



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108535483 B

(45) 授权公告日 2021.04.30

(21) 申请号 201810283165.2

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2018.04.02

G01N 21/64 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108535483 A

(56) 对比文件

CN 106918583 A, 2017.07.04

CN 107469845 A, 2017.12.15

(43) 申请公布日 2018.09.14

Yan-Mei Wu, et al. Upconversion

(73) 专利权人 军事科学院军事医学研究院环境
医学与作业医学研究所

fluorescence resonance energy transfer

biosensor for sensitive detection of

human immunodeficiency virus antibodies

in human serum.《Chem. Commun.》.2014,第50

卷

地址 300050 天津市和平区大理道1号

(72) 发明人 王江 高志贤 白家磊 彭媛

任舒悦 李双 宁保安

Jian Peng, et al. Sensitive Detection

of Carcinoembryonic Antigen Using

tability-Limited Few-Layer Black

Phosphorus as an Electron Donor and a

Reservoir.《small》.2017,第13卷

(74) 专利代理机构 北京思创大成知识产权代理
有限公司 11614

代理人 高爽

审查员 许珊萍

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

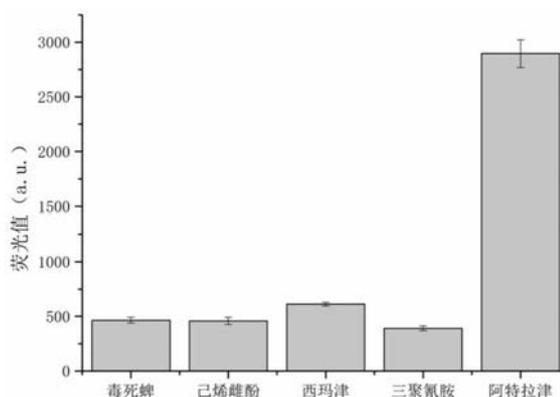
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒及应用和阿特拉津检测方法

(57) 摘要

本发明属于食品安全检测免疫分析技术领域,涉及一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒及应用和阿特拉津检测方法。该试剂盒包括以下组分:(1)羧基化核/壳型上转换纳米颗粒NaYF₄:Yb,Er@NaYF₄:Nd;(2)抗阿特拉津单克隆抗体;(3)黑磷纳米金复合材料分散液。利用该试剂盒或该检测方法,能够高灵敏的检测阿特拉津。



1. 一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括以下组分:

(1) 羧基化核/壳型上转换纳米颗粒 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}$;所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒的粒径为350-400nm;

(2) 抗阿特拉津单克隆抗体;

(3) 黑磷纳米金复合材料分散液;

所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒和所述抗阿特拉津单克隆抗体以羧基化核/壳型上转换纳米颗粒偶联抗阿特拉津单克隆抗体的形式提供;

其中,所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒通过包括以下步骤的方法制备:

(1) 合成上转换纳米颗粒内核:将氧化钇、氧化镱、氧化铒分别与三氟乙酸反应,制得三种三氟乙酸盐,然后将三种三氟乙酸盐与三氟乙酸钠、油酸、1-十八烯和油胺混合反应,制得所述上转换纳米颗粒内核;

(2) 制备核/壳型上转换纳米颗粒:将所述上转换纳米颗粒内核分散于有机溶剂中,加入三氟乙酸钠、三氟乙酸钇、三氟乙酸铒、油酸、1-十八烯进行反应,制得所述核/壳型上转换纳米颗粒;

(3) 制备羧基化核/壳型上转换纳米颗粒:将聚丙烯酸溶液与核/壳型上转换纳米颗粒混合,制得所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒;

其中,所述黑磷纳米金复合材料分散液通过如下方法制得:将黑磷晶体粉末与聚乙烯吡咯烷酮水溶液混合,超声条件下进行反应,反应后离心去除未剥离完全的黑磷晶体沉淀,得到黑磷纳米片;将黑磷纳米片洗净后超声分散于水中,加入氯金酸水溶液,震荡混合反应,离心去上清,清洗沉淀后分散于水中,得到所述黑磷纳米金复合材料分散液。

2. 权利要求1所述的阿特拉津检测试剂盒在检测阿特拉津中的应用。

3. 一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 建立阿特拉津标准曲线:

1-1) 将羧基化核/壳型上转换纳米颗粒偶联抗阿特拉津单克隆抗体用封闭液封闭,离心去上清后用PBS溶液洗涤,复溶于PBS溶液中;

1-2) 加入多个浓度梯度的阿特拉津标准品溶液,震荡孵育;

1-3) 离心去除未连接的小分子,用PBS溶液反复洗涤,复溶于PBS溶液中;

1-4) 加入黑磷纳米金复合材料分散液,剧烈震荡反应,反应结束后离心,用PBS溶液洗涤,除去未连接的黑磷纳米金;

1-5) 加入PBS溶液,进行荧光检测,绘制阿特拉津标准品的浓度与荧光猝灭值的标准曲线;

2) 待测样品中阿特拉津的检测:

2-1) 将羧基化核/壳型上转换纳米颗粒偶联抗阿特拉津单克隆抗体用封闭液封闭,离心去上清后用PBS溶液洗涤,复溶于PBS溶液中;

2-2) 加入含有阿特拉津的待测样品,震荡孵育;

2-3) 离心去除未连接的小分子,用PBS溶液反复洗涤,复溶于PBS溶液中;

2-4) 加入黑磷纳米金复合材料分散液,剧烈震荡反应,反应结束后离心,用PBS溶液洗

涤,除去未连接的黑磷纳米金;

2-5) 加入PBS溶液,进行荧光检测;

2-6) 根据步骤1) 绘制的标准曲线,根据检测到的荧光猝灭值计算待测样品中阿特拉津的浓度。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述多个浓度梯度的阿特拉津标准品溶液的浓度范围为0.01-1000ng/mL。

基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒及应用和 阿特拉津检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测免疫分析技术领域,更具体地,涉及一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒及应用和一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测方法。

背景技术

[0002] 阿特拉津(atrazine),别名莠去津,作为一种广谱除草剂,可防除多种一年生禾本科和阔叶杂草,适用于玉米、高粱、甘蔗、果树、苗圃、林地等旱田作物。然而,大规模的使用阿特拉津会通过各种途径污染食物和饮用水,导致严重的健康风险。美国环境保护署报道,阿特拉津摄入过量可能诱发至关重要的疾病,如低血压、肌肉痉挛和肾上腺损伤。目前,在地下水和地表水中均能检测到阿特拉津残留。因此,世界卫生组织(WHO)制订了饮用水中阿特拉津的最大残留水平(MRLs)为 $2\mu\text{g L}^{-1}$ 。

[0003] 目前已建立起的阿特拉津的检测方法主要包括大型仪器分析方法(HPLC,HPLC/MS等),生物传感器,免疫分析等。大型仪器方法需要昂贵的仪器,耗时的样品预处理以及复杂的检测程序。而ELISA作为传统免疫分析检测方法已经在部分地区广泛使用,但在实际样品(如玉米、甘蔗等)的检测过程中,容易受到食品中复杂成分的影响,从而使得该方法在检测的灵敏度和准确性上仍存在一定的缺陷。

[0004] 因此,建立食品中阿特拉津的高灵敏度检测方法对于绿色农业生产及保障民生健康具有十分重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒及应用和一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测方法,利用该试剂盒或该检测方法,能够高灵敏的检测阿特拉津。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测试剂盒,该试剂盒包括以下组分:

[0007] (1) 羧基化核/壳型上转换纳米颗粒 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er@NaYF}_4:\text{Nd}$ (绿色);

[0008] (2) 抗阿特拉津单克隆抗体;

[0009] (3) 黑磷纳米金复合材料分散液。

[0010] 根据本发明,所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒和所述抗阿特拉津单克隆抗体可分别提供,也可以羧基化核/壳型上转换纳米颗粒偶联抗阿特拉津单克隆抗体的形式提供。

[0011] 本发明的原理是采用上转换标记单克隆抗体与目标物特异性结合的免疫分析模式。制备羧基化核/壳型上转换纳米颗粒(绿色),构建“上转换/抗体”结构复合物。制备出吸收全波长可见光的“黑磷纳米金复合材料”,实现对“上转换/抗体”结构复合物的快速吸附,

通过荧光共振能量转移将“上转换/抗体”结构复合物的荧光猝灭。目标物阿特拉津可被单克隆抗体特异性识别,从而引起抗体构象改变,“黑磷纳米金复合材料”吸附蛋白能力降低,从而导致“上转换/抗体”结构复合物荧光猝灭强度降低。利用荧光定量检测“上转换/抗体”结构复合物的荧光强度实现对阿特拉津的间接定量。

[0012] 基于上述原理,所述羧基化壳/核型上转换纳米颗粒 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er@NaYF}_4:\text{Nd}$ (绿色)粒径为350-400nm,特定尺寸的颗粒能够进一步提高检测的灵敏度。

[0013] 本发明中阿特拉津单克隆抗体既要具有一定特异性识别阿特拉津的活性,又要能够与上转换颗粒偶联用于后续检测。本发明可以采用任何能够实现上述目的阿特拉津单克隆抗体。

[0014] 根据本发明,所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er@NaYF}_4:\text{Nd}$ 通过包括以下步骤的方法制备:

[0015] (1) 合成上转换纳米颗粒内核:将氧化钇、氧化镱、氧化铒分别与三氟乙酸反应,制得三种三氟乙酸盐,然后将三种三氟乙酸盐与三氟乙酸钠、油酸、1-十八烯和油胺混合反应,制得所述上转换纳米颗粒内核;

[0016] (2) 制备核/壳型上转换纳米颗粒:将所述上转换纳米颗粒内核分散于有机溶剂中,加入三氟乙酸钠、三氟乙酸钇、三氟乙酸铒、油酸、1-十八烯进行反应,制得所述核/壳型上转换纳米颗粒;

[0017] (3) 制备羧基化核/壳型上转换纳米颗粒:将聚丙烯酸溶液与核/壳型上转换纳米颗粒混合,制得所述羧基化核/壳型上转换纳米颗粒。

[0018] 根据本发明,所述黑磷纳米金复合材料分散液可通过如下方法制得:将黑磷晶体粉末与聚乙烯吡咯烷酮水溶液混合,超声条件下进行反应,反应后离心去除未剥离完全的黑磷晶体沉淀,得到黑磷纳米片;将黑磷纳米片洗净后超声分散于水中,加入氯金酸水溶液,震荡混合反应,离心去上清,清洗沉淀后分散于水中,得到所述黑磷纳米金复合材料分散液。

[0019] 本发明中所述黑磷纳米金复合材料的厚度为15nm。特定层数(5-10层)的黑磷纳米片分散液可以满足原位合成黑磷纳米金复合材料的要求。

[0020] 本发明的第二方面提供上述阿特拉津检测试剂盒在检测阿特拉津中的应用。

[0021] 本发明的第三方面提供一种基于上转换荧光免疫传感器的阿特拉津检测方法,该方法包括以下步骤:

[0022] 1) 建立阿特拉津标准曲线:

[0023] 1-1) 将羧基化核/壳型上转换纳米颗粒偶联抗阿特拉津单克隆抗体用封闭液封闭,离心去上清后用PBS溶液洗涤,复溶于PBS溶液中;

[0024] 1-2) 加入多个浓度梯度的阿特拉津标准品溶液,震荡孵育;

[0025] 1-3) 离心去除未连接的小分子,用PBS溶液反复洗涤,复溶于PBS溶液中;

[0026] 1-4) 加入黑磷纳米金复合材料分散液,剧烈震荡反应,反应结束后离心,用PBS溶液洗涤,除去未连接的黑磷纳米金;

[0027] 1-5) 加入PBS溶液,进行荧光检测,绘制阿特拉津标准品的浓度与荧光猝灭值的标准曲线;

[0028] 2) 待测样品中阿特拉津的检测:

[0029] 2-1) 将羧基化核/壳型上转换纳米颗粒偶联抗阿特拉津单克隆抗体用封闭液封闭,离心去上清后用PBS溶液洗涤,复溶于PBS溶液中;

[0030] 2-2) 加入含有阿特拉津的待测样品,震荡孵育;

[0031] 2-3) 离心去除未连接的小分子,用PBS溶液反复洗涤,复溶于PBS溶液中;

[0032] 2-4) 加入黑磷纳米金复合材料分散液,剧烈震荡反应,反应结束后离心,用PBS溶液洗涤,除去未连接的黑磷纳米金;

[0033] 2-5) 加入PBS溶液,进行荧光检测;

[0034] 2-6) 根据步骤1) 绘制的标准曲线,根据检测到的荧光猝灭值计算待测样品中阿特拉津的浓度。

[0035] 其中,所述多个浓度梯度的阿特拉津标准品溶液的浓度范围优选为0.01-1000ng/mL。

[0036] 本发明的试剂盒和方法能够高灵敏的、高特异性的实现样品中阿特拉津的检测。检测限可达到9.2pg/mL。

[0037] 本发明的其它特征和优点将在随后具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

[0038] 通过结合附图对本发明示例性实施方式进行更详细的描述,本发明的上述以及其它目的、特征和优势将变得更加明显。

[0039] 图1为上转换颗粒和上转换颗粒偶联单抗后的荧光光谱图。

[0040] 图2为黑磷以及黑磷纳米金分散液的紫外吸收光谱图。

[0041] 图3为以阿特拉津标准品的浓度为横坐标,各浓度对应的荧光猝灭值为纵坐标绘制的标准曲线。

[0042] 图4为基于上转换荧光免疫传感器检测阿特拉津特异性实验的响应图。

具体实施方式

[0043] 下面将更详细地描述本发明的优选实施方式。虽然以下描述了本发明的优选实施方式,然而应该理解,可以以各种形式实现本发明而不应被这里阐述的实施方式所限制。

[0044] 实施例中未注明的具体条件者,皆按照常规条件或制造商建议的条件进行,实验中所用到的阿特拉津及其类似物标准品购自百灵威公司,鼠抗阿特拉津单克隆抗体由本实验室制备并纯化(王彩红.阿特拉津与氨苄青霉素单抗制备、鉴定及ELISA方法的初步建立[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2010:42-66.)。黑磷晶体粉末购自先丰纳米公司。F97Pro荧光分光光度计购自上海棱光技术有限公司。

[0045] 实施例1

[0046] 一、核/壳上转换颗粒标记抗阿特拉津抗体的制备

[0047] 1) 核/壳上转换颗粒($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er@NaYF}_4:\text{Nd}$) 合成方法

[0048] ①使用王水清洗所有的玻璃器皿,用去离子水充分清洗,然后在100°C干燥箱中烘干。

[0049] ②制备稀土元素三氟乙酸前驱体:准确称量稀土元素氧化物(氧化钇、氧化镱、氧化铕)各10mmol分别加入到三个20mL两口瓶中,安装冷凝回流装置,固定于油浴锅中,将温

度升至80℃。缓慢磁力搅拌下加入60mmol三氟乙酸,保持温度反应24h。反应结束后于真空干燥箱中60℃干燥12h。得到的稀土三氟乙酸盐收集后放置于恒温恒湿干燥箱中保存。

[0050] ③合成上转换颗粒($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$)内核:准确称量1mmol的稀土三氟乙酸盐($\text{Y}:\text{Yb}:\text{Er}=78\%:20\%:2\%$)和1mM的三氟乙酸钠于100mL四口瓶中,量取10mmol的油酸、20mmol的1-十八烯和10mmol的油胺加入瓶中。加入耐高温磁力搅拌转子后,将四口瓶转移到磁力搅拌电加热套中,搅拌缓慢升温至110℃,使用真空泵抽真空10min除去反应体系中的水汽。随后在氮气保护下快速升温至300℃,保持30min。反应结束,降至室温后加入无水乙醇沉淀颗粒,16000rpm离心分离沉淀,用无水乙醇清洗沉淀3次。收集产物,重新分散于20mmol油酸和20mmol的1-十八烯中,随后加入1mmol三氟乙酸钠,将物质转移到100mL四口瓶中,磁力搅拌缓慢升温至110℃,使用真空泵抽真空10min除去反应体系中的水汽。随后在氮气保护下快速升温至325℃,保持30min。反应结束,降至室温后加入环己烷,13000rpm离心分离沉淀,用环己烷清洗沉淀3次。收集产物,得到合成上转换颗粒(绿色)内核。

[0051] ④合成核/壳型上转换颗粒($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}$):将上一步得到的上转换颗粒内核重新分散于10mL环己烷中,形成均一溶液,取5mL加入到100mL三口瓶中,随后加入1mmol三氟乙酸钠、0.8mmol三氟乙酸钇、0.2mmol三氟乙酸铈、20mmol油酸和20mmol 1-十八烯。磁力搅拌缓慢升温至110℃,使用真空泵抽真空10min除去反应体系中的水汽。随后在氮气保护下快速升温至325℃,保持30min。反应结束,降至室温后加入体积比1:1的环己烷/无水乙醇溶液,11000rpm离心分离沉淀,清洗沉淀3次,于真空干燥箱中60℃干燥12h。收集产物,得到核/壳型上转换颗粒(绿色)。

[0052] 2) 羧基化核/壳上转换颗粒标记抗阿特拉津抗体的制备

[0053] ①配制质量分数为1%的聚丙烯酸溶液:量取10mL无水乙醇于25mL烧杯中,称其质量,然后称量无水乙醇质量的1%质量的聚丙烯酸加入其中,搅拌混匀。

[0054] ②配制质量分数为1%的核/壳上转换颗粒分散液:量取5mL三氯甲烷于25mL烧杯中,称其质量,然后称量三氯甲烷质量的1%质量干燥的核/壳上转换颗粒粉末加入其中,超声形成均一溶液。

[0055] ③羧基化核/壳上转换颗粒:将配制好的聚丙烯酸溶液加入到上转换颗粒分散液中,室温磁力搅拌反应24h。反应结束加入无水乙醇,11000rpm离心分离沉淀,清洗沉淀3次,于60℃真空干燥箱中干燥12h。收集产物,得到羧基化核/壳型上转换颗粒。

[0056] ④羧基化上转换颗粒标记抗阿特拉津抗体:将一定量的羧基化上转换颗粒粉末溶于0.01M(pH7.4)PBS缓冲液中,浓度为0.5mg mL⁻¹。用PBS缓冲液配置浓度均为0.2mg mL⁻¹的EDC和NHS溶液。羧基化上转换溶液与EDC和NHS溶液以体积比1:2:1的比例混合后,37℃恒温震荡孵育2h活化颗粒表面的羧基。反应结束后,11000rpm离心分离沉淀,用PBS清洗沉淀3次后重新分散于PBS中。将初始浓度为5mg mL⁻¹的抗阿特拉津单克隆抗体从-20℃冰箱取出,于4℃解冻,用PBS将其稀释至1μg mL⁻¹,取与上转换颗粒等体积的抗体加入其中。37℃恒温震荡孵育2h,确保均匀混合。反应结束后,11000rpm离心分离沉淀,用PBS清洗沉淀3次后重新分散于PBS中,于4℃保存。

[0057] 对合成的羧基化上转换颗粒及标记抗体后的上转换颗粒进行荧光表征。结果如图1所示。

[0058] 取一定量的羧基化核/壳型上转换颗粒超声分散于PBS中,确保形成均一溶液且浓

度为 0.5mg mL^{-1} 。取分散于PBS中的标记抗阿特拉津抗体的上转换颗粒溶液 $500\mu\text{L}$ 。采用荧光分光光度计测量羧基化上转换颗粒及标记抗体后的上转换颗粒的荧光光谱。(上样量为 $500\mu\text{L}$,激发波长为 980nm ,激发带宽为 10nm ,激发电流为 0.27IA 。)

[0059] 二、黑磷纳米金分散液的制备

[0060] 1) 二维黑磷纳米片分散液的制备方法

[0061] 采用液相剥离黑磷晶体粉末来制备二维黑磷纳米片:

[0062] ①称量 10mg 聚乙烯吡咯烷酮于 50mL 离心管中,加入 20mL 双蒸水,超声溶解形成均一溶液。通入氩气 15min 以充分除去管中的氧气和水汽。

[0063] ②称量 10mg 黑磷晶体粉末加入离心管中,连续超声 30h (采用循环水确保超声过程中反应体系温度低于 25°C)。

[0064] ③反应结束后得到灰色均一溶液, 1000rpm 离心 20min 去除未剥离完全的黑磷晶体沉淀,收集上清于避光瓶中 4°C 保存。

[0065] 2) 黑磷纳米金复合材料分散液的制备方法

[0066] ①将黑磷纳米片分散液从 4°C 冰箱中取出, 12000rpm 离心 20min ,去上清,沉淀用双蒸水清洗3次,尽量将黑磷表面的PVP洗净。

[0067] ②将沉淀超声分散于双蒸水中形成均一溶液后, 1mL 黑磷纳米片分散液加入 $10\mu\text{L}$ 配置好的 1mM 的氯金酸水溶液。放置于涡旋振荡器上缓慢震荡 5min 。反应后 12000rpm 离心 5min 去上清,用双蒸水反复清洗沉淀,超声分散于双蒸水中,即得到浓度为 0.5mg/mL 的黑磷纳米金分散液,于避光瓶中 4°C 保存。

[0068] ③如图2所示,采用紫外分光光度计测量黑磷纳米片及黑磷纳米金分散液的紫外吸收峰。

[0069] 实施例2

[0070] 用于检测阿特拉津的上转换免疫传感器的应用方法。

[0071] 1) 将 $500\mu\text{L}$ 抗体修饰的上转换颗粒(0.5mg/mL)采用 1% BSA封闭液进行封闭, 37°C 下封闭 1h 。 11000rpm 离心 5min ,弃去上清液,使用 0.01M 的PBS反复洗涤,每次 5min ,复溶于 $500\mu\text{L}$ 的PBS中。

[0072] 2) 加入一定浓度稀释的(0.01ng mL^{-1} 、 0.1ng mL^{-1} 、 1ng mL^{-1} 、 10ng mL^{-1} 、 100ng mL^{-1} 、 1000ng mL^{-1})阿特拉津标准品,添加量 $500\mu\text{L}$, 37°C 下缓慢震荡孵育 1h 。

[0073] 3) 反应结束后, 11000rpm 离心 5min ,除去未连接的小分子,用PBS溶液反复洗涤,复溶于 $500\mu\text{L}$ PBS中。

[0074] 4) 加入黑磷纳米金(0.5mg/mL) $500\mu\text{L}$,剧烈震荡反应 10min ,形成结构复合物(UCP-mAb@BP-Au)。

[0075] 5) 反应结束后, 11000rpm 离心 10min ,用 $500\mu\text{L}$ 的PBS缓冲液反复冲洗5次,除去未连接的黑磷纳米金。

[0076] 6) 加入 $500\mu\text{L}$ PBS溶解结构复合物,用于荧光定量检测。

[0077] 7) 荧光定量检测:在以上实验条件的情况下,测量反应后上转换对应的荧光峰值,对应一系列稀释浓度的阿特拉津标准样品($0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000\text{ng mL}^{-1}$),绘制标准曲线。如图3所示,荧光值F值随着阿特拉津浓度的增加而增加,该趋势可以做如下解释:将不同浓度的阿特拉津小分子加入到离心管反应,上转换颗粒上的单克隆抗体通过特异性识别

捕获环境中阿特拉津,经过分离后加入的猝灭元件黑磷金,会吸附在磁颗粒表面的未识别小分子的阿特拉津抗体,形成结构复合物,猝灭上转换颗粒的荧光,而结合了小分子的抗体不能被猝灭元件吸附,其连接的上转换颗粒荧光不会被猝灭。因此,阿特拉津的浓度与上转换颗粒的荧光存在正相关关系。因此当体系中阿特拉津浓度较高时,对应抗体结合的小分子增加,猝灭元件可以捕获的抗体减少,上转换荧光猝灭减少,从而通过荧光定量产生荧光值增加。以阿特拉津的浓度为横坐标,荧光值为纵坐标,得到标准曲线方程为 $F = -2.85771gC + 19.2573, R^2 = 0.9914$,如图3所示。检出限为 9.2pg mL^{-1} 。

[0078] 实施例3

[0079] 用于检测阿特拉津的上转换荧光免疫传感器的特异性实验。

[0080] 1) 将 $500\mu\text{L}$ 抗体修饰的上转换颗粒(0.5mg/mL)采用 1% BSA封闭液进行封闭, 37°C 下封闭 1h 。 11000rpm 离心 5min ,弃去上清液,使用 0.01M 的PBS反复洗涤,每次 5min ,复溶于 $500\mu\text{L}$ 的PBS中。

[0081] 2) 分别于不同管中加入 $500\mu\text{L}$ (500ng/mL) 的毒死蜱、己烯雌酚、西马津、三聚氰胺、阿特拉津标准品。 37°C 下缓慢震荡反应 1h 。

[0082] 3) 反应结束后, 11000rpm 离心 5min ,除去未连接的小分子,用PBS溶液反复洗涤,复溶于 $500\mu\text{L}$ PBS中。

[0083] 4) 加入黑磷纳米金(0.5mg/mL) $500\mu\text{L}$,剧烈震荡反应 10min ,形成结构复合物(UCP-mAb@BP-Au)。

[0084] 5) 反应结束后, 11000rpm 离心 10min ,用 $500\mu\text{L}$ 的PBS缓冲液反复冲洗 5 次,除去未连接的黑磷纳米金。

[0085] 6) 加入 $500\mu\text{L}$ PBS溶解结构复合物,用于荧光定量检测。

[0086] 根据优化的实验条件下研究了上转换荧光免疫传感器检测阿特拉津的特异性:使用具有相同浓度的 500ng mL^{-1} 的结构或功能类似物毒死蜱、己烯雌酚、西马津和三聚氰胺作为非特异性小分子来证明该检测体系的特异性。而阿特拉津(500ng mL^{-1})的荧光值高于毒死蜱、己烯雌酚、西马津和三聚氰胺(图4)。该结果表明,上转换荧光免疫传感器对于阿特拉津检测具有优异的特异性。

[0087] 以上已经描述了本发明的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。

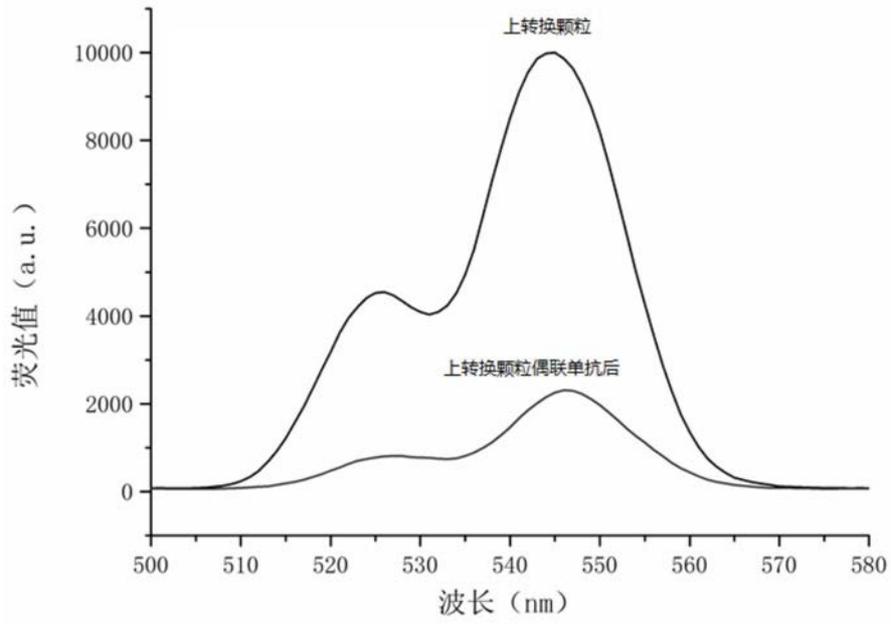


图1

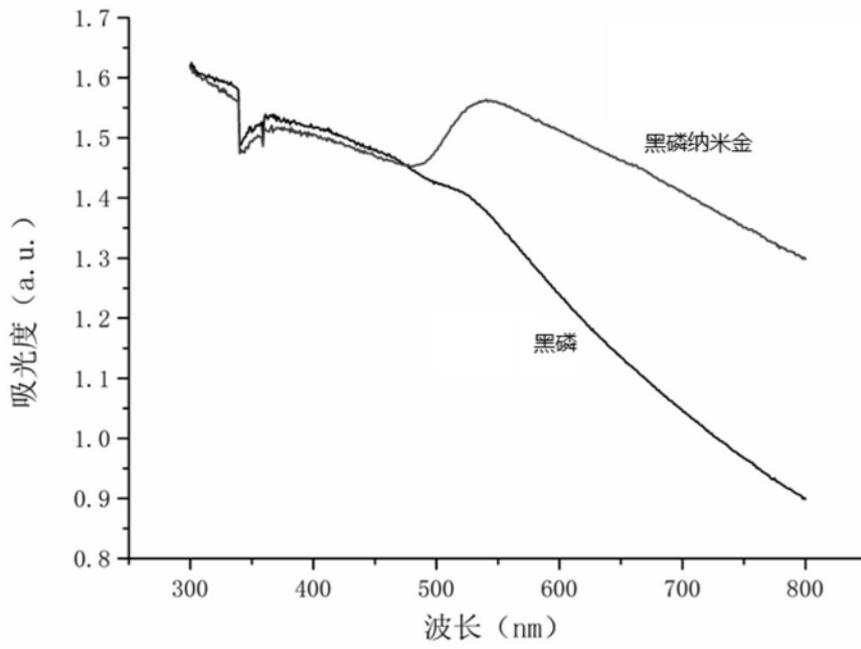


图2

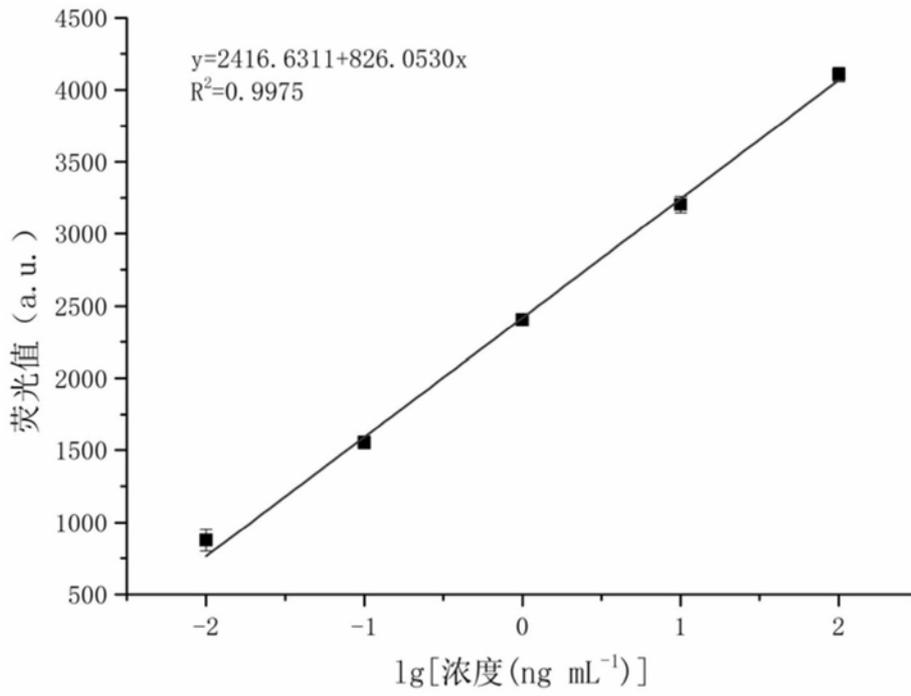


图3

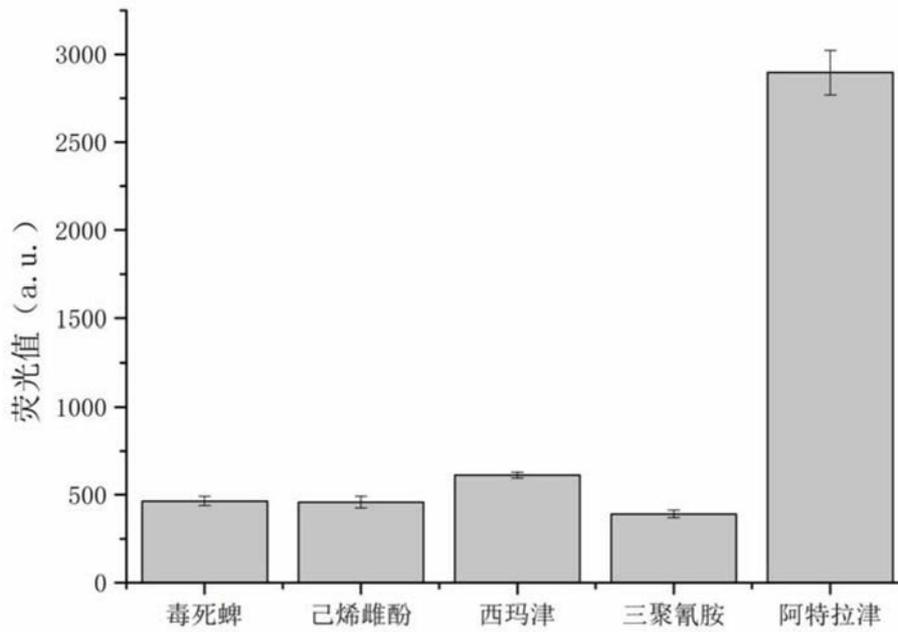


图4