



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109580939 A

(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201811476773.1

(22)申请日 2018.12.05

(71)申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街2699  
号(72)发明人 卢革宇 闫旭 李红霞 金蕊  
孙鹏 刘方猛(74)专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任  
公司 22201

代理人 刘世纯

(51)Int.Cl.

G01N 33/551(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

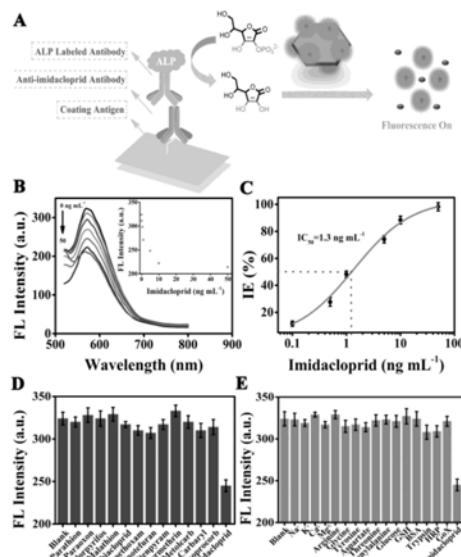
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法，属于生物传感器技术领域，本发明通过金纳米簇锚定在二维羟基氧化钴纳米片表面，形成纳米复合材料，导致荧光强度显著降低。通过引入能够触发CoOH纳米片分解的抗坏血酸，可有效逆转猝灭效应。值得注意的是，抗坏血酸诱导的相应荧光反应与抗体标记的ALP活性有关。经过竞争免疫反应后，ALP标记的抗体可与固定化抗原相结合，可调节检测平台的荧光变化。利用系统的荧光切换，FIA对吡虫啉的检测浓度( $IC_{50}$ )为 $1.3\text{ng mL}^{-1}$ ，比常规ELISA( $86.4\text{ng mL}^{-1}$ )敏感60倍。本发明的荧光免疫分析方法能够实现靶抗原吡虫啉的高灵敏检测，不仅为农药检测开辟了新的前景，而且为荧光免疫分析开辟了有效的策略。

A  
CN 109580939

CN

1.一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法,其特征在于,其步骤如下:

A、羟基氧化钴纳米片(CoOOH NPs)的制备:

首先制备CoOOH纳米片,将KOH和CoCl<sub>2</sub>按体积比1:4混合,然后超声1~5min;将NaClO相比上述混合液体积比1:55加入上述溶液中,继续超声10~15min,然后10000rpm离心10~15min,收集CoOOH NPs产物;去离子水洗涤三次,冷冻干燥得到的CoOOH NPs黑色粉末;最后,将CoOOH NPs用去离子水溶解稀释至0.025mg mL<sup>-1</sup>备用;

B、谷胱甘肽功能化的金纳米簇AuNCs制备:

将HuCl<sub>4</sub>和GSH按照体积比1:4混合,在1500r/min磁力搅拌过程中加入8倍体积的超纯水;然后,将上述混合物加热到70~80℃反应24小时以上,即可获得黄色AuNCs溶液,通过透析进行纯化,并通过冷冻抽干获得黄色AuNCs粉末,最后超纯水溶解稀释至0.20mg mL<sup>-1</sup>备用;

C、CoOOH-AuNCs复合材料的制备:

将步骤一的CoOOH NPs溶液和步骤B制备的AuNCs溶液等体积混合,并超声处理10~15分钟,然后将混合溶液在10000rpm下离心10~15分钟,10mL去离子水溶解沉淀,得到CoOOH-AuNCs复合材料溶液;

D、吡虫啉的荧光免疫分析:

取200μL包被抗体加入到96孔板,37℃孵育2h,包被板用300μL小牛血清37℃封闭60min;然后取不同浓度的吡虫啉(imidacloprid,50μL)和抗吡虫啉多克隆抗体加入孔板中37℃孵育60min,而后加入碱性磷酸酶(ALP)标记的二级抗体再次37℃孵育60min;随后,加入100μL的L-抗坏血酸-2-磷酸(AAP)37℃反应60min,将上述反应液与CoOOH-AuNCs复合物(100L)和100μL的Tris-HCl缓冲液37℃混合反应10min,然后进行信号放大和指示,最后,加入1700μL的超纯水,进行荧光检测并记录。

2.如权利要求1所述的一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法,其特征在于,步骤A所述的KOH的浓度为1.0mol L<sup>-1</sup>,CoCl<sub>2</sub>的浓度为10mol L<sup>-1</sup>,NaClO的浓度为0.9mol L<sup>-1</sup>。

3.如权利要求1所述的一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法,其特征在于,步骤B所述的HuCl<sub>4</sub>的浓度为20mmol L<sup>-1</sup>,GSH的浓度为100mmol L<sup>-1</sup>。

4.如权利要求1所述的一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法,其特征在于,步骤D所述的Tris-HCl缓冲液pH为9.0,浓度为10mmol L<sup>-1</sup>。

# 一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法

## 技术领域

[0001] 本发明属于生物传感器技术领域,具体涉及一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片(CoOOH NPs)复合材料的制备方法,并巧妙建立碱性磷酸酶(ALP)介导的吡虫啉荧光免疫检测分析方法。

## 背景技术

[0002] 现今,农药污染已成为一个世界性的公共卫生问题,其暴发不仅造成巨大的经济损失,还会严重危害人类生命安全。吡虫啉(Imidacloprid)作为一种触杀型烟碱类农药,作用于突触后的烟碱乙酰胆碱受体引起中枢神经正常传导受阻,使害虫麻痹死亡。同样,残留在农产品和环境样品中吡虫啉对动物和人类的神经受体也存在危害,甚者可能损害人体外周血淋巴细胞的DNA,在微量水平即可对人体健康造成巨大危险。因此,对食品和环境基质中的吡虫啉进行灵敏分析,对于满足食品安全需求、保护生态系统和保障人类健康具有重要意义。目前成熟的吡虫啉检测方法(高效液相色谱、液-质联用色谱、气相色谱法和气-质联用色谱)虽然可达到较高灵敏度,但是仪器检测存在操作复杂、成本高昂、稳定性差、检测步骤多等缺点,无法实现复杂样品中吡虫啉的大批量快速灵敏检测。基于特异性抗体-抗原识别的免疫分析,由于其操作简单、高特异性和显著选择性以及高通量等优点,成为农药检测的新策略,鉴于比色法的信号输出易于观察而被用作吡虫啉的免疫分析,例如酶联免疫吸附试验(ELISA)和侧向流动免疫色谱条,以及应用辣根过氧化物酶标记的半抗原和金纳米颗粒介导的单克隆抗体作为传感器,用于扩增筛选吡虫啉的反应信号提高灵敏度。然而,传统的酶或纳米材料标记的比色ELISA法,主要缺点是检测复杂环境和食品基质中低丰度的吡虫啉时,灵敏度较低,此外,这些已建立的方法还受到具有毒性的反应底物的限制,例如邻苯二胺和(3,3',5,5')-四甲基联苯胺。

[0003] 针对以上吡虫啉检测中的诸多问题,荧光免疫分析(FIA)利用其杰出的光学特殊荧光材料,成为一种非常有前途的候选方法。目前,荧光免疫分析大多集中于利用荧光材料作为标记产生可检测的信号,而非标记酶本身,在灵敏度方面取得显著的提高,但这类荧光免疫分析需要复杂的信号响应过程和响应机制,包括荧光各向异性/偏振测量、纳米材料-抗体结合和免疫凝集。因此,如何简化实验过程,提高传感性能,对荧光免疫分析方法的建立至关重要。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服现有检测技术中存在的检测灵敏度低、误差较大和测试方法繁琐等问题,借助金簇纳米的强荧光性能,提供了一种基于金纳米簇(AuNCs)-锚定羟基氧化钴(CoOOH)纳米片的复合材料及其制备方法,并将其利用在吡虫啉荧光免疫检测方法中,实现复杂基质中吡虫啉的简便高灵敏检测,从而促进这类传感器在农药检测中的实用化。本发明通过将酶(碱性磷酸酶, ALP)免疫测定与荧光平台相结合,利用标记酶来触发

纳米材料的荧光变化,开发直接的荧光免疫分析方法,不仅有效地提高了传感灵敏度,屏蔽了底物的毒性,而且大大简化了修饰和共轭过程。因此以荧光团和纳米材料为基础的猝灭剂在荧光免疫分析系统中的组合展现出广阔的应用前景。羟基氧化钴纳米片作为新兴的二维金属氧化物,因其具备易于快速合成、稳定性好、高亲水性等特点,在电催化和生物催化领域引起了极大关注,

[0005] 本发明的目的可通过如下技术方案实现:

[0006] 一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法,其步骤如下:

[0007] A、羟基氧化钴纳米片(CoOOH NPs)的制备:

[0008] 首先制备CoOOH纳米片,将KOH(1.0mol L<sup>-1</sup>)和CoCl<sub>2</sub>(10mol L<sup>-1</sup>)按体积比1:4混合,然后超声1-5min;将NaClO(0.9mol L<sup>-1</sup>)相比上述混合液体积比1:55加入上述溶液中,继续超声10-15min,然后10000rpm离心10-15min,收集CoOOH NPs产物;去离子水洗涤三次,冷冻干燥得到的CoOOH NPs黑色粉末;最后,将CoOOH NPs用去离子水溶解稀释至0.025mg mL<sup>-1</sup>备用;

[0009] B、谷胱甘肽功能化的金纳米簇AuNCs制备:

[0010] 将HuCl<sub>4</sub>(20mmol L<sup>-1</sup>)和GSH(100mmol L<sup>-1</sup>)按照体积比1:4混合,在 1500r/min磁力搅拌过程中加入8倍体积的超纯水;然后,将上述混合物加热到 70-80℃反应24小时以上,即可获得黄色AuNCs溶液,通过透析(1kDa)进行纯化,并通过冷冻抽干获得黄色AuNCs粉末,最后超纯水溶解稀释至0.20mg mL<sup>-1</sup>备用;

[0011] C、CoOOH-AuNCs复合材料的制备:

[0012] 将步骤一的CoOOH NPs溶液(0.25mg mL<sup>-1</sup>)和步骤B制备的AuNCs溶液(0.20mg mL<sup>-1</sup>)等体积混合,并超声处理10-15分钟,然后将混合溶液在10000rpm 下离心10-15分钟,10mL去离子水溶解沉淀,得到CoOOH-AuNCs复合材料溶液;

[0013] D、吡虫啉的荧光免疫分析:

[0014] 取200μL包被抗体(200ng mL<sup>-1</sup>)加入到96孔板,37℃孵育2h,包被板用 300μL小牛血清(BSA,5.0mg mL<sup>-1</sup>)37℃封闭60min;然后取不同浓度的吡虫啉(imidacloprid,50μL)和抗吡虫啉多克隆抗体(50μL)加入孔板中37℃孵育60min,而后加入碱性磷酸酶(ALP)标记的二级抗体再次37℃孵育60min;随后,加入100μL的L-抗坏血酸-2-磷酸(AAP)(2.0mmol L<sup>-1</sup>)37℃反应60min,将上述反应液与CoOOH-AuNCs复合物(100L)和100μL的Tris-HCl缓冲液(pH=9.0,10mmol L<sup>-1</sup>)37℃混合反应10min,然后进行信号放大和指示,最后,加入1700μL的超纯水,进行荧光检测并记录。

[0015] 本发明机理如下:

[0016] 制备的CoOOH-AuNCs复合材料中,CoOOH纳米片作为猝灭剂可以通过 FRET共振能量转移(FRET)机制有效抑制AuNCs的荧光强度。而抗坏血酸(AA)与CoOOH发生特异性氧化还原反应,将CoOOH纳米片分解生成Co<sup>2+</sup>,伴随检测传感平台FL强度的显著恢复。在AA刺激FL反应的基础上,该传感平台可以特异识别将L-抗坏血酸-2-磷酸(AAP)转化成AA的碱性磷酸酶(ALP)。本发明将ALP参与的特异催化过程引入到常规ELISA分析中,巧妙构建了荧光免疫分析策略,其中ALP被用作标记酶以产生可检测的信号,实现靶抗原(吡虫啉)的荧光定量检测(如图1所示)。本发明构建的荧光免疫分析方法不仅利用抗原抗体特异性识别作用和

酶促反应的特异性,同时借助CoOOH-AuNCs复合探针的优良光学特性,使得该传感检测平台不仅检测灵敏高而且选择性强。同时,该多功能模块化平台有效地屏蔽了底物的毒性,并大大消除修饰和共轭过程的要求。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有以下特点:

[0018] (1) 本发明制备的基于CoOOH NPs-AuNCs复合材料,构建的ALP介导的吡虫啉荧光免疫检测分析方法,集成了特异性抗体-抗原识别、有效的酶促反应和优良的光学特性,大大提高了吡虫啉的检测灵敏度。

[0019] (2) 本发明开发的功能模块化平台不仅有效地屏蔽了毒性底物的使用,而且大大消除了修饰和共轭过程的要求。

[0020] 本发明所提供的这一新FIA策略,为构建生物测定应用中通用而有效的荧光免疫分析策略提供新思路,使其在环境监测、食品分析和临床诊断方面展现出巨大的实际应用价值。

## 附图说明

[0021] 图1:实施例1所述,基于AuNCs-CoOOH NPs复合材料实现ALP的有效检测;其中,A为基于CoOOH-AuNCs复合物检测ALP的原理示意图;B为传感器的可行性验证,AuCNs、CoOOH-AuNCs、CoOOH、AuCNs+AA和 CoOOH-AuCNs+AAP+ALP的FL光谱;C为CoOOH-AuNCs+AAP体系在不同浓度ALP (0、0.1、0.5、1.0、5.0、10、50、100、500和1000U L<sup>-1</sup>) 存在下的荧光光谱。内插图表表示在ALP存在下传感体系的FL强度趋势;D为F<sub>alp</sub>/F<sub>alp0</sub>与 ALP的对数浓度的线性关系图;E为CoOOH-AuNCs体系和CoOOH-AuNCs-ALP 体系与干扰物(蛋白质为100μg mL<sup>-1</sup>,其它物质为1000μg mL<sup>-1</sup>)的荧光强度。

[0022] 图2:实施例3所述,基于AuNCs-CoOOH NPs传感平台实现ALP介导吡虫啉的荧光免疫分析;其中,A为本发明荧光免疫分析的原理示意图;B为在 FIA体系中不同浓度吡虫啉标准液 (0、0.1、0.5、1.0、5.0、10和50ng mL<sup>-1</sup>) 对应的荧光光光谱;C为IE (%) 与吡虫啉浓度的线性关系图;D为其它农药 (5ng mL<sup>-1</sup>) 对FIA检测吡虫啉的干扰反应;E为其他生物分子对FIA检测吡虫啉的干扰反应(蛋白质浓度为100μg mL<sup>-1</sup>,其它生物分子浓度为1000μg mL<sup>-1</sup>)。

## 具体实施方式

[0023] 下面结合附图对本发明做进一步地说明。

[0024] 实施例1:CoOOH NPs的合成

[0025] 首先制备CoOOH纳米片,将125μL KOH (1.0mol L<sup>-1</sup>) 和500μL CoCl<sub>2</sub> (10mol L<sup>-1</sup>) 混合,然后超声1min;将25μL NaClO (0.9mol L<sup>-1</sup>) 加入上述溶液中,继续超声10min,然后10000rpm离心10min,收集CoOOH NPs产物。去离子水洗涤三次,冷冻干燥得到的CoOOH NPs黑色粉末。最后,将CoOOH NPs用去离子水稀释至0.025mg mL<sup>-1</sup>备用。

[0026] 实施例2:谷胱甘肽功能化的AuNCs制备

[0027] 将0.60mL的HuCl<sub>4</sub> (20mmol L<sup>-1</sup>) 和0.15mL的GSH (100mmol L<sup>-1</sup>) 混合,在剧烈搅拌下加入4.55mL的超纯水中。然后,将上述混合物加热到70℃反应 24小时,即可获得黄色AuNCs溶液,通过透析 (1kDa) 进行纯化,并通过冷冻抽干获得黄色AuNCs粉末,最后,将AuNCs粉末用去离子水稀释至0.20mg mL<sup>-1</sup>备用。

[0028] 实施例3:CoOOH-AuNCs复合材料的制备

[0029] 取实施例1中的5.0mL CoOOH NPs溶液( $0.25\text{mg mL}^{-1}$ )，加入到实施例2 的AuNCs溶液(5.0mL,  $0.20\text{mg mL}^{-1}$ )，对混合物超声处理10分钟，然后将混合溶液在10000rpm下离心10分钟，10mL去离子水溶解沉淀。得到 CoOOH-AuNCs复合材料溶液。

[0030] 实施例4:碱性磷酸酶的荧光传感设计

[0031] 首先，测试CoOOH-AuNCs复合材料对AA检测的可能性，将不同浓度的 AA、CoOOH-AuNCs复合物溶液和10mmol L<sup>-1</sup>Tris-HCl缓冲液(pH=9.0)在37℃下按照体积比1:1:1混合10min，用超纯水稀释至2000L，记录荧光光谱；在 CoOOH-AuNCs复合体系中加入AA后，由于CoOOH纳米片和AA之间的氧化还原反应，CoOOH纳米片被还原生成Co<sup>2+</sup>，从而导致纳米复合物的分解，进而探针体系的FL得以恢复(蓝线，图1B)。

[0032] 接着，检测CoOOH-AuNCs复合荧光体系对ALP的敏感性，将 CoOOH-AuNCs纳米复合材料与2.0mmol L<sup>-1</sup>的AAP混合，然后与不同浓度的 ALP(0~1000U L<sup>-1</sup>)在37℃下混合反应50min。如图1C所示，随着ALP浓度的增加，CoOOH-AuNCs探针的荧光强度逐渐恢复。同时，FL比( $F_{\text{ALP}}/F_{\text{ALP}0}$ ，其中 $F_{\text{ALP}}$ 和 $F_{\text{ALP}0}$ 表示ALP存在和不存在时的FL强度)与ALP的对数浓度之间在0.1~1000U L<sup>-1</sup>范围内呈现良好的线性关系( $R^2=0.9939$ ) (图1D)。同时结果表明，生物样品中常见阳离子(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>)、氨基酸(精氨酸、甘氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸)、葡萄糖、GSH和蛋白质(BSA、胰蛋白酶、HRP、GoX)等不会显著影响检测体系的荧光强度变化(图1E)。

[0033] 说明，CoOOH-AuNCs复合材料构建的荧光免疫检测平台对ALP具有很高的选择性，且具有良好的抗干扰能力。

[0034] 实施例5:吡虫啉的荧光免疫分析

[0035] 基于抗原/抗体竞争型免疫识别和ALP介导的CoOOH-AuNCs荧光传感平台，构建吡虫啉检测体系(图2A)。200μL包被抗体( $200\text{ng mL}^{-1}$ )加入到96 孔板，37℃孵育2h，包被板用300μL小牛血清(BSA,  $5.0\text{mg mL}^{-1}$ ) 37℃封闭60 min。然后不同浓度的吡虫啉(imidacloprid, 50μL) 和抗吡虫啉多克隆抗体(50 μL)加入孔板中37℃孵育60min。由于农药浓度不同，96孔板中形成的包被抗原抗体复合物与靶标密切相关。而后加入ALP标记的二级抗体再次37℃孵育 60min。随后，加入100μL的AAP ( $2.0\text{mmol L}^{-1}$ ) 37℃反应60min，将上述反应液与CoOOH-AuNCs复合物(100L) 和100μL的Tris-HCl缓冲液(pH=9.0,  $10\text{mmol L}^{-1}$ ) 37℃混合反应10min，进行信号放大和指示最后，加入1700μL的超纯水，进行荧光检测并记录，吡虫啉浓度与荧光探针的FL强度呈反比关系，即在575nm处反应溶液的荧光发射强度随着吡虫啉浓度的增加而逐渐降低(图 2B)。在吡虫啉浓度为0.1~50ng mL<sup>-1</sup>范围内，抑制效率(IE%)随吡虫啉浓度增减呈现( $R^2=0.990$ ) 线性变化，IC50值(半抑制浓度)为 $1.3\text{ng mL}^{-1}$ (图2C)。吡虫啉检测限(LOD)为 $0.1\text{ng mL}^{-1}$ ，与报告的探针相比更好或相当。更重要的是，FIA的检测性能达到了中国农业部(GB 2763-2014)规定的食品样品分析要求(吡虫啉的最大残留限度在50~1000ng mL<sup>-1</sup>范围内)。

[0036] 而且，本发明构建的免疫荧光分析平台对有机磷农药(对硫磷、对氧磷、毒死蜱、马拉硫磷)、新烟碱类农药(噻虫啉、噻虫嗪、替硝基呋喃、烯啶)、拟除虫菊酯类农药(氯氰菊酯)和氨基甲酸酯类农药均没有明显影响，只有吡虫啉( $5\text{ng mL}^{-1}$ )可引起显著的变化(图2D)，表明该系统对吡虫啉具有高度选择性。

[0037] 实施例6:实际样品中吡虫啉含量的测定

[0038] 利用本发明开发的FIA平台,采用标准加入法,对农产品和食品样品中的吡虫啉进行检测,探讨其实用性。具体样品包括自来水、河水、土壤、水稻和苹果,添加吡虫啉标准液(50、500和1000ng mL<sup>-1</sup>)。然后,用PBS缓冲液(pH=6.5)将样品稀释50倍以抵抗背景干扰,并利用本发明开发的FIA策略进行检测。如表1所示,实际样品中吡虫啉的添加回收率为85.4–107.4%,相对标准偏差(RSD)小于5.5%。所得结果与气相色谱(GC)结果基本一致,表明该检测策略在实际样品中具有潜在的适用性。

[0039] 表1:应用本发明开发的FIA策略检测实际样品中的吡虫啉

[0040]

样品	添加浓度 (ng mL <sup>-1</sup> , ng g <sup>-1</sup> )	检测浓度		回收率 (%)	相对标准 偏差 (n=3, %)
		气相色谱	本发明		
自来水	0	/	/	/	/
	50	51.2	47.3	94.6	3.7
	500	486.7	426.9	85.4	3.7
	1000	1054.3	975	97.5	2.4
湖水	0	/	/	/	/
	50	51.3	46.9	93.7	4.3
	500	496.4	503.5	100.7	1.9
	1000	1087.6	905	90.5	2.2
稻米	0	/	/	/	/
	50	48.3	51.6	103.1	4.0
	500	461.1	514	102.8	3.4
	1000	1008.4	1074	107.4	5.2
苹果	0	/	/	/	/
	50	52.2	48.2	96.4	5.5
	500	493.3	485	97.0	3.0
	1000	1045	996	99.6	1.1

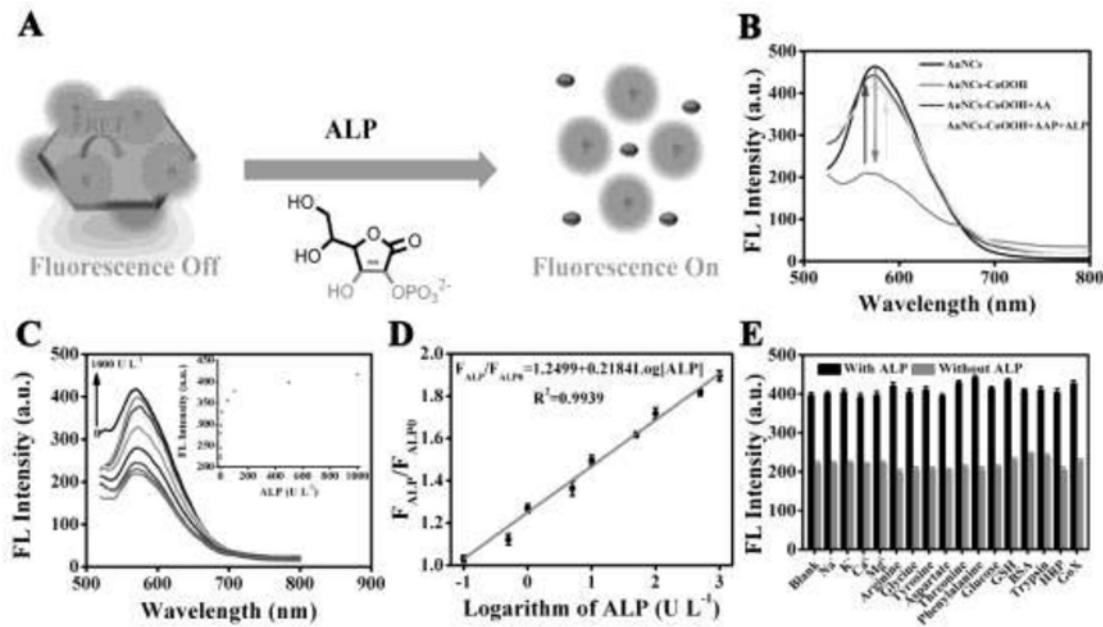


图1

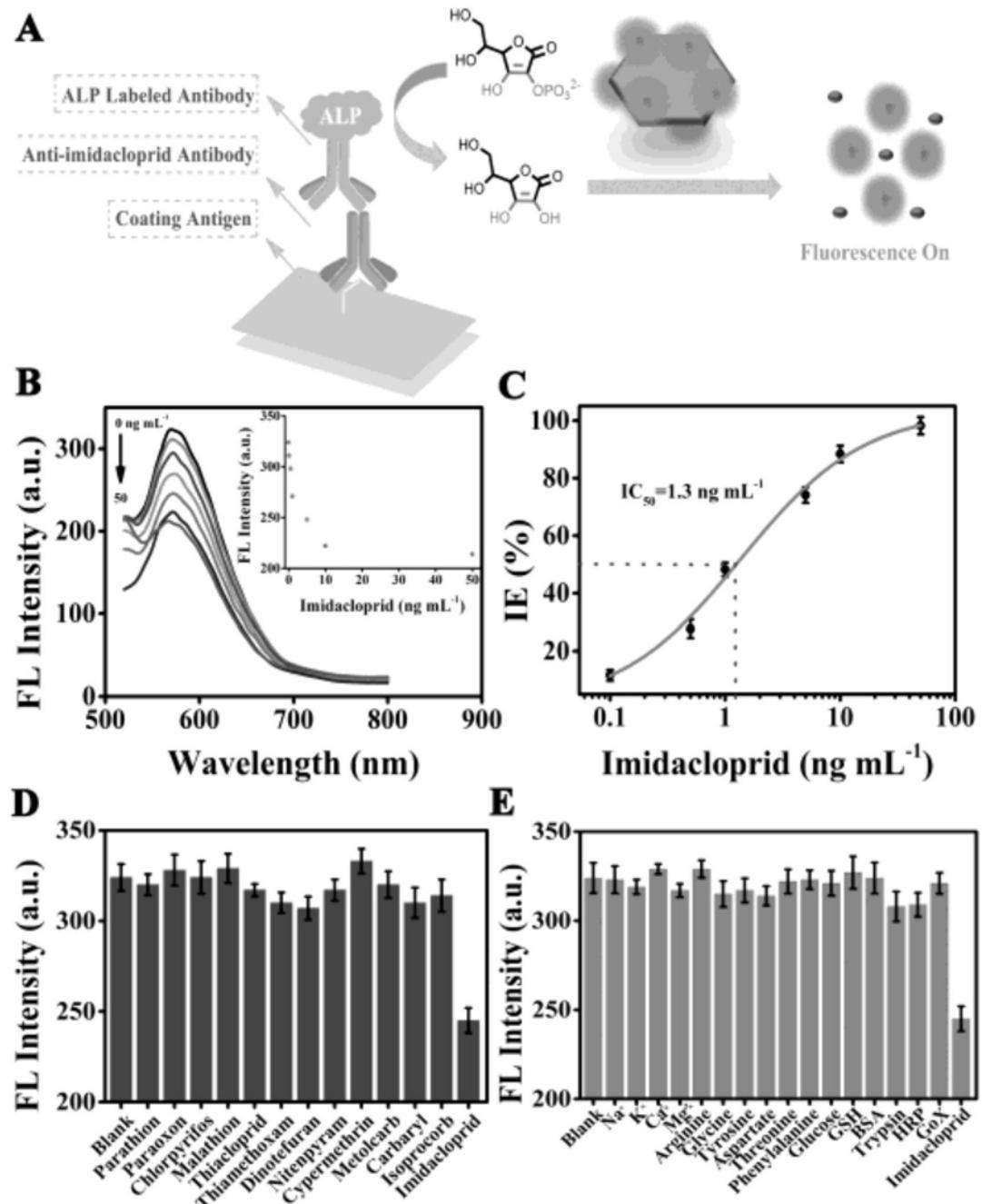


图2

专利名称(译)	一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109580939A</a>	公开(公告)日	2019-04-05
申请号	CN201811476773.1	申请日	2018-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	卢革宇 闫旭 李红霞 金蕊 孙鹏 刘方猛		
发明人	卢革宇 闫旭 李红霞 金蕊 孙鹏 刘方猛		
IPC分类号	G01N33/551 G01N33/535 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/551 G01N21/643 G01N33/535 G01N2021/6432		
代理人(译)	刘世纯		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种基于金纳米簇锚定羟基氧化钴纳米片的吡虫啉荧光免疫分析方法，属于生物传感器技术领域，本发明通过金纳米簇锚定在二维羟基氧化钴纳米片表面，形成纳米复合材料，导致荧光强度显著降低。通过引入能够触发CoOOH纳米片分解的抗坏血酸，可有效逆转猝灭效应。值得注意的是，抗坏血酸诱导的相应荧光反应与抗体标记的ALP活性有关。经过竞争免疫反应后，ALP标记的抗体可与固定化抗原相结合，可调节检测平台的荧光变化。利用系统的荧光切换，FIA对吡虫啉的检测浓度(IC50)为1.3ng mL<sup>-1</sup>，比常规ELISA(86.4ng mL<sup>-1</sup>)敏感60倍。本发明的荧光免疫分析方法能够实现靶抗原吡虫啉的高灵敏检测，不仅为农药检测开辟了新的前景，而且为荧光免疫分析开辟了有效的策略。

