



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116855583 A

(43) 申请公布日 2023.10.10

(21) 申请号 202310674628.9

(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铅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铅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探针和胶体金粒子实现了有效态铅的快速检测。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铅,具有较好的精确度和可靠性,检测限可达25pM,相比于传统的有效态铅检测技术更加灵敏,能够满足土壤复杂样品中有效态铅的快速检测需求,且检测方法简单易行,无需大型仪器,检测成本低。

1. 一种有效态铅的检测试剂,其特征在于,所述检测试剂中含有DNA1探针、DNA2探针和胶体金粒子;其中

所述DNA1探针中含有识别有效态铅的特异性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、互补序列4、互补序列5和互补序列6;

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6中的碱基互补配对,使DNA2探针形成发夹结构;

所述DNA1探针与DNA2探针的其中一端分别与胶体金粒子连接。

2. 根据权利要求1所述的有效态铅的检测试剂,其特征在于,所述DNA1探针与DNA2探针的其中一端通过巯基固定于胶体金粒子表面。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的有效态铅的检测试剂,其特征在于,所述DNA1探针和DNA2探针的核苷酸序列分别为:

DNA1探针:

5' -ACACACACACACCCATCTTCTCCGAGCCGGTCGAAAGTCAGTG-3' ;

DNA2探针:

5' -AACCTAGCAAAAAACACTGACTrAGGAAGATGGAAAAAAGCTAGGTT-3' ;

其中,所述DNA2探针的核苷酸序列中的rA代表腺嘌呤核糖核苷酸。

4. 根据权利要求3所述的有效态铅的检测试剂,其特征在于,所述DNA2探针的核苷酸序列上修饰有荧光基团。

5. 权利要求1~4任一项所述的检测试剂在制备检测有效态铅产品中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述产品中还含有缓冲液。

7. 权利要求1~4任一项所述的有效态铅的检测试剂在检测土壤中有效态铅的应用。

8. 一种有效态铅的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:将权利要求1-5任一项所述的DNA1探针、DNA2探针和胶体金粒子混合制得检测试剂,再与检测样品混合孵育,检测荧光强度。

9. 根据权利要求8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:胶体金粒子=1:2.5~20:0.25~10。

10. 根据权利要求8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铅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铅的荧光生物传感器及其应用。

背景技术

[0002] 在重金属分析过程中需要对土壤或水样中的有效态铅进行检测。从生态学意义上来说,有效态铅是指可以被植物实际吸收利用的铅,也叫生物有效态。铅的环境行为与生态效应并不取决于它在环境中的总量,而主要取决于铅的有效态浓度,有的甚至已作为评价土壤污染和建立环境标准的依据。有效态铅的富集会直接影响环境安全与植物生长,进而通过食物链,直接影响人体健康。因此,对有效态铅的检测具有重要意义。

[0003] 常规方法需要先采用大量化学试剂对有效态铅进行提取,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铅的方法具有重要意义。

[0004] 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序列对有效态铅进行识别,从而构建生物传感器,实现在常规缓冲液中快速检测复杂样品的有效态铅具有重要意义。

发明内容

[0005] 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铅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探针和胶体金粒子实现了有效态铅的快速检测,能够快速检测样品中的有效态铅,具有较好的精确度和可靠性。

[0006] 本发明的第一个方面,提出了一种有效态铅的检测试剂。

[0007] 在本发明中,所述有效态铅是指可以被植物吸收利用的铅。

[0008] 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探针和胶体金粒子;其中

[0009] 所述DNA1探针中含有识别有效态铅的特异性DNA酶、互补序列1和互补序列2;

[0010] 所述DNA2探针中含有互补序列3、互补序列4、互补序列5和互补序列6;

[0011] 所述互补序列1与所述互补序列3中的碱基互补配对;

[0012] 所述互补序列2与所述互补序列4中的碱基互补配对;

[0013] 所述互补序列5与所述互补序列6中的碱基互补配对,使DNA2探针形成发夹结构;

[0014] 所述DNA1探针与DNA2探针的其中一端分别与胶体金粒子连接。

[0015] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针中第21~35位碱基组成的核苷酸序列为识别有效态铅的特异性DNA酶的核苷酸序列。

[0016] 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13~20位碱基组成

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2为DNA1探针中第36~43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3为DNA2探针中第25~32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4为DNA2探针中第15~22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5为DNA2探针中第1~8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6为DNA2探针中第39~46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DNA1探针与DNA2探针的其中一端通过巯基固定于胶体金粒子表面。

[0023] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针和DNA2探针的核苷酸序列分别为:

[0024] DNA1探针:

[0025] 5'-ACACACACACACCCATCTTCTCCGAGCCGGTGCAGAAAGTCAGTG-3' (SEQ ID NO.1);

[0026] DNA2探针:

[0027] 5'-AACCTAGCAAAAAACACTGACTrAGGAAGATGGAAAAAAGCTAGGTT-3'

[0028] (SEQ ID NO.2)。

[0029] 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代表腺嘌呤核糖核苷酸。

[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与相邻的G(鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸)共同作为切割位点。

[0031] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针的核苷酸序列的5'端和所述DNA2探针的核苷酸序列的3'端修饰巯基(-SH)。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA2探针的核苷酸序列的5'端上修饰有荧光基团。

[0033] 在本发明的一些实施方式中,所述荧光基团为FAM。

[0034] 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FAM合理替换为其他荧光基团,以实现荧光标记的效果。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述胶体金粒子为市售产品,粒径为12~50nm。

[0036] 在本发明中,本领域技术人员可以根据实际使用需求,将胶体金粒子合理替换为对荧光具有淬灭作用的纳米材料,包括但不限于氧化石墨烯、单壁碳纳米管、碳化钛 $Ti_3C_2T_x$ (MXene)、二硫化钼(MoS_2)。

[0037] 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铅产品中的应用。

[0038] 在本发明的一些实施方式中,所述产品中还含有缓冲液。

[0039] 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铅的检测试剂在检测土壤中有有效态铅的应用。

[0040] 本发明的第四个方面,提供一种有效态铅的检测方法。

[0041] 在本发明的一些实施方式中,所述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探针和胶体金粒子混合制得检测试剂,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DNA1探针、DNA2探针和胶体金粒子置于缓冲液中溶解。

[0043] 在本发明的一些实施方式中,所述缓冲液为Tris-乙酸缓冲液。

[0044] 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。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。

[0045] 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10~100mM的乙酸钠,10~30mM的乙酸镁。

[0046] 在本发明的一些实施方式中,所述DNA1探针、DNA2探针和胶体金粒子溶解于缓冲液后混合,在23~27℃下放置12~16小时。

[0047] 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:胶体金粒子=1:2.5~20:0.25~10。

[0048] 在本发明的一些实施方式中,所述检测试剂的体系为:

组分	终含量
DNA1探针	20~80nM
DNA2探针	200~400nM
胶体金粒子	20~200nM
Tris-乙酸缓冲液	0.5~2mL

[0050] 在本发明的一些具体实施方式中,所述检测方法的检测试剂体系为:

组分	终含量
----	-----

DNA1 探针	50 nM
DNA2 探针	300 nM
胶体金粒子	100 nM
Tris-乙酸缓冲液	1 mL

[0053] 在本发明的一些实施方式中,所述孵育温度为23~27℃。

[0054] 在本发明的一些实施方式中,所述孵育时间为40~60分钟。

[0055] 在本发明的一些实施方式中,所述检测样品为土壤。

[0056] 所述检测方法的检测原理为:

[0057] 本发明在胶体金粒子表面固定核酸DNA1探针和DNA2探针制得荧光生物传感器,其中DNA1探针的第21~35位碱基组成的核苷酸序列为识别有效态铅的特异性DNA酶的核苷酸序列。DNA2探针是一种茎环结构的核酸探针,其中一端修饰有荧光基团FAM,在DNA2探针的

环部分含有一个rA碱基,代表腺嘌呤核糖核苷酸,rA与相邻的鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸G共同作为切割位点,能够在有效态铅存在时,与识别有效态铅的特异性DNA酶结合反应,发生切割反应,使DNA2探针的核苷酸序列断开,释放出DNA2探针的第1~22位碱基组成的核苷酸序列,此时FAM会远离胶体金,从而恢复FAM荧光,实现荧光信号的释放;本发明的检测方法检测原理为实际样品中特异性DNA序列对不同浓度下的有效态铅的识别能力不同,获得的转换信号的强度有差异,从而实现复杂样品中有效态铅的快速识别与检测。

[0058] 当检测体系中不存在有效态铅时,DNA2探针中的第1~8位碱基组成的核苷酸序列片段和第39~46位碱基组成的核苷酸序列片段互补配对,使DNA2探针在胶体金粒子上保持茎环结构,此时荧光基团FAM靠近胶体金,胶体金会淬灭FAM的荧光,此时检测体系中只有很低的背景荧光。

[0059] 当检测体系中存在有效态铅时,DNA1探针中的第13~20位碱基组成的核苷酸序列和第36~43位碱基组成的核苷酸序列分别与DNA2探针中的第25~32位碱基组成的核苷酸序列和第15~22位碱基组成的核苷酸序列杂交,DNA2探针中的第1~8位碱基组成的核苷酸序列片段和第39~46位碱基组成的核苷酸序列片段互补配对,使DNA2探针在胶体金粒子上保持茎环结构,DNA1探针中的第21~35位碱基组成的核苷酸序列识别有效态铅,进而在DNA2探针中的rAG处切割DNA2探针核苷酸序列,该DNA2探针不再保持茎环结构,从而可释放DNA2探针中的第1~22位碱基组成的核苷酸序列片段,该片段的荧光基团FAM会远离胶体金,从而恢复FAM荧光;当上述反应结束后,DNA1探针和有效态铅会循环利用,进一步与固定在胶体金粒子上的另外的DNA2探针反应,从而切割下一个茎环DNA2探针,通过依次循环切割反应,形成类似步行器的反应过程,从而可把全部胶体金粒子上的DNA2探针切割完毕,释放大量的荧光基团FAM,达到信号放大的目的,实现高灵敏检测有效态铅。

[0060] 本发明的有益效果是:

[0061] 1. 本发明提供了一种检测有效态铅的荧光生物传感器,该荧光生物传感器通过固定在纳米材料上的核酸探针特异性识别有效态铅,进而实现高效检测有效态铅,简化了操作,避免了萃取过程,极大缩短了检测时间。

[0062] 2. 本发明提供的荧光生物传感器用于土壤样品中有效态铅检测,无需复杂的消解萃取过程,可直接在缓冲液中实现检测,与传统的DTPA-CaCl₂法、HCl法萃取后采用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-OES)进行检测的结果相比,相对偏差更小,灵敏度更高,检出限可达25pM,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。

[0063] 3. 本发明提供的荧光生物传感器中的DNA1探针形成了一个类似步行器的结构,当存在有效态铅时能够通过不断的切割DNA2探针,实现信号放大的效果,有效提高了检测灵敏度。

附图说明

[0064] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步的说明,其中:

[0065] 图1为本发明实施例中的荧光生物传感器检测有效态铅的检测原理图;

[0066] 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;

[0067] 图3为本发明实施例中的荧光生物传感器检测有效态铅浓度的线性范围;

[0068] 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铅的检测结果。

具体实施方式

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 下述实施例中的室温均为23~27℃。

[0072] 有效态铅荧光生物传感器检测试剂

[0073] 本实施例制备了一种有效态铅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铅的荧光生物传感器检测试剂,其主要基于DNA1探针、DNA2探针和胶体金粒子构建得到,从而实现有效态铅的快速、高灵敏、定量化检测。

[0074] 上述DNA1探针的核苷酸序列如下所示:

[0075] 5' - (SH-) ACACACACACACCCATCTTCTCCGAGCCGGTCGAAAGTCAGTG - 3'

[0076] (SEQ ID NO.1);

[0077] DNA2探针的核苷酸序列如下所示:

[0078] 5' - (FAM) AACCTAGCAAAAAACACTGACTrAGGAAGATGGAAAAAAGCTAGGT T (-SH) - 3' (SEQ ID NO.2)。

[0079] 其中,DNA1探针的核苷酸序列中的第21~35位核苷酸组成的核苷酸序列为识别有效态铅的特异性核苷酸序列;

[0080] DNA2探针的核苷酸序列中的第1~8位核苷酸组成的核苷酸序列与第39~46位核苷酸组成的核苷酸序列互补配对,形成发夹结构,第23位rA碱基为腺嘌呤核糖核苷酸,与第24位的鸟嘌呤脱氧核糖核苷酸G共同作为DNA2探针的切割位点;

[0081] DNA1探针中第13~20位核苷酸组成的核苷酸序列与DNA2探针中的第25~32位核苷酸组成的核苷酸序列互补配对;

[0082] DNA1探针中第36~43位核苷酸组成的核苷酸序列与DNA2探针中的第15~22位核苷酸组成的核苷酸序列互补配对。

[0083] 有效态铅荧光生物传感器检测试剂的使用方法

[0084] 本实施例将上述实施例中的有效态铅荧光生物传感器检测试剂用于检测土壤样品中的有效态铅,具体检测步骤如下:

[0085] (1) 将DNA1探针和DNA2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50mM的乙酸钠、20mM的乙酸镁)中溶解,再与胶体金溶液(胶体金溶液中含有终浓度为100nM胶体金粒子,胶体金粒子的粒径为15nm)混合均匀,在室温下放置过夜,约12~16小时即得检测试剂,检测试剂体系的组成如表1所示。

[0086] 表1检测试剂的体系组成

[0087]

组分	终含量
DNA1探针	50nM

DNA2探针	300nM
胶体金粒子	100nM
Tris-乙酸缓冲液	1mL

[0088] (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,激发峰波长为495nm,记录发射峰525nm波长下的荧光信号。

[0089] 有效态铅的荧光生物传感器的检测原理示意图如图1所示。

[0090] 当检测体系中不存在有效态铅时,DNA2探针中的第1~8位碱基组成的核苷酸序列片段和第39~46位碱基组成的核苷酸序列片段互补配对,使DNA2探针在胶体金粒子上保持茎环结构,此时荧光基团FAM靠近胶体金,胶体金会淬灭FAM的荧光,此时检测体系中只有很低的背景荧光。

[0091] 当检测体系中存在有效态铅时,DNA1探针中的第13~20位碱基组成的核苷酸序列和第36~43位碱基组成的核苷酸序列分别与DNA2探针中的第25~32位碱基组成的核苷酸序列和第15~22位碱基组成的核苷酸序列杂交,DNA2探针中的第1~8位碱基组成的核苷酸序列片段和第39~46位碱基组成的核苷酸序列片段互补配对,使DNA2探针在胶体金粒子上保持茎环结构,DNA1探针中的第21~35位碱基组成的核苷酸序列识别有效态铅,进而在DNA2探针中的rAG(如图1所示红色小圆点标记位置)处切割DNA2探针核苷酸序列,该DNA2探针不再保持茎环结构,从而可释放DNA2探针中的第1~22位碱基组成的核苷酸序列片段,该片段的荧光基团FAM会远离胶体金,从而恢复FAM荧光;当上述反应结束后,DNA1探针和有效态铅会循环利用,进一步与固定在胶体金粒子上的另外的DNA2探针反应,从而切割下一个茎环DNA2探针,通过依次循环切割反应,形成类似步行器的反应过程,从而可把全部胶体金粒子上的DNA2探针切割完毕,释放大量的荧光基团FAM,达到信号放大的目的,实现高灵敏检测有效态铅。

[0092] 荧光检测反应完后的溶液,激发峰波长为495nm,发射峰波长为525nm;荧光强度与有效态铅的浓度具有正相关性,从而达到检测有效态铅的效果。

[0093] 有效态铅的荧光生物传感器检测方法的特异性评估

[0094] 为了检测上述有效态铅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⁺、Cd²⁺、Zn²⁺和Cr³⁺的标准溶液,终浓度均为10nM,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10nM的Pb²⁺标准溶液作为样品进行检测。

[0095] 具体检测步骤为:

[0096] 配制终浓度为10nM的不同干扰物标准溶液,分别是As³⁺、Hg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺和Cr³⁺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10nM Pb²⁺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。

[0097] 如图2所示,不同干扰物As³⁺、Hg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺和Cr³⁺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Pb²⁺才会使荧光强度明显增加,这证明该方法对Pb²⁺的检测具有很好的特异性。有效态铅的荧光生物传感器检测方法的灵敏度评估

[0098] 为了检测上述有效态铅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(100pM、1nM、10nM、100nM、1μM、10μM、100μM)的 Pb^{2+} 标准溶液作为样品进行检测。

[0099] 具体检测步骤为:

[0100] 配制 Pb^{2+} 标准溶液,浓度分别为100pM、1nM、10nM、100nM、1μM、10μM、100μM。将1mL上述不同浓度的 Pb^{2+} 标准溶液作为检测样品分别加到上述有效态铅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铅荧光生物传感器检测试剂的使用方法的检测步骤。

[0101] 如图3所示,以 Pb^{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100pM到10μM,线性方程是: $F=3.13 \times 10^6 LgC - 3.81 \times 10^6$ ($R^2=0.992$) (F 为荧光强度, C 为 Pb^{2+} 浓度)按照3倍信噪比标准(3S/N),本发明实施例的有效态铅荧光生物传感器检测方法对有效态铅的检测限为25pM。

[0102] 如图4所示,随着 Pb^{2+} 浓度的增加,对应的荧光强度逐渐增加,而当 Pb^{2+} 浓度达到从10μM到100μM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。有效态铅的荧光生物传感器检测方法与现有检测技术的对比评估

[0103] 为了进一步体现上述实施例中的有效态铅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铅,并与上述实施例中的有效态铅的荧光生物传感器检测方法进行对比评估。

[0104] 1.有效态铅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铅检测结果对比:

[0105] 具体操作步骤如下:

[0106] (1)将含有不同浓度有效态铅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铅的浓度。

[0107] (2)将含有不同浓度有效态铅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置于上述有效态铅荧光生物传感器检测试剂中,室温充分孵育50分钟。

[0108] (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,激发峰波长为495nm,记录发射峰525nm处的荧光值。

[0109] (4)根据荧光强度值,采用上述有效态铅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铅的浓度,并与DTPA- $CaCl_2$ 法提取后采用ICP-OES检测方法进行对比,结果如表2所示,两种检测方法相对偏差为-9.6%~6.1%。

[0110] 表2DTPA- $CaCl_2$ 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铅的检测结果

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#	4.6nM	4.9nM	6.1
土壤 2#	22.8nM	20.8nM	-9.6
土壤 3#	125.2nM	129.4nM	3.2
土壤 4#	282.7nM	296.6nM	4.7
土壤 5#	705.9nM	680.5nM	-3.7

[0111] ^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。

[0113] 从表2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铅的快速检测需求。

[0114] 2.有效态铅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铅检测结果对比:

[0115] 具体操作步骤如下:

[0116] (1)含有不同浓度有效态铅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铅的浓度。

[0117] (2)含有不同浓度有效态铅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置于上述有效态铅荧光生物传感器检测试剂中,室温充分孵育50分钟。

[0118] (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,激发峰波长为495nm,记录发射峰525nm处的荧光值。

[0119] (4)根据荧光强度值,采用上述有效态铅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铅的浓度,并与HCl法提取后采用ICP-OES检测方法进行对比,结果如表3所示,两种检测方法相对偏差为-6.1%~10.5%。表3HCl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铅的检测结果

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#	5.8nM	5.6nM	-3.5
土壤 2#	16.2nM	18.1nM	10.5
土壤 3#	52.5nM	56.6nM	7.2

[0121]	土壤 4#	121.6nM	116.4nM	-4.3
	土壤 5#	231.4nM	218.2nM	-6.1

[0122] ^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。

[0123] 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铅的快速检测需求。

[0124] 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铅荧光生物传感器检测方法相对于目前现有的有效态铅检测技术具有更高的技术优势和实际可用性。

[0125] 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。

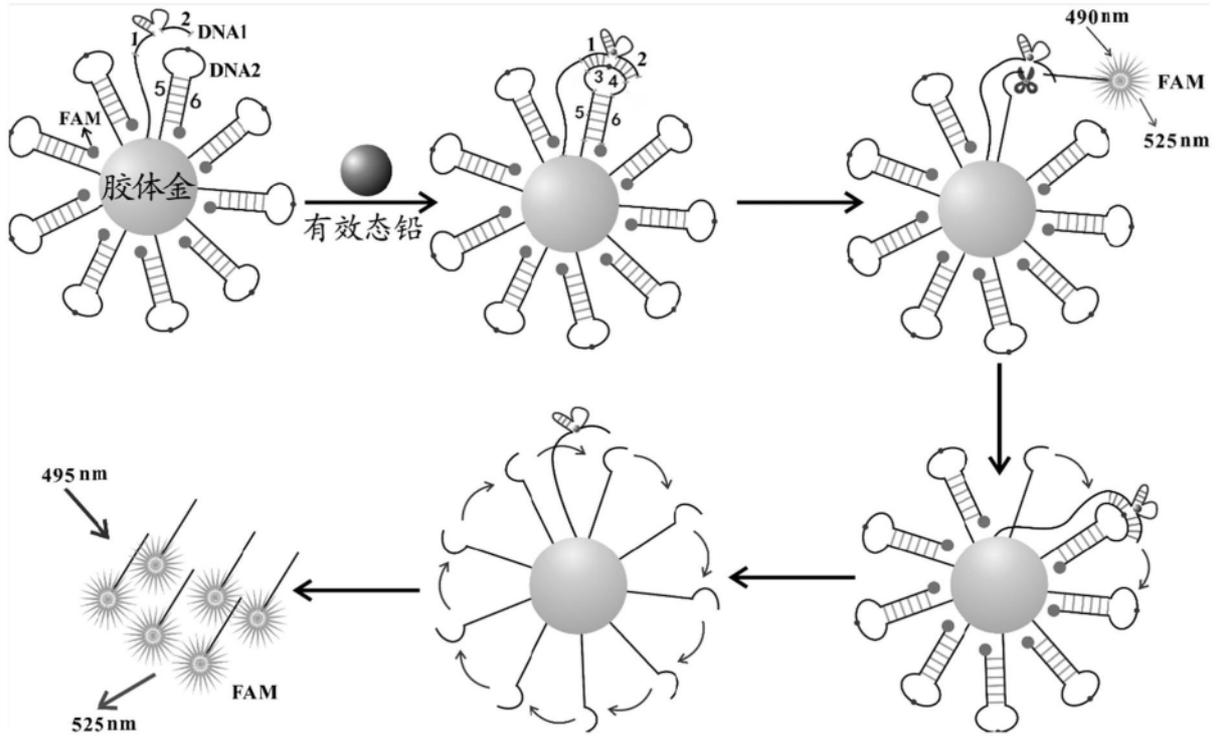


图1

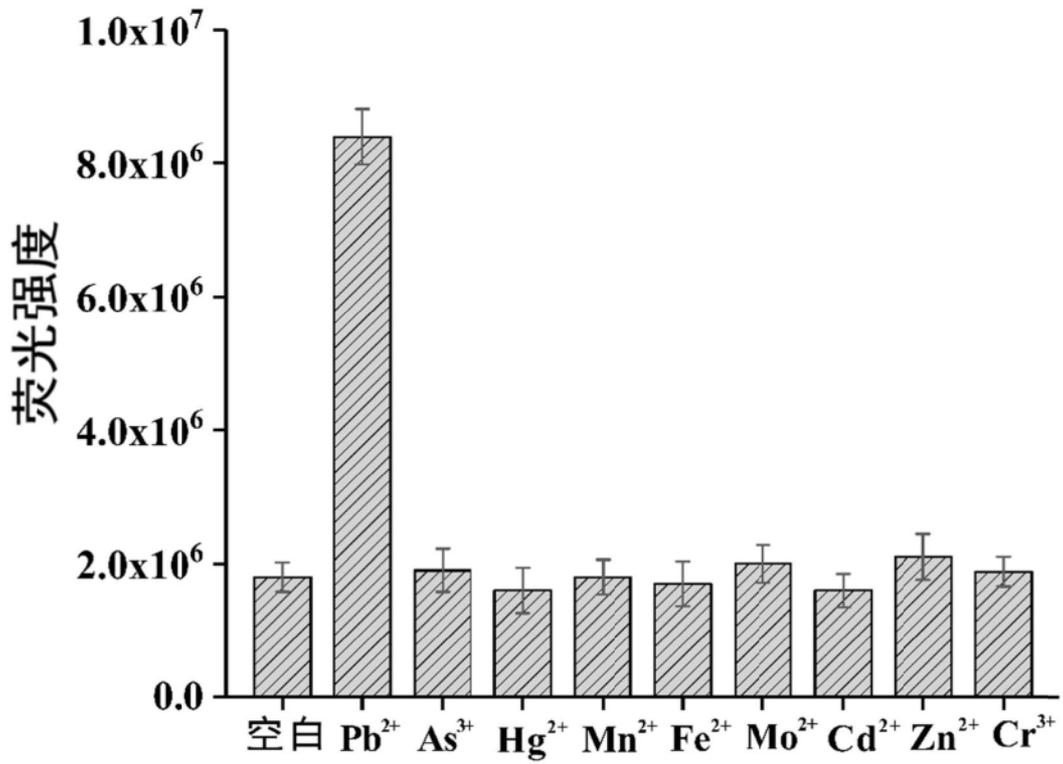


图2

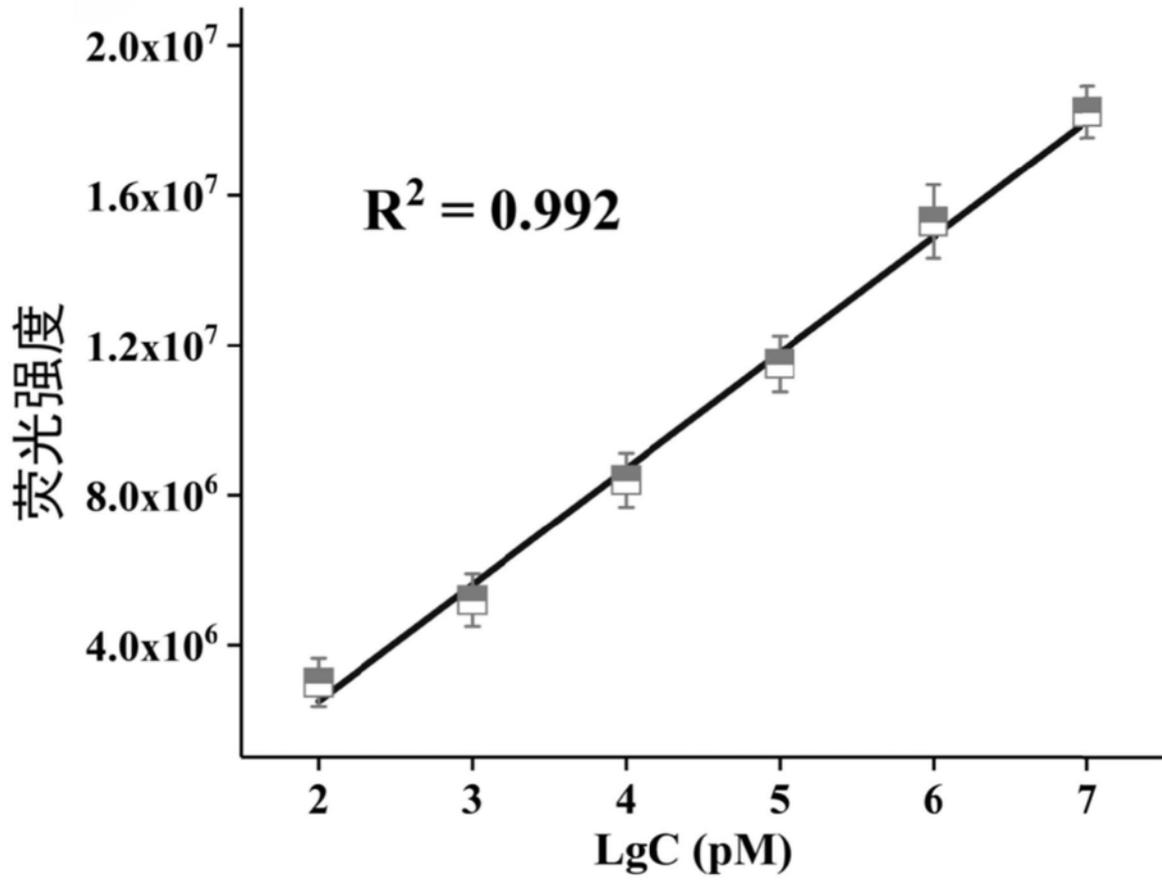


图3

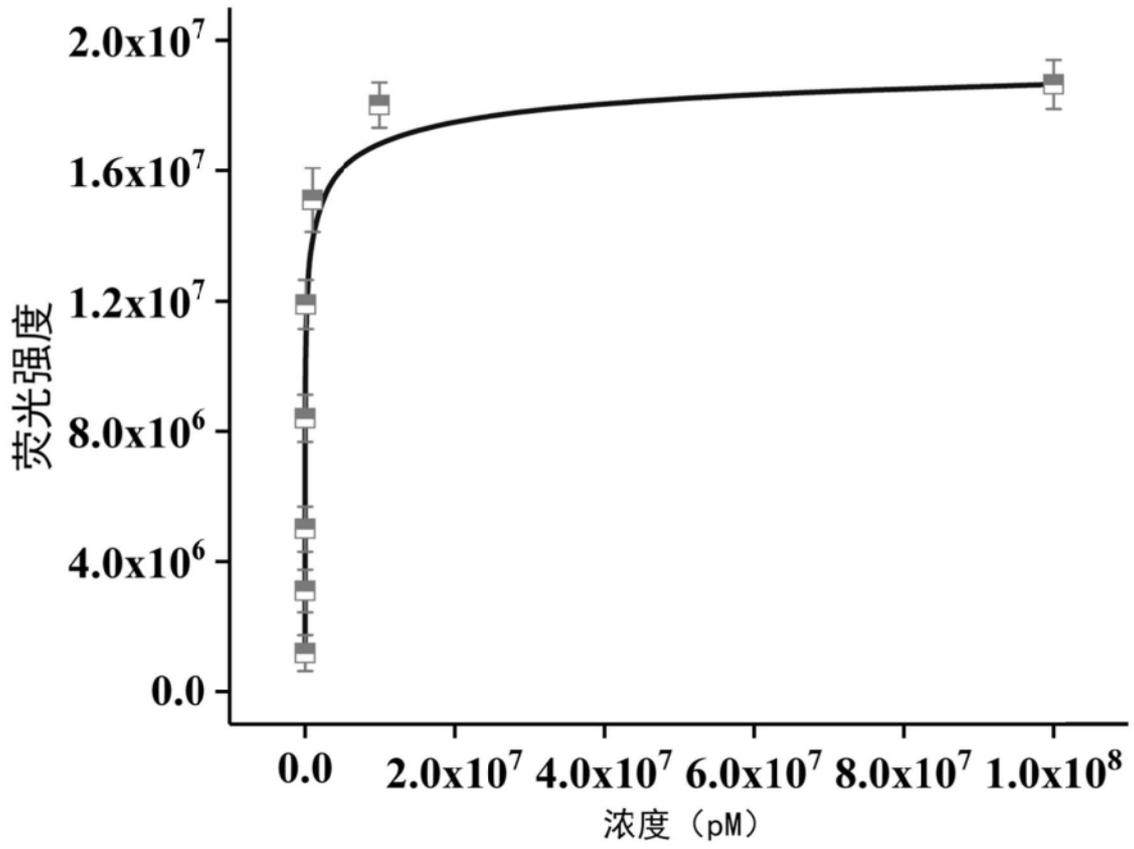


图4