



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102866252 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201210281587. 9

(22) 申请日 2012. 08. 09

(73) 专利权人 河南省农业科学院

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路  
116 号

(72) 发明人 职爱民 张改平 胡晓飞 赵东  
宋春美 杨继飞

(74) 专利代理机构 郑州金成知识产权事务所  
(普通合伙) 41121

代理人 郭增欣

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1402004 A, 2003. 03. 12, 说明书第 3 页第  
12-28 行, 第 4 页倒数第 7 行至第 8 页第 4 行, 权  
利要求 1-8.

CN 1847851 A, 2006. 10. 18, 权利要求 1、8,  
附图 1-2.

CN 101893623 A, 2010. 11. 24, 全文.

CN 1409113 A, 2003. 04. 09, 全文.

US 2005/0112703 A1, 2005. 05. 26, 全文.

US 5043265 A, 1991. 08. 27, 全文.

Adam M. Jakob and Thomas A. Schmedake. A  
Novel approach to monodisperse, Luminescent  
silica spheres. 《Chem. Mater. 》. 2006, 第 18 卷  
(第 14 期),

潘文. 硅酸盐基磷光体的制备、表征及性能  
研究. 《中国博士学位论文全文数据库基础科学  
辑》. 2009, (第 05 期),

周蕾 等. 上转磷光技术在快速生物分析中  
的应用. 《生物技术通报》. 2003, (第 3 期),

Werner Stöckl

ber, Arthur Fink. Controlled growth  
of monodisperse silica spheres in the  
micron size range. 《Journal of colloid and  
interface science》. 1968, 第 26 卷

审查员 许珊萍

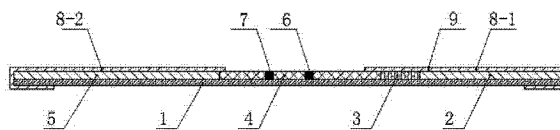
权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

磷光二氧化硅纳米颗粒标记的定量检测西马  
特罗的免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用磷光二氧化硅纳米颗粒标  
记的西马特罗免疫层析试纸条及其制备方法。试  
纸条含有支撑层、吸附层和保护层, 吸附层从测  
试端依次为吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维  
素膜层及手柄端的吸水材料层, 在纤维素膜层  
上设有用偶联西马特罗的载体蛋白溶液印制的  
隐形检测印迹, 还设有用羊抗或兔抗小鼠 IgG  
抗体溶液印制的隐形对照印迹; 磷光抗体纤维  
层采用吸附磷光抗体的玻璃纤维棉制成, 磷光  
抗体采用磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马  
特罗抗体。本发明的试纸条特异性强, 灵敏度  
高, 简便, 直观, 准确, 可进行定量和定性检  
测, 最低可检测到匹克级的痕量残留, 适用范  
围广, 成本低, 易于推广应用。



1. 一种磷光二氧化硅纳米颗粒标记的检测西马特罗的免疫层析试纸条,底层为支撑层,中间层为吸附层,保护层固定在吸附层上,吸附层从测试端依次为吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层,其特征在于:在纤维素膜层上设有用偶联西马特罗的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹,还设有用羊抗小鼠 IgG、兔抗小鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 抗体溶液印制的隐形对照印迹;所述磷光抗体纤维层采用吸附磷光抗体的玻璃纤维棉制成,磷光抗体采用磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马特罗抗体;

所述磷光二氧化硅纳米颗粒的粒径为 100-220nm;

所述磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马特罗抗体由以下方法制备,具体步骤为:

(1) 磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化:将 1g 磷光二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,回流 12-24h;回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,将得到的沉淀用无水乙醇洗涤,再将沉淀分散在无水乙醇中;

(2) 西马特罗抗体的标记:将西马特罗抗体置于 2-8°C、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中透析 8-12h;将氨基化的磷光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,用所述 CBS 缓冲液洗涤,然后与透析的西马特罗抗体混合均匀,于 2-8°C 反应,过夜,得到磷光二氧化硅的抗体复合物;向所得的抗体复合物中按 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8°C 反应 8-12h;用质量浓度 2% 的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min,得沉淀;将沉淀用 0.5mL、浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤后,4°C 保存,备用。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸条,其特征是:所述吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜;吸水材料层用吸水滤纸,支撑层用不吸水的韧性材料;纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜;偶联西马特罗的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸条,其特征是:所述隐形检测印迹和隐形对照印迹为平行排列的“||”直线式印迹,或“十十”字型排列印迹,或“T T”字型排列印迹,或“L L”字型排列印迹,或“| |”字型排列印迹,或“| |”字型排列印迹。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸条,其特征是:所述保护层为吸附纤维层、磷光抗体纤维层及吸水材料层上覆盖的保护膜;在吸附纤维层与磷光抗体纤维层交界处对应的保护膜上印制有样品标记线,该样品标记线偏向吸附纤维层一侧 0.3-0.7cm。

5. 权利要求 1 所述免疫层析试纸条的制备方法,其特征是:该方法包括以下步骤:

(1) 西马特罗单克隆抗体或多克隆抗体的制备;

(2) 磷光抗体纤维层的制备:包括磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化、西马特罗抗体的标记和纤维层的制备;

(3) 吸附纤维层的制备:吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;

(4) 纤维素膜层的制备:纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜,用点样仪在纤维素膜上不同位置分别喷点检测印迹和对照印迹,烘干后备用;

(5) 试纸条的组装:将吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维素膜层、吸水材料层从左至右依次贴在带有粘合剂的支撑层上,依次将支撑层、吸附层和保护层组装成试纸条;

所述磷光抗体纤维层的制备方法如下:

(1) 磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化:将 1g 磷光二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,回流 12-24h;将回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,得到的沉淀用无水乙醇洗涤,再将沉淀分散在无水乙醇中;

(2) 西马特罗抗体的标记:将西马特罗抗体置于 2-8°C、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中透析 8-12h;将氨基化的磷光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,用所述 CBS 缓冲液洗涤,然后与透析的西马特罗抗体混合均匀,于 2-8°C 反应,过夜,得到磷光二氧化硅的抗体复合物;向抗体复合物中按 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8°C 反应 8-12h;用质量浓度 2% 的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min,得沉淀;将沉淀用 0.5mL、浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤后,4°C 保存;

(3) 磷光抗体纤维层的制备:将制备的磷光二氧化硅抗体复合物用含有 2% 酪蛋白的 Tris 缓冲液稀释 100-1000 倍,然后将作为标记物垫的玻璃纤维棉浸入其中,以浸湿为准,冻干,备用;所述 Tris 缓冲液的浓度为 10 mM, pH 值为 7.8。

## 磷光二氧化硅纳米颗粒标记的定量检测西马特罗的免疫层析试纸条及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试纸,特别是涉及一种用磷光二氧化硅纳米颗粒为标记的用于定量检测西马特罗的免疫层析试纸条及制备方法。

### 背景技术

[0002] 西马特罗(cimaterol, CIM)又名喜马特罗,塞曼特罗,属于苯乙胺类药物的一种,是一种强效 $\beta$ 2-受体激动剂。CIM在医学和兽医临床上主要用于扩张气管和增加肺通气量,可以用于哮喘、阻塞性肺炎、平滑肌痉挛和休克等症。研究显示,饲喂CIM可以增加肥育猪的饲料报酬并增加瘦肉率,对牛、鸡、鸭和绵羊等动物都有一定作用,故CIM常被作为饲料添加剂非法用于动物源性食品生产中。长期使用则可能造成CIM在可食动物组织内蓄积性残留,常常引起食用者发生心悸、肌肉震颤、疼痛、神经症状、头晕头痛、恶心呕吐、发热寒战等临床症状,特别对心脏病、糖尿病和高血压等病人危害更大。鉴于CIM的明显危害,我国禁止CIM在畜禽生产中应用,并规定在所有的动物可食组织中不得检出。

[0003] 目前,用于西马特罗残留检测的方法较多,如(1)理化分析方法,如高压液相色谱法、气相色谱法、薄层层析法、电泳法等;(2)免疫分析法,如放射免疫法、酶联免疫吸附法等;(3)生物测定法,如微生物学测定法、放射受体测定法等。这些方法需要昂贵的仪器设备,需要熟练的专业人员操作,过程复杂,时间较长,限制了其应用范围,难以在生产中推广应用。

[0004] 免疫分析标记技术是指以抗原抗体间的特异性反应为基础,通过标记物对某种物质进行定性或定量检测的研究。标记免疫分析一般是将酶、荧光素、放射性核素等标记物对抗体或抗原进行标记,这种标记物保持了抗体或抗原的活性,不影响标记物的活性,当它与相应抗体或抗原反应后,可以直接测定复合物中的标记物,直接对目标物质进行定量分析。通过标记物的信号放大作用,可以提高免疫分析的敏感性。

[0005] 荧光免疫分析是以荧光素、荧光染料、量子点、镧系元素等为标记物,将抗原或抗体标记以荧光物质与相应的抗原或抗体结合,在荧光显微镜下检测荧光强度的一种检测方法。该法具有灵敏度高、特异性强的特点,但某些荧光素会产生生物学毒性,导致抗原或抗体的灵敏度和选择性下降。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题:提供一种用磷光二氧化硅纳米颗粒为标记的检测西马特罗免疫层析试纸条及其制备方法,该试纸条具有特异、灵敏、快速、简便定量检测微量西马特罗的特点。

[0007] 本发明的技术方案:

[0008] 一种磷光二氧化硅纳米颗粒标记的检测西马特罗的免疫层析试纸条,底层为支撑层,中间层为吸附层,保护层固定在吸附层上,吸附层从测试端依次为吸附纤维层、磷光抗

体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层,在纤维素膜层上设有用偶联西马特罗的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹,还设有用羊抗小鼠 IgG、兔抗小鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 抗体溶液印制的隐形对照印迹;所述磷光抗体纤维层采用吸附磷光抗体的玻璃纤维棉制成,磷光抗体采用磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马特罗抗体。

[0009] 所述磷光二氧化硅纳米颗粒的粒径为 100-220nm。

[0010] 所述磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马特罗抗体由以下方法制备,具体步骤为:

[0011] (1) 磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化:将 1g 磷光二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,回流 12-24h;回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,将得到的沉淀用无水乙醇洗涤,再将沉淀分散在无水乙醇中;

[0012] (2) 西马特罗抗体的标记:将西马特罗抗体置于 2-8℃、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中透析 8-12h;将氨基化的磷光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,用所述 CBS 缓冲液洗涤,然后与透析的西马特罗抗体混合均匀,于 2-8℃ 反应,过夜,得到磷光二氧化硅的抗体复合物;向所得的抗体复合物中按 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8℃ 反应 8-12h;用质量浓度 2% 的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min,得沉淀;将沉淀用 0.5mL、浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤后,4℃ 保存,备用。

[0013] 所述吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜;吸水材料层用吸水滤纸,支撑层用不吸水的韧性材料;纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜;偶联西马特罗的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或血蓝蛋白。

[0014] 所述隐形检测印迹和隐形对照印迹为平行排列的“||”直线式印迹,或“十十”字型排列印迹,或“十十”字型排列印迹,或“十十”字型排列印迹,或“十十”字型排列印迹,或“十十”字型排列印迹。

[0015] 所述保护层为吸附纤维层、磷光抗体纤维层及吸水材料层上覆盖的保护膜;在吸附纤维层与磷光抗体纤维层交界处对应的保护膜上印制有样品标记线,该样品标记线偏向吸附纤维层一侧 0.3-0.7cm。

[0016] 所述磷光二氧化硅纳米颗粒采用以下方法制备:

[0017] 按 0.75-1.5:2:3 的体积比量取浓氨水、乙醇、水,置于反应器中混合,搅拌均匀,得到反应液 A;将正硅酸四乙酯、乙醇按 1-2.5:22 的体积比混合,搅拌均匀得到溶液 B;将溶液 B 迅速加入到反应液 A 中,室温反应 2h;6500rpm 离心 5min,得沉淀;将沉淀用乙醇超声波洗涤,80℃ 烘干,于 400-800℃ 下煅烧 2-4h,即得到磷光二氧化硅纳米颗粒。

[0018] 所述免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 西马特罗单克隆抗体或多克隆抗体的制备;

[0020] (2) 磷光抗体纤维层的制备:包括磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化、西马特罗抗体的标记和纤维层的制备;

[0021] (3) 吸附纤维层的制备:吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成;

[0022] (4) 纤维素膜层的制备:纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜,用点样仪在纤维素膜上不同位置分别喷点检测印迹和对照印迹,烘干后备用;

[0023] (5) 试纸条的组装:将吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维素膜层、吸水材料层从右

至左依次贴在带有粘合剂的支撑层上,依次将支撑层、吸附层和保护层组装成试纸条。

[0024] 所述磷光抗体纤维层制备的具体方法如下:

[0025] (1)磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化:将 1g 磷光二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,回流 12-24h;将回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,得到的沉淀用无水乙醇洗涤,再将沉淀分散在无水乙醇中;

[0026] (2)西马特罗抗体的标记:将西马特罗抗体置于 2-8℃、浓度 0.025-0.05

[0027] mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中透析 8-12h;将氨基化的磷光二氧化硅纳米颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,用所述 CBS 缓冲液洗涤,然后与透析的西马特罗抗体混合均匀,于 2-8℃反应,过夜,得到磷光二氧化硅的抗体复合物;向抗体复合物中按 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8℃反应 8-12h;用质量浓度 2% 的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min,得沉淀;将沉淀用 0.5mL、浓度 0.01-0.02mol/L、pH7.8 的 Tris-HCL 缓冲液洗涤后,4℃保存;

[0028] (3)磷光抗体纤维层的制备:将制备的磷光二氧化硅抗体复合物用含有 2% 酪蛋白的 Tris 缓冲液稀释 100-1000 倍,然后将作为标记物垫的玻璃纤维棉浸入其中,以浸湿为准,冻干,备用;所述 Tris 缓冲液的浓度为 10 mM, pH 值为 7.8。

[0029] 本发明的试纸条具有以下优点:

[0030] (1)特异性强,灵敏度高。本发明试纸条将高灵敏的磷光二氧化硅纳米颗粒与免疫层析技术相结合,磷光二氧化硅纳米颗粒无需包裹任何荧光材料便可自行发光,且磷光寿命长,制作成本低、光稳定性强,能获得比普通磷光检测更高的灵敏度。该试纸条既保持了传统胶体金试纸条简便快速的优点,又克服了后者灵敏度低、无法定量的缺点,检测灵敏度更高、更稳定,最低可检测到匹克级的痕量残留。

[0031] (2)简便、快速。该试纸条可对全血、尿液、唾液、组织匀浆等直接检测,无须进行样品的预处理,在紫外光下直接观测结果,也可借助荧光阅读器直接读值,实现定量检测。检测时只需将试纸条插入被检样品 10~20 秒,5 分钟内即可判定检测结果,可现场操作,省时省力,操作简便,一步完成。

[0032] (3)结果显示形象、直观、准确。试纸条以显示蓝白色“|”和“||”(或“十”、“一”、“⊥”、“┘”、“└”)印迹作为检测的阳性和阴性标记,即在纤维素膜上显示一条蓝白色“|”印迹,表示被检样品中含有 CIM;显示两条蓝白色“||”印迹,表示被检样品中不含 CIM。检测结果可用肉眼直接观察,结果形象、直观、准确,简单明了,不易出现假阳性和假阴性等人为误判。

[0033] (4)节省费用。该试纸条检测时无需另配仪器设备和其它试剂,可随时随地进行检测,既能定性检测又能定量检测;检测费用低廉,能节省大量贵重仪器和设备的投入费用。

[0034] (5)适用范围广,便于推广应用。该试纸条能满足不同层次人员的需要,包括专业化验、海关检疫、卫生检疫、质量监测、畜产品加工、养殖户以及消费者个人等,既适于单个样品的检测,又适于大量样品的筛查,能应用于疾病诊断、毒品检测、细菌检测和环境检测等领域。本发明在保障食品安全、保护消费者健康方面具有极其重要意义,具有明显的经济效益和社会效益。

[0035] (6)本发明制备磷光二氧化硅纳米颗粒的工艺简单可行,易于操作。以磷光二氧化硅纳米颗粒标记 CIM 抗体时,只需将氨基化的磷光二氧化硅纳米颗粒与抗体直接偶联,方

法易行可控,通过调节磷光二氧化硅与抗体的摩尔比控制偶联率,从而有效提高基于磷光二氧化硅纳米颗粒标记的侧流层析免疫试纸条的灵敏度。

### 附图说明

[0036] 图 1 为本发明中磷光二氧化硅纳米颗粒的 TEM 表征图;

[0037] 从图 1 可知,磷光二氧化硅纳米颗粒的形态均一、大小一致,呈单分散状,有利于标记抗体,为其作为探针用于侧流层析免疫试纸奠定基础。图中颗粒粒径为  $200 \pm 5\text{nm}$ 。

[0038] 图 2 为本发明的免疫层析试纸条的结构示意图;

[0039] 图 3 为本发明的免疫层析试纸条的俯视图结构示意图;

[0040] 图 4 为本发明的免疫层析试纸条对 CIM 的回归曲线图。

### 具体实施方式

[0041] 本发明试纸条的制备过程包括:西马特罗单克隆或多克隆抗体的制备、磷光抗体纤维层的制备、吸附纤维层的制备、纤维素膜层的制备和试纸条的组装等步骤。

[0042] (1) 抗西马特罗单克隆抗体或多克隆抗体的制备

[0043] 单抗制备:以  $50\mu\text{g} \sim 100\mu\text{g}/\text{只}$  的西马特罗载体蛋白偶联物免疫 6~8 周龄 Balb/C 小鼠 3~4 次,每次免疫间隔时间 3~5 周,确定抗体效价符合要求后超强免疫,之后 3~4 天,将免疫小鼠眶下窦采血,分离阳性血清;脱颈致死,用 75% 的酒精浸泡小鼠 5~10min 消毒体表,无菌取其脾脏,将脾脏剪碎并研磨,经 120 目尼龙纱布过滤,1000rpm 离心 10min,收集脾细胞。将  $1 \times 10^8$  的脾细胞与 NS0 骨髓瘤细胞按 10:1 的比例混合,1000rpm 离心 10min,弃上清,细胞沉淀物于  $37^\circ\text{C}$  水浴中缓缓加入 0.7~1.0 mL CIM 的 50%PEG4000,作用 1min,然后缓缓加入无血清 1640 培养基 15 mL,以终止 PEG 的作用, $37^\circ\text{C}$  水浴 5~10 min,1000rpm 离心 10min,弃上清,将细胞沉淀物重悬于 HAT 选择培养基中,并加入 96 孔细胞培养板孔 ( $100\mu\text{L} \sim 200\mu\text{L}/\text{孔}$ ),置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养 10~14 天,用间接 ELISA 法进行阳性孔筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化,而后扩大培养,建立杂交瘤细胞株。所制备的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体可特异地与西马特罗反应,亲和力常数达到  $10^{10} \sim 10^{12}$ ,轻链亚型为  $\kappa$  或  $\lambda$ ,重链亚型为  $\text{IgG}_1$ 、 $\text{IgG}_{2a}$ 、 $\text{IgG}_{2b}$ 、 $\text{IgG}_3$ ,针对西马特罗特异抗原决定簇的单克隆抗体,用于磷光二氧化硅纳米颗粒的标记。

[0044] 多抗制备:用西马特罗载体蛋白偶联物免疫新西兰白兔,免疫剂量为  $200\mu\text{g} \sim 500\mu\text{g}/\text{次}$ ,背部皮下分 4~6 点注射。首免,用无菌 PBS 溶解西马特罗载体蛋白偶联物,与等量 FCA 混合,充分乳化;加强免疫,用无菌 PBS 溶解西马特罗载体蛋白偶联物,与等量 FIA 混合,充分乳化,首免后 2~3 周进行连续免疫 4~5 次,每次间隔 2~3 周,最后一次免疫后 10~15 天,以 ELISA 法测其定效价达到  $10^5$  以上时,采血并分离收集高免血清。以饱和硫酸铵盐析法提取 IgG 抗体,即取 1 份高免血清加 2 份 PBS (pH7.2)混匀,加等体积饱和硫酸铵溶液混匀,置  $4^\circ\text{C}$  冰箱 12h, $4^\circ\text{C}$ 、2500rpm 离心 15min,弃上清;再以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵溶液至终浓度 33%,置  $4^\circ\text{C}$  冰箱 2h, $4^\circ\text{C}$ 、2500rpm 离心 15min,弃上清;以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,置  $4^\circ\text{C}$  冰箱内用 PBS (pH7.2)透析 48~72h,中间换液数次, $4^\circ\text{C}$ 、12000rpm 离心 15min,收集上清,得纯化的抗西马特罗多克隆抗体, $-20^\circ\text{C}$  冻存,用于磷光二氧化硅纳米颗粒的标记。

[0045] (2) 磷光抗体纤维层的制备

[0046] a. 磷光二氧化硅纳米颗粒的制备

[0047] 采用反相微乳法制备空白二氧化硅纳米颗粒,通过优化微乳液中各组分的配比和氨水的量来控制纳米颗粒的大小。干燥后的二氧化硅纳米颗粒放于马弗炉中高温煅烧,根据不同煅烧温度,得到不同磷光强度和颜色的磷光二氧化硅纳米颗粒。具体过程如下:

[0048] 将浓氨水(质量含量 28%)、乙醇、水按 1:2:3 的体积比置于烧杯中,均匀搅拌,得到反应液 A;将正硅酸四乙酯、乙醇按 1:11 的体积比混合均匀,得到 B 溶液;将 B 溶液迅速加入到反应液 A 中,室温反应 2h;6500rpm 离心 5min,得沉淀,将沉淀用乙醇超声波洗涤 3 遍,80℃烘干,于 600℃下煅烧 2h,即得到磷光二氧化硅纳米颗粒。参见图 1。

[0049] b. 抗西马特罗单克隆抗体的标记

[0050] 第一步,磷光二氧化硅纳米颗粒的氨基化:将 1g 磷光二氧化硅纳米颗粒分散在甲苯溶液中,加入 0.3-1mL APTES (3-氨丙基三乙氧基硅烷),回流 12-24h;回流液冷却后 6500rpm 离心 5-10min,将沉淀用无水乙醇洗涤,最后分散在无水乙醇中;

[0051] 第二步,西马特罗抗体的标记:将西马特罗抗体置于 2-8℃、浓度 0.025-0.05mol/L、pH9.5 的 CBS 缓冲液中透析 8-12h;将二氧化硅颗粒 10000-13000rpm 离心 4-8min,用 CBS 缓冲溶液洗涤,然后与透析的西马特罗抗体混合均匀,在 2-8℃反应,过夜,得到磷光二氧化硅的抗体复合物;向抗体复合物中按抗体复合物与氰基硼氢化钠溶液 1:50-120 的体积比加入 0.5mol/L 的氰基硼氢化钠溶液,混匀,2-8℃反应 8-12h;用质量浓度 2% 的 BSA 溶液封闭过夜,10000-13000rpm 离心 4-8min 得沉淀;将沉淀用 0.5mL 的 Tris-HCL 缓冲液(0.01-0.02mol/L, pH7.8)洗涤,4℃保存,备用。

[0052] c. 磷光抗体纤维层的制备

[0053] 将制备好的磷光二氧化硅-抗体复合物用含有 2%酪蛋白的 10 mM Tris pH 7.8 缓冲液稀释 100-1000 倍,然后将作为标记物垫的玻璃纤维浸入其中,以浸湿为准,然后冻干,备用。或将稀释后的磷光二氧化硅-抗体复合物在检测前以 0.5-1.5 μL 的量滴加到磷光抗体纤维层中。

[0054] (3) 吸附纤维层的制备

[0055] 测试端吸附纤维层用玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯 PVDF 膜或聚酯膜制备,将纤维材料剪成宽 1.5cm 的条带,将其放入样品垫封闭液中浸泡 30min,于 37℃烘干,备用。

[0056] (4) 纤维素膜层的制备

[0057] 纤维素膜层用硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜,剪切成宽 1.5cm 规格的条带,用点样仪在纤维素膜上不同位置分别喷点 CIM 抗原和羊抗小鼠 IgG 抗体(或兔抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG 抗体),制作隐形的检测印迹带和对照印迹带,于 37℃烘干备用。

[0058] (5) 羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG) 抗体的制备

[0059] 以饱和硫酸铵提取西马特罗阴性小鼠血清 IgG (或阴性兔血清 IgG),即取 1 份小鼠血清(或兔血清)加 2 份 PBS (pH7.2)混匀,加等体积饱和硫酸铵溶液混匀,置 4℃冰箱 12h,4℃、2500rpm 离心 15min,弃上清,再以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,加饱和硫酸铵溶液至终浓度 33%,置 4℃冰箱 2h,4℃、2500rpm 离心 15min,弃上清,以适量 PBS (pH7.2)溶解沉淀,置 4℃冰箱内用 PBS (pH7.2)透析 48h,中间换液 3 次,4℃、12000rpm 离心 15min,收集上清,以紫外分光光度计测定其蛋白浓度,以 50μg ~ 100μg/kg 体重的小鼠血清(或兔血

清)IgG 经皮下和肌肉注射健康山羊或家兔 3 ~ 4 次,末次注射 10 天后,以 ELISA 测定其血清效价达到 1 :2000 以上时,心脏或动脉采血,分离收集高免血清,以饱和硫酸铵提取羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG)抗体(方法与提取小鼠血清 IgG 相同,不再重述),用于西马特罗检测试纸条对照印迹的制备。

[0060] (6) 本发明试纸条的检测反应原理:

[0061] 当检测 CIM 试纸测试端插入待测样品溶液后,待测溶液通过虹吸作用带动待测 CIM 及磷光抗体玻璃纤维棉中的磷光抗体一起向纤维素膜层扩散,并最终渗入手柄端的吸水材料层。在扩散过程中,待测 CIM 可与磷光抗体相结合,进而封闭磷光抗体上 CIM 的抗原结合点,阻止磷光抗体与纤维素膜上的人工抗原的检测印迹结合不能显示检测印迹,而羊或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG)抗体则可与磷光抗体结合,在紫外线激发下(或使用荧光阅读器直接读值)形成蓝白色对照印迹带“|”,即一条蓝白色带“|”印迹为阳性表示;反之样品溶液中无 CIM 时,则不能阻止磷光抗体与纤维素膜上的 CIM 人工抗原检测印迹结合,显示蓝白色检测印迹带“|”,同样羊抗或兔抗小鼠 IgG (或羊抗兔 IgG)抗体也与金标抗体结合,显示蓝白色对照印迹带“|”,形成两条蓝白色带“||”为阴性表示。如果纤维素膜上没有任何蓝白色带显示,则表明试纸条已失效。

[0062] 以下实施例具体说明试纸条的结构和检测方法。

[0063] 实施例一:参见图 2、图 3。图中 1 为支撑层,用塑胶薄片条制成,2 为吸附纤维层,用玻璃纤维棉制成,磷光抗体纤维层 3 上吸附有抗 CIM 单克隆抗体的磷光抗体玻璃纤维棉,纤维素膜层 4 采用硝酸纤维素膜,手柄端的吸水材料层 5 用吸水滤纸制成,将吸附纤维层 2、磷光抗体纤维层 3、纤维素膜层 4、吸水材料层 5 各层从右至左粘贴固定在支撑层 1 上,各层彼此之间交界处的纤维互相交叉渗透。在纤维素膜层 4 上设有隐形检测印迹 6,用偶联 CIM 的牛血清白蛋白溶液(BSA)制成;隐形对照印迹 7 用羊抗抗体溶液在纤维素膜上印迹制成“|”,两条印迹带平行排列,形成组合印迹带“||”。

[0064] 8-1 为覆盖在吸附纤维层 2 和磷光抗体纤维层 3 上面的样品端白色保护膜,8-2 为覆盖在吸水材料层 5 上面的其它颜色保护膜(如黄色),9 为样品标记线,该标记线位于吸附纤维层 2 与磷光抗体纤维层 3 交界处对应的白色保护膜偏向吸附纤维层 2 一侧约 0.5cm 处,在标记线右侧保护膜上印有箭头及 max 字样。

[0065] 待测样品的制备及检测操作步骤:

[0066] 检测肉样:将样品剪碎、磨细,以生理盐水稀释成 1 :5 的待测样品悬液。

[0067] 操作方法:将检测 CIM 试纸条样品端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,约 10 秒钟取出试纸条,在紫外光激发下观测结果。

[0068] 结果判定:(a) 阳性 如果在纤维素膜上显示有一条蓝白色印迹带“|”,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有 CIM;(b) 阴性 如果在纤维素膜上显示有两条蓝白色印迹带“||”,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中不含 CIM;(c) 失效 如果在纤维素膜上没有蓝白色带显示,则表明试纸条已失效。

[0069] 实施例二:试纸条结构和实施例一基本相同,不同之处在于:磷光抗体纤维层 3 吸附有抗 CIM 的多克隆抗体,吸附纤维层 2 用尼龙膜制成,纤维素膜层 4 采用纯纤维素膜,隐形检测印迹和隐形对照印迹均为“十”,8-2 为覆盖在吸水材料层 5 上面的手柄端兰色保护膜。

[0070] 用于检测奶样：用生理盐水将奶样稀释制成 1:2 ~ 1:5 的待测样品悬液。

[0071] 操作方法：将检测 CIM 试纸条样品端插入待测样品中，插入深度不超过标记线，约 10 秒钟取出试纸条，通过荧光阅读器直接读值，数值为 T 线和 C 线的荧光强度，根据峰值或峰面积绘制标准曲线，计算实际含量。

[0072] 实施例三：试纸条结构和实施例一基本相同，不同之处在于：吸附纤维层 2 用聚偏二氟乙烯 PVDF 膜制成，偶联 CIM 的载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白 (OVA)，隐形对照印迹 7 用兔抗小鼠 IgG 抗体溶液在纤维素膜上制成，纤维素膜层 4 采用羧化纤维素膜，8-2 为覆盖在吸水材料层 5 上面的手柄端绿色保护膜，隐形检测印迹带和隐形对照印迹带均为“┣”。

[0073] 用于检测血样：提取血清并用生理盐水将其稀释制成 1:2 ~ 10 的待测样品。结果判定和操作方法均同实施例一，不重述。

[0074] 实施例四：试纸条结构和实施例一基本相同，不同之处在于：吸附纤维层 2 用聚酯膜制成，纤维素膜层 4 采用羧化纤维素膜，隐形检测印迹 6 中偶联 CIM 的载体蛋白溶液为血蓝蛋白 (KLH)。

[0075] 用于检测尿样，可直接取尿液作为待测样品；检测印迹带和对照印迹带均为“┣”。操作方法和结果判定方法同例一。

[0076] 实施例五：试纸条结构和实施例一基本相同，不同之处在于：隐形对照印迹 7 用羊抗兔 IgG 抗体溶液在纤维素膜上制成，吸附纤维层 2 用尼龙膜制成。检测印迹带和对照印迹带均为“┣”。检测样品、结果判定和操作方法同例一。

[0077] 实施例六：和实施例一基本相同，不同之处在于：磷光抗体纤维层 3 吸附有抗 CIM 的多克隆抗体，检测样品为奶样；检测印迹带和对照印迹带均为“┣”。

[0078] 实施例七：和实施例一基本相同，不同之处在于：磷光抗体纤维层 3 吸附有抗 CIM 的多克隆抗体，检测样品为血样。

[0079] 实施例八：和实施例一基本相同，不同之处在于：磷光抗体纤维层 3 吸附有抗 CIM 多克隆抗体，检测样品为尿样。

[0080] 实施例九：和实施例一基本相同，不同之处在于：隐形检测印迹 6 中偶联 CIM 载体蛋白溶液为血蓝蛋白 (KLH)。

[0081] 实施例十：和实施例一基本相同，不同之处在于：隐形检测印迹 6 中偶联 CIM 载体蛋白溶液为鸡卵清白蛋白 (OVA)。

[0082] 实施例十一：本发明试纸条的灵敏性、特异性检测

[0083] 1、灵敏性的检测：用磷酸盐缓冲溶液 PBS (PH7.4)或双蒸水分别配置浓度为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0ng/mL 的 CIM 标准品，以实施例一的试纸条为例，试纸条上样 80-100 $\mu$ L，反应 5-10 分钟后，在紫外光下观察结果。对紫外光下反应后的试纸拍照，将图片用画图工具打开，用矩形工具选择 T 线区域，测定其光度值 ( $L_t$ )，减去 T 线 (检测线) 和 C 线 (对照线) 之间的背景光度值 ( $L_b$ )，以抑制率  $L_t - L_b$  为纵坐标，以不同 CIM 浓度的对数值为横坐标，绘制标准抑制曲线，进行相关回归分析，计算对该试纸条对 CIM 的  $IC_{50}$  和最低检测限。经测定，该试纸条对 CIM 的曲线回归方程为： $y = -50.637x + 133.1$ ，相关系数为  $R^2 = 0.9923$ ，根据回归方程计算出该试纸对 CIM 的  $IC_{50}$  为 437.62pg/mL，该试纸条的最低检测限为 111.85pg/mL。可见，该试纸条对 CIM 具有较高的灵敏度。其他例子中试纸条的检测结果和此类似。参见图 4。

[0084] 2、特异性的检测：以 CIM 的同类药物莱克多巴胺、盐酸克伦特罗以及磺胺间甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、噁唑酸、青霉素、四环素氯霉素、新霉素、喹乙醇作为竞争物，配置上述标品的浓度为 1mg/mL，用实施例一的试纸条检测其抑制率，以试纸条对 CIM 的  $IC_{50}$  与各竞争物的  $IC_{50}$  的百分比为其交叉反应率。

[0085] 测定结果见下表 1。可看出，试纸条的特异性较好，与其他药物均无交叉反应。其他例子中试纸条的检测结果和此类似。

[0086]

化合物	半数抑制浓度 $IC_{50}$ (ng/mL)	交叉反应性(%)
西马特罗	0.44	100
莱克多巴胺	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
盐酸克伦特罗	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
磺胺间甲氧嘧啶	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
磺胺嘧啶	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
噁唑酸	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
青霉素	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
四环素	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
氯霉素	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
新霉素	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$
喹乙醇	$>1.0 \times 10^3$	$<0.04$

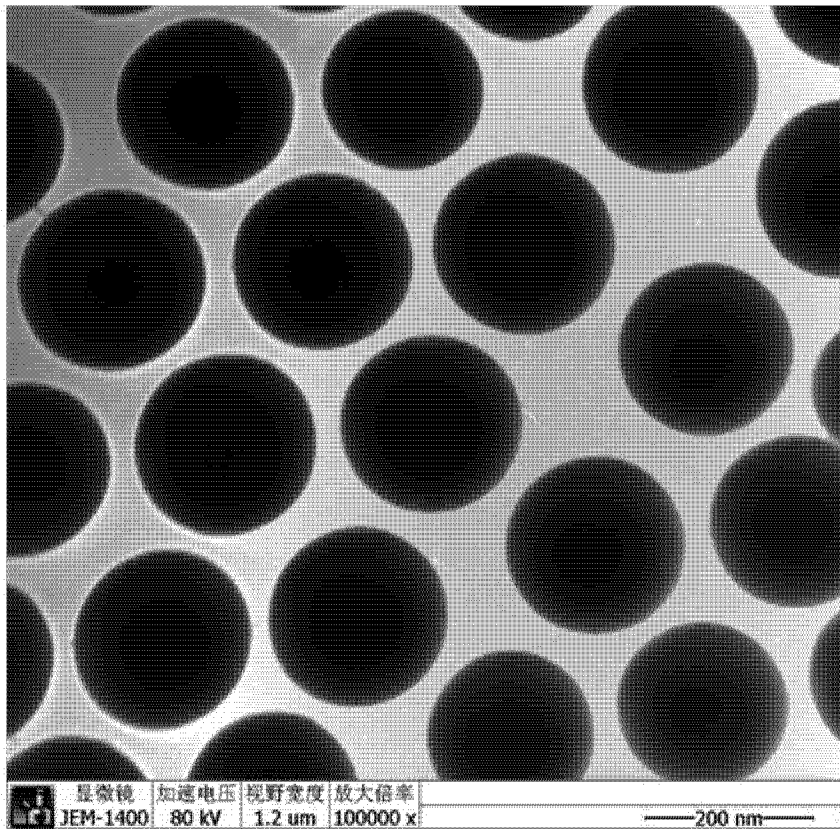


图 1

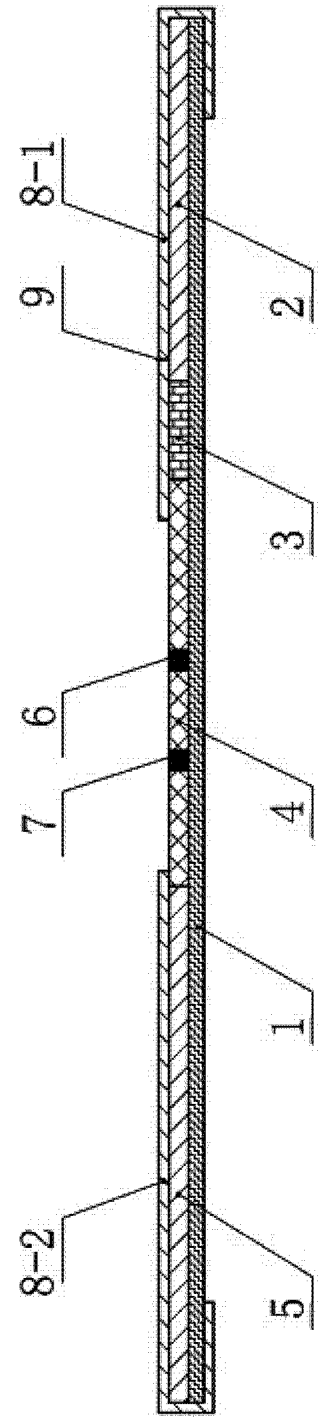


图 2

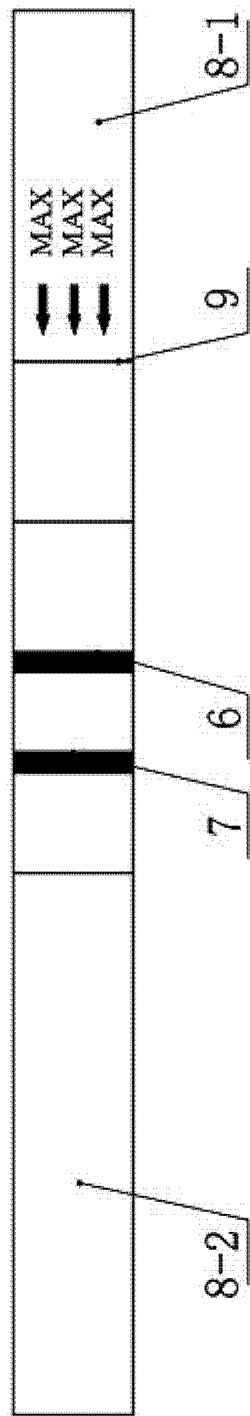


图 3

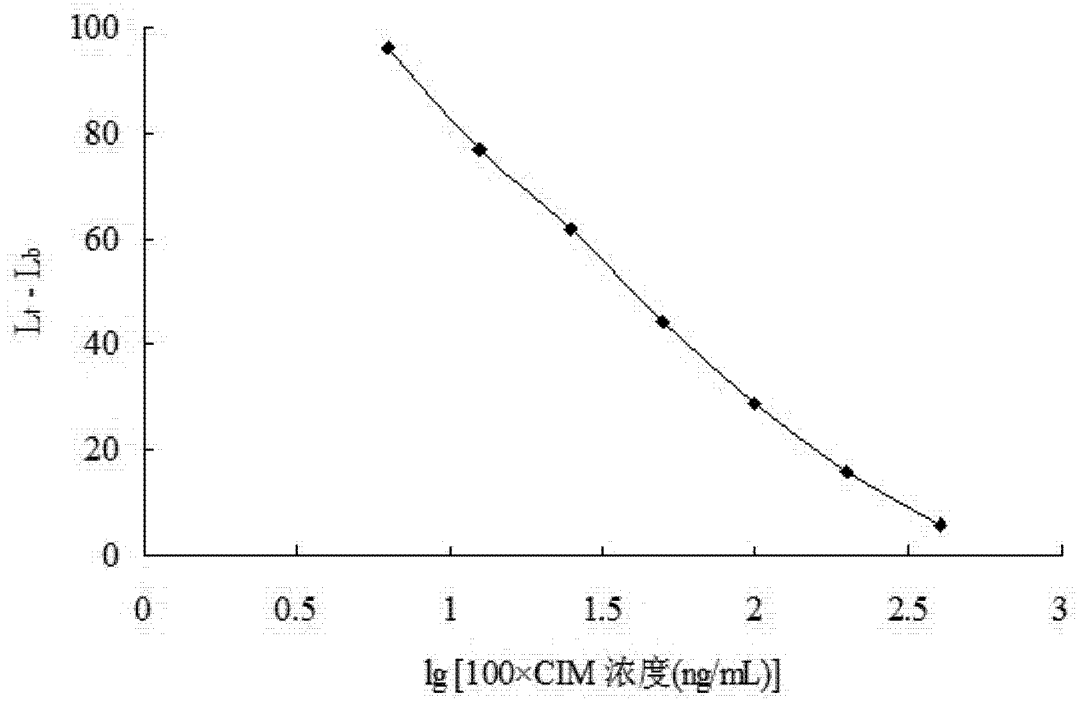


图 4

专利名称(译)	磷光二氧化硅纳米颗粒标记的定量检测西马特罗的免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102866252B</a>	公开(公告)日	2015-01-21
申请号	CN201210281587.9	申请日	2012-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院		
[标]发明人	职爱民 张改平 胡晓飞 赵东 宋春美 杨继飞		
发明人	职爱民 张改平 胡晓飞 赵东 宋春美 杨继飞		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
其他公开文献	CN102866252A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马特罗免疫层析试纸条及其制备方法。试纸条含有支撑层、吸附层和保护层，吸附层从测试端依次为吸附纤维层、磷光抗体纤维层、纤维素膜层及手柄端的吸水材料层，在纤维素膜层上设有用偶联西马特罗的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹，还设有用羊抗或兔抗小鼠IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹；磷光抗体纤维层采用吸附磷光抗体的玻璃纤维棉制成，磷光抗体采用磷光二氧化硅纳米颗粒标记的西马特罗抗体。本发明的试纸条特异性强，灵敏度高，简便，直观，准确，可进行定量和定性检测，最低可检测到匹克级的痕量残留，适用范围广，成本低，易于推广应用。

