



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109839500 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201711188784.5

(22)申请日 2017.11.24

(71)申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路17号

(72)发明人 江海洋 彭涛 沈建忠 王战辉

温凯 王见一 史为民 李建成

孙淑娟

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 王春霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法。所述分析方法以蛋白包裹的荧光金纳米簇作为荧光信号探针,是酶标抗原上的葡萄糖氧化酶催化底物葡萄糖产生过氧化氢使体系中荧光金纳米簇的荧光猝灭,利用目标物和酶标抗原竞争结合在微孔板上的抗体,从而使体系的荧光发射光谱发生变化,可用于灵敏定量检测目标物分子。本发明所采用的荧光金纳米簇对葡萄糖氧化酶响应灵敏,同时免标记技术使荧光金纳米簇在本体系应用中的可控性、稳定性得到大大提高。本方法所构建的体系具有操作简便、灵敏度高、稳定性好、成本低廉等优点,可应用于灵敏定量检测动物饲料中的喹乙醇残留。

1. 一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法,包括如下步骤:

(1) 向培养板中加入包被原进行包被,再加入目标物分子的单克隆抗体进行反应,然后加入封闭液进行封闭处理;

(2) 分别向所述培养板中加入葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物和所述目标物分子的标准溶液进行反应;

(3) 向所述培养板中加入葡萄糖溶液进行反应;

(4) 向所述培养板中加入荧光金纳米簇和硫酸亚铁溶液进行反应;

(5) 测定所述培养板中的混合液在365nm激发波长下,650nm波长处的荧光强度变化;根据所述目标物分子的标准溶液的浓度与其荧光强度的变化值,制作标准曲线;

(6) 分别向所述培养板中加入所述葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物和待测样品的提取液进行反应;重复步骤(3)-(5),得到在365nm激发波长下,650nm波长处的荧光强度变化值,再根据所述标准曲线,即得到所述待测样品的提取液中所述目标物分子的浓度。

2. 根据权利要求1所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:所述目标物分子为喹噁啉类药物;

所述待测样品为饲料或肉制品。

3. 根据权利要求2所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:所述喹噁啉类药物为喹乙醇。

4. 根据权利要求3所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:所述葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物为葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物,按照如下方法制备:

所述喹乙醇和琥珀酸酐进行反应,向所述反应后的体系中加入水经冷却出现沉淀物,离心收集沉淀;所述沉淀与碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行反应,然后加入葡萄糖氧化酶的溶液进行反应,即得所述葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物。

5. 根据权利要求4所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:所述喹乙醇与所述葡萄糖氧化酶的摩尔比为10~33:1;

采用PBS缓冲液配制所述葡萄糖氧化酶的溶液。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:所述荧光金纳米簇为蛋白包裹的荧光金纳米簇;

所述蛋白包裹的荧光金纳米簇是按照包括如下步骤的方法制备的:

将所述蛋白和氯金酸溶液等体积混合进行反应,然后加入NaOH溶液,继续反应即得;

所述蛋白的浓度为50mg/ml,所述氯金酸溶液的质量百分含量为0.5%;

所述NaOH溶液的加入量为所述蛋白和所述氯金酸溶液的总体积的1/10;

所述蛋白为牛血清白蛋白。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤(2)中,所述目标物分子的标准溶液的浓度为0~200μg/l。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤(3)中,所述葡萄糖溶液的浓度为0.8~1.2mg/ml。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的免标记荧光酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤(4)中,所述硫酸亚铁溶液的浓度为450~500μM。

一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法,属于纳米生物传感以及食品安全兽药检测领域。

背景技术

[0002] 荧光金纳米簇是以金属为核、有机配体为壳的粒径为0.2~3nm的核壳型结构,由于其粒径接近于电子的费米波长,性质介于单原子和较大的纳米粒子之间,呈现良好的光学性质,如发光性能好、光稳定性高、斯托克斯位移大、荧光量子产率高等,合成方法简便且绿色无污染。荧光金纳米簇作为一种新型的荧光纳米材料成为研究热点,而且已被广泛应用于催化、生物医药、生物检测等领域。但是在免疫分析检测中,因为其粒径小,和生物识别材料偶联后不易纯化,所以很难将其作为荧光标记物用于免疫分析检测中。根据文献报道,葡萄糖氧化酶是一种稳定性高、催化效率好、成本低廉的常用酶,它可以催化葡萄糖产生过氧化氢,再加入亚铁离子后发生芬顿反应产生大量羟基自由基,可以有效地猝灭荧光金纳米簇的荧光。

[0003] 喹乙醇属于喹噁啉类化合物,因为它具有提高饲料转化效率、加速动物生长和防止动物细菌疾病等功能,常以饲料添加或口服形式被用于动物养殖业中。喹乙醇在动物体内以原形或代谢物形式残留或经粪尿、饲料等形式排入生态环境,对生物和水体造成污染,进而通过食物链传递对人类健康产生潜在危害。鉴于此,欧盟于1998年禁止喹乙醇使用。但因为经济利益的驱使且上级缺乏有效的检测体系,目前养殖业仍存在喹乙醇的非法使用现象。为此国内外研究者相继建立了一些检测喹乙醇的技术方法,如色谱技术、酶联免疫吸附法、免疫层析法等。但是这些方法都存在一些不可避免的缺点,所以建立一种检测喹乙醇的新方法实现对该药物的超灵敏定量检测有助于监控其在动物养殖业中的使用,为我国的生态环境和动物性食品安全保驾护航。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法,本发明采用荧光金纳米簇作为一种新型的荧光纳米材料应用于免疫分析检测中,提高了分析方法的灵敏度、可控性和稳定性。

[0005] 本发明提供的基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法,包括如下步骤:制备荧光金纳米簇;合成葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物作为酶标抗原;构建荧光酶联免疫分析体系。

[0006] 具体地,所述免标记荧光酶联免疫分析方法包括如下步骤:

[0007] (1) 向培养板中加入包被原进行包被,再加入目标物分子的单克隆抗体进行反应,然后加入封闭液进行封闭处理;

[0008] (2) 分别向所述培养板中加入葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物和所述目标物分子的标准溶液进行反应;

- [0009] (3) 向所述培养板中加入葡萄糖溶液进行反应；
- [0010] (4) 向所述培养板中加入荧光金纳米簇和硫酸亚铁溶液进行反应；
- [0011] (5) 测定所述培养板中的混合液在365nm激发波长下,650nm波长处的荧光强度；根据所述目标物分子的标准溶液的浓度与其荧光强度的变化值,制作标准曲线；
- [0012] (6) 分别向所述培养板中加入所述葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物和待测样品的提取液进行反应；重复步骤(3)-(5),得到在365nm激发波长下,650nm波长处的荧光强度变化值,再根据所述标准曲线,即得到所述待测样品的提取液中所述目标物分子的浓度。
- [0013] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,步骤(1)中,采用碳酸盐缓冲液(0.01M、pH9.6)稀释所述包被原至浓度可为20 μ g/ml,可在4 $^{\circ}$ C包被过夜；
- [0014] 所述包被原可为Protein A。
- [0015] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,所述目标物分子可为喹噁啉类药物；
- [0016] 所述喹噁啉类药物具体可为喹乙醇；
- [0017] 所述待测样品可为饲料或肉制品,如鱼肉制品、鸡肉制品等。
- [0018] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,步骤(1)中,所述封闭液可采用牛血清白蛋白溶液,如在37 $^{\circ}$ C封闭1小时。
- [0019] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,所述葡萄糖氧化酶-目标物分子复合物可为葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物,可按照如下方法制备：
- [0020] 所述喹乙醇和琥珀酸酐进行反应,向所述反应后的体系中加入水经冷却出现沉淀物,离心收集沉淀；所述沉淀与碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行反应,然后加入葡萄糖氧化酶的溶液进行反应,即得所述葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物。
- [0021] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,所述喹乙醇与所述琥珀酸酐可在二甲基亚砜中进行所述反应；如在90 $^{\circ}$ C水浴条件下恒温搅拌反应1小时。
- [0022] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,所述喹乙醇与所述葡萄糖氧化酶的摩尔比为10~33:1；
- [0023] 采用PBS缓冲液(0.01M,pH7.2)配制所述葡萄糖氧化酶的溶液；
- [0024] 还包括如下纯化步骤：用3500Da的透析袋,在4 $^{\circ}$ C条件下透析48小时进行纯化处理；加入等体积的甘油后,-20 $^{\circ}$ C保存。
- [0025] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,所述荧光金纳米簇可为蛋白包裹的荧光金纳米簇；
- [0026] 所述蛋白包裹的荧光金纳米簇是按照包括如下步骤的方法制备的：
- [0027] 将所述蛋白和氯金酸溶液等体积混合进行反应,然后加入NaOH溶液,继续反应即得；
- [0028] 所述蛋白的浓度为50mg/ml,所述氯金酸溶液的质量百分含量为0.5%；
- [0029] 所述NaOH溶液的加入量为所述蛋白和所述氯金酸溶液的总体积的1/10；
- [0030] 所述蛋白可为牛血清白蛋白。
- [0031] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,步骤(2)中,所述目标物分子的标准溶液的浓度可为0~200 μ g/l。
- [0032] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,步骤(3)中,所述葡萄糖溶液的浓度可为0.8~1.2mg/ml,具体可为1.0mg/ml。

[0033] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,步骤(4)中,所述硫酸亚铁溶液的浓度可为450~500 μ M,具体可为500 μ M。

[0034] 上述的免标记荧光酶联免疫分析方法中,步骤(5)中,所述荧光强度变化指的是步骤(4)中加入所述硫酸亚铁溶液进行反应前后的荧光变化。

[0035] 本发明利用荧光金纳米簇能被葡萄糖氧化酶介导的芬顿反应产生的羟基自由基猝灭的特点,提供了一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析技术,能够实现简便、灵敏定量检测饲料中的喹乙醇。

[0036] 本发明具有如下有益效果:

[0037] 本发明解决了荧光金纳米簇在免疫分析检测中的应用障碍,提高了其在免疫分析检测应用中的可控性和稳定性。

[0038] 本发明检测方法具有灵敏度高、稳定性好、操作简便、成本低廉等优点。

[0039] 通过改变生物识别材料,利用葡萄糖氧化酶标签和荧光信号探针,本发明检测方法可以推广到喹噁啉类药物甚至其它药物残留的检测中。

附图说明

[0040] 图1为本发明基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法的原理示意图。

[0041] 图2为本发明实施例1制备的荧光金纳米簇的表征:图2(A)为在紫外灯下的外观图;图2(B)为纳米簇的荧光光谱图。

[0042] 图3为过氧化氢对荧光金纳米簇的影响:图3(A)为加入不同浓度过氧化氢溶液(a至i分别为0,0.05,0.1,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0,50.0 μ M)后荧光金纳米簇的荧光光谱变化;图3(B)为检测过氧化氢的定量标准曲线。

[0043] 图4为荧光金纳米簇对葡萄糖氧化酶的响应定量标准曲线。

[0044] 图5为基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法检测喹乙醇的定量标准曲线。

具体实施方式

[0045] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0046] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0047] 实施例1:合成牛血清白蛋白包裹的荧光金纳米簇

[0048] 将50mg/ml的牛血清白蛋白和0.5wt%的氯金酸溶液恒温至37 $^{\circ}$ C,两者等体积混合并剧烈搅拌反应2~3分钟后,加入1/10体积的NaOH(1M)溶液,继续在37 $^{\circ}$ C条件下搅拌反应12小时,室温下透析48小时纯化制备的荧光金纳米簇。收集放于4 $^{\circ}$ C暗处保存备用。

[0049] 结果如图2(A)所示,可以看出,所制备的荧光金纳米簇在365nm紫外灯照射下发出明显的红色荧光,荧光光谱图(图2(B))表明其最大激发波长和发射波长分别为365nm和640nm。

[0050] 实施例2:荧光金纳米簇对过氧化氢的响应

[0051] 制备好的荧光金纳米簇用超纯水稀释50倍,以150 μ l/孔的量加入到96孔板中,然后加入150 μ l/孔的系列浓度过氧化氢溶液(0,0.05,0.1,0.5,1.0,2.0,5.0,10,50 μ M)和50 μ l/孔的硫酸亚铁溶液(500 μ M),在常温下反应5min,用荧光光谱仪测定各孔在365nm激发光

下的550~750nm间的荧光发射光谱图,并记录640nm处的荧光强度。结果如图3(A)所示,可以看出,随着过氧化物浓度增加,荧光金纳米簇在640nm处的荧光强度逐渐下降;以过氧化氢浓度为横坐标,对应的荧光强度比率(F/F_0)为纵坐标绘制标准曲线(见图3(B)),结果表明,过氧化氢浓度在0.05~5.0 μ M之间,浓度和荧光呈良好的线性关系,相关系数为0.9888,最低检测限为0.126 μ M。

[0052] 实施例3:荧光金纳米簇对葡萄糖氧化酶的响应

[0053] 葡萄糖氧化酶用0.1M的PBS缓冲液稀释至 $0\sim 10^{-3}$ g/ml,以20 μ l/孔的量加入到96孔板中,然后加入130 μ l/孔的1.0mg/ml葡萄糖溶液(0.1M醋酸盐缓冲液),37 $^{\circ}$ C条件下反应半个小时,然后加入50 μ l/孔的荧光金纳米簇稀释液(150倍)和50 μ l/孔的硫酸亚铁溶液(500 μ M)常温下反应5min后,用荧光光谱仪测定各孔在365nm激发光下的640nm处的荧光强度。结果如图4所示,可以看出,随着葡萄糖氧化酶浓度增加,荧光金纳米簇在640nm处的荧光强度逐渐下降;以葡萄糖氧化酶浓度为横坐标,对应的荧光强度为纵坐标绘制标准曲线,结果表明葡萄糖氧化酶浓度在 $8.0\times 10^{-14}\sim 8.0\times 10^{-8}$ g/ml之间荧光强度呈良好的线性关系,相关系数为0.9663。说明非常少量的葡萄糖氧化酶即可使荧光金纳米簇的荧光发生明显的变化。

[0054] 实施例4:合成葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物

[0055] 将2.63g喹乙醇和1.30g琥珀酸酐用20ml二甲基亚砷溶解后,于90 $^{\circ}$ C水浴条件下恒温搅拌反应1小时,加入40ml超纯水后搅拌冷却至室温,出现大量黄色不溶物,离心弃上清,沉淀用超纯水洗涤3次后干燥;称取2.0mg干燥产物、4.1mg碳二亚胺盐酸盐、0.5mg N-羟基琥珀酰亚胺用1ml二甲基甲酰胺溶解,在室温下搅拌反应8小时后,逐滴加入葡萄糖氧化酶PBS溶液(0.01M, pH7.2)中,喹乙醇和葡萄糖氧化酶的摩尔比为10:1,4 $^{\circ}$ C搅拌反应过夜,反应结束后用3500Da的透析袋,在4 $^{\circ}$ C条件下透析48小时进行纯化处理,得到葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物。

[0056] 实施例5:建立定量检测喹乙醇的标准曲线

[0057] 1)在96孔板中加入Protein A稀释液(20 μ g/ml, 0.01M碳酸盐缓冲液, pH9.6) 150 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;2)洗板3次后,加入抗喹乙醇单克隆抗体稀释液(1:8000) 150 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C反应2小时;3)加入3mg/ml牛血清白蛋白溶液300 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1小时;4)洗板3次后,加入50 μ l/孔葡萄糖氧化酶-喹乙醇复合物和100 μ l/孔喹乙醇标准溶液(0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 μ g/l), 37 $^{\circ}$ C反应1小时;5)洗板3次后,加入150 μ l/孔葡萄糖溶液(1.0mg/ml), 37 $^{\circ}$ C反应半小时;6)加入荧光金纳米簇稀释液(1:150) 50 μ l/孔和硫酸亚铁溶液50 μ l/孔(500 μ M),常温反应10分钟;7)利用荧光光谱仪测定在365nm激发波长下,640nm波长处的荧光强度变化;8)根据喹乙醇浓度和荧光强度变化值(ΔF)的关系,绘制定量标准曲线(如图5),线性检测范围为1.0~100 μ g/l,最低检测限为0.53 μ g/l,可用于样品中的喹乙醇定量检测。

[0058] 实施例6:饲料样品测试

[0059] 称取 5.0 ± 0.02 g粉末状经仪器确证为不含喹乙醇的饲料样品,加入15ml甲醇水(5%, v/v)超声提取10min后,5000rpm离心5min,收集上清,得到饲料样品提取液,在提取液中分别添加10 μ g/l、50 μ g/l、100 μ g/l等不同浓度的喹乙醇标准品,按照实施例5的步骤进行检测,通过标准曲线进行定量并计算回收率,实验结果如表1所示。

[0060] 由表1的结果可以看出,本发明方法的平均回收率在93.3%~115.5%之间,变异系数在0.8%~16.4%,说明方法的准确可靠。

[0061] 表1饲料样品的测试结果

样品	添加量 (ng/ml)	测量值 (ng/ml)	回收率 (%)	CV (%)
1	10	9.329 ± 1.533	93.3	16.4
	50	56.88 ± 4.769	113.8	8.4
	100	106.4 ± 15.16	106.4	14.2
2	10	11.55 ± 2.636	115.5	18.1
	50	57.11 ± 12.38	114.2	11.7
	100	100.2 ± 4.356	100.2	4.3
3	10	9.814 ± 0.616	98.1	6.3
	50	53.26 ± 11.54	106.5	11.7
	100	105.9 ± 0.797	105.9	0.8
4	10	11.05 ± 1.542	110.5	14.0
	50	54.40 ± 4.520	108.8	8.3
	100	95.13 ± 7.371	95.1	7.7

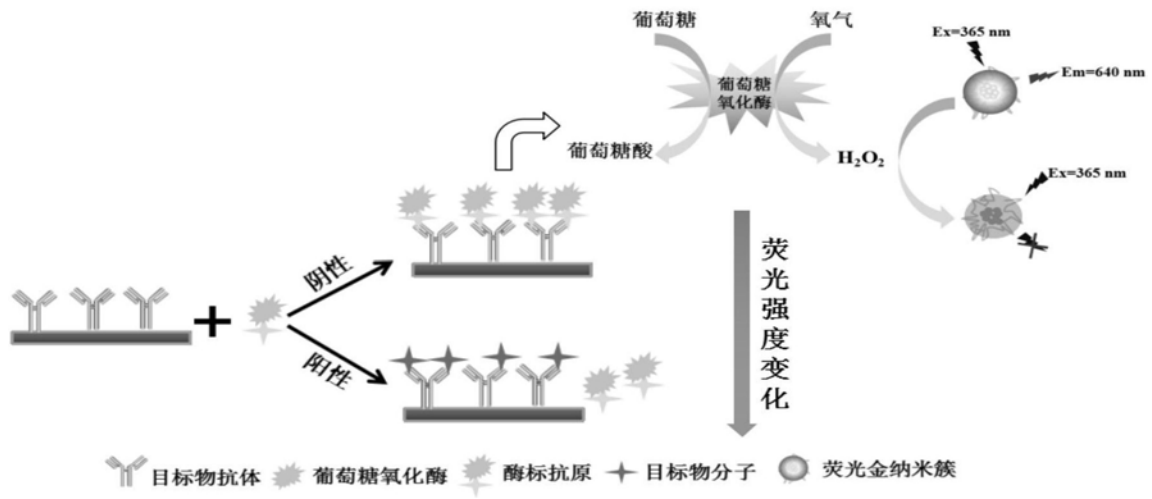


图1

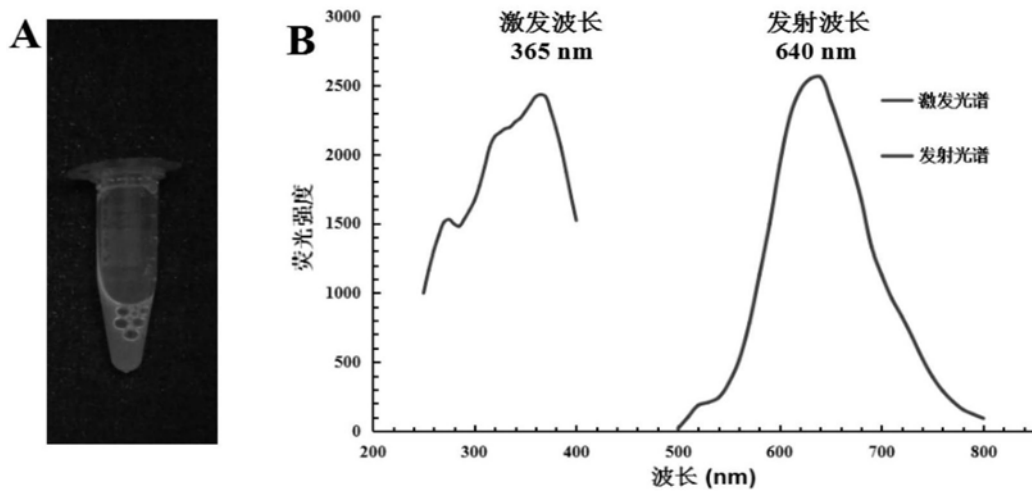


图2

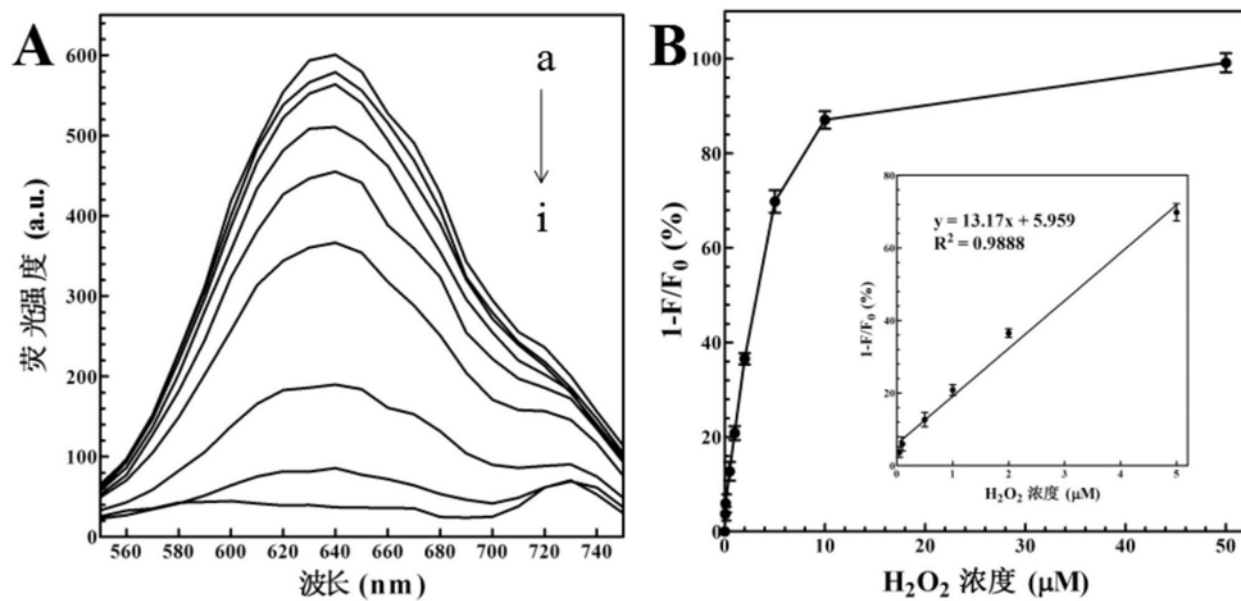


图3

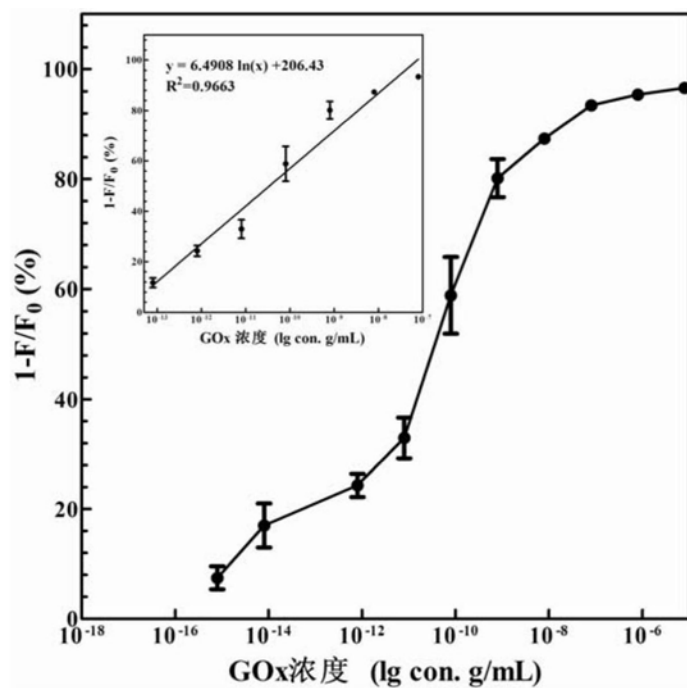


图4

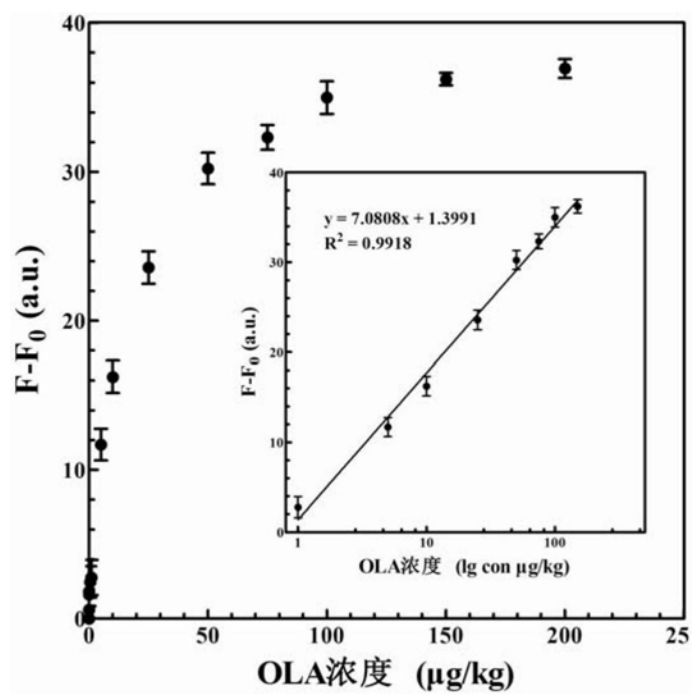


图5

专利名称(译)	一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	CN109839500A	公开(公告)日	2019-06-04
申请号	CN201711188784.5	申请日	2017-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	江海洋 彭涛 沈建忠 王战辉 温凯 史为民 李建成 孙淑娟		
发明人	江海洋 彭涛 沈建忠 王战辉 温凯 王见一 史为民 李建成 孙淑娟		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	关畅 王春霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于荧光金纳米簇的免标记荧光酶联免疫分析方法。所述分析方法以蛋白包裹的荧光金纳米簇作为荧光信号探针，是酶标抗原上的葡萄糖氧化酶催化底物葡萄糖产生过氧化氢使体系中荧光金纳米簇的荧光猝灭，利用目标物和酶标抗原竞争结合在微孔板上的抗体，从而使体系的荧光发射光谱发生变化，可用于灵敏定量检测目标物分子。本发明所采用的荧光金纳米簇对葡萄糖氧化酶响应灵敏，同时免标记技术使荧光金纳米簇在本体系应用中的可控性、稳定性得到大大提高。本方法所构建的体系具有操作简便、灵敏度高、稳定性好、成本低廉等优点，可应用于灵敏定量检测动物饲料中的喹乙醇残留。

样品	添加量 (ng/ml)	测量值 (ng/ml)	回收率 (%)	CV (%)
1	10	9.329 ± 1.533	93.3	16.4
	50	56.88 ± 4.769	113.8	8.4
	100	106.4 ± 15.16	106.4	14.2
2	10	11.55 ± 2.636	115.5	18.1
	50	57.11 ± 12.38	114.2	11.7
	100	100.2 ± 4.356	100.2	4.3
3	10	9.814 ± 0.616	98.1	6.3
	50	53.26 ± 11.54	106.5	11.7
	100	105.9 ± 0.797	105.9	0.8
4	10	11.05 ± 1.542	110.5	14.0
	50	54.40 ± 4.520	108.8	8.3
	100	95.13 ± 7.371	95.1	7.7