



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105699650 B

(45)授权公告日 2018.09.07

(21)申请号 201610086751.9
 (22)申请日 2016.02.16
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105699650 A
 (43)申请公布日 2016.06.22
 (73)专利权人 中国农业科学院农业质量标准与
 检测技术研究所
 地址 100080 北京市海淀区中关村南大街
 12号
 (72)发明人 金茂俊 王静 杜鹏飞 金芬
 邵华 余永新 郑鹭飞 王珊珊
 (74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
 事务所(普通合伙) 11371
 代理人 栾波
 (51)Int.Cl.
 G01N 33/577(2006.01)
 G01N 33/532(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 1445548 A,2003.10.01,
 CN 101290316 A,2008.10.22,
 CN 101001960 A,2007.07.18,
 CN 101198707 A,2008.06.11,

WO 03031591 A2,2003.04.17,
 KR 20100128890 A,2010.12.08,
 杨光昕.基于免疫PCR生物条形码技术检测
 多氯联苯的研究.《中国博士学位论文全文数据
 库 工程科技I辑》.2016,(第1期),
 Jwa-Min Nam, et al..Nanoparticle-
 Based Bio-Bar Codes for the
 ultrasensitive Detection of Proteins..
 《Science》.2003,第301卷(第5641期),
 张立营.蓝舌病病毒生物条形码及荧光定量
 型生物条形码检测体系的建立与评价.《中国博
 士学位论文全文数据库》.2008,(第12期),E059-
 46.
 Yong Tang, et al..An immunoassay
 based on bio-barcode method for
 quantitative detection of semicarbazide..
 《Eur Food Res Technol》.2011,第232卷(第6
 期),第963-969页.
 Yong Tang, et al..A sensitive
 immunosorbent bio-barcode assay combining
 PCR with icELISA for detection of
 gonyautoxin 2/3..《Analytica Chimica
 Acta》.2009,第657卷(第2期),第210-214页.

审查员 张绚

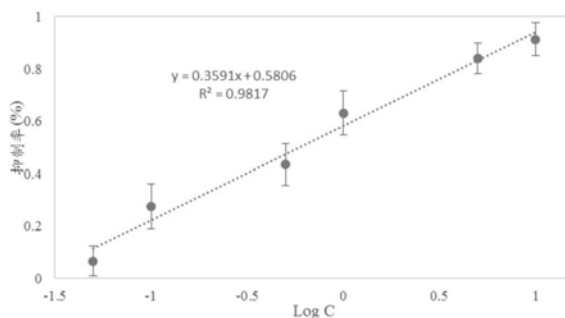
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及食品安全检测免疫分析技术领域,具体而言,涉及一种克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒,所述试剂盒包括盒体,所述盒体内包含有:克百威标准品、克百威磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、克百威双标胶体金纳米探针、DNA生物芯片、银染试剂。本申请提供的试剂盒可以简便、快速、灵敏、特异、稳定地检测待测样品中的克百威含量,实验重现性好,便于操作和生产。



CN 105699650 B

1. 一种克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括盒体,所述盒体内包含有:

克百威标准品、克百威磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、克百威双标胶体金纳米探针、DNA生物芯片、银染试剂;

所述单标胶体金纳米探针由单链DNA1包被胶体金颗粒得到;所述胶体金颗粒的粒径为13~15nm;

所述克百威双标胶体金纳米探针由抗克百威抗体和双链DNA包被胶体金颗粒得到;所述抗克百威抗体为单克隆抗体;所述克百威双标胶体金纳米探针具体由以下方法制备得到:

1)、取胶体金溶液调pH至8.8~9.2后向其中加入抗克百威抗体,搅拌混合,静置25~35min;然后加入硫醇修饰的单链DNA链,8~12℃静置36~44h;再调整pH至7.3~7.5,在120~180min内分2~4次等量加入NaCl至浓度0.08~0.12mol/L,每次间隔40~60min,8000~11000r/min离心8~12min,弃上清,得到含寡核苷酸的胶体金;

2)、用牛血清白蛋白浓度为0.8~1.2%的磷酸盐缓冲液重悬所述含寡核苷酸的胶体金,孵育1~3h;再加入与所述硫醇修饰的单链DNA链互补的生物条形码DNA链,室温杂交3~5h,8000~11000r/min离心,弃上清,得到所述克百威双标胶体金纳米探针;

所述DNA生物芯片由单链DNA2点制得到;

所述双链DNA由硫醇修饰的单链DNA和条形码单链DNA互补配对而成;所述单链DNA1和单链DNA2与所述条形码单链DNA存在互补配对关系,且配对区域不重叠;

所述克百威磁性纳米探针由磁性纳米粒子和克百威完全抗原偶联而成;所述克百威完全抗原由克百威和载体蛋白偶联而成;所述载体蛋白为鸡卵白蛋白;所述磁性纳米粒子的粒径为18~22nm。

2. 权利要求1所述的克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒在克百威定性定量分析中的应用。

3. 权利要求1所述的克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒测定克百威的方法,其特征在于,包括:

a)、将克百威标准品、提取与净化后的待测样品分别与等体积的克百威双标胶体金探针和克百威磁性纳米探针混合孵育;

b)、洗涤孵育产物并去杂化得到与各标准品与待测样品对应的生物条形码;

c)、将所述生物条形码与DNA生物芯片杂交,并加入单标纳米金探针放大信号;杂交反应结束后加入银染试剂并用芯片扫描测定仪测定各孔灰度值;

d)、以克百威标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算各样品中的克百威浓度。

克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测免疫分析技术领域,具体而言,涉及一种克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 克百威为不可逆胆碱酯酶抑制剂,对人、畜禽、鱼、鸟等毒性极高,一般加工成颗粒剂或种衣剂进行土壤或种子处理。药剂在土壤中残效期长,植物能通过根、茎、叶或种子吸收传导,在叶缘积累较多,误食染药植物可能引起中毒。土壤中的克百威还可能通过径流和渗透污染地面和地下水源。因此,建立高效快速的克百威检测技术,对于环境和农副产品中克百威残留的监测及克百威中毒的准确快速诊断和有效治疗,保障人类健康具有重要意义。

[0003] 免疫分析方法的作用和地位目前已得到国内外学者的广泛认可,免疫分析方法的研究也是检测方法研究最热门的领域之一。在免疫分析方法领域中,我国在酶联免疫分析方法方面开展了较为深入的研究,包括半抗原合成、抗体制备、标记物偶联、反应体系中各种理化性质对免疫分析方法的影响及半抗原结构与其所制备得到抗体之间的构效关系等方面。近年来,我国学者在荧光免疫分析、化学发光免疫分析、生物传感器和生物条形码免疫分析方法方面也开展了较多的研究工作。

[0004] 基于磁性纳米粒子的生物条形码免疫分析方法,利用生物条形码信号放大作用及磁性纳米粒子的分离富集作用,其最低检出限相对于ELISA方法提高了几个数量级,致使其从诞生以来,便获得了科学界的高度关注。生物条形码指的是可结合在纳米粒子上的大量相同序列的DNA片段。该方法最早是用于对前列腺特异性抗原(Prostate Specific Antigen,PSA)的检测。该方法主要包括:磁性纳米粒子表面修饰PSA单克隆抗体,胶体金纳米探针表面修饰起信号放大作用的生物条形码和针对PSA的另一种抗体。在PSA存在时,磁性纳米粒子、PSA、胶体金纳米探针通过抗原抗体反应形成“三明治”夹心复合结构。形成的复合物经磁场分离,富集的磁性纳米探针通过高温低盐法变性,释放生物条形码,通过检测解离下来的生物条形码含量便可以间接得到PSA的含量。

[0005] 生物条形码分析方法近十年来在痕量蛋白质和核酸检测方法得到了快速的发展,通过与免疫反应相结合建立的生物条形码免疫分析方法,将免疫分析方法的检测限提高到了一个新的高度。然而该方法建立至今,只能通过构建“三明治”结构模式实现对蛋白质等大分子物质的检测。由于克百威为小分子化合物,只有一个抗原结合位点,因此目前生物条形码免疫分析方法采用的“三明治”结构模式基本不能适用于克百威的检测。

[0006] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒,使用该试剂盒可以特异地定量检测水中或食品中克百威含量。该试剂盒通过竞争反应体系进行检测,

克服了目前生物条形码免疫分析方法采用的“三明治”结构模式基本不能适用于克百威的检测的缺陷。

[0008] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0009] 一种克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒,所述试剂盒包括盒体,所述盒体内包含有:

[0010] 克百威标准品、克百威磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、克百威双标胶体金纳米探针、DNA生物芯片、银染试剂。

[0011] 克百威(Carbofuran)分子式:C₁₂H₁₅N₃O₃;CAS号:1563-66-2。

[0012] 本发明通过改变生物条形码免疫分析方法的现有反应模式,建立基于小分子竞争反应模式的生物条形码免疫分析方法。通过将克百威与载体蛋白的偶联物包被于磁性纳米粒子表面制备克百威磁性纳米探针,并于胶体金纳米探针表面结合农药抗体和起信号放大作用的生物条形码用以制备克百威双标胶体金纳米探针,利用磁性纳米粒子表面的包被抗原与农药分子竞争结合胶体金纳米探针表面的抗体建立竞争型免疫化学反应体系。利用磁分离系统分离免疫结合的抗原抗体复合物,采用热变性技术促使胶体金纳米探针释放生物条形码,并利用DNA芯片探针和单标胶体金纳米探针杂交结合生物条形码,进而利用金标银染法测定生物条形码含量,实现对克百威农药的定量检测。

[0013] 该试剂盒的使用效果具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点。并且,根据本发明的检测系统为开放式操作,简便快速,特别适合广大的质检机构推广使用,为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

[0014] 优选的,所述克百威磁性纳米探针由磁性纳米粒子和克百威完全抗原偶联而成;所述克百威完全抗原由克百威和载体蛋白偶联而成。

[0015] 进一步优选的,所述载体蛋白为鸡卵白蛋白;所述磁性纳米粒子的粒径为18~22nm。

[0016] 鸡卵白蛋白(Ovalbumin,OVA)也称鸡卵清白蛋白,由386个氨基酸组成,分子量约43Kd。OVA作为惰性蛋白,它能维持胶体金的胶体稳定,起着有分散胶体金颗粒的骨架作用。

[0017] 惰性蛋白也可选用酪蛋白(Casein)或牛血清白蛋白(BSA)等。

[0018] 磁性纳米粒子的粒径对克百威完全抗原的偶联数量有着很大的影响,从而影响着最终反应的灵敏度。

[0019] 优选的,如上所述的试剂盒:

[0020] 所述单标胶体金纳米探针由单链DNA1包被胶体金颗粒得到;

[0021] 所述克百威双标胶体金纳米探针由抗克百威抗体和双链DNA包被胶体金颗粒得到;

[0022] 所述DNA生物芯片由单链DNA2点制得到;

[0023] 所述双链DNA由硫醇修饰的单链DNA和条形码单链DNA互补配对而成;所述单链DNA1和单链DNA2与所述条形码单链DNA存在互补配对关系,且配对区域不重叠。

[0024] DNA生物芯片上点制的DNA2为捕获DNA,能与条形码DNA互补配对并将其捕获在芯片上;单标胶体金纳米探针上的DNA1的作用在于进一步放大条形码DNA信号。

[0025] 双标胶体金纳米探针是双链DNA包被胶体金颗粒和抗被检物的抗被检物抗体,双链DNA中的1条和胶体金颗粒通过Au--S键相连,另1条DNA链是用来指示被检物的条形码

DNA。每一个胶体金颗粒上标记有很多条的条形码DNA,因而起到方法信号的作用,灵敏度较高。

[0026] 在实际操作中,条形码DNA的选择为现有技术,只要特异性和灵敏度够好即可。

[0027] 优选的,所述胶体金颗粒的粒径为13~15nm。

[0028] 本申请的技术要点是通过形成克百威磁性纳米探针-克百威双标胶体金纳米探针的结合,与克百威-克百威双标胶体金纳米探针的结合进行竞争,并且前者的结合应该可以均一的分离。灵敏度提高的关键在于被检物的有效回收和作为每个被检物识别结合位点对应的条形码DNA链的有效释放。条形码DNA的量对应被检物的量(克百威磁性纳米探针对被检克百威的竞争性结合的抑制率),因此可以通过定量条形码DNA间接定量痕量的被检物。克百威磁性纳米探针-克百威双标胶体金纳米探针的结合实质是磁性纳米探针中的克百威完全抗原与双标胶体金纳米探针中的抗克百威抗体的结合,而二者的结合强度与抗体/抗原的量密切相关,抗体/抗原的量则与胶体金颗粒/磁性纳米粒子的粒径密切相关。

[0029] 优选的,如上所述的试剂盒,所述克百威双标胶体金纳米探针具体由以下方法制备得到:

[0030] 1)、取胶体金溶液调pH至8.8~9.2后向其中加入抗克百威抗体,搅拌混合,静置25~35min;然后加入硫醇修饰的单链DNA链,8~12℃静置36~44h;再调整pH至7.3~7.5,加入NaCl至浓度0.08~0.12mol/L,8000~11000r/min离心8~12min,弃上清,得到含寡核苷酸的胶体金;

[0031] 2)、用牛血清白蛋白浓度为0.8~1.2%的磷酸盐缓冲液重悬所述含寡核苷酸的胶体金,孵育1~3h;再加入与所述硫醇修饰的单链DNA链互补的生物条形码DNA链,室温杂交3~5h,8000~11000r/min离心,弃上清,得到所述克百威双标胶体金纳米探针。

[0032] 进一步优选的,在加入NaCl至既定浓度时,在120~180min内分2~4次等量加入,每次间隔40~60min。

[0033] 加入NaCl的过程即DNA的老化过程。纳米金和DNA都带负电,所以会相互排斥,加入NaCl可以屏蔽掉纳米金表面的一些电荷,减少纳米粒子间的排斥。但过高浓度的NaCl会导致盐离子强度过大,易引起DNA团聚,所以将其逐步加入,防止瞬间离子强度的过大。

[0034] 优选的,如上所述的试剂盒,所述抗克百威抗体为单克隆抗体。

[0035] 单克隆抗体由于可以通过细胞株进行生产,各批次之间性质稳定,且特异性强,因而更适合试剂盒产品。

[0036] 如上所述的克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒在克百威定性定量分析中的应用。

[0037] 如上所述的克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒测定克百威的方法,包括:

[0038] a)、将克百威标准品、提取与净化后的待测样品分别与等体积的克百威双标胶体金探针和克百威磁性纳米探针混合孵育;

[0039] b)、洗涤孵育产物并去杂化得到与各标准品与待测样品对应的生物条形码;

[0040] c)、将所述生物条形码与DNA生物芯片杂交,并加入单标纳米金探针放大信号;杂交反应结束后加入银染试剂并用芯片扫描测定仪测定各孔灰度值;

[0041] d)、以克百威标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算各样品中的克百威浓度。

[0042] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0043] (1) 本发明可以特异地定量检测克百威含量。具有简便、快速、灵敏、特异、稳定等优点。并且,根据本发明的检测系统为开放式操作,简便快速,特别适合广大的质检机构推广使用,为食品安全检测提供一种非常有价值的检测手段。

[0044] (2) 根据本发明的试剂盒,磁性纳米探针中的克百威半抗原与检测样品中的克百威竞争克百威双标胶体金探针上的克百威单抗形成直接竞争体系,因此本法采用的竞争反应体系,即确保检测的灵敏度,也可有效保证检测结果的良好重现性。另外,这种模式还便于操作和生产。

[0045] (3) 本发明的试剂盒使用的是银染方法,通过检测生物芯片上的灰度值,灵敏度大大提高,可为蔬菜水果中克百威的检测提供更为灵敏、快速、可靠的依据。

附图说明

[0046] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0047] 图1为杂交反应结束后DNA生物芯片的扫描图;

[0048] 图2为实施例2中以克百威标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立的标准曲线。

具体实施方式

[0049] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0050] 实施例1

[0051] 克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒的制备方法

[0052] s11、单标胶体金探针的制备

[0053] 1)、金纳米颗粒合成方法

[0054] 向硅化好的烧杯中分别加入98mL去离子水,再分别加入2mL50mM氯金酸原液,使氯金酸的浓度为1mM,在磁力搅拌器上1000rpm/min搅拌、250℃加热,液体沸腾后继续煮沸2min;吸取10mL 38.8mM柠檬酸三钠,迅速一次性加入烧杯中,保持搅拌速度和加热温度不变,继续煮沸6min,可发现溶液颜色由无色逐渐变成紫色,再变成酒红色,根据加入柠檬酸三钠还原剂量的不同最终变成不同的颜色,待液体冷却后用去离子水补回原体积,于4℃密闭保存,合成的金纳米颗粒的粒径控制在13~15nm。

[0055] 2)、取巯基化DNA1溶液,加入100mmol/L的三(2-羧乙基)膦溶液(TCEP),在室温下摇床上放置2小时。还原剂TCEP与DNA1之间的比例接近200:1,高比例的差距加快反应速度,提高还原效果。室温下,新合成的纳米金球在6000rcf转速下20离心分钟,将纳米金球取出溶于超纯水。取一定体积的纳米金球10000rcf离心20分钟,去掉上清液,加入0.5×Tris-硼酸(TBE)缓冲溶液,然后加入所取的巯基化DNA的量,加入氯化钠溶液至氯化钠浓度为50mmol/L,常温下,反应24小时。逐渐添加氯化钠至浓度为500mmol/L(分3次加入,每次隔1

个小时加入一次), 常温下静置8小时。10000rcf离心20分钟, 除去上清液, 溶于超纯水, 重复3次, 得到巯基化DNA1修饰的纳米金球GNP溶液。

[0056] S12、克百威双标胶体金探针的制备

[0057] 取一定体积胶体金溶液, 用0.1mol/L K₂CO₃调节至pH=9.0; 静置15min, 加入一定量的克百威单克隆抗体, 在搅拌下将胶体金和抗体混合, 静置30min。然后加入硫醇修饰的DNA链, 10℃静置40h, 再以磷酸缓冲液(PBS)调整至pH=7.4, 提高NaCl浓度, NaCl分3次加入, 每隔1个小时加入一次, 至终浓度0.1mol/L, 10000r/min离心10min, 即得到含寡核苷酸的胶体金。用1mL PBS重悬含寡核苷酸的胶体金, 静置10~15分钟, 然后再加入5%牛血清白蛋白(BSA), 使BSA终浓度为1%, 封闭1h。再加入与硫醇修饰的所述单链DNA链互补的生物条形码DNA链, 室温杂交4h, 10000r/min离心得到克百威双标胶体金纳米探针。

[0058] S13、克百威磁性纳米探针的制备

[0059] 1)、鸡卵白蛋白(OVA)标记克百威半抗原的制备

[0060] 辣根过氧化物酶标记克百威半抗原的制备, 具体方法如下:

[0061] 取半抗原0.25mmol, 溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 搅拌下加入60μl正三丁胺和30μl氯甲酸乙酯, 室温搅拌反应1h。取反应液300μl缓慢滴加到6mL溶有120mg OVA的碳酸盐缓冲液(CBS, 0.01mol/L)中, 室温搅拌反应2h后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析3次, 然后用0.01mol/L的PBS透析3d, 每天换透析液3~4次。取出分装保存于-20℃的冰箱中。

[0062] 2)、磁性纳米粒子合成方法

[0063] 磁性微球的形成过程: 取8.1g FeCl₃·6H₂O和3.3g FeCl₂·4H₂O加入150mL去离子水, 配成溶液, 然后移入三口烧瓶中。在N₂保护环境下与剧烈搅拌状态下向Fe²⁺和Fe³⁺的混合溶液中18mL质量分数为25%的浓氨水, 溶液中开始生成棕褐色的Fe₃O₄粒子, 调节溶液的pH值在9~11之间, 此刻反应温度为70℃, 在反应的过程中要保证一定的搅拌速度, 反应的离子方程式为:

[0064]
$$\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- = \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$$

[0065] Fe₃O₄/油酸的合成: 在剧烈搅拌状态下将5.0g油酸(C₁₈H₃₄O₂)加入Fe₃O₄的液体中, 然后在N₂保护环境下, 温度为70℃水浴中反应一个小时, 使油酸均匀的包覆在粒子表面。反应结束后, 得到黑色溶胶状物质, 利用外加磁场将所得的沉淀从反应体系中分离出来, 用乙醇洗涤3次除去多余的油酸, 再用去离子水洗涤至pH=7, 此时得到油酸均匀包覆的Fe₃O₄粒子。

[0066] 单层羧基功能化的Fe₃O₄粒子合成: 采用高锰酸钾氧化油酸法合成壬二酸(HOOC(CH₂)₇COOH)形成羧基化磁性纳米粒子。加入160mL浓度为10mg/mL的KMnO₄溶液在剧烈搅拌状态, 温度为50℃条件下反应8h, 反应结束后利用外加磁场将所得沉淀从反应介质中分离出来, 并先后用去离子水洗涤3次, 所得产物在40℃下真空干燥, 将干燥后的粒子溶于水溶液便得到稳定的羧基化磁性纳米粒子。磁性纳米粒子的粒径控制在18~22nm。

[0067] 3)、磁性微球和OVA-半抗原的连接

[0068] a)、微球的活化。用pH=6.0, 15mmol/L的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液(MES)作为活化缓冲溶液, 取1mL磁珠于2.0mL离心管中, 加入活化缓冲溶液后, 将上清液吸掉; 再用活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍, 再分别加入碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺, 在漩涡振荡器上混合均匀, 室温活化30min。

[0069] b)、微球与OVA-半抗原偶联。用pH=7.4,0.01mol/L的磷酸盐吐温(PBST,1% Tween-20)溶液作偶联缓冲液,用活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍,再用偶联缓冲液洗涤磁珠2遍;然后用偶联缓冲液重悬磁珠,再加入OVA-半抗原,使得磁珠表面活化的羧基与OVA的氨基于37℃下反应1h,将OVA-半抗原偶联于磁珠表面,得到免疫磁珠。

[0070] c)、封闭。用偶联缓冲液洗涤偶联后磁珠2遍,加入含有2%BSA的偶联缓冲液封闭磁珠60min。最终得到免疫磁性探针。

[0071] S14、克百威标准品的制备

[0072] 用克百威纯品配制,浓度分别为0ng/mL、0.05ng/mL、0.01ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL,共7瓶;

[0073] 所述克百威纯品纯度不低于90%。

[0074] S15、反应体系工作浓度选定

[0075] 经优化选定磁性纳米探针稀释倍数为100倍,胶体金纳米探针稀释倍数为10倍。

[0076] S16、DNA芯片制备

[0077] 根据条形码探针序列设计可与其部分互补结合的捕捉探针DNA2;将氨基化修饰的捕捉探针通过芯片点样仪点到表面醛基化的在玻片上,点直径100 μ m,点间距500 μ m,点样量为0.7nL,DNA2探针浓度为75 μ mol/L,37℃固定。未结合的探针以去离子水冲洗,浸泡于巯基琥珀酸溶液中30min以钝化其余结合位点,以去离子水多次冲洗后,4℃备用。

[0078] S17、半成品及成品组成

[0079] 上述步骤所得部分分装即为半成品,抽出三份经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装为克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒,组装成试剂盒后还需抽检合格后才能出厂。

[0080] 综上,在本发明的研究过程中,本发明的发明人首先对所用的原材料进行了筛选试验和质量鉴定,包括抗体和克百威半抗原的活性,胶体金颗粒的粒径,磁性纳米颗粒的粒径和磁性等。然后通过对试剂盒的反应模式、反应时间、偶联效率、DNA生物芯片点样大小、银染时间,等一系列的条件进行了优化,建立了高灵敏度及良好重现性的克百威生物条形码免疫分析测定方法。

[0081] 实施例2

[0082] 本发明的试剂盒使用方法

[0083] 以上实施案例1制备的克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒的具体操作如下:

[0084] S21、自4℃冰箱中取出试剂盒,室温平衡10分钟;

[0085] S22、样品提取与净化

[0086] 称取10.0g(精确至0.01g)样品;加入10mL乙腈,高速匀浆0.5min,加入4.0g无水MgSO₄和1.0g NaCl后高速涡旋1min,在4℃以10000r/min高速离心5min。准确移取2mL乙腈提取液于10mL塑料离心管中,加入50mg N-丙基乙二胺(PSA)和50mg C18固相分散萃取净化剂,高速涡旋0.5min后,在4℃以10000r/min高速离心5min。取1mL上清液,在30℃下氮吹至干,残渣用1mL含10%甲醇的PBS缓冲液溶解。

[0087] S23、反应孔中加入20 μ L克百威双标胶体金探针,然后反应孔中分别加各浓度克百威标准品(0ng/mL、0.05ng/mL、0.01ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL)和经前处理后得到的样品各20 μ L,设一个重复,然后每孔加入克百威磁性纳米探针20 μ L,用微量振荡器

充分振荡混匀,然后置于温度为37℃,相对湿度为70%的恒温恒湿培养箱中温育1h;

[0088] S24、用PBST液洗涤三次,去杂化得到生物条形码;

[0089] S25、芯片杂交

[0090] 4μL生物条形码DNA与15μL杂交液混匀,均匀滴于芯片上,48℃杂交1h,0.2×SSC洗液清洗芯片1min,晾干待用。将4μL单标纳米金探针溶液与15μL杂交液(含有0.1%的十二烷基硫酸钠的0.01M PBS缓冲液)混匀,室温封闭30min。将封闭后的单标纳米金溶液均匀滴于晾干芯片的点阵区,48℃杂交1h。0.2×SSC洗液,清洗芯片1min,晾干。每点阵均匀加入新制银染液20μL(避光操作),室温反应10min后置于去离子水以终止反应,镜下观察。

[0091] S26、用芯片扫描测定仪测定各孔灰度值;

[0092] S27、以克百威标准品的浓度为横坐标,各浓度所对应的灰度抑制率为纵坐标,建立标准曲线,并根据标准曲线计算各样品中的克百威浓度;标准曲线图见图2。

[0093] 实验例1

[0094] 本发明试剂盒的方法学检定结果

[0095] 按照本领域中常见的检定规程对实施案例1中制备的试剂盒进行鉴定,结果见表1。

[0096] 表1本发明试剂盒的方法学检定结果

检验项目	检验标准	检验结果
准确性	平均回收率在70~110%	94.3%
特异性	与其类似物的交叉反应率 ≤0.1%	≤0.1%
精密性 C.V. (%)	≤20% (n=10)	11.7%
最低检测限	≤0.50ng/mL	0.55ng/mL
稳定性	各试剂组分置37℃至少6天	符合以上指标

[0098] 以上结果表明“克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒”的准确性、特异性、精密性、灵敏度和稳定性是完全符合条件的。

[0099] 实验例2

[0100] 克百威添加回收率试验

[0101] 为了检验克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒的实际应用性能,将克百威标准溶液加入到自来水中来模拟被克百威污染的水样,通过标准添加回收实验来测定自来水中克百威的浓度,添加浓度为1ng/mL、5ng/mL和10ng/mL的克百威,检测结果见表2。

[0102] 表2样品中克百威的添加回收率

	水样	添加量 (ng/mL)	回收率 均值±相对标准偏差(%)	GC-MS
[0103]	1	1	67.5±7.88	93.4±1.72
	2	5	99.5±7.68	94.3±1.55
	3	10	107.3±8.45	95.2±2.33

[0104] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明,然而应意识到,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此,这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。

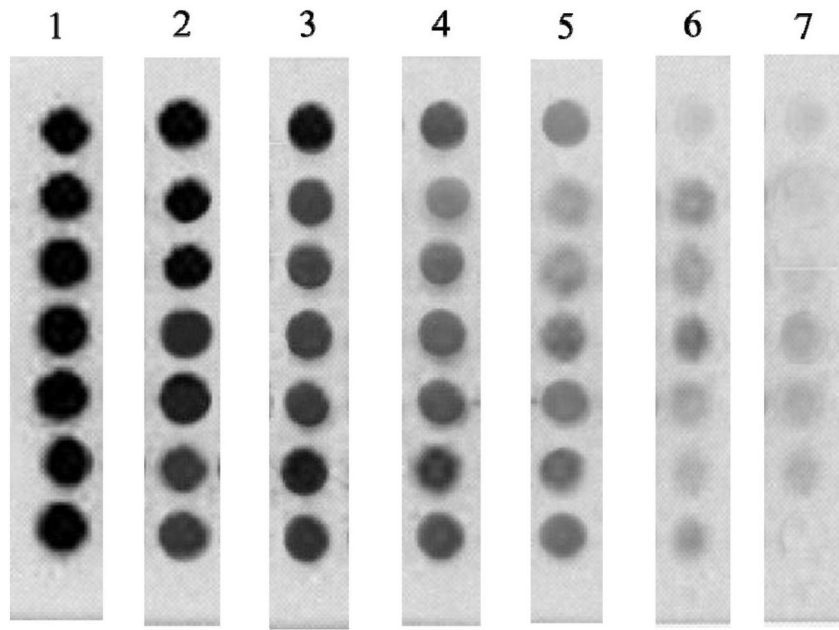


图1

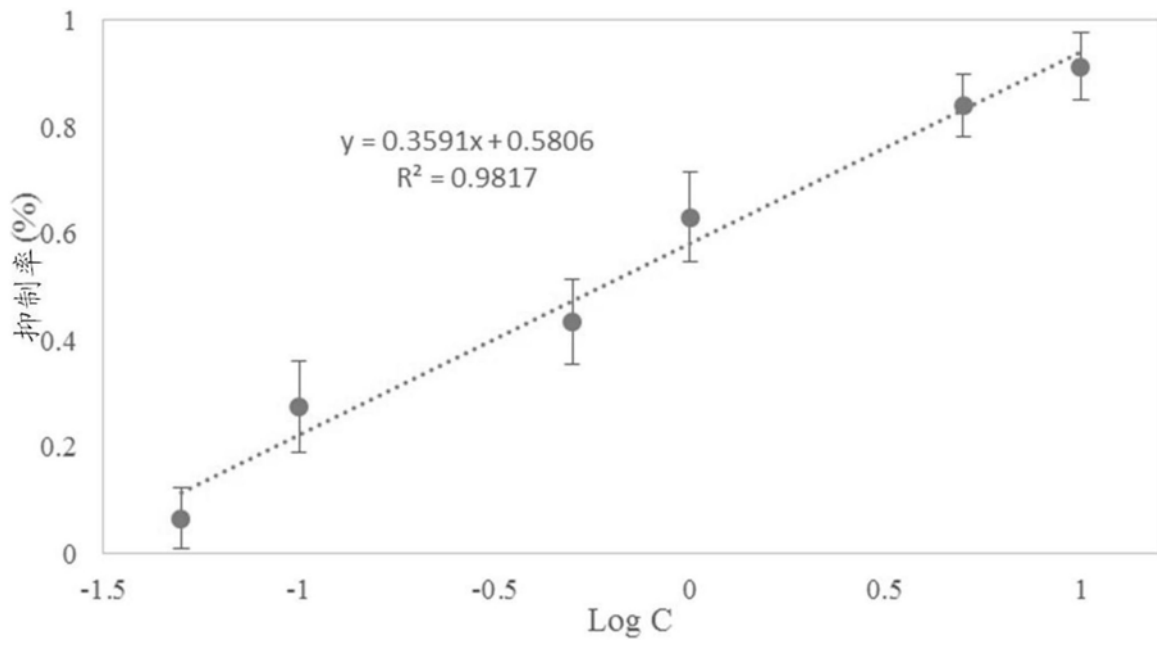


图2

专利名称(译)	克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105699650B	公开(公告)日	2018-09-07
申请号	CN201610086751.9	申请日	2016-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	金茂俊 王静 杜鹏飞 金芬 邵华 余永新 郑鹭飞 王珊珊		
发明人	金茂俊 王静 杜鹏飞 金芬 邵华 余永新 郑鹭飞 王珊珊		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/577		
代理人(译)	栾波		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN105699650A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及食品安全检测免疫分析技术领域，具体而言，涉及一种克百威生物条形码免疫分析测定试剂盒，所述试剂盒包括盒体，所述盒体内包含有：克百威标准品、克百威磁性纳米探针、单标胶体金纳米探针、克百威双标胶体金纳米探针、DNA生物芯片、银染试剂。本申请提供的试剂盒可以简便、快速、灵敏、特异、稳定地检测待测样品中的克百威含量，实验重现性好，便于操作和生产。

