



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884021 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910250689.6

(22)申请日 2019.03.29

(71)申请人 铁道警察学院

地址 450000 河南省郑州市金水区农业路
31号

(72)发明人 崔胜峰 万敬伟 梁帅 陈周

(74)专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通
合伙) 41104

代理人 时立新 张丽

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

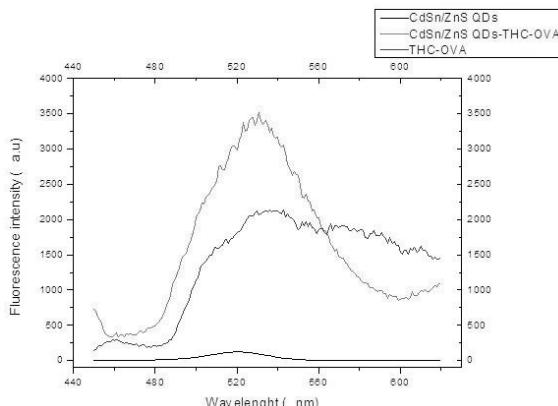
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种量子点标记的THC包被抗原、其制备方
法及利用其检测食品中大麻含量的方法

(57)摘要

一种量子点标记的THC包被抗原、其制备方
法及利用其检测食品中大麻含量的方法，属于食
品安全检测技术领域，所述制备过程包括如下步
骤：(1)THC半抗原的制备：称取丁二酸酐与THC，
在碳酸钾的催化作用下，55~65℃加热搅拌反应
至反应完全，薄层色谱分离，所得琥珀酰THC即为
THC半抗原；(2)THC包被抗原的制备：以EDC和NHS
为催化剂，将THC半抗原和卵清蛋白进行反应得
到THC包被抗原；(3)量子点标记的THC包被抗原
的制备：将CdSe/ZnS QDs溶解于硼酸缓冲液中，
在EDC和NHS作用下，将THC包被抗原滴加至CdSe/
ZnS QDs的硼酸缓冲液中，反应结束后，用PBS缓
冲液透析，即得。



1. 一种量子点标记的THC包被抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) THC半抗原的制备:以二氯甲烷或丙酮为溶剂,称取一定量丁二酸酐与THC,在碳酸钾的催化作用下,55~65℃加热搅拌至反应完全,薄层色谱分离,所得琥珀酰-THC即为THC半抗原;

(2) THC包被抗原的制备:以EDC和NHS为催化剂,将THC半抗原和卵清蛋白进行反应得到THC包被抗原;

(3) 量子点标记的THC包被抗原的制备:将CdSe/ZnS QDs溶解于硼酸缓冲液中,THC包被抗原滴加至CdSe/ZnS QDs的硼酸缓冲液中,在EDC和NHS催化作用下,反应结束后,用PBS缓冲液透析,即得。

2. 根据权利要求1所述量子点标记的THC包被抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)的具体过程如下:将THC溶于二氯甲烷或丙酮中,完全溶解后加入碳酸钾,55~65℃加热搅拌10~30 min,再加入丁二酸酐搅拌加热反应至反应完全,经后处理即得,碳酸钾、THC和丁二酸酐的摩尔比为1:(0.18~0.19):0.003;所述后处理的过程如下:将反应体系全部转移至离心管内加入DCM离心,取上层清液,再次利用薄层色谱法将琥珀酰THC与其他反应物质分离;THC与琥珀酰THC分离时展开剂为二氯甲烷与石油醚按体积1:1混合,琥珀酰THC与其他反应物质分离时展开剂为二氯甲烷与石油醚按体积2:1混合。

3. 根据权利要求1所述量子点标记的THC包被抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)的过程如下:将1.3 mg提纯干燥好的琥珀酰THC,溶于0.2 mL的蒸馏水,加1.7 mg EDC·HCl,记作A溶液;称取1.2 mg卵清蛋白,溶于0.3 mL的蒸馏水,用0.1 mol/L的HCl调pH至4.0,记为B溶液;将两溶液混合后,调pH至3.5~4.5,在调pH过程中,溶液逐渐变澄清,再加入1 mg的NHS,室温下搅拌30 min后,4℃搅拌至反应完全,用10 mM PBS缓冲液透析。

4. 根据权利要求1所述量子点标记的THC包被抗原的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)的过程如下:

① 避光条件下,将20.3 μL CdSe/ZnS QDs用10 mM、pH=7.4硼酸缓冲液稀释至1 μM,室温搅拌下,取步骤(2)中17 μL THC包被抗原滴加到CdSe/ZnS QDs溶液中混合均匀;

② 搅拌10 min后,搅拌下,将13 μL、10 mg/mL的EDC溶液滴加到步骤①溶液中反应20 min;

③ 搅拌下,再向反应液中滴加15 μL、10 mg/mL NHS溶液室温下搅拌反应4~5 h;

④ 反应结束后将CdSe/ZnS QDs标记的THC用PBS缓冲液透析24 h除去过量的CdSe/ZnS QDs;

⑤ 透析后,用超滤浓缩管以12000 rpm将溶液浓缩至原体积的十分之一,终产物复溶于PBS缓冲液中,取出后12000 rpm离心3 min除团聚,CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原保存于4℃黑暗条件下备用;其中,所述CdSe/ZnS QDs量子点浓度为8 μM;步骤② EDC溶液和步骤③ NHS溶液的溶剂均为10 mM、pH = 7.4硼酸盐缓冲溶液。

5. 权利要求1至4任一所述的制备方法制得的量子点标记的THC包被抗原。

6. 权利要求5所述的量子点标记的THC包被抗原在检测食品中大麻含量的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述检测为荧光免疫吸附分析方法,检测

时,以所述CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原为荧光探针,CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原与被分析物THC直接竞争具有特异性免疫反应的THC抗体。

8. 一种检测食品中大麻含量的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 先用10 mM PBS缓冲液清洗透明96孔酶标板每个孔,取THC抗体溶液加入96孔聚苯乙烯酶标板别哭和用于检测待测样品的实验孔中,使每孔含1 μ g THC抗体,37℃下孵育2~4h,再加入质量分数为4%的酪蛋白溶液封闭抗原上非特异性位点,37℃下孵育2~4h,然后用PBST溶液洗涤每孔以除去过量试剂;

(2) 然后将已知浓度的THC样品按照设定的梯度加入比色孔中,再加入权利要求1制得的量子点标记的THC包被抗原作为示踪剂,得到比色样品;

(3) 将待测样品加入步骤(1)的96孔板实验孔中,再加入权利要求1制得的量子点标记的THC包被抗原作为示踪剂;最后用PBS溶液定容,37℃下孵育2~4h,洗涤后通过目测荧光强度并和比色孔中的荧光强度比较从而确定待测样品中大麻的浓度。

9. 权利要求8所述检测食品中大麻含量的方法,其特征在于,THC样品梯度浓度依次为: $2 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ 分别依次标记为1~9号,不含THC成分的空白对照为0号孔。

一种量子点标记的THC包被抗原、其制备方法及利用其检测食品中大麻含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域,具体涉及一种量子点标记的THC包被抗原、其制备方法及利用其检测食品中大麻含量的方法。

背景技术

[0002] 大麻 (Cannabis),又名火麻等,大麻的化学成份极其复杂,主要有以下几种化合物构成:类脂物、黄酮类化合物、萜烯、碳氢化合物、非环形大苯酚、生物碱,柠檬酸银和环形大麻酚(如四氢大麻酚),每种化合物组分的含量在同一株植物的不同部位含量不同。

[0003] 大麻植株中的生物活性成分是四氢大麻酚、大麻酚、大麻二酚等化合物,其中四氢大麻酚含量较高,易检测。

[0004] 食品是维持人类生存和保护人类健康重要条件之一,是社会和谐发展的重要保障,也是提高人类素质的重要物质基础之一。食品安全越来越引起人们的关注和重视,非食品添加物大麻在食品中的滥用,已成为食品安全的突出问题。目前对大麻壳中特征生物碱最常用的检测方法有仪器分析法、免疫分析法等。免疫分析法以其灵敏、特异性和简单快速等特点得到广泛应用酶联免疫吸附测定(ELISA)技术是免疫学技术的重要组成,已被成功应用于食品检测,基于该原理的免疫层析试纸技术得到较好的发展,除了酶或底物作标记物,常用的还有放射性物质、荧光物质等,如以前的放射性免疫分析技术,但由于放射性物质对人体及环境有极大的伤害,所以不再常用。目前荧光免疫由于快速、灵敏、污染小等特点备受关注,尤其采用量子点作为荧光标记物使其发展更迅速,荧光量子点由于其优良的光学性能及稳定性在生物分析检测领域有广泛的应用,将量子点标记与免疫分析技术相结合,开发的新型检测方法对解决食品安全问题有重要意义。本发明将围绕新型荧光量子点标记生物抗体建立检测大麻中特征生物碱THC的新方法及应用开展研究工作,期望通过本发明,建立的新型荧光免疫检测方法能满足当前在大麻检测领域日益增长的检测需求。本发明主要将荧光量子点标记包被抗原与免疫分析技术相结合,建立对大麻的快速检测方法,达到简化操作步骤,节省操作时间,提高检测效率的目的,并将所建立的方法用于火锅底料中非法添加大麻的快速检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对目前酶联免疫吸附测定的灵敏度、环保性与简便性,提供一种基于量子点标记免疫分析的快速,实时,高灵敏度的大麻检测技术,所述方法灵敏度高,大大降低了食品安全检测的检漏率,提高工作效率,具有重要应用价值。

[0006] 本发明基于量子点标记免疫分析的大麻检测的方法,是将人工合成THC半抗原,与卵清蛋白(OVA)偶联形成完全包被抗原,利用THC抗体,同时借助间接竞争荧光免疫吸附测定方法检测THC。利用带羧基水溶性量子点CdSe/ZnS QDs以EDC/NHS为交联剂,与THC包被抗原生物共价偶联成荧光标记抗原,同时对偶联复合物进行表征,验证表明该荧光探针成功

制备并具有良好的特异性,进一步建立检测THC的荧光免疫分析方法。以96孔板为固相载体,利用制备的荧光包被抗原免疫探针建立荧光免疫竞争吸附分析法快速检测THC,并通过研究不同浓度THC与荧光标记包被抗原竞争结合THC抗体导致荧光强度的变化实现对THC的定性、定量识别检测。

[0007] 基于上述目的,本发明采取的技术方案如下:

一种量子点标记的THC包被抗原的制备方法,包括如下步骤:

(1) THC半抗原的制备:称取丁二酸酐与THC,在碳酸钾的催化作用下,55~65℃加热搅拌反应至反应完全,薄层色谱分离,所得琥珀酰THC即为THC半抗原;

(2) THC包被抗原的制备:以EDC和NHS为催化剂,将THC半抗原和卵清蛋白进行反应得到THC包被抗原(THC-OVA);

(3) 量子点标记的THC包被抗原(CdSe/ZnS QDs-THC-OVA)的制备:

将CdSe/ZnS QDs溶解于硼酸缓冲液中,在EDC和NHS作用下,将THC包被抗原滴加至CdSe/ZnS QDs的硼酸缓冲液中,反应结束后,用PBS缓冲液透析,即得。

[0008] 进一步地,所述步骤(1)的具体过程如下:取1 mg THC溶于250 μ L二氯甲烷,充分震荡混合均匀,然后加入138 mg碳酸钾,60℃加热搅拌20 min,再加入19.1 mg丁二酸酐搅拌加热反应4 h,经后处理即得。

[0009] 进一步地,所述后处理的过程如下:将反应体系全部转移至离心管内加入DCM离心,取上层清液,为尽可能减少损失,每次加入少量DCM,将离心重复3次,再次利用薄层色谱法将琥珀酰THC与其他反应物质分离;THC与琥珀酰THC分离时展开剂为二氯甲烷与石油醚(v/v = 1/1)混合,琥珀酰THC与其他反应物质分离时展开剂为二氯甲烷与石油醚(v/v = 2/1)混合。

[0010] 进一步地,所述步骤(2)的过程如下:将1.3 mg提纯干燥好的琥珀酰THC,溶于0.2 mL的蒸馏水,加1.7 mg EDC·HCl,记作A溶液;称取1.2 mg卵清蛋白,溶于0.3 mL的蒸馏水,用0.1 mol/L的HCl调pH至4.0,记为B溶液;将两溶液混合后,调pH至3.5~4.5,在调pH过程中,溶液逐渐变澄清,再加入1 mg的NHS,室温下搅拌30 min后4℃搅拌至反应完全,用10 mM PBS缓冲液透析。

[0011] 进一步地,所述步骤(3)的过程如下:

① 避光条件下,将20.3 μ L CdSe/ZnS QDs用10 mM、pH = 7.4硼酸缓冲液稀释至1 μ M,室温搅拌下,取步骤(2)中17 μ L THC包被抗原滴加到CdSe/ZnS QDs溶液中混合均匀;

② 搅拌10 min后,搅拌下,将13 μ L、10 mg/mL EDC溶液滴加到步骤①溶液中反应20 min;

③ 搅拌下,再向反应液中滴加15 μ L、10 mg/mL NHS溶液室温下搅拌反应4~5 h;

④ 反应结束后将CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原用PBS缓冲液透析24 h除去过量的CdSe/ZnS QDs;

⑤ 透析后,用超滤浓缩管以12000 rpm将溶液浓缩至原体积的十分之一,终产物复溶于PBS缓冲液中,取出后12000 rpm离心3 min除团聚,CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原保存于4℃黑暗条件下备用。

[0012] 进一步地,所述CdSe/ZnS QDs量子点浓度为8 μ M;步骤②中EDC溶液和步骤③中

NHS溶液的溶剂均为10 mM、pH = 7.4硼酸盐缓冲溶液。

[0013] 上述制备方法制得的量子点标记的THC包被抗原。

[0014] 上述量子点标记的THC包被抗原在检测食品中(如火锅汤料)大麻含量的应用。

[0015] 所述检测为荧光免疫吸附分析方法,检测时,以所述CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原为荧光探针,CdSe/ZnS QDs标记的THC包被抗原与被分析物THC直接竞争具有特异性免疫反应的THC抗体。

[0016] 硼酸盐缓冲溶液(10 mM, pH = 7.4)的配制过程如下:取45 mL硼酸溶液(0.2 mol/L)与5 mL的硼酸盐溶液(0.05 mol/L)混合为0.2 M的硼酸盐缓冲液,将其稀释20倍即为10 mM的硼酸盐溶液,室温保存;5×PBS溶液(0.05 mol/L, pH = 7.4)4℃保存,使用前稀释至1×PBS。

[0017] 一种检测食品中大麻含量的方法,包括如下步骤:

(1)先用10 mM PBS缓冲液清洗透明96孔酶标板每个孔,取THC抗体溶液加入96孔聚苯乙烯酶标板别哭和用于检测待测样品的实验孔中,使每孔含1 μ g THC抗体,37℃下孵育2~4h,再加入质量分数为4%的酪蛋白溶液封闭抗原上非特异性位点,37℃下孵育2~4h,然后用PBST溶液洗涤每孔以除去过量试剂;

(2)然后将已知浓度的THC样品按照设定的梯度加入比色孔中,再加入权利要求1制得的量子点标记的THC包被抗原作为示踪剂,得到比色样品;

(3)将待测样品加入步骤(1)的96孔板实验孔中,再加入权利要求1制得的量子点标记的THC包被抗原作为示踪剂;最后用PBS溶液定容,37℃下孵育2~4h,洗涤后通过目测荧光强度并和比色孔中的荧光强度比较从而确定待测样品中大麻的浓度。

[0018] 进一步地,THC样品梯度浓度依次为:2×10³ μ g/mL、1×10³ μ g/mL、0.5×10³ μ g/mL、0.1×10³ μ g/mL、0.1×10² μ g/mL、1 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.1×10⁻² μ g/mL、0.1×10⁻³ μ g/mL分别依次标记为1~9号,不含THC成分的空白对照为0号孔。

[0019] 将量子点标记的THC荧光免疫吸附分析方法检测THC时的检出限为1 ng/mL。

[0020] 包被抗原放置30天后测定荧光强度。新鲜制备的量子点标记的THC包被抗原与放置一个月后量子点标记的THC包被抗原同时对THC标准溶液检测,荧光信号强度几乎无明显差异,结果表明,放置一个月后溶液荧光强度及特异性几乎没有显著差异,对THC的检测方法无影响,此方法制备的荧光标记包被抗原稳定性较好。

[0021] 本发明针对THC制备了一种基于96孔板荧光免疫竞争分析,比较荧光强度的快速检测分析方法。通过一系列的实验,得出结论,所建立的96孔板荧光免疫竞争法通过与对照组荧光强度的比较可以有效实现对THC的快速定性检测,检测时间约1 h,并能有效快速筛选添加THC的火锅汤料。该分析方法可在手提式紫外灯下肉眼观察到含待测物样品荧光强度与标准样品比较荧光强度的强弱,该方法适合现场快速筛选非法添加大麻的火锅汤料,可为食品安全现场快速检测提供技术支持。

[0022] 本发明的优点:

(1) 本发明所述方法操作简便、操作步骤简单、节省时间、信号容易收集,用于现场快速筛选的基于96孔板荧光免疫竞争法为替代昂贵耗时费力的仪器方法以及更复杂的免疫测定方法,形式提供了一种简单和低成本的THC检测方法。

[0023] (2) 本发明所述的THC抗体和羧基化水溶性量子点CdSe/ZnS QDs制备方案成熟,

已经商业化,购买方便,制备的荧光标记抗体保存时间长,且每一次检测的用量少,是一种非常经济的检测方法。

[0024] (3) 本发明方法所得荧光标记抗体的灵敏度高,大大降低了THC的最低检测限。

附图说明

[0025] 图1 是卵清蛋白与THC包被抗原的荧光发射光谱图;

图2 为CdSe/ZnS QDs和CdSe/ZnS QDs标记的包被抗原的荧光发射光谱图;

图3 为CdSe/ZnS QDs标记包被抗原与不同浓度的THC溶液荧光光谱;

图4 为CdSe/ZnS QDs标记包被抗原与THC溶液中最大发射波长的荧光强度随THC溶液的变化。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图和实施例对本发明的技术方案做进一步详细说明,但不是对本发明保护范围的限制。

[0027] 实施例1

一种量子点标记的THC包被抗原的制备方法,包括如下步骤:

(1) THC半抗原的制备:

取1 mg THC溶于250 μ L二氯甲烷,充分震荡混合均匀,然后加入138 mg碳酸钾,60℃加热搅拌20 min,再加入19.1 mg丁二酸酐60℃加热搅拌反应4 h,所得琥珀酰THC即为THC半抗原。

[0028] 琥珀酰THC的分离提纯:将反应体系全部转移至离心管内加入DCM离心取上层清液,为尽可能减少损失,转移时可用DCM重复2~3次清洗反应体系并离心,再次利用薄层色谱法将琥珀酰THC与其他反应物质分离;

利用薄层色谱法分离THC与琥珀酰THC所用展开剂为二氯甲烷与石油醚按体积1:1混合;利用薄层色谱法将琥珀酰THC与其他反应物质分离展开剂为二氯甲烷与石油醚按体积2:1混合。

[0029] (2) THC包被抗原的制备;利用琥珀酰化THC与卵清蛋白(OVA)为载体蛋白采用EDC/NHS偶联成包被抗原载体蛋白偶联物;

在步骤(1)中取提纯干燥好的琥珀酰THC1.3 mg,溶于0.2 mL的蒸馏水,加1.7 mg EDC·HCl,记A溶液;称取1.2 mg OVA,溶于0.3 mL的蒸馏水,用0.1 mol/L的HCl调pH至4.0,记为B溶液。将两溶液混合后,用0.1 mol/L的HCl调pH至4.0左右,在调pH过程中,溶液逐渐变澄清,加入1 mg的NHS,室温下磁力搅拌30 min后4℃磁力搅拌过夜。用1×PBS (10 mM PBS缓冲液)透析三天除去未反应的小分子THC半抗原,每24 h更换一次透析液(10 mM PBS缓冲液);即得琥珀酰THC-OVA溶液,该溶液即是THC包被抗原。用超滤浓缩管(10000 D MWCO)5000 r/min离心浓缩由500 μ L浓缩至125 μ L,得到THC包被抗原4℃下避光储存待用。

[0030] THC包被抗原的表征:将步骤(2)中反应体系完全取出定容至500 μ L用荧光分光度计在230 nm的激发波长、240 nm/min的扫描速度下测定荧光强度,相同测定条件下与等浓度等体积的纯OVA溶液荧光强度作对比;如图1所示:图1中所用纯OVA溶液与琥珀酰THC-OVA溶液浓度均为2.4 mg/mL,500 μ L。与纯OVA溶液最大发射波长328 nm相比制备的琥珀酰

THC-OVA在最大发射峰处有明显蓝移,这种蓝移是由于琥珀酰THC与OVA成功偶联引起的。

[0031] (3) CdSe/ZnS量子点标记的THC包被抗原(简称THC-OVA-QDs)的制备:羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs通过EDC/NHS在硼酸盐缓冲液(pH = 7.4, 10 mM)中与步骤(2)制备的THC包被抗原偶联形成示踪剂,具体制备过程如下:

① 避光条件下,将20.3 μ L CdSe/ZnS QDs用硼酸缓冲液将(10 mM, pH = 7.4)稀释至1 μ M于圆底烧瓶,室温搅拌下,取步骤(2)中17 μ L THC包被抗原滴加到CdSe/ZnS QDs溶液中混合均匀(搅拌速度不宜过快,800~1000 r/min,以不产生气泡为准);

② 搅拌10 min后,调低搅拌速度500~700 r/min,13 μ L的EDC溶液(浓度为10 mg/mL,以10 mM, pH = 7.4硼酸盐缓冲为溶剂)滴加到溶液中反应20 min;

③ 在磁力搅拌下,滴加15 μ L NHS溶液(浓度为10 mg/mL,以10 mM, pH = 7.4硼酸盐缓冲为溶剂)室温下搅拌4~5 h;

④ 反应结束后将CdSe/ZnS QDs标记的THC-OVA用1×PBS缓冲液透析24 h除去过量的CdSe/ZnS QDs;

⑤ 透析后,用超滤浓缩管以12000 rpm将溶液浓缩至原体积的十分之一,用1×PBS离心洗涤3 min。洗涤后的产物复溶于1×PBS缓冲液中,12000 rpm离心3 min除团聚。CdSe/ZnS QDs标记包被抗原保存于4℃黑暗条件下备用;

所述量子点是通过武汉珈源量子点技术开发有限公司购买的浓度为8.0 μ M的量子点溶液,共200 μ L;硼酸盐缓冲溶液(10 mM, pH = 7.4):取45 mL硼酸溶液(0.2 mol/L)与5 mL的硼酸盐溶液(0.05 mol/L)混合为0.2 M的硼酸盐缓冲液,将其稀释20倍即为10 mM的硼酸盐溶液,室温保存;5×PBS溶液(0.05 mol/L, pH = 7.4)4℃保存,使用前稀释至1×PBS。

[0032] CdSe/ZnS QDs标记包被抗原的表征:将CdSe/ZnS QDs标记抗体的激发波长固定在365 nm,扫描其溶液以确定最大发射波长在520 nm,如图2所示;由图2可知,与CdSe/ZnS QDs最大发射波长520 nm相比制备的荧光标记包被THC抗原在最大发射峰处有明显红移,这种红移可能是由量子尺寸效应引起的:量子点的表面与抗体偶联修饰,可降低非辐射跃迁的概率。偶联后,量子点偶极作用增强及斯托克位移到增大。与量子点的发射峰相比,所制备荧光标记抗体的最大半峰宽没有明显的变化。也可得出结论,制备过程没有引起量子点的聚集、分散和不规则分布。

[0033] 所述羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs:EDC:NHS的最佳比值根据Sheng-Mei Wu等研究选取不同的物质的量之比的羧基化水溶性CdSe/ZnS QDs:EDC:NHS (1:2000:8000, 1:4000:8000, 1:6000:8000, 1:8000:8000, 1:4000:4000, 1:4000:6000和1:4000:10000),在其他相同偶联条件下,将CdSe/ZnS QDs与包被抗原偶联,用多功能酶标仪测定不同比例偶联物荧光强度,观察荧光稳定性,采用FLISA检测不同浓度的THC,确定EDC/NHS最佳比例,当QDs:EDC:NHS的物质的量的比例为1:2000:8000时,偶联物相对荧光强度最大,QDs:EDC:NHS的物质的量的比例为1:4000:8000时比1:2000:8000时偶联物更稳定,采用FLISA检测THC更稳定,灵敏度较高。因此,选取1:4000:8000的偶联物用于实验。将荧光标记抗体放置30天后测定荧光强度。新鲜制备的荧光标记抗原与放置一个月后荧光标记抗原同时对THC标准溶液检测,荧光信号强度几乎无明显差异,结果表明,放置一个月后溶液荧光强度及特异性几乎没有显著差异,对THC的检测方法无影响,此方法制备的荧光标记包被抗原稳定性较好。

[0034] 步骤(4): 荧光免疫吸附测定法(FLISA)定性定量检测THC以及确定最低检测限;

先用10 mM PBS缓冲液清洗透明96孔酶标板每个孔, 取10 μ L/孔, 0.1 μ g/ μ L的THC抗体溶液加入96孔聚苯乙烯酶标板A1~A10孔, 37℃下孵育2 h, THC抗体吸附在聚苯乙烯表面, 除去抗体溶液, 固定在96孔板上, 此后在A1~A8加入质量分数为4%的酪蛋白溶液30 μ L/孔, 37℃下孵育3h; 然后用PBST (10 mM PBS pH = 7.4+0.05% Tween20) 洗涤每孔3次, 以除去过量试剂; 然后将已知浓度的THC样品 (2×10^3 μ g/ml) 倍数稀释为: 2×10^3 μ g/mL、 1×10^3 μ g/mL、 0.5×10^3 μ g/mL、 0.1×10^3 μ g/mL、 0.1×10^2 μ g/mL、 1 μ g/mL、 0.1 μ g/mL、 0.1×10^{-2} μ g/mL、 0.1×10^{-3} μ g/mL, 0 μ g/mL(不加THC样品), 之后每孔内加入30 μ L步骤(3)制得的THC-OVA-QDs作为示踪剂; 最后用1×PBS溶液每孔定容至100 μ L, 37℃下孵育2 h, 在相应的洗涤步骤后得到比色样品, 检测时, 通过比较用于检测待测样品的实验孔内的荧光强度信号并测定每孔内的荧光强度, 待测物中THC含量越高, 与荧光标记包被抗原竞争越激烈, 通过与抗体结合吸附在96孔板上荧光标记包被抗原越少, 所测得荧光信号越弱, 达到检测THC的目的, 利用THC-OVA-QDs标记THC抗体作为荧光探针结合免疫分析建立一种新型快速的荧光免疫分析方法;

所述的THC抗体(Tetrahydrocannabinol Monoclonal Antibody)溶液通过美国CalBioreagents供应商购买得到, 浓度为4.9 mg/mL (Lot:MA1166, Catalog:M469), 在加入抗体溶液前用PBS清洗96孔板2~3次, THC-OVA-QDs为步骤(3)所制备, 其浓度为9.6 mg/mL; 一系列不同浓度的THC样品(如1000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001, μ g/mL)分别加入A1~A7孔, A8孔内不加THC样品作为空白对照组; 待反应结束相应的洗涤步骤后首先在365 nm紫外分析仪下观察各个孔内的荧光强度, 通过目测判断各孔内荧光信号的强弱, 荧光标记的包被原结合抗体的荧光强度与样品中的待测物浓度呈负相关。

[0035] 在用荧光分光度计测定各个孔内的荧光信号, 建立标准曲线;

在进一步的试验中重复步骤(4)操作, 测定相对标准偏差为6.85%, 改变待测样品的浓度梯度, 确定最低检测限, 建立更准确的标准曲线。如图3所示; 图中从下至上待测样品浓度梯度(c)分别为0.01、0.1、1、10、100, μ g/ml; 所得标准曲线方程为 $y = 1280 - 40.2x$, 如图4; 待测样品中THC含量越高, 与抗体竞争结合越多, 荧光标记抗原与吸附在96孔板上的抗体结合抗原越少, 所测得荧光信号越强, 达到检测THC的目的, 利用量子点标记THC抗原作为荧光探针结合免疫分析建立一种新型快速的荧光免疫分析方法。

[0036] 步骤(5): 实际样品中的检测;

透明96孔酶标板将A行1~10孔按照步骤(4)THC样品浓度依次为: 2×10^3 μ g/mL、 1×10^3 μ g/mL、 0.5×10^3 μ g/mL、 0.1×10^3 μ g/mL、 0.1×10^2 μ g/mL、 1 μ g/mL、 0.1 μ g/mL、 0.1×10^{-2} μ g/mL、 0.1×10^{-3} μ g/mL, 制备比色样品依次标记为1~9号, 0 μ g/mL(不加THC样品)标记为0号;

取100g火锅底料, 加水定容至1L, 加热煮沸后, 冷却至室温, 取0.5 mL示踪剂与0.5 mL火锅汤料待测液相混合, 在96孔板实验孔内滴加100~200 μ L的混合液, 37℃下静置2h, 洗涤后通过目测荧光强度并和比色孔中的荧光强度比较从而确定待测样品中大麻的浓度。

[0037] 所述预处理的96孔板处理方法为将10 μ L PBS稀释的THC抗体, 使每孔区域内包含1 μ g THC抗体, 注意避免液体试剂横向扩散。37℃温育2h, 用质量分数为4%酪蛋白溶液封闭抗原上非特异性位点, 37℃温育2~4h, 用PBST洗涤三遍, 37℃干燥, 4℃干燥保存;

所述定量测定分析将50 μ L检测液(步骤(3)中的CdSe/ZnS QDs标记包被抗原溶液)分

别与50 μL 火锅汤料样品混合加入上述预处理好的96孔板的每个反应孔中, 2 h后用PBST洗涤, 于黑暗中在紫外光下观察。对96孔板上THC包被抗原在与游离THC进行竞争性测定, 对于每个反应区域, CdSe/ZnS QDs标记THC包被抗原与抗体和游离THC的结合率相同, 游离THC和CdSe/ZnS QDs标记包被抗原偶联物竞争结合96孔板上的THC抗体的特异性位点, 从而达到荧光标记抗体对THC的检测, PBST彻底洗涤未结合的游离THC和CdSe/ZnS QDs标记包被抗原偶联物, 通过视觉判断, 荧光标记的包被抗原结合的THC抗体的荧光强度与样品中的待测物浓度呈负相关。于黑暗中在紫外光下观察反应区域的荧光强度变化, 与对照组反应孔相比, 反应区域的荧光强度随着THC浓度的减小而相继增加, 测定THC的目视检测限为1 ng/mL , 为确定96孔板荧光免疫吸附测定THC的目视最低检测限, 在THC浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1 ng/mL 区域上显示的荧光强度, 与对照点区域(不含THC)相比, 反应区域的荧光强度随着THC浓度的增加而连续降低。在THC浓度为1 ng/mL 和10 ng/mL 之间的荧光强度有明显差异, 而反应发生在对照区域和THC浓度为0.1 ng/mL 与1 ng/mL 区域的荧光强度差异较小, 较难区分。因此, 确定96孔板荧光免疫竞争测定THC的最低检测水平为1 ng/mL 。

[0038] 实施例2

(1) 示踪剂的制备:

检测液的制备与实施例1中步骤(3)中制备CdSe/ZnS QDs标记包被抗原示踪剂溶液相同;

(2) 标准溶液的制备:

标准溶液的制备即实施例1步骤(4)中所用过的96孔板回收将各孔内添加THC浓度作相应标记, 将THC浓度为 $2 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.5 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$ 分别依次标记为1~9号, 不含THC成分的空白对照为0号孔, 4°C干燥避光条件下固定保存, 待用;

(3) 比色法检测:

用上述96孔板荧光免疫竞争吸附法定性定量测定火锅汤料中的大麻成分包括以下步骤:

① 将预处理过的96孔板平放, 待测样品火锅汤料按照实施例1的比例加水定容煮沸, 冷却至室温, 取0.5 mL 检测液与0.5 mL 火锅汤料待测液相混合, 在96孔板一个孔内滴加100~200 μL 的混合液, 37°C下静置0.5 h,

② 用PBST洗涤后在手提式紫外灯下肉眼观察, 待测样品荧光强度在96孔板中5号和6号荧光强度之间, 即THC浓度范围应该在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。

[0039] ③ 用日立F-2600荧光仪激发波长230 nm, 测得THC的标准品荧光强度, 线性拟合得到图4的线性方程。在同样条件下测得待测样品的荧光强度, 带入线性方程后计算得到火锅汤料中的THC的浓度为5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0040] 为进一步验证检测的真实性, 将待测样品根据国标THC气质连用分析的方法, 采用GC-MS进行分析, 测得火锅汤料中THC含量为5.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与本发明所测得结果一致。

[0041] 应用检测2

本实施例所应用到相关的检测液、示踪剂、标准溶液均与应用检测1中相同, 不同点在于火锅汤料的品牌、口味以及煮沸的时间和温度; 所检测结果均匀GC-MS检测结果一致。

[0042] 以上所述,仅是本发明的较佳实施示例而已,并非对本发明作任何形式上的限制。任何熟悉本领域的技术人员,在不脱离本发明技术方案范围情况下,都可利用上述揭示的方法和技术内容对本发明技术方案做出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施示例。因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施示例所做的任何简单修改、等同变化及修饰,均仍属于本发明技术方案保护的范围内。

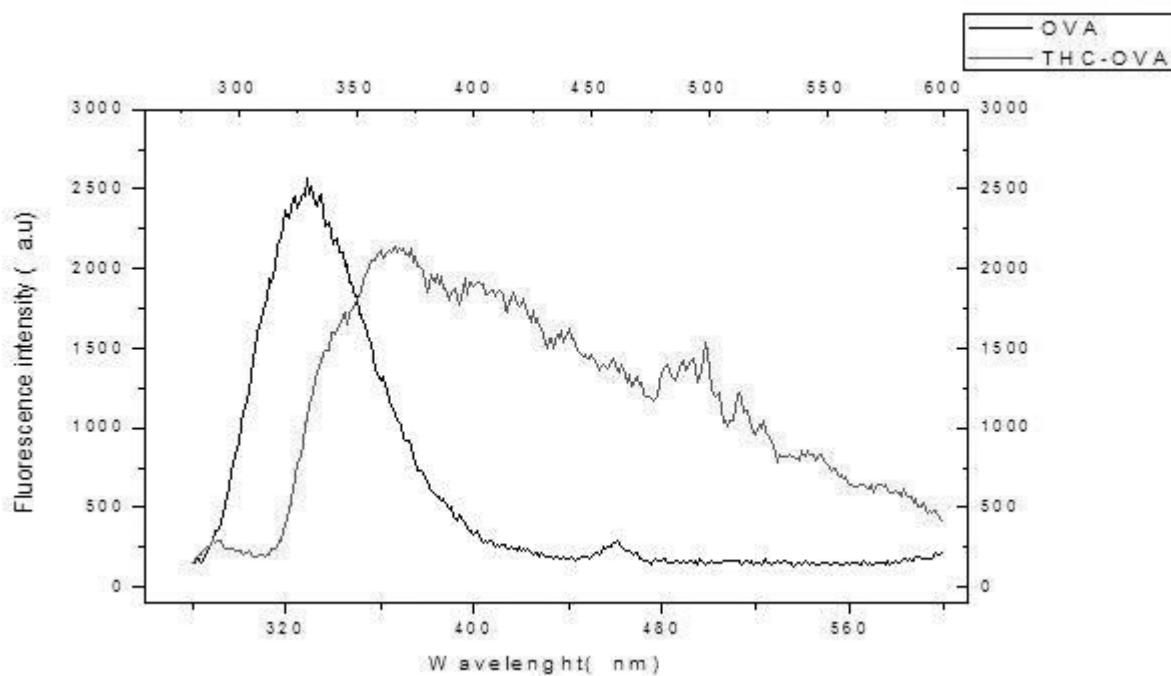


图1

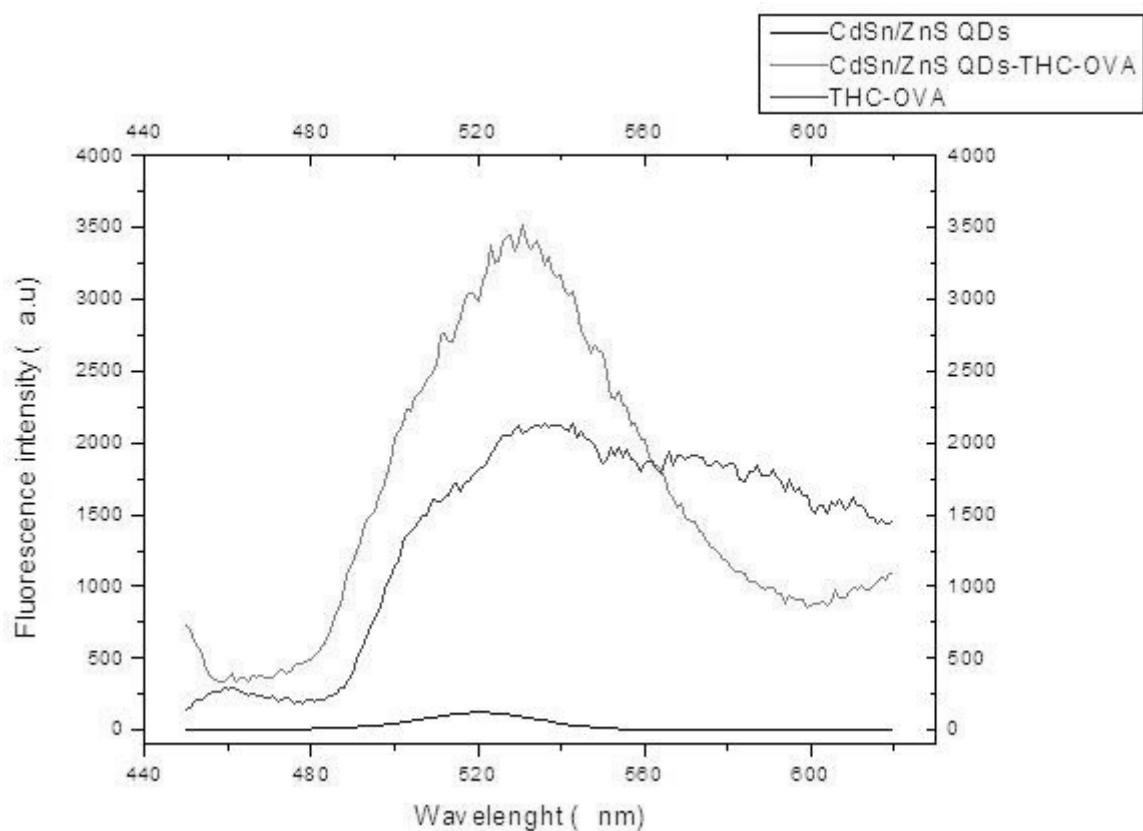


图2

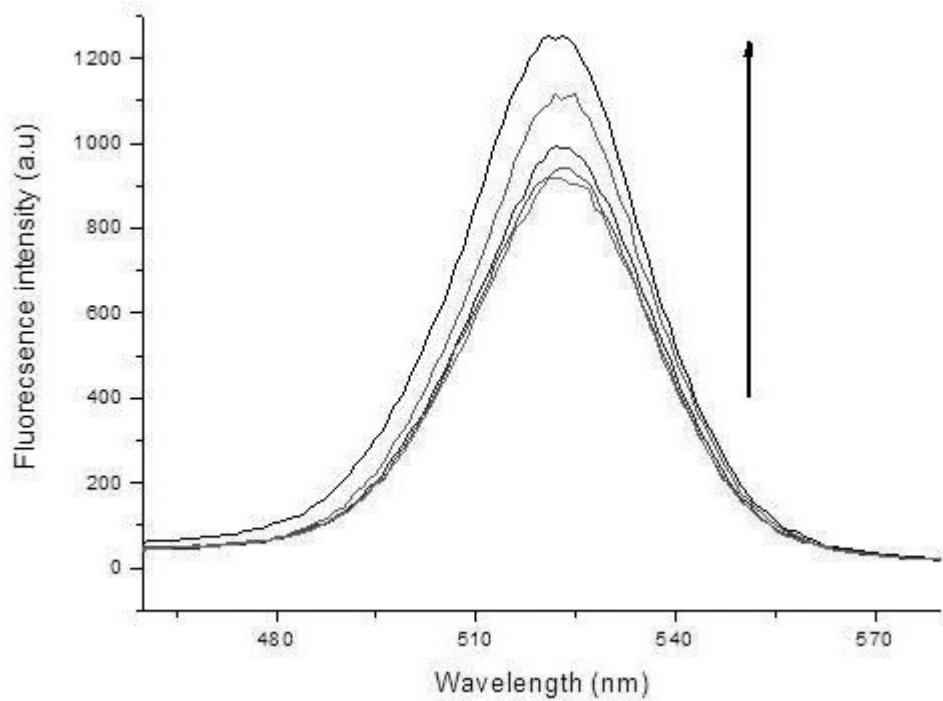


图3

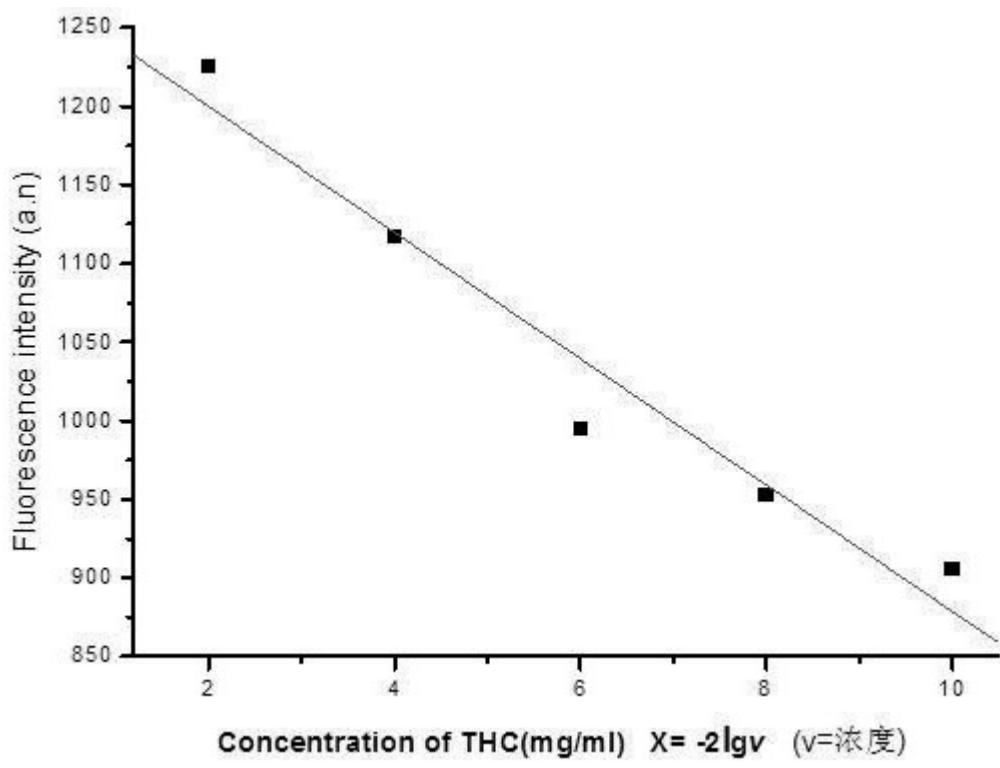


图4

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种量子点标记的THC包被抗原、其制备方法及利用其检测食品中大麻含量的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN109884021A | 公开(公告)日 | 2019-06-14 |
| 申请号 | CN201910250689.6 | 申请日 | 2019-03-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 铁道警察学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 铁道警察学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 铁道警察学院 | | |
| [标]发明人 | 崔胜峰 梁帅 陈周 | | |
| 发明人 | 崔胜峰 万敬伟 梁帅 陈周 | | |
| IPC分类号 | G01N21/64 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/544 | | |
| 代理人(译) | 张丽 | | |
| 外部链接 | Espacenet Sipo | | |

摘要(译)

一种量子点标记的THC包被抗原、其制备方法及利用其检测食品中大麻含量的方法，属于食品安全检测技术领域，所述制备过程包括如下步骤：(1)THC半抗原的制备：称取丁二酸酐与THC，在碳酸钾的催化作用下，55~65°C加热搅拌反应至反应完全，薄层色谱分离，所得琥珀酰THC即为THC半抗原；(2)THC包被抗原的制备：以EDC和NHS为催化剂，将THC半抗原和卵清蛋白进行反应得到THC包被抗原；(3)量子点标记的THC包被抗原的制备：将CdSe/ZnS QDs溶解于硼酸缓冲液中，在EDC和NHS作用下，将THC包被抗原滴加至CdSe/ZnS QDs的硼酸缓冲液中，反应结束后，用PBS缓冲液透析，即得。

