



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110018308 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201910249240.8

(22)申请日 2019.03.29

(71)申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路
301号

(72)发明人 张灿 师晓漫 于欣欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

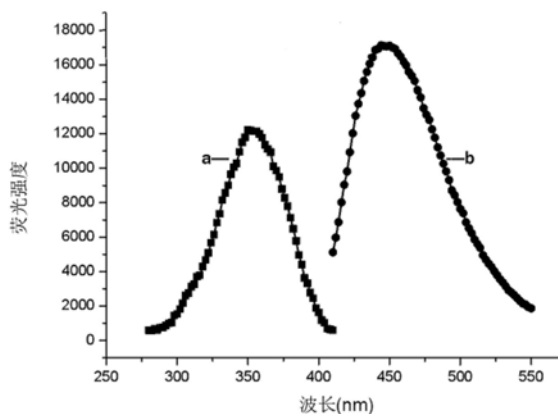
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法

(57)摘要

本发明属于荧光法快速检测技术领域,具体一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法;具体步骤为:首先合成碳量子点,然后将功能化修饰适于生物标记的纳米材料碳量子点与丙烯酰胺特异性抗体结合,制备碳量子点标记丙烯酰胺抗体,得到高效的量子点-抗体偶联复合物作为检测荧光探针,建立一种快速简便的荧光免疫分析方法应用在食品生产加工过程中丙烯酰胺的检测,为食品安全提供有效保障;本发明利用富含碳元素的前体物质柠檬酸合成碳量子点,来源广泛、成本低廉,安全环保;本发明提供的检测方法是基于酶联免疫法抗原抗体的特异性结合的原理检测丙烯酰胺,特异性较强,灵敏度较高,相比传统的酶联免疫法,检测时间缩短,检测效率提高。



1. 一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 合成碳量子点溶液;

(2) 取步骤(1)中得到的碳量子点溶液加入到的碳酸氢钠缓冲液中,搅拌,加入戊二醛溶液,搅拌,再加入的丙烯酰胺特异性抗体溶液,得到混合溶液,转移至冰浴中反应;然后加入硼氢化钠溶液,在冰浴条件下进行搅拌,然后于一定条件下静置后,再用磷酸盐缓冲液透析,得到碳量子点标记丙烯酰胺抗体溶液;

(3) 荧光免疫法检测丙烯酰胺;

S1:取丙烯酰胺半抗原与鸡卵清蛋白混合反应,得到包被原溶液,然后用碳酸盐缓冲液将包被原溶液稀释至一定浓度,得到包被原溶液稀释液,然后加入96孔黑色荧光酶标板的孔中,静置;

S2:将吐温20和磷酸盐缓冲液混合配置洗涤液,然后将洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中,把S1中得到的96孔黑色荧光酶标板放在酶标仪全自动洗板机下重复洗板,洗板后将96孔黑色荧光酶标板孔中的溶液吸干;

S3:将牛血清白蛋白溶解在磷酸盐缓冲液中配置溶液,得到封闭液,将封闭液加入到S2处理后的96孔黑色荧光酶标板孔中,于一定条件下进行静置,然后再次用酶标仪全自动洗板机进行洗板;

S4:在经过S3处理后的96孔黑色荧光酶标板中的孔中加入丙烯酰胺半抗原溶液和步骤(2)得到的碳量子点标记丙烯酰胺抗体溶液,于一定条件下进行竞争反应,得到竞争溶液;在一定的激发波长和发射波长条件下,测定96孔黑色荧光酶标板各孔中竞争溶液的荧光强度;

S5:分别以丙烯酰胺半抗原的浓度为横坐标,以步骤S4得到的荧光强度的比值为纵坐标,建立荧光酶联免疫法检测丙烯酰胺的标准曲线;进而实现对待测样品中丙烯酰胺含量的检测。

2. 根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(2)中所述碳量子点溶液的浓度为100-200mg/mL;所述碳酸氢钠缓冲液的浓度为500mM,pH=9.5;所述用戊二醛溶液的质量浓度为5%;所述硼氢化钠溶液浓度为20mg/mL;所述丙烯酰胺特异性抗体溶液的浓度为1-4mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(2)中所述碳量子点溶液、碳酸氢钠缓冲液、戊二醛溶液、丙烯酰胺特异性抗体溶液、硼氢化钠溶液的体积比为50-150:14-28:5-10:5-15:20-40。

4. 根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(2)中所述一定条件为4℃黑暗条件;所述静置时间为10-12h;所述用磷酸盐缓冲液的浓度为10mM,pH=7.4,透析时间为24-36h;所述的浓缩的方法为超滤浓缩管离心法,离心条件为:温度4℃,转速8000-10000r/min,时间15-20min。

5. 根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(3)的S1中所述的丙烯酰胺半抗原与鸡卵清蛋白用量的摩尔比为40~62:1。

6. 根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(3)的S1中所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.05mM,pH=9.6;所述包被原溶液稀释至一定浓度为5-10mg/L;所述在96孔黑色荧光酶标板中每孔加入包被原溶液稀释液的用量为100-

200uL;所述静置条件为4℃黑暗条件下存放10-12h。

7.根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(3)的S2中所述的吐温20与磷酸盐缓冲液的体积比为0.5-1:1000;所述洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中的用量为300~500mL。

8.根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(3)的S3中所述的牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的用量比为1-2g:100mL;所述在96孔黑色荧光酶标板孔中加入封闭液的体积为100-200uL;所述的一定条件为37℃黑暗条件;所述静置时间为1-2h。

9.根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(3)的S4中所述的丙烯酰胺半抗原溶液浓度为0.00032mg/L~5mg/L;所述的丙烯酰胺半抗原溶液和碳量子点标记丙烯酰胺抗体溶液的体积比为1-2:2-3。

10.根据权利要求1所述的碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法,其特征在于,步骤(3)的S4中所述的一定条件为37℃黑暗条件;竞争反应的时间为1-2h;所述最大激发波长为350nm;最大发射波长为460nm。

一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法

技术领域

[0001] 本发明属于荧光法快速检测技术领域,具体一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法。

背景技术

[0002] 丙烯酰胺是一种高水溶性的不饱和酰胺类小分子有害化合物,它广泛存在于常见的三大类加工食品中:高温加工的淀粉类食品(如薯片,最高含量至5312 $\mu\text{g/L}$)、早餐谷类食品(如面包和面包卷,含量高至3436 $\mu\text{g/L}$)、咖啡及其类似制品(如咖啡代用品,最高含量高至7300 $\mu\text{g/L}$)。食品中丙烯酰胺产生的主要途径为美拉德反应的天冬酰胺途径及甘油三酯氧化反应的丙烯醛途径;其中美拉德反应的天冬酰胺途径受到各界广泛认可。它具有神经和生殖毒性,长期接触会导致细胞DNA的损伤;同时它有较强的组织渗透性,可以通过未破损的皮肤、粘膜、肺和消化道进入人体,经口摄入为吸收丙烯酰胺最快速和最完整的途径,并且无法通过代谢排出。

[0003] 丙烯酰胺的检测方法主要有色谱法、毛细管电泳法以及生物传感器法等。这些方法灵敏度虽然高,可同时分析多种样品、检出限低、具有良好的准确度和精密度,但对样本净化要求高,前处理操作复杂,检测成本较高、时间较长,限制了此方法在现场检测丙烯酰胺的应用。而随着量子点的快速发展,量子点越来越普遍的被用作新型荧光标记物用于生物检测中,因此开展有关量子点的应用研究工作具有十分重要的意义。这主要是由于量子点本身具有的独特的光学性质,较高荧光量子产率和稳定性;而碳量子点作为一种新型的荧光碳纳米材料,合成方法简单,保持了碳材料的无毒性、生物相容性好的优点,可与生物分子有效偶联后直接用于生物标记和检测,具有较好的安全性。目前,量子点作为新型荧光标记物被用于检测丙烯酰胺的报道并不多见。其中,有学者提出了一种基于丙烯酰胺聚合CdSe/Zns量子点改变其独特光物理性质的新型荧光传感检测丙烯酰胺的方法,将N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺与量子点结合来制备功能性量子点,然后将该功能性量子点与丙烯酰胺溶液混合,并在紫外灯照射下在光引发剂存在下发生聚合;与不存在丙烯酰胺相比,量子点之间的距离增加,导致荧光强度增加。但该方法灵敏度较低。相比以上检测方法,目前最常用的方法是基于抗原抗体特异性结合的标记免疫分析技术检测丙烯酰胺。这种方法特异性强,灵敏度高,便于推广。基于以上研究基础,为了提高检测灵敏度,缩短检测时间,因此可以利用功能化水溶性荧光碳量子点与生物抗体进行偶联标记,进行荧光免疫分析,实现对丙烯酰胺的快速高灵敏的检测。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明旨在解决所述技术问题之一,提供一种量子点标记抗体检测丙烯酰胺的方法,通过优化反应条件,实现丙烯酰胺特异性抗体与量子点的偶联,建立一种新的检测丙烯酰胺的技术。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] (1) 碳量子点溶液的合成;

[0007] 首先,取柠檬酸和乙二胺溶解于水中,搅拌,得到混合溶液转移到水热反应釜中,然后置于干燥箱中加热反应,反应结束后得到粗制的碳量子点;然后加入氢氧化钠溶液和氯乙酸钠溶液,水浴超声反应,调节混合液的pH值至中性后,经透析、真空干燥浓缩后得到碳量子点溶液;

[0008] (2) 碳量子点标记丙烯酰胺抗体的制备;

[0009] 取步骤(1)中得到的碳量子点溶液加入到的碳酸氢钠缓冲液中,搅拌,加入戊二醛溶液,搅拌,再加入的丙烯酰胺特异性抗体溶液,得到混合溶液,转移至冰浴中反应;然后滴加硼氢化钠溶液,在冰浴条件下持续搅拌,然后于一定条件下静置后,再使用磷酸盐缓冲液缓冲液透析,得到碳量子点标记丙烯酰胺抗体溶液;

[0010] (3) 荧光免疫法快速检测丙烯酰胺;

[0011] 选用96孔黑色荧光酶标板,进行荧光酶联免疫分析实验:

[0012] 间接竞争荧光免疫检测步骤:

[0013] S1:包被:取丙烯酰胺半抗原与鸡卵清蛋白混合反应,得到包被原溶液,然后用碳酸盐缓冲液将包被原溶液稀释至一定浓度,得到包被原溶液稀释液,然后加入96孔黑色荧光酶标板的孔中,4℃黑暗条件下静置;

[0014] S2:洗板:将吐温20和磷酸盐缓冲液混合配置洗涤液,然后将洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中,把S1中得到的96孔黑色荧光酶标板放在酶标仪全自动洗板机下重复洗板,洗板后将96孔黑色荧光酶标板孔中的溶液吸干;

[0015] S3:封闭:将牛血清白蛋白溶解在磷酸盐缓冲液中配置溶液,得到封闭液,将封闭液加入到S2处理后的96孔黑色荧光酶标板孔中,于一定条件下进行静置,然后再次用酶标仪全自动洗板机进行洗板;

[0016] S4:竞争:在经过S3处理后的96孔黑色荧光酶标板中的孔中加入丙烯酰胺半抗原溶液和步骤(2)得到的碳量子点标记丙烯酰胺抗体溶液,于一定条件下进行竞争反应,得到竞争溶液;在一定的激发波长和发射波长条件下,测定96孔黑色荧光酶标板各孔中竞争溶液的荧光强度;

[0017] S5:绘制标准曲线:即分别以丙烯酰胺半抗原的浓度为横坐标,以步骤S4得到的荧光强度的比值为纵坐标,建立荧光酶联免疫法检测丙烯酰胺的标准曲线;进而实现对待测样品中丙烯酰胺含量的检测。

[0018] 样品检测:选取待测样品,将样品进行研磨、加入甲醇提取,离心取上清液,离心条件为:4℃,8000-10000r/min,15-20min;加入石油醚充分振荡萃取油脂,去除下层液体;然后添加不同浓度的丙烯酰胺标准品,振荡混匀;再加入对巯基苯甲酸,调pH至9.6,40℃下避光反应1h合成丙烯酰胺半抗原,振荡混匀,进行S1-S5步骤得到吸光度值,通过S6计算出该吸光度值对应的丙烯酰胺半抗原浓度,计算丙烯酰胺浓度;其中样品、甲醇、丙烯酰胺标准品与对巯基苯甲酸的用量为5g:10-20mL:5mL:4mg。

[0019] 优选的,步骤(1)中所述用柠檬酸与乙二胺和水的用量比1mol:4mol:10mL。

[0020] 优选的,步骤(1)中所述加热温度为180-200℃,反应时间为3-5h;所述水浴超声反应的时间为3-4h。

[0021] 优选的,步骤(1)中所述用氢氧化钠溶液和氯乙酸钠溶液的溶液的浓度均为0.1g/

mL。所述粗制的碳量子点溶液、氢氧化钠溶液和氯乙酸钠溶液的体积比为1:1:1。

[0022] 优选的,步骤(2)中所述碳量子点溶液的浓度为100-200mg/mL;所述碳酸氢钠缓冲液的浓度为500mM,pH=9.5;所述用戊二醛溶液的质量浓度为5%;所述硼氢化钠溶液浓度为20mg/mL;所述丙烯酰胺特异性抗体溶液的浓度为1-4mg/mL。

[0023] 优选的,步骤(2)中所述碳量子点溶液、碳酸氢钠缓冲液、戊二醛溶液、丙烯酰胺特异性抗体溶液、硼氢化钠溶液的体积比为50-150:14-28:5-10:5-15:20-40。

[0024] 优选的,步骤(2)中所述一定条件为4℃黑暗条件;所述静置时间为10-12h;所述用磷酸盐缓冲液的浓度为10mM,pH=7.4,透析时间为24-36h;所述的浓缩的方法为超滤浓缩管离心法,离心条件为4℃,8000-10000r/min,15-20min。

[0025] 优选的,步骤(3)的S1中所述的丙烯酰胺半抗原与鸡卵清蛋白用量的摩尔比为40~62:1。

[0026] 优选的,步骤(3)的S1中所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.05mM,pH=9.6;所述包被原溶液稀释至一定浓度为5-10mg/L;所述在96孔黑色荧光酶标板中每孔加入包被原溶液稀释液的用量为100-200uL;所述静置条件为4℃黑暗条件下静置10-12h。

[0027] 优选的,步骤(3)的S2中所述的吐温20与磷酸盐缓冲液的体积比为0.5-1:1000;所述洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中的用量为300~500mL。

[0028] 优选的,步骤(3)的S3中所述的牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的用量比为1-2g:100mL;所述在96孔黑色荧光酶标板孔中加入封闭液的体积为100-200uL;所述的一定条件为37℃黑暗条件;所述静置时间为1-2h。

[0029] 优选的,步骤(3)的S4中所述的丙烯酰胺半抗原溶液浓度为0.00032mg/L~5mg/L;所述的丙烯酰胺半抗原溶液和碳量子点标记丙烯酰胺抗体溶液的体积比为1-2:2-3;所述的一定条件为37℃黑暗条件;竞争反应的时间为1-2h;所述最大激发波长为350nm;最大发射波长为460nm。

[0030] 本发明的优点和效果:

[0031] (1) 本发明利用富含碳元素的前体物质柠檬酸合成碳量子点,来源广泛且成本低廉,使用的材料绿色无毒,对环境无毒副作用,通过水热法制备碳量子点工艺简单,适合规模化生产;修饰化后的量子点的荧光性能得到了明显增强,同时表现出良好的稳定性和生物相容性。

[0032] (2) 本发明的检测方法是基于酶联免疫法抗原抗体的特异性结合的原理检测丙烯酰胺,特异性较强,灵敏度较高。

[0033] (3) 本发明通过对碳量子点的合成方法进行优化,提高了碳量子点与抗体的偶联率,增强了碳量子点标记抗体的荧光值,通过荧光免疫分析检测,实现了对食品中丙烯酰胺的定性定量检测;而且本发明的检测方法相比传统的酶联免疫法,检测时间缩短,检测效率提高。

附图说明

[0034] 图1中a为实施例1制备的修饰后的碳量子点在最大激发波长下的荧光光谱图;b为实施例1制备的修饰后的碳量子点在最大发射波长下的荧光光谱图。

[0035] 图2中a为实施例1制备的粗制的碳量子点的傅里叶红外光谱图;b为实施例1制备

的修饰后的碳量子点的傅里叶红外光谱图。

[0036] 图3中a为实施例1制备的粗制的碳量子点标记丙烯酸胺抗体的荧光光谱图;b为实施例1制备的修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体的荧光光谱图。

[0037] 图4中a为实施例1制备的修饰后的碳量子点的紫外吸收光谱图;b为丙烯酸胺抗体的紫外吸收光谱图;c为修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体的紫外吸收光谱图。

[0038] 图5中a为实施例1制备的修饰后的碳量子点的荧光发射光谱图;b为修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体的荧光发射光谱图;c为紫外光照射下的修饰后的碳量子点;d为紫外光照射下的修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体。

[0039] 图6为荧光免疫法快速检测丙烯酸胺流程图。

[0040] 图7为荧光法快速检测丙烯酸胺方法的检测标准曲线。

具体实施方式

[0041] 本发明所使用的化学试剂均购买自上海国药集团化学试剂有限公司;丙烯酸胺特异性抗体、丙烯酸胺半抗原购自上海优宁维生物科技有限公司;96孔黑色荧光酶标板购自丹麦Nunc公司;酶标仪全自动洗板机购自美国Thermo公司;全自动酶标仪购自瑞士Tecan公司。

[0042] 实施例1:

[0043] (1) 碳量子点的合成:取柠檬酸、乙二醇溶解于超纯水中,柠檬酸、乙二醇和水的用量比1mol:4mol:10mL;室温下磁力搅拌30min;然后,将溶液转移到50mL聚四氟乙烯水热反应釜中并在电热恒温鼓风干燥箱中180℃加热5h。待反应溶液缓慢冷却至室温,回收反应釜中得到的粗制的碳量子点;然后,将5mL粗制的碳量子点与5mL含氢氧化钠和氯乙酸钠水溶液混合,其中氯乙酸钠水溶液的浓度为0.1g/mL;水浴超声3h;然后用稀HCl调节pH值至中性后,用分子截留量为1kDa的透析袋透析24h,经透析、真空干燥浓缩后得到碳量子点溶液,即得到荧光增强的修饰后的碳量子点;

[0044] (2) 碳量子点标记丙烯酸胺抗体:分别取粗制的碳量子点和修饰后的碳量子点1mL,然后与280μL的碳酸氢钠缓冲液(500mM,pH值9.5)搅拌混合,搅拌的同时,将100μL稀释好的5%的戊二醛水溶液滴加到碳量子点混合溶液中,在室温下搅拌1h后将其转移至冰浴中;加入100μL2.4mg/mL的丙烯酸胺多克隆抗体溶液,磁力搅拌反应1h,最后将400μL,20mg/mL的新鲜制备硼氢化钠溶液滴加到上述反应物中,在冰浴下持续搅拌1h,颜色变浅,将还原反应物保持在4℃下静置12h后得到碳量子点偶联丙烯酸胺抗体溶液;碳量子点偶联丙烯酸胺抗体溶液用1×磷酸盐缓冲液透析24h,超滤浓缩管离心法浓缩,离心条件为4℃,8000r/min离心20min,得到粗制的碳量子点标记丙烯酸胺抗体和修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体,使用前保存于4℃黑暗条件下;

[0045] (3) 荧光免疫法快速检测丙烯酸胺:选用96孔黑色荧光酶标板,选用96孔黑色荧光酶标板,取丙烯酸胺半抗原与鸡卵清蛋白混合反应,得到包被原溶液,丙烯酸胺半抗原与鸡卵清蛋白用量的摩尔比为40:1;然后用碳酸盐缓冲液将包被原溶液稀释至10mg/L,在96孔黑色荧光酶标板中每孔加入包被原溶液稀释液的用量为100μL;然后将吐温20和磷酸盐缓冲液混合配置洗涤液,然后取300mL的洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中,在酶标仪全自动洗板机上用洗涤液将96孔黑色荧光酶标板洗三遍,吸干;将2g的牛血清白蛋白溶解在100mL

的磷酸盐缓冲液中配置溶液,得到封闭液,然后在上述96孔黑色荧光酶标板空中加入200uL封闭液,37℃下静置1h;竞争:取100uL碳量子点标记丙烯酸胺抗体与100uL梯度稀释的浓度为5mg/L、1mg/L、0.2mg/L、0.04mg/L、0.008mg/L、0.0016mg/L、0.00032mg/L的丙烯酸胺半抗原溶液等体积加入酶标板中,以磷酸盐缓冲液为空白,以碳量子点标记抗体为对照,37℃下反应1h。测定:将96孔黑色荧光酶标板中得到的竞争液体吸出100uL,用全自动酶标仪在最大激发波长和最大发射波长下读取各孔荧光强度,绘制标准曲线。

[0046] 应用检测:荧光法快速检测丙烯酸胺应用于实际样品中的检测

[0047] 选择市售薯片为实际的样品检测样品,每样样品称取5g,加入20mL甲醇超声浸提15min,涡旋振荡2min,然后8000r/min离心15min。取上清液于分液漏斗中,加入20mL的石油醚充分振荡萃取油脂,去下层液体。分装于试管中,然后添加0.25、0.5、1mg/L三种不同浓度的丙烯酸胺标准品,振荡混匀。

[0048] 分别取1mL上述溶液,用于HPLC检测;另分别取5mL上述溶液,加入4mg对巯基苯甲酸,调pH至9.6,40℃下避光反应1h合成丙烯酸胺半抗原(其衍生率约为89.2%),振荡混匀,用荧光酶联免疫分析对衍生物进行检测,根据衍生率从而计算丙烯酸胺的含量。

[0049] 本实施例中同时采用了高效液相色谱法和荧光免疫分析法分析验证了添加样品回收率的测定,如表1;

[0050] 表1:高效液相色谱法(HPLC)和荧光免疫分析法(FLISA)检测薯片中丙烯酸胺的回收率实验

[0051]

样品	加标前 丙烯酸 胺浓度 (mg/L)	加标量 (mg/L)	HPLC (mg/L) (mean±SD;n=3)	回收率 (%)	FLISA (mg/L) (mean±SD;n=3)	回收率 (%)
市售 薯片 1	0.0336	0.25	0.2557±0.0123	79.7~88.84	0.2568±0.023	76.1~89.2 8
		0.5	0.4374±0.0139		0.4559±0.021	
		1	0.8306±0.047		0.7946±0.07	
市售 薯片 2	0.05	0.25	0.2826±0.041	73.92~93.04	0.2681±0.0125	81.2~87.2 4
		0.5	0.4196±0.0147		0.456±0.0613	
		1	0.8138±0.047		0.886±0.0865	

[0052] 说明:实验数据以平均值±标准差表示(mean±SD;n=3)

[0053] 如表1所示,可以看出高效液相色谱法和荧光酶联免疫分析法检测薯片中丙烯酸胺的回收率检测结果具有良好的一致性;结果表明,该荧光酶联免疫分析法能有效实现对食品中丙烯酸胺的快速检测。

[0054] 实施例2:

[0055] (1) 碳量子点的合成:取柠檬酸、乙二醇溶解于超纯水中,柠檬酸、乙二醇和水的用量比1mol:4mol:10mL;室温下磁力搅拌30min;然后,将溶液转移到50mL聚四氟乙烯水热反应釜中并在电热恒温鼓风干燥箱中200℃加热3h,待反应溶液缓慢冷却至室温,回收反应釜中得到的粗制的碳量子点;然后,将5mL粗制的碳量子点与5mL含氢氧化钠和5mL氯乙酸钠水溶液混合,其中氯乙酸钠水溶液的浓度为0.1g/mL;水浴超声4h;然后用稀HCl调节pH值至

中性后,用分子截留量为1kDa的透析袋透析24h,经透析、真空干燥浓缩后得到碳量子点溶液,即得到荧光增强的修饰后的碳量子点;

[0056] (2) 碳量子点标记丙烯酸胺抗体:分别取粗制的碳量子点溶液和修饰后的碳量子点溶液2mL,然后与300 μ L的碳酸氢钠缓冲液(500mM,pH值9.5)搅拌混合,搅拌的同时,加入150 μ L的5%的戊二醛水溶液,在室温下搅拌1h后将其转移至冰浴中;加入200 μ L 2.4mg/mL的丙烯酸胺多克隆抗体溶液,磁力搅拌反应1h,最后将600 μ L 20mg/mL的新鲜制备硼氢化钠溶液滴加到上述反应物中,在冰浴下持续搅拌1h,颜色变浅,将还原反应物保持在4 $^{\circ}$ C下静置10h后得到碳量子点偶联丙烯酸胺抗体溶液;碳量子点偶联丙烯酸胺抗体溶液用1 $\times$ 磷酸盐缓冲液透析30h,超滤浓缩管离心法浓缩,离心条件为4 $^{\circ}$ C,9000r/min离心15min,得到粗制的碳量子点标记丙烯酸胺抗体和修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体,使用前保存于4 $^{\circ}$ C黑暗条件下;

[0057] (3) 荧光免疫法快速检测丙烯酸胺:选用96孔黑色荧光酶标板,取丙烯酸胺半抗原与鸡卵清蛋白混合反应,得到包被原溶液,丙烯酸胺半抗原与鸡卵清蛋白用量的摩尔比为50:1;然后用碳酸盐缓冲液将包被原溶液稀释至8mg/L,在96孔黑色荧光酶标板中每孔加入包被原溶液稀释液的用量为150 μ L;然后将吐温20和磷酸盐缓冲液混合配置洗涤液,然后取400mL的洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中,将96孔黑色荧光酶标板洗三遍,吸干;将1g的牛血清白蛋白溶解在100mL的磷酸盐缓冲液中配置溶液,得到封闭液,然后在上述96孔黑色荧光酶标板空中加入200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C下静置1h;竞争:取100 μ L碳量子点标记丙烯酸胺抗体与100 μ L梯度稀释的浓度为5mg/L、1mg/L、0.2mg/L、0.04mg/L、0.008mg/L、0.0016mg/L、0.00032mg/L的丙烯酸胺半抗原溶液等体积加入酶标板中,以磷酸盐缓冲液为空白,以碳量子点标记抗体为对照,37 $^{\circ}$ C下反应1h;测定:将96孔黑色荧光酶标板中得到的竞争液体吸出100 μ L,用全自动酶标仪在最大激发波长和最大发射波长下读取各孔荧光强度,绘制标准曲线。

[0058] 实施例3:

[0059] (1) 碳量子点的合成:取柠檬酸、乙二胺溶解于超纯水中,柠檬酸、乙二胺和水的用量比1mol:4mol:10mL;室温下磁力搅拌30min;然后,将溶液转移到50mL聚四氟乙烯水热反应釜中并在电热恒温鼓风干燥箱中200 $^{\circ}$ C加热3h,待反应溶液缓慢冷却至室温,回收反应釜中得到的粗制的碳量子点;然后,将5mL粗制的碳量子点与5mL含氢氧化钠和5mL氯乙酸钠水溶液混合,其中氯乙酸钠水溶液的浓度为0.1g/mL;水浴超声4h;然后用稀HCl调节pH值至中性后,用分子截留量为1kDa的透析袋透析24h,经透析、真空干燥浓缩后得到碳量子点溶液,即得到荧光增强的修饰后的碳量子点;

[0060] (2) 碳量子点标记丙烯酸胺抗体:分别取粗制的碳量子点溶液和修饰后的碳量子点溶液3mL,然后与560 μ L的碳酸氢钠缓冲液(500mM,pH值9.5)搅拌混合,搅拌的同时,加入200 μ L的5%的戊二醛水溶液,在室温下搅拌1h后将其转移至冰浴中;加入300 μ L 2.4mg/mL的丙烯酸胺多克隆抗体溶液,磁力搅拌反应1h,最后再加入800 μ L浓度为20mg/mL的新鲜制备硼氢化钠溶液,在冰浴下持续搅拌1h,颜色变浅,将还原反应物保持在4 $^{\circ}$ C下静置10h后得到碳量子点偶联丙烯酸胺抗体溶液;碳量子点偶联丙烯酸胺抗体溶液用1 $\times$ 磷酸盐缓冲液透析30h,超滤浓缩管离心法浓缩,离心条件为4 $^{\circ}$ C,10000r/min离心15min,得到粗制的碳量子点标记丙烯酸胺抗体和修饰后的碳量子点标记丙烯酸胺抗体,使用前保存于4 $^{\circ}$ C黑暗条件

下;

[0061] (3) 荧光免疫法快速检测丙烯酰胺: 选用96孔黑色荧光酶标板, 取丙烯酰胺半抗原与鸡卵清蛋白混合反应, 得到包被原溶液, 丙烯酰胺半抗原与鸡卵清蛋白用量的摩尔比为62:1; 然后用碳酸盐缓冲液将包被原溶液稀释至5mg/L, 在96孔黑色荧光酶标板中每孔加入包被原溶液稀释液的用量为200uL; 然后将吐温20和磷酸盐缓冲液混合配置洗涤液, 然后取500mL的洗涤液加入酶标仪全自动洗板机中, 将96孔黑色荧光酶标板洗三遍, 吸干; 将1g的牛血清白蛋白溶解在100mL的磷酸盐缓冲液中配置溶液, 得到封闭液, 然后在上述96孔黑色荧光酶标板空中加入200uL封闭液, 37℃下静置1h; 竞争: 取100uL碳量子点标记丙烯酰胺抗体与100uL梯度稀释的浓度为5mg/L、1mg/L、0.2mg/L、0.04mg/L、0.008mg/L、0.0016mg/L、0.00032mg/L的丙烯酰胺半抗原溶液等体积加入酶标板中, 以磷酸盐缓冲液为空白, 以碳量子点标记抗体为对照, 37℃下反应1h; 测定: 将96孔黑色荧光酶标板中得到的竞争液体吸出100uL, 用全自动酶标仪在最大激发波长和最大发射波长下读取各孔荧光强度, 绘制标准曲线。

[0062] 图1中a为实施例1制备的修饰后的碳量子点在最大激发波长下的荧光光谱图; b为实施例1制备的修饰后的碳量子点在最大发射波长下的荧光光谱图; 由图1可以看出, 修饰后碳量子点的最大激发波长为350nm, 最大发射波长为444nm, 该量子点具有窄而强的荧光发射;

[0063] 图2中a为实施例1制备的粗制的碳量子点的傅里叶红外光谱图; b为实施例1制备的修饰后的碳量子点的傅里叶红外光谱图; 由图2可以看出, 修饰后的碳量子点在 1648cm^{-1} , 3108cm^{-1} (N-H振动峰) 处特征峰较强, 表明该碳量子点表面富含氨基, 使得该量子点具有更好的生物相容性, 提高了碳量子点的生物偶联率, 增强了碳量子点标记抗体的荧光强度;

[0064] 图3中a为实施例1制备的粗制的碳量子点标记丙烯酰胺抗体的荧光光谱图; b为实施例1制备的修饰后的碳量子点标记丙烯酰胺抗体的荧光光谱图; 由图3可以看出, 修饰后的碳量子点标记抗体荧光强度远远高于粗制的碳量子点标记抗体的荧光强度, 可能是由于修饰后的碳量子点表面氨基基团的明显增强, 使碳量子点更易与抗体进行偶联, 使标记物荧光信号明显增强;

[0065] 图4中a为实施例1制备的修饰后的碳量子点的紫外吸收光谱图; b为丙烯酰胺抗体的紫外吸收光谱图; c为修饰后的碳量子点标记丙烯酰胺抗体的紫外吸收光谱图; 由图4可以看出, 修饰后的碳量子点与抗体偶联后的紫外吸收峰包含了抗体的和碳量子点的紫外特征峰, 这一结果初步说明碳量子点与抗体偶联成功;

[0066] 图5中a为实施例1制备的修饰后的碳量子点的荧光发射光谱图; b为修饰后的碳量子点标记丙烯酰胺抗体的荧光发射光谱图; c为紫外光照射下的修饰后的碳量子点; d为紫外光照射下的修饰后的碳量子点标记抗体溶液; 由图5可以看出, 图中离心管中的修饰后的碳量子点和修饰后的碳量子点标记抗体溶液在紫外光照射下均具有较好的荧光。而且由图5也可以看出碳量子点标记抗体的最大发射波长在460nm, 相比于碳量子点原来的最大发射波长444nm发生红移, 而红移可能由量子点效应造成的, 功能化的碳量子点相对于非功能化的碳量子点尺寸的增加, 这一发现表明抗体与碳量子点偶联成功;

[0067] 图6为荧光免疫法快速检测丙烯酰胺流程图, 由图6可以看出, 该荧光免疫法用时较短, 操作简单;

[0068] 图7为荧光法快速检测丙烯酰胺方法的检测标准曲线,由图7可以看出,该曲线呈现良好的线性关系。

[0069] 说明:以上实施例仅用以说明本发明而并非限制本发明所描述的技术方案;因此,尽管本说明书参照上述的各个实施例对本发明已进行了详细的说明,但是本领域的普通技术人员应当理解,仍然可以对本发明进行修改或等同替换;而一切不脱离本发明的精神和范围的技术方案及其改进,其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

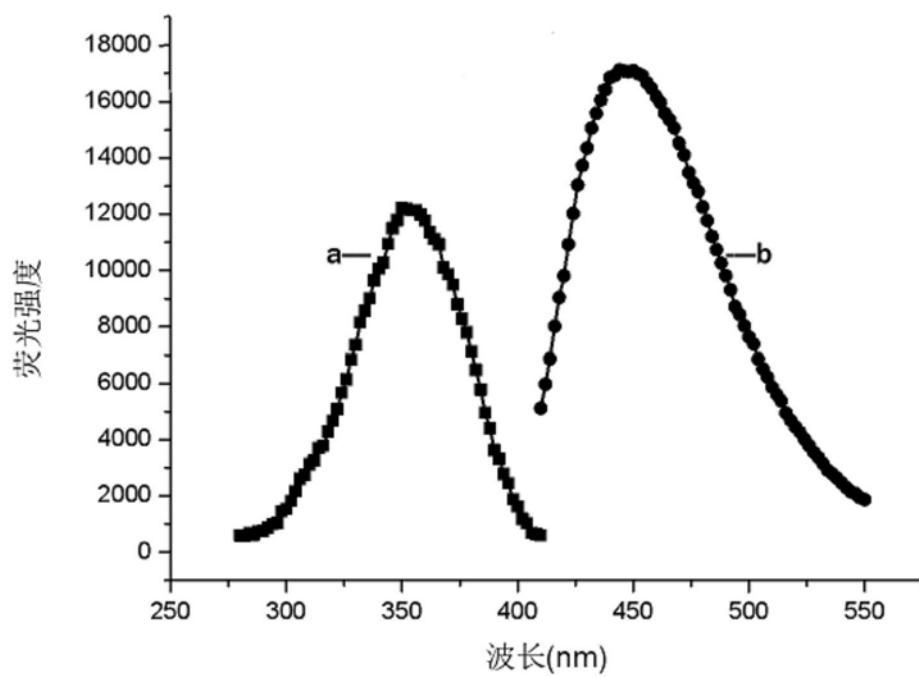


图1

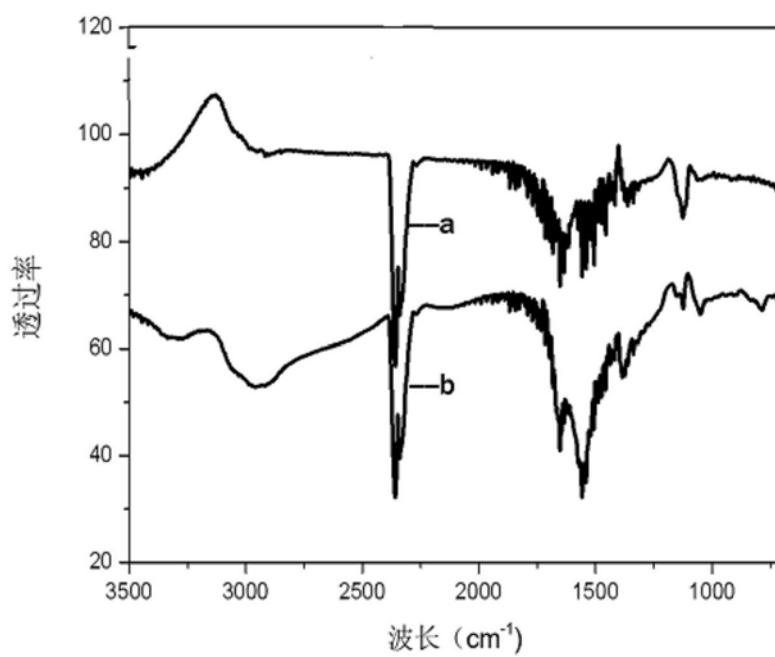


图2

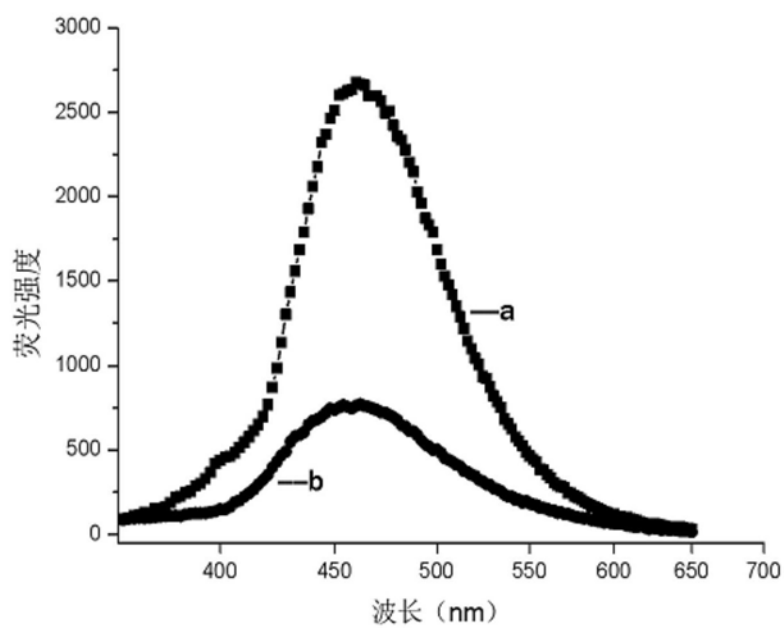


图3

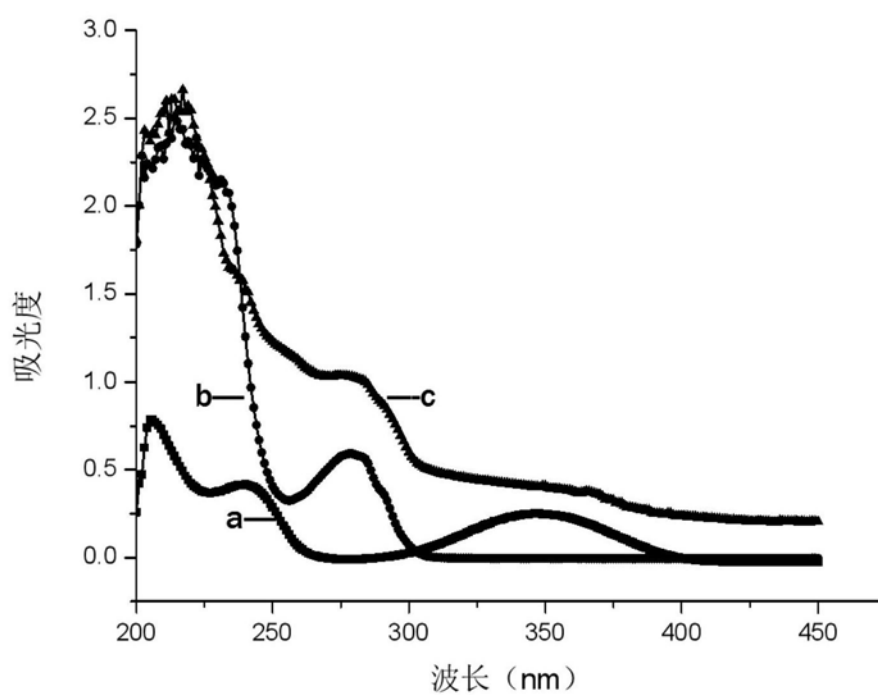


图4

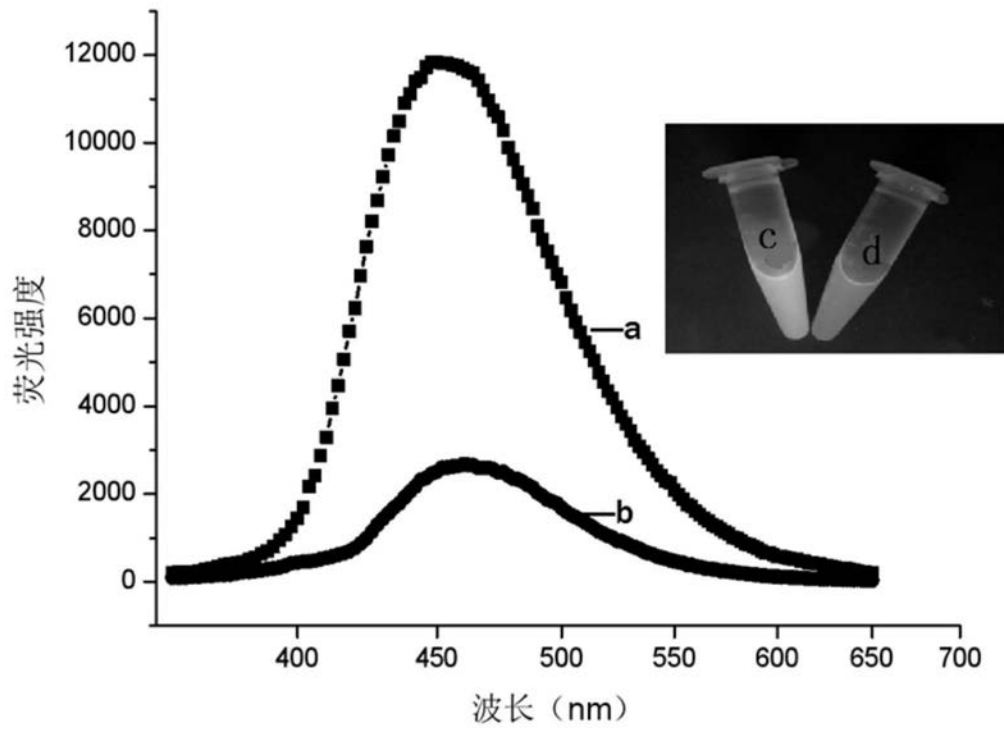


图5

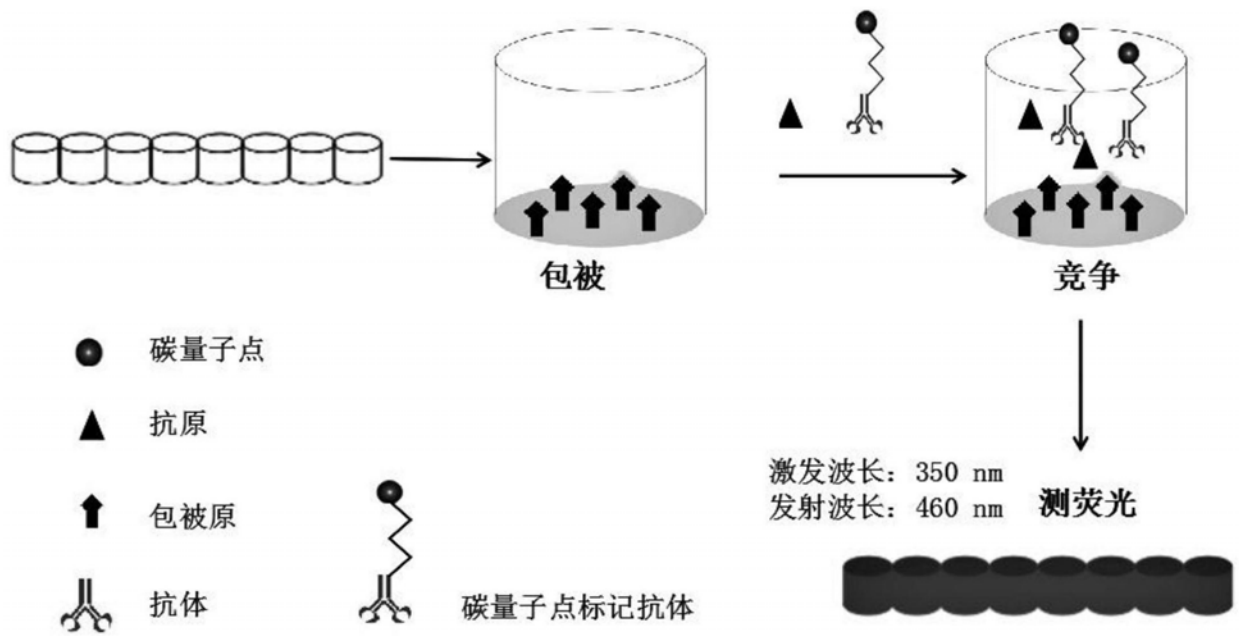


图6

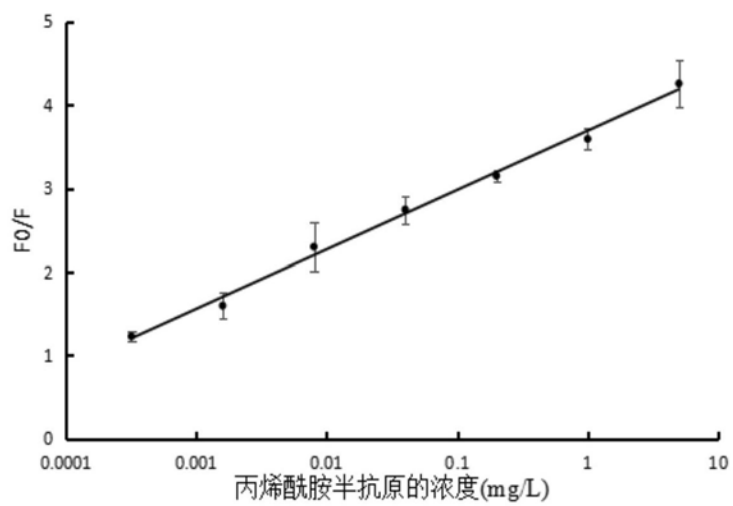


图7

专利名称(译)	一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法		
公开(公告)号	CN110018308A	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201910249240.8	申请日	2019-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	张灿 于欣欣		
发明人	张灿 师晓漫 于欣欣		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/582		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于荧光法快速检测技术领域，具体一种碳量子点荧光免疫法快速检测丙烯酰胺的方法；具体步骤为：首先合成碳量子点，然后将功能化修饰适于生物标记的纳米材料碳量子点与丙烯酰胺特异性抗体结合，制备碳量子点标记丙烯酰胺抗体，得到高效的量子点-抗体偶联复合物作为检测荧光探针，建立一种快速简便的荧光免疫分析方法应用在食品生产加工过程中丙烯酰胺的检测，为食品安全提供有效保障；本发明利用富含碳元素的前体物质柠檬酸合成碳量子点，来源广泛、成本低廉，安全环保；本发明提供的检测方法是基于酶联免疫法抗原抗体的特异性结合的原理检测丙烯酰胺，特异性较强，灵敏度较高，相比传统的酶联免疫法，检测时间缩短，检测效率提高。

