



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106442427 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610892262.2

(22)申请日 2016.10.13

(71)申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路1038号

(72)发明人 潘明飞 王晓骏 王俊平 刘冰 王硕

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事务所(普通合伙) 12219

代理人 陈松

(51)Int.Cl.

G01N 21/59(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/94(2006.01)

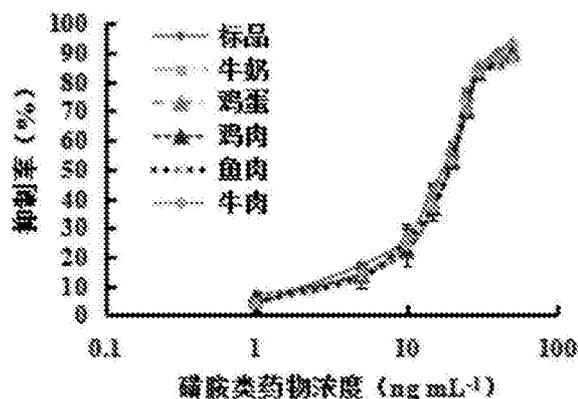
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法

(57)摘要

本发明涉及一种磺胺类药物表面等离子体共振免疫传感器及工作方法,其主要技术要点是用胺基偶联磺胺包被原(磺胺-OVA)修饰到传感芯片表面,将磺胺类待测药物与抗体混合液流经表面等离子体共振芯片表面,依据免疫抑制原理,实现对四种磺胺类药物(磺胺喹恶啉、磺胺氯哒嗪、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嘧)的分析检测。该发明将免疫检测高特异性与表面等离子共振技术的高灵敏、实时、快速的特点有效结合,检测过程简单、快速。所构建的表面等离子体共振免疫传感器具有检测准确度和灵敏度高、可重复使用且结果重现性好等优点,可用于牛奶、鸡蛋、鸡肉、牛肉、鱼肉等样品中四种磺胺类药物的分析检测。



1. 一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 芯片包被修饰:将固定等离子体共振芯片置于流通池中,通入EDC和NHS混合液进行芯片活化,用0.5%PBS冲洗,备用;通入磺胺-OVA溶液,用0.5%PBS溶液冲洗;通入乙醇胺溶液进行封闭,0.5%PBS溶液冲洗至基线稳定;

(2) 测定:将磺胺喹恶啉、磺胺氯吡嗪、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嗪分析物溶液分别与抗体混合,通入流通池中进行免疫结合反应,记录仪器响应值;

(3) 再生:用盐酸洗脱等离子体共振芯片表面结合的抗体,实现芯片再生,用0.5%PBS冲洗至基线稳定,进行下一次测定。

2. 根据权利要求1所述的一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:EDC和NHS混合液中,EDC浓度为 0.4mol L^{-1} ,NHS浓度为 0.1mol L^{-1} ,体积比为1:1,用量为170微升,流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:所用的磺胺-OVA溶液浓度为 $50\mu\text{g mL}^{-1}$,用量为175微升;所用的乙醇胺浓度为 1.0mol L^{-1} ,pH为8.5,用量为126微升,流速为 $30\mu\text{Lmin}^{-1}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:所用的0.5%PBS缓冲液的配制方法为用pH 7.4的磷酸盐缓冲液20倍稀释表面活性剂10%PBS溶液;PBS以 $30\mu\text{L min}^{-1}$ 的流速流经芯片。

5. 根据权利要求1所述的一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:步骤(2)磺胺喹恶啉、磺胺氯吡嗪、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嗪的浓度范围为 $1.0\text{--}50.0\text{ng mL}^{-1}$,抗体浓度为 $20\mu\text{g mL}^{-1}$;混合液进样流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$,时间3min。

6. 根据权利要求1所述的一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其特征在于:步骤(3)盐酸溶液浓度为 0.1mol L^{-1} ,0.5%PBS冲洗的流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$,时间1分钟。

一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法

技术领域

[0001] 本发明涉及传感和免疫分析技术领域,尤其是涉及一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法。

背景技术

[0002] 磺胺类药物(Sulfonamides)是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类化学治疗药物的总称,可通过干扰敏感菌的叶酸代谢,而对革兰氏阳性和阴性菌的生长、繁殖产生明显抑制作用,具有广谱抗菌特征。磺胺类药物基本无味,一般为白色或微黄色结晶粉末,性质稳定,便于长期保存。磺胺类药物由于其抗菌稳定性和广谱性、可长期保存、廉价等特点被广泛用于人类医学临床与畜禽养殖等领域。同时,磺胺类药物也存在很多副作用,如体内代谢时间长、引起细菌耐药性、有可能在体内蓄积、引危害免疫系统及泌尿系统等等,并可能以原型或活性代谢物形式排放到环境中而造成环境污染。到目前为止,世界各国或组织都对磺胺类药物在食品中的最高残留限量作出了明确的规定,食品中磺胺类药物残留的检测方法也主要集中在仪器分析(液相色谱、液质联用等)和免疫学方法(酶联免疫、发光免疫、胶体金免疫层析等),这些方法往往存在检测成本高、检测自动化程度差、或操作繁琐、容易交叉污染造成假阳性等缺点。

[0003] 表面等离子共振技术(Surface Plasmon Resonance, SPR)是近年来发展起来的用于分析生物分子相互作用的一项新技术,可实时地测定分子之间相互作用的亲和力参数、动力学参数及热力学参数。目前,SPR技术已被广泛应用于研究蛋白质-蛋白质、核酸-蛋白质、核酸-核酸以及一些小分子化合物的痕量检测上。SPR技术的重要特征是无需标记和实时动态分析,在食品安全快速检测领域有无可比拟的优势。结合免疫分析技术的SPR免疫传感器综合了SPR技术和免疫分析检测准确、高灵敏的优点,引起了大量食品安全研究人员的广泛关注。两者的结合,对开发新型准确、高灵敏、可重复、自动化程度高的食品中有害物分析检测新方法提供了新的方向。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明创造旨在提出一种操作简便、准确度和灵敏度高、可重复使用的磺胺表面等离子体共振免疫方法,以用于鸡肉、鸡蛋、牛肉、牛奶、鱼肉中磺胺类药物的测定。

[0005] 为达到上述目的,本发明创造的技术方案是这样实现的:

[0006] 一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法,其方法步骤是:

[0007] (1) 芯片包被修饰:将固定等离子体共振芯片置于流通池中,通入EDC和NHS混合液进行芯片活化,用0.5%PBS冲洗,备用;通入磺胺-OVA溶液,用0.5%PBS溶液冲洗;通入乙醇胺溶液进行封闭,0.5%PBS溶液冲洗至基线稳定;

[0008] (2) 测定:将磺胺喹恶啉、磺胺氯哒嗪、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嗪分析物溶液分别与抗体混合,通入流通池中进行免疫结合反应,记录仪器响应值;

[0009] (3) 再生:用盐酸洗脱等离子体共振芯片表面结合的抗体,实现芯片再生,用0.5% PBS冲洗至基线稳定,进行下一次测定。

[0010] 优选的,EDC和NHS混合液中,EDC浓度为 0.4mol L^{-1} ,NHS浓度为 0.1mol L^{-1} ,体积比为1:1,用量为170微升,流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$ 。

[0011] 优选的,所用的磺胺-OVA溶液浓度为 $50\mu\text{g mL}^{-1}$,用量为175微升;所用的乙醇胺浓度为 1.0mol L^{-1} ,pH为8.5,用量为126微升,流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$ 。

[0012] 优选的,所用的0.5% PBS缓冲液的配制方法为用pH 7.4的磷酸盐缓冲液20倍稀释表面活性剂10% PBS溶液;PBS以 $30\mu\text{L min}^{-1}$ 的流速流经芯片。

[0013] 优选的,步骤(2)磺胺喹恶啉、磺胺氯吡啶、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嘧啶的浓度范围为 $1.0\text{--}50.0\text{ng mL}^{-1}$,抗体浓度为 $20\mu\text{g mL}^{-1}$;混合液进样流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$,时间3min。

[0014] 优选的,步骤(3)盐酸溶液浓度为 0.1mol L^{-1} ,0.5% PBS冲洗的流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$,时间1分钟。

[0015] 本发明反应过程中控制流速是因为封闭过程和测定过程都是在芯片表面固定了包被原(磺胺-OVA)的基础上进行,控制流速的目的在于避免将其洗下,也为包被原与抗体蛋白结合提供稳定的环境。

[0016] 本发明的优点和积极效果:

[0017] (1) 本发明测定过程采用免疫抑制原理检测复杂生物样品(鸡蛋、鸡肉、牛奶、牛肉、鱼肉)中磺胺类药物含量,具有较高准确度和灵敏度。

[0018] (2) 本发明将无标记、实时动态分析的表面等离子体共振与免疫分析技术相结合,制备的表面等离子体共振免疫传感器具有操作性强、稳定性好、可重复使用的特征。

附图说明

[0019] 图1-图4四种磺胺类药物抑制率曲线

[0020] 图5五种选定样品的基质影响消除结果

具体实施方式

[0021] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明创造中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0022] 本发明将无标记、实时动态监测的SPR技术与免疫分析技术相结合,构建了磺胺SPR免疫传感器。其具体实施例为:

[0023] 一、芯片修饰过程

[0024] ①将CM-5型表面等离子体共振芯片固定于流通卡槽中,通入PBS(0.5%P20)缓冲液至基线稳定,设置流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$,温度为 25°C 。

[0025] ②通入170 μL 浓度为 0.4mol L^{-1} 的EDC与 0.1mol L^{-1} 的NHS混合液(1/1,V/V),用PBS(0.5%P20)缓冲液冲洗,流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$;

[0026] ③通入175 μL 浓度为 $50\mu\text{g mL}^{-1}$ 的磺胺-OVA包被原溶液,用PBS(0.5%P20)缓冲液冲洗,流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$;

[0027] ④通入126 μL 浓度为 1.0mol L^{-1} 乙醇胺溶液(pH=8.5),用PBS(0.5%P20)缓冲液冲洗至基线稳定。

[0028] 二、测定过程

[0029] ①标准曲线绘制

[0030] 将不同浓度 (0ng mL^{-1} 、 1.0ng mL^{-1} 、 5.0ng mL^{-1} 、 10.0ng mL^{-1} 、 15.0ng mL^{-1} 、 20.0ng mL^{-1} 、 25.0ng mL^{-1} 、 30.0ng mL^{-1} 、 40.0ng mL^{-1} 、 50.0ng mL^{-1}) 的四种磺胺类药物磺胺喹恶啉、磺胺氯哒嗪、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嗪分别与浓度为 $20\mu\text{g mL}^{-1}$ 磺胺抗体混合均匀, 静置 10min; 将混合溶液通入流通池内, 流速为 $30\mu\text{L min}^{-1}$, 记录仪器响应值; 根据所得各浓度的响应值绘制抑制率标准曲线, 如图1-图4。

[0031] ②样品前处理

[0032] 牛奶: 量取纯牛奶样品 10mL 于离心管中, 10000r min^{-1} 离心 30min。吸取上清液, 超纯水 10 倍稀释, 超滤。收集所得样品液用 PBS ($\text{pH}=7.4$) 稀释 10 倍。

[0033] 鸡蛋: 称量混匀后的鸡蛋 2.0g 置于离心管中。加入 10mL 乙腈, 漩涡混匀, 超声 20min, 10000r min^{-1} 离心 10min。吸取上清液, PBS 缓冲液 ($\text{pH}=7.4$) 稀释备用。

[0034] 牛肉、鸡肉、鱼肉: 准确称取粉碎后肉样 2.0g 置于离心管中, 加入 10mL 乙腈, 漩涡混匀, 超声 20min, 10000r min^{-1} 离心 10min。吸取上清液, PBS 缓冲液 ($\text{pH}=7.4$) 稀释备用。

[0035] 牛奶、鸡蛋、鸡肉、牛肉和鱼肉的基质标准曲线如图 5。

[0036] ③测定过程

[0037] 将磺胺类药物 (磺胺喹恶啉、磺胺氯哒嗪、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嗪各四分之一) 添加浓度分别为 10.0ng g^{-1} 、 20.0ng g^{-1} 、 30.0ng g^{-1} (或 ng mL^{-1}) 的鸡蛋、鸡肉、牛奶、牛肉和鱼肉样品进行样品前处理, 各提取液分别与浓度为 $20\mu\text{g mL}^{-1}$ 磺胺抗体混合均匀, 静置 10min 后注入流通池, 记录仪器响应值计算回收率。结果表明, 选定的 5 种样品中的磺胺类标准品总回收率在 84.8%–106.2% 之间, 且相对标准偏差 (RSD) 在 7.1% 以内 (表 1)。

[0038] 表 1 牛奶、鸡蛋、鸡肉、牛肉和鱼肉样品中磺胺类药物三个添加浓度的回收率结果

[0039]

样品	添加水平 (ng mL ⁻¹ 或 ng g ⁻¹)	回收率 (mean, n = 3, %)	相对标准偏差 (%, n = 3)
牛奶	10	105.2	3.2
	20	106.2	4.5
	30	88.5	5.2
鸡蛋	10	89.2	5.4
	20	89.0	5.1
	30	91.5	1.1
鸡肉	10	87.2	5.9
	20	92.7	1.1
	30	94.7	1.8
牛肉	10	84.8	6.6
	20	96.9	7.1
	30	85.6	2.5
鱼肉	10	91.7	4.6
	20	95.0	4.6
	30	87.8	5.3

[0040] ④再生过程

[0041] 将180 μ L HCl溶液注入到流通池中,实现修饰芯片再生,盐酸溶液浓度为0.1mol L⁻¹,0.5%PBS冲洗的流速为30 μ L min⁻¹,时间1分钟,重复测定300次,仪器信号衰减3.7%。

[0042] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

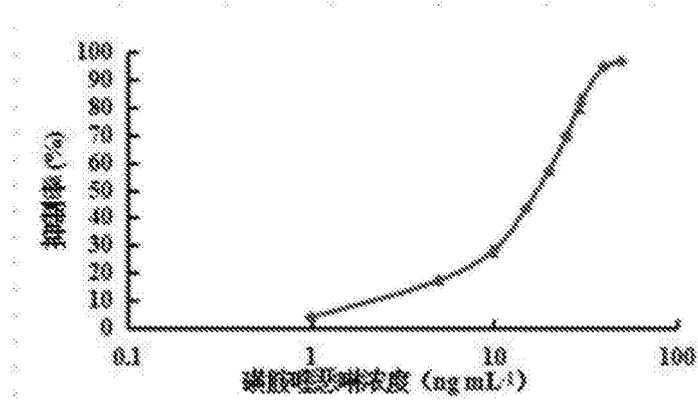


图1

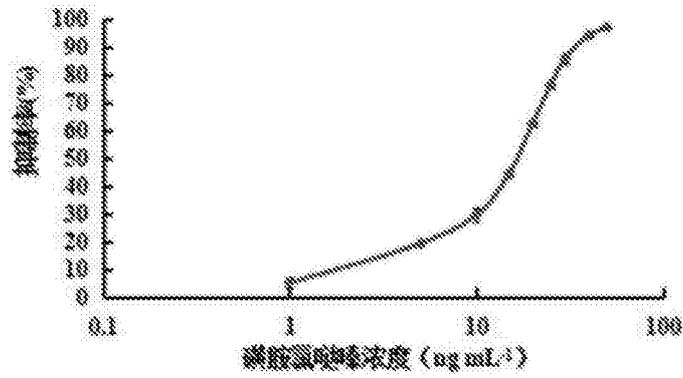


图2

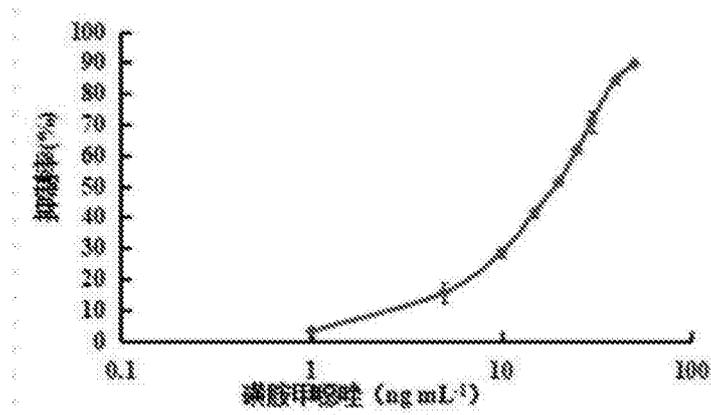


图3

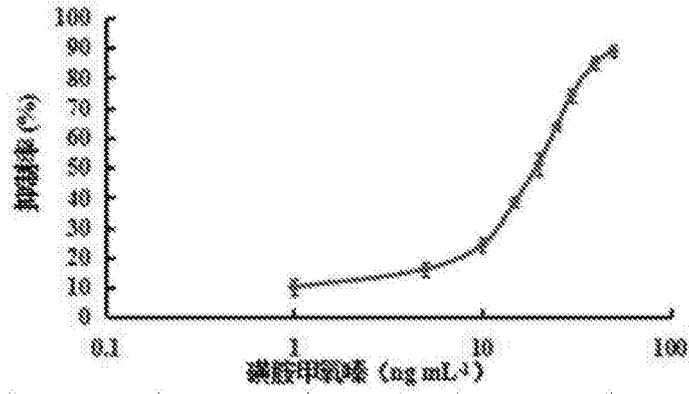


图4

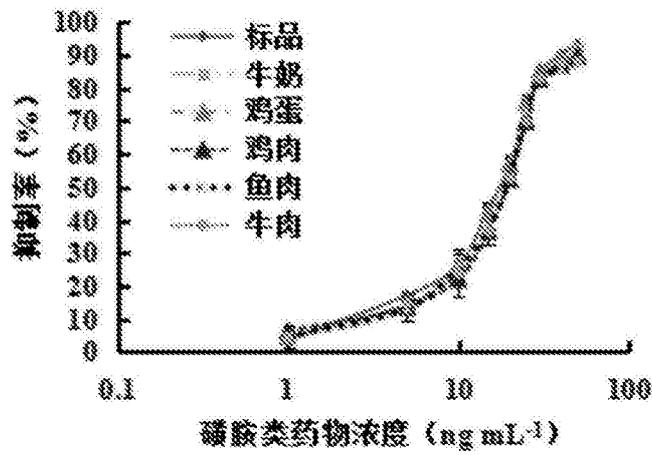


图5

专利名称(译)	一种检测磺胺的表面等离子体共振免疫方法		
公开(公告)号	CN106442427A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201610892262.2	申请日	2016-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	潘明飞 王晓骏 王俊平 刘冰 王硕		
发明人	潘明飞 王晓骏 王俊平 刘冰 王硕		
IPC分类号	G01N21/59 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/94		
CPC分类号	G01N21/59 G01N33/53 G01N33/6854 G01N33/9446 G01N2021/5903		
代理人(译)	陈松		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种磺胺类药物表面等离子体共振免疫传感器及工作方法，其主要技术要点是用胺基偶联磺胺包被原(磺胺-OVA)修饰到传感芯片表面，将磺胺类待测药物与抗体混合液流经表面等离子体共振芯片表面，依据免疫抑制原理，实现对四种磺胺类药物(磺胺喹恶啉、磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑和磺胺甲氧嘧)的分析检测。该发明将免疫检测高特异性与表面等离子共振技术的高灵敏、实时、快速的特点有效结合，检测过程简单、快速。所构建的表面等离子体共振免疫传感器具有检测准确度和灵敏度高、可重复使用且结果重现性好等优点，可用于牛奶、鸡蛋、鸡肉、牛肉、鱼肉等样品中四种磺胺类药物的分析检测。

