



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687279 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201910959017.2

D01D 1/02(2006.01)

(22)申请日 2019.10.10

C08J 9/28(2006.01)

(71)申请人 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

C08J 9/26(2006.01)

C08F 220/06(2006.01)

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号

(72)发明人 余永新 洪思慧 王淼 曹振
何亚荟 王静

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 11467

代理人 高琦

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

D01D 5/00(2006.01)

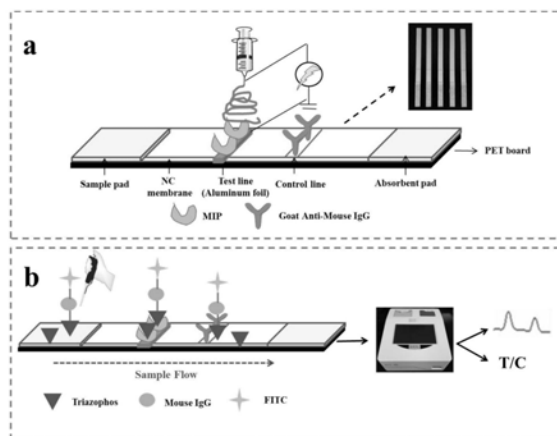
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法

(57)摘要

本发明涉及一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法,结合静电纺丝、分子印迹及免疫层析试纸检测技术,用静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线(检测限),羊抗小鼠IgG作为C线(质控线),通过三唑磷半抗原偶联小鼠IgG偶联异硫氰酸荧光素(THBu-IgG-FITC)荧光探针与目标物三唑磷直接竞争分子印迹结合位点而产生的荧光变化,建立三唑磷分子印迹静电纺丝层析荧光检测技术。本发明提供的三唑磷吸附功能材料具有较高的选择性,采用虚拟模板可解决模板渗漏问题,可以代替生物抗体应用于免疫层析技术当中;该吸附功能材料具有较高的稳定性、较长的使用寿命和较强的抗恶劣环境的能力,克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点。



1. 一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法,其特征在于,包括以下步骤:

层析试纸条的组建:首先,用样品垫处理液(0.5%吐温-0.02M pH 7.2PB缓冲液)对样品垫进行处理,然后干燥切条;接着,用划膜仪将二抗(羊抗小鼠IgG)以 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ 的流速划在NC膜上,37℃下干燥;随后对试纸条进行组装:因为T线需使用静电纺丝喷丝在铝箔上(NC膜不导电),在C线下方5mm处将NC膜裁断,剪裁1mm宽的铝箔放置在裁断处,将上下两条NC膜及中间的铝箔粘贴在黑色荧光专用背板上,T线与C线间距5mm,然后在NC膜上下两侧依次粘贴吸水垫和样品垫,两垫与NC膜间均各覆盖1mm;

静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线:

(1) 静电纺丝溶液的配制,首先配制CA电纺基质溶液:称取一定量的CA粉末,加入到丙酮中配置成120mg/ml的CA-丙酮溶液,在50℃水浴下震荡溶解5h,直到CA彻底溶解;然后配制三唑酮分子印迹分散液:称取一定量的MIPs聚合物,加入到丙酮中配置成20mg/ml的MIPs分散液,常温下超声分散50min,直至MIPs聚合物彻底均匀分散在丙酮里;最后将CA电纺基质溶液与MIPs分散液混合:取1ml 120mg/ml的CA溶液,加入111 μL 20mg/ml的MIPs溶液,再加入7 μL 10%的吐温溶液,在50℃水浴中震荡120min,常温超声分散30min,得到均匀的三唑酮分子印迹静电纺丝液;

(2) 静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线:采用实验室自制静电纺丝装置,包括自动微流泵、5ml注射器、高度调节架、喷针(22G)、接收板和高压电源,纺丝开始前,检查接地是否良好,记录温湿度,将配制好的分子印迹静电纺丝液吸入注射器中,喷针头与接收板间的接收距离调节至13cm,微流泵流速为 $12\mu\text{L}/\text{min}$,高压电压为12.0kV,待出丝稳定后,用负极夹住组装好的试纸条T线铝箔的一端,放在接收板上(保证每次放置位置一致),计时20min后取下,此时T线上便均匀的覆盖上分子印迹纳米纤维,而试纸条其他部位由于不导电而不会被覆盖,将纺好的试纸条放入烘箱中,37℃下干燥,随后用切条机切条,宽度为3.5mm,置于干燥器中室温保存,此时分子印迹试纸条便制备完成。

一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,具体而言,涉及一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法。

背景技术

[0002] 三唑磷(Triazophos)是一种中毒、广谱有机磷杀虫剂,在谷物、水果和蔬菜上广泛使用。由于三唑磷化学稳定性好、半衰期长,使其在环境中极易残留,对环境和人类健康造成潜在危害。自2016年12月31日,我国明令禁止在蔬菜上使用三唑磷。目前三唑磷的检测技术主要有确证技术和免疫分析技术,但这些方法通常存在仪器昂贵、分析时间长、抗体制备困难等诸多缺陷。因此,设计合成具有特异性强、稳定性好、制备成本低的仿生识别材料,建立灵敏、简单、快速、稳定、廉价的检测方法具有重要的现实意义。

[0003] 免疫层析试纸检测技术是一种将单克隆抗体技术、免疫标记技术及免疫层析技术等多种方法结合起来的固相标记免疫检测技术,应用于抗原、抗体和半抗原的定性、半定量和定量检测。其使用方便、快速、特异强、成本低、制作简单,不需要专业人员和大型昂贵仪器,成为最常用的免疫分析方法之一。但通常的免疫层析需要使用抗体,而抗体的使用存在成本高、储存条件高、需要牺牲动物等不足。分子印迹替代抗体有望克服这些缺点;截止目前,关于分子印迹仿生免疫层析技术只有谢蓉建立的莠去津竞争性金标试纸条。该方法存在分子印迹微球粒径较大可能会导致层析效果不好从而影响实验灵敏度的缺点,另外由于缺乏分子印迹对应的抗体,该方法采用两个试纸条来分别达到检测和质控的目的,容易产生误差而导致结果准确度下降。

[0004] 为克服以上缺点,本发明拟采用新的分子印迹仿生免疫层析模式,将分子印迹直接附着在NC膜(硝酸纤维素膜)上,但若直接通过划线法将分子印迹固定到NC膜上,一是不容易固定,分子印迹会随溶液层析;二是分子印迹上的特异性结合位点不容易暴露出来,从而导致实验灵敏度下降。为解决这一问题,我们拟在NC膜上利用静电纺丝技术制备分子印迹纳米纤维膜,既能很好的固定住分子印迹,又能将分子印迹的结合位点充分暴露出来,增加分子印迹与目标物的接触面积,提高传质速率。

[0005] 静电纺丝技术是一种独特的纤维制造工艺,利用静电力从聚合物溶液或熔体中生产细纤维,由此生产的纤维具有比传统纺纱工艺更细的直径(从微米到纳米)及更大的表面积。在静电纺丝过程中,在毛细管末端由表面张力保持的聚合物溶液受到电场的作用,并由该电场在液体表面上感应出电荷,当施加的电场达到临界值时,排斥电力克服表面张力,溶液的带电射流从泰勒锥的尖端喷出,并且在毛细管尖端和收集器之间的空间中发生不稳定的快速喷射,此过程中溶剂蒸发,并最终在收集器上固化成纤维。与常规纤维相比,静电纺丝纤维比表面积大、孔隙率高、物理机械性能强,已广泛应用于组织工程支架、药物输送、过滤、医疗保健、生物技术、环境工程、防御和安全等领域。

[0006] 静电纺丝技术与分子印迹技术的结合,既赋予了静电纺丝纤维膜特异性吸附能力,又增大了分子印迹聚合物的比表面积,提高吸附容量和传质速率。近几年来,应用静电

纺丝技术制备分子印迹膜受到了广泛关注。目前,用静电纺丝法制备分子印迹纤维膜的方法主要有包埋法和直接电纺法。本发明采用包埋法,即用沉淀法制备分子印迹微球,然后直接混入电纺液中制备分子印迹纳米纤维。截止目前,尚未有将静电纺丝技术与免疫层析技术联用的报道。

[0007] 本发明结合静电纺丝、分子印迹及免疫层析试纸检测技术,用静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线(检测限),羊抗小鼠IgG作为C线(质控线),通过三唑磷半抗原偶联小鼠IgG偶联异硫氰酸荧光素(THBu-IgG-FITC)荧光探针与目标物三唑磷直接竞争分子印迹结合位点而产生的荧光变化,建立三唑磷分子印迹静电纺丝层析荧光检测技术,实现对三唑磷残留检测。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服传统的三唑磷检测方法存在检测时间长、仪器价格昂贵、特异性抗体难制备等缺陷,提供一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法和一种基于静电纺丝制膜技术的三唑磷分子印迹层析检测方法。

[0009] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0010] 一种基于静电纺丝制膜技术的三唑磷分子印迹层析检测方法,包括以下步骤:

[0011] 1.半抗原的合成:

[0012] (1) O-乙基硫代磷酰二氯(TZM-1)的合成:称取三氯硫磷(PSCl_3) 68g(约0.4mol)置于带有低温温度计的三口烧瓶中,以冰盐水浴将其冷却至 $-10\sim-5^\circ\text{C}$,在剧烈搅拌下滴加入无水乙醇55g(约1.2mol),严格控制滴加速度,使反应液温度始终不大于 0°C 。滴加完毕后在 10°C 下继续反应2h。反应完毕,以 $(0\pm 5)^\circ\text{C}$ 蒸馏水洗涤反应液($100\text{ml}\times 2$),分出油层并以无水 Na_2SO_4 干燥,再经水泵减压蒸馏,收集 $65\sim 75^\circ\text{C}$ 馏分,得到51.8g无色透明油状液体(收率72.3%,以三氯硫磷计);

[0013] (2) O-乙基-O-[3-(1-苯基-1,2,4-三唑基)硫代磷酰一氯(TZM-2)的合成:称取TZM-136g(约0.2mol)置于250ml三口烧瓶中,搅拌下加入约16g(约0.1mol) 1-苯基-1,2,4-三唑醇,再加入15ml TEA和80ml DCM。待固体全部溶解后,用冰水浴将该溶液降温至 20°C 以下,加入微量催化剂并逐滴加入55ml 2mol/L的NaOH水溶液,继续反应1h。反应完毕后,加入50ml 5%NaOH冰水溶液,振荡后分出水层,油层以冰水洗涤至中性,再经无水 Na_2SO_4 干燥,减压浓缩,得少量棕色油状物,该油状物用石油醚萃取($50\text{ml}\times 2$),提取液再减压浓缩,得10.6g黄色液体(收率35%,以三唑醇计);

[0014] (3) 三唑磷半抗原的合成:称取1.03g(约10mmol) 4-氨基丁酸,溶解于10ml NaOH溶液(1mol/L)中,冰水浴冷却至 $0\sim 10^\circ\text{C}$,搅拌下缓慢加入1.51g(约5mmol)溶解于10ml二氧六环的TZM-2,加入微量催化剂,再滴加入10ml NaOH水溶液(1mol/L)。升温至 $15\sim 25^\circ\text{C}$,反应4h。反应完毕后,加入50ml水,再用石油醚洗涤反应混合物($40\text{ml}\times 2$),弃石油醚层,以2mol/L HCL调节水相pH约为3,再以乙酸乙酯萃取($40\text{ml}\times 2$),提取液用少量水洗涤后经无水 Na_2SO_4 干燥,减压浓缩,残余物于 4°C 密封存放过夜,有无色晶体析出。以乙酸乙酯-石油醚重结晶,过滤,干燥,得0.52g白色固体(THBu,收率27%,以中间体TZM-2计)。

[0015] 2.THBu-IgG-FITC荧光探针的制备:

[0016] (1) 称取9.43mg的三唑磷半抗原(0.025mmol)溶于0.5ml DMF中;

- [0017] (2) 称取8.63mg的NHS (0.075mmol) 加入到步骤1所配溶液中, 室温搅拌反应15min;
- [0018] (3) 称取7.73mg的DCC (0.0375mmol) 溶于0.5ml DMF中, 逐滴加入到步骤2所配溶液中, 室温搅拌反应过夜, 离心 (4000rpm/min) 10min;
- [0019] (4) 吸取步骤3中的上清液200 μ L缓慢滴加到1ml溶有10mg小鼠IgG的CBS溶液 (0.01mol/L) 中, 20 $^{\circ}$ C下搅拌反应4h;
- [0020] (5) 称取2.95mg FITC溶于2.95ml CBS (0.05mol/L, pH=9.6) 中, 避光逐滴将该溶液加入到步骤4反应液中, 随后4 $^{\circ}$ C下避光缓慢搅拌反应8h;
- [0021] (6) 将合成的THBu-IgG-FITC荧光探针置于0.01mol/L PBS (pH=7.4) 溶液中, 4 $^{\circ}$ C下透析至透析液清亮, 并于4 $^{\circ}$ C下保存。荧光探针不宜放置过长时间, 应尽快使用。
- [0022] 3. 分子印迹微球的制备: 称取29.4mg (0.1mmol) 三唑酮 (模板) 于100ml圆底烧瓶中, 加入20ml乙腈 (制孔剂) 溶解模板, 然后加入51 μ L (0.6mmol) MAA (功能单体), 室温震荡预聚合30min。随后加入319.3 μ L (1.0mmol) TRIM (交联剂) 和30mg AIBN (引发剂), 充氮2min后立即封口, 60 $^{\circ}$ C水浴中聚合反应24h。聚合完成后, 取出聚合物, 离心除去上清液, 再加入甲醇充分分散后离心, 以除去未反应的溶液, 滤纸包裹后放入索式抽提器中, 用甲醇: 乙酸 (9: 1, v/v) 溶液洗脱模板。
- [0023] 4. 层析试纸条的组建: 首先, 用样品垫处理液 (0.5%吐温-0.02M pH 7.2PB缓冲液) 对样品垫进行处理, 然后干燥切条; 接着, 用划膜仪将二抗 (羊抗小鼠IgG) 以1 μ L/cm的流速划在NC膜上, 37 $^{\circ}$ C下干燥; 随后对试纸条进行组装: 因为T线需使用静电纺丝喷丝在铝箔上 (NC膜不导电), 在C线下方5mm处将NC膜裁断, 剪裁1mm宽的铝箔放置在裁断处, 将上下两条NC膜及中间的铝箔粘贴在黑色荧光专用背板上, T线与C线间距5mm, 然后在NC膜上下两侧依次粘贴吸水垫和样品垫, 两垫与NC膜间均各覆盖1mm, 组装好的试纸条见图1 (a)。
- [0024] 5. 静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线:
- [0025] (1) 静电纺丝溶液的配制。首先配制CA电纺基质溶液: 称取一定量的CA粉末, 加入到丙酮中配置成120mg/ml的CA-丙酮溶液, 在50 $^{\circ}$ C水浴下震荡溶解5h, 直到CA彻底溶解; 然后配制三唑酮分子印迹分散液: 称取一定量的MIPs聚合物, 加入到丙酮中配置成20mg/ml的MIPs分散液, 常温下超声分散50min, 直至MIPs聚合物彻底均匀分散在丙酮里; 最后将CA电纺基质溶液与MIPs分散液混合: 取1ml 120mg/ml的CA溶液, 加入111 μ L 20mg/ml的MIPs溶液, 再加入7 μ L 10%的吐温溶液, 在50 $^{\circ}$ C水浴中震荡120min, 常温超声分散30min, 得到均匀的二唑酮分子印迹静电纺丝液;
- [0026] (2) 静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线: 采用实验室自制静电纺丝装置, 包括自动微流泵、5ml注射器、高度调节架、喷针 (22G)、接收板和高压电源。纺丝开始前, 检查接地是否良好, 记录温湿度, 将配制好的分子印迹静电纺丝液吸入注射器中, 喷针头与接收板间的接收距离调节至13cm, 微流泵流速为12 μ L/min, 高压电压为12.0kV。待出丝稳定后, 用负极夹住组装好的试纸条T线铝箔的一端, 放在接收板上 (保证每次放置位置一致), 计时20min后取下, 此时T线上便均匀的覆盖上分子印迹纳米纤维, 而试纸条其他部位由于不导电而不会被覆盖。将纺好的试纸条放入烘箱中, 37 $^{\circ}$ C下干燥, 随后用切条机切条, 宽度为3.5mm, 置于干燥器中室温保存, 此时分子印迹试纸条便制备完成。
- [0027] 6. 实验原理: 在NC膜上分别用静电纺丝法将分子印迹作为人工抗体固定在NC膜上作为T线, 用划膜法将二抗固定作为C线。如图1 (b), 当在样品垫上滴加目标物和THBu-IgG-

FITC荧光探针时,溶液通过毛细作用在NC膜上进行移动。其中,目标物三唑磷和THBu-IgG-FITC探针上的三唑磷半抗原均可与T线上的分子印迹相结合,同时探针中的IgG可与C线上的二抗结合。当二者移动到达T线时,目标物与荧光探针竞争结合分子印迹上的特异性结合位点,导致T线上的荧光强度与目标物的浓度成反比,而剩余的目标物与探针继续向前移动,至C线时探针上的IgG与二抗结合而达到质控作用。最后用荧光免疫分析仪(激发波长:450~470nm,接收波长:525nm)读取C、T线的荧光值,根据T线的荧光强弱及T/C值进行定性定量检测。

[0028] 7.实验流程:

[0029] (1) 试纸条的制备:按照步骤4)和步骤5)组装分子印迹试纸条,用封闭液(0.25% PVP+0.25% BSA+5% 蔗糖)封闭后37℃下干燥,置于干燥器中室温保存;

[0030] (2) 竞争反应:在试纸条的样品孔中先滴加100μL稀释10倍的THBu-IgG-FITC荧光探针(用0.01M PBS稀释)进行层析,3min后取出放入37℃烘箱中干燥15min,再加入100μL三唑磷标液或样品提取液进行层析,3min后进行荧光检测;

[0031] (3) 检测:用单通道荧光免疫分析仪读取T/C值,通过标准曲线计算三唑磷含量。

[0032] 本发明的优点和积极效果是:

[0033] 1.本发明提供的三唑磷吸附功能材料具有较高的选择性,采用虚拟模板可解决模板渗漏问题,可以代替生物抗体应用于免疫层析技术当中;该吸附功能材料由化学方法制备,具有较高的稳定性、较长的使用寿命和较强的抗恶劣环境的能力,克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点。

[0034] 2.本发明利用静电纺丝制膜技术合成了纳米纤维与分子印迹微球杂化的复合纳米膜,制备了三唑磷半抗原-IgG-FITC荧光探针,结合静电纺丝、分子印迹及免疫层析试纸检测技术,初步研制了特异性识别三唑磷农药的纳米膜层析试纸条,建立了对三唑磷农药快速响应的检测新方法,最终制备的试纸条对三唑磷在20~500μg/L范围内成线性相关性($y = -0.2638x + 0.8695$, $R^2 = 0.954$),检出限为20μg/L,检测时间仅为30min。本方法具备快速、简单、便携、适用于现场快速检测等优点,有望在今后利用该方法实现实际样品中三唑磷残留的定性定量检测。且本发明首次利用静电纺丝技术制备了分子印迹免疫层析反应纳米膜,提高了T线的稳定性和识别性能,为基于新型仿生识别材料的免疫层析试纸技术提供了新的思路。

附图说明

[0035] 图1为分子印迹静电纺丝试纸条结构图(a);直接竞争荧光检测流程图(b);

[0036] 图2为三唑磷试纸条标准曲线图。

具体实施方式

[0037] 为了使本领域的技术人员可以更好地理解本发明,下面结合附图和实施例对本发明技术方案进一步说明。

[0038] 1.半抗原的合成:

[0039] (1) O-乙基硫代磷酰二氯(TZM-1)的合成:称取三氯硫磷(PSCl_3) 68g(约0.4mol)置于带有低温温度计的三口烧瓶中,以冰盐水浴将其冷却至-10~-5℃,在剧烈搅拌下滴加入

无水乙醇55g (约1.2mol), 严格控制滴加速度, 使反应液温度始终不大于0℃。滴加完毕后在10℃下继续反应2h。反应完毕, 以(0±5)℃蒸馏水洗涤反应液(100ml×2), 分出油层并以无水Na₂SO₄干燥, 再经水泵减压蒸馏, 收集65~75℃馏分, 得到51.8g无色透明油状液体(收率72.3%, 以三氯硫磷计);

[0040] (2) 0-乙基-0-[3-(1-苯基-1,2,4-三唑基)硫代磷酰一氯(TZM-2)的合成: 称取TZM-136g (约0.2mol) 置于250ml三口烧瓶中, 搅拌下加入约16g (约0.1mol) 1-苯基-1,2,4-三唑醇, 再加入15ml TEA和80ml DCM。待固体全部溶解后, 用冰水浴将该溶液降温至20℃以下, 加入微量催化剂并逐滴加入55ml 2mol/L的NaOH水溶液, 继续反应1h。反应完毕后, 加入50ml 5%NaOH冰水溶液, 振荡后分出水层, 油层以冰水洗涤至中性, 再经无水Na₂SO₄干燥, 减压浓缩, 得少量棕色油状物, 该油状物用石油醚萃取(50ml×2), 提取液再减压浓缩, 得10.6g黄色液体(收率35%, 以三唑醇计);

[0041] (3) 三唑磷半抗原的合成: 称取1.03g (约10mmol) 4-氨基丁酸, 溶解于10ml NaOH溶液(1mol/L)中, 冰水浴冷却至0~10℃, 搅拌下缓慢加入1.51g (约5mmol) 溶解于10ml 二氧六环的TZM-2, 加入微量催化剂, 再滴加入10ml NaOH水溶液(1mol/L)。升温至15~25℃, 反应4h。反应完毕后, 加入50ml水, 再用石油醚洗涤反应混合物(40ml×2), 弃石油醚层, 以2mol/L HCL调节水相pH约为3, 再以乙酸乙酯萃取(40ml×2), 提取液用少量水洗涤后经无水Na₂SO₄干燥, 减压浓缩, 残余物于4℃密封存放过夜, 有无色晶体析出。以乙酸乙酯-石油醚重结晶, 过滤, 干燥, 得0.52g白色固体(THBu, 收率27%, 以中间体TZM-2计)。

[0042] 2. THBu-IgG-FITC荧光探针的制备:

[0043] (1) 称取9.43mg的三唑磷半抗原(0.025mmol)溶于0.5ml DMF中;

[0044] (2) 称取8.63mg的NHS(0.075mmol)加入到步骤1所配溶液中, 室温搅拌反应15min;

[0045] (3) 称取7.73mg的DCC(0.0375mmol)溶于0.5ml DMF中, 逐滴加入到步骤2所配溶液中, 室温搅拌反应过夜, 离心(4000rpm/min) 10min;

[0046] (4) 吸取步骤3中的上清液200μL缓慢滴加到1ml溶有10mg小鼠IgG的CBS溶液(0.01mol/L)中, 20℃下搅拌反应4h;

[0047] (5) 称取2.95mg FITC溶于2.95ml CBS(0.05mol/L, pH=9.6)中, 避光逐滴将该溶液加入到步骤4反应液中, 随后4℃下避光缓慢搅拌反应8h;

[0048] (6) 将合成的THBu-IgG-FITC荧光探针置于0.01mol/L PBS(pH=7.4)溶液中, 4℃下透析至透析液清亮, 并于4℃下保存。荧光探针不宜放置过长时间, 应尽快使用。

[0049] 3. 分子印迹微球的制备: 称取29.4mg(0.1mmol) 三唑酮(模板)于100ml圆底烧瓶中, 加入20ml乙腈(制孔剂)溶解模板, 然后加入51μL(0.6mmol) MAA(功能单体), 室温震荡预聚合30min。随后加入319.3μL(1.0mmol) TRIM(交联剂)和30mg AIBN(引发剂), 充氮2min后立即封口, 60℃水浴中聚合反应24h。聚合完成后, 取出聚合物, 离心除去上清液, 再加入甲醇充分分散后离心, 以除去未反应的溶液, 滤纸包裹后放入索式抽提器中, 用甲醇:乙酸(9:1, v/v)溶液洗脱模板。

[0050] 4. 层析试纸条的组建: 首先, 用样品垫处理液(0.5%吐温-0.02M pH 7.2PB缓冲液)对样品垫进行处理, 然后干燥切条; 接着, 用划膜仪将二抗(羊抗小鼠IgG)以1μL/cm的流速划在NC膜上, 37℃下干燥; 随后对试纸条进行组装: 因为T线需使用静电纺丝喷丝在铝箔上(NC膜不导电), 在C线下方5mm处将NC膜裁断, 剪裁1mm宽的铝箔放置在裁断处, 将上下两

条NC膜及中间的铝箔粘贴在黑色荧光专用背板上,T线与C线间距5mm,然后在NC膜上下两侧依次粘贴吸水垫和样品垫,两垫与NC膜间均各覆盖1mm,组装好的试纸条见图1(a)。

[0051] 5.静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线:

[0052] (1)静电纺丝溶液的配制。首先配制CA电纺基质溶液:称取一定量的CA粉末,加入到丙酮中配置成120mg/ml的CA-丙酮溶液,在50℃水浴下震荡溶解5h,直到CA彻底溶解;然后配制三唑酮分子印迹分散液:称取一定量的MIPs聚合物,加入到丙酮中配置成20mg/ml的MIPs分散液,常温下超声分散50min,直至MIPs聚合物彻底均匀分散在丙酮里;最后将CA电纺基质溶液与MIPs分散液混合:取1ml 120mg/ml的CA溶液,加入111μL 20mg/ml的MIPs溶液,再加入7μL 10%的吐温溶液,在50℃水浴中震荡120min,常温超声分散30min,得到均匀的三唑酮分子印迹静电纺丝液;

[0053] (2)静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线:采用实验室自制静电纺丝装置,包括自动微流泵、5ml注射器、高度调节架、喷针(22G)、接收板和高压电源。纺丝开始前,检查接地是否良好,记录温湿度,将配制好的分子印迹静电纺丝液吸入注射器中,喷针头与接收板间的接收距离调节至13cm,微流泵流速为12μL/min,高压电压为12.0kV。待出丝稳定后,用负极夹住组装好的试纸条T线铝箔的一端,放在接收板上(保证每次放置位置一致),计时20min后取下,此时T线上便均匀的覆盖上分子印迹纳米纤维,而试纸条其他部位由于不导电而不会被覆盖。将纺好的试纸条放入烘箱中,37℃下干燥,随后用切条机切条,宽度为3.5mm,置于干燥器中室温保存,此时分子印迹试纸条便制备完成。

[0054] 6.实验原理:在NC膜上分别用静电纺丝法将分子印迹作为人工抗体固定在NC膜上作为T线,用划膜法将二抗固定作为C线。如图1(b),当在样品垫上滴加目标物和THBu-IgG-FITC荧光探针时,溶液通过毛细作用在NC膜上进行移动。其中,目标物三唑磷和THBu-IgG-FITC探针上的三唑磷半抗原均可与T线上的分子印迹相结合,同时探针中的IgG可与C线上的二抗结合。当二者移动到达T线时,目标物与荧光探针竞争结合分子印迹上的特异性结合位点,导致T线上的荧光强度与目标物的浓度成反比,而剩余的目标物与探针继续向前移动,至C线时探针上的IgG与二抗结合而达到质控作用。最后用荧光免疫分析仪(激发波长:450~470nm,接收波长:525nm)读取C、T线的荧光值,根据T线的荧光强弱及T/C值进行定性定量检测。

[0055] 7.实验流程:

[0056] (1)试纸条的制备:按照步骤4和步骤5组装分子印迹试纸条,用封闭液(0.25%PVP+0.25%BSA+5%蔗糖)封闭后37℃下干燥,置于干燥器中室温保存;

[0057] (2)竞争反应:在试纸条的样品孔中先滴加100μL稀释10倍的THBu-IgG-FITC荧光探针(用0.01M PBS稀释)进行层析,3min后取出放入37℃烘箱中干燥15min,再加入100μL三唑磷标液或样品提取液进行层析,3min后进行荧光检测;

[0058] (3)检测:用单通道荧光免疫分析仪读取T/C值,通过标准曲线计算三唑磷含量。由图2可知,该分析方法对三唑磷的最低检出限为20μg/L,满足检测需要。

[0059] 以上所述实施例仅表达了本发明的优选实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形、改进及替代,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

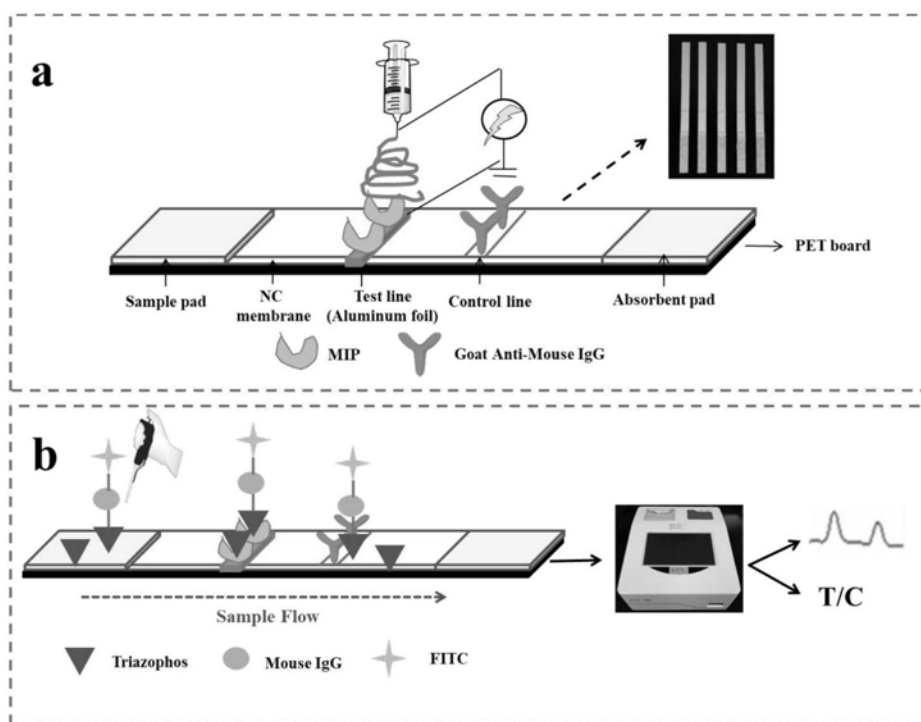


图1

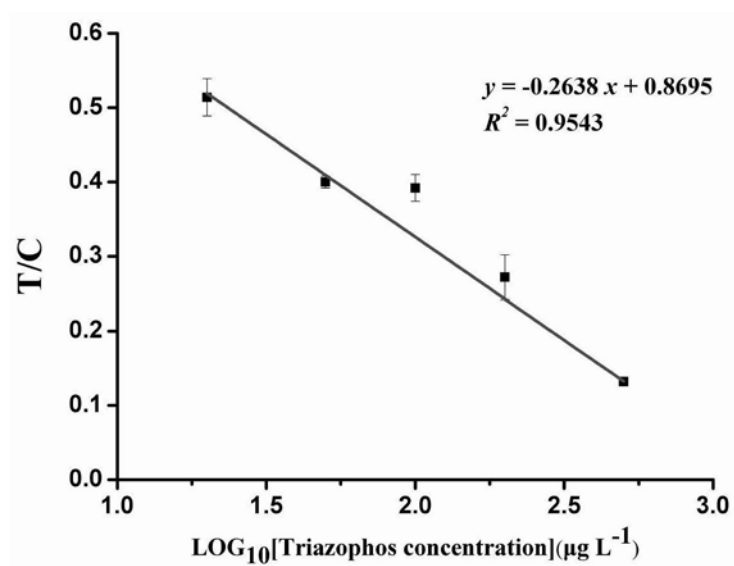


图2

专利名称(译)	一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法		
公开(公告)号	CN110687279A	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910959017.2	申请日	2019-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	余永新 洪思慧 王淼 曹振 何亚荟 王静		
发明人	余永新 洪思慧 王淼 曹振 何亚荟 王静		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 D01D5/00 D01D1/02 C08J9/28 C08J9/26 C08F220/06		
CPC分类号	C08F220/06 C08J9/26 C08J9/286 C08J2201/0422 C08J2333/02 D01D1/02 D01D5/003 D01D5/0069 D01D5/0076 D01D5/0092 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	高琦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种三唑磷分子印迹静电纺丝层析试纸条的组建方法，结合静电纺丝、分子印迹及免疫层析试纸检测技术，用静电纺丝法在NC膜上制备分子印迹T线(检测限)，羊抗小鼠IgG作为C线(质控线)，通过三唑磷半抗原偶联小鼠IgG偶联异硫氰酸荧光素(THBu-IgG-FITC)荧光探针与目标物三唑磷直接竞争分子印迹结合位点而产生的荧光变化，建立三唑磷分子印迹静电纺丝层析荧光检测技术。本发明提供的三唑磷吸附功能材料具有较高的选择性，采用虚拟模板可解决模板渗漏问题，可以代替生物抗体应用于免疫层析技术当中；该吸附功能材料具有较高的稳定性、较长的使用寿命和较强的抗恶劣环境的能力，克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点。

