



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103472219 B

(45) 授权公告日 2014.06.11

(21) 申请号 201310460621.3

(22) 申请日 2013.09.30

(73) 专利权人 湖南农业大学

地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区东湖湖南农业大学

(72) 发明人 刘霞 李文进 李蕾 毛璐刚 杨阳

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公司 43113

代理人 何为 袁颖华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/552 (2014.01)

(56) 对比文件

CN 102519912 A, 2012.06.27,

CN 102628803 A, 2012.08.08,

CN 102947703 A, 2013.02.27,

CN 101629909 A, 2010.01.20,

CN 102072894 A, 2011.05.25,

Ru-Ping Liang 等. Magnetic Fe3O4 composite-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched α -fetoprotein.. 《Analytica Chimica Acta》. 2012, 第 737 卷

Lucian-Gabriel Zamfir 等. Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized

magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection.. 《Sensors and Actuators B: Chemical》. 2011, 第 159 卷

Scott D. Soelberg 等. Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification.. 《Anal Chem》. 2009, 第 81 卷

Lucian-Gabriel Zamfir 等. Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection.. 《Sensors and Actuators B: Chemical》. 2011, 第 159 卷

Scott D. Soelberg 等. Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification.. 《Anal Chem》. 2009, 第 81 卷

Gemma Aragay. Nanomaterials for sensing and destroying pesticides.. 《Chem Rev》. 2012, 第 112 卷

Jung-Soon Park 等. A surface plasmon resonance biosensor for detecting Pseudomonas aeruginosa cells with self-assembled chitosan-alginate

(续)

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法

(57) 摘要

一种采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法, 该方法是将免疫磁纳米粒子加入到含溴氰菊酯的待测样品溶液中, 使免疫磁纳米粒子与溴氰菊酯发生特异性结合, 经外加磁场分离后得到结合物, 将该结合物直接注入经壳聚糖修饰的 SPR 芯片表面, 以检测出待测样品

溶液中的溴氰菊酯含量。上述免疫磁纳米粒子是将磁纳米粒子表面的羧基用 EDC/NHS 混合液活化后, 加入溴氰菊酯的单克隆抗体溶液, 再加入乙醇胺封闭, 经外加磁场分离后, 用 PBS 缓冲液定容制得。本方法将样品前处理和检测技术相结合, 有效提高了检测的灵敏度和准确性, 且操作简单, 快速、选择性高、重现性和再生性好, 回收率符合要求, 可直接对农产品中溴氰菊酯的残留进行检测, 具有重要的实际应用价值。

[转续页]

CN 103472219 B

[接上页]

(56) 对比文件

multilayers.. 《Talanta》.2007, 第 72 卷

S.T.Koev 等.Chitosan: an integrative biomaterial for lab-on-chip devices.. 《Lab Chip》.2012, 第 10 卷

Ru-Ping Liang 等.Magnetic Fe₃O₄@

Au composite-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched α -fetoprotein.. 《Analytica Chimica Acta》.2012, 第 737 卷

1. 一种采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法,其特征在于,该方法是将免疫磁纳米粒子加入到含溴氰菊酯的待测样品溶液中,使免疫磁纳米粒子与溴氰菊酯发生特异性结合,经外加磁场分离后得到免疫磁纳米粒子和溴氰菊酯的结合物,将该结合物直接注入经壳聚糖修饰的 SPR 芯片表面,获得 SPR 响应信号,以检测出待测样品溶液中的溴氰菊酯含量;

其中,上述免疫磁纳米粒子是取 200 μ L 1.9-3.8mM 的羧基化磁纳米粒子溶液,加入 0.4M 的 EDC 和 0.1M 的 NHS 混合溶液共 400 μ L,漩涡震荡 5-10min,冰浴超声 5-10min 后,再加入 200 μ L 0.27-0.55mg/mL 溴氰菊酯单克隆抗体溶液,漩涡震荡 5-10min,冰浴超声 5-10min,加入 0.1M 乙醇胺 200 μ L,漩涡震荡 5-10min,静置 15-20min,经外加磁场分离后,用 PBS 缓冲液清洗并定容至 200 μ L,得到。

2. 如权利要求 1 所述的采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法,其特征在于,所述溴氰菊酯单克隆抗体溶液是取 3.3mg 溴氰菊酯单克隆抗体加入 PBS 缓冲液 1ml 配制成 3.3mg/mL 的母液,再用 PBS 缓冲液稀释而成。

3. 如权利要求 1 所述的采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法,其特征在于,所述经壳聚糖修饰的 SPR 芯片是将 SPR 芯片在无水乙醇中浸泡 3-8min,经纯水冲洗,氮气吹干后,用氢火焰灼烧 15-30s,冷却后装入 SPR 仪器,待基线走平后,以 10-20 μ L/min 的流速通入 50-100 μ L 0.4mg/mL 的巯基乙胺溶液,再以 10-20 μ L/min 的流速通入 50-100 μ L 1.2-1.8mg/mL 的壳聚糖醋酸溶液,使该壳聚糖醋酸溶液在 SPR 芯片表面进行自组装制得。

4. 如权利要求 3 所述的采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法,其特征在于,所述壳聚糖醋酸溶液是取 200mg 壳聚糖溶于 pH 值为 3.6 的 50mL 50mM 醋酸-醋酸钠缓冲液中,60 $^{\circ}$ C 磁力搅拌 2-4h,冷却后,再用 pH 值为 3.6 的 50mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液稀释而成。

采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及农药分析及生物传感器技术领域,具体的是涉及一种利用免疫磁纳米粒子检测农产品中残留的溴氰菊酯的 SPR 免疫传感器方法。

背景技术

[0002] 溴氰菊酯,是目前菊酯类杀虫剂中毒力最高的一种。溴氰菊酯属于中毒毒类,皮肤接触可引起刺激症状,出现红色丘疹。急性中毒时,轻者有头痛、头晕、恶心、呕吐、食欲不振、乏力,重者还可出现肌束颤抖和抽搐。目前溴氰菊酯残留的检测方法主要有气相色谱、高效液相色谱、色谱/质谱联用技术、酶联免疫分析等。其中色谱分析法仪器设备贵重,样品前处理复杂,需专业人员;而酶联免疫分析方法相对复杂,灵敏度较低,耗时,成本较高,且均需要复杂的样品前处理。与上述检测方法相比,表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)传感技术是一种基于物质折射率变化的、可实时动态监测的现代检测技术,具有快速、高灵敏、耗样量少、无需标记、芯片可重复使用等特性,且操作简单,但无法直接高灵敏地检测溴氰菊酯农药小分子。

[0003] 农药残留分析是复杂混合物中痕量组分的分析技术,采用适当的农药残留提纯方法是成功建立准确、快速、高灵敏农药残留检测技术的关键。近年来发展的磁性纳米材料是一种新型的亲和性固相载体,在外加磁场下具有可控运动的特点,所需设备简单,操作柔和。将磁纳米粒子与各种分析方法相结合应用于检测,可以在复杂的体系中快速富集待检物,得到浓缩、纯净的样品,有助于缩短检测时间及检测的准确度。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是,针对现有 SPR 传感器无法实现直接高灵敏检测溴氰菊酯农药小分子,以及农产品样品前处理复杂的问题,提供一种采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法。该方法不仅将样品前处理和检测技术相结合,提高了方法的灵敏度和准确性,且操作简单,检测快速、选择性高、重现性和再生性好,回收率符合要求,可直接对农产品中溴氰菊酯残留进行检测,具有重要的实际应用价值。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种采用免疫磁纳米粒子和 SPR 技术相结合检测溴氰菊酯的方法,该方法是将免疫磁纳米粒子加入到含溴氰菊酯的待测样品溶液中,使免疫磁纳米粒子与溴氰菊酯发生特异性结合,经外加磁场分离后得到结合物,将该结合物直接注入经壳聚糖修饰的 SPR 芯片表面,以检测出待测样品溶液中的溴氰菊酯含量。

[0006] 上述检测溴氰菊酯的过程详述如下,请结合参见图 1:

[0007] 1、磁纳米粒子的制备和表征:取 0.5g 富里酸加入 60mL 纯水并置于圆底烧瓶中,通入氮气除氧的同时并用恒温磁力搅拌器 200r/min 搅拌加热至沸腾,沸腾后立即加入 5mL 含有 0.6g NaOH、1.08g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.6g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的混合溶液,回流 2h。待溶液冷却

至室温后,经磁性分离,多次纯水洗涤至中性,分别采用紫外光谱、傅里叶红外光谱和透射电子显微镜表征,结合参见图 2。

[0008] 上述羧基化磁纳米粒子的制备方法为现有技术,可参考已报道的表面羧基化磁纳米粒子的合成方法 [Chunjiao Zhou et al, Fulvic acid coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast agent, *Funct. Mater. Lett.* 03(2010)197-200 页]。

[0009] 2、免疫磁纳米粒子的制备:取 200 μ L 1.9-3.8mM 的羧基化磁纳米粒子溶液,加入 400 μ L 的 EDC/NHS (0.4M/0.1M) 混和液,漩涡震荡 5-10min,冰浴超声 5-10min 后,加入 200 μ L 0.27-0.55mg/mL 溴氰菊酯单克隆抗体溶液,漩涡震荡 5-10min,冰浴超声 5-10min 后,加入 0.1M 乙醇胺 200 μ L,漩涡震荡 5-10min,静置 15-20min 后,经外加磁场分离后,用 PBS 缓冲液 (10mM、pH7.4) 清洗并定容至 200 μ L,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用,分别采用紫外光谱、傅里叶红外光谱和透射电子显微镜进行表征,结合参见图 2。

[0010] 上述 0.27-0.55mg/mL 的溴氰菊酯单克隆抗体溶液是取 3.3mg 溴氰菊酯单克隆抗体(购买于武汉三鹰生物技术有限公司)加入 1ml PBS 缓冲液 (10mM、pH7.4) 配制成 3.3mg/mL 的母液,再用 PBS 缓冲液 (10mM、pH7.4) 稀释而成。

[0011] 3、SPR 传感器的构建:将 SPR 芯片在无水乙醇中浸泡 3-8min,经纯水冲洗,氮气吹干后,用氢火焰灼烧 15-30s,冷却后装入 SPR 仪器,待基线走平后,以 10-20 μ L/min 的流速通入 50-100 μ L 0.4mg/mL 的巯基乙胺溶液,再以 10-20 μ L/min 的流速通入 50-100 μ L 1.2-1.8mg/mL 的壳聚糖醋酸溶液,使该壳聚糖醋酸溶液在 SPR 芯片表面进行自组装(利用巯基乙胺的氨基与壳聚糖表面的羧基反应,使壳聚糖固定在芯片表面)制得。

[0012] 上述 1.2-1.8mg/mL 的壳聚糖醋酸溶液是取 200mg 壳聚糖溶于 50mL 50mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH3.6) 中,60 $^{\circ}$ C 磁力搅拌 2-4h,冷却后,再用 50mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH3.6) 稀释而成。

[0013] 4、免疫磁纳米粒子高效富集待测物溴氰菊酯:取上述制备的免疫磁纳米粒子加入含有溴氰菊酯的样品溶液,漩涡震荡 5-10min 后,冰浴超声 5-10min,然后静置 15-20min,经外加磁场分离后得到结合物,该结合物用 PBS 缓冲液 (10mM、pH7.4) 反复洗涤 3 次,用 PBS 定容后备用。

[0014] 5、将上述得到的免疫磁纳米粒子和溴氰菊酯的结合物直接注入传感器进行检测,即可得到样品溶液中溴氰菊酯的含量。

[0015] 本发明利用免疫磁纳米粒子与溴氰菊酯会发生特异性结合,经外加磁场分离后得到的结合物直接注入经壳聚糖修饰的 SPR 芯片表面,壳聚糖表面的氨基与溴氰菊酯的溴原子可发生霍夫曼烷基化反应,使芯片表面的折射率随着结合物中溴氰菊酯浓度的变化而变化,从而引起 SPR 响应信号的变化,据此可对溴氰菊酯直接进行定量分析,最低检测限为 2.5pg/mL。

[0016] 本发明与传统的检测方法及同类传感器比较,其 2.5pg/mL 的检测限比大多数文献报道的更低,见表 1。

[0017] 表 1 本发明与传统检测方法及同类传感器的对比

[0018]

方法	线性范围	检测限	参考文献
高效液相色谱	0.050-20.000 ng/mL	0.012 ng/mL	(Xi Yu et al.,2012)
	0.125-0.750 mg/kg	0.018 mg/kg	(ArminoMelo et al.,2012)
	0.200-20.000 mg/kg	0.200 mg/kg	(E.D.Tsochatzis et al.,2010)
	0.05-50.0 mg/kg	0.017 mg/kg	(Jianhua Cheng et al.,2009)
化学发光传感器	0.053-46.5 μ g/mL	0.018 μ g/mL	(Shenguang Ge et al.,2011)
	0.5-35.0 μ g/mL	0.16 μ g/mL	(Shenguang Ge et al.,2011)
本发明	0.01-1 ng/mL	2.5 pg/mL	

[0019] 与现有技术相比,本发明的优点如下:

[0020] 1、本发明利用磁纳米粒子的比表面积使之固定的抗体量增加,且免疫磁纳米粒子本身具有大的折射率,有效地提高了 SPR 的响应信号,使得新构建的 SPR 传感器具有很高的灵敏度,最低检测限为 2.5pg/mL。

[0021] 2、本发明利用免疫磁纳米粒子与溴氰菊酯发生特异性结合,经外加磁场分离后得到的结合物直接进行 SPR 检测,将样品前处理技术与检测技术相结合,有效提高了检测的准确性,且操作简单,检测速度快。此外该 SPR 传感器具有良好的特异性、重现性和回收率,可直接对农产品中溴氰菊酯残留进行检测,具有重要的实际应用价值。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明的溴氰菊酯传感器构建示意图。

[0023] 其中, a 表示磁纳米粒子, b 表示乙醇胺, c 表示溴氰菊酯的单克隆抗体, d 表示溴氰菊酯, e 表示壳聚糖, f 表示巯基乙胺, g 表示金膜, h 表示玻片, i 表示棱镜。

[0024] 图 2 为本发明中磁纳米粒子、免疫磁纳米粒子及其特异性结合溴氰菊酯复合物的紫外表征图。

[0025] 其中 :a 表示磁纳米粒子 + 溴氰菊酯的单克隆抗体 + 溴氰菊酯 + 壳聚糖, b 表示磁纳米粒子 + 溴氰菊酯的单克隆抗体, c 表示溴氰菊酯 + 溴氰菊酯的单克隆抗体, d 表示磁纳米粒子, e 表示溴氰菊酯, f 表示溴氰菊酯的单克隆抗体, g 表示壳聚糖 + 巯基乙胺。

[0026] 图 3 为本发明的 SPR 传感器的特异性。

[0027] 其中, a 表示溴氰菊酯、阿特拉津及氰戊菊酯的混合液, b 表示溴氰菊酯和氰戊菊酯的混合液, c 表示溴氰菊酯和阿特拉津的混合液, d 表示溴氰菊酯, e 表示阿特拉津, f 表示氰戊菊酯。

[0028] 图 4 为本发明检测溴氰菊酯的 SPR 动力学曲线。

[0029] 其中,各曲线代表的溴氰菊酯浓度分别为 :a--25ng/mL、b--10ng/mL、c--5ng/mL、d--1ng/mL、e--750pg/mL、f--500pg/mL、g--250pg/mL、h--100pg/mL、i--50pg/mL、j--25pg/mL、k--10pg/mL。

[0030] 图 5 为本发明检测溴氰菊酯的标准曲线。

具体实施方式：

[0031] 实施例 1、本发明构建的 SPR 传感器的特异性实验

[0032] 将本发明构建的 SPR 免疫传感器分别对 1ng/mL 的溴氰菊酯、1ng/mL 的氰戊菊酯、1ng/mL 的阿特拉津, 1ng/mL 的溴氰菊酯和 1ng/mL 的氰戊菊酯和 1ng/mL 的阿特拉津的混合物, 1ng/mL 的溴氰菊酯和 1ng/mL 的氰戊菊酯的混合物, 以及 1ng/mL 的溴氰菊酯和 1ng/mL 的阿特拉津的混合物进行检测, 比较相应的 SPR 响应信号的变化, 考察该传感器的特异性。结果表明, 结合参见图 3, 本发明构建的 SPR 传感器具有很好的特异性。

[0033] 实施例 2、检测溴氰菊酯标准曲线的建立

[0034] 将构建好的 SPR 传感器(壳聚糖醋酸溶液的浓度为 1.5mg/mL)在流速为 10 μ L/min 的条件下, 对免疫磁纳米特异性结合的不同浓度溴氰菊酯的结合物 (0, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.5, 0.25ng/mL, n=3) 进行检测, 建立检测溴氰菊酯的标准曲线, 线性范围: 0.01-1ng/mL, 最低检测限为 2.5pg/mL, 结合参见图 4 和图 5。

[0035] 实施例 3、加标回收率实验

[0036] 取适量溴氰菊酯标样添加到大豆样品中, 设置 0.75、0.5、0.25ng/mL 三个浓度, 每个浓度重复检测三次, 考察该构建的 SPR 传感器的准确性。

[0037] 大豆样品的前处理: 大豆经烘干后粉碎并过 100 目筛, 称 1g 大豆粉加入至 6mL80% 甲醇溶液中, 震荡 10min 后, 以 10000rpm 离心 3min。取上清液, 并用 80% 甲醇定容成 0.1g / mL 溶液, 再经 0.2 μ m 膜过膜处理后, 稀释成 1mg / mL 溶液 4 $^{\circ}$ C 保存, 如大豆样品为液体, 则直接加入溴氰菊酯标样。

[0038] 检测结果见表 2, 大豆回收率为 96.94—103.60%, 变异系数 2.18—13.72%, 回收率在允许范围 (低浓度回收率允许范围为 70—130%) 内, 符合回收率的要求。

[0039] 表 2 回收率实验

[0040]

样品中添加的 溴氰菊酯 (ng/mL)	检测到的 溴氰菊酯 (ng/mL)	相对标准偏差 (%) (n=3)	回收率 (%)
0.25	0.2592	13.72	103.60
0.5	0.5221	2.18	104.42
0.75	0.7271	4.35	96.94

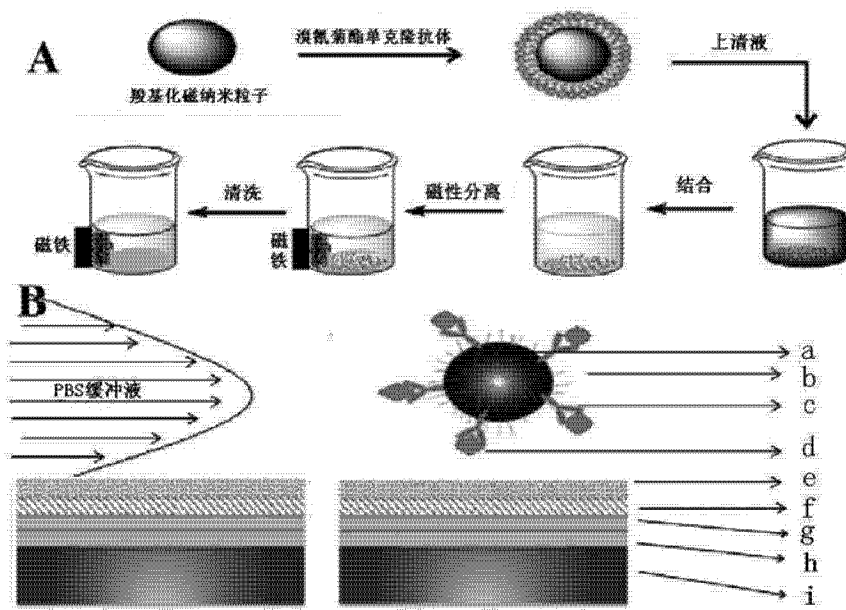


图 1

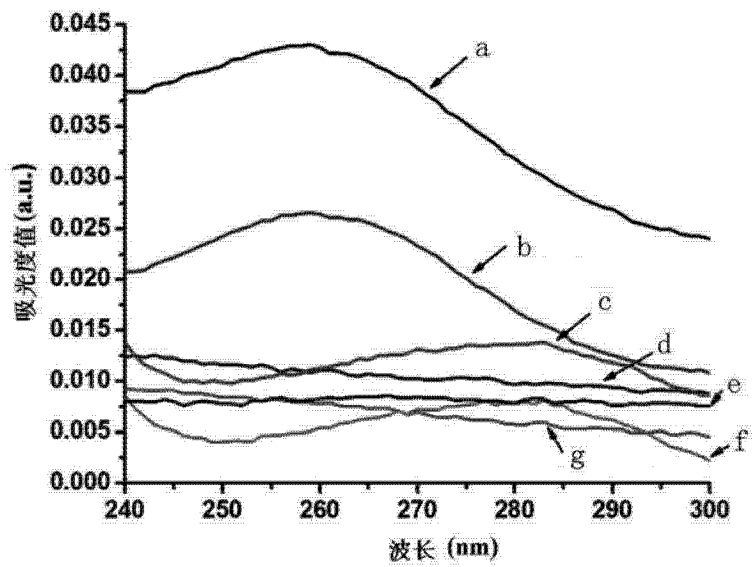


图 2

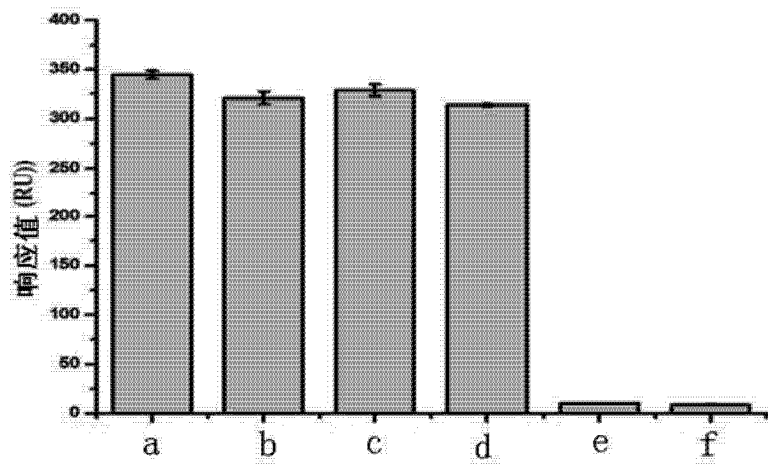


图 3

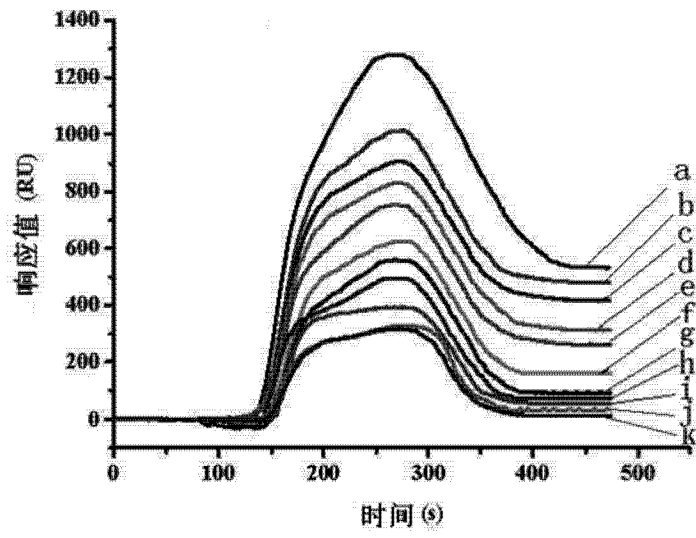


图 4

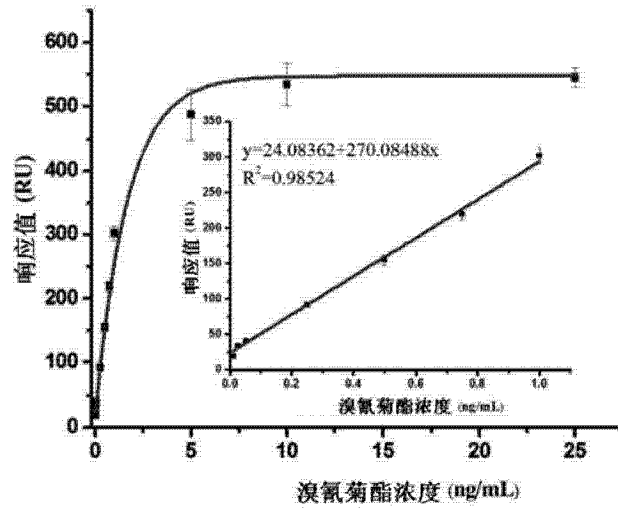


图 5

专利名称(译)	采用免疫磁纳米粒子和SPR技术相结合检测溴氰菊酯的方法		
公开(公告)号	CN103472219B	公开(公告)日	2014-06-11
申请号	CN201310460621.3	申请日	2013-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南农业大学		
[标]发明人	刘霞 李文进 李蕾 毛璐刚 杨阳		
发明人	刘霞 李文进 李蕾 毛璐刚 杨阳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/552		
代理人(译)	何为		
其他公开文献	CN103472219A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种采用免疫磁纳米粒子和SPR技术相结合检测溴氰菊酯的方法，该方法是将免疫磁纳米粒子加入到含溴氰菊酯的待测样品溶液中，使免疫磁纳米粒子与溴氰菊酯发生特异性结合，经外加磁场分离后得到结合物，将该结合物直接注入经壳聚糖修饰的SPR芯片表面，以检测出待测样品溶液中的溴氰菊酯含量。上述免疫磁纳米粒子是将磁纳米粒子表面的羧基用EDC/NHS混合液活化后，加入溴氰菊酯的单克隆抗体溶液，再加入乙醇胺封闭，经外加磁场分离后，用PBS缓冲液定容制得。本方法将样品前处理和检测技术相结合，有效提高了检测的灵敏度和准确性，且操作简单，快速、选择性高、重现性和再生性好，回收率符合要求，可直接对农产品中溴氰菊酯的残留进行检测，具有重要的实际应用价值。

