



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101699288 A

(43) 申请公布日 2010.04.28

(21) 申请号 200910035793.X

(22) 申请日 2009.10.16

(71) 申请人 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 徐丽广 陈伟 朱颖越 刘丽强 徐乃丰 马伟 许定华

(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 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 15/02(2006.01)

C07K 16/14(2006.01)

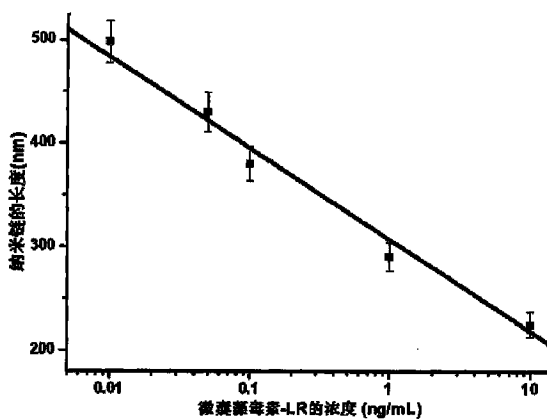
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素-LR 的方法

(57) 摘要

一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素-LR 的方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明以金纳米棒的端面与微囊藻毒素包被原及抗微囊藻毒素抗体分别偶联形成金纳米棒的探针,利用合成的金纳米棒探针与微囊藻毒素-LR 进行免疫反应从而由于金纳米棒端面的抗原抗体反应形成纳米链,通过纳米链的粒径的变化达到检测微囊藻毒素-LR 的目的。本发明是在液体环境中反应,不需要清洗的步骤,只需要一步反应,简化了反应的条件,减轻劳动强度,提高了检测的灵敏度。



1. 一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征在于包括包被原的修饰,抗体的修饰,修饰的包被原和金纳米棒的偶联,修饰的抗体和金纳米棒的偶联,反应条件的优化,抑制曲线的测定,实际样本的检测;

(1) 包被原的修饰:

将微囊藻毒素 -LR 包被原与硫辛酸相偶联得到修饰的包被原;

(2) 抗体的修饰:

将抗微囊藻毒素 -LR 抗体与硫辛酸相偶联得到修饰的抗微囊藻毒素 -LR 抗体;

(3) 用步骤 (1) 得到的修饰的包被原与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒 - 包被原探针;

(4) 用步骤 (2) 得到的修饰的抗微囊藻毒素 -LR 抗体与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒 - 抗体探针;

(5) 对抑制反应的各个条件进行优化;

(6) 标准曲线的建立:利用间接竞争免疫检测原理,将微囊藻毒素 -LR 和 (3) 金纳米棒 - 包被原探针同时加入到一个离心管中,而后向离心管中加入 (4) 金纳米棒 - 抗体探针,混匀,通过微囊藻毒素 -LR 和金纳米棒 - 包被原探针与金纳米棒 - 抗体探针进行竞争偶联,通过微囊藻毒素 -LR 浓度的不同会使形成的粒子形成不同的粒径分布,通过纳米粒度仪检测粒径的变化从而检测微囊藻毒素 -LR 的浓度,建立粒径 - 微囊藻毒素 -LR 浓度的标准曲线;

(7) 检测样品中微囊藻毒素 -LR 的浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是包被原的修饰:

① 0.3mL 的含硫辛酸的乙醇溶液,含硫辛酸 1.625mg,与 0.2mL 的微囊藻毒素 -LR 包被原溶液混合;

② 将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入步骤①所述溶液中后室温反应 4h;

③ 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换液 3 次;

④ 将修饰后的包被原放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

3. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是抗体的修饰:

① 0.3mL 的含硫辛酸的乙醇溶液,含硫辛酸 1.625mg,与 0.4mL 抗微囊藻毒素 -LR 抗体混合;

② 将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入步骤①所述溶液中后室温反应 4h;

③ 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换 3 次透析液;

④ 将修饰后的抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

4. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是金纳米棒 - 抗体探针的制备:采用晶种生长法合成金纳米棒,再经过 7500rpm 离心 15min 去除金纳米棒溶液中多余的 Vc、AgNO₃ 和小的球形粒子金纳米棒后,利用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 PEG20000 的 0.005mol/L 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 溶液进行重悬;

重悬液用 1mol/L HCl 调整至 pH 3.8 ;0.5mL、2nmol/L 重分散的金纳米棒 GNRs 溶液逐滴滴加到由 50 μ L 稀释到 1mL 的硫酸锌修饰的微囊藻毒素 -LR 抗体的稀释液中,室温搅拌反应 4h,反应结束后 6000rpm 离心 10min,运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 1mL 0.005mol/L CTAB 的溶液进行重分散,用该溶液洗涤两遍,最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 50 μ L 0.005mol/L/CTAB 的溶液进行重分散,此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

5. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是金纳米棒 - 包被原探针的制备:包被原 60 μ L 用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 940 μ L、0.005mol/L CTAB 的溶液进行稀释;

将 pH 3.8、0.5mL、2n mol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到硫辛酸修饰的微囊藻毒素 -LR 包被原的稀释液中,室温搅拌反应 4h,反应结束后 6000rpm 离心 10min,运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散,用该溶液洗涤两遍,最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μ L 进行重分散,此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

6. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是抑制反应条件的优化:

a) 金纳米棒 - 抗体 GNR-Ab 与金纳米棒 - 包被原 GNR-Ag 的配比:选择 1 : 1 作为 GNR-Ab 与 GNR-Ag 的最佳配比;

b) 反应时间的优化:采用 30min 作为抑制试验最佳的反应时间;

c) 反应温度的变化:采用 37 $^{\circ}$ C 作为最佳反应温度。

7. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是标准曲线的建立:通过测定纳米链的粒径可以建立基于金纳米棒探针的端面与端面相互连接的针对微囊藻毒素 -LR 的检测方法,步骤为:

① 向离心管中加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后加入用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释的 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL 的微囊藻毒素 -LR 后混匀,按照与 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 反应 30min;

② 反应结束,取 10 μ L 的反应液加入 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 990 μ L 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释,混匀。静置 2 分钟,用动态光散射仪测定该反应液的粒子的粒径,重复两次;

运用 MC-LR 的浓度作为横坐标,纳米链的粒径作为纵坐标建立抑制标准曲线。

8. 根据权利要求 1 所述的基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法,其特征是检测样品中微囊藻毒素 -LR 的浓度:步骤为:

① 向离心管中加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后加入用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释的含微囊藻毒素 -LR 的样品液后混匀,按照与 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 反应 30min;

② 反应结束,取 10 μ L 的反应液加入 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 990 μ L 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释,混匀。静置 2min,用动态光散射仪测定该反应液的粒子的粒径,重复两次;根据所测得的粒径值对照标准曲线求出样品液中微囊藻毒素 -LR 的含量。

一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法

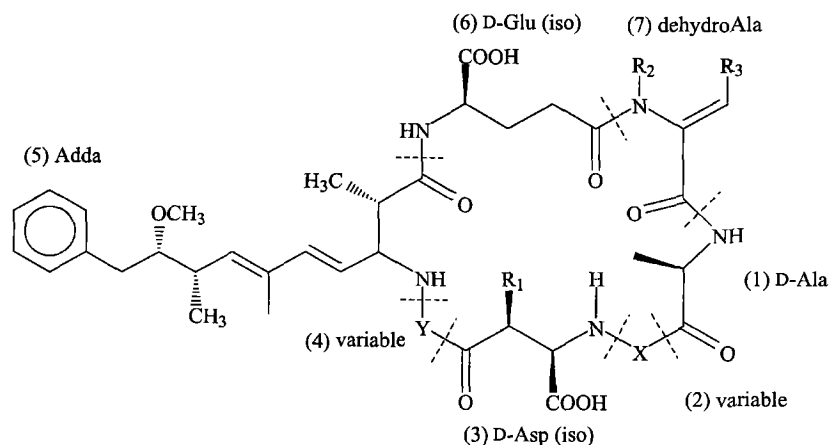
技术领域

[0001] 一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR(MC-LR) 的方法,属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

[0002] 随着经济的发展,含有大量的氮、磷营养物质的污水进入湖泊、水库使水体富营养化,致使藻类异常增殖,释放次级代谢物藻毒素 (Algae Toxins),威胁人类的饮用水的安全和水中其它生物的安全。其中微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 分布最广、危害最大,其结构如下:

[0003]



[0004] 其含有五个固定成分的氨基酸,两个可变的氨基酸X、Y。即在上述的结构式中其中X和Y分别为Leu和Arg的即为MC-LR。MC-LR是最为常见且毒性又最大的一种微囊藻毒素,世界卫生组织(WHO)推荐的饮用水中的MC-LR的最大残留限量为 $1.0 \mu\text{g/L}$,我国现颁布执行的生活饮用水水质卫生规范(2001, 0.001mg/L)和地表水环境质量标准(GB3838-2002, 微囊藻毒素-LR, 0.001mg/L),因此急需建立针对MC-LR检测的一种快速、简单、灵敏、省力的检测方法。

[0005] 常用的检测藻毒素的方法主要有仪器分析方法、生物化学法及免疫检测法等几大类。仪器分析方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、质谱、液质联用等,这些方法虽然灵敏但其需要昂贵的仪器设备,专业的操作人员,对检材的要求也比较高,并且需要进一步的样本前处理才能进行,这已经不能达到现代检测对快速、方便、准确的要求。生物化学法主要是蛋白磷酸酶抑制试验法,优点是快速,数小时即可实现对大量样品的检测,但其最大的不足之处在于特异性蛋白磷酸酶等没有商品供应、特异性差。免疫分析化学方法具有快速,灵敏度高,操作简单,专一性好等优点。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素(MC-LR)的方法,灵敏度高,操作方便,线性范围宽。

[0007] 本发明的技术方案：一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素 -LR 的方法，包括包被原的修饰，抗体的修饰，修饰的包被原和金纳米棒的偶联，修饰的抗体和金纳米棒的偶联，反应条件的优化，抑制曲线的测定，实际样本检测；

[0008] (1) 包被原的修饰：

[0009] 将微囊藻毒素 -LR 包被原与硫辛酸相偶联得到修饰的包被原；

[0010] (2) 抗体的修饰：

[0011] 将抗微囊藻毒素 -LR 抗体与硫辛酸相偶联得到修饰的抗微囊藻毒素 -LR 抗体；

[0012] (3) 用步骤 (1) 得到的修饰的包被原与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒 - 包被原探针；

[0013] (4) 用步骤 (2) 得到的修饰的抗微囊藻毒素 -LR 抗体与金纳米棒的端面偶联得到金纳米棒 - 抗体探针；

[0014] (5) 对抑制反应的各个条件进行优化；

[0015] (6) 标准曲线的建立：利用间接竞争免疫检测原理，将微囊藻毒素 -LR 和 (3) 金纳米棒 - 包被原探针同时加入到一个离心管中，而后向离心管中加入 (4) 金纳米棒 - 抗体探针，混匀，通过微囊藻毒素 -LR 和金纳米棒 - 包被原探针与金纳米棒 - 抗体探针进行竞争偶联，通过微囊藻毒素 -LR 浓度的不同会使形成的粒子形成不同的粒径分布，通过纳米粒度仪检测粒径的变化从而检测微囊藻毒素 -LR 的浓度，建立粒径 - 微囊藻毒素 -LR 浓度的标准曲线。

[0016] (7) 检测样品中微囊藻毒素 -LR 的浓度。

[0017] 包被原的修饰：

[0018] ① 0.3mL 的含硫辛酸的乙醇溶液，含硫辛酸 1.625mg，与 0.2mL 的微囊藻毒素 -LR 包被原溶液混合；

[0019] ② 将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入步骤①所述溶液中后室温反应 4h；

[0020] ③ 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天，每天换液 3 次；

[0021] ④ 将修饰后的包被原放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0022] 抗体的修饰：

[0023] ① 0.3mL 的含硫辛酸的乙醇溶液，含硫辛酸 1.625mg，与 0.4mL 抗微囊藻毒素 -LR 抗体混合；

[0024] ② 将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入步骤①所述溶液中后室温反应 4h；

[0025] ③ 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天，每天换 3 次透析液；

[0026] ④ 将修饰后的抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0027] 金纳米棒 - 抗体探针的制备：采用晶种生长法合成金纳米棒，再经过 7500rpm 离心 15min 去除金纳米棒溶液中多余的 Vc、AgNO₃ 和小的球形粒子金纳米棒后，利用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 PEG20000 的 0.005mol/L 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 溶液进行重悬；重悬液用 1mol/L HCl 调整至 pH 3.8；重悬液中的金纳米棒称之为金纳米棒 GNRS，在金纳米棒的制备过程中 CTAB 起着非常关键的作用。CTAB 主要是分布在金纳米棒的侧面从而金纳米棒的侧面带有正电荷，而金纳米棒的端面的分布很少，因此采用硫辛酸修饰的抗体会修饰

到金纳米棒的端面而非侧面上。0.5mL 2n mol/L 重分散的金纳米棒 GNRs 溶液逐滴滴加到由 50 μ L 稀释到 1mL 的硫酸锌修饰的微囊藻毒素 -LR 抗体的稀释液中, 室温搅拌反应 4h, 反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 1mL 0.005mol/LCTAB 的溶液进行重分散, 用该溶液洗涤两遍, 最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 50 μ L 0.005mol/L CTAB 的溶液进行重分散, 此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0028] 金纳米棒 - 包被原探针的制备: 包被原和金纳米棒的偶联与 (3) 抗体和金纳米棒的偶联操作相同, 只是在包被原的量上有区别, 即加入的包被原 60 μ L 用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 940 μ L 0.005mol/L CTAB 的溶液进行稀释。

[0029] 将 pH 3.8、0.5mL、2n mol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到硫辛酸修饰的微囊藻毒素 -LR 包被原的稀释液中, 室温搅拌反应 4h, 反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散, 用该溶液洗涤两遍, 最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μ L 进行重分散, 此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存;

[0030] 抑制反应条件的优化:

[0031] a) 金纳米棒 - 抗体 (GNR-Ab) 与金纳米棒 - 包被原 (GNR-Ag) 的配比

[0032] GNR-Ab 与 GNR-Ag 的配比采用了 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 和 1 : 3 进行优化, 通过动态光散射仪测定的最大的粒径作为该条件的最优条件, 最终 1 : 1 的配比所得到的纳米链的粒径最大, 因此选择 1 : 1 作为 GNR-Ab 与 GNR-Ag 的最佳配比;

[0033] b) 反应时间的优化

[0034] 一般来说, 随着反应时间的延长纳米链的长度会变长, 但是金纳米棒的聚合度到了一定的聚合程度, 纳米链的长度随着反应时间的延长变化就不是非常明显, 并且反应时间过长也会导致检测不是非常灵敏。

[0035] 因此, 选用 15min, 30min 和 1h 最为抑制反应时间的优化条件, 通过测定形成的纳米链的粒径可以得出 30min 的纳米链的粒径和 1h 的粒径变化程度不是很大并且 30min 反应时间短故而采用 30min 作为抑制试验最佳的反应时间。

[0036] c) 反应温度的变化

[0037] 温度对于抗体和抗原反应有比较大的影响, 因此对于反应温度进行了优化, 选用 4 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 作为反应温度优化条件。通过实验结果可知 37 $^{\circ}$ C 形成的纳米链的长度最长, 因而采用 37 $^{\circ}$ C 作为最佳反应温度。

[0038] 标准曲线的建立: 通过测定纳米链的粒径可以建立基于金纳米棒探针的端面与端面相互连接的针对微囊藻毒素 -LR 的检测方法, 步骤为:

[0039] ①向离心管中加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后加入用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释的 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL 的微囊藻毒素 -LR 后混匀, 按照与 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀, 放入 37 $^{\circ}$ C 反应 30min。

[0040] ②反应结束, 取 10 μ L 的反应液加入 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 990 μ L 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释, 混匀。静置 2 分钟, 用动态光散射仪 DLS 测定该反应液的粒子的粒径, 重复两次。

[0041] 运用 MC-LR 的浓度作为横坐标, 纳米链的粒径作为纵坐标建立抑制标准曲线。

[0042] 检测样品中微囊藻毒素 -LR 的浓度: 步骤为:

[0043] ①向离心管中加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后加入用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释的含微囊藻毒素 -LR 的样品液后混匀,按照与 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀,放入 37°C 反应 30min ;

[0044] ②反应结束,取 10 μ L 的反应液加入 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 990 μ L 的 0.005mol/L CTAB 溶液稀释,混匀。静置 2min,用动态光散射仪测定该反应液的粒子的粒径,重复两次;根据所测得的粒径值对照标准曲线求出样品液中微囊藻毒素 -LR 的含量。

[0045] 本发明的有益效果:与传统的 ELISA 方法相比,本发明利用晶种生长法合成的金纳米棒分别与微囊藻毒素的包被原和抗微囊藻毒素的抗体相连,在液体的环境下金纳米棒偶联抗体和金纳米棒偶联包被原反应形成纳米链,微囊藻毒素可以和金纳米棒偶联的包被原进行竞争结合金纳米棒偶联抗体的结合位点,因此微囊藻毒素的含量会影响纳米链的长度。故通过动态光散射测定液体环境中的纳米链的粒径分布来测定微囊藻毒素的含量。本发明只在液体环境中反应,不需要清洗的步骤,只需要一步反应,简化了反应的条件,减轻劳动强度,提高了检测的灵敏度。

附图说明

[0046] 图 1 微囊藻毒素检测的标准曲线。

具体实施方式

[0047] 实施例 1

[0048] (1) 包被原修饰:

[0049] 包被原的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和包被原的结合,具体操作步骤如下:

[0050] ① 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液(含硫辛酸 1.625mg)与 0.2mL 的包被原溶液混合。

[0051] ②将 75 μ L 的含碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h。

[0052] ③用 pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换液 3 次。

[0053] ④将修饰后的包被原放在 4°C 备用。

[0054] (2) 抗体修饰:

[0055] ① 0.3mL 的含硫辛酸的乙醇溶液(含硫辛酸 1.625mg)与 0.4mL 的抗体混合。

[0056] ②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌下逐滴滴入上述溶液中,室温反应 4h。

[0057] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换 3 次透析液。

[0058] ④将修饰后的抗体放在 4°C 备用。

[0059] (3) 抗体和金纳米棒端面偶联:

[0060] 采用晶种生长法合成金纳米棒首先要经过 7500rpm 离心 15min 去除溶液中多余的 Vc、AgNO₃ 和小的球形粒子金纳米棒后,利用 pH 3.8、0.005mol/L 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)含有 0.1% 聚乙二醇(PEG20000)的溶液进行重悬。重悬液的 pH 值用 1mol/L HCl 的进行调整。在金纳米棒的制备过程中 CTAB 起着非常关键的作用。CTAB 主要是分布在金纳米棒的侧面从而金纳米棒的侧面带有正电荷而金纳米棒的端面的分布很少,因此采用硫辛酸修饰的抗体会修饰到金棒的端面而非侧面上。0.5mL、2n mol/L 重分散的 GNRs 逐滴滴加到由 50 μ L 修饰后抗体稀释到 1mL 的抗体的稀释液。室温搅拌反应 4h。反应结束后 6000rpm

离心 10min, 运用 1mL 的 0.005M CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG 的溶液进行重分散。用该溶液洗涤两遍。最后用 50 μ L 的 0.005mol/L CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液进行重分散。此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0061] (4) 包被原和金纳米棒端面偶联：

[0062] 包被原和金纳米棒的偶联与 (3) 抗体和金纳米棒的偶联相似, 只是在包被原的量上有区别, 即加入的包被原 60 μ L 用 940 μ L 的 0.005mol/L CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液进行稀释。

[0063] 将 pH 3.8、0.5mL、2n mol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到硫辛酸修饰的微囊藻毒素 -LR 包被原的稀释液中, 室温搅拌反应 4h, 反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散, 用该溶液洗涤两遍, 最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μ L 进行重分散, 此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存；

[0064] (5) 抑制试验反应条件的优化：

[0065] 抑制试验受到了许多条件的影响, 在此我们对影响抑制试验最大的三个条件进行了优化即 GNR-Ab 与 GNR-Ag 的配比, 抑制试验反应时间, 反应温度。

[0066] a) GNR-Ab 与 GNR-Ag 的配比

[0067] GNR-Ab 与 GNR-Ag 的配比采用了 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 和 1 : 3 进行优化, 通过动态光散射仪测定的最大的粒径作为该条件的最优条件。最终 1 : 1 的配比所得到的纳米链的粒径最大, 因此选择 1 : 1 作为 GNR-Ab 与 GNR-Ag 的最佳配比。

[0068] b) 反应时间的优化

[0069] 一般来说, 随着反应时间的延长纳米链的长度会变长, 但是金纳米棒的聚合度到了一定的聚合程度, 纳米链的长度随着反应时间的延长变化就不是非常明显并且反应时间过长也会导致检测不是非常灵敏。

[0070] 因此, 选用 15min, 30min 和 1h 最为抑制反应时间的优化条件, 通过测定形成的纳米链的粒径可以得出 30min 的纳米链的粒径和 1h 的粒径变化程度不是很大并且 30min 反应时间短故而采用 30min 作为抑制试验最佳的反应时间。

[0071] c) 反应温度的变化

[0072] 温度对于抗体和抗原反应有比较大的影响因此对于反应温度进行了优化选用 4 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 作为反应温度优化条件。通过实验结果可知 37 $^{\circ}$ C 形成的纳米链的长度最长, 因而采用 37 $^{\circ}$ C 作为以后进一步实验的反应条件。

[0073] (6) 标准曲线的建立：

[0074] 微囊藻毒素 -LR(995.2Da) 作为一个小分子不可能被两个抗体分子进行识别。当 GNR-Ab 和 GNR-Ag 混合时, 由于抗体抗原反应导致金纳米棒发生自组装形成长的纳米链。当加入微囊藻毒素 MC-LR 时。MC-LR 就会与包被原竞争抗体的结合位点导致 GNR-Ab 不能两端同时与 GNR-Ag 发生免疫反应, 因此 MC-LR 的浓度会影响纳米链的长度, 通过测定纳米链的粒径可以建立基于金纳米棒探针的端面端面相互连接的针对 MC-LR 的检测方法, 具体的步骤为：

[0075] ①向离心管中加入 20 μ L 的 GNR-Ag 后加入用 0.005mol/L CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液稀释的 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10, 50, 100ng/mL 的微囊藻毒素后混匀, 按

照与 GNR-Ag 与 GNR-Ab 的体积比为 1 : 1 加入 GNR-Ab 混匀,放入 37℃反应 30min。

[0076] ②反应结束,取 10 μL 的反应液加入 990 μL 的 0.005mol/L CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液稀释,混匀。静置 2 分钟,用 DLS 测定该反应液的粒子的粒径,重复两次。

[0077] 运用 MC-LR 的浓度作为横坐标,纳米链的粒径为纵坐标建立抑制标准曲线。

[0078] (7) 实际样本的检测。

[0079] 实际样本是来自无锡不同区域的太湖水。我们通过对实际样本的添加回收率实验来验证本方法的可靠性。太湖水中的含有的原始的微囊藻毒素通过传统的 ELISA 进行测定。在搅拌的条件下添加微囊藻毒素 MC-LR 标准品至预先采集的实际样本太湖水中,添加的浓度为 0.05,0.1,0.5,1,2.5,5ng/mL。添加后将太湖水在 4 摄氏度静置两个小时以达到水中藻毒素的含量达到一致。而后通过本专利建立的检测方法测定 MC-LR 的浓度计算回收率。通过对数据分析得到回收率在 92.21%和 109.38%之间。两组平行试验的变异系数均小于 3.73%。通过这个结果可以得出本专利建立的检测方法是可行的并且简单、快速和省力的一种方法。

[0080] 表 1 实际样本检测即添加回收率实验。

[0081]

太湖水	原始浓度 ¹ (ng/mL)	添加浓度 (ng/mL)	检测浓度 ² 平均 ± SD (ng/mL)	回收率 (%) Mean ± SD ^b
1	0.27	0.05	0.35 ± 0.01	109.38 ± 3.12
2	0.76	0.1	0.86 ± 0.03	99.61 ± 3.73
3	1.04	0.5	1.42 ± 0.02	92.21 ± 1.30
4	1.69	1.0	2.70 ± 0.06	100.37 ± 2.07
5	2.87	2.5	5.15 ± 0.09	95.84 ± 1.67
6	4.33	5.0	9.32 ± 0.10	99.89 ± 1.02

[0082] ¹ 原始浓度采用传统的 ELISA 方法测定。

[0083] ² 检测浓度通过标准曲线计算得到。

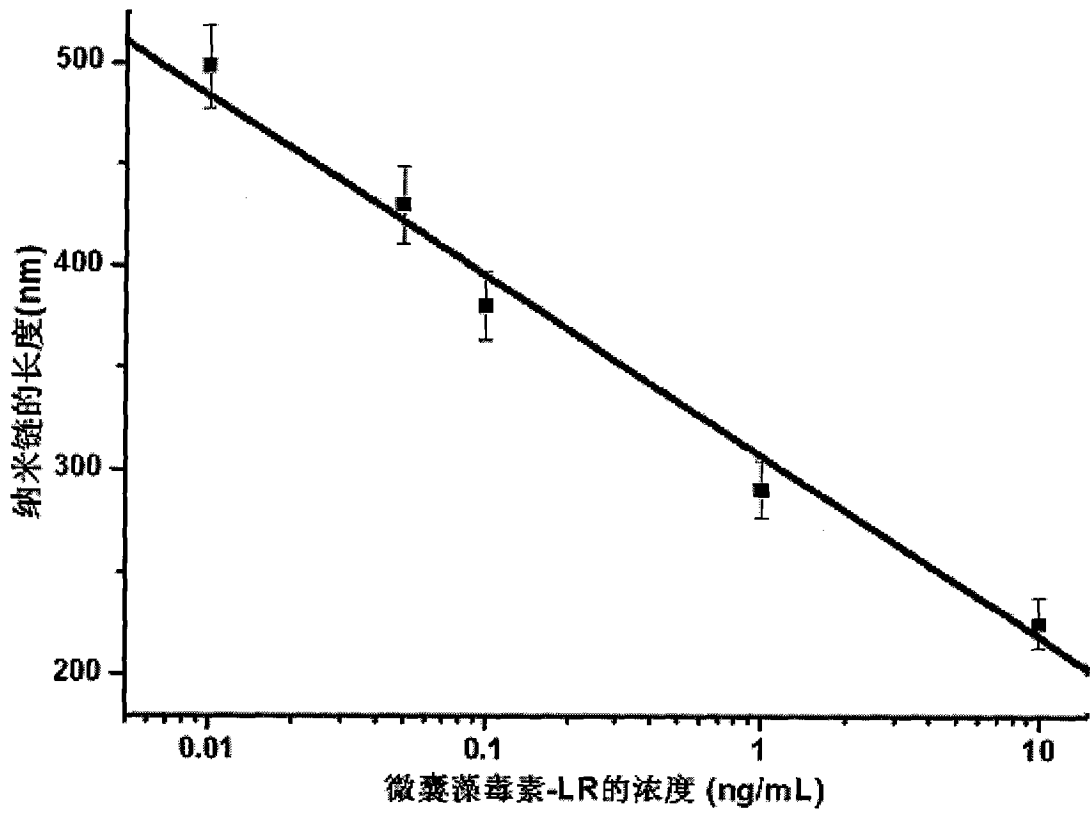


图 1

专利名称(译)	一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素-LR的方法		
公开(公告)号	CN101699288A	公开(公告)日	2010-04-28
申请号	CN200910035793.X	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 徐丽广 陈伟 朱颖越 刘丽强 徐乃丰 马伟 许定华		
发明人	胥传来 徐丽广 陈伟 朱颖越 刘丽强 徐乃丰 马伟 许定华		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N15/02 C07K16/14		
其他公开文献	CN101699288B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于金纳米棒端面自组装检测微囊藻毒素-LR的方法，属于免疫分析化学技术领域。本发明以金纳米棒的端面与微囊藻毒素包被原及抗微囊藻毒素抗体分别偶联形成金纳米棒的探针，利用合成的金纳米棒探针与微囊藻毒素-LR进行免疫反应从而由于金纳米棒端面的抗原抗体反应形成纳米链，通过纳米链的粒径的变化达到检测微囊藻毒素-LR的目的。本发明是在液体环境中反应，不需要清洗的步骤，只需要一步反应，简化了反应的条件，减轻劳动强度，提高了检测的灵敏度。

