



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646607 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201910630921.9

(22)申请日 2019.07.12

(71)申请人 广东工业大学

地址 510006 广东省广州市番禺区大学城
外环西路100号

(72)发明人 赵肃清 张春国 何绮怡 崔锡平
沈定 钟颖颖

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

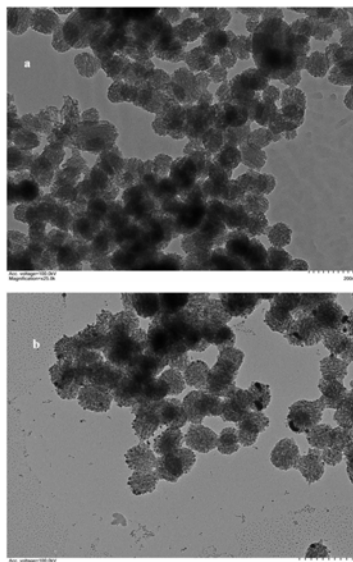
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体及其制备方法和应用。所述正电荷纳米金偶联抗体通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金和阿维菌素抗体偶联得到。本发明利用介孔二氧化硅将正电荷纳米金包裹,得到的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金更加稳定;另外,介孔二氧化硅包裹进一步提高了正电荷纳米金的类辣根过氧化酶的特性,能够使TMB显色,具有高催化活性;通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体可跳过二抗的步骤,实现TMB显色,进而实现阿维菌素的快速检测。



1. 一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体,其特征在于,通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金和阿维菌素抗体偶联得到;

所述介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金通过如下制备过程得到:

S1:将模板剂溶于水中,加入碱剂调节pH为10~11,然后于80~100℃下滴加有机硅源,搅拌、离心、洗涤、干燥得二氧化硅纳米粒子;

S2:将二氧化硅纳米粒子分散,加入高压传热介质后进行高压处理,洗涤,然后于盐酸-乙醇溶液中回流,洗涤干燥得介孔二氧化硅纳米粒子;

S3:将介孔二氧化硅纳米粒子悬浮于APTES溶液中,回流,干燥得胺改性的介孔二氧化硅纳米粒子;

S4:将胺改性的介孔二氧化硅纳米粒子分散,加入 HAuCl_4 溶液进行超声处理,然后加入 NaBH_4 ,搅拌,即得所述介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金。

2. 根据权利要求1所述正电荷纳米金偶联抗体,其特征在于,所述阿维菌素抗体通过如下过程制备得到:

S5:将阿维菌素用琥珀酸酐酰化,然后与载体蛋白OVA和BSA偶联得阿维菌素抗原;

S6:将阿维菌素抗原免疫动物,取血清即得阿维菌素抗体。

3. 根据权利要求2所述正电荷纳米金偶联抗体,其特征在于,S5包括如下过程:

S501:将阿维菌素溶解,加入咪唑和叔丁基二甲基氯硅烷,反应,纯化得5-0-t-BuMe₂Si AVM;

S502:5-0-t-BuMe₂Si AVM和琥珀酸酐回流反应,萃取,纯化得5-0t-BuMe₂Si-R-4-0 succinoyl AVM;

S503:将5-0t-BuMe₂Si-R-4-0 succinoyl AVM溶解,加入四丁基氟化铵反应,萃取,纯化得阿维菌素半抗原4-0-succinoyl AVM;

S504:将阿维菌素半抗原4-0-succinoyl AVM活化,加入OVA和BSA反应,透析,冻干得阿维菌素抗原。

4. 根据权利要求3所述正电荷纳米金偶联抗体,其特征在于,S504中所述活化选用的活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺NHS和二环己基碳二亚胺DCC。

5. 根据权利要求2所述正电荷纳米金偶联抗体,其特征在于,S6中所述动物为新西兰大白兔;所述免疫的次数为5次。

6. 权利要求1~5任一所述正电荷纳米金偶联抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将正电荷纳米金溶液和阿维菌素抗体混合,于36~38℃下30~35min,并于3~5℃下保持24~26h,即得。

7. 根据权利要求6所述制备方法,其特征在于,所述阿维菌素抗体来源于血清;所述正电荷纳米金和血清的质量体积比为1:0.6~1.0mg/μL。

8. 权利要求1~5任一所述正电荷纳米金偶联抗体在检测阿维菌素中的应用。

9. 一种基于正电荷纳米金检测阿维菌素的免疫分析方法,其特征在于,包括如下步骤:将权利要求1~5任一所述正电荷纳米金偶联抗体包被、封闭,然后加入至被测样品和金标抗体的混合液中,竞争反应后加入显色试剂,测定其吸光值即可计算得到阿维菌素的含量。

10. 根据权利要求9所述免疫分析方法,其特征在于,所述免疫分析方法还包括将所述正电荷纳米金偶联抗体包被、封闭,然后加入至阿维菌素标准品和和金标抗体的混合液中,

竞争反应后加入显色试剂,测定其吸光值得到标准曲线的步骤。

一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,具体涉及一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 阿维菌素 (AVM) 是源自土壤细菌阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 的杀虫/杀螨化合物。五种AVM,即阿维菌素 (ABM),伊维菌素 (IVM),依立诺克丁 (EPR),多拉菌素 (DOR) 和甲氨基阿维菌素 (EMA),广泛用于农业和农场动物,用于治疗广谱寄生虫病。AVM的特征在于在13位存在糖分子取代基,在25位存在仲丁基或异丙基。AVM通过对动物的中枢神经系统的 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体作用于无脊椎动物和脊椎动物从而起到灭虫作用。由于AVM的亲脂性质以及除了分泌物(尿液,粪便,精液)之外其动物体内残留物的长期持久性,AVM对极低剂量的寄生虫非常有效。毒理学研究表明,过量的AVM可能导致临床副作用从轻度到极端严重,包括死亡。可用于检测AVM的常规方法一般有高效液相色谱 (HPLC) 和液相色谱/质谱 (LC/MS),灵敏且可靠。然而,这些应用相对耗时并且仅在具有昂贵仪器的实验室规模上可用。免疫测定最近已经变得流行用于检测动物组织中的AVM残基,并且它们是快速的并且具有良好的灵敏度和特异性。

[0003] 因为天然酶具有一些严重的缺点,例如它们的催化活性可以容易地被抑制。此外,天然酶的制备,纯化和储存通常是耗时且昂贵的,所以人工酶模拟物是现在研究的一个新方向。由于金纳米粒子 (AuNPs) 易于制备,具有优异的生物相容性和独特的光电性能,因此在许多领域引起了越来越多的关注。但是目前测定阿维菌素的免疫分析方法存在需要二抗处理,操作复杂,准确度不高的缺点。

[0004] 因此,开发一种操作简单,且准确度高的新型免疫分析方法具有重要的研究意义和应用价值。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术中测定阿维菌素的免疫分析方法存在需要二抗处理,操作复杂,准确度不高的缺陷和不足,提供一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体。本发明发现带正电的AuNPs ($^{+}$ AuNPs) 具有固有的过氧化物酶样活性,其可以催化氧化的的过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 在水溶液中的蓝色,本发明利用介孔二氧化硅将正电荷纳米金包裹,得到的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金更加稳定;另外,介孔二氧化硅包裹进一步提高了正电荷纳米金的类辣根过氧化物酶的特性,能够使TMB显色,具有高催化活性;通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体可跳过二抗的步骤,实现TMB显色,进而实现阿维菌素的快速检测。

[0006] 本发明的另一目的在于提供上述正电荷纳米金偶联抗体的制备方法。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述正电荷纳米金偶联抗体在检测阿维菌素中的应

用。

[0008] 本发明的另一目的在于提供一种基于正电荷纳米金检测阿维菌素的免疫分析方法。

[0009] 为实现上述发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体,其特征在于,通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金和阿维菌素抗体偶联得到;

[0011] 所述介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金通过如下制备过程得到:

[0012] S1:将模板剂溶于水中,加入碱剂调节pH为10~11,然后于80~100℃下滴加有机硅源,搅拌、离心、洗涤、干燥得二氧化硅纳米粒子;

[0013] S2:将二氧化硅纳米粒子分散,加入高压传热介质后进行高压处理,洗涤,然后于盐酸-乙醇溶液中回流,洗涤干燥得介孔二氧化硅纳米粒子;

[0014] S3:将介孔二氧化硅纳米粒子悬浮于APTES溶液中,回流,干燥得胺改性的介孔二氧化硅纳米粒子;

[0015] S4:将胺改性的介孔二氧化硅纳米粒子分散,加入HAuCl₄溶液进行超声处理,然后加入NaBH₄,搅拌,即得所述介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金。

[0016] 一般情况下,纳米金通过如下方法制备得到:半胱胺溶液中依次添加HAuCl₄溶液和NaBH₄溶液,搅拌反应得到,但该方法得到的纳米金的储存周期很短,稳定性差。

[0017] 介孔二氧化硅具有高的比表面积和孔壁厚度,以及较高的热稳定性和水热稳定性,在吸附、分离和催化等方面具有广阔的应用前景。本发明尝试利用介孔二氧化硅来包裹纳米金来提高其稳定性。经多次研究,得到一种较好的包裹方式:

[0018] 本发明利用特定的模板法来制备胺改性的介孔二氧化硅纳米粒子,首先利用有机硅源还原得到二氧化硅纳米粒子,然后利用高压处理使得二氧化硅纳米粒子粒径更小及更好的分散,回流去除模板剂得到介孔二氧化硅纳米粒子,得到的介孔二氧化硅纳米粒子为50~60nm,再利用APTES对介孔二氧化硅纳米粒子进行胺改性使得介孔二氧化硅纳米粒子上携带氨基,同时利用HAuCl₄和NaBH₄合成纳米金,通过氨基实现介孔二氧化硅纳米对纳米金的包裹,最终纳米金在介孔二氧化硅里的粒径为小于10nm,得到的正电荷纳米金的稳定性大为提高。

[0019] 另一方面,纳米金具有类辣根过氧化酶的特性,介孔二氧化硅纳米对纳米金的包裹后进一步提高了该特性(其原因可能是介孔二氧化硅作为主基质,纳米金嵌入介孔主基质后,其电子和光学性质被改变,进而提高了催化活性),能够使TMB更快速、准确的显色,具有高催化活性;同时包裹后的纳米金具有良好的生物相容性,可以偶联抗体,使得酶联免疫吸附试验一步显色,在吸附,分离,催化等方面具有广阔的应用前景。

[0020] 将介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联阿维菌素抗体可跳过二抗的步骤,实现TMB显色,进而实现阿维菌素的快速检测。

[0021] 优选地,S1中所述碱剂为NaOH或KOH中的一种或几种。

[0022] 优选地,S1中所述有机硅源为TEOS或六甲基二硅氧烷中的一种或几种。

[0023] 本领域常规的高压传热介质均可用于本发明中实现热传导。

[0024] 优选地,S2中所述高压传热介质为去离子水和1,3,5-三甲苯的混合物。

[0025] 更为优选地,所述混合物中去离子水和1,3,5-三甲苯的体积比为1:1。

- [0026] 优选地, S2中二氧化硅纳米粒子分散于有机溶剂中。
- [0027] 更为优选地, 所述有机溶剂为乙醇、甲醇、DMSO或DMF中的一种或几种。
- [0028] 优选地, 所述APTES溶液为APTES的无水甲苯溶液。
- [0029] 优选地, S2中高压处理的温度为140~160℃, 时间不小于24h。
- [0030] S3中回流的温度为80~100℃, 回流的时间不小于24h。
- [0031] 优选地, S4中所述胺改性的介孔二氧化硅纳米粒子通过超声分散于水中。
- [0032] 优选地, S4中所述介孔二氧化硅纳米粒子和HAuCl₄的质量体积比为100:7~10g/mL。
- [0033] 优选地, S4中所述HAuCl₄和NaBH₄的体积摩尔比为2~2.5:5mL/mol。
- [0034] 阿维菌素抗体可按照现有技术中的方法制备得到。在此, 本发明也提供一种阿维菌素抗体的制备方法。
- [0035] 优选地, 所述阿维菌素抗体通过如下过程制备得到:
- [0036] S5: 将阿维菌素用琥珀酸酐酰化, 然后与载体蛋白OVA和BSA偶联得阿维菌素抗原;
- [0037] S6: 将阿维菌素抗原免疫动物, 取血清即得阿维菌素抗体。
- [0038] 更为优选地, S5包括如下过程:
- [0039] S501: 将阿维菌素溶解, 加入咪唑和叔丁基二甲基氯硅烷, 反应, 纯化得5-0-t-BuMe₂Si AVM;
- [0040] S502: 5-0-t-BuMe₂Si AVM和琥珀酸酐回流反应, 萃取, 纯化得5-0t-BuMe₂Si-R-4-o succinoyl AVM;
- [0041] S503: 将5-0t-BuMe₂Si-R-4-o succinoyl AVM溶解, 加入四丁基氟化铵反应, 萃取, 纯化得阿维菌素半抗原4-0-succinoyl AVM;
- [0042] S504: 将阿维菌素半抗原4-0-succinoyl AVM活化, 加入OVA和BSA反应, 透析, 冻干得阿维菌素抗原。
- [0043] 最为优选地, S504中所述活化选用的活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺NHS和二环己基碳二亚胺DCC。
- [0044] S6中可选用现有技术中常用的动物进行免疫试验, 一般免疫4~5次即可。
- [0045] 优选地, S6中所述动物为新西兰大白兔; 所述免疫的次数为5次。
- [0046] 上述正电荷纳米金偶联抗体的制备方法, 将正电荷纳米金溶液和阿维菌素抗体混合, 于36~38℃下30~35min, 并于3~5℃下保持24~26h。
- [0047] 更为优选地, 所述阿维菌素抗体来源于血清; 所述正电荷纳米金和血清的质量体积比为1:0.6~1.0mg/μL。
- [0048] 最为优选地, 所述正电荷纳米金和血清的质量体积比为1:0.8mg/μL
- [0049] 上述正电荷纳米金偶联抗体在检测阿维菌素中的应用也在本发明的保护范围内。
- [0050] 本发明还请求保护一种基于正电荷纳米金检测阿维菌素的免疫分析方法, 包括如下步骤: 将上述正电荷纳米金偶联抗体包被、封闭, 然后加入至被测样品和金标抗体的混合液中, 竞争反应后加入显色试剂, 测定其吸光值即可计算得到阿维菌素的含量。
- [0051] 优选地, 所述免疫分析方法还包括将所述正电荷纳米金偶联抗体包被、封闭, 然后加入至阿维菌素标准品和和金标抗体的混合液中, 竞争反应后加入显色试剂, 测定其吸光值得到标准曲线的步骤。

[0052] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0053] 本发明利用介孔二氧化硅将正电荷纳米金包裹,得到的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金更加稳定;另外,介孔二氧化硅包裹进一步提高了正电荷纳米金的类辣根过氧化酶的特性,能够使TMB显色,具有高催化活性;通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体可跳过二抗的步骤,实现TMB显色,进而实现阿维菌素的快速检测。。

附图说明

[0054] 图1为对比例1提供的正电荷纳米金的透射电镜图;

[0055] 图2为实施例1提供的介孔二氧化硅和介孔二氧化硅包裹正电荷纳米金的TEM图;

[0056] 图3为实施例1提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金使TMB显色和终止;

[0057] 图4为实施例1提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金的稳定性测试结果;

[0058] 图5为正电荷纳米金和血清的质量体积比优化图;

[0059] 图6为竞争曲线图。

具体实施方式

[0060] 下面结合实施例进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下例实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照本领域常规条件或按照制造厂商建议的条件;所使用的原料、试剂等,如无特殊说明,均为可从常规市场等商业途径得到的原料和试剂。本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

[0061] 实施例1~3介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金

[0062] 实施例1~3提供一系列的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金,具体如下。

[0063] 一、实施例1

[0064] 本实施例提供一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金的制备方法,其制备方法如下。

[0065] (1) 二氧化硅纳米粒子合成:将CTAB 0.5g溶解在240mL纯水中,将NaOH(1.75mL, 2mol/L)加入CTAB溶液中,然后将溶液温度调节至80℃继续搅拌的同时滴加2.5mL TEOS,将混合物搅拌3h,得到的白色沉淀,用离心的方法分离固体产物,并且用去离子水和乙醇洗涤数次,并在空气中干燥。

[0066] (2) 介孔二氧化硅的制备:将合成的二氧化硅纳米粒子(0.5g)通过超声处理分散在乙醇(15mL)中30min,然后加入30mL的1:1混合物(v:v)去离子水和1,3,5-三甲苯。将混合物置于高压釜中,并在不搅拌的情况下在140℃下保持24h,将白色粉末用乙醇和去离子水洗涤数次。为了除去表面活性剂(CTAB),将白色粉末在1.00mL HCl(37%)和50mL的乙醇溶液中回流6h,然后用去离子水和甲醇洗涤数次,并在真空中干燥。接下来将介孔二氧化硅(200mg)悬浮在APTES(1mmol)的无水甲苯(2.0mL)溶液中并在回流下加热24h进行二氧化硅表面的胺改性,然后通过真空干燥收集所得的纳米颗粒,用甲苯彻底洗涤,并在真空中干燥。

[0067] (3) 介孔二氧化硅包裹正电荷纳米金粒子的制备:通过超声处理纳米颗粒(100mg)分散在10mL蒸馏水中10min,然后加入7mL HAuCl₄溶液10min后超声处理,将新鲜制备的

NaBH₄ (5mL, 0.1mol/L) 加入剧烈搅拌1h。得到介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金粒子。

[0068] 二、实施例2

[0069] 本实施例提供一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金的制备方法,其制备方法如下。

[0070] (1) 二氧化硅纳米粒子合成:将CTAB 0.5g溶解在240mL纯水中,将NaOH(1.75mL, 2mol/L)加入CTAB溶液中,然后将溶液温度调节至100℃继续搅拌的同时滴加2.5mL TEOS,将混合物搅拌3h,得到的白色沉淀,用离心的方法分离固体产物,并且用去离子水和乙醇洗涤数次,并在空气中干燥。

[0071] (2) 介孔二氧化硅的制备:将合成的二氧化硅纳米粒子(0.5g)通过超声处理分散在乙醇(15mL)中30min,然后加入30mL的1:1混合物(v:v)去离子水和1,3,5-三甲苯。将混合物置于高压釜中,并在不搅拌的情况下在160℃下保持24h,将白色粉末用乙醇和去离子水洗涤数次。为了除去表面活性剂(CTAB),将白色粉末在1.00mL HCl(37%)和50mL的乙醇溶液中回流6h,然后用去离子水和甲醇洗涤数次,并在真空中干燥。接下来将介孔二氧化硅(200mg)悬浮在APTES(1mmol)的无水甲苯(2.0mL)溶液中并在回流下加热24h进行二氧化硅表面的胺改性,然后通过真空干燥收集所得的纳米颗粒,用甲苯彻底洗涤,并在真空中干燥。

[0072] (3) 介孔二氧化硅包裹正电荷纳米金粒子的制备:通过超声处理纳米颗粒(100mg)分散在10mL蒸馏水中10min,然后加入10mL HAuCl₄溶液10min后超声处理,将新鲜制备的NaBH₄(4mL, 0.1mol/L)加入剧烈搅拌1h。得到介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金粒子。

[0073] 三、实施例3

[0074] 本实施例提供一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金的制备方法,其制备方法如下。

[0075] (1) 二氧化硅纳米粒子合成:将CTAB 0.5g溶解在240mL纯水中,将NaOH(1.75mL, 2mol/L)加入CTAB溶液中,然后将溶液温度调节至90℃继续搅拌的同时滴加2.5mL TEOS,将混合物搅拌3h,得到的白色沉淀,用离心的方法分离固体产物,并且用去离子水和乙醇洗涤数次,并在空气中干燥。

[0076] (2) 介孔二氧化硅的制备:将合成的二氧化硅纳米粒子(0.5g)通过超声处理分散在乙醇(15mL)中30min,然后加入30mL的1:1混合物(v:v)去离子水和1,3,5-三甲苯。将混合物置于高压釜中,并在不搅拌的情况下在150℃下保持24h,将白色粉末用乙醇和去离子水洗涤数次。为了除去表面活性剂(CTAB),将白色粉末在1.00mL HCl(37%)和50mL的乙醇溶液中回流6h,然后用去离子水和甲醇洗涤数次,并在真空中干燥。接下来将介孔二氧化硅(200mg)悬浮在APTES(1mmol)的无水甲苯(2.0mL)溶液中并在回流下加热24h进行二氧化硅表面的胺改性,然后通过真空干燥收集所得的纳米颗粒,用甲苯彻底洗涤,并在真空中干燥。

[0077] (3) 介孔二氧化硅包裹正电荷纳米金粒子的制备:通过超声处理纳米颗粒(100mg)分散在10mL蒸馏水中10min,然后加入8mL HAuCl₄溶液10min后超声处理,将新鲜制备的NaBH₄(4.5mL, 0.1mol/L)加入剧烈搅拌1h。得到介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金粒子。

[0078] 同时,本实施例还提供一种常规方法制备得到的正电荷纳米金作为对比例1,与上述实施例1~3提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金进行对比。

[0079] 四、对比例1

[0080] 本对比例提供一种正电荷纳米金,其制备方法如下。

[0081] 将半胱胺溶液(400 μ L,213nmol/L)加入40mL的1.42nmol/L H₂AuCl₄溶液中,在室温搅拌20min,然后加入10 μ L的10mmol/L NaBH₄溶液,并将混合物在室温下黑暗中剧烈搅拌10min,然后将混合物进一步搅拌15min,将得到的红色溶液避光储存在冰箱(4 $^{\circ}$ C)中备用。

[0082] 性能测试

[0083] 如图1,为对比例1提供的正电荷纳米金的透射电镜图,从图可知,对比例1制备得到的正电荷纳米金粒径为20~30nm。

[0084] 如图2,为实施例1提供的介孔二氧化硅(图2-a)和介孔二氧化硅包裹正电荷纳米金的TEM图(图2-b)。从图可知,介孔二氧化硅中包裹正电荷纳米金颗粒,介孔二氧化硅的粒径为50~60nm,纳米金在介孔二氧化硅里的粒径为小于10nm。

[0085] 以实施例1提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金为例,对其性能进行测试。

[0086] (1) 显色性测试

[0087] 测试方法:TMB(10mg TMB溶于5mL无水乙醇)取0.5mL再加4.5mL超纯水,加5mL磷酸柠檬酸缓冲溶液得显色液。取适量的显色液(每孔50 μ L)加入实施例1提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金和对比例1提供的正电荷纳米金,使得溶液变成蓝色(如图3-a),再加入硫酸终止液,溶液变成黄色(图图3-b),在酶标仪可以测到相对应的OD值。

[0088] 经测定,实施例1提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金对应的OD值为1.8,对比例1提供的正电荷纳米金对应的OD值为1.2,由此可知,介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金具有明显的增色作用。

[0089] (2) 稳定性测试

[0090] 选用储存不同天数的正电荷纳米金按(1)中OD值的测试方法测试稳定性。测试结果如图4。由图4可知,实施例1提供的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金的OD值仅略微下降,稳定性较好,而对比例1提供的正电荷纳米金的OD值随着时间的延长呈现线性下降趋势,稳定性差。

[0091] 本发明通过介孔二氧化硅包裹正电荷纳米金,提高了稳定性和催化活性,具有较好的类辣根过氧化酶的特性,且可偶联抗体,在吸附、分离和催化等方面具有广阔的应用前景。

[0092] 实施例4介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体

[0093] 本实施例提供一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体,通过如下方法制备得到。

[0094] (1) 阿维菌素抗原的制备

[0095] (a):在反应前,用浓硫酸将叔丁基二甲基氯硅烷和咪唑预干燥1小时。将500mg阿维菌素溶于6.0mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入0.24g咪唑和0.26g叔丁基二甲基氯硅烷并在30 $^{\circ}$ C下反应2小时。柱色谱法得到5-O-t-BuMe₂Si AVM。

[0096] (b):将0.4g的5-O-t-BuMe₂Si AVM溶解在6.0mL的DMF中,依次加入0.26g的4-二甲氨基吡啶(DMAP),0.5mL的三乙胺和0.9g的琥珀酸酐。将反应在40 $^{\circ}$ C的水浴中回流2.5小时。除去不溶物质,然后用乙醚和3.6% HCl萃取,然后通过柱色谱法纯化,得到5-O-t-BuMe₂Si-R-4-o succinoyl AVM。

[0097] (c):将0.2g的5-*O*t-BuMe₂Si-R-4-*o* succinoyl AVM溶解在10.0mL的甲醇中,向其中加入0.5mL的四丁基氟化铵,使混合物反应1小时。首先用乙酸乙酯萃取,然后分别用40% NaHCO₃和水萃取两次。柱色谱法分离4-*O*-succinoyl AVM。

[0098] 称量30.0mg阿维菌素半抗原4-*O*-succinoyl AVM和6mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)并溶解在1.0mL DMF中,然后加入10.3mg二环己基碳二亚胺(DCC),并使其反应过夜。将反应溶液以6790×g离心5分钟,并取出上清液。称量OVA25.0mg和BSA 38.0mg并加入3.0mL磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,将其分别滴加到上述产物中,并在4℃下反应12小时。通过透析和冻干获得阿维菌素抗原。

[0099] 阿维菌素与BSA缀合作为免疫抗原,并与作为包被抗原的OVA偶联。

[0100] (2)阿维菌素抗体的制备

[0101] 将免疫抗原BSA-AVM溶解在PBS溶液中以制备1.0mg/mL溶液。对于第一次免疫,将1.0mL上述溶液与等体积的弗氏完全佐剂混合并乳化,并通过皮下多次注射免疫雄性新西兰白兔,2.0mL/只。在第一次免疫一个月后,将1.0mLBSA-AVM溶液与等体积的弗氏不完全佐剂混合并乳化,并通过皮下多次注射免疫雄性新西兰白兔,加强免疫实验动物,并将每个免疫周期改变为两周。在最后一次免疫接种一周后,从兔耳静脉取血。将血清储存在-20℃直至使用,无需任何纯化。

[0102] (3)介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体的制备

[0103] 将1mL合成的纳米金溶液(实施例1制备得到的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米,质量浓度为2mg/mL)和一定体积的含阿维菌素抗体的血清(血清中阿维菌素抗体的浓度为25mg/mL)混合,37℃温浴30min并在4℃下保持24h,在此阶段,正电荷纳米金通过静电相互作用与阿维菌素抗体偶联。

[0104] 为了探究纳米金和阿维菌素抗体偶联的最佳浓度,选用不同体积的血清使得纳米金和血清的浓度体积比为0.05~1mg/μL。

[0105] 其结果如图5,可知,当纳米金和血清的体积浓度为0.8mg/μL时,偶联效果最佳。

[0106] 实施例5基于正电荷纳米金检测阿维菌素的免疫分析方法

[0107] 利用实施例4得到的最佳浓度偶联得到的正电荷纳米金偶联抗体对阿维菌素进行检测。具体的过程如下。

[0108] (1)包被:用包被缓冲液(CBS,pH=9,0.05mol/L)将正电荷纳米金偶联抗体包被于96孔酶标板中,100μL/孔,4℃包被12h,用洗板机洗板三次并用吸水纸拍干。

[0109] (2)封闭:用含30%脱脂奶粉的PBS(0.01mol/L)进行封闭(300μL),在恒温水浴锅中37℃孵育1h,如上述步骤1洗涤操作。

[0110] (3)标准品和金标抗体结合:取不同浓度的阿维菌素标准品和被测样品分别和金标抗体混合,在恒温水浴锅中37℃孵育0.5h。

[0111] (4)竞争反应:把步骤(3)的混合物加入酶标板中,在水浴锅中37℃下孵育1h,如上述步骤1洗涤操作,再使用PBST手洗3次,使用吸水纸吸干酶标板。

[0112] (5)显色和终止:加入新鲜配制的TMB显色液,100μL/孔,在水浴锅中37℃下孵育15min,然后加入2M硫酸终止液,50μL/孔。

[0113] (6)检测吸光值:立即检测酶标板各孔在450nm处的吸光值。根据标准品做出标准曲线,被测样品数据带入标准曲线即可得到被测值。

[0114] 如图6,为标准曲线。从图可知,IC₅₀为8.39ng/ml,允许残余量为20ng/ml,可见,此方法能够到达检测标准。

[0115] 以上所述的具体实施方式,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,所应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施方式而已,并不用于限定本发明的保护范围,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

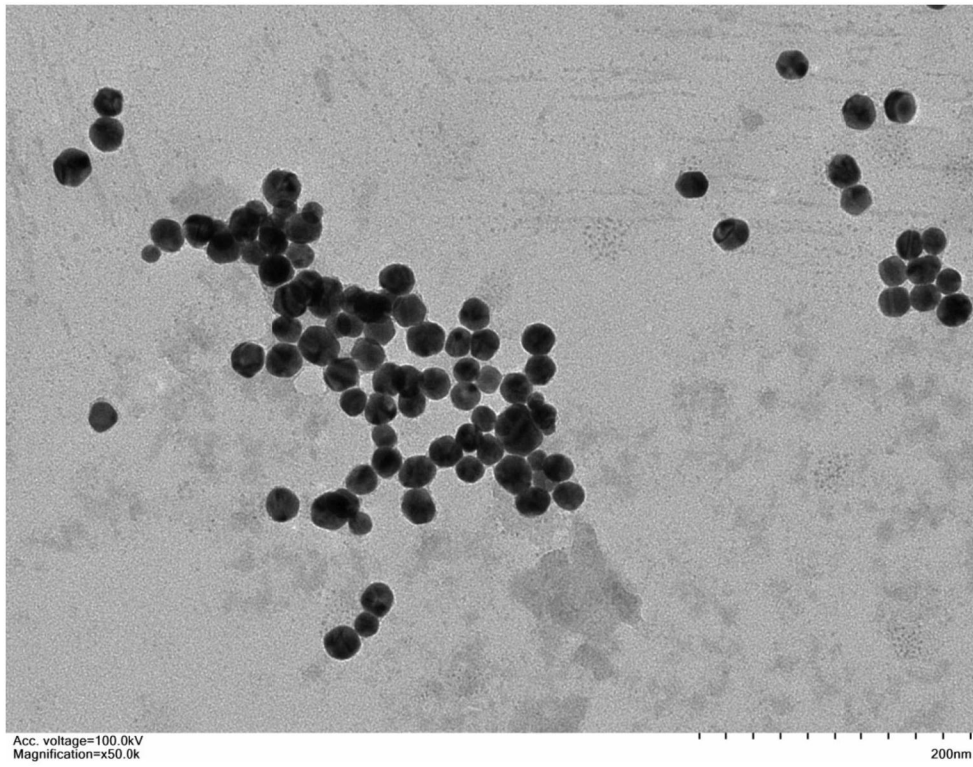


图1

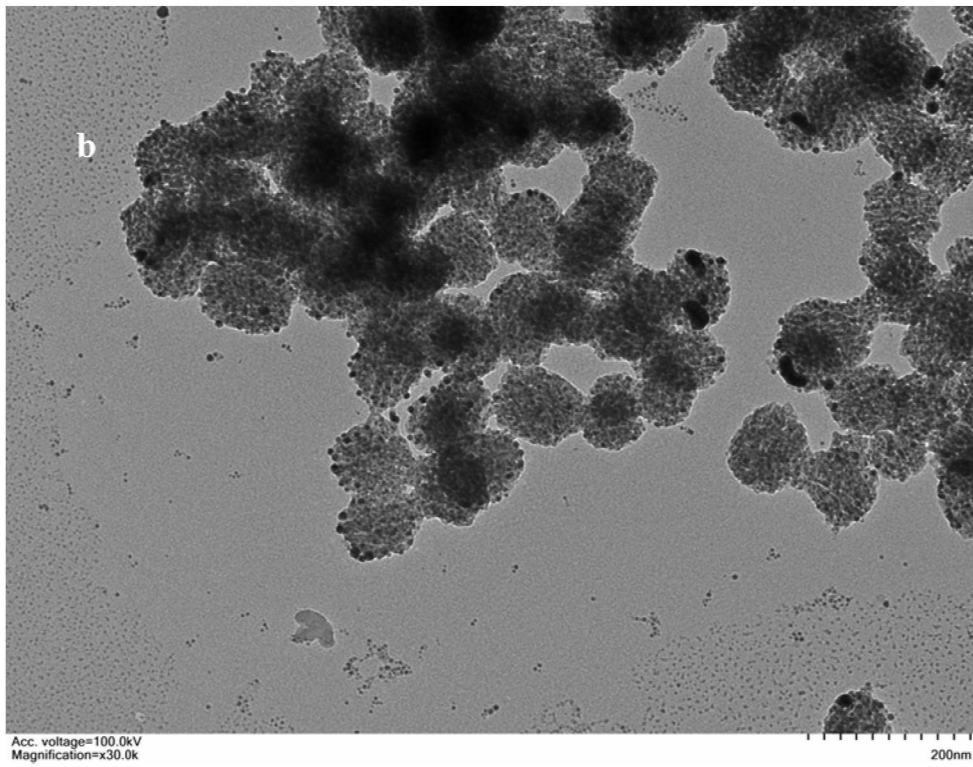
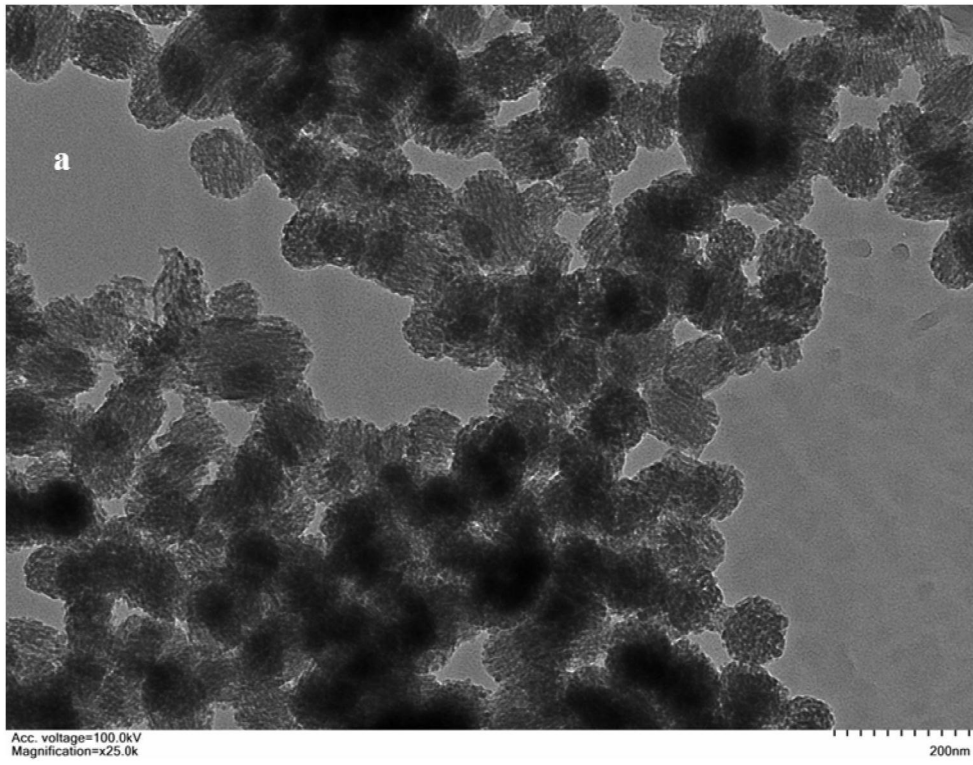


图2

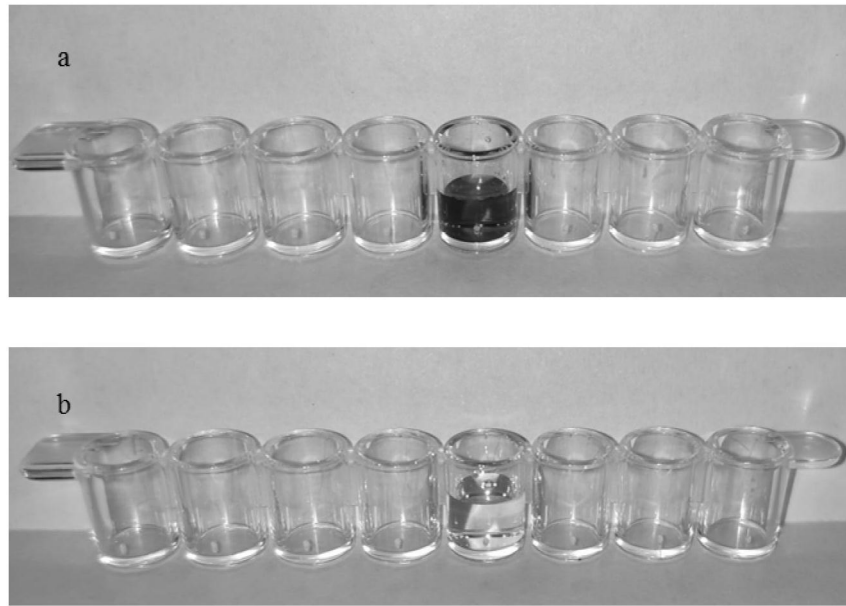


图3

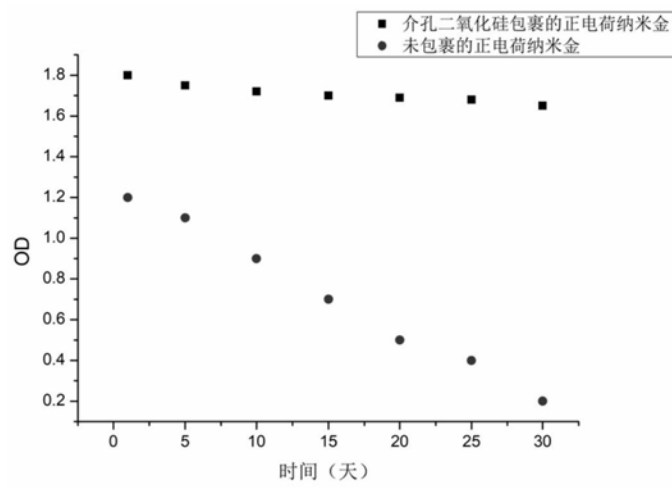


图4

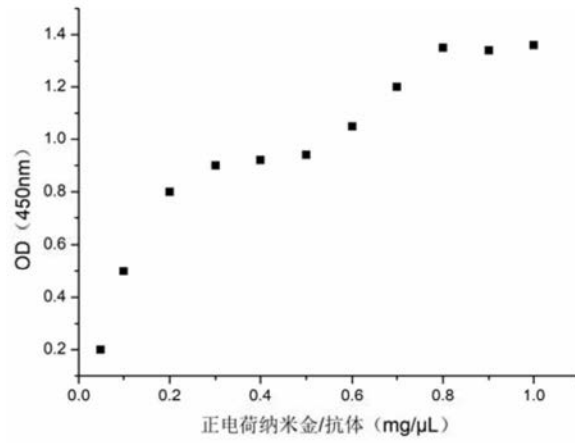


图5

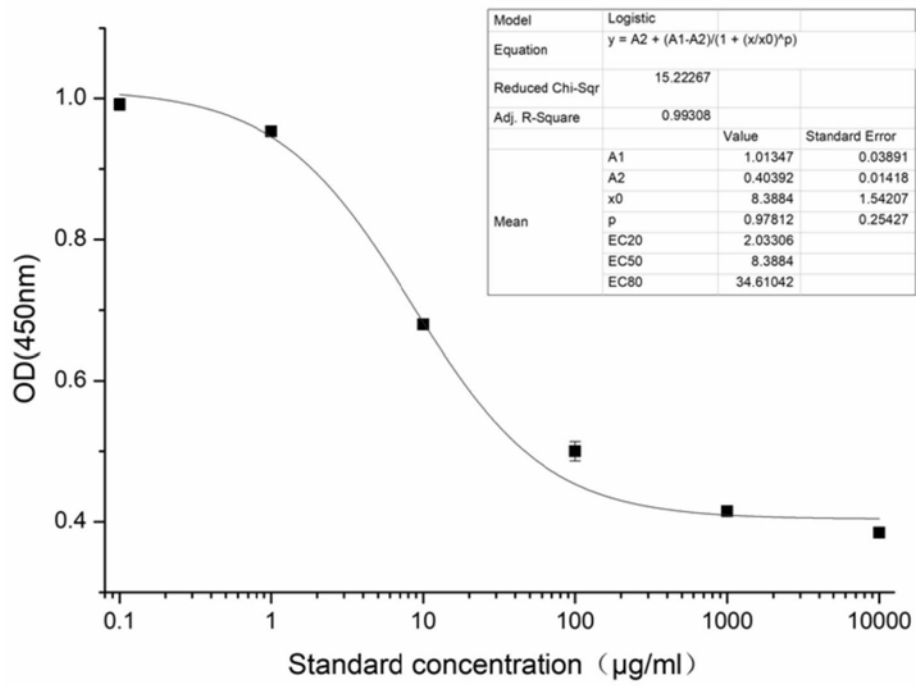


图6

专利名称(译)	一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110646607A	公开(公告)日	2020-01-03
申请号	CN201910630921.9	申请日	2019-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	赵肃清 张春国 何绮怡 崔锡平 沈定 钟颖颖		
发明人	赵肃清 张春国 何绮怡 崔锡平 沈定 钟颖颖		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/541 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/541 G01N33/54346		
代理人(译)	陈娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体及其制备方法和应用。所述正电荷纳米金偶联抗体通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金和阿维菌素抗体偶联得到。本发明利用介孔二氧化硅将正电荷纳米金包裹，得到的介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金更加稳定；另外，介孔二氧化硅包裹进一步提高了正电荷纳米金的类辣根过氧化物酶的特性，能够使TMB显色，具有高催化活性；通过介孔二氧化硅包裹的正电荷纳米金偶联抗体可跳过二抗的步骤，实现TMB显色，进而实现阿维菌素的快速检测。

