



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108072756 A

(43)申请公布日 2018.05.25

(21)申请号 201710860818.4

(22)申请日 2017.09.21

(71)申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路1038号

(72)发明人 生威 刘越 王硕 张燕 刘冰

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事务所(普通合伙) 12219

代理人 陈松

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

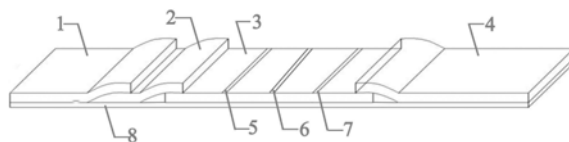
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条,包括样品垫1、玻璃纤维素膜2、硝酸纤维素膜3、吸水纸4和PVC背板8,其特征在于,在PVC背板上按顺序依次粘附有样品垫1、玻璃纤维素膜2、硝酸纤维素膜3、吸水纸4;所述的硝酸纤维素膜3上分别包被有双酚A抗原和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的检测线5、邻苯二甲酸二甲酯抗原和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的检测线6和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的质控线7。本发明还公开了这种试纸条的制备方法。发明具有以下突出的优点:1、特异性高,灵敏度好;2、检测成本低;3、操作简便;4、可同时检测两种水体污染物邻苯二甲酸二甲酯和双酚A,为食品中潜在多残留危害物的检测提供了新思路。



1. 一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条,包括样品垫、玻璃纤维素膜、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硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、样品垫、吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上分别包被有邻苯二甲酸二甲酯抗原、双酚A抗原和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的检测线T₁、T₂和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的质控线C,线间隔距离为5mm。

2. 根据权利要求1所述的一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条,其特征在于,用于同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A。

3. 权利要求1所述的一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 含邻苯二甲酸二甲酯抗体(双酚A)血清的纯化,得到被检物的多克隆抗体;

(2) 制备两种被检物抗原;

(3) 采用活化酯法制备量子点-鸡卵白蛋白偶联物;

(4) 制备两种胶体金-抗体标记物

(5) 取适量两种步骤(4)制备的被检物胶体金-抗体标记物,添加于样品溶液中;

(6) 取适量步骤(3)制备的被检物量子点-鸡卵白蛋白标记物与步骤(2)制备的被检物抗原混合包被在硝酸纤维素膜上构成检测线,取适量步骤(3)制备的被检物量子点-鸡卵白蛋白标记物包被于硝酸纤维素膜上构成质控线;

(7) 在PVC背板上按顺序依次粘附硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、样品垫、吸水垫,得到所述的多残留量子点荧光淬灭免疫层析试纸条。

一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及一种同时快速检测桶装水中邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的方法,特别是一种检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的多残留量子点荧光淬灭免疫层析试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯主要用在塑料生产中做增塑剂,加入可以提高塑料产品的可塑性和柔软性,降低脆性,例如,生产聚乙烯塑料(PVC)时,不加入邻苯二甲酸酯可得到硬质塑料,适当加入此种塑化剂便可得到软质塑料,柔软程度与加入塑化剂的比例成正比。而它的另一个用途是生产纺织品,在纺织品染色时,可作为染色载体。高温条件下,邻苯二甲酸分子可将染料和水分子同时带入纺织品纤维内,增加扩散力,提高染色效果。邻苯二甲酸酯可使分散染料在常压下染色,以便涤/毛混纺织物与分散/酸性染料同浴染色,美国专利(3632293)中也对邻苯二甲酸酯在染料上染过程中的作用有详细说明。邻苯二甲酸酯类物质也经常用于建筑材料、食品包装等产品的生产中,此外,润滑油、溶剂和清洁剂的生产也常用到。而由于邻苯二甲酸酯类化合物的大量应用,这类物质已经大量进入环境中,湖水和土壤中尤为常见。而在含有这类物质的食品包装材料,由于生活中的食品加热等其他操作会导致邻苯二甲酸酯进入到食品中,给人体带来健康威胁。

[0003] 双酚A是一种生产聚碳酸酯、环氧树脂、聚砜以及改性酚醛树脂等的重要中间体。它是一种典型的内分泌干扰物,是在环境中发现的一种异雌激素,双酚A能由食物链进入生物体内并与雌激素受体相互作用,从而影响生物的生殖、免疫神经等功能以及生物体的内分泌系统。由于双酚A的应用范围有逐渐拓宽的趋势,因此将随着生产及使用过程逐渐进入食品和环境危害人类的健康,双酚A对生态环境和人类健康的潜在危害是不容忽视的。

[0004] 量子点(Quantum dots, QDs),又称为半导体纳米晶,主要由II~VI族或者III~V族元素组成,如碲化镉(CdTe)、硒化镉(CdSe)等。与传统荧光材料相比,QDs的优点有:具有量子效应和良好的发光性;具有较宽的激发波长和较窄的发射波长;稳定性好;具有良好的生物兼容性;荧光寿命较长。

[0005] 量子点荧光淬灭免疫层系试纸条是基于荧光供体(量子点)与荧光受体(胶体金)的能量共振转移(FRET)实现的。即当荧光供体(量子点)的发射光谱与荧光受体(胶体金)的吸收光谱有一定重叠,当这两个荧光基团间的距离合适时(一般小于 100\AA),就可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象。量子点荧光淬灭免疫层析技术是在免疫分析技术的基础上,利用荧光量子点作荧光供体与包被抗原混合,固定于NC膜上,胶体金作荧光受体与抗体结合,当抗体与抗原特异性结合时,胶体金就标记于待测抗原上,在紫外灯的照射下与量子点发生能量共振转移。其中,质控线(C线)颜色的有无决定着试纸条的有效性,而检测线(T线)的有无则表示着目标物的有无。该技术操作简单快速、结果容易判定、安全

无污染,具有广泛的应用 前景。

[0006] 目前已经有一些针对食品中塑化剂的单一残留检测方法的报道,但是,通常食物样品可能会受到多种潜在有害化学物质残留污染,因此,需要设计 一些多残留检测的方法。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明创造旨在提出一种同时检测桶装水中邻苯二甲酸二甲 酯和双酚A的多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条。

[0008] 为达到上述目的,本发明创造的技术方案是这样实现的:

[0009] 一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的多残留量子点荧光猝灭免 疫层析试纸条,包括样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC 背板,在PVC背板上按顺序依次粘附有硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、样 品垫、吸水垫;所述的硝酸纤维素膜上分别包被有邻苯二甲酸二甲酯抗原和 量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的检测线5、双酚A抗原和量子点-鸡卵白蛋 白结合物构成的检测线6以及量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的质控线7, 两 条线间隔距离为5mm。

[0010] 本发明还公开了上述量子点荧光猝灭免疫层析试纸条的制备方法,包括 如下步骤:

[0011] 1. 邻苯二甲酸二甲酯血清(双酚A血清)的纯化

[0012] 抗体的纯化采用亲和层析原理纯化抗血清。Protein A从金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)中分离出来,可以特异性与抗体蛋白IgG重链的 Fc片段结合。当把抗血清加入到层析柱后,Protein A与IgG特异性结合, 固定在填料上,通过淋洗洗掉其他杂质,换洗脱液再次洗脱,就可得到目的 蛋白。纯化的步骤如下:

[0013] (1) 提前配置好所用溶液,并将盖子微微拧松,超声20分钟,以去除 溶液中的气泡,以防将气泡进入纯化柱,影响纯化效果。

[0014] (2) 平衡纯化柱:先用超纯水冲洗管路15min,保证整个管路内无杂 质,再用pH 7.4的结合缓冲液(Binding buffer)冲洗管路20min,将流速 设为5mL/min。将纯化柱从冰箱中取出,倒掉三分之一乙醇溶液,与蛋白纯 化仪连接,继续用pH 7.4的Binding buffer冲洗柱子,流速设定为1mL/min。观察软件中紫外和电导两条基线水平,并保持一段时间。

[0015] (3) 上样:将抗血清取出并恢复到室温,与Binding buffer等体积混合 稀释后,过0.45 μ m水膜以去除杂质,上样。上样时流速不宜过快,一般设 置为0.5mL/min。随着抗血清进入到凝胶中,抗体蛋白会结合到柱子上,而 其他蛋白不结合,可用Binding buffer冲洗掉,此时,紫外和电导会出现杂 蛋白峰,待两条基线再次水平后,保持一段时间。

[0016] (4) 洗脱:用pH 2.7的洗脱液缓冲液(Elution buffer,现配现用)冲 洗柱子,将凝胶上的目的蛋白洗脱下来,流速0.5mL/min。

[0017] (5) 收集目的蛋白:加入Elution buffer后,观察紫外电导图的变化, 当基线有向上走的趋势时收集液体,每管收集1mL,直至紫外电导图的曲 线再次水平。将每管液体均用紫外-可见分光光度计在280nm测定吸光度 值,保留吸光度值>0.2的纯化抗体,将所有抗体混合,用0.1mol/L的Tris 调节抗体pH至7.0。

[0018] (6) 处理纯化柱:用0.1mol/L醋酸冲洗柱子2min,流速设定为2 mL/min,再用

Binding buffer冲洗柱子半小时,用pH试纸测定流出缓冲液 的pH值,当pH试纸显示中性后,用20%乙醇溶液冲洗柱子20min,取下 柱子,将纯化装置关闭,取下的柱子需用20%乙醇溶液填满,4℃保存。

[0019] 将纯化之后的多克隆抗体在1×PB溶液中4℃透析3天,取出后4℃储存 备用。

[0020] 2. 被检物抗原(DMP-OVA)的制备

[0021] 包被抗原采用戊二醛法(GDA)将半抗原和卵清白蛋白(OVA)偶联。具体方法如下:

[0022] (1)取10mg OVA于小玻璃瓶中,用1mL PBS(pH 7.4)溶液溶解。

[0023] (2)另取2.78mg邻苯二甲酸二甲酯半抗原溶于100μL DMF中,待完 全溶解后,置于磁力搅拌器上,以5μL/min的速度将半抗原溶液加入到蛋白 溶液中,加入溶液时分多点加入以混合均匀。

[0024] (3)将10μL戊二醛与10μL PBS混合,加入到上述反应体系中,加 入时间不超过2min,室温避光反应1h后,至于4℃搅拌反应过夜。

[0025] (4)用PB透析72h除去多余的戊二醛,透析完全后,每管1mL分装 置于4℃冰箱中保存,每毫升中加10%叠氮钠5μL,4℃保存。

[0026] 3. 被检物抗原(BHPVA-OVA)的制备

[0027] 称取6.36mg BHPVA,加入200μL DMSO使之溶解,在搅拌状态下加 入3.20mg NHS, 4.31mg EDC,室温避光反应2h,得溶液A。称取20.00mg OVA溶解于2ml 0.1mol/L NaHCO₃(用HCl调pH到7)中,得溶液B。将 活化酯溶液冰浴条件下逐滴加入到蛋白溶液中,4℃条件下搅 拌反应过夜。用pH 7.4的PB缓冲液4℃条件下透析(透析袋规格:截留分子量8000-14000Da)3天,每天换3-4次透析液。在紫外线下测定结合情况,计算浓 度为7.50mg/ml,分 装并4℃保存,备用。

[0028] 4. 备量子点-鸡卵白蛋白偶联物的制备:

[0029] 使用活化酯法制备量子点-鸡卵白蛋白(QDs-OVA)偶联物。

[0030] (1)偶联反应。取25μL量子点于离心管中,加入0.3mg鸡卵白蛋白和 11.5μL EDC溶 液(10mg/ml),混匀,并用硼酸盐缓冲液将溶液体积补充至 200μL。然后用铝箔纸包裹安道 管,于摇床避光震荡反应3h。

[0031] (2)离心纯化。将反应液于4℃条件下,10000rpm离心3min,以除去 标记过程中形 成的聚沉物;将上清液转移到超滤膜中,于4℃条件下,8000 rpm离心3min,去除溶液中的盐 离子;最后将滤膜倒置在另一个离心管中, 4℃条件下,8000rpm离心3min,收集滤膜内的溶 液。4℃避光保存备用。

[0032] 5. 胶体金-邻苯二甲酸二甲酯抗体(AuNPs-DMP-Ab)标记物的制备

[0033] (1)准确移取1mL胶体金溶液置于进口安道管中,加入5μL 0.2mol/L K₂CO₃溶液,轻 摇安道管混匀,调节pH值至最佳值。

[0034] (2)将20μL 2.4mg/mL的邻苯二甲酸二甲酯抗体(DMP-Ab)加入到 上述溶液中混合 均匀,放置在4℃冰箱中1h。

[0035] (3)向其中加入20μL浓度为20%的BSA溶液以稳定金标抗体,再 加入10μL 20%的 PEG 20000溶液,封闭胶体金表面未与抗体连接的其他 位点,室温下静置30min。

[0036] (4)将安道管配平,4℃2000rpm条件下离心15min,未连接上抗体 的金粒子团聚, 形成沉淀,吸取上清液转移至另一安道管中。

- [0037] (5) 再次以4℃,10000rpm的条件离心30min,这时金标抗体形成沉淀。
- [0038] (6) 吸走上清液,保存沉淀,用金标工作液重悬。
- [0039] 6. 胶体金-双酚A抗体 (AuNPs-BPA-Ab) 标记物的制备
- [0040] (1) 准确移取1mL胶体金溶液置于进口安道管中,加入15μL 0.2mol/L K₂CO₃溶液,轻摇安道管混匀,调节pH值至最佳值。
- [0041] (2) 将25μL 3.6mg/mL的双酚A抗体 (BPA-Ab) 加入到上述溶液中混合均匀,放置在4℃冰箱中1h。
- [0042] (3) 向其中加入20μL浓度为20%的BSA溶液以稳定金标抗体,再加入10μL 20%的PEG 20000溶液,封闭胶体金表面未与抗体连接的其他位点,室温下静置30min。
- [0043] (4) 将安道管配平,4℃2000rpm条件下离心15min,未连接上抗体的金粒子团聚,形成沉淀,吸取上清液转移至另一安道管中。
- [0044] (5) 再次以4℃,10000rpm的条件离心30min,这时金标抗体形成沉淀。
- [0045] (6) 吸走上清液,保存沉淀,用金标工作液重悬。
- [0046] 7. 硝酸纤维素膜的包被
- [0047] 用上海金标的双维平面划膜仪将步骤3制备的DMP-OVA用PBS溶液稀释6倍后与用PBS溶液稀释5.7倍后的QDs-OVA标记物包被于硝酸纤维素膜3上作为检测线5,包被量为0.5μL/cm;用上海金标的双维平面划膜仪将步骤4制备的BPA-OVA用PBS溶液稀释4倍后与用PBS溶液稀释5.7倍后的QDs-OVA标记物包被于硝酸纤维素膜3上作为检测线6,包被量为0.5μL/cm;将用PBS溶液稀释6倍后的QDs-OVA包被于硝酸纤维素膜3上作为质控线7,包被量为0.5μL/cm,37℃烘干,封装备用。
- [0048] 8. 取15μL步骤5制备的AuNPs-DMP-Ab标记物和9μL步骤6制备的AuNPs-BPA-Ab标记物,添加于样品溶液中;
- [0049] 9. 在PVC背板上按顺序依次粘附硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、样品垫、吸水垫,得到所述的邻苯二甲酸二甲酯和双酚A多残留量子点荧光猝灭免疫层析试纸条。
- [0050] 上述材料中,水溶性量子点购自武汉珈源量子点技术开发有限公司,样品垫和硝酸纤维素膜购自美国Millipore公司,吸水垫和PVC背板购自上海金标生物科技公司。
- [0051] 本发明纯化了被检物抗体血清,得到了被检物多克隆抗体,备用。制备DMP-OVA (BHPVA-OVA) 混合QDs-OVA标记物为检测线的包被抗原,采用QDs-OVA标记物质控线。利用竞争法来检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A,根据检测线条带的深浅判断待测样品中是否含有两种目标物。
- [0052] 与现有国内外检测塑化剂的方法相比,本发明具有以下突出的优点:1、本发明的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条是利用抗原抗体的特异性反应实现的,因此特异性高,灵敏度好。2、本发明的检测试纸条检测时间快速且不需要任何特殊仪器及设备,检测成本低。3、本发明的检测试纸条操作简便,不需由专业人员操作。4、可同时检测两种水体污染物邻苯二甲酸二甲酯和双酚A,为食品中潜在多残留危害物的检测提供了新思路。

附图说明

[0053] 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：

[0054] 图1为本发明检测试纸条的组装示意图。

[0055] 图2为邻苯二甲酸二甲酯和双酚A检测限的确定(邻苯二甲酸二甲酯(T₁) 的浓度从左到右分别为0,100,0,100,500 μ g/L,双酚A(T₂) 的浓度从左到右分别为0,0,50,50,500 μ g/L)

图3为桶装水样品中添加邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的样品检测结果。邻苯二甲酸二甲酯(T₁) 的浓度从左到右分别为0,100,0,100,500 μ g/L,双酚A (T₂) 的浓度从左到右分别为0,0,50,50,500 μ g/L。

[0056]

[0057]

[0058] 附图1标记说明：

[0059] 1、样品垫

[0060] 2、玻璃纤维素膜

[0061] 3、硝酸纤维素膜

[0062] 4、吸水纸

[0063] 5、检测线T₁

[0064] 6、检测线T₂

[0065] 7、质控线

[0066] 8、PVC背板

具体实施方式

[0067] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明创造中的实施例及实施例中 的特征可以相互组合。

[0068] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0069] 实施例1(制备实施例)

[0070] (一)邻苯二甲酸二甲酯血清(双酚A血清)的纯化

[0071] (1)提前配置好所用溶液,并将盖子微微拧松,超声20分钟,以去除 溶液中的气泡,以防将气泡进入纯化柱,影响纯化效果。

[0072] (2)平衡纯化柱:先用超纯水冲洗管路15min,保证整个管路内无杂 质,再用pH 7.4的结合缓冲液(Binding buffer)冲洗管路20min,将流速 设为5mL/min。将纯化柱从冰箱中取出,倒掉三分之一乙醇溶液,与蛋白纯 化仪连接,继续用pH 7.4的Binding buffer冲洗柱子,流速设定为1mL/min。观察软件中紫外和电导两条基线水平,并保持一段时间。

[0073] (3)上样:将抗血清取出并恢复到室温,与Binding buffer等体积混合 稀释后,过0.45 μ m水膜以去除杂质,上样。上样时流速不宜过快,一般设 置为0.5mL/min。随着抗血清进入到凝胶中,抗体蛋白会结合到柱子上,而 其他蛋白不结合,可用Binding buffer冲洗掉,此时,紫外和电导会出现杂 蛋白峰,待两条基线再次水平后,保持一段时间。

[0074] (4)洗脱:用pH 2.7的洗脱液缓冲液(Elution buffer,现配现用)冲 洗柱子,将凝胶上的目的蛋白洗脱下来,流速0.5mL/min。

[0075] (5)收集目的蛋白:加入Elution buffer后,观察紫外电导图的变化,当基线有向

上走的趋势时收集液体,每管收集1mL,直至紫外电导图的曲线再次水平。将每管液体均用紫外-可见分光光度计在280nm测定吸光度值,保留吸光度值>0.2的纯化抗体,将所有抗体混合,用0.1mol/L的Tris 调节抗体pH至7.0。

[0076] (6) 处理纯化柱:用0.1mol/L醋酸冲洗柱子2min,流速设定为2 mL/min,再用 Binding buffer冲洗柱子半小时,用pH试纸测定流出缓冲液的pH值,当pH试纸显示中性后,用20%乙醇溶液冲洗柱子20min,取下柱子,将纯化装置关闭,取下的柱子需用20%乙醇溶液填满,4℃保存。

[0077] (7) 将纯化之后的多克隆抗体在1×PB溶液中4℃透析3天,取出后4℃ 储存备用。

[0078] (二) 被检物抗原(DMP-OVA)的制备

[0079] 包被抗原采用戊二醛法(GDA)将半抗原和卵清白蛋白(OVA)偶联。具体方法如下:

[0080] (1) 取10mg OVA于小玻璃瓶中,用1mL PBS(pH 7.4)溶液溶解。

[0081] (2) 另取2.78mg邻苯二甲酸二甲酯半抗原溶于100μL DMF中,待完全溶解后,置于磁力搅拌器上,以5μL/min的速度将半抗原溶液加入到蛋白溶液中,加入溶液时分多点加入以混合均匀。

[0082] (3) 将10μL戊二醛与10μL PBS混合,加入到上述反应体系中,加入时间不超过2min,室温避光反应1h后,至于4℃搅拌反应过夜。

[0083] (4) 用PB透析72h除去多余的戊二醛,透析完全后,每管1mL分装 置于4℃冰箱中保存,每毫升中加10%叠氮钠5μL,4℃保存。

[0084] (三) 被检物抗原(BHPVA-OVA)的制备

[0085] 称取6.36mg BHPVA,加入200μL DMSO使之溶解,在搅拌状态下加入3.20mg NHS, 4.31mg EDC,室温避光反应2h,得溶液A。称取20.00mg OVA溶解于2ml 0.1mol/L NaHCO₃(用HCl调pH到7)中,得溶液B。将活化酯溶液冰浴条件下逐滴加入到蛋白溶液中,4℃条件下搅拌反应过夜。用pH 7.4的PB缓冲液4℃条件下透析(透析袋规格:截留分子量8000-14000Da)3天,每天换3-4次透析液。在紫外线下测定结合情况,计算浓度为7.50mg/ml,分装并4℃保存,备用。

[0086] 利用抗原与量子点-鸡卵白蛋白QDs-OVA混合,包被硝酸纤维素膜上的检测线。

[0087] 实施例2(制备实施例)

[0088] 多残留量子点荧光淬灭免疫层析试纸条的组装及制备方法

[0089] 1、试纸条组装:

[0090] 本发明的试纸条组成如下:样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背板,在PVC背板上按顺序依次粘附有硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、样品垫、吸水垫;所述的硝酸纤维素膜3上分别包被有抗原与量子点-鸡卵白蛋白QDs-OVA混合物构成的检测线5、6和量子点-鸡卵白蛋白 QDs-OVA构成的质控线7。

[0091] 2、各量子点-鸡卵白蛋白偶联物的制备:

[0092] 使用活化酯法制备量子点-鸡卵白蛋白(QDs-OVA)偶联物。

[0093] (1) 偶联反应。取25μL量子点于离心管中,加入0.3mg鸡卵白蛋白和 11.5μL EDC溶液(10mg/ml),混匀,并用硼酸盐缓冲液将溶液体积补充至 200μL。然后用铝箔纸包裹安道管,于摇床避光震荡反应3h。

[0094] (2) 离心纯化。将反应液于4℃条件下,10000rpm离心3min,以除去 标记过程中形

成的聚沉物;将上清液转移到滤膜中,于4℃条件下,8000rpm 离心3min,去除溶液中的盐离子;最后将滤膜倒置在另一个离心管中,4℃ 条件下,8000rpm离心3min,收集滤膜内的溶液4℃保存备用。

[0095] 3、胶体金-邻苯二甲酸二甲酯抗体(AuNPs-DMP-Ab)标记物的制备

[0096] (1)准确移取1mL胶体金溶液置于进口安道管中,加入5μL 0.2mol/L K₂CO₃溶液,轻摇安道管混匀,调节pH值至最佳值。

[0097] (2)将20μL 2.4mg/mL的苯二甲酸二甲酯抗体(DMP-Ab)加入到上述溶液中混合均匀,放置在4℃冰箱中1h。

[0098] (3)向其中加入20μL浓度为20%的BSA溶液以稳定金标抗体,再加入10μL 20%的PEG 20000溶液,封闭胶体金表面未与抗体连接的其他位点,室温下静置30min。

[0099] (4)将安道管配平,4℃2000rpm条件下离心15min,未连接上抗体的金粒子团聚,形成沉淀,吸取上清液转移至另一安道管中。

[0100] (5)再次以4℃,10000rpm的条件离心30min,这时金标抗体形成沉淀。

[0101] (6)吸走上清液,保存沉淀,用金标工作液重悬。

[0102] 4、胶体金-双酚A抗体(AuNPs-BPA-Ab)标记物的制备

[0103] (1)准确移取1mL胶体金溶液置于进口安道管中,加入15μL 0.2mol/L K₂CO₃溶液,轻摇安道管混匀,调节pH值至最佳值。

[0104] (2)将25μL 3.6mg/mL的双酚A抗体(BPA-Ab)加入到上述溶液中混合均匀,放置在4℃冰箱中1h。

[0105] (3)向其中加入20μL浓度为20%的BSA溶液以稳定金标抗体,再加入10μL 20%的PEG 20000溶液,封闭胶体金表面未与抗体连接的其他位点,室温下静置30min。

[0106] (4)将安道管配平,4℃2000rpm条件下离心15min,未连接上抗体的金粒子团聚,形成沉淀,吸取上清液转移至另一安道管中。

[0107] (5)再次以4℃,10000rpm的条件离心30min,这时金标抗体形成沉淀。

[0108] (6)吸走上清液,保存沉淀,用金标工作液重悬。

[0109] 5、硝酸纤维素膜的包被

[0110] 用上海金标的双维平面划膜仪将步骤3制备的DMP-OVA用PBS溶液稀释6倍后与用PBS溶液稀释5.7倍后的QDs-OVA标记物包被于硝酸纤维素膜3上作为检测线5,包被量为0.5μL/cm;用上海金标的双维平面划膜仪将步骤4制备的BPA-OVA用PBS溶液稀释4倍后与用PBS溶液稀释5.7倍后的QDs-OVA标记物包被于硝酸纤维素膜3上作为检测线6,包被量为0.5μL/cm;将用PBS溶液稀释6倍后的QDs-OVA包被于硝酸纤维素膜3上作为质控线7,包被量为0.5μL/cm,37℃烘干,封装备用。

[0111] 6、试纸条的组装

[0112] 将硝酸纤维素膜3、玻璃纤维素膜2、样品垫1、吸水垫4按图1所示的顺序依次粘附在PVC板8上,切成3.7mm宽的小条,真空封装。

[0113] 实施例3(应用实施例)

[0114] 1、量子点标记免疫层析试纸条使用方法

[0115] 样品的预处理

[0116] 样品无需前处理,可直接用桶装水配制0.1M的PBS缓冲液直接上样。

[0117] 2、检测步骤

[0118] 用移液枪吸取100 μ L待检样品提取液于安道管中,并加入15 μ L AuNPs-DMP-Ab和9 μ L AuNPs-BPA-Ab,混匀后,滴加到试纸条的加样孔里,15分钟后观察结果。

[0119] 3、结果判定

[0120] 若待测样品试纸条检测线荧光消失,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荧光浅于质控线颜色或与质控线颜色一致,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,质控线均显绿色荧光条带,若质控线绿色荧光条带消失,则试纸条检测失效。

[0121] 实施例4(应用实施例)

[0122] 本发明的应用效果举例

[0123] 本实施例中所指的量子点荧光猝灭免疫层析试纸条检测方法参照实施例3所述的操作步骤,其检测结果如下。

[0124] 1、灵敏度试验

[0125] 如图2所示,按实施例3所述方法进行试验。当邻苯二甲酸二甲酯标准品浓度为100 μ g/L时,试纸条检测线出现荧光条带,显色结果与质控线颜色目测比较差别较小;当邻苯二甲酸二甲酯标准品浓度继续增大,检测线逐渐变亮。因此确定方法的目视检测限为100 μ g/L。

[0126] 当双酚A标准品浓度为50 μ g/L时,试纸条检测线出现荧光条带,显色结果与质控线颜色目测比较差别较小;当邻苯二甲酸二甲酯标准品浓度继续增大,检测线逐渐变亮。因此确定方法的目视检测限为50 μ g/L。

[0127] 2、加标样品的检测

[0128] 如图3所示,向样品中添加邻苯二甲酸二甲酯和双酚A标准品,样品中邻苯二甲酸二甲酯(T_1)的浓度从左到右分别为0,100,0,100,500 μ g/L,双酚A(T_2)的浓度从左到右分别为0,0,50,50,500 μ g/L,按实施例3所述方法进行实验,检测结果如图3,邻苯二甲酸二甲酯的检测限为100 μ g/L,双酚A的检测限为50 μ g/L。

[0129] 实验表明本发明的试纸条准确性好、灵敏度高,而且样品前处理方法简单,整个检测过程不超过20min,适用于大量样品的快速筛选,可作为邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的同时快速多残留检测的有效筛检手段。

[0130] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,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。

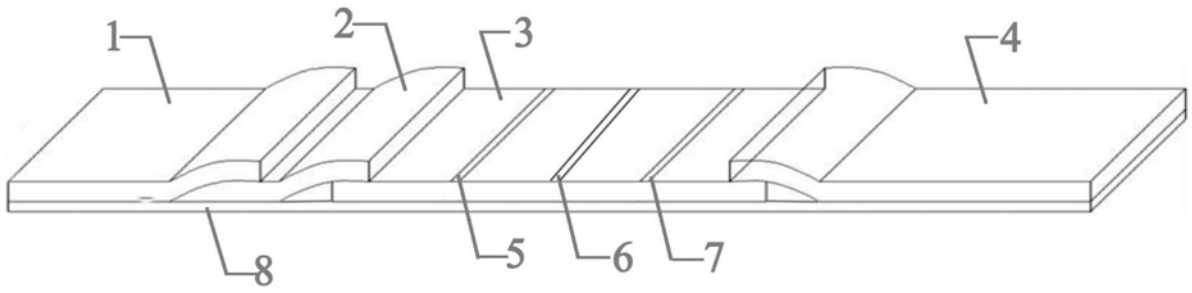


图1

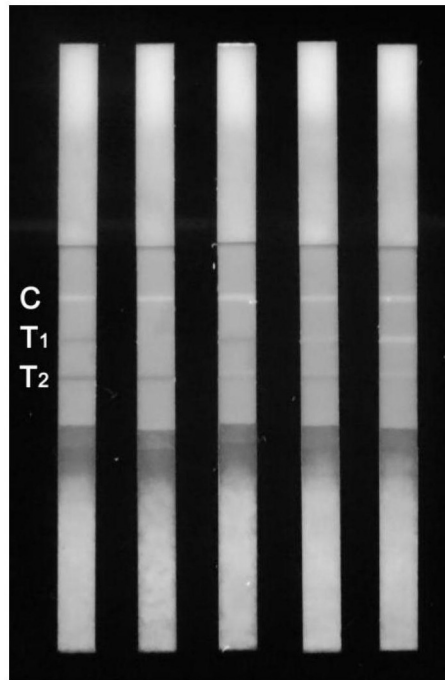


图2

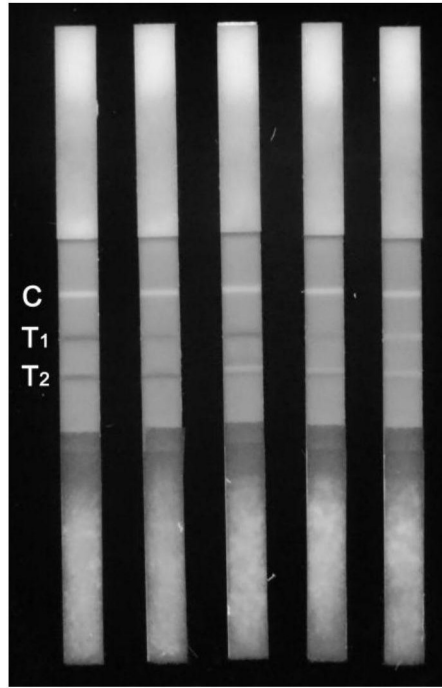


图3

专利名称(译)	一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条		
公开(公告)号	CN108072756A	公开(公告)日	2018-05-25
申请号	CN2017110860818.4	申请日	2017-09-21
[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	生威 刘越 王硕 张燕 刘冰		
发明人	生威 刘越 王硕 张燕 刘冰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6428 G01N2021/6432		
代理人(译)	陈松		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种同时检测邻苯二甲酸二甲酯和双酚A的量子点荧光淬灭层析试纸条，包括样品垫1、玻璃纤维素膜2、硝酸纤维素膜3、吸水纸4和PVC背板8，其特征在于，在PVC背板上按顺序依次粘附有样品垫1、玻璃纤维素膜2、硝酸纤维素膜3、吸水纸4；所述的硝酸纤维素膜3上分别包被有双酚A抗原和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的检测线5、邻苯二甲酸二甲酯抗原和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的检测线6和量子点-鸡卵白蛋白结合物构成的质控线7。本发明还公开了这种试纸条的制备方法。发明具有以下突出的优点：1、特异性高，灵敏度好；2、检测成本低；3、操作简便；4、可同时检测两种水体污染物邻苯二甲酸二甲酯和双酚A，为食品中潜在多残留危害物的检测提供了新思路。

