



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799332 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201811595181.1

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 北京农业质量标准与检测技术研究中心

地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号

(72)发明人 满燕 潘立刚 靳欣欣

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

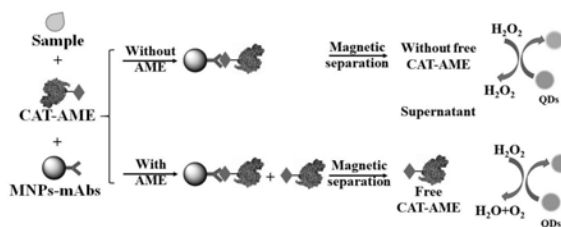
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法

(57)摘要

本发明提供链格孢酚单甲醚(AME)的磁免疫荧光定量检测方法,其是一种基于 H_2O_2 介导CdTe QDs荧光淬灭的磁免疫分析新方法。由过氧化氢酶(CAT)-AME作为竞争性抗原,与样品中的AME竞争性结合磁珠上的单克隆抗体,经磁分离后,上清中剩余的CAT-AME对 H_2O_2 进行降解,因此降低了 H_2O_2 对巯基丙酸量子点(MPA-CdTe QDs)的荧光淬灭率,并根据此原理来判断样品中AME的含量。利用本方法可以简单、快速地实现果蔬样本中AME的定量检测,最低检测限可达0.25pg/mL。



1. 链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

A、 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液的制备;

B、CAT-AME复合物溶液的制备;

C、巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液的制备;

D、不同浓度的AME标准品溶液的制备;

E、将不同浓度的AME标准品溶液分别与A制备的 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液和B制备的CAT-AME复合物溶液混合孵育一段时间后,进行磁分离,将上清液转移至离心管中,加入一定浓度的过氧化氢溶液,孵育一段时间后,将反应混合物加入C制备的的巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液中,避光反应一段时间后,检测产物的荧光强度,建立反映荧光强度与AME浓度之间关系的标准曲线;

F、将E中不同浓度的AME标准品溶液替换成待测样品溶液,按照相同的方法进行检测,将检测到的荧光强度代入上述标准曲线,计算得出待测样品溶液中AME含量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,A具体为:

A1、 Fe_3O_4 磁珠的制备:5.4g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2.78g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入到100mL水中,80℃条件下搅拌20min;加入30%氨水8mL,继续搅拌30min;用水和乙醇清洗后干燥,即得 Fe_3O_4 磁珠;

A2、 Fe_3O_4 磁珠的氨基化修饰:将100mg A1制备的磁珠在超声条件下分散于25mL无水乙醇;加入200 μL 水和1mL APTES,室温条件下孵育过夜;用水清洗后,将制备的氨基化磁珠复溶于8mL水中,得到氨基化的磁珠溶液;

A3、 Fe_3O_4 磁珠的醛基化修饰:取1mL A2制备的磁珠溶液复溶于1mL PB缓冲液中;加入0.5mL戊二醛,室温条件下孵育4h;用所述PB缓冲液清洗后重悬于1mL所述PB缓冲液中,得到醛基化的磁珠溶液;

其中,所述PB缓冲液的浓度为50mM, pH 8.0;

A4、 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液的制备:将100 μL 2.7mg/mL的AME单克隆抗体加入到1mL A3制备的醛基化的磁珠溶液中,室温条件下孵育过夜;加入200 μL 50mg/mL的BSA溶液,室温条件下孵育2h;经Tris-HCl缓冲液清洗后,重悬于10mL Tris-HCl缓冲液中,即得 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液;

其中,Tris-HCl缓冲液的浓度为10mM, pH 8.0。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,B具体为:

B1、羧基化AME溶液的制备:将100mg AME溶于5mL DMF,加入75mg溴丁酸甲酯和150mg碳酸钾,50℃搅拌反应2h,加入10mL水稀释,然后用10mL乙酸乙酯进行萃取,有机相经浓缩后,得到100mg甲酯修饰的AME;取75mg甲酯修饰的AME和9mg氢氧化锂溶解于由2.5mL的甲醇和2.5mL的四氢呋喃组成的混合液中,然后加入0.5mL水;将该混合溶液室温下搅拌孵育5h;有机相经浓缩后,残留物用2.5mL水进行稀释;将该稀释液的pH调至4.0,用5mL乙酸乙酯进行萃取,有机相经浓缩后得到羧基化AME溶液;

B2、CAT-AME复合物溶液的制备:将2mg EDC和1.6mg的NHS溶解于0.02mL 0.25mg/mL B1制备的羧基化AME溶液中,室温条件下孵育5h,得到溶液I;然后将4mg CAT溶解于2mL Tris-HCl溶液中,得到CAT溶液;将所述CAT溶液逐滴加入上述溶液I中,室温下搅拌12h;然后离心去除沉淀,上清液用Tris-HCl缓冲液透析72h,每12h更换一次透析液,即得CAT-AME复合物

溶液；

其中,Tris-HCl溶液的浓度为10mM,pH 8.0;所述Tris-HCl缓冲液的浓度为10mM,pH 8.0。

4.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,C具体为:

C1、将127.5mg Te和80mg NaBH₄加入5mL去离子水中,连续搅拌4h后,将该混合液置于冰上冷却,5000rpm离心10min后,收集上清液即为NaHTe溶液;

C2、在搅拌条件下,将硝酸镉和巯基丙酸混合,并用氢氧化钠溶液调节该混合溶液的pH至11,得到硝酸镉前驱体溶液;

C3、将C1制备的NaHTe溶液加入到经氮气饱和的硝酸镉前驱体溶液中,使NaHTe、硝酸镉和巯基丙酸的终浓度分别为0.8、1.7和2.5mg/mL,95℃条件下加热20min后,即得巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液。

5.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,D具体为:用12.5mM pH 7.0的Tri-HCl液将AME标准品配制成不同浓度。

6.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,E具体为:

E1、将100μL不同浓度的AME标准品溶液分别与15μL A制备的Fe₃O₄磁珠-AME单抗复合物溶液和B制备的CAT-AME复合物溶液在37℃下孵育30min;其中,混合体系中CAT-AME复合物的终浓度为12nM;

E2、孵育结束进行磁分离,将上清液转移至离心管中,加入21μM过氧化氢溶液,37℃下继续孵育30min;

E3、将E2的反应混合物加入C制备的100μL巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液中,避光室温条件下反应20min后,检测产物的荧光强度。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,E中利用多功能酶标仪检测产物的荧光强度,激发波长为310nm,发射波长为599nm。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,AME的线性检测范围是0.25-7.5pg/mL,最低检测限为0.25pg/mL。

9.根据权利要求1-8任一项所述的方法,其特征在于,F中还包括对待测样品进行前处理的步骤,具体为:将样品研磨成浆,或向样品中加水研磨成浆,向5mL浆液中加入20mL含100mM柠檬酸的乙腈溶液,室温条件下搅拌孵育30min后,加入2g氯化钠,10000rpm离心5min,取上清液经固相萃取柱纯化,收集透过液,经氮气干燥后,重新溶于0.1mL乙腈中,得到待测样品溶液。

链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全监测领域,具体地说,涉及链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法。

背景技术

[0002] 链格孢酚单甲醚(AME)是链格孢霉菌的主要次生代谢产物之一。它具有致癌性、致畸性,尤其是在食管癌的发生上尤为突出。因此,摄取链格孢毒素AME侵染的食品会对人体健康造成严重危害。目前科学家们已经在多种食品(如西红柿、小麦、葡萄、大米、红酒、燕麦片、大麦)中发现了AME的存在。因此,AME成为目前国内外科学家研究较多的主要的链格孢毒素之一。

[0003] 当前,用于链格孢毒素AME检测的方法主要依赖于液质联用传统检测方法。然而,这些传统的检测方法通常需要大型、昂贵的仪器设备以及专业的技术人员,并且检测只能在实验室中进行,检测时间长,费时费力。

[0004] 当前,基于抗原-抗体的免疫分析技术已经被广泛应用于食品分析领域。但是,目前仅有少数的文章报道了关于免疫分析技术在AME定量检测中的应用。此外,传统的免疫分析技术具有耗时长,需要大量的清洗步骤,容易引起孔与孔之间的交叉污染等弊端。并且传统的免疫分析技术采用96孔板作为抗原或抗体的固相载体。与96孔板相比较,磁珠作为固相载体具有快的反应动力学、高的比表面积、低的基质影响等优点。目前磁珠已被广泛用于构建多种新型免疫传感技术,并且实现了目标分子的快速、高专一性的富集与分离。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法,以实现实际样本中残留的链格孢毒素AME的快速、高灵敏检测。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明提供的链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法,其是一种基于 H_2O_2 介导CdTe QDs量子点荧光淬灭的磁免疫分析新方法。由CAT-AME作为竞争性抗原,与样品中的AME竞争性结合磁珠上的单克隆抗体,经磁分离后,上清中剩余的CAT-AME对 H_2O_2 进行降解,因此降低了 H_2O_2 对巯基丙酸量子点(MPA-CdTe QDs)的荧光淬灭率(MPA-CdTe QDs的荧光强度能被 H_2O_2 淬灭),并根据此原理来判断样品中AME的含量。MPA-CdTe QDs荧光强度的改变与样品中AME的含量呈线性关系。链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法的原理见图1。

[0007] 所述方法包括以下步骤:

[0008] A、 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液的制备;

[0009] B、CAT-AME复合物溶液的制备;

[0010] C、巯基丙酸修饰的碲化镉量子点(MPA-CdTe QDs)溶液的制备;

[0011] D、不同浓度的AME标准品溶液的制备;

[0012] E、将不同浓度的AME标准品溶液分别与A制备的 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液和B

制备的CAT-AME复合物溶液混合孵育一段时间后,进行磁分离,将上清液转移至离心管中,加入一定浓度的过氧化氢溶液,孵育一段时间后,将反应混合物加入C制备的的巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液中,避光反应一段时间后,检测产物的荧光强度,建立反映荧光强度与AME浓度之间关系的标准曲线;

[0013] F、将E中不同浓度的AME标准品溶液替换成待测样品溶液,按照相同的方法进行检测,将检测到的荧光强度代入上述标准曲线,计算得出待测样品溶液中AME含量。

[0014] A具体为:

[0015] A1、 Fe_3O_4 磁珠的制备:5.4g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2.78g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加入到100mL水中,80℃条件下搅拌20min;加入30%氨水8mL,继续搅拌30min;用水和乙醇清洗后干燥(用水和乙醇各清洗3次后,120℃干燥60min),即得 Fe_3O_4 磁珠;

[0016] A2、 Fe_3O_4 磁珠的氨基化修饰:将100mg A1制备的磁珠在超声条件下分散于25mL无水乙醇;加入200 μL 水和1mL APTES,室温条件下孵育过夜;用水清洗(洗5次)后,将制备的氨基化磁珠复溶于8mL水中,得到氨基化的磁珠溶液;

[0017] A3、 Fe_3O_4 磁珠的醛基化修饰:取1mL A2制备的磁珠溶液复溶于1mL PB缓冲液中;加入0.5mL戊二醛,室温条件下孵育4h;用所述PB缓冲液清洗后重悬于1mL所述PB缓冲液中,得到醛基化的磁珠溶液;

[0018] 其中,所述PB缓冲液的浓度为50mM,pH 8.0;

[0019] A4、 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液的制备:将100 μL 2.7mg/mL的AME单克隆抗体加入到1mL A3制备的醛基化的磁珠溶液中,室温条件下孵育过夜;加入200 μL 50mg/mL的BSA溶液,室温条件下孵育2h;经Tris-HCl缓冲液清洗(洗5次)后,重悬于10mL Tris-HCl缓冲液中,即得 Fe_3O_4 磁珠-AME单抗复合物溶液;

[0020] 其中,Tris-HCl缓冲液的浓度为10mM,pH 8.0。

[0021] B具体为:

[0022] B1、羧基化AME溶液的制备:将100mg AME溶于5mL DMF,加入75mg溴丁酸甲酯和150mg碳酸钾,50℃搅拌反应2h,加入10mL水稀释,然后用10mL乙酸乙酯进行萃取,有机相经浓缩(浓缩方法可采用氮气吹干,下同)后,得到100mg甲酯修饰的AME;取75mg甲酯修饰的AME和9mg氢氧化锂溶解于由2.5mL的甲醇和2.5mL的四氢呋喃组成的混合液中,然后加入0.5mL水;将该混合溶液室温下搅拌孵育5h;有机相经浓缩后,残留物用2.5mL水进行稀释;将该稀释液的pH调至4.0,用5mL乙酸乙酯进行萃取,有机相经浓缩后得到羧基化AME溶液;

[0023] B2、CAT-AME复合物溶液的制备:将2mg EDC和1.6mg的NHS溶解于0.02mL 0.25mg/mL B1制备的羧基化AME溶液中,室温条件下孵育5h,得到溶液I;然后将4mg CAT溶解于2mL Tris-HCl溶液中,得到CAT溶液;将所述CAT溶液逐滴加入上述溶液I中,室温下搅拌12h;然后离心去除沉淀,上清液用Tris-HCl缓冲液透析72h,每12h更换一次透析液,即得CAT-AME复合物溶液;

[0024] 其中,Tris-HCl溶液的浓度为10mM,pH 8.0;所述Tris-HCl缓冲液的浓度为10mM,pH 8.0。

[0025] C具体为:

[0026] C1、将127.5mg Te和80mg NaBH_4 加入5mL去离子水中,连续搅拌4h后,将该混合液置于冰上冷却,5000rpm离心10min后,收集上清液即为 NaHTe 溶液;

[0027] C2、在搅拌条件下,将硝酸镉和巯基丙酸混合,并用氢氧化钠溶液调节该混合溶液的pH至11,得到硝酸镉前驱体溶液;

[0028] C3、将C1制备的NaHTe溶液加入到经氮气饱和的硝酸镉前驱体溶液中,使NaHTe、硝酸镉和巯基丙酸的终浓度分别为0.8、1.7和2.5mg/mL,95℃条件下加热20min后,即得巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液。

[0029] D具体为:用12.5mM pH 7.0的Tri-HCl液将AME标准品配制成不同浓度。分别为分别为60,30,15,7.5,5.5,3.5,1.5,0.5,0.25和0pg/mL。

[0030] E具体为:

[0031] E1、将100μL不同浓度的AME标准品溶液分别与15μL A制备的Fe₃O₄磁珠-AME单抗复合物溶液和B制备的CAT-AME复合物溶液在37℃下孵育30min;其中,混合体系中CAT-AME复合物的终浓度为12nM;

[0032] E2、孵育结束进行磁分离,将上清液转移至离心管中,加入21μM过氧化氢溶液,37℃下继续孵育30min;

[0033] E3、将E2的反应混合物加入C制备的100μL巯基丙酸修饰的碲化镉量子点溶液中,避光室温条件下反应20min后,检测产物的荧光强度。

[0034] 优选地,E中利用多功能酶标仪检测产物的荧光强度,激发波长为310nm,发射波长为599nm。

[0035] 利用上述方法对样品中残留的AME的线性检测范围是0.25-7.5pg/mL,最低检测限为0.25pg/mL。

[0036] 可选地,F中还包括对待测样品进行前处理的步骤,具体为:将样品研磨成浆,或向样品中加水研磨成浆,向5mL浆液中加入20mL含100mM柠檬酸的乙腈溶液,室温条件下搅拌孵育30min后,加入2g氯化钠,10000rpm离心5min,取上清液经固相萃取柱纯化,收集透过液,经氮气干燥后,重新溶于0.1mL乙腈中,得到待测样品溶液。

[0037] 本发明中,所述AME单抗的制备方法可参考ZL201610539564.1,或Man Y,Liang G,Jia F,Li A,Fu H,Wang M,Pan L(2017)Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of alternariol monomethyl ether in fruit.Toxins 9:152。

[0038] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0039] (一)本发明基于Fe₃O₄磁珠-AME单抗复合物、CAT-AME复合物和巯基丙酸修饰的碲化镉量子点,建立了一种基于过氧化氢介导量子点荧光淬灭的磁免疫荧光分析方法,并将该方法用于AME的定量检测中。该方法具有简单、快速、专一性强、高灵敏的特点。

[0040] (二)本发明提供的链格孢毒素AME的磁免疫荧光定量分析方法,具有高的检测灵敏度,其最低检测限可达0.25pg/mL。

[0041] (三)利用本方法可以简单、快速地实现果蔬样本中AME的定量检测。

附图说明

[0042] 图1为本发明链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法的原理图。

[0043] 图2为本发明实施例1中Fe₃O₄磁珠-AME单抗复合物的紫外表征图。

[0044] 图3为本发明实施例1中CAT-AME复合物的紫外表征图。。

[0045] 图4为本发明实施例1中MPA-CdTe QDs的荧光及紫外表征图。

[0046] 图5为本发明实施例1中磁免疫荧光定量检测分析方法对AME的定量检测图。其中，a:不同AME浓度条件下，量子点的荧光发射光谱图；b:AME浓度与量子点荧光强度的改变值之间的关系。

[0047] 图6为本发明实施例3中对磁免疫荧光定量检测分析方法的专一性考察结果。

具体实施方式

[0048] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段，所用原料均为市售商品。

[0049] 本发明中的术语：

[0050] AME:链格孢酚单甲醚

[0051] CAT:过氧化氢酶

[0052] APTES:3-氨丙基三乙氧基硅烷

[0053] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0054] EDC:1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

[0055] NHS:N,N-二甲基甲酰胺

[0056] 实施例1链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法

[0057] 1、Fe₃O₄磁珠-AME单抗复合物的制备

[0058] 1.1 Fe₃O₄磁珠的合成

[0059] 5.4g FeCl₃·6H₂O和2.78g FeSO₄·7H₂O加入到100mL水中，80℃条件下搅拌20min；加入8mL 30%氨水，80℃条件下继续搅拌30min，用水和乙醇各清洗3次后，120℃干燥60min得到黑色的Fe₃O₄磁珠。

[0060] 1.2氨基化磁珠的制备

[0061] 在超声条件下，将100mg制备的磁珠分散于25mL无水乙醇中；加入200μL水和1mL APTES，室温条件下孵育过夜；用水彻底清洗5次后，将制备的氨基化磁珠复溶于8mL水中。

[0062] 1.3醛基化磁珠的制备

[0063] 取1mL上述制备的氨基化磁珠复溶于1mL PB缓冲液(50mM, pH8.0)；加入0.5mL戊二醛，室温条件下孵育4h；用该PB缓冲液清洗5次后重悬于1mL PB缓冲液中，得到醛基修饰的磁珠。

[0064] 1.4磁珠-抗体复合物的制备

[0065] 将100μL 2.7mg/mL的AME单克隆抗体加入到1mL醛基化磁珠，室温条件下孵育过夜。加入200μL 50mg/mL的BSA溶液，室温条件下孵育2h；经Tris-HCl(10mM, pH8.0)缓冲液清洗5次后，重悬于10mL Tris-HCl缓冲液。制备好的磁珠-mAbs放置于4℃备用。磁珠-AME单抗复合物的紫外表征结果见图2。

[0066] 2、CAT-AME复合物的制备

[0067] 2.1羧基化AME的制备

[0068] 将100mg AME溶于5mL DMF，加入75mg溴丁酸甲酯和150mg碳酸钾。50℃搅拌反应2h，加入10mL水稀释，然后用10mL乙酸乙酯进行萃取，有机相经浓缩(浓缩方法为氮气吹干，下同)后，得到100mg甲酯修饰的AME。取75mg甲酯修饰的AME和9mg氢氧化锂溶解于2.5mL的

甲醇和2.5mL的四氢呋喃,随后加入0.5mL的水。将该混合溶液室温下搅拌孵育5h。有机相经浓缩后,残留用2.5mL水进行稀释。将该混合溶液的pH调至4.0,用5mL乙酸乙酯进行萃取。有机相经浓缩后得到40mg羧基修饰的AME。

[0069] 2.2 CAT-AME复合物的制备

[0070] 2mg EDC和1.6mg的NHS溶解于0.02mL 0.25mg/mL羧基修饰的AME溶液中,室温条件下孵育搅拌5h以对羧基修饰的AME进行活化;4mg CAT溶解于2mL Tris-HCl (50mM, pH8.0), 10000rpm离心去除稍许沉淀后,将该CAT溶液逐滴加入活化后的羧基修饰的AME溶液中,室温下搅拌12h;离心去除沉淀,上清液用10mM Tris-HCl (pH8.0) 透析72h,每12h更换一次透析液;制备好的CAT-AME放置于4℃备用。CAT-AME复合物的紫外表征见图3。

[0071] 3、巯基丙酸修饰的碲化镉量子点(MPA-CdTe QDs)的制备

[0072] 127.5mg Te和80mg NaBH₄加入到5mL的去离子水中,连续搅拌4h后,将该混合液放置于冰上冷却。5000rpm离心10min后,得到0.2mM的NaHTe上清液。在搅拌条件下,将硝酸镉和巯基丙酸混合,并用氢氧化钠调节该混合溶液的pH至11,制备得到硝酸镉前驱体溶液。将新制备的NaHTe溶液加入到氮气饱和的硝酸镉前驱体溶液中,并使NaHTe、硝酸镉和巯基丙酸的终浓度分别为0.8、1.7和2.5mg/mL,95℃条件下加热20min后得到巯基丙酸修饰的碲化镉量子点。量子点的紫外及荧光谱图见图4。

[0073] 4、基于磁珠的竞争性荧光免疫传感检测方法的建立

[0074] 用Tri-HCl (12.5mM, pH 7.0) 将AME标准品稀释成浓度分别为60, 30, 15, 7.5, 5.5, 3.5, 1.5, 0.5, 0.25和0pg/mL的标准品溶液。100μL不同浓度的AME标准品溶液、15μLFe₃O₄磁珠-AME单抗复合物和CAT-AME复合物(其中,混合体系中CAT-AME复合物的终浓度为12nM)在37℃下孵育30min。磁分离后,含有CAT-AME的上清液被转入200μL离心管中,加入21μM过氧化氢,37℃下继续孵育30min。然后,将该混合溶液转入到含有100μL量子点(15nM)的96孔板中;室温条件下孵育20min后,用多功能酶标仪对量子点的荧光强度进行检测。检测结果见图5。

[0075] 结果表明,随着AME浓度的增加,量子点荧光强度也增加;并且在0.25-7.5pg/mL的范围内,荧光强度的改变值与AME的浓度呈良好的线性关系。 $\Delta FI = (-56.53 \pm 13.65) + (162.74 \pm 9.24) C_{AME}$, $R^2 = 0.9936$ 。最低检测限为0.25pg/mL。

[0076] 实施例2基于磁珠的竞争性荧光免疫传感检测方法在水果中AME检测中的应用

[0077] 1、样品前处理:将1kg的樱桃、橘子和苹果切成小块并研磨成浆;分别称取匀浆好的樱桃、橘子和苹果各5g,并加水至5mL;分别在樱桃、橘子和苹果中加入0.1μL、0.5μL 0.1mg/mL的AME标准品溶液和20mL含100mM柠檬酸的乙腈溶液,室温条件下搅拌孵育30min后,加入2g氯化钠。10000rpm离心5min后,上清液经固相萃取小柱纯化,收集透过液;取4mL透过液进行氮气干燥后,用0.1mL乙腈进行复溶。最后,得到的AME溶液用12.5mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 稀释成2.5和5pg/mL的浓度进行检测。

[0078] 2、定量检测:检测结果见表1。该检测方法的回收率为87.2-92.0%。结果表明该方法在水果实际样品中AME的定量检测中具有较高可靠度和实际应用性。

[0079] 表1水果样本中AME的加标检测试验结果

[0080]

样品	加标浓度	稀释后浓度	检测浓度	RSD	回收率
樱桃	0.1 µg/kg	2.5 pg/mL	2.27 pg/mL	0.069	90.8%
樱桃	0.5 µg/kg	5 pg/mL	4.58 pg/mL	0.033	91.6%
橘子	0.1 µg/kg	2.5 pg/mL	2.18 pg/mL	0.046	87.2 %
橘子	0.5 µg/kg	5 pg/mL	4.49 pg/mL	0.053	89.8%
苹果	0.1 µg/kg	2.5 pg/mL	2.30 pg/mL	0.049	92.0%
苹果	0.5 µg/kg	5 pg/mL	4.59 pg/mL	0.061	91.8%

[0081] 实施例3本发明基于磁珠的竞争性荧光免疫传感检测方法的特异性实验

[0082] 选择两种结构或功能与AME相似的链格孢毒素,如链格孢酚(AOH)、细交链孢菌酮酸(TeA)及其混合物,用实施例1中所述基于磁珠的竞争性荧光免疫传感检测方法进行定量检测,测定的样品溶液为:缓冲液对照样品、含有5pg/mL的AME溶液、含有1ng/mL的AOH溶液、含有1ng/mL的TeA溶液、含有5pg/mL AME和1ng/mL的AOH溶液、含有5pg/mL AME和1ng/mL的TeA溶液、含有1ng/mL AOH和1ng/mL的TeA溶液。检测结果见图6。从图6中可以看出,可以忽略的荧光强度的改变仅可以在含有AOH或TeA的样品中发现。而明显的荧光强度的改变仅在含有AME的样品中发现。以上结果表明本方法具有较好的检测专一性。

[0083] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

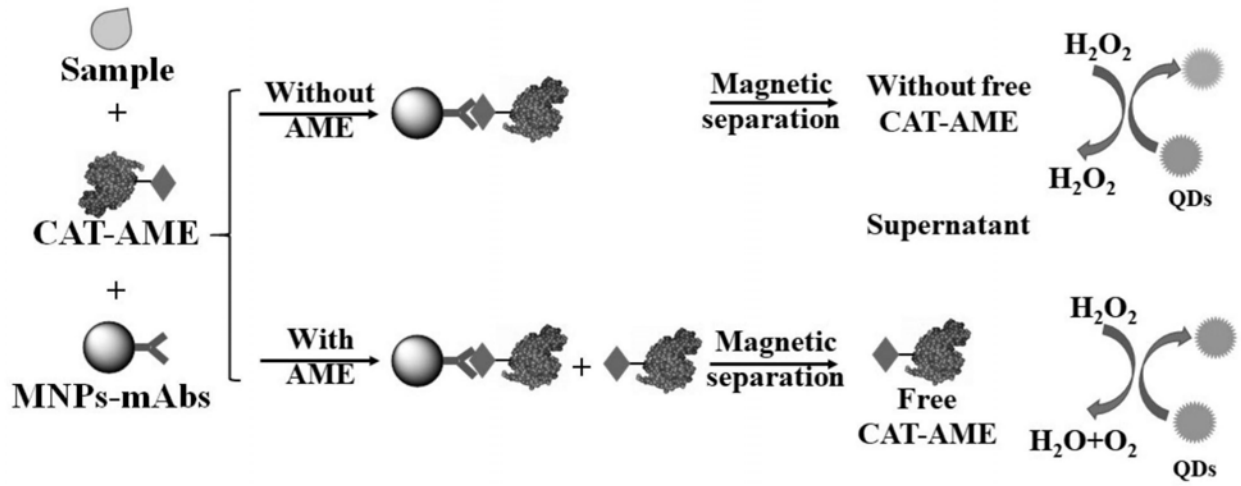


图1

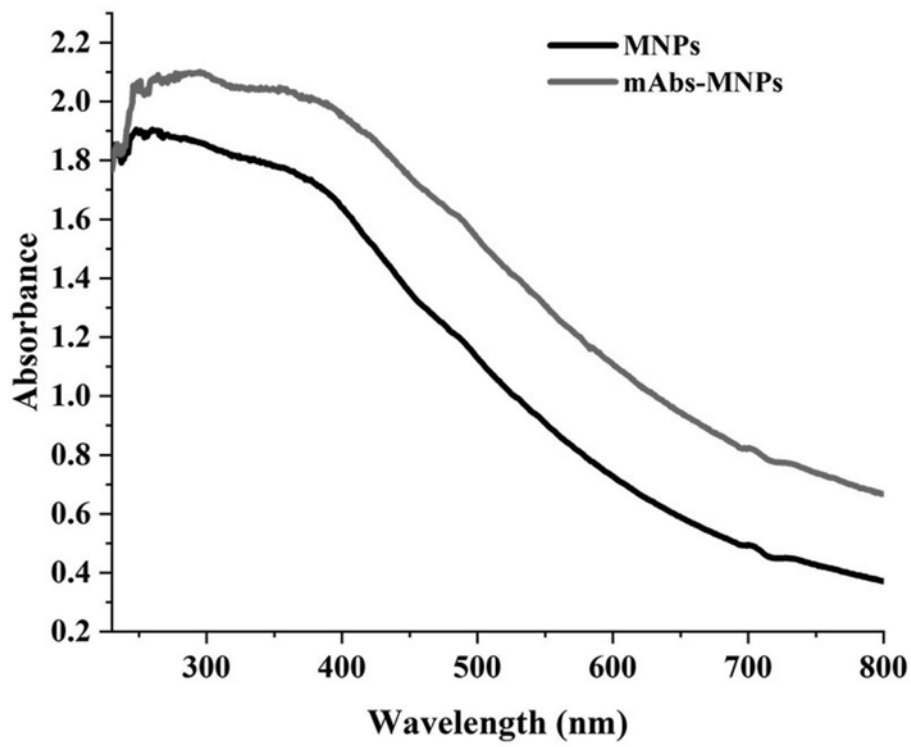


图2

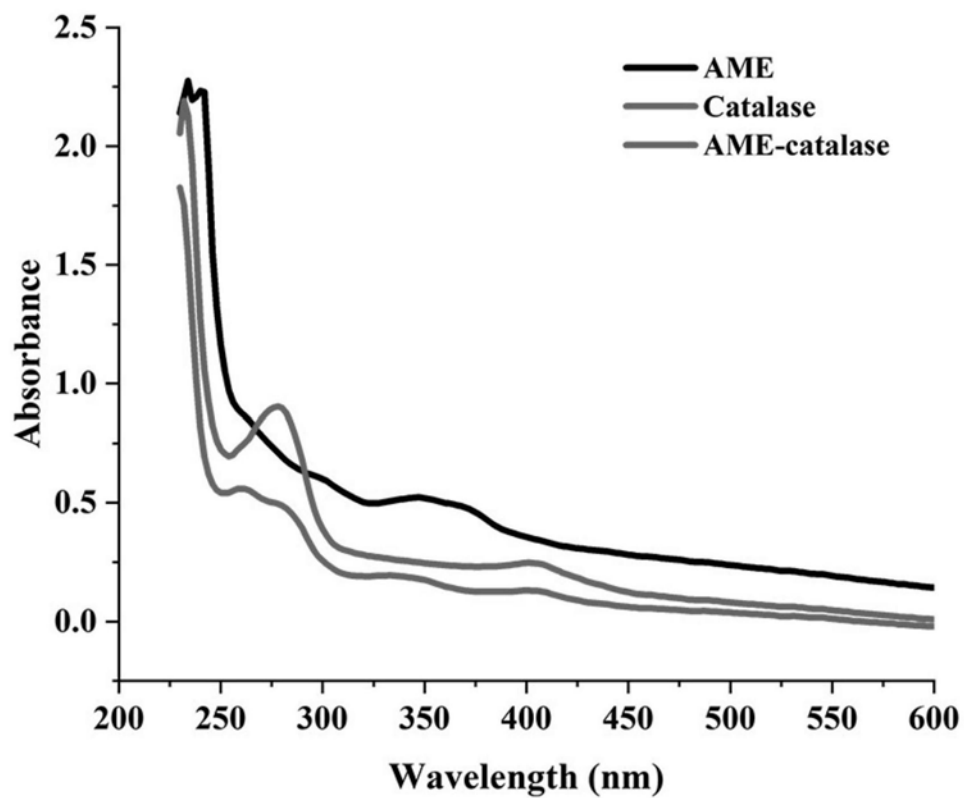


图3

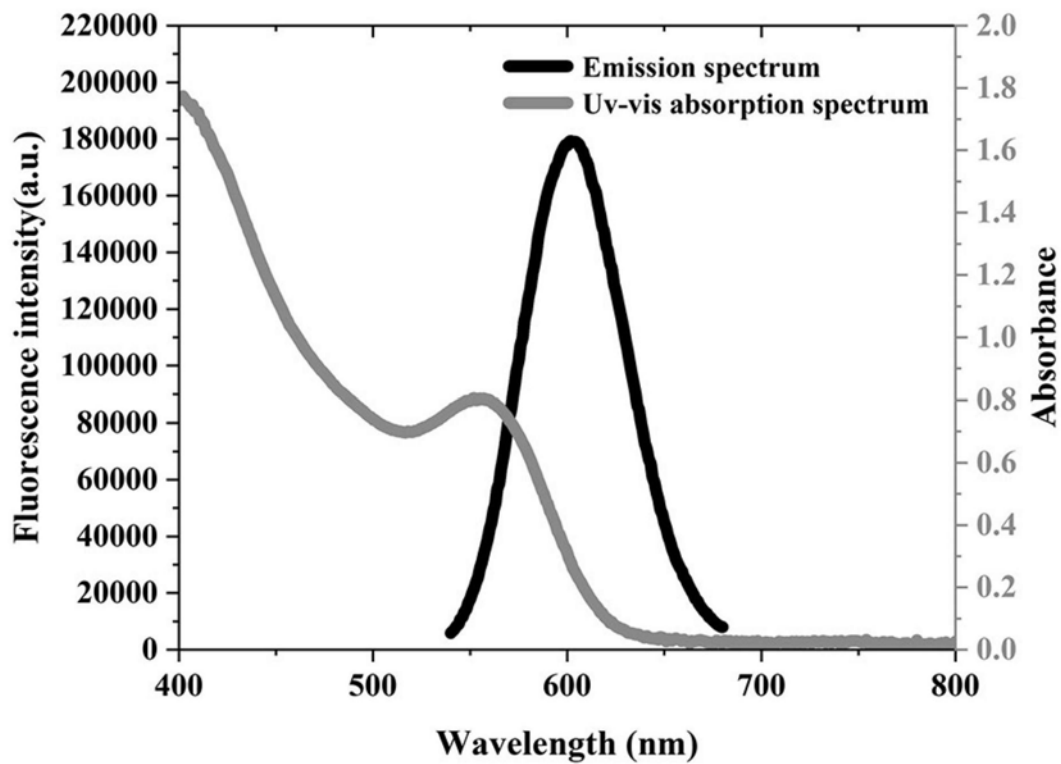


图4

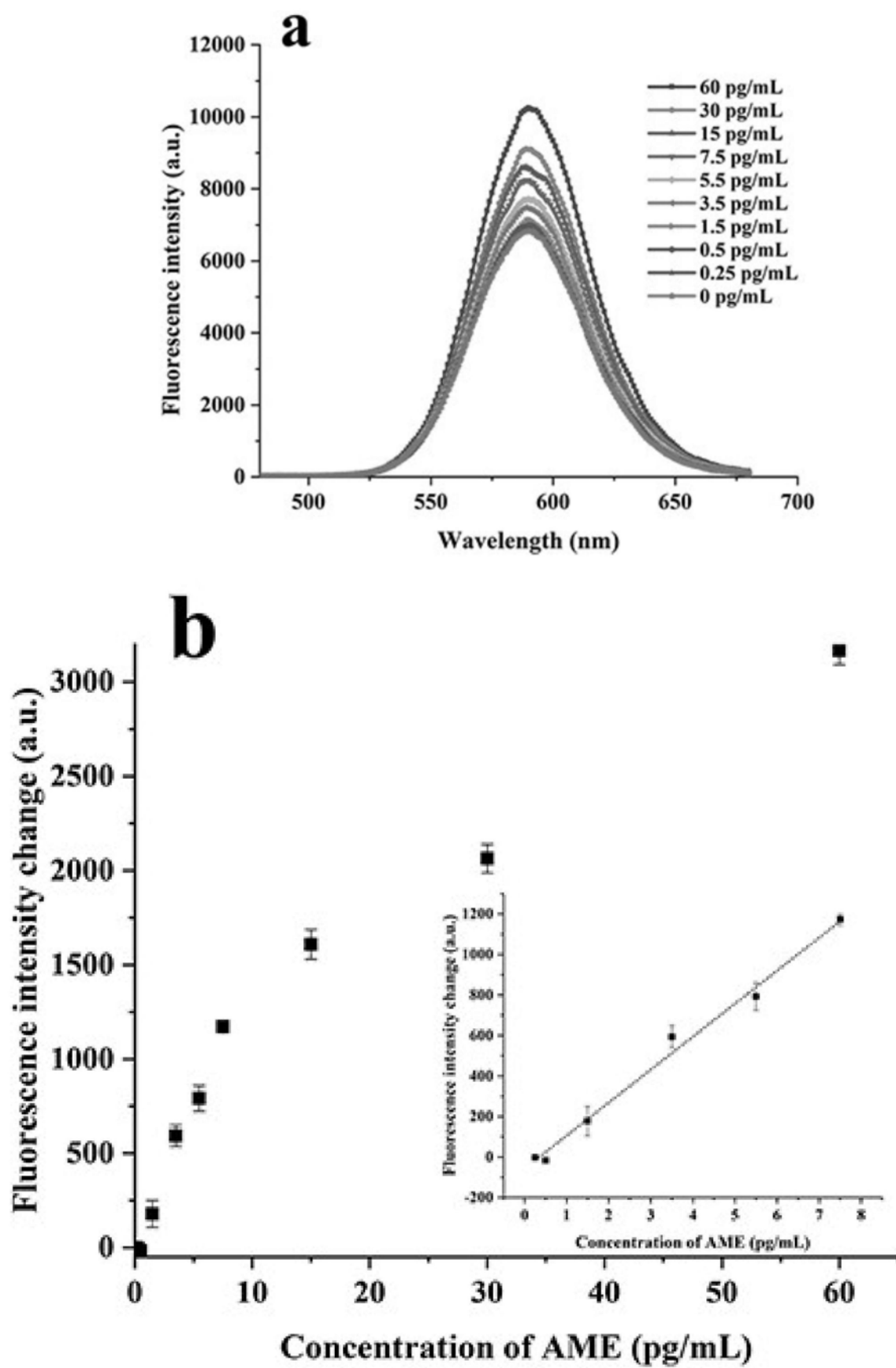


图5

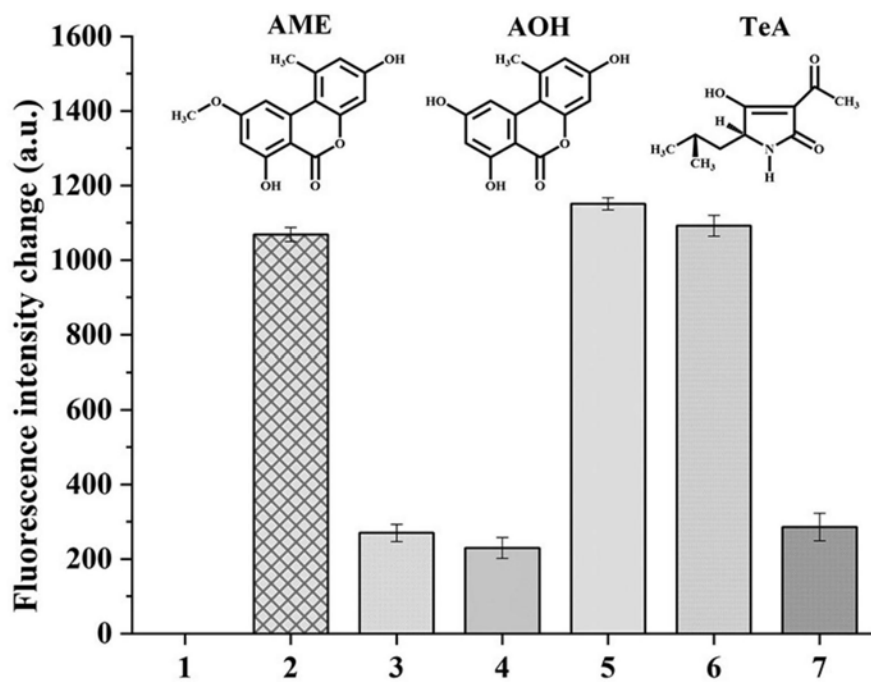


图6

专利名称(译)	链格孢酚单甲醚的磁免疫荧光定量检测方法		
公开(公告)号	CN109799332A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201811595181.1	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京农业质量标准与检测技术研究中心		
[标]发明人	满燕 潘立刚 靳欣欣		
发明人	满燕 潘立刚 靳欣欣		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/64		
代理人(译)	王文君 黄爽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供链格孢酚单甲醚(AME)的磁免疫荧光定量检测方法,其是一种基于H₂O₂介导CdTe QDs荧光淬灭的磁免疫分析新方法。由过氧化氢酶(CAT)-AME作为竞争性抗原,与样品中的AME竞争性结合磁珠上的单克隆抗体,经磁分离后,上清中剩余的CAT-AME对H₂O₂进行降解,因此降低了H₂O₂对巯基丙酸量子点(MPA-CdTe QDs)的荧光淬灭率,并根据此原理来判断样品中AME的含量。利用本方法可以简单、快速地实现果蔬样本中AME的定量检测,最低检测限可达0.25pg/mL。

