



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101699286 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 10

(21) 申请号 200910035792. 5

(22) 申请日 2009. 10. 16

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 朱颖越 陈伟 徐丽广 马伟 彭池方

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 15/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

王春刚. 金纳米棒的表明修饰及其生物识别

的研究. 《中国博士学位论文全文数据库 工程技术 I 辑》. 2007, (第 5 期), B020-23.

郭红燕 等. SERS 标记的金纳米棒探针用于免疫检测. 《化学学报》. 2009, 第 67 卷 (第 14 期), 1603-1608.

审查员 高雅

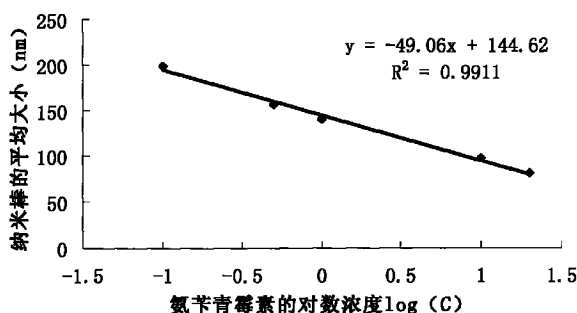
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法

(57) 摘要

一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法,属于免疫检测技术领域。本发明将氨苄青霉素抗体及包被原修饰到金纳米棒的侧面上去,再加氨苄青霉素标准品或待测上清液,氨苄青霉素标准品与包被原竞争修饰在金纳米棒侧面上的抗体,随着加入的氨苄青霉素标准品的量的不同,所形成的抗体与包被原的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径大小不同,由此用激光粒度仪进行检测而完成对含氨苄青霉素待测样品的检测。本法不需复杂的样品前处理;操作简便,只需加待测样品孵育后直接用仪器测定,一步就可完成;用于标记金纳米棒约为 13×40nm,水溶性高,分散性稳定性好。



1. 一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法,其特征是首先分别将氨苄青霉素抗体及包被原修饰到金纳米棒上去,再加氨苄青霉素标准品或待测上清液,氨苄青霉素标准品与包被原竞争修饰在金纳米棒上的抗体,随着加入的氨苄青霉素标准品的量的不同,所形成的抗体与包被原的金纳米棒的侧面组装的免疫聚合物的粒径大小不同,由此用激光粒度仪进行检测而完成对含氨苄青霉素待测样品的检测;步骤为:

(1) 氨苄青霉素抗体及包被原与金纳米棒的偶联:

a. 抗体与金纳米棒偶联:0.5mL、100  $\mu$ g/mL的氨苄青霉素抗体逐滴加入用0.1mol/L的碳酸钾预调至pH 8.5-8.8、0.5mL、2n mol/L金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C反应1h,反应结束6000rpm离心20min,去除未结合的抗体,重悬在pH 7.4、含0.5%聚乙二醇20000的0.01mol/L的PBS中,制得修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液;

b. 包被原与金纳米棒偶联:0.5mL、100  $\mu$ g/mL的氨苄青霉素包被原逐滴加入用0.1mol/L的盐酸预调至pH 5、0.5mL、2n mol/L的金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C反应1h,反应结束6000rpm离心20min,去除未结合的包被原,重悬在pH 7.4、含0.5%PEG20000的0.01mol/L的PBS中,制得修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液;

所述的氨苄青霉素抗体及包被原修饰的金纳米棒是将氨苄青霉素抗体及包被原用静电作用的方法偶联到带有正电荷的金纳米棒的表面;金纳米棒是十六烷基三甲基溴化铵修饰的金纳米棒,长径比为3;

(2) 金纳米棒侧面组装

10  $\mu$ L修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液与10  $\mu$ L不同浓度的氨苄青霉素标准品加入到1.5mL的离心管中,充分混匀,再加入10  $\mu$ L修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h后,取20  $\mu$ L反应液稀释到体积为1mL,加入到塑料检测小池中,测反应完的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径;

所述修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液、修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液,所用的溶液皆为pH 7.4、0.01mol/L的PBS缓冲液;氨苄青霉素标准品浓度C分别为0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、100ng/mL;

(3) 激光粒度仪检测,绘制金纳米棒免疫聚合物的粒径Size~氨苄青霉素浓度C标准曲线Size~C;

用英国马尔文激光粒度仪检测用不同浓度C的氨苄青霉素标准品侧面组装的金纳米棒免疫聚合物的粒径Size,检测温度为20 $^{\circ}$ C,检测角度为173 $^{\circ}$ ,激发光源波长633nm,激光功率5mW;绘制标准曲线Size~C;

(4) 激光粒度仪定量检测:

10  $\mu$ L修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液与10  $\mu$ L含氨苄青霉素的样品加入到1.5mL的离心管中,充分混匀,再加入10  $\mu$ L修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h后,取20  $\mu$ L反应液稀释到体积为1mL,加入到塑料检测小池中,测反应完的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径Size,以聚合物的粒径Size与标准曲线Size~C对照,求出样品中氨苄青霉素的浓度C。

## 一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法

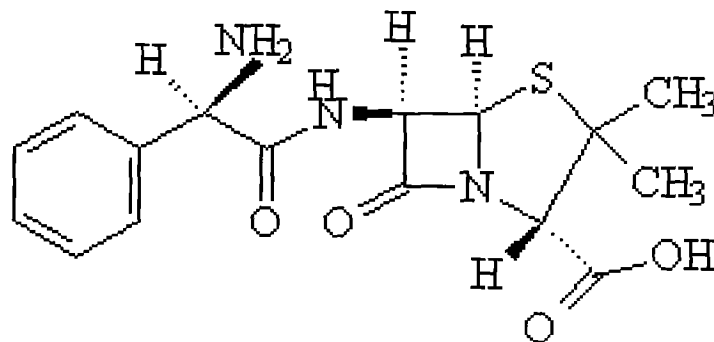
### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法,属于免疫检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 氨苄青霉素是半合成的青霉素,是在青霉素 G 侧链羧基的  $\alpha$  位引入氨基,改变了它的极性,使其更容易透过细菌细胞膜,扩大了抗菌谱,结构为:

[0003]



[0004] 氨苄青霉素耐酸不耐酶,内服或肌肉注射均易吸收,对大多数革兰氏阳性菌的效力不如青霉素。特点是对革兰氏阴性菌,如大肠埃希菌、变形杆菌、沙门菌等均有较强的作用。同时它具有耐酸的特征,避免了天然青霉素不宜内服的缺点,这就为临床给药提供了很大的方便,在临床上得以广泛应用。主要用于上述敏感菌所致的呼吸道感染、胃肠道感染、尿路感染、软组织感染、脑膜炎、败血症、心内膜炎等。氨苄青霉素临床不良反应主要以过敏性皮疹、过敏性休克和胃肠道反应为主。氨苄青霉素是治疗奶牛和其他食用动物疾病的常用药物之一,残留在动物性食品中的氨苄青霉素类药物会对人体、环境造成巨大的危害,目前迫切需要开发快速、廉价、易于操作的检测方法对其进行检测。

[0005] 当今国际上常用的氨苄青霉素残留检测的方法有:微生物法、色谱法、免疫分析法等。微生物检测的灵敏度不高且时间消耗长,而仪器分析方法不仅需要昂贵的仪器设备,对操作人员的要求也比较高,需要经过复杂的样品前处理才能进行。国外早已经开展了对氨苄青霉素抗生素免疫分析方法的研究,常用的方法为酶联免疫分析法(ELISA)、放射免疫法(RIA)和荧光免疫测定法(FIA等),其中ELISA最为常用,这类方法是将包被原包被酶标板,加入药物及抗药物抗体,再加入酶标二抗,即检测抗体,最后加入底物显色,一定时间后,用酶标仪检测某一特定波长的吸光度值,根据已知标准品含量计算样品中待测药物的浓度,此操作也存在繁琐,费时的缺点。

[0006] 激光粒度仪(Dynamic light scattering, DLS)技术由于可以用来对胶体、纳米颗粒和蛋白质进行的快速检测,通过测量其尺寸、多分散性以及 zeta 电位,优化其稳定性与储存能力,判断蛋白质是否聚集;筛选最优化的结晶条件;并可对仅 2  $\mu$ L 的样品进行寡聚物研究,仅需几纳克的原料物质。对于金纳米棒而言,其组装的大小可以用激光粒度仪来测

定。国内目前为止尚未见有利用金纳米棒的激光粒度仪的信号达到对体外目标物检测的报道,本发明弥补了这一空白。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种具有高灵敏性、特异性、准确度、操作方法简单并快速的金纳米棒标记抗体侧面组装的免疫检测方法,用于氨苄青霉素残留的快速检测。

[0008] 本发明的技术方案:一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法,首先分别将氨苄青霉素抗体及包被原修饰到金纳米棒上去,再加氨苄青霉素标准品或待测上清液,氨苄青霉素标准品与包被原竞争修饰在金纳米棒上的抗体,随着加入的氨苄青霉素标准品的量的不同,所形成的抗体与包被原的金纳米棒的侧面组装的免疫聚合物的粒径大小不同,由此用激光粒度仪进行检测而完成对含氨苄青霉素待测样品的检测;步骤为:

[0009] (1) 氨苄青霉素抗体及包被原与金纳米棒的偶联:

[0010] a. 抗体与金纳米棒偶联:0.5mL、100 $\mu$ g/mL的氨苄青霉素抗体逐滴加入用0.1mol/L的碳酸钾预调至pH 8.5-8.8、0.5mL、2n mol/L金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C反应1h,反应结束6000rpm离心20min,去除未结合的抗体,重悬在pH 7.4、含0.5%聚乙二醇PEG20000的0.01mol/L的PBS中,制得氨苄青霉素抗体修饰的金纳米棒探针;

[0011] b. 包被原与金纳米棒偶联:0.5mL、100 $\mu$ g/mL的氨苄青霉素包被原逐滴加入用0.1mol/L的盐酸预调至pH 5、0.5mL、2n mol/L的金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C反应1h,反应结束6000rpm离心20min,去除未结合的包被原,重悬在pH 7.4、含0.5%PEG20000的0.01mol/L的PBS中,制得氨苄青霉素包被原修饰的金纳米棒探针;

[0012] (2) 金纳米棒侧面组装

[0013] 10 $\mu$ L修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液与10 $\mu$ L不同浓度的氨苄青霉素标准品加入到1.5mL的离心管中,充分混匀,再加入10 $\mu$ L修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h后,取20 $\mu$ L反应液稀释到体积为1mL,加入到塑料检测小池中,测反应完的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径;

[0014] 所用的溶液皆为pH 7.4、0.01mol/L的PBS缓冲液;氨苄青霉素标准品浓度C分别为0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、100ng/mL;

[0015] (3) 激光粒度仪检测,绘制金纳米棒免疫聚合物的粒径Size $\sim$ 氨苄青霉素浓度C标准曲线Size $\sim$ C:

[0016] 用英国马尔文激光粒度仪检测(Zetasizer Nano ZS system)用不同浓度C的氨苄青霉素标准品侧面组装的金纳米棒免疫聚合物的粒径Size,检测温度为20 $^{\circ}$ C,检测角度为173 $^{\circ}$ ,激发光源波长633nm,激光功率5mW;绘制标准曲线Size $\sim$ C;

[0017] (4) 激光粒度仪定量检测:

[0018] 10 $\mu$ L修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液与10 $\mu$ L含氨苄青霉素的样品加入到1.5mL的离心管中,充分混匀,再加入10 $\mu$ L修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h后,取20 $\mu$ L反应液稀释到体积为1mL,加入到塑料检测小池中,测反应完的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径Size,以聚合物的粒径Size与标准曲线Size $\sim$ C对照,求出样品中氨苄青霉素的浓度C。

[0019] 所述的氨苄青霉素抗体及包被原修饰的金纳米棒是将氨苄青霉素抗体及包被原用静电作用的方法偶联到带有正电荷的金纳米棒的表面；金纳米棒是十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 修饰的金纳米棒,长径比为 3。

[0020] 所述的抗体是抗氨苄青霉素的多克隆抗体,经硫酸铵沉淀法纯化的特异性抗体。

[0021] 所述的氨苄青霉素包被原是将氨苄青霉素与卵清蛋白 (OVA) 通过戊二醛偶联得到的。

[0022] 所述的氨苄青霉素抗体与包被原修饰的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的形成：是由于氨苄青霉素抗体与包被原修饰的金纳米棒加入氨苄青霉素后,金纳米棒侧面的包被原与溶液中游离的氨苄青霉素竞争修饰在金纳米棒上的抗体,通过抗原与抗体的特异性结合形成抗原-抗体免疫聚合物。

[0023] 所述的激光粒度仪检测是利用氨苄青霉素抗体与包被原修饰的金纳米棒侧面组装所形成的免疫聚合物,通过激光照射,由布朗运动推算出聚合物的粒径大小。通常样品中氨苄青霉素浓度越大,竞争抑制修饰在金纳米棒上的抗体,则能与修饰在金纳米棒表面的包被原反应的抗体量越少,则形成的侧面组装的金纳米棒免疫聚合物的尺寸越小。

[0024] 本发明的有益效果：

[0025] (1) 本法检测时样品前处理简单,对于液体样品在一定浓度下可以直接用于检测。

[0026] (2) 本法操作简便快速,只需加待测样品孵育后直接进行一次测定,只需一步就可完成。

[0027] (3) 本法用于修饰的金纳米棒,尺寸为  $13 \times 40\text{nm}$ ,水相分散性稳定性好。具有很高的光散射,有利于灵敏检测。

#### 附图说明

[0028] 图 1 典型的添加标准品反应前后激光粒度仪检测的粒径分布图。

[0029] 图 2 激光粒度仪检测标准曲线。

#### 具体实施方式

[0030] 实施例 1 氨苄青霉素抗体及包被原与金纳米棒的偶联：

[0031] a. 抗体与金纳米棒偶联：0.5mL、100  $\mu\text{g/mL}$  的氨苄青霉素抗体逐滴加入用 0.1mol/L 的碳酸钾预调至 pH 8.5-8.8 的 0.5mL、2nmol/L 金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的抗体,重悬在 pH 7.4、0.01mol/L 的 PBS 中 (含 0.5% PEG20000),制得氨苄青霉素抗体修饰的金纳米棒探针；

[0032] b. 包被原与金纳米棒偶联：方法与抗体与金纳米棒偶联类似,0.5mL、100  $\mu\text{g/mL}$  的氨苄青霉素包被原逐滴加入用 0.1mol/L 的盐酸预调至 pH 5、0.5mL、2nmol/L 的金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的包被原,重悬在 pH 7.4、0.01mol/L 的 PBS (含 0.5% PEG20000) 中,制得氨苄青霉素包被原修饰的金纳米棒探针；

[0033] 实施例 2 激光粒度仪检测

[0034] 10  $\mu\text{L}$  修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液与 10  $\mu\text{L}$  不同浓度的氨苄青霉素标准品加入到 1.5mL 的离心管中,充分混匀,再加入 10  $\mu\text{L}$  修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶

液,漩涡混匀,37℃孵育 0.5h 后,取 20  $\mu$ L 反应液稀释到体积为 1mL,加入到塑料检测小池中,测反应完的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径 Size,以聚合物的尺寸 Size ~ 氨苄青霉素浓度 C 标准曲线 Size ~ C。

[0035] 所用的溶液皆为 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液;氨苄青霉素标准品浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、100ng/mL。

[0036] 实施例 3 激光粒度仪定量检测

[0037] 用英国马尔文激光粒度仪检测 (Zetasizer Nano ZS system) 测金纳米棒的粒径,

[0038] 本实验所用检测参数为:检测温度为 20℃,检测角度为 173°,激发光源波长 633nm,激光功率 5mW。

[0039] 金纳米棒侧面组装检测的原理:氨苄青霉素抗体与包被原修饰到金纳米棒侧面上去,再加氨苄青霉素标准品或待测上清液,氨苄青霉素标准品与包被原竞争修饰在金纳米棒上的抗体,随着加入的氨苄青霉素标准品的量的不同,所形成的抗体与包被原的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的尺寸不同,由此用激光粒度仪进行检测而完成对氨苄青霉素的检测。通过建立金纳米棒免疫聚合物的尺寸 Size ~ 氨苄青霉素浓度 C 标准曲线 Size ~ C,可对比求出样品中氨苄青霉素的浓度。

[0040] 实施例 4 实际样品测定

[0041] 标准曲线的绘制,以标准品浓度 C 为横坐标,以 Size 纵坐标,数据见下表,作图,见附图 2。

[0042] 表 1. 激光粒度仪检测数据

[0043]

	A	B	C	D	E
氨苄青霉素浓度 ng/ml	0.1	0.5	1	10	20
Size	198.9	155.7	139.3	98.25	81.88

[0044] 实际样品处理:取牛奶 10mL,于 2500r/min 离心 15min 脱脂,70℃热处理 3min 酶灭活,取上清液待测。

[0045] 10  $\mu$ L 修饰氨苄青霉素包被原的金纳米棒溶液与 10  $\mu$ L 待测上清液加入到 1.5mL 的离心管中,充分混匀,再加入 10  $\mu$ L 修饰氨苄青霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37℃孵育 0.5h 后,取 20  $\mu$ L 反应液稀释到体积为 1mL,加入到塑料检测小池中,用英国马尔文激光粒度仪 (Zetasizer Nano ZS system) 检测反应完的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径大小 Size。以 Size ~ C 氨苄青霉素浓度标准曲线对照,求出样品中氨苄青霉素的浓度。

[0046] 表 2. 实际样品添加回收

[0047]

样品	添加浓度 (ng g <sup>-1</sup> )	测得粒径 (nm)	检测浓度 (ng g <sup>-1</sup> )	回收率 (%) Mean±SD
生牛奶	1	142.20	1.12±0.14	112.62±1.5
	10	95.56	9.86±0.18	98.51±2.2
	20	80.79	19.78±0.36	96.05±1.4

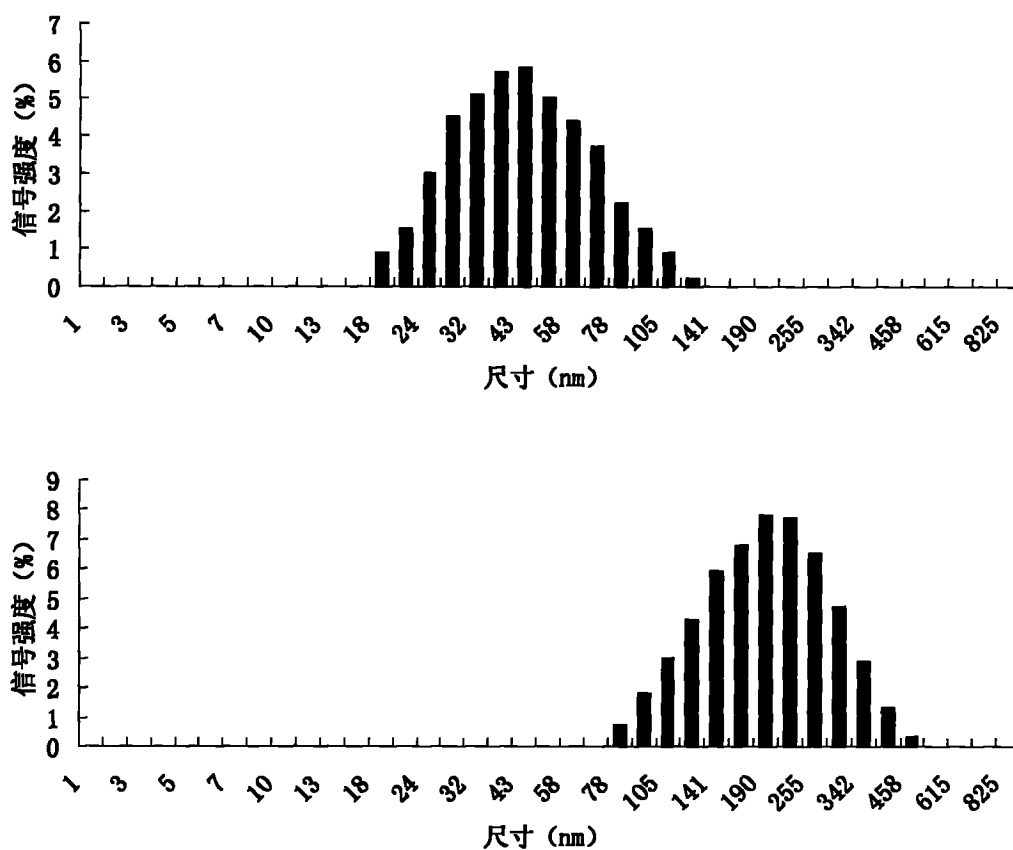


图 1

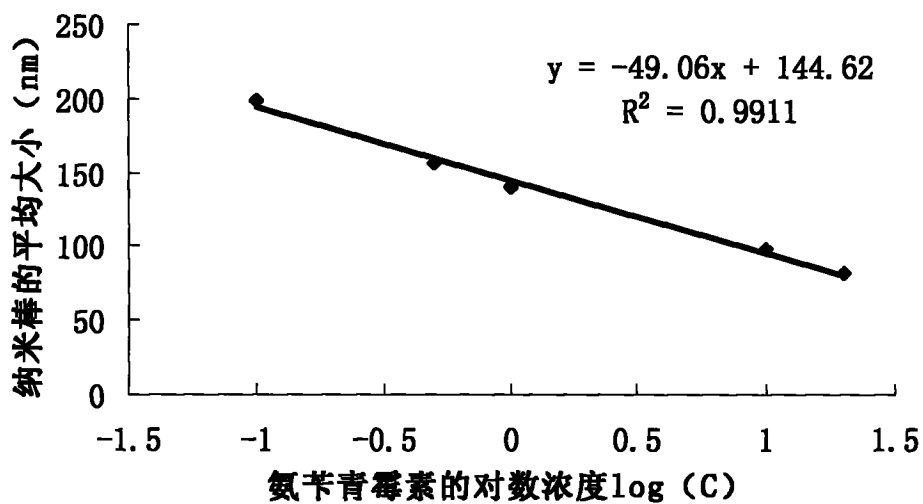


图 2

专利名称(译)	一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101699286B</a>	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN200910035792.5	申请日	2009-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 朱颖越 陈伟 徐丽广 马伟 彭池方		
发明人	胥传来 朱颖越 陈伟 徐丽广 马伟 彭池方		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N15/02		
审查员(译)	高雅		
其他公开文献	CN101699286A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种侧面组装的金纳米棒标记抗体定量检测氨苄青霉素的方法，属于免疫检测技术领域。本发明将氨苄青霉素抗体及包被原修饰到金纳米棒的侧面上去，再加氨苄青霉素标准品或待测上清液，氨苄青霉素标准品与包被原竞争修饰在金纳米棒侧面上的抗体，随着加入的氨苄青霉素标准品的量的不同，所形成的抗体与包被原的金纳米棒侧面组装的免疫聚合物的粒径大小不同，由此用激光粒度仪进行检测而完成对含氨苄青霉素待测样品的检测。本法不需复杂的样品前处理；操作简便，只需加待测样品孵育后直接用仪器测定，一步就可完成；用于标记金纳米棒约为13×40nm，水溶性高，分散性稳定性好。

