



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102426230 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 201110279477. 4

(22) 申请日 2011. 09. 20

(73) 专利权人 王利兵

地址 410004 湖南长沙市湘府中路 188 号湖南
出入境检验检疫局检验检疫技术中
心

专利权人 胥传来
许宙

(72) 发明人 王利兵 胥传来 许宙

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/537(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/19(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005/0142605 A1, 2005. 06. 30, 全文.

CN 101382542 A, 2009. 03. 11, 全文.

CN 102127445 A, 2011. 07. 20, 全文.

CN 102175736 A, 2011. 09. 07, 全文.

CN 102109518 A, 2011. 06. 29, 全文.

CN 101846631 A, 2010. 09. 29, 全文.

CN 101987364 A, 2011. 03. 23, 全文.

WO 2011/016053 A1, 2011. 02. 10, 全文.

Xiulan S, Xiaolian Z, Jian T, Zhou J, Chu FS. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. 《Int J Food Microbiol》. 2005, 第 99 卷 (第 2 期), 185-194.

孙秀兰等. 黄曲霉毒素 B1 抗体和纳米金颗粒的相互作用机理. 《高等学校化学学报》. 2007, 第 28 卷 (第 8 期), 1449-1453.

Xu Chuanlai et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues. 《Biomed. Chromatogr.》. 2006, 第 20 卷 1390-1394.

Libing Wang et al. Simple, Rapid, Sensitive, and Versatile SWNT-Paper Sensor for Environmental Toxin Detection Competitive with ELISA. 《Nano. lett.》. 2009, 第 9 卷 (第 12 期), 4147-4152.

Zhu Y, Qu C, Kuang H, Xu L, Liu L, Hua Y, Wang L, Xu C. Simple, rapid and sensitive detection of antibiotics based on the side-by-side assembly of gold nanorod probes. 《Biosens Bioelectron》. 2011, 第 26 卷 (第 11 期), 4387-4392.

审查员 李宏悦

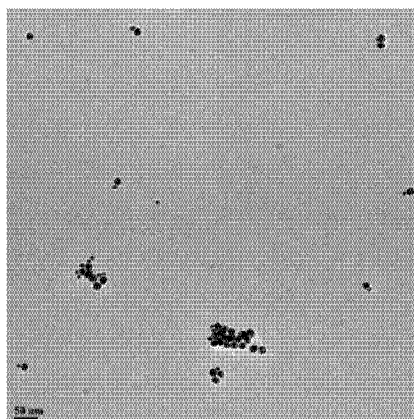
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法

(57) 摘要

一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法, 属于材料化学技术领域和食品安全技术领域。本发明包括金纳米粒子的合成、抗体 / 包被原偶联金纳米粒子、不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器的圆二色谱检测。本发明提供了一种检测黄曲霉毒素的不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器, 构建了利用圆二色 CD 信号进行检测的免疫传感器。



CN 102426230 B

1. 一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法,其特征在于:金纳米粒子的合成、抗体/包被原偶联金纳米粒子、不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器的圆二色谱检测;具体步骤为:

(1) 15nm 金纳米粒子的合成

15nm 金纳米粒子用柠檬酸三钠还原法合成;

(2) 8nm 金纳米粒子的合成

8nm 金纳米粒子用单宁酸和柠檬酸三钠还原氯金酸合成;

(3) 15nm 金纳米粒子和黄曲霉毒素抗体偶联

步骤(1)制备的 15nm 的金纳米粒子和黄曲霉毒素抗体通过静电作用形成 15nm 金纳米粒子-抗体复合体;

(4) 8nm 金纳米粒子和黄曲霉毒素包被原偶联

步骤(2)制备的 8nm 的金纳米粒子和黄曲霉毒素包被原通过静电作用形成 8nm 金纳米粒子-包被原复合体;

(5) 圆二色谱检测,绘制 CD 信号增值 $\Delta T \sim$ 黄曲霉毒素浓度 C 标准曲线

100 μ L 2nM 步骤(3)制备的 15nm 金纳米粒子-抗体复合体中加入 10 μ L 20nM 步骤(4)制备的 8nm 金纳米粒子-包被原复合体,再加入不同浓度的黄曲霉毒素标准品,孵育 1h 后,加入到微量比色皿中,测 CD 信号,以 CD 信号增值绘制 $\Delta T \sim C$ 标准曲线;

对照组设置:黄曲霉毒素抗体用赭曲霉毒素 A 抗体代替,其它操作同上。

2. 根据权利要求 1 所述的不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法,其特征在于:

(1) 15nm 金纳米粒子的合成

15nm 金纳米粒子的合成方案为:洁净的三口烧瓶中加入 87.5mL 超纯水,加入 2.3mL 质量浓度 0.4% 氯金酸溶液,搅拌并加热至沸腾,7-8min 后加入 1.4mL 质量浓度 1% 柠檬酸三钠溶液,溶液从无色变为红色后,停止加热,继续搅拌 15min;透射电镜显示 15nm;

(2) 8nm 金纳米粒子的合成

8nm 金纳米粒子的合成方案为:洁净的三口烧瓶中加入 69mL 超纯水,0.9mL 质量浓度 1% 氯金酸溶液作为 A 液;取一洁净的小瓶子,加入 3.8mL 质量浓度 1% 柠檬酸三钠溶液,0.1mL 质量浓度 1% 单宁酸溶液,0.2mL 25mM 碳酸钾溶液和 17.8mL 超纯水作为 B 液;A、B 液均加热到 60 $^{\circ}$ C,然后在高速搅拌下把 B 液迅速加入 A 液中,反应液在 60 $^{\circ}$ C 下继续搅拌 30min 形成深红色溶液,然后将溶液加热回流 2min 形成亮红色溶液,最后冷却到室温形成柠檬酸稳定的金纳米粒子,透射电镜显示 8nm;

(3) 15nm 金纳米粒子偶联黄曲霉毒素抗体

步骤(1)制备的 15nm 金纳米粒子取 100 μ L 置于 PCR 管中,加入 0.26 μ L 100 μ g/mL 的黄曲霉毒素抗体,在 15nm 金纳米粒子的 PCR 管中加入黄曲霉毒素抗体混匀后,向体系中加入 6 μ L 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 8.5,25 $^{\circ}$ C 静置反应 1h;

(4) 8nm 金纳米粒子偶联黄曲霉毒素包被原

步骤(2)制备的 8nm 金纳米粒子取 100 μ L 置于 PCR 管中,加入 2.6 μ L 100 μ g/mL 的黄曲霉毒素包被原,在 8nm 金纳米粒子的 PCR 管中加入黄曲霉毒素包被原混匀后,向体系中加入 9 μ L 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 8.5,25 $^{\circ}$ C 静置反应 2h;

(5) 圆二色谱检测, 绘制 CD 信号增值 $\Delta T \sim$ 黄曲霉毒素浓度 C 标准曲线

100 μ L 2nM 步骤(3) 制备的 15nm 金纳米粒子 - 抗体复合体中加入 10 μ L 20nM 步骤(4) 制备的 8nm 金纳米粒子 - 包被原复合体, 再加入不同浓度的黄曲霉毒素标准品, 孵育 1h 后, 加入到微量比色皿中, 测 CD 信号, 以 CD 信号增值绘制 $\Delta T \sim C$ 黄曲霉毒素浓度标准曲线;

对照组设置: 黄曲霉毒素抗体用赭曲霉毒素 A 抗体代替, 其它操作同上。

一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法

技术领域

[0001] 一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法,属于材料化学技术领域和食品安全技术领域。

背景技术

[0002] 纳米颗粒 (nanoparticles, Nas) 一般是指尺寸至少有一维在 1-100 nm 间的粒子。纳米尺度是处在原子簇和宏观物体交界的过渡区域,处于这个区域的材料具有一些独特性质,如小尺寸效应、表面、界面效应和量子尺寸效应等。空气中纳米颗粒虽然浓度很低,但具有很高的颗粒物数目。将宏观物体细分成纳米颗粒后,它的光学、热学、电学、磁学、力学以及化学性质和大体积固体相比将会显著不同。纳米材料的小尺寸、化学成分、表面结构、溶解性、外形和聚集情况决定着它们特殊的物理化学性质,这些性质使得纳米材料在将来有着广泛的用途。

[0003] 随着纳米科技的发展,纳米粒子组装体系的研究变得日益活跃。纳米粒子的二维和三维有序组装结构也因其重要的物理和化学性质近年来受到人们的广泛重视,它们在许多领域如:传感器、催化剂、磁化材料、表面增强拉曼和光学材料等方面有着潜在的应用。

[0004] 金纳米粒子是最为经典的一种金属纳米粒子,由于具有优良的稳定性和独特的光学、电学性质,在催化、传感器和生物分析检测等方面表现出很多潜在的应用价值,受到了物理、化学及生命科学等相关领域的广泛关注。它的高催化活性能通过自组装形成纳米结构的特点,使其在高级材料的制造上具有很大的应用前景。

[0005] 众所周知,当一束平面偏振光通过具有手性的介质时,由于该介质对左、右旋圆偏振光的折射率不同,使得它们通过介质的速度也不同,因此叠加产生的平面偏振光的振动方向将会改变,偏振光的振动平面将发生偏转,称为旋光性。许多生物大分子,如蛋白质、核酸、多糖等都是手性分子,所谓手性,就是具有不能重叠的三维镜像对应异构体。一般说来,凡具有手性的分子就具有旋光活性。

[0006] 所谓圆二色性是指当平面偏振光通过具有旋光活性的介质时,由于介质中同一种旋光活性分子存在手性不同的两种构型,因此它们对平面偏振光所分解成的右旋和左旋圆偏振光吸收不同,而吸收系数的差值即定义为圆二色性。

[0007] 圆二色光谱仪通过测量生物大分子的圆二色光谱从而得到生物大分子的二级结构,是简便和快捷的获得生物大分子结构的手段之一。其可应用于蛋白质折叠、蛋白质构象研究, DNA/RNA 反应,酶动力学,光学活性物质纯度测量,药物定量分析,生物化学与宏观大分子,金属络合物,聚合物化学等相关的科学研究。近年来,纳米粒子组装结构的手性研究成为人们关注的热点问题,但是通过组装产生 CD 信号,用于检测领域尚属空白。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种检测黄曲霉毒素的不对称金纳米粒子二聚体免疫传感

器,构建了利用 CD 信号检测的新型免疫传感器。

[0009] 本发明的技术方案:一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法,包括金纳米粒子的合成、抗体/包被原偶联金纳米粒子、不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器的圆二色谱检测。

[0010] (1) 15nm 金纳米粒子的合成

[0011] 15nm 金纳米粒子用柠檬酸三钠还原法合成;

[0012] (2) 8nm 金纳米粒子的合成

[0013] 8nm 金纳米粒子用单宁酸和柠檬酸三钠还原氯金酸合成;

[0014] (3) 15nm 金纳米粒子和黄曲霉毒素抗体偶联

[0015] 步骤(1)制备的 15nm 的金纳米粒子和黄曲霉毒素抗体通过静电作用形成 15nm 金纳米粒子-抗体复合体;

[0016] (4) 8nm 金纳米粒子和黄曲霉毒素包被原偶联

[0017] 步骤(2)制备的 8nm 的金纳米粒子和黄曲霉毒素包被原通过静电作用形成 8nm 金纳米粒子-包被原复合体;

[0018] (5) 圆二色谱检测,绘制 CD 信号增值 $\Delta T \sim$ 黄曲霉毒素浓度 C 标准曲线

[0019] 100 μ L 2nM 步骤(3)制备的 15nm 金纳米粒子-抗体复合体中加入 10 μ L 20nM 步骤(4)制备的 8nm 金纳米粒子-包被原复合体,再加入不同浓度的黄曲霉毒素标准品,孵育 1h 后,加入到微量比色皿中,测 CD 信号,以 CD 信号增值绘制 $\Delta T \sim C$ 标准曲线;

[0020] 对照组设置:黄曲霉毒素抗体用赭曲霉毒素 A 抗体代替,其它操作同上。

[0021] 具体步骤为:

[0022] (1) 15nm 金纳米粒子的合成

[0023] 15nm 金纳米粒子的合成方案为:洁净的三口烧瓶中加入 87.5mL 超纯水,加入 2.3mL 质量浓度 0.4% 氯金酸溶液,搅拌并加热至沸腾,7-8min 后加入 1.4mL 质量浓度 1% 柠檬酸三钠溶液,溶液从无色变为红色后,停止加热,继续搅拌 15min;透射电镜显示 15nm;

[0024] (2) 8nm 金纳米粒子的合成

[0025] 8nm 金纳米粒子的合成方案为:洁净的三口烧瓶中加入 69mL 超纯水,0.9mL 质量浓度 1% 氯金酸溶液作为 A 液;取一洁净的小瓶子,加入 3.8mL 质量浓度 1% 柠檬酸三钠溶液,0.1mL 质量浓度 1% 单宁酸溶液,0.2mL 25mM 碳酸钾溶液和 17.8mL 超纯水作为 B 液;A、B 液均加热到 60 $^{\circ}$ C,然后在高速搅拌下把 B 液迅速加入 A 液中,最终反应液在 60 $^{\circ}$ C 下继续搅拌 30min 形成深红色溶液,然后将溶液加热回流 2min 形成亮红色溶液,最后冷却到室温形成柠檬酸稳定的金纳米粒子,透射电镜显示 8nm;

[0026] (3) 15nm 金纳米粒子偶联黄曲霉毒素抗体

[0027] 步骤(1)制备的 15nm 金纳米粒子取 100 μ L 置于 PCR 管中,加入 0.26 μ L 100 μ g/mL 的黄曲霉毒素抗体,在 15nm 金纳米粒子的 PCR 管中加入黄曲霉毒素抗体混匀后,向体系中加入 6 μ L 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 8.5,25 $^{\circ}$ C 静置反应 1h;

[0028] (4) 8nm 金纳米粒子偶联黄曲霉毒素包被原

[0029] 步骤(2)制备的 8nm 金纳米粒子取 100 μ L 置于 PCR 管中,加入 2.6 μ L 100 μ g/mL 的黄曲霉毒素包被原,在 8nm 金纳米粒子的 PCR 管中加入黄曲霉毒素包被原混匀后,向体系中加入 9 μ L 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 8.5,25 $^{\circ}$ C 静置反应 2h;

[0030] (5) 圆二色谱检测, 绘制 CD 信号增值~黄曲霉毒素浓度 C 标准曲线

[0031] 100 μ L 2nM 步骤(3)制备的 15nm 金纳米粒子-抗体复合体中加入 10 μ L 20nM 步骤(4)制备的 8nm 金纳米粒子-包被原复合体, 再加入不同浓度的黄曲霉毒素标准品, 孵育 1h 后, 加入到微量比色皿中, 测 CD 信号, 以 CD 信号增值绘制 $\Delta T \sim C$ 黄曲霉毒素浓度标准曲线;

[0032] 对照组设置: 黄曲霉毒素抗体用赭曲霉毒素抗体代替, 其它操作同上。

[0033] 本发明的有益效果: 本发明提供了一种检测黄曲霉毒素的不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器, 构建了利用 CD 信号检测的新型免疫传感器。

附图说明

[0034] 图 1 典型的金纳米粒子二聚体组装图。

[0035] 图 2 纳米材料组装结构的圆二色谱图。

具体实施方式

[0036] 实施例 1

[0037] (1) 15nm 金纳米粒子的合成

[0038] 15nm 金纳米粒子的合成方案为: 洁净的三口烧瓶中加入 87.5mL 超纯水, 加入 2.3mL 0.4% 氯金酸溶液, 搅拌并加热至沸腾, 7-8min 后加入 1.4mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 溶液从无色变为红色后, 停止加热, 继续搅拌 15min; 透射电镜显示 15nm;

[0039] (2) 8nm 金纳米粒子的合成

[0040] 8nm 金纳米粒子的合成方案为: 洁净的三口烧瓶中加入 69mL 超纯水, 0.9mL 1% 氯金酸溶液作为 A 液; 取一洁净的小瓶子, 加入 3.8mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 0.1mL 1% 单宁酸溶液, 0.2mL 25mM 碳酸钾溶液和 17.8mL 超纯水作为 B 液; A、B 液均加热到 60 $^{\circ}$ C, 然后在高速搅拌下把 B 液迅速加入 A 液中, 最终反应液在 60 $^{\circ}$ C 下继续搅拌 30min 形成深红色溶液, 然后将溶液加热回流 2min 形成亮红色溶液, 最后冷却到室温形成柠檬酸稳定的金纳米粒子, 透射电镜显示 8nm;

[0041] (3) 15nm 金纳米粒子偶联黄曲霉毒素抗体

[0042] 步骤(1)制备的 15nm 金纳米粒子取 100 μ L 置于 PCR 管中, 加入 0.26 μ L 100 μ g/mL 的黄曲霉毒素抗体, 在 15nm 金纳米粒子的 PCR 管中加入黄曲霉毒素抗体混匀后, 向体系中加入 6 μ L 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 8.5, 25 $^{\circ}$ C 静置反应 1h;

[0043] (4) 8nm 金纳米粒子偶联黄曲霉毒素包被原

[0044] 步骤(2)制备的 8nm 金纳米粒子取 100 μ L 置于 PCR 管中, 加入 2.6 μ L 100 μ g/mL 的黄曲霉毒素包被原, 在 8nm 金纳米粒子的 PCR 管中加入黄曲霉毒素包被原混匀后, 向体系中加入 9 μ L 0.1M K_2CO_3 调节 pH 至 8.5, 25 $^{\circ}$ C 静置反应 2h;

[0045] (5) 圆二色谱检测, 绘制 CD 信号增值 $\Delta T \sim C$ 黄曲霉毒素浓度标准曲线

[0046] 100 μ L 2nM 步骤(3)制备的 15nm 金纳米粒子-抗体复合体中加入 10 μ L 20nM 步骤(4)制备的 8nm 金纳米粒子-包被原复合体, 再加入不同浓度的黄曲霉毒素标准品, 孵育 1h 后, 加入到微量比色皿中, 测 CD 信号, 以 CD 信号增值绘制 $\Delta T \sim$ 黄曲霉毒素浓度 C 标准曲线;

[0047] 对照组设置：黄曲霉毒素抗体用赭曲霉毒素体代替，其它操作同上。

[0048] 所述黄曲霉毒素抗体和黄曲霉毒素包被原均购于北京华安麦科生物技术有限公司，北京市昌平区科技园区超前路 6 号。

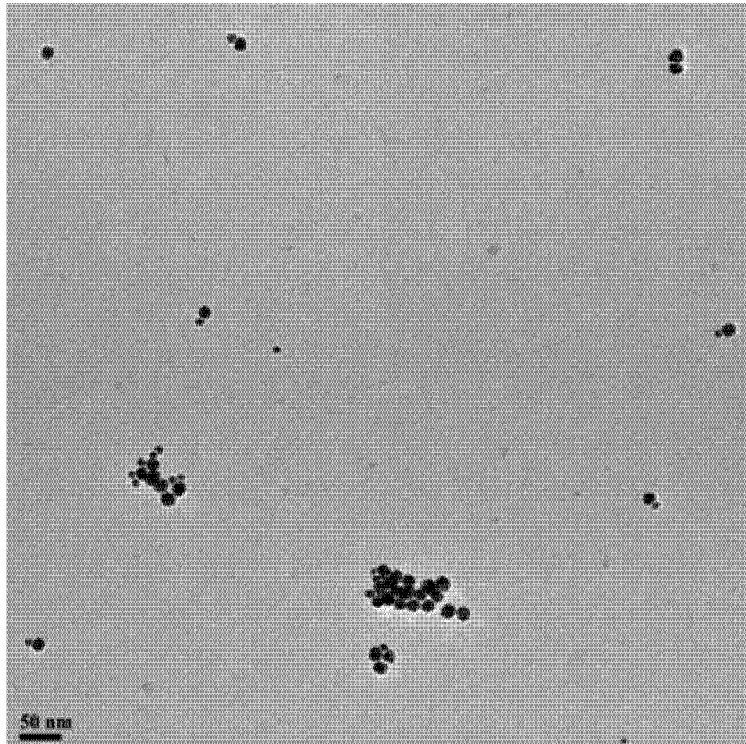


图 1

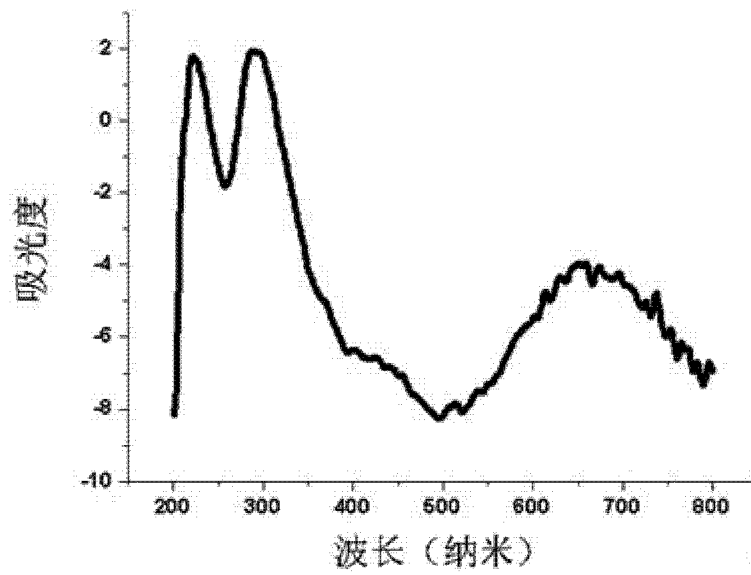


图 2

专利名称(译)	一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法		
公开(公告)号	CN102426230B	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN201110279477.4	申请日	2011-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 许宙		
申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 许宙		
当前申请(专利权)人(译)	王利兵 胥传来 许宙		
[标]发明人	王利兵 胥传来 许宙		
发明人	王利兵 胥传来 许宙		
IPC分类号	G01N33/537 G01N33/531 G01N21/19		
CPC分类号	B82Y40/00 G01N33/54346 B82Y30/00		
其他公开文献	CN102426230A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器检测黄曲霉毒素的方法，属于材料化学技术领域和食品安全技术领域。本发明包括金纳米粒子的合成、抗体/包被原偶联金纳米粒子、不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器的圆二色谱检测。本发明提供了一种检测黄曲霉毒素的不对称金纳米粒子二聚体免疫传感器，构建了利用圆二色CD信号进行检测的免疫传感器。

