基于荧光纳米颗粒免疫层析技术的毒死蜱快筛试纸的研制

秦斌[1,2]，王炳志[3]，闫研[1,2]，王铁杰[1,2]，殷果[1,2*]，许稳健[3]，严义勇[3](1.深圳市药品检验研究院，深圳 518057；2.深圳药品质量标准研究重点实验室，深圳 518057；3.深圳市易瑞生物技术股份有限公司，深圳 518101)

摘要：目的 研制快速检测中药材中毒死蜱的快筛试纸。**方法** 采用免疫层析技术，以 CdTe@SiO2 荧光纳米颗粒为标记物制备毒死蜱单抗-荧光纳米颗粒偶联物，以竞争抑制模式制备毒死蜱荧光免疫层析试纸条。**结果** 该试纸条对中药中毒死蜱的检出限为 25 ng·g^{-1}。从开始制样到检测出结果仅需 15~20 min。**结论** 该法操作简便，具有较高的灵敏度和特异性，可广泛应用于中药材中毒死蜱残留的现场筛查和检测。

关键词：双功能荧光纳米颗粒；毒死蜱；试纸条

中图分类号：R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2019)11-1348-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.11.007

引用本文：秦斌, 王炳志, 闫研, 等. 基于荧光纳米颗粒免疫层析技术的毒死蜱快筛试纸的研制[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(11): 1348-1351.

Development of Chlorpyrifos Test Strip Base on Bifunctional Fluorescent Nanoparticles Immune Chromatography Technology

QIN Bin[1,2], WANG Bingzhi[3], YAN Yan[1,2], WANG Tiejie[1,2], YIN Guo[1,2*], XU Wenjian[3], YAN Yiyong[3] (*1.Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China; 2.Shenzhen Key Laboratory of Drug Quality Standard Research, Shenzhen 518057, China; 3.Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518101, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To make chlorpyrifos test strip for on-site rapid screening and identification of chlorpyrifos in traditional Chinese medicine. **METHODS** CdTe@SiO2 fluorescent nanoparticle conjugated covalently with monoclonal antibody against chlorpyrifos was employed in the development of lateral flow strip assay by using the immunofluorescence technique. **RESULTS** This rapid test strip had a detection limit as low as 0.25 ng·kg^{-1}. It was easy of use and only takes 15–20 min to finish the test. **CONCLUSION** It is very simple in operation, high in sensitivity and specificity, and can be widely used in Chinese medicine screening and detection of chlorpyrifos residue.

KEYWORDS: bifunctional fluorescent nanoparticles; chlorpyrifos; lateral flow strip

毒死蜱是一种触杀式有机磷低毒化学农药，由于其在防治病虫害方面具有很好的效果，在我国农作物和药材生产中广泛使用。但过高的毒死蜱残留量会引起人体中毒、反应迟钝、神经系统麻痹、呼吸受阻等[1]。目前农药残留的测定方法主要有气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱法(LC-MS)等，依托相应的前处理方法能够获得较高的灵敏度[2-4]，但所涉及仪器设备成本高，操作复杂。为满足现场快速检测的要求，本研究将荧光纳米颗粒进行表面修饰，并与毒死蜱的特异性抗体进行偶联，研制了毒死蜱纳米荧光免疫层析快速检测试纸条。与传统的胶体金免疫层析技术相比，该荧光试纸条除了操作简单、快速和信号稳定外，还具有强抗光漂白能力，并且受溶剂影响小[5]，适用于有机磷等水溶性较差的目标物的快速检测。

1　材料

毒死蜱对照品购自 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司；2($CdCl_2$)·5(H_2O)、硼氢化钠、碲粉、巯基乙酸(mercapto acetic acid，TGA)、2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid，MES)、*N*-羟基硫代琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt，NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride，EDC]、牛血清蛋白(bovine serum albumin，BSA)均购自上海阿拉丁试剂有限公司；海藻糖、蔗糖、Triton X-100、吐温-20、叠氮钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)均购自百灵威科技有限公司；毒死蜱单克隆抗体由深圳市易瑞生物技术股份有限公司开发(其抗体浓度

基金项目：广东省科技计划项目(2015A030401018，2016A040403022)

作者简介：秦斌，男，副主任药师　Tel: 13632806330　E-mail: dinal29@126.com　***通信作者：**殷果，女，硕士，主任药师　Tel: 13926503730　E-mail: ayinguoa@126.com

2.5 mg·mL^{-1})；羊抗鼠 IgG 购自华美生物公司。所有试剂如无特殊说明均为分析纯。

PVC 衬板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸收垫购自美国 Millipore 公司；EASY-01 便携式荧光检测仪(深圳市易瑞生物技术股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 荧光纳米颗粒的制备[5]

称取 0.457 g 2($CdCl_2$)·5(H_2O)至盛有 100 mL 水的 250 mL 三颈烧瓶中，加入 0.334 mL TGA，用氢氧化钠(1 mol·L^{-1})调节溶液 pH 至 11。高速搅拌 10 min 后加入新配制的 NaHTe(由硼氢化钠和碲粉混合后超声制得)水溶液(各物质的量摩尔比：$CdCl_2$ ∶ TGA ∶ NaHTe=1 ∶ 2.4 ∶ 0.6)，加热回流 2~8 h 制得 CdTe，该反应须在氮气保护下进行。随后，称取 7.5 g 环己烷、2.27 g Triton X-100、1.94 g 正辛醇和 0.5 mL 水于烧瓶中制得 W/O 型微乳液，加入 420 μL CdTe，搅拌 5 min 后加入 120 μL 硅酸四乙酯(TEOS)与 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APS)的混合溶液，搅拌均匀后再加入 100 μL 浓氨水，室温下避光反应 24 h。加入 10 mL 丙酮终止反应，高速离心 10 min，弃上清，用乙醇和水分别洗涤 3 次，烘干得 SiO_2 包裹的 CdTe 纳米颗粒(CdTe@SiO_2)，用蒸馏水分散纳米颗粒，制成 1.0 mg·mL^{-1} 悬浮液备用。

2.2 荧光纳米颗粒-抗体偶联物制备[6]

吸取 30 μL 荧光纳米颗粒(1 mg·mL^{-1})加至 300 μL MES(50 mmol·L^{-1})中，再加入 100 μL NHS(10 mg·mL^{-1})及 EDC(10 mg·mL^{-1})，摇床中震荡混匀 30 min。低温高速离心，弃去上清液，用 500 μL MES(50 mmol·L^{-1})重悬颗粒，加入适量毒死蜱单克隆抗体，摇床中震荡 1 h。再加入 500 μL 5% BSA 封闭 30 min，冷冻高速离心 30 min，弃去上清液，用 1 mL MES(50 mmol·L^{-1})洗涤颗粒 3 次，最后用 300 μL 含 2%海藻糖的 PB 8.0(10 mmol·L^{-1})溶液重悬颗粒，置于 4 ℃保存备用。

2.3 白色微孔制备

用 100.0 mmol Tris-HCl pH 8.0，2.0%海藻糖，1.0%BSA，0.5%吐温-20，0.1%叠氮钠作为反应液。将反应液与标记好的荧光纳米颗粒按照 5∶1 混匀，混匀后按每孔 60 μL 加入到 96 孔酶标板内，置于–80 ℃超低温冰箱预冻 4 h，再置于冷冻干燥机内冻干，加帽后置于常温干燥间保存备用。

2.4 荧光试纸条的制备[7]

以毒死蜱-牛血清白蛋白偶合物为硝酸纤维素膜上的检测线。将毒死蜱-牛血清白蛋白偶合物用含有 2%的海藻糖的 PB 7.4 稀释成 2.5 mg·mL^{-1}，将稀释好的抗体用喷膜仪以 1.0 μL·cm^{-1}的量，喷涂于硝酸纤维素膜上。将喷好的膜置于 37 ℃恒温干燥箱内，烘烤 30 min，取出后放于干燥间备用。

以羊抗鼠 IgG 包被的硝酸纤维素膜作为质控线，将羊抗鼠 IgG 用含有 1%的蔗糖的 PBS(pH 7.4)稀释成 1.5 mg·mL^{-1}，将稀释好的二抗用喷膜仪以 1.0 μL·cm^{-1} 的量喷涂于硝酸纤维素膜上，将喷好的膜置于 37 ℃恒温干燥箱内。烘烤 30 min，取出后放于干燥间备用。

试纸条由 PVC 衬板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成。依次将硝酸纤维素膜、样品垫、结合垫贴于 PVC 衬板上(样品垫与硝酸纤维素膜重叠约 3 mm，吸收垫与硝酸纤维膜重叠约 4 mm)粘贴好后切成 4 mm 宽的试纸条，将制备好的试纸条置于密封袋中，加干燥剂，密封，4 ℃保存。

2.5 样品处理与检测

称取 2 g 粉碎后的中药样品(当归、泽泻、青蒿、薄荷等)加至 50 mL 离心管中，加入 8 mL 提取液(15%乙醇和 1 mol·mL^{-1} pH 8.0 Tris 混合液)，涡旋震荡 2 min 或摇匀后超声提取 2 min，高速离心 2 min，离心管中上层液体即为待测液。吸取 200 μL 待测液加入白色微孔内，吹打数次使微孔内液体混匀，静置 5 min 后，插入试纸条并计时 8 min。时间到后可用便携式荧光检测仪读出判定结果或借助紫外灯肉眼判断。

若待测液中含有毒死蜱，则目标化合物会与白色微孔内的抗体-荧光纳米颗粒偶联物结合，并朝着吸收垫方向移动，大部分抗体-荧光纳米颗粒偶联物结合会被质控线上的抗鼠 IgG 捕获，在紫外光照射下可观察到明显的红色荧光的质控线。反之，白色微孔内的抗体-荧光纳米颗粒偶联物，朝着吸收垫方向移动，大部分抗体-荧光纳米颗粒偶联物结合将被检测线上的毒死蜱-牛血清白蛋白偶合物所捕获，在紫外灯下会呈现出明显的荧光检测线。

紫外灯辅助肉眼判读依据：若检测线荧光亮度等于或亮于质控线，表示待测液中不含毒死蜱农药或其含量低于方法检测限，判为阴性；若检测线不出现或出现但荧光亮度明显暗于质控线，则结果为阳性；若果质控线不可见，则检测结果无效。

便携式荧光检测仪判读依据：便携式荧光检测仪可对试纸条检测线与质控线的荧光强度进行读值，若“检测线/质控线”值≥1，则检测结果为阴性(–)；若“检测线/质控线”值<1，则检测结果为阳性(+)。

2.6 方法学考察[8]

2.6.1 检测限 称取空白中药样品枸杞 2 g，共 6 份，分别加入 500 ng·mL^{-1} 毒死蜱对照品溶液 0，40，60，80，100，120 μL，得到的样品中毒死蜱浓度分别为 0，10，15，20，25，30 ng·g^{-1}，参照“2.5”项下方法进行中药样品处理，用荧光试纸条进行检测。结果显示，毒死蜱浓度增加到 25 ng·g^{-1} 时，可以观察到检测线荧光亮度明显比质控线暗，结果为阳性，因此本试纸条对毒死蜱检测限为 25 ng·g^{-1}，结果见图 1。

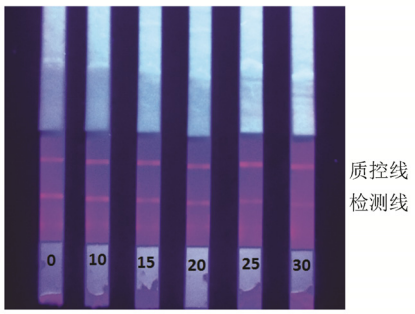

图 1 试纸条检测限检测结果

0，10，15，20，25，30 分别为样品中含 0，10，15，20，25，30 ng·g^{-1} 的毒死蜱。

Fig. 1 Determination of the sensitivity of the immunechromatographic strip

0, 10, 15, 20, 25, 30 were 0, 10, 15, 20, 25, 30 ng·g^{-1} chlorpyrifos in the sample.

2.6.2 特异性 配制浓度为 500 ng·mL^{-1} 的对硫磷、蝇毒磷、丰索磷、甲基对硫磷、三唑磷、喹硫磷、克百威对照品溶液，分别用荧光试纸条检测，结果均显阴性，结果见图 2。

2.6.3 适用性 称取当归、三七、枸杞、泽泻、薄荷、青蒿、山楂、金银花、板蓝根、莲子这 10 种常用中药材各 2 g，参照“2.5”项下方法进行中药样品处理，用荧光试纸条检测，结果均显阴性；取上述中药材各 2 g，分别加入 500 ng·mL^{-1} 毒死蜱对照品溶液 100 μL，得到的样品中，毒死蜱浓度均为 25 ng·g^{-1}，参照“2.5”项下方法进行中药样品处理，用荧光试纸条检测的结果见图 3，用荧光检测仪测定的结果得见表 1，结果均显阳性。

2.6.4 重复性 不同批次检测试纸条重复性检测结果显示，用不同批次的试纸条对 0 和 25 ng·g^{-1} 毒死蜱添加样品进行检测，结果均一致，实验证明不同批次生产的检测试纸条稳定可靠，具有良好的重复性。

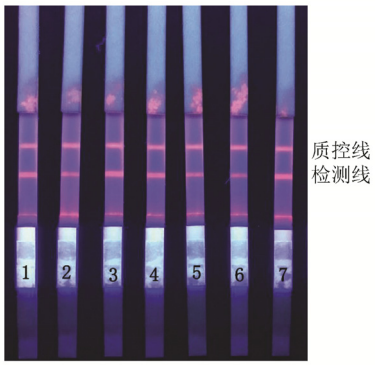

图 2 特异性检测结果

1–对硫磷；2–蝇毒磷；3–丰索磷；4–甲基对硫磷；5–三唑磷；6–喹硫磷；7–克百威。

Fig. 2 Specificity result of the strip test

1–parathion; 2–coumaphos; 3–fensulfothion; 4–parathion-methyl; 5–triazophos; 6–quintiofos; 7–carbofuran.

表 1 适用性检测结果

Tab. 1 Applicability result of the strip test

编号	样品	阴性	毒死蜱(25 ng·g^{-1})		
1	当归	1.92	0.06	0.07	0.07
		–	+	+	+
2	三七	1.87	0.09	0.09	0.08
		–	+	+	+
3	枸杞	2.16	0.23	0.24	0.23
		–	+	+	+
4	泽泻	2.34	0.08	0.08	0.08
		–	+	+	+
5	薄荷	2.45	0.06	0.05	0.06
		–	+	+	+
6	青蒿	1.93	0.07	0.06	0.07
		–	+	+	+
7	山楂	2.21	0.05	0.06	0.04
		–	+	+	+
8	金银花	1.86	0.10	0.09	0.09
		–	+	+	+
9	板蓝根	2.12	0.25	0.29	0.31
		–	+	+	+
10	莲子	1.98	0.08	0.09	0.08
		–	+	+	+

图 3 适用性检测结果

1–当归；2–三七；3–枸杞；4–泽泻；5–薄荷；6–青蒿；7–山楂；8–金银花；9–板蓝根；10–莲子。

Fig. 3 Applicability of the strip test

1–angelica sinensis; 2–pseudo-ginseng; 3–medlar; 4–rhizoma alismatis; 5–mint; 6–artemisia carvifolia; 7–hawthorn; 8–honeysuckle; 9–isatis root; 10–lotus seed.

2.6.5 稳定性　将制备好的检测试纸条置于 4 ℃和室温常规保存，在制备当天、第 5，15，25，35，45，60 天，分别取 2 个温度保存的试纸条各 10 条，检测阴性样品结果均为阴性，检测 25 ng·g^{-1} 毒死蜱添加样品，结果均为阳性。结果表明该试纸条可以常温保存至少 1 个月。

3　讨论

本研究制备的毒死蜱荧光免疫层析试纸条以胶体金免疫层系技术为基础，用发光性极强的 CdTe@SiO_2 荧光纳米颗粒标记物取代传统的胶体金标记物，可快速检测中药材中的毒死蜱，检出限为 25 ng·g^{-1}，灵敏度比目前胶体金方法高约 25 倍，检测时间从制样到出检测结果仅需 15~20 min，方法特异性高，硫磷、蝇毒磷等其他常见农药对检测结果无影响，且方法对根及根茎类、茎叶及全草类、果实及种子类中药饮片均适用，适用性广。

本试纸条较传统的 GC 和 GC-MS 具有节约成本、操作简便、检测周期短等明显优势，可广泛应用于中药中毒死蜱残留的现场筛查和检测，具有重要的经济价值和社会意义。

REFERENCES

[1] ZOU M C. Study of dynamic residues of the chlorpyrifos from the production of four medicinal plant based on molecularly imprinted technology [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.

[2] PANG Y, YU X L, LI H F, et al. Introduction of the guidance on the estimation of measurement uncertainty of results for the determination of pesticide residues [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(1): 17-21.

[3] XIA G F. Apolication of QuEchERS in pesticide residue analysis of traditional Chinese medicine [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.

[4] HU L, LI Y H, ZHOU M H. Determination of organophosphorus pesticide residue in health food with plant or fungus as materials by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(4): 563-566.

[5] 何晖，王炳志，毕思远, 等. 一种快速筛查志贺氏菌的荧光纳米免疫层析方法的建立[J]. 食品安全导刊, 2016(9): 115-119.

[6] YU J, SU J, ZHANG J, et al. CdTe/CdS quantum dot-labeled fluorescent immunochromatography test strips for rapid detection of Escherichia coli O157: H7 [J]. RSC Advances, 2017, 7(29): 17819-17823.

[7] XIANG H, ZHU H, SUN S H, et al. Experimental study of fluorescent magnetic nanoparticles labeled immunological assay for Vibrio parahaemolyticus thermostable direct heamolysin [J]. Chin J Food Hygiene(中国食品卫生杂志), 2017, 29(3): 302-306.

[8] ZOU Y H, QIU Y L, YU Y Y, et al. Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of huperzine A [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 11(31): 1370-1373.

收稿日期：2018-11-06

(本文责编：蔡珊珊)

http://www.chinjmap.com