



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103675256 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201210335125. 0

(22) 申请日 2012. 09. 12

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区塘沽经济技术
开发区十三大街 29 号天津科技大学食
品工程与生物技术学院

(72) 发明人 王硕 生威 袁萌 刘津涛
王俊平 张燕

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理
有限公司 12211

代理人 孙春玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

氯霉素免疫亲和凝胶检测柱

(57) 摘要

本发明涉及一种可视化快速检测食品中氯霉素残留的免疫亲和凝胶检测柱。本发明属于免疫学、酶学与分析化学领域。用溴化氰活化的琼脂糖凝胶分别偶联氯霉素抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 抗体制备氯霉素抗体胶和 HRP 抗体胶; 将溴化氰活化的琼脂糖凝胶用封闭液封闭后制备封闭胶。封闭胶与氯霉素抗体胶混合制备成检测层, 封闭胶与 HRP 抗体胶混合制备成质控层, 装入 1mL 的固相萃取柱, 确定检测过程各步骤工作条件, 研制了一种新型快速定性半定量检测食品中氯霉素残留的免疫亲和凝胶柱检测产品, 检测限为 $1\mu\text{g/L}$ 。该产品检测食品样品中氯霉素残留时不需要任何有机溶剂和复杂的前处理, 及大型仪器的辅助, 具有很好的易用性和准确性, 满足现场可视化快速检测的要求。

1. 氯霉素免疫亲和凝胶检测柱的组成,其特征在于:凝胶检测柱是在一个标准的 1mL 固相萃取柱内设有两层,上层为氯霉素抗体胶与封闭胶混合加入形成的检测层,下层为 HRP 抗体胶与封闭胶混合加入形成的质控层,质控层和检测层之间隔开一个 3mm 的空气层。

2. 权利要求 1 所述的氯霉素免疫亲和凝胶检测柱的组成,其特征在于:首先将聚乙烯垫片加入 1mL 的固相萃取柱中,然后加入 150 μ L 的用 HRP 抗体胶与封闭胶按 1 : 100 混合比例制得的混合胶,加入第二层聚乙烯垫片,用注射器活塞将 PBS 压出,在组装好的质控层上方约 3mm 处加入第三层聚乙烯垫片,然后加入 150 μ L 的用氯霉素抗体胶与封闭胶按 1 : 20 混合比例制得的混合胶,最后在顶部加入第四层垫片,用注射器活塞将 PBS 压出。

3. 权利要求 1 所述的氯霉素免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:所述的氯霉素免疫亲和凝胶检测柱检测氯霉素的检测限为 1 μ g/L。

4. 权利要求 1 所述的氯霉素免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:

(1) 封闭胶的制备使用溴化氰活化琼脂糖凝胶加入 HCl 溶液溶胀后被转移到特制的具砂板层析柱中用 HCl 溶液进行淋洗,再用偶联缓冲液冲洗柱子后加入甘氨酸封闭液室温封闭 2h,再用偶联缓冲液和醋酸钠缓冲溶液反复冲洗凝胶,待清洗液抽空,制备好的封闭胶用 PBS 按体积比 1 : 3 悬起,再加入 0.3ml/L 的抑菌素,放置于 4 $^{\circ}$ C 保存待用;

(2) 抗体胶的制备方法同封闭胶,差别仅在于在封闭之前 0.5mg/mL 的氯霉素特异性抗体被加入到凝胶当中室温偶联 2h。

氯霉素免疫亲和凝胶检测柱

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学、酶学与分析化学领域,尤其涉及氯霉素免疫亲和凝胶检测柱的制备。

背景技术

[0002] 氯霉素是一种广谱抗生素,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较好的抑制作用。它通过与核糖体的 50s 亚基上的 A 单位结合,阻碍肽酰基转移酶的转肽反应,阻止肽链延伸,从而达到抑制细菌蛋白质合成的目的。因其效高价廉,曾在畜牧业中广泛应用于动物各种传染性疾病的治疗。但其有较强的毒副作用,国内外研究机构发现,食品中的氯霉素残留超标,容易引起人体血小板减少性紫癜、粒细胞缺乏症、再生障碍性贫血等多种危害,特别是对早产儿和新生儿产生较为严重的毒性。近年来欧盟、美国等发达国家已相继禁止氯霉素用于动物源性食品,并明确规定氯霉素残留限量为不得检出。我国农业部已禁止使用该药,无论内销还是出口的畜产品,氯霉素残留都是必检项目。然而由于 CAP 抑菌效果好且价格低廉,目前我国仍有部分养殖户将 CAP 用于治疗禽类、家畜疾病。为保障人民健康及扩大与世界各国食品贸易往来,必须建立灵敏度高、特异性强、简单快速测定方法对氯霉素残留进行监控。

[0003] 目前报到的氯霉素检测方法主要有:微生物法、酶免疫法、放射免疫法、高效液相色谱法和气相色谱法。微生物法的检测周期较长。气相色谱法虽灵敏度较高,但也存在一些不足,如样品前处理过程复杂、分析速度慢、仪器化程度高且价格昂贵,不适合在基层推广使用。高效液相色谱法虽操作简单,但检出限较高,无法满足当前对氯霉素低残留限量的要求。基于抗原抗体特异性反应建立起来的免疫学测定方法,一直是兽药残留快速检测和样品筛选方法的研究热点,其具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度较高、特异性强等诸多优点,具有广阔的应用前景。尤其是可视化快速免疫检测技术,如试纸条,不需任何仪器设备,几分钟就可用肉眼观察实验结果,非常适合于大量样品的现场筛查和基层推广。然而试纸条检测也易受样品基质的影响,在不同食品样品检测中受到一定限制。本发明阐述的凝胶柱免疫检测产品为某些颜色较深及基质影响较大的样品中的氯霉素残留检测分析提供一种行之有效的可视化定性半定量快速简单检测方法,为食品安全的有力监管提供可靠的技术保障。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种可以定性半定量的检测食品中的氯霉素的简单、省时、灵敏的可视化的免疫亲和凝胶检测柱产品,凝胶检测柱是在一个标准的 1mL 固相萃取柱内设有两层:上层为氯霉素抗体胶与封闭胶混合加入形成的检测层,待测样品中含有的氯霉素可消除或减弱该层的颜色,从而根据胶体颜色深浅达到检测样品中的氯霉素的目的;下层为 HRP 抗体胶与封闭胶混合加入形成的质控层,只要检测过程加入酶标记物,该层都会显色。如果该层显色,则检测正常,如果该层无色,则检测失效,从而达到质控的目的。

本发明采取的技术方案是：

[0005] 封闭胶的制备

[0006] (1) 溶胀：称取 1.00g 溴化氰活化琼脂糖凝胶，加入到 80mL 的配制好的 HCl 溶液中，搅拌溶胀 10min（溶胀后胶的终体积约为 3.5mL）。

[0007] (2) 淋洗：将溶胀好的琼脂糖凝胶转移到在具砂板层析柱中，再加入 200mL HCl 淋洗，然后用偶联缓冲液冲洗柱子，调节柱子 pH 至中性。

[0008] (3) 封闭：加入 9mL 甘氨酸封闭液，密封柱子，室温下震荡反应 2h。

[0009] (4) 清洗：首先加入 10mL 的偶联缓冲液淋洗一次，然后用 10mL 的醋酸钠缓冲溶液和 10mL 的偶联缓冲液分别冲洗 3 遍。

[0010] (5) 贮存：待清洗液抽空，制备好的封闭胶用 PBS 悬起，约 10mL PBS（含有 0.3ml/L 的抑菌素），放置于 4℃ 保存待用。

[0011] 抗体胶的制备

[0012] (1) 溶胀：准确称取 0.50g 溴化氰活化琼脂糖凝胶，加入到 40mL 的配制好的 HCL 溶液中，搅拌溶胀 10min（溶胀后胶的终体积约为 1.8mL）。

[0013] (2) 淋洗：将溶胀好的琼脂糖凝胶转移到在具砂板层析柱中，再加入 200mL HCL 淋洗，然后用偶联缓冲液冲洗柱子，调节柱子 pH 至中性，将淋洗液全部洗完。

[0014] (3) 偶联抗体：取 0.50mg/mL 抗体，用 1mL 的偶联缓冲液稀释，然后加入到在具砂板层析柱中，密封柱子，室温下震荡反应 2h。

[0015] (4) 封闭：加入 10mL 的偶联缓冲液淋洗柱子，然后加入 10mL 的封闭液，再次密封柱子，室温震荡反应 2h。

[0016] (5) 清洗：首先加入 10mL 的偶联缓冲液淋洗一次，然后用 10mL 的醋酸钠缓冲溶液和 10mL 的偶联缓冲液分别冲洗 3 遍；

[0017] (6) 贮存：待清洗液抽空，制备好的抗体胶用 PBS 悬起，约 5mL PBS（含有 0.3ml/L 的抑菌素），放置于 4℃ 保存待用。

[0018] 检测柱的制备

[0019] (1) 制备质控层与检测层：

[0020] 质控层是由 HRP 抗体胶与封闭胶以一定比例混合好后，取 150 μ L 混合胶加入到 1mL 的 SPE 塑料柱中，用注射器活塞将 PBS 压出。

[0021] 检测层是由优化好的抗体胶与封闭胶以一定的比例混合好后，取 150 μ L 加入其中，用注射器活塞将 PBS 压出。

[0022] (2) 制备检测柱：

[0023] 检测柱由下到上，分别是质控层和检测层，质控层和检测层之间隔开一个 3mm 的空气层，可以防止加入底物显色后试剂和颜色从对照层迁移到检测层中。

[0024] 首先将聚乙烯垫片加入 1mL 的塑料柱中，然后加入质控层混合胶，加入第二层聚乙烯垫片，在质控层上方约 3mm 除加入第三层聚乙烯垫片，然后加入其检测层的混合胶，最后在顶部加入第四层垫片。

附图说明

[0025] 凝胶检测柱组成示意图见说明书附图。

[0026] 本发明的优点和积极效果是：

[0027] (1) 本发明提供的氯霉素免疫亲和凝胶检测柱，可专一识别氯霉素，具有非常高的选择性。

[0028] (2) 本发明氯霉素免疫亲和凝胶检测柱是一种可视化的定性半定量检测产品。对目标待测物的检测，检测柱会以检测层颜色的有无给出检测结果，即以是 / 否的可视定性信号给予应答，操作方便，结果判断简单。

[0029] (3) 本发明制得的氯霉素免疫亲和凝胶检测柱既可以使之与净化柱串联，消除样品基质影响；又可容纳较大体积的清洗缓冲液和样品溶液，提高了方法灵敏度。检测产品不需要任何有机溶剂和复杂的前处理，及大型仪器的辅助，具有很好的易用性和准确性，满足现场快速检测的要求。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例，对本发明进一步说明。

[0031] 本发明是将氯霉素的抗体固化在琼脂糖凝胶上，然后装柱而成。利用抗原抗体反应的高度特异性，当样品溶液通过免疫亲和凝胶检测柱时，氯霉素被特异性地结合到柱上，加入酶标后，氯霉素与酶标竞争结合到氯霉素抗体上，然后加入底物显色。其具体实施例为：

[0032] (1) 制备氯霉素免疫亲和凝胶检测柱质控层与检测层：

[0033] ①氯霉素免疫亲和凝胶检测柱质控层是由 HRP 抗体胶与封闭胶以 1 : 100 比例混合好后，取 150 μ L 混合胶加入到 1mL 的固相萃取柱中，用注射器活塞将 PBS 压出；

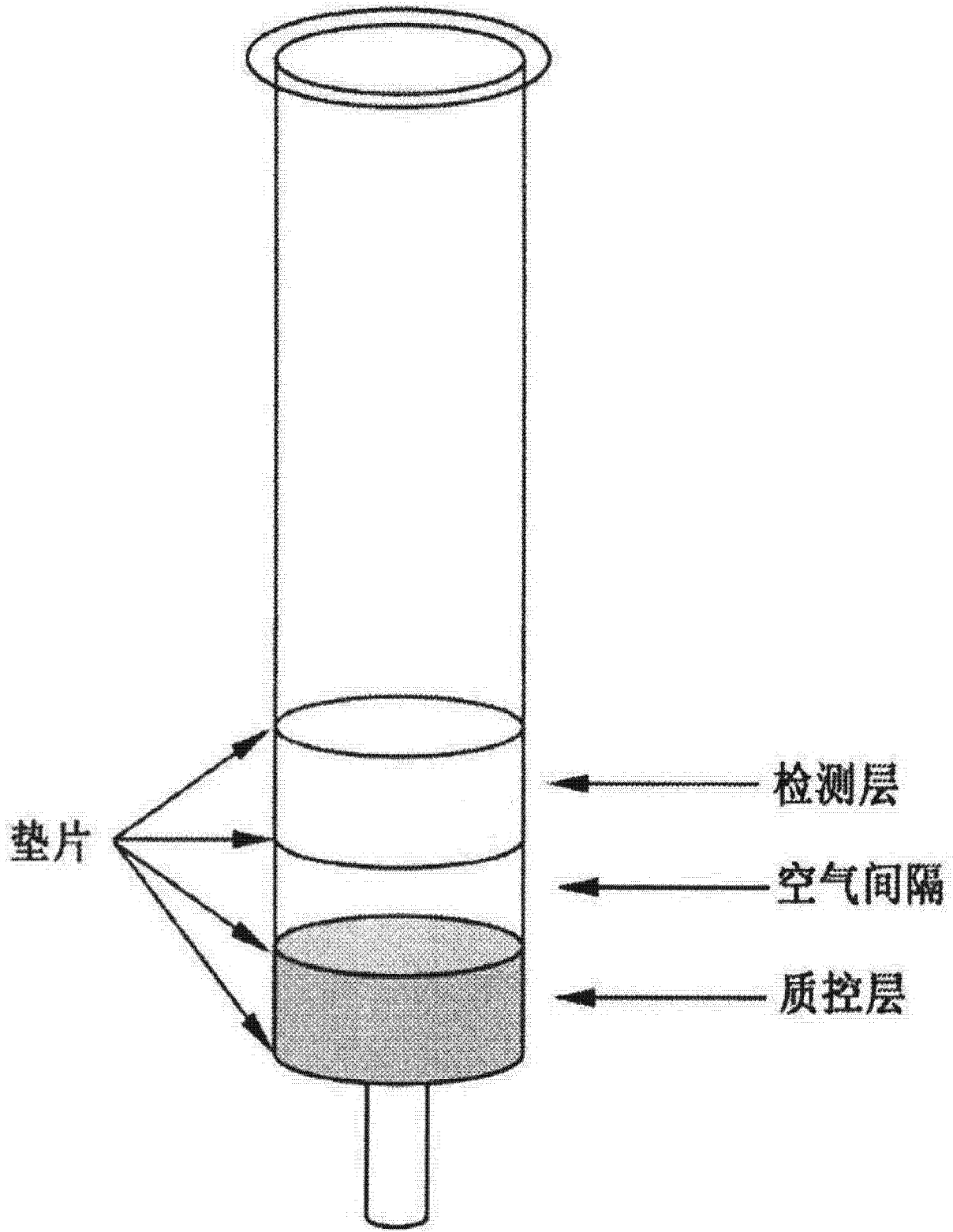
[0034] ②氯霉素免疫亲和凝胶检测柱检测层是由优化好的氯霉素抗体胶与封闭胶以 1 : 20 比例混合好后，取 150 μ L 加入其中，用注射器活塞将 PBS 压出；

[0035] (2) 制备氯霉素免疫亲和凝胶检测柱：

[0036] ①检测柱由下到上，分别是质控层和检测层，质控层和检测层之间隔开一个 3mm 的空气层，可以防止加入底物显色后试剂和颜色从质控层迁移到检测层中。

[0037] ②首先将聚乙烯垫片加入 1mL 的塑料柱中，然后加入质控层混合胶，加入第二层聚乙烯垫片，在质控层上方约 3mm 处加入第三层聚乙烯垫片，然后加入其检测层的混合胶，最后在顶部加入第四层垫片，检测柱经过实验验证不能重复使用。

[0038] (3) 氯霉素免疫亲和凝胶检测柱检测食品样品中氯霉素残留时不需要任何有机溶剂和复杂的前处理，及大型仪器的辅助，氯霉素免疫亲和凝胶检测柱检测氯霉素的检测限为 1 μ g/L。



专利名称(译)	氯霉素免疫亲和凝胶检测柱		
公开(公告)号	CN103675256A	公开(公告)日	2014-03-26
申请号	CN201210335125.0	申请日	2012-09-12
[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)	天津大学学报ISSN : 1672-3910		
[标]发明人	王硕 生威 袁萌 刘津涛 王俊平 张燕		
发明人	王硕 生威 袁萌 刘津涛 王俊平 张燕		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/559 G01N33/54306		
代理人(译)	孙春玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种可视化快速检测食品中氯霉素残留的免疫亲和凝胶检测柱。本发明属于免疫学、酶学与分析化学领域。用溴化氰活化的琼脂糖凝胶分别偶联氯霉素抗体和辣根过氧化物酶(HRP)抗体制备氯霉素抗体胶和HRP抗体胶；将溴化氰活化的琼脂糖凝胶用封闭液封闭后制备封闭胶。封闭胶与氯霉素抗体胶混合制备成检测层，封闭胶与HRP抗体胶混合制备成质控层，装入1mL的固相萃取柱，确定检测过程各步骤工作条件，研制了一种新型快速定性半定量检测食品中氯霉素残留的免疫亲和凝胶柱检测产品，检测限为1 μ g/L。该产品检测食品样品中氯霉素残留时不需要任何有机溶剂和复杂的前处理，及大型仪器的辅助，具有很好的易用性和准确性，满足现场可视化快速检测的要求。

