



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104515752 B

(45)授权公告日 2017.07.18

(21)申请号 201310450946.3

CN 102539388 A,2012.07.04,全文.

(22)申请日 2013.09.27

CN 103293132 A,2013.09.11,全文.

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104515752 A

王丽兰等.基于纳米材料的免疫传感器研究进展.《化学研究与应用》.2009,第21卷(第3期),第281-285页.

(43)申请公布日 2015.04.15

Zheng-Ping Li et al..Development of chemiluminescence detection of gold nanoparticles in biological conjugates for immunoassay.《Analytica Chimica Acta》.2005,(第551期),第85-91页.

(73)专利权人 中国人民解放军军事医学科学院

卫生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道1号

(72)发明人 彭媛 高志贤 宁保安 白家磊

孙思明 柳明

柳明等.SPR免疫传感技术检测水中阿特拉津除草剂.《解放军预防医学杂志》.2013,第31卷(第4期),第299-301页.

(51)Int.Cl.

G01N 21/552(2014.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

柳明等.SPR免疫传感技术检测水中阿特拉津除草剂.《解放军预防医学杂志》.2013,第31卷(第4期),第299-301页.

(56)对比文件

CN 102372774 A,2012.03.14,全文.

审查员 李占

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种用于检测阿特拉津的金标二抗信号放大SRP免疫传感方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测阿特拉津的金标二抗信号放大SRP免疫传感方法。本发明以抗原抗体免疫反应为基本原理,将抗原或抗体作为传感器敏感识别元件,利用间接竞争法结合SPR传感技术对除草剂阿特拉津进行检测,通过化学键将阿特拉津完全抗原(AT-OVA)固定在SPR芯片表面,与待测液中的阿特拉津小分子竞争结合其抗体,加入纳米金标记的二抗进行信号放大,提高了检测灵敏度,改善检测范围,建立信号放大的间接竞争抑制法。方法的最低检出限为0.72ng/mL,IC<sub>50</sub>为15.70ng/mL,检测范围2.18-629.06ng/mL。

CN 104515752 B

1. 一种用于检测阿特拉津的金标二抗信号放大SRP免疫传感方法,该方法包括:  
SPR检测平台的构建:

(1) 将洁净的SPR芯片浸入1.0mmol/L的十一巯基烷酸溶液中,室温过夜,将带有羧基的SPR芯片依次用乙醇、去离子水冲洗后氮气吹干,装入SPR传感器中;

(2) 以pH4.5醋酸-醋酸钠缓冲液为耦合缓冲液,在SPR传感器反应池中加入50 $\mu$ L 0.4mol/L EDC和50 $\mu$ L 0.1mol/L NHS混合液,以活化芯片表面的羧基;加入50 $\mu$ L耦合缓冲液稀释的阿特拉津完全抗原溶液,之后加入1.0mol/L pH 8.5的乙醇胺溶液作为封闭液,选用0.1mol/L的盐酸作为再生液,耦合缓冲液作为参比溶液;

以纳米金标记的二抗作为SPR传感器放大元件进行信号放大:

(3) 用磷酸盐缓冲溶液载液稳定芯片表面直到基线稳定;所述磷酸盐缓冲溶液的组成为:pH7.0、10mmol/L PBS,0.9%NaCl,0.005% (v/v) Tween-20;

(4) 取50 $\mu$ L 3.12 $\mu$ g/mL阿特拉津单抗,10 $\mu$ g/mL纳米金标记的二抗与阿特拉津小分子混合液在芯片表面进行免疫反应10min,用载液解吸附5min,去除不牢固的非特异结合,测得该浓度阿特拉津SPR传感响应值;最后用0.1mol/L盐酸+0.1%SDS为再生液,120s再生两次,去除与阿特拉津完全抗原结合的阿特拉津单克隆抗体,使阿特拉津完全抗原可用于下一次检测;

(5) 利用测得的信号与对应阿特拉津浓度绘制检测方法标准曲线,确定该方法的最低检出限0.72ng/mL,检测范围2.18-629.06ng/mL。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述阿特拉津完全抗原为阿特拉津与蛋白偶联物。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述阿特拉津完全抗原为阿特拉津与OVA偶联物。

## 一种用于检测阿特拉津的金标二抗信号放大SRP免疫传感方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种信号放大表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)免疫传感方法,用于高特异性与高灵敏度快速检测阿特拉津,特别涉及于纳米金标记二抗的SPR信号放大方法。

### 背景技术

[0002] 阿特拉津(Atrazine, AT)属三嗪类除草剂,通过抑制光合作用的电子传递而将杂草杀死,常用于防除玉米、高粱、甘蔗、果树等旱田作物的一年生阔叶和禾本科杂草。喷洒在农田中的AT,大部分扩散至空气或土壤里,然后随着降水及灌溉用水渗入地下,造成地下水污染。有研究表明,AT是一种雌激素干扰物,具有致畸可能性,甚至很低剂量的暴露也会增加健康风险。而且,它在环境中若干年仍能保持活性,引起生态环境的破坏。因此,2004年,欧盟将其列为禁用农药,日本也规定矿泉水中AT的最大残留限量为2ppb。中国颁布的《地表水环境质量标准-GB3838-2002》中,限定AT在地表水的残留量为3mg/L。美国国家环境保护局(U.S.Environmental Protection Agency, EPA)规定了饮用水中AT的最高允许浓度为3ppb,但是,美国地质调查局(United States Geological Survey, USGS)的研究表明,即使在低于EPA限定剂量的环境中,仍然能观测到AT对鱼类生殖的重大影响,会减少鱼类的繁殖[88]和产卵,并发现鱼的组织有异常。

[0003] 因此,建立灵敏快速检测AT的方法,对于保护环境以及人们饮水和食品安全是十分必要的。目前常用于AT检测的方法有高效液相色谱法(HPLC),酶联免疫吸附分析法(ELISA)以及气-质联用方法。但是,这些方法较费时,费溶剂。近年来,随着传感技术的发展和交叉学科的兴起,电化学传感器、压电传感器及微悬臂梁质量传感器,结合免疫技术、分子印迹技术越来越多地应用于环境监测领域,弥补了上述方法的不足。

[0004] 表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)传感技术是一类高新微量技术,是当前国际传感器领域的研究热点。利用SPR传感技术结合免疫分析技术,建立免疫传感方法对污染物进行检测,既发挥了SPR传感器实时、快速、无需标记的优势,又充分体现了免疫方法高特异性和高亲和力的特点,而信号放大方法的建立也极大的提高了SPR免疫传感的灵敏度,其具有很大开发潜力和广阔的应用前景。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种SPR免疫传感器方法用于检测阿特拉津。

[0006] 本发明的第二个目的是提供一种运用纳米金标记的二抗进行SPR信号放大的方法。

[0007] 本发明的技术方案概述如下:

[0008] 一种SPR免疫传感器运用纳米金标记的二抗进行信号放大的方法,具体步骤如下:

[0009] (1) 将芯片表面用巯基烷酸修饰,采用EDC/NHS方法,将阿特拉津完全抗原固定于

芯片表面,通过调节完全抗原浓度控制包被浓度。

[0010] (2) 将步骤(1)修饰的SPR芯片装入仪器中,加入将不同溶度的小分子阿特拉津与阿特拉津单克隆抗体,进行竞争免疫反应。

[0011] (3) 将纳米金标记的二抗加入反应体系中进行信号放大,绘制阿特拉津浓度与SPR信号响应的标准曲线,计算方法线性范围及最低检测限。

[0012] (4) 以不加胶体金标记的二抗为对照,在相同条件下进行间接竞争免疫实验,验证该方法的放大效果

[0013] (5) 选择扑草净,三聚氰胺,毒死蜱,和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)作为类似物,进行特异性实验。

[0014] (6) 利用建立的检测方法,连续多次对同一浓度的孔雀石绿溶液进行检测→再生→检测,测试所制备分子印迹膜的再生性能。

[0015] 所述阿特拉津完全抗原优选为阿特拉津-OVA偶联物,阿特拉津-BSA偶联物。

[0016] 所述纳米金标记的二抗加入方式优选为与小分子和抗体一步加入,与小分子和抗体二步加入。

## 附图说明

[0017] 图1纳米金标记二抗的SPR免疫传感信号放大意图。

[0018] 图2阿特拉津-OVA固定化过程的SPR信号变化。

[0019] 图3纳米金标记二抗信号放大SPR传感器对阿特拉津的响应标准曲线。

[0020] 图4无纳米金标记二抗与纳米金标记二抗信号放大对比图。

[0021] 图5阿特拉津及其类似物的特异性实验结果。

## 具体实施方式

[0022] 实施方式一:SPR检测平台的构建:

[0023] (1) 将洁净的SPR芯片浸入1.0mmol/L的十一巯基烷酸溶液中,室温过夜,将带有羧基的SPR芯片依次用乙醇、去离子水冲洗后氮气吹干,装入SPR传感器(AutoLab ESPRIT,荷兰)中。

[0024] (2) 以pH4.5醋酸-醋酸钠缓冲液为耦合缓冲液,在SPR传感器反应池中加入50μL 0.4mol/L EDC和0.1mol/L NHS(1/1, v/v) 混合液,以活化芯片表面的羧基。加入50μL耦合缓冲液稀释的完全抗原阿特拉津-OVA溶液,之后加入用1.0mol/L pH8.5的乙醇胺溶液作为封闭液,选用0.1mol/L的盐酸作为再生液,耦合缓冲液作为参比溶液(图2)。

[0025] 实施方式二:以纳米金标记的二抗作为SPR传感器放大元件进行信号放大

[0026] (1) 用磷酸盐缓冲溶液PBST buffer(10mmol/L PBS(pH7.0)+0.9%NaCl+0.005%(v/v) Tween-20) 载液稳定芯片表面直到基线稳定。

[0027] (2) 取50μL阿特拉津单抗,纳米金标记的二抗与阿特拉津小分子混合液在芯片表面进行免疫反应10min,用载液解吸附5min,去除不牢固的非特异结合,测得该浓度阿特拉津SPR传感响应值。最后用0.1mol/L盐酸+0.1%SDS为再生液,120s再生两次,去除与AT-OVA结合的AT-mAb,使AT-OVA可用于下一步检测。

[0028] (3) 利用测得的信号与对应阿特拉津浓度绘制检测方法标准曲线,最低检出限

0.72ng/mL,检测范围2.18-629.06ng/mL。

[0029] (4) 同样以不加入纳米金标记的二抗作为对照,在相同条件下检测阿特拉津,结果显示加入纳米金标记二抗的信号放大明显(图4)

[0030] (5) 配置不同浓度的扑草净,三聚氰胺,毒死蜱,和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)溶液进行检测,进行特异性实验,结果表明本方法对阿特拉津具有较好的特异性。(图5)

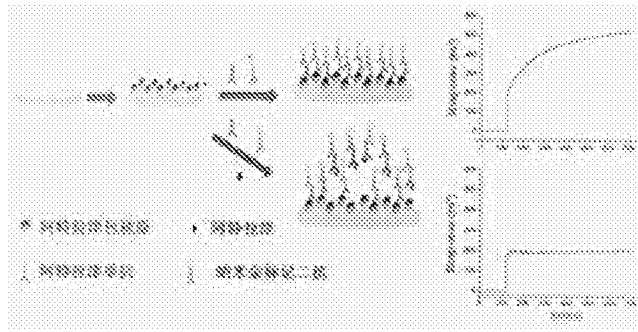


图1

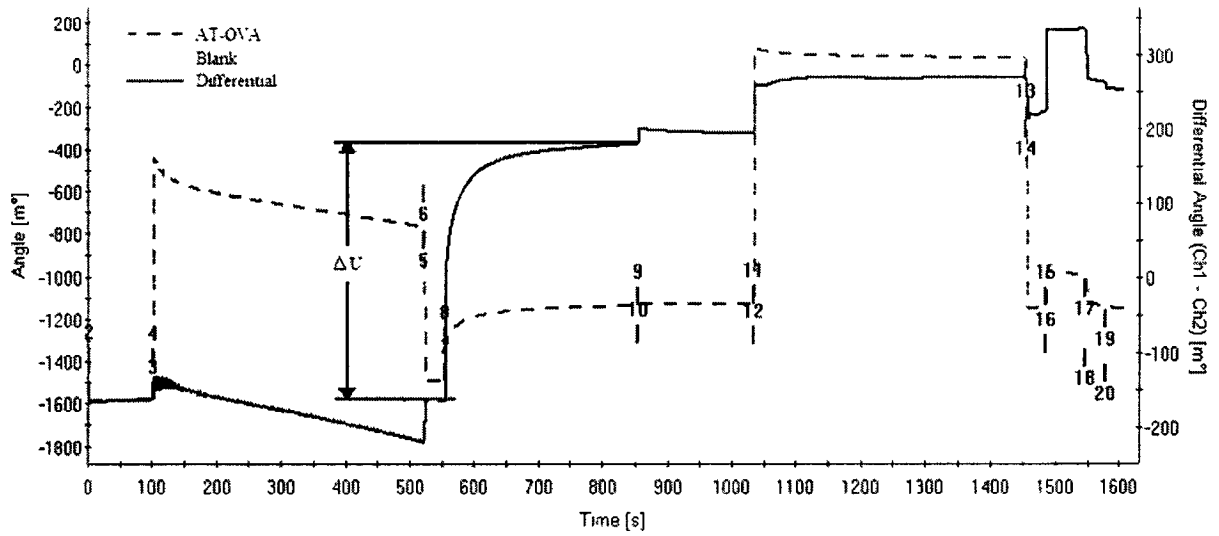


图2

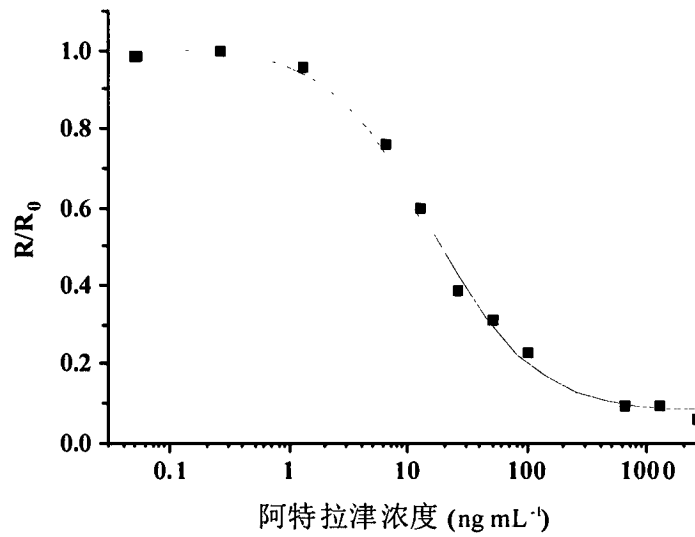


图3

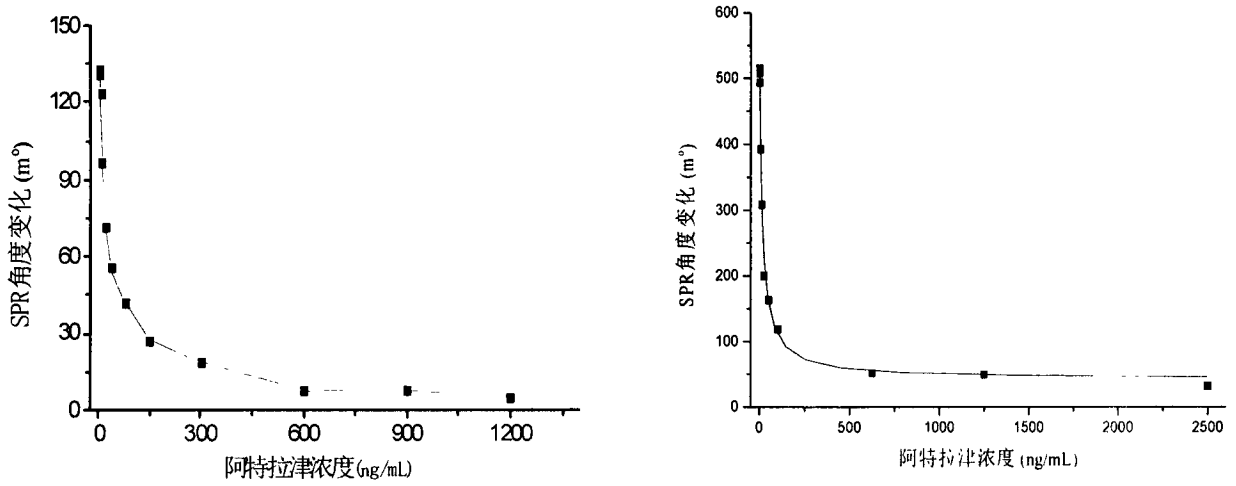


图4

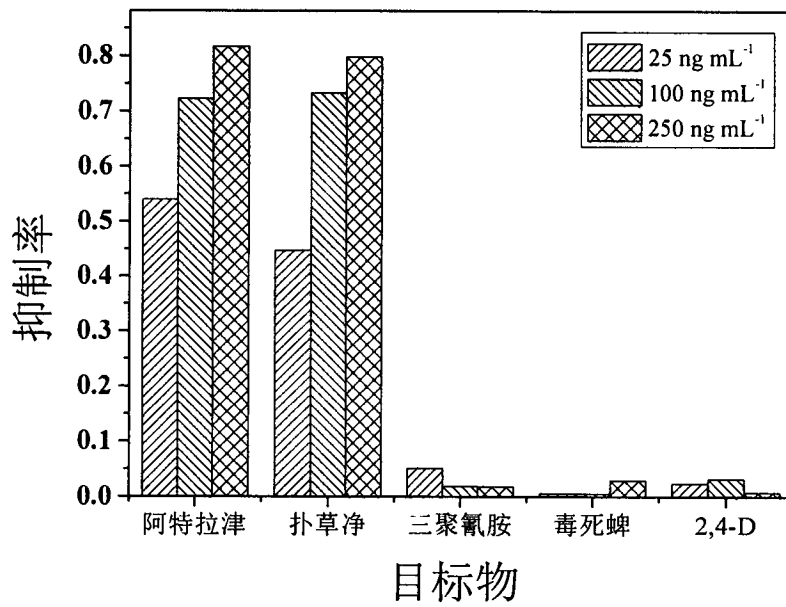


图5

专利名称(译)	一种用于检测阿特拉津的金标二抗信号放大SRP免疫传感方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104515752B</a>	公开(公告)日	2017-07-18
申请号	CN201310450946.3	申请日	2013-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	彭媛 高志贤 宁保安 白家磊 孙思明 柳明		
发明人	彭媛 高志贤 宁保安 白家磊 孙思明 柳明		
IPC分类号	G01N21/552 G01N33/577 G01N33/532		
审查员(译)	李占		
其他公开文献	CN104515752A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测阿特拉津的金标二抗信号放大SRP免疫传感方法。本发明以抗原抗体免疫反应为基本原理，将抗原或抗体作为传感器敏感识别元件，利用间接竞争法结合SPR传感技术对除草剂阿特拉津进行检测，通过化学键将阿特拉津完全抗原(AT-OVA)固定在SPR芯片表面，与待测液中的阿特拉津小分子竞争结合其抗体，加入纳米金标记的二抗进行信号放大，提高了检测灵敏度，改善检测范围，建立信号放大的间接竞争抑制法。方法的最低检出限为0.72ng/mL，IC50为15.70ng/mL，检测范围2.18-629.06ng/mL。

