



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110749737 A

(43)申请公布日 2020.02.04

(21)申请号 201910916230.5

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 南京市产品质量监督检验院

地址 210019 江苏省南京市建邺区嘉陵江
东街3号质监大厦

(72)发明人 肖有玉 卢菲

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限
公司 32200

代理人 黄欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

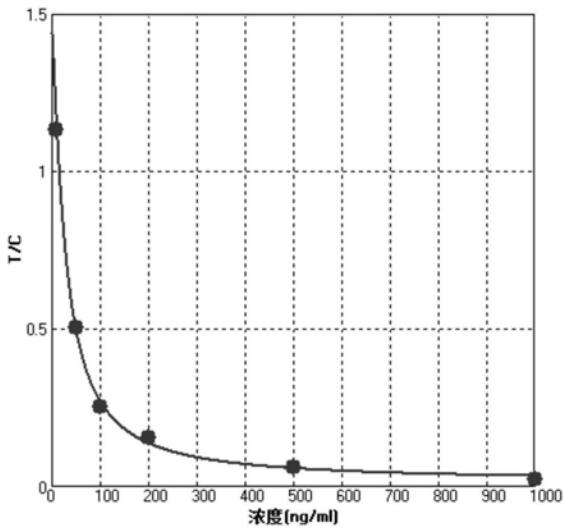
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫
层析试纸

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸，该试纸由样品垫、标记物垫、层析膜、缓冲垫相互重叠1-2mm依次粘贴在PVC底板上制得，所述层析膜为承载有检测线和质控线的硝酸纤维素膜，所述检测线包被有雌二醇抗原、质控线包被有羊抗鼠抗体；所述标记物垫上承载有偶联有雌二醇抗体的量子点。当牛奶中含有雌二醇时，流经T线位置会与T线包被的抗原竞争结合标记物垫上的抗体，从而改变检测的荧光强度来进行定量检测。



1. 一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸,由样品垫、标记物垫、层析膜、缓冲垫相互重叠1-2mm依次粘贴在PVC底板上制得,所述层析膜为承载有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,其特征在于:所述检测线包被有雌二醇抗原、质控线包被有羊抗鼠抗体;所述标记物垫上承载有偶联有雌二醇抗体的量子点。

2. 根据权利要求1所述的试纸,其特征在于:所述偶联有雌二醇抗体的量子点是将活化后的量子点与雌二醇抗体进行偶联后,加入牛血清白蛋白溶液封闭得到。

3. 权利要求1所述的层析试纸的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤1,制备标记物垫:

1) 向玻璃纤维素膜滴加第一处理试剂,烘干,得到预处理的玻璃纤维素膜;

2) 取100 μL 10mg/mL的量子点原液,超声分散;

3) 量子点微球活化,取50μL分散后的量子点原液,与450μL 0.05M pH6.5的MES缓冲液混匀,加入3μL 50 mg/mL的EDC混匀,加入3μL 75 mg/mL的NHS混匀,垂直混匀15min;

4) 重悬,将步骤3)得到的混合液10000rp离心10min,弃上清,加入500μL 0.05M pH7.5的MOPS缓冲液重悬,超声分散;

5) 抗体偶联:向步骤4)得到的分散液中加入50μg雌二醇抗体,混匀偶联0.5h;

6) 封闭:向步骤5)得到的混合液加入10 μL 20% v/v 乙醇胺混匀后,再加入500μL 10wt.% 牛血清白蛋白溶液,室温垂直混匀以封闭多余位点;

7) 重悬:将步骤6)得到的混合液10000 rpm离心5 min,加入500μL量子点稀释液定容到1mg/mL,超声分散,4℃保存;

8) 稀释:将步骤7)得到的量子点-抗体稀释到0.4mg/mL,超声分散,备用;

9) 将稀释好的量子点-抗体稀释液加入0.05% 胭脂红喷到预处理的玻璃纤维素膜上,烘干,得到标记物垫;

步骤2,向配制好的T线包被液按0.5 mg/mL加入雌二醇抗原、向配制好的C线包被液按1 mg/mL加入羊抗鼠抗体,分别喷至硝酸纤维素膜制备T线和C线,烘干,制得层析膜;

步骤3,向玻璃纤维素膜滴加第二处理试剂,烘干,制得缓冲垫;

步骤4,向棉浆纸滴加第三处理试剂,烘干,制得样品垫;

步骤5,将样品垫、标记物垫、层析膜、缓冲垫组装,即得。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述第一处理试剂是向0.05M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入5wt.%蔗糖、1wt.% Tween-20、0.2wt.% Proclin-300后制得。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述第二处理试剂是向0.05M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入1wt.% Triton X-100、0.2wt.% Proclin-300后制得。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述第三处理试剂是向0.05M pH8.5的Tris-Base缓冲溶液中加入5wt.%海藻糖、0.8wt.% Tween-20、3.2mM EDTANa₂、0.2wt.%酪蛋白后制得。

7. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述T线包被液是向0.2M pH8.0的Hepes缓冲溶液中加入2wt.%蔗糖和8wt.%甲醇后制得。

8. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述C线包被液是向0.05M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入8wt.%甲醇、2wt.%蔗糖、0.5wt.%BSA、0.1wt.% Proclin-300后制得。

9.根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于:所述量子点稀释液是向0.1M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入15wt.%蔗糖、0.5wt.% Tween-20、3wt.%BSA、1wt.%甘露醇、0.1wt.% Proclin-300后制得。

一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明属于食品检测技术领域,具体涉及一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸。

背景技术

[0002] 雌二醇(Estrodol,E2)是一种天然的雌激素,也是一种典型的内分泌干扰物,在自然界广泛分布。雌二醇能够促进动物生长发育,提高动物的产奶量,因此被广泛用于肉鸡、猪、奶牛等禽畜饲养,然而违规用药或未按照休药期生产动物性食品,易造成畜禽产品(肉、奶)中E2的残留,进而通过食物链危害人类健康,目前奶制品中雌激素含量呈逐年递增的模式,不仅能引起儿童性早熟,也可能会增加女性患乳腺癌的风险,因此建立雌二醇残留的快速检测技术对保障人群健康具有重要意义。

[0003] 免疫层析技术(Immunostrip assay,ICA)是一种建立在抗原与抗体特异性结合基础上的检测方法,该方法不仅快速、简便、灵敏度高,而且耗时短,适合于现场快速检测。

[0004] 目前针对雌二醇药物残留的检测方法有很多,包括以高效液相色谱、液相色谱与质谱联用、毛细管电泳分析法等为代表的大型仪器检测法,其灵敏度高,但需要使用大型仪器,检测用时较长,前处理复杂;以酶联免疫吸附法、胶体金试纸条为代表的传统快速检测方法,操作简便、用时较短,但具有抗基质干扰能力低、材料易受损等局限性;以化学发光免疫法为代表的新型检测方法,检测灵敏度高,结果易观察,但过程较复杂,生产成本较高。因此,为了维护奶制品市场的安全性和检测需求,开发一种简单、准确、可实现即时即效的检测方法,逐渐受到广泛的重视。量子点免疫层析技术是以量子点作为示踪标志物应用于免疫层析法中,它一方面利用了量子点的独特荧光作为观测信号,具有灵敏度高、快速的优点,另一方面利用了免疫层析技术的简便、特异性强、费用低等优点结合于一体,用于精准的定量检测奶制品中雌二醇的含量。目前国内对此方面研究较少,具有很大的创新性,适用于大批量筛查原料奶中雌二醇的含量,对快检技术的发展具有一定的推动作用。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术的不足,本发明的目的是提供一种检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸,通过研究活性材料与量子点标记与固性材料结合、活性材料浓度优化、原材料筛选等一系列技术,建立一种雌二醇量子点免疫层析的检测方法,并对减少基质干扰及简化前处理方法进行研究,进一步提高其处理方法的简便性,实现样本不处理直接上样。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸,由样品垫、标记物垫、层析膜、缓冲垫相互重叠1~2mm依次粘贴在PVC底板上制得,所述层析膜为承载有检测线和质控线的硝酸纤维素膜;其中,所述检测线包被有雌二醇抗原、质控线包被有羊抗鼠抗体;所述标记物垫上承载有偶联有雌二醇抗体的量子点。

[0008] 所述层析膜粘贴在PVC底板上,缓冲垫粘贴在层析膜一侧,相互重叠部分为1~

1.5mm；所述标记物垫和样品垫粘贴在层析膜另一侧，相互重叠部分为1~1.5mm，所有部分均紧密粘贴在PVC底板上。

[0009] 进一步地，所述样品垫选用棉浆纸，所述缓冲垫和标记物垫选用玻璃纤维素膜。

[0010] 进一步地，所述偶联有雌二醇抗体的量子点是将活化后的量子点与雌二醇抗体进行偶联后，加入牛血清白蛋白溶液封闭得到。

[0011] 上述层析试纸的制备方法，包括以下步骤：

[0012] 步骤1，制备标记物垫：

[0013] 1) 向玻璃纤维素膜滴加第一处理试剂，烘干，得到预处理的玻璃纤维素膜；

[0014] 2) 取100 μ L 10mg/mL的量子点原液，超声分散；

[0015] 3) 量子点微球活化，取50 μ L分散后的量子点原液，与450 μ L 0.05M pH6.5的MES缓冲液混匀，加入3 μ L 50mg/mL的EDC混匀，加入3 μ L 75mg/mL的NHS混匀，垂直混匀15min；

[0016] 4) 重悬，将步骤3)得到的混合液10000rp离心10min，弃上清，加入500 μ L 0.05M pH7.5的MOPS重悬，超声分散；

[0017] 5) 抗体偶联：向步骤4)得到的分散液中加入50 μ g雌二醇抗体，混匀偶联0.5h；

[0018] 6) 封闭：向步骤5)得到的混合液加入10 μ L 20% v/v乙醇胺混匀后，再加入500 μ L 10wt.%牛血清白蛋白溶液，室温垂直混匀以封闭多余位点；

[0019] 7) 重悬：将步骤6)得到的混合液10000prm离心5min，加入500 μ L量子点稀释液定容到1mg/mL，超声分散，4℃保存；

[0020] 8) 稀释：将步骤7)得到的量子点-抗体稀释到0.4mg/mL，超声分散，备用；

[0021] 9) 将稀释好的量子点-抗体稀释液加入0.05%胭脂红喷到预处理的玻璃纤维素膜上，烘干，得到标记物垫；

[0022] 步骤2，向配制好的T线包被液按0.5mg/mL加入雌二醇抗原、向配制好的C线包被液按1mg/mL加入羊抗鼠抗体，分别喷至硝酸纤维素膜制备T线和C线，烘干，制得层析膜；

[0023] 步骤3，向玻璃纤维素膜滴加第二处理试剂，烘干，制得缓冲垫；

[0024] 步骤4，向棉浆纸滴加第三处理试剂，烘干，制得样品垫；

[0025] 步骤5，将样品垫、标记物垫、层析膜、缓冲垫组装，即得。

[0026] 进一步地，所述第一处理试剂是向0.05M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入5wt.%蔗糖、0.3wt.%PVP k-30、1wt.%Tween-20、0.2wt.%Proclin-300后制得。

[0027] 进一步地，所述第二处理试剂是向0.05M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入1wt.%Triton X-100、0.2wt.%Proclin-300后制得。

[0028] 进一步地，所述第三处理试剂是向0.05M pH8.5的Tris-Base缓冲溶液中加入5wt.%海藻糖、0.8wt.%Tween-20、3.2mM EDTANa₂、0.2wt.%酪蛋白后制得。

[0029] 进一步地，所述T线包被液是向0.2M pH8.0的Hepes缓冲溶液中加入2wt.%蔗糖和8wt.%甲醇后制得。

[0030] 进一步地，所述C线包被液是向0.05M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入8wt.%甲醇、2wt.%蔗糖、0.5wt.%BSA、0.1wt.%Proclin-300后制得。

[0031] 进一步地，所述量子点稀释液是向0.1M pH8.0的Tris-Base缓冲溶液中加入15wt.%蔗糖、0.5wt.%Tween-20、3wt.%BSA、1wt.%甘露醇、0.1wt.%Proclin-300后制得。

[0032] 本发明的试纸用于定量检测牛奶中雌二醇的含量,采用量子点(纳米上转荧光物质)作为示踪物质,灵敏度高特异性好,采用免疫层析的方法反向竞争法进行检测:T线包被一定浓度的雌二醇抗原,C线作为质控先线包被有羊抗鼠单抗体,偶联有雌二醇抗体的量子点通过喷金仪均匀分布在标记物垫上,当牛奶中含有雌二醇时,流经T线位置会与T线包被的抗原竞争结合标记物垫上的抗体,从而改变检测的荧光强度来进行定量检测。

[0033] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0034] 1.较传统胶体金检测试剂盒灵敏度高,稳定性好,可实现定量检测。

[0035] 2.通过一系列技术调试和优化,可实现样本不处理,直接上样检测。

[0036] 3.操作简便,结果准确,可实现大批量原料奶的快速检测筛查。

附图说明

[0037] 图1为实施例2中雌二醇的标准曲线。

[0038] 图2为实施例2中雌二醇检测浓度与实际浓度的回归曲线。

具体实施方式

[0039] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法及未说明配方的试剂均为按照本领域常规条件。

[0040] 实施例1

[0041] 检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸的制备:

[0042] 1.试剂及原辅材料

[0043] 辅材:硝酸纤维素膜(NC膜)、玻璃纤维素膜,PVC底板,棉浆纸。

[0044] NC膜:承载T/C线活材。

[0045] 缓冲垫(玻璃纤维素膜):处理试剂:0.05M pH为8.0的Tris-Base缓冲溶液+1wt.% Triton X-100+0.2wt.% Proclin-300。每10cm*30cm面积均匀添加处理试剂15mL,放置37℃烘箱24h。

[0046] 样品垫(棉浆纸):0.05M pH为8.5的Tris-Base缓冲溶液+5wt.%海藻糖+0.8wt.% Tween-20+3.2mM EDTANa₂+0.2wt.%酪蛋白,每10cm*30cm面积均匀添加处理试剂20mL,放置45℃烘箱24h。

[0047] 标记物垫(玻璃纤维素膜,与缓冲垫的玻璃纤维素膜密度不同):0.05M pH为8.0的Tris-Base缓冲溶液+5wt.%蔗糖+0.3wt.%PVP K-30+1wt.%Tween-20+0.2wt.%Proclin-300每10cm*30cm面积均匀添加处理试剂16mL,放置37℃烘箱24h。

[0048] 标记试剂:0.05M MOPS缓冲液pH=7.5;0.05M MES缓冲液pH=6.5;1-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);10wt.%牛血清白蛋白;20%v/v乙醇胺溶液。

[0049] 包被液:

[0050] T线:0.2M Hepes缓冲液pH8.0+8wt.%甲醇+2wt.%蔗糖;

[0051] C线:0.05M pH为8.0的Tris-Base缓冲溶液+8wt.%甲醇+2wt.%蔗糖+0.5wt.% BSA+0.1wt.%Proclin-300。

- [0052] 量子点-抗体稀释液:0.1M TB pH8.0+15wt.%蔗糖+0.5wt.%Tween-20+3wt.%BSA+1wt.%甘露醇+0.1wt.%Proclin-300。
- [0053] 抗体:雌二醇抗体(标记所用)。
- [0054] 2.实验方法和步骤
- [0055] 2.1配制包被液
- [0056] T线包被液:0.2M Hepes 8.0+2wt.%蔗糖+8wt.%甲醇
- [0057] C线包被液:0.05M TB 8.0+8wt.%甲醇+2wt.%蔗糖+0.5wt.%BSA+0.1wt.%P300
- [0058] 2.2膜制备,各种抗体制备1条30cm
- [0059] 1)包被液配制
- [0060] C线包被物:1mg/mL羊抗鼠抗体(浓度:3.86mg/mL)
- [0061] T线包被物:0.5mg/mL(雌二醇抗原)
- [0062] 2)划膜
- [0063] 0.8 μ L/cm喷量,37℃烘箱烘干16-24小时
- [0064] 2.3量子点标记活性材料
- [0065] 制备步骤约各需要抗体50 μ g(雌二醇抗体)
- [0066] 1)取100 μ L量子点原液(10mg/mL)超声2min,检测并记录粒径分散系数(标准粒径<400nm,分散系数<0.1);
- [0067] 2)量子点微球活化:取50 μ L检测后的量子点原液(10mg/mL)+450 μ L pH6.5的0.05M MES缓冲液混匀,加入3 μ L EDC(50mg/mL),混匀,加入3 μ L NHS(75mg/mL)混匀,垂直混匀15min。
- [0068] 3)重悬:10000rpm 5min离心,弃上清;加500 μ L 0.05M MOPS 7.5重悬,超声分散2min;检测并记录粒径分散系数(标准粒径<400nm,分散系数<0.1);
- [0069] 4)抗体偶联:加入50 μ g雌二醇抗体,混匀偶联0.5h;
- [0070] 5)封闭:加入10 μ L 20%v/v乙醇胺混匀后,加500 μ L 10wt.%牛血清白蛋白溶液,室温垂直混匀以封闭多余位点10min;
- [0071] 6)重悬:10000prm离心5min,加入500 μ L量子点稀释液定容到1mg/mL,超声分散;检测并记录粒径分散系数(标准粒径<400nm,分散系数<0.1),4度保存;
- [0072] 7)稀释:量子点-抗体稀释到0.4mg/mL,超声分散,检测并记录粒径分散系数(标准粒径<400nm,分散系数<0.1);
- [0073] 8)喷标记物垫:使用喷金仪将稀释好的量子点-抗体稀释液喷到处理后的标记物垫上。
- [0074] 加入0.05%的胭脂红;
- [0075] 浓度0.4mg/mL,喷量4 μ L/cm;
- [0076] 喷金仪相关系数,喷头位置:X=5,Y=9,Z=7;标记物垫摆放位置,喷量4 μ L/cm;
- [0077] 9)烘干:45℃烘16-24h。
- [0078] 实施例2
- [0079] 利用量子点免疫层析试纸定量检测牛奶中雌二醇
- [0080] 1、标准品的配制:称取一定量雌二醇标准物质,用二甲基甲酰胺溶液稀释至10 μ g/mL,再用空白的牛奶样本稀释,配制成浓度为10、50、100、200、500、1000ng/mL系列标准工作

液。分别进行上样,对各自的荧光值进行检测,以标准工作液各浓度为横坐标(ng/mL),检测线T和质控线C的荧光检测值的比值为纵坐标,以四参数的拟合方式,四参数标准曲线方程为: $y = (1.436 - 0.0155) / [1 + (x / 28.982)^{1.223}] + 0.0155$ 。标准曲线如图1所示。

[0081] 2、定量检测:根据不同标准品雌二醇含量不同,竞争残留在T线抗原量的不同所得到检测荧光强度的不同,使用相关检测机器将荧光信号转换为发光值数字,计算T/C值,绘制标准曲线,检测样本时,根据T/C值进行反算,从而实现对样本中的雌二醇含量进行定量检测。

[0082] 3、将大量正常牛奶样本进行混合,作为零值样本,然后将零值样本上样20份本发明的层析试纸条,记录测试值,将20个测试值的T/C求平均值X和标准偏差SD,然后以 $X - 2SD$ 代入标准曲线方程计算出的浓度即为最低检测限,经实验得知,本发明检测试纸条的灵敏度为:5ng/mL。

[0083] 4、取接近线性范围上限的高值添加样牛奶样本按一定比例稀释为7种浓度,其中低值浓度的样本须接近线性范围的下限。其浓度为1600、800、400、200、100、50、10ng/mL,按上述实验步骤进行操作,对每一浓度的样本均重复检测3次,计算其平均值,将结果平均值带入标准曲线得到检测浓度与实际浓度做线性比较,线性相关系数r为:0.9996。

实验次数	线性点浓度值(ng/mL)							
	1600	800	400	200	100	50	10	
	T/C 检测值							
[0084]	1	0.0146	0.03212	0.0645	0.153	0.263	0.514	1.153
	2	0.0137	0.03038	0.0682	0.148	0.284	0.506	1.207
	3	0.0155	0.03541	0.0703	0.152	0.257	0.482	1.015
	AV	0.0146	0.0326	0.0677	0.1510	0.2680	0.5007	1.1250
	SD	0.0009	0.0026	0.0029	0.0026	0.0142	0.0167	0.0990
	CV	6.16%	7.83%	4.34%	1.75%	5.29%	3.33%	8.80%
	检测浓度	1767.357	867.026	419.307	182.527	101.465	49.594	10.257

[0085] 5、精密性:使用浓度为100ng/mL和500ng/mL的雌二醇牛奶质控品作为样本按照上述实验步骤进行检测,各重复测定3次,用标准偏差和平均值的比值计算其T/C的CV值,CV值<12%。

质控品 理论浓度 (ng·mL ⁻¹)	T/C 检测值	CV	
		T/C 平均值	%
[0086]	0.256	0.247	4.95%
	0.232		
	0.0654	0.0620	5.34%
	0.0617		
	0.0588		

[0087] 6、准确度(回收实验)

[0088] 用新鲜正常牛奶,加入雌二醇标准工作液,配制500、100、10ng/ml高、中、低三种不同浓度的加标液,每个浓度各检测10次,做加标回收试验,结果为雌二醇的回收率85.16%

~115.38%，具体实验数据如下：

实验次数	低值质控 (10ng/ml)	中值质控(100ng/ml)	高值质控 500(ng/ml)
	检测浓度 (ng/ml)		
1	9.87	89.77	514.77
2	8.85	103.28	529.84
3	9.35	85.76	472.92
4	11.25	112.74	484.63
5	11.55	107.58	552.74
[0089]	6	9.54	110.25
	7	9.62	95.33
	8	10.72	98.53
	9	10.32	84.62
	10	10.28	114.84
	平均值	10.14±1.41	100.27±15.38
	回收率	85.5%~111.5%	85.16%~115.38%
	整体回收率		89.17%~108.14%

[0090] 由以上结果可知，采用本发明的量子点标记法，不仅标记效率高，而且简单易重复，操作便利。通过本方法制备的量子点免疫层析试纸条，在定量检测牛奶中雌二醇时具有很高的灵敏度，无非特异的产生。结果易观察，具有可靠性，可以作为快速检测的一种有效工具。

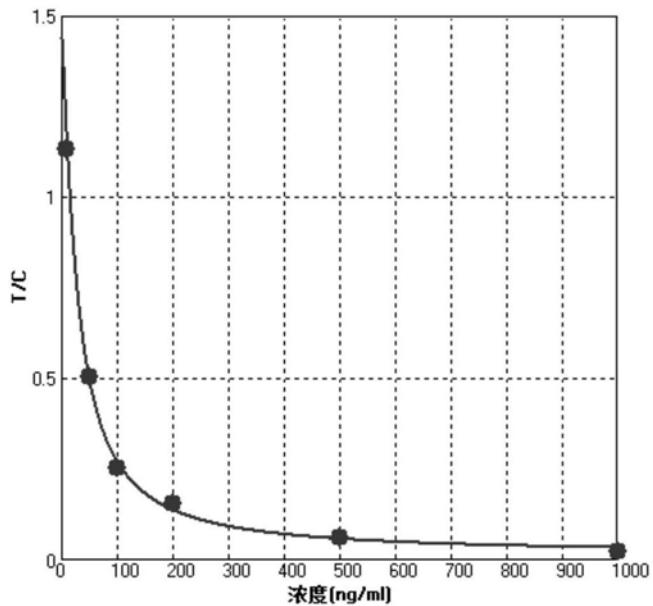


图1

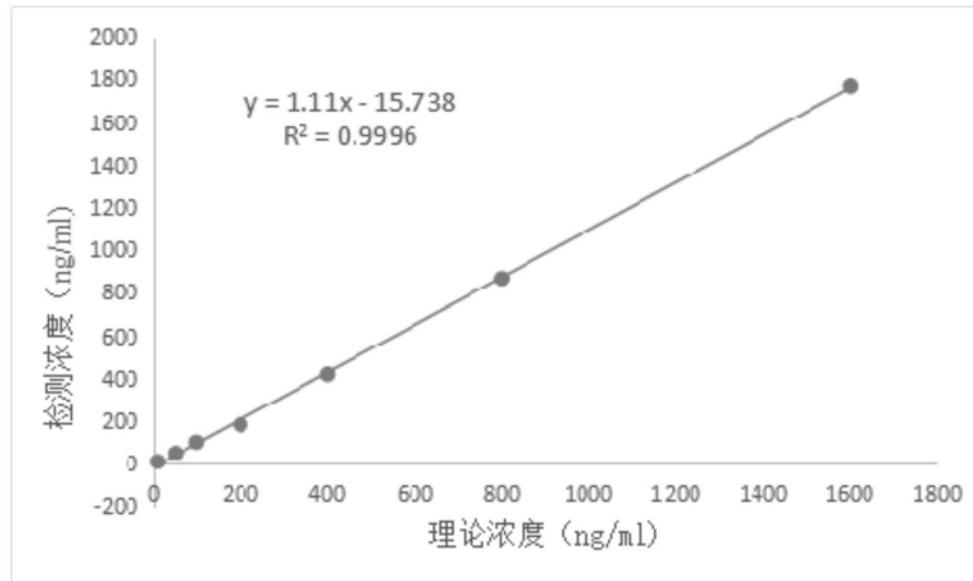


图2

专利名称(译)	一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN110749737A	公开(公告)日	2020-02-04
申请号	CN201910916230.5	申请日	2019-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	南京市产品质量监督检验院		
申请(专利权)人(译)	南京市产品质量监督检验院		
当前申请(专利权)人(译)	南京市产品质量监督检验院		
[标]发明人	肖有玉 卢菲		
发明人	肖有玉 卢菲		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/74		
代理人(译)	黄欣		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测牛奶中雌二醇的量子点免疫层析试纸，该试纸由样品垫、标记物垫、层析膜、缓冲垫相互重叠1-2mm依次粘贴在PVC底板上制得，所述层析膜为承载有检测线和质控线的硝酸纤维素膜，所述检测线包被有雌二醇抗原、质控线包被有羊抗鼠抗体；所述标记物垫上承载有偶联有雌二醇抗体的量子点。当牛奶中含有雌二醇时，流经T线位置会与T线包被的抗原竞争结合标记物垫上的抗体，从而改变检测的荧光强度来进行定量检测。

