



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102023151 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 201010284685. 9

(22) 申请日 2010. 09. 17

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 朱颖越 徐丽广 陈伟 刘丽强 徐乃丰 马伟

(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 21/65 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

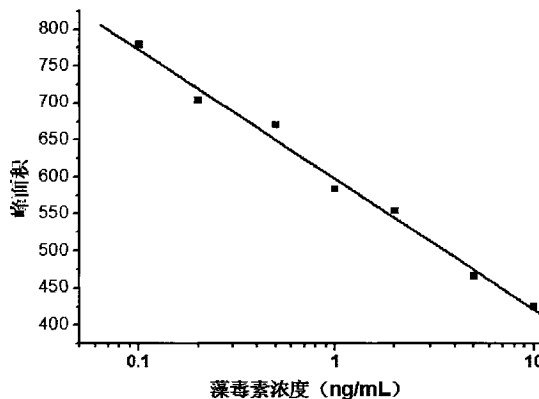
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法

(57) 摘要

一种基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下的检测微囊藻毒素 (MC-LR) 的方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明以金纳米棒的端面与微囊藻毒素的包被原及抗微囊藻毒素的抗体分别偶联形成金纳米棒的探针,利用合成的金纳米棒探针进行免疫反应从而由于金纳米棒端面的抗原抗体反应形成纳米链,组装形成的纳米链长度的不同使拉曼信号强度不同,通过拉曼信号的变化达到检测 MC-LR 含量的目的。本发明是在液体环境中反应,不需要清洗的步骤,只需要一步反应,简化了反应的条件,减轻劳动强度,提高了检测的灵敏度。



1. 一种基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法，其特征在于步骤为：

(1) 包被原的修饰：

将微囊藻毒素 MC-LR 的包被原与硫辛酸相偶联得到修饰的藻毒素包被原；

(2) 抗体的修饰：

将抗微囊藻毒素 MC-LR 的抗体与硫辛酸相偶联得到修饰的抗微囊藻毒素 MC-LR 的抗体；

(3) 用步骤 (1) 得到的修饰的藻毒素包被原与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒 - 包被原探针 GNR-Ag；

(4) 用步骤 (2) 得到的修饰的抗微囊藻毒素 MC-LR 的抗体与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒 - 抗体探针 GNR-Ab；

(5) 信号分子 4-氨基苯硫酚和 GNR-Ab 金纳米棒的侧面偶联；

(6) 微囊藻毒素 MC-LR 含量检测：利用间接竞争免疫检测原理，将微囊藻毒素 MC-LR 和步骤 (3) 得到的金纳米棒 - 包被原探针同时加入到一个离心管中，而后向离心管中加入步骤 (4) 得到的金纳米棒 - 抗体探针，混匀，通过微囊藻毒素 MC-LR 和金纳米棒 - 包被原探针与金纳米棒 - 抗体探针进行竞争偶联，通过微囊藻毒素 MC-LR 浓度的不同使形成的金纳米粒子形成不同的粒径分布，不同程度组装形成的纳米链对于拉曼信号的增强作用不同，通过拉曼仪器测定液体环境中的纳米链对于信号分子所产生的信号强度来间接测定微囊藻毒素的含量。

2. 根据权利要求 1 所述的基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法，其特征在于包被原的修饰：

①含硫辛酸 1.625mg 的 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液与含 2mg 的 0.2mL 的藻毒素包被原溶液混合；

②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h；

③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析三天，每天换三次透析液；

④将修饰后的藻毒素包被原放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

3. 根据权利要求 1 所述的基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法，其特征在于抗体的修饰：

①含硫辛酸 1.625mg 的 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液与含 4mg 的 0.4mL 的藻毒素抗体混合；

②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h；

③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析三天，每天换三次透析液；

④将修饰后的藻毒素抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

4. 根据权利要求 1 所述的基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法，其特征在于金纳米棒 - 抗体探针的制备：采用晶种生长法合成金纳米棒，合成的金纳米棒利用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 PEG 的 0.005M 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 稀释溶液进行重悬，重悬液采用 1M HCl 调整 pH 值 3.1，0.5mL 浓度为 2nmol 重分散的金纳米棒逐滴滴加到由 50 μ L 经修饰后的藻毒素抗体中，最终分散到 1mL 的稀释溶液中，采用硫辛酸修饰的藻毒素抗体会修饰到金棒的端面而非侧面上，室温搅拌反应 4h，反应

结束后 6000rpm 离心 10min, 用 1mL 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散, 洗涤两遍; 最后用 50 μ L 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散; 此金纳米棒-抗体探针, 即金纳米棒-藻毒素抗体偶联物 GNR-Ab 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

5. 根据权利要求 1 所述的基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法, 其特征在于金纳米棒-包被原探针的制备: 藻毒素包被原和金纳米棒的偶联与权利要求 4 所述藻毒素抗体和金纳米棒的偶联相似, 只是在包被原的量上有区别, 即加入的藻毒素包被原 60 μ L 后用 940 μ L 的 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行稀释; 此金纳米棒-包被原探针, 即金纳米棒-藻毒素包被原偶联物 GNR-Ag 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

6. 根据权利要求 1 所述的基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法, 其特征在于信号分子 4-氨基苯硫酚和 GNR-Ab 金纳米棒的侧面偶联: 在 495 μ L 偶联上藻毒素抗体的金纳米棒分散液中, 加入 5 μ L 浓度为 100mM 的 4-氨基苯硫酚的乙醇溶液, 至金纳米棒-藻毒素抗体偶联物分散液中 4-氨基苯硫酚的最终浓度为 1mM, 室温震荡避光反应 12h, 反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 1mL 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散, 洗涤两遍, 最后用 50 μ L 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散, 此信号分子 4-氨基苯硫酚偶联在 GNR-Ab 金纳米棒的侧面, 4-氨基苯硫酚与 GNR-Ab 偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

7. 根据权利要求 1 所述的基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法, 其特征在于标准曲线的建立: 通过测定拉曼信号大小进行 MC-LR 的检测, 步骤为:

①免疫反应: 向各个离心管中各加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后, 再向各离心管加入用 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液稀释的 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL 的微囊藻毒素后混匀, 按照 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀, 放入 37 $^{\circ}$ C 反应 30min;

②仪器检测: 反应结束, 反应液中加入等量的 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液稀释, 混匀, 静置 2min, 用拉曼仪测定该反应液中的信号分子的强度-峰面积, 重复三次;

运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 拉曼信号强度为纵坐标建立标准曲线, 检测限 LOD 通过公式 $LOD = 3.3SD/S$ 计算得出, SD 为变异系数, S 为标准曲线的斜率。

用拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法

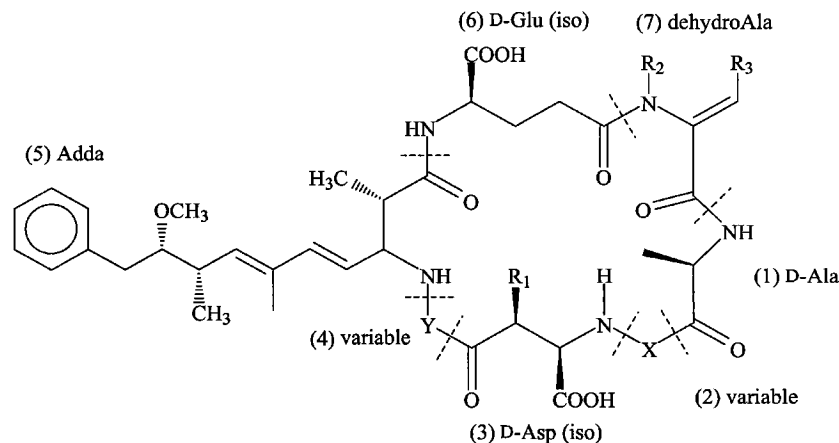
技术领域

[0001] 一种基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下的检测微囊藻毒素 (MC-LR) 的方法, 属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

[0002] 随着经济的发展, 含有大量的氮、磷营养物质的污水进入湖泊、水库, 使水体富营养化, 致使藻类异常增殖, 释放次级代谢物藻毒素 (Algae Toxins), 威胁人类的饮用水的安全和水体中其它生物的安全。其中微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 分布最广、危害最大, 其结构如下:

[0003]



[0004] 其含有五个固定成分的氨基酸, 两个可变的氨基酸 X、Y。即在上述的结构式中其中 X 和 Y 分别为 Leu 和 Arg 的即为 MC-LR。MC-LR 是最为常见且毒性又最大的一种微囊藻毒素, 世界卫生组织 (WHO) 推荐的饮用水中的 MC-LR 的最大残留限量为 $1.0 \mu\text{g/L}$, 我国现颁布执行的生活饮用水水质卫生规范 (2001, 0.001mg/L) 和地表水环境质量标准 (GB3838-2002, 微囊藻毒素 -LR, 0.001mg/L), 因此急需建立针对 MC-LR 检测的一种快速、简单、灵敏、省力的检测方法。

[0005] 常用的检测藻毒素的方法主要有仪器分析方法、生物化学法及免疫检测法等几大类。仪器分析方法主要包括高效液相色谱法 (HPLC)、质谱、液质联用等, 这些方法虽然灵敏但其需要昂贵的仪器设备, 专业的操作人员, 对检材的要求也比较高, 并且需要进一步的样本前处理才能进行, 这已经不能达到现代检测对快速、方便、准确的要求。生物化学法主要是蛋白磷酸酶抑制试验法, 优点是快速, 数小时即可实现对大量样品的检测, 但其最大的不足之处在于特异性蛋白磷酸酶等没有商品供应、特异性差。免疫分析化学方法具有快速, 灵敏度高, 操作简单, 专一性好等优点。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下的检测微

囊藻毒素 (MC-LR) 的方法, 灵敏度高, 操作方便, 线性范围宽。

[0007] 本发明的技术方案: 一种基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下的检测微囊藻毒素 (MC-LR) 的方法, 包括包被原和抗体的修饰, 抗体和金纳米棒的偶联, 包被原和金纳米棒的偶联, 信号分子 4-氨基苯硫酚和 GNR-Ab 金纳米棒的侧面偶联, 标准曲线的测定。步骤为:

[0008] (1) 包被原的修饰:

[0009] 将微囊藻毒素 MC-LR 的包被原与硫辛酸相偶联得到修饰的藻毒素包被原;

[0010] (2) 抗体的修饰:

[0011] 将抗微囊藻毒素 MC-LR 的抗体与硫辛酸相偶联得到修饰的抗微囊藻毒素 MC-LR 的抗体;

[0012] (3) 用步骤 (1) 得到的修饰的藻毒素包被原与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒-包被原探针 GNR-Ag;

[0013] (4) 用步骤 (2) 得到的修饰的抗微囊藻毒素 MC-LR 的抗体与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒-抗体探针 GNR-Ab;

[0014] (5) 信号分子 4-氨基苯硫酚和 GNR-Ab 金纳米棒的侧面偶联;

[0015] (6) 微囊藻毒素 MC-LR 含量检测: 利用间接竞争免疫检测原理, 将微囊藻毒素 MC-LR 和步骤 (3) 得到的金纳米棒-包被原探针同时加入到一个离心管中, 而后向离心管中加入步骤 (4) 得到的金纳米棒-抗体探针, 混匀, 通过微囊藻毒素 MC-LR 和金纳米棒-包被原探针与金纳米棒-抗体探针进行竞争偶联, 通过微囊藻毒素 MC-LR 浓度的不同使形成的金纳米粒子形成不同的粒径分布, 不同程度组装形成的纳米链对于拉曼信号的增强作用不同, 通过拉曼仪器测定液体环境中的纳米链对于信号分子所产生的信号强度来间接测定微囊藻毒素的含量。

[0016] 所述包被原的修饰:

[0017] ①含硫辛酸 1.625mg 的 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液与含 2mg 的 0.2mL 的藻毒素包被原溶液混合;

[0018] ②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h;

[0019] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析三天, 每天换三次透析液;

[0020] ④将修饰后的藻毒素包被原放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0021] 所述抗体的修饰:

[0022] ①含硫辛酸 1.625mg 的 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液与含 4mg 的 0.4mL 的藻毒素抗体混合;

[0023] ②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h;

[0024] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析三天, 每天换三次透析液;

[0025] ④将修饰后的藻毒素抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0026] 所述金纳米棒-抗体探针的制备: 采用晶种生长法合成金纳米棒, 合成的金纳米棒利用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 PEG 的 0.005M 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 稀释溶液进行重悬, 重悬液采用 1M HCl 调整 pH 值 3.1, 0.5mL 浓度为 2nmol 重分散的金纳米

棒 (GNRs) 逐滴滴加到由 50 μ L 经修饰后的藻毒素抗体中, 最终分散到 1mL 的稀释溶液中。采用硫辛酸修饰的藻毒素抗体会修饰到金棒的端面而非侧面上, 室温搅拌反应 4h, 反应结束后 6000rpm 离心 10min, 用 1mL 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散, 洗涤两遍; 最后用 50 μ L 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散; 此金纳米棒-抗体探针, 即金纳米棒-藻毒素抗体偶联物 GNR-Ab 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0027] 所述金纳米棒-包被原探针的制备: 藻毒素包被原和金纳米棒的偶联与上述藻毒素抗体和金纳米棒的偶联相似, 只是在包被原的量上有区别, 即加入的藻毒素包被原 60 μ L 后用 940 μ L 的 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行稀释; 此金纳米棒-包被原探针, 即金纳米棒-藻毒素包被原偶联物 GNR-Ag 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0028] 所述信号分子 4-氨基苯硫酚和 GNR-Ab 金纳米棒的侧面偶联: 在 495 μ L 偶联上藻毒素抗体的金纳米棒分散液中, 加入 5 μ L 浓度为 100mM 的 4-氨基苯硫酚的乙醇溶液, 至金纳米棒-藻毒素抗体偶联物分散液中 4-氨基苯硫酚的最终浓度为 1mM, 室温震荡避光反应 12h, 反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 1mL 的 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散, 洗涤两遍, 最后用 50 μ L 的 pH 3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液进行重分散, 此信号分子 4-氨基苯硫酚偶联在 GNR-Ab 金纳米棒的侧面, 4-氨基苯硫酚与 GNR-Ab 偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0029] 所述标准曲线的建立: 通过测定拉曼信号大小进行 MC-LR 的检测, 步骤为:

[0030] ①免疫反应: 向各个离心管中各加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后, 再向各离心管加入用 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液稀释的 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL 的微囊藻毒素后混匀, 按照 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀, 放入 37 $^{\circ}$ C 反应 30min;

[0031] ②仪器检测: 反应结束, 反应液中加入等量的 pH3.8、含有 0.1% PEG 的 0.005M CTAB 溶液稀释, 混匀, 静置 2min, 用拉曼仪测定该反应液中的信号分子的强度-峰面积, 重复三次;

[0032] 运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 拉曼信号强度为纵坐标建立标准曲线, 检测限 LOD 通过公式 $LOD = 3.3SD/S$ 计算得出, SD 为变异系数, S 为标准曲线的斜率。

[0033] 本发明的有益效果: 与传统的 ELISA 方法相比, 本发明利用晶种生长法合成的金纳米棒分别与微囊藻毒素的包被原和抗微囊藻毒素的抗体相连, 在液体的环境下金纳米棒偶联抗体和金纳米棒偶联包被原反应形成纳米链, 微囊藻毒素可以和金纳米棒偶联的包被原进行竞争结合金纳米棒偶联抗体的结合位点, 因此微囊藻毒素的含量会影响纳米链的长度。不同程度组装形成的纳米链, 对于拉曼信号的增强作用不同, 故通过拉曼仪器测定液体环境中的纳米链对于信号分子所产生的信号强度来间接测定微囊藻毒素的含量。本发明只在液体环境中反应, 不破坏样品, 不需要清洗的步骤, 只需要一步反应, 简化了反应的条件, 减轻劳动强度, 提高了检测的灵敏度。

附图说明

[0034] 图 1 加入不同浓度微囊藻毒素标准品后拉曼检测金纳米棒的结果图 (自上到下添加浓度为 100ng/mL, 10ng/mL, 1ng/mL, 0ng/mL)。

[0035] 图 2 微囊藻毒素检测的标准曲线。

具体实施方式

[0036] 实施例 1

[0037] (1) 藻毒素包被原的修饰：

[0038] 藻毒素包被原为藻毒素小分子和卵清蛋白通过碳二亚胺法进行偶联获得。

[0039] 藻毒素包被原的修饰采用碳二亚胺法将藻毒素包被原与硫辛酸相偶联得到修饰的藻毒素包被原，操作步骤如下：

[0040] ① 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液（含硫辛酸 1.625mg）与 0.2mL（含藻毒素包被原 2mg）的藻毒素包被原溶液混合。

[0041] ②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h。

[0042] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析三天，每天换三次透析液。

[0043] ④将修饰后的藻毒素包被原放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0044] (2) 藻毒素抗体修饰：

[0045] ① 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液（含硫辛酸 1.625mg）与 0.4mL 的藻毒素抗体溶液（含藻毒素抗体 4mg）混合。

[0046] ②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h。

[0047] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析三天，每天换三次透析液。

[0048] ④将修饰后的藻毒素抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0049] (3) 藻毒素抗体和金纳米棒端面偶联：

[0050] 采用晶种生长法合成金纳米棒，首先要经过 7500rpm 离心 15min 去除溶液中多余的 Vc， AgNO_3 和小的球形粒子金纳米棒后利用 pH3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 (PEG) 的 0.005M 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 稀释溶液进行重悬。采用 1M HCl 调整重悬液的 pH 值至 3.1。在金纳米棒的制备过程中 CTAB 起着非常关键的作用。CTAB 主要是分布在金纳米棒的侧面，从而金纳米棒的侧面带有正电荷，而 CTAB 在金纳米棒的端面分布很少，因此采用硫辛酸修饰的藻毒素抗体会修饰到金纳米棒的端面而非侧面上。0.5mL 浓度为 2nmol 重分散的金纳米棒 (GNRs) 逐滴滴加到由 50 μ L 经修饰后的藻毒素抗体中，最终分散到 1mL 的稀释溶液中。室温搅拌反应 4h。反应结束后 6000rpm 离心 10min，运用 1mL 的 0.005M CTAB (pH3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液进行重分散。洗涤两遍。最后用 50 μ L 的 0.005M CTAB (pH 3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液进行重分散。此金纳米棒 - 藻毒素抗体偶联物 (GNR-Ab) 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0051] (4) 藻毒素包被原和金纳米棒端面偶联

[0052] 藻毒素包被原和金纳米棒的偶联与 (3) 藻毒素抗体和金纳米棒的偶联相似，只是在藻毒素包被原的量上有区别，即加入的包被原 60 μ L 后用 940 μ L 的 0.005M CTAB (pH3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液进行稀释。此金纳米棒 - 藻毒素包被原偶联物 (GNR-Ag) 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0053] (5) 信号分子 4-氨基苯硫酚和 GNR-Ab 金纳米棒的侧面偶联

[0054] 在 495 μ L 偶联上藻毒素抗体的金纳米棒分散液中, 加入 5 μ L、100mM 的 4-氨基苯硫酚的乙醇溶液, 至金纳米棒-藻毒素抗体偶联物分散液中 4-氨基苯硫酚的最终浓度为 1mM, 室温震荡避光反应 12h。反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 1mL 的 0.005M CTAB (pH 3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液进行重分散。洗涤两遍。最后用 50 μ L 的 0.005M CTAB (pH3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液进行重分散。此信号分子 4-氨基苯硫酚偶联在 GNR-Ab 金纳米棒的侧面, 4-氨基苯硫酚与 GNR-Ab 偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0055] (6) 标准曲线的建立:

[0056] 微囊藻毒素 MC-LR (995.2Da) 作为一个小分子不可能被两个抗体分子进行识别。当金纳米棒-藻毒素抗体偶联物 (GNR-Ab) 和金纳米棒-藻毒素包被原偶联物 (GNR-Ag) 混合时, 由于抗体抗原反应导致金纳米棒发生自组装形成长的纳米链。当加入微囊藻毒素 MC-LR 时, MC-LR 就会与藻毒素包被原竞争藻毒素抗体的结合位点导致 GNR-Ab 不能两端同时与 GNR-Ag 发生免疫反应, 因此 MC-LR 的浓度会影响纳米链的长度, 不同程度组装形成的纳米链, 对于拉曼信号的增强作用不同, 故通过拉曼仪器测定液体环境中的纳米链对于信号分子所产生的信号强度来间接测定微囊藻毒素的含量。通过测定拉曼信号可以建立基于金纳米棒探针的端面与端面相互连接的针对 MC-LR 的检测方法, 具体步骤为:

[0057] ①免疫反应: 向各个离心管中各加入 50 μ L 的 GNR-Ag, 再向各管中分别加入用 0.005M CTAB (pH 3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液稀释的 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL 的微囊藻毒素之一种, 后混匀, 按照 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1:1 加入 GNR-Ab 混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 30min。

[0058] ②仪器检测: 反应结束, 反应液中加入等量的 0.005M CTAB (pH 3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液稀释, 混匀。静置 2min, 用拉曼仪测定该反应液中的信号分子的强度, 重复三次。

[0059] 运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 拉曼信号强度 (峰面积) 作为纵坐标建立标准曲线。检测限 (LOD) 通过公式 $LOD = 3.3SD/S$ 计算得出, 式中 SD 为变异系数, S 为标准曲线的斜率。

[0060] (7) 实际样本的检测。

[0061] 实际样本是来自于无锡不同区域的太湖水。我们通过对实际样本的添加回收率实验来验证我们方法的可靠性。太湖水中的含有的原始的微囊藻毒素通过传统的 ELISA 进行测定。在搅拌的条件下添加微囊藻毒素 MC-LR 至预先采集的实际样本太湖水中, 添加的浓度为 0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 5ng/mL。添加后将太湖水在 4 $^{\circ}$ C 静置两小时。而后通过本专利建立的检测方法测定 MC-LR 的浓度, 计算回收率。通过对数据分析得到回收率在 92.21% 和 109.38% 之间。两组平行试验的变异系数均小于 3.73%。检测结果如表 1。

[0062] 表 1

[0063]

太湖 水	MC-LR 原始浓度 (ng/mL, ELISA法 测定)	MC-LR 添加浓度 (ng/mL)	MC-LR 检测浓度 平均±SD(ng/mL, 本发明方 法测定)	回收率(%) Mean±SD ^b
1	0.26	0.05	0.32±0.01	103.22±3.02
2	0.79	0.1	0.84±0.04	94.38±2.73
3	1.08	0.5	1.42±0.03	89.87±1.31
4	2.77	2.5	5.15±0.08	97.72±1.57
5	4.43	5.0	9.88±0.11	104.77±3.22

[0064] 通过这个结果可以得出本专利建立的检测方法是可行的，并且是简单、快速和省力的一种方法。

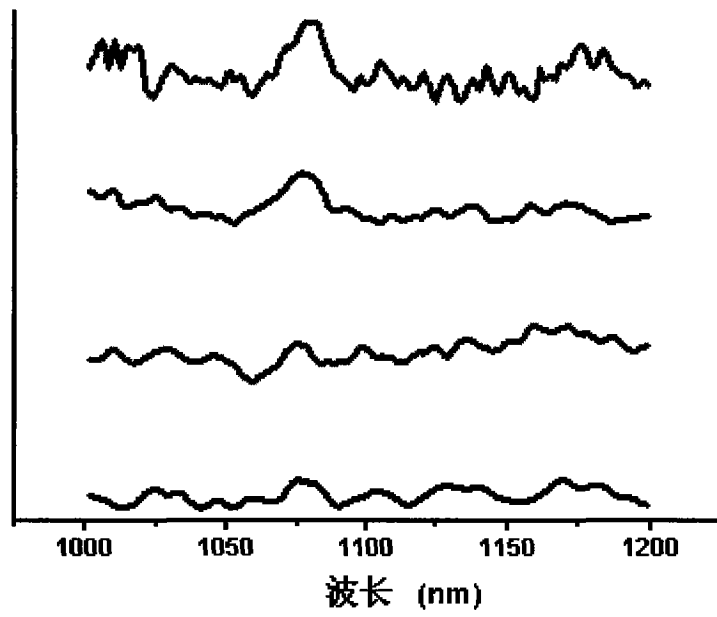


图 1

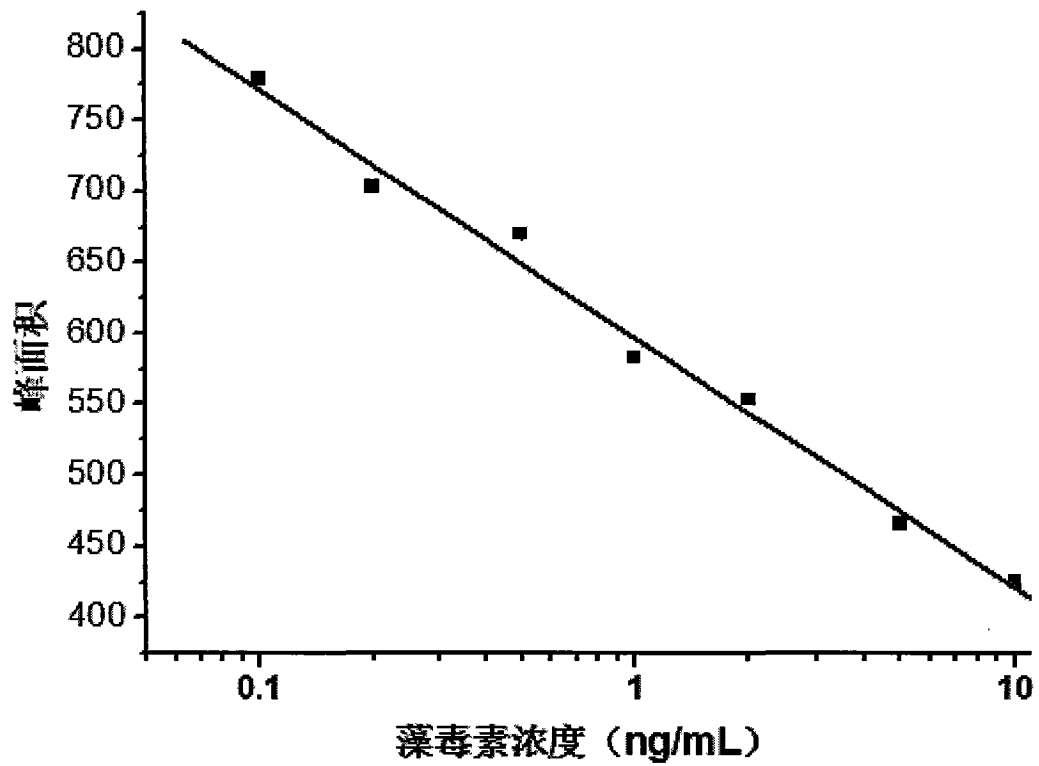


图 2

专利名称(译)	用拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下检测微囊藻毒素的方法		
公开(公告)号	CN102023151A	公开(公告)日	2011-04-20
申请号	CN201010284685.9	申请日	2010-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 朱颖越 徐丽广 陈伟 刘丽强 徐乃丰 马伟		
发明人	胥传来 朱颖越 徐丽广 陈伟 刘丽强 徐乃丰 马伟		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/531		
其他公开文献	CN102023151B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于拉曼光谱在金纳米棒端面自组装介导下的检测微囊藻毒素(MC-LR)的方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明以金纳米棒的端面与微囊藻毒素的包被原及抗微囊藻毒素的抗体分别偶联形成金纳米棒的探针,利用合成的金纳米棒探针进行免疫反应从而由于金纳米棒端面的抗原抗体反应形成纳米链,组装形成的纳米链长度的不同使拉曼信号强度不同,通过拉曼信号的变化达到检测MC-LR含量的目的。本发明是在液体环境中反应,不需要清洗的步骤,只需要一步反应,简化了反应的条件,减轻劳动强度,提高了检测的灵敏度。

