



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102353768 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201110189342. 9

W0 2005/028668 A1, 2005. 03. 31,

(22) 申请日 2011. 07. 07

审查员 舒霏霏

(73) 专利权人 清华大学深圳研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学
城清华校区 L-305A

(72) 发明人 马岚 袁航 吴峰

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1945331 A, 2007. 04. 11,

CN 101226194 A, 2008. 07. 23,

CN 101308146 A, 2008. 11. 19,

CN 1766623 A, 2006. 05. 03,

CN 101762706 A, 2010. 06. 30,

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于量子点的免疫荧光检测孔雀石绿的方法及专用试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种基于量子点的免疫荧光检测孔雀石绿的方法及专用试剂盒。本发明提供的用于检测孔雀石绿的免疫荧光检测试剂盒,包括孔雀石绿包被原和量子点标记的孔雀石绿抗体。本发明方法能实现对孔雀石绿残留药物的定量检测,并且检测限低、检测灵敏度高、特异性好,还适用于多种样品的检测。因此,本发明在孔雀石绿的检测领域具有广阔的应用前景。

1. 一种用于检测孔雀石绿的免疫荧光检测试剂盒,包括孔雀石绿包被原和量子点标记的孔雀石绿抗体;

所述孔雀石绿抗体为抗体效价为 10^6 以上、抗体亲和常数为 $10^6 \sim 10^8 \text{M}^{-1}$ 的孔雀石绿单克隆抗体;

所述量子点为表面羧基含量为 $1 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-3} \text{mmol/mg}$ 的水溶性 CdSe/ZnS 核壳结构的量子点;所述量子点的量子产率为 $40 \sim 70\%$;所述量子点的激发光波长为 345nm ,发射波长是 620nm ;

所述量子点的粒径为 $10 \sim 20 \text{nm}$,其粒径的偏差在 $10 \sim 30\%$ 之间;

所述孔雀石绿包被原为孔雀石绿与载体蛋白的偶联物;

所述试剂盒中还包括孔雀石绿标准品、稀释液、洗涤液、含有孔的聚苯乙烯板、包被缓冲液和封闭液;

所述孔雀石绿标准品为四甲基代二氨基三苯甲烷;

所述稀释液为 PBS 缓冲液;

所述洗涤液为 PBST 缓冲液;

所述包被缓冲液为碳酸盐缓冲液;

所述封闭液为含有用于包被的蛋白的 PBS 缓冲液;

所述标准品为如下溶液形式的标准品:用所述稀释液将所述四甲基代二氨基三苯甲烷稀释成如下各个浓度的溶液: 0.001 、 0.005 、 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.5 、 1 、 5 、 $10 \mu\text{g/L}$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述孔雀石绿包被原包被在所述含有孔的聚苯乙烯板上,包被方法为用所述包被缓冲液稀释所述孔雀石绿包被原得到 $10 \mu\text{g/ml}$ 的包被液,每孔中加 $100 \mu\text{l}$ 。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于:所述量子点标记的孔雀石绿抗体以如下溶液形式存在于试剂盒中:将每 $25 \mu\text{g}$ 所述量子点标记的孔雀石绿抗体用 5ml 所述稀释液稀释得到的溶液。

4. 一种检测样品中孔雀石绿的方法,包括如下步骤:用权利要求 1-3 中任一所述的试剂盒对待测样品进行检测,所述待测样品为动物肌肉组织样本。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于:所述待测样品为海鲜的可食肌肉。

一种基于量子点的免疫荧光检测孔雀石绿的方法及专用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于量子点的免疫荧光检测孔雀石绿的方法及专用试剂盒。

背景技术

[0002] 孔雀石绿 (Malachite Green, MAL) 又名碱性绿、盐基块绿、孔雀绿, 苯胺绿、维多利亚绿或中国绿等, 属三苯甲烷类染料, 曾被广泛用于预防和治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等。但孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿在水产品体内会产生高残留。人食用后易引起致癌、致畸和致突变等副作用。欧盟、美国以及部分东亚国家均已禁止将孔雀石绿用作渔类的抗真菌药物, 我国于 2002 年 5 月也将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中。目前, 用于孔雀石绿残留物定量检测的金标准是色谱 / 质谱法, 但其样品前处理过程繁琐费时, 检测费用高。基于竞争性酶联免疫反应原理的 ELISA 方法不需进行复杂的样品前处理过程, 检测时间相对短, 但其精度不够, 只能用于定性筛查, 无法用于定量确证。当前出口水产品中检测孔雀石绿残留及其污染状况调查的样品数量大, 任务重, 花费高, 检测周期过长。因此, 急需检测结果稳定、快速、经济的标准方法。

[0003] 量子点 (Quantum Dots, QDs) 标记材料是近年来发展起来的一类新型材料, 包括 II-VI 族和 III-V 族半导体纳米晶。由于量子点突出的发光和吸收特性, 使其具有荧光寿命长、宽激发光谱、窄发射光谱、可精确调谐的发射波长、很高的光化学稳定性、可进行多色标记等优越特性, 采用其作为标记材料, 可实现对靶标分子的超微量检测。

[0004] 由于适用于免疫诊断试剂的量子点标记材料必须满足量子产率高、荧光强、生物相容性好、高度稳定及成本低等要求, 而现行国外商业化的量子点其量子产率多在 40% 以下, 其尺寸偏小, 需要用激光光学仪器来照射激发, 目前仅能应用在细胞免疫荧光检测和流式细胞检测和分选等方面, 因此国际市场上还没有量子点免疫检测试剂问世。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种用于检测孔雀石绿的免疫荧光检测试剂盒。

[0006] 本发明所提供的用于检测孔雀石绿的免疫荧光检测试剂盒, 包括孔雀石绿包被原和量子点标记的孔雀石绿抗体。

[0007] 上述试剂盒中, 所述孔雀石绿抗体为抗体效价为 10^6 以上 (具体为 10^6)、抗体亲和常数为 $10^6 \sim 10^8 \text{M}^{-1}$ 或 $10^7 \sim 10^8 \text{M}^{-1}$ 或 10^8M^{-1} 的孔雀石绿单克隆抗体; 具体为抗体效价为 10^6 、抗体亲和常数为 10^8M^{-1} 的孔雀石绿单克隆抗体, 所述孔雀石绿单克隆抗体购自北京迈克隆兴生物技术有限公司, 产品目录号为 0010。

[0008] 所述量子点为表面羧基含量为 $1 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-3} \text{mmol/mg}$ 或 $1 \times 10^{-3} \sim 6 \times 10^{-3} \text{mmol/mg}$ 或 $5 \times 10^{-3} \text{mmol/mg}$ 的水溶性 CdSe/ZnS 核壳结构的量子点; 所述量子点的量子产率为 40% ~ 70% 或 50% ~ 70% 或 60%; 所述量子点的激发光波长为 345nm, 发射波长是 620nm。

[0009] 上述任一所述试剂盒中,所述量子点的粒径为 10 ~ 20nm,所述粒径具体为 13 ~ 20nm,所述粒径尤其优选为 20nm;其粒径的偏差(CV)在 10 ~ 30%之间,具体为 10 ~ 20%之间,再具体为 15%;

[0010] 上述任一所述试剂盒中,所述量子点标记的孔雀石绿抗体中,所述量子点上的羧基与所述孔雀石绿抗体上的氨基形成肽键,进而使所述量子点与所述孔雀石绿抗体连接。

[0011] 上述任一所述试剂盒中,所述孔雀石绿包被原为孔雀石绿与载体蛋白的偶联物,其中所述孔雀石绿与所述载体蛋白通过孔雀石绿中的引入的羧基与载体蛋白中的氨基形成的肽键而连接;所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、兔血清白蛋白、卵清蛋白、纤维蛋白原和兔和鸡的丙种球蛋白中的任一种。

[0012] 上述任一所述试剂盒中,所述试剂盒中还包括孔雀石绿标准品、稀释液、洗涤液、含有孔的聚苯乙烯板、包被缓冲液和封闭液;

[0013] 所述孔雀石绿标准品为四甲基代二氨基三苯甲烷;

[0014] 所述稀释液为 PBS 缓冲液;具体为 0.02M、pH7.4 的 PBS 缓冲液。

[0015] 所述洗涤液为 PBST 缓冲液;具体按照如下方法制备:取 0.2ml Tween20 及 0.1g 的 NaN₃ 溶于所述稀释液中,溶解后用稀释液定容至 1L。

[0016] 所述包被缓冲液为碳酸盐缓冲液;具体为 0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液。

[0017] 所述封闭液为含有用于包被的蛋白的 PBS 缓冲液;所述用于包被的蛋白为 BSA、卵清蛋白和血蓝蛋白中的任一种。具体按照如下方法制备:将 10g BSA 和 0.2ml Tween20 溶于上述稀释液中,溶解后用稀释液定容至 1L。

[0018] 上述任一所述试剂盒中,所述标准品为如下溶液形式的标准品:用所述稀释液将所述四甲基代二氨基三苯甲烷稀释成如下各个浓度的溶液:0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 μ g/L。

[0019] 上述任一所述试剂盒中,所述孔雀石绿包被原包被在所述含有孔的聚苯乙烯板上,包被方法为用所述包被缓冲液稀释所述孔雀石绿包被原得到 10 μ g/ml 的包被液,每孔中加 100 μ l。

[0020] 上述任一所述试剂盒中,所述量子点标记的孔雀石绿抗体以如下溶液形式存在于试剂盒中:将每 25 μ g 所述量子点标记的孔雀石绿抗体用 5ml 所述稀释液稀释得到的溶液。

[0021] 本发明的另一个目的是提供一种检测样品中孔雀石绿的方法。

[0022] 本发明所提供的检测样品中孔雀石绿的方法,包括如下步骤:用上述任一所述的试剂盒对待测样品进行检测,所述待测样品为动物肌肉组织样本,具体为可实用海鲜的可食肌肉,再具体为鱼、虾、蟹或甲鱼的可食肌肉。

[0023] 本发明检测方法的原理:采用量子点作为荧光信号标记分子,将孔雀石绿抗原直接包被在聚苯乙烯板的微孔中,加入孔雀石绿标准品或检测样品,以及量子点标记的孔雀石绿抗体,使其形成抗原-抗体二元发光免疫复合物,用荧光检测仪激发并检测该免疫荧光复合物的荧光强度,通过与测定形成的标准曲线对比获得待测孔雀石绿的浓度。

[0024] 抗原-抗体二元发光免疫复合物的形成是加入量子点标记的孔雀石绿抗体后,包被的孔雀石绿抗原与检测样品中的孔雀石绿竞争性地结合孔雀石绿抗体,通过抗原-抗体的特异性结合形成抗原-抗体二元免疫复合物。

[0025] 抗原-抗体二元发光免疫复合物的形成是同时加入量子点标记的孔雀石绿抗体

及检测样品后,包被在聚苯乙烯微孔中的孔雀石绿抗原与检测样品中的孔雀石绿竞争性地与孔雀石绿抗体结合,其中与检测样品结合剩余的孔雀石绿抗体与包被在微孔板中的孔雀石绿抗原发生特异结合后形成固定在微孔板中的抗原-抗体二元免疫复合物。

[0026] 本发明的孔雀石绿免疫荧光检测试剂与量子点标记的免疫荧光检测技术相关,是采用量子点作为荧光信号标记材料,进行免疫荧光定量测定的一类方法,该技术整合了荧光量子点纳米材料化学合成、表面修饰及标记技术、间接竞争式免疫检测技术等相关领域的研究。

[0027] 本发明之所以能检测孔雀石绿,在于采用了一种基于量子点标记的免疫荧光定量测定的方法,即将孔雀石绿抗原直接包被在聚苯乙烯板的微孔中,基于量子点标记的间接竞争免疫荧光检测法的测定原理,在加入孔雀石绿标准品或检测样品,以及量子点标记的孔雀石绿抗体后,通过检测结合到聚苯乙烯板微孔中的抗原-抗体二元免疫复合物的荧光强度来实现对孔雀石绿的检测:结合到聚苯乙烯板微孔的量子点标记抗体的数量不同,所产生的荧光强度也不同。在一定浓度范围内荧光强度值的高低与样品中的孔雀石绿的含量成反比。通过添加不同浓度的孔雀石绿标准品可制成标准曲线,根据此标准曲线查询各检测样品的荧光强度值可得到对应的孔雀石绿药物的浓度值。

[0028] 其具体的技术步骤包括:

[0029] (一) 荧光量子点标记探针的制备:采用适合的水溶性荧光量子点,活化其表面的羧基后,采用化学偶联的方式将孔雀石绿抗体定向连接到量子点表面。

[0030] (二) 包被抗原:采用与牛血清白蛋白偶联的孔雀石绿抗原作为包被抗原,通过物理吸附的方法将此抗原直接包被于聚苯乙烯板微孔中。

[0031] (三) 抗原-抗体荧光免疫复合物的形成:于上述包被好的聚苯乙烯板微孔中加入孔雀石绿标准品或检测样品,以及量子点标记的孔雀石绿抗体,吸附在孔内的孔雀石绿抗原与标准或样品中的孔雀石绿竞争性的与孔雀石绿抗体相结合,通过抗原-抗体的特异性结合形成抗原-抗体二元发光免疫复合物。

[0032] (四) 定量荧光检测:采用荧光酶标仪激发并检测上述所形成的抗原-抗体荧光免疫复合物的荧光强度;激发波长:345nm;发射波长:620nm;通过测定系列对应标准品的荧光强度形成标准曲线,通过与测定形成的标准曲线对比获得待测孔雀石绿的浓度。

[0033] 所述抗原-抗体二元发光免疫复合物的形成是:加入量子点标记的孔雀石绿抗体后,包被的孔雀石绿抗原与标准或样品中的孔雀石绿竞争性地结合孔雀石绿抗体,通过抗原-抗体的特异性结合形成抗原-抗体二元免疫复合物,其上标记的量子点经激发后可发荧光,本发明使用的激发光波长是345nm,发射波长是620nm,得到发红光的抗原-抗体免疫复合物。

[0034] 所述荧光强度的检测是用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗原-抗体二元发光免疫复合物的荧光强度,由于所采用的抗体是固定浓度的,通常待测样品中的孔雀石绿药物的浓度越高,被抗体捕获的药物量越多,与包被的孔雀石绿抗原结合的抗体越少,测得的荧光强度值越低。

[0035] 由于量子点在与抗体进行偶联中要用超速离心进行分离纯化,粒径太小的量子点如8nm和10nm的无法离心,偶联后无法纯化,使用效果较差;粒径太大的量子点如60nm以上的比较容易聚集,用在试剂盒上均一性较差。

[0036] 所述量子点的粒径为 10 ~ 20nm,所述粒径具体为 13 ~ 20nm,所述粒径尤其优选为 20nm;其粒径的偏差(CV)在 10 ~ 30%之间,较好为 10 ~ 20%之间,优选 15%。

[0037] 量子点的荧光量子产率及其荧光强度直接决定了检测灵敏度及其准确性的高低,传统方法制备的量子点的荧光量子产率通常都低于 40%,荧光强度较弱。

[0038] 为提高其灵敏度及准确性,所述量子点的量子产率为 40 ~ 70%,所述量子点的荧光量子产率具体为 50 ~ 70%,所述量子点的荧光量子产品尤其优选为 60%。

[0039] 为用于孔雀石绿残留物检测,量子点表面需带有易于与孔雀石绿抗体偶联的基团,这些基团可以是羧基、氨基等基团,优化的基团是带羧基的表面官能团,通常采用化学方法连接抗体,即用 EDC 和 NHS 活化量子点后,再与抗体发生羧合反应而完成偶联反应。

[0040] 在将孔雀石绿抗体和量子点以肽键共价结合形成的聚合体前,还包括活化所述量子点表面官能团的步骤。量子点表面的羧基含量不同会影响到检测的灵敏度,为提高灵敏度,所述官能团具体为羧基,所述羧基的含量为 $1 \times 10^{-3} \sim 9 \times 10^{-3} \text{ mmol/mg}$,所述羧基的含量具体为 $1 \times 10^{-3} \sim 6 \times 10^{-3} \text{ mmol/mg}$,所述羧基的含量尤其优选为 $5 \times 10^{-3} \text{ mmol/mg}$ 。

[0041] 在免疫检测中,抗体的性能指标对于检测的准确性至关重要,通常而言,特异性强、亲和力高的抗体,可以显著地提高检测的准确性。研究发现,为提高灵敏度,所述孔雀石绿抗体亲和常数为 $10^6 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$;所述孔雀石绿抗体亲和常数具体为 $10^7 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$;所述孔雀石绿抗体亲和常数尤其优选为 10^8 M^{-1} 。

[0042] 由于孔雀石绿是小分子物质,其分子表面特性不利于与聚苯乙烯微孔板的直接结合,需要将其与载体蛋白进行偶联后才能借助于载体蛋白的表面特性而达成与聚苯乙烯微孔板的良好结合。可用作载体蛋白的有各种动物的血清白蛋白,如牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)、人血清白蛋白(Human Serum Albumin,HSA),还有钥孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin,KLH)、甲状腺球蛋白、兔血清白蛋白(RSA)、卵清蛋白(Ovalbumin,OVA)、纤维蛋白原或兔和鸡的丙种球蛋白。研究发现,BSA 理化性质稳定,赖氨酸含量高,自由氨基多,在不同的 pH 和离子强度下均有较大的溶解度,在含有有机溶剂(如吡啶、DMF 等)的情况下均可和半抗原进行偶联,且在偶联后仍保持可溶状态,是作为载体蛋白的极佳选择,故本发明选用 BSA 作为偶联蛋白。

[0043] 本发明通过对荧光量子点、孔雀石绿抗原和孔雀石绿抗体分子特性的研究,通过对各种水溶性荧光量子点制备、包覆及表面修饰条件的优化,选择适合的水溶性荧光量子点与特异性的抗体进行定向共价化学偶联,获得功能性的荧光量子点标记探针,并通过优化竞争性免疫反应的各种条件,达到对孔雀石绿残留药物的快速和高灵敏定量测定。实验证明,本发明试剂盒的灵敏度高、特异性好、准确度高。本发明方法能实现对孔雀石绿残留药物的定量检测,并且检测限低、检测灵敏度高、特异性好,还适用于多种样品的检测。因此,本发明在孔雀石绿的检测领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0044] 图 1 水溶性 CdSe/ZnS 荧光量子点电镜(TEM)照片。

[0045] 图 2 用量子点标记的间接竞争免疫荧光法检测孔雀石绿的标准曲线。

具体实施方式

[0046] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0047] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0048] 实施例 1、检测试剂盒的组成及制备

[0049] 孔雀石绿购自北京恒元启天化工技术研究院,产品目录号为 1245 BW3811。其化学名称为四甲基代二氨基三苯甲烷。

[0050] 1、孔雀石绿包被原

[0051] 孔雀石绿与载体蛋白 BSA 的偶联物,孔雀石绿与 BSA 通过孔雀石绿中间体中的羧基与 BSA 中的氨基形成的肽键而连接。

[0052] 先合成孔雀石绿的中间体,引入羧基,再与蛋白偶联。

[0053] 具体步骤为:

[0054] 1) 在三口瓶中注入 60ml 无水乙醇,塞上带温度计的胶塞以控制温度,安装好冷凝回流管和氮气导入口,缓慢升温,防止出现暴沸,待瓶内搅拌子转动下的酒精稳定沸腾(85℃)开始缓慢打开氮气阀,控制速率,让气流能在瓶内稳定鼓出气泡,3 分钟后,待瓶内空气完全被氮气取代形成一个氮气保护氛围,加入 24g 约 18mmol 无水 ZnCl_2 做催化剂,并使其完全溶解,加入催化量(约 5mg)固体强酸离子交换树脂(阿拉丁公司,1098585),加入 0.9g 约 6mmol 4-对羧基苯甲醛,并使之充分混匀,加入 2.4ml 约 19mmol N,N-二甲苯胺,保持以上条件反应 25h,得到反应液 a;

[0055] 2) 反应结束后,冷却反应液 a 静置 12 小时(室温),瓶内溶液由淡绿色变为深绿色,62.4ml 冷却后反应液 a 中再加入 2ml 1mol/L 盐酸和 30ml 无水甲醇后,瓶内慢慢出现深绿色结晶和胶状物质,得到羧基化孔雀石绿;

[0056] 3) 取 82mg(约 0.2mmol)步骤 2) 得到的羧基化孔雀石绿溶解于 8ml DMF(N,N-二甲苯胺)中使之充分溶解,加入 20.6mg(约 0.1mmol)DCC(N,N-二环己基碳化二亚胺)在室温(25℃)下活化 15min,加入 NHS(N-羟基丁二酰亚胺)28.6mg(约 0.2mmol)在室温(25℃)下反应 1h,之后转入 4℃下反应 1.5h,得到活化的孔雀石绿;

[0057] 4) 取 100mg BSA 溶解于 8ml,得到活化的孔雀石绿 0.1mol/L、pH 为 8.5 的硼酸钠溶液中,得到 BSA 硼酸溶液,4℃下保存待用;

[0058] 5) 将每 82mg 步骤 3) 得到的活化的孔雀石绿在冰浴下缓慢加入 8ml 步骤 4) 得到的 BSA 硼酸溶液中 4℃反应 3.5h;

[0059] 6) 产物于 0.02mol/L, pH = 7.5 PBS 中透析 24 小时,每 6h 换次透析液,所得产品用冻干机冻干,于 -20℃保存。

[0060] 2、孔雀石绿包被原的包被

[0061] 采用包被缓冲液将孔雀石绿包被原稀释为浓度 10 $\mu\text{g/ml}$ 的包被液,在 96 孔聚苯乙烯微孔板条中每孔各加 100 μl ,于 4℃冰箱放置过夜。第二天弃去包被液、用洗涤液冲洗各板孔 3 次后,各孔加入 200 μl 封闭液,于 37℃封闭处理 2h。之后弃去封闭液、用洗涤液冲洗各板孔 3 次后,进行真空抽干、用铝箔袋密封后放置于 -20℃保存。

[0062] 3、量子点标记的孔雀石绿抗体:

[0063] 孔雀石绿抗体为效价为 10^6 、亲和常数为 10^8M^{-1} 的孔雀石绿单克隆抗体,其购自北京迈克隆兴生物技术有限公司,产品目录号为 0010。

[0064] 量子点购自深圳市泰勒斯科技有限公司,产品目录号为 TLS[®] LumiQD[™] 20。该

量子点的表征如下：粒径为 20nm、粒径的 CV 为 15%，量子产率为 60%，表面羧基含量为 $5 \times 10^{-3} \text{ mmol/mg}$ ，水溶性，CdSe/ZnS 核壳结构，激发光波长为 345nm，发射波长是 620nm；红色荧光量子点。量子点的扫描图如图 2 所示。

[0065] 所述量子点标记的孔雀石绿抗体中，所述量子点上的羧基与所述孔雀石绿抗体上的氨基形成肽键，进而使所述量子点与所述孔雀石绿抗体连接。

[0066] 量子点标记方法是：

[0067] 1) 取 2.5mg 的上述量子点用 0.1M 的 MES 缓冲液（称取 1.066g MES、0.45g NaCl 溶于 50ml 纯水，调 pH 至 4.7）洗涤并用 20000rpm 离心富集去上清后，用 1ml 浓度为 0.1M、PH 值为 4.7 的 MES 缓冲液重悬，加入 0.96mg（终浓度为 5mM）的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 和 1.15mg（终浓度为 10mM）N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 于其中。反应温度为 37℃，反应半小时后，得到活化后的量子点；

[0068] 2) 用 50mM pH = 8.5 的硼砂缓冲液洗涤，取 0.15mg 孔雀石绿单克隆抗体和 2.5mg 活化后量子点混合到 0.8ml 50mM pH = 8.5 的硼砂缓冲液（称取 1.9g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100ml 纯水，调 pH 至 8.5）中充分混匀。室温（25℃）下反应 3.5 小时，让抗体和量子点形成稳定的肽键共价结合，得到含有偶联后量子点的反应液；

[0069] 3) 反应结束后，向步骤 2) 得到的反应液中加入终浓度为 5%（质量百分含量）的 BSA (Sigma-Aldrich, 85041C) 对剩余活性氨基位点进行封闭，反应在 37℃ 下进行 0.5 小时，得到含有封闭后量子点的反应液；完成后，用 pH = 7.4 的 0.02M PBS 缓冲液（称取 2.3g Na_2HPO_4 、0.524g NaH_2PO_4 、 H_2O 、8.77g NaCl 溶于 1L 纯水，调 pH 至 7.4）洗涤，20000rpm 离心富集去上清，重悬后 4℃ 保存待用，得到量子点标记孔雀石绿抗体。

[0070] 4、孔雀石绿标准品：用稀释液将孔雀石绿稀释成如下各个浓度的溶液：0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10ug/L；

[0071] 5、稀释液：0.02M、pH7.4 的 PBS 缓冲液；

[0072] 配制：称取 2.3g Na_2HPO_4 、0.524g NaH_2PO_4 、 H_2O 和 8.77g NaCl 溶于 1L 纯水，调 pH 至 7.4。

[0073] 6、洗涤液：PBST 缓冲液；取 0.2ml Tween20 及 0.1g 的 NaN_3 溶于上述 PBS 缓冲液中，溶解后用上述 PBS 缓冲液定容至 1L。

[0074] 7、包被缓冲液：0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液。

[0075] 8、封闭液：将 10g BSA 和 0.2ml Tween20 溶于上述 PBS 缓冲液中，溶解后用 PBS 缓冲液定容至 1L。

[0076] 实施例 2、标准曲线的制备方法

[0077] 在制备好的孔雀石绿微孔板条中加入浓度为 0、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10ug/L 的孔雀石绿标准溶液，50ul/孔，将量子点标记 MAL 抗体用 PBS-T 稀释液 1：50 稀释 [即 25ug 标记抗体：5ml 稀释液]，每个微孔中加入 50ul，室温振荡 1 小时，洗涤液洗 3 次后用荧光酶标仪检测其荧光强度数值。荧光酶标仪设置为激发波长 345nm，发射波长 620nm。

[0078] 将竞争检测的检测限定为 $B_0/B = 1.2$ 时（ B_0 为 0 标准样检测值，B 为待测样检测值）的竞争药物的质量浓度，根据曲线回归方程确定检测体系的灵敏度。检测结果如下表 1 所示，将检出限定为 0.005ug/L。

[0079] 表 1 孔雀石绿不同浓度样品的量子点试剂盒检测值

[0080]

		孔雀石绿浓度 (ug/L)								
		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
荧光	Test1	0.6528	0.5484	0.4706	0.3887	0.3603	0.2309	0.1741	0.0925	0.0338
	Tcst2	0.6376	0.5046	0.4612	0.3969	0.3234	0.2716	0.1679	0.0822	0.0289
强度	Test3	0.6951	0.5474	0.4724	0.3231	0.3632	0.2754	0.1608	0.0781	0.0315
	Test4	0.6702	0.5611	0.4071	0.3791	0.3274	0.2732	0.1663	0.0896	0.0264
数值	Average	0.6639	0.5404	0.4528	0.3720	0.3436	0.2628	0.1673	0.0856	0.0302

[0081] 实施例 3、交叉反应的测定

[0082] 选择隐性孔雀石绿（经氧化）、结晶紫、隐性结晶紫（经氧化），分别配成系列浓度，用量子点试剂盒条进行检测。计算各竞争物的 IC50，用以下公式分别计算这 5 种药物与孔雀石绿量子点试剂盒的交叉反应率。计算公式为：交叉反应率（%）= [IC50（孔雀石绿）/IC50（待测药物）] × 100。

[0083] 测定及计算结果如表 2 所示。结果显示孔雀石绿量子点试剂盒对隐性孔雀石绿经氧化后完全交叉，对结晶紫和经氧化后的隐性结晶紫交叉率达 92%。

[0084] 表 2 孔雀石绿量子点试剂盒与其它药物的交叉反应

[0085]

药物名称	交叉反应率%
孔雀石绿	100
隐性孔雀石绿（氧化后）	100
结晶紫	92

[0086]

隐性结晶紫（氧化后）	92
------------	----

[0087] 实施例 4、准确性的测定

[0088] （一）样品提取：

[0089] 鱼去鳞、皮，沿背脊取肌肉；虾去头、壳，取可食肌肉部分；蟹、甲鱼等取可食部分。称取样品 5g（精确到 0.001g），置于匀浆杯中，向杯中依次加 1mL 盐酸羟胺溶液（0.25g/ml）、1mL 对甲苯磺酸溶液（0.05mol/L）和 2mL 乙酸铵溶液（0.1mol/L）和 10mL 乙腈，匀浆 2min，加入 5g 碱性氧化铝，用振荡器振荡 5min，4000g 离心 10 分钟，取上清液。加入 10ml 二氯甲烷，10ml 水，振荡 3min，静置分层，收集下层有机相，氮气吹干，用 1mL 0.02mol/L PBS 溶解残余物后，取 50ul 用于检测。

[0090] （二）回收率的测定

[0091] 检测 20 份阴性虾仁样品，其中 5 份阴性虾仁样品添加不同浓度的 MAL 标准液（0.1、0.5、1、2、5ug/L）。添加样品每个测试 5 次，并计算回收率。

[0092] 回收率测定结果见表 3，孔雀石绿添加样的回收率为 83%～97.5%，平均回收率

90.42%，变异系数 7.61%~10.58%，平均变异系数 8.66%，准确度较好。

[0093] 表 3 回收率测定

[0094]

MAL 添 加 量 (ug/L)	n	MAL 检测值 ($\bar{X} \pm SD$) ug/L	回收率 (%)	CV (%)
0.1	5	0.083±0.007	83	8.43
0.5	5	0.44±0.035	88	7.95
1	5	0.92±0.007	92	7.61
2	5	1.95±0.17	97.5	8.72
5	5	4.63±0.49	91.6	10.58
平均值			90.42	8.66

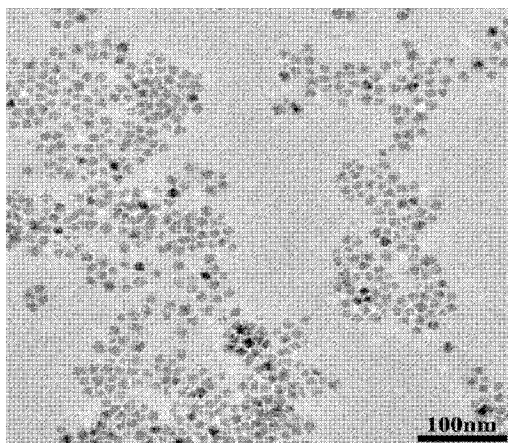


图 1

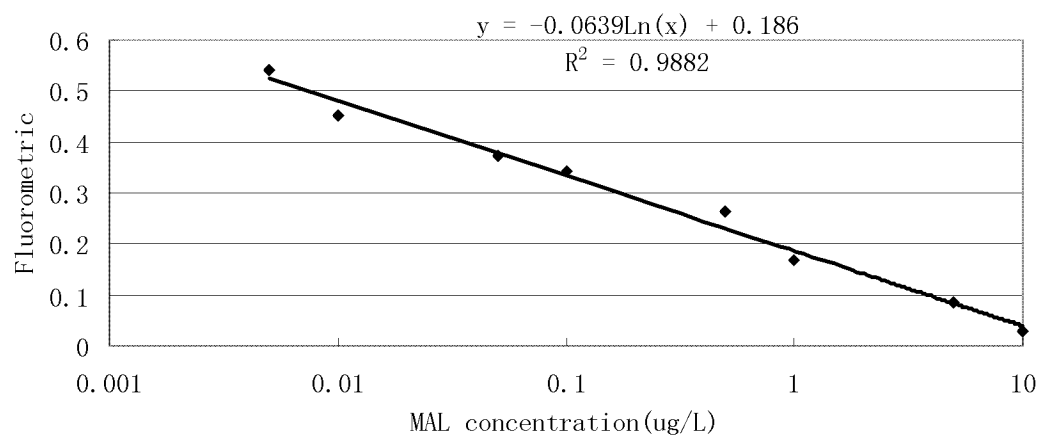


图 2

专利名称(译)	一种基于量子点的免疫荧光检测孔雀石绿的方法及专用试剂盒		
公开(公告)号	CN102353768B	公开(公告)日	2013-11-27
申请号	CN201110189342.9	申请日	2011-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
[标]发明人	马岚 袁航 吴峰		
发明人	马岚 袁航 吴峰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN102353768A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于量子点的免疫荧光检测孔雀石绿的方法及专用试剂盒。本发明提供的用于检测孔雀石绿的免疫荧光检测试剂盒，包括孔雀石绿包被原和量子点标记的孔雀石绿抗体。本发明方法能实现对孔雀石绿残留药物的定量检测，并且检测限低、检测灵敏度高、特异性好，还适用于多种样品的检测。因此，本发明在孔雀石绿的检测领域具有广阔的应用前景。

		孔雀石绿浓度 (ug/L)								
		0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
荧光 强度 数值	Test1	0.6528	0.5484	0.4706	0.3887	0.3603	0.2309	0.1741	0.0925	0.0338
	Test2	0.6376	0.5046	0.4612	0.3969	0.3234	0.2716	0.1679	0.0822	0.0289
	Test3	0.6951	0.5474	0.4724	0.3231	0.3632	0.2754	0.1608	0.0781	0.0315
	Test4	0.6702	0.5611	0.4071	0.3791	0.3274	0.2732	0.1663	0.0896	0.0264
Average		0.6639	0.5404	0.4528	0.3720	0.3436	0.2628	0.1673	0.0856	0.0302