



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109085336 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 201810992495.9

(22) 申请日 2018.08.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109085336 A

(43) 申请公布日 2018.12.25

(73) 专利权人 郑州工程技术学院
地址 450000 河南省郑州市惠济区英才街18号

(72) 发明人 职爱民 贾国超 高松 赵国欣
孙勇 谢光辉 李小静 丁勇

(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 徐文婷

(51) Int.Cl.
G01N 33/533 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102520179 A, 2012.06.27
WO 2008018716 A1, 2008.02.14
WO 2008141351 A1, 2008.11.27
CN 101661043 A, 2010.03.03
CN 104140084 A, 2014.11.12
CN 106153929 A, 2016.11.23
CN 106771213 A, 2017.05.31

CN 105431436 A, 2016.03.23
CN 101333436 A, 2008.12.31
CN 101907556 A, 2010.12.08
US 2010012899 A1, 2010.01.21
CN 101913611 A, 2010.12.15
JP 2012240983 A, 2012.12.10
CN 106833629 A, 2017.06.13
CN 107583600 A, 2018.01.16
CN 107915770 A, 2018.04.17
CN 103484111 A, 2014.01.01
CN 104031642 A, 2014.09.10
陈志燕等. 氮掺杂碳量子点荧光猝灭法检测水中Hg²⁺.《分析科学学报》.2018,第34卷(第2期),摘要,第214页第2段,第215页1.2.1.
De-Wen Zhang等.Photoelectrochemical response of carbon dots (CDs) derived from chitosan and their use in electrochemical imaging.《Mater. Horiz.》.2018,第5卷第426页左栏第1段.
Yunhua Yang等.One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan.《Chem. Commun.》.2011,第48卷全文.

审查员 张婷

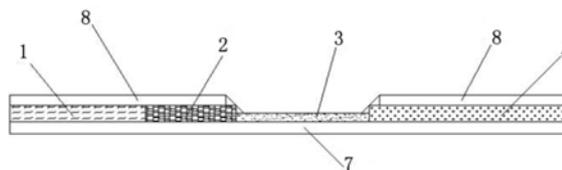
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称
一种检测伏马菌素B1的免疫层析试纸

(57) 摘要

本发明公开了一种检测伏马菌素B1的免疫层析试纸,该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样品垫、结合垫、层析膜及吸收垫,所述的结合垫上吸附有纳米材料标记的抗FB1单克隆抗体;所述的层析膜上设有用FB1人工抗原溶液印制的隐形检测印迹和用羊抗或兔抗小鼠IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹;所述的纳米材料为氮掺杂碳纳米材料、碳纳米材料、碳量子点荧光纳米颗粒。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、携带方便及可定量的特点。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。



CN 109085336 B

[接上页]

(72) 发明人 王岚 郭林 李靖靖

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件

陈建玲等. 伏马毒素B1时间分辨免疫荧光检测试剂盒的研制.《癌变 畸变 突变》.2013,第25卷(第1期),全文.

李滋. 稀土铈配合物掺杂的功能化二氧化硅微球的制备与表征.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程技术I辑》.2013,全文.

F.DiNardo等.A fluorescent immunochromatographic strip test using

Quantum Dots for fumonisins detection.

《Talanta》.2015,第150卷全文.

孙靖等. 掺杂碳量子点的二氧化硅纳米管的合成与表征.《中国科技论文》.2016,第11卷(第6期),全文.

石道飞等. 碳量子点的特性与合成方法.《广东化工》.2017,第44卷(第12期),全文.

Xiaojuan Gong等.Facile synthesis of nitrogen-doped carbon dots for Fe³⁺ sensing and cellular imaging.《Analytica Chimica Acta》.2014,第861卷全文.

Weijian Liu等.Carbon dots surface engineering and applications.《J. Mater. Chem. B》.2016,第4卷全文.

1. 一种检测伏马菌素B1的免疫层析试纸,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样品垫(1)、结合垫(2)、层析膜(3)及吸收垫(4),其特征在于,所述的结合垫上吸附有纳米材料标记的抗伏马菌素B1单克隆抗体;所述的层析膜上设有用伏马菌素B1人工抗原溶液印制的隐形检测印迹(5)和用羊抗或兔抗小鼠IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹(6);所述的纳米材料为氮掺杂碳纳米材料;

所述的氮掺杂碳纳米材料标记的抗伏马菌素B1单克隆抗体的制备方法为:

(1) 表面羧基化SiO₂纳米颗粒的制备

采用反相微乳法合成SiO₂纳米颗粒:按体积比10:30:10:1比例取Triton X-100、环己烷、正己醇、超纯水搅拌形成5.1 mL微乳液,加入200 μL氨水搅匀后,再加入80 μL正硅酸乙酯,室温避光反应24 h;反应结束后6000 rpm离心10 min,乙醇洗涤4次后用1 mL乙醇复溶,形成溶液A;将0.47 g氯乙酸加入到2.5 mL浓度为6 mol/L的NaOH溶液中,形成溶液B;将溶液A加入到溶液B中,室温搅拌反应70 min;反应结束后,6000 rpm离心10 min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

(2) 氮掺杂碳纳米材料SiO₂荧光探针的制备

将2 mg表面羧基化的SiO₂纳米颗粒和2 mg N,N'-羰基二咪唑加入到400 μL N,N-二甲基甲酰胺中,室温下磁力搅拌反应3 h;将其加入到1 mL浓度为1 mg/mL氮掺杂碳纳米材料溶液中,其中氮掺杂碳纳米材料溶解在0.1mol/L NaOH溶液中,15 min加完,室温避光搅拌反应4 h后;再次加入20 μL正硅酸乙酯,0.12 g氯乙酸,0.25 mg 氮掺杂碳纳米材料颗粒,室温避光搅拌反应2 h进行包壳,反复包壳3次,氮吹干燥,4℃密封保存;

(3) 伏马菌素B1单克隆抗体的标记

取步骤(2)制备的荧光探针15 mg溶于1.5 mL二氧六环、1.5 mL N,N-二甲基甲酰胺、60 μL三乙胺的混合溶液中,冰浴30 min,搅拌加入20 μL氯甲酸异丁酯,冰浴2 h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到500 μL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,室温搅拌反应过夜;4℃条件下,反应物用0.01 mol/L、pH 7.4的PBS缓冲溶液透析3 d,得到氮掺杂碳纳米材料标记的伏马菌素B1单克隆抗体溶液,4℃保存。

2. 根据权利要求1所述的检测伏马菌素B1的免疫层析试纸,其特征在于,所述的支撑体包括设置在吸附层底面的底层(7)和设置在吸附层顶面的面层(8)。

3. 根据权利要求1所述的检测伏马菌素B1的免疫层析试纸,其特征在于,所述的氮掺杂碳纳米材料是以壳聚糖为碳源,乙二醇为氮掺杂剂,采用水热法制备而成,具体方法为:将壳聚糖2.5 g溶于5 mL超纯水中,加入5 mL乙二醇,混匀后置于高压反应釜的聚四氟乙烯内胆中,180℃反应2 h,反应结束后将产物抽滤,双蒸水洗涤2次,60℃烘箱干燥得到氮掺杂碳纳米材料。

一种检测伏马菌素B1的免疫层析试纸

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伏马菌素B1 (FB1) 的免疫层析试纸。

背景技术

[0002] 伏马菌素B1 (Fumonisin,FB1) 主要由串珠镰刀菌和多育镰刀菌产生的毒素,该毒素广泛存在于各种粮食及其制品中,尤其是玉米。伏马毒素纯品为白色针状结晶,为一类相关的极性、水溶性代谢产物,为多氢醇和丙三羧酸的双酯化合物,对热很稳定,不易被蒸煮破坏,在多数粮食加工处理过程均比较稳定。伏马菌素对人、畜不仅是一种促癌物,而且是一种致癌物。动物试验和流行病学资料已表明,伏马菌素主要损害肝肾功能,能引起马脑白质软化症和猪肺水肿等,并与我国和南非部分地区高发的食道癌有关,现已引起世界范围的广泛注意。但目前国内对于伏马菌素对人体危害性具体情况还不清楚。

[0003] 目前国内外针对FB1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,但对样品的前处理和操作人员的技术要求高,且仪器设备价格昂贵,不适于现场快速检测。免疫分析法操作简单,成本低,结合氮掺杂碳纳米材料标记物具有激发发射波长灵活可调、荧光稳定性高且无闪烁现象等优势,最终可实现高敏感、高稳定的现场快速定量检测,社会及经济意义重大。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测伏马菌素B1 (FB1) 的免疫层析试纸,该试纸具有特异、灵敏、快速、简便等特点。

[0005] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0006] 一种检测伏马菌素B1的免疫层析试纸,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样品垫、结合垫、层析膜及吸收垫,所述的结合垫上吸附有纳米材料标记的抗FB1单克隆抗体;所述的层析膜上设有用FB1人工抗原溶液印制的隐形检测印迹和用羊抗或兔抗小鼠IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹;所述的纳米材料为氮掺杂碳纳米材料、碳纳米材料、碳量子点荧光纳米颗粒。

[0007] 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。

[0008] 氮掺杂碳纳米材料N-CDs是以壳聚糖为碳源,乙二醇为氮掺杂剂,采用水热法制备而成,具体方法为:将壳聚糖2.5g溶于5mL超纯水中,加入5mL乙二醇,混匀后置于高压反应釜的聚四氟乙烯内胆中,180℃反应2h,反应结束后将产物抽滤,双蒸水洗涤2次,60℃烘箱干燥得到N-CDs。

[0009] 氮掺杂碳纳米材料标记的抗FB1单克隆抗体的制备方法为:

[0010] (1) 表面羧基化SiO₂纳米颗粒的制备

[0011] 采用反相微乳法合成SiO₂纳米颗粒：按体积比10:30:10:1比例取Ttiton X-100、环己烷、正己醇、超纯水搅拌形成5.1mL微乳液，加入200μL氨水搅匀后，再加入80μL正硅酸乙酯，室温避光反应24h；反应结束后6000rpm离心10min，乙醇洗涤4次后用1mL乙醇复溶，形成溶液A；将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中，形成溶液B；将溶液A加入到溶液B中，室温搅拌反应70min；反应结束后，6000rpm离心10min，将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后，氮吹干燥，4℃密封保存；

[0012] (2) N-CDs-SiO₂荧光探针的制备

[0013] 将2mg表面羧基化的SiO₂纳米颗粒和2mg N,N'-羰基二咪唑加入到400μL N,N-二甲基甲酰胺中，室温下磁力搅拌反应3h；将其加入到1mL浓度为1 mg/mL N-CDs溶液中，15min加完，室温避光搅拌反应4h后；再次加入20μL正硅酸乙酯，0.12g氯乙酸，0.25mg N-CDs颗粒，室温避光搅拌反应2h进行包壳，反复包壳3次，氮吹干燥，4℃密封保存；

[0014] (3) FB1-mAb的标记

[0015] 取步骤(2)制备的荧光探针15mg溶于1.5mL二氧六环、1.5mL DMF、60μL三乙胺的混合溶液中，冰浴30min，搅拌加入20μL氯甲酸异丁酯，冰浴2h，得到标记溶液；将标记溶液滴加到500μL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中，室温搅拌反应过夜；4℃条件下，反应物用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲溶液透析3d，得到N-CDs标记的FB1-mAb溶液，4℃保存。

[0016] 碳纳米材料是以柠檬酸为碳源、半胱胺盐酸盐为钝化剂，通过水热合成法制备而成：将1.5g柠檬酸和1.62g半胱胺盐酸盐溶于7.5mL超纯水中，充分溶解后转移溶液至50mL聚四氟乙烯内胆之中，再将内胆置于高压反应釜中，200℃反应3h，反应结束后将产物抽滤，乙醇洗涤2次，65℃烘箱干燥，得到碳纳米材料TPCA。

[0017] 碳纳米材料标记的抗FB1单克隆抗体的制备方法为：

[0018] (1) 碳纳米材料TPCA的表面硅化

[0019] 将碳纳米材料TPCA分散在体积浓度为10%的乙醇溶液中，配制成浓度为1mg/mL的TPCA溶液；搅拌状态下将2mL氨水逐滴加入2mL TPCA溶液中，150rpm室温反应25min，然后加入80μL正硅酸乙酯，室温避光反应3h；反应结束后6000rpm离心10min，乙醇洗涤4次后，氮吹干燥，4℃密封保存；

[0020] (2) 碳纳米材料TPCA的表面羧基化

[0021] 将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中，形成溶液A；取200mg表面硅化的TPCA，加入到体积为2.5mL的乙醇中，形成溶液B；将溶液B加入到溶液A中，室温搅拌反应70min；反应结束后，6000rpm离心10min，将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后，氮吹干燥，4℃密封保存；

[0022] (3) FB1-mAb的标记

[0023] 将2mg表面羧基化的TPCA和2mg N,N'-羰基二咪唑加入到400μL N,N-二甲基甲酰胺中，室温下磁力搅拌反应3h，得到标记溶液；将标记溶液滴加到1mL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中，15min加完，4℃避光搅拌反应过夜；用PBS 4℃条件下透析3d，得到TPCA标记的FB1-mAb溶液，4℃保存。

[0024] 碳纳米材料是以色氨酸为碳源，通过水与五氧化二磷反应放热，促进色氨酸碳化及分子聚合制备而成：称取0.3g色氨酸溶于500-1000μL超纯水中；待完全溶解后，迅速导入装有3.0g五氧化二磷的玻璃小瓶中；待反应物质放热恢复至室温后，加入双蒸水洗涤2次，

离心取上清,65℃烘箱干燥,得到碳纳米材料。

[0025] 碳纳米材料标记的抗FB1单克隆抗体的制备方法为:

[0026] (1) 碳纳米材料的表面硅化

[0027] 将碳纳米材料分散在体积浓度为10%的乙醇溶液中,配制成浓度为1mg/mL的碳纳米溶液;搅拌状态下将2mL氨水逐滴加入2mL碳纳米溶液中,150rpm室温反应25min,然后加入80μL正硅酸乙酯,室温避光反应3h;反应结束后6000rpm离心10min,乙醇洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0028] (2) 碳纳米材料的表面羧基化

[0029] 将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中,形成溶液A;取200mg表面硅化的碳纳米材料,加入到体积为2.5mL的乙醇中,形成溶液B;将溶液B加入到溶液A中,室温搅拌反应70min;反应结束后,6000rpm离心10min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0030] (3) FB1-mAb的标记

[0031] 称取12.78mg表面羧基化的碳纳米材料溶于500μL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入9.34mg DCC,充分溶解;再滴加200μL溶解有4.17mg N-羟基琥珀酰亚胺的DMF溶液,室温搅拌反应8h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到500μL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,搅拌反应过夜;用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲透析3d,得到碳量子点荧光纳米颗粒标记的FB1-mAb溶液,4℃保存。

[0032] 碳量子点荧光纳米颗粒是以柠檬酸及甲胺盐为原料,通过微波辅助法制备而成:称取0.5g柠檬酸和0.176g甲胺盐酸盐,溶于5mL水中,超声充分溶解混合均匀后,放置于功率为700W的微波炉中,微波5min后,反应结束,自然冷却,双蒸水洗涤2次,65℃烘箱干燥,得到黑色固体,即为碳量子点荧光纳米颗粒。

[0033] 碳量子点荧光纳米颗粒标记的抗FB1单克隆抗体的制备方法为:

[0034] (1) 表面羧基化SiO₂纳米颗粒的制备

[0035] 采用反相微乳法合成SiO₂纳米颗粒:按体积比10:30:10:1比例取Ttiton X-100、环己烷、正己醇、超纯水搅拌形成微乳液5.1mL,加入200μL氨水搅匀后,再加入80μL正硅酸乙酯,室温避光反应24h;反应结束后6000rpm离心10min,乙醇洗涤4次后用1mL乙醇复溶,形成溶液A;将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中,形成溶液B;将溶液A加入到溶液B中,室温搅拌反应70min;反应结束后,6000rpm离心10min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0036] (2) 荧光探针的制备

[0037] 将2mg表面羧基化的SiO₂纳米颗粒和2mg N,N'-羰基二咪唑加入到400μL N,N-二甲基甲酰胺中,室温下磁力搅拌反应3h;将其加入到1mL浓度为1 mg/mL碳量子点荧光纳米颗粒溶液中,15min加完,室温避光搅拌反应4h后;再次加入20μL正硅酸乙酯,0.12g氯乙酸,0.25mg碳量子点荧光纳米颗粒,室温避光搅拌反应2h进行包壳,反复包壳3次,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0038] (3) FB1-mAb的标记

[0039] 称取12.78mg步骤(2)制备的荧光探针溶于500μL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入9.34mg DCC,充分溶解;再滴加200μL溶解有4.17mg N-羟基琥珀酰亚胺的DMF溶液,室温搅

拌反应8h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到500 μ L浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,搅拌反应过夜;用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲透析3d,得到碳量子点荧光纳米颗粒标记的FB1-mAb溶液,4 $^{\circ}$ C保存。

[0040] 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、携带方便及可定量的特点。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

[0041] 图1为本发明的试纸的主视图,图中,1为样品垫、2为结合垫、3为层析膜、4为吸收垫、7为底层、8为面层。

[0042] 图2为本发明的试纸的俯视图,图中,4为吸收垫、5为隐形检测印迹、6为隐形对照印迹、8为面层。

具体实施方式

[0043] 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。

[0044] 实施例1

[0045] 本发明的检测FB1的免疫层析试纸,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样品垫1、结合垫2、层析膜3及吸收垫4,所述的结合垫上吸附有纳米材料标记的抗FB1单克隆抗体FB1-mAb;所述的层析膜上设有用偶联FB1的载体蛋白(FB1人工抗原)溶液印制的隐形检测印迹5和用羊抗或兔抗小鼠IgG抗体溶液印制的隐形对照印迹6;所述的纳米材料为氮掺杂碳纳米材料、碳纳米材料、碳量子点荧光纳米颗粒。

[0046] 所述的支撑体包括设置在吸附层底面的底层7和设置在吸附层顶面的面层8。

[0047] 所述的支撑板材料为不吸水的韧性PVC材料。

[0048] 所述的样品垫材料除玻璃纤维棉外,还可为尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜。

[0049] 所述的结合垫材料为玻璃纤维棉。

[0050] 所述的层析膜材料除硝酸纤维素膜外,还可为纯纤维素膜或羧化纤维素膜。

[0051] 所述的吸水垫材料为强力吸水滤纸。

[0052] 所述的偶联FB1的载体蛋白除牛血清白蛋白(BSA)外,还可为鸡卵清蛋白(OVA)或血蓝蛋白(KLH)。

[0053] 所述的隐形检测印迹和隐形对照印迹除“||”直线式印迹外,还可以为“十十”字型排列印迹、“一一”字型排列印迹、“一一”字型排列印迹、“卜卜”字型排列印迹或“一卜”字型排列印迹。

[0054] 在样品垫与结合垫交界处对应的面层上印制有红色样品标记警告线,且印有max字样,该标记警告线距离样品垫顶端一侧1.1-1.2cm处。

[0055] 所述的面层覆盖在样品垫和结合垫上面的为白色,覆盖在吸水垫上面的为蓝色,还可为其它颜色(如绿色)。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例检测FB1试纸,主要包括:FB1人工抗原的制备、FB1单克隆抗体(FB1-mAb)、氮掺杂碳纳米材料(N-CDs)标记FB1抗体的制备以及基于N-CDs标记的免疫层析试纸的制备等步骤,其中,各产品的制备方法如下:

[0058] 1、FB1人工抗原(FB1-BSA)的制备

[0059] 采用EDC法,将FB1与载体蛋白BSA进行偶联,制备人工抗原。

[0060] 称取10mg的牛血清白蛋白(BSA)置于10mL螺口瓶中,用0.13mol/L的NaHCO₃溶液制成质量分数10%BSA活化溶液,调节pH为7.6。称取1mg FB1、1.073mg N,N-二环己基碳酰亚胺(DCC)和0.598mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),溶解于无水四氢呋喃,30℃振荡4h,然后4000r/min离心15min,弃上清,并用无水四氢呋喃洗涤沉淀,待沉淀中的四氢呋喃挥发完全后,将残留物溶于0.2mL N,N-二甲基甲酰胺。并将此溶液缓慢滴加到BSA活化溶液中,置于磁力搅拌器上,避光室温反应过夜。反应产物在4℃搅拌下用PBS透析3d,每天换液3-6次,透析后得到纯化的FB1-BSA。

[0061] 2、FB1-mAb的制备

[0062] 动物免疫:用制备的人工抗原FB1-BSA以20-25μg/只的用量,采用背部四点免疫法,免疫6-8周龄Balb/C母鼠4次,首免用弗氏完全佐剂乳化,其余用弗氏不完全佐剂乳化,每次免疫间隔时间3周,最后一次免疫后4周挑选抗体效价高、抑制率好的小鼠,进行超强免疫。

[0063] 细胞融合:超强免疫后3天,将免疫小鼠眶下窦取血,脱颈处死,取脾脏;用75%的酒精浸泡小鼠5-10min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,1000rpm离心10min,收集脾细胞。将脾细胞与NS₀骨髓瘤细胞按10:1的比例在离心管中混合,将其置于40℃水浴中;将1mL PEG-1500在60s内顺管壁加到离心管内,水浴中继续轻晃反应90s后,按照1mL/30s,3mL/30s,11mL/30s的速度将15mL 37℃的GNK溶液加入离心管中,然后在37℃水浴锅中反应5min,1000rpm离心10min,弃上清;打散细胞团后,加入40mL HAT培养基,混匀后加到饲养细胞培养板上,100μL/孔,置37℃,5%CO₂培养箱中。

[0064] 单克隆抗体的筛选:培养10-14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3-6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FB1反应,亲和力常数达到10¹⁰-10¹²L/mol,轻链亚型为κ或λ,重链亚型为IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃。

[0065] 3、基于N-CDs标记的免疫层析试纸的制备

[0066] (1) 采用水热法制备氮掺杂碳纳米材料N-CDs

[0067] 将壳聚糖2.5g溶于5mL超纯水中,加入5mL乙二醇,混匀后置于高压反应釜的聚四氟乙烯内胆中,180℃反应2h,反应结束后将产物抽滤,双蒸水洗涤2次,60℃烘箱干燥得到N-CDs。

[0068] (2) 表面羧基化SiO₂纳米颗粒的制备

[0069] 采用反相微乳法合成SiO₂纳米颗粒:按体积比10:30:10:1比例取Ttiton X-100、环己烷、正己醇、超纯水搅拌形成微乳液5.1mL,加入200μL氨水搅匀后,再加入80μL正硅酸乙酯,室温避光反应24h;反应结束后6000rpm离心10min,乙醇洗涤4次后用1mL乙醇复溶,形

成溶液A;将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中,形成溶液B;将溶液A加入到溶液B中,室温搅拌反应70min;反应结束后,6000rpm离心10min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存。

[0070] (3) N-CDs-SiO₂荧光探针的制备

[0071] 将2mg表面羧基化的SiO₂纳米颗粒和2mg N,N'-羰基二咪唑加入到400μLN,N-二甲基甲酰胺中,室温下磁力搅拌反应3h;将其加入到1mL浓度为1 mg/mL N-CDs溶液(0.1mol/L NaOH溶液溶解)中,15min加完,室温避光搅拌反应4h后;再次加入20μL正硅酸乙酯,0.12g氯乙酸,0.25mg N-CDs颗粒,室温避光搅拌反应2h进行包壳,反复包壳3次,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0072] (4) FB1-mAb的标记

[0073] 取步骤(2)制备的荧光探针15mg溶于1.5mL二氧六环、1.5mL DMF(N,N-二甲基甲酰胺)、60μL三乙胺的混合溶液中,冰浴30min,搅拌加入20μL氯甲酸异丁酯,冰浴2h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到500μL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,室温搅拌反应过夜;4℃条件下,反应物用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲溶液透析3d,得到N-CDs标记的FB1-mAb(N-CDs-FB1-mAb)溶液,4℃保存。

[0074] (5) 基于N-CDs标记的免疫层析试纸的制备

[0075] 将N-CDs-FB1-mAb溶液喷涂于玻璃纤维膜上,37℃恒温干燥4h,形成结合垫;将FB1人工抗原与羊抗或兔抗IgG溶液一同分别划在层析膜上,形成两条印记:一条为隐形检测印迹(T线)、一条为隐形对照印迹(C线),37℃恒温干燥过夜,制得层析膜;将样品垫、结合垫、层析膜、吸收垫按顺序粘贴在底层上后,再粘贴面层,裁切成合适尺寸获得试纸产品。

[0076] 检测反应原理

[0077] 当试纸测试端插入待测样品溶液后,在虹吸作用带动下,待测溶液会从试纸的测试端扩散到手柄端。

[0078] 在扩散过程中,待测溶液中的伏马菌素B1可与N-CDs-FB1-mAb相结合,进而封闭N-CDs-FB1-mAb上伏马菌素B1的抗原结合点,阻止N-CDs-FB1-mAb与层析膜上的检测印迹结合,而对照印迹上羊抗或兔抗小鼠IgG抗体则可与N-CDs-FB1-mAb结合,通过荧光读条仪,在紫外线激发下,T线处就不会出现吸收峰,C线处会出现吸收峰。反之若样品溶液中无伏马菌素B1时,则不能阻止N-CDs-FB1-mAb与层析膜上的检测印迹结合,而羊抗或兔抗小鼠IgG抗体也能与N-CDs-FB1-mAb结合,通过荧光读条仪,在紫外线激发下,T线和C线处均会出现吸收峰。如果层析膜上没有C线吸收峰,则表明试纸条已失效。

[0079] 本实施例对基于N-CDs标记的定量检测FB1的试纸的灵敏性、特异性检测。

[0080] 灵敏性的检测:用PBS分别配置浓度为500、250、125、62.5、31.25、15.62、0ng/mL的FB1标准品,置于聚苯乙烯小孔中,将试纸条测试端插入液面中,约1-2min取出试纸,25℃下放置5min后放入荧光读条仪,通过荧光读条仪直接读取峰图。以峰值或峰面积为纵坐标,以不同FB1浓度的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,进行相关回归分析,计算该试纸对FB1的IC₅₀和最低检测限。经测定,该试纸对FB1的曲线回归方程为: $y = -0.5395x + 1.5532$,相关系数为 $R^2 = 0.9985$,根据回归方程计算出该试纸对FB1的IC₅₀为89.12ng/mL,最低检测限为25.12ng/mL,表明免疫层析试纸对FB1具有较高的灵敏度。

[0081] 特异性的检测:以伏马菌素B1、T-2毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素A、展青霉素、

麦角毒素作为竞争物,配置上述标品浓度均为2mg/mL,用N-CDs标记的免疫层析试纸检测其抑制率,根据公式计算交叉反应率。

[0082] 测定结果见下表1,该N-CDs标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的特异性较好,与其他毒素均无交叉反应。

[0083] 表1基于N-CDs标记的定量检测伏马菌素B1的免疫层析试纸的交叉反应性

化合物	半数抑制浓度 (ng/mL)	交叉反应率 (%)
伏马菌素B1	89.12	100
T-2毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
赭曲霉毒素A	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
展青霉素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
麦角毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04

[0085] 定量检测:将试纸条测试端插入检测液中,液面不要超过样品标记警告线,约1-2min取出试纸,25℃下放置5min后放入荧光读条仪直接读出定量检测值。

[0086] 实施例3

[0087] 本实施例检测FB1试纸,主要包括:FB1人工抗原的制备、FB1单克隆抗体(FB1-mAb)、碳纳米材料标记FB1抗体的制备以及基于碳纳米材料标记的免疫层析试纸的制备等步骤,其中,各产品的制备方法如下:

[0088] 1、FB1人工抗原(FB1-BSA)的制备

[0089] 同实施例2。

[0090] 2、FB1-mAb的制备

[0091] 同实施例2。

[0092] 3、基于碳纳米材料标记的免疫层析试纸的制备

[0093] (1) 碳纳米材料TPCA的制备

[0094] 将1.5g柠檬酸和1.62g半胱胺盐酸盐溶于7.5mL超纯水中,充分溶解后转移溶液至50mL聚四氟乙烯内胆之中,再将内胆置于高压反应釜中,200℃反应3h,反应结束后将产物抽滤,乙醇洗涤2次,65℃烘箱干燥,得到碳纳米材料TPCA。

[0095] (2) 碳纳米材料TPCA的表面硅化

[0096] 将碳纳米材料TPCA分散在体积浓度为10%的乙醇溶液中,配制成浓度为1mg/mL的TPCA溶液;搅拌状态下将2mL氨水逐滴加入2mL TPCA溶液中,150rpm室温反应25min,然后加入80μL正硅酸乙酯,室温避光反应3h;反应结束后6000rpm离心10min,乙醇洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存。

[0097] (3) 碳纳米材料TPCA的表面羧基化

[0098] 将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中,形成溶液A;取200mg表面硅化的TPCA,加入到体积为2.5mL的乙醇中,形成溶液B;将溶液B加入到溶液A中,室温搅拌反应70min;反应结束后,6000rpm离心10min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存。

[0099] (4) FB1-mAb的标记

[0100] 将2mg表面羧基化的TPCA和2mg N,N'-羰基二咪唑加入到400μLN,N-二甲基甲酰胺

中,室温下磁力搅拌反应3h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到1mL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,15min加完,4℃避光搅拌反应过夜;用PBS 4℃条件下透析3d,得到TPCA标记的FB1-mAb溶液,4℃保存。

[0101] 检测反应原理同实施例2。

[0102] 本实施例对基于TPCA标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的灵敏性、特异性检测。

[0103] 灵敏性的检测:方法同实施例2。经测定,该试纸对FB1的曲线回归方程为: $y = -0.4740x + 1.4371$,相关系数为 $R^2 = 0.9992$,根据回归方程计算出该试纸对FB1的 IC_{50} 为95.50ng/mL,最低检测限为22.08ng/mL。表明免疫层析试纸对FB1具有较高的灵敏度。

[0104] 特异性的检测:方法同实施例2。测定结果见下表2,该TPCA标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的特异性较好,与其他毒素均无交叉反应。

[0105] 表2基于TPCA标记的定量检测伏马菌素B1的免疫层析试纸的交叉反应性

[0106]

化合物	半数抑制浓度 (ng/mL)	交叉反应率 (%)
伏马菌素B1	95.50	100
T-2毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
赭曲霉毒素A	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
展青霉素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
麦角毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04

[0107] 定量检测:方法同实施例2。

[0108] 实施例4

[0109] 本实施例检测FB1试纸,主要包括:FB1人工抗原的制备、FB1单克隆抗体(FB1-mAb)、碳纳米材料标记FB1抗体的制备以及基于碳纳米材料标记的免疫层析试纸的制备等步骤,其中,各产品的制备方法如下:

[0110] 1、FB1人工抗原(FB1-BSA)的制备

[0111] 同实施例2。

[0112] 2、FB1-mAb的制备

[0113] 同实施例2。

[0114] 3、基于碳纳米材料标记的免疫层析试纸的制备

[0115] (1) 碳纳米材料的制备

[0116] 称取0.3g色氨酸溶于500-1000 μ L超纯水中;待完全溶解后,迅速导入装有3.0g五氧化二磷的玻璃小瓶中;待反应物质放热恢复至室温后,加入适量双蒸水洗涤2次,离心取上清,65℃烘箱干燥,得到碳纳米材料。

[0117] (2) 碳纳米材料的表面硅化

[0118] 将碳纳米材料分散在体积浓度为10%的乙醇溶液中,配制成浓度为1mg/mL的碳纳米溶液;搅拌状态下将2mL氨水逐滴加入2mL碳纳米溶液中,150rpm室温反应25min,然后加入80 μ L正硅酸乙酯,室温避光反应3h;反应结束后6000rpm离心10min,乙醇洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0119] (3) 碳纳米材料的表面羧基化

[0120] 将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中,形成溶液A;取200mg表

面硅化的碳纳米材料,加入到体积为2.5mL的乙醇中,形成溶液B;将溶液B加入到溶液A中,室温搅拌反应70min;反应结束后,6000rpm离心10min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0121] (4) FB1-mAb的标记

[0122] 称取12.78mg表面羧基化的碳纳米材料溶于500μL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入9.34mg DCC,充分溶解;再滴加200μL溶解有4.17mg N-羟基琥珀酰亚胺的DMF溶液,室温搅拌反应8h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到500μL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,搅拌反应过夜;用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲透析3d,得到碳量子点荧光纳米颗粒标记的FB1-mAb溶液,4℃保存。

[0123] 检测反应原理同实施例2。

[0124] 本实施例对基于碳纳米材料标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的灵敏性、特异性检测。

[0125] 灵敏性的检测:方法同实施例2。经测定,该试纸对FB1的曲线回归方程为: $y = -0.4504x + 1.3439$,相关系数为 $R^2 = 0.9988$,根据回归方程计算出该试纸对FB1的 IC_{50} 为74.13ng/mL,最低检测限为16.11ng/mL。表明免疫层析试纸对FB1具有较高的灵敏度。

[0126] 特异性的检测:方法同实施例2。测定结果见下表3,该碳纳米材料标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的特异性较好,与其他毒素均无交叉反应。

[0127] 表3基于碳纳米材料标记的定量检测伏马菌素B1的免疫层析试纸的交叉反应性

化合物	半数抑制浓度 (ng/mL)	交叉反应率 (%)
伏马菌素B1	74.13	100
T-2毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
赭曲霉毒素A	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
展青霉素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04
麦角毒素	$>1.0 \times 10^5$	<0.04

[0129] 定量检测:方法同实施例2。

[0130] 实施例5

[0131] 本实施例检测FB1试纸,主要包括:FB1人工抗原的制备、FB1单克隆抗体(FB1-mAb)、碳量子点荧光纳米颗粒标记FB1抗体的制备以及基于碳量子点荧光纳米颗粒标记的免疫层析试纸的制备等步骤,其中,各产品的制备方法如下:

[0132] 1、FB1人工抗原(FB1-BSA)的制备

[0133] 同实施例2。

[0134] 2、FB1-mAb的制备

[0135] 同实施例2。

[0136] 3、基于碳量子点荧光纳米颗粒标记的免疫层析试纸的制备

[0137] (1) 碳量子点荧光纳米颗粒的制备

[0138] 称取0.5g柠檬酸和0.176g甲胺盐酸盐,溶于5mL水中,超声充分溶解混合均匀后,放置于功率为700W的微波炉中,微波5min后,反应结束,自然冷却,双蒸水洗涤2次,65℃烤箱干燥,得到黑色固体,即为碳量子点荧光纳米颗粒。

[0139] (2) 表面羧基化SiO₂纳米颗粒的制备

[0140] 采用反相微乳法合成SiO₂纳米颗粒:按体积比10:30:10:1比例取Ttiton X-100、环己烷、正己醇、超纯水搅拌形成微乳液5.1mL,加入200μL氨水搅匀后,再加入80μL正硅酸乙酯,室温避光反应24h;反应结束后6000rpm离心10min,乙醇洗涤4次后用1mL乙醇复溶,形成溶液A;将0.47g氯乙酸加入到2.5mL浓度为6mol/L的NaOH溶液中,形成溶液B;将溶液A加入到溶液B中,室温搅拌反应70min;反应结束后,6000rpm离心10min,将得到的沉淀用双蒸水洗涤4次后,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0141] (3) 荧光探针的制备

[0142] 将2mg表面羧基化的SiO₂纳米颗粒和2mg N,N'-羰基二咪唑加入到400μL N,N-二甲基甲酰胺中,室温下磁力搅拌反应3h;将其加入到1mL浓度为1 mg/mL碳量子点荧光纳米颗粒溶液(0.1mol/L NaOH溶液溶解)中,15min加完,室温避光搅拌反应4h后;再次加入20μL正硅酸乙酯,0.12g氯乙酸,0.25mg碳量子点荧光纳米颗粒,室温避光搅拌反应2h进行包壳,反复包壳3次,氮吹干燥,4℃密封保存;

[0143] (3) FB1-mAb的标记

[0144] 称取12.78mg步骤(2)制备的荧光探针溶于500μL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入9.34mg DCC,充分溶解;再滴加200μL溶解有4.17mg N-羟基琥珀酰亚胺的DMF溶液,室温搅拌反应8h,得到标记溶液;将标记溶液滴加到500μL浓度为1 mg/mL的单克隆抗体溶液中,搅拌反应过夜;用0.01mol/L、pH 7.4的PBS缓冲液透析3d,得到碳量子点荧光纳米颗粒标记的FB1-mAb溶液,4℃保存。

[0145] 检测反应原理同实施例2。

[0146] 本实施例对基碳量子点荧光纳米颗粒标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的灵敏性、特异性检测。

[0147] 灵敏性的检测:方法同实施例2。经测定,该试纸对FB1的曲线回归方程为: $y = -0.5394x + 1.5310$,相关系数为 $R^2 = 0.9966$,根据回归方程计算出该试纸对FB1的IC₅₀为81.28ng/mL,最低检测限为22.65ng/mL。表明免疫层析试纸对FB1具有较高的灵敏度。

[0148] 特异性的检测:方法同实施例2。测定结果见下表4,该碳量子点荧光纳米颗粒标记的定量检测FB1的免疫层析试纸的特异性较好,与其他毒素均无交叉反应。

[0149] 表4基于碳量子点荧光纳米颗粒标记的定量检测伏马菌素B1的免疫层析试纸的交叉反应性

化合物	半数抑制浓度 (ng/mL)	交叉反应率 (%)
伏马菌素B1	81.28	100
T-2毒素	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.04
玉米赤霉烯酮	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.04
赭曲霉毒素A	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.04
展青霉素	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.04
麦角毒素	$> 1.0 \times 10^5$	< 0.04

[0151] 定量检测:方法同实施例2。

[0152] 以上所述仅为本发明最佳的实施例,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应

包含在本发明的保护范围之内。

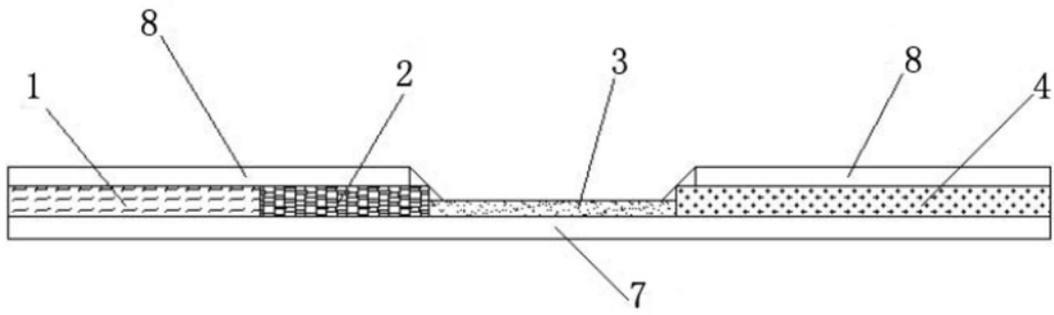


图1

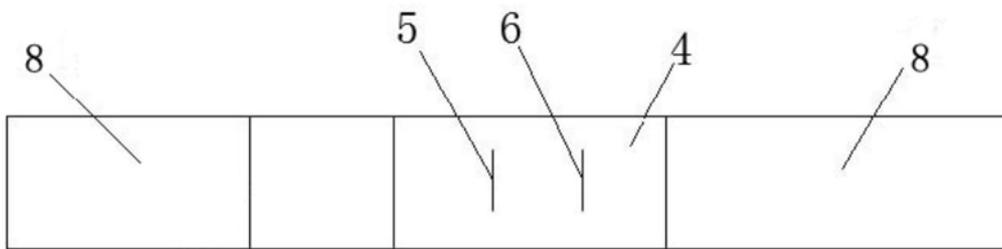


图2