



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104897906 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201510364747. X

G01N 33/533(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 06. 25

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 方维焕 章先 李肖梁 王歆
谢琿 时玉菲 孙孟娇

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 周世骏

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

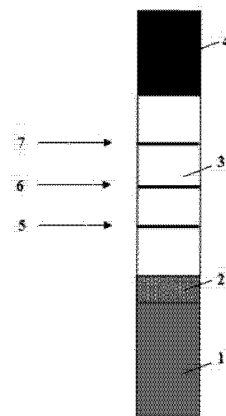
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

双重定量蛋白毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫层析技术,旨在提供一种双重定量蛋白毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法。该试纸条在聚氯乙烯背板表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫;在硝酸纤维素膜上设有两条检测线和一条质控线;在固定垫上固定有蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物;质控线由山羊抗鼠多克隆抗体喷涂形成,检测线由待检蛋白类毒素多克隆抗体喷涂形成,两条检测线所含蛋白类毒素多克隆抗体是不同的。本发明采用夹心法原理对蛋白类毒素进行定性检测和定量分析,可同时对两种蛋白类毒素进行定量检测,所制备的层析试纸条具有良好的灵敏度和稳定性,且操作简便快捷,特别适用于现场的快速诊断。



1. 双重定量蛋白毒素量子点荧光免疫层析试纸条,包括作为基材的黑色长条状聚氯乙烯背板,其特征在于,在沿背板长度方向在其表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫,相邻垫或膜间彼此搭接;在硝酸纤维素膜上,设有与背板同宽的彼此间隔的两条检测线和一条质控线,其中质控线位于吸水垫一侧;在量子点抗体标记物固定垫上,以喷涂、敷涂或浸泡的方式固定有蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物;所述质控线是将山羊抗鼠多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上形成,所述检测线是将待检蛋白类毒素多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上形成,两条检测线所含蛋白类毒素多克隆抗体是不同的。

2. 根据权利要求1所述的量子点荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述量子点抗体标记物固定垫上的蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物,其制备方法是:

以浓度为0.01M、pH = 7.4的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺溶液,浓度均为10mg/ml;取50 μ l羧基修饰的水溶性量子点至2ml EP管,加200 μ l浓度为0.05M、pH = 6的2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液,并根据水溶性量子点上羧基的摩尔数量加入EDC和NHS溶液;室温摇床活化30min后15000rpm离心30min弃上清,加入1ml含5 μ g特异性蛋白类毒素单克隆抗体的0.05M、pH = 6的MES缓冲液;室温摇床反应2h后15000rpm离心30min弃上清,并用1ml 0.01M、pH = 7.4的磷酸盐缓冲液重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述重悬、离心操作三次;最终加100 μ l的0.05M、pH = 8.0的硼酸盐缓冲液作为保存液,得到蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物,在4 $^{\circ}$ C放置,备用。

3. 根据权利要求1所述的量子点荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述蛋白类毒素单克隆抗体和多克隆抗体所对应的蛋白类毒素是金黄色葡萄球菌A型肠毒素、金黄色葡萄球菌B型肠毒素、金黄色葡萄球菌C型肠毒素、产气荚膜梭菌E型肠毒素或蜡样芽孢杆菌肠毒素FM蛋白中的任意一种。

4. 根据权利要求1至3任意一项中所述的量子点荧光免疫层析试纸条,其特征在于,该试纸条的宽度为0.4cm,样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的长度分别为1.7cm、0.8cm、2.5cm、1.7cm;其中,样品垫与量子点抗体标记物固定垫的搭接重合长度为0.2cm,量子点抗体标记物固定垫与硝酸纤维素膜的搭接重合长度为0.2cm,硝酸纤维素膜与吸收垫的搭接重合长度为0.3cm;在硝酸纤维素膜上,两条检测线及质控线之间的间距分别为0.4cm、0.4cm。

5. 制备权利要求1所述量子点荧光免疫层析试纸条的方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1) 制备量子点抗体标记物固定垫

以浓度为0.01M、pH = 7.4的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺溶液,浓度均为10mg/ml;取50 μ l羧基修饰的水溶性量子点至2ml EP管,加200 μ l浓度为0.05M、pH = 6的2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液,并根据水溶性量子点上的羧基摩尔数量加入EDC和NHS溶液;室温摇床活化30min后15000rpm离心30min弃上清,加入1ml含5 μ g特异性蛋白类毒素单克隆抗体的0.05M、pH = 6的MES缓冲液;室温摇床反应2h后15000rpm离心30min弃上清,并用1ml 0.01M、

pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述重悬、离心操作三次;最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液,得到蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物,在 4 $^{\circ}$ C 放置,备用;

以喷涂、敷涂或浸泡的方式,将蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物固定在量子点抗体标记物固定垫上,在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

(2) 检测线与质控线的喷涂:取硝酸纤维素膜贴于作为基材的长条状聚氯乙烯背板上,点膜仪在硝酸纤维素膜上同时喷涂两条检测线和一条质控线,其中质控线位于一侧;质控线的喷涂液为山羊抗鼠多克隆抗体,两条检测线的喷涂液是不同种类的待检蛋白类毒素多克隆抗体;在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后,置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟,晾干后在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

(3) 免疫层析试纸条的组装:将样品垫、量子点抗体标记物固定垫和吸收垫布置于聚氯乙烯背板上,并使样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次排列,硝酸纤维素膜的质控线位于吸水垫一侧,且相邻垫或膜间彼此搭接;将聚氯乙烯背板及其贴附的材料切成 4mm 宽的层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

双重定量蛋白毒素量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术,具体地说,是涉及对食品中两种蛋白类毒素同时进行检测的以量子点标记蛋白类毒素特异性单克隆抗体和荧光显色为基础的免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 现阶段常发的各类中毒事件,除了某些由无机化合物如氰化钾、砒霜引起外,绝大部分都是来自生物毒素,而微生物毒素是最常见的,食物中毒绝大部分是蛋白类毒素或真菌毒素引起的,作为病原菌致病的主要因素,以及很多疾病的重要诱发因子,对蛋白类毒素的研究以及在食品卫生中的监控,日益受到社会各界的高度重视。

[0003] 蛋白类毒素如金黄色葡萄球菌分泌的 A、C 型肠毒素、产气荚膜梭菌分泌的 E 型肠毒素和蜡样芽孢杆菌肠毒素 FM 等均可刺激宿主呕吐中枢而导致以呕吐为主要症状的食物中毒。蛋白类毒素的检测常见的方法是酶联免疫法 (ELISA),酶联免疫检测法操作简单,结果易获取,但需要配套的设备,如恒温培养箱、酶标仪等等,并且往往耗时较长,不能用于临床或现场的快速诊断。相比 ELISA,免疫层析试纸条可用于现场的快速检测,并且不需要其他辅助仪器,可弥补其他检测方法复杂而耗时的缺点。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术中酶标免疫技术耗时长和常规胶体金免疫层析试纸条灵敏度不高以及单通道等缺点,提供了一种同时检测两种蛋白类毒素的量子点荧光免疫层析试纸条及制备方法。

[0005] 为解决技术问题,本发明的解决方案是:

[0006] 提供一种同时检测两种蛋白类毒素的量子点荧光免疫层析试纸条,包括作为基材的黑色长条状聚氯乙烯 (PVC) 背板,在沿背板长度方向在其表面依次布置样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 和吸收垫,相邻垫或膜间彼此搭接;在硝酸纤维素膜上,设有与背板同宽的彼此间隔的两条检测线和一条质控线,其中质控线位于吸水垫一侧;

[0007] 在量子点抗体标记物固定垫上,以喷涂、敷涂或浸泡的方式固定有蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物;所述质控线是将山羊抗鼠多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上形成,所述检测线是将待检蛋白类毒素多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜上形成,两条检测线所含的蛋白类毒素多克隆抗体是不同的。

[0008] 本发明中,所述量子点抗体标记物固定垫上的蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物,其制备方法是:

[0009] 以浓度为 0.01M、pH = 7.4 的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液,浓度均配置为 10mg/ml;取 50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点 (购自深圳市海王英特龙生物技术股份有限公司,货

号 QD618-C-S001) 至 2ml EP 管, 加 200 μ l 浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N- 吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲液, 并根据水溶性量子点上羧基的摩尔数量加入不同体积的 EDC 和 NHS 溶液; 室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清, 加入 1ml 含 5 μ g 特异性蛋白类毒素单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液; 室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清, 并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬, 离心后洗去未反应的抗体; 重复上述重悬、离心操作三次; 最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液重悬, 将最终所得的蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物在 4 $^{\circ}$ C 放置, 备用。

[0010] 本发明中, 所述蛋白类毒素单克隆抗体和多克隆抗体所对应的蛋白类毒素是金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素、金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素、金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素、产气荚膜梭菌 E 型肠毒素或蜡样芽孢杆菌肠毒素 FM 蛋白中的任意一种。

[0011] 本发明中, 该试纸条的宽度为 0.4cm, 样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫的长度分别为 1.7cm、0.8cm、2.5cm、1.7cm; 其中, 样品垫与量子点抗体标记物固定垫的搭接重合长度为 0.2cm, 量子点抗体标记物固定垫与硝酸纤维素膜的搭接重合长度为 0.2cm, 硝酸纤维素膜与吸收垫的搭接重合长度为 0.3cm; 在硝酸纤维素膜上, 两条检测线及检测线 -2 与质控线之间的间距分别为 0.4cm、0.4cm。

[0012] 本发明进一步提供了制备前述量子点荧光免疫层析试纸条的方法, 包括下述步骤:

[0013] 1、制备量子点抗体标记物固定垫

[0014] 以浓度为 0.01M、pH = 7.4 的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液, 浓度均为 10mg/ml; 取 50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点 (购自深圳市海王英特龙生物技术股份有限公司, 货号 QD618-C-S001) 至 2ml EP 管, 加 200 μ l 浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N- 吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲液, 并根据水溶性量子点上羧基的摩尔数量加入 EDC 和 NHS 溶液; 室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清, 加入 1ml 含 5 μ g 特异性蛋白类毒素单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液; 室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清后并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬, 离心, 洗去未反应的抗体; 重复上述的重悬、离心操作三次; 最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液, 最终得到蛋白类毒素特异性多克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物;

[0015] 以喷涂、敷涂或浸泡的方式, 将蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物固定在量子点抗体标记物固定垫上, 在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

[0016] 2、取硝酸纤维素膜贴于作为基材的长条状聚氯乙烯背板上, 点膜仪在硝酸纤维素膜上同时喷涂两条检测线和一条质控线, 其中质控线位于一侧; 质控线的喷涂液为山羊抗鼠多克隆抗体, 两条检测线的喷涂液是不同种类的待检蛋白类毒素多克隆抗体; 在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后, 置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟, 晾干后在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

[0017] 3、将样品垫、量子点抗体标记物固定垫和吸收垫布置于聚氯乙烯背板上, 并使样品垫、量子点抗体标记物固定垫、硝酸纤维素膜和吸收垫依次排列, 硝酸纤维素膜的质控线位于吸水垫一侧, 且相邻垫或膜间彼此搭接;

[0018] 4、将聚氯乙烯背板及其贴附的材料切成 4mm 宽的层析条, 将层析条放入塑料板卡

内,用压卡机压实。

[0019] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0020] 本发明以量子点荧光材料取代常规的胶体金对蛋白类毒素特异性多克隆抗体进行标记,采用夹心法原理对蛋白类毒素进行定性检测和定量分析,硝酸纤维素膜上同时包被两条检测线,可同时对两种蛋白类毒素进行定量检测,所制备的层析试纸条具有良好的灵敏度和稳定性,且操作简便快捷,特别适用于现场的快速诊断。

附图说明

[0021] 图1为本发明中量子点荧光免疫层析试纸条的结构示意图。

[0022] 图中附图标记:1、样品垫;2、量子点抗体标记物固定垫;3、硝酸纤维素膜;4、吸收垫;5、检测-1;6、检测线-2;7、质控线。

具体实施方式

[0023] 发明原理描述:

[0024] 本发明中的量子点荧光免疫层析试纸条基于量子点荧光材料与免疫层析技术。此种免疫层析条以羧基修饰的水溶性硒化镉/硫化锌量子点(CdSe/ZnS)(CdSe为核心,ZnS为壳层,量子点表面经过羧基官能团修饰后可与特定生物分子进行共价偶联)取代常规的胶体金,在偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的作用下与蛋白类毒素单克隆抗体进行共价偶联,采用夹心法原理同时对食品中两种蛋白类毒素含量进行定性检测和定量分析。

[0025] 该检测蛋白类毒素的量子点荧光免疫层析试纸条,包括作为基材的黑色长条状聚氯乙烯背板,在沿背板长度方向在其表面依次布置样品垫(1)、量子点抗体标记物固定垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸收垫(4),相邻垫或膜间彼此搭接;在硝酸纤维素膜(3)上,设有与背板同宽的且彼此间隔的检测线-1(5)、检测线-2(6)以及质控线(7),其中质控线(7)位于吸水垫(4)的一侧;在量子点抗体标记物的固定垫(3)上,以喷涂、敷涂或浸泡的方式固定有蛋白类毒素特异性多克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物;质控线(7)是将山羊抗鼠多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜(3)上形成,检测1(5)和检测线-2(6)是将待检蛋白类毒素多克隆抗体喷涂于硝酸纤维素膜(3)上形成,检测线-1(5)和检测线-2(6)所含蛋白类毒素多克隆抗体是不同的。

[0026] 该试纸条的宽度为0.4cm,样品垫(1)、量子点抗体标记物固定垫(2)、硝酸纤维素膜(3)和吸收垫(4)的长度分别为1.7cm、0.8cm、2.5cm、1.7cm;其中,样品垫(1)与量子点抗体标记物固定垫2的搭接重合长度为0.2cm,量子点抗体标记物固定垫2与硝酸纤维素膜3的搭接重合长度为0.2cm,硝酸纤维素膜3与吸收垫4的搭接重合长度为0.3cm;在硝酸纤维素膜(3)上,检测线-1(5)、检测线-2(6)和检测线-2(6)与质控线(7)的间距分别为0.4cm、0.4cm。

[0027] 所述量子点抗体标记物固定垫2上的蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物,其制备方法是:以浓度为0.01M、pH=7.4的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,浓度均为10mg/ml;取50 μ l羧基修饰的水溶性量子点至2ml EP管,加200 μ l

浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 缓冲液,并根据水溶性量子点上羧基的摩尔数量加入 EDC 和 NHS 溶液;室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清,加入 1ml 含有 5 μ g 特异性蛋白类毒素单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液;室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清后用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述的重悬、离心操作三次;最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液,所得的量子点-抗体标记物 4 $^{\circ}$ C 放置,备用。

[0028] 本发明所述蛋白类毒素单克隆抗体和多克隆抗体所对应的蛋白类毒素,是金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素、金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素、金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素、产气荚膜梭菌 E 型肠毒素或蜡样芽孢杆菌肠毒素 FM 蛋白等中的任意一种。

[0029] 量子点荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括下述步骤:

[0030] 1、制备量子点抗体标记物固定垫

[0031] 以浓度为 0.01M、pH = 7.4 的硼酸盐缓冲液分别配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液,浓度均为 10mg/ml;取 50 μ l 羧基修饰的水溶性量子点至 2ml EP 管,加 200 μ l 浓度为 0.05M、pH = 6 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 缓冲液,并根据水溶性量子点上羧基的摩尔数量加入 EDC 和 NHS 溶液;室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 弃上清,加入 1ml 含 5 μ g 特异性蛋白类毒素单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液;室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min 弃上清,并用 1ml 0.01M、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液重悬,离心,洗去未反应的抗体;重复上述重悬、离心操作三次;最终加 100 μ l 的 0.05M、pH = 8.0 的硼酸盐缓冲液作为保存液,得到蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物 4 $^{\circ}$ C 放置,备用;

[0032] 以喷涂、敷涂或浸泡的方式,将蛋白类毒素特异性单克隆抗体与羧基修饰水溶性量子点标记复合物固定在量子点抗体标记物固定垫 (2) 上,在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

[0033] 2、质控线与检测线的喷涂:取硝酸纤维素膜 (3) 贴于作为基材的长条状聚氯乙烯背板上,点膜仪在硝酸纤维素膜 (3) 上同时喷涂检测线-1 (5)、检测线-1 (6)、质控线 (7),其中质控线 (7) 位于一侧;质控线 (7) 的喷涂液为山羊抗小鼠多克隆抗体,检测线-1 (5) 和检测线-2 (6) 的喷涂液是不同种类的待检蛋白类毒素多克隆抗体;在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟,晾干后在 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时备用;

[0034] 3、免疫层析试纸条的组装:将样品垫 (1)、量子点抗体标记物固定垫 (2) 和吸收垫 (4) 布置于聚氯乙烯背板上,并使样品垫 (1)、量子点抗体标记物固定垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3) 和吸收垫 (4) 依次排列,质控线 (7) 位于吸水垫 (4) 一侧,且相邻垫或膜间彼此搭接;将聚氯乙烯背板及其贴附的材料切成 4mm 宽的层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

[0035] 实施例:双重定量检测食品中金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素和金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素量子点荧光免疫层析试纸条的制备

[0036] 具体制备过程如下:

[0037] 1、制备量子点标记金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素单克隆抗体和量子点标记金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素单克隆抗体标记物固定垫

[0038] 常规法制备并纯化抗金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素和金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素的鼠源单克隆抗体和兔源多克隆抗体,金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素单克隆抗体和多克隆抗体

纯化后浓度分别为 3.5mg/ml 和 4mg/ml,金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素单克隆和多克隆抗体浓度分别为 4mg/ml 和 4.5mg/ml。

[0039] 制备蛋白类毒素单克隆抗体与羧基水溶性量子点的标记复合物:分别用硼酸盐缓冲液(0.01M, pH = 7.4)配置偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,浓度均为 10mg/ml,取羧基修饰的水溶性量子点(购自深圳市海王英特龙生物技术股份有限公司,货号 QD618-C-S001)50 μ l 于 2ml EP 管中并加入 200 μ l 0.05M 的 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲液,按照摩尔比(水溶性量子点上羧基:EDC:NHS = 1:5000:5000)分别加入加 3 μ l 的偶联剂 EDC 和 NHS 后,室温摇床活化 30min 后 15000rpm 离心 30min 后弃上清,加入 1ml 含 5 μ g 的金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素特异性单克隆抗体的 0.05M、pH = 6 的 MES 缓冲液室温摇床反应 2h 后 15000rpm 离心 30min,室温摇床反应 2h 后 5000rpm 离心 30min 弃上清,并用 1ml 0.01M 磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)重悬,离心,弃去上清,洗去未反应的抗体,共三次,最终加 100 μ l 的保存液(0.05M 硼酸盐缓冲液, pH = 8.0)重悬,4 $^{\circ}$ C 放置,备用。按照相同的方法偶联金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素单克隆抗体和羧基水溶性量子点,将得到量子点抗体复合物 4 $^{\circ}$ C 放置,备用;

[0040] 将两种单克隆抗体与量子点的标记复合物涂覆在量子点与抗体复合物固定垫上:设定点膜仪的喷涂参数为 25.0 μ l/cm,将两种单克隆抗体量子点的复合物等体积混匀后连接在点膜仪的 C 管道接口。取规格为 30cm \times 1cm 的玻璃纤维素膜放置于点膜仪的运动平台上。开启点膜仪,在固定垫上喷涂抗体量子点复合物,37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时。

[0041] 2、量子点免疫层析试纸条检测线与质控线的喷涂:取硝酸纤维素膜 3 贴于低背景值 PVC 背板,设定点膜仪的喷涂参数为 2 μ l/cm。取 4mg/ml 的金黄色葡萄球菌 A 型肠毒素多克隆抗体 1.5ml 和 4.5mg/ml 的金黄色葡萄球菌 C 型肠毒素多克隆抗体 1.5ml,分别接到点膜仪的 A、B 管道接口处,并同时取 4mg/ml 的山羊抗鼠多克隆抗体接到点膜仪的 C 管道接口,其中 A、B、C 的管道口间距均为 0.4cm,将贴有硝酸纤维素膜(3)的 PVC 背板置于点膜仪的往复运动平台上。开启点膜仪,在硝酸纤维素膜(3)上分别喷涂蛋白类毒素多克隆抗体和山羊抗鼠抗体,37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时。将背板置于聚乙二醇溶液中浸泡 30 分钟,晾干后 37 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时。

[0042] 3、免疫层析试纸条的组装:在固定于 PVC 板上的硝酸纤维素膜(3)靠近山羊抗鼠抗体的一端贴上吸收垫(4),硝酸纤维素膜与吸收垫 4 在长度上重合 0.3cm,在靠近蛋白类毒素多克隆抗体的一端依次贴上量子点单克隆抗体标记物固定垫(2)和样品垫(1),量子点单克隆抗体标记物固定垫(2)与硝酸纤维素膜(3)在长度上重合 0.2cm,样品垫(1)与量子点单克隆抗体复合物固定垫(2)长度方向上重合 0.2cm,最后将 PVC 背板及其贴附的材料切成 4mm 宽层析条,将层析条放入塑料板卡内,用压卡机压实。

[0043] 当加入被检测样品时,位于量子点抗体标记物固定垫(2)上的量子点单克隆抗体复合物通过层析作用与样品混匀后向吸收垫(4)一端移动,当样品中存在待检蛋白类毒素时,量子点单克隆抗体复合物会与目标毒素结合,通过检测线时,目标蛋白毒素-量子点单克隆抗体复合物会与检测线上的多克隆抗体结合,此时在紫外灯光照下,检测线有荧光时,呈阳性反应,表明样本中含有待检的蛋白毒素,如果检测线没有荧光,则样本为阴性,表明不含目标蛋白毒素。无论待检样品是否含有待检的蛋白类毒素,单克隆抗体量子点复合物都会移动到质控线(7)处与山羊抗鼠抗体结合,在紫外照射下显示荧光条带,提示该检测

系统是有效的,当质控线(7)没有显示荧光条带时则表明该检测系统失效。若检测结果判定为阳性,可通过配置不同浓度的蛋白毒素标准品,并读取检测线与质控线(7)荧光值,并计算检测线/质控线的荧光比值,以蛋白毒素标准品浓度对数为横坐标,以相对应的荧光比值为纵坐标建立标准曲线,对样本中蛋白毒素的浓度进行定量分析。

[0044] 应用量子点荧光免疫层析试纸条对采集的40份牛奶样本进行了检测,结果显示其中12份样本呈金黄色葡萄球菌A型肠毒素阳性(含量 $\geq 300\text{pg/ml}$),7份样本呈金黄色葡萄球菌C型肠毒素阳性(含量 $\geq 650\text{pg/ml}$)与商品化试剂盒(购自德国拜发,货号R4101)符合率为100%,且经过定量分析,金黄色葡萄球菌A型肠毒素含量在430-1340 pg/ml 之间,金黄色葡萄球菌C型肠毒素含量在710-1670 pg/ml 之间,可用于牛奶中金黄色葡萄球菌A型、C型肠毒素的快速定性检测与定量分析。

[0045] 特别说明:

[0046] 虽然本发明的实施例中只列举夹心原理对金黄色葡萄球菌A型肠毒素和C型肠毒素同时进行定性检测和定量分析。在本发明提供所述基于量子点荧光材料和免疫层析技术的同时检测两种蛋白类毒素的方法后,本领域技术人员能够根据其掌握的技能进行举一反三,实现同时检测其他蛋白类毒素的目的。

[0047] 以上是结合具体实施例子对本发明所做的进一步描述。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明原理的前提下,本发明及其应用还会有各种变化和改进,这些变化和进步都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

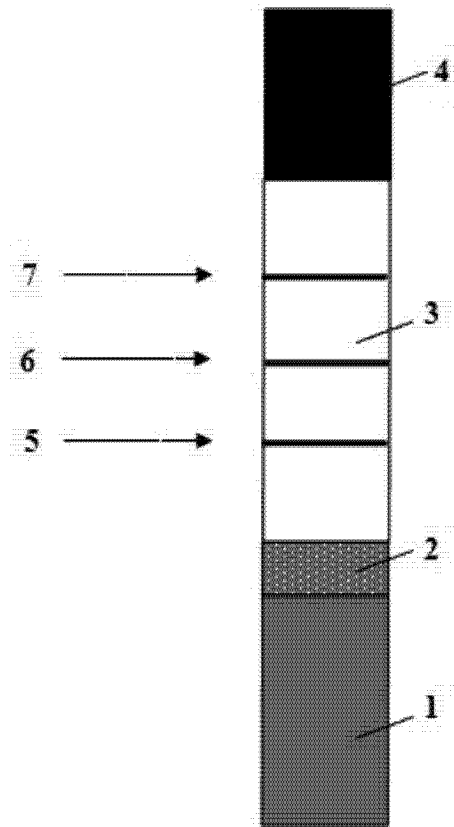


图 1