



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107860909 A

(43)申请公布日 2018.03.30

(21)申请号 201711096224.7

(22)申请日 2017.11.09

(71)申请人 陈军

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区
苏惠路98号

申请人 张嵘

(72)发明人 陈军 张嵘

(74)专利代理机构 苏州翔远专利代理事务所
(普通合伙) 32251

代理人 王华

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

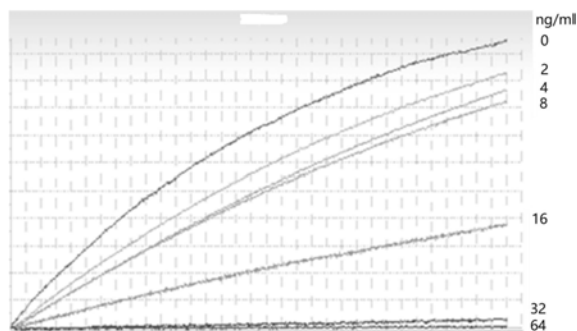
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种快速检测四环素残留的方法

(57)摘要

一种快速检测四环素残留的方法,属于检验技术领域。本发明采用混合酸酐法制备免疫原和包被抗原,籍由同型双功能团试剂与载体蛋白质偶联后修饰光纤探头形成多模干涉效应,通过检测光源在传感器膜面上形成的干涉光谱位移差异,此种位移变化间接反映目标物四环素抗体的浓度,由此实现对液体奶制品中四环素的检测。本发明有具检测速度快、操作过程简单、稳定性及重复性好、不需要昂贵仪器等优点,非常适合于在四环素残留的现场监测。



1. 一种快速检测四环素残留的方法,其特征在于:包括3,3'-二甲基联苯胺重氮化、包被原的合成、免疫原的合成、抗原包被修饰光纤传感器、抗体-胶体金偶联物的制备,以及检测步骤;

所述3,3'-二甲基联苯胺重氮化包括:将3,3'-二甲基联苯胺溶于盐酸中得到3,3'-二甲基联苯胺溶液,将亚硝酸钠溶液加入所述3,3'-二甲基联苯胺溶液,避光条件下进行反应,得到的产物记作A液;

所述包被原的合成包括:将牛血清白蛋白和四环素溶在冰冷的硼砂缓冲液中,然后将所述A液加入,避光条件下进行反应得到四环素包被抗原溶液,接着用PBS缓冲液透析,将透析后的溶液离心后得到的上清液冻干,得到包被原,即四环素-BSA偶联物;

所述免疫原的合成包括:将鸡卵清蛋白和四环素溶在冰冷的硼砂缓冲液中,然后将所述A液加入,避光条件下进行反应得到四环素免疫原溶液,接着用PBS缓冲液透析,将透析后的溶液离心后得到的上清液冻干,得到免疫原;

所述抗原包被修饰光纤传感器包括:将APS光纤传感器末端没入包被原溶液中,室温静置4~6min,再将APS光纤传感器末端没入蔗糖溶液中,晾干后置于2~8℃干燥的环境中保存;

所述抗体-胶体金偶联物的制备包括:向1mL胶体金中加入四环素抗体,涡旋混匀,室温静置15min,加入100μL的质量分数为10%的牛血清白蛋白溶液,室温封闭15min,10000 rpm离心10 min,弃掉上层清液,加入90μL pH 值为7.4的PBS缓冲液,重悬颗粒,得到金标BSA;

所述检测方法包括:

无标记检测:

将四环素-BSA偶联物用pH值为7.4的 PBS缓冲液稀释20倍,取200μL于微孔板的第2列;用巴氏杀菌奶稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0 ng/ml,分别取200 μL于微孔板的第4列,另外每孔添加50μL反应液;往微孔板第1列中加入200μL水,往微孔板的第3列加入200μL巴氏杀菌奶,并加入50μL反应液;用APS光纤传感器进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

金标记检测:

将四环素-BSA偶联物用pH值为7.4的 PBS缓冲液稀释20倍,取200 μL于微孔板的第2列;用巴氏杀菌奶稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0 ng/ml,分别取200μL于微孔板的第4列,另外每孔添加分别加入50 μL反应液、5 μL抗体-胶体金偶联物,混匀;往微孔板第1列中加入200μL水,往微孔板第3列加入200 μL巴氏杀菌奶、50 μL反应液、5 μL 金标BSA;用APS光纤传感器进行检测:第一列60 s,第2列60 s;第3列60 s;第4列300s。

2. 根据权利要求1所述的快速检测四环素残留的方法,其特征在于:将25mgde 3,3'-二甲基联苯胺溶于4.5mL的0.2M盐酸中得到3,3'-二甲基联苯胺溶液。

3. 根据权利要求1所述的快速检测四环素残留的方法,其特征在于:所述反应液为pH值为7.4的PBS缓冲液。

一种快速检测四环素残留的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学检测技术领域,具体涉及一种快速检测四环素残留的方法,特别涉及一种基于光纤传感器的四环素类抗生素残留的光学免疫检测方法。

背景技术

[0002] 四环素类抗生素属于氧化并四苯环衍生物,作为由放线菌产生的广谱抗生素,已经广泛应用于治疗人类和动物的细菌感染和促进生长。常用的四环素类抗生素有四环素、土霉素、强力霉素即脱氧土霉素、金霉素等。四环素类药物具有稳定的药性、优良的抗菌性、及低廉的价格,被广泛地用于禽畜疾病的预防和治疗。这类药物是目甜兽医临床用量最大的兽药之一,同时也是应用动物种类最多的兽药之一,但临床上常发生不合理的使用、滥用、不遵守休药期规定等情况,所以导致禽畜产品中存在很高浓度的药物残留,引起了细菌的耐药性增加,并直接对人们的健康造成威胁。

[0003] 为有效地管理控制四环素类药物的残留,必须建立起相应的检测监控手段和方法。四环素类抗生素分析常用的检测方法有高效液相色谱法、微生物分析法、酶联免疫分析法、毛细管电泳法、电化学分析法、化学发光法及联用技术等。色谱及其联用技术在抗生素残留分析中具有很多优势,尤其是在检测可靠性和灵敏度方面具有优势;微生物法是日前主要应用的检测四环素类抗生素残留的方法之一,多适用于大量样品的快速筛选;免疫分析法是以抗原与抗体的特异性结合反应为基础的分析技术,由于具有操作简便、灵敏度高、专一性强、适用于批量样品分析等特点,已广泛用于动物组织、蜂蜜等动物源性食品中四环素类抗生素的检测。

[0004] 尽管免疫学检测方法的灵敏度高及特异性较强,由于相应抗体的研发时间长而成本高,且方法重复性及稳定性较差而影响其进一步推广。传感器方法是近些年发展起来的新型检测技术,随着光纤传感技术及各种生物固定技术的广泛研究,光纤生物传感器得到了迅速的发展,各类光纤生物传感器的研制开发成为生物传感器的发展热点。其中,生物膜干涉技术基于光吸收、荧光和光反射原理,通过蛋白分子结合到传感器上的差异,导致可见光在传感器膜面上形成的干涉光谱位移差异,通过检测这种位移变化间接反映蛋白分子的浓度。因此,开发基于生物膜干涉技术的四环素检测方法有助于快速检测动物源性食品中四环素残留。

发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种快速检测四环素残留的方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供的技术方案是:一种快速检测四环素残留的方法,包括3,3'-二甲基联苯胺重氮化、包被原的合成、免疫原的合成、抗原包被修饰光纤传感器、抗体-胶体金偶联物的制备,以及检测步骤;

[0007] 所述3,3'-二甲基联苯胺重氮化包括:将3,3'-二甲基联苯胺溶于盐酸中得到3,3'-二甲基联苯胺溶液,将亚硝酸钠溶液加入所述3,3'-二甲基联苯胺溶液,避光条件下进

行反应,得到的产物记作A液;

[0008] 所述包被原的合成包括:将牛血清白蛋白和四环素溶在冰冷的硼砂缓冲液中,然后将所述A液加入,避光条件下进行反应得到四环素包被抗原溶液,接着用PBS缓冲液透析,将透析后的溶液离心后得到的上清液冻干,得到包被原,即四环素-BSA偶联物;

[0009] 所述免疫原的合成包括:将鸡卵清蛋白和四环素溶在冰冷的硼砂缓冲液中,然后将所述A液加入,避光条件下进行反应得到四环素免疫原溶液,接着用PBS缓冲液透析,将透析后的溶液离心后得到的上清液冻干,得到免疫原;

[0010] 所述抗原包被修饰光纤传感器包括:将APS光纤传感器末端没入包被原溶液中,室温静置4~6min,再将APS光纤传感器末端没入蔗糖溶液中,晾干后置于2~8℃干燥的环境中保存;

[0011] 所述抗体-胶体金偶联物的制备包括:向1mL胶体金中加入四环素抗体,涡旋混匀,室温静置15min,加入100μL的质量分数为10%的牛血清白蛋白溶液,室温封闭15min,10000rpm离心10min,弃掉上层清液,加入90μL pH值为7.4的PBS缓冲液,重悬颗粒,得到金标BSA;

[0012] 所述检测方法包括:

[0013] 无标记检测:

[0014] 将四环素-BSA偶联物用pH值为7.4的PBS缓冲液稀释20倍,取200μL于微孔板的第2列;用巴氏杀菌奶稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0ng/ml,分别取200μL于微孔板的第4列,另外每孔添加50μL反应液;往微孔板第1列中加入200μL水,往微孔板的第3列加入200μL巴氏杀菌奶,并加入50μL反应液;用APS光纤传感器进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s;

[0015] 金标记检测:

[0016] 将四环素-BSA偶联物用pH值为7.4的PBS缓冲液稀释20倍,取200μL于微孔板的第2列;用巴氏杀菌奶稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0ng/ml,分别取200μL于微孔板的第4列,另外每孔添加分别加入50μL反应液、5μL抗体-胶体金偶联物,混匀;往微孔板第1列中加入200μL水,往微孔板第3列加入200μL巴氏杀菌奶、50μL反应液、5μL金标BSA;用APS光纤传感器进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s。

[0017] 优选的技术方案为:将25mgde 3,3'-二甲基联苯胺溶于4.5mL的0.2M盐酸中得到3,3'-二甲基联苯胺溶液。

附图说明

[0018] 图1是四环素-BSA偶联物合成路线图。

[0019] 图2是TC-Tolidin-BSA紫外扫描光谱。a线是邻甲苯胺;b线是四环素;c线是TC-Tolidin-BSA偶联物。

[0020] 图3无标记检测牛奶中四环素残留。

[0021] 图4是金标记检测四环素加标样品。

[0022] 由于上述技术方案运用,本发明与现有技术相比具有的优点是:

[0023] 采用混合酸酐法别制备免疫原和包被抗原后籍由同型双功能团试剂与载体蛋白质偶联后修饰光纤探头形成多模干涉效应,再由光纤光谱分析装置检测和识别待测样品中

是否存在目标物以及浓度信息,实现样品中四环素的定量检测。该方法大大缩短了检测成本和检测时间,具有良好重现性和自动化、高通量等优势。

具体实施方式

[0024] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0025] 结合如下实施例对光纤生物传感器测定液体奶制品的方法进行进一步说明。

[0026] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0027] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0028] 实施例一:一种快速检测四环素残留的方法

[0029] 步骤(1)双官能团试剂(0-tohdine)重氮化制备如下:

[0030] 称取25mg 3,3'-二甲基联苯胺(0-tolidine)溶于4.5mL 0.2M盐酸中,4℃搅拌。称取17.5mg的亚硝酸钠溶于在0.5mL水中,将亚硝酸钠溶液逐滴加入0-tolidine溶液中,避光反应1h,得溶液A备用。

[0031] 包被原(TC-Tolidine-BSA)的制备如下:

[0032] 按照图1所示的四环素-BSA偶联物合成路线图进行合成。称取20mg BSA和10mg四环素溶于2mL冰冷的0.05M硼砂缓冲液(pH 8.5,含0.15M NaCl)中,4℃搅拌,将上述1mL A溶液逐滴加入到该溶液中,避光反应2h,得到四环素免疫原溶液(反应方程式如图1所示)。用PBS(pH 7.4)4℃透析5d(每12h更换一次透析液)后,将透析后的溶液高速离心(3000g)15min,弃沉淀,冻干上清液,得到紫色固体粉末,备用。

[0033] 免疫原(TC-Tolidine-OVA)的合成称取48mg鸡卵清蛋白(OV)A和10mg四环素溶于5mL冰冷的0.05M硼砂缓冲液(pH 8.5,含0.15M NaCl)中,4℃搅拌,将上述1.5mL A溶液逐滴加入到该溶液中,避光反应1h,得到四环素包被抗原溶液。用PBS(pH 7.4)4℃透析五天,每12h更换一次透析液。将透析后的溶液高速离心(3000g)15min,弃沉淀,冻干上清液,得到紫色固体粉末,紫外分析确认偶联成功后收集备用,紫外扫描光谱如图2所示。

[0034] 步骤(4)抗原包被修饰光纤传感器将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶液中,室温静置5min。再将光纤生物传感器没入质量分数为15%的蔗糖溶液中,室温静置1min。室温晾干,置于8℃干燥保存,备用,使用之前才将APS光纤传感器与ForteBio Octet Red生物分子相互作用仪连接。

[0035] 步骤(5)抗体-胶体金偶联物的制备向1mL胶体金中加入不同量的抗体,涡旋混匀,室温静置15min,加入100μL 10%BSA,室温封闭颗粒15min,10000rpm离心10min,弃掉上层清液,加入90μL PB(pH7.4),重悬颗粒,备用。

[0036] 无标记检测,步骤如下:

[0037] 将四环素-BSA偶联物(6mg/ml)用1×PBS(pH7.4)稀释20倍,取200μL于微孔板中(第2列);将四环素抗体(2mg/mL)用巴氏杀菌奶稀释50倍,并用该液体稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0ng/ml,分别取200μL于微孔板中(第4列),并加入50μL反应液;往微孔板第1列中加入200μL水,往第3列加入200μL巴氏杀菌奶,并加入50μL反应液;用APS光纤传感器进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s。结果如图3所示。从图中可以看出检测的灵敏性在16ng/mL左右。

[0038] 金标记检测,步骤如下:

[0039] 将四环素-BSA偶联物(6mg/ml)用1×PBS(pH 7.4)稀释20倍,取200μL于微孔板中(第2列);用巴氏杀菌奶稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0ng/ml,分别取200μL于微孔板中(第4列);往第4列中分别加入5μL抗体-胶体金偶联物、50μL反应液,混匀;往微孔板第1列中加入200μL水,往第3列加入200μL巴氏杀菌奶、50μL反应液、5μL金标BSA;用APS光纤传感器进行检测:第一列60s,第2列60s;第3列60s;第4列300s。图4为金标记检测牛奶中四环素残留标准曲线。

[0040] 灵敏性检测用金标记检测和胶体金加有不同浓度的标准四环素类抗生素的牛奶(预先用标准方法测定四环素类抗生素呈阴性)。两种检测方法的结果如表1所示。

[0041] 表1金标记检测方法与胶体金免疫层析方法检测牛乳中四环素类抗生素残留的灵敏性实验结果:

[0042]

四环素类抗生素	金标记生物膜干涉技术	胶体金免疫层析试纸条	四环素类抗生素	金标记生物膜干涉技术	胶体金免疫层析试纸条
四环素	2	8	金霉素	25	100
多西霉素	10	40	土霉素	50	100

[0043] 注:单位:ng/mL)

[0044] 特异性实验:用所建立的方法检测加标浓度为1000ng/ml的黄曲霉毒素M1、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、泰乐菌素、氯霉素和三聚氰胺,检测结果均为阴性。

[0045] 基质干扰评价:分别用6份原奶、7份来自不同批次的巴氏杀菌奶倍比稀释四环素类抗生素标准品,分别采用金标记BLI检测方式进行检测,灵敏性稳定达到2ng/ml。

[0046] 实施例二:一种快速检测四环素残留的方法

[0047] 一种快速检测液体奶制品中四环素残留的免疫分析方法,所述方法包括四环素特异性抗体、包被的四环素与载体蛋白的偶联物制备及以下步骤:

[0048] 步骤(1)双官能团试剂(0-tolidine)重氮化称取25mg 0-tolidine溶于4.5mL0.2M盐酸中,4℃搅拌。称取17.5mg的亚硝酸钠溶于在0.5mL水中,将亚硝酸钠溶液逐滴加入0-tolidine溶液中,避光反应1h,得溶液A备用。

[0049] 步骤(2)包被原(TC-Tolidine-BSA)的合成称取20mg BSA和10mg四环素溶在2mL冰冷的0.05M硼砂缓冲液(pH 8.5,含0.15M NaCl)中,4℃搅拌,将上述1mL A溶液逐滴加入到该溶液中,避光反应2h,得到四环素免疫原溶液。用PBS(pH 7.4)4℃透析5d(每12h更换一次透析液)后,将透析后的溶液高速离心(3000g)15min,弃沉淀,冻干上清液,得到紫色固体粉末,备用。

[0050] 步骤(3)免疫原(TC-Tolidine-OVA)的合成称取48mg鸡卵清蛋白(OV)A和10mg四环素溶在5mL冰冷的0.05M硼砂缓冲液(pH 8.5,含0.15M NaCl)中,4℃搅拌,将上述1.5mLA溶液逐滴加入到该溶液中,避光反应1h,得到四环素包被抗原溶液。用PBS(pH 7.4)4℃透析五天,每12h更换一次透析液。将透析后的溶液高速离心(3000g)15min,弃沉淀,冻干上清液,得到紫色固体粉末,备用。

[0051] 步骤(4)抗原包被修饰光纤传感器将APS光纤传感器末端没入不同浓度的包被原溶

液中,室温静置5min。再将光纤生物传感器没入15%蔗糖中,室温静置1min。室温晾干,置于2~8℃干燥保存,备用。

[0052] 步骤(5)抗体-胶体金偶联物的制备向1mL胶体金中加入不同量的抗体,涡旋混匀,室温静置15min,加入100μL 10%BSA,室温封闭颗粒15min,10000rpm离心10min,弃掉上层清液,加入90μL PB (pH7.4),重悬颗粒,备用。

[0053] 步骤(6)无标记检测采用ForteBio Octet Red生物分子相互作用仪对添加标准品的待检液体进行检测,检测过程:①平衡:将光纤传感器末端没入阴性待检液体(200μL待检液体+50μL缓冲液)中120s;②检测:将光纤传感器末端没入待测液体中(200μL待测样品+50μL缓冲液+2μg四环素抗体)中300s。待检液体与待测样品成分相同,但是经检测,不含有四环素。缓冲液为0.05M硼砂缓冲液(pH 8.5,含0.15M NaCl)

[0054] 步骤(7)金标记检测采用ForteBio Octet Red生物分子相互作用仪对添加标准品的牛奶样品进行检测,检测过程:①平衡:将光纤传感器末端没入待检液体中(200μL待检液体+50μL缓冲液+5μL金标BSA)中120s;②检测:将光纤传感器末端没入待测奶液(200μL待测牛奶+50μL缓冲液+5μL金标抗体-胶体金偶联物)中600s。待检液体为经检测,不含有四环素的牛奶。

[0055] 记录生物感测单元和光谱仪读取的信号值,绘制曲线,通过标准曲线确定样品目标物含量。

[0056] 标准曲线绘制可以采用现有,或者:无标记检测的标准曲线绘制:

[0057] 将四环素抗体(2mg/mL)用巴氏杀菌奶稀释50倍,并用该液体稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0ng/ml,分别取200μL于微孔板的第4列,并加入50μL反应液,用APS光纤传感器进行检测第4列300s。测得结果绘制后即得标准曲线。

[0058] 金标记检测的标准曲线绘制:

[0059] 用巴氏杀菌奶稀释四环素标准品到64、32、16、8、4、2、0ng/ml,分别取200μL于微孔板的第4列,往第4列中分别加入5μL抗体-胶体金偶联物、50μL反应液,混匀;用APS光纤传感器进行检测第4列300s。

[0060] 经检测,无标记检测时,待测样品含有0.4微克/千克的四环素。

[0061] 经检测,金标记检测时,待测样品没有四环素残留。

[0062] 本发明提供的一种利用光纤生物传感器测定液体奶制品中四环素含量,所述检测的目标物为四环素,所述的检测仪器为光纤光谱分析装置,通过在光线传感器探头表面修饰固定一层四环素特异性抗体,建立了检测样品中目标物的无标记/金标记测试方法,使用合适的曲线拟合技术获得定量曲线,实现目标物的定量。

[0063] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

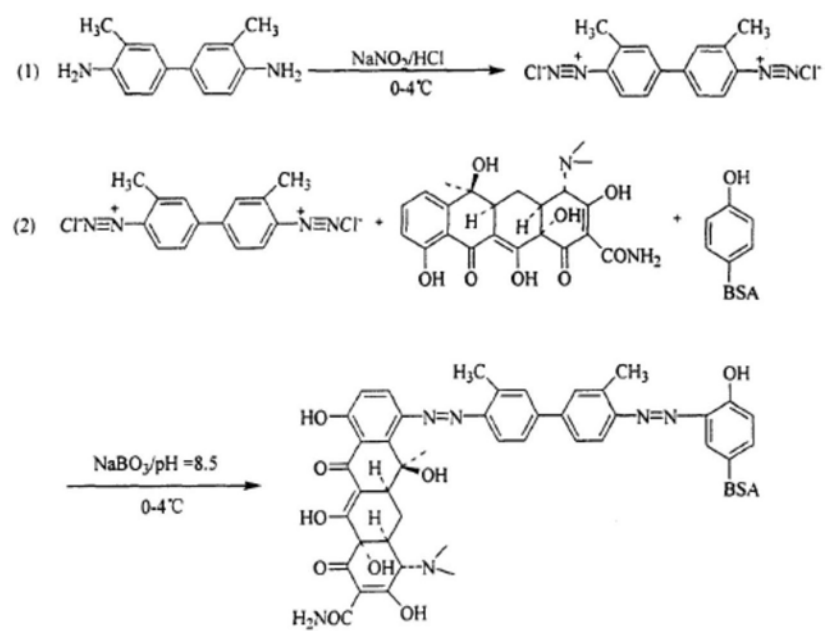


图1

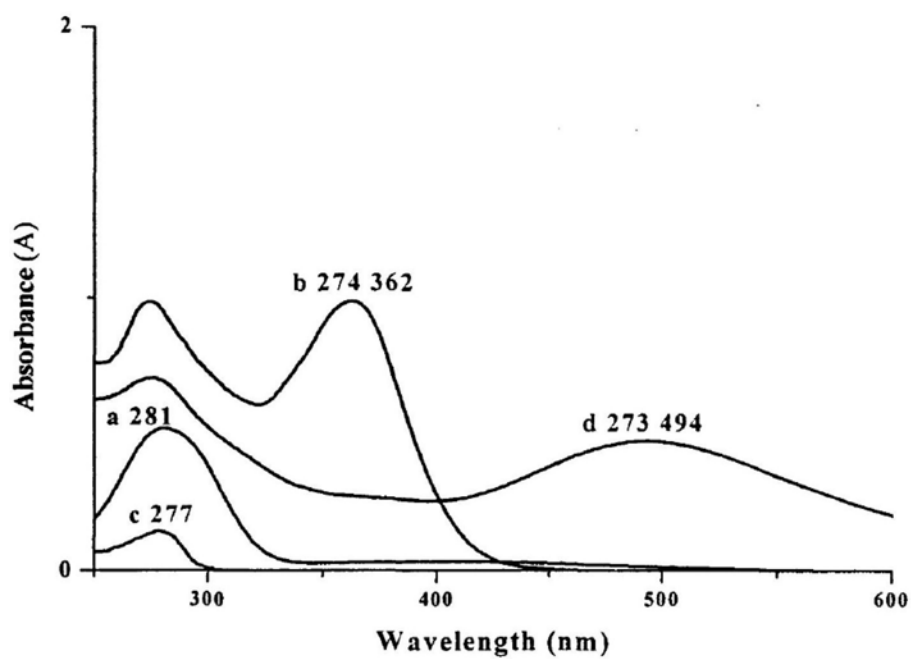


图2

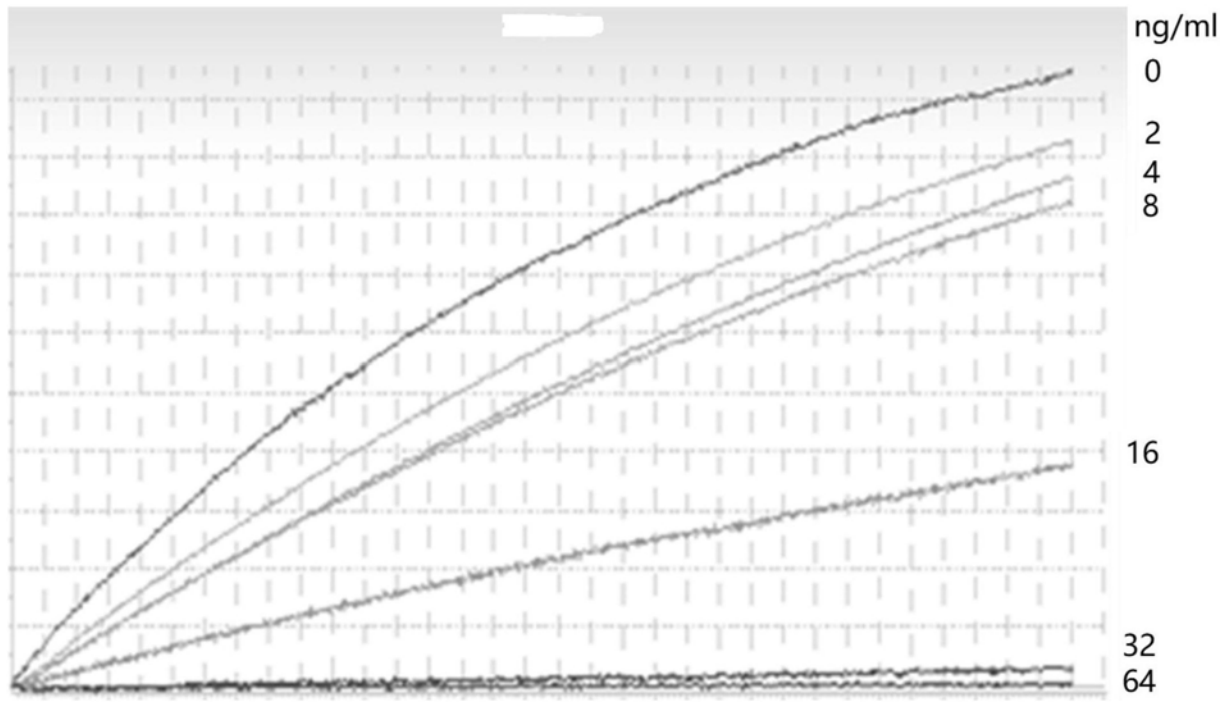


图3

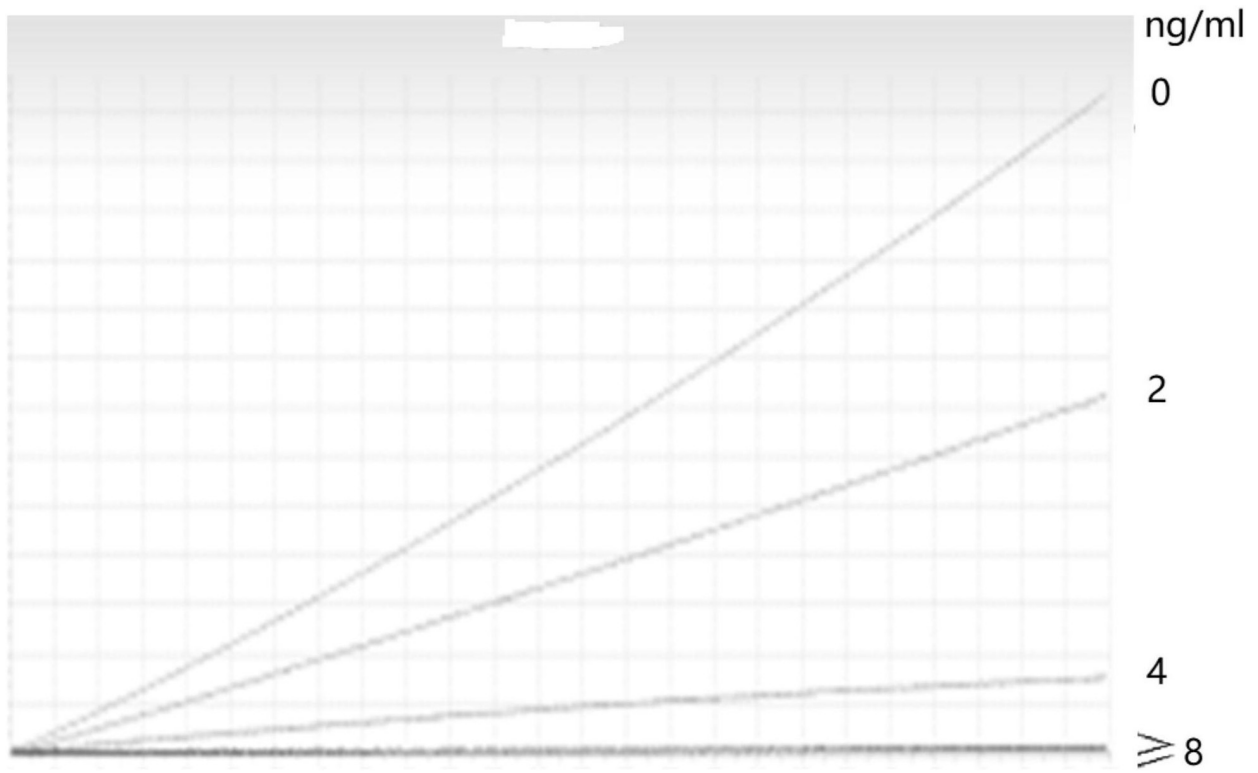


图4

专利名称(译)	一种快速检测四环素残留的方法		
公开(公告)号	CN107860909A	公开(公告)日	2018-03-30
申请号	CN2017111096224.7	申请日	2017-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	陈军 张嵘		
申请(专利权)人(译)	陈军 张嵘		
当前申请(专利权)人(译)	陈军 张嵘		
[标]发明人	陈军 张嵘		
发明人	陈军 张嵘		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/53 G01N21/31		
代理人(译)	王华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速检测四环素残留的方法，属于检验技术领域。本发明采用混合酸酐法制备免疫原和包被抗原，藉由同型双功能团试剂与载体蛋白质偶联后修饰光纤探头形成多模干涉效应，通过检测光源在传感器膜面上形成的干涉光谱位移差异，此种位移变化间接反映目标物四环素抗体的浓度，由此实现对液体奶制品中四环素的检测。本发明有具检测速度快、操作过程简单、稳定性及重复性好、不需要昂贵仪器等优点，非常适合于在四环素残留的现场监测。

