



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118425501 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202410830363.1

(22) 申请日 2024.07.05

(71) 申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术开发
区高创园A座313室

(72) 发明人 孙霞 郭业民 翟晟西 白梦圆

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

C08G 83/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫
层析试纸条

(57) 摘要

本发明提供了一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条,属于免疫检测技术领域。所述纳米酶免疫层析试纸的结构包括:样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜设于样品垫和吸水垫之间,样品垫一端插入含有纳米酶与抗体相结合($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$)的探针溶液中;硝酸纤维素膜上设有包被CAR-BSA的检测线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线。本发明制备得到的多功能纳米酶,将其作为显色剂标记到抗体中,并在3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)作用下使试纸条具有较宽的检测范围($0.25\text{-}50\text{ ng mL}^{-1}$)和较低的检测线 0.33 ng mL^{-1} ,大大扩宽了免疫层析试纸条的应用检测范围。

1. 一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条, 该试纸条包括PVC底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 所述的样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次首尾衔接粘贴在底板上, 所述样品垫插入含有克百威单克隆抗体标记物的探针溶液中, 所述的硝酸纤维素膜上设有包被CAR-BSA的检测线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述克百威单克隆抗体标记物中标记物为多功能纳米酶(Fe_3O_4 -MOF-Pt)。

3. 根据权利要求2所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述中多功能纳米酶(Fe_3O_4 -MOF-Pt)的制备过程为: 将10.5 g一水合柠檬酸完全溶解于100 mL超纯水中。加入500 mg Fe_3O_4 纳米粒子, 并持续超声30分钟使其分散在上述溶液中。将混合物搅拌4 h后用乙醇洗涤数次, 真空干燥得到 Fe_3O_4 -COOH。然后将50 mg Fe_3O_4 -COOH分散在4 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的乙醇溶液(10 mM)中, 边搅拌边加入4 mL 1,3,5-苯三甲酸(H_3BTC)溶液(10 mM)。混合物在60 °C下反应8 h。将产物洗涤3次后在60°C下干燥3 h得到 Fe_3O_4 -MOF。为了制备 Fe_3O_4 -MOF-Pt, 首先合成了Pt纳米颗粒。将10 μL 的 $\text{H}_2\text{PtCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM)加入到含有450 mg PVP的乙二醇溶液中。将混合物置于110°C的油浴锅中并磁力搅拌3 h, 将获得的溶液在氮气保护下储存。随后, 将50 mg Fe_3O_4 -MOF重悬于1 mL上述溶液中, 60°C下振摇6 h。将产物洗涤数次, 置于真空下干燥, 得到 Fe_3O_4 -MOF-Pt。

4. 根据权利要求1所述的免疫层析试纸条, 其特征在于: 所述克百威单克隆抗体标记物的探针制备过程为: 将0.3 mg EDC和0.6 mg NHS依次加入1 mL含5 mg Fe_3O_4 -MOF-Pt的PB溶液(0.01 M, pH 7)中。然后将1 mL含有5 μg CAR-mAb的PB混合。然后将该溶液与1 mL含5 μg CAR-mAb的PB混合, 在25°C振荡2 h。随后加入500 μL BSA (3% [w/v])阻断非特异性结合位点。最后, 在11,180×g下离心10 min, 重悬于含25%蔗糖、1%BSA的PB中, 得到 Fe_3O_4 -MOF-Pt-mAb探针, 并在4°C保存。

5. 一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条, 包括以下步骤:

1) 样品垫的制备: 样品垫预先用缓冲液处理, 60°C干燥3 h, 备用; 所述缓冲液组成为: 1.0%BSA(w/v)、1.0%PVP-K30(w/v)、0.05%吐温-20(v/v) PB溶液;

2) 检测线的制备: 取CAR-BSA用0.01M、pH 7的PB定容稀释到0.5mg mL^{-1} 做检测线; 用划膜仪将其划在硝酸纤维素膜上, 形成检测线;

3) 质控线的制备: 取羊抗鼠IgG抗体用0.01M、pH 7的PB定容稀释到0.5mg mL^{-1} 做质控线; 用划膜仪将其划在硝酸纤维素膜上, 形成质控线;

4) 将划好的硝酸纤维素膜置于37°C干燥3 h后即得处理的硝酸纤维素膜;

5) 将制备好的样品垫、硝酸纤维素膜、底板与吸水垫组装, 得到免疫层析试纸条。

6. 据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 所述检测线上CAR-BSA的用量为0.8 $\mu\text{L cm}^{-1}$, 质控线上羊抗鼠IgG抗体的用量为0.6 $\mu\text{L cm}^{-1}$ 。

一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条

[0001] 本发明涉及一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条,属于免疫检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,农药残留导致的环境污染和食品安全问题频频发生。克百威(CAR)作为一种高效、广谱的杀虫剂,被广泛应用于防治病虫害,保护与促进农作物生长。但其大量使用甚至滥用会导致其在农产品中残留,造成食品安全隐患,危害人体健康。有研究表明,长期接触克百威会导致中枢神经系统受损、肝脏损伤以及免疫抑制等健康问题。而蔬菜是占据农药市场的主要作物,也是人们日常生活所必需的。近年来,仍有报道指出蔬菜中存在克百威残留超标的现象。因此,除了从源头限制克百威的使用外,快速准确地检测出蔬菜中的克百威残留是保障农作物安全的重要环节。

[0003] 目前,常用于检测蔬菜中CAR残留的分析方法有物理检测法和免疫检测法。理化检测法包括高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)和毛细管电泳法等。这些传统分析方法灵敏度高、准确性好,但仪器昂贵、检测成本高、检测时间长。这些特点限制了其在现场检测的应用。免疫检测法主要是酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫层析技术。其中试剂盒检测时间长,操作复杂。

[0004] 免疫层析技术具有成本低、检测快速、现场实时监测等优点,是最广泛用于CAR快速检测的方法。

[0005] 在免疫层析试纸条的检测研究中,除了传统的胶体金标记材料外,研究人员还开发了各种具有不同颜色特性的纳米材料作为信号标签,用于新型试纸条的创建。然而,这些单功能材料的灵敏度、准确度和稳定性有限,不能满足复杂样品基质中痕量分析物的检测要求。

[0006] 因此,本研究利用MIL-100(Fe)基金属有机框架(MOF)作为间隔层包裹 Fe_3O_4 ,并在其表面负载铂(Pt)纳米颗粒。在保持 Fe_3O_4 纳米颗粒磁性的同时,极大程度上增加纳米复合材料的过氧化物样活性。对合成的多功能纳米酶 Fe_3O_4 -MOF-Pt进行抗体功能化,得到的探针可以有效捕获CAR并产生棕黄色比色信号。利用3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)催化显色底物从而实现信号放大,提高检测灵敏度和准确度。所构建的基于 Fe_3O_4 -MOF-Pt的免疫层析试纸条具有检测方法快速简便、检测结果灵敏可靠等优势。同时,也为农作物中农药残留快速检测提供了新的创新方向和思路。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,设计一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条,以解决现有技术中对蔬菜中克百威的残留难以快速检测而影响食品安全的技术问题。

[0008] 本发明采取的技术方案如下:一种基于多功能纳米酶检测克百威的免疫层析试纸条,该试纸条包括PVC底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述的样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次首尾衔接粘贴在底板上,所述样品垫插入含有克百威单克隆抗体标记物的探

针溶液中,所述的硝酸纤维素膜上设有包被CAR-BSA的检测线和包被羊抗鼠IgG抗体的质控线。

[0009] 进一步地,所述克百威单克隆抗体标记物中标记物为多功能纳米酶(Fe_3O_4 -MOF-Pt)。

[0010] 进一步地,所述克百威单克隆抗体标记物的制备过程为:将0.3 mg EDC和0.6 mg NHS依次加入1 mL含5 mg Fe_3O_4 -MOF-Pt的PB溶液(0.01 M, pH 7)中。然后将1 mL含有5 μg CAR-mAb的PB混合。然后将该溶液与1 mL含5 μg CAR-mAb的PB混合,在25°C振荡2 h。随后加入500 μL BSA (3% [w/v])阻断非特异性结合位点。最后,在11,180 $\times$ g下离心10 min,重悬于含25%蔗糖、1% BSA的PB中,得到 Fe_3O_4 -MOF-Pt-mAb探针,并在4°C保存。

[0011] 进一步地,所述多功能纳米酶(Fe_3O_4 -MOF-Pt)的制备过程为:将10.5 g一水合柠檬酸完全溶解于100 mL超纯水中。加入500 mg Fe_3O_4 纳米粒子,并持续超声30分钟使其分散在上述溶液中。将混合物搅拌4小时后用乙醇洗涤数次,真空干燥得到 Fe_3O_4 -COOH。

[0012] 进一步地,将50 mg Fe_3O_4 -COOH分散在4 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的乙醇溶液(10 mM)中,边搅拌边加入4 mL 1,3,5-苯三甲酸(H_3BTC)溶液(10 mM)。混合物在60°C下反应8 h。将产物洗涤3次后在60°C下干燥3小时得到 Fe_3O_4 -MOF。为了制备 Fe_3O_4 -MOF-Pt,首先合成了Pt纳米颗粒。将10 μL 的 $\text{H}_2\text{PtCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10mM)加入到含有450 mg PVP的乙二醇溶液中。将混合物置于110°C的油浴锅中并磁力搅拌3 h,将获得的溶液在氮气保护下储存。随后,将50 mg Fe_3O_4 -MOF重悬于1 mL上述溶液中,60°C下振荡6 h。将产物洗涤数次,置于真空下干燥,得到 Fe_3O_4 -MOF-Pt。

[0013] 上述免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤。

[0014] 1)样品垫的制备:样品垫预先用缓冲液处理,60°C干燥3 h,备用;所述缓冲液组成为:1.0%BSA(w/v)、1.0%PVP-K30(w/v)、0.05%吐温-20(v/v)的PB溶液。

[0015] 2)检测线的制备:取CAR-BSA用0.01M、pH 7的PB定容稀释到0.5mg mL^{-1} 做检测线;用划膜仪将其划在硝酸纤维素膜上,形成检测线。

[0016] 3)质控线的制备:取羊抗鼠IgG抗体用0.01M、pH 7的PB定容稀释到0.5mg mL^{-1} 做质控线;用划膜仪将其划在硝酸纤维素膜上,形成质控线。

[0017] 4)将划好的硝酸纤维素膜置于37°C干燥3 h后即得处理的硝酸纤维素膜。

[0018] 5)将制备好的样品垫、硝酸纤维素膜、底板与吸水垫组装,得到免疫层析试纸条。

[0019] 进一步地,所述检测线上CAR-BSA的用量为0.8 $\mu\text{L cm}^{-1}$,质控线上羊抗鼠IgG抗体的用量为0.6 $\mu\text{L cm}^{-1}$ 。

[0020] 本发明的有益效果:本发明制备得到的多功能纳米酶,将其作为显色剂标记到抗体中,并在3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)作用下使试纸条在比催化前具有更宽的检测范围(0.25-50 ng mL^{-1})和较低的检测线0.33 ng mL^{-1} ,大大扩宽了免疫层析试纸条的应用检测范围。

附图说明

[0021] 图1克百威多功能纳米酶免疫层析试纸条检测原理。

[0022] 图2纳米酶试纸条催化前的检测限结果。

[0023] 图3蔬菜中克百威的添加检测。

[0024] 图4多功能纳米酶试纸条特异性。

[0025] 图5纳米酶试纸条催化后的检测限结果。

具体实施方式

[0026] 下面的实施例可以使本专业的本领域技术人员更全面地理解本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。

[0027] 本发明的基于多功能纳米酶检测蔬菜中克百威的免疫层析试纸条检测原理为竞争抑制(见图1),原理如下:C区作为验证试纸结果有效性的参照,始终显色。将样品垫插入在微孔板的样品溶液中,样品溶液和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$ 混合后在吸收垫和硝酸纤维素膜的毛细管作用下向上迁移。当样品中没有克百威时, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$ 被T区CAR-BSA捕获,肉眼可见T区显亮黄色;当样品中含有克百威时,克百威与部分 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$ 竞争性结合从而减少了T区捕获的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$ 总量,肉眼可见T区显浅黄色甚至消线。随着样品中克百威浓度的增大,被捕获于T区的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$ 越来越少,T区颜色变淡,T区的颜色深浅与分析物浓度呈反比。无论样品中是否含有克百威, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt-mAb}$ 都会被C区的羊抗鼠IgG抗体捕获从而C区显亮黄色。

[0028] 等待反应结束后,将3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)添加到检测区中,可以明显看到催化后检测区颜色加深,检测线由亮黄色变成红棕色,检测范围变宽。

[0029] 以下将结合附图所示的具体实施方式对本发明进行详细描述。

[0030] 本实验用到的材料:检测线抗原为克百威完全抗原CAR-BSA(0.5mg mL^{-1}),质控线抗体为羊抗鼠IgG抗体(0.5mg mL^{-1}),抗体为克百威单克隆抗体CAR-mAb(9.6mg mL^{-1}),检测样本为克百威标准品,羊抗鼠IgG、CAR-BSA和CAR-mAb购自北京博奥龙免疫技术有限公司,克百威标准品购自阿拉丁,其他材料均在市场上购买。

[0031] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。

[0032] 纳米酶标记抗体。

[0033] 1) 纳米酶的制备,制备用于放大检测信号的纳米酶颗粒的方法包括:

将 10.5 g 一水合柠檬酸完全溶解于 100 mL 超纯水中。加入 500 mg Fe_3O_4 纳米粒子,并持续超声30分钟使其分散在上述溶液中。将混合物搅拌4小时后用乙醇洗涤数次,真空干燥得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 。

[0034] 2) 将 50 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 分散在 4 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的乙醇溶液(10 mM)中,边搅拌边加入 4 mL 1,3,5-苯三甲酸(H_3BTC)溶液(10 mM)。混合物在 60°C 下反应 8 h 。将产物洗涤3次后在 60°C 下干燥 3 h 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF}$ 。为了制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt}$,首先合成了Pt纳米颗粒。将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 $\text{H}_2\text{PtCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM)加入到含有 450 mg PVP的乙二醇溶液中。将混合物置于 110°C 的油浴锅中并磁力搅拌 3 h ,将获得的溶液在氮气保护下储存。随后,将 50 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF}$ 重悬于 1 mL 上述溶液中, 60°C 下振摇 6 h 。将产物洗涤数次,置于真空下干燥,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt}$ 。

[0035] 3) 克百威单克隆抗体标记物的制备过程为:将 0.3 mg EDC和 0.6 mg NHS依次加入 1 mL 含 5 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MOF-Pt}$ 的PB溶液(0.01 M , $\text{pH } 7$)中。然后将 1 mL 含有 $5\text{ }\mu\text{g}$ CAR-mAb的PB混合。然后将该溶液与 1 mL 含 $5\text{ }\mu\text{g}$ CAR-mAb的PB混合,在 25°C 振荡 2 h 。随后加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ BSA ($3\% [\text{w/v}]$)阻断非特异性结合位点。最后,在 $11,180 \times \text{g}$ 下离心 10 min ,重悬于含 25% 蔗糖

糖、1%BSA的PB中,得到 Fe_3O_4 -MOF-Pt-mAb探针,并在4℃保存。

[0036] 用于检测克百威的多功能纳米酶免疫层析试纸条的制备。

[0037] 1) 样品垫的制备:样品垫预先用缓冲液处理,60℃干燥3 h,备用;所述缓冲液组成为:1.0%BSA(w/v)、1.0%PVP-K30(w/v)、0.05%吐温-20(v/v)的PB溶液。

[0038] 2) 检测线的制备:取CAR-BSA用0.01M、pH 7的PB定容稀释到0.5 mg mL⁻¹做检测线;用划膜仪将其划在硝酸纤维素膜上,形成检测线。

[0039] 3) 质控线的制备:取羊抗鼠IgG抗体用0.01M、pH 7的PB定容稀释到0.5 mg mL⁻¹做质控线;用划膜仪将其划在硝酸纤维素膜上,形成质控线。

[0040] 4) 将划好的硝酸纤维素膜置于37℃干燥3 h后即得处理的硝酸纤维素膜。

[0041] 5) 将试纸条装配:将样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫按从下至上的顺序粘贴在底衬上,在硝酸纤维素膜上设有检测线和质控线;切割粘贴后的塑料板,装入检测卡;放入含大量干燥剂的干燥皿中室温密封保存。

[0042] 6) 检测流程。

[0043] 用纳米酶免疫层析试纸条检测克百威的具体的检测过程是将组装好的试纸条插入在10 μL克百威标准品和90 μL的PB混合溶液中,然后静置15 min,随后观察试纸条T区显色结果。然后待反应结束后,将3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)添加到检测区中,随后观察试纸条检测区的显色结果。

[0044] 7) 检测结果分析。

[0045] 阴性:若硝酸纤维素膜上质控线(C线)和检测线(T线)同时出现两条亮黄色印迹时,表示样品溶液中克百威含量<20 ng mL⁻¹,判为阴性。

[0046] 阳性:若硝酸纤维素膜上质控线(C线)显示亮黄色印迹,而检测线(T线)不显色时,表示被检测样品溶液中克百威含量≥20 ng mL⁻¹,判为阳性。

[0047] 无效:若硝酸纤维素膜上质控线(C线)不显示亮黄色印迹,则无论检测线(T线)是否出现亮黄色印迹,该检测卡均判为无效。

[0048] 测试例1克百威标准样品检测。

[0049] 克百威标准溶液采用如下步骤制得。

[0050] 1) 购买克百威标准品,使用甲醇溶液配制1 mg mL⁻¹的CAR标准储备液,以磷酸缓冲液(0.01M PB,由8.10mL的0.2M NaH_2PO_4 和1.90mL的0.2M Na_2HPO_4 用超纯水定容至200mL,然后用HCl 和 NaOH 调节pH为7)为克百威储备液的稀释溶剂,梯度稀释得到不同浓度的克百威标准溶液备用。

[0051] 2) 具体的,采用制得的纳米酶免疫层析试纸条,检测不同浓度的克百威(取15个不同浓度的标准品,分别为(0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、2.50、3.50、5.00、10.00、20.00、30.00、50.00、75.00、100 ng mL⁻¹)。进行层析反应15 min后,观察显色结果。显色模式下,阴性和低浓度阳性试纸T区呈现明显亮黄色。在催化作用后,阴性和低浓度阳性试纸T区呈现明显红棕色。克百威浓度增加至3.5 ng mL⁻¹时T区颜色变淡,50 ng mL⁻¹时T区颜色消失。

[0052] 测试例2蔬菜中克百威的检测。

[0053] 用0.01M PB缓冲液(pH 7)。

[0054] 将清洗好的蔬菜用搅碎机搅碎,放置在保鲜膜上,取5g蔬菜样品分别准确称重至7

个50 mL离心管中,各加入10 mL的甲醇,涡旋混匀,超声震荡10 min,依次在7个离心管中加入(0.5、1.25、2.5、5、10、30、100 ng mL⁻¹)的克百威标准品溶液,超声30 min后,进行离心10 000 rpm,离心10 min。离心后,进行取出上清,后用0.22 μm的滤膜过滤。取上清液20 μL加入到180 μL PB缓冲液中,选取20 μL加样检测。

[0055] 分析纳米酶试纸条对蔬菜中各浓度的克百威的检出效果,原浓度经过稀释10倍处理可检出30 ng mL⁻¹的克百威添加量。

[0056] 测试例3纳米酶试纸条的特异性。

[0057] 各配置啉虫脒、噻虫嗪、吡虫啉、腐霉利以及啉虫酰胺的100 ng mL⁻¹标准储备液,克百威为20 ng mL⁻¹标准储备液。

[0058] 100 ng mL⁻¹啉虫脒、噻虫嗪、吡虫啉、腐霉利以及啉虫酰胺,20 ng mL⁻¹克百威分别取20 μL进行加样检测。

[0059] 实验结果(图4)所示,相关农药干扰物啉虫脒、噻虫嗪、吡虫啉、腐霉利以及啉虫酰胺对克百威检测无干扰,纳米酶试纸条特异性良好。

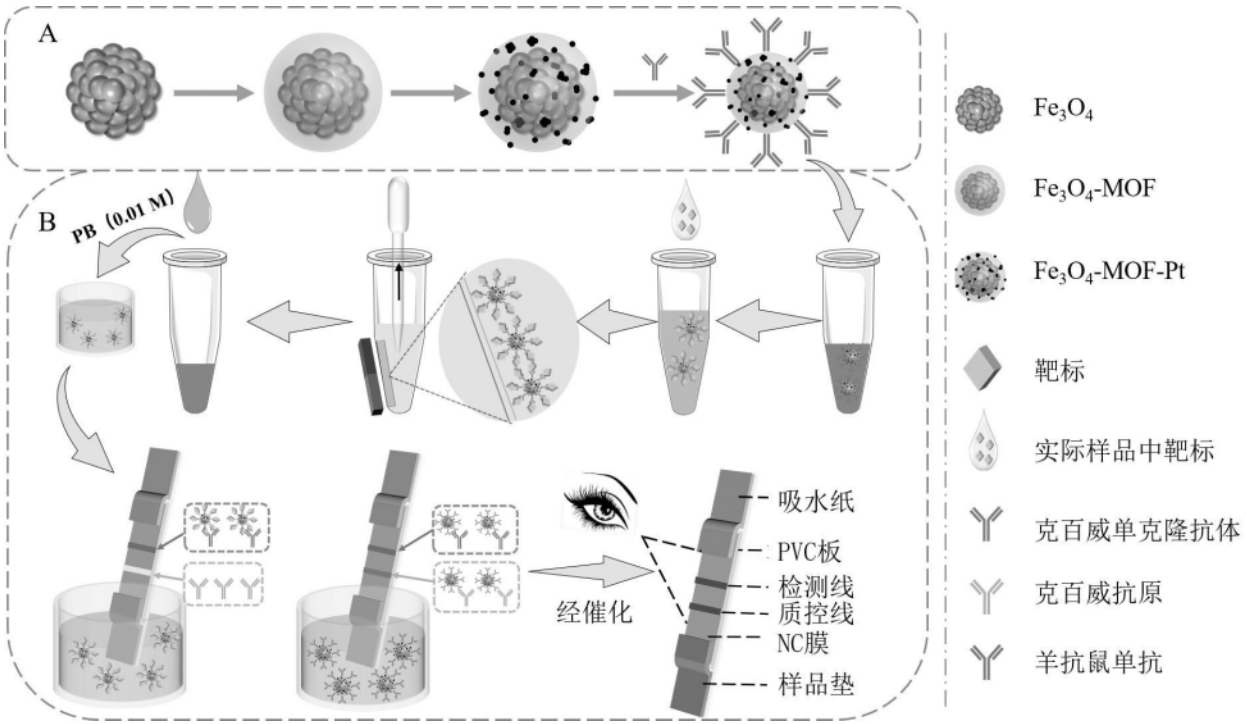


图 1

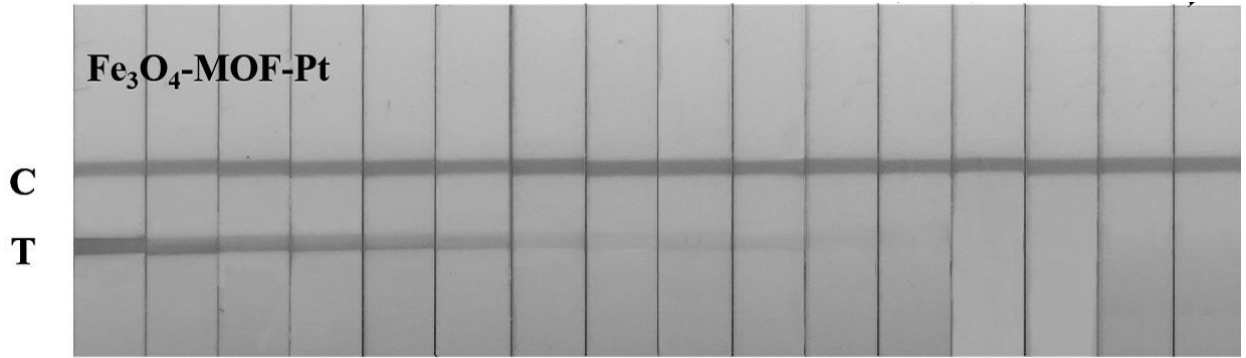


图 2

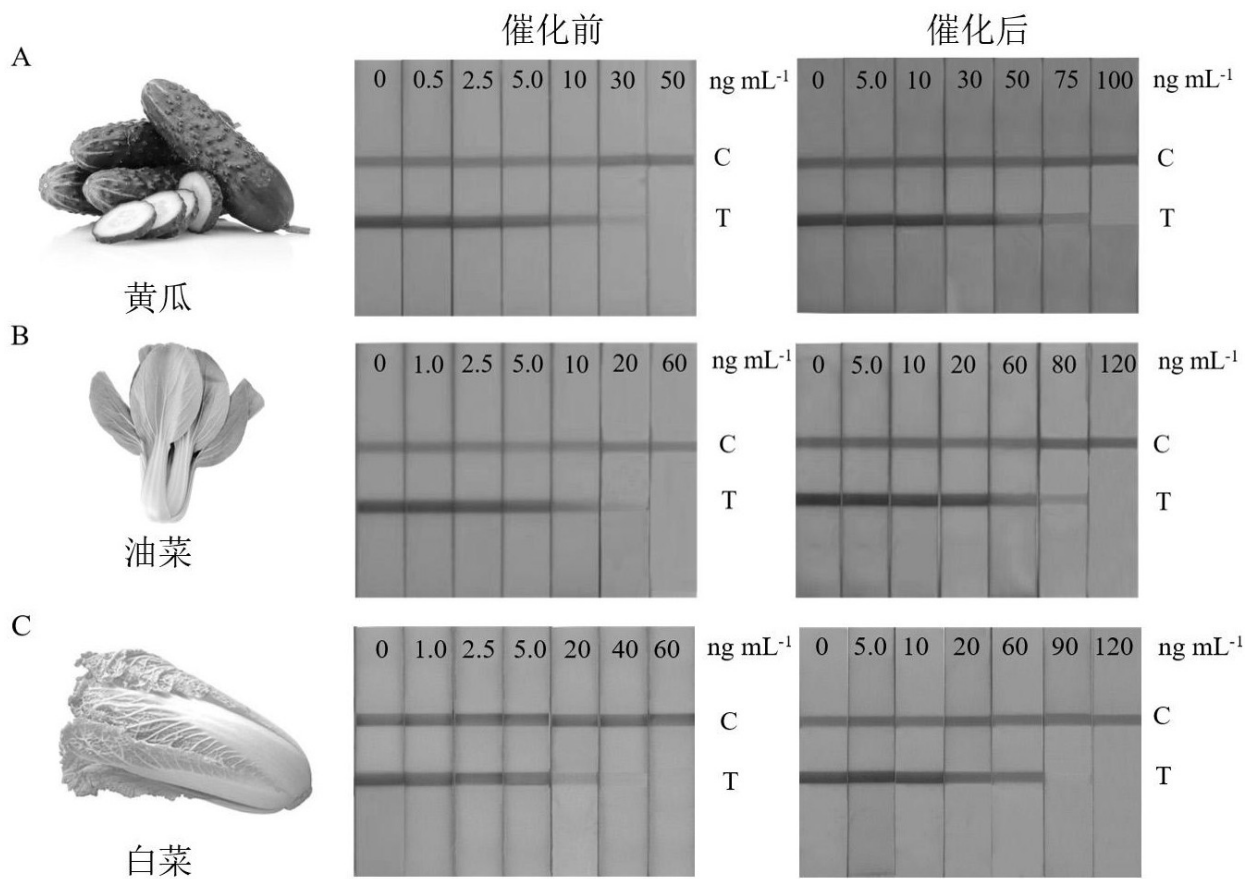


图 3

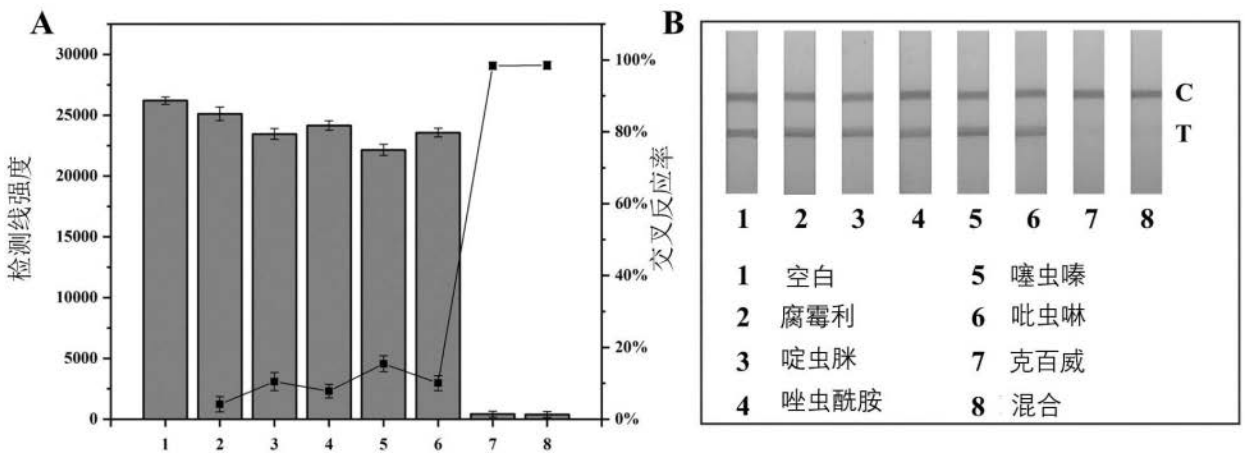


图 4

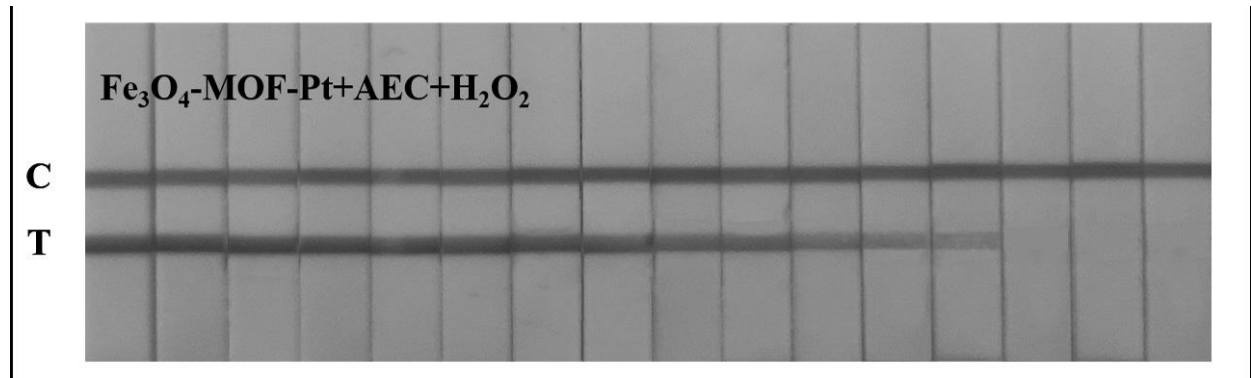


图 5