



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104251902 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201410513013. 9

(22) 申请日 2014. 09. 29

(73) 专利权人 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)

(56) 对比文件

CN 103675272 A, 2014. 03. 26,

CN 102539743 A, 2012. 07. 04,

CN 1479089 A, 2004. 03. 03,

JP 2004-323508 A, 2004. 11. 18,

US 2006/0024833 A1, 2006. 02. 02,

审查员 段晓露

权利要求书2页 说明书7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银粒子的免疫抗原和包被抗原;

b、将免疫抗原注射到动物体内,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,标准品溶液与待测样品溶液中的待测物质和固相抗原同时竞争酶标抗体上的结合位点,酶标抗体的酶促使底物液发光,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;

所述步骤a中50nm银粒子的免疫抗原的制备方法为:

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)碳化二亚胺盐酸盐溶液和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;

所述巯基乙酸溶液质量百分比浓度为9.9%,50nm银粒子溶液浓度为100μg/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,牛血清白蛋白溶液浓度为10g/L,巯基乙酸、1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺的物质的量比1:2:4;50nm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。

2. 如权利要求1所述的检测方法,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。

3. 如权利要求2所述的检测方法,其特征在于:所述多次免疫的方法为: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。

4. 如权利要求1所述的检测方法,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,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 pH9.6碳酸钠缓冲液溶解,加入0.5-1mL50nm银粒子高特异性抗体,放在冰箱内过夜后,用少量的NaH₂PO₄调至中性即可;最后用饱和硫酸铵溶液沉淀法将酶标抗体纯化,纯化后的抗体于4℃或-20℃保存。

5. 如权利要求1所述的检测方法,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,用稀释液包被96孔酶标板,每孔加稀释液80~150μL,放置4℃过夜,取出,用洗涤液PBST洗涤2~6次,每次2~6分钟;

2)封闭:加入质量百分比浓度为1%~5%OVA溶液,每孔100~200μL,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;

3)竞争:加入50 μ l/孔不同浓度含50nm银粒子的标准品溶液和待测样品溶液,然后分别加入50 μ L酶标抗体,使之发生竞争反应,30 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C下温育1~5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;

4)检测:加入底物液显色,每孔80~120 μ L,温育30分钟后,用2mol/L的H₂SO₄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银粒子的标准品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。

6.如权利要求5所述的检测方法,其特征在于:所述步骤d具体为:

1)包被:将包被抗原与水以1:100稀释后制成稀释液,用稀释液包被96孔酶标板,每孔加稀释液100 μ L,放置4 $^{\circ}$ C过夜,取出,用洗涤液PBST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%OVA溶液,每孔150~200 μ L,封闭没有包被抗原的多余的部分,37 $^{\circ}$ C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 μ l/孔不同浓度含50nm银粒子的标准品溶液和待测样品溶液,然后分别加入50 μ L酶标抗体,使之发生竞争反应,37 $^{\circ}$ C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3~5次,每次3~5分钟;

4)检测:加入底物液显色,每孔100 μ L,温育30分钟后,用2mol/L的H₂SO₄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银粒子的标准品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具挑战性的工作。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AgNO₃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℃储备用,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℃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℃

[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100μg/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0.5mg~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。

[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): NaCO_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):由稀释液中加入体积分数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。

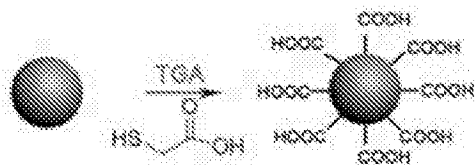
[0052] 实施例1

[0053] (1)50nm AgNPs即50nm银粒子全抗原

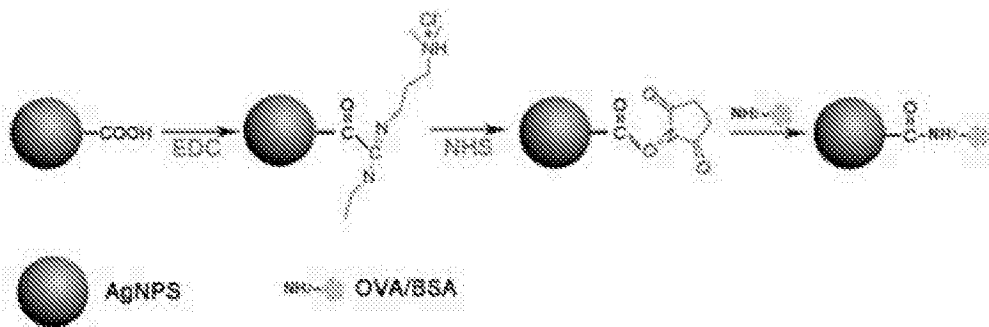
[0054] 1)50nm AgNPs的制备

[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℃存储备用,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NaH₂PO₄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100μL,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150μL,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50μL自制的50nm AgNPs标准溶液或样品溶液和50μL 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50μL/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50μL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100μL,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} –1000ng/mL,

[0079] 最低检测限(3σ)是0.0093ng/mL。

[0080] 最终测得样品溶液50nm AgNPs含量为1.34ng/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AgNO₃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。

[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20μL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40μL 10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和80μL10mg/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200μL 1%的BSA(免疫抗原)或者OVA(包被抗原),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。

[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℃)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。

[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 /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] $A=0.52152-0.05339\lg C$

[0105] $R^2=0.98342$,线性范围为 10^{-4} –100ng/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 $1C_{50}$ 浓度,交叉反应率=(抗原的 $1C_{50}$ 浓度/近似抗原的 $1C_{50}$ 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	CN104251902B	公开(公告)日	2016-06-01
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		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN104251902A		
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。

