



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110470688 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201910690169.7

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2019.07.29

G01N 33/94 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110470688 A

(56) 对比文件

Yunlei Xianyu et al..Broad-Range
Magnetic Relaxation Switching Bioassays
Using Click Chemistry-Mediated Assembly
of Polystyrene Beads and Magnetic
Nanoparticles.《ACS Sensors》.2019,第4卷

(43) 申请公布日 2019.11.19

(73) 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山
街1号

审查员 王超

(72) 发明人 陈翊平 董永贞 王知龙

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231

代理人 徐绍新

(51) Int.Cl.

G01N 24/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

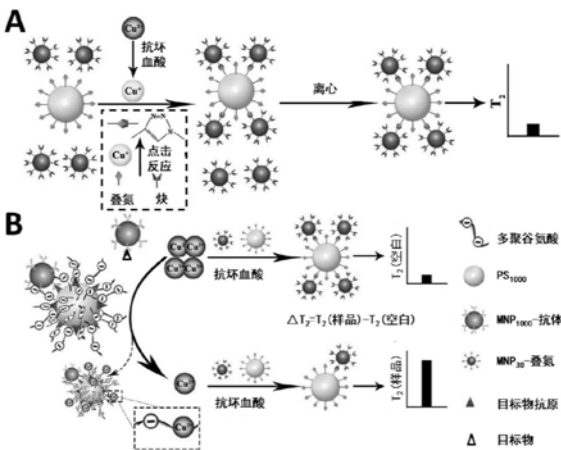
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫
传感器及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器及其应用,属于食品安全分析和检测领域。该免疫传感器包括完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸、磁珠-抗体、聚苯乙烯微球-叠氮、磁颗粒-炔。本发明传感器基于螯合化学反应,制成纳米螯合筛,特异性吸附铜离子,进而控制铜离子催化点击化学反应的程度,实现低场核磁共振免疫传感器的信号读出和放大,具有灵敏度高、特异性强等特点,可以实现对多种小分子目标物包括农药、抗生素以及生物大分子的检测。



1. 一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器检测生物大分子及 农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述免疫传感器包括完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸、磁珠-抗体、聚苯乙烯微球-叠氮、磁颗粒-炔, 所述完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸为同时修饰有完全抗原或捕获抗体和多聚谷氨酸的聚苯乙烯微球, 所述磁珠-抗体为修饰有抗体的磁珠, 所述抗体与完全抗原相对应, 所述聚苯乙烯微球-叠氮为修饰有叠氮分子的聚苯乙烯微球, 所述磁颗粒-炔基为修饰有炔基分子的磁颗粒,

该方法包括以下步骤: 将完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸、磁珠-抗体加入到含有待测目标物的溶液中进行免疫反应, 然后磁分离, 除去上清液, 并进行重悬, 将重悬液加入到 Cu^{2+} 溶液中进行螯合化学反应, 吸附 Cu^{2+} 后, 再次磁分离, 吸取上清液, 加入抗坏血酸, 使上清液中剩余的 Cu^{2+} 转化为 Cu^{+} 并催化聚苯乙烯微球-叠氮与磁颗粒-炔之间的点击化学反应, 反应完成后, 经离心、去掉上清液、洗涤、重悬, 对重悬液进行低场核磁共振信号测定, 确定待测目标物的含量。

2. 如权利要求1所述的检测生物大分子及农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述磁珠的粒径为250~3000 nm。

3. 如权利要求1所述的检测生物大分子及农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述磁颗粒的粒径为10~100 nm。

4. 如权利要求1所述的检测生物大分子及农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述聚苯乙烯微球的粒径为200~3000 nm。

5. 如权利要求1所述的检测生物大分子及农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述完全抗原为待测目标物和牛血清白蛋白的偶联物, 所述抗体为与待测目标物相对应的抗体。

6. 如权利要求1所述的检测生物大分子及农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述 Cu^{2+} 的浓度为0.5~5 mM。

7. 如权利要求1所述的检测生物大分子及农药和抗生素小分子残留的方法, 其特征在于: 所述生物大分子为降钙素原、沙门氏菌, 所述农药为毒死蜱、克百威, 所述抗生素为氯霉素、新霉素。

一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全分析和检测领域,具体涉及一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器及其应用。

背景技术

[0002] 食品安全关系广大人民群众身体健康,是一项需要重点关注的民生工程。多年来,我国制定了各种标准来保障食品安全,例如我国农业部2002年发布的《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》(第176号)、《动物性食品中兽药最高残留限量》(第235号)等公告。但食品安全问题依旧严峻,以超范围超限量使用食品添加剂、微生物污染和农兽药残留超标等三类问题最突出。

[0003] 全世界开发的农药种类(有效成分)有1500种以上,按其化学成分可分为有机磷类、有机氯类、拟除虫菊酯类、氨基甲酸酯类、苯氧乙酸类、有机锡类等。农药使用不当等原因常常造成农药残留超标,而农药残留对人体健康危害巨大,会造成急性中毒或慢性中毒,降低人体免疫力、可致癌、致畸和致突变,甚至造成个体死亡,而且还会影响农产品的对外贸易,也会对环境造成严重的污染。

[0004] 抗生素主要用于治疗各种细菌感染或致病微生物感染类疾病,一般情况下对其宿主不会产生严重的副作用,但抗生素的过量使用会在动物体内残留,残留的抗生素能够通过食物链在人体内富集,造成耐药性、组织器官病变、免疫能力降低等严重的安全问题。

[0005] 鉴于农药与抗生素残留给健康带来的巨大危害,减少、合理使用农药与抗生素是解决问题的根本措施,而食品中农药与抗生素残留的快速、准确检测则是保证合理使用的前提和保障人民群众舌尖上安全的最后一道防线。

[0006] 目前,对食品中农药与抗生素残留定性定量分析的主要手段是仪器分析法和免疫分析法。仪器分析方法具有灵敏度高、准确性好等优点,但样品前处理复杂,检测成本高,需要较高水平的专业技术人员,不适合现场快速检测。酶联免疫吸附测定法(ELISA)和胶体金免疫层析试纸条是主要的免疫分析方法。操作简单、高通量,但其灵敏度不能满足复杂食品基质中痕量农药与抗生素残留的准确分析。另外,酶抑制法也是检测农药残留的一种重要和常用的方法,但该方法的假阳性比较高,稳定性不好,其应用受到限制。

[0007] 体外诊断也和我们的身体健康息息相关,是实现疾病早期诊断和治疗的前提。检测体液中的生物标志物已经成为体外诊断的最重要的手段之一。例如,血清中的降钙素原是一种特异性良好的细菌感染生物标志物,正常的人体中降钙素原的含量很低,当人体被细菌感染之后其在血液中的浓度才会显著上升,能够反映全身炎症反应的活跃程度。因此其被作为一种细菌感染的特异性生物标志物,广泛应用于临床诊断领域。高灵敏检测血清中的降钙素原,可以及时诊断细菌感染疾病。及时发现细菌感染,一方面对疾病的正确诊断具有十分重要的意义,同时对合理使用抗生素,防止抗生素的滥用也具有重要的意义。

[0008] 生物传感器是一种新兴的检测技术,通过将待测目标物浓度转换为信号进行检测,主要包括固定化的生物敏感材料作为识别元件、理化转换器和信号放大装置构成的分

析工具,它具有分析效率高、准确性好、便携性好等优点,已广泛应用于食品安全、体外诊断等领域。低场核磁共振免疫传感器是一种将磁颗粒优异的磁学、光学性质与免疫分析高特异性和高灵敏度相结合的一种生物传感器。其主要优势为:(1) 纳米磁颗粒可以作为免疫磁分离的载体,实现对样品中痕量目标物的富集,最大程度简化样品前处理;(2) 因为食品样品中的磁信号背景低,因此将纳米磁颗粒作为磁信号探针,可以避免复杂样品基质的背景信号干扰,具有很高的信噪比,适合于浑浊的食品样品分析。但传统的低场核磁共振免疫传感器的传感原理是通过抗体和抗原的识别相互作用导致的磁纳米探针状态的改变,进而引起磁信号的改变。因为抗体和抗原识别作用导致的磁纳米探针状态的改变有限,所以传统的低场核磁共振免疫传感器不能实现对痕量农药或抗生素的检测。因此,在探索新的检测原理上,构建分析速度快,灵敏度高的低场核磁免疫传感器,为食品中的农药与抗生素残留的检测提供快速、准确的方法,在保证食品安全、保障人体健康、促进产业发展、维护国际声誉等方面具有重要的意义。

[0009] 点击反应是一种反应速度快,选择性好,很适合作为一种反应修饰纳米材料的表面,在生物传感,生物成像和化学分析等领域得到了广泛地应用。特别是一价铜(Cu^+)催化的叠氮(azide)分子和炔基(alkyne)分子之间的点击反应,已广泛应用于 Cu^{2+} 的直接检测和多种目标物的间接检测。例如,有研究者通过将叠氮分子和炔基分子分别修饰在纳米金的表面,通过 Cu^+ 催化的点击反应,可以将原来分散状态的纳米金变成聚集状态,进而引起颜色的改变,颜色的改变与纳米金聚集的程度成正相关,因此可以作为可视化读出系统。因为 Cu^{2+} 可以和抗坏血酸反应生成 Cu^+ ,因此该可视化方法可以检测 Cu^{2+} 。在此基础上,也有学者将通过碱性磷酸酶的去磷酸化作用,将没有还原性的抗坏血酸酯去磷酸化,转变成有还原性的抗坏血酸,其可以将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ,而 Cu^+ 可以催化叠氮和炔基的点击反应,进而可以实现纳米金状态的改变和可视化信号的读出。更为重要的是碱性磷酸酶是免疫分析中应用广泛的免疫标记酶,通过碱性磷酸酶标记的免疫反应可以实现对多种目标物的间接检测。这些前期的工作给我们很好的启发,即基于 Cu^+ 催化的点击反应可以作为改变磁颗粒状态或者磁颗粒数量的有效手段,是一个很有前途的信号放大系统。

[0010] 在本发明中,我们构建了一个对 Cu^{2+} 具有很高亲和力的纳米螯合筛,结合免疫磁富集和低场核磁共振技术,进而构建了一种灵敏度高,稳定性好的低场核磁免疫传感器,并且用于农兽药残留和生物大分子的检测。在该传感器中,聚苯乙烯微球(PS)表面可以修饰大量的多聚谷氨酸,形成一种具有纳米螯合筛结构的偶联物。因为多聚谷氨酸高分子有很多羧基,其表面带很多负电荷,因此偶联大量多聚谷氨酸的PS微球表面是带负电荷的,由于正负电荷的静电相互作用,多聚谷氨酸-PS微球表面会吸附大量的 Cu^{2+} 离子。更为重要的是,该多聚谷氨酸-PS微球可以同时偶联识别待测目标物的完全抗原或者捕获抗体,结合免疫磁分离技术,进而构建一种可以通过抗体-抗原识别作用来改变溶液中 Cu^{2+} 离子浓度的方法。溶液中 Cu^{2+} 改变量可以通过氧化还原反应转变成 Cu^+ 的改变量,而 Cu^+ 催化的点击反应诱导的低场核磁共振磁弛豫时间传感信号读出系统可以实现对 Cu^+ 浓度变化进行检测。在该低场核磁共振磁弛豫时间传感信号读出系统中,1000nm羧基修饰的聚苯乙烯微球(PS_{1000})和30nm羧基修饰的超顺纳米磁颗粒(MNP_{30})分别通过EDC/NHS的方式偶联上叠氮(azide)和炔基(alkyne)分子,分别制备成azide- PS_{1000} 和alkyne- MNP_{30} 偶联物。在 Cu^+ 离子催化的作用下,azide- PS_{1000} 和alkyne- MNP_{30} 会发生点击反应,生成 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物,因为 PS_{1000} 很容

易被离心,而MNP₃₀在同一转速下很难被离心。因此可以通过控制离心条件的策略,将没有反应的alkyne-MNP₃₀纳米颗粒去掉。因为PS₁₀₀₀本身没有磁信号,因此可以将离心得到的PS₁₀₀₀-MNP₃₀偶联物作为该方法的磁信号探针,实现对横向弛豫时间(T_2)的获取。 T_2 信号值与PS₁₀₀₀-MNP₃₀偶联物的含量成正相关,PS₁₀₀₀-MNP₃₀偶联物的形成和Cu⁺催化的点击反应进行程度成正比,而结合磁分离的免疫反应可以调控多聚谷氨酸-PS微球偶联物的含量,进而调节溶液中Cu²⁺的含量,Cu²⁺浓度的变化可以通过氧化还原反应转为Cu⁺浓度的变化。最终 T_2 信号与目标物的含量成正相关,这也是整个分析方法定量的基础。

[0011] 相比传统的低场核磁共振免疫传感器,该纳米整合筛介导的低场核磁共振免疫传感器具有如下的优势:(1)灵敏度高:a.多聚谷氨酸-PS微球纳米筛对Cu²⁺离子具有很高的亲和力,因为PS微球比表面积大,上面的羧基数量众多,可以偶联大量的多聚谷氨酸,而一个多聚谷氨酸分子具有很多羧基,通过正负电荷相互作用和大量的Cu²⁺发生螯合作用,这是整个方法灵敏度的一个重要基础;b.Cu⁺催化的点击反应具有很高的反应效率,可以催化形成大量的PS₁₀₀₀-MNP₃₀磁信号探针;c.磁信号 T_2 只与MNP₃₀的数量相关,即PS₁₀₀₀上能够偶联的MNP₃₀的数量,而传统的低场核磁共振免疫传感器中磁信号 T_2 和MNP₃₀的状态变化相关。相关研究表明,MNP₃₀数量的改变对磁信号 T_2 的影响比MNP₃₀状态的改变更为明显和有效,因此该方法基于MNP₃₀数量的改变导致的 T_2 信号传感效率就比传统的低场核磁免疫传感器的信号传感模式更为有效,这也是该方法灵敏度高的另外一个重要的原因。(2)稳定性好:Cu⁺催化的叠氮和炔基的点击反应是一种共价的反应,因此点击反应生成的PS₁₀₀₀-MNP₃₀磁探针很稳定,而传统的低场核磁免疫传感器中聚集后的磁颗粒可能过段时间后会重新分散,导致结果不稳定。另外,在传统的低场核磁免疫传感器中很多因素会导致磁颗粒的聚集,导致非正常的信号。而在该方法中,磁信号只与PS₁₀₀₀-MNP₃₀的数量相关,从信号传感原理方面保证了方法的稳定性。

[0012] 综上所述,纳米整合筛介导的低场核磁共振免疫传感器克服了传统的低场核磁共振免疫传感器灵敏度低、稳定性差的问题,在灵敏度和稳定性方法具有很大的优势,该方法可应用于农兽药残留的分析以及生物大分子的检测。

发明内容

[0013] 针对现有技术中存在的缺陷,本发明的目的在于提供一种纳米整合筛介导的低场核磁共振免疫传感器及其应用,该传感器具有较高的灵敏度、较好的稳定性及较强的特异性。

[0014] 为达到以上目的,本发明采取的技术方案是:

[0015] 所述免疫传感器包括完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸、磁珠-抗体、聚苯乙烯微球-叠氮、磁颗粒-炔,所述完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸为修饰有完全抗原或捕获抗体和多聚谷氨酸的聚苯乙烯微球,所述磁珠-抗体为修饰有抗体的磁珠,所述抗体与完全抗原相对应,所述聚苯乙烯微球-叠氮为修饰有叠氮分子的聚苯乙烯微球,所述磁颗粒-炔基为修饰有炔基分子的磁颗粒。

[0016] 进一步的,所述磁珠的粒径为250~3000nm。

[0017] 进一步的,所述纳米磁颗粒的粒径为10~100nm。

[0018] 进一步的,所述聚苯乙烯微球的粒径为200~3000nm。

[0019] 一种免疫传感器的应用,所述免疫传感器用于检测生物大分子及农药和抗生素等小分子残留。

[0020] 一种利用所述免疫传感器检测生物大分子及农药和抗生素等小分子残留的方法,包括以下步骤:将完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸、磁珠-抗体加入到含有待测目标物的溶液中进行免疫反应,然后磁分离,除去上清液,并进行重悬,将重悬液加入到 Cu^{2+} 溶液中进行螯合化学反应,吸附 Cu^{2+} 后,再次磁分离,吸取上清液,加入抗坏血酸,使上清液中剩余的 Cu^{2+} 转化为 Cu^+ 并催化聚苯乙烯微球-叠氮与磁颗粒-炔之间的点击化学反应,反应完成后,经离心、去掉上清、洗涤、重悬,对重悬液进行低场核磁共振信号测定,确定待测目标物的含量。

[0021] 进一步的,所述完全抗原为待测目标物和牛血清白蛋白的偶联物,所述抗体为与待测目标物相对应的抗体。

[0022] 进一步的,所述 Cu^{2+} 的浓度为0.5~5mM。

[0023] 进一步的,所述生物大分子为降钙素原、沙门氏菌,所述农药为毒死蜱、克百威;所述抗生素为氯霉素、新霉素。

[0024] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0025] (1) 灵敏度高:(a) 聚苯乙烯微球的比表面积大,可以偶联大量的多聚谷氨酸,而多聚谷氨酸具有很多羧基,带负电,因此对 Cu^{2+} 的亲合力大,可以吸附大量的 Cu^{2+} ;(b) Cu^{2+} 可以转化为 Cu^+ ,而 Cu^+ 催化的叠氮和炔基的点击反应具有反应速度快,效率高等特点;(c) 聚苯乙烯微球-叠氮的比表面积大,可以通过点击反应,其表面可以偶联大量的磁颗粒,因此磁信号很强,有利于方法灵敏度的提高;(d) 传统的低场核磁共振免疫传感器是基于磁探针状态的改变,而本工作是基于磁探针数量的改变。磁信号 T_2 对磁颗粒数量的改变更为敏感,因此本方法的灵敏度高于传统的低场核磁共振免疫传感器。

[0026] (2) 稳定性好:该免疫传感器不需要生物酶的催化,并且纳米筛的稳定性很好,可以在室温下保存2个月。更为重要的是,点击反应是共价反应,反应产物很稳定,而传统的低场核磁共振免疫传感器是基于抗体-抗原的生物相互作用导致的磁颗粒探针从分散状态变成聚集状态,因为抗体-抗原的作用力弱,导致聚集状态的磁探针有可能过段时间会重新分散,导致传统的低场核磁共振免疫传感器的不稳定,而采用点击反应策略就可以避免这个问题。

[0027] (3) 前处理简单,操作方便:本发明中纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器的检测方法,依赖于磁信号检测,而复杂的食品或者生物样品中磁信号背景很低,可以忽略不计,因此适合分析浑浊的生物或者食品样品,不需要进行前处理或者前处理简单,操作方便,检测速度快。

附图说明

[0028] 图1为本发明检测农药、抗生素等小分子的原理图。

[0029] 图2为本发明检测降钙素原、沙门氏菌等大分子的原理图。

[0030] 图3为本发明实施例中alkyne-MNP₃₀、PS₁₀₀₀-azide、PS₁₀₀₀-MNP₃₀离心前后上清液 T_2 信号的变化。

[0031] 图4为本发明实施例中 Cu^{2+} 与多聚谷氨酸之间的螯合化学反应原理图。

- [0032] 图5为本发明实施例中 Cu^{2+} 与多聚谷氨酸螯合前后 Cu^{2+} 含量变化。
- [0033] 图6为本发明实施例中多聚谷氨酸- PS_{1000} -BSA-完全抗原螯合 Cu^{2+} 前后电位变化。
- [0034] 图7为本发明实施例中纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器对 Cu^{2+} 的响应关系图。
- [0035] 图8为本发明实施例中 Cu^{2+} 用量优化图。
- [0036] 图9为本发明检测毒死蜱残留的标准曲线图。
- [0037] 图10为本发明检测克百威残留的标准曲线图。
- [0038] 图11为本发明检测氯霉素残留的标准曲线图。
- [0039] 图12为本发明检测新霉素残留的标准曲线图。
- [0040] 图13为本发明检测降钙素原的标准曲线图。
- [0041] 图14为本发明检测沙门氏菌的标准曲线图。
- [0042] 图15为本发明检测实际样品中毒死蜱的方法比较结果图。
- [0043] 图16为本发明检测毒死蜱的特异性结果图。

具体实施方式

[0044] 以下结合具体实施例对本发明作进一步详细说明。

[0045] 本发明实施例提供了一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器,参见图1、图2所示,基于以下原理:

[0046] 多聚谷氨酸带有大量负电荷,能够通过配位化学螯合大量的 Cu^{2+} ,而 Cu^{2+} 可以经抗坏血酸还原为 Cu^+ , Cu^+ 可以催化叠氮与炔之间的点击化学反应,使聚苯乙烯微球上偶联不同数量的磁颗粒,进行实现核磁共振信号读出。基于上述原因,检测小分子时可以在聚苯乙烯微球上偶联多聚谷氨酸与完全抗原,使完全抗原-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸与目标物竞争性结合磁珠-抗体,待测样品中目标物含量越高,则目标物-磁珠-抗体生成量越多,而磁珠-抗体-完全抗原-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸偶联物则越少,所吸附的 Cu^{2+} 则越少,溶液中剩余的 Cu^{2+} 越多,经还原产生的 Cu^+ 则越多,经 Cu^+ 催化的点击反应进行的程度就越高,在叠氮-聚苯乙烯微球上连接的炔基-磁颗粒也越多,低场核磁共振信号则越强。同理,检测大分子目标物时,完全抗原替换为捕获抗体,与目标物、磁珠抗体三者形成双抗夹心结构,目标物含量多的溶液,磁珠-目标物-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸偶联物则越多,吸附的 Cu^{2+} 则越多,溶液中剩余的 Cu^{2+} 越少,经还原产生的 Cu^+ 则越少。经 Cu^+ 催化的点击反应进行的程度就越小,因此在叠氮-聚苯乙烯微球上连接的炔基-磁颗粒则越少,低场核磁共振信号则越弱。因此,不同的目标物浓度对应不同的核磁共振信号强度,实现目标物的高灵敏检测。

[0047] 进一步的,通过一台0.47T低场核磁共振仪对得到的聚苯乙烯微球-磁颗粒的含量进行核磁共振横向弛豫时间(T_2)的测定即可。

[0048] 纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器的制备方法,在聚苯乙烯微球表面修饰多聚谷氨酸,得到聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸,将所述聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸与完全抗原(或捕获抗体)偶联,得到完全抗原或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸;在磁珠表面修饰与所述完全抗原相对应的抗体,得到磁珠-抗体;在聚苯乙烯微球表面修饰叠氮分子得到聚苯乙烯微球-叠氮;在磁颗粒表面修饰炔分子,得到磁颗粒-炔。在实际检测中,抗原、抗体与待测物相对应。

[0049] 制备方法具体包括以下步骤:

[0050] 本实施例中,选用磁颗粒粒径为30nm,即 MNP_{30} ,选用磁珠粒径为1000nm,即 MNP_{1000} ,选用聚苯乙烯微球粒径为1000nm,即 PS_{1000} ,在实际检测中,纳米粒子可以根据实际需要进行选择,纳米磁颗粒的粒径可以为10~100nm。磁珠的粒径可以为250~3000nm,聚苯乙烯微球的粒径可以为200~3000nm。

[0051] S1、制备 MNP_{30} -alkyne, PS_{1000} -azide偶联物

[0052] 将浓度为5mg/mL MNP_{30} (粒径为30nm的纳米磁颗粒) 与浓度为10mg/mL的EDC和10mg/mL的sulfo-NHS混匀在室温下缓慢涡旋30~60min,加入浓度为0.01M、pH为7.4的PBS缓冲液中,然后,加入浓度为10mg/mL的alkyne-PEG₄-NH₂,并在室温下缓慢涡旋1~2h混合均匀,通过磁分离除去未反应的alkyne-PEG₄-NH₂,并用PBST (即浓度为0.01M的PBS加浓度为0.05%Tween 20配置的pH为7.4的溶液) 洗涤,最后用浓度为0.01 M、pH为7.4的PBS缓冲液重悬得到磁颗粒-炔 (MNP_{30} -alkyne) 偶联物,并存放在4℃的环境中备用。

[0053] 将浓度为5mg/mL PS_{1000} (粒径为1000nm的羧基修饰的聚苯乙烯微球) 与浓度为10mg/mL的EDC和10mg/mL的sulfo-NHS混匀在室温下缓慢涡旋30~60min,离心,并用浓度为0.01M、pH为7.4的PBS缓冲液重悬,然后,加入浓度为10mg/mL的azide-PEG₄-NH₂,并在室温下缓慢涡旋1~2h混合均匀,通过离心除去未反应的azide-PEG₄-NH₂,并用PBST (即浓度为0.01M的PBS加浓度为0.05%Tween 20配置的pH为7.4的溶液) 洗涤,最后用浓度为0.01M、pH为7.4的PBS缓冲液重悬得到聚苯乙烯微球-叠氮 (PS_{1000} -azide) 偶联物,并存放在4℃的环境中备用。

[0054] 本实施例中比较了制备alkyne- MNP_{30} 与 PS_{1000} -azide偶联物离心前后 T_2 信号的变化,具体方法如下:测定alkyne- MNP_{30} 、 PS_{1000} -azide以及在点击反应条件 (Cu^{2+} 、抗坏血酸(Vc)) 下alkyne- MNP_{30} 和 PS_{1000} -azide反应混合物,在离心前后上清液 T_2 信号的变化。参见图3所示,在离心后,alkyne- MNP_{30} 、 PS_{1000} -azide的 T_2 信号无明显变化,说明alkyne- MNP_{30} 在该离心力作用下很稳定,不能被离心,同时也说明 PS_{1000} -azide本身没有磁信号。与此相反,在点击反应条件下, T_2 值极显著增大,说明alkyne- MNP_{30} 和 PS_{1000} -azide的点击反应发生了,生成了 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物。在离心过程中alkyne- MNP_{30} 不会被离心沉降,而 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物可以被离心,因此点击反应发生后,上清液中的alkyne- MNP_{30} 含量变小, T_2 值增大,也说明 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物的形成,证明此方案可行。

[0055] S2、制备 MNP_{1000} -Ab与多聚谷氨酸- PS_{1000} -BSA-完全抗原或捕获抗体偶联物

[0056] 将浓度为5mg/mL MNP_{1000} (粒径为1000nm的羧基磁珠) 与浓度为10mg/mL的EDC和10mg/mL的sulfo-NHS混匀在室温下缓慢涡旋10~30min。磁分离之后,加入浓度为0.01 M、pH为7.4的PBS缓冲液中,然后,加入一定量的抗体 (Ab, 抗体根据实际需要而选择),并在室温下缓慢涡旋1~2h混合均匀,磁分离,并用PBST洗涤,最后用浓度为0.01 M、pH为7.4的PBS缓冲液重悬,得到磁珠-抗体 (MNP_{1000} -Ab) 偶联物,4℃备用。

[0057] 将一定数量的多聚谷氨酸 (polyglutamic acid, pga) 与BSA-抗原 (或捕获抗体) 分别与10mg/mL的EDC和10mg/mL的sulfo-NHS混匀在室温下缓慢涡旋30~60min,加入到氨基修饰的 PS_{1000} 溶液中。其中,多聚谷氨酸和BSA-完全抗原的摩尔比在5:1-1:2区间调节。在室温下反应2~3h,离心后,重悬得到完全抗原-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸 (pga- PS_{1000} -BSA-抗原) 或捕获抗体-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸 (pga- PS_{1000} -捕获抗体),4℃备用。

[0058] S3、 Cu^{2+} 与pga之间的螯合化学反应

[0059] 取100 μL pga- PS_{1000} -BSA-抗原偶联物于离心管中,加入100 μL Cu^{2+} 溶液,在室温下缓慢涡旋反应15~20min后离心并收集上清液,使用电感耦合等离子体质谱法对溶液中剩余的 Cu^{2+} 进行测定,如图4、5所示,经反应后多聚谷氨酸螯合了大量的 Cu^{2+} 。同时,经本实施例中考察发现,如图6所示,pga- PS_{1000} -BSA-目标物在螯合 Cu^{2+} 前后的电位同样发生了显著变化,间接证明该纳米螯合筛可以高效螯合 Cu^{2+} 。

[0060] S4、纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器对 Cu^{2+} 的响应

[0061] 将50 μL 的alkyne-MNP₃₀偶联物,50 μL 的抗坏血酸和50 μL 的azide- PS_{1000} 偶联物混合,并分别加入一系列梯度浓度的 Cu^{2+} 溶液,在室温下缓慢涡旋反应10~15min,并离心2min,除去未反应的alkyne-MNP₃₀,用纯水重悬,洗涤,得到 PS_{1000} -MNP₃₀偶联物,并测定其 T_2 值。如图7所示, Cu^{2+} 浓度与 T_2 变化值存在良好的线性关系且具有较低的检出限,证明了本方案的可行性。

[0062] S5、制作标准曲线

[0063] 将一系列浓度的毒死蜱溶液与MNP₁₀₀₀-Ab溶液混匀,缓慢涡旋10~20min,经磁分离及PBST洗涤后,加入pga-PS-完全抗原与剩余的MNP₁₀₀₀-Ab进行免疫竞争反应20~30min,经磁分离、洗涤、重悬后,可得到pga-PS-MNP₁₀₀₀和MNP₁₀₀₀-毒死蜱偶联物。将上述偶联物加入1mM Cu^{2+} 溶液中,并孵化20-30min进行螯合化学反应,经磁分离,吸取上清液,得到剩余的 Cu^{2+} ,在吸取的上清液中加入抗坏血酸、azide- PS_{1000} 和alkyne-MNP₃₀室温下反应10~15min,并离心2min,除去未反应的alkyne-MNP₃₀偶联物,用纯水重悬,得到 PS_{1000} -MNP₃₀偶联物,并测定其 T_2 值。

[0064] 本实施例考察了不同浓度的 Cu^{2+} 用量进行螯合化学反应对毒死蜱检测 T_2 变化值的差别。参见图8所示,当 Cu^{2+} 浓度为1mM时,检测毒死蜱的 T_2 变化值的差别最显著。因此,选用 Cu^{2+} 浓度为1mM作为最终实验比例,在实际使用中, Cu^{2+} 浓度可以为0.5~5mM中的任意值同样可以满足检测需求。

[0065] 根据不同的分析对象,选择相应的抗体、完全抗原。在此基础上,以PS-MNP₃₀偶联物为最终低场核磁共振信号读出探针,以样品浓度(ng/mL)的对数为横坐标,以 ΔT_2 值为纵坐标作图,参见图9、图10、图11、图12、图13、图14所示,随着待测物浓度的增加, ΔT_2 值逐渐增大。

[0066] 本发明还提供一种采用上述方法制备的纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器,该免疫传感器包括完全抗原(或捕获抗体)-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸、磁珠-抗体、聚苯乙烯微球-叠氮、磁颗粒-炔,完全抗原(或捕获抗体)-聚苯乙烯微球-多聚谷氨酸为修饰有完全抗原(或捕获抗体)和多聚谷氨酸的聚苯乙烯微球,磁珠-抗体为修饰有抗体的磁珠,抗体与完全抗原相对应,所述聚苯乙烯微球-叠氮为修饰有叠氮分子的聚苯乙烯微球,所述磁颗粒-炔为修饰有炔分子的磁颗粒。磁珠的粒径为1000nm,纳米磁粒的粒径为30nm,聚苯乙烯微球的粒径为1000nm。

[0067] 本发明提供一种纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器的应用,该免疫传感器可用于检测农药、抗生素残留等小分子,待测农药为毒死蜱、克百威,待测抗生素为氯霉素、新霉素,还可用于检测降钙素原或沙门氏菌等大分子。

[0068] 上述免疫传感器检测抗生素与农药等小分子残留的方法,包括以下步骤:将上述

免疫传感器直接加入含有目标物的溶液中,进行竞争性免疫反应后磁分离,除去上清液,并重悬,将重悬液加入到 Cu^{2+} 溶液中进行螯合化学反应,磁分离,吸取上清液,利用上清液中剩余的 Cu^{2+} 在抗坏血酸下转化为 Cu^+ 并催化聚苯乙烯微球-叠氮、磁颗粒-炔之间的点击化学反应,反应完成后,经离心、洗涤、重悬,对重悬液进行低场核磁共振信号测定,确定待测目标物的含量。

[0069] 采用上述免疫传感器对农药、抗生素样品进行检测的具体方法为:

[0070] A、将50 μL MNP_{1000} -毒死蜱抗体与不同浓度的毒死蜱标准品混合反应,本实施例中选用的以 ng/mL 为单位的浓度:0,0.01,0.05,0.1,0.5,1,5,10,50,100,500,1000。再加入50 μL pga-PS_{1000} -BSA-抗原偶联物混匀,与剩余的 MNP_{1000} -Ab进行反应,可得到 pga-PS-MNP_{1000} 和 MNP_{1000} -毒死蜱完全抗原偶联物。将偶联物重悬液加入1 mM Cu^{2+} 溶液中,进行螯合化学反应,经磁分离,吸取上清液,得到剩余的 Cu^{2+} 。

[0071] B、在吸取的上清液中加入抗坏血酸、azide- PS_{1000} 和alkyne- MNP_{30} 进行点击化学反应,并离心,除去未反应的alkyne- MNP_{30} 偶联物,用纯水重悬,得到 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物。

[0072] C、对 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物重悬液进行信号读出。

[0073] 通过一台0.47T低场核磁共振仪对 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物进行 T_2 值的测定,即可得到毒死蜱的含量。

[0074] 重复上述步骤,将毒死蜱替换为克百威、氯霉素、新霉素,并将抗原和抗体进行相应的替换,其余实验条件均相同,进行信号读出。

[0075] 上述免疫传感器检测降钙素原与沙门氏菌等大分子的方法,包括以下步骤:将上述免疫传感器中的多聚谷氨酸-PS-完全抗原偶联物替换为多聚谷氨酸-PS-捕获抗体,其他不变,并将其直接加入含有目标物的溶液中,进行免疫反应(形成“双抗夹心”结构)后磁分离,除去上清液,并重悬,将重悬液加入到 Cu^{2+} 溶液中进行配位化学反应,磁分离,吸取上清液,利用上清液中剩余的 Cu^{2+} 在抗坏血酸下转化为 Cu^+ 并催化聚苯乙烯微球-叠氮、磁颗粒-炔之间的点击化学反应,反应完成后,经离心、洗涤、重悬,对重悬液进行低场核磁共振信号测定,确定待测目标物的含量。

[0076] 采用上述免疫传感器对降钙素原样品进行检测的具体方法为:

[0077] A、将50 μL MNP_{1000} -降钙素原抗体、不同浓度的降钙素原标准品(本实施例中选用的以 ng/mL 为单位的浓度:0,0.01,0.05,0.1,0.5,1,5,10,50,100,500,1000)、50 μL 多聚谷氨酸- PS_{1000} -捕获抗体偶联物混合反应,三者形成双抗夹心结构:“多聚谷氨酸-PS-降钙素原- MNP_{1000} ”。将偶联物重悬液加入1 mM Cu^{2+} 溶液中,进行配位化学反应,经磁分离,吸取上清液,得到剩余的 Cu^{2+} 。

[0078] B、在吸取的上清液中加入抗坏血酸、azide- PS_{1000} 和alkyne- MNP_{30} 进行点击化学反应,并离心,除去未反应的alkyne- MNP_{30} 偶联物,用纯水重悬,得到 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物。

[0079] C、对 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物重悬液进行信号读出。

[0080] 通过一台0.47T低场核磁共振仪对 PS_{1000} - MNP_{30} 偶联物进行 T_2 值的测定,即可得到降钙素原的含量。

[0081] 采用上述免疫传感器对沙门氏菌进行检测的具体方法为:

[0082] A、将50 μL MNP_{1000} -沙门氏菌抗体、不同浓度的沙门氏菌溶液(本实施例中选用的以 CFU/mL 为单位的浓度: 10^0 , 5×10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7)和50 μL 多聚

谷氨酸-PS₁₀₀₀-捕获抗体偶联物混合反应,三者形成双抗夹心结构-多聚谷氨酸-PS-沙门氏菌-MNP₁₀₀₀。磁分离,重悬之后,往该重悬液加入1mM Cu²⁺溶液中,进行螯合化学反应,经磁分离,吸取上清液,得到剩余的Cu²⁺。

[0083] B、在吸取的上清液中加入抗坏血酸、azide-PS₁₀₀₀和alkyne-MNP₃₀进行点击化学反应,并离心,除去未反应的alkyne-MNP₃₀偶联物,用纯水重悬,得到PS₁₀₀₀-MNP₃₀偶联物。

[0084] C、对PS₁₀₀₀-MNP₃₀偶联物重悬液进行信号读出。

[0085] 通过一台0.47T低场核磁共振仪对PS₁₀₀₀-MNP₃₀偶联物进行T₂值的测定,即可得到沙门氏菌的含量。

[0086] 将本实施例的方法与传统方法的分析性能进行比较:

[0087] a、根据本低场核磁共振免疫传感器,该方法具有如下的优势:(1)灵敏度高,通过结合螯合化学与点击化学反应实现磁信号的放大。通过实际样品的检测,发现该方法与GC-MS的检测结果一致,比ELISA方法的检测结果更加准确。其中有3个样品,低场核磁共振免疫传感器和GC-MS检测的是阳性,但ELISA检测出来的是阴性,说明ELISA的灵敏度和准确性不如低场核磁共振免疫传感器(如图15);(2)磁信号几乎不受背景干扰,前处理比较简单;特异性强,可以根据待测目标物的不同,选择不同的抗原抗体,实现特异性分析。

[0088] b、在特异性试验中,使用高灭磷、三唑磷、草甘膦、乐果作为类似物来测定以毒死蜱为检测样本时传感器的特异性,其中,毒死蜱与类似物的浓度比均设定为1:10。参见图16可知,只有目标农药能够导致T₂值的显著变化,其他类似物对磁共振信号的影响可以忽略不计。

[0089] c、回收率采用标准加入法进行了研究,即在空白水样中加入不同浓度的毒死蜱,如表1所示,毒死蜱的检测回收率为92%~120%,表明了本实施例方法准确度较高。

[0090] 表1纳米螯合筛介导的低场核磁共振免疫传感器检测毒死蜱回收率

[0091]

加标浓度 (ng/mL)	本传感器检测 (ng/mL)	回收率 (%)
0	Not detected	0
0.5	0.6±0.08	120
1	1.1±0.12	110
5	4.8±0.28	96
10	9.2±0.62	92
50	48.7±2.1	97.4
100	97.6±6.6	97.6

[0092] 本发明实施例的检测方法是直接将免疫磁探针加入待测样品溶液中进行免疫、螯合配位与点击反应,可以有效地提高方法的灵敏度;同时,本实施例的结果读出是基于低场核磁共振磁信号读出,避免了传统光信号读出时基底的干扰,不需要复杂的样品前处理步骤,准确度较高。

[0093] 本实施例中所使用的试剂和仪器设备来源入下:

[0094] 羧基修饰的1000nm磁珠:Dynabeads(美国热电公司,ThermaFisher);

[0095] 羧基修饰的30nm磁纳米粒子:Ocean NanoTech公司(美国);

[0096] 羧基修饰的聚苯乙烯微球(1000nm,500nm,200nm)和氨基修饰的聚苯乙烯微球(1000nm):Partikeltechnologie GmbH公司(德国);

[0097] 氯霉素-BSA、氯霉素抗体、新霉素-BSA、新霉素抗体、毒死蜱-BSA、毒死蜱抗体、克百威-BSA、克百威抗体：北京勤邦生物科技有限公司；

[0098] Alkyne-PEG₄-NH₂, azide-PEG₄-NH₂:Click Chemistry Tools公司(美国)；

[0099] 牛血清白蛋白、毒死蜱、高灭磷、三唑磷、草甘膦、乐果、克百威、氯霉素、新霉素：上海Sigma-Aldrich公司；

[0100] 磁分离架：上海万润纳米科技公司；0.47 T核磁共振仪(PQ 001)：上海纽迈科技公司；12个随机湖水样品：采集自湖北武汉南湖。

[0101] 本发明不仅局限于上述最佳实施方式，任何人在本发明的启示下都可得出其他各种形式的产品，但不论在其形状或结构上作任何变化，凡是具有与本发明相同或相近似的技术方案，均在其保护范围之内。

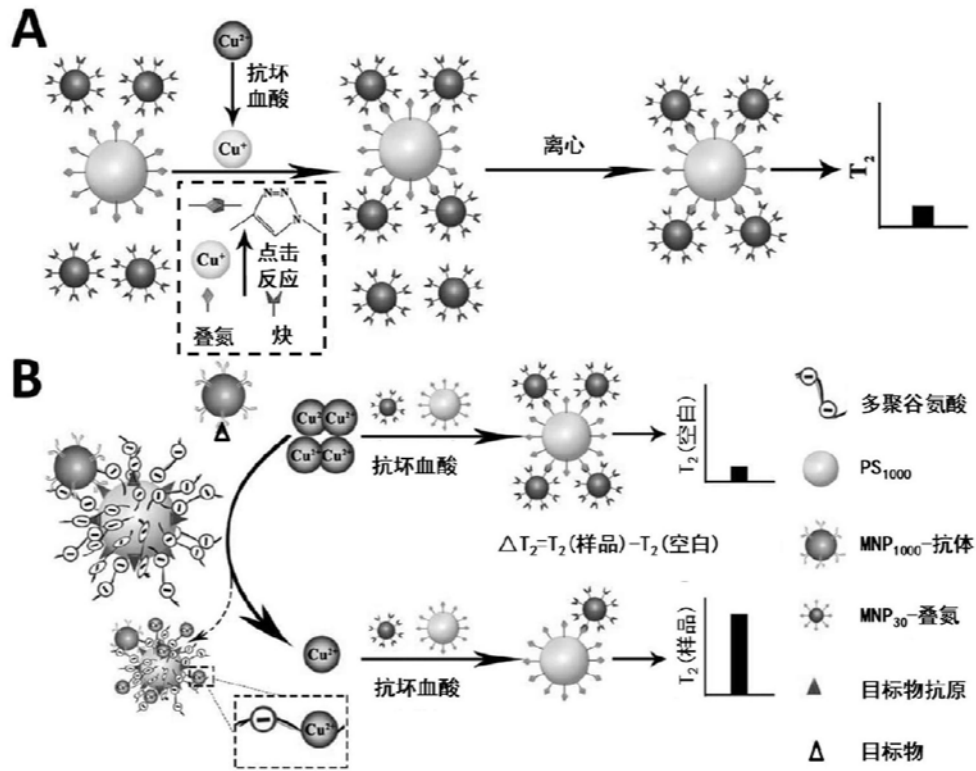


图1

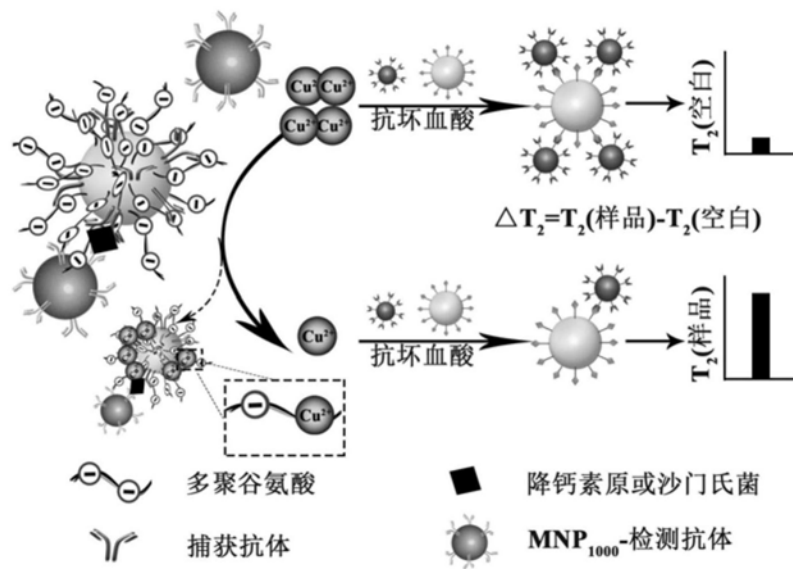


图2

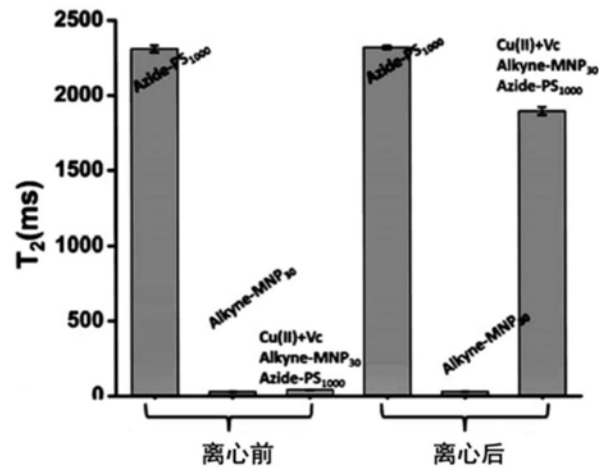


图3

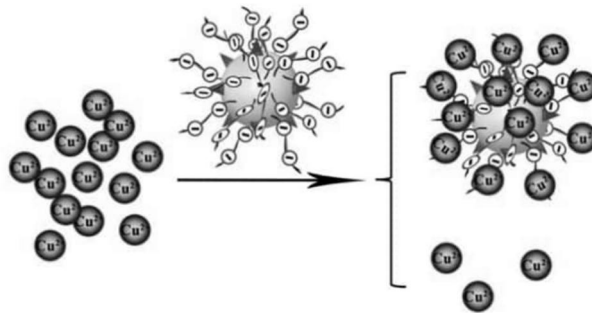


图4

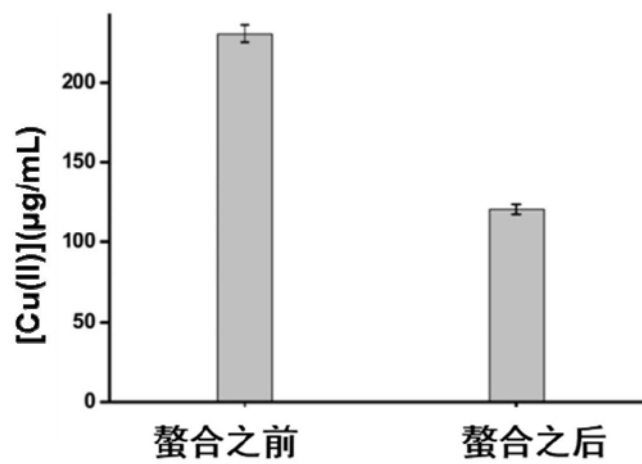


图5

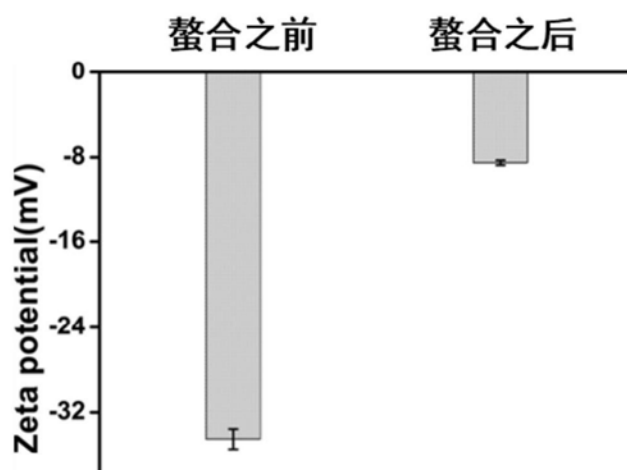


图6

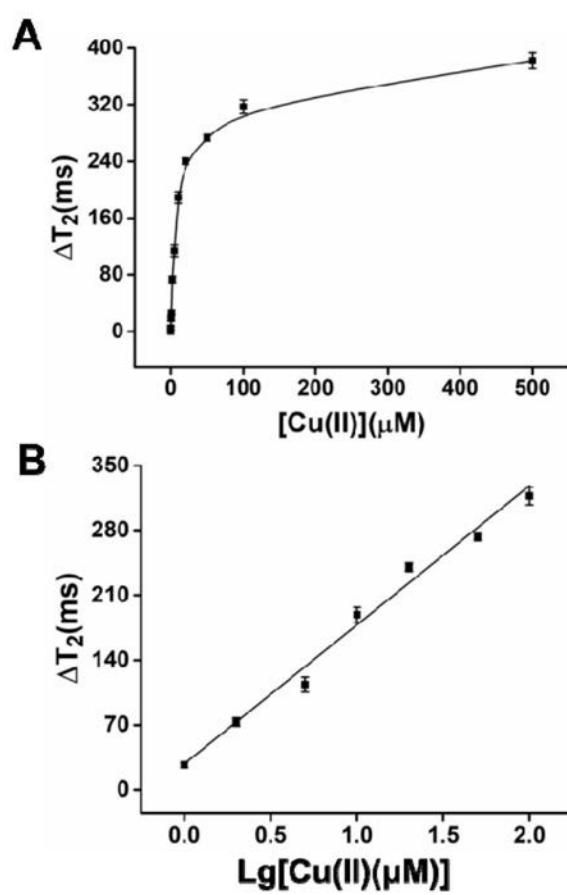


图7

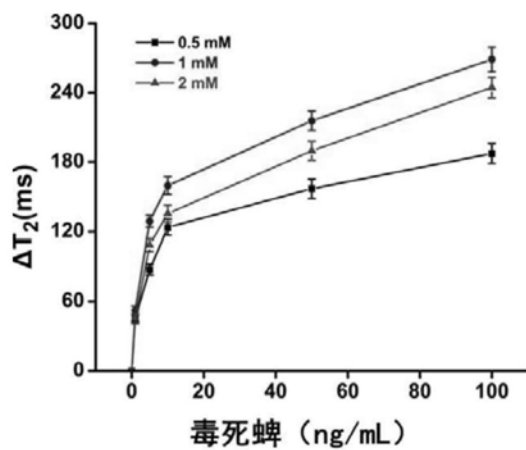


图8

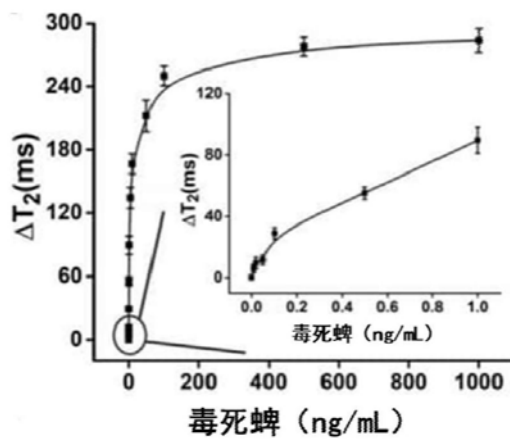


图9

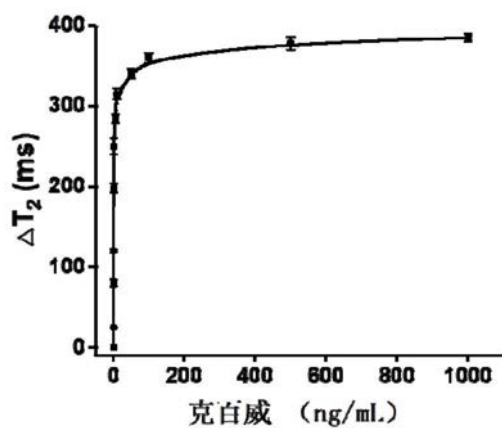


图10

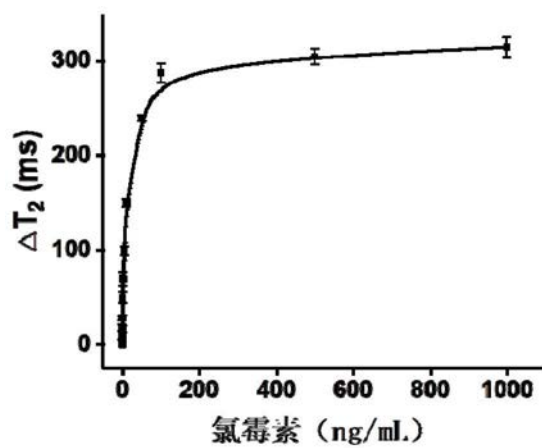


图11

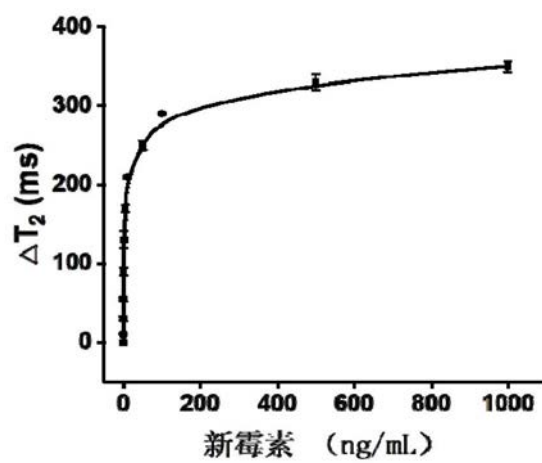


图12

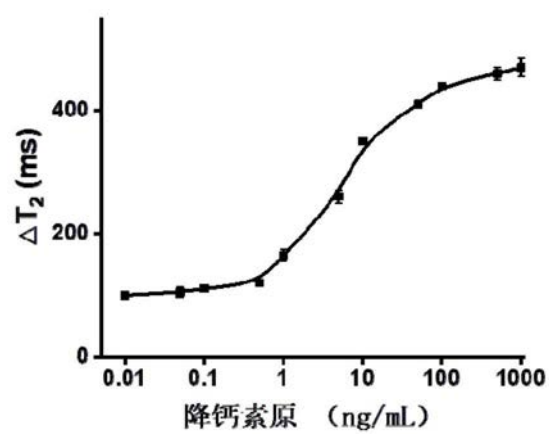


图13

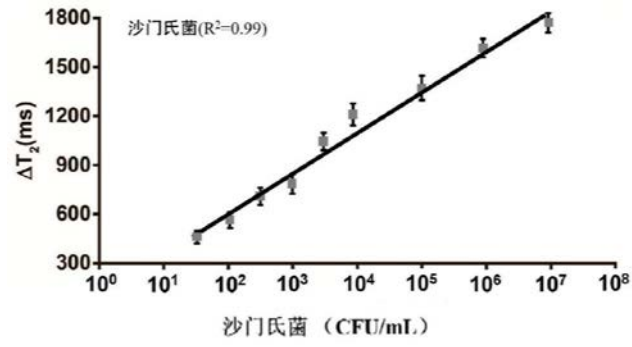


图14

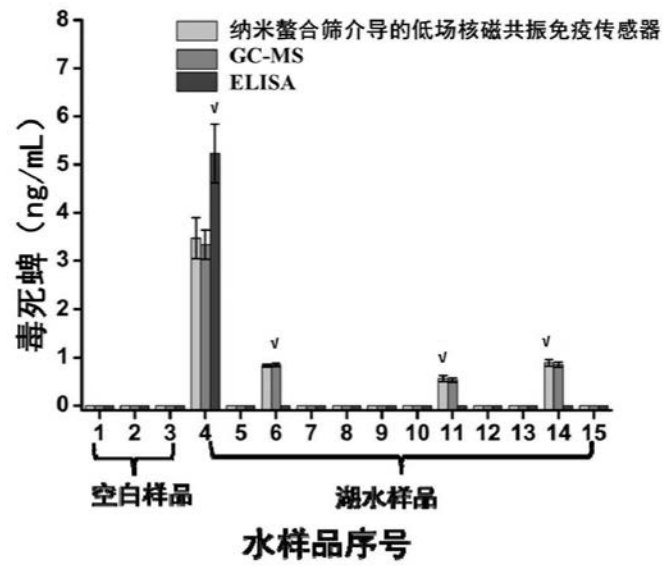


图15

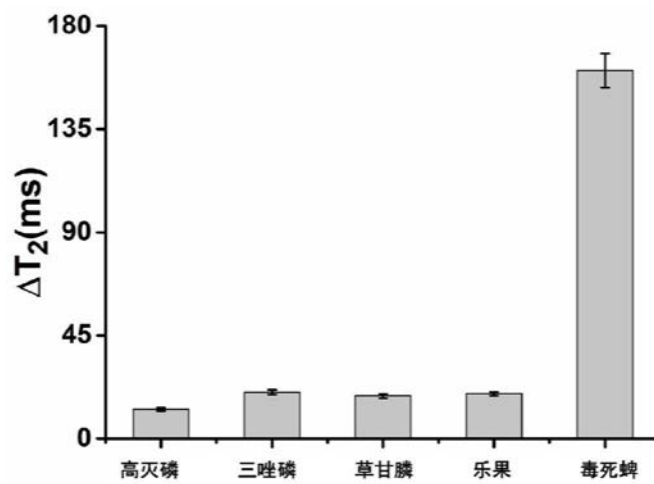


图16