



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116855582 A

(43) 申请公布日 2023.10.10

(21) 申请号 202310664759.9

(22) 申请日 2023.06.06

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

申请人 广东省科学院生态环境与土壤研究所

(72) 发明人 刘承帅 陈俊华 孙静 陈曼佳
童辉

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

专利代理师 梅素丽

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6825 (2018.01)

G12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种高灵敏检测有效态镉的荧光生物传感器及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种高灵敏检测有效态镉的荧光生物传感器及其应用,该荧光生物传感器基于DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针实现了有效态镉的快速检测。本发明中的荧光生物传感器能够快速检测样品中的有效态镉,具有较好的精确度和可靠性,检测限可达0.2nM,相比于传统的有效态镉检测技术更加灵敏,能够满足土壤复杂样品中有效态镉的快速检测需求,且检测方法简单易行,无需大型仪器,检测成本低。

1. 一种有效态镉的检测试剂,其特征在于,所述检测试剂中含有DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针;其中

所述DNA1探针中含有识别有效态镉的特异性DNA酶、互补序列1和互补序列2;

所述DNA2探针中含有互补序列3和互补序列4;

所述DNA3探针中含有互补序列5和互补序列6;

所述DNA4探针中含有互补序列7和互补序列8;

所述互补序列1与所述互补序列3中的碱基互补配对;

所述互补序列2与所述互补序列4中的碱基互补配对;

所述互补序列5与所述互补序列7中的碱基互补配对;

所述互补序列6与所述互补序列8中的碱基互补配对。

2. 根据权利要求1所述的有效态镉的检测试剂,其特征在于,所述DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针的核苷酸序列分别为:

DNA1探针:5' -CATCTTCCTTCGATAGTTAAAAGTCAGTG-3' ;

DNA2探针:5' -CGACATCGATATCACTGACTrAGGAAGATGATCTAACCTAGC-3' ;

DNA3探针:5' -AGTCAGTGATATCGATGTCGCATCTTCCGCTAGGTTAGAT-3' ;

DNA4探针:5' -ATCTAACCTAGCCGACATCGATAT-3' ;

其中,所述DNA2探针的核苷酸序列中的rA代表核酸腺嘌呤核糖核苷酸。

3. 根据权利要求2所述的有效态镉的检测试剂,其特征在于,所述DNA3探针和DNA4探针的核苷酸序列中的其中一条修饰有淬灭基团,另一条修饰有荧光基团。

4. 权利要求1~3任一项所述的检测试剂在制备检测有效态镉产品中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述产品中还含有缓冲液。

6. 权利要求1~3任一项所述的有效态镉的检测试剂在检测土壤中有效态镉的应用。

7. 一种有效态镉的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:将权利要求1~3任一项所述的DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针混合制得检测试剂,再与检测样品混合孵育,检测荧光强度。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述检测试剂中各组分的摩尔浓度比为:DNA1探针:DNA2探针:DNA3探针:DNA4探针=1:1~3:1~3:1~3。

9. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针通过互补配对形成双链复合物。

10. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述检测样品为土壤。

一种高灵敏检测有效态镉的荧光生物传感器及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分析检测领域,具体涉及一种高灵敏检测有效态镉的荧光生物传感器及其应用。

背景技术

[0002] 重金属进入土壤后不仅会对土壤的生态结构和功能稳定性造成影响,还会对植物的生长产生不利影响,甚至会通过各种食物链,经过逐级生物富集对人体健康产生危害。镉是一种常见的重金属,其对环境与人体的危害主要归因于有效镉的富集与超标。从生态学意义上来说,有效态镉是指可以被植物实际吸收利用的镉,也叫生物有效态。镉的环境危害主要取决于有效态的浓度和分布。因此,对有效态镉的检测具有重要意义。常规方法需要先采用大量化学试剂对有效态镉进行提取,包括BCR法、Maiz三步连续提取方法、Tessier五步连续提取法、DTPA-CaCl₂法等。这些方法需要连续多步的萃取分离过程,步骤繁琐,耗时较长。因此,探索构建一种无需消解萃取过程的快速检测有效态镉的方法具有重要意义。

[0003] 生物传感器通常采用DNA为分子识别元件,通过DNA识别与信号转换,实现简单快速检测目标物的目的。采用特异的DNA序列对有效态镉进行识别,从而构建生物传感器,实现在常规缓冲液中快速检测有效态镉具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种高灵敏检测有效态镉的荧光生物传感器及其应用,该荧光生物传感器基于DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针实现了有效态镉的快速检测,能够快速检测样品中的有效态镉,具有较好的精确度和可靠性。

[0005] 本发明的第一个方面,提出了一种检测有效态镉的检测试剂。

[0006] 在本发明中,所述有效态镉是指可以被植物吸收利用的镉。

[0007] 在本发明的一些实施方式中,所述检测试剂中含有DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针;其中

[0008] 所述DNA1探针中含有识别有效态镉的特异性DNA酶、互补序列1和互补序列2;

[0009] 所述DNA2探针中含有互补序列3和互补序列4;

[0010] 所述DNA3探针中含有互补序列5和互补序列6;

[0011] 所述DNA4探针中含有互补序列7和互补序列8;

[0012] 所述互补序列1与所述互补序列3中的碱基互补配对;

[0013] 所述互补序列2与所述互补序列4中的碱基互补配对;

[0014] 所述互补序列5与所述互补序列7中的碱基互补配对;

[0015] 所述互补序列6与所述互补序列8中的碱基互补配对。

[0016] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针中第9~21位碱基组成的核苷酸序列为识别有效态镉的特异性DNA酶的核苷酸序列。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列1为DNA1探针中第1~8位碱基组成的核苷酸序列。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列2为DNA1探针中第22~29位碱基组成的核苷酸序列。

[0019] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列3为DNA2探针中第22~29位碱基组成的核苷酸序列。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列4为DNA2探针中第13~20位碱基组成的核苷酸序列。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列5为DNA3探针中第9~20位碱基组成的核苷酸序列。

[0022] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列6为DNA3探针中第29~40位碱基组成的核苷酸序列。

[0023] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列7为DNA4探针中第13~24位碱基组成的核苷酸序列。

[0024] 在本发明的一些实施方式中,所述互补序列8为DNA4探针中第1~12位碱基组成的核苷酸序列。

[0025] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针的核苷酸序列分别为:

[0026] DNA1探针:5'-CATCTTCCTTCGATAGTTAAAAGTCAGTG-3'(SEQ ID NO.1);

[0027] DNA2探针:5'-CGACATCGATATCACTGACTrAGGAAGATGATCTAACCTAGC-3'(SEQ ID NO.2);

[0028] DNA3探针:5'-AGTCAGTGATATCGATGTTCGCATCTTCCGCTAGGTTAGAT-3'(SEQ ID NO.3);

[0029] DNA4探针:5'-ATCTAACCTAGCCGACATCGATAT-3'(SEQ ID NO.4)。

[0030] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA2探针的核苷酸序列中的rA代表核酸腺嘌呤核糖核苷酸。

[0031] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA2探针的核苷酸序列中的rA为切割位点。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA3探针和DNA4探针的核苷酸序列中的其中一条核苷酸序列修饰有淬灭基团,另一条核苷酸序列修饰有荧光基团。

[0033] 在本发明的一些实施方式中,所述淬灭基团修饰于DNA3探针的核苷酸序列的3'端。

[0034] 在本发明的一些实施例中,所述淬灭基团为BHQ3。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述荧光基团修饰于DNA4探针的核苷酸序列的5'端。

[0036] 在本发明的一些实施例中,所述荧光基团为Cy5。

[0037] 在本发明中,本领域技术人员可以根据实际使用需求,将荧光基团Cy5和淬灭基团BHQ3合理替换为其他荧光基团和淬灭基团,以实现荧光标记的效果。

[0038] 本发明的第二个方面,提供本发明第一个方面所述的检测试剂在制备检测有效态镉产品中的应用。

[0039] 在本发明的一些实施方式中,所述产品中还含有缓冲液。

[0040] 本发明的第三个方面,提供本发明第一个方面所述的有效态镉的检测试剂在检测土壤中有有效态镉的应用。

[0041] 本发明的第四个方面,提供一种有效态镉的检测方法,包括以下步骤:将本发明第一个方面所述的DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针混合制得检测试剂,再与检测样品混合孵育,检测荧光强度。

[0042] 在本发明的一些实施方式中,所述检测试剂中各组分的摩尔浓度比为:DNA1探针:DNA2探针:DNA3探针:DNA4探针=1:1~3:1~3:1~3。

[0043] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针通过互补配对形成双链复合物。

[0044] 在本发明的一些实施方式中,所述检测试剂中还含有缓冲液。

[0045] 在本发明的一些实施方式中,将本发明第一个方面所述的DNA1探针和DNA2探针分别溶解于缓冲液后,在23~27℃下混合杂交20~40分钟,即得DNA1-DNA2复合物。

[0046] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1-DNA2复合物的体系为:

[0047]	组分	终含量
	DNA1探针	50~100nM
	DNA2探针	100~150nM
	缓冲液	0.5~2mL

[0048] 在本发明的一些实施方式中,将本发明第一个方面所述的DNA3探针和DNA4探针分别溶解于缓冲液后,在23~27℃下混合杂交20~40分钟,即得DNA3-DNA4复合物。

[0049] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA3-DNA4复合物的体系为:

[0050]	组分	终含量
	DNA3 探针	100~150nM

[0051]	DNA4 探针	100~150nM
	缓冲液	0.5~2mL

[0052] 在本发明的一些实施方式中,所述缓冲液为Tris-乙酸缓冲液。

[0053] 在本发明的一些实施方式中,所述Tris-乙酸缓冲液的Tris-乙酸浓度为10~30mM。

[0054] 在本发明的一些实施方式中,所述Tris-乙酸缓冲液的pH值为7.0~8.0。

[0055] 在本发明的一些实施方式中,所述Tris-乙酸缓冲液中含有终浓度为80~120mM的乙酸钠。

[0056] 在本发明的一些实施方式中,所述孵育温度为23~27℃。

[0057] 在本发明的一些实施方式中,所述孵育时间为40~60分钟。

[0058] 在本发明的一些实施方式中,所述检测样品为土壤。

[0059] 所述检测方法的检测原理为:

[0060] 在本发明中,DNA1探针与DNA2探针杂交,DNA3探针与DNA4探针杂交,形成了DNA1-

DNA2复合物和DNA3-DNA4复合物,两种复合物共同构成荧光生物传感器。其中DNA1探针中的第9~21位碱基组成的核苷酸序列是能够识别有效态镉的特异核酸序列,DNA2探针中含有rA碱基,代表腺嘌呤核糖核苷酸,作为切割位点,DNA3探针的核苷酸序列的一端修饰有BHQ3淬灭基团,DNA4探针的核苷酸序列的一端修饰有Cy5荧光基团;该荧光生物传感器的检测原理为特异性DNA序列对不同浓度下的有效态镉的识别能力不同,获得的转换信号的强度有差异,从而实现有效态镉的快速识别与检测。

[0061] 当检测体系中不存在有效态镉时,DNA1-DNA2复合物中的DNA1探针的识别有效态镉的特异性DNA酶不被激活,DNA2探针的核苷酸序列无法被切割,DNA2探针切割位点两端的核苷酸序列片段无法释放,DNA3-DNA4复合物中的DNA3探针的核苷酸序列片段无法被置换,荧光基团Cy5与淬灭基团BHQ3靠近,Cy5的荧光被淬灭,此时检测体系中只有很低的背景荧光信号。

[0062] 当检测体系中存在有效态镉时,DNA1-DNA2复合物的DNA1探针中的第9~21位的核苷酸序列片段可特异识别有效态镉,特异性DNA酶被激活,并在DNA2探针中的rA(腺嘌呤核糖核苷酸)处切割DNA2探针,释放第1~20位碱基组成的核苷酸序列与第22~41位碱基组成的核苷酸序列片段,释放的第1~20位碱基组成的核苷酸序列片段与DNA3探针中的第1~20位碱基组成的核苷酸序列片段杂交,其中DNA3探针中的第1~8位碱基组成的核苷酸序列片段作为DNA支点,启动链置换反应,从而打开DNA3探针中的第21~28位碱基组成的核苷酸序列片段;DNA2探针释放的第22~41位碱基组成的核苷酸序列片段进一步与DNA3探针中第21~40位碱基组成的核苷酸序列片段杂交,其中DNA3探针中的第21~28位碱基组成的核苷酸序列片段作为DNA支点,启动链置换反应,从而把DNA3探针从DNA4探针中置换下来,使DNA3探针远离DNA4探针,使淬灭基团BHQ3远离荧光基团Cy5,使Cy5的荧光恢复,检测体系中的荧光强度。体系中的荧光强度与有效态镉的浓度具有相关性,从而达到检测有效态镉的目的。

[0063] 本发明的有益效果是:

[0064] 1. 本发明的荧光生物传感器采用了核酸探针来特异性识别有效态镉,根据特异性核酸对有效态镉的识别及切割能力的差异性,实现对有效态镉的识别与检测,传统有效态镉的检测方法依赖大型仪器,涉及消解和萃取步骤,过程繁琐,耗时长,相比之下本发明的荧光生物传感器简化了操作,避免了萃取过程,极大缩短了检测时间。

[0065] 2. 在本发明的荧光生物传感器中,只有当有效态镉存在时,才能通过核酸协同作用产生荧光信号,能够有效提高检测有效态镉的特异性,本发明的荧光生物传感器具有较好的精确度和可靠性,能满足实际土壤复杂样品检测需求。

附图说明

[0066] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步的说明,其中:

[0067] 图1为本发明实施例中的荧光生物传感器检测有效态镉的检测原理图;

[0068] 图2为本发明实施例中的荧光生物传感器检测不同标准样品以及空白对照的检测结果;

[0069] 图3为本发明实施例中的荧光生物传感器检测有效态镉浓度的线性范围;

[0070] 图4为本发明实施例中的荧光生物传感器对不同浓度的有效态镉的检测结果。

具体实施方式

[0071] 以下将结合实施例对本发明的构思及产生的技术效果进行清楚、完整地描述,以充分地理解本发明的目的、特征和效果。显然,所描述的实施例只是本发明的一部分实施例,而不是全部实施例,基于本发明的实施例,本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例,均属于本发明保护的范围。

[0072] 所使用的实验材料和试剂,若无特别说明,均为常规可从商业途径所获得的耗材和试剂。

[0073] 下述实施例中的室温均为23~27℃。

[0074] 有效态镉荧光生物传感器检测试剂

[0075] 本实施例制备了一种有效态镉荧光生物传感器检测试剂,在本实施例中的用于检测有效态镉的荧光生物传感器检测试剂,其主要基于DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针构建得到,从而实现有效态镉的快速、高灵敏、定量化检测。

[0076] 上述DNA1探针的核苷酸序列如下所示:

[0077] 5'-CATCTTCCTTCGATAGTTAAAAGTCAGTG-3' (SEQ ID NO.1);

[0078] DNA2探针的核苷酸序列如下所示:

[0079] 5'-CGACATCGATATCACTGACTrAGGAAGATGATCTAACCTAGC-3' (SEQ ID NO.2);

[0080] DNA3探针的核苷酸序列如下所示:

[0081] 5'-AGTCAGTGATATCGATGTCGCATCTTCCGCTAGGTTAGAT (BHQ3) -3' (SEQ ID NO.3);

[0082] DNA4探针的核苷酸序列如下所示:

[0083] 5'-(Cy5)ATCTAACCTAGCCGACATCGATAT-3' (SEQ ID NO.4)。

[0084] 其中,DNA1探针的核苷酸序列中第9~21位碱基组成的核苷酸序列为识别有效态镉的特异性核苷酸序列;

[0085] DNA2探针的核苷酸序列中第21位rA碱基为腺嘌呤核糖核苷酸,作为DNA2探针的核苷酸序列切割位点;

[0086] DNA1探针中第1~8位碱基组成的核苷酸序列与DNA2探针中的第22~29位碱基组成的核苷酸序列互补,DNA1探针中第22~29位碱基组成的核苷酸序列与DNA2探针中的第13~20位碱基组成的核苷酸序列互补;

[0087] DNA3探针中第9~20位碱基组成的核苷酸序列与DNA4探针中的第13~24位碱基组成的核苷酸序列互补,DNA3探针中第29~40位碱基组成的核苷酸序列与DNA4探针中的第1~12位碱基组成的核苷酸序列互补。

[0088] 有效态镉荧光生物传感器检测试剂的使用方法

[0089] 本实施例将上述实施例中的有效态镉荧光生物传感器检测试剂用于检测土壤样品中的有效态镉,具体检测步骤如下:

[0090] (1) 将DNA1探针、DNA2探针、DNA3探针和DNA4探针置于终浓度为20mM的Tris-乙酸缓冲液(pH为7.4,该Tris-乙酸缓冲液中含有终浓度为100mM的乙酸钠)中溶解,得到四种不同探针的缓冲液后,将DNA1探针的缓冲液和DNA2探针的缓冲液混合,另将DNA3探针的缓冲液和DNA4探针的缓冲液混合,分别在室温下杂交反应30分钟,形成DNA1-DNA2复合物和DNA3-DNA4复合物,将DNA1-DNA2复合物和DNA3-DNA4复合物等量混合后即得检测试剂,其中的DNA1-DNA2复合物的体系组成如表1所示,DNA3-DNA4复合物的体系组成如表2所示。

[0091] 表1DNA1-DNA2复合物的体系组成

组分	终含量
DNA1探针	100nM
DNA2探针	120nM
Tris-乙酸缓冲液	1mL

[0093] 表2DNA3-DNA4复合物的体系组成

组分	终含量
DNA3 探针	100nM
DNA4 探针	100nM
Tris-乙酸缓冲液	1mL

[0096] (2) 将0.2g检测样品和1mL上述检测试剂混合均匀后,在室温下孵育50分钟,检测荧光强度,激发峰为640nm,记录发射峰670nm处的荧光信号。

[0097] 有效态镉的荧光生物传感器的检测原理示意图如图1所示。

[0098] 当检测体系中不存在有效态镉时,DNA1-DNA2复合物中的DNA1探针的识别有效态镉的特异性DNA酶不被激活,DNA2探针的核苷酸序列无法被切割,DNA2探针切割位点两端的核苷酸序列片段无法释放,DNA3-DNA4复合物中的DNA3探针的核苷酸序列片段无法被置换,荧光基团Cy5与淬灭基团BHQ3靠近,Cy5的荧光被淬灭,此时检测体系中只有很低的背景荧光信号。

[0099] 当检测体系中存在有效态镉时,DNA1-DNA2复合物的DNA1探针中的第9~21位的核苷酸序列片段可特异识别有效态镉,特异性DNA酶被激活,并在DNA2探针中的rA(腺嘌呤核糖核苷酸,为图1所示的蓝色小圆点标记处)处切割DNA2探针,释放第1~20位碱基组成的核苷酸序列与第22~41位碱基组成的核苷酸序列片段,释放的第1~20位碱基组成的核苷酸序列片段与DNA3探针中的第1~20位碱基组成的核苷酸序列片段杂交,其中DNA3探针中的第1~8位碱基组成的核苷酸序列片段作为DNA支点,启动链置换反应,从而打开DNA3探针中的第21~28位碱基组成的核苷酸序列片段;DNA2探针释放的第22~41位碱基组成的核苷酸序列片段进一步与DNA3探针中第21~40位碱基组成的核苷酸序列片段杂交,其中DNA3探针中的第21~28位碱基组成的核苷酸序列片段作为DNA支点,启动链置换反应,从而把DNA3探针从DNA4探针中置换下来,使DNA3探针远离DNA4探针,使淬灭基团BHQ3远离荧光基团Cy5,使Cy5的荧光恢复,检测体系中的荧光强度。

[0100] 荧光检测反应完后的溶液,激发峰是640nm,发射峰是670nm;荧光强度与有效态镉的浓度具有正相关性,从而达到检测有效态镉的效果。

[0101] 有效态镉的荧光生物传感器检测方法的特异性评估

[0102] 为了检测上述有效态镉的荧光生物传感器检测方法的特异性,发明人使用了含有不同物质的标准溶液,分别是As³⁺、Hg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺和Cr³⁺的标准溶液,终浓度均为100nM,作为干扰物进行进行特异性测定,将上述的不同干扰物标准溶液和终浓度为

100nM的 Cd^{2+} 标准溶液作为样品进行检测。

[0103] 具体检测步骤为：

[0104] 配制终浓度为100nM的不同干扰物标准溶液，分别是 As^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cr^{3+} 的标准溶液，并将上述实施例中所使用的Tris-乙酸缓冲液作为空白对照。将1mL的上述不同干扰物标准溶液、终浓度为100nM的 Cd^{2+} 标准溶液和Tris-乙酸缓冲液分别加到上述实施例中的检测体系中，孵育后检测荧光强度。

[0105] 如图2所示，不同干扰物 As^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cr^{3+} 的标准溶液荧光强度与空白对照相比，变化不大，对检测不产生影响。只有当检测体系中含有 Cd^{2+} 才会使荧光强度明显增加，这证明该方法对 Cd^{2+} 的检测具有很好的特异性。

[0106] 有效态镉的荧光生物传感器检测方法的灵敏度评估

[0107] 为了检测上述有效态镉的荧光生物传感器检测方法的灵敏度，发明人使用了不同浓度(1nM、10nM、100nM、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1mM)的 Cd^{2+} 标准溶液作为样品进行检测。

[0108] 具体检测步骤为：

[0109] 配制 Cd^{2+} 标准溶液，浓度分别为1nM、10nM、100nM、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1mM。将上述 Cd^{2+} 标准溶液作为检测样品，分别加到上述有效态镉荧光生物传感器检测试剂中进行检测，检测方法同上述有效态镉荧光生物传感器检测试剂的使用方法的检测步骤。

[0110] 如图3所示，以 Cd^{2+} 浓度的对数(LgC)为横坐标，荧光强度为纵坐标，绘制标准曲线，可知二者具有很好的线性关系，线性范围是从1nM到100 μM ，线性方程是： $F = 5.5 \times 10^6 \text{LgC} + 8.1 \times 10^6$ ($R^2 = 0.992$) (F为荧光强度，C为 Cd^{2+} 浓度)按照3倍信噪比标准(3S/N)，本发明实施例的有效态镉荧光生物传感器检测方法对有效态镉的检测限为0.2nM。

[0111] 如图4所示，随着 Cd^{2+} 浓度的增加，对应的荧光强度逐渐增加，而当 Cd^{2+} 浓度达到从100 μM 到1mM这一阶段时，体系中的荧光强度逐渐达到饱和，荧光强度趋于平稳。有效态镉的荧光生物传感器检测方法与现有检测技术的对比评估

[0112] 为了进一步体现上述实施例中的有效态镉的荧光生物传感器检测方法的高灵敏度检测效果，发明人参考现有公开技术(甘国娟，刘妍，朱晓龙，等.3种提取剂对不同类型土壤重金属的提取效果[J].中国农学通报,2013,29(2):6.)中的内容，分别使用DTPA- CaCl_2 法和HCl法测试土壤样本中的有效态镉，并与上述实施例中的有效态镉的荧光生物传感器检测方法进行对比评估。

[0113] 1.有效态镉的荧光生物传感器检测方法与传统DTPA- CaCl_2 法对土壤样品中有效态镉检测结果对比：

[0114] 具体操作步骤如下：

[0115] (1)将含有不同浓度有效态镉的土壤样品采用传统DTPA- CaCl_2 法进行有效态的提取，并采用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-OES)进行检测，记录不同土壤样品中有效态镉的浓度。

[0116] (2)将含有不同浓度有效态镉的土壤样品同时采用荧光生物传感器法进行检测，研磨的土壤样品过0.15mm网筛，各土壤样品分别取0.2g置于上述有效态镉荧光生物传感器检测试剂中，室温充分孵育50分钟。

[0117] (3)将步骤(2)中孵育完成的样品液放入离心管中，在离心机上进行离心，转速为8000rpm，离心时间为10分钟，去除沉淀，检测上清液荧光强度，激发峰为640nm，记录发射峰

670nm处的荧光值。

[0118] (4) 根据荧光强度值,采用上述有效态镉的荧光生物传感器检测方法的灵敏度评估中得到的线性方程,计算出土壤样品中有效态镉的浓度,并与DTPA-CaCl₂法提取后采用ICP-OES检测方法进行对比,结果如表3所示,两种检测方法相对偏差为-8.3%~7.6%。

[0119] 表3DTPA-CaCl₂法+ICP-OES与本发明实施例荧光生物传感器检测方法对土壤样品中有效态镉的检测结果

样品	DTPA-CaCl ₂ 法 ^a	本发明实施例荧光生物传感器检测方法	相对偏差 ^b (%)
土壤 1#	2.6nM	2.4nM	-8.3
土壤 2#	8.5nM	9.2nM	7.6
土壤 3#	16.2nM	15.4nM	-4.9
土壤 4#	28.4nM	26.8nM	-5.9
土壤 5#	56.7nM	60.2nM	5.8

[0121] ^aDTPA-CaCl₂法提取后采用ICP-OES进行检测,^b本发明实施例荧光生物传感器检测方法vs.DTPA-CaCl₂法+ICP-OES。

[0122] 从表3中可以发现,本发明实施例的荧光生物传感器检测方法与传统DTPA-CaCl₂+ICP-OES方法相比,荧光生物传感器检测方法的相对偏差小于10%,说明该方法具有较好的精确度和可靠性,能满足实际土壤复杂样品中有效态镉的快速检测需求。

[0123] 2.有效态镉的荧光生物传感器检测方法与传统HCl法对土壤样品中有效态镉检测结果对比:

[0124] 具体操作步骤如下:

[0125] (1) 含有不同浓度有效态镉的土壤样品采用传统HCl法进行有效态的提取,并采用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-OES)进行检测,记录不同土壤样品中有效态镉的浓度。

[0126] (2) 含有不同浓度有效态镉的土壤样品同时采用荧光生物传感器法进行检测,研磨的土壤样品过0.15mm网筛,各土壤样品分别取0.2g置于上述有效态镉荧光生物传感器检测试剂中,室温充分孵育50分钟。

[0127] (3) 将步骤(2)中孵育完成的样品液放入离心管中,在离心机上进行离心,转速为8000rpm,离心时间为10分钟,去除沉淀,检测上清液荧光强度,激发峰为640nm,记录发射峰670nm处的荧光值。

[0128] (4) 根据荧光强度值,采用上述有效态镉的荧光生物传感器检测方法的灵敏度评估中得到的线性方程,计算出土壤样品中有效态镉的浓度,并与HCl法提取后采用ICP-OES检测方法进行对比,结果如表4所示,两种检测方法相对偏差为-8.7%~10.7%。表4HCl法+ICP-OES与本发明实施例荧光生物传感器检测方法对土壤样品中有效态镉的检测结果

样品	HCl法 ^a	本发明实施例荧光生物传感器检测方法	相对偏差 ^b (%)
土壤1#	4.5nM	4.3nM	-4.7

土壤2#	10.8nM	12.1nM	10.7
土壤3#	22.6nM	20.8nM	-8.7
土壤4#	36.4nM	37.6nM	3.2
土壤5#	62.7nM	60.2nM	-4.2

[0130] ^aHCl法提取后采用ICP-OES进行检测，^b本发明实施例荧光生物传感器检测方法 vs. HCl法+ICP-OES。

[0131] 从表4中可以发现，本发明实施例的荧光生物传感器检测方法与传统HCl+ICP-OES方法相比，荧光生物传感器检测方法的相对偏差在10%左右，说明该方法具有较好的精确度和可靠性，能满足实际土壤复杂样品中有效态镉的快速检测需求。

[0132] 从检测时间和检测成本上考量，结合检测限和线性范围，可以发现，上述实施例中的有效态镉荧光生物传感器检测方法相对于目前现有的有效态镉检测技术具有更高的技术优势和实际可用性。

[0133] 上面结合附图对本发明实施例作了详细说明，但是本发明不限于上述实施例，在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内，还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作出各种变化。此外，在不冲突的情况下，本发明的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

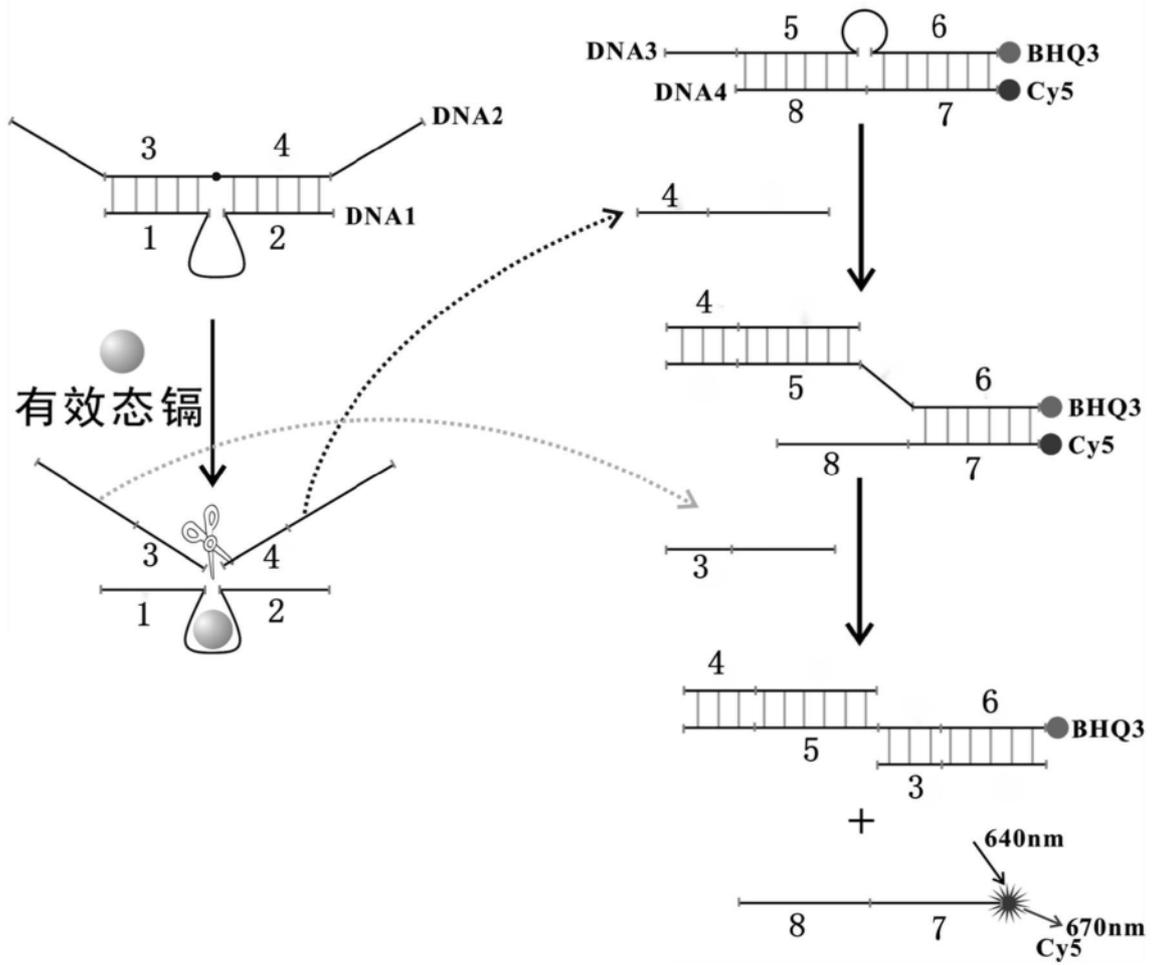


图1

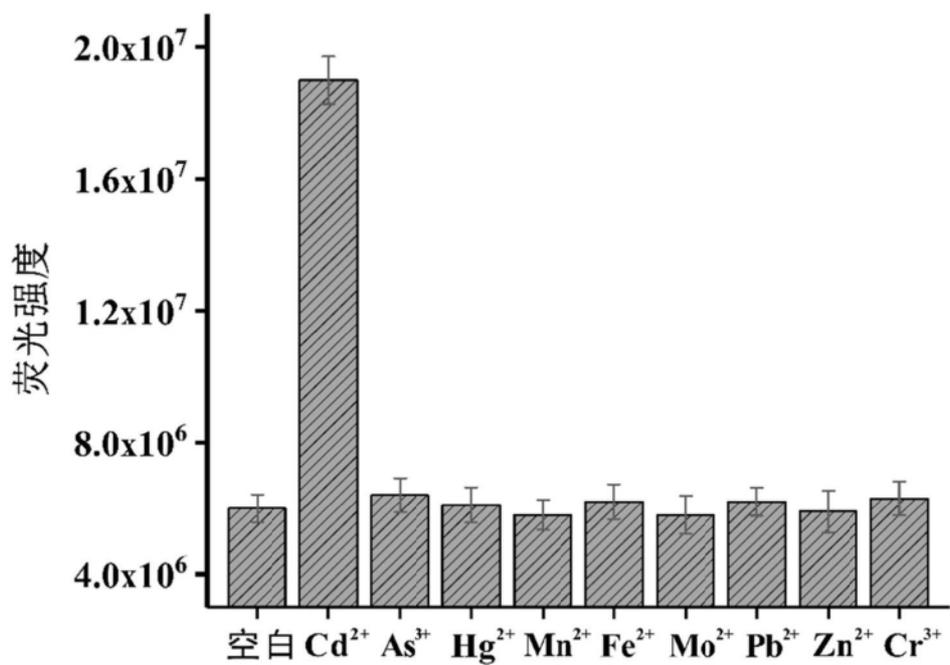


图2

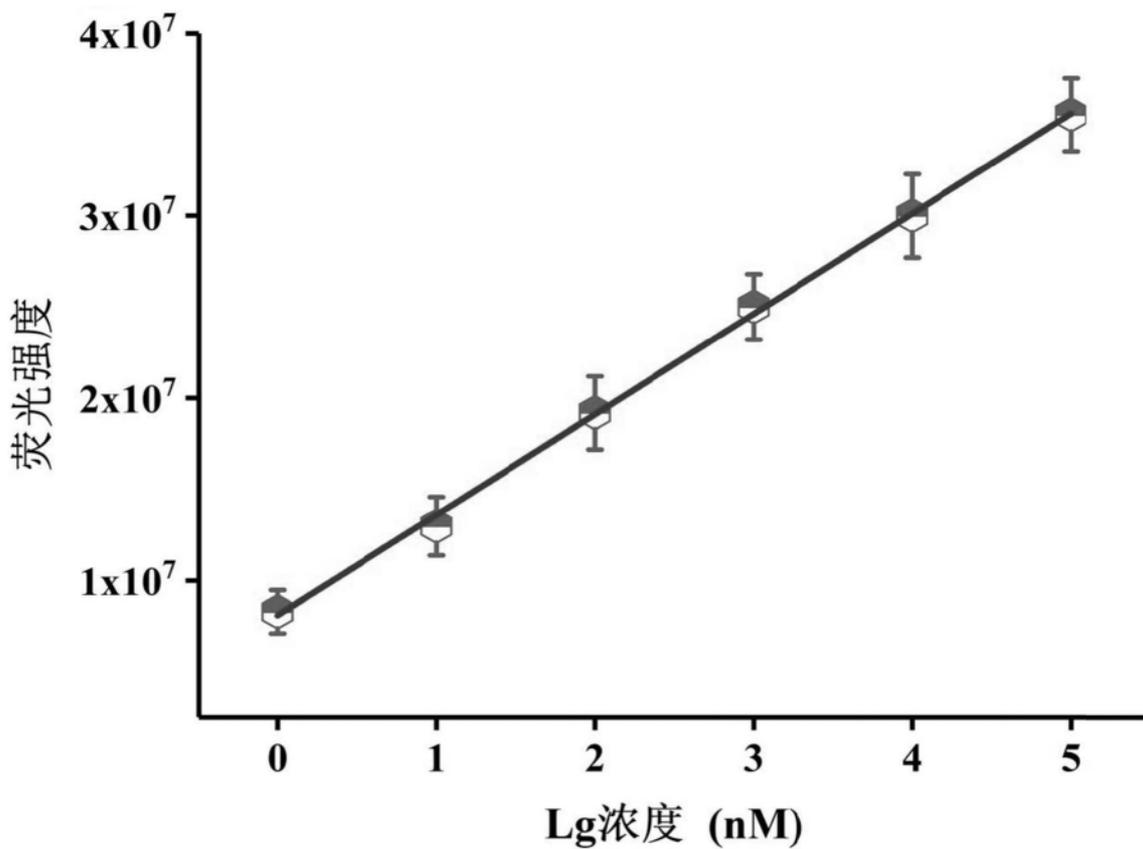


图3

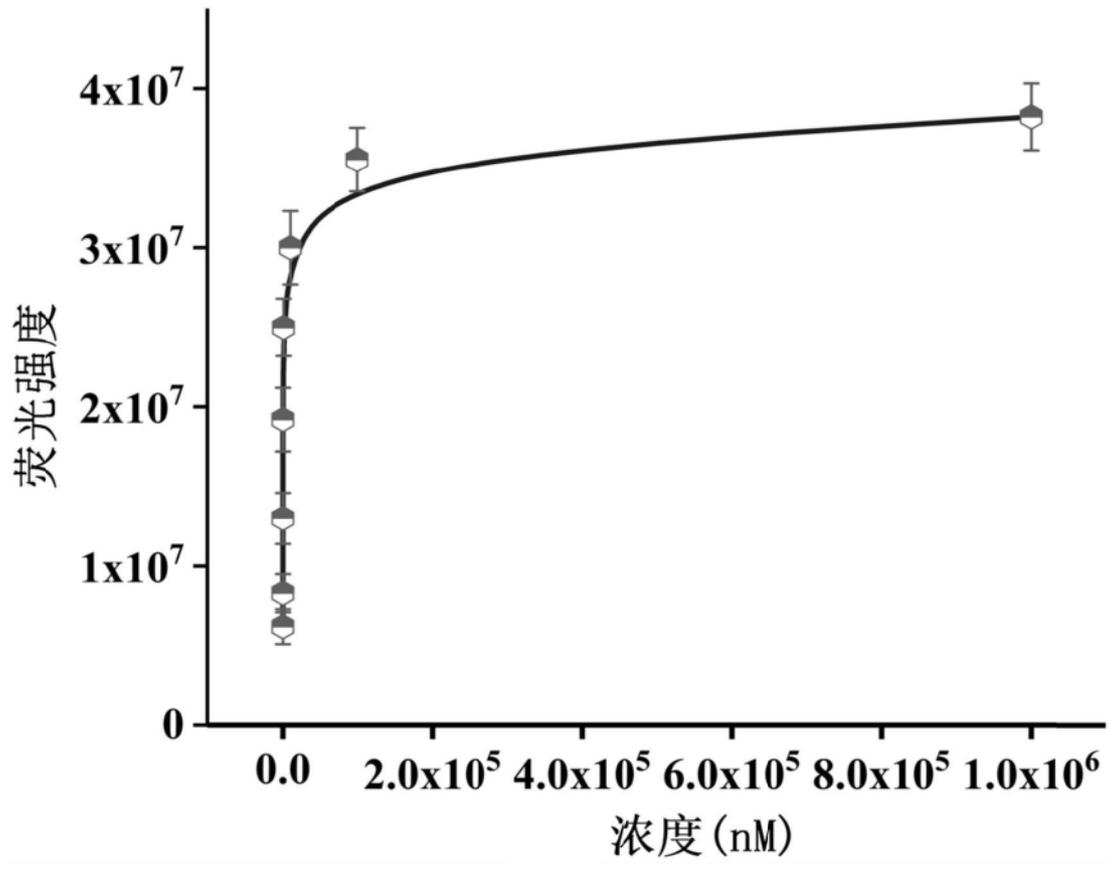


图4