



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101893623 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201010206479. 6

CN 1811449 A, 2006. 08. 02, 全文.

(22) 申请日 2010. 06. 22

CN 101339196 A, 2009. 01. 07, 全文.

(73) 专利权人 上海师范大学

审查员 蔡苗

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 王元凤 白亚龙 魏新林

(74) 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 杨杰民

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101551398 A, 2009. 10. 07,

CN 101526523 A, 2009. 09. 09,

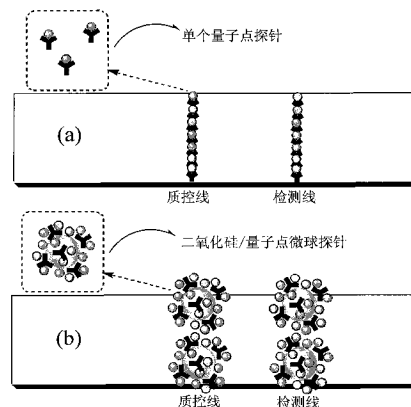
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法

(57) 摘要

本发明涉及检测方法,一种超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法。现有技术的缺点是:由于样品检测限度要求高;样品成分复杂,前处理难度大;检测灵敏度无法满足人们的要求。本发明方法为制备二氧化硅纳米粒子;将氨基化二氧化硅纳米粒子与抗体在缩合剂的作用下37℃孵育1-10h,高速离心1-4次除去未结合抗体与缩合剂;将离心后的沉淀物复溶,加入缩合剂及羧基化水溶性量子点,高速离心除去游离的量子点与缩合剂;制得二氧化硅/量子点复合微球探针;组建免疫层析试纸条体系。本发明的优点是:检测方法简便、结果准确、直观;灵敏度高;价格低廉;可做半定量检测、定量检测;应用广泛。



1. 一种超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,包括以下步骤:
 - (1) 制备氨基化二氧化硅纳米粒子:
 - A、由表面活性剂、油相、水相和助剂正己醇配制反相微乳液体系;在氨水为催化剂的情况下水解正硅酸乙酯制备粒径为 10-200nm 二氧化硅纳米粒子;
 - B、粒径为 200-1000nm 的二氧化硅纳米粒子可用töber法在乙醇/水溶液中用氨水催化 TEOS 合成;
 - C、将二氧化硅纳米粒子用硅烷偶联剂进行氨基化改性;得氨基化二氧化硅纳米粒子;
 - (2) 将氨基化二氧化硅纳米粒子与抗体在缩合剂的作用下 37℃ 孵育 1-10h, 高速离心 1-4 次除去未结合抗体与缩合剂;
 - (3) 将离心后的沉淀物复溶,加入缩合剂及羧基化水溶性量子点,37℃ 下孵育 1-10h, 高速离心除去游离的量子点与缩合剂;制得二氧化硅/量子点复合微球探针,用稀释液复溶,放入冰箱 4℃ 条件下保存备用;
 - (4) 将划有二抗与包被抗原的硝酸纤维素膜、吸水垫、喷有量子点微球探针的玻璃纤维素膜、玻纤膜或聚酯膜样品垫组装在背板上,组建免疫层析试纸条体系;
 - (5) 对于检测灵敏度要求高的检测物,增加量子点微球探针与样品的孵育步骤,增加反应时间;移取量子点微球探针于 96 孔板小孔中,冷冻干燥或低温真空干燥后密闭保存,在检测时滴加样品处理液于小孔中进行复溶,静置反应 2-10 分钟;吸取;加入没有结合垫的免疫层析试纸条中检测;
 - (6) 半定量与定量检测:
 - A、半定量检测:滴加样品后于紫外灯下观测条带显色情况;
 - B、定量检测:制作具有激发光源、信号采集、光信号数字转换部件与软件的定量检测平台。
2. 根据权利要求 1 所述的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于:步骤(2)所述缩合剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺的一种或几种混合。
3. 根据权利要求 1 所述的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于:步骤(3)所述量子点是水溶性表面具有羧基的量子点或核壳结构量子点的一种;直接在水相中合成,或者油相合成后进行水相改性。
4. 根据权利要求 1 所述的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于:步骤(3)所述稀释液为含牛血清白蛋白、蔗糖、叠氮钠、聚乙二醇 20000、吐温-20 物质的缓冲溶液。
5. 根据权利要求 1 所述的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于:量子点微球探针喷在玻璃纤维素膜上作为结合垫组装在试剂条上;或者直接移取一定量探针于可拆卸 96 孔板单个孔中,干燥密封保存,检测时用样品或样品处理液复溶并孵育。
6. 根据权利要求 1 所述的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于:
 - A、检测物质为大分子物质时,采用双抗体夹心法,检测线的组成物为检测物的另一抗体;

B、检测物质为小分子物质时,采用竞争法,检测线的组成物为检测物的包被抗原。

7. 根据权利要求 1 所述的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,其特征在于:免疫层析试纸条检测线为 1 条-3 条;多残留检测,每种残留物对应抗体分别用不同荧光颜色的量子点微球进行标记。

超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测方法,具体地说是一种超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法。

背景技术

[0002] 免疫层析试纸条检测是一种快速、简便、灵敏、直观、价格低廉,可根据需要随时进行现场检测的方法。具有其它检测方法例如气相色谱法、高效液相色谱法、气质联用色谱法、液质联用色谱法、毛细管电泳等仪器检测方法不具备的优点。在检测技术中处于重要的地位,也是对传统检测和仪器检测的良好补充。尤其在科学技术发展,生活水平提高的当代,人类重大疾病,环境污染,食品安全等问题日益受到极大的关注,免疫层析检测技术更加具有重要的作用。

[0003] 目前,免疫层析产品主要为胶体金免疫层析试纸条,其最早应用于医学检验,在早孕检测中应用取得了极大的成功;随后在各个领域迅速被扩大应用。在毒品检测、环境检测、食品安全检测领域得到了迅速的推广和应用。现有免疫层析检测技术的缺点是:由于食品安全检测、农药、兽药残留检测限度要求极度苛刻;同时食品类物质如肉类、禽类、果蔬、谷物等成分复杂,前处理难度大;胶体金免疫层析检测灵敏度往往无法满足人们的要求。因此发明一种灵敏度高、检测简便、直观、价格低廉的免疫层析检测方法是十分重要的。

[0004] 量子点是近 20 年来发展起来的半导体纳米晶材料,它具有如下特点:1、不同粒径大小的量子点具有不同的颜色,激发量子点的波长范围很宽,且连续分布,可以用同一波长的光激发不同大小的量子点而获得多种颜色标记,是一类理想的荧光探针。2、被激发的量子点所发射的荧光谱峰狭窄而对称,同时使用不同光谱特征的量子点发射光谱不出现交叠;使生物分子的定量检测和多组分检测变得容易。3、量子点探针的荧光强度比最常用的罗丹明 6G 染料高 20 倍;稳定性是罗丹明 6G 的 100 倍以上;可以经受反复多次激发,不易发生荧光淬灭,光化学稳定性高,不易分解。

[0005] 由于半导体纳米晶材料具有这些优良性能使得它为检测与诊断提供了有力工具。近年来从细胞标记应用已逐渐开始向多个领域的检测与诊断方向发展。由于量子点一般粒径微小,只有 1-10nm 左右,单个量子点发光强度有限,单个量子点与抗体相偶联,在实际应用中灵敏度远远不够。因此想要得到更高的发光强度,不仅是要提高单个量子点的荧光量子产率,更重要的是将多个量子点形成尺寸较大的微球,使得每个球体上具有大量的量子点;同时不能造成荧光强度的猝灭。将量子点包裹成球通常的做法是用反相微乳液法或 **stöber**发明的**stöber**法,将多个量子点包裹进二氧化硅纳米粒子中。应用这种方法得到的硅包量子点微球因为静电排斥只能包裹少量量子点,同时因为反应中试剂的作用,造成荧光强度很大的猝灭,无法得到较高的灵敏度。

[0006] 中国专利 200610024086.7、200810045548.2、200810041133.8、200810227473.X、200810186010.3 都不同程度的涉及量子点免疫层析试纸条检测方法,由于选用的都为单个量子点或者核壳型量子点,即使应用包裹技术,灵敏度也受到很大的限制。

[0007] 为了提供一种灵敏度高、检测简便、直观、价格低廉、应用广泛的免疫层析检测方法,发明一种超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,对于人类重大疾病,环境污染,食品安全的检测是十分必要的。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种灵敏度高、检测简便、直观、价格低廉、应用广泛的超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法。

[0009] 本发明的目的是这样实现的:

[0010] 一种超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 制备氨基化二氧化硅纳米粒子:

[0012] A、由表面活性剂、油相、水相、助剂配制反相微乳液体系;在氨水为催化剂的情况下水解正硅酸乙酯制备小粒径二氧化硅纳米粒子;

[0013] B、大粒径的二氧化硅纳米粒子可用 **stöber** 法在乙醇/水溶液中用氨水催化 TEOS 合成;

[0014] C、将二氧化硅纳米粒子用硅烷偶联剂进行氨基化改性;得氨基化二氧化硅纳米粒子;

[0015] (2) 将氨基化二氧化硅纳米粒子与抗体在缩合剂的作用下 37℃ 孵育 1-10h, 高速离心 1-4 次除去未结合抗体与缩合剂;

[0016] (3) 将离心后的沉淀物复溶,加入缩合剂及羧基化水溶性量子点,37℃ 下孵育 1-10h, 高速离心除去游离的量子点与缩合剂;制得二氧化硅/量子点复合微球探针,用稀液复溶,放入冰箱 4℃ 条件下保存备用;

[0017] (4) 将划有二抗与包被抗原或相应抗体的硝酸纤维素膜、吸水垫、喷有量子点微球探针的玻璃纤维素膜、玻纤膜或聚酯膜样品垫组装在背板上,组建免疫层析试纸条体系;

[0018] (5) 对于检测灵敏度要求高的检测物,增加量子点微球探针与样品的孵育步骤,增加反应时间;移取量子点微球探针于可拆卸 96 孔板小孔中,冷冻干燥或低温真空干燥后密闭保存,在检测时滴加样品处理液于小孔中进行复溶,静置反应 2-10 分钟;吸取;加入没有结合垫的免疫层析试纸条中检测;

[0019] (6) 可半定量与定量检测:

[0020] A、半定量检测:滴加样品后于紫外灯下观测条带显色情况;

[0021] B、定量检测:制作具有激发光源、信号采集、光信号数字转换部件与软件的定量检测平台。

[0022] 步骤 (1) 制备氨基化二氧化硅纳米粒子 A 与 C 两个步骤结合的方法也可另选用一步法:

[0023] 二氧化硅纳米粒子在反相微乳液中制备结束以后,直接在体系中加入氨基化硅烷偶联剂氨基化修饰。

[0024] 步骤 (2) 所述缩合剂为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺的一种或几种混合。

[0025] 步骤 (3) 所述量子点是水溶性表面具有羧基的量子点或核壳结构量子点的一种;可以直接在水相中合成,或者油相合成后进行水相改性。

[0026] 步骤(3)所述稀释液为含牛血清白蛋白、蔗糖、叠氮钠、聚乙二醇 20000、吐温-20 等物质的缓冲溶液。

[0027] 量子点微球探针可喷在玻璃纤维素膜上作为结合垫组装在试剂条上;直接移取一定量探针于 96 孔板小孔中,干燥密封保存,检测时用样品或样品处理液复溶并孵育。

[0028] 超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法:检测物质为大分子物质时,采用双抗体夹心法等,检测线的组成物为检测物的另一抗体;检测物质为小分子物质时,采用竞争法,检测线的组成物为检测物的包被抗原。

[0029] 免疫层析试纸条检测线为 1 条-3 条;多残留检测,每种残留物对应抗体分别用不同荧光颜色的量子点微球进行标记。

[0030] 本发明的要点是:应用氨基化二氧化硅纳米粒子为核心,先用少量偶联剂偶联将抗体共价连接于其上,然后在离心纯化以后,将大量羧基化量子点共价偶联于氨基化二氧化硅纳米粒子表面以及已与二氧化硅纳米粒子结合的抗体之上,在一个微球上附着有大量的量子点,极大的提高了量子点微球探针的荧光强度,从而极大的提高了免疫层析的灵敏度。此外,为了得到灵敏度更高的产品,改进了免疫层析方法,灵敏度得到进一步的提升。本发明可用于疾病诊断、环境监测、毒品检测、违禁药品检测、食品安全分析等方面的单残留或多残留快速、高灵敏度半定量检测,配备一些其他设备还可实现定量检测。

[0031] 具体检测方法包括以下几个步骤:

[0032] (1) 在表面活性剂,油相,水相,助剂组成的反相微乳液体系中,用氨水水解正硅酸乙酯 (TEOS) 制备二氧化硅纳米粒子,此二氧化硅纳米粒子粒径为 10-200nm。制备更大粒径的均一二氧化硅纳米粒子可用 **stöber** 发明的 **stöber** 法,在乙醇/水溶液中用氨水催化 TEOS 得到 200-1000nm 的二氧化硅纳米粒子。

[0033] (2) 然后将二氧化硅纳米粒子用硅烷偶联剂 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、3-(2-氨基乙基氨基)丙基三甲氧基硅烷 (AEAPS),或结合 3-(三羟基硅基)丙甲基磷酸酯 (THPMP) 进行氨基化改性。

[0034] (3) 将氨基化二氧化硅纳米粒子与适量抗体在少量缩合剂 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、N-羧基琥珀酰亚胺、N-羧基硫代琥珀酰亚胺的一种或几种混合使用的作用下,37°C 下孵育 1-10h,使氨基化二氧化硅纳米粒子与抗体结合,高速离心 1-4 次除去未结合抗体与缩合剂。

[0035] (4) 将离心后的沉淀物复溶,再加入较多量的缩合剂以及油相改性或水相直接合成的羧基化水溶性量子点,继续 37°C 下孵育 1-10h,然后高速离心除去游离的量子点与缩合剂等杂质。然后,将二氧化硅/量子点复合微球探针用含有 BSA、蔗糖、叠氮钠、聚乙二醇 20000、吐温-20 等物质的缓冲溶液复溶后 4°C 冰箱保存待用。

[0036] (5) 当检测物质为蛋白、病毒、致病菌等大分子物质时,可采用双抗体夹心法,NC 膜上的检测线组成为检测物的另一抗体,检测线有线则样品为阳性,反之则为阴性;如果检测物质为毒品、抗生素、农药残留等小分子物质时,采用竞争法,NC 膜上的检测线组成为检测物的包被抗原,检测线无线则样品为阳性,反之则为阴性。不论哪种方法,只要质控线无色检测结果均无效。

[0037] (6) 可用两种方法组建免疫层析体系:一,将划有二抗质控线与包被抗原或抗体、检测线的 NC 膜、吸水垫、喷有量子点微球探针的玻璃纤维素膜,以及玻纤膜或聚酯膜

样品垫组装在特制背板上,构成免疫层析体系,如图 3 所示。检测时只需在样品垫上直接滴加尿液、唾液、牛奶等单一样品;或者滴加肉类、谷类、果蔬等复杂样品的处理液后,层析 5-15min 观察结果。二,将划有二抗质控线与包被抗原、抗体、检测线的 NC 膜、吸水垫、以及玻纤膜或聚酯膜样品垫组装在特制背板上,组装试剂条体系,如图 4 所示。使用时,吸取一定量的量子点探针于可拆卸 96 孔板的小孔中,冷冻干燥或低温真空干燥,密封保存。检测时,移取一定量简单样品或者复杂样品处理液于小孔中,使得干燥物溶解并混合,静置反应 2-10min 后,吸取一定量滴于试纸条样品垫上,层析 5-15min 观察检测结果。后一种方法比前一种方法灵敏度提高 2-10 倍。

[0038] (7) 本检测体系除了单残留检测以外,还可进行多残留检测。当进行多残留检测时,不同颜色的量子点复合微球分别标记不同的抗体,NC 膜上除了以二抗作为质控线外,相应每种检测物的包被抗原或检测物抗体分别作为各自的检测线。同样,可以选择两种方法:其一,将各自的量子点微球探针取合适的量分别喷于玻璃纤维素膜上作为结合垫,并列固定在 NC 膜与样品垫之间;或者选择灵敏度更高的方法二,组装成无结合垫试纸条层析系统,分别吸取一定量的荧光微球探针加于不同 96 孔板小孔中,真空或冷冻干燥之后封闭保存,当检测时加入一定量样品或样品处理液复溶干燥物,并将所有干燥物与定量样品或样品处理液混合,静置 2-10min 以后,吸取一定量液体滴于样品垫上进行检测。如果体系为检测大分子物质的双抗体夹心法,检测线都出线,则残留物都为阳性;如果都不出线,则残留物均为阴性;一条检测线出线一条检测线不出线,则出线者为阳性,不出线者为阴性。如果体系为检测小分子物质的竞争法,结果恰好相反。不管哪种方法,如质控线不出线则检测结果一律无效。

[0039] (8) 此检测试纸条除了可半定量检测以外,还可以增加一些其他相应设备进行定量检测。简单配合暗箱式紫外灯、照相机(或摄像头)、以及 Photoshop(美国 Adobe 公司)与 Scion Image(美国 Scion 公司)软件进行分析,就可实现定量检测。如果想实现更高精度,更自动化的定量检测,还可以紫外 LED 为激发光源,CMOS 传感器为信号采集部件,以及光信号与数字信号转换软件的专业检测体系。

[0040] 本发明以粒径较大的氨基化二氧化硅纳米粒子为核心,依次偶联少量的抗体与大量的羧基化量子点,形成粒径较大且表面共价结合大量量子点的高强度荧光微球探针,以此微球为探针开发出的免疫层析试纸条产品与胶体金免疫层析以及单量子点作为探针的免疫层析方法相比灵敏度大大提升。借助简单仪器与软件还可进行定量检测,如果需要更精密高效的定量检测结果还可开发相关配套产品。

[0041] 本发明可广泛应用于传染性疾病检测、肿瘤早期诊断等疾病诊断、环境监测、毒品检测、违禁药品测试、食品中农药残留、致病菌安全分析等方面的单残留或多残留高灵敏度快速半定量检测,配合其他设施可实现定量检测。

[0042] 本发明的优点是:

[0043] 1、检测方法简便、结果准确、直观。

[0044] 2、检测结果灵敏度高。

[0045] 3、免疫层析试纸条价格低廉。

[0046] 4、既可做半定量检测,又可做定量检测。

[0047] 5、可广泛应用于传染性疾病检测、肿瘤早期诊断、环境监测、毒品检测、违禁药品

测试、食品中农药残留、致病菌安全分析等领域。

附图说明

- [0048] 图 1 为单个量子点探针与二氧化硅 / 量子点微球探针灵敏度比较图。
[0049] 图 2 为二氧化硅 / 量子点荧光微球探针制备图。
[0050] 图 3 为方法一组建的量子点微球免疫层析示意图。
[0051] 图 4 为方法二组建的更为灵敏的量子点微球免疫层析示意图。
[0052] 图 5 为量子点微球免疫层析多残留检测示意图。

具体实施方式

[0053] 以下结合附图通过实施例对本发明做进一步说明。

[0054] 实施例一：

[0055] 氨基化二氧化硅的制备：分别称取 8.85ml Triton X-100、37.5ml 环己烷、9ml 正己醇和适量水组成反相微乳液体系，在磁力搅拌下分别加入 0.5ml TEOS、0.3ml 氨水，反应 24h 之后，加入 0.1ml APTES 与 0.05ml THPMP 继续反应 12h，丙酮破乳，高速离心纯化后干燥。经过场发射扫描电镜表征，粒径为 115nm。

[0056] 水相合成 CdTe 量子点：在氮气饱和的 244mL 浓度为 2×10^{-2} mol/L CdCl₂ · 2.5H₂O 溶液 (114.2mg) 中加入 104.4μL 巯基丙酸，用 1mol/L NaOH 调溶液的 pH 在 9.2 左右。注入新鲜制备的 NaHTe。剧烈搅拌下用 N₂ 脱氧 20min，然后迅速加入上述新制备的碲化钠溶液注入反应体系，最终使得 Cd²⁺ : Te²⁻ : MPA 为 1 : 0.5 : 2.4，100℃ 下氮气保护回流不同时间得到绿色、黄色、红色的碲化镉量子点。

[0057] 量子点荧光微球探针的制备：称取 0.02g 氨基化二氧化硅纳米粒子，用 10ml 0.01mol/L PBS (pH = 7.4) 溶液溶解，用 0.12ml EDC 与 0.15ml NHS 活化 10min，然后加入 150ml 抗链霉素单克隆抗体，37℃ 下摇床振荡 2h，高速离心未结合的抗体以及其他杂质。随后将沉淀物复溶，加入 1ml EDC 与 1.3ml NHS，同样活化 10min，然后加入 3ml CdTe 量子点，继续 37℃ 下摇床振荡 2h。然后 14000r/min 高速离心除去游离的 CdTe 量子点以及杂质。将沉淀物用含有 BSA、蔗糖、PEG20000、吐温 -80、叠氮钠等物质的 PBS (pH = 8.0) 复溶，4℃ 冰箱保存。

[0058] 在特制背板上，依次贴上用划膜仪划有羊抗鼠质控线，链霉素 -OVA 检测线的 NC 膜、吸水垫、喷有抗链霉素单克隆抗体的结合垫、样品垫，然后用切条机切成 4mm 宽小条。经过系列调试，最终检测限可达到 0.3ng/ml。

[0059] 为了得到更高灵敏度，本实施例对传统的免疫层析方法做了一些修改，在特制背板上，依次贴上用划膜仪划有羊抗鼠质控线，链霉素 -OVA 检测线的 NC 膜、吸水垫、样品垫；量子点微球探针不直接喷于结合垫上，而是吸取一定量于可拆卸 96 孔板的小孔中，冷冻干燥后密封保存，当检测时吸取一定量样品加入小孔中溶解干燥物，并静置 5min，然后吸取一定量滴加与层析试纸条的样品垫处，检测限可达 0.1ng/ml。

[0060] 实施例二：

[0061] 氨基化二氧化硅的制备：在乙醇 / 水混合体系中，加入 2ml 正硅酸乙酯与 2ml 氨水，磁力搅拌 12h，得到二氧化硅纳米粒子，高速离心除去杂质，在以甲苯溶液中，加入 1ml

APTES, 90℃下, 回流 12h, 得到氨基化二氧化硅纳米粒子, 粒径为 231nm。

[0062] 合成 CdTe/ZnSe 量子点: 在高温有机相中合成油溶性 CdTe/CdSe 核壳型量子点, 然后用 MPA 进行配体交换, 将油溶性量子点转移至水相。得到羧基包覆的水溶性 CdTe/CdSe 量子点。

[0063] 按照实施例一中的方法制备得到绿色抗青霉素单克隆抗体二氧化硅 / 量子点微球探针和红色的抗氯霉素单克隆抗体二氧化硅 / 量子点微球探针。分别喷于结合垫上, 将两个结合垫并列排布在 NC 膜与样品垫之间。NC 膜上, 靠近吸水垫处为羊抗小鼠二抗组成的质控线, 然后依次为青霉素 OVA 与氯霉素 -OVA 组成的两条检测线。将试纸条组装好以后, 用切条机切成 4mm 宽小条, 组装外壳连同小片干燥剂封闭包装。

[0064] 检测时, 质控线不论样品为阴性或阳性, 质控线均显色为黄色, 否则检测无效。当检测线分别出现红色与绿色, 则均为阴性, 如果均不出线, 则都为阳性。如果出现绿色线而红色线未出, 则青霉素为阴性而氯霉素为阳性, 反之, 则青霉素为阳性而氯霉素为阴性。

[0065] 实施例三:

[0066] 氨基化二氧化硅纳米粒子与水溶性量子点的制备同实施例一。

[0067] 按照实施例一的方法, 制备偶联有抗甲胎蛋白单克隆抗体的二氧化硅 / 红色量子点微球探针。

[0068] 在特制背板上, 依次贴上 NC 膜 (用划膜仪划有羊抗鼠质控线, 抗甲胎蛋白多克隆抗体检测线)、吸水垫、喷有抗甲胎蛋白单克隆抗体的二氧化硅 / 红色量子点微球探针的结合垫、样品垫, 然后用切条机切成 4mm 宽小条。

[0069] 半定量检测时, 出现检测线出现红色线条为阳性, 否则为阴性, 如果质控线不显红色, 则检测无效。

[0070] 定量检测时, 配置一系列甲胎蛋白标准溶液: 0ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、40ng/ml、60ng/ml, 然后分别滴加到层析系统中, 15 分钟后于反射式紫外暗箱中用奥林巴斯相机拍照, 然后将照片导入电脑中, 用 photoshop 软件处理为灰度, 然后用 Scion Image 软件将条带转换为峰值信号, 分别将各峰面积对应浓度做标准曲线, 得到峰面积与浓度对应公式, 将检测样品同样处理, 可得到峰面积, 根据公式可以得知样品中甲胎蛋白含量。

[0071] 以上所述仅为本发明的优选实施例, 并不用于限制本发明, 对于本领域的技术人员来说, 本发明可以有更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、改进等, 均应包括在本发明的保护范围之内。

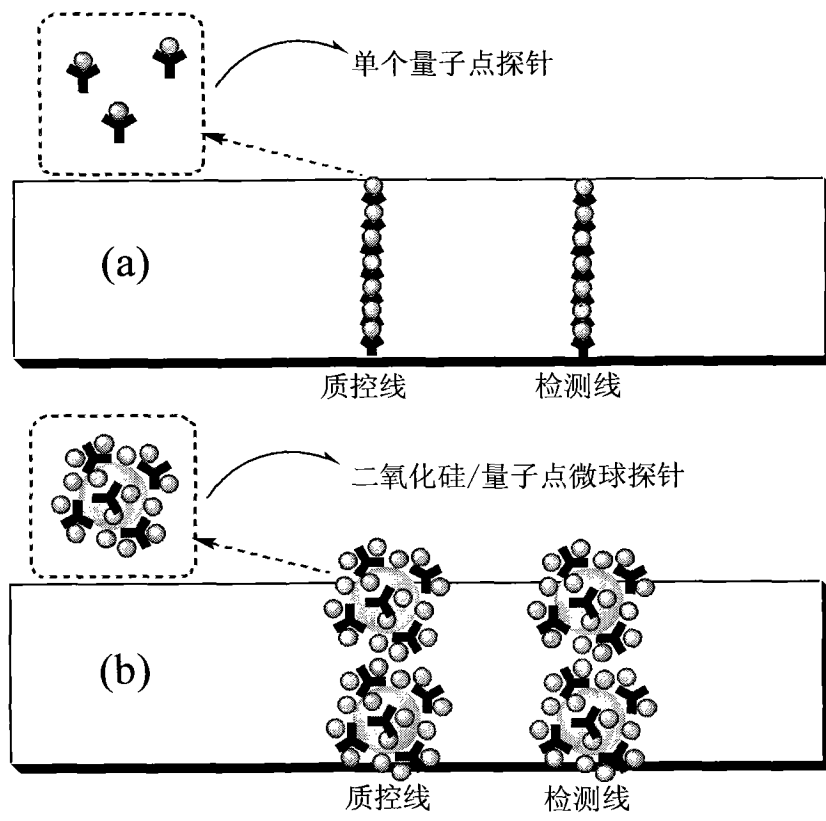


图 1

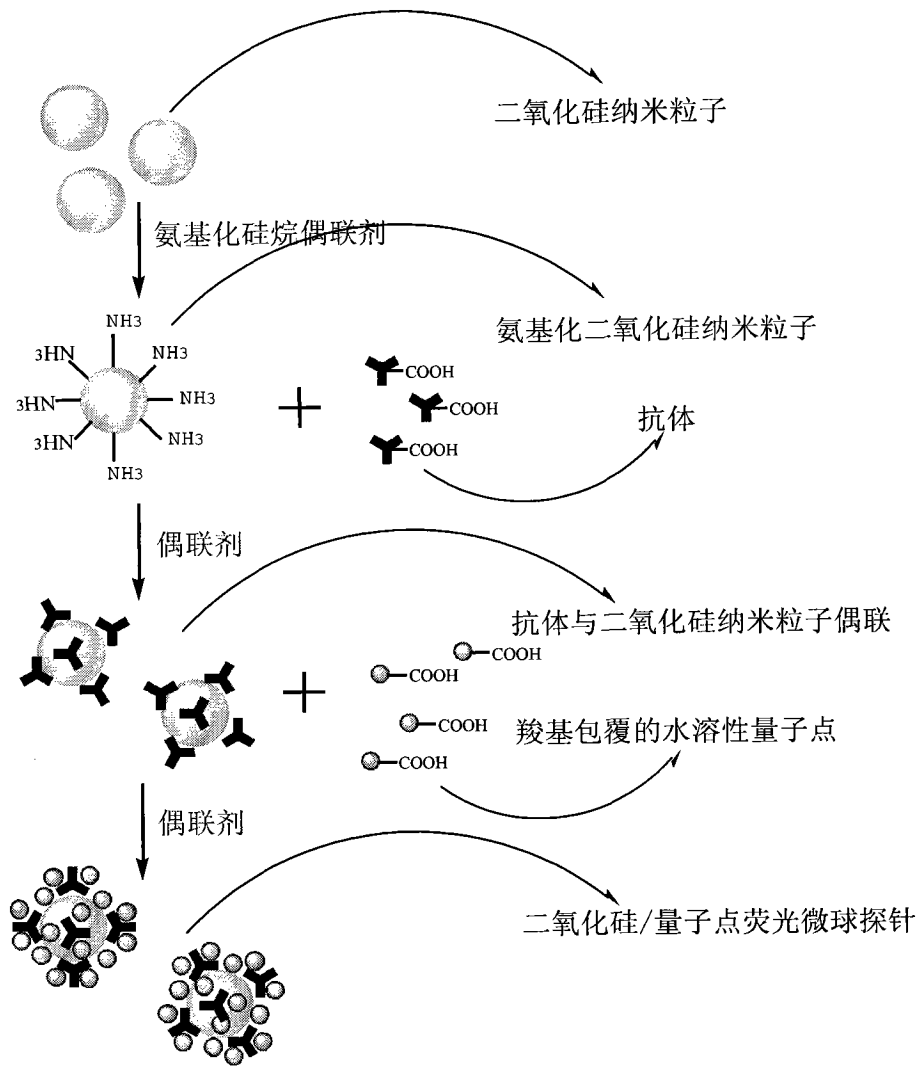


图 2

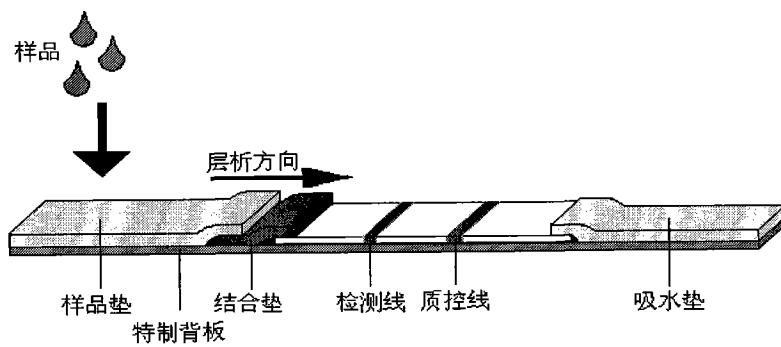


图 3

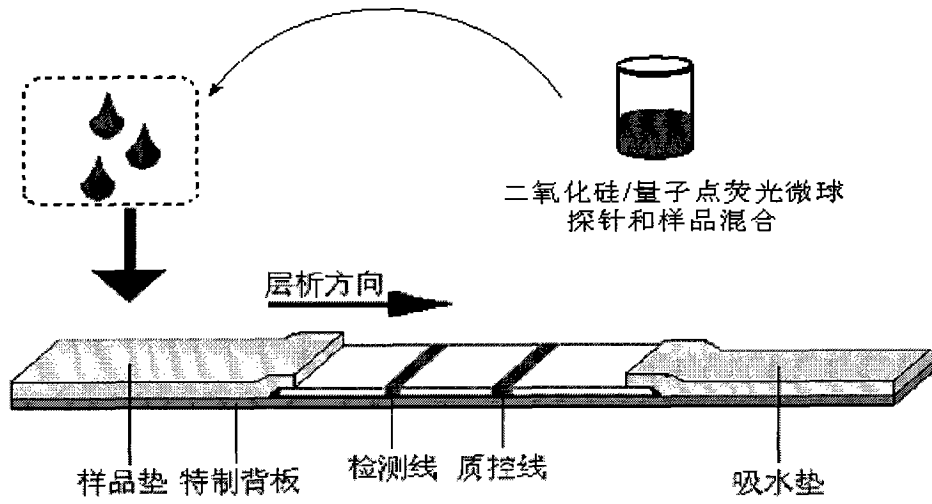


图 4

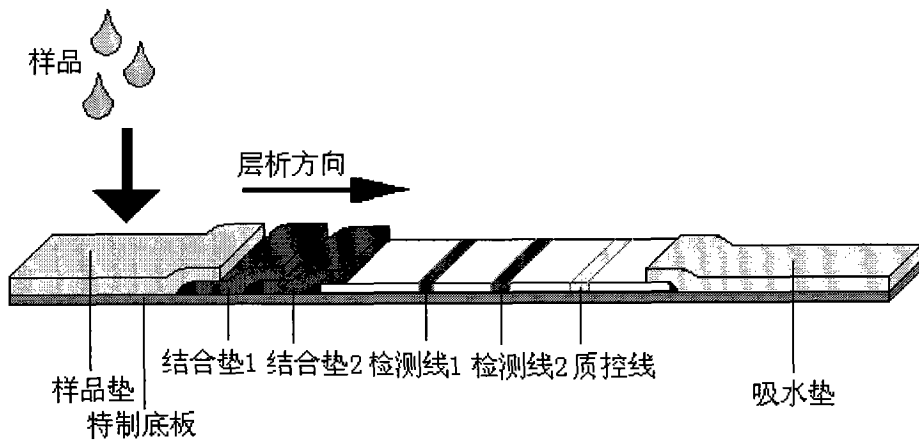


图 5

专利名称(译)	超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法		
公开(公告)号	CN101893623B	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	CN201010206479.6	申请日	2010-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	王元凤 白亚龙 魏新林		
发明人	王元凤 白亚龙 魏新林		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	杨杰民		
审查员(译)	蔡苗		
其他公开文献	CN101893623A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测方法，一种超灵敏量子点微球免疫层析试纸条快速检测方法。现有技术的缺点是：由于样品检测限度要求高；样品成分复杂，前处理难度大；检测灵敏度无法满足人们的要求。本发明方法为制备二氧化硅纳米粒子；将氨基化二氧化硅纳米粒子与抗体在缩合剂的作用下37°C孵育1-10h，高速离心1-4次除去未结合抗体与缩合剂；将离心后的沉淀物复溶，加入缩合剂及羧基化水溶性量子点，高速离心除去游离的量子点与缩合剂；制得二氧化硅/量子点复合微球探针；组建免疫层析试纸条体系。本发明的优点是：检测方法简便、结果准确、直观；灵敏度高；价格低廉；可做半定量检测、定量检测；应用广泛。

