



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101923089 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 22

(21) 申请号 201010228290. 7

(22) 申请日 2010. 07. 16

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市朝阳区前进大街
2699 号

(72) 发明人 徐力 张代辉 郭轶 张学忠
吕绍武

(74) 专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任
公司 22201

代理人 张景林 刘喜生

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

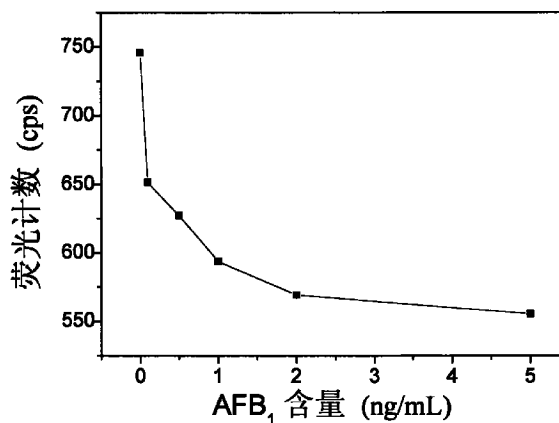
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明属于纳米生物技术领域,具体涉及一种黄曲霉毒素 B₁ 免疫磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法。本发明为免疫检测系统与磁性纳米材料的快速分离技术、荧光纳米材料的发光特性相结合的一种测定方法,其先是制备磁性分离试剂——复合物 (I),然后使黄曲霉毒素 B₁ 偶联到复合物 (I) 上,再加入偶联有全抗原的荧光粒子溶液 (复合物 (II)),复合物 (II) 中的黄曲霉毒素 B₁ 与复合物 (I) 上的剩余抗体发生免疫反应,形成复合物 (I)-复合物 (II) 的免疫夹心复合物 (III),这样黄曲霉毒素的浓度与最终被测溶液的荧光粒子溶液的荧光强度成反比,本发明的优点是检测快速、准确、明显、灵敏度高。



1. 一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法,其步骤如下:

(1) 磁性粒子的制备:通过高温分解法制备粒径为 5 ~ 18nm 的 Fe₃O₄ 磁性粒子,再利用细乳液法制备表面功能化的 Fe₃O₄ 磁性粒子;

(2) 磁性分离试剂 -- 复合物 (I) 的制备:利用缩合剂 1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐,使 Fe₃O₄ 磁性粒子与黄曲霉毒素 B₁ 抗体偶联形成复合物 (I);

(3) 荧光粒子的制备:通过有机相合成法制备荧光粒子,然后通过聚马来酸使荧光粒子表面功能化并转移到水相,得到荧光粒子;

(4) 荧光检测试剂 -- 复合物 (II) 的制备:利用缩合剂 1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐,使荧光粒子与黄曲霉毒素 B₁ 的全抗原偶联形成复合物 (II);

(5) 标准工作曲线的绘制:取 6 份体积均为 200uL 的磁性分离试剂 -- 复合物 (I) 分别放入试管中,再依次分别加入不同浓度的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 20uL,在 37℃ 下孵育 20 分钟后,在磁场中沉淀;然后倒去上清液,分别加入 50uL 荧光检测试剂复合物 (II) 溶液,在 37℃ 下孵育 20 分钟,在磁场中沉淀;倒去上清液,再分别加入 200uL、pH = 7.4、浓度为 0.01mol/L 的磷酸缓冲溶液,然后测定每个试管内溶液的荧光光谱,记录其最大荧光强度;再以荧光强度与黄曲霉毒素标准溶液的浓度为坐标绘制标准工作曲线;

(6) 对未知浓度的黄曲霉毒素 B₁ 溶液重复步骤 (5) 中的操作过程,得到样品的最大荧光强度,然后通过步骤 (5) 绘制的标准工作曲线读取样品中黄曲霉毒素 B₁ 的浓度。

2. 如权利要求 1 所述的一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:黄曲霉毒素 B₁ 的检测限为 0.1 ~ 5ng/mL。

3. 如权利要求 1 所述的一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:荧光粒子为 CdSe 荧光粒子、CdTe 荧光粒子或具有核 - 壳结构的 CdSe/ZnS 荧光粒子。

4. 如权利要求 1 所述的一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于:黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液的配制是将黄曲霉毒素 B₁ 首先溶解在甲醇溶液中,配制成 1mg/mL 甲醇溶液,然后用体积含量 10% 甲醇的磷酸缓冲溶液稀释,稀释后黄曲霉毒素 B₁ 溶液的浓度分别为 0ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL 和 5.0ng/mL。

一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米生物技术领域,具体涉及一种黄曲霉毒素 B₁ 免疫磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 (Aflatoxin, 简写 AF) 是主要由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的次生代谢产物,世界各地的玉米、小麦、高粱、甘薯、大豆、棉籽、禽蛋、肉、奶及奶制品中均存在黄曲霉毒素的污染情况。

[0003] 目前发现的 18 种黄曲霉毒素中,黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是毒性最大的真菌毒素,其毒性为砒霜的 68 倍,它诱发肝癌的能力是二甲基亚硝胺的 75 倍,它具有诱导突变、抑制免疫和致癌的作用,是目前公认致癌性最强的物质之一。AFM₁、AFB₂、AFG₁ 次之。同时,AF 十分稳定,加热至 230℃ 才能被完全破坏,因此一般烹饪加工不易消除,并且它可以通过多种途径污染食品,直接或间接进入人类食物链,威胁人类健康和生命安全。

[0004] 目前国际上对农产品中 AF 含量的检测,已成为强制性贸易技术措施。其中薄层层析法、高效液相色谱法和免疫化学法是受人们关注的几个代表性方法。以上三种方法中,薄层层析法是研究 AF 初期所使用的主要方法,主要是由于样品前处理过程繁琐、复杂,较适合于定性检测,不适于大批量样品的快速检测;高效液相色谱法具有快速、灵敏、准确等特点,并且可以用于定性和定量检测,但仪器价格昂贵,不便于操作;免疫分析法操作简便、快速,但也只能用来进行定性检测。因此,开发快速、准确、简便的检测技术是当务之急。目前,用纳米材料实现快速检测的方法是利用金标试纸进行检测,该方法可以快速的检测黄曲霉毒素的含量达标与否,但不能进行定量检测。本发明利用磁性分离和荧光纳米材料检测技术相结合的方法,实现黄曲霉毒素 B₁ 的定量检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法,主要用于检测粮食、食品、饮料、酒类、饲料等中的黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

[0006] 由于荧光粒子的激发谱在吸收阈值以上几乎是连续的,利于多波长激发;高强度的荧光发射,发光稳定性好,不容易被光分解和漂白,因此可以用于标记物的定量检测。磁性纳米材料具有特殊的超顺磁性,是被广泛应用的快速磁分离材料。利用磁性材料将被检测物从待检样本中分离,并与荧光检测试剂结合形成免疫夹心复合物,这样可以利用荧光粒子进行样本的定量检测。

[0007] 本发明的技术方案:检测原理是样品中的黄曲霉毒素 B₁ 首先与磁性纳米材料表面的抗体(复合物(I))发生免疫反应,偶联到磁性分离试剂——复合物(I)上,再加入偶联有全抗原的荧光粒子溶液(复合物(II)),复合物(II)中的黄曲霉毒素 B₁ 与复合物(I)上的剩余抗体发生免疫反应,形成复合物(I)—复合物(II)的免疫夹心复合物(III),这样免疫夹心复合物(III)的荧光强度就与黄曲霉毒素 B₁ 的量相关。在测试范围内,可以看出样品

中黄曲霉毒素的浓度与最终被测溶液的荧光粒子溶液的荧光强度成反比,其具体的黄曲霉毒素的含量需要从标准工作曲线上获得。

[0008] 本发明所述的一种黄曲霉毒素 B₁ 磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法,其步骤如下:

[0009] (1) 磁性粒子的制备:通过高温分解法制备粒径为 5 ~ 18nm 的 Fe₃O₄ 磁性粒子,再利用细乳液法制备表面功能化的 Fe₃O₄ 磁性粒子;

[0010] (2) 磁性分离试剂 — 复合物 (I) 的制备:利用缩合剂 EDC (EDC:1- 乙基 - (3- 二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐),使 Fe₃O₄ 磁性粒子与黄曲霉毒素 B₁ 抗体 (兔源性多克隆抗黄曲霉毒素 B₁ 抗体,购买于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司) 偶联形成复合物 (I);

[0011] (3) 荧光粒子的制备:通过有机相合成法制备 CdSe 荧光粒子,所制得的荧光粒子的尺寸在 2.5 ~ 3.0nm (其它荧光纳米材料:如 CdTe 荧光粒子、具有核 - 壳结构的 CdSe/ZnS 荧光粒子等也适用于本发明方法),然后通过聚马来酸使荧光粒子表面功能化并转移到水相,得到荧光粒子;

[0012] (4) 荧光检测试剂 — 复合物 (II) 的制备:利用缩合剂 EDC,使荧光粒子与黄曲霉毒素 B₁ 的全抗原 (BSA-AFB₁:连接黄曲霉毒素 B₁ 的牛血清白蛋白,购买于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司) 偶联形成复合物 (II);

[0013] (5) 标准工作曲线的绘制:取 6 份磁性分离试剂 — 复合物 (I) (每份 200uL) 分别放入试管中,再依次分别加入不同浓度的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 20uL (黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液配制:黄曲霉毒素 B₁ 首先溶解在甲醇溶液中,配制成 1mg/mL 甲醇溶液,然后用含 10% 甲醇 (体积含量) 的磷酸缓冲溶液 (pH 7.4、0.01mol/L) 稀释一定倍数,即得到黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液,黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液的浓度分别为 0ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL。),在 37℃ 下孵育 20 分钟后,在磁场中沉淀;然后倒去上清液,再分别加入 50uL 荧光检测试剂复合物 (II) 溶液,在 37℃ 下孵育 20 分钟,在磁场中沉淀,倒去上清液,得到免疫夹心复合物 (III)。再分别加入 200uL 的磷酸缓冲溶液 (pH = 7.4、0.01mol/L),测定每个试管内溶液的荧光光谱,记录其最大荧光强度 (荧光分光光度计 — 岛津 RF5301);然后以荧光强度与黄曲霉毒素标准溶液的浓度为坐标绘制标准工作曲线。

[0014] (6) 在实际检测中,首先绘制标准工作曲线,再测定 (重复第 5 步中的操作过程) 样品的荧光强度,通过工作曲线读取样品中 AFB₁ 的浓度。

[0015] 免疫磁分离荧光定量检测试剂盒用于黄曲霉毒素 B₁ 的检测,其检测限为 0.1 ~ 5ng/mL。

图 1:以荧光强度与黄曲霉毒素标准溶液的浓度为坐标绘制的标准工作曲线。

具体实施方式

[0016] 1. 磁性粒子的制备:

[0017] (1) 参照文献 J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 273-279, 通过高温分解方法合成 Fe₃O₄ 磁性粒子。向 N₂ 保护的三颈瓶内加入乙酰丙酮铁 [Fe(acac)₃] (0.3532g), 1,2- 十二二元醇 (1.0117g), 油酸 (1.0220mL), 油胺 (0.99mL) 混合, 苯醚 (10mL), 磁力搅拌。混合物加热至 200℃, 2h; 然后停止通入氮气, 再加热至约 300℃, 1h, 停止加热, 终止反应, 冷却至室温。冷

却后向三颈瓶中加入 20mL 乙醇,14000rpm 离心 20min,弃上清;将沉淀分散于 25uL 油酸、25uL 油胺和 5mL 正己烷混合溶液中;6000rpm 离心 10min;弃沉淀,向上清加入 10mL 乙醇,10000rpm 离心 20min,弃上清,即得到 Fe_3O_4 磁性粒子,粒径为 5 ~ 18nm,沉淀分散于正己烷中保存。

[0018] (2) 表面功能化的 Fe_3O_4 磁性粒子,参照文献 J. Nanopart. Res., 2009, 11, 289-296。首先超声将 0.218g Fe_3O_4 磁性粒子分散在 1mL 苯乙烯和 0.1mL 环己烷的溶液中形成油相,再将 0.08g 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 0.01g NaHCO_3 溶解于 30mL 水中形成水相;将油相和水相在冰水浴的条件下混合超声 10 分钟形成稳定的细乳液,然后将细乳液转入到加热的四颈瓶中,当温度到达 70℃时,加入 0.1mL 的丙烯酸,然后再加入 0.5mL 含有 0.015g 过硫酸钾 (KPS) 的水溶液引发聚合反应,在通冷凝水、氮气保护、300rpm 搅拌的条件下反应 12 小时,即得到表面功能化的 Fe_3O_4 磁性粒子的溶液(浓度约为 5.0mg/mL)。

[0019] 2. 磁性分离试剂——复合物 (I) 的制备:

[0020] 取上述步骤 (2) 制备的表面功能化的 Fe_3O_4 磁性粒子溶液 10uL,加入 0.01mol/L、pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液 140uL。再依次加入 50 μ L EDC (2mg/mL, 1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐) 溶液和 1uL 抗体溶液 (6.7mg/mL, 兔源性多克隆抗黄曲霉毒素 B_1 抗体),在气浴恒温振荡仪中,37℃条件下反应 4h。反应结束后用磁铁将磁性粒子富集在离心管底部,吸出上清液。将离心管底部的磁性粒子用 0.01mol/L、pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液 200 μ L 充分溶解,于 4℃保存;即得复合物 (I) 的溶液。

[0021] 3. 荧光粒子的制备:

[0022] (1) 储备液的制备:①储备液 a:氧化镉 (0.0154g)、油酸 (0.101g)、5mL 十八烯溶解在 25mL 三颈瓶中,在氮气的保护下加热到 240℃得到无色澄清的溶液;②储备液 b:硒粉 (0.188g)、油酸 (1.94g)、18mL 十八烯加入到氮气保护的 50mL 三颈瓶中,加热到 100℃反应 20 分钟,然后在 220℃加热 3 小时,最终变为黄色溶液;

[0023] (2) 荧光粒子的合成:储备液 a (25mL) 在氮气保护下加热到 280℃,加入 2mL 储备液 b,反应 30min,得到亮红色溶液,通过甲醇萃取,沉淀溶于氯仿,即得到 CdSe 荧光粒子的氯仿溶液,粒径为 2.5 ~ 3.0nm。

[0024] (3) 表面功能化的荧光粒子:0.72g 的聚马来酸十六烷醇酯 (PMAH) 溶解在 100mL 高纯水中,用 NaOH 调节 pH 值到 8 ~ 10,然后加入 10mL 荧光粒子的氯仿溶液 (2.0×10^{-4} mol/L),常温搅拌 24 小时,荧光粒子即转移到水相中。将水相溶液再过 0.22um 的滤膜,除去大的颗粒,产物再经过离心纯化,得到表面功能化的 CdSe 荧光粒子溶液(浓度约为 0.5mg/mL)。

[0025] 4. 荧光检测试剂——复合物 (II) 的制备:

[0026] 取荧光粒子溶液 100 μ L,加入 0.01mol/L、pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液 50uL。再依次加入 50uL EDC (2mg/mL, 1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐) 溶液和 2.5uL 抗体溶液 (5mg/mL, 兔源性多克隆抗黄曲霉毒素 B_1 抗体),在气浴恒温振荡仪中,37℃条件下反应 4h。反应结束后 12000rpm 离心 10min,吸出上清液。将离心管底部的荧光粒子用 0.01mol/L、pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液 200uL 充分溶解,于 4℃保存;即得复合物 (II) 的溶液。

[0027] 5. 标准工作曲线的绘制:

[0028] 取 6 份磁分离试剂——复合物 (I) (每份 200uL),分别加入黄曲霉毒素标准溶

液 20 μ L (黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液的浓度分别为 0ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL), 在 37℃ 下孵育 20 分钟后, 在磁场中沉淀; 然后倒去上清液, 再加入 50 μ L 荧光检测试剂复合物 (II) 溶液, 在 37℃ 下孵育 20 分钟, 在磁场中沉淀; 倒去上清液, 再加入 200 μ L 的磷酸缓冲溶液 (pH = 7.4、0.01mol/L), 测定该溶液的荧光光谱, 记录其最大荧光强度。然后再以荧光强度与黄曲霉毒素标准溶液的浓度为坐标绘制标准工作曲线, 测量数据见表 1, 绘制的标准曲线如图 1。

[0029] 表 1: 黄曲霉毒素标准工作曲线数据表

[0030]

标准工作曲线						
AFB ₁ 含量 (ng/mL)	0	0.1	0.5	1	2	5
荧光值 (cps)	745.6	651.5	627.1	593.6	569.2	555.4

[0031] 6. 样品的定量检测

[0032] 首先配制样品液 (样品 1、样品 2、样品 3, 其黄曲霉毒素 B₁ 的已知含量分别为 0.2ng/mL、0.8ng/mL 和 3ng/mL)。然后通过步骤 5 所述的方法和步骤测定样品 1、2、3 的荧光值如下: 样品 1: 645.1cps; 样品 2: 605.1cps 和样品 3: 564.4cps, 则通过步骤 5 绘制的标准工作曲线读取的对应的黄曲霉毒素 B₁ 的含量分别为: 0.21ng/mL、0.83ng/mL 和 3.02ng/mL, 与已知含量相符合得很好, 充分表明本发明所制备的试剂盒能够用于黄曲霉毒素 B₁ 的定量检测, 而且准确率高。

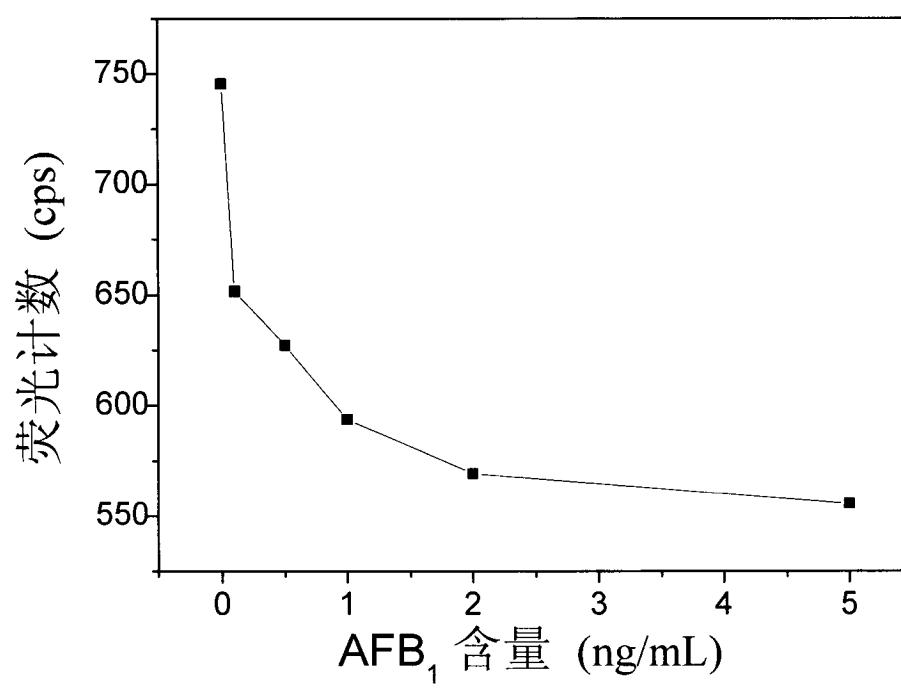


图 1

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素B1磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN101923089A	公开(公告)日	2010-12-22
申请号	CN201010228290.7	申请日	2010-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	徐力 张代辉 郭轶 张学忠 吕绍武		
发明人	徐力 张代辉 郭轶 张学忠 吕绍武		
IPC分类号	G01N33/532 G01N21/64		
代理人(译)	张景林 刘喜生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于纳米生物技术领域，具体涉及一种黄曲霉毒素B1免疫磁分离荧光定量检测试剂盒的制备方法。本发明为免疫检测系统与磁性纳米材料的快速分离技术、荧光纳米材料的发光特性相结合的一种测定方法，其先是制备磁性分离试剂——复合物(I)，然后使黄曲霉毒素B1偶联到复合物(I)上，再加入偶联有全抗原的荧光粒子溶液(复合物(II))，复合物(II)中的黄曲霉毒素B1与复合物(I)上的剩余抗体发生免疫反应，形成复合物(I)-复合物(II)的免疫夹心复合物(III)，这样黄曲霉毒素的浓度与最终被测溶液的荧光粒子溶液的荧光强度成反比，本发明的优点是检测快速、准确、明显、灵敏度高。

标准工作曲线						
AFB ₁ 含量 (ng/mL)	0	0.1	0.5	1	2	5
荧光值 (cps)	745.6	651.5	627.1	593.6	569.2	555.4