



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104714014 A

(43) 申请公布日 2015.06.17

(21) 申请号 201310682387.9

(22) 申请日 2013.12.16

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道 999 号

(72) 发明人 熊勇华 江湖 徐威 许杨 郭亮  
许恒毅

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法

(57) 摘要

本发明属于分析检测领域,公开了一种基于两种量子点间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>检测方法。本发明选择绿色量子点偶联 AFB<sub>1</sub>,红色量子点偶联抗 AFB<sub>1</sub>的单克隆抗体,二者混合后,由于抗原抗体特异性结合,两种量子点间距离靠近而发生能量共振转移,导致绿色量子点荧光下降,红色量子点荧光增强。当反应体系含有 AFB<sub>1</sub>时,游离的 AFB<sub>1</sub>与绿色量子点偶联的 AFB<sub>1</sub>共同竞争红色量子点偶联的抗体, AFB<sub>1</sub>的浓度直接影响绿色量子点能量转移效率,且在一定范围内绿色量子点能量转移效率与 AFB<sub>1</sub>浓度对数成反比例关系。本发明方法为均相免疫学检测 AFB<sub>1</sub>,具有检测时间短,灵敏度和准确性高,操作流程简单和检测成本低等特点。

1. 一种基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法,其特征在于包含以下步骤:(1)分别制备绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物;(2)将绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物混合,并与梯度浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液在结合缓冲液中共孵育,在波长 450 nm 的激发光下测定绿色量子点能量转移效率;以 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液浓度对数值为横坐标,绿色量子点能量转移效率为纵坐标,绘制检测 AFB<sub>1</sub> 的标准曲线;(3)将待测样品提取液、绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物在结合缓冲液中共孵育,测定绿色量子点能量转移效率,与标准曲线比对即得到待测样品提取液中 AFB<sub>1</sub> 含量。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述绿色量子点和红色量子点满足:二者发射光谱要分的足够开,即二者的发射峰形不能有交叠,具体为:绿色量子点最大发射波长介于 530 nm 至 550 nm,表面氨基化修饰;红色量子点最大发射波长介于 590 nm 至 620 nm,表面羧基化修饰。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述步骤(1)中绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联,采用 AFB<sub>1</sub> 脲化产物在 DCC, NHS 介导下直接与绿色量子点偶联,葡萄糖酸封闭绿色量子点表面残留的氨基位点;量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联摩尔比为 1:2 ~ 1:20,优选为 1:10。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述步骤(1)中红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联,采用 EDC, NHSS 介导将红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联,氨基葡萄糖封闭红色量子点表面残留的羧基位点,量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联摩尔比为 1:1。

5. 如权利要求 1 所述方法,其特征在于步骤(2)绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物混合摩尔比为 1:1 ~ 1:6,优选为 1:5。

6. 如权利要求 3 或 4 所述方法,使用的 EDC 和 NHSS 的物质量分别是量子点的 100 ~ 500 倍和 50 ~ 100 倍;活化时间是 20 ~ 40min;偶联时将 pH 值调至 7 ~ 8,偶联时间是 20 ~ 40min;封闭剂葡萄糖酸或氨基葡萄糖封闭时间是 0.5 ~ 1 小时;封闭后调 pH 值至弱酸性为 pH 4.5 至 5.5;偶联产物用高速离心方法分离出来,离心条件是 4°C ~ 10°C, 16000r/min ~ 20000r/min, 20 ~ 40min;复溶液为含有 20% 至 30% 丙三醇的 0 至 0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液。

7. 如权利要求 1 所述方法,其特征在于步骤(2)结合缓冲液为含 10% 甲醇的 0.01 M 磷酸盐缓冲液,溶液 pH 值为 7.4,结合温度为 37°C,结合时间 20 分钟。

8. 如权利要求 1 所述方法,其特征在于具体包括如下步骤:

(1) 试剂 1 即绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物的制备:

1) AFB<sub>1</sub> 的脲化与活化:每 0.2mg AFB<sub>1</sub> 与 0.4mg 羧甲氧基羟氨半盐酸盐(CMO)溶解于 80 μL 吡啶中,25°C 避光振摇反应 24h,冷冻干燥后用 1mL 超纯水溶解,用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0,用苯萃取除去未反应的 AFB<sub>1</sub>,水相中加入 0.1mol/L 稀盐酸调 pH 值至 3.0,以沉淀 AFB<sub>1</sub> 脲化物,再用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥既得纯净的 AFB<sub>1</sub> 脲化物;每称取 10μg AFB<sub>1</sub> 脲化物,溶解于 200 μL 二甲基甲酰胺(DMF)中,加入 3mg N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.3mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 37°C 避光振摇 2h;

2) 偶联:每在洁净的小烧杯中加入 0.2mL 硼酸盐缓冲液和 5 μL 浓度为 10μM 的绿色量子点,缓慢加入浓度为 10μM 的 AFB<sub>1</sub> 脲化活化物 50 μL,使 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点偶联摩尔比为 10,室温下偶联 1.5h;

3) 封闭:加入 1% 葡萄糖酸 100  $\mu$  L 封闭 45min, 缓调 pH 至 5.0;

4) 纯化:4 $^{\circ}$ C, 19000r/min, 离心 30min, 吸去上清液, 沉淀部分用含有 20% 甘油的超纯水 20  $\mu$  L 复溶, 得到的复溶液为后续实验的 1,000 $\times$  试剂 1 母液;

(2) 试剂 2 即红色量子点偶联 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的制备:

1) 红色量子点活化:每在洁净小烧杯中加入 0.2mL 硼酸水溶液, 偶联全过程用磁力搅拌器匀速缓慢搅拌, 缓慢加入 5  $\mu$  L 浓度为 10 $\mu$ M 的红色量子点, 将 8  $\mu$  L 0.5mg/mL EDC 和 2  $\mu$  L 0.5mg/mL NHSS 混匀后加入, 室温活化 20min; 2) 偶联:逐滴加入浓度为 10 $\mu$ M 的 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 5  $\mu$  L, 使 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点偶联摩尔比为 1:1, 用 0.1M NaOH 调 pH 至 7.4, 室温偶联 30min; 3) 封闭:加入 5% 氨基葡萄糖 100  $\mu$  L 封闭 45min, 用 0.1M 盐酸缓调 pH 至 5.0; 4) 纯化:4 $^{\circ}$ C, 19000r/min, 离心 30min, 吸去上清液, 沉淀部分用含有 20% 甘油的磷酸缓冲液(0.01mol PB, pH7.4) 20  $\mu$  L 复溶, 得到的复溶液为后续实验的 1,000 $\times$  试剂 2 母液;

(3) AFB<sub>1</sub> 浓度标准曲线的制作:每各取试剂 1 和试剂 2 母液 1  $\mu$  L, 分别用 1mL 和 0.2mL 超纯水稀释, 得到试剂 1 和试剂 2 待用液; 10  $\mu$  L 试剂 1 与 90  $\mu$  L 试剂 3 (含 10% 甲醇的 1 $\times$ PBS, pH7.4) 混合, 在激发光 450nm 下测定绿色量子点最大发射波长下的荧光强度, 得到数据记为 F; 将 10  $\mu$  L 试剂 1、10  $\mu$  L 试剂 2 和用 80  $\mu$  L 试剂 3 倍比稀释的 AFB<sub>1</sub> 溶液(0ng/mL 至 20ng/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min 后, 在激发光 450nm 下测定绿色量子点最大发射波长下的荧光强度, 得到数据记录为 F<sub>N</sub>, 分别代表 F<sub>0</sub>, F<sub>0.01</sub>, F<sub>0.06</sub>, F<sub>0.08</sub>, F<sub>0.1</sub>, F<sub>0.3</sub>, F<sub>0.5</sub>, F<sub>1</sub> 和 F<sub>5</sub>, 其中下标数值代表 AFB<sub>1</sub> 溶液浓度 (ng/mL); 将  $(F - F_N) / F \times 100\%$  记录为荧光能量转移效率 E (%); 以 AFB<sub>1</sub> 浓度对数值为横坐标, 荧光能量转移效率 E (%) 为纵坐标, 绘制出的检测 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线;

(4) AFB<sub>1</sub> 的检测:

1) 待测样品溶液准备:每取待测样品 1g, 用 5mL 60% 甲醇水溶液震荡提取 15min, 9000g 离心 10min, 上清液经 0.45  $\mu$  m 滤器过滤, 取 100  $\mu$  L 体积加入 100  $\mu$  L 0.01M, pH7.4 的 2 $\times$ PBS 和 400  $\mu$  L 的 pH7.4 的 1 $\times$ PBS 稀释, 即得 30 倍稀释的待测样液;

2) 取 80  $\mu$  L 待测样液与 10  $\mu$  L 试剂 1 和 10  $\mu$  L 试剂 2 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20min, 在激发光 450nm 下测定绿色量子点最大发射波长下的荧光强度, 计算待测物的 E (%) 值, 代入 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线即得到待测样液中 AFB<sub>1</sub> 含量。

## 基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物物理学分析检测技术领域,涉及一种黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)检测的方法。

### 背景技术

[0002] 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)是食品中存在的毒性最强的真菌毒素,属于 I 类致癌物,对人体危害极大。加强对它的检测监控对维护人类健康有着重要意义。目前快速筛查方法多为基于免疫学检测方法对其进行定性定量分析,如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫层析柱测定法和基于不同标记物显色的快速筛查试纸条等等。

[0003] 荧光共振能量转移(Förster resonance energy transfer,简称FRET),是指受激发的能量供体将能量传递给基态受体的一个非辐射能量转移过程,它对能量供受体之间的距离及相对偶极方向的纳米范围内变化非常敏感,只有在非常近的距离(10 nm)以内,才能够发生有效的能量共振转移,且这种能量转移效率与供受体之间距离成反比。因此FRET被称为一种高效的“光学分子尺”,近年来,该技术已经在物理、化学及生物学领域得到了广泛的研究与应用。量子点是一种随粒径大小变化可激发出不同波长荧光的纳米晶体,随粒径或最大发射波长的变化,量子点呈现出不同的颜色。如在最大发射波长 530 nm 至 550 nm 范围内的量子点呈现绿色,而在最大发射波长 590 nm 至 620 nm 范围内的量子点呈现红色。量子点的优点是荧光产率高,光稳定性好,激发光谱广而发射光谱窄,并且量子点表面可以修饰任何所需的化学基团,能方便的标记在生物分子上,是作为 FRET 能量供受体的良好材料。

### 发明内容

[0004] 本发明的创新性在于提出了一种新的快速、灵敏和廉价的免疫学定量检测 AFB<sub>1</sub> 方法,即基于红、绿量子点间能量共振转移信号来定量检测痕量的 AFB<sub>1</sub>。本发明基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法,包括红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物(试剂 1),绿色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物(试剂 2)和结合缓冲液(试剂 3)。其中红、绿量子点的选择前提是二者发射光谱没有重叠,且绿色量子点的发射光谱在红色量子点吸收光谱范围内,具体为:绿色量子点最大发射波长介于 530 nm 至 550 nm,表面氨基化修饰;红色量子点最大发射波长介于 590 nm 至 620 nm,表面羧基化修饰。试剂 1 和试剂 2 在激发光下都有特征发射光谱出现,当试剂 1 和试剂 2 以一定比例与试剂 3 混合孵育片刻后,由于抗原抗体结合,两种量子点靠近而产生能量共振转移,绿色量子点的能量转移给红色量子点,使二者能量一升一降,体现在发射光谱上就是绿色量子点特征发射光检测值下降而红色量子点特征发射光检测值提高,且升降幅度可以达到 20% 以上。在试剂 1、试剂 2 和用试剂 3 倍比稀释的 AFB<sub>1</sub> 溶液混合孵育片刻后,由于游离的 AFB<sub>1</sub> 与试剂 1 共同竞争试剂 2,导致部分试剂 1 与试剂 2 不能结合而使绿色量子点能量回升,能量转移效率下降。也就是说,AFB<sub>1</sub> 的浓度直接影响绿色量子点能量转移效率,且在一定范围二者成线性的反比例关系。以游离的 AFB<sub>1</sub> 浓

度对数值为横坐标,绿色量子点能量转移效率为纵坐标,绘制出检测 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线。检测食品样品中 AFB<sub>1</sub> 含量时,试剂 1、试剂 2 和待测食品样品中 AFB<sub>1</sub> 提取溶液(以下简称待测样液)混合孵育片刻后,测定荧光强度,代入公式 1(参见实施例 1),按照计算出的能量转移效率,可以根据标准曲线计算出对应的 AFB<sub>1</sub> 含量。

[0005] 本发明所述的一种基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法,技术方案包含下列步骤:

一种基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法,包含以下步骤:(1)分别制备绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物;(2)将绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物混合,并与梯度浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液在结合缓冲液中共孵育,在波长 450 nm 的激发光下测定绿色量子点能量转移效率;以 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液浓度对数值为横坐标,绿色量子点能量转移效率为纵坐标,绘制检测 AFB<sub>1</sub> 的标准曲线;(3)将待测样品提取液、绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物在结合缓冲液中共孵育,测定绿色量子点能量转移效率,与标准曲线比对即得到待测样品提取液中 AFB<sub>1</sub> 含量。

[0006] 所述绿色量子点和红色量子点满足:二者发射光谱要分的足够开,即二者的发射峰形不能有交叠,具体为:绿色量子点最大发射波长介于 530 nm 至 550 nm,表面氨基化修饰;红色量子点最大发射波长介于 590 nm 至 620 nm,表面羧基化修饰。

[0007] 所述步骤(1)中绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联,采用 AFB<sub>1</sub> 脲化产物在 DCC,NHS 介导下直接与绿色量子点偶联,葡萄糖酸封闭绿色量子点表面残留的氨基位点;量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联摩尔比为 1:2 ~ 1:20,优选为 1:10。

[0008] 所述步骤(1)中红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联,采用 EDC,NHSS 介导将红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联,氨基葡萄糖封闭红色量子点表面残留的羧基位点;量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联摩尔比为 1:1。

[0009] 步骤(2)绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联物混合摩尔比为 1:1 ~ 1:6,优选为 1:5。

[0010] 使用的 EDC 和 NHSS 的物质质量分别是量子点的 100 ~ 500 倍和 50 ~ 100 倍;活化时间是 20 ~ 40min;偶联时将 pH 值调至 7 ~ 8,偶联时间是 20 ~ 40min;封闭剂葡萄糖酸或氨基葡萄糖封闭时间是 0.5 ~ 1 小时;封闭后调 pH 值至弱酸性为 pH 4.5 至 5.5;偶联产物用高速离心方法分离出来,离心条件是 4℃ ~ 10℃,16000r/min ~ 20000r/min,20 ~ 40min;复溶液为含有 20% 至 30% 丙三醇的 0 至 0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液。

[0011] 结合缓冲液为含 10% 甲醇的 0.01 M 磷酸盐缓冲液,溶液 pH 值为 7.4,结合温度为 37℃,结合时间 20 分钟。

[0012] 基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测方法,具体包括如下步骤:

(1) 试剂 1 的制备:试剂 1 即绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物。AFB<sub>1</sub> 先用羧甲基羟胺半盐酸(CMO)脲化,即在 AFB<sub>1</sub> 结构上增加一个羧基。再用 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化该羧基,加入与表面氨基修饰的绿色量子点进行偶联,之后用葡萄糖酸封闭,调 pH 值至弱酸性后离心纯化,加入复溶液复溶。

[0013] (2) 试剂 2 的制备:试剂 2 即红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物。将表面羧基修饰的红色量子点用水溶性碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠(NHSS)活化,与

AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联,之后用氨基葡萄糖封闭,调 pH 值至弱酸性,离心纯化,加入复溶液复溶。

[0014] (3) AFB<sub>1</sub> 浓度标准曲线的制作:试剂 1 单独与试剂 3 (即结合溶液,含 10% 甲醇的 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH7.4) 混合,在激发光下测定绿色量子点特征发射荧光强度,得到数据记为 F。将试剂 1、试剂 2 和用试剂 3 倍比稀释的 AFB<sub>1</sub> 溶液共同混合孵育后,在激发光下测定绿色量子点特征发射荧光强度,得到数据记为 F<sub>N</sub>,其中 N 代表 AFB<sub>1</sub> 溶液的浓度。将  $(F - F_N) / F \times 100\%$  记录为荧光能量转移效率 E (%)。以 AFB<sub>1</sub> 浓度对数为横坐标,绿色量子点能量转移效率 E (%) 为纵坐标,绘制出检测 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线。

[0015] (4) AFB<sub>1</sub> 的检测:疑似含有 AFB<sub>1</sub> 的待测样液与试剂 1 和试剂 2 在 37℃ 下孵育 20min,在激发光下测定绿色量子点特征发射荧光强度,得到数据带入公式中 F<sub>N</sub> 位置,计算得到 E 值,根据标准曲线计算得到待测样液中 AFB<sub>1</sub> 含量。

[0016] 更具体的,包括如下步骤:

1) 试剂 1 即绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物的制备:

AFB<sub>1</sub> 的胍化与活化:每 0.2mg AFB<sub>1</sub> 与 0.4mg 羧甲氧基羟氨半盐酸盐 (CMO) 溶解于 80 μL 吡啶中,25℃ 避光振摇反应 24h,冷冻干燥后用 1mL 超纯水溶解,用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0,用苯萃取除去未反应的 AFB<sub>1</sub>,水相中加入 0.1mol/L 稀盐酸调 pH 值至 3.0,以沉淀 AFB<sub>1</sub> 胍化物,再用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥既得纯净的 AFB<sub>1</sub> 胍化物;每称取 10μg AFB<sub>1</sub> 胍化物,溶解于 200 μL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中,加入 3mg N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和 0.3mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 37℃ 避光振摇 2h;

偶联:每在洁净的小烧杯中加入 0.2mL 硼酸盐缓冲液和 5 μL 浓度为 10μM 的绿色量子点,缓慢加入浓度为 10μM 的 AFB<sub>1</sub> 胍化活化物 50 μL,使 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点偶联摩尔比为 10,室温下偶联 1.5h;

封闭:加入 1% 葡萄糖酸 100 μL 封闭 45min,缓调 pH 至 5.0;

纯化:4℃,19000r/min,离心 30min,吸去上清液,沉淀部分用含有 20% 甘油的超纯水 20 μL 复溶,得到的复溶液为后续实验的 1,000× 试剂 1 母液;

2) 试剂 2 即红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物的制备:

红色量子点活化:每在洁净小烧杯中加入 0.2mL 硼酸水溶液,偶联全过程用磁力搅拌器匀速缓慢搅拌,缓慢加入 5 μL 浓度为 10μM 的红色量子点,将 8 μL 0.5mg/mL EDC 和 2 μL 0.5mg/mL NHSS 混匀后加入,室温活化 20min;

偶联:逐滴加入浓度为 10μM 的 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 5 μL,使 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点偶联摩尔比为 1:1,用 0.1M NaOH 调 pH 至 7.4,室温偶联 30min;3) 封闭:加入 5% 氨基葡萄糖 100 μL 封闭 45min,用 0.1M 盐酸缓调 pH 至 5.0;4) 纯化:4℃,19000r/min,离心 30min,吸去上清液,沉淀部分用含有 20% 甘油的磷酸缓冲液 (0.01mol PB, pH7.4) 20 μL 复溶,得到的复溶液为后续实验的 1,000× 试剂 2 母液;

3) AFB<sub>1</sub> 浓度标准曲线的制作:每各取试剂 1 和试剂 2 母液 1 μL,分别用 1mL 和 0.2mL 超纯水稀释,得到试剂 1 和试剂 2 待用液;10 μL 试剂 1 与 90 μL 试剂 3 (含 10% 甲醇的 1×PBS, pH7.4) 混合,在激发光 450nm 下测定绿色量子点最大发射波长下的荧光强度,得到数据记为 F;将 10 μL 试剂 1、10 μL 试剂 2 和用 80 μL 试剂 3 倍比稀释的 AFB<sub>1</sub> 溶液 (0ng/mL 至 20ng/mL),37℃ 孵育 20min 后,在激发光 450nm 下测定绿色量子点最大发射波长下的

荧光强度,得到数据记录为  $F_N$ , 分别代表  $F_0, F_{0.01}, F_{0.06}, F_{0.08}, F_{0.1}, F_{0.3}, F_{0.5}, F_1$  和  $F_5$ , 其中下标数值代表 AFB<sub>1</sub> 溶液浓度 (ng/mL); 将  $(F - F_N) / F \times 100\%$  记录为荧光能量转移效率  $E$  (%); 以 AFB<sub>1</sub> 浓度对数值为横坐标, 荧光能量转移效率  $E$  (%) 为纵坐标, 绘制出的检测 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线;

#### 4) AFB<sub>1</sub> 的检测:

待测样品溶液准备: 每取待测样品 1g, 用 5mL 60% 甲醇水溶液震荡提取 15min, 9000 g 离心 10min, 上清液经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 取 100  $\mu$ L 体积加入 100  $\mu$ L 0.01M, pH7.4 的 2 $\times$ PBS 和 400  $\mu$ L 的 pH7.4 的 1 $\times$ PBS 稀释, 即得 30 倍稀释的待测样液;

取 80  $\mu$ L 待测样液与 10  $\mu$ L 试剂 1 和 10  $\mu$ L 试剂 2 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20min, 在激发光 450nm 下测定绿色量子点最大发射波长下的荧光强度, 计算待测物的  $E$  (%) 值, 代入 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线即得到待测样液中 AFB<sub>1</sub> 含量。

[0017] 本发明技术方案具有如下优点:

(1) 本发明技术方案灵敏度高, 由于巧妙的运用了两种量子点作为 AFB<sub>1</sub> 和其单克隆抗体的标记物, 利用抗原抗体反应的特异性确保了检测的准确性。而量子点间的荧光能量共振转移这一“分子尺”直接用于测定 AFB<sub>1</sub> 的浓度信号。由于整个反应为均相的免疫学检测反应, 免疫学反应效率大大高于目前常规的半固相免疫学反应, 提高了检测灵敏度, 且免去了常规 ELISA 反复洗板的繁琐过程。

[0018] (2) 本发明技术方案操作方法简单, 检测时间短。由于量子点具有优良的光化学稳定性, 测试者在一台荧光分光光度计做好 AFB<sub>1</sub> 的标准曲线后, 每次检测只需要将 3 种试剂与待测样液混合 20min, 读取 1 个荧光数据, 带入公式即可得到准确的 AFB<sub>1</sub> 浓度, 整个检测过程可在 30min 内完成。如果配有高通量荧光检测器, 此方法可以同时测定大量样品。

[0019] (3) 本发明技术方案样品和试剂用量少, 检测成本低。1 微摩尔偶联 AFB<sub>1</sub> 的绿色量子点和 5 微摩尔偶联 AFB<sub>1</sub> 抗体的红色量子点可以检测 5 万份 AFB<sub>1</sub> 疑似污染的样品。

### 附图说明

[0020] 图 1 为实施例 1 中基于绿色量子点和红色量子点间能量共振转移建立的 AFB<sub>1</sub> 检测方法的荧光扫描图, 激发波长 450nm。实线是 2.0 pmol 绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 分子偶联物(偶联比 1:10)和 2.0 pmol 红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物(偶联比 1:1)分别在 150  $\mu$ L pH7.4 的磷酸盐缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min 后的荧光发射图谱; 虚线圆点是 2.0 pmol 绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物和 2.0 pmol 红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物共同在 150  $\mu$ L pH7.4 的磷酸盐缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min 后的荧光发射图谱, 此时因抗原抗体结合使两种量子点靠近而发生能量共振转移, 导致绿色量子点能量下降而红色量子点能量升高; 虚线短线是 2.0 pmol 绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物和 2.0 pmol 红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物共同在含有 3 ng/mL AFB<sub>1</sub> 标准物质的 150  $\mu$ L pH7.4 磷酸盐缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min 后的荧光发射图谱, 由于游离的 AFB<sub>1</sub> 介入, 能量转移强度下降。

[0021] 图 2 为实施例 1 中透射电镜图:

图 2-A 为绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 分子偶联物(偶联比 1:10)和红色量子点与牛血清白蛋白偶联物(偶联比 1:1)混合孵育后的电镜结果; 图 2-B 为绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物和红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物(偶联比 1:1)混合孵育后的电镜结果; 图 2-C 为绿色量子点

与 AFB<sub>1</sub> 偶联物、红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物和 3ng/mL AFB<sub>1</sub> 标准溶液混合孵育后电镜结果。从图 2-A 可以看出,绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物和红色量子点与牛血清白蛋白偶联物呈分散状态存在,说明二者没有非特异性结合或靠近;由图 2-B 可知, AFB<sub>1</sub> 抗原抗体间特异性结合使两种量子点靠近;而图 2-C 表明,游离 AFB<sub>1</sub> 的介入导致两种量子点的分离。

[0022] 图 3 为实施例 1 中制作的 AFB<sub>1</sub> 浓度的标准曲线。

## 具体实施方式

### [0023] 实施例 1

基于最大发射波长为 530 nm 的绿色量子点和最大发射波长为 620 nm 红色量子点间能量共振转移建立的 AFB<sub>1</sub> 检测方法(含关键条件优化方案),包括以下主要步骤。

[0024] (1)绿色量子点与 AFB<sub>1</sub> 偶联物(试剂 1)的制备:绿色量子点(货号 QSA<sup>a</sup>-530-10,表面氨基化修饰,Oceannano 公司,美国), AFB<sub>1</sub> (Acros 公司,比利时)。

[0025] 1) AFB<sub>1</sub> 的脲化与活化:0.2mg AFB<sub>1</sub> 与 0.4mg 羧甲氧基羟氨半盐酸盐(CMO)溶解于 80 μL 吡啶中,25℃ 避光振摇反应 24h,冷冻干燥后用 1mL 超纯水溶解,用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0,用苯萃取除去未反应的 AFB<sub>1</sub>,水相中加入 0.1mol/L 稀盐酸调 pH 值至 3.0,以沉淀 AFB<sub>1</sub> 脲化物,再用乙酸乙酯抽提沉淀物,真空干燥既得纯净的 AFB<sub>1</sub> 脲化物。称取 10μg AFB<sub>1</sub> 脲化物,溶解于 200 μL 二甲基甲酰胺(DMF)中,加入 3mg N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和 0.3mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 37℃ 避光振摇 2h。

[0026] 2) 准备 5 只小烧杯,使用前用适量 0.2mol 硼酸盐缓冲液(pH7.4)润洗,每个小烧杯均加入 0.2mL 硼酸盐缓冲液和 5 μL 浓度为 10μM 的绿色量子点。偶联全过程用磁力搅拌器匀速缓慢搅拌。

[0027] 3) 分别缓慢加入浓度为 10μM 的 AFB<sub>1</sub> 脲化活化物 5 μL (条件 1)、10 μL (条件 2)、25 μL (条件 3)、50 μL (条件 4)和 100 μL (条件 5),使 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点偶联摩尔比分别为 1、2、5、10 和 20。室温下偶联 1.5h。

[0028] 4) 加入 1% 葡萄糖酸 100 μL 封闭 45min,缓调 pH 至 5.0。

[0029] 5) 4℃,19000r/min,离心 30min,吸去上清液,沉淀部分用含有 20% 甘油的超纯水 20 μL 复溶。

[0030] 通过步骤(4)表 1 的实验结果选择条件 4 即加入 10μM 的 AFB<sub>1</sub> 脲化活化物 50 μL ( AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点偶联摩尔比 10 :1) 得到的复溶液为后续实验的 1,000× 试剂 1 母液。

[0031] (2) 红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物(试剂 2)的制备:红色量子点(货号 QSH<sup>b</sup>-620-20,表面羧基化修饰,Oceannano 公司,美国), AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体(抗体株号:10B7,江西中德生物工程有限公司)。

[0032] 1) 准备 3 只小烧杯,使用前用适量硼酸水溶液润洗,均加入 0.2mL 硼酸水溶液,偶联全过程用磁力搅拌器匀速缓慢搅拌。

[0033] 2) 每个小烧杯中缓慢加入 5 μL 浓度为 10μM 的红色量子点。

[0034] 3) 将 8 μL EDC (0.5mg/mL) 和 2 μL NHSS (0.5mg/mL) 混匀后加入, 室温活化 20min。

[0035] 4) 分别逐滴加入浓度为 10μM 的 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 5 μL (条件 6)、15 μL (条件 7) 和 25 μL (条件 8),使 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点偶联摩尔比分别为 1、3 和 5。用 0.1M

NaOH 调 pH 至 7.4, 室温偶联 30min。

[0036] 5) 加入 5% 氨基葡萄糖 100  $\mu$ L 封闭 45min, 用 0.1M 盐酸缓调 pH 至 5.0。

[0037] 6) 4°C, 19000r/min, 离心 30min, 吸去上清液, 沉淀部分用含有 20% 甘油的磷酸缓冲液(0.01mol PB, pH7.4) 20  $\mu$ L 复溶。

[0038] 通过步骤(4)中表 1 的实验结果选择条件 6 即加入浓度为 10 $\mu$ M 的 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体 5  $\mu$ L(AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点偶联摩尔比 1:1)得到的复溶液为后续实验的 1,000 $\times$  试剂 2 母液。

[0039] (3) 绿色量子点偶联 AFB<sub>1</sub>、红色量子点偶联抗体后两种量子点之间相互作用的考察: 分别使用荧光扫描(附图 1)和透射电镜(附图 2)考察了两种量子点偶联抗原抗体后具体的行为关系。

[0040] 附图 1 为本发明一种检测 AFB<sub>1</sub> 的新方法的原理图, 即基于绿色量子点和红色量子点间能量共振转移建立的 AFB<sub>1</sub> 检测方法的荧光扫描图。图中实线是偶联 AFB<sub>1</sub> 的绿色量子点和偶联抗体的红色量子点分别在磷酸盐缓冲液中 37°C 孵育 20min 后的荧光发射扫描图谱, 为红、绿量子点原有的能量发射图谱; 虚线圆点是偶联 AFB<sub>1</sub> 的绿色量子点和偶联抗体的红色量子点等摩尔浓度混合后在磷酸盐缓冲液中 37°C 孵育 20min 后的荧光发射扫描图谱; 虚线短线是偶联 AFB<sub>1</sub> 的绿色量子点与偶联抗体的红色量子点等摩尔浓度混合后在含有 AFB<sub>1</sub> 标准物质的磷酸盐缓冲液中 37°C 孵育 20min 后的荧光发射扫描图谱; 上述激发波长均为 450nm。

[0041] 为排除绿、红量子点之间非特异性结合造成假阴性实验结果, 按照步骤(2)中方法制备了红色量子点与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物(偶联比 1:1), 将其与绿色量子点偶联的 AFB<sub>1</sub> 分子(偶联比 1:10)等摩尔比共同孵育后, 在透射电镜下观察, 两种量子点呈现较为均匀的分散状态(附图 2-A); 而将红色量子点与牛血清白蛋白换成红色量子点偶联的 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体(偶联比 1:1)混合孵育后在透射电镜下观察, 两种量子点表现出明显的靠近(附图 2-B), 证明了量子点间相互靠近是由于与其偶联的 AFB<sub>1</sub> 抗原、抗体之间特异性的结合, 而不是两种量子点之间的非特异性吸附作用; 在结合体系中加入游离 AFB<sub>1</sub>, 又导致了两种量子点的分离(附图 2-C)。

[0042] (4) 建立能量共振转移体系中关键条件的优化: 理论上, 一个绿色量子点标记一个 AFB<sub>1</sub>、一个红色量子点标记一个 AFB<sub>1</sub> 抗体, 并且二者等量使用时用来检测 AFB<sub>1</sub> 的灵敏度最高, 但是考虑到较低的抗原抗体标记量一方面使反应速率减慢, 不适合快速检测, 另一方面其能量转移的强度较低(小于 7%), 不利于样品的定量检测, 基于上述原因考察了 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点的偶联摩尔比(2 至 20)、AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点的偶联摩尔比(1 至 5)对绿色量子点能量下降和红色量子点能量提高强度的影响(表 1)。表 1 中第 3 组有最理想的能量下降和能量增加强度, 此时 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点的偶联摩尔比为 10:1, AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点的偶联摩尔比为 1:1。AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点的偶联摩尔比继续提高到 20:1 时, 能量转移程度反而下降, 这是由于绿色量子点表面过多的疏水性抗原表位的存在导致水溶性下降。当 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点的偶联摩尔比提高至 3 以上时, 出现了能量淬灭效应, 这是因为量子点表面过多过密的抗原抗体结合位点造成量子点之间的交联团聚。

[0043] 基于上述实验结果分析, 确定了试剂 1 为 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点之间偶联摩尔比为 10:1 时产物, 试剂 2 为 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点之间偶联摩尔比为 1:1 时产物, 将

能量变化更灵敏的绿色量子点能量降低比率作为 AFB<sub>1</sub> 检测的尺度。

[0044] 从理论上分析,一个绿色量子点周围结合的红色量子点越多,其能量降低的比率越大,因此考察了绿色量子点和红色量子点的比例关系对体系中能量转移强度的影响(表 2)。表 2 的结果验证了上述分析,试剂 2 用量的增加将能量转移强度从 18% 提高到 28%,当其与试剂 1 的摩尔比大于 5 以上时,能量转移强度不再有明显的提高。在本方法 AFB<sub>1</sub> 检测体系中,试剂 1 与试剂 2 的用量比为 1:5,为方便计算和使用,实际操作时将试剂 2 母液的稀释倍数设定为试剂 1 的 1/5。

[0045] 表 1 AFB<sub>1</sub> 与绿色量子点、AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体与红色量子点间偶联摩尔比对能量转移强度的影响

组别	抗体与红色量子点偶联摩尔比	AFB <sub>1</sub> 与绿色量子点偶联摩尔比	绿色量子点能量下降 (%)	红色量子点能量增加 (%)
1	1	2	7.86±0.21	10.38±0.39
2	1	5	14.39±0.33	16.46±0.21
3	1	10	18.60±0.17	20.23±0.35
4	1	20	13.53±0.24	12.44±0.31
5	3	2	8.832±0.18	5.92±0.49
6	3	5	3.67±0.33	4.21±0.26
7	3	10	33.77±0.19	-26.45±0.43
8	3	20	14.59±0.12	-14.54±0.45
9	5	2	9.63±0.20	6.58±0.66
10	5	5	22.23±0.44	-15.26±0.28
11	5	10	19.74±0.37	-10.01±0.45
12	5	20	14.607±0.34	12.81±0.54

表 2 试剂 1 与试剂 2 摩尔比对绿色量子点能量转移效率的影响

组别	试剂 1 与试剂 2 摩尔比	能量转移效率 E (%)
1	1:1	18.3643±0.64
2	1:2	20.9109±0.59
3	1:3	23.7354±0.46
4	1:4	26.7795±0.36
5	1:5	28.5432±0.53
6	1:6	28.8120±0.63

(5) AFB<sub>1</sub> 浓度标准曲线的制作:各取试剂 1 和试剂 2 母液 1 μL,分别用 1mL 和 0.2mL 超纯水稀释,得到试剂 1 和试剂 2 待用液。10 μL 试剂 1 与 90 μL 试剂 3(即结合溶液,含 10% 甲醇的 1×PBS, pH7.4)混合,在激发光 450nm 下测定 530nm 荧光强度(F2700 型分光光度计,日立),得到数据记为 F。将 10 μL 试剂 1、10 μL 试剂 2 和用 80 μL 试剂 3 倍比稀释的 AFB<sub>1</sub> 溶液(0ng/mL 至 20ng/mL),37°C 孵育 20min 后,在激发光 450nm 下测定 530nm 荧光强度,得到数据记录为 F<sub>N</sub>,分别代表 F<sub>0</sub>, F<sub>0.01</sub>, F<sub>0.06</sub>, F<sub>0.08</sub>, F<sub>0.1</sub>, F<sub>0.3</sub>, F<sub>0.5</sub>, F<sub>1</sub> 和 F<sub>5</sub>,其中下标数值代表 AFB<sub>1</sub> 溶液浓度(ng/mL)。将 (F - F<sub>N</sub>) / F × 100% 记录为荧光能量转移效率 E (%)。以 AFB<sub>1</sub> 浓度

对数值为横坐标, 荧光能量转移效率  $E$  (%) 为纵坐标, 绘制出检测  $AFB_1$  浓度的标准曲线  $y = -4.63 \ln(x) + 13.84$ 。其中  $y$  为能量转移效率  $E$ ,  $x$  为溶液中  $AFB_1$  浓度。

[0046] (6)  $AFB_1$  的检测:

1) 待测样品溶液准备: 取待测样品 1g, 用 5mL 60% 甲醇水溶液震荡提取 15min, 9000 g 离心 10min, 上清液经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 取 100  $\mu$ L 体积加入 100  $\mu$ L 的 2 $\times$ PBS (0.01M, pH7.4) 和 400  $\mu$ L 的 1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释, 即得 30 倍稀释的待测样液。

[0047] 2) 取 80  $\mu$ L 待测样液与 10  $\mu$ L 试剂 1 和 10  $\mu$ L 试剂 2 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20min, 在激发光 450nm 下测定 530nm 荧光强度, 得到数据代入  $E$  (%) =  $(F - F_N) / F \times 100\%$  (公式 1) 中  $F_N$ , 计算得到  $E$  值, 代入下式即得到待测样液中  $AFB_1$  含量。

[0048]  $AFB_1$  含量 (ng/mL) =  $e^{(E-13.84)/4.631}$ 。

[0049] 实施例 2

基于最大发射波长为 540 nm 的绿色量子点和最大发射波长为 620 nm 的红色量子点间能量共振转移建立的  $AFB_1$  检测方法, 使用高通量检测设备 (全波长扫描式多功能读数仪, 热电公司, 美国) 和 96 孔黑色荧光板 (3603 型, 康宁, 美国)。

[0050] (1) 绿色量子点与  $AFB_1$  偶联物 (试剂 1) 的制备: 使用最大发射波长为 540 nm 的绿色量子点 (QSA<sup>a</sup> -540-20, 表面氨基化修饰, Oceanano 公司, 美国), 基本操作步骤同于实施例 1。

[0051] (2) 红色量子点与  $AFB_1$  单克隆抗体偶联物 (试剂 2) 的制备: 基本操作步骤同于实施例 1。

[0052] (3)  $AFB_1$  浓度标准曲线的制作: 分别取 1  $\mu$ L 试剂 1 和 5  $\mu$ L 试剂 2 母液, 均用 1mL 超纯水稀释, 得到试剂 1 和试剂 2。10  $\mu$ L 试剂 1 与 90  $\mu$ L 试剂 3 (即结合溶液, 含 10% 甲醇的 1 $\times$ PBS, pH7.4) 混合, 加入 96 孔黑色荧光板孔 a1; 再将 10  $\mu$ L 试剂 1、10  $\mu$ L 试剂 2 和 80  $\mu$ L 试剂 3 稀释的  $AFB_1$  溶液 (浓度分别为 0.06ng/mL, 0.08 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL 和 5 ng/mL) 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min 后, 加入 96 孔黑色荧光板孔 a2 至 a8。在激发光 450nm 下测定 540nm 处荧光强度, 孔 a1 数据记为  $F$ 。孔 a2 至 a8 得到数据分别记为  $F_{0.06}$ 、 $F_{0.08}$ 、 $F_{0.1}$ 、 $F_{0.3}$ 、 $F_{0.5}$ 、 $F_1$  和  $F_5$ , 代入公式 1 (见实施例 1) 中  $F_N$  的位置, 计算  $E$  (%) 值。以游离的  $AFB_1$  浓度对数为横坐标,  $E$  (%) 为纵坐标, 绘制检测  $AFB_1$  浓度的标准曲线。

[0053] (4)  $AFB_1$  的检测: 24 份可疑含有  $AFB_1$  的大米样品、12 份花生样品和 12 份玉米样品分别粉碎, 各称取 1g 待测。每份样品用 5mL 60% 甲醇水溶液震荡提取 15min, 9000 g 离心 10min, 上清液经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 取 100  $\mu$ L 体积加入 100  $\mu$ L 的 2 $\times$ PBS (0.01M, pH7.4) 和 400  $\mu$ L 的 1 $\times$ PBS (pH7.4) 稀释, 即得 30 倍稀释的待测样液。每份待测样液分别取 80  $\mu$ L 与 10  $\mu$ L 试剂 1 和 10  $\mu$ L 试剂 2 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20min, 加入黑色荧光板相应各孔, 在激发光 450nm 下测定 540nm 处荧光强度, 得到每个样品的数据分别带入公式 (1) (见实施例 1) 中  $F_N$  位置, 计算得到  $E$  值, 根据标准曲线计算即得到待测样液中  $AFB_1$  含量, 再乘以稀释倍数 30 即得到对应样品中  $AFB_1$  含量 ( $\mu$ g/kg)。

[0054] 实施例 3

基于最大发射波长为 530 nm 的绿色量子点和最大发射波长为 610 nm 的红色量子点间能量共振转移建立的  $AFB_1$  检测方法。

[0055] (1) 绿色量子点与  $AFB_1$  偶联物 (试剂 1) 的制备: 基本操作步骤同于实施例 1。

[0056] (2) 红色量子点与 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体偶联物(试剂 2) 的制备:使用最大发射波长为 610 nm 的红色量子点(QSH<sup>b</sup>-610-20, 表面羧基化修饰, Oceanano 公司, 美国), 基本操作步骤同于实施例 1。

[0057] (3) AFB<sub>1</sub> 浓度标准曲线的制作:基本操作步骤同于实施例 1。

[0058] (4) AFB<sub>1</sub> 的检测:可疑含有 AFB<sub>1</sub> 的待测样液(制备方法同实施例 2)80 μL 与 10 μL 试剂 1 和 10 μL 试剂 2 在 37℃ 下孵育 20min, 在激发光 450nm 下测定 530nm 荧光强度, 得到数据带入公式(1)(见实施例 1)中  $F_N$  位置, 计算得到 E 值, 根据标准曲线公式即得到待测样液中 AFB<sub>1</sub> 含量。

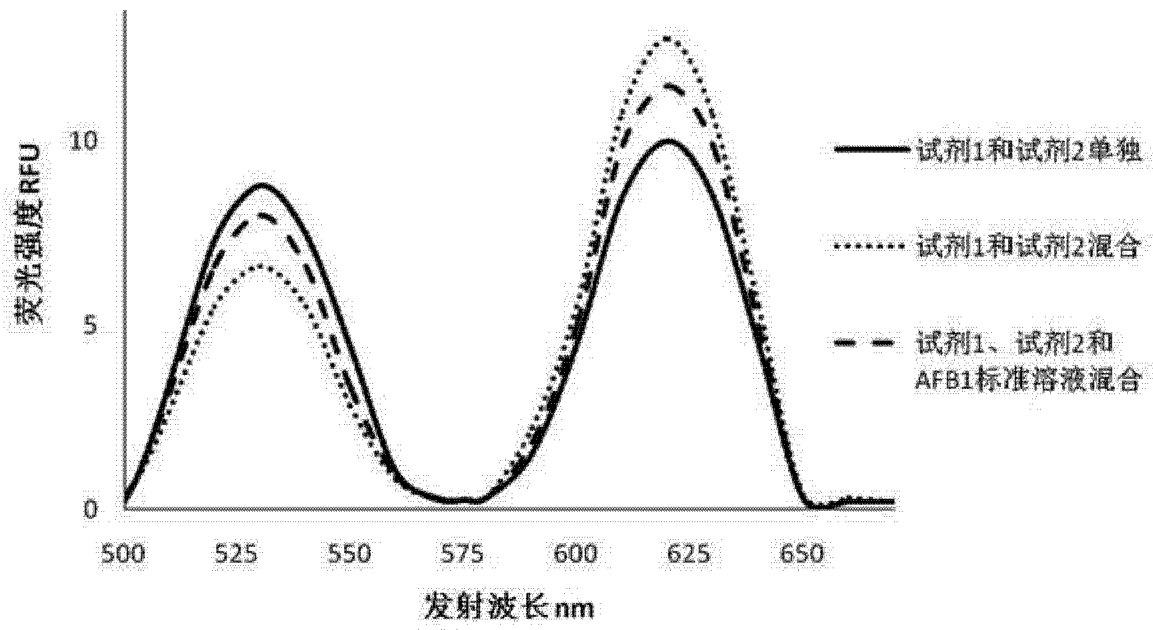


图 1

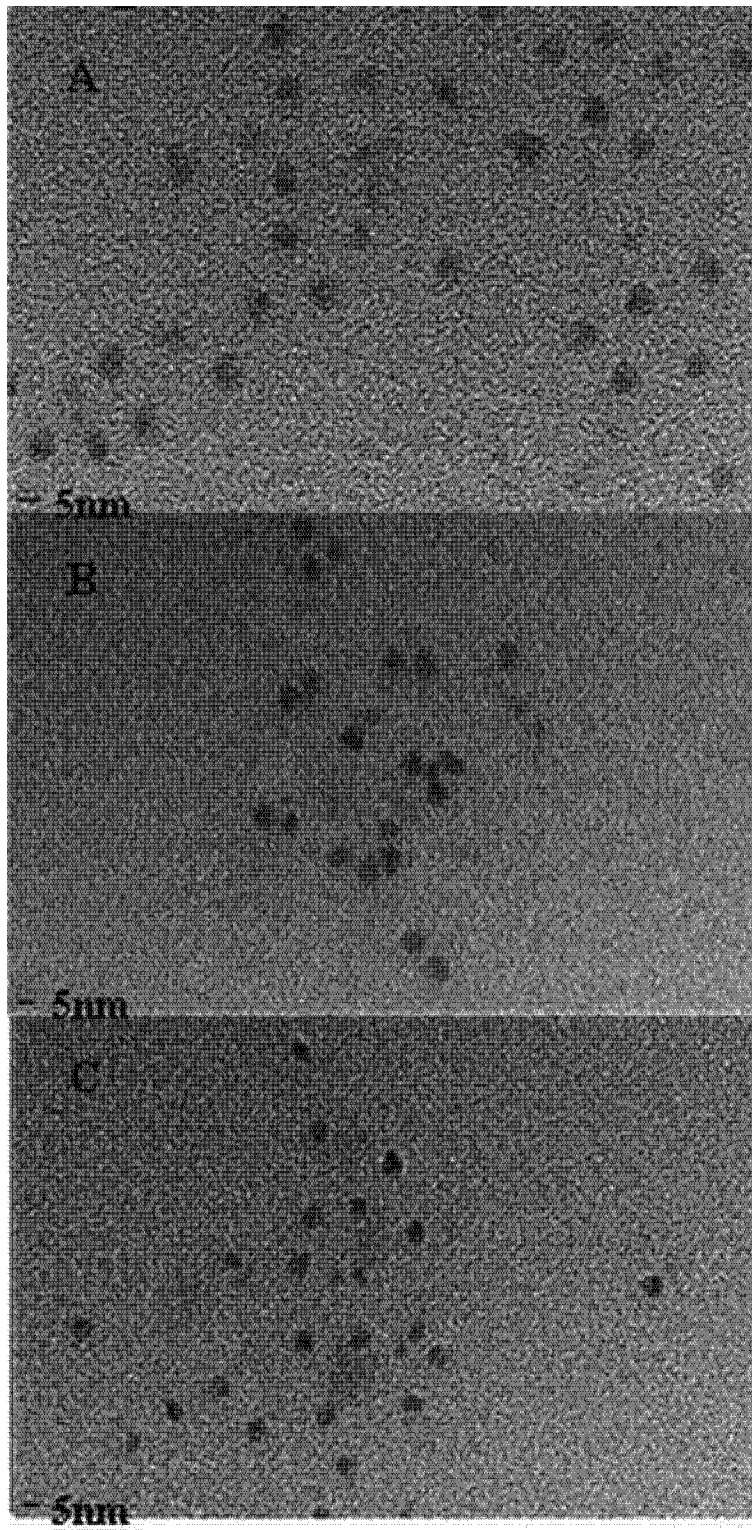


图 2

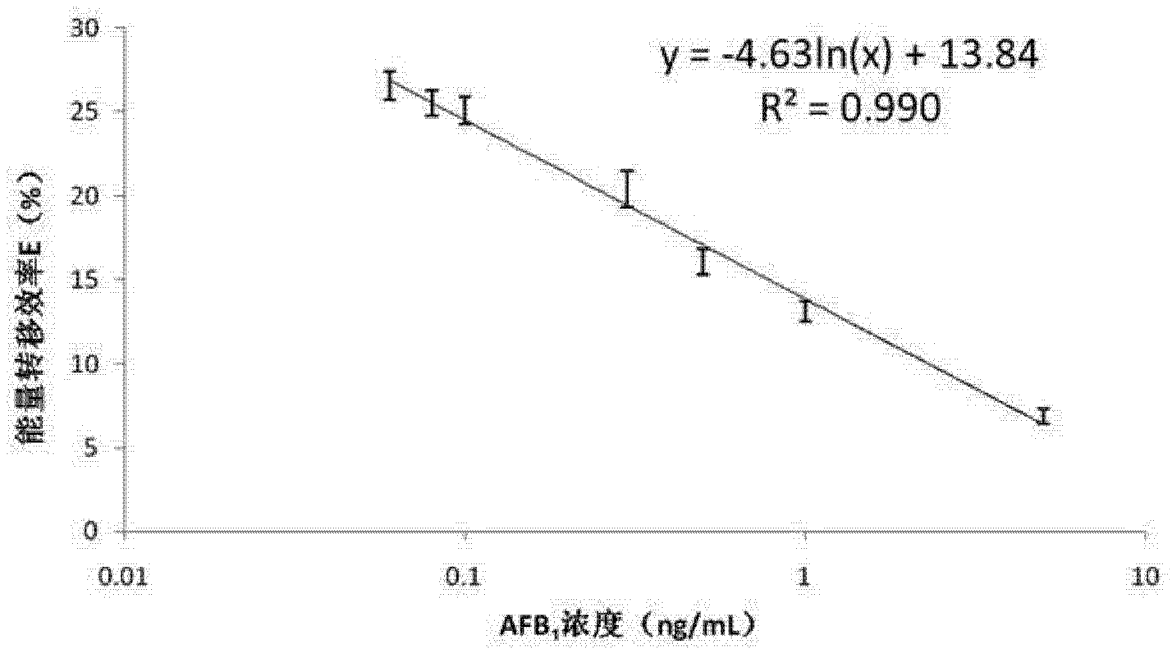


图 3

专利名称(译)	基于两种量子点之间能量转移的黄曲霉毒素B1检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104714014A</a>	公开(公告)日	2015-06-17
申请号	CN201310682387.9	申请日	2013-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	熊勇华 江湖 徐威 许杨 郭亮 许恒毅		
发明人	熊勇华 江湖 徐威 许杨 郭亮 许恒毅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/542		
其他公开文献	CN104714014B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于分析检测领域，公开了一种基于两种量子点间能量转移的黄曲霉毒素B1检测方法。本发明选择绿色量子点偶联AFB1，红色量子点偶联抗AFB1的单克隆抗体，二者混合后，由于抗原抗体特异性结合，两种量子点间距离靠近而发生能量共振转移，导致绿色量子点荧光下降，红色量子点荧光增强。当反应体系含有AFB1时，游离的AFB1与绿色量子点偶联的AFB1共同竞争红色量子点偶联的抗体，AFB1的浓度直接影响绿色量子点能量转移效率，且在一定范围内绿色量子点能量转移效率与AFB1浓度对数成反比例关系。本发明方法为均相免疫学检测AFB1，具有检测时间短，灵敏度和准确性高，操作流程简单和检测成本低等特点。

