



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104101708 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201310124432. 9

G01N 33/533(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 11

(71) 申请人 中国科学院化学研究所

地址 100190 北京市海淀区中关村北一街 2 号

(72) 发明人 高明远 刘春艳 侯毅

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 贺卫国

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

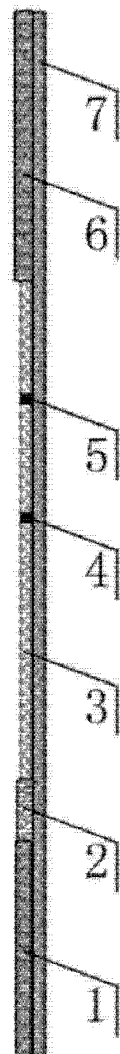
(54) 发明名称

一种基于上转换荧光 / 磁性纳米颗粒的免疫层析试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的免疫层析试纸及其制备方法, 结合上转换荧光 / 磁性材料优良的荧光与磁学特性和免疫层析技术, 在优化试纸条结构和各组成部件的基础上, 构建了免疫层析试纸条。该免疫层析试纸包括支撑材料和上层, 所述上层包括样品垫、结合释放垫、纤维素膜、吸水材料, 其中所述纤维素膜具有检测线和质控线, 在所述检测线上包覆有待测物抗原或抗体, 在所述质控线上包覆有二抗, 在所述结合释放垫上负载有上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的可与待测物结合的抗体。本发明实现了基于上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的免疫层析技术在药物残留等领域分析物的荧光定量和潜在磁性定量检测, 能够明显提高传统胶体金标记免疫层析方法的检测灵敏度。该试纸条特异性好, 灵敏度高, 检测简便、直观、准确、成本低, 适用范围广, 易于推广应用。

CN 104101708 A



1. 一种免疫层析试纸,所述免疫层析试纸包括支撑材料和上层,所述上层从一侧至另一侧依次包括样品垫、结合释放垫、纤维素膜、吸水材料,其中所述纤维素膜具有检测线和质控线,在所述检测线上包覆有待测物抗原或抗体,在所述质控线上包覆有二抗,在所述结合释放垫上负载有上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的可与待测物结合的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其中所述上转换荧光 / 磁性纳米材料包含基质材料、敏化离子和掺杂离子,所述基质材料选自以下各项中的一种或多种: NaReF_4 、 KReF_4 、 LiReF_4 、 Re_2O_3 、 RePO_4 、 $\text{Re}_2(\text{MO}_4)_3$ 、 ReVO_4 ,其中 Re 表示稀土元素,优选选自以下各项中的一种或多种: Gd^{3+} 、 Y^{3+} 、 Dy^{3+} ;所述敏化离子选自以下各项中的一种或多种: Yb^{3+} 、 Ce^{3+} ;所述掺杂离子选自以下各项中的一种或多种: Er^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Tm^{3+} 。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸,其中所述上转换荧光 / 磁性纳米材料是直径在 10nm 至 100nm 的纳米颗粒。

4. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的免疫层析试纸,其中所述样品垫、结合释放垫由选自以下各项中的一种或多种材料制成:玻璃纤维、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜;所述吸水材料由吸水滤纸制成;所述支撑材料由不吸水的韧性材料制成;所述纤维素膜由选自以下各项中的一种或多种材料制成:硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜。

5. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的免疫层析试纸,其中样品垫、结合释放垫经过用以下各项中的一种或多种的预处理:表面活性剂、蛋白、糖类和生物相容性高聚物。

6. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的免疫层析试纸条,其中所述待测物包括以下各项中的一种或多种:农药、抗生素、抗原、抗体、激素、细菌和病毒。

7. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的免疫层析试纸,其中所述上转换荧光 / 磁性纳米颗粒采用高温复分解反应制备。

8. 根据权利要求 7 所述的免疫层析试纸条,其中所述的高温复分解反应的方法包括:将包含基质材料、敏化离子和掺杂离子的一种或多种盐加入到溶剂中,加热脱水,冷却,之后将其加入至碱溶液中,加热,之后冷却、沉淀,得到纳米颗粒。

9. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的免疫层析试纸条,其中所述的上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的可与待测物结合的抗体是上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体,其通过以下方法制备:

1) 向多克隆 / 单克隆抗体分散液中加入三(2-羧乙基)膦进行反应,形成抗体溶液;
2) 将上转换荧光 / 磁性纳米颗粒的分散液加入到抗体溶液中进行反应,从而得到上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体的分散液。

10. 一种制备免疫层析试纸的方法,所述方法包括以下步骤:

步骤 1),如权利要求 8 所述合成上转换荧光 / 磁性纳米颗粒;

步骤 2),如权利要求 9 所述制备上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体;

步骤 3),制备样品垫和结合释放垫,将样品垫与结合释放垫用含表面活性剂、蛋白、糖类或生物相容性高聚物的缓冲溶液进行预处理;

步骤 4),点样及划线,将步骤 2) 获得的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体负载于步骤 3) 处理过的结合释放垫上;纤维素膜上分别标记作为检测线的待测物的抗原或抗体,和作为质控线的二抗;

步骤 5), 试纸条的组装, 将样品垫、结合释放垫、纤维素膜、吸水材料依次组装在支撑材料上, 组装成免疫层析试纸。

一种基于上转换荧光 / 磁性纳米颗粒的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试纸,特别是涉及一种以上转换荧光 / 磁性纳米颗粒作为标记物,可在食品安全、药物检测等领域实现快速、灵敏、定量分析的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫层析 (immunochromatography) 技术是近些年发展起来的,利用有色颗粒如胶体金,胶体硒等作为标记物而建立的一种比色分析方法。免疫层析技术和传统的实验室分析方法相比具有以下优势:快速,简便,不需要复杂的后处理过程,适用于现场分析。基于上述优势,免疫层析方法已经在分析检测领域取得了广泛的应用。然而,通过比色判读检测的传统方法具有局限性,检测灵敏度低,检测结果难以实现定量化,而且不易记录与保存。另一方面,近年来,随着食品安全等问题日益严重,人们对于分析检测灵敏度的要求也在不断地提高,具有荧光或磁学性质的颗粒由于可检测的光学信号和磁学信号,为灵敏定量检测提供了可能性,成为新一代免疫层析标记物。

[0003] 上转换荧光纳米颗粒是将稀土金属元素掺杂于纳米晶体的晶格中,在近红外激光的激发下可以发射可见光区或近红外光区的荧光。对于含钆或含镱材料,因为它们具有孤对电子,赋予材料顺磁性,使得其纳米颗粒成为具有磁性和上转换荧光双重性质的材料,这为双重定量检测奠定了基础。特别是,上转换荧光材料具有优异的光学性质,如大斯托克斯位移、窄发射、长荧光寿命、低毒性、良好的光漂白性、无检测本底干扰、可以达到胶体金的 100 倍的高灵敏度。同时,可以通过改变掺杂稀土离子的种类和比例改变发射光波长范围,获得不同荧光发射的纳米颗粒。因此,可以作为新型标记物在生物检测领域应用,不仅能提高检测的灵敏度,而且还为多重定量检测提供了新的方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一在于,针对现有免疫层析技术存在的不足,提供一种基于上转换荧光 / 磁性纳米颗粒的免疫层析试纸的制备方法,所述方法是一种快速,简便能够实现定量检测的免疫学检测方法,样品无需经过复杂的提纯处理过程,操作简单,待测物的检测具有高的灵敏度和特异性。

[0005] 具体地,本发明包括以下方面。

[0006] 在第一方面中,本发明涉及一种免疫层析试纸,所述免疫层析试纸包括支撑材料和上层,所述上层从一侧至另一侧依次包括样品垫、结合释放垫、纤维素膜、吸水材料,其中所述纤维素膜具有检测线和质控线,在所述检测线上包覆有待测物抗原或抗体,在所述质控线上包覆有二抗,在所述结合释放垫上负载有上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的可与待测物结合的抗体。

[0007] 在第一方面的一个实施方案中,所述上转换荧光 / 磁性纳米材料包含基质材料、

敏化离子和掺杂离子。

[0008] 在第一方面的一个实施方案中,所述基质材料选自以下各项中的一种或多种: NaReF_4 、 KReF_4 、 LiReF_4 、 Re_2O_3 、 RePO_4 、 $\text{Re}_2(\text{MO}_4)_3$ 、 ReVO_4 等,其中 Re 表示稀土元素,优选选自以下各项中的一种或多种: Gd^{3+} 、 Y^{3+} 、 Dy^{3+} 。

[0009] 在第一方面的一个实施方案中,所述敏化离子选自以下各项中的一种或多种: Yb^{3+} 、 Ce^{3+} 。

[0010] 在第一方面的一个实施方案中,所述掺杂离子选自以下各项中的一种或多种: Er^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Tm^{3+} 。

[0011] 在第一方面的一个实施方案中,所述上转换荧光 / 磁性纳米材料是直径在 5nm 至 200nm 的纳米颗粒,优选 10nm 至 100nm,更优选 20nm 至 60nm。

[0012] 在第一方面的一个实施方案中,所述样品垫、结合释放垫由选自以下各项中的一种或多种材料制成:玻璃纤维、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜。

[0013] 在第一方面的一个实施方案中,所述吸水材料由吸水滤纸制成;所述支撑材料由不吸水的韧性材料制成。

[0014] 在第一方面的一个实施方案中,所述纤维素膜由选自以下各项中的一种或多种材料制成:硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜。

[0015] 在第一方面的一个实施方案中,样品垫、结合释放垫经过用以下各项中的一种或多种的预处理:表面活性剂、蛋白、糖类和生物相容性高聚物。

[0016] 在第一方面的一个实施方案中,待测物包括以下各项中的一种或多种:农药、抗生素、抗原、抗体、激素、细菌或病毒。

[0017] 在第一方面的一个实施方案中,所述上转换荧光 / 磁性纳米颗粒采用高温复分解反应制备。

[0018] 在第一方面的一个实施方案中,所述高温复分解反应包括以下步骤:将包含基质材料、敏化离子和掺杂离子的一种或多种盐加入到溶剂中,真空加热脱水,冷却至室温,之后将其加入至碱溶液中,在惰性气氛下加热,之后冷却、沉淀,得到纳米颗粒。

[0019] 在第一方面的一个实施方案中,上转换荧光 / 磁性纳米材料标记的可与待测物结合的抗体是上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体,其可以通过以下方法制备:1) 向多克隆 / 单克隆抗体分散液中加入一定量的三(2-羧乙基)膦,室温反应,之后转移到缓冲液中;2) 将纳米颗粒分散在缓冲液中,之后将其加入到抗体溶液中,在室温反应,超滤置换缓冲液,得到上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体的分散液。

[0020] 在本发明的第二方面,涉及一种制备免疫层析试纸的方法,所述方法包括以下步骤:步骤 1),如上所述合成上转换荧光 / 磁性纳米颗粒;步骤 2),如上所述制备上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体;步骤 3),制备样品垫和结合释放垫,将样品垫与结合释放垫用含表面活性剂、蛋白、糖类或生物相容性高聚物的缓冲溶液处理;步骤 4),点样及划线,将步骤 2) 获得的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体负载于步骤 3) 处理过的结合释放垫上;纤维素膜上分别标记作为检测线的待测物的抗原或抗体,和作为质控线的二抗;步骤 5),试纸条的组装,将样品垫、结合释放垫、纤维素膜、吸水材料依次组装在支撑材料上,组装成免疫层析试纸。

附图说明

[0021] 图 1 为本发明的免疫层析试纸条的结构示意图。

[0022] 图 2 为本发明的免疫层析试纸条的俯视结构示意图。

[0023] 其中 1 为样品垫, 2 为结合释放垫, 3 为纤维素膜, 4 为检测线, 5 为质控线, 6 为吸水滤纸, 7 为支撑底板。

[0024] 图 3 为本发明实施例 1 所得 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Er}$ 纳米颗粒的透射电镜照片 (A) 及其光谱图 (B)。

具体实施方式

[0025] 在不被理论限定的情况下, 据推测, 本方法的工作原理包括:

[0026] (1) 基于竞争法检测时, 在免疫层析结合释放垫上固定有上转换 / 磁性纳米粒子标记的抗体, 当样品垫上滴加待测物溶液时, 通过毛细作用, 溶液沿纤维素膜向吸水纸方向层析, 抗体标记的纳米颗粒复溶, 到达纤维素膜上的检测线和质控线时, 与检测线的待测物抗原和质控线的二抗分别结合并显色, 当待测物溶液中含目标分子时, 会与检测线处的抗原竞争结合抗体, 在 980nm 近红外激光的激发下, 检测线上的荧光信号减弱但不会影响质控线荧光信号。当两条带荧光信号同时出现且荧光信号没有减弱时为阴性样本, 检测线荧光信号明显下降甚至消失为阳性样本, 质控线荧光信号消失则检测无效;

[0027] (2) 基于夹心法检测时, 在免疫层析结合释放垫上固定有上转换 / 磁性纳米粒子标记的抗体 1, 当样品垫上滴加待测物溶液时, 通过毛细作用, 溶液沿纤维素膜向吸水纸方向层析, 抗体标记的纳米颗粒复溶, 当待测物溶液中含目标分子时, 先与荧光纳米颗粒标记的抗体结合, 到达纤维素膜上的检测线包被的抗体 2 时, 抗体 2 通过与目标待测物的结合实现荧光显色, 当溶液中不含有待测目标物时, 荧光纳米颗粒标记的抗体 1 不会与检测线上包被的抗体 2 结合, 不能实现显色。当溶液到达质控线时, 质控线上包被的二抗与荧光颗粒标记的抗体 1 结合显色, 质控线的显色不受目标待测物的影响。因此对于结果的判定与竞争方法相反, 即在 980nm 近红外激光的激发下, 检测线和质控线上同时出现荧光信号为阳性样本; 当检测线上无荧光信号, 质控线显色, 为阴性样本; 当质控线信号消失检测无效。虽然二中原理在结果判定上相反, 但定量过程原理相同, 即免疫层析结束后, 分别读取质控线和检测线的荧光强度, 并用质控线的荧光信号强度进行校正, 比照标准曲线可以得到待测溶液中目标分析物的浓度。

[0028] 在下面给出本发明的技术方案的具体示例, 但本领域技术人员能够理解, 以下具体表述仅是实施本发明的多种方案中的示例, 它们不应被以任何方式理解为限制本发明的范围。

[0029] 在本发明的一个实施方案中, 涉及一种基于上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的免疫层析试纸条, 底层为支撑层, 从测试端起依次由样品垫、负载抗体标记物的结合释放垫、有蛋白印迹的纤维素膜以及吸水纸组成。其中, 抗体标记物为掺杂的 NaGdF_4 纳米颗粒与待测物多克隆 / 单克隆抗体的耦联物, 纤维素膜上的蛋白印迹为作为检测线的抗原或抗体, 以及作为质控线的二抗抗体。

[0030] 在本发明的一个实施方案中, 所述的掺杂的 NaGdF_4 纳米颗粒是以 NaGdF_4 作为基质

材料, Yb^{3+} 作为敏化剂, 由 Er^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} 中的一种或几种进行掺杂发光, 直径为 10 ~ 100nm 的纳米颗粒。该纳米颗粒不仅具有可见光区或近红外光区的荧光发射, 而且还具有 Gd^{3+} 赋予的顺磁性, 为荧光 / 磁性定量检测奠定了基础。

[0031] 在本发明的一个实施方案中, 所述的具有不同发射波长荧光的掺杂的 NaGdF_4 纳米颗粒采用高温复分解反应制备, 具体方法如下

[0032] 1) 绿光发射的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ 的制备

[0033] 将 0.05mmol ~ 1mmol 六水合氯化钆、0.01 ~ 0.03mmol 六水合氯化镱、0.001 ~ 0.005mmol 六水合稀土氯化铥, 加入到 30mL 油酸与十八烯的混合溶剂中。真空加热脱水 (100°C) 2 小时, 反应液冷却至室温。滴加氢氧化钠和氟化铵甲醇溶液中, 加入上述反应液中。氮气氛下加热到 280 ~ 320°C, 1h 后停止反应。待反应液冷却至室温后, 用乙醇沉淀, 并洗涤三次, 离心分离得到绿光发射的纳米颗粒。随后与一端为马来酰亚胺另一端为双磷酸 PEG 的配体进行配体置换, 获得可以分散在水相中的纳米颗粒。

[0034] 2) 蓝光发射的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}, \text{Tm}$ 的制备

[0035] 将 0.05mmol ~ 1mmol 六水合氯化钆、0.01 ~ 0.03mmol 六水合氯化镱、0.001 ~ 0.005mmol 六水合稀土氯化铥, 加入到 30mL 油酸与十八烯的混合溶剂中。真空加热脱水 (100°C) 2 小时, 反应液冷却至室温。滴加氢氧化钠和氟化铵甲醇溶液中, 加入上述反应液中。氮气氛下加热到 280 ~ 320°C, 1h 后停止反应。待反应液冷却至室温后, 用乙醇沉淀, 并洗涤三次, 离心分离得到蓝光发射的纳米颗粒。随后与一端为马来酰亚胺另一端为双磷酸 PEG 的配体进行配体置换, 获得可以分散在水相中的纳米颗粒。

[0036] 3) 近红外光发射的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}, \text{Tm}/\text{Er}$ 的制备

[0037] 将 0.05mmol ~ 0.07mmol 六水合氯化钆、0.0150 ~ 0.02mmol 六水合氯化镱、0.001 ~ 0.005mmol 六水合稀土氯化铥加入到 30mL 油酸与十八烯的混合溶剂中。真空加热脱水 (100°C) 2 小时, 反应液冷却至室温。滴加氢氧化钠和氟化铵甲醇溶液中, 加入上述反应液中。氮气氛下加热到 280 ~ 320°C, 1h 后停止反应。待反应液冷却至室温后, 用乙醇沉淀, 并洗涤三次, 离心分离得到近红外光发射的纳米颗粒。随后与一端为马来酰亚胺另一端为双磷酸 PEG 的配体进行配体置换, 获得可以分散在水相中的纳米颗粒。

[0038] 在本发明的一个实施方案中, 所述的掺杂的 NaGdF_4 纳米颗粒标记的多克隆 / 单克隆抗体由以下方法制备, 具体步骤为:

[0039] 1) 向分散在 0.1M 磷酸缓冲液中的多克隆 / 单克隆抗体中加入一定量的三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP), 室温反应 30 分钟将抗体中的 S-S 进行部分还原后, 除去副产物并将其转移到三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液中。

[0040] 2) 将纳米颗粒分散在三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液后将其按一定比例加入到抗体溶液中, 室温下反应 30 分钟后, 超滤置换缓冲液使其分散在 1×PBS 缓冲液中, 4°C 保存待用。

[0041] 在本发明的一个实施方案中, 所述的样品垫, 结合释放垫用玻璃纤维, 尼龙膜, 聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜; 吸水材料用吸水滤纸, 支撑材料用不吸水的韧性材料; 纤维素膜用硝酸纤维素膜, 纯纤维素膜或羧化纤维素膜。

[0042] 在本发明的一个实施方案中, 所述纤维素膜上的蛋白印迹检测线与质控线为平行排列印迹, 两条印迹之间距离为 0.5 ~ 1cm, 检测线印迹距离样品结合释放垫一侧 0.3 ~

0.7cm。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,所述的样品垫,结合释放垫需经过含蛋白、聚合物、表面活性剂或蔗糖等的PBS缓冲液的预处理。所述的蛋白为牛血清白蛋白,卵清蛋白,浓度为0.01%~10%,优选浓度为0.02~5%;所述聚合物为聚乙二醇PEG,聚-N-乙烯基吡咯烷酮PVP,浓度为0.1%~15%,优选浓度为0.1%~5%;所述表面活性剂为吐温20,吐温80(国药试剂),Triton100,Brij35(Sigma Aldrich)等,浓度为0.01%~2%,优选浓度为0.05%~1%;蔗糖浓度为1%~20%,优选浓度为2%~15%。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,所述的免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0045] 步骤1)合成上转换荧光/磁性纳米颗粒,并通过配体置换将其由油相转移至水溶液中,表面为带马来酰亚胺基团的双磷酸PEG;

[0046] 步骤2)制备上转换荧光/磁性纳米颗粒与待测物多克隆/单克隆抗体的耦联物;

[0047] 步骤3)样品垫和结合释放垫的制备,将样品垫与结合释放垫分别在不同的预制液中浸泡,并在37℃烘箱中充分干燥;

[0048] 步骤4)点样及划线,将步骤2)获得的上转换荧光/磁性纳米颗粒与抗体标记物负载于步骤3)处理过的结合释放垫上;纤维素膜上分别标记作为检测线的待测物抗原或抗体和作为质控线的羊抗兔IgG抗体,并在37℃烘箱中充分干燥;

[0049] 步骤5)试纸条的组装,将样品垫,结合释放垫,纤维素膜,吸水纸依次组装在支撑层底板上,组装成免疫层析试纸,裁切成3~5mm宽;

[0050] 步骤6)试纸条免疫层析及结果判读,将50~120μL样本滴加到样品垫上,溶液流经结合释放垫,使纳米粒子抗体标记物复溶,并随溶液借助毛细作用力层析至检测线和质控线后,依靠免疫反应进行显色,5~15分钟后,在980nm近红外光激发下,分别对检测线和质控线的荧光信号进行定量,同时以质控线的荧光信号强度进行校正建立标准曲线,进而实现分析物的定量检测。

[0051] 本发明的积极有益效果非限制性地包括以下各项:

[0052] 1)无背景干扰,灵敏度高,特异性强,具有双重信号定量检测的潜质。本发明的免疫层析试纸条以掺杂的稀土上转换荧光/磁性颗粒标记多克隆/单克隆抗体为基础制备而成,在近红外光照射下既可以肉眼直接读取荧光信号,也可以通过荧光扫描仪读取荧光信号(如近红外发射)或借助磁信号检测仪进行双重定量。由于上转换荧光纳米颗粒具有优异的光学和化学稳定性,不仅保证分析检测的稳定性,而且消除背景检测的荧光干扰,灵敏度大大提高。同时该方法具有高度的灵活性,由于稀土上转换荧光的特征光谱主要受掺杂离子的种类和比例的影响,因此可以通过改变掺杂离子的组合实现多样化的特征光谱,使其能根据实际检测需要而适用于多重分析。

[0053] 2)简便快速,安全性好,适用范围广,便于现场分析。免疫层析试纸条可以直接对血样,尿样,组织样等进行直接检测包括农药残留,毒物,抗生素等,无需进行复杂的前处理过程,检测使用溶液量小,全程需时10~20分钟,结果显示直观易于判断,也可以借助仪器直接读取定量结果。所用材料包括纳米颗粒在内对检测者,环境均无伤害。该免疫层析试纸条可以满足不同层次人的需求,包括专业化验,海关检疫,质量检测,消费者个人等。本发明在保障食品安全,维护消费者健康方面具有明显的经济效益和社会效益,拥有广阔的市

场前景。

[0054] 以下实施例具体说明上转换荧光 / 磁性颗粒标的制备及免疫层析试纸条的结构和检测方法：

[0055] 参见图 1 和图 2, 其中 1 为样品垫, 由玻璃纤维, 尼龙膜, 聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成。2 为结合释放垫, 由玻璃纤维, 尼龙膜, 聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成。3 为纤维素膜, 为硝酸纤维素膜, 纯纤维素膜或羧化纤维素膜。4 为检测线, 5 为质控线, 分别为待测物抗原或抗体和二抗在纤维素膜上的平行蛋白印迹。6 为吸水滤纸, 7 为支撑底板。各部件由下而上依次在支撑底板上组装, 彼此之间交界处相互重叠便于溶液层析。

[0056] 实施例

[0057] 实施例 1 不同发射波长上转换荧光 / 磁性纳米颗粒的制备

[0058] 1) 绿光发射的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Er}$ 的制备

[0059] 将 0.183g 六水合氯化钆、0.048g 六水合氯化镱、0.005g 六水合氯化铒, 加入到 30mL 油酸与十八烯的混合溶剂中。真空加热脱水 (100°C) 2 小时, 之后将反应液冷却至室温。将氢氧化钠和氟化铵甲醇溶液加入上述反应液中。在氮气氛下加热到 300°C 反应 1h 后停止反应。待反应液冷却至室温后, 用乙醇沉淀出 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Er}$ 纳米颗粒, 并用乙醇洗涤三次, 离心分离得到绿光发射的纳米颗粒, 如图 3(A) 所示, 光谱图如 (B) 所示。随后与一端为马来酰亚胺另一端为双磷酸 PEG 的配体进行配体置换, 获得可以分散在水相中的纳米颗粒。

[0060] 2) 蓝光发射的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Tm}$ 的制备

[0061] 将 0.183g 六水合氯化钆、0.048g 六水合氯化镱、0.005g 六水合氯化铥, 加入到 30mL 油酸与十八烯的混合溶剂中。真空加热脱水 (100°C) 2 小时, 之后将反应液冷却至室温。将氢氧化钠和氟化铵甲醇溶液加入上述反应液中。在氮气氛下加热到 300°C 反应 1h 后停止反应。待反应液冷却至室温后, 用乙醇沉淀出 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Tm}$ 纳米颗粒, 并用乙醇洗涤三次, 离心分离得蓝光发射的纳米颗粒。随后与一端为马来酰亚胺另一端为双磷酸 PEG 的配体进行配体置换, 获得可以分散在水相中的纳米颗粒。

[0062] 3) 近红外光发射的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Tm/Er}$ 的制备

[0063] 将 0.2579g 六水合氯化钆、0.1162g 六水合氯化镱、0.0025g 六水合氯化铥, 加入到 30mL 油酸与十八烯的混合溶剂中。真空加热脱水 (100°C) 2 小时, 之后将反应液冷却至室温。将氢氧化钠和氟化铵甲醇溶液加入上述反应液中。在氮气氛下加热到 300°C 反应 1h 后停止反应。待反应液冷却至室温后, 用乙醇沉淀出 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Tm}$ 纳米颗粒, 并用乙醇洗涤三次, 离心分离得近红外光发射的纳米颗粒。随后与一端为马来酰亚胺另一端为双磷酸 PEG 的配体进行配体置换, 获得可以分散在水相中的纳米颗粒。

[0064] 实施例 2: 基于竞争方法检测小分子的上转换荧光 / 磁性纳米颗粒标记的免疫层析试纸方法的建立

[0065] 以农药代谢产物甲基对氧磷为例, 该方法的步骤包括

[0066] 1) 纳米颗粒与抗体耦联物的制备

[0067] 将水相中绿光发射的 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Er}$ 纳米颗粒与甲基对氧磷抗体通过马来酰亚胺与巯基反应进行耦联。首先向分散在 $10\times\text{PBS}$ 缓冲液中含 1mg/mL 甲基对氧磷多克隆抗体溶液中加入 $0.5\% \sim 1\%$ 的三 (2- 羧乙基) 膦 (TCEP), 室温反应 30 分钟后, 除去副产物及未

反应的 TCEP,并将其转移到 Tris 缓冲液中。然后将纳米颗粒分散在 Tris 缓冲液中,并将其按一定比例加入到上述抗体溶液中,室温下反应 30 分钟后,超滤,置换缓冲液使其分散在 1×PBS 缓冲液中,4℃保存待用。

[0068] 2) 结合释放垫的制备,优化选择玻璃纤维作为结合释放垫,并浸入预处理液中浸泡,预处理液含有 5%蔗糖,0.1% Triton100,0.1%牛血清白蛋白(BSA)的 1×PBS 缓冲液,pH 为 7.0~7.4。37℃干燥后,将步骤 1) 制备的纳米颗粒蛋白标记物负载于处理好的结合释放垫上,37℃充分干燥。

[0069] 3) 样品垫的制备,将玻璃纤维浸入含 0.2%的 Brij35 的 1×PBS 缓冲液中,37℃充分干燥,保存于干燥器中备用。

[0070] 4) 在纤维素膜上划线,选硝酸纤维素(NC)膜作为固相基质,在距离一端约 1cm 处,将甲基对氧磷包被原划于 NC 膜上,作为检测线。在距离另一端 0.7cm 处,用二抗羊抗兔 IgG 划线,作为质控线。37℃真空干燥箱充分干燥。

[0071] 5) 免疫层析试纸条的组装:将样品垫,结合释放垫,NC 膜,吸水纸依次组装在支撑底板上,其中结合释放垫,吸水纸与 NC 膜两端分别重叠,便于毛细作用使溶液流动。组装后进行裁切,裁成 3mm 宽的免疫层析试纸条。

[0072] 6) 甲基对氧磷标准品的配置,将不同浓度的甲基对氧磷标准品储备液,分别加入到 10mL 容量瓶中,用 1×PBS 缓冲液定容至刻度线。

[0073] 7) 甲基对氧磷免疫层析检测,向裁切好的试纸条的样品垫上分别滴加不同浓度的标准溶液,10~15 分钟后,在 980nm 激光的照射下,观察试纸条的显色情况,并用相机进行拍照,利用 imageJ 软件对检测线和质控线的荧光信号进行定量,并用质控线的荧光信号进行参照,获得检测甲基对氧磷的标准曲线。将待测液滴加到免疫层析试纸上,将获得的检测线和质控线信号的比值代入标准曲线,从而计算得出待测物溶液中甲基对氧磷的含量。

[0074] 实施例 3 基于夹心法的上转换荧光/磁性纳米颗粒免疫层析试纸方法的建立

[0075] 以人绒毛膜促性腺激素(hCG)为例,步骤为

[0076] 1) 纳米颗粒与抗体耦联物的制备,将水相中蓝光发射的 NaGdF₄:Yb,Tm 纳米颗粒与抗 β 亚基绒毛膜促性腺激素(β-hCG)抗体通过马来酰亚胺与巯基反应进行耦联,首先向分散在 0.1M 磷酸缓冲液中含 1mg/mL 抗 β 亚基绒毛膜促性腺激素(β-hCG)单克隆抗体溶液中加入 0.5%~1%的三(2-羧乙基)膦(TCEP),室温反应 30 分钟后,除去副产物及未反应的 TCEP,并将其转移到 Tris 缓冲液中。然后将纳米颗粒分散在 Tris 缓冲液中,并将按一定比例加入到上述抗体溶液中,室温下反应 30 分钟后,超滤,置换缓冲液使其分散在 1×PBS 缓冲液中,4℃保存待用。

[0077] 2) 结合释放垫的制备,选择玻璃纤维作为结合释放垫,并浸入预处理液中浸泡,预处理液含有 10%蔗糖,0.1%吐温 20,0.1%牛血清白蛋白(BSA)的 1×PBS 缓冲液,pH 为 7.0~7.4。37℃干燥后,将步骤 1) 制备的纳米颗粒蛋白标记物负载于处理好的结合释放垫上,37℃充分干燥。

[0078] 3) 样品垫的制备,将玻璃纤维浸入含 0.4%的 Brij35 的 1×PBS 缓冲液中,37℃充分干燥,保存于干燥器中备用。

[0079] 4) 在纤维素膜上划线,选硝酸纤维素(NC)膜作为固相基质,在距离一端约 1cm 处,将抗 α 亚基绒毛膜促性腺激素(α-hCG)划于 NC 膜上,作为检测线。在距离另一端 0.7cm 处,

用二抗羊抗鼠 IgG 划线,作为质控线。37℃真空干燥箱充分干燥。

[0080] 5) 免疫层析试纸条的组装:将样品垫,结合释放垫,NC膜,吸水纸依次组装在支撑底板上,其中结合释放垫,吸水纸与NC膜两端分别重叠,便于毛细作用使溶液流动。组装后进行裁切,裁成3mm的免疫层析试纸条。

[0081] 6) hCG标准品的配置,将不同体积的hCG抗原标准品储备液,分别加入到10mL容量瓶中,用1×PBS缓冲液定容至刻度线。

[0082] 7) hCG抗原标准品的免疫层析检测,向裁切好的试纸条的样品垫上分别滴加不同浓度的标准溶液,10~15分钟后,在980nm激光的照射下,观察试纸条的显色情况,并用相机进行拍照,利用imageJ软件(National Institutes of Health)对检测线和质控线的荧光信号进行定量,并用质控线的荧光信号进行参照,获得检测甲基对氧磷的标准曲线(每个样本分别用3个试纸条测定,求平均值)。将待测液滴加到免疫层析试纸上,将获得的检测线和质控线信号的比值代入标准曲线,从而计算出待测物溶液中hCG抗原的含量。

[0083] 实施例4上转换荧光/磁性纳米颗粒免疫层析试纸方法用于实际样品的检测

[0084] 待测蔬菜样品中甲基对氧磷的检测:称取一定量的购自农贸市场的大叶蔬菜如生菜样本,剪碎,用pH为7.0~7.4的1×PBS缓冲液浸泡,并按不同比例1:1~1:10稀释。

[0085] 试纸条结构和实施例2基本相同,不同之处在于所用纳米颗粒为蓝色发射的NaGdF₄:Yb,Tm,结合释放垫的预处理液中含10%蔗糖,0.1%吐温20,和3%的聚合物PEG的pH为7.0~7.4的1×PBS缓冲液,样品垫为聚酯材料。

[0086] 将100μL样品溶液滴加在裁切好的试纸条的样品垫上,10~15分钟后,在980nm激光的照射下,观察试纸条的显色情况,并对结果进行定量处理。

[0087] 结果判定:在980nm激光照射下,如果出现检测线和质控线两条荧光条带则为阴性样本,出现质控线一条条带为阳性样本,质控线消失,则检测无效。层析结果的定量处理与实施例2相同。

[0088] 实施例5上转换荧光/磁性纳米颗粒免疫层析试纸方法用于实际样品的检测

[0089] 待测尿样中的hCG的检测:

[0090] 试纸条结构和实施例2基本相同,不同之处在于结合释放垫经含5%蔗糖,0.1%吐温20,0.1%牛血清白蛋白(BSA)的pH为7.0~7.4的1×PBS缓冲液处理。标准溶液为配置在正常人尿液中的不同浓度的hCG抗原标准品溶液,标准曲线基于此系列溶液构建。

[0091] 将100μL尿液样本(来自北京大学医学院化验科的妇女尿液样本)滴加在裁切好的试纸条的样品垫上,10~15分钟后,在980nm激光的照射下,观察试纸条的显色情况,并对结果进行定量处理。

[0092] 结果判定:在980nm激光照射下,如果出现检测线和质控线两条条带为阳性样本,出现质控线一条条带为阴性样本,质控线消失,则检测无效。层析结果的定量处理与实施例3相同。

[0093] 实施例6上转换荧光/磁性纳米颗粒免疫层析试纸方法用于实际样品的检测

[0094] 待测肉样克伦特罗的检测

[0095] 将猪肉样本(购自中关村小区菜市场)剪碎磨细,用pH为7.0~7.4的1×PBS缓冲液配置成1:2~1:10的样品悬浊液;

[0096] 试纸条结构和实施例 2 基本相同,不同之处在于结合释放垫经含 10%蔗糖,0.1% Triton100,0.1%牛血清白蛋白(BSA)的 pH 为 7.0 ~ 7.4 的 1×PBS 缓冲液。将 100 μL 样品溶液滴加在裁切好的试纸条的样品垫上,10 ~ 15 分钟后,在 980nm 激光的照射下,观察试纸条的显色情况,并对结果进行定量处理。

[0097] 结果判定:在 980nm 激光照射下,如果出现检测线和质控线两条条带为阴性样本,出现质控线一条条带为阳性样本,质控线消失,则检测无效。层析结果的定量处理与实施例 2 相同。

[0098] 实施例 7 上转换荧光 / 磁性纳米颗粒免疫层析试纸方法用于实际样品的检测

[0099] 待测牛奶样品中三聚氰胺的检测:

[0100] 将牛奶(购自超市的蒙牛和伊利纯牛奶)用 pH 为 7.0 ~ 7.4 的 1×PBS 缓冲液按不同比例稀释。

[0101] 试纸条结构和实施例 2 基本相同,不同之处在于在所用上转换荧光磁性纳米颗粒为近红外发射的 $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Tm}$,结合释放垫为尼龙材料,预处理液中含 10%蔗糖,0.1%吐温 20 和 0.05% BSA 的 pH 为 7.0 ~ 7.4 的 1×PBS 缓冲液,样品垫为聚酯材料。

[0102] 将 100 μL 样品溶液滴加在裁切好的试纸条的样品垫上,10 ~ 15 分钟后,在 980nm 激光的照射下,用荧光扫描仪对结果进行定量处理。

[0103] 结果判定:在 980nm 激光照射下,如果出现检测线和质控线两个荧光峰位则为阴性样本,若只出现质控线一个荧光峰位则为阳性样本,质控线荧光峰消失则检测无效。定量检测方法同实施例 2。

[0104] 实施例 8 上转换荧光 / 磁性纳米颗粒免疫层析试纸方法特异性考察

[0105] 以农药代谢物甲基对氧磷为例考察本方法的检测特异性

[0106] 试纸条结构和组成和实施例 2 基本相同,以与甲基对氧磷结构类似的对硫磷,以及在农业生产生活中经常使用到几种农药作为待测物,包括甲胺磷,毒死蜱,甲萘威,克百威(购自国家标准物质中心),考察甲基对氧磷免疫层析方法的特异性。将上述五种农药用 pH 为 7.0 ~ 7.4 的 1×PBS 缓冲液配成不同浓度的标准溶液,考察与目标待测物的交叉反应,结果表明该试纸条特异性好,与其他五种农药无交叉性。

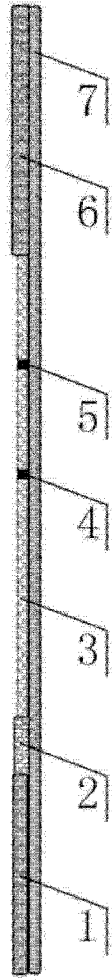


图 1

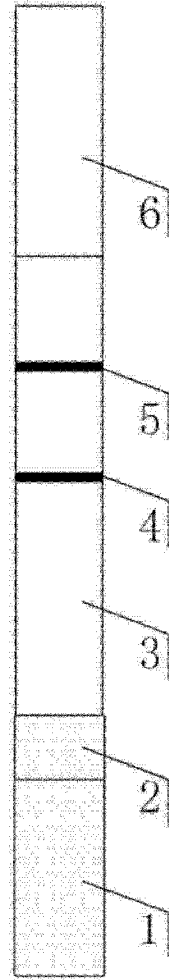


图 2

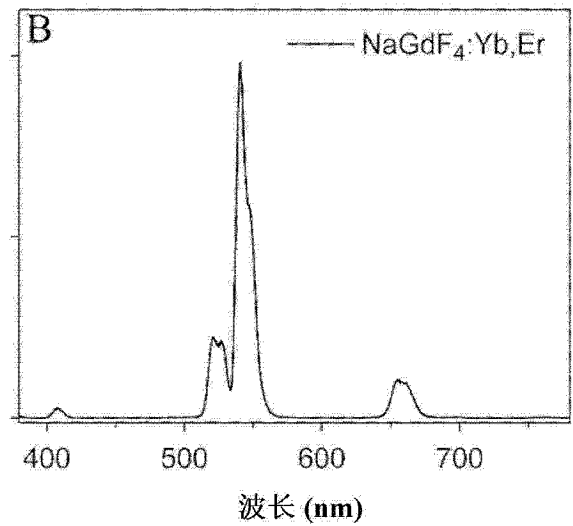
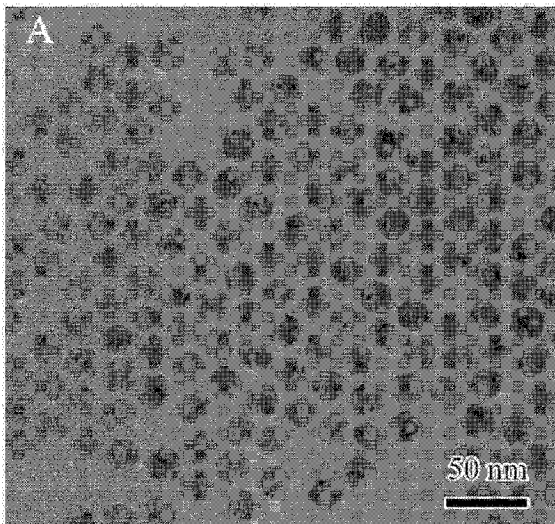


图 3

专利名称(译)	一种基于上转换荧光/磁性纳米颗粒的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN104101708A	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	CN201310124432.9	申请日	2013-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院化学研究所		
[标]发明人	高明远 刘春艳 侯毅		
发明人	高明远 刘春艳 侯毅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N33/54346 G01N33/558 G01N33/76		
代理人(译)	贺卫国		
其他公开文献	CN104101708B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种上转换荧光/磁性纳米材料标记的免疫层析试纸及其制备方法，结合上转换荧光/磁性材料优良的荧光与磁学特性和免疫层析技术，在优化试纸条结构和各组成部件的基础上，构建了免疫层析试纸条。该免疫层析试纸包括支撑材料和上层，所述上层包括样品垫、结合释放垫、纤维素膜、吸水材料，其中所述纤维素膜具有检测线和质控线，在所述检测线上包覆有待测物抗原或抗体，在所述质控线上包覆有二抗，在所述结合释放垫上负载有上转换荧光/磁性纳米材料标记的可与待测物结合的抗体。本发明实现了基于上转换荧光/磁性纳米材料标记的免疫层析技术在药物残留等领域分析物的荧光定量和潜在磁性定量检测，能够明显提高传统胶体金标记免疫层析方法的检测灵敏度。该试纸条特异性好，灵敏度高，检测简便、直观、准确、成本低，适用范围广，易于推广应用。

