



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108061797 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(21)申请号 201711335100.X

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2017.12.14

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇
国家农业科技园区江苏省农业科学院
基地

(72)发明人 罗淑芬 李鹏霞 胡花丽 周宏胜
张雷刚

(74)专利代理机构 南京苏创专利代理事务所
(普通合伙) 32273

代理人 张学彪

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/552(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

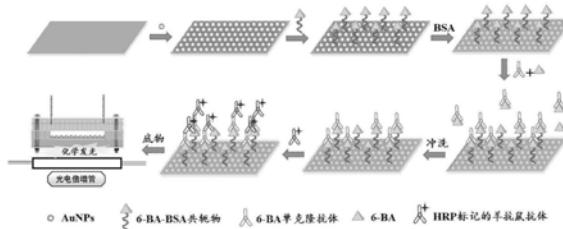
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫
传感器的制备方法及其分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测细胞分裂素6-BA的
化学发光免疫传感器的制备方法及其分析方法，
包括以下步骤：以金纳米粒子为固定载体，以共
价结合的方式，将细胞分裂素6-BA相应的包被抗
原固定于相应结合位点，从而制得该免疫传感
器；在此基础上，采用竞争免疫分析法，联合流动
注射，应用于化学发光分析，构建了一个高灵敏
的自动化化学发光免疫分析细胞分裂素6-BA的
方法。本发明具有快速，准确，样品用量少，稳定
性好，特异性高，灵敏度高等特点，可适用于植物
组织内源6-苄基腺嘌呤(6-BA)，玉米素，二氢玉
米素，激动素等细胞分裂素的测定。



1. 一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 金纳米粒子的制备

将100mL浓度为0.01%的HAuCl₄溶液煮沸，然后在搅拌的过程中，向其中加入2.5mL浓度为1%的柠檬酸三钠，继续加热10min后停止加热，待其冷却到室温后将制得的金纳米粒子分散于浓度为1%的壳聚糖醋酸缓冲液中，置于4℃下保存待用；

(2) 完全抗原制备

取2ml纯甲醇，依次向该甲醇内加入以下试剂：

2mg细胞分裂素6-BA核苷；

滴加1mL 0.01mol/L NaI0₄，室温搅拌20min；

180μL 0.1mol/L乙二醇，室温搅拌10min；

滴加2mL蛋白溶液，所述蛋白溶液中含有10mg牛血清蛋白或10mg卵清蛋白；

滴加浓度为5%的K₂CO₃调反应液pH至9.3，室温搅拌反应液1h；

2mg NaBH₄，每30min加1mg，于4℃下搅拌；

滴加浓度为0.1mol/L HC1调反应液pH至6.5，搅拌反应液1h；

将上述最终得到的反应液于4℃下用2.5L PBS透析，每5h更换透析液一次，透析3天后，将透析所得共轭物质存于0.01mmol/L PBS (pH 7.4) 中，于-20℃下保存，所述共轭物质即为包被抗原；

(3) 化学发光免疫传感器的组装

用环氧硅烷化的载玻片作为固相载体，将步骤(1)中以壳聚糖分散的金纳米粒子溶液滴涂于载玻片表面并置于4℃下晾干后，将待测抗原对应上述步骤(2)中所制得的包被抗原滴涂于该晾干后的载玻片表面，再将该载玻片置于4℃下反应过夜，然后将其冲洗干净后，用牛血清蛋白将该载玻片上的剩余活性位点封闭，即为免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于：用于制备金纳米粒子的所有玻璃器皿在使用前用王水浸泡，清洗干净并干燥后使用。

3. 根据权利要求1所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于：步骤(3)中，固相载体的环氧硅烷化方法为：将载玻片置于水虎鱼酸(H₂SO₄:H₂O₂=7:3, v:v)中浸泡后用去离子水冲洗；将冲洗干净的载玻片置于氮气气氛中吹干后置于含1%GPTMS的甲苯溶液中浸泡，然后依次用甲苯和无水乙醇洗脱载玻片上吸附的GPTMS，最后再将该载玻片置于氮气气氛中吹干。

4. 根据权利要求1所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于：所述步骤(1)中，壳聚糖醋酸缓冲液分散的金纳米粒子的浓度为10μmol/L；所述步骤(2)中，包被抗原的浓度为50μg/mL。

5. 利用权利要求1的方法制得的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法，其特征在于包括如下步骤：

(1) 将上述制备的免疫传感器组装到免疫微反应器中；

(2) 利用流动注射方式，将含待测抗原的样品和相应单克隆抗体注入上述免疫微反应器，温育30min后清洗；

(3) 再向上述步骤(2)中清洗结束的免疫微反应器中加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体,温育40min后清洗;

(4) 再向上述步骤(3)中清洗结束的免疫微反应器中加入发光底物,用光电倍增管对光信号进行收集和记录。

6. 根据权利要求5所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法,其特征在于:步骤(1)中所述免疫微反应器为流通池,由带有进口和出口的聚四氟乙烯盖、硅橡胶片和透明塑胶玻璃片组成;所述聚四氟乙烯盖的长×宽×高分别为4.3cm×2.5cm×0.8cm,所述硅橡胶片的厚度为2.0mm,所述透明塑胶玻璃片厚度为5mm。

7. 根据权利要求5所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法,其特征在于:步骤(2)中所述单克隆抗体的浓度为80ng/mL。

8. 根据权利要求5所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法,其特征在于:步骤(3)中所述羊抗鼠抗体浓度为1μg/mL。

9. 根据权利要求5所述的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法,其特征在于:步骤(4)中的化学发光体系为鲁米诺-H₂O₂发光体系。

一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法 及其分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光免疫分析领域,特别涉及一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法及其分析方法。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析是将化学发光系统与免疫反应相结合,用化学发光相关的物质标记抗体或抗原,与待测的抗原或抗体反应后,经过分离游离态的化学发光标记物,加入化学发光底物产生化学发光,进行抗原或抗体的定量或定性检测。近年来,化学发光免疫分析方法由于其具有灵敏度高、特异性强、适用面广、所需设备简单、线性范围较宽等优点,日益受到人们的青睐,在生命科学、临床医学以及环境、食品等领域得到广泛应用。而在实际应用中,常常需检测低丰度分析物样品,发展高灵敏的化学发光免疫分析方法,是近年来免疫分析方法发展的主要方向;随着纳米技术的发展,纳米材料,如金纳米粒子、碳纳米管、碳纳米角、SiO₂纳米粒子及它们的复合纳米结构,已用于超灵敏免疫传感器的构建。

[0003] 细胞分裂素是一类重要的植物生长调节剂,它有许多种类,如玉米素、玉米素核糖苷,二氢玉米素、0-配糖物及其核苷,异戊烯基腺嘌呤,激动素,6-BA等。关于细胞分裂素的功能,最早发现可促进细胞分裂,后来许多研究表明,细胞分裂素也在植物发育过程中起重要作用,如控制顶端优势,根的形成,叶绿体发育,花和叶片的衰老及采后衰老等。因此,了解植物体内细胞分裂素的含量具有重要的应用价值。

[0004] 目前细胞分裂素含量的检测方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳法和电化学法等,也有文献报道了免疫分析法,但多为酶联免疫分析法,且其分析灵敏度及线性范围受到一定的限制。因此,开发一种基于纳米材料的高灵敏度自动化化学发光免疫分析方法具有广阔的应用前景。

发明内容

[0005] 技术问题:为了解决现有技术的缺陷,本发明提供了一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法及其分析方法。

[0006] 技术方案:本发明提供了一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 金纳米粒子的制备

[0008] 将100mL浓度为0.01%的HAuCl₄溶液煮沸,然后在搅拌的过程中,向其中加入2.5mL浓度为1%的柠檬酸三钠,继续加热10min后停止加热,待其冷却到室温后将制得的金纳米粒子分散于浓度为1%的壳聚糖醋酸缓冲液中,置于4℃下保存待用;

[0009] (2) 完全抗原制备

[0010] 取2ml纯甲醇,依次向该甲醇内加入以下试剂:

[0011] 2mg细胞分裂素6-BA核苷;

- [0012] 滴加1mL 0.01mol/L NaIO₄,室温搅拌20min;
- [0013] 180μL 0.1mol/L乙二醇,室温搅拌10min;
- [0014] 滴加2mL蛋白溶液,所述蛋白溶液中含有10mg牛血清蛋白或10mg卵清蛋白;
- [0015] 滴加浓度为5%的K₂CO₃调反应液pH至9.3,室温搅拌反应液1h;
- [0016] 2mg NaBH₄,每30min加1mg,于4℃下搅拌;
- [0017] 滴加浓度为0.1mol/L HC1调反应液pH至6.5,搅拌反应液1h;
- [0018] 将上述最终得到的反应液于4℃下用2.5L PBS透析,每5h更换透析液一次,透析3天后,将透析所得共轭物质存于0.01mmol/LPBS (pH 7.4) 中,于-20℃下保存,所述共轭物质即为包被抗原;
- [0019] (3)化学发光免疫传感器的组装
- [0020] 用环氧硅烷化的载玻片作为固相载体,将步骤(1)中以壳聚糖分散的金纳米粒子溶液滴涂于载玻片表面并置于4℃下晾干后,将待测抗原对应上述步骤(2)中所制得的包被抗原滴涂于该晾干后的载玻片表面,再将该载玻片置于4℃下反应过夜,然后将其冲洗干净后,用牛血清蛋白将该载玻片上的剩余活性位点封闭,即为免疫传感器。
- [0021] 作为一种优选方案:上述用于制备金纳米粒子的所有玻璃器皿在使用前用王水浸泡,清洗干净并干燥后使用。
- [0022] 为进一步优选方案:上述步骤(3)中,固相载体的环氧硅烷化方法为:将载玻片置于水虎鱼酸(H₂SO₄:H₂O₂=7:3,v:v)中浸泡后用去离子水冲洗;将洗干净的载玻片置于氮气气氛中吹干后置于含1%GPTMS的甲苯溶液中浸泡,然后依次用甲苯和无水乙醇洗脱载玻片上吸附的GPTMS,最后再将该载玻片置于氮气气氛中吹干。
- [0023] 为进一步优选方案:上述步骤(1)中,壳聚糖醋酸缓冲液分散的金纳米粒子的浓度为10μmol/L;上述步骤(2)中,包被抗原的浓度为50μg/mL。
- [0024] 本发明还包括利用上述方法制得的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法,具体包括如下步骤:
- [0025] (1)将上述制备的免疫传感器组装到免疫微反应器中;
- [0026] (2)利用流动注射方式,将含待测抗原的样品和相应单克隆抗体注入上述免疫微反应器,温育30min后清洗;
- [0027] (3)再向上述步骤(2)中清洗结束的免疫微反应器中加入辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体,温育40min后清洗;
- [0028] (4)再向上述步骤(3)中清洗结束的免疫微反应器中加入发光底物,用光电倍增管对光信号进行收集和记录。
- [0029] 作为优选方案:上述分析方法步骤(1)中的免疫微反应器为流通池,由带有进口和出口的聚四氟乙烯盖、硅橡胶片和透明塑胶玻璃片组成;该聚四氟乙烯盖的长×宽×高分别为4.3cm×2.5cm×0.8cm,硅橡胶片的厚度为2.0mm,透明塑胶玻璃片厚度为5mm。
- [0030] 为进一步优选方案:上述分析方法步骤(2)中单克隆抗体的浓度为80ng/mL。
- [0031] 为进一步优选方案:上述分析方法步骤(3)中所述羊抗鼠抗体浓度为1μg/mL。
- [0032] 为进一步优选方案:上述分析方法步骤(4)中的化学发光体系为鲁米诺-H₂O₂发光体系
- [0033] 有益效果:本发明提供的细胞分裂素6-BA检测方法与气相色谱、液相色谱法相比,

存在以下有益效果：样品用量少，成本低，灵敏度高，结果准确，操作简单、快速。

附图说明

[0034] 图1为本发明检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备和分析方法示意图；

[0035] 图2本发明的6-BA标准样品检测的曲线示意图。

具体实施方式

[0036] 下面结合附图和具体实施例，进一步阐明本发明，应理解这些实施例仅用于说明本发明而不同于限制本发明的范围，在阅读了本发明之后，本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定的范围。

[0037] 本发明包括一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法，具体步骤如下：

[0038] (1) 金纳米粒子的制备

[0039] 金纳米粒子(AuNPs)的制备依据柠檬酸盐还原法。首先，用于制备AuNPs的所有玻璃器皿在使用前用王水($\text{HNO}_3:\text{HCl} = 3:1, \text{v:v}$)浸泡，之后清洗干净并干燥。将100mL 0.01% HAuCl_4 溶液煮沸，在不断搅拌的情况下，快速加入2.5mL 1% 柠檬酸三钠。10min后溶液变为酒红色，移去热源，在室温下冷却。制备所得AuNPs分散于1%壳聚糖醋酸缓冲液中，置于4℃下保存，供后续实验使用。

[0040] (2) 完全抗原制备

[0041] 取2mg细胞分裂素6-BA核苷溶于2ml甲醇，随后逐滴加入1mL 0.01mol/L NaI O_4 ，室温下搅拌反应20min，加入180 μL 0.1mol/L乙二醇，常温搅拌10min，向反应后的溶液中逐滴加入2mL蛋白溶液[10mg牛血清蛋白(BSA)或者卵清蛋白(OVA)]，用5% K_2CO_3 调节pH至9.3，搅拌1h后，加入两个单位的1mg NaBH_4 ，每间隔30min加一个单位，并于4℃下搅拌；以0.1mol/L HCl 调节反应液pH至6.5后，搅拌反应液1h；所得反应液以2.5LPBS透析(1.5mmol/L KH_2PO_4 , 8.3mmol/L $\text{Na}_2\text{HPo}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 及154mmol/L NaCl , pH 7.5)，每5h更换透析液一次，4℃下透析3天；透析所得共轭物质(细胞分裂素与BSA的共轭物)存于0.01mmol/L PBS(pH 7.4)中，于-20℃下保存，该共轭物质即为包被抗原。

[0042] (3) 化学发光免疫传感器的组装

[0043] 如图1所示，将环氧硅烷化的载玻片作为固相载体，以壳聚糖分散的金纳米粒子滴涂于载玻片表面，于4℃下晾干后，将50 μL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 待测抗原对应包被抗原滴涂于固定有金纳米粒子的载玻片表面，4℃下反应过夜，使包被抗原固定于金纳米粒子表面，冲洗干净后，以BSA将剩余活性位点封闭，免疫传感器即制备完成。

[0044] 上述冲洗缓冲液为：含0.05% Tween-20的0.01mmol/L PBST(pH 7.4)。

[0045] 上述BSA分散于0.01mmol/L的PBS(pH 7.4)中，浓度为1% (w/v)。

[0046] 本发明还包括利用上述方法制得的检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的分析方法，其具体步骤如下：

[0047] 如图1所示，将上述步骤(3)制备得到的6-BA化学发光免疫传感器组装于免疫微反应器中，利用流动注射方式，将35 μL 含不同浓度抗原的样品和35 μL 80ng/mL相应单克隆抗

体注入免疫微反应器,使包被抗原和待测抗原与抗体进行竞争免疫反应,温育30min后清洗,再加入70 μ L 1 μ g/mL辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体(IgG-HRP)温育40min,使其形成与抗原-抗体-IgG-HRP复合物进行结合,清洗后,加入发光底物,以光电倍增管对光信号进行收集记录,建立化学发光强度与6-BA溶液浓度之间的定量关系,根据该定量关系检测待测样品中6-BA的浓度。

[0048] 不同浓度6-BA与化学发光强度对应的标准曲线,如图2所示,线性方程为:y=-0.154x+2.053,相关系数为0.996,线性范围为:0.05~92ng/mL,检测限为:0.008ng/mL。

[0049] 为考察该方法的准确性及实际应用价值,特向黄豆芽样品中加入5.0ng/mL,10.0ng/mL,20ng/mL,30ng/mL,50ng/mL6-BA标品以测定6-BA的回收率,实验步骤如下:

[0050] 1)取黄豆芽样品,稀释一倍,测定发光值;

[0051] 2)另取一份黄豆芽样品,加入同体积标品(浓度为最终加入浓度的两倍),测定发光值;

[0052] 3)加标样品发光值减去样品发光值用于计算回收率。

[0053] 测定结果如表1所示。

[0054] 实施例1

[0055] 利用本方法对江苏淮安种植的“太空莲36号”莲子进行内源6-BA检测。

[0056] (1)样品的提取

[0057] 每个平行称取2g样品,用8mL 60%的酸化甲醇超声浸提30min,重复浸提一次,离心合并上清液,于氮吹仪下将甲醇吹干。剩余水相用C18Sep-Pak固相萃取小柱纯化,首先以3mL纯净水洗脱,再以2mL甲醇洗脱,用于测定6-BA。

[0058] (2)免疫传感器的制备

[0059] 取2mg 6-BAR(6-BA次生代谢产物)逐滴加入1mL0.01mol/L NaIO₄,室温下搅拌反应20min,加入180 μ L 0.1mol/L乙二醇,常温搅拌10min,向反应后的溶液中逐滴加入2mL蛋白溶液[10mg牛血清蛋白(BSA)或者卵清蛋白(OVA)],用5%K₂CO₃调节pH至9.3,搅拌1h后,加入两个单位的1mg NaBH4,每间隔30min加一个单位,并于4℃下搅拌,以0.1mol/L HCl调节反应液pH至6.5后,搅拌反应液1h。所得反应液以2.5L PBS透析(1.5mmol/L KH₂PO₄,8.3mmol/L Na₂HPO₄.12H₂O及154mmol/L NaCl,pH 7.5),每5h更换透析液一次,4℃下透析3天。透析所得共轭物质存于0.01mmol/L PBS(pH 7.4),-20℃下。细胞分裂素与BSA的共轭物作为包被抗原。

[0060] 如图1所示,将环氧硅烷化的载玻片作为固相载体,将上述实验制备的1%壳聚糖醋酸缓冲液分散的金纳米粒子滴涂于载玻片表面,于4℃下晾干后,将50 μ L 50 μ g/mL待测抗原对应包被抗原滴涂于固定有金纳米粒子的载玻片表面,4℃下反应过夜,使包被抗原固定于金纳米粒子表面,冲洗干净后,以BSA将剩余活性位点封闭,制得免疫传感器。

[0061] (3)样品分析

[0062] 将制得的6-BA化学发光免疫传感器组装于免疫微反应器中,利用流动注射方式,将35 μ L待测样品和35 μ L 80ng/mL相应单克隆抗体注入免疫微反应器,使包被抗原和待测抗原与抗体进行竞争免疫反应,温育30min后清洗,再加入70 μ L 1 μ g/mL辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体(IgG-HRP)温育40min,使其形成与抗原-抗体-IgG-HRP复合物进行结合,清洗后,加入发光底物,以光电倍增管对光信号进行收集记录。以化学发光强度与6-BA溶液浓度

之间的线性关系计算待测样品中6-BA的浓度。

[0063] 将所提取的样品，另取一份用高效液相色谱法(HPLC)进行检测，方法参考GB/T23381-2009食品中6-苄基腺嘌呤的测定高效液相色谱法，所得结果与本方法所得结果进行对比，数据如表2所示。

[0064] 实施例2

[0065] 利用本方法对南京市苏果超市购买的“耐寒优秀”西兰花进行内源6-BA检测。

[0066] 对该西兰花进行处理的实验过程同上述处理“太空莲36号”莲子过程全部相同。

[0067] 将所提取的样品，另取一份用高效液相色谱法(HPLC)进行检测，方法参考GB/T23381-2009食品中6-苄基腺嘌呤的测定高效液相色谱法，所得结果与本方法所得结果进行对比，数据如表2所示。

[0068] 结果分析：

[0069] 由表1数据可得出，在实际样品中，本发明方法用于检测样品内的细胞分裂素6-BA含量时，其检测结果的准确性很高；

[0070] 由表2数据可得出，在实际样品中，本发明方法对待测样品内的细胞分裂素6-BA进行提取时，其提取到的细胞分裂素6-BA含量数据比HPLC法的数据高6%-10%，充分证明了本发明技术方案检测结果的准确性和灵敏性。

[0071] 表1本发明的方法对6-BA的回收率

[0072]	样品编号	加入量	回收量	回收率	相对误差
		(ng/mL)	(ng/mL)	(%)	(%)
[0073]	1	5.0	5.10	102.0	2.0
	2	10	10.32	103.2	3.2
	3	20	20.18	100.9	0.9
	4	30	29.02	96.7	-3.27
	5	50	48.85	97.7	-2.3

[0074] 表2本发明的方法与HPLC法对莲子及西兰花内源6-BA含量检测的结果对比

[0075]	样品名称	本发明检测结果	高效液相色谱法
		ug/mL	ug/mL
	莲子	4.89	4.58
	西兰花	0.163	0.152

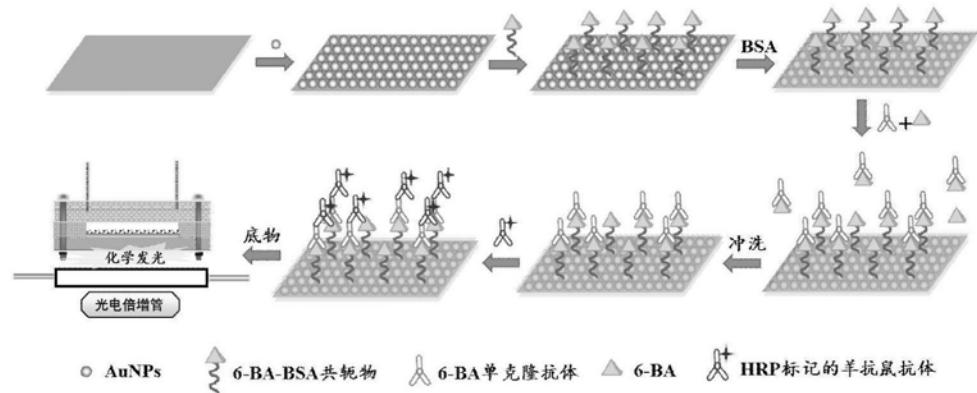


图1

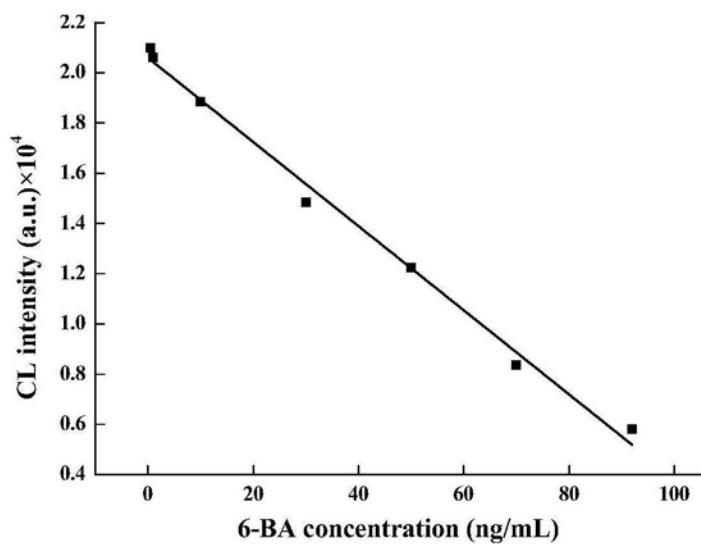


图2

专利名称(译)	一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法及其分析方法		
公开(公告)号	CN108061797A	公开(公告)日	2018-05-22
申请号	CN201711335100.X	申请日	2017-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	罗淑芬 李鹏霞 胡花丽 周宏胜 张雷刚		
发明人	罗淑芬 李鹏霞 胡花丽 周宏胜 张雷刚		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/552 G01N33/577 G01N21/76		
代理人(译)	张学彪		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种检测细胞分裂素6-BA的化学发光免疫传感器的制备方法及其分析方法，包括以下步骤：以金纳米粒子为固定载体，以共价结合的方式，将细胞分裂素6-BA相应的包被抗原固定于相应结合位点，从而制得该免疫传感器；在此基础上，采用竞争免疫分析法，联合流动注射，应用于化学发光分析，构建了一个高灵敏的自动化化学发光免疫分析细胞分裂素6-BA的方法。本发明具有快速，准确，样品用量少，稳定性好，特异性高，灵敏度高等特点，可适用于植物组织内源6-苄基腺嘌呤(6-BA)，玉米素，二氢玉米素，激动素等细胞分裂素的测定。

