



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108507989 B

(45) 授权公告日 2021.10.26

(21) 申请号 201810264179.X

G01N 33/558 (2006.01)

(22) 申请日 2018.03.28

G01N 33/533 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108507989 A

(56) 对比文件

CN 105092852 A, 2015.11.25

CN 105403704 A, 2016.03.16

(43) 申请公布日 2018.09.07

CN 101556280 A, 2009.10.14

(73) 专利权人 韶关学院

CN 102866252 A, 2013.01.09

地址 512005 广东省韶关市浈江区大学路
288号

JP 2011017697 A, 2011.01.27

(72) 发明人 郭杰标 林秀玉 谢伟光 蒋昊
黄钻元 朱哲 吴蓝洁 张鹏

郭杰标等. 保健酒违法添加奥沙普嗪免疫学
检测方法建立.《食品研究与开发》.2013,第34卷
(第11期),摘要.

(74) 专利代理机构 广州骏思知识产权代理有限
公司 44425

审查员 张娟

代理人 潘雯琪

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

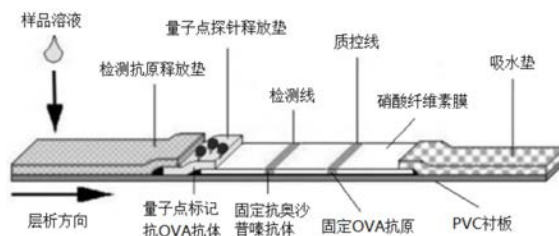
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡及检测方法。所述检测卡包括衬板、检测抗原释放垫、量子点探针释放垫、层析膜和吸水垫；检测抗原释放垫包含由卵清白蛋白和奥沙普嗪偶联而成的检测抗原；量子点探针释放垫包含标记有抗卵清白蛋白抗体的量子点探针；层析膜设有检测线和质控线，检测线固定抗奥沙普嗪抗体，质控线固定卵清白蛋白抗原。检测抗原从释放垫溶入检测体系，与检测抗体和标记抗体形成双抗体夹心免疫复合物，产生荧光检测信号。在质控线的检测参照作用之下，根据检测线上的荧光信号来判断样品中是否含有奥沙普嗪，增加了检测的信号强度和稳定性，提高了检测灵敏度和定量精密密度。



1. 双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,其特征在于:包括衬板、以及依次粘附于衬板上且相邻之间部分叠置的检测抗原释放垫、量子点探针释放垫、层析膜和吸水垫;所述检测抗原释放垫包含由卵清白蛋白和奥沙普嗪偶联而成的检测抗原;所述量子点探针释放垫包含标记有抗卵清白蛋白抗体的量子点探针;所述层析膜设有检测线和质控线,所述检测线固定抗奥沙普嗪抗体,所述质控线固定卵清白蛋白抗原。

2. 根据权利要求1所述的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述检测抗原释放垫采用玻璃纤维素膜吸收含有检测抗原、表面活性剂、甘露醇、蔗糖的PBS溶液制得。

3. 根据权利要求1所述的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述量子点探针释放垫采用人造纤维素膜吸收含有量子点荧光探针、聚乙二醇、甘露醇、蔗糖、甘氨酸的PBS溶液制得。

4. 根据权利要求1所述的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述层析膜采用硝酸纤维素膜,所述检测线由含有抗奥沙普嗪抗体和蔗糖的PBS溶液喷涂在硝酸纤维素膜上制得。

5. 根据权利要求4所述的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,其特征在于:所述质控线由含有卵清白蛋白和蔗糖的PBS溶液喷涂在硝酸纤维素膜上制得。

6. 双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

S1: 制备检测抗原、量子点探针、检测线和质控线;所述检测抗原由卵清白蛋白和奥沙普嗪偶联而成,所述量子点探针标记有抗卵清白蛋白抗体,所述检测线固定抗奥沙普嗪抗体,所述质控线固定卵清白蛋白抗原;

S2: 将样品溶液、检测抗原和量子点探针混合,一起输送至检测线和质控线,根据检测线和质控线上的荧光信号来判断样品中是否含有奥沙普嗪。

7. 根据权利要求6所述的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测方法,其特征在于:步骤S2中,通过以下方法进行判断:检测线和质控线都显示荧光信号,断定结果为阴性,样品中不含奥沙普嗪;检测线不显示荧光信号,质控线显示荧光信号,断定结果为阳性,样品中含有奥沙普嗪。

8. 根据权利要求6所述的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测方法,其特征在于:所述量子点探针在365nm光源激发下,产生630nm的发射光。

双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品药品安全检测领域,尤其涉及一种将免疫化学检测技术应用于保健品、中成药违法添加化学药品的检测,尤其是双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡及检测方法。

背景技术

[0002] 奥沙普嗪的化学名为2-(4-异丁基苯基)丙酸,属于非甾体抗炎药,具有抗炎、镇痛及解热作用,用于风湿性关节炎、粘连性脊椎炎、非炎性关节痛、关节炎、非关节性风湿病、非关节性炎症引起的疼痛,各种神经痛、癌症疼痛、创伤后疼痛及各种炎症所致发热等,但有一定的副作用,在临床上属于处方药,必须在医生的指导下服用。

[0003] 风湿性疾病是以关节、肌肉、软组织、神经等疼痛为主要症状,病程多呈慢性和反复发作。我国有通过“食疗”或中药调理慢性疾病的传统,在化学合成药品存在诸多副作用的背景下,针对风湿性疾病的保健食品(以保健酒为主)、中成药近年来广受市场青睐。

[0004] 奥沙普嗪止痛效果迅速且价格低廉,于是有不法厂家在保健食品、中成药中违法添加奥沙普嗪,以增强疗效牟取不正当利益。不当服用奥沙普嗪可能产生恶心、头痛或过敏性皮疹等不良反应,对消化道、肝脏和肾脏造成损伤,严重的甚至导致过敏性休克和急性肾功能衰竭。患者不知情而长期服用含奥沙普嗪的保健食品,其危害性是非常严重的,必须加强对违法添加奥沙普嗪产品的监督检查。目前,检测违法添加奥沙普嗪的确证方法是高效液相色谱、液质联用检测。但是这些方法设备投入大、运行费用高,样品预处理复杂,不能够现场进行检测,难以大规模对违法添加现象展开筛查。

[0005] 现有的奥沙普嗪快速检测方法主要是化学检测方法和薄层色谱检测方法,检测的灵敏度和抗干扰能力有提高的需要。免疫学检测方法灵敏、特异、快速和价廉,在环境监测和食品安全领域已广泛应用。目前报道的检测小分子化合物的免疫学方法,都是基于检测抗原和检测抗体的“二元体系免疫竞争法”,其将信号物质标记于检测抗体上,与层析膜上固定的检测抗原形成免疫复合物,产生检测信号。“二元体系免疫竞争法”存在以下缺点:1、需对每种检测抗体分别标记信号物质,导致信号物质无法统一制备;2、检测抗体在液相,稳定性不足;3、检测信号强度和灵敏度较低。

发明内容

[0006] 基于此,本发明的目的在于,提供一种双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡及检测方法,具有增加检测信号强度和稳定性、提高检测灵敏度的优点。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0008] 双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,包括衬板、以及依次粘附于衬板上且相邻之间部分叠置的检测抗原释放垫、量子点探针释放垫、层析膜和

吸水垫；所述检测抗原释放垫包含由卵清白蛋白和奥沙普嗪偶联而成的检测抗原；所述量子点探针释放垫包含标记有抗卵清白蛋白抗体的量子点探针；所述层析膜设有检测线和质控线，所述检测线固定抗奥沙普嗪抗体，所述质控线固定卵清白蛋白抗原。

[0009] 相比于传统的“二元体系免疫竞争法”，本发明的检测卡利用了“双抗体夹心免疫竞争法”原理，在“检测抗原”和“检测抗体”这两个免疫检测要素之外，增加了针对检测抗原载体蛋白的“标记抗体”。本发明在载体蛋白（卵清白蛋白）上共价连接检测物质（奥沙普嗪）合成检测抗原，将标记抗体（抗卵清白蛋白抗体）标记于量子点上，将检测抗体（抗奥沙普嗪抗体）固定于层析膜上，从而检测抗体捕获检测抗原上偶联的检测物质，标记抗体结合检测抗原上偶联的载体蛋白，形成双抗体夹心免疫复合物，产生荧光检测信号。当检测抗体被游离的检测物质结合，荧光强度将被抑制，从而产生抑制检测信号。

[0010] 具体的，检测时将样品溶液滴到检测抗原释放垫上，样品溶液运动的过程中将检测抗原和量子点探针溶解，并携带到检测线和质控线，被携带的量子点探针标记的抗卵清白蛋白（OVA）抗体、检测抗原与检测线上的抗奥沙普嗪抗体形成双抗体夹心免疫结合物，使检测线产生荧光信号；被携带的量子点探针标记的抗OVA抗体与质控线上固定的OVA抗原结合，在质控线上堆积形成荧光信号。当样品中存在游离的奥沙普嗪达到一定浓度，检测线上免疫反应就会被竞争阻断，荧光信号被抑制；而质控线上的荧光信号，不受奥沙普嗪浓度的影响。

[0011] 目前利用荧光量子点免疫层析方法检测奥沙普嗪的相关报道较少，本发明为食品药品安全检测工作提供新的工具。量子点是由200-10000原子集聚在三个球形空间的纳米半导体晶体，球形晶核直径2-8nm，为了增加量子点的水溶性和生物相容性，球形晶核外层通常会被有机分子包覆引入功能基团，直径会提高到15-30nm，具有很好的胶体性能和动力学特性，适合作为生物学检测的纳米标记材料。与传统有机荧光染料填充的纳米微球相比，量子点具有宽且呈连续分布的激发谱、窄而对称的发射峰；稳定性强、抗光漂白性强；光能力转化效率高、亮度是有机染料的数十倍甚至更多。

[0012] 相对于现有技术，本发明的检测卡具有以下优点：1、统一用抗载体蛋白抗体标记的量子点产生检测信号，只需集中制备一种作为荧光探针，有利于检测工作的规模化和标准化；2、检测抗体固定在层析膜上，通过对膜的封闭和干燥，对抗体的活性保护作用更为有利，增加抗体稳定性；3、免疫结合时空间位阻更小，提高检测信号强度和灵敏度；4、特异性强，检测时间短（5-10分钟），可现场操作，且借助便携360nm光源即可激发荧光信号，肉眼判读结果，检测成本低，操作简便，适合基层检测人员操作。

[0013] 进一步地，所述检测抗原释放垫采用玻璃纤维素膜吸收含有检测抗原、表面活性剂、甘露醇、蔗糖的PBS溶液制得。优选的，采用厚度为0.85mm的玻璃纤维素膜充分吸收含有10 μ g/mL检测抗原、50 μ g/mL表面活性剂、30mg/mL甘露醇、50mg/mL蔗糖的PBS溶液。其中，甘露醇作为冻干支架用于确保检测过程中检测抗原迅速溶解；蔗糖用于调节检测溶液黏度控制层析展开速度；表面活性剂用于消除检测过程的非特异性吸附，优选聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）；检测抗原由OVA和奥沙普嗪共价偶联合成，既能被膜上检测抗体结合，又能被量子点上的标记抗体结合。

[0014] 进一步地，所述量子点探针释放垫采用人造纤维素膜吸收含有量子点荧光探针、聚乙二醇、甘露醇、蔗糖、甘氨酸的PBS溶液制得。优选的，采用厚度为0.34mm的人造纤维素

膜吸收含有20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 量子点荧光探针、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 聚乙二醇(PEG-500)、10 mg/mL 甘露醇、60 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 甘氨酸的PBS溶液。其中,甘露醇作为冻干支架用于确保检测过程中量子点探针迅速溶解;聚乙二醇、蔗糖用于调节检测溶液黏度控制层析展开速度;甘氨酸用于消除检测过程的非特异性吸附;量子点荧光探针由量子点表面标记抗OVA抗体构成,能够结合被捕获在检测线上的检测抗原和固定在质控线上的OVA抗原,分别产生荧光检测信号。

[0015] 进一步地,所述层析膜采用硝酸纤维素膜,所述检测线由含有抗奥沙普嗪抗体和蔗糖的PBS溶液喷涂在硝酸纤维素膜上制得。优选的,将含有0.3 mg/mL 抗奥沙普嗪抗体和10 mg/mL 蔗糖的0.05M PBS溶液(pH 7.4),以1.0~4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 的量喷涂在硝酸纤维素膜上。检测线荧光信号形成的基础是抗体与检测抗原所偶联奥沙普嗪的免疫反应,会被检品中游离的奥沙普嗪竞争抑制。

[0016] 进一步地,所述质控线由含有卵清白蛋白和蔗糖的PBS溶液喷涂在硝酸纤维素膜上制得。优选的,将含有0.2 mg/mL OVA和10 mg/mL 蔗糖的0.05M PBS溶液(pH 7.4),以1.0~3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 的量喷涂在硝酸纤维素膜上。质控线荧光信号形成的基础是量子点的抗OVA抗体与质控OVA抗原的免疫反应,与奥沙普嗪检品无关,不会被检品中游离的奥沙普嗪竞争抑制。

[0017] 双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测方法,包括以下步骤:

[0018] S1:制备检测抗原、量子点探针、检测线和质控线;所述检测抗原由卵清白蛋白和奥沙普嗪偶联而成,所述量子点探针标记有抗卵清白蛋白抗体,所述检测线固定抗奥沙普嗪抗体,所述质控线固定卵清白蛋白抗原;

[0019] S2:将样品溶液、检测抗原和量子点探针混合,一起输送至检测线和质控线,根据检测线和质控线上的荧光信号来判断样品中是否含有奥沙普嗪。

[0020] 奥沙普嗪是小分子化合物,常规检测小分子化合物的免疫检测原理是“检测抗原”与“检测抗体”形成的“二元体系免疫竞争法”,针对该方法在量子点侧向免疫层析中的不足,本发明在“检测抗原”与“检测抗体”的基础上,加入“标记抗体”形成“双抗体夹心免疫竞争法”,并对各免疫反应要素在层析系统中的组合也进行了调整,将检测抗体固定在检测线,在量子点上标记抗OVA抗体构成荧光探针,与检测抗原(OVA-奥沙普嗪)“桥连”形成“双抗体夹心”免疫复合物,荧光探针积累形成检测信号,增加了检测的信号强度和稳定性,提高了检测灵敏度,当检测抗体被游离的检测物质结合,荧光强度将被抑制,从而产生抑制检测信号。利用本发明的检测方法对样品溶液中奥沙普嗪的最低检出限度为2.0 ng/mL ,对保健品、中成药中违法添加奥沙普嗪及其类似物的最低检出限度为2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,且可在5分钟内完成快速检测。

[0021] 进一步地,步骤S2中,通过以下方法进行判断:检测线和质控线都显示荧光信号,断定结果为阴性,样品中不含奥沙普嗪;检测线不显示荧光信号,质控线显示荧光信号,断定结果为阳性,样品中含有奥沙普嗪。其中,质控线是为了检验方法有效与否而设定,质控线显示荧光信号表明方法有效,质控线不显示荧光信号表明方法本身无效;而检测线形成双抗体夹心免疫复合物时产生荧光信号,当样品中存在游离的奥沙普嗪时,检测线上的免疫反应就会被竞争阻断,从而荧光信号消失。

[0022] 进一步地,所述量子点探针在365 nm 光源激发下,产生630 nm 的发射光。

[0023] 为了更好地理解和实施,下面结合附图详细说明本发明。

附图说明

[0024] 图1为实施例的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡的结构示意图。

[0025] 图2a为检测线上发生免疫反应、产生荧光信号的示意图。

[0026] 图2b为检测线上免疫反应被竞争阻断、荧光信号消失的示意图。

[0027] 图3为质控线上发生免疫反应、产生荧光信号的示意图。

[0028] 图4为荧光免疫检测结果产生的原理及检测结果的判断原则。

具体实施方式

[0029] 请参阅图1,其为本实施例的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测卡,包括PVC衬板、以及依次粘附于PVC衬板上且相邻之间部分叠置的检测抗原释放垫、量子点探针释放垫、硝酸纤维素膜(NC膜)和吸水垫;所述检测抗原释放垫包含由OVA和奥沙普嗪偶联而成的检测抗原;所述量子点探针释放垫包含标记有抗OVA抗体的量子点探针;所述硝酸纤维素膜设有检测线和质控线,所述检测线固定抗奥沙普嗪抗体,所述质控线固定OVA抗原。

[0030] 具体的,检测抗原释放垫的制备方法如下:采用厚度为0.85mm的玻璃纤维素膜充分吸收含有10 μ g/mL检测抗原、50 μ g/mL Triton X-100、30mg/mL甘露醇、50mg/mL蔗糖的PBS溶液,冷冻干燥后备用。

[0031] 具体的,量子点探针释放垫的制备方法如下:首先,采用活泼酯法对羧基化量子点进行标记,取1.0mL羧基化量子点稀释在20mL超纯水中,加入0.05mL新鲜配制的EDC溶液(10mg/mL),室温搅拌20分钟使羧基活化;在预活化微球中加入0.45mg抗OVA抗体,室温搅拌30分钟使活化羧基与抗体的氨基连接;溶液在16000rpm低温离心30分钟,弃去上清液以分离未结合的抗体;量子点探针用含10%Triton X-100的PBS溶液重悬,避光4 $^{\circ}$ C保存备用。然后,采用厚度为0.34mm的Whatman 85人造纤维素膜吸收含有20 μ g/mL量子点荧光探针、60 μ g/mL PEG-500、10mg/mL甘露醇、60mg/mL蔗糖、10mg/mL甘氨酸的PBS溶液,冷冻干燥后备用。

[0032] 具体的,检测线的制备方法如下:将含有0.3mg/mL抗奥沙普嗪特异性抗体和10mg/mL蔗糖的0.05M PBS溶液(pH 7.4),以1.00 μ g/cm的量喷涂在硝酸纤维素膜上,形成检测线。

[0033] 具体的,质控线的制备方法如下:将含有0.2mg/mL OVA和10mg/mL蔗糖的0.05M PBS溶液(pH 7.4),以1.00 μ g/cm的量喷涂在硝酸纤维素膜上,形成质控线。

[0034] 奥沙普嗪及其类似物的特异性抗体诱导产生方法、抗OVA抗体诱导产生方法、以及在量子点上标记抗OVA抗体、制备量子点荧光探针的方法均采用现有技术。

[0035] 本实施例的双抗体夹心免疫竞争法检测奥沙普嗪的量子点免疫层析检测方法如下:

[0036] 取0.2g(或0.2mL)样品,溶解在2.0mL无水乙醇中充分抽提目标检品,抽提液静止10分钟使杂质充分沉淀,取0.2mL上清液加入到20mL样品缓冲液,充分摇匀成为样品溶液;用滴管在检测抗原释放垫上滴加3-4滴样品溶液,样品溶液向硝酸纤维素膜运动的过程中使检测抗原和量子点探针释放,并先后越过检测线和质控线,根据检测线和质控线上的荧

光信号来判断样品中是否含有奥沙普嗪。

[0037] 在硝酸纤维素膜检测线上的抗奥沙普嗪抗体、量子点探针上标记的抗OVA抗体,分别与检测抗原结合,形成双抗体夹心免疫结合物,使检测线产生荧光检测信号,如图2a所示。当样品中存在游离的奥沙普嗪达到一定浓度,检测线上免疫反应就会被竞争阻断,荧光信号会消失,如图2b所示。量子点探针通过标记的抗OVA抗体与硝酸纤维素膜质控线上固定的OVA抗原结合,在质控线上堆积形成荧光信号,如图3所示。质控线是检验方法本身有效与否而设定,显色有效,不显色表明方法本身无效。

[0038] 如图4所示,量子点探针在365nm光源激发下,产生630nm的发射光,检测结果的判断原则为:检测线和质控线都显示荧光信号,断定结果为阴性(A),样品中不含奥沙普嗪;检测线不显示荧光信号,质控线显示荧光信号,断定结果为阳性(B和C),样品中含有奥沙普嗪,其中,阳性结果B中奥沙普嗪浓度为1.0ng/mL,阳性结果C中奥沙普嗪浓度高于2.0ng/mL。

[0039] 相对于现有技术,本发明采用的“双抗体夹心免疫竞争法”具有以下优点:1、统一用抗载体蛋白抗体标记的量子点产生检测信号,只需集中制备一种作为荧光探针,有利于检测工作的规模化和标准化;2、检测抗体固定在层析膜上,通过对膜的封闭和干燥,对抗体的活性保护作用更为有利,增加抗体稳定性;3、免疫结合时空间位阻更小,提高检测信号强度和灵敏度。利用本发明的检测方法对样品溶液中对奥沙普嗪的最低检出限度为2.0ng/mL,对保健品、中成药中违法添加奥沙普嗪及其类似物的最低检出限度为2.0μg/kg,且可在5分钟内完成快速检测。

[0040] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

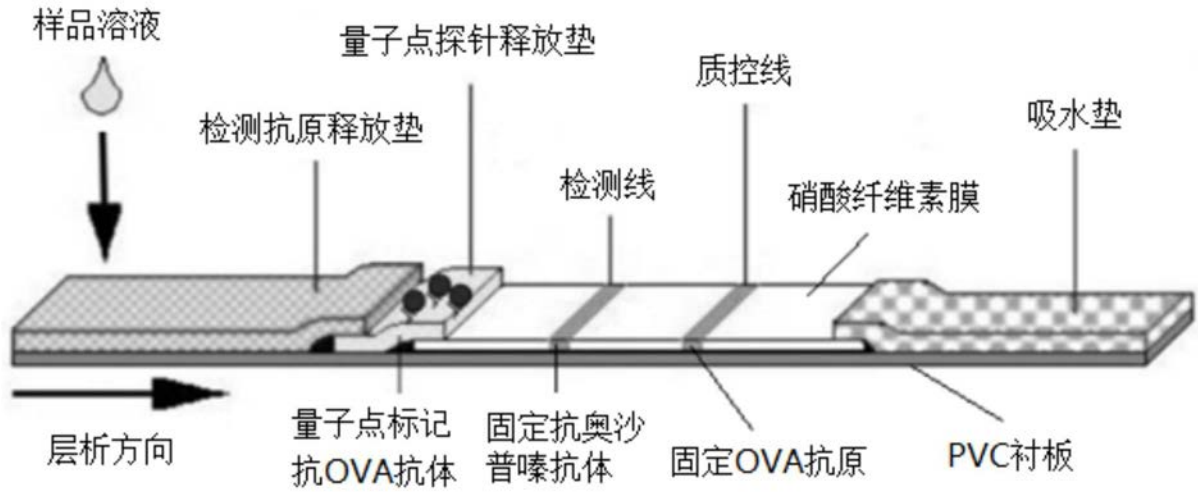


图1



图2a



图2b

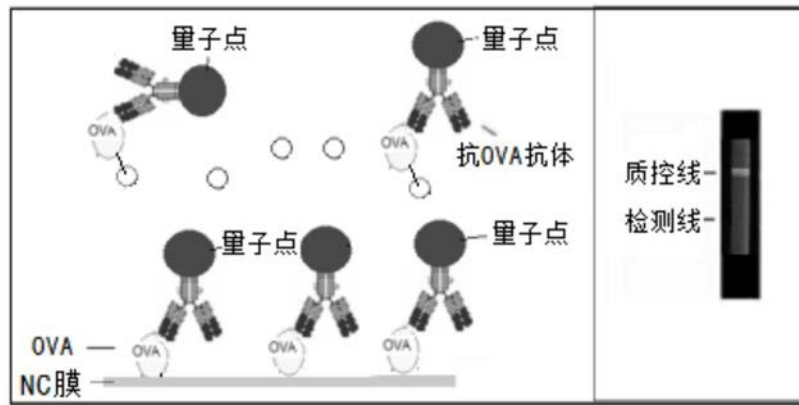


图3

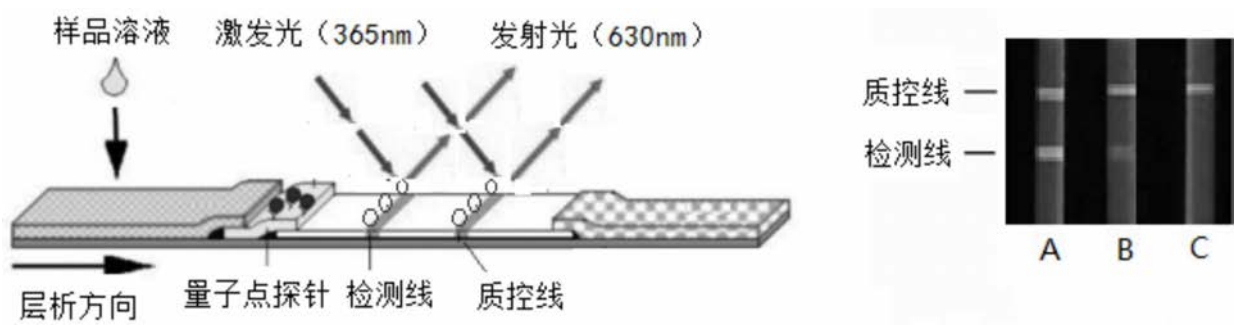


图4