



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105784988 B

(45)授权公告日 2018.07.13

(21)申请号 201610116190.2

(22)申请日 2016.03.01

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105784988 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(73)专利权人 华南师范大学

地址 510631 广东省广州市天河区石牌中
山大道西55号

(72)发明人 俞英 周丽娜 曹玉娟 林碧霞
水玲玲

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 裴晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图5页

(56)对比文件

US 2013/0266957 A1, 2013.10.10, 说明书
第[0003]、[0015]–[0050]段, 实施例, 图1A.

CN 105263855 A, 2016.01.20, 权利要求1–
27, 实施例1.

CN 103558373 A, 2014.02.05, 全文.

US 2002/0082350 A1, 2002.06.27, 全文.

CN 102911664 A, 2013.02.06, 全文.

Fangmao Ye, et al.Ultrasensitive

Detection of Proteins on Western Blots
with.《Macromol Rapid Commun.》.2013, 第34卷
(第9期),

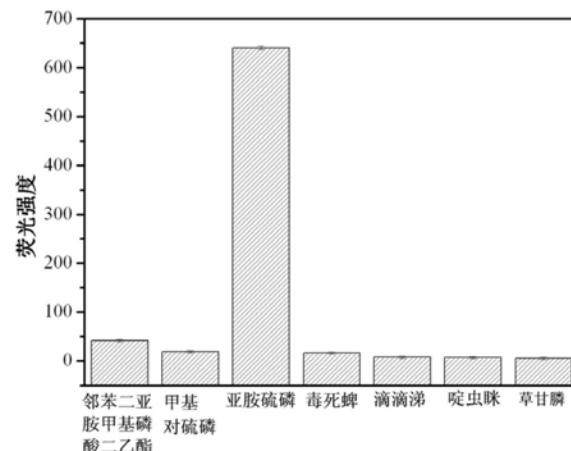
审查员 许珊萍

(54)发明名称

一种基于聚合物发光点的免疫探针及其制
备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于聚合物发光点的免
疫探针及其制备方法与应用。本发明通过CN-PPV
和PSMA反应, 制备得到PDs水溶液; 接着将PDs水
溶液、PBS和EDC混匀, 混匀, 得到混合液体A; 将混
合液体A和亚胺硫磷抗体混合反应, 得到基于聚
合物发光点的免疫探针。该免疫探针能特异性识
别亚胺硫磷, 因此可用其定性检测亚胺硫磷、半
定量或定量检测亚胺硫磷。本发明提供的定性和
半定量检测方法为原位可视化检测方法; 本发明
提供的定量检测方法灵敏度高, 特异性强, 可以
进行高灵敏度定量检测。



1. 一种基于聚合物发光点的免疫探针的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 聚合物点的合成及修饰:分别将聚合物CN-PPV和PSMA溶解于THF中,得到CN-PPV溶液和PSMA溶液;将CN-PPV溶液、PSMA溶液和THF混合,得到均相溶液,其中,在均相溶液中,CN-PPV和PSMA按质量比3:1~8:1配比;再将均相溶液加入到处于超声震荡状态下的超纯水中,超声震荡;接着通过氮气除去THF,浓缩,过滤,得到PDs水溶液;

(2) 亚胺硫磷探针的合成:将PDs水溶液、PBS和EDC混匀,得到混合液体A,其中,PDs和EDC按质量比1:2~1:6配比;将混合液体A和亚胺硫磷抗体混合,振荡反应,离心过滤,得到基于聚合物发光点的免疫探针,其中,亚胺硫磷抗体的加入量按亚胺硫磷抗体和PDs的质量比为5:(2~8)配比;

步骤(2)中所述的PBS溶液为pH=5~9、1M的PBS;

步骤(2)中所述的混合液体A中PDs的浓度为0.038~0.04mg/mL;

步骤(2)中所述的混合液体A中EDC的浓度为0.15~0.16mg/mL;

步骤(2)中所述的振荡反应的条件为于20~38℃振荡反应1~4h。

2. 根据权利要求1所述基于聚合物发光点的免疫探针的制备方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的均相溶液中CN-PPV和PSMA为按质量比为5:1配比;

步骤(1)中所述的均相溶液中CN-PPV的浓度为0.048~0.050mg/mL;

步骤(1)中所述的均相溶液中PSMA的浓度为0.008~0.010mg/mL;

步骤(1)中所述的超纯水的用量按超纯水的体积为均相溶液体积的1.9~2倍体积计算;

步骤(1)中所述的超声震荡的功率为160~200W;

步骤(1)中所述的超声震荡的时间为10min;

步骤(1)中所述的浓缩的条件为于70~120℃的温度下进行浓缩;

步骤(1)中所述的过滤为通过0.2μm的过滤膜过滤。

3. 根据权利要求1所述基于聚合物发光点的免疫探针的制备方法,其特征在于:

步骤(2)中所述的混合液体A中PDs和EDC为按质量比1:4配比;

步骤(2)中所述的亚胺硫磷抗体的加入量为按亚胺硫磷抗体和PDs的质量比为5:(2~6)配比。

4. 根据权利要求3所述基于聚合物发光点的免疫探针的制备方法,其特征在于:

所述的PBS溶液pH=7.3、1M的PBS;

所述的亚胺硫磷抗体的加入量为按亚胺硫磷抗体和PDs的质量比为5:4配比;

所述的振荡反应的条件为25~37℃振荡反应1.5~2.5h。

5. 一种基于聚合物发光点的免疫探针,其特征在于:通过权利要求1~4任一项所述的制备方法得到。

6. 权利要求5所述的基于聚合物发光点的免疫探针的应用,其特征在于:将所述基于聚合物发光点的免疫探针用于定性检测亚胺硫磷、半定量或定量检测亚胺硫磷。

7. 一种定性及半定量原位检测亚胺硫磷的方法,其特征在于包括如下步骤:

I、将权利要求5所述的基于聚合物发光点的免疫探针涂布或喷射于待检测物体上;

II、晾干后,用水淋洗后于紫外灯下观察;

III、出现橙色荧光,表明待检测物体上含有亚胺硫磷;

IV、根据橙色荧光强度能进行半定量检测。

8. 一种定量检测亚胺硫磷的方法,其特征在于包括如下步骤:

①将PDMS片浸泡于待测样品溶液中,目的是将亚胺硫磷装载于PDMS片上;

②接着将PDMS片取出,用水冲洗后置于BSA溶液中进行封闭;

③再将PDMS片取出,用水冲洗后置于权利要求5所述的基于聚合物发光点的免疫探针中,进行抗原抗体结合反应;

④最后将PDMS片取出,用水冲洗后,再用洗脱剂对PDMS片进行洗脱,对得到的洗脱液测定荧光强度;依据预先制定好的亚胺硫磷标准曲线,得到待测样品溶液中的亚胺硫磷浓度。

9. 根据权利要求8所述的定量检测亚胺硫磷的方法,其特征在于:

步骤①所述的PDMS片的规格选择为按每平方厘米装载不超过10ng亚胺硫磷计算;

步骤①所述的浸泡的时间为至少10h;

步骤②、③和④中所述的用水冲洗的次数为2~3次;

步骤②中所述的BSA溶液为浓度为质量百分比1%的BSA溶液;

步骤②中所述的封闭的时间为2h;

步骤③中所述的基于聚合物发光点的免疫探针的浓度为100 μ g/mL;

步骤③中所述的反应的时间为至少3.5h;

步骤④中所述的洗脱剂为二甲基甲酰胺、乙腈或无水乙醇;

步骤④中所述的洗脱的时间为至少20min。

10. 根据权利要求9所述的定量检测亚胺硫磷的方法,其特征在于:

所述的浸泡的时间为10~16h;

所述的反应的时间为3.5~5h;

所述的洗脱的时间为20~60min。

一种基于聚合物发光点的免疫探针及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及检测技术领域,特别涉及一种基于聚合物发光点的免疫探针及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 农药对食品、环境及生态的影响越来越受到人们的关注。农残样品具有组分复杂、分析物含量低的特点,对其含量进行测定是一项重要且具有挑战的工作。由于农残含量与人们的日常生活紧密相关,建立高灵敏度、现场可视化的农残检测方法是未来的发展方向之一。

[0003] 亚胺硫磷是目前常用的一种有机磷农药,最常用的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(LC-MS),但通常需要经过繁杂的样品前处理,所需仪器成本高,需专业人员操作。酶联免疫分析法(ELISA)也用来测定亚胺硫磷,如2008年Liang等根据硫代磷酸酯半族衍生物合成半抗原制备出多克隆通用抗体,对包括亚胺硫磷在内的8种有机磷农药进行了检测,其中亚胺硫磷的IC₅₀为159.7ng/mL。2013年Liu将电化学化学发光法和ELISA结合运用检测亚胺硫磷,测得亚胺硫磷的IC₅₀为8.56mg/L。但酶联免疫法步骤多,酶存在易失活的缺点,检测限不高。近几年表面增强拉曼光谱法受到关注,2014年Fan基于多克隆抗体研究,在基底表面修饰金原子后,用拉曼光谱对苹果样品中亚胺硫磷残留进行快速检测。2015年Pan使用银胶体作为SERS基底,用拉曼光谱测定茶叶、苹果、橘子中农药残留。拉曼光谱法需要用金、银等贵金属包覆基底,成本较高,同样需要大型贵重仪器检测。上述常用的检测方法都难以适用现场检测及可视化检测。

[0004] 荧光探针常用来可视化原位检测,量子点是受到关注的一类优良探针,广泛应用于定量检测和成像中。但传统的量子点主要是镉基量子点,存在重金属污染,因此制备和应用环境友好材料的探针十分必要。除了碳点、硅点外,近年来用有机聚合物作为原料合成的聚合物点,因其兼具有机荧光染料和量子点的特性,越来越受到关注。聚合物纳米颗粒粒径较小、荧光强度高、抗光漂白能力强。为了使探针具有识别特定分析物的功能,常常选用适配体、抗体等来修饰探针。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种基于聚合物发光点的免疫探针的制备方法。

[0006] 本发明的另一目的在于提供通过上述制备方法得到的基于聚合物发光点的免疫探针。

[0007] 本发明的再一目的在于提供所述基于聚合物发光点的免疫探针的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种基于聚合物发光点的免疫探针的制备方法,包括如下步骤:

[0009] (1) 聚合物点(PDs)的合成及修饰:分别将聚合物CN-PPV(聚苯撑乙烯衍生物)和

PSMA(苯乙烯-马来酸酐共聚物)溶解于THF(四氢呋喃)中,得到CN-PPV溶液和PSMA溶液;将CN-PPV溶液、PSMA溶液和THF混合,得到均相溶液,其中,在均相溶液中,CN-PPV和PSMA按质量比3:1~8:1配比;再将均相溶液加入到处于超声震荡状态下的超纯水中,超声震荡;接着通过氮气除去THF,浓缩,过滤,得到PDs水溶液;

[0010] (2) 亚胺硫磷探针的合成:将PDs水溶液、PBS和EDC(碳二亚胺)混匀,得到混合液体A,其中,PDs和EDC按质量比1:2~1:6配比;将混合液体A和亚胺硫磷抗体混合,振荡反应,离心过滤,得到基于聚合物发光点的免疫探针,其中,亚胺硫磷抗体的加入量按亚胺硫磷抗体和PDs的质量比为5:(2~8)配比。

[0011] 步骤(1)中所述的CN-PPV溶液的浓度优选为1.0mg/mL。

[0012] 步骤(1)中所述的PSMA溶液的浓度优选为1.0mg/mL。

[0013] 步骤(1)中所述的均相溶液中CN-PPV和PSMA优选为按质量比为5:1配比。

[0014] 步骤(1)中所述的均相溶液中CN-PPV的浓度优选为0.048~0.050mg/mL。

[0015] 步骤(1)中所述的均相溶液中PSMA的浓度优选为0.008~0.010mg/mL。

[0016] 步骤(1)中所述的超纯水的用量按超纯水的体积为均相溶液体积的1.9~2倍体积计算。

[0017] 步骤(1)中所述的超声震荡的功率为160~200W,优选为180W。

[0018] 步骤(1)中所述的超声震荡的时间优选为10min。

[0019] 步骤(1)中所述的浓缩的条件优选为于70~120℃的温度下进行浓缩;优选为于90℃温度下加热浓缩。

[0020] 步骤(1)中所述的过滤为通过0.2μm的过滤膜过滤。

[0021] 步骤(1)中所述的PDs水溶液的浓度以CN-PPV浓度计算。

[0022] 步骤(2)中所述的PBS溶液为pH=5~9、1M的PBS;优选为pH=7.3、1M的PBS。

[0023] 步骤(2)中所述的混合液体A中PDs的浓度为0.038~0.04mg/mL。

[0024] 步骤(2)中所述的混合液体A中EDC的浓度为0.15~0.16mg/mL。

[0025] 步骤(2)中所述的混合液体A中PDs和EDC优选为按质量比1:4配比。

[0026] 步骤(2)中所述的混匀优选通过如下操作实现:在涡旋振荡器上振荡5min。

[0027] 步骤(2)中所述的亚胺硫磷抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0028] 步骤(2)中所述的亚胺硫磷抗体的加入量优选为按亚胺硫磷抗体和PDs的质量比为5:(2~6)配比;更优选为5:4。

[0029] 步骤(2)中所述的振荡反应优选为通过如下操作实现:在摇床上振荡。

[0030] 步骤(2)中所述的振荡反应的条件为于20~38℃振荡反应1~4h;优选为于25~37℃振荡反应1.5~2.5h;更优选为于37℃振荡反应2h。

[0031] 步骤(2)中所述的离心的条件优选为4000~8000rpm离心3~8min;优选为6000rpm离心5min。

[0032] 步骤(2)中所述的基于聚合物发光点的免疫探针的浓度以PDs计算。

[0033] 一种基于聚合物发光点的免疫探针,通过上述制备方法得到。

[0034] 所述的基于聚合物发光点的免疫探针在定性检测亚胺硫磷、半定量或定量检测亚胺硫磷中进行应用。

[0035] 一种定性及半定量原位检测亚胺硫磷的方法,包括如下步骤:

- [0036] I、将所述的基于聚合物发光点的免疫探针涂布或喷射于待检测物体上；
[0037] II、晾干后，用水淋洗后于紫外灯下观察；
[0038] III、出现橙色荧光，表明待检测物体上含有亚胺硫磷；
[0039] IV、根据橙色荧光强度能进行半定量检测。
[0040] 所述的待检测物体为农作物，如水果。
[0041] 一种定量检测亚胺硫磷的方法，包括如下步骤：
[0042] ①将PDMS片浸泡于待测样品溶液中，目的是将亚胺硫磷装载于PDMS片上；
[0043] ②接着将PDMS片取出，用水冲洗后置于BSA溶液中进行封闭；
[0044] ③再将PDMS片取出，用水冲洗后置于所述的基于聚合物发光点的免疫探针中，进行抗原抗体结合反应；
[0045] ④最后将PDMS片取出，用水冲洗后，再用洗脱剂对PDMS片进行洗脱，对得到的洗脱液测定荧光强度；依据预先制定好的亚胺硫磷标准曲线，得到待测样品溶液中的亚胺硫磷浓度。
[0046] 步骤①所述的PDMS片优选为通过如下步骤制备得到：用超微切片机将固化后的聚二甲基硅氧烷切片成型。
[0047] 步骤①所述的PDMS片的规格选择为按每平方厘米装载不超过10ng亚胺硫磷计算。
[0048] 步骤①所述的浸泡的时间为至少10h；优选为10～16h；更优选为12h。
[0049] 步骤②、③和④中所述的水为蒸馏水或超纯水。
[0050] 所述的蒸馏水为二次蒸馏水。
[0051] 步骤②、③和④中所述的用水冲洗的次数为2～3次；优选为3次。
[0052] 步骤②中所述的BSA溶液优选为浓度为质量百分比1%的BSA溶液。
[0053] 步骤②中所述的封闭的时间优选为2h。
[0054] 步骤③中所述的基于聚合物发光点的免疫探针的浓度优选为100μg/mL。
[0055] 步骤③中所述的反应的时间优选为至少3.5h；更优选为3.5～5h；最优选为4h。
[0056] 步骤④中所述的洗脱剂为二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈(acetonitrile)或无水乙醇(ethanol)。
[0057] 步骤④中所述的洗脱的时间优选为至少20min；更优选为20～60min；最优选为40min。
[0058] 步骤④中所述的亚胺硫磷标准曲线为按照上述步骤①～④进行制备，其中步骤①中用亚胺硫磷标准溶液代替待测样品溶液。
[0059] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：
[0060] (1) 本发明采用简便方法构建了能特异性识别亚胺硫磷残留的探针PDs-Ab，该探针对水果表面亚胺硫磷残留可进行定性、半定量可视化检测。
[0061] (2) 本发明提供的定量检测方法是基于亚胺硫磷的疏水作用力，将其装载在PDMS片上，基于抗原抗体的免疫反应，再将抗体探针结合到PDMS片上，达到富集分离提高检测灵敏度，消除过量探针荧光的干扰的目的，建立的方法应用于实际样品，回收率实验表明方法可靠。该方法灵敏度高，特异性强，可以进行高灵敏度定量检测。

附图说明

[0062] 图1是不同条件对合成的免疫探针荧光强度的影响结果图:其中图(A)为合成反应的pH;图(B)为反应温度和时间,曲线a为37℃,曲线b为25℃;图(C)为投料质量比,为PDs:亚胺硫磷抗体。

[0063] 图2是PDs和PDs-Ab的光谱特征图;其中图A为激发和发射光谱,曲线a为PDs,曲线b为PDs-Ab;图B为紫外光谱图,曲线a为PDs,曲线b为PDs-Ab,曲线c为抗体,曲线d为亚胺硫磷;图C为PDs、图D为抗体(Antibody)、图E为PDs-Ab、图F为PDs-Antibody水合粒径检测结果图。

[0064] 图3是本发明提供的免疫探针的特异性检测结果图。

[0065] 图4是在紫外灯下对苹果快速可视化检测亚胺硫磷的照片图;其中图A为亚胺硫磷、图B为免疫探针、图C为20mg/L亚胺硫磷+免疫探针、图D为100μg/L亚胺硫磷+免疫探针、图E为250μg/L亚胺硫磷+免疫探针、图F为500μg/L亚胺硫磷+免疫探针。

[0066] 图5是不同实验条件对亚胺硫磷定量检测的影响结果图;其中,图A为洗脱剂,白色柱是荧光强度,黑色柱是吸光度;图B为吸附时间,曲线a为吸光度,曲线b为荧光强度,曲线c为封闭后荧光强度;图C为亚胺硫磷与探针作用时间;图D为洗脱时间;图E为PDMS片面积对洗脱液荧光强度的影响结果图,其中a、b、c分别为亚胺硫磷含量10.0、20.0、30.0ng。

[0067] 图6是免疫探针检测亚胺硫磷的工作曲线图。

具体实施方式

[0068] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0069] Poly[2-methoxy-5-(2-ethylhexyloxy)-1,4-(1-cyanovinylene-1,4-phenylene)](CN-PPV,MW 15,000)购于ADS Dyes有限公司(Quebec,Canada);poly(styrene-co-maleic anhydride)(PSMA,均分子量~1,700)购于Sigma-Aldrich有限公司(St.Louis,MO,USA);四氢呋喃(THF)购于国药集团化学试剂有限公司;碳二亚胺盐酸盐(EDC•HCl,98.5%)和亚胺硫磷(phosmet)购于Aladdin化学有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购于上海伯奥生物科技有限公司;无水乙醇(Anhydrous ethano)购于天津大茂化学试剂厂;聚二甲基硅氧烷(PDMS,Sylgard 184,美国Dow Corning Corporation(Midland,MI,USA))按说明书固化后,用超微切片机切片成型;实验所用水均为二次蒸馏水,所用试剂除特别说明外均为分析纯。

[0070] F-2500型荧光光谱仪(日本日立公司);UV-Vis 1700型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器公司);Zetasizer Nano ZS型马尔文纳米粒度分析仪(Malvern,UK)。

[0071] 实施例1 一种基于聚合物发光点的免疫探针的制备

[0072] (1) 亚胺硫磷多克隆抗体的制备

[0073] 按文献(徐莺.有机磷农药敌敌畏和亚胺硫磷免疫检测方法的研究[D].华中农业大学,2009.)采用Mannich法将phosmet偶联至阳离子牛血清白蛋白(cBSA)上,构建phosmet完全抗原。再按文献(宋洋.亚胺硫磷农药残留酶联免疫检测方法的研究[D].天津科技大学,2009)中亚胺硫磷抗原免疫方案免疫兔子,66天后抗血清效价达到最高时采用心脏取血,提取兔血清,离心分离得到亚胺硫磷抗体,紫外光谱测定获得抗体的浓度范围为0.64-0.78mg/mL,于-20℃保存备用。

[0074] 具体步骤如下：

[0075] 亚胺硫磷抗原合成步骤：

[0076] I、①将670 μ L乙二胺(EDA)滴加于等体积偶联缓冲液,冰浴,以1mol/L的HCl将pH调节至4.75;②将50mg BSA完全溶解于500 μ L的偶联缓冲液后,加入到①冰浴的溶液中;③将30mg碳化二亚胺(EDC)溶于500 μ L偶联缓冲液后,再滴加于②混合液中,避光,室温磁力搅拌反应2h,以4mol/1的醋酸终止反应;④去离子水对上述反应液透析72h,浓缩冻干,即为cBSA,-20℃储藏备用。

[0077] II、先将6mg cBSA以0.5mL去离子水和1.6mL MES溶解,再将1.5mg亚胺硫磷溶解于700 μ L乙醇,然后混合两个体系,摇匀成一个体系。往混合液中滴加100 μ L甲醛,于37℃下振摇反应24h,用去离子水透析,除去未偶联亚胺硫磷,收集偶联物,冷冻干燥,即为亚胺硫磷完全抗原.-20℃储藏备用。

[0078] 免疫实验步骤:免疫动物选择新西兰大白兔,月龄3个月,体重2~3kg,饲养于标准实验动物房中,连续观察3天,确定身体状况正常后进行免疫。采取皮下和肌肉注射法进行免疫,分4个部位注射:2处注射肌肉中,2处注射皮下。

[0079] 具体过程如下:

[0080] ①第1天:初次免疫,为提高抗原的免疫性,采用由弗氏完全佐剂乳化的免疫原,剂量为1mg/mL(溶于0.5mL 0.9%的NaCl和0.5mL的弗氏完全佐剂)。

[0081] ②第14天:加强免疫,剂量为0.5mg/mL(溶于0.5mL 0.9%的NaCl及0.5mL的弗氏不完全佐剂)。

[0082] ③第28天:加强免疫,剂量为0.5mg/mL(溶于0.5mL 0.9%的NaCl及0.5mL的弗氏不完全佐剂)。

[0083] ④第38天:第一次血液测试。从兔子耳缘静脉采血,离心分离血清。注意不要造成溶血,测定抗血清效价。

[0084] ⑤第56天:加强免疫,剂量为0.5mg/mL(溶于0.5mL 0.9%的NaCl及0.5mL的弗氏不完全佐剂)。

[0085] ⑥第66天:第二次血液测试,从兔子耳缘静脉采血,离心分离血清。测定抗血清效价。

[0086] 当抗血清效价达到最高时处死兔子。每只兔子的采血量在50mL以上,且兔子不易中途死亡。

[0087] 采集到的血液先在37℃下凝固2h,然后置4℃冰箱中过夜,使血块收缩,将血块自容器壁分离,血清全部倾入离心管,血块于4℃、4500rpm离心20min,取上清液与前面的血清混合,再于4℃下离心分离全部血清,得到的抗血清在-20℃下保存备用。

[0088] (2) 聚合物点(PDs)的合成及修饰

[0089] 分别将聚合物CN-PPV、PSMA溶解于THF中,均形成浓度为1.0mg/mL的溶液,取250 μ L CN-PPV溶液和50 μ L PSMA溶液分别加入到5mL THF溶液中,混合形成均相溶液,将混合液迅速加入10mL超纯水中,该过程在超声震荡仪中完成,超声震荡10min后取出。将此溶液通入N₂除去THF并在90℃下加热浓缩至5mL,用0.2 μ m的过滤膜过滤,得到浓度为50 μ g/mL的PDs水溶液(以CN-PPV浓度计算)。

[0090] (3) 亚胺硫磷探针的合成

[0091] 取5.0mL上述PDs溶液于烧杯中,加入1.3mL pH=5~9的PBS(1M)缓冲液和100μL EDC·HCl溶液(水中浓度为10mg/mL),室温下在涡旋振荡器上震荡5min混合均匀。加入亚胺硫磷抗体,在不同的温度(25℃和37℃)下在摇床中反应不同的时间,6000rpm离心5min,过滤得到浓度为100μg/mL探针(以PDs浓度计算)。

[0092] (4)结果:

[0093] A、pH值的影响:当PDs与抗体(Antibody)反应质量比为4:5,反应温度为37℃,反应时间为2h,结果如图1(A)所示,pH值在5~9的范围内,PDs-Ab的发光强度基本能保持较高范围,pH值为7.3时荧光强度达到最高值。但pH酸度太大、或碱性太强对抗体活性存在不利影响。因此,确定pH值的最佳条件为7.3。

[0094] B、温度和反应时间的影响:当PDs与抗体反应质量比为4:5,pH值为7.3,结果如图1(B)所示,37℃反应体系在反应初2.5个小时内的荧光强度显著高于25℃反应体系,3小时后略低于25℃反应体系。25℃和37℃两种温度反应体系荧光最高峰出现的时间也不同,37℃反应体系出现于2小时,25℃反应体系出现于2.5小时。化学反应速度随着温度的升高,反应速度逐渐加快,荧光强度也逐渐增大,而37℃一般是生物分子反应的最佳温度,抗体在37℃的条件下生物活性较高,有利于偶联反应。但随反应时间的延长,抗体蛋白将逐渐失活,因而反应3小时后,荧光强度低于25℃反应体系。所以综合考虑将反应的温度和时间设定为37℃、2小时为合成探针的最优条件。

[0095] C、当反应温度为37℃,反应时间为2h,pH值为7.3,结果如图1(C)所示,PDs与抗体反应质量比为4:5时,反应产物的荧光强度最大,PDs与抗体反应质量比为8:5时,即增大PDs比例时,反应产物的荧光强度最小,随着抗体比例的增加,荧光强度反而逐渐降低了,故PDs与抗体反应的最佳质量比为4:5。

[0096] 亚胺硫磷抗体探针的表征:聚合物点(PDs)的光学性质优劣决定了由其制备的荧光探针PDs-Ab的性质及应用,通过UV-Vis 1700型紫外-可见分光光度计测定吸光度,通过马尔文纳米粒度分析仪检测水合粒径,结果如图2所示。由图2A可知,PDs和PDs-Ab的激发光谱在330~450nm间均出现宽激发峰,PDs最强荧光峰在584nm,而PDs-Ab的最强荧光峰在578nm,比PDs蓝移了6nm。用硫酸奎宁作参比测定得到PDs的量子产率为56.7%。由图2B所示,PDs(2B a)在461nm处有一个宽峰,亚胺硫磷(2B d)在223nm、275nm处存在紫外吸收峰,抗体(2B c)在274nm处有个明显的蛋白吸收峰。偶联反应后得到PDs-Ab(2B b),在278nm和452nm处都存在峰,蛋白的吸收峰基本不变,PDs的特征峰略向短波方向移动。由图2C和2D可知PDs和抗体的水合粒径分别为8.97nm,69.57nm左右,分散性均较好,无团聚现象。图2E说明PDs和抗体直接混合溶液的水合粒径存在8.91nm和67.84nm两处,图2F说明PDs-Ab偶联物溶液的水合粒径为105.7nm左右,由此说明PDs和抗体偶联成功。

[0097] 实施例2 基于聚合物发光点的免疫探针的稳定性和特异性的检测

[0098] (1)按实施例1最佳反应条件制备基于聚合物发光点的免疫探针,最佳反应条件如下:PDs与抗体反应质量比4:5,反应温度为37℃,反应时间为2h,反应体系pH值为7.3。将制备得到的免疫探针(PDs-Ab溶液)进行如下步骤的试验。

[0099] (2)稳定性的检测:将基于聚合物发光点的免疫探针于4℃存放。在存放的第一周时间内,荧光强度变化很小。之后每隔一周测定一次,荧光强度均有随着时间的增加略微下降,存放30天后,荧光强度下降10%。上述结果可知探针荧光性质基本稳定,可以满足常规

分析样品需要。

[0100] (3) 特异性的检测:

[0101] (A) 选取了一种结构与亚胺硫磷很相似的有机物邻苯二亚胺甲基磷酸二乙酯(DPMMP)、与亚胺硫磷含有部分相同基团的有机磷农药(毒死蜱、甲基对硫磷,草甘膦),以及常用农药双对氯苯基三氯乙烷(DDT)、啶虫脒,进行对照。

[0102] (B) 测试方法如下:取一定大小($2 \times 2\text{cm}$)的PDMS片放入洁净的试管中,加入2.0mL亚胺硫磷样品(含量小于30ng)和对照样品(含量小于300ng),静置于室温下12h;取出用二次蒸馏水洗涤三次,置于洁净的试管中,用2.0mL 1% BSA溶液37℃下封闭2h,取出,用二次蒸馏水冲洗三次,置于洁净的试管中,加入2.0mL基于聚合物发光点的免疫探针(浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),静置于室温下4h,取出用二次蒸馏水冲洗三次,置于洗净的试管中,加入2.0mL无水乙醇溶液浸泡40min后取出PDMS板,测定浸泡液荧光强度。

[0103] (C) 结果:如图3所示,可以看出探针只能特异性检测亚胺硫磷,探针对与亚胺硫磷结构非常相近的有机物邻苯二亚胺甲基磷酸二乙酯(DPMMP),以及与亚胺硫磷有部分相同基团的毒死蜱、甲基对硫磷稍有微弱响应,但不会干扰亚胺硫磷的强响应;探针对结构差异较大的双对氯苯基三氯乙烷、啶虫脒、草甘膦几乎无响应,故探针检测亚胺硫磷体系的具有很好的特异性。

[0104] 应用例1 定性和半定量原位检测亚胺硫磷

[0105] (1) 定性可视化检测:取苹果三个,分别标记为样品A、B、C,用洁净的毛笔蘸取浓度是20mg/L的亚胺硫磷水溶液在苹果A、C表面描写一个亚胺硫磷英文字母P,室温下晾干,用洁净的毛笔蘸取浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 实施例2步骤(1)制备得到的PDs-Ab溶液,在B、C号苹果表面描写字母P,室温下晾干,用二次蒸馏水冲洗苹果表面后置于紫外灯下观察、拍照。结果如图4所示,在紫外光下,苹果和农药均无明显荧光(图4A);没有亚胺硫磷农药存在时,水溶性的探针通过水洗除去,在图4B上仅可以看到探针非特异性吸附的微弱橙色荧光;当有亚胺硫磷存在时,探针可以和亚胺硫磷结合,图4C可观察到探针在紫外灯下有明显的橙色荧光;实验说明该探针可用来定性检测苹果表面的亚胺硫磷残留,操作简单方便,易于观测。

[0106] (2) 半定量可视化检测:

[0107] 取苹果3个,分别标记为D、E、F。用洁净的毛笔蘸取已知浓度分别为100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的亚胺硫磷水溶液在苹果表面描写P字母,室温下晾干,用洁净的毛笔蘸取浓度是100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PDs-Ab溶液,在D、E、F号苹果表面按照P字母痕迹描写,室温下晾干,用二次蒸馏水冲洗苹果表面后,在紫外灯下观察、拍照。国标规定亚胺硫磷最大残留限量是500 $\mu\text{g}/\text{L}$ (GB16320-1996食品中亚胺硫磷最大残留限量标准),图4D-F亚胺硫磷为不同梯度的浓度,在紫外灯下观察到有明显的橙色荧光梯度。500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 亚胺硫磷呈现很强的荧光,浓度低至100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 也可以明显看到其产生的荧光,表明该探针检测亚胺硫磷的灵敏度满足实际样品测定的要求。

[0108] 应用例2 高灵敏度定量检测亚胺硫磷

[0109] (1) 应用PDMS片定量检测亚胺硫磷的参数摸索

[0110] ①洗脱剂的选择:为了定量测定PDMS片对亚胺硫磷农药的装载量,有必要将其卸载进行测定。选择不同洗脱剂,对其洗脱效果进行试验。具体试验步骤如下:PDMS片的规格为长宽为 $2 \times 2\text{cm}$,设置2组,每组6片,分别放入洗净的试管中,均加入2.0mL浓度为20 $\mu\text{g}/\text{L}$

mL的亚胺硫磷水溶液,均静置于室温下12h,取出用二次蒸馏水冲洗三次,其中一组分别直接加入2.0mL甲醇(methanol)、二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈(acetonitrile)、无水乙醇(ethanol)、体积百分比50%的乙醇溶液、体积百分比10%的乙醇溶液浸泡2h后取出PDMS板,在275nm处测定吸光度。另一组继续分别置于洗净的试管中,均加入2.0mL PDs-Ab溶液(浓度为100 μ g/mL),均静置于室温下4h,取出用二次蒸馏水冲洗三次,再分别置于洗净的试管中,分别加入2.0mL甲醇(methanol)、二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈(acetonitrile)、无水乙醇(ethanol)、体积百分比50%的乙醇溶液、体积百分比10%的乙醇溶液浸泡2h后取出PDMS板,分别测定浸泡液的荧光强度。结果如图5A所示,不同洗脱剂在PDMS片上洗脱下亚胺硫磷-PDs-Ab体系洗脱液的荧光强度(左轴)和在PDMS片上洗脱下亚胺硫磷洗脱液的紫外吸光度(右轴)不同,其中二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈(acetonitrile)、无水乙醇(ethanol)洗脱效果较好,综合考虑安全和毒性,选择无水乙醇最佳。

[0111] ②吸附亚胺硫磷时间的确定:将8片长宽为2×2(cm)的PDMS片分别放入洗净的试管中,均加入2.0mL

[0112] 亚胺硫磷水溶液(20 μ g/mL),分别放置2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h取出,用二次蒸馏水冲洗三次,再分别置于洗净的试管中,均加入2.0mL乙醇溶液浸泡2h后取出PDMS板,测定浸泡液吸光度,结果如图5B-a所示,可以看到随着吸附亚胺硫磷时间的增加,吸光度逐渐增加,而在12h后吸光度改变不大,综合考虑吸附量和效率,吸附时间以12h最佳。

[0113] ③BSA对PDMS片封闭的影响:将8片长宽为2×2(cm)的PDMS片分别置于装有2.0mL PDs-Ab(100 μ g/mL)溶液的试管中,室温下静置2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h后取出,用二次蒸馏水冲洗三次,用无水乙醇溶液洗脱2h,分别测定PDMS片所吸附探针的荧光强度。将8片2×2(cm)的PDMS片先用2.0mL浓度为质量百分比1%的BSA溶液于37℃下封闭2h,取出,用二次蒸馏水冲洗三次,再置于装有2.0mL PDs-Ab溶液(100 μ g/mL)的试管中,分别室温下静置2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h、16h后取出,用二次蒸馏水冲洗三次,用无水乙醇溶液洗脱2h,分别测定BSA封闭PDMS片吸附探针的荧光强度。实验结果表明PDMS片能直接吸附探针(图5B-b),并随着时间增加出现递增趋势,但是PDMS片被BSA封闭后对探针几乎无吸附(图5B-c),并且随时间的增加也没有吸附的迹象,故PDMS片装载亚胺硫磷后用BSA封闭,其对探针的吸附可以忽略不计。

[0114] ④吸附探针时间的确定:取10片长宽为2×2(cm)的PDMS片分别放入洗净的试管中,均加入2.0mL亚胺硫磷水溶液(20 μ g/mL)室温下静置12h。取出用二次蒸馏水冲洗三次再分别置于洗净的试管中,加入2.0mL PDs-Ab溶液(100 μ g/mL)于室温下静置。分别于0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h、3h、3.5h、4h、4.5h、5h取出并用二次蒸馏水冲洗三次后再分别置于洗净的试管中,均加入2.0mL无水乙醇溶液浸泡2h后取出PDMS板,分别测定浸泡液荧光强度,由图5C可知,PDMS片上亚胺硫磷与荧光探针PDs-Ab作用时间不同,乙醇洗脱液的荧光强度不同,而随着PDs-Ab与亚胺硫磷作用时间的增加,荧光强度有所增加,作用时间3.5h以后荧光强度不再明显增大,综合考虑作用效果和效率,探针作用时间为4h最佳。

[0115] ⑤洗脱时间的确定:将8片长宽为2×2(cm)的PDMS片,分别放入洗净的试管中,加入2.0mL亚胺硫磷水溶液(20 μ g/mL)中,室温下静置12h,取出用二次蒸馏水冲洗三次,再分别置于洗净的试管中,加入2.0mL PDs-Ab溶液(浓度为100 μ g/mL)后静置于室温下4h,取出用二次蒸馏水冲洗三次,再分别置于洗净的试管中并加入2.0mL无水乙醇溶液浸泡分别隔

10min、20min、30min、40min、50min、1h、2h、3h后取出PDMS板，分别测定浸泡液荧光的强度，由图5D可知，PDMS片乙醇洗脱液洗脱时间不同得到的乙醇洗脱液的荧光强度不同，而在10~30min内随着洗脱时间的增加，荧光强度有所增加，洗脱时间30min之后洗脱时间增加荧光强度改变不大，故综合考虑作用效果和效率，洗脱时间为40min最佳。

[0116] ⑥装载量的确定：具体操作是分三组，每组编号1~7，PDMS片厚0.27cm，长×宽分别为 0.5×0.5 、 0.5×1 、 1×1 、 0.5×3 、 2×1 、 1×3 、 2×2 (cm)，分别放入洗净的试管中，每组分别加入亚胺硫磷含量为10.0ng、20.0ng、30.0ng的样品2mL于室温下静置12h，取出用二次蒸馏水冲洗三次后置于洗净的试管中，加入2.0mL浓度为质量百分比1%的BSA溶液，于37℃下封闭2h，取出用二次蒸馏水冲洗三次后置于洗净的试管中，加入2.0mL PDs-Ab溶液(浓度为100μg/mL)于室温下静置4h，取出用二次蒸馏水冲洗三次并置于洗净的试管中，加入2.0mL无水乙醇溶液浸泡40min后取出PDMS板，分别测定浸泡液荧光强度。由图5E可知，10.0ng的亚胺硫磷在尺度为 1×1 (cm) 和 2×2 (cm) PDMS片的荧光强度不再增加，说明PDMS片尺度为 1×1 (cm) 可以满足10.0ng以下亚胺硫磷样品的装载；同理，PDMS片尺度为 1×2 (cm) 可以满足20.0ng以下的亚胺硫磷样品的装载；由此得到：PDMS片对亚胺硫磷最大装载量=10×长×宽 (cm)，用气象色谱法测得PDMS片对最大装载量以下的亚胺硫磷农药的装载率为98.5%。

[0117] (2) 应用PDMS片定量检测亚胺硫磷的工作曲线

[0118] 按下述实验步骤测定了亚胺硫磷的工作曲线：取长宽为 2×2 (cm) 的PDMS片分别放入洗净的试管中，加入2.0mL亚胺硫磷标准溶液温下静置12h，取出用二次蒸馏水冲洗三次再分别置于洗净的试管中，加入2.0mL浓度为质量百分比1%的BSA溶液37℃下封闭2h，取出用二次蒸馏水冲洗三次再分别置于洗净的试管中，加入2.0mL PDs-Ab溶液(浓度为100μg/mL)后静置于室温下4h，取出用二次蒸馏水冲洗三次再分别置于洗净的试管中，加入2.0mL无水乙醇溶液浸泡40min后取出PDMS板，分别测定浸泡液荧光的强度。在亚胺硫磷浓度为0~30ng/L范围内，随着亚胺硫磷浓度的增加，体系荧光强度逐渐增加。如图6所示，荧光强度F与亚胺硫磷的浓度呈良好线性关系，线性回归方程为 $F = 26.88C - 21.84$ (ng/L)，相关系数 $R^2 = 0.997$ ，线性范围为2.5~30ng/L，检出限为0.36ng/L。

[0119] (3) 实际样品的定量检测：

[0120] ①制备湖水、橘子皮、白菜叶片上亚胺硫磷残留样品。湖水样品的制备过程如下：取45mL广东省砚湖水，过滤去掉不可溶杂质，加入一定量的的亚胺硫磷水溶液，用二次蒸馏水稀释至50mL。橘子皮、白菜叶待测样制备过程如下：分别取适量白菜叶和橘皮样品，喷洒一定量的亚胺硫磷水溶液，放在室温下静置12h，取出，剪成小片，分别称取5.0g橘子皮、白菜叶待测样，碾碎，过滤除掉白菜叶和橘皮样品中不能溶的残渣，用二次蒸馏水洗涤残渣3次，液体移入容量瓶中，用二次蒸馏水定容到50mL。

[0121] 取上述含有亚胺硫磷的湖水、白菜、橘皮样品各2.0mL于洁净的试管中，按照应用例2步骤(2)，测定样品中的亚胺硫磷含量；再分别取上述已加5ng/L、15ng/L亚胺硫磷标准样品的湖水、白菜、橘皮样品各2.0mL，按应用例2步骤(2)，测定样品中亚胺硫磷含量，重复三次。

[0122] ②回收率的测定实验，结果见表1。结果表明水样中亚胺硫磷的回收率为98.75%~99.12%、白菜中亚胺硫磷的回收率为97.30%~98.22%、橘皮中亚胺硫磷的回收率为

97.22%~103.0%，符合样品测定的要求，能用于实际样品种亚胺硫磷残留的检测。

[0123] 表1蔬菜水果中亚胺硫磷含量的测定及回收率实验

[0124]

样品	初始测定值 (ng/L) n=3	添加量(ng/L)	检测量(ng/L) n=3	回收率(%) n=3
湖水样	9.81±0.11	5	14.68±0.21	99.12
		15	24.50±0.33	98.75
白菜叶	7.94±0.10	5	12.71±0.20	98.22
		15	22.32±0.29	97.30
橘皮	6.87±0.19	5	11.54±0.31	97.22
		15	22.52±0.40	103.0

[0125] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

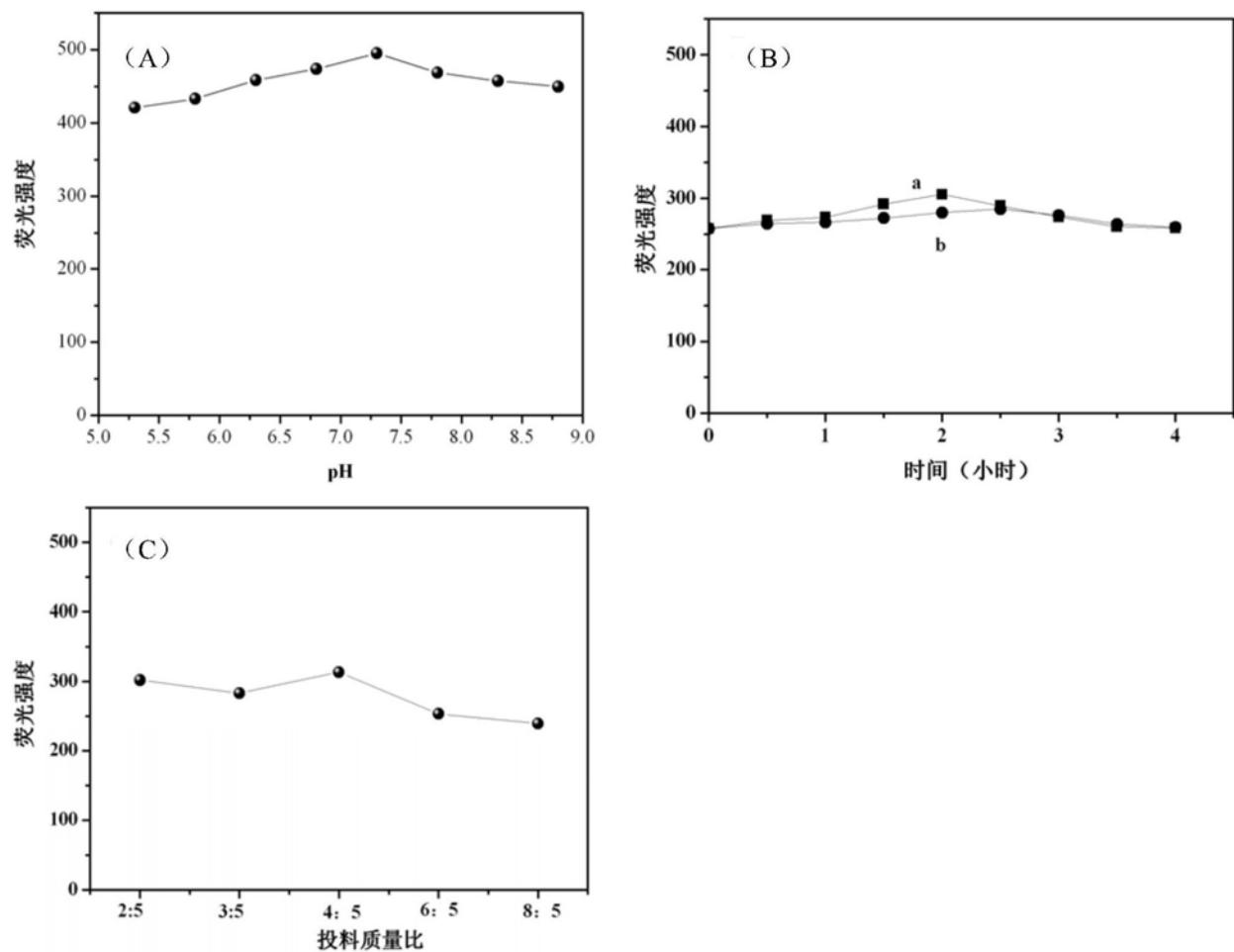


图1

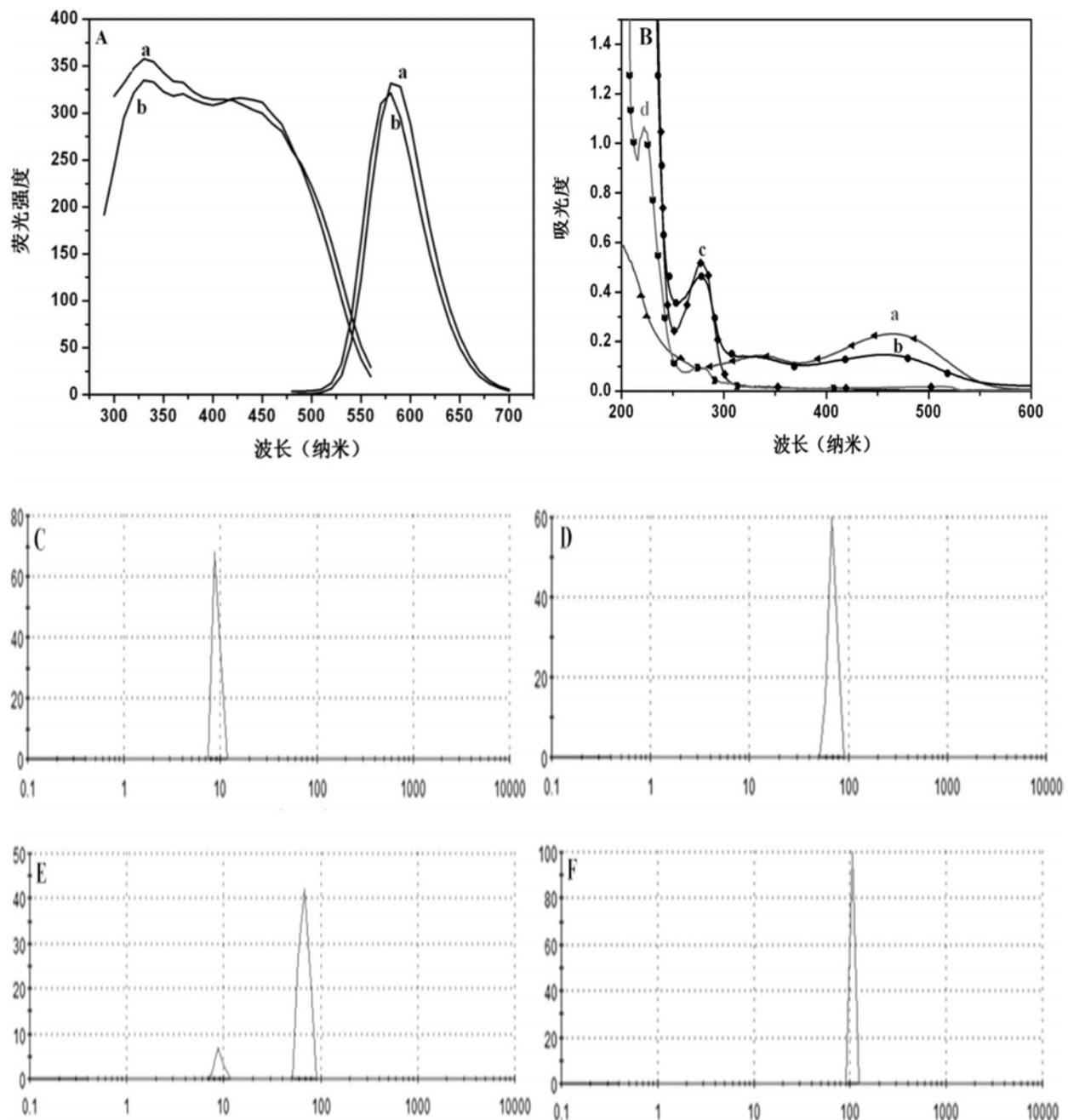


图2

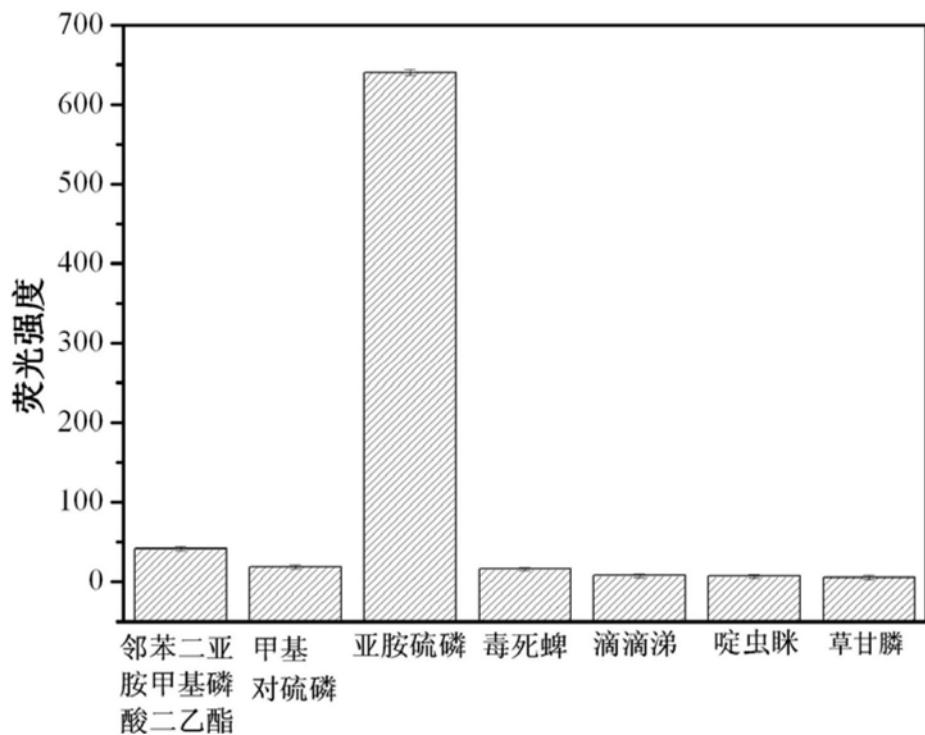


图3

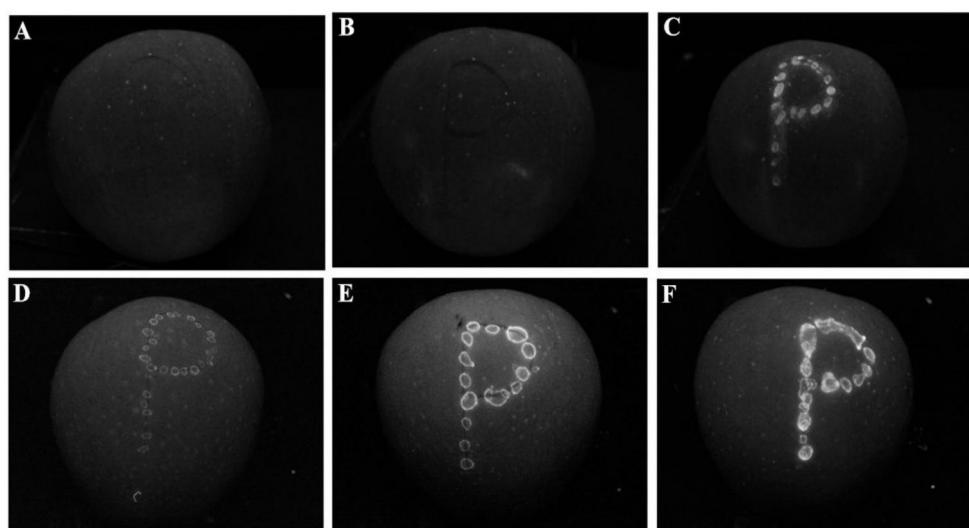


图4

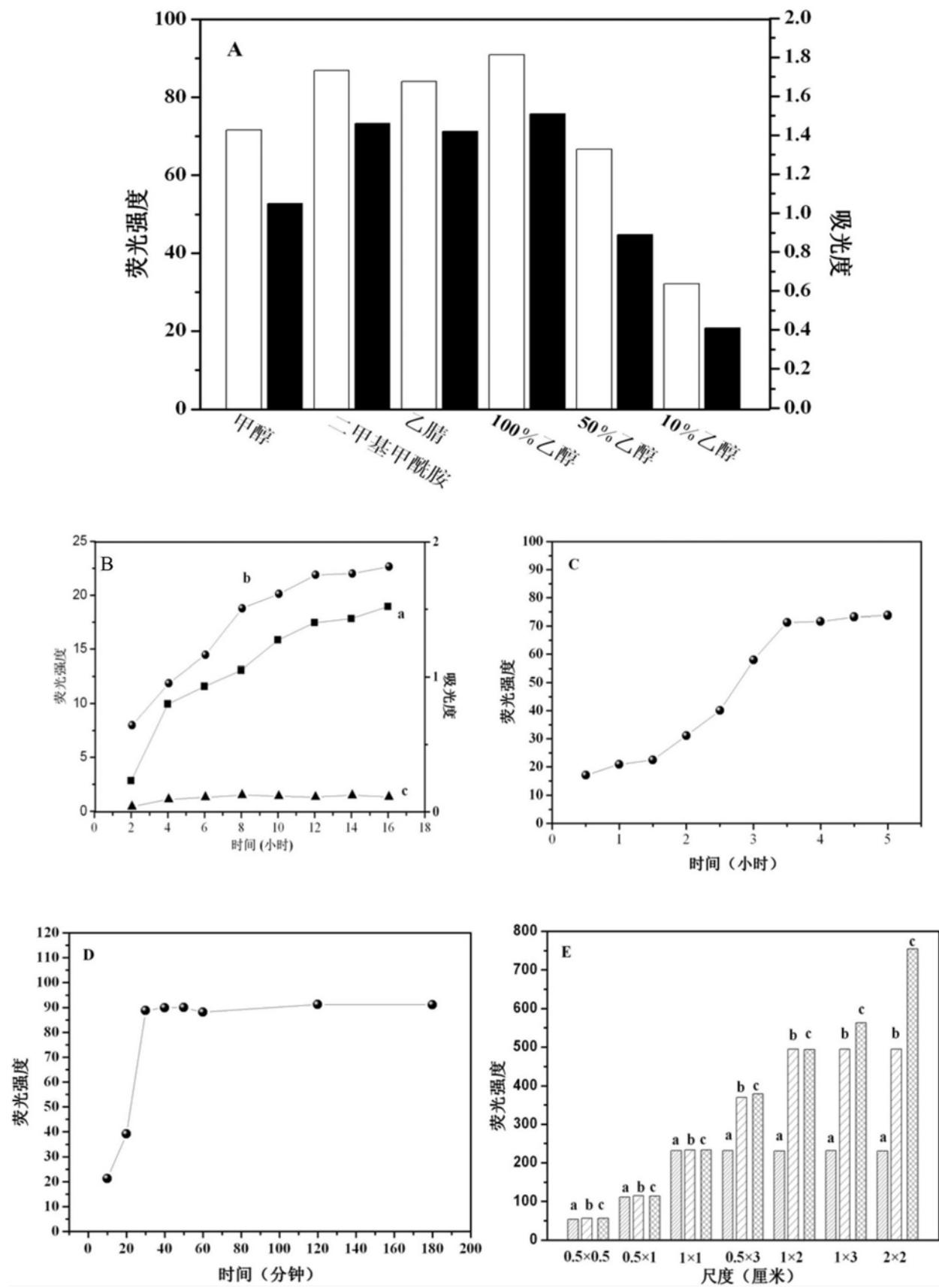


图5

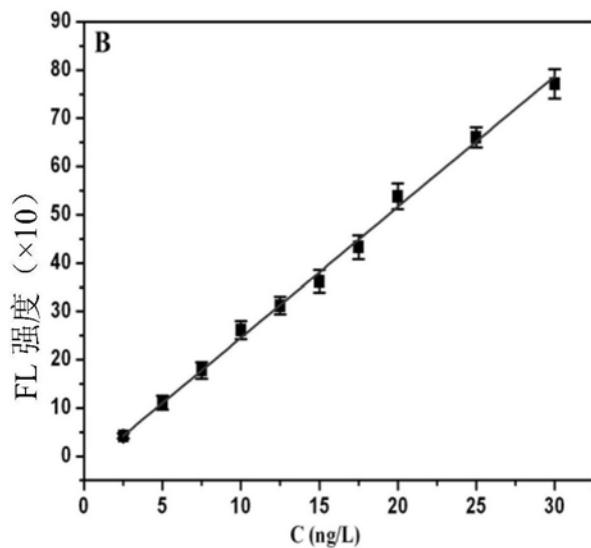


图6

专利名称(译)	一种基于聚合物发光点的免疫探针及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN105784988B	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN201610116190.2	申请日	2016-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
[标]发明人	俞英 周丽娜 曹玉娟 林碧霞 水玲玲		
发明人	俞英 周丽娜 曹玉娟 林碧霞 水玲玲		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
其他公开文献	CN105784988A		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种基于聚合物发光点的免疫探针及其制备方法与应用。本发明通过CN-PPV和PSMA反应，制备得到PDs水溶液；接着将PDs水溶液、PBS和EDC混匀，混匀，得到混合液体A；将混合液体A和亚胺硫磷抗体混合反应，得到基于聚合物发光点的免疫探针。该免疫探针能特异性识别亚胺硫磷，因此可用其定性检测亚胺硫磷、半定量或定量检测亚胺硫磷。本发明提供的定性和半定量检测方法为原位可视化检测方法；本发明提供的定量检测方法灵敏度高，特异性强，可以进行高灵敏度定量检测。

