



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104280437 B

(45)授权公告日 2017.01.11

(21)申请号 201410556800.1

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2014.10.21

G01N 27/30(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 27/48(2006.01)

申请公布号 CN 104280437 A

G01N 33/53(2006.01)

(43)申请公布日 2015.01.14

审查员 张楠喆

(66)本国优先权数据

201310686327.4 2013.12.17 CN

(73)专利权人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑路1号

(72)发明人 赵波 邵科峰 吴珺 陈昌云

张红琳

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 韩朝晖

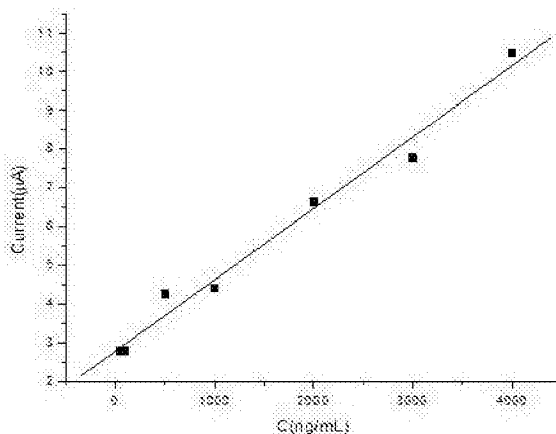
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种β-肾上腺素受体激动剂多残留检测免疫传感器及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种能检测多种β-肾上腺素受体激动剂(以下简称β-激动剂)的免疫电化学传感器。所述传感器包括基底电极、修饰于基底电极表面的石墨烯/壳聚糖复合物膜以及固定于石墨烯/壳聚糖复合物膜表面的β-激动剂多簇抗原。所述传感器表面固定的多簇抗原为沙丁胺醇-莱克多巴胺-BSA或沙丁胺醇-莱克多巴胺-OVA。本发明还提供了一种β-激动剂多残留免疫电化学检测方法,所述的免疫电化学传感器以K₃[Fe(CN)₆]为探针,基于β-激动剂宽谱特异性抗体对β-激动剂的交叉免疫反应,能实现对包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特步他林、马布特罗及妥布特罗在内的六种β-激动剂的检测。



1. 一种 β -肾上腺素受体激动剂的免疫电化学传感器,包括基底电极,其特征在于,所述传感器的基底电极表面修饰石墨烯/壳聚糖混合物膜, β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原固定于所述的石墨烯/壳聚糖混合物膜表面,并以牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点;所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原为沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白或沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白。

2. 根据权利要求1所述的免疫电化学传感器,其特征在于,所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原采用以下方法制备:

1)在BSA或OVA上以混合酸酐法偶联SAL半抗原,并进行纯化:

将0.2 mmol硫酸沙丁胺醇溶于5~10 ml无水乙醇中,加入0.2 mmol戊二酸酐,室温下反应3~5 h,离心;将下层固体溶于5~10 ml N,N-二甲基甲酰胺,加入0.2 mmol三正丁胺和0.2 mmol氯甲酸异丁酯,继续反应1~3 h;将上述反应液加入到5~10 ml含有5~10 mg/ml BSA或OVA的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析3~6次,冷冻干燥,即可得到SAL-BSA或SAL-OVA偶联物;

2)在步骤1)的产物上继续以混合酸酐法偶联RAC半抗原,并进行纯化:

将0.2 mmol戊二酸酐溶于5ml吡啶中,加入0.2 mmol盐酸莱克多巴胺,室温反应10~20 h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于5~10 ml N,N-二甲基甲酰胺,加入0.2 mmol三正丁胺和0.2 mmol氯甲酸异丁酯,继续反应1~3 h;将上述反应液加入到5~10 ml含有5~10 mg/ml SAL-BSA或SAL-OVA偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析3~6次,冷冻干燥即可得到所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫电化学传感器,其特征在于,所述的免疫电化学传感器采用以下方法制备:首先对基底电极进行打磨、抛光和超声清洗;然后将石墨烯/壳聚糖混合物修饰于电极表面,再将 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原滴涂于石墨烯/壳聚糖修饰的电极表面,最后用牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点。

4. 一种 β -肾上腺素受体激动剂多残留免疫电化学检测方法,包括以下步骤:

1)免疫电化学传感器的制备:首先对玻碳电极进行打磨、抛光和超声清洗;然后将石墨烯/壳聚糖混合物修饰于电极表面,再将 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原滴涂于石墨烯/壳聚糖修饰的电极表面,最后用牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点;

2)标准溶液的配制:配制一组包括空白标样在内的含有不同已知浓度的游离 β -肾上腺素受体激动剂、PH为7.4的磷酸缓冲溶液为标准溶液,其中含有相同浓度的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体;

3)工作曲线的建立:将所述免疫传感器分别浸入标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗免疫传感器,在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,记录响应电流;空白标样的响应电流为 I_0 ,含有游离 β -肾上腺素受体激动剂的标样的响应电流为 I_x ,响应电流的增加值 ΔI 等于含有游离 β -肾上腺素受体激动剂的标样的响应电流 I_x 与空白标样的响应电流 I_0 的差值;将所述 ΔI 与标准溶液中 β -肾上腺素受体激动剂的浓度 C 绘制成 $\Delta I-C$ 工作曲线,或采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程;

4) β -肾上腺素受体激动剂浓度的测定:将待测样品配制为含有与步骤2)相同浓度的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体的磷酸缓冲溶液,按照与步骤3)相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的增加值 ΔI 和 $\Delta I-C$

C线性回归方程,得到 β -肾上腺素受体激动剂含量。

5.根据权利要求4所述的 β -肾上腺素受体激动剂多残留免疫电化学检测方法,其特征在于,所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原为沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白或沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白。

6.根据权利要求4所述的 β -肾上腺素受体激动剂多残留免疫电化学检测方法,其特征在于,所述 β -肾上腺素受体激动剂包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特步他林、马布特罗和妥布特罗。

7.根据权利要求4所述的 β -肾上腺素受体激动剂多残留免疫电化学检测方法,其特征在于,所述的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体由所述的 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原通过动物免疫获得。

一种 β -肾上腺素受体激动剂多残留检测免疫传感器及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和分析化学技术领域,涉及一种基于抗体交叉反应的电化学免疫传感器及其检测方法,具体地涉及一种 β -肾上腺素受体激动剂(以下简称 β -激动剂)多残留检测免疫电化学传感器及其检测方法。

背景技术

[0002] β -肾上腺素受体激动剂,简称 β -激动剂,是动物源性食品中检出率最高、危害最严重的化学性残留危害物,其中最著名的就是克伦特罗(clenbuterol,CL),俗称“瘦肉精”。上世纪80年代,美国脂胺公司的科研人员意外发现,“瘦肉精”能增强动物脂肪分解,促进蛋白质合成,大大缩短肉品上市周期,显著提高胴体瘦肉率、饲料回报率和经济效益。随后在世界各地迅速推广,80年代后期,传入我国并在许多地区的饲料加工企业和养殖业推广使用,很快成为养殖业应用最广泛的“添加剂”。

[0003] “瘦肉精”除克伦特罗外,还包括沙丁胺醇(salbutamol,SAL)、莱克多巴胺(ractopamine,RAC)等20多个结构和性质相类似的化合物。这类化合物进入体内后选择性作用于腺苷酸环化酶,导致人体产生低敏感现象,哮喘发生率和发病程度升高;还可导致内分泌紊乱,诱发染色体畸变及恶性肿瘤,严重时可致人死亡。因此我国和世界上大多数国家都明文禁止“瘦肉精”用作饲料添加剂。

[0004] 目前, β -激动剂类兽药残留的检测方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、酶联免疫法(ELISA)和荧光免疫法(FIA)等。

[0005] 色谱法是 β -激动剂兽药残留的主要检测方法,但是色谱法检测成本高、操作复杂、大量的阴性样品重复检测;而酶联免疫法具有特异性强、样品前处理简单等优点,但特异性强的特点同时也决定了它的致命缺点:一种酶联免疫试剂盒或试纸条只能检测一种兽药残留,而无法检测其它的同类兽药残留,这就是容易出现漏检的原因(如2011年轰动全国的“双汇瘦肉精”事件);此外,随着 β -激动剂多种替代品的出现,如果进行完全检测,一个样品需要使用多种检测产品,大大提高了检测成本和工作时间,失去了快速筛选的意义。

[0006] 多残留免疫分析能同时检测一类药物残留,其低成本、高通量、快速现场的优点是现有的色谱法和特异性免疫方法无法比拟的,是未来食品安全检测领域的关键技术之一,逐渐引起人们重视。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种 β -激动剂多残留检测免疫电化学传感器,所述的传感器可用于 β -激动剂多残留免疫分析。

[0008] 本发明的另一目的还在于提供一种 β -激动剂多残留免疫电化学检测方法,所述的方法快速、高效、灵敏度高,具有较低的检出限,可用于食品中多种 β -激动剂的检测。

[0009] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0010] 一种 β -肾上腺素受体激动剂多残留免疫电化学传感器,包括基底电极,其特征在于,所述传感器的基底电极表面修饰石墨烯/壳聚糖混合物膜, β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原固定于所述的石墨烯/壳聚糖混合物膜表面,并以牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点;所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原为沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白(SAL-RAC-BSA)或沙丁胺醇-莱克多巴胺-卵清蛋白(SAL-RAC-OVA)。

[0011] 所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原采用以下方法制备:

[0012] 1)在BSA或OVA上以混合酸酐法偶联SAL半抗原,并进行纯化:

[0013] 将0.2 mmol硫酸沙丁胺醇溶于5~10 ml无水乙醇中,加入0.2 mmol戊二酸酐,室温下反应3~5 h,离心;将下层固体溶于5~10 ml N,N-二甲基甲酰胺,加入0.2 mmol三正丁胺和0.2 mmol氯甲酸异丁酯,继续反应1~3 h;将上述反应液加入到5~10 ml含有5~10 mg/ml BSA或OVA的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析3~6次,冷冻干燥,即可得到SAL-BSA或SAL-OVA偶联物;

[0014] 2)在步骤1)的产物上继续以混合酸酐法偶联RAC半抗原,并进行纯化:

[0015] 将0.2 mmol戊二酸酐溶于5ml吡啶中,加入0.2 mmol盐酸莱克多巴胺,室温反应10~20 h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于5~10 ml N,N-二甲基甲酰胺,加入0.2 mmol三正丁胺和0.2 mmol氯甲酸异丁酯,继续反应1~3 h;将上述反应液加入到5~10 ml含有5~10 mg/ml SAL-BSA或SAL-OVA偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜;将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析3~6次,冷冻干燥即可得到所述 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原。

[0016] 所述的基底电极优选玻碳电极。

[0017] 所述的免疫电化学传感器采用以下方法制备:首先对基底电极进行打磨、抛光和超声清洗;然后将石墨烯/壳聚糖混合物修饰于电极表面,再将 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原滴涂于石墨烯/壳聚糖修饰的电极表面,最后用牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点。

[0018] 为实现多种 β -激动剂的检测,本发明采取以下技术方案:一种 β -肾上腺素受体激动剂多残留免疫电化学检测方法,包括以下步骤:

[0019] 1)免疫电化学传感器的制备:首先对玻碳电极进行打磨、抛光和超声清洗;然后将石墨烯/壳聚糖混合物修饰于电极表面,再将 β -肾上腺素受体激动剂多簇抗原滴涂于石墨烯/壳聚糖修饰的电极表面,最后用牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点;

[0020] 2)标准溶液的配制:配制一组包括空白标样在内的含有不同已知浓度的游离 β -肾上腺素受体激动剂、PH为7.4的磷酸缓冲溶液为标准溶液,其中含有相同浓度的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体;

[0021] 3)工作曲线的建立:将所述免疫传感器分别浸入标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗免疫传感器,在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,记录响应电流;空白标样的响应电流为 I_0 ,含有游离 β -肾上腺素受体激动剂的标样的响应电流为 I_x ,响应电流的增加值 ΔI 等于含有游离 β -肾上腺素受体激动剂的标样的响应电流 I_x 与空白标样的响应电流 I_0 的差值;将所述 ΔI 与标准溶液中 β -肾上腺素受体激动剂的浓度 C 绘制成 $\Delta I-C$ 工作曲线,或采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程;

[0022] 4) β -肾上腺素受体激动剂浓度的测定:将待测样品配制为含有与步骤2)相同浓度的 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体的磷酸缓冲溶液,按照与步骤3)相同的方法对所

述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的增加值 ΔI 和 ΔI -C 线性回归方程,得到 β -肾上腺素受体激动剂含量。

[0023] 所述 β -肾上腺素受体激动剂包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特步他林、马布特罗及妥布特罗。

[0024] 所述 β -肾上腺素受体激动剂宽谱特异性抗体是由所述的多簇抗原通过动物免疫获得的。

[0025] 本发明提供的免疫电化学传感器及其检测方法能够用于多种 β -激动剂的检测,其最低检出限分别为:克伦特罗和沙丁胺醇为 0.3 ng/ml,莱克多巴胺为 0.1 ng/ml,特步他林 0.2 ng/ml,马布特罗和妥布特罗 0.4 ng/ml;检测线性范围分别为:克伦特罗为 50~4000 ng/ml,沙丁胺醇为 1~1500 ng/ml,莱克多巴胺为 50~3000 ng/ml,特步他林为 10~3000 ng/ml,马布特罗为 10~4000 ng/ml,妥布特罗为 1~2000 ng/ml。

[0026] 本发明具有如下的有益效果:本发明的传感器以 $K_3[Fe(CN)_6]$ 为探针,基于 β -激动剂宽谱特异性抗体对 β -激动剂的交叉免疫反应,能实现对包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特步他林、马布特罗及妥布特罗在内的六种 β -激动剂的检测。由于采用了对六种 β -激动剂都具有较高交叉反应率的 β -激动剂宽谱特异性抗体,因而能实现对上述六种 β -激动剂的共同检测。所述的传感器快速、高效、灵敏度高,并且所述的方法具有较低的检出限(0.1 ng/ml~0.4 ng/ml)和较宽的线性范围(1~1500 ng/ml 或 50~4000 ng/ml)。

[0027] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述。本发明的保护范围并不以具体实施方式为限,而是由权利要求加以限定。

附图说明

[0028] 图1为SAL、BSA以及SAL-BSA偶联物的紫外可见光谱图。

[0029] 图2为RAC、SAL-BSA偶联物以及SAL-RAC-BSA偶联物的紫外可见光谱图。

[0030] 图3为石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器在含有效价浓度为1:6400的 β -激动剂宽谱特异性抗体和不同浓度的游离的克伦特罗(a)4000 ng/ml,(b)3000 ng/ml,(c)2000 ng/ml,(d)1000 ng/ml,(e)500 ng/ml,(f)100 ng/ml,(g)50 ng/ml,(h)0ng/mL的孵育液中孵育后,在2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的磷酸缓冲溶液中的DPV曲线图。

[0031] 图4为响应电流的变化 ΔI 与克伦特罗浓度的工作曲线图。

[0032] 图5为石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器在含有效价浓度为1:6400的 β -激动剂宽谱特异性抗体和不同浓度的游离的沙丁胺醇(a)1500 ng/ml,(b)1000 ng/ml,(c)500 ng/ml,(d)100 ng/ml,(e)50 ng/ml,(f)10 ng/ml,(g)1 ng/ml,(h)0ng/mL的孵育液中孵育后,在2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的磷酸缓冲溶液中的DPV曲线图。

[0033] 图6为响应电流的变化 ΔI 与沙丁胺醇浓度的线性曲线图。

[0034] 图7为石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器在含有效价浓度为1:6400的 β -激动剂宽谱特异性抗体和不同浓度的游离的莱克多巴胺(a)3000 ng/ml,(b)2000 ng/ml,(c)1000 ng/ml,(d)500 ng/ml,(e)100 ng/ml,(f)50 ng/ml,(g)0ng/mL的孵育液中孵育后,在2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的磷酸缓冲溶液中的DPV曲

线图。

[0035] 图8为响应电流的变化 ΔI 与莱克多巴胺浓度的线性曲线图。

具体实施方式

[0036] 实施例1 多簇抗原(SAL-RAC-BSA偶联物)的制备

[0037] 1)在BSA上以混合酸酐法偶联SAL半抗原,再进行纯化:

[0038] 将0.2 mmol硫酸沙丁胺醇溶于5~10 ml无水乙醇中,加入0.2 mmol戊二酸酐,室温下反应3~5 h,离心。将下层固体溶于5~10 ml N,N-二甲基甲酰胺,加入0.2 mmol三正丁胺和0.2 mmol氯甲酸异丁酯,继续反应1~3 h。将上述反应液缓慢加入到5~10 ml含有5~10 mg/ml BSA的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析3~6次,冷冻干燥,即可得到SAL-BSA偶联物冻干粉。根据SAL、BSA以及SAL-BSA偶联物的紫外可见吸收光谱图(图1)计算可得偶联比,BSA:SAL = 1:8.5;

[0039] 2)在步骤1)的产物上继续以混合酸酐法偶联RAC半抗原,再进行纯化:

[0040] 将0.2 mmol戊二酸酐溶于5ml吡啶中,加入0.2 mmol盐酸莱克多巴胺,室温反应10~20 h,蒸干溶剂,将所得油状物溶于5~10 ml N,N-二甲基甲酰胺,加入0.2 mmol三正丁胺和0.2 mmol氯甲酸异丁酯,继续反应1~3 h。将上述反应液缓慢加入到5~10 ml含有5~10 mg/ml SAL-BSA偶联物的磷酸缓冲溶液中,室温反应过夜。将上述反应液用磷酸缓冲溶液透析3~6次,冷冻干燥即可得到SAL-RAC-BSA偶联物冻干粉。根据RAC、SAL-BSA偶联物以及SAL-RAC-BSA偶联物的紫外可见吸收光谱图(图2)计算可得偶联比,BSA:SAL:RAC = 1:8.5:30。

[0041] 实施例2 宽谱特异性抗体(抗SAL-RAC-BSA抗体)的制备

[0042] 用实施例1合成的SAL-RAC-BSA偶联物作为免疫原免疫体重约 2kg 的健康大白兔。首次免疫时将0.25mg免疫原与等量弗氏完全佐剂混合并充分乳化,背部皮下多点注射。两周后用同样剂量免疫原与等量弗氏不完全佐剂进行乳化并进行加强免疫,每两周加强免疫一次,共加强三次。最后一次免疫10天后对大白兔进行颈静脉采血,放在4℃环境下静置30 min,再用硫酸铵多级沉淀法进行纯化,即可得到抗SAL-RAC-BSA多克隆抗体。

[0043] 实施例3 电化学免疫传感器及其制备

[0044] 将直径为3 mm的玻璃碳电极依次用直径为0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉打磨,依次用无水乙醇-蒸馏水、蒸馏水超声清洗5 min,再用蒸馏水冲洗干净。在电极上滴涂4 μl 石墨烯/壳聚糖分散液,然后将2 μl 0.2 mg/ml的沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白溶液滴涂于电极表面,室温下晾干。最后将电极浸泡在5%的BSA溶液中,在37℃烘箱中孵育30 min,以封闭剩余的活性位点。

[0045] 实施例4 对克伦特罗的检测

[0046] 将石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器浸入总体积为50 μL 的含有不同浓度的游离克伦特罗和效价浓度为1:6400的 β -激动剂宽谱特异性抗体的磷酸缓冲溶液中,在37℃孵育30 min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于2 mmol/L的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描(图3)。

[0047] 将在克伦特罗浓度为0ng/mL的孵育液中孵育后的修饰电极的DPV峰电流定义为 I_0 ,在含有不同浓度克伦特罗的孵育液孵育后的修饰电极的DPV峰电流定义为 I_x ,计算 $\Delta I =$

$I_x - I_0$,以 ΔI 对克伦特罗浓度(C)作图可得 $\Delta I-C$ 工作曲线(图4)。采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程: $Y=2.78905+0.00184X$,克伦特罗的浓度在50~4000 ng/ml范围内与 ΔI 成正比,线性相关系数为0.99138。以大于噪音信号3倍的电流信号对应的浓度为最低检出限,重复5次以上实验得出,上述方法的最低检出限为0.3 ng/ml。

[0048] 实施例5 对沙丁胺醇的检测

[0049] 将石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器浸入总体积为50 μ L的含有不同浓度的游离沙丁胺醇和效价浓度为1:6400的 β -激动剂宽谱特异性抗体的磷酸缓冲溶液中,在37 $^{\circ}$ C孵育40 min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描(图5)。

[0050] 将在沙丁胺醇浓度为0ng/mL的孵育液中孵育后的修饰电极的DPV峰电流定义为 I_0 ,在含有不同浓度沙丁胺醇的孵育液孵育后的修饰电极的DPV峰电流定义为 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对沙丁胺醇浓度(C)作图可得 $\Delta I-C$ 工作曲线(图6)。采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程: $Y=2.86736+0.00598X$,沙丁胺醇的浓度在1~1500 ng/ml范围内与 ΔI 成正比,线性相关系数为0.99313。以大于噪音信号3倍的电流信号对应的浓度为最低检出限,重复5次以上实验得出,上述方法的最低检测限为0.3 ng/ml。

[0051] 实施例6 对莱克多巴胺的检测

[0052] 将石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器浸入总体积为50 μ L的含有不同浓度的游离莱克多巴胺和效价浓度为1:6400的 β -激动剂宽谱特异性抗体的磷酸缓冲溶液中,在37 $^{\circ}$ C孵育30 min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描(图7)。

[0053] 将在莱克多巴胺浓度为0ng/mL的孵育液中孵育后的修饰电极的DPV峰电流定义为 I_0 ,在含有不同浓度莱克多巴胺的孵育液孵育后的修饰电极的DPV峰电流定义为 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对莱克多巴胺浓度(C)作图可得 $\Delta I-C$ 工作曲线(图8)。采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程: $Y=0.84218+0.00228X$,莱克多巴胺的浓度在50~3000 ng/ml范围内与 ΔI 成正比,线性相关系数为0.98181。以大于噪音信号3倍的电流信号对应的浓度为最低检出限,重复5次以上实验得出,上述方法的最低检测限为0.1 ng/ml。

[0054] 实施例7 鸭肉样品中加标特步他林的测定

[0055] 1)鸭肉样品的处理:称取 1 ± 0.0050 g鸭肉于到10 ml的样品管中,加入特步他林标准液,和3 ml乙腈-丙酮提取液(V:V=4:1),混合物超声振荡30分钟,于2000 r/m下离心10分钟,将上清液转移至氮吹管中,残渣用3 ml的相同提取液重复提取1次,上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于50 $^{\circ}$ C温度下浓缩蒸发,浓缩物加入1 ml的pH为7.4磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0056] 2)鸭肉样品中加标特步他林的测定:分别取等量的不同鸭肉提取液样品,和 β -激动剂宽谱特异性抗体溶液及磷酸缓冲溶液混合配成孵育液,使得总体积为50 μ l,且 β -激动剂宽谱特异性抗体浓度均相等。将石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器浸入孵育液中,在37 $^{\circ}$ C孵育25 min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。定义空白样品的峰电流为 I_0 ,其他样品的峰电流 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$ 。

[0057] 以与实施例4中相同的方法得到的DPV峰电流差值 ΔI 与特步他林的浓度C的 $\Delta I-C$

工作曲线,计算得到特步他林的浓度,检测回收率结果如表1。

[0058] 表1为免疫传感器检测加标猪肉中的特步他林浓度的回收率

	特步他林添加量 (ng/ml)	特步他林测定量 (ng/ml)	回收率 (%)
[0059]	500.0	402.0, 430.7, 584.9	80.4, 86.1, 116.9
	1500.0	1381.4, 1732.6, 1579.1	92.1, 115.5, 105.7
	3000.0	3197.5, 2879.0, 3301.7	106.6, 95.9, 110.0

[0060] 实施例8 猪肉样品中加标马布特罗的测定

[0061] 1)猪肉样品的处理:称取 1 ± 0.0050 g猪肉于到10 ml的样品管中,加入马布特罗标准液,和3 ml乙腈-丙酮提取液(V:V=4:1),混合物超声振荡30分钟,于2000 r/m下离心10分钟,将上清液转移至氮吹管中,残渣用3 ml的相同提取液重复提取1次,上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于50 °C温度下浓缩蒸发,浓缩物加入1 ml的pH为7.4磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0062] 2)猪肉样品中加标马布特罗的测定:分别取等量的不同猪肉提取液样品,和 β -激动剂宽谱特异性抗体溶液及磷酸缓冲溶液混合配成孵育液,使得总体积为50 μ l,且 β -激动剂宽谱特异性抗体浓度均相等。将石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器浸入孵育液中,在37 °C孵育25 min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。定义空白样品的峰电流为 I_0 ,其他样品的峰电流 I_x ,计算 $\Delta I = I_x - I_0$ 。

[0063] 以与实施例4中相同的方法得到的DPV峰电流差值 ΔI 与马布特罗的浓度C的 $\Delta I-C$ 工作曲线,计算得到马布特罗的浓度,检测回收率结果如表2。

[0064] 表2为免疫传感器检测加标猪肉中的马布特罗浓度的回收率

	马布特罗添加量 (ng/ml)	马布特罗测定量 (ng/ml)	回收率 (%)
[0065]	500.0	427.5, 441.2, 539.6	85.5, 88.2, 107.9
	2000.0	1931.2, 2160.2, 1756.1	96.6, 108.1, 87.8
	4000.0	3801.5, 4426.2, 3543.6	95.0, 110.6, 88.6

[0066] 实施例9 鸡肉样品中加标妥布特罗的测定

[0067] 1)鸡肉样品的处理:称取 1 ± 0.0050 g鸡肉于到10 ml的样品管中,加入妥布特罗标准液,和3 ml乙腈-丙酮提取液(V:V=4:1),混合物超声振荡30分钟,于2000 r/m下离心10分钟,将上清液转移至氮吹管中,残渣用3 ml的相同提取液重复提取1次,上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于50 °C温度下浓缩蒸发,浓缩物加入1 ml的pH为7.4磷酸缓

冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0068] 2) 鸡肉样品中加标妥布特罗的测定: 分别取等量的不同鸡肉提取液样品, 和 β -激动剂宽谱特异性抗体溶液及磷酸缓冲溶液混合配成孵育液, 使得总体积为50 μ l, 且 β -激动剂宽谱特异性抗体浓度均相等。将石墨烯/壳聚糖/沙丁胺醇-莱克多巴胺-牛血清白蛋白修饰的免疫电化学传感器浸入孵育液中, 在37 $^{\circ}$ C孵育25 min, 用磷酸缓冲溶液冲洗后于2 mmol/L的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。定义空白样品的峰电流为 I_0 , 其他样品的峰电流 I_x , 计算 $\Delta I = I_x - I_0$ 。

[0069] 以与实施例4中相同的方法得到的DPV峰电流差值 ΔI 与妥布特罗的浓度C的 $\Delta I-C$ 工作曲线, 计算得到妥布特罗的浓度, 检测回收率结果如表3。

[0070] 表3为免疫传感器检测加标鸡肉中的妥布特罗浓度的回收率

妥布特罗添加量 (ng/ml)	妥布特罗测定量 (ng/ml)	回收率 (%)
100.0	112.3, 91.6, 84.2	112.3, 91.6, 84.2
1000.0	881.4, 1162.0, 879.1	88.1, 116.0, 87.9
2000.0	1797.0, 2142.4, 1832.9	89.8, 107.1, 91.6

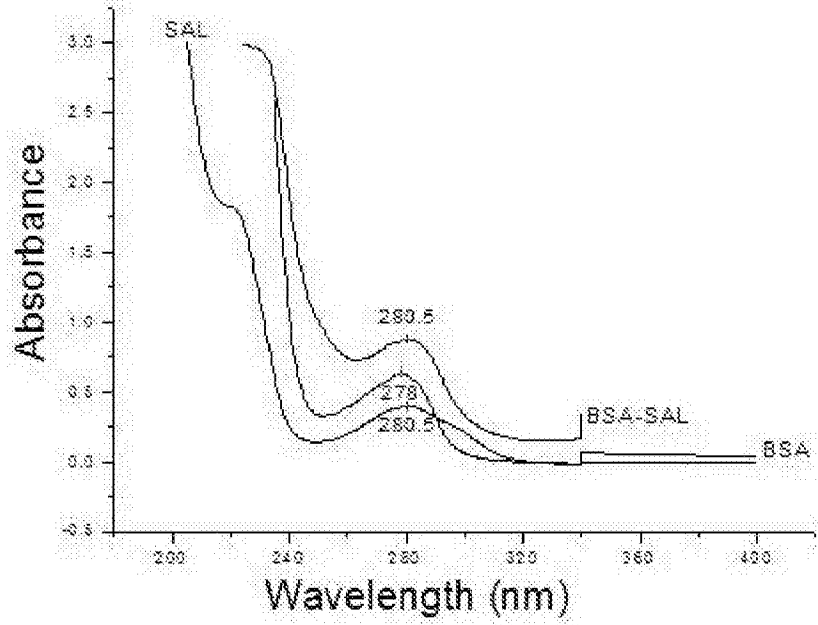


图1

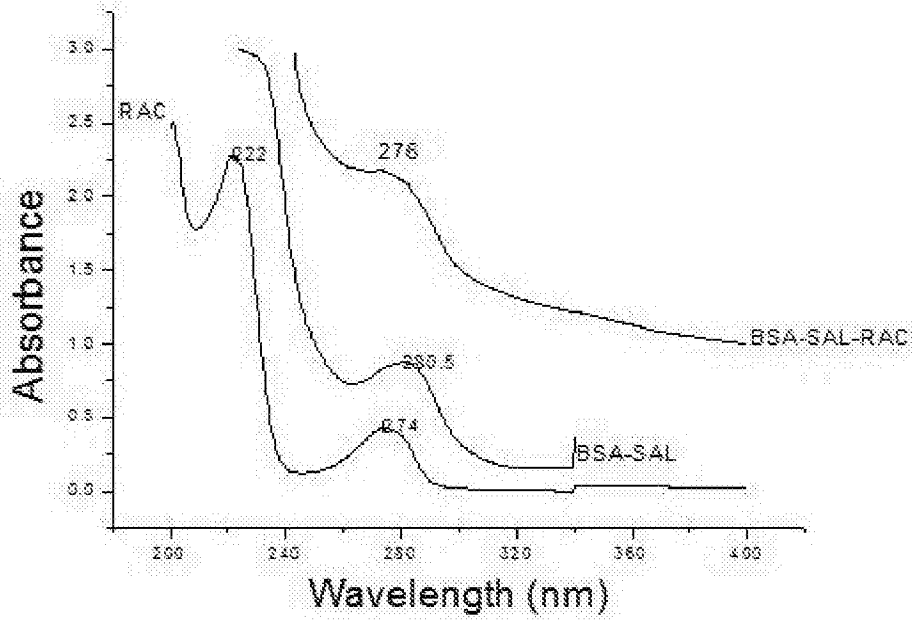


图2

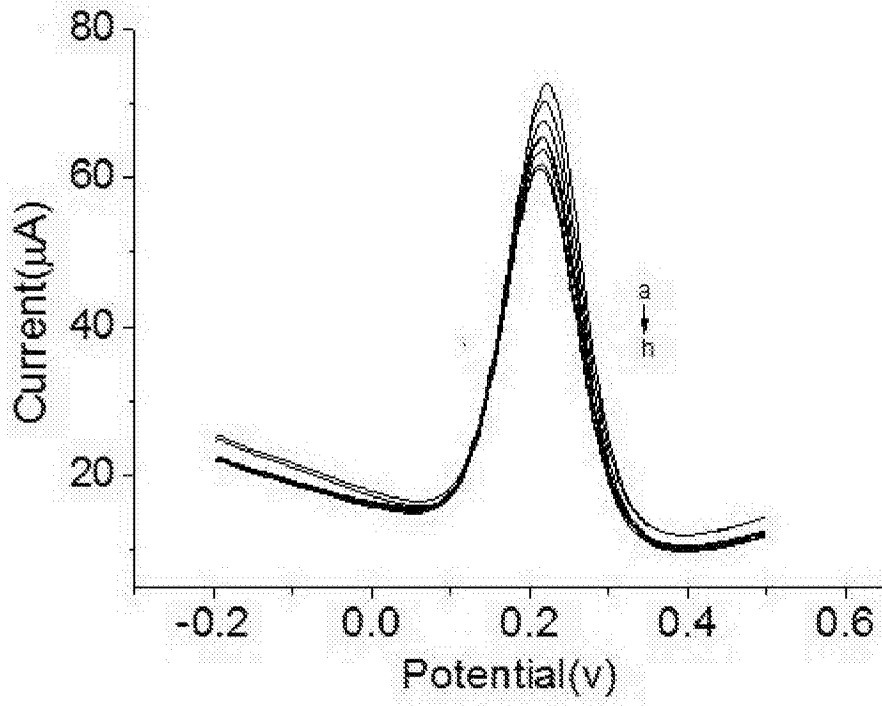


图3

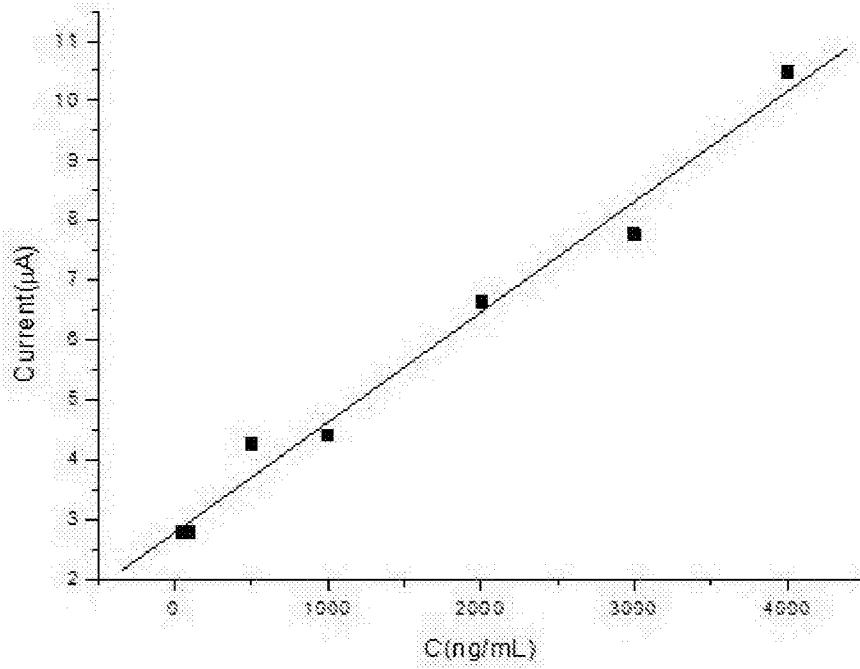


图4

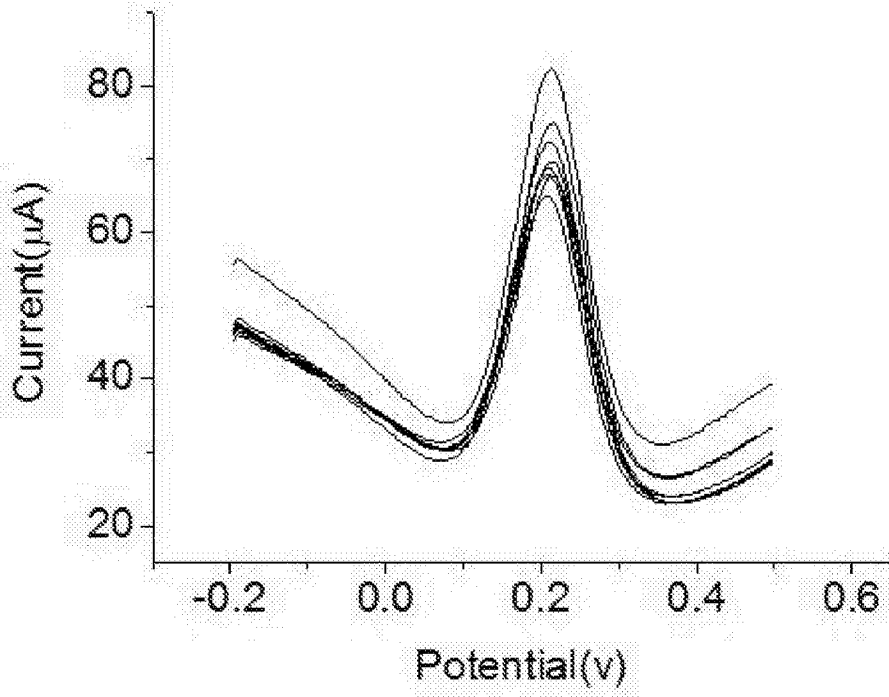


图5

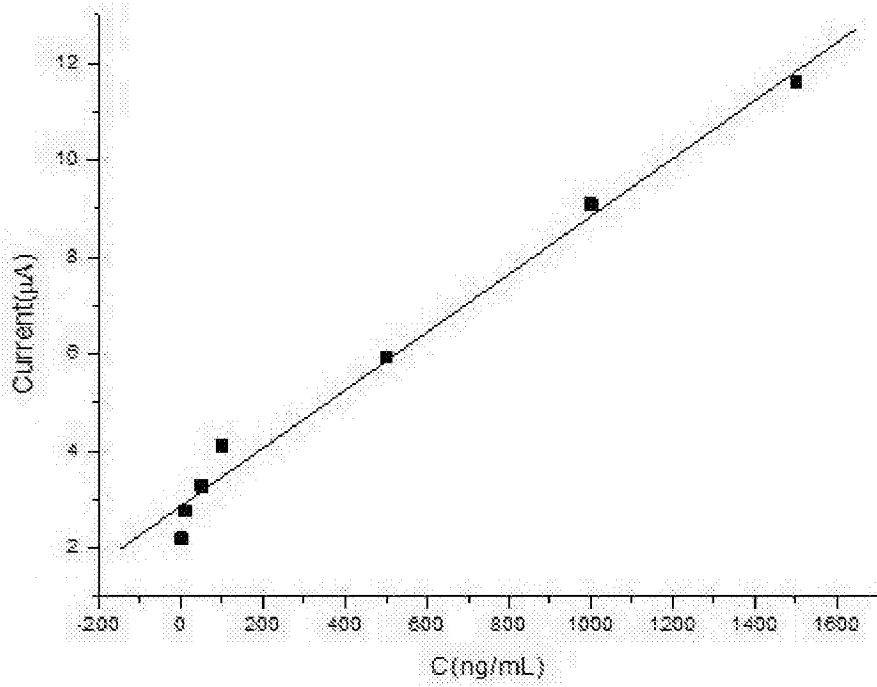


图6

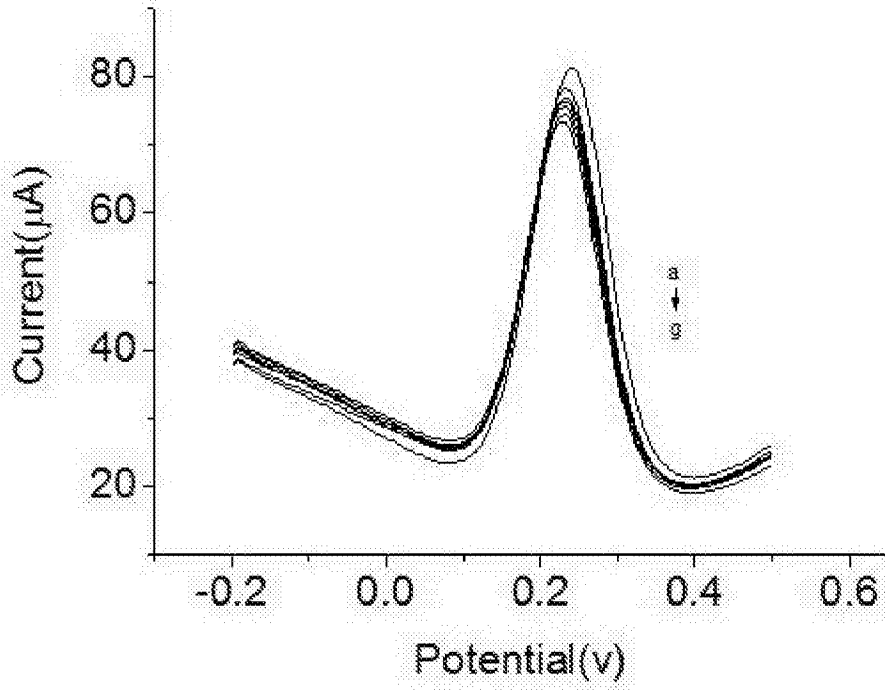


图7

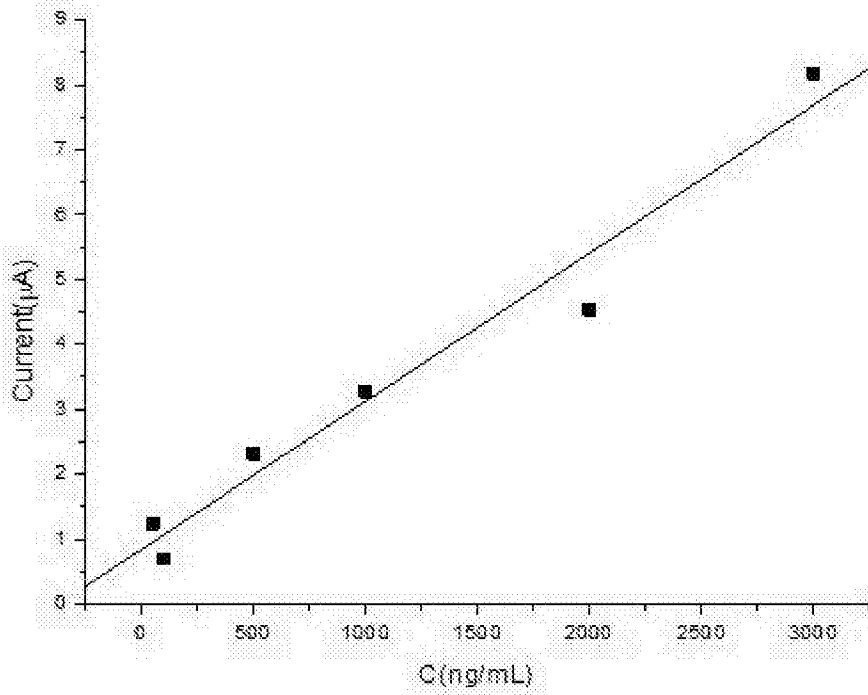


图8

专利名称(译)	一种 β -肾上腺素受体激动剂多残留检测免疫传感器及其检测方法		
公开(公告)号	CN104280437B	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201410556800.1	申请日	2014-10-21
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	赵波 邵科峰 吴璐 陈昌云 张红琳		
发明人	赵波 邵科峰 吴璐 陈昌云 张红琳		
IPC分类号	G01N27/30 G01N27/48 G01N33/53		
代理人(译)	韩朝晖		
优先权	201310686327.4 2013-12-17 CN		
其他公开文献	CN104280437A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种能检测多种 β -肾上腺素受体激动剂(以下简称 β -激动剂)的免疫电化学传感器。所述传感器包括基底电极、修饰于基底电极表面的石墨烯/壳聚糖复合物膜以及固定于石墨烯/壳聚糖复合物膜表面的 β -激动剂多簇抗原。所述传感器表面固定的多簇抗原为沙丁胺醇-莱克多巴胺-BSA或沙丁胺醇-莱克多巴胺-OVA。本发明还提供了一种 β -激动剂多残留免疫电化学检测方法,所述的免疫电化学传感器以 $K_3[Fe(CN)_6]$ 为探针,基于 β -激动剂宽谱特异性抗体对 β -激动剂的交叉免疫反应,能实现对包括克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、特步他林、马布特罗及妥布特罗在内的六种 β -激动剂的检测。

