



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101315371 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200810022033.0

(22) 申请日 2008.06.23

(73) 专利权人 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 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101144816 A, 2008.03.19, 全文.

Limei Ao et al. Fluoroimmunoassay for

Antigen Based on Fluorescence Quenching Signal of Gold Nanoparticles. 《Analytical Chemistry》. 2006, 第 78 卷 (第 4 期), 1104 - 1106.

孔小丽等. 抗体和寡核苷酸双标记纳米金生物探针的制备及性能分析. 《中国生物化学与分子生物学报》. 2008, 第 24 卷 (第 5 期), 481 - 487.

审查员 苗荻

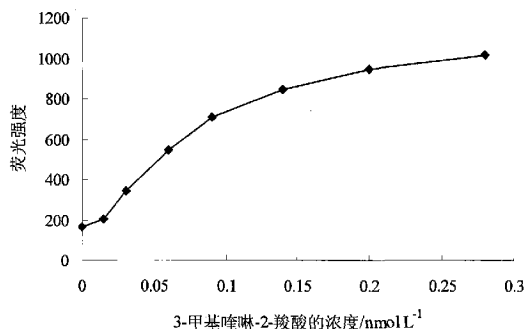
权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 1 页

(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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子用 3-氨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: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;

(8) 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 1.5  $\mu\text{g}$  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 1.5  $\mu\text{M}$  的寡核苷酸 5'-CGCATTCAGGATTGCATGAATGCCTCGTCTTAACGGTCTCAACTCGTA-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;

(9) 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}/\text{s}$  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  $\mu\text{L}$  抗体和 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}/\text{s}$  的速度注入 400  $\mu\text{L}$  pH7.0、0.1MNaCl 的 0.01M PBS 洗液;之后,将 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}/\text{s}$  的速度注入反应池,反应 6 分钟,冲洗;以 2  $\mu\text{L}/\text{s}$  的速度注入 100  $\mu\text{L}$  的双蒸水,60℃ 反应 6 分钟,最后再注入 100  $\mu\text{L}$  的双蒸

水,收集所需单链 DNA,撤去磁场,洗涤柱子以备再用;

(10) 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  $\mu$ L 亲和素的 pH9.6 碳酸钠缓冲溶液,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 PBS 清洗后,备用;

(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;

将收集的单链 DNA 与 10  $\mu$ L 的生物素标记的捕获探针 25  $\mu$ M,5'-生物素-a(10) TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3' 混合,再加入 20  $\mu$ L 的含 0.3MNaCl、0.02 % SDS 的 pH7.40.01M PBS 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后,再加入 20nM13nm 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  $\mu$ L PBS 缓冲液洗涤,加入 100  $\mu$ L 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。

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  $\mu$ L 三正丁胺,反应 0.5 小时;再加入 75  $\mu$ L 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

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  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度为 0.12mol/L,  $\text{Fe}^{3+}$  离子的浓度为 0.2mol/L;NaOH 溶液的浓度为 2.5mol/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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子;将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子 0.125g 用 100mL 乙醇和 1mL 二次蒸馏水分散,超声 30min,滴加 0.4mL3-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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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。

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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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 3mLN, 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。

## 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

[0001] 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

[0002] 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。

[0003] 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

[0004] 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。

[0005] 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:

[0006] (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;

[0007] (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;

[0008] (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;

[0009] (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;

- [0010] (5) 磁性纳米粒子的修饰 ;将制备的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子用 3- 氨基三乙氧基硅烷修饰 ;
- [0011] (6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联 ;
- [0012] (7) 两种粒径的金纳米粒子的制备 ;
- [0013] (8) 两种金纳米探针的制备 ;
- [0014] (9) 流动注射系统中的免疫反应 ;
- [0015] (10) 荧光酶标板的包被 ;
- [0016] (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。
- [0017] 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  $\mu\text{L}$  三正丁胺, 反应 0.5 小时 ;再加入 75  $\mu\text{L}$  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。
- [0018] 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。
- [0019] 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  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度为 0.12mol/L,  $\text{Fe}^{3+}$  离子的浓度为 0.2mol/L ;NaOH 溶液的浓度为 2.5mol/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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  干燥 24 小时, 在玛瑙研钵中研磨后所得产物为  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子 ;将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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 $^{\circ}\text{C}$  干燥 24 小时, 备用。
- [0020] 磁性纳米粒子与包被原的偶联 :取所得的 APTES 修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0021] 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。

[0022] 两种金纳米探针的制备:

[0023] 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'-TACGAGTTGAGACCGTTAAG ACGAGGCAATCATGCAATCCTGAATGCGt(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 1.5 μM 的寡核苷酸 5'-CGCATTCAGGATTGCATGAATGCCTCGTCTTAACGGTCTCAACTCGTA-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 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;

[0024] 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。

[0025] 流动注射系统中的免疫反应:先用 pH7.0、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 μL 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 μL/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 μL 抗体和 50 μL 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 μL/s 的速度注入 400 μL pH7.0、0.1M NaCl 的 0.01M PBS 洗液;之后,将 100 μL 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 μL/s 的速度注入反应池,反应 6 分钟,冲洗;以 2 μL/s 的速度注入 100 μL 的双蒸水,60℃ 反应 6 分钟,最后再注入 100 μL 的双蒸水,收集所需单链 DNA,撤去磁场,洗涤柱子以备再用。

[0026] 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 μL 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。

[0027] 荧光猝灭检测:将收集的单链 DNA 与 10 μL 的生物素标记的捕获探针 25 μM, 5'-生物素-a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3' 混合,再加入 20 μL 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 μL PBS 缓冲液洗涤,加入 100 μL 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。

[0028] 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

[0029] 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

[0030] 实施例 1

[0031] (1) 包被原的制备:

[0032] 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  $\mu$ L 三正丁胺,反应 0.5 小时,再加入 75  $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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;

[0033] 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 $^{\circ}$ 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;

[0034] (2) 免疫源的制备:

[0035] 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 $^{\circ}$ 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;

[0036] (3) 多克隆抗体制备:

[0037] 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。

[0038] (4) 抗体效价的测定:

[0039] 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  $3.2 \times 10^5$ 。

[0040] (5) 磁性纳米粒子的修饰:

[0041] 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  $\text{Fe}^{2+}$  离子的浓度为 0.12mol/L,  $\text{Fe}^{3+}$  离子的浓度为 0.2mol/L;NaOH 溶液的浓度为 2.5mol/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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  种子。

[0042] 将上步产物  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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  $60^\circ\text{C}$  干燥 24 小时,备用。

[0043] (6) 磁性纳米粒子与包被原的偶联:

[0044] 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  $4^\circ\text{C}$  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  $0.02\text{mol/L}$  pH7.6 的 Tris 缓冲液,  $4^\circ\text{C}$  保存备用。

[0045] (7) 金纳米粒子的制备:

[0046] 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,  $4^\circ\text{C}$  保藏。

[0047] (8) 金纳米探针的制备:

[0048] 首先, 30nm 金纳米粒子与  $1.5\mu\text{g}$  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  $5'-\text{tacgagttgagaccgttaagacgaggcaatcatgcaatcctgaatgcgt}(10)-\text{SH}-3'$ , 室温反应 20 小时, 再用 10mM 的磷酸盐缓冲溶液 ( $0.1\text{M NaCl}$ ) 调节 pH 值至 7.0, 盐陈 40 小时后于  $-4^\circ\text{C}$  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 ( $0.1\text{M NaCl}$ ) 溶解, 加入  $1.5\mu\text{M}$  的目标探针  $5'-\text{cgcattcaggattgcatgaatgcctcgtcttaacgggtctcaactcgta}-3'$   $37^\circ\text{C}$  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 10mM 的磷酸盐缓冲溶液 ( $0.3\text{MNaCl}$ ), 作为储备液  $4^\circ\text{C}$  保藏;

[0049] 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  $5'-\text{GGCAATCATGCAATCCTGAATGCGa}(10)-\text{SH}-3'$ , 室温反应 20 小时, 再用 10mM 的磷酸盐缓冲溶液 ( $0.1\text{M NaCl}$ ) 调节 pH 值至 7.0, 盐陈 40 小时后于  $-4^\circ\text{C}$  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 ( $0.1\text{MNaCl}$ ) 溶解,  $4^\circ\text{C}$  保藏。

[0050] (9) 流动注射系统中的免疫反应:

[0051] 先用  $0.01\text{M}$  PBS (pH7.0,  $0.1\text{M NaCl}$ ) 的洗液清洗微管和免疫反应池, 然后将  $40\mu\text{L}$  抗原修饰的超顺磁纳米粒子溶液 ( $0.5\text{mg/ml}$ ) 吸入螺线管中, 再以  $5\mu\text{L/s}$  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 ( $50\mu\text{L}$  抗体;  $50\mu\text{L}$  LMQCA) 吸入螺线管中, 其中, MQCA 溶解于  $0.01\text{MPBST}$  (pH7.4, 0.05% Tween-20) 中, 浓度从  $1\text{pg/mL} \sim 100\text{pg/mL}$ 。然后, 将混合溶液注入免疫反应池中室温反应 10 分钟, 再以  $20\mu\text{L/s}$  的速度注入  $400\mu\text{L}$   $0.01\text{MPBS}$  (pH7.0,  $0.1\text{M NaCl}$ ) 的洗液。之后, 将  $100\mu\text{L}$  的 30nm 金探针 (含有二抗和 DNA) 的溶液以  $1\mu\text{L/s}$  的速度注入反应池, 反应 6 分钟, 冲洗。以  $2\mu\text{L/s}$  的速度注入  $100\mu\text{L}$  的双蒸水,  $60^\circ\text{C}$  反应 6 分钟, 最后再注入  $100\mu\text{L}$  的双蒸水, 收集所需单链 DNA, 撤去磁场, 洗涤柱子以备再用。

[0052] (10) 荧光酶标板的包被:

[0053] 用亲和素包被荧光酶标板, 向酶标板每孔中加入  $100\mu\text{L}$  亲和素的碳酸钠缓冲溶

液 (pH9.6), 4°C 孵育过夜, 用 PBS 清洗后, 备用。

[0054] (11) 荧光猝灭检测:

[0055] 步骤 (9) 收集的单链 DNA 与 10  $\mu$  L 的生物素标记的捕获探针 (25  $\mu$  M, 5' - 生物素 -a(10)TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGA-3') 混合, 再加入 20  $\mu$  L (0.3M NaCl, 0.02 % SDS, 0.01M PBS, pH7.4), 37°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  $\mu$  L PBS 缓冲液洗涤, 加入 100  $\mu$  L FITC, 震荡, 荧光检测, 荧光强度可以通过 Wallac1420 工作站在 线观测。

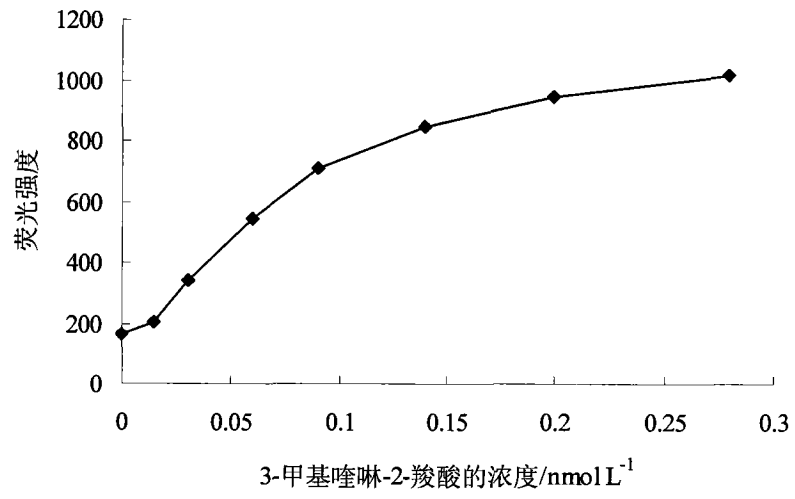


图 1

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	<a href="#">CN101315371B</a>	公开(公告)日	2012-05-23
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		
审查员(译)	苗荻		
其他公开文献	CN101315371A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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。

