



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109507409 B

(45) 授权公告日 2022.10.04

(21) 申请号 201811368699.1

(22) 申请日 2018.11.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109507409 A

(43) 申请公布日 2019.03.22

(73) 专利权人 山东师范大学
地址 250014 山东省济南市历下区文化东路88号

(72) 发明人 杜淑媛 葛园园 刘梦悦 王欣 张鸿雁

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221
专利代理师 王志坤

(51) Int. Cl.
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 108802133 A, 2018.11.13
CN 104655594 A, 2015.05.27
CN 107796938 A, 2018.03.13
CN 107064254 A, 2017.08.18

CN 106525812 A, 2017.03.22

CN 106501455 A, 2017.03.15

CN 105806908 A, 2016.07.27

Vinita, Narsingh R等. One step synthesis of AuNPs@MoS₂-QDs composite as a robust peroxidase-mimetic for instant unaided eye detection of glucose in serum, saliva and tear.《Sensors and Actuators B: Chemical》.2018,第263卷

Guanglei Fu等. Exploration of Nanoparticle-Mediated Photothermal Effect of TMB-H₂O₂ Colorimetric System and Its Application in a Visual Quantitative Photothermal Immunoassay.《Analytical Chemistry》.2018,

Vinita, Narsingh R等. One step synthesis of AuNPs@MoS₂-QDs composite as a robust peroxidase-mimetic for instant unaided eye detection of glucose in serum, saliva and tear.《Sensors and Actuators B: Chemical》.2018,第263卷

审查员 李倩

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

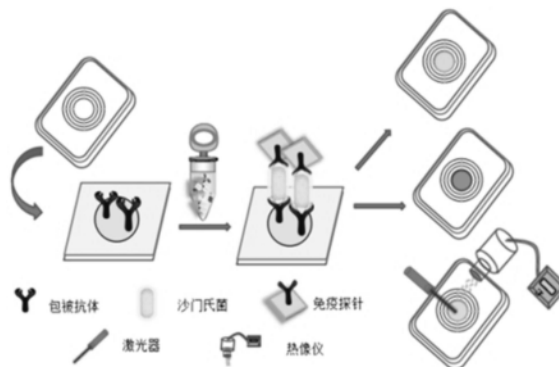
(54) 发明名称

一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于试剂检测领域,具体涉及一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条及其制备方法和应用。所述试纸条以MoS₂@Au纳米复合材料为标记材料。所述试纸条包括包被抗体或适配体、免疫探针、显色液以及硝酸纤维素薄膜;所述免疫探针由MoS₂@Au纳米复合材料与抗体或适配体偶联制得。本发明利用MoS₂纳米材料自身的催化和光热性能制备了均一、稳定的新型试纸条标记材料MoS₂@Au纳米复合材料;以其作为标记材料,一方面由于纳米金对抗体或适配体具有很强的吸附作用,大大增加了标记材料对抗

体或适配体的吸附量及吸附稳定性,有利于提高目标物的检测灵敏度和特异性。



1. 一种基于二硫化钼复合纳米材料催化和光热作用信号放大的试纸条在检测沙门氏菌中的应用,其特征在於,所述二硫化钼复合纳米材料为 MoS_2 @Au纳米复合材料;所述复合纳米材料pH值为6.0~8.0;所述试纸条包括包被抗体或适配体、免疫探针、显色液以及硝酸纤维素薄膜;所述免疫探针由 MoS_2 @Au纳米复合材料与抗体或适配体偶联制得。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述 MoS_2 @Au纳米复合材料的制备方法为将二硫化钼溶液微波超声处理后与氯金酸溶液混合反应3~10min后,离心弃上清,将沉淀复溶于超纯水,再次离心、复溶,即得。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述显色液由底物缓冲液、3,3',5,5'-四甲基联苯胺和过氧化氢组成。

4. 根据权利要求1~3任一项所述应用,其特征在於,试纸条的制备包括以下步骤:

(1) 在硝酸纤维素膜滴加抗体或适配体,包被抗体后,进行封闭、清洗;得抗体或适配体包被的试纸条;

(2) MoS_2 @Au纳米复合材料的制备:二硫化钼溶液微波超声处理后与氯金酸溶液混合反应3~10min后,离心弃上清,将沉淀复溶于超纯水,再次离心、复溶,即得;

(3) 将 MoS_2 @Au纳米复合材料与抗体或适配体偶联后,形成免疫探针,将目标待测物、免疫探针、显色液滴加至步骤(1)制备得到的抗体偶联试纸条上,即得。

一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于试剂检测领域,具体涉及一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 建立一种简便、灵敏的食品中危害物的快速检测方法是保障食品安全的有效途径。由于免疫试纸条快速检测方法的简便、快速和成本较低是目前已建立的针对食品中危害物的快速检测方法中应用范围最广的方法之一。试纸条方法可采用目测进行定性测定,可快速获得检测结果,但灵敏度有待提高。因此利用试纸条标记材料的性质(颜色和光热等)实现目标待测物的灵敏、半定量检测成为研究者的研究热点。

[0003] 目前试纸条的标记材料主要有以下三类,并均具有各自的优缺点:酶促反应材料,可通过材料的催化显色判断实验结果;染色标记材料(胶体金、胶乳微球等),通过染色材料显色的强弱或有无定性或半定量判断实验结果;荧光或磁性纳米材料(量子点、超顺磁粒子等),借助仪器可实现结果的定量分析。其中酶促反应受到成本和生物酶分子稳定性的限制应用的较少。胶体金试纸条是目前应用最广泛的快检技术,但其灵敏度、稳定性和重复性的提高是目前研究的热点。荧光或磁性纳米材料价格昂贵,材料的水溶性和生物相容性有待提高及检测需要借助大型仪器等方面限制了此类试纸条技术的发展和应用。因此综合上面标记材料的优势,寻找价格低廉,水溶性和生物相容性良好,具有颜色和催化性能可通过简便仪器提高检测灵敏度的标记材料成为研究趋势。

发明内容

[0004] 为解决上述检测存在的问题,本发明提供了一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条及其制备方法和应用。本发明所述快速检测试纸条以二硫化钼-纳米金($\text{MoS}_2\text{@Au}$)纳米复合材料为标记材料,克服了单一二硫化钼连接抗体量小、稳定性差的技术问题,并有效利用 $\text{MoS}_2\text{@Au}$ 纳米复合材料优异的催化和光热转化性能,实现对目标待测物的快速、灵敏检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 本发明第一个方面,提供二硫化钼纳米复合材料作为标记材料在检测产品中的应用。

[0007] 本发明第二个方面,提供一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条,所述试纸条以 $\text{MoS}_2\text{@Au}$ 纳米复合材料为标记材料。

[0008] 本发明第三个方面,提供以上所述基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 在硝酸纤维素膜滴加抗体或适配体,包被抗体后,进行封闭、清洗;得抗体或适配体包被的试纸条;

[0010] (2) MoS₂@Au纳米复合材料的制备:二硫化钼溶液微波超声处理后与氯金酸溶液混合反应3~10min后,离心弃上清,将沉淀复溶于超纯水,再次离心、复溶,即得;

[0011] (3) 将MoS₂@Au纳米复合材料与抗体或适配体偶联后,形成免疫探针,将目标待测物、免疫探针、显色液滴加至步骤(1)制备得到的抗体偶联试纸条上,即得。

[0012] 本发明第四个方面,提供以上所述的基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条在检测微生物、蛋白和生物小分子中应用。

[0013] 本发明取得有益的技术效果:

[0014] (1) 本发明利用MoS₂纳米材料自身的催化和光热性能制备了均一、稳定的新型试纸条标记材料MoS₂@Au纳米复合材料;以其作为标记材料,一方面由于纳米金对抗体或适配体具有很强的吸附作用,大大增加了标记材料对抗体或适配体的吸附量及吸附稳定性,有利于提高目标物的检测灵敏度和特异性;

[0015] (2) 本发明利用MoS₂@Au纳米复合材料对底物催化显色性能代替了传统生物大分子酶促反应,大大提高了催化性能的稳定性,降低了检测成本,同时利用纳米材料的催化和光热作用将检测的灵敏度较视觉检测限提高了约1个数量级;

[0016] (3) 本发明利用MoS₂@Au纳米复合材料优异的光热转换性能,可实现对待测物的快速检测,本发明快速检测试纸条整个检测时间约为30min,明显高于酶联免疫(检测约3h)的检测速度;

[0017] (4) MoS₂纳米材料的价格低廉,水溶性和生物相容性优异,不需要低温储存,可显著降低试纸条的成本和储藏稳定性,便于本发明试纸条的规模化生产。

附图说明

[0018] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0019] 图1本发明快速检测试纸条组装原理图;

[0020] 图2本发明快速检测试纸条检测限标准曲线图。

具体实施方式

[0021] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0022] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作和/或它们的组合。

[0023] 正如背景技术所介绍的,寻找价格低廉,水溶性和生物相容性良好的标记材料,是目前所亟需的。基于此,本发明提供了二硫化钼纳米复合材料作为标记材料在检测产品中的应用。

[0024] 进一步的,二硫化钼纳米复合材料可为二硫化钼与石墨烯、胶体金和纳米磁球任一种复合制得。本发明人首次发现:二硫化钼与石墨烯、胶体金和纳米磁球复合得到的纳米

材料可作为标记材料用于物质的快速检测。

[0025] 本发明第二个方面,提供一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条,所述试纸条以 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料为标记材料。

[0026] 进一步的,所述 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料的制备方法为将二硫化钼溶液微波超声处理后与氯金酸溶液混合反应3~10min后,离心弃上清,将沉淀复溶于超纯水,再次离心、复溶,即得。该方法步骤简单、 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料得率高、稳定性好。

[0027] 进一步的,所述试纸条包括包被抗体或适配体、免疫探针、显色液以及硝酸纤维素薄膜;所述免疫探针由 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料与抗体或适配体偶联制得。

[0028] 进一步的,所述显色液由底物缓冲液、3,3',5,5'-四甲基联苯胺和过氧化氢组成。以上试纸条成分相互配合、相互协同,可对物质实现快速、灵敏检测。

[0029] 所述底物缓冲液为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,pH5.0。

[0030] 本发明第三个方面,提供以上所述基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0031] (1)在硝酸纤维素膜滴加抗体或适配体,包被抗体后,进行封闭、清洗;得抗体或适配体包被试纸条;

[0032] (2) $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料的制备:二硫化钼溶液微波超声处理后与氯金酸溶液混合反应3~10min后,离心弃上清,将沉淀复溶于超纯水,再次离心、复溶,即得;

[0033] (3)将 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料与抗体或适配体偶联后,形成免疫探针,将目标待测物、免疫探针、显色液滴加至步骤(1)制备得到的抗体偶联试纸条上,即得。

[0034] 进一步的,步骤(3) $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料pH值为6.0~8.0。在该pH值范围内, $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料催化性能和光电性能俱佳;当pH值低于6.0时, $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料催化性能降低,当pH值高于8.0时, $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料光电性能受pH值影响显著。

[0035] 本发明第四个方面,提供以上所述的基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条在检测微生物、蛋白和生物小分子中的应用。

[0036] 进一步的,所述微生物为沙门氏菌。本发明基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条对沙门氏菌检测灵敏度高,最低检测限可达 10^2CFU/mL 。

[0037] 本发明基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条检测原理:将 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料与抗体或适配体进行偶联,制备具有过氧化物催化性能和光热转换性能的检测探针。

[0038] 将硝酸纤维素膜进行活化,在硝酸纤维素薄膜点样区滴加一定浓度的目标待测物抗体,置于 37°C 恒温培养箱15min,然后用脱脂奶粉溶液进行封闭。封闭结束后洗涤并烘干成功制备试纸条。将待测物与上述检测探针混合孵育,再取混合液滴加在试纸条上进行视觉检测,通过添加 MoS_2 底物进行催化显色以提高灵敏度。激光照射试纸条的检测区,利用 MoS_2 优异的光热转换性能建立温差与目标待测物的数量关系,实现目标待测物的快速、灵敏的半定量检测。

[0039] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0040] 实施例1一种基于二硫化钼复合纳米材料信号放大的试纸条

[0041] 所述快速检测试纸条以 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料为标记材料。

[0042] 所述MoS₂@Au纳米复合材料的制备方法为:

[0043] (1) 用电子天平称取样品二硫化钼6mg,将二硫化钼置于褐色玻璃瓶中,加入2mL超纯水,微波超声处理2h,制成浓度为3mg/mL的二硫化钼溶液。

[0044] (2) 取浓度为1%的氯金酸溶液600μL于10mL的EP管中,用超纯水稀释至6mL,再吸取上述已超声处理的二硫化钼溶液2mL加入EP管中,二硫化钼与氯金酸溶液混合反应5min。

[0045] (3) 将反应液分装至离心管中,设置离心机转速为8000rpm,离心0.5h,离心后用移液枪将上清液吸尽,再用超声装置复溶于3mL超纯水中,相同条件再次离心,最终将沉淀复溶于200μL超纯水中,制成MoS₂@Au纳米复合材料,并测定材料pH值。

[0046] 所述试纸条包括包被抗体或适配体、免疫探针、显色液以及硝酸纤维素薄膜;所述免疫探针由MoS₂@Au纳米复合材料与抗体或适配体偶联制得。

[0047] 所述显色液由底物缓冲液、3,3',5,5'-四甲基联苯胺和过氧化氢组成。具体用量及组成为:3940μL的底物缓冲液(pH=5),40μL的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,10mg/ml)和20μL过氧化氢(30%)组成的体系。

[0048] 所述试纸条的制备方法:

[0049] (1) 在硝酸纤维素膜滴加抗体或适配体,包被抗体后包被抗体后置于37℃恒温培养箱15min;配制浓度为4%的脱脂奶粉,滴加15μL 0.2%Tween-20制成封闭液,将包被抗体的薄膜投入封闭液37℃封闭1.5h,封闭后用0.1mol/L的PBS冲洗液洗涤1min并烘干;得抗体偶联试纸条;

[0050] (2) MoS₂@Au纳米复合材料的制备:具体制备方法同上所述;用1mol/L的NaOH或HCl分别调节MoS₂@Au纳米复合材料的pH值至7.0待用;

[0051] (3) MoS₂@Au 2.5μL与浓度为20μg/mL的抗体2.5μL偶联5min,用1%脱脂奶粉封闭MoS₂@Au-抗体偶联物5min,封闭后7000rpm离心5min,将上清吸去,沉淀用5μL PBS复溶;形成免疫探针,将免疫探针、显色液滴加至步骤(1)制备得到的抗体偶联试纸条上,即得。

[0052] 实施例2所述快速检测试纸条在检测沙门氏菌中的应用

[0053] 所述应用具体为:

[0054] 1) 沙门氏菌的处理

[0055] ①在超净工作台,将试管中鼠伤寒沙门氏菌菌落用灭菌的接种环挑取至液体LB培养基中,37℃振荡培养12h。

[0056] ②将收集的1mL菌液分别稀释到原菌液的10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸倍后,使得菌液浓度梯度依次约为10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹CFU/mL,各自吸25μL菌液涂布至牛肉膏蛋白胨培养基上,置于37℃培养箱中培养16h进行计数。

[0057] ③取上述①培养的沙门氏菌菌液1mL置于EP管中,以4000rpm离心5min,弃上清后用1mL PBS缓冲液清洗1次,复溶于PBS缓冲液中置于4℃低温储存。

[0058] 2) 沙门氏菌抗体偶联试纸条的制备

[0059] 在硝酸纤维素膜点样区滴加0.2mg/mL的鼠伤寒沙门氏菌抗体2μL,包被抗体后置于37℃恒温培养箱15min。配制浓度为4%的脱脂奶粉,滴加15μL 0.2%Tween-20制成封闭液。将包被抗体的薄膜浸入封闭液37℃封闭1.5h,封闭后用0.1mol/L的PBS冲洗液洗涤1min并晾干。

[0060] 3) 免疫探针的制备

[0061] 将pH值为8.0的 $\text{MoS}_2@Au$ 与浓度为 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体偶联5min,用1%脱脂奶粉封闭 $\text{MoS}_2@Au$ -抗体偶联物5min,封闭后7000rpm离心5min,弃上清后,沉淀用PBS复溶,形成免疫探针

[0062] 4) 沙门氏菌的检测

[0063] 将沙门氏菌菌液与 $\text{MoS}_2@Au$ -抗体偶联物混合液 $10\mu\text{L}$ 于点样区,反应5min后用PBS冲洗1min,晾干后滴加显色液 $20\mu\text{L}$,迅速置于 37°C 恒温箱避光干燥15min,最后观察试纸条显色结果:含有沙门氏菌的试纸条的显色区域颜色由无色变蓝的显色。

[0064] 5) 利用光热效应对沙门氏菌定量检测

[0065] 利用激光照射最佳时长及波长,用808nm波长的激光照射点样区1min,用红外热像仪测量记录试纸条点样处照射前后的温度数值和空白处的温度差,算出 ΔT (公式1)。通过对空白膜进行9次检测,计算出 ΔT 的平均值和标准偏差,确定本方法的灵敏度为3倍的空白标准偏差即1.84。以沙门氏菌数量的对数值为横坐标,以 ΔT 为纵坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程为 $Y=2.31X+0.823$, $R^2=0.949$,说明沙门氏菌的个数与温差在 $10^2-10^7\text{CFU}/\text{mL}$ 间呈良好的线性关系,因此,利用纳米材料的光热效应,在本方法中沙门氏菌的最低检测限为 $10^2\text{CFU}/\text{mL}$ 。

[0066] $\Delta T = \Delta T_1 - \Delta T_0$ 公式1

[0067] ΔT ,温度升高值。

[0068] ΔT_0 ,空白(未添加细菌)样品激光照射前后的温度升高值。

[0069] ΔT_1 ,添加样品后激光照射前后的温度升高值。

[0070] 在试验的同时,以 MoS_2 为材料构建的试纸条作为对照,单独将 MoS_2 与抗体偶联后,用于标记检测,检测限为 $10^6\text{CFU}/\text{mL}$ 。

[0071] 试验例

[0072] 对试纸条组装条件进行了优化,优化条件包括:封闭液浓度(脱脂奶粉、Tween-20)、纳米复合材料的pH值和抗体浓度。

[0073] (1) 封闭液浓度:

[0074] 配制浓度依次为1%、2%、3%、4%脱脂奶粉;

[0075] 配制浓度依次为0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%的Tween-20。

[0076] (2) 纳米复合材料的pH值

[0077] 用 $1\text{mol}/\text{L}$ 的NaOH或HCl分别调节 $\text{MoS}_2@Au$ 纳米复合材料的pH值至6.0、7.0、8.0。

[0078] (3) 抗体浓度

[0079] 将抗体浓度稀释至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 待用,配制浓度为4%的脱脂奶粉并滴加 $15\mu\text{L}$ 0.2% Tween-20制成封闭液。

[0080] 按上述实施例2方法进行检测,试验结果表明:封闭液中脱脂奶粉最佳浓度为4% (w/v), Tween-20浓度为0.2% (w/v), 纳米复合材料pH值为8, 抗体度浓度为 $20\mu\text{g}/\text{mL}$

[0081] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

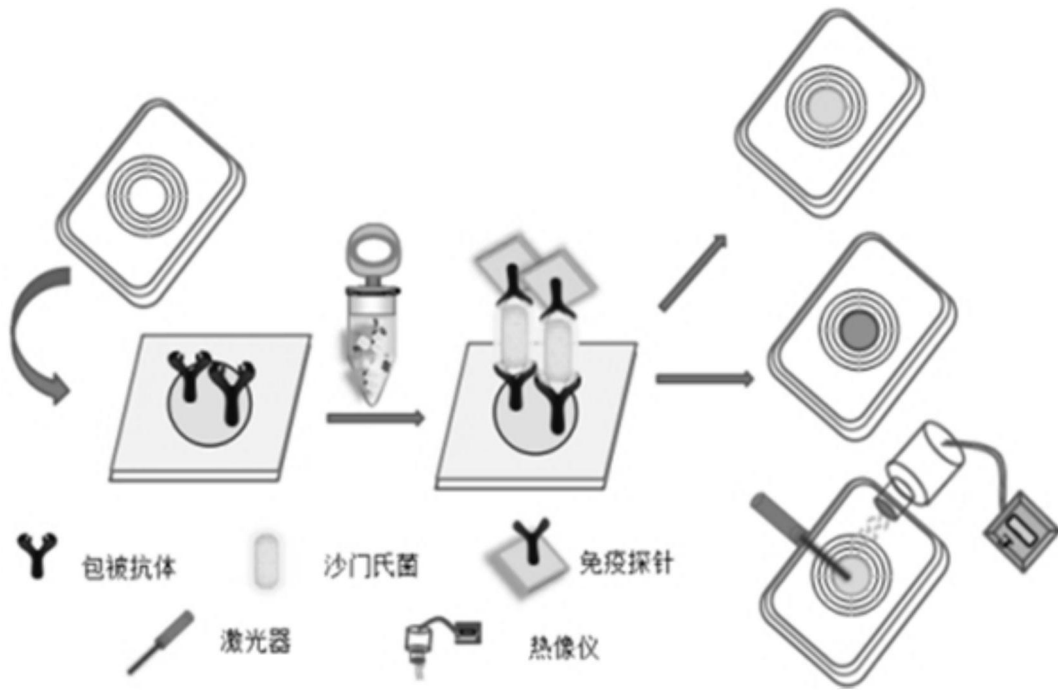


图1

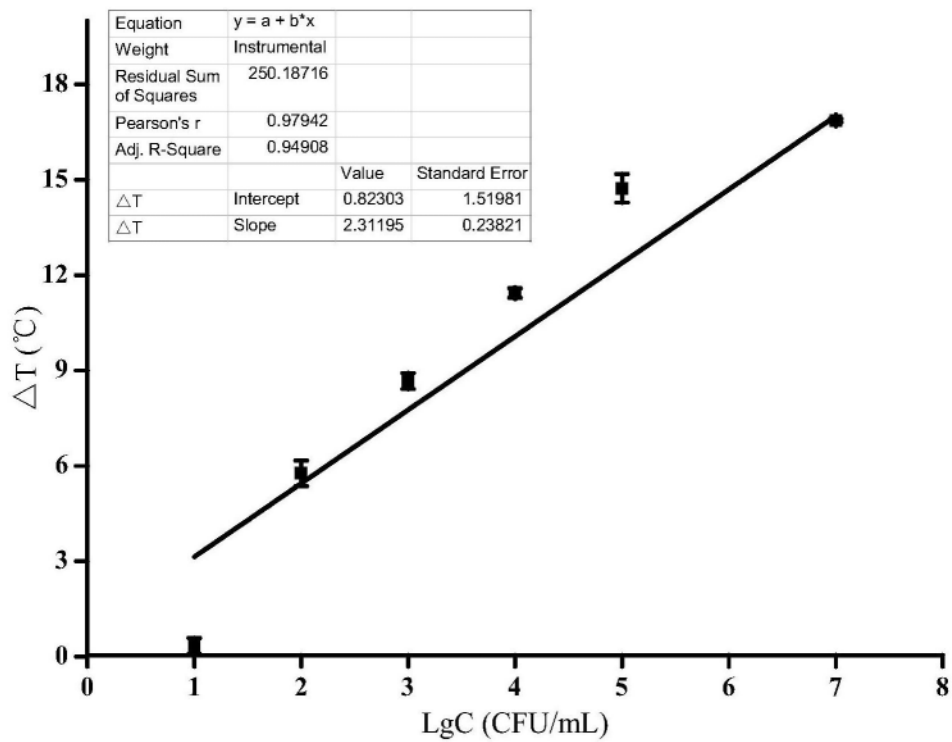


图2