



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107505300 B

(45)授权公告日 2019.12.20

(21)申请号 201710819041.7

(22)申请日 2017.09.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107505300 A

(43)申请公布日 2017.12.22

(73)专利权人 南京工业大学
地址 210009 江苏省南京市鼓楼区新模范
马路5号

(72)发明人 于海东 宗丽君 李林 张承武
刘志鹏 刘金华 黄维 欧阳启然
赖琮宇 朱成显 焦钰翠 高磊

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 吴频梅

(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件
董海洲. 诺氟沙星免疫分析化学研究.《中国

优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》
.2007,

Erqun Song et al..Multi-color quantum
dot-based fluorescence immunoassay array
for simultaneous visual detection of
multiple antibiotic residues in milk.
《Biosensors and Bioelectronics》.2015,

余宇燕 等.动物性食品中诺氟沙星残留的
荧光免疫分析方法研究.《现代食品科技》.2012,
第28卷(第7期),

Anna N. Berlina et al..Quantum dot-
based lateral flow immunoassay for
detection of chloramphenicol in milk.
《Anal Bioanal Chem》.2013,

Juan Peng et al..Development of an
icELISA and immunochromatographic strip
for detection of norfloxacin and its
analogues in milk.《Food and Agricultural
Immunology》.2016,

审查员 樊凯利

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

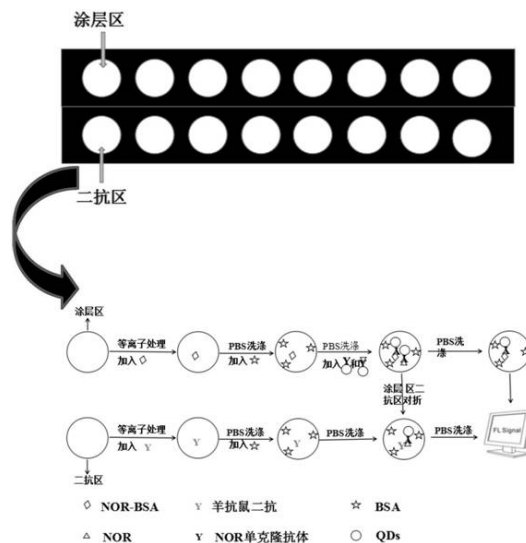
(54)发明名称

一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记
检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器

(57)摘要

本发明公开了一种基于荧光免疫分析用量
子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星NOR的微流体
纸基传感器,属于生物纳米技术领域。该传感器的
制备方法包括:首先,在色谱纸上通过喷蜡打
印技术,形成亲水区域与疏水区域,烘烤一定时
间并将纸进行等离子体处理;其次,制备NOR-牛
血清白蛋白BSA涂层抗原和量子点标记的NOR抗
体;再次,将涂层抗原与羊抗鼠二抗分别加入到
上下平行的白色纸区域中,并将NOR与量子点标
记的抗体混合物加入到涂层区,将纸对折,溶液
渗透到二抗区;最后,利用免疫分析测定,最终通
过荧光信号定量检测牛奶中的诺氟沙星。本发明
提供了一种成本低、操作简单、灵敏度高、检测限

低、快速检测NOR的纸基传感器。



CN 107505300 B

1. 一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,其特征在於:包括以下步骤:

(1) 设计纸基模型,在色谱纸上,利用喷蜡打印机打印所需模型,所述设计纸基模型为亲水区域与疏水区域,亲水区域第一行为涂层区、第二行为二抗区,烘烤后,等离子体处理所述的纸基模型;

(2) 诺氟沙星牛血清白蛋白NOR-BSA涂层抗原的制备;

(3) 量子点标记的诺氟沙星NOR抗体的制备;

(4) 配制不同浓度的NOR,并与步骤(3)中的量子点标记的诺氟沙星NOR抗体混合;

(5) 在步骤(1)所得的色谱纸的涂层区加入步骤(2)制备的NOR-BSA,在步骤(1)所得的色谱纸的二抗区加入羊抗鼠二抗,反应15-30min后,用磷酸缓冲盐溶液PBS洗涤,用牛血清白蛋白BSA阻隔后再洗涤;

(6) 将步骤(4)中的混合溶液加入到涂层区;反应2-5min后,将色谱纸对折,涂层区与二抗区重叠,再反应2-5min后洗涤;

(7) 利用荧光分光光度计分别检测涂层区与二抗区的荧光。

2. 根据权利要求1所述的基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,其特征在於:所述步骤(1)的纸是通过喷蜡打印技术,形成亲水与疏水区域,在105℃下,烘烤5分钟,再用等离子体清洗器处理纸,通过得失电子,使纸上的羟基变为醛基,醛基再与抗原或者抗体的氨基反应,以此将抗原或抗体更好地固定在纸上。

3. 根据权利要求1或2所述的基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,其特征在於:所述步骤(1)的等离子体处理的所述纸基模型在加样前需要密封,防止氧化。

4. 根据权利要求1所述的基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,其特征在於:所述步骤(2)的涂层抗原是通过透析所得。

5. 根据权利要求1所述的基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,其特征在於:所述步骤(5)和(6)的加样和对折,是将NOR-BSA涂层抗原与羊抗鼠二抗分别到涂层区与二抗区中,反应15-30min后,用PBS洗涤,再加入BSA进行阻隔,15-30min后,用PBS洗涤,再将NOR与量子点标记的单克隆抗体混合物加入到涂层区,反应2-5min后,将涂层区与二抗区对折重叠。

一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及生物材料、纳米材料,属于生物纳米技术领域,具体涉及一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器。

背景技术

[0002] 诺氟沙星是一种被广泛应用于人类和兽医治疗中的抗菌药,具有抗菌谱广、抗菌活性强的特点。但废水、地表水、食物等中的残留或者长期滥用诺氟沙星会对人体及动物造成严重的伤害。因此诺氟沙星的检测已经变成了一个越来越重要的问题。目前,有很多检测诺氟沙星的方法被报道在文献当中,主要包括高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、荧光法、紫外光度法等。但存在样本处理复杂、成本高、不易推广等缺点。

[0003] 本发明是在色谱纸上,用量子点与诺氟沙星单克隆抗体共轭物作为信号探针,通过荧光强度的不同达到对牛奶中诺氟沙星的定量检测。色谱纸具有成本低、便于携带等优点,量子点具有宽的激发谱和窄的发射谱,很好的光稳定性及高的荧光强度等优点。二者的完美结合,可以达到对诺氟沙星的灵敏性检测,使检测结果具有高的灵敏性、特异性及低的检测限。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题是:针对现有技术的不足,提出一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,解决了以往检测中样本处理复杂、成本高、不易推广等的缺点。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,包括以下步骤:

[0006] (1) 设计纸基模型,在色谱纸上,利用喷蜡打印机打印所需模型,烘烤后,等离子体处理纸;

[0007] (2) 诺氟沙星牛血清白蛋白NOR-BSA涂层抗原的制备;

[0008] (3) 量子点标记的诺氟沙星NOR抗体的制备;

[0009] (4) 配制不同浓度的NOR,并与步骤(3)中的量子点标记的NOR混合;

[0010] (5) 在步骤(1)所得的色谱纸的涂层区加入步骤(2)制备的NOR-BSA,在步骤(1)所得的色谱纸的二抗区加入羊抗鼠二抗,反应15-30min后,用磷酸缓冲盐溶液PBS洗涤,用牛血清白蛋白BSA阻隔后再洗涤;

[0011] (6) 将步骤(4)中的混合溶液加入到涂层区;反应2-5min后,将色谱纸对折,涂层区与二抗区重叠,再反应2-5min后洗涤;

[0012] (7) 利用荧光分光光度计分别检测涂层区与二抗区的荧光。

[0013] 优选的,所述步骤(1)的纸是通过喷蜡打印技术,形成亲水与疏水区域,在105℃下,烘烤5分钟,再用等离子体清洗器处理纸,通过得失电子,使纸上的羟基变为醛基,醛基

再与抗原或者抗体的氨基反应,以此将抗原或抗体更好地固定在纸上。

[0014] 优选的,所述步骤(1)的等离子体处理的纸在加样前需要密封,防止氧化。

[0015] 优选的,所述步骤(2)的涂层抗原是通过透析所得。

[0016] 优选的,所述步骤(3)的量子点标记的NOR单克隆抗体共轭物,需要用(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺·盐酸盐EDC·HCl和N-羟基丁二酰亚胺NHS对量子点进行活化,加入NOR单克隆抗体后再室温下搅拌2-4h,离心。

[0017] 优选的,所述步骤(5)和(6)的加样和对折,是将NOR-BSA涂层抗原与羊抗鼠二抗分别到涂层区与二抗区中,反应15-30min后,用PBS洗涤,再加入BSA进行阻隔,15-30min后,用PBS洗涤,再将NOR与量子点标记的单克隆抗体混合物加入到涂层区,反应2-5min后,将涂层区与二抗区对折重叠。

[0018] 优选的,所述步骤(7)的荧光检测,通过检测涂层区中在试管内未与NOR结合的量子点的荧光强度及二抗区中在试管内与NOR结合的量子点的荧光强度,实现定量地检测NOR。

[0019] 有益效果

[0020] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0021] 1、本发明的检测牛奶中诺氟沙星的荧光纸基传感器制作方法简单快速,适用范围广。

[0022] 2、成本低,能够降解,对环境无污染。

[0023] 3、本发明有效地克服了现有技术中本处理复杂、成本高、不易推广等缺点,本发明不仅具有强的特异性、高的灵敏度,还具有低的检测限。同时,本发明的方法还具有普适性,可以实现所有抗原与抗体特异性结合的检测,例如同属于氟喹诺酮类的恩诺沙星、环丙沙星的检测等。上述优点有助于提升荧光纸基传感器在生物技术的进一步应用。

附图说明

[0024] 下面结合附图对本发明的作进一步说明。

[0025] 图1是本发明的基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器的检测原理。

[0026] 图2是对NOR及NOR-BSA共轭物的表征。

[0027] 图3是对量子点及量子点与NOR抗体共轭物的表征。

[0028] 图4是不同浓度的NOR的荧光光谱图。

具体实施方式

[0029] 以下上述仅是本发明的具体实施方式,本领域技术人员可通过该说明书所阐述的说明内容轻易地了解本发明的各项细节与应用,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出一些改善,这些改进也应视为本发明的保护范围。

[0030] 实施例1

[0031] 基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器,包括以下步骤:

[0032] a. 等离子体处理纸的形成

[0033] 1) 设计一定大小的纸基模型,通过喷蜡打印技术,形成亲水区域(如图1所示白色区域)与疏水区域(如图1所示黑色区域);

[0034] 2) 在105℃下,烘烤5分钟;

[0035] 3) 用等离子体清洗器处理纸4min得到所需纸;

[0036] 4) 等离子体处理的纸在加样前需要密封,防止氧化。

[0037] b. NOR-BSA涂层抗原的制备

[0038] 1) 11.7mg NOR加入到3mL无水二甲基甲酰胺中;

[0039] 2) 加入70.5mg EDC.HCl和21.2mg NHS;

[0040] 3) 室温下搅拌一整夜后离心;

[0041] 4) 上清液加入到溶解在5mL PBS (0.01M, pH=7.4) 中的33.0mg的BSA中;

[0042] 5) 4℃透析3天后备用。

[0043] c. 量子点标记的NOR抗体的制备

[0044] 1) 将0.5mg/mL的EDC·HCl与0.5mg/mL的NHS加入到4μM的QDs,室温活化30min;

[0045] 2) 加入4μg/mL的诺氟沙星单克隆抗体,室温下震荡2h;

[0046] 3) 加入1%BSA阻隔30min;

[0047] d. 加样并将纸对折;

[0048] 1) 将NOR-BSA涂层抗原与羊抗鼠二抗分别加入第一行白色区域到涂层区与第二行白色区域二抗区,室温培养30min;

[0049] 2) 用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次,加入1%BSA阻隔30min,再用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次;

[0050] 3) 将不同浓度的NOR与量子点标记的抗体混合物分别加入到不同的涂层区,反应2min后,将涂层区与二抗区对折重叠,再反应2min后,再用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次。

[0051] e. 荧光检测

[0052] 1) 用荧光分光光度计检测涂层区中在试管内未与NOR结合的量子点标记的NOR抗体的荧光强度,随着NOR浓度的升高,涂层区的荧光强度逐渐降低;检测二抗区中在试管内与NOR结合的量子点标记的NOR抗体的荧光强度,随着NOR浓度的升高,二抗区的荧光强度逐渐增强。通过荧光强度与NOR曲线图,就可以实现定量地检测NOR。

[0053] 分别对实施例1中的NOR及NOR-BSA涂层抗原的共轭物用紫外-可见光谱进行表征,如图2所示,NOR-BSA涂层抗原的发生了红移,且吸光强度下降。

[0054] 从图2可以看出NOR与BSA偶联在了一起。

[0055] 分别对实施例1中的量子点及量子点与NOR抗体的共轭物用荧光光谱进行表征,如图3所示,在激发波长为365nm,发射波长为625nm时,量子点的荧光强度在NOR抗体加入后共轭物在同一发射波长处明显降低。

[0056] 从图3可以看出量子点与抗体偶合在了一起,且并不影响量子点固有的荧光特性。

[0057] 对实施例1中的不同浓度的NOR进行荧光光谱的检测,如图4所示,涂层区一随着NOR浓度的升高,荧光强度逐渐下降。

[0058] 从图4中荧光的强度就可以定量地分析NOR,并将此方法应用于其它食品或水中NOR的检测。

[0059] 实施例2

[0060] 基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器，包括以下步骤：

[0061] a. 等离子体处理纸的形成

[0062] 1) 设计一定大小的纸基模型，通过喷蜡打印技术，形成亲水区域(如图1所示白色区域)与疏水区域(如图1所示黑色区域)；

[0063] 2) 在105℃下，烘烤5分钟；

[0064] 3) 用等离子体清洗器处理纸4min得到所需纸；

[0065] 4) 等离子体处理的纸在加样前需要密封，防止氧化。

[0066] b. NOR-BSA涂层抗原的制备

[0067] 1) 11.7mgNOR加入到3mL无水二甲基甲酰胺中；

[0068] 6) 加入70.5mgEDC.HCl和21.2mgNHS；

[0069] 7) 室温下搅拌一整夜后离心；

[0070] 8) 上清液加入到溶解在5mLPBS(0.01M, pH=7.4)中的33.0mg的BSA中；

[0071] 9) 4℃透析3天后备用。

[0072] c. 量子点标记的NOR抗体的制备

[0073] 4) 将0.5mg/mL的EDC·HCl与0.5mg/mL的NHS加入到4uM的QDs，室温活化30min；

[0074] 5) 加入4ug/mL的诺氟沙星单克隆抗体，室温下震荡2.5h；

[0075] 6) 加入1%BSA阻隔30min；

[0076] d. 加样并将纸对折；

[0077] 4) 将NOR-BSA涂层抗原与羊抗鼠二抗分别加入第一行白色区域涂层区与第二行白色区域二抗区，室温培养25min；

[0078] 5) 用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次，加入1%BSA阻隔25min，再用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次；

[0079] 6) 将不同浓度的NOR与量子点标记的抗体混合物分别加入到不同的涂层区，反应2min后，将涂层区与二抗区对折重叠，再反应4min后，再用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次。

[0080] e. 荧光检测

[0081] 2) 用荧光分光光度计检测涂层区中在试管内未与NOR结合的量子点标记的NOR抗体的荧光强度，随着NOR浓度的升高，涂层区的荧光强度逐渐降低；检测二抗区中在试管内与NOR结合的量子点标记的NOR抗体的荧光强度，随着NOR浓度的升高，二抗区的荧光强度逐渐增强。通过荧光强度与NOR曲线图，就可以实现定量地检测NOR。

[0082] 实施例3

[0083] 基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器，包括以下步骤：

[0084] a. 等离子体处理纸的形成

[0085] 1) 设计一定大小的纸基模型，通过喷蜡打印技术，形成亲水区域(如图1所示白色区域)与疏水区域(如图1所示黑色区域)；

[0086] 2) 在105℃下，烘烤5分钟；

[0087] 3) 用等离子体清洗器处理纸4min得到所需纸；

[0088] 4) 等离子体处理的纸在加样前需要密封，防止氧化。

[0089] b. NOR-BSA涂层抗原的制备

[0090] 1) 11.7mg NOR加入到3mL无水二甲基甲酰胺中;

[0091] 10) 加入70.5mg EDC·HCl和21.2mg NHS;

[0092] 11) 室温下搅拌一整夜后离心;

[0093] 12) 上清液加入到溶解在5mL PBS (0.01M, pH=7.4) 中的33.0mg的BSA中;

[0094] 13) 4℃透析3天后备用。

[0095] c. 量子点标记的NOR抗体的制备

[0096] 7) 将0.5mg/mL的EDC·HCl与0.5mg/mL的NHS加入到4μM的QDs, 室温活化30min;

[0097] 8) 加入4μg/mL的诺氟沙星单克隆抗体, 室温下震荡4h;

[0098] 9) 加入1% BSA阻隔30min;

[0099] d. 加样并将纸对折;

[0100] 7) 将NOR-BSA涂层抗原与羊抗鼠二抗分别加入第一行白色区域到涂层区与第二行白色区域二抗区, 室温培养15min;

[0101] 8) 用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次, 加入1% BSA阻隔15min, 再用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次;

[0102] 9) 将不同浓度的NOR与量子点标记的抗体混合物分别加入到不同的涂层区, 反应2min后, 将涂层区与二抗区对折重叠, 再反应5min后, 再用0.01M, pH=7.4的PBS洗涤3次。

[0103] e. 荧光检测

[0104] 3) 用荧光分光光度计检测涂层区中在试管内未与NOR结合的量子点标记的NOR抗体的荧光强度, 随着NOR浓度的升高, 涂层区的荧光强度逐渐降低; 检测二抗区中在试管内与NOR结合的量子点标记的NOR抗体的荧光强度, 随着NOR浓度的升高, 二抗区的荧光强度逐渐增强。通过荧光强度与NOR曲线图, 就可以实现定量地检测NOR。

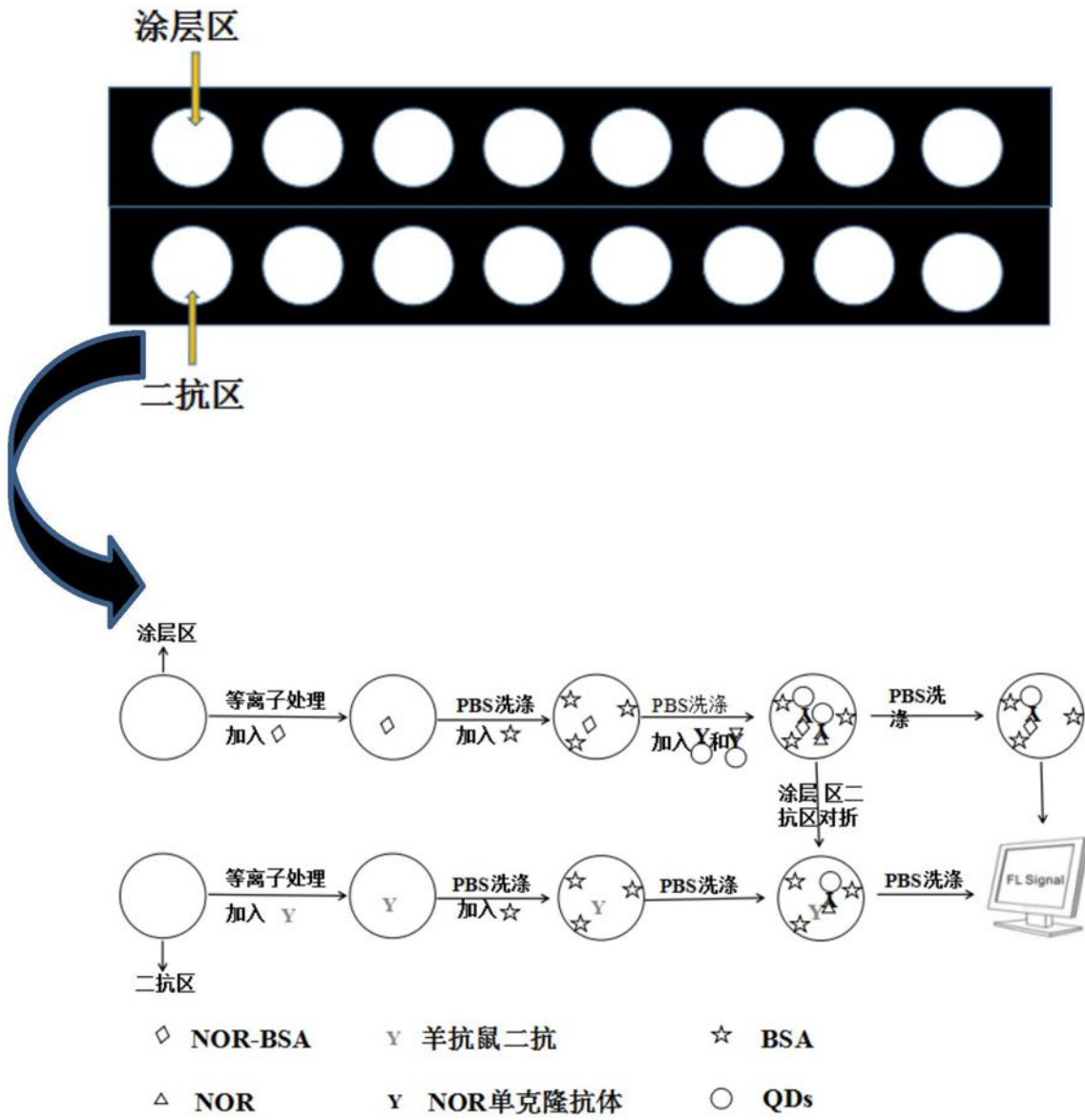


图1

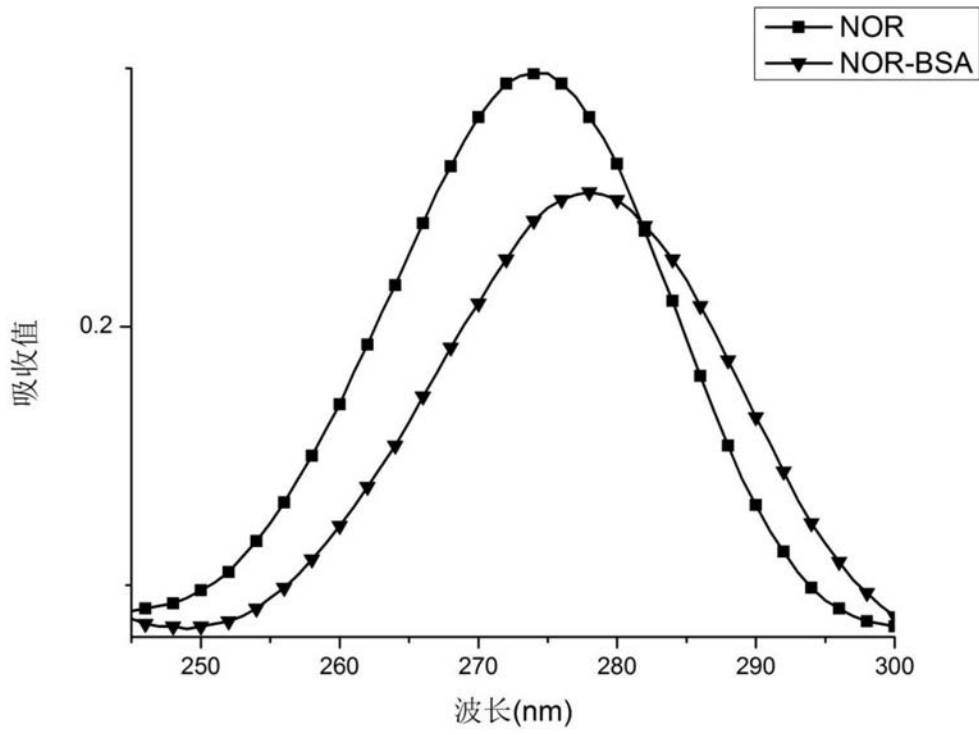


图2

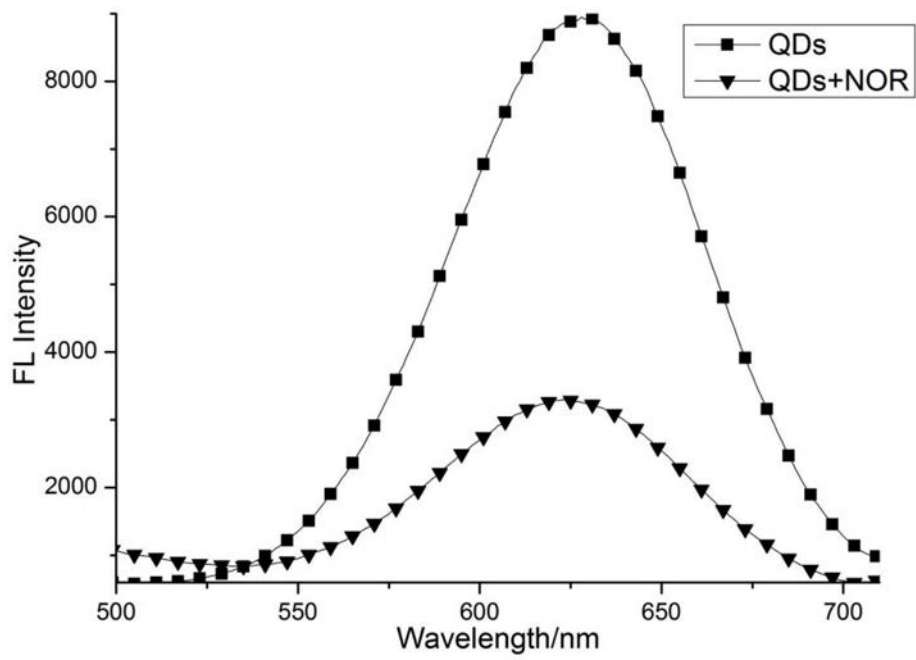


图3

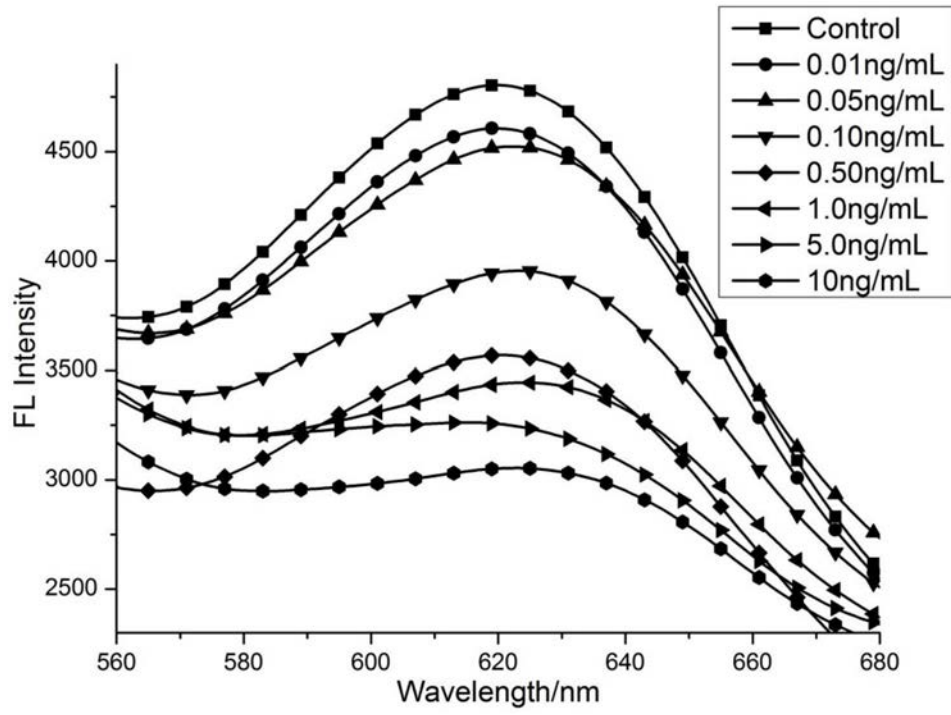


图4

专利名称(译)	一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星的微流体纸基传感器		
公开(公告)号	CN107505300B	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN2017110819041.7	申请日	2017-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	于海东 宗丽君 李林 张承武 刘志鹏 刘金华 黄维 欧阳启然 赖琼宇 朱成显 焦钰翠 高磊		
发明人	于海东 宗丽君 李林 张承武 刘志鹏 刘金华 黄维 欧阳启然 赖琼宇 朱成显 焦钰翠 高磊		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533		
其他公开文献	CN107505300A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于荧光免疫分析用量子点作为标记检测牛奶中诺氟沙星NOR的微流体纸基传感器，属于生物纳米技术领域。该传感器的制备方法包括：首先，在色谱纸上通过喷蜡打印技术，形成亲水区域与疏水区域，烘烤一定时间并将纸进行等离子体处理；其次，制备NOR-牛血清白蛋白BSA涂层抗原和量子点标记的NOR抗体；再次，将涂层抗原与羊抗鼠二抗分别加入到上下平行的白色纸区域中，并将NOR与量子点标记的抗体混合物加入到涂层区，将纸对折，溶液渗透到二抗区；最后，利用免疫分析测定，最终通过荧光信号定量检测牛奶中的诺氟沙星。本发明提供了一种成本低、操作简单、灵敏度高、检测限低、快速检测NOR的纸基传感器。

