



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106018815 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201610297627.7

(22)申请日 2016.05.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106018815 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(73)专利权人 新疆农垦科学院

地址 832000 新疆维吾尔自治区石河子市
乌伊公路221号

专利权人 孙凤霞

(72)发明人 孙凤霞 彭夏雨 康立超 罗瑞峰

卢春霞 罗小玲 向晓黎 李红敏
党富民 罗力力

(74)专利代理机构 重庆博凯知识产权代理有限公司 50212

代理人 张先芸

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 103018467 A,2013.04.03,权利要求1-3,说明书第6-18段,图1和图2.

CN 104730232 A,2015.06.24,权利要求1-9,说明书第3-73段.

CN 101533014 A,2009.09.16,权利要求1-4,说明书第1页倒数第7行至第5页,图1和图2.

US 2005043493 A1,2005.02.24,全文.

Guangyu Shen 等.Improvement of antibody immobilization using hyperbranched polymer and protein A.《Analytical Biochemistry》.2010,第409卷22-27.

孙凤霞 等.超支化聚合物合成方法概述.《热固性树脂》.2015,第30卷(第3期),49-54.

Zhanlong Mei 等.Immunochromatographic lateral flow strip for on-site detection of bisphenol A.《Microchim Acta》.2012,第180卷279-285.

审查员 周洋

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

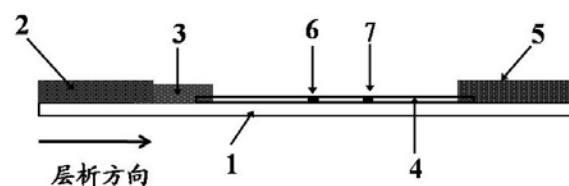
(54)发明名称

基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法,属于免疫学检测技术领域。本发明试纸条由样品垫、金标垫、包被膜和吸水膜依次粘贴组合到PVC底板上,其中,金标垫上涂覆有超支化纳米复合物增敏探针,包被膜上具有检测线和质控线,检测线上包被有双酚A包被抗原,质控线上包被有羊抗鼠IgG。本发明试纸条的制备方法包括超支化纳米复合物增敏探针的制备、金标垫的制备、包被膜的制备以及试纸条的组装等。本发明试纸条利用超支化金标抗体增敏探针代替常规的金标抗体,极大提高检测灵敏度,且操作简单、

检测速度快,不需要专用仪器设备,成本低廉,非常适合于基层检验检疫工作中大批量样品中双酚A的快速检测。



1. 一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法,其特征在于具体制备步骤如下:

(1) 超支化纳米复合物增敏探针的制备

取浓度为1mg/mL的抗双酚A单克隆抗体溶液5mL和4mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于1mL DMF中,加入5mg 碳二亚胺(EDC),室温下搅拌反应过夜,离心去沉淀,收集上清液,得到活化后的抗体溶液;

取粒径为10-15nm的胶体金溶液,用0.1M的 K_2CO_3 调节胶体金溶液的pH值为8.0-9.0,得到胶体金溶液;

取具有氨基/巯基双功能团的超支化聚合物0.5-1 mg溶解于5mL 0.01M的PBS溶液中,在冰水浴下,将活化后的抗体溶液缓慢滴加到超支化聚合物溶液中,4℃反应过夜,得到超支化-抗体复合物溶液;

将1mL胶体金溶液稀释到5mL纯水中,在氮气保护下,逐滴滴加到超支化-抗体复合物溶液中,磁力搅拌下室温反应12h,再逐滴加入1%的BSA溶液继续搅拌30min,10000rpm 4℃离心30min,弃上清,用纯水洗涤沉淀物,离心洗涤并重复3次后将沉淀用PBS缓冲液重悬,得到超支化金标抗体免疫复合物,使得氨基/巯基双功能团超支化聚合物,通过氨基与抗体偶联,通过巯基与金纳米粒子偶联;

(2) 超支化纳米复合物增敏探针金标垫的制备

将超支化金标抗体免疫复合物均匀的喷涂到玻璃纤维膜上,喷液量为0.7uL/cm,得到超支化纳米复合物增敏探针金标结合垫;

(3) 包被膜的制备

将浓度为1mg/mL的双酚A-牛血清白蛋白偶联物溶液均匀的喷涂到硝酸纤维素膜上,得到检测线;将浓度为0.5-1mg/mL的羊抗鼠IgG溶液均匀的喷涂到硝酸纤维素膜上,得到质控线;

(4) 基于超支化纳米复合物增敏探针免疫层析金标试纸条的制备

将样品垫、超支化纳米复合物金标结合垫、具有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴组合到PVC底板上,相邻粘贴物之间的重叠部分长度为2mm,用切割机切成3mm宽的试纸条,得到基于超支化纳米复合物的增敏型双酚A免疫层析金标试纸条,与干燥剂一起装于铝箔袋中密封保存。

基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 双酚A (BPA) 是合成聚碳酸酯、环氧树脂等多种高分子材料的重要单体,广泛用于食品和饮料的包装材料、纸杯及塑料薄膜等生产中。研究表明,双酚A 是一种重要的环境内分泌干扰物,其通过食品原材料和食品包装等可进入到食品中,通过食物链进入人体并在体内蓄积,可以诱发癌症、导致生殖功能障碍、儿童性早熟等,对人体危害极大。为保障食品安全,欧盟规定双酚A在食品接触材料的迁移限量为 $3\mu\text{g/g}$,我国规定双酚A的人体每日摄入量不能超过 $0.05\text{ }\mu\text{g/g}$ 。因此,食品中双酚A含量及分析方法的研究成为食品安全领域关注热点。

[0003] 目前双酚A检测方法主要有液相色谱法、气相色谱法、色谱联用法、电化学分析法、化学发光法、酶联免疫法等,这些方法对样品前处理要求高、设备昂贵、且操作过程会附加产生危害人体健康的问题。金标免疫层析法正好可以避免这些弊端,不需要专用仪器,只需要插入、比对即可,具有快速、低成本,操作简单易行,能满足绝大部分食品样品的检测,非常适用于大量样品的初筛。由于双酚A在食品和环境中的痕量存在,常规的胶体金免疫层析法的灵敏度较低,难以实现痕量双酚A的快速分析。同时,随着政府监管体系的完善和检测力度的加强,食品中双酚A污染会越来越少,这对胶体金免疫层析法的灵敏度提出了更高的要求。

[0004] 对于免疫分析法而言,抗原抗体的亲和力往往决定了检测下限,在获得抗原抗体后,其本身的亲和力是固定的,要大幅度的提高检测灵敏度,只能从标记物入手,而如何提高生物分子或标记物的固定量来实现信号放大是其中的关键问题。

[0005] 超支化聚合物 (HBPs) 正是解决这一问题的完美材料。与其他载体分子相比,超支化聚合物具有树枝状三维立体构造,结构末端有大量的官能团[22],经过表面修饰可以承载大量信号分子,而且其分子内部存在着较大的孔腔,能以包埋的方式固定很多分子,使信号分子的承载量大大提高,同时具有良好的物理化学稳定性。因此,将超支化聚合物应用于分析化学领域已成为近年来的研究热点。

发明内容

[0006] 本发明针对常规胶体金免疫层析试纸灵敏度低难以实现痕量双酚A的检测要求,利用双功能团超支化聚合物作为载体,将超支化聚合物、金纳米粒子和抗体三者组装,制备超支化纳米复合物,并作为增敏探针应用于免疫层析金标试纸中,实现食品中痕量双酚A超灵敏快速检测。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条包括PVC 底板，在PVC底板上依次设置有样品玻璃纤维膜，超支化免疫探针金标垫，硝酸纤维素膜和吸水玻璃纤维膜四种粘贴物；所述相邻粘贴物之间相互连接叠放；所述硝酸纤维素膜上依次设置有检测线和质控线。

[0009] 所述超支化免疫探针金标垫包被有超支化金纳米复合物标记抗双酚A抗体。所述检测线上包被有双酚A包被原。所述质控线上包被有羊抗鼠IgG。

[0010] 所述基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法的具体制备操作步骤如下：

[0011] (1) 超支化纳米复合物增敏探针的制备

[0012] 取本实验室制备并纯化的抗双酚A单克隆抗体，用5mM pH7.0的NaCl缓冲液透析，8000rpm离心20min，取上清得到抗体溶液，并调节浓度为1-2mg/mL；取抗体溶液5mL和4mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于1mLDMF中，加入5mg 碳二亚胺(EDC)，室温下搅拌反应过夜，离心去沉淀，收集上清液，得到活化后的抗体溶液。

[0013] 采用柠檬酸钠还原法制备粒径为10-15nm的胶体金溶液，用0.1M的K₂CO₃调节胶体金溶液的pH值为8.0-9.0，得到胶体金溶液。

[0014] 取具有氨基/巯基双功能团的超支化聚合物0.5-1mg溶解于5mL 0.01M的 PBS溶液中，在冰水浴下，将活化后的抗体溶液缓慢滴加到超支化聚合物溶液中，4℃反应过夜，得到超支化-抗体复合物溶液。

[0015] 将1mL胶体金溶液稀释到5mL纯水中，在氮气保护下，逐滴滴加到超支化-抗体复合物溶液中，磁力搅拌下室温反应12h后，再逐滴加入1%的BSA溶液继续搅拌30min，10000rpm 4℃离心30min，弃上清，用纯水洗涤沉淀物，离心洗涤并重复3次后将沉淀用PBS缓冲液重悬，得到超支化金标抗体免疫复合物。

[0016] (2) 超支化纳米复合物增敏探针金标垫的制备

[0017] 用三维平面点膜喷金仪将上述制备的超支化金标抗体免疫复合物均匀的喷涂到玻璃纤维膜上，喷液量为0.7uL/cm，置于37℃烘干后封装备用。

[0018] (3) 包被膜的制备

[0019] 用三维平面点膜喷金仪将浓度为1mg/mL的双酚A-牛血清白蛋白偶联物溶液均匀的喷涂到硝酸纤维素膜上，得到检测线；将浓度为0.5-1mg/mL的羊抗鼠 IgG溶液均匀的喷涂到硝酸纤维素膜上，得到质控线。

[0020] (4) 基于超支化纳米复合物的增敏型免疫层析金标试纸条的制备

[0021] 将样品玻璃纤维膜、超支化纳米复合物金标结合垫、具有检测线和质控线的硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴组合到PVC底板上，相邻粘贴物之间的重叠部分长度为2mm，用切割机切成3mm宽的试纸条，得到基于超支化纳米复合物的增敏型双酚A免疫层析金标试纸条，与干燥剂一起装于铝箔袋中密封保存备用。

[0022] 本发明试纸条的工作原理：利用氨基/巯基双功能团超支化聚合物做为载体，首先利用其上的氨基，通过活性酯法和抗体偶联；再利用超支化聚合物上的巯基，通过金硫键自组装可大量偶联金纳米粒子。与常规胶体金免疫层析试纸条相比，当目标物浓度极低时，在检测线上富集的超支化金标抗体免疫复合物含有更多的金纳米粒子，其沉淀线显色也会更深，根据间接竞争检测原理，可实现常规试纸条更低浓度的目标物的超灵敏检测，显著提高

试纸条检测方法的灵敏度。

[0023] 本发明的有益效果体现在以下方面：

[0024] (1) 本发明针对常规胶体金免疫层析试纸条灵敏度低难以应对痕量双酚A 现场快速分析的实际难题,利用氨基/巯基双功能团的超支化聚合物外围的巯基可大量偶联胶体金的特点,制备超支化金标抗体增敏探针代替常规的金标抗体,建立了基于超支化金标抗体复合物的信号增强型胶体金试纸条,当双酚A浓度极低时也可使检测线显色,实现对双酚A的快速高灵敏检测,最低检测限为0.5 ng/mL;

[0025] (2) 本发明提供了一种通用的增敏型胶体金免疫层析试纸检测方法,只需要将双酚A抗体替换为其他目标物的抗体,即可实现其他痕量目标物的快速高灵敏检测;

[0026] (3) 本发明操作简单,检测速度快,不需要专用仪器设备,成本低,非常适合于基层检验检疫工作中大批量样品的现场快速初筛。

附图说明

[0027] 图1本发明试纸条的组成结构示意图。

[0028] 图2本发明试纸条的检测结果示意图。

[0029] 附图中序号说明:1:PVC底板;2:样品玻璃纤维膜;3:超支化增敏探针金标垫;4:硝酸纤维素膜;5:吸水玻璃纤维膜;6:检测线;7:质控线。

具体实施方式

[0030] 为更好的理解本发明,下面结合具体的实施例来进一步阐明,应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0031] 实施例1

[0032] 如图1所示,一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条,其中序号1为PVC底板,其两端分别设有样品玻璃纤维膜2和吸水玻璃纤维膜5;在PVC底板的中部设置有硝酸纤维素膜检测层4,其上有检测线6 和质控线7;在硝酸纤维素膜检测层4和样品玻璃纤维膜2之间设置有金标垫3。

[0033] 所述金标垫3上包被有超支化金标抗体复合物增敏探针。所述检测线6上包被有抗双酚A抗体。所述质控线7上包被有羊抗鼠IgG。

[0034] 实施例2

[0035] 一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法具体操作步骤如下:

[0036] (1) 超支化纳米复合物增敏探针的制备

[0037] 取浓度为1mg/mL的抗双酚A单克隆抗体溶液5mL和4mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于1mL DMF中,加入5mg碳二亚胺(EDC),室温下搅拌反应过夜,离心去沉淀,收集上清液,得到活化后的抗体溶液。

[0038] 取粒径为15nm的胶体金溶液,用0.1M的K₂CO₃调节胶体金溶液的pH值为8.5,得到胶体金溶液。

[0039] 取具有氨基/巯基双功能团的超支化聚合物0.8mg溶解于5mL 0.01M的PBS 溶液中,在冰水浴下,将活化后的抗体溶液缓慢滴加到超支化聚合物溶液中,4℃反应过夜,得到

超支化-抗体复合物溶液。

[0040] 将1mL胶体金溶液稀释到5mL纯水中,在氮气保护下,逐滴滴加到超支化-抗体复合物溶液中,磁力搅拌下室温反应12h后,再逐滴加入1%的BSA溶液继续搅拌30min,10000rpm 4℃离心30min,弃上清,用纯水洗涤沉淀物,离心洗涤并重复3次后将沉淀用PBS缓冲液重悬,得到超支化-抗体-金粒子复合物,即超支化纳米复合物增敏探针。

[0041] (2) 超支化纳米复合物增敏探针金标垫的制备

[0042] 用三维平面点膜喷金仪将上述制备的超支化纳米复合物增敏探针均匀的喷涂到玻璃纤维膜上,喷液量为0.7uL/cm,置于37℃烘干后得到超支化纳米复合物增敏探针金标垫,封装备用。

[0043] (3) 具有检测线和质控线的硝酸纤维膜的制备

[0044] 用三维平面点膜喷金仪将浓度为1mg/mL的双酚A-牛血清白蛋白偶联物溶液均匀的喷涂到硝酸纤维素膜上,得到检测线;将浓度为1mg/mL的羊抗鼠IgG 溶液均匀的喷涂到硝酸纤维素膜上,得到质控线。

[0045] (4) 基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备

[0046] 参见图1,将样品玻璃纤维膜2、超支化纳米复合物金标结合垫3、具有检测线6和质控线7的硝酸纤维素膜4和吸水垫5依次粘贴组合到PVC底板1上,相邻粘贴物之间的重叠部分长度为2mm,用切割机切成3mm宽的试纸条,得到基于超支化纳米复合物的增敏型双酚A免疫层析金标试纸条,与干燥剂一起装于铝箔袋中密封保存备用。

[0047] 本发明试纸条采用胶体金免疫层析技术,利用间接竞争法原理检测样品中是否含有双酚A,检测结果判断标准参见图2。具体使用时,将制备好的金标试纸条取出,其样品玻璃纤维膜端插入到待测样品溶液中,等待10min后取出用肉眼进行观察。试纸条上检测线6显色程度和待测样品中双酚A浓度呈反比,检测线6显色越浅,则说明双酚A浓度越高。

[0048] 当试纸条上检测线6不显色,只有质控线7显色时,说明待测样品为阳性,样品中双酚A浓度大于0.5ng/mL;当试纸条上质控线7显色,而检测线6显色较浅时,说明待测样品为弱阳性,样品中双酚A浓度小于0.5ng/mL;当试纸条上质控线7和检测线6均显色时,说明待测样品中不含有双酚A,待测样品为阴性;如果试纸条上质控线7和检测线6均不显色,则试纸条出现质量问题,检测结果无效。

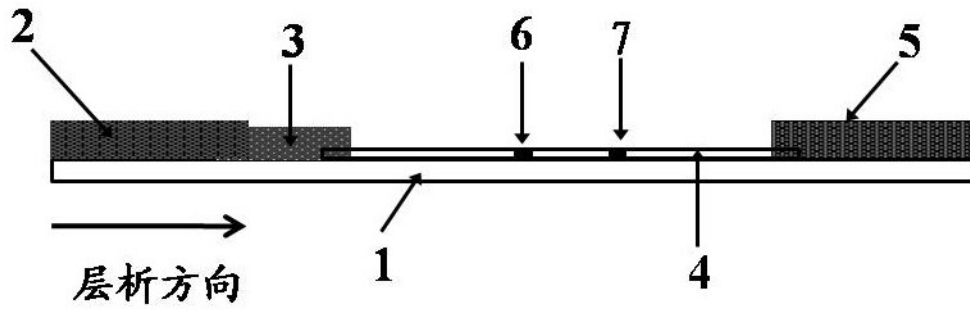


图1

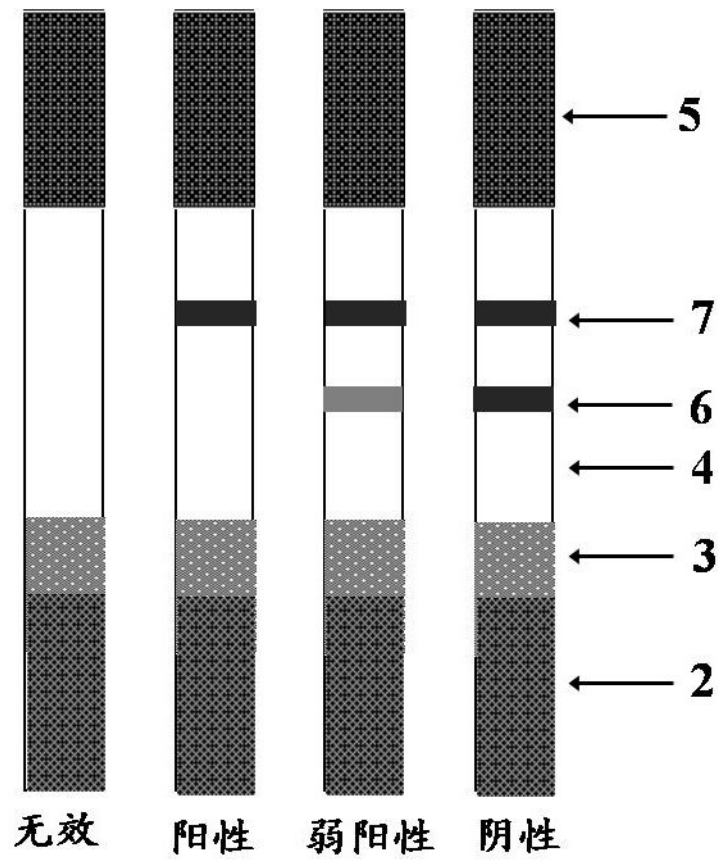


图2

专利名称(译)	基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN106018815B	公开(公告)日	2018-10-16
申请号	CN201610297627.7	申请日	2016-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	新疆农垦科学院 孙凤霞		
申请(专利权)人(译)	新疆农垦科学院 孙凤霞		
当前申请(专利权)人(译)	新疆农垦科学院 孙凤霞		
[标]发明人	孙凤霞 彭夏雨 康立超 罗瑞峰 卢春霞 罗小玲 向晓黎 李红敏 党富民 罗力力		
发明人	孙凤霞 彭夏雨 康立超 罗瑞峰 卢春霞 罗小玲 向晓黎 李红敏 党富民 罗力力		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/577		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN106018815A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于超支化纳米复合物的双酚A增敏型免疫层析金标试纸条的制备方法，属于免疫学检测技术领域。本发明试纸条由样品垫、金标垫、包被膜和吸水膜依次粘贴组合到PVC底板上，其中，金标垫上涂覆有超支化纳米复合物增敏探针，包被膜上具有检测线和质控线，检测线上包被有双酚A包被抗原，质控线上包被有羊抗鼠IgG。本发明试纸条的制备方法包括超支化纳米复合物增敏探针的制备、金标垫的制备、包被膜的制备以及试纸条的组装等。本发明试纸条利用超支化金标抗体增敏探针代替常规的金标抗体，极大提高检测灵敏度，且操作简单、检测速度快，不需要专用仪器设备，成本低廉，非常适合于基层检验检疫工作中大批量样品中双酚A的快速检测。

