



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104515752 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201310450946. 3

(22) 申请日 2013. 09. 27

(71) 申请人 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

(51) Int. Cl.

G01N 21/552(2014. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

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_{50} 为 15. 70ng/mL,检测范围 2. 18-629. 06ng/mL。

1. 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 (Autolab ESPRIT, 荷兰) 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 μ L 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 50 μ L 耦合缓冲液稀释的阿特拉津完全抗原 (包被原) 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。

2. 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

(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。

(2) 取 50 μ L 3.12 μ g/mL 阿特拉津单抗, 10 μ 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, 去除与包被原结合的阿特拉津单克隆抗体, 使包被原可用于下一次检测。

(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, 确定该方法的最低检出限 0.72ng/mL, 检测范围 2.18-629.06ng/mL。

3. 权利要求 2 所述包被原可以是其他阿特拉津与蛋白偶联物, 优选阿特拉津与 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 50 μ L 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 50 μ L 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 50 μ L 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)

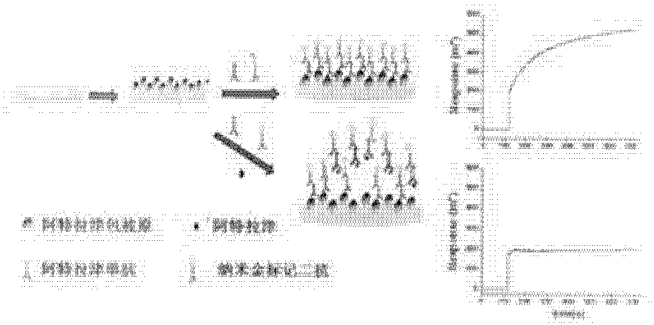


图 1

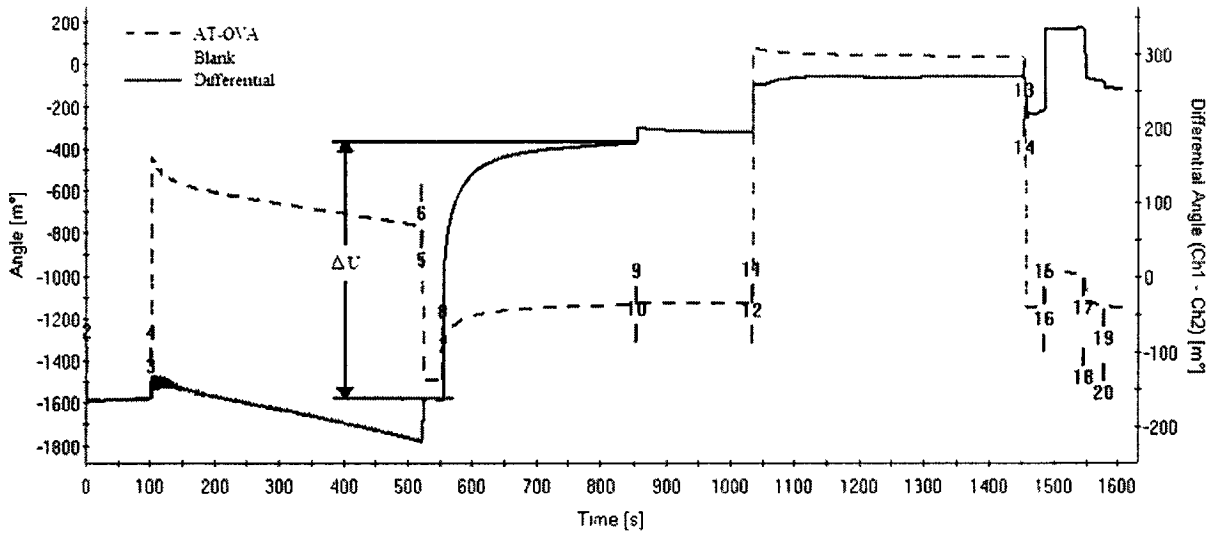


图 2

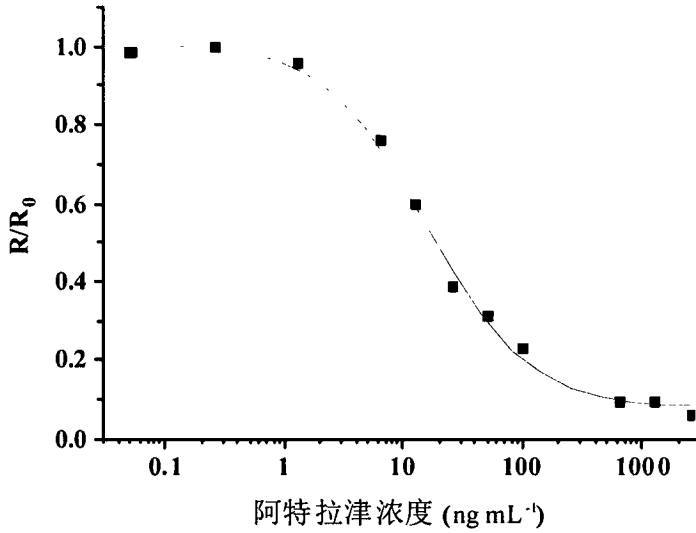


图 3

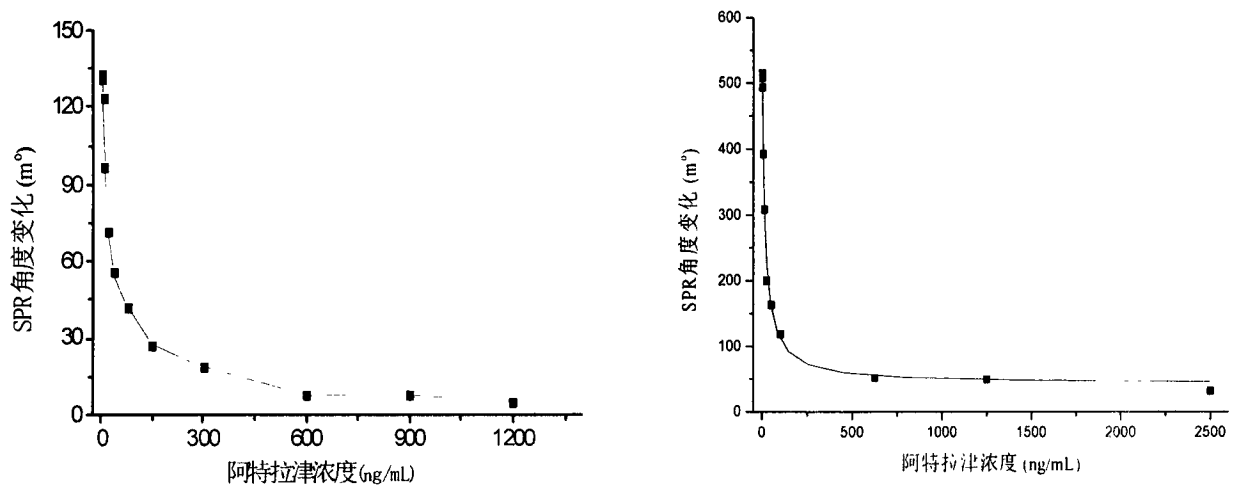


图 4

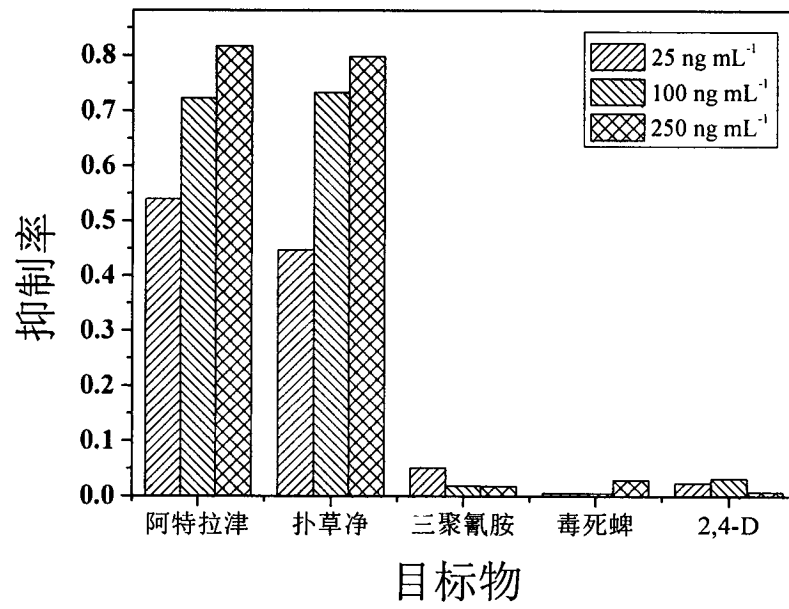


图 5

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	CN104515752A	公开(公告)日	2015-04-15
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		
其他公开文献	CN104515752B		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。

