

[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 200810022033.0

[43] 公开日 2008年12月3日

[11] 公开号 CN 101315371A

[22] 申请日 2008.6.23

[21] 申请号 200810022033.0

[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 李雅丽
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

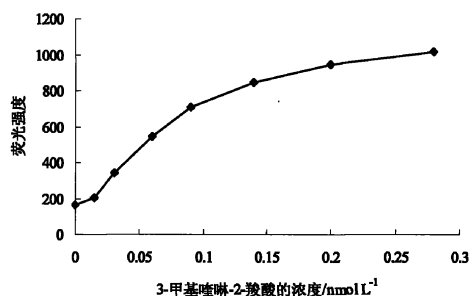
权利要求书3页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

一种3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法

[57] 摘要

一种3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，属于免疫分析化学技术领域。本发明包括免疫源、包被原、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，金纳米粒子的制备，金纳米探针的制备，流动注射系统中的免疫反应，荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测。本发明大大提高了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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是包括免疫源、包被原、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，金纳米粒子的制备，金纳米探针的制备，流动注射系统中的免疫反应，荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测；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：用所得免疫原免疫兔子得到特异性多克隆抗体；

(4) 包被原的固定：用所得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的制备；

(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) 荧光酶标板的包被；

(11) 流动注射荧光猝灭的检测：利用间接竞争免疫检测将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一端与互补DNA修饰的金纳米探针反应，另一端与生物素修饰的互补DNA反应，并用亲和素固定于酶标板上，加入异硫氰酸荧光素，用荧光酶标仪检测荧光信号从而检测3-甲基-喹啉-2-羧酸含量。

2、根据权利要求1所述的 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，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-二羟基甲酰胺中，加入 120 μL 三正丁胺，反应 0.5 小时；再加入 75 μL 氯甲酸异丁酯，反应 1 小时；再与含有 100mg 间氨基苯甲酸、6mL pH9.6 的碳酸钠缓冲溶液混合，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺 20.63mg，加入到 3mL N,N-二羟基甲酰胺中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与 3mL 含 60mg 卵清蛋白的溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析 3 天，冻干，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3、根据权利要求1所述的 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，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11.5mg,

N,N-二环己基二亚胺 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺中, 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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法, 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+} 离子的浓度为 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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法, 其特征是磁性纳米粒子与包被原的偶联: 取所得的APTES修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒 10mg, N-羟基琥珀酰亚胺 11.5mg, N,N-二环己基二亚胺 20.63mg, 加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺中, 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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法, 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; 加入3.5mL柠檬酸三钠溶液制得的金纳米粒子平均粒径为13nm, 加入1mL柠檬酸三钠溶液制得的金纳米粒子平均粒径为30nm。

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

30nm金纳米探针的制备: 首先, 30nm金纳米粒子与1.5 μg 的羊抗兔在pH9.1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 的10mM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 的10mM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0.3M NaCl 的10mM磷酸盐缓冲溶液中，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13nm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 的10mM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 的10mM磷酸盐缓冲液溶解，4℃保藏。

8、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是流动注射系统中的免疫反应：先用pH 7.0、含0.1M NaCl 的0.01M 磷酸盐缓冲液作洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40μL 0.5mg/mL抗原修饰的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~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、0.1M NaCl 的0.01M PBS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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是荧光酶标板的包被：用亲和素包被荧光酶标板，向酶标板每孔中加入100μL亲和素的pH9.6碳酸钠缓冲溶液，4℃孵育过夜，用PBS清洗后，备用。

10、根据权利要求1所述的3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，其特征是荧光猝灭检测：将收集的单链DNA与10μL的生物素标记的捕获探针25μM，5' -生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3' 混合，再加入20μL 的含0.3M NaCl、0.02%SDS的pH7.4 0.01M PBS溶液，37℃孵育10分钟后，再加入20nM 13nm金纳米探针进一步杂交10分钟后，将杂交液转移到亲和素包被的荧光酶标板上，室温孵育30分钟，最后，用100μL PBS缓冲液洗涤，加入100μL 异硫氰酸荧光素，震荡，荧光检测，荧光强度通过Wallac1420工作站在线观测。

一种 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法

技术领域

一种 3-甲基-喹啉-2-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，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，并将其固定于金纳米粒子表面，加入异硫氰酸荧光素，检测荧光信号从而达到检测 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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，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-羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，包括免疫源、包被原、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，金纳米粒子的制备，金纳米探针的制备，流动注射系统中的免疫反应，荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测；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：用所得免疫原免疫兔子得到特异性多克隆抗体；

(4) 包被原的固定：用所得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的制备；

(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) 荧光酶标板的包被；

(11) 流动注射荧光猝灭的检测：利用间接竞争免疫检测将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一端与互补DNA修饰的金纳米探针反应，另一端与生物素修饰的互补DNA反应，并用亲和素固定于酶标板上，加入异硫氰酸荧光素，用荧光酶标仪检测荧光信号从而检测3-甲基-喹啉-2-羧酸含量。

包被原的制备：取 3-甲基-喹啉-2-羧酸 102mg，溶解在 6mL N,N-二羟基甲酰胺中，加入 120 μL 三正丁胺，反应 0.5 小时；再加入 75 μL 氯甲酸异丁酯，反应 1 小时；再与含有 100mg 间氨基苯甲酸、6mL pH9.6 的碳酸钠缓冲溶液混合，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 11.5mg，N,N-二环己基二亚胺 20.63mg，加入到 3mL N,N-二羟基甲酰胺中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与 3mL 含 60mg 卵清蛋白的溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析 3 天，冻干，-20 $^{\circ}\text{C}$ 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11.5mg，N,N-二环己基二亚胺 20.63mg，加入到3mL N,N-二羟基甲酰胺中，室温搅拌反应过夜，离心去沉淀，上清液再与3mL含130mg卵清蛋白的溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应过夜，离心，上清液用超纯水透析3天，冻干，-20 $^{\circ}\text{C}$ 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+} 离子的浓度为 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 Fe₃O₄ 种子；将 Fe₃O₄ 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 Fe₃O₄ 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。

磁性纳米粒子与包被原的偶联：取所得的 APTES 修饰的 Fe₃O₄ 纳米颗粒 10mg，N-羟基琥珀酰亚胺 11.5mg，N,N-二环己基二亚胺 20.63mg，加入到 3mL N,N-二羟基甲酰胺中，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。

两种粒径的金纳米粒子的制备：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；加入 3.5mL 柠檬酸三钠溶液制得的金纳米粒子平均粒径为 13nm，加入 1mL 柠檬酸三钠溶液制得的金纳米粒子平均粒径为 30nm。

两种金纳米探针的制备：

30nm 金纳米探针的制备：首先，30nm 金纳米粒子与 1.5μg 的羊抗兔在 pH9.1 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 的 10mM 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 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液溶解，加入 1.5μM 的寡核苷酸 5'-CGCATTGAGGATTGCATGAATGCCTCGTCTTAACGGTCTCAACTCGTA-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 0.3M NaCl 的 10mM 磷酸盐缓冲溶液中，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 13nm 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 的 10mM 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 的10mM磷酸盐缓冲液溶解，4℃保藏。

流动注射系统中的免疫反应：先用pH 7.0、含0.1M NaCl 的0.01M 磷酸盐缓冲液作洗液清洗微管和免疫反应池，然后将40 μ L 0.5mg/mL抗原修饰的超顺磁纳米粒子溶液吸入螺线管中，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50 μ L抗体和50 μ L 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~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 pH7.0、0.1M NaCl 的0.01M PBS洗液；之后，将100 μ L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。

荧光酶标板的包被：用亲和素包被荧光酶标板，向酶标板每孔中加入100 μ L亲和素的pH9.6碳酸钠缓冲溶液，4℃孵育过夜，用PBS清洗后，备用。

荧光猝灭检测：将收集的单链 DNA 与 10 μ L 的生物素标记的捕获探针 25 μ M，5' -生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3' 混合，再加入 20 μ L 的含 0.3M NaCl、0.02%SDS 的 pH7.4 0.01M PBS 溶液，37℃孵育 10 分钟后，再加入 20nM 13nm 金纳米探针进一步杂交 10 分钟后，将杂交液转移到亲和素包被的荧光酶标板上，室温孵育 30 分钟，最后，用 100 μ L PBS 缓冲液洗涤，加入 100 μ L 异硫氰酸荧光素(FITC)，震荡，荧光检测，荧光强度通过 Wallac1420 工作站在线观测。

本发明的有益效果：本发明大大提高了 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-羧酸的免疫荧光猝灭检测结果。

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)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间氨基苯甲酸的碳酸钠缓冲溶液(pH9.6)的溶液混合，在4℃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)中，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，冻干，-20℃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)中，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℃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；

(3) 多克隆抗体制备：

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+} 离子的浓度为 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。

将上步产物 Fe_3O_4 种子 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℃ 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)中，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：

所有的玻璃仪器都用强酸浸泡，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(13nm粒子需3.5mL；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1.5μg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1.5μM的目标探针

5' -cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacgggtctcaactcgta-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；

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，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40μL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。将预孵育的混合溶液(50μL抗体；50μLMQCA)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~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 0.01M PBS(pH7.0, 0.1M NaCl)的洗液。之后，将100μL的30nm金探针(含有二抗和DNA)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。

(10) 荧光酶标板的包被:

用亲和素包被荧光酶标板, 向酶标板每孔中加入100 μ L亲和素的碳酸钠缓冲溶液(pH9.6), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 用PBS清洗后, 备用。

(11) 荧光猝灭检测:

步骤(9)收集的单链DNA与10 μ L的生物素标记的捕获探针(25 μ M, 5' -生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3')混合, 再加入20 μ L(0.3M NaCl, 0.02%SDS, 0.01M PBS, pH7.4), 37 $^{\circ}$ C孵育10分钟后, 再加入13nm金纳米探针(20nM)进一步杂交10分钟后, 将杂交液转移到亲和素包被的荧光酶标板上, 室温孵育30分钟。最后, 用100 μ L PBS缓冲液洗涤, 加入100 μ L FITC, 震荡, 荧光检测, 荧光强度可以通过Wallac1420工作站在线观测。

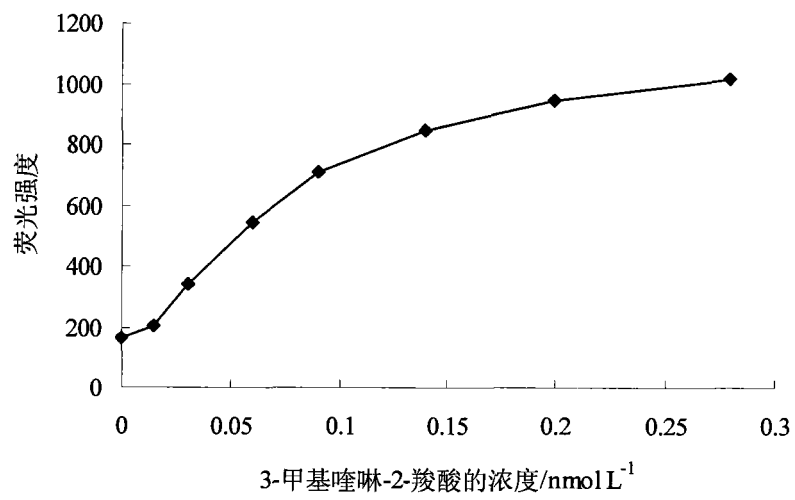


图 1

专利名称(译)	一种3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸的免疫荧光猝灭检测方法		
公开(公告)号	CN101315371A	公开(公告)日	2008-12-03
申请号	CN200810022033.0	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 李雅丽 边爱		
发明人	胥传来 冀宝庆 陈伟 李雅丽 边爱		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
其他公开文献	CN101315371B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种3 - 甲基 - 喹啉 - 2 - 羧酸的免疫荧光猝灭检测方法，属于免疫分析化学技术领域。本发明包括免疫源、包被原、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，金纳米粒子的制备，金纳米探针的制备，流动注射系统中的免疫反应，荧光酶标板的包被和流动注射荧光猝灭的检测。本发明大大提高了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。

