



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105954513 A  
(43)申请公布日 2016.09.21

(21)申请号 201610523119.6

(22)申请日 2016.07.01

(71)申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路  
301号

(72)发明人 张灿 韩玉凤 崔涵雨 蔡健荣  
刘源

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

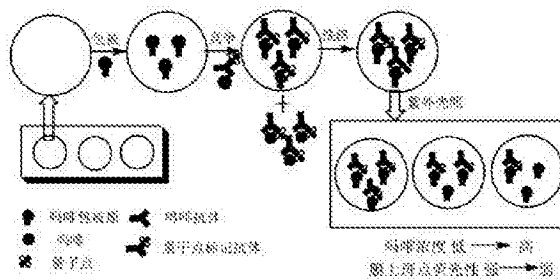
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

Flow-through膜载体量子点检测吗啡试纸的制备及应用

(57)摘要

本发明公开了Flow-through膜载体量子点检测吗啡试纸的制备及应用,属于膜载体量子点荧光免疫印迹技术。本采用硝酸纤维素薄膜为固相载体,利用其印迹作用在其表面包被吗啡抗原,用牛血清白蛋白封闭非特异性位点,将吗啡特异性抗体与带羧基水溶性CdTe@ZnS量子点在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺作用下进行偶联标记,制备得到量子点标记吗啡荧光抗体,利用抗体与抗原的特异性结合及Flow-through膜载体印迹吸附作用,达到检测效果。制备过程简单,制备产品理化性能好、检测灵敏度较高的快速检测试纸条的方法。通过Flow-through膜上荧光强度的变化从而定性检测样本中吗啡含量。本发明较酶联免疫快速检测方法的制作成本低廉,检测方法简便快速,检测结果明显直观。



CN 105954513 A

1. 吗啡的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条的制备方法,其特征在于按照下述步骤进行:

Flow-through膜的预处理:

硝酸纤维素薄膜用铅笔画直径为5mm圆孔,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)(浸泡15min,取出用蒸馏水冲干净,将试纸条紧贴蒸馏水打湿平铺的滤纸,每孔均匀滴加20 $\mu$ L吗啡特异性抗原,37 $^{\circ}$ C温育30min,用牛血清白蛋白(BSA)封闭抗原上非特异性位点,37 $^{\circ}$ C温育30min,用含吐温磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤三遍,37 $^{\circ}$ C干燥,4 $^{\circ}$ C干燥保存;

(2) 羧基水溶性CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体的制备:

将羧基化CdTe@ZnS用硼酸缓冲液稀释至1 $\mu$ M于圆底烧瓶,磁力搅拌;加入43 $\mu$ L浓度为3.73mg/mL的吗啡特异性抗体,混合均匀(搅拌速度不易过快,以不产生气泡为准);搅拌5min后,调低搅拌速度,加入13 $\mu$ L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)溶液,反应20min后加入15 $\mu$ L N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应2h;反应结束,用冷冻离心机12000rpm离心3min除团聚;

(3) 羧基水溶性CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体的纯化:

用超滤管将样品纯化5次,终产物复溶于PBS缓冲液中;终产物取出后12000rpm离心3min除团聚,测定浓度后保存于4 $^{\circ}$ C备用。

2. 根据权利要求1所述的吗啡的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条的制备方法,其特征在于步骤(1)中,所述用PBS为10mM,pH 7.4;所述用PBS配制吗啡特异性抗原浓度为0.05 $\mu$ g/ $\mu$ L,所述BSA的浓度为1-1.5%(W/V)。

3. 根据权利要求1所述的吗啡的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条的制备方法,其特征在于步骤(2)中,所述EDC浓度为用10mM ,pH=7.4的硼酸盐缓冲配置10mg/mL,NHS浓度为用10mM,pH=7.4硼酸盐缓冲配置10mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的吗啡的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条的制备方法,其特征在于步骤(2)中,所述偶联反应的温度为25 $^{\circ}$ C,时间为2h。

5. 根据权利要求1所述的吗啡的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条的制备方法,其特征在于步骤(3)中,所述每次纯化液体与硼酸缓冲液体积比不小于10。

6. 根据权利要求1-5任一项制备方法所制备的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹吗啡快速检测试纸条。

7. 利用权利要求6所述的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条用于检测吗啡的方法,其特征在于,将待测样品充分溶解在水中置于石油醚中萃取后,再加入一定量的CdTe /ZnS量子点标记吗啡特异性抗体混匀;将所述液体均匀滴加在检测试纸条。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,样品与CdTe /ZnS量子点标记吗啡特异性抗体充分反应30min。

## Flow-through膜载体量子点检测吗啡试纸的制备及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于膜载体快速检测技术领域,特别涉及一种基于Flow-through膜载体量子点标记免疫印迹技术实现快速检测吗啡的方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 一些不法商家在食品加工中添加罂粟壳等非食品用违禁原料,这些原料中包含吗啡、罂粟碱、可待因、蒂巴因、那可汀等生物碱成分,其中吗啡为罂粟壳中最具代表性的特征生物碱,人体长期接触容易成瘾,还会对人体神经系统造成损害。目前,尚无一种快速、灵敏、有效检测调味品中非法添加罂粟壳及其水解物的标准方法,常用方法主要有分光光度法、薄层色谱法和气相、液相色谱及质谱联用等分析手段。分光光度法和薄层色谱法能够实现简单检测,但灵敏度受限,对于调味品中微量禁用物质的检测存在困难。仪器分析检测灵敏度高,其瓶颈是需要复杂昂贵的仪器设备及专业操作人员,样品前处理繁琐费时、检测费用高,难以满足高通量、快速检测的需要。近年来,基于抗原抗体特异性结合的免疫分析技术因其快速灵敏而广泛应用于食品安全检测中。

[0003] 以荧光染料标记抗体或抗原作为示踪剂的一种新的免疫分析技术,其原理与酶联免疫吸附剂测定(ELISA)相似,无需加入底物显色,利用检测仪察看荧光现象或测量荧光强度,从而判断抗原或抗体的存在、定位和分布情况或检测受检标本中抗原或抗体的含量。量子点(quantum dots, QDs)是一种半导体纳米晶体,其光化学性质比有机染料稳定,散射少,不易发生荧光漂白,荧光持续时间长。经化学修饰的水溶性量子点,有很好的生物相容性,可与生物分子有效偶联后直接用于生物标记和检测,具有较好的安全性。利用功能化水溶性荧光量子点CdTe@ZnS将其与吗啡生物抗体进行偶联标记,制备成一种吗啡的荧光识别元件,以硝酸纤维素膜为固相载体建立了Flow-through膜载体免疫印迹分析方法实现对吗啡的快速高灵敏检测。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是填补当前尚未有的基于量子点标记特异性抗体Flow-through膜载体免疫印迹快速检测吗啡试纸条的空白。提供一种以硝酸纤维素膜为固相载体,将吗啡特异性抗体与带羧基水溶性CdTe@ZnS量子点在EDC/NHS作用下进行偶联标记制备吗啡荧光抗体,建立了一种吗啡的快速检测方法,且该试纸条制备过程简单、理化性能好、检测灵敏度较高。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0006] 采用硝酸纤维素膜(Millipore)作为固相载体,通过在其表面包被一定量的吗啡特异性包被抗原,用BSA封闭膜载体上非特异性结合位点,利用水溶性功能化量子点的生物相容性和荧光性稳定性,将量子点标记吗啡特异性抗体,利用荧光抗体与包被抗原和吗啡在膜载体反应区域上竞争性结合,采用flow-through方式反应后膜上荧光强弱判断样本中吗啡含量。

[0007] 吗啡的Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条的制备方法,按照下述步骤进行:

[0008] (1)Flow-through膜的预处理:

[0009] 硝酸纤维素薄膜用铅笔画直径为5mm圆孔,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)浸泡15min,取出用蒸馏水冲干净,将试纸条紧贴蒸馏水打湿平铺的滤纸,每孔均匀滴加20 $\mu$ L吗啡特异性抗原,37 $^{\circ}$ C温育30min,用牛血清白蛋白(BSA)封闭抗原上非特异性位点,37 $^{\circ}$ C温育30min,用含吐温的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤三遍,37 $^{\circ}$ C干燥,4 $^{\circ}$ C干燥保存。

[0010] (2)羧基水溶性CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体的制备:

[0011] 将羧基化CdTe@ZnS用硼酸缓冲液稀释至1 $\mu$ M于圆底烧瓶,磁力搅拌。加入43 $\mu$ L浓度为3.73mg/mL的吗啡特异性抗体,混合均匀(搅拌速度不易过快,以不产生气泡为准)。搅拌5min后,调低搅拌速度,加入13 $\mu$ L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)溶液,反应20min后加入15 $\mu$ L N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温反应2h。反应结束,用冷冻离心机12000rpm离心3min除团聚。

[0012] (3)羧基水溶性CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体的纯化:

[0013] 用超滤管将样品纯化5次,终产物复溶于PBS缓冲液中。终产物取出后12000rpm离心3min除团聚,测定浓度后保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0014] 步骤(1)中,所述用PBS为10mM,pH 7.4;所述用PBS配制吗啡特异性抗原浓度为0.05 $\mu$ g/ $\mu$ L,所述BSA的浓度为1-1.5%(W/V)。

[0015] 步骤(2)中,所述EDC浓度为用10mM,pH=7.4的硼酸盐缓冲溶液配置10mg/mL,NHS浓度为用10mM,pH=7.4硼酸缓冲盐溶液配置10mg/mL。

[0016] 步骤(2)中,所述偶联反应的温度为25 $^{\circ}$ C,时间为2h。

[0017] 步骤(3)中,所述每次纯化液体与硼酸缓冲盐溶液体积比不小于10。

[0018] 本发明制备方法所制备的吗啡Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹快速检测试纸条。

[0019] 本发明所述的吗啡Flow-through膜载体量子点荧光免疫印迹检测试纸条用于快速检测火锅底料中非法添加物罂粟壳的特征生物碱吗啡,将待测样品火锅底料充分溶解在水中加入石油醚进行萃取后,取出水相层与CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体混匀后,将液体均匀滴加在检测试纸条。

[0020] 所述样品与CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体充分反应30min。

[0021] 同时将不含吗啡的检测试纸条为空白参照。

[0022] 本发明的有益效果是:

[0023] (1)检测方法简便快速,检测结果明显直观,检测灵敏度较高,不需借助复杂仪器,适用于现场快速筛选鉴定。

[0024] (2)制备过程简单,成本低廉。

[0025] (3)制备过程产生的污染较小。

## 附图说明

[0026] 图1为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条的制备检测流程图。

[0027] 图2为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条的检测示意图,随吗啡浓度

的增加,荧光性逐渐减弱,1为不含吗啡,2为 $0.01\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,3为 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,4为 $1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡。

[0028] 图3为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条的未偶联标记量子点CdTe@ZnS吸附示意图,从图中可以看出,游离的CdTe@ZnS量子点在Flow-through膜上几乎没有静电吸附,且随吗啡浓度的增加,荧光性无变化,1为不含吗啡,2为 $0.01\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,3为 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,4为 $1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡。

[0029] 图4为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条检测火锅样品添加罂粟壳煮沸不同时间检测示意图,1为不含吗啡,2为煮沸10min,3为煮沸20min。

[0030] 图5为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条检测火锅样品添加罂粟壳煮沸不同时间检测示意图,1为不含吗啡,2为煮沸0.5h,3为煮沸1h,4为煮沸2h。

[0031] 图6为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条检测样本不同添加量吗啡的回收率检测示意图,1为不含吗啡,2为 $0.01\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,3为 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,4为 $1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡。

### 具体实施方式

[0032] 本发明是将Flow-through膜印迹技术与免疫检测技术相结合,制备荧光量子点标记吗啡特异性抗体,在固相载体硝酸纤维素膜上制备免疫印迹检测试纸条,以下结合具体实施例来说明本发明,但本发明的保护范围并不限于此。

[0033] 图1为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条的制备检测流程图。

[0034] 图2为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条的检测示意图,随吗啡浓度的增加,荧光性逐渐减弱,1为不含吗啡,2为 $0.01\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,3为 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,4为 $1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡。

[0035] 图3为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条的未偶联标记量子点CdTe@ZnS吸附示意图,从图中可以看出,游离的CdTe@ZnS量子点在Flow-through膜上几乎没有静电吸附,且随吗啡浓度的增加,荧光性无变化,1为不含吗啡,2为 $0.01\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,3为 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,4为 $1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡。

[0036] 图4为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条检测火锅样品添加罂粟壳煮沸不同时间检测示意图,1为不含吗啡,2为煮沸10min,3为煮沸20min。

[0037] 图5为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条检测火锅样品添加罂粟壳煮沸不同时间检测示意图,1为不含吗啡,2为煮沸0.5h,3为煮沸1h,4为煮沸2h。

[0038] 图6为Flow-through膜载体免疫印迹检测吗啡试纸条检测样本不同添加量吗啡的回收率检测示意图,1为不含吗啡,2为 $0.01\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,3为 $0.1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡,4为 $1\text{mg kg}^{-1}$ 吗啡。

[0039] 实施例1

[0040] 膜载体免疫印迹Flow-through吗啡试纸条的制备:

[0041] A.Flow-through膜的预处理:硝酸纤维素薄膜(Millipore)用铅笔画直径为5mm圆孔,用PBS(10mM,pH 7.4)浸泡15min,取出用蒸馏水冲干净,将试纸条紧贴蒸馏水打湿平铺的滤纸,每孔均匀滴加 $20\mu\text{L}$ 吗啡特异性抗原, $37^\circ\text{C}$ 温育30min,用BSA封闭抗原上非特异性位点, $37^\circ\text{C}$ 温育30min,用PBST洗涤三遍, $37^\circ\text{C}$ 干燥, $4^\circ\text{C}$ 干燥保存;

[0042] B. 羧基水溶性CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体的制备:将羧基化CdTe@ZnS用硼酸缓冲液(10mM, pH7.4)稀释至1 $\mu$ M于圆底烧瓶,磁力搅拌。加入43 $\mu$ L吗啡特异性抗体(3.73mg/mL),混合均匀(搅拌速度不易过快,以不产生气泡为准)。搅拌5min后,调低搅拌速度,加入13 $\mu$ L的EDC溶液,反应20min后加入15 $\mu$ LNHS,室温反应2h。反应结束,用冷冻离心机12000rpm离心3min除团聚。

[0043] C. 羧基水溶性CdTe@ZnS量子点标记吗啡特异性抗体的纯化:用超滤管将样品纯化5次,终产物复溶于PBS缓冲液中。终产物取出后12000rpm离心3min除团聚,测定浓度后保存于4 $^{\circ}$ C备用。

[0044] 实施例1中免疫印迹试纸条应用实际样品的检测步骤如下:

[0045] 选择不含吗啡的火锅底料为样品,通过加入一定量的罂粟壳加热煮沸不同时间,用制备的吗啡免疫印迹试纸条检测在添加罂粟壳样品中的特征生物碱-吗啡的检测效果。称取固体样品火锅底料5.00g,罂粟壳1g,加入50mL温水浸泡并煮沸10min、20min、0.5h、1h、2h,过滤洗涤滤渣,蒸馏水定容至50mL。准确移取25mL滤液于分液漏斗中,加入25mL石油醚振荡除油脂,静置分层,放出下层即为待测液。取30 $\mu$ L CdTe@ZnS量子点标记抗体与30 $\mu$ L的煮沸不同时间的样品待测液混匀,反应30min,在检测试纸条每孔均匀滴加30 $\mu$ L,洗涤后在365nm紫外下观察荧光性。

[0046] 实施例1的试纸条操作简便,检测结果直观易分辨。如图4、图5所示,吗啡免疫印迹试纸条的阴性火锅样本(不含罂粟壳)与阴性火锅样本添加罂粟壳煮沸10min、20min对比荧光强度变化不太明显,对煮沸30min、60min、120min相比荧光强度变化明显,且随着煮沸时间的增加检测试纸荧光性变弱,说明吗啡的溶出量随着煮沸时间的增加而增加。本实施例中同时采用了以吗啡生物抗体ELISA方法验证了罂粟壳中含有的特征生物碱吗啡的测定,如表1所示,两种方法的检测结果具有较好的一致性。

[0047] 表1火锅底料加罂粟壳煮沸不同时间的检测结果(以吗啡计)

[0048]

样品序号	加热时间 (min)	生物抗体 ELISA 检测吗啡浓度 (mg kg <sup>-1</sup> )	Flow-through 荧光斑点 免疫检测
1	10	0.0544 $\pm$ 0.0044	+++
2	20	0.0552 $\pm$ 0.0115	+++
3	30	0.1268 $\pm$ 0.02531	+++
4	60	0.5938 $\pm$ 0.04123	+++
5	120	0.7922 $\pm$ 0.02868	+++

[0049] 注:以未添加罂粟壳(不含吗啡)的阴性火锅底料样本为参照,(+)“阳性”,斑点荧光性比参照弱,表示含有罂粟壳特征生物碱吗啡;(-)“阴性”,斑点荧光性与参照无区别活比参照颜色深,表示不含罂粟壳特征生物碱吗啡,( $\pm$ )“阳性/阴性”,斑点荧光性与参照区别不大。

[0050] 实施例2

[0051] 实施例2中吗啡免疫印迹试纸条应用实际样品的检测步骤如下：

[0052] 选择阴性火锅底料为实际检测样品，通过添加不同浓度的吗啡，用制备的吗啡免疫印迹试纸条检测在实际样品中的效果。

[0053] 样品添加回收实验2：称取三份2g火锅底料空白样品，加入10mL水，添加0.25、0.5、1mg kg<sup>-1</sup>的吗啡，加热溶解后，过滤洗涤滤渣，蒸馏水定容至10mL，加入10mL石油醚振摇除油脂，放出下层即为待测液。取30μL CdTe@ZnS量子点标记抗体与30μL的煮沸0.5h、1h、2h待测液混匀，反应30min，在检测试纸条每孔均匀滴加30μL，洗涤后在365nm紫外下观察荧光性。

[0054] 使用实施例2的试纸条操作简便，检测结果直观易分辨。如图6所示，吗啡免疫印迹试纸条对吗啡不同浓度添加量与无添加的火锅底料空白样品相比荧光强度变化明显，且随着添加量的增加荧光性减弱。本实施例中同时采用了以传统吗啡生物抗体为识别元件的ELISA方法验证了添加样品回收率的测定，如表2所示，检测结果具有较好的一致性。结果表明制备的吗啡免疫印迹快速检测Flow-through膜试纸条可以有效实现对样品中吗啡的定性检测。

[0055] 表2火锅样品直接添加吗啡的回收检测结果

[0056]

样品序号	添加浓度 (mg kg <sup>-1</sup> )	生物抗体 ELISA 检测吗啡浓度 (mg kg <sup>-1</sup> )	Flow-through 荧光斑点 免疫
1	0.1	0.1007±0.0019	+++
2	0.5	0.4362±0.0011	+++
3	1	0.8284±0.00095	+++

[0057] 说明：实验数据以平均值±标准差表示(mean±SD;n=3)，Flow-through膜载体试纸条检测：以未添加罂粟壳的阴性火锅底料样本为参照，(+)“阳性”，检测样本的斑点荧光性比参照弱，表示样本含有罂粟壳特征生物碱吗啡；(-)“阴性”，检测样本的斑点荧光性与参照相比荧光强或者无区别，表示不含罂粟壳特征生物碱吗啡，(±)“阳性/阴性”，检测样本的斑点荧光性与参照区别不明显。

[0058] 所述实施例为本发明的优选的实施方式，但本发明并不限于上述实施方式，在不背离本发明的实质内容的前提下，本领域技术人员能够做出的任何显而易见的改进、替换或变型均属于本发明的保护范围。

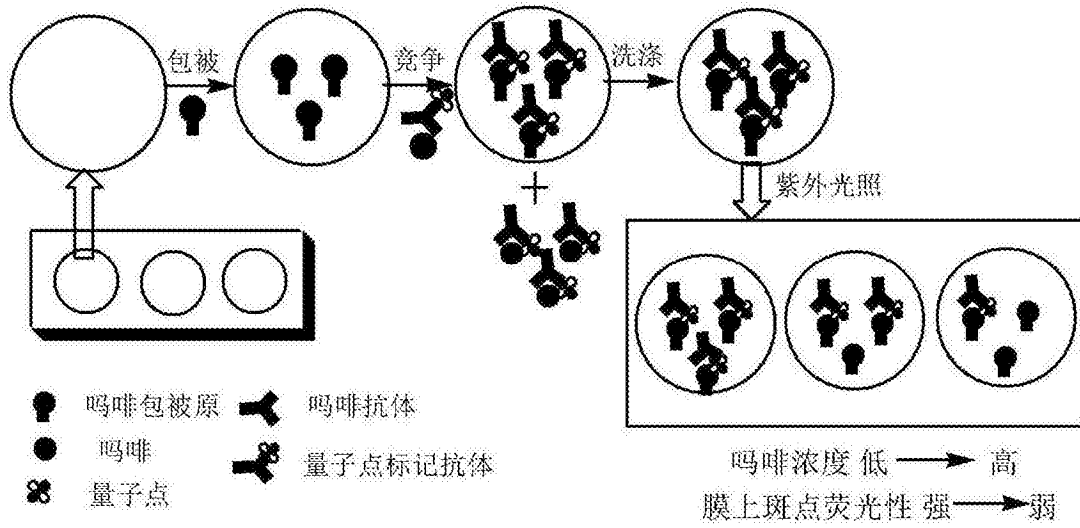


图1

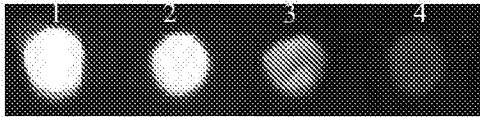


图2

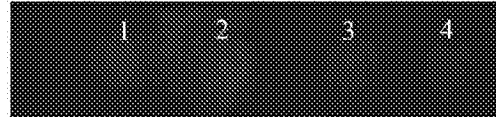


图3



图4



图5



图6

专利名称(译)	Flow-through膜载体量子点检测吗啡试纸的制备及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105954513A</a>	公开(公告)日	2016-09-21
申请号	CN201610523119.6	申请日	2016-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	张灿 韩玉凤 崔涵雨 蔡健荣 刘源		
发明人	张灿 韩玉凤 崔涵雨 蔡健荣 刘源		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了Flow-through膜载体量子点检测吗啡试纸的制备及应用，属于膜载体量子点荧光免疫印迹技术。本采用硝酸纤维素薄膜为固相载体，利用其印迹作用在其表面包被吗啡抗原，用牛血清白蛋白封闭非特异性位点，将吗啡特异性抗体与带羧基水溶性CdTe@ZnS量子点在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺作用下进行偶联标记，制备得到量子点标记吗啡荧光抗体，利用抗体与抗原的特异性结合及Flow-through膜载体印迹吸附作用，达到检测效果。制备过程简单，制备产品理化性能好、检测灵敏度较高的快速检测试纸条的方法。通过Flow-through膜上荧光强度的变化从而定性检测样本中吗啡含量。本发明较酶联免疫快速检测方法的制作成本低廉，检测方法简便快速，检测结果明显直观。

