



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106018794 B

(45)授权公告日 2017.08.04

(21)申请号 201610415407.X

(22)申请日 2016.06.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106018794 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(73)专利权人 焦作百奥泰科生物科技有限公司

地址 454950 河南省焦作市武陟县三阳乡
(詹泗路)大聂村段南侧

(72)发明人 职爱民 贾国超 张培蕾 李镁娟
王自良 宋莲军 邱国庆

(74)专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所
(普通合伙) 41122

代理人 张爱军

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

CN 103454423 A,2013.12.18,

CN 204439557 U,2015.07.01,

CN 103525413 A,2014.01.22,

CN 102435731 A,2012.05.02,

CN 101915830 A,2010.12.15,

CN 105242047 A,2016.01.13,

CN 202814980 U,2013.03.20,

CN 105044346 A,2015.11.11,

CN 104059669 A,2014.09.24,

CN 102798720 A,2012.11.28,

梅青松.荧光氧化石墨烯的制备及其在生物传感器中的应用.《中国博士学位论文全文数据库》.2013,

陈欢等.水溶性 NaYF₄:Yb /Tm 纳米粒子的制备及其上转换发光性质.《发光学报》.2010,第31卷(第4期),

顾婉娜等.下转换发光粉体材料NaGd (WO₄)₂:Eu³⁺的制备及荧光性能研究.《当代化工》.2013,第42卷(第2期),

审查员 舒霏霏

权利要求书3页 说明书14页 附图3页

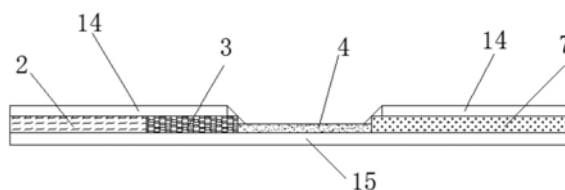
(54)发明名称

一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸

(57)摘要

本发明公开了一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,包括支撑体和固定在支撑体上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及吸水材料层,所述的纤维素膜层上设有用偶联T-2的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹和用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹;所述的荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成,荧光抗体为氧化石墨烯荧光纳米材料、NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒或NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。本发明的试纸条具有特异性强、灵敏度高、稳定性高、安全性好、简便、快速的特点,在便携式荧光读数仪下可实现现场定量检测,能满足不

同层次人员的需要。



1. 一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,包括支撑体和固定在支撑体上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层(2)、荧光抗体纤维层(3)、纤维素膜层(4)及吸水材料层(7),其特征在于,所述的纤维素膜层上设有用偶联T-2的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹(5)和用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹(6);所述的荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成,荧光抗体为氧化石墨烯荧光纳米材料、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 纳米颗粒或 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体;

所述的支撑体包括透明的中空管体(1),吸附层填充在中空管体内部,吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及吸水材料层;

所述的中空管体(1)的上端装有连接头(8),连接头(8)上端设置有辅助吸附装置,所述的辅助吸附装置包括与所述连接头呈密封连接的连接套(13)和设置在所述连接套上部的气囊(12),气囊(12)的出气口依次经连接套(13)上部的进气通道(132)、连接头(8)的内腔(9)与中空管体(1)的上口部相连通,进气通道所在的连接套侧壁上设置有只能向外排气无法向内吸气的单向出气装置(11);

所述的单向出气装置包括设置在进气通道所在的连接套侧壁的换气腔(111),换气腔(111)内设置有圆球形的密封球(113),换气腔(111)的底面上开有与密封球相对应的第一出气口(114),第一出气口经出气通道(115)与进气通道(132)相连通,换气腔(111)侧面设置有与外界大气相连通的第二出气口(112),构成只能向外排气、无法向进气通道吸气的单向出气结构。

2. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的支撑体包括设置在吸附层底面的底层(15)和设置在吸附层顶面的面层(14)。

3. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的第一出气口(114)为圆形,其直径小于密封球的直径。

4. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的连接头(8)为上下开口的中空结构,其下端与中空管体(1)的上端呈密封连接,连接头上部的外壁上设置有外螺纹,连接套(13)的下部设置有与连接头相对应的盲孔(131),盲孔(131)内壁上设置有与外螺纹相对应的内螺纹,连接头通过外螺纹和内螺纹旋装在连接套下部的盲孔(131)内,连接头的顶部与盲孔顶部之间在连接套上设置有防止漏气的密封圈(10)。

5. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的隐形检测印迹(5)和隐形对照印迹(6)呈相间设置在纤维素膜层(4)的表面,间距为5-15mm;

所述的中空管体(1)的内腔为长方形。

6. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

(1) 氧化石墨烯荧光材料修饰:

取20mg氧化石墨烯磨碎,加入到5mL DMF中,超声混匀后,加入20mL二氯亚砷,80℃下加热回流48h后离心,得到中间体酰氯化氧化石墨烯,用四氢呋喃洗涤两次后,干燥;再在抽真空氮气保护的条件下,将酰氯化氧化石墨烯和1mL正丁胺混合,60℃反应72h,冷却至室温,得到烷基胺修饰的氧化石墨烯,分散于20mL双蒸水中,8000r/min离心,除去未反应的正丁胺,将剩余的反应液通过旋转蒸发仪蒸干,蒸干后的干物质重新分散在双蒸水中,配制成浓度

为1mg/mL的修饰的氧化石墨烯荧光材料水溶液；

(2) 表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液的制备：

(a) 将100mg硝酸银溶解于250mL超纯水中，加热沸腾，加入10mL质量分数1%的柠檬酸钠溶液，80℃加热回流1h后搅拌0.5h，4℃条件下过夜；取1mL过夜后的溶液，加入1mM的巯基乙酸10μL，搅拌24h后离心，除去未反应的巯基乙酸，超纯水洗涤3次，用旋转蒸发仪蒸干，加超纯水配制成浓度为1mg/mL巯基乙酸包覆的银纳米颗粒溶液；

(b) 取0.1mM的EDC 10μL和0.1mM的NHS 10μL，逐步加入到1mL巯基乙酸包覆的银纳米颗粒溶液中，反应1h，得到羧基活化的银纳米颗粒溶液；

(c) 取0.1mM的T-2单克隆抗体或多克隆抗体20μL，加入到羧基活化的银纳米颗粒溶液中，4℃反应过夜，得到表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液；

(3) 氧化石墨烯荧光纳米材料T-2抗体的标记：

取修饰的氧化石墨烯荧光材料水溶液5mL，加入2mL戊二醛，室温反应3h，离心，除去未反应的戊二醛，将剩余的反应液分散在0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲溶液中，加入表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液，4℃反应3h，经离心，收集氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体，0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液洗涤，保存备用。

7. 根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸，其特征在于，所述的NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

(1) 采用水热合成法制备NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒：

分别取浓度均为0.5mol/L的Y(NO₃)₃溶液5.5mL、Yb(NO₃)₃溶液0.5mL和Tm(NO₃)₃溶液0.5mL，混合均匀，再加入0.4mol/L的柠檬酸钠溶液2mL，25℃条件下避光充分反应1h；加入1.5mol/L NH₄F溶液7mL，25℃条件下避光搅拌0.5h，用HNO₃调节pH值至7.4，静置0.5h，加双蒸水稀释至30mL；再在220℃下反应24h，冷却到室温，经过滤、双蒸水洗涤、干燥，得到发蓝色光的NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒；

(2) 荧光纳米颗粒的表面硅化：

将NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒加入0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液中，配制成浓度为1mg/mL的NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒溶液，再将5mL浓氨水滴入5mL NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒溶液中，充分搅拌反应20min，再加入2.5mL正硅酸四乙酯，4℃避光条件下反应4h；6000r/min离心10min，得到表面硅化的荧光纳米颗粒，用乙醇洗涤4次，分散在甲醇中，配制成浓度为10mg/mL的荧光纳米颗粒甲醇溶液；

(3) 荧光纳米颗粒的表面氨基化：

取3mL荧光纳米颗粒甲醇溶液，加入5mL的丙酮，密封后磁力搅拌20min，再用超声波均匀分散，加入3μL的APTSA，密封后在40℃反应30min，再在70℃水浴反应1h，6000r/min离心5min，得到表面氨基化的荧光纳米颗粒，用乙醇反复洗涤4次，真空干燥后，4℃密封保存；

(4) T-2抗体的标记：

用0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲溶液将表面氨基化的荧光纳米颗粒溶解，配制成浓度为10mg/mL的表面氨基化的荧光纳米颗粒溶液；取10mL表面氨基化的荧光纳米颗粒溶液与5.6mg NHS和15mg EDC混合，室温避光反应3h，6000r/min离心5min，取上清液；将1mg/mL的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体加入上清液中，T-2单克隆抗体或者多克隆抗体和上清液的体积比为1:100，4℃避光反应4h，离心，双蒸水洗涤后分散在PBS缓冲溶液中，4℃条件下透

析3d,离心,收集沉淀,得到NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或多克隆抗体,置于PBS缓冲溶液中,4℃保存。

8.根据权利要求1所述的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,其特征在于,所述的NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

(1)采用水热合成法制备NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒

称取7g Gd₂O₃和7g Eu₂O₃,分别加入至50mL的HNO₃中,加热至80℃,保温浓缩至全部结晶,制得Gd(NO₃)₃和Eu(NO₃)₃;将Na₂WO₄·2H₂O溶于去离子水中,配制成浓度为0.2mol/L的Na₂WO₄溶液;将制得的Gd(NO₃)₃和Eu(NO₃)₃用去离子水溶解,分别制备质量分数为80%的Gd(NO₃)₃溶液和质量分数为15%的Eu(NO₃)₃溶液,吸取配制的5mL Gd(NO₃)₃溶液、10mL Na₂WO₄溶液和5mL Eu(NO₃)₃溶液,加入到反应釜中,用稀硝酸、氢氧化钠调节pH=5,搅拌均匀,封闭反应釜,200℃恒温加热24h后,自然降至室温;将反应釜中溶液倒出静置,待溶液中粉体沉淀后,去除上清液,用蒸馏水洗涤粉体3次,每次静置3h;将洗好的粉体加热至80℃干燥12h,得到NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒;

(2) T-2抗体的标记

将T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液10000r/min离心30min,除去杂质;用去离子水溶解NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒,配制成浓度为0.1mg/mL的NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒溶液,然后用0.1mol/L K₂CO₃溶液调节NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒溶液至pH 8.2;

取10mL NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒溶液,在搅拌状态下,加入T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液100μl,T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液浓度1mg/mL,混匀,室温温育30min,4℃、10000r/min离心30min,弃上清,将沉淀用0.02mol/L Na₂B₄O₇溶液稀释至10mL,10000r/min离心30min,沉淀用0.02mol/L Na₂B₄O₇溶液稀释至1mL,4℃保存备用。

一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析试纸,特别是涉及一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸。

背景技术

[0002] T-2毒素(T-2toxin,称T-2)是单端孢霉烯族毒素之一,主要产生菌是镰孢菌属,如拟枝孢镰刀菌(*Fusariumsporotrich-oides*)、枝孢镰刀菌(*Fusariumspor otrichiella*)等。T-2毒素作为一种常见的真菌毒素,在自然界中广泛存在,主要污染小麦、大麦、玉米等粮食作物及其制品,对人类健康及畜牧业构成了较大危害。T-2毒素可引起机体过氧化损伤,动物实验表明,其毒性因使用剂量分为急性、亚急性和慢性。T-2毒素还具有致畸性和弱的致癌性,但不具有致突变性。T-2毒素中毒后的一般临床症状为厌食、呕吐、腹泻、生长停滞、繁殖和神经机能障碍等。此外,T-2毒素可能还与我国某些地区大骨节病、食管癌和克山病的高发病率有关。1997年联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)在日内瓦召开的联席会议上,把T-2毒素同黄曲霉毒素一起作为自然存在的最危险的食物污染源。因此针对T-2开展有效的快速检测很有意义。目前,用于T-2的检测方法主要有生物鉴定法、化学分析法、仪器分析法和免疫分析法4大类。生物鉴定法的优点是待检样品不需很纯,缺点是灵敏度低、实验周期较长。化学分析法的优点是经济实用,但不能准确定量,且分析结果的可重复性和再现性差。仪器分析法具有高分离、高检测效能及快速分析能力等优势,但对样品的前处理要求高,对操作人员技术要求高,且仪器设备价格昂贵,不适于快速检测。免疫分析法操作简单,成本低,而且具有较好的准确性和灵敏性,同时能进行定性和半定量或一定定量的检测,适合于对大量样品的筛查,是目前优先发展的检测技术。

[0003] 未修饰的氧化石墨烯表现出很弱的荧光,在紫外光照射下用肉眼基本上观察不到荧光。这是由于氧化石墨烯纳米片表面有很多含氧基团,例如纳米片表面上的环氧键和羟基,纳米片侧面的羧基,这些基团通常能诱导电子-空穴对的非辐射复合,从而导致氧化石墨烯的荧光很弱。经过正丁胺修饰以后,氧化石墨烯纳米片表面的环氧键和羧基都被反应掉,这将极大地降低其非辐射复合能力。因此修饰后,氧化石墨烯表现出很强的荧光可作为新型标记物在生物检测领域应用。虽然胶体金试纸在此方面应用较广,但其不能做到定量检测,作为更敏感、稳定、灵活、安全的氧化石墨烯荧光层析试纸的研究,是胶体金免疫检测技术的有力补充,亟待加强该方面的研究和探讨。

[0004] 上转换荧光纳米颗粒经过表面修饰与活化后,作为新型标记物在生物检测等领域进行应用。因其独特的物理结构和光学特性,使上转换荧光免疫试纸法与理化检测与微生物检测技术相比,具有灵敏度高,操作过程简单,成本低及能进行大批量现场检测的特点;与胶体金试纸相比,具备定量检测的特色,作为更敏感、稳定、灵活、安全的UPT-LF的研究,是胶体金免疫检测技术的有力补充。但是目前上转换荧光材料的制备和试纸的研究仍存在发光效率不够,荧光材料种类少等缺陷,亟待加强该方面的研究和探讨。

[0005] 下转换荧光纳米颗粒具有高灵敏度,是一种完全惰性的无机发光材料,具有独特

物理结构和光学特性,可作为新型标记物应用在生物检测领域。将其与生物学、免疫学、材料学相结合而开发的用于T-2快速检测的下转换荧光纳米颗粒标记免疫层析方法,在灵敏、稳定、灵活方面显示了优异的特性,是胶体金免疫检测技术的有利补充,亟待加强该方面的研究和探讨。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,该试纸具有特异、灵敏、快速、简便等特点,能定量检测食品、饲料、中草药中的T-2毒素。

[0007] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0008] 一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,包括支撑体和固定在支撑体上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及吸水材料层,所述的纤维素膜层上设有用偶联T-2的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹和用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹;所述的荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成,荧光抗体为氧化石墨烯荧光纳米材料、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 纳米颗粒或 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0009] 所述的支撑体包括设置在吸附层底面的底层和设置在吸附层顶面的面层。

[0010] 所述的支撑体包括透明的中空管体,吸附层填充在中空管体内部,吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及吸水材料层。

[0011] 所述的中空管体的上端装有连接头,连接头上端设置有辅助吸附装置,所述的辅助吸附装置包括与所述连接头呈密封连接的连接套和设置在所述连接套上部的气囊,气囊的出气口依次经连接套上部的进气通道、连接头的内腔与中空管体的上口部相连通,进气通道所在的连接套侧壁上设置有只能向外排气无法向内吸气的单向出气装置。

[0012] 所述的单向出气装置包括设置在进气通道所在的连接套侧壁的换气腔,换气腔内设置有圆球形的密封球,换气腔的底面上开有与密封球相对应的第一出气口,第一出气口经出气通道与进气通道相连通,换气腔侧面设置有与外界大气相连通的第二出气口,构成只能向外排气、无法向进气通道吸气的单向出气结构。

[0013] 所述的第一出气口为圆形,其直径小于密封球的直径。

[0014] 所述的连接头为上下开口的中空结构,其下端与中空管体的上端呈密封连接,连接头上部的外壁上设置有外螺纹,连接套的下部设置有与连接头相对应的盲孔,盲孔内壁上设置有与外螺纹相对应的内螺纹,连接头通过外螺纹和内螺纹旋装在连接套下部的盲孔内,连接头的顶部与盲孔顶部之间在连接套上设置有防止漏气的密封圈。

[0015] 所述的隐形检测印迹和隐形对照印迹呈相间设置在纤维素膜层的表面,间距为5-15mm。

[0016] 所述的中空管体的内腔为长方形。

[0017] 所述的氧化石墨烯荧光纳米材料是一种以氧化石墨烯为基质通过酰氯化反应和烷基胺来修饰后,用银纳米颗粒进行表征后得到的荧光纳米材料。

[0018] 所述的氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 氧化石墨烯荧光材料修饰:

[0020] 取20mg氧化石墨磨碎,加入到5mL DMF中,超声混匀后,加入20mL二氯亚砷,80℃下加热回流48h后离心,得到中间体酰氯化氧化石墨烯,用四氢呋喃洗涤两次后,干燥;再在抽真空氮气保护的条件下,将酰氯化氧化石墨烯和1mL正丁胺混合,60℃反应72h,冷却至室温,得到烷基胺修饰的氧化石墨烯,分散于20mL双蒸水中,8000r/min离心,除去未反应的正丁胺,将剩余的反应液通过旋转蒸发仪蒸干,蒸干后的干物质重新分散在双蒸水中,配制成浓度为1mg/mL的修饰的氧化石墨烯荧光材料水溶液;

[0021] (2) 表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液的制备:

[0022] (a) 将100mg硝酸银溶解于250mL超纯水中,加热沸腾,加入10mL质量分数1%的柠檬酸钠溶液,80℃加热回流1h后搅拌0.5h,4℃条件下过夜;取1mL过夜后的溶液,加入1mM的巯基乙酸10μL,搅拌24h后离心,除去未反应的巯基乙酸,超纯水洗涤3次,用旋转蒸发仪蒸干,加超纯水配制成浓度为1mg/mL巯基乙酸包覆的银纳米颗粒溶液;

[0023] (b) 取0.1mM的EDC 10μL和0.1mM的NHS 10μL,逐步加入到1mL巯基乙酸包覆的银纳米颗粒溶液中,反应1h,得到羧基活化的银纳米颗粒溶液;

[0024] (c) 取0.1mM的T-2单克隆抗体或多克隆抗体20μL,加入到羧基活化的银纳米颗粒溶液中,4℃反应过夜,得到表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液;

[0025] (3) 氧化石墨烯荧光纳米材料T-2抗体的标记:

[0026] 取修饰的氧化石墨烯荧光材料水溶液5mL,加入2mL戊二醛,室温反应3h,离心,除去未反应的戊二醛,将剩余的反应液分散在0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲溶液中,加入表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液,4℃反应3h,经离心,收集氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体,0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液洗涤,保存备用。

[0027] 所述NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒是以NaYF₄为基质、Yb³⁺为敏化剂,由Yb和Tm共掺杂形成的直径为60~80nm的发蓝色荧光的纳米颗粒。

[0028] 所述的NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0029] (1) 采用水热合成法制备NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒:

[0030] 分别取浓度均为0.5mol/L的Y(NO₃)₃溶液5.5mL、Yb(NO₃)₃溶液0.5mL和Tm(NO₃)₃溶液0.5mL,混合均匀,再加入0.4mol/L的柠檬酸钠溶液2mL,25℃条件下避光充分反应1h;加入1.5mol/L NH₄F溶液7mL,25℃条件下避光搅拌0.5h,用HNO₃调节pH值至7.4,静置0.5h,加双蒸水稀释至30mL;再在220℃下反应24h,冷却到室温,经过滤、双蒸水洗涤、干燥,得到发蓝色光的NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒;

[0031] (2) 荧光纳米颗粒的表面硅化:

[0032] 将NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒加入0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液中,配制成浓度为1mg/mL的NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒溶液,再将5mL浓氨水滴入5mL NaYF₄:Yb,Tm荧光纳米颗粒溶液中,充分搅拌反应20min,再加入2.5mL正硅酸四乙酯,4℃避光条件下反应4h;6000r/min离心10min,得到表面硅化的荧光纳米颗粒,用乙醇洗涤4次,分散在甲醇中,配制成浓度为10mg/mL的荧光纳米颗粒甲醇溶液;

[0033] (3) 荧光纳米颗粒的表面氨基化:

[0034] 取3mL荧光纳米颗粒甲醇溶液,加入5mL的丙酮,密封后磁力搅拌20min,再用超声波均匀分散,加入3μL的APTSA,密封后在40℃反应30min,再在70℃水浴反应1h,6000r/min

离心5min,得到表面氨基化的荧光纳米颗粒,用乙醇反复洗涤4次,真空干燥后,4℃密封保存;

[0035] (4) T-2抗体的标记:

[0036] 用0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲溶液将表面氨基化的荧光纳米颗粒溶解,配制成浓度为10mg/mL的表面氨基化的荧光纳米颗粒溶液;取10mL表面氨基化的荧光纳米颗粒溶液与5.6mg NHS和15mg EDC混合,室温避光反应3h,6000r/min离心5min,取上清液;将1mg/mL的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体加入上清液中,T-2单克隆抗体或者多克隆抗体和上清液的体积比为1:100,4℃避光反应4h,离心,双蒸水洗涤后分散在PBS缓冲溶液中,4℃条件下透析3d,离心,收集沉淀,得到NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或多克隆抗体,置于PBS缓冲溶液中,4℃保存。

[0037] 所述的NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒是以氧化钆(Gd₂O₃)、钨酸钠(Na₂WO₄·2H₂O)为基质,铕离子(Eu³⁺)为敏化剂,在条件反应下形成100~200nm的纳米颗粒。

[0038] 所述的NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0039] (1) 采用水热合成法制备NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒

[0040] 称取7g Gd₂O₃和7g Eu₂O₃,分别加入至50mL的HNO₃中,加热至80℃,保温浓缩至全部结晶,制得Gd(NO₃)₃和Eu(NO₃)₃;将Na₂WO₄·2H₂O溶于去离子水中,配制成浓度为0.2mol/L的Na₂WO₄溶液;将制得的Gd(NO₃)₃和Eu(NO₃)₃用去离子水溶解,分别制备质量分数为80%的Gd(NO₃)₃溶液和质量分数为15%的Eu(NO₃)₃溶液,吸取配制的5mL Gd(NO₃)₃溶液、10mL Na₂WO₄溶液和5mL Eu(NO₃)₃溶液,加入到反应釜中,用稀硝酸、氢氧化钠调节pH=5,搅拌均匀,封闭反应釜,200℃恒温加热24h后,自然降至室温;将反应釜中溶液倒出静置,待溶液中粉体沉淀后,去除上清液,用蒸馏水洗涤粉体3次,每次静置3h;将洗好的粉体加热至80℃干燥12h,得到NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒;

[0041] (2) T-2抗体的标记

[0042] 将T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液10000r/min离心30min,除去杂质;用去离子水溶解NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒,配制成浓度为0.1mg/mL的NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒溶液,然后用0.1mol/L K₂CO₃溶液调节NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒溶液至pH 8.2;

[0043] 取10mL NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒溶液,在搅拌状态下,加入T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液100μl,T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液浓度1mg/mL,混匀,室温温育30min,4℃、10000r/min离心30min,弃上清,将沉淀用0.02mol/L Na₂B₄O₇溶液稀释至10mL,10000r/min离心30min,沉淀用0.02mol/L Na₂B₄O₇溶液稀释至1mL,4℃保存备用。

[0044] 所述的吸附纤维层由玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜制成。

[0045] 所述的吸水材料层由吸水滤纸制成。

[0046] 所述的纤维素膜层由硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜制成。

[0047] 所述的偶联T-2的载体蛋白为牛血清白蛋白、鸡卵清蛋白或血蓝蛋白。

[0048] 所述隐形检测印迹和隐形对照印迹还可以为“十”字型排列印迹、“┐”字型排列印迹、“┌”字型排列印迹、“└”字型排列印迹或“┘”字型排列印迹。

[0049] 所述的面层覆盖在吸附纤维层、荧光抗体纤维层及吸水材料层上,在吸附纤维层与荧光抗体纤维层交界处对应的面层上印制有样品标记线,该样品标记线偏向吸附纤维层

一侧0.3~0.7cm。

[0050] 本发明的试纸条具有特异性强、灵敏度高、稳定性高、安全性好、简便、快速、结果显示形象、直观、适用范围广、携带方便的特点。在便携式荧光读数仪下可实现现场定量检测。能满足不同层次人员的需要,包括专业化验、海关检疫、卫生检疫、质量监测、畜产品加工、养殖户以及消费者个人等。本发明在保障食品安全、保护消费者健康方面具有极其重要的意义,将具有明显的经济效益和社会效益。

附图说明

[0051] 图1为实施例4的试纸的主视图,图中,2为吸附纤维层,3为荧光抗体纤维层,4为纤维素膜层,7为吸水材料层,14为面层,15为底层。

[0052] 图2为实施例4的试纸的俯视图,图中,4为纤维素膜层,5为隐形检测印迹,6为隐形对照印迹,14为面层,15为底层,16为样品标记线。

[0053] 图3为实施例5的试纸的主视图,图中,1为中空管体,2为吸附纤维层,3为荧光抗体纤维层,4为纤维素膜层,5为隐形检测印迹,6为隐形对照印迹,7为吸水材料层,8为连接头,9为连接头的内腔,10为密封圈,11为单向出气装置,12为气囊,13为连接套。

[0054] 图4为图3的A-A向剖视图,图中,1为中空管体,4为纤维素膜层,6为隐形对照印迹。

[0055] 图5为图3中的连接头的主视图,图中,1为中空管体,8为连接头。

[0056] 图6为图3中的连接头的俯视图,图中,8为连接头,9为连接头的内腔。

[0057] 图7为图3中的连接套的剖视图,图中,10为密封圈,12为气囊,13为连接套,111为换气腔,112为第二出气口,113为密封球,114为第一出气口,115为出气通道,131为盲孔,132为进气通道。

具体实施方式

[0058] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0059] 实施例1

[0060] 检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸的制备,主要包括:T-2人工抗原的制备、T-2单克隆抗体或多克隆抗体的制备、氧化石墨烯荧光纳米材料标记T-2抗体的制备、纤维素膜层的制备以及免疫层析试纸的组装等步骤。

[0061] 1、偶联T-2载体蛋白的制备

[0062] 将T-2与载体蛋白进行偶联,制备人工合成抗原。

[0063] (1) T-2毒素中间产物的制备:称取10mg T-2毒素溶解于5mL吡啶中,加入200mg琥珀酸酐,蒸气浴下回流反应3-4h,室温下磁力搅拌过夜,旋转蒸发仪将溶剂旋干,加入4mL去离子水,用4mL氯仿萃取4次,合并有机相,然后再将其旋转蒸干,得到的固态物质即是T-2HS中间产物,用1mL的二甲基甲酰胺将产物溶解备用。

[0064] (2) 人工抗原的合成

[0065] 采用碳二亚胺(EDC)法合成人工抗原,方法如下:取0.5mL步骤(1)产物的二甲基甲酰胺溶液记为A液;称取10mg BSA、4mg EDC加入到3mL超纯水中溶解,记为B液;在搅拌的情况下将A液逐滴加入到B液中,4℃避光条件下磁力搅拌18h,反应产物在PBS溶液中透析72h,期间换液9次。将透析液4000r/min离心10min,弃沉淀,将上清分装于小管中,20℃冰箱冷冻

保存备用。

[0066] 2、抗T-2抗体的制备

[0067] (1) 单克隆抗体的制备

[0068] 动物免疫：用制备的T-2载体蛋白偶联物以30 μ g $\sim$ 50 μ g/只的用量免疫6 $\sim$ 8周龄Balb/C小鼠3 $\sim$ 4次，每次免疫间隔时间3 $\sim$ 5周，确定抗体效价符合要求后进行超强免疫，并在融合之前检测其抑制价。

[0069] 细胞融合：超强免疫后3 $\sim$ 4天，将免疫小鼠眶下窦采血，分离阳性血清；脱颈致死，用75%的酒精浸泡小鼠5 $\sim$ 10min消毒体表，无菌取其脾脏，将脾脏剪碎并研磨，经120目尼龙纱布过滤，1000r/min离心10min，收集脾细胞。将1 $\times$ 10⁸的脾细胞与NS0骨髓瘤细胞按10:1的比例混合，1000r/min离心10min弃上清，将细胞沉淀物于37 $^{\circ}$ C水浴中缓缓加入0.7 $\sim$ 1.0mL的50%PEG4000，1min内加完，前30s加0.1 $\sim$ 0.3mL，中间15s加0.2 $\sim$ 0.4mL，最后15s加完；然后缓缓加入无血清1640培养基15mL，以终止PEG的作用，37 $^{\circ}$ C水浴5 $\sim$ 10min，1000r/min离心10min弃上清，将细胞沉淀物重悬于HAT选择培养基中，并加入96孔细胞培养板中(8 $\sim$ 10块)，100 μ L $\sim$ 200 μ L/孔，置于37 $^{\circ}$ C、5%的CO₂培养箱中培养。

[0070] 单克隆抗体的筛选：培养10 $\sim$ 14天，用间接ELISA法进行阳性孔筛选，选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行3 $\sim$ 6次有限稀释克隆化(直到细胞克隆为单克隆，检测各个克隆孔效价、抑制价基本一致)，而后扩大培养，建立杂交瘤细胞株。所制备的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体可特异地与T-2反应，亲和力常数达到10¹⁰ $\sim$ 10¹²，轻链亚型为 κ 或 λ ，重链亚型为IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃，针对T-2特异抗原决定簇的单克隆抗体，用于制备氧化石墨烯荧光纳米材料标记抗体的玻璃纤维棉。

[0071] (2) 多克隆抗体的制备

[0072] 用T-2载体蛋白偶联物免疫新西兰白兔，免疫剂量为200 μ g $\sim$ 500 μ g/次，背部皮下分4 $\sim$ 6点注射。首免，用无菌PBS溶解制备的T-2载体蛋白偶联物，与等量弗氏完全佐剂(FCA)混合，充分乳化；加强免疫，用无菌PBS溶解T-2载体蛋白偶联物，与等量弗氏不完全佐剂(FIA)混合，充分乳化，首免后2 $\sim$ 3周进行，连续免疫4 $\sim$ 5次，每次间隔2 $\sim$ 3周，最后一次免疫后10 $\sim$ 15天，以ELISA法测其定效价达到10⁵以上时，采血并分离收集高免血清。

[0073] 以饱和硫酸铵盐析法提取IgG抗体，即取1份高免血清加2份PBS(pH7.2)混匀，加等体积饱和硫酸铵溶液混匀，置4 $^{\circ}$ C冰箱12h，4 $^{\circ}$ C、2500r/min离心15min，弃上清，再以适量PBS(pH7.2)溶解沉淀，加饱和硫酸铵溶液至终浓度33%，置4 $^{\circ}$ C冰箱2h，4 $^{\circ}$ C、2500r/min离心15min，弃上清，以适量PBS(pH7.2)溶解沉淀，置4 $^{\circ}$ C冰箱内用PBS(pH7.2)透析48 $\sim$ 72h，中间换液数次，4 $^{\circ}$ C、12000r/min离心15min，收集上清，得纯化的抗T-2多克隆抗体，-20 $^{\circ}$ C冻存，用于制备氧化石墨烯荧光纳米材料标记抗体玻璃纤维棉。

[0074] 3、氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备

[0075] (1) 氧化石墨烯荧光材料修饰：

[0076] 取20mg氧化石墨磨碎，加入到5mL二甲基甲酰胺(DMF)中，超声混匀后，加入20mL二氯亚砷，80 $^{\circ}$ C下加热回流48h后离心，得到中间体酰氯化氧化石墨烯，用四氢呋喃洗涤两次后，干燥；再在抽真空氮气保护的条件下，将酰氯化氧化石墨烯和1mL正丁胺混合，60 $^{\circ}$ C反应72h，冷却至室温，得到烷基胺修饰的氧化石墨烯，分散于20mL双蒸水中，8000r/min离心，除去未反应的正丁胺，将剩余的反应液通过旋转蒸发仪蒸干，蒸干后的干物质重新分散在双

蒸水中,配制成浓度为1mg/mL的修饰的氧化石墨烯荧光材料水溶液;

[0077] (2) 表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液的制备:

[0078] (a) 将100mg硝酸银溶解于250mL超纯水中,加热沸腾,加入10mL质量分数1%的柠檬酸钠溶液,80℃加热回流1h后搅拌0.5h,4℃条件下过夜;取1mL过夜后的溶液,加入1mM的巯基乙酸10μL,搅拌24h后离心,除去未反应的巯基乙酸,超纯水洗涤3次,用旋转蒸发仪蒸干,加超纯水配制成浓度为1mg/mL巯基乙酸包覆的银纳米颗粒溶液;

[0079] (b) 取0.1mM的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC) 10μL和0.1mM的NHS10μL,逐步加入到1mL巯基乙酸包覆的银纳米颗粒溶液中,反应1h,得到羧基活化的银纳米颗粒溶液;

[0080] (c) 取0.1mM的T-2单克隆抗体或多克隆抗体20μL,加入到羧基活化的银纳米颗粒溶液中,4℃反应过夜,得到表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液;

[0081] (3) 氧化石墨烯荧光纳米材料T-2抗体的标记:

[0082] 取修饰的氧化石墨烯荧光材料水溶液5mL,加入2mL戊二醛,室温反应3h,离心,除去未反应的戊二醛,将剩余的反应液分散在0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲溶液中,加入表面标记T-2抗体银纳米颗粒溶液,4℃反应3h,经离心,收集氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体,0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液洗涤,保存备用。

[0083] 4、荧光抗体纤维层的制备

[0084] 将1:100~1:500稀释的氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2抗体吸附于精制玻璃纤维棉中,4℃低温真空干燥,制备氧化石墨烯荧光纳米材料标记抗体的玻璃纤维棉。

[0085] 5、吸附纤维素膜层的制备:

[0086] 纤维素膜层由硝酸纤维素制成,用点样仪在纤维素膜层的不同位置分别喷点T-2人工抗原检测印迹和兔抗鼠IgG抗体(或羊抗鼠IgG抗体、羊抗兔IgG抗体)对照印迹,于37℃烘干备用。

[0087] 6、免疫层析试纸的组装

[0088] 将吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层、吸水材料层从测试端开始依次贴在带有粘合剂的底层上,再在覆盖上面层,并切成3-4cm宽的试纸即可。

[0089] 7、检测反应原理

[0090] 当试纸测试端插入待测样品溶液后,在虹吸作用带动下,待测溶液中T-2和荧光抗体纤维层中的荧光抗体一起向纤维素膜层扩散,直至到吸水材料层。

[0091] 在扩散过程中,待测T-2可与吸附在氧化石墨烯上的T-2抗体-银纳米颗粒相结合,因抗原-抗体作用和静电吸引作用,导致T-2抗体-银纳米颗粒从氧化石墨烯上剥离出来,进而释放氧化石墨烯所散发的荧光,并和偶联T-2的载体蛋白结合。而羊抗鼠抗体则能与T-2抗原结合,在350nm紫外线激发下隐形检测印迹线(T线)和隐形对照印迹线(C线)都会出现吸收峰,通过荧光读条仪读取T线峰值定量检测待测样品中T-2中的含量。反之,样品中无T-2时,则T线和C线不会出现紫外吸收峰。

[0092] 实施例2

[0093] 实施例2中免疫层析试纸的制备和实施例1基本相同,主要不同之处在于:荧光抗体为NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0094] 所述的NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,

包括以下步骤:

[0095] (1) 采用水热合成法制备 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 纳米颗粒:

[0096] 分别取浓度均为 0.5mol/L 的 $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 5.5mL 、 $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.5mL 和 $\text{Tm}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.5mL ,混合均匀,再加入 0.4mol/L 的柠檬酸钠溶液 2mL , 25°C 条件下避光充分反应 1h ;加入 1.5mol/L NH_4F 溶液 7mL , 25°C 条件下避光搅拌 0.5h ,用 HNO_3 调节 pH 值至 7.4 ,静置 0.5h ,加双蒸水稀释至 30mL ;再在 220°C 下反应 24h ,冷却到室温,经过滤、双蒸水洗涤、干燥,得到发蓝色光的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 荧光纳米颗粒;

[0097] (2) 荧光纳米颗粒的表面硅化:

[0098] 将 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 荧光纳米颗粒加入 0.01mol/L 、 $\text{pH}7.4$ 的PBS缓冲液中,配制成浓度为 1mg/mL 的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 荧光纳米颗粒溶液,再将 5mL 浓氨水滴入 5mL $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 荧光纳米颗粒溶液中,充分搅拌反应 20min ,再加入 2.5mL 正硅酸四乙酯, 4°C 避光条件下反应 4h ; 6000r/min 离心 10min ,得到表面硅化的荧光纳米颗粒,用乙醇洗涤4次,分散在甲醇中,配制成浓度为 10mg/mL 的荧光纳米颗粒甲醇溶液;

[0099] (3) 荧光纳米颗粒的表面氨基化:

[0100] 取 3mL 荧光纳米颗粒甲醇溶液,加入 5mL 的丙酮,密封后磁力搅拌 20min ,再用超声波均匀分散,加入 $3\mu\text{L}$ 的 N -(2-氨乙基)-3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTSA),密封后在 40°C 反应 30min ,再在 70°C 水浴反应 1h , 6000r/min 离心 5min ,得到表面氨基化的荧光纳米颗粒,用乙醇反复洗涤4次,真空干燥后, 4°C 密封保存;

[0101] (4) T-2抗体的标记:

[0102] 用 0.01mol/L 、 $\text{pH}7.4$ 的PBS缓冲溶液将表面氨基化的荧光纳米颗粒溶解,配制成浓度为 10mg/mL 的表面氨基化的荧光纳米颗粒溶液;取 10mL 表面氨基化的荧光纳米颗粒溶液与 5.6mg NHS和 15mg EDC混合,室温避光反应 3h , 6000r/min 离心 5min ,取上清液;将 1mg/mL 的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体加入上清液中,T-2单克隆抗体或者多克隆抗体和上清液的体积比为 $1:100$, 4°C 避光反应 4h ,离心,双蒸水洗涤后分散在PBS缓冲溶液中, 4°C 条件下透析 3d ,离心,收集沉淀,得到 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ 纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或多克隆抗体,置于PBS缓冲溶液中, 4°C 保存。

[0103] 检测反应原理

[0104] 当试纸测试端插入待测样品溶液后,在虹吸作用带动下,待测溶液中T-2和荧光抗体纤维层中的荧光抗体一起向纤维素膜层扩散,直至到吸水材料层。

[0105] 在扩散过程中,待测T-2可与荧光抗体相结合,进而封闭荧光抗体上T-2的抗原结合点,阻止荧光抗体与纤维素膜上的T-2人工抗原的检测印迹结合,不能显示检测印迹,而羊或兔抗小鼠IgG(或羊抗兔IgG)抗体则可与荧光抗体结合,在红外线激发下通过荧光读条仪T线处就不会出现吸收峰,C线处会出现吸收峰。反之样品溶液中无T-2时,则不能阻止荧光抗体与纤维素膜上偶联T-2载体蛋白的检测印迹结合,通过荧光读条仪T线处就会出现吸收峰,同样羊抗或兔抗小鼠IgG(或羊抗兔IgG)抗体也能与荧光标记抗体结合,通过荧光读条仪C线处也会出现吸收峰。如果纤维素膜上没有T线和C线吸收峰,则表明试纸条已失效。

[0106] 实施例3

[0107] 实施例3中免疫层析试纸的制备和实施例1基本相同,主要不同之处在于:荧光抗体为 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或多克隆抗体。

[0108] 所述的 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0109] (1) 采用水热合成法制备 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒

[0110] 称取7g Gd_2O_3 和7g Eu_2O_3 ,分别加入至50mL的 HNO_3 中,加热至 80°C ,保温浓缩至全部结晶,制得 $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$;将 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于去离子水中,配制成浓度为0.2mol/L的 Na_2WO_4 溶液;将制得的 $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 和 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 用去离子水溶解,分别制备质量分数为80%的 $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 溶液和质量分数为15%的 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,吸取配制的5mL $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ 溶液、10mL Na_2WO_4 溶液和5mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,加入到反应釜中,用稀硝酸、氢氧化钠调节 $\text{pH}=5$,搅拌均匀,封闭反应釜, 200°C 恒温加热24h后,自然降至室温;将反应釜中溶液倒出静置,待溶液中粉体沉淀后,去除上清液,用蒸馏水洗涤粉体3次,每次静置3h;将洗好的粉体加热至 80°C 干燥12h,得到 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒;

[0111] (2) T-2抗体的标记

[0112] 将T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液10000r/min离心30min,除去杂质;用去离子水溶解 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒,配制成浓度为0.1mg/mL的 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒溶液,然后用0.1mol/L K_2CO_3 溶液调节 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒溶液至 $\text{pH} 8.2$;

[0113] 取10mL $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 纳米颗粒溶液,在搅拌状态下,加入T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液100 μl ,T-2单克隆抗体或多克隆抗体溶液浓度1mg/mL,混匀,室温温育30min, 4°C 、10000r/min离心30min,弃上清,将沉淀用0.02mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液稀释至10mL,10000r/min离心30min,沉淀用0.02mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液稀释至1mL, 4°C 保存备用。

[0114] 检测反应原理

[0115] 当试纸测试端插入待测样品溶液后,待测溶液通过虹吸作用带动待测T-2及荧光纳米颗粒标记抗体玻璃纤维棉中的下转换荧光纳米颗粒 $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2:\text{Eu}^{3+}$ 标记抗体一起向纤维素膜层扩散,并最终渗入手柄端的吸水材料层。在扩散过程中,待测T-2可与荧光纳米颗粒标记抗体纤维层中的下转换荧光纳米颗粒标记抗体相结合,进而封闭下转换荧光纳米颗粒标记抗体上T-2的抗原结合点,阻止下转换荧光纳米颗粒标记抗体与纤维素膜上偶联T-2载体蛋白的检测印迹结合,试纸上无法显示检测印迹,而羊或兔抗小鼠IgG(或羊抗兔IgG)抗体则可与下转换荧光纳米颗粒标记抗体结合,在红外线激发下通过荧光读条仪T线处就不会出现吸收峰,C线处会出现吸收峰。反之样品溶液中若无T-2,则不能阻止下转换荧光纳米颗粒标记抗体与纤维素膜上偶联T-2载体蛋白的检测印迹结合,通过荧光读条仪T线处就会出现吸收峰,同样羊抗或兔抗小鼠IgG(或羊抗兔IgG)抗体也能与下转换荧光纳米颗粒标记抗体结合,通过荧光读条仪C线处也会出现吸收峰。如果纤维素膜上没有T线和C线吸收峰,则表明试纸条已失效。

[0116] 以下结合其他实施例具体说明免疫层析试纸的结构和检测方法

[0117] 实施例4

[0118] 本实施例的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸,参照图1-2,包括支撑体和固定在支撑体上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层2、荧光抗体纤维层3、纤维素膜层4及吸水材料层7,所述的纤维素膜层上设有用偶联T-2的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹5和用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹6;所述的荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成,荧光抗体为氧化石墨烯荧光纳米材

料标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0119] 所述的支撑体包括设置在吸附层底面的底层15和设置在吸附层顶面的面层14。

[0120] 所述的面层覆盖在吸附纤维层、荧光抗体纤维层及吸水材料层上,在吸附纤维层与荧光抗体纤维层交界处对应的面层上印制有样品标记线16,该样品标记线偏向吸附纤维层一侧0.3~0.7cm。

[0121] 为了更好的技术效果,所述的隐形检测印迹5和隐形对照印迹6呈相间设置在纤维素膜层4的表面,即两条印迹带平行排列成“||”,间距为5~15mm。

[0122] 覆盖在吸附纤维层和荧光抗体纤维层上面的面层为白色,覆盖在吸水材料层上面的面层为其它颜色(如黄色),测试样品标记线位于吸附纤维层与荧光抗体纤维层交界处对应的白色面层偏向吸附纤维层一侧约0.5cm处,在标记线右侧面层上印有箭头及max字样。

[0123] (1) 待测样品的制备及检测步骤:

[0124] 检测肉样:将样品剪碎、细磨,用生理盐水稀释制成1:10 (m/v) 的样品悬液。

[0125] 操作方法:将T-2试纸测试端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,约10~20秒钟取出试纸,5min后放入荧光读条仪直接读值。

[0126] 结果判定:

[0127] (a) 阳性判定:通过荧光读条仪T线和C线处都出现吸收峰,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有T-2毒素;

[0128] (b) 阴性判定:通过荧光读条仪T线和C线处都不出现吸收峰,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中不含T-2毒素;

[0129] (c) 失效判定:通过荧光读条仪T线不出现吸收峰,C线处出现吸收峰,或T线处出现吸收峰,C线处不出现吸收峰,则表明试纸已失效。

[0130] (2) 本实施例免疫层析试纸的灵敏性、特异性检测

[0131] 灵敏性的检测:用磷酸盐缓冲液PBS (pH 7.4) 或双蒸水分别配制浓度为1、2、4、5、10、20、30ng/mL的T-2标准品,在本实施例的免疫层析试纸上上样80~100 μ L,反应5min后,通过读条仪读取T线扫描面积光密度的相对光密度值(relative optical density, ROD)。以不同浓度标准品与空白标准品相对光密度值的百分率为纵坐标,以不同标准品浓度的常用对数值为横坐标,绘制标准曲线,进行相关回归分析,计算该试纸对T-2的IC₅₀和最低检测限。经测定,该试纸T-2对的曲线回归方程为: $y = -0.610x + 1.023$,相关系数为 $R^2 = 0.990$,根据回归方程计算出该试纸对T-2的IC₅₀为7.2ng/mL,当 $ROD \times pixel\% = 90\%$ 时,曲线方程对应的T-2浓度为1.59ng/mL,即机读灵敏度,考虑到实际检测工作的需要和用户操作方面的误差,其机读检测限确定为2ng/mL。目测敏感度为8ng/mL,表明免疫层析试纸对T-2具有较高的灵敏度。

[0132] 特异性的检测:以其他真菌毒素作为竞争物,配制上述标准品不同浓度,用免疫层析试纸检测其抑制率,以该试纸对T-2的与IC₅₀各竞争物IC₅₀的百分比作为其交叉反应率。测定结果见表1。由表1可看出,该免疫层析试纸的特异性较好,与其他真菌毒素均无交叉反应。

[0133] 表1免疫层析试纸与其他真菌毒素的交叉反应

[0134]

化合物	半数抑制浓度IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
-----	--------------------------------	----------

T-2毒素	7.2	100
赭曲霉毒素A	$>1.0 \times 10^4$	<0.072
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^4$	<0.072
伏马毒素B ₁	$>1.0 \times 10^5$	<0.0072
黄曲霉毒素B ₁	$>1.0 \times 10^5$	<0.0072
呕吐毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.0072

[0135] 本实施例的试纸条具有以下优点：

[0136] (1) 特异性强，灵敏度高。本实施例的试纸条以氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2抗体为基础制成，由于经修饰过的氧化石墨烯荧光材料具有非凡光学特性和良好的生物相容性，同时氧化石墨烯电子传递效率高，使得这种新型免疫方法灵敏度高，检测极限低，最低仅为2ng/mL。

[0137] (2) 稳定性高，安全性好。本实施例的试纸条氧化石墨烯荧光纳米材料标记的T-2抗体为基础制成，纳米银颗粒表面与蛋白质带有相反的电荷基团，因静电吸附而牢固结合；石墨烯比表面积大，能与多种蛋白质生物分子通过化学反应结合，而对其生物活性影响很小，稳定性高，灵活性好。

[0138] (3) 本实施例的氧化石墨烯荧光免疫层析试纸可对玉米、DDGS、饲料等进行检测。通过银纳米和氧化石墨烯共同作用，检测信号增强，降低抗体用量，节省抗体成本。

[0139] 实施例5

[0140] 本实施例的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸，参照图3-7，包括支撑体和固定在支撑体上的吸附层，所述的支撑体包括透明的中空管体1，吸附层填充在中空管体内部，吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及吸水材料层，所述的纤维素膜层上设有用偶联T-2的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹5和用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹6；所述的荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成，荧光抗体为NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0141] 所述的中空管体1的上端装有连接头8，连接头8上端设置有辅助吸附装置，所述的辅助吸附装置包括与所述连接头呈密封连接的连接套13和设置在所述连接套上部的气囊12，气囊12的出气口依次经连接套13上部的进气通道132、连接头8的内腔9与中空管体1的上口部相连通，进气通道所在的连接套侧壁上设置有只能向外排气无法向内吸气的单向出气装置11。

[0142] 所述的单向出气装置包括设置在进气通道所在的连接套侧壁的换气腔111，换气腔111内设置有圆球形的密封球113，换气腔111的底面上开有与密封球相对应的第一出气口114，第一出气口经出气通道115与进气通道132相连通，换气腔111侧面设置有与外界大气相连通的第二出气口112，构成只能向外排气、无法向进气通道吸气的单向出气结构。

[0143] 为了更好的技术效果，所述的第一出气口114为圆形，其直径小于密封球的直径。这样的设置能够使第一出气口与圆球形的密封球更加紧密的结合，保证空间的密封性。

[0144] 所述的连接头8为上下开口的中空结构，其下端与中空管体1的上端呈密封连接，连接头上部的外壁上设置有外螺纹，连接套13的下部设置有与连接头相对应得盲孔131，盲孔131内壁上设置有与外螺纹相对应的内螺纹，连接头通过外螺纹和内螺纹旋装在连接套

下部的盲孔131内,连接头的顶部与盲孔顶部之间在连接套上设置有防止漏气的密封圈10。

[0145] 所述的隐形检测印迹5和隐形对照印迹6呈相间设置在纤维素膜层4的表面,间距为5~15mm。

[0146] 所述的中空管体1的内腔为长方形。

[0147] 测试样品标记线位于吸附纤维层与荧光抗体纤维层交界处对应的透明中空管体上偏向吸附纤维层一侧约0.5cm处,在标记线右侧的透明中空管体上印有箭头及max字样。

[0148] 使用时,将连接套和连接头通过内外螺纹连接在一起,轻轻挤压气囊,气囊中的气体通过进气通道、连接头的内腔和连接套侧壁的换气腔向外排出,此时换气腔内的圆球形密封球被从气囊中挤压出的气体抬起,气囊中的气体通过第一出气口顺利向外排出;将试纸插入待测样品溶液中,然后松开气囊,此时,中空管体的内腔、连接头的内腔和进气通道内产生负压,在负压的吸引下,密封球紧紧吸附在换气腔的底面上的第一出气口上,将其封闭,从而帮助样品溶液更加快速的浸润试纸,从而减少样品溶液浸润试纸条的时间,提高检测效率。

[0149] 由上述情况可以清楚的看出,本实施例结构新颖独特,简单合理,通过将支撑体整体修改为密闭结构,同时在支撑体的顶部增加气囊,使吸收更加迅速,从而有效提高检测的速度和准确度,同时气囊部分和支撑体部分为密封拆装式连接,检测完毕后只需更换支撑体部分即可,拆装方便,易操作,使用效果好,是检测试纸上的创新。

[0150] (1) 待测样品的制备及检测步骤:

[0151] 检测奶样:将样品用无水乙醇稀释制成1:10 (v/v) 的样品悬液。

[0152] 操作方法:挤压气囊,将气囊内的气体排出,将T-2试纸测试端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,松开气囊,约3-5秒钟取出试纸,4min后放入荧光读条仪直接读值。

[0153] 结果判定:

[0154] (a) 阳性判定:通过荧光读条仪T线处不出现吸收峰,C线处出现吸收峰,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有T-2毒素;

[0155] (b) 阴性判定:通过荧光读条仪T线和C线处都出现吸收峰,表示检测结果为阴性,说明在待测样品中不含T-2毒素;

[0156] (c) 失效判定:通过荧光读条仪T线和C线处都不出现吸收峰,则表明试纸已失效。

[0157] (2) 本实施例免疫层析试纸的灵敏性、特异性检测

[0158] 灵敏性的检测:用磷酸盐缓冲液PBS (pH 7.4) 或双蒸水分别配制浓度为1、2、4、5、10、20、30ng/mL的T-2标准品,在本实施例的免疫层析试纸上上样80~100 μ L,反应4min后,通过读条仪读取T线扫描面积光密度的相对光密度值(relative optical density, ROD)。以不同浓度标准品与空白标准品相对光密度值的百分率为纵坐标,以不同标准品浓度的常用对数值为横坐标,绘制标准曲线,进行相关回归分析,计算该试纸对T-2的IC₅₀和最低检测限。经测定,该试纸T-2对的曲线回归方程为: $y = -0.539x + 0.901$,相关系数为 $R^2 = 0.993$,根据回归方程计算出该试纸对T-2的IC₅₀为5.55ng/mL,当 $ROD \times \text{pixel} \% = 90\%$ 时,曲线方程对应的T-2浓度为1ng/mL,即机读灵敏度,考虑到实际检测工作的需要和用户操作方面的误差,其机读检测限确定为1.5ng/mL。目测敏感度为6ng/mL,表明免疫层析试纸对T-2具有较高的灵敏度。

[0159] 特异性的检测:以其他真菌毒素作为竞争物,配制上述标准品不同浓度,用免疫层

析试纸检测其抑制率,以该试纸对T-2的与IC₅₀各竞争物IC₅₀的百分比作为其交叉反应率。测定结果见表2。由表2可看出,该免疫层析试纸的特异性较好,与其他真菌毒素均无交叉反应。

[0160] 表2免疫层析试纸与其他真菌毒素的交叉反应

[0161]

化合物	半数抑制浓度 IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
T-2 毒素	5.55	100
赭曲霉毒素 A	$>1.0 \times 10^4$	<0.0555
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^4$	<0.0555
伏马毒素 B ₁	$>1.0 \times 10^5$	<0.0056
黄曲霉毒素 B ₁	$>1.0 \times 10^5$	<0.0056

[0162]

呕吐毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.0056
------	--------------------	-----------

[0163] 本实施例的试纸条具有以下优点:

[0164] (1) 特异性强,灵敏度高。本实施例上转换荧光免疫层析试纸以发蓝色光谱的上转换荧光纳米材料NaYF₄:Yb,Tm标记的T-2抗体为基础制成,由于NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒发光效率高,能有效消除样品检测背景光,灵敏度大幅提高,最低仅为到1.5ng/mL。

[0165] (2) 稳定性高,安全性好。本实施例的试纸中上转换荧光纳米材料NaYF₄:Yb,Tm能有效发射蓝色光谱,完全避免了其他条件引起的发光淬灭。NaYF₄:Yb,Tm材料具有无机惰性、红外光激发、可见光发射的特点,使用该试纸进行检测对于周围人员与环境无任何危害。

[0166] (3) 简便、快速。利用荧光读条仪,该试纸可直接读值,实现现场快速定量检测。只要将试纸插入被检样品3~5秒钟,4分钟后即可读取结果,在T线处无吸收峰表示被检样品中含有T-2;反之,不含T-2。结果直观、准确,简单明了,最大限度的避免了人为误判。

[0167] (4) 本实施例的试纸制备时,荧光抗体采用NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或多克隆抗体,即将氨基化的NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒直接与抗体相连,标记过程简单,偶联率高,从而有效提高基于NaYF₄:Yb,Tm材料的免疫试纸的灵敏度。

[0168] 实施例6

[0169] 本实施例的检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸的结构同实施例4,不同之处在,本实施例的荧光抗体为NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。

[0170] (1) 待测样品的制备及检测步骤:

[0171] 检测尿样:将样品用无水乙醇稀释制成1:10(v/v)的样品悬液。

[0172] 操作方法:将T-2试纸测试端插入待测样品中,插入深度不超过标记线,约10~20秒钟取出试纸,5min后放入荧光读条仪直接读值。

[0173] 结果判定:

[0174] (a) 阳性判定:通过荧光读条仪T线处不出现吸收峰,C线处出现吸收峰,表示检测结果为阳性,说明在待测样品中含有T-2毒素;

[0175] (b) 阴性判定:通过荧光读条仪T线和C线处都出现吸收峰,表示检测结果为阴性,

说明在待测样品中不含T-2毒素；

[0176] (c) 失效判定：通过荧光读条仪T线和C线处都不出现吸收峰，则表明试纸已失效。

[0177] (2) 本实施例免疫层析试纸的灵敏性、特异性检测

[0178] 灵敏性的检测：用磷酸盐缓冲液PBS (pH 7.4) 或双蒸水分别配制浓度为1、2、4、5、10、20、30ng/mL的T-2标准品，在本实施例的免疫层析试纸上上样80~100μL，反应5min后，通过读条仪读取T线扫描面积光密度的相对光密度值(relative optical density, ROD)。以不同浓度标准品与空白标准品相对光密度值的百分率为纵坐标，以不同标准品浓度的常用对数值为横坐标，绘制标准曲线，进行相关回归分析，计算该试纸对T-2的IC₅₀和最低检测限。经测定，该试纸T-2对的曲线回归方程为： $y = -0.580x + 0.955$ ，相关系数为 $R^2 = 0.992$ ，根据回归方程计算出该试纸对T-2的IC₅₀为6.09ng/mL，当 $ROD \times \text{pixel} \% = 90\%$ 时，曲线方程对应的T-2浓度为1.24ng/mL，即机读灵敏度，考虑到实际检测工作的需要和用户操作方面的误差，其机读检测限确定为2ng/mL。目测敏感度为7ng/mL，表明免疫层析试纸对T-2具有较高的灵敏度。

[0179] 特异性的检测：以其他真菌毒素作为竞争物，配制上述标准品不同浓度，用免疫层析试纸检测其抑制率，以该试纸对T-2的与IC₅₀各竞争物IC₅₀的百分比作为其交叉反应率。测定结果见表3。由表3可看出，该免疫层析试纸的特异性较好，与其他真菌毒素均无交叉反应。

[0180] 表3免疫层析试纸与其他真菌毒素的交叉反应

[0181]

化合物	半数抑制浓度IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
T-2毒素	6.09	100
赭曲霉毒素A	$>1.0 \times 10^4$	<0.061
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^4$	<0.061
伏马毒素B ₁	$>1.0 \times 10^5$	<0.0061
黄曲霉毒素B ₁	$>1.0 \times 10^5$	<0.0061
呕吐毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.0061

[0182] 本实施例的试纸条具有以下优点：

[0183] (1) 特异性强，灵敏度高。本实施例下转换荧光纳米颗粒标记免疫层析试纸是以氧化钆(Gd₂O₃)、钨酸钠(Na₂WO₄ · 2H₂O)为基质，铕离子(Eu³⁺)为敏化剂形成的100~200nm纳米颗粒，具有良好的光学特性，使T-2的检测消除了背景光的干扰，灵明度大大提高，最低可检测到2ng/mL。

[0184] (2) 稳定性高。NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒属于完全惰性的无机发光材料，这些性质使得其具有非常好的光稳定性，在紫外灯的照射下不发生光漂白，使得读值稳定。

[0185] (3) 简便、快速。使用本实施例试纸可与荧光读条仪结合使用，直接读值，实现现场定量检测，只需将试纸条插入被检样品中10~20秒钟，取出后5分钟内即可判定检测结果。

[0186] (4) 结果显示形象、直观、准确。本实施例荧光纳米颗粒标记免疫层析试纸是以T线是否出现吸收峰作为检测阳性和阴性的标准。若T线处无吸收峰则表示被检样品中含有T-2，反之则表示被检样品中不含T-2。结果直观、准确，不易出现假阳性和假阴性等人为误判。

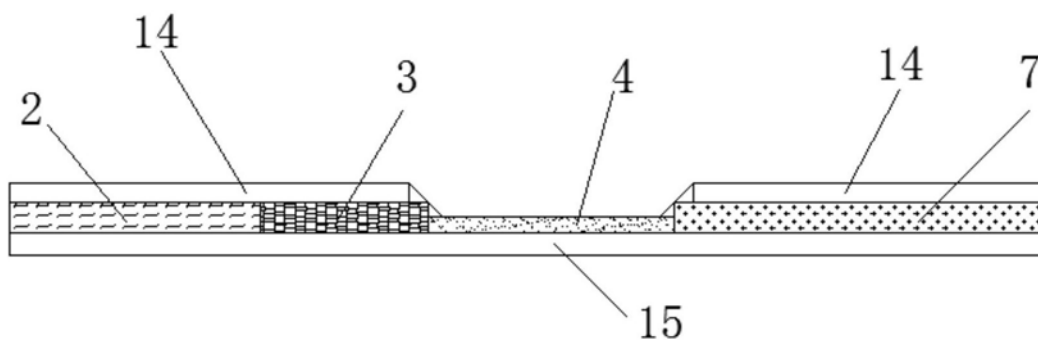


图1

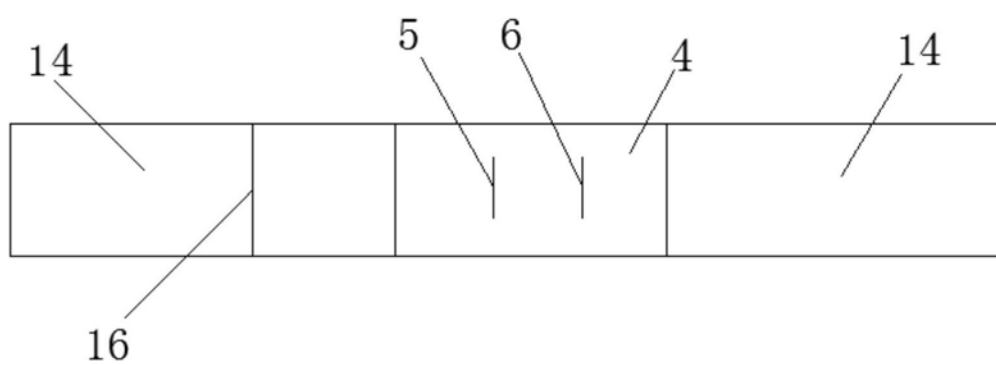


图2

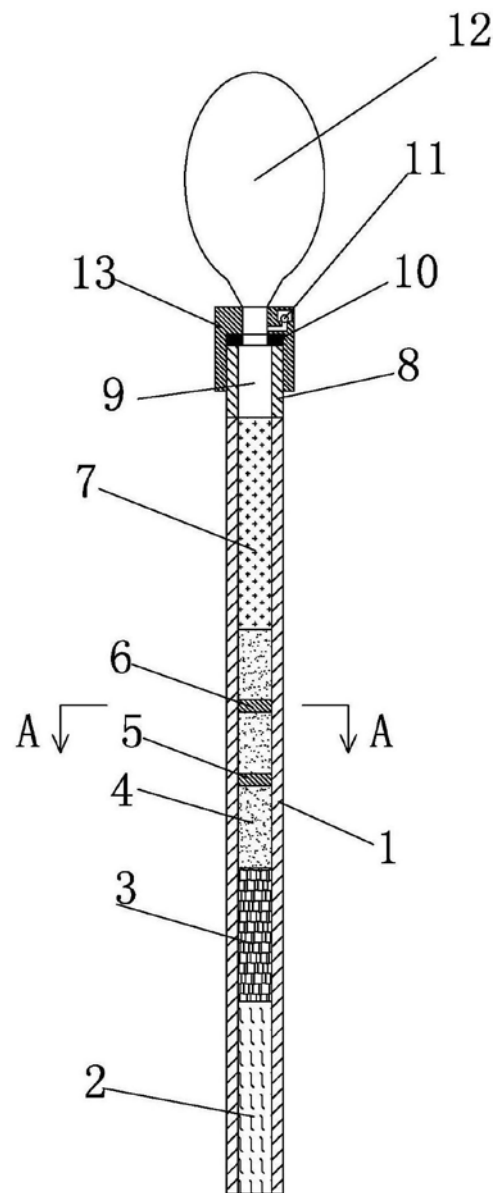


图3

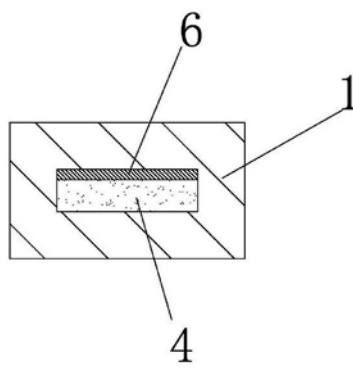


图4

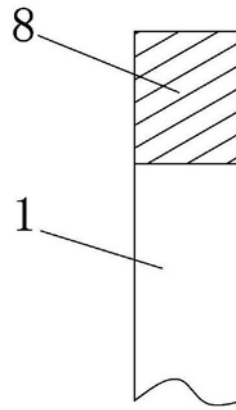


图5

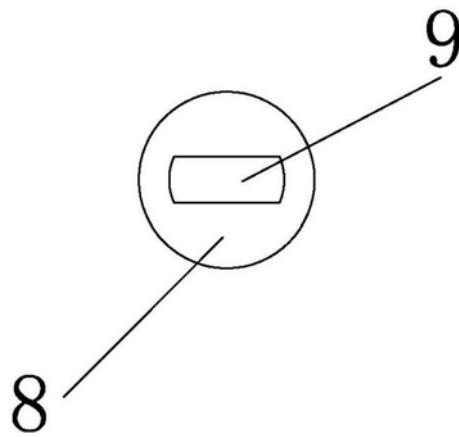


图6

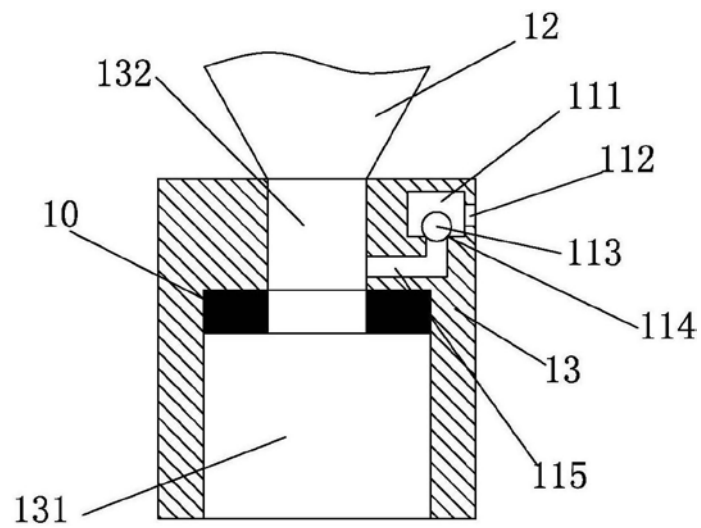


图7

专利名称(译)	一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN106018794B	公开(公告)日	2017-08-04
申请号	CN201610415407.X	申请日	2016-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	焦作百奥泰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	焦作百奥泰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	焦作百奥泰生物科技有限公司		
[标]发明人	职爱民 贾国超 张培蕾 李镁娟 王自良 宋莲军 邱国庆		
发明人	职爱民 贾国超 张培蕾 李镁娟 王自良 宋莲军 邱国庆		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54346 G01N33/558		
代理人(译)	张爱军		
其他公开文献	CN106018794A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测T-2毒素的荧光免疫层析试纸，包括支撑体和固定在支撑体上的吸附层，吸附层从测试端开始依次为吸附纤维层、荧光抗体纤维层、纤维素膜层及吸水材料层，所述的纤维素膜层上设有用偶联T-2的载体蛋白溶液印制的隐形检测印迹和用羊抗小鼠IgG、兔抗小鼠IgG或羊抗兔IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹；所述的荧光抗体纤维层采用吸附荧光抗体的玻璃纤维棉制成，荧光抗体为氧化石墨烯荧光纳米材料、NaYF₄:Yb,Tm纳米颗粒或NaGd(WO₄)₂:Eu³⁺纳米颗粒标记的T-2单克隆抗体或者多克隆抗体。本发明的试纸条具有特异性强、灵敏度高、稳定性高、安全性好、简便、快速的特点，在便携式荧光读数仪下可实现现场定量检测，能满足不同层次人员的需要。

