



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061143 A
(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810896274.1

(22)申请日 2017.02.21

(62)分案原申请数据

201710091845.X 2017.02.21

(71)申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 熊勇华 江湖 郭亮 李响敏

赖卫华 聂丽娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

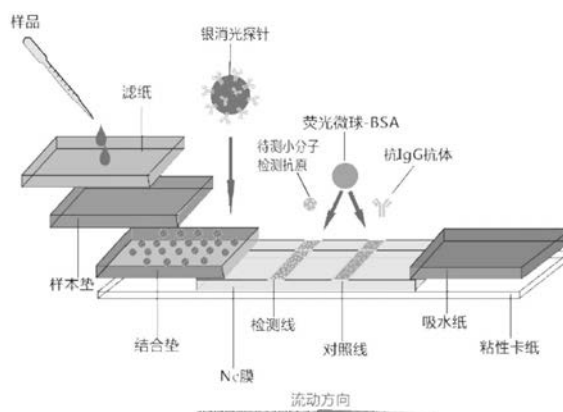
权利要求书1页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明为检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,属分析检测领域,公开了检测小分子物质的免疫层析试纸条:将修饰牛血清白蛋白的荧光物质分别与检测抗原以及抗免疫球蛋白G抗体混合,喷涂在试纸条特定区域上做为检测线及质控线,标记特异性单克隆抗体的银纳米粒子(银消光探针)喷涂在试纸条结合垫。当样品溶液不存在待测物时,银消光探针与检测线上检测抗原结合,吸收了荧光物质的激发光或发射光而使检测线无荧光,而质控线有荧光;当样品溶液存在待测物时,银消光探针优先与待测物结合,此时结合在检测线上的银消光探针数量减少,而结合在质控线上的银消光探针数量增加,导致试纸条检测线荧光增加,而质控线荧光下降。本发明较传统免疫层析试纸条检测小分子物质的消线判读模式更灵敏。



1. 检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,其特征在于制备方法如下:

待测物质为三聚氰胺,荧光物质为最大发射波长590nm的羧基表面量子点;

(1) 最大发射波长590nm的羧基表面量子点与BSA结合:20mL 0.01M pH 6.0PB中,加入1mg羧基表面量子点,200 μ g EDC,室温搅拌20min后,再加入20mL 1% (w/v) BSA水溶液,室温搅拌1h,缓慢加入稀盐酸调pH至5.0,再19000转离心20min,沉淀复溶于2mL水中,得量子点-BSA,4 $^{\circ}$ C保存备用;

(2) 银消光探针合成:

1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长,a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠SC浓度至5mM,单宁酸TA 0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL 25mM AgNO₃,溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90 $^{\circ}$ C,加入0.5mL 25mM SC,1.5mL 2.5mM TA,1mL 25mM AgNO₃,补足体系体积至100mL,搅拌30min,重复"移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL 25mM SC,1.5mL 2.5mM TA和1mL 25mM AgNO₃,补足体系体积至100mL,90 $^{\circ}$ C搅拌30min"这一过程11次,获得SPR吸收峰为450nm的银纳米粒子,与量子点-590激发光一致;

2) 银纳米粒子与三聚氰胺单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液,7000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含三聚氰胺单抗5 μ g的0.1M硼酸溶液,NaOH调pH至7.5;室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1% (w/v) BSA的0.1M pH 7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液,4 $^{\circ}$ C保存备用;

(3) 合成三聚氰胺检测抗原:

1mg三聚氰胺溶于0.2mL吡啶溶液中,加入丁二酸酐1mg,室温搅拌4h,氮气吹干,得到的白色产物溶解于200 μ L DMF中,加入1mg NHS、1mg DCC,室温搅拌4h,将混合液10000转离心10min,取上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中,室温缓慢搅拌过夜,转入4 $^{\circ}$ C 0.01M, pH 7.4PBS中透析72h;

(4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸五部分组成;其中,样品垫用包含1% BSA,0.4%吐温20和0.03%叠氮钠的50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用包含0.2%吐温20和2%蔗糖的0.01M pH 7.4的PBS缓冲溶液浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以5 μ L/cm的浓度喷涂在结合垫上;将1.6mg/mL检测抗原与80 μ g/mL量子点-BSA混合后喷涂于NC膜的检测线,0.2mg/mL驴抗鼠二抗与80 μ g/mL量子点-BSA混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.85 μ L/cm,将喷涂后的NC膜置于37 $^{\circ}$ C的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学分析检测技术领域,涉及检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条。

背景技术

[0002] 免疫层析技术具有速度快、抗基质干扰能力强、操作简便等优点,是现场快速筛查的首选方法,也是食品安全、医药卫生、环境保护等领域创新研究的热点。近年来,基于免疫层析技术的胶体金试纸条得到了广泛应用,然而传统的胶体金免疫层析方法因检测灵敏度不高,在检测某些微量或痕量分析物如食品中污染的真菌毒素等方面仍存在较大缺陷。因此,提高免疫层析方法的检测灵敏度对于拓延其适用范围具有非常重要的意义。荧光标记物与传统胶体金标记物相比,具有更高的信号强度,可提高试纸条检测灵敏度。

[0003] 利用试纸条检测小分子待测物,通常使用竞争反应模式,即检测线上的人工抗原与待测物共同竞争荧光物质标记的抗体,检测信号强度与待测物含量成反比关系,当待测物含量处于较低水平时,较强的检测信号对待测物含量的微小变化并不敏感,因此灵敏度偏低。在竞争免疫层析试纸条上构建荧光消减模式可以使待检物浓度与荧光强度成正比,即待检物在痕量存在时荧光信号从无到有,可以提高检测灵敏度和准确性。相较于常规胶体金粒子,银纳米粒子具有更高的摩尔消光能力,因此具有更强的荧光消减能力,从而可进一步提高试纸条检测灵敏度。此外,银纳米粒子的消光光谱随粒子粒径增加而增大,银纳米粒子粒径从10nm到100nm,对应的表面等离子共振(SPR)吸收峰从400nm到500nm,拓宽了胶体金荧光“淬灭”免疫层析试纸条荧光物质的选择范围(金纳米粒子SPR吸收峰在500nm以上)。

发明内容

[0004] 本发明的银纳米粒子消光免疫层析试纸条基于银纳米粒子吸收荧光物质的激发光或发射光而导致其荧光信号减弱,用于快速定性和定量检测小分子物质。银纳米粒子消光免疫层析试纸条的结构组成见附图1所示,包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成,其中滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上。荧光物质-BSA与待测小分子物质检测抗原混合固定在试纸条检测线,荧光物质-BSA与IgG Fc片段特异性识别抗体(二抗)混合固定在试纸条对照线(质控线),银纳米粒子与小分子物质特异性抗体复合物(银消光探针)固定在试纸条结合垫上,待检物质溶液通过滤纸过滤,经样本垫进入结合垫,待测小分子与银消光探针结合,在吸水纸毛细作用下,待检溶液在试纸条上流动,继续前进到达检测线,未与待测小分子结合的银消光探针与检测线上的检测抗原结合,其余的银消光探针继续前进到达质控线与二抗结合。加样十至二十分钟后,试纸条在荧光读取仪中读取检测线和质控线的荧光数值。由于银纳米粒子特异性的吸收荧光物质的激发光或发射光,导致检测线上的荧光值与银粒子数量

成反比例,而与待检小分子物质的浓度成正比例关系,样品中不含待检小分子物质时,检测线上没有荧光信号。本发明所述的一种检测小分子物质的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,制备方法为:

[0005] (1) 荧光物质与牛血清白蛋白(简称BSA)通过羧基和氨基间共价键结合

[0006] 所选用的荧光物质为荧光微球、量子点微球、量子点或荧光染料;荧光物质需先经过表面氨基或羧基修饰,再与BSA上的羧基或氨基通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(简称EDC)活化共价结合,得荧光物质-BSA;荧光物质的最适激发波长和最大发射波长二者至少其一在400nm至500nm之间;

[0007] (2) 制备银消光探针:

[0008] 1) 采用种子逐步生长法合成银纳米粒子,对每一步的银粒子测定紫外吸收峰,当峰值达到与所选用的配对荧光物质的最大激发波长或发射波长一致时停止生长;具体方案为:a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(简称SC)浓度至5mM,单宁酸(简称TA) 0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL 25mM AgNO_3 ,溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90℃,加入0.5mL SC (25mM), 1.5mL TA (2.5mM), 1mL AgNO_3 (25mM), 补足体系体积至100mL,搅拌30min;重复"移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC (25mM), 1.5mL TA (2.5mM) 和1mL AgNO_3 (25mM), 补足体系体积至100mL,90℃搅拌30min"这一过程,紫外扫描监测银纳米粒子SPR吸收峰的变化情况,直到获得SPR吸收峰与配对荧光材料的最大激发波长或发射波长相同,得银纳米粒子;

[0009] 2) 银纳米粒子与待检小分子单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约为 10^{10} 至 10^{12}),5000转至10000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含待检小分子抗体(IgG含量1μg至80μg)的0.1M pH 7.0-7.5硼酸溶液;20℃磁力搅拌器上搅动2h,5000转至10000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于pH 7.0至7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,5000转至10000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.0至7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,得银消光探针,4℃保存备用;

[0010] (3) 检测抗原(小分子-BSA)制备:将小分子待测物与BSA通过共价键结合;

[0011] 先活化小分子待测物上非抗体识别位点的基团,然后与BSA分子上氨基或羧基通过共价键结合得小分子待测物-BSA;该方法与制备小分子人工抗原的方法相同;

[0012] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0013] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜(简称NC膜)和吸水纸等五部分组成;其中滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;其中结合垫上承载银消光探针,每个试纸条结合垫固定探针数量为 10^6 至 10^8 个;检测线上固定待检小分子的检测抗原和荧光物质-BSA,每个试纸条检测线上固定小分子检测抗原0.1μg至0.5μg;质控线上固定抗免疫球蛋白G(简称IgG)抗体即二抗和荧光物质-BSA,每个试纸条质控线上固定抗IgG抗体10ng至100ng;检测线和质控线上固定荧光物质-BSA的量均以荧光物质质量计算为1ng至50ng;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0014] 进一步的,前述试纸条在具体领域中的细化应用:

[0015] 本发明还公开了,检测黄曲霉毒素M₁的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,待测物质为黄曲霉毒素M₁(简称AFM₁),荧光物质为异硫氰酸荧光素微球;

[0016] 制备方法如下:

[0017] (1) 氨基表面异硫氰酸荧光素微球与BSA结合:

[0018] 25mL磷酸盐缓冲液(简称PB,0.01M,pH 6.0)中,加入20mg氨基表面异硫氰酸荧光素微球,5mg BSA,200 μ g EDC,室温搅拌45min后,再加入200 μ g EDC,25mg BSA,室温搅拌1h,8000转离心10min,沉淀复溶于2mL水中,得荧光微球-BSA,4 $^{\circ}$ C保存备用;

[0019] (2) 银消光探针合成:

[0020] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO₃(25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90 $^{\circ}$ C,加入0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM),1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM)和1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,90 $^{\circ}$ C搅拌30min”这一过程16次,获得SPR吸收峰为494nm的银纳米粒子,与异硫氰酸荧光素微球最大激发光一致;

[0021] 2) 银纳米粒子与抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 6×10^{10} 个),5000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含AFM₁单抗20 μ g的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.4);20 $^{\circ}$ C磁力搅拌器上搅动2h,离心10min,弃上清;重悬于pH 7.4含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,5000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.4含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液,得银消光探针溶液,4 $^{\circ}$ C保存备用;

[0022] (3) 合成AFM₁检测抗原:

[0023] 将1mg AFM₁、0.5mg琥珀酸酐和2mL吡啶混合,120 $^{\circ}$ C加热回流3h,氮气吹干后用200 μ L二甲基甲酰胺(简称DMF)溶解,加入1mg N,N'-二环己基碳二亚胺(简称DCC)和1mg N-羟基琥珀酰亚胺(简称NHS),室温搅拌4h,将混合液10000转离心10min,取上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中。室温缓慢搅拌过夜,转入4 $^{\circ}$ C磷酸盐缓冲生理盐水(简称PBS,0.01M,pH 7.4)中透析72h。

[0024] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0025] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.5%的吐温20和0.05%的叠氮钠)浸润,并于60 $^{\circ}$ C干燥2h;结合垫用0.01M的PBS(pH 7.5)缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,于60 $^{\circ}$ C干燥4h,银消光探针溶液稀释10倍后以3 μ L/cm的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.2mg/mL)与荧光微球-BSA(100 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠IgG(0.2mg/mL)与荧光微球-BSA(100 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.75 μ L/cm,将喷涂后的NC膜置于37 $^{\circ}$ C的真空干燥箱中干燥6h;所述商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,

在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在Nc膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0026] 本发明还公开了,检测猪尿中沙丁胺醇的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,待测物质为沙丁胺醇,荧光物质为最大发射波长620nm的羧基表面量子点微球;制备方法如下:

[0027] (1) 最大发射波长620nm的羧基表面量子点微球与BSA结合:

[0028] 25mL PB(0.01M,pH 6.0)中,加入10mg羧基表面量子点微球,200 μ g EDC,室温搅拌20min后,再加入5mL BSA水溶液(0.5%,w/v),室温搅拌1h,8000转离心10min,沉淀复溶于2mL水中,得量子点微球-BSA,4 $^{\circ}$ C保存备用;

[0029] (2) 银消光探针合成:

[0030] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO₃(25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90 $^{\circ}$ C,加入0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM),1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM)和1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,90 $^{\circ}$ C搅拌30min”这一过程11次,获得SPR吸收峰为450nm的银纳米粒子,与量子点微球激发光一致;

[0031] 2) 银纳米粒子与抗沙丁胺醇单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 1.3×10^{11} 个),7000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含沙丁胺醇单抗5 μ g的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.2);室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1%(w/v)BSA的0.1M pH 7.2含0.1%(w/v)BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.2含0.1%(w/v)BSA的0.1M硼酸溶液,4 $^{\circ}$ C保存备用;

[0032] (3) 合成沙丁胺醇检测抗原:

[0033] 1mg沙丁胺醇溶于0.5mL无水乙醇,加1mg琥珀酸酐,室温搅拌2h,氮气吹干后用200 μ L DMF溶解,加入1mg DCC和1mg NHS,室温搅拌4h,10000转离心10min,将上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中。室温缓慢搅拌过夜,转入4 $^{\circ}$ C PBS(0.01M,pH 7.4)中透析72h。

[0034] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0035] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.4%的吐温20和0.03%的叠氮钠)浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用0.01M的PBS(pH 7.4)缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以3.5 μ L/cm的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.0mg/mL)与量子点微球-BSA(80 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠IgG(0.25mg/mL)与量子点微球-BSA(80 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.77 μ L/cm,将喷涂后的NC膜置于37 $^{\circ}$ C的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在Nc膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;

试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0036] 本发明还公开了,检测鸡肉中恩诺沙星的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,待测物质为恩诺沙星,荧光物质为7-氨基-4-甲基香豆素-BSA(简称AMCA-BSA);制备方法如下:

[0037] (1) 银消光探针合成:

[0038] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA) 0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO_3 (25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90°C,加入0.5mL SC (25mM), 1.5mL TA (2.5mM), 1mL AgNO_3 (25mM), 补足体系体积至100mL, 搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC (25mM), 1.5mL TA (2.5mM) 和1mL AgNO_3 (25mM), 补足体系体积至100mL, 90°C搅拌30min”这一过程9次,获得SPR吸收峰为442nm的银纳米粒子,与AMCA发射光一致;

[0039] 2) 银纳米粒子与抗恩诺沙星单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 1.6×10^{11} 个), 7500转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含沙恩诺沙星6.5 μg 的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.5);室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1% (w/v) BSA的0.1M pH 7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7500转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液,4°C保存备用;

[0040] (2) 合成恩诺沙星检测抗原:

[0041] 称取1mg恩诺沙星、1mg NHS和1mg EDC,溶解于0.2mL DMF中,加入10 μL 三乙胺,室温搅拌4h,逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中,室温缓慢搅拌过夜,转入4°C PBS (0.01M, pH 7.4) 中透析72h。

[0042] (3) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0043] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.4%的吐温20和0.03%的叠氮钠)浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用0.01M的PBS (pH 7.4) 缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以4 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.75mg/mL)与AMCA-BSA(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠二抗(0.25mg/mL)与AMCA-BSA(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.75 $\mu\text{L}/\text{cm}$,将喷涂后的NC膜置于37°C的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0044] 本发明还公开了,检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条,待测物质为三聚氰胺,荧光物质为最大发射波长590nm的羧基表面量子点;制备方法如下:

[0045] (1) 最大发射波长590nm的羧基表面量子点与BSA结合:

[0046] 20mL PB (0.01M, pH 6.0) 中,加入1mg羧基表面量子点,200 μg EDC,室温搅拌20min

后,再加入20mL BSA水溶液(1%,w/v),室温搅拌1h,缓慢加入稀盐酸调pH至5.0,再19000转离心20min,沉淀复溶于2mL水中,得量子点-BSA,4℃保存备用;

[0047] (2) 银消光探针合成:

[0048] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO_3 (25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90℃,加入0.5mL SC (25mM),1.5mL TA (2.5mM),1mL AgNO_3 (25mM),补足体系体积至100mL,搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC (25mM),1.5mL TA (2.5mM)和1mL AgNO_3 (25mM),补足体系体积至100mL,90℃搅拌30min”这一过程11次,获得SPR吸收峰为450nm的银纳米粒子,与量子点-590激发光一致;

[0049] 2) 银纳米粒子与三聚氰胺单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 1.3×10^{11} 个),7000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含三聚氰胺单抗5 μg 的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.5);室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1% (w/v) BSA的0.1M pH 7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.5含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液,4℃保存备用;

[0050] (3) 合成三聚氰胺检测抗原:

[0051] 1mg三聚氰胺溶于0.2mL吡啶溶液中,加入丁二酸酐1mg,室温搅拌4h。氮气吹干,得到的白色产物溶解于200 μL DMF中,加入1mg NHS、1mg DCC,室温搅拌4h。将混合液10000转离心10min,取上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中。室温缓慢搅拌过夜,转入4℃PBS (0.01M,pH 7.4) 中透析72h。

[0052] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0053] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.4%的吐温20和0.03%的叠氮钠)浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用0.01M的PBS (pH 7.4) 缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.6mg/mL)与量子点-BSA (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠二抗(0.2mg/mL)与量子点-BSA (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.85 $\mu\text{L}/\text{cm}$,将喷涂后的NC膜置于37℃的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0054] 试纸条的结构组成见附图1所示。

[0055] 银纳米粒子消光试纸条的使用:在试纸条卡盒的加样孔上加入待检物质溶液后,在吸水纸毛细作用下,待检溶液在试纸条上流动,首先经滤纸过滤掉较大杂质,流经样本垫,进入结合垫,待检物质与银消光探针结合,继续前进到达检测线,未结合待检物质的银探针与检测线上检测抗原结合,其余的银探针继续前进到达质控线与二抗结合。加样10min

至20min后,试纸条卡盒放入荧光读取仪中读取检测线和质控线的荧光数值。由于银粒子特异性的吸收荧光物质的激发光或发射光,导致检测线上的荧光值与银纳米粒子数量成反比例,而与待检物质的浓度成正比例关系。当样品中不含有待检小分子物质时,检测线上无荧光信号。定量检测时需要绘制标准曲线。

[0056] 当样品溶液不存在待测物,银消光探针在毛细作用力下,在硝酸纤维素膜上爬行到达检测线与检测抗原结合,少量残留的银消光探针继续前进到达质控线与二抗结合,由于银纳米粒子的消光作用,试纸条检测线没有荧光,而质控线有荧光;当样品溶液存在待测物时,银消光探针首先与待测物结合,此时与检测线结合的银消光探针减少,而结合在质控线上的银消光探针数量增加,导致试纸条检测线荧光增加,而质控线荧光下降。

[0057] 本发明方法荧光强度与待检小分子物质的浓度成正比例关系,在小分子物质痕量存在时,荧光从无到有,较传统免疫层析试纸条检测小分子物质的消线判读模式更灵敏。

[0058] 本发明银纳米粒子消光免疫层析试纸条检测线上荧光值与结合在上面的银纳米粒子数量成反比,与待测小分子含量成正比,待检溶液中不含有目标小分子物质时,检测线上没有荧光。

[0059] 本发明的创新性在于提出了一种新的银纳米粒子消光免疫层析试纸条检测小分子物质的方法,该方法采用摩尔消光系数较高的银纳米粒子作为消光探针,特异性的吸收荧光物质的激发光或发射光,利用荧光消减模式将检测小分子的竞争免疫层析反读模式转换为正读模式,进而提高检测灵敏度。

[0060] 本发明技术方案具有如下优点:

[0061] (1) 本发明技术方案灵敏度高,由于银纳米粒子的摩尔消光系数高于胶体金,将银纳米粒子做为消光探针应用于小分子竞争免疫层析的正读模式可以提高检测灵敏度。

[0062] (2) 本发明拓宽了荧光“淬灭”试纸条的荧光物质的选择范围,粒径10nm至100nm的银纳米粒子的SPR吸收峰在400nm至500nm之间,可匹配最大激发波长或发射波长范围在400nm至500nm之间的荧光物质,而胶体金的SPR吸收峰在500nm以上。

附图说明

[0063] 图1为银纳米粒子消光免疫层析试纸条结构图。最底层为粘性卡纸,其中间部位粘贴Nc膜,Nc膜预先在检测线位置喷涂待测小分子检测抗原和荧光物质-BSA,在质控线位置喷涂抗IgG抗体(二抗)和荧光物质-BSA。Nc膜左边的粘性卡纸上依次粘贴结合垫(喷涂有银消光探针)、样本垫和滤纸,结合垫右侧边缘与Nc膜左侧边缘层叠1至2mm,样本垫层叠在结合垫上面,左侧错开1至2mm粘贴在卡纸上,滤纸层叠在样本垫上,同样左侧错开1至2mm粘贴在卡纸上。Nc膜右边粘贴吸水纸,吸水纸左侧边缘与Nc膜右侧边缘层叠1至2mm。检测时待测样品溶液经滤纸、样本垫、结合垫,在吸水纸毛细作用下进入Nc膜,自左向右流动。

[0064] 图2为银纳米粒子消光免疫层析试纸条样品检测示意图。当检测阳性样品时,银消光探针不结合在检测线上,激发光照射时荧光物质产生发射光;当检测阴性样品时,银消光探针结合在检测线上,特异性吸收荧光物质的激发光或发射光,激发光照射时无荧光信号。

具体实施方式

[0065] 为了使本发明更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应

当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0066] 实施例中所涉及的所有鼠源性IgG类单克隆抗体:抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体、抗恩诺沙星单克隆抗体、抗三聚氰胺单克隆抗体及抗沙丁胺醇单克隆抗体,荧光物质:氨基表面异硫氰酸荧光素微球和7-氨基-4-甲基香豆素与BSA复合物(AMCA-BSA)等均由无锡中德伯尔生物技术有限公司提供;本实验所涉及到的羧基修饰量子点和羧基修饰量子点微球由美国Ocean-nano公司提供;本实验所涉及到的所有小分子标准物质均购买自Sigma公司。

[0067] 实施例中所涉及的所有定量检测小分子物质的标准方程的制作过程均为:在20个阴性样品基质中分别掺入不同浓度的待测小分子标准物质,制成20份梯度加标样品,经样品前处理后各取70μL样液加入试纸条加样孔,一定时间后读取检测线荧光值和质控线荧光值,将二者比值设为纵坐标,加标样品中小分子物质浓度的对数值设为横坐标,绘制标准曲线,去掉两端偏离线性较大的点,保证相关系数R²不小于0.985,即得到定量检测的标准方程和线性范围。

[0068] 化合物缩略名及其中文全称:

[0069] SC/柠檬酸钠、TA/鞣酸、PB/磷酸盐缓冲液、PBS/磷酸盐缓冲生理盐水、BSA/牛血清白蛋白、EDC/1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、二甲基甲酰胺/DMF、N,N'-二环己基碳二亚胺/DCC、IgG/免疫球蛋白G、AMCA/7-氨基-4-甲基香豆素。

[0070] 实施例1

[0071] 基于银纳米粒子与异硫氰酸荧光素微球间的荧光消减免疫层析试纸条检测牛奶中黄曲霉毒素M₁

[0072] (1) 氨基表面异硫氰酸荧光素微球与BSA结合:

[0073] 25mL磷酸盐缓冲液(简称PB,0.01M,pH 6.0)中,加入20mg氨基表面异硫氰酸荧光素微球,5mg BSA,200μg EDC,室温搅拌45min后,再加入200μg EDC,25mg BSA,室温搅拌1h,8000转离心10min,沉淀复溶于2mL水中,得荧光微球-BSA,4℃保存备用;

[0074] (2) 银消光探针合成:

[0075] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO₃(25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90℃,加入0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM),1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM)和1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,90℃搅拌30min”这一过程16次,获得SPR吸收峰为494nm的银纳米粒子,与异硫氰酸荧光素微球最大激发光一致;

[0076] 2) 银纳米粒子与抗黄曲霉毒素M₁单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约6×10¹⁰个),5000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含AFM₁单抗20μg的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.4);20℃磁力搅拌器上搅动2h,离心10min,弃上清;重悬于pH 7.4含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,5000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.4含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液,得银消光探针溶液,4℃保存备用;

[0077] (3) 合成AFM₁检测抗原:

[0078] 将1mg AFM₁、0.5mg琥珀酸酐和2mL吡啶混合,120℃加热回流3h,氮气吹干后用200

μL 二甲基甲酰胺(简称DMF)溶解,加入1mg N,N'-二环己基碳二亚胺(简称DCC)和1mg N-羧基琥珀酰亚胺(简称NHS),室温搅拌4h,将混合液10000转离心10min,取上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中。室温缓慢搅拌过夜,转入4℃磷酸盐缓冲生理盐水(简称PBS,0.01M,pH 7.4)中透析72h。

[0079] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.5%的吐温20和0.05%的叠氮钠)浸润,并于60℃干燥2h;结合垫用0.01M的PBS(pH 7.5)缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,于60℃干燥4h,银消光探针溶液稀释10倍后以3 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.2mg/mL)与荧光微球-BSA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠IgG(0.2mg/mL)与荧光微球-BSA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.75 $\mu\text{L}/\text{cm}$,将喷涂后的NC膜置于37℃的真空干燥箱中干燥6h;所述商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。(1) 氨基表面异硫氰酸荧光素微球与BSA结合

[0080] (5) 样品前处理与检测:

[0081] 1mL全脂牛奶用微型离心机旋转2min,移除上层脂肪,从下层取出70 μL 加入试纸条加样孔。脱脂牛奶不需离心步骤,直接取出70 μL 加入试纸条加样孔,20min后放入荧光读取仪中,激发光波长494nm,检测波长517nm,读取检测线和质控线上荧光值,带入标准方程: $y = 0.20 \ln(x) + 0.71$,其中y为检测线和质控线上荧光值的比值,x即为牛奶中黄曲霉毒素M₁浓度,单位为ng/mL。本方法定量检测牛奶中黄曲霉毒素M₁的标准方程线性范围是0.4ng/mL至10ng/mL,即y值范围在0.52至1.17之间时黄曲霉毒素M₁含量符合本方程关系。本方法定性检测牛奶中黄曲霉毒素M₁的检出限是0.2ng/mL,即牛奶中黄曲霉毒素M₁浓度大于0.2ng/mL时,检测线上出现荧光信号。

[0082] 实施例2

[0083] 基于银纳米粒子与量子点微球-620间的荧光消减免疫层析试纸条检测猪尿中的沙丁胺醇

[0084] (1) 最大发射波长620nm的羧基表面量子点微球与BSA结合:

[0085] 25mL PB(0.01M,pH 6.0)中,加入10mg羧基表面量子点微球,200 μg EDC,室温搅拌20min后,再加入5mL BSA水溶液(0.5%,w/v),室温搅拌1h,8000转离心10min,沉淀复溶于2mL水中,得量子点微球-BSA,4℃保存备用;

[0086] (2) 银消光探针合成:

[0087] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO₃(25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90℃,加入0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM),1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,

搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM)和1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,90℃搅拌30min”这一过程11次,获得SPR吸收峰为450nm的银纳米粒子,与量子点微球激发光一致;

[0088] 2) 银纳米粒子与抗沙丁胺醇单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 1.3×10^{11} 个),7000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含沙丁胺醇单抗5 μ g的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.2);室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1% (w/v) BSA的0.1M pH 7.2含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.2含0.1% (w/v) BSA的0.1M硼酸溶液,4℃保存备用;

[0089] (3) 合成沙丁胺醇检测抗原:

[0090] 1mg沙丁胺醇溶于0.5mL无水乙醇,加1mg琥珀酸酐,室温搅拌2h,氮气吹干后用200 μ L DMF溶解,加入1mg DCC和1mg NHS,室温搅拌4h,10000转离心10min,将上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中。室温缓慢搅拌过夜,转入4℃PBS(0.01M,pH 7.4)中透析72h。

[0091] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0092] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.4%的吐温20和0.03%的叠氮钠)浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用0.01M的PBS(pH 7.4)缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以3.5 μ L/cm的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.0mg/mL)与量子点微球-BSA(80 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠IgG(0.25mg/mL)与量子点微球-BSA(80 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.77 μ L/cm,将喷涂后的NC膜置于37℃的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0093] (5) 样品前处理与检测:

[0094] 视感透明的猪尿样品不需要前处理,直接取70 μ L加入试纸条检测。状态浑浊的猪尿样品经微型离心机旋转2min,取上清液70 μ L加入试纸条加样孔,15min后放入试纸条荧光读取仪中,激发光波长450nm,检测波长620nm,读取检测线和质控线上荧光值,带入标准方程: $y = 0.3241n(x) + 0.976$,其中y为检测线和质控线上荧光值的比值,x即为猪尿中沙丁胺醇浓度,单位为ng/mL。本方法定量检测猪尿中沙丁胺醇的标准方程线性范围是0.2ng/mL至5ng/mL,即y值范围在0.45至1.72之间时沙丁胺醇含量符合本方程关系。本方法定性检测猪尿中沙丁胺醇的检出限是0.1ng/mL,即猪尿中沙丁胺醇浓度大于0.1ng/mL时,检测线上出现荧光信号。

[0095] 实施例3

[0096] 基于银纳米粒子与AMCA间的荧光消减免疫层析试纸条检测鸡肉中的恩诺沙星

[0097] (1) 银消光探针合成:

[0098] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调

整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO₃(25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b)银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90℃,加入0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM),1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM)和1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,90℃搅拌30min”这一过程9次,获得SPR吸收峰为442nm的银纳米粒子,与AMCA发射光一致;

[0099] 2)银纳米粒子与抗恩诺沙星单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 1.6×10^{11} 个),7500转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含沙恩诺沙星6.5μg的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.5);室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1%(w/v)BSA的0.1M pH 7.5含0.1%(w/v)BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7500转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.5含0.1%(w/v)BSA的0.1M硼酸溶液,4℃保存备用;

[0100] (2)合成恩诺沙星检测抗原:

[0101] 称取1mg恩诺沙星、1mg NHS和1mg EDC,溶解于0.2mL DMF中,加入10μL三乙胺,室温搅拌4h,逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中,室温缓慢搅拌过夜,转入4℃ PBS(0.01M,pH 7.4)中透析72h。

[0102] (3)银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0103] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.4%的吐温20和0.03%的叠氮钠)浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用0.01M的PBS(pH 7.4)缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以4μL/cm的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.75mg/mL)与AMCA-BSA(60μg/mL)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠二抗(0.25mg/mL)与AMCA-BSA(60μg/mL)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.75μL/cm,将喷涂后的NC膜置于37℃的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0104] (4)样品前处理与检测:

[0105] 取1g鸡肉样品,80℃均质处理5min,加入3mL 0.01M PB(pH7.0,含0.6M NaCl),漩涡震荡混匀3min,4000转离心5min,回收上清液,残渣再提取一次。合并两次共6mL提取液,取70μL加入试纸条加样孔,15min后放入试纸条荧光读取仪中,激发光波长350nm,检测波长442nm,读取检测线和质控线上荧光值,带入标准方程: $y=0.3421n(x)+0.397$,其中y为检测线和质控线上荧光值的比值,x即为鸡肉中恩诺沙星含量,单位为μg/kg。本方法定量检测鸡肉中恩诺沙星的标准方程线性范围是0.5μg/kg至18μg/kg,即y值范围在0.16至1.38之间时鸡肉中恩诺沙星含量符合本方程关系。本方法定性检测鸡肉中恩诺沙星的检出限是0.25μg/kg,即鸡肉中恩诺沙星浓度大于0.25μg/kg时,检测线上出现荧光信号。

[0106] 实施例4

[0107] 基于银纳米粒子与量子点-590间的荧光消减免疫层析试纸条检测奶粉和牛奶中的三聚氰胺

[0108] (1) 最大发射波长590nm的羧基表面量子点与BSA结合:

[0109] 20mL PB(0.01M,pH 6.0)中,加入1mg羧基表面量子点,200 μ g EDC,室温搅拌20min后,再加入20mL BSA水溶液(1%,w/v),室温搅拌1h,缓慢加入稀盐酸调pH至5.0,再19000转离心20min,沉淀复溶于2mL水中,得量子点-BSA,4 $^{\circ}$ C保存备用;

[0110] (2) 银消光探针合成:

[0111] 1) 银纳米粒子的合成包括种子生成及逐步生长。a) 银种子制备:在100mL体系中调整柠檬酸钠(SC)浓度至5mM,单宁酸(TA)0.1mM,加热剧烈搅拌,一开始沸腾,立即加入1mL AgNO₃(25mM),溶液马上变成亮黄色,补足体系体积至100mL,得到种子银大小约15nm的种子银溶液;b) 银粒子逐步生长:在100mL体系中移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,温度设定到90 $^{\circ}$ C,加入0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM),1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,搅拌30min。重复“移除19.5mL反应液,加入16.5mL水,0.5mL SC(25mM),1.5mL TA(2.5mM)和1mL AgNO₃(25mM),补足体系体积至100mL,90 $^{\circ}$ C搅拌30min”这一过程11次,获得SPR吸收峰为450nm的银纳米粒子,与量子点-590激发光一致;

[0112] 2) 银纳米粒子与三聚氰胺单克隆抗体结合:取1mL银纳米粒子溶液(粒子数约 1.3×10^{11} 个),7000转离心10min,弃上清;沉淀重悬于1mL含三聚氰胺单抗5 μ g的0.1M硼酸溶液(NaOH调pH至7.5);室温搅拌2h,离心10min,弃上清;重悬于含0.1%(w/v)BSA的0.1M pH 7.5含0.1%(w/v)BSA的0.1M硼酸溶液中,5min后,7000转离心10min,沉淀重悬于0.25mL pH 7.5含0.1%(w/v)BSA的0.1M硼酸溶液,4 $^{\circ}$ C保存备用;

[0113] (3) 合成三聚氰胺检测抗原:

[0114] 1mg三聚氰胺溶于0.2mL吡啶溶液中,加入丁二酸酐1mg,室温搅拌4h。氮气吹干,得到的白色产物溶解于200 μ L DMF中,加入1mg NHS、1mg DCC,室温搅拌4h。将混合液10000转离心10min,取上清液逐滴加入2mL含10mg BSA的0.13M碳酸氢钠溶液中。室温缓慢搅拌过夜,转入4 $^{\circ}$ C PBS(0.01M,pH 7.4)中透析72h。

[0115] (4) 银纳米粒子消光免疫层析试纸条的组装:

[0116] 试纸条包括滤纸、样本垫、结合垫、NC膜和吸水纸等五部分组成;其中,样品垫用50mM pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液(包含1%的BSA,0.4%的吐温20和0.03%的叠氮钠)浸润,室温下减湿干燥10h;结合垫用0.01M的PBS(pH 7.4)缓冲溶液(包含0.2%吐温20和2%蔗糖)浸润,室温下减湿干燥12h,银消光探针溶液稀释5倍后以5 μ L/cm的浓度喷涂在结合垫上;将检测抗原(1.6mg/mL)与量子点-BSA(80 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的检测线,驴抗鼠二抗(0.2mg/mL)与量子点-BSA(80 μ g/mL)混合后喷涂于NC膜的质控线上,设置各线喷涂量均为0.85 μ L/cm,将喷涂后的NC膜置于37 $^{\circ}$ C的真空干燥箱中干燥6h;商业化的滤纸和吸水纸不经特殊处理,直接使用;滤纸、样本垫与结合垫层叠组装在NC膜一端,吸水纸层叠在NC膜另一端,五部分整体固定在粘性卡纸上;距离检测线4.0mm至6.0mm处喷涂质控线;切割成宽度3.8mm每条,装入试纸条卡盒中,卡盒与常规的胶体金速测卡盒相同,内有试纸条固定卡槽,在试纸条的滤纸位置留有加样孔,在NC膜上检测线和质控线位置留有检测窗口;试纸条检测卡与干燥剂一起装入避光袋密封保存待用。

[0117] (4) 样品前处理与检测:

[0118] 全脂和不完全脱脂奶粉:取1g奶粉,加入8mL超纯水,漩涡震荡2min,取出1mL用微型离心机离心2min,移除上层脂肪。

[0119] 脱脂奶粉:取1g奶粉,加入8mL超纯水,漩涡震荡2min。

[0120] 纯牛奶:取出1mL用微型离心机离心2min,移除上层脂肪。

[0121] 脱脂牛奶不需前处理。

[0122] 上述样品分别取出70 μ L加入试纸条加样孔,15min后放入试纸条荧光读取仪中,激发光波长450nm,检测波长590nm,读取检测线和质控线上荧光值,分别带入标准方程。

[0123] 奶粉和脱脂奶粉: $y=0.304\ln(x)+0.363$,其中y为检测线和质控线上荧光值的比值,x即为奶粉中的三聚氰胺浓度,单位为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法定量检测奶粉中三聚氰胺的标准方程线性范围是1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至40 $\mu\text{g}/\text{kg}$,即y值范围在0.5至1.48之间时奶粉中三聚氰胺含量符合本方程关系。本方法定性检测奶粉中三聚氰胺的检出限是0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,即奶粉中三聚氰胺浓度大于0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,检测线上出现荧光信号。

[0124] 纯牛奶和脱脂牛奶: $y=0.304\ln(x)+0.997$,其中y为检测线和质控线上荧光值的比值,x即为牛奶中的三聚氰胺浓度,单位为 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。本方法定量检测牛奶中三聚氰胺的标准方程线性范围是0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 至5 $\mu\text{g}/\text{L}$,即y值范围在0.5至1.48之间时牛奶中三聚氰胺含量符合本方程关系。本方法定性检测牛奶中三聚氰胺的检出限是0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$,即牛奶中三聚氰胺浓度大于0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,检测线上出现荧光信号。

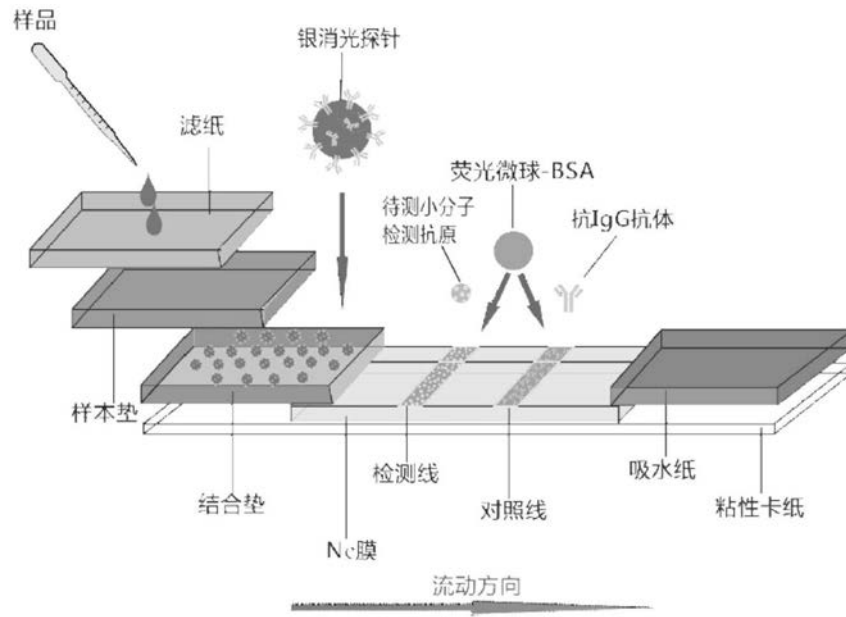


图1

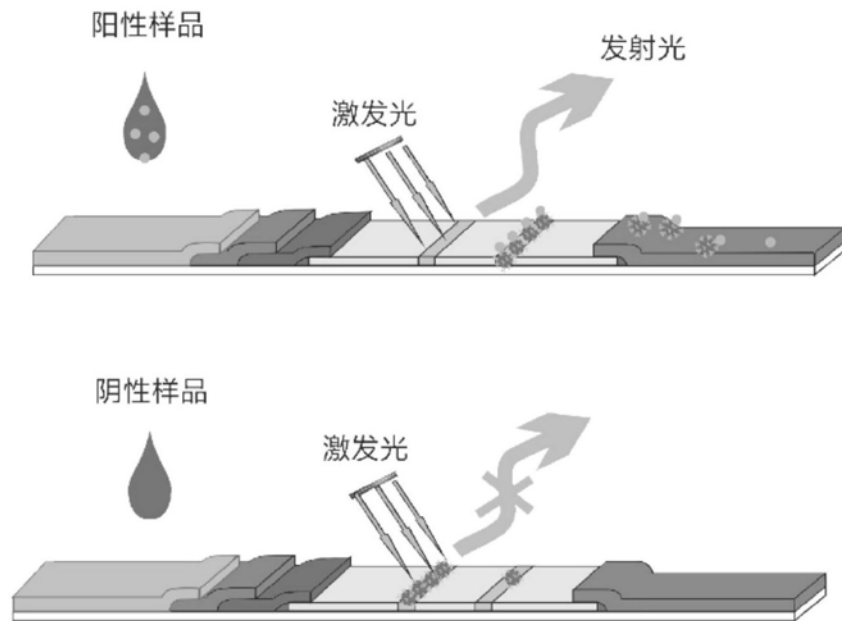


图2

专利名称(译)	检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN109061143A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810896274.1	申请日	2017-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	熊勇华 江湖 郭亮 李响敏 赖卫华 聂丽娟		
发明人	熊勇华 江湖 郭亮 李响敏 赖卫华 聂丽娟		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N21/6428 G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为检测牛奶和奶粉中三聚氰胺的银纳米粒子消光免疫层析试纸条，属分析检测领域，公开了检测小分子物质的免疫层析试纸条：将修饰牛血清白蛋白的荧光物质分别与检测抗原以及抗免疫球蛋白G抗体混合，喷涂在试纸条特定区域上做为检测线及质控线，标记特异性单克隆抗体的银纳米粒子(银消光探针)喷涂在试纸条结合垫。当样品溶液不存在待测物时，银消光探针与检测线上检测抗原结合，吸收了荧光物质的激发光或发射光而使检测线无荧光，而质控线有荧光；当样品溶液存在待测物时，银消光探针优先与待测物结合，此时结合在检测线上的银消光探针数量减少，而结合在质控线上的银消光探针数量增加，导致试纸条检测线荧光增加，而质控线荧光下降。本发明较传统免疫层析试纸条检测小分子物质的消线判读模式更灵敏。

