



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109900890 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910243581.4

(22)申请日 2019.03.28

(71)申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区第十三大街9号

(72)发明人 王俊平 李诗洁 王硕

(74)专利代理机构 天津合正知识产权代理有限公司 12229

代理人 陈松

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

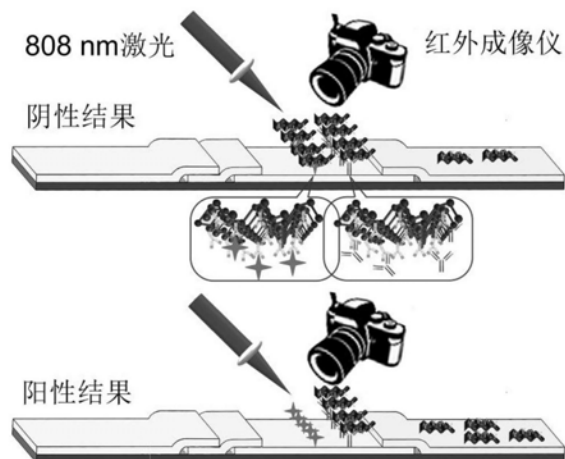
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条及其制备方法,包括以下步骤:(1)将氯金酸在黑磷表面还原为金纳米颗粒;(2)将待测物抗体吸附于黑磷-金纳米颗粒复合物表面制备光热探针;(3)按顺序依次将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘贴于PVC背板上;(4)所述的硝酸纤维素膜上分别包被有待测物抗原构成的检测线和羊抗兔或鼠抗体构成的质控线;(5)将光热探针与待测样品混合后滴加于样品垫,通过毛细管作用向吸水垫层析,待测物抗原与待测物竞争结合光热探针;(6)通过808nm激光照射并利用红外温度计捕获温度。本发明具有特异性高、灵敏度高、操作简便及可实现定量检测的优点。



1. 一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条,包括样品垫、结合垫、包被光热探针的硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背板,其特征在于,在PVC背板上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上分别包被有由小分子抗原构成的检测线和二抗构成的质控线,两条线间隔距离为4-6mm;样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫各交叠区的长度分别为0.8-1.3mm,试纸条宽3.0-4.0mm;样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫各交叠区的长度分别为1mm。

2. 权利要求1所述的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1) 利用黑磷纳米片的化学不稳定性将氯金酸在黑磷表面还原为金纳米颗粒,得到黑磷-金纳米颗粒;

(2) 利用金纳米颗粒的物理吸附性能将待测物抗体吸附于黑磷-金纳米颗粒复合物表面制备“黑磷-金纳米颗粒-待测物抗体”光热探针;

(3) 按顺序依次将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘贴于PVC背板上;

所述的硝酸纤维素膜上分别包被有待测物抗原构成的检测线和羊抗兔或鼠抗体构成的质控线;将2.5 $\mu$ L光热探针与100 $\mu$ L待测样品混合后滴加于样品垫,通过毛细管作用向吸水垫层析,待测物抗原与待测物竞争结合光热探针。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,黑磷-金纳米颗粒的制备方法为:取5mL 200 $\mu$ g/mL黑磷纳米片14000rpm离心15min后弃去上清,沉淀溶于20mL 0.3mmol/L柠檬酸钠水溶液中,搅拌中加入250 $\mu$ L 10mmol/L氯金酸溶液,5min后溶液由黄色变为紫黑色,形成BP-Au杂化纳米材料,浓度为50 $\mu$ g/m。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,黑磷-金纳米颗粒-待测物抗体光热探针的制备包括如下步骤:

(a) 取400 $\mu$ L步骤(1)制备的黑磷-金纳米颗粒溶液,将4 $\mu$ L 0.65mg/mL待测物抗体加入到上述溶液中混合均匀,室温下静置1h;

(b) 向步骤(a)得到的混合溶液中加入10 $\mu$ L 20%BSA及5 $\mu$ L 10%PEG-20000,混匀后室温下静置30min;

(c) 将安道管配平,4 $^{\circ}$ C条件下,12000rpm离心步骤(b)得到的溶液15min,弃去上清,溶液复溶至80 $\mu$ L0.5%BSA,0.5%PVP,1%Tween 20及0.5%PEG<sub>200</sub>混合液中待用。

5. 根据权利要求2所述的试纸条的制备方法,其特征在于,将用PBS溶液稀释后的羊抗兔或羊抗鼠抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线,包被量分别为0.7 $\mu$ L/cm,37 $^{\circ}$ C烘干,斩切为宽为3.7mm的试纸条,封装备用。

## 一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种小分子待测物光热定量免疫层析快速检测技术,特别是一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条及其制备方法,属于免疫层析检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 光热转换试剂是一类能够有效地将光能转换为局部热能的材料或者化合物,因其良好的应用性能而越来越受到人们的关注,并在能源转换与储存、医学成像与治疗以及传感等领域得到了广泛的研究与应用。依靠光热转换试剂的作用产生局部高温,从而杀死癌细胞的肿瘤治疗方法被称为“光热疗法 (photothermal therapy, PTT)”,这种新兴的肿瘤治疗方法受到了科学家们的青睐。近年来,大量的光热转换材料被合成,包括贵金属纳米颗粒、碳基材料、金属和非金属化合物、有机染料以及多种纳米复合材料。又因为近红外光源对生物组织具有较好的穿透性和对水较低的升温作用,因此,对近红外光源高响应的光热转换材料被广泛应用于生物医学领域的研究中。黑磷纳米片具有上述优异的光热性能。作为一种直接带隙半导体,其能带在0.3-1.8eV可随层数调整,因此,其具有良好的近红外(650-1400nm)激发响应。同时,利用黑磷纳米片的化学不稳定性,一些贵金属可在其表面还原形成纳米颗粒,加强其光热转换率的同时,提供更多抗体等生物材料的偶联位点。黑磷及黑磷-金属复合物依赖其较大的比表面积及卓越的光热性能是在生物医学及分析化学领域做出了巨大的贡献,如在光热治疗、药物输送,生物成像、生物诊断和生物传感器方面。然而,光热转换试剂在食品安全检测领域的应用却鲜有报道。

[0003] 免疫层析试纸条具有操作简单、检测快速,成本低等优势,成为近年来备受关注的一种定性检测技术。同时,在实际检测过程中,短时间内就可得出检测结果的快速免疫层析检测技术更是因其不依赖复杂仪器、体积小、方便携带等优势成为最为合适的现场可视化快速食品安全检测工具。然而传统的基于光学信号的免疫层析试纸条在灵敏度或检测范围方面具有局限性。基于标记材料光热性能的热信号输出方式仅需通过廉价的激光器和红外温度计记录温度变化数值,在不借助其他读数仪器的情况下,即可通过简单的数学换算即可得到检测样品中待测物的浓度。将这一信号输出方式应用于免疫层析试纸条中,不仅克服了传统光学比色信号的分辨率差和背景干扰大的缺点,同时提高了试纸条检测灵敏度,为定量试纸条的发展提供了新的思路和良好的条件。同时,其化学不稳定性也可被用于作为还原剂在BP表面还原金属纳米颗粒以构建生物传感器。目前,以黑磷-金纳米颗粒复合物为探针的光热定量免疫层析试纸条还未见报道。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供了一种以黑磷-金纳米粒子复合物为探针的小分子待测物光热定量免疫层析快速检测技术,为了实现上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0005] 一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条,包括样品垫、结合垫、包被光热探针的硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背板,其特征在在于,在PVC背板上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上分别包被有由小分子抗原构成的检测线和二抗构成的质控线,两条线间隔距离为4-6mm;样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫各交叠区的长度分别为0.8-1.3mm,试纸条宽3.0-4.0mm;样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫各交叠区的长度分别为1mm。

[0006] 本发明还公开了所述的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 利用黑磷纳米片的化学不稳定性将氯金酸在黑磷表面还原为金纳米颗粒,得到黑磷-金纳米颗粒;

[0008] (2) 利用金纳米颗粒的物理吸附性能将待测物抗体吸附于黑磷-金纳米颗粒复合物表面制备“黑磷-金纳米颗粒-待测物抗体”光热探针;

[0009] (3) 按顺序依次将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘贴于PVC背板上;

[0010] 所述的硝酸纤维素膜上分别包被有待测物抗原构成的检测线和羊抗兔或鼠抗体构成的质控线;将2.5 $\mu$ L光热探针与100 $\mu$ L待测样品混合后滴加于样品垫,通过毛细管作用向吸水垫层析,待测物抗原与待测物竞争结合光热探针;

[0011] 使用本发明的试纸条通过808nm激光照射并利用红外温度计捕获温度进行光热定量检测。

[0012] 优选的,黑磷-金纳米颗粒的制备方法为:取5mL 200 $\mu$ g/mL黑磷纳米片14000rpm离心15min后弃去上清,沉淀溶于20mL 0.3mmol/L柠檬酸钠水溶液中,搅拌中加入250 $\mu$ L 10mmol/L氯金酸溶液,5min后溶液由黄色变为紫黑色,形成BP-Au杂化纳米材料,浓度为50 $\mu$ g/m。

[0013] 优选的,黑磷-金纳米颗粒-待测物抗体光热探针的制备包括如下步骤:

[0014] (a) 取400 $\mu$ L步骤(1)制备的黑磷-金纳米颗粒溶液,将4 $\mu$ L 0.65mg/mL待测物抗体加入到上述溶液中混合均匀,室温下静置1h;

[0015] (b) 向步骤(a)得到的混合溶液中加入10 $\mu$ L 20%BSA及5 $\mu$ L 10%PEG-20000,混匀后室温下静置30min;

[0016] (c) 将安道管配平,4 $^{\circ}$ C条件下,12000rpm离心步骤(b)得到的溶液15min,弃去上清,溶液复溶至80 $\mu$ L 0.5%BSA,0.5%PVP,1%Tween 20及0.5%PEG<sub>200</sub>混合液中待用。优选的,将用PBS溶液稀释后的羊抗兔或羊抗鼠抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线,包被量分别为0.7 $\mu$ L/cm,37 $^{\circ}$ C烘干,斩切为宽为3.7mm的试纸条,封装备用。

[0017] 优选的,黑磷-金纳米颗粒(BP-Au)的制备:

[0018] 取5mL 200 $\mu$ g/mL黑磷纳米片(BPNSs)14000rpm离心15min后弃去上清,沉淀溶于20mL 0.3mmol/L柠檬酸钠水溶液中,搅拌中加入250 $\mu$ L 10mmol/L氯金酸溶液,5min后溶液由黄色变为紫黑色,形成BP-Au杂化纳米材料,浓度为50 $\mu$ g/mL。

[0019] 本方法名试纸条的使用方法是:取2.5 $\mu$ L制备的BP-Au-Ab标记物,添加于100 $\mu$ L样品溶液中,混合后滴在样品垫上,用肉眼在10分钟内获得视觉结果。在测试条干燥后,用808nm激光照射T-线,并用红外热成像仪或红外温度计捕获结果。激光光斑直径为3.7mm。

[0020] 本发明中检测待测物的黑磷-金纳米颗粒复合物光热免疫层析快速检测技术的原理如下:

[0021] 将与BP-Au-Ab标记物混合的样品溶液滴到样品垫上,并且由于毛细力而向吸收垫的方向上方流动。在待测物阴性样品中,棕紫色BP-Au-Ab探针被T线的待测物抗原捕获,产生明显的棕紫色线,并且在用808nm红外激光(功率密度为 $8.1\text{mw}/\text{mm}^2$ )照射后,检测线的温度显著上升。然而,当检测到待测物阳性样品溶液时,待测物与检测线5上的待测物抗原竞争与BPNS-Au-Ab探针结合,棕色紫色线颜色随样品中待测物浓度的增加而变浅直至消失。随着探针的减少,温度变化程度减弱。

[0022] 当通过肉眼进行可视化半定量检测时,以试纸条上检测线颜色的变化作为结果判断标准:若待测样品试纸条检测线颜色与质控线颜色一致,则判断为阴性样品,即不含待测物;若待测样品试纸条检测线颜色浅于质控线颜色或检测限颜色消失,则判断为阳性样品,即待测样品中含有待测物;阳性结果和阴性结果,质控线均显棕色条带,若质控线棕色条带消失,则试纸条检测失效。

[0023] 当通过808nm激光照射并通过红外热像仪进行光热定量检测时:以待测物浓度抑制检测限温度升高的变化作为结果判断标准:抑制率的计算公式为:抑制率( $\%$ ) =  $(T_0 - T_x) / (T_0 - T_b) \times 100\%$ ,其中 $T_0$ 为检测无待测物样品的T线温度, $T_x$ 为温度用于检测待测物阳性样品的T线, $T_b$ 是除C和T线以外的NC膜的温度。本发明将待测物对试纸条温度的抑制率为15%时所对应的待测物的浓度( $IC_{15}$ )定义为试纸条的检测限。待测物对试纸条温度的抑制率为50%时所对应的待测物的浓度( $IC_{50}$ )定义为试纸条的检测灵敏度。

[0024] 本发明制备了黑磷-金纳米颗粒-待测物抗体光热探针,利用竞争法来检测待测物,根据检测线的温度变化判断待测样品中待测物的含量。若质控线条带无颜色,则该试纸条失效。

[0025] 与现有国内外小分子物质免疫层析检测技术相比,本发明具有以下突出的优点:

[0026] 1、本发明利用黑磷纳米片制备了具有良好的光热性能的光热探针;

[0027] 2、本发明将该探针应用于免疫层析快速检测技术上,实现了以温度变化作为信号输出的方式;

[0028] 3、本发明可用于小分子待测物的高灵敏度和定量检测;

[0029] 4、本发明准确性好、灵敏度高,适用于大量样品的快速筛选,可作为食品中小分子待测物快速检测的有效筛检手段。

## 附图说明

[0030] 构成本发明创造的一部分的附图用来提供对本发明创造的进一步理解,本发明创造的示意性实施例及其说明用于解释本发明创造,并不构成对本发明创造的不当限定。在附图中:

[0031] 图1为本发明检测试纸条的组装示意图。

[0032] 图2为本发明纳米颗粒-待测物抗体光热探针的制备示意图。

[0033] 图3为黑磷纳米片和黑磷-金纳米复合物的光热响应结果图(黑磷纳米片和黑磷-金纳米复合物的浓度从左到右分别为6.25,12.5,25,50,100and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

[0034] 图4为本发明检测试纸条的结果判定方法示意图。

[0035] 图5为普通相机拍摄检测结果图(待测物的浓度从左到右分别为0、0.005、0.01、0.03、0.1、0.5、1、3、5、8、10、15 $\mu\text{g}/\text{L}$ )。

[0036] 图6为红外热像仪检测结果图(待测物的浓度从左到右分别为0、0.005、0.01、0.03、0.1、0.5、1、3、5、8、10、15 $\mu\text{g/L}$ )。

[0037] 图7为恩诺沙星光热灵敏度/曲线(待测物的浓度分别为0、0.005、0.01、0.03、0.1、0.5、1、3、5、8、10、15 $\mu\text{g/L}$ )。

[0038] 附图标记说明:

[0039] 1.样品垫、2.结合垫、3.硝酸纤维素膜 4.吸水垫、5.检测线、6.质控线、7.PVC板

### 具体实施方式

[0040] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造,但所举实例不作为对本发明的限定。

[0041] 实施例1(制备实施例)

[0042] 1.恩诺沙星多克隆抗体(ENR-Ab)的纯化

[0043] 本发明采用免疫亲和层析柱进行抗血清进行纯化,用Protein A-Sepharose 4B作为填料。纯化恩诺沙星抗血清的具体步骤如下:

[0044] 所用缓冲液提前超声20min,以赶走气泡。

[0045] (1)平衡柱子:用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)冲洗管路,流速6.5mL/min,2min。装柱后再用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)平衡柱子,流速1mL/min,直至基线水平。

[0046] (2)上样:待基线水平后,将恩诺沙星抗血清用等体积pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)稀释(1:1,V/V)后上柱,流速为0.5mL/min。上样结束后,用pH7.4 Binding buffer冲柱子,流速1mL/min。抗体被特异性吸附在填料位点上,其他杂蛋白随缓冲液流出,直至基线水平。

[0047] (3)洗脱:用pH 2.7的洗脱缓冲液(Elution buffer)洗脱柱子上结合的抗体,洗出目的蛋白,流速为0.5mL/min。

[0048] (4)测定:在280nm紫外下检测洗脱液蛋白浓度,当吸光度 $A_{280} > 0.2$ 时,收集洗脱液,收集完毕后迅速用1mol/L Tris调pH至7.0。

[0049] (5)抗体的透析与保存:用pH 7.4抗体透析液(磷酸盐缓冲液,PB)透析所得抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 透析三天,每天换三次透析,透析后取出,加入0.1% (W/V)的 $\text{NaN}_3$ ,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

[0050] (6)处理纯化柱:抗体收集完后迅速用0.1M醋酸溶液冲洗柱子2min,流速2mL/min,然后再用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)平衡柱子,直到流出液pH至中性。最后用20%乙醇溶液冲洗柱子,20min后加满,封存于4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

[0051] 2.恩诺沙星抗原(ENR-OVA)的制备

[0052] (1)在冰浴中将2.1mg恩诺沙星溶解于0.3mL无水DMF中,搅拌下向其中逐滴加入2 $\mu\text{L}$ 三正丁胺和1.5 $\mu\text{L}$ 氯甲酸异丁酯。将混合物在4 $^{\circ}\text{C}$ 下在黑暗中搅拌1小时,为A液。

[0053] (2)将10mg OVA溶解于1mL碳酸盐缓冲液(0.05mol/L,pH 9.6)中,为B液。

[0054] (3)搅拌下将A液逐滴加入B液中,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育12小时。

[0055] (4)将得到的恩诺沙星抗原溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下用PBS缓冲液(0.01mol/L,pH 7.4)透析3天,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下5000rpm离心5min,去除沉淀,上清液于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0056] 实施例2(制备实施例)

[0057] 黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条的组装及制备方法

[0058] 1. 试纸条组装:

[0059] 本发明的试纸条组成如下:样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4和PVC板7,在PVC板7上按顺序依次粘附有样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4;所述的硝酸纤维素膜3上分别包被有恩诺沙星抗原构成的检测线5和羊抗兔二抗构成的质控线6。

[0060] 2. 黑磷-金纳米颗粒(BP-Au)的制备:

[0061] 如图2所示,取5mL 200 $\mu$ g/mL黑磷纳米片(BPNSs)14000rpm离心15min后弃去上清,沉淀溶于20mL 0.3mmol/L柠檬酸钠水溶液中,搅拌中加入250 $\mu$ L 10mmol/L氯金酸溶液,5min后溶液由黄色变为紫黑色,形成BP-Au杂化纳米材料,浓度为50 $\mu$ g/mL。

[0062] 3. 黑磷-金纳米颗粒-恩诺沙星抗体光热探针(BP-Au-Ab)的制备:

[0063] 选择物理吸附的方式制备BP-Au-Ab偶联复合物,如图2所示。

[0064] (1)取400 $\mu$ L BP-Au溶液,向其中添加4 $\mu$ L 0.65mg/mL ENR-Ab,室温下静置1h。

[0065] (2)向步骤(1)中加入10 $\mu$ L 20%BSA及5 $\mu$ L 10%PEG-20000,混匀后室温下静置30min。

[0066] (3)将安道管配平,4 $^{\circ}$ C条件下,12000rpm离心15min,弃去上清,溶液复溶至80 $\mu$ L 0.5%BSA,0.5%PVP,1%Tween 20及0.5%PEG200混合液中待用。

[0067] 4. 硝酸纤维素膜的包被

[0068] 用双维平面划膜仪将实施例1制备的ENR-OVA用PBS溶液稀释为0.1mg/mL后,包被于硝酸纤维素膜3上作为检测线5,包被量为0.7 $\mu$ L/cm;将用PBS溶液稀释为0.81mg/mL后的羊抗兔抗体包被于硝酸纤维素膜3上作为质控线6,包被量为0.7 $\mu$ L/cm,37 $^{\circ}$ C烘干。

[0069] 5. 试纸条的组装

[0070] 将样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4按图1所示的顺序依次粘附在PVC板7上,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫个交叠区的长度分别为1mm。切成3.7mm宽的小条,真空封装。

[0071] 实施例3(应用实施例)

[0072] 为了验证光热信号输出的优势,分别取3 $\mu$ L 6.25,12.5,25,50,100and 200 $\mu$ g/mL的黑磷纳米片和黑磷-金纳米复合物溶液滴加于硝酸纤维素膜上,干燥后用808nm激光照射30s并用红外像机或红外温度计记录温度,以评估黑磷纳米片和黑磷-金纳米颗粒复合物的光学图像,光热图像和温度趋势(图3)。光学成像无法看到相同浓度的BP和BP-Au之间的微小差异,只有当浓度增加到50 $\mu$ g/mL时,光学相机才能捕获信号(图3a)。然而,红外热像仪通过热信号将灰度图像转换为彩色图像,可以在图像上更清楚地区分材料浓度的变化(图3b),且黑磷-金纳米颗粒复合物的颜色范围更宽(黑磷-金纳米颗粒复合物为12.5 $\mu$ g/mL-200 $\mu$ g/mL,黑磷纳米片为100 $\mu$ g/mL-200 $\mu$ g/mL)。此外,黑磷-金纳米颗粒复合物的温度变化率较大,这为区分分析物的小浓度变化提供了有利条件。因此,黑磷-金纳米颗粒复合物在检测低浓度或痕量浓度变化样品方面具有更大的优势。

[0073] 实施例4(应用实施例)

[0074] 1. 光热定量免疫层析技术的使用方法

[0075] 动物源性食品的预处理

[0076] 将1.0g可食用组织样品加入到15mL离心管中,加入0.2mL 0.1mol/L NaOH和0.8mL

乙腈,并剧烈摇动5min。在室温下以5000rpm离心5分钟后,收集上清液并用PBS缓冲液(0.01mol/L,pH 7.4)稀释15倍,直接用于试纸条检测。

## [0077] 2. 检测步骤

[0078] 用移液枪吸取100 $\mu$ L待检样品提取液于安道管中,并加入2.5 $\mu$ L BP-Au-Ab,混匀后,滴加到试纸条的加样孔里,用肉眼在10分钟内获得视觉结果。在测试条干燥后,用808nm激光照射T-线,并用红外热成像仪或红外温度计捕获结果。激光光斑直径为0.37cm,功率密度为8.1mw/mm<sup>2</sup>。

## [0079] 3. 结果判定

[0080] 如图5所示,当通过肉眼进行可视化半定量检测时,以试纸条上检测线5颜色的变化作为结果判断标准:若待测样品试纸条检测线5颜色与质控线6颜色一致,则判断为阴性样品,即不含恩诺沙星;若待测样品试纸条检测线5颜色明显浅于质控线6颜色或检测线5颜色消失,则判断为阳性样品,即待测样品中含有恩诺沙星;阳性结果和阴性结果,质控线6均显棕色条带,若质控线6棕色条带消失,则试纸条检测失效。

[0081] 当通过808nm激光照射并利用红外热像仪捕获温度进行光热定量检测时:以恩诺沙星浓度抑制检测线5温度升高的变化作为结果判断标准:抑制率的计算公式为:抑制率(%) =  $(T_0 - T_x) / (T_0 - T_b) \times 100\%$ ,其中T<sub>0</sub>为检测无恩诺沙星样品的T线温度,T<sub>x</sub>为温度用于检测恩诺沙星阳性样品的T线,T<sub>b</sub>是除C和T线以外的NC膜的温度。本发明将待测物对试纸条温度的抑制率为15%时所对应的待测物的浓度(IC<sub>15</sub>)定义为试纸条的检测限。待测物对试纸条温度的抑制率为50%时所对应的待测物的浓度(IC<sub>50</sub>)定义为试纸条的检测灵敏度。

## [0082] 实施例5(制备实施例)

### [0083] 1. 黄曲霉毒素抗体的纯化

[0084] 本发明采用免疫亲和层析柱进行抗血清进行纯化,用Protein A-Sepharose 4B作为填料。纯化黄曲霉毒素抗血清的具体步骤如下:

[0085] 所用缓冲液提前超声20min,以赶走气泡。

[0086] (1) 平衡柱子:用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)冲洗管路,流速6.5mL/min,2min。装柱后再用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)平衡柱子,流速1mL/min,直至基线水平。

[0087] (2) 上样:待基线水平后,将黄曲霉毒素抗血清用等体积pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)稀释(1:1,V/V)后上柱,流速为0.5mL/min。上样结束后,用pH7.4Binding buffer冲柱子,流速1mL/min。抗体被特异性吸附在填料位点上,其他杂蛋白随缓冲液流出,直至基线水平。

[0088] (3) 洗脱:用pH 2.7的洗脱缓冲液(Elution buffer)洗脱柱子上结合的抗体,洗出目的蛋白,流速为0.5mL/min。

[0089] (4) 测定:在280nm紫外下检测洗脱液蛋白浓度,当吸光度A<sub>280</sub>>0.2时,收集洗脱液,收集完毕后迅速用1mol/L Tris调pH至7.0。

[0090] (5) 抗体的透析与保存:用pH 7.4抗体透析液(磷酸盐缓冲液,PB)透析所得抗体,4℃透析三天,每天换三次透析,透析后取出,加入0.1%(W/V)的NaN<sub>3</sub>,4℃储存备用。

[0091] (6) 处理纯化柱:抗体收集完后迅速用0.1M醋酸溶液冲洗柱子2min,流速2mL/min,然后再用pH 7.4的磷酸盐缓冲液(Binding buffer)平衡柱子,直到流出液pH至中性。最后

用20%乙醇溶液冲洗柱子,20min后加满,封存于4℃储存。

## [0092] 2. 黄曲霉毒素抗原的制备

[0093] (1) 将1mg黄曲霉毒素和3mg CMO溶解在2mL无水吡啶中,混合均匀。

[0094] (2) 在37℃氮气保护条件下反应12h,得到橙红色反应物。

[0095] (3) 对产物进行真空旋蒸,得到粘稠油状AFB<sub>0</sub>,在60℃下真空干燥,收集产物。

[0096] (4) 将步骤(4)中的AFB<sub>0</sub>与ENC和NHS以1:2:5的摩尔比溶于0.35mLN,N-二甲基甲酰胺中,室温避光反应12h,得到活化酯溶液。

[0097] (5) 将活化酯溶液驻地缓慢地加入到OVA溶液中,4℃下缓慢搅拌过夜,产物用PBS缓冲液(0.01mol/L,pH 7.4)在4℃透析三天,每天换三次透析,透析后取出,得到黄曲霉毒素抗原,加入0.1%(W/V)的NaN<sub>3</sub>,4℃储存备用。

## [0098] 实施例6(制备实施例)

### [0099] 黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条的组装及制备方法

#### [0100] 1. 试纸条组装:

[0101] 本发明的试纸条组成如下:样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4和PVC板7,在PVC板7上按顺序依次粘附有样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4;所述的硝酸纤维素膜3上分别包被有黄曲霉毒素抗原构成的检测线5和羊抗兔二抗构成的质控线6。

#### [0102] 2. 黑磷-金纳米颗粒(BP-Au)的制备:

[0103] 如图2所示,取5mL 200μg/mL黑磷纳米片(BPNSs)14000rpm离心15min后弃去上清,沉淀溶于20mL 0.3mmol/L柠檬酸钠水溶液中,搅拌中加入250μL 10mmol/L氯金酸溶液,5min后溶液由黄色变为紫黑色,形成BP-Au杂化纳米材料,浓度为50μg/mL。

#### [0104] 3. 黑磷-金纳米颗粒-黄曲霉毒素抗体光热探针的制备:

[0105] 选择物理吸附的方式制备BP-Au-Ab偶联复合物,如图2所示。

[0106] (1) 取400μL BP-Au溶液,向其中添加4μL 0.65mg/mL黄曲霉毒素抗体并混合均匀,室温下静置1h。

[0107] (2) 向步骤(1)中加入10μL 20%BSA及5μL 10%PEG-20000,混匀后室温下静置30min。

[0108] (3) 将安道管配平,4℃条件下,12000rpm离心15min,弃去上清,溶液复溶至80μL 0.5%BSA,0.5%PVP,1%Tween 20及0.5%PEG200混合液中待用。

#### [0109] 4. 硝酸纤维素膜的包被

[0110] 用双维平面划膜仪将实施例1制备的黄曲霉毒素抗原用PBS溶液稀释为0.1mg/mL后,包被于硝酸纤维素膜3上作为检测线5,包被量为0.7μL/cm;将用PBS溶液稀释为0.81mg/mL后的羊抗兔抗体包被于硝酸纤维素膜3上作为质控线6,包被量为0.7μL/cm,37℃烘干。

#### [0111] 5. 试纸条的组装

[0112] 将样品垫1、结合垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4按图1所示的顺序依次粘附在PVC板7上,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫个交叠区的长度分别为1mm。切成3.7mm宽的小条,真空封装。

## [0113] 实施例7(应用实施例)

### [0114] 1. 光热定量免疫层析技术的使用方法

#### [0115] 谷物样品的预处理

[0116] 称取1g谷物样品粉末(经质谱验证为阴性样),加入2mL90%乙腈溶液剧烈震荡搅拌5min,在室温下以5000rpm离心5分钟后,收集上清液并用PBS缓冲液(0.01mol/L,pH 7.4)稀释15倍,直接用于试纸条检测。

## [0117] 2. 检测步骤

[0118] 用移液枪吸取100 $\mu$ L待检样品提取液于安道管中,并加入2.5 $\mu$ L BP-Au-Ab,混匀后,滴加到试纸条的加样孔里,用肉眼在10分钟内获得视觉结果。在测试条干燥后,用808nm激光照射T-线,并用红外热成像仪或红外温度计捕获结果。激光光斑直径为0.37cm,功率密度为8.1mw/mm<sup>2</sup>。

[0119] 当通过808nm激光照射并利用红外热像仪捕获温度进行光热定量检测时:以黄曲霉毒素浓度抑制检测线5温度升高的变化作为结果判断标准:抑制率的计算公式为:抑制率(%) =  $(T_0 - T_x) / (T_0 - T_b) \times 100\%$ ,其中T<sub>0</sub>为检测无黄曲霉毒素样品的T线温度,T<sub>x</sub>为温度用于检测恩诺沙星阳性样品的T线,T<sub>b</sub>是除C和T线以外的NC膜的温度。本发明将待测物对试纸条温度的抑制率为15%时所对应的待测物的浓度(IC<sub>15</sub>)定义为试纸条的检测限。待测物对试纸条温度的抑制率为50%时所对应的待测物的浓度(IC<sub>50</sub>)定义为试纸条的检测灵敏度。

[0120] 以上所述方法及实例仅为充分说明本发明的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所做的变换和替换,都在本发明的保护范围内。

[0121] 以上所述仅为本发明创造的技术原理,仅是本发明的优选实施方式,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

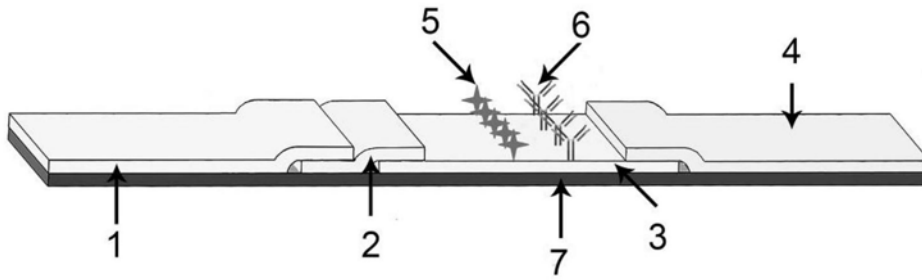


图1

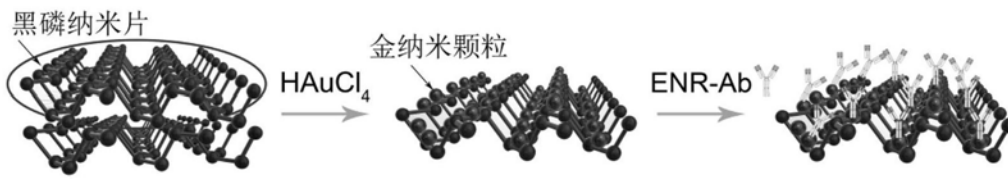


图2

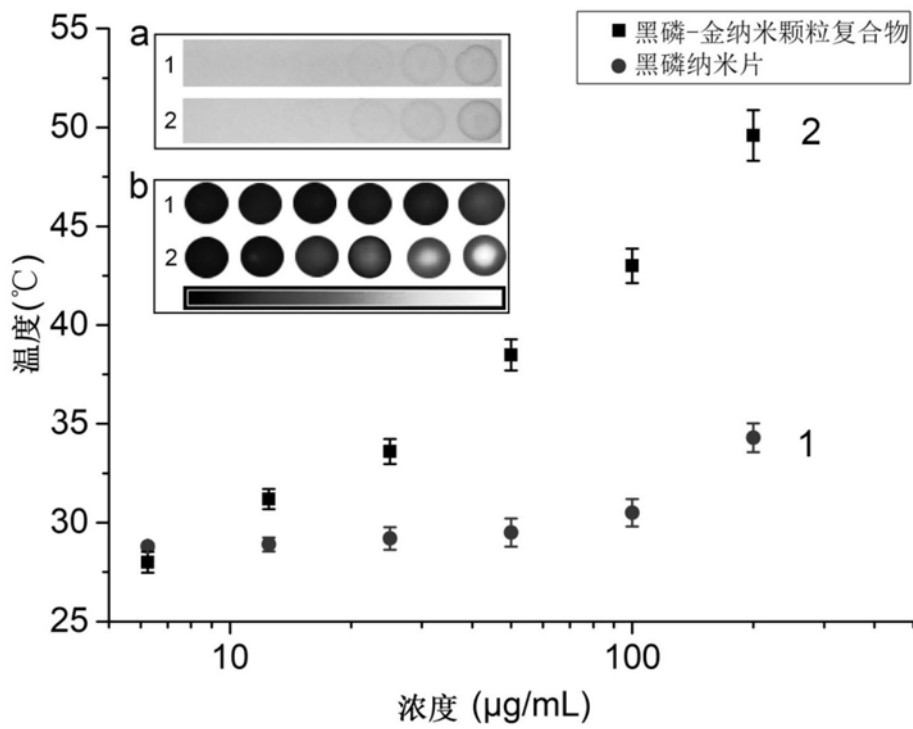


图3

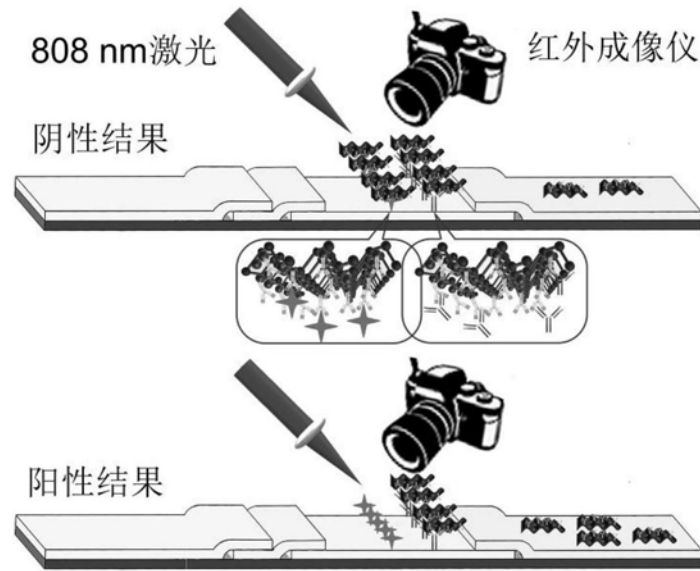


图4

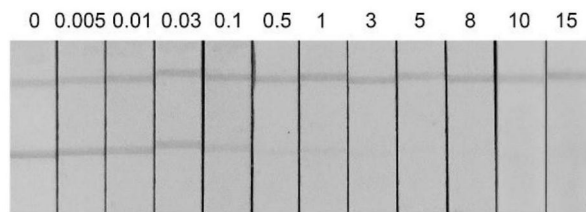


图5



图6

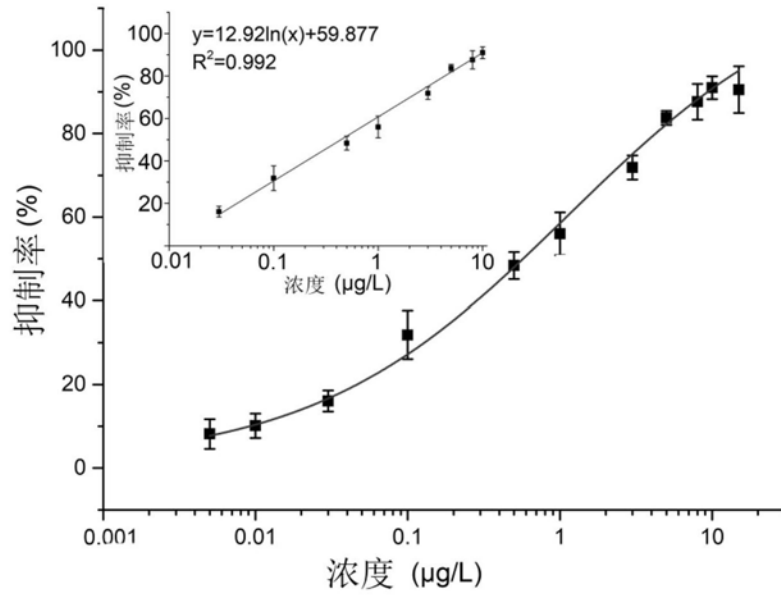


图7

专利名称(译)	一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109900890A</a>	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN201910243581.4	申请日	2019-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王俊平 李诗洁 王硕		
发明人	王俊平 李诗洁 王硕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	陈松		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测小分子物质的黑磷-金纳米粒子复合物光热定量免疫层析试纸条及其制备方法，包括以下步骤：(1)将氯金酸在黑磷表面还原为金纳米颗粒；(2)将待测物抗体吸附于黑磷-金纳米颗粒复合物表面制备光热探针；(3)按顺序依次将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘贴于PVC背板上；(4)所述的硝酸纤维素膜上分别包被有待测物抗原构成的检测线和羊抗兔或鼠抗体构成的质控线；(5)将光热探针与待测样品混合后滴加于样品垫，通过毛细管作用向吸水垫层析，待测物抗原与待测物竞争结合光热探针；(6)通过808nm激光照射并利用红外温度计捕获温度。本发明具有特异性高、灵敏度好、操作简便及可实现定量检测的优点。

