



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106290830 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610589676.8

(22)申请日 2016.07.26

(71)申请人 大连民族大学

地址 116600 辽宁省大连市经济技术开发区
辽河西路18号

(72)发明人 华瑞年 国婷婷 张伟 于基成
那立艳

(74)专利代理机构 大连智高专利事务所(特殊
普通合伙) 21235

代理人 毕进

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

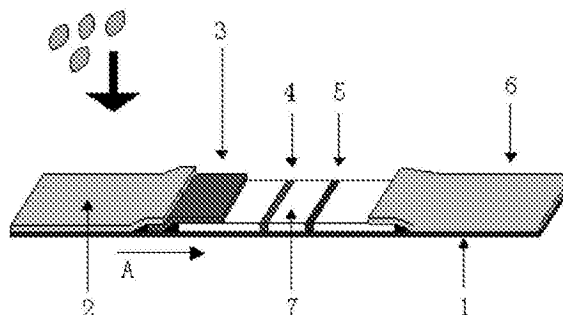
权利要求书1页 说明书12页 附图8页

(54)发明名称

一种基于上转换荧光纳米粒子快速检测杀
螟硫磷的免疫层析试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于上转换荧光纳米粒子快速检测杀螟硫磷的免疫层析试纸及其制备方法,属于化学鉴定技术领域。本发明的农药试纸包含试纸板、样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元;样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元均连接于所述试纸板上;所述检测单元位于所述试纸板的中间;所述检测单元包含抗原包被液以及封闭液。本发明的有益效果为:试纸具有“快速、简便、特异、敏感、低成本”的特点,特别是其“快速、简便”的特点,特别适合于广大基层单位、野外作业人员以及大批量时间紧的检测和面积普查等,显示巨大的发展潜力和应用前景,被认为是食品安全检测最有前途的新技术之一,已成为食品安全检测的主要发展趋势。



1. 检测农药残留试纸, 其特征在于所述试纸包含: 试纸板、样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元;

样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元依次相连且均连接于所述试纸板上;

所述样品滴加单元与样品回收单元位于所述试纸板的两端, 所述检测单元位于所述试纸板的中间;

所述检测单元包含纳米粒子标记结合垫、检测线和质控线; 所述检测线位于所述纳米粒子标记结合垫和所述质控线之间; 所述纳米粒子标记结合垫包含抗原包被液以及上转换荧光纳米粒子标记抗体试样; 所述上转换荧光纳米粒子标记抗体试样为绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺或红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺, Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的PBS溶液。

2. 根据权利要求1所述的检测农药残留试纸, 其特征在于, 所述检测线以及质控线均位于层析膜上, 纳米粒子标记结合垫与所述层析膜相连; 所述层析膜为NC硝酸纤维素膜。

3. 根据权利要求1所述的检测农药残留试纸, 其特征在于, 所述纳米粒子标记抗体试样中绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的含量为0.00666-0.132 μ g/mL; 红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb, Er标记杀螟硫磷-IgG的含量为0.01-0.2 μ g/mL。

4. 根据权利要求1所述的检测农药残留试纸, 其特征在于, 所述检测线上的标记物为杀螟硫磷-OVA, 所述质控线的标记物为羊抗兔二抗。

5. 检测农药残留试纸的制备方法, 其特征在于, 包含下列步骤:

S1. 制备稀土上转换纳米材料;

S2. 制备农药多克隆抗体以及检测所述农药多克隆抗体的效价;

S3. 利用所述步骤S1制备的产物标记所述农药多克隆抗体;

S4. 利用所述步骤S3产物制备检测农药残留试纸。

6. 根据权利要求5所述的检测农药残留试纸的制备方法, 其特征在于, 所述步骤S1为制备稀土上转换绿光纳米材料或制备稀土上转换红光纳米材料。

一种基于上转换荧光纳米粒子快速检测杀螟硫磷的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学鉴定技术领域,特别是一种基于上转换荧光纳米粒子快速检测杀螟硫磷的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 在20世纪80年代初,在西方发达国家兴起了一种快速检测的技术,其原理是通过胶体金结合垫、纳米材料结合垫、量子点结合垫、荧光素结合垫等的毛细管作用,用与结合垫相对应的材料进行标记,经过硝酸纤维素膜作用,抗体和抗原在此特异性结合,将此技术称为免疫层析试纸检测技术。用于标记的这些物质都具有肉眼可见或在紫外光激发下看出抗体与抗原特异性结合的颜色或荧光显现。免疫层析试纸条因其快速、简便及操作简单等特点,其使用领域也越来越广,且得到了很好的发展。用于试纸条标记的材料也越来越多。

[0003] 免疫层析试纸主要组成部分为样品垫、标记物结合垫、硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜、T线(检测线)、C线(质控线)、吸水垫、聚氯乙烯(polyvinylchloride, PVC)底板。如胶体金试纸,由于胶体金的特点,试纸制备原理分为竞争法和夹心法。竞争法:当联有待测抗原的样品滴加到样品垫上时,通过毛细管作用,样品向前移动,到胶体金结合垫上时,样品中的抗原会与抗体特异性结合。到达T线时,T线上的抗体会与样品中剩余的抗体特异性结合,变红。样品再继续移动,到达C线时,再次与C线上的抗体反应,变红。当试纸条上出现两条红线时,说明样品中的抗原含量低于检测线,呈阴性。反之,当样品中的抗原含量高于检测限时,在胶体金结合垫上抗原大部分与抗体特异性结合,T线未出现红色,而C线出现红色,则为阳性。无论样品中的待测抗原高于还是低于检测线,C线都应出现,否则试纸条无效。与之实验结果相反,出现两条红线为阳性,一条红线为阴性的方法为夹心法。

[0004] 农药残留问题是随着农药大量生产和广泛使用而产生的。到目前为止,世界上化学农药年产量近200万吨,约有1000多种人工合成化合物被用作杀虫剂、杀菌剂、杀藻剂、除虫剂、落叶剂等类农药。农药尤其是有机农药大量施用,造成严重的农药污染问题,成为对人体健康的严重威胁。

[0005] 免疫试纸技术在医学、兽医诊断,农业,生物福利,食品安全,环境安全,工业检测,甚至新出现的分子诊断及纳米治疗领域都有广泛的应用,具有非常广泛的应用前景。在食品安全检测领域里,主要涉及到兽药、农药残留,违禁添加物、生物毒素、重金属、环境毒素等,基本上大多数的食品安全检测涉及的都可以应用到。技术上来说,免疫试纸检测技术具有“快速、简便、特异、敏感、低成本”的特点,特别是其“快速、简便”的特点,适用于现场巨量样品检测,有着巨大的应用前景,被认为是食品安全检测最有前途的新技术之一,已成为食品安全检测的主要发展趋势。

[0006] 目前农药残留分析主要采用仪器分析和免疫分析方法。我们国家用的最多的,按照试验数来算的话,就是试纸。其他的技术当然都在用,但是试验的绝对数都没有试纸多,

气-质色谱、液-质色谱难以应付巨量的样品。其中仪器分析法具有灵敏度高、准确度高和精密性好等优点,但存在样品前处理繁琐、试剂用量大、费时、分析成本高,需昂贵的仪器设备等缺点,不适合现场快速检测。纳米生物技术是纳米技术与生物技术交叉渗透形成的新技术,利用纳米生物技术对细胞内外物质分析和检测、疾病早期诊断、生物分子的示踪标记等研究一直是国内外相关领域的研究重点。为了能够实现食品及环境中农药残留的快速检测,科学工作者开始关注上转换(将长波长光转换为短波长光发射的过程)纳米荧光材料。上转换纳米荧光材料是一类用980nm红外光做激发光源的材料,用此激发光做激发源的材料光穿透度较深,在生物组织内不会发光,故不产生背景荧光,对生物组织的损伤几乎为零。合成该类材料的物质毒性较小,且具有良好的化学稳定性,发光强度较好,它的吸收和发射带宽窄,从而降低检测背景,提高信噪比,这些特征导致上转换纳米荧光材料拥有非常好的生物应用前景。建立起基于上转换纳米材料快检农药多(单)残留的方法无疑是非常重要的,到目前为止,上转换纳米荧光材料已在细胞标记、生物大分子检测、小动物成像、光动力学疗法及药物输送等方面得到了应用。但将上转换纳米荧光材料用作标记物,与免疫层析技术相结合进行小分子农药残留的分析还未见报道。利用上转换纳米材料快速检测农药多(单)残留的分析方法,对发展快检农药多残留检测技术具有重要的理论研究和实际应用意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,制作出纳米级上转换发光材料。本发明提供快速检测农药残留的免疫层析试纸,所述试纸包含:试纸板、样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元;样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元依次相连且均连接于所述试纸板上;所述样品滴加单元与样品回收单元位于所述试纸板的两端,所述检测单元位于所述试纸板的中间;所述检测单元包含纳米粒子标记结合垫、检测线和质控线;所述检测线位于所述纳米粒子标记结合垫和所述质控线之间;所述纳米粒子标记结合垫包含抗原包被液以及上转换荧光纳米粒子标记抗体试样;所述上转换荧光纳米粒子标记抗体试样为绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺或红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的PBS溶液。

[0008] 优选地,所述检测线以及质控线均位于层析膜上,纳米粒子标记结合垫与所述层析膜相连;所述层析膜为NC硝酸纤维素膜。

[0009] 优选地,所述纳米粒子标记抗体试样中绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的含量为0.00666-0.132 μ g/mL;红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的含量为0.01-0.2 μ g/mL。

[0010] 优选地,所述检测线上的标记物为杀螟硫磷-OVA,所述质控线的标记物为羊抗兔二抗。

[0011] 本发明还保护检测农药残留试纸的制备方法,包含下列步骤:S1.制备稀土上转换纳米材料;S2.制备农药多克隆抗体以及检测所述农药多克隆抗体的效价;S3.利用所述步骤S1制备的产物标记所述农药多克隆抗体;S4.利用所述步骤S3产物制备检测农药残留试纸。

[0012] 优选地,所述步骤S1为制备稀土上转换绿光纳米材料或制备稀土上转换红光纳米材料。

[0013] 本发明的优点和积极效果是:上转换纳米荧光材料具有有机染料和量子点材料无

法比拟的优势,如毒性小、化学稳定性高、发光强度高、光稳定性好、吸收和发射带窄和荧光寿命长等;此外980nm红外激光作激发源也有许多优势,例如较深的光穿透深度、对生物组织几乎无损伤、生物组织不会发光(无背景荧光),从而降低检测背景,提高信噪比,这些特征导致上转换纳米荧光材料拥有非常好的生物应用前景。建立起基于上转换纳米材料快检农药多残留的方法无疑是非常重要的,利用上转换纳米材料快速检测农药多(单)残留的分析方法,对发展快检农药多残留检测技术具有重要的理论研究和实际应用意义。免疫试纸技术在医学、兽医诊断,农业,生物福利,食品安全,环境安全,工业检测,甚至新出现的分子诊断及纳米治疗领域都有广泛的应用,具有非常广泛的应用前景。在食品安全检测领域里,主要涉及到兽药、农药残留,违禁添加物、生物毒素、重金属、环境毒素等,基本上大多数的食品安全检测涉及的都可以应用到。技术上来说,免疫试纸检测技术具有“快速、简便、特异、敏感、低成本”的特点,特别是其“快速、简便”的特点,特别适合于广大基层单位、野外作业人员以及大批量时间紧的检测和大面积普查等,显示巨大的发展潜力和应用前景,被认为是食品安全检测最有前途的新技术之一,已成为食品安全检测的主要发展趋势。

附图说明

- [0014] 图1为合成绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的扫描电镜图;
- [0015] 图2为绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的透射电镜图;
- [0016] 图3为水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺上转换纳米粒子的TEM图;
- [0017] 图4水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的SEM照片;
- [0018] 图5为在595nm吸收波长下,BSA的浓度与水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG吸光度的关系曲线;
- [0019] 图6为在595nm吸收波长下,BSA的浓度与水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG吸光度的关系曲线;
- [0020] 图7为检测农药单残留的免疫层析试纸结构图;
- [0021] 图8为水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺不同浓度封闭筛选结果判据图;
- [0022] 图9为试纸的灵敏度示意图,A:阴性B:阳性T:检测线C:质控线;
- [0023] 图10为水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺试纸条检测杀螟硫磷农残灵敏度结果图;
- [0024] 图11为水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺试纸条检测杀螟硫磷农残灵敏度结果图;
- [0025] 图12为水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺不同浓度封闭筛选结果判据图;
- [0026] 图13试纸条阴阳性判断图,A:阴性B:阳性T:检测线C:质控线;
- [0027] 图14为水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺试纸条检测杀螟硫磷农残灵敏度结果图;
- [0028] 图15为水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺试纸条检测杀螟硫磷农残灵敏度结果图;
- [0029] 图16为杀螟硫磷标准样的气相色谱图;
- [0030] 图17为样品梨中的杀螟硫磷含量;
- [0031] 图18为样品苹果中的杀螟硫磷含量;
- [0032] 图19为样品黄瓜中的杀螟硫磷含量;
- [0033] 图20为样品西红柿中的杀螟硫磷含量;

- [0034] 图21为样品大米中的杀螟硫磷含量；
- [0035] 图22为样品小米中的杀螟硫磷含量；
- [0036] 图23为水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺试纸条验证结果,a:梨,b:苹果,c:黄瓜,d:西红柿,e:大米,f:小米。

具体实施方式

[0037] 近年来因为稀土上转换纳米材料的光学性质,使其在生物领域的应用有着大量可待开发的潜能。 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺(Tm³⁺)是目前为止发现的上转换效率最高的材料,故其在生物检测与标记方面获得广泛关注。但是,因制备得到的稀土上转换纳米材料是油溶性材料,需利用KMnO₄/NaIO₄将油溶性纳米粒子转变成水溶性纳米粒子。

[0038] 本发明利用高温热分解法制备了油酸包覆的 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子。

[0039] 1、绿色稀土上转换纳米材料的制备

[0040] (1)实验仪器与实验试剂

[0041] 表1实验仪器一览表

[0042]

仪器名称	型号	生产厂家
数显智能控温磁力搅拌器	SZCL-2	巩义市予华仪器有限责任公司
循环水式多用真空泵	SHB-3	河南予华仪器有限公司
氧气减压器	YQY-07	宁波市丰宏仪器仪表制造有限公司
四联磁力加热搅拌器	CJJ-4	金坛市大地自动化仪器厂
台式高速冷冻离心机	H2050R	湖南湘仪实验室仪器有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9036A	上海精宏实验设备有限公司

[0043] 表2化学试剂一览表

[0044]

试剂名称	分子式	纯度	生产厂家
氧化钇	Y ₂ O ₃	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氧化镱	Yb ₂ O ₃	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氧化铒	Er ₂ O ₃	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氯化钇	YCl ₃ ·6H ₂ O	分析纯	自制
氯化镱	YbCl ₃ ·6H ₂ O	分析纯	自制
氯化铒	ErCl ₃ ·6H ₂ O	分析纯	自制
十八烯	C ₁₈ H ₃₆	≥90%	AladdinIndustrialCorporation
油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	90%	阿法埃莎(天津)化学有限公司
氟化氢铵	NH ₄ HF ₂	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	NaOH	分析纯	沈阳市医药公司化玻站试剂分装厂
甲醇	CH ₃ OH	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
无水乙醇	CH ₃ CH ₂ OH	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
95%乙醇	CH ₃ CH ₂ OH	95%	天津市科密欧化学试剂有限公司
环己烷	C ₆ H ₁₂	分析纯	北京化工厂

[0045] (2)制备稀土氯化物

[0046] 将稀土氧化物10g倒入新烧杯中,加入5mL蒸馏水,加入浓度37%的HCl 50-60mL,搅拌,若太浓稠则继续加入HCl。

[0047] 微溶后,置于铺有石棉网的电炉上加热至沸腾,若一直未澄清,则再加入20-30mL HCl,沸腾至剩余溶液为原来一半后仍未澄清,则继续加入浓度为37%的HCl,直至澄清。

[0048] 澄清后的溶液沸腾蒸干至溶液开始出现大气泡时,加入蒸馏水80mL,冲洗杯壁及玻璃棒。反复重结晶四次左右最后一次蒸干后快速搅拌成结晶状,装管。

[0049] (3)高温热分解法制备油溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺上转换荧光纳米粒子

[0050] ①将稀土氯化物(2mmol)[YCl₃·6H₂O(78%)、YbCl₃·6H₂O(20%)、ErCl₃·6H₂O(2%)],90%油酸(12mL)、90%十八烯(30mL)置于三口烧瓶中,放入搅拌子,抽真空,30min后加热。抽真空时放在热电偶上,只搅拌不加热。

[0051] ②将NaOH(5mmol)、NH₄HF₂(5mmol)、无水甲醇(10mL)置于小烧杯中,放入搅拌子,封上封口膜,置于磁力搅拌器上常温搅拌。

[0052] ③步骤①中抽真空完毕,在15min内将三口烧瓶中溶液加热到150℃,保温15~20min即可,随即关闭搅拌,关闭加热,使之降低至室温。

[0053] ④尽量少进空气的情况下加入步骤2中的溶液,缓慢逐滴滴加,使之充分反应。滴加结束后开始通入N₂,通入30min左右,将滴加过程中进入的空气排尽。

[0054] ⑤排尽空气后将体系加热至80℃(15-20min左右升至80℃),温度变化范围在5℃以内,不能低于80℃,保温1.5h。

[0055] ⑥保温1.5h后,在0.5h内将溶液升温至310℃,充分反应,N₂保护下保温2h。随即在N₂保护及搅拌下冷却至室温。

[0056] ⑦洗涤产物:将离心机调至9000r/min,时间设定为10min,用无水乙醇将产物洗涤一遍;环己烷:无水乙醇以1:3比例混合将产物洗涤两遍;无水乙醇将产物洗涤两遍;95%乙醇将产物洗涤两遍。将离心管放入干燥箱干燥产物。

[0057] (4)水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的制备

[0058] 将上述制备好的绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺(50mg)、环己烷(50mL)、叔丁醇(35mL)、去离子水(5mL)以及5wt%K₂CO₃溶液(2.5mL)室温下混合搅拌20min。将10mL含2.85mmol KMnO₄和0.0525mmol NaIO₄水溶液缓慢滴入。40℃下反应48h,用95%乙醇洗涤离心(9000r/min)产物得初产物。初产物溶于12.5mL pH为4-5的HCl,常温下搅拌反应30min。反应结束9000r/min离心,最后用95%乙醇洗涤离心得到产物。

[0059] 将产物分散于15mL去离子水中待用。

[0060] (5)绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的表征

[0061] a)SEM分析

[0062] 从图1的SEM照片可看到高温热解法合成的绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺上转换纳米粒子,其形貌为实心的纳米球,颗粒大小均匀,粒径为30nm左右,从SEM图片也可观察到产物物相纯净。

[0063] TEM分析

[0064] 从图2的TEM照片可看到高温热解法合成的绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子,其形貌为实心的纳米球,颗粒大小均匀,粒径为30nm左右,从TEM图片也可观察到产物物相纯净。

[0065] 从图3可看出,氧化后的绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的形貌和粒径尺寸均未发生改变,仍为粒径在30nm左右的球状粒子。

[0066] 2、红色稀土上转换纳米材料的制备

[0067] 表3实验仪器一览表

[0068]

仪器名称	型号	生产厂家
X射线粉末衍射仪	XRD-6000 型	日本岛津公司
透射电子显微镜	JEM-2010 型	日本日立公司
荧光光谱仪	F-4500 型	日本日立公司
高速离心机	H-2050R	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
电热恒温干箱	DHG-9036A 型	上海精宏实验设备有限公司
数显智能控温磁力搅拌器	SZCL-2	巩义市予华仪器有限责任公司
循环水式真空泵	SHZD (III)	巩义市予华仪器有限责任公司
四联磁力搅拌器	CJJ-4	金坛市大地自动化仪器厂

[0069] 表4化学试剂一览表

[0070]

试剂名称	化学式	纯度	生产厂家
聚乙烯亚胺 (PEI)	PEI	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
氟化铵	NH ₄ F	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
氯化钠	NaCl	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
无水乙醇	CH ₃ CH ₂ OH	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
95%乙醇	CH ₃ CH ₂ OH	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司

[0071] (1)红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子的合成

[0072] 1)先制备A、B、C三种溶液:

[0073] A溶液:0.0585g NaCl(1mmol)、0.0288g YCl₃·6H₂O(0.095mmol)、0.1938g YbCl₃·6H₂O(0.5mmol)、0.001909g ErCl₃·6H₂O(0.005mmol)、0.1487g GdCl₃·6H₂O(0.4mmol)、10mL去离子水。

[0074] B溶液:0.1480gNH₄F(4mmol)、10mL去离子水。

[0075] C溶液:量取10mL质量浓度为0.05g/mL PEI溶液和30mL无水乙醇混合在50mL烧杯中。

[0076] 2)在不断搅拌下,将溶液C缓慢滴加到溶液A中,搅拌30min。再将溶液B在10min内缓慢滴加到其中,然后接着搅拌20min。将上述溶液分成3份倒入3个100mL的不锈钢反应釜,再将上述实验制备的红色纳米棒样品的四分之一加入反应釜中,然后放在烘箱中,将烘箱的温度调至200℃,加热48h,自然冷却到室温。

[0077] 3)将产物在9000r/min的转速下离心10min,用无水乙醇洗涤4次。获得的沉淀在80℃下干燥,得到的白色粉末即为表面有氨基修饰的水溶性红光发射 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子。

[0078] (2)SEM分析

[0079] 从图4可看出,水热法合成的红光发射 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子,其形貌为

实心的纳米球,SEM图片可观察到产物晶型规则,物相纯净,纳米球的粒径均为50nm左右。

[0080] 3、水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺或红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子标记杀螟硫磷多克隆抗体

[0081] (1)水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG

[0082] i. 磷酸缓冲盐溶液(PBS)的配制(0.01M)

[0083] 将NaCl(0.8g)、KCl(0.002g)、Na₂HPO₄(0.144g)、KH₂PO₄(0.024g)用水定容至100mL,即可得到pH=7.4的PBS溶液。

[0084] 配制pH=5的PBS溶液,用30% HCl将上述溶液pH调至5.0即可。

[0085] ii. 水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的方法

[0086] 取经KMnO₄-NaIO₄氧化溶于15mL水的 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺,向上述溶液中加入15mL PBS(pH=5)缓冲液后,加入0.01152g(0.000384×30mL)EDC与0.03257g SuIf o-NHS(0.00108565×30mL),常温搅拌30min,活化羧基。加入200 μ L(C=1mg/mL)杀螟硫磷,常温反应2h。9000rpm离心出产物,产物用PBS(pH=7.4)洗2次后定容于15mLPBS(pH=7.4)中。

[0087] (2)水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG

[0088] i. β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG产物的制备方法

[0089] ①取实验所制备得到的水溶性 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子10mg置于50mL离心管中,加入10mL去离子水,超声30min。

[0090] ②超声结束后将溶液进行离心,取上清液备用。

[0091] ③将上清液转移至25mL小烧杯中,向其中加入200 μ L杀螟硫磷抗体,在搅拌的条件下常温反应2h。

[0092] ④随后再向其中加入戊二醛(25%,W/W)0.50mL,逐滴滴加,同样在搅拌的条件下常温反应5h。反应结束后,将产物离心(12000rpm),并用PBS(pH=7.4)洗涤3次,洗涤结束后定容在2mL的PBS中。

[0093] (3)考马斯亮蓝法定量分析蛋白的含量

[0094] ①配制布拉德福德试剂:取考马斯亮蓝G-250 50mg置于200mL烧杯中,加入25mL的95%乙醇使其溶解,随后加入60mL 85%(w/v)的磷酸,转移至500mL容量瓶,用去离子水稀释至500mL。溶液需现配现用。

[0095] ②配置BSA浓度分别为0,0.02,0.04,0.06,0.08和0.10mg/mL的标准液各1.00mL。

[0096] ③取②中的配置好的BSA溶液中分别放入指定试管中,根据顺序分别加入5.00mL的布拉德福德试剂,摇晃均匀,反应2min后,用作待测液。设定紫外分光光度计的吸收波长在595nm,用待测液进行吸光度测定。

[0097] 水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG根据顺序的得到的测定结果如下:0,0.161,0.372,0.541,0.693,0.830。由浓度及吸光度作图可知二者有如下的线性关系。见图5,回归方程为:

[0098] $Y=8.108X+0.008(R^2=0.998)$

[0099] 其中X为BSA浓度,Y为吸光度。经测定,绿色样品 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的吸光度为0.087,根据蛋白质标准曲线计算出 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺@杀螟硫磷-IgG表面的杀螟硫磷-IgG偶联率为4.61%(含杀螟硫磷-IgG 9.11mg/mL)。这个结果进一步表明,杀螟硫磷-IgG已被绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子标记成功。

[0100] 水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG根据顺序的得到的测定结果如下:0,0.157,0.360,0.518,0.662,0.795。由浓度及吸光度作图可知二者有如下的线性关系。见图6,回归方程为:

[0101] $Y=8.068X+0.011(R^2=0.995)$

[0102] 其中X为BSA浓度,Y为吸光度。经测定,样品 β -NaY(Gd)F₄:Yb,Er@杀螟硫磷-IgG的吸光度为0.282,根据蛋白质标准曲线计算出 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺@杀螟硫磷-IgG表面的杀螟硫磷-IgG偶联率为13.44%(含杀螟硫磷-IgG 33.59 μ g/mL)。这个结果进一步表明,杀螟硫磷-IgG已被红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子成功标记。

[0103] 4、农药单残留检测免疫层析试纸的制备

[0104] 表4化学材料一览表

[0105]

材料名称	规格	生产厂家
硝酸纤维素膜	140.265.2.5*30cm	上海金标生物科技有限公司
硝酸纤维素膜	135.265.2.5*30cm	上海金标生物科技有限公司
吸水纸	CH27.265.300*200mm	上海金标生物科技有限公司
玻璃纤维素膜(金标)	SB08.265.300*200mm	上海金标生物科技有限公司
PVC塑料胶板	265.300*60mm	上海金标生物科技有限公司

[0106] 表5实验仪器一览表

[0107]

仪器名称	型号	生产厂家
激光器	ks3-11312-105-k98s02	北京凯普林光电科技股份有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9036A	上海精宏实验设备有限公司
照相机	佳能	日本佳能

[0108] (1)免疫层析试纸条的组装

[0109] 农药单残留检测免疫层析试纸条的结构如图7所示。试纸条包含试纸板1、样品滴加单元2、检测单元以及样品回收单元6。

[0110] 样品滴加单元2、检测单元以及样品回收单元6依次相连且均连接于所述试纸板1上;所述试纸板1为PVC胶板。所述样品滴加单元2与样品回收单元6位于所述试纸板1的两端,所述检测单元位于所述试纸板1的中间。

[0111] 所述检测单元包含纳米粒子标记结合垫3、检测线4和质控线5;所述纳米粒子标记结合垫3包含抗原包被液以及上转换荧光纳米粒子标记抗体试样;所述上转换荧光纳米粒子标记抗体试样为 β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺标记杀螟硫磷-IgG的PBS溶液。所述抗原包被液以及所述上转换荧光纳米粒子标记抗体试样可由前述制备方法制得。

[0112] 检测线4以及质控线5均位于层析膜7上。纳米粒子标记结合垫3与层析膜7相连,层析膜7为NC硝酸纤维素膜。

[0113] 1)利用水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺纳米粒子标记杀螟硫磷-IgG检测杀螟硫磷免疫层析试纸的制备方法

[0114] i)抗原包被液的选择

[0115] 准确量取杀螟硫磷抗原20 μ L配成2 μ L/mL包被液。

[0116] ii) 纳米粒子标记抗体浓度的选择

[0117] 配制不同浓度的标记上转换纳米粒子的抗体试样, 在980nm光的激发下, 观察所划线的发光强度选择最适浓度。

[0118] A: 200 μ L 含0.3300 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0119] B: 200 μ L 含0.1665 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0120] C: 200 μ L 含0.3330 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0121] D: 200 μ L 含0.4995 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0122] E: 200 μ L 含0.6600 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液。

[0123] 实验结果如图8以及表6所示:

[0124] 表6荧光强度(注: “+”、“-”代表荧光强度)

试 样	A	B	C	D	E
[0125] 1 号荧光亮度	++	+	+++	+	+
2 号荧光亮度	++	++	+++	+	++

[0126] 如图8所示, 在980nm波长光照射NC膜进行结果判定。由不同浓度的标记上转换纳米粒子的抗体试样筛选结果(表6和图8)可知, 标记上转换纳米粒子的抗体试样液C: 200 μ L 含0.3330 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷的PBS溶液, NC膜上的线荧光强度最强, 其他浓度的试纸条荧光强度就弱。由上述结果可知, 在标记上转换纳米粒子的抗体试样液中含有C: 200 μ L 含0.3330 μ g/mL β -NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷的PBS溶液时效果最佳, 可作为检测杀螟硫磷含量的备用试纸条。

[0127] 2) 水溶性绿色 β -NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺纳米粒子标记杀螟硫磷-IgG检测杀螟硫磷免疫层析试纸的灵敏度确定

[0128] 若同时出现两条绿色荧光, 则说明样品呈阴性(如图9-A)。当只有一条绿色荧光时(如图9-B), 样品呈阳性。若两条线都不出现, 说明试纸条失败。

[0129] 3) 杀螟硫磷农药残留检测限的确认

[0130] 表7灵敏度的测定(500~1ng)

	杀螟硫磷浓度(ng/mL)							
	500	200	100	50	20	10	5	1
[0131] 结果(T 线)	+	+	+	+	+	-	-	-

[0132] (备注: “+”、“-”分别表示阳性和阴性)

[0133] 表8灵敏度的测定(20~11ng)

[0134]

	杀螟硫磷浓度(ng/mL)											
	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9
结果(T 线)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

[0135] (备注: “+”、“-”分别表示阳性和阴性)

[0136] 由表7、8和图10、11可知, 试纸条检测含量在11ng/mL以上的杀螟硫磷标准液时, 结果都为阳性。对此浓度进一步实验, 发现在检测浓度为11ng/mL的杀螟硫磷时, 可观测到样本试纸条T线。因此, 试纸条的检测灵敏度确定为11ng/mL。

[0137] 由上述实验可得,因为确定了杀螟硫磷抗体的浓度,将检测线定在11ng/mL。当在适当范围内调节杀螟硫磷的浓度可调节试纸条的灵敏度。检测线可变。

[0138] 4)水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺@杀螟硫磷-IgG免疫层析试纸的制备及实验结果

[0139] i)抗原包被液的选择

[0140] 准确量取杀螟硫磷抗原20 μ L配成2 μ L/mL包被液。

[0141] ii)纳米粒子标记抗体浓度的选择

[0142] 配制不同浓度的标记上转换纳米粒子的抗体试样,在980nm光的激发下,观察所划线的发光强度选择最适浓度。

[0143] A:200 μ L含0.05 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0144] B:200 μ L含0.25 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0145] C:200 μ L含0.50 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0146] D:200 μ L含0.75 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液;

[0147] E:200 μ L含1.00 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷-IgG的PBS溶液。

[0148] 实验结果如图12所示

[0149] 表9荧光强度

试 样	A	B	C	D	E
[0150] 1 号荧光亮度	+	++	+++	+	+
2 号荧光亮度	+	++	+++	+	+

[0151] 注:“+”、“-”代表荧光强度

[0152] 如上图所示,在980nm波长光照射NC膜进行结果判定。由包被液筛选结果(表9和图12)可知,标记上转换纳米粒子的抗体试样C:200 μ L含0.50 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷的PBS溶液,NC膜上的线荧光强度最强,其他浓度的试纸条荧光强度就弱。由上述结果可知,在标记上转换纳米粒子的抗体试样中有200 μ L含0.50 μ g/mL β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺/Er³⁺@杀螟硫磷的PBS溶液时最为理想,可作为检测杀螟硫磷含量的备用试纸条。

[0153] 5)水溶性红色 β -NaY(Gd)F₄:Yb³⁺,Er³⁺@杀螟硫磷-IgG免疫层析试纸的制备原理及灵敏度确定。

[0154] 由试纸条原理可知,若同时出现两条红色荧光,则说明样品呈阴性(如图13-A)。当只有一条红色荧光时(如图13-B),样品呈阳性。若两条线都不出现,说明试纸条失败。

[0155] 表10灵敏度的测定(200~1ng)

[0156]

	杀螟硫磷浓度 (ng/mL)							
	200	100	50	20	10	5	2	1
结果(T 线)	+	+	+	+	-	-	-	-

[0157] 注:“+”、“-”分别表示阳性和阴性

[0158] 表11灵敏度的测定(20~10ng)

[0159]

	杀螟硫磷(ng/mL)										
	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10
结果(T线)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

[0160] 注：“+”、“-”分别表示阳性和阴性

[0161] 由表10、11和图14、15可知,试纸条检测含量在20ng/mL以上的杀螟硫磷标准液时,结果都为阳性。对此浓度进一步实验,发现在检测浓度为12ng/mL的杀螟硫磷时,可观测到样本试纸条T线。因此,试纸条的检测灵敏度确定为12ng/mL。

[0162] 由上述实验可得,因为确定了杀螟硫磷抗原的浓度,将检测限定在12ng/mL。当在适当范围内调节杀螟硫磷的浓度可调节试纸条的灵敏度。检测线可变。

[0163] 利用绿色和红色上转换纳米粒子标记杀螟硫磷多克隆抗体荧光探针分别检测螟硫磷农残的实验结果表明,检测杀螟硫磷农残的检测限基本相同。

[0164] 6)基于上转换纳米粒子免疫层析试纸检测农残含量与仪器分析法对比

[0165] i)气相色谱分析水果、蔬菜及原粮中的杀螟硫磷含量与免疫层析试纸检测农药含量对比

[0166] 表12化学试剂一览表

	试剂名称	纯度	生产厂家
[0167]	杀螟硫磷标准品	98%	南京钟鼎生物技术有限公司
	丙酮	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
	二氯甲烷	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
	氯化钠	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
[0168]	无水硫酸钠	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司

[0169] ii)实验仪器

[0170] 岛津气相色谱仪(火焰光度检测器FPD);粉碎机;旋转蒸发仪;5μL进样器。

[0171] iii)样品前处理

[0172] ①分别称取研磨过的苹果、梨、西红柿、黄瓜50.00g,粉碎过经20目筛的大米、小米25.00g置于300mL烧杯中,分别加入100mL丙酮和50mL去离子水,杀螟硫磷标准样2μL(1mg/mL,相当于加2μg标准样),提取2min。

[0173] ②将该混合物经两层滤纸的布氏漏斗减压抽滤。

[0174] ③将滤液转移至200mL的烧杯中,向其中加入10g-15g氯化钠使溶液处于饱和状态。

[0175] ④取处于饱和状态的滤液100mL置于分液漏斗中,猛烈振摇2-3min,静置10min,使丙酮与水分层,分出水相用50mL二氯甲烷振摇2min,再静置分层10min。

[0176] ⑤将丙酮与二氯甲烷的提取液混合与300mL烧杯中,加入30g无水硫酸钠,经布氏漏斗抽滤,用40mL的二氯甲烷分4次洗涤容器和硫酸钠,也经抽滤。

[0177] ⑥将得到的溶液经旋转蒸发仪浓缩至约2mL(相当于1μg/mL),将浓缩液定容到25mL容量瓶中,加入二氯甲烷定容至刻度(相当于40ng/mL)。

[0178] iv)实验条件

[0179] 气体速度:氮气50mL/min、氢气100mL/min,空气50mL

[0180] 温度:柱箱240℃,气化室260℃,检测器270℃

[0181] 进样量:2μL

[0182] v)实验结果与分析

[0183] ①样品中杀螟硫磷的含量计算

$$[0184] \quad X_i = \frac{A_i \times V_1 \times V_3 \times E_{si} \times 1000}{A_{si} \times V_2 \times V_4 \times m \times 1000}$$

[0185] X_i ——i组分杀螟硫磷农药的含量(mg/kg);

[0186] A_i ——试样中i组分的峰面积;

[0187] A_{si} ——混合标准液中i组分的峰面积;

[0188] V_1 ——试样提取液的总体积(mL);

[0189] V_2 ——净化用提取液的总体积(mL);

[0190] V_3 ——浓缩后的定容体积(mL);

[0191] V_4 ——进样体积(μL);

[0192] E_{si} ——注入色谱仪中的i组分的质量(ng);

[0193] m ——试样的质量(g)。

[0194] 表13水果、蔬菜及原粮中的杀螟硫磷含量

[0195]

	梨	苹果	黄瓜	西红柿	大米	小米
加入量(ng)	40	40	40	40	80	80
测定量(ng)	38	43	42	36	77	85
回收率(%)	95	107.5	105	90	96.3	106.3

[0196] 图16为杀螟硫磷标准样的气相色谱,结果如图17-22所示。

[0197] vi)实验结果与试纸条结果对比

[0198] 由表13及图23可知,气相色谱检测时杀螟硫磷加入量为12ng,试纸条可检测出样品呈阴性,符合检测结果。

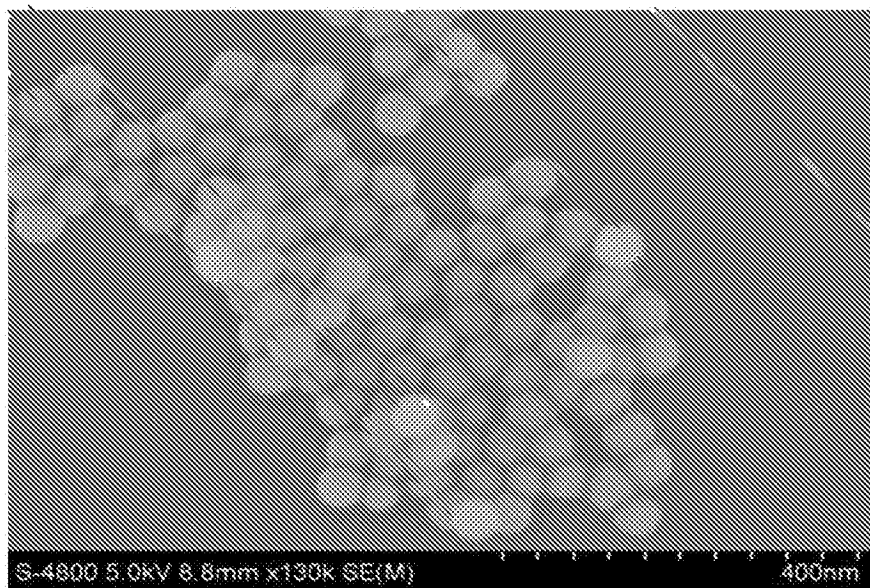


图1

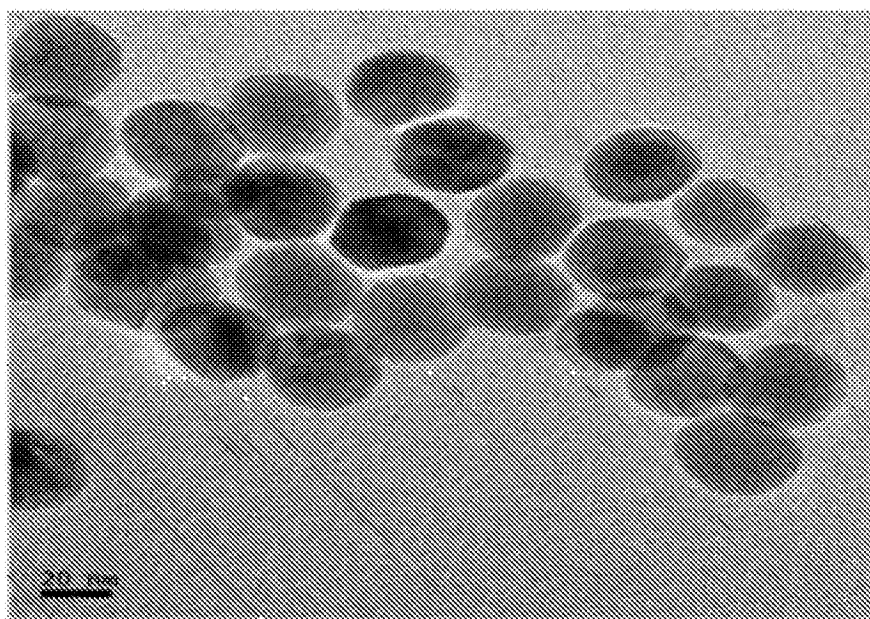


图2

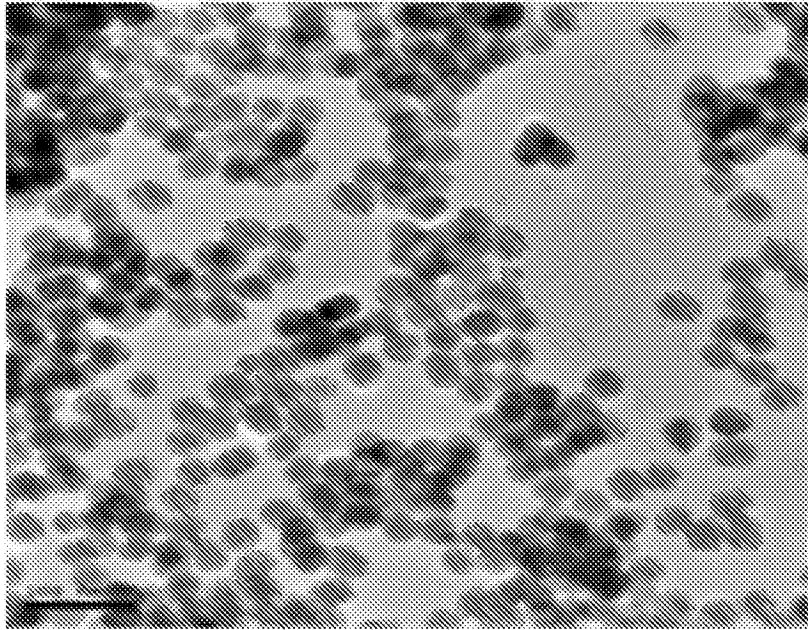


图3

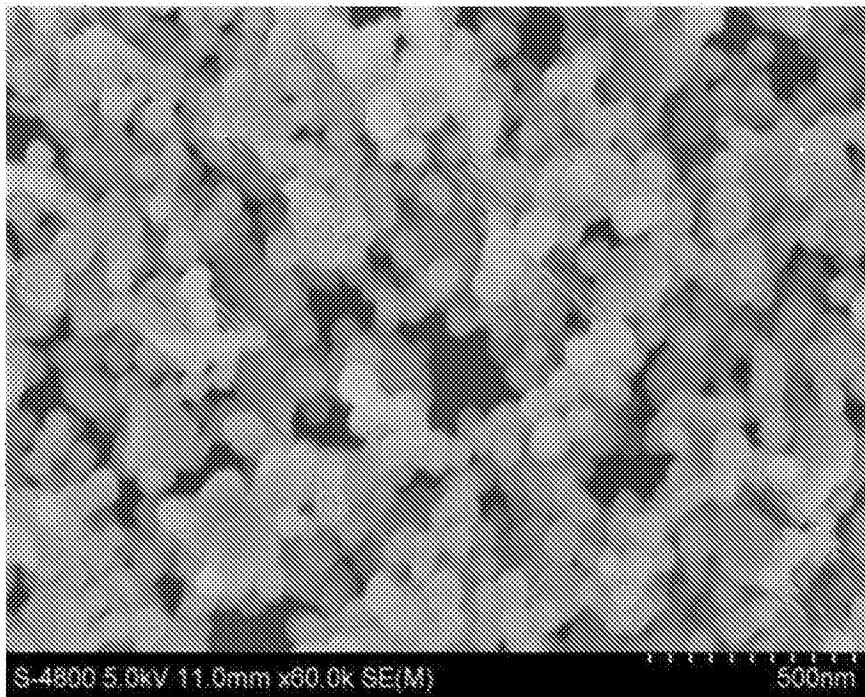


图4

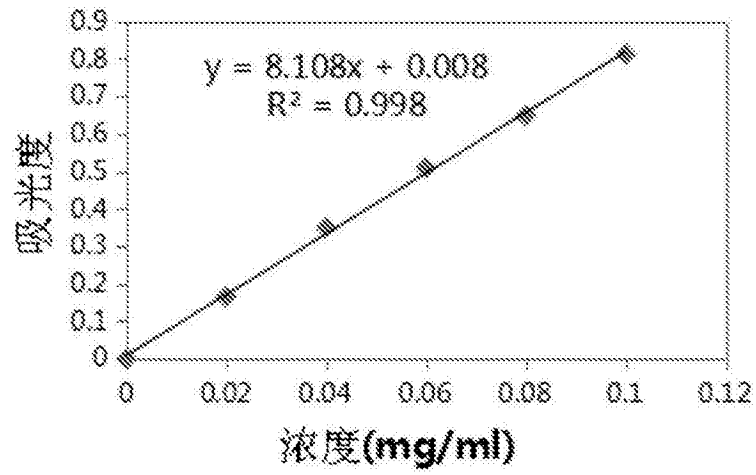


图5

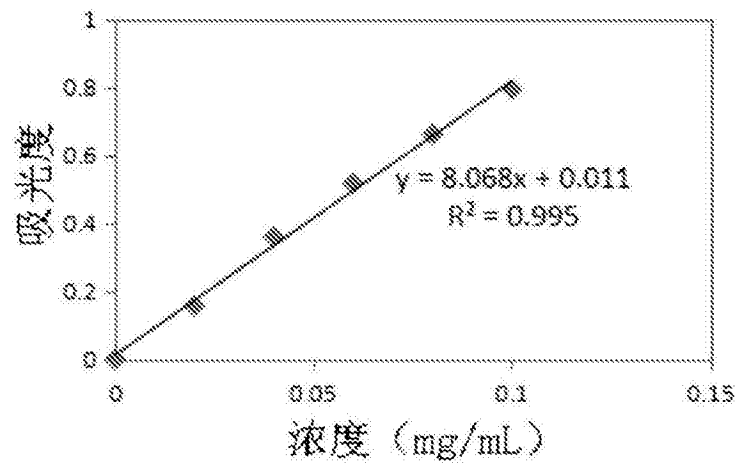


图6

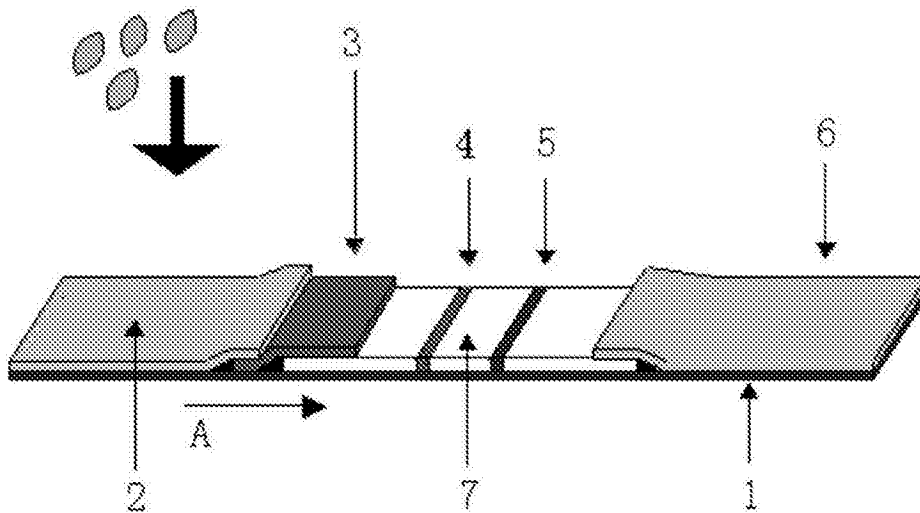


图7

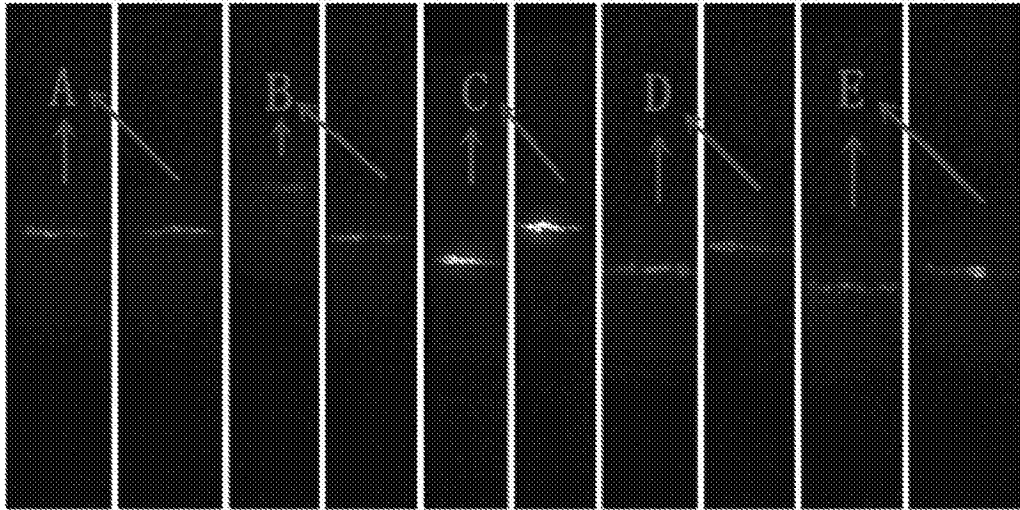


图8

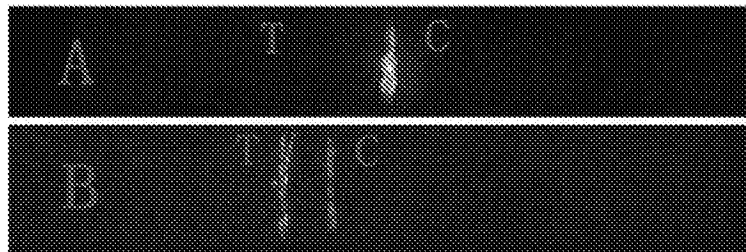


图9

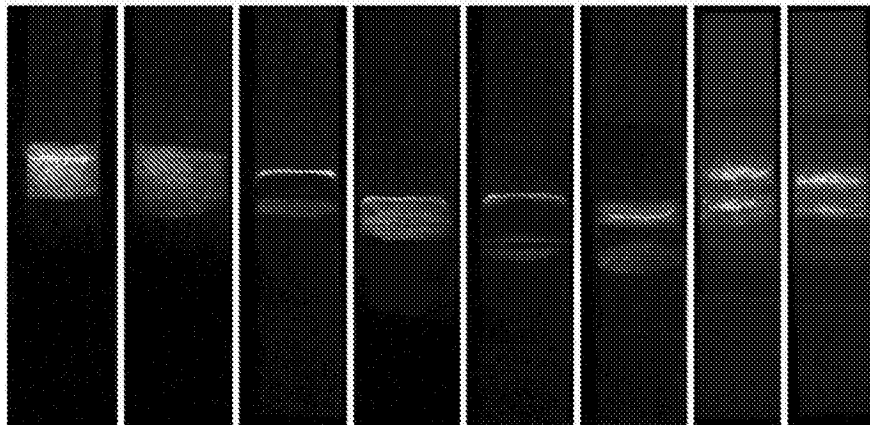


图10

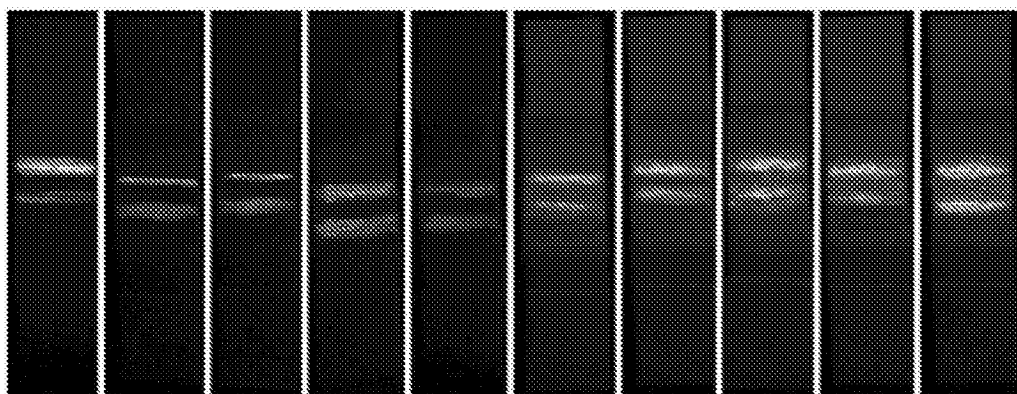


图11

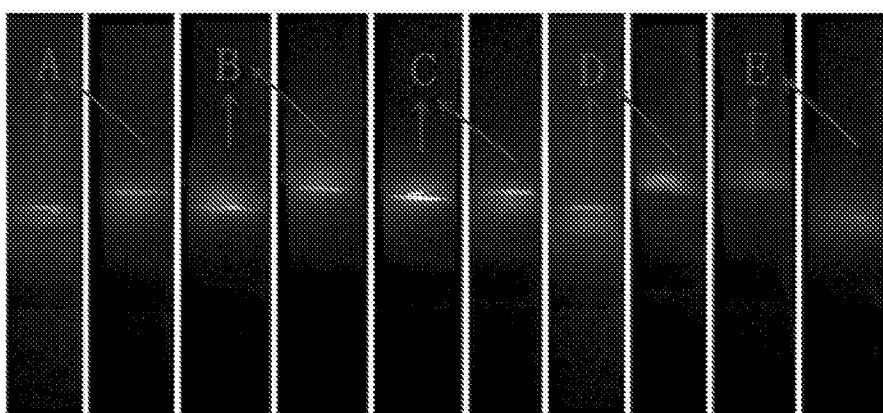


图12

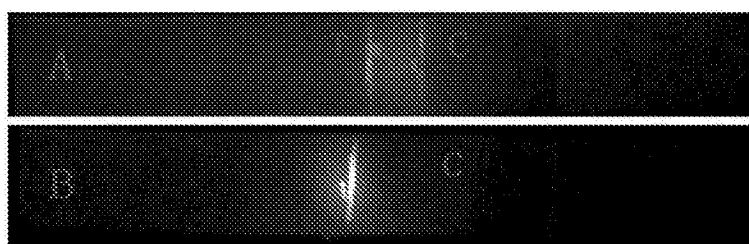


图13

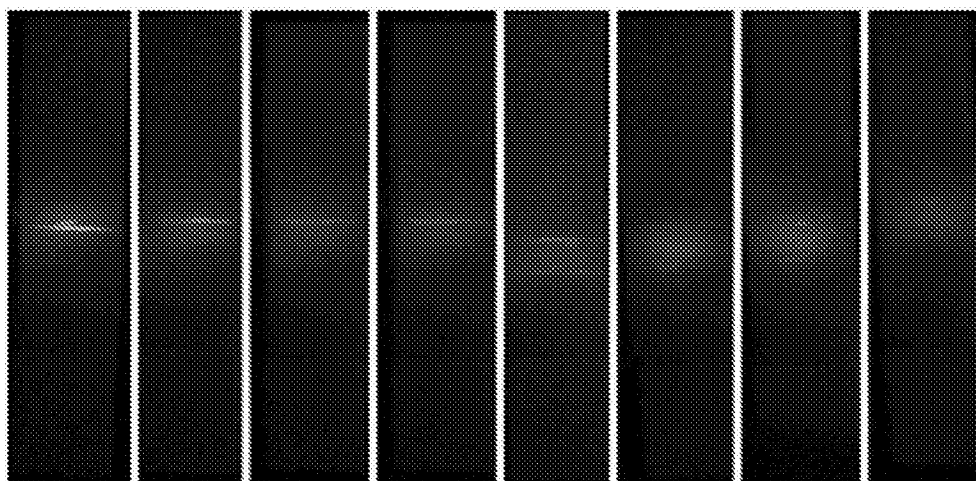


图14

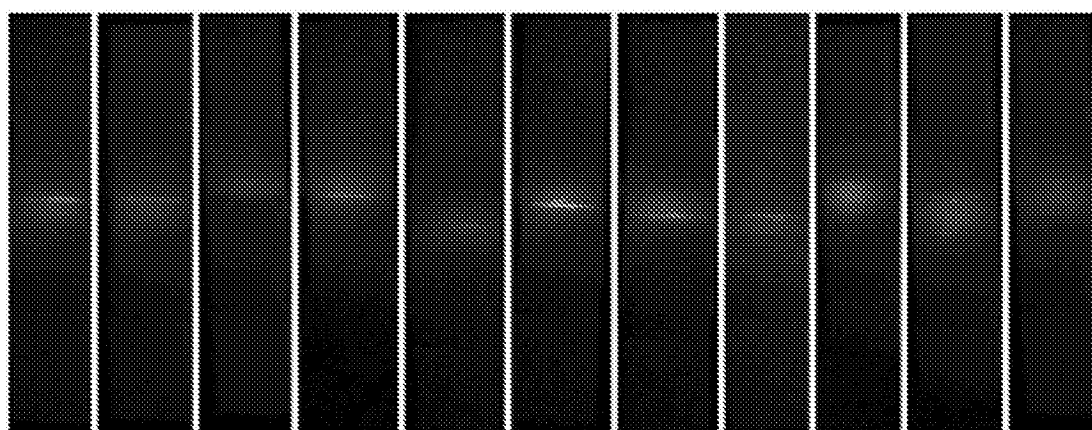


图15

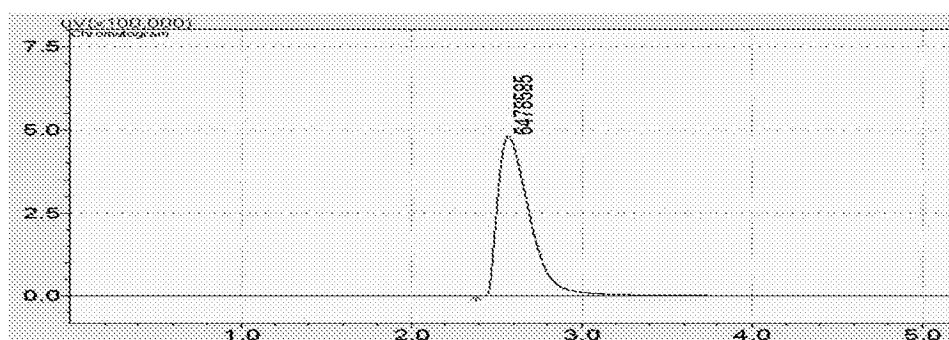


图16

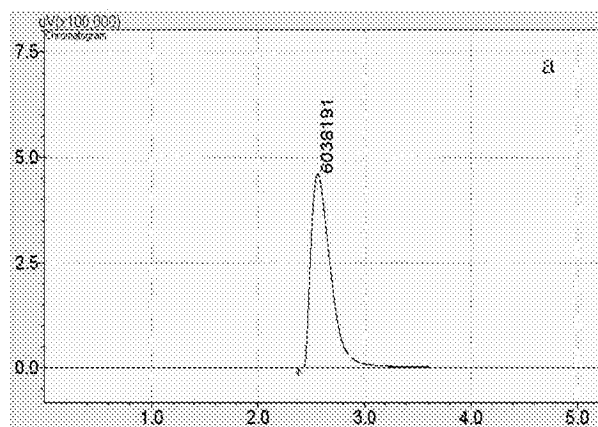


图17

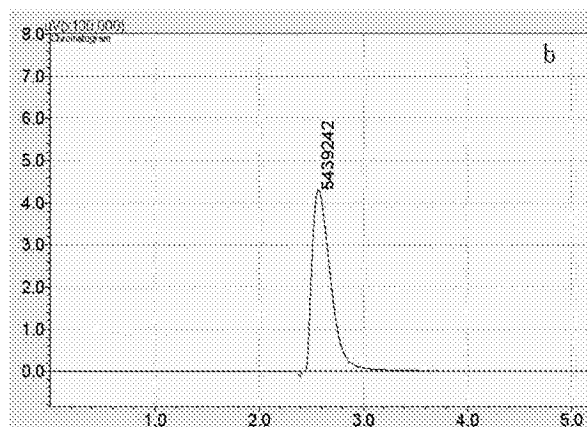


图18

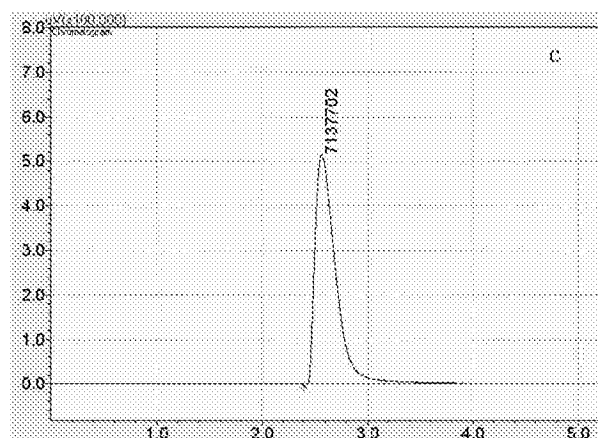


图19

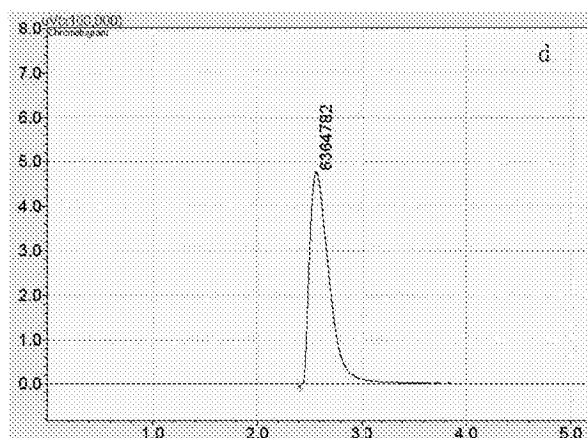


图20

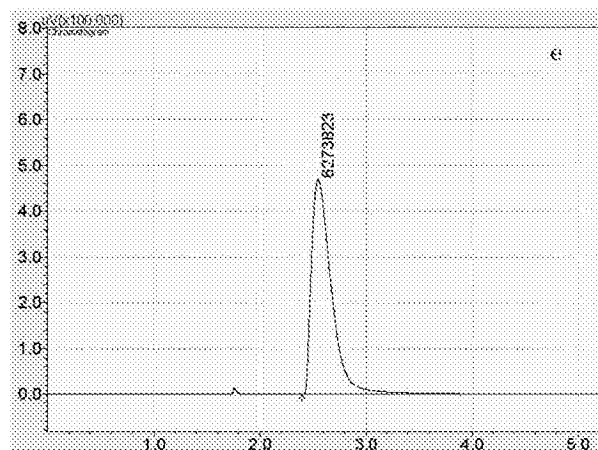


图21

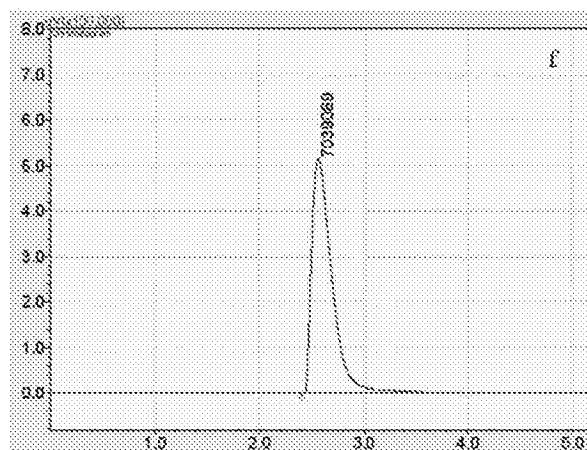


图22

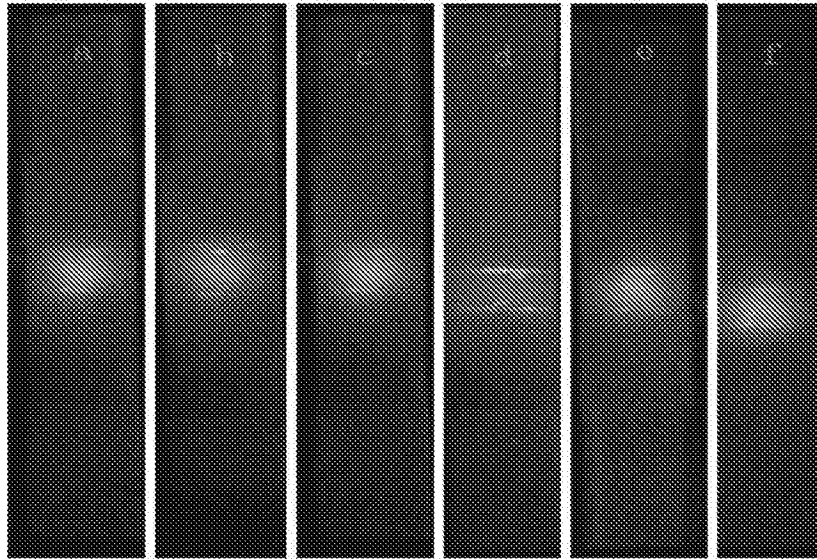


图23

专利名称(译)	一种基于上转换荧光纳米粒子快速检测杀螟硫磷的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN106290830A	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201610589676.8	申请日	2016-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	大连民族学院		
申请(专利权)人(译)	大连民族大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连民族大学		
[标]发明人	华瑞年 国婷婷 张伟 于基成 那立艳		
发明人	华瑞年 国婷婷 张伟 于基成 那立艳		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/558 G01N21/6428 G01N33/531 G01N33/532 G01N2021/6439		
代理人(译)	毕进		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于上转换荧光纳米粒子快速检测杀螟硫磷的免疫层析试纸及其制备方法,属于化学鉴定技术领域领域。本发明的农药试纸包含试纸板、样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元;样品滴加单元、检测单元以及样品回收单元均连接于所述试纸板上;所述检测单元位于所述试纸板的中间;所述检测单元包含抗原包被液以及封闭液。本发明的有益效果为:试纸具有“快速、简便、特异、敏感、低成本”的特点,特别是其“快速、简便”的特点,特别适合于广大基层单位、野外作业人员以及大批量时间紧的检测和面积普查等,显示巨大的发展潜力和应用前景,被认为是食品安全检测最有前途的新技术之一,已成为食品安全检测的主要发展趋势。

