



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104714014 B

(45)授权公告日 2016.09.21

(21)申请号 201310682387.9

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2013.12.16

审查员 刘彦宁

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104714014 A

(43)申请公布日 2015.06.17

(73)专利权人 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)

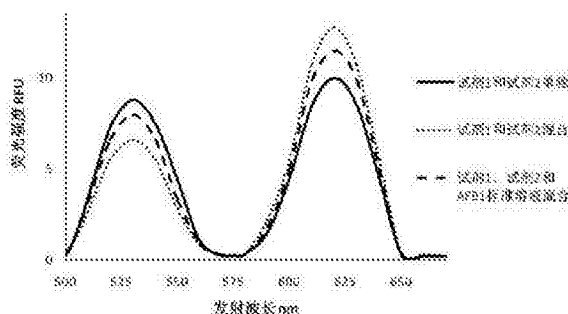
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

## (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;

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;

具体包括如下步骤:

(a)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溶解于80μL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;每称取10μg AFB<sub>1</sub>脲化物,溶解于200μL二甲基甲酰胺中,加入3mg N,N'-二环己基碳二亚胺和0.3mg N-羟基琥珀酰亚胺37℃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5μL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50μL,使AFB<sub>1</sub>与绿色量子点偶联摩尔比为10:1,室温下偶联1.5h;

3) 封闭:加入1%葡萄糖酸100μL封闭45min,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%甘油的超纯水20μL复溶,得到的复溶液为后续实验的1,000×试剂1母液;

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

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5μL浓度为10μM的红色量子点,将8μL 0.5mg/mL EDC和2μL 0.5mg/mL NHSS混匀后加入,室温活化20min; 2) 偶联:逐滴加入浓度为10μM的AFB<sub>1</sub>单克隆抗体5μL,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100μL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pH7.4 0.01mol/L PB磷酸缓冲液20μL复溶,得到的复溶液为后续实验的1,000×试剂2母液;

(c) 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1μL,分别用1mL和0.2mL超纯水稀释,得到试剂1和试剂2待用液;10μL试剂1与90μL试剂3即pH7.4含10%甲醇的1×PBS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10μL试剂1、10μL试剂2和用80μL试剂3倍比稀释的0ng/mL至20ng/mL AFB<sub>1</sub>溶液,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<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-1

$F_N)/F \times 100\%$ 记录为荧光能量转移效率 $E(\%)$ ;以 $AFB_1$ 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 $AFB_1$ 浓度的标准曲线;

(d) $AFB_1$ 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,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 $AFB_1$ 浓度的标准曲线即得到待测样液中 $AFB_1$ 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:

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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℃~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。

[0012] 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。

[0013] 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:

[0014] (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。

[0015] (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。

[0016] (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<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。

[0017] (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。

[0018] 更具体的, 包括如下步骤:

[0019] 1) 试剂1即绿色量子点与AFB<sub>1</sub>偶联物的制备:

[0020] 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80μL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; 每称取10μg AFB<sub>1</sub>脲化物, 溶解于200μL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;

[0021] 偶联: 每在洁净的小烧杯中加入0.2mL 硼酸盐缓冲液和5μL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50μL, 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;

[0022] 封闭: 加入1%葡萄糖酸100μL封闭45min, 缓调pH至5.0;

[0023] 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20μL复溶, 得到的复溶液为后续实验的1,000×试剂1母液;

[0024] 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:

[0025] 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5μL浓度为10μM的红色量子点, 将8μL 0.5mg/mL EDC和2μL 0.5mg/mL NHSS混匀后加入, 室温活化20min;

[0026] 偶联: 逐滴加入浓度为10μM的AFB<sub>1</sub>单克隆抗体5μL, 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100μL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)20μL复溶, 得到的复溶液为后续实验的1,000×试剂2母液;

[0027] 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1μL, 分别用1mL和0.2mL超纯水稀释, 得到试剂1和试剂2待用液; 10μL试剂1与90μL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10μL试剂1、10μL试剂2和用80μL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<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,绘制出的检测AFB<sub>1</sub>浓度的标准曲线;

[0028] 4)AFB<sub>1</sub>的检测:

[0029] 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0.45μm滤器过滤,取100μL体积加入100μL 0.01M, pH7.4的2×PBS和400μL的pH7.4的1×PBS稀释,即得30倍稀释的待测样液;

[0030] 取80μL待测样液与10μL试剂1和10μL试剂2在37℃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。

[0031] 本发明技术方案具有如下优点:

[0032] (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。

[0033] (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。

[0034] (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

[0035] 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150μL pH7.4的磷酸盐缓冲液中37℃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150μL pH7.4的磷酸盐缓冲液中37℃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150μL pH7.4磷酸盐缓冲液中37℃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。

[0036] 图2为实施例1中透射电镜图:

[0037] 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。

[0038] 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

[0039] 实施例1

[0040] 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。

[0041] (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,0ceannano公司,美国),AFB<sub>1</sub>(Acros公司,比利时)。

[0042] 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80μL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200μL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。

[0043] 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5μL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。

[0044] 3)分别缓慢加入浓度为10μM的AFB<sub>1</sub>脲化活化物5μL(条件1)、10μL(条件2)、25μL(条件3)、50μL(条件4)和100μL(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。

[0045] 4)加入1%葡萄糖酸100μL封闭45min,缓调pH至5.0。

[0046] 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20μL复溶。

[0047] 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50μL(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。

[0048] (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,0ceannano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)。

[0049] 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。

[0050] 2)每个小烧杯中缓慢加入5μL浓度为10μM的红色量子点。

[0051] 3)将8μL EDC(0.5mg/mL)和2μL NHSS(0.5mg/mL)混匀后加入,室温活化20min。

[0052] 4)分别逐滴加入浓度为10μM的AFB<sub>1</sub>单克隆抗体5μL(条件6)、15μL(条件7)和25μL(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。

[0053] 5)加入5%氨基葡萄糖100μL封闭45min,用0.1M 盐酸缓调pH至5.0。

[0054] 6)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)20μL复溶。

[0055] 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。

[0056] (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。

[0057] 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C孵育20min后的荧光发射扫描图谱;上述激发波长均为450nm。

[0058] 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)。

[0059] (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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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

[0063]

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±0.31	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

[0064] 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

[0065]

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

[0066] (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1μL,分别用1mL和0.2mL超纯水稀释,得到试剂1和试剂2待用液。10μL试剂1与90μL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10μL试剂1、10μL试剂2和用80μL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<sub>1</sub>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<sub>1</sub>浓度。

[0067] (6)AFB<sub>1</sub>的检测:

[0068] 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0.45μm滤器过滤,取100μL体积加入100μL的2×PBS (0.01M,pH7.4)和400μL的1×PBS (pH7.4)稀释,即得30倍稀释的待测样液。

[0069] 2)取80μL待测样液与10μL试剂1和10μL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<sub>1</sub>含量。

[0070] AFB<sub>1</sub>含量 (ng/mL) =  $e^{(E-13.84)/4.631}$ 。

[0071] 实施例2

[0072] 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<sub>1</sub>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)。

[0073] (1)绿色量子点与AFB<sub>1</sub>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,Oceannano公司,美国),基本操作步骤同于实施例1。

[0074] (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:基本操作步骤同于实施例1。

[0075] (3)AFB<sub>1</sub>浓度标准曲线的制作:分别取1μL试剂1和5μL试剂2母液,均用1mL超纯水稀释,得到试剂1和试剂2。10μL试剂1与90μL试剂3(即结合溶液,含10%甲醇的1×PBS,pH7.4)混合,加入96孔黑色荧光板孔a1;再将10μL试剂1、10μL试剂2和80μL试剂3稀释的AFB<sub>1</sub>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℃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<sub>1</sub>浓度对数为横坐标,E(%)为纵坐标,绘制检测AFB<sub>1</sub>浓度的标准曲线。

[0076] (4)AFB<sub>1</sub>的检测:24份可疑含有AFB<sub>1</sub>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0.45μm滤器过滤,取100μL体积加入100μL的2×PBS (0.01M,pH7.4)和400μL的1×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80μL与10μL试剂1和10μL试剂2在37℃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<sub>1</sub>含量,再乘以稀释倍数30即得到对应样品中AFB<sub>1</sub>含量(μg/kg)。

[0077] 实施例3

[0078] 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<sub>1</sub>检测方法。

[0079] (1)绿色量子点与AFB<sub>1</sub>偶联物(试剂1)的制备:基本操作步骤同于实施例1。

[0080] (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,Oceannano公司,美国),基本操作步

骤同于实施例1。

[0081] (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。

[0082] (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 $\mu$ L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,得到数据带入公式(1)(见实施例1)中F<sub>N</sub>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。

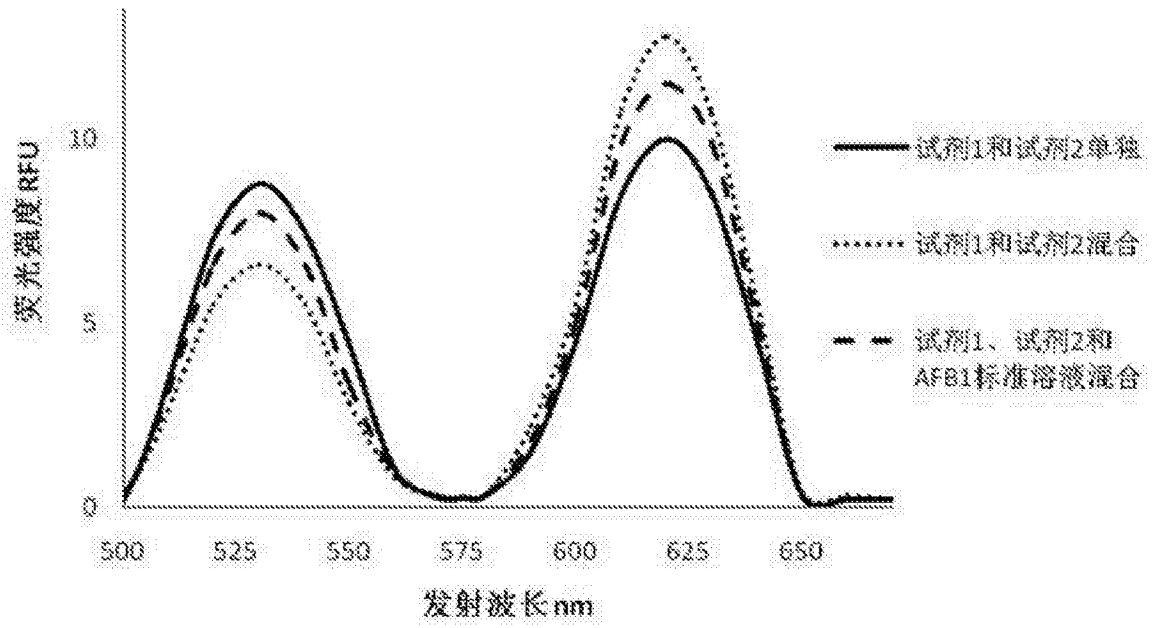


图 1

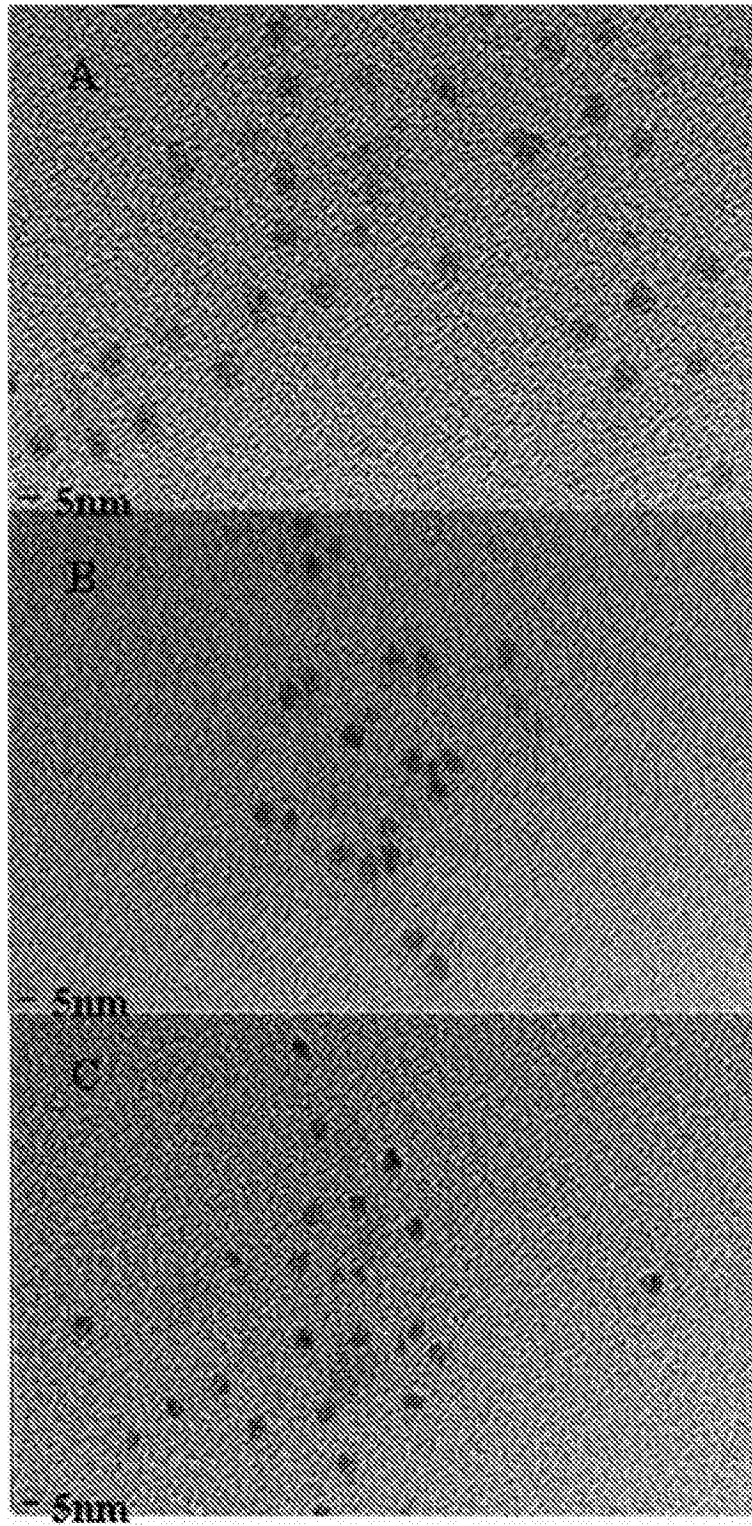


图 2

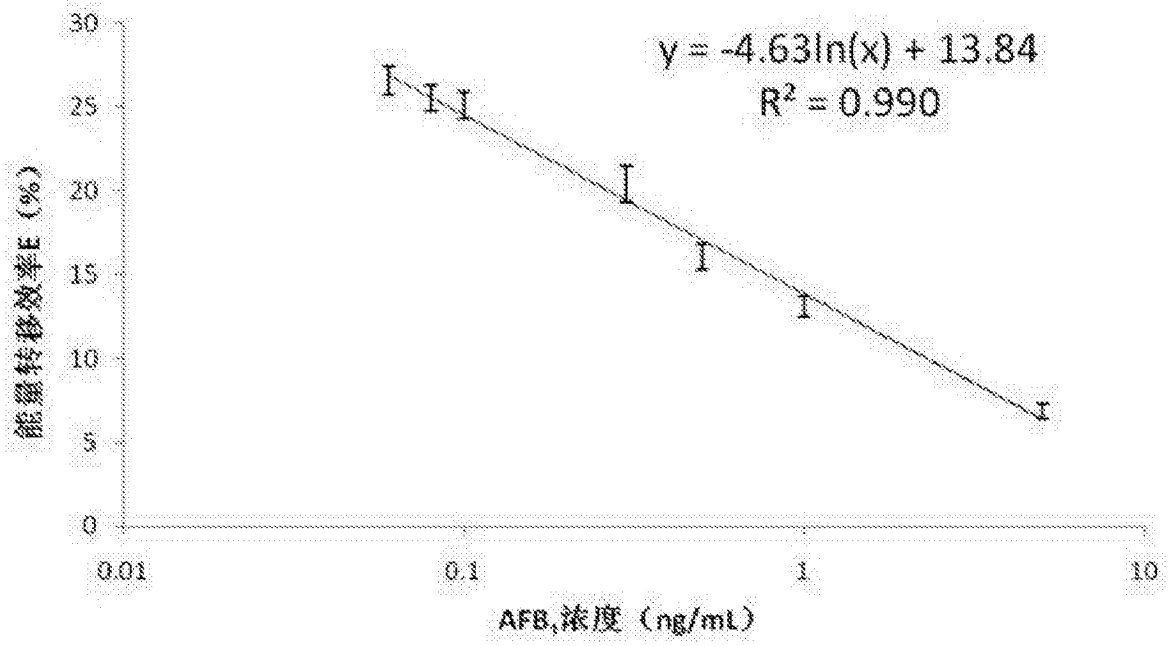


图 3

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="#">CN104714014B</a>	公开(公告)日	2016-09-21
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		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN104714014A		
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。

