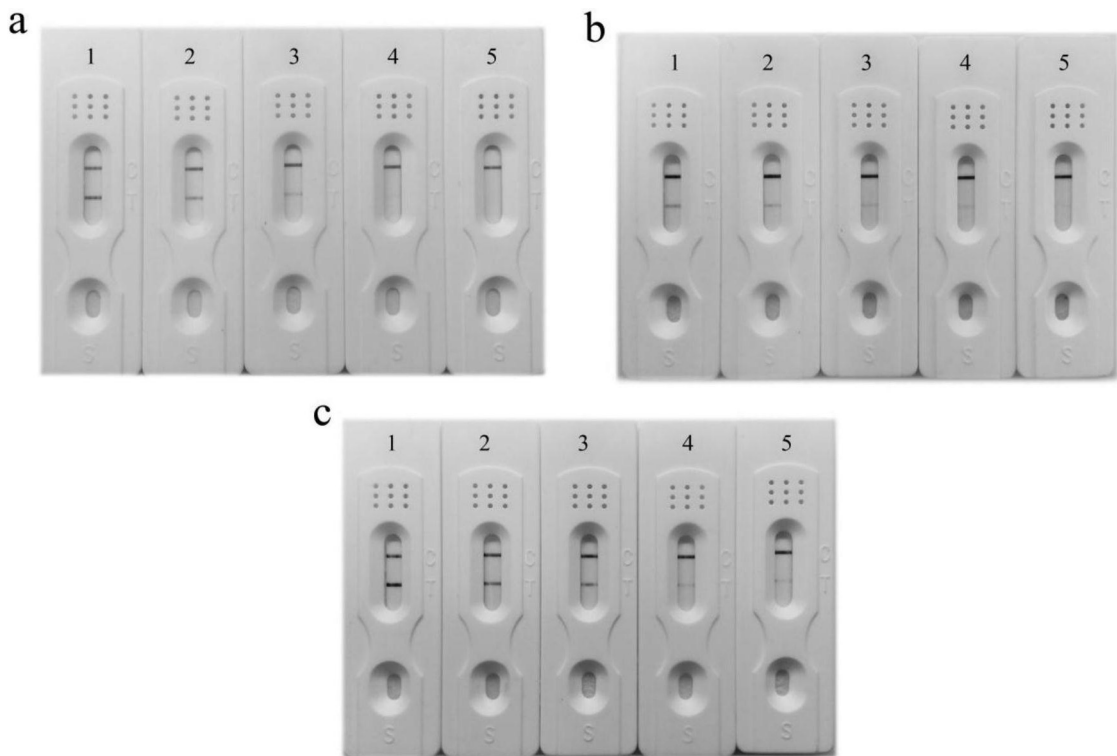


图7

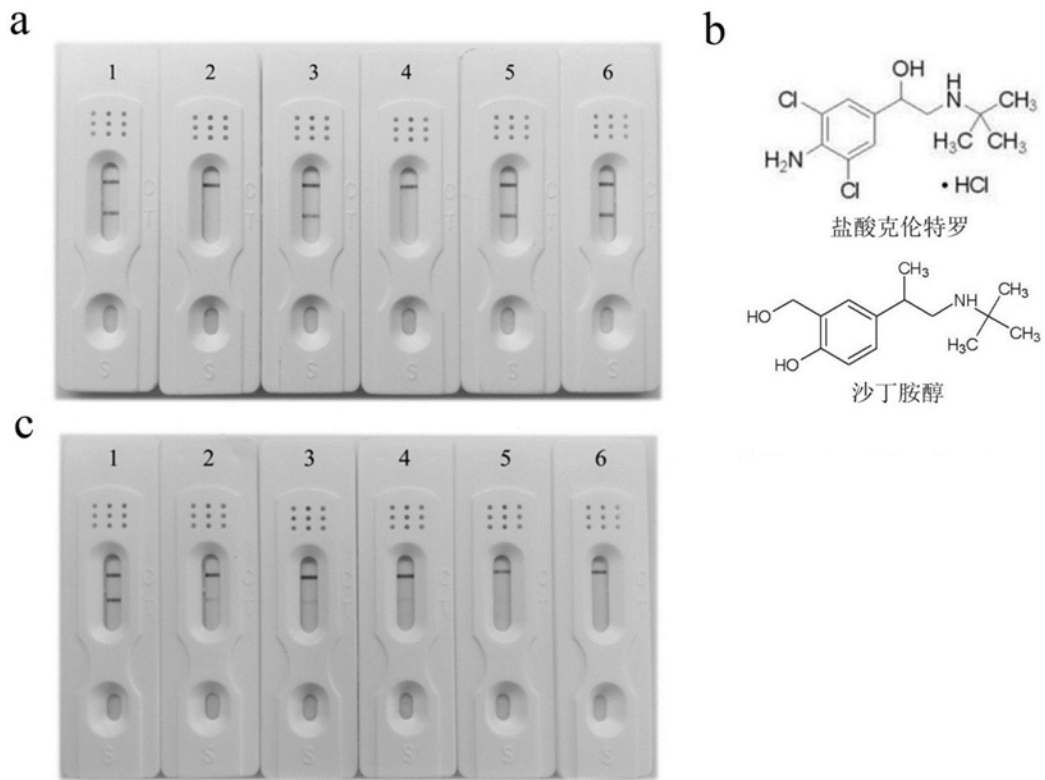


图8

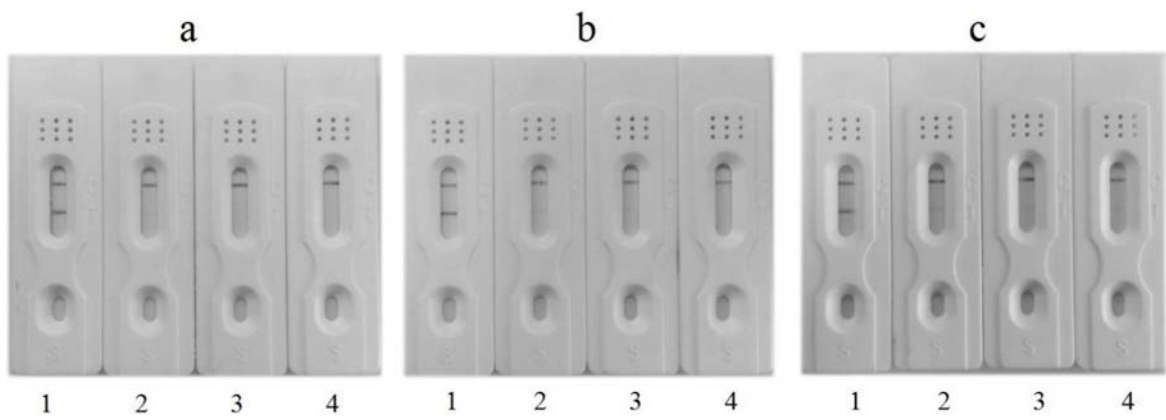


图9

专利名称(译)	一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒、胶体硒标记物、检测卡及其制备方法、应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107167615A</a>	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN2017110343657.1	申请日	2017-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	河南大学		
申请(专利权)人(译)	河南大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南大学		
[标]发明人	马远方 王志增 靖静 郭亚飞 陶宁亚 张贝 刘广超 李淑莲 张军 柴立辉		
发明人	马远方 王志增 靖静 郭亚飞 陶宁亚 张贝 刘广超 李淑莲 张军 柴立辉		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/74		
其他公开文献	CN107167615B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于盐酸克伦特罗检测的胶体硒、胶体硒标记物、检测卡及其制备方法、应用，属于生物学免疫层析检测方法技术领域。本发明的胶体硒由胶体硒颗粒溶液和模板制成，该模板是SDS和PEG，其中PEG和SDS的摩尔比为10-80：1，制得的胶体硒为36nm左右的分散均匀的球形颗粒，颗粒均匀、形状规则，颗粒溶液清澈透亮，重悬特性好，用于侧向层析时分离效果好。采用该胶体硒制得的检测卡检测时具有灵敏、稳定、快速等优势，与传统的胶体金检测卡相比，原料价格便宜，制备方法简便成本更加经济。

