

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810222339.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 27/22 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101676727A

[22] 申请日 2008.9.17

[21] 申请号 200810222339.0

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 阎锡蕴 庄洁 冯静 杨东玲

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 吴小明

权利要求书2页 说明书10页 附图6页

[54] 发明名称

检测蓖麻毒素的方法

[57] 摘要

本发明建立了一种检测蓖麻毒素的新方法。该方法包括：利用偶联有抗蓖麻毒素单克隆抗体(6A6)的磁性纳米颗粒捕获溶液中的蓖麻毒素，再加入偶联有抗蓖麻毒素单克隆抗体(7G7)的胶体金纳米颗粒，利用胶体金催化硝酸银和对苯二酚的氧化还原反应，使银颗粒沉积在胶体金表面。将磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到组合微叉指电极上，烘干，测定该复合物引起电极间电容值的变化。通过更换探针分子，这种新方法可以广泛的用于各种毒素或病毒的检测。与传统双抗夹心ELISA比较，这种基于两种纳米颗粒建立的电容检测系统具有灵敏度高，检测速度快等优点。

1. 一种利用磁性纳米材料和胶体金纳米材料检测蓖麻毒素的双抗夹心 ELISA 方法，包括：

将偶联有一种抗蓖麻毒素单克隆抗体的磁性纳米颗粒与待测样品混合，以捕获蓖麻毒素；

加入偶联有另一种抗蓖麻毒素单克隆抗体的胶体金纳米颗粒；

加入硝酸银和对苯二酚反应，形成磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物；

将上述磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到包括电极的电容检测系统中，检测电极间电容值的改变。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述磁性纳米颗粒为二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中所述胶体金纳米颗粒为氯金酸-柠檬酸钠法合成的金纳米颗粒。

4. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述磁性纳米颗粒偶联的单克隆抗体为 6A6。

5. 根据权利要求 1 或 3 的方法，其中所述胶体金纳米颗粒偶联的单克隆抗体为 7G7。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中所述电极是组合微叉指电极。

7. 根据权利要求 1 的方法，该方法是在溶液中进行的，优选所述磁性纳米颗粒偶联的单克隆抗体和所述胶体金纳米颗粒偶联的单克隆抗体是相同或不同亚型的 IgG，识别蓖麻毒素的相同链或不同链，更优选为鼠源单克隆抗体。

8. 一种利用磁性纳米材料和胶体金纳米材料检测抗原的双抗夹心 ELISA 方法，包括：

将偶联有一种针对所述抗原的单克隆抗体的磁性纳米颗粒与待测样品混合，以捕获蓖麻毒素；

加入偶联有另一种针对所述抗原的单克隆抗体的胶体金纳米颗粒；

加入硝酸银和对苯二酚反应，形成磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒

复合物；

将上述磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到包括电极的电容检测系统中，检测电极间电容值的改变。

9. 根据权利要求8的方法，其中所述抗原为病毒或毒素，优选所述磁性纳米颗粒为二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒和所述胶体金纳米颗粒为氯金酸-柠檬酸钠法合成的金纳米颗粒。

10. 一种检测蓖麻毒素的双抗夹心 ELISA 方法，其特征在于：

将单克隆抗体 6A6 用作捕获抗体；和

将单克隆抗体 7G7 用作检测抗体。

## 检测蓖麻毒素的方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测蓖麻毒素的新方法，具体的说，本发明建立了一种基于磁性纳米颗粒和胶体金纳米颗粒的电容检测系统，用于蓖麻毒素的检测。通过更换抗体分子，这种新的检测方法可以应用于多种毒素或病毒的检测。

### 背景技术

蓖麻毒素(Ricin)是蓖麻籽中含有的一种植物糖蛋白，分子量 60-65 kDa。毒素粉末无色无味，干燥品在室温下稳定，升温也不分解，甚至干热到 100 °C 时对毒性影响也很小，随水分含量的增高稳定性下降，水中煮沸可使其失活。蓖麻毒素由 A 和 B 两条多肽链组成，两链间由一个二硫键连接。毒素 B 链上含有两个半乳糖，可和细胞表面的含半乳糖结合位点结合，通过内陷作用进入细胞质，发挥毒性作用。蓖麻毒素属于蛋白合成抑制剂或核糖体失活剂。

蓖麻毒素以其极强的毒性和致死率而受到各国的普遍重视。在 1997 年生效的《禁止化学武器公约》中，已将蓖麻毒素列入公约的一级控制清单。美国反恐专家组 18 位专家曾联合发布白皮书，认为蓖麻毒素最有可能成为未来战争或恐怖主义者首先使用的生化武器。根据这部白皮书，2001 年美国反恐规划把蓖麻毒素列入最可能使用的毒剂之一。目前检测蓖麻毒素的研究已经成为全世界防御未来生物战争或恐怖主义的重要策略。因此，建立毒素检测系统，加强检测蓖麻毒素的技术储备不仅是十分必要的，而且是迫切需要的。

电容传感器是建立在平板电容模型基础上的一种传感技术，通过测量电容的变化来反映系统的一些特性。

平板电容器的电容值可以由下是计算：

$$C = k \frac{\epsilon S}{d}$$

其中  $\epsilon$  是极板间介质的介电常数,  $\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$ ,

$\epsilon_0$  是空气的介电常数,  $\epsilon_r$  是电介质的介电常数

$S$  是两极板的正对面积

$d$  是两极板的距离

$k$  是常系数

由公式可以看出, 电容值与介电常数  $\epsilon$ 、极板正对面积  $S$  和极板间距  $d$  有关, 当这三个参数中的任意一个改变时电容都会随之发生改变。因此根据改变电容器的参数不同, 电容传感器可以分为三类: 可变间距式、可变面积式和可变电介质式, 根据不同的物理量测量需要可以选择不同的传感器类型。例如可变间距式多用于测量位移、加速度等; 可变面积式用来测量角度变化; 可变电介质式测量多用于测量液位、物质种类等等。

## 发明内容

在本发明中使用了抗蓖麻毒素的单克隆抗体 7G7、8C2 和 6A6。分别分泌单克隆抗体 7G7、8C2 和 6A6 的杂交瘤细胞 7G7、8C2 和 6A6 商购自北京盛源枫科技发展有限公司。

杂交瘤细胞的制备过程如下 (参见 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495, 1975; Yeh et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; Yeh et al., *Int. J. Cancer*, 1982): 以天然纯化经甲醛灭活的蓖麻毒素全毒素作为免疫原对 BALB/C 小鼠进行免疫接种, 每次皮下注射 20  $\mu$ g 蛋白/每只鼠, 每两星期一次, 共三次。取脾细胞之前加强免疫一次, 皮下注射 20  $\mu$ g 蛋白每只鼠。加强免疫之后三天, 取脾脏, 并将脾细胞悬浮于 RPMI 培养基中。在聚乙二醇 (PEG) 存在下, 将脾细胞和 SP2/0-Ag14 鼠骨髓瘤细胞进行融合, 并用 HAT 选择性培养基 (含次黄嘌呤 (hypoxanthin)、氨基蝶呤 (aminopterin) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (thymidin) 的培养基) 对杂交瘤进行筛选, 获得杂交瘤细胞。用 ELISA 的方法筛选与天然蓖麻毒素有强结合能力的抗体, 获得三株抗体, 分别命名为 7G7、8C2 和 6A6, 同时获得分泌这些抗体的杂交瘤细胞, 依次是 7G7、8C2 和 6A6。

本发明人鉴定了这三株抗体均属 IgG1 亚型。ELISA 证实了这些抗体和蓖麻毒素的特异性结合。

利用免疫印迹 (Western blotting) 的方法, 证实 6A6 识别蓖麻毒素的 A 链, 7G7 和 8C2 识别蓖麻毒素的 B 链。

本发明同时利用识别 A 链的抗体, 如 6A6; 和识别 B 链的抗体, 如 7G7, 开发了一套夹心 ELISA 的方法, 用于检测蓖麻毒素。

利用 6A6 和 7G7 两株抗体, 建立了一种基于两种纳米颗粒的电容检测系统, 该系统利用偶联有抗蓖麻毒素单克隆抗体 (6A6) 的磁性纳米颗粒捕获溶液中的蓖麻毒素, 再加入偶联有抗蓖麻毒素单克隆抗体 (7G7) 的胶体金纳米颗粒, 利用胶体金催化硝酸银和对苯二酚的氧化还原反应, 使银颗粒沉积在胶体金表面。将磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到组合微叉指电极上, 烘干, 测定该复合物引起电极间电容值的变化。

本发明是通过改变电极间的电介质来实现对蓖麻毒素检测的。当溶液中存在蓖麻毒素时, 会形成磁性纳米颗粒-蓖麻毒素-胶体金-银颗粒复合物。由于银颗粒具有良好的导电性, 介电常数远大于空气, 因而当极板间有银颗粒存在时, 会引起电容值的显著增加。

在本发明的一个实施方案中, 所述的磁性纳米颗粒为二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒, 直径为 1  $\mu\text{m}$ 。

在本发明的另一个实施方案中, 所述的偶联磁性纳米颗粒的单克隆抗体为 6A6。

在本发明的另一个实施方案中, 所述的胶体金纳米颗粒直径为 10 nm。

在本发明的另一个实施方案中, 所述的偶联胶体金颗粒的单克隆抗体为 7G7。

在本发明的另一个实施方案中, 所述的组合微叉指电极是利用电子线路加工工艺加工而成, 电极厚度是 0.1  $\mu\text{m}$ 。基底是环氧树脂材料, 厚度为 1.48 mm。

在本发明的另一个实施方案中, 所述的组合微叉指电极, 其特征在于: 其中相邻叉指间距为 100  $\mu\text{m}$ , 指宽度为 0.3 mm, 交叉部分的长度为 4 mm。

在本发明的另一个实施方案中, 通过更换抗体分子, 所述方法可用于多种毒素或病毒的检测。

更具体地，本发明涉及以下各项：

1. 一种利用磁性纳米材料和胶体金纳米材料检测蓖麻毒素的夹心 ELISA 方法，包括：

将偶联有一种抗蓖麻毒素单克隆抗体的磁性纳米颗粒与待测样品混合，以捕获蓖麻毒素；

加入偶联有另一种抗蓖麻毒素单克隆抗体的胶体金纳米颗粒；

加入硝酸银和对苯二酚反应，形成磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物；

将上述磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到包括电极的电容检测系统中，检测电极间电容值的改变。

2. 根据以上 1 的方法，其中所述磁性纳米颗粒为二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒，该材料是以四氧化三铁磁性纳米颗粒为核，外面包覆了一层二氧化硅材料制得。

3. 根据以上 1 的方法，其中所述胶体金纳米颗粒为氯金酸-柠檬酸钠法合成的金纳米颗粒。

4. 根据以上 1 或 2 的方法，其中所述磁性纳米颗粒偶联的单克隆抗体为 6A6。

5. 根据以上 1 或 3 的方法，其中所述胶体金纳米颗粒偶联的单克隆抗体为 7G7。

6. 根据以上 1 的方法，其中所述电极是组合微叉指电极，该电极是由传统的平板电极并列叠加而成。

7. 根据以上 1 的方法，该方法是在溶液中进行的，优选所述磁性纳米颗粒偶联的单克隆抗体和所述胶体金纳米颗粒偶联的单克隆抗体是相同或不同亚型的 IgG，识别蓖麻毒素的相同链或不同链，更优选为鼠源单克隆抗体。

8. 一种利用磁性纳米颗粒和胶体金纳米颗粒检测样品中抗原的夹心 ELISA 方法，包括：

将偶联有一种针对所述抗原的单克隆抗体的磁性纳米颗粒与待测样品混合，以捕获蓖麻毒素；

加入偶联有另一种针对所述抗原的单克隆抗体的胶体金纳米颗粒；

加入硝酸银和对苯二酚反应，形成磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物；

将上述磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到包括电极的电容检测系统中，检测电极间电容值的改变。

9. 根据以上 8 的方法，其中所述抗原为病毒或毒素，优选所述磁性纳米颗粒为二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒和所述胶体金纳米颗粒为氯金酸-柠檬酸钠法合成的金纳米颗粒。

10. 一种检测蓖麻毒素的夹心 ELISA 方法，其特征在于：

将单克隆抗体 6A6 用作捕获抗体；和

将单克隆抗体 7G7 用作检测抗体。

应当指出，上述实施方案和特征可以任意组合。

本发明的特点在于：(1) 利用一组抗蓖麻毒素的单克隆抗体，建立了双抗夹心 ELISA 方法用于蓖麻毒素的检测；(2) 建立了一种基于两种纳米颗粒的电容检测系统，该系统灵敏度高，检测速度快。

## 附图简述

图 1. 抗蓖麻毒素单克隆抗体 7G7、8C2 和 6A6 的亲合力(图中 8B11、9H7 和 4A5 分别是商购自北京盛源枫科技发展有限公司的其它抗蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞分泌的相应抗体)；

图 2. 抗蓖麻毒素单克隆抗体 7G7、8C2 和 6A6 的纯化，(A) 腹水，(B) 穿过，(C) 纯化的抗体；

图 3. 抗蓖麻毒素单克隆抗体亚类鉴定；

图 4. 抗蓖麻毒素单克隆抗体活性检测；

图 5. 抗蓖麻毒素单克隆抗体抗原表位鉴定；

图 6. 抗蓖麻毒素单克隆抗体不同组合检测灵敏度比较；

图 7. 双抗夹心 ELISA 检测蓖麻毒素；

图 8. 双抗夹心 ELISA 检测蓖麻毒素标准曲线；

图 9. 透射电镜(TEM)观察胶体金纳米颗粒(A)和磁性纳米颗粒(B)及组合微叉指电极的设计(C)；

图 10. 基于两种纳米颗粒的蓖麻毒素电容检测系统的示意图；



图 11. 蓖麻毒素电容检测系统的特异性;  
图 12. 蓖麻毒素电容检测系统的灵敏度。

### 具体实施方式

下面进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

#### **实施例 1 单克隆抗体 7G7、8C2 和 6A6 的活性鉴定**

抗蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞 7G7、8C2、6A6、4A5、9H7 和 8B11 购自北京盛源枫科技发展有限公司。利用 ELISA 的方法测定单克隆抗体 7G7、8C2、6A6、4A5、9H7 和 8B11 对蓖麻毒素的亲合力。具体方法如下: 使用蓖麻毒素(商购自 Sigma-Aldrich), 作为包被抗原, 检测杂交瘤细胞 7G7、8C2、6A6、4A5、9H7 和 8B11 的培养上清液。具体的做法是, 首先在 ELISA 板上过夜包被 50  $\mu$ l 的 5  $\mu$ g/ml 蓖麻毒素蛋白, 用 PBS 洗三遍。加入 3% BSA 封闭 1 h。然后加入分泌抗体的杂交瘤培养上清孵育 1 h, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体孵育 1 h, 最后加入底物(200 ng/ml 四甲基联苯二胺(TMB), 0.03%  $H_2O_2$ , pH4.5)显色, 50  $\mu$ l/孔, 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min, 加入 50  $\mu$ l/孔 2 M  $H_2SO_4$  终止反应, 酶标仪 450 nm 读数(如图 1)。从 ELISA 的结果可以看到, 7G7、8C2 和 6A6 的亲合力较高。

大量培养扩增杂交瘤细胞 7G7、8C2 和 6A6, 分别制成细胞悬液, 用于制备抗体腹水。腹水的制备方法简述如下: 六周龄 BALB/C 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)腹腔注射降植烷(Sigma-Aldrich) 0.5 ml/只。10 天后, 将杂交瘤细胞悬液接种于 BALB/C 小鼠腹腔,  $1 \times 10^7$ /ml/只, 约十天后, 收集腹水, 离心取上清液。

通过蛋白 A 亲和层析(Roche), 从腹水中纯化单克隆抗体(如图 2)。将纯化单克隆抗体无菌过滤, 并冷藏或冷冻保存。

利用鼠抗体亚型鉴定试剂盒(BD Pharmingen), 鉴定出抗体 7G7、8C2 和 6A6 均属于 IgG1 亚型, 如图 3 所示。

ELISA 方法用于鉴定纯化的 7G7、8C2 和 6A6 三种抗体对于蓖麻毒素蛋白的结合特异性。天然纯化的蓖麻毒素用作包被抗原。ELISA 结果如图 4 所示，6A6，7G7 和 8C2 均能很好的识别蓖麻毒素。

### 实施例 2 单克隆抗体 7G7、8C2 和 6A6 的抗原表位鉴定。

利用 Western blotting 的方法，鉴定了本发明中所述的三株抗体的抗原表位。具体方法是，用 0.1 M 还原剂二硫苏糖醇（DTT）将连接蓖麻毒素 A、B 链的二硫键打开，利用 Western blotting 鉴定抗体识别的抗原表位。其中 6A6，可以识别蓖麻毒素 A 链，7G7 和 8C2 可以识别蓖麻毒素 B 链（如图 5）。

### 实施例 3 双抗夹心 ELISA 检测蓖麻毒素系统的建立

本发明建立了一种双抗夹心 ELISA 方法，检测蓖麻毒素。首先筛选检测蓖麻毒素的配对抗体，具体方法如下：首先将 7G7、8C2 和 6A6 生物素化（Pierce），将三株抗体分别配对（如表 1），比较不同配对检测蓖麻毒素的灵敏度，如图 6。证实了用 6A6 作为捕获抗体，生物素（Biotin）标记的 7G7（7G7-bio，bio 表示生物素）作为检测抗体，检测灵敏度最高。

表 1

包被抗体	6A6	6A6	7G7	7G7	8C2	8C2
检测抗体	7G7-bio	8C2-bio	6A6-bio	8C2-bio	6A6-bio	7G7-bio

在确定捕获抗体和检测抗体后，以蓖麻毒素（商购自 Sigma-Aldrich）作为标准品，确定检测系统的线性范围。实验证实，本发明开发的夹心 ELISA 具有较高的灵敏度和较宽的线性范围。

具体实验方法如下：

1) ELISA 板包被抗体：将抗体 6A6 以 0.02 M PBS（pH 7.25）稀释至 2  $\mu\text{g/ml}$ ，50  $\mu\text{l/孔}$  4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。

2) 封闭非特异结合位点：200  $\mu\text{l/孔}$  2%BSA/PBS，室温孵育 2 h。

3) 样品孵育：将已知浓度的蓖麻毒素梯度以封闭液稀释用来绘制标准曲线，稀释后的浓度分别为 0、4、8.1、16.12、31.25、62.5、125、250、500 ng/ml。每个样品设两次重复。室温孵育 2 h。

4) PBST 5 次，PBS 1 次洗去非特异性结合。

5) 检测抗体孵育：检测抗体 7G7-bio 以 2%BSA/PB 稀释至 1  $\mu\text{g/ml}$ ，50  $\mu\text{l/孔}$  室温孵育 2 h。

6) PBST 5 次，PBS 1 次洗去非特异性结合。

7) 酶标二抗检测信号：加入合适浓度的链霉亲和素-HRP (Sigma-Aldrich)，50  $\mu\text{l/孔}$ ，室温孵育 1 h。

8) PBST 5 次，PBS 1 次洗去非特异性结合。

9) 颜色反应：加入底物 (200 ng/ml 四甲基联苯二胺 (TMB)，0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，pH4.5) 显色，100  $\mu\text{l/孔}$ ，37  $^\circ\text{C}$  15 min，加入 50  $\mu\text{l/孔}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应，酶标仪 450 nm 读数。

10) 软件统计结果：软件分析吸光值，根据标准蓖麻毒素浓度绘制标准曲线。

### 结果分析：

利用已知蓖麻毒素的浓度制作标准曲线。稀释后蓖麻毒素的浓度为 0~500 ng/ml，绘制标准曲线如图 7。经计算得出该方法检测范围在 0~62.5 ng/ml 内符合线性。取蓖麻毒素浓度 0~62.5 ng/ml 作图所得到的标准曲线 ( $R^2=0.99$ )，如图 8 所示。该检测系统的灵敏度为 5 ng/ml (50 pM)。

### 实施例 4 胶体金和二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒的合成及组合微叉指电极的制作

通过氯金酸-柠檬酸钠还原法 (Oliver C, Methods in molecular biology, 34:299-302,1994) 制备胶体金纳米颗粒。将 1 ml, 1% 的氯金酸 ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Sigma-Aldrich) 溶液加入 100 ml 双蒸水中，加热至沸腾，迅速加入 5 ml 1% 的柠檬酸钠溶液，在搅拌下恒温回流制得红色胶体金颗粒。透射电镜下观察胶体金颗粒的大小是否均匀一致。测量胶体金颗粒直径为 10 nm，尺度均一、分散性和稳定性较好 (如图 9A)。

将26 mg四氧化三铁磁性纳米颗粒（天津市倍思乐色谱技术开发中心）与40 ml乙醇混合，加入0.5 ml去离子水和1.5 ml 25%氨水。不断搅拌，加入正硅酸乙酯（TEOS）（Sigma-Aldrich）反应8 hr，取出，用乙醇洗涤三遍，60 °C干燥。透射电镜观察磁性纳米颗粒的直径为1  $\mu\text{m}$ （如图9B）。

组合微叉指电极的灵敏度相比传统的电容器提高数倍（Varshney M & Li Y, *Biosens. Bioelectron.*, 22:2408-2414,2007），更适合测量微小的变量。同时组合微叉指电极的电极设计方便，尺寸容易控制，在实际应用中可以根据应用环境的要求调整电极的大小，以及叉指的指长、指宽、指间距和叉指的数目。图9C示出了叉指电极的尺寸，其中相邻叉指间距为100  $\mu\text{m}$ ，指宽度为0.3 mm，交叉部分的长度为4 mm。

电极采用电子线路加工工艺加工而成（中国科学院电工研究所），电极厚度是0.1  $\mu\text{m}$ 。基底是环氧树脂材料，厚度为1.48 mm。这种材料既经济方便又能抗酸碱腐蚀，适合用于生物分子的检测。

### 实施例5 基于两种纳米颗粒的蓖麻毒素电容检测系统的建立

为了建立电容检测系统，我们首先将胶体金纳米颗粒与抗蓖麻毒素单克隆抗体7G7偶联，作为检测探针。具体方法如下：取1 ml 实施例4中制备的胶体金颗粒，用25 mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调pH至8.5，加入10  $\mu\text{l}$ ，1 mg/ml的抗蓖麻毒素单克隆抗体7G7，混匀，室温静置10 min。加入100  $\mu\text{l}$  10% BSA，混匀，室温静置10 min，10000 rpm离心20 min，吸除上清。用50  $\mu\text{l}$  PBS重悬胶体金沉淀，4 °C保存。

随后我们将实施例4中制备的二氧化硅包埋式四氧化三铁纳米颗粒与抗蓖麻毒素单克隆抗体6A6偶联，作为捕获探针。具体方法如下：取1 ml 10 mg/ml的二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性纳米颗粒，加入50 mg/ml的NHS（N-羟基琥珀酰亚胺），EDC（碳二亚胺）各50  $\mu\text{l}$ ，室温孵育30 min，用去离子水清洗，除去多余的NHS/EDC。加入1 ml pH 6.0的乙酸钠，100  $\mu\text{g}$ 的抗蓖麻毒素单克隆抗体6A6，混匀，4 °C孵育2 hr，PBS洗涤，加入50 mM pH 7.4 Tris-HCl封闭活化的羧基，PBS重悬，4 °C保存。

在制备好检测探针和捕获探针后，利用偶联有抗蓖麻毒素单克隆抗体6A6的磁性纳米颗粒（MNPs-6A6）捕获溶液中的蓖麻毒素，再加入偶联

有抗蓖麻毒素单克隆抗体 7G7 的胶体金纳米颗粒 (GNPs-7G7), 室温孵育 30 min, 用 PBN (与磷酸盐缓冲液不同之处在于以  $\text{NaNO}_3$  替代磷酸盐缓冲液中的  $\text{NaCl}$ ) 洗涤, 除去非特异吸附的胶体金, 加入硝酸银/对苯二酚混合液 (Sigma-Aldrich), 避光反应 5 min, 将磁性纳米颗粒-抗原-胶体金-银颗粒复合物转移到组合微叉指电极上, 烘干 (如图 10)。

本发明利用电化学工作站 (Zahner) 测定该复合物引起电极间电容值的变化。含有蓖麻毒素的实验组电容值为 25 pF, 而不含蓖麻毒素的对照组电容值为 3 pF (如图 11)。

为了鉴定该检测系统的特异性, 我们以正常小鼠 IgG (mIgG) 作为对照, 如上所述制备偶联有小鼠 IgG 的磁性纳米颗粒 (MNPs-mIgG), 然后用于与以上相同的检测体系中用于检测蓖麻毒素。可以观察到无论溶液中是否有蓖麻毒素, 电容值均为 3 pF (如图 11)。

为了鉴定该检测系统的灵敏度, 将蓖麻毒素梯度稀释 ( $10^{-9} \sim 10^{-13}$  M), 蓖麻毒素的浓度大于  $10^{-11}$  M 均可检出 (如图 12)。

与传统夹心 ELISA 比较, 电容检测系统的灵敏度更高, 耗时更短, 如表 2。

表 2 电容检测系统与传统夹心 ELISA 的比较

	灵敏度	检测时间
夹心 ELISA	50 pM	> 3 小时
电容检测系统	10 pM	< 1 小时

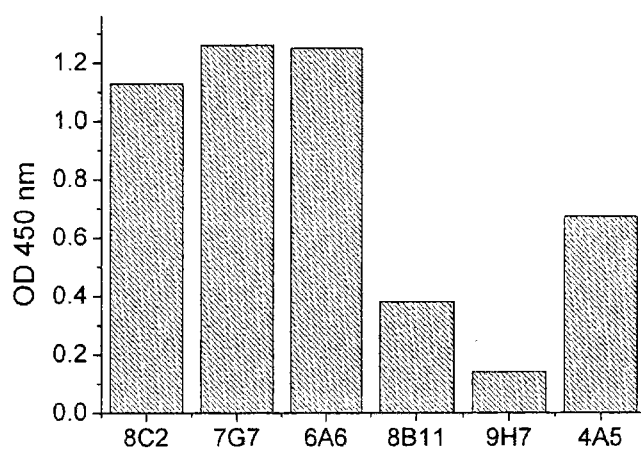


图 1

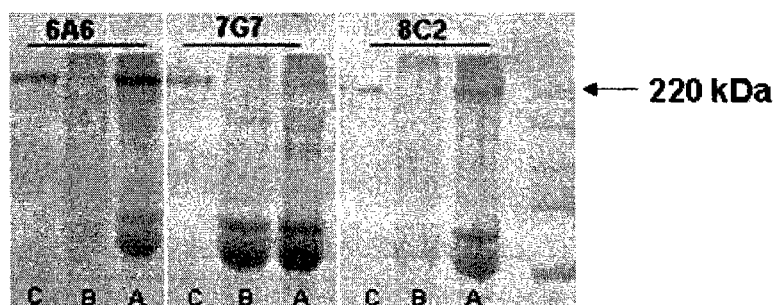


图 2

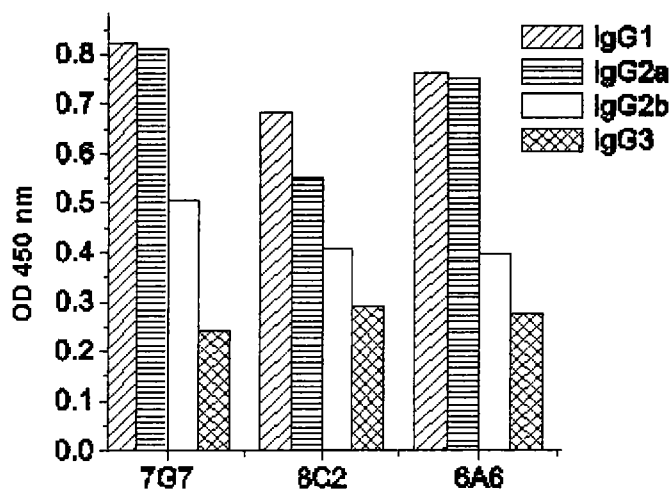


图 3

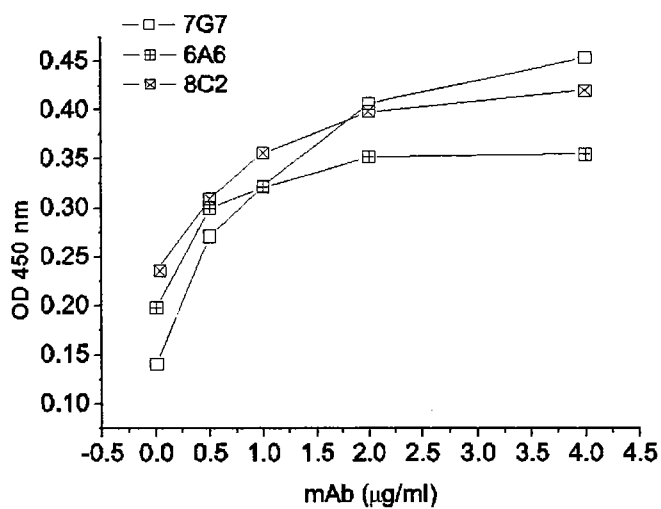


图 4

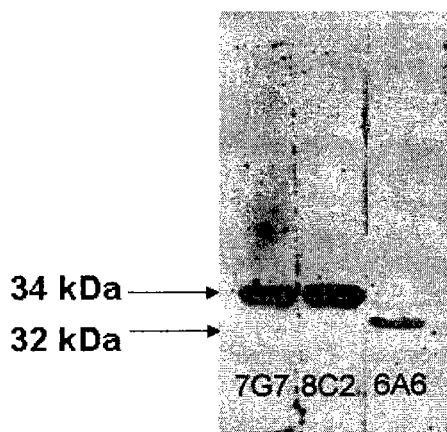


图 5

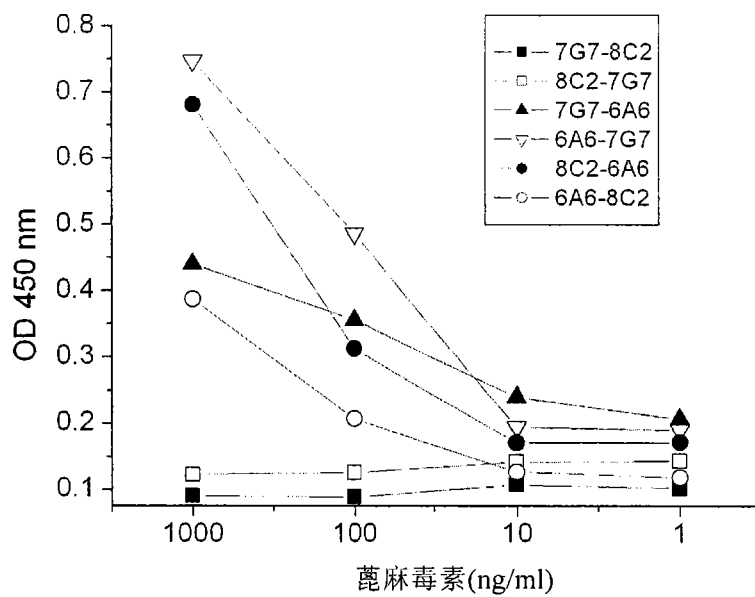


图 6



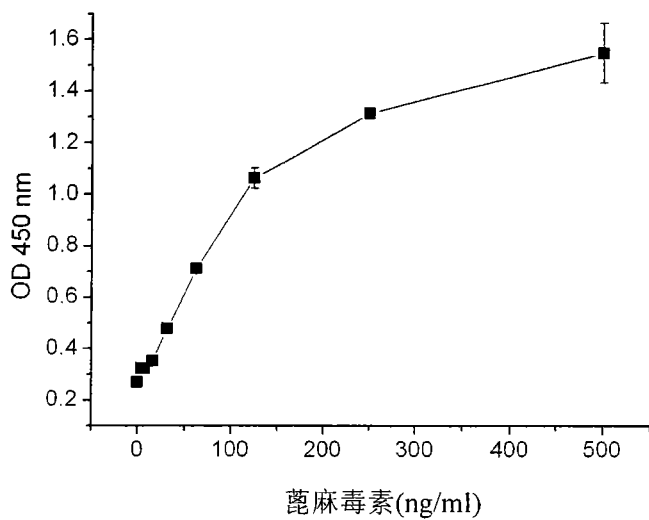


图 7

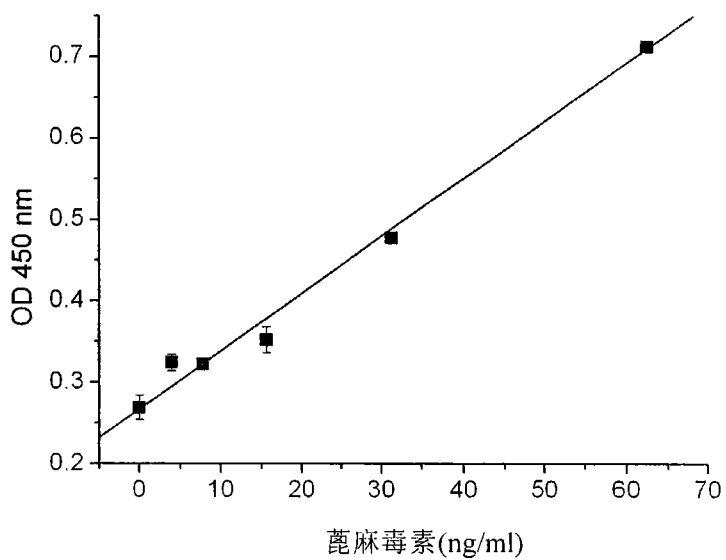


图 8

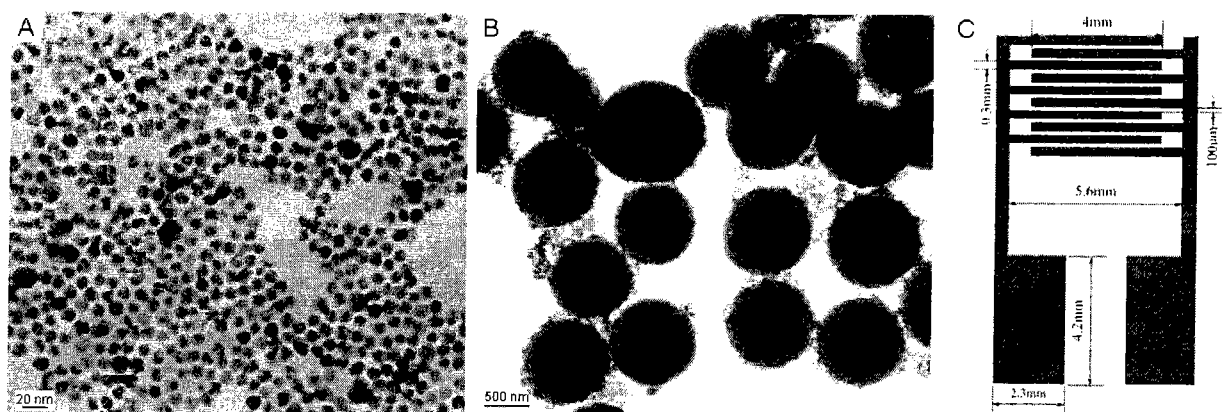


图 9

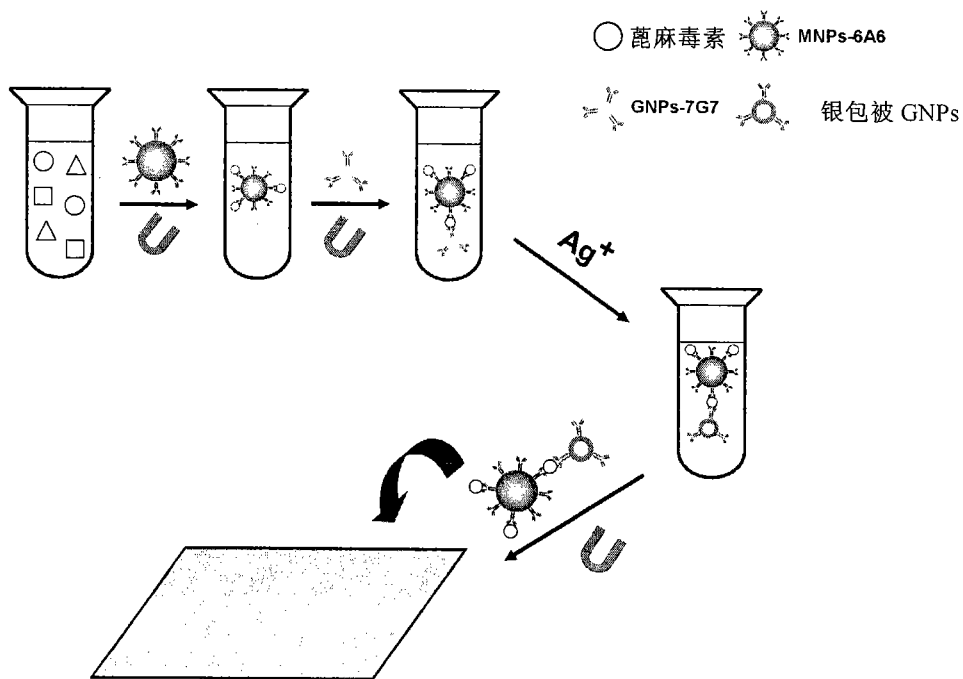


图 10

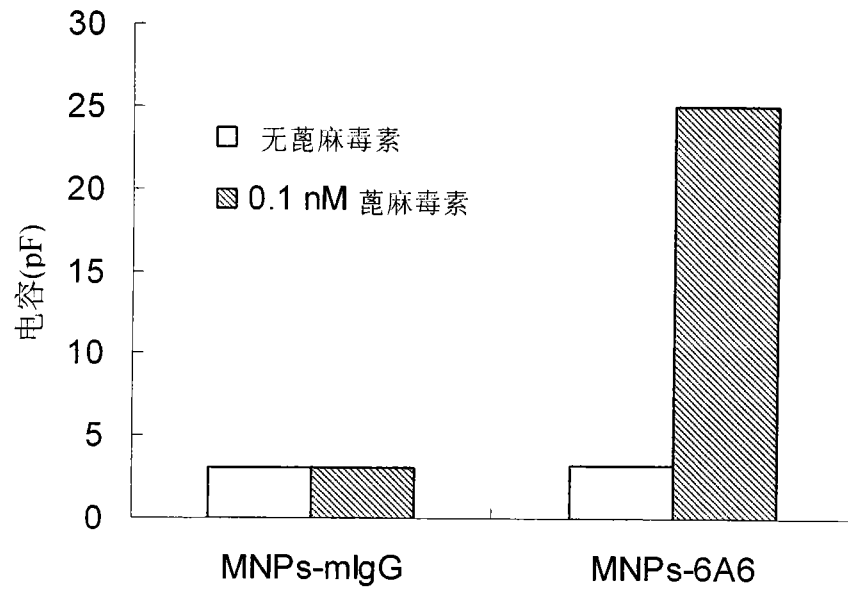


图 11

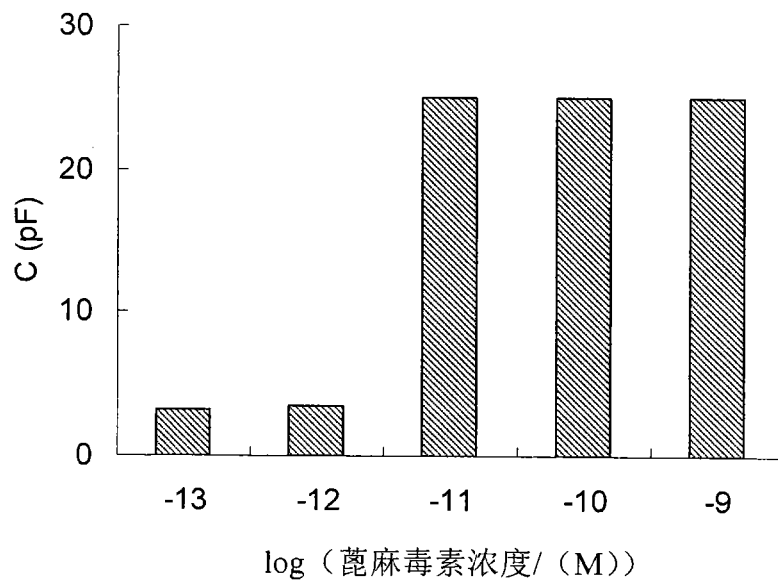


图 12