

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810022031.1

[43] 公开日 2008 年 12 月 3 日

[11] 公开号 CN 101315370A

[22] 申请日 2008.6.23

[21] 申请号 200810022031.1

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
江南大学食品学院

[72] 发明人 胥传来 冀宝庆 陈伟 祝长青
边爱

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

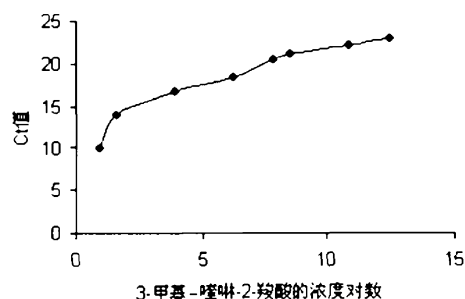
权利要求书 4 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种 3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸的免疫荧光
PCR 检测方法

[57] 摘要

一种 3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸的免疫荧光 PCR 检测方法, 属于免疫分析化学技术领域。本发明包括包被原、免疫原、和抗体的制备, 包被原的固定, 磁性纳米粒子的修饰, 磁性纳米粒子与包被原的偶联, 两种粒径的金纳米粒子制备, 两种金纳米探针的制备, 流动注射系统中的免疫反应, 实时荧光定量 PCR 检测和待测样品的检测; 本发明大大提高了喹啉类饲料添加剂代谢物 3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸检测的灵敏度, 且操作更加简便, 达到了高通量的目的, 而且以磁性粒子作为固相载体, 具有清洗和分离方便, 操作简单的优点, 用 DNA 修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的 HRP 进行免疫反应, 简化了反应的条件, 提高了检测的灵敏度, 达到国际领先水平。



1. 一种3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法，其特征是包被原、免疫原、和抗体的制备，包被原的固定，磁性纳米粒子的修饰，磁性纳米粒子与包被原的偶联，两种粒径的金纳米粒子制备，两种金纳米探针的制备，流动注射系统中的免疫反应，实时荧光定量PCR检测和待测样品的检测；工艺步骤为：

(1) 包被原的制备：将 3-甲基-喹啉-2-羧酸与间氨基苯甲酸相连，再与卵清蛋白相偶联得到包被原；

(2) 免疫原的制备：将3-甲基-喹啉-2-羧酸与牛血清蛋白相偶联得到免疫原；

(3) 抗体的制备：用步骤(2)得到的免疫原免疫兔子得到特异性多克隆抗体；

(4) 包被原的固定：将步骤(1)得到的包被原与磁性微粒偶联，并固定于玻璃微通道内；

(5)磁性纳米粒子的修饰：将制备的 Fe_3O_4 种子用3-氨丙基三乙氧基硅烷修饰；

(6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联：

(7) 两种粒径的金纳米粒子制备；

(8) 两种金纳米探针的制备；

(9) 流动注射系统中的免疫反应：

(10) 实时荧光定量PCR检测：将3-甲基-喹啉-2-羧酸和多克隆抗体通过玻璃微通道内，竞争结合后的多克隆抗体与经羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的金纳米探针反应，变性得到单链DNA并将其收集，收集得到的单链DNA进行实时荧光定量PCR检测，得到关于3-甲基-喹啉-2-羧酸的浓度与Ct值的标准曲线；

(11) 待测样品的检测：待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对，得到待测样品中3-甲基-喹啉-2-羧酸的含量。

2、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法，其特征是包被原的制备：

取3-甲基-喹啉-2-羧酸102mg，溶解在6mL N,N-二羟基甲酰胺DMF中，加入120 μ L三正丁胺，反应0.5小时，再加入75 μ L氯甲酸异丁酯，反应1小时，再与含有100mg间氨基苯甲酸的pH9.6碳酸钠缓冲溶液6mL溶液混合，在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应2小时，过程中有沉淀产生，离心，取沉淀物，干燥，得到3-甲基-喹啉-2-羧酸半抗原；取3-甲基-喹啉-2-羧酸半抗原9.9mg，N-羟基琥珀酰亚胺NHS 11.5mg，N,N-二环己基二亚胺DCC 20.63mg，加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺DMF中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL含60mg卵清蛋白OVA的溶液在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，冻干，-20 $^{\circ}$ C保存备用。

3、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法，其特征是免疫原的制备：取3-甲基-喹啉-2-羧酸102mg，N-羟基琥珀酰亚胺NHS

11.5mg, N,N-二环己基二亚胺DCC 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺DMF中, 室温搅拌反应过夜, 离心去沉淀, 上清液再与3mL含130mg卵清蛋白OVA的溶液在4℃下搅拌反应过夜, 离心, 上清液用超纯水透析3天, 冻干, -20℃保存备用。

4、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法, 其特征是磁性纳米粒子的修饰: 用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的溶液及 NaOH 溶液, 将所配两种铁盐溶液混合, 在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12 mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2 mol/L; NaOH 溶液的浓度为 2.5 mol/L; 在剧烈搅拌下将一定体积的 NaOH 溶液缓慢滴加到混合铁盐溶液中, 将所得的沉淀在 60℃陈化 2 小时, 用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次, 过滤后再在 60℃干燥 24 小时, 在玛瑙研钵中研磨后所得产物为 Fe_3O_4 种子。将 Fe_3O_4 种子 0.125g 用 100mL 乙醇和 1mL 二次蒸馏水分散, 超声 30min, 滴加 0.4mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷 APTES, 室温搅拌 7 小时, 以 8000r/min 离心 30min, 将 APTES 修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒从反应介质中分离, 并用乙醇溶液对其清洗 5 次, 过滤后再在 60℃干燥 24 小时, 备用。

5、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法, 其特征是磁性纳米粒子与包被原的偶联: 取所得APTES修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒10mg, N-羟基琥珀酰亚胺NHS 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺DCC 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺DMF中, 室温搅拌反应过夜, 离心去沉淀, 上清液再与3mL含60mg卵清蛋白OVA的溶液在4℃下搅拌反应过夜, 离心, 上清液用超纯水透析3天, 对透析袋中溶液进行磁性分离, 弃上清, 加入含2%明胶的pH9.6碳酸钠缓冲溶液封闭, 再加入PBST洗涤液, 洗涤后磁分离, 去上清, 最后向磁性分离过的离心管中加入1mL 0.02mol/L pH7.6的Tris缓冲液, 4℃保存备用。

6、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法, 其特征是金纳米粒子的制备: 所用的玻璃仪器都强酸浸泡, 双蒸水清洗, 晾干备用; 制备时, 向洁净的三角烧瓶中加入100mL质量浓度为0.01%的氯金酸, 加热, 煮沸, 紧接着加入1%的柠檬酸三钠溶液3.5mL 或1mL, 边加热边搅拌, 溶液颜色从淡黄色变成红色, 反应持续6-8分钟柠檬酸三钠使金纳米粒子完全沉降, 所得金纳米粒子粒径对应分别为13nm或30nm, 最后, 溶液分别冷却至室温, 稀释到100mL, 4℃保藏。

7、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法, 其特征是金纳米探针的制备:

30nm金纳米探针的制备: 30nm金纳米粒子与1.5 μg 的羊抗兔在pH9.1的碱性水溶液中搅拌反应, 紧接着, 向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸 5'-TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCAATCCTGAATGCGt(10

) -SH-3'，室温反应20小时，再用含0.1M NaCl、10mM 的磷酸盐缓冲溶液调节pH 至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl、10mM的磷酸盐缓冲溶液溶解，加入1.5μM的寡核苷酸 5' -CGCATTTCAGGATTGCATGAATGCCTCGTCTTAACGGTCTCAACTCGTA-3' 37℃杂交4小时，再次离心去上清，杂交过程重复4次，沉淀最后溶解于含0.3MNaCl、10mM的磷酸盐缓冲溶液，得到羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金纳米探针，作为储备液4℃保藏；

13nm金纳米探针的制备：直接向金纳米溶液中加入巯基寡核苷酸 5' -GGCAATCATGCAATCCTGAATGCGa(10)-SH-3'，室温反应20小时，再用含0.1M NaCl、10mM 的磷酸盐缓冲溶液调节pH值至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl、10mM的磷酸盐缓冲溶液溶解，4℃保藏。

8、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法，其特征是流动注射系统中的免疫反应：先用含0.1M NaCl、pH7.0、0.01M PBS的洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40μL抗原修饰的0.5mg/mL超顺磁纳米粒子溶液吸入螺线管中，再以5μL/s的速率注入免疫反应池内，电磁铁通电，吸附磁珠，将其固定在反应池内；将预孵育的50μL抗体和50μL 3-甲基-喹啉-2-羧酸混合溶液吸入螺线管中，其中，3-甲基-喹啉-2-羧酸溶解于pH7.4、含0.05%Tween-20的0.01M PBST中，浓度从1pg/mL到100pg/mL；然后，将混合溶液注入免疫反应池中室温反应10分钟，再以20μL/s的速度注入400μL pH7.0、含0.1M NaCl的 0.01M PBS的洗液，之后，将100μL的羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金纳米探针的溶液以1μL/s的速度注入反应池，反应6分钟，冲洗；以2μL/s的速度注入100μL的双蒸水，60℃反应6分钟，最后再注入100μL的双蒸水，收集所需单链DNA，撤去磁场，洗涤柱子以备再用。

9、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法，其特征是实时荧光定量PCR检测：设计

正义引物F为：5' -CGCATTTCAGGATTGCATGA-3'，

反义引物R为：5' -CGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3'；

配制总体积为20μL的反应溶液，各组分分别为：TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0μL，超纯水6.8μL，正义引物F 0.6μL，反义引物R 0.6μL和收集的单链DNA 2.0 μL；将此混合溶液放入实时荧光PCR仪，进行如下操作：95℃ / 30 s 预变性；进行扩增，95℃/5s，60℃/5s，72℃/10s，共45个循环；进行熔点曲线分析：95℃/0s，45℃/15s，95℃/0s，0.1℃/s，连续收集荧光，1个循环；最终得到关于3-甲基-喹啉-2-羧酸的浓度与Ct值的标准曲线。

10、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测方法，其

特征是待测样品的检测：待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对，得到待测样品中3-甲基-喹啉-2-羧酸的含量。

一种 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光 PCR 检测方法

技术领域

一种 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光 PCR 检测方法，属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

3-甲基-喹啉-2-羧酸，英文名称：3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA)，是喹啉类饲料添加剂在动物体内的代谢产物，以喹诺酮和喹乙醇为主要代表。当鸡、猪、鱼等食用此类饲料添加剂后，会在体内，主要是在肌肉、肠道、肾脏中代谢生成 3-甲基-喹啉-2-羧酸，这种代谢物对人体毒性极大。由于国内对喹啉类添加剂的大量滥用，造成了添加剂在动物体内的含量严重超标，国内的检测技术尚停留在对原药的检测，随着国际标准的提高，我国贸易的国际化，这种检测技术已经不能满足要求。近年来，国外开始逐渐加大了对代谢物 3-甲基-喹啉-2-羧酸的研究和检测。为了与国际接轨，减少我国的肉类制品在出口时不必要的损失，我国有必要加大对代谢物的研究力度，由于对其研究较少，检测限仍然较高，为了弥补这一空白，有必要研究一种灵敏度高，检测限低，操作简单的，针对 3-甲基-喹啉-2-羧酸的检测方法。

HPLC 和 LC-MS/MS 的方法虽然灵敏，但是所需仪器价格昂贵，对操作人员的要求较高，较难推广。免疫分析化学方法具有快速，灵敏度高，操作简单，专一性好等优点。与传统的 ELISA 方法相比，本发明利用纳米磁性粒子作为固相载体，在流动注射系统中进行免疫反应，用 DNA 修饰的金纳米粒子作为探针，免疫反应后，收集 DNA，并利用实时荧光 PCR 技术进行检测，从而达到检测 3-甲基-喹啉-2-羧酸的目的，本发明方法大大提高了检测的灵敏度，且操作更加简便，达到了高通量的目的，而且以磁性粒子作为固相载体，具有清洗和分离方便，操作简单的优点，用 DNA 修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的 HRP 进行免疫反应，简化了反应的条件，提高了检测的灵敏度。

发明内容

本发明的目的是提供一种 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光 PCR 检测方法，灵敏度高，操作方便，线性范围宽。

本发明的技术方案：一种 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光 PCR 检测方法，包括包被原、免疫原、和抗体的制备，包被原的固定，磁性纳米粒子的修饰，磁性纳米粒子与包被原的偶联，两种粒径的金纳米粒子制备，两种金纳米探针的

制备，流动注射系统中的免疫反应，实时荧光定量PCR检测和待测样品的检测；工艺步骤为：

(1) 包被原的制备：将 3-甲基-喹啉-2-羧酸与间氨基苯甲酸相连，再与卵清蛋白相偶联得到包被原；

(2) 免疫原的制备：将3-甲基-喹啉-2-羧酸与牛血清蛋白相偶联得到免疫原；

(3) 抗体的制备：用步骤(2)得到的免疫原免疫兔子得到特异性多克隆抗体；

(4) 包被原的固定：将步骤(1)得到的包被原与磁性微粒偶联，并固定于玻璃微通道内；

(5)磁性纳米粒子的修饰：将制备的 Fe_3O_4 种子用3-氨丙基三乙氧基硅烷修饰；

(6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联；

(7) 两种粒径的金纳米粒子制备；

(8) 两种金纳米探针的制备；

(9) 流动注射系统中的免疫反应；

(10) 实时荧光定量PCR检测：将3-甲基-喹啉-2-羧酸和多克隆抗体通过玻璃微通道内，竞争结合后的多克隆抗体与经羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的金纳米探针反应，变性得到单链DNA并将其收集，收集得到的单链DNA进行实时荧光定量PCR检测，得到关于3-甲基-喹啉-2-羧酸的浓度与Ct值的标准曲线；

(11) 待测样品的检测：待测样品测得的Ct值与得到的标准曲线进行比对，得到待测样品中3-甲基-喹啉-2-羧酸的含量。

包被原的制备：取 3-甲基-喹啉-2-羧酸 102mg，溶解在 6mL N,N-二羟基甲酰胺 DMF 中，加入 120 μ L 三正丁胺，反应 0.5 小时，再加入 75 μ L 氯甲酸异丁酯，反应 1 小时，再与含有 100mg 间氨基苯甲酸的 pH9.6 碳酸钠缓冲溶液 6mL 溶液混合，在 4 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 2 小时，过程中有沉淀产生，离心，取沉淀物，干燥，得到 3-甲基-喹啉-2-羧酸半抗原；取 3-甲基-喹啉-2-羧酸半抗原 9.9mg, N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺 DCC 20.63mg，加入到 3mL N,N-二羟基甲酰胺 DMF 中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与 3mL 含 60mg 卵清蛋白 OVA 的溶液在 4 $^{\circ}$ C 下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析 3 天，冻干，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

免疫原的制备：取3-甲基-喹啉-2-羧酸102mg，N-羟基琥珀酰亚胺NHS 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺DCC 20.63mg，加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺DMF 中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL含130mg卵清蛋白OVA的溶液在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，冻干，-20 $^{\circ}$ C保存备用。

磁性纳米粒子的修饰：用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的溶液及 NaOH 溶液，将所配两种铁盐溶液混合，在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离

子的浓度为 0.12 mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2 mol/L; NaOH 溶液的浓度为 2.5 mol/L; 在剧烈搅拌下将一定体积的 NaOH 溶液缓慢滴加到混合铁盐溶液中, 将所得的沉淀在 60°C 陈化 2 小时, 用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次, 过滤后再在 60°C 干燥 24 小时, 在玛瑙研钵中研磨后所得产物为 Fe_3O_4 种子。将 Fe_3O_4 种子 0.125g 用 100mL 乙醇和 1mL 二次蒸馏水分散, 超声 30min, 滴加 0.4mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷 APTES, 室温搅拌 7 小时, 以 8000r/min 离心 30min, 将 APTES 修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒从反应介质中分离, 并用乙醇溶液对其清洗 5 次, 过滤后再在 60°C 干燥 24 小时, 备用。

磁性纳米粒子与包被原的偶联: 取所得 APTES 修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒 10mg, N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺 DCC 20.63mg, 加入到 3mL N,N-二羟基甲酰胺 DMF 中, 室温搅拌反应过夜, 离心去沉淀, 上清液再与 3mL 含 60mg 卵清蛋白 OVA 的溶液在 4°C 下搅拌反应过夜, 离心, 上清液用超纯水透析 3 天, 对透析袋中溶液进行磁性分离, 弃上清, 加入含 2% 明胶的 pH9.6 碳酸钠缓冲溶液封闭, 再加入 PBST 洗涤液, 洗涤后磁分离, 去上清, 最后向磁性分离过的离心管中加入 1mL 0.02mol/L pH7.6 的 Tris 缓冲液, 4°C 保存备用。

金纳米粒子的制备: 所有的玻璃仪器都强酸浸泡, 双蒸水清洗, 晾干备用; 制备时, 向洁净的三角烧瓶中加入 100mL 质量浓度为 0.01% 的氯金酸, 加热, 煮沸, 紧接着加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 3.5mL 或 1mL, 边加热边搅拌, 溶液颜色从淡黄色变成红色, 反应持续 6-8 分钟柠檬酸三钠使金纳米粒子完全沉降, 所得金纳米粒子粒径分别为 13nm 或 30nm, 最后, 溶液分别冷却至室温, 稀释到 100mL, 4°C 保藏。

金纳米探针的制备: 包括 30nm 金纳米粒子的制备和 13nm 金纳米探针的制备

30nm 金纳米粒子的制备: 30nm 金纳米粒子与 1.5 μg 的羊抗兔在 pH9.1 的碱性水溶液中搅拌反应, 紧接着, 向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸 5' -TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCAATCCTGAATGCGt (10)-SH-3', 室温反应 20 小时, 再用含 0.1M NaCl、10mM 的磷酸盐缓冲溶液调节 pH 至 7.0, 盐陈 40 小时后于 -4°C 下 2000r.p.m 离心 30 分钟, 弃上清, 红色沉淀物用含 0.1M NaCl、10mM 的磷酸盐缓冲溶液溶解, 加入 1.5 μM 的寡核苷酸 5' -CGCATTTCAGGATTGCATGAATGCCTCGTCTTAACGGTCTCAACTCGTA-3' 37°C 杂交 4 小时, 再次离心去上清, 杂交过程重复 4 次, 沉淀最后溶解于含 0.3M NaCl、10mM 的磷酸盐缓冲溶液, 得到羊抗兔抗体及双链 DNA 共同修饰的 30nm 金纳米探针, 作为储备液 4°C 保藏;

13nm 金纳米探针的制备: 直接向金纳米溶液中加入巯基寡核苷酸

5' -GGCAATCATGCAATCCTGAATGCGa(10)-SH-3', 室温反应 20 小时, 再用含 0.1M NaCl、10mM 的磷酸盐缓冲溶液调节 pH 值至 7.0, 盐陈 40 小时后于 -4°C

下2000r.p.m离心30分钟，弃上清，红色沉淀物用含0.1M NaCl、10mM的磷酸盐缓冲溶液溶解，4℃保藏。

流动注射系统中的免疫反应：先用含0.1M NaCl、pH7.0、0.01M PBS的洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40μL抗原修饰的0.5mg/mL超顺磁纳米粒子溶液吸入螺线管中，再以5μL/s的速率注入免疫反应池内，电磁铁通电，吸附磁珠，将其固定在反应池内；将预孵育的50μL抗体和50μL 3-甲基-喹啉-2-羧酸混合溶液吸入螺线管中，其中，3-甲基-喹啉-2-羧酸溶解于pH7.4、含0.05%Tween-20的0.01M PBST中，浓度从1pg/mL到100pg/mL；然后，将混合溶液注入免疫反应池中室温反应10分钟，再以20μL/s的速度注入400μL pH7.0、含0.1M NaCl的0.01M PBS的洗液，之后，将100μL的羊抗兔抗体及双链DNA共同修饰的30nm金纳米探针的溶液以1μL/s的速度注入反应池，反应6分钟，冲洗；以2μL/s的速度注入100μL的双蒸水，60℃反应6分钟，最后再注入100μL的双蒸水，收集所需单链DNA，撤去磁场，洗涤柱子以备再用。

实时荧光定量PCR检测：设计

正义引物F为：5' -CGCATTTCAGGATTGCATGA-3'，

反义引物R为：5' -CGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3'；

配制总体积为20μL的反应溶液，各组分分别为：TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0μL，超纯水6.8μL，正义引物F 0.6μL，反义引物R 0.6μL和收集的单链DNA 2.0 μL；将此混合溶液放入实时荧光PCR仪，进行如下操作：95℃ / 30 s 预变性；进行扩增，95℃/5s，60℃/5s，72℃/10s，共45个循环；进行熔点曲线分析：95℃/0s，45℃/15s，95℃/0s，0.1℃/s，连续收集荧光，1个循环；最终得到关于3-甲基-喹啉-2-羧酸的浓度与Ct值的标准曲线。

待测样品的检测：待测样品测得的 Ct 值与得到的标准曲线进行比对，得到待测样品中 3-甲基-喹啉-2-羧酸的含量。

本发明的有益效果：本发明大大提高了喹啉类饲料添加剂代谢物 3-甲基-喹啉-2-羧酸检测的灵敏度，且操作更加简便，达到了高通量的目的，而且以磁性粒子作为固相载体，具有清洗和分离方便，操作简单的优点，用 DNA 修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的 HRP 进行免疫反应，简化了反应的条件，提高了检测的灵敏度，达到国际领先水平。

附图说明

图1 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光PCR检测结果。

具体实施方式

实施例 1

(1) 包被原的制备：

取3-甲基-喹啉-2-羧酸102mg，溶解在6mL N,N-二羟基甲酰胺(DMF)，加入

120 μ L三正丁胺，反应0.5小时，再加入75 μ L氯甲酸异丁酯，反应1小时，再与含有100mg间氨基苯甲酸的碳酸钠缓冲溶液(pH9.6)混合，在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应2小时，过程中有沉淀产生，离心，取沉淀物，干燥，得到半抗原；

取半抗原9.9mg, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺(DCC) 20.63mg,加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺(DMF), 室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL卵清蛋白(OVA) (60mg) 溶液在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，冻干，-20 $^{\circ}$ C保存备用；

(2) 免疫源的制备：

取3-甲基-喹啉-2-羧酸102mg, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺(DCC) 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺(DMF), 室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL卵清蛋白(OVA) (130mg) 溶液在4 $^{\circ}$ C下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，冻干，-20 $^{\circ}$ C保存备用；

(3) 免疫动物：

采用新西兰大白兔作为被免疫的动物，首次免疫时将免疫源与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂，在大白兔背部皮下多点注射，免疫剂量为1mg/只，间隔2-4周后，用相同剂量免疫源加等量弗氏不完全佐剂混合制成乳化剂，加强免疫，免疫期间监测抗体效价及特异性，最后一次免疫不加佐剂。最后一次免疫7天后，心脏放血，经硫酸铵分级沉淀得到纯化的MQCA多克隆抗体。

(4) 抗体效价的测定：

采用间接ELISA方法对免疫后不同时期的抗体进行效价的监测，以OD值达到1.0左右时判断为阳性，结果最后抗体的效价为 3.2×10^5 。

(5) 磁性纳米粒子的修饰：

用二次蒸馏水分别配制 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的溶液及 NaOH 溶液，将所配两种铁盐溶液混合。在铁盐的混合溶液中 Fe^{2+} 离子的浓度为 0.12 mol/L, Fe^{3+} 的浓度为 0.2 mol/L; NaOH 溶液的浓度为 2.5 mol/L。在剧烈搅拌下将一定体积的 NaOH 溶液缓慢滴加到混合铁盐溶液中，将所得的沉淀在 60 $^{\circ}$ C 陈化 2 小时，用二次蒸馏水将沉淀物清洗数次，过滤后再在 60 $^{\circ}$ C 干燥 24 小时，在玛瑙研钵中研磨后所得产物为 Fe_3O_4 种子。

将上步产物0.125g 用100mL乙醇和1mL水溶解，超声30min，滴加0.4mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)，室温搅拌7小时，以8000r/min离心30min，将 APTES 修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒从反应介质中分离，并用乙醇溶液对其清洗5次，过滤后再在60 $^{\circ}$ C干燥24小时，备用。

(6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联：

取步骤(5)所得最终产物10mg, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺(DCC) 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺(DMF), 室温搅

拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL卵清蛋白(OVA)(60mg)溶液在4℃下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，对透析袋中溶液进行磁性分离，弃上清，加入含2%明胶的封闭液封闭，再加入PBST洗涤液，洗涤后磁性分离，去上清，最后向磁性分离过的离心管中加入1mL 0.02mol/L pH7.6的Tris缓冲液，4℃保存备用。

(7) 金纳米粒子的制备:

所有的玻璃仪器都强酸浸泡，双蒸水清洗，晾干备用。制备时，向洁净的三角烧瓶中加入100mL浓度为0.01%的氯金酸，加热，煮沸，紧接着加入1%的柠檬酸三钠溶液(30nm粒子需1mL)，边加热边搅拌，溶液颜色从淡黄色变成红色，反应持续6-8分钟以使柠檬酸三钠完全沉降。最后，溶液分别冷却至室温，稀释到100mL，4℃保藏。

(8) 金纳米探针的制备:

首先，30nm金纳米粒子与1.5 μ g的羊抗兔在碱性水溶液中搅拌反应(pH9.1)，紧接着，向溶液中加入巯基修饰的寡核苷酸(5'-tacgagttgagaccgtaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt(10)-SH-3')，室温反应20小时，再用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M NaCl)调节pH值至7.0，盐陈40小时后于-4℃下2000r.p.m离心30分钟，弃上清。红色沉淀物用10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.1M NaCl)溶解，加入1.5 μ M的目标探针(5'-cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacggctctcaactcga-3')37℃杂交4小时，再次离心去上清，杂交过程重复4次，沉淀最后溶解于10mM的磷酸盐缓冲溶液(0.3M NaCl)，作为储备液4℃保藏。

(9) 流动注射系统中的免疫反应:

先用0.01M PBS(pH7.0, 0.1M NaCl)的洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40 μ L抗原修饰的超顺磁纳米粒子溶液(0.5mg/ml)吸入螺线管中，再以5 μ L/s的速率注入免疫反应池内，电磁铁通电，吸附磁珠，将其固定在反应池内。将预孵育的混合溶液(50 μ L抗体; 50 μ LMQCA)吸入螺线管中，其中，MQCA溶解于0.01M PBST(pH7.4, 0.05%Tween-20)中，浓度从1pg/mL到100pg/mL。然后，将混合溶液注入免疫反应池中室温反应10分钟，再以20 μ L/s的速度注入400 μ L 0.01M PBS(pH7.0, 0.1M NaCl)的洗液。之后，将100 μ L的30nm金探针(含有二抗和DNA)的溶液以1 μ L/s的速度注入反应池，反应6分钟，冲洗。以2 μ L/s的速度注入100 μ L的双蒸水，60℃反应6分钟，最后再注入100 μ L的双蒸水，收集所需单链DNA，撤去磁场，洗涤柱子以备再用。

(10) 实时荧光定量PCR检测:

设计出正义引物(F)为5'-cgcattcaggattgcatga-3'，反义引物(R)为5'-cgagttgagaccgtaagacga-3'。其次，配制总体积为20 μ L的反应溶液，各组分

分别为：TOYOBO SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0 μ L；超纯水 6.8 μ L；正义引物(F) 0.6 μ L；反义引物(F) 0.6 μ L；步骤(9)收集的单链DNA 2.0 μ L。将此混合溶液放入实时荧光PCR仪，进行如下操作：95 $^{\circ}$ C / 30 s 预变性；进行扩增，95 $^{\circ}$ C/5s, 60 $^{\circ}$ C/5s, 72 $^{\circ}$ C/10s(收集荧光)，共45个循环；进行熔点曲线分析：95 $^{\circ}$ C/0s, 45 $^{\circ}$ C/15s, 95 $^{\circ}$ C/0s(0.1 $^{\circ}$ C/s, 连续收集荧光)，1个循环。最终得到关于3-甲基-喹啉-2-羧酸的标准曲线，达到了检测的目的。

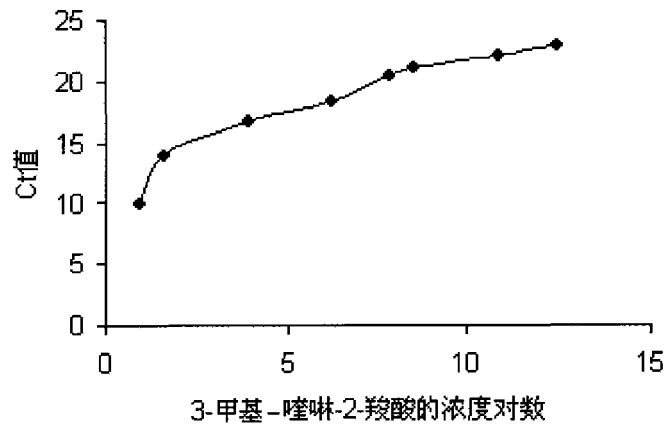


图 1

专利名称(译)	一种3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸的免疫荧光PCR检测方法		
公开(公告)号	CN101315370A	公开(公告)日	2008-12-03
申请号	CN200810022031.1	申请日	2008-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 冀宝庆 陈伟 祝长青 边爱		
发明人	胥传来 冀宝庆 陈伟 祝长青 边爱		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸的免疫荧光PCR检测方法，属于免疫分析化学技术领域。本发明包括包被原、免疫原、和抗体的制备，包被原的固定，磁性纳米粒子的修饰，磁性纳米粒子与包被原的偶联，两种粒径的金纳米粒子制备，两种金纳米探针的制备，流动注射系统中的免疫反应，实时荧光定量PCR检测和待测样品的检测；本发明大大提高了喹啉类饲料添加剂代谢物3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸检测的灵敏度，且操作更加简便，达到了高通量的目的，而且以磁性粒子作为固相载体，具有清洗和分离方便，操作简单的优点，用DNA修饰的金纳米粒子作为探针代替传统的HRP进行免疫反应，简化了反应的条件，提高了检测的灵敏度，达到国际领先水平。

