



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109633144 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201811631563.5

(22)申请日 2018.12.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109633144 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(73)专利权人 南昌大学
地址 330000 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 赖卫华 熊勇华 魏华 陈媛
章钢刚 许恒毅 喻志标 彭娟

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司 11246

代理人 胡群

(51)Int.Cl.
G01N 33/533(2006.01)
G01N 33/553(2006.01)

(56)对比文件

CN 104101581 A,2014.10.15,
CN 106645686 A,2017.05.10,
CN 108918860 A,2018.11.30,
CN 105968377 A,2016.09.28,
CN 106459095 A,2017.02.22,
US 2013266953 A1,2013.10.10,
US 2013089889 A1,2013.04.11,
Wei Z et al.,.Rigidifying fluorescent linkers by metal-organic framework formation for fluorescence blue shift and quantum yield enhancement.《J Am Chem Soc.》.2014,第136卷(第23期),
唐本忠 等.聚集诱导发光.《科学》.2017,第69卷(第4期),
胡蓉 等.聚集诱导发光聚合物.《高分子学报》.2018,(第2期),

审查员 杨玉路

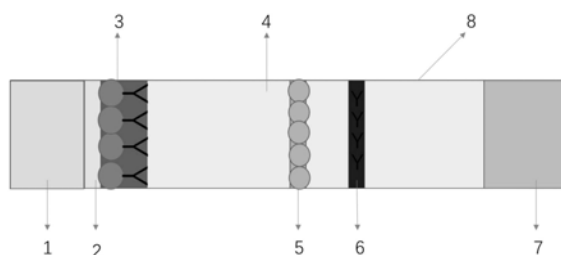
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,在底板上依次搭接粘贴滤纸、样本垫、AIEFM复合物玻璃纤维垫、喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水纸,制成荧光免疫层析试纸条,用于定量检测样本中的待测物浓度,制得的试纸条具有检测灵敏度高的特点。



1. 一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,包括底板,以及在底板上依次地搭接粘贴的滤纸,样本垫,玻璃纤维垫,硝酸纤维素膜和吸水纸,其特征在于:所述的玻璃纤维垫上喷涂有聚集诱导发光荧光微球标记的抗体复合物,该玻璃纤维垫的制备方法包括如下步骤:

(1) 聚集诱导发光荧光微球的制备:将四联苯乙烯酸四甲酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚马来酸酐十八醇酯溶于三氯甲烷溶剂,四联苯乙烯酸四甲酯溶于三氯甲烷后的浓度为10~100mg/mL,PMMA、PMAO溶于三氯甲烷后的浓度均为10~500mg/mL,之后用质量浓度为0.1~10%的十二烷基硫酸钠溶液作为分散剂分散,在冰浴条件下,将溶液超声制成微乳,将该微乳除去三氯甲烷,离心取沉淀物,清洗沉淀物复溶于缓冲溶液中,即制得聚集诱导发光荧光微球;

(2) 聚集诱导发光荧光微球标记抗体的制备:向制得的聚集诱导发光荧光微球中加入待标记抗体,再加入EDC,混匀后,4℃反应过夜,之后,加入封闭剂,室温反应2h,离心取沉淀,得到的沉淀复溶,制成聚集诱导发光荧光微球复合物;

(3) 聚集诱导发光荧光微球标记抗体的玻璃纤维垫:将制得的聚集诱导发光荧光微球复合物喷涂到玻璃纤维垫上即可。

2. 根据权利要求1所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述步骤(2)中的聚集诱导发光荧光微球在加入待标记抗体前可进行预处理,预处理的步骤包括:将步骤(1)得到的聚集诱导发光荧光微球超声1~10min,再用0.01~0.5M pH 6.0~8.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度至0.01~0.1mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述步骤(2)中加入待标记抗体后的抗体终浓度为1~100μg/mL,加入对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺后其终浓度为0.01~1mg/mL,加入封闭剂后封闭剂的终浓度为0.1~1%,且所述封闭剂选自酪蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、聚乙二醇、脱脂牛奶中的任意一种。

4. 根据权利要求1所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述步骤(2)中加入封闭剂反应后的溶液离心的转速为5000~20000rpm,时间为10~50min。

5. 根据权利要求1所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述步骤(2)中离心后的沉淀用0.01~0.1M pH 6.0~9.0的磷酸盐缓冲液复溶为起始体积的1倍至1/10倍,即可制成聚集诱导发光荧光微球复合物,并可于4℃保存备用。

6. 根据权利要求1所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述聚集诱导发光荧光微球标记的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体、噬菌体表达抗体。

7. 根据权利要求1所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上包被有待测物人工偶联抗原或待测物抗体作为检测线,包被有抗鼠抗体或抗兔抗体作为质控线,该硝酸纤维素膜上的制备方法,包括如下步骤:

(1) 使用0.01~0.5M pH 6.0~8.0的PBS溶液分别调节包被物待测物人工偶联抗原或

待测物抗体、抗鼠抗体或抗兔抗体至浓度为0.01~10.0mg/mL;其中,该待测物抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体、噬菌体表达抗体;

(2) 将调整浓度后的待测物人工偶联抗原或待测物抗体喷涂于硝酸纤维素膜上部,作为检测线,将抗鼠抗体或抗兔抗体喷涂于硝酸纤维素膜下部,作为质控线;其中,检测线和质控线之间间隔一定距离,二者的喷膜量均为0.25~0.74 μ L/cm;

(3) 将喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜于37 $^{\circ}$ C过夜烘干处理后,在室温干燥的环境下保存备用。

8. 根据权利要求7所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述步骤(1)中所述的待测物人工偶联抗原是指小分子待测物与大分子蛋白质通过化学偶联方法制备的具有免疫源性和反应源性的全抗原;其中,该小分子待测物涵盖医学检验领域和食品安全检测领域所需要检测的所有小分子物质;偶联方法包括重氮法、碳二亚胺法、戊二醛法、混合酸酐法、琥珀酸酐法;该偶联的大分子蛋白包括牛血清白蛋白、酪蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白;偶联比为1:5~1:200,偶联后透析纯化,得到所需的人工偶联抗原。

9. 根据权利要求1-8任意一项所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,该试纸条的组装包括以下步骤:

(1) 在底板上搭接粘贴下述材料:滤纸、样本垫、喷涂有AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫、喷涂有待测物偶联人工抗原或抗体作为检测线和抗鼠抗体/抗兔抗体作为质控线的硝酸纤维素膜和吸水纸,即组装成本发明的使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条大板;

(2) 组装好的试纸条大板,通过切刀切成需要的宽度,即成本发明的使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,该试纸条可以直接使用,也可以装入塑料卡壳中使用。

10. 根据权利要求1-8任意一项所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述试纸条的检测过程包括如下步骤:经过处理后的检测样本加样到以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条上,加样体积为50~200 μ L,反应时间为3~30分钟,通过读取试纸条的荧光数据后由内置标准曲线计算检测样本浓度来实现定量检测,或者通过使用不同波长的手电筒对试纸条照射后观察检测线和质控线有无荧光来实现对检测样本的定性判断。

一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验和食品安全检测领域,具体涉及一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,来定量检测样本中的待测物浓度。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是一种基于抗原抗体特异性反应的检测方法,具有检测速度快、特异性好、操作简单和费用低等优点,相比于其它方法更能满足现场大批量检测的需求,因此近年来发展迅猛,被广泛应用于食品安全、医学检验和环境污染监测等领域。其中胶体金免疫层析试纸条是应用最广泛的一种免疫层析产品,但灵敏度较差且易受基质干扰。因此近年来的免疫层析技术主要有三个发展方向:一是采用免疫磁分离富集技术从复杂基质中分离浓缩目标物以避免样品基质的干扰;二是通过信号放大系统(如生物素-链霉亲和素系统等)以提高免疫层析方法的灵敏度;三是采用新型标记物(如荧光微球),提高信号输出或转变信号输出类型,以达到提高灵敏度的目的。

[0003] 荧光是一种光致发光现象。当一束波长在物质激发波长范围内的光照射该物质时,会以发射光的形式释放所吸收的能量,这一物质即是荧光物质。荧光信号的输出与入射光(激发光)的强度成正相关关系,相比于传统胶体金的灰度信号,其可以提高入射光的强度以提高发射光的强度,从而达到提高灵敏度的目的;检测基质中常含有有色杂质,荧光探针相比于胶体金,抗基质干扰能力也更强。

[0004] 聚集诱导发光荧光微球(AIEFM)可以在特定的底物诱导下形成聚集体,荧光效率出现显著的增加,从而实现刺激源的定性分析和定量检测,使高灵敏度的在线传感监测变得更加容易。“聚集诱导发光”材料制作的探针具有制备成本低、用量灵活度大、光稳定性高、长效追踪效果好等优势。

[0005] 基于上述情况,发明人研究开发了一种使用聚集诱导发光材料四联苯乙酸四甲酯(TCBPE)制备得到的荧光微球,可以应用于医学检验和食品安全快速检测等领域并提高试纸条检测灵敏度,目前,尚未有将四联苯乙酸四甲酯材料制备荧光微球中并应用的相关报道。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条。

[0007] 本发明的另一个目的是提供上述试纸条的制备方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采取的技术方案如下:

[0009] 本发明提供了一种以聚集诱导发光荧光微球(AIEFM)为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,它包括底板以及在底板上搭接粘贴的滤纸、样本垫、玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,其中,所述玻璃纤维垫包被有聚集诱导发光荧光微球标记的抗体,该玻璃纤维

垫的制备方法包括如下步骤：

[0010] (1) 聚集诱导发光荧光微球的制备：将四联苯丙烯酸四甲酯、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚马来酸酐十八醇酯 (PMAO) 溶于三氯甲烷溶剂 (四联苯丙烯酸四甲酯溶于三氯甲烷后的浓度为10~100mg/mL, PMMA、PMAO溶于三氯甲烷后的浓度均为10~500mg/mL), 之后用质量浓度为0.1~10%的十二烷基硫酸钠溶液作为分散剂分散, 在冰浴条件下, 将溶液超声制成微乳 (乳化的时间为1~60min, 乳化功率为600W), 将该微乳除去三氯甲烷, 离心 (转速为4000-15000rpm, 时间为10-30分钟) 取沉淀物, 用0.01M的氢氧化钠作为洗涤剂洗涤沉淀物3次后, 用蒸馏水洗涤至离心后上清液澄清即可, 将清洗后的沉淀物复溶于0.05-0.5M pH为5-9的硼酸-硼酸钠缓冲溶液中, 即制得AIEFM;

[0011] (2) 聚集诱导发光荧光微球标记抗体的制备：向制得的聚集诱导发光荧光微球中加入待标记抗体, 再加入EDC, 混匀后, 4℃反应过夜, 之后, 加入封闭剂, 室温反应2h, 离心取沉淀, 得到的沉淀复溶, 制成聚集诱导发光荧光微球复合物;

[0012] (3) 聚集诱导发光荧光微球标记抗体的玻璃纤维垫：将制得的聚集诱导发光荧光微球复合物喷涂到玻璃纤维垫上即可。

[0013] 进一步的, 所述聚集诱导发光荧光微球标记抗体的玻璃纤维垫中的待标记抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体、噬菌体表达抗体。

[0014] 进一步的, 步骤 (2) 中所述聚集诱导发光荧光微球标记抗体的制备包括如下具体步骤：取聚集诱导发光荧光微球超声1~10min, 再用0.01~0.5M pH 6.0-8.0的硼酸盐缓冲液调节微球浓度至0.01~0.1mg/mL, 加入待标记抗体使其终浓度为1~100μg/mL, 然后, 加入EDC并使EDC终浓度为0.01~0.1mg/mL, 振荡混匀后, 4℃反应过夜, 之后, 加入封闭剂, 使其终浓度为0.1~1%, 室温反应2h, 然后在5000~20000rpm转速下离心10~50min, 沉淀用0.01-0.1M pH 7.0~8.0的磷酸盐缓冲液复溶为起始体积的1/10, 制成聚集诱导发光荧光微球复合物于4℃保存备用;

[0015] 进一步的, 本发明的硝酸纤维素膜上包被有待测物人工偶联抗原或待测物抗体作为检测线, 包被有抗鼠抗体或抗兔抗体 (二抗) 作为质控线; 其中, 该硝酸纤维素膜的制备方法, 包括如下步骤:

[0016] (1) 使用0.01~0.5M pH 6.0~8.0的PBS (磷酸盐缓冲溶液) 溶液分别调节包被物待测物人工偶联抗原或待测物抗体、抗鼠抗体或抗兔抗体至浓度为0.01~10.0mg/mL;

[0017] (2) 将调整浓度后的待测物人工偶联抗原或待测物抗体喷涂于硝酸纤维素膜上部, 作为检测线, 将抗鼠抗体或抗兔抗体喷涂于硝酸纤维素膜下部, 作为质控线; 其中, 检测线和质控线之间间隔一定距离, 二者的喷量均为0.25~0.74μL/cm;

[0018] (3) 将喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜于37℃过夜烘干处理后, 在室温干燥的环境下保存备用。

[0019] 进一步的, 所述的待测物人工偶联抗原是指小分子待测物与大分子蛋白质通过化学偶联方法制备的具有免疫源性和反应源性的全抗原; 其中, 所述的小分子待测物涵盖医学检验领域和食品安全检测领域所需要检测的所有小分子物质; 所述的偶联方法包括重氮法、碳二亚胺法、戊二醛法、混合酸酐法、琥珀酸酐法; 所述的偶联大分子蛋白包括牛血清白蛋白、酪蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白; 所述的偶联比为1:5~1:200, 偶联后透析纯化, 得到所需的人工偶联抗原。

[0020] 进一步的,所诉待测物抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体、噬菌体表达抗体。

[0021] 进一步的,所述的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备成的荧光免疫层析试纸条的组装,包括以下步骤:

[0022] (1) 在底板上搭接粘贴下述材料:滤纸、样本垫、喷涂有AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫、喷涂有待测物偶联人工抗原或抗体作为检测线和抗鼠抗体/抗兔抗体作为质控线的硝酸纤维素膜和吸水纸,即组装成本发明的使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条大板。

[0023] (2) 组装好的试纸条大板,通过切刀切成需要的宽度,即成本发明的使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条,该试纸条可以直接使用,也可以装入塑料卡壳中使用。

[0024] 本发明提供的一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条的检测过程包括:

[0025] 经过处理后的检测样本加样到本发明制备的荧光免疫层析试纸条,加样体积为50~200 μ L/条,反应时间为3~30分钟,之后,可以通过读取该试纸条上检测线和质控线的荧光数据,内置标准曲线计算检测样本浓度来实现定量检测,也可以通过使用不同波长的手电筒对试纸条照射观察检测线和质控线有无荧光来实现定性判断。

[0026] 本发明的有益效果是:

[0027] 本发明制备的免疫荧光层析试纸条首次以四联苯乙烯酸四甲酯聚集诱导发光材料制作的AIEFM做为信标载体,其荧光信号强且装载量大,具有聚集诱导发光的良好荧光特性,避免了普通荧光微球由于在聚集到一定浓度时会发生荧光淬灭的现象,制备得到的荧光免疫层析试纸条检测灵敏度高。

附图说明

[0028] 图1是免疫层析试纸条结构示意图,其中,1样本垫、2滤纸、3AIEFM-抗体复合物玻璃纤维垫、4硝酸纤维素膜、5检测线、6质控线、7吸水纸、8PVC底板;

[0029] 图2为竞争法AIEFM荧光免疫层析试纸条检测原理图,其中,1为检测线上的待测物人工偶联抗原,2为质控线上的抗鼠抗体或抗兔抗体,3为小分子待测物,4为AIEFM-抗体复合物。

[0030] 图3为双抗夹心法AIEFM荧光免疫层析试纸条检测原理图,其中,1为检测线上的待测物抗体,2为质控线上的抗鼠抗体或抗兔抗体,3为大分子待测物,4为AIEFM-抗体复合物。

[0031] 图4为普通AIEFM荧光微球制备的试纸条与本发明AIEFM荧光微球制备的试纸条信号强度对比图。

[0032] 如图1所示,该免疫层析试纸条的构成为:在PVC底板8上,依次搭接地粘贴喷涂有检测线5和质控线6的Nc膜4、喷涂有AIEFM-抗体复合物的金垫3、样本垫1、滤纸2和吸水纸7,粘贴好后通过切条机切成4 \times 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,即为一张完整的检测试纸条。

[0033] 如图2所示,检测原理如下:待测样本加入到试纸条加样孔中并反应完成后,样本如果是阴性,样本随层析方向层析,结合垫上的AIEFM-抗体复合物涌动到检测线位置,与检

测线上的人工偶联抗原发生基于抗原抗体结合的免疫学反应而形成抗原抗体复合物，AIEFM在检测线上聚集并显示出荧光，部分未与人工偶联抗原结合的AIEFM-抗体复合物涌动到质控线位置，与相应的抗抗体结合从而质控线也显示出荧光。样本如果是阳性，则样本中的待测物先与AIEFM-抗体复合物结合，结合了待测物的AIEFM-抗体复合物不能再和检测线上的待测物人工偶联抗原结合，则检测线荧光变浅甚至消失，质控线显示荧光原理同阴性样本。

[0034] 如图3所示，检测原理如下：待测样本加入到试纸条加样孔中并反应完成后，样本如果是阴性，样本随层析方向层析，结合垫上的AIEFM-抗体复合物涌动到检测线位置，不能与检测线上的待测物抗体发生基于抗原抗体结合的免疫学反应，因此检测线上没有荧光出现，AIEFM-抗体复合物涌动到质控线位置，与相应的抗抗体结合从而质控线显示出荧光。样本如果是阳性，则样本中的待测物先与AIEFM-抗体复合物结合，结合了待测物的AIEFM-抗体复合物涌动到检测线上，因待测物分子量较大，表面有与多个抗体结合的位点，因此与检测线上的待测物抗体结合，AIEFM双抗夹心复合物形成，则检测线出现荧光，质控线显示荧光原理同阴性样本。

[0035] 如图4所示，用普通荧光染料TPE (四苯基乙烯) 和TCPE (四苯乙烯酸四甲酯，TCPE的合成方法来自文献Rigidifying Fluorescent Linkers by Metal-Organic Framework Formation for Fluorescence Blue Shift and Quantum Yield Enhancement Journal of the American Chemical Society 2014136 (23), 8269-8276中报道) 制备的AIEFM和本发明方法制备的AIEFM制备检测大肠杆菌O157:H7荧光检测试纸条，在相同的检测灵敏度下，本发明的AIEFM制备的试纸条荧光强度最高，换言之，如果在相同的荧光强度下，本发明的AIEFM制备的试纸条灵敏度最高。

具体实施方式

[0036] 实施例1：聚集诱导发光荧光微球制备 (TCBPE染料制备)

[0037] 一、配置染料预制液：称取TCBPE (TCBPE合成方法来自文献Rigidifying Fluorescent Linkers by Metal-Organic Framework Formation for Fluorescence Blue Shift and Quantum Yield Enhancement Journal of the American Chemical Society 2014 136 (23), 8269-8276中报道)、PMMA和PMAO，溶于氯仿中，使TCBPE、PMMA、PMAO溶于氯仿中的终浓度分别为30, 50, 25mg/mL；

[0038] 二、制备微乳液：吸取2400 μ L上述预制液，分散于12mL 0.25% SDS溶液中，冰浴条件下，超声破碎仪超声乳化3min，乳化功率为600W；

[0039] 三、固化成球：将上述乳化液置于旋转蒸发容器中，旋蒸至无氯仿，浓缩液用12000r/min 4 $^{\circ}$ C离心20min，弃上清，沉淀用0.01M NaOH 54ml分三次洗涤三次，水洗数次后离心至上清液澄清即可，清洗后的沉淀物复溶于18mL硼酸-硼酸钠缓冲溶液 (0.2M, pH=8) 中，并4 $^{\circ}$ C暗处保存。

[0040] 实施例2：一种使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的检测25-羟基维生素D (25-OH-VD) 的竞争法免疫层析试纸条的制备

[0041] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0042] 1. 硝酸纤维素膜的制备；

[0043] (1) 制备25-OH-VD人工抗原(25-OH-VD-OVA)：

[0044] 偶联方法为混合酸酐法，偶联蛋白为卵清蛋白(OVA)，偶联比为1:80，偶联后透析纯化，得到25-OH-VD-OVA。

[0045] (2) 检测线和质控线的制备：

[0046] 25-OH-VD-OVA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上：用0.01M pH7.5的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释25-OH-VD-OVA偶联物的浓度为1mg/mL，所得的溶液在膜上喷涂作为检测线；稀释抗鼠抗体的浓度为1mg/mL，所得的溶液在膜上喷涂作为质控线，两线的喷量均为0.74 μ L/cm，检测线与膜顶边间隔10mm，两线中间间隔5mm，37 $^{\circ}$ C烘干12小时，放置于干燥柜中保存备用。

[0047] 2. AIEFM-抗体复合物玻璃纤维垫的制备：

[0048] (1) AIEFM标记25-OH-VD单克隆抗体的制备：取0.5mg荧光微球超声(实施例1制备得到)1分钟，用pH 6.0的0.1M硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.05mg/mL，然后加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)100 μ L(EDC用pH 6.0的0.1M硼酸盐缓冲液溶解)，振荡混匀后，1mL荧光微球中加入6 μ g25-OH-VD单克隆抗体，充分混合后，4 $^{\circ}$ C搅拌反应过夜，加入终浓度为0.5%的牛血清白蛋白，室温封闭2h，8000rpm离心30min，沉淀用0.01M pH 7.0的PBS(磷酸盐缓冲液)复溶为起始体积的1/10，按照3 μ L/cm体积喷涂到玻璃纤维垫上，真空干燥2h。

[0049] (2) 调节标准曲线：在阴性基质中加标，标准曲线中25-OH-VD浓度为：0、4、12、36、108、324ppb，计算 R^2 为0.9902，线性回归方程式为： $y = -325.9x + 687.3$ 。

[0050] 3. 组装试纸条：

[0051] (1) 滤纸和样本垫规格为1 \times 30cm；

[0052] (2) 喷涂有AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫，规格为0.8 \times 30cm；

[0053] (3) 喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜，规格为2.5 \times 30cm；

[0054] (4) 吸水纸，规格为1.2 \times 30cm；

[0055] (5) PVC底板，规格为5.5 \times 30cm。

[0056] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴，组装好后用切刀裁切成4 \times 55mm的试纸条，装入塑料卡壳中，压紧后装入铝箔袋，加入干燥剂后，封口保存，室温环境保质期为12个月。

[0057] 二、定量检测样本中的25-OH-VD

[0058] 用上述的免疫层析试纸条检测样本中25-OH-VD的方法，包括如下的步骤：

[0059] 1. 在试纸条加样孔中加入人血清样本100 μ L，反应15min；

[0060] 2. 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口，检测线和质控线荧光强弱会以数值的高低在显示器上显示，根据仪器中已经录入的标准曲线，即可计算出样本中25-OH-VD的含量，实现样本中25-OH-VD的定量检测。

[0061] 实施例3：一种使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的检测玉米赤霉烯酮的竞争法免疫层析试纸条的制备

[0062] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0063] 1. 硝酸纤维素膜的制备；

[0064] (1) 制备ZEN人工抗原(ZEN-BSA)：

[0065] 偶联方法为混合酸酐法,偶联蛋白为牛血清白蛋白(BSA),偶联比为1:100,偶联后透析纯化,得到ZEN-BSA。

[0066] (2) 检测线和质控线的制备:

[0067] ZEN-BSA偶联物和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.0的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释ZEN-BSA偶联物的浓度为6mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为0.5mg/mL,所得的溶液在膜上喷涂作为质控线,两线的喷量均为0.74 μ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0068] 2. AIEFM-抗体复合物玻璃纤维垫的制备:

[0069] (1) AIEFM标记ZEN单克隆抗体的制备:取0.5mg荧光微球超声(实施例1制备得到)1分钟,用pH 7.0的0.2M硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.05mg/mL,然后加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)100 μ L(EDC用pH 7.0的0.2M硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,1mL荧光微球中加入10 μ gZEN单克隆抗体,充分混合后,4 $^{\circ}$ C搅拌反应过夜,加入终浓度为0.5%的酪蛋白,室温封闭2h,8000rpm离心30min,沉淀用0.01MpH 7.4的PBS(磷酸盐缓冲液)复溶为起始体积的1/10,按照8 μ L/cm体积喷涂到玻璃纤维垫上,真空干燥2h。

[0070] (2) 调节标准曲线:在阴性基质中加标,标准曲线中ZEN浓度为:0、0.5、1、2、4、8ppb,计算R²为0.9912,线性回归方程式为: $y = -896.9x + 1678.3$ 。

[0071] 3. 组装试纸条:

[0072] (1) 滤纸和样本垫规格为1 \times 30cm;

[0073] (2) 喷涂有AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫,规格为0.8 \times 30cm;

[0074] (3) 喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5 \times 30cm;

[0075] (4) 吸水纸,规格为1.2 \times 30cm;

[0076] (5) PVC底板,规格为5.5 \times 30cm。

[0077] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4 \times 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为12个月。

[0078] 二、定量检测样本中的ZEN

[0079] 用上述的免疫层析试纸条检测样本中玉米赤霉烯酮的方法,包括如下的步骤:

[0080] 1. 称取饲料或粮食样本2g,加入10mL提取液后震荡1分钟,取上清液检测;

[0081] 2. 在试纸条加样孔中加入110 μ L样本,反应5min;

[0082] 3. 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中ZEN的含量,实现阳性样本的定量检测。

[0083] 实施例4:一种使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的检测乙肝表面抗原(HBsAg)的双抗夹心法免疫层析试纸条的制备

[0084] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0085] 1. 硝酸纤维素膜上检测线和质控线的制备:

[0086] HBsAg多克隆抗体和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH 7.4的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释HBsAg多克隆抗体的浓度为2mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为检测线;

稀释抗鼠抗体的浓度为0.5mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为质控线,两线的喷膜量均为0.74 μ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0087] 2. AIEFM-抗体复合物玻璃纤维垫的制备:

[0088] (1) AIEFM标记HBsAg单克隆抗体的制备:取0.5mg荧光微球(实施例1制备得到)超声1分钟,用pH 6.0的0.01M PBS缓冲液调节微球浓度为0.1mg/mL,然后加入10mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 500 μ L(用pH 6.0的0.1M硼酸盐缓冲液溶解),振荡混匀后,1mL荧光微球中加入50 μ gHBsAg单克隆抗体,充分混合后,4 $^{\circ}$ C搅拌反应过夜,加入终浓度为0.5%的牛血清白蛋白,室温封闭2h,8000rpm离心30min,沉淀用0.01M pH 7.0的PBS复溶为起始体积,按照7 μ L/cm体积喷涂到玻璃纤维垫上,真空干燥2h。

[0089] (2) 调节标准曲线:在阴性基质中加标,加标标准曲线中HBsAg浓度为:0、10、20、40、80、160ppb,计算R²为0.9946,线性回归方程式为: $y = 429.9x + 4341.3$ 。

[0090] 3. 组装试纸条:

[0091] (1) 滤纸和样本垫规格为1 \times 30cm;

[0092] (2) 喷涂有AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫,规格为0.8 \times 30cm;

[0093] (3) 喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,规格为2.5 \times 30cm;

[0094] (4) 吸水纸,规格为1.2 \times 30cm;

[0095] (5) PVC底板,规格为5.5 \times 30cm。

[0096] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴,组装好后用切刀裁切成4 \times 55mm的试纸条,装入塑料卡壳中,压紧后装入铝箔袋,加入干燥剂后,封口保存,室温环境保质期为12个月。

[0097] 二、定量检测样本中的HBsAg

[0098] 用上述的免疫层析试纸条检测样本中HBsAg的方法,包括如下的步骤:

[0099] 1. 在试纸条加样孔中加入人血清样本100 μ L,反应20min;

[0100] 2. 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口,检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示,根据仪器中已经录入的标准曲线,即可计算出样本中HBsAg的含量,实现样本中HBsAg的定量检测。

[0101] 实施例5:一种使用聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的检测大肠杆菌0157:H7的双抗夹心法免疫层析试纸条的制备

[0102] 一、免疫层析试纸条的制备工艺

[0103] 1. 硝酸纤维素膜上检测线和质控线的制备:

[0104] 大肠杆菌0157:H7多克隆抗体和抗鼠抗体包被到硝酸纤维素膜上:用0.01M pH7.5的PBS(磷酸盐缓冲液)稀释0157:H7多克隆抗体的浓度为2mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为检测线;稀释抗鼠抗体的浓度为0.5mg/mL,所得的溶液喷涂在膜上作为质控线,两线的喷量均为0.74 μ L/cm,检测线与膜顶边间隔10mm,两线中间间隔5mm,37 $^{\circ}$ C烘干12小时,放置于干燥柜中保存备用。

[0105] 2. AIEFM-抗体复合物玻璃纤维垫的制备:

[0106] (1) AIEFM标记0157:H7单克隆抗体的制备:取0.5mg荧光微球(实施例1制备得到)超声1分钟,用pH 8.0的0.2M硼酸盐缓冲液调节微球浓度为0.05mg/mL,然后加入10mg/mL对

乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺 (EDC) 100 μ L (EDC用pH 8.0的0.2M硼酸盐缓冲液溶解), 振荡混匀后, 1mL荧光微球中加入20 μ g大肠杆菌O157:H7单克隆抗体, 充分混合后, 4 $^{\circ}$ C搅拌反应过夜, 加入终浓度为0.5%的酪蛋白, 室温封闭2h, 8000rpm离心30min, 沉淀用0.01M pH 7.0的PBS复溶为起始体积的1/10, 按照9 μ L/cm体积喷涂到玻璃纤维垫上, 真空干燥2h。

[0107] (2) 调节标准曲线: 在阴性基质中加标, 标准曲线中大肠杆菌O157:H7浓度为: 0、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 CFU/mL, 计算出R²为0.9965, 线性回归方程式为: $y = 654.3 \times + 5120.4$ 。

[0108] 3. 组装试纸条:

[0109] (1) 滤纸和样本垫规格为1 \times 30cm;

[0110] (2) 喷涂有AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫, 规格为0.8 \times 30cm;

[0111] (3) 喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜, 规格为2.5 \times 30cm;

[0112] (4) 吸水纸, 规格为1.2 \times 30cm;

[0113] (5) PVC底板, 规格为5.5 \times 30cm。

[0114] 将以上材料按照试纸条结构示意图中各组分位置进行依次粘贴, 组装好后用切刀裁切成4 \times 55mm的试纸条, 装入塑料卡壳中, 压紧后装入铝箔袋, 加入干燥剂后, 封口保存, 室温环境保质期为12个月。

[0115] 二、定量检测样本中的大肠杆菌O157:H7

[0116] 用上述的免疫层析试纸条检测样本中大肠杆菌O157:H7的方法, 包括如下的步骤:

[0117] 1. 样本前处理: 样本按照国标方法进行增菌培养, 培养后检测;

[0118] 2. 在试纸条加样孔中加入110 μ L样本, 反应5min;

[0119] 3. 将试纸条插入荧光读取仪的检测窗口, 检测线和质控线荧光的强弱会以数值的高低在显示器上显示, 根据仪器中已经录入的标准曲线, 即可计算出样本中大肠杆菌O157:H7的含量, 实现样本的定量检测。

[0120] 对比例1: 荧光素脂染料试纸条制备

[0121] 荧光素脂微球制备: 称取荧光素脂, PMMA和PMAO溶于氯仿, 使之溶于三氯甲烷后的终浓度分别为30、50、25mg/mL, 吸取2400 μ L该溶液, 分散于12mL 0.25% SDS溶液中, 冰浴下, 超声破碎仪超声乳化5min, 乳化功率为600W, 之后, 将乳化液置于旋转蒸发容器中, 旋蒸至无氯仿, 浓缩液用12000r/min 4 $^{\circ}$ C离心20min, 弃上清, 沉淀用0.01M NaOH 54mL分三次洗涤, 水洗数次至离心后上清液澄清, 清洗后的沉淀物复溶于18mL硼酸-硼酸钠缓冲溶液(0.2M, pH=8)中, 4 $^{\circ}$ C暗处保存;

[0122] 荧光素脂微球试纸制备: 分别取0.5mg上述制得的荧光素脂微球4份, 每份素脂微球分别按照实施例2、3、4、5中含AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫的试纸的制备步骤(除将含AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫中的聚集诱导发光荧光微球替换为等量的荧光素脂微球, 其余步骤相同), 制成4份普通素脂微球试纸条。

[0123] 将上述新制得的4份普通荧光素脂微球试纸条分别编号5、6、7、8, 再取实施例2、3、4、5制备得到的试纸条, 编号1、2、3、4, 通过检测8种试纸条的最低检测灵敏度来比较, 试纸条最低检测灵敏度的检测方法为: 随机选取20个阴性样本, 加样反应完成后用荧光读取仪读取荧光值, 该结果通过代入各检测卡标准曲线计算出样本中待测物浓度, 20个阴性样本计算出的浓度平均值加上3倍标准偏差, 即为该检测卡最低检测灵敏度。检测结果见表1。

[0124] 表1

编号	试纸条灵敏度	编号	试纸条灵敏度
1	2.1ppb	5	13.7ppb
2	0.21ppb	6	2.3ppb
3	2.4ppb	7	21.9ppb
4	10 ² CFU/mL	8	10 ⁴ CFU/mL

[0126] 从表1中可以看出,本方法制备的试纸条,其灵敏度均比普通荧光微球制备的试纸条灵敏度高,说明该试纸条具有检测灵敏度高的优点。

[0127] 对比例2

[0128] 微球制备:将实施例2中的TCBPE替换为TPE(四苯乙烯),其余与实施例1相同,制得以TPE为荧光染料制备的微球。

[0129] 试纸制备:取0.5mg上述制得的脂微球,按照实施例5中含AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫的试纸的制备步骤(除将含AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫中的聚集诱导发光荧光微球替换为等量的以TPE为荧光染料制备的微球,其余步骤相同),制成以TPE为荧光染料制备的微球的检测大肠杆菌0157:H7试纸条。

[0130] 对比例3

[0131] 微球制备:将实施例2中的TCBPE替换为TCPE(四苯乙烯酸四甲酯,TCPE的合成方法来自文献Rigidifying Fluorescent Linkers by Metal-Organic Framework Formation for Fluorescence Blue Shift and Quantum Yield Enhancement. Journal of the American Chemical Society[J].2014,136(23),8269-8276中报道),其余与实施例1相同,制得以TCPE为荧光染料制备的微球。

[0132] 试纸制备:取0.5mg上述制得的脂微球,按照实施例5中含AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫的试纸的制备步骤(除将含AIEFM-抗体复合物的玻璃纤维垫中的聚集诱导发光荧光微球替换为等量的以TPE为荧光染料制备的微球,其余步骤相同),制成以TPE为荧光染料制备的微球的检测大肠杆菌0157:H7试纸条。

[0133] 实施例6

[0134] 将对比例1(对比例1中的检测大肠杆菌0157:H7试纸)、对比例2、对比例3制备的试纸和实施例5制备的试纸检测大肠杆菌0157:H7,结果如图4所示。在相同的检测灵敏度下,本发明的AIEFM制备的试纸条荧光强度最高,换言之,如果在相同的荧光强度下,本发明的AIEFM制备的试纸条灵敏度最高。

[0135] 综上所述,本发明提供的方法成功制备了聚集诱导发光荧光微球作为信标载体制备得到的荧光免疫层析试纸条,该试纸条可以普遍应用于对抗原或抗体的灵敏检测。

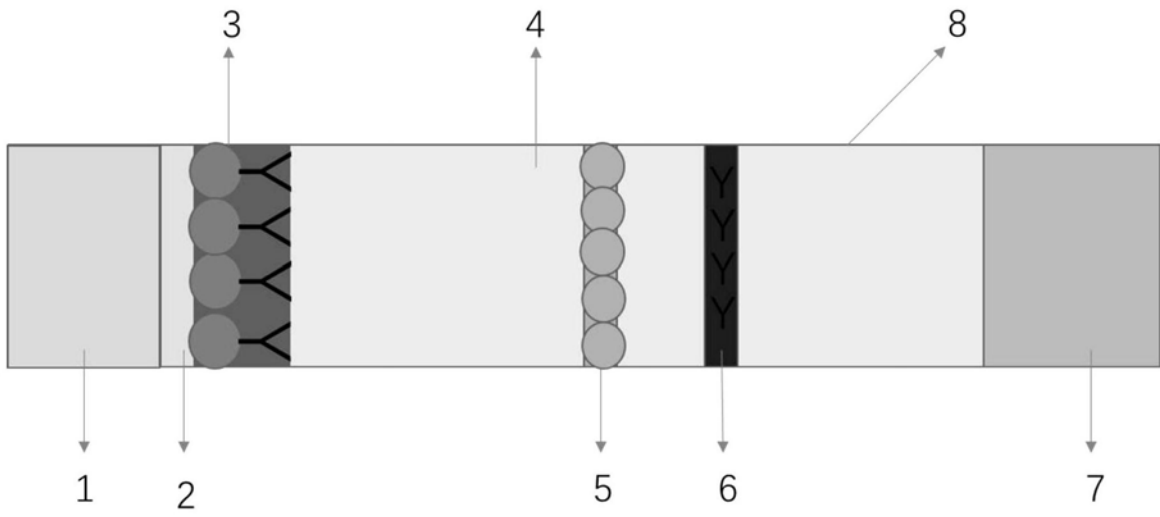


图1

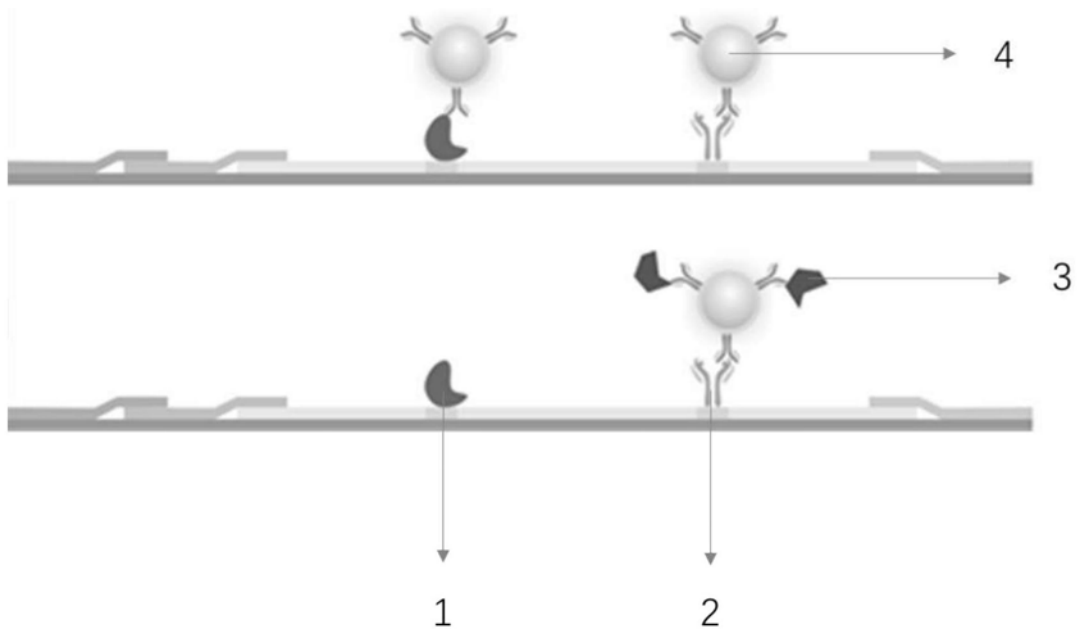


图2

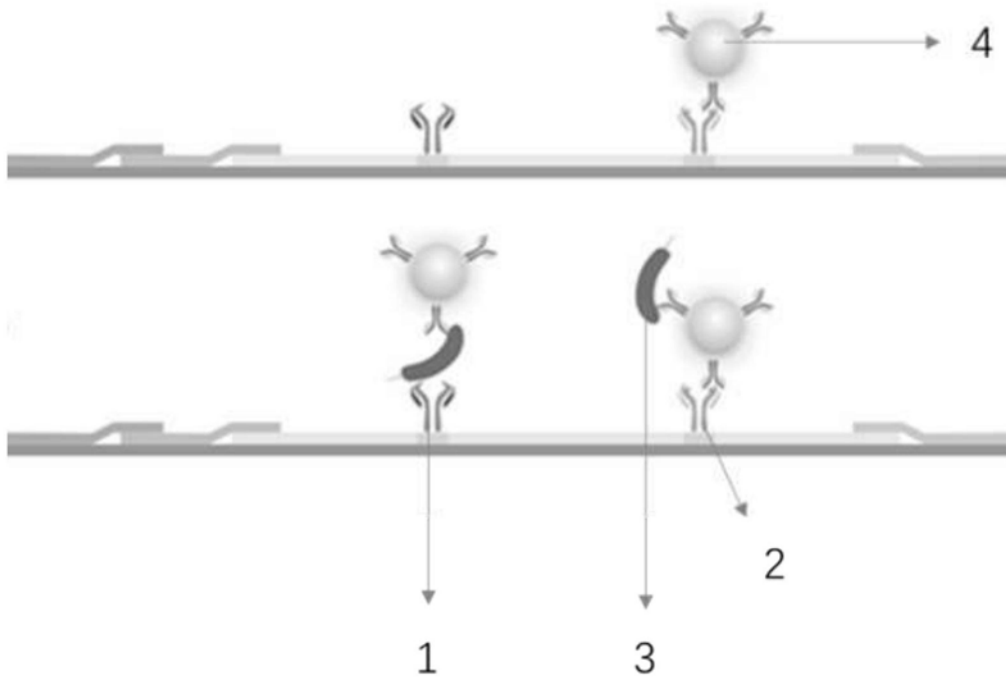


图3

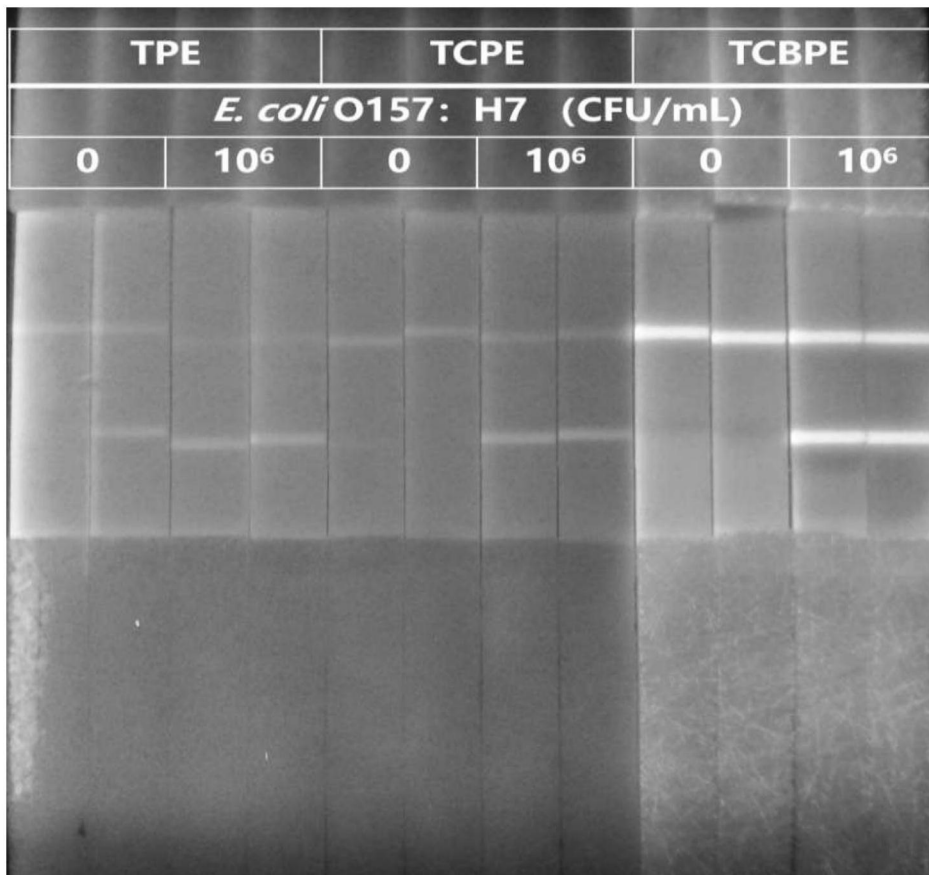


图4

专利名称(译)	一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条		
公开(公告)号	CN109633144B	公开(公告)日	2020-07-14
申请号	CN201811631563.5	申请日	2018-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	赖卫华 熊勇华 魏华 陈媛 许恒毅 喻志标 彭娟		
发明人	赖卫华 熊勇华 魏华 陈媛 章钢刚 许恒毅 喻志标 彭娟		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/553		
代理人(译)	胡群		
其他公开文献	CN109633144A		
外部链接	SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种以聚集诱导发光荧光微球为信标载体制备的荧光免疫层析试纸条，在底板上依次搭接粘贴滤纸、样本垫、AIEFM复合物玻璃纤维垫、喷涂有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水纸，制成荧光免疫层析试纸条，用于定量检测样本中的待测物浓度，制得的试纸条具有检测灵敏度高的特点。

