



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044346 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510359684. 9

(22) 申请日 2015. 06. 25

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 方维焕 章先 李肖梁 谢琿
王歆 孙孟娇

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 周世骏

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

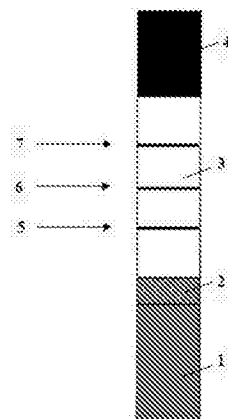
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

双重定量真菌毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫层析技术,旨在提供一种双重定量真菌毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法。该试纸条在聚氯乙烯背板表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫;在硝酸纤维素膜上设有两条检测线和一条质控线;在固定垫上固定有真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物;质控线由山羊抗鼠多克隆抗体喷涂形成,检测线由待检真菌毒素偶联抗原喷涂形成,两条检测线所含真菌毒素偶联抗原是不同的。本发明采用竞争法原理对真菌毒素进行定性检测和定量分析,可同时对两种真菌毒素进行检测,所制备的层析试纸条具有良好的灵敏度和稳定性,且操作简便快捷,特别适用于现场快速诊断。



1. 双重定量真菌毒素量子点荧光免疫层析试纸条,包括作为基材的黑色长条状聚氯乙烯背板,其特征在于,在沿背板长度方向在其表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,相邻垫或膜间彼此搭接;在硝酸纤维素膜上,设有与背板同宽的彼此间隔的两条检测线和一条质控线,其中质控线位于吸水垫一侧;

在量子点抗体标记物固定垫上,以喷涂、敷涂或浸泡的方式固定有真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物;所述质控线是将山羊抗鼠多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上形成,所述检测线是将待检真菌毒素偶联抗原喷涂于硝酸纤维素膜上形成,两条检测线所含真菌毒素偶联抗原是不同的。

2. 根据权利要求1所述的量子点荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述量子点抗体标记物固定垫上的真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物,其制备方法是:

以浓度为0.01M、pH = 7.4的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺溶液,浓度均为10mg/ml;取50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点至2ml EP管,加200 μ l 浓度为0.05M、pH = 6的2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液,并根据水溶性量子点上的羧基数量加入EDC和NHS溶液;室温摇床活化30min后15000rpm离心30min弃上清后加入1ml含5 μ g特异性真菌毒素单克隆抗体的0.05M、pH = 6的MES缓冲液;室温摇床反应2h后15000rpm离心30min弃上清,并用1ml 0.01M、pH = 7.4的磷酸盐缓冲液重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述的重悬、离心操作三次;最终加100 μ l的0.05M、pH = 8.0的硼酸盐缓冲液作为保存液,得到真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物,在4 $^{\circ}$ C放置,备用。

3. 根据权利要求1所述的量子点荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述真菌毒素单克隆抗体所对应的真菌毒素,是赭曲霉毒素A、黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素中的任意一种。

4. 根据权利要求1至3任意一项中所述的量子点荧光免疫层析试纸条,其特征在于,该试纸条的宽度为0.4cm,样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的长度分别为1.7cm、0.8cm、2.5cm、1.7cm;其中,样品垫与量子点抗体标记物固定垫的搭接重合长度为0.2cm,量子点抗体标记物固定垫与硝酸纤维素膜的搭接重合长度为0.2cm,硝酸纤维素膜与吸收垫的搭接重合长度为0.3cm;在硝酸纤维素膜上,两条检测线及检测线-2与质控线之间的间距分别为0.4cm、0.4cm。

5. 制备权利要求1所述量子点荧光免疫层析试纸条的方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1) 制备量子点抗体标记物固定垫

以浓度为0.01M、pH = 7.4的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺溶液,浓度均为10mg/ml;取50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点至2ml EP管,加200 μ l 浓度为0.05M、pH = 6的2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液,并根据水溶性量子点上的羧基数量加入EDC和NHS溶液;室温摇床活化30min后15000rpm离心30min弃上清,加入1ml含5 μ g特异性真菌毒素单克隆抗体的0.05M、pH = 6的MES缓冲液;室温摇床反应2h后15000rpm离心30min弃上清,并用1ml 0.01M、pH = 7.4的磷酸盐缓冲液重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述的重悬、离心操作三次;最终

加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液,得到真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点的标记复合物,在 4 $^{\circ}$ C 放置,备用;

以喷涂、敷涂或浸泡的方式,将真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点的标记复合物固定在量子点抗体标记物固定垫上,在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

(2) 检测线与质控线的喷涂:取硝酸纤维素膜贴于作为基材的长条状聚氯乙烯背板上,点膜仪在硝酸纤维素膜上同时喷涂两条检测线和一条质控线,其中质控线位于一侧;质控线的喷涂液为山羊抗鼠多克隆抗体,两条检测线的喷涂液是不同种类的待检真菌毒素偶联抗原;在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后,置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟,晾干后在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

(3) 免疫层析试纸条的组装:将样品垫、量子点抗体标记物固定垫和吸收垫布置于聚氯乙烯背板上,并使样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次排列,硝酸纤维素膜的质控线位于吸水垫一侧,且相邻垫或膜间彼此搭接;将聚氯乙烯背板及其贴附的材料切成 4mm 宽的层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

双重定量真菌毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术,具体地说,是涉及同时对食品中两种真菌毒素同时进行检测的以量子点标记真菌毒素特异性单克隆抗体和荧光显色为基础的免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 现阶段常发的各类中毒事件,除了某些由无机化合物如氰化钾、砒霜引起外,绝大部分都是来自生物毒素,而微生物毒素是最常见的,食物中毒绝大部分是细菌毒素或真菌毒素引起的,真菌毒素由于污染范围广、毒性强等特点日益受到食品安全监测领域的高度重视。

[0003] 真菌毒素是真菌产生的小分子次级代谢产物,是粮食和饲料中的重要污染物。真菌毒素的检测常见的方法是酶联免疫法(ELISA),虽然酶联免疫法操作简单,结果易获取,但需要配套的设备,如恒温培养箱、酶标仪等等,且往往耗时较长,不能用于临床或现场的快速诊断。相比ELISA,免疫层析试纸条可用于现场的快速检测,并且不需要其他辅助仪器,可弥补其他检测方法复杂而耗时的缺点。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术中酶标免疫技术耗时长和常规胶体金免疫层析试纸条灵敏度不高以及单通道等缺点,提供了一种检测真菌毒素的量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法。

[0005] 为解决技术问题,本发明的解决方案是:

[0006] 提供一种同时检测两种真菌毒素的量子点荧光免疫层析试纸条,包括作为基材的黑色长条状聚氯乙烯背板,在沿背板长度方向在其表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,相邻垫或膜间彼此搭接;在硝酸纤维素膜上,设有与背板同宽的彼此间隔的两条检测线和一条质控线,其中质控线位于吸水垫一侧;

[0007] 在量子点抗体标记物固定垫上,以喷涂、敷涂或浸泡的方式固定有真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物;所述质控线是将山羊抗鼠多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上形成,所述检测线是将待检真菌毒素偶联抗原喷涂于硝酸纤维素膜上形成,两条检测线所含真菌毒素偶联抗原是不同的。

[0008] 本发明中,所述量子点抗体标记物固定垫上的真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物,其制备方法是:

[0009] 以浓度为0.01M、pH=7.4的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,浓度均为10mg/ml;取50 μ l羧基修饰的水溶性量子点至2ml EP管,加200 μ l浓度为0.05M、pH=6的2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液,并根据水溶性量子点上的羧基数目加入EDC和NHS溶液;室温摇床活化30min后15000rpm离心30min弃上清后加入1ml含5 μ g特异性真菌毒素单克隆

抗体的 pH = 6.0、0.05M 的 MES 缓冲液；室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清，并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬，离心，洗去未反应的抗体；重复上述的重悬、离心操作三次；最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液，得到真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物，在 4 $^{\circ}$ C 放置，备用。

[0010] 本发明中，所述真菌毒素单克隆抗体所对应的真菌毒素，是赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素等中的任意一种。

[0011] 本发明中，该试纸条的宽度为 0.4cm，样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的长度分别为 1.7cm、0.8cm、2.5cm、1.7cm；其中，样品垫与量子点抗体标记物固定垫的搭接重合长度为 0.2cm，量子点抗体标记物固定垫与硝酸纤维素膜的搭接重合长度为 0.2cm，硝酸纤维素膜与吸收垫的搭接重合长度为 0.3cm；在硝酸纤维素膜上，两条检测线及检测线 -2 与质控线之间的间距分别为 0.4cm、0.4cm。

[0012] 本发明进一步提供了制备前所述量子点荧光免疫层析试纸条的方法，包括下述步骤：

[0013] (1) 制备量子点抗体标记物固定垫

[0014] 以浓度为 0.01M、pH = 7.4 的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液，浓度均为 10mg/ml；取 50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点至 2ml EP 管，加 200 μ l 浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 缓冲液，并根据水溶性量子点上的羧基数目加入 EDC 和 NHS 溶液；室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清后加入 1ml 含 5 μ g 特异性真菌毒素单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液；室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清，并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬，离心，洗去未反应的抗体；重复上述重悬、离心操作三次；最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液，得到真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点的标记复合物 4 $^{\circ}$ C 放置，备用；

[0015] 以喷涂、敷涂或浸泡的方式，将真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点的标记复合物固定在量子点抗体标记物固定垫上，在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用；

[0016] (2) 取硝酸纤维素膜贴于作为基材的长条状聚氯乙烯背板上，点膜仪在硝酸纤维素膜上同时喷涂两条检测线和一条质控线，其中质控线位于一侧；质控线的喷涂液为山羊抗鼠多克隆抗体，两条检测线的喷涂液是不同种类的待检真菌毒素偶联抗原；在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后，置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟，晾干后在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用；

[0017] (3) 将样品垫、量子点抗体标记物固定垫和吸收垫布置于聚氯乙烯背板上，并使样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次排列，硝酸纤维素膜的质控线位于吸水垫一侧，且相邻垫或膜间彼此搭接；

[0018] (4) 将聚氯乙烯背板及其贴附的材料切成 4mm 宽的层析条，将层析条放入塑料板卡内，用压卡机压实。

[0019] 与现有技术相比，本发明的有益效果是：

[0020] 本发明以量子点荧光材料取代常规的胶体金对真菌毒素特异性单克隆抗体进行标记，采用竞争法原理对真菌毒素进行定性检测和定量分析，硝酸纤维素膜上同时包被两条检测线，分别为待检真菌毒素偶联抗原，可同时对两种真菌毒素进行检测，所制备的层析试纸条具有良好的灵敏度和稳定性，且操作简便快捷，特别适用于现场的快速诊断。

附图说明

[0021] 图 1 为本发明中量子点荧光免疫层析试纸条的结构示意图。

[0022] 图中附图标记：1、样品垫；2、量子点抗体标记物固定垫；3、硝酸纤维素膜；4、吸收垫；5、检测线-1；6、检测线-2；7、质控线。

具体实施方式

[0023] 发明原理描述：

[0024] 本发明中的量子点荧光免疫层析试纸条基于量子点荧光材料与免疫层析技术。此种免疫层析条以羧基修饰的水溶性硒化镉/硫化锌量子点 (CdSe/ZnS) (CdSe 为核心, ZnS 为壳层, 量子点表面经过羧基官能团修饰后可与特定生物分子进行共价偶联) 取代常规的胶体金, 在偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的作用下与真菌毒素单克隆抗体进行共价偶联, 采用竞争法原理对食品中真菌毒素含量进行定性检测和定量分析。

[0025] 该可同时检测两种真菌毒素的量子点荧光免疫层析试纸条, 包括作为基材的黑色长条状聚氯乙烯背板, 在沿背板长度方向在其表面依次布置样品垫 (1)、量子点抗体标记物固定垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3) 和吸收垫 (4), 相邻垫或膜间彼此搭接; 在硝酸纤维素膜 (3) 上, 设有与背板同宽的彼此间隔的检测线 (5)、检测线 (6) 和质控线 (7), 其中质控线 (7) 位于吸水垫 (4) 的一侧; 在量子点抗体标记物的固定垫 (3) 上, 以喷涂、敷涂或浸泡的方式固定有真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物; 质控线 (7) 是将山羊抗鼠多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜 (3) 上形成, 检测线-1 (5) 和检测线-2 (6) 是将待检的真菌毒素偶联抗原喷涂于硝酸纤维素膜 (3) 上形成, 检测线-1 (5) 和检测线-2 (6) 所含真菌毒素偶联抗原是不同的。

[0026] 该试纸条的宽度为 0.4cm, 样品垫 (1)、量子点抗体标记物固定垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3) 和吸收垫 (4) 的长度分别为 1.7cm、0.8cm、2.5cm、1.7cm; 其中, 样品垫 (1) 与量子点抗体标记物固定垫 2 的搭接重合长度为 0.2cm, 量子点抗体标记物固定垫 (2) 与硝酸纤维素膜 (3) 的搭接重合长度为 0.2cm, 硝酸纤维素膜 (3) 与吸收垫 (4) 的搭接重合长度为 0.3cm; 在硝酸纤维素膜 (3) 上, 检测线-1 (5)、检测线-2 (6) 和质控线 (7) 的间距分别为 0.4cm、0.4cm。

[0027] 所述量子点抗体标记物固定垫 (2) 上的真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物, 其制备方法是: 以浓度为 0.01M、pH = 7.4 的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液, 浓度均为 10mg/ml; 取 50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点至 2ml EP 管, 加 200 μ l 浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲液, 并根据羧基水溶性量子点上的羧基数量加入 EDC 和 NHS 溶液; 室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清, 加入 1ml 含 5 μ g 特异性真菌毒素单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液; 室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清后并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬, 离心, 洗去未反应的抗体; 重复上述的重悬、离心操作三次; 最终加入 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为得到的量子点标记单克隆抗体的保存液, 4 $^{\circ}$ C 放置, 备用。

[0028] 本发明所述真菌毒素单克隆抗体所对应的真菌毒素,本发明中,所述真菌毒素单克隆抗体所对应的真菌毒素,是赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素中的任意一种。

[0029] 量子点荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括下述步骤:

[0030] 1、制备量子点抗体标记物固定垫

[0031] 以浓度为 0.01M、pH = 7.4 的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液,浓度均为 10mg/ml;取 50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点至 2ml EP 管,加 200 μ l 浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 缓冲液,并根据水溶性量子点上的羧基数量加入 EDC 和 NHS 溶液;室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清后加入 1ml 含 5 μ g 特异性真菌毒素单克隆抗体的 pH = 6 的 MES 缓冲液;室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清,并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述重悬、离心操作三次;最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液,得到真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物 4 $^{\circ}$ C 放置,备用;

[0032] 以喷涂、敷涂或浸泡的方式,将真菌毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物固定在量子点抗体标记物固定垫 2 上,在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

[0033] 2、检测线与质控线的喷涂:取硝酸纤维素膜 (3) 贴于作为基材的长条状聚氯乙烯背板上,点膜仪在硝酸纤维素膜 (3) 同时上喷涂检测线 -1 (5)、检测线 -2 (6)、质控线 (7),其中质控线 (7) 位于一侧;质控线 (7) 的喷涂液为山羊抗小鼠多克隆抗体,检测线 -1 (5) 和检测线 -2 (6) 的喷涂液是不同种类的待检真菌毒素偶联抗原;在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后,置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟,晾干后在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

[0034] 3、免疫层析试纸条的组装:将样品垫 (1)、量子点抗体标记物固定垫 (2) 和吸收垫 (4) 布置于聚氯乙烯背板上,并使样品垫 (1)、量子点抗体标记物固定垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3) 和吸收垫 (4) 依次排列,质控线 (7) 位于吸水垫 (4) 一侧,且相邻垫或膜间彼此搭接;将聚氯乙烯背板及其贴附的材料切成 4mm 宽的层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

[0035] 实施例 1:双重定量检测食品中赭曲霉毒素 A 和黄曲霉毒素 B1 量子点荧光免疫层析试纸条的制备

[0036] 具体制备过程如下:

[0037] 1、制备量子点 - 赭曲霉毒素 A 单克隆抗体标记物与量子点 - 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体标记物固定垫

[0038] 常规法制备并纯化抗赭曲霉毒素 A 和黄曲霉毒素 B1 鼠单克隆抗体,浓度分别为 5mg/ml 和 3mg/ml,备用;

[0039] 制备真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物:分别用硼酸盐缓冲液 (0.01M, pH = 7.4) 配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液,浓度均为 10mg/ml,取羧基修饰的水溶性量子点 (购自深圳市海王英特龙生物技术股份有限公司,货号 QD618-C-S001) 50 μ l 于 2ml EP 管中并加入 200 μ l 0.05M 的 MES 缓冲液,按照摩尔比 (水溶性量子点上的羧基数目:EDC:NHS = 1:5000:5000) 分别加入加 3 μ l 的偶联剂 EDC 和 NHS 后,室温摇床活化 30min,15000rpm 离

心 30min 后弃上清,加入 1ml 含 $5 \mu\text{g}$ 的赭曲霉毒素 A 特异性单克隆抗体的 0.05M 、 $\text{pH} = 7.4$ 的 MES 缓冲液,室温摇床反应 2h, 15000rpm 离心 30min 后弃上清,并用 1ml 0.01M 磷酸盐缓冲液 (0.01M , $\text{pH} = 7.4$) 重悬,离心,洗去未反应的抗体,重复上述的重悬、离心操作三次,最终加 $100 \mu\text{l}$ 的保存液 (0.05M 硼酸盐缓冲液, $\text{pH} = 8.0$) 重悬后, 4°C 放置,备用。按照相同的方法偶联黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体和羧基水溶性量子点,得到标记抗体复合物;

[0040] 设定点膜仪的喷涂参数为 $30.0 \mu\text{l}/\text{cm}$,将两种量子点-单克隆抗体复合物等体积混匀后连接在点膜仪的 C 管道接口。取规格为 $30\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的量子点抗体标记物固定垫 2 放置于点膜仪的运动平台上。开启点膜仪,在量子点抗体标记物固定垫 2 上喷涂抗体量子点复合物, 37°C 干燥 2 小时。

[0041] 2、量子点免疫层析试纸条检测线与质控线的喷涂:取硝酸纤维素膜 3 贴于低背景值 PVC 背板,设定点膜仪的喷涂参数为 $2 \mu\text{l}/\text{cm}$ 。取 $5\text{mg}/\text{ml}$ 的赭曲霉毒素 A 偶联抗原 OTA-OVA 1.5ml 和 $2\text{mg}/\text{ml}$ 的黄曲霉毒素 B1 偶联抗原 AFB1-OVA 1.5ml ,分别接到点膜仪的 A、B 管道接口处,并同时取 $4\text{mg}/\text{ml}$ 的山羊抗鼠多克隆抗体接到点膜仪的 C 管道接口,其中 A、B、C 的管道口间距均为 0.4cm ,将贴有硝酸纤维素膜 3 的 PVC 背板置于点膜仪的往复运动平台上。开启点膜仪,在硝酸纤维素膜 3 上分别喷涂真菌毒素偶联抗原和山羊抗鼠抗体, 37°C 干燥 2 小时。将背板置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟后晾干后 37°C 干燥 2 小时。

[0042] 3、免疫层析试纸条的组装:在固定于 PVC 板上的硝酸纤维素膜 (3) 靠近山羊抗鼠抗体的一端贴上吸收垫 (4),硝酸纤维素膜 (3) 与吸收垫 (4) 在长度上重合 0.3cm ,在靠近真菌毒素偶联抗原一端依次贴上量子点抗体标记物固定垫 (2) 和样品垫 (1),量子点抗体标记物固定垫 (2) 与硝酸纤维素膜 (3) 在长度上重合 0.2cm ,样品垫 (1) 与量子点抗体标记物固定垫 (2) 长度方向上重合 0.2cm ,最后将 PVC 背板及其贴附的材料切成 4mm 宽层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

[0043] 当加入被检测样品时,位于量子点抗体标记物固定垫 (2) 上的量子点抗体复合物通过层析作用与样品混匀后向吸收垫一端移动,当样品中的两种待检真菌毒素超标时 ($\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$),可将抗体量子点复合物完全结合,使得没有多余的量子点-真菌毒素单克隆抗体复合物与检测线-1 (5) 和检测线-2 (6) 上的偶联抗原进行结合,此时在紫外灯照下,检测线-1 (5) 和检测线-2 (6) 没有荧光,呈阳性反应,表明待检物质超标。如果有荧光,判定为被检测样品呈阴性,表明待检物质含量在允许的范围。无论待检样品中的两种待检物质含量是否超标,抗体量子点复合物都会移动到质控线 (7) 处,与山羊抗鼠抗体结合,紫外照射下显示荧光条带,提示该检测系统有效;如果该处没有显示荧光条带,表明该检测系统失效,检测结果无效。若判定为阳性,可配置不同浓度的两种真菌毒素标准品,读取检测线与质控线荧光值,计算检测线/质控线的荧光比值,以真菌毒素标准品浓度对数为横坐标,以相对应的荧光比值为纵坐标建立标准曲线,对样本中真菌毒素的浓度进行定量分析。

[0044] 应用双重定量量子点荧光免疫层析试纸条对采集的 60 份食物样本进行了检测,并与 ELISA 进口试剂盒检测结果进行了对比 (赭曲霉毒素 A:货号 R1311,黄曲霉毒素 B1:货号 R1211;均购于德国拜发)。定性检测时 (赭曲霉毒素 A 含量 $\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$,黄曲霉毒素 B1 含量 $\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$),赭曲霉毒素 A 阳性样本为 5 个,黄曲霉毒素 B1 阳性样本为 7 个,与试剂盒的符合率达到 100%,且经过定量分析,赭曲霉毒素 A 的含量在 $1.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $4.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,黄曲霉毒素 B1 的含量在 $1.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $4.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,定量检测的灵敏度已达到国家

标准 (5 μ g/kg), 可用于食品中赭曲霉毒素 A 与黄曲霉毒素 B1 的快速定性检测与定量分析。

[0045] 特别说明：

[0046] 虽然本发明的实施例中只列举了竞争原理同时对两种真菌毒素进行定性检测和定量分析。在本发明提供所述基于量子点荧光材料和免疫层析技术的同时检测两种真菌毒素的方法后, 本领域技术人员能够根据其掌握的技能举一反三, 实现检测其他目标物质的目的。

[0047] 以上是结合具体实施例子对本发明所做的进一步描述。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明原理的前提下, 本发明及其应用还会有各种变化和改进, 这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

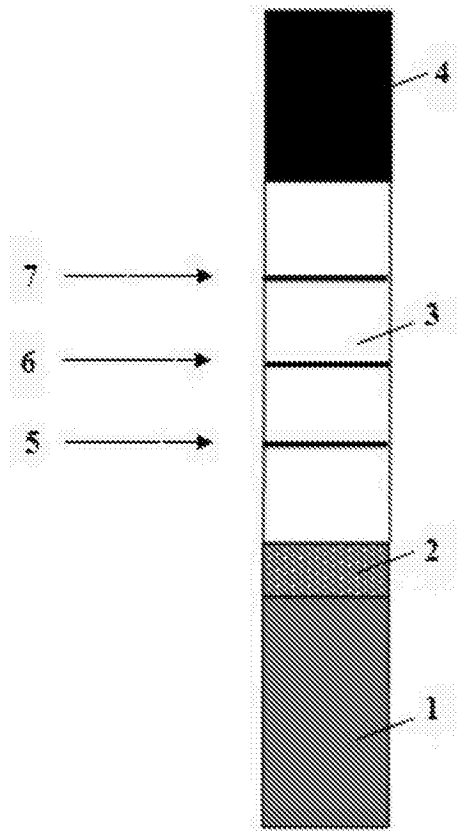


图 1

专利名称(译)	双重定量真菌毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN105044346A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510359684.9	申请日	2015-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	方维焕 章先 李肖梁 谢琿 王歆 孙孟娇		
发明人	方维焕 章先 李肖梁 谢琿 王歆 孙孟娇		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/588 G01N33/533		
代理人(译)	周世骏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫层析技术，旨在提供一种双重定量真菌毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法。该试纸条在聚氯乙烯背板表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫；在硝酸纤维素膜上设有两条检测线和一条质控线；在固定垫上固定有真菌毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物；质控线由山羊抗鼠多克隆抗体喷涂形成，检测线由待检真菌毒素偶联抗原喷涂形成，两条检测线所含真菌毒素偶联抗原是不同的。本发明采用竞争法原理对真菌毒素进行定性检测和定量分析，可同时对两种真菌毒素进行检测，所制备的层析试纸条具有良好的灵敏度和稳定性，且操作简便快捷，特别适用于现场快速诊断。

