



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110308273 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910655762.8

(22)申请日 2019.07.19

(71)申请人 武汉理工大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区珞狮路
122号

(72)发明人 吉晓莉 吴思佳 张净铭 郑伟鹏
雷一凡 冯凌志 饶新楠

(74)专利代理机构 北京君恒知识产权代理事务
所(普通合伙) 11466

代理人 张强

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的
黄曲霉毒素检测方法

(57)摘要

基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法,主要步骤为:制备合成磁性贵金属复合纳米颗粒溶液,用罗丹明6G标记黄曲霉毒素抗体,再利用一端连有巯基,另一端带NHS基团的双官能团聚乙二醇修饰剂,将其固定在磁性贵金属复合纳米颗粒表面;加入已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清样,洗涤2~3次后,在微通道内用磁铁聚集所形成的免疫复合物于一点,用便携式拉曼光谱仪照射该点并读取数据,绘制标准曲线,分析数据后进行标准模型的建立,最后将少量样品稀释到混合胶体溶液中,测量拉曼光谱信号,根据标准模型测定样品中的黄曲霉毒素抗原浓度。该方法操作简单方便,使待测物充分富集,有利于检测信号的放大,提高检测精度,缩短检测时间。

1. 基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 主要步骤为:

磁性贵金属纳米颗粒的标记与修饰: 先用罗丹明6G标记黄曲霉毒素抗体, 再利用一端连有巯基, 另一端带NHS基团的双官能团聚乙二醇修饰剂, 将其固定在磁性贵金属复合纳米颗粒表面;

标准模型的建立: 在固定有黄曲霉毒素抗体的磁性贵金属复合纳米颗粒中加入已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清样品形成复合物, 置于微流控芯片内, 用磁铁聚集所形成的免疫复合物于一点, 用便携式拉曼光谱仪照射并读取数据, 绘制标准曲线, 分析数据后进行标准模型的建立;

未知浓度的黄曲霉毒素的检测: 根据样品基质的不同, 将待测样品加入到磁性贵金属复合纳米颗粒中, 在微流控的微通道内测量拉曼光谱信号, 根据标准模型测定样品中的黄曲霉毒素抗原浓度。

2. 根据权利要求1所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清其浓度取决于待测黄曲霉毒素的浓度, 且应大于待测黄曲霉毒素的浓度。

3. 根据权利要求1所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的微流控通道的直径 $1\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$ 。

4. 根据权利要求1所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的磁性贵金属复合纳米颗粒制备过程为:

第一步: 制备单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒溶液; 以乙酰丙酮铁为前驱体, 1,2-十六烷二醇为还原剂, 油酸、油胺为表面活性剂, 用高温热分解法在 200°C 时合成粒径可调的单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒;

第二步: 合成磁性贵金属复合纳米颗粒溶液; 以上一步制备的超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒为种核, 利用通过物理方法或化学方法在其表面生长 $2\sim 3\text{nm}$ 的贵金属纳米裹层。

5. 根据权利要求1或3所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的磁性贵金属复合纳米颗粒可以通过控制生长时间来调节纳米颗粒的尺寸。

6. 根据权利要求1或3所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的贵金属为金或银或铜。

7. 根据权利要求1或3所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的物理方法为原子蒸镀, 磁控溅射或者脉冲激光沉积。

8. 根据权利要求1或3所述的基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法, 其特征在于, 所述的化学方法为金属离子的自组装生长或利用电化学沉积。

基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测领域,尤其涉及到一种基于贵金属纳米粒子的针对黄曲霉毒素的检测方法。

背景技术

[0002] 食品安全紧密关联着人们生产生活以及经济和社会的发展,食品安全问题越来越受国家和人民的关注,其中真菌毒素是导致食品安全问题的重要因素,当前具有致癌作用的真菌毒素主要包括黄曲霉毒素、伏马毒素、赫曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和杂色曲霉毒素等,其中黄曲霉毒素是污染农产品毒性最强、致癌力最高的真菌毒素。目前国内针对黄曲霉毒素的检测方法主要是基于理化和免疫的分析方法,主要包括有薄层层析法、高效液相色谱法、质谱和毛细管电泳等检测方法。薄层层析法是一种用来分离混合物的技术,在覆有一层吸附剂薄片状的玻璃、塑胶或铝箔纸上进行的,材质通常为硅胶,三氧化二铝或纤维素。这层吸附剂被称为固定相;高效液相色谱是色谱法的一个重要分支,以液体为流动相,采用高压输液系统,将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,在柱内各成分被分离后,进入检测器进行检测,从而实现了对试样的分析;毛细管电泳是用石英毛细管柱,在pH值>3的情况下,其内表面带负电,与缓冲液接触时形成双电层,在高压电场作用下,形成双电层一侧的缓冲液由于带正电而向负极方向移动,从而形成电渗流。同时,在缓冲溶液中,带电粒子在电场作用下,以各自不同速度向其所带电荷极性相反方向移动,形成电泳。带电粒子在毛细管缓冲液中的迁移速度等于电泳和电渗流的矢量和。各种粒子由于所带电荷多少、质量、体积以及形状不同等因素引起迁移速度不同而实现分离。薄层层析法作为我国目前检测毒素类物质的国标方法,虽然操作简便,成本低廉,但由于是半定量方法,灵敏度低,已经难以满足低检测限的需要;而其他仪器分析方法虽然灵敏度高、重现性好,但同时存在着耗时长、操作复杂等缺点,不能满足对黄曲霉毒素现场快速精准检测的需求;基于以上问题,文献Materials Science and EngineeringC33(2013)2229-2234公布了一种基于黄曲霉毒素M1核酸适体的黄曲霉毒素M1电化学测定法,该法选择性和检测灵敏度均高,只是电极组装较为复杂,需专业人才才能完成,并且存在探针信号弱、检测灵敏度差、假阳性高等缺点。

发明内容

[0003] 针对现有技术中存在的上述问题,本发明的目的在于提供基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法,其目的在于使黄曲霉毒素快速充分富集,有利于检测信号的放大,使检测点的寻找更为方便,缩短检测时间,提高检测效率。

[0004] 本发明采用的技术方案为:基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法,主要步骤为:

[0005] 磁性贵金属纳米颗粒的标记与修饰:先用罗丹明6G标记黄曲霉毒素抗体,再利用

一端连有巯基,另一端带NHS基团的双官能团聚乙二醇修饰剂,将其固定在磁性贵金属复合纳米颗粒表面;

[0006] 标准模型的建立:在固定有黄曲霉毒素抗体的磁性贵金属复合纳米颗粒中加入已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清样品形成复合物,置于微流控芯片内,用磁铁聚集所形成的免疫复合物于一点,用便携式拉曼光谱仪照射并读取数据,绘制标准曲线,分析数据后进行标准模型的建立;

[0007] 未知浓度的黄曲霉毒素的检测:根据样品基质的不同,将待测样品加入到磁性贵金属复合纳米颗粒中,在微流控的微通道内测量拉曼光谱信号,根据标准模型测定样品中的黄曲霉毒素抗原浓度。

[0008] 所述的已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清其浓度取决于待测黄曲霉毒素的浓度,且应大于待测黄曲霉毒素的浓度。

[0009] 所述的磁性贵金属复合纳米颗粒制备过程为:

[0010] 第一步:制备单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒溶液;以乙酰丙酮铁为前驱体,1,2-十六烷二醇为还原剂,油酸、油胺为表面活性剂,用高温热分解法在 200°C 时合成粒径可调的单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒;

[0011] 第二步:合成磁性贵金属复合纳米颗粒溶液;以上一步制备的超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒为种核,利用通过物理方法或化学方法在其表面生长 $2\sim 3\text{nm}$ 的贵金属纳米裹层;

[0012] 所述的贵金属为金或银或铜。

[0013] 所述的微流控通道的直径 $1\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 。

[0014] 所述的磁性贵金属复合纳米颗粒可以通过控制生长时间来调节纳米颗粒的尺寸。

[0015] 所述的物理方法为原子蒸镀,磁控溅射或者脉冲激光沉积。

[0016] 所述的化学方法为金属离子的自组装生长或利用电化学沉积。

[0017] 上述技术方案具有如下有益效果:

[0018] 1、磁性贵金属复合纳米颗粒可在磁场或电场中做定向运动,使待测物充分富集,检测点的寻找更为方便,缩短检测时间。

[0019] 2、利用酶磷反应原理,使黄曲霉毒素更充分的富集在磁性贵金属复合纳米颗粒表面,有利于检测信号的放大,提高检测精度。

[0020] 3、使黄曲霉毒素的检测灵敏度更高、操作更简便、户外便携性好、有利于进行在线检测。

[0021] 4、在微流控通道内对黄曲霉毒素进行检测,能够大大减少噪声引入,提高检测结果的准确性。

具体实施方式

[0022] 基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法:

[0023] 第一步,制备单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒溶液。以乙酰丙酮铁为前驱体、1,2-十六烷二醇为还原剂、油酸、油胺为表面活性剂,用高温热分解法合成粒径可调的单分散超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒;

[0024] 第二步,合成磁性贵金属复合纳米颗粒溶液,以上一步制备的超顺磁 Fe_3O_4 纳米颗粒为种核,通过原子蒸镀、磁控溅射或者脉冲激光沉积Au或Ag或Cu贵金属纳米粒子团簇或

者通过贵金属离子 Au^+ 或 Ag^+ 或 Cu^{2+} 的自组装生长或利用电化学沉积的方法在其表面生长一定厚度的Au或Ag或Cu贵金属纳米粒子裹层;

[0025] 第三步:表征磁性贵金属复合纳米颗粒,用TEM、SEM观测纳米颗粒的形貌特征,XRD、XPS分析其结构成分,超导量子测量仪测定其超顺磁特性;

[0026] 第四步:用罗丹明6G标记黄曲霉毒素抗体。将带有异硫氰酸酯基团的罗丹明6G与黄曲霉毒素抗体反应,用分子筛柱分离纯化罗丹明6G标记黄曲霉毒素抗体;

[0027] 第五步:用被罗丹明6G黄曲霉毒素抗体修饰磁性贵金属复合纳米颗粒;利用一端连有巯基,另一端带NHS基团的双官能团聚乙二醇修饰剂,在磁性贵金属复合纳米颗粒表面固定被罗丹明6G黄曲霉毒素抗体;

[0028] 第六步:在固定有黄曲霉毒素抗体的磁性贵金属复合纳米颗粒中加入已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清样品形成复合物,置于微流控芯片中,用磁铁聚集所形成的免疫复合物于一点,用便携式拉曼光谱仪照射该点并读取数据,绘制标准曲线,分析数据后进行标准模型的建立;

[0029] 第七步:根据样品基质的不同(血清、咽拭子、唾液等),将待测样品加入到第五步所得的纳米颗粒中,在微流控芯片的微通道内测量拉曼光谱信号,根据标准曲线测定样品中的黄曲霉毒素抗原浓度。

专利名称(译)	基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法		
公开(公告)号	CN110308273A	公开(公告)日	2019-10-08
申请号	CN201910655762.8	申请日	2019-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	武汉理工大学		
申请(专利权)人(译)	武汉理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉理工大学		
[标]发明人	吉晓莉 吴思佳 郑伟鹏 冯凌志		
发明人	吉晓莉 吴思佳 张净铭 郑伟鹏 雷一凡 冯凌志 饶新楠		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
代理人(译)	张强		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

基于磁性贵金属复合纳米颗粒与微流控的黄曲霉毒素检测方法，主要步骤为：制备合成磁性贵金属复合纳米颗粒溶液，用罗丹明6G标记黄曲霉毒素抗体，再利用一端连有巯基，另一端带NHS基团的双官能团聚乙二醇修饰剂，将其固定在磁性贵金属复合纳米颗粒表面；加入已知浓度的黄曲霉毒素抗原血清样，洗涤2~3次后，在微通道内用磁铁聚集所形成的免疫复合物于一点，用便携式拉曼光谱仪照射该点并读取数据，绘制标准曲线，分析数据后进行标准模型的建立，最后将少量样品稀释到混合胶体溶液中，测量拉曼光谱信号，根据标准模型测定样品中的黄曲霉毒素抗原浓度。该方法操作简单方便，使待测物充分富集，有利于检测信号的放大，提高检测精度，缩短检测时间。