



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101782574 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 201010101035.6

(22) 申请日 2010.01.26

(71) 申请人 湖南农业大学

地址 410128 湖南省长沙市芙蓉区湖南农业大学

(72) 发明人 肖浪涛 王若仲 蔺万煌 刘清

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种检测农产品中 2,4-二氯苯氧乙酸的压电免疫传感方法

### (57) 摘要

本发明涉及了一种检测农产品中 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 含量的压电免疫传感方法,主要包括以下步骤来实现:1) 2,4-D 与 BSA 的偶联; 2) 电极修饰与免疫传感器的制备; 3) 制备纳米金标记的羊抗鼠 IgG 抗体; 4) 标准曲线的制备; 5) 样品检测。本发明有益的效果是:在检测中,利用纳米金标记的羊抗鼠 IgG 将信号放大,提高检测灵敏度,从而实现 2,4-D 的高灵敏定量测定,该方法在 2,4-D 浓度为  $13.3\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 666\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内时成线性关系,检测下限为  $13\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时,该方法具有方法简便,结果可靠,成本较低等优点。

1. 一种检测农产品中 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 的压电免疫传感方法,其特征在于包括以下步骤:

- (1) 2,4-D 与 BSA 的偶联;
- (2) 在石英晶振表面制备无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器;
- (3) 制备纳米金标记的羊抗鼠 IgG 抗体;
- (4) 制作标准工作曲线;
- (5) 样品检测。

2. 根据权利要求 1 所述的检测农产品中 2,4-D 的方法,其特征包括:

根据权利要求 1 所述的 2,4-D 与牛血清白蛋白 (BSA) 的偶联,其特征在于:称取 3.315g 2,4-D 溶解在 0.5mL 的无菌二甲基甲酰胺 (DMF) 中,再称取 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 4.028g、二氯乙烷 (EDC) 6.71g 同时加入 2,4-D 的无菌 DMF 中,室温下搅拌反应 5 小时 (130rpm, 28℃)。再称取 0.024g BSA 溶于 2.4mL pH 11 的硫酸缓冲液中,然后将含有 2,4-D 的无菌 DMF 缓慢加入到 BSA 的硫酸缓冲液中,在室温下慢速搅拌反应 4 小时,4℃过夜。将反应液放入透析袋,在 500mL 10% 的 DMF 液中 4℃透析二次 (4h/次);再在 500mL 的 0.01M 的 PBS 中透析 4 次。制得 2,4-D 与 BSA 的偶联物。将 2,4-D-BSA 保存在 4℃的 PBS 中,备用。

根据权利要求 1 所述的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器由以下步骤制备:向洗净的石英晶振内加入 10.0mM 半胱胺盐酸盐溶液,并于 25℃自组装 2.5 小时,石英晶振表面用纯水清洗三次,即在晶振表面获得一层致密均匀的半胱胺自组装单层膜;用 2.5% (V/V) 戊二醛溶液 50  $\mu$ L 活化组装后金电极表面的羧基。经 PBS 和去离子水清洗后,吹干。在电极表面滴加 30  $\mu$ L 浓度为 10.0  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 BSA-2,4-D 溶液于晶振表面,置于 37℃恒温水浴箱中温育 1 小时,用 PBS 和去离子水清洗,晾干。再在电极表面上滴加 40  $\mu$ L 1% BSA (pH 7.4) 并置于 37℃恒温水浴箱中温育 1 小时,经 PBS 和去离子水清洗后,吹干,即获得无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器。

根据权利要求 1 所述标准工作曲线的制作,其特征在于:取不同浓度的 2,4-D 标准溶液和 2,4-D 抗体 (单抗) 混合液,取常规量滴到已制备好的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器,37℃环境下反应 1 小时;接着加入纳米金标记抗体 (二抗),37℃环境下反应 1 小时,实验过程中传感器的频率变化由石英晶体分析仪及联机计算机实时记录。对免疫传感器表面的频率变化连续检测直到稳态,获得稳定的数值。改变 2,4-D 标准溶液的浓度,按上述步骤测定一系列不同浓度的 2,4-D 标准溶液,用免疫传感器表面的频率变化值与 2,4-D 浓度绘制标准工作曲线。

根据权利要求 1 所述的检测农产品中 2,4-D 的方法,其特征在于:取处理好的样品溶液和 2,4-D 抗体 (单抗) 混合液,取常规量滴到已制备好的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器,37℃环境下反应 1 小时;接着加入纳米金标记抗体 (二抗),37℃环境下反应 1 小时,对免疫传感器表面的频率变化连续检测直到稳态,获得稳定数值。将频率变化与绘制好的标准工作曲线对照获得农产品样品溶液中 2,4-D 的数值。

## 一种检测农产品中 2,4-二氯苯氧乙酸的压电免疫传感方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测方法,具体是一种检测农产品中 2,4-二氯苯氧乙酸的压电免疫传感方法。

### 背景技术

[0002] 2,4-D 是一种应用广泛的植物生长调节剂,其测定方法有萃取-光度法、液相色谱法、液相色谱质谱法、薄层色谱法、衍生气相色谱法等。但这些传统方法都有一定的局限性,如:样品前处理复杂、操作繁琐费时、测定周期长、设备昂贵、灵敏度低等。免疫传感器是利用电化学免疫传感器的高灵敏度、简便、快速等特点,结合生物识别系统(抗原抗体特异性结合)而形成的一种自动化分析检测系统,具有操作简单、快速、灵敏度高等优点,在 2,4-D 的测定中引起高度重视,因此,研究一种高灵敏度、简便、快速的 2,4-D 免疫传感测定新方法有非常重要的意义。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种农产品中 2,4-D 含量的检测方法。本发明能较好的满足 2,4-D 测定的需要,且方法简单,快速,灵敏度高,为检测 2,4-D 提供了一种新的途径。

[0004] 为了达到上述目的,本发明提供的检测农产品中 2,4-D 含量的方法包括以下步骤:2,4-D 与 BSA 的偶联;在金电极表面制备无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器;制备纳米金标记的羊抗鼠 IgG 抗体;制作标准工作曲线;样品检测。

[0005] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案还可以进一步完善。所述 2,4-D 与 BSA 的偶联可以由以下步骤制备:称取 3.315g 2,4-D(0.015mmol)溶解在 0.5mL 的无菌 DMF 中,再称取 NHS 4.028g(0.035mmol)、EDC 6.71g(0.035mmol)同时加入 2,4-D 的无菌 DMF 中,室温下搅拌反应 5 小时(130rpm, 28℃)。再称取 0.024gBSA 溶于 2.4mL pH 11 的硫酸缓冲液中,然后将含有 2,4-D 的无菌 DMF 缓慢加入到 BSA 的硫酸缓冲液中,约 15min 加完,在室温下慢速搅拌反应 4 小时,4℃过夜。将反应液放入透析袋,在 500mL 10%的 DMF 液中 4℃透析二次,4h/次;再在 500mL 的 0.01M 的 PBS 中透析四次。制得 2,4-D 与 BSA 的偶联物。将 2,4-D-BSA 保存在 4℃的 PBS 中,备用。

[0006] 所述无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器可以由以下步骤制备:(1) 石英晶振表面的半胱胺盐酸盐溶液自组装:向洗净的石英晶振内加入 10.0mM 半胱胺盐酸盐溶液,并于 25℃自组装 2.5 小时,石英晶振表面用纯水清洗三次,即在晶振表面获得一层致密均匀的半胱胺自组装单层膜;(2) 修饰后的石英晶振表面抗原固定化:用 2.5% (V/V) 戊二醛溶液 50  $\mu$ L 活化组装后金电极表面的羧基;经 PBS 和去离子水清洗后,吹干。将自组装了半胱胺自组装单层膜的金电极表面滴加 30  $\mu$ L 浓度为 10.0  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 BSA-2,4-D 溶液于晶振表面,置于 37℃恒温水浴箱中温育 1 小时,用 PBS 和去离子水清洗,晾干;再在电极表面上

滴加 40  $\mu$  L 1% BSA (pH 7.4) 并置于 37℃ 恒温水浴箱中温育 1 小时, 以封闭电极表面多余的蛋白结合位点, 防止免疫测定过程中的非特异性吸附产生误差, 经 PBS 和去离子水清洗后, 吹干, 即获得无试剂型 2,4-D 电化学免疫传感器。

[0007] 所述的制作标准工作曲线方法为: 取不同浓度的 2,4-D 标准溶液和 2,4-D 抗体 (单抗) 混合液, 取常规量滴到已制备好的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器, 37℃ 环境下反应 1 小时; 接着加入纳米金标记抗体 (二抗), 37℃ 环境下反应 1 小时, 对免疫传感器表面的频率变化连续检测直到稳态, 获得稳定的数值。改变 2,4-D 标准溶液的浓度, 按上述步骤测定一系列不同浓度的 2,4-D 标准溶液, 用免疫传感器表面的频率变化值与 2,4-D 浓度绘制标准工作曲线。

[0008] 所述的样品测定方法为: 取处理好的样品溶液和 2,4-D 抗体 (单抗) 混合液, 取常规量滴到已制备好的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器, 37℃ 环境下反应 1 小时; 接着加入纳米金标记抗体 (二抗), 37℃ 环境下反应 1 小时, 对免疫传感器表面的频率变化连续检测直到稳态, 获得稳定数值。将频率变化值与绘制好的标准工作曲线对照获得农产品样品溶液中 2,4-D 的数值。

[0009] 2,4-D 压电免疫传感器的检测原理: 本发明是基于利用压电免疫传感器具有高灵敏度、简便、快速、可靠等特点, 结合生物识别系统 (抗原抗体特异性结合) 而形成的一种自动化分析检测系统, 实现农产品中 2,4-D 含量的检测。本发明利用自组装技术和静电吸附作用, 将 2,4-D-BSA 全抗原固定在通过由自组装半胱胺和静电吸附纳米金修饰的石英晶振金电极表面, 解决了抗原固定的难题, 然后在电极上滴加 anti-2,4-D 和 2,4-D 的混合物, 由于 2,4-D 和 2,4-D-BSA 都能与 anti-2,4-D 发生高特异性的免疫反应, 如果样品中 2,4-D 含量高, 由于大部分 2,4-D 抗体已经与样品中 2,4-D 反应了, 结合到金电极表面的 2,4-D 抗体就少, 这样纳米金标记的二抗结合上去的量也就少。2,4-D 和 2,4-D-BSA 竞争与 anti-2,4-D 反应后, 用纳米金标记的羊抗鼠 IgG 将信号进一步放大, 然后用石英晶体分析仪及联机计算机测定。本发明实际上其放大倍数与样品中 2,4-D 含量成反比, 即样品中 2,4-D 越少, 连接到金电极上的抗体反而越多, 纳米金标记的二抗上去的也越多, 质量放大越明显。

[0010] 本发明效果是: 在 2,4-D 浓度为 13.3ng/mL-666.7ng/mL 范围内成线性关系, 检测下限为 13.0ng/mL, 能满足农产品中 2,4-D 测定的需要。

## 附图说明

[0011] 图 1 是本发明的农产品实际样品 2,4-D 含量的检测图。

## 具体实施方式

[0012] 下面结合实施例对本发明做进一步描述。

### [0013] 一、试剂与仪器

[0014] 半胱胺 (Cys, ACROS 公司)、BSA-2,4-D 偶联抗原 (BSA-2,4-D) 由植物激素与生长发育湖南省重点实验室合成、配制; 戊二醛为 Fluka 公司产品; 鼠抗 2,4-D 抗体委托北京博奥森生物技术有限公司制备; 羊抗鼠 IgG 抗体 (G-Anti-MsIgG) 和牛血清白蛋白 (BSA) 从北京鼎国生物技术有限公司购买; 氯金酸和柠檬酸钠购于上海化学试剂公司; 不同 pH 值的 PBS 溶液用 0.01M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  配制; Piranha 试剂为按体积比 3 : 7 配制的  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$

混合液；其它试剂均为分析纯；实验中所用的水为二次蒸馏水。

[0015] 9MHz, AT- 切型双面镀金石英晶振 (QCM) 购于北京晨星无线电设备厂, 使用前用 O 型橡胶圈和塑料片将一侧封闭而另一侧粘有一个总体积为 300  $\mu\text{L}$  的检测池；联机的压电分析仪 (QCA922) 购于美国的普林斯顿应用研究所；CSS501 型恒温箱购于重庆实验装备厂；TCL-16A 型台式高速冷冻离心机为长沙平凡仪器仪表有限公司产品；扫描电子显微镜 (SEM, JSM 6700F) 为日本 JEOL Ltd. 公司产品。

## [0016] 二、实施方法

[0017] 这种检测农产品中 2,4-D 的方法, 主要包括以下步骤来实现：

[0018] 1. 2,4-D 与 BSA 的偶联：称取 3.315g 2,4-D (0.015mmol) 溶解在 0.5mL 的无菌 DMF 中, 再称取 NHS 4.028g (0.035mmol)、EDC 6.71g (0.035mmol) 同时加入 2,4-D 的无菌 DMF 中, 室温下搅拌反应 5 小时 (130rpm, 28 $^{\circ}\text{C}$ )。再称取 0.024gBSA 溶于 2.4ml pH11 的硫酸缓冲液中, 然后将含有 2,4-D 的无菌 DMF 缓慢加入到 BSA 的硫酸缓冲液中, 约 15min 加完, 在室温下慢速搅拌反应 4 小时, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。将反应液放入透析袋, 在 500mL10% 的 DMF 液中 4 $^{\circ}\text{C}$  透析二次, 4h/次；再在 500mL 的 0.01M 的 PBS 中透析四次。制得 2,4-D 与 BSA 的偶联物。将 2,4-D-BSA 保存在 4 $^{\circ}\text{C}$  的 PBS 中, 备用。

[0019] 2. 无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器的制备：向洗净的石英晶振内加入 10.0mM 半胱胺盐酸盐溶液, 并于 25 $^{\circ}\text{C}$  自组装 2.5 小时, 石英晶振表面用纯水清洗三次, 即在晶振表面获得一层致密均匀的半胱胺自组装单层膜；用 2.5% (V/V) 戊二醛溶液 50  $\mu\text{L}$  活化组装后金电极表面的羧基。经 PBS 和去离子水清洗后, 吹干。在电极表面滴加 30  $\mu\text{L}$  浓度为 10.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 BSA-2,4-D 溶液于晶振表面, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴箱中温育 1 小时, 用 PBS 和去离子水清洗, 晾干。再在电极表面上滴加 40  $\mu\text{L}$  1% BSA (pH 7.4) 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴箱中温育 1 小时, 以封闭电极表面多余的蛋白结合位点, 防止免疫测定过程中的非特异性吸附产生误差, 经 PBS 和去离子水清洗后, 吹干, 即获得无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器。

[0020] 3. 制备纳米金标记的羊抗鼠 IgG 抗体。

[0021] 4. 标准工作曲线的制作：取不同浓度的 2,4-D 标准溶液和 2,4-D 抗体 (单抗) 混合液, 取常规量滴到已制备好的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器, 37 $^{\circ}\text{C}$  环境下反应 1 小时；接着加入纳米金标记抗体 (二抗), 37 $^{\circ}\text{C}$  环境下反应 1 小时, 对免疫传感器表面的频率变化连续检测直到稳态, 获得稳定的数值。改变 2,4-D 标准溶液的浓度, 按上述步骤测定一系列不同浓度的 2,4-D 标准溶液, 用免疫传感器表面的频率变化值与 2,4-D 浓度绘制标准工作曲线在 2,4-D 浓度为 13.3ng/mL-666.7ng/mL 范围内成线性关系, 校正曲线是  $y = -279.1 + 255.5x$ , 相关系数 R 为 0.9957, 检测下限为 13.0ng/mL。

[0022] 5. 样品检测：取处理好的样品溶液和 2,4-D 抗体 (单抗) 混合液, 取常规量滴到已制备好的无试剂型 2,4-D 压电免疫传感器, 37 $^{\circ}\text{C}$  环境下反应 1 小时；接着加入纳米金标记抗体 (二抗), 37 $^{\circ}\text{C}$  环境下反应 1 小时, 对免疫传感器表面的频率变化连续检测直到稳态, 获得稳定数值。将频率变化与绘制好的标准工作曲线对照获得农产品样品溶液中 2,4-D 的数值。

[0023] 本方法检测实例：利用该传感器对用生长调节剂处理过的棉花幼叶中 2,4-D 残留量进行了检测：取棉花幼叶鲜样 1.5000g, 于 1.5mL 离心管中冰浴研磨, 加入 600  $\mu\text{L}$  100% 的甲醇, 混匀后浸提过夜, 4800g 离心 10min, 取上清液于一新离心管中, 剩余残渣用 200  $\mu\text{L}$

100%的甲醇浸提 2h, 4800g 离心 10min, 取上清, 合并两次上清液, 移入一新 5mL 离心管中。用 3000  $\mu$ L 超纯水稀释提取液, 过 Waters Sep-pak C18 柱, 用 200  $\mu$ L 20% 甲醇和 250  $\mu$ L 30% 甲醇分别洗脱后, 用 300  $\mu$ L 100% 甲醇洗脱并收集 IAA, 用于后续的检测和分析。接着, 将收集好的 2,4-D 用 100  $\mu$ L 100% 甲醇溶解后, 取 20  $\mu$ L 进行 HPLC 检测, 同时, 取 20  $\mu$ L 滴加入 PBS 溶液中, 用 2,4-D 电化学免疫传感器检测, 其检测数据表明 (图 1), 本方法与 HPLC 测定的结果基本一致。

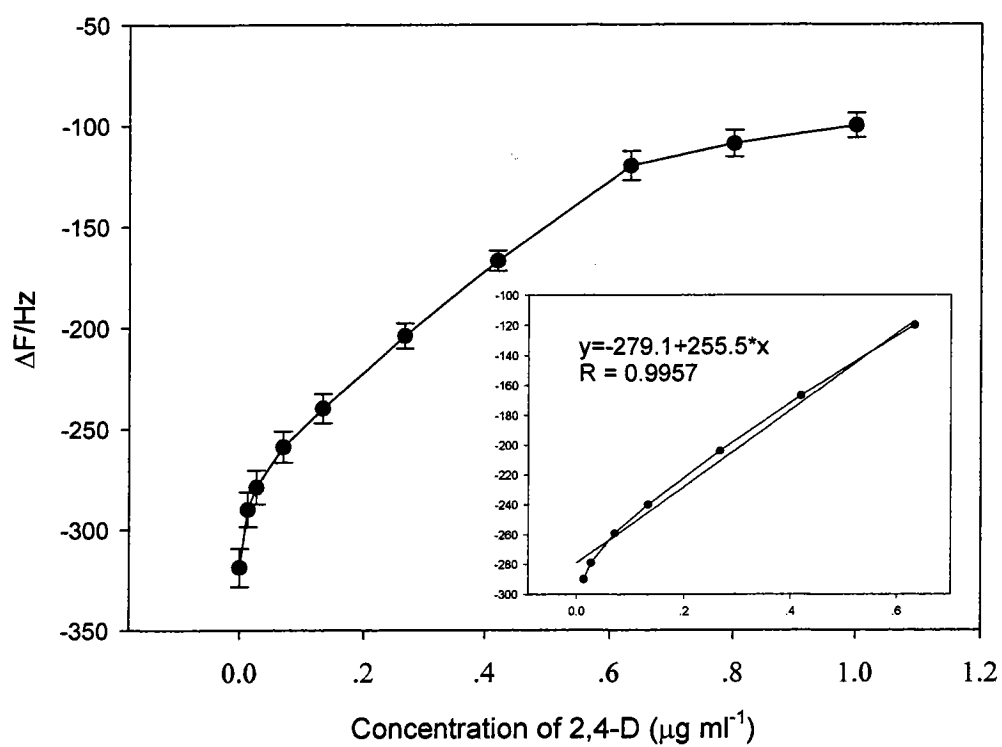


图 1

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种检测农产品中2,4-二氯苯氧乙酸的压电免疫传感方法                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101782574A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-07-21 |
| 申请号            | CN201010101035.6                               | 申请日     | 2010-01-26 |
| [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         | 肖浪涛<br>王若仲<br>蔺万煌<br>刘清                        |         |            |
| 发明人            | 肖浪涛<br>王若仲<br>蔺万煌<br>刘清                        |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/577 G01N27/414                |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及了一种检测农产品中2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)含量的压电免疫传感方法, 主要包括以下步骤来实现: 1)2, 4-D与BSA的偶联; 2)电极修饰与免疫传感器的制备; 3)制备纳米金标记的羊抗鼠IgG抗体; 4)标准曲线的制备; 5)样品检测。本发明有益的效果是: 在检测中, 利用纳米金标记的羊抗鼠IgG将信号放大, 提高检测灵敏度, 从而实现2, 4-D的高灵敏度定量测定, 该方法在2, 4-D浓度为13.3ng·mL<sup>-1</sup> ~ 666ng·mL<sup>-1</sup>范围内时成线性关系, 检测下限为13ng·mL<sup>-1</sup>。同时, 该方法具有方法简便, 结果可靠, 成本较低等优点。

