



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109507419 B

(45) 授权公告日 2021.10.12

(21) 申请号 201811390815.X

(22) 申请日 2018.11.21

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109507419 A

(43) 申请公布日 2019.03.22

(73) 专利权人 军事科学院军事医学研究院环境
医学与作业医学研究所

地址 300041 天津市和平区大理道1号

(72) 发明人 周焕英 高志贤 任舒悦 王永辉
刘芳 刘忠文 宁保安

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 代芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108587626 A, 2018.09.28

CN 106512029 A, 2017.03.22

CN 108508215 A, 2018.09.07

CN 103293295 A, 2013.09.11

CN 104987866 A, 2015.10.21

CN 106492236 A, 2017.03.15

CN 108404137 A, 2018.08.17

Qin Wang等.Magnetic and luminescent
properties of Fe/Fe₃O₄@Y₂O₃:Eu
nanocomposites.《Journal of Alloys and
Compounds》.2011,第509卷

审查员 李倩

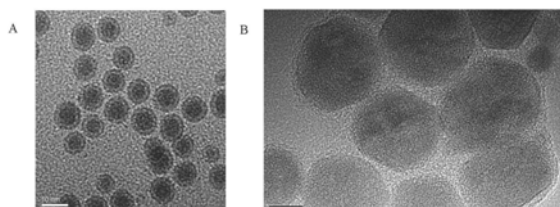
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用,属于食品安全检测技术领域。磁性上转换荧光复合微球,包括Fe内核、包覆所述Fe内核的Fe₃O₄壳层和包覆所述Fe₃O₄壳层的含有镧系元素的磁性上转换荧光壳层,形成一种核-壳-壳型磁性荧光复合微球;在所述磁性上转换荧光壳层的外表面修饰有-NH₂基团;所述磁性上转换荧光复合微球的直径为20~30nm。核-壳-壳型磁性上转换荧光复合微球作为荧光响应元件与四环素药物的单克隆抗体偶联来制备免疫层析试纸条。所述免疫层析试纸条具有检测灵敏度高的特点。



1. 一种磁性上转换荧光复合微球,其特征在于,包括Fe内核、包覆所述Fe内核的 Fe_3O_4 壳层和包覆所述 Fe_3O_4 壳层的含有镧系元素的磁性上转换荧光壳层;在所述磁性上转换荧光壳层的外表面修饰有 $-\text{NH}_2$ 基团;所述磁性上转换荧光复合微球的直径为20~30nm;

所述荧光复合微球的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将十六烷基铵和盐酸混合搅拌3.5~4.5h,固液分离,收集沉淀物,洗涤,得到氯化十六烷基铵;

(2) 将所述氯化十六烷基铵、油胺溶液和1-十八烯混合,在 N_2 保护下脱气,得到的脱气混合物加热至115~125℃保温反应20~35min,再与五羰铁溶液混合反应,待五羰铁反应产物降温至50~60℃时与油酸溶液混合反应,将油酸反应产物进行固液分离,收集的沉淀经洗涤后重悬于洗涤液中,得到 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液;

(3) 将镧系稀土氧化物与三氟乙酸混合,混合液在75~85℃条件下回流20~26h,干燥,得到镧系稀土前驱体;

(4) 将所述步骤(3)中镧系稀土前驱体、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和所述步骤(2)中 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液混合,在 N_2 保护下,将得到的混合物伴随搅拌加热至320~340℃保温反应,将反应产物冷却后和乙醇混合,将得到的乙醇混合物经磁分离,磁颗粒洗涤,收集的纳米微球沉淀为核-壳-壳结构磁性上转换复合微球;

(5) 将所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球进行氨基化,得到磁性上转换荧光复合微球;

其中步骤(1)~(2)和步骤(3)之间没有时间顺序的限制。

2. 根据权利要求1所述的磁性上转换荧光复合微球,其特征在于,所述镧系元素包括钇、镱或铒。

3. 权利要求1或2所述的磁性上转换荧光复合微球的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将十六烷基铵和盐酸混合搅拌3.5~4.5h,固液分离,收集沉淀物,洗涤,得到氯化十六烷基铵;

(2) 将所述氯化十六烷基铵、油胺溶液和1-十八烯混合,在 N_2 保护下脱气,得到的脱气混合物加热至115~125℃保温反应20~35min,再与五羰铁溶液混合反应,待五羰铁反应产物降温至50~60℃时与油酸溶液混合反应,将油酸反应产物进行固液分离,收集的沉淀经洗涤后重悬于洗涤液中,得到 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液;

(3) 将镧系稀土氧化物与三氟乙酸混合,混合液在75~85℃条件下回流20~26h,干燥,得到镧系稀土前驱体;

(4) 将所述步骤(3)中镧系稀土前驱体、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和所述步骤(2)中 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液混合,在 N_2 保护下,将得到的混合物伴随搅拌加热至320~340℃保温反应,将反应产物冷却后和乙醇混合,将得到的乙醇混合物经磁分离,磁颗粒洗涤,收集的纳米微球沉淀为核-壳-壳结构磁性上转换复合微球;

(5) 将所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球进行氨基化,得到磁性上转换荧光复合微球;

其中步骤(1)~(2)和步骤(3)之间没有时间顺序的限制。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中油胺溶液、1-十八烯、

五羰铁溶液和油酸溶液的体积和氯化十六烷基铵的质量比为0.3mL:20mL:0.7mL:0.2mL:

0.1g;所述油胺溶液的摩尔浓度为1mmol;所述油酸溶液的摩尔浓度为1mmol;所述五羰铁溶液的摩尔浓度为5mmol。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中镧系稀土氧化物的质量与三氟乙酸的体积比为3~3.5g:5mL;

所述步骤(4)中镧系稀土前驱体的质量、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和 $\text{Fe@Fe}_3\text{O}_4$ 溶液的体积比为1g:10mL:15mL:10mL;所述三氟乙酸钠溶液的摩尔浓度为2mmol;所述油胺溶液的摩尔浓度为1mmol。

6. 根据权利要求3~5任意一项所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(5)中氨基化的方法为将核-壳-壳结构磁性上转换复合微球、乙醇、氨水、水和正硅酸乙酯溶液混合在40~45℃条件下反应,再加入-氨丙基三乙氧基硅烷,40~45℃条件下继续反应,用乙醇沉淀颗粒后洗涤;所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球的质量、乙醇、氨水、水和正硅酸乙酯溶液、3-氨丙基三乙氧基硅烷的体积比为25mg:15mL:625μL:5mL:5μL:25μL。

7. 一种检测四环素的磁性上转换荧光免疫层析试纸条,包括底板和在所述底板上依次黏附的加样垫、结合垫、反应区和吸水垫,所述反应区包括检测区和质控区,其特征在于,所述结合垫包被有磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体;所述磁性上转换荧光复合微球为权利要求1或2所述磁性上转换荧光复合微球或权利要求3~6任意一项所述制备方法制备的磁性上转换荧光复合微球;

所述检测区包被有四环素药物半抗原-载体蛋白偶联物。

8. 根据权利要求7所述的试纸条,其特征在于,所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的喷涂量为12~13μL/cm²;所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的浓度为2.5mg/mL。

9. 根据权利要求7或8所述的试纸条,其特征在于,所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

A. 将磁性上转换荧光复合微球混悬液和体积浓度25%戊二醛水溶液在振荡条件下混合,所得混合物固液分离,得到的沉淀重悬后,所得重悬液和四环素药物单克隆抗体溶液混合,超声振荡,固液分离,收集沉淀重悬;

B. 将重悬后的磁性上转换荧光复合微球-抗体偶联物进行封闭,再次固液分离,得到的沉淀重悬,得到磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体。

10. 权利要求7~9任意一项所述的免疫层析试纸条在检测食品四环素残留中的应用。

一种检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测技术领域,具体涉及一种检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 四环素(Tetracycline,TC),是四环素族抗生素中最基本的化合物。该类抗生素广泛应用于革兰阳性和阴性细菌、细胞内支原体、衣原体和立克次氏体引起的感染。因其广谱抗菌活性、良好的口服吸收效果、低毒性、低成本等特点得到了广泛的应用。随着临床上四环素类抗生素耐药菌的大量产生及其不良反应的深入了解,部分四环素类抗生素逐渐从临床应用退出。然而,包括美国在内的许多国家,将四环素作为生长促进剂投喂给动物,导致副产品中残留四环素的问题。目前,在肉、蜂蜜和牛奶等动物产品中发现了四环素残留。由于人类处于食物链的顶端,通过食物链的富集作用,动物产品中残留的四环素会对人体造成危害甚至无形地加强了细菌对四环素类抗生素的抗性。为此,世界各国对TCs残留的检测十分关注。我国规定了牛奶中四环素残留限量为100 μ g/L,加强对四环素药物检测技术的研究和快速检测技术的发展是非常有必要的。

[0003] 目前,检测四环素比较经典的方法包括高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)等,这些都是比较传统的方法,也是目前的确证方法。另外,目前常用的还有酶联免疫法(ELISA)。但由于以上方法均需先进的检测仪器,检测费用昂贵、步骤繁琐耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适用于基层企事业单位的大通量快速筛查检测。胶体金免疫层析法具有检测速度快、价格便宜、操作简单等优点,是目前国内外检测四环素药物的主要监控方法,但仍存在一些缺陷,如稳定性较差、灵敏度较低、无法实现定量检测、基质效应明显背景干扰大,且颜色单一,难以实现批量检测的目的。

[0004] 上转换荧光免疫层析技术是继胶体金免疫层析技术后,在磁性上转换荧光复合微球标记技术上发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它结合了上转换荧光技术、免疫标记技术和免疫层析技术的各个优点,具有快速、操作简便等优势。上转换荧光颗粒作为标记物,与胶体金、磁性纳米材料、乳胶微球、量子点、荧光素等相比,该标记物属于惰性无机发光材料,具有耐用性强、稳定性好、有效期长、通量高、无干扰等特点,已成为标记免疫层析技术的研究热点。但是传统的上转换磁性上转换荧光复合微球的发光强度随粒径增大而增强,为了保证检测的荧光强度,过大的粒径会导致在层析过程中流动性差,从而降低检测灵敏度。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供磁性上转换荧光复合微球及其制备方法、检测四环素层析试纸条及其应用,所述磁性上转换荧光复合微球具有稳定性好且发光效率高的

特点,以磁性上转换荧光复合微球作为发色标志物制备的检测四环素层析试纸条检测灵敏度高。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种磁性上转换荧光复合微球,包括Fe内核、包覆所述Fe内核的 Fe_3O_4 壳层和包覆所述 Fe_3O_4 壳层的含有镧系元素的磁性上转换荧光壳层;在所述磁性上转换荧光壳层的外表面修饰有 $-\text{NH}_2$ 基团;所述磁性上转换荧光复合微球的直径为20~30nm。

[0008] 优选的,所述镧系元素包括钇、镱或铒。

[0009] 本发明提供了所述磁性上转换荧光复合微球的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 将十六烷基铵和盐酸混合搅拌3.5~4.5h,固液分离,收集沉淀物,洗涤,得到氯化十六烷基铵;

[0011] (2) 将所述氯化十六烷基铵、油胺溶液和1-十八烯混合,在 N_2 保护下脱气,得到的脱气混合物加热至115~125℃保温反应,再与五羰铁溶液混合反应,待五羰铁反应产物降温至50~60℃时与油酸溶液混合反应,将油酸反应产物进行固液分离,收集的沉淀经洗涤后重悬于洗涤液中,得到 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液;

[0012] (3) 将镧系稀土氧化物与三氟乙酸混合,混合液在75~85℃条件下回流,干燥,得到镧系稀土前驱体;

[0013] (4) 将所述步骤(3)中镧系稀土前驱体、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和所述步骤(2)中 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液混合,在 N_2 保护下,将得到的混合物伴随搅拌加热至320~340℃保温反应,将反应产物冷却后和乙醇混合,将得到的乙醇混合物经磁分离,磁颗粒洗涤,收集的纳米微球沉淀为核-壳-壳结构磁性上转换复合微球;

[0014] (5) 将所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球进行氨基化,得到磁性上转换荧光复合微球;

[0015] 其中步骤(1)~(2)和步骤(3)之间没有时间顺序的限制。

[0016] 优选的,所述步骤(2)中油胺溶液、1-十八烯、五羰铁溶液和油酸溶液的体积和氯化十六烷基铵的质量比为0.3mL:20mL:0.7mL:0.2mL:0.1g;所述油胺溶液的摩尔浓度为1mmol;所述油酸溶液的摩尔浓度为1mmol;所述五羰铁溶液的摩尔浓度为5mmol。

[0017] 优选的,所述步骤(3)中镧系稀土氧化物的质量与三氟乙酸的体积比为3~3.5g:5mL;

[0018] 所述步骤(4)中镧系稀土前驱体的质量、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液的体积比为1g:10mL:15mL:10mL;所述三氟乙酸钠溶液的摩尔浓度为2mmol;所述油胺溶液的摩尔浓度为1mmol。

[0019] 优选的,所述步骤(5)中氨基化的方法为将核-壳-壳结构磁性上转换复合微球、乙醇、氨水、水和正硅酸乙酯溶液混合,在40℃条件下反应,再加入-氨丙基三乙氧基硅烷,40℃条件下继续反应,用乙醇沉淀颗粒后洗涤;所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球的质量、乙醇、氨水、水和正硅酸乙酯溶液、3-氨丙基三乙氧基硅烷的体积比为25mg:15mL:625μL:5mL:5μL:25μL。

[0020] 本发明提供了一种检测四环素的磁性上转换荧光免疫层析试纸条,包括底板和在所述底板上依次黏附的加样垫、结合垫、反应区和吸水垫,其中所述反应区包括检测区和质控区,所述结合垫包被有磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体;

[0021] 所述磁性上转换荧光复合微球为上述方案所述磁性上转换荧光复合微球或上述制备方法制备的磁性上转换荧光复合微球；

[0022] 所述检测区包被有四环素药物半抗原-载体蛋白偶联物。

[0023] 优选的，所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的喷涂量为 $12 \sim 13 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ；所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的浓度为 $2.5 \text{mg}/\text{mL}$ 。

[0024] 优选的，所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

[0025] A. 将磁性上转换荧光复合微球混悬液和体积浓度25%戊二醛水溶液在振荡条件下混合，所得混合物固液分离，得到的沉淀重悬后，所得重悬液和四环素药物单克隆抗体溶液混合，超声振荡，固液分离，收集沉淀重悬；

[0026] B. 将重悬后的磁性上转换荧光复合微球-抗体偶联物进行封闭，再次固液分离，得到的沉淀重悬，得到磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体。

[0027] 本发明提供了所述的免疫层析试纸条在检测食品四环素残留中的应用。

[0028] 本发明提供了一种磁性上转换荧光复合微球，包括Fe内核、包覆所述Fe内核的 Fe_3O_4 壳层和包覆所述 Fe_3O_4 壳层的含有镧系元素的磁性上转换荧光壳层，形成一种核-壳-壳型磁性荧光复合微球；在所述磁性上转换荧光壳层的外表面修饰有-NH₂基团；所述磁性上转换荧光复合微球的直径为 $20 \sim 30 \text{nm}$ 。所述磁性上转换荧光复合微球以Fe作为内核，中间包覆一层 Fe_3O_4 壳，该结构增强了金属局域等离子共振效应，增强对镧系上转换荧光的光信号，从而提高磁性上转换荧光复合微球的发光效率高，同时核-壳-壳型磁性荧光复合微球结构稳定，具有较大反stock位移，无由激发光引起的荧光背景对检测的干扰，能够长期稳定的增强发光效率，提高荧光检测稳定性，从而解决本申请的技术问题。

[0029] 同时，本发明提供的磁性上转换荧光复合微球，磁性Fe内核的存在能缩短上转换颗粒的核磁共振横向弛豫时间，使上转换颗粒对其周围水分子运动的影响增强，从而增强了颗粒的亲水性，增加了复合微球的生物相容性，能大量吸附抗体偶联物、迅速湿润、充分释放抗体结合物，从而减少误差，降低成本，增加后续制备成检测试纸条的反应灵敏度。荧光寿命长，消除了环境中荧光物质对待测物的干扰，使检测光信号结果更加准确。

[0030] 本发明提供了一种检测四环素的磁性上转换荧光免疫层析试纸条，采用所述核-壳-壳型磁性上转换荧光复合微球作为荧光响应元件，磁性上转换荧光复合微球表面修饰活性基团-NH₂，与四环素药物的单克隆抗体偶联，形成抗体与微球的稳定结合。基于核-壳-壳型磁性上转换荧光复合微球的发光效率高、生物相容性高的特点，大大提高了检测灵敏度。本发明提供的免疫层析试纸条具有检测范围广，检测限低的特点。实验证明，线性检测范围为 $5 \sim 2000 \text{ng}/\text{mL}$ 范围内检测结果准确，检测限为 $3.78 \text{ng}/\text{mL}$ 。与常规方法相比，本发明提供的免疫层析试纸条的线性检测范围提高了一个数量级，检测灵敏度提高了两个数量级。

附图说明

[0031] 图1为磁性上转换荧光纳米颗粒透射电镜表征图；图1-A为 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微球的电镜表征图；图1-B为 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UCP}$ 的电镜表征图；

[0032] 图2为磁性上转换荧光免疫层析试纸剖面结构示意图；

- [0033] 图3为组装后磁性上转换荧光免疫层析试纸俯视图；
- [0034] 图4为本发明绘制的抑制率I (%)与四环素药物浓度lgC的关系曲线；
- [0035] 图5为磁性上转换荧光免疫层析试纸条的特异性实验检测结果。

具体实施方式

[0036] 本发明提供了一种磁性上转换荧光复合微球,包括Fe内核、包覆所述Fe内核的 Fe_3O_4 壳层和包覆所述 Fe_3O_4 壳层的含有镧系元素的磁性上转换荧光壳层;在所述磁性上转换荧光壳层的外表面修饰有 $-\text{NH}_2$ 基团;所述磁性上转换荧光复合微球的直径为20~30nm。

[0037] 本发明提供的磁性上转换荧光复合微球,所述微球以Fe作为内核,中间包覆一层 Fe_3O_4 壳,外层包裹一层含有镧系元素的磁性上转换荧光壳层,形成核-壳-壳型结构,与现有技术中 Fe_3O_4 壳-上转换荧光壳层的复合微球相比,所述核-壳-壳型结构增强了金属局域等离子共振效应,对镧系上转换荧光具有增强作用。并且磁性内核的存在缩短了上转换颗粒的核磁共振横向弛豫时间,使上转换颗粒对其周围水分子运动的影响增强,从而增强了颗粒的亲水性,可大量吸附抗体偶联物、迅速湿润、充分释放抗体结合物,从而减少误差,降低成本,增加整个体系的反应灵敏度。同时上转换荧光具有较大反stock位移,无由激发光引起的荧光背景对检测的干扰,提高荧光检测稳定性;其荧光寿命长,消除了环境中荧光物质对待测物的干扰,使检测结果更加准确。

[0038] 本发明对镧系元素的种类没有特殊限制,采用本领域技术人员所熟知的镧系元素即可。所述镧系元素优选包括铈、镱或铒。在本发明实施例中,以制备铈元素为镧系元素的代表制备复合微球,说明复合微球的性能。

[0039] 本发明提供了所述磁性上转换荧光复合微球的制备方法,包括以下步骤:

[0040] (1) 将十六烷基铵和盐酸混合搅拌3.5~4.5h,固液分离,收集沉淀物,洗涤,得到氯化十六烷基铵;

[0041] (2) 将所述氯化十六烷基铵、油胺溶液和1-十八烯混合,在 N_2 保护下脱气,得到的脱气混合物加热至115~125℃保温反应,再与五羰铁溶液混合反应,待五羰铁反应产物降温至50~60℃时与油酸溶液混合反应,将油酸反应产物进行固液分离,收集的沉淀经洗涤后重悬于洗涤液中,得到 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液;

[0042] (3) 将镧系稀土氧化物与三氟乙酸混合,混合液在75~85℃条件下回流,干燥,得到镧系稀土前驱体;

[0043] (4) 将所述步骤(3)中镧系稀土前驱体、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和所述步骤(2)中 $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 溶液混合,在 N_2 保护下,将得到的混合物伴随搅拌加热至320~340℃保温反应,将反应产物冷却后和乙醇混合,将得到的乙醇混合物经磁分离,磁颗粒洗涤,收集的纳米微球沉淀为核-壳-壳结构磁性上转换复合微球;

[0044] (5) 将所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球进行氨基化,得到磁性上转换荧光复合微球;

[0045] 其中步骤(1)~(2)和步骤(3)之间没有时间顺序的限制。

[0046] 本发明将十六烷基铵和盐酸混合搅拌3.5~4.5h,固液分离,收集沉淀物,洗涤,得到氯化十六烷基铵。

[0047] 本发明对所述搅拌的方式没有特殊限制,采用本领域所熟知的手动搅拌或机械搅

拌均可。所述搅拌的速度优选为500~750rpm,更优选为700rpm。所述搅拌的时间优选为4h。本发明对所述固液分离的方式没有特殊限制,采用本领域所熟知的固液分离方式即可。在本发明实施例中,所述固液分离采用静置后倾倒的方法进行。

[0048] 在本发明中,所述洗涤用溶剂优选为己烷。所述洗涤的次数优选为2~4次,更优选为3次。本发明对十六烷基铵和盐酸的来源没有特殊限制,采用本领域所熟知的商业途径购买得到。

[0049] 得到氯化十六烷基铵后,本发明将所述氯化十六烷基铵、油胺溶液和1-十八烯混合,在 N_2 保护下脱气,得到的脱气混合物加热至115~125℃保温反应,再与五羰铁溶液混合反应,待五羰铁反应产物降温至50~60℃时与油酸溶液混合反应,将油酸反应产物进行固液分离,收集的沉淀经洗涤后重悬于洗涤液中,得到 $Fe@Fe_3O_4$ 溶液。

[0050] 在本发明中,所述脱气的时间优选为35~45min,更优选为40min。所述保温反应的时间优选为25~35min,更优选为30min。所述加热上限温度优选为120℃。与五羰铁溶液混合反应的时间优选为20~30min,更优选为25min。油酸溶液混合时的温度优选为60℃。所述与油酸混合反应的时间优选为8~12min,更优选为10min。本发明对所述固液分离的方式没有特殊限制,采用本领域所熟知的固液分离方式即可。在本发明实施例中,所述固液分离采用静置后倾倒的方法进行。

[0051] 在本发明中,所述油胺溶液、1-十八烯、五羰铁溶液和油酸溶液的体积和氯化十六烷基铵的质量比优选为0.3mL:20mL:0.7mL:0.2mL:0.1g,更优选为0.3mL:20mL:0.7mL:0.2mL:0.1g。所述油胺溶液的摩尔浓度优选为0.8~1.2mmol,更优选为1mmol;所述油酸溶液的摩尔浓度优选为0.8~1.2mmol,更优选为1mmol;所述五羰铁溶液的摩尔浓度优选为4.5~5.5mmol,更优选为5mmol。本发明对所述油胺、五羰铁和油酸的来源没有特殊限制,采用本领域所熟知的商业购买途径获得即可。

[0052] 在本发明中,洗涤用溶剂优选为己烷。所述洗涤的次数优选为2~4次,更优选为3次。所述 $Fe@Fe_3O_4$ 溶液的浓度优选为0.5~1.5mg/mL,更优选为1mg/mL。

[0053] 本发明将镧系稀土氧化物与三氟乙酸混合,混合液在75~85℃条件下回流,干燥,得到镧系稀土前驱体。

[0054] 在本发明中,所述镧系稀土氧化物的质量与三氟乙酸的体积比优选为3g:5mL。所述镧系稀土氧化物包括氧化镱、氧化钕或氧化钐。

[0055] 在本发明中,所述回流的温度优选为80℃。所述回流的时间优选为22~26h,更优选为24h。干燥的温度优选为60℃。干燥的时间没有限制,达到含水量低于20%即可。

[0056] 得到镧系稀土前驱体后,本发明将所述镧系稀土前驱体、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和所述 $Fe@Fe_3O_4$ 溶液混合,在 N_2 保护下,将得到的混合物伴随搅拌加热至320~340℃保温反应,将反应产物冷却后和乙醇混合,将得到的乙醇混合物经磁分离,磁颗粒洗涤,收集的纳米微球沉淀为核-壳-壳结构磁性上转换复合微球。

[0057] 在本发明中,所述镧系稀土前驱体的质量、三氟乙酸钠溶液、油胺溶液和 $Fe@Fe_3O_4$ 溶液的体积比优选为0.8~1.2g:8~12mL:15~18mL:10~15mL,更优选为1g:10mL:15mL:10mL;所述三氟乙酸钠溶液的摩尔浓度优选为1.5~2mmol,更优选为2mmol;所述油胺溶液的摩尔浓度优选为0.8~1mmol,更优选为1mmol。

[0058] 在本发明中,所述保温反应的时间优选为50~70min,更优选为60min。所述冷却的

温度优选为80℃以下。所述乙醇的添加体积为10mL。洗涤用溶剂优选为己烷。所述洗涤的次数优选为2~4次,更优选为3次。

[0059] 得到核-壳-壳结构磁性上转换复合微球后,本发明将所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球进行氨基化,得到磁性上转换荧光复合微球。

[0060] 在本发明中,所述氨基化的方法优选为将核-壳-壳结构磁性上转换复合微球、乙醇、氨水、水和正硅酸乙酯溶液混合,在40~45℃条件下反应,再加入-氨丙基三乙氧基硅烷,40~45℃条件下继续反应,用乙醇沉淀颗粒后去离子水洗涤。所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球的质量、乙醇、氨水、水和正硅酸乙酯溶液、3-氨丙基三乙氧基硅烷的体积比优选为25mg:15mL:625μL:5mL:5μL:25μL。所述反应或继续反应的时间优选为5~7h,更优选为6h。所述反应的温度优选为40℃。

[0061] 基于本发明提供的磁性上转换荧光复合微球具有较强的荧光效果、荧光稳定性好,生物相容性强,光信号干扰低的特点,以磁性上转换荧光复合微球作为抗体的荧光标记物标记抗体,用于制备免疫层析试纸条。本发明提供了一种检测四环素的磁性上转换荧光免疫层析试纸条(见图2),包括底板和在所述底板上依次黏附的加样垫、结合垫、反应区和吸水垫,其中所述反应区包括检测区和质控区,所述结合垫包被有磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体;

[0062] 所述检测区包被有四环素药物半抗原-载体蛋白偶联物。

[0063] 在本发明中,所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的喷涂量优选为12~13μL/cm²,更优选为12.5μL/cm²。所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的浓度优选为2~3mg/mL,更优选为2.5mg/mL。

[0064] 在本发明中,所述磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的制备方法,优选包括以下步骤:

[0065] A.将磁性上转换荧光复合微球混悬液和体积浓度25%戊二醛水溶液在振荡条件下混合,所得混合物固液分离,得到的沉淀重悬后,所得重悬液和四环素药物单克隆抗体溶液混合,超声振荡,固液分离,收集沉淀重悬;

[0066] B.将重悬后的磁性上转换荧光复合微球-抗体偶联物进行封闭,再次固液分离,得到的沉淀重悬,得到磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体溶液。

[0067] 在本发明中,磁性上转换荧光复合微球混悬液和体积浓度25%戊二醛水溶液的体积比为5:1.5mL。所述磁性上转换荧光复合微球混悬液中磁性上转换荧光复合微球的质量为100mg。磁性上转换荧光复合微球混悬液的溶剂为pH值7.5~8.5,0.01mol/L的硼酸盐缓冲液。所述混合的时间优选为2h。所述固液分离的方式优选为离心。所述离心的转速优选为8000~12000rpm,更优选为10000rpm。所述离心的时间优选为5~15min,更优选为10min。

[0068] 在本发明中,所述沉淀重悬用溶剂为去离子水。重悬用溶剂的体积为2mL。所述四环素药物单克隆抗体溶液的浓度优选为2~3mg/mL,更优选为2.5mg/mL。重悬液和四环素药物单克隆抗体溶液的体积比为100:1。

[0069] 在本发明中,超声振荡的条件如下:功率:150W;温度:0~8℃;时间:25~30min。所述固液分离或再次固液分离的方法优选离心。所述离心的温度优选为4℃,所述离心的转速优选为10000r/min。所述离心的时间为10min。重悬后的磁性上转换荧光复合微球-抗体偶联物的浓度为2.5mg/mL。

[0070] 在本发明中,所述封闭用溶液优选为BSA溶液。所述BSA溶液的质量浓度优选为20%。封闭的时间优选为5min。

[0071] 在本发明中,磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体溶液优选在贮存缓冲液中4℃避光保存。所述贮存缓冲液的含量成分如下:含质量浓度0.01%NaN₃、质量浓度0.1%BSA的pH值7.4的PB缓冲液。

[0072] 在本发明中,四环素药物半抗原-载体蛋白偶联物的包被浓度优选为90~110μg/mL,更优选为100μg/mL。四环素药物半抗原-载体蛋白偶联物的喷涂量为0.9~1.2μL/cm。

[0073] 在本发明中,所述质控区包被羊抗鼠抗抗体。所述羊抗鼠抗抗体为200μg/mL。所述羊抗鼠抗抗体的喷膜量优选为1.0μL/cm。

[0074] 在本发明中,底板、结合垫、加样垫和吸收垫的材质采用本领域所熟知的材质即可。

[0075] 本发明对所述免疫层析试纸条的制备方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的层析试纸条的制备方法即可。所述免疫层析试纸条在2~8℃环境中保存,有效期12个月。

[0076] 本发明提供了所述的免疫层析试纸条在检测食品四环素残留中的应用。

[0077] 在本发明中,所述检测食品四环素残留的方法,优选包括以下步骤:

[0078] 吸取100μL待检样品溶液于所述免疫层析试纸条的加样孔中,室温反应15min;将试纸卡插入UPT-3A型荧光检测仪的承载器中,通过触摸显示屏选择待检项目,按下“开始检测”按键,荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试;通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

[0079] 测试完成后,仪器获得试纸卡上检测区磁性上转换荧光强度与质控区磁性上转换荧光强度的比值,根据公式1,其中T₀和C₀分别是阴性样品T线和C线的荧光强度值,而T和C是不同浓度四环素标准溶液(0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、50、100ng/mL)检测得到的T线和C线的荧光强度值,绘制计算得到的抑制率I(%)与四环素药物浓度lgC的关系曲线(图4),得到线性检测范围为0.05~10ng/mL。获得待测样品荧光强度比值,通过标准曲线公式2计算得到提取液中四环素药物的含量,最后经换算即得待测样品中四环素药物的含量。

[0080] 式1I=[(T₀/C₀-T/C)÷T₀/C₀]×100;

[0081] 式2I=56.037+37.809lgC。

[0082] 除定量检测外,所述应用还包括半定量检测,具体方法如下:测试完成后,仪器将根据检测得到的检测区磁性上转换荧光强度与质控区磁性上转换荧光强度的比值,自动计算出提取液中四环素药物的浓度值,并根据预设的阈值给出阴阳性判断。阴性(-):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阴性,表示样本中不含有四环素药物或其浓度低于检测限。阳性(+):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阳性,表示样本中四环素药物浓度等于或高于检测限。无效:若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0083] 下面结合实施例对本发明提供的一种检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0084] 原料来源说明:

[0085] 实验中所用到的四环素及其类似物(土霉素、金霉素和盐酸强力霉素)标准品购自

百灵威公司。

[0086] 四环素单克隆抗体及羊抗鼠抗抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

[0087] 仪器来源说明:

[0088] LGJ-10D型冷冻干燥机购自北京四环科学仪器厂;

[0089] HM3010单维往复划膜仪、ZQ2000微电脑自动斩切机购自上海金标公司;

[0090] UPT-3A便携式上转换发光免疫分析仪购自北京热景生物技术有限公司。

[0091] 实施例1

[0092] 表面氨基化核-壳-壳型磁性上转换荧光复合微球的合成方法

[0093] (1) 制备氯化十六烷基铵(HDA·HCl):十六烷基铵和盐酸搅拌4h后,丢弃上清液,沉淀物用己烷洗涤3次,最终得到HDA·HCl。

[0094] (2) 制备Fe@Fe₃O₄核-壳结构磁性微球:在三口烧瓶中,将油胺(OM)溶液(0.3mL, 1mmol)和1-十八烯(ODE, 20mL)与步骤(1)合成的HDA·HCl(0.1g, 1mmol)的混合物进行搅拌,在N₂保护下脱气40min,将混合物加热到120℃,保温反应30min。随后向混合物中快速加入五羰铁溶液(0.7mL, 5mmol),反应25min,待温度降至60℃后,加入油酸溶液(0.2mL, 1mmol)反应10min,冷却至室温。将上清液倒出,沉淀用环己烷洗涤三次后重新分散在环己烷中,得到Fe@Fe₃O₄溶液。

[0095] (3) 制备Fe@Fe₃O₄@UCP核-壳-壳结构磁性上转换复合微球:将10mmol重量的稀氧化钪溶于含5mL三氟乙酸(CF₃COOH)的100mL烧瓶中,在80℃条件下回流24h,在60℃条件下干燥,得到镧系稀土前驱体。向步骤(2)制备的Fe@Fe₃O₄溶液中加入1mmol相应的稀土前驱体溶液、2mmol的CF₃COONa溶液和15mL OM溶液。随后,在N₂保护下,将所得混合物在磁力搅拌条件下快速加热到340℃,反应1h。随后将反应混合物冷却至80℃,向体系中加入10mL乙醇,冷却至室温。通过磁分离收集所得纳米微球,并用环己烷多次洗涤。将所得核-壳-壳结构磁性上转换复合微球在60℃真空干燥24h,得到核-壳-壳结构磁性上转换复合微球。

[0096] (4) 称取25mg所述核-壳-壳结构磁性上转换复合微球置于50mL圆底烧瓶中,加入15mL乙醇、625μL氨水、5mL水和15μL正硅酸乙酯,在40℃加热搅拌6h后加入25μL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,在40℃继续反应6h。反应结束后,用乙醇沉淀颗粒,随后用去离子水洗涤沉淀3次,离心收集。

[0097] 制备的核-壳-壳结构磁性上转换复合微球进行电镜观察。结果见图1。图1-A为Fe@Fe₃O₄微球的电镜表征图;图1-B为Fe@Fe₃O₄@UCP的电镜表征图。

[0098] 实施例2

[0099] 磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的制备

[0100] (1) 偶联:10mg实施例1制备的磁性上转换荧光复合微球分散于5mL缓冲液(所述缓冲液为pH值为7.5~8.5, 0.01mol/L的硼酸盐缓冲液)中,加入1.5mL体积浓度25%戊二醛水溶液,缓慢振荡2h,离心分离后重悬于2mL去离子水中并加入20μL浓度为2.5mg/mL单抗,超声振荡20min,在4℃条件下10000r/min的转速离心10min后弃上清,重悬于缓冲液中;

[0101] (2) 封闭:将步骤(1)所述混悬液加入质量浓度20%BSA溶液中超声振荡封闭5min, 4℃10000r/min离心10min后弃上清,重悬于缓冲液中;

[0102] (3) 贮存:将步骤(2)所述混悬液于4℃条件下10000r/min的速度离心10min后弃上清,重悬于贮存缓冲液中,以此法洗涤微球1次,混匀后于4℃避光保存。

[0103] 实施例3

[0104] 层析免疫试纸条的组装

[0105] 1、将实施例2制备的磁性上转换荧光复合微球标记的四环素药物单克隆抗体冻干到结合垫上,具体步骤如下:

[0106] 将贮存的磁性上转换荧光复合微球标记的四环素药物单克隆抗体用10mL冻存缓冲液稀释成0.5mg/mL后,向结合垫上以12.5μL/cm²滴加,随后放入冷冻干燥机中,在冷阱温度为-50℃条件下,预冻2h后,再真空干燥12h,即可取出,得到冻干有磁性上转换荧光复合微球标记四环素药物单克隆抗体的结合垫,密封保存。

[0107] 2、硝酸纤维素(NC)膜的制备

[0108] 用0.05mol/L、pH 7.2的PBS缓冲液将四环素药物半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到100μg/mL,用Isoflow点膜仪将其喷涂于NC膜上的检测区(T),喷膜量为1.0μL/cm;用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200μg/mL,用上海金标划膜仪将其喷涂于NC膜上的质控区(C),喷膜量为1.0μL/cm。将制备好的NC膜置于37℃条件下干燥1h,备用。

[0109] 3、试纸条的组装

[0110] 将加样垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,加样垫的末端与结合垫的始端相连接结合垫的末端与硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,加样垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成4mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡(图2和图3)。

[0111] 将试纸卡与微孔试剂组装成四环素药物磁性上转换荧光免疫层析试纸条,在2~8℃阴凉避光干燥保存,有效期为12个月。

[0112] 实施例4

[0113] 检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条的应用

[0114] 1、样品前处理

[0115] 准确称取10g±0.01g牛奶样品至10mL离心管中,加入2mL甲醇,涡动10min充分混匀;3000r/min离心5min,取上清待检。

[0116] 2、用试纸条检测

[0117] 吸取100μL待检样品溶液于加样孔中,室温反应15min;将试纸卡插入UPT-3A型荧光检测仪的承载器中,通过触摸显示屏选择待检项目,按下“开始检测”按键,荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试;通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

[0118] 3、检测结果分析方法

[0119] (1) 定量检测

[0120] 测试完成后,仪器获得试纸卡上检测区磁性上转换荧光强度与质控区磁性上转换荧光强度的比值,根据公式1,其中T₀和C₀分别是阴性样品T线和C线的荧光强度值,而T和C是不同浓度四环素标准溶液(0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、50、100ng/mL)检测得到的T线和C线的荧光强度值,绘制计算得到的抑制率I(%)与四环素药物浓度lgC的关系曲线(图4),得到线性检测范围为0.05~10ng/mL。获得待测样品荧光强度比值,通过标准曲线公式2计算得到提取液中四环素药物的含量,最后经换算即得待测样品中四环素药物的含量。

[0121] 公式1 $I = [(T_0/C_0 - T/C) \div T_0/C_0] \times 100$;

[0122] 公式 $2I = 56.037 + 37.809 \log C$ 。

[0123] 4、检测限试验

[0124] 将空白牛奶样品20份用磁性上转换荧光免疫层析试纸条进行检测,根据荧光检测仪结果计算得到检测限为:0.033ng/mL。采用常规方法制备镧系上转换荧光颗粒标记的单抗制备的试纸条线性检测范围为5~2000ng/mL,检测限为3.78ng/mL。

[0125] 本方法与常规方法相比,线性检测范围提高了一个数量级,灵敏度提高了两个数量级。

[0126] 5、假阳性率、假阴性率试验

[0127] 取空白牛奶样品,及添加四环素药物至检测限浓度的牛奶样品各4份,用3个批次生产的磁性上转换荧光免疫层析试纸条分别进行检测,计算其阴阳性率。结果见表1。

[0128] 表1检测阳性、阴性样本结果

[0129]

样本	添加浓度 (ng/mL)	检出浓度 (ng/mL)	样本结果
空白样本 1	0	0	阴性
空白样本 2	0	0	阴性
空白样本 3	0	0	阴性
空白样本 4	0	0	阴性
加标样本 1	0.05	0.04±0.35	阳性
加标样本 2	0.5	0.42±0.22	阳性
加标样本 3	5	5.43±0.41	阳性
加标样本 4	50	52.45±0.37	阳性

[0130] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性样品时,结果全为阳性,可知阳性符合率为100%,假阴性率为0;检测阴性样品时,结果全为阴性,可知阴性符合率为100%,假阳性率为0。这说明本发明的检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条可以对动物组织样品中四环素药物残留进行快速检测。

[0131] 6、特异性试验

[0132] 用检测四环素药物的磁性上转换荧光免疫层析试纸条检测100ng/mL的土霉素、金霉素、盐酸强力霉素等药物,结果全为阴性(见图5)。这说明说明本试纸条对100ng/mL的土霉素、金霉素、盐酸强力霉素等药物无交叉反应,特异性较好。

[0133] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

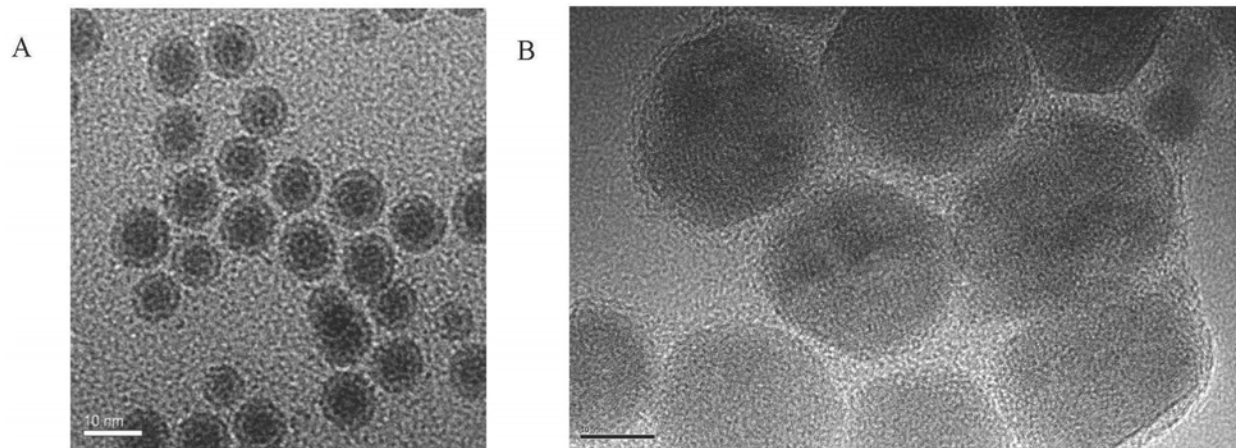


图1

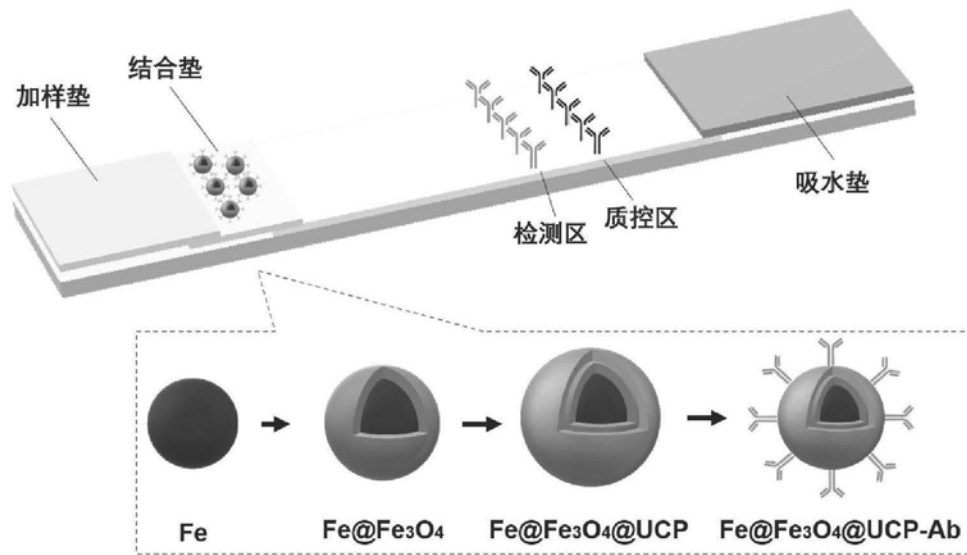


图2

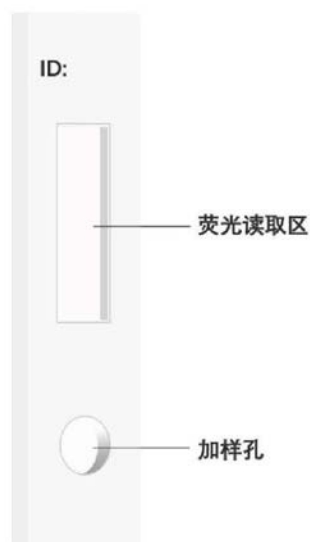


图3

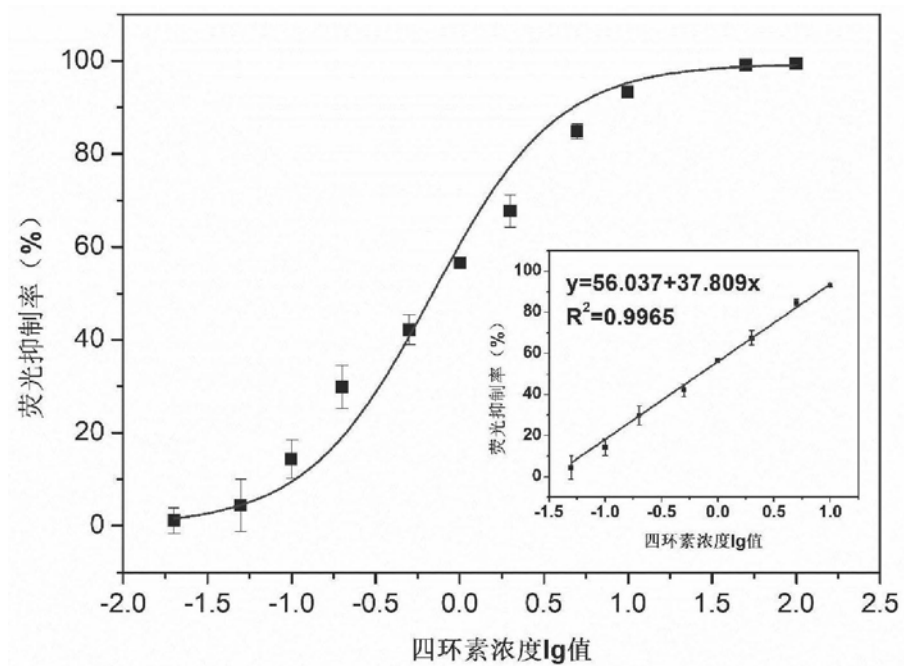


图4

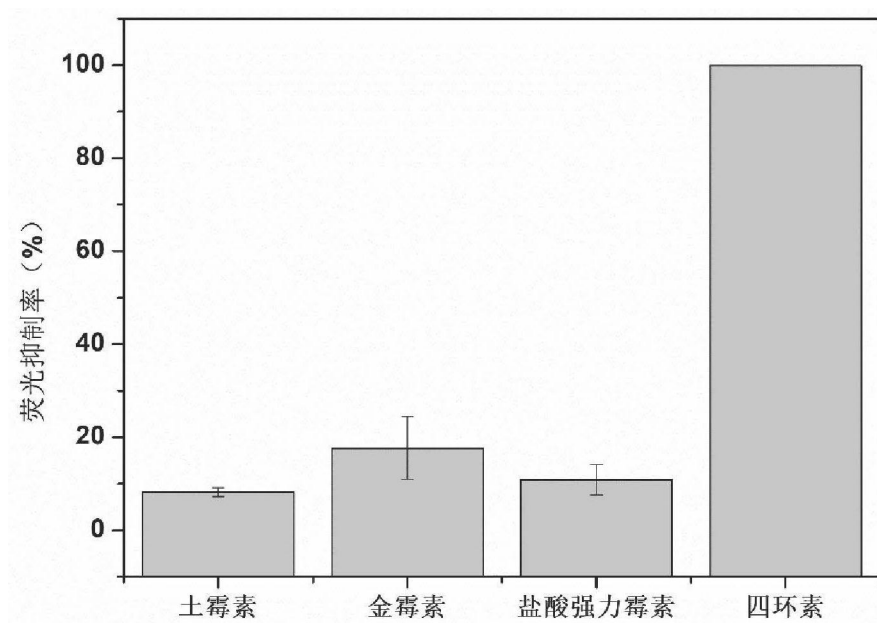


图5