



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104251902 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201410513013. 9

(22) 申请日 2014. 09. 29

(71) 申请人 安徽师范大学

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区花津南路
安徽师范大学

(72) 发明人 张明翠 吴瑕玉

(74) 专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 朱圣荣

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种 50nm 银粒子的定量检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种 50nm 银粒子的定量检测方法。检测方法步骤包括：制备 50nm 银粒子的免疫原和包被抗原、制备 50nm 银粒子高特异性抗体、制备酶标抗体、用吸光度法测定 50nm 银粒子含量。本发明检测方法特异性高，灵敏度高，操作相对简单。

1. 一种 50nm 银粒子的定量检测方法,步骤包括:

- a、制备 50nm 银粒子的免疫原和包被抗原;
- b、将免疫原注射到动物体内,制得 50nm 银粒子高特异性抗体;
- c、制备酶标抗体;

d、用吸光度法测定 50nm 银粒子含量,利用直接竞争酶联免疫法将标准品与待测样竞争抗体的反应,酶标抗体的酶可以促使底物液发光,从而测得吸光度值,即可通过标准曲线来定量检测 50nm 银粒子含量。

2. 如权利要求 1 所述的测试方法,其特征在于:

所述步骤 a 中 50nm 银粒子的免疫原的制备方法为:

在搅拌下将巯基乙酸溶液加入到 50nm 银粒子溶液中,在搅拌 15-20min 后,分别加入 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺溶液,室温避光下搅拌 3-4h,然后再调节 pH9~10,加入牛血清白蛋白溶液,4℃下搅拌 5-6h,将所得溶液装入透析袋中,用蒸馏水透析 12 小时以上,避光低温保存。

3. 如权利要求 2 所述的测试方法,其特征在于:所述巯基乙酸溶液质量百分比浓度为 9.9%,50nm 银粒子溶液溶液浓度 100 μg/mL,1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐溶液浓度为 10mg/mL,N-羟基琥珀酰亚胺溶液浓度为 10mg/mL,牛血清白蛋白浓度为 10g/L,TGA、EDAC 和 NHS 的物质的量比 1:2:4;纳米银粒子溶液、巯基乙酸溶液和牛血清白蛋白溶液的体积比为 400:1:10。

4. 如权利要求 1 所述的测试方法,其特征在于:所述步骤 b 中高特异性抗体的制备方法为:

将免疫抗原与弗氏佐剂以体积比 1:1 混溶,对动物进行多次免疫,制得 50nm 银粒子高特异性抗体。

5. 如权利要求 4 所述的测试方法,其特征在于:所述多次免疫方法为:第一次动物免疫将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶,免疫剂量 0.5mg~1mg/kg/次,免疫注射,免疫三周后,进行六次加强免疫,加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶,进行免疫注射,免疫剂量 0.5mg~1mg/kg/次,六次加强免疫间隔为 2-3 周,经六次加强免疫后,从动物静脉采血,血清室温 20-25℃静置 0.5-1h,在冰箱 4℃静置 2h 后吸取上层澄清的血清,制得高特异性抗体。

6. 如权利要求 1 所述的测试方法,其特征在于:所述步骤 c 酶标抗体的制备方法为:

取辣根过氧化物酶 10mg 溶于 0.4mL 0.05mol/L pH9.6 碳酸钠缓冲液即 CB 缓冲液,待溶解后加入 25%戊二醛 0.1mL,然后 37℃温育 2 小时;之后加入 0-4℃无水乙醇 2mL,2500r/min 离心 15 分钟,倾去上清液;取沉淀以 80%乙醇 4mL 混悬,同上离心,倾去乙醇,将管倒置,使乙醇充分流出;沉淀用 1mL 0.05mol/L pH9.6CB 缓冲液溶解,加入 0.5-1mL50nm 银粒子抗体,放在冰箱内过夜后,用少量的 NaH_2PO_4 调至中性即可。最后用饱和硫酸铵溶液沉淀法将其纯化,纯化抗体于 4℃或 -20℃保存。

7. 如权利要求 1 所述的测试方法,其特征在于:所述步骤 d 具体为:

1) 包被:将包被抗原与水以 1:50~1:200 稀释后制成稀释液,优选 1:100,用稀释液包被 96 孔酶标板,每孔加稀释液 80~150 μL,优选 100 μL,放置 4℃过夜,取出用洗涤液 PBST 洗涤 2~6 次,每次 2~6 分钟,优选洗涤 3~5 次,每次 3~5 分钟。

2) 封闭：加入质量百分比浓度为 1%～5% OVA 溶液，优选 1% 的 OVA；每孔 100～200 μL ，优选 150～200 μL ，封闭没有包被抗原的多余的部分，30℃～40℃温育 0.5～2.0 小时后，取出用洗涤液 PBST 洗涤 2～6 次，每次 2～6 分钟，优选 37℃温育 0.5～1.0 小时后，取出用洗涤液 PBST 洗涤 3～5 次，每次 3～5 分钟。

3) 竞争：加入 50 μL /孔不同浓度含 50nm 银粒子的溶液和样品溶液，然后加入分别加入 50 μL 酶标抗体，使之发生竞争反应。30℃～40℃下温育 1～5 小时，优选 37℃下温育 3 小时，使待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点，取出用洗涤液 PBST 洗涤 2～6 次，每次 2～6 分钟，优选洗涤 3～5 次，每次 3～5 分钟。

4) 检测：加入底物液显色，每孔 80～120 μL ，优选每孔 100 μL ，温育 30 分钟后，用 2mol/L 的 H_2SO_4 终止液停止反应。用多功能酶标仪测定各孔在 490nm 时的吸光强度。

5)、根据吸光强度和含 50nm 银粒子的溶液浓度绘制工作曲线，根据工作曲线求得待测样品溶液中 50nm 银粒子的含量。

一种 50nm 银粒子的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料检测技术领域,特别涉及一种 50nm 银粒子的定量检测方法。

背景技术

[0002] 多个世纪以来,银通常被作为金属银被大家广泛使用,如银饰品和银器具。现如今,随着纳米技术的发展,以纳米技术为核心的新科技革命已经成为当今时代的主题。银常作为纳米粒子的形式渗透到我们日常生活与生产中。同其他有机的抗微生物相比,纳米银具有抗菌性和低毒性,因此纳米银在抗菌药物和食品生产中已经被广泛的应用。纳米银对环境安全和人类健康贡献极大,开发应用前景极其广阔,在生活日渐便捷化的今日,纳米银添加制品已成为广大消费者的必备用品。

[0003] 我们知道,纳米银可以通过直接或间接接触等途径进入环境和人体,在纳米银如此广阔的开发应用前景下,我们对纳米银可能产生的生物学效应和潜在的毒理性研究还不够充分。白春礼院士在 293 次香山会议上的报告指出:“在发展纳米的同时,同步开展其安全性研究,使纳米技术成为人类第一个在其可能产生负面效应之前,就已经过认真的研究,引起广泛重视,并最终能安全造福人类的技术。”同时,2003 年,Science 和 Nature 也相继发表文章,探讨纳米材料的生物效应、对环境和健康的影响。因此,对纳米材料的研究及其重要。

[0004] 目前,我们可以通过透射式电子显微镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)和扫描电子显微镜(SEM)等对纳米银的尺寸、外貌和结构形态做一定的研究,但对于纳米银的定量检测却是一项极其具有挑战性的工作。目前,我们对纳米粒子的定量检测方法主要有电感耦合等离子体质谱法、分光光度法、火焰原子吸收光谱法和电化学法等,但上述方法均存在一定的缺陷,比如电感耦合等离子体质谱法只适用特定尺寸的纳米粒子,对于小尺寸的纳米粒子并不适用;分光光度法和火焰原子吸收光谱法干扰因素较多,对含量较高样品的测定结果尚可,但对低含量样品的检测能力不强;而电化学分析法定量分析稳定性差,灵敏度低,不适合理论应用。所以,开发一种简单、快速、适用于现场监控的痕量分析方法已经迫在眉睫。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种 50nm 银粒子的定量检测方法,本发明检测方法对痕量 50nm 银粒子的检测方法特异性高,灵敏度高,操作相对简单。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种 50nm 银粒子的定量检测方法,步骤包括:

[0008] a、制备 50nm 银粒子的免疫原和包被抗原;

[0009] b、将免疫原注射到动物体内,制得 50nm 银粒子高特异性抗体;

[0010] c、制备酶标抗体;

[0011] d、用吸光度法测定 50nm 银粒子含量,利用直接竞争酶联免疫法将标准品与待测

样竞争抗体的反应,酶标抗体的酶可以促使底物液发光,从而测得吸光度值,即可通过标准曲线来定量检测 50nm 银粒子含量。

[0012] 所述 50nm 银粒子的制备方法为:

[0013] 称取 27.8mg 的 AgNO_3 溶解于 100mL 蒸馏水中溶解,再转移到三角烧瓶中,缓慢搅拌下油浴加热至沸腾,快速加入 3mL 1% 的柠檬酸三钠溶液,继续沸腾 35 分钟,冷却后用棕色瓶收集, 4°C 贮存备用,所得溶液即为含 50nm 银粒子的溶液。

[0014] 所述步骤 a 中 50nm 银粒子的免疫原的制备方法为:

[0015] 在搅拌下将巯基乙酸 (TGA) 水溶液加入到 50nm 银粒子溶液中,在搅拌 15-20min 后,分别加入 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐 (EDAC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的水溶液,室温避光下搅拌 3-4h,然后再调节 pH9 ~ 10,加入牛血清白蛋白溶液 (BSA, sigma 公司), 4°C 下搅拌 5-6h,将所得溶液装入透析袋中,用蒸馏水透析 12 小时以上,避光低温保存。

[0016] 所述避光低温保存温度为 4°C ;

[0017] 所述巯基乙酸水溶液质量百分比浓度为 9.9%,50nm 银粒子溶液浓度 $100\mu\text{g/mL}$,EDAC 溶液浓度为 10mg/mL, NHS 溶液浓度为 10mg/mL, BSA 浓度为 10g/L, TGA、EDAC 和 NHS 的物质的量比 1:2:4;纳米银粒子溶液、巯基乙酸溶液和牛血清白蛋白溶液的体积比为 400:1:10;

[0018] 所述包被抗原的制备方法基本同免疫原的制备方法,不同处在于用质量百分比 1% 卵清蛋白溶液 (OVA) 代替 10g/L 牛血清白蛋白;

[0019] 所述步骤 b 中高特异性抗体的制备方法为:

[0020] 将免疫抗原与弗氏佐剂以体积比 1:1 混溶,对动物进行多次免疫,制得 50nm 银粒子高特异性抗体。

[0021] 所述多次免疫方法为:第一次动物免疫将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶,免疫剂量 $0.5\text{mg} \sim 1\text{mg/kg/次}$,免疫注射,免疫三周后,进行六次加强免疫,加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶,进行免疫注射,免疫剂量 $0.5\text{mg} \sim 1\text{mg/kg/次}$,六次加强免疫间隔为 2-3 周,经六次加强免疫后,从动物静脉采血,血清室温 $20-25^\circ\text{C}$ 静置 0.5-1h,在冰箱 4°C 静置 2h 后吸取上层澄清的血清,制得高特异性抗体。

[0022] 所述弗氏佐剂制备方法为:将液体石蜡和羊毛脂按 2:1 体积比用超声清洗器超声 3 小时左右,使之完全混匀,制得不完全弗氏佐剂;临用前向不完全弗氏佐剂中加入卡介苗即为完全弗氏佐剂,不完全弗氏佐剂与卡介苗的体积比为 6:1。

[0023] 所述动物包括哺乳动物、禽类,哺乳动物包括家兔、马、羊、鼠、猪和猴,优选兔和鼠,禽类包括鸡、鸭和鹅,优选鸡;所述的动物为适龄、健壮、无感染的动物,优选雄性动物,动物的年龄应为青壮年,兔龄选月龄 2 ~ 5 个月,体重 2 ~ 3Kg 的成年雄兔,鸡优选蛋鸡。

[0024] 所述的免疫注射的部位包括腹腔内、静脉内、肌肉内、淋巴结内、皮下和皮内注射,这些方法可以单独使用或多次组合使用,优选背部皮下多点注射、皮内多点注射和腿部肌肉注射单独或多种组合注射。

[0025] 所述的佐剂也可以为胞壁酸二肽、多糖类物质等有机佐剂,或者明矾等无机佐剂。

[0026] 所述步骤 c 酶标抗体的制备方法为:

[0027] 取辣根过氧化物酶 10mg 溶于 0.4mL 0.05mol/L pH9.6 碳酸钠缓冲液即 CB 缓冲液,待溶解后加入 25%戊二醛 0.1mL,然后 37℃温育 2 小时;之后加入 0-4℃无水乙醇 2mL,2500r/min 离心 15 分钟,倾去上清液;取沉淀用 80%乙醇 4mL 混悬,同上离心,倾去乙醇,将管倒置,使乙醇充分流出;沉淀用 1mL 0.05mol/L pH9.6 CB 缓冲液溶解,加入 0.5-1mL50nm 银粒子抗体,放在冰箱内过夜后,用少量的 NaH_2PO_4 调至中性即可。最后用饱和硫酸铵溶液沉淀法将其纯化,纯化抗体于 4℃或 -20℃保存。

[0028] 所述步骤 d 具体为:

[0029] 1) 包被:将包被抗原与水以 1:50 ~ 1:200 稀释后制成稀释液,优选 1:100,用稀释液包被 96 孔酶标板,每孔加稀释液 80 ~ 150 μL ,优选 100 μL ,放置 4℃过夜,取出用洗涤液 PBST 洗涤 2 ~ 6 次,每次 2 ~ 6 分钟,优选洗涤 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 5 分钟。

[0030] 2) 封闭:加入质量百分比浓度为 1% ~ 5% OVA 溶液,优选 1%的 OVA;每孔 100 ~ 200 μL ,优选 150 ~ 200 μL ,封闭没有包被抗原的多余的部分,30℃ ~ 40℃温育 0.5 ~ 2.0 小时后,取出用洗涤液 PBST 洗涤 2 ~ 6 次,每次 2 ~ 6 分钟,优选 37℃温育 0.5 ~ 1.0 小时后,取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 5 分钟。

[0031] 3) 竞争:加入 50 μL /孔不同浓度含 50nm 银粒子的溶液和样品溶液,然后加入分别加入 50 μL 酶标抗体,使之发生竞争反应。30℃ ~ 40℃下温育 1 ~ 5 小时,优选 37℃下温育 3 小时,使待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点,取出用洗涤液 PBST 洗涤 2 ~ 6 次,每次 2 ~ 6 分钟,优选洗涤 3 ~ 5 次,每次 3 ~ 5 分钟。

[0032] 4) 检测:加入底物液显色,每孔 80 ~ 120 μL ,优选每孔 100 μL ,温育 30 分钟后,用 2mol/L 的 H_2SO_4 终止液停止反应。用多功能酶标仪测定各孔在 490nm 时的吸光强度。

[0033] 5)、根据吸光强度和含 50nm 银粒子的溶液浓度绘制工作曲线,根据工作曲线求得待测样品溶液中 50nm 银粒子的含量。

[0034] 本发明具有以下优点和积极效果:

[0035] (1) 抗体实用性强:本发明制备出了特异性好、效价高的多克隆抗体。

[0036] (2) 提供了一种对纳米材料的定量检测方法:通过制备的纳米银的多克隆抗体,使我们能够测量痕量 50nm AgNPs。

[0037] (3) 此免疫分析方法特异性高,灵敏度高,操作相对简单。

具体实施方式

[0038] 实验药品及仪器:

[0039] (1) 实验试剂

[0040] 牛血清蛋白 (BSA), 羊血清蛋白 (OVA), 辣根过氧化物酶 (HRP), 液体石蜡, 羊毛脂, 无水乙醚, 戊二醛 (25%), 液体卡介苗, 75%医用酒精, 氢氧化钠, 尿素, 无水碳酸钠, 碳酸氢钠, 磷酸氢二钠, 氨水, 硝酸银, 巯基乙酸 (99%, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$), N- 羟基琥珀酰亚胺 (98%, $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$), 柠檬酸三钠, 磷酸, 硫酸, 乙醇, 柠檬酸, 邻苯二胺, 盐酸, 氯化钠, 磷酸二氢钠, 硫酸铵, 四硼酸钠, Tween-20, 过氧化氢, 实验用水为超纯水。

[0041] (2) 实验仪器

[0042] UV-4100 型紫外 - 可见分光光度计, 集散式恒温加热磁力搅拌器, 磁力搅拌器, 透析袋, 一次性注射器, 多功能酶标仪, SCQ50 超声波清洗器, TGL-16G 高速台式离心机, 96 孔

酶标板。

[0043] (3) 溶液的配制

[0044] 1) 1% 柠檬酸三钠 : 50mg 柠檬酸三钠溶解在 4.95mL 蒸馏水中

[0045] 2) 生理盐水 : 0.85g NaCl 用蒸馏水定容到 100mL

[0046] 3) 包被液缓冲液 (0.05mol/L, pH = 9.6 碳酸钠缓冲液, CB) : Na_2CO_3 0.0795g, NaHCO_3 0.147g 溶于蒸馏水, 定容到 50mL

[0047] 4) 稀释液 (0.01mol/L, pH = 7.4 磷酸盐缓冲液, PBS) : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.96g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2964g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g 溶于蒸馏水, 定容到 1000mL

[0048] 5) 洗涤液 (0.01mol/L, pH = 7.4, PBST) : 由稀释液中加体积分数 0.05% 吐温制成

[0049] 6) 封闭液 : 质量百分比为 1% 的卵清蛋白 (OVA) 溶液, 溶剂为 PBS

[0050] 7) 底物液 : 柠檬酸 0.5106g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.8408g 溶于蒸馏水, 定容到 50mL, 称取 4mg 邻苯二胺溶于 10mL 上述溶液中, 临用前加入 15 μL 30% 的 H_2O_2

[0051] 8) 终止液 : 2mol/L 硫酸溶液。

[0052] 实施例 1

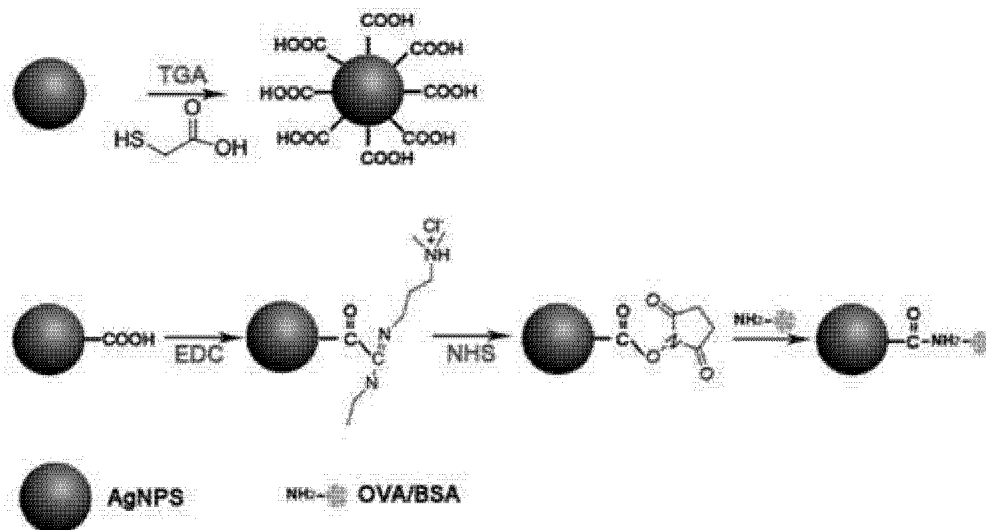
[0053] (1) 50nm AgNPs 即 50nm 银粒子全抗原

[0054] 1) 50nm AgNPs 的制备

[0055] 称取 27.8mg 的 AgNO_3 溶解于 100mL 蒸馏水中溶解, 再转移到三角烧瓶中, 缓慢搅拌下油浴加热至沸腾, 快速加入 3mL 1% 的柠檬酸三钠溶液, 继续沸腾 35 分钟, 冷却后用棕色瓶收集, 4℃ 贮存备用, 所得溶液即为 50nm AgNPs。

[0056] 2) 免疫抗原和包被抗原的制备

[0057]



[0058] 取 8mL 新制备的 AgNPs 溶液, 用 20 μL 稀释 10 倍 pH7.0 的巯基乙酸 (TGA) 修饰, 搅拌 15 分钟后, 在磁力搅拌下逐滴加入 40 μL 10mg/mL 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 80 μL 10mg/mL 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 溶液, 室温下避光搅拌 3 小时, 用 2mol/L 的 NaOH 调剂 pH 为 9 到 10, 加入 200 μL 1% 的 BSA 溶液, 4℃ 下搅拌 5 小时, 将所得溶液装入透析袋中, 用蒸馏水透析 12 小时, 用棕色避光试剂瓶 4℃ 保存, 制得免疫抗原。

[0059] 包被抗原制备基本同免疫抗原制备, 不同处在于使用 1% 卵清蛋白溶液 (OVA) 代

替 1% 的牛血清白蛋白溶液, 1% 的牛血清白蛋白溶液配制方法同 1% 卵清蛋白溶液。

[0060] (2) 50nm AgNPs 抗体的制备

[0061] 1) 抗体的制备方法

[0062] 将免疫抗原与弗氏佐剂以体积比 1:1 混溶, 通过皮下注射对选择的新西兰大白兔进行多次免疫, 第一次动物免疫我们注射免疫抗原与卡介苗和佐剂混合的弗氏完全佐剂, 之后的多次加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶后注射, 经六次加强免疫后, 制得兔抗 50nmAgNPs 抗体。

[0063] 2) 弗氏佐剂的制备

[0064] 将液体石蜡和羊毛脂按 2:1 体积比用超声清洗器分多次超声 3 小时左右, 每次超声 20 分钟, 使之完全混匀, 即滴一滴乳化剂到冰水混合液中半分钟之内不扩散才能算混合完全。此油包水乳化剂称之为弗氏不完全佐剂。不完全佐剂低温 (0-4℃) 贮存, 临用前加卡介苗即为弗氏完全佐剂, 不完全弗氏佐剂与卡介苗的体积比为 6:1。

[0065] 3) 免疫步骤

[0066] 本实验选用 7 只月龄 3 个月左右, 体重为 1.5-2kg 左右的健康新西兰雄兔作为免疫对象。其中 1 至 6 号兔子为实验组, 7 号兔子为空白对照组。首次注射用含完全弗氏佐剂的抗原进行基础免疫, 之后用含不完全弗氏佐剂的抗原加强免疫。用剪刀将兔子背部的毛剪干净, 再用医用酒精消毒, 采用背部皮下多点注射的方法, 免疫剂量为 1mg/kg/ 次, 每次背部皮下免疫 10 点, 每个点注射 0.1mL。3 周后开始第一次加强免疫, 以后每 2 周再次加强免疫, 经 6 次加强免疫后, 从兔耳静脉采血, 每只兔子采血 1mL, 血清室温 (20-25℃) 静置 1h, 在冰箱 (4℃) 静止 2 小时后吸取上层澄清的血清。

[0067] 4) 酶标抗体的制备

[0068] 取辣根过氧化物酶 10mg 溶于 0.4mL 0.05mol/L pH9.6 CB 缓冲液, 待溶解后加入 25% 戊二醛 0.1mL, 然后 37℃ 温育 2 小时。之后加入 4℃ 无水乙醇 2mL, 2500r/min 离心 15 分钟, 倾去上清液。取沉淀以 80% 乙醇 4mL 混悬, 同上离心, 倾去乙醇, 将管倒置, 使乙醇充分流出。沉淀用 1mL 0.05mol/L pH9.6 CB 缓冲液溶解, 加入 1mL 40nm AgNPs 抗体, 放在冰箱内过夜后, 用少量的 NaH_2PO_4 调至中性即可。最后用饱和硫酸铵溶液沉淀法将其纯化, 纯化抗体于 4℃ 保存。

[0069] (3) 直接竞争酶联免疫分析法检测 50nm AgNPs 的建立

[0070] 1) 包被: 用浓度为 1:100 的包被抗原 OVA-AgNPs 包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μL , 放置 4℃ 过夜, 取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。

[0071] 2) 封闭: 加入 1% OVA 溶液, 每孔 150 μL , 封闭没有包被抗原的多余的部分, 避免抗体的非特异吸附在酶标板上。37℃ 温育 1 小时后, 取出同上洗涤 3 次。

[0072] 3) 竞争: 每孔加入 50 μL 自制的 50nm AgNPs 标准溶液或样品溶液和 50 μL HRP 标记的 50nmAgNPs 抗体, 使之发生竞争反应。37℃ 下温育 3 小时后, 使待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点。加样时应将所加物加在板孔的底部, 避免加在孔壁上部, 并注意不可溅出, 不可产生气泡。然后同上洗涤。

[0073] 加入 50 μL / 孔浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000 的 50nm AgNPs 标准溶液和样品溶液, 然后分别加入 50 μL 酶标抗体, 使之发生竞争反应。37℃ 下温育 3 小时后, 使待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点, 取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次, 每

次 3 分钟。

[0074] 4) 检测：加入底物液显色，每孔 100 μ L，温育 30 分钟后，用终止液停止反应。用多功能酶标仪测定各孔在 490nm 时的吸光强度。

[0075] (4) 标准曲线的绘制

[0076] 根据吸光度及标准溶液浓度绘制线性方程：

[0077] $A = 0.5621 - 0.0521 \log C$

[0078] $R^2 = 0.99091$ ，线性范围为 $10^{-3} - 1000 \text{ ng/mL}$ ，

[0079] 最低检测限 (3σ) 是 0.0093 ng/mL 。

[0080] 最终测得样品溶液 50nm AgNPs 含量为 1.34 ng/mL 。

[0081] 实施例 2

[0082] (1) 50nm AgNPs 即 50nm 银粒子全抗原

[0083] 1) 50nm AgNPs 的制备

[0084] 称取 27.8mg 的 AgNO_3 溶解于 100mL 蒸馏水中溶解，再转移到三角烧瓶中，缓慢搅拌下油浴加热至沸腾，快速加入 3mL 1% 的柠檬酸三钠溶液，继续沸腾 35 分钟，冷却后用棕色瓶收集， 4°C 贮存备用，所得溶液即为 50nm AgNPs。

[0085] 2) 免疫抗原和包被抗原的制备

[0086] 取 8mL 新制备的 AgNPs 溶液，用 20 μ L 稀释 10 倍 pH7.0 的巯基乙酸 (TGA) 修饰，搅拌 15 分钟后，在磁力搅拌下逐滴加入 40 μ L 10mg/mL 的 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 80 μ L 10mg/mL 的 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 溶液，室温下避光搅拌 3 小时，用 2mol/L 的 NaOH 调剂 pH 为 9 到 10，加入 200 μ L 1% 的 BSA (免疫抗原) 或者 OVA (包被抗原)， 4°C 下搅拌 5 小时，将所得溶液装入透析袋中，用蒸馏水透析 12 小时，用棕色避光试剂瓶 4°C 保存。

[0087] (2) 50nm AgNPs 抗体的制备

[0088] 1) 抗体的制备方法

[0089] 将免疫抗原与弗氏佐剂以体积比 1:1 混溶，通过皮下注射对选择的新西兰大白兔进行多次免疫，第一次动物免疫我们注射免疫抗原与卡介苗和佐剂混合的弗氏完全佐剂，之后的多次加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶后注射，经六次加强免疫后，制得兔抗 50nm AgNPs 抗体。

[0090] 2) 弗氏佐剂的制备

[0091] 将液体石蜡和羊毛脂按 2:1 体积比用超声清洗器分多次超声 3 小时左右，每次超声 20 分钟，使之完全混匀，即滴一滴乳化剂到冰水混合液中半分钟之内不扩散才能算混合完全。此油包水乳化剂称之为弗氏不完全佐剂。不完全佐剂低温 ($0-4^\circ\text{C}$) 贮存，临用前加卡介苗即为弗氏完全佐剂。

[0092] 3) 免疫步骤

[0093] 本实验选用 7 只月龄 3 个月左右，体重为 1.5-2kg 左右的健康新西兰雄兔作为免疫对象。其中 1 至 6 号兔子为实验组，7 号兔子为空白对照组。首次注射用含完全弗氏佐剂的抗原进行基础免疫，之后用含不完全弗氏佐剂的抗原加强免疫。用剪刀将兔子背部的毛剪干净，再用医用酒精消毒，采用背部皮下多点注射的方法，免疫剂量为 1 mg/kg/次 ，每次背部皮下免疫 10 点，每个点注射 0.1mL。3 周后开始第一次加强免疫，以后每 2 周再次加强

免疫,经 6 次加强免疫后,从兔耳静脉采血,每只兔子采血 1mL,血清室温 (20-25℃) 静置 1h,在冰箱 (4℃) 静止 2 小时后吸取上层澄清的血清。

[0094] 4) 酶标抗体的制备

[0095] 取辣根过氧化物酶 10mg 溶于 0.4mL 0.05mol/L pH9.6 CB 缓冲液,待溶解后加入 25% 戊二醛 0.1mL,然后 37℃ 温育 2 小时。之后加入 4℃ 无水乙醇 2mL,2500r/min 离心 15 分钟,倾去上清液。取沉淀以 80% 乙醇 4mL 混悬,同上离心,倾去乙醇,将管倒置,使乙醇充分流出。沉淀用 1mL 0.05mol/L pH9.6 CB 缓冲液溶解,加入 1mL 40nm AgNPs 抗体,放在冰箱内过夜后,用少量的 NaH_2PO_4 调至中性即可。最后用饱和硫酸铵溶液沉淀法将其纯化,纯化抗体于 4℃ 保存。

[0096] (3) 直接竞争酶联免疫分析法检测 50nm AgNPs 的建立

[0097] 1) 包被:用浓度为 1:100 的包被抗原 OVA-AgNPs 包被 96 孔酶标板,每孔 100 μL ,放置 4℃ 过夜,取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

[0098] 2) 封闭:加入 1% OVA 溶液,每孔 150 μL ,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上。37℃ 温育 1 小时后,取出同上洗涤 3 次。

[0099] 3) 竞争:每孔加入 50 μL 自制的 50nm AgNPs 标准溶液或样品溶液和 50 μL HRP 标记的 50nmAgNPs 抗体,使之发生竞争反应。37℃ 下温育 3 小时后,使待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点。加样时应将所加物加在板孔的底部,避免加在孔壁上部,并注意不可溅出,不可产生气泡。然后同上洗涤。

[0100] 加入 50 μL 1/ 孔浓度分别为 0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 的 50nm AgNPs 标准溶液和样品溶液,然后分别加入 50 μL 酶标抗体,使之发生竞争反应。37℃ 下温育 3 小时后,使待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点,取出用洗涤液 PBST 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

[0101] 4) 检测:加入底物液显色,每孔 100 μL ,温育 30 分钟后,用终止液停止反应。用多功能酶标仪测定各孔在 490nm 时的吸光强度。

[0102] (4) 标准曲线的绘制

[0103] 根据吸光度及标准溶液浓度绘制线性方程:

$$[0104] A = 0.52152 - 0.05339 \log C$$

$$[0105] R^2 = 0.98342, \text{线性范围为 } 10^{-4} - 100 \text{ ng/mL},$$

[0106] 最低检测限 (3σ) 是 0.0076ng/mL。

[0107] 最终测得样品溶液 50nm AgNPs 含量为 5.83ng/mL。

[0108] 用酶联免疫直接竞争分析法测定不同尺寸的金纳米粒子和银纳米粒子的交叉反应。计算类似物的 IC_{50} 浓度,交叉反应率 = (抗原的 IC_{50} 浓度 / 近似抗原的 IC_{50} 浓度) $\times 100\%$ 。结果如下,

[0109]

不同尺寸纳米材料	交叉反应率 (%)
50nm 球形银纳米粒子	100
80nm 球形银纳米粒子	9.58
16nm 球形金纳米粒子	<0.01
40nm 球形金纳米粒子	<0.01
80nm 球形金纳米粒子	<0.01

[0110] 可以看出与其他抗原的交叉反应率均小于 10%,说明此 50nm AgNPs 抗体的特异

性较高。

专利名称(译)	一种50nm银粒子的定量检测方法		
公开(公告)号	CN104251902A	公开(公告)日	2014-12-31
申请号	CN201410513013.9	申请日	2014-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
[标]发明人	张明翠 吴瑕玉		
发明人	张明翠 吴瑕玉		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/54366		
代理人(译)	朱圣荣		
其他公开文献	CN104251902B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种50nm银粒子的定量检测方法。检测方法步骤包括：制备50nm银粒子的免疫原和包被抗原、制备50nm银粒子高特异性抗体、制备酶标抗体、用吸光度法测定50nm银粒子含量。本发明检测方法特异性高，灵敏度高，操作相对简单。

