



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110873793 A

(43)申请公布日 2020.03.10

(21)申请号 201810994085.8

(22)申请日 2018.08.29

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号  
中国农业大学西校区

(72)发明人 江海洋 沈建忠 王战辉 温凯  
彭涛 郑丕苗

(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 陈晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种高通量超灵敏荧光金纳米簇免疫层析  
试纸条及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种高通量超灵敏荧光金纳米簇免疫层析试纸条及其应用。该荧光金纳米簇免疫层析试纸条包括样本垫、硝酸纤维素膜、吸水纸以及PVC粘性底板。所述硝酸纤维素膜上包被有两条目标物检测线和一条质控线。本发明还公开了成套荧光金纳米簇偶联抗体探针，是由链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体和链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体组成。所述荧光金纳米簇是以6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶和精氨酸为配体的超强荧光的绿色荧光金纳米簇。本发明优点是方法简单快速、结果直观准确、可定量/半定量检测，能够实现兽药残留的高通量超灵敏在线检测。

1. 一种试剂盒,其包括试纸条和成套荧光金纳米簇偶联抗体探针;

所述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针由链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体和链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体组成;

所述试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及吸水垫组成;

所述检测线T1、所述检测线T2和所述质控线相互分离;

所述检测线T1处包被有小分子化合物A抗原;所述抗小分子化合物A的抗体能够特异性结合小分子化合物A抗原;

所述检测线T2处包被有小分子化合物B抗原;所述抗小分子化合物B的抗体能够特异结合小分子化合物B抗原;

所述质控线处包被有抗所述抗小分子化合物A的抗体和所述抗小分子化合物B的抗体的抗体;

所述检测线T1位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端;

所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

所述荧光金纳米簇是以6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶为配体、精氨酸为刚化剂合成的荧光纳米颗粒;

或,所述链霉亲和素化的荧光金纳米簇是通过活泼酯法将链霉亲和素的氨基与荧光金纳米簇表面的羧基偶联得到的偶联物;

或,所述链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体是利用生物素与链霉亲和素的特异性识别能力将链霉亲和素化的荧光金纳米簇与生物素化的抗小分子化合物A的抗体偶联形成的偶联物;

或,所述链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体是利用生物素与链霉亲和素的特异性识别能力将链霉亲和素化的荧光金纳米簇与生物素化的抗小分子化合物B的抗体偶联形成的偶联物。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的多克隆抗体或单克隆抗体;

或,所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的多克隆抗体或单克隆抗体。

4. 根据权利要求1-3任一所述的试剂盒,其特征在于:

所述荧光金纳米簇的粒径为1.8-2.2nm;

或,所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的单克隆抗体;

或,所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的单克隆抗体;

或,所述质控线处包被有羊抗鼠IgG。

5. 根据权利要求1-4任一所述的试剂盒,其特征在于:

所述基底层的材料为聚氯乙烯;

或,所述样品垫为玻璃纤维素膜;

或,所述包被膜为硝酸纤维素膜;

或,所述检测线T1与所述检测线T2之间的距离为3mm;

或,所述检测线T2与所述质控线之间的距离为3mm。

6.根据权利要求1-5任一所述的试剂盒,其特征在于:

所述小分子化合物A和所述小分子化合物B均为兽药残留分子;

或,所述小分子化合物A为盐酸克伦特罗;

或,所述小分子化合物B为莱克多巴胺。

7.权利要求1-6任一所述的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:分别制备权利要求1-6任一所述的试剂盒中的试纸条和成套荧光金纳米簇偶联抗体探针;

制备所述试纸条的方法包括如下步骤:

I、分别制备所述样品垫、所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及所述吸水垫;

II、将步骤I得到的所述样品垫、步骤I得到的所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜与所述吸水垫依次粘贴到所述基底层上,得到所述试纸条;

所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜按照如下方法制备:将权利要求1-6中所述的小分子化合物A抗原、权利要求1-6中所述的小分子化合物B抗原和所述羊抗鼠IgG分别喷涂在所述包被膜的检测线T1区域、检测线T2区域和质控线区域,形成所述检测线T1、检测线T2和所述质控线,得到所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜;

制备所述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针的方法为权利要求1-6中所述的链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体和链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体的制备方法。

8.权利要求1-6任一所述的试剂盒或权利要求7所述的制备方法在同时检测两种不同的小分子化合物中的应用;

或,权利要求1-6任一所述的试剂盒或权利要求7所述的制备方法在同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物中的应用;

或,权利要求1-6任一所述的试剂盒或权利要求7所述的制备方法在同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量中的应用。

9.一种同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物的方法,包括如下步骤:

(a1)向待测样本中加入权利要求1-6中任一一所述的成套荧光金纳米簇偶联抗体探针,得到混合溶液;

(a2)将所述混合溶液孵育3min,然后加入权利要求1-6中任一一所述的试纸条的样品垫上,层析20min后,在紫外凝胶成像仪下观察检测线T1、检测线T2和质控线的显色情况;

若T1线不显色,T2线不显色,C线显绿色,则待测样本中含有小分子化合物A和小分子化合物B;

若T1线不显色,T2线显绿色,C线显绿色,则待测样本中含有小分子化合物A,且不含有小分子化合物B;

若T1线显绿色,T2线不显色,C线显绿色,则待测样本中不含有小分子化合物A,且含有小分子化合物B;

若T1线显绿色,T2线显绿色,C线显绿色,则待测样本中不含有小分子化合物A和小分子化合物B。

10. 一种同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法,包括如下步骤:

(b1) 绘制标准曲线

配制系列浓度的小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液,将所得的若干份含有不同浓度的标准品溶液分别与权利要求1-6中任一所述的成套荧光金纳米簇偶联抗体探针混合,得到混合液;然后将所述混合溶液孵育3min,然后加入权利要求1-6中任一所述的试纸条的样品垫上,层析20min后,使用荧光读取仪测定T1、T2和C线的荧光强度;分别以所述小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液的浓度或其对数为横坐标,以所述检测线T1和所述检测线T2的荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线图,得到标准曲线方程;

(b2) 待测样本检测

将所述待测样本与权利要求1-6中任一所述的成套荧光金纳米簇偶联抗体探针混合,得到混合液;然后将所述混合溶液孵育3min,然后加入权利要求1-6中任一所述的试纸条的样品垫上,层析20min后,使用荧光读取仪测定T1、T2和C线的荧光强度;将所述检测线T1和所述检测线T2的荧光强度代入步骤b1) 所得标准曲线方程,计算得到所述待测样本中的小分子化合物A和小分子化合物B的浓度值。

## 一种高通量超灵敏荧光金纳米簇免疫层析试纸条及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全中兽药检测领域,具体涉及一种高通量超灵敏荧光金纳米簇免疫层析试纸条及其应用。

### 背景技术

[0002] 免疫层析技术是出现于80年代初期的一种独特的免疫分析方式,它具有快速简单、灵敏便捷、价格低廉等优点,可以实现目标物的在线快速检测和监控,目前在食品安全、医学诊断、环境监测等领域得到了广泛的应用。基于胶体金为标记物的免疫层析技术是运用最成功最广泛的一种快速筛查手段,但是其灵敏度往往很难满足人们的要求。因此,建立一种高通量超灵敏同时检测一个样品中多种目标物残留的免疫层析方法是十分必要的。

[0003] 荧光金纳米簇是近几年出现的一种新型荧光纳米材料,它是由几个到几百个原子组成的粒径为0.2-3nm的以金属为核、有机配体为壳的核壳型结构,由于其粒径接近于电子的费米波长,性质介于单原子和较大的纳米粒子或大体积的贵金属之间。在一定程度上,荧光金纳米簇有效克服了传统荧光纳米材料的缺点,具有光致发光性能强、光稳定性良好、斯托克斯位移大和生物相容性好等优点。但是目前广泛应用研究的荧光金纳米簇是以牛血清白蛋白为配体合成的,荧光量子产率都较低(<10%),很难将其作为标记物用于免疫快速检测技术中。而以6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶为配体,精氨酸为刚化剂合成的荧光金纳米簇(Arg-ATT-AuNCs)有超强的绿色荧光,同时具有水溶性好、稳定性高、单分散性好、荧光量子产率高等优点,表面大量的羧基易于和蛋白进行偶联。

### 发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是如何同时简便、快速、高灵敏的检测两种不同的化合物。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明首先提供了一种试剂盒。

[0006] 本发明提供的试剂盒包括荧光免疫层析试纸条和成套荧光金纳米簇偶联抗体探针;

[0007] 所述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针由链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体和链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体组成;

[0008] 所述荧光免疫层析试纸条由依次连接并固定于基底层上的样品垫、设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及吸水垫组成;

[0009] 所述检测线T1、所述检测线T2和所述质控线相互分离;

[0010] 所述检测线T1处包被有小分子化合物A抗原;所述抗小分子化合物A的抗体能够特异性结合小分子化合物A抗原;

[0011] 所述检测线T2处包被有小分子化合物B抗原;所述抗小分子化合物B的抗体能够特异结合小分子化合物B抗原;

[0012] 所述质控线处包被有抗所述抗小分子化合物A的抗体和所述抗小分子化合物B 的抗体的抗体；

[0013] 所述检测线T1位于所述包被膜靠近所述样品垫的一端；

[0014] 所述质控线位于所述包被膜靠近所述吸水垫的一端。

[0015] 上述试剂盒中，所述荧光金纳米簇是以6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶为配体、精氨酸为刚化剂合成的荧光纳米颗粒；该荧光纳米颗粒是水溶性表面，具有大量羧基的核壳型绿色荧光纳米颗粒，合成方法简单、绿色无污染。

[0016] 所述链霉亲和素化的荧光金纳米簇是通过活泼酯法将链霉亲和素的氨基与荧光金纳米簇表面的羧基偶联得到的偶联物；

[0017] 所述链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体是利用生物素与链霉亲和素的特异性识别能力将链霉亲和素化的荧光金纳米簇与生物素化的抗小分子化合物A的抗体偶联形成的偶联物；

[0018] 所述链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体是利用生物素与链霉亲和素的特异性识别能力将链霉亲和素化的荧光金纳米簇与生物素化的抗小分子化合物B的抗体偶联形成的偶联物。

[0019] 本发明的成套荧光金纳米簇偶联抗体探针可于96孔板单个孔中干燥密封保存，检测时用样品复溶。

[0020] 进一步的，

[0021] 所述荧光金纳米簇的制备方法如下：a1) 用氢氧化钠水溶液将6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶溶解至终浓度为80mM；然后将其加入到氯金酸溶液中，室温下避光反应1~2 小时，得到弱发光荧光金纳米簇；再通过超滤除去未反应的小分子，并用超纯水重悬至原体积，得到弱发光荧光金纳米簇体系。a2) 将精氨酸溶液加入所述弱发光荧光金纳米簇体系中，在37℃ 环境中避光反应24~26小时，得到超强发光的绿色荧光金纳米簇溶液。本发明制备的荧光金纳米簇的结构示意图如图1所示。该荧光金纳米簇的制备方法参见文献：Fabrication of Water-Soluble, Green-Emitting Gold Nanoclusters with a 65% Photoluminescence Quantum Yield via Host-Guest Recognition, Deng H H, Shi X Q, Wang F F, et al. Chemistry of Materials, 2017, 29中的方法。

[0022] 所述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针的制备方法如下：

[0023] b1) 链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs的制备：b1-1) 将荧光金纳米簇溶液、Tris-HCl (pH8.0) 和链霉亲和素溶液混匀，得到混合液。b1-2) 取EDC溶液和NHSS溶液加入所述混合液中，于室温下避光搅拌反应2小时，得到反应后溶液。b1-3) 向所述反应后溶液中加入BSA溶液封闭30min；得到封闭后溶液；然后将封闭后溶液用超滤管超滤5min，上清用Tris-HCl (pH8.0) 重悬至1ml，得到链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs 溶液。

[0024] b2) 生物素化抗体的制备：b2-1) 在碳酸氢钠溶液中加入生物素溶液和盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液，然后在室温下振荡反应2.5小时。反应完成后，用透析袋进行纯化，得到生物素化的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液。b2-2) 在碳酸氢钠溶液中加入生物素溶液和莱克多巴胺单克隆抗体溶液，然后在室温下振荡反应2.5小时。反应完成后，用透析袋进行纯化，得到莱克多巴胺单克隆抗体溶液。

[0025] b3) 荧光检测探针的制备：取链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs溶液，同时加入生物素

化的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液和生物素化的莱克多巴胺单抗溶液,室温反应30 min,得到本发明的荧光检测探针溶液。该溶液中含有链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs 与生物素化盐酸克伦特罗单克隆抗体形成的偶联物及链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs 与生物素化莱克多巴胺单克隆抗体形成的偶联物。

- [0026] 上述试剂盒中,
- [0027] 所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的多克隆抗体或单克隆抗体;
- [0028] 所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的多克隆抗体或单克隆抗体。
- [0029] 所述检测线T1包被有小分子化合物A与BSA载体蛋白的偶联物;
- [0030] 所述检测线T2包被有小分子化合物B与BSA载体蛋白的偶联物。
- [0031] 上述试剂盒中,所述荧光金纳米簇的粒径为1.8-2.2nm;
- [0032] 所述抗小分子化合物A的抗体为抗小分子化合物A的单克隆抗体;
- [0033] 所述抗小分子化合物B的抗体为抗小分子化合物B的单克隆抗体;
- [0034] 所述质控线处包被有羊抗鼠IgG。
- [0035] 上述试剂盒中,所述基底层的材料为聚氯乙烯;
- [0036] 所述样品垫为玻璃纤维素膜;
- [0037] 所述包被膜为硝酸纤维素膜;
- [0038] 所述检测线T1与所述检测线T2之间的距离为3mm;
- [0039] 所述检测线T2与所述质控线之间的距离为3mm。
- [0040] 上述试剂盒中,所述小分子化合物A和所述小分子化合物B均为兽药残留分子;
- [0041] 所述小分子化合物A具体为盐酸克伦特罗;
- [0042] 所述小分子化合物B具体为莱克多巴胺。
- [0043] 为了解决上述技术问题,本发明又提供了上述试剂盒的制备方法。
- [0044] 本发明的试剂盒的制备方法包括如下步骤:分别制备上述试剂盒中的试纸条和成套荧光金纳米簇偶联抗体探针;
- [0045] 制备所述试纸条的方法包括如下步骤:
- [0046] I、分别制备所述样品垫、所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜,以及所述吸水垫;
- [0047] II、将步骤I得到的所述样品垫、步骤I得到的所述设有检测线T1、检测线T2 和质控线的包被膜与所述吸水垫依次粘贴到所述基底层上,得到所述试纸条;
- [0048] 所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜按照如下方法制备:将所述小分子化合物A抗原、所述小分子化合物B抗原和所述羊抗鼠IgG分别喷涂在所述包被膜的检测线T1区域、检测线T2区域和质控线区域,形成所述检测线T1、检测线 T2和所述质控线,得到所述设有检测线T1、检测线T2和质控线的包被膜;
- [0049] 制备所述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针的方法为上述链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体和链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体的制备方法。
- [0050] 为了解决上述技术问题,本发明还提供了上述试剂盒或上述方法的新用途。
- [0051] 本发明提供了上述试剂盒或上述方法在同时检测两种不同的小分子化合物中的应用。

[0052] 本发明还提供了上述试剂盒或上述方法在同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物中的应用。

[0053] 本发明还提供了上述试剂盒或上述方法在同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量中的应用。

[0054] 为了解决上述技术问题,本发明还提供了一种同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物的方法。

[0055] 本发明提供的同时检测待测样本中是否含有两种不同的小分子化合物的方法包括如下步骤:

[0056] (a1) 向待测样本中加入上述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针,得到混合溶液;

[0057] (a2) 将所述混合溶液孵育3min,然后加入上述试纸条的样品垫上,层析20 min后,在紫外凝胶成像仪下观察检测线T1、检测线T2和质控线的显色情况;

[0058] 若T1线不显色,T2线不显色,C线显绿色,则待测样本中含有小分子化合物A和小分子化合物B;

[0059] 若T1线不显色,T2线显绿色,C线显绿色,则待测样本中含有小分子化合物 A,且不含有小分子化合物B;

[0060] 若T1线显绿色,T2线不显色,C线显绿色,则待测样本中不含有小分子化合物A,且含有小分子化合物B;

[0061] 若T1线显绿色,T2线显绿色,C线显绿色,则待测样本中不含有小分子化合物A和小分子化合物B。

[0062] 为了解决上述技术问题,本发明最后还提供了一种同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法。

[0063] 本发明提供的同时检测待测样本中两种不同的小分子化合物含量的方法包括如下步骤:

[0064] (b1) 绘制标准曲线

[0065] 配制系列浓度的小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液,将所得的若干份含有不同浓度的标准品溶液分别与上述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针混合,得到混合液;然后将所述混合溶液孵育3min,然后加入上述试纸条的样品垫上,层析20min后,使用荧光读取仪测定T1、T2和C线的荧光强度;分别以所述小分子化合物A和小分子化合物B的标准品溶液的浓度或其对数为横坐标,以所述检测线T1 和所述检测线T2的荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线图,得到标准曲线方程;

[0066] (b2) 待测样本检测

[0067] 将所述待测样本与上述成套荧光金纳米簇偶联抗体探针混合,得到混合液;然后将所述混合溶液孵育3min,然后加入上述试纸条的样品垫上,层析20min后,使用荧光读取仪测定T1、T2和C线的荧光强度;将所述检测线T1和所述检测线T2 的荧光强度代入步骤b1)所得标准曲线方程,计算得到所述待测样本中的小分子化合物A和小分子化合物B的浓度值。

[0068] 上述检测方法是采用竞争法检测样品中的小分子化合物,荧光信号与目标物的浓度成负相关。定性检测是滴加样品后于紫外灯下观察试纸条检测线的显色情况进行定性判断;定量检测是与荧光读取仪联用,将试纸条上检测线和质控线的荧光信号转换为电信号

并输出为具体数值。

[0069] 上述应用或方法中,所述小分子化合物A和所述小分子化合物B均为兽药残留分子;所述小分子化合物A具体为盐酸克伦特罗;所述小分子化合物B具体为莱克多巴胺。

[0070] 本发明提供了一种以Arg-ATT-AuNCs为标记物的免疫层析技术。本发明的有益效果如下:本发明的免疫层析技术可对样品中的两种目标物进行高通量超灵敏快速检测,适用于商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象的快速在线检测和监控。相比于传统的胶体金免疫层析试纸条,本发明试纸条可以获得更高的检测效率和更高的灵敏度。此外,本发明的免疫层析试纸条具有简单方便、价格低廉、检测结果直观等优点。

## 附图说明

[0071] 图1是荧光金纳米簇结构示意图。

[0072] 图2是基于荧光金纳米簇免疫层析试纸条的结构图。

[0073] 图3是基于荧光金纳米簇免疫层析试纸检测结果示意图。

[0074] 图4是同时检测盐酸克伦特罗和莱克多巴胺定量标准曲线。

## 具体实施方式

[0075] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0076] 下述实施例中的EDC和NHSS均为阿拉丁试剂有限公司的产品。

[0077] 实施例一:盐酸克伦特罗和莱克多巴胺荧光金纳米簇免疫层析试纸条的制备

[0078] 一、荧光检测探针的制备

[0079] 1、荧光金纳米簇的制备

[0080] 本发明的荧光金纳米簇(Arg-ATT-AuNCs)是以6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶为配体、精氨酸为刚化剂,通过两步法合成的荧光纳米颗粒,刚化剂精氨酸中的胍基通过氢键与6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶形成“主客识别”效应,精氨酸的羧基暴露在外面,使其易于修饰。荧光金纳米簇的制备方法参见文献:Fabrication of Water-Soluble, Green-Emitting Gold Nanoclusters with a 65% Photoluminescence Quantum Yield via Host-Guest Recognition, Deng H H, Shi X Q, Wang F F, et al. Chemistry of Materials, 2017, 29中的方法。具体步骤如下:

[0081] (1) 用15ml浓度为0.2M的氢氧化钠水溶液将6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶(Alfa Aesar Chemicals Co.Ltd)溶解至终浓度为80mM;然后将其加入到15ml浓度为10 mg/ml的氯金酸溶液(sigma)中,室温下避光反应1~2小时,得到弱发光荧光金纳米簇;再通过超滤除去未反应的小分子,并用超纯水重悬至原体积,得到弱发光荧光金纳米簇体系。

[0082] (2) 称取0.0627g精氨酸(Sigma)加入至10ml离心管中,然后加入9ml超纯水并用氢氧化钠将pH调到10,得到浓度为40mM的精氨酸溶液。

[0083] (3) 取2ml步骤(2)制备的精氨酸溶液加入至18ml步骤(1)合成的弱发光荧光金纳米簇体系中,在37℃环境中避光反应24~26小时,得到浓度约为9.6mg/ml 的超强发光的绿

色荧光金纳米簇(Arg-ATT-AuNCs)溶液。本发明制备的荧光金纳米簇(Arg-ATT-AuNCs)的结构示意图如图1所示。

[0084] 2、链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs的制备

[0085] (1) 将300 $\mu$ l步骤1制备Arg-ATT-AuNCs溶液、3ml浓度为10mM的Tris-HCl (pH8.0) 和100 $\mu$ l浓度为5mg/ml的链霉亲和素溶液(溶剂为水)混匀,得到混合液。

[0086] (2) 分别称取1mg的EDC和1mg的NHSS,并分别用1ml浓度为10mM的 Tris-HCl (pH8.0) 溶解,分别得到EDC溶液和NHSS溶液。

[0087] (3) 取100 $\mu$ l步骤(2)制备的EDC溶液和100 $\mu$ l步骤(2)制备的NHSS溶液加入步骤(1)制备的混合液中,于室温下避光搅拌反应2小时,得到反应后溶液。

[0088] (4) 向步骤(3)制备的反应后溶液中加入50 $\mu$ l质量分数为20%的BSA溶液进行封闭30min;得到封闭后溶液;然后将封闭后溶液用100KDa的超滤管以5000rpm 的速度超滤纯化5min,上清用10mM Tris-HCl (pH8.0) 重悬至1ml,得到链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs溶液,置于4℃保存备用。

[0089] 3、生物素化抗体的制备

[0090] (1) 称取0.084克的碳酸氢钠用10ml水溶解形成浓度为0.1M的碳酸氢钠水溶液,称取1.0mg活泼酯化的生物素(阿拉丁试剂有限公司)用1ml二甲基亚砜溶解形成浓度为1mg/ml的生物素溶液。

[0091] (2) 在1.46ml碳酸氢钠溶液中加入0.1ml的生物素溶液和40 $\mu$ l浓度为30mg/ml 的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液(盐酸克伦特罗单克隆抗体购自北京维德维康生物技术有限公司,产品目录号为CL-1F8-F9),然后在室温下振荡反应2.5小时。反应完成后,用分子截留量为3000Da的透析袋(北京索莱宝科技有限公司)进行纯化,得到浓度为0.682mg/ml的生物素化的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液。

[0092] 在1.46ml碳酸氢钠溶液中加入0.1ml的生物素溶液和40 $\mu$ l浓度为30mg/ml的莱克多巴胺单克隆抗体溶液(莱克多巴胺单克隆抗体购自北京维德维康生物技术有限公司,产品目录号为RACT-18B1),然后在室温下振荡反应2.5小时。反应完成后,用分子截留量为3000Da的透析袋(北京索莱宝科技有限公司)进行纯化,得到浓度为2.574mg/ml的生物素化的莱克多巴胺单克隆抗体溶液。

[0093] 4、荧光检测探针的制备

[0094] 取100 $\mu$ l步骤2制备的链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs溶液,同时加入10 $\mu$ l生物素化的盐酸克伦特罗单克隆抗体溶液和0.5 $\mu$ l生物素化的莱克多巴胺单抗溶液,室温反应30min,得到本发明的荧光检测探针溶液,该溶液中含有链霉亲和素化 Arg-ATT-AuNCs与生物素化盐酸克伦特罗单克隆抗体形成的偶联物及链霉亲和素化Arg-ATT-AuNCs与生物素化莱克多巴胺单克隆抗体形成的偶联物。移取2 $\mu$ l荧光检测探针溶液于96孔板单个孔中并干燥密封保存,检测时用样品复溶。

[0095] 二、检测线和质控线的制备

[0096] 用0.01M的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.0)分别将盐酸克伦特罗人工抗原(盐酸克伦特罗人工抗原是盐酸克伦特罗与BSA载体蛋白偶联得到的偶联物,购自北京维德维康生物技术有限公司,产品目录号为G472-3)、莱克多巴胺人工抗原(莱克多巴胺人工抗原是莱克多巴胺与BSA载体蛋白偶联得到的偶联物,购自北京维德维康生物技术有限公司,产品目录号

为G694) 和羊抗鼠 IgG (购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 产品目录号为 125229) 稀释至浓度分别为 0.6mg/ml、0.2mg/ml 和 0.3mg/ml, 以 0.75 $\mu$ l/cm 的喷量喷涂于硝酸纤维素膜上, 分别作为试纸条的两条检测线 T1 和 T2 以及一条质控线, 45℃ 条件下干燥 2 小时后保存备用。

[0097] 三、样品垫的制备

[0098] 样本垫为经过 0.01~5% (体积分数) Tween-20 处理的 1×30cm 的滤血膜。样本垫具体处理方法如下: 将样品垫 (玻璃纤维素膜) 用含 5% (质量分数) 蔗糖和 0.01~5% (体积分数) Tween-20 的磷酸缓冲液 (PBS, pH7.4) 浸泡湿润, 然后放置 37℃ 烘箱干燥 2h, 并于干燥环境保存备用。

[0099] 四、试纸条的组装

[0100] 将烘干的硝酸纤维素膜、烘干的样品垫和吸水垫依次粘在 PVC 底板 (购自上海金标生物科技有限公司, 产品目录号为 SMNF31-40) 上。样品垫和吸水垫在两端各压住 NC 膜 2mm。组装好后将 PVC 底板切成 4mm 宽的试纸条并放入准备好的试纸条盒中, 装入铝箔袋, 加入干燥剂后, 封口保存。

[0101] 本发明免疫层析试纸条的结构示意图如图 2 所示, 本发明的免疫层析试纸条可以同时检测盐酸克伦特罗和莱克多巴胺。

[0102] 实施例二: 猪尿样品中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的定性和定量检测方法

[0103] 一、定性检测

[0104] 将 100 $\mu$ l 待测样本 (经检测盐酸克伦特罗和莱克多巴胺均为阴性的猪尿样品) 加入含有 3 $\mu$ l 实施例一步骤一中制备的荧光检测探针溶液的微孔中混匀并孵育 3min, 然后将孵育后溶液滴加在试纸条的样本垫上, 十五分钟, 在紫外灯下观察试纸条检测线和质控线的显色情况。

[0105] 若 T1 线不显色, T2 线不显色, C 线显绿色, 则待测样本中含有盐酸克伦特罗和莱克多巴胺;

[0106] 若 T1 线不显色, T2 线显绿色, C 线显绿色, 则待测样本中含有盐酸克伦特罗, 且不含有莱克多巴胺;

[0107] 若 T1 线显绿色, T2 线不显色, C 线显绿色, 则待测样本中不含有盐酸克伦特罗, 且含有莱克多巴胺;

[0108] 若 T1 线显绿色, T2 线显绿色, C 线显绿色, 则待测样本中不含有盐酸克伦特罗和莱克多巴胺。

[0109] 结果表明: 试纸条的两条检测线和质控线都呈现明显绿色荧光条带, 说明待测样本中不含有盐酸克伦特罗和莱克多巴胺。

[0110] 二、定量检测

[0111] 1、标准曲线的绘制

[0112] (1) 在经检测盐酸克伦特罗和莱克多巴胺均为阴性的猪尿样品中, 同时添加盐酸克伦特罗和莱克多巴胺标准品, 分别得到如下含有不同浓度的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺标准品的标准品溶液: 盐酸克伦特罗浓度为 0.0005 $\mu$ g/L 和 莱克多巴胺浓度为 0.0005 $\mu$ g/L 的标准品溶液 1; 盐酸克伦特罗浓度为 0.001 $\mu$ g/L 和 莱克多巴胺浓度为 0.001 $\mu$ g/L 的标准品溶液 2; 盐酸克伦特罗浓度为 0.005 $\mu$ g/L 和 莱克多巴胺浓度为 0.005 $\mu$ g/L 的标准品溶液 3; 盐酸

克伦特罗浓度为0.01 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为0.01 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液4;盐酸克伦特罗浓度为0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液5;盐酸克伦特罗浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液6;盐酸克伦特罗浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液7;盐酸克伦特罗浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液8;盐酸克伦特罗浓度为2.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为2.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液9;盐酸克伦特罗浓度为4.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为4.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液10;盐酸克伦特罗浓度为8.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和莱克多巴胺浓度为8.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准品溶液11。

[0113] (2) 将100 $\mu\text{l}$ 待测样本(标准品溶液1-11)加入含有3 $\mu\text{l}$ 荧光检测探针溶液的微孔中混匀并孵育3min,然后将孵育后溶液滴加在试纸条的样本垫上,十五分钟后,将试纸条用荧光读取仪(ESE-Quant LR3,德国QIAGEN有限公司)对试纸条的检测线和质控线上的荧光信号进行读数,并以目标物浓度对数为横坐标,荧光信号强度为纵坐标绘制标准曲线(图4),得到标准曲线方程。

[0114] 2、待测样本中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺检测

[0115] 将100 $\mu\text{l}$ 待测样本加入含有3 $\mu\text{l}$ 荧光检测探针溶液的微孔中混匀并孵育3min,然后将孵育后溶液滴加在试纸条的样本垫上,十五分钟后,将试纸条用荧光读取仪(ESE-Quant LR3,德国QIAGEN有限公司)对试纸条的检测线和质控线上的荧光信号进行读数,将检测线T1和检测线T2的荧光强度代入步骤1所得标准曲线方程,计算得到待测样本中的盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的浓度值。

[0116] 实施例三、荧光金纳米簇免疫层析法的应用

[0117] 一、待测样本的制备

[0118] 以实施例二中的标准品溶液5、7和8作为待测样本。

[0119] 二、盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的检测

[0120] 将待测样本加入含有3 $\mu\text{l}$ 荧光检测探针溶液的微孔中混匀并孵育3min,然后将孵育后溶液滴加在试纸条的样本垫上,十五分钟后,将试纸条用荧光读取仪(ESE-Quant LR3,德国QIAGEN有限公司)对试纸条的检测线和质控线上的荧光信号进行读数,分别得到T1、T2和C线的荧光强度。将其代入图4的标准曲线进行计算,得到待测样本中盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的含量并计算其回收率和变异系数。回收率(%) = (测量值/添加浓度)  $\times 100\%$ ;变异系数CV = 标准偏差/平均数。

[0121] 结果如表1所示。从图中可以看出:回收率在89.2%-111.4%之间,变异系数小于8.58%,说明本发明荧光金纳米簇免疫层析法的准确度和精确度良好。

[0122] 表1、样本检测结果和回收率

[0123]

添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	盐酸克伦特罗 Clen			莱克多巴胺 RAC		
	测量值( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	回收率(%)	CV (%)	测量值( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	回收率(%)	CV (%)
0.05	0.05	100	8.58	0.053	105.6	1.52
0.5	0.557	111.4	3.41	0.467	93.3	3.39
1.0	0.892	89.2	3.46	0.972	97.2	7.71

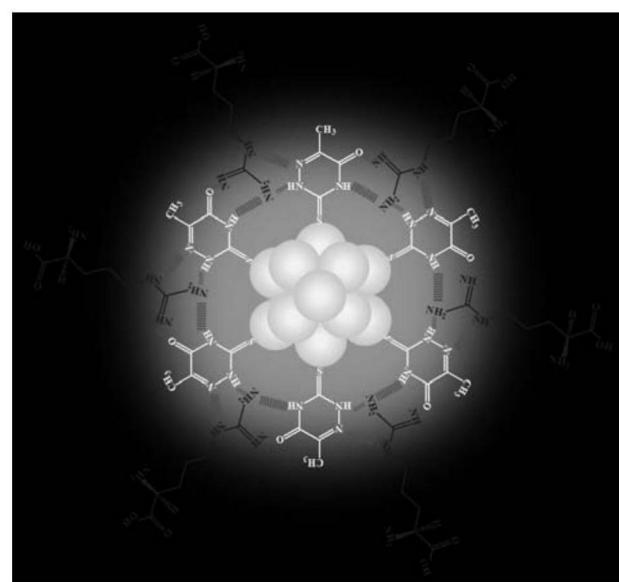


图1

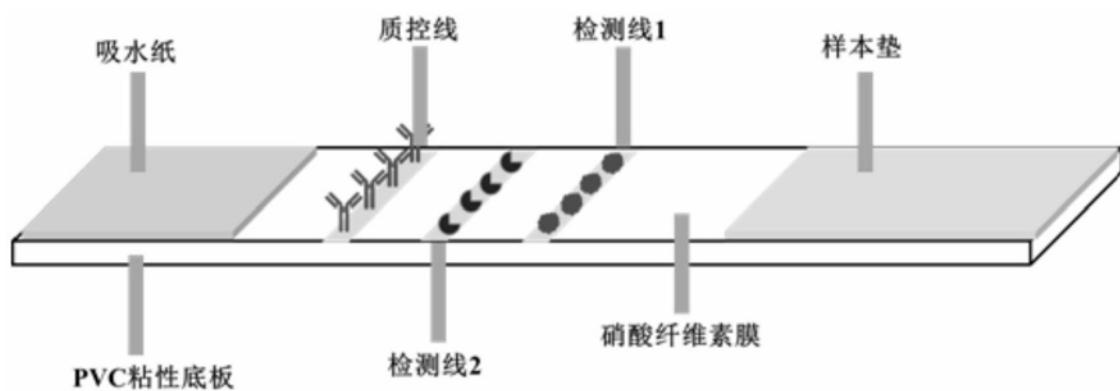


图2

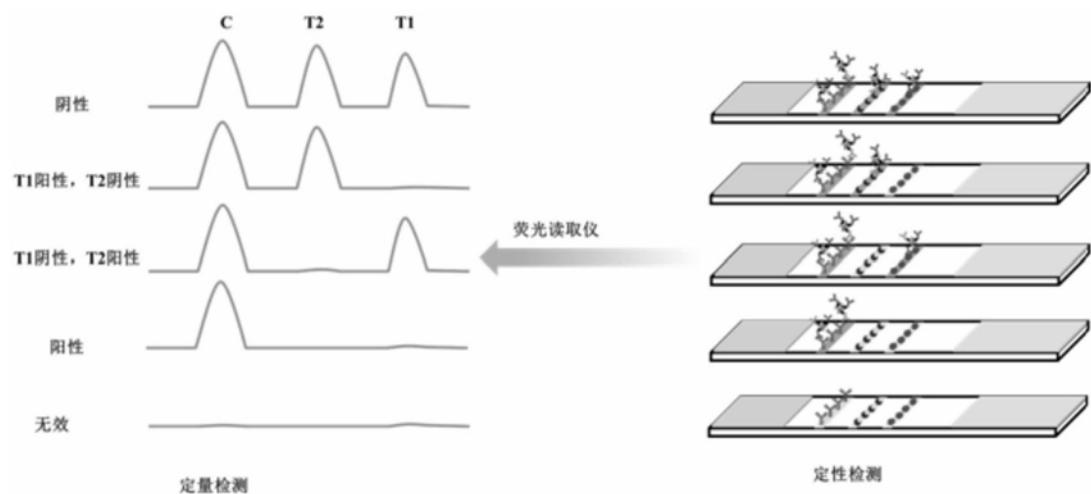


图3

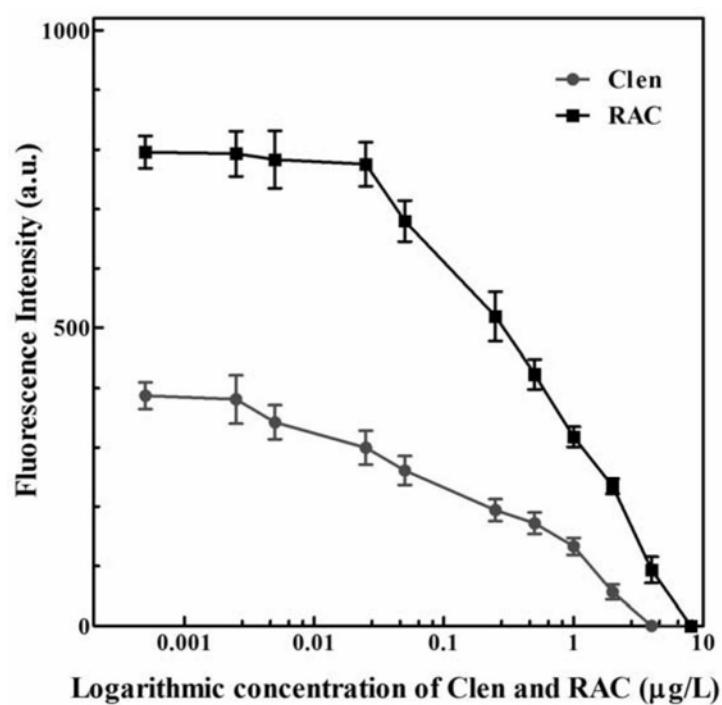


图4

专利名称(译)	一种高通量超灵敏荧光金纳米簇免疫层析试纸条及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110873793A</a>	公开(公告)日	2020-03-10
申请号	CN201810994085.8	申请日	2018-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	江海洋 沈建忠 王战辉 温凯 彭涛		
发明人	江海洋 沈建忠 王战辉 温凯 彭涛 郑丕苗		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	关畅 陈晓庆		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种高通量超灵敏荧光金纳米簇免疫层析试纸条及其应用。该荧光金纳米簇免疫层析试纸条包括样本垫、硝酸纤维素膜、吸水纸以及PVC粘性底板。所述硝酸纤维素膜上包被有两条目标物检测线和一条质控线。本发明还公开了成套荧光金纳米簇偶联抗体探针，是由链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物A的抗体和链霉亲和素化的荧光金纳米簇标记的生物素化的抗小分子化合物B的抗体组成。所述荧光金纳米簇是以6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶和精氨酸为配体的超强荧光的绿色荧光金纳米簇。本发明优点是方法简单快速、结果直观准确、可定量/半定量检测，能够实现兽药残留的高通量超灵敏在线检测。

