



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103323587 A

(43) 申请公布日 2013.09.25

(21) 申请号 201310270942.7

(22) 申请日 2013.06.28

(71) 申请人 天津农学院

地址 300384 天津市西青区津静路 22 号

(72) 发明人 崔新仪 李宁 梁红春 曲福玲

王学利 胡奇

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限

公司 12209

代理人 王融生

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

### (54) 发明名称

一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法

### (57) 摘要

一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法,其技术方案是:1、核壳量子点的制备及不同高分子修饰对脂溶性量子点水溶性改性;2、量子点探针制备及其纯化;3、吡虫啉抗体量子点免疫分析方法的建立。本发明在量子点制备、纯化、性能表征及在农药吡虫啉残留检测中应用,是基于量子点和羊抗小鼠二抗的偶联物,建立的一种灵敏、快速检测蔬菜中吡虫啉的荧光免疫分析法。

1. 一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法,其特征在于:

量子点的制备选用目前常用的半导体材料:锌、硒、镉、硅为原料,采用胶体化学方法,制备出具有稳定核壳结构、能呈现不同荧光颜色的量子点,每个量子点均具有了一个光谱地址;本方法分别采用有机相合成和水溶液合成两种方法,有机相合成 CdX (X=Se、S、Te)量子点具体技术路线;水溶液合成 CdX (X=Se、S、Te),提高量子点的荧光效率,采用 top-down 量子点制作方法制备 TeS 和 CdS;

量子点功能化修饰和抗体标记将上述具有稳定核壳结构的量子点,分别与带活性功能基团的材料:巯基丙酸、聚乙二醇或双亲性高分子进行反应,采用超声乳化和化学自组装方法,分别制备出带不同功能基团:氨基和羧基的水溶性量子点,并与抗体等进行化学偶联,经凝胶色谱分离纯化后,制备出量子点标记的抗体;采用酶联免疫 ELISA 方法对量子点标记的抗体的活性进行检测,确定量子点功能化修饰和对抗体标记的最佳条件;以 NHS 为辅助试剂使抗体与量子点共价连接,用 BSA、OVA 等进行封闭,经稳定化处理,制得量子点标记的抗体;

建立免疫层析试纸条快速检测分析检测吡虫啉。

## 一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于检测蔬菜中吡虫啉的荧光免疫分析法，特别涉及一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法。

[0002] 本发明主要应用量子点对抗体进行标记检测农药残留，量子点是近年新发展起来的纳米材料，具有许多优良的荧光性能，在荧光免疫学、基因组学和医学等领域显示出广阔的应用前景，本发明在量子点制备、纯化、性能表征及在农药吡虫啉残留检测中应用，是基于量子点和羊抗小鼠二抗的偶联物，建立的一种灵敏、快速检测蔬菜中吡虫啉的荧光免疫分析法。

### 背景技术

[0003] 目前，食品安全检测方法主要有化学分析法 (CA)、薄层层析法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、GC-MS 联用法、酶联免疫吸附法 (ELISA) 等，这些方法存在检测时间长、灵敏度低、假阳性高、样品前处理复杂、样品基质干扰严重等制约因素，难以满足实际检测特别是现场快速检测的需要。现阶段，我国食品安全关键检测技术与发达国家差距较大，很大程度上为我国食品安全带来隐患，同时也限制了我国的食物贸易。当前，面对国内外食品安全新形势，迫切需要研制和开发灵敏、准确、快速的食品安全检测新技术。

[0004] 量子点，又称半导体纳米微晶粒，粒径在 1 ~ 100nm 之间，主要由 II ~ VI 族或 III ~ V 族元素组成，其中，以 CdX (X = S、Se、Te) 研究较多，量子点接受激发光后能够产生荧光。与传统的有机荧光染料相比，量子点具有以下特点：1) 激发光谱宽且连续，发射光谱窄、对称、重叠小。激发光谱宽、连续可以使用一种激发光同时激发多种量子点而获得不同波长的荧光；发射峰窄、对称、重叠小，有利于提高测定的选择性和灵敏度；2) 可通过控制量子点的大小和组成来调谐其发射波长，利用该特点可选择合适的量子点降低或避免背景干扰；3) 荧光强度及稳定性高，可实现较长时间分析检测。正因为具有如此独特的光学性能，量子点可作为一种优良的荧光探针应用于生物研究中。但是，直接制备特别是在有机相中制备的量子点难以与生物大分子发生直接偶联，一般需先用含巯基、氨基或羧基的功能基团对量子点表面进行一定的修饰，修饰后的量子点生物相容性较好，可通过共价结合与生物分子偶联。目前，最常用的方法是在量子点上引入带有羧基的功能基团，然后以碳二亚胺为偶联剂结合生物大分子如酶、抗体等，制成的量子点荧光探针可用于分析检测。近年来，量子点作为荧光标记探针已在生物分析尤其在免疫分析、快速诊断中广泛应用。Goldman 等将核-壳结构的 CdSe/ZnS 量子点与抗体结合，用于荧光免疫分析。他们首先将重组蛋白通过静电作用结合于量子点上，然后再与抗体相连接，使用这种探针，利用直接与间接 ELISA 方法对葡萄球菌肠毒素和 2, 4, 6-三硝基甲苯进行了荧光免疫分析，灵敏度非常高。随后，该课题组又用亲和素修饰量子点，生物素修饰抗体，亲和素和生物素特异性相互作用使得量子点易与抗体结合，且抗体仍保持原有的生物活性，这样偶联物可用于荧光免疫分析。由于一分子亲和素可与四分子生物素结合，且结合力很强，这种基于量子点荧光标记的 ELISA 法用于样品检测，检测的灵敏度有了大大的提高。

## 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是：提供一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法。

[0006] 本发明的技术方案是：

[0007] 1、核壳量子点的制备及不同高分子修饰对脂溶性量子点水溶性改性；

[0008] 2、量子点标记吡虫啉抗体制备；

[0009] 3、吡虫啉抗体量子点免疫分析方法的建立。

[0010] 一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法，其特征在于：

[0011] 量子点的制备选用目前常用的半导体材料：锌、硒、镉、硅为原料，采用胶体化学方法，制备出具有稳定核壳结构、能呈现不同荧光颜色的量子点，每个量子点均具有了一个光谱地址；本方法分别采用有机相合成和水溶液合成两种方法，有机相合成 CdX (X=Se、S、Te) 量子点具体技术路线；水溶液合成 CdX (X=Se、S、Te)，提高量子点的荧光效率，采用 top-down 量子点制作方法制备 TeS 和 CdS；

[0012] 量子点功能化修饰和抗体标记将上述具有稳定核壳结构的量子点，分别与带活性功能基团的材料：巯基丙酸、聚己二醇或双亲性高分子进行反应，采用超声乳化和化学自组装方法，分别制备出带不同功能基团：氨基和羧基的水溶性量子点，并与抗体等进行化学偶联，经凝胶色谱分离纯化后，制备出量子点标记的抗体；采用酶联免疫 ELISA 方法对量子点标记的抗体的活性进行检测，确定量子点功能化修饰和对抗体标记的最佳条件；以 NHS 为辅助试剂使抗体与量子点共价连接，用 BSA、OVA 等进行封闭，经稳定化处理，制得量子点标记的抗体；

[0013] 建立免疫层析试纸条快速检测分析检测吡虫啉。

[0014] 具体方法：

[0015] 一种量子点标记的免疫检测吡虫啉的方法，其特征在于：

[0016] 量子点的制备选用目前常用的半导体材料：锌、硒、镉、硅为原料，采用胶体化学方法，制备出具有稳定核壳结构、能呈现不同荧光颜色的量子点，每个量子点均具有了一个光谱地址；本方法分别采用有机相合成和水溶液合成两种方法，有机相合成 CdX (X=Se、S、Te) 量子点具体技术路线；水溶液合成 CdX (X=Se、S、Te)，为了提高量子点的荧光效率，采用 top-down 量子点制作方法制备 TeS 和 CdS；

[0017] 称取 1gCdO(TeO)粉末于三颈圆底烧瓶中，加入 20mL 甘油，然后缓慢加热到 160℃，过程中通氮气保护，保持至形成红色的透明液体；称取 0.1gSe 粉放入另一个三颈圆底烧瓶中，加入 50mL 液体石蜡，然后缓慢加热到 200℃，形成透明液体；然后抽取 6mL Cd 前驱体溶液加到 Se 前驱体溶液中，接着加入 2mL 油胺，连续搅拌，溶液变至橙色。15min 后 30mL 量子点溶液，加到 50mL 4℃ 的二甲苯中，即得到 CdSe(TeSe)。在 500mL 的三颈圆底烧瓶中，加入 150mL 的去离子水，加入 L-半胱氨酸和 CdCl<sub>2</sub> 溶液后，混合液 pH 值用 NaOH 溶液调至 11.0，并在适当的搅拌速度下，加入巯基丁二酸 30mL，最终保持 L-cysteine:CdCl<sub>2</sub>=2:1 的摩尔比，制得巯基丁二酸包覆的 CdTe/CdS 核壳型量子点。

[0018] 1mL 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.6) 中，加入 300 μL 制备好的量子点和 120 μL 0.2g/L NHS，25℃ 活化 10min，再加入 100 μL 0.1g/L 吡虫啉多克隆抗体，25℃ 下涡旋

混匀 25min, 然后经凝胶色谱分离纯化后, 制备出量子点标记的抗体; 采用酶联免疫 ELISA 方法对量子点标记的抗体的活性进行检测。

[0019] 用点膜仪, 将吡虫啉抗原 (0.3g/L) 喷在硝酸纤维膜上, 将羊抗小鼠二抗 (1.0g/L) 喷在玻璃纤维膜形成检测带 (T) 和质控带 (C), T 带与 C 带间隔 5mm, 置于 37°C 恒温箱中固定 20min。再将硝酸纤维膜、玻璃纤维膜和吸水板依次粘帖在吸水纸板上, 切割成试纸条, 干燥后密封保存。

[0020] 本发明特点及效果是:

[0021] 主要应用量子点对抗体进行标记检测农药残留, 量子点是近年新发展起来的纳米材料, 具有许多优良的荧光性能, 在荧光免疫学、基因组学和医学等领域广阔的应用, 本发明在量子点制备、纯化、吡虫啉抗体量子点免疫分析方法及在农药吡虫啉残留检测中应用, 是基于量子点和羊抗小鼠二抗的偶联物, 建立的一种灵敏、快速检测蔬菜中吡虫啉的荧光免疫分析法。

### 具体实施方式

[0022] 本量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法, 如下:

[0023] 1、核壳量子点的制备及不同高分子修饰对脂溶性量子点水溶性改性;

[0024] 2、量子点标记吡虫啉抗体制备;

[0025] 3、吡虫啉抗体量子点免疫分析方法的建立。

[0026] 1、一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法: 量子点的制备选用目前常用的半导体材料: 锌、硒、镉、硅为原料, 采用胶体化学方法, 制备出具有稳定核壳结构、能呈现不同荧光颜色的量子点, 每个量子点均具有了一个光谱地址; 本方法分别采用有机相合成和水溶液合成两种方法, 有机相合成 CdX (X=Se、S、Te) 量子点具体技术路线; 水溶液合成 CdX (X=Se、S、Te), 提高量子点的荧光效率, 采用 top-down 量子点制作方法制备 TeS 和 CdS;

[0027] 量子点功能化修饰和抗体标记将上述具有稳定核壳结构的量子点, 分别与带活性功能基团的材料: 巯基丙酸、聚己二醇或双亲性高分子进行反应, 采用超声乳化和化学自组装方法, 分别制备出带不同功能基团: 氨基和羧基的水溶性量子点, 并与抗体等进行化学偶联, 经凝胶色谱分离纯化后, 制备出量子点标记的抗体; 采用酶联免疫 ELISA 方法对量子点标记的抗体的活性进行检测, 确定量子点功能化修饰和对抗体标记的最佳条件; 以 NHS 为辅助试剂使抗体与量子点共价连接, 用 BSA、OVA 等进行封闭, 经稳定化处理, 制得量子点标记的抗体;

[0028] 建立免疫层析试纸条快速检测分析检测吡虫啉。

[0029] 具体方法:

[0030] 1、量子点的制备选用目前常用的半导体材料: 锌、硒、镉、硅为原料, 采用胶体化学方法, 制备出具有稳定核壳结构、能呈现不同荧光颜色的量子点, 每个量子点均具有了一个光谱地址; 本方法分别采用有机相合成和水溶液合成两种方法, 有机相合成 CdX (X=Se、S、Te) 量子点具体技术路线; 水溶液合成 CdX (X=Se、S、Te), 为了提高量子点的荧光效率, 采用 top-down 量子点制作方法制备 TeS 和 CdS;

[0031] 2、称取 1gCdO (TeO) 粉末于三颈圆底烧瓶中, 加入 20mL 甘油, 然后缓慢加热到

160℃,过程中通氮气保护,保持至形成红色的透明液体;称取 0.1gSe 粉放入另一个三颈圆底烧瓶中,加入 50mL 液体石蜡,然后缓慢加热到 200℃,形成透明液体;然后抽取 6mLCd 前驱体溶液加到 Se 前驱体溶液中,接着加入 2mL 油胺,连续搅拌,溶液变至橙色。15min 后 30mL 量子点溶液,加到 50mL4℃的二甲苯中,即得到 CdSe(TeSe)。在 500mL 的三颈圆底烧瓶中,加入 150mL 的去离子水,加入 L-半胱氨酸和 CdCl<sub>2</sub> 溶液后,混合液 pH 值用 NaOH 溶液调至 11.0,并在适当的搅拌速度下,加入巯基丁二酸,最终保持 L-cysteine:CdCl<sub>2</sub>=2:1 的摩尔比,制得巯基丁二酸包覆的 CdTe/CdS 核壳型量子点。

[0032] 3、在 1mL0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.6) 中,加入 200 μL 制备好的量子点和 120 μL0.2g/LNHS,25℃ 活化 10min,再加入 100 μL0.1g/L 吡虫啉多克隆抗体,25℃ 下涡旋混匀 25min,然后经凝胶色谱分离纯化后,制备出量子点标记的抗体;采用酶联免疫 ELISA 方法对量子点标记的抗体的活性进行检测。4、用点膜仪,将吡虫啉抗原 (0.3g/L) 喷在硝酸纤维膜上,将羊抗小鼠二抗 (1.0g/L) 喷在玻璃纤维膜形成检测带 (T) 和质控带 (C),T 带与 C 带间隔 5mm,置于 37℃ 恒温箱中固定 20min。再将硝酸纤维膜、玻璃纤维膜和吸水板依次粘帖在吸水纸板上,切割成试纸条,干燥后密封保存。

[0033] 本方法:

[0034] (1) 核壳量子点的制备,基于微球为载体的免疫分析体系,利用量子点激发谱带宽、发射峰窄且对称、颜色依其尺寸连续可调等特性进行,首次提出用于吡虫啉分析的新方法。本方法为量子点标记吡虫啉抗体的定量检测,因此敏感度有望大幅度提高,现有公认的灵敏方法(如高效液相色谱方法)可提高至少 1 个数量级以上。

[0035] (2) 不同高分子修饰对脂溶性量子点水溶性改性,量子点探针制备及其纯化,利用全内反射高分辨表面波谱成像手段可在不同波长下动态表征不同颜色的量子点探针特性。

[0036] (3) 建立吡虫啉抗体量子点免疫分析试纸条。

专利名称(译)	一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103323587A</a>	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201310270942.7	申请日	2013-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	天津农学院		
申请(专利权)人(译)	天津农学院		
当前申请(专利权)人(译)	天津农学院		
[标]发明人	崔新仪 李宁 梁红春 曲福玲 王学利 胡奇		
发明人	崔新仪 李宁 梁红春 曲福玲 王学利 胡奇		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种量子点标记的夹心荧光免疫检测吡虫啉的方法，其技术方案是：1、核壳量子点的制备及不同高分子修饰对脂溶性量子点水溶性改性；2、量子点探针制备及其纯化；3、吡虫啉抗体量子点免疫分析方法的建立。本发明在量子点制备、纯化、性能表征及在农药吡虫啉残留检测中应用，是基于量子点和羊抗小鼠二抗的偶联物，建立的一种灵敏、快速检测蔬菜中吡虫啉的荧光免疫分析法。