



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106568949 B

(45)授权公告日 2018.07.27

(21)申请号 201610944123.X

(22)申请日 2016.11.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106568949 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(73)专利权人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 熊勇华 黄小林 周耀峰 熊斯诚 江湖 赖卫华

(74)专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有限公司 36115

代理人 刘华

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01) (续)

(56)对比文件

CN 105759045 A, 2016.07.13, 说明书第5-44段.

CN 105842441 A, 2016.08.10, 说明书第3-30段.

CN 104991070 A, 2015.10.21, 说明书第4-40段.

CN 101893623 A, 2010.11.24, 全文.

CN 102253214 A, 2011.11.23, 全文.

CN 105602545 A, 2016.05.25, 全文.

US 2010291474 A1, 2010.11.18, 全文.

董春红等. 双亲性高分子PMAO超声乳化法改性量子点的制备.《天津市生物医学工程学会第三十三届学术年会论文集》.2013, 第3页.

金丽等. 无机/有机掺杂CdTe/PMMA的合成.《吉林化工学院院报》.2013, 第30卷(第1期), 第24-27页.

戴尽波. 量子点标记免疫技术在食品中小分子有害物检测中的应用.《食品科学》.2016, 第19卷(第37期), 第296-301页.

刘富华等. 量子点制备与表面修饰.《化学通报》.2013, 第76卷(第9期), 第822-827页.

任美玲. 量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测玉米中的黄曲霉毒素B1.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2016, (第03期), 第1-60页. (续)

审查员 刘莉丹

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

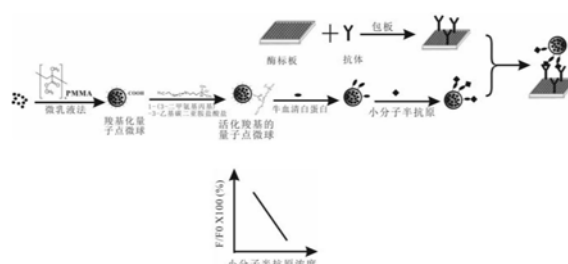
(54)发明名称

一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法利用包埋有量子点的荧光微球替代常规的酶载体与小分子半抗原偶联,以偶联产物作为竞争抗原执行直接竞争ELISA.该技术方案中,荧光微球通过高聚物载体包埋了大量的量子点,因而具有更高的发光强度,可有效地提高检测的灵敏度.此外,由于量子点包裹在微球的内部,受外界环境影响小,在一定程度上避免了荧光的淬灭以及微球的聚沉.同时,由于量子点微球具有相对较大的粒径,

因此较量子点分离纯化简便,低转速(< 10000rpm)离心就能实现常规溶液中的微球分离;而且,较大的粒径可在一定程度上降低竞争抗原与包被抗体之间过高的亲和力,从而提升检测的灵敏度。



CN 106568949 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

*G01N 33/58*(2006.01)

*G01N 33/533*(2006.01)

*G01N 33/543*(2006.01)

(56)对比文件

任美玲.量子点荧光微球免疫层析试纸条定量检测玉米中的黄曲霉毒素B1.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2016,(第03期),第1-60页.

1. 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 在酶标板上包被抗体;

2) 以氯仿为溶剂,配制油酸基团修饰的量子点浓度为15~25mg/mL、PMMA浓度为25~35mg/mL、PMAO浓度为15~25mg/mL的混合溶液,保持25~35min,而后将取十二烷基磺酸钠水溶液与上述混合溶液混合至其中油酸基团修饰的量子点浓度为3~4mg/mL,混合均匀后去除氯仿,固液分离取固相,即得到标记有羧基修饰的量子点的荧光微球;

3) 利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,将产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原;

4) 将待测溶液与上述竞争抗原加入至步骤1) 包被有抗体的酶标板中,抗原抗体结合反应,而后检测酶标板的荧光强度;

步骤3) 中,所述利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,包括以下步骤:在磷酸盐缓冲液中将标记有羧基修饰的量子点的荧光微球与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺、牛血清白蛋白混合,至溶液中牛血清白蛋白的质量体积分数为0.8%~1.2%,于35~39℃反应25~35min,而后补加1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺3~5次,每次补加后于35~39℃反应25~35min,补加全部完成后固液分离取固相,洗涤后溶解于碳酸氢钠溶液中。

2. 根据权利要求1所述的一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,其特征在於所述量子点是CdSe/ZnS量子点。

3. 根据权利要求1所述的一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,其特征在於所述量子点的激发波长为450nm、发射波长为620nm。

4. 根据权利要求1所述的一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,其特征在於氯仿的去除是利用旋蒸实现的。

5. 根据权利要求1所述的一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,其特征在於步骤3) 中所述固液分离是以12000~15000rpm的转速离心8~12min。

6. 根据权利要求1所述的一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,其特征在於所述抗原抗体反应的条件是在35~39℃反应25~35min。

## 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗原检测技术领域,进一步涉及直接竞争ELISA法的改进,具体涉及一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法。

### 背景技术

[0002] 免疫分析是以抗原与抗体之间特异性识别和可逆性结合反应为基础的痕量分析方法。免疫分析不仅适用于大分子化合物(如蛋白质、核酸、细菌)的检测,也适用于小分子化合物(如真菌毒素、农药、兽药、环境激素、违禁食品添加剂以及生理活性化学物质等)的测定。由于免疫分析具有特异性强、灵敏度高、简单、快速、费用低和适于现场大批量样品筛选等优点,它在环境监测、食品安全检测、临床诊断以及生物分析等分析领域中得到广泛应用。

[0003] 酶联免疫吸附法作为免疫分析的形式之一,具有技术条件要求低、携带方便、操作简便和经济、有效期长、灵敏度高、特异性强、可实现大批量检测、常以试剂盒的形式出现且易商品化等优点,已经成为了应用最为广泛和发展最为成熟的生物检测与分析技术。现今,常用的酶联免疫吸附法主要包括两大类:一类是双抗体夹心酶联免疫吸附法,该类方法已被广泛用于检测含有多个抗原决定簇的大分子抗原,如蛋白、微生物以及细胞等。相对于具有多个抗原决定簇的大分子抗原,小分子化合物因其分子量较小(小于6000)往往只有单一抗原决定簇,无法使用双抗体夹心酶联免疫吸附法进行检测。竞争酶联免疫吸附法是检测小分子半抗原最常用的方法之一,主要有两种检测模式:直接竞争酶联免疫吸附法和间接竞争酶联免疫吸附法。其中,直接竞争酶联免疫吸附法因其简单快速在小分子半抗原的检测中扮演了重要的角色。然而,传统的直接竞争酶联免疫吸附法具有两个明显的缺点:一、采用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶催化化学底物显色作为信号输出导致灵敏度较低;二、酶标抗原或竞争抗原与抗体的亲和力相对较高导致竞争抗原很难被目标分析物竞争,从而导致灵敏度偏低。因此,提高检测信号的灵敏度或降低竞争抗原对抗体的亲和力可以有效地提高传统直接竞争酶联免疫吸附法的灵敏度。

[0004] 在传统直接竞争酶联免疫吸附法中,竞争抗原的制备是通过将小分子半抗原与载体蛋白(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)偶联。由于载体蛋白的尺寸较小,导致竞争抗原与相应抗体的亲和力较高,无法被目标物所竞争。相对于载体蛋白,纳米颗粒具有更大的尺寸和重量,在相同的温度下,其布朗运动更慢。使用纳米颗粒作为小分子半抗原的载体可以合成出亲和力更低的竞争抗原,从而更容易被目标分析物竞争,进而获得更高的检测灵敏度。此外,使用纳米材料替代蛋白作为竞争抗原的载体,有效地规避了传统化学合成或生物合成抗原类似物的局限性,如操作复杂繁琐、费时费力以及偶然性大等。基于上述技术优势,纳米颗粒的抗原载体受到了广泛的关注,然而在载体的选择方面,既应当考虑分子层面的偶联效果,同时还应当具有良好的发光特性。近年来,量子点以其宽激发、窄发射、斯托克斯位移大和耐光漂白等优良的光学特性在免疫学分析中得到了广泛应用,有研究者尝试利用量子点代替常规载体HRP、ALP,然而实际研究中发现量子点与抗原的结合效果不理想,相

应的发光性能难以保证,同时由于量子点本身性质不稳定,因此易受环境影响而发生荧光淬灭,此外,由于量子点的粒径仍相对较小,因此一方面存在分离纯化不方便的问题,另一方面仍会导致竞争抗原和抗体之间亲和力过高的现象。

### 发明内容

[0005] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,以解决现有技术的直接竞争ELISA法中因显色底物发光性能不佳而导致检测灵敏度较低的技术问题。

[0006] 本发明要解决的另一技术问题是现有技术的直接竞争ELISA法中因竞争性抗原与抗体的亲和力过高而导致检测灵敏度较低。

[0007] 本发明要解决的再一技术问题是以期通过量子点替代酶载体的直接竞争ELISA法中,量子点的发光性能难以得到保证。

[0008] 本发明要解决的又一技术问题是以期通过量子点替代酶载体的直接竞争ELISA法中,量子点的化学稳定性较低。

[0009] 本发明要解决的又一技术问题是当采用量子点微球作为抗原标记载体对小分子半抗原执行酶联免疫吸附法检测时,被标记抗原的生物学活性下降。

[0010] 本发明要解决的又一技术问题是当采用量子点微球作为抗原标记载体对小分子半抗原执行酶联免疫吸附法检测时,在长期保持过程中抗原-量子点微球复合物中抗原活性下降。

[0011] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0012] 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法属于直接竞争ELISA法,其中与小分子半抗原偶联的载体是标记有羧基修饰的量子点的荧光微球。

[0013] 作为优选,该方法包括以下步骤:

[0014] 1) 在酶标板上包被抗体;

[0015] 2) 制备标记有羧基修饰的量子点的荧光微球;

[0016] 3) 将步骤2) 所得产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原;

[0017] 4) 将待测溶液与所述竞争抗原加入至步骤1) 包被有抗体的酶标板中,抗原抗体结合反应,而后检测酶标板的荧光强度。

[0018] 作为优选,步骤2) 所述标记有羧基修饰的量子点的荧光微球是通过以下方法制备的:以氯仿为溶剂,配制油酸基团修饰的量子点浓度为15~25mg/mL、PMMA浓度为25~35mg/mL、PMAO浓度为15~25mg/mL的混合溶液,保持25~35min,而后将取十二烷基磺酸钠水溶液与所述混合溶液混合至其中油酸基团修饰的量子点浓度为3~4mg/mL,混合均匀后去除氯仿,固液分离取固相,即得到标记有羧基修饰的量子点的荧光微球。在此基础上进一步优选的:所述混合均匀可以是在超声震荡条件下实现的;所述固液分离可以通过离心实现的;固液分离取固相后可以用超纯水洗涤,洗涤次数可以是三次,洗涤后的产物可以在超纯水中于4℃保存。

[0019] 作为优选,所述量子点是CdSe/ZnS量子点。

[0020] 作为优选,所述量子点的激发波长为450nm、发射波长为620nm。

[0021] 作为优选,氯仿的去除是利用旋蒸实现的。

[0022] 作为优选,步骤3)具体包括以下操作:利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,将产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原。

[0023] 作为优选,所述利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,包括以下步骤:在磷酸盐缓冲液中将标记有羧基修饰的量子点的荧光微球与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、牛血清白蛋白混合,至溶液中牛血清白蛋白的质量体积分数为0.8%~1.2%,于35~39℃反应25~35min,而后补加1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺3~5次,每次补加后于35~39℃反应25~35min,补加全部完成后固液分离取固相,洗涤后溶解于碳酸氢钠溶液中。在以上的优选技术方案中,为了获得高的重复性,牛血清白蛋白采用了饱和标记。在此基础上进一步优选的:补加的次数可以是4次;所述磷酸盐缓冲液的初始浓度可以是0.04~0.06mol/L,其pH可以是5.8~6.2;每次重复补加的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺的量可以相等;取固相后可以用超纯水洗涤,洗涤次数可以是三次(该洗涤步骤用于去除多余的BSA);所述碳酸氢钠溶液的pH可以是8.2~8.6;溶解于碳酸氢钠溶液中以后可以于4℃保存。

[0024] 作为优选,步骤3)中的固液分离是以12000~15000rpm的转速离心8~12min。

[0025] 作为优选,标记有羧基修饰的量子点的荧光微球与小分子半抗原之间的偶联是利用活泼酯法实现的。

[0026] 作为优选,经BSA包被的标记有羧基修饰的量子点的荧光微球与小分子半抗原偶联的偶联是利用活泼酯法实现的。

[0027] 在以上技术方案中,为获得不同亲和力的竞争性抗原,可以通过控制小分子半抗原与牛血清白蛋白包被的量子点微球上的牛血清白蛋白的摩尔比来实现,具体用量及操作条件可依据活泼酯法的一般技术常识进行适应性选择;当然,小分子半抗原与牛血清白蛋白包被的量子点微球上的牛血清白蛋白之间具体标记摩尔可以比分别为5:1、1:1、1:5、1:10、1:20,优选为1:10。

[0028] 作为优选,所述抗原抗体反应的条件是在35~39℃反应25~35min。

[0029] 作为优选,步骤4)中竞争性抗原及待测样品的加入量均为40~60μL/孔;更优的是50μL/孔。

[0030] 作为优选,经抗原抗体反应后,先用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次,再用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次,再检测荧光强度。

[0031] 在以上技术方案中,检测得到的荧光强度即用于反应待测样品中小分子半抗原的含量,实际操作中可利用已知浓度且呈梯度分布的小分子半抗原标准溶液,通过以上方法绘制百分荧光率(百分荧光率( $\%$ )= $F/F_0 \times 100\%$ ,其中 $F_0$ 为第一个标准(0标准)的荧光强度值, $F$ 为标准品或样本的荧光强度值的平均值)——小分子半抗原浓度的标准曲线,再利用待测样品的荧光强度计算出相应的百分荧光率,然后从标准曲线中计算待测样品的小分子半抗原含量。具体操作方法可依据本技术领域的一般技术常识进行适应性选择。上述梯度分布的小分子半抗原的标准液,可以分别选择1.5、1、0.75、0.4、0.2、0.1、0.05、0pg/mL。

[0032] 在以上技术方案中,各试剂在使用前可以先于室温平衡30min以上再使用。所述PMAO是马来酸酐/1-十八碳烯交替共聚物,所述PMMA是聚甲基丙烯酸甲酯,二者均可自市面购得。所述油酸基团修饰的量子点可以依据本领域的常规技术制备获得。

[0033] 本发明适用于小分子半抗原的定量检测,如真菌毒素、农药、兽药、环境激素、违禁

食品添加剂以及具有生理活性的化学物质等,特别是适合于目标分析物的痕量检测。样品处理按照常规处理方法即可。

[0034] 采用本发明技术方案具有如下有益效果:

[0035] 1、本发明通过微乳液法将单个的荧光量子点包埋至聚合物微球中,制备出了发光强度更高的荧光量子点微球,其发光强度较相应的量子点提高了2800倍;此外,由于量子点包裹在微球的内部,受外界环境(溶剂、热、电、磁等)影响小,在壳结构的保护下性质更稳定,在一定程度上避免了荧光的淬灭以及微球的聚沉。同时,量子点微球的粒径约为几十到几百纳米,分离纯化较量子点简便,低转速(<10000rpm)离心就能实现常规溶液中的微球分离。

[0036] 2、本发明方法通过使用油溶性量子点制备高发光的量子点荧光微球用于代替量子点直接用于常规免疫学荧光标记,大大地提高了荧光信号输出的强度,有利于提高检测灵敏度。

[0037] 3、本发明方法通过使用粒径更大的量子点微球替代小的蛋白粒子作为小分子半抗原的偶联载体,可以获得不同亲和力的竞争抗原,且亲和力变化范围更宽,有助于提高直接竞争免疫学分析的检测灵敏度。

[0038] 4、本发明技术通过利用高发光的量子点微球替代传统酶催化的化学显色信号,减少了酶催化的步骤,因此操作更简单,检测时间更短。

[0039] 本发明提供了一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法利用包埋有量子点的荧光微球(Quantum dot beads, QBs)替代常规的酶载体与小分子半抗原偶联,以偶联产物作为竞争抗原执行直接竞争ELISA。该技术方案中,荧光微球通过高聚物载体包埋了大量的量子点,因而具有更高的发光强度,可有效地提高检测的灵敏度。此外,由于量子点包裹在微球的内部,受外界环境(溶剂、热、电、磁等)影响小,在壳结构的保护下性质更稳定,在一定程度上避免了荧光的淬灭以及微球的聚沉。同时,量子点微球的粒径约为几十到几百纳米,分离纯化较量子点简便,低转速(<10000rpm)离心就能实现常规溶液中的微球分离;而且,由于荧光微球具有较大的粒径,因此可在一定程度上降低竞争抗原与包被抗体之间过高的亲和力,从而提升检测的灵敏度。

## 附图说明

[0040] 图1是本发明方法的原理示意图;

[0041] 图2是本发明实施例1中黄曲霉毒素M1直接竞争荧光免疫学分析的标准曲线;

[0042] 图3是本发明实施例1中对硫磷直接竞争荧光免疫学分析的标准曲线;

[0043] 图4是本发明实施例1中恩诺沙星直接竞争荧光免疫学分析的标准曲线;

[0044] 图5是本发明实施例1中19-去甲睾酮直接竞争荧光免疫学分析的标准曲线;

[0045] 图6是本发明实施例1中三聚氰胺直接竞争荧光免疫学分析的标准曲线;

[0046] 图7是本发明实施例1中1,25-二羟基维生素D直接竞争荧光免疫学分析的标准曲线。

## 具体实施方式

[0047] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在

以下实施例中对于属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0048] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0049] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解相同含义。

[0050] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;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;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0051] 在以下试验中,磷酸盐缓冲液(PBS,0.05M,pH 7.4)的配置方法如下:NaCl 40g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.5g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g,KCl 1.0g溶于1L超纯水中。用0.1M NaOH调pH值至8.0~9.0。

[0052] 试验中所涉及的鼠源性IgG类单克隆抗体:抗黄曲霉毒素M1单克隆抗体,抗对硫磷单克隆抗体、抗恩诺沙星单克隆抗体、抗19-去甲睾酮单克隆抗体、抗三聚氰胺单克隆抗体及抗1,25-二羟基维生素D单克隆抗体,均由无锡中德伯尔生物技术有限公司提供,本实验所涉及的所有小分子半抗原均购买自Sigma公司。

[0053] 实施例1

[0054] 1、羧基修饰的量子点荧光微球的制备

[0055] 10mg油酸基团修饰后的量子点(该量子点的激发波长为450nm,发射波长为620nm)溶解在0.5mL的氯仿中,再加入15mg的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)和10mg马来酸酐/1-十八碳烯交替共聚物(PMAO),半小时后该混合液重新溶解在2.5mL的十二烷基磺酸钠水溶液中最最终浓度约3.3mg/mL,该混合液在超声条件下混匀,混匀后用旋蒸的方法除去氯仿这个非极性有机溶剂后得到水溶性羧基修饰的量子点荧光微球通过离心的方式将量子点荧光微球分离下来,分离后的量子点荧光微球用超纯水洗涤三次。洗涤后的量子点荧光微球重新溶解在超纯水中4℃保存。

[0056] 2、牛血清白蛋白包被的量子点微球的制备

[0057] 将水溶性羧基修饰的量子点荧光微球溶解于pH 6.0,0.05mol/L磷酸盐缓冲液中,加入适量的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺后,加入质量体积分数为1%的牛血清白蛋白,37℃反应半小时,半小时后继续加入等量的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺,重复补加四次,该牛血清白蛋白饱和包被的量子点荧光微球在14000rpm下离心10min,去掉上清后用超纯水洗涤三次去除多余的血清白蛋白,离心后的量子点荧光微球复溶在pH 8.4的碳酸氢钠溶液中,4℃保存。

[0058] 3、检测效果验证试验

[0059] 本节以第1、2节所制备的牛血清白蛋白包被的量子点微球为实验原料,执行本发明方法,用以验证该方法对真菌毒素、农药、兽药、环境激素、违禁食品添加剂等小分子物质的检测效果。

[0060] 本发明方法用于检测小分子半抗原含量时,通过以下步骤实施样品前处理,而后

用本发明检测方法进行检测、分析结果。

[0061] 1) 样品前处理:将买来的小分子半抗原标准品稀释至相应的浓度梯度,浓度按照所需的实际检测限确定;稀释好的抗原样本放入4℃冰箱备用。不同的待检样本中目标分析物的纯化方法具体参照国标完成。

[0062] 2) 用本发明检测方法进行检测真菌毒素、农药、兽药、环境激素、违禁食品添加剂及具有生理活性的化学物质含量。

[0063] 3) 分析结果。

[0064] 用上述制备的8个不同浓度的标准品1.5、1、0.75、0.4、0.2、0.1、0.05、0pg/mL。在激发波长为450nm,发射波长为620nm处检测荧光强度。

[0065] 百分荧光率的计算,标准品或样本的百分荧光率等于标准品或样本的荧光强度值的平均值除以第一个标准(0标准),即百分荧光率(%)= $F/F_0 \times 100\%$ ,其中 $F_0$ 为第一个标准(0标准)的荧光强度值, $F$ 为标准品或样本的荧光强度值的平均值(双孔)。

[0066] 以百分荧光率为纵坐标,以小分子半抗原浓度(g/mL)为横坐标绘制标准曲线,求出线性方程。当进行实际样本检测时,将样本的荧光值( $F/F_0 \times 100\%$ )值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应样本的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中小分子半抗原的实际浓度。

[0067] 3.1对黄曲霉毒素 $M_1$ 的检测实验

[0068] 20 $\mu$ g/mL的蛋白G每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,4℃过夜,用含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入0.1 $\mu$ g/mL的抗黄曲霉毒素 $M_1$ 单克隆抗体100 $\mu$ L每孔,37℃孵育120min,含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入10mg/mL的牛血清白蛋白340 $\mu$ L每孔,37℃孵育120min,有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入不同浓度的黄曲霉毒素 $M_1$ ,每孔50 $\mu$ L加入到酶标板中,加入50 $\mu$ L黄曲霉毒素 $M_1$ 偶联牛血清白蛋白包被的量子点微球(竞争抗原),37℃孵育40min后,用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次后用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次,用SpectraMax i3x多功能酶标仪测定酶标板荧光强度。将待检溶液每孔50 $\mu$ L加入到包被有抗体的酶标板中,同时加入50 $\mu$ L竞争抗原,37℃孵育40分钟后测定每孔的荧光强度,通过计算平均值后代入到标准曲线获得待检样品中黄曲霉毒素 $M_1$ 浓度。具体实验结果如下:线性标准曲线为 $y = -25.921n(x) + 17.158$ , $R^2 = 0.9984$ ,见附图2。通过标准曲线计算得该方法的半数抑制浓度 $IC_{50}$ (即 $F/F_0 \times 100\% = 50\%$ )为0.28pg/mL。

[0069] 以上方法不局限于黄曲霉毒素 $M_1$ 的检测,还可以用于其他真菌毒素的检测,黄曲霉毒素 $B_1/B_2/G_1/G_2$ 、赭曲霉毒素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、伏马菌素、T2毒素等。

[0070] 3.2对对硫磷的检测实验

[0071] 20 $\mu$ g/mL的蛋白G每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,4℃过夜,用含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入0.1 $\mu$ g/mL的抗对硫磷单克隆抗体100 $\mu$ L每孔,37℃孵育120min,含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入10mg/mL的牛血清白蛋白340 $\mu$ L每孔,37℃孵育120min,有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入不同浓度的对硫磷,每孔50 $\mu$ L加入到酶标板中,加入50 $\mu$ L对硫磷偶联牛血清白蛋白包被的量子点微球(竞争

抗原), 37℃ 孵育40min后, 用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次后用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次, 用SpectraMax i3x多功能酶标仪测定酶标板荧光强度。将待检溶液每孔50μL加入到包被有抗体的酶标板中, 同时加入50μL竞争抗原, 37℃ 孵育40分钟后测定每孔的荧光强度, 通过计算平均值后代入到标准曲线获得待检样品中对硫磷浓度。具体实验结果如下: 线性标准曲线为 $y = -24.94 \ln(x) + 15.374$ ,  $R^2 = 0.9965$ , 见附图3。通过标准曲线计算得该方法的半数抑制浓度 $IC_{50}$  (即 $F/F_0 \times 100\% = 50\%$ ) 为0.25pg/mL。

[0072] 以上方法不局限于对硫磷的检测, 还可以用于其他类型的农药的检测, 如其他的有机磷或有机氯农药、氨基甲酸酯类农药等。

#### [0073] 3.3对恩诺沙星的检测实验

[0074] 20μg/mL的蛋白G每孔100μL加入酶标板中, 4℃ 过夜, 用含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次, 加入0.1μg/mL的抗恩诺沙星单克隆抗体100μL每孔, 37℃ 孵育120min, 含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次, 加入10mg/mL的牛血清白蛋白340μL每孔, 37℃ 孵育120min, 有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次, 加入不同浓度的恩诺沙星, 每孔50μL加入到酶标板中, 加入50μL恩诺沙星偶联牛血清白蛋白包被的量子点微球(竞争抗原), 37℃ 孵育40min后, 用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次后用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次, 用SpectraMax i3x多功能酶标仪测定酶标板荧光强度。将待检溶液每孔50μL加入到包被有抗体的酶标板中, 同时加入50μL竞争抗原, 37℃ 孵育40分钟后测定每孔的荧光强度, 通过计算平均值后代入到标准曲线获得待检样品中恩诺沙星浓度。具体实验结果如下: 线性标准曲线为 $y = -21.94 \ln(x) + 20.74$ ,  $R^2 = 0.9905$ , 见附图4。通过标准曲线计算得该方法的半数抑制浓度 $IC_{50}$  (即 $F/F_0 \times 100\% = 50\%$ ) 为0.26pg/mL。

[0075] 以上方法不局限于恩诺沙星的检测, 还可以用于其他类型的兽药检测, 如其他的氟喹诺酮类、磺胺类、β受体兴奋剂及四环素类药物等

#### [0076] 3.4对19-去甲睾酮的检测实验

[0077] 20μg/mL的蛋白G每孔100μL加入酶标板中, 4℃ 过夜, 用含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次, 加入0.1μg/mL的抗19-去甲睾酮单克隆抗体100μL每孔, 37℃ 孵育120min, 含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次, 加入10mg/mL的牛血清白蛋白340μL每孔, 37℃ 孵育120min, 有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次, 加入不同浓度的19-去甲睾酮, 每孔50μL加入到酶标板中, 加入50μL19-去甲睾酮偶联牛血清白蛋白包被的量子点微球(竞争抗原), 37℃ 孵育40min后, 用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次后用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次, 用SpectraMax i3x多功能酶标仪测定酶标板荧光强度。将待检溶液每孔50μL加入到包被有抗体的酶标板中, 同时加入50μL竞争抗原, 37℃ 孵育40分钟后测定每孔的荧光强度, 通过计算平均值后代入到标准曲线获得待检样品中19-去甲睾酮浓度。具体实验结果如下: 线性标准曲线为 $y = -28.39 \ln(x) + 20.294$ ,  $R^2 = 0.9802$ , 见附图5。通过标准曲线计算得该方法的半数抑制浓度 $IC_{50}$  (即 $F/F_0 \times 100\% = 50\%$ ) 为0.35pg/mL。

[0078] 以上方法不局限于19-去甲睾酮的检测, 还可以用于其他类型的环境激素的检测, 如性激素(孕酮、睾酮)、类固醇衍生物等。

### [0079] 3.5对三聚氰胺的检测实验

[0080] 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白G每孔100 $\mu\text{L}$ 加入酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗三聚氰胺单克隆抗体100 $\mu\text{L}$ 每孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育120min,含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入10mg/mL的牛血清白蛋白340 $\mu\text{L}$ 每孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育120min,有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入不同浓度的三聚氰胺,每孔50 $\mu\text{L}$ 加入到酶标板中,加入50 $\mu\text{L}$ 三聚氰胺偶联牛血清白蛋白包被的量子点微球(竞争抗原),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40min后,用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次后用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次,用SpectraMax i3x多功能酶标仪测定酶标板荧光强度。将待检溶液每孔50 $\mu\text{L}$ 加入到包被有抗体的酶标板中,同时加入50 $\mu\text{L}$ 竞争抗原,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40分钟后测定每孔的荧光强度,通过计算平均值后代入到标准曲线获得待检样品中三聚氰胺浓度。具体实验结果如下:线性标准曲线为 $y = -17.11 \ln(x) + 42.003$ ,  $R^2 = 0.9777$ ,见附图6。通过标准曲线计算得该方法的半数抑制浓度 $\text{IC}_{50}$ (即 $F/F_0 \times 100\% = 50\%$ )为0.63 $\text{pg}/\text{mL}$ 。

[0081] 以上方法不局限于三聚氰胺的检测,还可以用于其他违禁食品添加剂的检测。3.6对1,5-二羟基维生素D的检测实验

[0082] 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蛋白G每孔100 $\mu\text{L}$ 加入酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗1,25-二羟基维生素D单克隆抗体100 $\mu\text{L}$ 每孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育120min,含有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入10mg/mL的牛血清白蛋白340 $\mu\text{L}$ 每孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育120min,有0.05%的吐温20的0.01M的PBS洗涤酶标板三次后用0.01M的PBS洗涤一次,加入不同浓度的1,25-二羟基维生素D,每孔50 $\mu\text{L}$ 加入到酶标板中,加入50 $\mu\text{L}$ 1,25-二羟基维生素D偶联牛血清白蛋白包被的量子点微球(竞争抗原),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40min后,用含0.05%吐温20的0.01M磷酸盐缓冲液洗涤酶标板三次后用0.01M的磷酸盐缓冲液洗涤酶标板1次,用SpectraMax i3x多功能酶标仪测定酶标板荧光强度。将待检溶液每孔50 $\mu\text{L}$ 加入到包被有抗体的酶标板中,同时加入50 $\mu\text{L}$ 竞争抗原,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40分钟后测定每孔的荧光强度,通过计算平均值后代入到标准曲线获得待检样品中1,25-二羟基维生素D浓度。具体实验结果如下:线性标准曲线为 $y = -24.31 \ln(x) + 26.373$ ,  $R^2 = 0.9844$ ,见附图7。通过标准曲线计算得该方法的半数抑制浓度 $\text{IC}_{50}$ (即 $F/F_0 \times 100\% = 50\%$ )为0.38 $\text{pg}/\text{mL}$ 。

[0083] 以上方法不局限于1,5-二羟基维生素D的检测,还可以用于其他类型的生理活性化学物质的检测。

### [0084] 实施例2

[0085] 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法包括以下步骤:

[0086] 1) 在酶标板上包被抗体;

[0087] 2) 制备标记有羧基修饰的量子点的荧光微球;

[0088] 3) 将步骤2) 所得产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原;

[0089] 4) 将待测溶液与所述竞争抗原加入至步骤1) 包被有抗体的酶标板中,抗原抗体结合反应,而后检测酶标板的荧光强度。

[0090] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0091] 步骤2) 所述标记有羧基修饰的量子点的荧光微球是通过以下方法制备的:以氯仿为溶剂,配制油酸基团修饰的量子点浓度为15mg/mL、PMMA浓度为25mg/mL、PMAO浓度为15mg/mL的混合溶液,保持25min,而后将取十二烷基磺酸钠水溶液与所述混合溶液混合至其中油酸基团修饰的量子点浓度为3mg/mL,混合均匀后去除氯仿,固液分离取固相,即得到标记有羧基修饰的量子点的荧光微球。

[0092] 所述量子点是CdSe/ZnS量子点。

[0093] 所述量子点的激发波长为450nm、发射波长为620nm。

[0094] 氯仿的去除是利用旋蒸实现的。

[0095] 步骤3) 具体包括以下操作:利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,将产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原。

[0096] 所述利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,包括以下步骤:在磷酸盐缓冲液中将标记有羧基修饰的量子点的荧光微球与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、牛血清白蛋白混合,至溶液中牛血清白蛋白的质量体积分数为0.8%,于35℃反应25min,而后补加1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺3次,每次补加后于35℃反应25min,补加全部完成后固液分离取固相,洗涤后溶解于碳酸氢钠溶液中。

[0097] 所述固液分离是以12000rpm的转速离心8min。

[0098] 所述抗原抗体反应的条件是在35℃反应25min。

[0099] 实施例3

[0100] 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法包括以下步骤:

[0101] 1) 在酶标板上包被抗体;

[0102] 2) 制备标记有羧基修饰的量子点的荧光微球;

[0103] 3) 将步骤2) 所得产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原;

[0104] 4) 将待测溶液与所述竞争抗原加入至步骤1) 包被有抗体的酶标板中,抗原抗体结合反应,而后检测酶标板的荧光强度。

[0105] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

[0106] 步骤2) 所述标记有羧基修饰的量子点的荧光微球是通过以下方法制备的:以氯仿为溶剂,配制油酸基团修饰的量子点浓度为25mg/mL、PMMA浓度为35mg/mL、PMAO浓度为25mg/mL的混合溶液,保持35min,而后将取十二烷基磺酸钠水溶液与所述混合溶液混合至其中油酸基团修饰的量子点浓度为4mg/mL,混合均匀后去除氯仿,固液分离取固相,即得到标记有羧基修饰的量子点的荧光微球。

[0107] 氯仿的去除是利用旋蒸实现的。

[0108] 步骤3) 具体包括以下操作:利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,将产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原。

[0109] 所述利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,包括以下步骤:在磷酸盐缓冲液中将标记有羧基修饰的量子点的荧光微球与1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、牛血清白蛋白混合,至溶液中牛血清白蛋白的质量体积分数为1.2%,于39℃反应35min,而后补加1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺5次,每次补加后于39℃反应35min,补加全部完成后固液分离取固相,洗涤后溶解于碳酸氢钠溶液中。

- [0110] 所述固液分离是以15000rpm的转速离心12min。
- [0111] 所述抗原抗体反应的条件是在39℃反应35min。
- [0112] 实施例4
- [0113] 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法包括以下步骤:
- [0114] 1) 在酶标板上包被抗体;
- [0115] 2) 制备标记有羧基修饰的量子点的荧光微球;
- [0116] 3) 将步骤2) 所得产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原;
- [0117] 4) 将待测溶液与所述竞争抗原加入至步骤1) 包被有抗体的酶标板中,抗原抗体结合反应,而后检测酶标板的荧光强度。
- [0118] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:
- [0119] 所述量子点是CdSe/ZnS量子点。
- [0120] 所述抗原抗体反应的条件是在39℃反应35min。
- [0121] 步骤3) 具体包括以下操作:利用牛血清白蛋白包被标记有羧基修饰的量子点的荧光微球,将产物与小分子半抗原偶联,即得到竞争抗原。
- [0122] 实施例5
- [0123] 一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法,该方法属于直接竞争ELISA法,其中与小分子半抗原偶联的载体是标记有羧基修饰的量子点的荧光微球。
- [0124] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

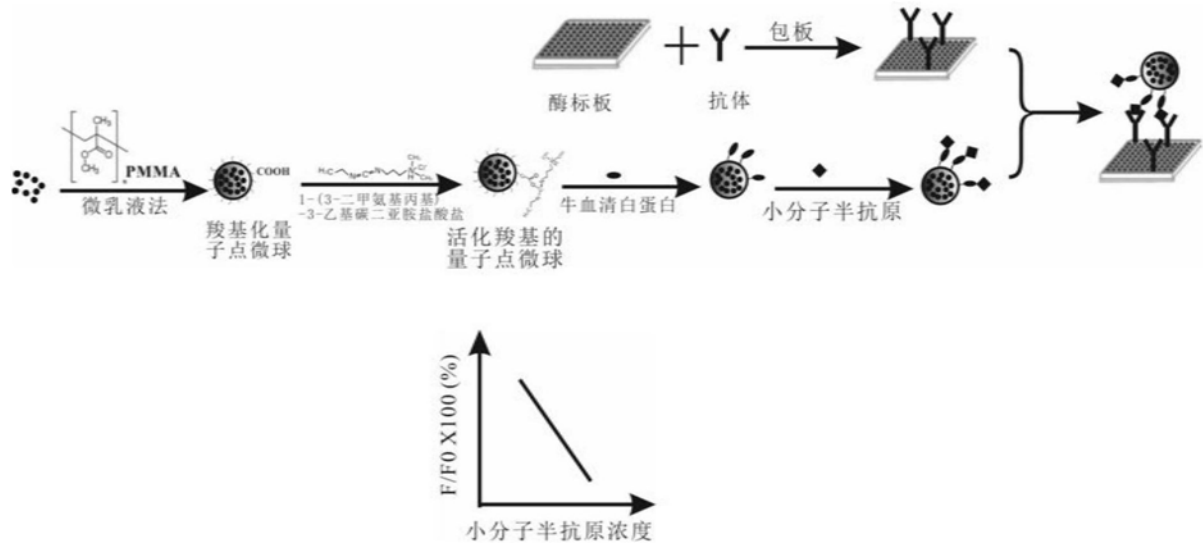


图1

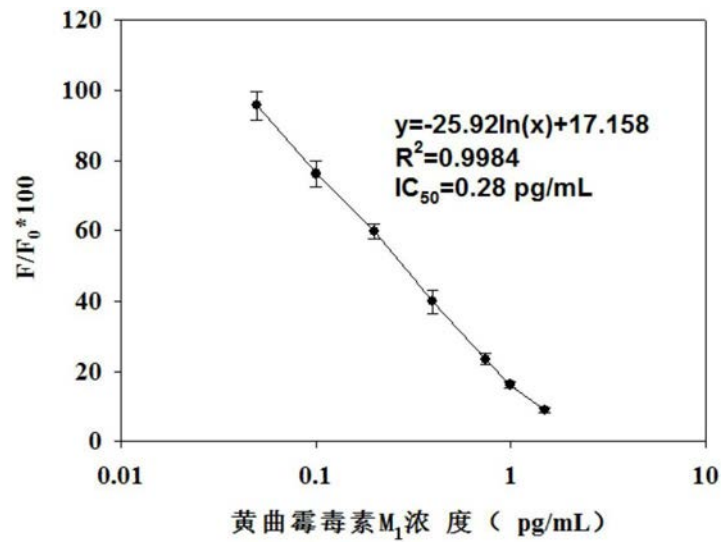


图2

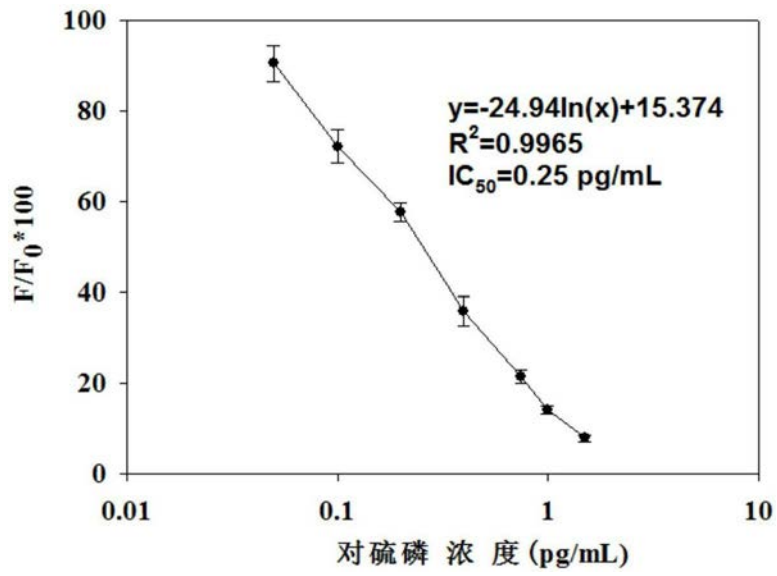


图3

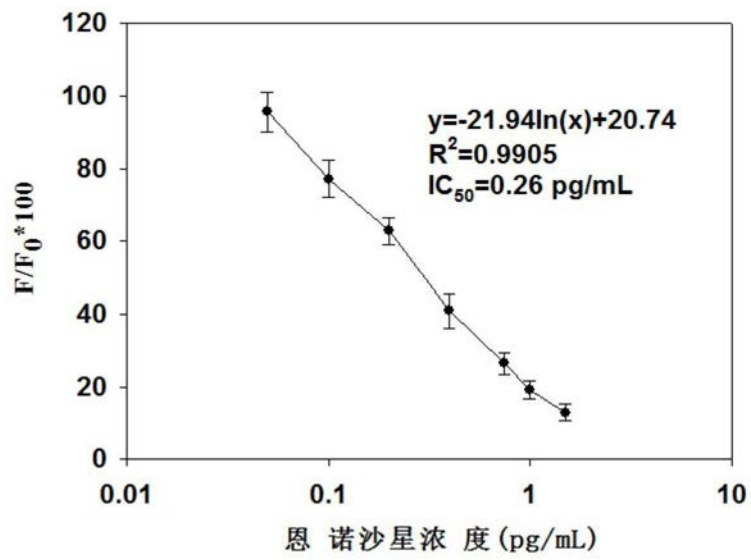


图4

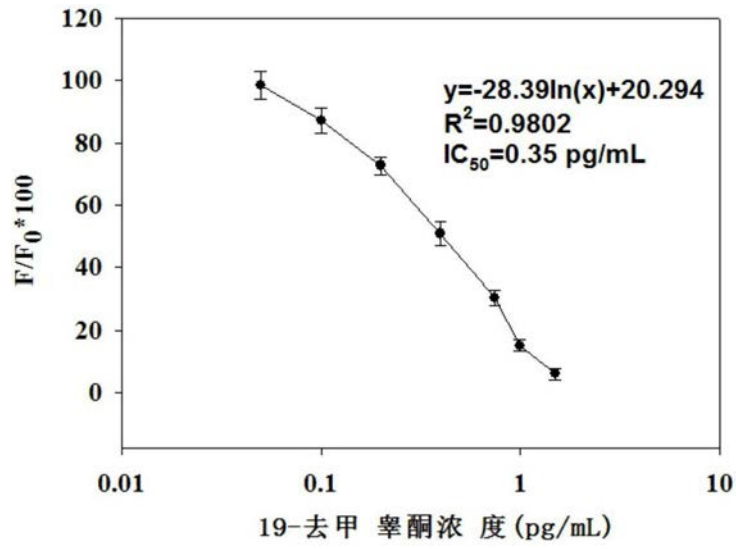


图5

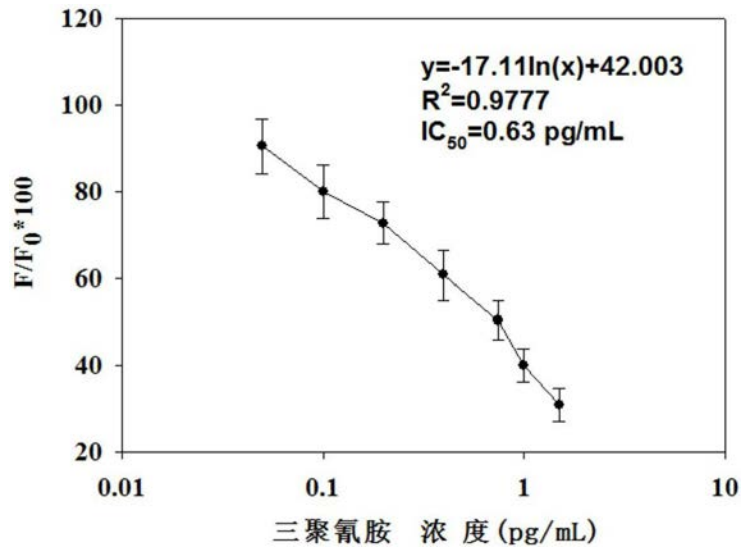


图6

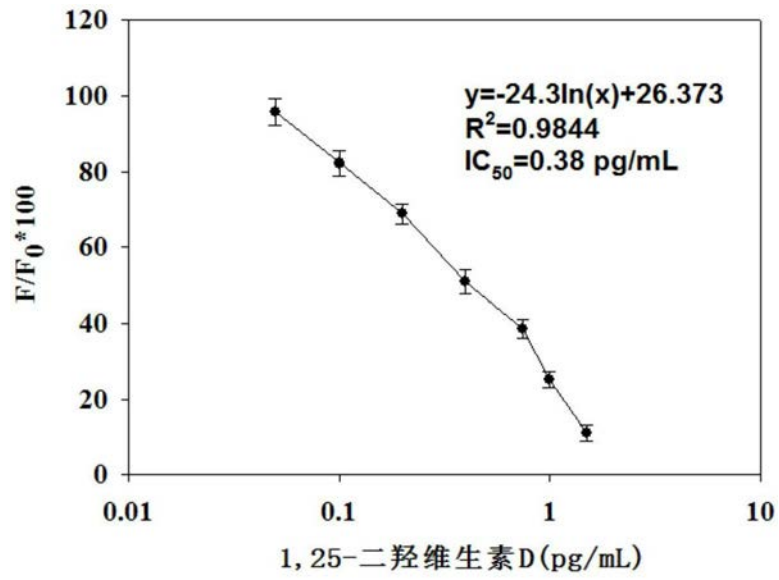


图7

专利名称(译)	一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106568949B</a>	公开(公告)日	2018-07-27
申请号	CN201610944123.X	申请日	2016-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	熊勇华 黄小林 周耀峰 江湖 赖卫华		
发明人	熊勇华 黄小林 周耀峰 熊斯诚 江湖 赖卫华		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/58 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/588		
代理人(译)	刘华		
其他公开文献	CN106568949A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种基于直接竞争荧光免疫分析的小分子半抗原检测方法，该方法利用包埋有量子点的荧光微球替代常规的酶载体与小分子半抗原偶联，以偶联产物作为竞争抗原执行直接竞争ELISA。该技术方案中，荧光微球通过高聚物载体包埋了大量的量子点，因而具有更高的发光强度，可有效地提高检测的灵敏度。此外，由于量子点包裹在微球的内部，受外界环境影响小，在一定程度上避免了荧光的淬灭以及微球的聚沉。同时，由于量子点微球具有相对较大的粒径，因此较量子点分离纯化简便，低转速(<10000rpm)离心就能实现常规溶液中的微球分离；而且，较大的粒径可在一定程度上降低竞争抗原与包被抗体之间过高的亲和力，从而提升检测的灵敏度。

