



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103983769 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201410112602.6

(22) 申请日 2014. 03. 25

(73) 专利权人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路
238 号

(72) 发明人 曹立民 杜淑媛 隋建新 林洪
王静雪

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 尉伟敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101091115 A, 2007. 12. 19,

CN 101528350 A, 2009. 09. 09,

CN 103018462 A, 2013. 04. 03,

CN 103261441 A, 2013. 08. 21,

CN 2482086 Y, 2002. 03. 13,

EP 0483117 A2, 1992. 04. 29,

US 4690907 A, 1987. 09. 01,

US 7708944 B1, 2010. 05. 04,

C. Giovannoli 等. A novel approach for a
non competitive capillary electrophoresis

immunoassay with laser-induced fluorescence
detection for the determination of human
serum albumin.. 《Journal of Chromatography
A》. 2007, 第 1155 卷

C. Mastichiadis 等. Capillary-based
immunoassays, immunosensors and DNA
sensors-steps towards integration and
multi-analysis.. 《Trends in Analytical
Chemistry》. 2008, 第 27 卷

J. J. Cras 等. Comparison of chemical
cleaning methods of glass in preparation
for silanization.. 《Biosensors &
Bioelectronics》. 1999, 第 14 卷

Zhanjun Yang

等. Strptavidin-functionalized capillary
immune microreactor for highly efficient
chemiluminescent immunoassay.. 《Analytici
Chimica Acta》. 2011, 第 706 卷

审查员 毕秀华

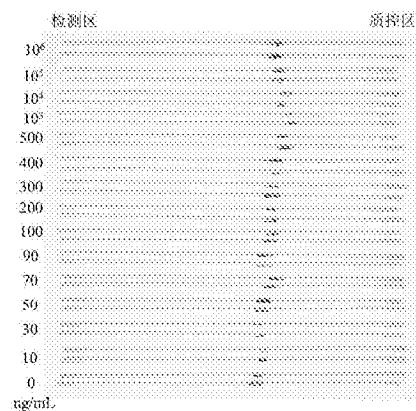
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种纳米金免疫层析毛细管的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种纳米金免疫层析毛细管的
制备方法, 利用化学键交联的方法对毛细玻璃管
内壁进行修饰, 将质控区和检测区固定在毛细管
内壁的特定区域, 组装了一种新型的免疫层析毛
细管。本发明以玻璃材质的毛细管为基底, 较硝酸
纤维素膜、纸质材料和线性材料更稳定, 基底材料
更稳固不易脱落, 更不易受环境因素的影响, 可以
显著地减少批间和批内差异, 组装过程相对简单,
且组装过程中不需要使用大型仪器, 修饰、组装技
术简单易掌握。



1. 一种纳米金免疫层析毛细管的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)毛细管的处理:将毛细管浸入piranha溶液中超声清洗15-20min,超纯水清洗至中性,干燥,冷却,然后将毛细管依次浸入KOH溶液、超纯水、HCl溶液、超纯水及有机溶剂中分别超声清洗10-15min,然后烘干;

(2)毛细管的修饰:将GPTMS和三乙胺溶于无水甲苯中得修饰液,使得GPTMS的终浓度为8vol%-15vol%,三乙胺的终浓度为1vol%-2vol%,将步骤(1)处理所得毛细管浸没于修饰液中室温下干燥环境中反应18h-25h,排出毛细管内的修饰液,室温下干燥环境中保持2-3h,然后将毛细管浸入无水甲苯中上下抽动清洗5-7min,接着将毛细管浸入丙酮中上下抽动清洗5-7min,氮气气氛下干燥;

(3)免疫层析毛细管的组装:将作为检测区的抗原和作为质控区的二抗分别注入步骤(2)处理得到的毛细管的两端,25-30℃下固定1.5-2.5h,将毛细管浸入PBST缓冲液中抽动清洗3-5min,重复清洗三次,1-2wt%的BSA溶液注满毛细管,在30-37℃下反应1.5-2h,将毛细管浸入PBST缓冲液中抽动清洗3-5min,重复清洗三次,干燥后获得免疫层析毛细管;

步骤(1)中所述piranha溶液的制备方法为:95wt%-98wt%浓硫酸与30wt%双氧水按照3-4:1的体积比混合,混合时将双氧水溶液缓慢加入浓硫酸中,不断搅拌以保持混合液的温度在80℃以下

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:步骤(1)中的有机溶剂为丙酮或乙醇。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:步骤(1)中KOH溶液浓度为0.8-1.2mol/L,HCl溶液浓度为0.8-1.2mol/L。

4. 根据权利要求1或2或3所述的制备方法,其特征在于:步骤(2)无水甲苯的制备方法为:甲苯中加入无水硫酸钠静置10-24h,抽滤除去无水硫酸钠,然后加入金属钠丝,同时加入二苯甲酮作为指示剂,加热回流2-3h,然后常压蒸馏,收集111±1℃的馏分得无水甲苯。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:无水硫酸钠用量为5-10g/100mL甲苯,金属钠丝用量为0.5-1g/100mL甲苯,二苯甲酮用量为0.1-0.5g/100mL甲苯。

6. 根据权利要求1或2或3所述的制备方法,其特征在于:所述抗原为小清蛋白,二抗为羊抗兔二抗。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于:小清蛋白与PBS缓冲液配制成浓度0.1-0.25mg/mL的小清蛋白溶液后注入毛细管,羊抗兔二抗与PBS缓冲液配制成浓度0.2-0.3mg/mL的羊抗兔二抗溶液后注入毛细管。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于:小清蛋白溶液注入毛细管的用量为3-6μL,羊抗兔二抗溶液注入毛细管的用量为3-6μL。

一种纳米金免疫层析毛细管的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,特别涉及一种纳米金免疫层析毛细管的制备方法。

背景技术

[0002] 免疫印迹、酶联免疫(ELISA)、电化学传感器和 SPR 传感器是近些年新发展起来的快速检测方法,因其较好的灵敏度、精确度、稳定性和选择性被用于环境、食品和医学中危害因子的检测。但是这些方法操作时间较长,且需要昂贵的仪器和专业的操作技能限制其用于现场的快速检测,尤其限制其在资源相对缺乏地区的应用。20世纪80年代初期,免疫胶体金层析技术以其灵敏度高、特异性强、操作简捷、不需要仪器等特点在医学、环境、食品检测及农牧业等领域广泛应用。胶体金免疫层析方法的核心技术是以条状纤维层析材料为基底通过毛细管作用使金标材料混合物泳动,移动至固定抗原或抗体的区域时,待检物与金标的结合物被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。基于硝酸纤维素膜的高蛋白结合能力和易处理的性质被广泛用作免疫层析的基底材料。然而,硝酸纤维素膜较薄、韧性小且结构复杂,因而在处理过程中易破碎,且易受环境温度和湿度的影响进而影响检测的灵敏度、重复性和贮存寿命(Fu, E. ; Liang, T. ; Houghtaling, J. ; Ramachandran, S. ; Ramsey, S. A. ; Lutz, B. ; Yager, P. Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format. *Anal. Chem.* 2011, 83, 7941–7946)。

[0003] 近期大家越来越关注新型基底材料的开发,以期提高免疫检测的灵敏度和稳定性,同时降低实际应用的成本。纸质材料被引入做为 ELISA、免疫印迹、斑点金免疫渗滤和电化学发光免疫检测的基底材料。纸质材料作为基底的检测方法制备较容易,可裸眼或通过仪器表征其结果。但纸质材料基底结构仍较为复杂且纸质基底较脆组装过程中易弄碎。另外棉线和尼龙线被引入作为免疫层析的基底,但是线本身质地松散、不均匀、易脱落,因此固定量和边界很难控制。以 SPE 柱为反应器的凝胶柱免疫反应将检测过程引入管中进行,但此种方法组装和检测过程复杂。因此,寻找一种稳定的基底,通过简单的组装方法设计出一种快速、稳定性、灵敏度好的检测方法成为目前研究的方向。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种纳米金免疫层析毛细管的制备方法,以玻璃材质的毛细管为基底,较硝酸纤维素膜、纸质材料和线性材料更稳定,基底材料更稳固不易脱落,更不易受环境因素的影响,可以显著地减少批间和批内差异,组装过程相对简单,且组装过程中不需要使用大型仪器,修饰、组装技术简单易掌握。

[0005] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0006] 一种纳米金免疫层析毛细管的制备方法,包括如下步骤:

[0007] (1)毛细管的处理:将毛细管浸入 piranha 溶液中超声清洗 15–20min,超纯水清洗

至中性，干燥，冷却，然后将毛细管依次浸入 KOH 溶液、超纯水、HCl 溶液、超纯水及有机溶剂中分别超声清洗 10–15min，然后烘干。

[0008] 利用 piranha 溶液的强氧化性去除毛细管上的有机残留物，同时对毛细管的玻璃表面进行羟基化，使得毛细管的玻璃表面上具有亲水性。

[0009] 将毛细管依次浸入 KOH 溶液、超纯水、HCl 溶液、超纯水及有机溶剂中分别超声清洗，以进一步用碱、酸清洗玻璃表面去除离子和表面的活性基团，同时稳定玻璃表面上的羟基。

[0010] (2)毛细管的修饰:将 GPTMS 和三乙胺溶于无水甲苯中得修饰液，使得 GPTMS 的终浓度为 8vol%–15vol%，三乙胺的终浓度为 1vol%–2vol%，将步骤(1)处理所得毛细管浸没于修饰液中室温下干燥环境中反应 18h–25h，排出毛细管内的修饰液，室温下干燥环境中保持 2–3h，然后将毛细管浸入无水甲苯中上下抽动清洗 5–7min，接着将毛细管浸入丙酮中上下抽动清洗 5–7min，氮气气氛下干燥。

[0011] GPTMS (3-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷)含有丰富的环氧基团，通过修饰液处理，将 GPTMS 的环氧基团固定在毛细管的内壁。排出毛细管内的修饰液，室温下干燥环境中保持 2–3h，是为了毛细管内壁上固定的基团更稳定，以保证检测时的稳定性。

[0012] (3)免疫层析毛细管的组装:将作为检测区的抗原和作为质控区的二抗分别注入步骤(2)处理得到的毛细管的两端，25–30℃下固定 1.5–2.5 h，将毛细管浸入 PBST 缓冲液中抽动清洗 3–5min，重复清洗三次，1–2wt% 的 BSA 溶液注满毛细管，在 30–37℃下反应 1.5–2h，将毛细管浸入 PBST 缓冲液中抽动清洗 3–5min，重复清洗三次，干燥后获得免疫层析毛细管。

[0013] 作为检测区的抗原是能与胶体金标记的一抗特异性结合的抗原，作为质控区的二抗是能与胶体金标记的一抗特异性结合的抗体。本方法可以用于多种抗原 – 一抗 – 二抗对应物的检测。

[0014] 1–2wt% 的 BSA 溶液注满毛细管，在 30–37℃下反应 1.5–2h，以封闭毛细管内壁上没有连接蛋白的非特异性位点。

[0015] 玻璃材质具有很多适合作为基底的优点，如廉价、表面均一光滑、无渗透、耐高温、能承受高离子强度漂洗、荧光背景低和样品使用量少等优点。

[0016] 本发明针对传统免疫层析材料的不足和玻璃材质自身的优点，利用玻璃毛细管为层析反应器，将胶体金免疫层析检测方法成功转移至毛细管中，建立了一种新型毛细管免疫层析方法。将二抗和抗原固定在特定区域为质控区和检测区，应用直接竞争的方法组装了免疫层析毛细管。

[0017] 作为优选，步骤(1)中的有机溶剂为丙酮或乙醇。

[0018] 作为优选，步骤(1)中所述 piranha 溶液的制备方法为：95 wt %–98wt% 浓硫酸与 30wt% 双氧水按照 3–4:1 的体积比混合，混合时将双氧水溶液缓慢加入浓硫酸中，不断搅拌以保持混合液的温度在 80℃以下。

[0019] 作为优选，步骤(1)中 KOH 溶液浓度为 0.8–1.2mol/L，HCl 溶液浓度为 0.8–1.2mol/L。

[0020] 作为优选，步骤(2)无水甲苯的制备方法为：甲苯中加入无水硫酸钠静置 10–24h，抽滤除去无水硫酸钠，然后加入金属钠丝，同时加入二苯甲酮作为指示剂，加热回流 2–3h，

然后常压蒸馏,收集 111±1℃的馏分得无水甲苯。

[0021] 作为优选,无水硫酸钠用量为 5-10g/100mL 甲苯,金属钠丝用量为 0.5-1g/100mL 甲苯,二苯甲酮用量为 0.1-0.5g/100mL 甲苯。

[0022] 作为优选,所述抗原为小清蛋白,二抗为羊抗兔二抗。针对不同的检测物,可以选择其它不同的抗原、二抗。抗原为小清蛋白,二抗为羊抗兔二抗是针对小清蛋白的检测而设计的,用于与被检测物(小清蛋白)混合的一抗:为保证检测结果的精确和稳定性选用单克隆抗体,可以选择兔抗小清蛋白,鼠抗小清蛋白等,对应的二抗可以选择羊抗兔或者羊抗鼠、兔抗鼠等二抗。

[0023] 作为优选,小清蛋白与 PBS 缓冲液配制浓度 0.1-0.25 mg/mL 的小清蛋白溶液后注入毛细管,羊抗兔二抗与 PBS 缓冲液配制浓度 0.2-0.3 mg/mL 的羊抗兔二抗溶液后注入毛细管。

[0024] 作为优选,小清蛋白溶液注入毛细管的用量为 3-6 μL,羊抗兔二抗溶液注入毛细管的用量为 3-6 μL。

[0025] 本发明的有益效果是:

[0026] 1、首次采用毛细管为免疫层析的反应器,将质控区和检测区固定在刚性的玻璃基底上,避免了传统基地材料如硝酸纤维素膜因材质复杂而引起的拖带、稳定性和重复性差的缺点。

[0027] 2、以玻璃材质为基底较硝酸纤维素膜、纸质材料和线性材料更稳定,基底材料更稳固不易脱落,更不易受环境因素的影响,可以显著地减少批间和批内差异。

[0028] 3、以毛细管为免疫层析反应的容器,由于其微小的管径可以减少样品的使用量,十几微升甚至几微升的样品即可完成检测。

[0029] 4、以毛细管为免疫层析反应的容器,由于其可控的长度可以方便设计多残留的检测。

[0030] 5、组装过程相对简单,且组装过程中不需要使用大型仪器,修饰、组装技术简单易掌握。

[0031] 6、使用 GPTMS 作为将二抗和抗原固定在毛细管内壁上的交联剂,由于其末端的环氧基团提高了蛋白质的结合能力,并同时尽可能地保持了抗原抗体的活性。

[0032] 7、以固定在质控区和检测区上的二抗和抗原为固定相,结合检测混合液中的目标待测物-金标一抗结合物,使其聚集在特定的区域,以肉眼辨别其结果。

[0033] 8、使用毛细管作为免疫层析的反应容器成本较低,且材质较均一,利于较长时间储藏。

[0034] 9、采用本发明制成的免疫层析毛细管可根据实际检测需要进行质控区和检测区的组装,从而实现对危害因子的快速、可视化检测。

附图说明

[0035] 图 1 是本发明免疫层析毛细管的组装流程图,图中 a、毛细管的清洗;b、环氧基团的修饰;c、抗原和二抗的固定;d、非特异位点的封闭。

[0036] 图 2 是本发明免疫层析毛细管的组装效果。

[0037] 图 3 是免疫层析毛细管对小清蛋白检测结果的扫描图片,两端分别为控制区和检

测区,小清蛋白的浓度为从 0 到 10^6 ng/mL。

具体实施方式

[0038] 下面通过具体实施例,并结合附图,对本发明的技术方案作进一步的具体说明。
[0039] 本发明中,若非特指,所采用的原料和设备等均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0040] 1、仪器和试剂

- [0041] HP Scanjet G4050 扫描仪 中国惠普有限公司
[0042] 超声清洗仪 KQ 5200B 昆山市超声仪器有限公司
[0043] 分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司
[0044] MS1 Minshaker 涡旋振荡器 IKA 公司
[0045] 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司
[0046] 自动超纯水仪 (Ro DI digital) 北京康铭泰克科技发展有限公司
[0047] pHs-3C 型 pH 计 上海伟业仪器厂
[0048] 蛋白 A 柱 GE Healthare
[0049] 毛细管($d=0.9\text{mm}$) 华西医科大学仪器厂
[0050] 氯金酸(HAuCl₄) 中国国药集团
[0051] 兔抗小清蛋白 华大蛋白提供
[0052] 羊抗兔二抗 北京中杉金桥生物技术有限公司
[0053] 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) Sigma 试剂公司
[0054] BSA (牛血清白蛋白) 索莱宝生物科技有限公司
[0055] 三乙胺 中国国药集团
[0056] Tris-HCL Solarbio 公司。

[0057] 2、免疫层析毛细管的组装

[0058] 实施例 1:

[0059] (1) 毛细管的处理:

[0060] piranha 溶液的配制:95 wt % 浓硫酸与 30wt% 双氧水按照 4:1 的体积比混合,混合时将双氧水溶液缓慢加入浓硫酸中,不断搅拌以保持混合液的温度在 80℃以下。

[0061] 将毛细管迅速浸入上述热的 piranha 溶液中超声清洗 15min,超纯水清洗至中性,105℃的烘箱中干燥 2h,冷却,然后将毛细管依次浸入浓度为 0.8mol/L 的 KOH 溶液(200mL)、超纯水(200mL,中间更换两次)、浓度为 0.8mol/L 的 HCl 溶液(200mL)、超纯水(200mL,中间更换两次)及丙酮(200mL)中分别超声清洗 15min,然后在 105℃的烘箱中干燥 1h 以上,以完全出去水分。

[0062] (2) 毛细管的修饰:

[0063] 无水甲苯的制备:300mL 甲苯(分析纯)中加入 15 g 无水硫酸钠静置 10h,抽滤除去无水硫酸钠,然后加入 2g 金属钠丝,同时加入 0.5g 二苯甲酮作为指示剂,将回流装置中的空气用氮气置换,加热回流 2h,使溶液变蓝;停止加热,改为蒸馏装置,然后常压蒸馏,收集 111±1℃的馏分得无水甲苯。

[0064] 将 GPTMS 和三乙胺溶于无水甲苯中得修饰液,使得 GPTMS 的终浓度为 8vol%,三乙

胺的终浓度为 1vol%，将步骤(1)处理所得毛细管浸没于修饰液中室温下干燥环境中反应 25h，排出毛细管内的修饰液，室温下干燥环境中保持 2h，然后将毛细管浸入无水甲苯中上下抽动清洗 5min，接着将毛细管浸入丙酮中上下抽动清洗 5min，氮气气氛下干燥。

[0065] (3) 免疫层析毛细管的组装：

[0066] 将作为检测区的抗原(浓度 0.1mg/mL 的小清蛋白溶液，小清蛋白与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L)配制而成)和作为质控区的二抗(浓度 0.2mg/mL 的羊抗兔二抗溶液，羊抗兔二抗与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L)配制而成)分别注入步骤(2)处理得到的毛细管的两端，小清蛋白溶液注入毛细管的用量为 6 μL，羊抗兔二抗溶液注入毛细管的用量为 6 μL，25℃下固定 2.5 h，将毛细管浸入于 PBST 缓冲液(PH7.4)中抽动清洗 3min，重复清洗三次，1wt% 的 BSA 溶液(BSA 与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L)配制而成)注满毛细管，在 30℃下反应 2h，将毛细管浸入于 PBST 缓冲液中抽动清洗 3min，重复清洗三次，干燥后获得免疫层析毛细管。

[0067] 实施例 2：

[0068] (1) 毛细管的处理：

[0069] piranha 溶液的配制：98wt% 浓硫酸与 30wt% 双氧水按照 3:1 的体积比混合，混合时将双氧水溶液缓慢加入浓硫酸中，不断搅拌以保持混合液的温度在 80℃以下。

[0070] 将毛细管迅速浸入上述热的 piranha 溶液中超声清洗 20min，超纯水清洗至中性，105℃的烘箱中干燥 1h，冷却，然后将毛细管依次浸入浓度为 1.2mol/L 的 KOH 溶液(200mL)、超纯水(200mL，中间更换两次)、浓度为 1.2mol/L 的 HCl 溶液(200mL)、超纯水(200mL，中间更换两次)及乙醇(200mL)中分别超声清洗 15min，然后在 105℃的烘箱中干燥 1h 以上，以完全除去水分。

[0071] (2) 毛细管的修饰：

[0072] 无水甲苯的制备：300mL 甲苯(分析纯)中加入 30 g 无水硫酸钠静置 24h，抽滤除去无水硫酸钠，然后加入 1.5g 金属钠丝，同时加入 1.5g 二苯甲酮作为指示剂，将回流装置中的空气用氮气置换，加热回流 3h，使溶液变蓝；停止加热，改为蒸馏装置，然后常压蒸馏，收集 111±1℃的馏分得无水甲苯。

[0073] 将 GPTMS 和三乙胺溶于无水甲苯中得修饰液，使得 GPTMS 的终浓度为 15vol%，三乙胺的终浓度为 2vol%，将步骤(1)处理所得毛细管浸没于修饰液中室温下干燥环境中反应 18h，排出毛细管内的修饰液，室温下干燥环境中保持 3h，然后将毛细管浸入无水甲苯中上下抽动清洗 7min，接着将毛细管浸入丙酮中上下抽动清洗 7min，氮气气氛下干燥。

[0074] (3) 免疫层析毛细管的组装：

[0075] 将作为检测区的抗原(浓度 0.25 mg/mL 的小清蛋白溶液，小清蛋白与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L)配制而成)和作为质控区的二抗(浓度 0.3 mg/mL 的羊抗兔二抗溶液，羊抗兔二抗与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L)配制而成)分别注入步骤(2)处理得到的毛细管的两端，小清蛋白溶液注入毛细管的用量为 3 μL，羊抗兔二抗溶液注入毛细管的用量为 3 μL，30℃下固定 1.5h，将毛细管浸入于 PBST 缓冲液(PH7.4)中抽动清洗 5min，重复清洗三次，2wt% 的 BSA 溶液注满毛细管，在 37℃下反应 1.5h，将毛细管浸入于 PBST 缓冲液中抽动清洗 5min，重复清洗三次，干燥后获得免疫层析毛细管。

[0076] 实施例 3：

[0077] (1) 毛细管的处理:

[0078] piranha 溶液的配制: 98wt% 浓硫酸与 30wt% 双氧水按照 3:1 的体积比混合, 混合时将双氧水溶液缓慢加入浓硫酸中, 不断搅拌以保持混合液的温度在 80℃ 以下。

[0079] 将毛细管迅速浸入上述热的 piranha 溶液中超声清洗 18min, 超纯水清洗至中性, 105℃ 的烘箱中干燥 3h, 冷却, 然后将毛细管依次浸入浓度为 1mol/L 的 KOH 溶液(200mL)、超纯水(200mL, 中间更换两次)、浓度为 1mol/L 的 HCl 溶液(200mL)、超纯水(200mL, 中间更换两次)及丙酮(200mL) 中分别超声清洗 12min, 然后在 105℃ 的烘箱中干燥 1h 以上, 以完全除去水分。

[0080] (2) 毛细管的修饰:

[0081] 无水甲苯的制备: 300mL 甲苯(分析纯)中加入 20 g 无水硫酸钠静置 18h, 抽滤除去无水硫酸钠, 然后加入 1.5g 金属钠丝, 同时加入 1g 二苯甲酮作为指示剂, 将回流装置中的空气用氮气置换, 加热回流 2.5h, 使溶液变蓝; 停止加热, 改为蒸馏装置, 然后常压蒸馏, 收集 111±1℃ 的馏分得无水甲苯。

[0082] 将 GPTMS 和三乙胺溶于无水甲苯中得修饰液, 使得 GPTMS 的终浓度为 10vol%, 三乙胺的终浓度为 1.5vol%, 将步骤(1) 处理所得毛细管浸没于修饰液中室温下干燥环境中反应 20h, 排出毛细管内的修饰液, 室温下干燥环境中保持 2.5h, 然后将毛细管浸入无水甲苯中上下抽动清洗 6min, 接着将毛细管浸入丙酮中上下抽动清洗 6min, 氮气气氛下干燥。

[0083] (3) 免疫层析毛细管的组装:

[0084] 将作为检测区的抗原(浓度 0.2 mg/mL 的小清蛋白溶液, 小清蛋白与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L) 配制而成) 和作为质控区的二抗(浓度 0.3 mg/mL 的羊抗兔二抗溶液, 羊抗兔二抗与 PBS 缓冲液(PH7.4, 0.01mol/L) 配制而成) 分别注入步骤(2) 处理得到的毛细管的两端, 小清蛋白溶液注入毛细管的用量为 4 μL, 羊抗兔二抗溶液注入毛细管的用量为 4 μL, 28℃ 下固定 2 h, 将毛细管浸入 PBST 缓冲液(PH7.4) 中抽动清洗 4min, 重复清洗三次, 1.5wt% 的 BSA 溶液注满毛细管, 在 32℃ 下反应 1.8h, 将毛细管浸入 PBST 缓冲液中抽动清洗 4min, 重复清洗三次, 干燥后获得免疫层析毛细管。

[0085] 毛细管的清洗、管内壁的修饰及质控区和检测区的组装过程如图 1 所示。通过 piranha 溶液、KOH 及 HCl 溶液的清洗使毛细管内壁上固定上稳定的羟基基团。GPTMS 为毛细管内壁连结上丰富的环氧基基团, 环氧基相比较于氨基和羧基提供更优异的蛋白质固定基团, 并能尽可能的保证蛋白质的活性。GPTMS 将二抗和抗原固定在特定区域作为质控区和检测区, BSA 将没有连结二抗、抗原的非特异性位点环氧基团进行封闭。至此, 免疫层析毛细管的组装过程结束, 4℃ 下储存备用。

[0086] 免疫层析毛细管的具体组装效果如图 2, 当金标一抗和待检测物同时进入免疫层析毛细管进行免疫反应后, 通过颜色现象分析其测试结果。a 为固定好质控区和检测区的免疫层析毛细管; b 为对阴性样品的检测, 当进入免疫层析毛细管的混合液中没有待测物时, 金标一抗和检测区上固定的抗原结合, 当到达质控区时同样和管壁上的二抗结合, 因此可以同时在检测区和质控区看到由于金标一抗聚集呈现两条红色; c 为对阳性样品的检测, 由于待测样品中的抗原与免疫层析毛细管检测区上固定的抗原与金标一抗发生竞争性结合, 因此金标一抗就无法或者只有少量能结合到检测区上固定的抗原, 因此, 检测区的颜色相对质控区明显减弱或者完全没有颜色, 只出现金标一抗聚集在质控区的一条红色区域。

[0087] 3、毛细管检测条件的优化

[0088] 设置了一系列的环氧基硅烷(GPTMS)修饰时间实验,结果表明随着固定时间的延长,免疫反应后显色逐渐加深,当固定时间超过18h后显色深度逐渐不发生变化,且随着时间的增长管内壁上开始出现固定不均匀的情况,因此修饰时间确定为18h-25h。

[0089] 对修饰液的比例进行选择,将GPTMS配置成一系列浓度的混合液(5 vol % - 25 vol %),把前处理过的毛细管浸入此混合液中固定18h。免疫反应后可以观察到当GPTMS的浓度达到8vol%-15vol%后,随着GPTMS浓度的增大,颜色深度将不再增加。因此,在本发明中GPTMS的浓度选为8vol%-15vol%。

[0090] 封闭液和封闭时间的选择,配置成一系列浓度的BSA溶液(0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%),对固定有质控区、检测区的毛细管进行不同时间的封闭:1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h。以质控区和阴性样品的检测区边界清晰,对阳性检测完全没有颜色为标准,最终选择的封闭液的浓度为1%-2%,封闭时间为1.5-2h。

[0091] 质控区和检测区固定二抗和抗原浓度的选择:将二抗和抗原的浓度分别稀释为0.1-0.5 mg/mL,检测阴性样品时质控区和检测区的颜色基本相同,阳性样品时检测区完全没有颜色,同时保证两者的用量最小及尽量低的检测限。经过优化后固定二抗的浓度约为0.2-0.3 mg/mL,抗原的浓度约为0.1-0.25 mg/mL。

[0092] 4、对小清蛋白的检测

[0093] 4.1胶体金标记的一抗(金标一抗)的制备

[0094] 胶体金的制备:将实验中用到的玻璃仪器和转子等在新配置的王水(HCl : HNO₃ = 3 : 1)中至少浸泡15min,然后依次用大量的去离子水冲洗干净,100℃以上干燥。向双颈瓶中加入100mL 1mM HAuCl₄,在冷凝条件下使用磁力搅拌器搅拌下均匀加热。充分沸腾后,快速加入10mL 38.8mM 柠檬酸钠溶液,溶液的颜色会发生快速的变化,其顺序应为:淡黄色→无色→黑色→紫色→深红色。继续加热回流15-20min后停止加热,持续搅拌使反应系统自然冷却至室温。将冷却好的溶液过孔径为0.45 μm的醋酸滤膜。制备好的纳米金溶液4℃条件下避光保存。

[0095] 胶体金标记的一抗的制备:使用蛋白A柱对兔抗小清蛋白(一抗)进行纯化,3000g离心15min除去沉淀。0.1M的K₂CO₃将上述纳米金溶液调至pH 8.2,缓慢加入兔抗小清蛋白至终浓度为20 μg/mL,缓慢均匀搅拌2h,接下来加入10wt% BSA至终浓度为1 wt %,以及1 wt % 的聚乙二醇(PEG20000)至最终体积的1/10,继续搅拌30min 封闭纳米金粒子上的非特异性位点。然后2500 g 离心15 min 除去聚集的沉淀,10000 g 离心1h 收集沉淀,将沉淀复溶于pH8.2的含有1wt% BSA和0.02 wt % NaN₃的Tris-HCl缓冲液,复溶至原体积(纳米金溶液的体积)的1/10得金标兔抗小清蛋白(胶体金标记的一抗),4℃保存。

[0096] 4.2小清蛋白提取

[0097] 称取从佳世客超市(青岛)中购买的大菱鲆鱼糜制品,与Tris-HCl(pH 7.5)以1:2(w/v)混合匀浆,将匀浆后的样品过滤后,98℃下水浴加热5min,最后3800g离心5min,收集上清(小清蛋白溶液)进行测试。

[0098] 4.3样品检测

[0099] 将4.1节制备好的金标兔抗小清蛋白与4.2节方法提取纯化后的小清蛋白溶液按1:1的体积比混合混匀。取5 μL的前述混合液从检测区端注入免疫层析毛细管,静置4min

后用移液器推动混合液向下移动流经至毛细免疫层析管的质控区，同样在此区停留 4min，将多余的混合液排出毛细管，然后用 PBST (pH7.4) 注满全管后甩出清洗，重复此清洗步骤三次。通过裸眼定性获得检测结果。

[0100] 用本发明组装的免疫层析毛细管对待测样品进行检测，免疫反应后通过观察质控区和检测区的颜色判定结果。当两部分均呈现红色且颜色几乎相同时为阴性结果；只有质控区呈现红色，检测区为无色或者是检测区的颜色比质控区浅时为阳性结果；质控区未呈现红色的免疫层析毛细管为失效。

[0101] 将制备好的免疫层析毛细管用于阴性样品的检测，在反应之初质控区和检测区的颜色随着显色时间的增加而加深，4min 后颜色的深浅基本上不发生变化，说明金标一抗已稳定结合在管壁上，因此显色时间为 4min。

[0102] 4.4 不同浓度小清蛋白的检测

[0103] 按照 4.2 节的方法获得小清蛋白溶液，用考马斯亮蓝法(现有常规方法)测定小清蛋白的浓度，然后用 PBS (PH7.4, 0.01mol/L) 将小清蛋白配置成一系列浓度梯度的溶液，金标兔抗小清蛋白一抗与不同浓度的小清蛋白溶液按 1:1 的体积比混合混匀，取 5 μL 的前述混合液从检测区端注入免疫层析毛细管，静置 4min 后用移液器推动混合液向下移动流经至毛细免疫层析管的质控区，同样在此区停留 4min，将多余的混合液排出毛细管，然后用 PBST (pH7.4) 注满全管后甩出清洗，重复此清洗步骤三次，观察显色情况。其结果如图 3 所示，当小清蛋白的浓度升高至 70ng/mL 时检测区的颜色明显弱于质控区的颜色，当浓度继续升高时颜色越来越浅，因此本发明的免疫层析毛细管的视觉检测限为 70ng/mL，即当小清蛋白的浓度高于 70ng/mL 检测区的颜色明显弱于质控区或检测区无颜色为阳性，反之为阴性。此检测限显著低于对鱼过敏的消费者的最低预期值 5 mg/kg。

[0104] 4.5 毛细层析管的稳定性和重复性

[0105] 将同一批次制备的毛细层析管 4 °C 条件下分别储存 2, 4, 8 天，和 2, 4 周，进行阴性样本检测，其检测区和控制区的颜色均没有显著变化，说明储存稳定性良好。原因可能是由于玻璃毛细管可以有效的保护检测区不被环境的温度、湿度、氧气和光线所破坏。小清蛋白通过环氧基团共价固定在检测区，此共价结合力明显牢固于传统的电子吸引力和疏水作用力，因此增强了检测的稳定性。

[0106] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案，并非对本发明作任何形式上的限制，在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

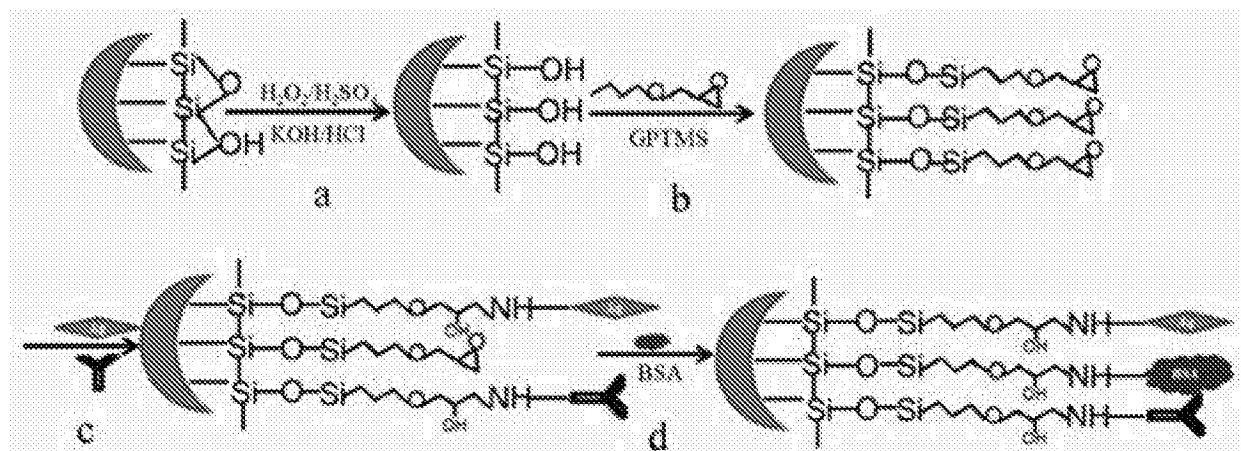


图 1

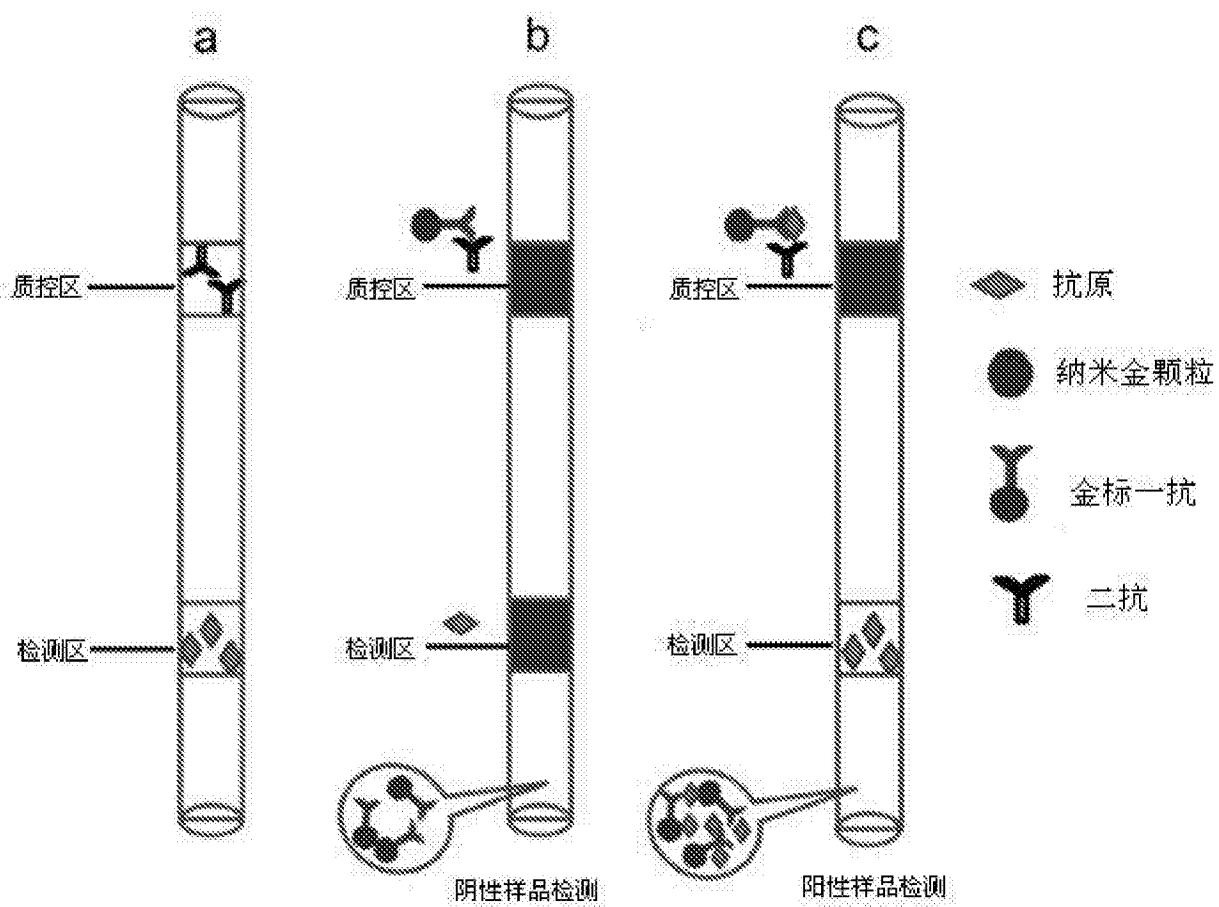


图 2

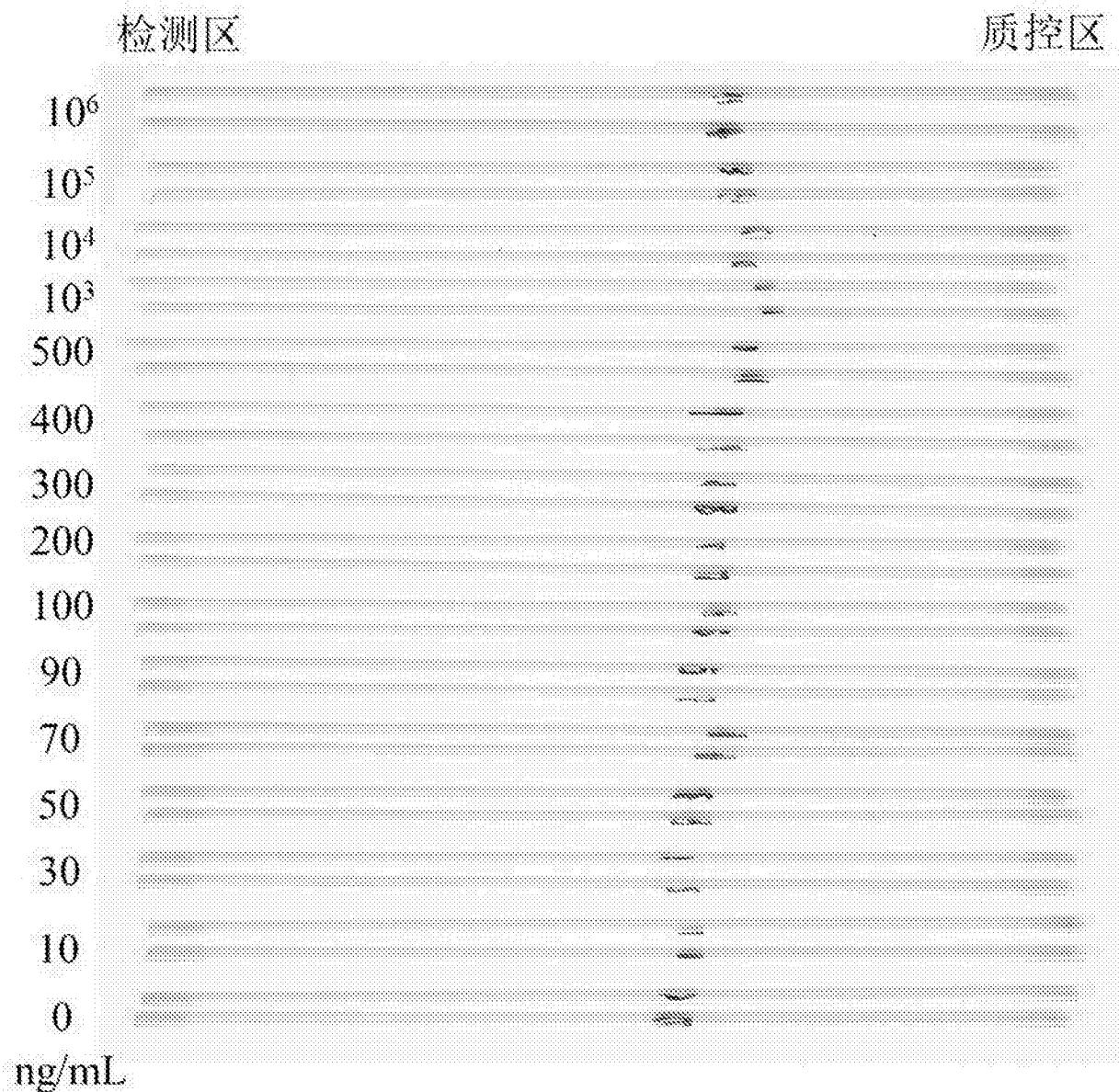


图 3