(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108717122 A
(43)申请公布日 2018.10.30

(21)申请号 201810559617.5

(22)申请日 2018.06.02

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:C201670 2016.06.08

(71)申请人 暨南大学
地址 510000 广东省广州市黄埔大道西601号

(72)发明人 向军俭

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

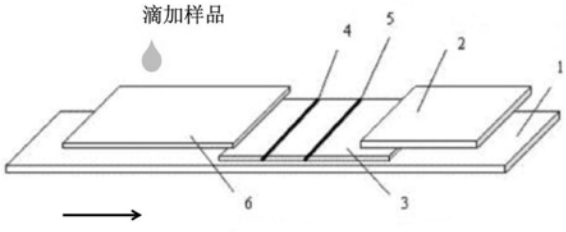
权利要求书1页 说明书14页 附图3页

(54)发明名称

一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其在检测样品铜离子浓度中的应用,属于铜离子检测技术领域;所述免疫荧光层析试纸条包括依次搭接的玻璃纤维垫、硝酸纤维膜和吸水纸;所述玻璃纤维垫上喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物;所述硝酸纤维素膜依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线和包被二抗的质控线;所述免疫荧光层析试纸条使用方便,灵敏度高;检测灵敏度(IC_{50})为3.6ng/ml,检测范围(IC_{20}-IC_{80})为0.4-32.3ng/ml,检测限(IC_{10})为0.2ng/ml。



CN 108717122 A

1.一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条，其特征在于，包括依次搭接的玻璃纤维垫、硝酸纤维膜和吸水纸；所述玻璃纤维垫表面喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物；所述硝酸纤维素膜依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线和包被二抗的质控线；

所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物由铜离子单克隆抗体与荧光微球偶联获得；

所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。

2.根据权利要求1所述的免疫荧光层析试纸条，其特征在于，所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的浓度为0.03～0.05μg/μl；所述玻璃纤维垫上铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的喷涂量为3～5μl/cm。

3.根据权利要求1或2所述的免疫荧光层析试纸条，其特征在于，所述铜离子单克隆抗体由杂交瘤细胞株4F12分泌产生，所述杂交瘤细胞株4F12的保藏编号为CCTCCNO:C201670。

4.根据权利要求1所述的免疫荧光层析试纸条，其特征在于，所述铜离子检测完全抗原的浓度为0.3～0.6μg/μl；所述硝酸纤维素膜上铜离子检测完全抗原的喷涂量为0.1～0.2μl/mm。

5.根据权利要求1或4所述的免疫荧光层析试纸条，其特征在于，所述铜离子检测完全抗原中的螯合剂为双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA；所述载体蛋白为鸡卵白蛋白OVA。

6.权利要求1～5任意一项所述免疫荧光层析试纸条在检测样品铜离子浓度中的应用。

7.权利要求6所述的应用，其特征在于，包括以下步骤：

1)将待检样品滴加到玻璃纤维膜上进行层析；

2)读取所述层析后的免疫荧光试纸条检测线、质控线的荧光信号值Bt和Bc；

3)将所述荧光信号值Bt/Bc作为B值带入预定的标准线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度；

所述预定的标准线性回归方程的自变量为铜离子浓度的log10对数，因变量为发光抑制率，所述因变量由式I计算得到，$(B_0-B)/B_0\times100\%$式I，B_0为未添加待检样品的荧光信号值Bt_0/Bc_0，B为添加待检样品时的荧光信号值Bt/Bc。

8.根据权利要求7所述的应用，其特征在于，所述标准线性回归方程通过以下方法获得：

用梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA替换步骤1)中的待检样品，按照步骤1)～2)的方法获得竞争物标准品的荧光信号值Bt/Bc，以0ng/ml竞争物标准品的荧光信号值Bt_0/Bc_0为B_0，计算得到梯度浓度竞争物标准品的发光抑制率，以所述发光抑制率为纵坐标，以Cu^{2+}浓度log10对数为横坐标，绘制标准曲线，获得标准线性回归方程。

9.根据权利要求7所述的应用，其特征在于，步骤1)中所述待检样品的滴加量为60～90μl；所述层析时间为12～18min。

10.根据权利要求7所述的应用，其特征在于，所述样品包括中草药样品、土壤样品和水样。

一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于重金属免疫检测技术领域，尤其涉及一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 重金属在地球上广泛分布，正常情况下不会对人类的生活环境造成危害。但随着城市的急速扩张和工业的快速发展，大量重金属因人为活动以非常态速度进入我们的生活环境，这些重金属及其化合物多有致畸、致癌作用，并且都是蓄积性毒物，通过饮用水或食物链富集等方式严重危害人类及动物的健康。

[0003] 目前对于环境污染最严重的重金属包括：铅、镉、汞、铬、砷(号称“五毒”)，除此之外，还包括毒性相对较弱的镍、锌、铜、钴、锡、钒等。虽然重金属铜的毒性相对较弱，但是因其在工业、农业及畜牧业的广泛应用，铜污染的危害也越来越多的引起人们的关注。人体摄入过量的铜会引发一系列病变，急性铜中毒可引起胃肠道黏膜刺激症状，如恶心、干呕、腹泻，甚至溶血性贫血，肾功能衰竭、休克、昏迷或死亡。慢性摄入铜过高，可引起呼吸系统疾病，铜粉尘可引起咽痛、咳嗽、咯痰和胸闷气憋，甚至出现尘肺等。另外，铜盐具有一定杀菌效果，所以在饲料中也被广泛使用，但高剂量的铜进入家畜的体内很难被代谢，随着生物累积效应造成家畜中毒死亡，还会通过食用家畜肉制品而直接威胁人类健康。因此，加强食品和环境卫生的重金属铜的监查检测迫在眉睫，意义重大。

[0004] 传统重金属检测方法多采用物理/化学方法，如原子吸收光谱法(AAS)、原子荧光光谱法(AFS)、电感耦合等离子体光谱分析法(ICP)等，虽然其检测结果准确，可信度高，但需要大型仪器设备和专业人员操作，分析时间长，成本昂贵，有一定时间地点局限性，难以适应突发性的环境污染事件或大规模环境质量筛查检测。现有的重金属铜的检测方法成本高、效率低、准确性欠佳。

发明内容

[0005] 有鉴于此，本发明的目的在于提供一种成本低、效率高、准确率高的检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其应用。

[0006] 为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条，包括依次搭接的玻璃纤维垫、硝酸纤维膜和吸水纸；所述玻璃纤维垫表面喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物；所述硝酸纤维素膜依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线和包被二抗的质控线；所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物由铜离子单克隆抗体与荧光微球偶联获得；所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。

[0007] 优选的，所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的浓度为0.03～0.05μg/μl；所述玻璃纤维垫上铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的喷涂量为3～5μl/cm。

[0008] 优选的，所述铜离子单克隆抗体由杂交瘤细胞株4F12分泌产生，所述杂交瘤细胞

株4F12的保藏编号为CCTCC NO:C201670。

[0009] 优选的,所述铜离子检测完全抗原的喷涂浓度为0.3～0.6μg/μl;所述硝酸纤维素膜上铜离子检测完全抗原的喷涂量为0.1～0.2μl/mm。

[0010] 优选的,所述铜离子检测完全抗原中的螯合剂为双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA;所述载体蛋白为鸡卵白蛋白OVA。

[0011] 本发明还提供了所述免疫荧光层析试纸条在检测样品铜离子浓度中的应用。

[0012] 优选的,包括以下步骤:1)将待检样品滴加到玻璃纤维膜上进行层析;2)读取所述层析后的免疫荧光试纸条检测线、质控线的荧光信号值Bt和Bc;3)将所述荧光信号值Bt/Bc作为B值带入预定的标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度;所述预定的标准曲线线性回归方程的自变量为铜离子浓度的log10对数,因变量为发光抑制率,所述因变量由式I计算得到,$(B_0-B)/B_0\times100\%$式I,B_0为未添加待检样品或未添加标准样品时的荧光信号值Bt_0/Bc_0,B为添加待检样品时的荧光信号值Bt/Bc。

[0013] 优选的,所述标准曲线线性回归方程通过以下方法获得:

[0014] 用梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA替换步骤1)中的待检样品,按照步骤1)～2)的方法获得竞争物标准品的荧光信号值Bt/Bc,以0ng/ml竞争物标准品的荧光信号值Bt_0/Bc_0为B_0,计算得到梯度浓度竞争物标准品的发光抑制率,以发光抑制率为纵坐标,以Cu^{2+}浓度log10对数为横坐标,绘制标准曲线,获得标准曲线线性回归方程。

[0015] 优选的,步骤1)中所述待检样品的滴加量为60～90μl;所述层析时间为12～18min。

[0016] 优选的,所述样品包括中草药样品、土壤样品和水样。

[0017] 本发明的有益效果:本发明提供的免疫荧光层析试纸条包括依次搭接的玻璃纤维垫、硝酸纤维膜和吸水纸;所述玻璃纤维垫上喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物;所述硝酸纤维素膜依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线和包被二抗的质控线。所述铜离子检测完全抗原将小分子的铜离子与载体蛋白偶联,使铜离子能够通过免疫的方法检测,利用发光抑制率与铜离子浓度log10对数的线性关系定量测定铜离子浓度;本发明以发光抑制率为纵坐标,以Cu^{2+}浓度log10对数为横坐标,绘制标准曲线,检测待检样品中铜离子的浓度,能够实现铜离子浓度的快速高效检测;所述免疫荧光层析试纸条,使用方便,灵敏度高;检测灵敏度(IC_{50})为3.6ng/ml,检测范围(IC_{20}-IC_{80})为0.4-32.3ng/ml,检测限(IC_{10})为0.2ng/ml。满足GB5749《生活饮用水卫生标准》生活饮用水、GB3838《地表水环境质量标准》I类～Ⅴ类水中铜最低限量值0.01mg/L的检测要求。

附图说明

[0018] 图1为实施例1中的免疫荧光层析试纸条的结构图;

[0019] 图2为铜离子检测完全抗原的SDS-PAGE鉴定图;

[0020] 图3为BCA法测定铜离子检测完全抗原蛋白浓度的标准曲线;

[0021] 图4为实施例2中免疫荧光层析试纸条检测卡检测不同浓度竞争物标准品的结果照片;

[0022] 图5为实施例2中免疫荧光层析试纸条检测卡荧光信号曲线图;

[0023] 图6为实施例2中免疫荧光层析试纸条法测定铜离子浓度标准曲线。生物保藏说明

[0024] 杂交瘤细胞株4F12,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址:中国,武汉,武汉大学;保藏时间:2016年6月8日,保藏编号为CCTCC NO:C201670。

具体实施方式

[0025] 本发明提供了一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条,如图1所示,包括依次搭接的玻璃纤维垫(6)、硝酸纤维膜(3)和吸水纸(2);所述玻璃纤维垫上喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物;所述硝酸纤维素膜依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线(4)和包被二抗的质控线(5);其中箭头所指方向为层析方向;所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物由铜离子单克隆抗体与荧光微球偶联获得;所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂。

[0026] 在本发明中,所述玻璃纤维垫作为样品垫;所述玻璃纤维垫采用市售玻璃纤维垫即可。本发明所述玻璃纤维垫上喷涂铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物;所述喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的玻璃纤维垫通过以下步骤制备获得:将所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物喷涂于玻璃纤维垫上后进行干燥。在本发明中所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的喷涂浓度为0.03～0.05μg/μl;更优选为0.04μg/μl;所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的喷涂量优选为3～5μl/cm,更优选为4μl/cm。所述喷涂优选的采用喷涂仪进行;本发明在喷涂结束后优选的将所述喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的玻璃纤维垫进行干燥;所述干燥的温度优选为45～55℃,更优选为50℃;所述干燥的时间优选为12～24h,更优选为16～20h。在本发明中,所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物通过将所述铜离子单克隆抗体与荧光微球偶联获得。在本发明中所述偶联优选为采用EDC-NHS介导法,利用EDC和NHS活化荧光微球表面的羧基,活化后的荧光微球表面的羧基与铜离子单克隆抗体上的氨基缩合偶联形成酰胺键获得铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物。在本发明中所述荧光微球为市售商品;所述荧光微球商品以液体状态存在。在本发明具体实施过程中,首先超声分散荧光微球得到荧光微球分散液;然后将所述荧光微球分散液与EDC和NHS混合进行活化,得到活化荧光微球分散液;将所述活化荧光微球分散液离心,得到活化微球;将所述活化微球与磷酸缓冲溶液混合超声分散,得到活化微球缓冲体系;将所述活化微球缓冲体系与铜离子单克隆抗体混合偶联,得到铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物。

[0027] 在本发明中,所述超声分散的总功率优选为20w,所述超声时选择10～15%的功率,所述超声的方式优选为间歇性超声;具体为超声3～5s,间歇3～5s。本发明在得到荧光微球分散液后将所述荧光微球分散液与EDC和NHS混合进行活化,得到活化荧光微球分散液。在本发明中所述EDC和NHS的用量优选的为每1ml荧光微球使用EDC和NHS各4～6mg更优选的为5mg。本发明中,所述活化的时间优选为12～18min,更优选为15min。

[0028] 本发明在得到活化荧光微球分散液后,离心所述活化荧光微球分散液得到活化微球。在本发明中,所述离心的转速优选为10000rpm～14000rpm;更优选为12000rpm;所述离心的时间优选为8～12min,更优选为10min。本发明在获得活化微球后,将所述活化微球与磷酸缓冲溶液混合超声分散,得到活化微球缓冲体系;本发明中所述磷酸缓冲液的浓度优选为0.01mol/L,所述磷酸缓冲液的用量以与固相组分混合后的总体积计,优选的使混合后的活化微球缓冲体系的体积与荧光微球分散液的体积一致;此处超声分散的条件参数与上

述超声分散的条件和参数一致，在此不再赘述；本发明在所述超声分散后用清洗活化剂清洗1～3次；本发明中，所述清洗活化剂优选为含300mM海藻糖，1％白蛋白的0.01Mol/L的磷酸缓冲液，PH7.2.；所述清洗活化剂的作用是洗去未结合的EDC和NHS。

[0029] 本发明在清洗所述活化的荧光微球后，将所述荧光微球与铜离子单克隆抗体混合偶联获得铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物。在本发明中所述铜离子单克隆抗体与荧光微球的质量体积比优选为(0.3～0.5)mg:1ml。本发明中所述偶联在避光条件下进行，所述偶联的时间优选的为1.5～3h，更优选的为2～2.5h。

[0030] 本发明在所述偶联后，进行封闭获得铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物。在本发明中，所述封闭用封闭液优选的为1％的BSA溶液，本发明在加入封闭液后进行低温超声分散，所述低温超声分散的温度优选的为4～10℃，所述低温超声分散的总功率优选为20w，所述低温超声分散时选择10～15％的功率，所述低温超声分散优选为间歇性超声；具体为超声3～5s，间歇3～5s。在本发明中所述封闭的时间优选为0.8～1.2h，更优选为1h；所述封闭优选的在避光条件下进行。本发明在所述封闭后优选的离心去上清，收集固相组分为铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物。

[0031] 在本发明中所述铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物优选的与保护液混合均匀保存于4℃。在本发明中，所述保护液优选的为含分1％(质量)BSA，0.05％(质量)吐温的磷酸缓冲液；本发明中所述混合均匀的方法优选的为低温超声分散，与上述提及的低温超声分散的参数一致，在此不再赘述。

[0032] 在本发明中所述铜离子单克隆抗体由杂交瘤细胞株4F12分泌产生，所述杂交瘤细胞株4F12的保藏编号为CCTCC NO:C201670。在本发明中所述杂交瘤细胞株4F12分泌生产铜离子单克隆抗体的方法采用本领域常规的杂交瘤细胞株分泌生产单克隆抗体的方法即可，无其他特殊要求。在本发明具体实施过程中，将所述细胞株4F12腹腔注射小鼠，6～8天后抽取腹水，分离纯化腹水获得铜离子单克隆抗体。

[0033] 本发明所述的免疫荧光层析试纸条还包括硝酸纤维素膜，所述硝酸纤维素膜上依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线和包被二抗的质控线。在本发明中，所述硝酸纤维素膜检测线上铜离子检测完全抗原的喷涂浓度优选的为0.3～0.6μg/μl，更优选的为0.4～0.5μg/μl。本发明中所述铜离子检测完全抗原的喷涂量优选为0.1～0.2μl/mm，更优选为0.15μl/mm。本发明中，所述硝酸纤维素膜质控线上二抗的喷涂浓度优选的为0.3～0.6μg/μl，更优选的为0.4～0.5μg/μl；所述二抗的喷涂量优选为0.1～0.2μl/mm，更优选为0.15μl/mm。本发明中所述喷涂优选的采用喷涂仪进行；本发明在检测线和质控线喷涂结束后优选的将硝酸纤维素膜进行干燥；所述干燥的温度优选为45～55℃，更优选为50℃；所述干燥的时间优选为24～72h，更优选为36～60h。

[0034] 在本发明中，所述二抗优选的为市售二抗产品，更优选的为兔IgG。在本发明中，所述铜离子检测完全抗原包括铜离子、载体蛋白以及将所述铜离子与载体蛋白偶联的螯合剂在本发明中所述铜离子检测完全抗原中的螯合剂优选为双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA；所述载体蛋白优选为鸡卵白蛋白OVA；本发明中所述双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA和载体蛋白均采用市售商品即可。本发明中所述铜离子检测完全抗原通过以下方法制备获得：C1)将螯合剂溶液逐滴滴加至载体蛋白溶液中螯合获得螯合蛋白溶液；C2)将铜离子溶液逐滴滴加至所述螯合蛋白溶液中螯合至反应液呈淡蓝色，并伴有浑浊获得铜离子检测完全抗原。

[0035] 在本发明中，所述螯合剂溶液优选的为将所述p-SCN-Bn-NOTA粉末溶解于DMSO中获得，所述p-SCN-Bn-NOTA溶液的浓度优选的为25mg/ml；所述OVA蛋白溶液优选的为将OVA蛋白粉末溶解于HEPES缓冲液中获得，所述HEPES缓冲液的浓度优选的为0.1M，pH值优选的为8.9；所述OVA蛋白溶液的浓度优选的为10mg/ml；在本发明中，所述NOTA与OVA的摩尔比优选的为(68～72):1，更优选的为70:1；本发明将所述螯合剂溶液逐滴加入OVA液中，0～4℃搅拌螯合2～4h，4℃过夜获得螯合蛋白溶液。

[0036] 本发明所述的双功能螯合剂包含两个不同的结构单元，一是功能基团，可与生物大分子(如蛋白)以共价键形式连接；二是金属螯合基团，在三氮环配体空穴内使金属离子与其牢固结合，且引入的金属离子远离生物大分子，从而保证其生物活性不受影响。p-SCN-Bn-NOTA是多氨基多羧基类环形螯合剂中最小的一类，是在1,4,7-三氮杂环壬烷的基础上，在三个氮原子上连接三个羧基，此外NOTA杂环上还连接特征性功能基团——末端携带SCN(硫氰根)离子的苄基，通过共价键连接即可实现与OVA蛋白分子的偶联。

[0037] 在本发明中，所述铜离子溶液优选的为将$CuSO_4 \cdot 5H_2O$粉末溶于超纯水制备获得，所述铜离子溶液的浓度优选的为0.8～1.2mg/ml，更优选的为1.0mg/ml。在本发明中，所述铜离子与NOTA摩尔比优选的为(75～80):(68～72)，更优选的为1.1:1。在本发明中将所述铜离子溶液逐滴加入螯合蛋白溶液中，0～4℃搅拌螯合25～35min，反应液呈淡蓝色，并伴有浑浊，螯合结束。

[0038] 本发明在铜离子与螯合蛋白螯合反应后，优选将得到的螯合反应产物采用30kD超滤管超滤去除未偶联上的NOTA与铜离子，获得铜离子检测完全抗原。本发明获得的所述铜离子检测完全抗原中铜离子与载体蛋白OVA偶联比为(18～22):1。本发明中，所述超滤的转速优选的为4000～6000g，更优选的为5000g；所述超滤的时间优选的为8～12min，更优选的为10min；所述超滤的次数优选的为3～8次，更优选的为5次。

[0039] 本发明在获得铜离子检测完全抗原后，优选的通过SDS-PAGE、ICP-AES、BCA法联合鉴定所述铜离子检测完全抗原是否偶联成功以及计算其偶联比率。在本发明中所述铜离子检测完全抗原与待检样品中的铜离子共同竞争铜离子单克隆抗体，抑制待检样品中的铜离子与铜离子单克隆抗体结合，根据荧光信号值的大小计算抑制率。

[0040] 在本发明中，所述免疫荧光层析试纸条优选的还包括PVC背板(1)，所述PVC背板(1)作为支撑物，将所述依次搭接的玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜和吸水纸粘于PVC背板上。

[0041] 在本发明中，所述免疫荧光层析试纸条优选的还包括检测卡外壳；所述检测卡外壳优选的为PCV、PC、PE、ABS和PS中的一种。本发明中所述检测卡外壳正对玻璃纤维膜的中心留有加样孔，方便待检样品的加入。

[0042] 本发明还提供了所述免疫荧光层析试纸条在检测样品铜离子浓度中的应用。

[0043] 本发明所述的应用具体包括以下步骤：1)将待检样品滴加到玻璃纤维膜上进行层析；2)读取所述层析后的免疫荧光试纸条检测线、质控线的荧光信号值Bt和Bc；3)将所述荧光信号值Bt/Bc作为B带入预定的标准曲线线性回归方程计算获得待检样品中铜离子浓度；所述预定的标准曲线线性回归方程的自变量为铜离子浓度的log10对数，因变量为发光抑制率，所述因变量由式I计算得到，$(B_0-B)/B_0 \times 100\%$式I，B_0为未添加待检样品或未添加标准样品时的荧光信号值Bt_0/Bc_0，B为添加待检样品时的荧光信号值Bt/Bc。

[0044] 在本发明具体实施过程中，每一个试纸条的加样量优选的为60～90μl，更优选的

为75μl。本发明按照上述加样量将所述待检样品滴加至加样区，15min后上机读取荧光信号B。在本发明中所述读取荧光信号值B优选的采用飞测Ⅱ代免疫荧光定量检测仪(广州万孚生物技术股份有限公司)。

[0045] 本发明在获得荧光信号值B后，将所述荧光信号值B带入预定的标准曲线线性回归方程计算，获得待检样品中铜离子浓度。本发明中所述预定的标准曲线线性回归方程为y＝31.58X+32.346，其中x为发光抑制率，y为待检样品中的铜离子浓度，x＝(B0-B)/B_0×100％，B_0为未添加待检样品是的荧光信号值。

[0046] 在本发明中，所述标准曲线线性回归方程优选通过以下方法获得：用不同梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA替换上述技术方案所述步骤2)中的待检样品，按照上述技术方案所述免疫荧光层析试纸条的使用方法检测获得荧光信号值B，以0ng/ml竞争物标准品的荧光信号值为B0，计算不同梯度浓度竞争物标准品的发光抑制率x，x＝(B0-B)/B0×100％，以发光抑制率为纵坐标，以Cu^{2+}浓度log10对数为横坐标，绘制标准曲线，获得标准曲线线性回归方程。

[0047] 在本发明中，所述不同梯度浓度的竞争物标准品Cu-NOTA的浓度优选的包括0ng/ml、0.8ng/ml、1.6ng/ml、3.12ng/ml、6.25ng/ml、12.5ng/ml、25ng/ml、50ng/ml和100ng/ml。

[0048] 本发明所述方法制备获得预定的标准曲线线性回归方程的R^2＝0.995，检测灵敏度(IC_{50})为3.6ng/ml，检测范围(IC_{20}-IC_{80})为0.4-32.3ng/ml，检测限(IC_{10})为0.2ng/ml。可满足GB5749《生活饮用水卫生标准》生活饮用水、GB3838《地表水环境质量标准》Ⅰ类～Ⅴ类水中铜最低限量值0.01mg/L的检测要求。

[0049] 本发明提供了所述免疫荧光层析试纸条在检测样品铜离子浓度中的应用。在本发明中，所述样品优选的包括中草药样品、土壤样品和水样。本发明中，所述样品在检测前优选的与螯合剂偶联获得待检样品。在本发明具体实施过程中，当所述样品为中草药样品或土壤样品时，优选的将中草药样品或土壤样品微波消解联合沉淀法，复溶后再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品。在本发明中，所述微波消解优选的采用微波消解仪进行；所述微波消解的目的是将固定样品消化为液态。在本发明中，所述微波消解的条件的消解程序优选为：130℃爬升10min，130℃保持3min；160℃爬升3min，160℃保持5min；180℃爬升3min，180℃保持40min；冷却；本发明中所述固体样品在消解前优选的进行预消解；所述预消解优选为通风橱过夜或赶酸仪130℃预热30min。在本发明中，所述沉淀法的目的是通过调节消解样品液的pH使铜离子沉淀，从而将铜离子与大多金属离子有效分离。在本发明中，所述沉淀的条件优选为：将消解后的中草药样品和土壤样品分别定容至10ml和25ml，分别取5ml定容样品液，通过1.0～2.0mol/LNaOH调节溶液pH至中性6.7～7.2，并加入0.2～0.4ml 1‰一定量絮凝剂(聚丙烯酰胺，PAM)，静置15～20min后1500～2500rpm离心5～10min，去上清收集沉淀，然后通过1.0～2.0mol/L稀HNO_3缓慢复溶沉淀用于制备具有反应原性的半抗原待测样品。在本发明中，所述样品微波消解联合沉淀复溶后与螯合剂偶联的具体操作：将消解后的中草药样品定容至10ml，取5ml加入5μg/μl单NOTA液1～2μl混匀反应15min；或将消解后土壤样品定容至25ml，取5ml加入5μg/μl单NOTA液2～4μl混匀反应15min。

[0050] 当所述样品为水样时，包括河水、池塘水、农田水、地表水；将所述水样过滤后再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品；所述过滤优选的先采用滤纸过滤，然后采用滤膜过滤；所述滤膜的孔径优选为0.22um。在本发明中，所述过滤后的水样与螯合剂偶联的具体操作方

法:取5ml过膜液加入2μg/μl单NOTA液1～2μl混匀反应15min。

[0051] 下面结合实施例对本发明提供的一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其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。

[0052] 实施例1免疫荧光层析试纸条的制备

[0053] 铜离子检测完全抗原的制备与鉴定

[0054] 通过双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA将Cu离子与载体蛋白OVA进行偶联

[0055] 配置pH8.9,0.1M HEPES缓冲液,将OVA蛋白粉末溶于HEPES缓冲液中,得到浓度为10mg/ml的OVA蛋白溶液;将NOTA粉末溶于DMSO溶液中,得到浓度为25mg/ml的NOTA溶液;将NOTA液逐滴加入OVA蛋白溶液中,冰盒中搅拌螯合3h,4℃过夜制得NOTA-OVA液(NOTA与OVA摩尔比约70:1);

[0056] 将$CuSO_4 \cdot 5H_2O$粉末溶于超纯水,得到浓度为1.0mg/ml的铜离子溶液;将Cu^{2+}溶液逐滴加入NOTA-OVA液中(Cu^{2+}与NOTA摩尔比约1.1:1),冰盒中搅拌螯合30min,反应液呈淡蓝色,并伴有浑浊,即制得Cu-NOTA-OVA完全抗原,并4℃保存。然后用30kD超滤管超滤制得Cu-NOTA-OVA完全抗原,超滤条件:离心机转速5000g,离心10min,超滤5次,去除未偶联上的p-SCN-Bn-NOTA与Cu离子,获得铜离子检测完全抗原。

[0057] 通过SDS-PAGE、ICP-AES、BCA法联合鉴定完全抗原是否偶联成功以及计算其偶联比率。

[0058] SDS-PAGE结果如图2所示,重金属铜完全抗原Cu-NOTA-OVA条带与载体蛋白OVA条带相比有明显滞后现象,合成的完全抗原分子量比载体蛋白更大,表明Cu-NOTA成功偶联结合上OVA,检测抗原制备成功。

[0059] 火焰原子吸收仪器法测得完全抗原Cu-NOTA-OVA中Cu浓度为0.1107mg/ml,BCA法的标准曲线如图3所示,测得完全抗原Cu-NOTA-OVA中OVA蛋白浓度为3.962mg/ml,计算得完全抗原Cu离子与载体蛋白OVA偶联比约为20:1,满足要求。

[0060] 铜离子单克隆抗体的制备与鉴定

[0061] 复苏冻存的可稳定分泌抗重金属铜单克隆抗体的细胞株4F12,该细胞株于2016年6月8日保藏于武汉大学,保藏编号为CCTCC NO:C201670,并扩大培养,将生长状态良好的阳性细胞以5×10^5cells/只腹腔注射提前已打不完全佐剂的10周龄的Balb/c小鼠,接种7天后每日观察小鼠生存状态,当小鼠腹部明显肿胀时,及时用无菌针头取出腹水,3000rpm离心15min,取上清-20℃分装冻存。将收集的腹水型抗体4℃缓慢溶解,1200rpm离心30min去除杂质,在0℃条件下缓慢搅拌滴加与其等体积的4℃预冷的饱和硫酸铵溶液,30min后4℃沉淀过夜。转移混合液,4℃下10000rpm离心20min弃上清,取沉淀复溶制备重悬液,4℃透析3次,每次6h,完成后用结合缓冲液稀释并用0.45um滤膜抽滤,再通过ProteinG亲和层析柱纯化抗体。纯化收集的抗体用30kD超滤管4℃超滤,采用SDS-PAGE凝胶鉴定纯化后抗体纯度,BCA试剂盒测定纯化后抗体的蛋白浓度,并通过间接ELISA和棋盘法分别测定纯化抗体的效价与亲和力。B4效价6×10^5倍,抗体亲和力常数$K=1.51\times10^{10}$L/mol。

[0062] 铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物的制备

[0063] 通过EDC-NHS介导法(1ml荧光微球中加入0.3-0.5mg抗体)偶联荧光微球与单克隆抗体蛋白,以制备荧光微球抗体复合物。超声分散荧光微球,超声分散总功率为20W,超声时选择10%-15%功率,超声3-5s,间歇3-5s;然后将配置好的EDC液和NHS液依次加入超声分

散好的荧光微球液中，迅速颠倒混匀并室温均匀活化15min；离心(12000rpm，10min)去上清，加入反应液(0.01mol/L的磷酸缓冲溶液，如制备荧光微球抗体复合物总体积为1ml，离心后补齐反应液至1ml即可)后超声分散混匀，清洗活化剂(清洗未结合上的EDC和NHS)2次后，加入铜离子单克隆抗体，室温避光混匀2～2.5h进行偶联；离心去上清，加入1％BSA封闭液，低温超声分散(功率同上，温度为4～10℃)后，室温避光混匀1h进行封闭；离心去上清，加入保存液(保存液为0.01mol/L含有1％BSA，0.05％吐温的磷酸缓冲液，保存液的加入体积同上，补齐1ml即可)后低温超声分散并4℃避光保存，即完成荧光微球抗体复合物的制备。

[0064] 玻璃纤维垫和硝酸纤维素膜的喷涂

[0065] 将包被检测抗原与兔IgG稀释至最佳工作浓度(0.45μg/μl)后，将其均匀喷涂(喷膜仪喷涂，喷涂速度为0.15μl/mm)于适宜NC膜上，50℃恒温干燥40h，以制备T线抗原与C线抗体。将荧光微球抗体复合物稀释至最佳工作浓度(0.04μg/μl)后，将其均匀喷涂(喷垫仪喷涂，喷涂速度为4μl/cm)于适宜玻璃纤维垫上，50℃恒温干燥20h。之后将干燥的玻璃纤维垫、NC膜、吸水纸依次贴合，切条机切割成4mm宽试纸条，并组装成试纸条检测卡，室温干燥避光保存。

[0066] 实施例2

[0067] 用实施例1中的免疫荧光层析试纸条检测样品中的铜离子浓度的性能评价

[0068] 标准曲线的制备：将系列梯度浓度(0、0.8、1.6、3.12、6.25、12.5、25、50、100ng/ml)竞争物标准品Cu-NOTA按每张卡75ul加样量滴加至加样区，15min后上机读取荧光信号。每一检测采用10个平行组求得均值，计算标准曲线与抑制率(灵敏度)。将0ng/ml标准品孔的荧光信号T/C值定为B_0，其他孔的T/C值为B，以检测抑制率$(B_0-B)/B_0\times100\%$为纵坐标，以Cu^{2+}浓度log10对数为横坐标，绘制标准抑制曲线。

[0069] 所述的免疫荧光层析试纸条产品标准曲线制备过程中检测铜离子后的照片如图4所示，试纸条检测卡T线荧光染料信号肉眼可见其梯度变化，C线荧光染料信号肉眼不可见，可通过免疫荧光定量检测仪读取定量荧光信号值。图5为读取的荧光信号曲线图，标准曲线结果如图6所示，标准曲线线性回归方程为$y=31.58X+32.346$，$R^2=0.995$，检测灵敏度(IC_{50})为3.6ng/ml，检测范围(IC_{20}-IC_{80})为0.4-32.3ng/ml，检测限(IC_{10})为0.2ng/ml。可满足GB5749《生活饮用水卫生标准》生活饮用水、GB3838《地表水环境质量标准》Ⅰ类～Ⅴ类水中铜最低限量值0.01mg/L的检测要求。

[0070] 准确度与精密度评价：

[0071] 生产组装3个批次试纸条检测卡，在免疫荧光层析试纸条法的线性范围内，选用低、中、高3种不同浓度的标准液，每一浓度点重复10次，采用上述方法测定荧光信号，通过标准曲线计算检测浓度。免疫荧光层析试纸条法批内、批间差异见表1和表2：其中，批内回收率在91.3％～117.8％之间，RSD在15％以下；批间回收率在91.3％～119.8％之间，RSD在10％以下，符合一般重金属残留分析的检测要求。

[0072] 表1 免疫荧光层析试纸条法批内差异试验(n＝10)

[0073]

标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
1.6	1.46	91.3	0.21	14.1
6.25	7.36	117.8	0.55	7.4
25	25.70	102.8	0.68	2.6

[0074] 表2 免疫荧光层析试纸条法批间差异试验(n＝3)

[0075]

标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
1.6	1.46	91.3	0.06	4.0

[0076]

6.25	7.49	119.8	0.56	7.5
25	26.94	107.8	1.56	5.8

[0077] 样品液中添加回收试验：

[0078] 在PB缓冲液、CB缓冲液、专用样本稀释液中分别添加竞争物标准品，配置低、中、高3种不同浓度的检测液，采用上述方法测定荧光信号。在本发明中，所述专用样本稀释液为300mM海藻糖，1％牛血清白蛋白的0.01Mol/L的磷酸缓冲液，PH7.2。PB、CB缓冲液以及试纸条样本专用稀释液添加回收试验结果见表3、表4和表5：通过对比各缓冲溶液体系检出值，回收率以及相对标准偏差可以发现，不同缓冲体系对荧光检测分析过程准确性会产生显著影响，且样本专用稀释液较其他缓冲溶液检测值的准确性和稳定性更高。

[0079] 表3 免疫荧光层析试纸条法PB缓冲液添加回收试验(n＝3)

[0080]

标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
3	4.84	161.3	1.03	21.2
10	14.85	148.5	0.49	3.3
30	35.99	120.0	4.54	12.6

[0081] 表4 免疫荧光层析试纸条法CB缓冲液添加回收试验(n＝3)

[0082]

标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
3	3.51	117.0	0.40	11.3
10	15.33	153.3	0.83	5.4
30	33.98	113.3	3.51	10.3

[0083] 表5 免疫荧光层析试纸条法专用样本稀释液添加回收试验(n＝3)

[0084]

标准液浓度 (ng/ml)	检测值 (ng/ml)	回收率 (%)	SD (ng/ml)	RSD (%)
3	3.47	115.7	0.23	6.5
10	11.68	116.8	0.93	8.0

[0085]

30	31.52	105.1	0.51	1.6

[0086] 特异性评价

[0087] 通过免疫荧光层析试纸条法求出各金属元素标准抑制曲线灵敏度(IC_{50}值)，通过公式Cross Reactivity＝[IC_{50}(Cu)/IC_{50}(其他金属离子)]×100％求得各金属元素的交叉反应率。

[0088] 如表6所示，本方法中除Mg元素、Zn元素分别对铜单克隆抗体有14.2％、5.3％的交叉反应率外，其余常见金属元素的交叉反应率均小于或近似1％，其特异性总体良好，满足一般检测要求。

[0089] 表6 免疫荧光层析试纸条法特异性试验

[0090]

heavy metal ion/NOTA	IC_{50} (ng/ml)	Cross Reactivity (%)
Cu	3.6	100.0
Pb	＞10000	＜1.0
Mn	2299.2	＜1.0
Cd	432.2	＜1.0
Zn	67.3	5.3
Mg	25.4	14.2
NOTA	162.2	2.2

[0091] 稳定性评价：

[0092] 根据已建立的免疫荧光层析试纸条法制备一批试纸条检测卡，在37℃干燥避光保存数周，于1周、2周、3周、4周时分别拿出，检测低、中、高3种不同浓度的标准液，采用上述方法测定荧光信号，通过标准曲线计算检测浓度。免疫荧光层析试纸条法稳定性试验结果见表7。

[0093] 表7 免疫荧光层析试纸条法稳定性试验结果

[0094]

时间(week)	标准液浓度(ng/ml)	检测值(ng/ml)	回收率(%)	SD(ng/ml)	RSD(%)
1 week	3	3.66	122.0	0.11	3.0

[0095]

	10	13.48	134.8	0.08	3.2
	30	34.01	113.4	0.04	2.9
	3	4.15	138.3	0.05	1.5
2 weeks	10	13.99	139.9	0.06	2.7
	30	36.61	122.0	0.08	5.6
	3	3.11	103.7	0.18	4.7
3 weeks	10	13.05	130.5	0.13	5.5
	30	33.08	110.3	0.02	1.2
	3	3.89	129.7	0.29	7.9
4 weeks	10	14.86	148.6	0.10	4.2
	30	36.89	123.0	0.07	5.3

[0096] 实施例3

[0097] 利用实施例1所述的免疫荧光层析试纸条检测中草药样品、土壤样品、及水样中铜离子浓度

[0098] 1、中草药、土壤样品的微波消解回收率

[0099] 微波消解的条件准确称量样品0.2000g，加入硝酸8ml，通风橱过夜或赶酸仪130℃预热30min预消解；选择消解程序(130℃爬升10min，130℃保持3min；160℃爬升3min，160℃保持5min；180℃爬升3min，180℃保持40min；冷却)；在本发明中所述样品微波消解后与螯合剂偶联的具体操作：中草药样品消解后用10ml容量瓶定容，取5ml消解液加入5μg/μl单NOTA液1～2μl混匀反应15min；土壤样品消解后用25ml容量瓶定容，取5ml消解液加入5μg/μl单NOTA液2～4μl混匀反应15min。在样品微波消解的同时，将标准物质与空白对照一同进行消解，采用石墨炉原子吸收法检测消解后标准物质与空白对照中的Cu含量，计算消解回收率，以评估消解效率是否达标。

[0100] 植物标准物质为国家一级标准物质GBW 07602(GSV-1)灌木枝叶，铜含量标准值为:5.2μg/g;土壤标准物质为国家一级标准物质GBW07404(GSS-4)土壤成分分析标准物质，铜含量标准值为:40.0μg/g;空白对照为硝酸AR，铜最高含量:≤0.00001％，标准物质及空白对照消解后Cu含量测定结果如表8所示:

[0101] 表8 标准物质及空白对照微波消解后Cu含量测定结果

[0102]

样品名称	石墨炉原子吸收检测值 (ng/ml)	RSD (%)
标准物质-灌木枝叶	39.705	0.8
标准物质-土壤	346.5	1.4
空白对照-硝酸 AR	2.757	2.9

[0103] 标准物质实际称量0.2000g，赶酸后定容至25ml，所以微波消解后标准物质Cu含量计算得:

[0104] (1)植物:(39.705-2.757)×0.025÷0.2＝4.62μg/g;

[0105] (2)土壤:(346.5-2.757)×0.025÷0.2＝42.97μg/g。

[0106] 消解回收率计算得:

[0107] (1)植物:(4.62/5.2)×100％＝88.8％;

[0108] (2)土壤:(42.97/40.0)×100％＝107.4％。

[0109] 消解合格。

[0110] 中草药及水样样品待测样的制备与检测

[0111] 中草药样品中铜含量的测定

[0112] 将中草药样品干燥研磨粉碎后微波消解联合沉淀复溶，再与过量螯合剂NOTA偶联以制备待测样品。通过上述化学发光间接竞争法、以及ICP-AES仪器法同时对样品中Cu含量进行测定，结果如表9所示

[0113] 表9 中草药样品重金属铜含量测定结果(n＝3)

[0114]

样品号	样品名	免疫荧光层析试纸条法		ICP-AES 仪器法	
		检 测 值 *(ug/g)	RSD(%)	检 测 值 (μg/g)	RSD(%)
7# 1693-3	决明子	3.66	11.0	3.62	2.4
8# 1693-1	枸杞	8.24	7.4	8.68	0.9
9# 1693-2	菊花	3.32	13.3	3.12	0.8

[0115]

10# 1640-3	金银花	4.06	8.9	4.12	1.5
11# 1640-2	金银花	3.05	16.4	3.32	0.8
12# 1640-1	金银花	4.08	4.7	3.62	0.1
13# 1815-1	金银花	8.22	15.5	6.22	0.8
14# 1733-1	金银花	7.53	16.6	9.42	1.4
15# 1758-1	金银花	4.37	15.7	5.92	0.2
16# 1816-1	金银花	6.38	9.3	7.02	0.6
17# 1546-1	黄芪	5.98	5.6	5.03	0.5
19# 1352-1	白芍	5.91	15.7	4.01	0.9
20# 1693-4	覆盆子	9.17	9.2	9.82	0.4

[0116] *免疫荧光层析试纸条法检测值为系数校正后结果(基于以上13个样本的校正函数为y＝1.7877x+1.8287)

[0117] 免疫荧光层析试纸条法与ICP-AES仪器法检测结果采用GraphPad Prism及SPSS进行相关性统计分析,Pearson相关性分别为0.877,检测结果在0.05水平上显著相关,可应用于一般(中草药)植物中铜含量的检测。

[0118] 水样样品中铜含量的测定

[0119] 将河水、池塘水、农田水、(金属加工厂)地表水等水样样品滤纸过滤后0.22um滤器过膜,再与螯合剂NOTA偶联以制备待测样品。通过上述免疫荧光层析试纸条以及ICP-AES仪器法同时对样品中Cu含量进行测定,结果如表11所示。

[0120] 表11 水样样品重金属铜含量测定结果

[0121]

样品号	样品名	免疫荧光层析试纸条法		ICP-AES 仪器法	
		检 测 值 *(ug/L)	RSD(%)	检 测 值 (μg/L)	RSD(%)
W-01#	池塘水	9.1	1.1	8.8	1.2
W-02#	池塘水	7.0	12.4	6.8	8.2
W-03#	农田水	8.2	9.0	8.9	2.0
W-04#	农田水	7.8	7.9	7.5	1.1
W-05#	农田水	11.1**	4.1	20.0	2.2

[0122]

W-06#	珠江水	7.5	7.9	6.2	3.1
W-07#	珠江水	7.2	16.9	6.3	1.2
W-08#	珠江水	6.9	7.8	5.9	3.5
W-09#	珠江水	7.2	5.8	6.4	0.8
W-10#	金属加工厂地表水	27.1	7.3	26.6	0.5
W-11#	金属加工厂地表水	29.3	1.3	25.8	0.8
W-12#	珠江水	8.1	0.1	8.2	2.9
W-13#	珠江水	7.0	13.9	6.2	1.4
W-14#	珠江水	9.1	18.9	6.6	1.8
W-15#	珠江水	7.9	15.5	7.6	0.6

[0123] *免疫荧光层析试纸条法检测值为系数校正后结果(基于以上15个样本的校正函数为y＝1.6982x+5.9604)

[0124] 免疫荧光层析试纸条法与ICP-AES仪器法检测结果采用GraphPad Prism及SPSS进行相关性统计分析,Pearson相关性分别为0.929,检测结果在0.05水平上显著相关,可应用于一般水样中铜含量的检测。

[0125] 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。

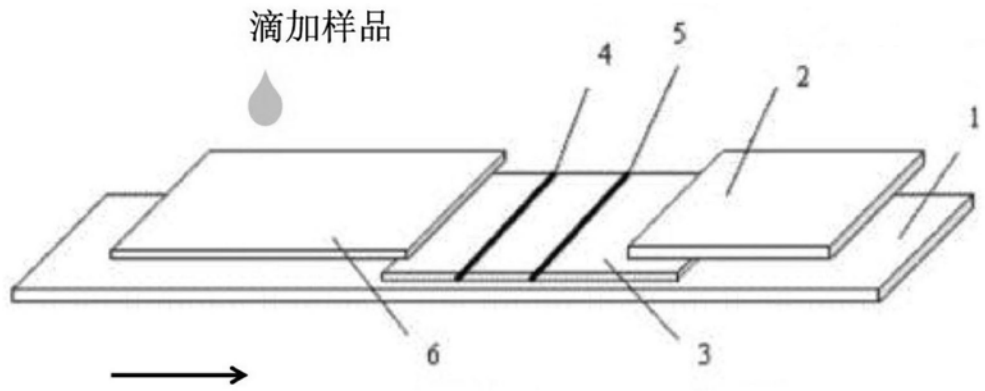

滴加样品
4
5
2
1
6
3

图1

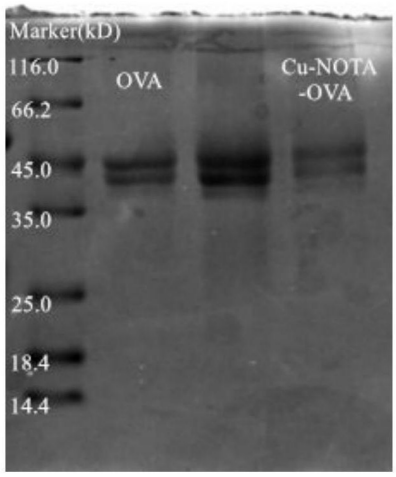

Marker(kD)
116.0
66.2
45.0
35.0
25.0
18.4
14.4
OVA
Cu-NOTA
-OVA

图2

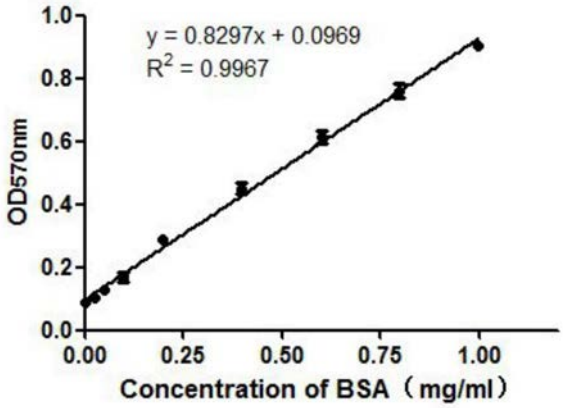

y = 0.8297x + 0.0969
R2 = 0.9967
OD570nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
Concentration of BSA（mg/ml）

图3

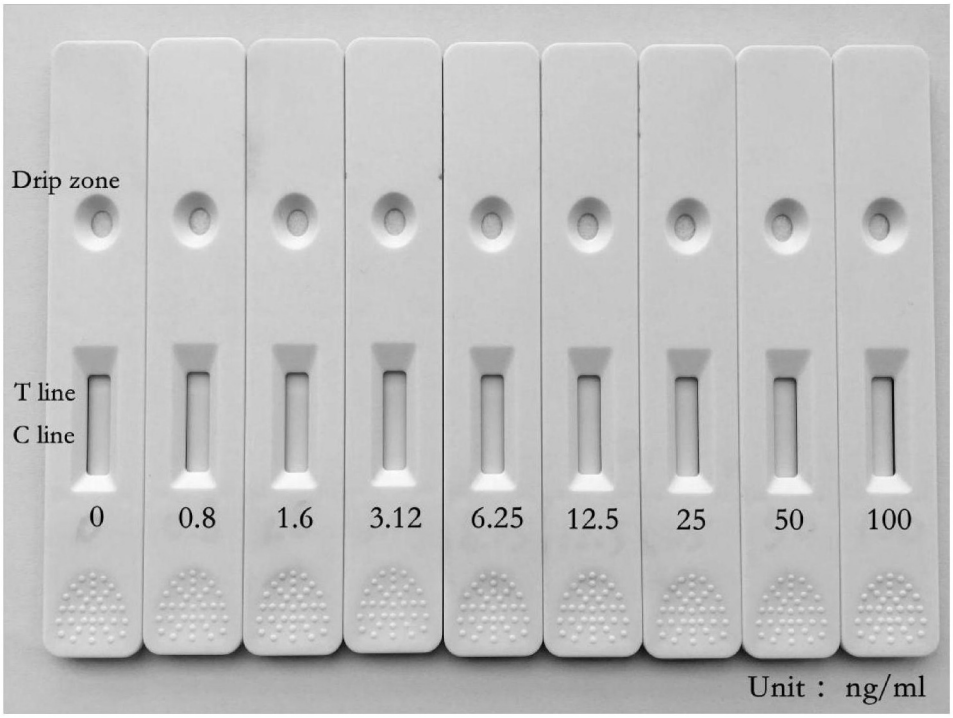

Drip zone
T line
C line
0
0.8
1.6
3.12
6.25
12.5
25
50
100
Unit : ng/ml

图4

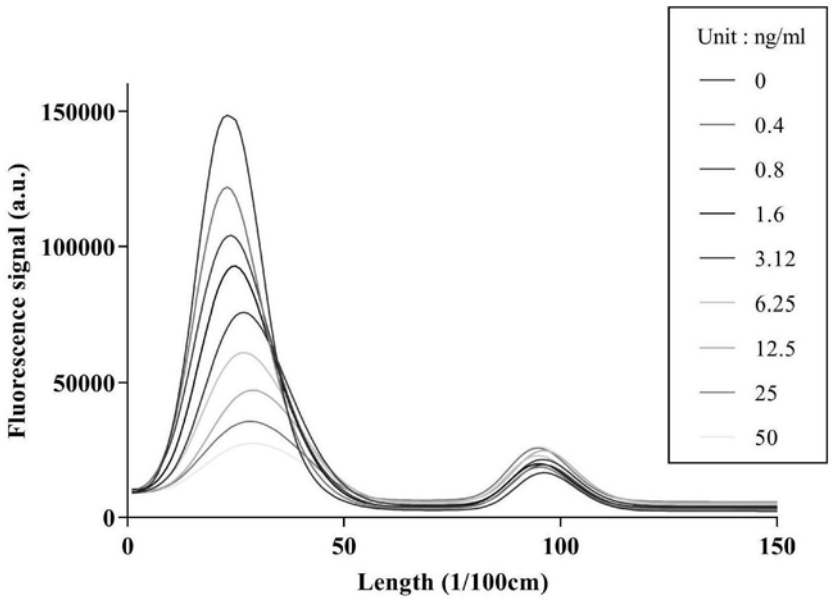

Unit : ng/ml
0
0.4
0.8
1.6
3.12
6.25
12.5
25
50
Fluorescence signal (a.u.)
150000
100000
50000
0
0
50
100
150
Length (1/100cm)

图5

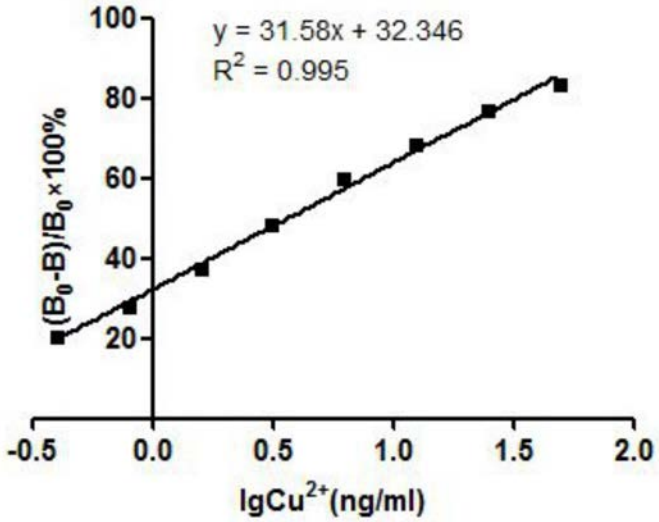
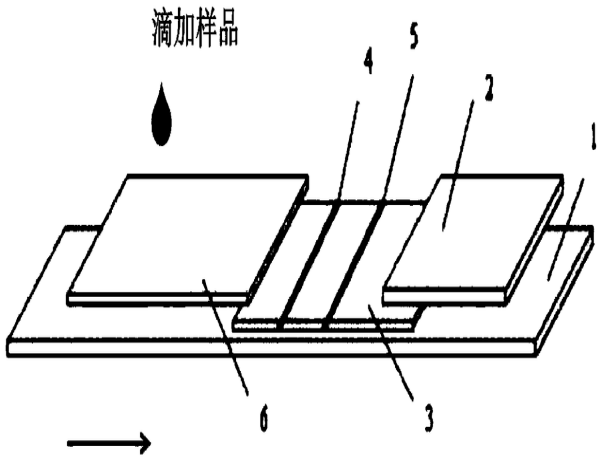

y = 31.58x + 32.346
R2 = 0.995
(B0-B)/B0×100%
100
80
60
40
20
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
lgCu2+(ng/ml)

图6

专利名称(译)	一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其应用		
公开(公告)号	CN108717122A	公开(公告)日	2018-10-30
申请号	CN201810559617.5	申请日	2018-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南大学		
发明人	向军俭		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测铜离子的免疫荧光层析试纸条及其在检测样品铜离子浓度中的应用，属于铜离子检测技术领域；所述免疫荧光层析试纸条包括依次搭接的玻璃纤维垫、硝酸纤维膜和吸水纸；所述玻璃纤维垫上喷涂有铜离子单克隆抗体-荧光微球复合物；所述硝酸纤维素膜依次设置包被铜离子检测完全抗原的检测线和包被二抗的质控线；所述免疫荧光层析试纸条使用方便，灵敏度高；检测灵敏度(IC50)为3.6ng/ml，检测范围(IC20-IC80)为0.4-32.3ng/ml，检测限(IC10)为0.2ng/ml。