



(21) 申请号 201710506200.8

(22) 申请日 2017.06.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109142703 A

(43) 申请公布日 2019.01.04

(73) 专利权人 南京理工大学

地址 210094 江苏省南京市孝陵卫200号

(72) 发明人 宋继中 董宇辉 唐晓倩 韩博宁

薛洁 曾海波 张兆威

(74) 专利代理机构 南京理工大学专利中心

32203

代理人 刘海霞

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106675559 A, 2017.05.17

CN 105866416 A, 2016.08.17

CN 105759045 A, 2016.07.13

CN 102495210 A, 2012.06.13

WO 2017020137 A1, 2017.02.09

US 2010227315 A1, 2010.09.09

审查员 陈亚文

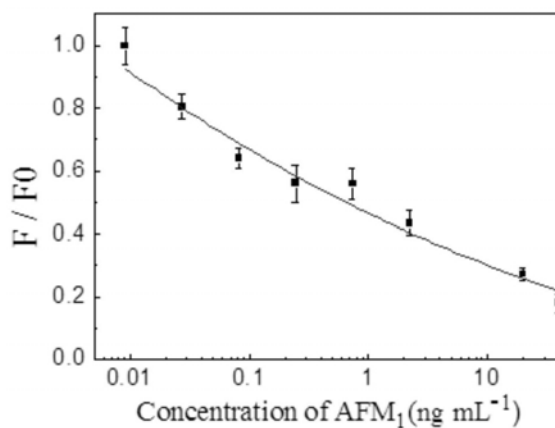
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54) 发明名称

基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的
检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法。所述方法首先在CsX、PbX₂的原料中添加少量的表面活性剂油胺,通过球磨得到可在水中分散的水溶性钙钛矿纳米晶,再通过表面进一步修饰阴离子表面活性剂使其表面带负电荷,与黄曲霉素M1的抗体相结合,采用荧光免疫检测方法对黄曲霉素M1进行定量检测。本发明制备钙钛矿纳米晶的工艺简单,成本低廉,荧光效率高,可对黄曲霉素M1进行定量检测,检测灵敏度可达0.01ng/mL,开拓了钙钛矿材料的应用范围,具有良好的应用前景。



1. 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,其特征在于,具体步骤如下:

步骤1,将油胺加入到CsX和PbX₂粉末中,以300~500rpm的转速球磨1~7h,其中球料质量比为15:1 ~ 30:1,所述的X为Cl、Br、I,CsPbX₃的摩尔量与油胺的体积比为10~40:1,mol:L;

步骤2,在球磨粉末中加入水溶性阴离子表面活性剂,加入Tris缓冲液搅拌溶解,调节pH至7~8,得到水溶性钙钛矿溶液;

步骤3,将黄曲霉素M1抗体溶液加入到水溶性钙钛矿溶液中,混匀后室温静置进行吸附,得到抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液;

步骤4,将待检测的黄曲霉素M1溶液与包被液混合,37℃下孵育进行包被,包被结束后,除去液体,清洗,甩干,加入4%牛奶稀释液,在37℃孵育,清洗,甩干;

步骤5,将抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液滴加到步骤4中包被的待检测的黄曲霉素M1中,检测吸光度,得到初始吸光度F₀,之后37℃下孵育,孵育结束后,清洗,甩干,检测吸光度,得到最终吸光度F,根据黄曲霉素M1的浓度与F/F₀的标准曲线关系,计算得到待检测的黄曲霉素M1的浓度。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤2中,所述的阴离子表面活性剂为十二烷基硫酸钠,钙钛矿纳米晶与水溶性阴离子表面活性剂的质量比为5:1~10:1。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤3,所述的静置吸附时间为15~30min。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤4,所述的包被孵育时间为1~2h。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤5,所述的孵育时间为20~30min。

基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,属于免疫分析领域。

背景技术

[0002] 卤化物钙钛矿材料具有出色的光伏性能和较高的能量转化率,在背光荧光粉领域具有巨大潜力。与有机无机杂化钙钛矿($\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbX}_3$)相比,无机钙钛矿(CsPbX_3)显示出优异的稳定性,在光电子学具有巨大潜在应用价值。

[0003] 钙钛矿发光性能优异,在生物成像、荧光免疫检测探针等都具有应用潜力,然而其水稳性能依然是技术瓶颈,水溶更是难以实现,大大限制了其在生物方面的应用。为实现水溶性能,有研究通过制备油溶性的钙钛矿纳米晶,随后用固体脂质纳米颗粒来包裹钙钛矿纳米晶实现水溶,然而其制备方法复杂,且有机溶剂使用量大,不利于大批量生产与环保要求([1]Gomez L,de Weerd C,Hueso J L,et al.Color-stable water-dispersed cesium lead halide perovskite nanocrystals[J].Nanoscale,2017,9(2):631-636.)。

[0004] 在免疫检测中,荧光免疫检测快捷且操作简易,是一种优异的免疫检测方法。黄曲霉素M1是一种易接触人体的致毒物,且由于大多存在于牛奶等奶制品中,其暴露的对象包含婴幼儿,因此其检测十分必要。目前国内外检测黄曲霉素M1的方法有高效液相法、液质联用、荧光探针法等([2]Wang Y,et al.HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB.Food Control,2012;28(1):131-134.[3]Cavaliere C,Foglia P,et al.Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography—tandem mass spectrometry.J Chromatography A,2006;1135(2):135-141.[4]Tayebi M,et al.Determination of total aflatoxin using cysteamine-capped CdS quantum dots as a fluorescence probe[J].Colloid& Polymer Science,2016,294(9):1-10.)。其中荧光探针法快捷便利,无需昂贵的仪器,是非常活跃的研究领域。目前,将钙钛矿应用于黄曲霉素M1的检测中仍未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法。

[0006] 实现上述目的的技术方案如下:

[0007] 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,具体步骤如下:

[0008] 步骤1,将油胺加入到 CsX 和 PbX_2 粉末中,以300~500rpm的转速球磨1~7h,其中球料质量比为15:1~30:1,所述的X为Cl、Br、I, CsPbX_3 的摩尔量与油胺的体积比为10~40:1;

[0009] 步骤2,在球磨粉末中加入水溶性阴离子表面活性剂,加入Tris缓冲液搅拌溶解,调节pH至7~8,得到水溶性钙钛矿溶液;

[0010] 步骤3,将黄曲霉素M1抗体溶液加入到水溶性钙钛矿溶液中,混匀后室温静置进行吸附,得到抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液;

[0011] 步骤4,将待检测的黄曲霉素M1溶液与包被液混合,37℃下孵育进行包被,包被结束后,除去液体,清洗,甩干,加入4%牛奶稀释液,在37℃孵育,清洗,甩干;

[0012] 步骤5,将抗体和水溶性钙钛矿的混合溶液滴加到步骤4中包被的待检测的黄曲霉素M1中,检测吸光度,得到初始吸光度 F_0 ,之后37℃下孵育,孵育结束后,清洗,甩干,检测吸光度,得到最终吸光度 F ,根据黄曲霉素M1的浓度与 F/F_0 的标准曲线关系,计算得到待检测的黄曲霉素M1的浓度。

[0013] 步骤2中,所述的阴离子表面活性剂为十二烷基硫酸钠(SDS),钙钛矿纳米晶与水溶性阴离子表面活性剂的质量比为5:1~10:1。

[0014] 步骤3,所述的静置吸附时间为15~30min。

[0015] 步骤4,所述的包被孵育时间为1~2h。

[0016] 步骤5,所述的孵育时间为20~30min。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有以下显著优点:

[0018] 1)采用一步球磨法制备水溶性钙钛矿纳米晶,该方法简单,可批量放大生产,成本低,制得的钙钛矿在水中稳定;

[0019] 2)将水溶性钙钛矿纳米晶用于黄曲霉素M1的检测,检测灵敏度可达0.01ng/mL,达到实际应用的要求,拓宽了黄曲霉素M1荧光检测范围。

[0020] 本发明首次将钙钛矿应用于检测黄曲霉素M1的检测中,拓宽了钙钛矿的应用范围。

附图说明

[0021] 图1为实施例1和实施例3制备的钙钛矿纳米晶的XRD图。

[0022] 图2为实施例1制备的钙钛矿纳米晶的TEM图。

[0023] 图3为实施例1制备的钙钛矿纳米晶的PL图。

[0024] 图4为实施例1制备的钙钛矿纳米晶的紫外吸收图谱随水溶浓度的变化图。

[0025] 图5为实施例1制备的钙钛矿纳米晶与抗体偶联的TEM图。

[0026] 图6为实施例1制备的钙钛矿纳米晶与抗体偶联不同pH下的荧光检测变化图。

[0027] 图7为实施例2钙钛矿纳米晶检测黄曲霉素M1的标准曲线。

[0028] 图8为实施例4制备的钙钛矿纳米晶水溶液照片。

[0029] 图9为实施例5制备的钙钛矿纳米晶的PL图。

[0030] 图10为实施例1和对比例1制备的钙钛矿纳米晶与抗体结合后静置后的图。

[0031] 图11为对比例2制得的钙钛矿纳米晶在水中的分散情况图。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步详述。

[0033] 本发明在 CsX 、 PbX_2 的原料中添加少量的表面活性剂,通过球磨的方法得到可在水中分散的发光纳米晶,通过表面进一步修饰阴离子表面活性剂使得表面带负电荷,与黄曲霉素M1的抗体相结合,通过荧光免疫检测方法可针对黄曲霉素M1进行定量检测。

[0034] 实施例1

[0035] 基于水溶性钙钛矿纳米晶的黄曲霉素M1的检测方法,具体包括如下步骤:

[0036] 1) 将100 μ L油胺加入到2mmol的CsBr与PbBr₂粉末中,充入氩气进行保护,密封球磨罐,以400rpm的转速球磨2h,其中球料质量比为30:1;

[0037] 2) 在80mg球磨粉末中加入10mg的SDS粉末,加入2mL Tris缓冲液,搅拌溶解,调节pH至7.4,得到水性钙钛矿溶液;

[0038] 3) 将步骤2) 的溶液取8份75 μ L,分别加425 μ L纯水稀释,用0.1M的K₂CO₃溶液对溶液pH进行调节,分别滴加1~8 μ L并用混匀器进行混匀;

[0039] 4) 取10 μ L黄曲霉素M1抗体溶液分别加到步骤3) 的混合溶液中,混匀并室温静置半小时进行吸附;

[0040] 5) 配制黄曲霉素M1抗原溶液浓度为0.25 μ g/mL,包被液(Na₂CO₃、NaHCO₃) 每个孔滴加100 μ L,抗原溶液滴加100 μ L,在酶标仪中晃板多次混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育2h进行包被,之后倒掉孔中溶液进行自动洗板,并摔干;在孔中加入牛奶稀释液(4%的浓度),在37 $^{\circ}$ C培养1h,之后进行自动洗板三次,留待备用;

[0041] 6) 将100 μ L不同pH梯度的步骤4) 溶液分别加入到孔板中,晃匀,并用酶标仪进行初始值测量;

[0042] 7) 将步骤6) 溶液在37 $^{\circ}$ C下培养半小时,自动洗板三次,摔干,用酶标仪测量荧光最终值。

[0043] 本实施例制得的CsPbBr₃钙钛矿纳米晶其结晶性表征XRD见图1的1,其晶相的峰位和强度与钙钛矿的标准卡片相吻合,说明其良好的结晶性。其相貌TEM图见图2,晶粒尺寸分布为50~100nm。其水溶液的PL发光谱图见图3,发光峰中心波长为522nm,半峰宽仅为18nm。其紫外吸收图谱随水溶浓度的变化见图4,在水中的溶解度可达3.4mg/mL。与抗体偶联的TEM图见图5,从a到c依次为CsPbBr₃钙钛矿纳米晶、抗体以及偶联后的荧光探针。不同pH下荧光检测变化图见图6,当pH较大时,其检测效果好。

[0044] 实施例2

[0045] 1) 将100 μ L油胺加入到2mmol的CsBr与PbBr₂粉末中,充入氩气进行保护,密封球磨罐,以400rpm的转速球磨2h,其中球料质量比为30:1;

[0046] 2) 在80mg球磨粉末中加入10mg的SDS粉末,加入2mL Tris缓冲液,搅拌溶解,调节pH至7.4,得到水性钙钛矿溶液;

[0047] 3) 将步骤2) 的溶液取75 μ L,加425 μ L纯水稀释,用0.1M的K₂CO₃溶液对溶液pH进行调节,滴加8 μ L并用混匀器进行混匀;

[0048] 4) 取10 μ L黄曲霉素M1抗体溶液分别加到步骤3) 的混合溶液中,混匀并室温静置半小时进行吸附;

[0049] 5) 配制不同浓度的黄曲霉素M1抗原溶液,包被液(Na₂CO₃、NaHCO₃) 每个孔滴加100 μ L,抗原溶液滴加100 μ L,在酶标仪中晃板多次混合均匀,37 $^{\circ}$ C孵育2h进行包被,之后倒掉孔中溶液进行自动洗板,并摔干;在孔中加入牛奶稀释液(4%的浓度),在37 $^{\circ}$ C培养1h,之后进行自动洗板三次,留待备用;

[0050] 6) 将100 μ L步骤4) 溶液加入到孔板中,晃匀,并用酶标仪进行初始值测量;

[0051] 7) 将步骤6) 溶液在37 $^{\circ}$ C下培养半小时,自动洗板三次,摔干,用酶标仪测量荧光最终值。

[0052] 钙钛矿纳米晶检测黄曲霉素M1的标准曲线见图7。在0.02to 10.1ng/mL的黄曲霉

素M1浓度范围内呈现线性变化,其检测灵敏度可达0.01ng/mL,可满足实际应用的要求。

[0053] 实施例3

[0054] 1) 将50μL油胺加入到2mmol的CsBr与PbBr₂粉末中,充入氩气进行保护,密封球磨罐,以400rpm的转速球磨2h,其中球料质量比为30:1;

[0055] 2) 在50mg球磨粉末中加入10mg的SDS粉末,加入2mL Tris缓冲液,搅拌溶解,调节pH至7.4,得到水溶性钙钛矿溶液;

[0056] 3) 将步骤2)的溶液取8份75μL,加425μL纯水稀释,用0.1M的K₂CO₃溶液对溶液pH进行调节,用混匀器进行混匀;

[0057] 4) 取10μL黄曲霉素M1抗体溶液分别加到步骤3)的混合溶液中,混匀并室温静置半小时进行吸附;

[0058] 5) 配制黄曲霉素M1抗原溶液浓度为0.25ug/mL,包被液(Na₂CO₃、NaHCO₃)每个孔滴加100uL,抗原溶液滴加100uL,在酶标仪中晃板多次混合均匀,37℃孵育2h进行包被,之后倒掉孔中溶液进行自动洗板,并摔干;在孔中加入牛奶稀释液(4%的浓度),在37℃培养1h,之后进行自动洗板三次,留待备用;

[0059] 6) 将步骤4)溶液分别加入100μL到孔板中,晃匀,并用酶标仪进行初始值测量;

[0060] 7) 将步骤6)溶液在37℃下培养半小时,自动洗板三次,摔干,用酶标仪测量荧光最终值。

[0061] 本实施例制得的CsPbBr₃钙钛矿纳米晶其XRD见图1的2,其结晶性依然良好。

[0062] 实施例4

[0063] 本实施例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤1)中油胺体积改为200μL,其他条件保持一致。本实施例制得的钙钛矿纳米晶水溶液照片见图8,水溶性良好。

[0064] 实施例5

[0065] 本实施例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤1)中CsBr与PbBr₂粉末改为CsI与PbI₂,其他条件保持一致。本实施例制得的钙钛矿纳米晶其发光图谱见图9,发光性能依然良好。

[0066] 对比例1

[0067] 本对比例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤2)中Tris改为PBS,其他条件保持一致。本对比例制得的CsPbBr₃钙钛矿纳米晶用于黄曲霉素M1的荧光免疫检测。其检测效果稍差,抗体与纳米晶结合后放置有沉淀,见图10。

[0068] 对比例2

[0069] 本对比例与实施例3基本相同,唯一不同的在于,将实施例1的步骤1)中油胺改为250μL,其他条件保持一致,本对比例制得的钙钛矿纳米晶在水中的溶解性变差,见图11,绝大部分钙钛矿纳米晶沉淀,不能在水中分散。

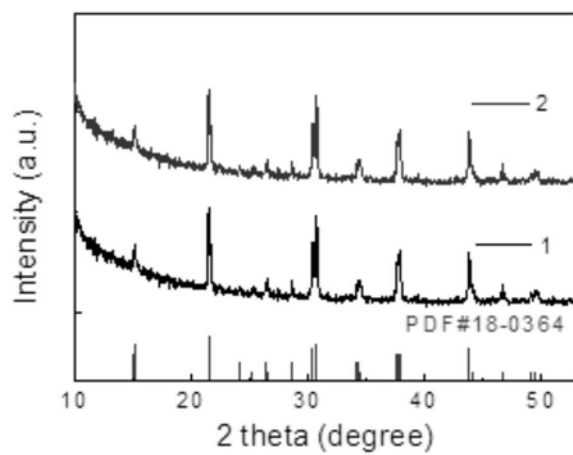


图1

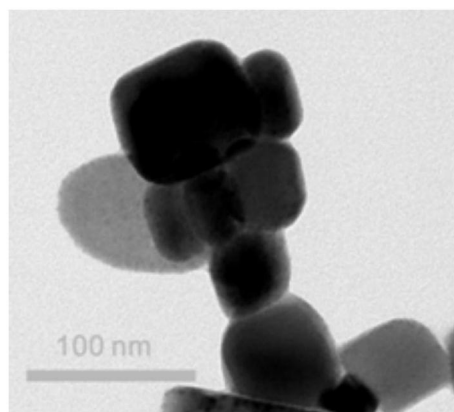


图2

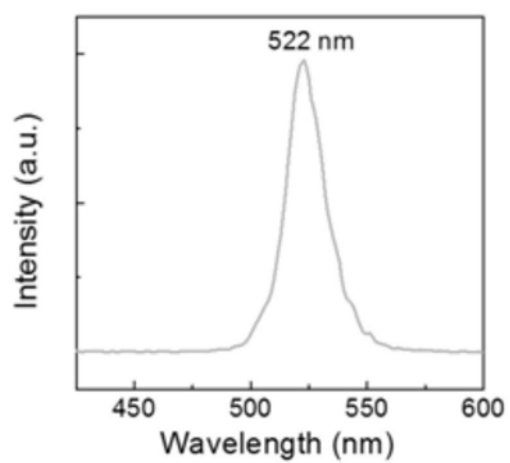


图3

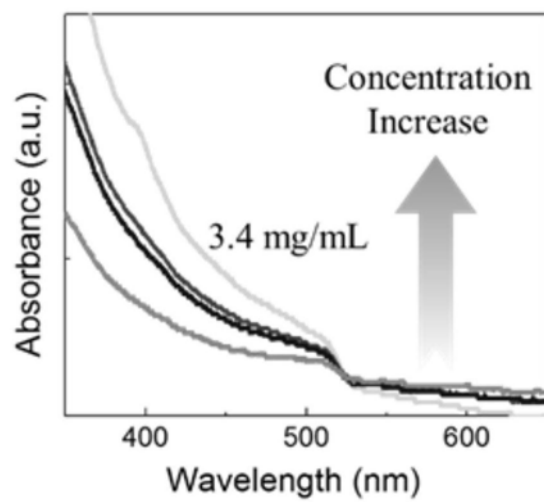


图4

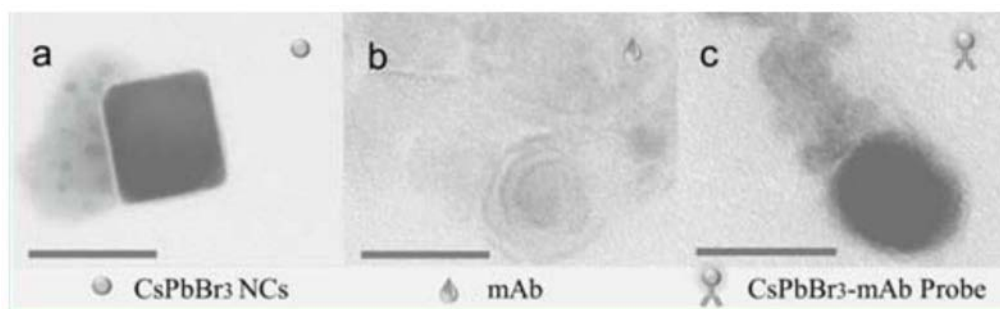


图5

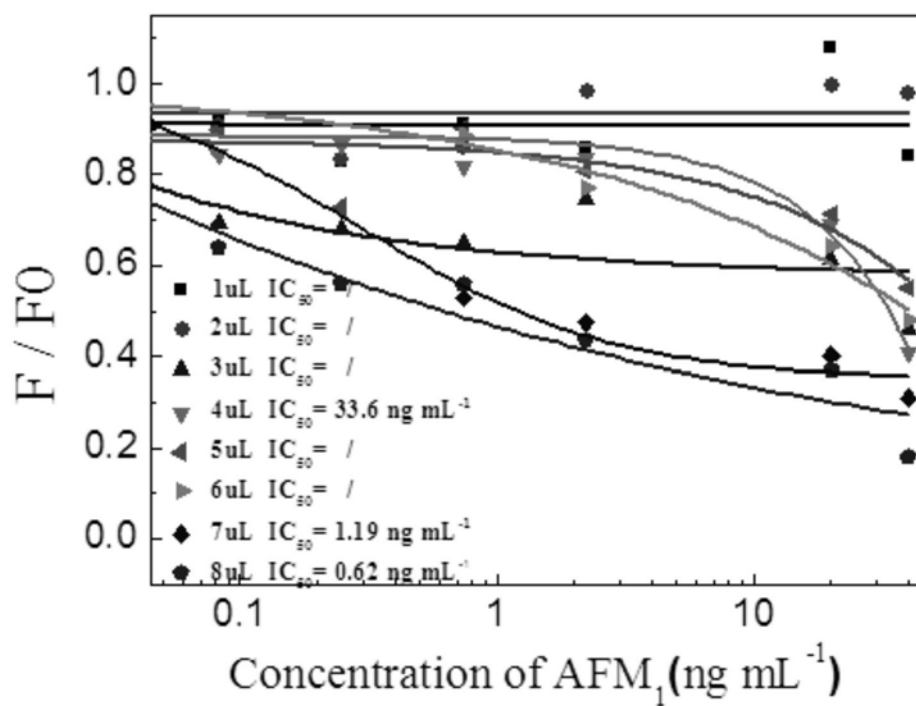


图6

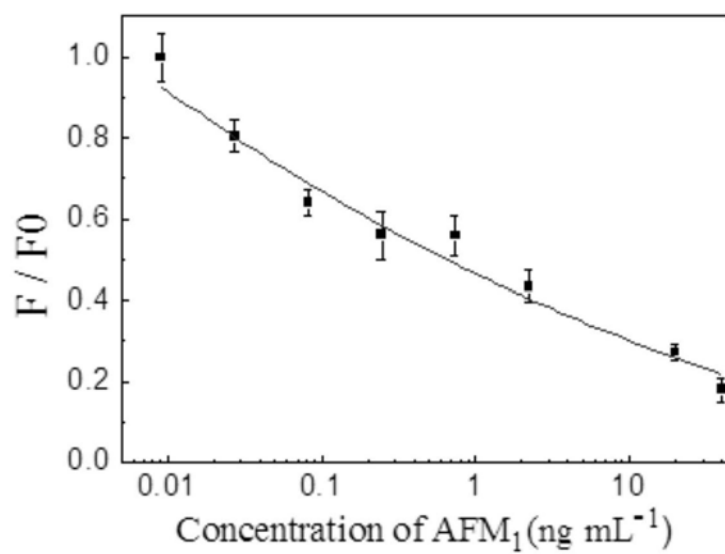


图7

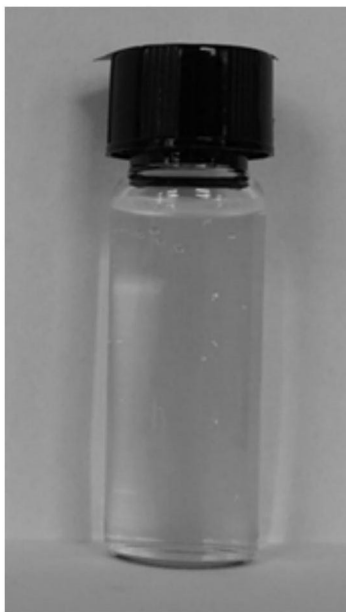


图8

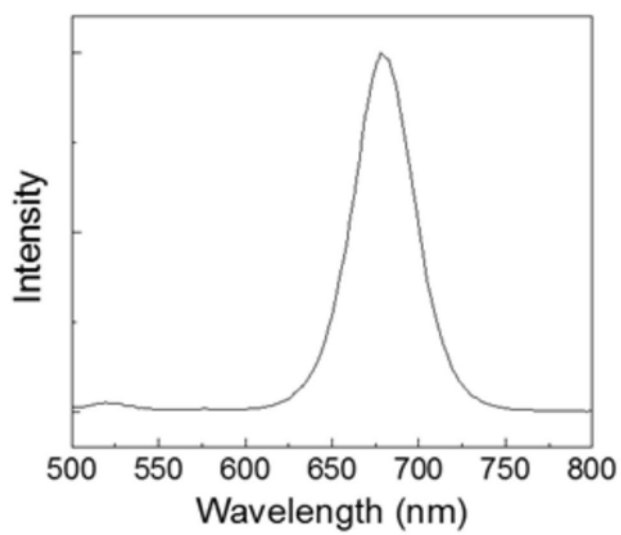


图9

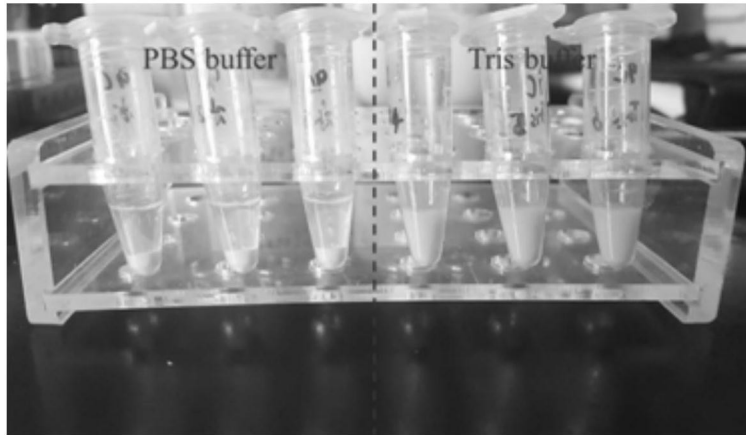


图10



图11